



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월25일
 (11) 등록번호 10-1247037
 (24) 등록일자 2013년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) **C12N 5/07** (2010.01)
 (21) 출원번호 10-2003-7016718
 (22) 출원일자(국제) 2002년06월20일
 심사청구일자 2007년05월16일
 (85) 번역문제출일자 2003년12월20일
 (65) 공개번호 10-2004-0044415
 (43) 공개일자 2004년05월28일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2002/019477
 (87) 국제공개번호 WO 2003/000868
 국제공개일자 2003년01월03일
 (30) 우선권주장
 09/888,309 2001년06월21일 미국(US)
 10/157,288 2002년05월28일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 Neron, 2000, 제28권, 제31-40면.*
 Exp. Nerons, 1998, 제149권, 제411-423면.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
제론 코포레이션
 미국 캘리포니아주 멘로 파크 콘스티튜션 드라이브 230
 (72) 발명자
카펜터멜리사케이
 미국94552
 캘리포니아주카스트로밸리엠티우드서클20750
덴햄제로드제이
 미국94102캘리포니아주샌프란시스코옥타비아스트리트331넘버8
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **파킨슨씨 병 치료를 위한 도파민성 신경 및 증식-컴피턴트전구세포**

(57) 요약

본 발명은, 다능 줄기 세포로부터 신경 선조세포 및 분화 뉴런의 집단을 얻을 수 있는 개선된 방법을 제공한다. 본 기술은 상이한 신경 표현형의 다양한 종류로 분화되는 능력을 유지하면서도, 40 회 배가 이상으로 증식하는 선조세포 제조에 사용 가능하다. 도파민성 뉴런의 특성인 타이로신 히드록실라제 염색되는 세포 비율이 높은 세포 집단을 수득하였다. 본 발명의 신경 선조세포 및 말단 분화된 뉴런은, 약물 스크리닝 및 파킨슨씨 병과 같은 임상적으로 중요한 신경 질환의 치료에서의 사용을 위해 다량으로 생성 가능하다.

(72) 발명자

이노쿠마마거릿에스

미국95131캘리포니아주산호세파게이트서클1155

시즈스코트알

미국94566캘리포니아주플레전턴리슬링드라이브1053

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 인간 배아 줄기 세포로부터 배상체를 형성하는 단계;
 - b) 배상체를 플레이팅하는 단계;
 - c) bFGF를 포함하는 배지에서 단계 b)로부터의 배상체를 배양하는 단계; 및
 - d) cAMP 및 아스코르브산을 포함하는 배지에서 단계 c)의 배상체를 배양함으로써 MAP-2 및 티로신 히드록실라제를 발현하는 세포를 포함하는 세포 집단을 수득하는 단계
- 를 포함하는, 인간 배아 줄기 세포주로부터 시험관 내에서 분화된, 영양주가 없는 (feeder-free) 세포 집단을 수득하는 방법으로서,

상기 분화된 세포 집단이 MAP-2 및 티로신 히드록실라제를 발현하는 세포를 포함하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

하기를 포함하는, 신경 세포 또는 신경 세포 활성화에 대한 화합물의 효과를 스크리닝하는 방법:

- a) 제 1 항의 방법에 의해 수득된 분화된 세포 집단과 화합물을 조합하고;
- b) 화합물과 조합하여 수득한 세포 집단 중 세포의 표현형 또는 활성의 임의의 변화를 측정하고; 그리고

c) 상기 변화를, 신경 세포 또는 신경 세포 활성화에 대한 화합물의 효과와 연결지음.

청구항 13

삭제

청구항 14

제 1 항에 있어서, 단계 c)에서의 배지가 BDNF 및 NT-3을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 단계 c)에서의 배지가 FGF8 및 음향 헤지호그 (SHH)를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 16

하기 단계를 포함하는, 인간 배아 줄기 세포를 MAP-2 및 티로신 히드록실라제를 발현하는 세포로 분화시키는 방법:

- a) 인간 배아 줄기 세포로부터 배상체를 형성하는 단계;
- b) 배상체를 플레이팅하는 단계;
- c) bFGF, EGF, PDGF 및 IGF를 포함하는 배지내에서 단계 b)로부터의 배상체를 배양하는 단계;
- d) 1) EPO, 2) cAMP, 또는 3) EPO 및 cAMP 중 어느 하나, 및 bFGF, EGF, PDGF 및 IGF를 포함하는 배지내에서 단계 c)로부터의 배상체를 배양하는 단계; 및
- e) BDNF, NT-3, EPO, cAMP 및 아스코르브산을 포함하는 배지내에서 단계 d)로부터의 배상체를 배양함으로써 MAP-2 및 티로신 히드록실라제를 발현하는 세포를 수득하는 단계.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 US 실용 특허 출원 09/888,309 (2001년 6월 21일 출원) 및 10/157,288 (2002년 5월 28일 출원)에 대해 우선권을 주장한다. US 및 다른 관할 지역에서의 수행을 목적으로, 두 우선권 출원이 국제 특허 공개 WO 01/51616 및 WO 01/88104와 함께 참고로 본원에 그 전체로서 통합된다.

배경기술

[0002] 인간 투여에 적합한 세포주의 유도 및 확장에 대한 새로운 연구는 새로운 세계 의학 치료에 진입의 안내를 약속한다. 지독하고 예전에 치료하기 어려웠던 질병 상태도 과학이 신경 세포 생물학 및 신경 전구세포에 있어서의 중요하고 새로운 발견들을 지속적으로 이용하는 한 재생 의학의 가능성에 굴복할 것이다.

[0003] 치료상 개선이 필요한 질병 상태중에 신경학적 기능장애에 관한 것들이 있다. 리스트상의 상단 부분에는, 자발적이며, 완만한 진행성이며, 중추신경계의 퇴행성 질환으로서, 느리고 감소된 운동성, 근육 경축, 안정시 떨림, 및 자세 불안정성으로 특징지어지는 파킨슨씨 병이 있다. 그 증상은 흑색질, 청색반점 및 신경전달물질 도파민의 결핍을 야기하는 다른 뇌 줄기 도파민 세포에서의 염색된 신경의 진행성 퇴행의 결과로 일어난다. 파킨슨씨 병은 40대 이상의 0.4% 및 65세 이상의 1%가 걸리는 중년에서 4번째로 널리 퍼진 신경 퇴행성 질환이다. 발병 연령에 상관 없이, 이 질환은 종종 고통받는 사람에게 대해 지독한 결과를 수반한다.

[0004] 신경계 질환을 그렇게 다루기 어렵게 하는 것은 손상의 비가역성이 종종 유지되는 것이다. 상기 상태에 대한 주요한 희망은 신경망을 재구성하고, 신경계의 기능을 정렬된 상태로 되돌릴 수 있는 세포 집단을 개발하는 것이다. 일회성증거는 태아의 도파민성 신경의 이식이 파킨슨씨 병에서 화학적 이상을 돌려놓을 수 있음을 보여준다. 그러나, 적합한 조직이 매우 부족하다.

[0005] 이러한 이유로, 신경 선조세포에 대한 막대한 관심이 증가하고 있다. 다양한 종류의 계통 제한 전구세포가 그들 스스로 재생되며 그리고 중추신경계의 선택된 위치에 존재한다 (Kalyani 등, Biochem. Cell Biol. 6:1051, 1998). 잠정 신경 제한 전구체 세포는 신경 세포 접착 분자 (PS-NCAM)의 폴리시알화 이소폼 (isoform)을 발현한다 (Mayer Proschel 등, Neuron 19: 773, 1997). 그들은 보도에 따르면 신경교세포를 제외한 다양한 종류의 신경을 생성하는 능력을 갖는다. 반면, 잠정 신경교세포 제한 전구체는 신경이 아닌 신경교세포를 형성하는 능력을 갖는 것으로 보인다 (Rao 등, Dev. Biol. 188: 48, 1997). 태아 또는 성인 조직의 잠정 신경 전구체는 US 특허 5,852,832; 5,654,183; 5,849,553 및 5,968,829 및 WO 99/01159 에 더욱 개시되어 있다.

[0006] 불행히도, 신경 조직에서 분리된 선조세포들은 인간 임상 치료에 필요한 세포수를 생산할 수 있는 충분한 복제 능력을 갖고 있음이 확인되어지지 않았었다.

[0007] 또 다른 공급원은 초기 배아 조직에서 분리된 다능성 세포이다. 배아 줄기 (ES) 세포는 25년 전에 마우스 배아에서 최초 분리되었다 (G.R. Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:7634, 1981). ES 세포는 실질적으로 동일한 종의 임의의 조직 형태의 자손으로 변화할 수 있는 것으로 믿어진다. Li, Smith 등 (Cur. Biol. 8: 971, 1998)은 계통 선별에 의한 마우스 ES 세포에서 신경 전구체의 생성을 보고하였다. Bjorklund 등은 마우스 ES 세포에서 기능성 도파민성 신경의 생산을 보고 하였다 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 19:2344, 2002).

[0008] 인간 ES 세포는 더욱 최근에 분리하였다 (Thomson 등, Science 282: 114, 1998). 인간 ES 세포는 그들을 미분화 상태로 유지하거나 그들을 특정 분화 경로로 이끄는데 매우 다른 조건을 요구한다 (US 특허 6,090,622 & 6,200,806; 호주 특허 AU 729377, 및 PCT 공개 WO 01/51616). 이 이유로 인해, 인간 ES 세포로부터 상대적으로 동일한 세포 집단을 준비하는 방법에 대하여 약간만이 알려져있을 뿐이다.

[0009] PCT 공개 WO 01/88104 (Carpenter, Geron Corporation)은 인간 ES 세포를 분화시킴으로서 수득되는 신경 선조 세포 집단을 개시하였다. 90 % 초과 NCAM 양성, 35 % β-튜불린 양성 및 75 % A2B5 양성의 집단이 수득되었다. Zhang 등 (Nature Biotech. 19: 1129, 2001)은 이어서 인간 ES 세포에서 신경 전구체의 분화를 보고하였다.

[0010] 특정 임상 조건의 치료에서의 사용을 위해 더욱 최적화된 신경 세포의 집단을 제조하기 위한 기술에 대해 강한 필요가 존재한다.

발명의 상세한 설명

[0011] 본 발명은 다능성 세포로부터 신경 계통의 세포로 분화된 영양류 세포의 효율적 생산을 위한 시스템을 제공한다. 본 발명의 전구체 및 말단 분화된 세포는 신경계 기능의 회복을 위한 약물 테스트 및 약제의 생산을 포함하여, 수많은 중요한 응용에서 사용될 수 있다.

[0012] 본 발명의 한 면은 신경 세포 및 그 전구체와 같은 신경 계통의 특징을 갖는 세포의 높은 비율을 포함하는 세포의 집단이다. 세포들은 A2B5, NCAM, MAP-2, 네스틴, β-튜불린 III 및 기타 본 명세에 후에 기재되는 것과 같은 표현형 마커 및 특징적인 형태학적 및 기능적 기준으로 확인될 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 면은 신경 표현형을 갖는 세포로 분화되는 (또는 재프로그래밍되는) 능력을 갖는 태아 또는 성인 조직 유래의 배아 줄기 세포, 배아 배 세포, 일차 배아 조직 또는 줄기세포와 같은 다능성 세포로부터 신경 세포를 포함하는 세포 집단을 만드는 방법이다. 상기 방법은 세포를 특정 목적 특질을 갖는 신경 세포로의 성장을 유도하는 가용성 인자 및 환경 조건의 조합으로 배양하는 것을 포함한다. 본 발명은 후보 인자들을 기능에 따라 그룹짓고, 줄기 세포 또는 그 자손을 다양한 배양의 인자 군과 함께 배양하는, 다능성 줄기 세포를 신경 세포로 분화하는 분화 프로토콜을 최적화하는 전략을 포함한다. 목적 세포 타입을 생산하는 중요한 그룹을 동정하고, 그 후 각 그룹의 개별적 구성요소들을 하나 하나 제거함으로써 요구되는 최소 조성을 결정한다.

[0014] 예로서, 다능성 줄기 세포를 노긴 (noggin) 및 폴리스타틴 (follistatin)과 같은 하나 이상의 첨가된 TGF-β 슈퍼 패밀리 안타고니스트의 존재 하에서 고체 표면상에서의 직접 분화에 의해 생산할 수 있다. 다른 방법으로, 다능성 줄기세포를 덩어리 (cluster) 또는 배상체로 배양할 수 있다. 다양한 정도의 성숙도의 신경 세포의 증식은 첨가된 마이트젠 또는 성장인자 (EGF 및 FGF와 같은)를 포함하는 배양액에서 배양 및, 이와 동시 또는 그후 다양한 최적화된 조합에 따라 뉴로트로핀 (NT-3 또는 BDNF와 같은) 및 다른 인자 (EPO와 같은)의 첨가를 포함한다. 특정 환경에서 유용한 분화 인자의 리스트가 하기의 상세한 설명 및 실시예에 나열된다. 임의적으로, 당업자는 세포의 증식을 더욱 촉진하는 물리적 분리 기술 또는 조작 기술을 사용할 수 있다.

[0015] 본 발명에 따라 제조되는 성숙한 뉴런 (neuron) 및 그 전구체는 세포 집단의 자손 또는 그들이 유래된 확립된 세포주로 특정될 수 있다. 이는 신경 세포의 계능이 본질적으로 부모 집단의 것과 동일하다는 것을 표준 DNA 핑거 프린팅과 같은 몇몇의 적당한 기술에 의해 입증함으로써 증명될 수 있다. 다른 방법으로, 그 관계는 신경 세포의 유도 동안 유지된 기록의 리뷰를 통해 확립될 수 있다. 신경 세포가 부모 세포 집단에서 유래되었다는 특징은 몇가지 면에서 중요하다. 특히, 미분화 세포 집단이 신경 동종 이식의 조직적합 형에서 환자를 미리 면역관용 (pretolerize) 할 수 있는 집단과 같은 공유된 계능 (신경 세포의 또 다른 배치 또는 치료에 사용될 수 있는 다른 세포 타입)을 갖는 추가적 세포의 생산에 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명의 한 구현예에서, 신경 세포는 신경 전구세포로 분화된 상기한 인간 다능성 세포로부터 제조되며, 그후 계대 배양된다. 배아 줄기 세포를 기원 세포 타입으로 사용하는 것은, 마이트젠의 부재중 뉴로트로핀으로 배양할 때 또는 적당한 대상에 투여할 때에 작용하는 뉴런으로의 말단 분화를 거치는 완전한 능력을 유지하면서도 빠르게 팽창하는 집단의 생성을 촉진한다. 특정 전구세포 집단은 추가 분화시 고 증식된 뉴런의 집단을 형성하는 그 능력을 상실하지 않고도 배양액에서 적어도 ~10, 20 또는 40 회 세포수 배가 (doubling) 를 수행하는 능력을 갖는다. 사용된 조건에 따라, 높은 비율의 타이로신 히드록실라제 양성 세포로 분화되는 능력을 갖는 전구체 집단이 생성될 수 있다. 이 표현형은 파킨슨씨 병의 치료에 요망되는 도파민성 신경과

일치한다.

- [0017] 본 발명의 세포는 신경 세포 독성, 신경 세포의 기능을 조절하는 능력, 또는 뉴런의 유도 및 증식을 보조하는 화합물의 능력을 스크리닝하는데 사용될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 세포는 본 발명의 분리된 세포 또는 세포 집단이 투여된 개체에서, 상기 개체의 신경계의 기능을 재구성하거나 보충하기 위해 사용될 수 있다. 본 목적을 위하여, 분리된 세포 및 세포 집단은 신경계에 영향을 미치는 질환을 치료하는데 사용되는 약제로서 제형화된다.
- [0019] 본 발명의 이들 또는 다른 구현예들은 하기의 상세한 설명에서 명확해질 것이다.

실시예

[0104] 실시예 1: 성숙 뉴런으로의 배아 줄기 세포의 분화

[0105] 인간 배아 줄기 (hES) 세포를 영양자 (feeder)가 없는 배양액으로부터 수득하였다 (AU 729377, WO 01/51516에 기재된 바 참조). 배상체를 하기와 같이 제조하였다. hES 세포의 콘플루언트 단층 배양물을, 1mg/mL 콜라게나아제 중에서 5-20 분 동안 인큐베이션 후, 세포를 플레이트에서 긁어 냄으로써 채집하였다. 이어서 상기 세포를 덩어리로 분리시켜, 비부착성 세포 배양 플레이트 (Costar) 중에 80% KO ("낙아웃") DMEM (Gibco) 및 20% 열불활성화되지 않은 FBS (Hyclone) 로 구성되고, 1% 비필수 아미노산, 1 mM 글루타민, 0.1mM β-머캅토에탄올로 보충된 배양액 중에 플레이팅하였다. 상기 세포를 웰 (6 웰 플레이트) 당 2mL 배양액 중에 1:1 또는 1:2 비로 접종하였다.

[0106] 현탁 4 일 후, 10ng/ml 인간 EGF, 10ng/ml 인간 bFGF, 1ng/ml 인간 PDGF-AA, 및 1ng/ml 인간 IGF-1으로 보충된 결정된 배양액에서, 피브로넥틴 코팅된 플레이트에 배상체를 플레이팅하였다. 배상체는 플레이트에 부착하여, 세포는 플라스틱으로 이동 시작하여 단층을 형성하였다.

[0107] 3일 후, 신경 형태를 가지는 많은 세포가 관측되었다. 신경 전구세포는, BrdU 혼입, 네스틴 염색 양성 및, 세포주 특이성 분화 마커의 결핍인 세포로서 확인되었다. 추정 신경 및 교신조 세포는, 폴리시알화 NCAM 및 A2B5에 대한 양성으로 확인되었다. 41 내지 60%의 세포가 NCAM을 발현하였고, 20-66%는 A2B5를 발현하였으며, 이는 플로우 사이토메트리로 측정하였다. NCAM 양성인 하위군 세포는 β-튜불린 III 및 MAP-2를 발현하는 것으로 밝혀졌다. GFAP 또는 GalC와 같은 교세포 마커와의 공존은 관측되지 않았다. A2B5 양성 세포는 신경 및 교세포 모두를 생성하는 것으로 보였다. A2B5 세포의 하위군은, β-튜불린 III 또는 MAP-2를 발현하고, 별도의 일부군은 GFAP를 발현하였다. 신경 형태를 가지는 일부 세포는, NCAM 및 A2B5 모두에 이중 염색되었다. NCAM 양성 및 A2B5 양성군 모두는 교세포 보다 뉴런을 훨씬 더 함유하였다.

[0108] 세포 집단을, 마이토젠이 전혀 없으나, 10ng/ml 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 10ng/ml 뇌 유도 신경영양 인자 (BDNF)를 함유하는 배양액에 세포를 재플레이팅 하여 추가로 분화시켰다. 광대한 돌기를 가진 뉴런이 약 7일 후 관측되었다. 레틴산 (RA)에 유지시킨 배상체의 배양액은, 레틴산이 없이 유지된 세포 (~5%) 에 비해 보다 많은 MAP-2 양성 세포를 나타내었다 (~26%). GFAP 양성인 세포가 패치 내에서 관측되었다. GalC 양성 세포가 확인되었으나, 세포는 크고 평평하여, 복잡한 돌기를 가지지 않았다.

[0109] 신경전달물질 합성의 존재를 평가하였다. GABA-면역반응성 세포는, β-튜불린 III 및 MAP-2를 공발현하고, 신경세포의 형태 특성을 가지는 것으로 확인되었다. 신경 마커를 공발현하지 않으나, 정상세포와 같은 형태를 가지는 GABA 양성 세포가 가끔 확인 되었다. 신경세포는, 타이로신 히드록실라제 (TH) 및 MAP-2 모두를 발현하는 것으로 확인되었다. 시냅스 형성은, 시냅토피신 항체로 염색하여 확인하였다.

[0110] TH 염색은, 인간 ES 세포의 H9 세포주로부터 분화된 배양액에서 관측되었다. 배상체를 4일간 10 μM의 레틴산에 유지하고, 이후, EGF, 염기성 FGF, PDGF, 및 IGF 내의 피브로넥틴 코팅된 플레이트에 3일간 플레이팅하였다. 이를 10ng/ml NT-3 및 10ng/ml BDNF 가 보충된 N2 배양액 내에서의 라미닌 상에 이후 계대시켜, 14일간 추가로 분화하게 한다. 분화된 세포는 실온에서 20분간 파라포름알데히드 4%로 고정하여, 도파민 세포에 대한 마커인 TH 에 대한 항체를 사용하여 가시화하였다.

[0111] 실시예 2: 도파민성 세포의 풍부한 세포 집단

[0112] 배상체를 10 μM 레틴산을 함유한 현탁액에서 4일 동안 배양한 후, EGF, bFGF, PDGF, 및 IGF-1으로 보충된 단순 배양액에서 3-4 일 동안 플레이팅하였다. 이어서 세포를 자성 비드 분류 또는 면역판닝에 의해 A2B5-양성 또는 NCAM-양성 농축 집단으로 분리하였다.

- [0113] 면역학적으로 선택된 세포를 10 ng/mL NT-3 및 10 ng/mL BDNF 로 보충된 단순 배양액에서 유지하였다. 14일 후에, NCAM-분류된 세포의 25 ±4% 는 MAP-2 양성이었고, 이 중에서 1.9 ±0.8%는 GABA-양성이고, 3 ±1%는 도파민 합성의 율속단계 효소이며, 일반적으로 도파민-합성 세포의 대표적인 것으로 고려되는 타이로신 히드록실라제 (TH) 양성이었다.
- [0114] NCAM 에 대해 분류된 세포 집단에서, NCAM 양성인 세포는 GFAP 또는 GalC와 같은 신경교 마커를 발현하지 않았다. 상기 데이터는 뉴런 제한 전구세포를 함유하는 집단이 hES 세포 배양물로부터 직접 분리될 수 있고, 신경교 전구세포로 본질적으로 오염되지 않았다는 것을 나타낸다.
- [0115] 그와는 반대로, A2B5에 대해 분류된 세포는 뉴런 및 성상교세포 양자를 생성하는 능력을 가진다. 농축 후에, 세포를 NT-3 및 BDNF로 보충된 단순 배양액내로 위치하고, 14일 동안 분화하도록 하였다. 플레이팅 후 처음 1-2 일 내에, A2B5 농축된 집단내의 세포는 돌기들을 확장하기 시작했다. 2주 후에, 세포는 성숙 뉴런의 형태를 취하였고, 세포의 32 ±3% 는 MAP-2 양성이었다. 중요하게, MAP-2 세포의 3 ±1% 는 TH-양성인 반면, 단지 0.6 ±0.3% 가 GABA 면역반응성이었다. 상기 데이터는 세포 집단이 도파민을 합성하는 것을 포함한, 성상교세포 및 뉴런 양자에 대한 선조세포를 포함하는 hES 세포로부터 수득될 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0116] TH를 발현하는 뉴런을 수득하기 위한 조건의 추가의 상세한 것은 하기와 같이 수행하였다. 배상체를 1 mg/mL 콜라게나아제 (37°C, 5-20분)에서 인큐베이션하고, 접시를 긁어내고, 세포를 비부착성 배양 플레이트 (Costar®)에 위치함으로써 계대 32에서 H7 세포주의 콘플루언트 hES 세포로부터 생성시켰다. 생성된 EB를 FBS 및 10 μM 모두-트랜스 레틴산을 함유하는 배양액의 현탁액에서 배양하였다. 4일 후에, 집합체를 수합하고, 원심분리 튜브에서 가라앉게 하였다. 이어서 상층액을 흡입하고, 집합체를 증식 배양액 (N2, 1/2 농도 B27, 10 ng/mL EGF (R & D Systems), 10 ng/mL bFGF (Gibco), 1 ng/mL PDGF-AA (R & D Systems), 및 1 ng/mL IGF-1 (R & D Systems)로 보충된 DMEM/F12 1:1)의 폴리 L-라이신 및 피브로넥틴 코팅된 플레이트상에서 플레이팅하였다.
- [0117] EB를 3일 동안 부착하여 증식하도록 한 후; 약 1분간 트립신 (Sigma) 처리하여 수합하고 1일 동안 증식 배양액에서 폴리 L-라이신 및 라미닌 코팅된 4-웰 체임버 슬라이드상에서 1.5×10^5 세포/웰로 플레이팅하였다. 이어서 배양액을 B27 및 하기 성장 각테일 중의 하나로 보충된 신경 기초 (Neural Basal) 배양액으로 교환하였다:
- [0118] - 10 ng/mL bFGF (Gibco), 10 ng/mL BDNF, 및 10 ng/mL NT-3
- [0119] - 10 ng/mL bFGF, 5000 ng/mL 음향 헤지호그, 및 100 ng/mL FGF8b
- [0120] - 10 ng/mL bFGF 단독.
- [0121] 2일 간격으로 공급하면서, 세포를 상기 조건에서 6일 동안 유지하였다. 7일에, 배양액을 B27, 및 하기 각테일 중의 하나로 보충된 신경 기초 배양액으로 교환하였다:
- [0122] - 10 ng/mL BDNF, 10 ng/mL NT-3
- [0123] - 1 μM cAMP, 200 μM 아스코르브산
- [0124] - 1 μM cAMP, 200 μM 아스코르브산, 10 ng/mL BDNF, 10 ng/mL NT-3.
- [0125] 이들이 면역세포화학을 위해 고정되고, 항-TH 또는 MAP-2로써 표지될 경우 12일 까지 2일 간격으로 배양물에 공급하였다. 마커의 발현을 40 ×대물렌즈를 이용하여 3개의 웰의 각각에서 4 필드를 섀프로써 정량화하였다.
- [0126] 결과를 표 1에서 보여준다. bFGF, BDNF 및 NT-3에서 초기에 배양한 것이 가장 높은 비율의 TH 양성 세포를 수득하였다.

[0127] [표 1]

도파민 뉴런 제조조건			
배양 조건			TH 양성인 MAP-2 세포%
1~6일	6~12일	MAP-2 양성 세포%	
BDNF, NT-3, bFGF	BDNF, NT-3	26 %	5.5 %
BDNF, NT-3, bFGF	cAMP, AA (아스코르브산)	35 %	4.0 %
BDNF, NT-3, bFGF	cAMP, AA, BDNF, NT-3	25 %	8.7 %
bFGF, FGF8, SHH	BDNF, NT-3	37 %	3.7 %
bFGF, FGF8, SHH	cAMP, AA	34 %	3.9 %
bFGF, FGF8, SHH	cAMP, AA, BDNF, NT-3	21 %	5.8 %
bFGF	BDNF, NT-3	28 %	3.5 %
bFGF	cAMP, AA	26 %	4.1 %
bFGF	cAMP, AA, BDNF, NT-3	22 %	5.7 %

[0128] 실시예 3: 에리트로포이에틴과 배양함에 의한 도파민 세포 비율 증가

[0129] 삭제

[0130] 다음 실험에서, 배상체를, 폴리라이신 피브로넥틴 코팅된 웰에 플레이팅하여, 10ng/ml EGF, 1ng/ml PDGF-AA, 10ng/ml bFGF 및 1ng/ml IGF-1과 함께 배양하였다. 4일째, 5U/ml EPO, 700 μM cAMP 또는 모두를 혼합물에 보충하였다. 세포를 재플레이팅하여, 7일간 10ng/ml BDNF, 10ng/ml NT-3 및 임의로 EPO, cAMP, 및 200 μM 아스코르브산으로 처리하였다. 결과를 표 2에 기재하였다. 배양액 중의 총세포 중 MAP-2 양성인 세포의 비율은 본 실험에서 비정상적으로 낮았다.

[0131] [표 2]

도파민 뉴런 제조조건			
배양 조건			TH 양성인 MAP-2 세포% (SD)
1~3일	4~5일	6~12일	
EGF, bFGF, PDGF, IGF-1	EGF, bFGF, PDGF, IGF-1	BDNF, NT-3	20 % (13%)
(동일)	(동일)	BDNF, NT-3, EPO, cAMP, AA	24 % (3%)
(동일)	동일 플러스 EPO	BDNF, NT-3, EPO, cAMP, AA	31 % (13%)
(동일)	동일 플러스 cAMP	BDNF, NT-3, EPO, cAMP, AA	47 % (2%)
(동일)	동일 플러스 EPO & cAMP	BDNF, NT-3, EPO, cAMP, AA	57 % (7%)

[0132] 삭제

[0133] 이러한 결과는, 신경 전구세포의 유도 동안 cAMP 및 EPO를 가하는 것이, 타이로신 히드록실라제를 발현하는, 최후 획득되는 뉴런의 백분율을 증가시킴을 먼저 나타낸다. Studer 등은, EPO 존재 하의 중뇌 선조체의 증식 및 분화 및, 또는 산소의 저분압이 도파민성 뉴런의 수를 증가시킴을 보고하였다 (J. Neurosci. 20: 7377, 2000). EPO는 저산소 조건하에서 신경보호능을 가지고, 다능 선조세포를 신경경로로 유도하는 것으로 생각된다(Shingo 등, J. Neurosci. 21: 9733, 2001). 이러한 효과는, 야누스 키나제-2 및 핵 인자 카파B (NF-κB)의 크로스토크, Bcl-x(L) 발현의 상승조절, 또는 AP-1 (Jun/Fos) 경로의 활성화의 결과일 수 있다. 다른 수단에 의한 pPS 유도된 신경 세포 내의 이들 경로의 조절은, EPO의 효과를 흉내낼 수 있다.

[0134] 실시예 4: hES 세포의 도파민성 뉴런으로의 직접적 분화

[0135] 본 연구는, 배상체의 형성 없이, 인간 ES 세포가 뉴런으로 분화하는 각종 패러다임을 평가하였다.

[0136] 유사성 및/또는 기능 중복성에 따라, 시험 인자를 그룹으로 나누는 계획을 구성하였다 (표 3). 인자의 그룹화는, 그룹내 관련 활성이 ES 세포 집단 상에서 유도되는 가능성을 증가시킨다. 이러한 가설은, 혼합물 내의 일부 인자가 분화 캐스케이드를 개시한다는 것이다. 분화 진행에 따라, 세포의 수용체 발현 프로필이 변화하고, 이는 혼합물 내의 다른 인자에 반응성이 된다.

[0137] 처리 기간 중 계속적으로 인자들의 복합 혼합물을 제공함에 의해, 세포 변화 반응성의 시점과 그 기작을 명확히 규명할 필요가 없어진다. 혼합물이 원하는 분화 과정을 유도하는 것으로 규명되면, 이는 최소의 최적 혼합물 달성을 위해 체계적으로 단순화된다. 추가의 시험 이후, 최소의 처리는 결국, 1, 2, 3, 또는 그 이상의 나열된 인자를 포함하며, 이는 실험상 결정된 방법에 따라 동시 또는 연속으로 사용된다.

[0138] [표 3]

시험 인자 그룹		
그룹 1 뉴로트로핀	그룹 2 마이토젠	그룹 3 줄기 세포 인자
30 ng/mL NGF 30 ng/mL NT-3 30 ng/mL NT-4 30 ng/mL BDNF	30 ng/mL EGF 30 ng/mL FGF-2 (basic FGF) 37 ng/mL FGF-8b 30 ng/mL IGF-I 30 ng/mL PDGF-AA	8 ng/mL LIF 3 ng/mL IL-6 3 ng/mL IL-11 3 ng/mL SCF 30 ng/mL CNTF
그룹 4 분화인자 TGF-β 슈퍼패밀리	그룹 5 TGF-β 슈퍼패밀리 안타고니스트	그룹 6 분화 인자
30 ng/mL BMP-2 37 ng/mL GDF-5 3 ng/mL GDNF 30 ng/mL 뉴투린	150 ng/mL 노킨 30 ng/mL 폴리스타틴	37 ng/mL SHH
그룹 7 항신경 인자	그룹 8 분화인자	그룹 9 생존인자 / 항산화제
37 ng/mL 미드킨	17 μM 레틴산	166 μM 아스코르브산
그룹 10 분화인자 / 신경전달물질	그룹 11 생존인자	
10 μM 도파민	100 μM 디부틸릴 cAMP	

[0139]

[0140] 실험은 하기와 같이 실시하였다. 인간 ES 세포주의 단층 배양액을 콜라게나제 IV 중에서 5-10 분 인큐베이션하고, 이후 플레이트에서 세포를 긁어내어 채집하였다. 세포를 분말화에 의해 분리하여, 마우스 배아 영양자 세포에 의해 24시간 조절된 Knockout Serum Replacement (Gibco BRL) 를 가진 Knockout DMEM 배양액 (Gibco BRL)에서 성장 인자 감소된 Matrigel[®] 로 선처리된 96웰 조직 배양 플레이트상에 서브컨플루언스 (subconfluence) 로 플레이팅하였다. 플레이팅 1 일 후, 0.5mM 글루타민, B27 보충액 (Gibco BRL) 및 하기한 시험 인자 그룹들로 보충된 Neurobasal 배양액 (NB; Gibco BRL)으로 배양액을 교체하였다. 세포들에게, 글루타민, B27 및 시험 인자들을 함유한 신선한 Neurobasal 배양액으로 11일간 매일 공급하였다.

[0141]

11 일 후, 세포를 트립신으로 5-10분간 인큐베이션하여 채집하고, 1:6 희석으로, 라미닌 선처리된 조직 배양 플레이트의 96웰에 재플레이팅하고, 글루타민, B27 및 시험 인자들을 함유한 신선한 Neurobasal 배양액으로 추가 5일간 매일 공급하였다. 세포를 20 분간 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 초기 신경 마커인 β-튜불린 III, 후기 신경 마커인 MAP-2 및 도파민성 뉴런 관련 효소인 타이로신 히드록실라제에 대한 항체들로 염색하였다. 세포 핵을 DAPI로 표지화하고, 시각 검사로 정량화하였다. 결과를 표 4에 기재하였다.

[0142] [표 4]

hES 세포의 뉴런으로의 직접분화					
세포배양중에 포함된 시험 화합물 그룹	β -튜불린III 양성		MAP-2 양성		타이로신 히드록실라제 양성
	세포 / 웰	총%	세포 / 웰	세포 / 웰	총%
대조군	102	—	2	1	—
처리 A: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	0	0	0	0	—
처리 B: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	362	6%	132	14	0.2%
처리 C: 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	—	—	—	—	—
처리 D: 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	378	11%	162	16	0.5%
처리 E: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	6	—	2	4	—
처리 F: 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	282	12%	92	4	0.2%
처리 G: 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	17	—	0	2	—

— = 비 측정

[0143] 삭제

[0144] 다른 실험에서, 세포를 글루타민, B27 및 시험 인자 그룹들을 함유한 Neurobasal 배양액으로 앞서와 같이 배양하고, 8일째 트립신으로 채집한 후, 5일 동안 재플레이팅하였다. 결과는 표 5에 기재된다.

[0145] [표 5]

hES 세포의 뉴런으로의 직접분화				
세포 배양 중에 포함된 시험 화합물 그룹	β -튜불린III 양성	MAP-2 양성	타이로신 히드록실라제 양성	TH 에 또한 양성인 MAP-2 양성%
	세포 / 웰	세포 / 웰	세포 / 웰	
대조군	4	4	0	
처리 A: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	12	8	3	
처리 B: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	268	12	4	
처리 C: 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	12	0	0	
처리 D: 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	372	48	7	15%
처리 E: 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	0	0	0	
처리 F: 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	196	56	0	
처리 G: 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11	16	0	9	

- [0146] 삭제
- [0147] 다수의 처리 패러다임에 의해 뉴런의 직접적 분화가 유도되었다. 그룹 5 인자 (노킨 및 폴리스타틴)를 포함한 처리가 가장 효과적이었다.
- [0148] 도 1은, 처리 B, 처리 D, 및 처리 F를 사용하여 얻고, β -튜불린 III에 대해 염색한 분화된 세포의 예의 영역을 나타낸다. 형태 및 β -튜불린 III 염색으로 볼 때, 세포의 약 5-12%가 뉴런이었다. MAP-2 염색으로 볼 때, 이들 중의 약 1/3은 성숙 뉴런이었다. 총 뉴런의 약 2-5% (MAP-2 양성 뉴런의 5-15%)가 또한 타이로신 히드록실라제에 의해 염색되었는데, 이는 도파민 표현형과 일치하는 것이다.
- [0149] 이어진 실험을 실행하여, 특정 인자 콕테일의 효과 및 분화의 키네틱을 추가로 연구하였다.
- [0150] 도 2(A)는, TGF- β 수퍼패밀리 안타고니스트 노킨 및 폴리스타틴을 가변의 시간 동안 사용한 실험 결과를 나타낸다. H7 세포주의 서브컨플루언트 hES 세포를 처리 D로 15일간 처리하되, cAMP의 농도는 700 μ g이었다. 그 결과, 노킨 및 폴리스타틴 모두 뉴런 분화에 기여하며, 시너지로 작용함을 나타낸다. 노킨은 약 1 주 시점 (5일 내지 8일)에서 중요한 것으로 보이며, 폴리스타틴은 약 2 주 시점 부근 (13 일 내지 15일)에서 중요한 것으로서, 작은 신경돌기보다는 성숙 뉴런의 생성을 최대화한다.
- [0151] 도 2(B)는, TGF- β 수퍼패밀리 안타고니스트를 함유한 표 4의 처리 혼합물을 사용한 신경 유도의 시간 진행을 나타낸다. 도 2(C)는 나아가, 직접 분화에서의 노킨과 폴리스타틴의 효과를 나타낸다. 첫째 막대로 나타낸 hES 세포는 그룹 1, 4, 6, 7, 9, 10 및 11의 인자 (표 3) 및, 700 μ M cAMP, 5U/ml EPO와 30ng/ml FGF-8 (그룹 2)으로 처리하였다. β -튜불린 양성인 뉴런은 노킨 또는 폴리스타틴 없이 실제로 생성되지 않았다. 그러나, 노킨 및 폴리스타틴 단독 또는 레틴산과의 조합은 신경 분화의 제 1 단계를 통해 hES 세포를 직접적으로 유도하였다. 초기의 노킨/폴리스타틴 유도가, 신경 선조세포를 생성하여, 이는, 이어서 기타 인자의 첨가에 의해 뉴런을 형성하도록 유도하는 것으로 가정된다.
- [0152] 도 2(D)는, 도파민성 뉴런을 원하는 경우에 혼합물로부터 레틴산 (RA)을 제거한 경우의 이점을 나타낸다. 세포를, 이전과 같이 (왼쪽의 2개 막대) 또는 레틴산을 결핍시킨 (오른쪽 2개 막대) 것에 의해 처리 F 에 따라 분화시켰다. 레틴산을 포함시키면, β -튜불린 양성인 뉴런의 총 백분율이 약간 증가하였으나, 타이로신 하이드록실라제에 양성 염색되는 총 뉴런 비율을 감소시켰다.
- [0153] 실시예 5. 연속 계대에 의한 신경 전구세포의 증식성 재생
- [0154] 본 발명의 신경 선조세포는 배양액내에서 계대되어 팽창 가능한데, 이는 이들의 고유하면서도 유익한 특성 일부를 나타낸다.
- [0155] 예의 실험에서, 인간 배아 줄기 세포를 채집하여, 20% FBS 및 10 μ M 레틴산을 함유한 낙아웃 DMEM에서 배상체를 형성하도록 현탁 배양액에 위치시켰다. 4일이 지난후에, 배상체를, N2 보충제, B27 보충제 (보통량의 절반), 10ng/ml 인간 EGF, 10ng/ml 인간 bFGF, 1ng/ml 인간 PDGF-AA 및 1ng/ml 인간 IGF-1으로 보충된 DMEM/F12 배양액 중의 폴리-L-라이신/피브로넥틴 코팅된 플레이트에 플레이팅 하였다.
- [0156] 세포를 3일간 배양하고, 하기와 같이 간단히 트립신화하여 채집하였다. 0.53mM EDTA 중의 0.5% 트립신 (Gibco #25300-054) 0.5ml을 6웰 플레이트의 각 웰에 레이어링하고, 이후 즉시 플레이트로부터 제거하였다. 15초간 기다린 후 (실온), 신경 베이스 배양액과 B27 보충액을 웰에 가하고, 이후 제거하고 원심분리하여 분리된 세포를 회수하였다 (1-10%의 세포).
- [0157] 폴리-L-라이신 15 μ g/ml (Sigma #P1274)를 1ml/웰로 6개의 웰 플레이트를 코팅하고, 이후 20 μ g/ml 인간 태반 라미닌 (Gibco #23017-015)을 1ml/웰로 밤새 코팅하였다. 분화 트립신화된 세포 펠릿을 B27 보충제, 10ng/ml NT-3, 및 10ng/ml BDNF를 함유한 신경 베이스 배양액에 재현탁하고, 웰 당 500,000 내지 750,000 세포로 상기 코팅된 웰에 플레이팅하였다.
- [0158] 5 일 후, 세포를 완전 트립신화로 회수하여, 계수하고 각종 인자 콕테일 존재하에 새로운 폴리-L-라이신/라미닌 코팅된 웰 중에서 웰 당 100,000 내지 150,000 세포로 재플레이팅하였다. 사용 농도는 하기와 같았다: 10ng/ml NT-3, 10ng/ml BDNF, 10ng/ml 인간 EGF, 10ng/ml 인간 bFGF 또는 10ng/ml LIF, 이들의 다양한 조합. 1 주당 3 회 배양액을 반씩 교환하여 세포에게 공급하였다. 7일 마다, 세포를 트립신화하여, 계수하고 동일 인자 함유 새로운 배양액 내에서 재계대하였다.

[0159] 도 3(A)는, 이 실험에서 얻은 성장 곡선을 나타낸다. BDNF 및 NT-3 단독에서 계대된 세포는 ~1주 이후 성장이 정지되었고, 뉴런으로 대부분 분화되었다. 그러나, 배양액에 EGF 및 bFGF를 가한 것은 세포가 전구세포 형태로 증식하는 것을 계속하도록 허용하였다. 이들 세포의 마커 프로필을 표 6에 나타내었다.

[0160] [표 6]

		신경선조세포의 표현형						
카테고리	계대	마커						
		네스틴	PS-NCAM	A2B5	β -튜불린 III	GFAP	MAP2	타이로신 히드록실라제
NT-3, BDNF, EGF, bFGF, LIF	p4	+++	+++	++	+	+	-	-
	p8	+++	+++	+	+	+	-	-
NT-3, BDNF, EGF, bFGF	p4	+++	+++	+	+	+	-	-
	p8	+++	+++	-	+	+	-	-
EGF, bFGF, LIF	p4	++	++	+	+	+	-	-
	p8	++	++	-	+	-	-	-
EGF, bFGF	p4	++	++	-	-	-	-	-
	p8	+	+	-	-	-	-	-

[0161]

[0162] 따라서, BDNF, NT-3, EGF 및 bFGF의 조합에서 계대된 세포는 신경 전구세포 마커인 네스틴 및 NCAM을 충분히 발현하였다.

[0163] 도 3(B)는, BDNF 및 NT-3 단독에서 말단 분화되도록 유도된 세포에서의 결과를 나타낸다. BDNF, NT-3, EGF 및 bFGF의 조합에서의 세포 계대는, 말단 분화시보다 많은 뉴런을 생성하였고, 이는 분화 이전의 신경 전구세포의 고비율과 일치한다.

[0164] 도 4(A)는, 타이로신 히드록실라제에 양성 염색된 세포 비율을 나타낸다. 다시금, BDNF, NT-3, EGF 및 bFGF의 조합은, 시험한 조합 중 적합한 수율을 나타내었다.

[0165] 도 4(B)는, BDNF 및 NT-3 단독뿐 아니라, NT-4, 신경 성장 인자, 아스코르브산, cAMP 및 도파민 (농도는 표 3에 기재된 바와 동일)과 같은 추가 인자를 포함함에 의해서 말단 분화되도록 유도됨에 의해, 보다 많은 TH 양성 뉴런이 생성됨을 나타낸다. 세포들 중 총 세포수의 5% 이하는 도파민 마커의 표현형을 나타내었다.

[0166] H7 hES 세포주의 신경 선조세포를, B27 보충액, 30% 혈청 대체물, 및 10% DMSO를 함유한 신경 베이스 배양액 중에서 계대 10에서 동결하였다 (동결 바이얼 당 5×10^5 세포). 세포를 약 6.5개월 이후에 녹였다. 녹인 세포는 동결 이전과 동일한 많은 특성을 가졌다: 60-80% β -튜불린 및 MAP-2 양성, 타이로신 히드록실라제에 대해 ~5% 양성.

[0167] 관련 실험에서, 세포는, 배양 기질 상에서보다는 클러스터로 성장시켜 계대하였다. 신경 선조세포를, 거의 킨플루언트할 때 6 웰 플레이트로부터 트립신을 사용하여 채집하였다 (웰당 ~ 3 또는 4×10^5 세포). 이를, 비부착성 웰 내에서 웰당 $\sim 2.5 \times 10^5$ 세포로 시딩하여, B27 보충액, 10ng/ml NT-3, 10ng/ml BDNF, 10ng/ml EGF 및 10ng/ml bFGF를 함유한 2ml의 신경 베이스 배양액에서 배양하였다. 배양액의 반을 교체하여 세포에게 공급하고, 이후 4일간 배양하였다. 이를, 10ng/ml NT-3 및 10ng/ml BDNF를 함유하나 마이토젠이 없는 배양액 내에서 이후 분화시켰다.

[0168] 본 명세서 기재의 본 발명의 이용은 보통 최적화의 문제로서, 본 발명의 사상 또는 하기 청구범위에서 벗어남 없이 실행될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1 은 분화 인자의 혼합물을 사용하여 고체 기질상에 ES 세포의 직접 분화에 의해 수득되는 신경 세포를 보여주는 형광 현미경도이다. 보여진 세 지역은 모두 뉴로트로핀 및 TNF- β 슈퍼 패밀리 안타고니스트 노긴 및

폴리스타틴을 포함한 처리에 의한 것이다. 신경 과정을 갖고 신경 마커용으로 β -튜블린 III 이 염색된 많은 세포들이 보여진다. 타이로신 히드록실라제 (도파민성 뉴런에 대한 마커)에 또한 양성인 MAP-2 양성 세포의 비율이 ~15 % 만큼 높았다.

[0021] 도 2 는 직접 분화에 의해 hES 세포로부터 뉴런을 제조하는 면을 보여준다. β -튜블린 양성 뉴런의 수율은 미분화된 세포가 라미닌상에서 플레이팅되어 TGF- β 슈퍼 패밀리 안타고니스트 노긴 (N) 및 폴리스타틴 (F)와 배양될 때 높다 (패널 A). 수율은 마이토젠을 제외한 줄기 세포 인자의 존재하에서 추가 향상되었다 (처리 F, 패널 B). 레틴산은 생산된 뉴런의 수를 증가시켰으나 (패널 C), 타이로신 히드록실라제 (TH)에 양성적으로 염색되는 뉴런의 비율을 감소시켰다 (패널 D).

[0022] 도 3 은 hES 를 배양함으로써 분화가 개시되어 배상체를 형성한 뉴런 제조의 면을 보여준다. 세포를 그후 마이토젠중에서 배양하여, 분별 트립신화하고, 그후 마이토젠 또는 향신경성 인자의 각테일을 함유하는 배양액 중 다중 계대시켰다. 마이토젠 및 뉴로트로핀 둘다 사용될때, 세포는 약 40 회 배가 (패널 A)를 통해 계대하면서, 증식 능력 및 성숙한 뉴런으로 분화되는 능력을 유지한다 (패널 B).

[0023] 도 4 는 표피 성장 인자 (EGF), 기초 섬유모세포 성장 인자 (FGF-2), 뇌 유도 향신경성 인자 (BDNF), 및 뉴로트로핀 3 (NT-3)의 혼합물중 세포의 계대가, 분화에 따라, 집단에서 전체 세포의 퍼센트로서 ~ 7 % TH-양성 세포를 함유하는 세포 집단을 생산한 신경 세포 전구체의 집단을 생성시켰음을 보여준다 (패널 A). 전구세포의 말단 분화에 사용되는 각테일은 또한 TH-양성 세포의 제조를 또한 향상시킬 수 있다 (패널 B).

[0024] 상세한 설명

[0025] 다능성 줄기세포를 선택된 분화 물질 존재하에 배양할 경우에, 성숙한 신경 세포 또는 그 자손의 표현형 특성을 갖는 세포의 비율이 현저하게 높은 세포 집단이 유래된다는 것을 발견하였다. 이들 세포는 신경계의 이상에 관계된 질환의 치료 및 약물 스크리닝에서의 사용에 적합하다.

[0026] 본 발명에 포함된 시스템은 인간 배아 줄기 (hES) 세포의 확립된 세포주로부터 수득된 세포 집단에 의하여 설명된다. 분화는 배상체 형성 또는 하나 이상의 TGF- β 슈퍼 패밀리 안타고니스트의 존재하에 적당한 기질상에서 hES 세포를 배양하는 것과 같은 하기에 개시된 몇가지 기술에 의하여 개시될 수 있다. 신경 계통으로 전부 분화되는 것으로, 성숙한 뉴런으로 추가 분화될 수 있는 전구세포들이 수득된다.

[0027] hES 세포로부터 형성된 신경 전구체들은 도 3(A)에서 보여진 바와 같이 약 40 회 배가로 배양액에서 계대 가능하다. 놀랍게도, 다중 계대 후라도, 세포들은 도 3(B)에서 보여진 바와 같이, 성숙한 뉴런으로의 분화능을 전부 유지한다. 증식능 및 분화능의 이 강력한 조합은 예전에는 배양액 중 인간 신경 세포에서 가능하지 않았었다.

[0028] 본 발명의 방법에 의해 수득된 성숙한 뉴런은 상기 세포 유형에 특징적인 연장된 과정을 가지며, 신경미세섬유 및 MAP-2와 같은 뉴런-특이적 마커에 대한 염색을 보여주고, 신경집합단백 (synaptophysin)에 대한 염색에 의해 검출된, 시냅스 형성에 대한 증거를 보여준다. 이들 세포는 다양한 신경전달물질에 반응하며, 표준 패치-클램프 (patch-clamp) 시스템에서 측정된 활동 전위를 생성할 수 있다. 상기의 모든 면에서, 세포는 완전한 신경 기능을 할 수 있음이 분명하다.

[0029] 특히 흥미 있는 것은 본 시스템을 조절하여 치료적으로 중요한 특성을 갖는 뉴런을 생성할 수 있는 전구체의 비율을 최적화할 수 있는 가능성이다. 도 1 은 도파민성 뉴런의 특징인 타이로신 히드록실라제에 대해 양성적으로 염색되는 뉴런을 보여준다. 상기 타입의 세포는 파킨슨씨 병의 치료에 특히 바람직한데, 이전에 개시된 어떤 다른 공급원도 충분히 다량으로 알맞은 종류의 세포를 공급할 수 없었다. 도 4에서 개시된 바와 같이, 마이토젠 EGF 및 FGF-2, 및 뉴로트로핀 BDNF 및 NT-3를 함유하는 배양액 중 전구세포를 계대함에 의해, 집단의 전체 세포의 퍼센트로서 ~ 7% TH-양성 세포를 생성할 수 있는 증식 세포집단이 생성된다.

[0030] 본 발명의 다능성 줄기 세포 및 계통-제한 전구체의 일부는 배양액에서 매우 활발하게 증식하므로, 본 명세서에 기재된 시스템은 신경 세포의 무제한 공급을 제공한다. 상업적 스케일로의 확장은 미분화된 다능성 줄기 세포의 수준 또는 전환되는 (committed) 신경 전구체 수준에서 일어날 수 있다. 본 발명의 세포는 CNS 이상의 연구, 약학적 개발 및 치료적 처리에서 중요한 응용을 갖는다.

[0031] 정의

[0032] 본 명세서의 목적을 위해, 용어 "신경 선조세포" 또는 "신경 전구세포"는 신경 세포 (예를 들면, 신경 전구세포 또는 성숙 신경) 또는 신경교세포 (예를 들면, 신경교 전구세포, 성숙 성상교세포, 또는 성숙 희돌기세포)인 자

손을 생성할 수 있는 세포를 의미한다. 일반적으로, 이들은 특정 방식으로 탈분화 또는 재프로그래밍되지 않는다면, 시험관 내에서 배양할 경우에 이들 스스로 다른 배아 생식 층의 자손을 생산하지 않는다.

- [0033] "신경 선조세포" 또는 "신경 전구세포"는 성숙한 뉴런인 자손을 생성할 수 있는 세포이다. 상기 세포는 신경교세포를 생성하는 능력을 가지거나 가지지 않을 수 있다. "신경교 선조세포" 또는 "신경교 전구세포"는 성숙 성상교세포 또는 성숙 희돌기세포인 자손을 생성할 수 있는 세포이다. 상기 세포는 신경 세포를 생성하는 능력을 가지거나 가지지 않을 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 사용된 "분화 시약"은 신경 계통 (전구세포 및 말단 분화된 세포를 포함)의 분화 세포를 생산하기 위해 본 발명의 배양 시스템에 사용된 화합물의 집합의 하나를 말한다. 화합물의 작용 방식에 관하여 제한하고자하는 의도는 아니다. 예를 들면, 시약은 표현형의 변화를 유도하거나 돕고, 특정 표현형을 가진 세포의 성장을 촉진시키거나 다른 것의 성장을 지연시키거나, 미지의 기작을 통해 다른 물질과 함께 작용함으로써 분화 과정을 도울 수 있다.
- [0035] 원형 "영장류 다능성 줄기 세포" (pPS 세포)는 수정 후 임의 시점에서 전배아, 배아 또는 태아 조직으로부터 유래된 다능성 세포이며, 적합한 조건 하에서 표준 기술로 허용되는 시험에 따라, 8-12 주령 SCID 마우스 중에 기형종을 형성할 수 있는 능력과 같이, 3 가지 배엽 (내배엽, 중배엽 및 외배엽) 모두의 유도체인 몇몇 상이한 세포 유형의 자손을 생산할 수 있는 특징을 갖는다. pPS 세포의 정의에 인간 배아 줄기(hES) 세포 및 인간 배아 생식 세포(hEG)가 그 예가 되는 다양한 타입의 배아 세포가 포함된다. pPS 세포들은 바람직하게는 악성 종양원에서 유래되지 않는다. 세포가 정배수체인 것이 (언제나 반드시 그런 것은 아니나) 바람직하다.
- [0036] pPS 세포 배양물은 집단내의 줄기 세포 및 이들의 유도체의 실질적인 비율이 배아 또는 성인 기원의 분화된 세포로부터 이들을 뚜렷이 구별짓는 미분화 세포의 형태적 특성을 나타내는 경우 "미분화된" 것으로 기재된다. 집단내의 미분화 세포의 콜로니는 종종 분화된 주변 세포에 의해 둘러싸일 수 있다고 생각된다.
- [0037] "영양 세포 (feeder cell)" 또는 "영양자 (feeder)"는 제 2 타입의 세포가 성장할 수 있는 환경을 제공하기 위해, 또 다른 타입의 세포와 공동 배양되는 한 타입의 세포를 설명하는데 사용되는 용어이다. pPS 세포의 성장을 유지하기 위해 신선한 영양 세포를 첨가하지 않고 분열된 후에 1회 이상을 통해 세포가 성장했다면 pPS 세포 집단은 영양 세포가 "본질적으로 없는" 것으로 불린다.
- [0038] 용어 "배상체 (embryoid body)"는 pPS 세포가 단층 배양에서 과도하게 자랄 경우 나타나거나, 현탁 배양에서 유지되는 분화 및 미분화 세포의 집합체를 말한다. 배상체는, 전형적으로는 상이한 생식 층으로부터인, 상이한 세포 타입의 혼합물이며, 형태적인 기준 및 면역세포화학법에 의해 검출가능한 세포 마커에 의해 구별 가능하다.
- [0039] "성장 환경"이란 해당 세포가 시험관 내에서 증식, 분화, 또는 성숙할 환경이다. 환경의 특색에는 세포가 배양되는 배양액, 존재 가능한 임의의 성장 인자 또는 분화-유도 인자, 및 존재한다면, 지지 구조 (예를 들면, 고체 표면 상의 기질)가 포함된다.
- [0040] 세포는 폴리뉴클레오티드가 인공적인 조작의 임의의 적당한 수단에 의해 세포내로 전달된 경우에, 또는 세포가 폴리뉴클레오티드를 물려받은 원래 변형된 세포의 자손인 경우에, "유전적으로 변형된", "트랜스펙션된", 또는 "유전적으로 형질전환된" 것으로 일컬어진다. 폴리뉴클레오티드는 종종 관심 단백질을 코딩하는 전사가능 서열을 함유하는데, 이는 세포로 하여금 증가된 수준에서 단백질을 발현하게 한다. 유전적인 변형은 변형된 세포의 자손이 동일한 변형을 가진다면, "유전성"이라 일컬어진다.
- [0041] 일반적인 기술
- [0042] 분자 유전학 및 유전 공학의 일반적인 방법은 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Sambrook 등, Cold Spring Harbor)의 현재 판; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller & Calos 편저); 및 Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel 등 편저, Wiley & Sons) 에 기재되어 있다. 세포 생물학, 단백질 화학 및 항체 기술은 Current Protocols in Protein Science(J.E. Colligan 등 편저, Wiley & Sons); Current Protocols in Cell Biology(J.S. Bonifacino 등, Wiley & Sons) 및 Current protocols in Immunology(J.E. Colligan 등 편저, Wiley & Sons)에서 발견될 수 있다.
- [0043] 세포 배양 방법은 일반적으로 Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique(R.I. Freshney 편저, Wiley & Sons)의 현행판; General Techniques of Cell Culture(M.A. Harrison & I.F. Rae, Cambridge Univ. Press) 및 Embryonic Stem Cell: Methods and Protocols (K. Turksen 편저, Humana Press)에 개시된다.

- [0044] 신경계 이상의 상술, 및 다양한 타입의 신경 세포, 마커, 및 관련 가용성 인자의 규명을 위해, 독자는 CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances (M.H. Tuszynski & J.H. Kordower, 편저, Academic Press, 1999)를 참조한다. 신경 세포의 관리 및 영양공급은 The Neuron: Cell and Molecular Biology (3판, I.B. Levitan & L.K. Kaczmarek, Oxford U. Press, 2001) 및 The Neuron in Tissue Culture (L. W. Haynes Ed., John Wiley & Son Ltd, 1999)에 개시되어 있다.
- [0045] 줄기 세포의 공급원
- [0046] 본 발명은 다양한 타입의 줄기 세포를 사용하여 실행될 수 있다. 본 발명에서 사용에 특히 적합한 것은 포배와 같은 임신 후 형성된 조직, 또는 임신 도중 임의의 시점에서 취해진 태아 또는 배아 조직에서 유래된 영장류 다능성 줄기 (pPS) 세포이다. 하기에 개시된 배아 줄기 세포 또는 배아 생식 세포의 일차 배양액 또는 확립된 세포주들은 그 비제한적인 예들이다. 본 발명의 기술은 또한 일차 배아 또는 태아 조직을 이용하여 미분화된 세포주를 먼저 확립함 없이 일차 배아 세포에서 직접 신경 세포를 유도함으로써 직접 수행될 수 있다.
- [0047] 배아 줄기 세포는 영장류 종의 일원의 포배로부터 분리될 수 있다 (U.S. 특허 5,843,780; Thomson 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995). 인간 배아 줄기 (hES) 세포는 Thomson 등 (U.S. 특허 제 6,200,806호; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998) 및 Reubinoff 등, (Nature Biotech. 18:399, 2000)에 기재된 기술을 사용하여 인간 포배기 세포로부터 제조될 수 있다. hES 세포와 동등한 세포 타입들은 WO 01/51610 (Bresagen)에 간략히 개시된 것처럼 원시 외배엽 유사 (EPL) 세포와 같은 그 다능성 유도체를 포함한다.
- [0048] 인간 배아 생식 (hEG) 세포는 최종 생리 기간의 약 8 - 11 주 후 채취한 인간 태아 재료 중에 존재하는 원시 생식 세포로부터 제조될 수 있다. 적합한 제조 방법은 Shambloott 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998 및 미국 특허 제 6,090,622 호에 기재되어 있다.
- [0049] 분화를 촉진시키지 않고 증식을 촉진시키는 배양 조건하에서, 배양액 중에 계속적으로 pPS 세포를 증식시킬 수 있다. 예로써의 혈청-함유 ES 배양액은 80% DMEM (Knock-Out DMEM, Gibco 와 같은), 20% 소 태아 혈청 (FBS, Hyclone) 또는 혈청 대체물 (WO 98/30679), 1% 비필수 아미노산, 1 mM L-글루타민, 및 0.1mM β -머캅토에탄올로써 제조한다. 사용 직전에, 인간 bFGF를 4ng/mL로 첨가한다 (WO 99/20741, Geron Corp.).
- [0050] 전통적으로, ES 세포를 영양 세포층, 전형적으로 배아 또는 태아 조직으로부터 유래된 혼합된 세포집단에서 배양한다 (US 특허 6,200,806). Geron의 과학자들은 pPS 세포가 영양 세포 없이도 미분화 상태로 유지될 수 있다는 것을 발견하였다. 영양자가 없는 배양 환경은 세포의 매트릭스 (Matrigel[®] 또는 라미닌과 같은) 상에서 지지될 수 있으며, 분화 없이 세포의 증식을 보조하는 인자들을 함유하는 영양 배양액에서 배양된다. 예로써, 조사된 기본 마우스 배아 섬유 모세포 (또는 인간 배아 줄기 세포에서 유래되는 섬유 모세포 유사 세포)와 같은 상기 인자를 분비하는 세포로 미리 배양하고, 8ng/ml 염기성 FGF를 조절 전후 둘다에 보충함으로써 획득한 조절된 배양액이다. 현미경 하에서 ES 세포는, 높은 핵/세포질 비율, 뚜렷한 인 및 대개 SSEA 3 및 4 와 같은 특징적인 표현형 마커를 발현하는 밀집 콜로니 형성으로써 나타난다. 배아 줄기세포의 추가의 케어 및 피딩에 관한 자세한 것은 국제 특허 공보 WO 99/20741 및 WO 01/51616 에 제시되어 있다.
- [0051] 삭제
- [0052] 삭제
- [0053] 본 발명에 기재된 일부 기술은, 태아 또는 성인 조직에서 얻은 신경 세포 또는 신경 전구세포의 분화 유지 또는 촉진에 또한 사용 가능하다 (미국 특허, 5,852,832; 5,654,183; 5,849,553 및 5,968,829 및 WO 09/50526 및 WO 99/01159). 달리 기재되지 않는 한, 본 발명은 인간, 비인간 영장류, 가금류, 및 기타 비인간 포유류를 포함한 임의의 척추 동물종의 세포를 이용하여 실행 가능하다.
- [0054] 신경 전구세포 및 말단 분화된 세포의 제조를 위한 물질 및 절차
- [0055] 본 발명의 신경 선조세포 및 성숙 뉴런은 적절한 분화 패러다임을 이용하여 줄기 세포를 분화함으로써 제조 가능하다.

- [0056] 일반적으로, 분화 과정은, 적절한 기질, 및 분화 시약이 첨가되는 영양 배양액을 함유하는 배양 환경에서 실행한다. 적절한 기질은, 양전하로 코팅된 고체 표면, 예를 들면 폴리-L-라이신 및 폴리오르니틴이 적합하다. 기질은, 세포의 매트릭스 성분, 일례로 피브로넥틴 및 라미닌으로 코팅 가능하다. 기타 허용되는 세포의 매트릭스는 Matrigel[®] (Engelbreth-Holm-Swarm 종양 세포 유래의 세포의 매트릭스)을 포함한다. 기타 적절한 것은, 폴리-L-라이신을 피브로넥틴, 라미닌, 또는 이들 모두와 조합한 것과 같은 조합 기질이다.
- [0057] 본 발명의 신경계통 세포는, 목적 세포 타입의 생존 또는 증식을 뒷받침하는 배양액 내에서 배양된다. 종종, 혈청 대신 자유 아미노산으로 영양을 공급하는 정의된 배양액을 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 신경 세포의 지속적 배양을 위해 개발된 첨가제로 배양액에 보충하는 것이 바람직하다. 그 예로는 Gibco에서 시판되는 N2 및 B27 첨가제가 있다.
- [0058] 신경 분화 경로를 따르는 발전 세포는, 목적 세포 타입의 과성장을 촉진하는 분화 시약의 각테일을 배양액에 포함시킴에 의해 촉진된다. 이는, 세포 또는 그 자손이 분화된 세포 타입의 표현형을 나타내도록 지시하는 것과, 목적 표현형 세포의 성장을 촉진하는 것, 또는 기타 세포 타입의 성장을 억제하는 것을 포함한다. 발명을 실행하기 위해 이들 시약의 활동 모드를 이해하는 것은 일반적으로 불필요하다.
- [0059] 적당한 분화 시약은 다양한 종류의 성장 인자, 예를 들면, 표피 성장 인자 (EGF), 전환성장인자 α (TGF- α), 임의의 형태의 섬유아세포 성장 인자 (FGF-4, FGF-8, 및 염기성 섬유아세포 성장 인자 = bFGF로 예시됨), 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF), 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-1 및 기타), 고농도의 인슐린, 헤지혹, 뉴로트로핀군의 일원 (예를 들면, 신경 성장 인자 = NGF, 뉴로트로핀 3 = NT-3, 뇌 유래 신경영양인자 = BDNF), 골형성단백질 (특히 BMP-2 및 BMP-4), 레틴산 (RA) 및 gp130과 복합하는 수용체에 대한 리간드 (예를 들면, LIF, CNTF, 및 IL-6)가 포함된다. 또한 전기한 인자에 대한 각각의 세포-표면 수용체에 결합하는 대안적인 리간드 및 항체가 적합하다. 전형적으로, 상기 또는 하기 실시예에서 열거한 2, 3, 4, 또는 그 이상의 물질을 함유할 수 있는 다수의 분화 물질이 사용된다.
- [0060] 분화의 하나의 방법에서, pPS 세포를 적당한 지지체, 예를 들면, 부착성 유리 또는 플라스틱 표면, 예를 들면, 폴리-라이신으로 코팅된 덮개 유리 상에, 피브로넥틴 또는 라미닌 같은 친신경 매트릭스 단백질 존재 또는 비존재 하에서 직접 플레이팅한다. 이어서 세포를 신경 세포로의 분화를 촉진시키도록 적용된 적당한 영양 배지 중에서 배양한다. 이것을 '직접 분화' 방법이라 하며, 이는, 국제 특허 공보 WO 01/51616 및 우선권 미국 특허 출원 09/888,309 호에 더 기재되어 있다. 노긴 및 폴리스타틴과 같은 TGF- β 수퍼패밀리 안타고니스트는 신경 분화를 이끌고, 직접 분화에 의해 수득된 신경 세포의 표현형을 가지는 세포의 비율 증가에 특히 유용하다 (실시예 4).
- [0061] 또 다른 분화 방법에서, pPS 세포를 먼저 세포 덩어리 형성에 의해 이종의 세포 집단으로 미리 분화하도록 한다. 예로써의 변이에서, 이들을 현탁액 중에 배양함으로써 pPS 세포로부터 배상체가 형성된다. 선택적으로, 이전에 열거한 하나 이상의 분화 물질 (예를 들면, 레틴산)이 배지 내에 포함되어 배상체내에서 분화를 촉진시킬 수 있다. 배상체가 충분한 크기 또는 성숙도에 도달한 후에 (일반적으로 3-4일), 이들을 분화 배양물의 기질 상에 플레이팅한다. 배상체를 세포를 분산시키지 않고 기질 상에 직접 플레이팅할 수 있다. 이것은 신경세포 전구체를 배상체로부터 세포의 매트릭스 상에 이동하게 한다. 상기 배양물의 적당한 배지 상으로의 이은 계대는 신경 선조세포를 선발하는 것을 돕는다. 일부 방법에서, 세포는 먼저 EGF, bFGF, PDGF, 및 IGF-1 과 같은 마이토젠 각테일 내에서 배양되고, 이후, 신경 선조세포 선택을 위해 마이토젠 및 뉴로트로핀의 조합에서 계대한다.
- [0062] 본 발명은, 특정 신경 표현형 생성을 위해 유효한 인자 조합 확인을 위한 전략을 포함한다. 신경 분화 또는 성장을 강화하는 것으로 알려지거나 추정되는 각종 인자는, 기타 조직 또는 종의 신경 세포에 대한 공지의 효과, 공지 수용체에 대한 결합능, 기능이 공지된 기타 인자와의 구조적 유사성 또는 기타 적절한 기준에 의해 각종 기능성 클래스로 분류된다. 각 클래스 내의 인자는, 적절한 실시 농도로 수합한다. 이후 각 인자의 클래스를 다양한 조합으로 조합하여 세포를 배양하여 목적 타입의 전구세포 또는 성숙 뉴런의 성장을 촉진하는 능력으로 인자들을 평가한다. 인자의 부재에 의해 혼합물이 목적 표현형을 촉진하는 능력을 잃게되는 것에 의해 필수 인자 클래스를 확인한다. 필수 클래스가 확인되고 나머지가 제거되면, 단일 성분 제거에 의해 이들 클래스 각각을 분류하여, 최소 각테일을 확인한다. 이러한 전략의 실행은 실시예 4에 개시되어 있다.
- [0063] 필요시, 분화된 세포는 특정 세포 집단을 풍부하게 하기 위해 분류될 수 있다. 일례로, 세포는, 신경 세포의 특정 마커에 결합하는 항체 또는 리간드 (NCAM과 같은)에 접촉시켜, 이후 고체상 흡착 또는 형광 활성화 세포

분류와 같은 적절한 면역 기법으로 특이하게 인식된 세포를 분리할 수 있다. 또한 적절한 것으로는 분별 플레이팅 또는 채집 (harvesting) 기법이 있는데, 이는, 목적 세포 타입의 부착성 또는 분리성을 이용하여 이중 세포 집단 내의 기타 세포에서 세포를 분리해낸다.

[0064] 마이트젠 (bFGF 및 EGF 등)의 조합과 하나 이상의 뉴로트로핀 (BDNF, NT-3 또는 둘 다 등)을 이용하여 증식 배양 중에 신경 전구세포의 표현형을 계대할 수 있음이 이제 밝혀졌다. 이는, 실시예 2, 4, 및 5에 기재되어 있다. 세포는 이 방법에 따라 40 회 배가까지 계대 가능하며 (도 3), 이때 증식능과 성숙 뉴런을 만드는 능력이 모두 유지된다.

[0065] 시작되는 선조세포는 인간 치료에서 특히 가치를 지니는 것으로 가정되는데, 이는, 이들이 조작에 대해 보다 내성이며, 목적 조직에 이동하여 기능적으로 상응하는 방식으로 축적되는 보다 큰 능력을 소지하는 때문이다. 선조세포는, 실시예 5에 예시된 고체 표면 또는, 현탁 배양액에서 성장시킬 수 있으며, 여기에서 이들은 덩어리 또는 구형 구조를 형성하는 경향이 있다. 예로써, 신경 선조세포는 거의 컨플루언트할 때 트립신을 사용하여 채집한다. 이들을 이후 비부착성 웰 내에 약 1/2의 밀도로 시딩하여, 10ng/ml BDNF, NT-3, EGF, 및 bFGF를 함유한 보충 배양액에서 배양하고, 주 당 약 3회 교체한다.

[0066] 신경 선조세포의 유도 또는 유지 동안의 배양액의 기타 성분의 알맞은 선택은, 이들이 생성할 수 있는 성숙 세포의 특성 및 범위에 영향을 미칠 수 있다. 실시예 4에 기재된 바와 같이, 신경 선조세포의 직접 분화 동안 배양액 내에 레틴산을 포함하면, 말단 분화시에 생성된 MAP-2 세포의 비율을 증가시키지만, 도파민성 뉴런과 관련된 타이로신 히드록실라제 (TH)에 대해 양성인 세포비율을 감소시킨다. 반면, 신경 선조세포 형성 동안 배양액 내에서 cAMP 수준을 증가시키는 에리트르포이에틴 (EPO) 또는 시약을 포함시키면, TH 양성인 뉴런을 형성하는 능력이 증가함을 밝혀내었다. 이와 다르게, 세포는, EPO 경로를 활성화하는 특정 항체 또는 애고니스트와 함께 배양되거나 또는 약한 저산소 조건 (저 산소 수준, 즉 3-6%)에서 배양될 수 있다. EPO를 사용하여 도파민성 표현형 형성을 증가하는 것은 실시예 3에 기재되어 있다.

[0067] 이들 방법 임의의 것에 의해 제조된 신경 전구세포는, 성숙 뉴런으로 추가 분화 가능하다. 완전 분화된 세포는, 신경 조직에 대한 각종 화합물의 시험관내 효과 스크리닝 및 평가와 같은 본 발명의 각종 적용에 바람직하다. 또한, 완전 분화 세포를 제조하여, 이들이 유래된 신경 선조세포의 기능상 능력을 확인하는 것도 유용하다.

[0068] 성숙한 뉴런은, 포스콜린 (또는 콜레라 독신, 이소부틸메틸잔틴, 디부틸아데노신 시클릭 모노포스페이트와 같은 세포내 cAMP 수준을 증가시키는 기타 화합물), c-kit 리간드, 레틴산, 또는 기타 인자 또는 뉴로트로핀 패밀리의 인자 조합과 같은 성숙 인자와 신경 전구세포를 배양함에 의해 형성 가능하다. 특히 유효한 것은 뉴로트로핀-3 (NT-3)가 뇌 유도 신경영양 인자 (BDNF)와 조합된 것이다. 다른 후보로는, GDNF, BMP-2 및 BMP-4가 있다. 이와 다르게 또는 추가로, EGF, FGF 와 같이 신경 전구세포 증식을 촉진하는 인자, 또는 배양을 유지하기 위해 이전에 사용하던 기타 마이트젠의 일부 또는 전체를 결핍시킴에 의해 성숙을 증가시킬 수 있다.

[0069] 가능한 기타 적용

[0070] 본 발명의 많은 신경 전구세포 집단은 상당한 증식능을 가진다. 필요하다면, 복제능은, 세포 내의 텔로머라아제 역전사제 (TERT)의 수준을 증가시킴으로써 추가로 증가되는데, 이는, 내재 유전자의 전사를 증가시키거나 또는 트랜스진의 도입에 의해 실행된다. 국제 특허 출원 WO 98/14592 에 제공되는 인간 텔로머라아제 (hTERT)의 촉매 성분이 특히 적합하다. 인간 세포에서의 텔로머라아제의 트랜스펙션 및 발현은 문헌에 기재되어 있다[Bodnar 등, Science 279:349, 1998 및 Jiang 등, Nat. Genet. 21:111, 1999]. 유전적으로 변형된 세포는, 표준 방법에 의해서, RT-PCR, 텔로머라아제 활성 (TRAP 분석), hTERT 의 면역세포화학적 염색 또는 복제능에 의해, hTERT 발현에 대해 평가될 수 있다.

[0071] 치료용 및 다른 적용에 사용하기 위해, 전구세포 또는 성숙 신경 세포 집단에 미분화 pPS 세포가 실질적으로 없는 것이 종종 바람직하다. 집단으로부터 미분화 줄기 세포를 제거하는 하나의 방법은 이들을 미분화 세포에서 우선적인 발현을 유도하는 프로모터의 조절하에 이펙터 유전자 (effector gene)의 벡터로써 트랜스펙션시키는 것이다. 적당한 프로모터에는 TERT 프로모터 및 OCT-4 프로모터가 포함된다. 이펙터 유전자는 세포 (예를 들면, 독소 또는 세포사멸의 매개자를 코딩함)에 직접 용해성일 수 있다. 대안적으로, 이펙터 유전자는 세포를 외부 물질, 예를 들면, 항체 또는 약물전구체의 독성 효과에 민감하게 할 수 있다. 갠시클로비어 (ganciclovir)에 감수성으로 발현되는 세포를 야기하는 단순포진 (Herpes Simplex) 티미딘 키나아제 (tk) 유전자가 전형적이다. 적당한 pTERT-tk 구축물은 국제 특허 공보 WO 98/14593 (Morin 등)에 제시되어 있다.

- [0072] 신경 전구세포 및 말단 분화 세포의 특성
- [0073] 형태학적 특징, 발현 세포 마커의 검출 또는 정량화, 효소 활성, 또는 신경전달물질 및 이의 수용체, 및 전기생리학적 기능과 같은 다수의 표현 기준에 따라 세포를 규명할 수 있다.
- [0074] 본 발명에 구현된 특정 세포는 신경 세포 또는 신경교세포에 특징적인 형태학적 특성을 가진다. 특징은 그러한 세포의 존재를 평가하는 당업자에 의해 용이하게 인지된다. 예를 들면, 뉴런의 특징은 작은 세포체, 및 액손 및 수상돌기를 연상시키는 복수의 돌기이다. 본 발명의 세포는 또한 이들이 다양한 종류의 신경 세포에 특징적인 표현형 마커를 발현하는가에 따라 규명될 수 있다.
- [0075] 대상 마커에는 이에 제한되지 않고, 뉴런의 특징인 β -튜불린 III, 신경소관연합단백질 (microtubule-associated protein) 2 (MAP-2), 또는 신경미세섬유; 성상교세포에 존재하는 신경교 근원섬유 산성 단백질 (glial fibrillary acidic protein :GFAP); 희돌기세포의 특징인 갈락토세레브로시드 (GalC) 또는 미엘린 기저 단백질 (MBP); 미분화 hES 세포의 특징인 Oct-4; 신경 전구세포 및 기타 세포의 특징인 네스틴이 포함된다. A2B5 (당지질) 및 폴리시알화 NCAM (neural cell adhesion molecule) 모두 이미 기재된 바 있다. A2B5 및 NCAM이 신경 계통 세포를 연구할 때 지지 마커인 반면, 상기 마커는 때로는 다른 세포 유형, 예를 들면, 간 또는 근육 세포에서도 나타날 수 있다는 것을 인지해야 한다. β -튜불린 III는 이전에는 신경 세포에 특이적인 것으로 생각되었으나, hES 세포의 아집단이 또한 β -튜불린 III 양성이라는 것을 발견하였다. MAP-2는 다양한 유형의 충분히 분화된 뉴런의 더욱 엄격한 마커이다. 본 발명에 따라 제조된 특정 세포 집단은, 단독 또는 각종 조합으로, 최소 30%, 50%, 75%, 90% 또는 그 이상으로 이들 마커에 대해 양성인 것을 포함한다.
- [0076] 본 명세서에 열거되고 당업계에 공지된 조직 특이적 마커는 임의의 적당한 면역학적 기술, 예를 들면, 세포 표면 마커에 대한 유동 면역세포화학법, 세포내 또는 세포 표면 마커에 대한 (예를 들면, 고정된 세포 또는 조직 단편의) 면역조직화학법, 세포 추출물의 웨스턴 블롯 분석법, 및 세포 추출물 또는 배지 내로 분비된 산물에 대한 효소면역측정법을 이용하여 검출할 수 있다. 하나의 세포에 의한 항원의 발현은 현저하게 검출가능한 양의 항체가, 선택적으로 세포의 고정 후, 및 선택적으로 표지를 증폭시키기 위해 표지된 이차 항체 또는 다른 접합물 (예를 들면, 바이오틴-아비딘 접합물)을 사용하여, 표준 면역세포화학법 또는 유동 세포측정 분석법에서 항원에 결합한다면 "항체-검출가능한"으로 일컬어진다.
- [0077] 조직 특이적인 유전자 산물의 발현은 또한 노던 블롯 분석, 돛-블롯 혼성화 분석, 또는 표준 증폭 방법에서 서열 특이적 프라이머를 사용한 역전사 개시 증합효소 연쇄반응 (RT-PCR)에 의해 mRNA 수준에서 검출할 수 있다. 더욱 상세한 것은 미국 특허 제 5,843,780 호를 참조. 본 명세서에 열거된 특정 마커의 서열 데이터는 공유 데이터베이스, 예를 들면, GenBank (URL www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez)로부터 취득될 수 있다. mRNA 수준에서의 발현은 전형적인 제어된 실험에서 표준 절차에 따라 세포 시료상에서 분석을 수행한 것이 명확히 구별가능한 혼성화 또는 증폭 산물을 생산한다면 본 명세서에 기재된 분석법 중의 하나에 따라 "검출가능한"으로 일컬어진다. 단백질 또는 mRNA 수준에서 검출된 조직 특이적 마커의 발현은 수준이 대조군 세포, 예를 들면, 미분화 pPS 세포, 섬유아세포, 또는 다른 무관한 세포 유형의 2배 이상, 바람직하게는 10배 또는 50배 이상이면 양성으로 고려된다.
- [0078] 신경 세포, 특히 말단 분화 세포의 특징은 또한 신경전달물질의 생합성, 방출, 및 재흡수에 관련된 수용체 및 효소, 및 시냅스 전달에 관련된 탈분극 및 재분극 사건에 관련된 이온 통로이다. 시냅스 형성의 증거는 신경접합단백의 염색에 의해 취득될 수 있다. 특정 신경전달물질에 대한 감수성의 증거는 γ -아미노 부티르산 (GABA), 글루타메이트, 도파민, 3,4-디히드록시페닐알라닌 (DOPA), 노르아드레날린, 아세틸콜린, 및 세로토닌에 대한 수용체를 검출함으로써 취득될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 특정 신경 전구세포 집단의 분화 (예를 들면, NT-3 및 BDNF를 이용)는 20%, 30%, 또는 40% 이상 MAP-2 양성인 세포 집단을 생성할 수 있다. 실질적인 비율, 예를 들면, 5%, 10%, 25%, 또는 그 이상의 NCAM 또는 MAP-2 양성 세포 (세포수 기준으로)는 신경전달물질, 예를 들면, 아세틸콜린, 글리신, 글루타메이트, 노르에피네프린, 세로토닌, 또는 GABA를 합성할 수 있을 것이다. 본 발명의 특정 집단은, 면역세포화학법 또는 mRNA 발현에 의해 측정할 때, 1%, 5%, 10% 또는 그 이상의 티로신 히드록실라제 (TH) 양성 세포를 포함하는 NCAM 또는 MAP-2 양성 세포를 포함하며, 이는 NCAM 또는 MAP-2 양성 세포의 백분율 또는 세포 집단 중에 존재하는 모든 세포의 백분율에 대한 것이다. TH는 일반적으로 당업계에서 도파민 합성 세포에 대한 마커로서 간주된다.

- [0080] 삭제
- [0081] 분화 집단에 존재하는 성숙 뉴런을 추가로 밝히기 위해, 세포를 기능성 기준에 따라 시험할 수 있다. 예를 들면, 신경전달물질, 또는 생체내에서 뉴런에 영향을 주는 것으로 알려진 다른 환경 조건에 반응하여, 칼슘 유동을 임의의 표준 기술에 의해 측정할 수 있다. 먼저, 집단 내의 뉴런 유사 세포를 형태학적 기준, 또는 NCAM과 같은 마커로 확인한다. 이어서 신경전달물질 또는 조건을 세포에 적용하고, 반응을 모니터링한다. 또한 세포에 표준 패치-클램프 기술을 행하여, 활동 전위에 대한 증거의 존재 여부, 및 인가된 전위 및 반응 사이의 지연 시간이 어떠한지를 결정할 수 있다.
- [0082] pPS 세포의 확립된 세포주로부터 유도할 경우에, 본 발명의 세포 집단 및 분리된 세포는 전형적으로 이들이 유래된 세포주와 동일한 계통을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 이것은 염색체 DNA가 pPS 세포와 신경세포 사이에 90% 이상 동일하다는 것을 의미하는데, 이는 신경세포가 정상적인 유사 분열의 과정을 통해 미분화 세포주로부터 수득된다면 추론될 수 있다. 트랜스진 (예를 들면, TERT)을 도입하거나 내재 유전자를 결손하기 위해 재조합 방법으로 처리된 신경세포는 모든 조작되지 않은 유전 원소가 보존되기 때문에, 여전히 이들이 유래된 세포주와 동일한 계통을 가지는 것으로 생각된다.
- [0083] 신경 전구세포 및 말단 분화된 세포의 사용
- [0084] 본 발명은, 신경 전구세포 및 성숙 신경 및 교세포를 다수 생산할 수 있는 방법을 제공한다. 상기 세포 집단은 중요한 연구, 개발 및 상업적 목적에 사용될 수 있다.
- [0085] 본 발명의 세포는 기타 계통의 세포에서 바람직하게 발현되는 cDNA 로 비교적 덜 오염된 cDNA 라이브러리를 제조하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 5분 동안 1000rpm 에서 원심분리로 다능 신경 전조세포를 수확한 후, mRNA를 제조하여, 역전사시킨 후, 임의로는 이를 성숙 뉴런, 성상교세포, 희돌기세포, 또는 미분화된 성상교세포의 cDNA로써 제거할 수 있다. 뉴런의 발현 패턴은, 마이크로배열 분석에 의해 다른 세포 타입과 비교된다 [Fritz 등, Science 288:316, 2000; "Microarray Biochip Technology", L Shi, www.Gene-Chips.com 에서 일반적으로 검토됨].
- [0086] 본 발명의 분화된 세포는 또한 다능 신경 전조세포, 신경 또는 신경교 계통의 세포로 전환되는 세포, 및 성숙 뉴런, 성상교세포, 및 희돌기세포의 마커에 특이적인 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 면역원성 형태인 본 발명의 세포를 척추 동물에게 주사함으로써 다중클론 항체를 제조할 수 있다. 단클론 항체의 제조는 표준 참고문헌에 기재되어 있다 [Harrow & Lane (1988), 미국 특허 제 4,491,632 호, 제 4,472,500 호 및 제 4,444,887 호 및 Methods in Enzymology 73B:3 (1981)].
- [0087] 상업적 흥미상의 적용은, 작은 분자 약물의 스크리닝에 세포를 이용하는 용도 및 임상 치료를 위하여 뉴런을 함유하는 약학 조성물의 제조를 포함한다.
- [0088] 약물 스크리닝
- [0089] 본 발명의 신경 전구세포는, 신경 전구세포 및 이들의 다양한 자손의 특징에 영향을 미치는 인자 (예를 들면, 용매, 작은분자 약물, 펩티드, 폴리뉴클레오티드) 또는 환경 조건 (예를 들면, 배양 조건 또는 조작)의 스크리닝에 사용될 수 있다.
- [0090] 일부 적용에서, pPS 세포 (미분화된 또는 분화된) 는 신경 세포로의 성숙을 촉진, 또는 장기간 배양에서 상기 세포의 증식 및 유지를 촉진하는 인자의 스크리닝에 사용된다. 예를 들면, 후보 성숙 인자 또는 성장 인자는 이들을 상이한 웰 내의 세포에 첨가한 후, 세포의 추가 배양 및 용도에 대해 바람직한 기준에 따라, 나타나는 임의의 표현형 변화를 측정함으로써 시험된다.
- [0091] 본 발명의 다른 스크리닝 적용은 신경 조직 또는 신경 전달에 대한 이들의 효과에 대한 약제 화합물의 시험에 관한 것이다. 화합물이 신경 세포 상에서 약리 효과를 가지도록 고안되었거나, 다른 곳에 효과를 가지도록 고안된 화합물이 의도치 않는 신경계에 대한 부작용을 가지기 때문에 스크리닝을 수행할 수 있다. 본 발명의 임의의 신경 전구세포 또는 말단 분화 세포, 예를 들면, 도파민성, 세로토닌계, 콜린계, 감각성, 및 운동 뉴런, 희돌기세포, 및 성상교세포를 이용하여 스크리닝을 수행할 수 있다.
- [0092] 독자는 일반적으로 하기 표준 교과서를 참조한다; "In vitro Methods in Pharmaceutical Research", Academic Press, 1997 및 미국 특허 제 5,030,015 호. 후보 약제 화합물의 활성 평가에는 일반적으로, 본 발명의 분

화된 세포를 다른 약물과 조합하여 또는 단독으로 후보 화합물과 배합하는 것이 관여된다. 연구자는 화합물에 기인한 세포의 형태, 마커 표현형 또는 기능성 활성의 임의 변화를 측정할 수 있다 (비처리 세포 또는 불활성 화합물 처리 세포와 비교하여), 관측된 변화와 화합물의 효과를 관련짓는다.

[0093] 세포 독성은 먼저, 세포 생존능, 생존, 형태 및 특정 마커 및 수용체의 발현에 대한 효과에 의해 측정될 수 있다. 염색체 DNA에 대한 약물의 효과는 DNA 합성 또는 치유를 측정함으로써 결정할 수 있다. [³H]-티미딘 또는 BrdU 혼입은, 특히 세포 주기의 지정되지 않은 시점에서 또는 세포 복제에 요구되는 수준 초과시, 약물 효과와 일치한다. 원하지 않는 효과에는 또한, 중기 (metaphase) 스프레딩에 의해 측정되는 딸 크로마티드 교환의 비정상적 속도가 포함될 수 있다. 추가의 정보에 대해서, 독자는 하기를 참고한다: A. Vickers, pp 375-410, "In vitro Methods in Pharmaceutical Research", Academic Press, 1997.

[0094] 세포 기능의 효과를 임의의 표준 분석법의 사용으로 평가하여 세포 배양 또는 적당한 모델에서, 신경 세포의 표현형 또는 활성, 예를 들면, 수용체 결합, 신경전달물질 합성, 방출 또는 흡수, 전기생리, 및 신경 돌기 또는 미엘린 시스 (sheath)의 성장을 관찰할 수 있다. 일례로, 시냅스 접촉 및 성형성을 변형하는 약물의 능력은, 시냅신 또는 시냅토포신에 대한 면역조직 화학 염색에 의해 배양물에서 측정 가능하다. 전기생리학은, IPSP 및 EPSP를 측정하여 평가한다 (억제 및 흥분 후시냅스 전위). 이와 다르게, 2전극 시스템을 사용하여, 한 세포를 자극하고, 시스템 내 다른 세포의 반응을 평가한다. 후보 약물 존재하의 시스템의 양태를, 약물 비존재하에서의 양태와 비교하고, 이를 약물이 시냅스 접촉 또는 세포 성형성에 영향을 끼치는 약물의 능력과 연관 짓는다.

[0095] 치료 용도

[0096] 본 발명은 또한 타고난 기능상의 오류, 질병 상태의 영향, 또는 상처의 결과로 인한 것일 수 있는, 치료를 필요로 하는 대상체의 중추신경계 (CNS) 기능을 복구하기 위한 신경 전구세포의 용도를 제공한다.

[0097] 치료용 투여에 대한 신경 전구세포의 타당성 결정을 위해, 먼저 세포를 적합한 동물 모델에서 시험할 수 있다. 한 단계에 있어서는, 생체 내에서 세포가 생존하면서 그들의 표현형을 유지하는 능력을 평가한다. 신경 전구세포를, 면역결핍 동물 (예를 들면, 누드 마우스, 또는 화학적으로 또는 광조사에 의해 면역결핍화된 동물)의 뇌강 또는 척수와 같은, 관찰이 가능한 부위에 투여한다. 수일 내지 수주 이상의 기간 후에 조직을 취하여, pPS 유래 세포의 존재 여부를 평가한다.

[0098] 이는, 미리 표지된 (예를 들면, BrdU 또는 [³H]티미딘 이용) 검출 가능한 표지 (예를 들면, 녹색 형광 단백질 또는 β-갈락토시다제)를 발현하는 세포를 투여하거나, 항상성 세포 마커 (예를 들면, 인간 특이적 항체를 이용)의 연속 검출에 의해 수행할 수 있다. 설치류 모델에서 신경 전구세포를 시험하는 경우, 투여된 세포의 존재 및 표현형은, 인간 특이적 항체를 이용하는 면역조직화학 또는 ELISA, 또는 인간 폴리뉴클레오티드 서열에 특이적인 증폭을 유도하는 프라이머 및 혼성화 조건을 이용하는 RT-PCR 분석에 의해서 평가될 수 있다. mRNA 또는 단백질 수준에서 유전자 발현을 평가하는데 적합한 마커를 본 명세서의 다른 부분에서 제공한다.

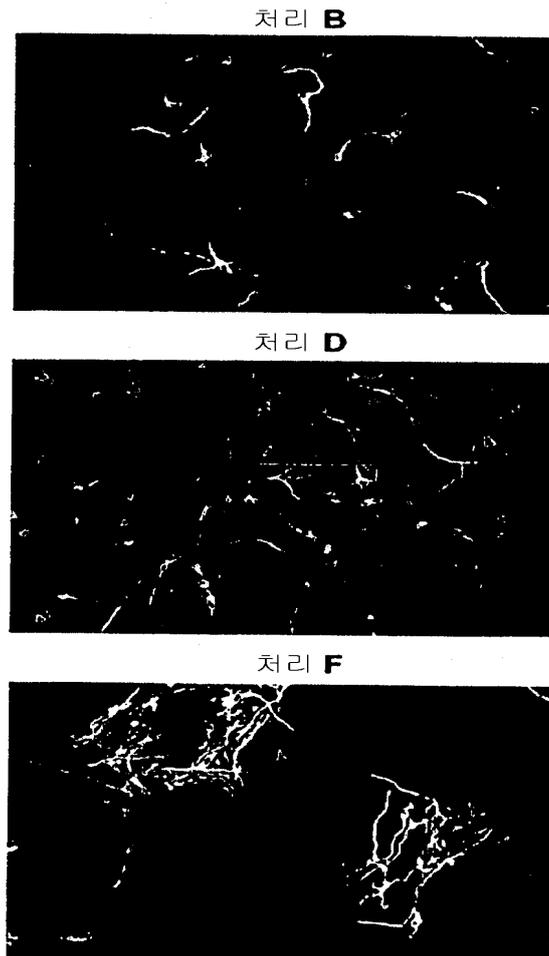
[0099] 신경계 기능의 복구를 시험하는 다양한 동물 모델은 ["CNS Regeneration; Basic Science and Clinical Advances", M.H. Tuszynski & J.H. Kordower, 편저, Academic Press, 1999]에 기재된다. 파킨슨씨 병은 래트에서 흑질선조체 상처를 외과적으로 유도하여, 뇌에서의 주요 도파민 경로를 차단하여 모델화한다. 다른 표준 동물 모델은 MPTP (1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘)으로 마우스 또는 비인간 영장류 흑색질 중의 도파민성 뉴런의 화학적 상처이다. 이는 문헌에 기재되어 있다 (Furns 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80: 4546, 1983; Freed 등, Appl. Neurophysiol. 47:16, 1984; 및 Bjorklund 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 19:2344, 2002).

[0100] 본 발명의 분화된 세포는 또한 이를 필요로 하는 인간 환자의 조직 재구성 또는 재생에 사용될 수 있다. 세포를 원하는 조직 부위로 이식되거나 이동하도록 하는 방식으로 투여하여, 기능적으로 결핍된 부위를 재구성하거나 재생한다. 예증으로써, 치료될 병에 따라, 신경 줄기 세포를 중추신경계의 유조직 또는 수막강내 부위로 직접 이식한다. 이식을 단세포 현탁액 또는 μl 당 25,000-500,000 세포의 밀도의 작은 집합체를 이용하여 수행한다 (미국 특허 제 5,968,829 호). 본 발명에 구현된 특정 신경 선조세포는 신경계의 급성 또는 만성 손상의 치료를 위해 고안된다. 예를 들면, 흥분성 독성이 간질, 발작, 허혈, 및 알츠하이머병을 포함한 다양한 상태에 관련되어 있다. 도파민성 뉴런은, 파킨슨씨병, 헌팅턴씨병의 GABA 신경, 및 척수 상처 또는 근위축성 외측 경화증 (ALS)의 운동 뉴런 치료를 위해 제형화 가능하다.

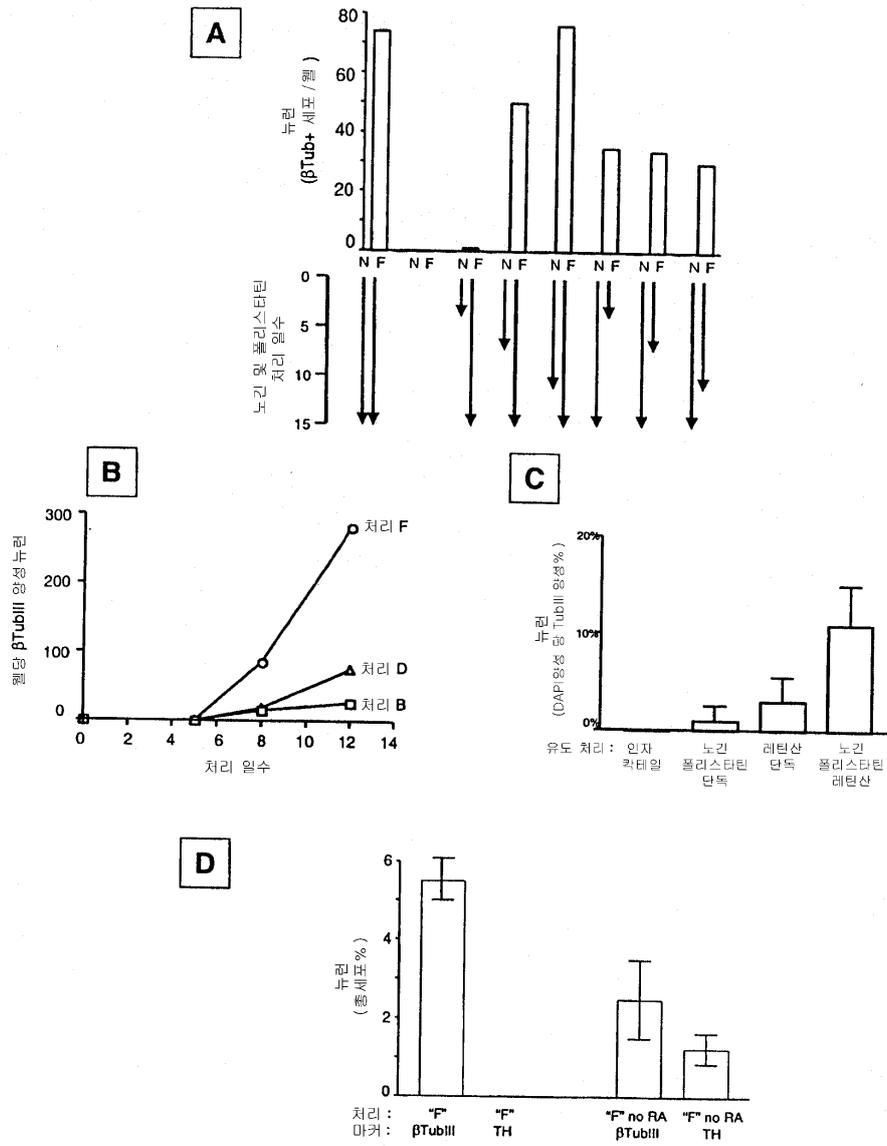
- [0101] 본 발명에 따른 신경 선조세포 및 말단 분화 세포는 인간 투여를 위해 충분히 멸균 조건하에 제조된 등장성 부형제를 함유하는 약학적 조성물의 형태로 공급될 수 있다. 의학 제형의 일반적인 원리에 대해, 독자는 하기를 참고한다: Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn & W. Sheridan 편저, Cambridge University Press, 1996; 및 Hematopoietic Stem Cell Therapy, E.D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000.
- [0102] 조성물은 선택적으로 원하는 목적, 예를 들면, 일부 신경성 이상을 개선하기 위해 CNS 기능의 재구성을 위해 표기된 지시와 함께 적당한 용기내에 포장될 수 있다.
- [0103] 하기 실시예는 본 발명의 특정 구현예의 비제한의 예증으로서 제공된다.

도면

도면1

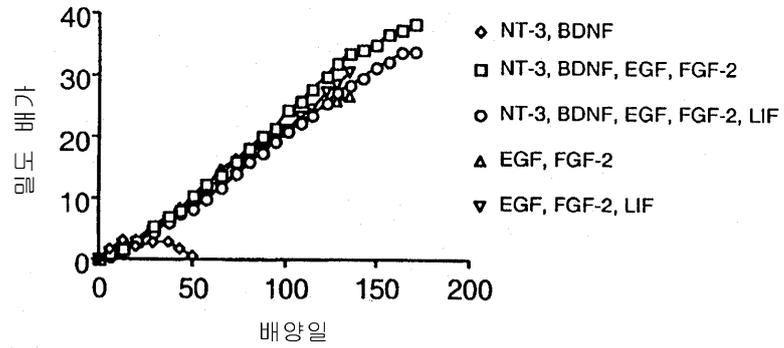


도면2

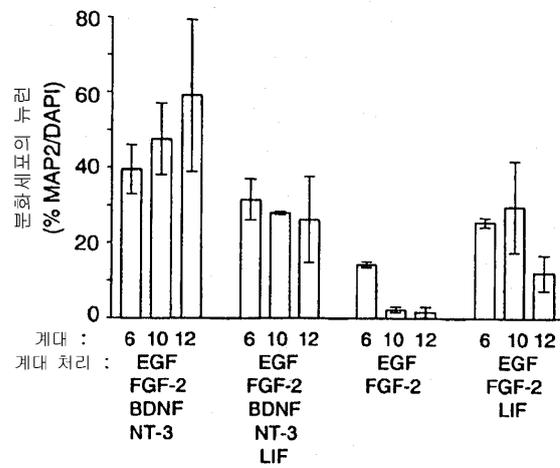


도면3

A

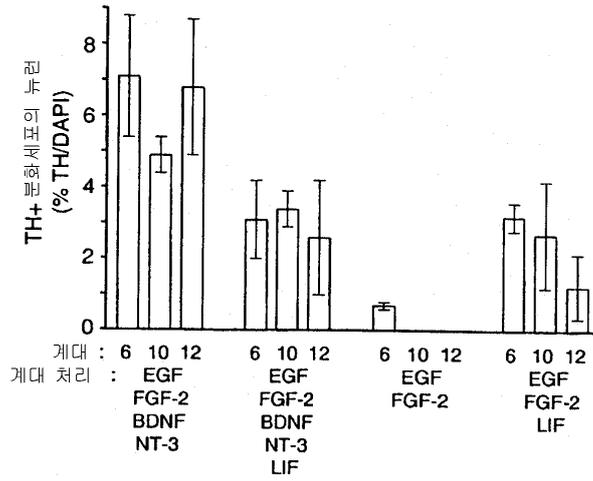


B



도면4

A



B

