



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0147800
(43) 공개일자 2016년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) A61K 35/34 (2015.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0657 (2013.01)
A61K 35/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7030978
(22) 출원일자(국제) 2015년05월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년11월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/059745
(87) 국제공개번호 WO 2015/169762
국제공개일자 2015년11월12일
(30) 우선권주장
14167201.4 2014년05월06일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌자체스트라쎄 124
(72) 발명자
부르킨 마르크
스위스 체하-4054 바젤 바흘레텐슈트라쎄 41
술리히트 조나
스위스 체하-4125 리헨 파라디스슈트라쎄 15
(74) 대리인
특허법인코리아나

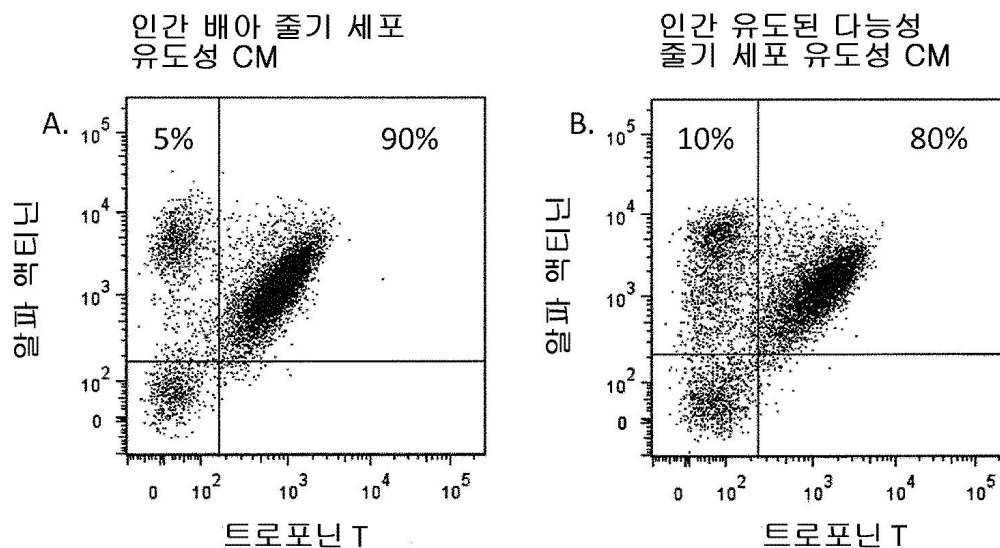
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 다능성 줄기세포의 심근세포로의 분화 방법

(57) 요약

본 출원은 다능성 줄기 세포 (PSC) 의 심근세포로의 분화 방법에 관한 것이다. 나아가, 본 출원은 화학적으로 규정된 배지 유도의 연쇄된 방법을 기반으로 하는 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 및 유도된 다능성 줄기 세포 (iPSC) 의 규정된 심근세포로의 분화 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 2500/38 (2013.01)

C12N 2501/415 (2013.01)

C12N 2501/727 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

C12N 2503/00 (2013.01)

C12N 2506/02 (2013.01)

C12N 2506/45 (2013.01)

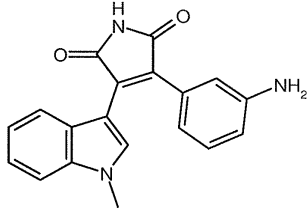
명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 다능성 줄기 세포의 심근세포로의 분화 방법:

- 다능성 세포를 3 내지 $7 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 의 밀도로 제공하는 단계, 및
- 상기 세포를 하기 화학식의 화합물을 함유하는 무(無)인슐린 배지에서 인큐베이션하는 단계:



청구항 2

제 1 항에 있어서, 세포가 0.3 내지 10 μM 의 상기 화합물을 함유하는 무인슐린 배지에서 인큐베이션되는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 단계 b)가 세포를 12 내지 48 시간 동안 인큐베이션함을 포함하는 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, c) 상기 세포를 Wnt-C59를 함유하는 무인슐린 배지에서 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 단계 c)가 상기 세포를 1 내지 10 μM Wnt-C59를 함유하는 무인슐린 배지에서 인큐베이션함을 포함하는 방법.

청구항 6

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 단계 c)가 상기 세포를 24 내지 72 시간 동안 인큐베이션함을 포함하는 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계들 사이에서 상기 세포를 24 내지 48 시간 동안 무인슐린 배지에서 인큐베이션하는 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, d) 상기 세포를 인슐린을 함유하는 배지에서 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 b), c) 및 d)의 배지가 아스코르브산을 함유하는 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다능성 줄기 세포가 유도된 다능성 줄기 세포인 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 유도된 다능성 줄기 세포가 인간 세포인 방법.

청구항 12

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서, 상기 유도된 다능성 줄기 세포가 심장 세포의 기능장애에 의해 유발되는 질병을 앓고 있는 환자로부터 획득되는 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 방법으로 획득되는 심근세포.

청구항 14

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 방법으로 획득되는 심근세포의 바이오뱅크 (biobank).

청구항 15

심장 세포의 기능장애에 의해 유발되는 질병에 대한 생체내 모델로서의 제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 방법으로 획득되는 심근세포 또는 제 14 항의 바이오뱅크의 용도.

청구항 16

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 방법으로 획득되는 심근세포 또는 제 14 항의 바이오뱅크를 함유하는 치료 조성물.

청구항 17

본질적으로 본원에 기재된 방법 및 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 다능성 줄기 세포 (PSC) 의 심근세포로의 분화 방법에 관한 것이다. 나아가, 본 출원은 화학적으로 규정된 배지의 연쇄된 유도 단계들을 기반으로 하는 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 및 유도된 다능성 줄기 세포 (iPSC) 의 증식성 심근세포로의 분화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수년간, 다양한 세포 배양 시스템이 전임상 약물 개발에 이용되어 왔다. 그러나, 확립된 세포 모델들은 그들이 발암성 조직으로부터 또는 형질전환 및 불멸화된 세포로부터 유도되기 때문에 약제학적으로 관련된 질병-특이적 생리학을 부분적으로만 반영한다. 특히, 끝까지 분화된 심근세포는 제한된 증식 잠재성을 보유하는 것으로 나타났기 때문에, 약물 개발을 위한 세포 모델을 유효하게 생성할 역량을 갖지 않는다. 따라서, 연구 및 약물 개발에서 신뢰할만한 세포 모델로서 사용될 수 있는 더 많은 질병 관련 인간 세포 유형이 필요하다.

[0003] 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 및 유도된 다능성 줄기 세포 (iPSC) 는 연구자들에게 관능성 인간 세포 유형, 예를 들어 심근세포, 신경 세포, 췌장 세포 등을 생성할 막대한 기회를 제공한다. 순수한 hESC 및 iPSC 유도성 인간 심근세포 (hESCM) 배양의 시험관내 분화를 위한 강건한 프로토콜은, 초기 인간 심장발생의 이해를 진전시킬 뿐 아니라, 약물 개발의 전임상 단계에서 약물 효능을 시험하고, 임상 단계 진입 전에 심장 독성을 평가하기 위한 비-형질전환 인간 세포 모델로서 심근세포를 이용하도록 하는 강력한 도구를 제시할 것이다. 추가적으로, hESC 유도성 인간 심근세포는 심장 재생에 중요한 경로를 식별할 기회를 열어주고, 궁극적으로는 줄기-세포 기반 치료요법을 뒷받침할 임상적 응용을 유도할 수 있을 것이다.

[0004] 약제학적 연구 및 개발을 위한 세포 검정 모델 개발을 위해서는, 그러한 분화 프로토콜은 하기와 같은 조건을 이상적으로 충족시킬 세포를 생성할 필요가 있다: a) 높은 수준의 재현성을 가진 강건함; b) 매우 순수한 세포

유형을 다수 생성함; c) 단시간에 분화가능; d) 다중 스크리닝 개시를 위한 बै치 적합성 (batch conformity) 을 보장하도록 냉동될 수 있는 세포를 생성함; e) 질병-특이적 관독 모델링에 관련된 기능 및 생리를 제공함. P. W. Burrige 등의 문헌에서는 다능성 세포를 심근세포로 분화시키려는 접근법을 개괄했다 (P. Burrige, Keller, Gold, & Wu, 2012). 이제까지 상기 조건을 충족하는 공지된 프로토콜이 없었다. 특히, 공지된 프로토콜을 통해 수득된 심근세포는 임의의 기능적 특성의 손실없이 냉동 및 해동하는 것이 어렵다.

[0005] 그러한 필요조건을 충족하기 위해, 매우 순수한 심근세포를 다수 (95% 까지) 생성하는 신규한 분화 방법을 개발했다. 분화 프로토콜은 10 일의 시간 간격으로 심장 계열로의 분화를 지령하는 규정된 소형 분자를 이용한다. 그들의 순도를 더욱 증가시키기 위해, 심근세포에 유리한 조건을 이용해 심근세포를 다시 플레이팅하여 심근세포를 풍부화한다. 나아가, 상기 심근세포를 이후에 냉동하고, 액체 질소 하에 저장하고, 다시 해동할 수 있다. 심근세포를 약제학적 연구 및 개발에 이용되는 각종 스크리닝 포맷에 부응하는지 시험했다. 본 발명은 선행 기술 프로토콜에 비해 더 짧은 시간 내에 현저히 증가된 수율로 다능성 줄기 세포를 심근세포로 분화시키는 개선된 방법을 제공한다. 상기 신규한 방법은 다능성 줄기 세포로부터 배아체 또는 소형 세포 덩어리들을 수득해야 할 필요를 줄이고, 이제까지 공지된 방법들의 낮은 재현성 및 표준화의 주된 단점을 제거했다. 나아가, 그러한 높은 효율은 그러한 규정된 심근세포가 약물 발견 및 안전성 평가에서, 재생 의학 적용에서, 및 약제학적 공업에서의 시험관내 질병 모델링에서 대규모로 이용될 수 있도록 해 준다.

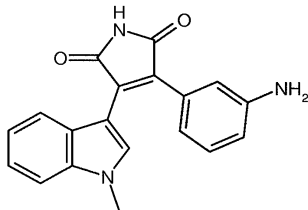
발명의 내용

[0006] 발명의 개요

[0007] 1. 본원에서는 하기의 단계를 포함하는, 다능성 줄기 세포의 심근세포로의 분화 방법이 제공된다:

[0008] a) 3 내지 $7 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 의 밀도로 다능성 세포를 제공하는 단계

[0009] b) 상기 세포를 하기 화학식의 화합물을 함유하는 무(無)인슐린 배지에서 배양하는 단계:



[0010]

한 구현예에서, 세포를 0.3 내지 10 μM 의 상기 화합물을 함유하는 무인슐린 배지에서 인큐베이션한다.

[0012] 한 구현예에서, 단계 b) 는 상기 세포를 12 내지 48 시간 동안 인큐베이션하는 것을 포함한다.

[0013] 한 구현예에서, 상기 방법은 추가적으로 c) 상기 세포를 Wnt- C59 를 함유하는 무인슐린 배지에서 인큐베이션하는 단계를 추가적으로 포함한다.

[0014] 한 구현예에서, 단계 c) 는 상기 세포를 1 내지 10 μM Wnt- C59 를 함유하는 무인슐린 배지에서 인큐베이션하는 단계를 추가적으로 포함한다.

[0015] 한 구현예에서, 단계 c) 는 세포를 24 내지 72 시간 동안 인큐베이션하는 것을 포함한다.

[0016] 한 구현예에서, 단계들 사이에서 세포를 무인슐린 배지에서 24 내지 48 시간 동안 인큐베이션하는 것을 포함한다.

[0017] 한 구현예에서, 상기 방법이 d) 상기 세포를 인슐린을 함유하는 배지에서 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다.

[0018] 한 구현예에서, 단계 b), c) 및 d) 의 배지가 아스코르브산을 함유한다.

[0019] 한 구현예에서, 상기 다능성 줄기 세포가 유도된 다능성 줄기 세포이다.

[0020] 한 구현예에서, 상기 유도된 다능성 줄기 세포가 인간 세포이다.

[0021] 한 구현예에서, 상기 유도된 다능성 줄기 세포가 심장 세포의 기능장애로 유발되는 질병을 앓는 대상체로부터 수득된다.

- [0022] 한 구현예에서, 상기 임의의 구현예의 방법으로 수득되는 심근세포가 제공된다.
- [0023] 한 구현예에서, 상기 임의의 구현예의 방법으로 수득되는 심근세포의 바이오뱅크가 제공된다.
- [0024] 한 구현예에서, 상기 임의의 구현예의 방법으로 수득되거나 또는 심근세포의 바이오뱅크의 심근세포가 심장 세포의 기능장애에 의해 유발되는 질병에 대한 시험관내 모델로서 이용된다.
- [0025] 한 구현예에서, 상기 임의의 구현예의 방법으로 수득되거나 또는 심근세포의 바이오뱅크의 심근세포를 함유하는 치료요법 조성물이 제공된다.
- [0026] 상기 임의의 구현예들은 단독으로 또는 조합하여 제시될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] **도 1:** FACS 분석이 분화 제 14 일째의 고농도 심근세포를 식별해준다. hESC 및 iPSC 가 전부 유사한 결과를 제공한다. A: 인간 배아 줄기 세포 유도성 심근세포. B: 인간 유도된 다능성 줄기 세포 유도성 심근세포.
- 도 2:** 다중 심근세포 분화의 FACS 분석이 프로토콜의 강건성을 입증한다.
- 도 3:** FACS 분석은 정제 방법이 심근세포의 순도를 개선함을 보여준다. A: 제 14 일에 $5.5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 심근세포로 60% 순도. B: 추가 정제 단계 후 $4.4 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 심근세포로 98% 순도.
- 도 4:** 면역형광 염색 - 공초점 현미경 분석이 세포에서 심근세포의 전형인 알파 액티닌 및 트로포닌 T 에 의한 횡문 패턴을 밝혀낸다. 녹색 (*): 알파 액티닌, 적색 (#): 트로포닌 T, 청색 (+): 핵.
- 도 5:** xCELLigent 분석 - 이소프로테레놀이 다능성 줄기 세포 유도성 심근세포에서 박동수를 증가시킨다.
- 도 6:** 다능성 줄기 세포 유도성 심근세포가 분화 제 14 일 및 제 18 일에 해동 후 생존 심근세포 수의 높은 비율을 보여준다. 각 실험에서 4×10^6 개의 세포가 냉동되었다.

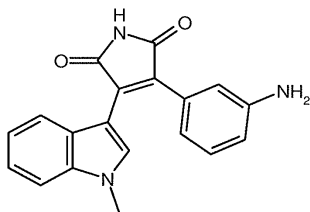
발명의 상세한 설명

본 발명은 더 짧은 시간 내에 선행 기술 프로토콜에 비해 현저히 증가된 증식 중 심근세포 수율로 다능성 줄기 세포를 심근세포로 분화시키는 개선된 방법을 제공한다.

본원에 개시된 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 및 유도된 다능성 줄기 세포 (iPSC) 를 규정된 심근세포로 분화시키는 신규한 방법은 화학적으로 규정된 배지 유도, 분화 개시 후 단지 10 일 만에 (또는 더욱 조기에: 8 일 만에) 박동 세포 생성의 연쇄된 단계를 기반으로 한다.

한 구현예에서, 하기 단계를 포함하는 다능성 줄기 세포의 심근세포로의 분화 방법이 제공된다:

- 3 내지 7×10^5 세포/ cm^2 의 밀도로 다능성 세포를 제공하는 단계
- 상기 세포를 하기 화학식의 화합물을 함유하는 무인슐린 배지에서 인큐베이션하는 단계



3-(3-아미노-페닐)-4-(1-메틸-1H-인돌-3-일)-피롤-2,5-디온 (CP21)

다능성 줄기 세포가 3 내지 7×10^5 세포/ cm^2 의 밀도, 즉 매우 높은 밀도로 제공된다. 한 구현예에서, 세포가 5.5×10^5 세포/ cm^2 의 밀도로 제공된다. 놀랍게도, 본 발명의 발명자들은 높은 밀도로 세포를 제공하는 것이 분화 효율 및 심근 세포 수율을 증가시켰음을 발견했다.

한 구현예에서, 높은 밀도로 제공되는 세포를, 단계 a) 를 이용한 분화 개시 전에 임의의 죽은 세포를 제거하기

위해, 적합한 완충액 또는 배지로 세척한다.

단계 b)의 배지는 무인슐린 배지이다. 선행 기술에서의 보고에서 인슐린 함유 분화 배지가 심장발생을 차단함을 보인 바 있기 때문에 (Lian u. a., 2013), 단계 b)의 초기 분화 배지에 인슐린이 없다는 것은 중요하다.

분화를 개시하기 위해, 본원에서 "화합물 21" 또는 "CP21"로도 언급되는 화합물 21 (3-(3-아미노-페닐)-4-(1-메틸-1H-인돌-3-일)-피롤-2,5-디온을 함유하는 무인슐린 배지에서 세포를 인큐베이션하여 wnt-경로를 활성화한다; 참고문헌은, 예를 들어 L. Gong 등; Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters 20 (2010), 1693-1696).

심근세포 분화를 유도하는 화합물 21의 최적 농도는 세포 용기에 부착되는 다능성 세포의 세포 밀도에 좌우된다. 상이한 세포 밀도 (1.8 내지 $11 \times 10^5 / \text{cm}^2$ hESC 또는 iPSC) 및 다양한 CP21 농도 (0 내지 10 μM)를 이용한 여러 병행 분화 실험에서, 세포 밀도 $5.5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 및 CP21 농도 2 μM 를 이용하면 가장 효율적인 다능성 줄기 세포의 심근세포로의 분화를 제공할 수 있음을 발견했다. 5 μM 를 초과하는 CP21 농도는 세포 생존력 감소를 나타냈다. 이는, 선행 기술 프로토콜에서는 효율적 분화를 위해서는 Wnt 경로의 여타 조절자들의 더 높은 농도를 필요로 했기 때문에 놀라운 것이다.

한 구현예에서, 상기 분화 방법의 단계 b)는 0.3 내지 10 μM CP21, 바람직하게는 0.5 내지 5 μM CP21를 함유하는 배지에서 세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다. 한가지 바람직한 구현예에서, 상기 분화 방법의 단계 b)는 2 μM CP21를 함유하는 배지에서 세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다.

24h CP21 인큐베이션 후, 세포는 강력한 세포 사멸을 나타낸다. CP21의 다양한 인큐베이션 시간 시험은 24h이 심장형성에 최적이며, 더 길거나 또는 더 짧은 인큐베이션 시간은 덜 효율적인 분화를 초래함을 보여줬다.

한 구현예에서, 단계 b)는 CP21를 함유하는 무인슐린 배지에서 12 내지 48 시간, 바람직하게는 18 내지 24 시간 동안 세포를 인큐베이션함을 포함한다.

한가지 바람직한 구현예에서, 단계 b)는 CP21를 함유하는 무인슐린 배지에서 24 시간 동안 세포를 인큐베이션함을 포함한다.

한 구현예에서, 단계 b)의 배지는 아스코르브산을 함유한다. 기본 배지에 대한 아스코르브산의 첨가는 심근세포 분화를 개선시키는 것으로 나타났다 (Cao u.a., 2012).

따라서, 한 구현예에서, 단계 b)의 배지는 CP21 및 아스코르브산을 함유하는 무인슐린 배지이다. 한가지 그러한 구현예에서, 배지는 0.5 내지 5 μM CP21 및 아스코르브산을 함유한다.

한 구현예에서, 상기 방법은 c) 상기 세포를 Wnt-C59를 함유하는 무인슐린 배지에서 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다.

Wnt-C59는 Wnt 신호전달 경로를 차단하는 소형 분자이다 (WO2010101849, 2-(4-(2-메틸피리딘-4-일)페닐)-N-(4-(피리딘-3-일)페닐)아세트아미드). Wnt-C59는 매우 강력하며 매우 선택적인 Wnt 신호전달 안타고니스트이다. 이는 Wnt 단백질의 포큐핀 (Porcupine) (막-결합 O-아실트랜스퍼라아제)에 의한 팔미틸화를 방지하여, Wnt 단백질 분비 및 활성을 차단한다.

상이한 농도의 wnt 억제인자 Wnt-C59 (1 내지 10 μM)를 이용하면 심근세포에서의 유의한 증가를 초래한다. 최적 농도는 2 μM 로 식별되었다. Wnt-C59를 첨가하지 않은 경우, 분화는 심근세포를 제공하지 않았다.

5 μM 를 초과하는 농도의 Wnt-C59는 세포 사멸 증가를 나타냈다. 한 구현예에서, 상기 분화 방법의 단계 c)는 세포를 1 내지 10 μM Wnt-C59를 함유하는 배지에서 인큐베이션함을 포함한다. 한가지 바람직한 구현예에서, 상기 분화 방법의 단계 c)는 세포를 2 μM Wnt-C59를 함유하는 배지에서 인큐베이션함을 포함한다.

wnt 경로는 매우 복잡하여, 상이한 작용 방식의 여타 Wnt 저해제들이 시험되었다.

항기생충제 니클로사마이드 (Chen 등, Biochemistry. 2009 Nov 3;48(43): 10267-74.)가 프리즐드 1 함유 (Frizzled 1 endocytosis)을 촉진하고, 디셰벨드-2 (Dishevelled-2) 단백질을 하향조절하고, Wnt3A-자극 베타-카테닌 안정화 및 LEF/TCF 리포터 활성을 억제한다.

피르비늄 (Pyrrvinium)은 시험관내에서 모든 카제인 키나아제 1 (CK1) 패밀리에 결합하고, 카제인 키나아제 1 α

(CK1 α) 키나아제 활성을 선택적으로 강화함으로써 Wnt 신호전달의 강력한 저해제이며, Axin의 안정화를 가져오는 결과를 초래하며, β -카테닌 턴오버를 증가시킨다 (Thorne 등, Nat Chem Biol. 2010 Nov; 6(11): 829-36.).

항기생충제 니클로사마이드 및 피르비늄을 심근세포 분화를 유도하는 그들의 능력에 대해 시험했다. WntC-59와는 상반되도록, 타 Wnt 저해제가 모두 심근세포의 성공적 생성을 제공하지 않았다. 다능성 줄기 세포를 심근세포로 분화시키는 시험한 Wnt 저해제들의 상이한 효능은 wnt 분비 차단에 의한 wnt 경로의 특이적 저해가 중요한 메커니즘으로 보임을 시사한다.

한 구현예에서, 단계 c)는 세포를 24 내지 72 시간, 바람직하게는 48 시간 동안 Wnt-C59를 함유하는 무인슐린 배지에서 인큐베이션함을 포함한다.

한 구현예에서, 상기 단계 b) 및 c)의 상기 무인슐린 배지는 무혈청 배지이다. 한 구현예에서, 상기 무인슐린 배지가 RPMI1680 (Gibco사 제품)이다.

한 구현예에서, 세포를 각 단계 b) 및 c) 사이에 24 시간 내지 48 시간, 바람직하게는 48 시간 동안 무인슐린 배지에서 인큐베이션한다. 한 구현예에서, 상기 배지는 무혈청 배지이다. 또다른 구현예에서, 상기 배지는 아스코르브산을 함유한다.

한 구현예에서, 세포를 아스코르브산을 함유하는 무혈청, 무인슐린 배지에서 24 시간 내지 48 시간, 바람직하게는 48 시간 동안 각 단계 b) 및 c) 사이에서 인큐베이션된다.

한 구현예에서, 상기 임의의 구현예에 기재된 다능성 세포의 심근세포로의 분화 방법은 d) 세포를 인슐린을 함유하는 배지에서 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다. 그러한 후자 단계에서, 인슐린은 심근세포 및 그의 심장 전구체 세포의 증식을 촉진한다.

한 구현예에서, 단계 d)는 세포를 36 내지 60 시간, 바람직하게는 48 시간 동안 인슐린을 함유하는 배지에서 인큐베이션하는 것을 포함한다. 한 구현예에서, 상기 배지는 무혈청 배지이다. 또다른 구현예에서, 상기 배지는 아스코르브산을 함유한다.

증량 단계 d)에 사용되기에 적합한 배지는 예를 들어 DMEM, 고급 글루코오스 + L-글루타민 + 피루베이트 및 카르니틴, 타우린, 크레아틴, BSA, 비타민 C 또는 Cellular Dynamics international사의 iCell 심근세포 유지용 배지이다.

바람직하게는 배지가 각 단계 사이에서 교환되는데, 예를 들어 배지를 예를 들어 세포 흡출 또는 원심분리에 의해 제거하고, 상청액을 제거한 후, 후속 단계에 사용될 배지를 세포에 첨가한다. 한 구현예에서, 세포를 적합한 완충액 또는 배지로 세척한 후, 후속 단계의 배지를 첨가해 임의의 죽은 세포들을 제거한다. 세포 세척에 유용한 완충액 또는 배지는 당업계에 공지되어 있다. 세포 세척에 적합한 완충액의 한가지 예시는 예를 들어 인산염 완충 식염수 (PBS)이다.

한 구현예에서, 분화 방법에 유용한 다능성 세포는 안정한 생장 및/또는 복제 횟수를 허용하는 조건 하에 배양된다. 예를 들어, 세포가 다능성 배지에서 생장되며, 여러번 계대된다. 본원에 사용된 "다능성 배지"는 단일 세포로서의 다능성 줄기 세포가 그들의 다능성을 유지하면서 단일층 상에 부착하기에 유용한 당업계에 널리 공지된 임의의 화학적으로 규정된 배지를 가리킨다. 한 구현예에서, 다능성 배지는 단백질 키나아제의 단백질 세린/트레오닌 키나아제 (ROCK) 패밀리를 형성하는 소형 분자 저해제 (본원에서, ROCK 키나아제 저해제로 지칭함)를 함유하는 무혈청 배지이다.

한 구현예에서, ROCK 키나아제 저해제는 1-(5-이소퀴놀린술포닐)호모피페라진, N-벤질-2-(피리미딘-4-아미노)티아졸-4-카르복사미드 및 (+)-(R)-트랜스-4-(1-아미노에틸)-N-(4-피리딜) 시클로-헥산카르복사미드 디히드로클로라이드)의 군으로부터 선택된다.

본원에서 유용한 ROCK 키나아제 저해제의 예시는 파수딜 (1-(5-이소퀴놀린술포닐)호모피페라진), 티아조비빈 (N-벤질-2-(피리미딘-4-10일아미노)티아졸-4-카르복사미드) 및 Y27632 ((+)-(R)-트랜스-4-(1-아미노에틸)-N-(4-피리딜) 시클로-헥산카르복사미드 디히드로클로라이드, 예를 들어 Tocris bioscience사의 카탈로그 번호: 1254)이다. 한가지 바람직한 구현예에서, ROCK 키나아제 저해제는 Y27632이다. 한 구현예에서, 다능성 배지는 2 내지 20 μ M Y27632, 바람직하게는 5 내지 10 μ M Y27632를 함유하는 무혈청 배지이다. 또다른 구현예에서, 다능성 배지는 2 내지 20 μ M 파수딜을 함유하는 무혈청 배지이다. 또다른 구현예에서, 다

능성 배지는 0.2 내지 10 μM 티아조비빈을 함유하는 무혈청 배지이다.

본원에 제시된 신규한 방법을 이용하면, 다능성 줄기 세포 유래의 알파 액티닌 및 트로포닌 T 를 발현하는 심근 세포를 수율 60 내지 98% 까지 분화시키는 것이 가능하다.

한 구현예에서, 상기 방법은 e) 상기 세포를 다시 플레이팅하여 무인슐린 배지에 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 단계는 심근세포의 순도를 추가로 증가시킨다. 한 구현예에서, 상기 세포를 다시 플레이팅하고, 우태아 혈청을 보충한 무인슐린 배지에서 18 내지 32 시간 동안, 바람직하게는 24 시간 동안 인큐베이션한다. 한가지 그러한 구현예에서, 배지는 ROCK 저해제를 추가로 함유한다. 한 구현예에서, ROCK 저해제는 Y-27632 이다.

본원에 기재된 방법으로 수득되는 심근세포는 여러 계대 동안 증식될 수 있으며, 냉동 및 해동 후에도 그들의 기능적 특성을 유지할 수 있다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "분화하다", "분화" 는 덜 분화된 세포를 체세포로 변환, 예를 들어 다능성 줄기 세포를 심근세포로 변환하는 하나 이상의 단계들을 지칭한다. 다능성 줄기 세포의 심근세포로의 분화는 본원에 기재된 방법으로 달성된다.

본원에 사용된 용어 "줄기 세포" 는 자체-갱생 능력을 가진 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "분화되지 않은 줄기 세포" 는 다양한 범위의 세포 유형으로 분화하는 능력을 가진 줄기 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 사용된 "다능성 줄기 세포" 는 여러 세포 유형의 세포를 제공할 수 있는 줄기 세포를 지칭한다. 다능성 줄기 세포 (PSC) 는 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 및 인간 유도된 다능성 줄기 세포 (hiPSC) 를 포함한다. 인간 유도된 다능성 줄기 세포는 예를 들어 당업계에 공지된 방법에 의해 4 가지 규정된 인자들 (Sox2, Oct4, Klf4, c-Myc) 의 유도에 의해 재프로그래밍화 (reprogrammed) 체세포로부터 유도될 수 있다. 인간 체세포는 건강한 개체 또는 환자로부터 수득될 수 있다. 그러한 공여자 세포들은 임의의 적합한 공급원으로부터 용이하게 수득될 수 있다. 본원에서 인체, 예를 들어 인간 피부 세포, 혈액 세포 또는 뇨 시료로부터 수득가능한 세포들에 침습적 과정 없이 공여자 세포의 단리를 가능케 하는 공급원이 바람직하다.

인간 다능성 줄기 세포가 바람직하긴 하지만, 상기 방법은 또한 비-인간 다능성 줄기 세포, 예를 들어 영장류, 설치류 (예를 들어, 래트, 마우스, 토끼) 및 개의 다능성 줄기 세포에도 적용가능하다.

본원에 사용된 바와 같이, "심근세포" 는 적어도 세포 마커 트로포닌 T (트로포닌 T 유형 2 (Cardiac), 유전자 기호 TNNT2, Entrez Gene: 7139, UniProtKB: P45379) 을 발현하는 세포이며, 바람직한 구현예에서 또한 세포 마커 알파 액티닌 (ACTN2 액티닌, 알파 2, 유전자 기호 ACTN2, Entrez Gene: 88, UniProtKB: P35609) 을 발현한다. 트로포닌 T 및/또는 알파 액티닌의 발현은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 실시예 부분에 기재된 FACS 분석으로 평가될 수 있다. 심근세포는 자발적인 주기적 수축 활성 ("박동") 을 발현한다. 이는 본 발명의 방법으로 수득되는 심근세포가 적절한 Ca^{++} 농도 및 전해질 균형을 갖춘 적합한 조직 배양 환경에서 배양되는 경우, 임의의 추가적인 구성성분들을 배양 배지에 첨가할 필요없이 세포가 세포의 한 축을 따라 주기적 방식으로 수축한 후 수축으로부터 이완하는 것으로 관찰될 수 있음을 의미한다. 추가로, 본원에 개시된 방법으로 수득되는 세포들은 심근세포의 여타 특징들, 예를 들어 이온 채널 또는 적절한 전기생리학을 발현할 수 있다.

본원에 사용된 바와 같이, "증식 중인 심근세포" 는 발현 알파 액티닌 및 트로포닌 T 를 발현하며, 세포 분열에 의해 증식하는 세포이다.

"마커의 발현" 은 세포에서 특정 유전자가 mRNA 로 전사되며, 일반적으로 후속하여 특정 기능을 발휘하는 단백질 (그의 유전자 산물) 로 번역됨을 의미한다. 마커의 발현은 당업계에 공지된 방법으로 RNA 수준에서 또는 단백질 수준에서 검출 및 정량될 수 있다. 본원에서 예를 들어 마커에 대한 항원 결합으로 특정 단백질의 존재여부를 시험함으로써 단백질 수준에서 마커의 발현을 검출하는 것이 바람직하다.

임의의 상기 구현예들은 단독으로 또는 조합하여 제시될 수 있다.

본 발명의 한 구현예에서, 환자 특이적 또는 건강한 개체 특이적 심근세포 생성 방법이 제공된다. 그러한 목적을 위해, 환자 또는 건강한 개체로부터 수득된 인간 유도된 다능성 줄기 세포 (iPSC) 가 본원에 기재된 방법으로 심근세포로 분화된다. 환자-특이적 인간 iPSC 는 환자 또는 건강한 개체로부터 수득된 체세포를 다능성 줄기 세포로 재프로그래밍화되어 당업계에 공지된 방법으로 수득될 수 있다. 예를 들어, 섬유아세포, 각질세포 또는 지방세포가 치료가 필요한 개체 유래 또는 건강한 개체 유래 피부 생검에 의해 수득되고, 당업계에 공지된 방법으로 다능성 줄기 세포로 재프로그래밍화될 수 있다. 유도된 다능성 줄기 세포를 위한 공급원으로

서 적합한 여타 체세포들은 혈액 시료로부터 획득되는 백혈구 또는 상피 세포 또는 뇨 시료로부터 획득되는 여타 세포들이다. 이어서, 환자 특이적 유도된 다능성 줄기 세포는 본원에 기재된 방법으로 환자 특이적 또는 건강한 개체 특이적 심근세포로 분화된다. 본 발명의 또다른 국면에서, 임의의 상기 방법으로 제공되는 심근세포의 개체군이 제공된다. 바람직하게는, 심근세포의 개체군이 환자특이적이며, 즉 병에 걸린 개체들로부터 획득되는 iPSCs로부터 유도된다. 또다른 구현예에서, 심근세포의 개체군이 건강한 개체로부터 획득된다.

환자로부터 유도된 심근세포는 확장성 심근병증, 비후성 심근증, 제한성 심근증, 부정맥유발성 우심실 형성이상, 관상동맥 심장 질병과 같은 질병의 병리생리학 연구를 위한 질병 관련 시험관내 모델을 나타낸다.

한 구현예에서, 상기 방법으로 획득되는 심근세포는 심장 세포의 기능장애에 의해 유발되는 질병, 예를 들어 심장 비대, 박동 효율 감소, 심근세포의 불규칙한 흥분, 불충분한 칼슘 조종을 역전, 억제 또는 예방하기 위한 화합물 스크리닝에 이용된다. 바람직하게는, 본 발명의 방법으로 획득되는 심근세포는 질병이 있는 대상체로부터 유도된다. 또다른 구현예에서, 상기 방법으로 획득되는 심근세포는 심장 질병, 예를 들어 상기 언급된 것들의 치료를 위한 신규 표적 및 화합물들의 스크리닝 및 평가에 이용된다. 바람직하게는, 본원에 기재된 본 발명의 방법으로 획득되는 심근세포가 예를 들어 확장성 심근병증, 비후성 심근증, 제한성 심근증, 부정맥유발성 우심실 형성이상, 관상동맥 심장 질병과 같은 질병에 걸린 개체로부터 유도된다. 질병이 있는 대상체로부터의 심근세포의 분화는 인간 배경 페러다임에서 약물 안전성을 조기에 평가할 특별한 기회를 제공한다. 또다른 구현예에서, 상기 방법으로 획득되는 심근세포는 심장의 시험관내 모델로서 이용된다.

본 발명은 제노-프리 (xeno-free) 조건에서 유도된, 환자 특이적 심근세포 또는 이식에 적합한 동일한 HLA 유형을 가진 건강한 개체 유래의 상용적 세포를 공급하는 매우 효율적인 방법을 제공한다. "제노-프리 배양 조건"은 오직 인간 및 재조합 기원의 구성성분들만을 함유하는 부착을 위한 배지 및 기질을 지칭한다. 따라서, 외래병원체 (xenopathogens)로 인한 오염의 위험을 피하게 되며, 신장 세포가 재생의학에서의 이용에 안전하다. 본원에 기재된 방법을 이용한 환자 특이적 유도된 다능성 줄기 세포 (iPSCs)의 환자 특이적 심근세포로의 분화는 심근세포의 자기조직 공급원 생성을 위한 용이한 접근가능하며 재현가능한 기법을 제공한다.

세포 치료요법에서 자가조직 및/또는 상용성 세포의 이용은 면역학적 거부 대상이 될 수도 있는 비-자가조직 세포의 이용을 초월하는 중요한 장점이다. 대조적으로, 자가조직 세포들은 유의한 면역학적 응답을 거의 이끌어내지 않는다.

본 발명의 추가로 바람직한 국면에서, 환자 특이적 심근세포의 바이오뱅크의 생성이 포함된다. 한 구현예에서, 건강한 개체 및/또는 환자로부터 획득되는 심근세포의 상이한 개체군을 포함하는 바이오뱅크가 생성된다.

본원에 사용된 용어 "바이오뱅크"는 상이한 개체들 또는 종으로부터 취한 생물학적 시료의 라이브러리를 의미한다. 검체 및 관련 데이터의 보관 수집은 확장성 심근병증, 비후성 심근증, 제한성 심근증, 부정맥유발성 우심실 형성이상, 관상동맥 심장 질병과 관련된 질병을 다루고자 연구 목적을 의도로 한다. 또다른 구현예에서, 바이오뱅크는 혈관 재생 의학 접근법에 이용된다.

또다른 국면에서, 본 발명은 임의의 상기 방법으로 제공되는 심근세포를 함유하거나 또는 임의의 상기 세포 개체군을 함유하는 치료 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 치료 조성물은 예를 들어 5% 인간 혈청 알부민이 있는 인산염-완충 식염수를 포함하는 생리화적으로 상용성인 용액을 추가로 함유한다. 치료 조성물은 예를 들어 확장성 심근병증, 비후성 심근증, 제한성 심근증, 부정맥유발성 우심실 형성이상, 관상동맥 심장 질병과 같은 질병을 치료, 예방 또는 안정화하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 섬유아세포, 각질세포 또는 지방세포가 치료가 필요한 개체 또는 건강한 개체 유래의 피부 생검으로부터 획득되어, 당업계에 공지된 방법으로 재프로그래밍될 수 있다 ("Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Takahashi 등., 2007, Cell 131, 861-72). 유도된 다능성 줄기 세포의 공급원으로서 적합한 여타 체세포들은 혈액 시료로부터 획득되는 백혈구 세포 또는 상피 세포 또는 뇨 시료로부터 획득되는 여타 세포이다. 이어서, 환자 특이적 유도된 다능성 줄기 세포가 본원에 기재된 방법으로 심근세포로 분화되며, 수합되어, 병태 치료를 위해 개체에 도입된다. 본 발명의 방법으로 제공된 심근세포는 질병이 있거나 또는 손상된 세포의 정상적인 기능을 대체 또는 보조하기 위해 이용될 수 있다.

본 발명의 또다른 구현예는 확장성 심근병증, 비후성 심근증, 제한성 심근증, 부정맥유발성 우심실 형성이상, 관상동맥 심장 질병과 관련된 질병 치료요법을 위한 심근세포의 바이오뱅크의 용도이다. 바이오뱅크는 바람직하게는 여러 HLA 유형을 가진 건강한 개체 또는 환자로부터 획득된 심근세포를 포함한다. 건강한 공여자로부터 획득된 세포를 상용적 HLA 유형을 가진 치료가 필요한 개체로 이식하는 것은 이종이식 세포 이식에서 일반적으로 관련된 거부 반응의 심각한 문제를 방지한다. 통상적으로, 거부는 시클로스포린과 같은 항-거부

약물 또는 면역억제제의 투여로 예방 또는 감소된다. 그러나, 그러한 약물은 심각한 부작용, 예를 들어 면역억제, 발암 특성, 신장 독성이 있을 뿐 아니라 매우 고가이다. 본 발명은 시클로스포린, 이물란, FK-506, 글루코코르티코이드 및 라파마이신, 및 이들의 유도체와 같은 항-거부 약물의 필요를 제거하거나 또는 적어도 현저히 감소시킨다.

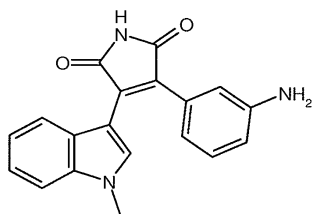
본 발명의 치료 방법과 관련하여, 심근세포를 포유류에 투여하는 것을 특별한 투여 방식, 투여량 또는 투약 빈도로 한정하는 것을 의도하지 않으며; 본 발명은 모든 방식의 투여, 예를 들어 근육내, 정맥내, 동맥내, 병소내, 피하 또는 질병을 예방 또는 치료하기에 적합한 투여량을 제공하기에 충분한 임의의 여타 경로를 포함한다. 심근세포는 단일 투여량 또는 다중 투여량으로 포유류에 투여될 수 있다. 다중 투여량이 투여되는 경우, 투여량은 예를 들어 1 주, 1 개월, 1 년 또는 10 년을 두고 분리될 수 있다. 하나 이상의 성장 인자, 호르몬, 인터루킨, 싸이토카인, 소형 분자 또는 여타 세포들이 또한 세포의 투여 이전에, 그 동안 또는 이후에 투여되어 특별한 세포 유형에 그들이 더욱 편향되도록 할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 실시예

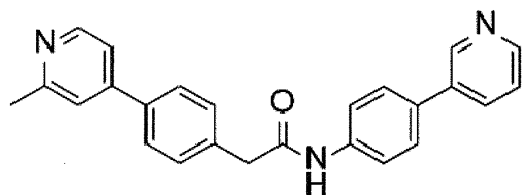
[0029] 재료 및 방법

[0030] CP21R7: 3-(3-아미노-페닐)-4-(1-메틸-1H-인돌-3-일)-피롤-2,5-디온 (본원에서는 "화합물 21" 또는 "CP21" 로도 언급함; 참고문헌은, 예를 들어 L. Gong 등; Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters 20 (2010), 1693-1696).



[0032] CP21R7

[0033] Wnt-C59 : 2-(4-(2-메틸피리딘-4-일)페닐)-N-(4-(피리딘-3-일)페닐)아세트아미드 (Cellagen Technology 사 제품, 카탈로그 번호 C7641-2s, W02010101849):



[0035] 인간 ESC: SA001, LOT CA001 를 2001 년 3 월 20 일에 Goeteborg University 및 스웨덴의 Arvid Wallgrens Backe 20, SE-413 46 Goeteborg 소재의 Cellartis AB 에서 단리했으며, 스웨덴에서 모든 적용가능한 법을 준수하며, Goeteborg University 및 Uppsala University 의 Local Research Ethics Committees 에서 승인받았다.

배아 공급원: 냉동, IVF 유래 잉여물. 공여자 기밀유지: 공여자의 사생활 및 기밀을 보호하기 위해, 배아 공여자와 관련된 모든 식별자들을 삭제했다. 따라서, 공여자에 관한 어떤 정보도 접근불가하다. 특히, 공여행위로 인해 공여자에게 임의의 금전적 보상을 제공하지 않았다. hESC 로 작업하고, 상이한 세포주를 유도하는 것에 대해 승인받았다. 책임이 있는 윤리 위원회 (Ethikkommission beider Basel) 및 연방 보건청은 본 연구 프로젝트를 승인했다. (Ref-No: R-FP-S-1-0002-0000).

[0036] 인간 iPSC: SBI System Biosciences 사의 카탈로그 번호: SC101A-1 롯데 번호 110218-FF/ Life technologies 사의 카탈로그 번호: A13777 인 Gibco® Episomal hiPSC Line.

[0037] 인간 다능성 줄기 세포를 TeSR1 배지 (Stem cell Technologies 사 제품) 중의 hESC-qualified Matrigel (BD Bioscience 사 제품) 상에서 일상적으로 배양했다. 배양은 StemPro Accutase (Invitrogen 사 제품) 을 이용해 매 4 내지 6 일 마다 계대했다. 증량된 생존능을 위해, 효소 해리 1 시간 전에 TeSR1 배지가 10 μ M

ROCK-저해제를 함유한다.

- [0038] **500 ml 분화 배지**
- [0039] RPMI1680 + Glutamax 481 ml GIBCO#61870
- [0040] 아스코르브산 (10mg/ml) 4 ml Sigma#A4544
- [0041] (최종 농도: 80 μ g/ml)
- [0042] B27 - Insulin (50x) 10 ml Invitrogen#05-0129SA
- [0043] PenStrep 5 ml GIBCO#15140-122
- [0044] (최종 농도: 50U/ml)
- [0045] **500 ml 증량 배지**
- [0046] RPMI1680 + Glutamax 481 ml GIBCO#61870
- [0047] 아스코르브산 (10mg/ml) 4 ml Sigma#A4544
- [0048] (최종 농도: 80 μ g/ml)
- [0049] B27 + Insulin (50x) 10 ml Invitrogen#12587-01
- [0050] PenStrep 5 ml GIBCO#15140-122
- [0051] (최종 농도: 50U/ml)
- [0052] 본원에서 유용한 추가 시약 및 재료:
- [0053] Matrigel (BD Bioscience 사 제품, Cat.354277)
- [0054] mTeSR1 배지 (Stemcell Technologies 사 제품, Cat.05850)
- [0055] 어큐타아제 (Accutase) (Innovative Cell Technologies 사 제품, Cat.AT-104)
- [0056] Rock 저해제, Y-27632 (Millipore 사 제품, Cat.SCM075)
- [0057] RPMI 배지 (Gibco by Life Technologies 사 제품, Cat.61870)
- [0058] 아스코르브산 (Sigma, Cat.A4544)
- [0059] 50xB-27® Supplement Minus Insulin (Gibco by Life Technologies 사 제품, Cat.0050129SA)
- [0060] 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco by Life Technologies 사 제품, Cat.15070)
- [0061] 인슐린을 첨가하고 비타민 A 를 뺀 50xB27 (Gibco by Life Technologies 사 제품, Cat.12587)
- [0062] 0.05% 트립신/EDTA, 1x (Gibco by Life Technologies 사 제품, Cat.25300)
- [0063] autoMACS 전개 완충액 (Miltenyi 사 제품, Cat.130-091-221)
- [0064] Inside Perm + InsideFix (Miltenyi 사 제품, Inside Stain Kit, Cat.130-090-477)
- [0065] 0.1% 젤라틴 (Millipore 사 제품, Cat.ES-006-B)
- [0066] 냉동 바이알 (Corning 사 제품 #430659)
- [0067] Mr.Frosty 냉동 저장고 (Thermo Scientific 사 제품 #5100-0001)
- [0068] DMSO (Sigma 사 제품 #D2438)
- [0069] 우태아혈청 (Invitrogen 사 제품 #16000044)
- [0070] Falcon Cell Culture Dishes 35×10mm (BD 사 제품 #353001)
- [0071] Falcon Cell Culture Dishes 100×20mm (BD 사 제품 #353003)
- [0072] 6-웰-플레이트 Corning Costar (Sigma 사 제품 #CLS3516)

- [0073] 항-근절 (Anti-Sarcomeric) 알파 액티닌 [EA-53] 항체 (Abcam 사 제품, Cat.ab9465)
- [0074] 항-심근 트로포닌 T 항체 (Abcam 사 제품, Cat.ab45932)
- [0075] Alexa Fluor® 488 및 당나귀 항-마우스 IgG (H+L) (Invitrogen 사 제품, Cat.A21202)
- [0076] Alexa Fluor® 647 당나귀 항-토끼 IgG (H+L) (Invitrogen, Cat.A31573)
- [0077] Alexa Fluor® 555 당나귀 항-토끼 IgG (H+L) (Invitrogen, Cat.A31572)
- [0078] Hoechst 33258, 5수화물 (비스-벤즈이미드) (Molecular Probes 사 제품, Cat.H3569)
- [0079] **심근세포의 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 및 유도된 다능성 줄기 세포 (iPSC)로부터의 분화**
- [0080] 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 또는 유도된 다능성 줄기 세포 (iPSC) 를 Matrigel (BD Bioscience 사 제품, Cat.354277) 로 코팅된 56cm² 디쉬 상에서 10 ml mTeSR1 배지 (Stemcell Technologies 사 제품, Cat.05850) 중 에 37℃ 및 5% CO₂ 에서 배양했다.
- [0081] 심근세포 분화 개시 전에, 세포를 3 내지 4 회 계대시켜, 다능성 줄기 세포가 안정한 생장 및 복제 시간을 나타 내는지 확인했다.
- [0082] 그들의 다능성 상태를 보존함으로써 다능성 줄기 세포를 번식시키기 위해, hESC 또는 iPSC 를 하기와 같이 처 리했다: 세포를 10 ml PBS -/- 로 1 회 세척하고, 이후 3 ml 어큐타아제 (Innovative Cell Technologies, Cat.AT-104) 와 2 내지 3 분 동안 37℃ 및 5% CO₂, 에서 인큐베이션하여, 세포를 떼어냈다.
- [0083] 어큐타아제의 효소 반응을 7 ml mTeSR1 를 이용해 중단했고, 3 분 동안 500×g 에서의 세포의 원심분리를 후속 했다.
- [0084] 세포를 10 ml mTeSR1 에 재현탁시키고, 계수했다. 추가 배양을 위해, 2×10⁶ 세포를 새롭게 코팅된 Matrigel 이 있는 56 cm² 디쉬 상에 플레이팅했다. 추가로, hESC 또는 iPSC 를 10 ml mTeSR1 및 10 μM Rock 저해제, Y-27632 (Millipore 사 제품, Cat.SCM075) 에서 37℃ 및 5% CO₂ 로 배양했다. 후속하여, 10 ml mTeSR1 배지를 매일 교체하고, 다능성 줄기 세포를 80% 의 밀도로 배양 후 계대했다.
- [0085] 심근세포로의 성공적인 분화를 위해, 다능성 줄기 세포를 5.5×10⁵/cm² 의 hESC 또는 iPSC 를 이용해 고밀도로 플레이팅했다. 계대 및 배양을 다능성 줄기 세포에 대해 상기 기재된 바와 같이 수행했다.
- [0086] 24 시간 후 (제 1 일), hESC 또는 iPSC 를 180 μl/cm² PBS -/- 를 이용해 1 회 세척하고, 배양 배지를 180 μl /cm² 분화 배지로 교체했다.
- [0087] 다능성 줄기 세포의 심장 계열로의 분화를 개시하기 위해, 배지는 2 μM 화합물 21 (CP21), 소형 분자이며 글리 코젠 신타아제 키나아제 3 의 고도로 선별적 저해제 (GSK3β) 를 함유했다.
- [0088] CP1 과의 인큐베이션 24 시간 후 (제 2 일), 세포를 상기 기재된 바와 같이 PBS -/- 로 세척하고, 48 시간 동 안 220 μl/cm² 분화 배지에서 배양했다.
- [0089] 48 시간 후 (제 4 일), 세포를 상기 기재된 바와 같이 PBS -/- 로 세척하고, wnt 분비를 차단함으로써 강력한 wnt 저해제인 2 μM Wnt-C59 (Cellagen Technology, 카탈로그 번호 C7641-2s, W02010101849) 를 함유하는 220 μl/cm² 분화 배지에서 배양했다.
- [0090] 48 시간 후 (제 6 일), 세포를 상기 기재된 바와 같이 PBS -/- 로 세척하고, 48 시간 동안 220 μl/cm² 분화 배 지에서 배양했다.
- [0091] 48 시간 후 (제 8 일), 세포를 상기 기재된 바와 같이 PBS -/- 로 세척하고, 48 시간 동안 아스코르브산, 페니 실린-스트렙토마이신을 함유하나, 여기서 B27 와 인슐린을 함유하고, 비타민 A 는 땀 220 μl/cm² RPMI 배지 (= 증량 배지) 에서 배양했다.
- [0092] 박동 세포에 의해 볼 수 있는 최초의 심근세포가 분화 8 일째에 관찰되었으며, 제 14 일이 될 때까지 추가로 증

가되었다.

[0093] 후속 배지 교체는 매 48 시간 마다 $220 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 증량 배지를 이용해 수행되었다.

[0094] 세포 특징분석

[0095] 분화 과정의 효율을 시험하기 위해, 심근세포를 세포 면역세포화학 및 심근세포에 특이적인 항원을 이용하는 형광 활성화 세포 분류 (Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)) 를 이용해 분화 제 14 일째에 특징분석했다.

[0096] 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석

[0097] 세포를 $180 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ PBS -/- 로 세척하고, 5 내지 10 분 동안 $100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 0.05% 1× Trypsin/EDTA (Gibco by Life Technologies 사 제품, Cat.25300) 를 이용해 37℃ 및 5% CO₂ 에서 해리시켰다

[0098] 필요에 따라, 세포를 배양 용기로부터 살며시 긁어내어, 피펫으로 뽑아올렸다가 내리고, 후속하여 37℃ 및 5% CO₂ 에서 5 내지 10 분 동안 인큐베이션했다.

[0099] 이후, 3 배 증량 배지 및 10% 우태아 혈청 (FBS) 을 첨가했다.

[0100] 이어서, 세포를 100 μm 세포 여과기를 통해 여과하고 계수했다.

[0101] 분석을 위해, 현탁액 중의 1×10^6 세포를 1.5 ml 관에 옮겼다. 500×g 에서 원심분리 3 분 후, 상청액을 제거하고, 세포를 50 μl 의 Inside Fix (Miltenyi 사 제품, Inside Stain Kit, Cat.130-090-477) 및 50 μl 의 PBS -/- 로 15 분간 실온에서 암실 중에 고정시켰다.

[0102] 이후, 100 μl 의 autoMACS 전개 완충액 (Miltenyi 사 제품, Cat.130-091-221) 을 첨가하고 원심분리했다. 상청액을 제거하고, 세포를 100 μl 의 Inside Perm (Miltenyi 사 제품, Inside Stain Kit, Cat.130-090-477) 로 세척하고, 원심분리하고, 상청액을 제거했다. 세포를 Anti-Sarcomeric Alpha Actinin [EA-53] 항체 (Abcam 사 제품, Cat.ab9465) 및 Anti-Cardiac Troponin T 항체 (Abcam 사 제품, Cat.ab45932) 와 함께 인큐베이션하고, Inside Perm 로 1 시간 동안 4℃ 에서 1:100 으로 희석했다.

[0103] 이후, 세포를 500 μl 전개 완충액으로 세척하고, 원심분리하고, 상청액을 제거했다. 세포를 2 차 항체 (Inside Perm 중에 1:1000) 와 10 분 동안 실온에서 인큐베이션했다. 하기와 같은 2 차 항체를 이용했다: Alexa Fluor® 488 당나귀 항-마우스 IgG (H+L) (Invitrogen 사 제품, Cat.A21202) 및 Alexa Fluor® 647 당나귀 항-토끼 IgG (H+L) (Invitrogen 사 제품, Cat.A31573).

[0104] 후속하여, 세포를 500 μl 전개 완충액으로 세척하고, 원심분리 후 세포를 500 μl 전개 완충액에 재현탁시키고, 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 시스템으로 측정했다.

[0105] 상이한 CP21 농도를 이용한 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 및 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC) 로부터의 심근세포의 분화

[0106] 상기 기재된 프로토콜을 상이한 CP21 농도를 이용해 반복했다. 결과는 하기 표에 제시한다: (-) 심근세포 수득되지 않음, (+) - (+++): 수득된 심근세포의 양.

μM 로 나타낸 Cp21농도	0	0.3	1	2	3	5	10
실험 I	-	-	+	++	++	+	-
실험 II	-	-	+	+++	+	-	-
실험 III	-	-	+	++	++	-	-

[0107]

[0108] 정제

[0109] 심근세포의 순도를 증가시키기 위해, 풍부화 단계를 개발했다.

- [0110] 상기 기재된 바와 같이, 세포를 $180 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ PBS -/- 로 세척하고, 5 내지 10 분간 $100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 0.05% 1x Trypsin/EDTA (Gibco by Life Technologies 사 제조, Cat.25300) 를 이용해 37°C 및 5% CO_2 에서 해리시켰다.
- [0111] 필요에 따라, 세포를 배양 용기로부터 살며시 긁어내어, 피펫으로 뽑아올렸다가 내리고, 후속하여 37°C 및 5% CO_2 에서 5 내지 10 분 동안 인큐베이션했다.
- [0112] 이후, 3 배 증량 배지 및 10% 우태아 혈청 (FBS) 을 첨가했다.
- [0113] 이어서, 세포를 $100 \mu\text{m}$ 세포 여과기를 통해 여과하고 계수했다.
- [0114] $130 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 0.1% Gelatine (Millipore, Cat.ES-006-B) 으로 코팅한 새로운 플레이트를 1 시간 동안 37°C 에서 인큐베이션했다.
- [0115] $2.7 \times 10^5/\text{cm}^2$ 세포를 $180 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 증량 배지 10% 우태아 혈청 (FBS) 에 플레이팅했다. 추가로, $10 \mu\text{M}$ Rock 저해제를 첨가했다. 24 시간 후, $220 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 배지를 FBS 및 Rock 저해제가 부재하는 증량 배지로 교체했다. 배지를 48 시간 마다 교체했다.
- [0116] 제 18 내지 21 일에, 세포를 FACS 로 분석하고, 하기 분석을 위해 상이한 포맷으로 상기 기재된 바와 같이 다시 플레이팅했다: 면역형광 염색, xCELLigence 로 줄기 세포- 유도성 심근세포에서의 화합물들의 박동 리듬 및 전 부정맥효과 검출.
- [0117] 세포를 검정 조건에 맞는 플레이트 포맷에 이동시켰다. 세포가 24시간 동안 $200 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 증량 배지와 10% 우태아 혈청 (FBS) 에서 부착되도록 했다. 추가로, $10 \mu\text{M}$ Rock 저해제를 첨가했다. 24 시간 후, $220 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 증량 배지를 FBS 및 Rock 저해제 없이 교체했다. 배지를 48 시간 마다 교체했다.
- [0118] **심근세포의 냉동 및 해동**
- [0119] 제 14 일에, 심근세포를 정제 방법을 위해 기재된 바와 같이 다시 플레이팅했다. 제 18 일에, 세포를 상기 개요한 바와 같이 해리시키고, 후속하여 그들의 알파-액티닌 및 트로포닌 T 발현에 대해 FACS 로 분석했다. 80% 및 상기 심근세포를 이용한 배양을 냉동 프로토콜에 적용했다. 80% 미만의 심근세포가 있는 배양을 폐기했다.
- [0120] 세포를 계수하고, 4×10^6 개의 세포를 냉동 바이알마다 10% DMSO 및 $10 \mu\text{M}$ Y-27632 를 함유하는 1 ml 의 냉각시킨 FBS 와 냉동시켰다.
- [0121] 세포를 500xg 에서 3 분 동안 원심분리하고, 후속하여 FBS 보충 10% DMSO 및 $10 \mu\text{M}$ Y-27632 에 조심스럽게 재현탁시켰다. 심근세포 세포 현탁액의 1 ml 분취액을 4°C 예비-냉각 냉동 바이알에 충전시키고, 24 시간 동안 -80°C 에서 냉동시켰다. 이후, 냉동바이알을 액체 질소 중에 저장했다.
- [0122] 심근세포를 해동하기 위해, 바이알을 1 내지 2 분 동안 37°C 에서 수조에서 인큐베이션하고, 세포를 10 ml 증량 배지와 10% 우태아 혈청에 조심스럽게 이동시켰다. 세포를 2 분 동안 $300 \times g$ 에서 원심분리했다. 이후, 펠렛을 6 ml 증량 배지와 10% 우태아 혈청 및 $10 \mu\text{M}$ Y-27632 에 재현탁시키고, 0.1% 젤라틴으로 코팅한 6-웰 플레이트의 3 개 웰에 플레이팅했다. 24 시간 후, 세포를 FBS 및 Y-27632 이 없는 $220 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 증량 배지로 교체했다. 후속하여, 배지를 3 일마다 교체하고, 5 내지 7 일 후에는 세포를 검정 조건에 맞는 플레이트 포맷으로 플레이팅했다 (예를 들어, 심근 형문의 와해를 검출할 검정: 96 웰 포맷; 박동수 기록을 위한 검정: 96 웰 포맷).
- [0123] **xCELLigence 심근세포 박동 분석**
- [0124] 이소프로테레놀은 심장 베타-1 수용체 자극으로 심장 박동 및 심근 수축성을 증가시킨다. 줄기 세포 유도성 심근세포에서 그러한 전부정맥 효과를 검출하기 위해, $7 \times 10^4/\text{cm}^2$ 세포를 $130 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 0.1% 젤라틴으로 1 시간 동안 37°C 에서 코팅한 특별한 E-Plate Cardio 96 (Roche 사 제품, 카탈로그 번호05232368001) 에 플레이팅했다. 세포가 플레이트에 부착되고, 상기 기재된 바와 같이 2 일 동안 회복된 후, 배지를 iCell 심근세포 유지 배지 (Cellular Dynamics 사 제품, 카탈로그 번호 No.CMM-100-120-005) 로 교체했다. 세포를 xCELLigence RTCA Cardio System (Roche Applied Science 사 제품) 를 이용해 측정했다. 플레이팅 후 제 7 일에 세포를

3 μM 이소프로테레놀로 처리하고, 직접 측정했다. 각 96-웰 플레이트를 12,9 ms 의 해상도로 측정했다. 처음 3 분은 개입없이 측정되었고, 이후 24 시간 동안은 15 분마다 세포를 1 분 동안 측정했다.

[0125] **면역형광 염색**

[0126] 면역형광 염색을 위해, 세포를 4% 파라포름알데히드로 15 분 동안 실온에서 고정했다.

[0127] 세포를 PBS -/- 로 세척 후, 세포를 PBS -/- 중의 10% 당나귀 혈청 및 0.1% Triton (차단 완충액) 을 이용해 실온에서 20 분 동안 차단 및 삼투화했다. 이후, 세포를 1:100 희석된 1 차 항체 항-근절 알파 액티닌 [EA-53] 항체 (Abcam 사 제품, Cat.ab9465) 및 항-심장 트로포닌 T 항체 (Abcam 사 제품, Cat.ab45932) 을 이용해 차단 완충액에서 4°C 로 밤새 염색했다.

[0128] 세포를 PBS -/- 로 세척하고, 2 차 항체 Alexa Fluor® 488 가 있는 차단 완충액에서 1:1000 로 염색하고, 당나귀 항-마우스 IgG (H+L) (Invitrogen 사 제품, Cat.A21202) 및 Alexa Fluor® 555 당나귀 항-토끼 IgG (H+L) (Invitrogen 사 제품, Cat.A31572) 과 함께 1 시간 동안 실온에서 차단 완충액 중에 염색했다. PBS -/- 중 1:1000 희석된 Hoechst 33258, 오수화물 (비스-벤즈이미드) (Molecular Probes 사 제품, Cat.H3569) 를 이용하는 여러 PBS -/- 세척 단계 후 핵을 염색했다.

[0129] 결과

[0130] 분화 후, 세포를 그들의 심근세포 함량에 대해 분석했다. 도 1 은 분화 제 14 일째의 심근세포를 정량한 FACS 분석을 도시한다.

[0131] 알파 액티닌 및 트로포닌 T 이중 양성 세포를 특징으로 하는 평균 80 내지 90% 의 심근세포가 획득되었다. 도 1 에서, 세포의 부분 모집단이 알파 액티닌에 대한 단일 양성 염색되었다 (5 내지 10%). 이는 더욱 미성숙한 심근세포의 표시이며, 이러한 이유로 그러한 집단은 스코어링에 포함되지 않았다. 그 결과는 다능성 줄기 세포의 공급원으로서 hESC (도 1A) 또는 iPSC (도 1B) 를 이용하는 것과는 독립적이다. $5.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 다능성 줄기 세포로 출발하여, 분화 프로토콜이 평균 4 내지 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 알파 액티닌 및 트로포닌 T 양성 심근세포를 생성했다.

[0132] 분화 프로토콜의 강건성을 입증하기 위해, 여러 실험을 수행했으며, 각 배양에서 심근세포의 함량을 분석했다. 도 2 는 95 내지 40% 범위로 심근세포를 향한 분화 효능을 보여주는 10 개의 독립적 실험을 도시한다. 그러나, 실험의 대부분 (10 개 중 7 개) 이 허용가능한 비율인 75% 를 초과하는 심근세포 함량을 보여줬다. 60% 이상의 심근세포를 생성하는 실험을 진행시켰다. 60% 미만의 분화는 폐기했다. 실험들 사이에서의 변동성은 대부분 분화 개시시 다능성 줄기 세포의 품질 및 배양 상태에 의해 유발될 공산이 크다.

[0133] 심근세포에 대한 순도를 더 증가시키기 위해, 추가적인 정제 단계를 확립했다. 분화 제 14 일에, 세포를 탈착시켜 FACS 로 분석했다. 도 3A 는 배양이 제 14 일째에 60% ($5.4 \times 10^5/\text{cm}^2$) 심근세포를 함유하는 $9 \times 10^5/\text{cm}^2$ 세포를 계수함을 보여준다. 정제 방법이 성공적인 것으로 되기 위해, 알파 액티닌 양성 세포의 최소 백분율은 60% 이상이 되어야 한다. 해리된 세포를 다시 플레이팅하고 ($2.7 \times 10^5/\text{cm}^2$), 증량 배지에서 배양했다. 7 일 후 세포를 수합하고, $4.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 세포를 계수하고 분석했다. 도 3B 는 정제 단계후 배양 중의 심근세포 함량이 60 내지 98% 로 증가함을 보여줘, 상기 방법을 이용한 고도 풍부화 심근세포 $4.4 \times 10^5/\text{cm}^2$ 의 효율적 생산을 입증했다. 이후, 세포를 검정 조건에 맞는 배양 포맷으로 이동시켰다.

[0134] 심근세포를 추가 특징분석을 위해 면역형광으로 분석했다. 도 4 는 알파 액티닌 (녹색), 트로포닌 T (적색) 및 핵 특이적 Hoechst 염색 (청색) 에 대한 항체를 이용한 제 27 일의 심근세포의 면역형광 염색을 보여준다. 도 4 에서 결과로써의 면역형광이 심근세포에 대한 특징인 알파 액티닌 및 트로포닌 T 특이적 형문이 있는 세포를 보여준다.

[0135] 심장 상의 β -수용체의 활성화는 심근세포에서 심박동 증가를 유도한다. 다능성 줄기 세포 유도성 심근세포가 β -수용체 활성화에 응답함을 확인하기 위해, 심근세포를 β -수용체 아고니스트 이소프로테레놀과 인큐베이션한 후, 후속하여 xCELLigence 시스템을 이용해 분석했다. 도 5 는 다능성 줄기 세포 유도성 심근세포를 3 μM 이소프로테레놀과 인큐베이션 후, 박동 속도가 미처리 대조군에 비해 분 당 45 로부터 60 박동으로 증가했음을 보여준다. 본 실험은 상기 분화 프로토콜에 의해 생성된 다능성 줄기 세포 유도성 심근세포가 기능성

인간 심근세포와 닮았음을 추가로 입증한다.

[0136] 심근세포의 냉동 및 해동은 해동 후 낮은 세포 회복 수준으로 인해 전통적으로 어려웠다.

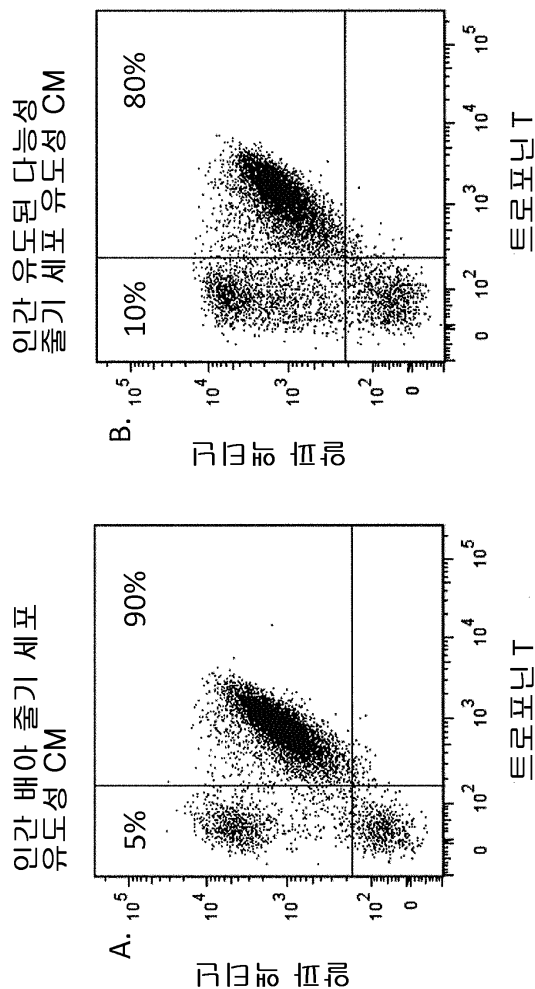
[0137] 검정을 위해서는 동일한 세포의 대량 배치를 갖는 것이 중요하기 때문에, 다능성 줄기 세포 유도성 심근세포가 냉동고에 저장 후 해동될 수 있는지 여부를 시험했다. 상이한 연령 (제 14, 18 및 32 일) 의 분화된 심근세포를 냉동하는 시도를 했다. 도 6 에서 알 수 있는 바와 같이, 더 이른 분화 시기에 냉동된 심근세포가 해동 후 더 높은 세포 생존 비율을 나타낸다. 그러나, 분화 제 18 일에 정제 후 해동된 세포가 약제학적 검정을 위해 세포를 사용하기에 최선의 조건을 제공했다. 상기 시기에 세포는 해동 후 훨씬 더 높은 순도를 나타냈으며, 심근세포가 검정 포맷에 맞는 세포 배양 용기에 직접 이동될 수 있었다.

[0138] 분화 제 32 일에 냉동된 심근세포 해동시, 생존율은 매우 낮았고, 대다수 세포가 손실되었다. 이는 상기 시기에 세포의 낮은 증식 속도에 기인한 것으로, 해동 후 저조한 심근세포 회복을 제공한다.

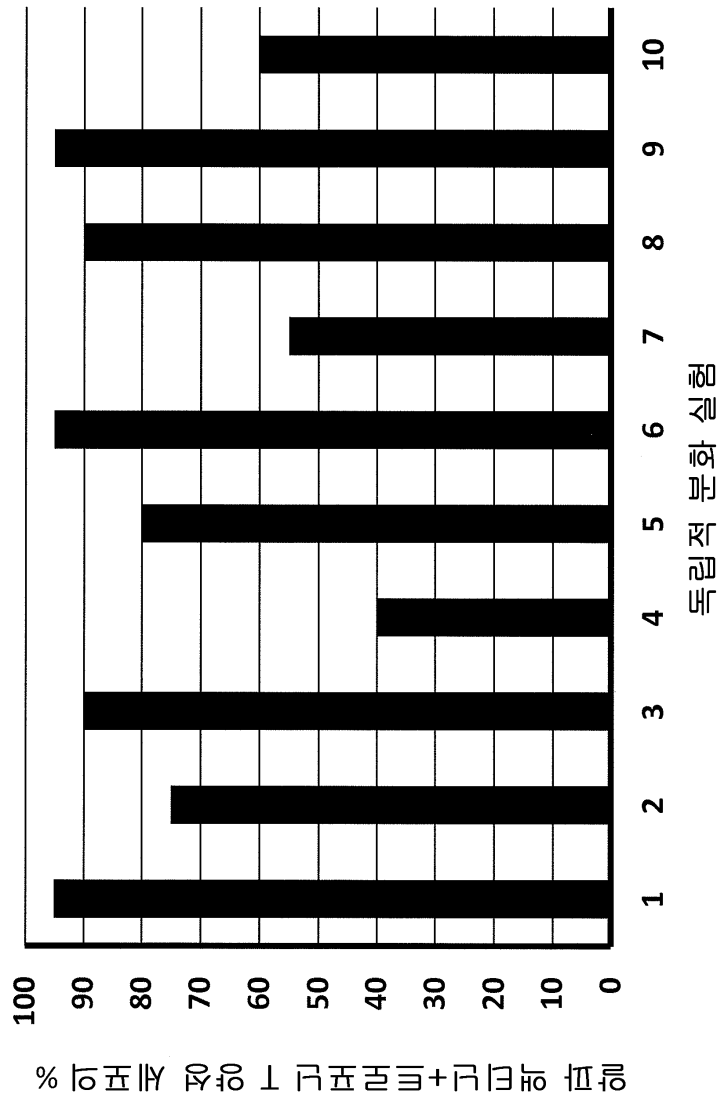
[0139] 다능성의 유도된 심근세포에 대한 냉동 최적 시간은 분화 제 18 일 정제 후인 것으로 결정되었다. 상기 시기에 알파 액티닌 및 트로포닌 T 양성 세포에 대한 회복 비율은 평균 85% 를 초과하며, 심근세포가 여전히 증식 중이어서, 추가로 검정 개발에 세포를 이용하기에 최적인 조건을 제공한다.

도면

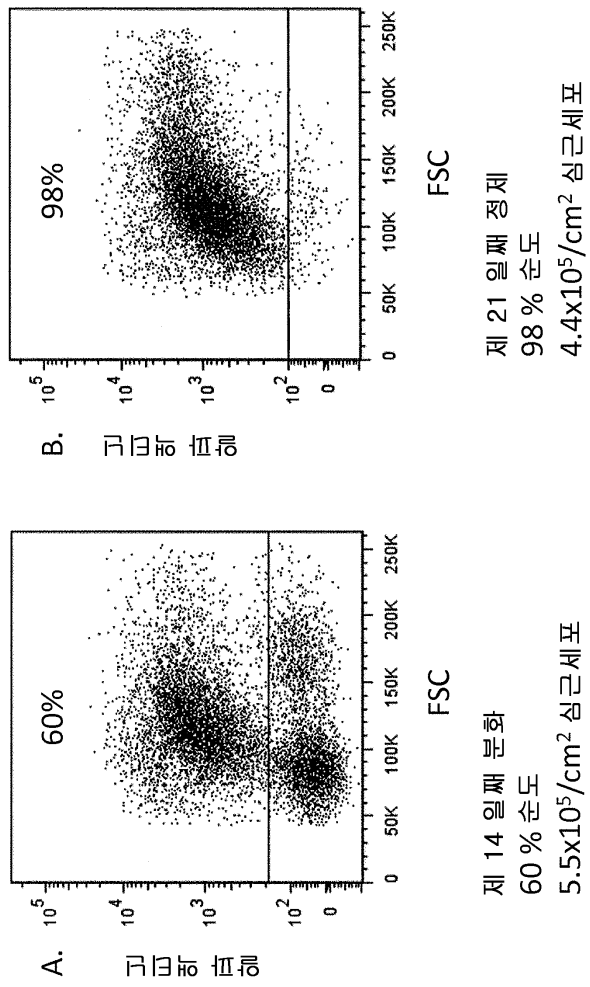
도면1



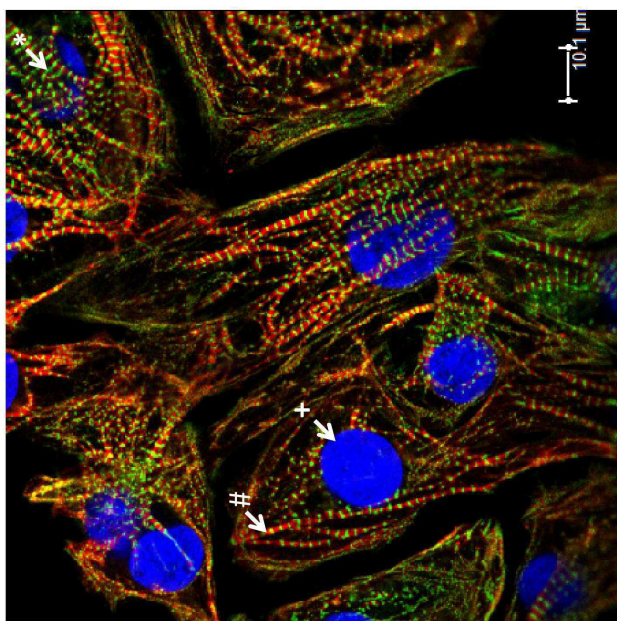
도면2



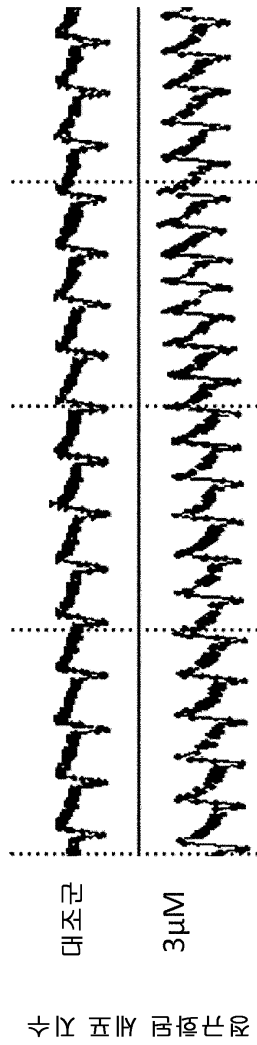
도면3



도면4



도면5



Time Cardio

대조군	45 박동수/분
3μM 이소프로테레놀	60 박동수/분

도면6

