(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0060016
(43) 공개일자 2019년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0797 (2010.01) *A61K 35/30* (2015.01)
A61K 38/30 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C07K 14/65 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0623 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7015061(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년10월19일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-7013001
원출원일자(국제) 2015년10월19일
심사청구일자 2017년05월15일
(85) 번역문제출일자 2019년05월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/056226
(87) 국제공개번호 WO 2016/064737
국제공개일자 2016년04월28일
(30) 우선권주장
62/066,174 2014년10월20일 미국(US)
62/147,950 2015년04월15일 미국(US)

(71) 출원인
뉴럴스템, 인크.
미국 메릴랜드 20876 저먼타운 스위트 2024 골든 로드 레인 20271
(72) 발명자
헤이젤, 토마스
미국 20878 메릴랜드주 노스 포토맥 던레이스 스트리트 14801
조헤, 카를, 케이.
미국 33160 플로리다주 서니 아일스 유닛 1030 베이뷰 드라이브 500
(74) 대리인
양영준, 김영

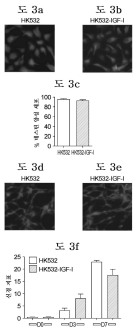
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 **성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 안정한 신경 줄기세포 및 그의 사용 방법**

(57) 요 약

본 개시내용은 IGF-1과 같은 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 인간 신경 줄기세포를 제공한다. 또한, 예를 들어 ALS를 포함하는 신경변성 질환 또는 장애의 치료를 위해 인간 신경 줄기세포를 사용하는 방법이 개시된다. 본 개시내용은 일반적으로 예를 들어 신경영양성 인자를 포함하는 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 인간 신경 줄기세포에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 성장 인자는 인간 신경 줄기세포에 의해 안정적으로 발현된다. 이러한 인간 신경 줄기세포는 이를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 신경변성 질환 또는 장애를 갖는 인간 대상체)에서 신경변성 질환 또는 장애의 치료에 사용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 38/30 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
C07K 14/65 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1)을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 60회 초과의 세포 배가 (doubling) 동안 분화하지 않고 팽창가능한, 신경변성 질환 또는 장애의 치료를 위한 안정한 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 줄기세포가 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 신경 줄기세포에 비해 유의하게 증가된 수의 GAD65-양성 GABA성 뉴런으로 분화할 수 있는 것인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 3

성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 60회 초과의 세포 배가 동안 분화하지 않고 팽창가능한, 신경변성 질환 또는 장애의 치료를 위한 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 4

제3항에 있어서, 성장 인자가 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1), 신경교 세포주 유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뇌 유래 신경영양성 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 신경영양성 인자인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 5

제4항에 있어서, IGF-1이 IGF-1 이소형인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 6

제5항에 있어서, IGF-1 이소형이 IGF-1 이소형 4인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 7

제6항에 있어서, IGF-1 이소형 4가 서열식별번호: 1에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 8

제3항에 있어서, 인간 신경 줄기세포가 피질, 해마, 시상, 중뇌, 소뇌, 후뇌, 척수 및 후근 신경절로 이루어진 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래되는 것인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 9

제1항에 있어서, 태아 유래 인간 신경 줄기세포가 임신 연령이 5주 내지 20주인 태아로부터 얻어지는 것인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 10

제3항에 있어서, 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 유비퀴틴 C (UbC) 프로모터, 인간 포스포글리세레이트 키나제 1 프로모터, 인간 시냅신 프로모터 또는 합성 CAG 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 11

인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1)을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 60회 초과의 세포 배가 동안 분화하지 않고 팽창가능하며, 여기서 IGF-1은 서열식별번호: 1에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고,

IGF-1 뉴클레오티드 서열이 안정적으로 발현되는 것인, 신경변성 질환 또는 장애의 치료를 위한 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 12

성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 태아 유래 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 포함하고, 여기서 성장 인자는 안정적으로 발현되며, 인간 신경 줄기세포는 60회 초과의 세포 배가 동안 분화하지 않고 팽창가능한 것인, 신경변성 질환 또는 장애의 치료를 위한 제약 제제.

청구항 13

제12항에 있어서, 성장 인자가 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1), 신경교 세포주 유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뇌 유래 신경영양성 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 신경영양성 인자인 제약 제제.

청구항 14

제13항에 있어서, IGF-1이 IGF-1 이소형인 제약 제제.

청구항 15

제14항에 있어서, IGF-1 이소형이 IGF-1 이소형 4인 제약 제제.

청구항 16

제15항에 있어서, IGF-1 이소형 4가 서열식별번호: 1에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 제약 제제.

청구항 17

제12항에 있어서, 신경변성 질환 또는 장애가 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 척수 손상 (SCI), 외상성 뇌 손상 (TBI), 알츠하이머병 (AD), 치매, 경도 인지 장애, 당뇨병, 당뇨병 관련 CNS 합병증, 말초 신경병증, 망막 신경병증 또는 다발성 경화증인 제약 제제.

청구항 18

제17항에 있어서, 척수 손상이 외상성 척수 손상 또는 허혈성 척수 손상인 제약 제제.

청구항 19

대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 투여되고, IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 태아 유래 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 포함하며, 여기서 하나 이상의 인간 신경 줄기세포는 60회 초과의 세포 배가 동안 분화하지 않고 팽창가능한 것인, 대상체의 뇌에서 아밀로이드 베타 (Aβ) 침착을 감소시키거나, 대상체의 뇌에서 Aβ 침착을 제거하거나, 대상체의 뇌에서 Aβ 축적을 방지하기 위한 제약 제제.

청구항 20

제19항에 있어서, 뇌의 하나 이상의 영역이 해마 및/또는 피질을 포함하는 것인 제약 제제.

청구항 21

대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 투여되고, IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 태아 유래 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 포함하며, 여기서 하나 이상의 인간 신경 줄기세포는 60회 초과의 세포 배가 동안 분화하지 않고 팽창가능한 것인, 대상체의 뇌에서 다수의 콜린성 뉴런을 증가시키기 위한 제약 제제.

청구항 22

제21항에 있어서, 뇌의 하나 이상의 영역이 해마 및/또는 피질을 포함하는 것인 제약 제제.

청구항 23

대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 투여되고, IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 태아 유래 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 포함하며, 여기서 하나 이상의 인간 신경 줄기세포는 60회 초과의 세포 배가 동안 분화하지 않고 팽창가능한 것인, 대상체의 뇌에서 시냅스를 회복시키기 위한 제약 제제.

청구항 24

대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 투여되고, IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 태아 유래 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 포함하며, 여기서 하나 이상의 인간 신경 줄기세포는 60회 초과의 세포 배가 동안 분화하지 않고 팽창가능한 것인, 대상체의 기억 및/또는 인지를 회복시키기 위한 제약 제제.

청구항 25

제1항에 있어서, 줄기세포가 뉴런 및 신경교로 분화할 수 있는 것인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 줄기세포가 60% 뉴런 및 40% 신경교로 분화할 수 있는 것인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 27

제11항에 있어서, 줄기세포가 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 신경 줄기세포에 비해 유의하게 증가된 수의 GAD65-양성 GABA성 뉴런으로 분화할 수 있는 것인 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 28

제13항에 있어서, 줄기세포가 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 신경 줄기세포에 비해 유의하게 증가된 수의 GAD65-양성 GABA성 뉴런으로 분화할 수 있는 것인 제약 제제.

청구항 29

제12항에 있어서, 줄기세포가 뉴런 및 신경교로 분화할 수 있는 것인 제약 제제.

청구항 30

인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) 이소형 4를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 60회 초과의 세포 배가 동안 분화하지 않고 팽창가능한, 신경변성 질환 또는 장애의 치료를 위한 안정한 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 31

인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) 이소형 4를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 60회 초과의 세포 배가 동안 분화하지 않고 팽창가능하며, IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 신경 줄기세포에 비해 유의하게 증가된 수의 GAD65-양성 GABA성 뉴런으로 분화할 수 있는, 신경변성 질환 또는 장애의 치료를 위한 안정한 태아 유래 인간 신경 줄기세포.

청구항 32

인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) 이소형 4를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 태아 유래 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 포함하고, 여기서 성장 인자는 안정적으로 발현되며, 인간 신경 줄기세포는 60회 초과의 세포 배가 동안 분화하지 않고 팽창가능한 것인, 신경변성 질환 또는 장애의 치료를 위한 제약 제제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 우선권 주장

[0002] 본원은 2015년 4월 15일 출원된 미국 특허 가출원 62/147,950의 우선권 및 이익을 주장하고, 2014년 10월 20일

출원된 미국 특허 가출원 62/066,174의 우선권 및 이익을 주장하고, 이들 출원은 각각 본원에 참고로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 포유동물 중추 신경계 (CNS)에서 세포의 발달 및 생존에 있어서 인슐린-유사 성장 인자-1 (IGF-1)의 중요한 역할로 인해, 이 단백질은 CNS에 영향을 주는 다양한 병태에 대한 잠재적으로 중요한 치료제로 고려되어 왔다. 바이러스 벡터 및 척수강내 주사를 포함한 일부 방법에 의한 IGF-1의 전달은 동물 모델에서 ALS의 치료를 위한 가능성을 보여주었다. 그러나, 임상 시험에서 인간 환자에게 성숙한 재조합 IGF-1을 피하 투여하면 ALS의 치료에서 효능이 입증되지 않았다. 따라서, 치료 유효량의 IGF-1을 신경 세포 손실 부위에 전달하는 개선된 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0004] 개요

[0005] 본 개시내용은 일반적으로 예를 들어 신경영양성 (neurotrophic) 인자를 포함하는 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 인간 신경 줄기세포에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 성장 인자는 인간 신경 줄기세포에 의해 안정적으로 발현된다. 이러한 인간 신경 줄기세포는 이를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 신경변성 질환 또는 장애를 갖는 인간 대상체)에서 신경변성 질환 또는 장애의 치료에 사용될 수 있다.

[0006] 본 개시내용은 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1)을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 신경 줄기세포 (예를 들어, 안정한 인간 신경 줄기세포)를 제공한다. 신경 줄기세포는 IGF-1을 발현하고, 예를 들어 IGF-1을 안정적으로 과다발현한다. IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 신경 줄기세포는 놀랍게도 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 신경 줄기세포에 비해 GAD65-양성 GABA성 (GABAergic) 뉴런의 수를 현저히 증가시킨다.

[0007] 본 개시내용은 또한 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 신경 줄기세포 (예를 들어, 안정한 인간 신경 줄기세포)를 제공한다. 신경 줄기세포는 예를 들어 성장 인자를 발현하고, 예를 들어 성장 인자를 안정적으로 과다발현한다.

[0008] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 성장 인자는 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1), 신경교 세포주 유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뇌 유래 신경영양성 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 신경영양성 인자이다.

[0009] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, IGF-1은 IGF-1 이소형 4와 같은 IGF-1 이소형이다. 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 추가의 실시양태에서, IGF-1 이소형 4는 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0010] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 임의의 실시양태 중 한 실시양태에서, IGF-1 이소형은 N-말단 신호 펩티드, 성숙 IGF-1 단백질 및 E-펩티드를 포함한다.

[0011] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 인간 신경 줄기세포는 피질, 해마, 시상, 중뇌, 소뇌, 후뇌, 척수, 및 후근 신경절로 이루어지는 군으로부터 선택되는 조직으로부터 유래된다.

[0012] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 인간 신경 줄기세포는 태아 또는 배아로부터 얻어진다.

[0013] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 인간 신경 줄기세포는 임신 주령이 약 5 내지 약 20주인 태아로부터 얻어진다.

[0014] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 인간 신경 줄기세포는 뉴런 및/또는 신경교로 분화할 수 있다.

[0015] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 인간 신경 줄기는 뇌 및/또는 척수 내로 이식될 수 있다.

[0016] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 인간 신경 줄기는 불멸화된다.

[0017] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 인간 신경 줄기세포는 불멸화 유전자를 보유하는 레트로바이러스에 의한 감염을 통해 불멸화된다.

[0018] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 유비퀴틴 C (UbC) 프로모터 (예를 들어, 서열식별번호: 3에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖는 유비퀴틴 C (UbC) 프로모터), 인간 포스포글리세레이트 키나제 1 프로모터, 인간 시냅신 프로모터, 또는 합성 CAG 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0019] 본 개시내용은 또한 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1)을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 인간 신경 줄기세포를 제공하고, 여기서 IGF-1은 서열식별번호: 1에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 IGF-1 뉴클레오티드 서열은 안정적으로 발현된다.

[0020] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 인간 신경 줄기세포는 불멸화된다.

[0021] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 유비퀴틴 C (UbC) 프로모터 (예를 들어, 서열식별번호: 3에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖는 유비퀴틴 C (UbC) 프로모터), 인간 포스포글리세레이트 키나제 1 프로모터, 인간 시냅신 프로모터, 또는 합성 CAG 프로모터에 연결된다.

[0022] 본 개시내용은 또한 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 신경 줄기세포 (예를 들어, 안정한 인간 신경 줄기세포)의 치료 유효량을 대상체 (예를 들어, 신경변성 질환 또는 장애를 갖는 인간 대상체)에게 투여하는 것을 포함하는, 신경변성 질환 또는 장애의 치료 방법을 제공한다.

[0023] 본 개시내용은 또한 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 신경 줄기세포 (예를 들어, 안정한 인간 신경 줄기세포)의 치료 유효량을 대상체 (예를 들어, 신경변성 질환 또는 장애를 갖는 인간 대상체)에게 투여하는 것을 포함하는, 신경변성 질환 또는 장애의 치료 방법을 제공한다.

[0024] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 성장 인자는 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1), 신경교 세포주 유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뇌 유래 신경영양성 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 신경영양성 인자이다.

[0025] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, IGF-1은 IGF-1 이소형 4와 같은 IGF-1 이소형이다. 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태의 추가의 실시양태에서, IGF-1 이소형 4는 서열식별번호: 1에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0026] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, IGF-1 이소형은 N-말단 신호 펩티드, 성숙 IGF-1 단백질 및 E-펩티드를 포함한다.

[0027] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 치료 유효량의 하나 이상의 인간 신경 줄기세포는 뉴런 및/또는 신경교로 분화할 수 있다.

[0028] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 치료 유효량의 하나 이상의 인간 신경 줄기세포는 뇌 또는 척수 내로 이식될 수 있다.

[0029] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 유비퀴틴 C (UbC) 프로모터 (예를 들어, 서열식별번호: 3에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖는 유비퀴틴 C (UbC) 프로모터), 인간 포스포글리세레이트 키나제 1 프로모터, 인간 시냅신 프로모터, 또는 합성 CAG 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0030] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 신경변성 질환 또는 장애는 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 척수 손상 (SCI), 외상성 뇌 손상 (TBI), 알츠하이머 (Alzheimer) 병 (AD), 치매, 경도 인지 장애, 당뇨병, 당뇨병 관련 CNS 합병증, 말초 신경병증, 망막 신경병증 또는 다발성 경화증이다.

[0031] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 척수 손상은 외상성 척수 손상 또는 허혈성 척수 손상이다.

[0032] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 치료 유효량의 하나 이상의 신경 줄기세포는 신경변성 영역 내로 주사된다.

[0033] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 치료 유효량의 하나 이상의 신경 줄기세포는 신경변성 영역 내의 약 5 내지 약 50개 부위에 투여된다.

[0034] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 하나 이상의 부위는 대략 100 마이

크로미터 내지 약 5000 마이크로미터의 거리만큼 분리되어있다.

[0035] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과의 치료 유효량의 하나 이상의 신경 줄기세포는 신경변성 영역에서 뉴런을 생성할 수 있다.

[0036] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 상기 대상체는 인간이다.

[0037] 본 개시내용은 또한 성장 인자가 안정적으로 발현되는, 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 인간 신경 줄기세포의 제조 방법을 제공하고, 상기 방법은 하나 이상의 인간 신경 줄기세포를 얻는 단계; 폴리 D-라이신 및 피브로넥틴으로 예비 코팅된 조직 배양 처리된 접시 상에 하나 이상의 신경 줄기세포를 플레이팅하는 단계; 성장 배지 (예를 들어, 무혈청 성장 배지)에서 하나 이상의 신경 줄기세포를 배양하는 단계; 팽창된 신경 줄기세포의 집단을 생성하기 위해 하나 이상의 신경 줄기세포를 팽창시키는 단계; 및 성장 인자를 코딩하는 벡터로 신경 줄기세포를 감염시키는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 팽창된 신경 줄기세포는 팽창된 신경 줄기세포를 불멸화 유전자를 코딩하는 레트로바이러스로 감염시킴으로써 불멸화된다.

[0038] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 성장 인자는 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1), 신경교 세포주 유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뇌 유래 신경영양성 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 신경영양성 인자이다.

[0039] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, IGF-1은 IGF-1 이소형 4와 같은 IGF-1 이소형이다. 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 추가의 실시양태에서, IGF-1 이소형 4는 서열식별번호: 1에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0040] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, IGF-1 이소형은 N-말단 신호 펩티드, 성숙 IGF-1 단백질 및 E-펩티드를 포함한다.

[0041] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 인간 신경 줄기세포는 유산된 인간 태아로부터 사후 단리된 조직으로부터 얻어진다.

[0042] 임의의 상기 언급된 또는 아래에서 언급되는 실시양태 중 한 실시양태에서, 인간 신경 줄기세포는 Myc-ER 융합 유전자의 한 카피를 보유하는 복제-결핍 레트로바이러스로 감염된다.

[0043] 본 개시내용은 대상체의 뇌에서 아밀로이드 베타 (Aβ) 침착을 감소시키거나, 대상체의 뇌 (예를 들어, 해마 및/또는 피질)에서 Aβ 침착을 제거하거나, 대상체의 뇌에서 Aβ 축적을 방지하는 방법을 제공하고, 이 방법은 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 치료 유효량의 하나 이상의 인간 신경 줄기세포를 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 투여하는 것을 포함한다.

[0044] 본 개시내용은 대상체의 뇌 (예를 들어, 해마 및/또는 피질)에서 다수의 콜린성 (cholinergic) 뉴런을 증가시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

[0045] 본 개시내용은 또한 대상체의 뇌에서 시냅스를 회복시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

[0046] 본 개시내용은 대상체의 기억 및/또는 인지를 회복시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0047] 상기한 개요 및 이하의 본 개시내용의 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해 될 것이다. 본 개시내용을 예시하기 위해, 현재 바람직한 실시양태가 도면에 제시된다. 그러나, 이 개시내용은 제시된 정확한 배치, 예 및 도구로 제한되지 않음을 이해하여야 한다.

도 1. HK532 및 HK532-IGF-I 세포에서의 IGF-I 생산 및 신호전달. (a) 조기 분화 전체에 걸친 HK532 및 HK532-IGF-I에서의 IGF-I의 생산. (b) DAPI (청색) 및 IGF-IR (녹색)로 표지된 D7 HK532 및 HK532-IGF-I의 대표적인 ICC 이미지. 스케일 막대 50 ㎛. (c) 미분화 및 분화된 (D7) HK532 및 HK532-IGF-I에서 IGF-I 신호전

달의 웨스턴 블롯 (Western blot) 분석. 세포를 1시간 동안 LY, U 또는 NVP의 억제제 패널로 처리한 다음, 30분 동안 IGF-I로 처리하였다. 모든 블롯을 pIGF-IR, IGF-IR, pERK, ERK, pAKT 및 AKT로 프로빙하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다.

도 2. 유도된 IGF-I 발현은 HK532 증식 및 이동에 영향을 미치지 않는다. (a) HK532 및 HK532-IGF-I 배양에서 D0, D3 및 D7에서 EdU 양성 세포 비율의 정량. (b-e) DAPI (청색) 및 EdU (녹색)로 표지된 D0 및 D7 HK532 및 HK532-IGF-I의 대표적인 ICC 이미지. 스케일 막대 200 ㎛. (f-g) D0 및 D7에서의 이동된 HK532 및 HK532-IGF-I의 흡광도 정량.

도 3. 유도된 IGF-I 발현은 분화 동안 전구체 상태의 유지 또는 신경돌기 성장에 영향을 미치지 않는다. (a-b) DAPI (청색) 및 네스틴 (Nestin) (적색)으로 표지된 D0 HK532 및 HK532-IGF-I의 대표적인 ICC 이미지. (c) 네스틴 양성 D0 HK532 및 HK532-IGF-I의 정량. (d-e) DAPI (청색) 및 TUJ1 (적색)로 표지된 D7 HK532 및 HK532-IGF-I의 대표적인 ICC 이미지. (f) 신경 지표 (neural index) 측정 (μm^2/세포)의 정량. 스케일 막대 200 ㎛.

도 4. HK532 및 HK532-IGF-I 세포의 말단 표현형. (a-b) DAPI (청색) 및 GAD65 (녹색)로 표지된 D7 HK532 및 HK532-IGF-I 세포의 대표적인 ICC 이미지. (c-d) DAPI (청색) 및 VGLUT (적색)로 표지된 D7 세포의 대표적인 ICC 이미지. 스케일 막대 200 ㎛. (e) HK532 및 HK532-IGF-I 세포에서의 GAD65-양성 GABA성 뉴런의 정량. HK532-IGF-I 세포는 우선적으로 GABA성 뉴런으로 분화한다 ($^{*}p<0.05$). (f) HK532 및 HK532-IGF-I 세포에서의 VGLUT-양성 글루타메이트성 (glutamatergic) 뉴런의 정량.

도 5. HK532-IGF-I 세포는 신경 보호성이고, APP/PS1 AD 및 WT 마우스 내로 이식할 때 생존한다. (a) 1차 CN, HK532 및 HK532-IGF-I에서의 Aβ 독성에 대한 아폽토시스 및 CC3 활성화의 정량. 두 HK532 세포주는 모두 CN보다 저항성이다 ($^{*}p<0.05$). (b-d) DAPI 및 CC3으로 표지된 1차 CN의 대표적인 ICC 이미지 (스케일 막대 200 ㎛). (b) Aβ 비처리 대조군 CN, (c) Aβ 처리 CN, (d) HK532와 동시 배양된, Aβ 처리 CN, 및 (e) HK532-IGF-I와 동시 배양된, Aβ 처리 CN. (f) CN/HK532 동시 배양에서 Aβ- 매개 아폽토시스 및 CC3 활성화의 정량. HK532-IGF-I은 HK532에 비해 증가된 신경 보호 능력을 보였다 ($^{*}p<0.05$). (g-h) 해마술 뇌궁 (fimbria fornix) 내로의 이식 10주 후의 (g) APP/PS1 AD 동물 및 (h) WT 동물의 해마 영역에서 인간 초기 신경 전구체의 DAPI, HuNu 및 DCX 표지의 대표적인 이미지 (10X 스케일 막대 200 ㎛; 60X 스케일 막대 50 ㎛).

도 6. Aβ 수준은 HK532-IGF-I 이식으로 현저히 감소된다. 형광 현미경 검사는 APP/PSI 비히클 처리 마우스의 해마 (a-c) 및 피질 (d-f)에서 Aβ 플라크 (화살촉)의 뚜렷한 형성을 보여준다. 이 플라크는 HK532-IGF-I 처리에 의해 눈에 띄게 완화되었다. 핵은 모든 절편에서 DAPI (청색)로 염색되었다. 스케일 막대: 100 ㎛. (g) 비히클 처리군 및 NSC 처리군의 비-tg로부터의 형광 강도 (A.U.) 변화의 정량은 샴 (sham)에 비해 HK532-IGF-I 처리 마우스에서 Aβ의 유의하게 감소된 수준을 보여주고, 이것은 HK532-IGF-I가 Aβ 누적을 매개함을 시사한다. $^{***}P<0.001$ (h) 특이적으로 피질 및 해마 내의 Aβ 형광 수준의 비교는 비히클 주사 마우스에 비해 NSC 주사 마우스의 피질 절편에서의 Aβ 침착이 유의하게 감소함을 보여주지만 ($^{***}P<0.001$), 해마 절편 내의 감소된 수준은 유의하지 않았다.

도 7. HK532-IGF-I 이식 (engraftment)은 선조체에서 콜린성 뉴런을 구제한다. (a-c) 각각의 군에서 ChAT (녹색)에 대해 면역염색된 선조체의 형광 이미지. 스케일 막대 100 ㎛. (d) ChAT 양성 세포의 고배율 이미지. 핵은 DAPI로 염색되었다 (청색). 스케일 막대: 50 ㎛. (e) 모든 마우스의 선조체 전체에 걸친 세포 수는 비-tg 마우스에 비해 비히클 주사된 APP/PSI 마우스에서 콜린성 뉴런의 유의적인 손실을 나타냈다. $^{*}P<0.05$. (f) 비-tg 마우스로부터의 콜린성 뉴런에서 배수 변화의 계산은 HK532-IGF-I로 처리된 APP/PSI 마우스에서 유의하게 더 많은 양을 나타낸다. $^{*}P<0.05$.

도 8. HK532-IGF-I은 시냅스전 (pre-synaptic) 활성을 증가시키고, 내인성 뉴런과의 시냅스를 형성한다. (a-c) 시냅토피신에 대해 염색된 해마 절편의 형광 현미경은 비히클 주사된 APP/PSI 마우스에 비해 비-tg 및 NSC 주사된 APP/PSI 마우스에서 형광 신호의 가시적으로 증가된 강도를 나타낸다. 스케일 막대: 100 ㎛. (d-f) 치상회 (dentate gyrus)의 과립 세포층 근처의 시냅토피신의 고배율 이미지. 스케일 막대: 50 ㎛. (g-j) NSC 주변의 시냅스전 기능을 보여주는 인간 NuMA (적색), 시냅토피신 (녹색) 및 DAPI (청색)에 대해 면역염색된 NSC 처리군으로부터의 절편의 형광 이미지. 스케일 막대: 50 ㎛.

도 9. 전각 (ventral horn)에서의 인간 세포 이식물의 존재 및 회백질 및 백질 전체에 걸친 넓은 분포를 보여주는 동결-면역 조직 화학 (도 9a-c). 각각의 이미지에서, SC121 (녹색)은 모든 인간의 세포질을 나타내고, DAPI (청색)는 모든 세포핵을 나타낸다. a의 삽입도는 A'에 표시되고, A'의 삽입도는 A"에 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 상세한 설명

[0049] 본 개시내용은 예를 들어 신경영양성 인자를 포함하는 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 신경 줄기세포 (예를 들면, 태아 또는 배아로부터 유래된 인간 신경 줄기세포)를 제공하고, 여기서 성장 인자는 신경 줄기세포에 의해 안정적으로 발현된다. 본 발명자들은 신경 줄기세포가 놀랍게도 신경 세포 손실 부위에 이식되어, 예를 들어 신경영양성 인자, 예컨대 성숙 IGF-1을 포함하는 성장 인자를 치료 유효량으로 안정적으로 발현한다는 것을 발견하였다. 신경영양성 인자는 예를 들어 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) (예를 들어, 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 IGF-1 이소형), 신경교 세포주 유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뇌 유래 신경영양성 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 또는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 포함할 수 있다. 그러나, 신경 줄기세포에 의해 분비될 수 있는 임의의 단백질이 본 개시내용에서 사용하기 위해 고려된다. 이러한 인간 신경 줄기세포는 신경 줄기세포 세포주에서 얻을 수 있고, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 척수 손상 (SCI), 외상성 뇌 손상 (TBI), 알츠하이머병 (AD), 치매, 경도 인지 장애, 당뇨병, 당뇨병 관련 CNS 합병증, 말초 신경병증, 망막 신경병증 또는 다발성 경화증을 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 CNS 적응증을 포함하는 신경변성 질환 또는 장애의 치료에 사용될 수 있다.

[0050] 놀랍게도, 본 발명자들은 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고 신경 줄기세포에 의해 IGF-1가 안정적으로 발현되는 인간 신경 줄기세포가, IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 신경 줄기세포에 비해 GAD65-양성 GABA성 뉴런의 유의하게 증가된 수를 생산함 (즉, 이 뉴런으로 분화하고/하거나 이 뉴런의 성장을 지지할 수 있음)을 발견하였다. 이것은 특히 GABA성 뉴런의 변성이 마우스 모델 및 인간 환자에서 보고되었기 때문에 알츠하이머병과 치료학적으로 관련된다 ([Loreth *et al.* (2012) *Neurobiol Dis*, 2012. 47(1): p. 1-12]; [Schwab *et al.* (2013) *J Alzheimers Dis*, 2013. 33(4): p. 1073-88]). 따라서, IGF-1을 안정적으로 발현하는 신경 줄기세포의 이식은 알츠하이머병에서 선택적으로 상실되는 것을 대체하고 뇌에서 중요한 신경망을 회복시키기 위해 디 노보 (de novo) GABA성 뉴런의 공급원을 제공한다.

[0051] 성장 인자를 발현하는 본 개시내용의 신경 줄기세포는 뇌 및 척수 내로 효율적으로 이식되고, 일제히 뉴런 및 신경교로 분화되고, 숙주 조직과 통합됨으로써 안정하고 다분화성일 수 있다. 이러한 통합은 숙주 뉴런과 이식된 줄기세포 유래 뉴런 사이의 시냅스 연결 형성을 포함한다. CNS에서의 안정한 이식 및 통합의 이점은 세포 이식 및 이에 의한 성장 인자의 생산이 세포가 살아있는 한 일정하고 안정적일 수 있다는 것이다. 또한, 숙주 뉴런과 이식된 뉴런 사이의 시냅스 접촉의 형성은 손상되거나 병이 있는 뉴런에 인접한 시냅스 및 간질 공간으로 성장 인자의 직접 전달을 가능하게 한다. 또한, 신경 줄기세포 자체는 치료 활성이고, 매우 다양한 알려지니 성장 인자를 생산하고, 질병 과정에서 상실될 수 있는 뉴런을 교체한다.

[0052] 또한, 본 개시내용의 신경 줄기세포는 그의 뉴런 자손체가 신경 줄기세포가 주사되는 부위 부근에 국소 체류하면서 그의 신경교 자손체가 뇌 및 척수 전체에 걸쳐 광범위하게 이동한다는 이점을 제공한다. 이 특성은 뉴런을 통한 성장 인자의 국소 전달 또는 신경교를 통해 CNS 전체에 걸쳐 넓게 분포된 전달을 선택적으로 표적화할 수 있게 한다. IGF-1, GDNF, BDNF, NT3, NGF, VEGF 등의 신경영양성 인자와 같은 성장 인자의 뉴런 분비의 이점은 고농도의 상응하는 수용체에 바로 인접한 시냅스 틈의 제한된 공간을 비롯한 표적 세포에 인접한 세포외 공간 내로 성장 인자가 지속적으로 방출되어 표적 세포에 의해 내재화되고 역으로 수송될 수 있기 때문에, 심지어 소량의 성장 인자도 치료 용량에 도달할 수 있다는 것이다 (Rind *et al.* (2005), *J Neurosci* 25:539-549).

[0053] 또한, 그의 기원 또는 그의 성장 조건의 결과로서, 원하는 비율의 뉴런 및/또는 신경교를 생성할 수 있는 (예를 들어, 60% 뉴런 및 40% 신경교를 생성할 수 있는) 신경 줄기세포가 개시된다. 더 높은 비율의 뉴런을 생성하는 신경 줄기세포는 필요에 따라 특정 표적 영역에 성장 인자를 국소적으로 전달하기 위해 사용될 수 있는 반면, 보다 높은 비율의 신경교를 생성하는 것은 성장 인자를 보다 전신적으로 전달하기 위해 사용될 수 있다. 국소 투여가 바람직할 수 있는 성장 인자의 예는 다면발현성 (pleiotrophic) 효과를 갖는 IGF-1, NGF, NT3 또는 BDNF와 같은 신경영양성 인자를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 전신 투여하는 것이 바람직할 수 있는 성장 인자의 예는 효소 대체용, 예컨대 리소솜성 질환 치료용 단백질, 시토카인에 대한 모노클로날 항체, 시토카인 수용체 또는 성장 인자 수용체를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0054] 한 실시양태에서, 성장 인자는 예를 들어 도 1에 제시된 IFG1 이소형을 포함하는 IGF-1과 같은 신경영양성 인자이다. IGF-1 이소형은 IGF-1 이소형 4일 수 있다. 한 실시양태에서, IGF-1 이소형 4는 서열식별번호: 1에 제시된 뉴클레오티드 서열 (서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열)을 갖는다. 이 이소형은 다음과 같은 3개의 상이한 잠재적인 생물학적 이펙터를 포함한다: 다양한 IGF 결합 단백질뿐만 아니라 IGF-1 수용체에 결합할 수 있는 성숙 IGF-1 단백질; IGF-1 수용체와는 독립적인 메커니즘을 통해 허혈 및 다른 유해한 병태에 대한 신경보호제로서 작용할 수 있는, 프로-IGF-1 프로세싱 동안 방출된 카르복시 (C-) 말단 MGF 펩티드; 및 프리-프로-IGF-1 프로세싱 동안 방출된 아미노 (N-) 말단 신호 펩티드.

[0055] IGF-1 생물학은 복잡하다. 6개의 상이한 형태의 인간 IGF-1 mRNA 전사체는 모두 하나의 성숙 IGF-1 단백질을 생산하는 2개의 상이한 프로모터 (문헌 [Barton (2006), *J Appl Physiol* 100:1778-1784]에서 검토됨)의 제어 하에 생산된다. 다양한 전사체는 성숙 IGF-1 단백질로 번역되고, 그 동안 별개의 절단 생성물이 생성된다. 전사체 이소형 및 다양한 절단 산물은 조직 특이적인 것으로 알려져 있다. 따라서, 순환하는 성숙 IGF-1 단백질의 75%가 간에서 생산되지만, 근육, 신장 및 뇌/척수를 비롯한 여러 다른 조직이 그 자신의 IGF-1 전사체 및 단백질을 생산한다. 또한, 예를 들어 뇌에서의 IGF-1 수준은 IGF-1의 혈장 수준과 독립적으로 조절된다 (Adams *et al.* (2009), *Growth Factors* 27:181-188). 특히, 래트 및 마우스 IGF-1 유전자는 인간 IGF-1 유전자와 다르게 조절되어 종 사이에 동등하지 않은 IGF-1 이소형을 생성한다 (Barton (2006), *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 31:791-797).

[0056] CNS에서의 성장 인자의 용량 (예를 들어, 치료 유효량) 및 위치는 상이한 프로모터를 사용함으로서 및 또한 별개의 분화 및 이동 특성을 갖는 상이한 신경 줄기세포주를 사용함으로써 다양할 수 있다. 예를 들어, 시냅신 프로모터는 1차적으로 뉴런 자손체에서 낮은 수준 내지 중간 수준의 발현을 유도하기 위해 사용되어, 뉴런 집단을 표적화하기 위해 국지적인 분포를 보장할 수 있다. 이와 대조적으로, 유비퀴틴 C 프로모터는 뉴런 및 신경교 세포 자손체 둘 모두에 발현을 지시하여 성장 인자의 보다 넓은 분포를 가능하게 할 수 있다. 또한, 닭 β-액틴 프로모터에 융합된 사이토메갈로바이러스 (CMV) 인핸서로 이루어진 합성 CAG 프로모터는 매우 높은 수준의 성장 인자 발현을 유도할 수 있다. 더욱이, 보다 높은 비율의 뉴런을 생성하는 신경 줄기세포는 필요에 따라 성장 인자를 특정 표적 영역에 국소적으로 전달하는 데 사용될 수 있는 반면, 보다 높은 비율의 신경교를 생성하는 신경 줄기세포는 성장 인자를 보다 전신적으로 전달하기 위해 사용될 수 있다. 국소 투여가 바람직할 수 있는 성장 인자의 예는 다면발현성 효과를 갖는 신경영양성 인자, 예컨대 IGF-1, NGF, NT3 또는 BDNF를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 전신적으로 투여하기에 바람직할 수 있는 성장 인자의 예는 효소 대체용, 예컨대 리소솜성 질환 치료용 단백질, 시토카인에 대한 모노클로날 항체, 시토카인 수용체 또는 성장 인자 수용체를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0057] **신경 줄기세포**

[0058] 신경영양성 인자와 같은 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 신경 줄기세포 (예를 들어, 안정한 인간 신경 줄기세포)가 제공된다. 신경영양성 인자는 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1), 신경교 세포주 유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뇌 유래 신경영양성 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)일 수 있다. 또한, 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 갖는 신경 줄기세포를 포함하는 신경 줄기세포주가 제공된다. 신경 줄기세포는 바람직하게는 안정하고, 60회 초과의 세포 배가 (doubling) 후에도 배양액에서 분화하지 않는다.

[0059] 본 개시내용은 발명은 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1)을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 신경 줄기세포 (예를 들어, 안정한 인간 신경 줄기세포)를 제공한다. 신경 줄기세포는 IGF-1을 발현하고, 예를 들어 IGF-1을 안정적으로 과다발현한다. IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 신경 줄기세포는 놀랍게도 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는 신경 줄기세포에 비해 GAD65-양성 GABA성 뉴런의 유의하게 증가된 수를 생산한다. 신경 줄기세포는 바람직하게는 안정하고, 60회 초과의 세포 배가 후에도 배양액에서 분화하지 않는다.

[0060] 본 개시내용은 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1)을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 발현하는 안정한 인간 신경 줄기세포를 제공한다.

[0061] 한 실시양태에서, 신경영양성 인자는 예를 들어 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 IGF-1 이소형 4와 같은 IGF-1 이소형을 포함하는 IGF-1이다. 놀랍게도, 본 발명자들은 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 IGF-1 이소형 4가 신경 줄기세포에 의해 발현될 때 기능적임 (예를 들어, 그의 수용체와 결합하여 생리학적 영향을 갖는 신호 전달 과정을 개시함)을 발견하였다. 이러한 발견은 이전의 일부 보고에서, 성숙 IGF-1을 발현하는 신

경 줄기세포의 투여가 기능적 이익을 제공하는데 비효과적임 (즉, 신경 줄기세포가 질환 또는 장애를 치료하는데 비효과적임)이 제시되었기 때문에 전혀 예상하지 못한 것이었다.

[0062] 본원에서 사용되는 용어 "신경 줄기세포" 또는 "NSC"는 다음과 같은 중추 신경계 (CNS)의 세 가지 주요 세포 유형 각각으로 분화하는 그의 능력에 따라 기능적으로 정의될 수 있는 다분화성 줄기세포를 지칭한다: 뉴런, 성상세포 및 희소돌기 아교세포. 본원에서 사용되는 용어 "줄기세포"는 자가-재생할 수 있는 미분화된 세포를 지칭하고, 이것은 각각의 세포 분열로 적어도 하나의 딸 세포 또한 줄기세포일 것임을 의미한다. NSC는 또한 신경 또는 뉴런 전구체 또는 신경상피 전구체 세포를 지칭할 수 있다.

[0063] 본 개시내용은 또한 성장 인자가 안정적으로 발현되는, 성장 인자를 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 인간 신경 줄기세포를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 하나 이상의 인간 신경 줄기세포를 얻는 단계; 폴리 D-라이신 및 피브로넥틴으로 예비 코팅된 조직 배양 처리된 접시 상에 하나 이상의 신경 줄기세포를 플레이팅하는 단계; 무혈청 성장 배지에서 하나 이상의 신경 줄기세포를 배양하는 단계; 팽창된 신경 줄기세포의 집단을 생성하기 위해 하나 이상의 신경 줄기세포를 팽창시키는 단계; 팽창된 신경 줄기세포를 불멸화 유전자를 코딩하는 레트로바이러스로 감염시키는 단계; 및 이전에 레트로바이러스로 감염된 신경 줄기세포를 성장 인자를 코딩하는 벡터로 감염시키는 단계를 포함한다. 상기 불멸화된 신경 줄기세포 및 신경 줄기세포의 제조 방법은 미국 특허 7,544,511에 개시되어 있다.

[0064] 한 실시양태에서, NSC는 각각의 세포가 뉴런, 성상세포 또는 희소돌기 아교세포로 분화하는 능력을 갖도록 다분화성이다. 또 다른 실시양태에서, NSC는 각각의 세포가 CNS의 3가지 세포 유형 중 2가지로 분화하는 능력을 갖도록 이분화성이다. 또 다른 실시양태에서, NSC는 시험관 내에서 적어도 뉴런 및 성상세포 둘 모두를 생성하는 이분화성 세포를 포함하고, 생체 내에서 적어도 뉴런을 생성하는 단분화성 세포를 포함한다.

[0065] 성장 조건은 하나의 세포 유형 또는 또 다른 세포 유형으로의 세포의 분화 방향에 영향을 미칠 수 있고, 이것은 세포가 단일 계통을 향해 투입되지 않음을 나타낸다. 뉴런 분화를 선호하는 배양 조건에서, 특히 인간 CNS로부터의 세포는 주로 뉴런 및 성상세포에 대해 이분화성이고, 희소돌기 아교세포로의 분화는 미미하다. 따라서, 개시된 방법의 분화된 세포 배양은 뉴런 및 성상세포를 생성할 수 있다.

[0066] 한 실시양태에서, NSC는 CNS로부터 단리된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 세포와 관련하여 용어 "단리된"은 세포가 천연적으로 발생하는 (예를 들어, 세포가 유기체에서 천연적으로 발생하는) 것과는 다른 환경에 있는 세포를 지칭하고, 세포는 그의 천연 환경으로부터 제거된다.

[0067] NSC는 원하는 뉴런 집단에 대해 천연적으로 신경원성 (neurogenic)이고 배아, 태아, 출생 후, 청소년 또는 성체 조직으로부터 유래된 영역으로부터 단리될 수 있다. 원하는 세포 집단은 질병 진행 과정에서 손실되거나 불활성인 특정 뉴런 표현형을 대체하거나 보완할 수 있는 상기 표현형의 세포를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, NSC는 뇌실하 영역 (SVZ) 또는 치상회 (DG)의 과립하 영역 (subgranular zone)으로부터 단리된다. 바람직한 실시양태에서, NSC는 복측 운동 뉴런 (ventral motor-neuron)의 신경 발생이 충분한, 그동안 복측 운동 뉴런의 신경 발생이 충분한 인간 태아 발달의 임신 연령에서 얻어지는 척수로부터 단리된다.

[0068] 따라서, 한 실시양태에서, NSC는 약 6.5 내지 약 20주의 임신 연령에 척수로부터 단리된다. 바람직하게는, NSC는 약 7주 내지 약 9주의 임신 연령에 척수로부터 단리된다. 또 다른 실시양태에서, NSC는 배아 척수 조직으로부터 단리된다. 또 다른 실시양태에서, 신경 줄기세포는 인간으로부터 단리된다. 단리가능한 NSC 집단의 비율은 공여자의 연령에 따라 달라질 수 있음을 이해하여야 한다. 세포 집단의 팽창 용량은 또한 공여자의 연령에 따라 달라질 수 있다.

[0069] 예를 들어, 복측 중뇌의 NSC는 동일한 임신 단계에서 척수로부터 수득된 NSC와 구별된다. 특히, 복측 중뇌로부터의 NSC는 티로신-히드록실라제-발현 도파민성 뉴런을 생성할 수 있는 반면, 척수로부터의 NSC는 아세틸콜린-생산 콜린성 뉴런을 생성할 수 있다. 그러나, 두 세포 유형 모두가 보다 흔한 (ubiquitous) 글루타메이트 생성 및 GABA 생성 뉴런을 동시에 생성한다. 따라서, 한 실시양태에서, 개시된 방법은 적어도 부분적으로는, 아세틸콜린 생산 콜린성 뉴런의 이식에 의해 개선되거나 감소되는 병태를 치료하기 위해 척수로부터 NSC를 수득하는 것을 포함한다.

[0070] NSC는 또한 출생 후 및 성체 조직으로부터 단리될 수 있다. 출생 후 및 성체 조직으로부터 유래된 NSC는 그의 성장 및 분화 특징뿐만 아니라 뉴런 및 신경교로 분화하는 그의 능력에 대해서 정량적으로 동일하다. 그러나, 다양한 출생 후 및 성체 CNS로부터 NSC의 시험관내 단리 효율은 보다 풍부한 NSC 집단을 보유하는 태아 조직으로부터의 NSC 단리보다 훨씬 더 낮을 수 있다. 그럼에도 불구하고, 태아 유래 NSC와 마찬가지로, 개시된 방법

은 신생아 및 성체 공급원으로부터 유래된 NSC의 적어도 약 30%가 시험관 내에서 뉴런으로 분화되도록 할 수 있다. 따라서, 태아 유래 NSC에 대해 위에서 설명한 바와 같이, 출생 후 및 성체 조직을 사용할 수 있다.

[0071] 한 실시양태에서, 인간 태아 척수 조직을 현미경 하에 절단한다. 목 하부/가슴 상부 절편에 해당하는 조직 영역이 단리된다. NSC는 단리되고, 한데 모은 후, 피브로넥틴 및 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF; FGF-2)를 함유하는 배지에서 폴리-D-라이신 코팅 배양 용기에서 팽창된다. 세포를 팽창시킨 후, 보존제 및 항생제가 없는 배지에서 약 10,000개 세포/마이크로리터의 원하는 표적 세포 밀도로 농축시킨다. 농축된 세포는 이식을 위해 신선하게 사용하거나 또는 추후 사용을 위해 동결될 수 있다.

[0072] 한 실시양태에서, NSC는 배아 줄기세포 또는 유도 다능성 줄기세포로부터 유래된다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "배아 줄기세포"는 신체의 모든 세포 (예를 들어, 외배엽, 중배엽 및/또는 내배엽 세포 계통)를 생성할 수 있는 발생 중인 배아로부터 단리된 줄기세포를 말한다. 본원에서 사용되는 용어 "유도 다능성 줄기세포"는 체세포보다 더 높은 효능을 갖는, 체세포 (예를 들어, 분화된 체세포)로부터 유래된 줄기세포를 의미한다. 배아 줄기세포 및 유도 다능성 줄기세포는 보다 성숙한 세포 (예를 들어, 신경 줄기세포 또는 신경 전구체 세포)로 분화할 수 있다. 시험관 내에서 배아 또는 유도 다능성 줄기세포를 NSC로 성장시키고 분화시키기 위해 사용되는 방법은 예를 들어 문헌 [Daadi *et al.*, *PLoS One*. 3(2):e1644 (2008)]에 설명된 것과 같을 수 있다.

[0073] 본원에 개시된 신경 줄기세포에서 성장 인자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 조절하기 위해 사용될 수 있는 여러 표준 분자생물학 기술이 있다. 예를 들어, 성장 인자의 발현 수준을 조절하고/하거나 신경 줄기세포의 어느 후손이 성장 인자를 발현할 것인지 조절하기 위해 상이한 프로모터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 유비퀴틴 C (UbC), PGK 또는 CAG 프로모터는 본원에 개시된 인간 신경 줄기세포의 분화된 뉴런 및 신경교 자손체에서 성장 인자의 상이한 수준의 발현을 부여한다. PGK 프로모터는 낮은 수준의 성장 인자, 즉 24시간당 1백만 세포당 약 0.5 ng 단백질의 생산을 가능하게 하고, UbC 프로모터는 더 많은 양의 성장 인자 생산, 즉 24시간당 1백만 세포당 약 2 ng 단백질의 생산을 가능하게 하고, CAG 프로모터는 훨씬 더 많은 양의 성장 인자 생산, 즉 24시간당 1백만 세포당 약 14 ng 단백질의 생산을 가능하게 한다. 부가적으로 또는 별법으로, 발현은 신경 줄기세포의 특정 자손체에서 유도되고 그로 한정될 수 있다. 예를 들어, 인간 시냅신 프로모터는 신경 줄기세포의 뉴런 자손체에 성장 인자의 발현을 지시하기 위해 사용될 수 있다.

[0074] **치료 방법**

[0075] 본원에 개시된 바와 같은 신경 줄기세포는 신경변성 질환 또는 장애, 예컨대 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 척수 손상 (SCI), 외상성 뇌 손상 (TBI), 알츠하이머병 (AD), 치매, 경도 인지 장애, 당뇨병, 당뇨병 관련 CNS 합병증, 말초 신경병증, 망막 신경병증 또는 다발성 경화증을 포함하는 질환 또는 장애의 치료 방법에 유용하다. 이러한 방법은 예를 들어 주사에 의해 대상체에게 치료 유효량의 본원에 개시된 신경 줄기세포를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 개시된 신경 줄기세포로 치료된 대상체는 신경 줄기세포의 투여 전, 투여 동안 및/또는 투여 후에 면역억제된다.

[0076] 일부 실시양태에서, 질환, 장애 또는 병태의 "치료하기" 또는 "치료"는 적어도 부분적으로는 다음을 포함한다: (1) 질환, 장애 또는 병태의 예방, 즉 질환, 장애 또는 병태에 노출되었거나 그 질환, 장애 또는 병태에 걸리기 쉽지만 아직 질환, 장애 또는 병태의 증상을 경험하거나 나타내지 않은 포유동물에서 질환, 장애 또는 병태의 임상 증상이 발생하지 않도록 함; (2) 질병, 장애 또는 병태의 억제, 즉 질병, 장애 또는 병태 또는 그의 임상 증상의 발달을 정지시키거나 감소시킴; 또는 (3) 질병, 장애 또는 병태의 완화, 즉 질병, 장애 또는 병태 또는 그의 임상 증상의 퇴행을 야기함. 개시된 신경 줄기세포를 투여한 대상체가 개시된 신경 줄기세포로 치료되지 않은 대상체에 비해 해마-의존성 행동 과제의 개선을 나타내는 경우, 신경변성 질환 또는 장애가 치료 된 것으로 간주될 수 있다.

[0077] 본원에서 사용되는 용어 "예방", "예방하다", "예방하는", "억제", "억제하다", "억제하는", "저해하다" 및 "저해"는 질환 상태 또는 병태의 임상 징후의 발병 (예를 들어, Aβ의 침착물의 형성)을 일시적으로 또는 영구적으로 예방하거나, 억제하거나, 감소시키기 위한 방식으로 (예를 들어, Aβ의 침착물과 같은 질병 상태 또는 병태의 임상 징후의 발병 전에) 개시되는 작용 과정 (예컨대 본원에 개시된 NSC의 투여)을 의미한다. 그러한 예방, 억제 또는 감소는 절대적으로 유용할 필요는 없다.

[0078] 일부 실시양태에서, 본원에서 사용되는 "유효량"은 대상체에게 치료 효과를 부여하는 데 필요한 척수-유래 신경 줄기세포의 양을 지칭한다. 본원에서 사용되는 "치료 유효량"은 치료되는 질환, 장애 또는 병태의 증상 중 하

나 이상을 어느 정도 완화시키기 위해 충분한 척수-유래 신경 줄기세포의 투여량을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 결과는 질병의 징후, 증상 또는 원인의 감소 및/또는 완화, 또는 생물학적 시스템의 임의의 다른 바람직한 변경이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 치료 용도의 "유효량"은 과도한 부작용 없이 질병 증상의 임상적으로 유의한 감소를 제공하기 위해 필요한 척수-유래 신경 줄기세포의 양이다. 일부 실시양태에서, 임의의 개별 경우에서 적절한 "유효량"은 용량 증가 연구와 같은 기술을 사용하여 결정된다. "치료 유효량"이란 용어는 예를 들어 예방적 유효량을 포함한다. 다른 실시양태에서, 척수-유래 신경 줄기세포의 "유효량"은 과도한 유해한 부작용 없이 목적하는 약리학적 효과 또는 치료적 개선을 달성하는데 효과적인 양이다. 다른 실시양태에서, "유효량" 또는 "치료 유효량"은 대사의 변화, 연령, 체중, 대상체의 일반적인 상태, 치료되는 병태, 또는 치료되는 병태의 중증도, 및 처방 의사의 판단에 따라 대상체마다 달라지는 것이 이해된다.

[0079] 신경 줄기세포를 ALS에서 변성 상부 및 하부 운동 뉴런을 구제하기 위해 운동 피질 및/또는 척수 회백질 내로 이식하고, 이환된 뉴런을 구제하기 위해 허혈성 또는 출혈성 뇌졸중의 급성 및 만성 단계에서 경색 부위에 이식하고, 치매 및 알츠하이머병에서 콜린성 뉴런을 보호하기 위해 마이네르트 (Meynert)의 핵 기저부에 이식하고, 노쇠 동안의 치매 또는 알츠하이머병의 진행을 늦추거나 간질 발작을 감소시키기 위해 해마 또는 뇌의 다른 영역에 이식하고, 외상성 뇌 손상 또는 뇌졸중에서 신경 보호를 위해 내섬유막 및 뇌량과 같은 백질관 내에 이식될 수 있다. 이들 위치의 신경 줄기세포는 당뇨병 및 당뇨병 관련 CNS 합병증과 같은 다른 적응증의 치료를 위해 IGF-1 단백질을 분포시키기 위해 뇌 전체에 걸쳐 방사형으로 이동할 수 있다. 신경 줄기세포는 늑간근 및/또는 횡격막근 내로 이식되어 근육 종판을 증가시키고 ALS 또는 경부 척수 손상 환자의 호흡 용량을 향상시킬 수 있다. 신경 줄기세포는 골격근에 이식되어 근이영양증 및 다양한 운동 뉴런 질환에서 근육 섬유를 증가시킬 수 있다. 신경 줄기세포는 척수 근위축증, 연수 근위축증, 및 소뇌 실조증을 포함하는 병태에 의해 영향 받는 운동 뉴런을 구제하기 위해 소뇌 및/또는 뇌간으로 이식될 수 있다. 신경 줄기세포는 다발성 경화증에서 수초성 희소돌기 아교세포 (myelinating oligodendrocyte)의 재생을 위해 척수내에 이식될 수 있다. 신경 줄기세포는 효소 결핍 질환에서 신경 보호를 위한 IGF-1의 전신적인 분포를 위해 척수강내 공간 또는 지주막하 공간 내에 이식될 수 있다.

[0080] 본 개시내용은 대상체의 뇌 (예를 들어, 해마 및/또는 피질)에서 아밀로이드 베타 (Aβ) 침착 (예를 들어, Aβ 침착 수준)을 감소시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 대상체의 뇌에서의 Aβ 수준은 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하지 않은 대상체의 뇌에 비해 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% 또는 그 초과의 비율만큼 감소할 수 있다. 대상체의 뇌에서의 Aβ 수준은 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하지 않은 대상체의 뇌에 비해 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 초과의 배수만큼 감소할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 알츠하이머병을 갖는다.

[0081] 본 개시내용은 대상체의 뇌 (예를 들어, 해마 및/또는 피질)에서 Aβ 축적물을 제거하거나 대상체의 뇌 (예를 들어, 해마 및/또는 피질)에서 Aβ 축적을 예방하는 방법을 제공하고, 이 방법은 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 알츠하이머병을 갖는다.

[0082] 본 개시내용은 대상체의 뇌 (예를 들어, 해마 및/또는 피질)에서 Aβ 축적을 예방하는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 알츠하이머병을 갖는다.

[0083] 본 개시내용은 대상체의 뇌 (예를 들어, 해마 및/또는 피질)에서 다수의 콜린성 뉴런을 증가시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 대상체의 뇌에서 콜린성 뉴런의 수는 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하지 않은 대상체의 뇌에 비해 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% 또는 그 초과의 비율만큼 증가할 수 있다. 대상체의 뇌에서 콜린성 뉴런의 수는 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하지 않은 대상체의 뇌에 비해 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 초과의 배수만큼 증가할 수 있다. 일부 실시양태

에서, 대상체는 알츠하이머병을 갖는다.

[0084] 또한, 본 개시내용은 대상체의 뇌에서 시냅스를 회복시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 알츠하이머병을 갖는다.

[0085] 본 개시내용은 대상체의 기억 및/또는 인지를 회복시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역에 IGF-1을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 인간 신경 줄기세포의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 알츠하이머병을 갖는다.

[0086] 한 실시양태에서, NSC는 허용되는 제약 담체로 희석될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "제약상 허용되는 담체"는 본 개시내용의 세포가 그와 함께 투여되고 미국 연방 정부 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 동물에서, 보다 특히 인간에서 사용하기 위해 일반적으로 인정되는 다른 약전에 제시된 희석제, 아주반트, 부형제 또는 비히클을 의미한다. 이러한 제약 담체는 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등과 같은 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들을 포함하는 액체, 예컨대 물 및 오일일 수 있다. 제약 담체는 염수, 아카시아 검, 젤라틴, 전분 페이스트, 활석, 케라틴, 콜로이드성 실리카, 우레아 등일 수 있다. 환자에게 투여될 때, 신경 줄기세포 및 제약상 허용되는 담체는 무균일 수 있다. 물은 세포가 정맥 내로 투여될 때 유용한 담체이다. 염수 용액 및 수성 덱스트로스 및 글리세롤 용액은 또한 특히 주사가능한 용액을 위한 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 제약 담체는 또한 글루코스, 락토스, 수크로스, 글리세롤 모노스테아레이트, 염화나트륨, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등과 같은 부형제를 포함한다. 본 발명의 조성물은 필요한 경우, 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 또한 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은 유리하게는 용액, 에멀젼, 서방성 제제의 형태, 또는 사용하기에 적합한 임의의 다른 형태를 취할 수 있다. 적합한 담체의 선택은 통상의 기술자의 기술 범위 내에 있다.

[0087] 다양한 뉴런 아형은 배양에서 팽창된 신경 줄기세포의 조작으로부터 수득될 수 있다. 따라서, 개시된 방법에 기초한 구체적인 뉴런 아형은 필요에 따라 결과를 개선하기 위해 다른 무관한 또는 원하지 않는 세포로부터 단리 및 정제될 수 있고, 인지 기능 장애의 치료에 사용될 수 있다.

[0088] 개시된 방법에서의 NSC는 하나의 부위로부터 유도될 수 있고, 자가이식편과 동일한 대상체 내의 또 다른 부위에 이식될 수 있다. 또한, 개시된 방법에서 NSC는 유 전적으로 동일한 공여자로부터 유래되고, 자가이식편(isograft)으로서 이식될 수 있다. 또한, 개시된 방법에서 NSC는 동일한 종의 유전적으로 동일하지 않은 구성원으로부터 유래되고, 동종이식편 (allograft)으로서 이식될 수 있다. 별법으로, NSC는 비-인간 기원으로부터 유래되고, 이종이식편 (xenograft)으로서 이식될 수 있다. 강력한 면역억제제의 개발과 함께, 돼지 유래의 신경 전구체와 같은 비-인간 신경 전구체의 동종이식편 및 이종이식편을 인간 대상체 내에 이식할 수 있다.

[0089] 샘플 조직은 임의의 표준 방법에 의해 분리될 수 있다. 한 실시양태에서, 조직은 분리된 세포의 현탁액을 형성하기 위해 피펫 및 2가 양이온 미함유 완충제 (예를 들어, 염수)를 사용한 부드러운 기계적 분쇄에 의해 분리된다. 과량의 국소 세포 밀도를 방지하기 위해 주로 단일 세포를 얻기 위한 충분한 분리가 필요하다.

[0090] NSC의 성공적인 상업적 적용을 위해서는, 많은 연속적인 계대배양을 통해 안정한 팽창 및 분화 능력을 갖는 견고하고 일관된 배양물을 유지하는 것이 바람직하다. 상기한 바와 같이, 배양 방법은 그의 상이한 전구체 특성을 유지하면서 CNS 발달의 상이한 영역 및 연령으로부터 NSC의 개별 세포주의 장기간에 걸친 안정한 팽창을 달성하도록 최적화될 수 있다. 한 실시양태에서, 줄기세포는 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 8,460,651, 미국 특허 8,236,299, 미국 특허 7,691,629, 미국 특허 5,753,506, 미국 특허 6,040,180 또는 미국 특허 7,544,511에 제시된 방법에 따라 배양될 수 있다.

[0091] 한 실시양태에서, 개시된 방법의 NSC는 이식을 위한 예비-분화된 세포를 포함할 수 있다. 세포의 최대 수율 및 절차의 단순성을 위해, 주로 미분화 세포 집단을 포함하는 융합 (confluent) 배양물을 이식을 위해 수거한다. 그러나, 자발적으로 분화하기 시작한 소수의 세포 집단도 증가된 세포 밀도 때문에 존재할 수 있음을 이해하여야 한다.

[0092] 한 실시양태에서, NSC는 상기한 임상적으로 사용가능한 동면 또는 동결 용액과 같은 용액에 농축된다. 한 실시양태에서, NSC는 세포의 투여를 위한 세포 밀도와 동일하거나 상이할 수 있는 적절한 세포 밀도로 농축된다. 한 실시양태에서, 투여를 위한 세포 밀도는 주사 부위, 유익한 효과를 위해 필요한 최소 용량 및 독성 부작용 고려사항과 같은 인자에 따라 약 1,000개 세포/마이크로리터 내지 약 1,000,000개 세포/마이크로리터로 다양할 수 있다.

[0093] 알려진 방법을 사용하는 공여자 세포의 낮은 세포 생존은 효과적인 치료를 시도하기 위해 비교적 작은 영역에 대한 다량의 세포의 전달을 필요로 한다. 그러나, 주사 부피는 숙주 조직에 가해지는 유체정역학적 압력(hydrostatic pressure)이고, 많은 주사 부피와 연관된 연장된 주사 시간은 수술 위험을 악화시킨다. 또한, 공여자 세포의 과다 주사는 숙주 실질 조직의 압박 및 후속 손상을 유도한다. 부피 제한을 보상하기 위해, 알려진 방법은 주사를 위한 높은 세포 밀도의 현탁액의 제조를 필요로 한다. 그러나, 세포 밀도가 높으면 이식된 세포의 밀집된 군집화가 촉진되고, 세포 이동 또는 퍼짐을 억제하여, 제한된 영역을 넘어선 효과적인 치료를 방해하고 숙주 조직과의 원활한 통합을 방해한다.

[0094] 이와 대조적으로, 개시된 방법에 의해 제조된 세포의 생체 내에서의 개선된 생존의 결과로서, 더 적은 수의 세포가 주사당 필요하다. 실제로, 주사된 세포의 수의 3 내지 4배가 주사시로부터 6개월 후에 존재하는 것으로 밝혀졌고, 이들은 개시된 방법을 사용하여 유의한 정량적 생존을 보여준다. 또한, 정량적 생존으로 인해, 원하는 세포 용량의 재현가능한 투여가 이루어질 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, NSC는 약 1,000 내지 약 1,000,000개 세포/마이크로리터의 밀도로 농축된다. 한 실시양태에서, NSC는 약 2,000 내지 약 80,000 NSC/마이크로리터의 밀도로 농축된다. 또 다른 실시양태에서, 약 5,000 내지 약 50,000 NSC/마이크로리터가 효과적인 이식을 위해 사용되었다. 또 다른 실시예에서, 약 10,000 내지 30,000 NSC/마이크로리터가 사용된다. 바람직한 실시양태에서, NSC는 약 70,000 NSC/마이크로리터의 밀도로 농축된다.

[0095] 또 다른 실시양태에서, NSC는 약 1,000 내지 약 10,000개 세포/마이크로리터, 약 10,000 내지 약 20,000개 세포/마이크로리터, 약 20,000 내지 약 30,000개 세포/마이크로리터, 약 30,000 내지 약 40,000개 세포/마이크로리터, 약 40,000 내지 약 50,000개 세포/마이크로리터, 약 50,000 내지 약 60,000개 세포/마이크로리터, 약 60,000 내지 약 70,000개 세포/마이크로리터, 약 70,000 내지 약 80,000개 세포/마이크로리터, 약 80,000 내지 약 90,000개 세포/마이크로리터, 또는 약 90,000 내지 약 100,000개 세포/마이크로리터의 밀도로 농축된다.

[0096] 또 다른 실시양태에서, NSC는 약 100,000 내지 약 200,000개 세포/마이크로리터, 약 200,000 내지 약 300,000개 세포/마이크로리터, 약 300,000 내지 약 400,000개 세포/마이크로리터, 약 400,000 내지 약 500,000개 세포/마이크로리터, 약 500,000 내지 약 600,000개 세포/마이크로리터, 약 600,000 내지 약 700,000개 세포/마이크로리터, 약 700,000 내지 약 800,000개 세포/마이크로리터, 약 800,000 내지 약 900,000개 세포/마이크로리터, 약 900,000 내지 약 1,000,000개 세포/마이크로리터의 밀도로 농축된다.

[0097] 또 다른 실시양태에서, NSC는 주사 부위당 약 100 마이크로리터 미만의 주사 부피로 현탁되어 치료 영역으로 전달될 수 있다. 예를 들어, 다중 주사가 이루어질 수 있는 인간 대상체의 인지 기능 장애의 치료에서, 주사 부위당 0.1 및 약 100 마이크로리터의 주사 부피가 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, NSC는 주사 부위당 약 1 마이크로리터의 주사 부피에 현탁되어 치료 영역으로 전달될 수 있다.

[0098] 한 실시양태에서, 개시된 방법은 NSC를 약 1,000 내지 약 10,000개 세포/마이크로리터, 약 10,000 내지 약 20,000개 세포/마이크로리터, 약 20,000 내지 약 30,000개 세포/마이크로리터, 약 30,000 내지 약 40,000개 세포/마이크로리터, 약 40,000 내지 약 50,000개 세포/마이크로리터, 약 50,000 내지 약 60,000개 세포/마이크로리터, 약 60,000 내지 약 70,000개 세포/마이크로리터, 약 70,000 내지 약 80,000개 세포/마이크로리터, 또는 약 80,000 내지 약 90,000개 세포/마이크로리터, 또는 약 90,000 내지 약 100,000개 세포/마이크로리터의 세포 밀도로 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역 내로 주사하는 것을 포함한다.

[0099] 일부 실시양태에서, 개시된 방법은 NSC를 약 100,000 내지 약 200,000개 세포/마이크로리터, 약 200,000 내지 약 300,000개 세포/마이크로리터, 약 300,000 내지 약 400,000개 세포/마이크로리터, 약 400,000 내지 약 500,000개 세포/마이크로리터, 약 500,000 내지 약 600,000개 세포/마이크로리터, 약 600,000 내지 약 700,000개 세포/마이크로리터, 약 700,000 내지 약 800,000개 세포/마이크로리터, 약 800,000 내지 약 900,000개 세포/마이크로리터, 또는 약 900,000 내지 약 1,000,000개 세포/마이크로리터의 세포 밀도로 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역 내로 주사하는 것을 포함한다.

[0100] 한 실시양태에서, 개시된 방법은 NSC를 약 5,000 내지 약 50,000개 세포/마이크로리터의 세포 밀도로 주사하는 것을 포함한다. 바람직한 양태에서, 개시된 방법은 NSC를 약 70,000개 세포/마이크로리터의 세포 밀도로 주사하는 것을 포함한다.

[0101] 한 실시양태에서, 개시된 방법은 약 4,000 내지 약 40,000개 세포, 약 40,000 내지 약 80,000개 세포, 약 80,000 내지 약 120,000개 세포, 약 120,000 내지 약 160,000개 세포, 약 160,000 내지 약 200,000개 세포, 약 200,000 내지 약 240,000개 세포, 약 240,000 내지 약 280,000개 세포, 약 280,000 내지 약 320,000개 세포,

약 320,000 내지 약 360,000개 세포, 또는 약 360,000 내지 약 400,000개 세포의 총 세포 수가 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역 내로 도입되도록 NSC를 다중 주사하는 것을 포함한다.

[0102] 일부 실시양태에서, 개시된 방법은 약 400,000 내지 약 800,000개 세포, 약 800,000 내지 약 1,200,000개 세포, 약 1,200,000 내지 약 1,600,000개 세포, 약 1,600,000 내지 약 2,000,000개 세포, 약 2,000,000 내지 약 2,400,000개 세포, 약 2,400,000 내지 약 2,800,000개 세포, 약 2,800,000 내지 약 3,200,000개 세포, 약 3,200,000 내지 약 3,600,000개 세포, 또는 약 3,600,000 내지 약 4,000,000개 세포의 총 세포 수가 대상체의 뇌의 하나 이상의 영역 내로 도입되도록 NSC를 다중 주사하는 것을 포함한다.

[0103] 팽창된 NSC가 치료 영역으로 전달하기 위해 현탁되는 배지의 양은 본원에서 주사 부피로 지칭될 수 있다. 주사 부피는 주사 부위 및 조직의 변성 상태에 따라 결정된다. 보다 구체적으로, 주사 부피의 하한은 높은 세포 밀도의 점성 현탁액의 실제 액체 취급 및 세포의 군집 경향에 의해 결정될 수 있다. 주사 부피의 상한은 실제 수술 시간뿐만 아니라 숙주 조직 손상을 피하기 위해 필요한 주사 부피에 의해 가해지는 압축력의 한계에 의해 결정될 수 있다.

[0104] 세포를 원하는 영역에 주사하기 위한 임의의 적합한 장치가 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 실질적으로 일정한 유속으로 일정 시간에 걸쳐 마이크로리터 미만 (sub-microliter)의 부피를 전달할 수 있는 주사기가 사용된다. 세포는 바늘 또는 가요성 튜브 또는 임의의 다른 적절한 전달 장치를 통해 장치에 로딩될 수 있다.

[0105] 또 다른 실시양태에서, 세포는 뇌에서 약 2 내지 약 5개의 부위에 주사된다. 한 실시양태에서, 세포는 뇌에서 약 5 내지 약 10개의 부위에 주사된다. 한 실시양태에서, 세포는 뇌에서 약 10 내지 약 30개의 부위에 주사된다. 한 실시양태에서, 세포는 뇌에서 약 10 내지 약 50개의 부위에 주사된다. 부위 중 적어도 2개는 약 100 마이크로미터 내지 약 5,000 마이크로미터의 거리만큼 분리될 수 있다. 한 실시양태에서, 주사 부위 사이의 거리는 약 400 내지 약 600 마이크로미터이다. 한 실시양태에서, 주사 부위 사이의 거리는 약 100 내지 약 200 마이크로미터, 약 200 내지 약 300 마이크로미터, 약 300 내지 약 400 마이크로미터, 약 400 내지 약 500 마이크로미터, 약 500 내지 약 600 마이크로미터, 약 600 내지 약 700 마이크로미터 마이크로미터, 약 700 내지 약 800 마이크로미터, 약 800 내지 약 900 마이크로미터, 또는 약 900 내지 약 1,000 마이크로미터이다. 한 실시양태에서, 주사 부위 사이의 거리는 약 1,000 내지 약 2,000 마이크로미터, 약 2,000 내지 약 3,000 마이크로미터, 약 3,000 내지 약 4,000 마이크로미터, 또는 약 4,000 내지 약 5,000 마이크로미터이다. 주사 부위 사이의 거리는 척수 조직 전체에 걸쳐 실질적으로 끊임없는 연속적인 공여자 세포의 존재를 기초로 하고 래트 또는 돼지와 같은 동물 모델에서 약 2-3개월 생존을 달성하는 것으로 입증된 평균 주사 부피를 기초로 결정할 수 있다. 인간에서의 실제 주사 횟수 및 주사 사이의 간격은 동물 모델의 결과로부터 추정할 수 있다.

[0106] 개시된 방법의 NSC는 생체 내에서 다수의 뉴런을 생성할 수 있다. NSC가 이식 전에 명백하게 예비 분화되지 않으면, NSC는 분화되기 전에 생체 내에서 2 내지 4회의 세포 분열까지 증식할 수 있고, 이로써 효과적인 공여자 세포의 수를 추가로 증가시킬 수 있다. 분화시, 뉴런은 특정 신경 전달 물질을 분비한다. 또한, 뉴런은 생체 내에서 성장 인자, 효소 및 다른 조건에 유리한 다른 단백질 또는 물질을 이식체를 둘러싼 환경으로 분비한다. 따라서, 생체 내에서 매우 많은 뉴런을 생성하는 이식 세포의 능력 때문에 및 인지 기능 장애가 뉴런 유래 요소를 포함하는 요소의 누락에 의해 야기되거나 이 누락을 야기할 수 있기 때문에, 다양한 병태가 개시된 방법에 의해 치료될 수 있다. 따라서, 성장 인자, 효소 및 다른 단백질과 같은 뉴런-유래 요소의 부재로 인한 인지 기능 장애를 앓고 있는 대상체는 개시된 방법에 의해 효과적으로 치료될 수 있다.

[0107] 한 실시양태에서, 일정량의 NSC를 포함하는 조성물은 공지된 방법, 예컨대 정맥내 투여에 따라, 예를 들어 볼러스 (bolus)로서 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근내, 복강내, 뇌척수내, 정맥내, 피하, 관절내, 활막내, 또는 척수강내 경로에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 세포의 뇌척수내, 척수강내, 정맥내, 복강내 또는 피하 투여가 바람직하고, 뇌척수내, 척수강내 또는 정맥내 경로가 특히 바람직하지만; 관련 기술 분야에 잘 알려진 다른 세포 투여 방식이 사용될 수 있다.

[0108] 한 실시양태에서, 본 발명의 NSC의 조성물은 주사가능한 제제로 제제화되고, 예를 들어 뇌척수내 전달에 적합한 활성 성분의 수용액 또는 현탁액을 포함한다. 주사용 조성물, 특히 뇌내 전달용 조성물을 제조할 때, 약 7 미만, 또는 약 6 미만, 예를 들어 약 2 내지 약 7, 약 3 내지 약 6 또는 약 3 내지 약 5의 pH로 완충된 장성 조절제의 수용액을 포함하는 연속적인 상이 존재할 수 있다. 예를 들어, 장성 조절제는 예를 들어 염화나트륨, 글루코스, 만니톨, 트레할로스, 글리세롤 또는 제제의 삼투압을 혈액과 등장성으로 만드는 다른 제약 물질을 포함할 수 있다. 별법으로, 보다 많은 양의 장성 조절제가 제제에 사용될 때, 이것은 제약상 허용되는 희석제로 주

사 전에 희석되어 혼합물이 혈액과 등장성이 되도록 만들 수 있다.

[0109] 임의의 상기 방법의 일부 실시양태에서, NSC를 포함하는 조성물은 한 번 투여된다. 임의의 상기 방법의 일부 실시양태에서, NSC를 포함하는 조성물의 초기 투여량을 투여한 후, 하나 이상의 후속 용량을 투여한다. 본 개시내용의 방법에 사용될 수 있는 투여 요법 (예를 들어, 제1 투여와 1회 이상의 후속 투여 사이의 간격)의 예는 대략 매주 1회 내지 약 12개월마다 1회의 간격, 약 2주마다 1회 내지 약 6개월마다 1회의 간격, 약 1개월마다 1회 내지 약 6개월마다 1회의 간격, 약 1개월마다 1회 내지 약 3개월마다 1회의 간격, 또는 약 3개월마다 1회 내지 약 6개월마다 1회의 간격을 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여는 매월, 2개월마다, 3개월마다, 4개월마다, 5개월마다, 6개월마다 또는 질환 재발시에 행해진다.

[0110] 한 실시양태에서, NSC는 약 5 내지 약 50개의 부위에 주사된다. 한 실시양태에서, NSC는 약 10 내지 약 30개의 부위에 주사된다. 부위 중 적어도 2개는 약 100 마이크로미터 내지 약 5000 마이크로미터의 거리만큼 분리될 수 있다. 한 실시양태에서, 주사 부위 사이의 거리는 약 400 내지 약 600 마이크로미터이다. 인간에서 실제 주사 횟수는 동물 모델의 결과로부터 추정할 수 있다.

[0111] 본 개시내용의 방법은 NSC의 주사 전에, 주사와 동시에 또는 주사 후에 하나 이상의 면역억제 약물의 투여를 포함할 수 있다.

[0112] 일부 실시양태에서, NSC 및 면역억제 약물은 함께 투여될 수 있다. 요법을 구성하는 NSC 및 면역억제 약물은 조합 투여 형태일 수 있거나 또는 실질적으로 동시 투여되는 별개의 투여 형태일 수도 있다. NSC 및 면역억제 약물은 또한 NSC 또는 면역억제 약물이 다단계 투여를 요하는 요법에 의해 투여되는 경우 순차적으로 투여될 수 있다. 따라서, 요법은 별개의 활성제의 이격된 투여로서 NSC 및 면역억제 약물의 순차적 투여를 요구할 수 있다. 다중 투여 단계 사이의 시간은 NSC 및 면역억제 약물의 특성, 예컨대 치료 화합물의 효능, 용해도, 생체이용률, 혈장 반감기 및 동역학 프로파일에 따라 및 대상체의 음식물 섭취의 영향 및 환자의 연령 및 상태에 따라 수분에서 수시간 내지 수일 범위일 수 있다. 표적 분자 농도의 일주기 (circadian) 변화 또한 최적 투여 간격을 결정할 수 있다. 동시에, 실질적으로 동시에 또는 순차적으로 투여되든지 상관없이, NSC 및 면역억제 약물은 정맥내 경로에 의한 NSC의 투여 및 경구 경로, 경피 경로, 정맥내 경로, 근내 경로에 의한 또는 예를 들어 점막 조직을 통한 직접 흡수에 의한 면역억제 약물의 투여를 요구하는 요법을 수반할 수 있다. 신경 줄기세포 및 면역억제 약물이 경구, 흡입 스프레이, 직장, 국소, 구강 (예를 들어, 설하) 또는 비경구 (예를 들어, 피하, 근내, 정맥내 및 피내 주사 또는 주입 기술)로, 별개로 또는 함께 투여되든지 상관없이, 각각의 상기 치료 화합물은 제약상 허용되는 부형제, 희석제 또는 다른 제제 성분의 적합한 제약 제제 내에 포함될 것이다.

[0113] 추가의 설명이 없으면, 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 상기한 설명 및 하기의 예시적인 실시예를 사용하여 본 개시내용의 작용제를 만들고 이용하고 특허 청구된 방법을 실시할 수 있다고 생각된다. 다음의 실시예는 본 개시내용의 실시를 용이하게 하기 위해 제공되고, 어떠한 방식으로도 본 개시내용의 나머지를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0114] **실시예**

[0115] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되고, 이것은 어떠한 방식으로도 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 하기 실험예에서 사용되는 물질 및 방법은 다음과 같다.

[0116] 실시예 1: 재료 및 방법

[0117] *HK532 제조*

[0118] 인간 HK532 NSC 세포주 (NSI-HK532 및 NSI-HK532.UbC-IGF-I)는 뉴랄스템, 인크. (Neuralstem, Inc., 미국 메릴랜드주 록빌)에 의해 제공되었다. 간단히 설명하면, HK532는 선택 유산으로 임신 연령 8주의 인간 태아로부터 얻은 피질 조직으로부터 제조되었다. 이 물질은 NIH (National Institutes of Health) 및 FDA의 지침에 따라 사전 고지를 통한 동의 하에 뉴랄스템, 인크.에 기증되었다. 지침은 문헌 [Johe et al. (1996) Genes Dev. 10(24):3129-40]에 기재된 바와 같이 외부 독립적인 검토 위원회에 의해 검토되고 승인되었다. 피질의 NSC는 불멸화 유전자 및 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 조건적으로 불멸화되었다. 불멸화 유전자는 인간 에스트로겐 수용체의 C-말단 리간드 결합 도메인을 코딩하는 cDNA 단편과 함께 3' 말단에 융합된 인간 c-myc cDNA를 포함하였다. 세포를 네오마이신 내성에 대해 선택하고, 단일 세포주 (HK532)로서 증식시켰다. 이어서, 세포주를 복제-결함 재조합 렌티바이러스 벡터로 형질도입시켜 인간 유비퀴틴 C (UbC) 프로모터에 의해 유도된 인간 IGF-I의 발현을 유도하였다. 생성되는 세포는 추가의 선택 없이 단일 세포주로 증식되었다 (HK532.UbC-IGF-I). 동일한 UbC 프로모터 하에 녹색 형광 단백질 (GFP)을 발현하는 대조군 구

축물을 사용한 HK532의 형질도입은 약 90-95%의 GFP 양성 증식 세포를 생성시켰다.

[0119] *HK532 배양 및 분화*

[0120] HK532 및 HK532-IGF-I 세포 둘 모두의 배양은 상기한 바와 같이 수행되었다 [42]. 간단히 설명하면, 세포를 24시간 동안 10 mM Hepes 완충제 중에서 100 ㎍/mL 폴리-D-라이신 (밀리포어 (Millipore), 미국 매사추세츠주 빌러리카)으로, 이어서 1시간 동안 PBS 중에서 25 ㎍/mL 피브로넥틴으로 코팅한 플라스크에서 성장시켰다. 별법으로, 피질 뉴런 (CN)과 공동 배양하기 전에 폴리-L-라이신으로 코팅된 삽입체에 세포를 씨딩하였다. 전구체 상태의 성장 및 유지를 위해 세포를 10 ng/mL 섬유모세포 성장 인자 (FGF)가 보충된 N2B+ 배지 (뉴랄스템, 인크. (미국 메릴랜드주 록빌) 제공)에서 배양하였다. 분화를 위해, 세포를 FGF가 없는 NSDM 분화 배지 (4 mM L-글루타민, 20 μM L-알라닌, 6 μM L-아스파라긴, 67 μM L-프롤린, 250 nM 비타민 B12, 25 mg/L 인슐린, 100 mg/L 트랜스페린, 20 nM 프로게스테론, 100 μM 푸트레신, 및 30 nM 아셀렌산나트륨을 보충한 DMEM)에서 배양하였다. 분화된 세포 데이터는 분화후 일 (즉, 분화되지 않은 (D0), 제1일 (D1), 제3일 (D3) 등)로서 표시된다. 배지는 50% 배지 교체로 2일마다 변경되었다.

[0121] *IGF-I 생산 및 신호전달*

[0122] IGF-I 발현 및 신호전달은 이전에 기술된 바와 같이 ([Vincent et al. Endocrine Society Abstracts (2003) P3-316 p. 548]; 및 [Chia et al. Am J Epidemiol (2008) 167(12):1438-45]), ELISA 및 웨스턴 블로팅에 의해 HK532 및 HK532-IGF-I 세포에서 결정되었다. 간단히 말하면, IGF-I 생산을 확인하기 위해 조건화된 배지를 미분화 (D0) 및 분화된 (D3 및 D7) HK532 및 HK532-IGF-I 세포로부터 수거하고, 센트리콘 (Centricon) 필터 (3 KDa 컷오프 (cut off); 밀리포어, 미국 매사추세츠주 빌러리카)를 사용하여 1 ml까지 10배 농축하고, 제조사의 지시에 따라 인간 특이적 IGF-I ELISA (어세이 디자인스 (Assay Designs), 엔조 라이프 사이언시스 (Enzo Life Sciences Inc.), 미국 뉴욕주 파밍데일)에서 전개시켰다. IGF-I 신호전달 분석을 위해, HK532 및 HK532-IGF-I 세포를 4시간 동안 처리 배지 (인슐린을 첨가하지 않은 NSDM 분화 배지)에서 배양한 후, 1시간 동안 선택 억제제를 첨가하고, 이어서 30분 동안 외인성 IGF-I (20 nM)을 첨가하였다. 억제제는 Akt 경로 억제제 LY294002 (LY; 20 μM, 시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트 루이스), MAPK 억제제 U0126 (U; 20 μM, 칼바이오켐 (Calbiochem), 미국 캘리포니아주 라 호야) 또는 IGF-IR 억제제 NVPAEW541 (NVP; 1 μM; 시그마-알드리치)를 포함하였다. 웨스턴 블로팅을 위해, 총 세포 단백질은 빙냉 RIPA 완충제 (20 mM 트리스, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1 mM Na 데옥시콜레이트, 1% 트리톤 X-100, 0.1 트립신 단위/L 아프로티닌, 10 mg/mL 류펩틴, 및 50 mg/mL PMSF)에서 추출하고, 단백질 농도를 결정하고, 샘플을 SDS-PAGE 겔에서 전기영동하고, 니트로셀룰로스로 옮겼다. 1차 항체 (달리 나타내지 않으면, 셀 시그날링 테크놀로지, 인크. (Cell Signaling Technology, Inc., 미국 매사추세츠주 댄버스)로부터 얻음)은 다음을 포함하였다: 포스포-IGF-IR (pIGF-IR), IGF-IRβ (Tyr1135/1136), 포스포-Akt (Ser473) (pAkt), Akt, 포스포-ERK (pERK), ERK 및 β-액틴 (케미콘 (Chemicon), 미국 캘리포니아주 테메큘라). 1차 항체를 4℃에서 밤새 인큐베이팅한 후, 막을 22℃에서 1시간 동안 양고추냉이 퍼옥시다제 (셀 시그날링 테크놀로지, 인크., 미국 매사추세츠주 댄버스)에 접합된 적절한 2차 항체와 함께 인큐베이팅하고, 화학 발광 기질 (수퍼시그날 웨스트 피코 (SuperSignal West Pico); 피어스 (Pierce), 피셔 사이언티픽 (Fisher Scientific), 미국 뉴햄프셔주 햄튼)로 발색시키고, 코닥 바이오맥스 자르 (Kodak BioMax XAR) 필름 (시그마-알드리치)에 노출시켰다.

[0123] *세포 이동*

[0124] 미분화된 HK532 및 HK532-IGF-I 세포를 4℃에서 밤새 보관한 후 이동 삽입체에 첨가하거나(1×10^6 세포/mL 또는 3×10^6 세포/바이알), 또는 6-웰 플레이트 상에서 배양하고 분화 D7에 삽입체로 이동시켰다. IGF-I (최종 농도 10 nM)가 있거나 없는 NSDM + 10% FBS를 삽입체 아래에 첨가하였다. 24시간 후, 삽입체를 통해 이동한 세포를 QCM 24-웰 비색 세포 이동 검정 (Colorimetric Cell Migration Assay) (밀리포어)을 사용하여 염색하였다. 이동은 표준 랩시스템즈 플루오로스캔 아센트 에프엘 (LabSystems Fluoroskan Ascent FL) 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 530 및 590 nm에서 정량하였다.

[0125] *세포 증식 및 분화*

[0126] 세포 증식 및 분화는 표준 실험실 면역세포화학 (ICC) 프로토콜을 사용하여 평가하였다 ([Kim et al. Journal of Biological Chemistry (1997) 272:21268-21273]; [Lunn et al. Neurobiol Dis (2012) 46(1):59-68]). 간단히 설명하면, HK532 및 HK532-IGF-I 세포를 24-웰 플레이트에서 폴리-L-라이신 및 피브로넥틴-코팅 유리 커버슬립 상에서 배양하였다. 세포 증식은 10 μM 5'-에티닐-2'-데옥시우리딘 (EdU)과 함께 세포를 2시간 동안 배

양한 후, Click-It EdU 키트 (인비트로겐 (Invitrogen))에 대해 제조사의 프로토콜에 따라 고정하고 처리함으로써 D0, D3 및 D7에 [45]에서 설명된 바와 같이 측정하였다. EdU 혼입은 디지털 카메라가 장착된 올림푸스 (Olympus) BX-51 현미경을 사용하여 캡쳐된 형광 이미지의 정량에 의해 측정되었다. 모든 샘플 (n=3)에 대해 증식 실험당 약 2.5-2.7 x 10^3 세포가 계수되었다.

[0127] 분화를 평가하기 위해, 세포를 4% PFA로 고정시키고, 0.1% 트리톤 (Triton)/PBS로 투과성으로 만들고, 5% 정상 당나귀 혈청/0.1% 트리톤 PBS로 차단하였다. 다음으로, Ki67 (노부스 (Novus), 미국 콜로라도주 리틀톤), TUJ1 (뉴로믹스 (Neuromics), 미국 미네소타주 에디나), 네스틴 (Nestin) (케미콘, 밀리포어), GAD65/67 (밀리포어), VGLUT2 (밀리포어), 또는 IGF-IRβ (1:500, 시그마) 1차 항체는 달리 명시되지 않는 한 4℃에서 밤새 1:1000으로 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 Cy3, Cy5 또는 FITC-접합된 2차 항체 (잭슨 이뮤노리써치 (Jackson ImmunoResearch), 미국 펜실베니아주 웨스트그로브) 중에서 인큐베이팅한 후, DAPI와 함께 ProLong Gold 안티-페이드 (anti-fade) (몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes), 인비트로겐 (미국 캘리포니아주 칼스바드))를 사용하여 유리 슬라이드에 올려놓았다. 올림푸스 BX-51 현미경을 사용하여 이미지를 캡쳐하고, 모든 샘플 (n=3)에 대해 분화 실험당 약 2.5-2.7 x 10^3 세포를 계수하였다.

[0128] 이어서, 본 발명자들은 이전에 기술된 바와 같이 (Lunn et al. Stem Cells Dev (2010) 19(12):1983-93) 본 발명자들이 확립한 신경 지표 측정을 사용하여 전구체 상태의 유지 및 축색돌기 성장에 대한 유도된 IGF-I 발현의 효과를 조사하였다. 간단히 설명하면, 세포를 분화의 처음 7일 동안 유리 커버슬립 상에서 단일층으로 배양하고, 신경 전구체 세포를 확인하기 위해 네스틴으로 또는 1차 뉴런 과정을 관찰하기 위해 TUJ1로 D0, D3 및 D7에 면역표지하였다. 모든 네스틴-표지된 샘플 (n=3)에 대해 실험당 2.5 x 10^3 초과의 세포가 계수되었다. 별법으로, TUJ1-표지된 이미지 및 그의 상응하는 DAPI 이미지는 메타모프 (MetaMorph) (몰레큘라 디바이시스 (Molecular Devices), 미국 캘리포니아주 서니베일)를 사용하여 분석되었다. 역치를 설정하고, 영역 통계를 사용하여 신경돌기로 덮인 영역을 측정하였다. 세포 수는 "count nuclei" 플러그-인 (plug-in)을 사용하여 계수하고, 임의의 오류계수된 세포를 수정하기 위해 수동 조정이 이루어졌다. 뉴런의 수 및 신경돌기 길이는 완전한 뉴런 영역을 핵의 수로 나눈 값으로 표현되는, 복합 신경 지표 측정을 사용하여 분석하였다. 데이터는 세포당 신경돌기 영역 (㎛2/세포)으로 제시된다 (Lunn et al. Stem Cells Dev (2010) 19(12):1983-93). 상태당 총 6개의 이미지가 계수되었고 약 7.5 x 10^3 DAPI-표지된 세포 (n=3)를 나타낸다.

[0129] *1차 CN 제조 및 신경보호의 평가*

[0130] 1차 CN은 본 발명자들의 이전에 발표된 프로토콜 (Lunn et al. Stem Cells Dev (2010) 19(12):1983-93)에 따라 단리하였다. 간단히 설명하면, E15 스프라그-돌리 (Sprague-Dawley) 래트 배아로부터의 CN을 수집하고, 막을 제거하고, 조직을 2-3 mm 조각으로 절단하였다. 조직을 37℃에서 10분 동안 0.5% 트립신/EDTA 내에서 인큐베이팅한 후, 1분 동안 혈청 코팅된 유리 피펫으로 분쇄하여 세포를 분리시켰다. 생성된 세포 현탁액을 24-웰 플레이트에서 폴리-L-라이신 코팅된 유리 커버 슬립에 도포하고, 2.5 mg/ml 알부민, 2.5 ㎍/ml 카탈라제, 2.5 ㎍/ml SOD, 0.01 mg/ml 트랜스페린, 15 ㎍/ml 갈락토스, 6.3 ng/ml 프로게스테론, 16 ㎍/ml 푸트레신, 4 ng/ml 셀레늄, 3 ng/ml β-에스트라디올, 4 ng/ml 하이드로코르티손, 1X 페니실린/스트렙토마이신/네오마이신 (깁코 비알엘 (Gibco BRL)) 및 1X B-27 첨가제 (깁코 비알엘)를 보충한 뉴로베이설 배지 (Neurobasal Medium) (깁코 비알엘, 인비트로겐)을 포함하는 성장 배지에서 인큐베이팅하였다.

[0131] 독성 AD 미세환경에 대한 CN, HK532 및 HK532-IGF-I 감수성을 조사하기 위해, 세포를 약 72시간 동안 10 μM Aβ(1-42) (rPeptide)로 처리하였다. 세포 손상은 ICC 후에 CC3-양성 세포의 백분율을 계수하여 결정되는, 절단된 카스파제-3 활성화 (CC3)에 의해 평가되었다. 모든 샘플 (n=3)에 대해 실험당 약 2.5 x 10^3 세포가 계수되었다. 신경보호 효과를 평가하기 위해, 분화된 D7 HK532-IGF-I을 삽입체에 씨딩하고, 정규 성장 배지에서 1차 CN 배양액과 함께 동시 배양하였다. 24시간 후, 동시 배양물을 72시간 동안 10 μM Aβ(1-42) (rPeptide)로 처리하였다. 1차 CN은 CC3 항체 (1:1000, 셀 시그날링)를 사용하여 상기한 바와 같이 ICC 분석을 위해 고정하였다.

[0132] *생체내 이식*

[0133] 생체내 이식 후에 HK532-IGF-I 세포가 생존하고 해마 영역에 통합됨을 입증하기 위해, B6C3-Tg(APPswe/PSEN1ΔE9)85Dbo/J (APP/PS1; n=5) 및 야생형 B6C3F1/J (WT; n=8) 마우스를 6주령의 잭슨 래보래토리 (Jackson Laboratory, 미국 메인주 바 하버)로부터 수득하였다. 11주령에, 마우스에게 타크롤리무스 (Tacrolimus) 펠렛

(FK-506; 뉴랄스템, 인크. 제공)을 피하 주사하고, 12주령에 세포 이식 수술을 실시하였다. 간단히 설명하면, 마우스를 이소플루오란으로 마취하고, 표준 정위틀 (stereotactic frame) (스토엘팅 컴퍼니 (Stoelting Company), 미국 일리노이주 우드 데일)에 두었다. 피부를 절개하고, 예상되는 주사 부위에서 큰 개두술을 수행하였다. HK532-IGF-I 세포 현탁액은 정수리점 (bregma)으로부터 측정된 다음 좌표에 의해 표시된 3개의 부위 (각각 후방/외측/복측)에서 해마술 뇌궁 내로의 양측 주사에 의해 투여되었다 (총 6회 주사): -0.82/±0.75/2.5, -1.46/±2.3/2.9, -1.94/±2.8/2.9. 각각의 주사는 30,000 세포/ ㎕의 세포 농도에서 1 ㎕ 부피 (60초 초과에 걸친 투여와 바늘을 빼기 전에 60초 지연)로 이루어졌다. 이어서, 흡수성 봉합사를 사용하여 피부를 봉합하였다. 수술 후, 마우스에게 2일 동안 복강 내로 마약성 진통제를 투여하고, 타크롤리무스 펠렛을 연구 기간 내내 계속 투여하였다. 분석을 위해 세포 이식 후 2주 및 10주에 마우스를 희생시켰다. 간단히 설명하면, 동물을 마취하고, 빙냉 염수로 관류시키고, 뇌를 절개하고, 반구 간 경계를 따라 절단하였다. 뇌를 4% PFA에서 밤새 후고정하고, 면역조직화학 (IHC)을 위해 30%에서 동결보호하였다.

[0134] IHC를 위해, 고정된 뇌 조직을 최적 절단 온도 화합물 (OCT)을 사용하여 포매하고, 냉동 미세 절단기를 사용하여 14 ㎛ 슬라이스로 절편화하였다. IHC로 이식된 세포를 검출하고 해마술 뇌궁에 대한 정확한 표적화를 확인하기 위해 동물당 10개의 해마 절편을 선택하였다. 절편을 PBS로 재수화하고, PBS 중 0.5% 트리톤 X-100 내에서 20분 동안 투과성으로 만들고, 1X PBS 중 0.1% 트리톤 X-100 내의 5% 당나귀 혈청에서 30분 동안 차단하였다. 더블코르틴 (Doublecortin) (DCX; 밀리포어) 및 휴먼 뉴클레이 (Human Nuclei) (HuNu, 밀리포어)에 대한 1차 항체를 일괄적으로 1:200으로 희석하고, 4℃에서 밤새 절편과 함께 인큐베이팅하였다. 1차 항체 인큐베이팅 후, 절편을 PBS로 3회 세척하고, 당나귀에서 유도된 형광-접합된 2차 항체 (Alexa 488 및 Alexa 594; 1:500, 인비트로겐)와 함께 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 염색이 완료되면, 슬라이드에 DAPI 핵 염색 (몰레큘라 프로브스, 인비트로겐)을 함유하는 ProLong Gold 안티-페이드 마운팅 배지를 사용하여 유리 커버슬립을 올려놓았다. 형광 이미지는 Leica SP2 공촛점 현미경을 사용하여 캡처하였다.

[0135] *통계 분석*

[0136] 모든 데이터는 평균 ± 표준 편차 (SD), n=3으로 또는 3개의 독립적인 실험의 대표적인 이미지로서 나타내었다. 통계 분석은 그래프패드 프리즘 (GraphPad Prism) (그래프패드 소프트웨어, 인크. (GraphPad Software, Inc.), 미국 캘리포니아주 라 호야)을 사용하여 수행하였다. 쌍별 비교를 위해 대응표본 t-시험 (paired t-test)이 사용되었다. $p<0.05$의 값은 통계적으로 유의하다고 간주되었다 ($^{*}p<0.05$).

[0137] 실시예 2: IGF-I 생산 및 신호전달

[0138] HK532 세포는 이전에 기술되지 않은 신규한 피질 NSC이다. 세포 치료제로서의 잠재적 효능을 향상시키고, IGF-I 생산의 그의 신경보호 능력에 대한 영향을 결정하기 위해, 전장 인간 IGF-I을 코딩하는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 HK532-IGF-I 세포주를 생성하였다. 조건화된 배지의 ELISA 분석은, 모 HK532 세포가 IGF-I의 매우 낮은 수준 내지 검출할 수 없는 기저 수준을 생산하는 반면, HK532-IGF-I 세포는 D0와 D7 사이에 3-5 ng/mL의 IGF-I을 생산 (약 50배 증가)한다는 것을 보여주었다 (도 1a). 따라서, HK532-IGF-I 세포는 초기 분화 전체에 걸쳐 유지되는 평가가능한 수준의 IGF-I을 생산하고, 이것은 견고하고 안정한 IGF-I 발현을 확인해준다.

[0139] 성장 인자 수용체 수준 및 활성화가 자가분비성 IGF-I 발현에 의해 어떻게 조절되는지를 조사하였다. IHC에 의해, IGF-IR 발현은 D7에 모 HK532 세포 및 HK532-IGF-I 둘 모두의 세포 표면을 따라 관찰되었다 (도 1b). 웨스턴 블롯 분석은 이 발현을 확인하였고, 두 세포주 모두에서 분화 후에 수용체 발현이 유의하게 증가함을 나타냈다 (도 1c). D0 및 D7에서 HK532에 비해 HK532-IGF-I에서 약간 감소된 IGF-IR 발현 수준이 관찰되었지만, IGF-IR 인산화 및 신호전달 활성화는 세포주 사이에 유의한 차이가 없었고, 외인성 IGF-I의 첨가는 수용체의 인산화 증가를 초래하였고 (도 1c); 상기 활성화는 분화 후에 유의하게 더 현저하였다.

[0140] IGF-I 신호전달이 미토겐 (mitogen)-활성화된 세포외 신호-조절 키나제/세포외 신호-조절 키나제 (MEK/ERK), 미토겐-활성화된 단백질 키나제 (MAPK) 및 포스파티딜이노시톨 3-키나제 (PI3K)/Akt 경로를 활성화시킴을 고려하여, HK532 및 HK532-IGF-I 세포에서 이들 주요 경로의 인산화 및 하류 활성화를 평가하였다 (도 1c). D0 및 D7에서 기저 MAPK 신호전달이 있었지만, 세포주 사이에 유의한 차이가 없었고, IGF-I 자극은 분화 후에 신호전달만을 증가시켰다. 그러나, 기저 Akt 신호전달은 D0 HK532-IGF-I 세포에서 및 분화 후에는 두 세포주 모두에서 유의하게 증가하였다. 외인성 IGF-I의 첨가는 분화 후에 HK532 세포에서 Akt의 강력한 증가를 촉진하는 반면, HK532-IGF-I에서 IGF-I 자극 후에 아주 작은 Akt 활성화가 관찰되었다. 이들 데이터는 모 세포에 비해 외인성 IGF-I에 대한 HK532-IGF-I의 반응성이 감소함을 입증한다. 주목할 만하게, MAPK 신호전달의 억제는 Akt 인산화를 증가시키고, Akt 신호전달의 억제는 역방향 관찰을 야기하였고, 이것은 이들 경로가 보상 신호전달이 가능함

을 시사한다. 그러나, 수용체 길항제 NVP를 사용한 IGF-IR 신호전달의 억제는 MAPK 신호전달에는 영향을 주지 않았지만, IGF-IR 및 Akt의 활성화를 두 세포주 모두에서 기저 수준 미만으로 현저하게 감소시켰다 (도 1c). 이들 데이터는 함께, HK532-IGF-I 세포가 정상 IGF-IR 및 MAPK/Akt 신호전달 프로파일을 나타냄을 입증한다.

[0141] 실시예 3: IGF-I 발현은 HK532 증식 또는 이동을 변화시키지 않는다.

[0142] EdU 혼입은 HK532 및 HK532-IGF-I 세포 증식에 대한 IGF-I의 효과를 평가하기 위해 사용되었다. 처리되지 않은 D0 HK532 및 HK532-IGF-I의 약 36% 및 33%가 각각 EdU 양성이었다 (도 2a-e). D3에서, HK532 및 HK532-IGF-I의 6% 및 9%가 각각 EdU 양성이었고, D7에는 두 세포주의 3% 미만이 EdU 양성이었다. 따라서, D0, D3 또는 D7에서 증식 프로파일의 차이는 관찰되지 않았고, 두 세포주 모두 D7에서 최소 증식을 나타내었다. 이러한 데이터는 IGF-I가 초기 분화 단계에서 증식을 촉진하지 않거나 유지하지 않음을 보여준다.

[0143] HK532 및 HK532-IGF-I 이동에 대한 IGF-I의 영향을 또한 D0 및 D7에서 평가하였다. 두 시점 모두에서 HK532 및 HK532-IGF-I에 대해 유사한 이동 수준이 관찰되었다 (도 2f-g). 또한, 추가의 IGF-I가 트랜스웰 (transwell) 삽입체 아래에 첨가될 때, 어떠한 변화도 관찰되지 않았다. 따라서, 유도된 IGF-I 발현은 전구체 세포 이동에 대해 식별가능한 효과를 발휘하지 않았다.

[0144] 실시예 4: IGF-I-발현 HK532는 신경 분화능을 보유한다.

[0145] 다음으로, HK532 전구체 상태의 유지 및 축색돌기 성장에 대한 IGF-I의 영향을 조사하였다. D0 HK532 및 HK532-IGF-I의 약 92% 및 90%가 각각 네스틴 양성이었고, 이것은 IGF-I 발현이 전구체 상태의 유지에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 신경 분화의 초기 지표로서 확립된 신경 지표 방법을 사용하여 신경돌기 성장에 대한 IGF-I의 영향도 평가하였다. HK532 및 HK532-IGF-I 세포 둘 모두에서, 세포가 분화됨에 따라 D0과 D7 사이에서 신경 지수가 증가하였고, 시험된 임의의 시점에서 세포주 사이에 차이가 관찰되지 않았다 (도 3f). 이들 데이터는 IGF-I가 초기 HK532 분화에 영향을 미치지 않는다는 것을 입증한다.

[0146] 실시예 5: GABA성 표현형은 HK532-IGF-I에서 증가하고, 글루타메이트성 표현형은 증가하지 않는다.

[0147] 말단 분화에 대한 IGF-I의 영향을 결정하기 위해, D0, D3 및 D7에서 글루타메이트성 (VGLUT) 및 GABA성 (GAD65) 표현형을 보이는 세포의 비율을 정량하였다. GAD65-양성 세포는 정량되었고, 각각 총 세포의 74% 및 67%에서 모 HK532 세포에 비해 HK532-IGF-I에서 유의하게 증가하였다 (도 4a, b, e). HK532 (61%) 및 HK532-IGF-I (67%) 배양액에서 VGLUT 양성 세포의 비율은 유의하게 상이하지 않았다 (도 4c, d, f). 이러한 데이터는 IGF-I의 존재가 세포 분화로 인한 GABA성 뉴런의 수를 증가시키지만, 글루타메이트성 뉴런의 수에는 유의한 영향을 미치지 않는다는 것을 입증한다.

[0148] 실시예 6: HK532-IGF-I은 Aβ독성에 저항성을 갖고 시험관 내에서 1차 CN을 보호한다.

[0149] Aβ(1-42)는 일반적으로 사용되는 AD-관련 독성의 시험관내 모델이다 (Bruce et al. (1996) PNAS 93(6):2312-6). 유의한 아폽토시스 및 CC3 활성화는 Aβ에 노출되었을 때 1차 CN과 NSC 세포주 둘 모두에서 관찰되었다 (도 5a). HK532 및 HK532-IGF-I의 아폽토시스 수준은 1차 CN에서 관찰된 것보다 유의하게 더 낮았다 ($p<0.05$; 도 5a). 변형된 전구체의 보호 능력을 조사하기 위해, HK532 및 HK532-IGF-I와 간접적으로 동시에 배양한 1차 CN에서 Aβ 독성을 평가하였다 (도 5b-e). CC3 활성화에 의해 다시 표시되는 1차 CN에서의 아폽토시스는 HK532와 동시 배양할 때 40% 미만으로, HK532-IGF-I와 동시 배양할 때 30% 미만으로 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$; 도 5f). 이들 데이터는 HK532-IGF-I 세포주가 신경보호 효과가 있고 Aβ에 의해 유발된 1차 CN 사멸을 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0150] 실시예 7: HK532-IGF-I은 이식에서 생존하고 AD 마우스 모델에서 생체 내에서 통합된다.

[0151] 전임상 시험의 실행가능성을 확립하기 위해, HK532-IGF-I 세포를 통상적으로 사용되는 AD 모델인 APP/PS1 이중 트랜스제닉 마우스에 이식하였다 (Cao et al. J Biol Chem (2007) 282(50):36275-82). 이 파일럿 연구는 해마의 해마술 뇌궁에서 세포의 정확하고 적정한 해부학적 배치를 확인하고 시간이 지남에 따라 이식된 세포 생존을 평가하기 위한 것이었다. 주사된 모든 동물에서 표적 정확도가 달성되었다. 이식된 인간 세포는 이식 후 2주 (데이터는 나타내지 않음) 및 10주에 HuNu 및 DCX에 대해 IHC에 의해 검출되었다 (도 5e, f). 이식된 세포는 AD (도 5e) 및 WT 동물 (도 6f) 둘 모두의 해마 영역에서 명백하였다. 뉴런 전구체를 표지하는 미세관 결합 인단백질인 DCX로 HuNu 표지 세포를 동시 염색한 결과, 신경발생이 나타났고, 이식된 피질 전구체가 초기 뉴런 분화 단계에 있음을 제시한다.

[0152] 실시예 8: HK532-IGF-I의 투여는 AD 마우스 모델에서 생체 내에서 Aβ 플라크 형성을 감소시킨다.

[0153] Aβ 병리학에 대한 생체내 HK532-IGF-I 이식의 전반적인 효과를 평가하기 위해, 5개의 Aβ 이소형 (Aβ-37, 38, 39, 40 및 42)에 대한 폴리클로날 항체를 사용하여 마우스당 다수의 해마 및 피질 절편에 대한 면역염색을 수행하였다. 절편의 형광 이미지는 총 면역반응 영역 및 강도의 측정을 기초로 하여 정량되었다. 예상한 바와 같이, 결과는 비히클 주사 APP/PS1 마우스에서의 명확한 Aβ 플라크 형성 및 비-tg 동물에서의 Aβ의 부재를 나타낸다 (도 6a-b, d-e). 더욱이, 비히클 주사 APP/PS1 마우스에 비해 HK532-IGF-I로 처리된 APP/PS1 마우스에서 Aβ 수준의 대폭적인 감소가 있었다 (P<0.0001; 독립표본 (unpaired) t-시험) (도 6b-c, e-g). 이 데이터는 HK532-IGF-I이 Aβ에 의해 유발된 손상으로부터 뉴런 조직을 보호하는 기능뿐만 아니라 Aβ 침착물을 제거하고/하거나 Aβ 축적에 저항함으로써 Aβ의 침착을 약화시킨다는 것을 보여준다.

[0154] NSC-처리 마우스에서의 Aβ 감소 메카니즘에 대한 더 많은 통찰을 얻기 위해, 해마 및 피질에서의 Aβ 수준의 차이를 개별적으로 고려하였다. Aβ는 NSC-처리 마우스의 피질에서 현저히 감소되었다 (P<0.0005; 독립표본 t-시험) (도 6h). 그러나, NSC-처리 마우스의 해마에서의 Aβ의 감소는 유의하지 않았다 (P=0.1061; 독립표본 t-시험) (도 6h).

[0155] 실시예 9: HK532-IGF-I의 투여는 AD 마우스 모델에서 생체내 콜린 활성을 증가시킨다.

[0156] 본 발명자들의 AD 모델에서 콜린성 뉴런의 존재를 평가하고 이들 뉴런에 대한 HK532-IGF-I 이식의 효과를 조사하기 위해, 각각의 마우스의 선조체 절편을 높은 수준의 ChAT를 발현하는 콜린성 뉴런을 확인하기 위해 ChAT에 대한 항체로 면역염색하였다 (도 7a-d). 본 발명자들은 각각의 절편에 대한 선조체의 전체를 촬영하고, 각각에 대한 ChAT 양성 세포의 수를 세었다. 세포 수는 WT에 비해 APP/PS1 마우스에서 선조체 콜린성 뉴런의 유의적인 손실을 나타냈다 (P=0.0115; 독립표본 t-시험) (도 7e). 또한, 비히클 주사 AD 마우스에 비해 NSC-처리 APP/PS1 마우스에서 콜린성 뉴런의 수가 유의하게 증가하였다 (P=0.0366, 독립표본 t-시험) (도 7f). 이러한 결과는 APP/PS1 마우스에서 HK532-IGF-I 이식에 의해 선조체에서 콜린성 기능이 구제됨을 나타낸다.

[0157] 실시예 10: HK532-IGF-I의 투여는 AD 마우스 모델에서 생체내 시냅스전 활성을 증가시킨다.

[0158] HK532-IGF-I이 APP/PS1 마우스에서 시냅스 밀도를 증가시키는지 결정하기 위해, 모든 동물로부터의 해마 절편을 시냅스전 마커인 시냅토피신으로 면역염색하였다. 비히클-주사 트랜스제닉 마우스에 비해, HK532-IGF-I이 이식된 APP/PS1 마우스의 해마에서 형광 강도의 식별가능한 증가가 발견되었다 (도 8a-f). 이 증가된 강도는 비-주사된 및 샴 처리된 비-tg 마우스 둘 모두에서 발견된 수준과 대등하였다. 이 데이터는 HK532-IGF-I 이식이 AD에서 시냅스를 복원하여 기억 및 인지를 구조함을 나타낸다.

[0159] HK532-IGF-I 세포가 내인성 뉴런과 시냅스를 형성하는지 조사하기 위해, HK532-IGF-I 처리된 마우스의 해마 절편에 대해 인간 NuMA 및 마우스 및 인간 기원 둘 모두의 시냅토피신의 공동 염색을 수행하였다. 상당한 시냅토피신 양성 염색이 NSC가 위치한 다형체 층의 영역에서 발견되었다 (도 8i). 더욱이, 시냅스 마커는 NuMA 염색 세포와 뚜렷하게 경계를 두었고, 이것은 인간 NSC 유래 세포가 내인성 뉴런과 시냅스를 형성할 수 있음을 시사한다 (도 8g-j).

[0160] 실시예 11: HK532.UbC-IGF1의 생존 및 척수 내 통합

[0161] 생존 및 척수 내 통합을 입증하기 위해, HK532.UbC-IGF1을 근위축성 측삭 경화증 (ALS)의 확립된 동물 모델인 SOD1G93A 래트의 경부 척수 내에 이식하였다. 경부 척수 (C4-C6 척수 수준)의 전각을 표적으로 하여, 각각의 동물에게 총 $1.8x10^5$ 세포를 주사하였다. 동물은 일시적 미코페놀레이트 모페틸 (이식 후 7일 동안 30 mg/kg IP에 의해 및 지속적인 타크롤리무스 전달에 의해 면역억제하였다. 동물은 표준 관류-고정 전에 56일 생존하였다. 냉동 면역조직화학은 전각에서의 인간 세포 이식편의 존재 및 회백질 및 백질 전체에 걸쳐 광범위한 분포를 보여준다 (도 9a-c).

[0162] 달리 나타내지 않는 한, 명세서 및 청구범위에서 사용되는 성분의 양, 특성, 예컨대 분자량, 반응 조건 등을 표현하는 모든 수치는 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 그 반대로 표시되지 않는 한, 명세서 및 첨부된 청구범위에 제시된 수치 파라미터는 본 개시내용에 의해 얻고자 하는 원하는 특성에 따라 변할 수 있는 근사치이다. 청구범위의 균등론의 적용을 제한하려는 시도가 아니고 최소한, 각각의 수치 파라미터는 적어도 보고된 유효 자릿수에 비추어 및 일반적인 반올림 기술을 적용하여 해석되어야 한다.

[0163] 본 개시내용의 넓은 범위를 제시하는 수치 범위 및 파라미터가 근사값임에도 불구하고, 구체적인 실시예에 제시된 수치 값은 가능한 한 정확하게 보고된다. 그러나, 모든 수치는 본질적으로 그 각각의 시험 측정에서 발견된

표준 편차로 인해 필연적으로 발생하는 특정 오차를 포함한다.

[0164] 본 개시 내용을 설명하는 문맥에서 (특히 하기 청구범위의 문맥에서) 사용되는 용어 "a", "an", "the" 및 유사한 지시자는 본원에서 달리 명시되거나 문맥에 의해 명확하게 모순되지 않는 한, 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 본원에서 값의 범위에 대한 언급은 그 범위에 속하는 각각의 개별적인 값을 단지 개별적으로 언급하는 약식 방법으로 사용하기 위한 것으로 의되된다. 본 명세서에서 달리 나타내지 않는 한, 각각의 개별적인 값은 마치 본 명세서에서 개별적으로 언급된 것처럼 명세서에 포함된다. 본원에서 설명되는 모든 방법은 본원에서 달리 나타내지 않거나 문맥상 분명하게 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 임의의 및 모든 예 또는 예시적인 용어 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단순히 개시내용을 보다 잘 나타내도록 의도된 것이고, 달리 특허 청구된 개시내용의 범위를 제한하지 않는다. 명세서에서 어떠한 용어도 본 개시내용의 실시에 필수적인 임의의 특허청구되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0165] 본원에 개시된 개시내용의 대체 요소 또는 실시양태의 분류는 본 발명에 대한 제한으로 해석되지 않아야 한다. 각각의 군의 구성원은 개별적으로 또는 군의 다른 구성원 또는 본원에서 발견되는 다른 요소와 임의의 조합으로 언급되거나 특허청구될 수 있다. 편의성 및/또는 특허성을 이유로 한 군의 하나 이상의 구성원이 군에 포함되거나 군에서 삭제될 수 있다. 이러한 임의의 포함 또는 삭제가 발생하는 경우, 명세서는 수정된 군을 포함하고, 따라서 첨부된 청구범위에서 사용되는 모든 마커쉬 (Markush) 군의 기재된 설명을 충족하는 것으로 간주된다.

[0166] 본 개시내용을 수행하기 위해 본 발명자들에게 알려진 최선의 방식을 비롯하여, 본 개시내용의 특정 실시양태가 본원에서 설명된다. 물론, 이들에 대한 변형은 상기한 설명을 읽음으로써 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 명백해질 것이다. 본 발명자들은 통상의 기술자가 그러한 변형을 적절하게 사용할 것을 기대하고, 본 발명자들은 본 개시내용이 본원에서 구체적으로 설명된 것 이외의 다른 방식으로 실시되는 것을 의도한다. 따라서, 본 개시내용은 적용가능한 법률에 의해 허용되는 바와 같이 본원에 첨부된 청구범위에서 언급되는 주제의 모든 변형 및 동등물을 포함한다. 또한, 본원에서 달리 나타내거나 또는 문맥에 의해 명확하게 모순되지 않는 한, 그의 모든 가능한 변형에서 상기 언급된 요소의 임의의 조합이 본 개시내용에 포함된다.

[0167] 본원에 개시된 특정 실시양태는 "로 이루어지는" 및 "로 본질적으로 이루어지는" 이라는 용어를 사용하여 청구범위에서 추가로 제한될 수 있다. 청구범위에서 사용되는 경우, 최초 출원되었든 보정에 의해 추가되었든 상관없이, "로 이루어지는"이라는 전환 용어는 청구범위에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. "로 본질적으로 이루어지는"이라는 전환 용어는 청구범위를 특정된 물질 또는 단계 및 기본적인 및 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것으로 제한한다. 특허청구된 개시내용의 실시양태는 본원에서 본질적으로 또는 명시적으로 설명되고, 실행가능하다.

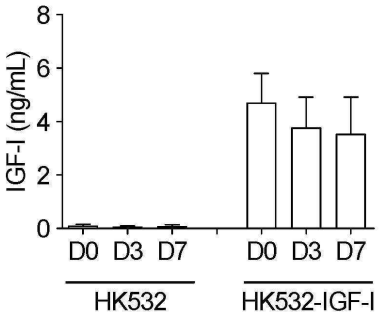
[0168] 본원에서 개시된 개시내용의 실시양태는 본 개시내용의 원리를 예시하는 것임을 이해하여야 한다. 사용될 수 있는 다른 변형은 본 개시내용의 범위 내에 있다. 따라서, 제한이 아닌 예로서, 본원의 교시내용에 따라 본 개시내용의 다른 구성이 이용될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 정확하게 제시되고 설명된 것으로 제한되지 않는다.

[0169] 본 개시내용은 다양한 구체적인 물질, 절차 및 실시예를 참고로 하여 본원에서 설명되고 예시되었지만, 본 발명은 그 목적을 위해 선택된 물질 및 절차의 특정 조합으로 제한되지 않는다고 이해된다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 세부 사항의 많은 변형이 포함될 수 있다. 명세서 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 고려되어고, 본 개시내용의 진정한 범위 및 사상은 하기 청구범위에 의해 표시되는 것이 의도된다. 본원에서 언급된 모든 참고문헌, 특허 및 특허 출원은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

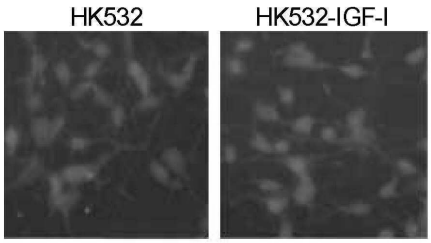
도면

도면1

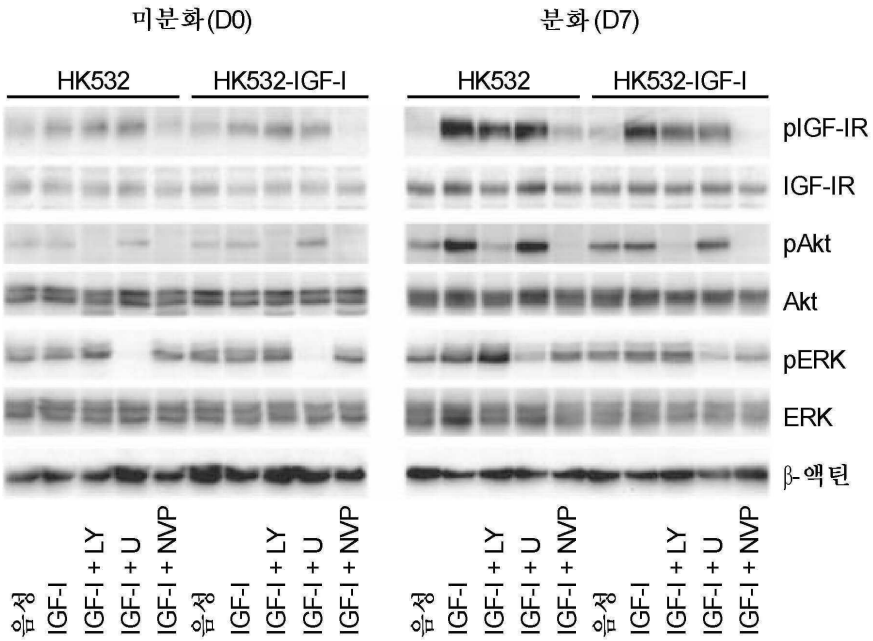
도 1a



도 1b

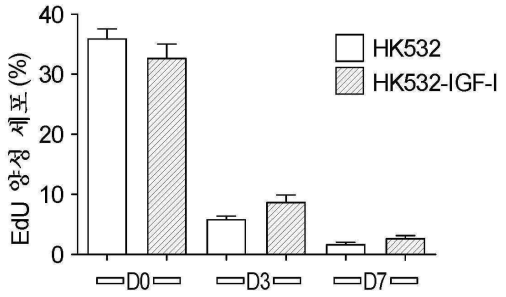


도 1c

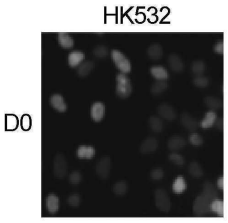


도면2

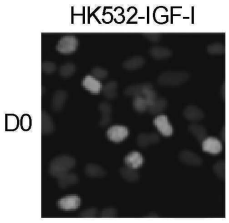
도 2a



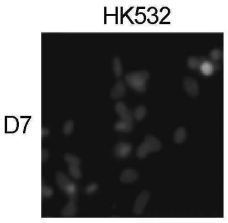
도 2b



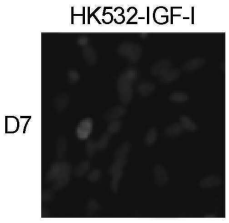
도 2c



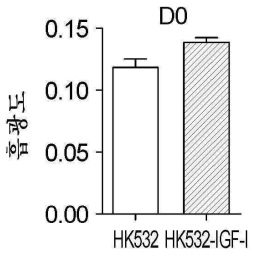
도 2d



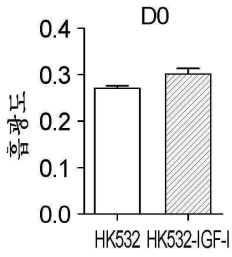
도 2e



도 2f



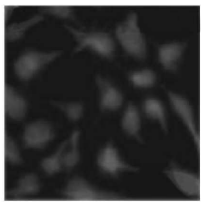
도 2g



도면3

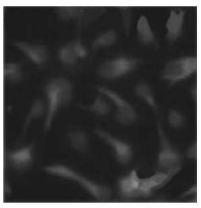
도 3a

HK532

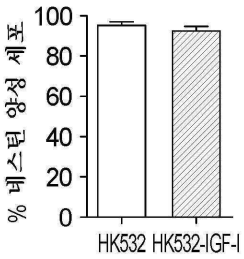


도 3b

HK532-IGF-I

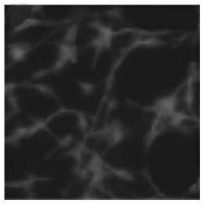


도 3c



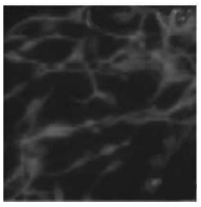
도 3d

HK532

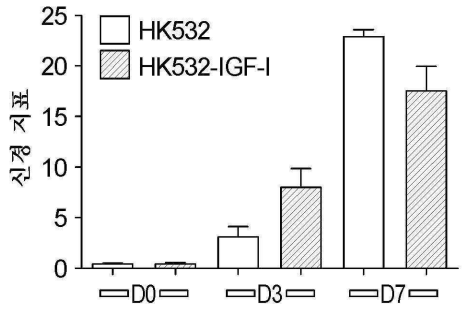


도 3e

HK532-IGF-I

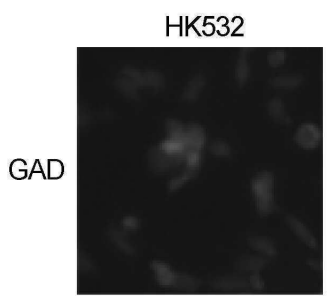


도 3f

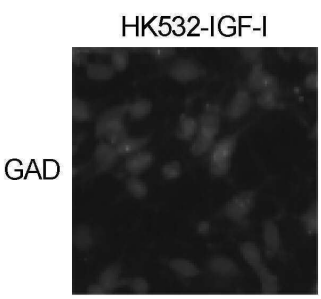


도면4

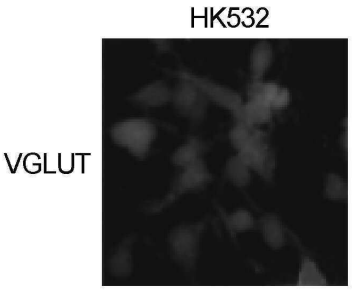
도 4a



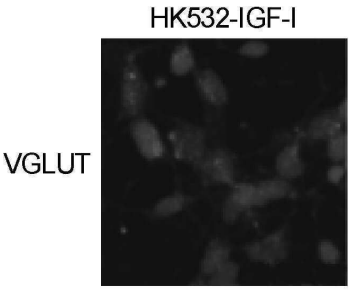
도 4b



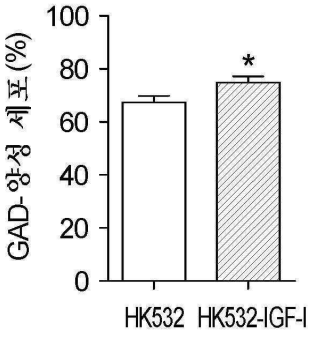
도 4c



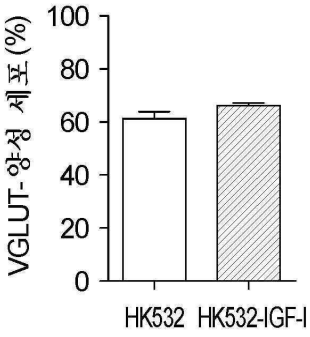
도 4d



도 4e

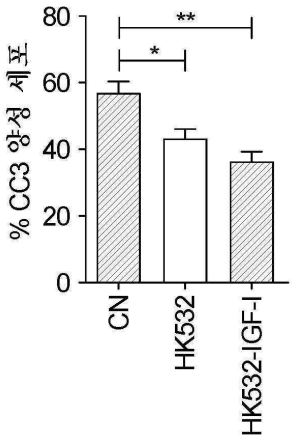


도 4f



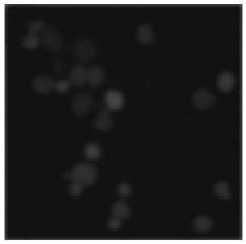
도면5i

도 5a



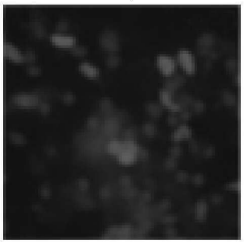
도 5b

대조군



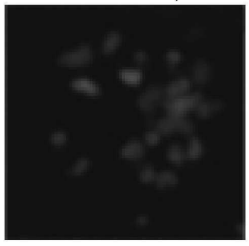
도 5c

+Aβ



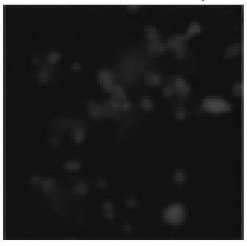
도 5d

HK532+Aβ



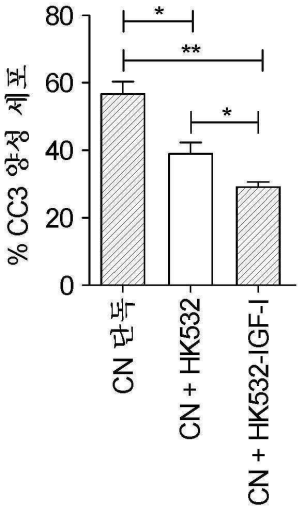
도 5e

HK532-IGF-I+Aβ

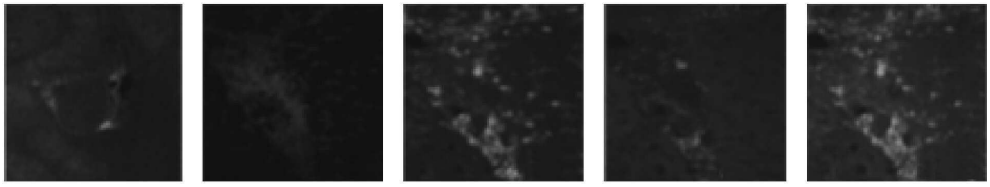


도면5ii

도 5f



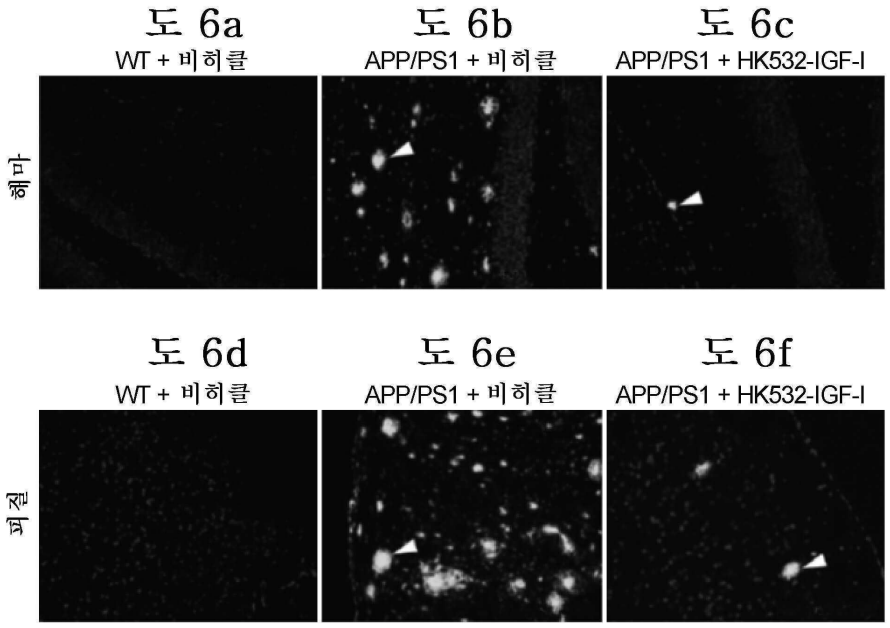
도 5g

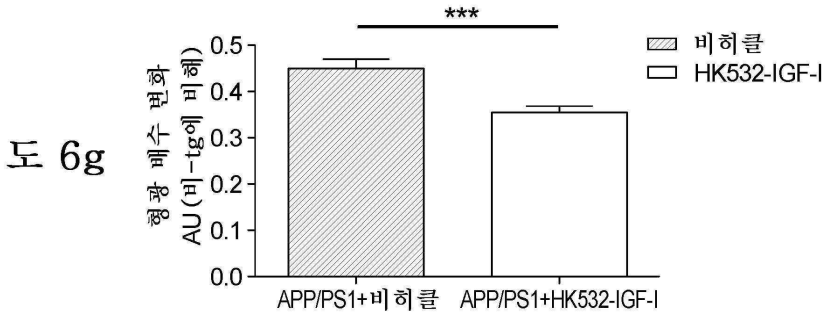


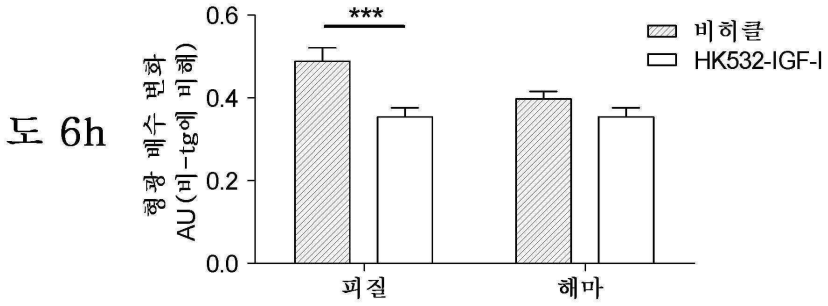
도 5h



도면6

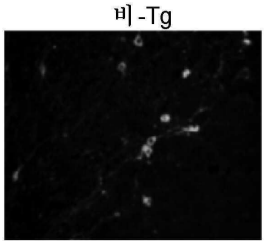

도 6a
WT + 비히클
도 6b
APP/PS1 + 비히클
도 6c
APP/PS1 + HK532-IGF-I
해마
도 6d
WT + 비히클
도 6e
APP/PS1 + 비히클
도 6f
APP/PS1 + HK532-IGF-I
피질


도 6g
***
비히클
HK532-IGF-I
형광 배수 변화
AU(비-tg에 비해)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
APP/PS1+비히클
APP/PS1+HK532-IGF-I

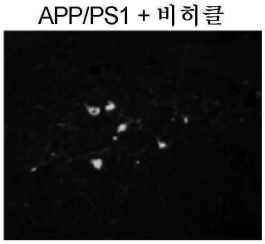

도 6h
***
비히클
HK532-IGF-I
형광 배수 변화
AU(비-tg에 비해)
0.6
0.4
0.2
0.0
피질
해마

도면7

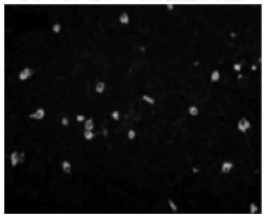
도 7a



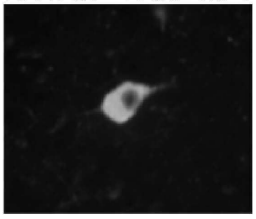
도 7b



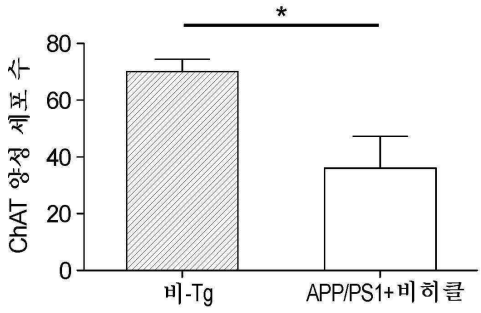
도 7c



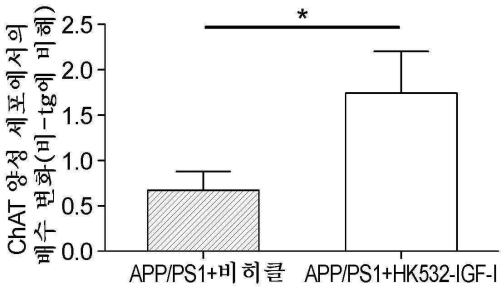
도 7d



도 7e

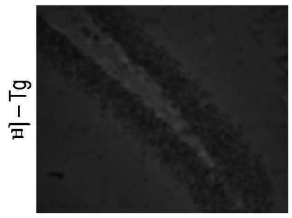


도 7f

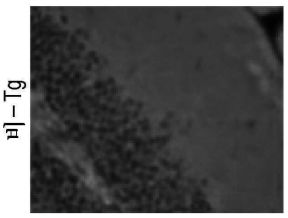


도면8

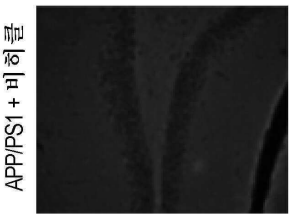
도 8a



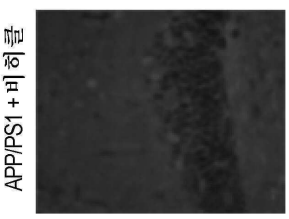
도 8d



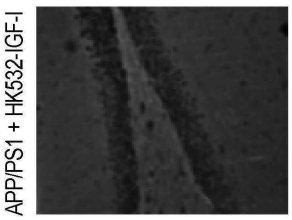
도 8b



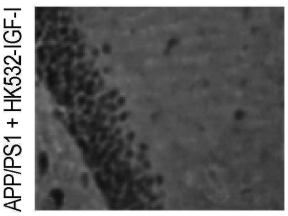
도 8e



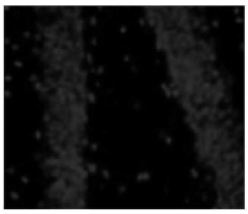
도 8c



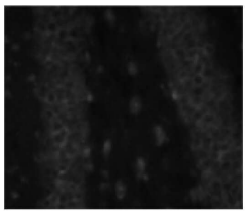
도 8f



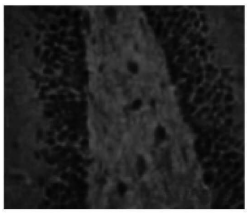
도 8g



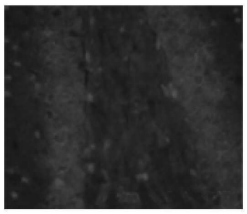
도 8h



도 8i

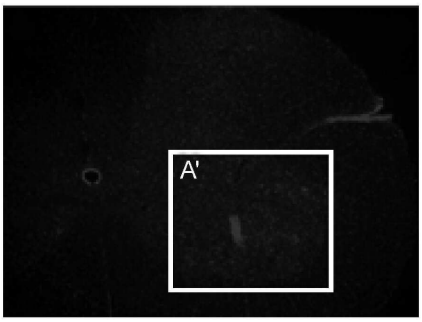


도 8j

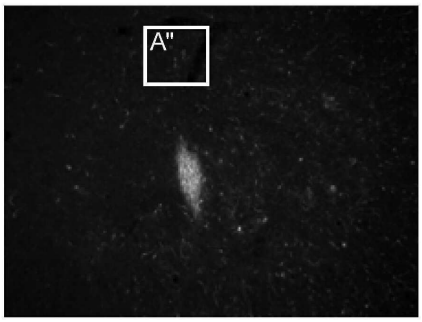


도면9

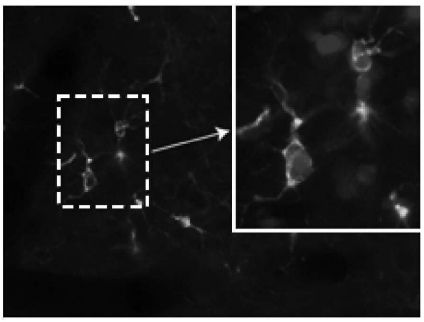
도 9a



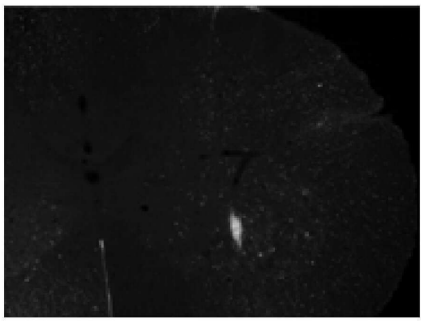
도 9A'



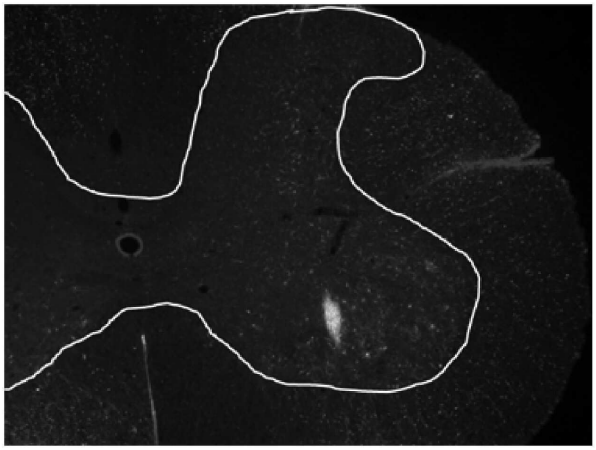
도 9A"



도 9b



도 9c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Neuralstem, Inc.

<120> STABLE NEURAL STEM CELLS COMPRISING AN EXOGENOUS POLYNUCLEOTIDE CODING FOR A GROWTH FACTOR AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 3708869.00181US

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 477

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized: IGF-1 isoform 4 cDNA

<400> 1

atgggaaaaa tcagcagtct tccaacccaa ttatttaagt gctgcttttg tgatttcttg 60

aaggtgaaga tgcacaccat gtcctcctcg catctcttct acctggcgct gtgcctgctc 120

accttcacca gctctgccac ggctggaccg gagacgctct gcggggctga gctggtggat 180

gctcttcagt tcgtgtgtgg agacaggggc ttttatttca acaagcccac agggtatggc 240

tccagcagtc ggagggcgcc tcagacaggc atcgtggatg agtgctgctt ccggagctgt 300

gatctaagga ggctggagat gtattgcgca cccctcaagc ctgccaagtc agctcgctct 360

gtccgtgccc agcgccacac cgacatgccc aagacccaga agtatcagcc cccatctacc 420

aacaagaaca cgaagtctca gagaaggaaa ggaagtacat ttgaagaacg caagtag 477

<210> 2

<211> 158

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized: IGF-1 isoform 4 protein

<400> 2

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe
1 5 10 15

Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu
20 25 30

Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala
35 40 45

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

50 55 60

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
65 70 75 80

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys

85 90 95

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu

100 105 110

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp

115 120 125

Met Pro Lys Thr Gln Lys Tyr Gln Pro Pro Ser Thr Asn Lys Asn Thr

130 135 140

Lys Ser Gln Arg Arg Lys Gly Ser Thr Phe Glu Glu Arg Lys

145 150 155

<210> 3

<211> 1217

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized: human ubiquitin C promoter

<400> 3

gatctggcct ccgcgccggg ttttggcgcc tcccgcgggc gccccctcc tcacggcgag 60

cgctgccacg tcagacgaag ggcgcagcga gcgtcctgat ccttccgccc ggacgctcag 120

gacagcggcc cgctgctcat aagactcggc cttagaaccc cagtatcagc agaaggacat 180

tttaggacgg gacttgggtg actctagggc actggttttc tttccagaga gcggaacagg 240

cgaggaaaag tagtcccttc tcggcgattc tgcggaggga tctccgtggg gcggtgaacg 300

ccgatgatta tataaggacg cgccgggtgt ggcacagcta gttccgtcgc agccgggatt 360

tgggtcgcgg ttcttgtttg tggatcgctg tgatcgtcac ttggtgagta gcgggctgct 420

gggctggccg gggctttcgt ggccgccggg ccgctcggtg ggacggaagc gtgtggagag 480

accgccaagg gctgtagtct gggtccgcga gcaaggttgc cctgaactgg gggttggggg 540

gagcgcagca aaatggcggc tgttcccgag tcttgaatgg aagacgcttg tgaggcgggc 600

tgtgaggtcg ttgaaacaag gtgggggggca tggtgggcgg caagaaccca aggtcttgag 660

gccttcgcta atgcgggaaa gctcttattc gggtgagatg ggctggggca ccatctgggg 720

accctgacgt gaagtttgtc actgactgga gaactcgggt ttgtcgtctg gttgcggggg 780

cggcagttat gcggtgccgt tgggcagtgc acccgtacct ttgggagcgc gcgcctcgtc 840

gtgtcgtgac gtcacccgtt ctgttggctt ataatgcagg gtggggccac ctgccggtag 900

gtgtgcggta ggcttttctc cgtcgcagga cgcagggttc gggcctaggg taggctctcc 960

tgaatcgaca ggcgccggac ctctggtgag gggagggata agtgaggcgt cagtttcttt 1020

ggtcggtttt atgtacctat cttcttaagt agctgaagct ccggttttga actatgcgct 1080

cggggttggc gagtgtgttt tgtgaagttt tttaggcacc ttttgaaatg taatcatttg 1140

ggtcaatatg taattttcag tgttagacta gtaaattgtc cgctaaattc tggccgtttt 1200

tggctttttt gttagac 1217