

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁸

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0002033

(43) 공개일자 2006년01월06일

(21) 출원번호	10-2005-7024112(분할)		
(22) 출원일자	2005년12월15일		
(62) 원출원	특허10-2000-7000022		
	원출원일자 : 2000년01월03일	심사청구일자	2003년06월30일
번역문 제출일자	2005년12월15일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/013875	(87) 국제공개번호	WO 1999/01159
국제출원일자	1998년07월03일	국제공개일자	1999년01월14일

(30) 우선권주장	08/909,435	1997년07월04일	미국(US)
	09/109,858	1998년07월02일	미국(US)

(71) 출원인 유니버시티 오브 유타 리서치 파운데이션
미국, 유타 84112, 솔트레이크 시티, 파크 빌딩 210

(72) 발명자 라오 마헨드라 에스.
미합중국 84124 유타주 솔트레이크 시티 에스 파크힐 드라이브4590
메이ер 프로스첼 마켓
미합중국 84092 유타주 샌디 에스 히든 벨리 로드 12169
칼야니 안잘리 제이.
미합중국 84102 유타주 솔트레이크 시티 사우스 600 이스트 207

(74) 대리인 최덕규

심사청구 : 있음

(54) 계통이 예정된 신경세포 전구체

요약

자가-증식이 예정된 간세포 집단은 다양한 신경세포의 표현형으로 분화될 수 있는 배아 13.5일째의 척수를 발육시킴으로써 동정되었다. 이러한 신경세포로 예정된 전구체(NRP)는 매우 높게 폴리시알레이트된(polysialated) 또는 배아 신경세포 접착 분자(E-NCAM)를 발현하고, 신경상피 간세포(NEP 세포)와는 형태적으로 구별되며, 척수 교질세포 프로제니터(progenitor)는 배아 10.5일째의 척수로부터 유도되었다. NRP 세포들은 섬유아세포 성장인자(FGF) 및 뉴로트로핀-3(NT-3)의 존재하에서 다양한 경로를 통하여 자가 증식되고, 신경세포 에피토프의 특화된 서브셋(subset)을 발현한다. RA가 존재하고 FGF가 결여된 상태에서 배양하였을 때, NRP 세포들은 GABA성, 글루타메이트성 및 콜린성 면역반응성 신경세포로 분화된다. NRP 세포들은 배아 10.5일째의 신경관으로부터 배양된 다분화능 NEP 세포들로부터 발생될 수 있다. 클로날 분석은 E-NCAM 면역반응성 NRP 세포들은 다른 예정된 CNS 전구체를 발생시키는 NEP 프로제니터 세포들로부터 야기된다는 것을 보여주었다. 상기 NEP에서 유도된 E-NCAM 면역반응성 세포들은 정해진 배지에서 자가 증식성이 있으며, 매스 및 클로날 배지내에서 다양한 신경세포의 표현형으로 분화된다. 이와 같이, 척수의 배아 13.5일째에 생체 내에서(*in vivo*) 존재하는 더욱 예정된 신경세포 전구체 세포들 및 다분화능 NEP 세포들 사이에는 직접적인 계통 관계가 존재한다. 또한 본 발명은 신경성 질환을 치료하는 방법을 개시한다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 NRP 세포를 포함한 NEP 세포 및 그 프로제니(progeny)의 면역반응성의 요약도를 나타낸 것이다.

도 2는 콜린 아세틸 트랜스퍼라아제(ChAT), p75, islet-1(Isl-1), 칼빈딘(calbindin), 글루탐산 디카복실라아제(GAD), 글루타미나아제 및 시클로필린(하우스키핑 유전자)의 발현을 검정하기 위한 쥐(rat)의 E-NCAM⁺ 세포들로부터 분리된 총 RNA의 RT-PCR 증폭 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 퓨라-2(fura-2) 칼슘 이온 이미지에 의해 측정된 격렬하게 해리되고(빈 막대) 분화된(빛금친 막대) E-NCAM⁺ 세포의 신경전달물질에 대해 반응을 하는 세포수를 막대 그래프로 나타낸 것이다: GABA(Y-아미노 부틸산), Gly(글리신), DA(도파민), Glu(글루타메이트), Ach(아세틸 콜린), RR(쥐(rat)의 링거액), 및 50mm K RR(나트륨 이온을 칼륨 이온으로 치환한 쥐(rat)의 링거액).

도 4는 격렬하게 해리된 E-NCAM⁺ 세포로부터 Ca²⁺의 I₃₄₀/I₃₈₀의 비율을 나타낸 것이다.

도 5는 분화된 E-NCAM⁺ 세포로부터 Ca²⁺의 I₃₄₀/I₃₈₀의 비율을 나타낸 것이다.

도 6은 성숙된 신경세포의 마커(marker)가 발현되는 것 대한 단일의 E-NCAM⁺ 클론을 PCR 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 퓨라-2(fura-2) 칼슘 이온 이미징에 의한 신경전달물질에 대해 반응을 하는 네 개의 E-NCAM⁺ 클론에 대한 세포의 백분율을 막대 그래프로 나타낸 것이다: GABA(Y-아미노 부틸산), Gly(글리신), DA(도파민), Glu(글루타메이트), Ach(아세틸 콜린), RR(쥐(rat)의 링거액), 및 50mm K RR(나트륨 이온을 칼륨 이온으로 치환한 쥐(rat)의 링거액).

도 8 및 9는 하나의 E-NCAM⁺ 클론으로부터 기록된 두 가지 세포들로부터 Ca²⁺의 I₃₄₀/I₃₈₀의 비율을 나타낸 것이다.

도 10은 BRDU를 결합시켜 측정한 것으로 E-NCAM⁺ 세포의 세포 분열에 있어서 뼈 모포제닉(morphogenetic) 단백질 2(BMP-2)의 효과를 나타낸 것이다.

도 11은 BRDU를 결합시켜 측정한 것으로 E-NCAM⁺ 세포의 세포 분열에 있어서 소닉 헤지호그(sonic hedgehog)(Shh)의 효과를 나타낸 것이다.

도 12는 좌로부터 p75, Isl-1, ChAT, 칼빈딘(calbindin), GAD 및 글루타미나아제의 발현을 검정하기 위하여 생쥐(mouse)의 E-NCAM⁺ 세포들로부터 분리된 총 RNA를 RT-PCR을 통하여 증폭한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 좌로부터 네스틴, N-CAM, 뉴로필라멘트-M(NF-M), 마이크로튜블 관련 단백질 2(Map-2), GFAP 및 DM-20/PLP의 발현을 검정하기 위하여 분화된 생쥐(mouse)의 ES 세포들로부터 분리된 총 RNA를 RT-PCR을 통하여 증폭한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 좌로부터 ChAT, p75, islet-1, 칼빈딘, GAD 및 글루타미나아제의 발현을 검정하기 위하여 분화된 생쥐(mouse)의 ES 세포들로부터 분리된 총 RNA를 RT-PCR을 통하여 증폭한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

기술분야

관련 출원에 대한 설명

본 출원은 1997. 7. 4일자 미국특허출원 제08/909,435호의 일부계속출원이다.

연구 또는 개발을 위한 연합적 후원

본 발명은 정부적인 지원으로 FIRST 장학금과 국립 보건원의 기초 암 연구를 위한 대학원 지원금의 도움을 받아 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정한 권리를 갖는다.

배경기술

본 발명은 계통이 예정된 전구체 세포 및 그 물질의 제조 및 이용방법에 관한 것이다. 특히 본 발명은 포유류의 배아로부터 분리된 신경세포로 예정된 전구체(NRP), 신경상피 간세포(NEP cell) 또는 배아 간세포(ES)에 관한 것이다. 상기 NRP들은 자가 증식(self-renewal)을 할 수 있고 신경세포(neuron)로 분화될 수 있는 것이지만, 성상아교세포 및 희돌기아교세포로 이루어진 교질세포(glia)로는 분화되지 않는다. 또한 상기 NRP 세포들을 발생, 분리, 배양, 감염 및 이식하는 방법을 개시한다.

간세포들의 특성을 지닌 다분화능(multipotent) 세포들은 중추신경계의 여러 부위 및 여러 분화 단계에서 동정되어왔다(F.H. Gage 외, CNS로부터 간세포의 분리, 특성화 및 이용, 18 Ann. Rev. Neurosci. 159-92(1995); M. Marvin 및 R. McKay, 척추 동물 CNS의 다분화능 간세포, 3 Semin. Cell. Biol. 401-11(1992); 및 R.P. Skoff, 신경아교질 세포(neuroglial cell)의 계통, 2 The Neuroscientist 335-44(1996)). 상기에서 언급한 NEP 세포들은 자가 증식 기능을 지니고 신경세포, 희돌기아교세포 및 성상아교세포로서의 분화 기능을 지니고 있으며, 이러한 점들로 인하여 상기 세포들은 다분화능 간세포라는 것을 의미한다(A.A. Davis 및 Temple, 쥐(rat) 배아의 대뇌 피질에 있는 자가 증식 다분화능 간세포, 362 Nature 363-72(1994); A.G. Gritti 외, 기초 섬유아세포의 성장 인자에 반응하는 성숙한 쥐(mouse) 뇌의 다분화능 간세포의 증식 및 자가 증식, 16 J. Neurosci. 1091-1100(1996); B.A. Reynolds 외, 신경세포와 성상아교세포를 만드는 다분화능 EGF에 반응하는 스트리아탈 배아 프로제니터(striatal embryonic progenitor), 12 J. Neurosci. 4565-74(1992); B.A. Reynolds & S. Weiss, EGF-반응 포유류 배아의 CNS 전구체가 간세포라는 것을 증명하는 클로날과 모 집단 분석, 175 Developmental Biol. 1-13(1996); B.P. Williams 외, 일반적인 전구체 세포로부터 신경세포 및 희돌기아교세포의 발생, 7 Neuron 685-93(1991)).

신경계는 정해진 분화 가능성을 갖고 있는 전구체 세포들을 포함하고 있다(T.J. Kilpatrick 및 P.F. Bratlett, 생쥐(mouse) 대뇌로부터 클론된 다분화능 전구체는 FGF-2를 요구하는 반면, 교질 전구체들은 FGF-2 또는 EGF로 자극을 받음, 15 J. Neurosci. 3653-61(1995); J. Price 외, 레트로바이러스에 매개된 유전자 전이에 의한 대뇌 신경계의 계통 분석, 84 Developmental Biol. 156-60(1987); B.A. Reynolds 외, 상기서; B.A. Reynold 및 S. Weiss, 상기서; B. Williams, 대뇌 피질의 난핵 부분에 있어서의 전구 세포 타입, 17 BioEssays 391-93(1995); 및 B.P. Williams 외, 상기서). 다분화능 간세포 및 계통이 예정된 전구체 세포들간의 관계는 아직 불명확하다. 계통이 정해진 세포들은 다분화능 세포들로부터 유래될 수 있지만 직접적인 실험적 증거가 없는 신경계에서는 여전히 가설적인 가능성이 있을 수 있을 뿐이다. 또한 다분화능 세포로부터 상기 전구체들을 정제하는 방법도 소개된 바 없다.

여기에서 참고로 인용된 발명의 명칭이 「NEP(Neuroepithelial Stem) 세포의 발생, 특성화 및 분리」인 미국특허출원 제 08/852,744호(1997. 5. 7 출원)에 의하면, NEP 세포들은 피브로넥틴(fibronectin)위에서 성장하고 섬유아세포 성장인자(FGF)를 필요로 하고, 계배 추출물(CEE)에 아직 특징이 부여되지 않은 성분이 존재하기 때문에 배지에서 미분화된 표현형(phenotype)을 유지하고 증식한다. NEP 세포들의 성장 요소들은 배아 14.5일째의 피질 난핵대(ventricular) 부분 세포로부터 분리된 뉴로스피어(neurosphere)와는 다르다(B.A. Reynolds 외, 상기서; B.A. Reynolds 및 S. Weiss, 상기서; 국제출원공개 제9615226호; 국제출원공개 제9615224호; 국제출원공개 제9609543호; 국제출원공개 제9513364호; 국제출원공개 제9416718호; 국제출원공개 제9410292호; 및 국제출원공개 제9409119호). 뉴로스피어는 현탁 배지에서 배양되고 CEE 또는 FGF를 요구하지는 않으나 생존을 위해서는 상피 성장인자(EGF)에 의해 영향을 받는다. 비록 FGF가 뉴로

스피어의 성장을 일시적으로 지지할 수는 있긴 하나, 상기 뉴로스피어를 장기간 성장시키게 하는 데는 적합하지는 않다. 접착성 배지에서 자라는 NEP 세포들은 FGF에 영향을 받지 않으며, EGF 수용체가 검출 가능한 수준을 표현하지는 않고, 그리고 뉴로스피어가 분리될 수 있는 전 단계인 배아 성장 단계에서 분리된다. 이와 같이, NEP 세포들은 뇌 골수 및 척추의 다분화능 전구체로 나타날 수 있으며, 반면에 뉴로스피어는 피질의 간세포로 나타날 수 있다. 그럼에도 불구하고, NEP 세포들은 중추신경계의 다분화능 간세포 또는 전구세포로부터 계통 제한 원리를 연구하기 위한 시범적인 시스템으로 제공된다. NEP 세포들에 대한 연구로 인하여 명백해진 위와 같은 원리들은 신경세포 및 교질세포의 발생을 위하여 충분히 다분화될 수 있는 모든 CNS 전구체 세포들에 대해 광범위하게 적용될 것이라고 예상된다. 이와 같이, 본 발명은 신경세포 및 교질세포로 분화될 수 있는 동안 CNS가 유도되는 부위에 관계없이 모든 CNS 전구 세포들에 적용될 수 있다.

Anderson 및 D.L. Stemple의 미국특허 제5,589,376호는 포유류의 신경분(neural crest) 간세포, 이의 분리 및 클로날 증식에 대한 방법을 개시하고 있으나, 배양된 NEP 세포, 배양된 계통이 예정된 전구체 세포, 및 이를 발생, 분리 및 배양하는 방법에 대해 개시하지는 않고 있다. 신경분 세포들은 말초신경계(PNS)의 신경세포 및 교질세포로 분화되는 반면에, NEP 세포들은 중추신경계(CNS)의 신경세포 및 교질세포로 분화된다.

「계통이 예정된 신경세포 전구체의 분리」에 대한 미국특허출원 제08/909,435호(1997. 7. 4 출원)는 신경세포로 분화될 수는 있지만 교질세포로는 분화되지 않는 신경세포로 예정된 전구(NRP) 세포에 대해 개시하고 있다. 상기 특허출원은 NRP 세포들이 NEP 세포들로부터 분리될 수 있으며, 또한 배아 척수로부터 직접적으로 분리될 수 있다는 것을 개시하였다.

「중추신경계로부터 계통이 예정된 교질세포의 전구체」에 대한 미국특허출원 제08/980,850호(1997. 11. 29 출원)는 희돌기아교세포, A2B5⁺ 프로세스-베어링(process-bearing) 성상아교세포 및 A2B5⁻ 섬유아세포와 같은 성상아교세포로 분화될 수 있으며, 신경세포로 분화되지 않는 교질세포로 예정된 전구체(GRP) 세포에 대하여 개시하고 있다. GRP 세포들은 분화된 NEP 세포들로부터 분리될 수 있으며, 또한 CNS 조직으로부터 분리될 수 있고, 그리고 성장인자 조건, 형태, 프로제니(progeny)의 희소돌기교질세포-타입-2 성상아교세포(O-2A) 프로제니터(progenitor) 세포들과는 다르다.

「CNS 및 PNS에 있어서 일반적인 신경세포의 프로제니터」에 대한 미국특허출원 제09/073,881호(1998. 5. 6 출원)는 CNS 및 PNS의 다른 세포들과 마찬가지로 신경분 세포로 분화되는 것으로 유도될 수 있는 NEP 세포에 대하여 개시하고 있다.

신경세포로 예정된 전구 세포들은 다른 곳에 나타나는 NEP 세포, GRP 세포, 뉴로스피어 및 신경분 간세포들과는 구별된다. NEP 세포들은 신경세포 또는 교질세포로 분화될 수 있으며, 반면에 NRP는 신경세포로 분화될 수 있지만 교질세포로는 분화되지 않고, 그리고 NEP 및 NRP 세포들은 별개의 세포 마커(cell marker)를 드러내고 있다. GRP 세포들은 교질세포로 분화될 수 있지만 신경세포로 분화되지 않는다. 상기에서 언급한 바와 같이, 뉴로스피어는 현탁 배지에서 배양되고 CEE 또는 FGF를 필요로 하지는 않지만 생존을 위해서는 EGF에 영향을 받으나, 반면에 NRP 세포들은 접착성 배지에서 배양되고 EGF 수용체가 검출될 수 있는 수준을 나타내지 않는다. 또한 신경분 세포들은 말초신경계의 신경세포 및 교질세포로 분화되지만, NRP 세포들은 중추신경계의 신경세포로 분화된다. NRP 세포들은 폴리시알레이트된(polysialated) 또는 배아 신경세포 접착 분자(E-NCAM)로 나타날 수도 있으나, NEP 세포, 뉴로스피어, GRP 세포 및 신경분 세포들은 그렇지 않다. 그러므로, NRP 세포들은 다른 세포 타입과는 다른 증식 가능성(proliferative potential), 세포 마커(cell marker)의 표현 및 영양 조건을 갖고 있다.

시험관내에서(*in vitro*) 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 분리하고 성장시킴으로써, 이식을 위한 순수한 신경세포 집단의 사용, 특이적으로 선택된 발육 단계에 있어서의 유전자 발견, 및 표적 유전자 치료 등과 같은 치료적·진단적 사용에 대한 세포-특이적 항체의 발생 등을 가능하게 한다. 또한 NRP 세포들은 특이한 특성을 갖는 신경세포의 부차집단 즉, 높은 처리량 분석(throughtout assay)으로 신경전달물질(neurotransmitter) 기능 및 작은 분자들을 분석하는 모토뉴런(motoneuron) 및 다른 신경세포를 생성하는데 사용될 수 있다. 더욱이, NEP 세포 또는 배아 간세포(ES cell)들로부터 NRP 세포를 획득하는 방법은 많은 수의 후-유사분열단계의 신경세포의 준비 원료를 제공하는 것이다. 종양 세포주로부터 획득된 후-유사분열단계의 세포들은 이미 상업적으로 입수 가능하다(예를 들어, Clontech, Palo Alto, CA). 또한 본 발명은 다분화능 NEP 세포들이 어떻게 다양하게 NEP 유도체로 정해지는지를 제시한다. 특히, 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들의 성장 및 자가 증식을 가능하게 하는 배양 조건이 적합하기 때문에 상기 포유류의 간세포를 발육시킬 수 있다. 이러한 점은 NEP 유도체의 많은 수의 종양들이 포유류, 특히 사람내에 존재하기 때문에 바람직하다. 포유류의 NEP 세포의 성장에 대한 인식은 사람의 질병(disorder)을 이해하는 데 필수적인 것이다.

본 발명은 앞서 언급한 견지에서 보더라도, 포유류의 신경계로 분화가 예정된 전구체 세포들의 분리된 집단 및 상기 세포들을 발생, 분리, 배양, 감염 및 이식하는 방법에 있어서 상당히 진척된 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 분리된 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들의 순수한 집단 및 그 프로제니(progeny)를 제공하기 위한 것이다.

본 발명의 다른 목적은 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 발생, 분리, 배양 및 재생하는 방법 및 그 프로제니를 제공하기 위한 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 신경세포 및 교질세포 둘 다를 발생시킬 수 있는 CNS 다분화능 전구체 세포로부터 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 발생시키는 방법을 제공하기 위한 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 신경세포로 예정된 전구체 세포들로부터 유도되는 신경세포의 순수한 분화 집단을 제공하기 위한 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 형질감염시키고 이식하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

이러한 목적들은 포유류의 CNS 신경세포로 예정된 전구체 세포들의 분리된 순수한 집단들을 제공함으로써 달성될 수 있다. 바람직하게 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포들은 자가 증식이 가능하고 CNS 신경세포로 분화가 가능하지만 CNS 교질세포로는 분화될 수 없고, 그리고 배아 신경세포 접착 분자(E-NCAM)를 발현하면서도 A2B5 항체에 의해 인식되는 갱글리오시드(ganglioside)를 발현하지는 못한다. 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포들은 네스틴(nestin) 또는 β -III 튜블린(tubulin)을 발현하게 할 수도 있고, 그렇지 않을 수도 있다. 이와 같이 배아 신경세포 접착 분자(E-NCAM)는 상기 세포들에 대한 명백한 항원이다. 상기 NRP 세포들은 신경전달물질을 방출시키고 상기 물질과 반응하는 신경세포들로 분화될 수 있다. 상기 신경세포들은 이러한 신경전달물질들에 대한 수용체를 가진다고 할 수 있으며, 상기 세포들은 신경전달물질-합성 효소를 발현하는 능력을 지닌다. 상기 NRP 세포들은 기능 시냅스(synapse)의 형성 및/또는 전기적 활성을 증가시키게 하는 신경세포로 분화될 수 있다. 또한 상기 NRP 세포들은 상기 세포들에 대한 성장인자, 상기 세포들에 대한 분화인자, 상기 세포들에 대한 성숙인자 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 안정적으로 발현하게 할 수 있다. 또한 본 발명의 신경세포로 예정된 전구체 세포들은 사람, 사람을 제외한 영장류, 말, 개과, 고양이, 소과, 돼지, 양, 토끼목 및 설치류로부터 선택 및 분리될 수 있다.

본 발명의 포유류의 CNS 신경세포로 예정된 전구체 세포들의 순수한 집단(population)을 분리하는 방법은 하기 단계로 이루어진다:

- (a) 신경세포 및 교질세포를 발생시키는 포유류의 다분화능 CNS 간세포 집단을 분리하고;
- (b) 상기 세포들을 주입하기 위해 배치된 배지내에서 상기 다분화능 CNS 간세포를 배양하여, 분화가 개시되도록 하고;
- (c) 신경세포로 예정된 전구체 세포를 한정하는 선택된 항원을 발현하게 하는 세포 부차집단(subpopulation)들을 분화된 세포들로부터 정제하고; 그리고
- (d) 고착 성장이 가능하도록 배치된 배지에서 정제된 세포 부차집단들을 배양함.

신경세포로 예정된 전구체 세포들을 한정하는 바람직한 선택된 항원은 배아 신경세포 접착 분자(E-NCAM)이다. 바람직하게 상기 NRP 세포들을 정제하는 단계는 특이적 항원 캡처(capture), 플루어레신, 활성화된 세포 소팅(sorting) 및 자석구를 캡처(magnetic bead capture)로 이루어진 군으로부터 선택된 절차를 포함한다. 특이적 항체 캡처는 매우 바람직하다. 바람직한 구체예에서, 포유류의 다분화능 CNS 간세포는 신경상피 간세포이다. CNS의 신경상피 간세포의 집단을 분리하기 위한 바람직한 절차는 하기 단계로 이루어진다:

- (a) 신경관 폐쇄(closure) 후, 그러나 신경관의 세포 분화 전 배아 발육 단계에 있는 포유류의 배아로부터 CNS 조직을 제거하고;

(b) 상기 포유류의 배아로부터 제거된 상기 신경관으로 이루어진 세포들을 분리하고;

(c) 섬유아세포 성장인자 및 계배 추출물의 효과적인 양으로 이루어진 신경상피 간세포를 토대(substratum)상 공급-세포-독립(feeder-cell-independent) 배지 및 고착·성장을 위한 배지에 평판하고; 그리고

(d) 신경상피 간세포를 성장시키기 위한 온도 및 대기에서 상기 평판된 세포들을 배양함.

바람직하게 상기 포유류의 배아는 사람, 사람을 제외한 영장류, 말, 개과, 고양이, 소과, 돼지, 양, 토끼목 및 설치류로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또한 상기 토대(substratum)는 피브로넥틴(fibronectin), 비트로넥틴(vitronectin), 라미닌 및 RGD 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 구체예에서, 상기 배지는 섬유아세포성장인자 및 뉴로트로핀 3(NT-3)의 효율적인 양으로 이루어진다.

포유류의 CNS 신경세포로 예정된 전구체 세포의 순수한 집단을 분리하기 위한 방법은 하기 단계로 이루어진다:

(a) 신경관 폐쇄(closure) 후, 그러나 신경관의 교질세포 및 신경세포 분화 전의 배아 발생 단계에 있는 포유류의 배아로부터 CNS 조직의 샘플을 제거하고;

(b) 상기 포유류의 배아로부터 제거된 CNS 조직의 샘플로 이루어진 세포들을 해리시키고;

(c) 신경세포로 예정된 전구체 세포를 명확하게 하도록 선택된 항원을 발현하는 부차집단을 상기 해리된 세포로부터 정제하고;

(d) 신경세포로 예정된 전구체 세포의 토대(substratum)상 공급-세포-독립(feeder-cell-independent) 배지 및 고착·성장을 위한 배지에서 상기 정제된 세포 부차집단을 평판배양하고; 그리고

(e) 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포를 성장시키기 위한 온도 및 대기에서 상기 평판된 세포들을 배양함.

바람직하게 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포를 한정하는 선택된 항원은 배아 신경세포 접착 분자(E-NCAM)이다. 또한 바람직한 정제 단계는 특이적 항원 캡처(capture), 플루어레신, 활성화된 세포 소팅(sorting) 및 자석 구슬 캡처(magnetic bead capture)로 이루어진 군으로부터 선택된 절차를 포함한다. 특이적 항체 캡처가 매우 바람직하다. 상기 포유류의 배아는 사람, 사람을 제외한 영장류, 말, 개과, 고양이, 소과, 돼지, 양, 토끼목 및 설치류로 이루어진 군으로부터 선택된다.

후-유사분열단계의 신경세포를 수득하는 방법은 하기 단계로 이루어진다:

(a) 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 공급하고, 증식 조건내에서 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 배양하고; 그리고

(b) 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포의 증식 조건을 배양 조건으로 변화시키고, 그럼으로써 후-유사분열단계의 신경세포로 분화될 수 있는 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 수득함.

바람직한 상기 배양 조건의 변화는 기초배지에 레티노산을 첨가하거나 기초배지에 유사분열인자를 회수하는 것을 포함한다. 상기 유사분열인자는 섬유아세포성장인자이다. 또한 배양조건의 변화는 기초배지에 신경세포의 성숙인자를 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 바람직한 신경세포의 성숙인자는 소닉 헤지호그(sonic hedgehog), BMP-2, BMP-4, NT-3, NT-4, CNTF, LIF, 레티노산, 뇌-유도된 뉴로트로픽 인자(BDNF) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명의 다른 바람직한 구체예는 여기에서 언급되는 상기 포유류의 CNS 신경세포로 예정된 세포들로 이루어진 분리된 세포성 조성물을 포함한다. 본 발명의 다른 바람직한 구체예는 상기 조성물의 치료적으로 효과적인 양 및 제약학적으로 수용 가능한 담체를 포함한다.

포유류에 있어서 신경세포성 질환(disorder)을 치료하는 방법은 여기에서 언급되는 상기 포유류의 CNS 신경세포로 예정된 세포들로 이루어진 분리된 세포성 조성물의 치료적으로 효과적인 양을 상기 포유류에게 투여하는 것을 포함한다. 포유류의 신경적으로 가벼운 질병을 치료하는 다른 방법은 상기 제약학적 조성물 및 제약학적으로 수용 가능한 담체를 치료적으로 효과적인 양으로 상기 포유류에게 투여하는 것을 포함한다. 상기 조성물은 근육내 투여, 수막강내 투여, 복강내 투여,

정맥내 투여 및 이들의 조합으로부터 선택된 일반적인 방법으로 투여된다. 이와 같은 방법은 분화인자, 성장인자, 세포성숙인자 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것들을 투여하는 것을 포함한다. 상기 분화인자들은 레티노산, BMP-2, BMP-4 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

신경 퇴행성 증후군(neurodegenerative symptom)들을 치료하기 위한 방법은 하기 단계로 이루어진다:

(a) 신경세포로 예정된 전구체 세포의 순수한 집단을 마련하고;

(b) 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포를 성장인자, 신경전달물질, 신경전달물질 합성효소, 뉴로펩티드, 뉴로펩티드 합성 효소, 또는 자유-라디칼 매개된 손상에 대해 보호를 할 수 있는 물질로 유전적으로 형질전환시키고, 그럼으로써 상기 성장인자, 신경전달물질, 신경전달물질 합성효소, 뉴로펩티드, 뉴로펩티드 합성 효소, 또는 자유-라디칼 매개된 손상에 대해 보호를 할 수 있는 물질을 발현하는 교질세포로 예정된 전구체 세포의 형질전환된 부차집단을 생성시키고; 그리고

(c) 상기 포유류에 신경세포로 예정된 전구체 세포의 상기 형질전환된 집단의 효과적인 양을 투여함.

신경학적 활성화에 대한 방법 또는 스크리닝 화합물은 하기 단계로 이루어진다:

(a) 시험관내에서(*in vitro*) 배양된 신경세포로 예정된 전구체 세포나 그 유도체, 또는 이들의 혼합물의 순수한 집단을 마련하고;

(b) 다양한 투약량으로 선택된 화합물을 상기 세포나 그 유도체, 또는 이들의 혼합물에 노출시키고; 그리고

(c) 선택된 시간 동안 상기 선택된 화합물에 대한 상기 세포나 그 유도체, 또는 이들의 혼합물의 반응을 점검함.

신경세포성 또는 신경 퇴행성 질병을 치료하는 방법은 신경세포로 예정된 전구체 세포나 그 유도체, 또는 이들의 혼합물의 효과적인 양을 상기 치료가 필요한 포유류에게 투여하는 것으로 이루어진다. 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포나 그 유도체, 또는 이들의 혼합물은 이종 공여체(heterologous donor) 또는 자기 공여체 autologous donor)로부터 선택될 수 있다. 상기 공여체는 태아, 청소년 또는 성인의 것일 수 있다.

포유류의 CNS 신경세포로 예정된 전구체 세포의 순수한 집단을 분리해내는 방법은 하기 단계로 이루어진다:

(a) 포유류의 배아 간세포의 샘플을 마련하고;

(b) 상기 포유류의 배아 간세포로부터 신경세포로 예정된 전구체 세포를 한정하는 선택된 항원을 발현하는 부차집단을 정제하고;

(c) 상기 정제된 부차집단을 신경세포로 예정된 전구체 세포의 토대(substratum)상 공급-세포-독립(feeder-cell-independent) 배지 및 고착·성장을 위한 배지에서 평판배양하고; 그리고

(d) 상기 신경세포로 예정된 세포를 성장시키기 위한 온도 및 대기에서 상기 평판된 세포들을 배양함.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 신경세포로 예정된 전구체 세포 및 이들의 제조 및 사용 방법을 기술하기에 앞서, 본 발명은 특정한 배열, 공정 과정 및 물질들에 국한되는 것은 아니며, 상기 배열, 공정 과정 및 물질들은 다양할 수 있다. 또한 본 발명의 보호 범위는 첨부된 특허청구범위 및 그것의 균등한 것에까지 미치지 때문에, 여기에서 이용되는 기술은 단지 특정 실시예를 기술하기 위한 목적으로 사용되는 것이며 이에 제한되는 것은 아니다.

본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용된 대상물을 지칭하는 용어는 본 발명의 문맥상에서 특별히 언급하지 않는 이상 복수의 지시 대상물을 포함하는 것이다. 이와 같이, 예를 들어, "배아"라는 용어는 둘 이상의 배아를 지칭할 수도 있으며, "유사분열 촉진인자(mitogen)"는 둘 이상의 유사분열 촉진인자의 혼합물을 지칭하는 것일 수도 있고, 그리고 "인자"란 둘 이상의 인자의 혼합물을 지칭하는 것일 수도 있다.

본 발명을 개시하고 청구함에 있어서 하기의 전문 용어는 다음에서 정의한 바와 같이 사용될 것이다.

여기에서 사용되는 "자가 증식"이란 예를 들어 신경상피 간세포(neuroepithelial stem cell)가 두 개의 딸세포를 생산하기 위하여 분할되어 상기 딸세포 중 적어도 하나가 다분화능 신경상피 간세포로 될 수 있는 기능을 의미하거나, 또는 신경세포로 예정된 전구체 세포(NRP cell)가 분할되어 두 개의 딸세포를 생산하여 적어도 하나가 신경세포로 예정된 전구체 세포로 될 수 있는 기능을 의미하는 것이다.

여기에서 사용되는 "클론 밀도(clonal density)" 및 이와 유사한 용어는 선택된 배양 디쉬에 평판배양되는 경우 단일 및 비-침해(non-impinging) 세포가 분리될 만큼 낮은 밀도를 의미한다. 대표적인 상기 클론 밀도는 약 225 세포/100mm 배양 디쉬이다.

여기에서 사용되는 "공급-세포-독립 고착 배양(feeder-cell-independent adherent culture)" 및 이와 유사한 용어가 의미하는 바는 대상 조직으로부터 취한 세포가 첨가되는 배양 디쉬에 우선 평판하여, 다른 세포 층이 존재하지 않는 상태의 시험관내에서(*in vitro*) 세포를 성장시키는 것을 말한다. 공급 세포 배양에 있어서, 상기 공급 세포는 대상 조직으로부터 취한 세포들을 부착시키기 위한 토대(substratum)를 제공하고, 추가적으로 유사분열 촉진인자 및 생존인자로써 공급된다. 여기에서 사용되는 공급-세포-독립 고착 배양은 화학적으로 정의된 토대, 예를 들어 피브로넥틴을 사용하고, 유사분열 촉진인자 또는 생존인자는 정제된 인자 또는 다른 세포 또는 조직으로부터 취해진 추출물(crude extracts)을 함유한 액체 배양 배지를 보충하기 위하여 제공된다. 그러므로 공급-세포-독립 배양에 있어서, 상기 배양 디쉬내의 세포들은 대상 조직으로부터 유도된 초기 세포(primarily cell)들이고, 대상 조직으로부터 유도된 세포들의 성장을 지지하도록 요구된 다른 세포 형태들을 포함하지는 않는다.

여기에서 사용되는 "효과적인 양"이란 비독성이며, 바람직한 효과 및 기능을 수행하기 위해 제공될 수 있을 만큼의 성장인자, 생존인자 또는 다른 인자의 효과적인 양을 의미한다. 예를 들어, 여기에서 사용되는 FGF의 효과적인 양이란 다른 본질적인 영양원 및 인자 등이 조합되어 사용되는 경우 NEP 세포의 자가 재생 및 증식을 위하여 선택된 양을 의미한다. 이식을 위한 NRP 세포나 그 유도체, 또는 이들의 혼합물의 효과적인 양은 선택된 효과를 얻기 위하여 충분한 세포의 양 또는 수를 의미한다. NRP 세포들은 일반적으로 약 5~50,000 세포/ μ l의 농도로 투약될 것이다. 이식은 일반적으로 주사 부위당 약 15 μ l까지로 이루어질 것이다. 그러나 중추신경계의 외과적 수술과 함께 이루어지는 이식은 상기와 같은 농도에서 여러 번 행하여질 수 있다. 이와 같이, 이식에 사용되는 세포 수는 단지 실용적인 면에서만 제한되고, 상기 수들은 본 발명의 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 과도한 실험을 하지 않고도 결정될 수 있다.

여기에서 사용되는 NRP 세포의 "유도체"란 유전자 형질도입, 분화 또는 이와 유사한 공정에 의하여 시험관내에서(*in vitro*) NRP 세포로부터 유도된 세포를 의미하는 것이다.

여기에서 사용되는 "NRP 세포를 포유류에게 투여하는 것"이란 수용체(recipient)의 CNS 조직 가까이 또는 CNS 조직 내로 이식 또는 삽입한다는 의미이다. 상기 투여는 외과적 수술 즉, 본 발명의 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 주입 캐놀라 및 바늘 등을 수단으로 하는 모든 방법에 의해 이루어진다.

여기에서 사용되는 "이종(heterologous)"이란 이식 수용체와는 다른 개체, 조직 또는 세포를 의미하는 것이다. 이식 공여체는 이식 수용체와 같이 동종 또는 이종으로부터 취하여질 수 있다. 예를 들면, 이식을 위한 NRP 세포의 이종 공여체는 이식 수용체와 같이 다른 종으로부터 취하여질 수 있다.

여기에서 사용되는 "자기(autologous)"란 신체내에서 자가 발생적인 것을 의미한다. 예를 들어, 이식을 위한 조직 또는 세포의 자기 공여체는 이식을 받는 동일 개체이다. 또 다른 예로는, 자기 세포는 개체내에서 기인하며, 전이되고, 이식되는 세포들이다. 생체내(*in vivo*) 조작은 세포를 회수하고 상기 세포 또는 유도체를 이식하는 그 사이에서 이루어질 수 있으나, 이식 전에 필수적으로 요구되는 것은 아니다.

여기에서 사용되는 "형질전환", "형질도입" 및 "형질감염" 등은 삽입 또는 전이의 방법에 관계없이, 유전자 또는 유전자들을 NRP 세포내로 삽입 또는 전이시키는 것을 의미한다. 그러므로 형질전환은 칼슘 인산 형질감염, DEAE-텍스트란 형질감염, 폴리브렌 형질감염, 일렉트로포레이션(electroporation), 리포펙션(lipofection) 및 바이러스 감염 등과 같이 당업계에 알려진 모든 다른 방법에 의하여 이루어질 수 있다.

본 발명은 쥐 및 사람으로부터 분리된 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 이용하는 것에 관한 것이다. 그러나 본 발명은 모든 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 포함하는 것이며, 쥐나 사람의 신경세포로 예정된 전구체 세포들에 한정되는 것은 아니다. 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들은 사람, 사람을 제외한 영장류, 말, 개과, 고양이, 소과, 돼지, 양 및 토끼류 등으로부터 선택 및 분리될 수 있다.

중추신경계의 다분화능 간세포는 직접적으로 또는 계통이 예정된 중간 전구체의 발생을 통하여 분화된 신경세포 및 교질세포를 발생하게 할 수 있다. 망막이 분화됨에 있어서, 다분화능 망막 전구체는 중간 전구체가 존재하지 않도록 최종 분열 단계에서조차도 분화된 세포들의 모든 조합들을 발생시킬 수 있다. 중추신경계의 다른 부분에서는, 이와는 반대로 레트로바이러스를 표지시켜 연구한 결과 하나의 세포 타입 또는 제한된 수의 세포 타입을 발생시키는 계통 예정된 전구체의 존재가 암시적으로 확인되었다. 상기 이분화능(bipotent) 회돌기아교세포-타입-2-성상아교세포(O-2A) 및 신경세포 전구체와 같은 중간 단계 전구체는 조직 배양 연구에 개시된 바 있다. 그러나 아직은 신경세포 및 교질세포로 분화가 가능한 다분화능 배아 또는 성인 간세포, 또는 다른 간세포로부터 취해진 중간 계통 예정된 전구체의 발생이 최근에 출원된 미국특허출원 제08/909,435호(1997. 7. 4 출원)까지만 보더라도 발견되지는 않았다. 이와 같이 배지에서 동정된 다분화능 간세포, 및 생체내(*in vivo*) 및 시험관내(*in vitro*)에서 동정된 감각 전구체(committed precursor)와의 계통 관계는 지금까지 발견되지 않았다. 발육(development)될 수 있는 모델들은 (1) 계통적으로 관련된 세포를 보여주는 다분화능 및 더욱 감각된 간세포(committed stem cell) 또는 (2) 분화의 독립 통로를 나타내는 세포들을 포함하였다.

쥐(rat) 척수를 발육시키는 것은 상기 분화를 연구하는 것에 대한 이상적인 모델을 보여준다. 배아 10.5일째에서는, 미방(caudal) 신경관이 생체내(*in vivo*) 및 시험관내(*in vitro*)에서 네스틴 면역반응성 분할 세포의 동종 집단으로 나타난다. 상기 초기 동종 세포들은 특징적인 공간적 그리고 시간적 프로파일(profile)에 있어서 신경세포, 회소돌기세포 및 성상돌기세포를 발생시키기 위하여 며칠에 걸쳐서 형태를 갖추어간다(patterned). 신경조직발생(neurogenesis)은 등배 경사(ventro-dorsal gradient)를 유도하여 쥐(rat)에 있어서 배아 13.5일째에 후유사분열을 진행시키고 초기 신경세포를 제공한다. 신경조직발생은 이들 동안 더 진행되어 회돌기아교세포 전구체의 분화를 유도하고 성상돌기아교세포의 분화를 유도한다.

시험관내에서(*in vitro*) 더 늘어난 기간 동안 분화된 세포로써 쥐(rat)의 배아 10.5일째로부터 분리된 신경상피 간세포(NEP cell)를 성장시키는 방법은 미국특허출원 제08/852,744호에서 개시하고 있으며, 더 나아가 CNS내의 세가지 주요 세포 타입을 발생시킬 수 있는 집단들을 제시하였다. 이와 같은 NEP 세포들은 매개 신경모세포(intermediate neuroblast)를 통해 또는 직접적으로 중결 분화의 한 부분과 같이 신경세포로 분화될 수 있는 분열되는 다분화능 간세포로 나타난다. 신경세포들이 매개체 또는 더욱 예정된 전구체를 통하여 NEP 세포들로부터 분화되었는지에 대하여 측정하기 위해, NEP 세포들의 분화 배지로부터 취한 면역학적으로 한정된 집단의 종류를 분리하여 특화하였다. 여기에서는 형태학적 그리고 표현형적으로 NRP들과 동일성이 있는 세포들을 NEP 세포 배지로부터 분리할 수 있다는 것을 보여주었다. 클로날 분석(clonal analysis)은 각각의 NEP 세포들이 신경세포 전구체의 발생을 통하여 신경세포를 발생시킨다는 것을 보여주고, 그리고 신경세포로 예정되고 교질세포로 예정된 전구체를 발생시킨다는 것을 보여준다. 더 나아가 E-NCAM⁺(양성 배아 신경세포 접착 분자) 세포들이 배아 13.5일째에 신경관 배지에서 나타나는 것을 보여주었으며, 상기 세포들이 유사분열을 한다는 것과, 성상아교세포 또는 회돌기아교세포와 같은 것은 아니지만 다양한 신경세포 표현형을 발생시킬 수 있는 자가 증식성 간세포라는 것을 보여주었다. 이와 같이 신경세포로 예정된 전구체(NRP)들은 생체내(*in vivo*) 신경세포의 분화의 단계에서 동정될 수 있다. 더욱이 NRP는 생쥐(mouse)의 배아, 생쥐 배아 간세포(ES cell) 및 사람의 배아 척수로부터 분리되고 배양될 수 있다는 것을 제시한다. 이와 같은 결과들은 다분화능 및 신경세포로 예정된 간세포들 사이에 직접적인 계통 관계가 존재한다는 것을 나타내는 것이며, 신경세포의 분화가 발생 운명에 있어서 커다란 제한요소를 포함한다는 것을 제시한다.

도 1은 척수 분화에 대한 모델을 보여주는 것이다. 상기 모델은 신경분(neural crest)의 조혈 및 분화에 대하여 제시된 것과 유사하다(D.J. Anderson의 「신경분 계통 문제: 조혈과정이란?」, 3 Neuron 1-12(1989)). 상기 모델에 의하면, NEP 세포(10)는 미방 신경분의 동종 세포 집단으로 나타나며, 상기 신경분은 네스틴(즉, 네트틴⁺(nestin⁺))을 발현시키지만 다른 계통 표지(lin⁻)를 발현시키지는 않는다. 상기 세포들은 배지내에서 분열되고 자가 증식되고, 그리고 분화된 표현형을 발생시킨다. 종전의 결과들은 더욱 제한된 분화능을 지닌 즉시 분화되는 전구체를 제시하였다. 상기 전구체들은 교질세포로 예정된 전구체(14)를 포함하며, 상기 전구체(14)는 회돌기아교세포(18) 및 성상아교세포(22)를 발생시키고, 또한 다양한 종류의 신경세포(30 및 34)들을 발생시키는 신경세포 프로그엔이터(progenitor)를 발생시킨다. 또한 상기 모델은 PNS 신경세포(42), 시반세포(46) 및 유연근(smooth muscle) 세포(50)로 분화될 수 있는 신경분 세포(38)도 NEP 세포로부터 유래한다는 것을 나타내고 있다. 그러므로 상기 모델은 다분화능 전구체(NEP 세포)들이 매개 전구체를 통하여, 분화된 세포(즉, 회돌기아교세포, 모토뉴런(motoneuron), PNS 신경세포, 시반세포 및 유연근 세포)를 발생시키는 것을 제시한다. 상기 모델은 결과적으로 신경세포로 예정된 증식 잠재성을 갖는 세포들이 존재한다는 것을 나타낸다.

NEP 세포 배지는 분화된 세포 타입을 얻기 위하여 분류될 수 있는 순간적으로 나타나는 많은 세포들의 근원이 되는 세포들을 제공한다. 본능적 영향하의 발육에 대한 잠재성이 CNS내 다양한 표현형을 발생시키게 되고 그러한 발육 잠재성으로 인하여, 상기에 언급한 결과들은 진보적인 제한요소를 만나는 초기 다분화능 세포들을 묘사하는 모델을 지지하는 직접적

인 증거이다. 증거는 초기 다분화능 NEP 세포들이 시험관내(*in vitro*) 신경세포로 예정된 전구체를 발생시키고, 그리고 상기 신경세포로 예정된 전구체들이 생체내(*in vivo*)에 존재한다는 것을 말해준다. 또한 NRP는 아세포(blast cell)의 특징을 가지고 있다는 것을 보여주며, 다분화능 간세포 및 더욱 예정된 NEP 세포들 사이에 직접적인 계통 관계가 존재하는 것을 보여준다.

이러한 결과들은 E-NCAM 면역반응성 세포들이 그것들의 분화능에 있어서는 제한적이라는 것을 제시하였다. E-NCAM⁺ 세포들은 테스트된 모든 배양 조건하에서 회돌기아교세포 또는 성상아교세포로 분화되는 데에 실패하였다. 반대로, 동일한 조건하에서 NEP 세포들은 신경세포, 성상아교세포 및 회돌기아교세포들로 분화되었으며, A2B5 면역반응 세포들은 회돌기아교세포로 분화되었다. 이러한 이유로 인하여, E-NCAM 면역반응성 세포들은 신경세포로 예정된 전구체로 여기에서 설명하고 있다.

면역 및 이중-표지 결과들은 E-NCAM이 다분화능 NEP 세포들로부터 발생된 특수한 신경세포의 하부계통을 동정하는데에 이용될 수 있다는 것을 증명한다. 조혈 시스템 및 신경분의 매개 전구체에 대한 마커와 같이, E-NCAM 및 A2B5 교질 세포 전구체 마커는 매개 전구체에 비하여 독특한 것은 아니다. 이와 유사하게, A2B5는 동일한 종류의 신경세포를 인지하는 것으로 나타났고, 동일한 배양 조건에서 성상아교세포에 의하여 일시적으로 발현된다. 그럼에도 불구하고, 특정한 배양 조건하에서는 여기에서 정의된 상기 마커들이 매개 전구체를 선택하는데 사용될 수 있으며, 그럼으로써 분화능에 제한성을 갖는 공발현되는 초기 세포 표면 에피토프를 나타내는데에 이용될 수 있다.

실시에

여기에서 나열되는 실험들에 사용되는 기초 배지(NEP 배지)는 DMEM-F12(GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD)에 100 μ l/ml의 트랜스페린(Calbiochem, San Diego, CA), 5 μ l/ml의 인슐린(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 16 μ l/ml의 푸트레신(putrescine)(Sigma), 20nM의 프로게스테론(progesterone)(Sigma), 30nM 셀렌산(selenious acid)(Sigma), 1mg/ml 소 혈청 알부민(GIBCO/BRL), 플러스 B27 첨가제(GIBCO/BRL), 20ng/ml의 기초 섬유아세포성장인자(bFGF) 및 10% 계배 추출물(CEE)로 보충하여 이루어졌다. 일반적으로 상기 첨가제들은 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 100 $\times$ 의 농도로 보관되었다. 정상적으로 200ml의 NEP 배지를 CEE를 제외한 모든 첨가제들과 함께 준비하였고, 2주 내에 사용하였다. CEE를 배양된 세포들을 공급할 때 NEP 배지에 첨가하였다.

FGF 및 CEE는 D.L. Stemple 및 D.J. Anderson의 상기서; M.S. Rao 및 D.J. Anderson의 상기서; 및 L. Sommers와의 포유류의 신경조직발생에 있어서 bHLH 전사인자 MASH1의 세포기능, 15 Neuron 1245-58(1995)에서 개시된 바와 같이 마련되었다. FGF도 또한 상업적으로 입수 가능하였다(UBI).

간단히 말하면, CEE는 하기와 같이 마련되었다. 병아리 알(chick egg)들을 습기가 많은 상태에서 38 $^{\circ}$ C로 11일 동안 배양하였다. 알들을 세척하고 배아들을 제거하여 4 $^{\circ}$ C의 무균 최소 에센셜 배지(글루타민 및 Earle 염을 함유한 MEM)가 들어있는 페트리디쉬에 두었다. 약 10개의 배아들을 30ml 주사기를 이용하여 50ml의 테스트 튜브내로 담가두었다. 상기 절차들은 일반적으로 약 25ml의 배지에서 이루어진다. 25ml의 각각의 배지에 MEM 25ml를 첨가하였다. 상기 튜브를 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 흔들어주었다. 무균의 하이알루로니다아제(hyaluronidase)(배아 1mg/25g)(Sigma)를 첨가하였고, 그리고 상기 혼합물을 30,000g로 6시간 동안 원심분리하였다. 상층액을 회수하여 0.45 μ m의 필터에 통과시킨 후 0.22 μ m 필터로 통과시켜 -80 $^{\circ}$ C에서 사용할 때까지 보관하였다.

라미닌(Laminin)(Biomedical Technologies Inc.)은 증류수에 용해시켜 20mg/ml의 농도로 맞추고 조직 배양 플레이트(Falcon)에 처리하였다. 피브로넥틴(fibronectin)(Sigma)은 10mg/ml의 스톡 농도로 재현탁시키고, -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였고, 그리고 D-PBS(GIBCO/BRL)내에서 250 μ g/ml의 농도로 희석시켰다. 상기 피브로넥틴 용액을 조직 배양 디쉬에 처리하고 즉시 회수하였다. 그 다음, 상기 라미닌 용액으로 처리하고 플레이트를 5시간 동안 배양하였다. 과량의 라미닌을 회수하였고, 상기 플레이트를 건조한 상태로 두었다. 코팅된 플레이트(coating plate)를 물로 세척한 후에 다시 건조시켰다. 피브로넥틴은 NEP 세포들이 콜라겐 또는 폴리-L-리신(PLL)에 고착되지 않고 라미닌에는 불완전하게 고착되기 때문에, 피브로넥틴은 NEP 세포들을 위한 성장 기질로 선택되었다. 이와 같이 배지내의 NEP 세포들을 유지시키기 위한 다음의 실험들은 피브로넥틴으로 코팅된 디쉬에서 이루어졌다. 라미닌으로 코팅된 디쉬들이 사용되었으며, 이는 NEP 간세포의 분화를 촉진하기 위해서였다.

클로날 분석(clonal analysis)을 위하여, 트립신화에 의하여 추출된 세포들은 35mm 디쉬당 50~100개의 세포 밀도로 평판되었다. 개개의 세포들이 동정되었고 그리스 펜슬(grease pencil)로 위치를 디쉬 위에 표시하였다. 세포들을 상기 언급한 대로 10~15일에 걸쳐서 첨가제와 함께 DMEM/F12 내에서 성장시켰다.

본 발명의 세포들은 제약학적 조성물을 포함하는 조성물의 제조에 이용될 수 있으며, 상기 조성물은 적절하게 조제되고 투여됨으로써 관련 신경 조직의 상해, 질병 또는 퇴행성으로 야기된 결함, 쇠약 및 다른 기능 장애의 치료를 가능하게 한다. 제한되지 않는 실시예에 의하여, 본 발명에 의하여 마련된 바람직한 세포들을 예를 들어, 세포 치환 치료법을 효과적이게 하는 수단과 같은 이식을 통하여 투여함으로써 세포 상해 또는 쇠약이 이루어지는 경우 이를 치료할 수 있다. 이와 같이 예를 들어, 상기 세포들은 성장 및 분화의 촉진을 위한 성장 배지내에서 마련될 수 있다. 바람직한 배지는 예를 들어, 성장 또는 분화 인자, 예를 들어 레티노산, BMP-2, BMP-4 또는 NT-3, NT-4, CNTF 및 BDNF 등과 같은 하나 이상의 뉴로트로핀(neurotrophin)을 포함할 수 있다. 그러므로 상기 배지내에서 바람직하게 자란 세포들은 수막강내적으로 I.V., I.P. 또는 표적 부위에 세포를 주입하는 최선의 수단이면 무엇이든 상관없이 이용하여 주입될 수 있다. 이러한 타입의 특정한 투여 형태들은 의사나 전문가에게 잘 알려져 있다.

본 발명의 세포들은 진단적으로 적용함에 있어서 유용하고, 스크리닝 분석과 같은 예를 들어 신경세포 표지 및 다른 결함 파트너 또는 리간드, 모듈레이터 또는 세포 성장 및/또는 분화의 모듈레이터와 같은 기능을 할 수 있는 인자들을 동정하는 데에 사용하기 위하여 마련될 수 있다. 본 발명의 세포들은 예를 들어 세포성장 및 분화에 있어서 결함을 밝혀내기 위한 분석법에 있어서 양성 대조군으로써, 그리고 세포성장 및 분화를 야기시키는 인자로서 사용될 수 있다.

본 발명의 세포들은 여러 가지 치료적 목적에 이용될 수 있으며, 이러한 치료적 목적은 제약학적 조성물 및 바람직한 담체들을 마련하는 것을 포함하고, 이는 치료를 필요로 하는 개체에게 투여함으로써 상해, 질병 또는 유전적으로 야기된 신경적인 결손과 관련한 다양한 세포성 쇠약, 기능장애 또는 다른 변칙 또는 비정상적인 것을 치료할 수 있다. 본 발명에서 숙지되는 파킨슨 병, 헌팅톤 병, 알츠하이머 병, 및 질병 또는 조건들은 상해, 외상, ALS 병(또는 Lou Gehrig 병)으로 야기되는 기능장애를 포함한다.

실시예 1

신경세포로 예정된 전구체 분할이 생체내에서(*in vivo*) 정상적으로 발견되는 지에 대하여 측정하기 위하여, 쥐(rat) 척추 배아 13.5일째의 단편들을 초기 신경세포 표지의 패널(panel)로 분석하였다. 단편들은 배아 13.5일째에 신선하게 냉동된 배아의 잘라진 부분들이었고, 이뮤노사이토케미스트리(immunocytochemistry)에 의하여 표지되었다. 염색절차를 당업계에 알려진 방법대로 수행하였다. E-NCAM(Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa) 및 β -III 튜블린(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)에 대한 항체로 세포들을 이중-표지시키거나, 또는 세포들을 E-NCAM로 염색하고 모든 세포를 동정하는 뉴클리어 마커(nuclear marker)인 DAPI로 카운터스테인하였다. 모든 2차 모노클로날 항체는 Southern Biotechnology로부터 입수하였다.

폴리시알레이트된(polysialate) 또는 배아의 N-CAM(E-NCAM)은 신경세포 전구체에 대한 적당한 마커(marker)가 된다는 것을 밝혀냈다. E-NCAM 면역활성 세포들은 배아 13.5일째에 첫 번째로 검출되었다. E-NCAM 면역활성 세포들은 신경관의 변방대(margin)에서 발견될 수 있었으나 증식되는 난할대(ventricular)에서는 발견되지 않았다. β -III 튜블린으로 이중표지된 것은 대부분의 E-NCAM 면역반응성 세포들이 상기 신경세포 마커를 공발현하는 것을 제시하였다. 더욱 중간 쪽에 나타나는 세포 소집단은 E-NCAM⁺였으나, β -III 튜블린 면역반응성을 나타내지는 않았고, E-NCAM이 β -III 튜블린에 앞서서 발현되는 신경세포 전구체로 분화된 초기 및 특이적 마커일 수 있다는 것을 제시하였다.

실시예 2

E-NCAM 면역반응성 세포들을 특정화하기 위하여, 배아 13.5일째의 척수를 해리시키고, E-NCAM 면역반응성 세포들을 항체의 패널(panel)로 염색하였다(표 1). Sprague-Dawley 쥐(rat) 배아를 배아 13.5일째에 제거하여 Hanks 발란스된 염용액(HBSS, Gibco)이 들어 있는 페트리디쉬에 두었다. 상기 배아의 신경 절편(trunk segment)을 텅스텐 바늘을 이용하여 절개하였고, 행군 후 신선한 HBSS로 옮겼다. 척수들을 가느다란 5번 핀셋(forceps)을 이용하여 주변 연결조직으로부터 기계적으로 절개하였다. 분리된 척수들을 0.05% 트립신/EDTA 용액에서 20분간 배양하였다. 상기 트립신 용액을 10% 우태아 혈청(FBS)을 함유하는 신선한 HBSS로 대체시켰다. 파스테르 피펫으로 세포들을 해리시키기 위하여 상기 절편들을 서서히 부수었다. 그 후 부서진 세포들을 높은 밀도로 PLL/라미닌으로 코팅된 35mm 디쉬에 평판하였고 24시간 후에 염색하였다.

A2B5 및 α -GalC와 같은 세포 표면 마커를 염색하면서 살아있는 세포를 배양한다. 내부항원에 대한 항체로 세포를 염색하기 위하여 배지들을 냉각된 메탄올에서 고정시켰다. 여기에서 상기 내부항원들은 다음과 같다: 성장아교세포를 특이하게 인지하는 GFAP(A. Bignami 외, 이뮤노플루오레신(immunofluorescence)에 의한 성장아교세포내 교질섬유세포 산성 단

백질의 자리화(localization), 102 Neurosci. Lett. 137-41(1989)); 신경세포들을 염색하는 β -III 튜블린(DAKO) 및 RT-97(E. Geisert 및 A. Frankfurter, 쥐(rat)의 β -튜블린 족의 면역염색에 의해 가시화시킴으로써 상해에 대해 신경세포의 반응 관찰, 102 Neurosci. Lett. 137-41(1989)); 분화된 간세포에 대한 마커인 네스틴(U. Lendahl 외, 중간 필라멘트 단백질의 새로운 족(class)을 발현시키는 CNS 간세포, 60 Cell, 585-95(1990)); 또는 분화된 세포들의 수를 측정하기 위한 마커인 5-브로모데옥시우리딘(BrdU, Sigma). 이중 또는 삼중으로 표지하는 실험들은 배양되는 세포들과 일차 항체들을 적절하게 결합시키면서 동시에 배양함으로써 이루어졌고, 그 다음 비-크로스-반응적(non-cross-reactive) 이차 항체로도 결합시키면서 이루어졌다(M. Mayer 외, 희돌기아교세포의 발생, 돌연변이 및 생존을 위한 섬모 뉴트로핀 인자 및 루케미아(ciliary neurotrophic factor and leukemia) 저해 인자, 120 Development 142-53(1994)). 삼중 표지 실험에 있어서, 배지들을 1시간 동안 차단 완충제 내에서 일차 항체로 배양하였고, PBS로 행군 후, 1시간 동안 차단 완충제 내에서 중-특이적 이차 항체와 함께 배양하였다. 배지들은 PBS로 3번 세척되었고 플루오레신 현미경으로 검사하였다. 동시에 4개의 항체로 표지하기 위하여, 살아있는 세포들은 표면 항체 A2B5 및 α -GalC과 함께 이중층이 생기지 않도록 우선 배양되었다. 그 후 세포들을 냉각된 메탄올로 10분 동안 고정시켰고 α - β -III 튜블린 및 적당한 이차 항체로 염색하였다. 상기 염색 결과를 관찰한 후에(거의 음성으로 관찰됨), 클론들을 GFAP 및 표면 항체의 first set에 대한 두 번째 층으로 염색하였다. 마지막으로, GFAP에 대한 이차 항체가 첨가되었다. 이러한 절차는 세 개의 플루오레신-칼라 컨쥬게이트된 이차 항체를 이용하여 4개의 항체들로 염색하는 것을 가능하게 하는 것이었다.

전체 세포들의 $60 \pm 3\%$ 로 구성된 E-NCAM 면역반응성 세포들은 평판 후 24시간에서 분리된 배지에서 나타났다. 잔류하는 세포들의 대부분은 A2B5⁺였다. 미국특허출원 제08/852,744호는 발육단계에서 A2B5 면역반응성 세포들은 A2B5를 공발현시키지 않는다는 것을 개시한 바 있다. 상기한 바와 같이, β -III 튜블린 또는 E-NCAM 면역반응성 세포는 A2B5를 공발현시키지 않았다. 배양된 E-NCAM 면역반응성 세포들($85 \pm 8\%$)은 네스틴 면역반응성과 마찬가지로 β -III 튜블린 면역반응성을 공발현시켰지만, 교질세포 전구체 면역반응성을 특정화시키는 마커들을 발현시키지는 않았다. 약 20%의 E-NCAM⁺ 세포들은 24시간 동안 분할되었다. 분할된 E-NCAM⁺ 세포들 대부분은 β -III 튜블린을 공발현시켰으며, 상기 세포 집단은 분할되는 신경아세포(neuroblast)라는 것을 나타내었다. 아직도 상기 높은 비율의 상기세포들이 긴 표지 기간과 함께 상기와 같은 조건하에서 분할된다고 하는 것은 알려지지 않는다. 그러나 이러한 집단들이 비록 신경세포로 충분히 감각된 세포들의 부분들을 포함할지라도 이렇게 감각된 신경세포(committed neuron)들은 조직 배지내에서 확장과 분열과 함께 상기 집단으로부터 제거될 수 있다. 표 2는 이러한 세포들의 항원 프로필에 대한 결과를 요약한 것이며, 여러 가지 다른 항원들을 발현하는 배아 13.5일체의 배아로부터 취하여진 E-NCAM⁺ 세포의 백분율을 보여준다. 이러한 결과들은 배아 13.5일체의 척수로부터 취하여진 E-NCAM⁺ 세포들이 신경세포를 발현시킨다는 것을 나타내며, 교질세포나 마커를 발현시키지는 않는다는 것을 나타낸다.

【표 1】

항체 / 종류	출처	인식된 항원	인식된 세포 타입
Anti-NCAM/mouse IgG	DSHB ^a	Polysialated N-CAM	신경세포
Anti-Nestin	DSHB	Nestin	NEP 세포
Anti- β -III tubulin/mouse IgG1	Sigma ^b	Intermediate filament	신경세포
RT-97	DSHB	Neurofilaments	신경세포
Anti-A2B5/mouse IgM	BMB ^c	Ganglioside	희돌기아교세포 및 전구체
Anti-GFAP/rabbit IgG	Accurate ^d	Glial fibrillary acid	성상아교세포
Anti-NF60	Chemicon ^e	Neurofilament 60	신경세포
Anti-GalC/mouse IgG	BMB	Galactocerebroside	희돌기아교세포 및 전구체
Anti-Peripherin	Chemicon	Peripherin	모토뉴런, PNS 신경세포
Anti-MAP kinase	Chemicon	MAP2 Kinase	신경세포

a : 미국 Iowa 주, Developmental Studies Hybridoma Bank

b : 미국 MO 주, St. Louis, Sigma Chemical Co.

c : 미국 MD 주, Gaithersburg, Boehringer Mannheim Biochemicals

d : 미국 NY 주, Westbury, Accurate

e : 미국 CA 주, Temecula, Chemicon

[표 2]

항원	% 발현
α -Nestin	98 %
α - β -III tubulin	50 %
RT-97	95 %
α -NF M	100 %
α -MAP kinase	100 %
A2B5	0 %
α -GFAP	0 %
α -NF 60	0 %
α -GalC	0 %
α -Peripherin	0 %

실시예 3

E-NCAM 면역반응성 세포들의 분화 가능성을 측정하기 위하여, E-NCAM⁺ 세포들을 이뮤노패닝(immunopanning)에 의하여 정제하였고 격자로 된 디쉬에 클론 밀도로 평판하였다. 배아 13.5일째 세포들을 실시예 2에 의하여 마련하였다. E-NCAM⁺ 세포 집단들을 Wysocki 및 V. Sato, 림프구 "패닝(panning)": 세포 분리(selection) 방법, 75 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 2844-48(1978); 및 M. Mayer 외, 상기서에 의해 개시된 방법대로 항체-캡처(antibody-capture) 기술을 이용하여 배아 13.5일째 되는 세포들로부터 정제하였다. 간단하게, 세포들을 트립신처리하고 그 결과로 얻어진 세포 현탁액을 A2B5-항체-코팅된 디쉬에 평판하여 상기 플레이트에 A2B5⁺ 세포들을 결합시켰다. 상기 상층액을 제거하였고, 그 플레이트를 J. Bottenstein 및 G. Sato, 무혈청 보충 배지내에서의 쥐(rat) 뉴로블라스토마 세포주의 성장, 76 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 514-17(1979)에 언급되어 있는 바와 같이 첨가제가 보충되어 있는 DMEM(DMEM-BS)으로 세척하였다. 상기 상층액을 E-NCAM-항체-코팅된 디쉬에 평판하고 E-NCAM 면역반응성 세포들과 결합하도록 방치하였다. 여기에서 결합된 세포들을 플레이트로부터 긁어모았고, 하나의 웰당 5,000개의 세포로 300ml DMEM-BS ± 성장인자의 피브로넥틴/라미닌-코팅된 글라스 커버슬립(glass coverslip)상에 다시 플레이트하였다.

플레이트를 코팅하는 A2B5 및 E-NCAM 항체들은 5 μ g/ μ l의 농도로 이용되었다. 세포들을 37℃ 배양기내에서 20~30분 동안 플레이트에 결합되도록 방치하였다. 성장인자들은 하루 걸러서 10ng/ml의 농도로 첨가되었다. 재조합된 bFGF 및 뉴로트로핀 3(NT-3)은 PreproTech로부터 구입하였고 레티노산(RA)은 Sigma에서 구입하였다.

24시간 후에, 여러개의 이뮤노패닝된 E-NCAM⁺ 세포들은 실시예 2에서 기재된 방법에 따라서 이뮤노사이토케미스트리에 의하여 분석되었다. 바로 그때 상기 세포들의 95% 이상이 E-NCAM⁺였다. 정제된 그리고 염색된 세포들을 격자 클로날 디쉬에 평판되었고, 개개의 E-NCAM⁺ 세포들을 동정하여 실시예 2의 이뮤노사이토케미스트리에 의하여 분석되었다.

테스트된 모든 사이토키닌의 최적 성장은 세포가 FGF(10ng/ml) 및 NT-3(10ng/ml)에서 배양되었을 때에 관찰되었다. FGF 및 NT-3의 존재하에서, 단일 E-NCAM⁺ 세포들은 배지에서 분할되어 한 개에서 몇 백개의 세포들로 클로니들이 생성되었다. 5일째에 이르러서, 대부분의 클로니들은 E-NCAM 면역반응성을 발현하도록 유지된 20~50개의 딸세포들을 포함하였다. 딸세포들은 밝은 상(phase)으로 나타났고 짧은 진행과정(processes)을 갖는다. 이 단계에서는 대부분의 E-NCAM⁺ 세포들은 β -III 튜블린 또는 뉴로필라멘트-M 면역반응성을 발현하지는 않는다.

E-NCAM⁺ 클론들의 분화를 촉진하기 위하여, 상기 FGF- 및 NT-3-함유 배지를 레티노산(RA), 및 유사분열 촉진인자(mitogen)인 bFGF 함유 배지로 치환하였다. 이와 같은 분화 배지에서, E-NCAM⁺ 세포들은 분할 및 정교하고 광범위한 과정들을 멈추고 신경 마커가 발현되기 시작하였다. 모든 세포들을 동정하기 위한 신경 및 교질세포 마커 및 DAPI 히스토케미스트리로 클론을 4중 표지함으로써 모든 클론들이 β -III 튜블린 면역반응성 세포들 및 뉴로필라멘트-M(NF-M) 면역반응성 세포들을 포함하고 있다는 것과 E-NCAM⁺ 클론들은 회돌기아교세포 또는 성상아교세포들로 분화되지 않는다는 것을 알 수 있었다.

표 3은 DAPI, α - β -III 튜블린, A2B5 및 α -GFAP로 124 E-NCAM⁺ 클론들을 4중으로 표지함으로써 얻어진 결과를 나타낸 것이다.

[표 3]

발현된 항원	클론
α - β -III tubulin	100 %
A2B5	0 %
α -GFAP	0 %

실시예 4

본 실시예에서는, 실시예 2과 동일한 방법으로 분리된 배아 13.5일째 척수로부터 유도된 이뮤노패닝된 A2B5⁺ 세포들을 기초배지에 FGF 및 NT-3이 첨가된 신경세포 촉진 배지에서 배양하였다. 배양주를 5일 동안 발육시켰고, 그리고 실시예 3에서와 같이 RA-함유 배지로 교체하였으며, 시스터 플레이트를 E-NCAM 또는 A2B5 면역반응성을 위하여 염색하였다.

어떠한 A2B5 이뮤노패닝된 세포도 신경세포의 성장을 진척시키는 조건하에서 성장시켰을 경우 E-NCAM 면역반응성이 나타나지 않았다. 그러나 모든 A2B5 이뮤노패닝된 세포들은 A2B5 면역반응성을 발현하도록 유지하여, 교질세포 전구체 세포의 생존 및 증식에 영향을 미치지 않는 신경세포 촉진 상태를 나타내었다. A2B5 교질세포 전구체 세포가 FGF 및 NT-3의 존재하에서 뚜렷한 세포 사망 없이 A2B5를 발현하고, 배양 10일 후 건강한 회돌기아교세포 및 성상돌기세포를 발생시키면서 평행적으로 정제하고 성장시켰기 때문에, E-NCAM⁺ 전구체로부터 분화될 수 있는 회돌기아교세포 및 성상아교세포의 신경세포 배양주의 사망이 초래되어 실시예 3의 회돌기아교세포 및 성상아교세포의 분화가 검출되지 않았다.

또한 A2B5⁺ 세포들은 결코 FGF 및 NT-3의 존재하에서 신경세포를 발생시키지 않으며, 테스트가 이루어지는 어느 때이고 E-NCAM의 발현은 관찰되지 않았다. 이와 같이, E-NCAM 면역반응성 세포들은 A2B5 면역반응성 교질세포로 예정된 전구체들이며, 이러한 것들은 회돌기아교세포로 분화될 수는 없으며, 다분화능 배아 10.5일째의 신경상피세포와 비교하여 볼 때 신경세포로 분화가 될 것이었다.

실시예 5

본 발명의 시스템에서는 E-NCAM이 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 동정하는 것을 명확하게 나타내며 동시에, 발생의 마지막 단계에 있는 특정한 교질세포 전구체가 E-NCAM 면역반응성을 발현할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 발견은 본 발명의 방법에 의해 동정된 여러 E-NCAM⁺ 세포들이 이분화능(bipotent)일 수 있다는 가능성을 제시한다. 이러한 가능성을 테스트하기 위하여, E-NCAM⁺ 세포들을 신경세포 촉진 배지(FGF + NT-3) 또는 교질세포 촉진 배지(FGF + 10% 우 태아 혈청)에서 클로날로 평판되었고 그 세포들의 발생에 대하여 비교하였다. 10% 우태아 혈청을 포함한 FGF를 함유하는 배지는 교질세포를 분화시키기 위하여 선택되었으며, 그 이유는 상기 배지가 A2B5 면역반응성 교질세포 전구체 세포뿐만 아니라 척수 NEP 세포들의 성상아교세포의 분화를 촉진하기 때문이다(미국특허출원 제08/852,744호).

모든 E-NCAM⁺ 클론(24/24)을 8일 후 β -III 튜블린⁺ 세포들만을 함유하는 신경세포 촉진 배지내에서 성장시켰으며, 이와 동시에 상기 클론들은 성상아교세포를 발생시키거나 증식시키지 않는 혈청 함유 배지 내에서 성장시켰다. 교질 촉진 조

건내에서 자란 총 97개의 E-NCAM⁺ 세포들로부터, 90개의 클론(92%)들은 24시간 후에 단일 사망 세포로 이루어져 있으며, 나머지 7개의 클론(8%)들은 48시간 후에 하나 또는 두 개의 사망 세포들을 포함하였다. 이와 같이, E-NCAM 면역반응성 세포들은 교질세포 전구체 세포들과는 대조적으로 정상아교세포 촉진 조건에서 증식거나 분화되는데에 실패하였다.

실시예 6

신경세포의 발생에 대한 E-NCAM⁺ 세포의 제한은 신경세포의 특정한 하부타입을 발생시키는데 대한 제한을 포함하는지를 알아보기 위하여, FGF가 결여된 상태의 RA 및 NT-3에서 성장된 E-NCAM⁺ 클론이 다른 신경전달물질을 발현하는지를 측정해 보았다. 본 실시예에 사용되는 항체들은 표 4에서 나타내었다.

[표 4]

항체/종류	출처	인식된 항원	인식된 세포 타입
Anti-ChAT/goat IgG	Chemicon	콜린 아세틸 트랜스퍼라아제	모토뉴런 (motoneurons)
Anti Glutamate/rabbit IgG	Chemicon	글루타메이트	흥분성 신경세포 (excitatory neurons)
Anti GABA/Rabbit IgG	Chemicon	감마 아미노 부틸릭산	저해성 신경세포 (inhibitory neurons)

이러한 결과들은 개개의 클론들이 GABA성, 글루타메이트성 및 콜린성 신경세포들을 발생시킬 수도 있다는 것을 의미한다. 테스트된 10개의 클론들은 모두 GABA성, 글루타메이트성 및 콜린성 신경세포들을 포함하였다. 이와 같이 분화되는 신경세포에 한정되지 않는 E-NCAM 면역반응성 세포들은 흥분성, 저해성 그리고 콜린성 신경세포를 발생시킬 수 있는 능력이 있다.

실시예 7

실시예 5와 동일한 방법으로 E-NCAM⁺ 세포들을 FGF 및 NT-3 내에서 성장시켰고 그 세포들의 주된 클론(primary clone)들을 배양 7~10일 후에 수 백만 세포들로 성장시켜, 몇몇의 자가 증식 정도가 나타났다. E-NCAM⁺ 집단의 연장된 자가 증식을 증명하기 위하여, 선택된 클론들을 이차적 그리고 삼차적으로 서브클로닝하였다. 배아 13.5일째의 척수로부터 취하여진 개개의 E-NCAM⁺ 세포들을 피브로블라스트/라미닌에 평판하였고 FGF 및 NT-3의 존재하에서 7일 동안 배양하였다. 5개의 개개의 클론들을 무작위적으로 선별하여 동일한 익스팬션 조건을 이용하여 클로날 밀도에서 재평판하였다. 이차 클론들의 수를 세었고, 그리고 커다란 클론들이 선별되어 재평판되었다. 여기에서 얻어진 삼차 클론들의 수를 세었고, 그리고 나서 클론들을 FGF 및 RA를 교환함으로써 후유사분열 신경세포로 분화하도록 유도하였다.

모든 클론들은 많은 딸 클론(daughter clone)들을 생성시켰고 상기 딸 클론들은 삼차 클론들을 동시에 발생시켰다. 작은 클론들과 매우 큰 클론들은 유사 자가 증식성을 나타내었다. 삼차 클론들을 RA를 함유하고 FGF가 결여된 배지에 접촉시켰을 때, 클론의 다수의 세포들은 β -III 튜블린을 발현하는 후유사분열 신경세포로 분화되었다. 이와 같이, E-NCAM⁺ 세포들은 연장된 자가 증식성을 갖고 있으며, 신경세포로 발생될 수 있는 능력을 가진 다수의 딸세포로 발생될 수 있다.

이와 같은 결과들은 여러 단계(multiple passage) 후라도, E-NCAM 면역반응성이 배지내의 다수의 신경세포 표현형으로 분화할 수 있는 신경아세포를 동정할 수 있다는 것을 제시하였다. NT-3 및 FGF는 증식 단계에 있는 아세포들을 유지시키기 위한 요건이며, 동시에 RA는 분화를 촉진하였다.

실시예 8

배아 10.5일째의 척수로부터 취하여진 개개의 NEP 세포들은 신경세포, 정상 아교세포 및 희돌기아교세포를 발생시킬 수 있는 E-NCAM 면역 반응성, 다분화능 및 세포의 자가 증식 집단임이 이미 밝혀진 바 있다(미국특허출원 제08/852,744 호). NEP 전구체로부터 신경세포의 분화가 E-NCAM⁺ 중간 신경세포 전구체의 발생을 포함하는지를 알아보기 위하여, 시험관내에서 분화되도록 유도된 NEP 세포 배지에 E-NCAM⁺ 면역반응성 세포가 존재하는지 실험하였다.

NEP 세포들을 미국특허출원 제08/852,744호에 기재된 방법에 따라 마련하였다. 간단하게, Spargue Dawley 쥐(rat)의 배아를 10.5일째 배아(13~22개의 체절(somites))에서 제거하여 Ca 및 Mg이 결여된 Hanks 안정된 염용액(HBSS, GIBCO/BRL)을 포함하는 페트리 디쉬에 두었다. 배아(마지막 10개의 체절)의 트렁크(trunk) 절편을 텅스텐 바늘을 이용하여 분리하고, 행구고, 그리고 신선한 HBSS로 옮겼다. 크렁크 절편을 10분에서 12분 동안 1%의 트립신 용액(GIBCO/BRL)내에서 4℃로 배양하였다. 상기 트립신 용액을 10% 우 태아 혈청(FBS, GIBCO/BRL)을 함유한 신선한 HBSS로 대체하였다. 상기 절편을 파스텔 피펫으로 부드럽게 갈아서 체절과 연결조직으로 둘러싸이지 않은 신경관을 분리시켰다. 분리된 신경관을 10분 동안 0.05% 트립신/EDTA 용액으로 옮겼다. 세포들을 갈아서 해리시켰고 피브로넥틴으로 코팅된 35mm 디쉬에 NEP 배지로 평판하였다. 세포들을 5% CO₂/95% 대기하에서 보관하였다. 세포들을 낮은 밀도(약 35mm 플레이트당 5,000 세포 이하)로 평판한 후 1~3일 후에 재평판하였다. 여러 개의 디쉬에서 얻은 세포에 트립신 처리(2분 동안 0.05% 트립신/EDTA 용액)를 하여 추출하였다. 그 다음 세포들을 펠렛팅하였고, 소량으로 재현탁하였고, 그리고 수를 세었다. 약 5,000개의 세포들이 35mm 디쉬(Corning 또는 Nunc)에 평판되었다.

배아 10.5일째의 배아로부터 얻은 NEP 세포들을 5일 동안 FGF 및 CEE가 존재하는 상태에서 배양하였고, CEE가 존재하는 라미닌 위에서 재평판함으로써 분화시켰다. 분화된 NEP 세포들을 E-NCAM, GFAP 및 GalC에 대한 항체로 삼중 표지하였다. 이러한 것은 E-NCAM 면역 세포들이 성상아교세포(GFAP) 또는 희돌기아교세포(GalC) 마커를 발현하는 NEP 세포들로부터 분화되었다는 것을 나타내었다. 시스터 플레이트(sister plate)를 E-NCAM 및 네스틴에 대한 항체로 이중 표지하였다. 이러한 것은 E-NCAM 면역반응 세포들이 네스틴을 공발현시키는 NEP 세포들로부터 분화되었다는 것을 알 수 있었다. NEP 세포들을 BrdU로 24시간 동안 배양하였고 BrdU 및 E-NCAM에 대한 항체로 이중 표지하였다. 이것은 대부분의 E-NCAM 면역반응성 세포들이 24시간 내에 분화된 것을 나타내었다. 상기와 같은 높은 표지 비율(labeling rate)은 이전의 실시예와 비교하여 분리 절차에 있어서 다른점을 나타낼 수도 있다. 표 5는 배아 10.5일째의 세포로부터 취하여진 E-NCAM⁺ 세포들의 항원 프로필을 요약한 것이다. NEP-유도된 E-NCAM⁺ 세포들은 배아 13.5일째의 E-NCAM⁺ 세포들과 항원적으로 유사하였으며, 실험된 교질세포의 마커를 발현하지는 않았다. 하기 표 5에서 세포들의 작은 서브셋(subset)이 해당 마커를 발현하는 것은 '*'로 나타내었다.

[표 5]

항원	발현
α -nestin	+/-
α - β -III tubulin*	+
A2B5	-
α -GFAP	-
α -GalC	-

이와 같이, 유도된 NEP 배지에는 E-NCAM⁺ 세포들을 포함한 다수의 표현형이 존재하였다. 배아 13.5일째의 E-NCAM⁺ 세포들과 같이 NEP 유도 E-NCAM⁺ 세포들은 교질세포 마커를 발현시키지 않았지만 β -III 튜블린(20~30%) 및 네스틴(70~80%) 면역반응성을 공발현시켰다. 패닝(panning)된 E-NCAM⁺ 세포 90%가 BrdU에 결합되었고, 배지내에 RA 또는 NT-3을 첨가시킨 후에 신경세포를 발생시켰고, 배아 13.5일째의 E-NCAM 면역반응성 세포들과 유사하게 나타났다.

실시예 9

단일 NEP 유도된 E-NCAM⁺ 세포들이 분화 가능성에 있어서 신경세포에 제한을 가하는지에 대한 여부를 알기 위하여, 세포들을 클로날 배지에서 조사하였다. NEP 세포들은 미국특허출원 08/852,744호에 기재된 대로 CEE가 결여된 라미닌 위에서 평판함으로써 분화가 유도되었다. 배아 10.5일째의 배아로부터 유도된 NEP 세포들은 FGF 및 CEE의 존재하에서 5일 동안 배양되었고, CEE가 결여된 상태하에서 파미닌 위에 재평판함으로써 분화되었다. 그 후 이뮤노패닝된 E-NCAM 면역반응성 세포들은 피브로넥틴/라미닌으로 코팅된 클로날-그리드 디쉬(Greiner Labortechnik) 위에서 평판되었고, 단일 세포들을 배양하였다. 5일 후에, 클론들을 RA로 바꾸고, FGF를 회수하였다. 클론들을 3일 동안 자라게 한 후, 파라포름알데히드로 고정시키고, A2B5, 및 GFAP와 β -III 튜블린에 대한 항체로 표지하였다. 또한, 세포들을 DAPI로 카운터스

테인하여 각각의 세포핵을 관찰하였다. 표 6은 조사된 47개의 클론들을 염색한 결과를 요약한 것이다(47개의 클론 중 8개의 클론은 재평판시 생존하지 못하였다). 어떠한 클론도 성상아교세포(GFAP⁺), 또는 교질세포 전구체(A2B5⁺)를 포함하지 않았다.

[표 6]

발현된 항원	클론
α - β -III tubulin	100 %
A2B5	0 %
α -GFAP	0 %

세포들의 분화가 유도된 48시간 후에, 10~30%의 세포들은 E-NCAM 면역반응성이 발현되기 시작하였다. NEP-세포-유도된 E-NCAM⁺ 세포들을 실시예 3과 같은 절차에 따라서 이뮤노패닝하여 선별하였고, 개개의 E-NCAM⁺ 세포들을 FGF 및 NT-3을 포함하는 배지에 평판하였고, 그리고 클론들을 10일 후에 분석하였다.

모든 클론들이 E-NCAM⁺/β-III-튜블린* 세포들을 포함하였지만, GFAP 또는 A2B5 면역반응성 세포들을 포함하지는 않았다. 또한 개개의 E-NCAM⁺ 세포들은 패런트 NEP 세포 집단(parent NEP cell population)으로부터 성상아교세포 및 회돌기아교세포를 촉진하는 배양 조건하에서, 회돌기아교세포 또는 성상아교세포로 분화하는데 실패하였다. E-NCAM⁺ 세포들은 높은 농도의 FGF(10ng/ml) 및 NT-3(10ng/ml)이 존재하는 상태하에서 규정된 배지의 분할 전구체 세포들로 유지될 수 있었다. 3개월까지 유지된 E-NCAM⁺ 세포들은 β-III-튜블린* 성숙된 신경세포로 빠르게 분화될 수 있었으며, 상기 신경세포들은 라미닌 위의 성숙된 RA에 노출되었을 경우 다양한 신경전달물질 표현형으로 나타났다. 이와 같이 E-NCAM⁺ 세포들은 분화능 및 항원 프로파일 있어서, 또한 분화된 전구체 세포 집단의 연장된 성장을 위한 최적 조건에 있어서도 배아 13.5일째의 신경세포 전달물질과 유사하였다.

실시예 10

뚜렷이 균일한 네스틴⁺/E-NCAM⁺ NEP 세포 집단으로부터 E-NCAM⁺ 집단의 분화는 발생 운명이 정해져 있다고 제시하였다. 개개의 NEP 세포들은 신경아세포 또는 교질아세포를 발생시키기 위해 미리 예정된 것일 수 있다는 것은 믿기 어렵긴 하지만 가능하다고 판단되었다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여, E-NCAM 면역반응성 세포 및 A2B5 면역반응성 세포들을 발생시키는 것에 대한 개개의 E-NCAM 클론의 능력을 측정하였다. A2B5 면역반응성이 발생 단계에 있는 회돌기아교세포-성상아교세포 전구체와 구별된다는 것을 미리 보여주었기 때문에 A2B5 및 E-NCAM을 선별하였다. 10.5일째의 배아로부터 얻은 NEP 세포들을 5일 동안 FGF 및 CEE의 존재하에서 배양하였고, 트립신처리를 하여 추출하였으며, 격자 클로날 디쉬에서 클로날 밀도로 재평판되었다. 배양 7일 후에, 개개의 클론들은 실시예 2와 같은 방법에 의하여 E-NCAM 및 A2B5에 대한 항체로 이중-표지되었다. 배양된 112개의 NEP 클론들 중에서, 83%가 A2B5 및 E-NCAM 면역반응성 세포를 발생시켰다. 상기 클론들 중 5%만이 A2B5 면역반응성 세포를 구성하였고, 클론들 중 12%가 A2B5 또는 E-NCAM 면역반응성을 확인할 수 있는 염색이 관찰되지 않았다. 테스트된 모든 클론들에 있어서, E-NCAM 및 A2B5는 비-오버래핑(non-overlapping) 집단으로 발현되었다. 즉, 어느 세포도 두 마커 모두를 공발현하지 못했다. 표 7은 112개의 클론들로 얻어진 결과들을 요약한 것이다.

[표 7]

발현된 항원	클론	클론 수
E-NCAM ⁺ /A2B5 ⁺	83 %	93
A2B5 ⁺ 단독	5 %	6
E-NCAM ⁻ /A2B5 ⁻	12 %	13

이와 같이, NEP 세포들의 대다수가 신경세포로 예정된 전구체와 마찬가지로 교질세포로 예정된 세포들에 대한 전구체를 발생시킬 수 있다는 것을 나타내고 있다.

실시예 11

대부분의 신경세포들이 E-NCAM⁺ 중간 신경아세포를 통해 발생되었는지를 테스트하기 위하여, 보충-매개된 세포 용해가 E-NCAM⁺ 세포들을 선택적으로 사멸시키는데 이용되었다. 분화를 위한 상태에서 NEP 세포들을 재평판한 후 24시간 후에, E-NCAM 면역반응성 세포들을 E-NCAM에 대한 IgG 항체 및 기니픽(guinea pig) 보충물을 이용하여 사멸시켰다. 시스터 플레이트에서, 교질세포 전구체는 항-A2B5 IgM 항체 및 보충물을 이용하여 사멸되었다. 발생 단계에서, 대부분의 E-NCAM⁺ 세포들은 β -III 튜블린을 발현하지 않았다. 처리된 플레이트를 3일 동안 분화되도록 방치하였고, 신경세포의 발달을 관찰하였다. E-NCAM 매개된 용해(lysis)로 인하여 β -III 튜블린-면역반응성 세포들의 수가 상당히 감소되었고, 여기에서 상기 세포들은 A2B5로 처리된 배지와 비교하여 볼 때 발육(development)된 것이었고(각각 219 ± 35 : 879 ± 63), 그리고 시험관내(*in vitro*) NEP 세포로부터 신경세포의 분화는 E-NCAM 면역반응 단계를 통한 전이(transition)를 요구한다는 것을 제시하였다.

실시예 12

격렬하게 해리된 NRP 세포들과 구별될 수 있는 분화된 E-NCAM⁺ 세포들

E-NCAM⁺ 세포들을 실시예 3의 절차에 따라서 이뮤노페닝함으로써 분리하여, 35mm 디쉬에 평판하였고, 그리고 24시간(격렬하게 해리된) 또는 10일(분화된) 동안 성숙하도록 방치하였다. 그 후 실시예 2의 방법에 의하여, 배양된 세포들은 BRDU 결합, E-NCAM 발현, NF-M 발현 및 시냅토피신(synaptophysin) 발현에 의한 세포 분화에 대하여 분석되었다. 격렬하게 해리된 E-NCAM⁺ 세포들의 약 70%가 BRDU에 결합되었으며 배지에서 E-NCAM⁺ 세포들이 분화되어 나타나는 반면, 10일 후에 분화 촉진 배지내에서는 세포가 BRDU에 약간 결합되거나 결합되지 않고, 그리고 분화가 정지되었다. E-NCAM 및 NF-M 면역반응성에 대한 이중-표지는 격렬하게 해리된 매우 소수의 세포들이 NF-M을 발현하는 것을 보여주었고, 거의 대부분의 분화된 세포들은 그 단백질을 발현하는 것으로 나타났다. 이와 유사하게, 시냅토피신은 시냅틱 소포(vesicle) 및 기능적인 시냅스와 특이적으로 관련된 단백질이며(T.C. Sudhof, 시냅틱 소포 순환(Synaptic Vesicle Cycle): 단백질-단백질 상호작용의 캐스케이드, 375 Nature 645-653(1995)), 상기 시냅토피신은 격렬하게 해리된 E-NCAM⁺ 세포들에 의하여는 아니지만 분화된 세포에 의하여 발현되었다. 비록 시냅토피신 단백질 발현이 시냅틱 소포와 관련이 되어있다 하더라도, 초기 발현은 세포체 내에서 발견될 수 있으며 신경조직발생(neurogenesis)이 이루어지는 동안 초기에 발현되었다(M. Fujita 외, 쥐(rat)의 소뇌의 과립 세포내에서의 시냅토피신의 발생 프로파일: 이뮤노사이토케미스트리 연구, 45 J. Electron Microsc. Tokyo 185-194(1996); 및 D. Grabs 외, 쥐(rat)의 해마(hippocampal) 네트워크의 출생전후 발달이 일어나는 동안 시냅토피신 및 시냅토포린의 분화적 발현, 6 Eur. J. Neurosci. 1765-1771(1994)). 이러한 결과들은 격렬하게 해리된 E-NCAM⁺ 세포들이 성숙되었고, 배지에서 성숙된 분화 세포라는 것을 보여주는 것이다. 또한 이러한 결과들은 NRP 세포들이 RA에 의하여, 그리고 유사분열 촉진인자의 제거에 의하여 분화를 유도하였는지를 제시하였으며, 상기 세포들은 성숙한 신경세포의 많은 형태적(morphological) 및 면역적 특성을 획득한다.

실시예 13

분화된 그러나 격렬하게 해리되지는 않은 E-NCAM⁺ 세포들에서 검출될 수 있는 신경세포의 많은 표현형들(phenotypes)

NRP 세포들은 회돌기아교세포 또는 성상아교세포가 아닌 후유사분열의 신경세포로 분화될 수 있다고 상기에서 나타낸 바 있다. NRP 세포들이 척수에서 존재하는 주요한 신경세포의 모든 표현형으로 분화될 수 있는지를 알아보기 위하여, 또는 상기 NRP 세포들이 분화능에 있어서 더욱 더 많은 예정성을 갖는지에 대하여 알아보기 위하여 성숙한 신경세포에 대한 효소 및 세포 타입 특이적 마커를 합성하는 신경전달물질의 발현을 분화하기 위한 NRP를 유도한 후 시험하였다. 또한 p75(Q. Yan & E.J. Johnson, 발육하는 쥐(rat)에 있어서 신경세포 성장인자의 이뮤노사이토케미스트리 연구, 8 J. Neurosci. 3481-3498(1988)의 발현); 척수의 모토뉴런(motoneuron)을 특정짓는 Islet-1(T. Tsuchida 외, LIM 호메오박스(homeobox) 유전자가 발현되는 것으로 한정된 배아의 모터 신경세포의 국부 조직(topographic organization), 79 Cell 957-970(1994)); 및 GABA로 공발현되는 칼빈딘(C. Batini, 단백질-D28K를 결합시키는 GABA 및 칼슘 결합의 소뇌 국재(localization) 및 공국재(colocalization), 128 Arch. Ital. Biol. 127-149(1990))이 시험되었다.

쥐(rat)의 13.5일째 신경관 배아로부터 취하여진 E-NCAM⁺ 세포들을 실시예 3과 동일한 방법에 의하여 이뮤노패닝하여 분리하였고, 35mm 디쉬에 평판하였고, 그리고 분화 촉진 배지에서 배양하였다. 배양 10일 후, 총 RNA를 상기 세포들로부터 분리하였고 신경전달물질 아세틸콜린(Ach), GABA 및 글루타메이트를 합성하기 위한 능력은 RT-PCR에 의하여 합성된 효소를 발현시켜 획득되었다. 총 RNA는 구아니딘 이소티오시아네이트-페놀-클로로포름 추출 방법(TRIZOL, Gibco/BRL)의 변형에 의하여 세포들 또는 전체 조직으로부터 분리되었다. cDNA 합성을 위하여, 총 RNA 1~5 μ g을 Gibco/BRL 프로토콜에 따라서 SUPERScript II(Gibco/BRL), 변형된 말로니 뮤린 루케미아 바이러스(Maloney murine leukemia virus) 역전사효소(RT), 및 올리고(dT)₁₂₋₁₈ 프라이머를 이용하여 20 μ l로 반응시켜 사용되었다.

cDNA의 PCR 증폭을 위하여, cDNA를 역전사효소 반응의 1/20 만큼의 양으로 50 μ l의 반응량으로 분주하면서 이용하였다. PCR 증폭은 ELONGASE 폴리머라아제(Gibco/BRL)를 이용하여 행하여졌다. 수용체의 PCR 증폭에 사용되는 프라이머 염기서열 및 순환 온도는 표 8과 같다. 상기 반응은 35번 순환되고, 완전한 신장(extension)이 이루어지는 것이 확실한 마지막 부분에서 10분 동안 72 $^{\circ}$ C로 배양하였다. 여기에서 얻어진 PCR 생성물은 AVANTAGE PCR-PURE 키트(Clontech, Palo Alto, CA)를 이용하여 정제되었고, 그것들의 동일성을 확인하기 위하여 서열분석되었다.

[표 8]

유전자	생성물 크기(bp)	프라이머(센스, 안티센스)
p75	329	서열번호: 1 및 2
ChAT	377	서열번호: 3 및 4
Isl-1	350	서열번호: 5 및 6
GAD ₆₅	327	서열번호: 7 및 8
calbindin28	276	서열번호: 9 및 10
glutaminase	560	서열번호: 11 및 12
cyclophilin	302	서열번호: 13 및 14

도 2에서 보여진 바와 같이, 상기 모든 유전자들은 분화된 세포("D")에 나타났다. 반대로 신경전달물질 표현형의 상기 마커들 중 어느 것도 분리 후 24시간 내에 검사된 세포들로부터 검출될 수 없었으며(도 2에서 "AD"란 "격렬하게 해리된"이라는 의미임), 그러한 것은 비록 하우스키퍼 유전자, 즉 시클로필린(cyclophilin)의 발현이 두 세포 집단 모두에서 신속하게 검출될 수 있다 하더라도 그러하다. 상기와 같은 결과들은 배지내에서 NRP 세포들이 성숙된다는 것과 NCAM 발현 및 신경세포의 운명 결정이 신경전달물질의 합성에 우선한다는 것을 보여준다.

모든 세포들 또는 분화된 세포들의 서브셋(subset)이 상기와 같은 마커들을 발현시키는지 결정하기 위하여, 효소를 합성하는 신경전달물질의 발현을 이뮤노사이토케미스트리에 의하여 시험하였다. 세포들을 10일 동안 배양하였고, 분화하도록 하여, 고정시켰으며, 그리고 콜린, 아세틸트랜스퍼라아제(ChAT), 글루탐산 데카르복실라아제(GAD), 티로신 하이드록실라아제(TH), 글리신 및 글루타메이트의 발현을 검출하기 위하여 실시예 2와 같은 방법의 이뮤노사이토케미스트리에 의해 시험되었다. ChAT, TH 및 GAD에 대한 항체를 Chemicon으로부터 입수하였고, 글루타메이트 및 글리신에 대한 항체들은 Signature Immunologicals로부터 입수하였다. 실제로 모든 분화된 세포들이 검출 가능한 글루타메이트 수준을 발현하였다. 매우 작은 백분율로 글리신 및 GAD가 발현되었다. 추출 백분율은 10~50%로 다양하게 나타났다. ChAT 및 TH⁺ 세포 백분율은 매우 작고, 1~5%의 범위 있다. 그러나 변경된 배양 조건은 실질적으로 많은 수로 보여졌다. 실제로 100%의 세포들이 글루타메이트를 합성하기 때문에, 최소한 몇 개의 세포들은 하나 이상의 신경전달물질을 합성할 것이다. 그럼에도 불구하고, 상기와 같은 결과들은 분화에 있어서, E-NCAM⁺ 세포들이 신경전달물질 표현형이 다른 집단에서 성숙될 수 있다는 것을 분명히 보여주고 있다.

분화된 세포로 얻어진 결과와는 대조적으로, ChAT, GAD, TH 또는 글리신 중 어느 하나도 격렬하게 해리된 세포들에서 검출될 수 없었다. 글루타메이트는 그러한 세포들의 작은 서브셋(subset)에서 검출되었다(10% 이하). 그러나 글루타미나아제는 RT-PCR에 의한 상기 세포들 내에서는 검출될 수 없었으며(도 2), 그것은 배지로부터 상기 세포들에 의하여 글루타메이트가 흡수되었다는 것을 나타냈다.

실시예 14

성숙(maturation)에 의해 변화된 E-NCAM⁺ 세포들의 신경전달물질 수용체

성숙한 신경세포는 상기의 표면위의 적절한 신경전달물질 수용체를 발현함으로써 다수의 신경전달물질에 응답할 수 있는 능력을 지니고 있으며, 이와 같은 능력은 상기 세포의 또 다른 중요한 특성이다. 글루타메이트, 글리신, 도파민 및 아세틸콜린에 반응하는 분화된 E-NCAM⁺ 세포들의 능력을 측정하기 위하여, 플루오-2 Ca²⁺ 이미징 기술이 이용되었다. 배아 13.5일째의 E-NCAM⁺ 세포들을 10일 동안 배지에서 성장시켰고 분화되도록 두었다. 상기 세포들을 플루오-2와 함께 로딩하였고, 신경전달물질의 적용에 대한 탈분극 반응(depolarizing response)을 점검하였다.

세포들을 5μM 플루오-2/AM(D. Grynkiewicz 외, 매우 향상된 플루오어레신 특성을 지닌 칼슘 인디케이터의 새로운 발생, 260 J. Biol. Chem. 3440-3450(1985))으로, 그리고 23℃의 암실에서 20분간 쥐의 링거(RR)내에 PLURONIC F127(80μg/ml)를 더 첨가하여 로딩되었고, 그리고 RR로 3번 세척하고 10분간 디에스테르화하였다. 세포내 칼슘 농도의 상대적인 변화는 340/380nm의 자극에 의한 플루오어레신 강도의 배경-교정 비율(background-corrected ratio)로부터 측정되었다. 반응은 비율이 정해진 한계선의 가치의 10%의 최소 린스(rinse)로써 정의되었다. Zeiss-Attofluor 이미징 시스템 및 소프트웨어(Atto Instruments Inc., Rockville, MD)는 상기 데이터를 이용하여 분석하였다. 데이터 점들은 1Hz에서 표본화되었다. 신경전달물질은 RR 내에서 만들어졌으며, 작은 양의 루프 인젝터(200μl)를 이용하여 배스 교환(bath exchange)에 의해 운반되었다. RR은 140mM NaCl, 3mM KCl, 1mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 10mM HEPES 및 10mM 글루코오스를 함유하였다. 또한 산화를 예방하기 위하여 도파민 용액에 500μM의 아스코르브산을 첨가하였다. 500μM의 아스코르브산의 대조군을 적용한 것에는 어떠한 효과도 없었다. 모든 용액의 pH는 NaOH를 이용하여 7.4로 맞추었다. 또한 50mM의 K⁺ RR은 정상적인 RR내 Na⁺를 같은 molar의 K⁺를 치환하여 만들었다.

도 3은 격렬하게 해리된 세포 및 분화된 세포에서 유도된 신경전달물질에 반응하는 세포수를 막대 그래프로 나타낸 것이다. 일반적으로, 신경전달물질에 반응하는 세포의 수 및 신경전달물질-유도된 Ca²⁺ 반응의 크기는 분화된 세포에서 증가되었다. 가장 두드러진 실시예는 도파민이었으며, 여기에서는 격렬하게 해리된 세포의 10%가 내부의 Ca²⁺에 있어서 증가된 500μM의 도파민에 반응하였으며, 분화된 세포의 76%가 반응하는 것과 비교해보면 최종적으로 66%가 증가한 것이나 마찬가지였다. 이러한 점에 있어서의 예외는 GABA 및 글리신에 대한 Ca²⁺의 반응이었다. 흥미롭게도, 격렬하게 해리된 세포는 46%가 GABA에 반응하는데 비하여, 분화된 세포는 8%만이 GABA에 반응하였다. 이와 유사하게, 글리신에 반응하는 Ca²⁺의 대사속도는 격렬하게 해리된 세포에 있어서는 20%, 그리고 분화된 세포에서는 0%로 감소하였다. 바람직한 저해적 신경전달물질의 프로필에 있어서, 이러한 변화는 성숙과 관련한 내부 염소 이온 농도의 감소를 나타내며, GABA 및 글리신 반응은 탈분극 반응(depolarizing)으로부터 과분극 반응(hyperpolarizing)으로 변위된다(W. Wu 외, 쥐(rat)의 척수에서의 글리신 및 GABA-매개된 시냅스의 초기 발육, 12 J. Neurosci. 3935-3945(1992)). 그러나 염소 이온 수준이 증가되어 남고, 그리고 적은 GABA 및 글리신 수용체들이 분화되는 세포로 발현될 수 있다는 가능성이 제외될 수도 있다. 도 4 및 도 5는 각각 경과된 시간 동안 격렬하게 해리된 그리고 분화된 세포들로부터 (I₃₄₀/I₃₈₀) Ca²⁺의 반응비를 나타낸 것이다. 격렬하게 해리된 세포들은 GABA 및 글루타메이트에 반응하였지만, 동일한 배아로부터 분화된 세포들은 도파민, 글루타메이트 및 아세틸콜린에 반응하였고 GABA 또는 글리신에는 반응하지 않았다. 인접한 세포들의 다양한 신경전달물질과 Ca²⁺의 반응 비교는 세포 사이의 반응 프로필에 있어서 서로 이종임을 밝혀내었으며, 신경전달물질을 합성하기 위한 능력에 있어서 이종의 E-NCAM⁺ 세포들만은 아니라는 것을 제시하면서, 전달 수용체 발현이라는 용어가 선택되었다. 신경전달물질뿐 아니라, 쥐(rat) 링거의 증가된 K⁺ (50mM K⁺ RR)는 세포를 탈분극하도록 적용되었고, 그리고 전압-개폐 채널을 통하여 Ca²⁺의 출입이 허용되도록 적용되었다. 격렬하게 해리된 세포들에 있어서, 50mM K⁺ RR에 반응하는 49%가 85%의 분화된 세포와 비교하여 볼 때, 더욱 분화된 세포들은 격렬하게 해리된 세포들보다 전기적인 능력이 있다는 것을 알 수 있었다.

이와 같이, 격렬하게 해리된 E-NCAM⁺ 세포들 및 완전하게 분화된 E-NCAM⁺ 세포들의 여러 가지 특성들에 대한 비교는 표 9에 요약하여 나타내었으며, 상기 세포들 사이에는 각기 두드러진 특성이 존재한다. 미성숙한 세포는 유사분열적으로 활성이 있으나, 분화된 세포는 그렇지 않다. 미성숙한 세포는 모든 성숙한 신경세포의 단백질인 NF-M, 시냅토피신 또는 신경전달물질을 발현하지 않으나, 반면에 이와 같은 단백질들은 분화된 세포들에서 검출될 수 있다. 더욱이, 신경전달물질로 유도된 Ca²⁺ 반응에 있어서 격렬하게 해리된 세포들은 분화된 세포들 보다 모든 전체적으로 반응성이 적다.

[표 9]

특 성	격렬하게 해리된 세포	분화된 세포
유사분열의 상태	유사분열	후유사분열
세포 크기	비교적 작음	비교적 큼
부산물(process outgrowth)	매우 적거나 없음	광범위함
신경세포 마커(marker)	NCAM, β -III-tubulin, MAP-2 kinase, nestin	NCAM, β -III-tubulin, MAP-2 kinase, NF-M, synaptophysin, peripherin
신경전달물질, 신경전달물질 합성 효소, 또는 그 외 다른 표현 특이적 마커	없음(단, 소량의 glutamate 면역반응성)	glutamate, glycine, glutaminase, GAD, ChAT, Isl-1, p75, calbindin
신경전달물질에 대한 반응	세포의 작은 서브셋(subset)에서는 약함	모든 세포에서 강하고 격렬함
GABA 및 glycine에 대한 탈분극 반응	모두 탈분극 반응으로 측정됨	탈분극 반응이 거의 없거나 완전히 검출되지 않음

실시예 15

다수의 신경전달물질의 표현형을 발생시킬 수 있는 개개의 E-NCAM⁺ 세포

상기에서 언급한 매스 컬처(mass culture) 실험은 E-NCAM⁺ 집단이 다수의 신경전달물질의 표현형을 발생시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 그러나 개개의 세포들이 특이적 신경세포의 표현형을 발생시키기 위하여 미리 감작될 수 있다는 가능성은 존재하였다. 매스 컬처에서 NRP들의 분화능이 개개의 NRP의 잠재적인 능력을 반영하는지에 대한 여부를 알아보기 위하여, E-NCAM⁺ 세포들의 클로날 분석이 수행되었다. E-NCAM⁺ 세포들을 실시예 3과 동일한 방법으로 면역선별하였으며(immunoselected), 클로날 밀도로 평판되었고, FGF 및 NT-3에서 그리고 증식을 촉진시킬 수 있는 조건에서 배양하였다. 클론들은 배지내에서 10일 후에 몇 백개의 세포들로 성장하였고, 그 후 그 세포들의 분화능은 배지에서 FGF를 회수하고 RA를 첨가함으로써 촉진되었다.

세 가지 다른 기술들이 개개의 NRP 세포들로부터 발생된 클론들이 이종의 신경세포 집단으로 구성되어있는지를 알아보기 위하여 이용되었다: 실시예 13에 의한 RT-PCR, 실시예 2에 의한 방법에 따른 이류노사이토케미스트리, 및 실시예 14에 의한 칼슘 이미징(calcium imaging). 6개의 클론들이 RT-PCR 분석에 의하여 실험되었다. 상기 6개의 클론 중 5개의 클론은 다양한 신경전달물질의 표현형을 나타내었다: 1개의 클론은 테스트된 6개의 마커들을 나타내었고, 3개의 클론들은 4가지 마커들을 나타내었고, 그리고 나머지 1개의 클론은 3가지 마커들을 나타내었다. 그러므로 1개의 클론을 제외한 모든 클론들이 세포의 이종 집단으로 구성되어 있었다. 하나의 클론은 단지 p75 및 Isl-1의 검출가능한 수준으로 나타났지만, ChAT는 그렇지 않았다. 상기와 같은 클론은 완전하게 분화되지 않은 미성숙한 클론을 의미하였다. 도 6은 테스트된 모든 신경전달물질을 발현하는 대표적인 클론들로부터 얻은 결과를 나타낸 것이다. 상기 결과들은 개개의 클론들이 다수의 신경전달물질 합성 효소 또는 다른 표현 마커(phenotypic marker)를 발현한다는 것과, 대부분의 클론들이 이종의 집단으로 구성되어 있다는 것을 증명하는 것이다.

PCR 결과를 확인하기 위하여, 그리고 단백질 수준에서의 이종성을 보여주기 위하여, 클론들은 p75의 발현에 대하여 분석되었다. 17개의 클론 중 어떠한 클론도 p75 면역반응성 세포들이 독점적으로 구성되지는 않으나 17개의 클론 모두는 다른 신경세포와 마찬가지로 p75에 면역반응적인 세포들을 포함하였다. 이와 마찬가지로 글루타메이트 또는 글리신 면역반응성을 위한 염색은 각각의 전달물질(transmitter)이 동일한 클로날 집단에 있어서 세포의 서브셋(subset)에 의하여만 발현된다는 것을 나타내었고, 클론들은 이종의 집단임을 가르켰다.

이종성은 다른 신경전달물질의 합성에 의하여 증명되었을 뿐 아니라 세포에 의하여 발현된 수용체의 이종성에 의하여도 증명되었다. 증가된 세포내 칼슘 농도에 의한 증거로써, GABA, 글리신, 도파민, 글루타메이트, 아세틸콜린 및 50mM K⁺ RR의 적용에 대한 분화된 클로날 세포의 반응 프로필을 조사하였다. Ca²⁺ 측정은 4개의 다른 클론으로부터 113개의 세포

에서 이루어졌다. 상기 4개의 클론들 모두는 그 반응 프로필에 있어서 이중성이 나타났으며, 개개의 클론들간에는 다소 다른점이 있었다. 도 7은 적용된 신경전달물질 각각에 반응하는 4개의 모든 클론들로부터 얻어진 세포들을 백분율로 계산하여 막대 그래프로 나타낸 것이다.

분화된 E-NCAM⁺ 세포의 매스 컬처와 함께, 클로날 세포들은 클루타메이트(93%), 아세틸콜린(96%), 50mM K⁺ RR(70%) 및 도파민(50%)에 비교적 높게 반응하였으며, 반면에 몇몇 세포들은 GABA(27%) 및 글리신(1%)에 반응하였다. 도 8 및 9는 하나의 클론으로부터 측정된 두 개의 세포들로부터의 Ca²⁺ 반응의 (I₃₄₀/I₃₈₀) 비율을 나타낸 것이다. 이러한 수용체의 이중성 발현은 개개의 NRP 세포들의 다분화능 특성을 제시한 것이다. 이와 같이, 세포들의 클로날 집단의 성숙은 매스 컬처에서의 세포의 성숙과 밀접하게 유사한 점이 있다.

다수의 독립적 방법에 의하여, 상기 클로날 분석은 개개의 NRP 세포들의 다분화능 특성을 증명하는 것이다. 이러한 분석은 매스 컬처 결과, NRP 세포들이 발육적인 측면의 잠재성을 갖고 있다는 것을 확인시켜주었다. 신경세포들을 발생시키도록 예정되었다 하더라도, 프로제니(progeny)의 특별한 표현형은 발생의 나중 단계에서 지시되었다. 이와 같이, 신경세포 전구체는 계통이 예정된 신경세포 전구체 및 분화된 신경세포 프로제니 사이의 전이를 확정하기 위하여 정제될 수 있고, 동시에 조작될 수 있다는 사실이 증명되었다.

실시예 16

NRP 세포들의 운명에 영향을 미치는 세포의 신호

여기에서 개시된 결과들은 신경세포 전구체가 매스 및 클로날 컬처에서 다양한 표현형을 갖는 성숙한 신경세포로 시험관 내에서(*in vitro*) 발달될 수 있는지를 보여주는 것이고, 그리고 RA의 적용 또는 FGF의 제거가 다양한 표현형으로의 분화를 촉진시킬 수 있는지에 대하여 보여주는 것이다. 그러나 정상적인 발육 상태에서, 분화는 공간적으로 그리고 시간적으로 조절되어, 모토뉴런은 배쪽으로 발생되고, 감각(sensory) 신경세포는 등쪽으로 발생하며, 이러한 것은 특정한 환경적 신호가 신경세포 전구체의 바이어스 분화(bias differentiation)일 수 있다는 것을 제시한 것이다. 이러한 예로서, 두 개의 잠재적인 조절 분자의 영향이 신경조직발생 시기에 척수로 발현되고, 등(BMP-2/4; J.M. Graff, 배의 형성(patterning): BMP인지 또는 BMP가 아닌지, 그것이 문제이다, 89 Cell 171-174(1997)) 또는 배(Shh; M.J. Fietz 외, 초파리 및 척추동물의 발육(development)에 있어서 Hedgehog 유전자 족, Development(Suppl.) 43-51(1994))의 표현형의 바이어스 세포(bias cell)에서 나타내는 것이다.

BMP-2가 E-NCAM⁺ 세포들의 배지에 첨가되었을 때에, 세포 분열은 급격히 감소되었다. BMP-2으로 인하여 유사분열 촉진인자 및 FGF를 과도하게 진행시켰으며, FGF가 존재하는 상태에서 세포분열이 60% 감소되었다(도 10). 동일한 효과들은 BMP-4에서도 찾아볼 수 있다. BMP-2는 생존 인자가 아니며, 그 이유는 BMP-2 단독으로 존재하는 상태에서 자란 세포들이 생존하지 못하기 때문이다. 유사분열이 감소되면서 분화된 세포가 출현되었다. 세포의 크기가 증가되었고 세포들은 광범위한 과정들을 만들어냈다. 48시간 동안 BMP-2에서 자란 세포들은 신경전달물질을 발현하는지에 대하여 측정되었다. GABA성, 클루타메이트성, 도파민성 및 콜린성 신경세포들이 검출되었다. 상기 콜린성 신경세포의 수는 비처리 대조군보다는 훨씬 크지만(5~10% : 0~1%), 모든 다른 표현형들이 매우 촉진되어 나타나기 때문에 배(ventral)쪽의 표현형으로 치우치지는 않았다. 이와 같이, BMP-2는 항유사분열제의 역할을 하였고, E-NCAM⁺ NRP 세포들의 분화를 촉진하기는 하지만, 배의 운명(ventral fate)을 저해하는 것으로 나타나지는 않았다.

BMP의 영향을 촉진하는 항유사분열 및 분화와는 대조적으로, Shh는 유사분열인자로 나타났다. 100ng/ml의 Shh의 유사분열의 결과(최대 반응)는 대조군보다 세배 높게 나타났으나, 10ng/ml의 FGF 결과보다는 적게 나타났다(도 11). Shh로 한 실험은 NT-3의 존재하에서 이루어졌으며, 상기 NT-3는 생존제였으며(Y.A. Barde, 뉴로트로핀: 신경세포를 생존시키는 단백질 족(protein family), 390 Prog. Clin. Biol. Res. 45-56(1994)), 유사분열 촉진인자는 아니었고, 이것은 Shh 그 자체가 E-NCAM⁺ 세포에 대한 생존 인자로 나타날 수 없기 때문이며, 즉 Shh 단독으로 있는 배지에서 자란 E-NCAM⁺ 세포들은 생존하기 못했기 때문이다. 유사분열상의 Shh는 노출된 이틀 후에 단지 외견상으로 그 영향이 나타날 뿐이었고, 그리고 5일 이상 분석이 이루어졌다. 세포 분열의 분화는 처음 24시간 동안은 발견되지 않았다.

Shh는 5일 이상 분석을 통하여 모토뉴런 분화를 촉진한다는 것이 밝혀지지 않았다. 세포들은 증식이 되었으며, p75 또는 ChAT 면역반응성 신경세포들이 검출되지 않았다. 콜린성 신경세포들을 관찰하는데에 실패한 것은 p75 또는 ChAT 양성 세포들로 분화를 하는 것에 대해서 E-NCAM⁺ 세포들이 무능하기 때문이 아니었으며, BMP-2 또는 RA와 같은 분화제로

처리하였을 때 ChAT 및 p75 면역반응성 세포를 분화시킬 수 있는 것과 같이 시스터 컬처(sister culture)에서는 E-NCAM⁺ 세포들이 증식으로 인하여 Shh에 반응하였다. 최소한 테스트 기간 동안 Shh는 예상외로 모토뉴런 분화를 촉진하지 못하였다.

상기와 같은 결과들은 세포의 신호 분자인 Shh 및 BMP가 E-NCAM⁺ 세포들의 표현형을 조절한다는 것을 제시하였다. BMP-2는 세포 증식을 억제하고 분화를 촉진시키며 배 표현형(ventral phenotypes)으로의 분화를 저해하지는 않는다. 반대로, Shh는 증식을 촉진하고, p75 및 ChAT 면역반응성 신경세포를 포함한 모든 신경세포의 표현형으로의 분화를 저해한다.

실시예 17

E-NCAM 면역반응성 신경세포 전구체를 포함하는 생쥐(mouse)의 신경관

NRP가 생쥐(mouse)의 신경관에 존재하는지를 알아보기 위하여, 실시예 2와 같은 방법에 의해 배아 11일째의 생쥐의 척수를 해리시켜 E-NCAM 면역반응성 세포들의 특성에 대하여 시험하였다. 다수의 E-NCAM 면역반응성 세포들이 배아 11일째에 발견되었고, 상기 세포들은 세포의 총 집단의 약 60%를 이루고 있었다. E-NCAM 양성 세포들은 다양한 방법들로 신경세포와 형태적으로 유사하다는 것이 발견되었다. 발육(development) 마지막 단계에서, Gal-C 또는 GFAP와 E-NCAM의 공발현은 이중-표지 실험에서 발견되었으며, E-NCAM 면역반응성이 신경세포 전구체를 동정할 수 있다는 것을 제시하였다.

생쥐(mouse)의 E-NCAM-양성 세포가 세포 분열을 진행시키는지에 대하여 알아보기 위하여, 세포들을 BRDU로 이중 표지하였고, 그 후 BRDU 및 E-NCAM 면역반응성을 공발현시키는 세포들을 검출하기 위한 이중 표지를 하였다. 그 결과, E-NCAM 양성 세포들은 배지내에서 최소한 3일 동안 분할되었다. 이와 같이, E-NCAM 양성 세포들은 쥐(rat)에서 이전에 언급했던 NRP와 유사하게 나타났다. E-NCAM 양성 세포들이 다양한 신경세포의 표현형을 발생시키는지 확인하기 위하여, 실시예 3과 동일한 방법으로 준비한 면역적으로 선별된 E-NCAM 세포들을 10일 동안 배지내에서 분화시켰다. 그 다음 플레이트를 추출하였고, cDNA를 실시예 13과 동일한 방법으로 준비하여 신경전달물질 합성을 평가하였다. 도 12에서와 같이, p75, islet-1, ChAT, calbindin, GAD 및 글루타미나아제들을 분화된 집단내에서 신속하게 검출할 수 있었다. 이와 같이, 생쥐의 E-NCAM 면역반응성 세포들은 콜린성, 흥분성 및 저해성 표현형을 발현하는 신경세포를 발생시킬 수 있었다.

실시예 18

ES 세포로부터 발생될 수 있는 E-NCAM 면역반응성 신경아세포

실시예 17에서는 생쥐(mouse)의 척수가 쥐(rat)의 NRP 세포와 유사한 E-NCAM 면역반응성 NRP를 포함하고 있다는 것을 보여주었다. 유사한 계통이 예정된 전구체들이 ES 세포들로부터 발생될 수 있는지를 알아보기 위하여, 생쥐(mouse)의 ES 세포들을 Developmental Studies Hybridoma Bank(DSHB; University of Iowa, Iowa City, Iowa)로부터 입수하였고, 배지에서 자라게 한 다음 E-NCAM, A2B5 및 다른 신경교질세포 마커들의 발현에 대해 특정하였다. 앞서 기술한 바와 같이, 미분화된 ES 세포들은 테스트된 모든 마커들에 대한 검출 가능한 면역반응성을 나타내지 못하였다. 반대로, ES 세포들이 신경세포의 분화 조건하에서 평판되었을 경우, ES 세포들은 자신들의 형태(morphology)를 바꾸고, 다양한 신경세포 및 교질세포의 마커를 발현하기 시작하였다(도 13). 분화된 ES 세포들을 추출하였고, 총 RNA를 실시예 13과 동일한 방법을 이용하여 RT-PCR에 의하여 마련하였다. 특히 E-NCAM의 초기 발현(초기 신경세포 마커) 및 PLP/DM20 유전자(배아 교질 전구체에 의해서 발현되는 것으로 알려짐)는 주목할 만하다. PCR에 의하여 초기 신경세포 및 교질세포 마커를 검출함에 있어서 시종 일관, 세포를 발현하는 높은 폴리시알레이티드 NCAM(polysialiated NCAM)은 총 세포에 대하여 작은 비율을 차지하였다. 배지내의 세포들 중 5% 이하가 배지내에서 5일 후에 E-NCAM 면역반응성을 발현하였다. A2B5 면역반응성 세포들의 비율이 상당히 증가하였고, 분화된 세포들의 약 10%가 상기 마커를 발현하였다.

E-NCAM 면역반응성 세포들이 신경세포 전구체를 표현하는지를 알아보기 위하여, 신경세포 및 교질세포 마커들의 공발현이 시험되었다. E-NCAM 면역반응성 세포들은 MAP-2 및 β -III 튜블린 면역반응성을 공발현하였으나, GFAP 및 네스틴을 공발현하지는 않았다. E-NCAM 양성 세포들은 Gal-C 또는 다른 회돌기아교세포의 마커들을 발현하지 않았다. 이와 같이, E-NCAM 면역반응성 세포들은 척수에서 유도된 E-NCAM 양성 NRP와 유사하게 나타나는 생쥐(mouse)의 ES 세포들로부터 유도되었다.

ES 세포에서 유도된 신경세포 전구체가 다양한 종류의 신경세포로 발생되는지를 확인하기 위하여, E-NCAM 면역반응성 세포들은 실시예 3과 동일한 방법으로 면역적으로 선별되었고, 그리고 상기에서 정제된 세포들은 10일 동안 분화되도록 놔두었다. 그 후 세포들을 추출하였으며, 표현형 마커(phenotypic marker)의 발현에 대한 이뮤노사이토케미스트리 및 RT-PCR에 의하여 분석하였다. 도 14는 ChAT, p75, islet-1, calbindin, GAD 및 글루타미나아제의 PCR 실험 결과를 나타낸 것이며, 상기와 같은 것들은 분화된 집단에서 신속하게 검출되었다. 이와 같이, ES 세포에서 유도된 E-NCAM면역반응성 세포들은 다양한 신경전달물질들을 발현하는 후유사분열의 신경세포로 분화되었고, 상기 신경전달물질은 콜린성, 흥분성 및 저해성 표현형을 포함하였다. 그러므로, ES 세포들은 계통이 예정된 NRP 세포들의 원천(source)으로써 사용될 수 있다.

실시예 19

사람의 신경관에 존재하는 NRP

NRP가 사람의 신경관에 존재하는지를 알아보기 위하여, 사람 배아의 척수를 해리시켰고, 높은 농도의 FGF를 함유하는 DMEM/F12에서 자란 세포들을 실시예 2와 동일한 방법으로 시험하였다.

사람의 척수 세포(HSC)들은 초기에는 쥐(rat) 및 생쥐(mouse)의 척수와 형태적으로 유사하게 나타나지만, 신경세포의 형태를 갖는 상당한 비율의 세포들을 갖는 섬유아세포로 신속하게 분화되었다. HSC를 빠르게 분할되도록 하였으며, 대부분의 세포들(95%)이 네스틴에 면역반응성을 나타내었다. 상기 단계에서, 배지는 GFAP 또는 O4/Gal-C 면역반응성 세포들의 발현에 의해 검출될 수 있는 성상아교세포, 희소도기아교세포 또는 그것들의 전구체를 포함하지는 않았다. E-NCAM 면역반응성 세포들이 상당한 수로 존재하지만, 총 집단의 약 40%를 이루었다. 비록 몇몇의 단조로운(flat) E-NCAM 면역반응성 세포들이 나타나기는 했지만, E-NCAM 면역반응성 세포들은 신경세포와 형태적으로 유사하게 나타났다. E-NCAM 양성 세포들의 두 집단 모두가 MAP2K에 면역반응성을 나타내었고, 다양한 초기 신경세포 마커들을 발현하였으며, 이를 표 10에 요약하여 나타내었다.

[표 10]

항 원	E-NCAM ⁺ 세포
nestin	100%
MAP-2	100%
neurofilament H	80%
neurofilament M	때때로 세포에 따라
β -III tubulin	100%
Gal-C/O4	0%
GFAP	0%

분화 단계에서는, 이중 표지에 의하여 Gal-C 또는 GFAP와 함께 E-NCAM이 공발현되는 것이 관찰되지 않았으며, E-NCAM 면역반응성이 신경세포 전구체를 동정하는 것을 암시하였다. 즉, E-NCAM 면역반응성 사람의 척수 세포는 신경세포를 발현하지만 비 신경세포의 항원을 발현하지는 않는다. 사람의 E-NCAM⁺ 세포가 쥐(rat)의 그것과 같이 세포 분열을 하는지에 관하여 알아보기 위하여, HSC의 혼합 배지를 BRDU로 표지하였고, 그 다음 BRDU 및 E-NCAM 면역반응성을 공발현시키는 세포를 검출하기 위하여 이중 표지하였다. 그 결과 E-NCAM⁺ 세포들은 배지 내에서 최소 3일 동안 분할되었다. E-NCAM 면역반응성 세포들이 NF-H를 발현한다는 표 10의 결과와 일관성 있게, NF-H 및 BRDU 결합 세포들이 NF-H를 공발현하였다. 이와 같이 설치류의 태아 척수 배지에서처럼, 사람으로부터 분할된 네스틴 면역반응성 전구체 세포들이 존재하였고, E-NCAM 면역반응성 세포들이 이 세대(age)에서 총 전구체 집단의 상당한 절편을 나타내었다. E-NCAM⁺ 세포들은 쥐나 생쥐에 대해 앞에서 언급한 NRP와 유사하게 나타났다.

이식된 세포들을 화학적 및 전기적으로 상해시킨 결과를 포함하여, 신경세포의 실질적 파괴, 또는 노화 과정을 포함한 모든 방식으로 얻어진 비정상적 신경학적 또는 퇴행성 신경 장애를 갖고 있는 사람을 포함한 동물에게 투여할 수 있다. 양측(bilateral), 또는 예를 들어 파킨슨병으로 고생하는 환자의 경우에서처럼 가장 효과적인 쪽의 반대측(contralateral)에서

이식될 수 있다. 외과적 처치는 두개골 봉합술에 관한 것처럼, 특정한 뇌의 지역이 위치하도록 바라직하게 수행되며, 정위 기술(stereotactic techniques)에 의하여 외과적으로 수행된다. 선택적으로 세포들은 정위적인 외과적 처치가 결여된 상태에서 이식될 수 있다. 세포들을 본 발명의 기술분야에서 알려진 모든 세포 주입 방법 또는 이식 방법을 이용하여 영향을 받는 모든 신경세포 지역에 전달할 수 있다.

본 발명의 다른 구체예에서, NRP 세포들을 숙주내로 이식하고, 숙주에서의 증식 및/또는 분화가 유도될 수 있는데, 그것은 하기에 의하여 이루어진다: (1) 투여 전 시험관내(*in vitro*)에서의 증식 및/또는 분화; (2) 투여 전 시험관내(*in vitro*) 분화, 및 투여 후 생체내(*in vivo*) 증식 및 분화; (3) 투여 전 시험관내(*in vitro*) 증식, 및 투여 후 생체내(*in vivo*) 증식없이 분화; 또는 (4) 신선하게 분리된 다음 직접적으로 주입한 후에 생체내(*in vivo*)에서 증식 및 분화.

NRP 세포들은 치료적 전달 또는 다른 화합물로 이용될 수 있다. 치료적 화합물의 전달을 위하여 혈액-뇌 장벽을 통과시키기 위한 방법에는 본 발명의 기술분야에 알려진 캡슐화 장치(encapsulation device)로 세포를 이식하는 방법이 있으며, 또는 유전적으로 조작된 치료적 화합물을 자체적으로 생산하는 세포들을 직접적으로 이식하는 방법이 있다. 그러한 화합물들은 작은 분자, 펩티드, 단백질 또는 바이러스 입자일 수 있다. 세포들은 칼슘 포스페이트 형질감염, DEAE-텍스트란 형질감염, 폴리브렌 형질감염, 일렉트로포레이션(electroporation), 리포펙션(lipofection) 및 바이러스 감염 등을 포함하는 본 발명의 기술분야에서 알려진 모든 수단에 의하여 유전적으로 형질도입될 수 있다. 세포들은 치료적인 물질을 발현시키기 위하여 유전적으로 우선 조작되었고, 그리고 확산될 수 있는 자유 세포로 이식되었으며, CNS 연조직(parenchyma)내로 결합되거나 캡슐화 장치내로 포함된다(R.P. Lanza 및 W.L. Chick, 캡슐화된 세포 치료학, Sci. Amer.: Sci & Med., July/Aug, 16-25(1995); P.M. Galletti, 생체인공 기관, 16 Artificial Organs 55-60(1992); A.S. Hoffman, 1990년대의 생물학적 물질의 분자공학: A Growing Liaison of Polymers with Molecular Biology, 16 Artificial Organs 43-49(1992); B.D. Ratner, 생물체질과학에 있어서의 새로운 아이디어 - 공학적인 생물학적물질에 대한 경로, 27 J. Biomed. Mat. Res. 837-850(1993); 및 M.J. Lysaght 외, 최근 면역분리된 세포 치료법의 발전, 56 J. Cell Biochem. 196-203(1994)).

이식된 세포들은 로다민 또는 플루오레신으로 표지된 마이크로스피어(microsphere), 패스트 블루(fast blue), 비스-벤자민, 또는 β -갈락토시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)와 같은 효소적 표지를 발현시키기 위한 본 발명의 기술분야에서 이미 알려진 유전적인 형질도입 절차에 의하여 결합된 유전적인 마커(marker)와 같은 트레이서 다이(tracer dye)로 결합시킴으로써 동정될 수 있다.

본 발명의 기술분야에서 이미 알려진 발현 시스템은 세포내에서 활동적인 프로모터를 갖는 동안 치료적 화합물을 발현시키는 데에 적절하며, 개시, 종결 및 폴리아데닐화를 위한 내부 신호를 사용하기 위하여 이용될 수 있다. 바람직한 발현 벡터(vector)의 예들은 pSC11을 포함한 재조합 백시니아 바이러스 벡터, 시미안 바이러스 40(SV 40), 라우스 사코마 바이러스(RSV), 쥐의 유방암 바이러스(MMTV), 아데노바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV), 소의 파필로마 바이러스, 엡스테인-바 바이러스(EBV) 또는 렌티바이러스와 같은 바이러스로부터 유도된 벡터, 또는 본 발명의 기술분야에서 알려진 모든 다른 진핵생물의 발현 벡터들을 포함한다. 상기 발현 벡터들 대다수가 상업적으로 입수가 가능하다.

세포들은 숙주 내에서 발현이 요구되는 신경전달물질, 뉴로펩티드, 신경전달물질 합성 효소 또는 뉴로펩티드 합성 효소를 암호화하는 모든 유전자를 발현하기 위하여 형질 도입될 수 있다.

시험관내에서(*in vitro*)에서 배양된 NRP 세포 및/또는 그 유도체들은 잠재적인 신경학적으로 치료적 조성물을 스크리닝하기 위하여 이용될 수 있다. 이러한 조성물들은 다양한 투약형태에서 배지내의 세포들에게 적용될 수 있으며, 세포들의 투약은 다양한 시간으로 점검되었다. 효소, 수용체 및 다른 세포 표면 분자와 같은 증가된 수준의 단백질의 발현을 유도하는 것, 또는 신경전달물질, 아미노산, 뉴로펩티드 및 바아오제닉 아민(biogenic amine)의 발현은 단백질 분석, 효소적 분석, 수용체 결합 분석, 효소-연결된 면역소르벤트(immunosorbent) 분석, 전기영동적 분석, 고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 분석, 웨스턴 블랏 및 방사선면역 분석을 포함하여, 상기 분자들의 수준이 변경된 것을 확인할 수 있는 모든 당업계의 기술로 분석될 수 있다. 노던 블랏과 같은 핵산 분석법은 상기 분자에 대한 mRNA 암호화의 수준을 측정하기 위한 것이거나 상기 분자들을 합성하는 효소들에 대한 mRNA 암호화 수준을 측정하기 위한 것이다. 선택적으로, 상기와 같은 제약학적 조성물로 처리된 세포들은 동물 및 그 생존물(survival)에게 이식될 수 있고, 그리고 신경세포를 형성할 수 있는 능력 및 상기 세포 타입의 모든 기능을 발현할 수 있는 능력은 본 발명의 기술분야에서 적용가능한 모든 방법에 의하여 분석될 수 있다.

NRP 세포들은 본 발명의 분야에서 모든 알려진 방법들에 의하여 저온 보존될 수 있다.

실시예 20

비정상적 신경학적 또는 신경 퇴행성 증후군의 치료를 위한 NRP 세포들 및/또는 그 유도체들의 이용

NRP 세포들은 실시예 2, 3, 8, 18 또는 19의 방법에 의하여 분리된다. 세포들을 사람의 배아 또는 성인의 CNS로부터 얻거나, 또는 세포들의 면역거부가 임상적으로 문제가 없는, 즉 사람의 면역 체계를 외부의 자극으로부터 보호하지 않기 위해서 유전적으로 조작된 피그(pig)와 같은 엑소그라픽 소스(xenographic source)로부터 얻었다. 일상적인 절차로 CNS 조직을 절개하였고, 무균의 수집 장치내에서 조직을 수집한 후에 CNS 조직을 절개함으로써 배아로부터 수집된 세포들을 얻었다. 일반적인 해부를 통하여 조직을 분해함으로써 출생 후의 CNS로부터 유래한 세포들을 얻었다. 조직을 마련하여, 세포들을 면역정제하였고, 그리고 결과적으로 정제된 세포들을 실시예 2와 같은 방법으로 배양하였다.

세포들은 직접적으로 이식될 수 있거나 또는 이식 전에 시험관내에서(*in vitro*) 우선 배양될 수도 있다. 시험관내에서(*in vitro*) 배양된 집단들은 신경세포 및 신경세포로 발생될 것이 예정된(committed) 세포의 발생을 향상시킬 수 있는 조건하에서 더 배양될 수 있다.

일반적으로 이식은 PBS와 같은 생리적인 염용액내에서 5~50,000 세포/ μ l의 세포 현탁도로 이루어졌다. 세포들은 질병 또는 상태에 의해 영향을 받는 모든 CNS 의 영역에 또는 그 근처에 이식될 수 있다. 이식 절차는 사람 환자에게 이용하기 위하여 적절하게 변형될 수도 있으며, 상기 이식 절차는 본질적으로 O-2A 프로제니터 세포 이식 분야에서 당업자에게 알려진 것과 유사한 절차이다(A.K. Groves 외, 정제된 O-2A 프로제니터 세포들의 이식에 의해 이루어지는 신경의 수초가 파괴된 정신적 장애(demyelinated lesion)의 복구, 362 Nature 453-455(1993).

더욱 상세하게는, 이식은 컴퓨터 X선 단층 촬영 스테레오타틱 가이드(stereotaxic guide)를 이용하여 행한다. 본 발명의 기술분야에 알려진 모든 방법들을 이용하여 환자를 수술한다. 정확하게 배치된 이식이 바람직한 경우에, 환자는 이식을 받을 부위의 좌표를 확실하게 하기 위하여 CT 스캐닝을 받는다. 주입 캐놀라는 관련된 분야의 당업자에 의하여 이용되는 모든 형태의 것이 이용될 수 있다. 상기 캐놀라는 그 후에 올바른 좌표의 너로 삽입시킨 다음 제거되었고, 19-게이지(gauge) 용해 캐놀라로 대체시킨 후 소량의 세포 현탁액으로 재로딩하였다. 상기 세포들을 상기 캐놀라로 1분당 1~10ml의 비율로 천천히 용해시킨 다음, 캐놀라를 회수하였다. 제일 큰 가능한 지역에 걸쳐서 확산된 세포들로 인하여 바람직할 수 있는 몇몇의 질병들에 있어서, 다수의 스테레오타틱 바늘의 통로가 전지역에 걸쳐서 만들어질 수 있다. 출혈 또는 부종(edema)에 대하여 환자들은 후-수술적으로 검사하였다. 신경학적 평가들은 여러 가지 후-수술적 간격에서 행하여졌으며, 또한 이식된 세포들의 대사적 활성을 측정하기 위하여 이용될 수 있다면 PEP 스캔(scan)도 역시 마찬가지로 행해질 수 있다. 이러한 그리고 이와 유사한 방법들은 본 발명이 제시하는 모든 목적들에 대한 NRP 세포들의 모든 이식에 이용될 수 있다.

방법의 성공은 비공격적 분석, 예를 들어 핵 자기 공명 영상 스캐너에 의하여 측정되며, 본 발명의 기술분야에 알려진 방법들에 따라서 기능적으로 회복되었는지를 측정한다.

실시예 21

이식을 위해 유전적으로 조작된 NRP 세포들 및/또는 그 유도체들의 이용

본 실시예에서 NRP 세포들은 생체내(*in vivo*) 파괴에 대한 이식된 세포의 내성을 만들어 낸 유전자 생성물의 발현, 숙주 세포에 대해 영양 작용의 지지체를 제공할 유전자 생성물의 발현, 및/또는 숙주내에서 발생하는 파괴적인 방법들을 제한하는 유전자 생성물의 발현을 위한 질병의 지역에 또는 지역 근처에 삽입되기 전에 생체외에서(*ex vivo*) 유전적으로 변형된다. 유전적인 변형은 본 발명의 기술분야에서 알려진 모든 기술에 의하여 이루어질 수 있으며, 단지 칼슘 포스페이트 형질감염, DEAE-텍스트란 형질감염, 폴리브렌 형질감염, 일렉트로포레이션, 리포펙션 및 바이러스의 감염 등에 제한되는 것은 아니다. 유전자는 생체내(*in vivo*) 파괴에 대한 세포 내성을 만들어 내는 것, 숙주 세포에 영양 작용의 지지체를 제공하는 유전자 생성물을 발현시키는 것 및/또는 숙주내에서 발생하는 파괴적인 방법을 제한하는 유전자 생성물을 발현시키는 것은 하기를 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다: 인슐린-유사 성장 인자- I ; 퇴화-가속 인자(decay accelerating factor); 카탈라아제(catalase); 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제(superoxide dismutase); 뉴트로핀 족을 이루는 것들; 교질세포-유도 뉴트로픽 인자; 섬모 신경영양성(ciliary neurotrophic) 인자; 루케미아 저해 인자; 파스(fas) 리간드; 염증성 프로세스를 저해하는 사이토킨(cytokine); 염증성 프로세스를 저해하는 수용체 절편; 및 염증성 프로세스를 저해하는 항체 등.

실시예 22

잠재적으로 신경학적 치료 조성물의 스크리닝에 대한 NRP 세포들 및/또는 유도체들의 이용

시험관내에서(*in vitro*) 배양된 NRP 세포들 또는 그 유도체들이나 혼합물들은 다양한 투약형태로 조성물에 노출될 수 있고, 상기 세포들의 반응은 다양한 시간대로 점검되었다. 효소, 수용체 및 다른 세포 표면 분자들과 같은 단백질의 새로운 또는 증가된 수준의 발현에 대한 유도, 또는 신경전달물질, 아미노산, 뉴로펩티드 및 바이오제닉 아민의 유도는 본 발명의 기술분야에서 알려진 모든 기술들로 분석될 수 있고, 단백질 분석, 효소적 분석, 수용체 결합 분석, 효소-결합된 면역소르벤트 분석, 전기영동적 분석, 고성능 액체 크로마토그래피에 의한 분석, 웨스턴 블랏 및 방사선면역 분석(radioimmune assay)을 포함하여, 상기 분자들의 수준이 변경된 것을 확인할 수 있는 모든 당업계의 기술로 분석될 수 있다. 노던 블랏과 같은 핵산 분석법은 상기 분자에 대한 mRNA 암호화의 수준을 측정하기 위한 것이거나 상기 분자들을 합성하는 효소들에 대한 mRNA 암호화 수준을 측정하기 위한 것이다. 또한 예를 들면 브로모데옥시우리딘 또는 트리티에이트된(tritiated) 티미딘의 결합에 의해 측정된 것과 같이, NRP 세포들 및/또는 그 유도체들의 분할을 촉진할 수 있는 화합물에 대하여 NRP 세포 수를 증가시키는 것을 유도하거나 DNA 합성을 촉진하는 화합물의 능력을 측정하는 것에 의한 스크리닝을 하는데 세포들이 이용될 수 있다. 또한 사멸이 예상되는 상태(예를 들어, 신경독성 시약에 노출 및 모든 영양 작용 인자의 회수)에서 세포들을 화합물에 적용하여, 그리고 본 발명의 실무자들에게 알려진 모든 기술을 이용한 세포 생존 실험에 의하여, 세포들은 NRP 세포들 및/또는 상기 유도체들의 생존을 증가시키는 화합물에 대한 스크리닝에 이용될 수 있다. 세포들을 특정한 수용체에 결합하는 것을 특이적으로 방해하는 화합물에 대한 스크리닝하는데 이용될 수 있으며, 이와 같은 것들은 상기 수용체에 대한 작용물질의 결합에 의하여 도출된 반응을 막기 위한 차단 화합물의 능력을 봄으로써 가능한 것이다. 또한 세포들은 본 발명의 당업자에게 알려진 리간드 결합 분석을 이용하여 특정한 수용체를 활성화시킬 수 있는 화합물에 대한 스크리닝에 이용될 수 있으며, 이러한 것은 칼슘 수준의 흐름(flux)과 같은 수용체의 발현과 관련한 생리적인 변형을 관찰함으로써, 또는 당업자에게 알려진 다른 변화를 관찰함으로써 이루어질 수 있다. 선택적으로, 상기 제약학적 조성물로 처리된 세포들을 동물 및 그 생존물(survival)에 이식할 수 있으며, 신경세포를 형성할 수 있는 능력 및 이러한 세포 타입의 모든 기능을 발현하는 능력은 본 발명의 기술분야에서 수용 가능한 방법에 의하여 분석될 수 있다.

실시예 23

본 실시예에 있어서, 세포들은 배아 13.5일째의 쥐(rat)의 척수로부터 추출되었고, E-NCAM 면역반응성 신경세포로 예정된 전구체 세포들은 실시예 3의 방법에 따라서 이뮤노페닝에 의하여 분리되었다. 이러한 세포들을 세포 트래커(cell tracker)로 표지하였고, 유리 마이크로일렉트로드(microelectrode)를 이용하여 다른 피질 지역에 이식되었다. 동물들은 3.5, 10 또는 21일 후에 희생되었고, 본 발명의 기술분야에서 잘 알려진 방법에 따라서 뇌를 절개하였다. 상기 이식된 세포들은 생존하였고, 세번 모두 분화되었다.

실시예 24

본 실시예에서 세포들을 추출하였으며, 분리하였고, 실시예 3에 기재된 대로 35mm 디쉬에 평판하였다. 세포들을 그린 플루어레센트 단백질(GFP) 수용체 유전자를 포함한 레트로바이러스의 구조와 함께 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 하에서 배양되었다. 세포들을 8시간 동안 재생시키고, 그런 후에 GFP 발현을 위하여 분석하였다. GFP 발현은 감염 후 초기 24시간 동안 검출되었으며, 상기 실험이 종결된 2주 동안까지 GFP 발현이 지속되었다. 이와 같은 결과들은 엑토픽(ectopic) 유전자는 이중의 프로모터가 존재하는 상태하의 NRP에서 발현될 수 있다는 것과 감염된 세포들이 몇 주 동안 엑토픽 단백질들을 안정적으로 발현하도록 유지된다는 것을 보여준다.

발명의 효과

본 발명은 분리된 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들의 순수한 집단 및 그 프로제니(progeny), 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 발생, 분리, 배양 및 재생하는 방법 및 그 프로제니, 신경세포 및 교질세포 둘 다를 발생시킬 수 있는 CNS 다분화능 전구체 세포로부터 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 발생시키는 방법, 신경세포로 예정된 전구체 세포들로부터 유도되는 신경세포의 순수한 분화 집단, 및 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 형질감염시키고 이식하는 방법을 제공하는 발명의 효과를 갖는다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

배아 신경세포 접착분자(E-NCAM)를 발현하고;

증식을 위해 FGF를 필요로 하며;

다중의 패시지(passage) 상에서 자라고; 그리고

신경세포로 분화할 수 있는 능력이 있지만, 교질 세포(glial cells)로 분화되지는 않는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 포유류의 자가-증식성(self-renewing)인 신경세포로 예정된(neuron-restricted) 전구체 세포의 분리되고 정제된 집단.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포들이 A2B5 항체에 의해 인식되는 갱글리오시드(ganglioside)를 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 집단.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포들이 네스틴(nestin)을 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 집단.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포들이 인간을 제외한 영장류, 말, 개과, 고양이, 소과, 돼지, 양, 토끼목 및 설치류로 이루어진 군으로부터 선택된 포유류의 배아로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 집단.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 세포들은 신경전달물질을 방출하고 상기 물질에 반응하는 능력이 있는 신경세포로 분화될 수 있는 것을 특징으로 하는 집단.

청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 신경세포들은 상기 신경전달물질에 대한 수용체를 나타내고, 상기 세포들이 신경전달물질을 합성하는 효소를 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 집단.

청구항 7.

제1항에 있어서, 상기 세포들은 기능 시냅스(functional synapses)의 형성 및/또는 전기적 활성의 증가가 가능한 신경세포로 분화될 수 있는 것을 특징으로 하는 집단.

청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 세포들은 상기 세포들의 성장인자, 분화인자, 성숙인자 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나 이상의 물질들을 안정적으로 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 집단.

청구항 9.

하기 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 배아 신경세포 접착분자(E-NCAM)를 발현하고, 증식을 위해 FGF를 필요로 하며, 다중의 페시지(passage) 상에서 자라고, 그리고 신경세포로 분화할 수 있는 능력이 있지만, 교질 세포(glial cells)로 분화되지는 않는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 포유류의 자가-증식성(self-renewing)인 신경세포로 예정된(neuron-restricted) 전구체 세포의 분리되고 정제된 집단을 분리하기 위한 방법:

- (a) 신경세포 및 교질세포를 발생시키는 포유류의 다분화능 CNS 간세포 집단을 분리하고;
- (b) 상기 세포들을 주입하기 위해 배치된 배지내에서 상기 다분화능 CNS 간세포를 배양하여, 분화가 개시되도록 하고;
- (c) 상기에서 분화된 세포들로부터 신경세포로 예정된 전구체 세포를 한정하기 위한 배아 신경세포 접착 분자인 선택된 항원을 발현하는 세포 부차집단(subpopulation)을 분화된 세포들로부터 정제하고; 그리고
- (d) 고착 성장이 가능하도록 배치된 배지에서 상기 정제된 세포 부차집단을 배양함.

청구항 10.

하기 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 배아 신경세포 접착분자(E-NCAM)를 발현하고, 증식을 위해 FGF를 필요로 하며, 다중의 페시지(passage) 상에서 자라고, 그리고 신경세포로 분화할 수 있는 능력이 있지만, 교질 세포(glial cells)로 분화되지는 않는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 포유류의 자가-증식성(self-renewing)인 신경세포로 예정된(neuron-restricted) 전구체 세포의 분리되고 정제된 집단을 분리하기 위한 방법:

- (a) 신경관 폐쇄(closure) 후, 그러나 신경관의 세포 분화 전 배아 발생 단계에 있는 인간을 제외한 포유류의 배아로부터 CNS 조직 샘플을 제거하고;
- (b) 상기 인간을 제외한 포유류의 배아로부터 제거된 CNS 조직의 샘플로 이루어진 세포들을 분리하고;
- (c) 상기에서 분리된 세포들로부터 신경세포로 예정된 전구체 세포를 한정하는 배아의 신경세포 접착 분자인 선택된 항원을 발현하는 부차집단(subpopulation)을 정제하고;
- (d) 상기 정제된 세포의 부차집단을 신경세포로 예정된 전구체 세포의 토대(substratum)상 공급-세포-독립(feeder-cell-independent) 배지 및 고착·성장을 위한 배지에서 평판하고; 그리고
- (e) 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포를 성장시키기 위한 온도 및 대기에서 상기 평판된 세포들을 배양함.

청구항 11.

하기 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 후유사분열 신경세포의 획득 방법:

- (a) 배아 신경세포 접착분자(E-NCAM)를 발현하고, 증식을 위해 FGF를 필요로 하며, 다중의 페시지(passage) 상에서 자라고, 그리고 신경세포로 분화할 수 있는 능력이 있지만, 교질 세포(glial cells)로 분화되지는 않는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 포유류의 자가-증식성(self-renewing)인 신경세포로 예정된(neuron-restricted) 전구체 세포들을 제공하고, 증식이 가능한 조건에서 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포들을 배양하고; 그리고
- (b) 증식 조건에서 분화 조건으로 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포들의 배양 조건을 변화시키고, 그럼으로써 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포를 후유사분열 신경세포로 분화시킴.

청구항 12.

제11항에 있어서, 상기 배양 조건의 변화는 레티노산을 기초 배지에 첨가하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 13.

제11항에 있어서, 상기 배양 조건의 변화는 기초 배지로부터 후유사분열 인자를 회수하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 14.

제13항에 있어서, 상기 후유사분열 인자는 섬유아세포 성장인자인 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 15.

제11항에 있어서, 상기 배양 조건의 변화는 신경세포의 성숙인자를 기초 배지에 첨가하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 16.

제15항에 있어서, 상기 신경세포의 성숙인자는 소닉 헤지호그(sonic hedgehog), BMP-2, BMP-4, NT-3, NT-4, CNTF, LIF, 레티노산, 뇌-유도된 뉴로트로픽 인자(BDNF) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 17.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 상기 인간을 제외한 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들로 이루어진 것을 특징으로 하는 분리된 세포성 조성물 및 제약학적으로 수용가능한 담체의 치료적으로 효과적인 양으로 이루어진 신경세포성 질환을 치료하기 위해 사용되는 제약학적 조성물.

청구항 18.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 상기 인간을 제외한 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들로 이루어진 것을 특징으로 하는 분리된 세포성 조성물의 치료적으로 효과적인 양을 상기 인간을 제외한 포유류에게 투여하는 것으로 이루어진 것을 특징으로 하는 신경세포성 질환(neuronal disorder)의 치료방법.

청구항 19.

제17항의 상기 조성물의 치료적으로 효과적인 양을 상기 인간을 제외한 포유류에게 투여하는 것으로 이루어진 것을 특징으로 하는 신경세포성 질환의 치료방법.

청구항 20.

제18항에 있어서, 상기 조성물을 근육내 투여, 수막강내 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 일반적으로 선택된 방법에 의하여 투여하는 것을 특징으로 하는 신경세포성 질환의 치료방법.

청구항 21.

제19항에 있어서, 상기 방법은 분화인자, 성장인자, 세포성숙인자 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것의 투여를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 신경세포성 질환의 치료방법.

청구항 22.

제21항에 있어서, 상기 분화인자는 레티노산, BMP-2, BMP-4 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 신경세포성 질환의 치료방법.

청구항 23.

성장인자, 세포성숙인자, 세포분화제 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 시약(agent)을 교질세포에게 전달하는 전달 매개체로 사용되는 것을 특징으로 하는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 상기 인간을 제외한 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들로 이루어진 것을 특징으로 하는 분리된 세포성 조성물.

청구항 24.

신경세포에게 영양작용적 인자(trophic factor)를 전달하기 위한 전달 매개체로 사용되는 것을 특징으로 하는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 상기 인간을 제외한 포유류의 신경세포로 예정된 전구체 세포들로 이루어진 것을 특징으로 하는 분리된 세포성 조성물.

청구항 25.

하기 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 신경 퇴행성 증후군의 치료방법:

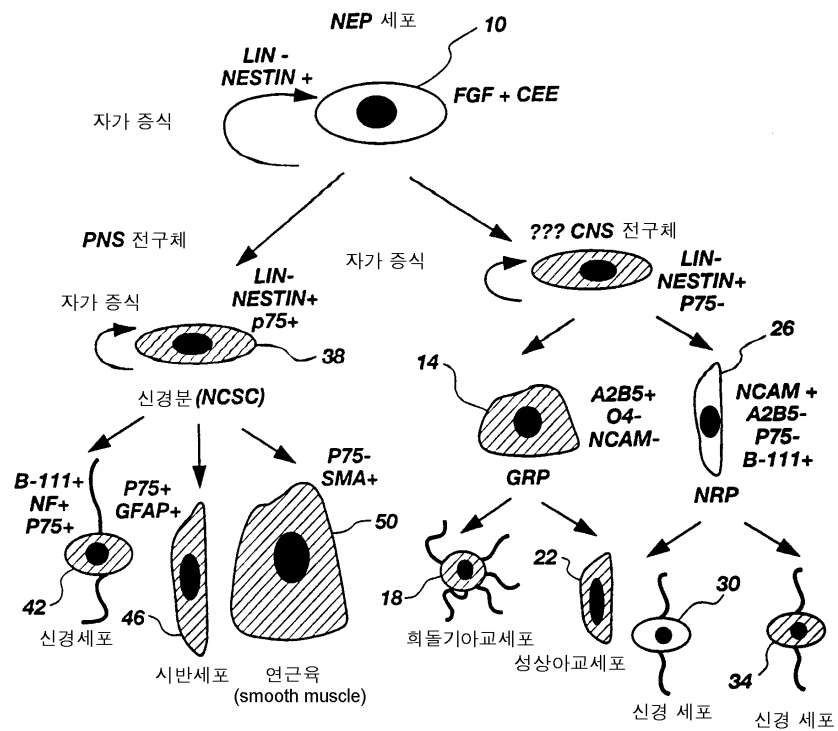
(a) 배아 신경세포 접착분자(E-NCAM)를 발현하고, 증식을 위해 FGF를 필요로 하며, 다중의 폐시지(passage) 상에서 자라고, 그리고 신경세포로 분화할 수 있는 능력이 있지만, 교질 세포(glial cells)로 분화되지는 않는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 포유류의 자가-증식성(self-renewing)인 신경세포로 예정된(neuron-restricted) 전구체 세포의 순수한 집단을 마련하고;

(b) 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포를 성장인자, 신경전달물질, 신경전달물질 합성효소, 뉴로펩티드, 뉴로펩티드 합성 효소, 또는 자유-라디칼 매개된 손상에 대해 보호를 할 수 있는 물질로 유전적으로 형질전환시키고, 그럼으로써 상기 성장인자, 신경전달물질, 신경전달물질 합성효소, 뉴로펩티드, 뉴로펩티드 합성 효소, 또는 자유-라디칼 매개된 손상에 대해 보호를 할 수 있는 물질을 발현하는 교질세포로 예정된 전구체 세포의 형질전환된 부차집단을 생성시키고; 그리고

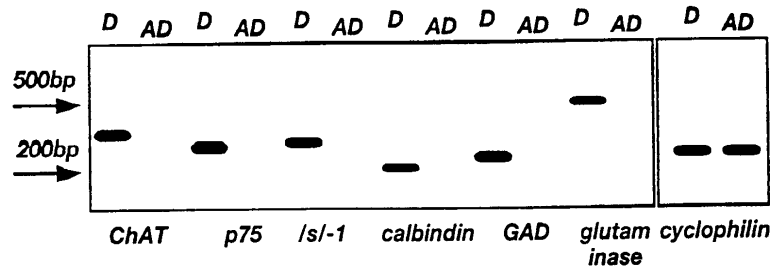
(c) 상기 인간을 제외한 포유류에게 상기 신경세포로 예정된 전구체 세포의 형질전환된 집단의 효과적인 양을 투여함.

도면

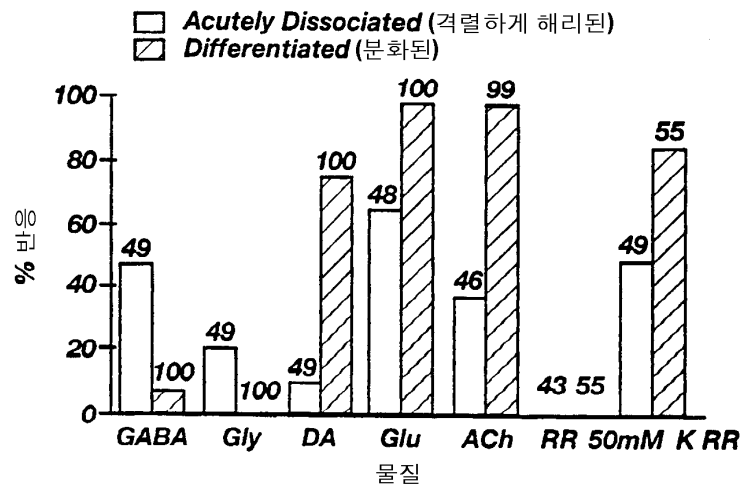
도면1



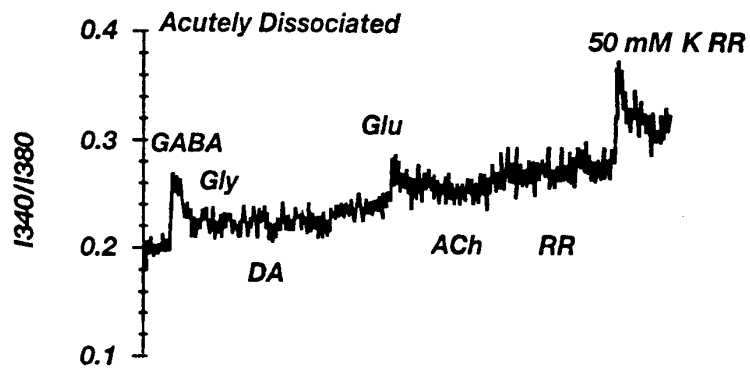
도면2



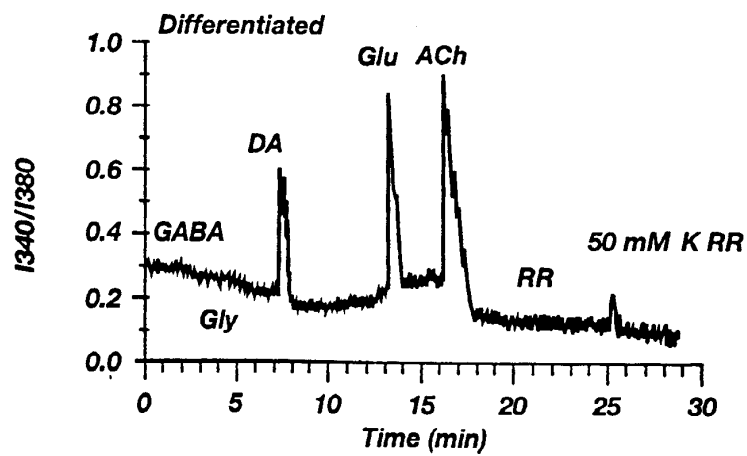
도면3



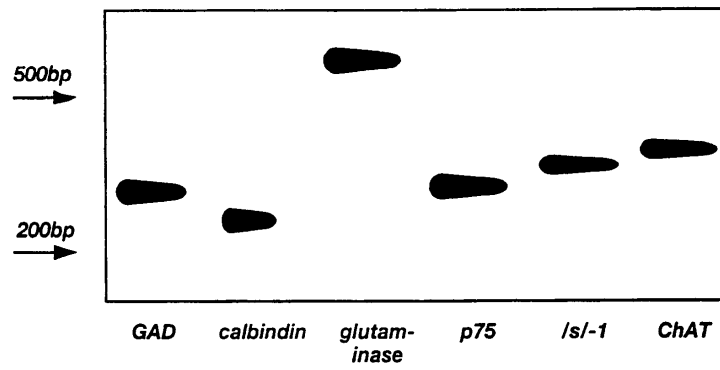
도면4



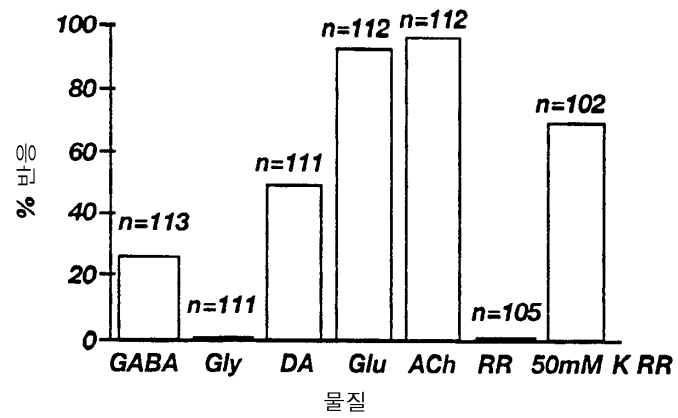
도면5



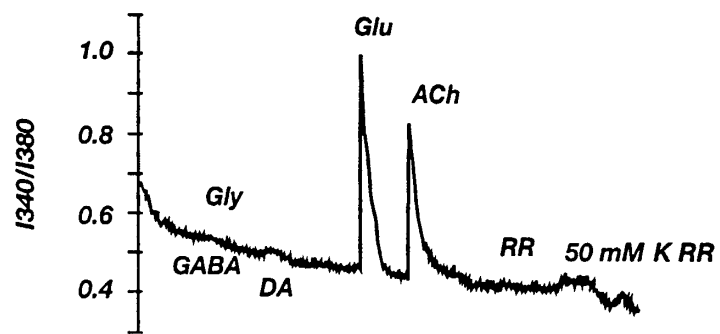
도면6



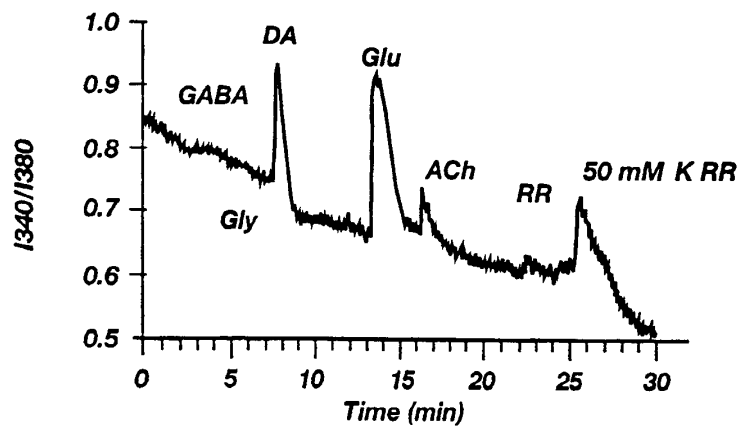
도면7



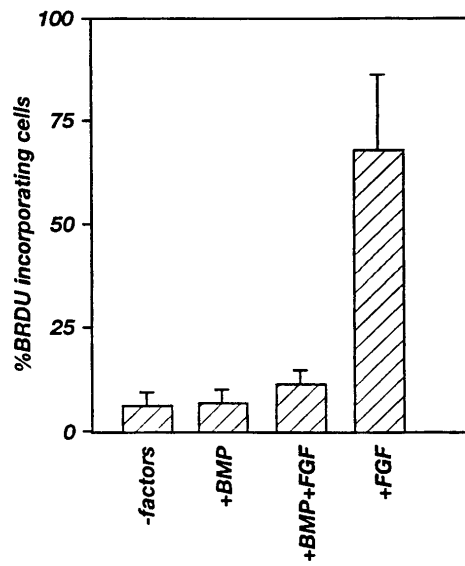
도면8



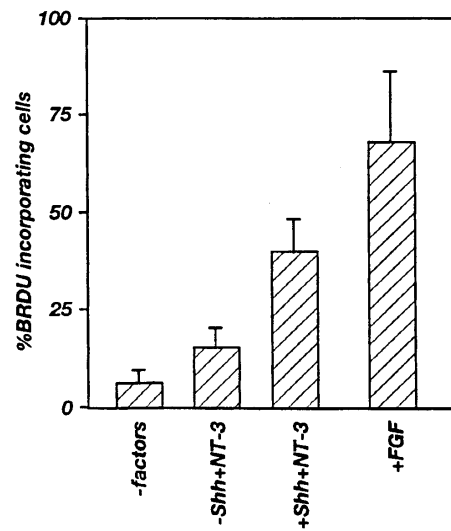
도면9



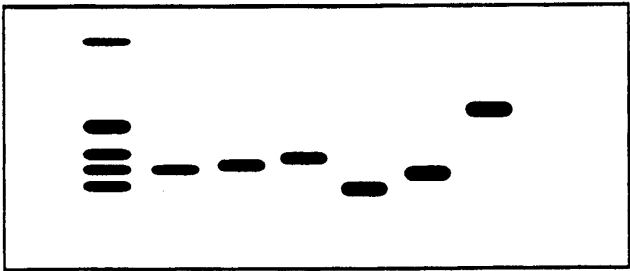
도면10



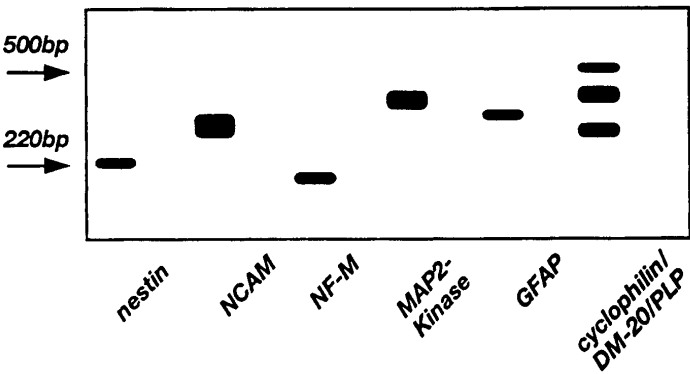
도면11



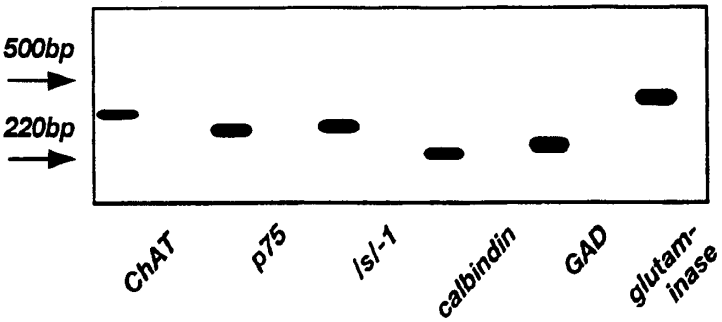
도면12



도면13



도면14



서열목록

- <110> University of Utah Research Foundation
- <120> Lineage-Restricted Neuronal Precursors
- <150> US 08/909,435
- <151> 1997-07-04
- <150> US 09/109,858

<151> 1998-07-02

<160> 14

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 1
 gcacatactc agacgaagcc a 21

<210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 2
 agcagccaag atggagcaat agac 24

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 3
 ctgaatactg gctgaatgac atg 23

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 4
 aaattaatga caacatccaa gac 23

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 5
 gcagcatagg cttcagcaag 20

<210> 6

<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	6	
	gtagcaggtc cgcaaggtg	19
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	7	
	gaatcttttc tcctggtggt g	21
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	8	
	gatcaaaaagc cccgtacaca g	21
<210>	9	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	9	
	gcagaatccc acctgcag	18
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	10	
	gttgctggca tcgaaagag	19
<210>	11	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	11	
	gcacagacat gggtgggata ctag	24

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 12
 gcagggctgt tctggagtcg 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 13
 ccaccgtgtt cttcgacatc 20

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 14
 ggtccagcat ttgccatgg 19