



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0052706
(43) 공개일자 2017년05월12일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0735 (2010.01) C07K 14/475 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/074 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 5/0606 (2013.01)
C07K 14/475 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7012167(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2009년06월30일
심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2016-7022553
원출원일자(국제) 2009년06월30일
심사청구일자 2016년09월09일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년05월02일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2009/049183</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/002846
국제공개일자 2010년01월07일</p> <p>(30) 우선권주장
61/076,908 2008년06월30일 미국(US)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
얀센 바이오테크 인코포레이티드
미국 펜실베이니아주 19044 호삼 릿지뷰 드라이브 800/850</p> <p>(72) 발명자
류 지아지안
미국 뉴저지 08558 스킨맨 그랜드뷰 로드 199 제이앤드제이 컨슈머 컴패니즈
데이비스 자넷
미국 뉴저지 08558 스킨맨 그랜드뷰 로드 199 제이앤드제이 컨슈머 컴패니즈
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인한성</p> |
|--|--|

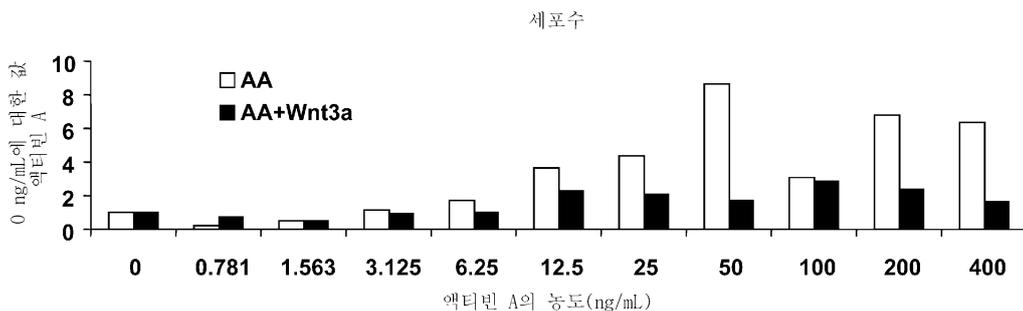
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 만능 줄기 세포의 분화

(57) 요약

본 발명은 만능 줄기 세포를 분화시키는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키도록 하는 충분한 양의 GDF-8을 포함하는 배지 내에서 만능 줄기 세포를 배양하는 것을 포함하는, 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 5/00 (2013.01)
C12N 5/0018 (2013.01)
C12N 5/0696 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/076,900 2008년06월30일 미국(US)
61/076,915 2008년06월30일 미국(US)

(72) 발명자

파멘티 크리스틴

미국 캘리포니아 92121-1126 샌디에고 메리필드 로
우 3210 센토코 알앤드디

본넷 파스칼 지슬랭 앙드레

벨기에 베-2340 비어세 투른호우트세베크 30 안센
파마슈티카 엔브이

명세서

청구범위

청구항 1

액티빈 A가 결핍되고, GDF-8 및 14-메틸-3,5,7,14,18,24,28-헵타아자테트라사이클로[20.3.1.1~2,6~.1~8,12~]옥타코사-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-노나엔-17-온이 보충된 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하는 것을 포함하는, 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 세포로 분화시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 만능 줄기 세포가 인간 만능 줄기 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 인간 만능 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 배지가 EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D 및 무스치몰로 추가로 보충된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 배지가 무혈청 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 배지가 FGF로 추가로 보충된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 배지가 약 5 ng/ml 내지 약 500 ng/ml의 GDF-8을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 세포를 약 1일 내지 약 3일 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 배지가 EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, VEGF, 무스치몰, PD98059, LY294002, U0124, U0126, 및 나트륨 부티레이트로 구성된 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, EGF가 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, FGF4가 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C 및 PDGF-D 중 하나 이상이 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, VEGF가 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 무스치몰이 약 1 μM 내지 약 200 μM의 농도로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, PD98059가 약 0.1 μM 내지 약 10 μM의 농도로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제9항에 있어서, LY294002가 약 0.25 μM 내지 약 25 μM의 농도로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제9항에 있어서, U0124 및 U0126 중 하나 이상이 약 0.1 μM 내지 약 10 μM의 농도로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제9항에 있어서, 나트륨 부티레이트가 약 0.05 μM 내지 약 5 μM의 농도로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 배지가 Wnt3a를 결핍하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 2008년 6월 30일에 출원된 출원 일련 번호 제 61/076,900 호, 2008년 6월 30일에 출원된 출원 일련 번호 제 61/076,908 호, 및 2008년 6월 30일에 출원된 출원 일련 번호 제 61/076,915 호를 우선권으로 주장한다.

[0002] 본 발명은 만능 줄기 세포를 분화시키는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기에 충분한 양의 GDF-8을 포함하는 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하는 것을 포함하는, 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 제 1형 당뇨병 및 이식가능한 랑게르한스섬의 부족에 대한 세포 대체 치료법의 발전으로, 생착(engraftment)에 적합한 인슐린 생산 세포, 또는 β 세포의 공급원을 개발하는 데 관심이 집중되어 왔다. 한 가지 접근법은 예를 들어, 배아 줄기 세포와 같은 만능성 줄기 세포로부터 기능성 β 세포를 생성하는 것이다.

[0004] 척추동물 배아 발생에서, 만능성 세포는 낭배형성 (gastrulation)으로 알려진 과정에서 삼배엽층 (three germ layers) (외배엽, 중배엽, 및 내배엽)을 포함하는 세포군을 생성한다. 예를 들어, 갑상선, 흉선, 췌장, 소화관, 및 간과 같은 조직은 중간 단계를 통해 내배엽으로부터 발생할 것이다. 이 과정에서 중간 단계는 완성 내배엽의 형성이다. 완성 내배엽 세포는 예를 들어, HNF-3베타, GATA4, MIXL1, CXCR4 및 SOX17과 같은 많은 마커를 발현한다.

[0005] 췌장의 형성은 완성 내배엽의 췌장 내배엽으로의 분화로부터 생긴다. 췌장 내배엽의 세포는 췌장-십이지장 호메오박스(homeobox) 유전자, Pdx1을 발현한다. Pdx1의 부재 하에서는, 췌장은 복측 원기(ventral bud) 및 배측 원기(dorsal bud)의 형성 이상으로는 발달하지 못한다. 따라서, Pdx1 발현이 췌장 기관형성에서 중요한 단계를 특징짓는다. 성숙한 췌장은 다른 세포형 중에서도 외분비 조직 및 내분비 조직을 포함한다. 외분비 및 내분비 조직은 췌장 내배엽의 분화로부터 생긴다.

[0006] 췌도 세포의 특징을 지닌 세포가 마우스의 배아 세포로부터 유도된 것으로 보고되었다. 예를 들어, 루멜스키(Lumelsky) 등 (문헌[Science 292:1389, 2001])은 생쥐 배아 줄기 세포가 췌도와 유사한 인슐린-분비 구조로

분화한 것을 보고한다. 소리아(Soria) 등(문헌[Diabetes 49:157, 2000])은 생쥐 배아 줄기 세포로부터 유도된 인슐린-분비 세포가 스트렙토토신-유도 당뇨 생쥐에서 혈당을 정상화시킴을 보고한다.

- [0007] 한 예에서, Hori 등(PNAS 99: 16105, 2002)은 마우스 배아 줄기 세포를 포스포이노시타이드(phosphoinositide) 3-카이네이즈의 억제제(LY294002)로 치료하면, β 세포를 닮은 세포를 생성함을 개시한다.
- [0008] 다른 예에서는, 블리츠크(Blyszczuk) 등 (문헌[PNAS 100:998, 2003])은 Pax4를 구성적으로 발현하는 생쥐 배아 줄기 세포로부터 인슐린-생산 세포를 생성하는 것을 보고한다.
- [0009] Micallef 등은 레틴산이 Pdx1 양성 췌장 내배엽을 형성하는 배아 줄기 세포의 의무를 조절할 수 있음을 보고한다. 레틴산은 배아에서 낭배형성의 마지막에 해당하는 기간 동안 배아 줄기 세포 분화의 4일째에 배양물에 첨가될 때 Pdx1 발현을 유도하는 데 가장 효과적이다 (문헌[Diabetes 54:301, 2005]).
- [0010] Miyazaki 등은 Pdx1을 과발현하는 마우스 배아 줄기 세포주를 보고한다. 그들의 결과는 외인성 Pdx1 발현이 생성된 분화된 세포에서 인슐린, 소마토스타틴, 글루코키나아제, 뉴로제닌3, P48, Pax6, 및 HNF6 유전자의 발현을 명확히 향상시켰음을 보여준다 (문헌[Diabetes 53: 1030, 2004]).
- [0011] Skoudy 등은 액티빈 A(많은 TGF- β 슈퍼패밀리)가 마우스 배아 줄기 세포에서 외분비계 췌장 유전자(p48 및 아밀레이즈) 및 내분비계 유전자(Pdx1, 인슐린, 및 글루카곤)의 발현을 상향조절함을 보고한다.
- [0012] 최대 효과는 1 nM 액티빈 A를 사용할 때 관찰되었다. 그들은 또한 인슐린 및 Pdx1 mRNA의 발현 수준이 레틴산에 의해 영향을 받지 않지만, 3 nM FGF7 처리가 Pdx1의 전사체의 수준을 증가시킴을 관찰하였다 (문헌[Biochem. J. 379: 749, 2004]).
- [0013] Shiraki 등은 배아 줄기 세포의 Pdx1 양성 세포로의 분화를 특이적으로 향상시키는 성장 인자들의 효과를 연구하였다. 그들은 TGF β 2가 높은 비율의 Pdx1 양성 세포를 재생적으로 제공함을 관찰하였다(Genes Cells. 2005 June; 10(6): 503-16).
- [0014] Gordon 등은 Wnt 신호전달의 억제제와 함께 액티빈의 존재 하에 그리고 혈청의 부재 하에 마우스 배아 줄기 세포로부터 브라키어리 [양성]/ HNF-3베타 [양성] 내배엽 세포의 유도를 나타내었다(US 2006/0003446A 1).
- [0015] Gordon 등. (PNAS, Vol 103, 페이지 16806, 2006)은: "Wnt 및 TGF-베타/ 노달/ 액티빈 신호전달은 전방부 원시 스트리크의 발생에 필요하였다"라고 언급한다.
- [0016] 그러나, 배아 줄기 세포 발생의 마우스 모델은 예를 들어, 인간과 같은 고등 포유류에서의 발생 프로그램을 정확하게 모방하지 않을 수 있다.
- [0017] Thomson 등은 인간 배반포로부터 배아 줄기 세포를 단리하였다(Science 282:114, 1998). 동시에, Gearhart와 동료들은 태아 생식선 조직으로부터 인간 배아 배(인간 배아 생식, hEG) 세포주를 유도하였다 (문헌[Shamblott *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998]). 백혈병 억제 인자(LIF)와 함께 배양함으로써 간단하게 분화를 방지할 수 있는 마우스 배아 줄기 세포와는 달리, 인간 배아 줄기 세포는 매우 특별한 조건 하에서 유지되어야 한다 (미국 특허 제6,200,806호; 국제특허 공개 WO 99/20741호; 국제특허 공개 WO 01/51616호).
- [0018] D'Amour 등은 고농도의 액티빈 및 낮은 혈청의 존재 하에 인간 배아 줄기 세포-유도 완성 내배엽의 풍부한 배양물의 생성을 기술한다(D'Amour K A *et al.* 2005). 마우스의 신장 피막하에 이들 세포를 이식하면 일부 내배엽 기관의 특징을 가진 보다 성숙한 세포로의 분화가 야기되었다. 인간 배아 줄기 세포-유래 완성 내배엽 세포는 FGF-10의 첨가 후에 Pdx1 양성 세포로 추가로 분화될 수 있다 (미국 특허 출원 공개 제2005/0266554A1호).
- [0019] D'Amour 등(Nature Biotechnology--24, 1392-1401 (2006))은: "우리는 인간 배아 줄기(hES) 세포를 췌장 호르몬 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 췌장 폴리펩티드 및 그렐린을 합성할 수 있는 내분비 세포로 전환시키는 분화 방법을 개발하였다. 이 방법은 완성 내배엽, 창자관 내배엽, 췌장 내배엽 및 내분비 전구체를 닮은 단계를 통해 세포를 내분비 호르몬을 발현하는 세포로 가게 하는 도중에 생체 내에서 췌장 기관형성을 유도한다"로 언급한다.
- [0020] 또다른 예에서, Fisk 등은 인간 배아 줄기 세포로부터 췌장 도세포를 생성하는 시스템을 보고한다 (US2006/0040387A1). 이 경우에, 분화 경로를 세 단계로 나누었다. 인간 배아 줄기 세포를 먼저 n-부티레이트와 액티빈 A의 조합을 이용하여 내배엽으로 분화시켰다. 이어서, EGF 또는 베타셀룰린과 조합된 노긴(Noggin)과 같은 TGF- β 길항제를 이용하여 세포를 배양하여 Pdx1 양성 세포를 생성하였다. 마지막 분화는 니코틴아미드에 의해 유도되었다.

- [0021] 한 예에서, Benvenistry 등은: "우리는 PDX1의 과발현이 췌장 풍부해진 유전자의 발현을 향상시켰고, 인슐린 발현의 유도는 단지 생체 내에서 존재하는 추가의 신호를 필요로 할 수 있는 것으로 결론짓는다"고 언급한다 (Benvenistry *et al*, Stem Cells 2006; 24:1923-1930).
- [0022] 액티빈 A는 세포 증식 및 분화의 조절, 및 신경 생존의 촉진을 포함한 광범위한 생물학적 활성을 나타내는 TGF-베타 패밀리에 속한다. 다음, 액티빈 A의 단리 및 정제는 종종 복잡하고 종종 불완전한 수율을 초래할 수 있다. 예를 들어, Pangas, S.A. 및 Woodruff, T.K는: "인히빈 및 액티빈은 뇌하수체 FSH 분비의 조절을 포함한 다양한 생리학적 역할을 갖는 단백질 호르몬이다. 형질 성장 인자- β 유전자 패밀리의 다른 구성원과 마찬가지로, 이들은 더 큰 전구체 분자로부터 가공되고, 뿐만 아니라 기능성 이량체로 조립된다. 천연 공급원으로부터 인히빈 및 액티빈을 단리하면 단지 제한된 양의 생물학적 단백질 생성을 생성할 수 있을 뿐이다"라고 언급한다 (J. Endocrinol. 172 (2002) 199-210).
- [0023] 또 다른 예에서, Arai, K. Y. 등은: "액티빈은 형질 성장 인자- β 슈퍼패밀리에 속하는 다기능성 성장 인자이다. 천연 공급원으로부터 액티빈을 단리하는 것은 많은 단계를 필요로 하고 단지 제한된 양을 생성한다. 재조합 제조가 최근 연구에서 사용되어 왔음에도 불구하고, 재조합 액티빈의 정제는 여전히 여러 단계를 필요로 한다."고 언급한다(Protein Expression and Purification 49 (2006) 78-82).
- [0024] 따라서, 만능 줄기 세포의 분화를 용이하게 하기 위해서는 액티빈 A의 대용물이 여전히 유의하게 필요하다.
- [0025] 요약
- [0026] 한 실시 양태에서, 본 발명은 만능 줄기 세포가 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화되게 하기에 충분한 양의 GDF-8을 포함하는 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하는 것을 포함하는, 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [0027] 한 실시 양태에서, 충분한 양의 GDF-8을 포함하는 배지는 또한 적어도 하나의 다른 화합물을 함유한다. 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 화합물은 아닐린-피리디노트라이아진이다. 대안의 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 화합물은 사이클릭 아닐린-피리디노트라이아진이다.

도면의 간단한 설명

- [0028] <도 1>
- 도 1은 H1 인간 배아 줄기 세포의, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 보여준다. 분화는 IN 세포 분석기 1000(IN Cell Analyzer 1000)(GE 헬스케어(GE Healthcare))을 사용하여 세포수(패널 A) 및 SOX17 강도(패널 B)를 측정함으로써 결정되었다. 인간 배아 줄기 세포는 20ng/mL Wnt3a + 지시된 농도의 액티빈 A를 함유하는 배지(흑색 막대) 또는 Wnt3a는 없으나 지시된 농도의 액티빈 A는 함유된 배지(백색 막대)로 총 4일 동안 처리되었다.
- <도 2>
- 도 2는 인간 배아 줄기 세포주 H1의 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 데 사용되는 액티빈 A 및 GDF8의 용량 반응 관계를 보여준다. 세포는 검정 제 1 일에 20ng/mL Wnt3a와 함께 제시된 농도의 액티빈 A 또는 GDF8로 총 3일 동안 처리되었다. 분화는 GE 헬스케어 IN 세포 분석기 상에서의 고집적 분석 및 형광 항체 프로브를 사용한 SOX17 강도 측정에 의해 결정되었다.
- <도 3>
- 도 3은 실시예 12에 기술된 방법에 따라, 분화 제 1 단계 후의 세포 내 CXCR4의 발현을 보여준다. H1 세포는 제 1 일의 20ng/mL Wnt3a, 또는 모든 3일 동안 2.5 μ M 화합물 34 또는 2.5 μ M 화합물 56과 함께, 총 3일 동안 100ng/mL 액티빈 A 또는 200ng/mL GDF-8로 처리되었다. CXCR4 발현은 형광 항체 프로브 및 유세포분석을 사용하여 측정되어, 제시된 양성 세포의 %를 제공하였다.
- <도 4>
- 도 4는 실시예 12에 기술된 방법에 따라, 완성 내배엽으로의 3일 간의 분화 후의 SOX17 세포의 발현을 보여준다. H1 세포는 제 1 일의 20ng/mL Wnt3a, 또는 모든 3일 동안 2.5 μ M 화합물 34 또는 2.5 μ M 화합물 56과 함께 총 3일 동안 100ng/mL 액티빈 A 또는 200ng/mL GDF-8로 처리되었다. 분화는 GE 헬스케어 IN 세포 분석기 상에서의 고집적 분석 및 형광 항체 프로브를 사용한 SOX17 강도(흑색 막대) 및 결과의 세포수(백색 막

대)의 측정에 의해 결정되었다.

<도 5>

도 5는 실시예 12에 기술된 방법에 따라, 제 3단계의 분화 후 세포 내에서의 PDX1 및 CDX2 단백질의 발현을 보여준다. H1 세포는 제 1 일의 20ng/mL Wnt3a, 또는 모든 3일 동안 2.5 μM 화합물 34 또는 2.5 μM 화합물 56과 함께 총 3일 동안 100ng/mL 액티빈 A 또는 200ng/mL GDF-8로 처리되었고, 그 후 제 2 및 제 3단계의 분화를 통한 후속한 분화가 이어졌다. 형광 항체 프로브 및 고집적 분석을 사용해 분석된 바와 같이, 단백질 발현 및 세포수는 각각의 처리군에 대해 도시된다. 비교를 위해, 값은 액티빈 A/Wnt3a를 사용한 처리에 대해 정규화된다.

<도 6>

도 6은 실시예 12에 기술된 방법에 따라, 제 4단계의 분화 후 세포 내에서의 PDX1 단백질의 발현(백색 막대) 및 세포수(흑색 막대)를 보여준다. H1 세포는 제 1 일의 20ng/mL Wnt3a, 또는 모든 3일 동안 2.5 μM 화합물 34 또는 2.5 μM 화합물 56과 함께 총 3일 동안 100ng/mL 액티빈 A 또는 200ng/mL GDF-8로 처리되었고, 그 후 제 2, 제 3 및 제 4단계의 분화를 통한 후속한 분화가 이어졌다. 형광 항체 프로브 및 고집적 분석을 사용해 측정된 바와 같이, 단백질 발현 및 세포수는 각각의 처리군에 대해 도시된다. 비교를 위해, 값은 액티빈 A/Wnt3a를 사용한 처리에 대해 정규화된다.

<도 7>

도 7은 실시예 12에 기술된 방법에 따라 분화된 세포 내 세포수, 및 인슐린 및 글루카곤의 단백질 발현을 보여준다. H1 세포는 제 1 일의 20ng/mL Wnt3a, 또는 모든 3일 동안 2.5 μM 화합물 34 또는 2.5 μM 화합물 56과 함께 총 3일 동안 100ng/mL 액티빈 A 또는 200ng/mL GDF-8로 처리되었고, 그 후 제 2, 제 3, 제 4, 및 제 5단계의 분화를 통한 후속한 분화가 이어졌다. 형광 항체 프로브 및 고집적 분석을 사용해 분석된 바와 같이, 단백질 발현 및 세포수는 각각의 처리군에 대해 도시된다. 비교를 위해, 값은 액티빈 A/Wnt3a를 사용한 처리에 대해 정규화된다.

<도 8>

도 8은 실시예 13에 기술된 방법에 따라, 완성 내배엽으로의 분화 후, 인간 배아 줄기 세포 내 SOX17 단백질 발현 및 세포수를 보여준다. H1 세포는 제 1 일의 20ng/mL Wnt3a, 또는 검정의 첫 2일 동안 2.5 μM 화합물 34 또는 2.5 μM 화합물 56과 함께 총 4일 동안 100ng/mL 액티빈 A 또는 100ng/mL GDF-성장인자로 처리되었다. 형광 항체 프로브 및 고집적 분석을 사용해 분석된 바와 같이, SOX17 단백질 발현(흑색 막대) 및 세포수(백색 막대)는 각각의 처리군에 대해 도시된다. 비교를 위해, 값은 액티빈 A/Wnt3a를 사용한 처리에 대해 정규화된다. 패널 8a는 임의의 성장 인자의 부재(없음), 또는 액티빈 A/Wnt3a 처리(AA/Wnt3a) 또는 개별 시약만으로 처리된 경우의 일련의 분화 조절 조건을 보여준다. 패널 8b는 GDF-3, 단독 또는 Wnt3a, 화합물 34, 또는 화합물 56과의 다중 병용 시의 분화를 보여준다. 패널 8c는 GDF-5, 단독 또는 Wnt3a, 화합물 34, 또는 화합물 56과의 다중 병용 시의 분화를 보여준다. 패널 8d는 GDF-8, 단독 또는 Wnt3a, 화합물 34, 또는 화합물 56과의 다중 병용 시의 분화를 보여준다. 패널 8e는 GDF-10, 단독 또는 Wnt3a, 화합물 34, 또는 화합물 56과의 다중 병용 시의 분화를 보여준다. 패널 8f는 GDF-11, 단독 또는 Wnt3a, 화합물 34, 또는 화합물 56과의 다중 병용 시의 분화를 보여준다. 패널 8g는 GDF-15, 단독 또는 Wnt3a, 화합물 34, 또는 화합물 56과의 다중 병용 시의 분화를 보여준다.

<도 9>

도 9는 실시예 14에 기술된 방법에 따라, 완성 내배엽으로의 분화 후, 인간 배아 줄기 세포 내 SOX17 단백질 발현을 보여준다. H1 세포는 검정 제 1 일 동안 20ng/mL Wnt3a 또는 2.5 μM 화합물 34와 병용해서, 100ng/mL의 액티빈 A 또는 제시된 농도의 다양한 성장 인자로 총 3일 동안 처리되었다. 형광 항체 프로브 및 고집적 분석을 사용해 분석된 바와 같이, SOX17 단백질 발현(흑색 막대) 및 세포수(백색 막대)는 각각의 처리군에 대해 도시된다. 비교를 위해, 값은 액티빈 A/Wnt3a를 사용한 처리에 대해 정규화된다. 패널 9a는 Wnt3a 단독, 또는 임의의 성장 인자의 부재(없음) 또는 액티빈 A/Wnt3a 처리와 함께(AA/Wnt3a)인 경우의 일련의 분화 조절 조건을 보여준다. 패널 9b는 20ng/mL Wnt3a와 함께, 제시된 농도의 GDF-8(벤더 퍼프로텍(Vendor PeproTech))을 사용한 분화를 보여준다. 패널 9c는 20ng/mL Wnt3a와 함께, 제시된 농도의 GDF-8(벤더 세넨도아(Vendor Shendoah))을 사용한 분화를 보여준다. 패널 9d는 Wnt3a 또는 화합물 34와의 다중 병용과 함께, 제시된 농도의 TGFβ1을 사용한 분화를 보여준다. 패널 9e는 Wnt3a 또는 화합물 34와의 다중 병용과 함께, 제시된 농도의 BMP2를 사용한 분화를 보여준다. 패널 9f는 Wnt3a 또는 화합물 34와의 다중 병용과 함께, 제시된 농도의 BMP3을 사용한 분화를 보여준다. 패널 9g는 Wnt3a 또는 화합물 34와의 다중 병용과 함께, 제시된 농도의 BMP4를 사

용한 분화를 보여준다.

<도 10>

도 10은 실시예 15에 기술된 방법에 따라, 완성 내배엽으로의 분화 후, 인간 배아 줄기 세포에서의 SOX17 단백질 발현을 보여준다. H1 세포는 20ng/mL Wnt3a와 함께 100ng/mL의 액티빈 A 또는 100ng/mL GDF-8을 사용해 다양한 시간대로 노출하면서 총 3일 동안 처리되었다. 형광 항체 프로브 및 고집적 분석으로 측정된 바와 같이, SOX17 단백질 발현은 각각의 처리군에 대한 총 강도값으로 보여지며, 성장 인자 무첨가(무(無)처리), Wnt3a 단독, 액티빈 A 또는 GDF-8 단독, 또는 액티빈 A/Wnt3a 처리 또는 GDF-8/Wnt3a 처리의 분화 조절 조건을 시험하며, 여기서, Wnt3a는 제시된 바와 같이 검정 제 1일 동안만 또는 모든 3일 동안 첨가되었다.

<도 11>

도 11은 실시예 15에 기술된 방법에 따라, 완성 내배엽으로의 분화 후, 인간 배아 줄기 세포에서의 SOX17 단백질 발현을 보여준다. H1 세포를 제시된 농도의 시험 화합물 (화합물 181 (패널 a), 화합물 180 (패널 b), 화합물 19(패널 c), 화합물 202 (패널 d), 화합물 40 (패널 e), 화합물 34 (패널 f), 또는 GSK3 억제제 BIO (패널 g))와 함께 100ng/mL의 액티빈 A로 다양한 시간대로 노출하면서 총 3일 동안 처리하였고, 여기서, 시험 화합물은 검정 제 1 일에만 첨가하였다. 형광 항체 프로브 및 고집적 분석으로 측정된 바와 같이, SOX17에 대한 단백질 발현은 총 강도값에 의해 도시된다.

<도 12>

도 12는 실시예 15에 기술된 방법에 따라, 완성 내배엽으로의 분화 후, 인간 배아 줄기 세포에서의 SOX17 단백질 발현을 보여준다. H1 세포를 제시된 농도의 시험 화합물 (화합물 181 (패널 a), 화합물 180 (패널 b), 화합물 19(패널 c), 화합물 202 (패널 d), 화합물 40 (패널 e), 화합물 34 (패널 f), 또는 GSK3 억제제 BIO (패널 g))와 함께 100ng/mL의 액티빈 A로 다양한 시간대로 노출하면서 총 3일 동안 처리하였고, 여기서, 시험 화합물은 검정 총 3일 동안 첨가하였다. 형광 항체 프로브 및 고집적 분석으로 측정된 바와 같이, SOX17에 대한 단백질 발현은 총 강도값에 의해 도시된다.

<도 13>

도 13은 실시예 15에 기술된 방법에 따라, 완성 내배엽으로의 분화 후, 인간 배아 줄기 세포에서의 SOX17 단백질 발현을 보여준다. H1 세포를 제시된 농도의 시험 화합물 (화합물 181 (패널 a), 화합물 180 (패널 b), 화합물 19(패널 c), 화합물 202 (패널 d), 화합물 40 (패널 e), 화합물 34 (패널 f), 또는 GSK3 억제제 BIO (패널 g))와 함께 100ng/mL의 GDF-8로 다양한 시간대로 노출하면서 총 3일 동안 처리하였고, 여기서, 시험 화합물은 검정 제 1 일에만 첨가하였다. 형광 항체 프로브 및 고집적 분석으로 측정된 바와 같이, SOX17에 대한 단백질 발현은 총 강도값에 의해 도시된다.

<도 14>

도 14는 실시예 15에 기술된 방법에 따라, 완성 내배엽으로의 분화 후, 인간 배아 줄기 세포에서의 SOX17 단백질 발현을 보여준다. H1 세포를 제시된 농도의 시험 화합물 (화합물 181 (패널 a), 화합물 180 (패널 b), 화합물 19(패널 c), 화합물 202 (패널 d), 화합물 40 (패널 e), 화합물 34 (패널 f), 또는 GSK3 억제제 BIO (패널 g))와 함께 100ng/mL의 GDF-8로 다양한 시간대로 노출하면서 총 3일 동안 처리하였고, 여기서, 시험 화합물은 검정 총 3일 동안 첨가하였다. 형광 항체 프로브 및 고집적 분석으로 측정된 바와 같이, SOX17에 대한 단백질 발현은 총 강도값에 의해 도시된다.

<도 15>

도 15는 실시예 15에 기술된 방법에 따라, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽으로 분화시킨 후, 세포수 수율을 보여준다. H1 세포는 20ng/mL Wnt3a와 함께 100ng/mL 액티빈 A 또는 100ng/mL GDF-8로 다양한 시간대로 노출하면서 총 3일 동안 처리하였다. 형광 핵 프로브 및 고집적 분석으로 측정된 바와 같이, 세포수는 각각의 처리군에 대해 보여지고, 성장 인자 무첨가(무처리), Wnt3a 단독, 액티빈 A 또는 GDF-8 단독, 또는 액티빈 A/Wnt3a 처리 또는 GDF-8/Wnt3a 처리가 있는 분화 조절 조건을 시험하며, 여기서, Wnt3a는 보여진 바와 같이 단지 검정 제 1 동안 또는 총 3일 동안 첨가되었다.

<도 16>

도 16은 실시예 15에 기술된 방법에 따라, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽으로 분화시킨 후, 세포수 수율을

보여준다. H1 세포를 제시된 농도의 시험 화합물 (화합물 181 (패널 a), 화합물 180 (패널 b), 화합물 19(패널 c), 화합물 202 (패널 d), 화합물 40 (패널 e), 화합물 34 (패널 f), 또는 GSK3 억제제 BIO (패널 g))와 함께 100ng/mL의 액티빈 A로 다양한 시간대로 노출하면서 총 3일 동안 처리하였고, 여기서, 시험 화합물은 검정 제 1 일에만 첨가하였다. 형광 핵 프로브 및 고집적 분석으로 측정된 바와 같이 세포수 수율을 나타낸다.

<도 17>

도 17은 실시예 15에 기술된 방법에 따라, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽으로 분화시킨 후, 세포수 수율을 보여준다. H1 세포를 제시된 농도의 시험 화합물 (화합물 181 (패널 a), 화합물 180 (패널 b), 화합물 19(패널 c), 화합물 202 (패널 d), 화합물 40 (패널 e), 화합물 34 (패널 f), 또는 GSK3 억제제 BIO (패널 g))와 함께 100ng/mL의 액티빈 A로 다양한 시간대로 노출하면서 총 3일 동안 처리하였고, 여기서, 시험 화합물은 검정 총 3 일 동안 첨가하였다. 형광 핵 프로브 및 고집적 분석으로 측정된 바와 같이 세포수 수율을 나타낸다.

<도 18>

도 18은 실시예 15에 기술된 방법에 따라, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽으로 분화시킨 후, 세포수 수율을 보여준다. H1 세포를 제시된 농도의 시험 화합물 (화합물 181 (패널 a), 화합물 180 (패널 b), 화합물 19(패널 c), 화합물 202 (패널 d), 화합물 40 (패널 e), 화합물 34 (패널 f), 또는 GSK3 억제제 BIO (패널 g))와 함께 100ng/mL의 GDF-8로 다양한 시간대로 노출하면서 총 3일 동안 처리하였고, 여기서, 시험 화합물은 검정 제 1 일에만 첨가하였다. 형광 핵 프로브 및 고집적 분석으로 측정된 바와 같이 세포수 수율을 나타낸다.

<도 19>

도 19는 실시예 15에 기술된 방법에 따라, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽으로 분화시킨 후, 세포수 수율을 보여준다. H1 세포를 제시된 농도의 시험 화합물 (화합물 181 (패널 a), 화합물 180 (패널 b), 화합물 19(패널 c), 화합물 202 (패널 d), 화합물 40 (패널 e), 화합물 34 (패널 f), 또는 GSK3 억제제 BIO (패널 g))와 함께 100ng/mL의 GDF-8로 다양한 시간대로 노출하면서 총 3일 동안 처리하였고, 여기서, 시험 화합물은 검정 총 3일 동안 첨가하였다. 형광 핵 프로브 및 고집적 분석으로 측정된 바와 같이 세포수 수율을 나타낸다.

<도 20>

도 20은 실시예 16에서 기술된 방법에 따라 다중 분화 단계 전체에 걸쳐 세포 내 다양한 단백질 마커의 발현을 보여준다. H1 세포를 제 1 일 동안 20ng/mL Wnt3a 또는 제 1 일에만 첨가된 2.5µM 다양한 화합물(화합물 19, 화합물 202, 화합물 40, 또는 GSK3 억제제 BIO)과 함께 총 3일 동안 100ng/mL 액티빈 A 또는 100ng/mL GDF-8로 처리하였다. 도 20, 패널 a는 분화 제 1 단계 후 세포 내에서 완성 내배엽 마커, CXCR4에 대한 FACS 분석을 보여준다. CXCR4 발현은 형광 항체 프로브 및 유세포분석을 이용해 측정하여, 나타낸 바와 같이 양성 세포의 %를 획득하였다. 도 20, 패널 b는 분화 제 1 단계로 인한 정규화된 SOX17 단백질 발현 (흑색 막대) 및 회수된 세포 수 (백색 막대)에 대한 고집적 이미지 분석을 보여주며, 제시된 상응하는 처리를 시험한다. 도 20, 패널 c는 분화 단계 5를 통해 처리된 배양물로부터 회수된 상대 세포수에 대한 고집적 이미지 분석을 보여준다. 도 20, 패널 d는 분화 단계 5를 통해 처리된 배양물로부터 글루카곤 단백질 발현에 대한 고집적 이미지 분석을 보여준다. 도 20, 패널 e는 분화 단계 5를 통해 처리된 배양물로부터 인슐린 단백질 발현에 대한 고집적 이미지 분석을 보여준다. 도 20, 패널 f는 분화 단계 5를 통해 처리된 배양물로부터 글루카곤 대 인슐린 발현의 비를 보여준다. 비교를 위해, 패널 b, c, d, e, 및 f에서의 발현값은 단계 1 동안에 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 대조군 처리에 대해 정규화된다.

<도 21>

도 21은 실시예 17에서 기술된 방법에 따라 다중 분화 단계 전체를 통해 세포 내에서의 다양한 단백질 및 RT-PCR 마커의 발현을 보여준다. H1 세포는 제 1 일 동안 20ng/mL Wnt3a 또는 제 1 일에만 첨가된 하기 농도의 다양한 화합물(화합물 181, 화합물 180, 화합물 19, 화합물 202, 화합물 40, 화합물 56, 또는 GSK3 억제제 BIO)과 함께, 총 3일 동안 100ng/mL 액티빈 A 또는 100ng/mL GDF-8로 처리하였다. 분화 제 1 단계 후 세포 내에서 완성 내배엽 마커, CXCR4에 대한 FACS 분석을 보여주며, 여기서 처리는 액티빈 A (패널 a) 또는 GDF-8 (패널 b)과 함께 Wnt3a 또는 다양한 화합물을 조합하였다. CXCR4 발현은 형광 항체 프로브 및 유세포분석을 사용하여 측정되어, 제시된 양성 세포의 %를 제공하였다. 도 21의 후속한 패널에서, 다양한 분화 마커에 대한 정규화된 RT-PCR 값은 하기와 같이 분화의 제 1 단계 동안에 액티빈 A 또는 GDF-8을 사용한 각각의 처리와 함께 보여진다: 액티빈 A (패널 c) 또는 GDF-8 (패널 d)을 조합한 처리에 대한 분화의 한 단계의 종료 시의 마커; 액티빈 A (패널 e) 또는 GDF-8 (패널 f)을 조합한 처리에 대한 분화의 3단계의 종료 시의 마커; 액티빈 A (패널

g) 또는 GDF-8 (패널 h)을 조합한 처리에 대한 분화의 4단계의 종료 시의 마커; 액티빈 A (패널 i) 또는 GDF-8 (패널 j)을 조합한 처리에 대한 분화의 5단계의 종료 시의 마커. 5단계의 분화의 종료 시, 고집적 분석을 수행하여, 액티빈 A (패널 k) 또는 GDF-8 (패널 m)을 사용한 분화의 제 1 단계 동안 상응하는 처리에 대한 회수된 세포수를 측정하였다. 고집적 분석을 또한 사용하여, 5단계의 분화의 종료 시에 회수된 세포군 내 글루카곤 및 인슐린 강도를 측정하며, 이는 분화 제 1 단계 동안 액티빈 A (패널 l) 또는 GDF-8 (패널 n)을 사용한 처리에 상응하였다.

<도 22>

도 22는 실시예 18에서 기술된 방법에 따라 처리된 세포 내에서 다양한 단백질 및 RT-PCR 마커의 발현을 보여준다. H1 세포는 제 1 일의 20ng/mL Wnt3a, 또는 제 1 일 동안에만 2.5 μM 화합물 40 또는 2.5 μM 화합물 202와 함께 총 3일 동안 100ng/mL 액티빈 A 또는 100ng/mL GDF-8로 처리하였다. 도 22, 패널 a는 분화 제 1 단계 후 세포 내에서 완성 내배엽 마커, CXCR4에 대한 FACS 분석을 보여준다. CXCR4 발현은 형광 항체 프로브 및 유세포분석을 사용하여 측정되어, 제시된 양성 세포의 %를 제공하였다. 도 22, 패널 b에서, 제 4의 분화 단계 후 회수된 세포 내에서 다양한 분화 마커에 대한 정규화된 RT-PCR 값은 분화 제 1 단계 동안 액티빈 A/Wnt3a 또는 GDF-8/화합물 40 또는 GDF-8/화합물 202를 사용한 각각의 처리에 상응하는 것으로 보여진다.

<도 23>

도 23은 실시예 18에서 기술된 바와 같은 분화 프로토콜의 4단계의 종료 시 세포를 수여받은 스킨드(SCID)-베이지 마우스에서 검출된 C-펩티드의 수준을 보여준다.

<도 24>

도 24 패널 a는 실시예 19에서 기술된 바와 같은 분화 프로토콜의 1단계의 종료 시 FACS에 의해 측정된 바와 같이, CXCR4의 발현을 보여준다. 패널 b는 실시예 19에서 기술된 바와 같은 분화 프로토콜의 4단계의 종료 시 세포에서의 RT-PCR에 의해 측정된 바와 같이, 다양한 유전자의 발현을 보여준다. 2개의 상이한 실험 복제물이 보여지며(복제물-1 및 복제물-2), 각각은 동일한 처리 프로토콜을 받았다. 패널 c는 시험관내 분화의 제 1 단계 동안 GDF-8 및 Wnt3a로 처리된 바와 같은 분화 프로토콜의 4단계의 종료 시 세포를 받은 스킨드-베이지 마우스에서 검출된 C-펩티드의 수준을 보여준다. 패널 d는 시험관내 분화 제 1 단계 동안 GDF-8 및 화합물 28로 처리된 바와 같은 분화 프로토콜의 4단계의 종료 시 세포를 받은 스킨드-베이지 마우스에서 검출된 C-펩티드의 수준을 보여준다.

<도 25>

도 25는 실시예 22에서 기술된 바와 같이 본 발명의 방법에 따라 처리된, 마이크로캐리어 비드 상에서 키운 세포로부터의 세포수 (패널 a) 및 CXCR4의 발현 (패널 b)을 보여준다. 세포는 무처리(미분화) 또는 100ng/mL 액티빈 A를 20ng/mL Wnt3a와 함께 조합한 처리(AA/Wnt3a) 또는 보여진 바와 같이 GDF-8을 조합한 다양한 처리를 이용해 사이토크스3 비드 상에서 키웠다: 50ng/mL GDF-8과 함께 2.5 μM 화합물 34 (Cmp 34+8); 또는 50ng/mL GDF-8과 함께 2.5 μM 화합물 34 및 50ng/mL PDGF (Cmp 34+8+D); 또는 50ng/mL GDF-8과 함께 2.5 μM 화합물 34 및 50ng/mL PDGF 및 50ng/mL VEGF (Cmp 34+8+D+V); 또는 50ng/mL GDF-8과 함께 2.5 μM 화합물 34 및 50ng/mL PDGF 및 50ng/mL VEGF 및 20ng/mL 무스치볼 (Cmp 34+8+D+V+M).

<도 26>

도 26은 실시예 23에서 기술된 바와 같이 본 발명의 화합물의 처리 후의 세포의 증식을 보여준다. I를 통한 패널 b는 GDF-8과 조합된 화합물을 사용하고 분화 검정을 시작한 후 제 1 일, 제 2 일, 및 제 3 일째에 MTS OD 관독을 측정하는 처리에 대한 검정 결과를 보여준다.

<도 27>

도 27은 본 발명의 방법에 따라 처리된 마이크로캐리어 비드 상에서 키운 세포로부터의 다양한 단백질 및 유전자의 발현을 보여준다. 패널 a는 실시예 24에서 기술된 분화 프로토콜의 1 단계의 종료 시, 세포에서 FACS에 의해 측정된 바와 같이 CXCR4, CD99, 및 CD9의 양성 발현%를 보여준다. 패널 B는 분화 프로토콜의 3단계를 통해 분화된 제시된 바와 같은 처리로부터 회수된 세포를 보여준다. 패널 C는 단계에서 제시된 바와 같이 처리되고 프로토콜의 3단계를 통해 분화된 세포에서 발현된 다양한 유전자 마커에 대한 ddCT 값을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 개시 내용의 명확함을 위하여, 그리고 제한하지 않고서, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용은 본 발명의 특정한 특성, 실시 형태, 또는 응용을 설명하거나 예시하는 하기 세부 항목으로 나뉘어진다.
- [0030] 정의
- [0031] 줄기 세포는 단일 세포 레벨에서 자가 재생하고 분화하여 자가 재생 전구 세포, 비재생 전구 세포, 및 최종 분화 세포를 비롯한 자손 세포 (progeny cell)를 생성하는 그의 능력에 의해 규정되는 미분화 세포이다. 줄기 세포는 또한 다수의 배엽층(내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로부터 다양한 세포 계통의 기능성 세포로 시험관 내에서 분화하는 그의 능력, 및 이식 후 다수의 배엽층의 조직이 생기게 하며 배반포 내로의 주입 후, 전부는 아니라 하더라도 대부분의 조직에 실질적으로 기여하는 그의 능력을 특징으로 한다.
- [0032] 줄기 세포는 그들의 발생 잠재력에 의해 분류된다: (1) 모든 배아 및 배자 외 세포 유형이 생기게 할 수 있음을 의미하는 전능성; (2) 모든 배아 세포 유형이 생기게 할 수 있음을 의미하는 만능성; (3) 세포 계통의 하위세트이지만 모두 특정 조직, 기관 또는 생리학적 시스템 내에 있는 하위세트가 생기게 할 수 있음을 의미하는 만능성(예를 들어, 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell, HSC)는 HSC(자가-재생), 혈구 세포 제한된 소기능성(oligopotent) 조상세포 및 혈액의 정상 성분인 모든 세포 유형 및 요소(예를 들어, 혈소판)를 포함하는 자손을 생성할 수 있음); (4) 만능성 줄기 세포보다 더 제한된 하위세트의 세포 계통이 될 수 있음을 의미하는 소기능성; 및 (5) 단일 세포 계통(예를 들어, 정자발생 줄기 세포)이 생기게 할 수 있음을 의미하는 단일기능성.
- [0033] 분화는 특화되지 않은 ("미결정된 (uncommitted)") 또는 덜 특화된 세포가 예를 들어, 신경 세포 또는 근육 세포와 같은 특화된 세포의 특징을 획득하는 과정이다. 분화된 또는 분화 유도된 세포는 세포 계통 내에서 보다 특화된 ("결정된 (committed)") 위치를 차지한 것이다. 분화 과정에 적용될 때, 용어 "결정된"은 분화 경로에서, 통상적인 환경하에서 특정 세포형 또는 세포형의 서브세트로 계속 분화할 것이며, 통상적인 환경하에서 다른 세포형으로 분화할 수 없거나 덜 분화된 세포형으로 돌아갈 수 없는 시점까지 진행한 세포를 말한다. 탈분화는 세포가 세포 계통 내의 덜 특화된 (또는 결정된) 위치로 되돌아가는 과정을 말한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세포 계통은 세포의 유전, 즉, 어느 세포로부터 왔는지 그리고 어떤 세포를 발생시킬 수 있는지를 규정한다. 세포 계통은 세포를 발생과 분화의 유전적 체계 내에 둔다. 계통 특이적 마커는 대상 계통의 세포 표현형과 특이적으로 관련되며, 미결정된 세포가 대상 계통으로 분화하는지를 평가하기 위해 사용될 수 있는 특징을 말한다.
- [0034] " β -세포 계통"은 전사 인자 PDX-1, 및 하기 전사 인자 중 적어도 하나에 대한 양성 유전자 발현을 갖는 세포를 말한다: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF-3 베타, MAFA, PAX4, 또는 PAX6. β -세포 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 β 세포를 포함한다.
- [0035] 본원에서 사용된 바와 같이, "완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포", 또는 "단계 1 세포", 또는 "단계 1"은 하기 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 말한다: SOX17, GATA4, HNF-3 베타, GSC, CER1, 노달, FGF8, 브라키어리, 혼합형 호메오박스 단백질, FGF4 CD48, 에오메소더민(eomesodermin)(EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, 또는 OTX2. 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 원시선 전구 세포, 원시선 세포, 중내배엽 세포 및 완성 내배엽 세포를 포함한다.
- [0036] 본원에서 사용된 바와 같이, "췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포"는 하기 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 말한다: PDX1, HNF-1 베타, PTF1 알파, HNF6, 또는 HB9. 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 췌장 내배엽 세포, 원시 장관(원시 창자관) 세포, 및 후방 전장 세포를 포함한다.
- [0037] 본원에서 사용된 바와 같이, "췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포", 또는 "단계 5 세포", 또는 "단계 5"는 하기 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 말한다: NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, 또는 PTF-1 알파. 췌장 내분비 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포는 췌장 내분비 세포, 췌장 호르몬 발현 세포, 및 췌장 호르몬 분비 세포, 및 β -세포 계통의 세포를 포함한다.
- [0038] 본원에서 사용된 바와 같이, "완성 내배엽"은 낭배의 외피(epiblast)로 인한 세포의 특징을 갖고 위장관로 및 그의 유도체를 형성하는 세포를 말한다. 완성 내배엽 세포는 하기 마커를 발현한다: HNF-3 베타, GATA4, SOX-17, 세베루스(Cerberus), OTX2, 구세코이드(goosecoid), C-Kit, CD99, 또는 MIXL1.
- [0039] 본원에서 사용된 바와 같이, "배자의 내배엽"은 하기 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포군을 말한다: SOX7, AFP, 또는 SPARC.
- [0040] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "마커"는 관심있는 세포에서 차등적으로 발현되는 핵산 또는 폴리펩티드 분자

이다. 이와 관련하여, 차등 발현은 양성 마커의 레벨 증가 및 음성 마커의 레벨 감소를 의미한다. 마커 핵산 또는 폴리펩티드의 검출가능한 레벨은 다른 세포에 비하여 대상 세포에서 충분히 더 높거나 더 낮아, 대상 세포가 당업계에 알려진 다양한 방법 중 임의의 것을 이용하여 다른 세포로부터 확인되어 구별될 수 있다.

- [0041] 본원에서 사용된 바와 같이, "중내배엽 세포"는 하기 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 말한다: CD48, 에오메소더민 (EOMES), SOX17, DKK4, HNF-3 베타, GSC, FGF17, 또는 GATA-6.
- [0042] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "취장 내분비 세포", 또는, "취장 호르몬 발현 세포"는 하기 호르몬 중 적어도 하나를 발현할 수 있는 세포를 말한다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 및 취장 폴리펩티드.
- [0043] 본원에서 사용된 바와 같이, "취장 내배엽 세포", 또는 "단계 4 세포", 또는 "단계 4"는 하기 마커 중 적어도 하나를 발현할 수 있는 세포를 말한다: NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, PAX4, 또는 NKX2.2.
- [0044] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "취장 호르몬 생산 세포"는 하기 호르몬 중 적어도 하나를 생산할 수 있는 세포를 말한다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 및 취장 폴리펩티드.
- [0045] 본원에서 사용된 바와 같이, "취장 호르몬 분비 세포"는 하기 호르몬 중 적어도 하나를 분비할 수 있는 세포를 말한다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 및 취장 폴리펩티드.
- [0046] 본원에서 사용된 바와 같이, "후방부 전장 세포" 또는 "단계 3 세포", 또는 "단계 3"은 하기 마커 중 적어도 하나를 분비할 수 있는 세포를 말한다: PDX1, HNF1, PTF-1 알파, HNF6, HB-9, 또는 PROX-1.
- [0047] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "전(pre)-원시선 세포"는 하기 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 말한다: 노달, 또는 FGF8.
- [0048] 본원에서 사용된 바와 같이, "원시 창자관 세포" 또는 "단계 2 세포", 또는 "단계 2"는 하기 호르몬 중 적어도 하나를 분비할 수 있는 세포를 말한다: HNF1, HNF-4 알파.
- [0049] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "원시선 세포"는 하기 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 말한다: 브라키우리, 혼합형 호메오박스 단백질, 또는 FGF4.
- [0050] 만능 줄기 세포의 단리, 팽창, 및 배양
- [0051] 만능 줄기 세포의 특성화
- [0052] 만능 줄기 세포의 만능성은 예를 들어, 세포를 중중 복합 면역결핍증(SCID) 마우스에 주사하고, 형성하는 기형 종을 4% 파라포름알데하이드를 사용해 고정한 다음, 3개의 배엽층으로부터 세포 유형의 증거를 조직학적으로 시험함으로써 확인될 수 있다. 대안적으로, 만능성은 배양체 (embryoid body)를 형성하고, 삼배엽층과 관련된 마커들의 존재에 대해 배양체를 평가함으로써 결정될 수 있다.
- [0053] 번식된 만능 줄기 세포주는 표준 G-밴딩 기술을 이용하여 핵형을 결정하고 상응하는 영장류 종의 공개된 핵형과 비교할 수 있다. "정상 핵형"을 가진 세포를 얻는 것이 필요하며, 이는 세포가 모든 인간 염색체가 존재하며 눈에 띄게 변경되지 않은 정배수체임을 의미한다.
- [0054] 만능 줄기 세포의 공급원
- [0055] 사용될 수 있는 만능 줄기 세포의 유형은 임신 후 형성된 조직으로부터 유도되는 구축된 만능 세포주를 포함하고, 이러한 조직에는 전-배아 조직 (예를 들어, 배반포), 배아 조직, 또는 전형적으로 본질적으로는 대략 10 내지 12주의 임신 전이 아닌 임신 동안의 임의의 때에 취해진 태아 조직이 포함된다. 비-제한적 예는 구축된 인간 배아 줄기 세포 또는 인간 배아 생식 세포주, 예를 들어, 인간 배아 줄기 세포주 H1, H7, 및 H9 (와이셀 (WiCell))이다. 이러한 세포의 초기 수립 또는 안정화 시에 본 명세서의 조성물의 사용도 고려되며, 이 경우에는 공급원 세포는 공급원 조직으로부터 직접 취한 일차 만능성 세포일 것이다. 영양세포의 부재하에서 이미 배양된 만능성 줄기 세포 집단으로부터 취한 세포가 또한 적합하다. 돌연변이 인간 배아 줄기 세포주, 예를 들어, BG01v (BresaGen (Athens, GA))가 또한 적합하다.
- [0056] 일 실시 형태에서, 인간 배아 줄기 세포는 톰슨등 (미국 특허 제5,843,780호; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844, 1995)에 기재된 바와 같이 제조된다.
- [0057] 한 실시 양태에서, 만능 줄기 세포는 문헌[Takahashi *et al.* (세포 131: 1-12, 2007)]에서 기술된 바와 같이

제조된다.

- [0058] 만능 줄기 세포의 배양
- [0059] 일 실시 형태에서, 만능 줄기 세포는 전형적으로 다양한 방식으로 만능 줄기 세포를 지지하는 영양 세포층 상에서 배양된다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는 본질적으로 공급원 세포가 없으나 그럼에도 실질적인 분화를 겪지 않으면서 만능 줄기 세포의 증식을 지지하는 배양 시스템 내에서 배양된다. 영양세포가 없는 배양에서 분화 없는 만능 줄기 세포의 성장은 이전에 다른 세포 유형을 이용하여 배양함으로써 조절된 배지를 이용하여 지지된다. 대안적으로, 영양세포가 없는 배양에서 분화 없는 만능 줄기 세포의 성장은 화학적 규명 배지를 이용하여 지지된다.
- [0060] 만능 줄기 세포는 적합한 배양 기재 상에 도달될 수 있다. 일 실시 형태에서, 적합한 배양 기재는 세포의 매트릭스 성분, 예를 들어, 기저막에서 유래되거나 또는 부착 분자 수용체-리간드 커플링의 일부를 형성할 수 있는 것들이다. 한 실시 양태에서, 적합한 배양 기질은 매트리지겔(MATRIGEL)® (백톤 디켄슨(Becton Dickenson))이다. 매트리지겔®은 재구성된 기저막을 형성하기 위해 실온에서 젤화되는 엔겔브레-홀름-스왈(Engelbreth-Holm-Swarm) 중앙 세포로부터의 용해성 제제이다.
- [0061] 다른 세포의 매트릭스 성분 및 성분 혼합물이 대안으로서 적합하다. 증식되는 세포 유형에 따라, 이것은 라미닌, 피브로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 헤파란 설페이트 등을 단독으로 또는 다양한 조합으로 포함할 수 있다.
- [0062] 만능 줄기 세포는 적합한 분포로 그리고 세포 생존, 번식, 및 바람직한 특징의 보유를 촉진하는 배지의 존재하에서 기재상에 도달될 수 있다. 모든 이들 특성은 시딩 분포에 세심한 주의를 기울여 이익을 얻으며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0063] 적절한 배지는 하기 성분들, 예를 들어, 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle's Medium) (DMEM), Gibco # 11965-092; 녹아웃 (Knockout) 돌베코 변형 이글 배지 (KO DMEM), Gibco # 10829-018; 햄(Ham's) F12/50% DMEM 기본 배지; 200 mM L-글루타민, Gibco # 15039-027; 비필수 아미노산 용액, Gibco 11140-050; β -메르캅토에탄올, 시그마 # M7522; 인간 재조합 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF), Gibco # 13256-029로부터 제조될 수 있다.
- [0064] 만능 줄기 세포로부터의 췌장 호르몬 생성 세포의 형성
- [0065] 한 실시 양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 만능 줄기세포로부터 췌장 호르몬 생성 세포를 생성하는 방법을 제공한다:
- [0066] a. 만능 줄기 세포를 배양하는 단계,
- [0067] b. 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계,
- [0068] c. 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계, 및
- [0069] d. 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계.
- [0070] 본 발명의 한 측면에서, 췌장 내분비 세포는 췌장 호르몬 생성 세포이다. 대안적인 측면에서, 췌장 내분비 세포는 β -세포 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포이다. β -세포 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 PDX1, 및 하기 전사 인자 중 적어도 하나를 발현한다: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF-3 베타, MAFA, PAX4, 또는 Pax6. 본 발명의 한 측면에서, β -세포 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 β -세포이다.
- [0071] 본 발명에 사용하기에 적합한 만능 줄기 세포는 예를 들어, 인간 배아 줄기 세포주 H9 (NIH 코드: WA09), 인간 배아 줄기 세포주 H1 (NIH 코드: WA01), 인간 배아 줄기 세포주 H7 (NIH 코드: WA07), 및 인간 배아 줄기 세포주 SA002 (스웨덴 소재의 셀라르티스(Cellartis))를 포함한다. 만능 세포의 하기 특징적인 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 또한 본 발명에 사용하기에 적합하다: ABCG2, 크립토, CD9, FOXD3, 코넥신43, 코넥신45, OCT4, SOX2, 나노그(Nanog), hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra1-60, 또는 Tra1-81.
- [0072] 만능 줄기 세포는 공급원 세포층 상에서 배양될 수 있다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는 세포의 기질 상에서

배양될 수 있다. 세포의 기질은 마우스 육종 세포로부터 추출된 용해화된 기저막 제제일 수 있다(BD 바이오사이언스(BD Biosciences)에서 판매, 제품명 매트리지엘™). 대안적으로, 세포의 기질은 성장 인자-감소 매트리지엘™일 수 있다. 대안적으로, 세포의 기질은 파이프록틴일 수 있다. 대안적 실시 형태에서, 만능 줄기 세포는 인간 혈청으로 코팅된 조직 배양 기재 상에서 배양되고 분화된다.

- [0073] 세포의 기질은 조직 배양 기재를 코팅하기 전에 희석될 수 있다. 세포의 매트릭스를 희석하고 조직 배양 기질을 코팅하기 위한 적합한 방법의 예는 문헌[Kleinman, H.K., *et al.*, *Biochemistry* 25:312 (1986)], 및 [Hadley, M.A., *et al.*, *J.Cell.Biol.* 101:1511 (1985)]에서 찾을 수 있다.
- [0074] 한 실시 양태에서, 세포의 기질은 매트리지엘™이다. 한 실시 양태에서, 조직 배양 기질은 1:10 희석에서 매트리지엘™으로 코팅된다. 대안의 실시 양태에서, 조직 배양 기질은 1:15 희석에서 매트리지엘™으로 코팅된다. 대안의 실시 양태에서, 조직 배양 기질은 1:30 희석에서 매트리지엘™으로 코팅된다. 대안의 실시 양태에서, 조직 배양 기질은 1:60 희석에서 매트리지엘™으로 코팅된다.
- [0075] 한 실시 양태에서, 세포의 기질은 성장 인자-감소 매트리지엘™이다. 한 실시 양태에서, 조직 배양 기질은 1:10 희석에서 성장 인자-감소 매트리지엘™으로 코팅된다. 대안의 실시 양태에서, 조직 배양 기질은 1:15 희석에서 성장 인자-감소 매트리지엘™으로 코팅된다. 대안의 실시 양태에서, 조직 배양 기질은 1:30 희석에서 성장 인자-감소 매트리지엘™으로 코팅된다. 대안의 실시 양태에서, 조직 배양 기질은 1:60 희석에서 성장 인자-감소 매트리지엘™으로 코팅된다.
- [0076] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커는 SOX17, GATA4, HNF-3 베타, GSC, CER1, 노달, FGF8, 브라키어리, 혼합형 호메오박스 단백질, FGF4 CD48, 에오메소더민 (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, 및 OTX2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 한 측면에서, 완성 내배엽 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포는 원시선 전구 세포이다. 다른 측면에서, 완성 내배엽 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포는 중내배엽 세포이다. 다른 측면에서, 완성 내배엽 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포는 완성 내배엽 세포이다.
- [0077] 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커는 PDX1, HNF-1 베타, PTF1 알파, HNF6, HB9 및 PROX1로 이루어진 군으로부터 선택된다. 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 한 측면에서, 췌장 내배엽 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포는 췌장 내배엽 세포이다.
- [0078] 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커는 NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, 및 PTF-1 알파로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 췌장 내분비 세포는 하기 호르몬 중 적어도 하나를 발현할 수 있다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 및 췌장 폴리펩티드. 췌장 내분비 계통의 특징을 나타내는 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 한 측면에서, 췌장 내분비 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포는 췌장 내분비 세포이다. 췌장 내분비 세포는 췌장 호르몬 발현 세포일 수 있다. 대안적으로, 췌장 내분비 세포는 췌장 호르몬 분비 세포일 수 있다.
- [0079] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성
- [0080] 본 발명의 한 측면에서, 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기 위해 충분한 양의 GDF-8을 포함하는 배지 내에서 만능 줄기 세포를 배양함으로써, 만능 줄기 세포는 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0081] 만능 줄기 세포는 충분한 양의 GDF-8을 함유하는 배지 내에서 약 1일 내지 약 7일 동안 배양될 수 있다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는 충분한 양의 GDF-8을 함유하는 배지 내에서 약 1일 내지 약 6일 동안 배양될 수 있다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는 충분한 양의 GDF-8을 함유하는 배지 내에서 약 1일 내지 약 5일 동안 배양될 수 있다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는 충분한 양의 GDF-8을 함유하는 배지 내에서 약 1일 내지 약 4일 동안 배양될 수 있다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는 충분한 양의 GDF-8을 함유하는 배지 내에서 약 1일 내지 약 3일 동안 배양될 수 있다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는 충분한 양의 GDF-8을 함유하는 배지 내에서 약 1일 내지 약 2일 동안 배양될 수 있다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는 충분한 양의 GDF-8을 함유하는 배지 내에서 약 1일 동안 배양될 수 있다.
- [0082] 한 실시 양태에서, GDF-8은 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, GDF-8은 약 5ng/mL 내지 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, GDF-8은 약 5ng/mL 내지 약 25ng/mL

의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, GDF-8은 약 25ng/mL의 농도에서 사용된다.

- [0083] 한 실시 양태에서, 충분한 양의 GDF-8을 포함하는 배지는 또한 적어도 하나의 다른 인자를 함유한다. 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, VEGF, 무스치몰, PD98059, LY294002, U0124, U0126, 및 나트륨 부티레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0084] 한 실시 양태에서, EGF는 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, EGF는 약 5ng/mL 내지 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, EGF는 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다.
- [0085] 한 실시 양태에서, FGF4는 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, FGF4는 약 5ng/mL 내지 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, FGF4는 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다.
- [0086] 한 실시 양태에서, PDGF-A는 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, PDGF-A는 약 5ng/mL 내지 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, PDGF-A는 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다.
- [0087] 한 실시 양태에서, PDGF-B는 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, PDGF-B는 약 5ng/mL 내지 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, PDGF-B는 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다.
- [0088] 한 실시 양태에서, PDGF-C는 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, PDGF-C는 약 5ng/mL 내지 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, PDGF-C는 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다.
- [0089] 한 실시 양태에서, PDGF-D는 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, PDGF-D는 약 5ng/mL 내지 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, PDGF-D는 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다.
- [0090] 한 실시 양태에서, VEGF는 약 5ng/mL 내지 약 500ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, VEGF는 약 5ng/mL 내지 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, VEGF는 약 50ng/mL의 농도에서 사용된다.
- [0091] 한 실시 양태에서, 무스치몰은 약 1 μM 내지 약 200 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, 무스치몰은 약 1 μM 내지 약 20 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, 무스치몰은 약 20 μM의 농도에서 사용된다.
- [0092] 한 실시 양태에서, PD98059는 약 0.1 μM 내지 약 10 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, PD98059는 약 0.1 μM 내지 약 1 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, PD98059는 약 1 μM의 농도에서 사용된다.
- [0093] 한 실시 양태에서, LY294002는 약 0.25 μM 내지 약 25 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, LY294002는 약 0.25 μM 내지 약 2.5 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, LY294002는 약 2.5 μM의 농도에서 사용된다.
- [0094] 한 실시 양태에서, U0124는 약 0.1 μM 내지 약 10 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, U0124는 약 0.1 μM 내지 약 1 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, U0124는 약 1 μM의 농도에서 사용된다.
- [0095] 한 실시 양태에서, U0126은 약 0.1 μM 내지 약 10 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, U0126은 약 0.1 μM 내지 약 1 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, U0126은 약 1 μM의 농도에서 사용된다.
- [0096] 한 실시 양태에서, 나트륨 부티레이트는 약 0.05 μM 내지 약 5 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, 나트륨 부티레이트는 약 0.05 μM 내지 약 0.5 μM의 농도에서 사용된다. 대안의 실시 양태에서, 나트륨 부티레이트는 약 0.5 μM의 농도에서 사용된다.
- [0097] 대안의 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 아닐린-피리디노트라이아진, 사이클릭 아닐린-피리디노트라이아진, N-[[1-(페닐메틸)아제판-4-일]메틸]-2-피리딘-3-일아세트아미드, 4-[[4-(4-[[2-(피리딘-2-일아미노)에

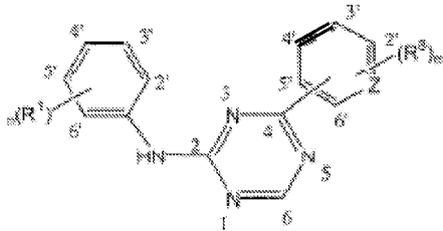
틸]아미노}-1,3,5-트리아진-2-일)피리딘-2-일]옥시)부탄-1-올, 3-({3-[4-({2-[메틸(피리딘-2-일)아미노]에틸}아미노)-1,3,5-트리아진-2-일)피리딘-2-일]아미노)프로판-1-올, N-4-~[2-(3-플루오로페닐)에틸]-N-2-~[3-(4-메틸피페라진-1-일)프로필]피리도[2,3-d]피리미딘-2,4-다이아민, 1-메틸-N-[(4-피리딘-3-일-2-~{3-(트라이플루오로메틸)페닐}아미노)-1,3-티아졸-5-일]메틸]피페리딘-4-카르복사미드, 1,1-다이메틸에틸 {2-[4-({5-[3-(3-하이드록시프로필)페닐]-4H-1,2,4-트리아졸-3-일}아미노)페닐]에틸}카르바메이트, 1,1-다이메틸에틸 {{3-({5-[5-(3-하이드록시프로필)-2-(메틸옥시)페닐]-1,3-옥사졸-2-일}아미노)페닐}메틸}카르바메이트, 1-({5-[6-({4-[(4-메틸피페라진-1-일)설포닐]페닐}아미노)피라진-2-일]티오펜-2-일}메틸)피페리딘-4-올, 1-({4-[6-({4-[(4-메틸피페라진-1-일)설포닐]페닐}아미노)피라진-2-일]티오펜-2-일}메틸)피페리딘-4-카르복사미드, 및 2-{{4-(1-메틸에틸)페닐}아미노}-N-(2-티오펜-2-일에틸)-7,8-다이하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-6(5H)-카르복사미드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0098] 본 발명의 화합물

[0099] 본 발명은 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시킬 수 있는 화합물을 제공한다.

[0100] 한 실시 양태에서, 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시킬 수 있는 화합물은 화학식 (1)의 아닐린-피리디노트리아진:

[0101] [화학식 (1)]



[0102] 그의 N-산화물 형태, 약학적으로 허용가능한 부가염 및 입체화학적으로 이성질체성 형태이다:

[0103] [여기서, m은 1 내지 4의 정수를 나타내고; n은 1 내지 4의 정수를 나타내고; Z은 N 또는 C를 나타내고;

[0105] R¹ 및 R⁸은 각각 독립적으로 수소, Het¹⁴, 시아노, 할로, 하이드록시, C₁₋₆알콕시-, C₁₋₆알킬-, 모노-또는 다이(C₁₋₄알킬)아미노-카르보닐-, 모노-또는 다이(C₁₋₄알킬)아미노-설포닐, 할로로 치환된 C₁₋₆알콕시를 나타내거나, R¹은 하이드록시 또는 할로로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 치환된 C₁₋₆알킬을 나타내고;

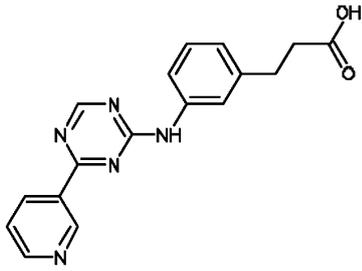
[0106] R² 및 R⁹은 각각 독립적으로 수소, C₁₋₄알킬, C₂₋₄알케닐, Het³, Het⁴-C₁₋₄알킬-, Het⁵-C₁₋₄알킬카르보닐-, 모노-또는 다이(C₁₋₄알킬)아미노-C₁₋₄알킬-카르보닐-, 또는 수소, 하이드록시, 아미노 또는 C₁₋₄알킬옥시-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의 치환된 수소를 나타내고;

[0107] R³ 및 R⁷은 각각 독립적으로 수소, C₁₋₄알킬, Het⁶, Het⁷-C₁₋₄알킬-, C₂₋₄알케닐카르보닐(Het⁸-C₁₋₄알킬아미노카르보닐-로 임의 치환됨), C₂₋₄알케닐설포닐-, C₁₋₄알킬옥시C₁₋₄알킬-, 또는 수소, 하이드록시, 아미노 또는 C₁₋₄알킬옥시-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의 치환된 페닐을 나타내고;

[0108] R₄, R₅, R₆ 및 R¹⁰는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₄알킬(하이드록시, Het⁹ 또는 C₁₋₄알킬옥시)로 임의 치환됨)을 나타내고;

[0109] Het¹ 및 Het²는 각각 독립적으로 피롤리딘, 피페리딘, 피페라지, 피리딘, 피리미딘, 피라지, 이미다졸리딘 또는 피라졸리딘로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서, 상기 Het¹ 및 Het²는 아미노, 하이드록시, C₁₋₄알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, 페닐, 페닐-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬-옥시-C₁₋₄알킬-모노-또는 다이(C₁₋₄알킬) 아미노- 또는 아미노-카르보닐-로 임의로 치환되고;

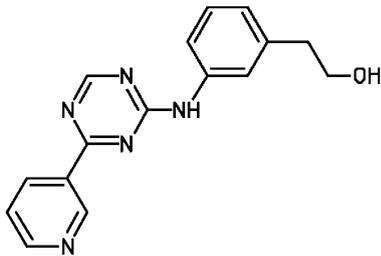
- [0110] Het³ 및 Het⁶은 각각 독립적으로 피롤리디닐 또는 피페리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het³ 및 Het⁶은 C₁₋₄알킬, C₃₋₆사이클로알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬옥시C₁₋₄알킬 또는 폴리하이드록시-C₁₋₄알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고;
- [0111] Het⁴, Het⁷ 및 Het⁹는 각각 독립적으로 모르폴리닐, 피롤리디닐, 피페라지닐 또는 피페리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het⁴, Het⁷ 및 Het⁹는 C₁₋₄알킬, C₃₋₆사이클로알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬옥시C₁₋₄알킬 또는 폴리하이드록시-C₁₋₄알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고;
- [0112] Het⁵는 모르폴리닐, 피롤리디닐, 피페라지닐 또는 피펜디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het⁵는 C₁₋₄알킬, C₃₋₆사이클로알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬옥시C₁₋₄알킬 또는 폴리하이드록시-C₁₋₄알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고;
- [0113] Het¹⁰, Het¹¹ 및 Het¹³은 각각 독립적으로 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 피리디닐, 피리미디닐, 피라지닐, 이미다졸리디닐 또는 피라졸리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het¹⁰, Het¹¹ 및 Het¹³은 아미노, 하이드록시, C₁₋₄알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, 페닐, 페닐-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬-옥시-C₁₋₄알킬-, 아미노-카르보닐- 또는 모노-또는 다이(C₁₋₄알킬)아미노-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고;
- [0114] Het¹²는 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 피리디닐, 피리미디닐, 피라지닐, 이미다졸리디닐 또는 피라졸리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het¹²는 아미노, 하이드록시, C₁₋₄알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, 페닐, 페닐-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬-옥시-C₁₋₄알킬-; 모노-또는 다이(C₁₋₄알킬)아미노- 또는 아미노-카르보닐-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고;
- [0115] Het¹⁴는 모르폴리닐; 피롤리디닐; 피페라지닐; 이미다졸릴; 피롤릴; 2,3,4-트리아자피롤릴; 1,2,3-트리아자졸릴; 피라졸릴; 또는 피페리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het¹⁴는 C₁₋₄알킬, C₃₋₆사이클로알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬옥시C₁₋₄알킬 또는 폴리하이드록시-C₁₋₄알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고; 특히 Het¹⁴는 모르폴리닐; 피롤리디닐; 피롤릴; 2,3,4-트리아자피롤릴; 피페라지닐 또는 피페리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het¹⁴는 C₁₋₄알킬, C₃₋₆사이클로알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬옥시C₁₋₄알킬 또는 폴리하이드록시-C₁₋₄알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환된다].
- [0116] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (1)의 화합물이다.
- [0117] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (2)의 화합물이다.
- [0118] [화학식 (2)]



[0119] : 3-{3-[(4-피리딘-3-일-1,3,5-트리아진-2-일)아미노]페닐}프로판산. 본원에서 "화합물 1"이라고 한다.

[0120] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (3)의 화합물이다.

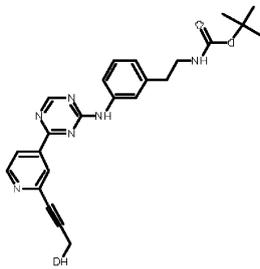
[0121] [화학식 (3)]



[0122] : 2-{3-[(4-피리딘-3-일-1,3,5-트리아진-2-일)아미노]페닐}에탄올. 본원에서 "화합물 2"라고 한다.

[0123] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (4)의 화합물이다.

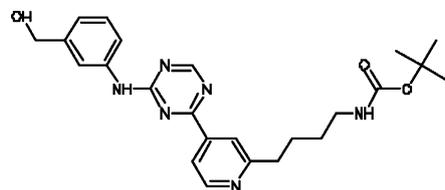
[0124] [화학식 (4)]



[0125] : 1,1-다이메틸에틸 {2-[3-({4-[2-(3-하이드록시프로프-1-일-1-일)피리딘-4-일]-1,3,5-트리아진-2-일}아미노)페닐]에틸}카르바메이트. 본원에서 "화합물 3"이라고 한다.

[0126] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (5)의 화합물이다.

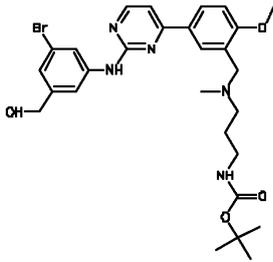
[0127] [화학식 (5)]



[0128] : 1,1-다이메틸에틸 {4-[4-({3-[(하이드록시메틸)페닐]아미노}-1,3,5-트리아진-2-일)피리딘-2-일]부틸}카르바메이트. 본원에서 "화합물 4"라고 한다.

[0129] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (6)의 화합물이다.

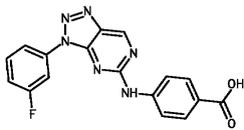
[0130] [화학식 (6)]



[0131] : 1,1-다이메틸에틸 {3-[[5-(2-{{3-브로모-5-(하이드록시메틸)페닐}아미노)피리미딘-4-일)-2-(메틸옥시)페닐]메틸}(메틸)아미노]프로필}카르바메이트. 본원에서 "화합물 5"라고 한다.

[0132] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (7)의 화합물이다.

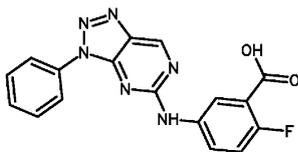
[0133] [화학식 (7)]



[0134] : 4-{{3-(3-플루오로페닐)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-5-일}아미노}벤조산. 본원에서 "화합물 6"이라고 한다.

[0135] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (8)의 화합물이다.

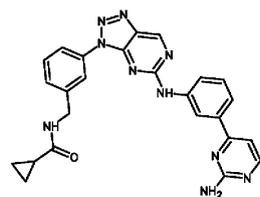
[0136] [화학식 (8)]



[0137] : 2-플루오로-5-{{3-페닐-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-5-일}아미노}벤조산. 본원에서 "화합물 7"이라고 한다.

[0138] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (9)의 화합물이다.

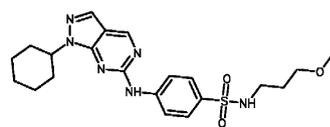
[0139] [화학식 (9)]



[0140] : N-{{3-(5-{{3-(2-아미노피리미딘-4-일)페닐}아미노)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-3-일}페닐)메틸}사이클로프로판카르복사미드. 본원에서 "화합물 8"이라고 한다.

[0141] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (10)의 화합물이다.

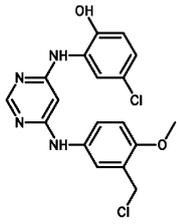
[0142] [화학식 (10)]



[0143] : 4-{{(1-사이클로헥실-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-일)아미노}-N-{{3-(메틸옥시)프로필}벤젠설포나미드. 본원에서 "화합물 9"라고 한다.

[0144] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (11)의 화합물이다.

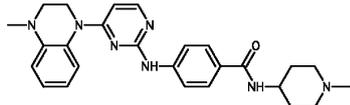
[0145] [화학식 (11)]



[0146] : 4-클로로-2-[[6-[[3-(클로로메틸)-4-메톡시페닐]아미노]피리미딘-4-일]아미노]페놀. 본원에서 "화합물 10"이라고 한다.

[0147] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (12)의 화합물이다.

[0148] [화학식 (12)]

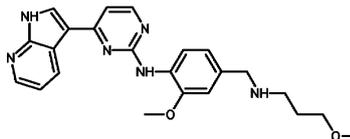


[0149]

[0150] : 4-[[4-(4-메틸-3,4-다이하이드로퀴놀살린-1(2H)-일)피리미딘-2-일]아미노]-N-(1-메틸피페리딘-4-일)벤즈아미드. 본원에서 "화합물 11"이라고 한다.

[0151] 한 실시 양태에서, 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (13)의 화합물이다.

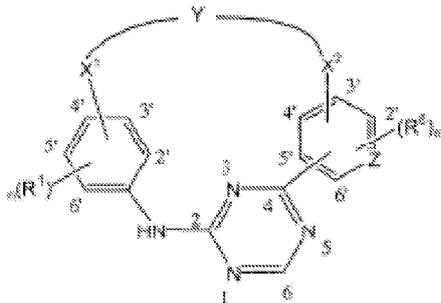
[0152] [화학식 (13)]



[0153] : N-(2-메톡시-4-[[3-(메톡시프로필)아미노]메틸]페닐)-4-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일)피리미딘-2-아민. 본원에서 "화합물 12"라고 한다.

[0154] 한 실시 양태에서, 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시킬 수 있는 화합물은 화학식 (14)의 사이클릭 아닐린-피리디노트라이아진:

[0155] [화학식 (14)]



[0156]

[0157] 그의 N-산화물 형태, 약학적으로 허용가능한 부가염 및 입체화학적으로 이성질체성 형태이다:

[0158] [여기서, m은 1 내지 4의 정수를 나타내고; n은 1 내지 4의 정수를 나타내고; Z은 N 또는 C를 나타내고;

[0159] Y는 $-NR^2-C_{1-6}알킬-CO-NR^4-$, $-C_{1-4}알킬-NR^9-C_{1-4}알킬-$, $C_{1-6}알킬-CO-Het^{10}-$, $-Het^{11}-CO-C_{1-6}알킬-$, $-Het^{12}-C_{1-6}알킬-$, $-CO-Het^{13}-C_{1-6}알킬-$, $-CO-NR^{10}-C_{1-6}알킬-$, $-Het^1-C_{1-6}알킬-CO-NR^5-$, 또는 $-Het^2-CO-NR^6-$ 을 나타내고, 여기서, $-C_{1-6}알킬-연결기(-NR^2-C^{1-6}알킬-CO-NR^4-$ 또는 $-Het^1-C_{1-6}알킬-CO-NR^5-$ 내)는 하이드록시, 메톡시, 아미노카르보닐, 할로, 페닐, 인돌릴, 메틸설파이드, 티올, 하이드록시페닐, 시아노페닐, 아미노 및 하이드록시카르보닐로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고;

- [0160] X^1 은 직접 결합, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알킬옥시-, C_{1-4} 알킬-CO-, C_{2-4} 알케닐, C_{2-4} 알키닐, 또는 C_{1-4} 알킬-NR³-을 나타내고, 여기서 상기 C_{1-4} 알킬 또는 C_{2-4} 알케닐은 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 할로 치환체로 임의로 치환되고;
- [0161] X^2 은 직접 결합, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알킬옥시-, C_{1-4} 알킬-CO-, C_{2-4} 알케닐, C_{2-4} 알키닐, 또는 C_{1-4} 알킬-NR⁷-을 나타내고, 여기서 상기 C_{1-4} 알킬 또는 C_{2-4} 알케닐은 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 할로 치환체로 임의로 치환되고;
- [0162] R^1 및 R^8 은 각각 독립적으로 수소, Het¹⁴, 시아노, 할로, 하이드록시, C_{1-6} 알콕시-, C_{1-6} 알킬-, 모노- 또는 다이(C_{1-4} 알킬)아미노-카르보닐-, 모노- 또는 다이(C_{1-4} 알킬)아미노-설포닐, 할로로 치환된 C_{1-6} 알콕시-를 나타내거나, R^1 은 하이드록시 또는 할로로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 치환된 C_{1-6} 알킬을 나타내고;
- [0163] R^2 및 R^9 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, C_{2-4} 알케닐, Het³, Het⁴- C_{1-4} 알킬-, Het⁵- C_{1-4} 알킬카르보닐-, 모노-또는 다이(C_{1-4} 알킬)아미노- C_{1-4} 알킬-카르보닐-, 또는 수소, 하이드록시, 아미노 또는 C_{1-4} 알킬옥시-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환된 페닐을 나타내고;
- [0164] R^3 및 R^7 은 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, Het⁶, Het⁷- C_{1-4} 알킬-, C_{2-4} 알케닐카르보닐(Het⁸- C_{1-4} 알킬아미노카르보닐-로 임의 치환됨), C_{2-4} 알케닐설포닐-, C_{1-4} 알킬옥시 C_{1-4} 알킬-, 또는 수소, 하이드록시, 아미노 또는 C_{1-4} 알킬옥시-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환된 페닐을 나타내고;
- [0165] R^4 , R^5 , R^6 및 R^{10} 은 각각 독립적으로 수소, 또는 하이드록시로 임의 치환된 C_{1-4} 알킬, Het⁹ 또는 C_{1-4} 알킬옥시를 나타내고;
- [0166] Het¹ 및 Het²는 각각 독립적으로 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 피리디닐, 피리미디닐, 피라지닐, 이미다졸리디닐 또는 피라졸리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het¹ 및 Het²는 아미노, 하이드록시, C_{1-4} 알킬, 하이드록시- C_{1-4} 알킬-, 페닐, 페닐- C_{1-4} 알킬-, C_{1-4} 알킬-옥시- C_{1-4} 알킬-모노-또는 다이(C_{1-4} 알킬) 아미노- 또는 아미노-카르보닐-로 임의로 치환되고;
- [0167] Het³ 및 Het⁶은 각각 독립적으로 피롤리디닐 또는 피페리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het³ 및 Het⁶은 C_{1-4} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 하이드록시- C_{1-4} 알킬-, C_{1-4} 알킬옥시 C_{1-4} 알킬 또는 폴리하이드록시- C_{1-4} 알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고;
- [0168] Het⁴, Het⁷ 및 Het⁹는 각각 독립적으로 모르폴리닐, 피롤리디닐, 피페라지닐 또는 피페리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het⁴, Het⁷ 및 Het⁹는 C_{1-4} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 하이드록시- C_{1-4} 알킬-, C_{1-4} 알킬옥시 C_{1-4} 알킬 또는 폴리하이드록시- C_{1-4} 알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고;
- [0169] Het⁵는 모르폴리닐, 피롤리디닐, 피페라지닐 또는 피펜디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het⁵는 C_{1-4} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 하이드록시- C_{1-4} 알킬-, C_{1-4} 알킬옥시 C_{1-4} 알킬 또는 폴리하이드록시- C_{1-4} 알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고;
- [0170] Het¹⁰, Het¹¹ 및 Het¹³은 각각 독립적으로 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 피리디닐, 피리미디닐, 피라지닐, 이미다졸리디닐 또는 피라졸리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het¹⁰, Het¹¹ 및 Het¹³은 아미노, 하이드록시, C_{1-4} 알킬, 하이드록시- C_{1-4} 알킬-, 페닐, 페닐- C_{1-4} 알킬-, C_{1-4} 알킬-옥시- C_{1-4} 알킬-, 아미노-카르보닐- 또는 모노-또는 다이(C_{1-4} 알킬)아미노-로 임의로 치환되고;

[0171] Het¹²는 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 피리디닐, 피리미디닐, 피라지닐, 이미다졸리디닐 또는 피라졸리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het¹²는 아미노, 하이드록시, C₁₋₄알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, 페닐, 페닐-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬-옥시-C₁₋₄알킬-; 모노-또는 다이(C₁₋₄알킬)아미노- 또는 아미노-카르보닐-로 임의로 치환되고;

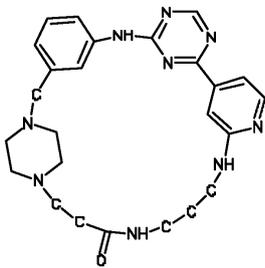
[0172] Het¹⁴는 모르폴리닐; 피롤리디닐; 피페라지닐; 이미다졸릴; 피롤릴; 2,3,4-트리아자피롤릴; 1,2,3-트리아자졸릴; 피라졸릴; 또는 피페리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het¹⁴는 C₁₋₄알킬, C₃₋₆사이클로알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬옥시C₁₋₄알킬 또는 폴리하이드록시-C₁₋₄알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고; 특히 Het¹⁴는 모르폴리닐; 피롤리디닐; 피롤릴; 2,3,4-트리아자피롤릴; 피페라지닐 또는 피페리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het¹⁴는 C₁₋₄알킬, C₃₋₆사이클로알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬옥시C₁₋₄알킬 또는 폴리하이드록시-C₁₋₄알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환되고; 더욱 특히 Het¹⁴는 모르폴리닐; 피롤리디닐; 피페라지닐 또는 피페리디닐로부터 선택되는 헤테로사이클을 나타내고, 여기서 상기 Het¹⁴는 C₁₋₄알킬, C₃₋₆사이클로알킬, 하이드록시-C₁₋₄알킬-, C₁₋₄알킬옥시C₁₋₄알킬 또는 폴리하이드록시-C₁₋₄알킬-로부터 선택되는 하나 또는 가능한 경우 2개 이상의 치환체로 임의로 치환된다].

[0173] 화학식 (7)의 화합물은 얀센 파마소티카 N.V.(Janssen Pharmaceutica N.V.)에 양도된 W02007/003525에 개시된다.

[0174] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (14)의 화합물이다.

[0175] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (15)의 화합물이다.

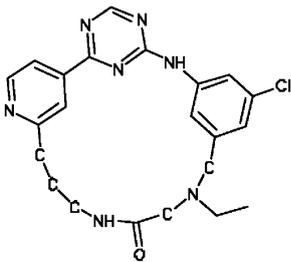
[0176] [화학식 (15)]



[0177] : 1,8,10,12,17,19,23,27,33-노나아자헩타사이클로 [25.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]테트라트리아콘타-3(34),4,6,9(33),10,12,14(32),15,17-노나엔-24-온. 본원에서 "화합물 13"이라고 한다.

[0178] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (16)의 화합물이다.

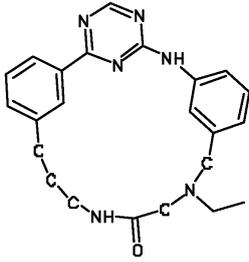
[0179] [화학식 (16)]



[0180] : 10-클로로-14-에틸-3,5,7,14,17,22,27-헵타아자테트라사이클로 [19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온. 본원에서 "화합물 14"라고 한다.

[0181] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (17)의 화합물이다.

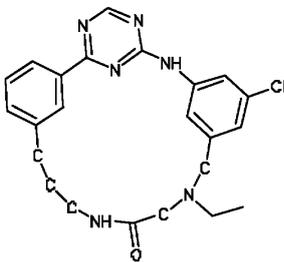
[0182] [화학식 (17)]



[0183] : 14-에틸-3,5,7,14,17,27-헥사아자테트라사이클로[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온. 본원에서 "화합물 15"라고 한다.

[0184] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (18)의 화합물이다.

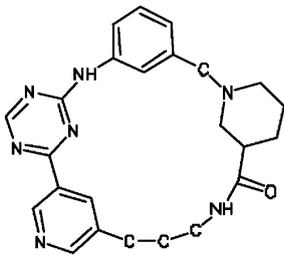
[0185] [화학식 (18)]



[0186] : 10-클로로-14-에틸-3,5,7,14,17,27-헥사아자테트라사이클로[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온. 본원에서 "화합물 16"이라고 한다.

[0187] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (19)의 화합물이다.

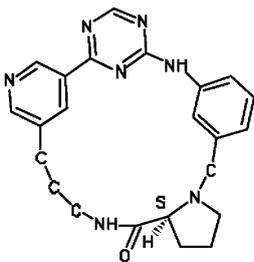
[0188] [화학식 (19)]



[0189] : 3,5,7,14,20,26,31-헵타아자펜타사이클로[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.1~14,18~]헨트라이아콘타-1(28),2(31),3,5,8(30),9,11,24,26-노나엔-19-온. 본원에서 "화합물 17"이라고 한다.

[0190] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (20)의 화합물이다.

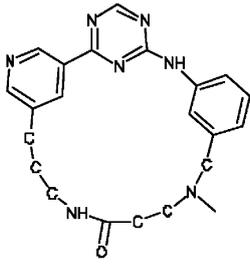
[0191] [화학식 (20)]



[0192] : (18S)-3,5,7,14,20,26,30-헵타아자펜타사이클로[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.0~14,18~]트라이아콘타-1(28),2(30),3,5,8(29),9,11,24,26-노나엔-19-온. 본원에서 "화합물 18"이라고 한다.

[0193] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트라이아진은 화학식 (21)의 화합물이다.

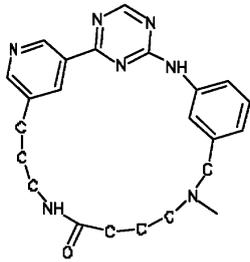
[0194] [화학식 (21)]



[0195] : 14-메틸-3,5,7,14,18,24,28-헵타아자테트라사이클로[20.3.1.1~2,6~.1~8,12~]옥타코사-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-노나엔-17-온. 본원에서 "화합물 19"라고 한다.

[0196] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (22)의 화합물이다.

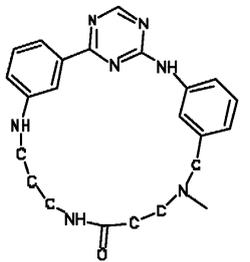
[0197] [화학식 (22)]



[0198] : 14-메틸-3,5,7,14,19,25,29-헵타아자테트라사이클로[21.3.1.1~2,6~.1~8,12~]노나코사-1(27),2(29),3,5,8(28),9,11,23,25-노나엔-18-온. 본원에서 "화합물 20"이라고 한다.

[0199] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (23)의 화합물이다.

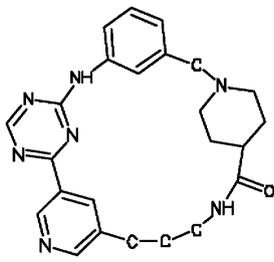
[0200] [화학식 (23)]



[0201] : 14-메틸-3,5,7,14,18,22,29-헵타아자테트라사이클로[21.3.1.1~2,6~.1~8,12~]노나코사-1(27),2(29),3,5,8(28),9,11,23,25-노나엔-17-온. 본원에서 "화합물 21"이라고 한다.

[0202] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (24)의 화합물이다.

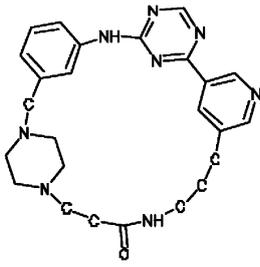
[0203] [화학식 (24)]



[0204] : 1,8,10,12,16,22,30-헵타아자펜타사이클로[22.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]헨트라이아콘타-3(31),4,6,9(30),10,12,14(29),15,17-노나엔-23-온. 본원에서 "화합물 22"라고 한다.

[0205] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (25)의 화합물이다.

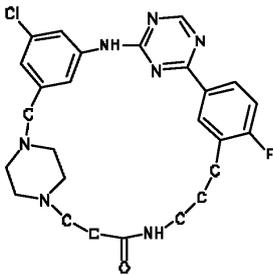
[0206] [화학식 (25)]



[0207] : 1,8,10,12,16,22,26,32-옥타아자펜타사이클로[24.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]트라이트리아콘타-3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17-노나엔-23-온. 본원에서 "화합물 23"이라고 한다.

[0208] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (26)의 화합물이다.

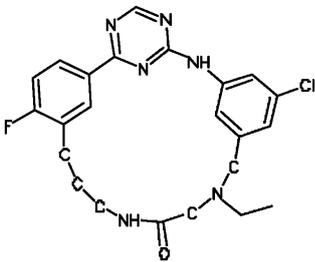
[0209] [화학식 (26)]



[0210] : 5-클로로-17-플루오로-1,8,10,12,22,26,32-헵타아자펜타사이클로[24.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]트라이트리아콘타-3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17-노나엔-23-온. 본원에서 "화합물 24"라고 한다.

[0211] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (27)의 화합물이다.

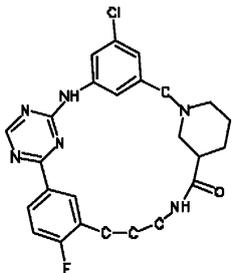
[0212] [화학식 (27)]



[0213] : 10-클로로-14-에틸-22-플루오로-3,5,7,14,17,27-헥사아자테트라사이클로[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온. 본원에서 "화합물 25"라고 한다.

[0214] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (28)의 화합물이다.

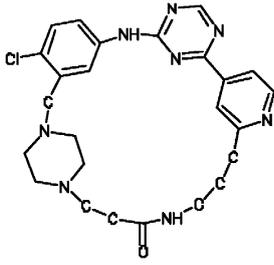
[0215] [화학식 (28)]



[0216] : 10-클로로-25-플루오로-3,5,7,14,20,31-헥사아자펜타사이클로[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.1~14,18~]헵트리아콘타-1(28),2(31),3,5,8(30),9,11,24,26-노나엔-19-온. 본원에서 "화합물 26"이라고 한다.

[0217] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (29)의 화합물이다.

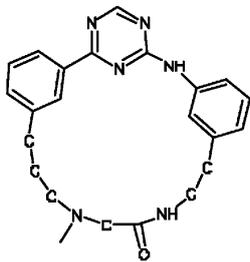
[0218] [화학식 (29)]



[0219] : 4-클로로-1,8,10,12,17,22,26,32-옥타아자펜타사이클로 [24.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]트라이트라이아콘타-3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17-노나엔-23-온. 본원에서 "화합물 27"이라고 한다.

[0220] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (30)의 화합물이다.

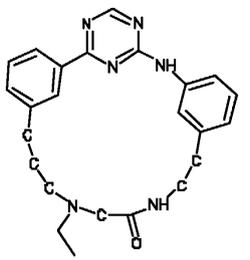
[0221] [화학식 (30)]



[0222] : 18-메틸-3,5,7,15,18,28-헥사아자테트라사이클로[20.3.1.1~2,6~.1~8,12~]옥타코사-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-노나엔-16-온. 본원에서 "화합물 28"이라고 한다.

[0223] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (31)의 화합물이다.

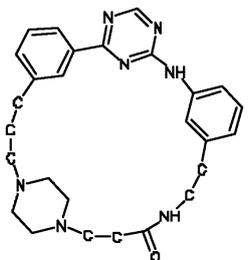
[0224] [화학식 (31)]



[0225] : 18-에틸-3,5,7,15,18,28-헥사아자테트라사이클로[20.3.1.1~2,6~.1~8,12~]옥타코사-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-노나엔-16-온. 본원에서 "화합물 29"라고 한다.

[0226] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (32)의 화합물이다.

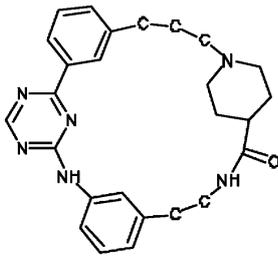
[0227] [화학식 (32)]



[0228] : 1,8,10,12,17,19,23,27,33-노나아자펜타사이클로[25.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]테트라트라이아콘타-3(34),4,6,9(33),10,12,14(32),15,17-노나엔-24-온. 본원에서 "화합물 30"이라고 한다.

[0229] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (33)의 화합물이다.

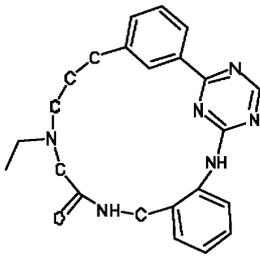
[0230] [화학식 (33)]



[0231] : 1, 11, 13, 15, 23, 31-헥사아자펜타사이클로[23.2.2.1~5,9~.1~10,14~.1~16,20~]도트라
이아콘타-5(32), 6, 8, 10(31), 11, 13, 16(30), 17, 19-노나엔-24-온. 본원에서 "화합물 31"이라고 한다.

[0232] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (34)의 화합물이다.

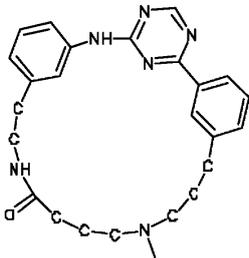
[0233] [화학식 (34)]



[0234] : 15-에틸-13, 14, 15, 16, 18, 19-헥사하이드로-1H-6,2-(아제노)-7,11-(메테노)-
1,3,5,15,18-벤조펜타아자사이클로헥시코신-17(12H)-온. 본원에서 "화합물 32"라고 한다.

[0235] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (35)의 화합물이다.

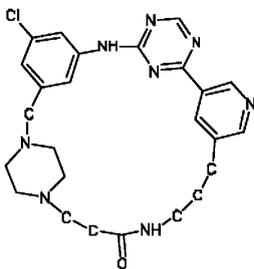
[0236] [화학식 (35)]



[0237] : 20-메틸-3, 5, 7, 15, 20, 30-헥사아자테트라사이클로[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~]트리아콘
타-1(28), 2(30), 3, 5, 8(29), 9, 11, 24, 26-노나엔-16-온. 본원에서 "화합물 33"이라고 한다.

[0238] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (36)의 화합물이다.

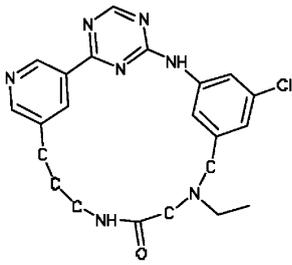
[0239] [화학식 (36)]



[0240] : 5-클로로-1, 8, 10, 12, 16, 22, 26, 32-옥타아자펜타사이클로
[24.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]트라이트리아콘타-3(33), 4, 6, 9(32), 10, 12, 14(31), 15, 17-노나엔-23-온. 본
원에서 "화합물 34"라고 한다.

[0241] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (37)의 화합물이다.

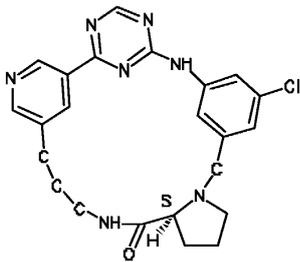
[0242] [화학식 (37)]



[0243] : 10-클로로-14-에틸-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로 [19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온. 본원에서 "화합물 35"라고 한다.

[0244] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (38)의 화합물이다.

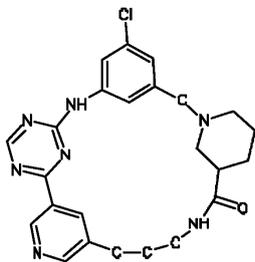
[0245] [화학식 (38)]



[0246] : (18S)-10-클로로-3,5,7,14,20,26,30-헵타아자펜타사이클로 [22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.0~14,18~]트리아콘타-1(28),2(30),3,5,8(29),9,11,24,26-노나엔-19-온. 본원에서 "화합물 36"이라고 한다.

[0247] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (39)의 화합물이다.

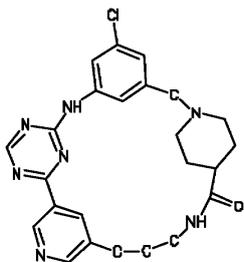
[0248] [화학식 (39)]



[0249] : 10-클로로-3,5,7,14,20,26,31-헵타아자펜타사이클로 [22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.1~14,18~]헥트리아콘타-1(28),2(31),3,5,8(30),9,11,24,26-노나엔-19-온. 본원에서 "화합물 37"이라고 한다.

[0250] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (40)의 화합물이다.

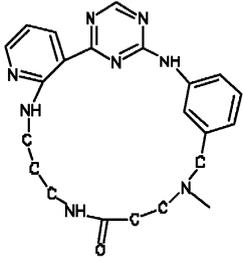
[0251] [화학식 (40)]



[0252] : 5-클로로-1,8,10,12,16,22,30-헵타아자펜타사이클로 [22.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]헥트리아콘타-3(31),4,6,9(30),10,12,14(29),15,17-노나엔-23-온. 본원에서 "화합물 38"이라고 한다.

[0253] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (41)의 화합물이다.

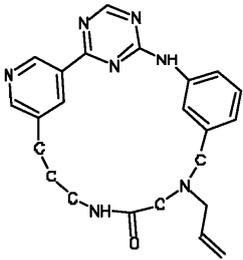
[0254] [화학식 (41)]



[0255] : 9-메틸-2,3,4,5,7,8,9,10-옥타하이드로-16H-17,21-(아제노)-11,15-(메테노)피리도[3,2-g][1,3,5,9,13,17]헥사아자사이클로트라이코신-6(1H)-온. 본원에서 "화합물 39"라고 한다.

[0256] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리도노트리아진은 화학식 (42)의 화합물이다.

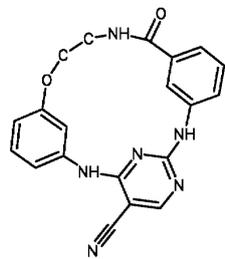
[0257] [화학식 (42)]



[0258] : 14-프로프-2-엔-1-일-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로[19.3.1.1-2,6-.1-8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온. 본원에서 "화합물 40"이라고 한다.

[0259] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리도노트리아진은 화학식 (43)의 화합물이다.

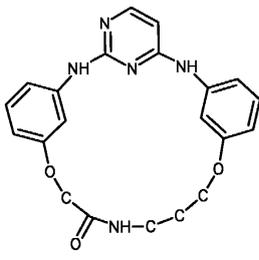
[0260] [화학식 (43)]



[0261] : 18-옥소-14-옥사-2,4,8,17,25-펜타아자테트라사이클로[17.3.1.1-3,7-.1-9,13~]펜타코사-1(23),3(25),4,6,9(24),10,12,19,21-노나엔-6-카르보니트릴. 본원에서 "화합물 41"이라고 한다.

[0262] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리도노트리아진은 화학식 (44)의 화합물이다.

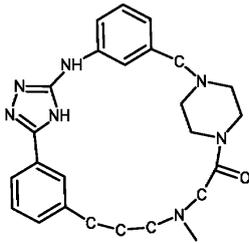
[0263] [화학식 (44)]



[0264] : 14,21-다이옥사-2,4,8,18,28-펜타아자테트라사이클로[20.3.1.1-3,7-.1-9,13~]옥타코사-1(26),3(28),4,6,9(27),10,12,22,24-노나엔-19-온. 본원에서 "화합물 42"라고 한다.

[0265] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리도노트리아진은 화학식 (45)의 화합물이다.

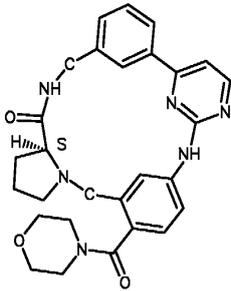
[0266] [화학식 (45)]



[0267] : 21-메틸-1,8,10,11,21,24,30-헵타아자펜타사이클로 [22.2.2.1~3,7~.1~9,12~.1~13,17~]헨트라이아콘타-3(31),4,6,9,11,13(29),14,16-옥탄-23-온. 본원에서 "화합물 43"이라고 한다.

[0268] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (46)의 화합물이다.

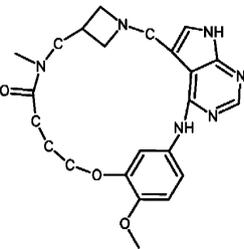
[0269] [화학식 (46)]



[0270] : (18S)-11-(모르폴린-4-일카르보닐)-5,7,14,20,28-펜타아자펜타사이클로 [20.3.1.1~2,6~.1~8,12~.0~14,18~]옥타코사-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-노나엔-19-온. 본원에서 "화합물 44"라고 한다.

[0271] 한 실시 양태에서, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진은 화학식 (47)의 화합물이다.

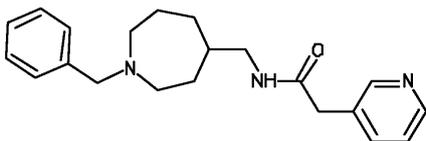
[0272] [화학식 (47)]



[0273] : 10-메톡시-17-메틸-2,14,15,17,18,19,20,22-옥타하이드로-6H-19,21-메타노-7,11-(메테노)-12-옥사-2,3,5,6,17,21-헥사아자사이클로코사[1,2,3-cd]인텐-16(13H)-온. 본원에서 "화합물 45"라고 한다.

[0274] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (48)의 화합물이다:

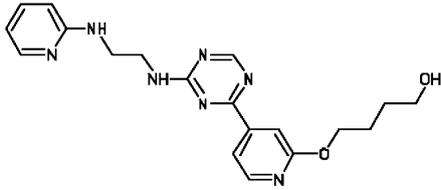
[0275] [화학식 (48)]



[0276] . N-{[1-(페닐메틸)아제판-4-일]메틸}-2-피리딘-3-일아세트아미드. 본원에서 "화합물 46"이라고 한다.

[0277] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (49)의 화합물이다:

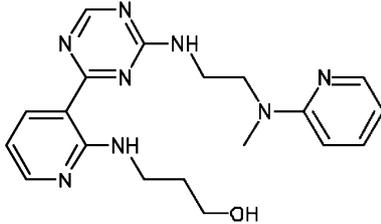
[0278] [화학식 (49)]



[0279] . 4-([4-(4-([2-(피리딘-2-일아미노)에틸]아미노)-1,3,5-트리아진-2-일)피리딘-2-일]옥시)부탄-1-올. 본원에서 "화합물 47"이라고 한다.

[0280] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (50)의 화합물이다:

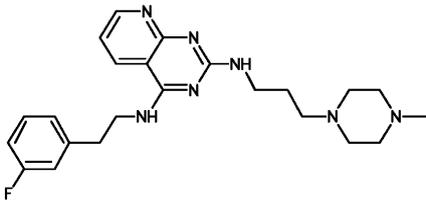
[0281] [화학식 (50)]



[0282] . 3-([3-[4-([2-[메틸(피리딘-2-일)아미노]에틸]아미노)-1,3,5-트리아진-2-일]피리딘-2-일]아미노)프로판-1-올. 본원에서 "화합물 48"이라고 한다.

[0283] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (51)의 화합물이다:

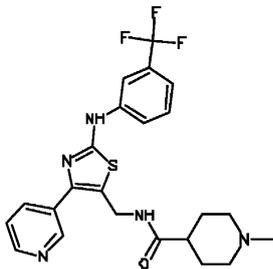
[0284] [화학식 (51)]



[0285] . N-4-[2-(3-플루오로페닐)에틸]-N-2-[3-(4-메틸피페라진-1-일)프로필]피리도[2,3-d]피리미딘-2,4-다이아민. 본원에서 "화합물 49"라고 한다.

[0286] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (52)의 화합물이다:

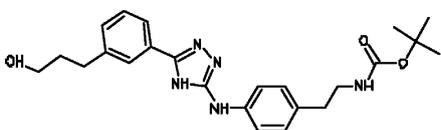
[0287] [화학식 (52)]



[0288] . 1-메틸-N-[(4-피리딘-3-일-2-([3-(트리플루오로메틸)페닐]아미노)-1,3-티아졸-5-일)메틸]피페리딘-4-카르복사미드. 본원에서 "화합물 50"이라고 한다.

[0289] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (53)의 화합물이다:

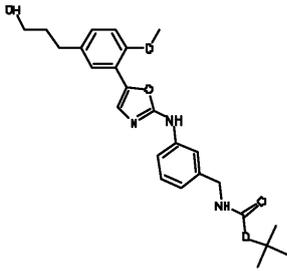
[0290] [화학식 (53)]



[0291] . 1,1-다이메틸에틸 {2-[4-([5-[3-(3-하이드록시프로필)페닐]-4H-1,2,4-트리아졸-3-일]아미노)페닐]에틸}카르바메이트. 본원에서 "화합물 51"이라고 한다.

[0292] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (54)의 화합물이다:

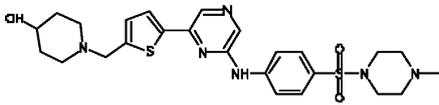
[0293] [화학식 (54)]



[0294] . 1,1-다이메틸에틸 {[3-({5-[5-(3-하이드록시프로필)-2-(메틸옥시)페닐]-1,3-옥사졸-2-일}아미노)페닐]메틸}카르바메이트. 본원에서 "화합물 52"라고 한다.

[0295] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (55)의 화합물이다:

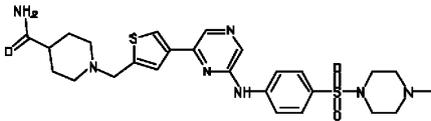
[0296] [화학식 (55)]



[0297] . 1-({5-[6-({4-[(4-메틸피페라진-1-일)설포닐]페닐}아미노)피라진-2-일]티오펜-2-일}메틸)피페리딘-4-올. 본원에서 "화합물 53"이라고 한다.

[0298] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (56)의 화합물이다:

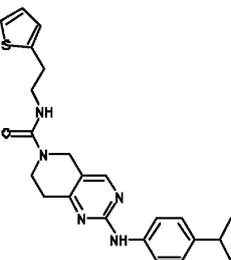
[0299] [화학식 (56)]



[0300] . 1-({4-[6-({4-[(4-메틸피페라진-1-일)설포닐]페닐}아미노)피라진-2-일]티오펜-2-일}메틸)피페리딘-4-카르복사미드. 본원에서 "화합물 54"라고 한다.

[0301] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (57)의 화합물이다:

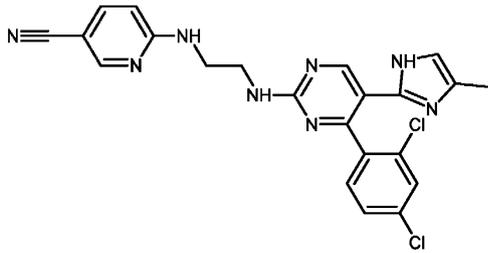
[0302] [화학식 (57)]



[0303] . 2-{{4-(1-메틸에틸)페닐}아미노}-N-(2-티오펜-2-일에틸)-7,8-다이하이드로피리도[4,3-d]피리미딘-6(5H)-카르복사미드. 본원에서 "화합물 55"라고 한다.

[0304] 한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (58)의 화합물이다:

[0305] [화학식 (58)]



[0306]

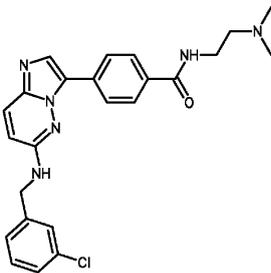
6-[(2-{{[4-(2,4-다이클로로페닐)-5-(4-메틸-1H-이미다졸-2-일)피리미딘-2-일]아미노}에틸}아미노]피리딘-3-카르보니트릴. 본원에서 "화합물 56"이라고 한다.

[0307]

한 실시 양태에서, 적어도 하나의 다른 인자는 화학식 (59)의 화합물이다:

[0308]

[화학식 (59)]



[0309]

4-(6-{{[(3-클로로페닐)메틸]아미노}이미다조[1,2-b]피리다진-3-일]-N-[2-(다이메틸아미노)에틸]벤즈아미드. 본원에서 "화합물 57"이라고 한다.

[0310]

완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 검출

[0311]

완성 내배엽 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포의 형성은 특정 프로토콜을 이행하기 전후에 마커의 존재에 대해 시험함으로써 결정될 수 있다. 만능성 줄기 세포는 전형적으로 그러한 마커를 발현하지 않는다. 따라서, 만능성 세포의 분화는 세포가 그들을 발현하기 시작할 때에 검출된다.

[0312]

분화 효율은 완성 내배엽 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포에 의해 발현되는 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 제제 (예를 들어, 항체)에 처리 세포 집단을 노출시킴으로써 결정될 수 있다.

[0313]

배양되거나 단리된 세포에서 단백질 및 핵산 마커의 발현을 평가하는 방법은 당업계에서의 표준이다. 이들은 정량적 역전사효소 폴리머라아제 연쇄 반응(RT-PCR), 노던 블롯(Northern blots), 원위치 혼성화(예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds. 2001 supplement)] 참고), 및 면역분석, 예를 들어, 단면(sectioned) 재료의 면역조직화학적 분석, 웨스턴 블롯팅(Western blotting), 및 온전한 상태의 세포에서 접근가능한 마커의 경우, 유세포분석(유세포분석 분석, FACS) (예를 들어, 문헌[Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)] 참고)을 포함한다.

[0314]

예를 들어, 만능성 줄기 세포의 특징은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 만능성 줄기 세포의 추가 특징은 계속 확인되고 있다. 만능 줄기 세포 마커는 예를 들어, ABCG2, 크립토(cripto), FOXD3, 코넥신43, 코넥신45, OCT4, SOX2, 나노그, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra1-60, 또는 Tra1-81 중 하나 이상의 발현을 포함한다.

[0315]

만능성 줄기 세포를 본 발명의 방법으로 처리한 후, 분화된 세포는 완성 내배엽 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포에 의해 발현된 CXCR4와 같은 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 제제 (예를 들어, 항체)에 처리 세포 집단을 노출시켜 정제할 수 있다.

[0316]

취장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성

[0317]

완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 당업계의 임의의 방법에 의해 또는 본 발명에서 제안된 임의의 방법에 의해 취장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.

[0318]

예를 들어, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 문헌[D'Amour *et al.*, Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006)]에 개시된 방법에 따라 취장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될

수 있다.

- [0319] 예를 들어, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 섬유아세포 성장 인자 및 헤지호그 시그널링 경로 억제제 KAAD-사이클로파민으로 처리하고, 이어서 섬유아세포 성장 인자 및 KAAD-사이클로파민을 함유하는 배지를 제거하고, 그 후 세포를 레틴산, 섬유아세포 성장 인자 및 KAAD-사이클로파민을 함유하는 배지에서 배양함으로써, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다. 이 방법의 예는 문헌[Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006)]에 개시된다.
- [0320] 본 발명의 일 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는, 라이프스캔 인크에 허여된, 미국 특허 출원 제11/736,908호에 개시된 방법에 따라, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 레틴산 및 적어도 하나의 섬유아세포 성장 인자로 소정 기간 동안 처리함으로써, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.
- [0321] 본 발명의 일 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는, 라이프스캔 인크에 허여된, 미국 특허 출원 제11/736,908호에 개시된 방법에 따라, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 레틴산 및 적어도 하나의 섬유아세포 성장 인자로 소정 기간 동안 처리함으로써, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.
- [0322] 본 발명의 한 측면에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 추가로, 미국 특허 출원 일련 번호 제 60/990,529 호에서 개시된 방법에 따라 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 처리함으로써, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0323] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성을 향상시킬 수 있는 적어도 하나의 다른 추가 인자로 처리될 수 있다. 대안적으로, 적어도 하나의 다른 추가 인자는 본 발명의 방법에 의해 형성된 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 증식을 향상시킬 수 있다. 추가로, 적어도 하나의 다른 추가 인자는 본 발명의 방법에 의해 형성된 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포가 다른 세포 유형을 형성하는 능력을 향상시키거나, 또는 임의의 다른 추가의 분화 단계의 효율을 개선할 수 있다.
- [0324] 적어도 하나의 추가의 인자는 예를 들어, 니코틴아미드, TGF- β 패밀리의 구성원(TGF- β 1, 2, 및 3 포함), 혈청 알부민, 섬유아세포 성장 인자 패밀리의 구성원, 혈소판-유도 성장 인자-AA, 및 -BB, 혈소판 풍부 혈장, 인슐린 성장 인자 (IGF-I, II), 성장 분화 인자 (예를 들어, GDF-5, -6, -8, -10, -11), 글루카곤 유사 펩티드-I 및 II (GLP-I 및 II), GLP-1 및 GLP-2 미메토타디, 엑센딘-4, 레틴산, 부갑상선 호르몬, 인슐린, 프로게스테론, 아프로티닌, 하이드로코티손, 에탄올아민, 베타 머캅토에탄올, 표피 성장 인자 (EGF), 개스트린 I 및 II, 구리 킬레이트화제, 예를 들어, 트라이에틸렌 펜타민, 포스콜린, Na-부티레이트, 액티빈, 베타셀룰린, ITS, 노긴, 신경 돌기 성장 인자, 노달, 발프로산, 트라이코스타틴 A, 나트륨 부티레이트, 간세포 성장 인자 (HGF), 스펅고신-1, VEGF, MG132 (EMD, CA), N2 및 B27 보충제 (Gibco, CA), 스테로이드 알칼로이드, 예를 들어, 사이클로파민 (EMD, CA), 케라틴세포 성장 인자 (KGF), 덕코프 단백질 패밀리를, 소 뇌하수체 추출물, 이자 신생-관련 단백질 (INGAP), 인디안 헤지호그, 소닉 헤지호그, 프로테아좀 억제제, 노치 경로 억제제, 소닉 헤지호그 억제제, 또는 그의 조합일 수 있다.
- [0325] 적어도 하나의 다른 추가 인자는 췌장 세포주, 예를 들어, PANC-1 (ATCC 번호: CRL-1469), CAPAN-1 (ATCC 번호: HTB-79), BxPC-3 (ATCC 번호: CRL-1687), HPAF-II (ATCC 번호: CRL-1997), 간 세포주, 예를 들어, HepG2 (ATCC 번호: HTB-8065), 및 장 세포주, 예를 들어, FHs 74 (ATCC 번호: CCL-241)로부터 얻은 조절된 배지에 의해 공급될 수 있다.
- [0326] 췌장 내배엽 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포의 검출
- [0327] 췌장 내배엽 계통의 특징을 나타내는 마커는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 췌장 내배엽 계통의 특징을 나타내는 추가의 마커는 계속 확인되고 있다. 이들 마커는 본 발명에 따라 처리된 세포가 분화하여, 췌장 내배엽 계통의 특징을 나타내는 특성을 획득한 것을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 췌장 내배엽 계통 특이적 마커는 예를 들어, H1xb9, PTF-1a, PDX-1, HNF-6, HNF-1베타와 같은 하나 이상의 전사 인자의 발현을 포함한다.
- [0328] 분화 효율은 췌장 내배엽 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포에 의해 발현되는 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 제제 (예를 들어, 항체)에 처리 세포 집단을 노출시킴으로써 결정할 수 있다.

- [0329] 배양되거나 단리된 세포에서 단백질 및 핵산 마커의 발현을 평가하는 방법은 당업계에서의 표준이다. 이들은 정량적 역전사효소 폴리머라아제 연쇄 반응(RT-PCR), 노던 블롯, 원위치 혼성화(예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds. 2001 supplement)] 참고), 및 면역분석, 예를 들어, 단면 재료의 면역조직화학적 분석, 웨스턴 블롯팅, 및 온전한 상태의 세포에서 접근가능한 마커의 경우, 유세포 분석(FACS) (예를 들어, 문헌[Harlow 및 Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)] 참고)을 포함한다.
- [0330] 췌장 내분비 계통의 마커를 발현하는 세포의 형성
- [0331] 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 당업계의 임의의 방법에 의해 또는 본 발명에서 개시된 임의의 방법에 의해 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0332] 예를 들어, 췌장 내분비 계통의 마커를 발현하는 세포는 문헌[D'Amour *et al*, Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006)]에 개시된 방법에 따라 췌장 내분비 계통의 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0333] 예를 들어, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 DAPT 및 엑센딘 4를 함유하는 배지에서 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 배양하고, 이어서 DAPT와 엑센딘 4를 함유하는 배지를 제거하고, 그 후 엑센딘 1, IGF-1 및 HGF를 함유하는 배지에서 상기 세포를 배양함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다. 이 방법의 예는 문헌[Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006)]에 개시된다.
- [0334] 예를 들어, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 엑센딘 4를 함유하는 배지에서 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 배양하고, 이어서 엑센딘 4를 함유하는 배지를 제거하고, 그 후 엑센딘 1, IGF-1 및 HGF를 함유하는 배지에서 상기 세포를 배양함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다. 이러한 방법의 한 예는 문헌[D' Amour *et al*, Nature Biotechnology, 2006]에 개시된다.
- [0335] 예를 들어, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 DAPT 및 엑센딘 4를 함유하는 배지에서 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 배양함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다. 이러한 방법의 한 예는 문헌[D' Amour *et al*, Nature Biotechnology, 2006]에 개시된다.
- [0336] 예를 들어, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 엑센딘 4를 함유하는 배지에서 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 배양함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다. 이러한 방법의 한 예는 문헌[D' Amour *et al*, Nature Biotechnology, 2006]에 개시된다.
- [0337] 본 발명의 일 태양에서, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 라이프스캔 인크에 허여된 미국 특허 출원 제11/736,908호에 개시된 방법에 따라 노치 시그널링 경로를 억제하는 인자로 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 처리함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.
- [0338] 본 발명의 일 태양에서, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 라이프스캔 인크에 허여된 미국 특허 출원 제11/736,908호에 개시된 방법에 따라 노치 시그널링 경로를 억제하는 인자로 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 처리함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.
- [0339] 본 발명의 일 태양에서, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 라이프스캔 인크에 허여된 미국 특허 출원 제11/736,908호에 개시된 방법에 따라 노치 시그널링 경로를 억제하는 인자로 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 처리함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.
- [0340] 본 발명의 한 측면에서, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 추가로, 미국 특허 출원 일련 번호 제60/990,529호에서 개시된 방법에 따라 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 처리함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화된다.
- [0341] 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성을 향상시킬 수 있는 적어도 하나의 다른 추가 인자로 처리될 수 있다. 대안적으로, 적어도 하나의 다른 추가 인자는 본 발명의 방법에 의해 형성된 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 증식을 향상시

킬 수 있다. 추가로, 적어도 하나의 다른 추가의 인자는 다른 세포 유형을 형성하거나 임의의 다른 추가의 분화 단계의 효능을 향상시키는, 본 발명의 방법에 의해 형성되는 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 능력을 증진시킬 수 있다.

[0342] 적어도 하나의 추가의 인자는 예를 들어, 니코틴아미드, TGF- β 패밀리의 구성원(TGF- β 1, 2, 및 3 포함), 혈청 알부민, 섬유아세포 성장 인자 패밀리의 구성원, 혈소판-유도 성장 인자-AA, 및 -BB, 혈소판 풍부 혈장, 인슐린 성장 인자 (IGF-I, II), 성장 분화 인자 (예를 들어, GDF-5, -6, -8, -10, -11), 글루카곤 유사 펩티드-I 및 II (GLP-I 및 II), GLP-1 및 GLP-2 미메토바디, 엑센딘-4, 레틴산, 부갑상선 호르몬, 인슐린, 프로게스테론, 아프로티닌, 하이드로코티손, 에탄올아민, 베타 머캅토에탄올, 표피 성장 인자(EGF), 개스트린 I 및 II, 구리 킬레이트화제 예를 들어, 트라이에틸렌 펜타민, 포스콜린, Na-부티레이트, 액티빈, 베타셀룰린, ITS, 노킨, 신경 돌기 성장 인자, 노달, 발프로산, 트라이코스타틴 A, 나트륨 부티레이트, 간세포 성장 인자 (HGF), 스팅고신-1, VEGF, MG132 (EMD, CA), N2 및 B27 보충제 (Gibco, CA), 스테로이드 알칼로이드 예를 들어, 사이클로프라민 (EMD, CA), 케라틴세포 성장 인자 (KGF), 디코프(Dickkopf) 단백질 패밀리를, 소 뇌하수체 추출물, 이자 신생-관련 단백질 (INGAP), 인디안 헤지호그, 소뇌 헤지호그, 프로테아좀 억제제, 노치 경로 억제제, 소뇌 헤지호그 억제제, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0343] 적어도 하나의 다른 추가 인자는 췌장 세포주, 예를 들어, PANC-1 (ATCC 번호: CRL-1469), CAPAN-1 (ATCC 번호: HTB-79), BxPC-3 (ATCC 번호: CRL-1687), HPAF-II (ATCC 번호: CRL-1997), 간 세포주, 예를 들어, HepG2 (ATCC 번호: HTB-8065), 및 장 세포주, 예를 들어, FHs 74 (ATCC 번호: CCL-241)로부터 얻은 조절된 배지에 의해 공급될 수 있다.

[0344] 췌장 내분비 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포의 검출

[0345] 췌장 내분비 계통의 세포의 특징을 나타내는 마커는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 췌장 내분비 계통의 특징을 나타내는 추가의 마커는 계속 확인되고 있다. 이들 마커는 본 발명에 따라 처리된 세포가 분화하여 췌장 내분비 계통의 특징을 나타내는 특성을 획득한 것을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 췌장 내분비 계통 특정 마커는 예를 들어, NGN3, NEURO, 또는 ISL1과 같은 하나 이상의 전사 인자의 발현을 포함한다.

[0346] β 세포 계통의 세포의 특징을 나타내는 마커는 당업자에게 잘 알려져 있으며, β 세포 계통의 특징을 나타내는 추가의 마커는 계속 확인되고 있다. 이들 마커는, 본 발명에 따라 처리된 세포가 β -세포 계통의 특징적 특성을 획득하기 위해 분화되었음을 확인하는데 사용될 수 있다. β 세포 계통 특정 특징은 다른 것들 중에서도 예를 들어, PDX1, NKX2.2, NKX6.1, ISL1, PAX6, PAX4, NEUROD, HNF1 베타, HNF6, HNF3 베타, 또는 MAFA와 같은 하나 이상의 전사 인자의 발현을 포함한다. 이들 전사 인자는 내분비 세포의 확인을 위해 당업계에 잘 수립되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Edlund (Nature Reviews Genetics 3: 524-632 (2002))]을 참조한다.

[0347] 분화 효율은 췌장 내분비 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포에 의해 발현되는 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 제제 (예를 들어, 항체)에 처리 세포 집단을 노출시킴으로써 결정할 수 있다. 대안적으로, 분화 효율은 β 세포 계통의 특징을 나타내는 마커를 발현하는 세포에 의해 발현되는 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 제제 (예를 들어, 항체)에 처리 세포 집단을 노출시킴으로써 결정할 수 있다.

[0348] 배양되거나 단리된 세포에서 단백질 및 핵산 마커의 발현을 평가하는 방법은 당업계에서의 표준이다. 이들은 정량적 역전사효소 폴리머라아제 연쇄 반응(RT-PCR), 노던 블롯, 원위치 혼성화(예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds. 2001 supplement)] 참고), 및 면역분석, 예를 들어, 단면(sectioned) 재료의 면역조직화학적 분석, 웨스턴 블롯팅, 및 온전한 상태의 세포에서 접근가능한 마커의 경우, 유세포분석(FACS) (예를 들어, 문헌[Harlow 및 Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)] 참고)을 포함한다.

[0349] 본 발명의 일 태양에서, 분화 효율은 처리 이후의 주어진 세포 배양물 중 인슐린 양성 세포의 백분율을 측정함으로써 결정된다. 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 100% 인슐린 양성 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 90% 인슐린 양성 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 80% 인슐린 양성 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 70% 인슐린 양성 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 60% 인슐린 양성 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 50% 인슐린 양성 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 40% 인슐린 양성 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 30% 인슐린 양

성 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 20% 인슐린 양성 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 10% 인슐린 양성 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 주어진 배양물 중 약 5% 인슐린 양성 세포를 생성한다.

[0350] 본 발명의 일 태양에서, 분화 효율은 세포에 의해 분비된 C-펩티드의 양을 측정함으로써 검출되는 바와 같이, 포도당-자극된 인슐린 분비를 측정함으로써 결정된다. 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 1000 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 900 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 800 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 700 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 600 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 500 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 400 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 500 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 400 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 300 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 200 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 100 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 90 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 80 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 70 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 60 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 50 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 40 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 30 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 20 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포는 약 10 ng C-펩티드/pg DNA를 생성한다.

[0351] 치료법

[0352] 일 태양에서, 본 발명은 제I형 당뇨병을 앓고 있거나 상기 당뇨병이 발병될 위험이 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 만능 줄기 세포를 배양하는 단계, 만능 줄기 세포를 시험관 내에서 β-세포 계통으로 분화시키는 단계, 및 β-세포 계통의 세포를 환자 내로 이식하는 단계를 포함한다.

[0353] 또 다른 태양에서, 본 발명은 제2형 당뇨병을 앓고 있거나, 상기 당뇨병이 발병될 위험이 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 만능 줄기 세포를 배양하는 단계, 배양된 세포를 시험관 내에서 β-세포 계통으로 분화시키는 단계, 및 β-세포 계통의 세포를 환자 내로 이식하는 단계를 포함한다.

[0354] 적절하다면, 환자는 이식된 세포의 생존과 기능을 촉진하는 약학 제제 또는 생물활성제로 추가로 처리될 수 있다. 이러한 제제는 예를 들어, 인슐린, 다른 것들 중에서도, TGF-β1, 2, 및 3을 포함한 TGF-β 패밀리를 포함하는 단백질 (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, 및 -13), 섬유아세포 성장 인자-1 및 -2, 혈소판-유도 성장 인자-AA, 및 -BB, 혈소판 풍부 혈장, 인슐린 성장 인자 (IGF-I, II) 성장 분화 인자 (예를 들어, GDF-5, -6, -7, -8, -10, -15), 혈관 내피 세포-유도 성장 인자 (VEGF), 플라이오트로핀, 엔도텔린을 포함할 수 있다. 다른 약학적 화합물은 예를 들어, 니코틴아미드, 글루카곤 유사 펩티드-I (GLP-1) 및 II, GLP-1 및 -2 미메티바디, 엑센딘-4, 레틴산, 부갑상선 호르몬, MAPK 억제제, 예를 들어, 미국 공보 2004/0209901 및 미국 공보 2004/0132729에 개시된 화합물을 포함할 수 있다.

[0355] 만능 줄기 세포는 수령체 내로 이식하기 전에 인슐린-생성 세포로 분화될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 만능 줄기 세포는 수여자에게 이식되기 전에 β-세포로 완전히 분화된다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는 미분화 또는 부분 분화 상태로 수령체 내로 이식될 수 있다. 추가 분화는 수령체 내에서 일어날 수 있다.

[0356] 완성 내배엽 세포 또는 대안적으로, 척장 내배엽 세포, 또는 대안적으로, β 세포는 분산된 세포로서 이식되거나, 또는 간문맥내로 주입될 수 있는 클러스터로 형성될 수 있다. 대안적으로, 세포는 생체적합성 분해성 중합체 지지체, 다공성 비분해성 장치로 제공되거나 또는 피막화되어 숙주 면역 반응으로부터 보호될 수 있다. 세포는 수령체에서 적절한 부위 내로 이식될 수 있다. 이식 부위는 예를 들어, 간, 천연 척장, 신장 피막하 공간, 장막, 복막, 장막하 공간, 장, 위, 또는 피하 주머니를 포함한다.

- [0357] 추가 분화, 이식된 세포의 생존 또는 활성을 향상시키기 위하여, 성장 인자, 산화방지제 또는 항염증제와 같은 추가 인자를 세포의 투여 전에, 세포의 투여와 동시에, 또는 세포의 투여 후에 투여할 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 성장 인자는 생체 내에서 투여된 세포를 분화시키기 위해 사용된다. 이들 인자는 내인성 세포에 의해 분비되어 원위지에서 투여된 세포에 노출될 수 있다. 이식된 세포는 내부 및 외부 투여된 당업계에 알려진 성장 인자의 임의의 조합에 의해 분화되도록 유도될 수 있다.
- [0358] 이식에 사용되는 세포의 양은 환자의 상태 및 치료에 대한 반응을 포함한 많은 다양한 인자에 좌우되고, 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0359] 일 태양에서 본 발명은 당뇨병을 앓고 있거나 상기 당뇨병이 발병될 위험이 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 만능 줄기 세포를 배양하는 단계, 시험관 내에서 배양된 세포를 β -세포 계통으로 분화시키는 단계, 및 세포를 3차원 지지체 내로 혼입하는 단계를 포함한다. 세포는 환자 내로 이식되기 전에 이 지지체 상에서 시험관 내에서 유지될 수 있다. 대안적으로, 세포를 함유한 지지체는 추가의 시험관 내 배양 없이 환자에게 직접 이식될 수 있다. 지지체에는 이식된 세포의 생존과 기능을 촉진하는 적어도 하나의 약학 제제가 선택적으로 혼입될 수 있다.
- [0360] 본 발명의 목적을 위해 사용하기에 적합한 지지체 물질은 조직 복구에 유용한 조직 주형, 도관, 장벽, 및 저장 부를 포함한다. 구체적으로, 생물학적 조직을 재구성하거나 재생시키기 위해서뿐만 아니라 조직 성장을 유도하기 위한 주화성 제제를 전달하기 위해 시험관 내 및 생체 내에서 사용된 폼, 스펀지, 젤, 하이드로젤, 직물, 및 부식 구조체 형태의 합성 및 천연 물질이 본 발명의 방법의 실시에서 사용하기에 적합하다. 예를 들어, 미국 특허 제5,770,417호, 미국 특허 제6,022,743호, 미국 특허 제5,567,612호, 미국 특허 제5,759,830호, 미국 특허 제6,626,950호, 미국 특허 제6,534,084호, 미국 특허 제6,306,424호, 미국 특허 제6,365,149호, 미국 특허 제6,599,323호, 미국 특허 제6,656,488호, 미국 특허 출원 공개 제2004/0062753 A1호, 미국 특허 제4,557,264호 및 미국 특허 제6,333,029호에 개시된 물질을 참고한다.
- [0361] 약학 제제가 혼입된 지지체를 형성하기 위하여, 약학 제제는 지지체를 형성하기 전에 중합체 용액과 혼합될 수 있다. 대안적으로, 약학 제제는 바람직하게는 약학적 단체의 존재 하에서, 제작된 지지체 상에 코팅될 수 있다. 약학 제제는 액체, 미분 고체, 또는 임의의 다른 적절한 물리적 형태로 존재할 수 있다. 대안적으로, 부형제는 약학 제제의 방출 속도를 변경하기 위하여 지지체에 첨가될 수 있다. 대안의 실시 양태에서, 지지체는 예를 들어, 미국 특허 제 6,509,369 호에 개시된 화합물과 같은 항염증 화합물인 적어도 하나의 약학적 화합물과 함께 혼입된다.
- [0362] 지지체에는 예를 들어, 미국 특허 제6,793,945호에 개시된 화합물과 같은 항-세포자살 화합물인 적어도 하나의 약학적 화합물이 혼입될 수 있다.
- [0363] 지지체에는 예를 들어, 미국 특허 제6,331,298호에 개시된 화합물과 같은 섬유증 억제제인 적어도 하나의 약학적 화합물이 또한 혼입될 수 있다.
- [0364] 지지체에는 또한 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0220393호 및 미국 특허 출원 공개 제2004/0209901호에 개시된 화합물과 같은 혈관신생을 향상시킬 수 있는 적어도 하나의 약학적 화합물이 혼입될 수 있다.
- [0365] 지지체에는 또한 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0171623호에 개시된 화합물과 같은 면역억제 화합물인 적어도 하나의 약학적 화합물이 혼입될 수 있다.
- [0366] 지지체는 또한, 예를 들어, 다른 것들 중에서도, TGF- β 1, 2, 및 3을 포함한 TGF- β 패밀리를 구성원, 골 형성 단백질 (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, 및 -13), 섬유아세포 성장 인자-1 및 -2, 혈소판-유도 성장 인자-AA, 및 -BB, 혈소판 풍부 혈장, 인슐린 성장 인자 (IGF-I, II) 성장 분화 인자 (예를 들어, GDF-5, -6, -8, -10, -15), 혈관 내피 세포-유도 성장 인자 (VEGF), 플레이오토로핀, 엔도텔린과 같은 성장 인자인 적어도 하나의 약학적 화합물과 함께 혼입될 수 있다. 다른 약학적 화합물은 예를 들어, 니코틴아미드, 저산소증 유도성 인자 1-알파, 글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1), GLP-1 및 GLP-2 미메티바디, 및 II, 엑센딘-4, 노달, 노긴, NGF, 레틴산, 부갑상선 호르몬, 테나신-C, 트로포엘라스틴, 트롬빈-유래 펩티드, 카텔리시딘, 데펜신, 라미닌, 피브로넥틴 및 비트로넥틴과 같은 부착성 세포의 매트릭스 단백질의 세포- 및 헤파린-결합 도메인을 함유한 생물학적 펩티드, MAPK 억제제, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0209901호 및 미국 특허 출원 공개 제 2004/0132729호에 개시된 화합물을 포함할 수 있다.
- [0367] 스캐폴드(scaffold) 내로 본 발명의 세포를 혼입시키는 것은 스캐폴드 상에 세포를 간단히 침적시키는 것에 의

해 성취될 수 있다. 세포는 간단한 확산에 의해 스캐폴드 내로 들어갈 수 있다 (문헌[J. Pediatr. Surg. 23 (1 Pt 2): 3-9 (1988)]). 세포 접종의 효율을 향상시키기 위하여 몇몇 다른 접근법이 개발되었다. 예를 들어, 스피너 플라스크(spinner flasks)가 폴리글리콜산 스캐폴드 상에 연골세포를 접종하는 데 사용되었다 (문헌 [Biotechnol. Prog. 14(2): 193-202 (1998)]). 세포를 접종하기 위한 다른 접근법은 원심분리를 사용하는 것이며, 이것은 접종된 세포에 대해 최소의 스트레스를 생성하며 접종 효율을 향상시킨다. 예를 들어, Yang 등은 세포 접종 방법을 개발하였다(문헌[J. Biomed. Mater. Res. 55(3): 379-86 (2001)]).

[0368] 본 발명을 하기 실시예에 의해 추가로 예시하지만 하기 실시예에 의해 한정되지는 않는다.

[0369] 실시예

[0370] 개시 내용의 명확함을 위하여, 그리고 제한하지 않고서, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용은 본 발명의 특정한 특성, 실시 형태, 또는 응용을 설명하거나 예시하는 하기 세부 항목으로 나뉘어진다.

[0371] 실시예 1

[0372] 인간 배아 줄기 세포 배양

[0373] 인간 배아 줄기 세포주 H1, H7 및 H9를 위셀 리서치 인스티튜트, 인크.(WiCell Research Institute, Inc.)(미국 위스콘신주 매디슨)로부터 입수하였으며 공급처인 상기 인스티튜트에 의해 제공된 설명서에 따라 배양하였다. 인간 배아 줄기 세포는 1:30 희석의 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (BD 바이오사이언스(BD Biosciences); Cat # 356231)로 코팅된 플레이트 상에 접종하고, 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈(R&D Systems); Cat # 233-FB)가 보충된 MEF-조건화된 배지에서 배양하였다. 매트릭셀™ 상에서 배양된 세포를 일상적으로, 콜라게네이즈 IV (인비트로젠/깁코(Invitrogen/GIBCO); Cat # 17104-019), 디스페이즈(Dispase)(인비트로젠(Invitrogen); Cat # 17105-041), 또는 리버레이즈 CI 효소(Liberase CI enzyme)(로쉐(Roche); Cat # 11814435001)를 사용해 클러스터로서 계대배양하였다. 일부 경우, 세포를 아쿠테이즈(ACCUTASE) (시그마(Sigma); Cat # A6964)를 사용해 단일 세포로서 계대배양하였다.

[0374] 이들 실시예에서 사용된 인간 배아 줄기 세포를 평균 4일마다 계대배양하면서, 미분화된, 만능 상태에서 유지시켰다. 세포 배양물을 콜라게네이즈 (1 또는 10 mg/mL; 시그마-알드리치) 용액에 37°C에서 10 내지 30분 동안 노출시키고, 이어서 파이펫 팁으로 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 중력에 의해 침강시킨 다음에, 세정하여, 잔류 콜라게나아제를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 비로 분리하거나 이후의 검정을 위해 1:1 비로 분리하였다. 모든 인간 ES 세포주를 50미만의 계대배양수로 유지하고, 정상 핵성 표현형 및 마이코플라스마 오염의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다.

[0375] 실시예 2

[0376] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성에 대한 생물검정법

[0377] 액티빈 A는 배아 줄기 세포를 완성 내배엽으로 분화시키는 것을 포함해 광범위한 세포 유형에서 분화의 중요한 매개체이다. 인간 배아 줄기 세포를 액티빈 A 및 Wnt3a의 조합물로 처리하는 경우, 완성 내배엽의 대표적인 다양한 유전자가 상향조절된다. 인간 배아 줄기 세포 내에서 이러한 분화를 측정하는 생물검정법은 스크리닝 목적용 96-웰 플레이트에 대한 소형화된 포맷으로 채택되었다. 유효 검사는 액티빈 A 및 Wnt3a 재조합 단백질의 시판의 공급원으로 처리하고, 완성 내배엽의 대표적인 마커로서 간주되는 전사 인자 SOX17의 단백질 발현을 측정하는 것을 이용해 완성되었다.

[0378] 살아있는 세포 검정법: 간략하게는, H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 콜라게네이즈(인비트로젠; Cat # 17104-019) 처리 및 부드러운 긁기를 이용해 세포를 계대배양하고, 잔여 효소를 제거하기 위해 세정하고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 96-웰 흑색 플레이트(팩카드 뷰플레이트(Packard ViewPlates); 퍼킨 엘머(Perkin Elmer); Cat #6005182) 상에서 1:1(표면적)의 비로 플레이팅하였다. 세포가 클러스터로서 부착되게 놔둔 다음, 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였고, 매일 100 μ l을 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 마우스 배아 섬유아세포 (MEF) 조건화된 배지 웰 당 공급하였다.

[0379] PBS(인비트로젠; Cat # 14190)에서 각각의 플레이트 웰을 2회 세정하고, 이어서 각각의 웰에 DMEM:F12 기본 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032) 내 시험 표본의 분취물(100 μ l)을 첨가함으로써 검정을 시작하였다. 시험 조건은 총 4-일의 검정 기간에 걸쳐 시험 표본이 든 각 웰로부터 배지를 흡인 및 교환함으로써 격일로

공급하면서, 3중으로 수행하였다. 검정 제 1 일 및 제 2 일에, 검정 웰에 첨가되는 시험 표본을 0.5% FCS(하이클론(HyClone); Cat # SH30070.03) 및 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN)가 든 DMEM:F12 내에서 희석시켰다. 검정 제 3 일 및 제 4 일에, 검정 웰에 첨가되는 시험 표본을 2% FCS는 있고 Wnt3a가 없는 DMEM:F12 내에서 희석시켰다. 양성 대조군 표본은 검정 전체에 걸쳐서 100ng/mL의 농도로 첨가된 재조합 인간 액티빈 A(펄프로텍; Cat #120-14) + 제 1 일 및 제 2 일에 Wnt3a (20ng/mL)로 이루어졌다. 음성 대조군 표본에는 액티빈 A 및 Wnt3a 둘다를 사용한 처리를 생략하였다.

[0380] 고집적 분석: 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼(Alexis Biochemical); Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488(Alexa Fluor 488) 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 멀레큘라 프로브(Molecular Probes); Cat #AZ1467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고, 이미지를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.

[0381] 이미징은 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단(dichroic)을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7(IN Cell Developer Toolbox 1.7)(GE 헬스케어(GE Healthcare)) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 SOX17 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다. 각각의 복제 세트에 대한 평균 및 표준 편차에 대하여 정규화 데이터를 계산하였다.

[0382] 도 1은 액티빈 A(펄프로텍)의 시판의 공급원의 2-배 희석 곡선을 시험하고 세포수 (도 1a) 및 SOX17 강도 (도 1b) 둘 다를 측정하여, 스크리닝 검정법의 유효 검사를 보여준다. SOX17 발현의 유도를 위한 최적의 액티빈 A 효과는 일반적으로 30-50ng/mL의 EC₅₀과 함께 100-200ng/mL 범위 내에서 관찰하였다. 검정 제 1 일 및 제 2 일째의 처리에서 Wnt3a를 제거하면, 측정가능한 SOX17 발현을 생성하지 못하였다(도 1b, 백색 막대). 액티빈 A의 부재 또한 SOX17 발현을 제공하지 못하였다(도 1b).

[0383] 실시예 3

[0384] 일차 스크리닝: 액티빈 A의 부재 하에, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 데 있어서 본 발명의 화합물의 효과

[0385] 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 것은 다시 말해 다운스트림 기질의 인산화 및 핵 전좌를 유도하고, 결과적으로 특정 표적 유전자의 발현을 조절하는 수용체 카이네이즈를 활성화시키는 일련의 수용체-리간드 상호작용을 통해 매개된다. 일부 세포 유형에서 이들 신호전달 캐스캐이드의 최적의 활성화는 반대의 디폴트 경로의 억제를 필요로 할 수 있다. 다른 경우에, 더 큰 카이네이즈 패밀리의 대안의 구성원을 수반하는 중복(redundant) 경로는 하나 이상의 신호전달 분자에 대해 부분적으로 치환될 수 있다. 다른 경우에, 정준 및 비-정준 경로는 상이한 개시 자극을 사용해 분리될 수 있으나 유사한 기능적 결과를 초래할 수 있다.

[0386] 세포-기재 기능적 스크린은 특정 세포 반응에 영향을 줄 수 있는 신규 표적 및 방법을 규명하기 위한 하나의 접근법이다. 하나의 매우 강력한 접근법은 일련의 반복적 스크린을 수반하여, 하나의 스크린으로부터의 결과 또는 히트(hit)는 후속한 스크린에 통합된다. 대안적으로, 일련의 상이한 변수는 조합적 경향으로 통합되어(예를 들어, 카이네이즈 억제제와 함께 성장 인자), 세포 분화에 대한 신규 효과를 규명한다. 이 경우, 그의 합성에서 아닐린-피리디노트리아진, 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진 및 중간체 구조물을 포함하는 소분자의 라이브러리는 인간 배아 줄기 세포의 완성 내배엽 분화 동안에 중요한 특성에 대해, 특히 저 혈청 내 그리고 성장

인자 액티빈 A의 부재 하에서, '제 1' 분화 단계의 종료 시 세포수를 유지 또는 증진시키는 효과에 대해 시험되었다.

[0387] 스크리닝 검정법

[0388] 세포 검정법 검종: 간략하게는, H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터는 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로겐; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 세포를 콜라게네이즈(인비트로겐; Cat # 17104-019) 처리 및 부드러운 굽기를 이용해 계대배양하고, 세정하여 잔여 효소를 제거하고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 96-웰 흑색 플레이트(팩카드 뷰플레이트; 퍼킨 엘머; Cat #6005182) 상에 100 μ l/웰의 부피를 사용해 1:1(표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 클러스터로서 부착되게 놔둔 다음, 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였고, 매일 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 MEF 조건화된 배지를 공급하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가슴 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0389] 화합물의 제조 및 검정: 시험되는 화합물은 96-웰 플레이트 포맷에서 5mM 스타크로서 이용가능하여 제조하였고, 100% DMSO(시그마; Cat # D2650) 에서 용해시키고, -80°C에 보관하였다. 라이브러리 화합물을 추가로, 50mM HEPES(인비트로겐; Cat # 15630-080), 20% DMSO 내 0.2mM의 중간 농도로 희석시키고, 4°C에서 보관하였다. 시험 조건을 삼중으로 수행하였고, 4일의 검정 기간에 걸쳐 격일로 공급하였다. 일차 스크리닝 검정법은 각 웰로부터 배양 배지를 흡인함으로써 시작되고, 이어서 PBS(인비트로겐; Cat # 14190)에서 3회 세정하여 잔여 성장 인자 및 혈청을 제거하였다. 검정 제 1 일에, 웰 당 200 μ l의 시험 부피를 0.5% FCS(하이클론; Cat # SH30070.03) 및 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN) + 2.5 μ M 시험 화합물이 보충된 DMEM:F12 기본 배지(인비트로겐; Cat # 11330-032)를 함유하도록 다시 첨가하였다. 검정 제 3 일에, 웰 당 200 μ l의 시험 부피를 Wnt3a는 없이 2% FCS + 2.5 μ M 시험 화합물이 보충된 DMEM:F12 기본 배지를 함유하도록 다시 첨가하였다. 양성 대조군 표본은 FCS가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였고, 이는 제 1 일 및 제 2 일에만 Wnt3a (20ng/mL)를 첨가하는 4일간의 검정 전체를 통해 시험 화합물 대신 100ng/mL 재조합 인간 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14)를 사용하였다. 음성 대조군 표본은 FCS가 보충된 DMEM:F12 기본 배지를 함유하였고, 액티빈 A를 생략한 채 제 1 일 및 제 2 일에 Wnt3a를 첨가하였다.

[0390] 고집적 분석: 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로겐; Cat # 14190)로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로겐; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 멀레큘라 프로브; Cat # AZ1467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로겐; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.

[0391] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 SOX17 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다. 각각의 복제 세트에 대한 평균 및 표준 편차에 대하여 정규화 데이터를 계산하였다.

[0392] 도 1은 시험되는 화합물에 대한 일차 스크리닝의 결과를 보여주며, 이는 액티빈 A의 부재 하에 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는데 있어서의 그의 효과를 보여준다. 결과는 세포수 및 SOX17 강도 둘 다의 정량적 측정을 포함하고, 여기서, 각각의 데이터점은 삼중 웰로부터 평균을 낸 것이고 각각의 웰에서 동일한 분야를 이용해 각각의 파라미터에 대해 분석되었다. 전사 인자 SOX17의 발

현은 완성 내배엽 분화의 지표인 것으로 간주된다. 일차 스크리닝 결과는 8개의 96-웰 스크리닝 플레이트로부터 포착되었다. 플레이트 대 플레이트 가변성은 각각의 플레이트 상에서의 개별의 양성 및 음성 대조군을 포함하여 환산되었다(reduced). 결과를 정규화하고, 양성 대조군의 %로서 표현하였다. 검정 종료 시 세포수의 유지 또는 증폭에 강조를 하였다.

[0393] 표 2는 27개의 화합물의 하위군 및 일차 스크리닝으로부터의 그의 분석된 결과를 열거하고, 여기서 이들 히트는 스크리닝 검정법에서 액티빈 A의 부재 하에도 불구하고 양성 대조군과 동일하거나 더 양호한 수준에서 세포수를 유지하는 것으로 나타났다.

[0394] 일부 경우, SOX17 발현을 액티빈 A (예를 들어, 사이클릭 아닐린-피리디노트라이아진 화합물 35 및 화합물 22의 부재 하에 유도하였다.

[0395] 표 2에 보여진 화합물은 액티빈 A의 부재 하에 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는데 있어서의 효과를 추가로 평가하기 위해 선택되었다.

[0396] 실시예 4

[0397] 이차 스크리닝: 액티빈 A의 부재 하에서 EGF/FGF4와 함께, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는데 있어서 본 발명의 화합물의 효과

[0398] 일정량의 Wnt3a를 사용한 액티빈 A의 적정 곡선은 DE 분화 동안에 적어도 2가지 효과를 보여주었다: 1) 세포수의 유지 또는 세포 상실 예방; 및 2) DE의 마커, 예를 들어, SOX17 발현의 유도(실시예 2). 실시예 3으로부터의 일차 스크리닝은 액티빈 A/Wnt3a 단독의 첨가에 대한 검정에서 유사하거나 향상된 세포수를 유지시킬 수 있는 화합물을 규명하였다. 이차 스크리닝 검정법을 수행하여, 다른 성장 인자, 특히 EGF 및 FGF4와 규명된 화합물의 조합물이 완성 내배엽의 발생에 미치는 효과를 평가하였다.

[0399] 세포 검정법 접종: H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 세포를 콜라게네이즈(인비트로젠; Cat # 17104-019) 처리 및 부드러운 굵기를 이용해 계대배양하고, 세정하여 잔여 효소를 제거하고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 96-웰 흑색 플레이트(팩카드 뷰플레이트; 퍼킨엘머; Cat #6005182) 상에 100µl/웰의 부피를 사용해 1:1(표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포는 클러스터로서 부착되게 한 다음 1일 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하고, 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 MEF-조건화된 배지를 매일 공급하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가습 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0400] 화합물 및 성장 인자의 제제: EGF (R&D 시스템즈; Cat # 236-EG) 및 FGF4 (R&D 시스템즈; Cat #235-F4)에 대한 스탁 농도는 250ng/mL이었고, 각각을 0.1% BSA(시그마; Cat # A7888)가 있는 PBS에서 용해시켰다. 화합물은 96-웰 플레이트 포맷에서 5mM 스탁으로서 이용가능하였고, 100% DMSO(시그마; Cat # D2650)에서 용해시키고, -80°C에 보관하였다. 화합물을 추가로, 50mM HEPES(인비트로젠; Cat # 15630-080), 20% DMSO 내 0.2mM의 중간 농도로 희석시키고, 4°C에서 보관하였다. 모든 성장 인자 및 억제제는 깊은 웰, 96-웰 폴리프로필렌 플레이트에서 제조하였고, 검정 시작 시에 DMEM:F12 기본 배지에서 5x 중간체 스탁으로 희석시키고, 4°C에 보관하였다.

[0401] 이차 스크리닝 검정을 수행하였고, 삼중으로 시험하고, 4일간의 검정 기간에 걸쳐 격일로 공급하였다.검정은 각 웰로부터 배양 배지를 흡인함으로써 시작되고, 이어서 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)에서 3회 세정하여 잔여 성장 인자 및 혈청을 제거하였다. 웰 당 80µl의 시험 부피는 0.625% FCS(하이클론; Cat # SH30070.03), 25ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈), 및 3.125 µM 화합물 + 20µl 5x 성장 인자 스탁이 보충된 DMEM:F12 기본 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032)를 함유하도록 다시 첨가하여, 검정에서 0.5% FCS, 20ng/mL Wnt3a, 및 2.5 µM 화합물 + 50ng/mL EGF 및 50ng/mL FGF4의 최종 농도를 획득하였다. 양성 대조군 웰(100µl/웰)은 0.5% FCS, 20ng/mL Wnt3a 및 100ng/mL 액티빈 A가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰(100µl/웰)은 0.5% FCS 및 20ng/mL Wnt3a가 있으나 액티빈 A는 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다.

[0402] 제 3 일에, 웰을 흡인하고, 여기에 80µl DMEM:F12 기본 배지를 공급하였는데, 이 배지에는 웰 당 2.5% FCS(하이클론) 및 3.125 µM 화합물 + 20µl 5x 성장 인자 스탁이 보충되었고, 그리하여 검정에서 2% FCS 및 2.5 µM 화합물 (Wnt3a 생략) + 50ng/mL EGF 및 FGF4의 최종 농도를 획득하였다. 양성 대조군 웰(100µl/웰)은 2% FCS 및 100ng/mL 액티빈 A는 보충되었으나 Wnt3a는 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰(100µl/웰)은 2% FCS는 있으나 액티빈 A 및 Wnt3a 둘 다 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다.

- [0403] 고집적 분석: 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오킴칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 멀레콜라 프로브; Cat # AZ1467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.
- [0404] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 SOX17 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다. 각각의 복제 세트에 대한 평균 및 표준 편차에 대하여 정규화 데이터를 계산하였다.
- [0405] 표 3A는 표 2에서 보여진 아닐린-피리디노트리아진 화합물과 함께 시험되는 2개의 성장 인자, EGF 및 FGF 4 (각각 50ng/mL)에 대한, 액티빈 A의 부재 하에 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는데 있어서 그의 효과에 대한 결과를 보여준다. 결과는 SOX17 발현에 대한 최상의 효과에 대해 감소하는 순서로 랭킹된다. SOX17 발현에 대한 이들 화합물의 효과가 액티빈 A/Wnt3a 양성 대조군에 대해 약한 것으로 간주되었더라도, 이들 화합물 중 일부에 대한 반응은 유의한 것으로 간주되었다. 예를 들어, 화합물의 선택은 추측컨대 세포자살을 예방하거나 세포 주기를 조정함으로써 검정 동안에 웰 당 높은 세포수를 유지하는 것과 관련해 독특한 특성을 갖는 것으로 보인다. 또한, 이들 화합물은 SOX17 발현에 의해 측정된 바와 같이, 보통의 완성 내배엽 분화를 촉진하기 위해 EGF 및 FGF4를 사용한 상승효과를 갖는 것으로 보인다. 가장 강력한 화합물은 표 3b에 열거된다. 이러한 검정에서 EGF 및 FGF4와 함께 시험되는 다른 화합물은 검정에서 SOX17 발현을 유지하는데 효과적이지 않았으나 세포수를 유지할 수 있었다(예를 들어, 화합물 90: 85% 세포수; 2% SOX17 발현).
- [0406] 실시예 5
- [0407] 액티빈 A의 부재 하에 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 데 있어서 다른 인자와 조합된 본 발명의 화합물의 효과
- [0408] 이차 검정법을 수행하여, 완성 내배엽 분화를 조절하는 것으로 문헌에서 알려진 다른 개별 성장 인자 또는 화합물과 조합된 본 발명의 화합물의 효과를 평가하였다.
- [0409] 세포 검정법 접종: H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 세포를 콜라게네이즈(인비트로젠; Cat # 17104-019) 처리 및 부드러운 굽기를 이용해 계대배양하고, 세정하여 잔여 효소를 제거하고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 96-웰 흑색 플레이트(팩커드 뷰플레이트; 퍼킨엘머; Cat #6005182) 상에 100 μ l/웰의 부피를 사용해 1:1(표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 클러스터로서 부착되게 놔둔 다음, 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였고, 매일 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 MEF 조건화된 배지를 공급하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가습 박스에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 로 유지하였다.
- [0410] 화합물 및 성장 인자의 제조: R&D 시스템즈로부터 구매한 성장 인자의 스탁은 EGF (Cat # 236-EG), FGF4 (Cat #235-F4), PDGF-A (Cat #221-AA), PDGF-B (Cat #220-BB), PDGF-C (Cat #1687-CC), PDGF-D (Cat #1159-SB), PDGF-A/B (Cat #222-AB), VEGF (Cat #293-VE), BMP-1 (Cat #1927-ZN)BMP-2 (Cat #355-BM), BMP-4 (Cat #314-BP), BMP-6 (Cat #507-BP), BMP-7 (Cat #222-AB), BMP-2/7 (Cat #3229-BM)이었다. 시험되는 다른 제제는 하기와 같이 구매하였다: BMP-7 (시그마; Cat # B1434), LY294002 (카이만(Cayman); Cat 70920), PD98059, U0126,

U0124 (EMD 바이오사이언스(EMD Biosciences); Cat # 453710), 무스치몰(muscimol)(토크리스(Tocris); Cat # 0289), 비우쿨린(biuculline)(토크리스; Cat # 0130), 나트륨 부티레이트(시그마; Cat # B5887). 모든 성장 인자는 0.1% BSA(시그마; Cat # A7888)가 있는 PBS에서 용해시키고 -80℃에서 동결보관하였다. 소분자는 100% DMSO(시그마; Cat # D2650)에서 용해시키고 -80℃에서 동결보관하였다. 화합물은 96-웰 플레이트 포맷에서 5mM 스탁으로서 이용가능하였고, 100% DMSO에서 용해시키고, -80℃에서 보관하였다. 본 발명의 화합물을 추가로, 50mM HEPES(인비트로젠; Cat # 15630-080), 20% DMSO 내 0.2mM의 중간 농도로 희석시키고, 4℃에서 보관하였다. 모든 성장 인자 및 억제제는 깊은 웰, 96-웰 폴리프로필렌 플레이트에서 제조하였고, 검정 시작 시에 DMEM:F12 기본 배지에서 5x 중간체 스탁으로 희석시키고, 4℃에 보관하였다.

[0411] 이차 스크리닝 검정을 수행하였고, 삼중으로 시험하고, 4일간의 검정 기간에 걸쳐 격일로 공급하였다. 검정은 각 웰에서 배양 배지를 흡인함으로써 개시하고, 이어서 PBS에서 3회 세정하여 잔여 성장 인자 및 혈청을 제거하였다. 웰 당 80 μ l의 시험 부피는 0.625% FCS(하이클론; Cat # SH30070.03), 25ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈), 및 3.125 μ M 화합물 + 20 μ l 5x 성장 인자 스탁 또는 소분자가 보충된 DMEM:F12 기본 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032)를 함유하도록 다시 첨가하여, 0.5% FCS, 20ng/mL Wnt3a, 및 2.5 μ M 화합물의 최종 농도를 획득하였다. 모든 잔여 성장 인자는 50ng/mL의 최종 검정 농도에서 시험하였다(EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PDGF-A/B, VEGF, BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-2/7). 시험되는 소분자의 최종 검정 농도는 하기와 같았다: 무스치몰 (20 μ M), PD98059 (1 μ M), LY294002 (2.5 μ M), U0124 (1 μ M), U0126 (1 μ M), 나트륨 부티레이트 (0.5mM). 양성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 0.5% FCS, 20ng/mL Wnt3a 및 100ng/mL 액티빈 A가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 0.5% FCS 및 20ng/mL Wnt3a가 있으나 액티빈 A는 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다.

[0412] 제 3 일에, 웰을 흡인하고, 여기에 80 μ l DMEM:F12 기본 배지를 공급하였으며 이 배지에는 웰 당 2.5% FCS(하이클론) 및 3.125 μ M 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진 화합물 + 20 μ l 5x 성장 인자 스탁 또는 소분자가 보충되었으며, 그리하여 모든 잔여 성장 인자 또는 소분자에 대해 제 1 일에 주지된 바와 같이 2% FCS 및 2.5 μ M 화합물 (Wnt3a 생략)의 최종 농도를 획득하였다. 양성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 2% FCS 및 100ng/mL 액티빈 A는 보충되었으나 Wnt3a는 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 2% FCS는 있으나 액티빈 A 및 Wnt3a 둘 다 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다.

[0413] 고집적 분석: 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1시간 동안 각 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 멀레콜라 프로브; Cat # AZ1467) 를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.

[0414] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 획득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 획득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 SOX17 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다. 각각의 복제 세트에 대한 평균 및 표준 편차에 대하여 정규화 데이터를 계산하였다.

[0415] 표 4는 본 발명의 혼합물과 개별 성장 인자 또는 다른 소분자를 사용한 처리 후, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는데 대한 결과를 보여준다. 일반적으로, BMP 패밀리의 구성원(BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-2/7) 은 SOX17 발현을 억제시켰거나 이에 대해 무시할만한 효과를 가졌다. 이러한 검정에서 시험된 소분자 효소 억제제의 대부분에 대해서도 동일하였다(LY294002, PD98059, U0126, U0124, 나트륨 부티레이트). 그러나, PDGF 패밀리의 일부 구성원(PDGF-A, -AB, -C, 및 -D)

은 SOX17 발현의 증가를 제공하였다(액티빈 A/Wnt3a 대조군의 10-25%). SOX17 발현의 유사한 증가를 보여주는 다른 성장 인자는 EGF (34%), VEGF (18%), 및 FGF4 (17%)를 포함하였으며, 그림에도 FGF4는 세포수 유지를 지지할 수는 없었다. 화합물 35와 함께 시험되는 소분자 무스치물 (GABA_A 수용체 효능제) 또한 SOX17 발현의 적절한 증가를 제공하였고; GABA_A 길항제 비쿠쿨린은 SOX17 발현에 어떠한 효과도 없었다. EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-AB, PDGF-C, 및 PDGF-D 및 무스치물은 완성 내배엽 분화 동안에 추가의 평가를 위해 선택되었다.

[0416] 실시예 6

[0417] 액티빈 A의 부재 하에 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 데 있어서 다른 인자와 조합된 본 발명의 화합물의 효과

[0418] 완성 내배엽 분화에 대한 다른 개별 제제와 상이한 화합물의 조합물의 효과를 평가하기 위해 이차 검정법을 수행하였다. 이러한 스크린에 선택된 다른 제제는 화합물 17을 사용해 시험되고 표 5에서 언급된 바와 같이, 완성 내배엽 형성에서 적절한 증가를 이미 보여주었다. 이러한 스크린에서, 화합물의 더 광범위한 패널을 단일쌍 비교 또는 플딩된 조합에서 이들 제제를 사용해 평가하였다.

[0419] 세포 검정법 접종: H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 콜라게네이즈(인비트로젠; Cat # 17104-019) 처리 및 부드러운 굵기를 이용해 세포를 계대배양하고, 잔여 효소를 제거하기 위해 세정하고, 100 µl/웰의 부피를 사용해, 감소된 성장 인자 매트릭셀™코팅된 96-웰 흑색 플레이트(콕카드 뷰플레이트; 퍼킨 엘머; Cat #6005182) 상에서 1:1(표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 클러스터로서 부착되게 놔둔 다음, 1 내지 3 일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였고, 매일 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 MEF-조건화된 배지를 공급하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 습도조절된 상자 내에서 37°C, 5% CO₂에서 유지시켰다.

[0420] 화합물 및 성장 인자의 제조: R&D 시스템즈로부터 구매한 성장 인자 스탁은 EGF (Cat # 236-EG), FGF4 (Cat #235-F4), PDGF-A (Cat #221-AA), PDGF-D (Cat #1159-SB), PDGF-A/B (Cat #222-AB), 및 VEGF (Cat #293-VE)였다. 무스치물은 토크리스(Cat # 0289)로부터 구매하였다. 모든 성장 인자는 PBS에서 0.1% BSA(시그마; Cat # A7888)와 함께 용해시키고 -80°C에서 동결보관하였다. 무스치물은 100% DMSO(시그마; Cat # D2650)에서 용해시키고 -80°C에서 동결보관하였다. 화합물은 96-웰 플레이트 포맷에서 5mM 스탁으로서 이용가능하였고, 100% DMSO(시그마; Cat # D2650)에서 용해시키고, -80°C에서 보관하였다. 화합물을 추가로, 50mM HEPES(인비트로젠; Cat # 15630-080), 20% DMSO 내 0.2mM의 중간 농도로 희석시키고, 4°C에서 보관하였다. 모든 성장 인자 및 억제제는 깊은 웰, 96-웰 폴리프로필렌 플레이트에서 제조하였고, 검정 시작 시에 DMEM:F12 기본 배지에서 5x 중간체 스탁으로 희석시키고, 4°C에 보관하였다.

[0421] 이차 스크리닝 검정을 수행하였고, 삼중으로 시험하고, 4일간의 검정 기간에 걸쳐 격일로 공급하였다.검정은 각 웰의 배양 배지를 흡인함으로써 개시되고 이어서 PBS에서 3회 세정하여 잔여 성장 인자 및 혈청을 제거하였다. 0.625% FCS(하이클론; Cat # SH30070.03), 25ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈), 및 3.125 µM 화합물 + 20 µl 5x 성장 인자 스탁 또는 소분자가 보충된 DMEM:F12 기본 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032)를 함유하도록 웰 당 80 µl의 시험 부피를 다시 첨가하여, 0.5% FCS, 20ng/mL Wnt3a, 및 2.5 µM의 총 농도를 수득하였다. 모든 잔여 성장 인자는 50ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B, VEGF)의 최종 검정 농도에서 시험하였다. 무스치물의 최종 검정 농도는 20 µM이었다. 양성 대조군 웰(100 µl/웰)은 0.5% FCS, 20ng/mL Wnt3a 및 100ng/mL 액티빈 A가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰(100 µl/웰)은 0.5% FCS 및 20ng/mL Wnt3a가 있으나 액티빈 A는 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다.

[0422] 제 3 일에, 웰을 흡인하고 2.5% FCS(하이클론) 및 3.125 µM 화합물 + 20 µl 5x 성장 인자 스탁 또는 소분자가 보충된 80 µl DMEM:F12 기본 배지를 공급하여, 모든 잔여 성장 인자 또는 소분자에 대해 제 1 일에 언급된 바와 같이 2% FCS 및 2.5 µM 화합물 (Wnt3a 생략)의 최종 농도를 수득하였다. 양성 대조군 웰(100 µl/웰)은 2% FCS 및 100ng/mL 액티빈 A는 보충되었으나 Wnt3a는 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰(100 µl/웰)은 2% FCS는 있으나 액티빈 A 및 Wnt3a 둘 다 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다.

[0423] 고집적 분석: 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차

항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1 시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 멀레콜라 프로브; Cat # AZ1467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 µg/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 µl/웰 PBS 에 두었다.

[0424] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색 조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 SOX17 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다. 각각의 복제 세트에 대한 평균 및 표준 편차에 대하여 정규화 데이터를 계산하였다.

[0425] 표 5는 성장 인자 및 무스치물은 있고 액티빈 A는 없이 다양한 조합에서 완성 내배엽 생물검정에서 시험된 히트 (표 2)로서 이미 규명된 화합물을 보여준다. 일부 화합물은 시험되는 모든 성장 인자 조합물을 사용한 SOX17 발현에 최소의 또는 약한 효과를 가졌다. 그러나, 일부 화합물은 일부 그러나 모두는 아닌 성장 인자 조합을 사용해 유의한 SOX17 발현을 유도할 수 있었다. 한 화합물 특히, 화합물 34는 이러한 검정에서 세포수 뿐만 아니라 SOX17 발현 둘 다에서 시험되고 매개된 모든 성장 인자 증가와 함께 유의한 상승 반응을 가졌다: 화합물 39 + 1) EGF+FGF4 = 77%의 양성 대조군 반응; 또는 2) EGF+FGF4+PDGF-AB = 68%의 양성 대조군 반응; 또는 3) EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF = 31%의 양성 대조군 반응.

[0426] 실시예 7

[0427] 액티빈 A의 부재 하에 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 데 있어서 다른 인자와 조합된 본 발명의 화합물의 효과

[0428] 본 실시예에서, 액티빈 A의 부재 하에 강력한 SOX17 반응을 취득하기 위해, 최상의 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진 화합물, 화합물 34와의 조합에 필요한 성장 인자의 최소수를 분석하려고 노력하였다. 본 실시예에서 또한, 신규 성장 인자, GDF-8을 평가에 추가하였다. 마이오스타틴으로도 알려져 있는 GDF-8은 TGF-β 패밀리의 구성원이고, SMAD 2/3 인산화를 유도하기 위해 액티빈 유형 II 및 TGF-β 유형 I 수용체 (ALK4/5)를 사용하는 것으로 보여졌다.

[0429] 세포 검정법 점중: H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 세포를 콜라게네이즈(인비트로젠; Cat # 17104-019) 처리 및 부드러운 긁기를 이용해 계대배양하고, 세정하여 잔여 효소를 제거하고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 96-웰 흑색 플레이트(백커트 뷰플레이트; 퍼킨 엘머; Cat #6005182) 상에 100 µl/웰의 부피를 사용해 1:1(표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 클러스터로서 부착되게 놔둔 다음, 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였고, 매일 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 MEF-조건화된 배지를 공급하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가습 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0430] 화합물 및 성장 인자의 제조: R&D 시스템즈로부터 구매한 성장 인자 스탁은 EGF (Cat # 236-EG), FGF4 (Cat #235-F4), PDGF-A (Cat #221-AA), PDGF-D (Cat #1159-SB), PDGF-A/B (Cat #222-AB), VEGF (Cat #293-VE), 및 GDF-8 (Cat # 788-G8)였다. 무스치물은 토크리스 (Cat # 0289)로부터 구매하였다. 모든 성장 인자는 0.1% BSA(시그마; Cat # A7888)가 있는 PBS에서 용해시키고 -80°C에서 동결보관하였다. 소분자는 100% DMSO(시그마; Cat # D2650)에서 용해시키고 -80°C에서 동결보관하였다. 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진 화합물은 96-웰 플레이트 포맷에서 5mM 스탁으로서 이용가능하고, 100% DMSO에서 용해시키고, -80°C에서 보관하였다. 화합물 34를 추가로, 50mM HEPES(인비트로젠; Cat # 15630-080), 20% DMSO 내 0.2mM의 중간 농도로 희석시키고, 4°C에서 보관하였다. 모든 성장 인자 및 억제제는 깊은 웰, 96-웰 폴리프로필렌 플레이트에서 제조하였고, 검정 시작 시에 DMEM:F12 기본 배지에서 5x 중간체 스탁으로 희석시키고, 4°C에서 보관하였다.

[0431] 이차 스크리닝 검정을 수행하였고, 삼중으로 시험하고, 4일간의 검정 기간에 걸쳐 격일로 공급하였다. 검정은

각 웰의 배양 배지를 흡인함으로써 개시되고 이어서 PBS에서 3회 세정하여 잔여 성장 인자 및 혈청을 제거하였다. 웰 당 80 μ l의 시험 부피를 0.625% FCS(하이클론; Cat # SH30070.03), 25ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈), 및 3.125 μ M 화합물 27 + 20 μ l 5x 성장 인자 스택 또는 소분자가 보충된 DMEM:F12 기본 배지(인비트로겐; Cat # 11330-032)를 함유하도록 다시 첨가하여, 0.5% FCS, 20ng/mL Wnt3a, 및 2.5 μ M 화합물 34의 최종 농도를 수득하였다. 모든 잔여 성장 인자는 50ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B, VEGF)의 최종 검정 농도로 시험하였으며, 예외로 GDF-8은 25ng/mL에서 시험하였다. 무스치물의 최종 검정 농도는 20 μ M이었다. 양성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 0.5% FCS, 20ng/mL Wnt3a 및 100ng/mL 액티빈 A가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 0.5% FCS 및 20ng/mL Wnt3a가 있으나 액티빈 A는 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다.

[0432] 제 3 일에, 웰을 흡인하고 80 μ l DMEM:F12 기본 배지를 공급하였으며, 이 배지에는 2.5% FCS(하이클론) 및 3.125 μ M 화합물 34 + 20 μ l 5x 성장 인자 스택 또는 소분자가 웰 당 보충되어, 2% FCS 및 2.5 μ M 화합물 34(Wnt3a 생략)의 최종 농도를 그리고 모든 잔여 성장 인자 또는 소분자에 대해 제 1 일에 주지된 바와 같이 수득하였다. 양성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 2% FCS 및 100ng/mL 액티빈 A는 보충되었으나 Wnt3a는 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 2% FCS는 있으나 액티빈 A 및 Wnt3a 둘 다 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다.

[0433] 고집적 분석: 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로겐; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 멀레콜라 프로브; Cat # AZ1467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로겐; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS 내에 두었다.

[0434] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 수득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 수득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 SOX17 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다. 각각의 복제 세트에 대한 평균 및 표준 편차에 대하여 정규화 데이터를 계산하였다.

[0435] 표 6은 이러한 검정의 결과를 보여준다. GDF-8이 화합물 34와 함께 존재하는 경우, SOX17 발현의 실질적인 증가가 관찰되었다. 더욱이, 화합물 34와 함께 GDF-8 및 Wnt3a은 100ng/mL 액티빈 A/Wnt3a 처리를 사용해서 보여진 것과 유사한 범위에서 SOX17 발현 (대조군의 88%)을 수득하기에 충분하였다. 성장 인자 GDF-8은 인간 배아 줄기 세포의 완성 내배엽 분화 동안에 액티빈 A에 대한 교체물로서 작용할 수 있는 것으로 보인다.

[0436] 실시예 8

[0437] 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시킬 수 있는 화합물에 대한 추가의 스크리닝

[0438] 따라서, 가능한 한 규명된 히트에 대한 화합물 구조를 바탕으로, 유사체 연구를 수행하여, 완성 내배엽 생물검정에서 시험될 추가의 관련 화합물을 발견하였다. 구조 연구를 하여 스크리닝 화합물을 수득하였다. 이러한 검정을 위한 스크리닝 파라미터는 이전의 검정에서 최적의 결과를 제공하였던 인자의 조합, 특히 EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, 및 GDF-8과 소분자 화합물을 조합하여 이용하도록 디자인되었다.

[0439] 포 검정법 접종: 간략하게는, H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로겐; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 세포를 콜라게네이즈(인비트로겐;

Cat # 17104-019) 처리 및 부드러운 굽기를 이용해 계대배양하고, 세정하여 잔여 효소를 제거하고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 96-웰 흑색 플레이트(팩카드 뷰플레이트; 퍼킨 엘머; Cat #6005182) 상에 100 μ l/웰의 부피를 사용해 1:1(표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 클러스터로서 부착되게 놔둔 다음, 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였고, 매일 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 MEF-조건화된 배지를 공급하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가슴 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0440] *화합물의 제조 및 검정:* R&D 시스템즈에서 구매한 성장 인자는 EGF (Cat # 236-EG), FGF4 (Cat #235-F4), PDGF-A (Cat #221-AA), PDGF-D (Cat #1159-SB), PDGF-A/B (Cat #222-AB), VEGF (Cat #293-VE), 및 GDF-8 (Cat # 788-G8)였다. 무스치물은 토크리스 (Cat # 0289)로부터 구매하였다. 스크리닝은 96-웰 플레이트 포맷에서 5mM 스타크로서 이용가능하여 제조하였고, 100% DMSO(시그마; Cat # D2650) 에서 용해시키고, -80°C에 보관되는 화합물의 라이브러리를 사용해 수행하였다. 화합물을 추가로, 50mM HEPES(인비트로젠; Cat # 15630-080), 20% DMSO 내 0.2mM의 중간 농도로 희석시키고, 4°C에서 보관하였다. 시험 조건은 단일 웰에서 수행되었고, 4일간의 검정 기간에 걸쳐 격일로 공급되었다. 일차 스크리닝 검정법은 각 웰로부터 배양 배지를 흡인함으로써 시작되고, 이어서 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)에서 3회 세정하여 잔여 성장 인자 및 혈청을 제거하였다. 검정 제 1 일에, 웰 당 200 μ l의 시험 부피를 0.5% FCS(하이클론; Cat # SH30070.03) 및 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN) + 2.5 μ M 화합물이 보충된 DMEM:F12 기본 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032)를 함유하도록 다시 첨가하였다. 모든 잔여 성장 인자는 GDF-8이 25ng/mL에서 시험되는 것을 제외하고는, 50ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B, VEGF)의 최종 검정 농도에서 시험하였다. 무스치물의 최종 검정 농도는 20 μ M이었다. 양성 대조군 표본은 0.5% FCS + 20ng/mL Wnt3a 및 100ng/mL 재조합 인간 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14)가 보충된 동일한 기본배지를 함유하였다. 음성 대조군 표본은 0.5% FCS 및 20ng/mL Wnt3a가 보충된 DMEM:F12 기본 배지를 함유하였다. 검정 제 3 일에, 웰 당 200 μ l의 시험 부피는 Wnt3a는 없고 2% FCS + 2.5 μ M 화합물이 보충된 DMEM:F12 기본 배지를 함유하도록 다시 첨가되었다. 모든 잔여 성장 인자는 GDF-8이 25ng/mL에서 시험되는 것을 제외하고는, 50ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B, VEGF)의 최종 검정 농도에서 시험하였다. 무스치물의 최종 검정 농도는 20 μ M이었다. 양성 대조군 표본은 2% FCS 및 100ng/mL 재조합 인간 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14)가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 표본은 2% FCS가 보충된 DMEM:F12 기본 배지를 함유하였다. 양성 대조군 표본은 제 1 일 및 제 2 일에 Wnt3a (20ng/mL)와 함께 4일의 검정 전체에 걸쳐 아닐린-피리디노트리아진 화합물 대신에 100ng/mL 재조합 인간 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14)를 사용하며, FCS가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 표본은 제 1 일 및 제 2 일에 Wnt3a를 첨가하나 액티빈 A를 사용한 처리는 생략한, FCS가 보충된 DMEM:F12 기본 배지를 함유하였다.

[0441] *고집적 분석:* 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924) 를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 멀레콜라 프로브; Cat # AZ1467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.

[0442] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 전체 Sox17 단백질 발현을 세포 x 세포 면적의 전체 형광성으로서 정의되는 전체 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다. 각각의 복제 세트에 대한 평균 및 표준 편차에 대하여 정규화 데이터를 계산하였다.

[0443] 표 7에서, GDF-8 및 성장 인자/효능제의 조합물(EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물)은 신규 세트의 아

닐린-피리디노트리아진 화합물을 사용해 시험하였다. 이러한 단일 실험에서 2개의 검정 플레이트의 결과를 SOX17 반응에 대해 랭킹한다(액티빈 A 및 Wnt3a로의 양성 대조군 처리의 %로서). 추가의 화합물은 성장 인자/효능제 풀을 사용한 유의한 상승 활성을 보여주는 것으로 규명되었다. 이들 화합물은 액티빈 A의 부재 하에 인간 배아 줄기 세포 분화 동안에 검정 세포수를 유지하고 SOX17 발현을 제공하는 둘 다에서 효과적이었다. 양성 대조군의 25%가 넘는 활성을 갖는 이들 히트의 목록은 표8에 보여진다.

[0444] 주목하게는, 초기 일차 스크리닝의 4개의 히트(표 2)는 유사체 라이브러리에서 중복되었다. 이들 화합물 중 2가지는 유사체 스크리닝을 사용한 히트로서 반복되었다(화합물 34 및 화합물 35; 표 8의 상자에서 제시됨); 한가지는 유사체 스크리닝에서 약한 히트였고, 한 가지 화합물은 반복하지 않았다.

[0445] 실시예 9

[0446] 저농도의 액티빈 A의 존재 하에 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는데 있어서 본 발명의 화합물의 효과

[0447] 상기 완성 내배엽 생물검정에서 히트로서 규명되었던 화합물 또한 매우 낮은 용량의 액티빈 A를 사용한 상승 효과를 보여줄 수 있음을 측정하는 것이 중요하였다. 초기 평가는 표 3b에서 언급된 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진 화합물의 짧은 히트 목록을 사용해 수행하였다.

[0448] 세포 검정법 접종: H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 세포를 콜라게네이즈(인비트로젠; Cat # 17104-019) 처리 및 부드러운 굽기를 이용해 계대배양하고, 세정하여 잔여 효소를 제거하고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 96-웰 흑색 플레이트(팩커드 뷰플레이트; 퍼킨 엘머; Cat #6005182)상에 100 μ l/웰의 부피를 사용해 1:1(표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 클러스터로서 부착되게 놔둔 다음, 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였고, 매일 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 MEF-조건화된 배지를 공급하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가슴 박스에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0449] 화합물 및 성장 인자의 제조: R&D 시스템즈로부터 구매한 성장 인자 스탁은 EGF (Cat # 236-EG), FGF4 (Cat #235-F4), PDGF-A (Cat #221-AA), PDGF-D (Cat #1159-SB), PDGF-A/B (Cat #222-AB), VEGF (Cat #293-VE), 및 GDF-8 (Cat #788-G8)였다. 액티빈 A는 퍼프로텍 (Cat #)에서 구매하였다. 무스치물은 토크리스 (Cat # 0289)로부터 구매하였다. 모든 성장 인자는 0.1% BSA(시그마; Cat # A7888)가 있는 PBS에서 용해시키고 -80 $^{\circ}$ C에서 동결보관하였다. 무스치물은 100% DMSO(시그마; Cat # D2650)에서 용해시키고 -80 $^{\circ}$ C에서 동결보관하였다. 화합물은 96-웰 플레이트 포맷에서 5mM 스탁으로서 이용가능하였고, 100% DMSO(시그마; Cat # D2650)에서 용해시키고, -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 화합물을 추가로, 50mM HEPES(인비트로젠; Cat # 15630-080), 20% DMSO 내 0.2mM의 중간 농도로 희석시키고, 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 모든 성장 인자 및 억제제는 깊은 웰, 96-웰 폴리프로필렌 플레이트에서 제조하였고, 검정 시작 시에 DMEM:F12 기본 배지에서 5x 중간체 스탁으로 희석시키고, 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0450] 이차 스크리닝 검정을 수행하였고, 삼중으로 시험하고, 4일간의 검정 기간에 걸쳐 격일로 공급하였다. 검정은 각 웰의 배양 배지를 흡인함으로써 개시되고 이어서 PBS에서 3회 세정하여 잔여 성장 인자 및 혈청을 제거하였다. 웰 당 80 μ l의 시험 부피는 0.625% FCS(하이클론; Cat # SH30070.03), 25ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈), 12.5ng/mL 액티빈 A, 및 3.125 μ M 화합물 + 20 μ l 5x 성장 인자 스탁 또는 소분자가 보충된 DMEM:F12 기본 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032)를 함유하도록 다시 첨가하여, 0.5% FCS, 20ng/mL Wnt3a, 10ng/mL 액티빈 A, 및 2.5 μ M 화합물의 최종 농도를 수득하였다. 모든 잔여 성장 인자는 50ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B, VEGF)의 최종 검정 농도로 시험하였으며, 예외로 GDF-8은 25ng/mL에서 시험하였다. 무스치물의 최종 검정 농도는 20 μ M이었다. 양성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 0.5% FCS, 20ng/mL Wnt3a 및 10ng/mL (low 용량) 또는 100ng/mL (고용량) 액티빈 A가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 0.5% FCS 및 20ng/mL Wnt3a는 보충되었으나 액티빈 A는 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다.

[0451] 제 3 일에, 웰을 흡인하고, 80 μ l DMEM:F12 기본 배지를 공급하였고, 이 배지에는 웰 당 2.5% FCS(하이클론), 12.5ng/mL 액티빈 A, 및 3.125 μ M 화합물 + 20 μ l 5x 성장 인자 스탁 또는 소분자를 보충하여, 2% FCS, 10ng/mL 액티빈 A, 및 2.5 μ M 화합물 (Wnt3a 생략)의 최종 농도를 수득하였고, 모든 잔여 성장 인자 또는 소분자에 대해 제 1 일에 언급된 대로였다. 양성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 2% FCS 및 10ng/mL 또는 100ng/mL 액티빈 A는 보충되었으나 Wnt3a는 생략된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰(100 μ l/웰)은 2% FCS는 있으나 액티빈 A 및 Wnt3a 둘 다를 생략한 동일한 기본 배지를 함유하였다.

- [0452] **고집적 분석:** 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; cat # AF1924) 를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488 공역된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 말레콜라 프로브; Cat # AZ1467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.
- [0453] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 SOX17 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다. 각각의 복제 세트에 대한 평균 및 표준 편차에 대하여 정규화 데이터를 계산하였다.
- [0454] 표 9는 다양한 화합물, 및 저용량의 액티빈 A와 성장인자의 상이한 조합물의 검정으로 인한 결과를 보여준다. 일부 화합물은 다양한 성장 인자를 사용한 강력한 상승 반응을 보여주었다. 다른 경우에, 상승 효과는 더욱 적절하였으나 저용량의 액티빈 A 대조군에 대해 유의하였다. 다른 화합물은 저용량 액티빈 A 대조군에 대한 활성을 갖지 않았다.
- [0455] 실시예 10
- [0456] 액티빈 A의 부재 하에 단일 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 데 있어서 본 발명의 화합물의 효과
- [0457] 사이클릭 아닐린-피리디노트라이아진 화합물은 또한, 단일 세포에의 효소 처리를 통해 분산된 세포를 사용한 스크리닝 포맷에서 시험하였고, 검정을 위해 단층으로 플레이팅하였다. 검정은 저용량일지라도 성장 인자를 제공할 수 있는 혈청을 제거하기 위한 변화를 만들었다. 종료 시, 기본 배지를 바꾸고, 혈청을 무(無)-지방산 BSA로 교환하였다. 검정은 4일에서 3일로 단축되어서, 결과를 측정하기 위한 더 짧은 기간을 제공하였다. 마지막으로, 검정법은 액티빈 A의 부재 하에 완성 내배엽 분화에 대해 유의하지만 차선의 효과를 보여주었던 2개의 성장 인자, EGF 및 FGF4를 포함하였다.
- [0458] 스크리닝 검정법
- [0459] **세포 검정법 집중:** 간략하게는, H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 배양물을 10cm² 표면적 당 10mL의 동일 부피를 사용해 37°C에서 5분 동안 아큐테이즈(시그마; Cat # A6964)로 처리한 다음 부드럽게 재현탁시키고, 원심분리에 의해 펠렛화시키고, 계수를 위해 MEF 조건화된 배지에서 재현탁시켰다. 검정법 집중을 위해, 세포를 50,000개 세포/cm²로 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 96-웰 흑색 플레이트(팍커드 뷰플레이트; Cat #6005182) 상에 100 μ l/웰의 부피를 사용해 플레이팅하였다. 세포가 부착되게 놔둔 다음, 3 내지 5일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였고, 매일 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 MEF-조건화된 배지를 공급하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가습 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.
- [0460] **화합물의 제조 및 검정:** EGF 및 FGF4의 스탱을 96-웰 폴리프로필렌 플레이트(코닝 인코포레이티드(Corning, Inc.); Cat # 3960)에서 제조하였다. 화합물 22는 100% DMSO(시그마; Cat # D2650) 내에서 용해된 5mM 스탱으로서 이용가능하였고, -80°C에 보관하였다. 검정은 각 웰의 배양 배지를 흡인함으로써 개시되고 이어서 PBS에서 3회 세정하여 잔여 성장 인자 및 혈청을 제거하였다. 웰 당 80 μ l의 시험 부피는 2.5% 무지방산 BSA (MP Biomedicals LLC; Cat # 152401), 10ng/mL bFGF (퍼프로텍 인코포레이티드 Cat # 100-18B), 25ng/mL Wnt3a(R&D

시스템즈; Cat # 1324-WN) 및 3.125 μ M 화합물 22 + 20 μ l 5x 성장 인자 스택이 보충된 RPMI 1640 기본 배지(인비트로젠; Cat # 22400-089)를 함유하도록 첨가되어, 검정에서 2% 무지방산 BSA, 8ng/mL bFGF(퍼프로텍 인코포레이티드 Cat # 100-18B), 20ng/mL Wnt3a, 및 2.5 μ M 화합물 22의 최종 농도를 수득하였다. 양성 대조군 웰은 2% 무지방산 BSA, 8ng/mL bFGF, 20ng/mL Wnta, 및 100ng/mL 재조합 인간 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14)가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 웰은 2% 무지방산 BSA, 8ng/mL bFGF, 20ng/mL Wnt3a는 보충되었으나 액티빈 A 처리는 생략한 동일한 기본 배지를 함유하였다.

[0461] 검정 제 2 일에, 웰을 다시 흡인하고, 웰 당 80 μ l로 공급하였고 2.5% 무지방산 BSA, 10ng/mL bFGF, 및 3.125 μ M 화합물 22 + 20 μ l 5x 성장 인자 스택이 보충된 RPMI 1640 기본 배지를 함유하도록 다시 첨가하여, 검정에서 2% 무지방산 BSA, 8ng/mL bFGF 및 2.5 μ M 화합물 22의 최종 농도를 수득하였다. 양성 대조군 웰은 2% 무지방산 BSA, 8ng/mL bFGF 및 100ng/mL 재조합 인간 액티빈 A가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 표본은 2% 무지방산 BSA, 8ng/mL bFGF는 보충되었으나 액티빈 A 처리는 생략한 동일한 기본 배지를 함유하였다.

[0462] 고집적 분석: 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 멀레콜라 프로브; Cat # AZ1467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.

[0463] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 수득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 수득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 SOX17 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다. 각각의 복제 세트에 대한 평균 및 표준 편차에 대하여 정규화 데이터를 계산하였다.

[0464] 표 10은 화합물 34를 사용한 이러한 검정의 결과를 보여준다. 화합물 34는 없고 EGF 및/또는 FGF4 단독이 있는 대조군 표본은 낮은 SOX17 발현을 가졌다. 화합물 34의 첨가는 SOX17 발현의 유의한 증진을 추가하였다.

[0465] 실시예 11

[0466] 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 액티빈 A 및 GDF-8의 능력의 비교

[0467] 이전의 실시예는 GDF-8이 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기 위해 액티빈 A를 대체할 수 있음을 보여주었다. 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 GDF-8 및 액티빈 A의 능력에 대해 상대적인 잠재성을 아는 것이 중요하였다. 용량 반응 검정은 배아 줄기 세포 분화 동안의 결과를 비교하기 위해 동일 농도의 각각의 성장 인자를 사용하여 수행하였다.

[0468] 검정용 세포의 제조: 인간 배아 줄기 세포의 스택 배양물(H1 인간 배아 줄기 세포주)을 평균 매 4일째에 계대 배양하면서 MEF 조건화된 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭셀-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/mL 디스페이즈(인비트로젠, Cat #: 17105-041)의 용액에 37 $^{\circ}$ C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고 이어서 MEF 조건화된 배양 배지로 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수합하고 잔여 디스페이즈를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비에서 또는 중간 검정을 위해 1:1 비에서 분리하였다. 모든 인간 배아 줄기 세포주를 50미만의 계대배양수에서 유지하고, 정상 핵성 표현형 및 마이크로플라즈마 오염의

부재에 대해 일상적으로 평가하였다.

[0469] 검정에서 사용되는 세포 클러스터는 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지에서 고르게 재현탁시켰고, 감소된 성장 인자 매트릭스 코팅된 96-웰 팩카드 뷰플레이트(피킨 엘머; Cat # 6005182) 상에 100 μ l/웰의 부피를 사용해 접종하였다. 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지를 초기 플레이팅 및 증가를 위해 사용하였다. 각각의 웰의 쓰고 난 배지를 흡인하여, 동일 부피의 새로운 배지로 교체함으로써 매일 공급을 행하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가슴 박스에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0470] **검정법:** 검정은 각 웰에서 배양 배지를 흡인하고 시험 배지의 분취물 (100 μ l)을 다시 첨가함으로써 개시하였다. 시험 조건은 총 3일의 검정 기간에 걸쳐 4중으로 수행하였고, 각 웰에서 배지를 흡인하고 신선한 시험 배지로 대체함으로써 제 1 일 및 제 2 일에 공급하였다. 2개의 12-채널 폴리프로필렌 그릇(Argos technologies, Inc, Cat #: B3135)을 사용하여, 상이한 농도의 액티빈 A(피프로텍; Cat #120-14) 또는 GDF-8(R&D 시스템즈, Cat # 788-G8)을 함유하는 시험 배지를 제조하였다. 2에서 12로 숫자를 매긴, 각각의 그릇의 채널은 2% 알부민 소 프랙션 V, 무지방산 (FAF BSA)(MP 바이오메디칼스, 인코포레이티드(MP Biomedicals, Inc); Cat # 152401) 및 8ng/mL bFGF (피프로텍 인코포레이티드; Cat #: 100-18B), 및 제 1 일에는 첨가되고 제 2 일 및 제 3 일에는 생략되는 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF)가 보충된 RPMI-1640 배지(인비트로젠; Cat #: 22400)로 구성된 1mL 검정 배지를 함유하였다. 각각의 그릇 중 채널 번호 1은 1600ng/mL 액티빈 A 또는 1600ng/mL GDF-8을 함유하였고, 동일한 검정 배지로 희석되었다. 배지 1mL을 채널 번호 1에서 채널 번호 2로 옮기고 잘 혼합하였다. 새 파이프 팁을 사용해, 채널 번호 2에서 채널 번호 3으로 배지 1mL을 옮기고, 이어서 완전히 혼합하였다. 동일 과정을 각각의 개별 그릇에 대해 채널 숫자 11을 통해 연속적으로 반복하였다. 각각의 그릇의 채널 숫자 12는 액티빈 A 또는 GDF-8이 없는 배지를 함유하였다. 이를 수행하여, 일련의 2-배 시험 희석액을 만들었고, 이에 개별 검정 웰에 첨가하기 위한 1.6ng/mL 내지 1600ng/mL 범위의 농도로 액티빈 A 또는 GDF-8이 들어 있었다.

[0471] **고집적 분석:** 3일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 1회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 2시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. PBS로 3회 세정한 후, 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 인비트로젠; Cat #A21467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, 각각의 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 5 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 15분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.

[0472] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 이미지는 웰 당 25개 필드에서 취득하였다. 각 웰 내 총 SOX17 강도에 대한 측정치는 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 평균 및 표준 편차는 각각의 4중 데이터 세트에 대해 계산하였다. 총 SOX17 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 4500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 총 SOX17 강도 데이터는 그래프패드 프리즘 4.02 (그래프패드 소프트웨어 인코포레이티드, 로 줄라, 캘리포니아주(GraphPad Software, Inc., Lo Jolla, CA)를 사용해 계산하였다. 데이터는 각각의 데이터 세트에서의 최소값 및 최대값을 각각 0% 및 100%로서 정의하도록 정규화되었다. 표 11은 액티빈 A 및 GDF-8 데이터 세트의 각각에 대한 정규화된 값을 보여준다. 2개의 시그마형 용량-반응 곡선은 표 11에 보여진 정규화된 값을 사용해 생성되는 바와 같이 도 2에서 보여진다. 곡선 피트를 지시하는 R² 값은 그래프패드 프리즘을 이용해 계산하고, 액티빈 A에 대해 0.9944 및 GDF-8에 대해 0.9964인 것으로 측정하였다. 그래프패드 프리즘을 이용해, 각각의 성장 인자에 대한 EC₅₀ 값을 계산하고, 액티빈 A에 대해 13.9ng/mL 및 GDF-8에 대해 184.8ng/mL인 것으로 측정하였다. 이들 데이터는, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 것을 유도함에 있어서 GDF-8이 액티빈 A보다 덜 강력함을 지시한다. 그럼에도 불구하고, GDF-8은 액티빈 A 대신에 사용될 수 있고, SOX17 발현에 의해 언급된 바와 같이 특정 농도에서 완성 내배엽 세포의 동일 군을 유도할 수 있다.

[0473] 실시예 12

- [0474] 본 발명의 방법에 따라 형성된 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화할 수 있다
- [0475] 인간 배아 줄기 세포의 평행군은 화합물 34 또는 화합물 56과 함께 GDF-8을 사용해 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시켰다. 이후, 단계적 분화 프로토콜을 처리된 세포에 적용하여, 췌장 내배엽 및 내분비 계통으로의 분화를 촉진하였다. 액티빈 A 및 Wnt3a로 처리된 세포로 이루어진 평행 대조군은 단계적 분화 방법 전체에 걸쳐 비교를 위해 유지시켰다. 표본은 다양한 분화 단계의 대표적인 단백질 및 mRNA 생물마커의 출현을 측정하기 위해 매 분화 단계에서 취하였다.
- [0476] **검정용 세포의 제조:** 인간 배아 줄기 세포 (H1 인간 배아 줄기 세포주)의 스타크 배양물은 평균 매 4일마다 계대 배양하면서 MEF 조건화된 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/mL 디스페이즈(인비트로젠, Cat #: 17105-041)의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고 이어서 MEF 조건화된 배양 배지로 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수합하고 잔여 디스페이즈를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비에서 또는 중간 검정을 위해 1:1 비에서 분리하였다. 모든 인간 ES 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형 및 마이코플라즈마의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다.
- [0477] 세포 클러스터를 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지에 고르게 재현탁시키고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 24-웰, 흑색 벽(black wall) 배양 플레이트 (Arctic White; Cat # AWLS-303012) 상에 0.5mL/웰의 부피로 접종하였다. 각각의 웰의 쓰고 난 배지를 흡인하여, 동일 부피의 새로운 배지로 교체함으로써 매일 공급을 행하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 37°C, 5% CO₂에서 유지시켰다.
- [0478] **검정법:** 검정은 각 웰에서 배양 배지를 흡인하고 시험 배지의 분취물(0.5mL)을 다시 첨가함으로써 개시하였다. 분화 제 1단계에 대한 시험 조건은 총 3일에 걸쳐 수행하였고, 각 웰에서 배지를 흡인하고 신선한 시험 배지로 대체함으로써 매일 공급하였다. 검정 제 1 일에, 100ng/mL 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14) 또는 200ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8)을 개별 검정 웰에 첨가하고, 여기서, 각각의 성장 인자는 1% 알부민 소 프랙션 V, 무지방산 (FAF BSA)(MP 바이오메디칼스, 인코포레이티드; Cat # 152401), 1% 프로부민 (밀리포어 (Millipore); Cat # 81-068-3) 및 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF)가 있는 RPMI-1640 배지(인비트로젠; Cat # 22400)로 희석시켰다. 검정 제 2 일에, 100ng/mL 액티빈 A 또는 200ng/mL GDF-8을 Wnt3a는 없고 2% FAF BSA 가 보충된 RPMI-1640 배지로 희석시켰다. GDF-8을 사용한 일부 시험 표본에서, Wnt3a는 2.5 μM의 농도로 화합물 34 또는 화합물 56으로 대체되었고, 화합물 34 또는 화합물 56은 총 3일간의 완성 내배엽 분화 동안 매일 첨가하였다. 분화 제 1 단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 완성 내배엽 형성의 마커인 CXCR4의 수준을 평가하기 위한 유세포분석을 위해 수합하였다. 추가의 웰은 분화의 다른 마커를 측정하기 위한 RT-PCR 분석을 위해 수합되었다.
- [0479] 분화 제 1단계의 종료 시, 각각의 처리군의 평행 웰의 복제물 세트에 추가의 단계적 분화를 시행하였다. 제 1 분화 단계 후, 지속적인 배양 및 분화를 수행하는 모든 웰이 동일한 처리를 받았음을 유지하는 것은 중요하다. 이러한 지속적인 분화 프로토콜은 하기에 기술된다.
- [0480] 분화 프로토콜의 단계 2는 2일에 걸쳐서 수행하였다. 세포는 각 웰에서 배지를 흡인하고 2% 알부민 소 프랙션 V, 무지방산 (FAF BSA)(MP 바이오메디칼스, 인코포레이티드; Cat # 152401), 50ng/mL FGF7 (퍼프로텍; Cat # 100-19), 및 250nM 사이클로파민 (칼바이오켄; Cat # 239804)을 함유한 DMEM:F12 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032)의 새 분취물(0.5mL)로 교체함으로써 매일 공급하였다.
- [0481] 분화 프로토콜의 단계 3은 4일에 걸쳐 수행하였다. 세포는 각 웰에서 배지를 흡인하고 1% B27 (인비트로젠; Cat # 17504-044), 50ng/mL FGF7, 100ng/mL 노긴(R&D 시스템즈; Cat # 3344-NG), 250 nM KAAD-사이클로파민 (칼바이오켄(Calbiochem); Cat # 239804), 및 2 μM 모든-trans 레티논산(RA) (시그마-알드리치; Cat # R262 5)이 보충된 DMEM-고포도당(인비트로젠; Cat # 10569)의 새 분취물(0.5mL)로 교체함으로써 매일 공급하였다. 분화 제 3단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 분화 마커를 측정하기 위해 RT-PCR 분석하려고 수합하였다. 다른 배양 웰은 췌장 내배엽과 관련된 전사 인자인 Pdx1, 및 초기 내배엽과 관련된 전사 인자인 Cdx2의 단백질 발현 수준에 대한 고집적 이미지 분석을 하였다.
- [0482] 분화 프로토콜의 단계 4는 3일에 걸쳐 수행하였다. 세포는 각 웰에서 배지를 흡인하고 1% B27, 100ng/mL 노긴, 100ng/mL Netrin-4, 1μM DAPT (EMD 바이오사이언스(EMD Biosciences); Cat #565770), 및 1μM Alk 5

억제제 (엑소라(Axxora); Cat # ALX-270-445)가 보충된 DMEM-고포도당(인비트로젠; Cat # 10569)의 새 분취물 (0.5mL)로 교체함으로써 매일 공급하였다. 분화 제 4단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 분화 마커를 측정하기 위해 RT-PCR 분석하려고 수합하였다. 다른 배양 웰은 Pdx1의 단백질 발현 수준에 대한 고집적 이미지 분석을 하였다.

[0483] 분화 프로토콜의 단계 5는 1% B27, 및 1 μ M Alk 5 억제제와 함께 DMEM-고포도당에서 7일에 걸쳐 수행하였다. 모든 날에, 각 웰의 배지를 흡인하고 새 분취물(0.5mL)로 교환하였다. 분화 제 5단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 분화 마커를 측정하기 위해 RT-PCR 분석하려고 수합하였다. 다른 배양 웰은 인슐린 및 글루카곤의 단백질 발현 수준에 대한 고집적 이미지 분석을 하였다.

[0484] 분화 프로토콜의 단계 6은 1% B27과 함께 DMEM-고포도당에서 7일에 걸쳐 수행하였다. 격일로 각 웰의 배지를 흡인하고 새 분취물(0.5mL)로 교환하였다. 분화 제 6단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 분화 마커를 측정하기 위해 RT-PCR 분석하려고 수합하였다.

[0485] FACS 분석: FACS 분석용 세포는 PBS(인비트로젠; Cat # 14040-133) 내 0.5% 인간 감마-글로불린(시그마; Cat# G-4386)의 1:5 용액: BD FACS 염색 완충액 - BSA (BD; Cat #554657)에서 4°C에서 15분 동안 블라킹시켰다. 다음, 세포를 CD9 PE(BD; Cat # 555372), CD99 PE(Caltag; Cat # MHCD9904) 및 CXCR4 APC (R&D 시스템즈; Cat# FAB173A)용 항체로 4°C에서 30분 동안 염색하였다. BD FACS 염색 완충액에서의 일련의 세정 후, 세포를 7-AAD(BD; Cat # 559925)를 사용해 생존성을 알아보기 위해 염색하고, BD FACS어레이 상에서 진행시켰다. PE 및 APC 둘 다에 대한 마우스 IgG1K 아이소타입 대조군 항체를 사용해 양성 세포%를 게이팅하였다.

[0486] RT-PCR 분석: 에탄올-함유, 고염 완충액의 존재 하에 실리카-겔 막(Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA)에 결합시키고 이어서 세정하여 오염물을 제거함으로써 RNA 표본을 정제하였다. 터보(TURBO) DNA-프리(free) 키트(엠비온, 인크.(Ambion, INC))를 이용하여 RNA를 추가로 정제하고, 이어서 고품질 RNA를 물에서 용출시켰다. 수율 및 순도는 분광 광도계 상에서 A260 및 A280 판독에 의해 평가하였다. cDNA 복사본은 ABI(ABI, CA) 고용량 cDNA 아키브 키트(archive kit)를 사용해 정제된 RNA로부터 제조하였다.

[0487] 달리 명시되지 않으면, 모든 시약은 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)로부터 구매하였다. 실시 간 PCR 반응은 ABI 프리즘® 7900 서열 검출 시스템(ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System)을 사용해 수행하였다. 택맨® 유니버설 PCR 마스터 믹스® (ABI, 캘리포니아주)(TAQMAN® UNIVERSAL PCR MASTER MIX® (ABI, CA))는 20 μ L의 총 반응 부피 내 20ng의 역전사 RNA와 함께 사용하였다. 각각의 cDNA 샘플을 이중으로 행하여 피펫팅 에러에 대해 보정하였다. 프라이머 및 FAM-표지 택맨®프로브는 200nM의 농도로 사용하였다. 각각의 표적 유전자의 발현 수준은 어플라이드 바이오시스템즈에 의해 이미 개발된 인간 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소(GAPDH) 내인성 대조군을 사용해 정규화하였다. 프라이머 및 프로브 세트는 표 12에 열거한다. 50°C에서 2분 동안, 이어서 95°C에서 10분 동안 초기 인큐베이션한 후, 표본은 2단계에서 40회 순환시켰다-95°C에서 15초 동안의 변성 단계, 및 이어서 60°C에서 1분 동안의 어닐링/연장 단계. 데이터 분석은 진엠프® 7000 서열 검출 시스템 소프트웨어(GENEAMP®7000 Sequence Detection System software)를 사용해 수행하였다. 각각의 프라이머/프로브 세트에 대하여, 형광 강도가 증폭의 지수 영역의 중간의 특정 값에 도달하는 사이클 수로서 Ct 값을 결정하였다. 상대적인 유전자 발현 수준을 비교 Ct 방법을 이용하여 계산하였다. 간략하게는, 각각의 cDNA 표본에 대해, 내인성 대조군 Ct 값을 흥미있는 Ct의 유전자에서 제하여, 델타 Ct값(Δ Ct)을 수득하였다. 표적의 정규화된 양은 2- Δ Ct로서 계산하였고, 이는 증폭이 100% 효율인 것으로 가정한다. 최종 데이터를 보정 샘플에 대하여 나타내었다.

[0488] 고집적 분석: 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 1회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924) 를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 2시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. PBS로 3회 세정한 후, PBS 내에서 1:200으로 희석된 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 인비트로젠; Cat #A21467)를 각 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 5 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 15분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ L/웰 PBS에 두었다. 분석에 사용되는 다른 일차 항체는 1:100 희석 마우스 항-인간 CDX2 (인비트로젠; Cat # 397800), 1:100 희석 염소 항-인간 Pdx1 (산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology); Cat # SC-14664), 1:200 희석 토끼 항-인간 인슐린 (셀 시그널링(Cell Signaling); Cat

C27C9), 및 1:1500 희석 마우스 항-인간 글루카곤 (시그마-알드리치; Cat # G2654)을 포함하였다. 분석에 사용되는 다른 일차 항체는 1:400 희석 알렉사 플루오르 647 닭 항-마우스 IgG (인비트로젠; Cat # A-21463), 1:200 희석 알렉사 플루오르 488 당나귀 항-염소 IgG (인비트로젠; Cat # A11055), 1:1000 희석 알렉사 플루오르 647 닭 항-토끼 IgG (인비트로젠; Cat # A21443), 및 1:1000 희석 알렉사 플루오르 488 닭 항-마우스 IgG (인비트로젠; Cat # A21200)을 포함하였다.

[0489] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 이미지는 웰 당 25개 필드에서 취득하였다. 총 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 희색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 4500의 희색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다.

[0490] 대표적인 분화 마커에 대한 PCR 결과는 각각의 분화 단계로부터 수확된 세포에 대한 표 13에서 보여진다. GDF-8 및 Wnt3a 또는 GDF-8 및 화합물 34 또는 화합물 56으로 처리된 표본은 내배엽 및 내분비 분화와 관련된 발현 마커의 유사한, 또는 일부 경우 향상된 발현 수준을 보여주었다.

[0491] 도 3은 FACS 분석 결과를 보여주며, 이 결과는 분화 제 1단계 후 완성 내배엽 마커인 CXCR4의 발현을 보여준다. 인간 배아 줄기 세포를 GDF-8 및 Wnt3a로 처리하면 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 처리와 비교해 동일한 %의 CXCR4 양성 세포를 제공하였다. 유사하게는, 인간 배아 줄기 세포를 GDF-8 및 소분자(화합물 34 또는 화합물 56)로 처리하는 것 또한, 동일하거나 약간 더 높은 %의 CXCR4 양성 세포를 제공하였다. 도 4는 3일간의 완성 내배엽으로의 분화 후 인간 배아 줄기 세포에서의 정규화된 SOX17 단백질 발현에 대한 고집적 이미지 분석을 보여준다. GDF-8 + Wnt3a 또는 GDF-8 + 소분자를 사용한 처리군에 대한 발현 수준은 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 처리와 유사하다.

[0492] 도 5는 췌장 내배엽으로의 분화의 제 3단계 후 인간 배아 줄기 세포에서의 정규화된 Pdx1 및 Cdx2 단백질 발현에 대한 고집적 이미지 분석을 보여준다. GDF-8 + Wnt3a 또는 GDF-8 + Wnt3a 또는 GDF-8 + 본 발명의 화합물을 사용한 처리군에 대한 발현 수준은 동일한 수준의 PDX1 및 CDX2를 보여준다. 일부 처리군에서, 분화 후 유지된 세포수는 감소되어, PDX1 발현 세포의 비를 증가시켰다. 유사한 결과는 도 6에서 보여진 바와 같은 분화의 제 4단계 후 모든 처리군에서 동등한 정규화된 PDX1 발현을 보여주는 것으로 취득되었다. 도 7에서, 인슐린 및 글루카곤의 정규화된 단백질 수준이 보여지고, 이는 액티빈 A 및 GDF-8 처리군 간의 동일한 발현을 나타낸다.

[0493] 이러한 수렴적인 결과는 Wnt3a 또는 화합물 34 또는 화합물 56과 함께 GDF-8이 완성 내배엽 분화 및 후속한 췌장 내배엽 및 내분비 분화 동안에 액티빈 A 대신일 수 있음을 나타낸다.

[0494] 실시예 13

[0495] 단백질의 GDF 패밀리의 다른 구성원을 사용한 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성

[0496] 인간 배아 줄기 세포를 다른 GDF 패밀리 구성원으로 처리한다면 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 형성할 수 있는지 알아보는 것은 중요하였다. 화합물 34 또는 화합물 56과 조합된 Wnt3a는 6개의 상이한 GDF 성장 인자 [GDF-3, GDF-5, GDF-8, GDF-10, GDF-11, 및 GDF-15]와 함께 인간 배아 줄기 세포 상에서 시험하여, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단백질의 GDF 패밀리의 구성원의 능력을 측정하였다. 액티빈 A 및 Wnt3a로 처리된 세포의 평행 대조군은 비교를 위해 유지하였다.

[0497] 검정용 세포의 제조: 인간 배아 줄기 세포 (H1 인간 배아 줄기 세포주)의 스태크 배양물은 평균 매 4일마다 계대 배양하면서 MEF 조건화된 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭스™ (BD 바이오사이언스; Cat # 356231)-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/mL 디스페이즈(인비트로젠; Cat # 17105-041)의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고 이어서 MEF 조건화된 배양 배지로 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수합하고 잔여 디스페이즈를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비에서 또는 중간 검정을 위해 1:1 비에서 분리하였다. 모든 인간 ES 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형

및 마이코플라스마의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다.

[0498] 세포 클러스터를 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지에 고르게 재현탁시키고, 감소된 성장 인자 매트릭셀TM-코팅된 96-웰 팩카드 뷰플레이트(피킨 엘머; Cat # 6005182) 상에 0.1mL/웰의 부피로 접종하였다. 각각의 웰의 쓰고 난 배지를 흡인하여, 동일 부피의 새로운 배지로 교체함으로써 매일 공급을 행하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 37°C, 5% CO₂에서 유지시켰다.

[0499] **검정법:** 검정은 각 웰에서 배양 배지를 흡인하고 시험 배지의 분취물(100 μ l)(0.5mL)을 다시 첨가함으로써 개시하였다. 시험 조건은 총 4일의 검정 기간에 걸쳐 3중으로 수행하였고, 각 웰에서 배지를 흡인하고 신선한 시험 배지로 대체함으로써 제 1 일 및 제 3 일에 공급하였다. 다양한 구성원의 GDF 패밀리 단백질을 하기와 같이 시험하기 위해 수득하였다: GDF-3 (피프로텍; Cat # 120-22); GDF-5 (테퓨이 오르토펜디스, 인코포레이티드 (DePuy Orthopaedics, Inc.), 존슨 앤드 존슨 컴퍼니(Johnson & Johnson company)); GDF-8 (R&D 시스템즈; Cat # 788-G8); GDF-10 (R&D 시스템즈; Cat # 1543-BP); GDF11 (피프로텍; Cat # 120-11); GDF-15 (R&D 시스템즈; Cat # 957-GD). 검정 제 1 일에, 모든 웰에 0.5% 태아 소 혈청(하이클론; Cat # SH30070.03)이 보충된 기본 배지 DMEM:F12 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032)의 분취물(80 μ l)을 넣었다. 일련의 5개의 상이한 대조군 또는 실험 시험 표본을 제조하여, 액티빈 A 또는 다양한 GDF를 Wnt3a 또는 화합물 34 또는 화합물 56과 함께 평가하였다. 이들 시험 표본은 적절하게 매칭된 검정 웰에 20 μ l 분취물(5x 농축)로 첨가하여, 지시된 최종 검정 조건에서 각 웰에서 100 μ l의 최종 검정 부피를 수득하였다. 제 1 세트의 대조군 표본에서, 하기 조건을 시험하였다: 1) 무첨가(즉, 보충적 성장 인자 또는 소분자 없음); 2) 100ng/mL 액티빈 A(피프로텍; Cat #120-14)와 함께 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF); 3) 20ng/mL Wnt3a 단독; 4) 임의의 성장 인자 또는 소분자 없이 화합물 34 단독 (2.5 μ M); 5) 임의의 성장 인자 또는 소분자 없이 화합물 56 단독 (2.5 μ M). 제 2 세트의 시험 표본에서, 100ng/mL GDF3와 함께 하기 조건을 시험하였다: 1) 무첨가(즉, GDF-3 단독); 2) 20ng/mL Wnt3a; 3) 20ng/mL Wnt3a와 함께 화합물 34(2.5 μ M); 4) 화합물 34 (2.5 μ M); 5) 화합물 56 (2.5 μ M); 및 6) 20ng/mL Wnt3a와 함께 화합물 56 (2.5 μ M). 제 3 세트의 시험 표본에서, 각각의 6개의 조건을 100ng/mL GDF-5와 조합하였다. 제 4 세트의 시험 표본에서, 각각의 6개의 조건을 100ng/mL GDF-8과 조합하였다. 제 5 세트의 시험 표본에서, 각각의 6개의 조건을 100ng/mL GDF-10과 조합하였다. 제 6 세트의 시험 표본에서, 각각의 6개의 조건을 100ng/mL GDF-11과 조합하였다. 제 7 세트의 시험 표본에서, 각각의 6개의 조건을 100ng/mL GDF-15와 조합하였다. 검정 제 3 일에, 모든 시험 표본을 위한 모든 웰에, Wnt3a 또는 화합물 34 또는 화합물 56이 없이 100ng/mL 액티빈 A 또는 100ng/mL 개별의 GDF 성장 인자를 넣었고 2% FBS가 보충된 DMEM:F12 배지에서 희석시켰다.

[0500] **고집적 분석:** 배양 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 1회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 2시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. PBS로 3회 세정한 후, PBS 내에서 1:200으로 희석된 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 인비트로젠; Cat #A21467)를 각 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 5 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 15분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.

[0501] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 이미지는 웰 당 25개 필드에서 수득하였다. 총 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 수득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 4500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다.

[0502] 도 8은 4일간의 완성 내배엽으로의 분화 후 인간 배아 줄기 세포에서의 SOX17 단백질 발현을 위한 고집적 이미지 분석을 보여준다. 각 경우에, 결과는 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 양성 대조군 처리에 대해 정규화된다. 도 8a에서, 단지 양성 대조군 처리만이 SOX17의 유의한 발현을 수득하였고; Wnt3a 단독 또는 화합물 34 또는 화합물 56 단독을 사용한 처리는 SOX17 발현을 유도하는데 실패하였다. 도 8, B 내지 G의 패널에서, 정규화된

SOX17 발현 수준은 개별 처리에서 액티빈 A 대신에 각각의 GDF 성장 인자에 대해 보여진다. GDF-3 (도 8b) 및 GDF-5 (도 8c)는 SOX17의 약한 발현을 본 발명의 화합물 중 하나가 존재하는 시험 표본에서만 유도하였다. GDF10 (도 8d), GDF11 (도 8e) 및 GDF15 (도 8g)는 GDF3 또는 5를 처리했을 때 관찰된 것보다 더 크나 액티빈 A 및 Wnt3a 처리를 사용해 관찰된 것보다 더 작은 유의한 수준의 SOX17 발현을 유도하였다. 일반적으로, SOX17 발현은 GDF-10, GDF-11, 또는 GDF-15가 Wnt3a와 조합되는 경우 무시할만하였으나, 본 발명의 화합물 중 하나와 조합된 경우; 특히 화합물 34와 조합된 경우 향상되었다. 도 8d는 GDF-8이 화합물 34 또는 화합물 56과 조합되는 경우 SOX17의 강력한 유도를 야기한 경우 GDF-8을 사용하는 처리군에 대한 결과를 보여주며, 초과하는 결과가 액티빈 A/Wnt3a 양성 대조군을 사용해 관찰되었다. 이러한 실시예의 일부에서, GDF 성장 인자와 조합된 화합물 34 또는 화합물 56의 존재는 또한, 분화 동안에 세포수의 증가를 야기하였다.

[0503] 이러한 수합적인 결과는 GDF-8이 화합물 34 또는 화합물 56과 함께 사용된 경우 시험되는 모든 다른 GDF 패밀리 구성원보다 우수하였고, 완성 내배엽 분화 동안에 액티빈 A 대신에 사용가능하였다.

[0504] 실시예 14

[0505] TGF 슈퍼패밀리의 단백질의 다른 구성원을 사용한 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성

[0506] 인간 배아 줄기 세포를 다른 TGF 슈퍼패밀리 구성원으로 처리하는 것이 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성을 용이하게 할 수 있음을 알아보는 것은 중요하였다. 화합물 34 및 Wnt3a는 TGF β -1, BMP2, BMP3, 또는 BMP4와 함께 인간 배아 줄기 세포 상에서 시험하여, 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 TGF 슈퍼패밀리 구성원의 능력을 측정하였다. 즉, GDF-8의 2개의 상이한 시판의 공급원은 Wnt3a을 이용해 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 그의 능력에 대해 알아보았다. Wnt3a와 함께 액티빈 A를 사용하는 양성 대조군은 비교를 위해 유지시켰다.

[0507] 검정용 세포의 제조: 인간 배아 줄기 세포 (H1 인간 배아 줄기 세포주)의 스타크 배양물은 평균 매 4일마다 계대 배양하면서 MEF 조건화된 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭셀™-(BD 바이오사이언스; Cat # 356231)-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/mL 디스페이즈(인비트로젠; Cat # 17105-041)의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고 이어서 MEF 조건화된 배양 배지로 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수합하고 잔여 디스페이즈를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비에서 또는 중간 검정을 위해 1:1 비에서 분리하였다. 모든 인간 배아 줄기 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형 및 마이코플라스마의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다.

[0508] 세포 클러스터를 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지에 고르게 재현탁시키고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 96-웰 팩카드 뷰플레이트(피킨 엘머; Cat # 6005182) 상에 0.1mL/웰의 부피로 접종하였다. 각각의 웰의 쓰고 난 배지를 흡인하여, 동일 부피의 새로운 배지로 교체함으로써 매일 공급을 행하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 37°C, 5% CO₂에서 유지시켰다.

[0509] 검정법: 검정은 각 웰에서 배양 배지를 흡인하고 시험 배지의 분취물 (100 μ l) 을 다시 첨가하여, 개시하였다. 시험 조건은 총 3일의 검정 기간에 걸쳐 3중으로 수행하였고, 각 웰에서 배지를 흡인하고 신선한 시험 배지로 대체함으로써 제 1 일 및 제 2 일에 공급하였다. 다양한 성장 인자 단백질을 하기와 같이 시험에서 수득하였다: BMP-2 (R&D 시스템즈; Cat # 355-BM); BMP-3(R&D 시스템즈; Cat # 113-BP); BMP-4(R&D 시스템즈; Cat # 314-BP); TGF β -1(R&D 시스템즈; Cat # 240-B); GDF-8 (피프로텍; Cat # 120-00); GDF-8(세난도아; Cat #100-22); 및 액티빈 A(피프로텍; Cat #120-14). 검정 제 1 일에, 각 웰에 80 μ l의 성장 배지[2.5% 알부민 소프랙션 V, 무지방산(FAF BSA)(MP 바이오메디칼스, 인코포레이티드; Cat # 152401), 및 10ng/mL bFGF를 함유하는 RPMI-1640(인비트로젠; Cat #: 22400)]로 처리하였다. 일부 웰에서, 25ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF)를 성장 배지에 첨가하여, 20ng/mL의 최종 검정 농도를 수득하였다. 일부 웰에서, 액티빈 A를 성장 배지에 첨가하여, 100ng/mL의 최종 검정 농도를 수득하였다. 일부 웰에서, 3.125 μ M 화합물 34를 성장 배지에 첨가하여, 2.5 μ M의 최종 검정 농도를 수득하였다. 추가의 성장 인자(RPMI-1640에서 희석된 5x 농축)의 용량 적정을 또한 개별 시험 웰에 첨가하여, 모든 처리 조건에 대한 각 웰에서 100 μ l의 최종 검정 부피를 수득하였다. 검정 제 2 일에, Wnt3a 및 화합물 34를 검정에서 생략하였다. 모든 웰에 80 μ l의 성장 배지[2.5% FAF BSA, 및 10ng/mL bFGF를 함유하는 RPMI-1640] 및 20 μ l 의 각각의 성장 인자 희석액(RPMI-1640에서 희석된 5x 농축)을 제공하였다. 이러한 검정을 위한 비교 대조군은 하기를 포함하였다: 1) 성장 인자 무첨가; 2) Wnt3a 단독; 및 3) 액티빈 A와 함께 Wnt3a. GDF-8의 각 시판의 공급원을 Wnt3a와 함께 시험하였다. BMP 성장

인자뿐만 아니라 TGFβ-1의 각각을 Wnt3a, 화합물 34, 및 화합물 34와 조합된 Wnt3a 둘 다와 함께 시험하였다.

[0510] 고집적 분석: 배양 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 1회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 2시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. PBS로 3회 세정한 후, PBS 내에서 1:200으로 희석된 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 인비트로젠; Cat #A21467)를 각 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 5μg/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 15분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100μl/웰 PBS에 두었다.

[0511] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 이미지는 웰 당 25개 필드에서 획득하였다. 총 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 획득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 4500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다.

[0512] 도 9는 3일간의 완성 내배엽으로의 분화 후 인간 배아 줄기 세포에서의 SOX17 단백질 발현에 대한 고집적 이미지 분석을 보여준다. 각 경우, 결과는 액티빈 A와 Wnt3a에 대한 양성 대조군 처리에 대해 정규화된다. 도 9a의 결과는 성장 배지 단독, 또는 Wnt3a 단독을 사용한 처리는 SOX17 발현을 유도하지 못하였고; 단지 액티빈 A의 첨가만이 SOX17의 강력한 발현을 야기하였다. 도 9, 패널 B 및 C에서, GDF-8의 시판의 공급원의 각각에 대한 결과를 도시하고, 이는 2개의 판매 회사 간에 강력함에 있어서 차이를 보여준다. 액티빈 A보다 덜 강력함에도 불구하고, Wnt3a와 함께 GDF-8로 처리된 세포에서 SOX17 발현의 유의한 유도가 존재하였다. 도 9, 패널 D, E, F 및 G에서, 결과는 BMP2, BMP3, BMP4, 및 TGFβ-1을 사용하고, Wnt3a, 또는 화합물 34, 또는 Wnt3a와 화합물 34 둘 다와 조합된 각각의 성장 인자에 대한 용량 적정을 혼입한 완성 내배엽 분화에 대해 보여준다. 일부 처리(예를 들어, BMP2 및 BMP4)가 검정의 종료 시 세포수에 유의한 효과를 가졌더라도, 이들 성장 인자 및 처리 조합물 중 임의로 인한 SOX17 발현의 유도는 Wnt3a 처리 단독과 비교해 약하거나 무시할만하였다.

[0513] 실시예 15

[0514] 본 발명의 화합물의 선택과 함께 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성에 대한 용량 범위 연구

[0515] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성을 매개할 화합물 181, 화합물 180, 화합물 19, 화합물 202, 화합물 40, 및 화합물 34에 대한 최적의 작업 농도를 아는 것이 중요하였다. 종합해서, 나란한 비교는 완성 내배엽 검정법에서 액티빈 A 또는 GDF-8와 조합된 각각의 화합물의 적정에 대해 수행하였다. 마지막으로, 각각의 화합물에 대한 노출 기간은 검정에서 시험되었고, 또한 액티빈 A 또는 GDF-8과 함께, 검정 제 1 일의 검정에서만 또는 총 3일의 완성 내배엽 형성 전체에 걸쳐 화합물을 첨가하였다.

[0516] 검정용 세포의 제조: 인간 배아 줄기 세포(H1 인간 배아 줄기 세포주)의 스택 배양물은 평균 매 4일마다 계대 배양하면서 8ng/mL bFGF(퍼프록트 인코포레이티드; Cat # 100-18B)가 보충된 MEF 조건화된 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (BD 바이오사이언스; Cat # 356231)-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/mL 디스페이즈(인비트로젠; Cat # 17105-041)의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고 이어서 MEF 조건화된 배양 배지로 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수합하고 잔여 디스페이즈를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비에서 또는 중간 검정을 위해 1:1 비에서 분리하였다. 모든 인간 배아 줄기 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형 및 마이코플라스마의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다.

[0517] 세포 클러스터를 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지에 고르게 재현탁시키고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 96-웰 팩커드 뷰플레이트(퍼킨 엘머; Cat # 6005182) 상에 0.1mL/웰의 부피로 접종하였다. 각각의 웰의 쓰고 난 배지를 흡인하여, 동일 부피의 새로운 배지로 교체함으로써 매일 공급을 행하였다. 플레이트를 검

정 기간 전체에 걸쳐 37°C, 5% CO₂에서 유지시켰다.

[0518] **검정법:** 검정은 각 웰에서 배양 배지를 흡인하고 시험 배지의 분취물(100 μ l)을 다시 첨가함으로써 개시하였다. 시험 조건은 총 4일의 검정 기간에 걸쳐 4중으로 수행하였고, 각 웰에서 배지를 흡인하고 신선한 시험 배지로 대체함으로써 매일 공급하였다. 각 웰을 80 μ l의 성장 배지[2.5% 알부민 소 프랙션 V, 무지방산 (FAF BSA)(MP 바이오메디칼스, 인코포레이티드; Cat # 152401), 10ng/mL bFGF, 및 추가의 성장 인자 (1.25x 농축)를 함유하는 RPMI-1640(인비트로겐; Cat #: 22400)] 및 20 μ l의 시험 화합물(RPMI-1640에서 희석된 5x 농축)로 처리하여 웰 당 100 μ l의 최종 검정 부피를 획득하였다. 이러한 검정에서 시험 화합물은 6가지의 본 발명의 화합물: 화합물 181, 화합물 180, 화합물 19, 화합물 202, 화합물 40, 및 화합물 34, 및 시판의 GSK3i 억제제 BIO (EMD Chemicals, Inc.; Cat # 361550)을 포함하였다. 검정 제 1 일에, 웰을 다양한 대조군 또는 실험 조건으로 처리하였다. 지시된 바와 같은 최종 검정 농도를 사용하여 대조군 조건은 하기와 같았다: 1) 성장 배지 단독; 2) 20ng/mL Wnt3a 단독 R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF); 3) 100ng/mL 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14); 4) 100ng/mL 액티빈 A 및 20ng/mL Wnt3a; 5) 100ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8); 6) 100ng/mL GDF-8 및 20ng/mL Wnt3a. 시험 화합물을 2-배로 연속해서 희석시켜, 최종 검정에서 78nM 내지 10 μ M 범위의 농도를 제공하였다. 실험 시험 표본은 100ng/mL 액티빈 A 또는 100ng/mL GDF-8을 사용한 각각의 개별 화합물 희석 시리즈를 조합하였고, 2개의 처리 세트에는 Wnt3a가 없었다. 검정 제 2 일 및 제 3 일에, 일부 웰은 20ng/mL Wnt3a로 계속해서 처리하거나 액티빈 A 또는 GDF-8와 조합된 시험 화합물과 희석하였다. 다른 웰에서, 액티빈 A 또는 GDF-8 처리는 검정 제 2 일 및 제 3 일에 계속하였으나, Wnt3a 또는 희석된 시험 화합물을 제거하였다.

[0519] **고집적 분석:** 배양 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로겐; Cat # 14190)로 1회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로겐; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 2시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. PBS로 3회 세정한 후, PBS에서 1:200으로 희석된 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 인비트로겐; Cat #A21467)를 각 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 5 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로겐; Cat # H3570)를 실온에서 15분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.

[0520] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 이미지는 웰 당 25개 필드에서 획득하였다. 총 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 획득하였다. 핵의 분할을 희색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 4500의 희색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다.

[0521] **결과:** 고집적 분석 결과는 도 10 - 14에서의 SOX17 발현 및 도 15 - 19에서의 검정의 종료 시의 생성 세포수에 대해 보여진다. 도 10에서, 결과는 액티빈 A 또는 GDF-8을 단독으로 또는 Wnt3a와 조합해서 사용한 대조군 처리로 인한 SOX17 발현에 대해 보여진다. 액티빈 A 처리는 GDF-8 처리로 관찰된 것보다 유의하게 더 높은 SOX17 발현을 초래하였다. 유사하게는, 도 15에서 보여진 바와 같이, Wnt3a가 검정 동안 1일 또는 3일 동안 존재하는가의 여부와 상관없이, 액티빈 A 처리는 GDF-8 처리를 사용해 보여진 것보다 검정의 종료 시 더 높은 수의 세포를 초래하였다. 액티빈 A 처리와 함께 화합물 181, 화합물 180, 화합물 19, 화합물 202, 화합물 40, 또는 화합물 34 중 임의의 첨가하는 것은 화합물이 검정 개시때인 1일 또는 검정의 기간 전체에 걸쳐 3일 동안 존재하는가와 상관없이 SOX 17 발현을 증진시키거나(도 11 -12) 세포수를 증가시키지 못하였다(도 17-18). 그러나, GDF-8과 함께 화합물 181, 화합물 180, 화합물 19, 화합물 202, 화합물 40, 또는 화합물 34를 사용한 처리는 SOX17 발현을 유의하게 향상시켰고(도 13-14), 또한 검정 종료 시의 세포수를 증진시켰다(도 18-19). 화합물 181, 화합물 180, 화합물 19, 화합물 202, 화합물 40, 또는 화합물 34 및 GDF-8를 조합해서 사용한 경우, 많은 경우에 SOX17 발현 및 세포수의 향상은 액티빈 A 처리를 사용해 관찰된 결과와 동일하였다. GDF-8과 조합된 향상된 분화는 독성이 종종 최고 농도에서 관찰됨에도 불구하고, 많은 화합물에 대해 용량 적정 효과에서 뚜렷하였다. 대부분의 경우, 화합물 및 GDF-8을 사용한 처리로부터의 최적의 유의한 효과는 검정 개시 시, 화합물 노출 제 1 일에만 뚜렷하였다. 일부 경우, 검정 기간 전체에 걸쳐 화합물의 존재는 저하 효과가 전혀 없었거나 약간의 유의한 효과를 가졌다. 이들 수렴적인 결과로부터, GDF8 처리와 함께 각각의 화합물에 대한 최적의 작

업 농도를 측정하였다. 결과는 일반적으로 본 검정에서 시험된 것과 같이 1-10 μM 범위에서 특이적인 화합물이었다.

- [0522] 실시예 16
- [0523] 본 발명의 방법에 따르지 않고 형성된 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 체장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화될 수 있다.
- [0524] 추가의 소분자는 완성 내배엽 분화를 위한 GDF-8과 함께 시험하였다. 이들은 시판의 GSK3 억제제뿐만 아니라 본 발명의 화합물을 포함하였다. 단계식 분화 프로토콜은 다양한 소분자와 함께 GDF-8로 처리된 세포에 적용하였다. 분화의 효능은 체장 내배엽, 또는 체장 내분비 계통을 대표하는 생물마커에 대한 유전자 발현에 의해 측정하였다. 액티빈 A 및 Wnt3a로 처리된 세포의 평행 대조군 표본은 단계식 분화 방법 전체를 통틀어서 비교를 위해 유지시켰다.
- [0525] **검정용 세포의 제조:** 인간 배아 줄기 세포 (H1 인간 배아 줄기 세포주)의 스타크 배양물은 평균 매 4일마다 계대 배양하면서 MEF 조건화된 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (BD 바이오사이언스; Cat # 356231)-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/mL 디스페이즈(인비트로젠, Cat #: 17105-041)의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고 이어서 MEF 조건화된 배양 배지로 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수합하고 잔여디스페이즈를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비에서 또는 중간 검정을 위해 1:1 비에서 분리하였다. 모든 인간 배아 줄기 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형 및 마이코플라즈마의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다.
- [0526] 세포 클러스터를 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지에 고르게 재현탁시키고, 감소된 성장 인자 매트릭셀-코팅된 24-웰, 흑색 벽 배양 플레이트(Arctic White; Cat # AWLS-303012) 상에 0.5mL/웰의 부피로 플레이팅하였다. 각각의 웰의 쓰고 난 배지를 흡인하여, 동일 부피의 새로운 배지로 교체함으로써 매일 공급을 행하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 37°C, 5% CO₂에서 유지시켰다.
- [0527] **검정법:** 검정은 각 웰에서 배양 배지를 흡인하고 시험 배지의 분취물(0.5mL)을 다시 첨가하여 개시하였다. 분화의 제 1 단계 동안의 시험 조건은 총 3일의 기간에 걸쳐 수행하였고, 각 웰에서 배지를 흡인하고 신선한 시험 배지로 대체함으로써 매일 공급하였다. 검정 제 1 일에, 100ng/mL 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14) 또는 100ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8)을 개별 검정 웰에 첨가하고, 여기서, 각각의 성장 인자는 2% 알부민 소 프랙션 V, 무지방산 (FAF BSA) (프롤리안트 인코포레이티드(Proliant Inc.) Cat #: SKU 68700), 및 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF)와 함께 RPMI-1640 배지(인비트로젠; Cat # 22400)로 희석시켰다. 검정 제 2 일에, 100ng/mL 액티빈 A 또는 100ng/mL GDF-8을 Wnt3a가 없는 2% FAF BSA가 보충된 RPMI-1640 배지로 희석시켰다. GDF-8을 사용하는 일부 시험 표본에서, Wnt3a를 소분자 화합물로 대체하고, 완성 내배엽 분화의 제 1 일에만 첨가하였다. 이들 소분자는 화합물 19 (검정에서 2.5 μM), 화합물 202 (검정에서 2.5 μM), 화합물 40 (검정에서 2.5 μM), 또는 시판의 GSK3 억제제 BIO (검정에서 0.5 μM) (EMD 케미칼스, 인코포레이티드(EMD Chemicals, Inc.); Cat # 361550)를 포함하였다. 분화 제 1 단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 완성 내배엽 형성의 마커인 CXCR4의 수준을 평가하기 위한 유세포분석을 위해 수합되었다. 추가의 웰은 분화의 다른 마커를 측정하기 위한 RT-PCR 분석을 위해 수합되었다.
- [0528] 완성 내배엽 분화의 제 1 단계의 종료 시, 각각의 처리군의 평행 웰의 복제물 세트에 추가의 단계식 분화를 하였다. 제 1 분화 단계 후, 후속한 배양 및 분화를 받는 모든 웰에 동일한 처리를 한 것을 유지하는 것이 중요하다. 이러한 지속적인 분화 프로토콜은 하기에 기술된다.
- [0529] 분화 프로토콜의 단계 2는 2일에 걸쳐 수행하였다. 각각의 웰에서 배지를 흡인하고 2% FAF BSA, 50ng/mL FGF7 (퍼프로텍; Cat # 100-19), 및 250nM 사이클로파민-KAAD (칼바이오펜; Cat # 239804)를 함유하는 DMEM:F12 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032)의 새 분취물(0.5mL)로 교환함으로써 세포에 매일 공급하였다.
- [0530] 분화 프로토콜의 단계 3을 7일에 걸쳐 수행하였다. 각 웰로부터 배지를 흡인하고, 0.1% 알부맥스 (인비트로젠; Cat #: 11020-021), 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS-X; 인비트로젠; Cat # 51500056), 50ng/mL FGF7, 100ng/mL 노긴(R&D 시스템즈; Cat # 3344-NG), 250 nM KAAD-사이클로파민, 및 2 μM 모든-trans 레틴산(RA) (시그마-알드리지; Cat # R2625)이 보충된 DMEM-고 포도당(인비트로젠; Cat # 10569)의 새 분취물(0.5mL)로 교환함으로써 세포에 매일 공급하였다. 분화 제 3단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 분화의 마커를 측정하기 위한 RT-PCR에 의한 분석을 위해 수합되었다. 다른 배양 웰에 Pdx1, 및 Cdx2의 단백질 발현 수준에

대한 고집적 이미지 분석을 하였다.

- [0531] 분화 프로토콜의 단계 4를 3일에 걸쳐 수행하였다. 각 웰로부터 배지를 흡인하고, 0.1% 알부맥스, 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 100ng/mL 노긴, 및 1 μ M Alk 5 억제제 (엑소라; Cat # ALX-270-445)가 보충된 DMEM-고포도당의 새 분취물(0.5mL)로 교환함으로써 세포에 매일 공급하였다. 분화의 제 4단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 분화의 마커를 측정하기 위한 RT-PCR에 의한 분석을 위해 수합되었다. 다른 배양 웰에 Pdx1의 단백질 발현 수준을 위한 고집적 이미지 분석을 하였다.
- [0532] 분화 프로토콜의 단계 5는 0.1% 알부맥스, 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 및 1 μ M Alk 5 억제제가 있는 DMEM-고포도당에서 7일에 걸쳐 수행하였다. 각 웰에서 배지를 흡인하고 모든 날에 새 분취물(0.5mL)로 교환하였다. 분화의 제 5단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 분화의 마커를 측정하기 위한 RT-PCR에 의한 분석을 위해 수합되었다. 다른 배양 웰은 인슐린 및 글루카곤의 단백질 발현 수준에 대한 고집적 이미지 분석을 하였다.
- [0533] FACS 분석: FACS 분석용 세포는 PBS(인비트로젠; Cat # 14040-133) 내 0.5% 인간 감마-글로불린(시그마; Cat # G-4386)의 1:5 용액: BD FACS 염색 완충액 - BSA (BD; Cat #554657)에서 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 블라킹시켰다. 다음, 세포를 CD9 PE(BD; Cat # 555372), CD99 PE (칼텍(Caltag); Cat # MHCD9904) 및 CXCR4 APC (R&D 시스템즈; Cat# FAB173A)에 대한 항체로 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 염색하였다. BD FACS 염색 완충제 내에서의 일련의 세정 후, 세포를 7-AAD(BD; Cat # 559925)로 생존성에 대해 염색하고, BD FACS어레이 상에서 진행시켰다. PE 및 APC 둘다에 대한 마우스 IgG1K 아이소타입 대조군 항체를 사용해 양성 세포%를 게이팅하였다.
- [0534] RT-PCR 분석: 에탄올-함유, 고염 완충액의 존재 하에 실리카-겔 막(Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA)에 결합시키고 이어서 세정하여 오염물을 제거함으로써 RNA 표본을 정제하였다. 터보(TURBO) DNA-프리(free) 키트(엠비온, 인크.(Ambion, INC))를 이용하여 RNA를 추가로 정제하고, 이어서 고품질 RNA를 물에서 용출시켰다. 수율 및 순도는 분광 광도계 상에서 A260 및 A280 관독에 의해 평가하였다. cDNA 복사본은 ABI(ABI, CA) 고용량 cDNA 아키브 키트(archive kit)를 사용해 정제된 RNA로부터 제조하였다.
- [0535] 달리 명시되지 않으면, 모든 시약은 어플라이드 바이오시스템즈로부터 구매하였다. 실시간 PCR 반응은 ABI 프리즘 $^{\circ}$ 7900 서열 검출 시스템(ABI PRISM $^{\circ}$ 7900 Sequence Detection System)을 사용해 수행하였다. 택맨 $^{\circ}$ 유니버설 PCR 마스터 믹스 $^{\circ}$ (ABI, 캘리포니아주)(TAQMAN $^{\circ}$ UNIVERSAL PCR MASTER MIX $^{\circ}$ (ABI, CA))는 20 μ L의 총 반응 부피 내 20ng의 역전사 RNA와 함께 사용하였다. 각각의 cDNA 샘플을 이중으로 행하여 피펫팅 에러에 대해 보정하였다. 프라이머 및 FAM-표지 택맨 $^{\circ}$ 프로브는 200nM의 농도로 사용하였다. 각각의 표적 유전자의 발현 수준은 어플라이드 바이오시스템즈에 의해 이미 개발된 인간 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소(GAPDH) 내인성 대조군을 사용해 정규화하였다. 프라이머 및 프로브 세트는 표 12에 열거한다. 50 $^{\circ}$ C에서 2분 동안, 이어서 95 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 초기 인큐베이션 후, 표본은 2단계에서 40회 순환시켰다-95 $^{\circ}$ C에서 15초 동안의 변성 단계, 및 이어서 60 $^{\circ}$ C에서 1분 동안의 어닐링/연장 단계. 데이터 분석은 진앰프 $^{\circ}$ 7000 서열 검출 시스템 소프트웨어(GENEAMP $^{\circ}$ 7000 Sequence Detection System software)를 사용해 수행하였다. 각각의 프라이머/프로브 세트에 대하여, 형광 강도가 증폭의 지수 영역의 중간 특정 값에 도달하는 사이클 수로서 Ct 값을 결정하였다. 상대적인 유전자 발현 수준을 비교 Ct 방법을 이용하여 계산하였다. 간략하게는, 각각의 cDNA 표본에 대해, 내인성 대조군 Ct 값을 흥미있는 Ct의 유전자에서 제하여, 델타 Ct값(Δ Ct)을 수득하였다. 표적의 정규화된 양은 2- Δ Ct로서 계산하였고, 이는 증폭이 100% 효율인 것으로 가정한다. 최종 데이터를 보정 샘플에 대하여 나타내었다.
- [0536] 고집적 분석: 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 1회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 2시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. PBS로 3회 세정한 후, PBS 내에서 1:200으로 희석된 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 인비트로젠; Cat # A21467)를 각 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 5 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 15분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ L/웰 PBS에 두었다. 분석에 사용되는 다른 일차 항체는 1:200 희석 토끼 항-인간 인슐린 (세포 신호전달; Cat # C27C9), 및 1:1500 희석 마우스 항-인간 글루카곤 (시그마-알드리치; Cat # G2654)을 포함하였다. 분석에 사용되는 이차 항체는 1:1000 희석 알렉사 플루오르 647 닭 항-토끼 IgG (인비트로젠; Cat # A21443), 및 1:1000 희석 알렉사 플루오르 488 닭 항-마우스 IgG (인비트로젠; Cat # A21200)을

포함하였다.

- [0537] 이미지는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 이미지는 웰 당 25개 필드에서 획득하였다. 총 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 획득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 4500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다.
- [0538] 대표적인 분화 마커에 대한 PCR 결과는 각각의 분화 단계로부터 수합된 세포에 대한 표 14에서 보여진다. GDF-8 및 Wnt3a으로 또는 GDF-8 및 소분자로 처리된 표본은 내배엽 및 내분비 분화와 관련된 마커의 유사한 발현 수준을 보여주었다.
- [0539] 도 20, 패널 A는 분화 제 1 단계 후 완성 내배엽 마커인 CXCR4의 FACS 분석을 보여준다. 인간 배아 줄기 세포를 GDF-8 및 Wnt3a로 처리하면 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 처리와 비교해 유사한 %의 CXCR4 양성 세포를 획득하였다. 인간 배아 줄기 세포를 GDF-8 및 본 발명의 화합물(화합물 19, 화합물 202, 화합물 40, 또는 GSK3 억제제 IX BIO)로 처리하는 것 또한, 동일하거나 약간 더 높은 %의 CXCR4 양성 세포를 획득하였다. 도 20, 패널 B는 3일간의 완성 내배엽으로의 분화 후 인간 배아 줄기 세포에서 정규화된 SOX17 단백질 발현에 대한 고집적 이미지 분석을 보여준다. 일부 경우, GDF-8을 사용한 처리는 분화 제 1 단계의 종료 시 더 낮은 세포수를 초래하였다. 그러나, Wnt3a 또는 소분자 억제제와 조합된 GDF-8 처리는 완성 내배엽의 마커인 SOX17의 발현을 분명하게 유도하였다. 한 경우, GDF-8 및 화합물 40을 사용한 처리는 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 처리와 동일한 배양에서 세포수 및 SOX17 발현을 제공하였다.
- [0540] 도 20, 패널 C는 분화 단계 5를 통해 처리된 배양물로부터 회수된 상대 세포수에 대한 고집적 이미지 분석을 보여준다. 단계 1의 종료에서 더 일찍 관찰된 바와 같이, 일부 처리는 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 처리에 대한 세포 회수의 하락을 야기하였다. 이러한 세포수의 감소는 GDF-8을 GSK3 억제제 BIO와 함께 사용하고 또한 GDF-8을 화합물 19와 함께 사용한 처리군에서 특이적으로 나타났다. 추가의 GDF-8 처리군은 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 처리와 유사한 세포 회수를 가졌다. 도 20, 패널 D-F에서, 인슐린 및 글루카곤의 정규화된 단백질 수준은 각각의 처리군에 대해 그의 개별 비에 따라 보여진다. 인슐린 및 글루카곤의 유사한 수준은 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 처리에 대해 GDF-8 처리의 각각을 사용해 획득되었고, 이는 Wnt3a 또는 소분자와 함께 GDF-8은 완성 내배엽 분화 및 후속한 체장 내배엽 및 내분비 분화 동안에 액티빈 A를 대신할 수 있다.
- [0541] 실시예 17
- [0542] GDF-8 및 본 발명의 화합물을 사용하여 형성된 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 체장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화시킬 수 있다
- [0543] 추가의 소분자는 완성 내배엽 분화를 위해 GDF-8 및 액티빈 A와 함께 시험되었다. 이들은 시판의 GSK3 억제제 뿐만 아니라 본 발명의 화합물을 포함하였다. 단계식 분화 프로토콜은 다양한 소분자와 함께 GDF-8로 처리된 세포에 적용하였다. 분화의 효능은 체장 내배엽, 및 체장 내분비 계통을 대표하는 생물마커에 대한 유전자 발현에 의해 측정하였다. 액티빈 A 및 Wnt3a로 처리된 세포의 평행 대조군 표본은 단계식 분화 방법 전체를 통틀어서 비교를 위해 유지시켰다.
- [0544] 검정용 세포의 제조: 인간 배아 줄기 세포 (H1 인간 배아 줄기 세포주)의 스탱 배양물은 평균 매 4일마다 계대 배양하면서 8ng/mL bFGF (피프로텍 인코포레이티드; Cat # 100-18B)가 보충된 MEF 조건화된 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (BD 바이오사이언스; Cat # 356231)-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/mL 디스페이즈(인비트로젠; Cat # 17105-041)의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고 이어서 MEF 조건화된 배양 배지로 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수합하고 잔여디스페이즈를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비에서 또는 중간 검정을 위해 1:1 비에서 분리하였다. 모든 인간 ES 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형 및 마이코플라스마의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다.
- [0545] 세포 클러스터를 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지에 고르게 재현탁시키고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™-코팅된 24-웰, 흑색 벽 배양 플레이트 (Arctic White; Cat # AWLS-303012)에서 0.5mL/웰의 부피로 배양하였

다. 각각의 웰의 쓰고 난 배지를 흡인하여, 동일 부피의 새로운 배지로 교체함으로써 매일 공급을 행하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 37°C, 5% CO₂에서 유지시켰다.

- [0546] **검정법:** 검정은 각 웰에서 배양 배지를 흡인하고 시험 배지의 분취물(0.5mL)을 다시 첨가하여 개시하였다. 분화 제 1 단계에 대한 시험 조건은 총 3일의 검정 기간에 걸쳐 수행하였고, 각 웰에서 배지를 흡인하고 신선한 시험 배지로 대체함으로써 매일 공급하였다. 검정 제 1 일에, 100ng/mL 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14) 또는 100ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8)을 개별 검정 웰에 첨가하고, 여기서, 각각의 성장 인자는 2% 알부민 소 프랙션 V, 무지방산 (FAF BSA)(MP 바이오메디칼스, 인코포레이티드; Cat # 152401)이 있는 RPMI-1640 배지(인비트로겐; Cat # 22400)로 희석시켰다. 일부 표본에서, 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF)를 또한 포함하였다. 검정 제 2 일에, 100ng/mL 액티빈 A 또는 100ng/mL GDF-8은 모든 표본에서 Wnt3a는 생략된 2% FAF BSA가 보충된 RPMI-1640 배지로 희석시켰다. GDF-8을 사용한 일부 시험 표본에서, Wnt3a를 소정의 농도의 소분자 화합물로 대체하고, 단지 완성 내배엽 분화의 제 1 일에만 첨가하였다. 이들 소분자는 화합물 181(검정 내 1.25 μM), 화합물 180(검정 내 2.5 μM), 화합물 19(검정 내 10 μM), 화합물 202(검정 내 2.5 μM), 화합물 40(검정 내 5 μM), 화합물 34(검정 내 2.5 μM), 화합물 206(검정 내 2.5 μM), 및 시판의 GSK3 억제제 IX BIO(검정 내 10 μM) (EMD 케미칼스, 인코포레이티드; Cat # 361550)을 포함하였다. 분화 제 1 단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 완성 내배엽 형성의 마커인 CXCR4의 수준을 평가하기 위한 유세포분석을 위해 수합하였다. 추가의 웰은 분화의 다른 분화 마커를 측정하기 위한 RT-PCR 분석을 위해 수합되었다.
- [0547] 완성 내배엽 분화의 제 1 단계의 종료 시, 각각의 처리군의 평행 웰의 복제물 세트에 추가의 단계식 분화 처리를 하였다. 제 1 분화 단계 후, 후속한 배양 및 분화를 받는 모든 웰에 동일한 처리를 한 것을 유지하는 것이 중요하다. 이러한 지속적인 분화 프로토콜은 하기에 기술된다.
- [0548] 분화 프로토콜의 단계 2는 2일에 걸쳐서 수행하였다. 세포는 각 웰에서 배지를 흡인하고 2% FAF BSA, 50ng/mL FGF7(퍼프로텍; Cat # 100-19), 및 250nM 사이클로파민-KAAD(칼바이오캠; Cat # 239804)를 함유한 DMEM:F12 배지(인비트로겐; Cat # 11330-032)의 새 분취물(0.5mL)로 교체함으로써 매일 공급하였다.
- [0549] 분화 프로토콜의 단계 3은 4일에 걸쳐 수행하였다. 세포는 각 웰에서 배지를 흡인하고 0.1% 알부맥스 (인비트로겐; Cat #: 11020-021), 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS-X; 인비트로겐; Cat # 51500056), 50ng/mL FGF7, 100ng/mL 노긴(R&D 시스템즈; Cat # 3344-NG), 250 nM KAAD-사이클로파민, 및 2 μM 모든-trans 레틴산 (RA)(시그마-알드리치; Cat # R2625)(RA) (시그마-알드리치; Cat # R2625)이 보충된 DMEM-고포도당(인비트로겐; Cat # 10569)의 새 분취물(0.5mL)로 교체함으로써 매일 공급하였다. 분화의 제 3단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 분화의 마커를 측정하기 위한 RT-PCR에 의한 분석을 위해 수합되었다.
- [0550] 분화 프로토콜의 단계 4는 3일에 걸쳐 수행하였다. 세포는 각 웰에서 배지를 흡인하고 0.1% 알부맥스, 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 100ng/mL 노긴, 및 1 μM Alk 5 억제제 (엑소라; Cat # ALX-270-445)가 보충된 DMEM-고 포도당의 새 분취물(0.5mL)로 교환함으로써 세포에 매일 공급하였다. 분화의 제 4단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 분화의 마커를 측정하기 위한 RT-PCR에 의한 분석을 위해 수합되었다.
- [0551] 분화 프로토콜의 단계 5는 0.1% 알부맥스, 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 및 1 μM Alk 5 억제제가 있는 DMEM-고 포도당에서 7일에 걸쳐 수행하였다. 각 웰의 배지를 흡인하고, 모든 날에 새 분취물(0.5mL)로 교환하였다. 분화의 제 5단계의 종료 시, 일부 웰의 세포는 분화의 마커를 측정하기 위한 RT-PCR에 의한 분석을 위해 수합되었다. 다른 배양 웰은 인슐린 및 글루카곤의 단백질 발현 수준에 대한 고집적 이미지 분석을 하였다.
- [0552] **FACS 분석:** FACS 분석용 세포는 PBS(인비트로겐; Cat # 14040-133) 내 0.5% 인간 감마-글로불린(시그마; Cat# G-4386)의 1:5 용액: BD FACS 염색 완충액 - BSA (BD; Cat #554657)에서 4°C에서 5분 동안 블라킹시켰다. 다음, 세포를 CD9 PE(BD; Cat # 555372), CD99 PE(Caltag; Cat # MHCD9904) 및 CXCR4 APC (R&D 시스템즈; Cat# FAB173A)에 대한 항체로 4°C에서 30분 동안 염색하였다. BD FACS 염색 완충액에서의 일련의 세정 후, 세포를 7-AAD(BD; Cat # 559925) 를 사용해 생존성을 알아보기 위해 염색하고, BD FACS어레이 상에서 진행시켰다. PE 및 APC 둘 다에 대한 마우스 IgG1K 아이소타입 대조군 항체를 사용해 양성 세포%를 게이팅하였다.
- [0553] **RT-PCR 분석:** 에탄올-함유, 고염 완충액의 존재 하에 실리카-겔 막(Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA)에 결합시키고 이어서 세정하여 오염물을 제거함으로써 RNA 표본을 정제하였다. 터보(TURBO) DNA-프리(free) 키트(엠비온, 인크.(Ambion, INC))를 이용하여 RNA를 추가로 정제하고, 이어서 고품질 RNA를 물에서 용출시켰다. 수율 및 순도는 분광 광도계 상에서 A260 및 A280 관독에 의해 평가하였다. cDNA 복사본은 ABI(ABI, CA) 고용량 cDNA 아카이브 키트(archive kit)를 사용해 정제된 RNA로부터 제조하였다.

[0554] 달리 명시되지 않으면, 모든 시약은 어플라이드 바이오시스템즈로부터 구매하였다. 실시간 PCR 반응은 ABI 프리즘® 7900 서열 검출 시스템을 사용해 수행하였다. 택맨® 유니버설 PCR 마스터 믹스® (ABI, 캘리포니아주)는 20 µL의 총 반응 부피 내 20ng의 역전사 RNA와 함께 사용하였다. 각각의 cDNA 샘플을 이중으로 행하여 피펫팅 에러에 대해 보정하였다. 프라이머 및 FAM-표지 택맨®프로브는 200nM의 농도로 사용하였다. 각각의 표적 유전자의 발현 수준은 어플라이드 바이오시스템즈에 의해 이미 개발된 인간 글리세르알데하이드-3-포스포이트 탈수소효소(GAPDH) 내인성 대조군을 사용해 정규화하였다. 프라이머 및 프로브 세트는 표 12에 열거한다. 50°C에서 2분 동안, 이어서 95°C에서 10분 동안 초기 인큐베이션한 후, 표본은 2단계에서 40회 순환시켰다-95°C에서 15초 동안의 변성 단계, 및 이어서 60°C에서 1분 동안의 어닐링/연장 단계. 데이터 분석은 진엠프® 7000 서열 검출 시스템 소프트웨어를 사용해 수행하였다. 각각의 프라이머/프로브 세트에 대하여, 형광 강도가 증폭의 지수 영역의 중간의 특정 값에 도달하는 사이클 수로서 Ct 값을 결정하였다. 상대적인 유전자 발현 수준을 비교 Ct 방법을 이용하여 계산하였다. 간략하게는, 각각의 cDNA 표본에 대해, 내인성 대조군 Ct 값을 흥미있는 Ct의 유전자에서 제하여, 델타 Ct값(ΔCt)을 수득하였다. 표적의 정규화된 양은 $2^{-\Delta Ct}$ 로서 계산하였고, 이는 증폭이 100% 효율인 것으로 가정한다. 최종 데이터를 보정 샘플에 대하여 나타내었다.

[0555] 고집적 분석: 배양 종료 시, 점점 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 1회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 2시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. PBS로 3회 세정한 후, PBS 내에서 1:200으로 희석된 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 인비트로젠; Cat # A21467)를 각 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 5µg/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 15분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100µL/웰 PBS 에 두었다. 분석에 사용되는 다른 일차 항체는 1:100 희석 마우스 항-인간 CDX2 (인비트로젠; Cat # 397800), 1:100 희석 염소 항-인간 Pdx1 (산타 크루즈 바이오테크놀로지; Cat # SC-14664), 1:200 희석 토끼 항-인간 인슐린 (셀 시그널링; Cat # C27C9), 및 1:1500 희석 마우스 항-인간 글루카곤 (시그마-알드리치; Cat # G2654)을 포함하였다. 분석에 사용되는 다른 일차 항체는 1:400 희석 알렉사 플루오르 647 닭 항-마우스 IgG (인비트로젠; Cat # A-21463), 1:200 희석 알렉사 플루오르 488 당나귀 항-염소 IgG (인비트로젠; Cat # A11055), 1:1000 희석 알렉사 플루오르 647 닭 항-토끼 IgG (인비트로젠; Cat # A21443), 및 1:1000 희석 알렉사 플루오르 488 닭 항-마우스 IgG (인비트로젠; Cat # A21200)을 포함하였다.

[0556] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 이미지는 웰 당 25개 필드에서 수득하였다. 총 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 수득하였다. 핵의 분할을 희색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 4500의 희색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다.

[0557] 결과: 대표적인 분화 마커에 대한 결과는 분화 각 단계에서 수확된 세포에 대해 도 21 및 표 15에서 보여진다. 도 21a 및 b에서, CXCR4에 대한 유세포분석 결과는 완성 내배엽 분화의 제 1 단계 동안에 다양한 처리에 대해 보여진다. 도 21a는 액티빈 A와 함께 다양한 화합물을 사용한 처리로 인한 CXCR4 발현에 대한 효과를 보여준다. 도 21b는 GDF-8과 함께 다양한 화합물을 사용한 처리로 인한 CXCR4 발현에 대한 효과를 보여준다. 액티빈 A와 함께 본 발명의 화합물은 CXCR4 발현을 증진시키지 못하였다. 그러나, 본 실시예에서 시험된 본 발명의 화합물의 모두는 GDF-8와 함께 CXCR4 발현을 증진시켰다.

[0558] 도 21c 및 21d에서, 분화의 단계 1의 종료 시 다양한 분화 마커에 대한 정규화된 RT-PCR 값은 액티빈 A (도 21c) 또는 GDF-8 (도 21d)과 조합된 본 발명의 선택된 화합물을 사용하여, 프로토콜의 단계 1 동안에 적용된 처리에 대해 보여진다. 유사한 정규화된 RT-PCR 값은 분화 프로토콜의 단계 3의 종료 시(도 21e 및 21f) 및 분화 프로토콜의 단계 4의 종료 시(도 21g 및 21h) 및 분화 프로토콜의 단계 5의 종료 시(도 21i 및 21j) 평가하였다. 본 발명의 화합물을 GDF-8과 조합한 분화 단계 1 동안의 처리는 GDF-8 처리 단독과 비교해 다양한 내배엽 및 체장 마커의 향상된 발현을 가졌다(도 21f 및 21h 및 21j). 본 발명의 화합물을 액티빈 A와 조합한 처리는 액티빈 A 단독 또는 액티빈 A와 Wnt3a의 처리와 비교해 발현 마커에서 최소의 또는 무향상을 가졌다(도 21e, 및 21g 및 21i). 표 15는 액티빈 A 또는 GDF-8을 본 발명의 화합물과 조합하거나 조합하지 않는 단계 1

동안의 처리와 비교해, 각각의 분화 단계의 종료 시 추가의 유전자 마커에 대한 비교의 CT값을 요약한다. 분화 단계 5의 종료 시, 고집적 분석을 수행하여 세포수 (도 21k 및 21m) 및 인슐린 및 글루카곤의 단백질 발현 (도 21l 및 21n)을 측정하였다. 분화 제 1 단계 동안에 GDF-8을 단독으로 또는 본 발명의 화합물과 조합한 처리는 분화 단계 5의 종료 시 인슐린 및 글루카곤 발현을 초래하였고, GDF-8은 완성 내배엽 형성의 개시 동안에 액티빈 A대신에 사용가능하였고, 이어서 체장 호르몬 세포를 초래하였다. 종합해서, 이들 데이터는 개별 소분자 중 임의의 것의 첨가가 액티빈 A와 조합한 처리에 대한 분화 마커에 대해 최소의 효과를 가짐을 보여준다. 그러나, GDF8 처리와 함께 소분자의 첨가는 단계 1 분화의 종료 시 즉각적인 완성 내배엽 분화 및 또한 단계 3, 4, 및 5의 종료 시 다운스트림 분화 마커에 대해 유의한 향상된 효과를 가졌다. 가변성은 소분자의 패널 내에서 관찰되었고, 이는 아마도 검정에 사용된 화합물의 농도 및/또는 작용 기작으로 인한 것이다.

- [0559] 실시예 18
- [0560] GDF-8 및 본 발명의 화합물을 사용하여 형성된 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 설치류에 이식된 후 C-펩티드를 방출할 수 있다.
- [0561] GDF-8 및 소분자를 사용한 처리에 의해 시험관내에서 발생된 체장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포가 생체 내에서 기능성 내분비 세포를 생성할 수 있는지를 알아보는 것이 중요하였다. 생체 내에서 이식 연구를 수행하여, 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 처리 대 GDF-8 및 소분자 화합물을 사용한 처리에 의해 분화된 세포를 비교하였다.
- [0562] 세포의 제조: H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 평균 4일마다 계대배양하면서 키웠다. 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지는 초기 접종 및 팽창에 사용되었다. 모든 인간 ES 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형 및 마이코플라즈마 오염의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다.
- [0563] 세포 배양물을 1 mg/mL 디스페이즈(인비트로젠; Cat # 17105-041)의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고 이어서 MEF 조건화된 배양 배지로 세포 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 세포를 계대배양하였다. 세포 클러스터는 MEF 조건화된 배지에서 저속으로 원심분리하여, 잔여 디스페이즈를 제거한 다음, 감소된 성장 인자 매트릭셀 (BD 바이오사이언스; Cat # 356231)-코팅된 6-웰 플레이트 (Nunc; Cat # 140685) 상에 2.5mL/웰의 부피를 사용해 1:3의 비로 접종하기 위해 8ng/mL bFGF(피프토텍 인코포레이티드; Cat # 100-18B)가 보충된 MEF 조건화된 배지에서 고르게 재현탁시켰다. 각각의 웰의 쓰고 난 배지를 흡인하여, 동일 부피의 새로운 배지로 교체함으로써 매일 공급을 행하였다. 플레이트를 배양 기간 전체에 걸쳐 37°C, 5% CO₂에서 유지시켰다.
- [0564] 세포 분화: 세포를 감소된 성장 인자 매트릭셀™으로 코팅된 6-웰 플레이트에 접종한 후 3일째에 분화 방법을 시작하였다. 4-단계 프로토콜은 H1 인간 배아 줄기 세포를 체장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 시험관내 분화시키는데 사용하였다. 단계 1은 완성 내배엽 세포를 발생시키기 위해 3일에 걸쳐 수행하였다. 단계 1의 제 1 일에, 소모된 배양 배지를 흡인하고, 2% 알부민 소 프랙션 V, 무지방산 (FAF BSA) (프롤리안트 바이올로지칼스; Cat # SKU 68700) 및 8ng/mL bFGF가 있는 동일 부피의 RPMI-1640 기본 배지(인비트로젠; Cat # 22400)를 첨가함으로써 분화를 개시하였다. 하나의 처리군에서, 세포는 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF)가 있는 100ng/mL 액티빈 A(피프토텍; Cat #120-14)에 노출시켰다. 제 2의 처리군에서, 세포는 100ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈; Cat # 788-G8)에 2.5 μM 화합물 40과 함께 노출시켰다. 제 3 처리군에서, 세포는 100ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈; Cat # 788-G8)에 2.5 μM 화합물 202와 함께 노출시켰다. 분화의 제 1 단계의 제 2 및 제 3 일에, 모든 처리군 내 세포에 Wnt3a 또는 본 발명의 화합물을 첨가하지 않으면서, 2% FAF BSA, 8ng/mL bFGF 및 100ng/mL 액티빈 A (처리군 1) 또는 100ng/mL GDF-8 (처리군 2 및 3)을 함유하는 RPMI-1640을 공급하였다. 배양 제 3 일의 종료 시, 각각의 처리군의 하나의 웰은 FACS 분석을 위해 수확하였다.
- [0565] 분화 프로토콜의 단계 2는 3일에 걸쳐서 수행하였다. 모든 처리군의 세포에 2% FAF BSA 및 50ng/mL FGF7 (피프토텍; Cat # 100-19)이 보충된 DMEM:F12 (인비트로젠; Cat # 11330-032)를 매일 공급하였다.
- [0566] 분화 프로토콜의 단계 3은 4일에 걸쳐서 수행하였다. 모든 처리군의 세포에 1% B27 (인비트로젠; Cat #: 17504-044), 50ng/mL FGF7, 100ng/mL 노킨(R&D 시스템즈; Cat # 3344-NG), 250 nM KAAD-사이클로파민 (칼바이오캠; Cat # 239804), 및 2 μM 모든-trans 레틴산 시그마-알드리치; Cat # R2625)가 보충된 DMEM-고 포도당 (인비트로젠; Cat #10569) 를 매일 공급하였다.

- [0567] 분화 프로토콜의 단계 4는 3일에 걸쳐서 수행하였다. 모든 처리군의 세포에 1% B27, 100ng/mL 노긴, 및 1 μ M ALK5 억제제 (엑소라; Cat # ALX-270-445)가 보충된 DMEM-고 포도당을 처음 2일 동안 매일 공급하였다. 제 3일에, 20 μ l 팀(라인인(Rainin); Cat # RT-L10F) 및 세포 급개(코닝(Corning); Cat # 3008)를 사용하여 기층으로부터 세포를 들어올린 다음, 50 mL 튜브에 옮겼다. 세포를 중력에 의해 침강시키고, 세포 펠렛을 어지럽히지 않으면서 상층액을 흡인하였다. 세포는 1% B27, 100ng/mL 노긴 및 1 μ M ALK5 억제제가 보충된 DMEM-고 포도당에 재현탁시킨 다음, 6-웰 코스타울트라 로우 어태치먼트 마이크로플레이트(Ultra Low Attachment Microplates) (코닝 인코포레이티드(Corning Inc.), Cat # 3471)에서 밤새 배양하였다. 이후, 현탁 배양액 내 세포를 수합 및 계수하였다. 10x10⁶ 세포/ 마우스의 분취물을 이식에 사용하였다. 0.5x10⁶ 세포의 분취물을 RT-PCR 분석을 위해 수합하였다.
- [0568] 도 22, 패널 A는 개별 처리군의 각각에 대한 단계 1의 종료 시 발생하는 완성 내배엽 세포에 대한 유세포분석 결과를 보여준다. 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 처리 또는 GDF-8 및 본 발명의 화합물을 사용한 처리는 단계 1의 종료 시 CXCR4 (85% 초과)의 유사한 수준을 발현하는 세포를 초래하였고, 이는 동등한 완성 내배엽 세포군이 각각의 처리군으로부터 유도되었음을 제안한다.
- [0569] 분화 프로토콜의 단계 4의 종료 시 각각의 처리군의 세포에 대한 RT-PCR 분석에 대한 결과는 도 22, 패널 B에 보여진다. 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용하거나 GDF-8 및 화합물 40을 사용하거나 GDF-8 및 화합물 202를 사용하여 체장 내배엽 (PE)으로 분화되는 세포는 동일한 수준의 PE 마커: CDX2, MAFA, NGN3, NKX6.1, PDX1 및 Ptf1 발현하였다. 이들 결과는 GDF-8 및 소분자를 사용하는 분화 프로토콜은 체장 내배엽 전구체 세포군을 만드는데 있어서 동일하게 효과적임을 제시한다.
- [0570] 본 발명의 방법에 따라 처리된 인간 배아 줄기 세포의 마우스에 이식: 5 내지 6주령 수컷 스킵-페이지 마우스 (C.B-*Igh*-1b/GbmsTac-*Prkdc*^{scid}-*Lyst*^{bg} N7) 는 타코닉 팜스(Taconic Farms)에서 구매하였다. 마우스는 마이크로단리(microisolator) 케이지에서 키웠고 멸균된 먹이와 물을 마음대로 먹게 하였다. 수술 준비에서, 마우스의 귀에 태그를 달아 식별을 하고, 그의 체중을 재고, 그의 혈당을 휴대용 혈당측정기(LifeScan; One Touch)를 사용해 측정하였다. 수술 제 1일에, 아이솔플루란 및 산소의 혼합물을 사용해 마우스를 마취시키고, 수술 부위를 작은 동물 클리퍼를 사용해 면도하였다. 수술전에 마우스에 0.1 mg/kg 부프레넥스(Buprenex)를 피하 투여하였다. 70% 아이스프로필 알콜, 10% 포비돈-요오다이드, 및 70% 아이스프로필 알콜의 연속 세정으로 수술 부위를 만들고, 피부 및 근육층을 통해 좌측 삼입부를 만들었다. 좌측 신장을 떼어내고, 0.9% 염화나트륨으로 축축하게 유지시켰다. 24G x 3/4" I.V. 카테터를 사용해 신장 피막을 관통시키고, 바늘을 제거하였다. 다음, 카테터를 신장 피막 밑에서 신장의 먼 구멍으로 두었다. 마우스의 수술전 준비 동안에, 이식용 세포는 1.5 mL 마이크로퓨즈 튜브에서 원심분리하고, 대부분의 상층액을 제거하여, 세포의 펠렛을 수합하기 위해 충분한 배지를 남겨 두었다. 세포는 라인인 포스-D 양성 대체 파이펫 팁으로 수합하고, 파이펫은 세포가 중력에 의해 침강되도록 전환시켰다. 잉여의 배지는 이식용 포장된 세포 제제를 남겨두면서 분산시켰다. 이식을 위해, 포스-D 파이펫 팁을 카테터의 허브에 단단하게 놔두었고, 세포를 신장의 먼 구멍에 전달하기 위한 신장 피막 밑에서 카테터를 통해 파이펫으로부터 배분시켰다. 카테터의 루멘을 소량의 배양 배지로 플러싱하여, 임의의 잔여 세포에 전달시키고, 카테터를 제거하였다. 신장 피막을 저온 코터리(cautery)로 밀봉하고, 신장을 그의 원래의 해부학적 위치에 되돌려 놓았다. 근육을 5-0 바이크릴(VICRYL) 봉합실을 사용해 연속 봉합으로 밀폐시키고, 피부는 와운드 클립(wound clip)을 사용해 밀폐시켰다. 마우스는 마취에서 풀려났고 완전히 회복되게 놔두었다. 수술 후에 1.0 mg/kg 메타캄을 마우스에 피하 투여하였다.
- [0571] 이식 후, 마우스의 무게를 1주에 한 번 재고, 혈당을 1 주에 2회 측정하였다. 이식 후 다양한 간격에서, 3 g/kg 포도당을 마우스에 복강내 투여하고, 소량의 해파린이 든 마이크로퓨즈 튜브에 후안구동(retro-orbital sinus)을 통해 포도당을 주사한 지 60분째에 혈액을 빼내었다. 혈액을 원심분리하고, 혈장을 제 2 마이크로퓨즈 튜브에 두고, 건조 얼음 상에서 냉동시켜서, 인간 C-펩티드 검정을 수행할 때까지 -80°C에 보관하였다. 인간 C-펩티드 수준은 제조업자의 지시에 따라 메르코디아/알프코 다이아그노스틱스 울트라센서티브 C-펩티드 엘라이자(Mercodia/ALPCO Diagnostics Ultrasensitive C-peptide ELISA)를 사용해 측정하였다.
- [0572] 인간 C-펩티드에 대한 엘라이자 결과는 개별 처리군의 각각의 세포가 이식된 마우스에 대해 도 23에서 보여진다. 순환하는 인간 C-펩티드 중 어느 것도 임의의 처리군의 세포를 받은 임의의 마우스에 대해 4주의 이식후에 검출되지 않았다. 이식후 8주째에, 검출가능한 C-펩티드는 액티빈 A 및 Wnt3a로 처리된 세포를 받은 2마리의 마우스 중 1마리; GDF-8 및 화합물 40으로 처리된 세포를 받은 3마리의 마우스 중 1마리; 및 GDF-8 및 화합물 202로 처리된 세포를 받은 3마리의 마우스 중 2마리에서 발견되었다. 이들 결과는 동일한 내분비 전구

체 세포군이 GDF-8 및 소분자를 사용한 분화 프로토콜로부터 유도될 수 있었고, 세포는 추가로 생체 내에서 포도당 반응성, 인슐린 분비 세포로 성숙되었음을 제시한다.

- [0573] 실시예 19
- [0574] GDF-8을 사용하여 형성된 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 설치류에 이식된 후 C-펩티드를 방출할 수 있다.
- [0575] 액티빈 A의 부재 하에 GDF-8을 사용해 분화된 세포 또한, 생체 내에서 설치류 이식 모델에서 인간 C-펩티드를 분비할 수 있는 내분비 세포군으로 추가로 분화될 수 있음을 언급하는 것이 중요하였다.
- [0576] 세포의 제조: H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 평균 매 4일마다 계대배양하면서 키웠다. 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지는 초기 접종 및 팽창에 사용되었다. 모든 인간 ES 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형 및 마이코플라스마 오염의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다.
- [0577] 세포 배양물을 1 mg/mL 디스페이즈(인비트로젠; Cat # 17105-041)의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고 이어서 MEF 조건화된 배양 배지로 세포 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 세포를 계대배양하였다. 세포 클러스터는 MEF 조건화된 배지에서 저속으로 원심분리하여, 잔여 디스페이즈를 제거한 다음, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (BD 바이오사이언스; Cat # 356231)-코팅된 6-웰 플레이트 (닝크 (Nunc); Cat# 140685) 상에 2.5mL/웰의 부피를 사용해 1:3의 비로 접종하기 위해 8ng/mL bFGF(퍼프로텍 인코포레이티드; Cat # 100-18B)가 보충된 MEF 조건화된 배지에서 고르게 재현탁시켰다. 각각의 웰의 쓰고 난 배지를 흡인하여, 동일 부피의 새로운 배지로 교체함으로써 매일 공급을 행하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 37°C, 5% CO₂ 에서 유지시켰다.
- [0578] 세포 분화: 분화 방법은 세포를 6-웰 플레이트에 접종한 후 3일째에 시작하였다.4-단계 프로토콜은 H1 인간 배아 줄기 세포를 체장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 시험관내 분화시키는데 사용하였다. 단계 1은 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 발생시키기 위해 3일에 걸쳐 수행하였다. 단계 1의 제 1 일째에, 소모된 배양 배지를 흡인하고 2% 알부민 소 프랙션 V, 무지방산 (FAF BSA) (프롤리안트 바이올러지칼스; Cat # SKU 68700) 및 8ng/mL bFGF가 든 동일 부피의 RPMI-1640 기본 배지(인비트로젠; Cat # 22400)를 첨가하여 분화를 개시하였다. 하나의 처리군에서, 이중 세트의 세포는 100ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈; Cat # 788-G8) 및 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF)로 처리하였다. 제 2 처리군에서, 이중 세트의 세포는 100ng/mL GDF-8 및 2.5 μM 화합물 40으로 처리하였다. 단계 1 분화의 제 2 및 제 3 일에, 모든 처리군 내 세포에 2% FAF BSA, 8ng/mL bFGF 및 100ng/mL GDF-8는 들어 있으나 Wnt3a 또는 화합물 40을 첨가하지 않는 RPMI-1640을 공급하였다. 배양 제 3 일의 종료 시, 각각의 처리군의 하나의 웰은 FACS 분석을 위해 수합하였다.
- [0579] 분화 프로토콜의 단계 2는 3일에 걸쳐 수행하였다. 모든 처리군에 대한 세포에 매일 2% FAF BSA 및 50ng/mL FGF7 (퍼프로텍; Cat # 100-19)이 보충된 DMEM:F12 (인비트로젠; Cat # 11330-032)를 공급하였다.
- [0580] 분화 프로토콜의 단계 3은 4일에 걸쳐 수행하였다. 모든 처리군에 대한 세포에 매일 1% B27 (인비트로젠; Cat #: 17504-044), 50ng/mL FGF7, 100ng/mL 노긴(R&D 시스템즈; Cat # 3344-NG), 250 nM KAAD-사이클로파민 (칼바이오펜; Cat # 239804), 및 2 μM 모든-trans 레틴산(RA) (시그마-알드리치; Cat # R2625)이 보충된 DMEM-고포도당(인비트로젠; Cat # 10569)을 공급하였다.
- [0581] 분화 프로토콜의 단계 4는 3일에 걸쳐 수행하였다. 모든 처리군에 대한 세포에 처음 2일 동안 1% B27, 100ng/mL 노긴 및 1μM ALK5 억제제 (엑소라; Cat # ALX-270-445), 및 100ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈; Cat # 788-G8) 이 보충된 DMEM-고 포도당을 매일 공급하였다. 단계 4의 제 3 일에, 세포를 20 μl 틱(라이닌; Cat # RT-L10F) 및 세포 급개(코닝; Cat # 3008)를 사용해 6-웰 플레이트에서 수합하고, 50 mL 튜브에 옮겼다. 세포를 중력에 의해 침강되게 하였고, 세포 펠렛을 어지럽히지 않으면서 상층액을 흡인하였다. 세포는 1% B27, 100ng/mL 노긴, 및 1μM ALK5 억제제가 보충된 DMEM-고 포도당에서 재현탁시킨 다음, 6-웰 코스타 울트라 로우 어태치먼트 마이크로플레이트(코닝 인코포레이티드, Cat # 3471)에서 밤새 배양하였다. 이후, 현탁액 배양물 내 세포를 수합하고 계수하였다. 10x10⁶ 세포/마우스의 분취물을 이식에 사용하였다. 0.5x10⁶ 세포의 분취물을 RT-PCR 분석을 위해 수합하였다.
- [0582] 도 24a는 개별 처리군의 각각에 대한 단계 1의 종료 시 발생된 완성 내배엽 세포에 대한 유세포분석 결과를 보

여준다. GDF-8 및 Wnt3a를 사용한 처리 또는 GDF-8 및 화합물 40을 사용한 처리에 대한 결과는 단계 1의 종료 시 유사한 수준의 CXCR4을 발현하였고, 이는 각각의 처리군으로 인한 동일한 및 강력한 완성 내배엽 세포군을 제안한다. 이중 처리 세트는 강한 동의를 얻었다. 분화 프로토콜의 단계 4의 종료 시 RT-PCR 분석에 대한 이식 전의 결과는 도 24b에서 보여진다. GDF-8 및 Wnt3a 또는 GDF-8 및 화합물 40을 사용하여 췌장 내배엽(PE)으로 분화된 세포는 동일한 수준의 CDX2, MafA, Ngn3, NKX6.1, Pdx-1 및 Ptf1A와 같은 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하였다. 이러한 결과는 GDF-8 및 Wnt3a 또는 GDF-8 및 본 발명의 화합물을 이용한 분화 프로토콜은 췌장 내배엽 전구체 세포군을 제조하는데 효과적이었음을 언급한다. 분화 프로토콜은 2개의 독립적이나 동일한 처리 세트에서 수행하였다. 이중 처리 세트의 결과는 RT-PCR 분석에 의해 보여진 바와 같이 강한 동의를 얻었다.

[0583] 마우스에의 인간 배아 줄기 세포의 이식: 5 내지 6주령 수컷 스킵드-베이지 마우스 (C.B-*Igh-1b/GbmsTac-Prkdc^{scid}-Lys1^{bg}* N7)는 타코닉 팜스에서 구매하였다. 마우스는 마이크로단리 케이지에서 키웠고 멸균된 먹이와 물을 마음대로 먹게 하였다. 수술 준비에서, 마우스의 귀에 태그를 달아 식별을 하고, 그의 체중을 재고, 그의 혈당을 휴대용 혈당측정기(LifeScan; One Touch)를 사용해 측정하였다. 수술 제 1 일에, 아이솔플루란 및 산소의 혼합물을 사용해 마우스를 마취시키고, 수술 부위를 작은 동물 클리퍼를 사용해 면도하였다. 수술전에 마우스에 0.1 mg.kg 부프레넥스(Buprenex)를 피하 투여하였다. 70% 아이스프로필 알콜, 10% 포비돈-요오다이드, 및 70% 아이스프로필 알콜의 연속 세정으로 수술 부위를 만들고, 피부 및 근육층을 통해 좌측 삽입부를 만들었다. 좌측 신장을 떼어내고, 0.9% 염화나트륨으로 축축하게 유지시켰다. 24G x 3/4" I.V. 카테터를 사용해 신장 피막을 관통시키고, 바늘을 제거하였다. 다음, 카테터를 신장 피막 밑에서 신장의 먼 구멍으로 두었다. 마우스의 수술전 준비 동안에, 이식용 세포는 1.5 mL 마이크로퓨즈 튜브에서 원심분리하고, 대부분의 상층액을 제거하여, 세포의 펠렛을 수합하기 위해 충분한 배지를 남겨 두었다. 세포는 라이닌 포스-D 양성 대체 파이렛 팁으로 수합하고, 파이렛은 세포가 중력에 의해 침강되도록 전환시켰다. 잉여의 배지는 이식용 포장된 세포 제제를 남겨 두면서 분산시켰다. 이식을 위해, 포스-D 파이렛 팁을 카테터의 허브에 단단하게 놔두었고, 세포를 신장의 먼 구멍에 전달하기 위한 신장 피막 밑에서 카테터를 통해 파이렛으로부터 배분시켰다. 카테터의 루멘을 소량의 배양 배지로 플러싱하여, 임의의 잔여 세포에 전달시키고, 카테터를 제거하였다. 신장 피막을 저온 코터리로 밀봉하고, 신장이 그의 원래의 해부학적 위치에 되돌려 놓았다. 근육을 5-0 마이크로릴 봉합실을 사용해 연속 봉합으로 밀폐시키고, 피부는 와운드 클립을 사용해 밀폐시켰다. 마우스는 마취에 의해 제거하고 완전히 회복되게 놔두었다. 수술후에 1.0 mg.kg 메타캠을 마우스에 피하 투여하였다.

[0584] 이식 후, 마우스의 무게를 1주에 한 번 재고, 혈당을 1주에 2회 측정하였다. 이식 후 다양한 간격에서, 3g/kg 포도당을 마우스에 복강내 투여하고, 소량의 헤파린이 든 마이크로퓨즈 튜브에 후안구동을 통해 포도당을 주사한 지 60분째에 혈액을 빼내었다. 혈액을 원심분리하고, 혈장을 제 2 마이크로퓨즈 튜브에 두고, 건조 얼음 상에서 냉동시켜서, 인간 C-펩티드 검정을 수행할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 인간 C-펩티드 수준은 제조업자의 지시에 따라 메르코디아/알프코 다이아그노스틱스 울트라센서티브 C-펩티드 엘라이자를 사용해 측정하였다. 인간 C-펩티드에 대한 엘라이자 결과는 개별 처리군의 각각의 세포가 이식된 마우스에 대해 도 29c 및 d에서 보여진다. 인간 C-펩티드의 유사한 수준은 각각의 처리 범주에 대해 이식후 8주째에 검출가능하였고, 이는 동일한 내분비 전구체 세포군이 GDF-8 및 Wnt3a 또는 GDF-8 및 본 발명의 화합물을 사용하는 분화 프로토콜로부터 유도될 수 있음을 지시한다.

[0585] 실시예 20

[0586] 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는, CDK, GSK3, 및 TRK 억제제의 잠재력 평가

[0587] 14개의 프로프리터터리(proprietary) 소분자 하위세트는 CDK, GSK3, 및/또는 TRK 신호전달 경로에 대한 특이성을 갖는 것으로 알려져 있으며, 이는 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 그의 잠재력에 대해 평가하였다.

[0588] 세포 검정법 점중: 간략하게는, H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231)-코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 세포를 콜라게네이즈(인비트로젠; Cat # 17104-019) 처리 및 부드러운 굵기를 이용해 계대배양하고, 세정하여 잔여 효소를 제거하고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (BD 바이오사이언스; Cat # 356231)-코팅된 96-웰 흑색 플레이트(팩커드 뷰플레이트; 퍼킨 엘머; Cat # 6005182) 상에서 100µl/웰의 부피를 사용해 1:1(표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 부착되게 놔둔 다음, 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였고, 매일 8ng/mL bFGF(R&D 시스

템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 MEF-조건화된 배지를 공급하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가슴 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0589] **화합물의 제조 및 검정:** 스크리닝은 표 16에서 기술된 화합물을 사용해 수행하였다. 또한, 화합물 34는 이전의 실시예에서 언급된 바와 같이, 양성 대조군으로서 포함되었다. 시험되는 화합물은 96-웰 플레이트 포맷에서 5mM 스타크로서 이용가능하게 제조하였고, 100% DMSO(시그마; Cat # D2650)에서 용해시키고, -80°C에 보관하였다. 라이브리리 화합물을 추가로, 50mM HEPES(인비트로젠; Cat # 15630-080), 20% DMSO 내 0.2mM의 중간 농도로 희석시키고, 4°C에 보관하였다. 시험 조건은 삼중으로 수행하고, 4일간의 검정 기간에 걸쳐 격일로 공급하였다. 검정은 각 웰의 배양 배지를 흡인함으로써 개시되고 이어서 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)에서 3회 세정하여 잔여 성장 인자를 제거하였다. 검정 제 1 일에, 웰 당 200 μ l의 시험 부피는 0.5% FCS(하이클론; Cat # SH30070.03) 및 100ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8) + 2.5 μ M 화합물이 보충된 DMEM:F12 기본 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032)를 사용해 각 웰에 첨가하였다. 평행 세트의 시험 표본은 배지에서 GDF-8을 생략하는 것을 제외하고는 동일한 방식으로 처리하였다. 검정 제 3 일에, 웰 당 100 μ l의 시험 부피는 2% FCS + 100ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8)이 보충된 DMEM:F12 기본 배지를 사용하여 각 웰에 첨가하였다. GDF-8은 검정 제 1 일에 GDF-8로 처리되지 않았던 시험 표본으로부터 생략하였다. 양성 대조군 표본은 제 1 일 및 제 2 일에 Wnt3a (20ng/mL) 첨가와 함께 4일간의 검정 전체에 걸쳐 FCS 및 100ng/mL 재조합 인간 액티빈 A (퍼프로텍; Cat #120-14)가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 표본은 FCS가 보충된 DMEM:F12 기본 배지를 함유하였다.

[0590] **고집적 분석:** 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체(염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 멀레콜라 프로브; Cat # AZ1467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 μ g/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.

[0591] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 총 SOX17 단백질 발현은 세포 면적으로 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 삼중 웰로부터의 평균 데이터를 수합하였다. 양성 대조군에 대한 처리된 웰의 %를 계산하였다.

[0592] 이러한 스크린에 대한 결과는 표 17에 보여진다. 소분자 중 어느 것도 4일간의 분화 방법 동안에 GDF-8의 부재 하에 유의한 SOX17 발현을 유도하지 않았다. 화합물 34는 실험 대조군으로서 작용하였고, 액티빈 A 및 Wnt3a을 사용하는 양성 대조군으로 관찰된 수준과 동일한 GDF-8의 존재 하에 유의한 SOX17 발현을 유도하였다. 본 실시예에서 시험되는 본 발명의 잔여 화합물은 SOX17 발현의 약한 내지 중간 정도의 유도를 갖는 활성의 범위를 보여주었다. 주목하게는, 이러한 하위세트의 화합물의 분화 활성은 모든 3개의 효소 신호 경로에 대한 선택성과 관련해서 관찰되었고, 이는 분명한 작용 기작을 결론적으로 측정하는 것을 어렵게 한다.

[0593] 실시예 21

[0594] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성을 매개할 수 있는 본 발명의 화합물의 유사체에 대한 스크리닝

[0595] 본 발명의 화합물에 대한 구조를 바탕으로, 유사체 연구를 수행하였고, 118개의 유사체를 발견하였다. 초기 스크리닝은 일부 유사체는 액티빈 A의 부재 하에 다른 성장 인자와 조합해서 완성 내배엽 분화를 유도할 수 있는지 알아보았다. 이들 유사체는 GDF-8과만 조합해서 완성 내배엽 분화를 또한 유도할 수 있는지 알아보는 것이 중

요하였다.

[0596] 세포 검정법 검증: 간략하게는, H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (인비트로젠; Cat # 356231) -코팅된 조직 배양 플라스틱 상에서 키웠다. 세포를 콜라게네이즈(인비트로젠; Cat # 17104-019) 처리 및 부드러운 굽기를 이용해 계대배양하고, 세정하여 잔여 효소를 제거하고, 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (BD 바이오사이언스; Cat # 356231)-코팅된 96-웰 흑색 플레이트(팩커드 뷰플레이트; 퍼킨 엘머; Cat #6005182) 상에 100 µl/웰의 부피를 사용해 1:1(표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 부착되게 놔둔 다음, 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였고, 매일 8ng/mL bFGF(R&D 시스템즈; Cat # 233-FB)가 보충된 MEF-조건화된 배지를 공급하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가습 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0597] 화합물의 제조 및 검정: 스크리닝은 유사한 화합물의 라이브러리를 사용해 수행하였다. 본 라이브러리의 화합물은 96-웰 플레이트 포맷에서 5mM 스택으로서 이용가능하게 제조하였고, 100% DMSO(시그마; Cat # D2650)에서 용해시키고, -80°C에 보관하였다. 라이브러리 화합물을 추가로, 50mM HEPES(인비트로젠; Cat # 15630-080), 20% DMSO 내 0.2mM의 중간 농도로 희석시키고, 4°C에 보관하였다. 시험 조건을 삼중으로 수행하였고, 4일간의 검정 기간에 걸쳐 격일로 공급되었다. 각 웰로부터 배양 배지를 흡인함으로써 검정은 시작되고, 이어서 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)에서 3회 세정하여 잔여 성장 인자를 제거하였다. 검정 제 1 일에, 웰 당 200µl 의 시험 부피는 0.5% FCS(하이클론; Cat # SH30070.03) 및 200ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8) + 2.5 µM 화합물이 보충된 DMEM:F12 기본 배지(인비트로젠; Cat # 11330-032)를 사용하여 각 웰에 첨가하였다. 검정 제 3 일에, 웰 당 100µl 의 시험 부피는 2% FCS + 200ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8)이 보충된 DMEM:F12 기본 배지를 사용하여 각 웰에 첨가하였다. 양성 대조군 표본은 제 1 일 및 제 2 일에 Wnt3a (20ng/mL)와 함께 4일간의 검정 기간 전체에 걸쳐, FCS 및 100ng/mL 재조합 인간 액티빈 A(펄프로텍; Cat #120-14)가 보충된 동일한 기본 배지를 함유하였다. 음성 대조군 표본은 액티빈 A를 사용한 처리는 생략한 채, 제 1 일 및 제 2 일째에 Wnt3a를 첨가하면서, FCS가 보충된 DMEM:F12 기본 배지를 함유하였다.

[0598] 고집적 분석: 4일간의 배양의 종료 시, 검정 플레이트를 PBS(인비트로젠; Cat # 14190)로 2회 세정하고, 4% 파라포름알데하이드(알렉시스 바이오케미칼; Cat # ALX-350-011)로 실온에서 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 3회 세정하고, 0.5% Triton X-100(시그마; Cat # T8760-2)을 실온에서 20분 동안 침투시켰다. 세포를 PBS로 다시 3회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 내 4% 닭 혈청 (인비트로젠; Cat # 16110082)으로 블라킹시켰다. 일차 항체 (염소 항-인간 SOX17; R&D 시스템즈; Cat # AF1924)를 4% 닭 혈청에서 1:100으로 희석시키고, 실온에서 1 시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 알렉사 플루오르 488 공액된 이차 항체 (닭 항-염소 IgG; 멀레콜라 프로브; Cat # AZ1467)를 PBS 내에서 1:200으로 희석시키고, PBS로 3회 세정한 후 각각의 표본 웰에 첨가하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4µg/mL 호크스트 33342 (인비트로젠; Cat # H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고 이미지화를 위해 100µl/웰 PBS에 두었다.

[0599] 이미지화는 호크스트 33342 및 알렉사 플루오르 488을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 세포 분석기 1000(GE 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 양성 대조군 웰로부터 그리고 이차 항체 단독으로 염색된 비처리 음성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 SOX17 강도의 측정을 IN 세포 디벨로퍼 툴박스 1.7 (GE 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 각각의 복제 데이터 세트에 대하여 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 전체 Sox17 단백질 발현을 세포 x 세포 면적의 전체 형광성으로서 정의되는 전체 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다. 각각의 복제 세트에 대한 평균 및 표준 편차에 대하여 정규화 데이터를 계산하였다.

[0600] 스크리닝 결과는 이러한 단일 실험에서 4개의 검정 플레이트로부터 표 18에서 보여진다. 화합물은 액티빈 A 및 Wnt3a를 사용한 양성 대조군 처리의 %로서 SOX17 발현에 대하여 랭킹된다. 이러한 검정은 표 19에서 보여진 바와 같이 12개의 신규 유사체 히트의 목록을 규명하였다.

[0601] 실시예 22

[0602] 마이크로캐리어 상에서 성장한 인간 배아 줄기 세포는 본 발명의 방법에 따른 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.

- [0603] 측량가능한 조건 하에 많은 내분비 세포의 분화 및 생성을 위해, 인간 배아 줄기 세포가 본 발명의 방법을 사용해 마이크로캐리어 비드 상에서 완성 내배엽으로 성장 및 분화될 수 있음을 보여주는 것이 중요하였다.
- [0604] 검정용 세포의 제조 및 분화: H1 p49C3 세포는 미국 특허 출원 제 61/116,447 호에 기술된 방법에 따라, 125mL 스피너 플라스크에서 사이토텍스3 비드(Cytodex3 beads)(GE 헬스케어 라이프 사이언스, 뉴저지주(GE Healthcare Life Sciences, NJ)) 상에서 일상적으로 성장시켰다. 제 7 일에, 세포 및 비드는 웰 당 30cm² 비드 표면적의 비율로 6 웰 플레이트 (벤더(Vendor); Cat # XXX)에 옮기고, 플레이트는 록킹 플랫폼(rocking platform) 상에 두었다. 양성 대조군 처리 웰(AA/Wnt3a로 지정)에서 비드 상의 세포는 2일 동안 100ng/mL 액티빈 A(피프로텍; Cat #120-14) 및 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF)의 첨가를 사용해 분화시키고, 이어서 2mL/웰의 부피를 사용해 2% 무지방산 BSA (MP 바이오메디칼스, 인코포레이티드; Cat # 152401)가 있는 RPMI-1640(인비트로겐; Cat #: 22400)에서 1일 동안 100ng/mL 액티빈 A 및 8ng/mL bFGF (피프로텍 인코포레이티드; Cat #: 100-18B)를 첨가해 분화시켰다. 2.5 μM의 최종 농도의 화합물 34는 임의의 다른 성장 인자 처리의 부재 하에 3일 동안 2% 무지방산 BSA (2mL/웰)가 있는 RPMI-1640 내 음성 대조군 처리 웰(CMP 단독으로 지정)에 첨가하였다. 제 3 처리 웰(CMP+8라고 지정)에는 3일 동안 2% 무지방산 BSA (2mL/웰)가 있는 RPMI-1640 내 2.5 μM + 50ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8)에서 화합물 34를 제공하였다. 제 4 처리 웰(CMP+ 8+D라고 지정)에는 3일 동안 2% 무지방산 BSA (2mL/웰)가 있는 RPMI-1640 내 50ng/mL GDF-8 및 50ng/mL PDGF-D와 함께 2.5 μM에서 화합물 34를 제공하였다. 제 5 처리 웰(CMP+ 8+D+V라고 지정)에는 3일 동안 2% 무지방산 BSA (2mL/웰)가 있는 RPMI-1640 내 50ng/mL GDF-8, 50ng/mL PDGF-D, 및 50ng/mL VEGF와 함께 2.5 μM에서 화합물 34를 제공하였다. 제 6 처리 웰(CMP+ 8+D+V+M라고 지정)에는 3일 동안 2% 무지방산 BSA (2mL/웰)가 있는 RPMI-1640 내 50ng/mL GDF-8, 50ng/mL PDGF-D, 50ng/mL VEGF, 및 20ng/mL 무스치몰과 함께 2.5 μM에서 화합물 34를 제공하였다. 모든 배지 및 처리물은 매일 교환하였다.
- [0605] 처리 및 배양의 종료 시, 세포는 미국 특허 출원 제 61/116,447 호에서 기술된 방법에 따라, 비드에서 수합하였다. 수합된 세포는 상기 기술된 방법에 따라, 유세포분석에 의해 계수 및 분석하였다.
- [0606] 결과는 도 25에 나타나 있다. 패널 A에서 보여진 바와 같이, 분화를 받은 모든 처리군에 대해 유사한 수의 세포를 회수하였다. 패널 B에서 보여진 바와 같이, 화합물 34 단독으로 처리된 세포는 CXCR4 양성 세포로 분화되지 않았다. 분화 동안에 액티빈 A 및 Wnt3a를 첨가하는 양성 대조군 처리는 결과의 세포군의 68%에서 CXCR4의 발현을 유도하였다. 다양한 성장 인자 조합이 첨가된 화합물 34는 평균적으로 50%의 세포에서 CXCR4 발현을 유도하였다. 주목하게는, 동일한 수준의 CXCR4 발현은 단일성장 인자, GDF-8, 또는 GDF-8을 포함하는 다중 성장 인자와 조합해서 화합물 34를 사용한 처리 동안에 관찰되었다. 적어도 GDF-8과 함께 화합물 34가 완성 내배엽 분화를 촉진시키기 위해 액티빈 A 및 Wnt3a를 대신할 수 있음을 증명한다. 이러한 실시예는 또한, 처리 과정이 마이크로캐리어 비드 상에서 성장되고 분화된 세포에 대해 효과적임을 보여준다.
- [0607] 실시예 23
- [0608] GDF-8과 함께 본 발명의 화합물은 세포 증식을 증진시킨다.
- [0609] 이전의 실시예는 GDF-8이 인간 배아 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기 위해, 액티빈 A를 대체할 수 있음을 보여주었다. 완성 내배엽 형성에 대해 GDF-8 및 액티빈 A의 상대적인 잠재성을 아는 것이 중요하였다. 용량 반응 검정은 동일한 농도의 각각의 성장 인자를 사용해 수행하여, 인간 배아 줄기 세포 분화 동안에 결과를 비교하였다.
- [0610] 완성 내배엽 분화 동안에 GDF-8과 함께 사용되는 본 발명의 화합물은 세포 증식을 유도하는 그의 능력에 대해 평가하였다. 결과는 액티빈 A 또는 GDF-8 단독을 사용한 처리와 비교하였다.
- [0611] 검정용 세포의 제조: 인간 배아 줄기 세포 (H1 인간 배아 줄기 세포주)의 스타크 배양물은 평균 매 4일마다 계대 배양하면서 MEF 조건화된 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭셀™ (BD 바이오사이언스; Cat # 356231)-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/mL 디스페이즈(인비트로겐, Cat #: 17105-041)의의에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고 이어서 MEF 조건화된 배양 배지로 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수합하고 잔여디스페이즈를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비에서 또는 중간 검정을 위해 1:1 비에서 분리하였다. 모든 인간 배아 줄기 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵성 표현형 및 마이크로플라즈마 오염의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다.
- [0612] 검정에서 사용되는 세포 클러스터를 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지에 고르게 재현탁시키고, 감소된

성장 인자 매트릭스™-코팅된 96-웰 랙카드 뷰플레이트(퍼킨 엘머; Cat # 6005182) 상에 100mL/웰의 부피로 집중하였다. 8ng/mL bFGF가 보충된 MEF 조건화된 배지는 초기 집중 및 팽창에 사용되었다. 각각의 웰의 쓰고 난 배지를 흡인하여, 동일 부피의 새로운 배지로 교체함으로써 매일 공급을 행하였다. 각각의 검정 플레이트 내 배경 세트의 웰에 세포를 집중하지 않았으나, 검정 전체를 통틀어서 기본 배지 조건을 처리하였다. 플레이트를 검정 기간 전체에 걸쳐 가슴 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0613] **검정법:** 검정은 각 웰에서 배양 배지를 흡인하고 시험 배지의 최종 분취물(100 μ l)을 다시 첨가하여 개시하였다. 시험 조건은 총 3일의 검정 기간에 걸쳐 3중으로 수행하였고, 각 웰에서 배지를 흡인하고 신선한 시험 배지로 대체함으로써 매일 공급하였다. 24, 48, 및 72 시간의 종료 시에 평행적으로 평가하기 위해 동시에 동일한 검정을 세팅하였다.

[0614] 검정 제 1 일에, 세포를 함유하는 모든 웰에 2.5% 알부민 소 프랙션 V, 무지방산 (FAF BSA; 최종 검정에서 2%) (프롤리안트 인코포레이티드, Cat #: SKU 68700)이 보충된 RPMI-1640 배지(인비트로젠; Cat #: 22400)의 분취물 (80 μ l)을 제공하였다. 다양한 대조군 및 시험 표본은 적절한 웰(웰 당 20 μ l)에 첨가되는 5x 농도에서 제조되었다. 대조군 조건은 지시된 바와 같이 최종 성장 인자 농도와 함께 하기를 포함하였다: 1) 2% FAF BSA가 있는 기본 배지; 2) 100ng/mL 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14)와 함께 8ng/mL bFGF (퍼프로텍; Cat # 100-18B); 3) 8ng/mL bFGF 및 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF)와 함께 100ng/mL 액티빈 A; 4) 100ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8)와 함께 8ng/mL bFGF; 5) GDF-8와 함께 8ng/mL bFGF 및 20ng/mL Wnt3a. 추가의 세트의 대조군 웰의 세포는 검정 전체를 통틀어서 MEF 조건화된 배지로 처리하였다. GDF-8을 사용한 일부 대조군 표본에서, Wnt3a는 본 발명의 화합물로 대체하였다. 실험적 시험 표본에 대해, 8개의 상이한 화합물은 3개의 상이한 용량 농도를 생성하기 위해 연속적으로 2-배 희석시킨 다음, 100ng/mL GDF-8 및 8ng/mL bFGF와 조합하였다. 이들 소분자는 프로프리터리 화합물 화합물 181, 화합물 180, 화합물 19, 화합물 202, 화합물 40, 화합물 34, 화합물 56, 및 시판의 GSK3 억제제 BIO (EMD 케미칼스, 인코포레이티드; Cat # 361550)를 포함하였다. 검정 제 2 및 제 3 일에, 대조군 및 시험 표본을 위한 모든 웰을 흡인시키고, Wnt3a는 일부 대조군 웰로부터 제거하는 점을 제외하고는, 동일한 처리 조건을 사용하여 다시 영양공급하였다.

[0615] **MTS 검정법:** 24, 48, 또는 72시간의 배양의 종료 시, 제조업자의 지시에 따라, 하나의 세트의 검정 플레이트에 MTS 검정(프로메가; Cat# G3581)을 하였다. 간략하게는, 20 μ l의 MTS는 각각의 웰에 첨가하고, 검정 플레이트를 OD490 판독하기 전에 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 통계적 측정은 배경을 제하고 계산하여 (즉, 세포가 없는 처리 웰), 평균의 표준 오차 외에도 각각의 삼중 세트에 대한 평균값을 측정하였다.

[0616] MTS 검정법은 포르마잔 생성물로의 테트라졸륨 화합물의 효소환원에서 세포 대사적 활성의 측정이다. 단일 시점에서, MTS 검정은 세포 생존성의 비교 지시로서 사용할 수 있다. 연이은 시점에서 평행적으로 평가된 MTS 검정은 즉, 각각의 처리 조건에 대한 세포 증식과 관련된 수 있는 세포 대사적 활성에서의 증가와 관련된 추가의 정보를 추가할 수 있다. 도 26, 패널 A는 3일 간의 검정에 걸쳐 모든 대조군 처리에 대한 OD490 판독을 보여준다. 조건화된 배지로 처리된 세포는 3일에 걸쳐 OD490에서 거의 변화를 보이지 않았으며, 이는 이러한 처리군 내 세포수는 그대로였음을 지시한다. 대조적으로, 성장 인자 없는 기본 배지에서 배양된 세포(무처리)는 시간에 따라 세포수의 상실과 관련된 OD490의 꾸준한 감소를 보여주었다. Wnt3a가 있고 없는 분화 방법 동안에 액티빈 A 처리는 OD490의 증가분 증가를 보였고, 이는 시간에 걸쳐 세포군의 유의한 팽창을 지시한다. Wnt3a의 부재 하에 GDF-8 처리는 액티빈 A 처리에 대해 OD490의 감소를 초래하였고; 이는 제 1 일에만 인지가 가능하였고, 모든 배양 3일에 걸쳐 유지되었다. Wnt3a를 GDF-8 처리군에 첨가하면 배양 제 3 일에 의해 회수 및 OD490의 증가를 초래하였다.

[0617] 도 26, 패널 B 내지 도 26, 패널 I은 GDF-8와 함께 소분자 억제제를 처리에 대한 MTS 검정법 결과를 보여준다. 본 발명의 화합물 및 GDF-8을 사용한 처리로부터의 OD490 판독은 액티빈 A를 사용한 처리와 동일하거나 초과된 결과였다. 모든 경우에, GDF-8을 조합한 각각의 소분자의 최적의 농도는 GDF-8 단독을 사용한 처리에 대한 3일의 검정에 걸친 향상된 OD490 판독을 초래하였다. 이는, 본 발명의 화합물은 완성 내배엽 분화 동안에 세포군의 증식 및 팽창을 유도하는데 중요함을 제시한다.

[0618] 실시예 24

[0619] 마이크로캐리어 상에서 성장된 인간 배아 줄기 세포는 본 발명의 방법에 따라 내분비 전구체 세포로 분화될 수 있다.

[0620] 산업 조건 하에 다수의 내분비 세포의 분화 및 생성을 위해, 인간 배아 줄기 세포는 액티빈 A가 없는 프로토콜

을 사용해 마이크로캐리어 비드 상에서 내분비 전구체 세포로 성장 및 분화될 수 있음을 보여주는 것이 중요하였다.

- [0621] *검정용 세포의 제조 및 분화*: H1 p45 세포는 10초 마다 약 1회전에서 록킹 플랫폼 (바리 믹스, 서모 사이언티픽 (Vari Mix, Thermo Scientific), Cat#M79735) 상에 위치한 6 웰 울트라 로우 어태치먼트 플레이트 (코스타; Cat #3471)에서 사이토탉스3 비드(GE 헬스케어; Cat # 17-0485-01) 상에서 키웠다. MEF 조건화된 배지를 6일 동안 매일 교환하였다. 다음, 배지를 하기 처리로 바꾸어서, 내배엽 분화를 개시하였다. 양성 대조군 처리 웰의 비드 상의 세포(AA+Wnt라고 지정)는 2% 무지방산 BSA (프롤리언트 바이오메디칼스, 인코포레이티드; SKU # 68700) 가 있는 RPMI-1640(인비트로젠; Cat #: 22400) 내에서, 100ng/mL 액티빈 A(퍼프로텍; Cat #120-14), 8ng/mL bFGF (퍼프로텍 인코포레이티드; Cat #: 100-18B), 및 20ng/mL Wnt3a(R&D 시스템즈; Cat # 1324-WN/CF)의 첨가를 사용해 1일 동안 그리고 이어서 2mL/웰의 부피를 사용해 2일 동안 100ng/mL 액티빈 A 및 8ng/mL bFGF (퍼프로텍 인코포레이티드; Cat #: 100-18B)의 첨가를 사용해 분화시켰다. 제 2 처리 웰(GDF-8+MCX라고 지정)에 1일 동안 2.5 μ M의 화합물 202 + 200ng/mL GDF-8 (R&D 시스템즈, Cat # 788-G8) 및 8ng/mL bFGF를 제공하였고, 이어서 2일 동안 2% 무지방산 BSA (2mL/웰) 배지가 있는 RPMI-1640 내 200ng/mL GDF-8 및 8ng/mL bFGF를 제공하였다. 제 3 처리 웰(GDF-8+Wnt라고 지정)은 2% 무지방산 BSA (2mL/웰) 배지가 있는 RPMI-1640 내에서, 1일 동안 20ng/mL Wnt3a 및 8ng/mL bFGF가 있는 200ng/mL GDF-8, 그리고 이어서 2일 동안 200ng/mL GDF-8 및 8ng/mL bFGF를 제공하였다. 모든 배지 및 처리물은 매일 교환하였다.
- [0622] 처리 및 배양의 종료 시, 세포는 수합 및 계수하여, 세포 회수를 측정하고 유세포분석하였다. 높은 수준의 CXCR4 및 CD99는 모든 3개의 처리 섭생 후 나타났다(도 27a). 세포수는 표본 간에 다양하였다(도 27b). 더 낮은 세포수는 다른 처리군보다 GDF-8을 사용하고 완성 내배엽에서 및 제 4단계에서 처리된 표본에서 관찰되었다. 이는 본 발명의 화합물은 분화 동안에 세포의 증식을 증가시킬 수 있음을 제시한다.
- [0623] 단계 3의 종료에서, 내배엽 유전자 PDX1, HNF4 알파, 및 CDX2는 세포에서 발현된다(도 27c, d). 분화 단계 1 동안 GDF-8 및 본 발명의 화합물을 사용한 세포의 처리는 대조군 분화 처리보다 Pdx1의 더 양호한 발현을 초래하였다. 단계 4의 종료 시, 내배엽 유전자를 추가로 상향조절하였다(도 27e, f). 이들 결과는 GDF-8 + 화합물 202는 완성 내배엽 분화에 대한 액티빈 A 및 Wnt3a를 대체하여, 췌장 내배엽 형성을 초래할 수 있다.
- [0624] 본 명세서 전체에 걸쳐 인용된 간행물은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다. 본 발명의 다양한 측면은 실시예 및 바람직한 실시 양태를 참조로 하여 상기 예시되었음에도, 본 발명의 범주는 전술한 상세한 설명에 의해서가 아니라 본 특허 법칙의 원칙 하에 적절하게 의도되는 하기 청구항에 의해 정의된다.

[0625] [표 1]

플레이트 #	화합물 #	세포수		Sox17 발현	
		평균 총 세포수	양성 대조군 %	평균 총 강도	양성 대조군 %
플레이트 5	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	7159	67.42	8.12E+06	2.51
플레이트 5	액티빈 A / Wnt3a	10619	100.00	3.23E+08	100.00
플레이트 5	화합물 58	4848	45.66	-1.60E+06	-0.49
플레이트 5	화합물 59	20	0.19	-4.62E+06	-1.43
플레이트 5	화합물 60	3348	31.52	-2.33E+05	-0.07
플레이트 5	화합물 61	2931	27.60	-3.05E+06	-0.94
플레이트 5	화합물 62	7171	67.53	-2.04E+06	-0.63
플레이트 5	화합물 3	14211	133.82	-2.34E+06	-0.73
플레이트 6	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	3264	32.97	2.52E+06	0.80
플레이트 6	액티빈 A / Wnt3a	9902	100.00	3.14E+08	100.00
플레이트 6	화합물 63	1917	19.36	4.75E+05	0.15
플레이트 6	화합물 26	5434	54.88	-6.33E+05	-0.20
플레이트 6	화합물 27	6288	63.50	-1.13E+06	-0.36
플레이트 6	화합물 28	4121	41.62	-1.89E+06	-0.60
플레이트 6	화합물 29	5164	52.15	-1.66E+06	-0.53
플레이트 6	화합물 30	4726	47.73	-1.23E+06	-0.39
플레이트 7	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	9545	47.57	-4.87E+06	-0.99
플레이트 7	액티빈 A / Wnt3a	20064	100.00	4.92E+08	100.00
플레이트 7	화합물 31	7230	36.03	-3.45E+06	-0.70
플레이트 7	화합물 32	14655	73.04	-3.03E+06	-0.62

[0626]

플레이트 7	화합물 33	13891	69.23	-8.11E+06	-1.65
플레이트 7	화합물 34	11674	58.18	-2.24E+06	-0.46
플레이트 7	화합물 35	15379	76.65	-7.30E+06	-1.48
플레이트 7	화합물 36	8356	41.65	-4.57E+06	-0.93
플레이트 8	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	6868	36.97	-2.31E+06	-0.52
플레이트 8	액티빈 A / Wnt3a	18575	100.00	4.47E+08	100.00
플레이트 8	화합물 37	9048	48.71	-3.51E+06	-0.79
플레이트 8	화합물 38	11361	61.16	-4.31E+06	-0.96
플레이트 8	화합물 39	7054	37.98	-3.83E+06	-0.86
플레이트 8	화합물 40	8104	43.63	-4.59E+06	-1.03
플레이트 1	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	2972	27.98	1.64E+07	19.74
플레이트 1	액티빈 A / Wnt3a	3126	29.44	8.33E+07	100.00
플레이트 1	화합물 64	2201	20.72	1.71E+07	20.52
플레이트 1	화합물 65	3030	28.53	2.83E+07	33.95
플레이트 1	화합물 66	1990	18.74	2.36E+07	28.30
플레이트 1	화합물 67	2074	19.53	2.63E+07	31.55
플레이트 1	화합물 68	1432	13.48	1.03E+07	12.39
플레이트 1	화합물 69	2593	24.42	2.62E+07	31.43
플레이트 1	화합물 70	2236	21.05	2.59E+07	31.11
플레이트 1	화합물 71	2996	28.22	3.07E+07	36.92
플레이트 1	화합물 72	2179	20.52	1.21E+07	14.50
플레이트 1	화합물 73	2817	26.53	2.93E+07	35.25
플레이트 1	화합물 74	2853	26.86	2.25E+07	27.01
플레이트 1	화합물 75	1689	15.91	1.42E+07	17.05
플레이트 1	화합물 76	2324	21.89	1.48E+07	17.81
플레이트 1	화합물 77	2306	21.71	2.04E+07	24.55
플레이트 1	화합물 78	3298	31.06	2.58E+07	31.00
플레이트 1	화합물 79	2855	26.88	2.79E+07	33.47

[0627]

1					
플레이트 1	화합물 80	3603	33.93	3.22E+07	38.62
플레이트 1	화합물 81	2263	21.31	1.07E+07	12.91
플레이트 1	화합물 82	1210	11.39	1.36E+07	16.33
플레이트 1	화합물 83	1805	17.00	1.82E+07	21.87
플레이트 1	화합물 84	2024	19.06	2.48E+07	29.80
플레이트 1	화합물 85	2840	26.74	3.45E+07	41.44
플레이트 1	화합물 86	1447	13.63	8.43E+06	10.13
플레이트 1	화합물 87	5336	50.25	4.20E+07	50.38
플레이트 2	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	4033	35.50	2.14E+07	21.70
플레이트 2	액티빈 A / Wnt3a	4292	37.78	9.86E+07	100.00
플레이트 2	화합물 88	3416	30.06	4.17E+07	42.28
플레이트 2	화합물 89	4751	41.82	2.11E+07	21.40
플레이트 2	화합물 90	4542	39.98	3.03E+07	30.70
플레이트 2	화합물 91	1401	12.33	1.29E+06	1.31
플레이트 2	화합물 92	4210	37.06	2.95E+07	29.90
플레이트 2	화합물 93	4157	36.59	2.29E+07	23.26
플레이트 2	화합물 94	4046	35.61	2.85E+07	28.91
플레이트 2	화합물 95	8368	73.66	4.02E+07	40.72
플레이트 2	화합물 96	3695	32.53	2.92E+07	29.57
플레이트 2	화합물 97	3437	30.26	2.41E+07	24.44
플레이트 2	화합물 98	4178	36.77	3.75E+07	38.07
플레이트 2	화합물 99	3739	32.91	2.10E+07	21.29
플레이트 2	화합물 100	2275	20.02	1.27E+07	12.86
플레이트 2	화합물 101	3496	30.77	2.98E+07	30.17
플레이트 2	화합물 102	4874	42.90	2.10E+07	21.32
플레이트 2	화합물 103	4228	37.22	2.69E+07	27.32
플레이트 2	화합물 104	6115	53.82	4.93E+07	49.99

[0628]

플레이트 2	화합물 105	6484	57.07	5.03E+07	50.95
플레이트 2	화합물 106	4211	37.06	3.94E+07	40.00
플레이트 2	화합물 107	2853	25.11	1.78E+07	18.04
플레이트 2	화합물 108	3779	33.27	2.39E+07	24.26
플레이트 2	화합물 108	2869	25.26	2.04E+07	20.71
플레이트 2	화합물 110	4398	38.71	2.53E+07	25.65
플레이트 3	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	2589	91.17	1.17E+07	5.89
플레이트 3	액티빈 A / Wnt3a	6933	244.13	1.98E+08	100.00
플레이트 3	화합물 111	6816	240.04	5.33E+07	26.90
플레이트 3	화합물 112	5357	188.66	3.52E+07	17.74
플레이트 3	화합물 113	6002	211.37	8.55E+07	43.11
플레이트 3	화합물 114	3308	116.49	3.85E+07	19.44
플레이트 3	화합물 115	5007	176.31	3.96E+07	19.95
플레이트 3	화합물 116	3802	133.89	3.12E+07	15.75
플레이트 3	화합물 117	6521	229.64	4.16E+07	20.97
플레이트 3	화합물 118	6128	215.81	5.53E+07	27.91
플레이트 3	화합물 119	4184	147.35	3.41E+07	17.21
플레이트 3	화합물 120	2489	87.66	2.87E+07	14.49
플레이트 3	화합물 121	4985	175.54	3.94E+07	19.87
플레이트 3	화합물 25	4151	146.17	4.03E+07	20.32
플레이트 3	화합물 122	6407	225.61	4.15E+07	20.95
플레이트 3	화합물 123	4465	157.24	5.35E+07	26.99
플레이트 3	화합물 124	4417	155.53	4.67E+07	23.55
플레이트 3	화합물 125	6367	224.23	5.73E+07	28.93
플레이트 3	화합물 126	6157	216.82	7.47E+07	37.70
플레이트 3	화합물 127	5593	196.97	5.61E+07	28.28
플레이트 3	화합물 128	4160	146.50	4.91E+07	24.77
플레이트 3	화합물 129	3778	133.03	3.54E+07	17.88

[0629]

3					
플레이트 3	화합물 130	4357	153.43	4.15E+07	20.92
플레이트 3	화합물 131	6135	216.05	4.28E+07	21.61
플레이트 3	화합물 132	4421	155.69	4.58E+07	23.12
플레이트 3	화합물 133	7069	248.94	6.52E+07	32.88
플레이트 4	무-엑티빈 A (유-Wnt3a)	3274	86.62	1.25E+07	12.79
플레이트 4	엑티빈 A / Wnt3a	4158	110.03	9.79E+07	100.00
플레이트 4	화합물 134	5277	139.62	3.43E+07	35.04
플레이트 4	화합물 64	5657	149.67	3.38E+07	34.48
플레이트 4	화합물 135	2790	73.83	1.63E+07	16.63
플레이트 4	화합물 34	4774	126.33	4.35E+07	44.47
플레이트 4	화합물 136	4881	129.16	3.20E+07	32.73
플레이트 4	화합물 137	1740	46.05	9.16E+06	9.35
플레이트 4	화합물 30	6367	168.46	4.22E+07	43.13
플레이트 4	화합물 37	5377	142.27	2.85E+07	29.14
플레이트 4	화합물 138	7722	204.32	3.07E+07	31.37
플레이트 4	화합물 139	3574	94.56	1.30E+07	13.32
플레이트 4	화합물 140	3893	103.00	1.12E+07	11.46
플레이트 4	화합물 39	6114	161.77	3.45E+07	35.22
플레이트 4	화합물 141	4310	114.04	1.61E+07	16.48
플레이트 4	화합물 142	5091	134.71	3.74E+07	38.22
플레이트 4	화합물 35	6601	174.65	8.50E+07	86.77
플레이트 4	화합물 143	3582	94.79	2.17E+07	22.14
플레이트 4	화합물 144	6787	179.57	5.45E+07	55.69
플레이트 4	화합물 145	3752	99.29	2.23E+07	22.81
플레이트 4	화합물 146	2554	67.59	1.83E+07	18.71
플레이트 4	화합물 112	3289	87.03	1.48E+07	15.11
플레이트 4	화합물 113	3819	101.06	2.34E+07	23.93

[0630]

플레이트 4	화합물 114	1259	33.32	1.34E+07	13.67
플레이트 4	화합물 22	5517	145.98	7.09E+07	72.39
플레이트 4	화합물 150	5104	135.04	3.34E+07	34.11
플레이트 5	무-엑티빈 A (유-Wnt3a)	7159	116.70	8.12E+06	2.51
플레이트 5	엑티빈 A / Wnt3a	10619	173.09	3.23E+08	100.00
플레이트 5	화합물 151	2785	45.39	-1.03E+06	-0.32
플레이트 5	화합물 152	4693	76.50	-3.08E+06	-0.95
플레이트 5	화합물 153	9718	158.40	-1.20E+06	-0.37
플레이트 5	화합물 154	3479	56.70	-1.97E+06	-0.61
플레이트 5	화합물 155	9343	152.28	-3.45E+06	-1.07
플레이트 5	화합물 156	3813	62.16	-2.58E+05	-0.08
플레이트 6	무-엑티빈 A (유-Wnt3a)	3264	68.37	2.52E+06	0.80
플레이트 6	엑티빈 A / Wnt3a	9902	207.40	3.14E+08	100.00
플레이트 6	화합물 157	2480	51.94	-1.22E+06	-0.39
플레이트 6	화합물 158	5271	110.41	-1.30E+06	-0.41
플레이트 6	화합물 159	6478	135.68	-1.84E+06	-0.59
플레이트 6	화합물 160	4212	88.21	1.30E+05	0.04
플레이트 6	화합물 161	2439	51.09	-9.20E+05	-0.29
플레이트 6	화합물 162	1260	26.39	-1.35E+06	-0.43
플레이트 7	무-엑티빈 A (유-Wnt3a)	9545	156.12	-4.87E+06	-0.99
플레이트 7	엑티빈 A / Wnt3a	20064	328.17	4.92E+08	100.00
플레이트 7	화합물 163	16557	270.81	-7.31E+06	-1.49
플레이트 7	화합물 164	16472	269.42	-7.37E+06	-1.50
플레이트 7	화합물 165	3015	49.32	-7.34E+06	-1.49
플레이트 7	화합물 166	13845	226.45	-7.98E+06	-1.62
플레이트 7	화합물 167	10325	168.87	-7.35E+06	-1.49
플레이트 7	화합물 168	14139	231.26	-6.49E+06	-1.32
플레이트 7	화합물 169	4468	73.08	-6.38E+06	-1.30

[0631]

7					
플레이트 8	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	6868	179.83	-2.31E+06	-0.52
플레이트 8	액티빈 A / Wnt3a	18575	486.35	4.47E+08	100.00
플레이트 8	화합물 170	13140	344.04	-4.13E+06	-0.93
플레이트 8	화합물 171	10894	285.22	-2.61E+06	-0.58
플레이트 8	화합물 172	3416	89.44	-4.72E+06	-1.06
플레이트 8	화합물 173	8815	230.81	-4.25E+06	-0.95
플레이트 8	화합물 174	11760	307.91	-3.33E+06	-0.75
플레이트 8	화합물 175	5	0.13	-4.91E+06	-1.10
플레이트 8	화합물 176	10139	265.47	-4.73E+06	-1.06
플레이트 8	화합물 177	9994	261.68	-2.95E+06	-0.66
플레이트 8	화합물 178	8998	235.58	-3.74E+06	-0.84
플레이트 5	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	7159	67.42	8.12E+06	2.51
플레이트 5	액티빈 A / Wnt3a	10619	100.00	3.23E+08	100.00
플레이트 5	화합물 21	4719	44.44	-1.96E+06	-0.61
플레이트 5	화합물 22	2036	19.18	-1.79E+06	-0.55
플레이트 5	화합물 23	2563	24.13	-1.56E+06	-0.48
플레이트 5	화합물 24	4470	42.09	-7.05E+05	-0.22
플레이트 5	화합물 24	6085	57.30	-3.08E+06	-0.95
플레이트 5	화합물 26	7276	68.52	-2.38E+06	-0.74
플레이트 5	화합물 27	4588	43.20	-5.63E+05	-0.17
플레이트 5	화합물 28	2682	25.26	-1.37E+06	-0.43
플레이트 5	화합물 29	5778	54.41	-1.94E+06	-0.60
플레이트 5	화합물 30	620	5.84	-5.05E+06	-1.56
플레이트 5	화합물 31	3419	32.19	-1.42E+06	-0.44
플레이트 6	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	3264	69.07	2.52E+06	0.80
플레이트 6	액티빈 A / Wnt3a	9902	209.51	3.14E+08	100.00
플레이트 6	화합물 32	2142	45.32	-1.33E+06	-0.42

[0632]

플레이트 6	화합물 33	5564	117.73	-8.63E+05	-0.27
플레이트 6	화합물 34	5927	125.41	-2.01E+06	-0.64
플레이트 6	화합물 35	10068	213.01	-2.15E+06	-0.68
플레이트 6	화합물 36	5170	109.39	-1.22E+06	-0.39
플레이트 6	화합물 37	3098	65.55	1.91E+06	0.61
플레이트 6	화합물 38	1537	32.52	4.48E+04	0.01
플레이트 6	화합물 39	3650	77.23	-2.01E+06	-0.64
플레이트 6	화합물 40	5817	123.07	4.91E+05	0.16
플레이트 6	화합물 64	4359	92.23	-1.07E+05	-0.03
플레이트 6	화합물 30	4035	85.38	2.09E+06	0.66
플레이트 6	화합물 65	3279	69.37	-5.63E+05	-0.18
플레이트 6	화합물 67	2698	57.08	-1.95E+06	-0.62
플레이트 7	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	9545	321.22	-4.87E+06	-0.99
플레이트 7	액티빈 A / Wnt3a	20064	675.20	4.92E+08	100.00
플레이트 7	화합물 68	10894	366.62	-5.15E+06	-1.05
플레이트 7	화합물 69	9734	327.58	-3.97E+06	-0.81
플레이트 7	화합물 70	16736	563.21	-6.51E+06	-1.32
플레이트 7	화합물 71	17999	605.71	-7.38E+06	-1.50
플레이트 7	화합물 72	7309	245.96	-6.47E+06	-1.32
플레이트 7	화합물 73	8888	299.10	-3.03E+06	-0.62
플레이트 7	화합물 74	11496	386.85	-2.67E+06	-0.54
플레이트 7	화합물 75	9739	327.74	-7.75E+06	-1.57
플레이트 7	화합물 76	14439	485.89	-4.19E+06	-0.85
플레이트 7	화합물 77	12331	414.95	-6.03E+06	-1.22
플레이트 7	화합물 78	9702	326.49	-6.57E+06	-1.33
플레이트 7	화합물 79	8535	287.22	-6.92E+06	-1.41
플레이트 8	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	6868	295.49	-2.31E+06	-0.52
플레이트 8	액티빈 A / Wnt3a	18575	799.17	4.47E+08	100.00

[0633]

[0634] [표 2]

화합물 #	세포수	Sox17 강도
	양성 대조군 %	양성 대조군 %
화합물 17	133.8	-0.7
화합물 95	195.0	40.7
화합물 138	185.7	31.4
화합물 87	170.7	50.4
화합물 144	163.2	55.7
화합물 35	158.7	86.8
화합물 30	153.1	43.1
화합물 105	151.0	51.0
화합물 39	147.0	35.2
화합물 104	142.5	50.0
화합물 29	136.0	34.5
화합물 22	132.7	72.4
화합물 37	129.3	29.1
화합물 134	126.9	35.0
화합물 150	122.7	34.1
화합물 142	122.4	38.2
화합물 136	117.4	32.7
화합물 80	115.2	38.6
화합물 34	114.8	44.5
화합물 102	113.5	21.3
화합물 89	110.7	21.4
화합물 105	105.8	30.7
화합물 78	105.5	31.0
화합물 141	103.6	16.5
화합물 110	102.5	25.7
화합물 133	102.0	32.9

[0635]

[0636] [표 3]

화합물 #	처리		세포수		Sox17 발현	
			평균 총 세포수	양성 대조군 %	평균 총 강도	양성 대조군 %
없음	무-액티빈 A, 유-Wnt3a		23253	124.16	1.97E+07	10.59
없음	액티빈 A / Wnt3a		18728	100.00	1.86E+08	100.00
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	21445	114.51	3.43E+07	18.48
없음	무-액티빈 A, 유-Wnt3a		23253	124.16	1.97E+07	10.59
없음	액티빈 A / Wnt3a		18728	100.00	1.86E+08	100.00
화합물 22	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	18336	97.91	3.72E+07	20.05
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	18891	100.87	3.26E+07	17.55
화합물 29	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	20221	107.97	2.83E+07	15.27
화합물 39	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	17095	91.28	2.82E+07	15.19
화합물 37	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	15605	83.32	2.67E+07	14.37
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	23823	127.20	2.54E+07	13.69
화합물 80	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	19864	106.07	2.33E+07	12.54
화합물 141	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	17719	94.61	2.24E+07	12.04
화합물 30	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	18063	96.45	2.18E+07	11.73
화합물 150	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	16833	89.88	2.16E+07	11.63
화합물 144	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	17100	91.31	2.04E+07	11.01

[0637]

화합물 104	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	17863	95.38	1.89E+07	10.19
화합물 142	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	18955	101.21	1.84E+07	9.90
화합물 110	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	17534	93.62	1.76E+07	9.45
화합물 78	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	17703	94.52	1.71E+07	9.23
화합물 133	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	16521	88.22	1.67E+07	8.97
화합물 87	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	16495	88.07	1.55E+07	8.33
화합물 95	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	16900	90.24	1.43E+07	7.72
화합물 136	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	19167	102.34	7.91E+06	4.26
화합물 105	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	15217	81.25	7.45E+06	4.01
화합물 134	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	17208	91.88	7.40E+06	3.99
화합물 138	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	16695	89.14	6.65E+06	3.58
화합물 89	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	14652	78.24	3.89E+06	2.10
화합물 90	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	15903	84.92	3.53E+06	1.90
화합물 102	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	12943	69.11	2.85E+05	0.15
없음	무-액티빈 A, 유-Wnt3a		23253	124.16	1.97E+07	10.59
없음	액티빈 A / Wnt3a		18728	100.00	1.86E+08	100.00
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	18294	97.68	1.99E+07	10.70

[0638]

[0639]

[표 3b]

화합물 #	세포수	Sox17 강도
	양성 대조군 %	양성 대조군 %
화합물 22	97.91	20.05
화합물 34	100.87	17.55
화합물 29	107.97	15.27
화합물 39	91.28	15.19
화합물 37	83.32	14.37
화합물 35	127.20	13.69

[0640]

[0641]

[표 4]

화합물 #	처리	세포수		Sox17 발현		
		평균 총 세포수	양성 대조군 %	평균 총 강도	양성 대조군 %	
없음	무-액티빈 A (유-Wnt3a)		7107	67.96	-1.27E+07	-7.94
없음	액티빈 A / Wnt3a		10459	100.00	1.60E+08	100.00
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a)	EGF	6942	73.43	1.27E+06	0.74
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	5738	60.69	3.14E+06	1.83
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	4453	47.10	9.30E+05	0.54
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+부스치물	10391	109.91	8.92E+06	5.20
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	5728	60.59	2.14E+06	1.24
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	13198	139.59	1.29E+07	7.54
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	10480	110.85	8.97E+06	5.23
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+부스치물	13649	144.37	1.45E+07	8.43
없음	무-액티빈 A (유-Wnt3a)		3117	34.86	-1.41E+06	-0.72
없음	액티빈 A / Wnt3a		8942	100.00	1.95E+08	100.00
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	EGF	19334	216.23	6.62E+07	33.86
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	PDGF-AB	16662	186.34	4.95E+07	25.33
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	PDGF-A	16885	188.84	4.48E+07	22.94
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	VEGF	18263	204.25	3.51E+07	17.98
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	FGF4	4410	49.32	3.33E+07	17.04
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	부스치물	18867	211.00	2.61E+07	13.35
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	PDGF-C	16642	186.12	1.85E+07	9.46
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	PDGF-D	17618	197.03	1.84E+07	9.41
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	PDGF-B	14168	158.46	1.52E+07	7.76

[0642]

화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	PD98059	18877	211.11	1.30E+07	6.64
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	BMP1	18849	210.81	1.29E+07	6.59
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	LY294002	18374	205.49	1.03E+07	5.28
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	BMP4	16748	187.31	8.97E+06	4.59
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	BMP2	16218	181.38	8.89E+06	4.55
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	BMP7	20111	224.91	8.05E+06	4.12
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	U0124	16539	184.97	7.54E+06	3.86
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	BMP6	17838	199.50	7.32E+06	3.75
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	BMP2/7	12042	134.67	7.08E+06	3.62
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	비쿠클린	19312	215.98	1.95E+06	1.00
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	U0126	19961	223.24	-5.75E+05	-0.29
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	부티레이트	14238	159.24	-1.85E+06	-0.94
없음		무-액티빈 A (유-Wnt3a)	6049	45.2	-1.31E+07	-5.2
없음		액티빈 A/Wnt3a	13392	100.0	2.50E+08	100.0
화합물 20		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	9434	70.4	1.48E+08	59.1
화합물 17		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	7988	59.6	1.13E+08	45.0
화합물 16		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	8303	62.0	9.20E+07	36.7
화합물 13		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	7045	52.6	7.22E+07	28.8
화합물 19		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	7799	58.2	6.82E+07	27.2
화합물 92		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	5886	44.0	5.63E+07	22.5
화합물 93		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	5463	40.8	4.38E+07	17.5
화합물 94		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	5100	38.1	4.18E+07	16.7
화합물 95		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	4510	33.7	3.32E+07	13.3

[0643]

		D, 무스치볼, GDF8				
화합물 96		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	4570	34.1	3.09E+07	12.3
화합물 97		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	4561	34.1	2.15E+07	8.6
화합물 98		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	3176	23.7	9.86E+06	3.9
화합물 99		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	1209	9.0	-1.56E+07	-6.2
없음		무-액티빈 A (유-Wnt3a)	15494	98.0	-1.25E+07	-4.4
없음		액티빈 A/Wnt3a	15807	100.0	2.86E+08	100.0
화합물 18		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	8742	55.3	1.01E+08	35.4
화합물 14		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	8464	53.5	8.33E+07	29.1
화합물 15		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	7234	45.8	7.95E+07	27.8
화합물 100		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	6805	43.0	5.88E+07	20.6
화합물 101		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	5668	35.9	5.34E+07	18.7
화합물 102		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	6195	39.2	5.29E+07	18.5
화합물 103		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	7545	47.7	5.13E+07	18.0
화합물 104		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	4757	30.1	4.58E+07	16.0
화합물 105		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	6285	39.8	4.29E+07	15.0
화합물 106		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	5622	35.6	2.86E+07	10.0
화합물 107		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	3951	25.0	1.72E+07	6.0

[0644]

화합물 108	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	3226	20.4	1.58E+07	5.5
화합물 109	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	3473	22.0	1.46E+07	5.1
화합물 110	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	3703	23.4	1.32E+07	4.6
화합물 111	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	2918	18.5	1.22E+07	4.3
화합물 112	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	2975	18.8	1.04E+07	3.6
화합물 113	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	2910	18.4	9.18E+06	3.2
화합물 114	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	2734	17.3	6.13E+06	2.1
화합물 115	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	2169	13.7	3.77E+06	1.3
화합물 116	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	3107	19.7	3.52E+06	1.2
화합물 117	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	3343	21.1	5.35E+05	0.2
화합물 118	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	3034	19.2	2.37E+05	0.1
화합물 119	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	2263	14.3	-1.66E+06	-0.6
화합물 120	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	1771	11.2	-5.57E+06	-2.0
화합물 121	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	1136	7.2	-1.79E+07	-6.3
화합물 122	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	2021	12.8	-2.09E+07	-7.3

[0645]

[0646]

[표 5]

화합물 #	처리	세포수		Sox17 발현	
		평균총 세포수	양성 대조군 %	평균 총 강도	양성 대조군 %
없음	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	7107	67.96	-	-7.94
없음	액티빈 A / Wnt3a	10459	100.00	1.60E+08	100.00
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a) EGF	6942	73.43	1.27E+06	0.74
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a) EGF+FGF4	5738	60.69	3.14E+06	1.83
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a) EGF+FGF4+PDGF-AB	4453	47.10	9.30E+05	0.54
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a) EGF+FGF4+PDGF-AB+무스치물	10391	109.91	8.92E+06	5.20
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a) EGF+PDGF-A+VEGF	5728	60.59	2.14E+06	1.24
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a) FGF4+PDGF-A+VEGF	13198	139.59	1.29E+07	7.54
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a) EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	10480	110.85	8.97E+06	5.23
화합물 17	무-AA (유-Wnt3a) EGF+FGF4+PDGF-A+무스치물	13649	144.37	1.45E+07	8.43
없음	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	7107	67.96	1.27E+07	-7.94
없음	액티빈 A / Wnt3a	10459	100.00	1.60E+08	100.00
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a) EGF	23887	228.40	1.01E+07	-6.32
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a) EGF+FGF4	21268	203.36	1.36E+06	0.85
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a) EGF+FGF4+PDGF-AB	17611	168.39	1.28E+07	8.03
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a) EGF+FGF4+PDGF-AB+무스치물	17949	171.62	1.54E+06	0.96
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a) EGF+PDGF-A+VEGF	23242	222.23	1.23E+07	7.72
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a) FGF4+PDGF-A+VEGF	16068	153.63	3.92E+07	24.57

[0647]

화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	16132	154.25	9.11E+07	57.04
화합물 35	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치물	15457	147.80	6.89E+07	43.15
화합물 29	무-AA (유-Wnt3a)	EGF	1971	18.84	1.44E+07	-9.00
화합물 29	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	7436	71.10	4.35E+06	-2.72
화합물 29	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	6535	62.48	7.52E+06	-4.71
화합물 29	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+무스치물	1376	13.15	1.42E+07	-8.91
화합물 29	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	8880	84.91	8.53E+06	-5.34
화합물 29	무-AA (유-Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	8146	77.89	4.82E+06	-3.02
화합물 29	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	8858	84.70	7.15E+06	-4.48
화합물 29	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치물	10071	96.30	2.95E+06	1.85
화합물 37	무-AA (유-Wnt3a)	EGF	7966	76.17	1.19E+07	-7.42
화합물 37	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	6932	66.28	4.62E+06	-2.89
화합물 37	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	7473	71.46	2.61E+06	-1.63
화합물 37	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+무스치물	7914	75.67	1.91E+06	-1.20
화합물 37	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	12956	123.88	1.25E+07	-7.82
화합물 37	무-AA (유-Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	6731	64.36	1.10E+07	-6.89
화합물 37	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	8778	83.93	1.39E+05	0.09
화합물 37	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치물	5821	55.66	1.22E+07	-7.64
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	EGF	13062	124.89	2.78E+07	17.39
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	13133	125.58	1.23E+08	76.85

[0648]

화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	12532	119.83	1.09E+08	68.41
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+무스치물	15811	151.18	6.90E+06	4.32
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	11801	112.84	4.04E+06	2.53
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	15262	145.93	1.15E+07	7.18
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	12901	123.36	5.01E+07	31.35
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치물	12208	116.72	5.56E+07	34.83
없음	무-액티빈 A (유-Wnt3a)		10224	108.14	7.36E+05	0.43
없음	액티빈 A / Wnt3a		9455	100.00	1.72E+08	100.00
화합물 39	무-AA (유-Wnt3a)	EGF	11615	122.85	1.49E+05	0.09
화합물 39	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	10456	110.59	5.11E+06	2.98
화합물 39	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	9972	105.47	1.62E+06	0.94
화합물 39	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+무스치물	10540	111.48	2.22E+06	1.29
화합물 39	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	17050	180.34	4.84E+06	2.82
화합물 39	무-AA (유-Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	8856	93.67	7.01E+05	0.41
화합물 39	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	7973	84.33	5.30E+06	3.09
화합물 39	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치물	9103	96.28	7.32E+05	0.43
화합물 22	무-AA (유-Wnt3a)	EGF	14105	149.19	1.75E+06	1.02
화합물 22	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4	12971	137.19	1.04E+07	6.05
화합물 22	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	16580	175.36	8.60E+06	5.01
화합물 22	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+무스치물	14676	155.23	5.61E+06	3.27
화합물 22	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	20372	215.48	4.99E+06	2.91
화합물 22	무-AA (유-Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	12277	129.85	4.90E+06	2.86
화합물 22	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	12522	132.44	7.88E+06	4.59
화합물 22	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치물	11610	122.80	1.33E+07	7.77

[0649]

[0650]

[표 6]

화합물 #	처리		세포수		Sox17 발현	
			평균총 세포수	양성 대조군 %	평균 총 강도	양성 대조군 %
없음	무-액티빈 A (유-Wnt3a)		477	6.64	7.4E+04	0.09
없음	액티빈 A / Wnt3a		7185	100.00	8.0E+07	100.00
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	없음	4611	64.18	1.4E+07	17.21
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	EGF	6145	85.53	1.5E+07	19.18
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF4	5323	74.09	2.7E+07	33.75
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	PDGF-D	5017	69.84	1.5E+07	18.76
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	PDGF-A	4175	58.11	1.1E+07	13.43
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	VEGF	4713	65.60	1.0E+07	12.49
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	GDF8	6354	88.44	7.1E+07	88.59
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	무스치분	7286	101.41	3.1E+07	38.38
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	PDGF-D+VEGF	5030	70.01	1.2E+07	14.58
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	VEGF+무스치분	776	10.81	1.3E+06	1.56
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	PDGF-D+무스치분	3490	48.57	6.5E+06	8.02
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	GDF8+PDGF-D	6889	95.88	5.8E+07	72.59
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	PDGF-D+무스치분+VEGF	2133	29.68	2.7E+06	3.32
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	GDF8+PDGF-D+VEGF	5585	77.74	6.6E+07	81.75
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	GDF8+VEGF+무스치분	6083	84.67	5.6E+07	69.62
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	GDF8+PDGF-D+VEGF+무스치분	9455	131.60	9.6E+07	119.24
화합물 34	무-AA, 무-Wnt3a	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+무스치분+GDF8	4757	66.21	3.9E+07	48.77
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+무스치분+GDF8	6028	83.90	7.0E+07	87.44

[0651]

[0652]

[표 7]

플레이트	처리	화합물 #	세포수		Sox17 발현	
			평균 총 세포수	양성 대조군 %	평균 총 강도	양성 대조군 %
1	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	없음	6049	45.2	1.31E+07	-5.2
1	Activin A/Wnt3a	없음	13392	100.0	2.50E+08	100.0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 18	13037	97.3	1.63E+08	65.2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 14	9344	69.8	1.23E+08	49.0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 15	8448	63.1	8.64E+07	34.5
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 16	5498	41.1	6.56E+07	26.2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 64	5063	37.8	5.88E+07	23.5
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 65	4788	35.8	4.57E+07	18.2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 66	8129	60.7	3.53E+07	14.1
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 67	6791	50.7	3.18E+07	12.7
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 68	3456	25.8	2.30E+07	9.2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 69	3995	29.8	1.69E+07	6.8
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 70	474	3.5	1.80E+07	-7.2
2	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	없음	15494	98.0	1.25E+07	-4.4
2	Activin A/Wnt3a	없음	15807	100.0	2.86E+08	100.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 19	8425	53.3	1.19E+08	41.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 13	9123	57.7	1.13E+08	39.7

[0653]

2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 71	6048	38.3	5.51E+07	19.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 72	6060	38.3	5.46E+07	19.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 73	5545	35.1	3.99E+07	14.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 74	10898	68.9	3.91E+07	13.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 75	4117	26.0	3.01E+07	10.5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 76	3825	24.2	2.74E+07	9.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 77	5928	37.5	2.44E+07	8.5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 78	3303	20.9	2.03E+07	7.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 79	4767	30.2	1.85E+07	6.5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 80	2194	13.9	1.22E+07	4.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 81	2920	18.5	9.16E+05	0.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 82	1819	11.5	1.05E+07	-3.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 83	2153	13.6	1.19E+07	-4.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 84	58	0.4	2.94E+07	-10.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 85	57	0.4	3.03E+07	-10.6
1	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	없음	6049	45.2	1.31E+07	-5.2
1	Activin A/Wnt3a	없음	13392	100.0	2.50E+08	100.0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 20	9434	70.4	1.48E+08	59.1
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 17	7988	59.6	1.13E+08	45.0

[0654]

1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 16	8303	62.0	9.20E+07	36.7
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 13	7045	52.6	7.22E+07	28.8
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 19	7799	58.2	6.82E+07	27.2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 92	5886	44.0	5.63E+07	22.5
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 93	5463	40.8	4.38E+07	17.5
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 94	5100	38.1	4.18E+07	16.7
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 95	4510	33.7	3.32E+07	13.3
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 96	4570	34.1	3.09E+07	12.3
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 97	4561	34.1	2.15E+07	8.6
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 98	3176	23.7	9.86E+06	3.9
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 99	1209	9.0	1.56E+07	-6.2
2	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	없음	15494	98.0	1.25E+07	-4.4
2	Activin A/Wnt3a	없음	15807	100.0	2.86E+08	100.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 18	8742	55.3	1.01E+08	35.4
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 14	8464	53.5	8.33E+07	29.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 15	7234	45.8	7.95E+07	27.8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 100	6805	43.0	5.88E+07	20.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 101	5668	35.9	5.34E+07	18.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치볼, GDF8	화합물 102	6195	39.2	5.29E+07	18.5

[0655]

2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 103	7545	47.7	5.13E+07	18.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 104	4757	30.1	4.58E+07	16.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 105	6285	39.8	4.29E+07	15.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 106	5622	35.6	2.86E+07	10.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 107	3951	25.0	1.72E+07	6.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 108	3226	20.4	1.58E+07	5.5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 109	3473	22.0	1.46E+07	5.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 110	3703	23.4	1.32E+07	4.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 111	2918	18.5	1.22E+07	4.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 112	2975	18.8	1.04E+07	3.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 113	2910	18.4	9.18E+06	3.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 114	2734	17.3	6.13E+06	2.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 115	2169	13.7	3.77E+06	1.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 116	3107	19.7	3.52E+06	1.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 117	3343	21.1	5.35E+05	0.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 118	3034	19.2	2.37E+05	0.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 119	2263	14.3	1.66E+06	-0.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 120	1771	11.2	5.57E+06	-2.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 121	1136	7.2	-	-6.3

[0656]

	GDF8				1.79E+07	
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 122	2021	12.8	2.09E+07	-7.3
1	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	없음	6049	45.2	1.31E+07	-5.2
1	Activin A/Wnt3a	없음	13392	100.0	2.50E+08	100.0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 19	15878	118.6	2.67E+08	106.5
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 24	12714	94.9	2.46E+08	98.2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 23	12165	90.8	2.15E+08	86.0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 21	12640	94.4	1.65E+08	65.9
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 13	11491	85.8	1.61E+08	64.3
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 30	11396	85.1	1.34E+08	53.4
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 36	7964	59.5	9.47E+07	37.8
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 32	8066	60.2	9.29E+07	37.1
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 26	7415	55.4	8.30E+07	33.1
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 17	6994	52.2	7.76E+07	31.0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 31	6957	51.9	6.59E+07	26.3
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 179	3573	26.7	2.43E+07	9.7
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 180	922	6.9	2.20E+07	-8.8
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치분, GDF8	화합물 181	8	0.1	2.68E+07	-10.7
2	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	없음	15494	98.0	1.25E+07	-4.4
2	Activin A/Wnt3a	없음	15807	100.0	2.86E+08	100.0

[0657]

2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 18	21102	133.5	4.18E+08	146.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 15	15373	97.3	3.74E+08	130.8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 14	9008	57.0	2.62E+08	91.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 38	9650	61.0	2.46E+08	86.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 35	10461	66.2	1.59E+08	55.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 16	9064	57.3	1.48E+08	51.8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 34	8907	56.3	9.99E+07	35.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 20	7346	46.5	8.90E+07	31.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 27	8044	50.9	8.81E+07	30.8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 28	7591	48.0	8.77E+07	30.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 40	4049	25.6	8.23E+07	28.8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 33	7485	47.4	8.10E+07	28.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 25	6571	41.6	7.60E+07	26.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 182	7631	48.3	6.74E+07	23.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 183	6777	42.9	5.93E+07	20.8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 184	5475	34.6	5.44E+07	19.0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 185	4093	25.9	4.92E+07	17.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 186	5274	33.4	4.63E+07	16.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 187	5342	33.8	4.02E+07	14.1

[0658]

	GDF8					
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 188	5533	35.0	3.98E+07	13.9
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 189	5928	37.5	3.96E+07	13.9
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 190	4822	30.5	3.90E+07	13.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 191	4249	26.9	3.81E+07	13.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 192	5616	35.5	3.54E+07	12.4
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 193	4158	26.3	3.23E+07	11.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 194	3470	22.0	2.96E+07	10.4
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 195	3800	24.0	2.95E+07	10.3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 196	4619	29.2	2.78E+07	9.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 197	4011	25.4	2.45E+07	8.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 198	4367	27.6	1.92E+07	6.7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 199	3162	20.0	1.20E+07	4.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 200	2087	13.2	4.43E+06	1.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 201	1568	9.9	6.17E+06	-2.2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 202	5213	33.0	1.41E+07	-4.9
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 203	7	0.0	3.04E+07	-10.6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 204	11	0.1	3.18E+07	-11.1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, 무스치물, GDF8	화합물 205	10	0.1	3.20E+07	-11.2

[0659]

[0660] [표 8]

화합물 #	세포수		Sox17 발현	
	평균총 세포수	양성 대조군 %	평균 총 강도	양성 대조군 %
화합물 18	21102	133.5	4.18E+08	146.3
화합물 15	15373	97.3	3.74E+08	130.8
화합물 19	15878	118.6	2.67E+08	106.5
화합물 24	12714	94.9	2.46E+08	98.2
화합물 14	9008	57.0	2.62E+08	91.6
화합물 38	9650	61.0	2.46E+08	86.2
화합물 23	12165	90.8	2.15E+08	86.0
화합물 21	12640	94.4	1.65E+08	65.9
화합물 13	11491	85.8	1.61E+08	64.3
화합물 35	10461	66.2	1.59E+08	55.7
화합물 30	11396	85.1	1.34E+08	53.4
화합물 16	9064	57.3	1.48E+08	51.8
화합물 36	7964	59.5	9.47E+07	37.8
화합물 32	8066	60.2	9.29E+07	37.1
화합물 34	8907	56.3	9.99E+07	35.0
화합물 26	7415	55.4	8.30E+07	33.1
화합물 20	7346	46.5	8.90E+07	31.2
화합물 17	6994	52.2	7.76E+07	31.0
화합물 27	8044	50.9	8.81E+07	30.8
화합물 28	7591	48.0	8.77E+07	30.7
화합물 40	4049	25.6	8.23E+07	28.8
화합물 33	7485	47.4	8.10E+07	28.3
화합물 25	6571	41.6	7.60E+07	26.6
화합물 31	6957	51.9	6.59E+07	26.3
화합물 20	9434	70.4	1.48E+08	59.1
화합물 17	7988	59.6	1.13E+08	45.0
화합물 16	8303	62.0	9.20E+07	36.7
화합물 18	8742	55.3	1.01E+08	35.4
화합물 14	8464	53.5	8.33E+07	29.1
화합물 13	7045	52.6	7.22E+07	28.8
화합물 15	7234	45.8	7.95E+07	27.8
화합물 19	7799	58.2	6.82E+07	27.2

[0661]

[0662] [표 9]

플레이트 #	처리			세포수		Sox17 발현	
	액티브 A	화합물 #	성장 인자	평균 총 세포수	양성 대조군 %	평균 총 강도	양성 대조군 %
1	없음	없음	없음	9164	149.46	-5.91E+06	-5.17
1	10 ng/ml AA	없음	없음	6132	100.00	1.52E+06	1.33
1	100 ng/ml AA	없음	없음	9658	157.51	1.14E+08	100.00
1	10 ng/ml AA	화합물 22	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+무스치물+GDF8+Wnt3a	8556	139.53	8.78E+07	76.82
1	10 ng/ml AA	화합물 22	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	7657	124.87	4.70E+07	41.09
1	10 ng/ml AA	화합물 22	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치물+Wnt3a	8100	132.10	4.42E+07	38.65
1	10 ng/ml AA	화합물 22	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	7975	130.06	3.43E+07	30.03
1	10 ng/ml AA	화합물 22	EGF+FGF4+Wnt3a	9800	159.83	4.59E+07	40.13
1	10 ng/ml AA	화합물 22	FGF4+Wnt3a	6490	105.84	4.28E+07	37.43
1	10 ng/ml AA	화합물 22	EGF+Wnt3a	5001	81.55	2.80E+07	24.45
1	10 ng/ml AA	화합물 22	Wnt3a	4543	74.09	3.05E+07	26.65
1	10 ng/ml AA	화합물 35	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+무스치물+GDF8+Wnt3a	2522	41.14	-4.86E+06	-4.25
1	10 ng/ml AA	화합물 35	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	3479	56.74	-3.96E+06	-3.46
1	10 ng/ml AA	화합물 35	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치물+Wnt3a	3820	62.29	-1.67E+06	-1.46
1	10 ng/ml AA	화합물 35	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	3263	53.21	-4.56E+06	-3.99
1	10 ng/ml AA	화합물 35	EGF+FGF4+Wnt3a	2704	44.10	-4.17E+06	-3.65
1	10 ng/ml AA	화합물 35	FGF4+Wnt3a	284	4.64	-7.54E+06	-6.59
1	10 ng/ml AA	화합물 35	EGF+Wnt3a	155	2.53	-7.82E+06	-6.84
1	10 ng/ml AA	화합물 35	Wnt3a	173	2.83	-7.61E+06	-6.66

[0663]

1	10 ng/ml AA	화합물 29	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+무스치콜+GDF8+Wnt3a	2737	44.63	2.41E+07	21.10
1	10 ng/ml AA	화합물 29	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	2283	37.23	5.59E+06	4.88
1	10 ng/ml AA	화합물 29	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치콜+Wnt3a	4676	76.26	2.41E+07	21.11
1	10 ng/ml AA	화합물 29	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	3964	64.65	2.27E+07	19.89
1	10 ng/ml AA	화합물 29	EGF+FGF4+Wnt3a	1736	28.31	1.98E+06	1.73
1	10 ng/ml AA	화합물 29	FGF4+Wnt3a	2139	34.89	6.98E+06	6.10
1	10 ng/ml AA	화합물 29	EGF+Wnt3a	365	5.96	-4.86E+06	-4.25
1	10 ng/ml AA	화합물 29	Wnt3a	2090	34.09	4.89E+06	4.28
2	없음	없음	없음	9325	121.89	-3.35E+06	-3.01
2	10 ng/ml AA	없음	없음	5177	67.67	3.89E+06	3.49
2	100 ng/ml AA	없음	없음	7650	100.00	1.11E+08	100.00
2	10 ng/ml AA	화합물 34	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+무스치콜+GDF8+Wnt3a	18362	240.02	3.45E+08	309.74
2	10 ng/ml AA	화합물 34	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	15574	203.58	2.59E+08	232.70
2	10 ng/ml AA	화합물 34	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치콜+Wnt3a	17890	233.85	2.88E+08	258.30
2	10 ng/ml AA	화합물 34	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	17875	233.65	2.68E+08	241.07
2	10 ng/ml AA	화합물 34	EGF+FGF4+Wnt3a	14158	185.07	2.40E+08	215.35
2	10 ng/ml AA	화합물 34	FGF4+Wnt3a	13323	174.15	2.19E+08	196.86
2	10 ng/ml AA	화합물 34	EGF+Wnt3a	14527	189.89	2.28E+08	204.84
2	10 ng/ml AA	화합물 34	Wnt3a	3589	46.91	7.02E+07	63.08
2	10 ng/ml AA	화합물 39	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+무스치콜+GDF8+Wnt3a	5738	75.00	2.14E+07	19.24
2	10 ng/ml AA	화합물 39	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	2531	33.08	2.82E+06	2.53
2	10 ng/ml AA	화합물 39	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치콜+Wnt3a	2879	37.64	3.61E+06	3.24
2	10 ng/ml AA	화합물 39	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	2989	39.07	-1.78E+04	-0.02
2	10 ng/ml AA	화합물 39	EGF+FGF4+Wnt3a	734	9.59	-3.93E+06	-3.53
2	10 ng/ml AA	화합물 39	FGF4+Wnt3a	521	6.81	-4.46E+06	-4.01
2	10 ng/ml AA	화합물 39	EGF+Wnt3a	211	2.75	-4.54E+06	-4.08

[0664]

2	10 ng/ml AA	화합물 39	Wnt3a	518	6.78	-2.37E+06	-2.13
2	10 ng/ml AA	화합물 37	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF+PDGF-D+무스치콜+GDF8+Wnt3a	5711	74.65	1.21E+07	10.82
2	10 ng/ml AA	화합물 37	EGF+FGF4+PDGF-AB+VEGF+Wnt3a	4767	62.31	-5.16E+05	-0.46
2	10 ng/ml AA	화합물 37	EGF+FGF4+PDGF-A+무스치콜+Wnt3a	4540	59.34	9.23E+05	0.83
2	10 ng/ml AA	화합물 37	EGF+FGF4+PDGF-AB+Wnt3a	4223	55.20	-6.15E+05	-0.55
2	10 ng/ml AA	화합물 37	EGF+FGF4+Wnt3a	3501	45.77	5.60E+05	0.50
2	10 ng/ml AA	화합물 37	FGF4+Wnt3a	3930	51.37	-1.88E+06	-1.69
2	10 ng/ml AA	화합물 37	EGF+Wnt3a	1431	18.70	-2.75E+06	-2.47
2	10 ng/ml AA	화합물 37	Wnt3a	791	10.34	-2.99E+06	-2.68

[0665]

[0666] [표 10]

화합물 #	처리			세포수		Sox17 발현	
				평균 총 세포수	양성 대조군 %	평균 총 강도	양성 대조군 %
없음	무-액티빈 A (유-Wnt3a)			4273	33.70	4.75E+07	17.49
없음	액티빈 A (with Wnt3a)			12676	100.00	2.72E+08	100.00
화합물 34	No AA (without Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(50ng/ml)	13317	105.06	2.01E+08	74.08
화합물 34	No AA (without Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(100ng/ml)	14189	111.93	2.01E+08	73.90
화합물 34	No AA (without Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(50ng/ml)	12616	99.52	1.80E+08	66.21
화합물 34	No AA (without Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(100ng/ml)	8269	65.23	1.13E+08	41.73
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	없음	없음	11711	92.38	1.65E+08	60.68
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	없음	EGF(25ng/ml)	16052	126.63	2.14E+08	78.82
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	없음	EGF(50ng/ml)	13593	107.23	1.94E+08	71.52
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	없음	EGF(100ng/ml)	13170	103.90	1.93E+08	71.04
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(25ng/ml)	없음	18433	145.41	2.49E+08	91.72
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(25ng/ml)	EGF(25ng/ml)	18841	148.63	2.60E+08	95.72
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(25ng/ml)	EGF(50ng/ml)	16232	128.05	2.30E+08	84.79
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(25ng/ml)	EGF(100ng/ml)	9309	73.44	1.39E+08	51.00
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	없음	12757	100.64	1.66E+08	61.10
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(25ng/ml)	17720	139.79	2.31E+08	85.01
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(50ng/ml)	16331	128.83	2.26E+08	83.11
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(100ng/ml)	16336	128.87	2.32E+08	85.24
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	없음	19853	156.61	2.59E+08	95.45
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(25ng/ml)	19880	156.83	2.59E+08	95.47
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(50ng/ml)	18166	143.30	2.35E+08	86.30
화합물 34	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(100ng/ml)	11241	88.68	1.55E+08	57.10
없음	무-AA (유-Wnt3a)	없음	EGF(50ng/ml)	5558	43.85	5.01E+07	18.44
없음	무-AA (유-Wnt3a)	없음	EGF(100ng/ml)	6818	53.79	6.42E+07	23.62
없음	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	없음	8494	67.01	6.62E+07	24.35
없음	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(50ng/ml)	10138	79.98	7.30E+07	26.87
없음	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(50ng/ml)	EGF(100ng/ml)	10219	80.62	7.75E+07	28.51
없음	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	없음	9944	78.45	6.68E+07	24.59
없음	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(50ng/ml)	11046	87.14	8.17E+07	30.07
없음	무-AA (유-Wnt3a)	FGF(100ng/ml)	EGF(100ng/ml)	7695	60.71	6.87E+07	25.28

[0667]

[0668] [표 11]

정상화된 SOX17 강도		GDF8			
액티빈 A					
ng/mL	평균	SD	평균	SD	
1600	100.00	9.20	100.00	9.00	
800	100.00	6.60	84.90	6.30	
400	100.00	3.30	72.20	7.50	
200	100.00	1.90	51.30	5.30	
100	90.70	8.70	32.70	5.10	
50	85.20	4.70	17.60	4.80	
25	73.10	2.80	5.10	3.60	
12.50	50.90	6.20	0.90	0.80	
6.25	18.40	4.80	0.70	1.40	
3.13	3.00	1.90	0.10	0.20	
1.56	0.10	0.00	0.00	0.20	
0.00	0.00	0.20	0.30	0.30	

[0669]

[0670] [표 12]

마커명	카탈로그 # *
AFP	Hs00173490_m1
CD99	Hs00365982_m1
CD9	Hs00233521_m1
CDH1	Hs00170423_m1
CDH2	Hs00169953_m1
CDX2	Hs00230919_m1
CER1	Hs00193796_m1
CXCR4	Hs00237052_m1
FGF17	Hs00182599_m1
FGF4	Hs00173564_m1
FOXA2	Hs00232764_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
GATA4	Hs00171403_m1
GATA6	Hs00232018_m1
GSC	Hs00418279_m1
HLXB9	Hs00232128_m1
KIT	Hs00174029_m1
MIXL1	Hs00430824_g1
NANOG	Hs02387400_g1
OTX2	Hs00222238_m1
POU5F1	Hs00742896_s1

[0671]

SOX17	Hs00751752_s1
SOX7	Hs00846731_s1
T	Hs00610080_m1
ALB	Hs00609411_m1
AMY2A	Hs00420710_g1
ARX	Hs00292465_m1
CDX2	Hs00230919_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
GCG	Hs00174967_m1
HNF4A	Hs00230853_m1
INS	Hs00355773_m1
ISL1	Hs00158126_m1
MAFA	Hs01651425_s1
MAFB	Hs00534343_s1
NEUROD1	Hs00159598_m1
NEUROG3	Hs00360700_g1
NKX2-2	Hs00159616_m1
NKX2-5	Hs00231763_m1
NKX6-1	Hs00232355_m1
PAX4	Hs00173014_m1
PAX6	Hs00240871_m1
PDX1	Hs00236830_m1
PECAM1	Hs00169777_m1
POU3F4	Hs00264887_s1
PTF1A	Hs00603586_g1
SST	Hs00356144_m1
ZIC1	Hs00602749_m1

[0672]

[0673] [표 13]

분화 단계 1		CT 값																									
처리	GAFFM	AIF	CG	CGD	CHH	CHG	CH2	CH3	CH3K4	H3K27	H3K9	H3K9me3	H3K4Me3	H3K27Ac	H3K27me3	H3K9me3	H3K36me3	H3K36me1	H3K36me2	H3K36me3	H3K36me4	H3K36me5	H3K36me6	H3K36me7	H3K36me8		
AA/MSM	115	347	233	241	243	213	366	164	227	20	325	247	237	221	223	25	234	28	238	226	314	235	322	323			
GEN/MSM	117	361	23	225	233	21	362	178	219	199	331	233	237	219	221	239	221	266	23	219	296	234	319	322			
GEN 화합물34	115	33	23	221	236	209	352	178	213	187	326	24	232	217	218	24	23	255	232	215	301	232	317	321			
GEN 화합물36	11	312	203	209	212	184	352	155	194	172	287	211	206	196	20	215	215	25	211	192	279	218	311	303			
분화 단계 3		CT 값																									
처리	GAFFM	AIB	AMT2A	ARX	CTD2	CGG	H3K4	DN	H3K1	M4FA	M4FB	NEUROD1	NEUROD2	NEUROD3	NEUROD4	NEUROD5	NEUROD6	PA2A	PA2B	POU1	POU2AM1	POU2F4	PPIA	SST	ZK1		
AA/MSM	117	221	302	303	224	341	211	349	279	351	363	306	28	242	321	385	306	36	256	262	245	364	363	327			
GEN/MSM	114	221	297	309	225	345	211	347	274	346	369	305	28	29	314	36	311	333	254	304	301	365	279	324			
GEN 화합물34	114	223	287	347	225	366	211	361	275	342	363	333	31	322	338	378	322	365	263	301	311	364	276	322			
GEN 화합물36	112	225	287	316	225	363	212	387	273	344	37	306	279	29	338	362	303	327	25	289	304	348	275	327			
분화 단계 4		CT 값																									
처리	GAFFM	AIB	AMT2A	ARX	CTD2	CGG	H3K4	DN	H3K1	M4FA	M4FB	NEUROD1	NEUROD2	NEUROD3	NEUROD4	NEUROD5	NEUROD6	PA2A	PA2B	POU1	POU2AM1	POU2F4	PPIA	SST	ZK1		
AA/MSM	113	263	271	223	217	195	206	205	223	31	223	27	279	246	315	315	275	264	241	269	276	40	252	314			
GEN/MSM	119	293	297	241	222	199	212	207	227	312	242	233	278	23	334	315	277	263	243	282	282	382	248	314			
GEN 화합물34	119	268	271	25	223	215	21	222	244	313	246	246	287	256	316	296	279	264	239	275	241	321	247	265			
GEN 화합물36	113	288	271	223	226	176	212	166	224	289	229	227	255	232	32	279	253	253	232	279	275	309	228	321			
분화 단계 5		CT 값																									
처리	GAFFM	AIB	AMT2A	ARX	CTD2	CGG	H3K4	DN	H3K1	M4FA	M4FB	NEUROD1	NEUROD2	NEUROD3	NEUROD4	NEUROD5	NEUROD6	PA2A	PA2B	POU1	POU2AM1	POU2F4	PPIA	SST	ZK1		
AA/MSM	113	265	278	24	223	182	214	165	224	313	237	241	225	254	287	32	28	251	242	269	29	375	225	289			
GEN/MSM	113	297	285	242	221	182	22	167	224	311	224	246	222	256	299	305	261	254	246	289	289	334	221	321			
GEN 화합물34	119	246	28	241	227	176	224	163	227	313	24	244	224	256	313	32	264	256	246	287	287	345	216	35			
GEN 화합물36	21	211	28	251	248	183	232	171	246	321	249	243	236	262	34	302	267	273	269	287	315	247	221	323			
분화 단계 6		CT 값																									
처리	GAFFM	AIB	AMT2A	ARX	CTD2	CGG	H3K4	DN	H3K1	M4FA	M4FB	NEUROD1	NEUROD2	NEUROD3	NEUROD4	NEUROD5	NEUROD6	PA2A	PA2B	POU1	POU2AM1	POU2F4	PPIA	SST	ZK1		
AA/MSM	214	243	307	276	257	194	247	215	264	346	272	271	40	226	307	324	309	266	282	312	326	364	222	343			
GEN/MSM	217	225	304	263	252	184	242	193	262	352	263	263	35	21	323	305	307	273	283	283	322	315	339	224	274		
GEN 화합물34	213	246	313	271	26	184	247	201	263	348	264	27	345	292	316	331	304	261	29	329	338	327	221	345			
GEN 화합물36	212	25	309	26	259	174	244	196	257	347	259	261	342	241	338	307	293	272	279	336	332	332	21	349			

[0674]

[0675]

[표 14]

분화 단계 1

CT 값

처리	GAPDH	AFP	CD9	CD99	CDH1	CDH	CDX2	CER1	CXCR4	FGF17	FGF4	FOXA2	GATA4	GATA6	GSC	HDX8	KIT	MIXL1	NANOG	OTX2	POU5F1	SOX17	SOX7	T
AAWnt3a	20	35.6	24.1	24.2	26	20.9	40	17.5	22.7	19.9	35.8	24.7	23.8	22.1	21.6	23.4	23.2	28.1	24.5	22	32.6	23.2	39	36.8
GDF8Wnt3a	20.1	34	23.8	24.5	24.6	21.6	40	19.5	23.3	21	34.8	26.1	24.5	23.3	23.3	17.6	25.5	28.3	24.9	23	31	23.7	33.9	34.2
GDF8GSK3 inhibitor BIO	19	34.4	23.7	24.1	24.3	21.3	36	18.7	23	20.1	33.5	24.2	24.2	22.4	21.8	23.4	24.2	28.4	23.7	21.8	30.8	23	33.7	33.1
GDF8 하향증 19	18.8	34.8	23.8	24	24.6	20.7	37.7	18.8	22.3	20	34.4	24.2	23.6	22.5	21.9	23.1	24.3	28	24.3	21.8	31.3	22.3	33	32.9
GDF8 하향증 Z02	19.8	40	24.5	23.5	25.8	20.8	40	18.8	22.2	20.3	36.5	24.4	23.4	22.3	22.3	24	24.8	27.3	26	21.9	33.3	22.7	32.6	32.1
GDF8 하향증 40	19.8	36.1	24.3	22.9	26.2	21.9	33.3	18.8	22.5	20.3	38.1	25.3	23.4	23	23	26	25.7	27.8	26	22.3	32.8	23.2	27.2	29.3

분화 단계 3

CT 값

처리	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEURO D1	NEURO G3	NKX2-2	NKX2-5	NKX6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AAWnt3a	17.9	25.4	29.5	28.4	23.3	34.1	21.5	29.2	29.4	34	27	25.8	25.2	27.3	34.1	28.3	27.8	35.2	22.7	28.3	28.6	30.5	32.2	37.4
GDF8Wnt3a	18.5	26.5	30.4	28.4	23.9	34.2	22.5	29	29	34.4	27.1	27.2	26.4	27.9	37.8	29	29.2	31.4	23.3	32.2	30.1	30.7	31	30.1
GDF8GSK3 inhibitor BIO	18.5	25.2	30.3	28.4	23.6	32.8	22.5	28.8	29.3	34.7	27.6	26.8	26.2	27.5	35	28.8	28.7	32.9	23.2	32.2	29.5	30.5	31.3	31.1
GDF8 하향증 19	18.4	26.1	30.2	28.1	24	33.1	22.5	28.5	30	34.4	27.3	26.6	25.9	27.5	37.6	27.8	28.3	33.8	22.9	31.7	29.7	30	32.4	33.4
GDF8 하향증 Z02	18.7	26.7	31.1	28.6	24	34.9	22.7	30.3	31.6	34.2	27.8	27.2	27	28	40	30	29	36.2	23.7	30.9	30.2	32.4	32.4	34.6
GDF8 하향증 40	18.6	25.8	30.5	28.6	23.8	37.6	22.5	30	31.1	34.5	27.9	27.2	26.2	27.8	37.2	29.5	29	37.1	23.2	31.5	30.2	31.5	32.4	36.5

분화 단계 4

CT 값

처리	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEURO D1	NEURO G3	NKX2-2	NKX2-5	NKX6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AAWnt3a	18.9	21.3	28.8	24.6	23.4	21.7	21.9	21.6	25.2	32.4	24.9	23.7	23.8	24.2	33.9	26.6	26.6	27	23	29.2	27	28.1	25.3	32.6
GDF8Wnt3a	18.3	21.3	28.5	25.3	23.1	22.6	21.5	21.9	26.7	33.1	24.9	24.3	24.2	24.7	35.4	25.8	26.2	27.3	23.2	31.2	27	28.7	24.7	24.6
GDF8GSK3 inhibitor BIO	19	21.1	28.7	25.3	23.3	22.3	21.5	22	25.7	32.5	25.4	24	24	24.7	35.4	26.1	26	27.7	23.2	30.7	27.4	26.5	25.6	31.5
GDF8 하향증 19	18.9	21.7	28.9	25.2	23.5	22.4	22.2	22	25.6	34	25.4	24.1	23.9	24.6	35.9	25.7	25.7	27.8	23.1	31.4	27.1	26.5	25.5	31.4
GDF8 하향증 Z02	19	20.9	28.2	25.1	23.6	22.4	22.1	22	25.5	33.3	25.5	23.9	24.1	24.5	35.7	26	25.8	27.6	23.4	30.2	27.5	26.8	26.1	35.7
GDF8 하향증 40	19.2	21.1	29.4	25.5	23.7	22.8	22.3	22.3	26	33.5	25.8	24.2	24.2	24.6	37.3	25.9	25.9	28.4	23.1	30.4	27.6	26.4	26.3	34.4

분화 단계 5

CT 값

처리	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEURO D1	NEURO G3	NKX2-2	NKX2-5	NKX6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AAWnt3a	19.1	19.5	28.6	23.1	23.9	16.2	21.9	16.9	23.4	33.7	23.3	21.7	27.4	24	33.1	25	26.4	24.7	22.6	27.1	28.4	27.5	22	34.1
GDF8Wnt3a	18.4	19.8	28.4	23.8	23.8	17.2	22.3	17.4	24	32.6	23.9	22.6	28.6	24.2	33.1	25.8	27.2	25.6	23.8	29.2	28.9	28.1	22.7	26.8
GDF8GSK3 inhibitor BIO	19.1	19.2	29.1	24	24.2	17.2	22.4	17.6	24	33.5	23.8	22.9	28.4	24.4	40	25.1	27.3	25.6	23.8	29.2	28.1	26.7	23	26.3
GDF8 하향증 19	19	20	28.8	23.4	24.2	17	22.6	17.1	23.8	33.2	23.9	22.9	28.6	24.1	34.6	25	26.8	25.6	23.4	28.8	28.2	26.2	22.9	28.8
GDF8 하향증 Z02	19.2	20	29	23	23.9	16.7	22.2	16.8	23.2	32.7	23.8	22.3	28.2	23.2	40	26	27.2	25.3	23.4	29.9	28.1	26.4	22.6	33.8
GDF8 하향증 40	19.6	19.5	29	23.7	24.2	16.9	22.2	17.1	23.9	33.2	23.9	22.5	28.1	23.5	34.8	25	27.3	26.4	23.4	29.9	29.2	27.5	22.3	34.8

[0676]

[0677] [표 15]

단계 1		RT-PCR CT 값																								
처리	GADH1	ATP	CD9	CD99	CDH1	CDH1	CDX2	CER1	CXCR4	FGF17	FGF4	FOXA2	GAT4A	GAT46	GSC	ILX109	KIT	MED1	NANOG	OTX2	POU5F1	SOX17	SOX7	T		
AA	18.4	32.8	25.2	24.0	26.1	21.8	36.0	18.3	20.4	20.7	34.0	25.1	25.0	22.9	22.4	24.8	22.7	28.9	24.1	22.5	32.2	21.6	32.3	35.1		
AA+Wnt3	18.2	40.0	23.5	22.0	24.1	20.9	40.0	17.1	22.0	18.7	33.4	22.9	23.1	21.8	22.8	23.3	22.9	27.7	22.7	19.9	31.0	21.2	31.2	34.1		
AA+피할론R1	20.1	40.0	24.5	23.3	26.0	20.7	33.9	18.2	22.0	20.1	33.1	25.6	24.7	22.9	20.8	25.5	19.7	27.8	24.8	22.3	32.8	22.2	33.0	33.8		
AA+피할론R8	18.4	34.2	23.6	21.6	23.9	21.4	35.2	17.2	22.0	18.9	34.0	24.0	23.1	22.6	22.5	24.8	22.6	27.9	23.7	20.3	32.1	21.4	32.0	32.7		
AA+피할론R9	20.1	35.4	24.4	24.9	26.3	20.8	40.0	17.9	17.7	20.5	32.8	25.6	25.1	22.7	21.3	26.0	22.6	29.3	24.1	22.9	32.1	22.3	33.0	29.6		
AA+피할론202	20.3	40.0	25.1	23.7	23.9	21.4	40.0	18.3	22.0	20.4	36.0	25.7	24.5	23.0	21.8	23.2	23.9	27.7	24.5	22.3	32.7	22.6	32.1	33.5		
AA+피할론40	18.9	40.0	24.6	23.6	23.8	21.4	40.0	17.7	22.7	20.2	33.1	23.5	24.6	22.5	20.9	23.5	22.9	28.0	23.8	22.0	33.6	22.3	32.5	32.8		
AA-GSK3inhBDO	20.2	33.0	25.4	23.7	27.2	21.9	33.5	18.5	22.2	20.9	36.0	23.8	23.0	23.2	22.2	23.2	23.7	28.5	24.9	22.8	34.3	23.4	32.7	33.5		
AA+피할론206	18.8	40.0	24.9	23.7	23.5	21.1	40.0	18.3	19.6	20.7	36.2	24.4	24.8	22.7	22.6	24.1	23.7	27.6	23.9	22.9	33.2	23.3	32.4	34.6		
GDF3	21.6	40.0	23.5	23.9	23.2	22.3	40.0	20.1	24.6	22.1	34.9	23.9	27.5	24.8	24.2	23.3	23.4	30.6	23.0	24.3	29.5	23.2	29.8	32.9		
GDF3+Wnt3	21.2	40.0	23.0	23.8	23.1	22.6	40.0	19.7	23.6	22.0	34.8	23.7	27.3	24.4	23.8	23.0	23.1	30.5	24.8	24.4	31.1	23.0	34.5	32.6		
GDF3+피할론R1	20.7	40.0	23.1	23.6	23.5	22.4	40.0	20.0	23.0	21.5	36.3	23.2	23.4	23.9	23.6	24.3	26.3	28.1	23.4	23.3	31.8	23.7	32.8	31.9		
GDF3+피할론R8	20.9	40.0	23.6	24.0	26.9	22.1	34.7	19.9	22.7	21.1	36.6	23.0	23.2	23.9	23.6	24.2	23.8	28.3	26.3	23.0	33.2	24.2	32.8	32.3		
GDF3+피할론R9	18.6	40.0	23.9	23.7	24.6	20.7	40.0	18.0	21.8	20.4	33.2	24.2	23.0	22.8	22.1	24.0	22.6	28.5	23.1	22.7	30.3	22.6	32.1	29.3		
GDF3+피할론202	18.5	30.6	22.1	20.2	22.8	18.7	33.8	18.5	22.4	19.9	34.3	23.6	22.7	22.5	23.5	23.1	23.9	27.7	23.1	21.5	30.0	22.3	32.0	32.5		
GDF3+피할론40	18.7	40.0	23.0	22.6	24.7	20.5	33.8	18.2	22.4	20.5	33.4	24.9	24.2	22.6	23.4	23.4	23.4	28.5	24.0	22.2	31.6	23.7	31.2	32.7		
GDF3-GSK3inhBDO	18.6	30.1	23.1	21.8	24.3	22.0	33.4	17.7	23.3	20.1	34.8	24.7	24.5	22.4	22.7	24.1	23.0	29.3	24.8	21.8	31.7	23.3	33.7	34.6		
GDF3+피할론206	18.7	40.0	22.7	22.5	23.2	21.0	28.9	18.4	23.0	20.3	34.5	23.3	24.9	22.9	23.6	23.8	23.7	29.7	24.7	22.2	30.7	24.4	32.8	33.8		
단계 3		RT-PCR CT 값																								
처리	GADH1	A120	AMF2A	ARX	CDX2	GCG	ITIH4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NES22	NKX2-5	NKX6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PRDM4	POU4F4	P771A	SST	ZC11		
AA	18.5	26.9	30.6	32.0	22.9	34.1	22.4	34.8	29.3	36.4	27.4	30.1	28.0	29.3	34.6	32.2	31.4	40.0	23.3	31.0	30.5	34.6	33.2	34.8		
AA+Wnt3	18.4	27.3	30.2	33.0	23.0	34.7	22.4	40.0	28.8	33.9	27.7	30.4	28.1	29.0	40.0	34.9	31.9	38.1	23.8	30.9	30.7	40.0	32.8	40.0		
AA+피할론R1	18.6	26.0	30.1	34.2	22.3	40.0	22.3	40.0	30.4	34.6	28.5	31.4	29.0	30.3	33.9	33.8	33.3	40.0	23.0	30.0	30.8	36.0	34.6	34.8		
AA+피할론R8	18.8	25.5	30.0	33.3	22.5	35.1	22.3	40.0	29.4	34.3	28.6	32.6	30.3	31.1	32.5	33.3	33.3	36.2	26.3	28.9	31.3	40.0	34.7	34.4		
AA+피할론R9	34.1	40.0	40.0	40.0	40.0	37.4	40.0	40.0	40.0	34.9	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0		
AA+피할론202	18.5	26.2	30.7	33.0	22.5	34.8	22.6	35.1	29.8	33.1	28.2	30.0	28.5	29.5	33.6	33.9	32.0	36.6	24.1	29.7	31.9	40.0	34.2	40.0		
AA+피할론40	18.5	23.8	30.1	34.9	22.2	40.0	22.3	40.0	29.7	34.1	28.1	30.8	29.1	30.3	33.6	34.4	32.9	40.0	24.8	30.3	31.3	33.6	33.3	33.4		
AA-GSK3inhBDO	18.5	24.9	30.1	34.6	22.0	40.0	21.5	40.0	30.2	34.9	27.8	34.0	31.0	31.8	32.6	40.0	34.9	40.0	26.1	31.0	32.4	40.0	33.2	34.8		
AA+피할론206	18.3	27.0	30.3	33.7	22.7	35.7	22.3	40.0	28.4	34.4	27.8	30.7	28.6	29.8	32.8	33.0	31.5	30.4	23.9	29.7	31.2	33.0	31.8	40.0		
GDF3	18.0	28.7	30.4	33.3	23.8	40.0	23.6	40.0	28.5	33.6	27.2	30.3	28.7	30.3	34.4	33.0	32.4	24.8	23.5	30.0	30.8	34.2	29.5	26.1		
GDF3+Wnt3	17.4	27.0	28.5	33.8	23.1	35.1	22.4	40.0	26.3	30.5	28.1	30.1	27.5	29.1	40.0	32.9	31.5	23.8	23.1	32.2	29.8	34.0	27.7	28.2		
GDF3+피할론R1	18.8	27.8	30.2	31.3	23.4	40.0	22.7	34.5	28.8	33.5	27.3	28.9	27.0	28.9	33.4	32.5	30.5	33.4	23.5	29.4	30.5	33.9	32.4	34.5		
GDF3+피할론R8	18.8	27.3	30.6	32.4	22.8	34.9	22.7	40.0	29.5	33.9	27.7	30.0	27.5	29.0	33.4	32.6	31.2	40.0	23.7	31.6	30.8	34.6	34.4	40.0		
GDF3+피할론R9	18.3	24.9	28.7	33.4	22.0	40.0	22.2	40.0	29.7	34.5	28.4	33.3	31.5	32.2	34.4	33.2	34.4	33.0	23.0	29.4	31.6	40.0	34.1	33.5		
GDF3+피할론202	18.7	27.8	30.4	32.8	23.8	40.0	22.9	34.6	28.5	34.2	27.6	29.6	27.1	28.4	33.7	30.5	30.4	31.8	23.0	30.1	30.2	31.6	30.9	34.0		
GDF3+피할론40	18.4	27.7	30.1	32.5	23.0	35.1	22.4	40.0	29.1	34.3	27.5	30.0	27.3	28.8	33.3	32.9	31.5	40.0	23.2	29.2	30.5	36.3	33.7	40.0		
GDF3-GSK3inhBDO	18.4	24.9	30.3	31.3	22.2	34.7	21.7	34.5	29.9	33.3	27.6	28.2	26.8	27.9	34.6	33.9	30.6	33.1	24.0	30.4	30.0	34.8	33.6	40.0		
GDF3+피할론206	18.2	27.6	30.2	33.5	23.8	40.0	22.9	40.0	27.9	33.1	27.1	29.9	27.7	29.3	40.0	32.3	31.3	27.4	23.3	32.7	30.8	33.0	29.2	30.3		

[0678]

단계 4		RT-PCR CT 값																						
처리	GAPDH	ALB	AMP2A	ARX	CDK2	CCG	ENF4A	INS	ISL1	MATA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NCX2-2	NCX2-5	NEK3-1	PAN4	PAK6	POU1	PRAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZK1
AA	19.0	22.4	28.6	23.9	25.7	22.8	22.1	23.6	24.1	30.6	23.5	23.7	23.3	24.0	31.3	27.4	25.7	27.1	23.7	29.8	26.5	29.6	24.3	32.5
AA+Wnt3a	19.5	23.5	29.3	24.6	26.1	25.1	22.7	25.2	25.1	31.1	24.4	24.4	24.1	24.5	31.8	27.5	26.1	27.9	24.1	30.4	27.2	31.1	25.9	32.4
AA+ 화합물181	18.0	21.0	27.7	24.0	22.1	24.5	21.0	24.6	24.5	31.6	24.0	24.2	24.6	24.6	30.9	28.1	26.3	28.0	24.0	27.9	27.5	31.0	25.5	31.2
AA+ 화합물180	19.4	21.0	27.3	25.3	21.6	25.4	20.6	26.7	26.1	34.7	24.6	25.5	25.8	25.0	29.4	28.9	27.7	28.9	24.0	26.7	28.5	32.6	27.1	31.2
AA+ 화합물19	19.2	20.7	29.1	24.0	23.3	21.8	21.9	22.7	24.4	31.1	23.9	24.0	24.1	24.4	32.1	27.4	26.3	26.9	24.3	29.6	27.7	29.5	24.0	33.1
AA+ 화합물40	19.2	20.8	29.4	24.7	22.9	22.2	21.8	23.5	25.3	31.5	24.7	24.7	25.3	25.0	32.2	28.7	27.1	28.2	25.1	30.3	28.5	31.2	25.6	32.7
AA+GSK3 inhibitor	19.0	19.1	29.2	25.7	22.7	25.2	21.1	26.3	26.5	33.0	25.4	26.3	27.7	26.2	31.5	32.9	29.4	30.0	26.5	29.6	31.5	33.7	27.2	32.4
AA+ 화합물206	18.8	20.9	28.4	23.3	22.9	21.2	21.7	22.8	24.0	30.4	23.5	23.5	23.3	23.8	31.9	27.2	25.5	26.3	23.6	29.7	26.6	29.3	25.6	32.9
CDK8	18.0	25.5	29.1	29.8	24.5	31.3	23.8	30.9	27.6	32.8	24.1	29.2	28.7	29.0	32.3	31.2	31.1	27.9	26.5	29.4	29.4	40.0	26.0	22.8
CDK8+Wnt3a	19.0	24.3	29.0	25.4	24.4	27.7	23.0	25.5	25.4	32.7	25.1	25.4	24.0	25.0	33.3	28.0	26.7	28.8	23.8	33.4	27.7	30.5	24.1	29.0
CDK8+ 화합물181	18.0	22.8	28.1	23.5	23.1	24.6	21.4	22.7	23.8	30.6	23.0	22.9	21.8	23.2	32.1	25.7	24.2	27.0	22.3	27.6	25.4	26.6	24.2	31.6
CDK8+ 화합물180	19.5	24.0	29.3	24.4	23.9	25.7	22.5	24.5	24.7	31.4	24.4	24.3	23.7	24.4	33.5	27.7	26.0	28.3	23.8	30.5	26.9	30.7	26.3	33.4
CDK8+ 화합물19	19.1	22.6	28.5	25.5	22.9	26.7	22.1	27.2	25.8	32.6	25.5	26.2	26.4	25.6	34.0	30.2	28.2	30.0	25.1	30.2	28.2	32.6	27.9	31.1
CDK8+ 화합물202	19.0	22.0	28.9	23.7	24.5	21.8	22.5	21.7	24.3	30.3	23.5	22.9	22.2	23.4	33.4	25.9	24.8	26.5	23.0	29.5	26.1	27.9	22.4	34.1
CDK8+ 화합물40	19.0	21.4	29.0	23.4	23.6	21.0	22.0	21.5	23.8	30.2	23.3	23.2	22.7	23.7	33.2	26.6	24.8	26.1	23.4	29.3	26.4	28.4	22.7	32.6
CDK8+GSK3 inhibitor	19.1	19.4	29.1	24.3	23.0	21.5	21.4	21.8	24.6	31.0	24.0	23.8	23.8	24.2	33.1	27.9	26.1	27.0	24.2	30.0	27.8	29.5	23.4	32.7
CDK8+ 화합물206	18.9	21.6	28.9	24.4	24.0	22.6	22.3	22.7	24.9	30.9	24.2	23.7	23.0	24.0	33.3	26.3	25.5	27.2	23.5	31.4	26.9	27.7	24.0	28.9

단계 5		RT-PCR CT 값																						
처리	GAPDH	ALB	AMP2A	ARX	CDK2	CCG	ENF4A	INS	ISL1	MATA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NCX2-2	NCX2-5	NEK3-1	PAN4	PAK6	POU1	PRAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZK1
AA	18.3	20.2	27.6	22.0	23.4	14.1	21.3	14.9	22.4	31.8	22.7	22.8	28.1	23.7	34.1	25.5	27.3	24.0	23.2	30.1	28.8	27.3	19.6	34.4
AA+Wnt3a	18.0	20.0	27.7	21.9	23.1	14.0	20.9	14.6	22.3	31.6	22.0	21.6	28.0	23.4	34.8	26.1	27.3	23.7	23.3	29.6	28.8	27.5	19.4	32.5
AA+ 화합물181	18.0	18.8	27.6	22.0	22.9	14.3	20.9	14.5	22.1	31.4	22.2	21.5	28.9	23.3	32.2	26.1	26.8	24.0	23.1	27.5	28.8	26.0	18.8	31.2
AA+ 화합물180	18.0	18.8	27.6	22.4	22.9	14.9	21.0	14.7	22.4	31.9	22.6	21.7	29.5	23.8	30.2	26.5	27.2	24.3	23.2	26.7	29.0	26.7	18.7	30.3
AA+ 화합물19	17.9	23.6	28.6	28.2	25.4	27.0	24.2	26.9	22.2	32.0	24.4	27.2	31.2	28.0	30.1	25.8	35.1	26.6	29.4	31.5	28.2	32.4	23.1	24.0
AA+ 화합물202	18.6	19.2	28.0	22.6	23.4	14.9	21.3	15.0	22.7	31.8	22.6	21.9	28.6	23.7	29.9	25.8	26.9	24.7	23.6	27.7	29.2	27.9	19.4	32.8
AA+ 화합물40	18.3	18.9	27.9	22.3	23.0	14.6	21.1	14.7	22.5	31.5	22.4	21.6	29.0	23.5	32.9	26.1	27.1	24.4	23.2	28.1	29.2	28.1	19.1	31.9
AA+GSK3 inhibitor	18.3	17.1	28.0	23.0	22.6	15.1	20.5	15.1	22.8	31.8	22.8	22.1	29.5	24.2	33.8	27.5	27.4	24.9	23.8	28.3	29.9	29.7	19.5	32.0
AA+ 화합물206	18.2	19.5	27.9	22.2	23.4	14.4	21.3	14.8	22.5	31.1	22.4	21.7	28.0	23.6	35.8	25.9	27.1	24.1	23.3	29.0	28.7	27.5	19.7	32.7
CDK8	17.4	20.5	28.2	23.4	18.1	22.9	17.7	17.7	24.3	31.8	23.3	24.2	30.1	25.9	31.4	26.6	29.4	26.6	25.6	29.7	27.8	29.5	21.1	22.5
CDK8+Wnt3a	17.8	20.6	28.2	24.8	24.3	17.7	22.9	17.5	24.2	31.9	23.5	24.0	30.2	25.6	31.9	27.0	29.3	26.5	25.6	29.8	28.1	30.7	21.5	22.8
CDK8+ 화합물181	18.0	19.1	27.6	22.4	23.4	14.5	21.2	14.8	22.5	31.5	22.6	21.7	27.4	23.4	33.8	25.0	26.8	24.4	23.0	27.5	28.8	27.3	19.5	31.9
CDK8+ 화합물180	18.0	18.0	27.3	22.2	22.9	14.2	20.9	14.4	22.2	31.4	22.1	21.2	27.9	23.2	40.0	25.1	26.1	23.8	22.9	29.6	28.7	27.3	18.8	31.5
CDK8+ 화합물19	18.3	18.5	27.8	23.4	23.0	16.2	21.2	15.6	23.2	32.2	24.2	22.6	31.2	24.3	33.9	28.6	27.3	25.2	24.2	29.0	31.1	31.0	20.5	31.9
CDK8+ 화합물202	18.7	19.6	28.3	23.1	24.0	15.7	21.9	15.8	23.5	32.8	23.3	22.3	27.8	23.8	31.3	24.8	27.1	25.2	23.2	29.0	29.5	27.1	20.8	30.9
CDK8+ 화합물40	18.1	18.7	27.9	22.3	23.0	14.8	21.1	14.8	22.6	31.5	22.5	21.5	27.3	23.2	33.2	25.0	26.6	24.1	22.9	27.3	28.9	27.4	20.4	32.0
CDK8+GSK3 inhibitor	18.4	17.1	27.6	23.2	22.8	15.2	20.6	15.5	23.1	32.6	22.6	22.1	28.2	24.2	33.0	26.7	27.3	24.8	24.0	28.1	31.1	28.5	19.3	32.4
CDK8+ 화합물206	18.0	20.0	27.9	23.4	23.0	16.0	22.1	16.0	23.6	32.1	22.9	22.8	28.5	24.4	30.5	25.9	27.5	25.4	24.0	29.7	28.3	28.0	20.8	32.9

[0679]

[0680]

[표 16]

화합물 #	1 차 선택성
화합물 6	GSK 에 대해 선택적임
화합물 7	GSK 에 대해 선택적임
화합물 8	GSK 에 대해 선택적임
화합물 9	CDK 에 대해 선택적임
화합물 57	Trk 에 대해 선택적임
화합물 41	GSK 에 대해 선택적임
화합물 42	CDK 에 대해 선택적임
화합물 10	CDK 에 대해 선택적임
화합물 34	양성 대조군
화합물 11	CDK 에 대해 선택적임
화합물 43	Trk 에 대해 선택적임
화합물 44	GSK 에 대해 선택적임
화합물 12	CDK 에 대해 선택적임
화합물 45	Trk 에 대해 선택적임

[0681]

[0682] [표 17]

플레이트	처리	화합물 #	화합물 선택성	세포수		Sox17 발현	
				평균 총 세포수	양성 대조군 %	평균 총 강도	양성 대조군 %
1	무-액티빈 A	없음	N/A	9809	67.8	-4.0E+05	-0.2
1	액티빈 A/Wnt3a	없음	N/A	14476	100.0	2.3E+08	100.0
1	무-GDF8	화합물 11	CDK 에 대해 선택적임	565	3.9	-1.1E+06	-0.5
1	무-GDF8	화합물 44.	GSK 에 대해 선택적임	14	0.1	-1.1E+06	-0.5
1	무-GDF8	화합물 43	Trk 에 대해 선택적임	8610	59.5	-2.1E+05	-0.1
1	무-GDF8	화합물 42	CDK 에 대해 선택적임	8700	60.1	-2.4E+05	-0.1
1	무-GDF8	화합물 57	Trk 에 대해 선택적임	1222	8.4	-7.1E+05	-0.3
1	무-GDF8	화합물 10	CDK 에 대해 선택적임	7011	48.4	-6.6E+05	-0.3
1	무-GDF8	화합물 41	GSK 에 대해 선택적임	9995	69.0	5.9E+04	0.0
1	무-GDF8	화합물 7	CDK 에 대해 선택적임	3	0.0	-1.4E+06	-0.6
1	무-GDF8	화합물 45	Trk 에 대해 선택적임	8857	61.2	-4.5E+05	-0.2
1	무-GDF8	화합물 6.	GSK 에 대해 선택적임	14827	102.4	-1.8E+05	-0.1
1	무-GDF8	화합물 9	CDK 에 대해 선택적임	7156	49.4	-4.2E+04	0.0
1	무-GDF8	화합물 12	GSK 에 대해 선택적임	13124	90.7	-2.3E+05	-0.1
1	무-GDF8	화합물 8	GSK 에 대해 선택적임	13235	91.4	3.8E+05	0.2
1	GDF8	화합물 34	양성 대조군	13926	96.2	2.6E+08	111.8
1	GDF8	화합물 45	Trk 에 대해 선택적임	9540	65.9	1.1E+08	47.9
1	GDF8	화합물 7	GSK 에 대해 선택적임	5296	36.6	7.0E+07	30.4
1	GDF8	화합물 10	CDK 에 대해 선택적임	4627	32.0	6.6E+07	28.6
1	GDF8	화합물 6.	GSK 에 대해 선택적임	5118	35.4	5.8E+07	25.2
1	GDF8	화합물 43	Trk 에 대해 선택적임	6682	46.2	5.4E+07	23.4
1	GDF8	화합물 42	CDK 에 대해 선택적임	5686	39.3	4.9E+07	21.2
1	GDF8	화합물 8	GSK 에 대해 선택적임	5018	34.7	4.7E+07	20.4
1	GDF8	화합물 9	CDK 에 대해 선택적임	4816	33.3	4.5E+07	19.4
1	GDF8	화합물 41	GSK 에 대해 선택적임	4455	30.8	3.4E+07	14.8
1	GDF8	N/A	N/A	2856	19.7	2.2E+07	9.4
1	GDF8	화합물 57	Trk 에 대해 선택적임	2110	14.6	1.1E+07	4.8
1	GDF8	화합물 11	CDK 에 대해 선택적임	210	1.4	-4.9E+05	-0.2
1	GDF8	화합물 44.	GSK 에 대해 선택적임	226	1.6	-9.5E+05	-0.4
1	GDF8	화합물 12	CDK 에 대해 선택적임	31	0.2	-1.3E+06	-0.6

[0683]

[0684] [표 18]

플레이트	처리	화합물 #	세포수				Sox17 발현			
			평균 총 세포수	SD	CV%	양성 대조군 %	평균 총 강도	SD	CV%	양성 대조군 %
1	무-액티빈 A (유-Wnt3a)	없음	15489	0	0.00	103.2	3.75E+07	0.00E+00	0.00	10.9
1	액티빈 A/Wnt3a	없음	15007	1991	13.27	100.0	3.45E+08	7.16E+07	20.75	100.0
1	GDF8	화합물 206	20568	1683	8.18	137.1	5.19E+08	4.41E+07	8.51	150.3
1	GDF8	화합물 207	19224	1091	5.68	128.1	2.54E+08	5.69E+07	22.41	73.6
1	GDF8	화합물 19	12569	1524	12.13	83.8	2.40E+08	6.34E+07	26.44	69.5
1	GDF8	화합물 23	8758	474	5.41	58.4	1.16E+08	9.07E+06	7.80	33.7
1	GDF8	화합물 170	6460	2305	35.68	43.0	9.44E+07	6.98E+07	73.93	27.4
1	GDF8	화합물 208	4848	1225	25.27	32.3	2.26E+07	2.15E+07	94.96	23.6
1	GDF8	화합물 209	4831	1243	25.74	32.2	3.97E+07	1.61E+07	40.56	11.5
1	GDF8	화합물 32	4338	1520	35.04	28.9	3.63E+07	3.27E+07	90.14	10.5
1	GDF8	화합물 30	4679	435	9.29	31.2	3.47E+07	1.04E+07	30.03	10.1
1	GDF8	화합물 223	3704	1077	29.08	24.7	3.45E+07	2.74E+07	79.43	10.0
1	GDF8	화합물 2	4538	632	13.93	30.2	2.95E+07	2.81E+06	9.50	8.6
1	GDF8	화합물 210	2645	817	30.88	17.6	2.90E+07	2.45E+07	84.73	8.4
1	GDF8	화합물 24	5012	1263	25.21	33.4	2.64E+07	1.66E+07	62.95	7.7
1	GDF8	화합물 211	5165	796	15.41	34.4	2.61E+07	5.02E+06	19.23	7.6
1	GDF8	화합물 212	5476	1445	26.39	36.5	2.54E+07	1.18E+07	46.53	7.4
1	GDF8	화합물 224	5188	761	14.67	34.6	2.46E+07	8.26E+06	33.56	7.1
1	GDF8	화합물 225	4431	1149	25.92	29.5	2.45E+07	2.65E+07	108.19	7.1
1	GDF8	화합물 13	3123	1508	48.27	20.8	2.44E+07	2.30E+07	94.13	7.1

[0685]

1	GDF8	화합물 213	1261	1028	81.49	8.4	2.07E+07	1.97E+07	95.03	6.0
1	GDF8	화합물 52	4932	386	7.82	32.9	1.99E+07	6.90E+06	34.67	5.8
1	GDF8	화합물 214	3345	335	10.01	22.3	1.93E+07	1.39E+07	72.18	5.6
1	GDF8	화합물 51	4289	940	21.91	28.6	1.70E+07	1.10E+07	64.86	4.9
1	GDF8	화합물 26	4896	545	11.14	32.6	1.65E+07	5.93E+06	36.02	4.8
1	GDF8	화합물 226	3617	577	15.94	24.1	1.59E+07	4.96E+06	31.21	4.6
1	GDF8	화합물 215	4326	165	3.81	28.8	1.45E+07	2.69E+06	18.53	4.2
1	GDF8	화합물 31	3619	1011	27.92	24.1	1.36E+07	4.63E+06	34.15	3.9
1	GDF8	화합물 216	3364	629	18.70	22.4	8.75E+06	2.30E+06	26.32	2.5
1	GDF8	화합물 217	2859	544	19.03	19.1	8.75E+06	1.94E+06	22.16	2.5
1	GDF8	화합물 218	1327	118	8.92	8.8	6.44E+06	9.70E+05	15.05	1.9
1	GDF8	화합물 219	368	168	45.67	2.5	1.79E+06	1.29E+06	72.17	0.5
2	무-엑티빈 A (유-Wnt3a)	없음	15778	0	0.00	103.2	2.24E+07	0.00E+00	0.00	6.7
2	엑티빈 A/Wnt3a	없음	15290	1119	7.32	100.0	3.37E+08	2.84E+07	8.44	100.0
2	GDF8	화합물 202	20177	987	4.89	132.0	4.85E+08	1.94E+07	4.00	144.0
2	GDF8	화합물 227	2911	4619	158.69	19.0	3.89E+07	6.69E+07	172.00	11.5
2	GDF8	화합물 15	4383	1775	40.49	28.7	3.57E+07	3.57E+07	100.03	10.6
2	GDF8	화합물 228	4043	1253	30.98	26.4	3.10E+07	2.53E+07	81.62	9.2
2	GDF8	화합물 229	3451	892	25.85	22.6	1.80E+07	1.46E+07	81.07	5.4
2	GDF8	화합물 4	3163	805	25.44	20.7	1.58E+07	3.54E+06	22.32	4.7
2	GDF8	화합물 220	2791	1453	52.05	18.3	1.40E+07	9.00E+06	64.28	4.2
2	GDF8	화합물 5	3137	1172	37.34	20.5	1.30E+07	7.52E+06	57.85	3.9
2	GDF8	화합물 230	2624	248	9.46	17.2	1.24E+07	1.55E+07	124.73	3.7
2	GDF8	화합물 231	4773	2651	55.55	31.2	1.22E+07	6.51E+06	53.37	3.6
2	GDF8	화합물 232	3273	1290	39.41	21.4	1.18E+07	1.51E+07	127.98	3.5
2	GDF8	화합물 221	1950	361	18.52	12.8	1.18E+07	1.54E+07	131.11	3.5
2	GDF8	화합물 233	3041	180	5.93	19.9	1.12E+07	1.09E+07	97.44	3.3
2	GDF8	화합물 147	3434	1199	34.91	22.5	1.12E+07	9.80E+06	87.75	3.3

[0686]

2	GDF8	화합물 234	2835	623	21.98	18.5	9.47E+06	5.67E+06	59.84	2.8
2	GDF8	화합물 235	3391	2269	66.91	22.2	9.10E+06	6.51E+06	71.52	2.7
2	GDF8	화합물 236	2868	561	19.57	18.8	6.73E+06	6.32E+06	93.82	2.0
2	GDF8	화합물 33	2362	511	21.66	15.4	6.60E+06	2.45E+06	37.20	2.0
2	GDF8	화합물 1	3213	166	5.16	21.0	6.48E+06	3.09E+06	47.67	1.9
2	GDF8	화합물 53	2783	441	15.86	18.2	6.36E+06	2.89E+06	45.36	1.9
2	GDF8	화합물 237	2973	292	9.83	19.4	6.02E+06	3.00E+06	49.79	1.8
2	GDF8	화합물 238	2739	485	17.70	17.9	5.97E+06	6.10E+06	102.07	1.8
2	GDF8	화합물 239	3156	667	21.15	20.6	5.60E+06	2.42E+06	43.24	1.7
2	GDF8	화합물 240	3002	287	9.55	19.6	4.68E+06	3.13E+06	66.80	1.4
2	GDF8	화합물 200	2308	209	9.04	15.1	4.39E+06	1.88E+06	42.83	1.3
2	GDF8	화합물 222	1776	719	40.47	11.6	3.33E+06	2.52E+06	75.78	1.0
2	GDF8	화합물 241	2949	446	15.14	19.3	3.29E+06	1.55E+06	47.03	1.0
2	GDF8	화합물 242	385	184	47.83	2.5	1.08E+06	8.85E+05	81.61	0.3
2	GDF8	화합물 243	249	55	22.21	1.6	2.53E+05	3.07E+05	121.25	0.1
2	GDF8	화합물 204	250	21	8.38	1.6	1.36E+05	2.27E+04	16.66	0.0
3	무-엑티빈 A (유-Wnt3a)	없음	15796	0	0.00	99.6	2.82E+07	0.00E+00	0.00	8.0
3	엑티빈 A/Wnt3a	없음	15867	785	4.95	100.0	3.54E+08	2.40E+07	6.77	100.0
3	GDF8	화합물 34	6974	3723	53.38	44.0	2.07E+08	9.51E+07	45.85	58.6
3	GDF8	화합물 185	10892	1552	14.24	68.6	1.53E+08	4.08E+07	26.72	43.1
3	GDF8	화합물 35	7746	1873	24.17	48.8	1.35E+08	4.86E+07	36.08	38.0
3	GDF8	화합물 22	6727	1927	28.64	42.4	1.06E+08	5.04E+07	47.73	29.8
3	GDF8	화합물 34	4889	1152	23.57	30.8	4.31E+07	2.11E+07	48.95	12.2
3	GDF8	화합물 184	4173	1758	42.14	26.3	3.94E+07	2.24E+07	56.78	11.1
3	GDF8	화합물 223	4234	1604	37.88	26.7	3.55E+07	2.51E+07	70.56	10.0
3	GDF8	화합물 37	4187	338	8.06	26.4	3.11E+07	1.56E+07	50.18	8.8
3	GDF8	화합물 244	4479	1229	27.43	28.2	2.73E+07	1.52E+07	55.71	7.7
3	GDF8	화합물 245	4725	99	2.09	29.8	2.59E+07	1.03E+07	39.90	7.3

[0687]

3	GDF8	화합물 246	3820	1091	28.57	24.1	2.30E+07	2.69E+07	117.08	6.5
3	GDF8	화합물 247	3730	966	25.90	23.5	2.14E+07	1.04E+07	48.63	6.1
3	GDF8	화합물 248	3875	445	11.48	24.4	2.13E+07	9.45E+06	44.45	6.0
3	GDF8	화합물 25	3879	658	16.95	24.4	1.76E+07	1.21E+07	69.04	5.0
3	GDF8	화합물 195	3703	405	10.94	23.3	1.61E+07	3.27E+06	20.34	4.5
3	GDF8	화합물 227	2904	397	13.68	18.3	1.43E+07	1.35E+07	94.25	4.0
3	GDF8	화합물 183	3306	969	29.32	20.8	1.35E+07	1.14E+07	84.25	3.8
3	GDF8	화합물 187	2768	1426	51.51	17.4	1.35E+07	9.02E+06	66.67	3.8
3	GDF8	화합물 201	3213	1114	34.66	20.3	1.35E+07	1.69E+07	125.02	3.8
3	GDF8	화합물 197	3268	211	6.46	20.6	1.30E+07	5.25E+06	40.51	3.7
3	GDF8	화합물 249	3840	348	9.06	24.2	1.29E+07	6.79E+06	52.72	3.6
3	GDF8	화합물 141	2404	213	8.86	15.1	1.12E+07	4.95E+06	44.30	3.2
3	GDF8	화합물 194	3177	354	11.14	20.0	9.75E+06	2.11E+06	21.63	2.8
3	GDF8	화합물 250	3683	420	11.40	23.2	9.14E+06	4.78E+06	52.32	2.6
3	GDF8	화합물 251	3021	668	22.10	19.0	8.41E+06	4.59E+06	54.60	2.4
3	GDF8	화합물 20	2793	205	7.35	17.6	6.77E+06	1.86E+06	27.45	1.9
3	GDF8	화합물 252	2580	135	5.24	16.3	6.20E+06	2.31E+05	3.72	1.8
3	GDF8	화합물 253	2485	820	32.98	15.7	5.83E+06	1.47E+06	25.20	1.6
3	GDF8	화합물 202	2095	518	24.71	13.2	5.75E+06	2.62E+06	45.66	1.6
3	GDF8	화합물 21	371	294	79.19	2.3	2.36E+06	3.07E+06	129.78	0.7
4	무-엑티빈 A (유-Wnt3a)	없음	16629	0	0.00	119.3	2.42E+07	0.00E+00	0.00	7.8
4	엑티빈 A/Wnt3a	없음	13945	1535	11.01	100.0	3.09E+08	4.77E+07	15.46	100.0
4	GDF8	화합물 34	7416	6482	87.41	53.2	2.10E+08	1.82E+08	86.70	68.0
4	GDF8	화합물 240	11283	2023	17.93	80.9	1.61E+08	4.41E+07	27.34	52.2
4	GDF8	화합물 28	5236	1787	34.12	37.5	4.03E+07	3.08E+07	76.36	13.1
4	GDF8	화합물 198	3985	2674	67.10	28.6	3.89E+07	5.55E+07	142.91	12.6
4	GDF8	화합물 196	4861	1501	30.87	34.9	3.03E+07	1.98E+07	65.37	9.8
4	GDF8	화합물 18	1921	1759	91.56	13.8	2.94E+07	3.65E+07	123.90	9.5

[0688]

4	GDF8	화합물 186	3486	425	12.19	25.0	2.34E+07	1.42E+07	60.78	7.6
4	GDF8	화합물 254	3960	1521	38.42	28.4	2.31E+07	2.27E+07	98.10	7.5
4	GDF8	화합물 168	3460	324	9.36	24.8	2.28E+07	7.13E+06	31.23	7.4
4	GDF8	화합물 190	3402	1318	38.74	24.4	1.87E+07	1.58E+07	84.61	6.1
4	GDF8	화합물 255	4006	1625	40.57	28.7	1.52E+07	1.05E+07	68.91	4.9
4	GDF8	화합물 50	2666	743	27.86	19.1	1.48E+07	8.30E+06	56.15	4.8
4	GDF8	화합물 27	3721	721	19.37	26.7	1.19E+07	9.69E+06	81.29	3.9
4	GDF8	화합물 256	2922	1275	43.64	21.0	9.41E+06	8.65E+06	92.01	3.0
4	GDF8	화합물 257	3182	705	22.14	22.8	8.06E+06	4.49E+06	55.75	2.6
4	GDF8	화합물 258	2731	472	17.29	19.6	7.89E+06	7.24E+06	91.70	2.6
4	GDF8	화합물 189	2350	1625	69.16	16.9	7.72E+06	5.36E+06	69.41	2.5
4	GDF8	화합물 259	2195	955	43.49	15.7	6.92E+06	2.58E+06	37.29	2.2
4	GDF8	화합물 260	2468	741	30.04	17.7	6.64E+06	3.33E+06	50.18	2.2
4	GDF8	화합물 261	2965	456	15.38	21.3	6.23E+06	2.10E+06	33.61	2.0
4	GDF8	화합물 192	2377	572	24.08	17.0	6.17E+06	2.76E+06	44.65	2.0
4	GDF8	화합물 262	2894	399	13.78	20.8	5.75E+06	3.00E+06	52.20	1.9
4	GDF8	화합물 188	3005	759	25.26	21.6	5.02E+06	3.97E+06	79.06	1.6
4	GDF8	화합물 263	2129	230	10.79	15.3	4.77E+06	1.14E+06	23.93	1.5
4	GDF8	화합물 264	2630	342	13.00	18.9	4.28E+06	2.17E+06	50.73	1.4
4	GDF8	화합물 265	2636	1372	52.04	18.9	4.27E+06	1.15E+06	26.86	1.4
4	GDF8	화합물 14	274	14	5.02	2.0	1.56E+05	9.51E+04	60.91	0.1
4	GDF8	화합물 205	241	3	1.20	1.7	1.36E+05	6.83E+04	50.42	0.0
4	GDF8	화합물 266	271	7	2.67	1.9	1.18E+05	3.34E+04	28.43	0.0
4	GDF8	화합물 203	253	4	1.49	1.8	1.09E+05	3.49E+04	32.09	0.0

[0689]

[0690]

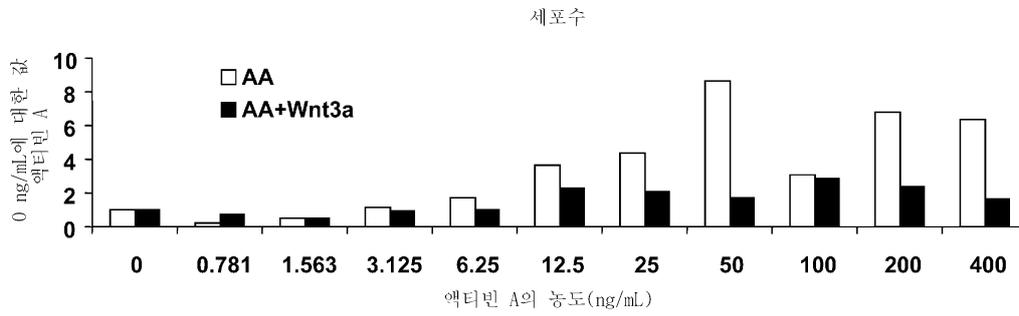
[표 19]

화합물 #	Sox17 발현
	양성 대조군 %
화합물 181	150.3
화합물 202	144.0
화합물 180	73.6
화합물 19	69.5
화합물 34	68.0
화합물 40	52.2
화합물 185	43.1
화합물 185	38.0
화합물 35	33.7
화합물 23	29.8
화합물 22	27.4
화합물 17	23.6

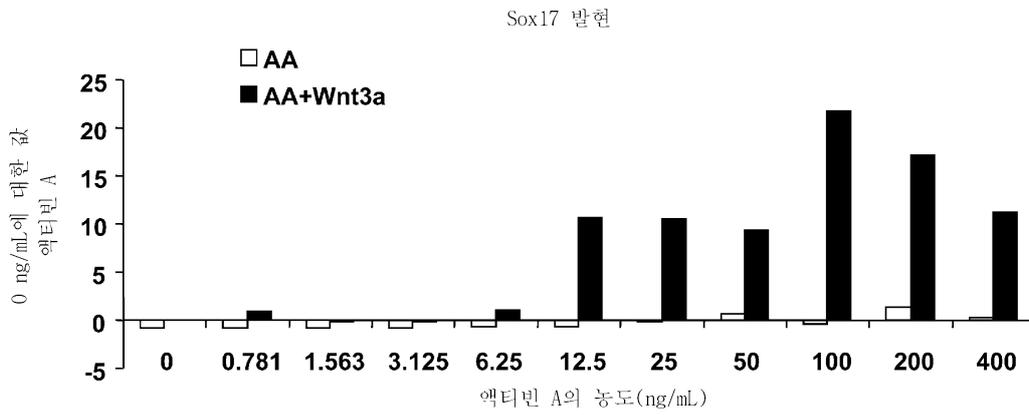
[0691]

도면

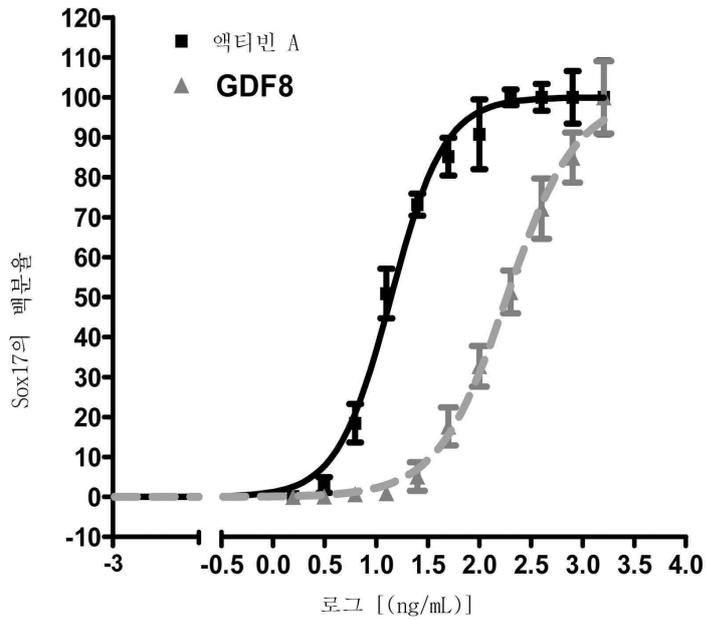
도면1a



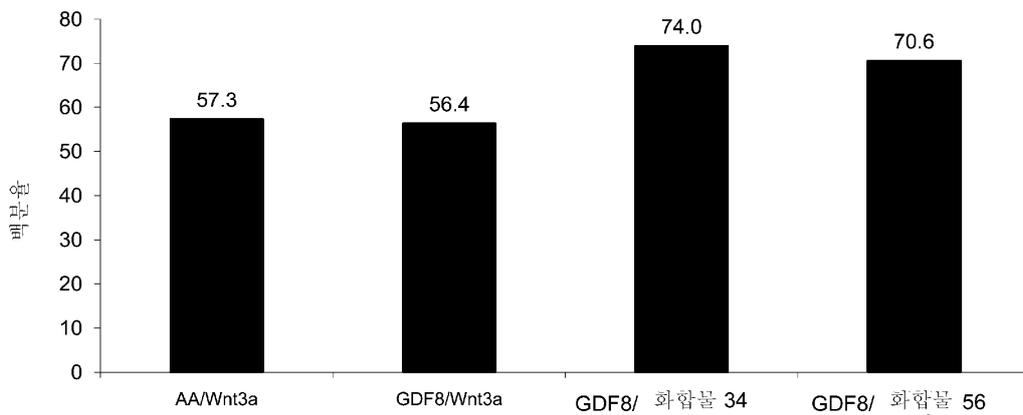
도면1b



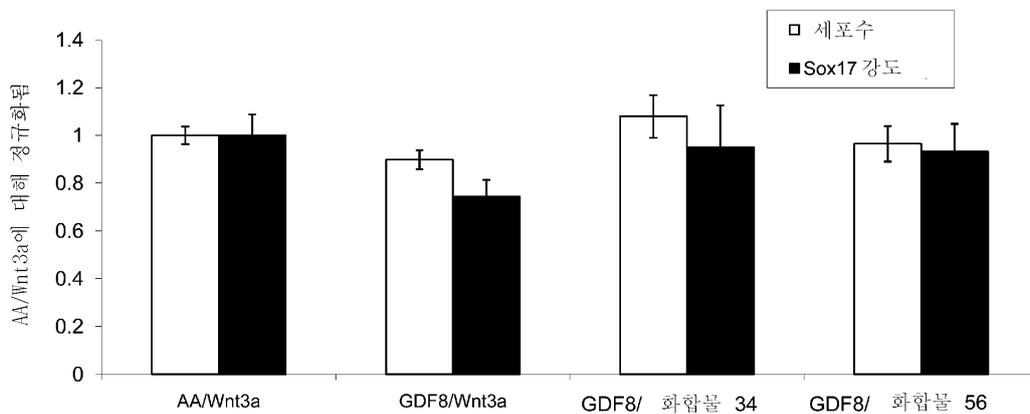
도면2



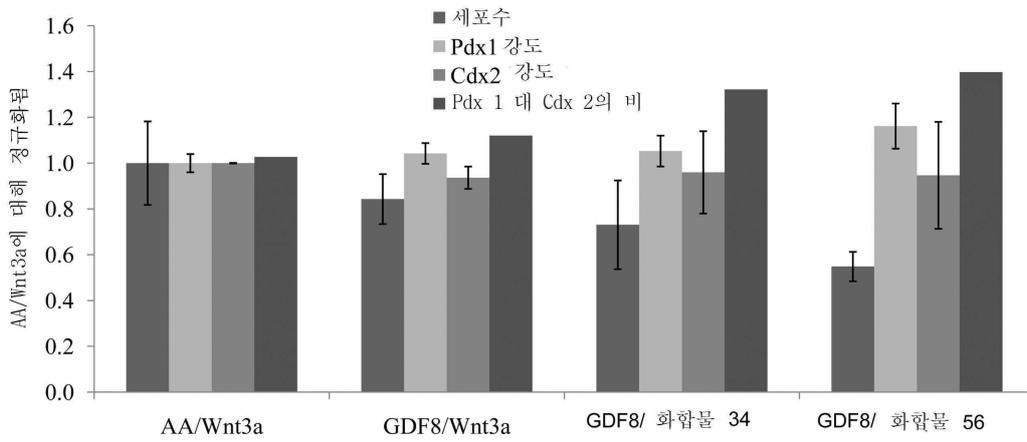
도면3



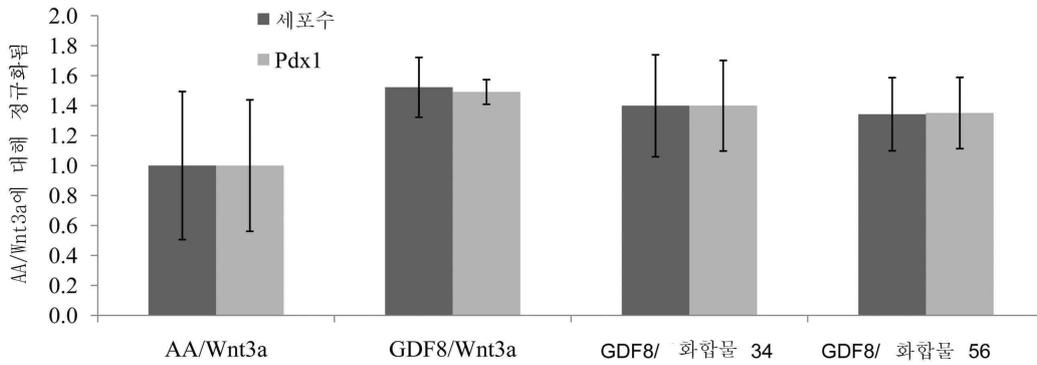
도면4



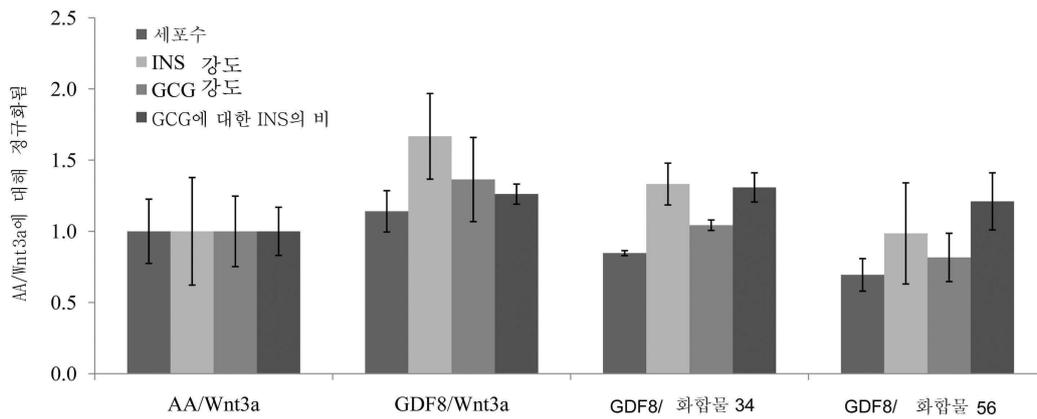
도면5



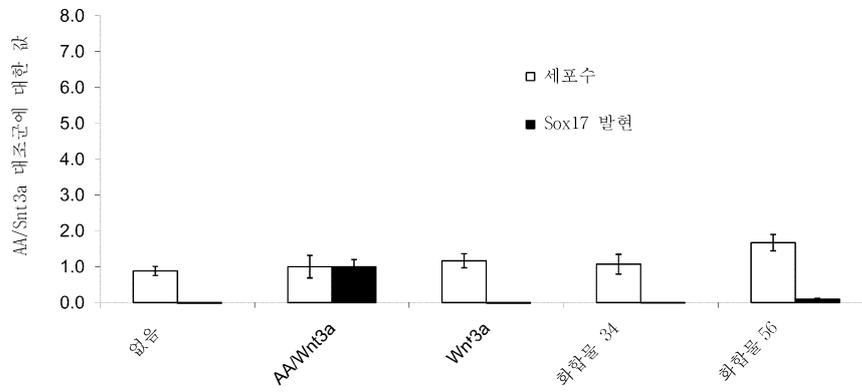
도면6



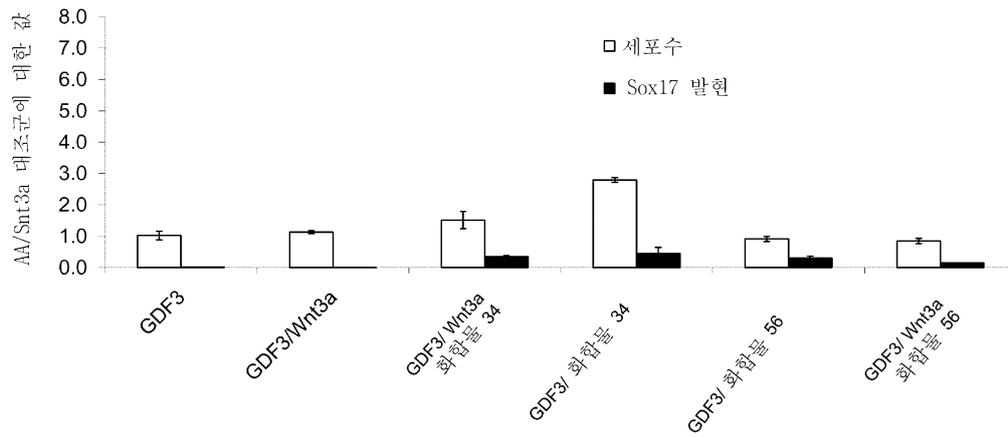
도면7



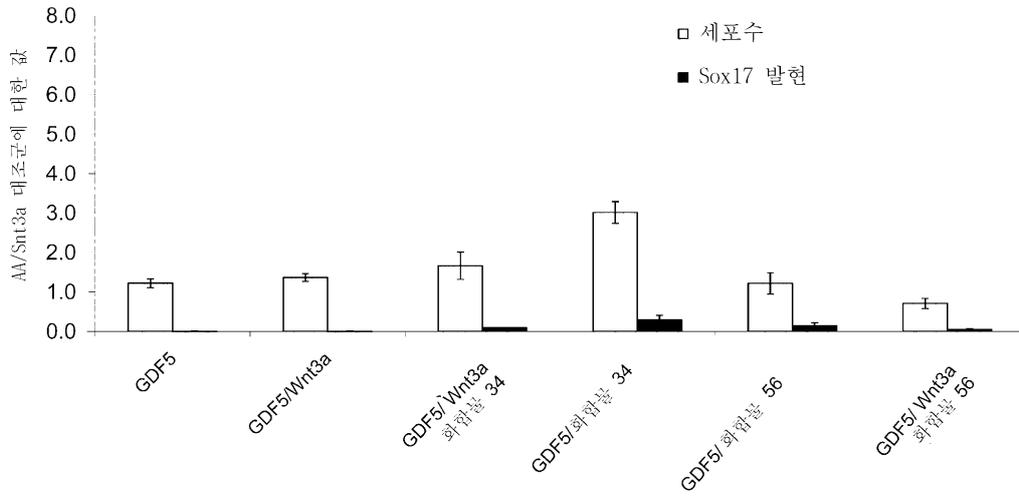
도면8a



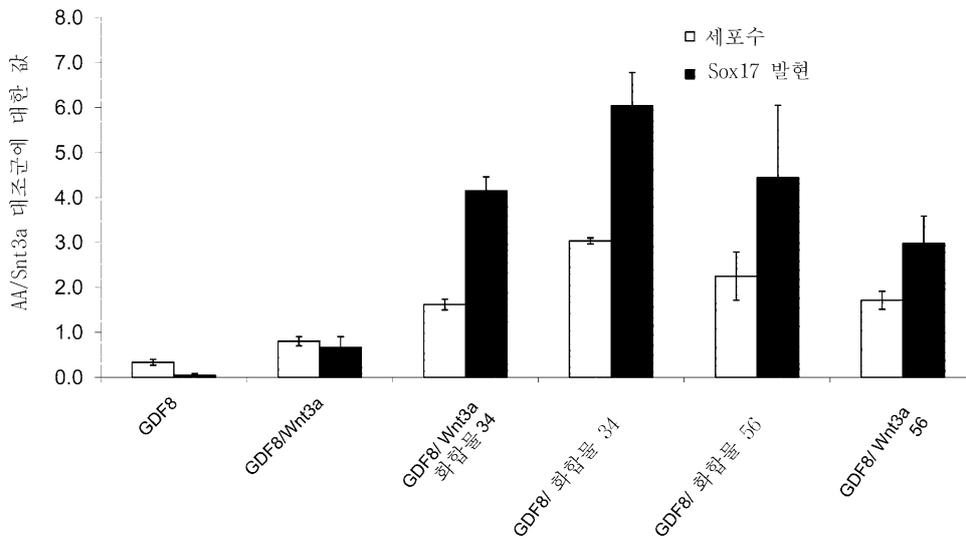
도면8b



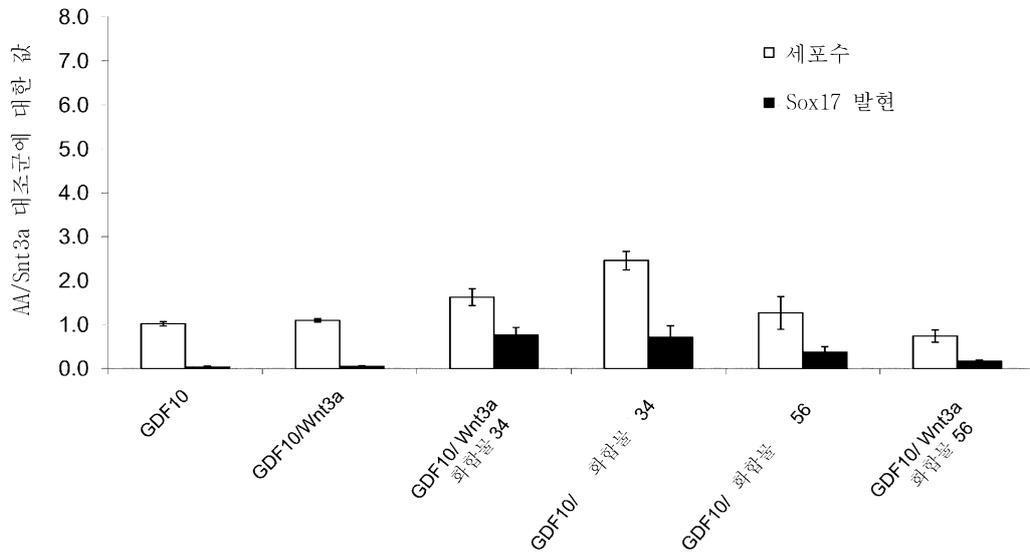
도면8c



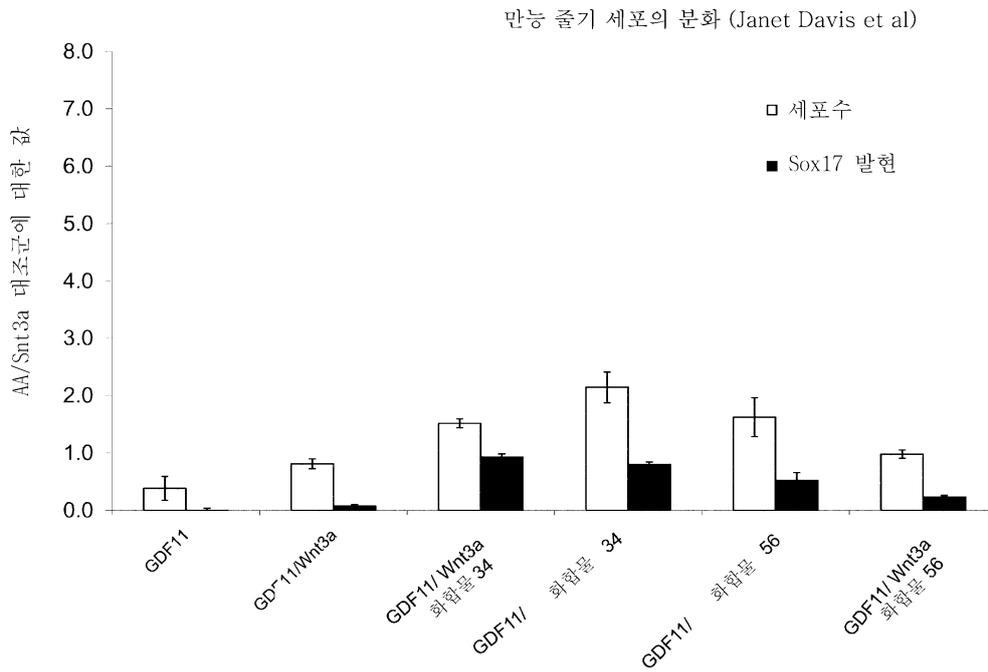
도면8d



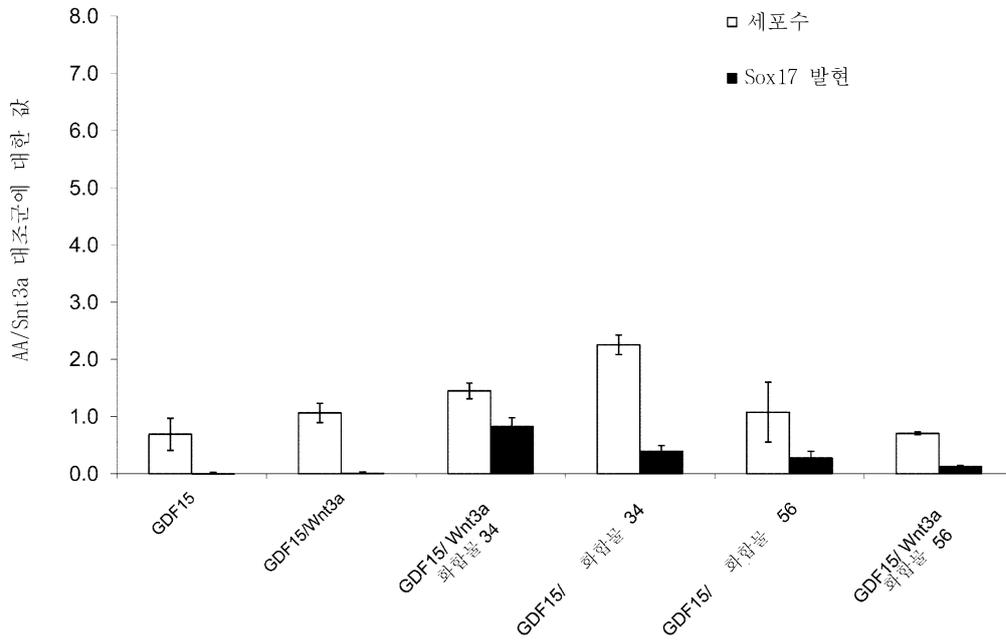
도면8e



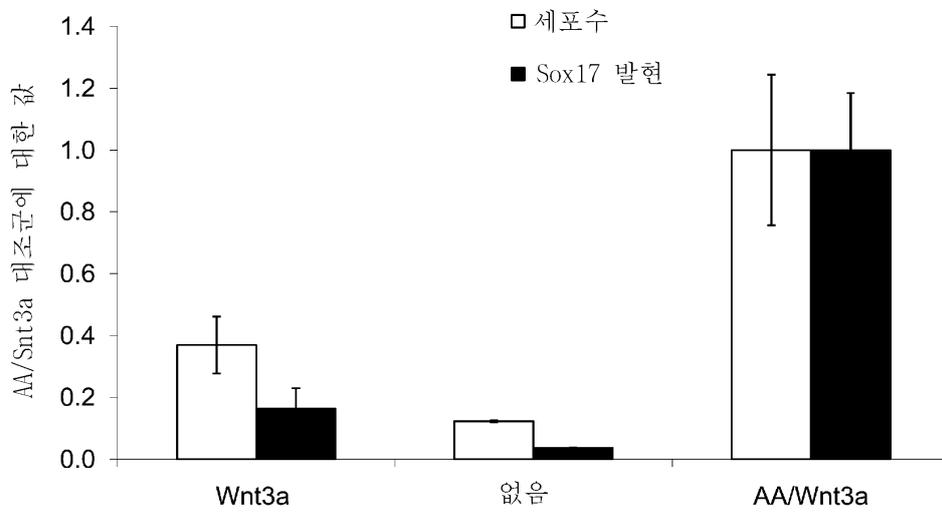
도면8f



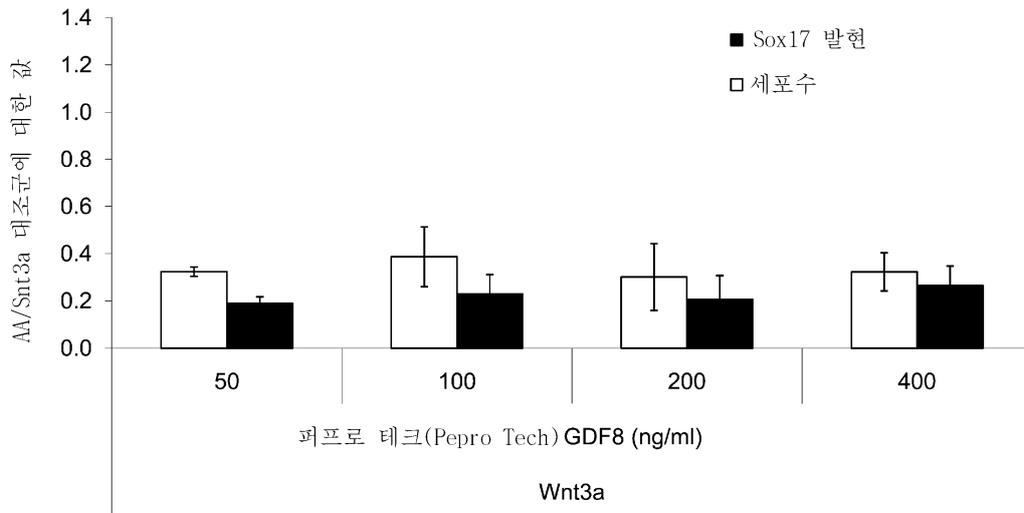
도면8g



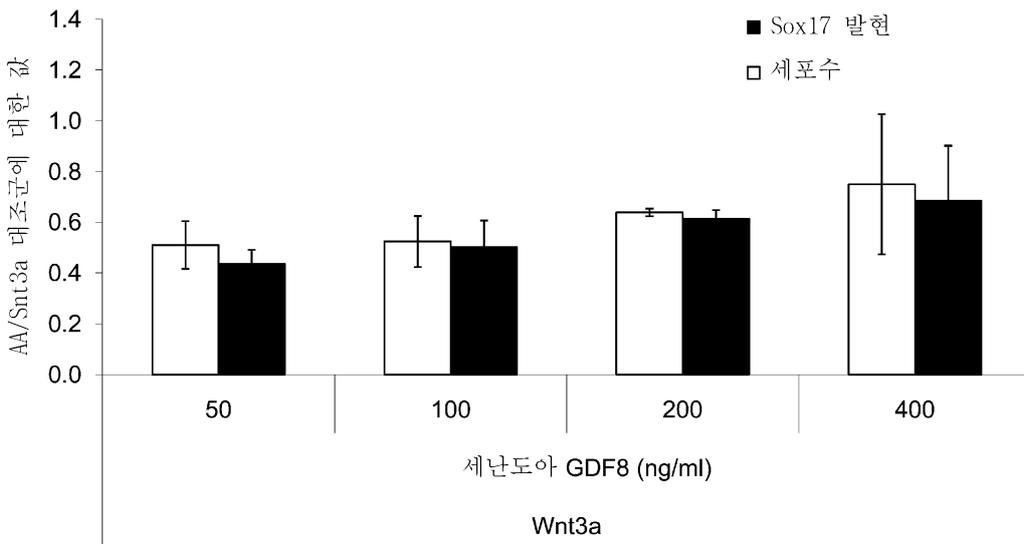
도면9a



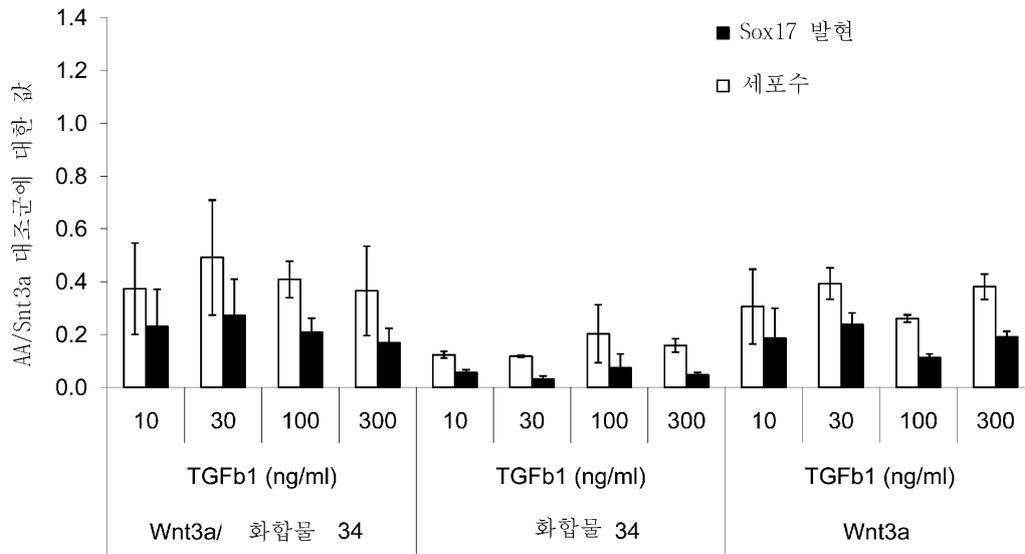
도면9b



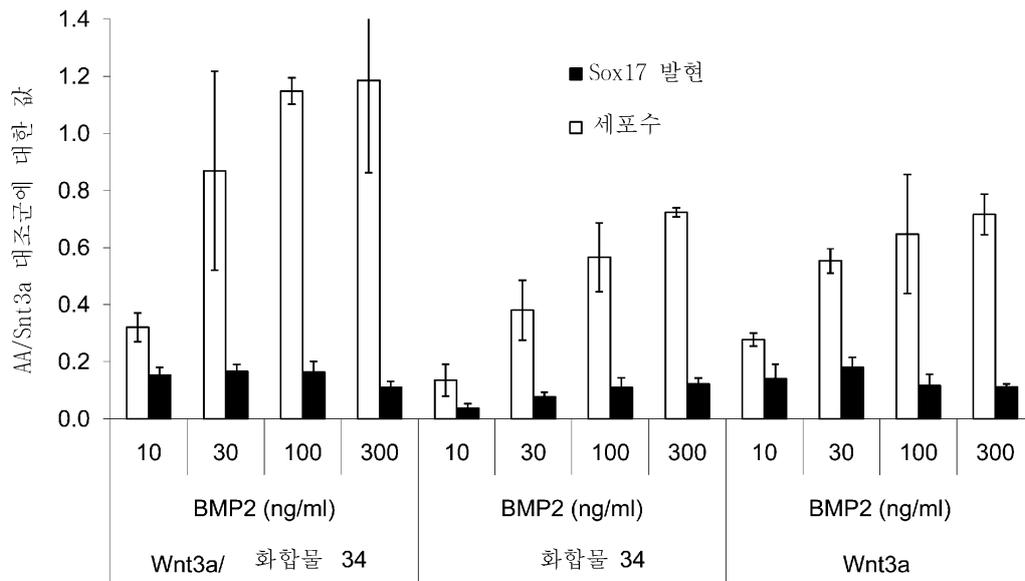
도면9c



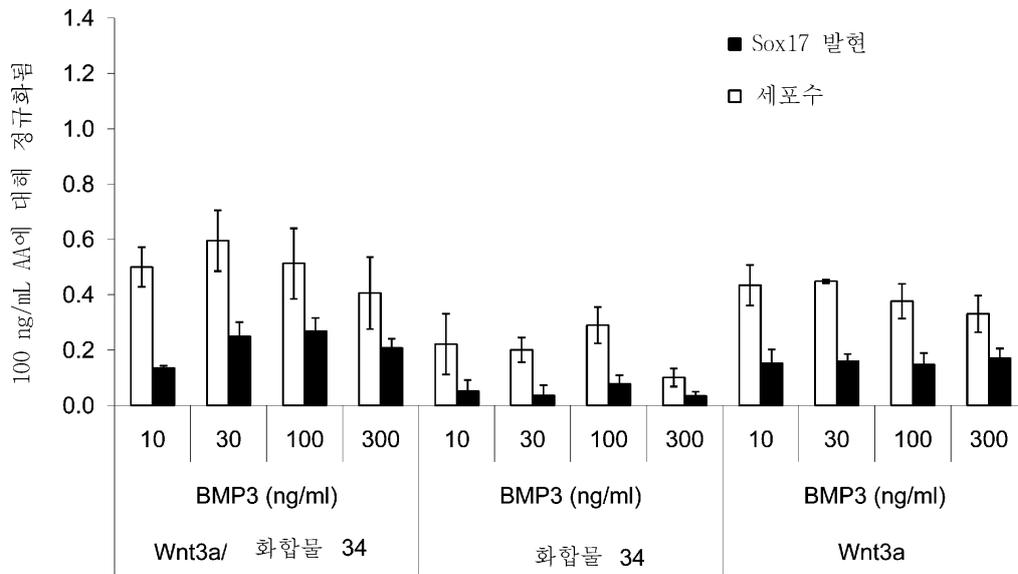
도면9d



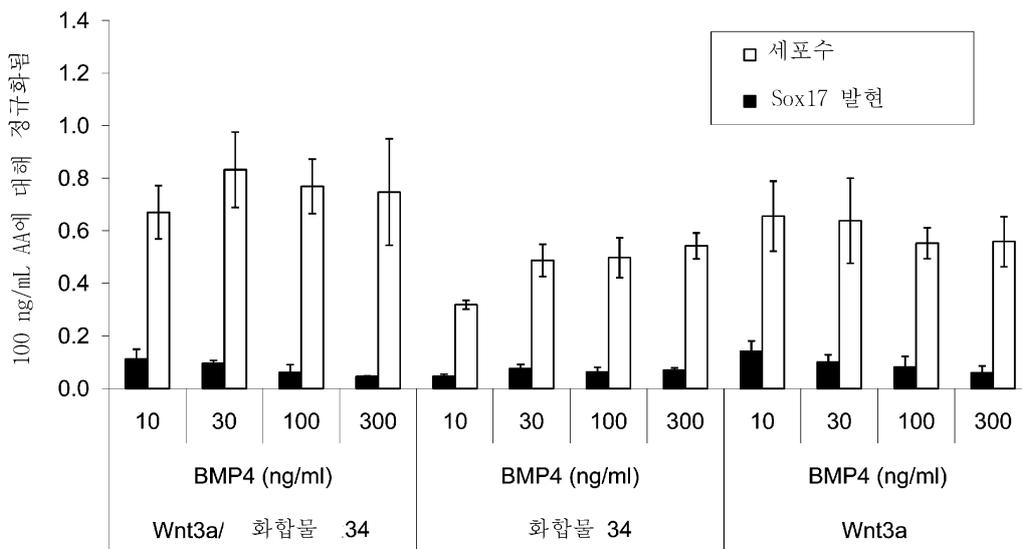
도면9e



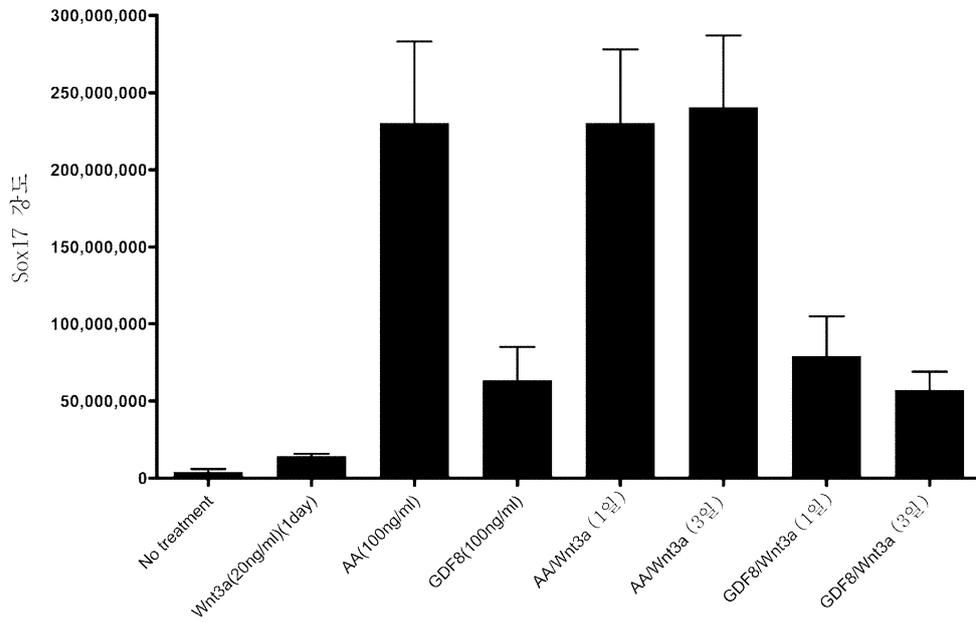
도면9f



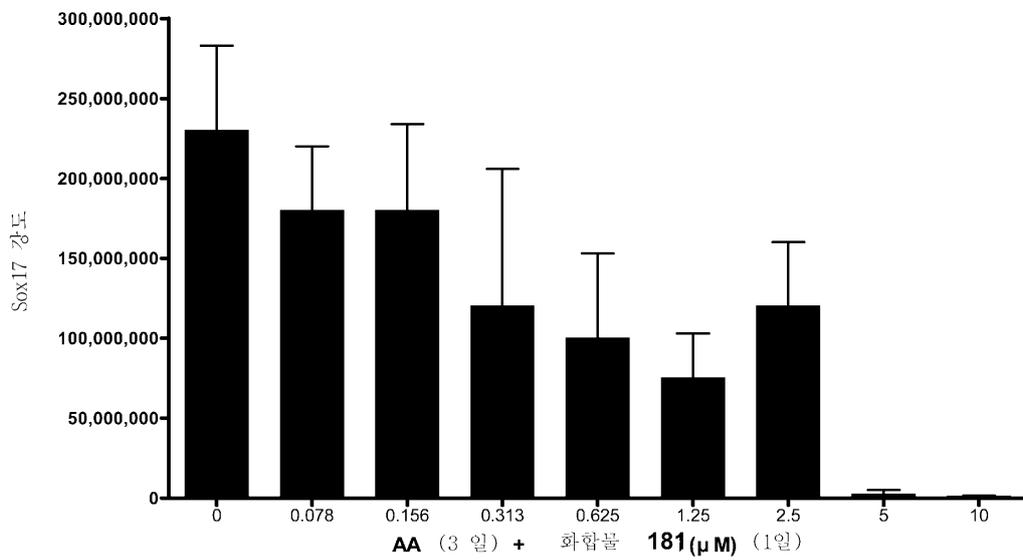
도면9g



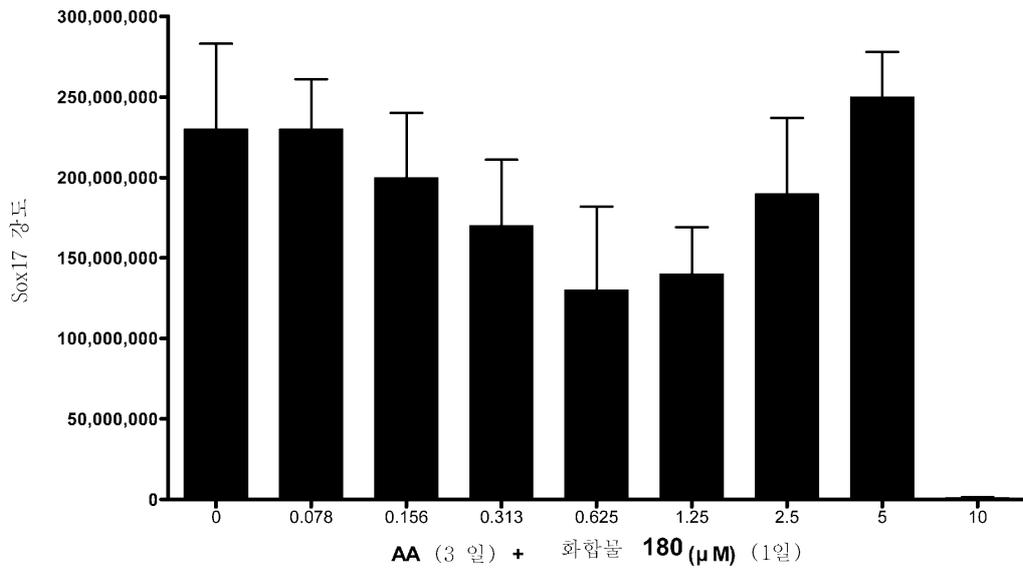
도면10



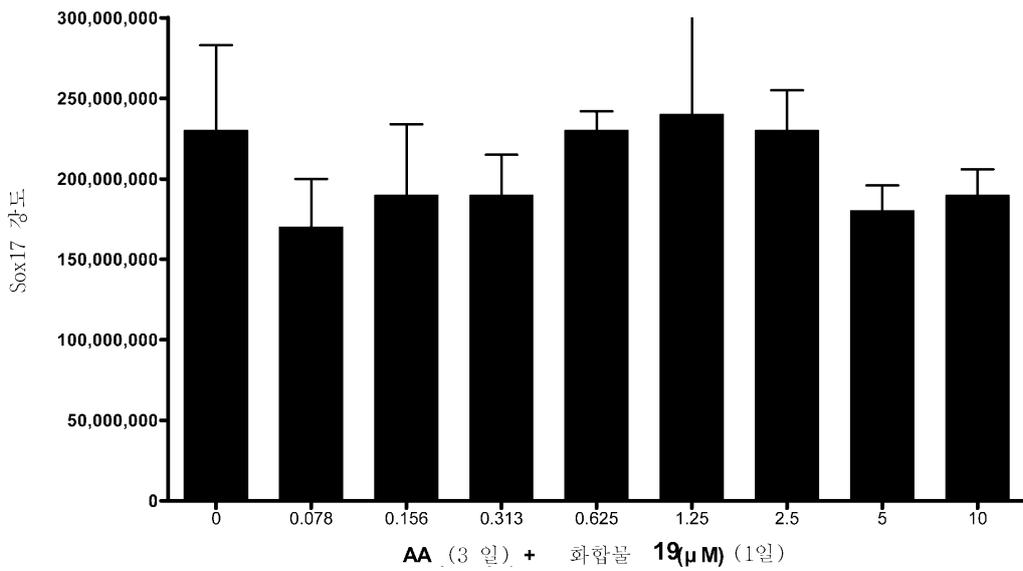
도면11a



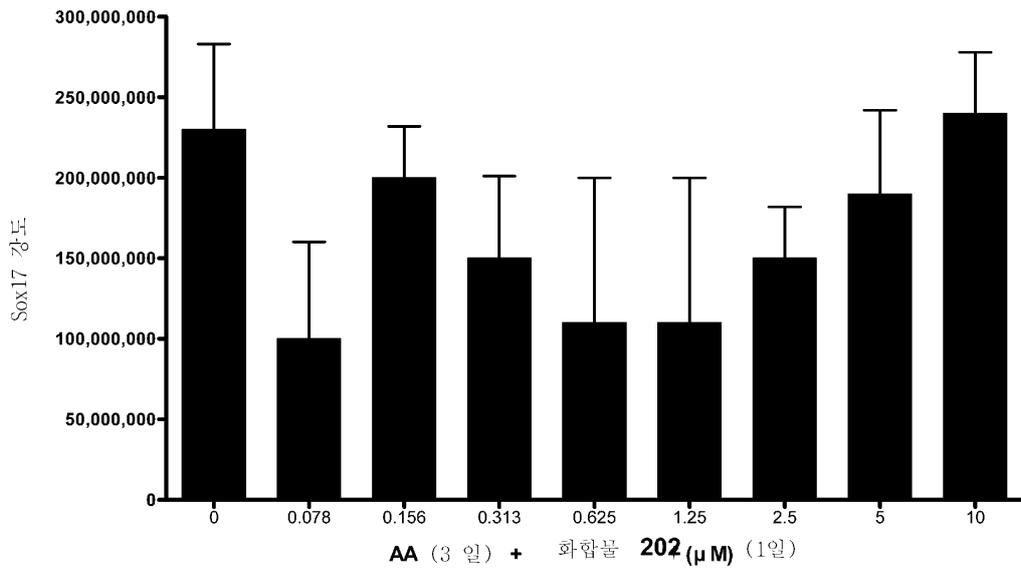
도면11b



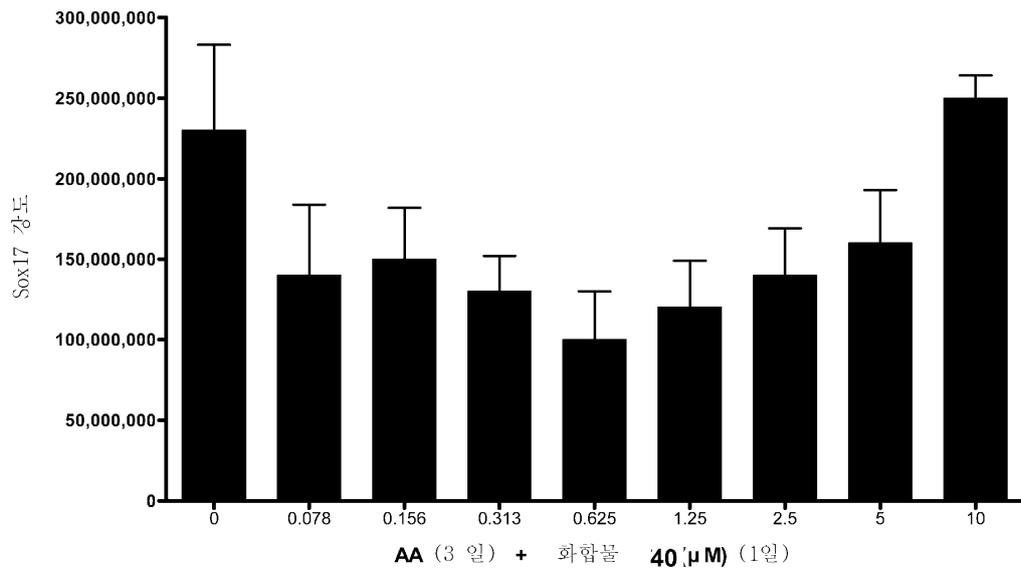
도면11c



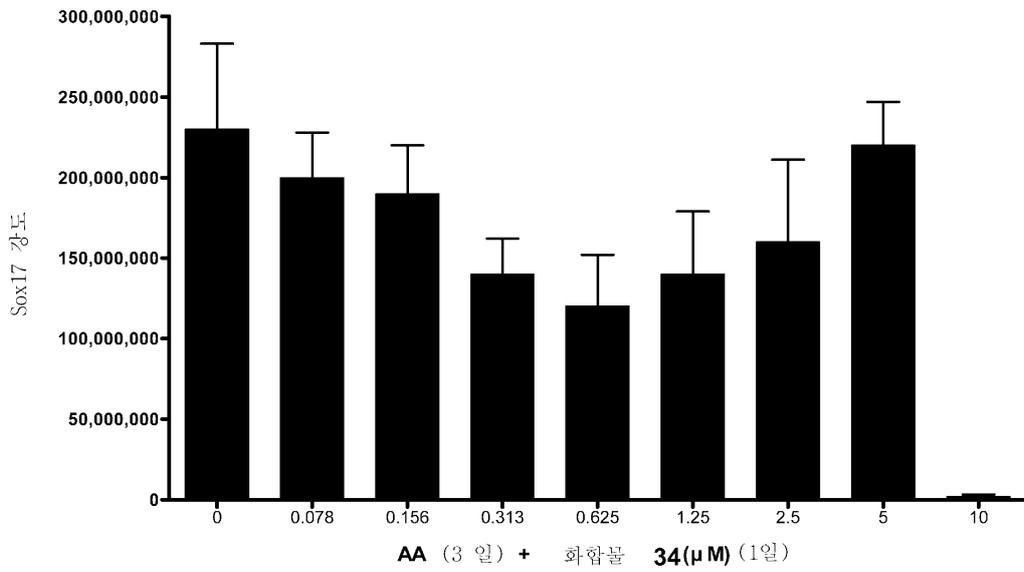
도면11d



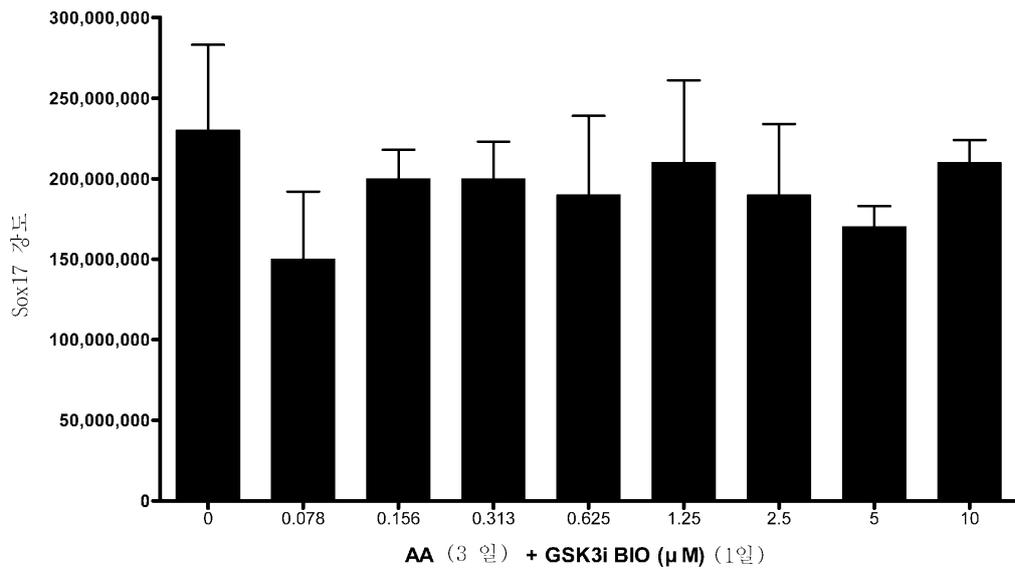
도면11e



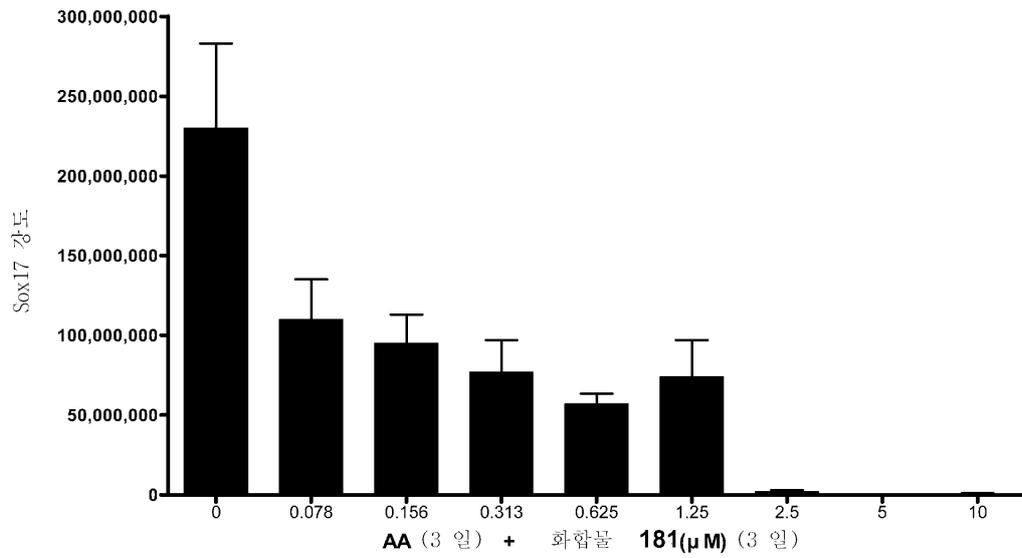
도면11f



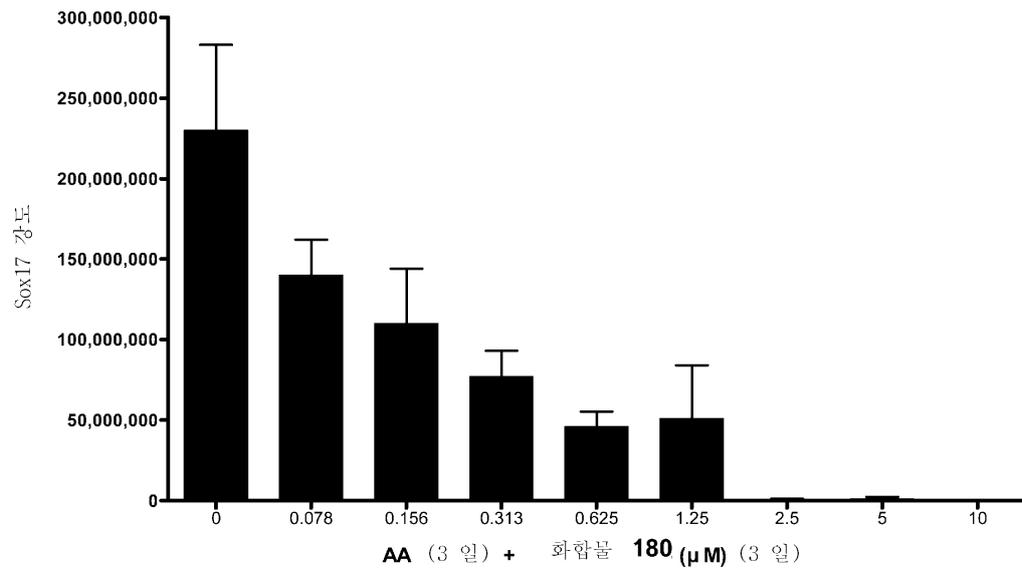
도면11g



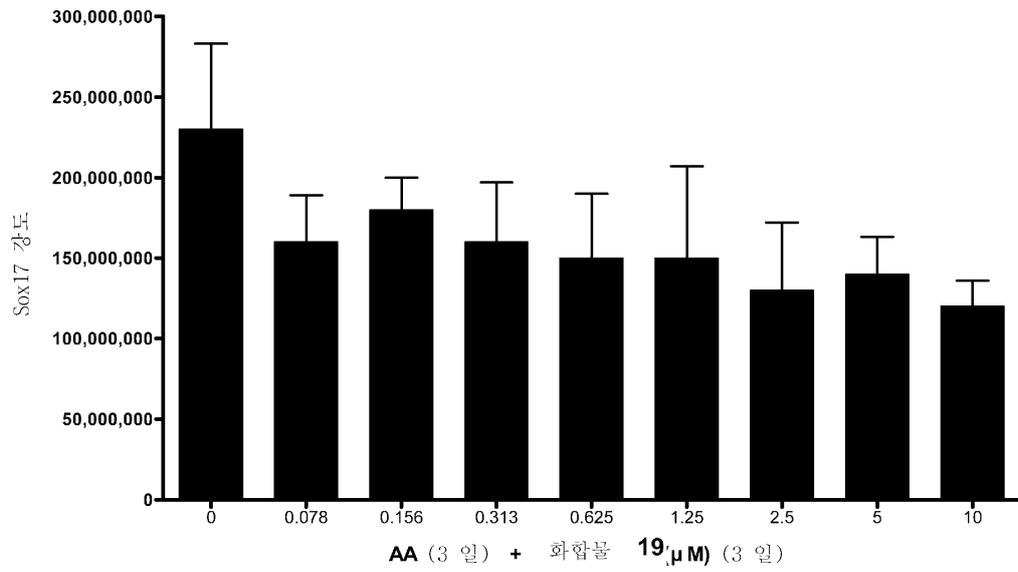
도면12a



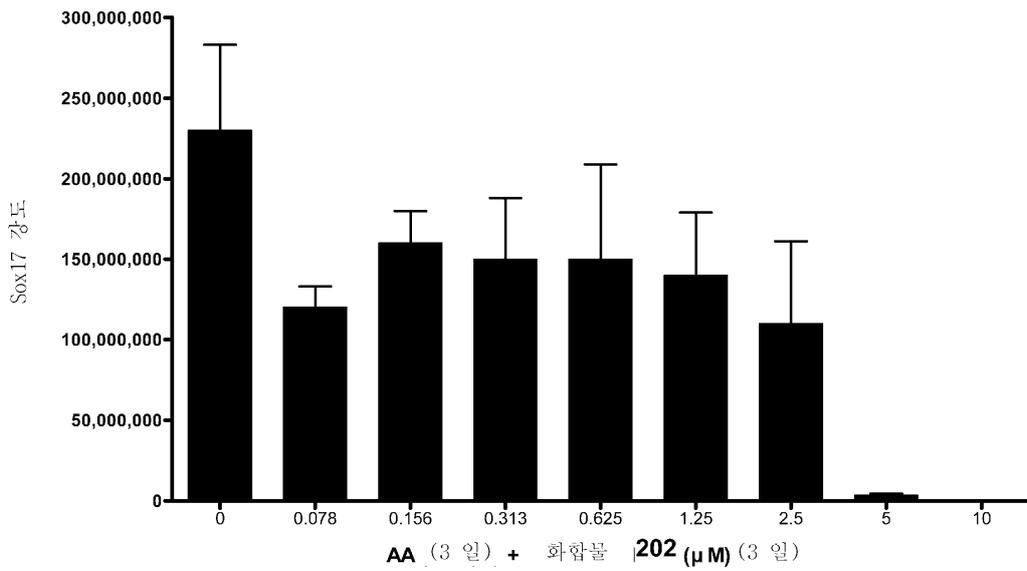
도면12b



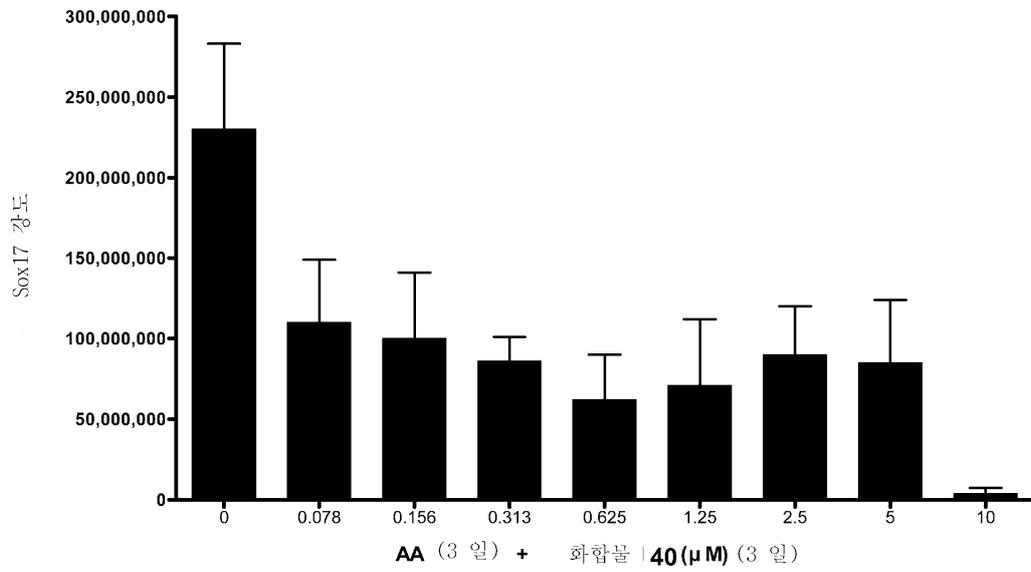
도면12c



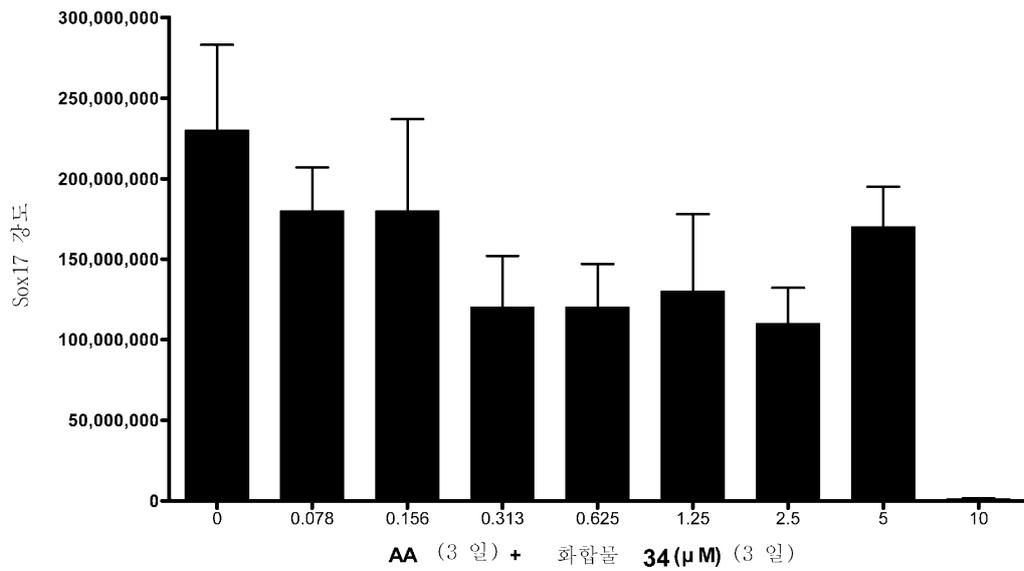
도면12d



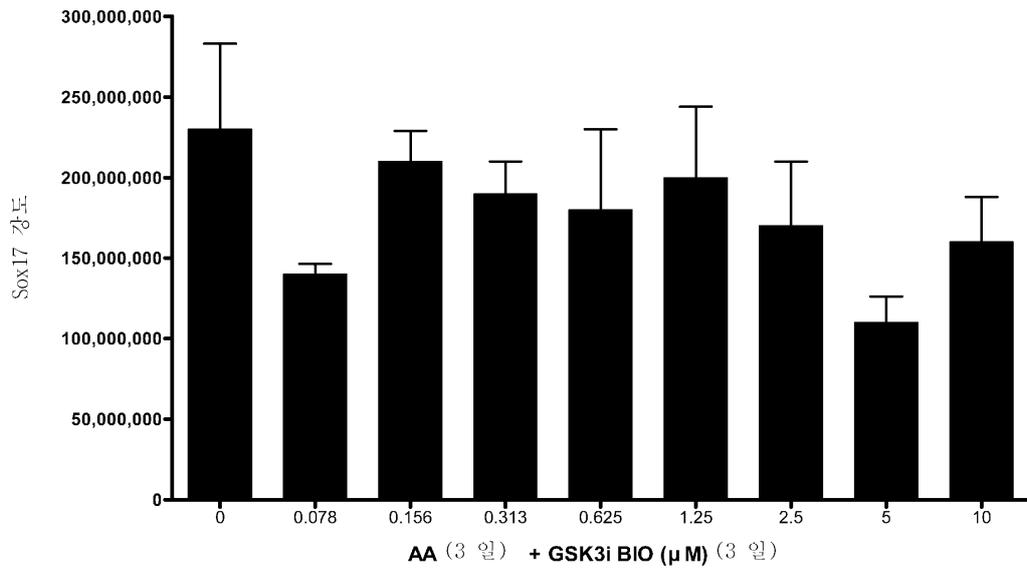
도면12e



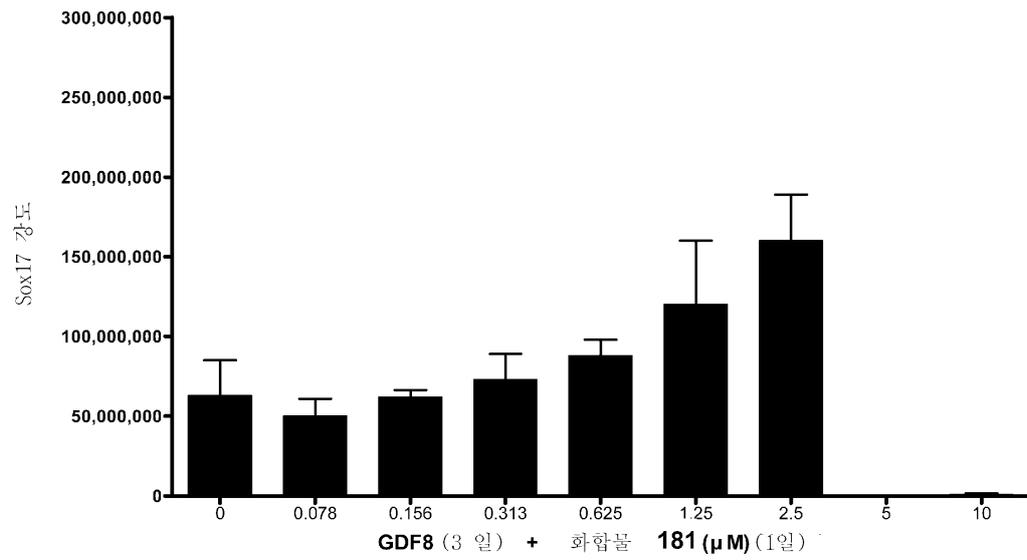
도면12f



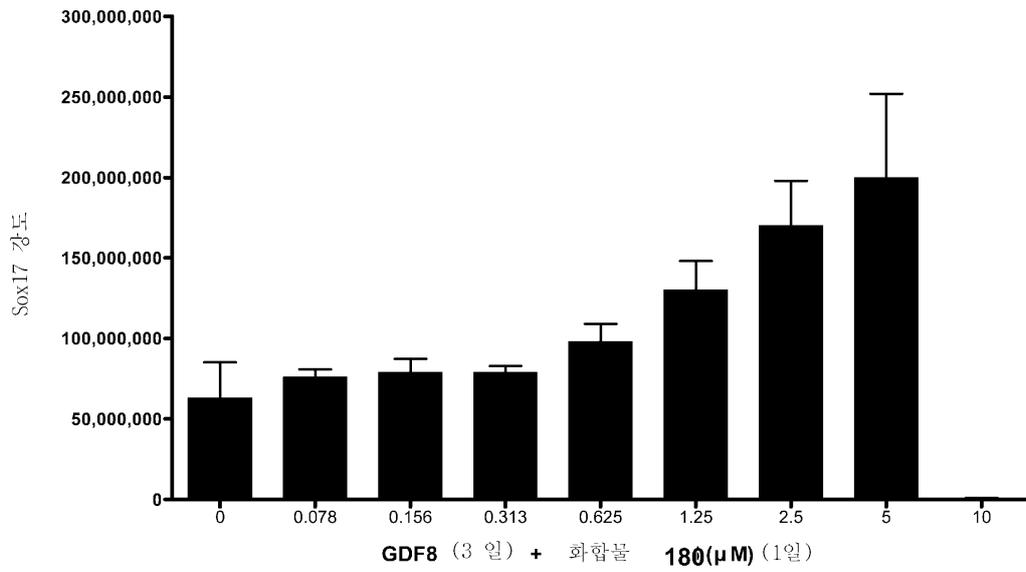
도면12g



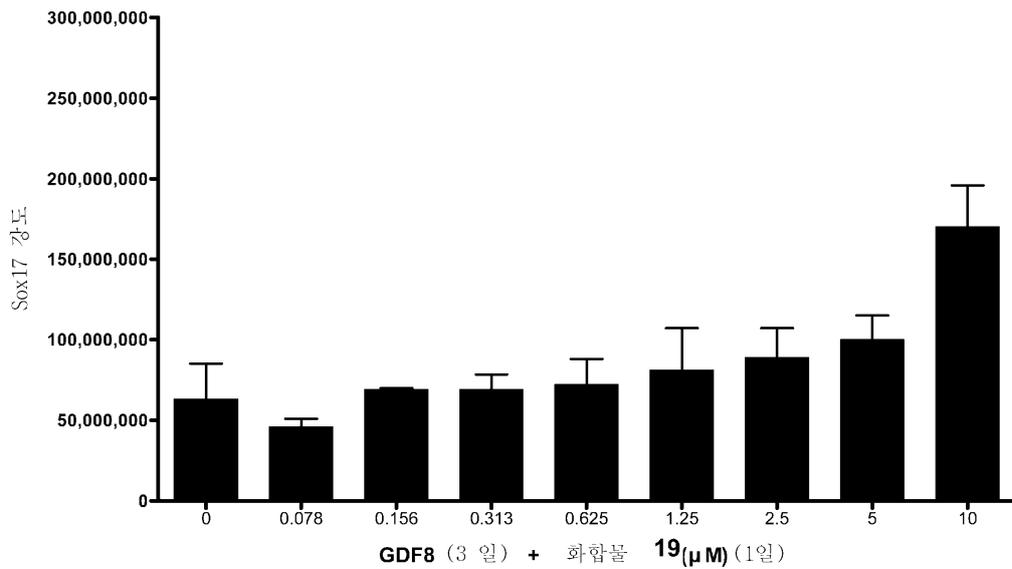
도면13a



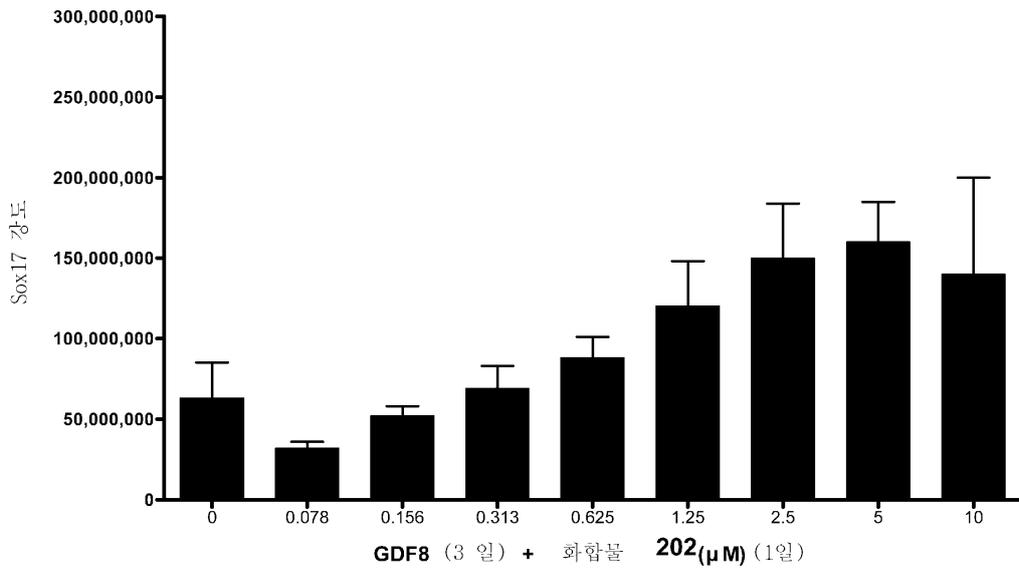
도면13b



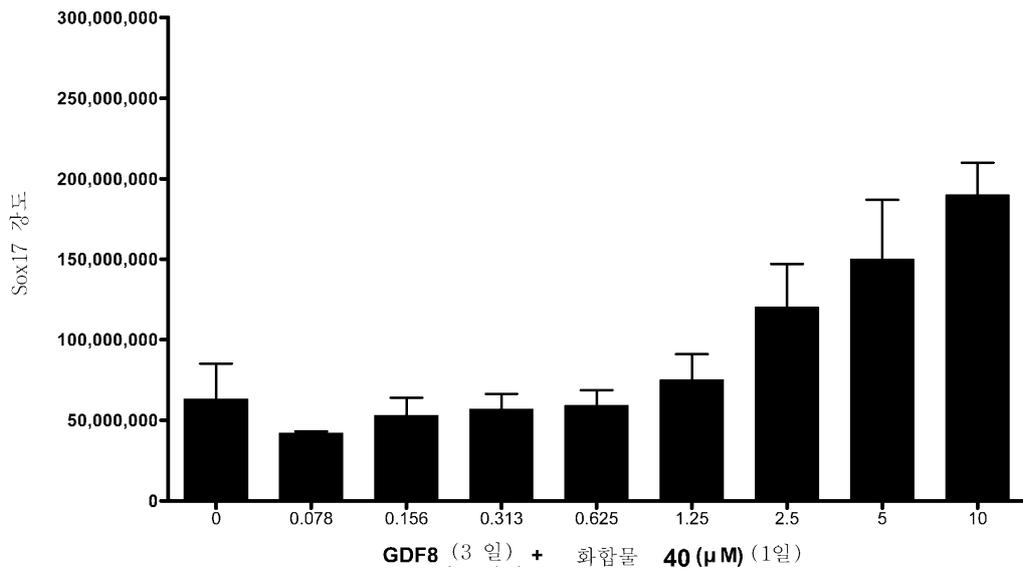
도면13c



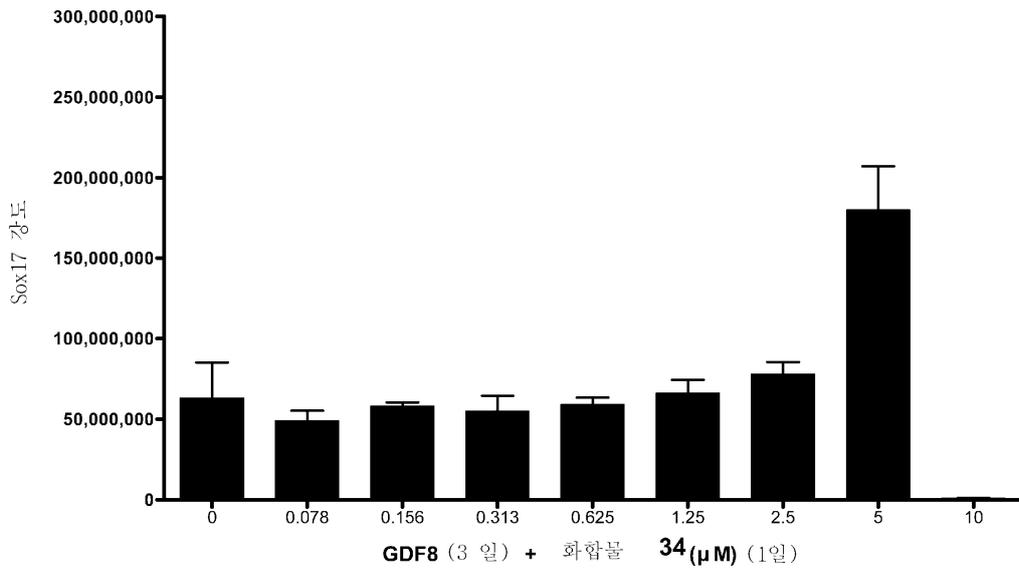
도면13d



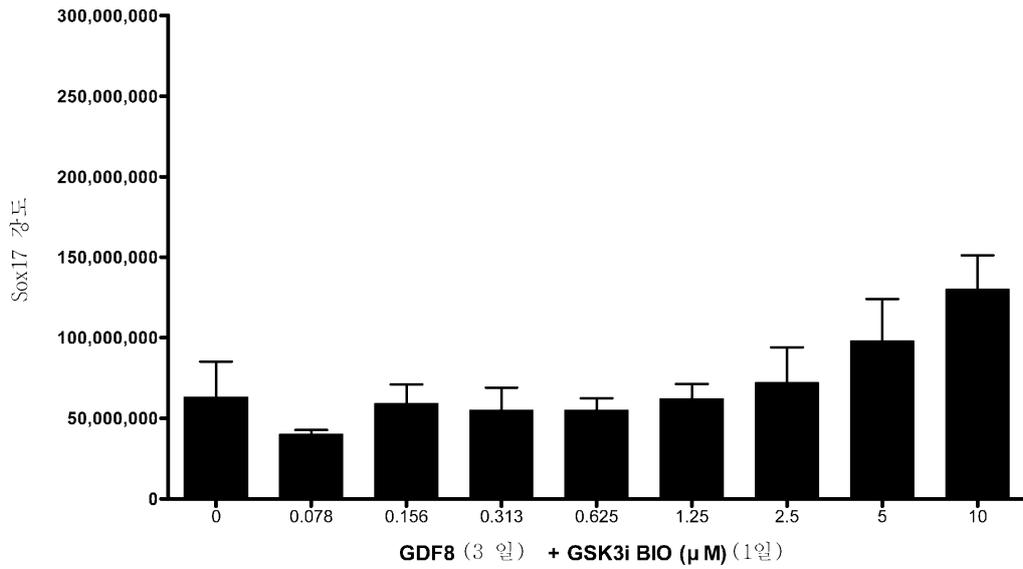
도면13e



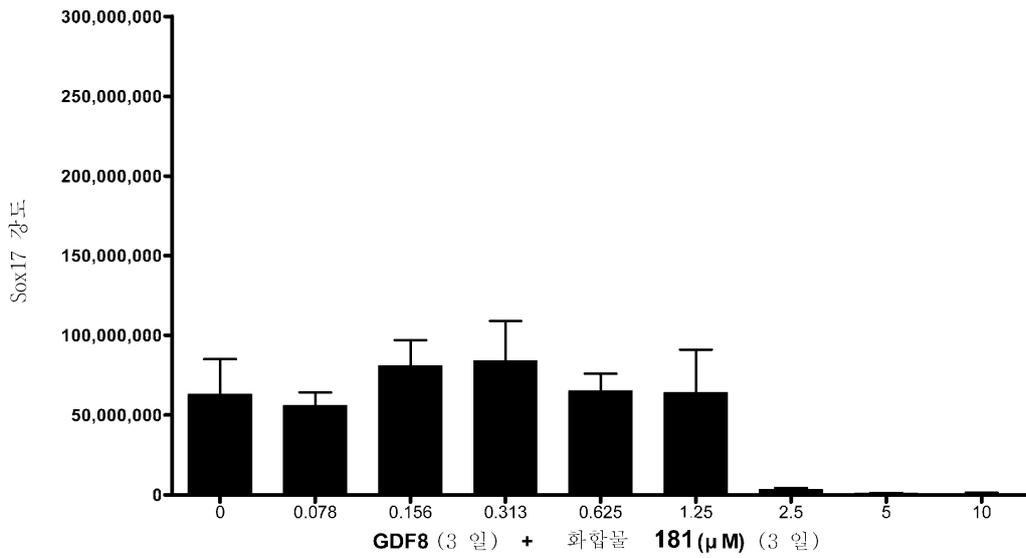
도면13f



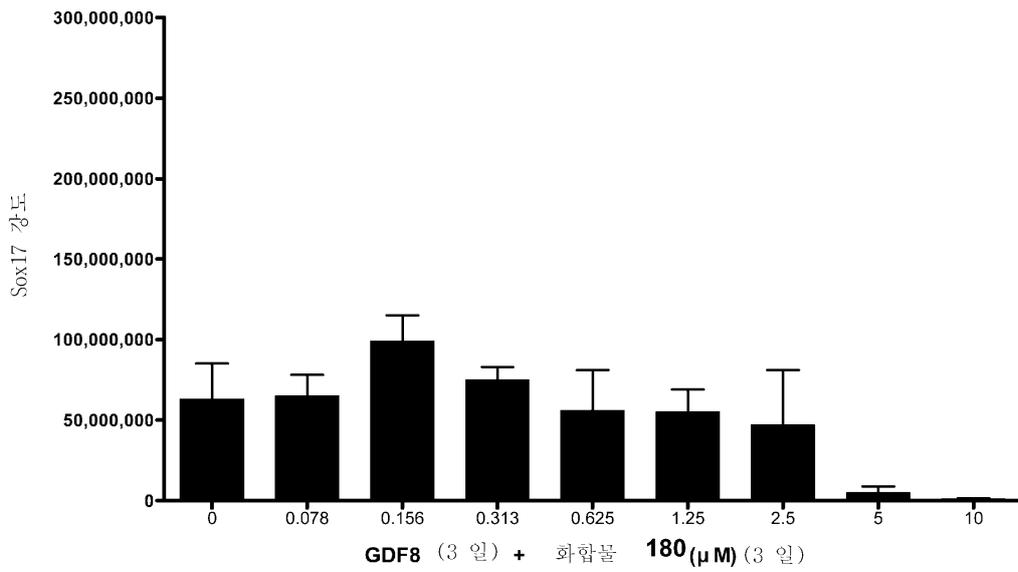
도면13g



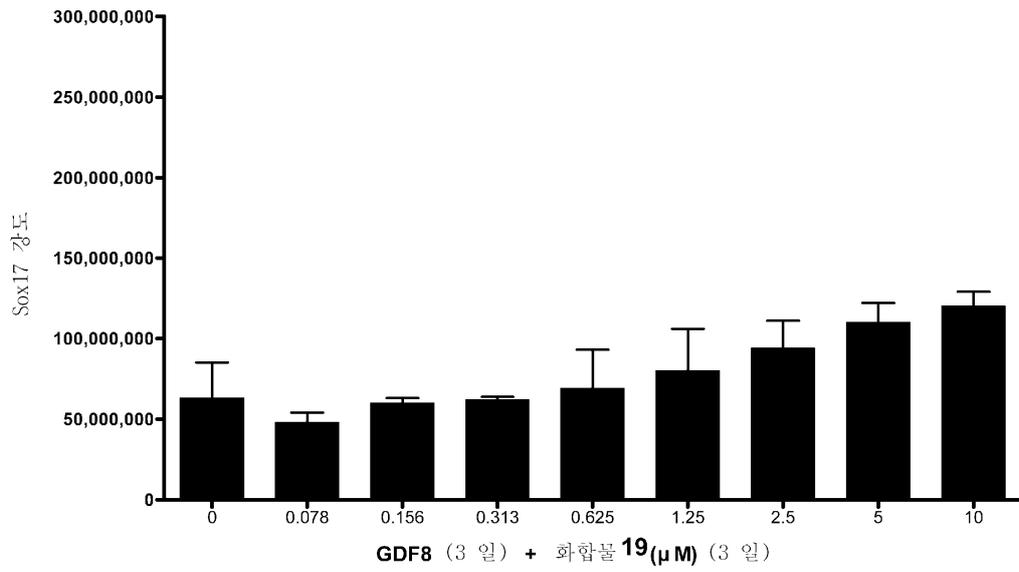
도면14a



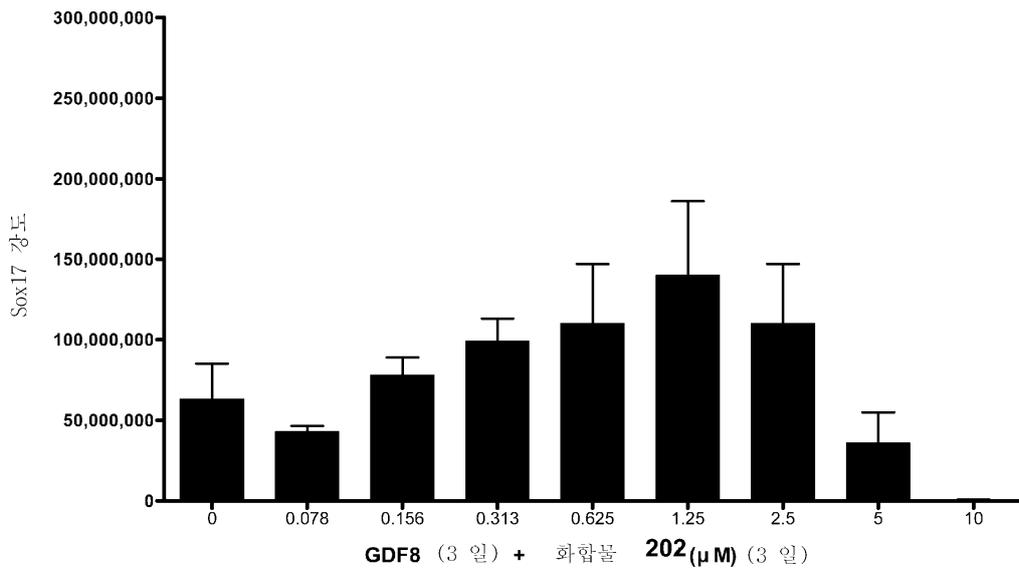
도면14b



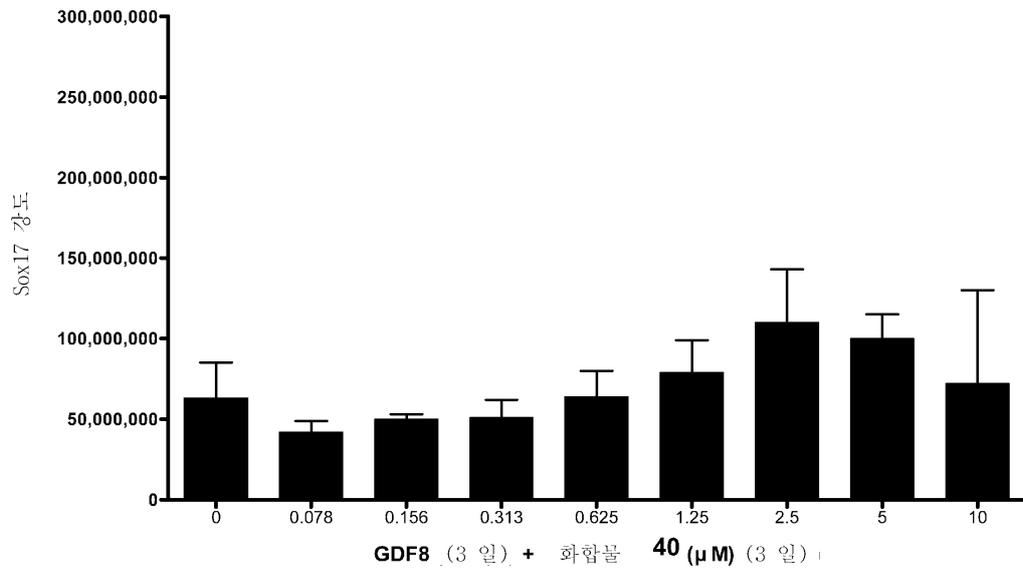
도면14c



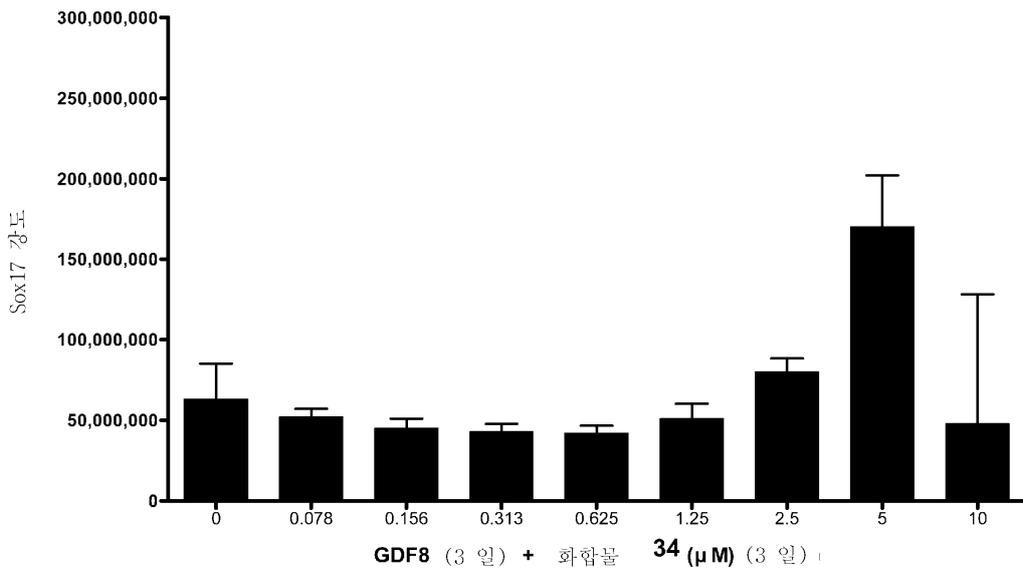
도면14d



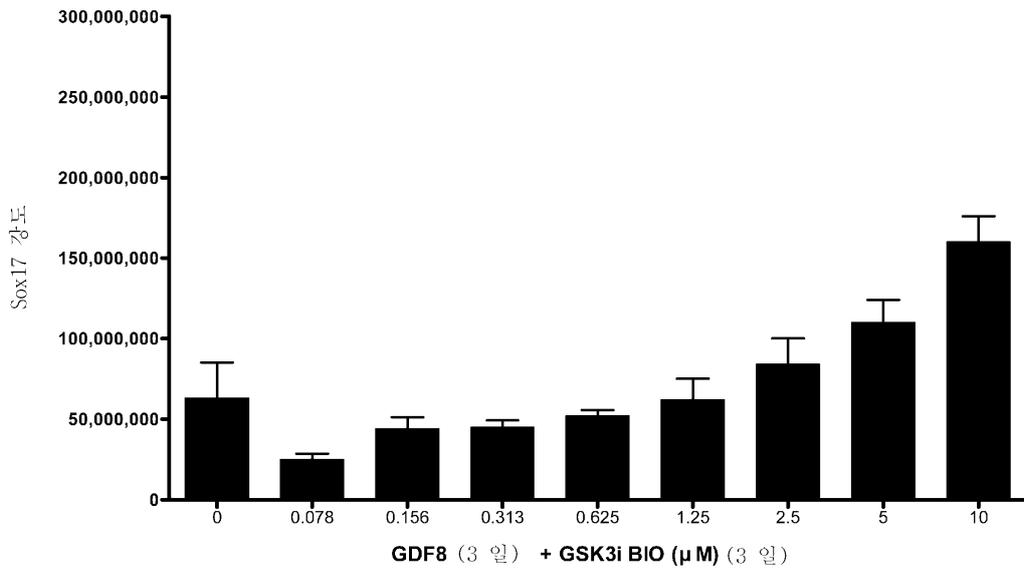
도면14e



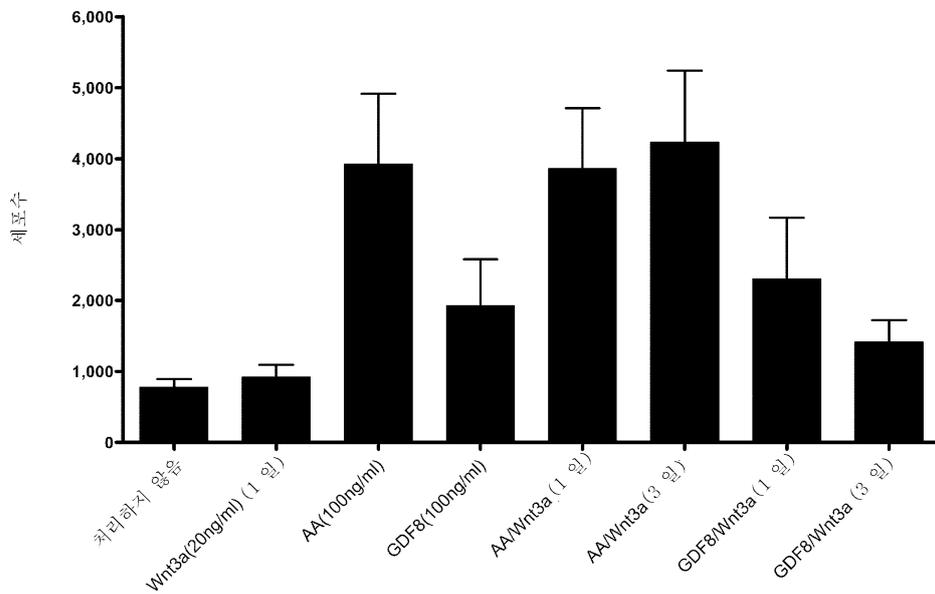
도면14f



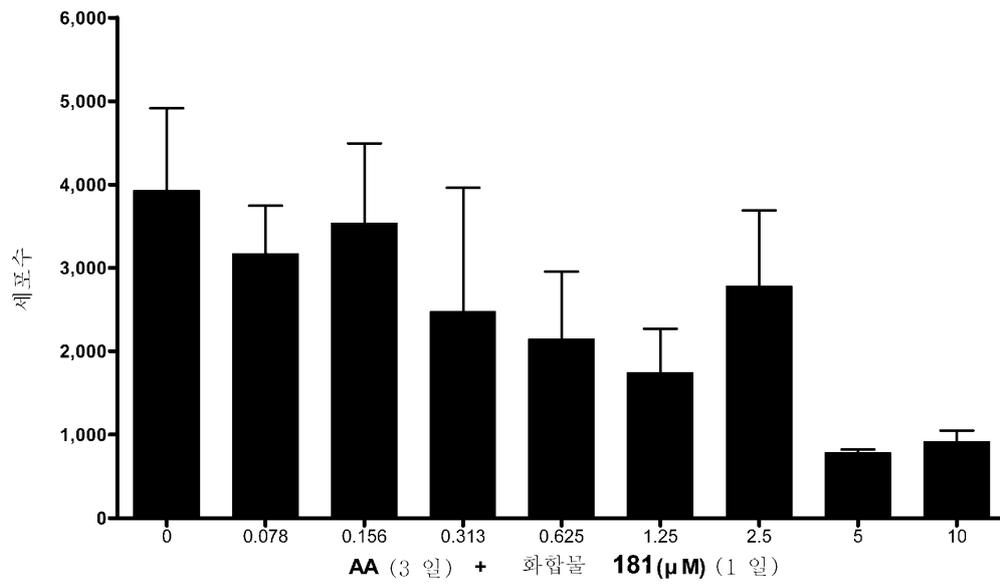
도면14g



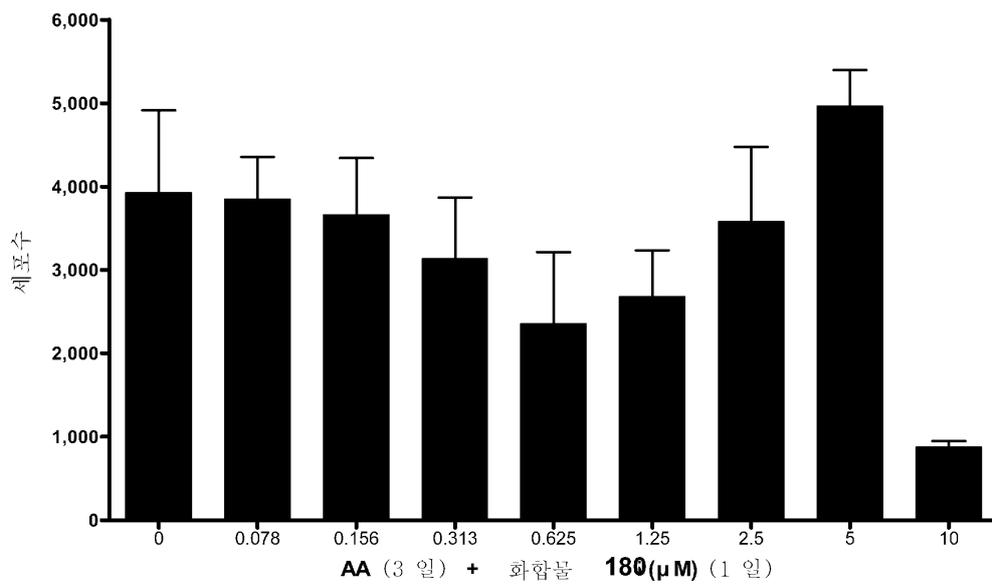
도면15



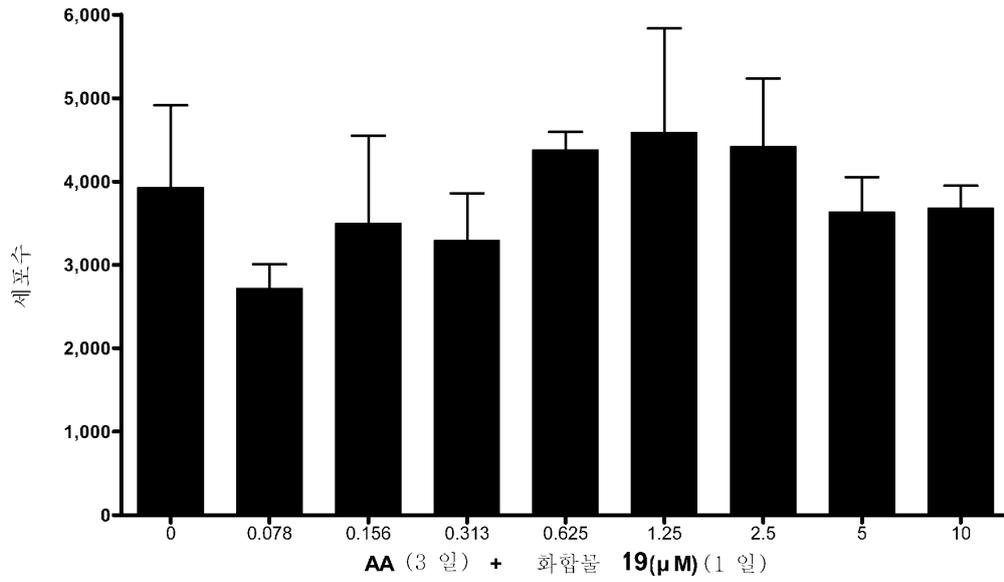
도면16a



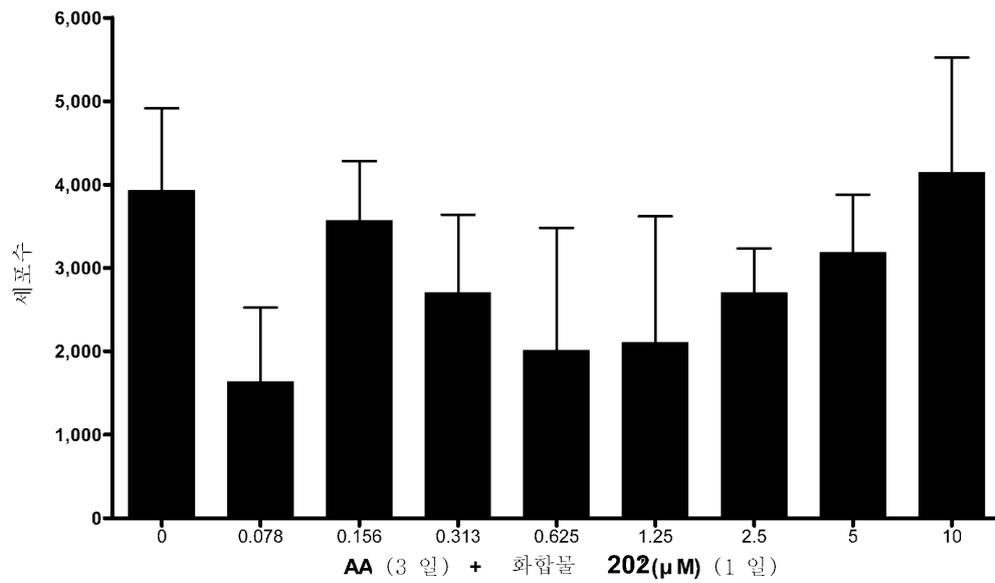
도면16b



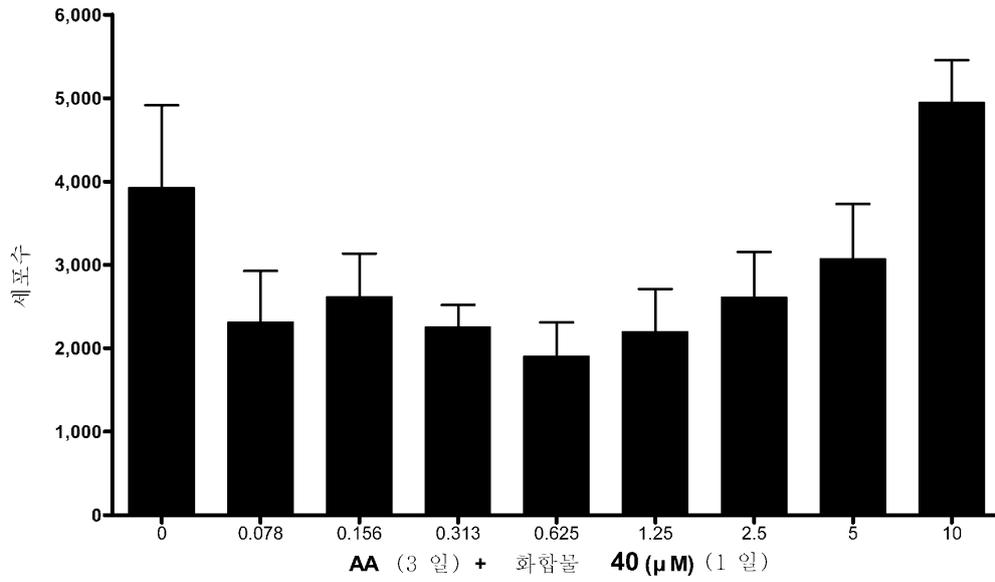
도면16c



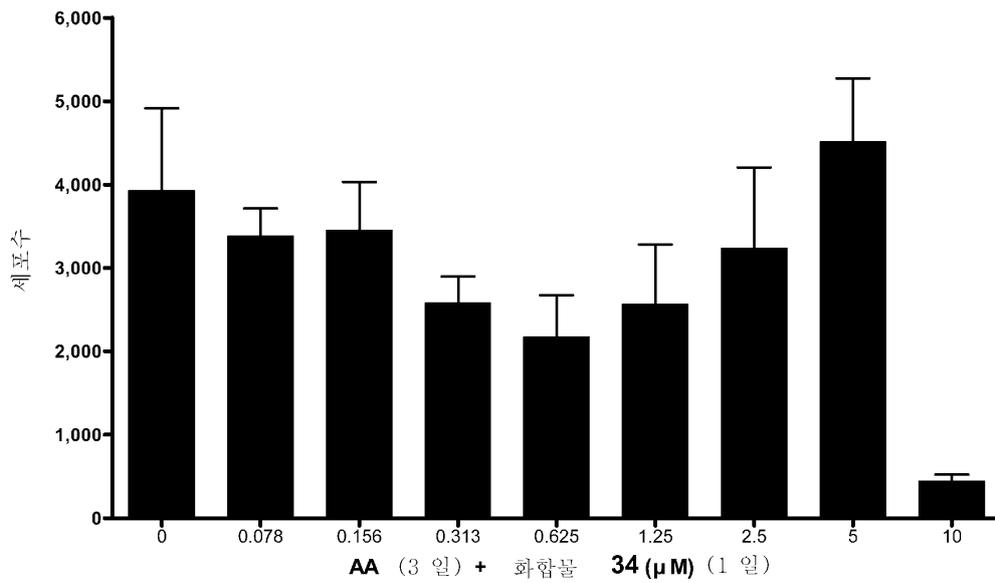
도면16d



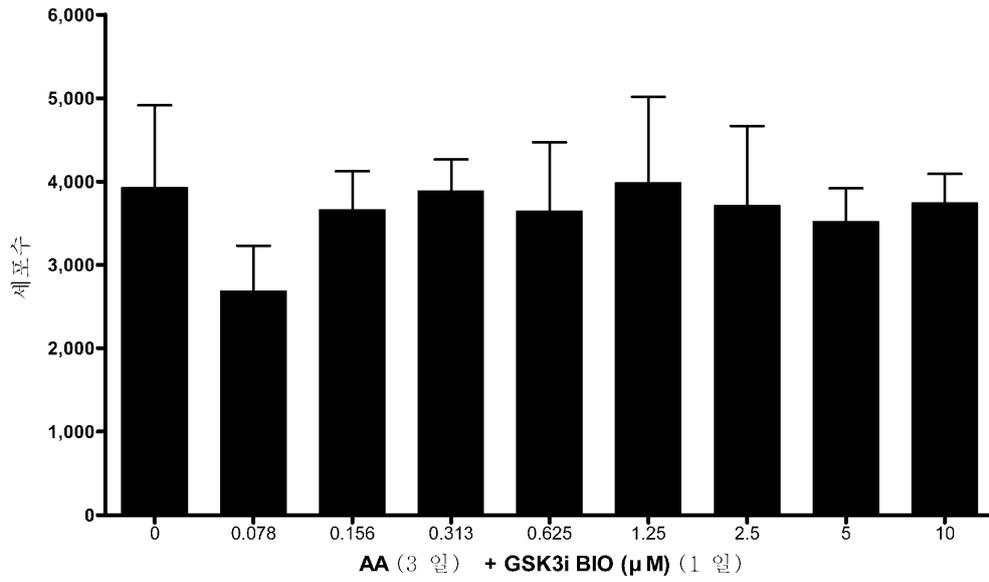
도면16e



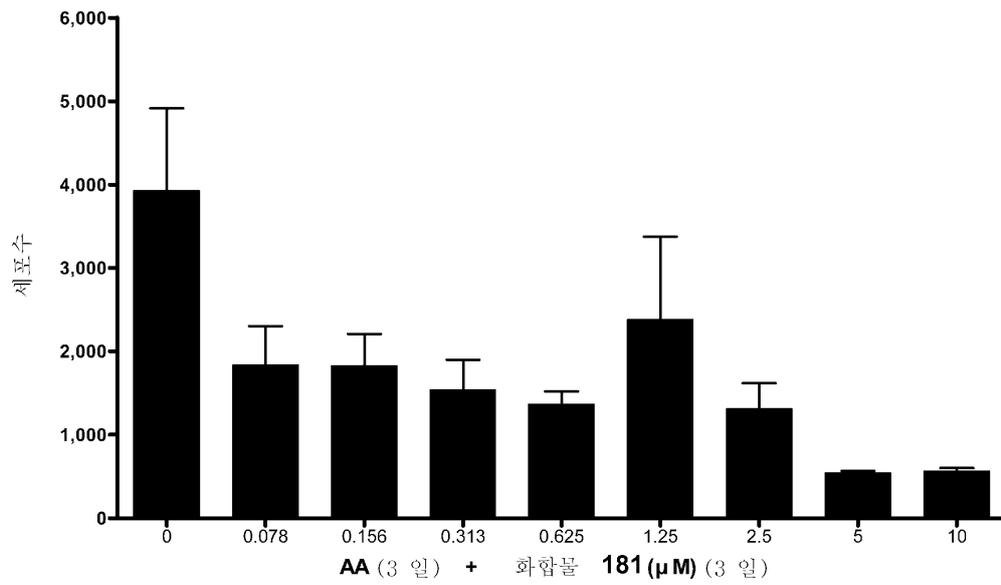
도면16f



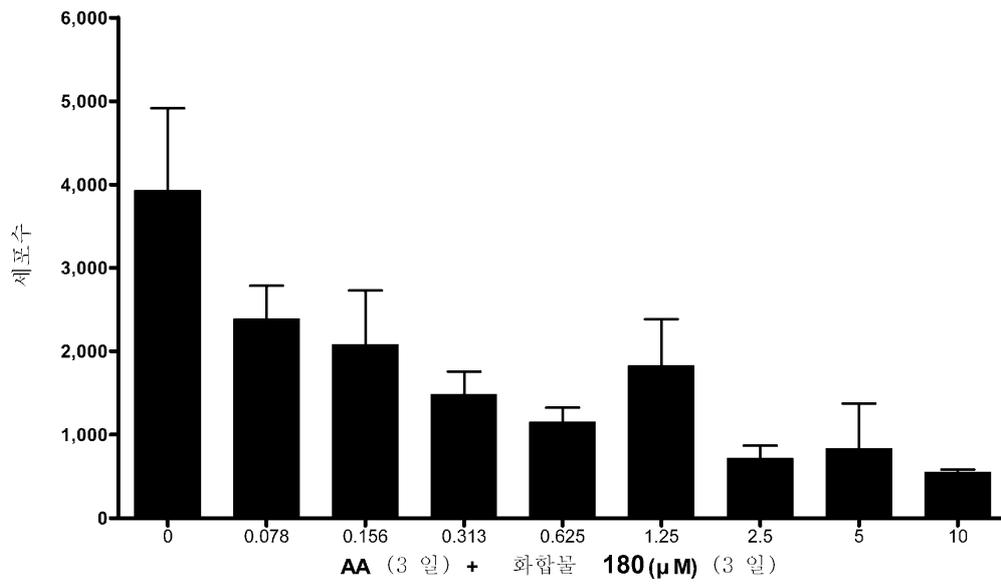
도면16g



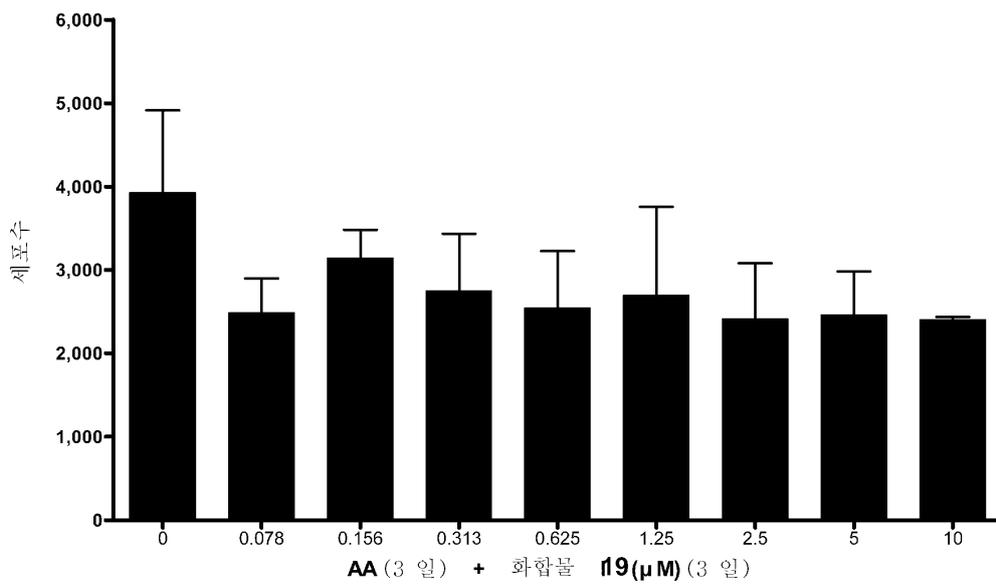
도면17a



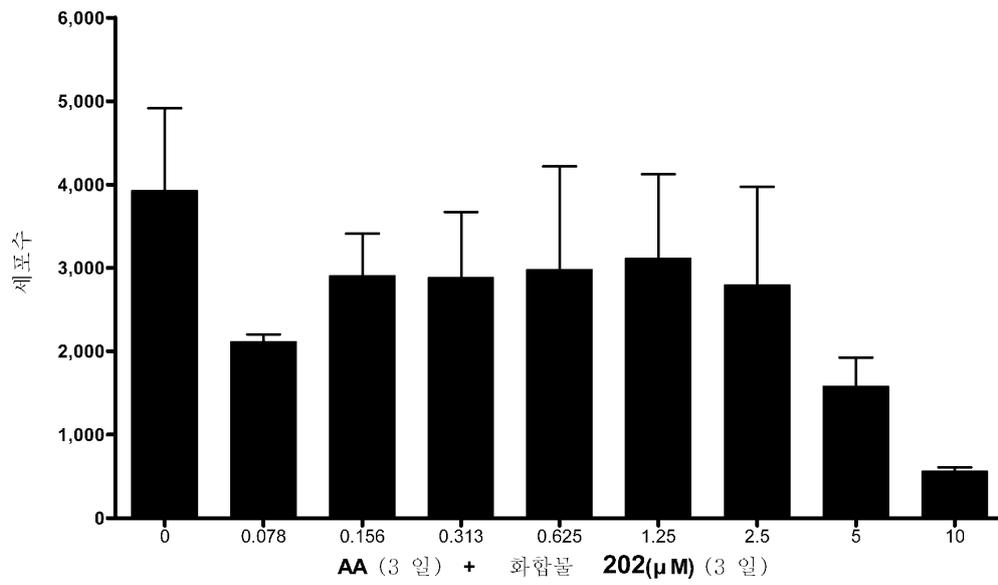
도면17b



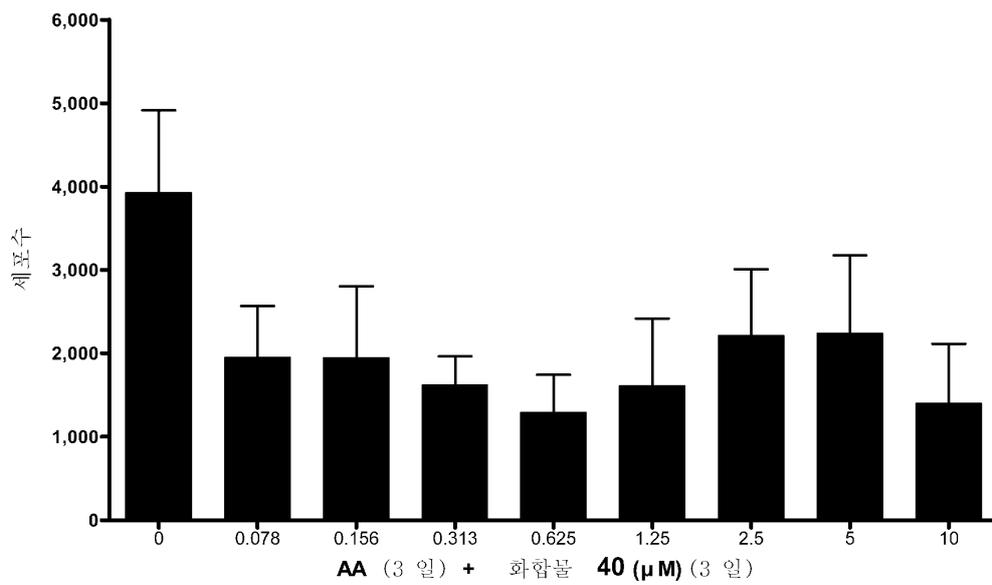
도면17c



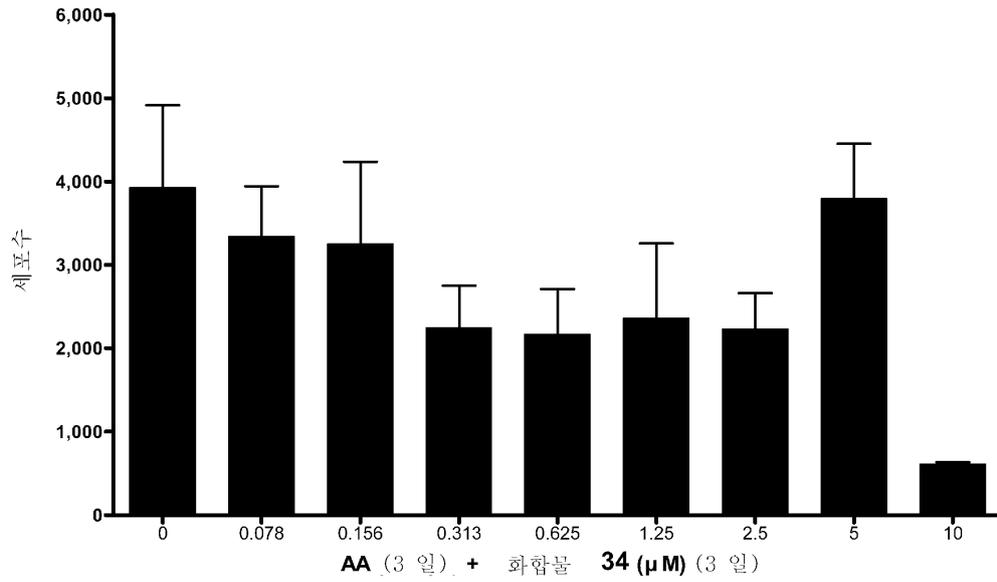
도면17d



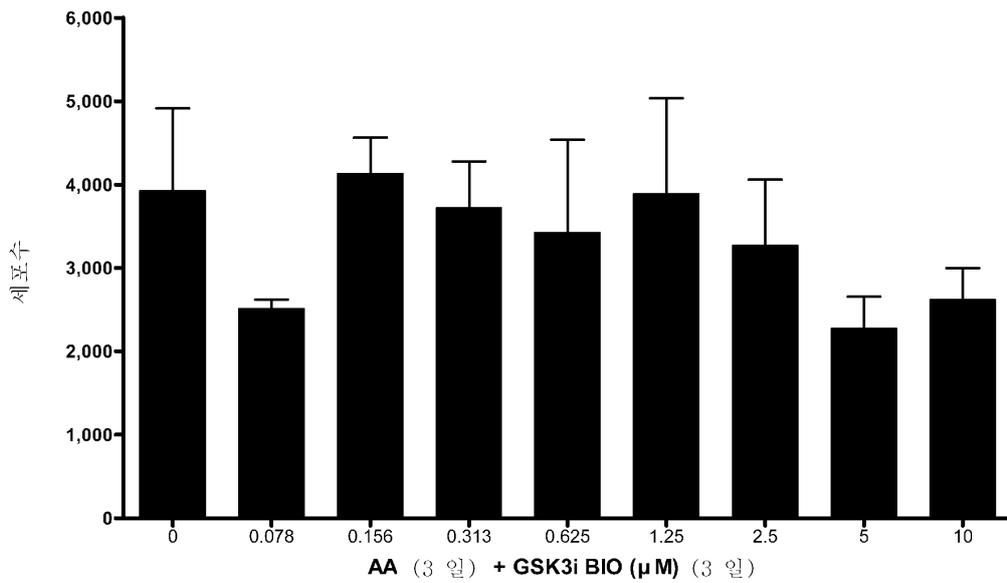
도면17e



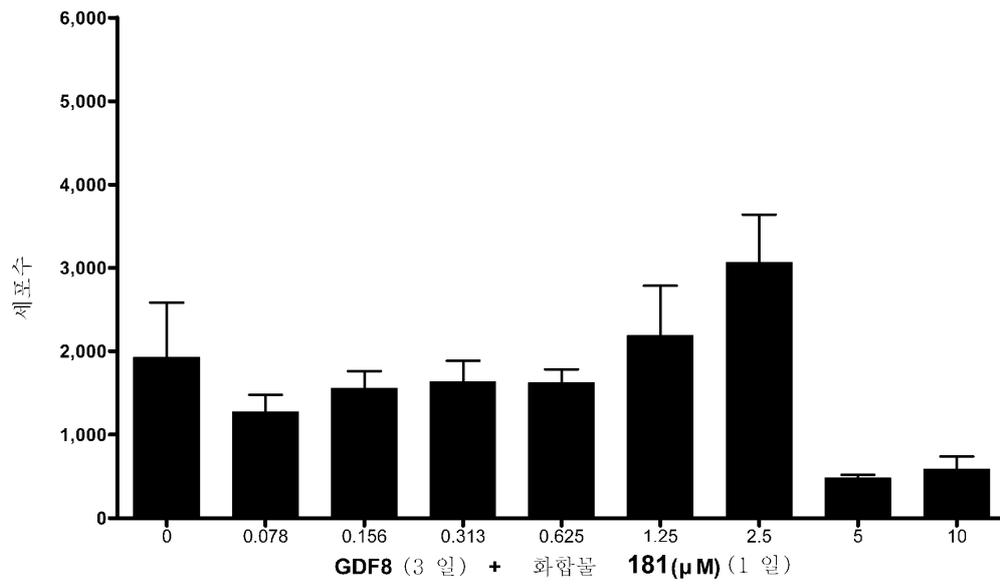
도면17f



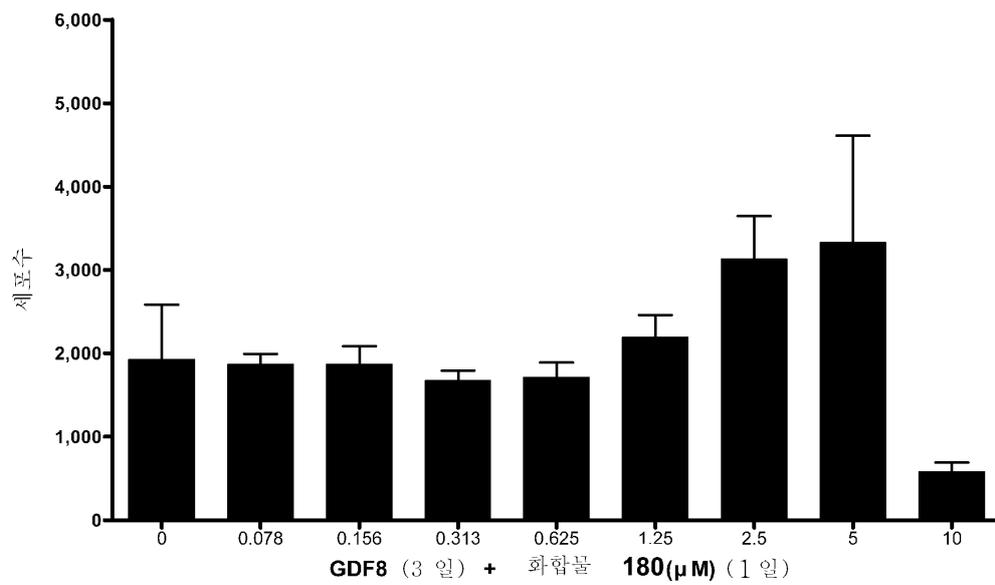
도면17g



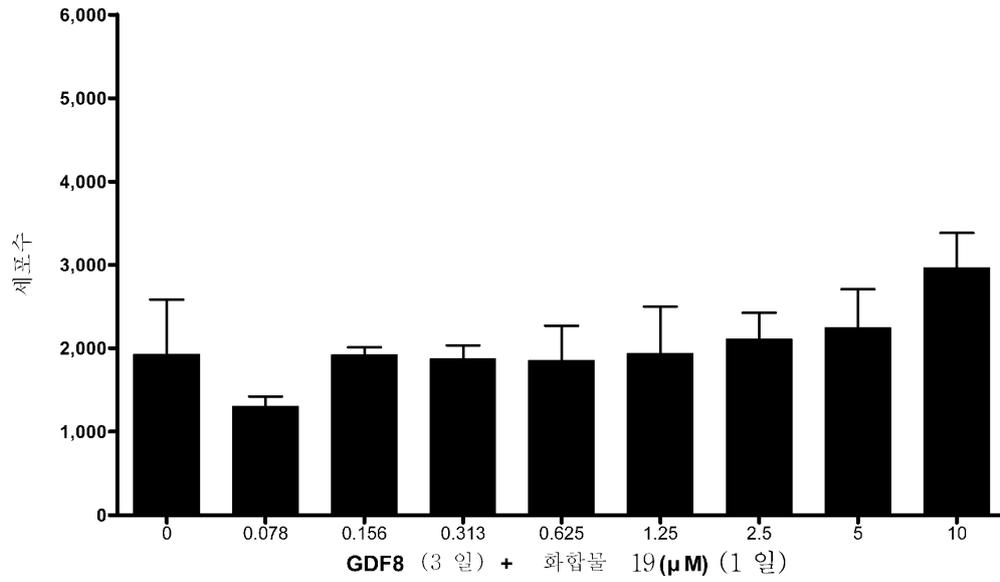
도면18a



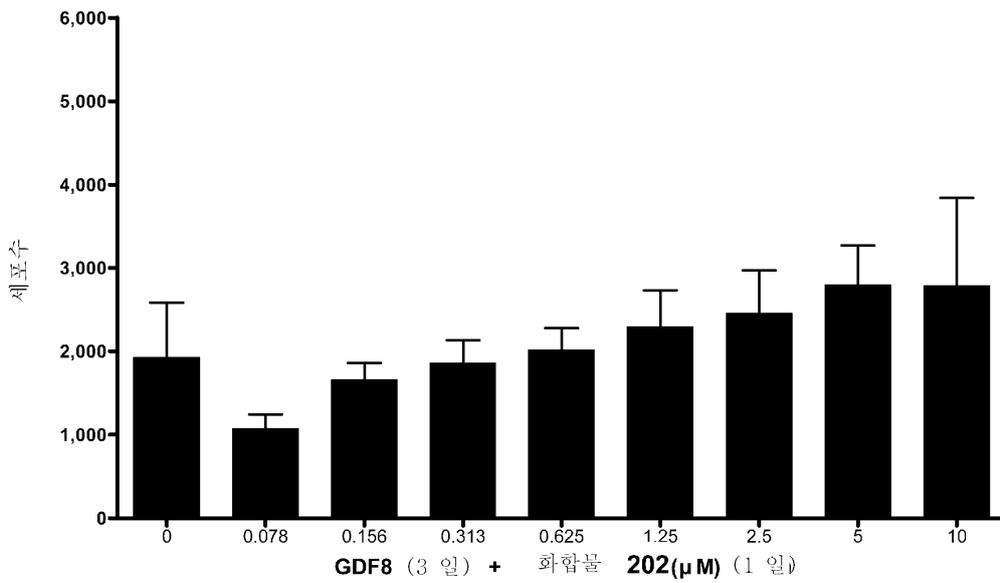
도면18b



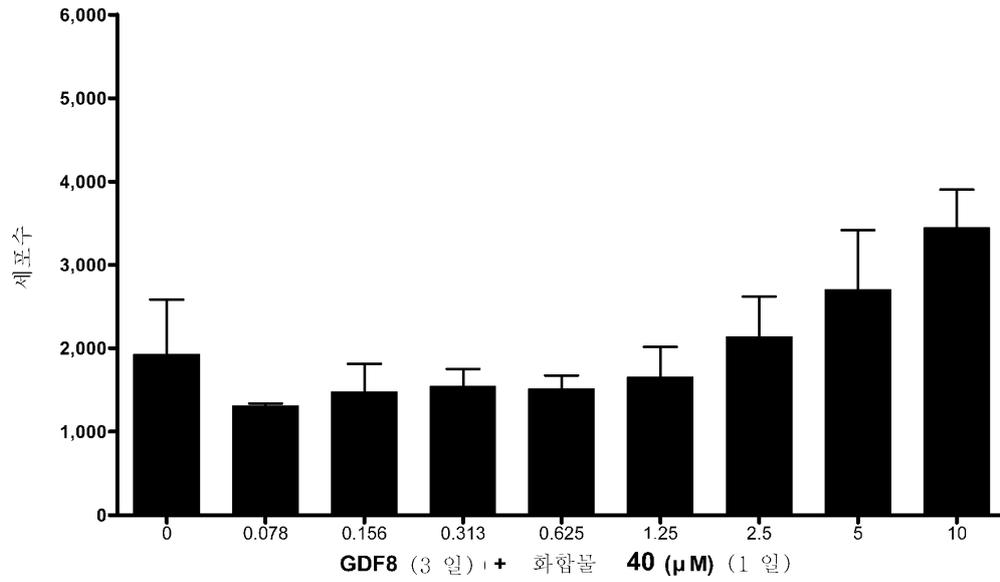
도면18c



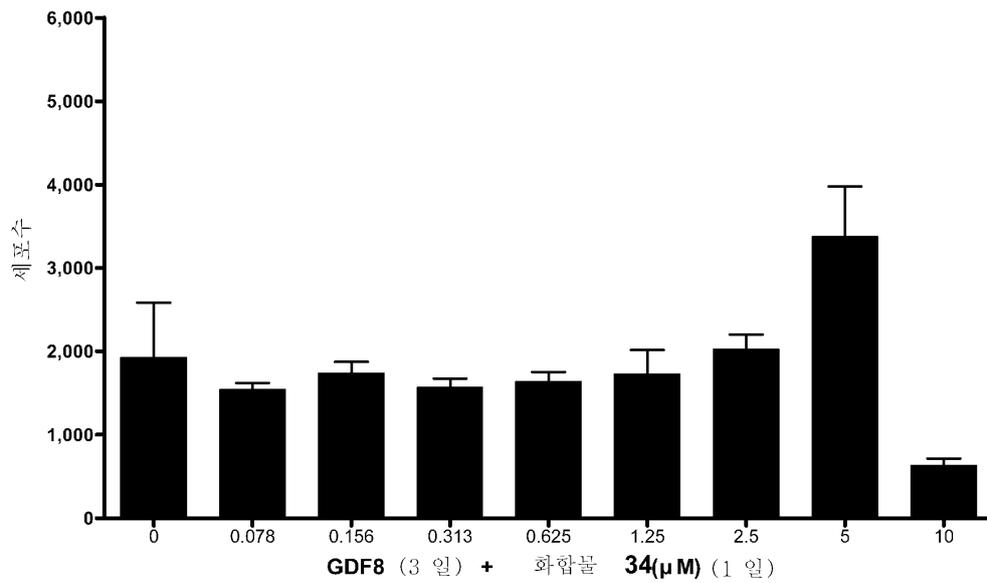
도면18d



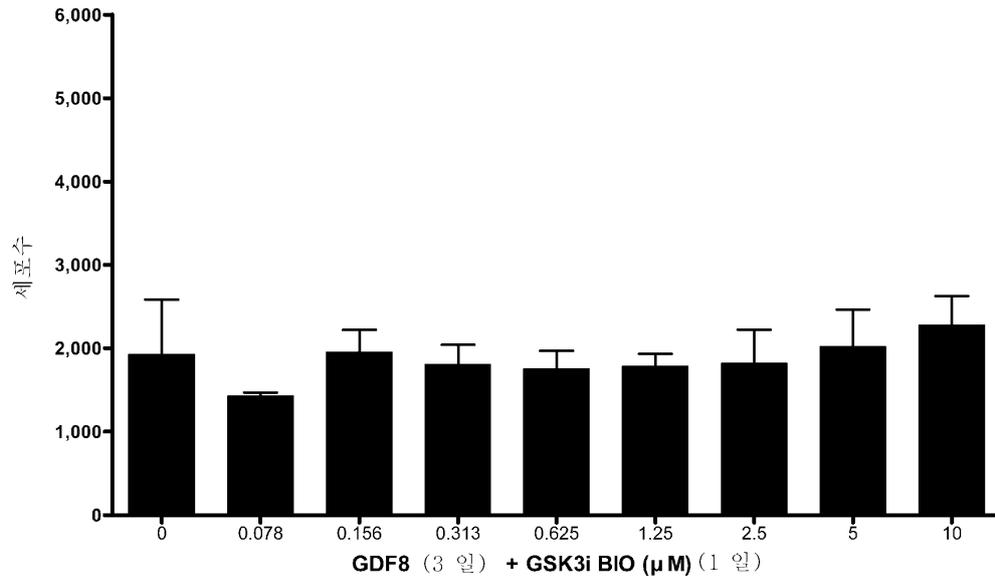
도면18e



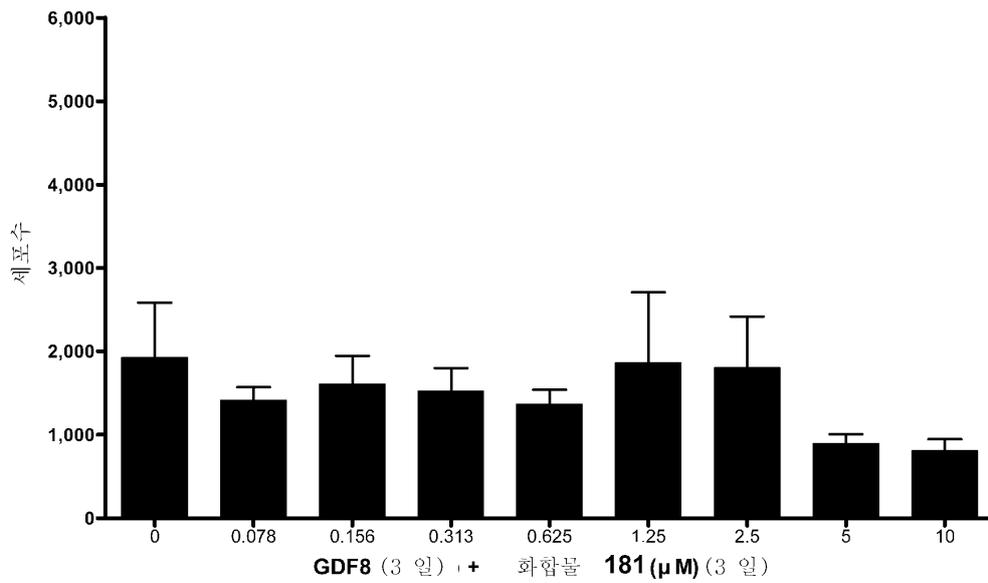
도면18f



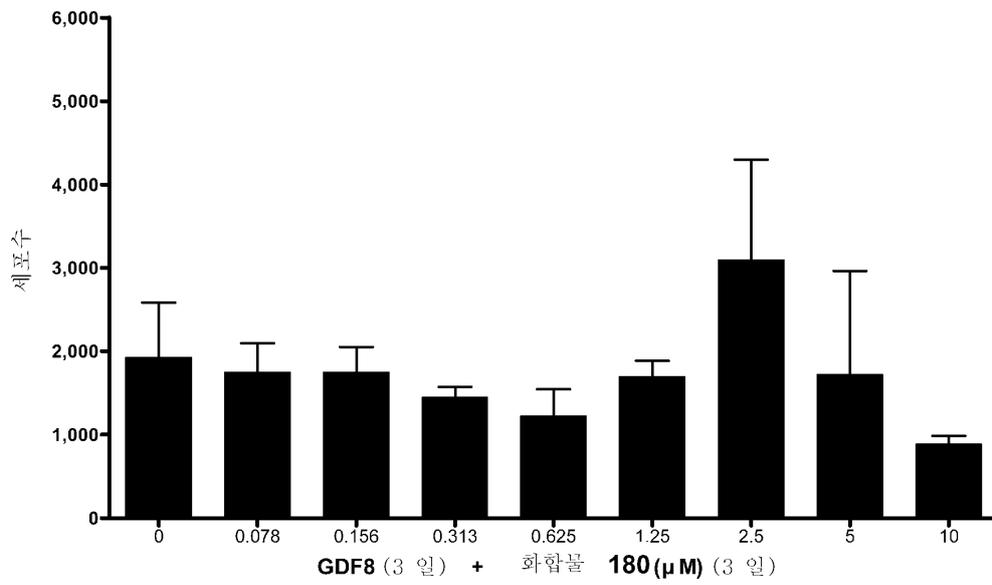
도면18g



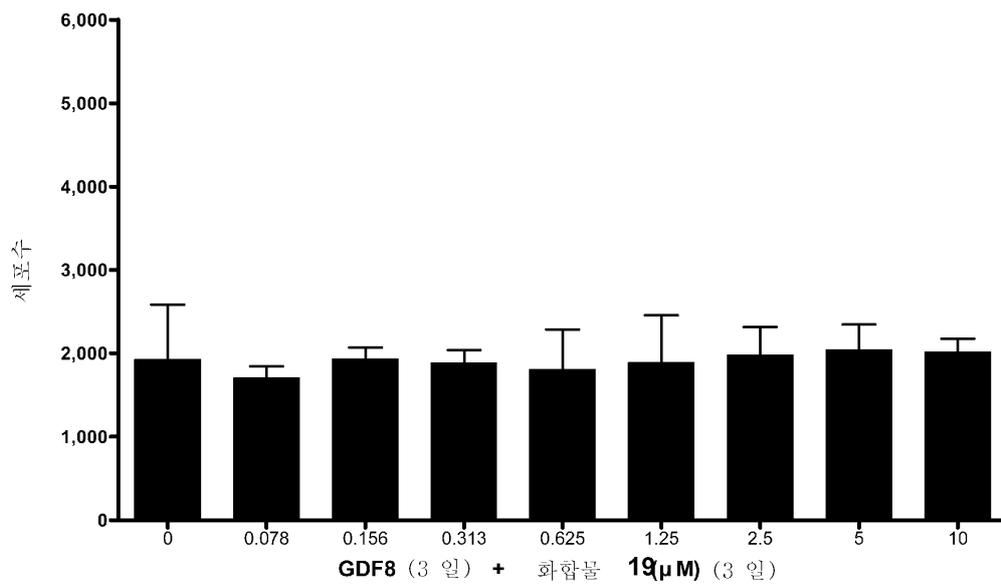
도면19a



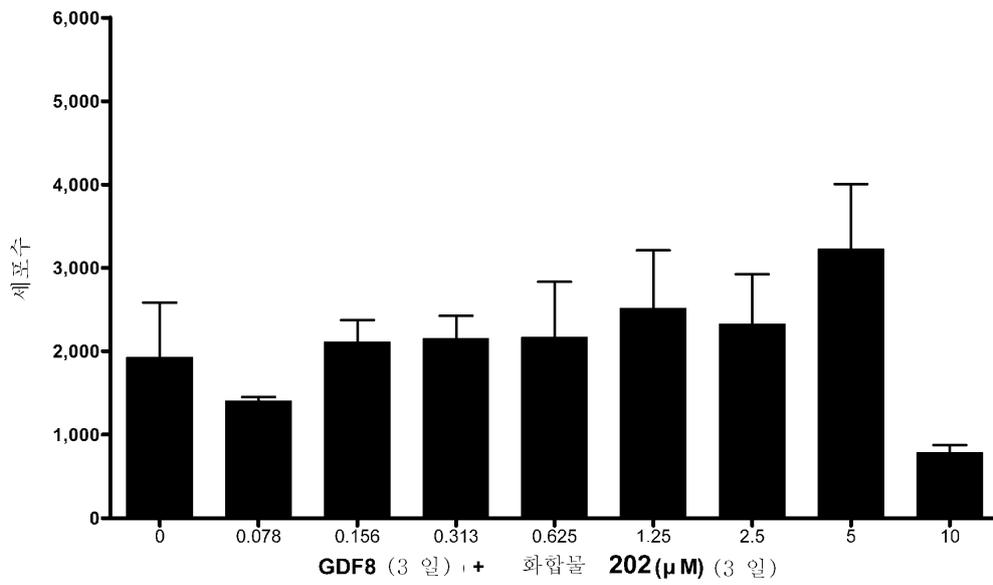
도면19b



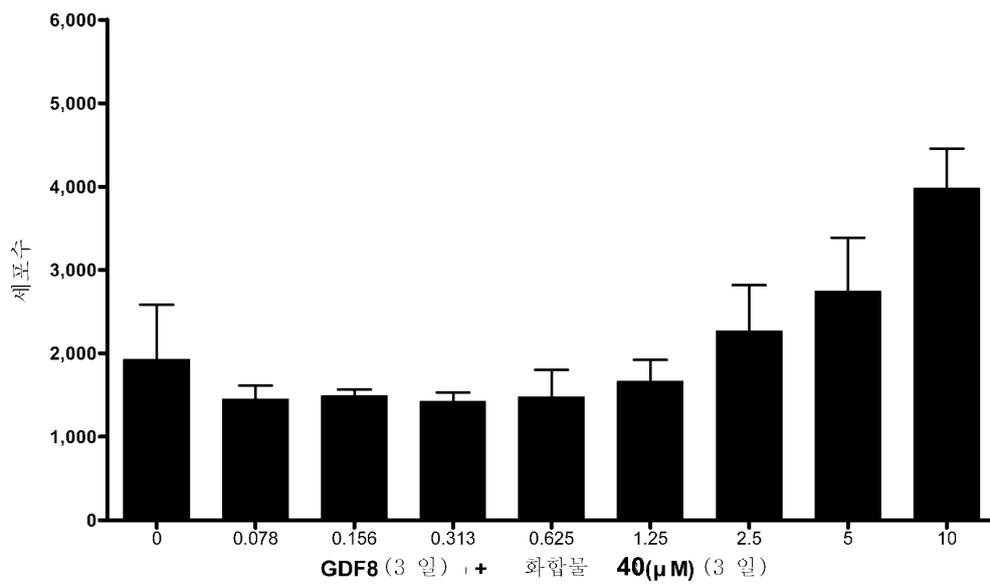
도면19c



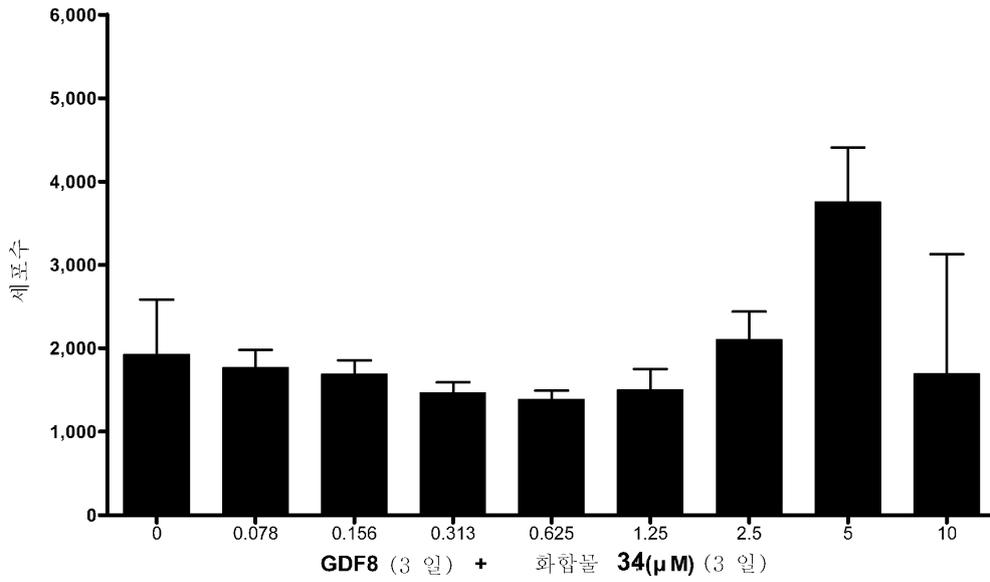
도면19d



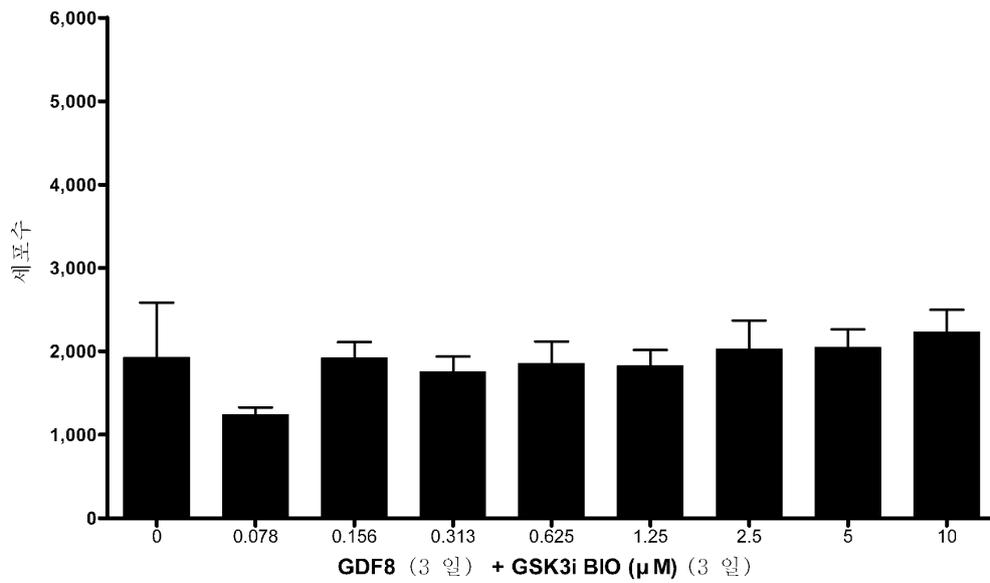
도면19e



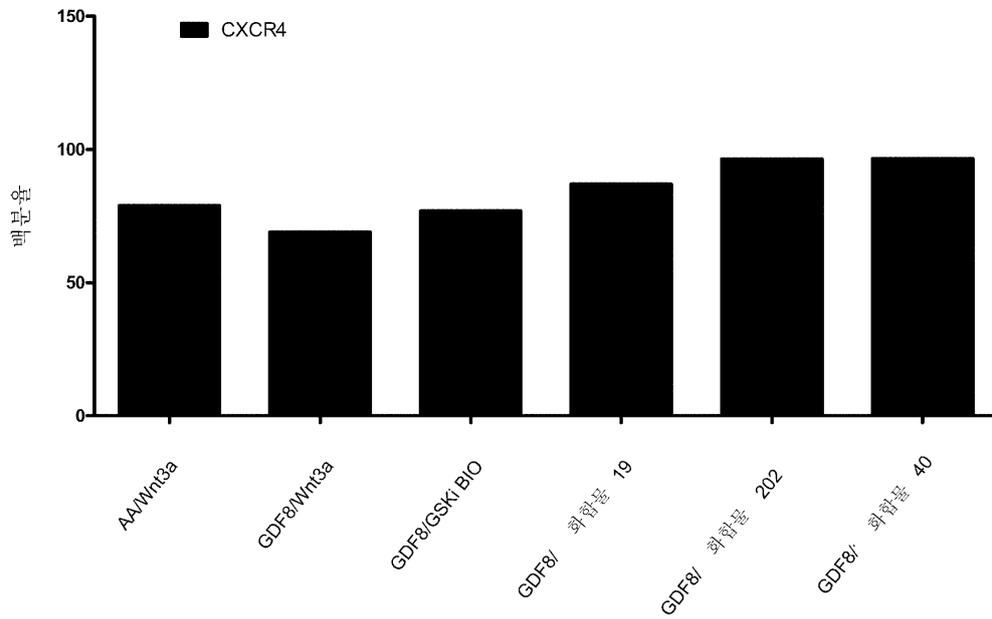
도면19f



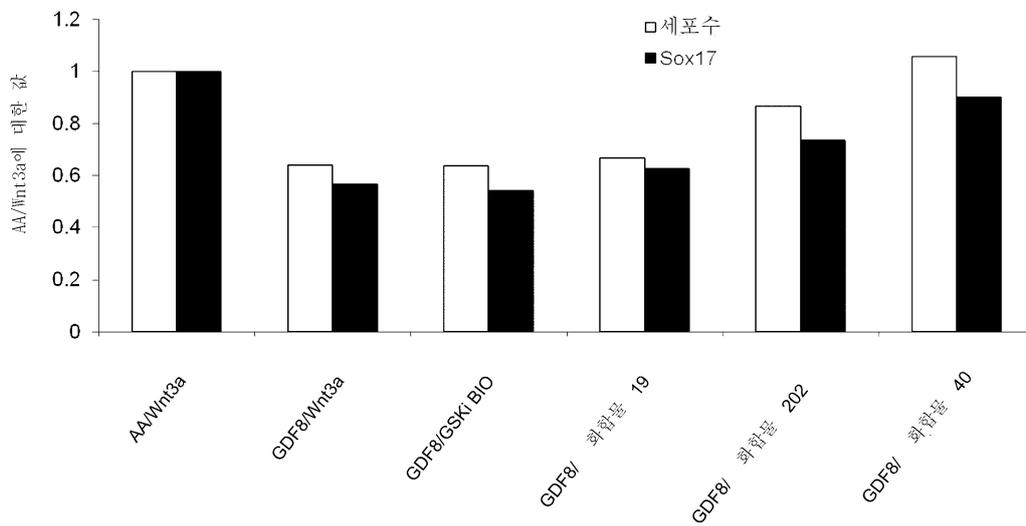
도면19g



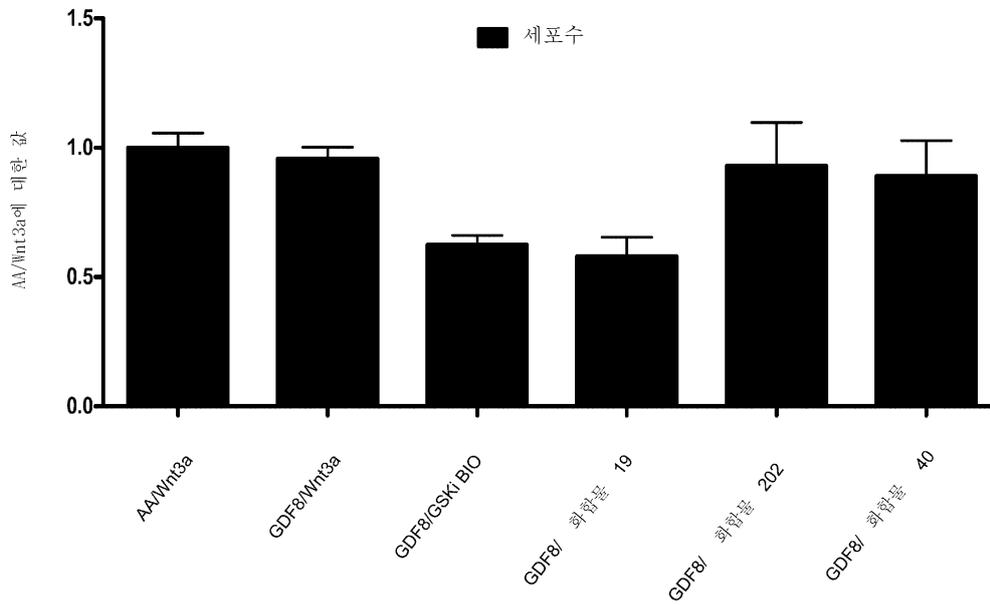
도면20a



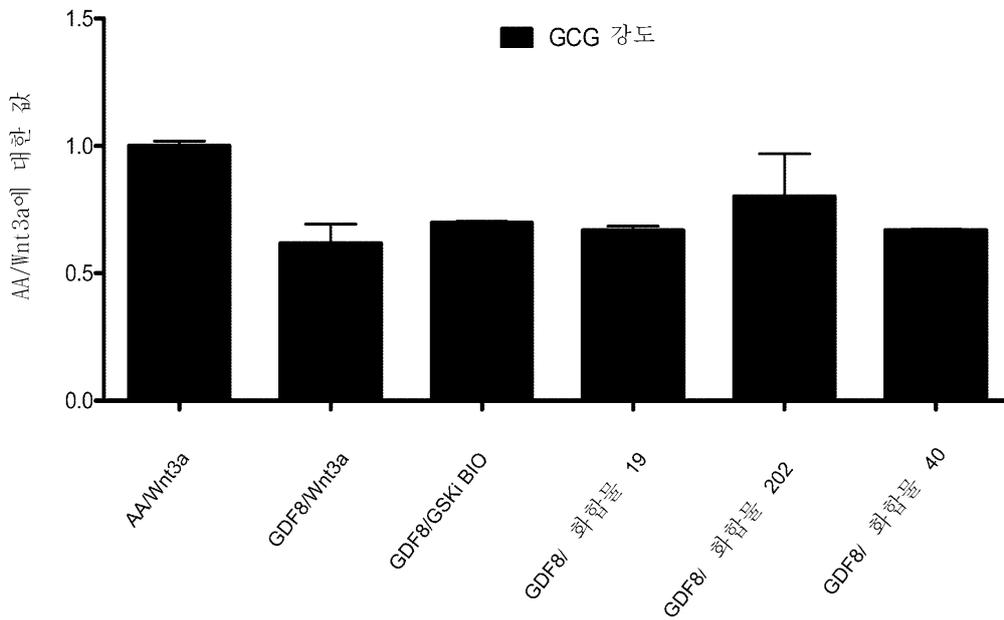
도면20b



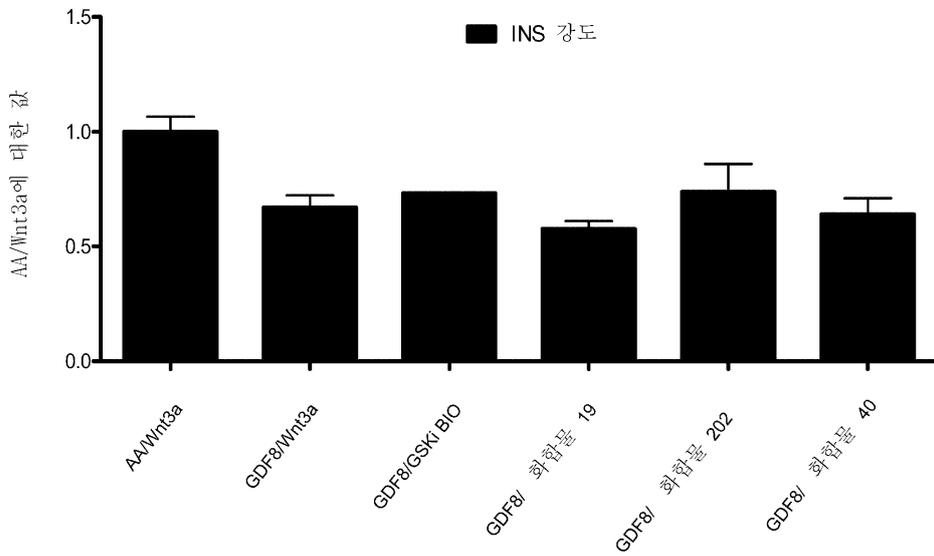
도면20c



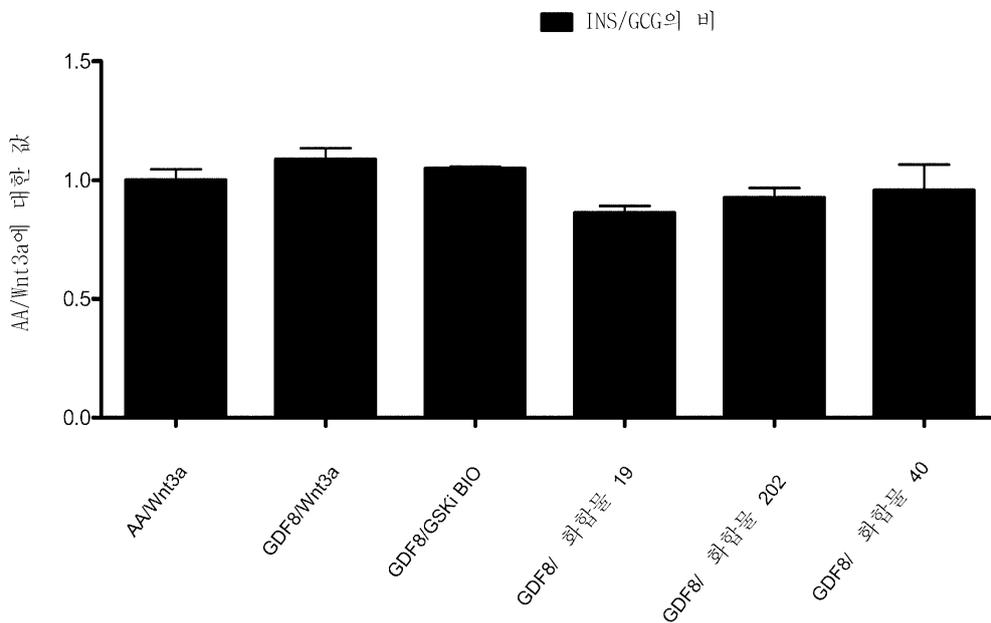
도면20d



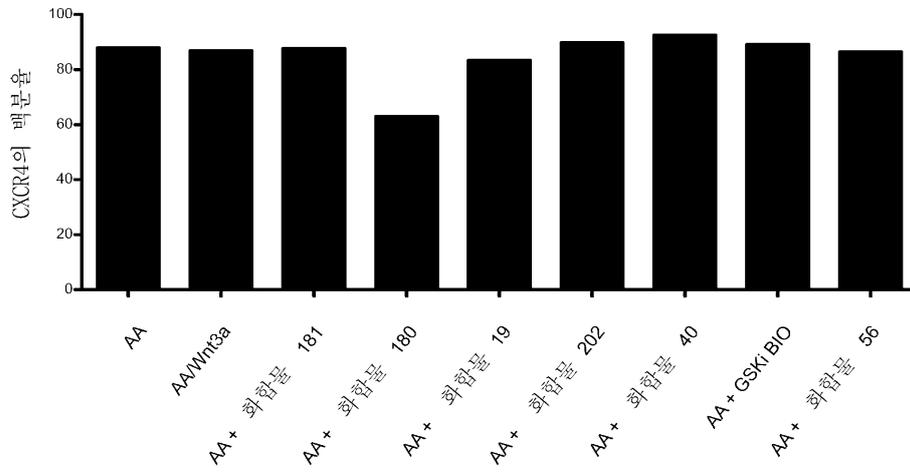
도면20e



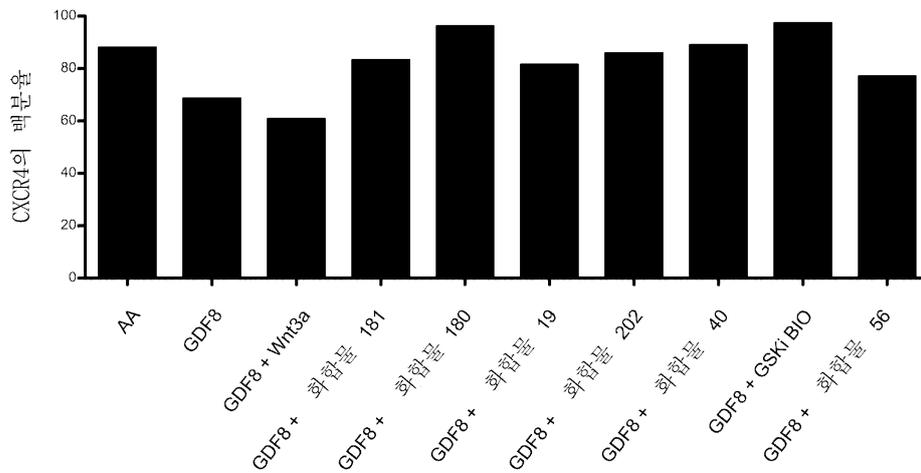
도면20f



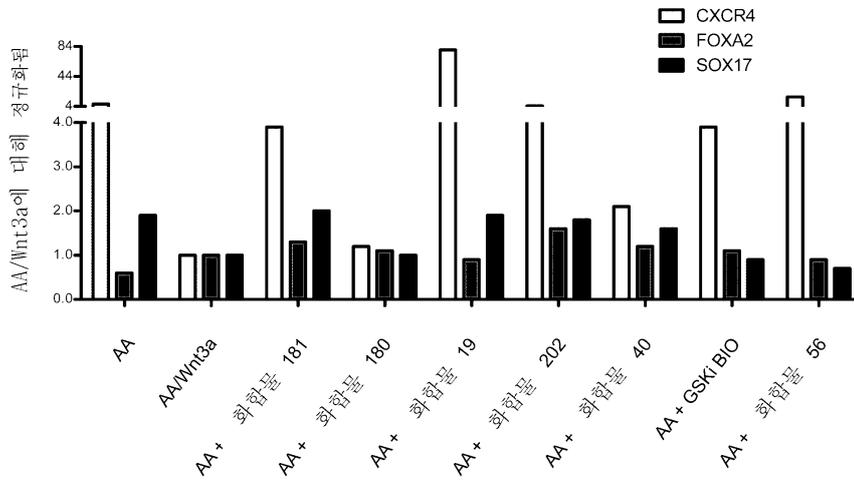
도면21a



도면21b

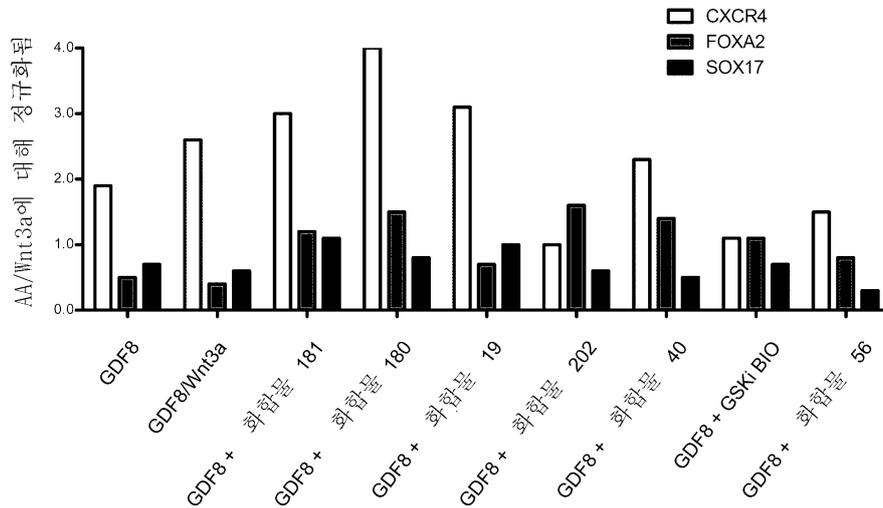


도면21c



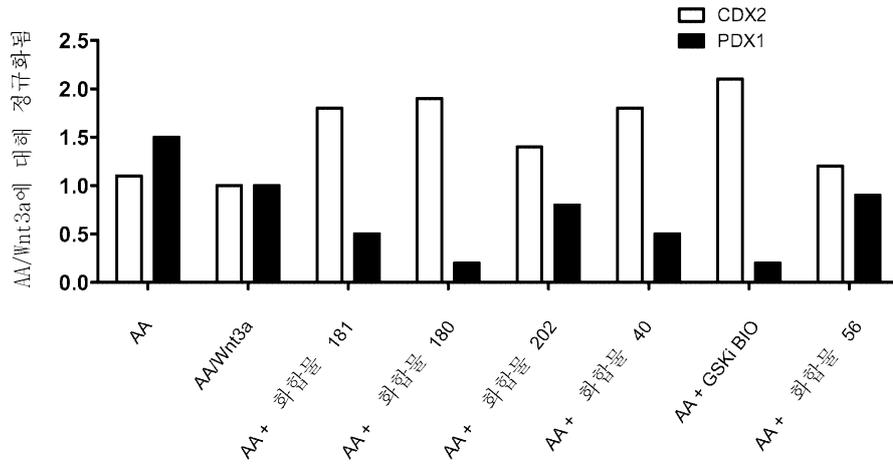
화합물\CT	GAPDH	CXCR4	FOXA2	SOX17
없음	19.4	20.4	25.1	21.6
Wnt3a	18.2	22.0	22.9	21.2
화합물 181	20.1	22.0	25.6	22.2
화합물 180	18.4	22.0	24.0	21.4
화합물 19	20.1	17.7	25.6	22.3
화합물 202	20.3	22.0	25.7	22.6
화합물 40	19.9	22.7	25.5	22.3
GSK3i IX(bio)	20.2	22.2	25.8	23.4
화합물 56	19.8	19.6	24.4	23.3

도면21d



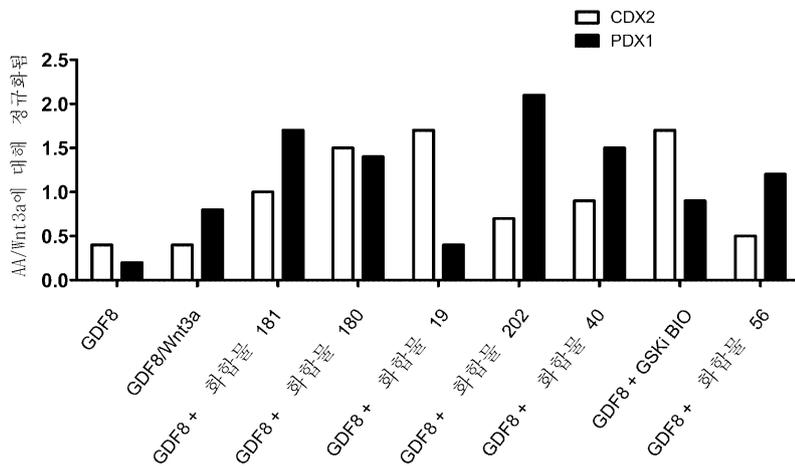
화합물\CT	GAPDH	CXCR4	FOXA2	SOX17
없음	21.6	24.6	25.9	25.2
Wnt3a	21.2	23.6	25.7	25.0
화합물 181	20.7	23.0	25.2	23.7
화합물 180	20.9	22.7	25.0	24.2
화합물 19	19.6	21.8	24.2	22.6
화합물 202	18.5	22.4	23.6	22.3
화합물 40	19.7	22.4	24.9	23.7
GSK3i IX(bio)	19.6	23.3	24.7	23.3
화합물 56	19.7	23.0	25.3	24.4

도면21e



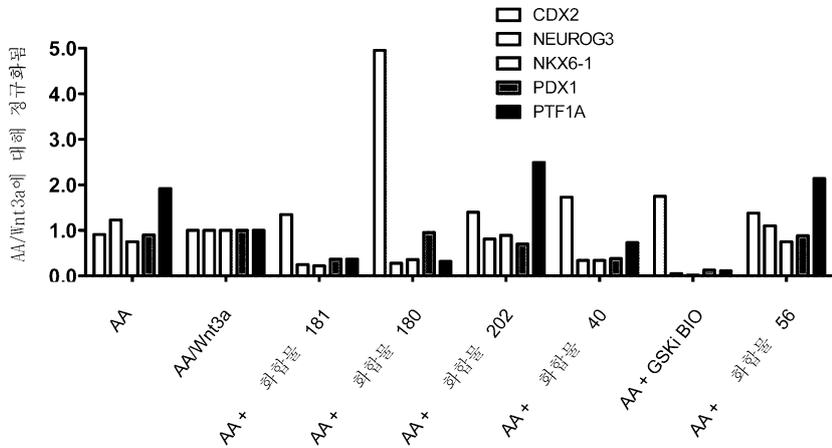
화합물 \CT	GAPDH	CDX2	PDX1
없음	18.5	22.9	23.3
Wnt3a	18.4	23.0	23.8
화합물 181	18.6	22.3	25.0
화합물 180	18.8	22.5	26.3
화합물 202	18.5	22.5	24.1
화합물 40	18.5	22.2	24.8
GSK3i (bio)	18.5	22.0	26.1
화합물 56	18.3	22.7	23.9

도면21f



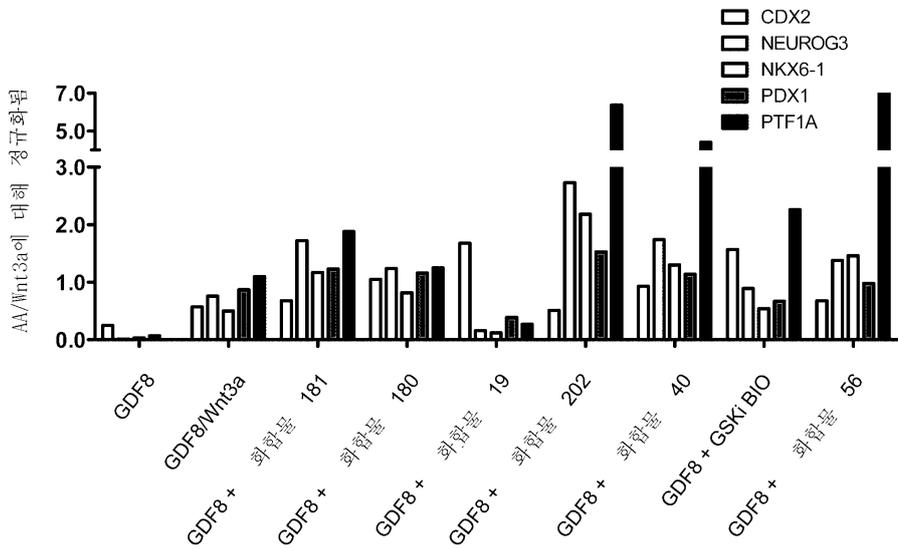
화합물 \CT	GAPDH	CDX2	PDX1
없음	18.0	23.8	25.5
Wnt3a	17.4	23.1	23.1
화합물 181	18.8	23.4	23.5
화합물 180	18.8	22.8	23.7
화합물 19	18.3	22.0	25.0
화합물 202	18.7	23.8	23.0
화합물 40	18.4	23.0	23.2
GSK3i (bio)	18.4	22.2	24.0
화합물 56	18.2	23.8	23.3

도면21g



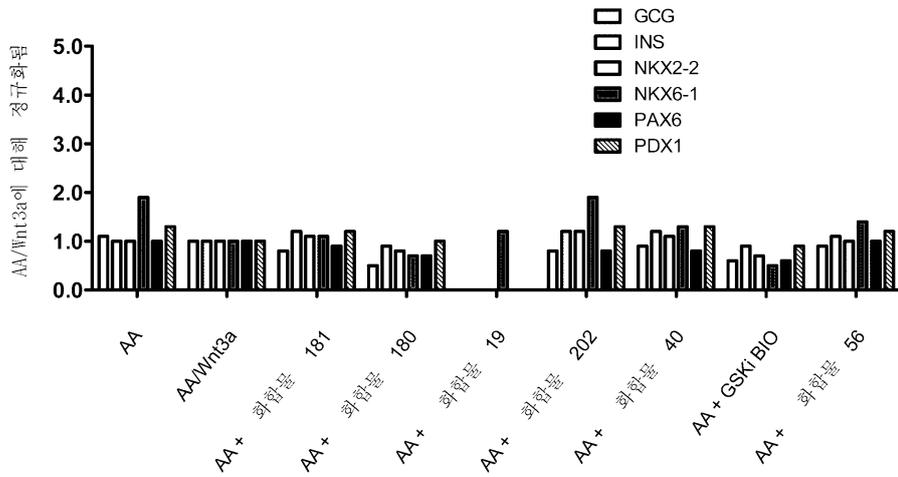
화합물\CT	GAPDH	CDX2	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
없음	19.0	23.7	23.3	27.4	23.7	29.6
Wnt3a	19.5	24.1	24.1	27.5	24.1	31.1
화합물 181	18.0	22.1	24.6	28.1	24.0	31.0
화합물 180	19.4	21.6	25.8	28.9	24.0	32.6
화합물 202	19.2	23.3	24.1	27.4	24.3	29.5
화합물 40	19.2	22.9	25.3	28.7	25.1	31.2
GSK3i (bio)	19.0	22.7	27.7	32.9	26.5	33.7
화합물 56	18.8	22.9	23.3	27.2	23.6	29.3

도면21h



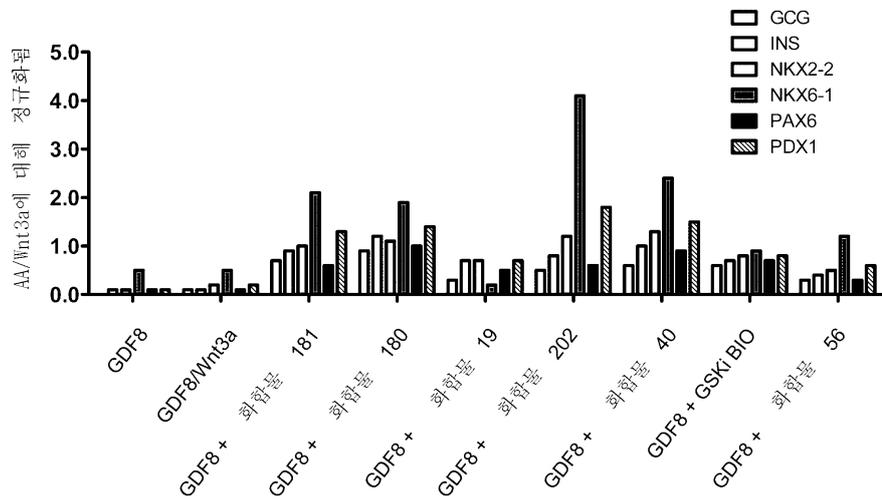
화합물\CT	GAPDH	CDX2	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
없음	18.0	24.6	28.7	31.2	26.5	40.0
Wnt3a	19.0	24.4	24.0	28.0	23.8	30.5
화합물 181	18.0	23.1	21.8	25.7	22.3	28.6
화합물 180	19.5	23.9	23.7	27.7	23.8	30.7
화합물 19	19.1	22.9	26.4	30.2	25.1	32.6
화합물 202	19.0	24.5	22.2	25.9	23.0	27.9
화합물 40	19.0	23.6	22.7	26.6	23.4	28.4
GSK3i (bio)	19.1	23.0	23.8	27.9	24.2	29.5
화합물 56	18.9	24.0	23.0	26.3	23.5	27.7

도면21i



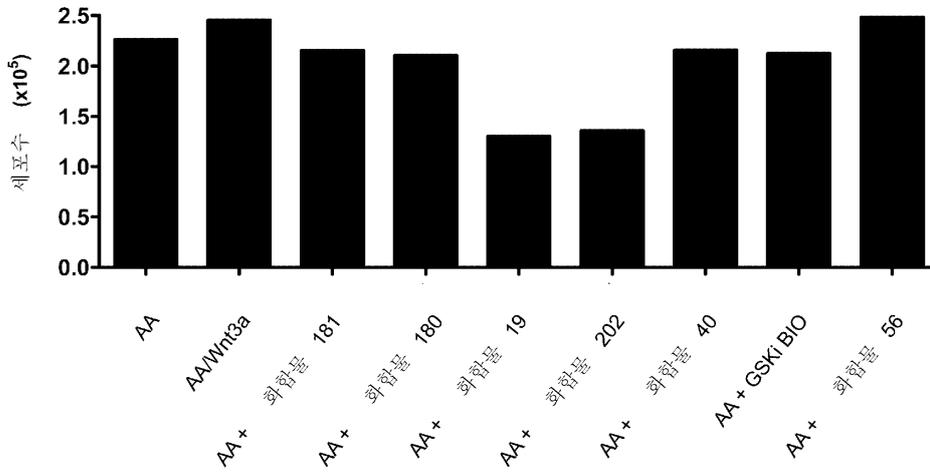
화합물 \ CT	GAPDH	GCG	INS	NKX2-2	NKX6-1	PAX6	PDX1
없음	18.3	14.1	14.9	23.7	25.5	24.0	23.2
Wnt3a	18.0	14.0	14.6	23.4	26.1	23.7	23.3
화합물 181	18.0	14.3	14.5	23.3	26.1	24.0	23.1
화합물 180	18.0	14.9	14.7	23.8	26.5	24.3	23.2
화합물 19	17.9	27.0	26.9	28.0	25.8	28.6	29.4
화합물 202	18.6	14.9	15.0	23.7	25.8	24.7	23.6
화합물 40	18.3	14.6	14.7	23.5	26.1	24.4	23.2
GSK3i IX(bio)	18.3	15.1	15.1	24.2	27.5	24.9	23.8
화합물 56	18.2	14.4	14.8	23.6	25.9	24.1	23.3

도면21j

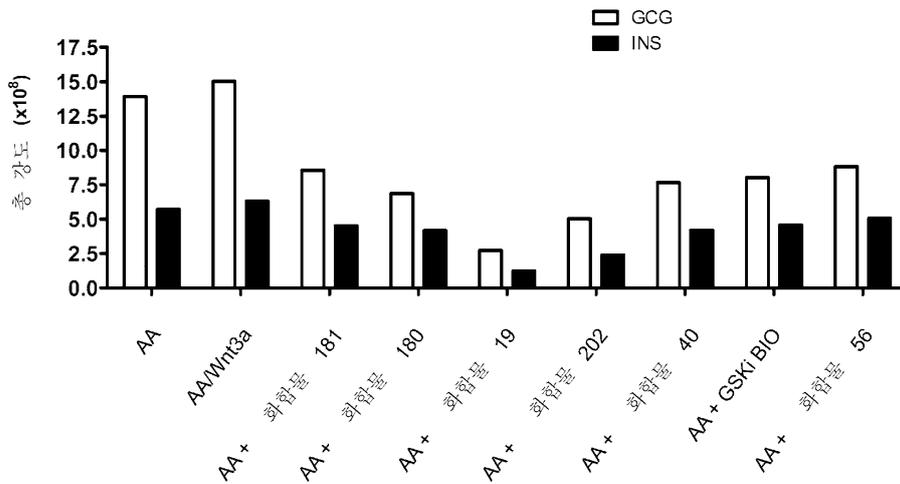


화합물 \ CT	GAPDH	GCG	INS	NKX2-2	NKX6-1	PAX6	PDX1
없음	17.4	18.1	17.7	25.9	26.6	26.6	25.6
Wnt3a	17.8	17.7	17.5	25.6	27.0	26.5	25.6
화합물 181	18.0	14.5	14.8	23.4	25.0	24.4	23.0
화합물 180	18.0	14.2	14.4	23.2	25.1	23.8	22.9
화합물 19	18.3	16.2	15.6	24.3	28.6	25.2	24.2
화합물 202	18.7	15.7	15.8	23.8	24.8	25.2	23.2
화합물 40	18.1	14.8	14.8	23.2	25.0	24.1	22.9
GSK3i IX(bio)	18.4	15.2	15.5	24.2	26.7	24.8	24.0
화합물 56	18.0	16.0	16.0	24.4	25.9	25.4	24.0

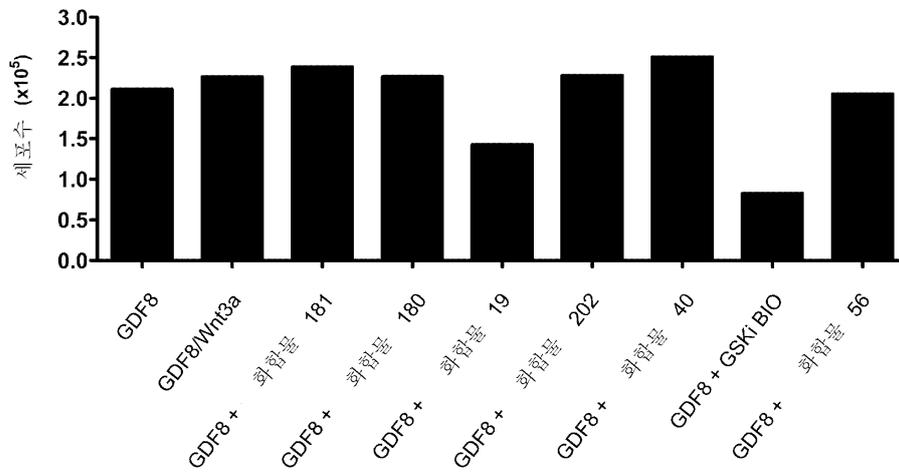
도면21k



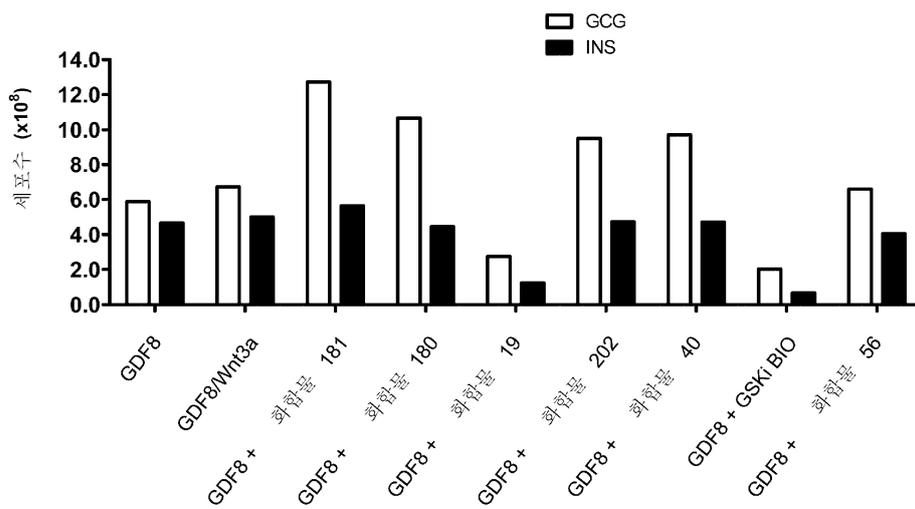
도면21l



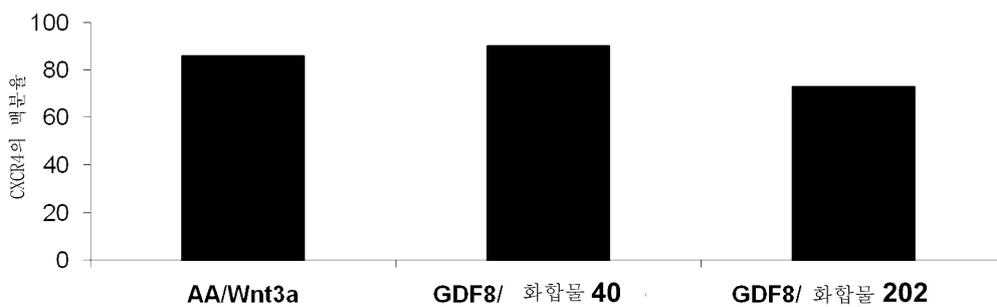
도면21m



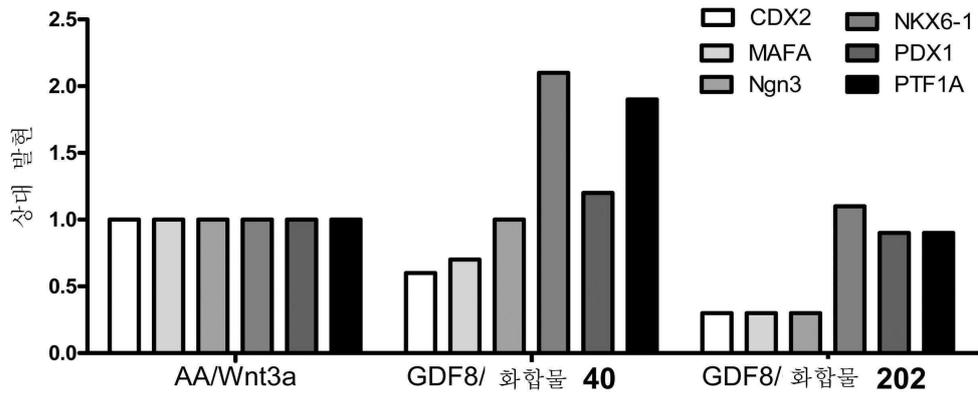
도면21n



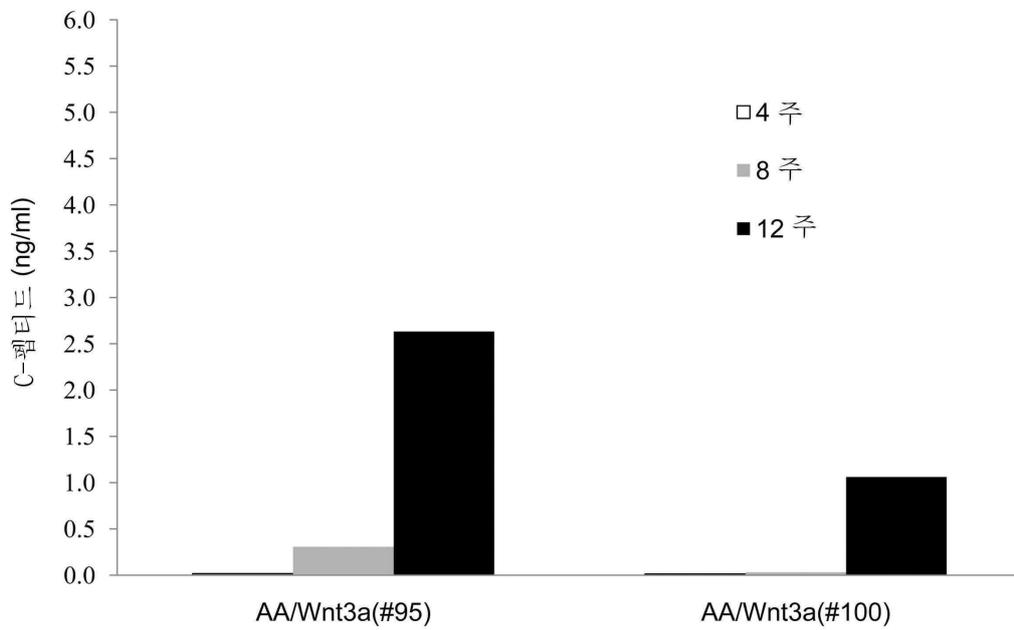
도면22a



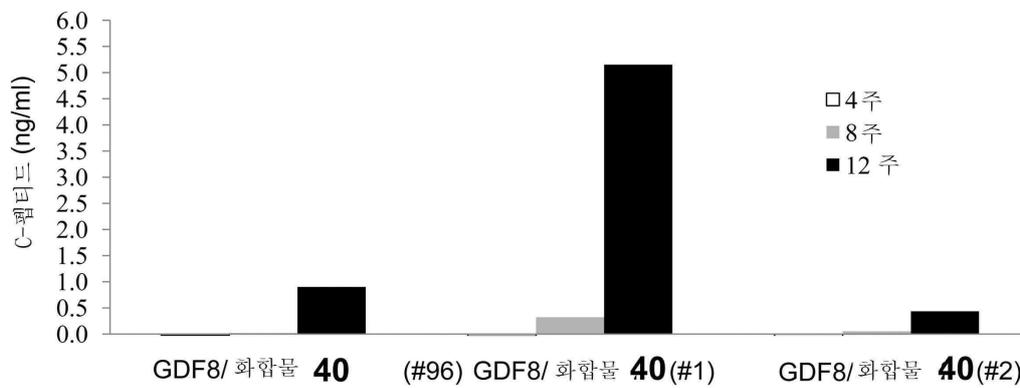
도면22b



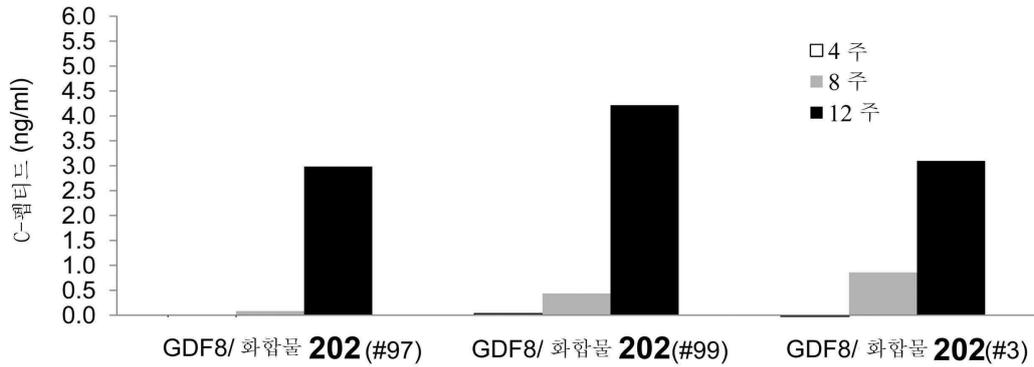
도면23a



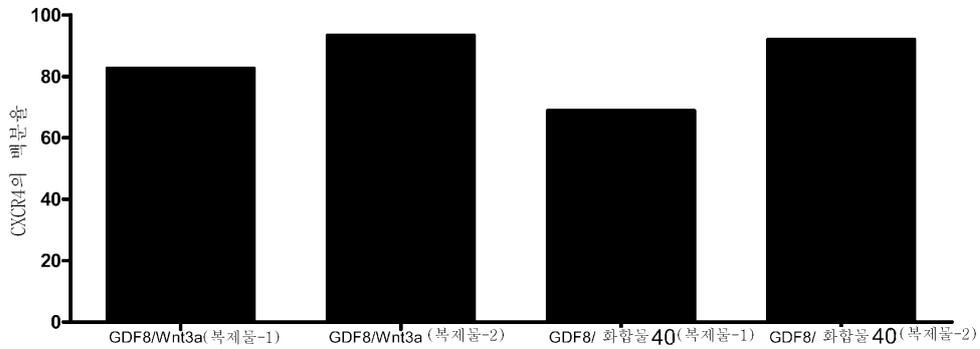
도면23b



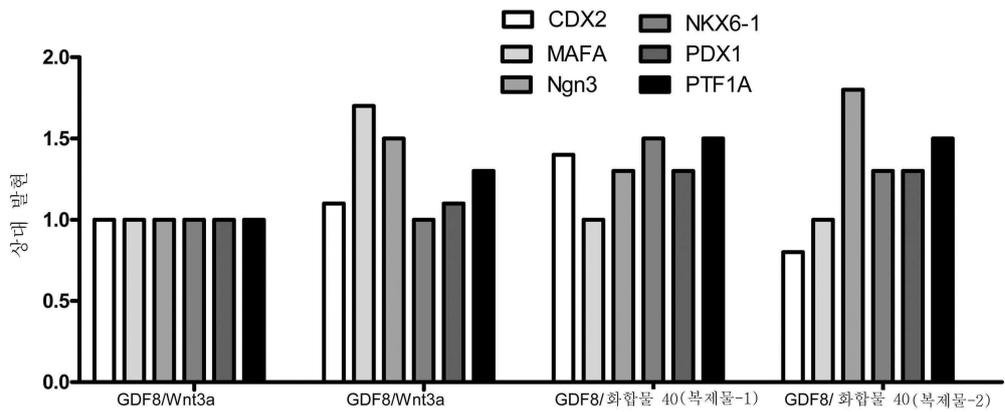
도면23c



도면24a

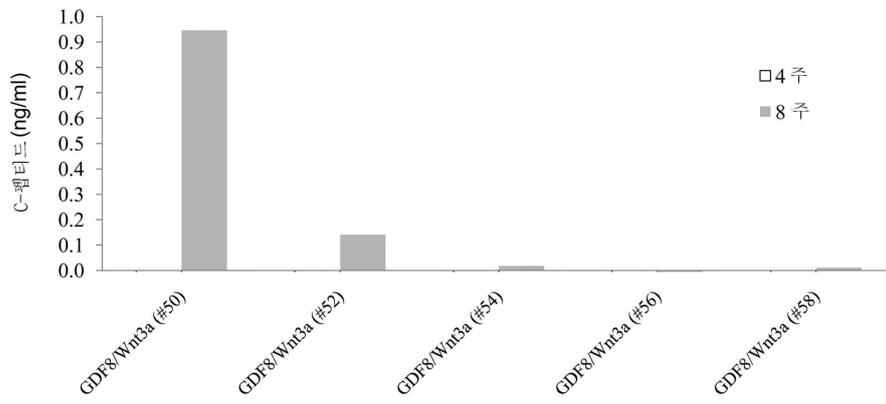


도면24b

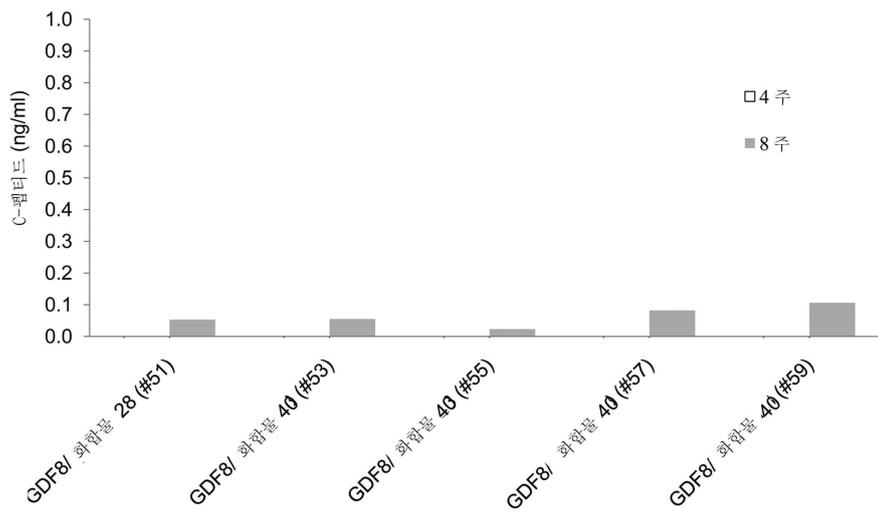


처리 \CTs	GAPDH	CDX2	MAFA	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
GDF8/Wnt3a	19.0	24.8	31.0	24.1	24.3	22.5	25.4
GDF8/Wnt3a	18.6	24.3	29.8	23.1	23.9	22.0	24.7
GDF8/ 화합물 40 (복제물 1)	19.3	24.6	31.3	23.9	24.0	22.3	25.0
GDF8/ 화합물 40 (복제물 2)	18.7	24.9	30.6	22.9	23.7	21.8	24.5

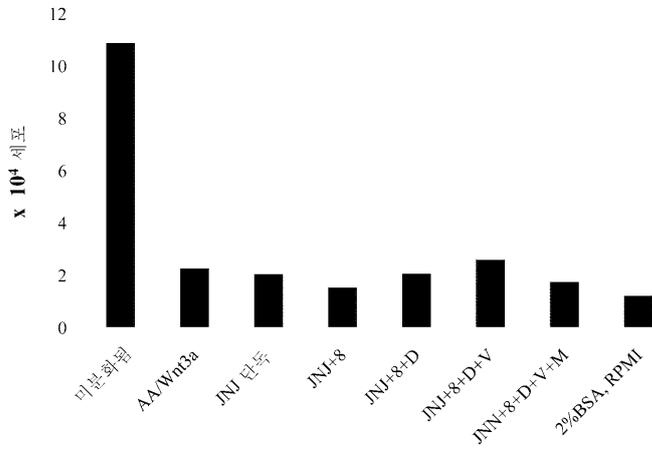
도면24c



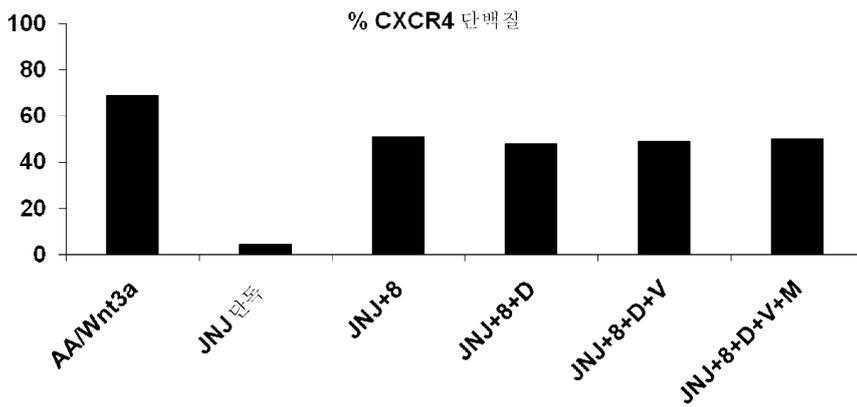
도면24d



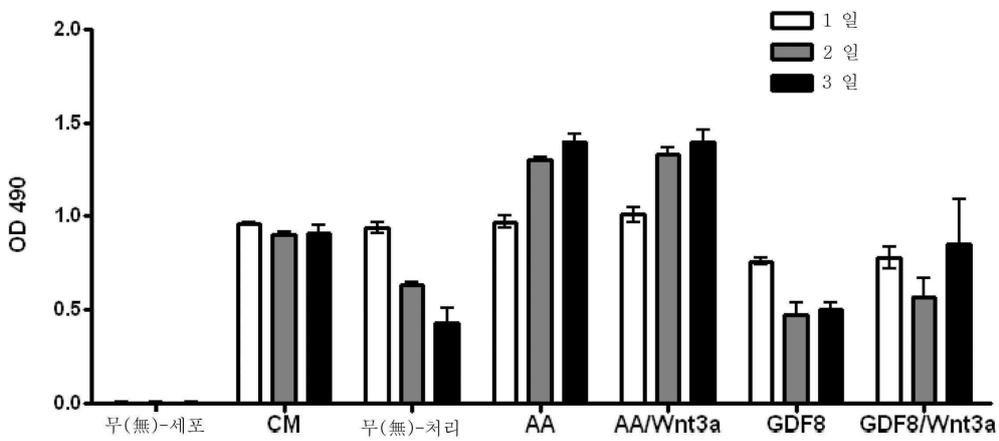
도면25a



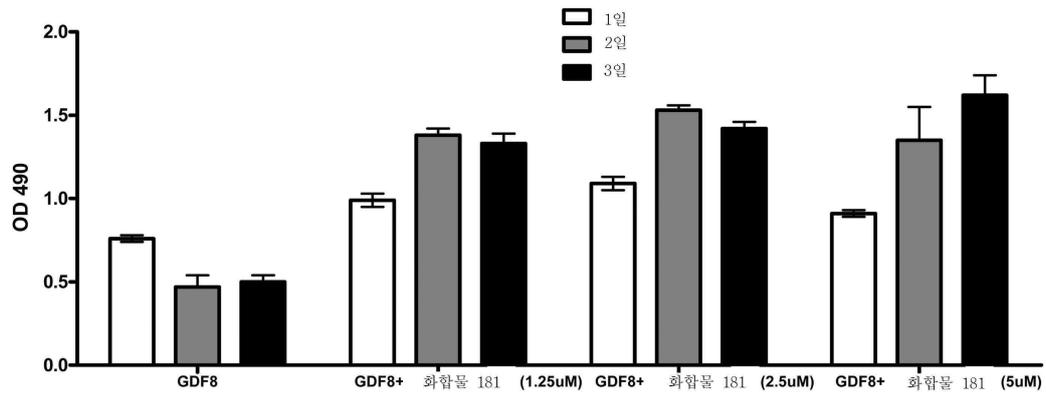
도면25b



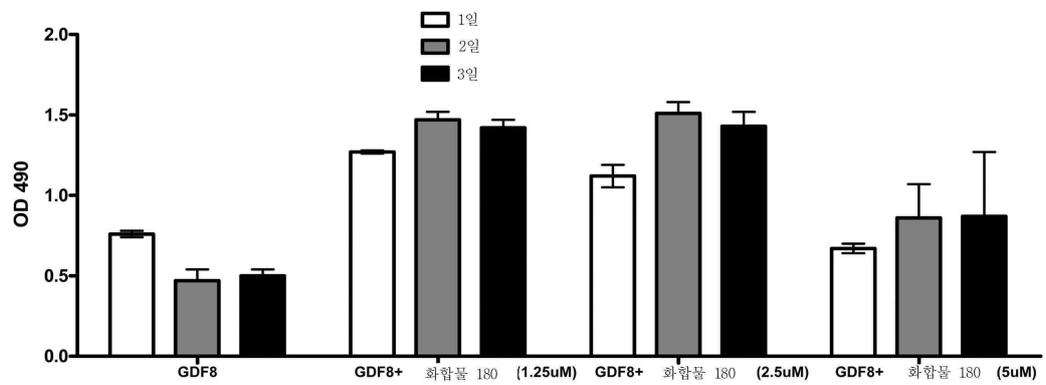
도면26a



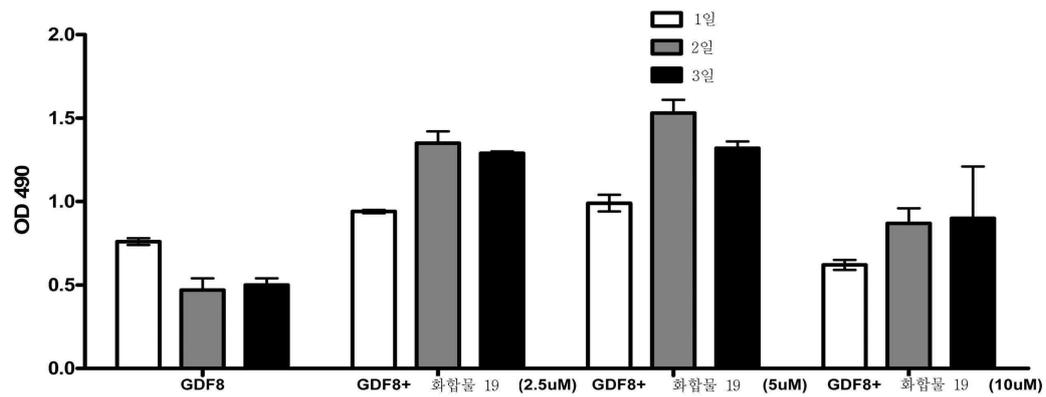
도면26b



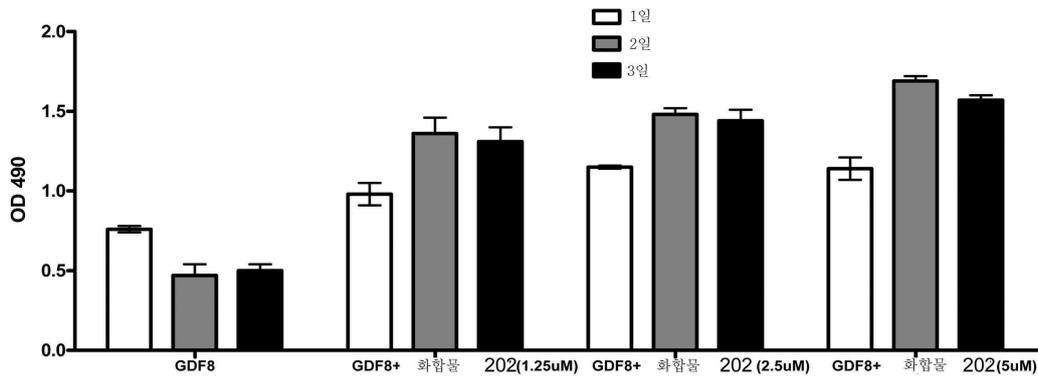
도면26c



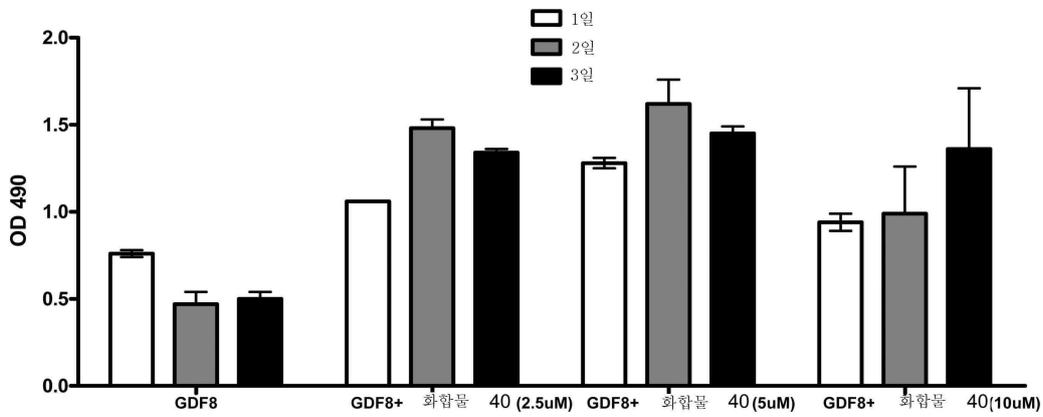
도면26d



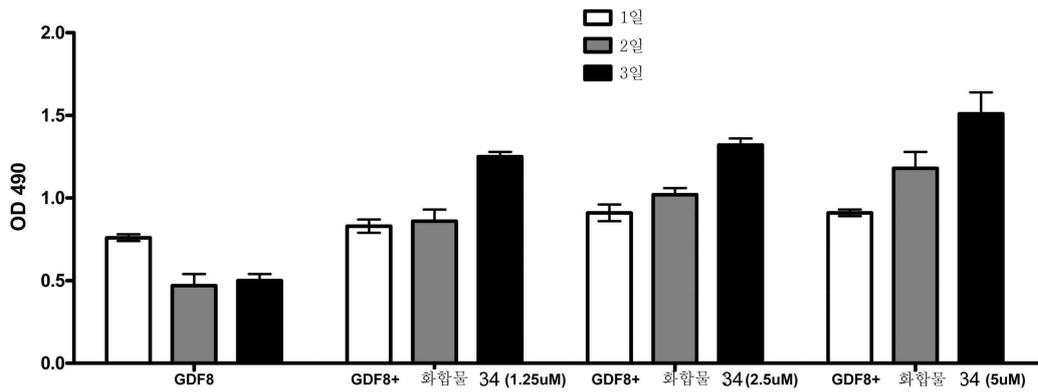
도면26e



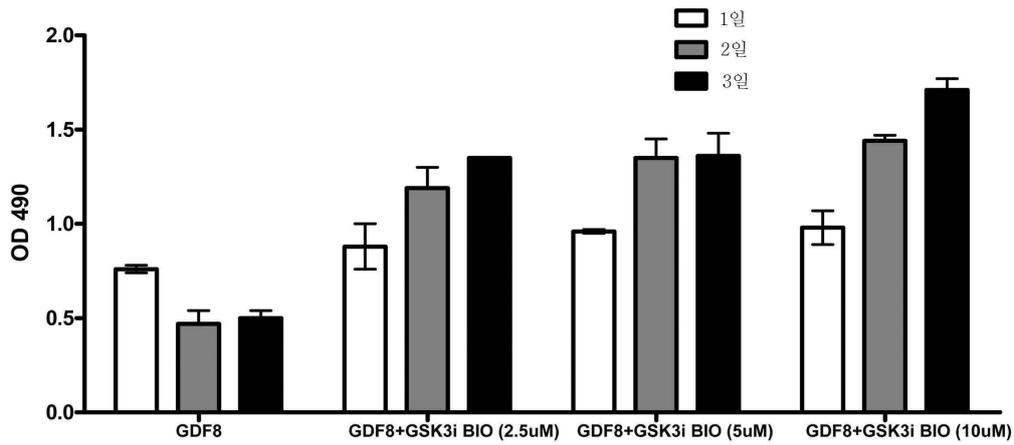
도면26f



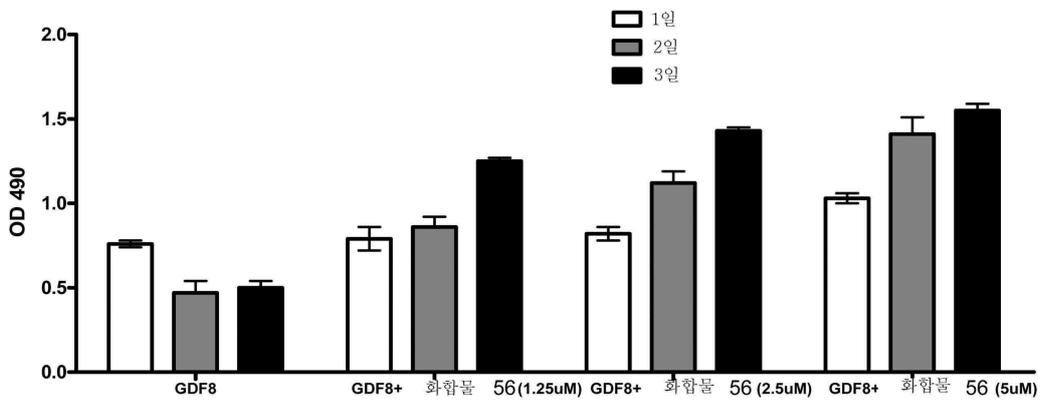
도면26g



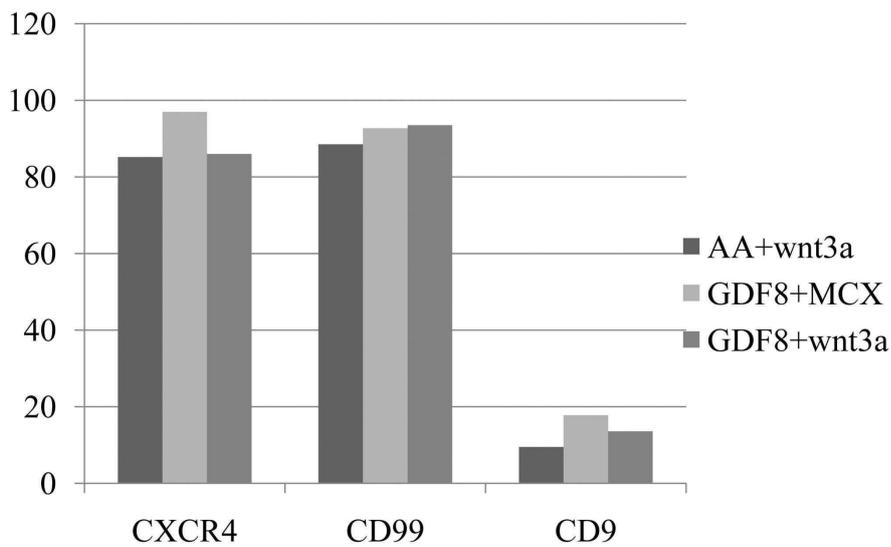
도면26h



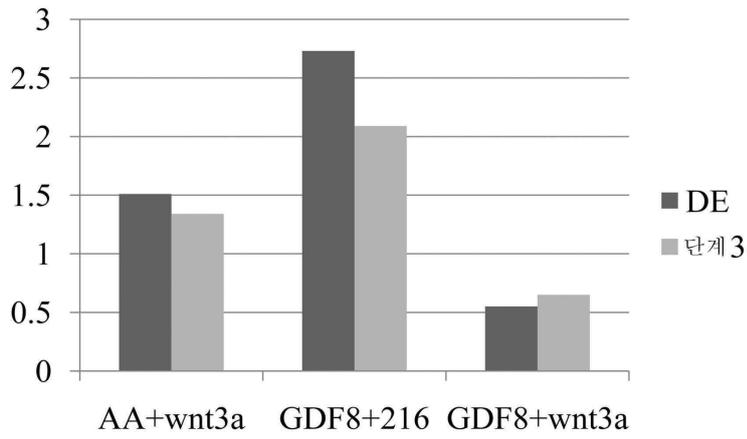
도면26i



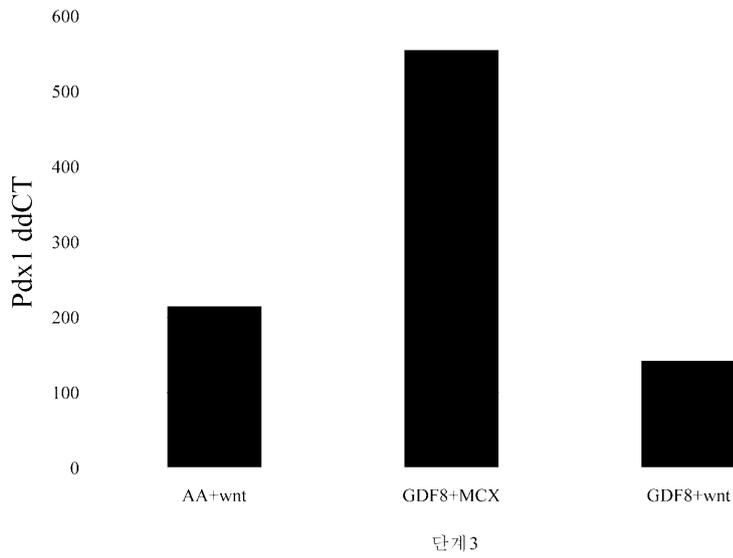
도면27a



도면27b



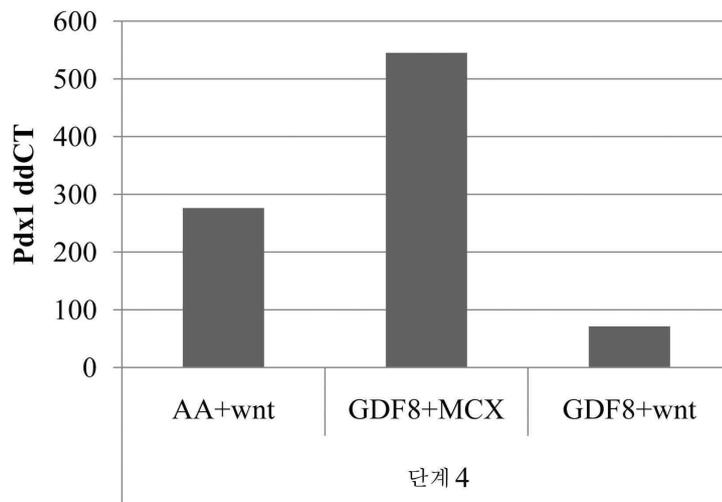
도면27c



도면27d

단계 3	AA+wnt	GDF8+MCX	GDF8+wnt
Pdx	215	555	142
Cdx2	1614	1567	965
HNF4a	339	210	267

도면27e



도면27f

단계 4	AA+wnt	GDF8+MCX	GDF8+wnt
Pdx	276	545	71
Cdx2	1971	2496	983
HNF4a	640	426	609