



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월16일  
(11) 등록번호 10-1529317  
(24) 등록일자 2015년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/00 (2006.01)  
C12N 5/02 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2008-7001452  
(22) 출원일자(국제) 2006년06월20일  
심사청구일자 2011년04월29일  
(85) 번역문제출일자 2008년01월18일  
(65) 공개번호 10-2008-0030026  
(43) 공개일자 2008년04월03일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/024060  
(87) 국제공개번호 WO 2007/002136  
국제공개일자 2007년01월04일  
(30) 우선권주장  
60/693,141 2005년06월22일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020040022448 A\*  
US20020061837 A1\*  
US20050054092 A1\*  
WO2002044343 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
아스테리아스 바이오세라퓨틱스, 인크.  
미국, 캘리포니아주 94025, 멘로 파크, 콘스티튜션 드라이브 230  
(72) 발명자  
골드 조셉 디  
미국 캘리포니아주 94110 샌프란시스코 룬디스 레인 100  
하씨니포어 모하메드  
미국 캘리포니아주 94506 덴빌 도브 크릭 레인 206  
(74) 대리인  
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 14 항

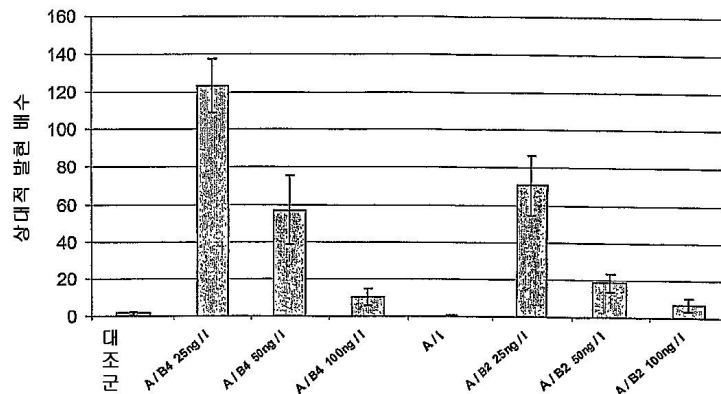
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **영장류 다능성 줄기 세포의 심근세포 계통 세포로의 분화**

(57) 요약

본 발명은 영장류 다능성 줄기 세포의 심근세포 계통의 세포로의 분화를 위한 신규한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 특정 성장 인자 중에 영장류 다능성 줄기 세포를 순차 배양하여 심근세포 계통의 세포를 생산하는 것을 이용한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 순차 배양으로 생산된 세포군은 심근세포 계통의 세포를 고 비율(%)로 생산하도록 심근세포 계통의 세포에 대해 추가로 농축한다.

대표도 - 도4



**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

a) 액티빈 A의 존재 및 골형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP)의 부재 하에 인간 배아 줄기(hES) 세포를 배양하는 단계; 및

b) BMP의 존재 및 액티빈 A의 부재 하에 세포를 후속 배양하는 단계

를 포함하는 인간 배아 줄기(hES) 세포로부터 심근세포 계통의 세포를 얻는 방법으로서, BMP는 BMP-2 또는 BMP-4인 방법.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제1항에 있어서, BMP는 BMP-2인 방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서, BMP는 BMP-4인 방법.

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

제1항에 있어서, hES 세포는 1일 동안 액티빈 A의 존재 하에 배양한 후, 4일 동안 BMP의 존재 하에 후속 배양하는 것인 방법.

**청구항 7**

제1항에 있어서, BMP 배양 단계 후에, 배지가 액티빈 A 또는 BMP를 포함하지 않는 배양 단계를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 추가의 배양 단계는 1주 이상 동안 실시하는 것인 방법.

**청구항 9**

제7항에 있어서, 추가의 배양 단계는 2주 이상 동안 실시하는 것인 방법.

**청구항 10**

제7항에 있어서, 추가의 배양 단계는 인슐린 유사 성장 인자 I(insulin-like growth factor I, IGF-I) 또는 인슐린 유사 성장 인자 II(IGF-II)를 포함하는 배지에서 실시하는 것인 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 추가의 배양 단계는 IGF-I을 포함하는 배지에서 실시하는 것인 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 배상체가 형성되는 단계를 포함하지 않는 것인 방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서, BMP 배양 단계 후에 배양물로부터 세포를 수거하는 단계 및 수거한 세포군을 심근세포 계통의 세포에 대해 농축시키는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 수거한 세포군은 퍼콜(Percoll) 구배로 농축시키는 것인 방법.

**청구항 15**

제13항에 있어서, 농축 단계는 심체(cardiac body)의 형성을 포함하는 것인 방법.

**청구항 16**

a) 액티빈 A의 존재 및 BMP의 부재 하에 1일 동안 무혈청 배지에서 hES 세포를 배양하는 단계;

b) BMP의 존재 및 액티빈의 부재 하에 4일 동안 무혈청 배지에서 후속 배양하는 단계;

c) 배양물로부터 세포를 수거하는 단계; 및

d) 수거한 세포군을 심근세포 계통의 세포에 대해 농축시키는 단계

를 상기한 순서로 포함하는, hES 세포로부터 농축된 심근세포 계통의 세포군을 얻는 방법으로서, BMP는 BMP-2 또는 BMP-4인 방법.

**청구항 17**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

**관련 출원의 참조**

[0001]

본 출원은 2005년 6월 22일에 출원한 USSN 60/693,141호를 우선권으로 주장한다.

[0002]

**발명의 분야**

[0003]

본 발명은 영장류 다능성 줄기 세포의 심근세포 계통 세포로의 시험관내 분화 분야에 관한 것이다.

[0004]

**배경 기술**

[0005]

재생 의학 연구에 있어서 주요 도전과제는 심장 기능의 재구성을 보조할 수 있는 세포 조성물을 개발하는 것이다. 대략 5명의 남성 및 여성 중 1명이 일정 형태의 심혈관 질환을 나타내는 것으로 추정되고 있다(National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988-94, Center of Disease Control and the American Heart Association). 일반적인 병태는 관상동맥질환(인구의 5%), 선천성 심혈관 결함(0.5%) 및 울혈성 심부전(3%)을 포함한다. 약학 분야에서는 심장 질환으로 인해 발생하는 손상을 제한하는데 도움이 될 수 있는 소분자 의약 및 생물학적 화합물은 생산해왔지만, 손상 조직의 재생에 도움이 되도록 상업적으로 이용할 수 있는 것은 없다.

[0006]

심장 재생이 가능한 세포군을 개발하려는 목적으로, 여러 다른 영역에서 연구가 진행되어 왔다. 몇몇 센터에서는, 심근경색 이후 치료를 위해 자가 골수 유래 세포를 이용하는 것을 테스트하는 임상 시험이 진행중이다(Perin et al., Circulation 107:2294, 2003; Strauer et al., Circulation 106:1913, 2002; Zeiher et al., Circulation 106:3009, 2002; Tse et al., Lancet 361:47, 2003; Stamm et al., Lancet 366:45, 2003). 이 세포가 심장 조직의 혈액 관류를 개선하는 정화 기능을 가질 수 있다고 가정하였다. 또한, 심장 치료를 위해 자가 골격근 근모세포의 사용을 테스트하기 위한 임상 시험도 진행중이다(Menasche et al., J. Am. Coll. Cardiol. 41:1078, 2003; Pagani et al., J. Am. Coll. Cardiol. 41:879, 2003; Hagege et al., Lancet 361:491, 2003). 그러나, 줄무늬근 세포의 수축이 심박동과 적당하게 함께 기능할 수 있는지는 분명하지 않다.

[0007]

더욱 직접적인 접근법은 이미 작용성 심근세포가 된 세포를 사용하는 것이다. 동계의 신생 또는 출생후 심장 세포는 영구적인 관상 폐색으로 생긴 손상을 복구하는 동물 모델에서 사용되어 왔다(Reffelmann et al., J. Mol. Cell Cardiol. 35:607, 2003; Yao et al., J. Molec. Cell. Cardiol. 35:607, 2003). 따라서, 그러한 세포가

인간 치료용으로 이용가능하다면, 허혈성 심질환의 치료에 매우 효과적일 수 있다. 또한, 약제 등의 화합물을 스크리닝하기 위해 심근세포를 사용할 수 있다.

[0008] **발명의 개요**

[0009] 본 발명은 영장류 다능성 줄기 세포로부터 심근세포 계통의 세포를 얻는 방법을 제공한다. 심근세포 계통의 세포는 여러가지 가능한 용도, 비제한적인 예로서 유효 약제 스크리닝, 세포독성 화합물 스크리닝, 및 손상되거나 병에 걸린 심장의 생체내 수복과 같은 치료 적용 등의 용도를 가진다.

[0010] 본 발명의 특정 구체예에서, 영장류 다능성 줄기 세포로부터 심근세포 계통의 세포를 얻는 방법은 하기의 순서로, 액티빈의 존재 및 골형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP)의 부재 하에 영장류 다능성 줄기 세포를 배양하는 단계; 및 BMP의 존재 하에 세포를 후속 배양하는 단계; 및 배양물로부터 생성된 세포를 수거하는 단계를 포함한다.

[0011] 본 발명은 또한 농축된 심근세포 계통의 세포군을 얻는 방법을 제공한다. 특정 구체예에서, 이들 방법은 하기의 순서로, 액티빈의 존재 및 BMP의 부재 하에 영장류 다능성 줄기 세포를 배양하는 단계; BMP의 존재 하에 세포를 후속 배양하는 단계; 배양물로부터 세포를 수거하는 단계; 및 수거된 세포군을 심근세포 계통의 세포에 대해 농축하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서는, 이들 방법은 하기의 순서로, 액티빈 A의 존재 및 BMP의 부재 하에 약 1일 동안 무혈청 배지에서 영장류 다능성 줄기 세포를 배양하는 단계; 액티빈의 부재 및 BMP-4 또는 BMP-2의 존재 하에 약 4일 동안 무혈청 배지에서 세포를 후속 배양하는 단계; 배양물로부터 세포를 수거하는 단계; 및 수거된 세포군을 심근세포 계통의 세포에 대해 농축하는 단계를 포함한다.

[0012] 본 발명의 특정 구체예에서, 배양 단계 동안 세포를 고체 표면에 부착시킨다. 특정 구체예에서, 세포는 BMP를 이용하는 배양 단계에서 배양체를 형성한다. 특정 구체예에서, 액티빈 및/또는 BMP 배양 단계 동안 세포를 단세포 현탁액에서 배양한다.

[0013] 특정 구체예에서, 액티빈의 존재 하에 세포를 1일 이상 배양한다. 특정 구체예에서, BMP의 존재 하에 4일 이상 동안 세포를 배양한다. 특정 구체예에서, 액티빈은 액티빈 A이다. 특정 구체예에서, BMP는 BMP-4 또는 BMP-2이다.

[0014] 특정 구체예에서, BMP 배양 단계 후에 액티빈 또는 BMP의 부재 하에 추가의 시간 동안 세포를 배양한다. 이들 특정 구체예들에서, 추가의 배양 단계 시간은 2주 이상이다. 이들 특정 구체예들에서, 인슐린 유사 성장 인자 (insulin-like growth factor, IGF)가 배양 단계에 포함된다. 이들 특정 구체예들에서, IGF는 IGF-1이다.

[0015] 본 발명의 특정 구체예들에서, 분화 프로토콜로 생성된 세포군을 심근세포 계통의 세포에 대해 농축한다. 이들 특정 구체예들에서, 퍼콜(Percol1) 구배를 사용하여 일정 비율의 심근세포 계통의 세포군을 농축한다.

[0016] 본 발명의 특정 구체예에서, 수거된 세포는  $\alpha$ -마이오신 중쇄( $\alpha$ MHC)에 대해 약 10% 양성이다. 본 발명의 특정 구체예에서, 수거된 세포는 적어도 10%의 심장 트로포닌 I(cTnI) 양성이다. 본 발명의 특정 구체예에서, 수거된 세포는 적어도 25%의 심장 트로포닌 I(cTnI) 양성이다.

[0017] 본 발명의 특정 구체예에서, 심체는 심근세포 계통의 세포군을 농축 및/또는 확장하도록 형성된다. 이들 특정 구체예들에서, 상기 방법은 클러스터로서 존재하는 세포로부터 단세포로 존재하는 농축 세포군의 세포를 분리하는 단계; 영양 배지에서 클러스터로서 존재하는 세포를 재현탁시키는 단계; 영양 배지에서 재현탁 세포를 재배양하는 단계; 및 재배양된 세포를 수집 및 세척하는 단계를 추가로 포함한다.

[0018] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 영장류 다능성 줄기 세포로부터 분화된 심근세포 계통의 세포군을 제공한다. 본 발명은 또한 인간 배반포로부터 얻은 영장류 다능성 줄기 세포주로부터의 미분화 세포와; 본 발명에 따른 상기 영장류 다능성 줄기 세포로부터 분화된 심근세포 계통 세포군을 포함하는, 인간 배반포 세포로부터 심근세포 계통 세포의 생성 과정에서 배양된 다수의 세포군을 제공한다.

[0019] 본 발명의 특정 구체예에서, 영장류 다능성 줄기 세포의 심근세포 계통의 세포로의 분화는 무혈청 배지에서 발생한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 영장류 다능성 줄기 세포의 심근세포 계통의 세포로의 분화는 혈청을 0.5% 미만으로 함유하는 배지에서 발생한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 영장류 다능성 줄기 세포의 심근세포 계통의 세포로의 분화는 혈청을 1% 미만으로 함유하는 배지에서 발생한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 영장류 다능성 줄기 세포의 심근세포 계통의 세포로의 분화는 혈청을 5% 미만으로 함유하는 배지에서 발생한다.

[0020] 본 발명의 특정 구체예에서, 영장류 다능성 줄기 세포가 심근세포 계통의 세포로 분화하는 동안 젤라틴, 매트릭스

겔(Matrigel), 라미닌, 피브로넥틴 및/또는 비트로넥틴 중 하나 이상을 포함하는 기재에 세포를 부착시킨다.

[0021] 본 발명의 특정 구체예에서, 영장류 다능성 줄기 세포는 액티빈 배양 단계 실시 전에 1~7일 동안 MEM-CM + bFGF 에서 배양한다. 특정 구체예에서, 영장류 다능성 줄기 세포는 액티빈 배양 단계 실시 전에 약 6일 동안 MEM-CM + bFGF에서 배양한다.

[0022] 특정 구체예에서, 액티빈의 존재 하에 세포를 배양하는 동안 배지 RPMI + 1X B27을 사용한다. 특정 구체예에서, BMP의 존재 하에 세포를 배양할 때 배지 RPMI + 1X B27을 사용한다. 특정 구체예에서, 액티빈의 존재 하에 세포를 배양할 때 배지 RPMI + N2를 사용한다. 특정 구체예에서, BMP의 존재 하에 세포를 배양할 때 배지 RPMI + N2를 사용한다.

**발명의 상세한 설명**

[0045] **일반적인 기법**

[0046] 본 발명의 실시예에 유용한 일반 기법의 추가 상세한 설명에 대해서는, 실시자가 세포 생물학, 세포 배양학, 발생학, 및 심장생리학의 표준서 및 검토서를 참조할 수 있다.

[0047] 조직 및 세포 배양물과 배아 줄기 세포와 관련하여 독자는 문헌[Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach (E.J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); Guide to Techniques in Mouse Development (P.M. Wasserman et al. eds., Academic Press 1993); Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993); Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy (P.D. Rathjen et al., Reprod. Fertil. Dev. 10:31, 1998; and R.I. Freshney, Culture of Animal Cells, Wiley-Liss, New York, 2000)]을 참고할 수 있다. 심장 세포 배양과 관련한 표준 참고서는 The Heart Cell in Culture (A. Pinson ed., CRC Press 1987), Isolated Adult Cardiomyocytes (Vols. I & II, Piper & Isenberg eds., CRC Press 1989), 및 Heart Development (Harvey & Rosenthal, Academic Press 1998)를 포함한다. 분자 및 세포 생물학의 일반적인 방법은 Short Protocols in Molecular Biology, 4<sup>th</sup> Ed.; Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); 및 Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998) 등의 표준서에서 찾아볼 수 있다.

[0048] **영장류 다능성 줄기 세포**

[0049] 본 발명은 영장류 다능성 줄기 세포의 심근세포 계통의 세포로의 분화 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 사용할 수 있는 영장류 다능성 줄기 세포는 배아 줄기 세포를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 영장류 종의 배반포로부터 배아 줄기 세포를 분리할 수 있다(미국 특허 5,843,780; Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995). 인간 배아 줄기(hES) 세포는, 예를 들어 Thomson 등의 문헌(미국 특허 6,200,806; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998) 및 Reubinoff 등의 문헌[Nature Biotech. 18:399, 2000]에 개시된 기법을 사용하여 인간 배반포 세포로부터 준비할 수 있다. 다른 영장류 다능성 줄기 세포형은, WO 01/51610 (Bresagen)에 요약된 원시 외배엽 유사(EPL) 세포 및 인간 배아 생식(hEG) 세포 (Shablott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에 사용된 배아 줄기 세포는 배아 줄기 세포주로부터 선택하거나, 또는 1차 배아 조직으로부터 직접 얻을 수 있다. 비제한적인 예로서 H1, H7, H9, H13 또는 H14(Thompson 문헌 참조); hESBGN-01, hESBGN-02, hESBGN-03(BresaGen, Inc., Athens, GA); HES-1, HES-2, HES-3, HES-4, HES-5, HES-6(싱가포르의 ES Cell International, Inc.에서 입수); HSF-1, HSF-6(샌프란시스코의 University of California에서 입수); I 3, I 3.2, I 3.3, I 4, I 6, I 6.2, J 3, J 3.2(이스라엘 하이파의 Technion-Israel Institute of Technology에서 입수); UCSF-I 및 UCSF-2(Genbacev et al., Fertil. Steril. 83(5): 1517-29, 2005); 세포주 HUES 1-17(Cowan et al., NEJM 350(13): 1353-56, 2004); 및 세포주 ACT-14 (Klimanskaya et al., Lancet, 365(9471):1636-41, 2005)를 비롯한 다수의 배아 줄기 세포주가 확립되어 있다.

[0051] 특정 구체예에서, 본 발명에 사용된 영장류 다능성 줄기 세포는 영양공급 세포 무함유 방식으로 유도할 수 있다 (예컨대, Klimanskaya et al., Lancet, 365(9471):1636-41 (2005) 참조).

[0052] **영장류 다능성 줄기 세포 배양**

[0053] 당업계에 공지된 각종 기질, 배지 및 기타 보충제 및 인자를 사용하여 영장류 다능성 줄기 세포를 배양할 수 있

다. 분화를 억제하면서 증식을 촉진하는 배양 조건을 이용하여 영양류 다능성 줄기 세포를 연속 증식시킬 수 있다. 예시적인 배지는 80% DMEM(예컨대 Knock-Out DMEM, Gibco), 20%의 규정 태아 소 혈청(FBS, Hyclone) 또는 혈청 대용물(US 2002/0076747 A1, Life Technologies Inc.) 중 하나, 1% 비필수 아미노산, 1 mM L-글루타민, 및 0.1 mM  $\beta$ -머캅토에탄올로 제조한다.

[0054]

특정 구체예에서, 영양류 다능성 줄기 세포는 영양공급 세포, 전형적으로는 배아 또는 태아 조직으로부터 유도된 섬유아세포의 층 상에서 배양한다(Thomson et al., Science 282:1145, 1998). 특정 구체예에서, 이들 영양공급 세포는 인간 또는 마우스로부터 유래한 것이다. 인간 영양공급 세포를 각종 인간 조직으로부터 분리하거나, 또는 인간 배아 줄기 세포의 섬유아세포로의 분화에 의해 유도한다(예컨대, WO 01/51616호 참조). 특정 구체예에서, 사용할 수 있는 인간 영양공급 세포는 태반 섬유아세포(예컨대, Genbacev et al., Fertil. Steril. 83(5): 1517-29, 2005 참조), 난관 상피 세포(예컨대, Richards et al., Nat. Biotechnol., 20:933-36, 2002 참조), 포피 섬유아세포(예컨대, Amit et al., Biol. Reprod. 68:2150-56, 2003 참조), 자궁 내막 세포(예컨대, Lee et al., Biol. Reprod. 72(1):42-49, 2005 참조)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055]

특정 구체예에서, 배아 줄기 세포는 영양공급 세포를 첨가하지 않고 미분화 상태로 유지할 수 있다(예컨대, Rosler et al., Dev. Dynam. 229:259-274, 2004 참조). 영양공급 세포를 함유하지 않는 배양은, 통상적으로 분화 없이 세포의 증식을 촉진하는 인자를 포함하는 영양 배지에 의해 지원된다(예컨대, 미국 특허 6,800,480호 참조). 특정 구체예에서, 영양류 다능성 줄기 세포로부터 유도된 섬유아세포 유사 세포, 텔로머화 마우스 섬유아세포 또는 조사된(~4,000 rad) 1차 마우스 배아 섬유아세포 등과 같이 그러한 인자를 분비하는 세포와 배지를 배양함으로써 상기 인자를 배지로 도입할 수 있다(미국 특허 6,642,048호). 20% 혈청 대용물 및 4 ng/ml bFGF가 보충된 KO DMEM 등의 혈청 무함유 배지에서 영양공급 세포를 평판배양하여 배지를 조절할 수 있다. 1~2일간 조절된 배지에 추가의 bFGF를 보충하여, 1~2일 동안 영양류 다능성 줄기 세포 배양을 지원하는 데 사용한다(예컨대, WO 01/51616; Xu et al., Nat. Biotechnol. 19:971, 2001 참조).

[0056]

대안적으로, 미분화 형태로 세포의 증식을 촉진하는 (섬유아세포 성장 인자 또는 포르스콜린 등의) 인자를 첨가하여 보충한 새로운 또는 조정되지 않은 배지를 사용할 수 있다. 그 예로는 40-80 ng/ml의 bFGF가 보충되고, 경우에 따라서 줄기 세포 인자(15 ng/ml), 또는 Flt3 리간드(75 ng/ml)를 포함하는 X-VIVO<sup>TM</sup> 10 (Biowhittaker) 또는 QBSF<sup>TM</sup>-60 (Quality Biological Inc.) 등의 기본 배지가 있다(예컨대, Xu et al., Stem Cells 23(3):315-23, 2005 참조). 이들 배지 조제물은 다른 시스템에서의 속도의 2~3배로 세포 성장을 지원하는 장점이 있다(예컨대, WO 03/020920호 참조).

[0057]

예를 들어, 영양류 다능성 줄기 세포를 > 15,000 세포  $cm^{-2}$ (최적으로 90,000  $cm^{-2}$ ~170,000  $cm^{-2}$ )로 평판배양한다. 통상적으로, 세포가 완전히 분산되기 전에(즉, 콜라게나제 IV 처리 ~ 5분) 효소 분해를 중지한다. ~10~2,000 세포 덩어리를 추가의 분산 없이 기재 상에서 직접 평판배양한다. 대안적으로, PBS 중 0.5 mM EDTA 용액 중에서 ~5분간 항온처리하거나, 또는 기계적으로 플레이트로부터 원하는 세포를 예컨대 미세한 피펫으로 분리하거나 긁어내어 단순히 떼어내어 플레이트가 용해성에 도달하기 전에 효소 없이 세포를 수거할 수 있다. 배양 용기로부터 세척한 후에, 세포를 추가의 분산 없이 새로운 배양물로 평판배양한다. 추가의 예에서, 영양공급세포의 부재 하에 배양된 융합성 인간 배아 줄기 세포를, 37°C에서 5~15분 동안 0.05% (wt/vol) 트립신(Gibco) 및 0.053 mM EDTA 용액과 함께 항온처리하여 플레이트로부터 제거한다. 플레이트 중에 남은 세포를 분리하여, 세포를 단일 세포 및 작은 클러스터를 포함하는 현탁액으로 분쇄한 다음 50,000~200,000 세포  $cm^{-2}$  밀도로 평판배양하여 생존을 촉진하고 분화를 제한한다.

[0058]

현미경 하에서, 영양류 다능성 줄기 세포는 고 비율의 핵/세포질, 영양류 핵인 및 세포 접합부의 식별이 불량한 치밀한 콜로니 형성을 나타낸다. 영양류 다능성 줄기 세포는 통상적으로 단계 특이적 배아 항원(SSEA) 3 및 4와 Tra-1-60 및 Tra-1-81이라고 명명한 항체를 사용하여 검출가능한 마커를 발현한다. 미분화된 인간 배아 줄기 세포는 통상적으로 RT-PCR에 의해 검출되는 바와 같이, 전사 인자 Oct-3/4, 크립토, 가스트린-방출 펩티드(GRP) 수용체, 포도칼릭신 유사(podocalyxin-like) 단백질(PODXL), 및 인간 텔로머라제 역전사 효소(hTERT)(US 2003/0224411 A1)를 발현한다.

[0059]

영양류 다능성 줄기 세포의 심근세포 계통의 세포로의 분화

[0060]

본 발명은 특히 액티빈의 존재 하에 영양류 다능성 줄기 세포를 먼저 배양한 후 BMP의 존재 하에 후속 배양하는 순차 배양에 의해 영양류 다능성 줄기 세포를 심근세포 계통의 세포로 분화하는 방법을 제공한다. 액티빈을 사

용하여 배양하는 단계 중간에는 BMP를 제외하지만, BMP를 사용한 후속 배양 단계 중간에는 액티빈을 경우에 따라 포함시킬 수 있다.

- [0061] 일부 구체예에서, 액티빈은 10 ng/ml~200 ng/ml, 또는 25 ng/ml~100 ng/ml, 또는 50 ng/ml~100 ng/ml의 농도로 배양 배지에 포함된다. 특정 구체예에서, 액티빈은 10 ng/ml 이하 또는 200 ng/ml 이상의 농도로 배양 배지에 포함된다.
- [0062] 특정 구체예에서, BMP는 10 ng/ml~200 ng/ml, 또는 25 ng/ml~100 ng/ml, 또는 50 ng/ml~100 ng/ml의 농도로 배양 배지에 포함된다. 특정 구체예에서, BMP는 10 ng/ml 이하 또는 200 ng/ml 이상의 농도로 배양 배지에 포함된다.
- [0063] 특정 구체예에서, 분화에 사용된 액티빈은 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB 또는 액티빈 C이다. 특정 구체예에서, 1종 이상의 액티빈을 사용할 수 있다. 특정 구체예에서, 다른 TGFβ 슈퍼패밀리 구성원, 예컨대 TGFβ, 노달(nodal), 또는 레프티(lefty)를, 본 발명의 방법에서 액티빈 대신에 또는 액티빈과 함께 사용할 수 있다.
- [0064] 특정 구체예에서, 분화에 사용되는 BMP는 BMP-2, BMP-4, 또는 BMP-7이다. 특정 구체예에서, BMP는 BMP-2, BMP-4 또는 BMP-7 이외의 BMP이다(BMP-1 제외). 특정 구체예에서, 1종 이상의 BMP를 사용할 수 있다.
- [0065] 특정 구체예에서, 분화 세포는 BMP 단계 이후에 액티빈 및 BMP의 부재 하에 배양한다. 이들 구체예 중 일부에서는, 그 배양 단계에 IGF를 포함시킨다. 이들 구체예 중 일부에서는, 10 ng/ml~500 ng/ml; 또는 25 ng/ml~100 ng/ml; 또는 50 ng/ml~100 ng/ml의 농도로 IGF를 포함시킨다. 일부 구체예에서는, 10 ng/ml 미만 또는 500 ng/ml 초과 농도로 IGF를 포함시킨다. IGF는 IGF-1 또는 IGF-2일 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법에서 IGF 대신 인슐린으로 대체할 수 있다.
- [0066] 영양류 다능성 줄기 세포의 심근세포 계통의 세포로의 분화 과정에서, 여러가지 지정 기간 동안 액티빈, BMP 또는 IGF의 존재 하에 세포를 배양한다. 특정 구체예에서, 액티빈을 포함하는 배양 단계 기간은 12~36 시간, 또는 12 시간~2 일, 또는 6 시간~4 일, 또는 4 시간~5 일이다. 일부 구체예에서, 액티빈을 포함하는 배양 단계는 5일 이상 지속된다.
- [0067] 일부 구체예에서, BMP를 포함하는 배양 단계 기간은 3~5일, 또는 2~8일, 또는 1~14일이다. 특정 구체예에서, BMP를 포함하는 배양 단계는 14일 이상 지속된다.
- [0068] 특정 구체예에서, IGF를 포함하는 배양 단계 기간은 3~5일, 또는 2~8일, 또는 1~4 주이다. 특정 구체예에서, IGF를 포함하는 배양 단계는 4주 이상 지속된다.
- [0069] 예를 들어, 특정 구체예에서 매트릭젤 상에서 평판배양한 인간 배아 줄기 세포는 BMP의 부재 하에 약 1일 동안 액티빈 A 50 ng/ml와 먼저 배양한 후, 액티빈의 부재 하에 약 4일 동안 BMP-4 50 ng/ml와 배양하고 나서, 액티빈 및 BMP의 부재 하에 2주 동안 IGF-1 50 ng/ml의 존재 하에 배양할 수 있다. 특정 구체예에서, 생성되는 심근세포 계통의 세포를 수거하고 실시예 3에 개시된 바와 같은 퍼콜 구배로 농축시킨다.
- [0070] 특정 구체예에서, 직접 분화에 의해 심근세포 계통의 세포로 영양류 다능성 줄기 세포를 분화시킬 수 있다. 영양류 다능성 줄기 세포에 대한 분화 패러다임은 통상적으로 배상체의 계획된 형성을 포함하는데, 이는 상이한 종류의 세포 간에 혼선을 유발하여, 배아와 유사한 방식으로 조직 형성을 촉진하는 것으로 생각된다. 그러나, 배상체 형성의 필요성을 없애는 것이 종종 유리한데, 그 이유는 이로써 분화 과정의 제어가 향상되며, 생성되는 세포군이 더욱 균일해지는 경향이 있기 때문이다(예컨대, WO 01/51616; US 2002/0151053 A1 참고).
- [0071] 직접 분화 기법의 장점 중 하나는, 다른 방법에서는 특징적인 심근세포 분화 과정을 개시 또는 지원하는 혈청 또는 혈청 대용물이 필요하지 않다는 것이다. 대신에, 배지가 심근세포 또는 뉴런과 같은 분화된 세포를 지원하는 인공 영양 보충제를 포함하도록 조제할 수 있다. 그 예로는 B27 보충제, N2 보충제 및 G5 보충제(Life Technologies/Gibco)가 있다. 특정 구체예에서, 보충제는 영양분과 인간 인슐린(500 μg/l), 인간 트랜스페린(5-10 mg/ml) 및 셀레늄(0.5 μg/ml) 등의 조인자를 포함하며, 푸트레신(putrescine)(1.5 mg/l), 비오틴(1 μg/l), 히드로코르티손(0.4 μg/l), 또는 프로그스테론(0.6 μg/l), 및/또는 낮은 농도의 유사분열 촉진인자, 예컨대 EGF 또는 FGF(1 μg/l)도 포함할 수 있다. 상업적 규모로 생산하고 인간 치료용으로 사용하기 위해서, 인간 이외의 동물로부터 유도된 성분은 제외하는 것이 유리할 수 있다.
- [0072] 특정 구체예에서, 분화 단계에서 사용된 배양 배지는 혈청을 포함하지 않는다. 특정 구체예에서, 분화 단계에서 사용된 배양 배지는 혈청을 0.25% 미만, 또는 0.5% 미만, 또는 1.0% 미만, 또는 2.0% 미만, 또는 5.0% 미만, 또

는 10% 미만으로 포함한다.

[0073] 직접 분화 방법의 장점에도 불구하고, 본 발명의 특정 구체예에서는 본 발명의 방법으로 액티브 배양 단계를 제외한 분화 프로토콜에서 일부 시점에서 배상체의 형성을 통해 영양류 다능성 줄기 세포를 심근세포 계통의 세포로 분화시킬 수 있다. 배상체는 당업계에 공지된 각종 방법으로 형성할 수 있다.

[0074] 특정 구체예에서, 본 발명의 방법을 실시하는 과정에서 분화 세포를 기재 상에서 배양한다. 본 발명의 방법에 사용할 수 있는 기재는 콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 히알루로네이트, 폴리-L-리신-코팅된 조직 배양 플라스틱 또는 매트릭셀을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명의 실시예에 있어서, 세포 배양시 사용할 수 있는 고체 표면은 다양하다. 고체 표면은 표준 세포 배양 플레이트, 예컨대 6-웰, 24-웰, 96-웰, 또는 144-웰 플레이트를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 고체 표면은 마이크로캐리어 및 디스크를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 구체예에서 마이크로캐리어는 비드이다. 이들 비드는 세포 부착을 증가시키기 위한 양으로 하전된 기를 가지는 시토크스 텍스트란(Cytodex Dextran) 마이크로캐리어, 세포 부착을 위한 젤라틴/콜라겐 코팅된 비드, 및 세포 부착을 위해 상이한 다공성을 구비한 거대기공 마이크로캐리어 비드 등의 각종 형태일 수 있다. 시토크스 텍스트란, 젤라틴 코팅 및 거대기공 마이크로캐리어 비드는 시판되고 있다(Sigma-Aldrich, 미주리주 세인트 루이스 또는 Solohill Engineering Inc., 미시간주 앤 아버). 특정 구체예에서, 비드는 크기가 90~200  $\mu\text{m}$ , 면적이 350~500  $\text{cm}^2$ 이다, 비드는 각종 재료, 비제한적인 예로서 유리 또는 플라스틱으로 이루어질 수 있다. 특정 구체예에서, 세포 부착을 위한 교반형 탱크 생물반응기에서 디스크를 사용할 수 있다. 디스크는 New Brunswick Scientific Co, Inc.(뉴저지주 에디슨) 등의 회사가 판매하고 있다. 특정 구체예에서, 디스크는 폴리에스테르/폴리프로필렌 디스크인 Fibra-cel 디스크이다. 이들 디스크는 g당 표면적이 1200  $\text{cm}^2$ 이다.

[0076] 고체 표면은 각종 물질, 비제한적인 예로서 폴리스티렌, 폴리비닐클로라이드, 폴리카르보네이트, 폴리테트라플루오로에틸렌, 펠리넥스 또는 써마녹스 등의 유리 또는 플라스틱으로 제조될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 고체 표면은 입체형상일 수 있다. 예시적인 입체 고체 표면은 예컨대 US20050031598에 개시되어 있다.

[0077] 특정 구체예에서, 세포는 본 발명의 방법을 실시하는 과정에서 단세포 현탁액으로 존재한다. 단세포 현탁은, 회전 플라스크, 진탕 플라스크 또는 발효기에서의 배양을 비롯한 각종 방법으로 실시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 사용할 수 있는 발효기는 Celligen Plus(New Brunswick Scientific Co, Inc., 뉴저지주 에디슨)와 STR, 즉 교반형 탱크 반응기(Applikon Inc., 캘리포니아주 포스터 시티)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 구체예에서, 생물반응기에 배지를 연속 살포하거나 또는 생물반응기를 유가 배양 방식에 사용할 수 있다. 생물 반응기는 2.2 l, 5 l, 7.5 l, 14 l 또는 20 l 등의 상이한 크기로 할 수 있다.

[0078] **심근세포 계통의 세포 농축 및 증식**

[0079] 본 발명자들은 농축 단계 없이 고 순도의 심근세포 계통의 세포군을 얻은 방법을 제공한다. 그런데, 하나 이상의 농축 단계를 부가하면 더욱 고 순도의 심근세포 계통의 세포군을 생산할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 본 발명의 분화 단계에 의해 얻은 심근세포 계통의 세포를 농축 및/또는 증식하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 세포 유형을 농축하는 각종 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 비제한적인 예로서 기계적 분리, 밀도 분리, 세포 분리, 자기 분리 및 유전자 선별 기법을 포함한다(예, 세포 분리의 일반적인 논의에 대해서는 Freshney의 문헌[Culture of Animal Cells, Wiley-Liss, New York, 2000 - Chapter 14] 참조). 이들 방법 중 일부에 대한 예는 하기에 논의되어 있다.

[0080] **밀도 구배**

[0081] 특정 구체예에서, 심근세포 계통의 세포는, 비제한적인 예로서 퍼콜(예컨대, 본원의 실시예 3 및 Xu 등의 문헌[Circ. Res. 91(6):501-08, 2002] 참조), 피콜(Pharmacia), 메트리자미드(Nygaard), 레드그래드(GE Healthcare) 및 텍스트란과 같은 밀도 구배 배지를 사용하여 밀도 구배 분리로 농축시킨다.

[0082] **세포 분리(Cell Sorting) 기법**

[0083] 비심근세포 계통의 세포로부터 심근세포 계통의 세포를 분리하기 위한 여러 세포 분리 기법이 이용가능하다. 이들 세포 분리 기법은 음성 면역선별 및 양성 면역선별을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0084] 면역선별이란 항체 또는 항체 유사 분자, 예컨대 랙틴이나 합텐에 의해 선별계의 특이성을 부여하는 각종 기법을 포함하는 포괄적인 용어이다. 그러한 특이성의 예는 특이적 세포 표면 항원에 대한 항체의 친화도이다. 일반

적인 2가지 유형의 면역선별 기법이 실시된다. 음성 면역선별은 본 명세서에 개시된 방법에 따라 영장류 다능성 줄기 세포의 분화로 생긴 세포군으로부터 비심근세포 계통의 세포를 제거하는 것과 같이 이종군으로부터 특정 성분의 아군을 제거하는 것을 포함한다. 반대로, 양성 면역선별은 본 명세서에 개시된 방법에 따라서 영장류 다능성 줄기 세포의 분화로부터 심근세포 계통의 세포를 직접 선택하여 회수하는 것과 같이, 특정 성분의 직접적인 선택 및 회수를 의미한다. 비제한적인 예로서 유세포 분석법(FACS), 면역자기 기법, 항체 컬럼, 면역침전 및 면역패닝(immunopanning)을 비롯한 각종 유형의 면역선별을 본 발명의 실시예에 사용할 수 있다.

[0085]

심체

[0086]

특정 구체예에서, 심체로서 언급되는 클러스터로 성장시켜 심근세포 계통의 세포를 추가 증식 또는 농축시킬 수 있다.

[0087]

먼저, 심근세포 계통의 세포의 특징적인 표현형을 가지는 세포를 포함하는 세포군을 형성하고, 경우에 따라서 밀도 분리 또는 다른 기법으로 농축시킨다. 이어서, 이 세포를 클러스터로 형성하고, 현탁액 중의 단세포를 제거한다. 이는 클러스터를 정치시키고 단세포를 포함하는 상청액을 피펫으로 제거하여 실현할 수 있다. 진행에 앞서, (예를 들어 간단한 트립신 처리 및/또는 기계적 분산에 의해) 클러스터를 분해하는 것이 때로 유리하다. 이어서 (태아 소 혈청, 혈청 대용물, 또는 CCT를 함유하는 배지를 일례로 하는) 새로운 배양 배지에서 저부착 플레이트에서 세포를 현탁액으로 배양하고, "2차" 심체로 재응집시킨다. 그 후, 크기가 10~5000 세포(통상적으로 50~1000 세포)의 클러스터로 잔존하는 심근세포 계통의 세포를 필요에 따라 주기적으로 재공급하면서 연속 배양한다.

[0088]

적절한 기간(통상 1~7일) 후에, 배양된 세포를 특성규명을 위해 수거하거나, 또는 약물 스크리닝 또는 약제 제조에 사용할 수 있다. 8일 이상에 걸쳐 단세포를 제거하고 클러스터를 재배양하는 추가의 사이클로 세포를 얻는 경우에는 정제 효과를 증가시킬 수 있다. 경우에 따라, 세포의 클러스터를 단세포 또는 더 작은 세포 클러스터로 분산시키는 단계를 각 사이클에 도입하여 추가 증식시킬 수 있다. 현탁 세포의 응집에 의해 또는 클러스터 내의 증식에 의해, 또는 둘다에 의해서 더 큰 클러스터를 형성할 수 있다. 심근세포 계통의 세포는 적당한 조건 하에 그러한 클러스터를 형성하는 경향이 있고, 단세포의 제거는 다른 세포형의 제거에 도움이 되고 균질성을 증가시킨다는 것이 본 발명의 가설이다.

[0089]

심체 기법을 사용하여 분화 과정의 임의 시점에서 세포군 중 심근세포를 증식 및/또는 농축시킬 수 있다. 하기에 예시된 바와 같이, 앞선 밀도 분리에 의한 농축 단계 후에 본 기법을 사용할 수 있다. 이러한 기법의 실시는 본 발명의 실시 이전에는 기대하지 않았던 이점을 발휘한다. 특히, 실시간 PCR에 의해 검출된 미오신 중쇄의 발현은, 세포가 7일 동안 배양될 때 10~100배 증가한다. 조성물 중 클러스터의 비율이 개시된 방식으로 처리시 일반적으로 50% 이상, 가능하게는 약 80~100%로 높으면 자발적인 수축 작용을 나타낸다.

[0090]

**ES 분화된 심근세포 계통의 세포의 특성화**

[0091]

본 발명의 기법에 따라서 얻은 심근세포 계통의 세포를 다수의 표현형 기준에 따라 특성화할 수 있다.

[0092]

영장류 다능성 줄기 세포주로부터 유도된 전구 세포 및 심근세포는 흔히 다른 공급원으로부터 유래한 심근세포의 형태학적 특징을 나타낸다. 이들은 방추형, 둥근형, 삼각형 또는 다각형일 수 있으며, 면역염색에 의해 검출 가능한 근절 구조의 특징인 줄무늬를 나타낼 수 있다(도 1). 이들은 편평한 판 형태의 세포, 또는 기질에 부착되어 고정되거나 또는 현탁액 중에 부유하는 응집체를 형성할 수 있는데, 이것은 전자 현미경 조사시 전형적인 근절 및 심방 과립을 나타낸다.

[0093]

적절한 환경에서, 영장류 다능성 줄기 세포 유도된 심근세포는 종종 자발적인 주기적 수축 작용을 발현한다. 이것은  $Ca^{++}$  농도 및 전해질 균형이 적당한 적절한 조직 배양 환경에서 배양되는 경우, 배양 배지에 임의의 추가 성분을 부가하지 않아도 세포가 세포의 한 축과 교차하여 수축한 다음 수축으로부터 해제될 수 있다는 것을 의미한다. 수축은 주기적인데, 이는 수축이 정상적인 완충액 중에서 분당 ~6 내지 200회 수축, 흔히 분당 ~20 내지 ~90회 수축의 빈도로 규칙적 또는 불규칙적으로 반복된다는 것을 의미한다(도 2). 각 세포는 세포 자체의 자발적인 주기적 수축 작용을 발휘할 수 있거나, 또는 조직, 세포 응집체 또는 배양된 세포 덩어리 내의 인접 세포와 협력하여 자발적인 주기적 수축 작용을 발휘할 수 있다.

[0094]

수축의 성질 및 빈도에 대한 배양 조건의 영향에 따라서 세포의 수축 작용을 특성화할 수 있다. 이용가능한  $Ca^{++}$  농도를 감소시키거나 또는  $Ca^{++}$ 의 경막 수송을 저해하는 화합물은 흔히 수축 활성화에 영향을 미친다. 예를 들어, L형 칼슘 채널 차단제 딜티아제프은 용량 의존적 방식으로 수축 활성을 억제한다. 한편, 아드레날린성 수용체 작

동제, 예컨대 이소프레날린 및 페닐에프린은 심박수 증가 효과를 가진다. 또한, 세포의 기능적 성질의 특성화는  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , 및  $\text{Ca}^{++}$ 에 대한 채널의 특성화를 포함한다. 활동 전위와 같이 심근세포에 대해 패치 클램프(patch clamp) 분석을 하여 전기생리학을 연구하였다. Igelmund 등의 문헌[Pflugers Arch. 437:669, 1999; Wobus et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 27:752, 1995; and Doevendans et al., J. Mol. Cell Cardiol. 32:839, 2000] 참조.

[0095] 심근세포 계통의 세포는 통상적으로 하기의 심근세포 특이적 마커 중 하나 이상을 가진다:

[0096] · 심장 트로포닌 I(cTnI) - 가로무늬근 수축을 조절하기 위해 칼슘 민감성 분자 전환을 제공하는 트로포닌 복합체의 서브유닛

[0097] · 심장 트로포닌 T(cTnT)

[0098] · Nkx2.5 - 초기 마우스 배 발생 도중 심장 중배엽에서 발현되고 발생 중인 심장에서 지속되는 심장 전사 인자

[0099] 세포는 통상적으로 하기의 마커 중 하나 이상(및 흔히 적어도 3, 5 또는 그 이상)을 발현한다:

[0100] · 심방 나트륨이노 인자(ANF)- 발생 중인 심장 및 태아 심근세포에서 발현되지만 성인에서는 하향조절되는 호르몬. 심장 세포에서는 고도로 특이적인 방식으로 발현되지만 골격 근세포에서는 발현되지 않기 때문에 심근세포에 대한 양호한 마커로 여겨진다.

[0101] · 미오신 중쇄(MHC), 특히 심장 특이적인  $\beta$ 쇄.

[0102] · 티틴(Titin), 트로포마이신,  $\alpha$ -육중 액티닌(sarcomeric actinin) 및 데스민.

[0103] · GATA-4 - 심장 중배엽에서 고도로 발현되고 발생 중인 심장에서 지속되는 전사 인자. 이 인자는 여러 심장 유전자를 조절하고 심장발생에 역할을 한다.

[0104] · MEF-2A, MEF-2B, MEF-2C, MEF-2D; 심장 중배엽에서 발현되고 발생 중인 심장에서 지속되는 전사 인자.

[0105] · 심장 세포에서 부착을 매개하는 N-카드헤린(cadherin)

[0106] · 심근세포 사이의 간극 접합(gap junction)을 형성하는 컨넥신(Connexin) 43.

[0107] ·  $\beta$ 1-아드레날린성 수용체( $\beta$  1-AR)

[0108] · 심근 경색 후에 혈청에서 상승되는 크레아틴 키나제 MB(CK-MB) 및 마이오글로빈.

[0109] ·  $\alpha$ -심장 액틴, 조기 성장 반응-1, 및 사이클린 D2.

[0110] 유세포 면역분석법 또는 세포 표면 마커에 대한 친화 흡착법, 세포내 또는 세포 표면 마커에 대한 (예컨대, 고정 세포 또는 조직 절편의) 면역세포화학, 세포 추출물의 웨스턴 블롯 분석, 및 세포 추출물 또는 배지로 분비된 생성물에 대한 효소 결합 면역분석 등의 적절한 면역 기법을 사용하여 조직 특이적 마커를 검출할 수 있다. cTnI 및 cTnT 등의 심장 마커를 다른 이소폼과 구별하는 항체는 Sigma 및 Spectral Diagnostics 등의 공급자가 시판하고 있다. 세포에 의한 항원 발현은, 경우에 따라 세포의 고정 후에, 그리고 경우에 따라 표지된 2차 항체를 사용하여 표준 면역세포화학 또는 유세포 분석법에서 유의적으로 검출가능한 항체량이 항원에 결합하는 경우 항체로 검출가능하다고 한다.

[0111] 조직 특이적 유전자 산물의 발현은, 노던 블롯 분석, 도트 블롯 하이브리드화 분석 또는 공개적으로 입수 가능한 서열 데이터(GenBank)를 사용한 표준 증폭 방법으로 서열 특이적 프라이머를 이용한 역전사효소 개시된 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 mRNA 수준에서 검출할 수 있다. 단백질 또는 mRNA 수준에서 검출되는 조직 특이적 마커의 발현은, 그 수준이 미분화된 영장류 다능성 줄기 세포의 수준보다 2배 이상, 바람직하게는 10배 이상 또는 50배 이상인 경우 양성으로 한다.

[0112] 조직 특이적 유전자 산물의 발현은, 노던 블롯 분석, 도트 블롯 하이브리드화 분석 또는 표준 증폭 방법으로 서열 특이적 프라이머를 사용한 역전사효소 개시된 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 mRNA 수준에서 검출할 수도 있다. 추가의 상세한 설명에 대해서는 미국 특허 5,843,780호 참조. 이 개시물에 열거된 특정 마커에 대한 서열 데이터는 GenBank(URL [www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez))와 같은 공개 데이터베이스로부터 입수할 수 있다. mRNA 수준에서의 발현은, 전형적인 제어 실험에서 표준 절차에 따라 세포 샘플에 대해 분석을 실시하여 명확하게 식별가능한 하이브리드화 또는 증폭 산물을 유도한 경우 이 개시물에 언급된 분석들 중 하나에 따라서 "검출가능하다"고 한다. 단백질 또는 mRNA 수준에서 검출되는 조직 특이적 마커의 발현은, 그 수준이 미분화된 영장

류 다능성 줄기 세포의 수준보다 2배 이상, 바람직하게는 10배 이상 또는 50배 이상인 경우 양성으로 한다.

[0113] 마커가 목적하는 표현형의 세포 표면에서 확인되면, 면역패닝 또는 항체 매개 형광 활성화 세포 분리와 같은 기법으로 세포군을 추가로 농축시키기 위해 면역선별에 사용할 수 있다.

[0114] 본 발명의 세포군 및 분리된 세포는, 영장류 다능성 줄기 세포의 확립 세포주로부터 유도되는 경우, 이들이 유도된 세포주와 동일한 계통을 가지는 것으로 특징지을 수 있다. 이것이 의미하는 바는, 염색체 DNA는 RFLP 또는 SNP 분석에 의한 영장류 다능성 줄기 세포와 심장 세포 간의 동일성이 90%를 넘을 수 있다는 것이며, 정상 유사 분열 과정에서 미분화 세포주로부터 심장 세포를 얻은 것으로 추정할 수 있다. 심근세포 계통의 세포가 부모 세포군으로부터 유도된다는 특징은 몇몇 측면에서 중요하다. 특히, 미분화 세포군은, 환자를 심장 동종이식편의 조직접합형에 대해 사전에 내성화시킬 수 있는 군과 같이 계통을 공유한 추가의 세포 - 심장 세포의 추가 배위 또는 치료에 유용할 수 있는 다른 세포형 -을 생성하는 데 이용할 수 있다(US 2002/0086005 A1; WO 03/050251).

[0115] *분화 세포의 유전자 변경*

[0116] 본 발명의 세포는 분화 전 또는 후에 세포의 유전자 조작으로 하나 이상의 유전자 변경을 포함하도록 만들어질 수 있다(US 2002/0168766 A1). 예를 들어, 세포를 제한된 발생 계통 세포 또는 최종 분화 세포로 진행시키기 전 또는 후에, 텔로머라제 역전사 효소를 발현하도록 세포를 유전자 변경하여 복제 가능성이 증가되도록 세포를 처리할 수 있다(US 2003/0022367 A1).

[0117] 본 발명의 세포를 유전자 변경하여 조직 재생과 연관된 능력을 향상시키거나, 또는 투여 부위로 치료 유전자를 전달할 수 있다. pan 특이적이거나 또는 분화 세포형에서 특이적으로 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된, 목적하는 유전자에 대한 기지의 코딩 서열을 사용하여 벡터를 고안한다. 특히, 하나 이상의 각종 유형의 성장 인자, 예컨대 FGF, 심장 친화성 인자, 예컨대 심방 나트륨이노 인자, 크립토 및 심장 전사 조절 인자, GATA-4, Nkx2.5, 및 MEF2-C를 발현하도록 유전자 변경된 세포가 관심의 대상이다. 투여 부위에서의 이들 인자의 생성은, 작용성 표현형의 채택 촉진, 투여된 세포의 이로운 효과 증대 또는 치료 부위에 인접한 숙주 세포의 증식 또는 활성 증가를 실현할 수 있다.

[0118] 특정 구체예에서, 하나 이상의 항원 발현이 감소 또는 제거되어 이들 세포의 면역원성이 저하되도록 인간 이외의 심근세포 계통의 세포를 유전자 변경하는 것이 바람직하다. 이것은, 예를 들어 인간 이외의 심근세포 계통의 세포를 인간에게 이종이식하는 데 유용할 수 있다.

[0119] ES 분화된 심근세포 계통의 세포의 용도

[0120] 본 발명은 다수의 심근세포 계통의 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 이들 세포군은 다수의 중요한 연구, 개발 및 상업적 용도로 사용할 수 있다.

[0121] *스크리닝*

[0122] 본 발명의 심근세포는, 세포와 다양한 이의 자손의 특성에 영향을 미치는 환경적 조건(예, 배양 조건 또는 조작) 또는 인자(예, 용매, 소분자 약물, 펩티드, 올리고펩티드)에 대한 스크리닝을 위해 상업적으로 사용할 수 있다.

[0123] 일부 용도에서, (미분화 또는 분화된) 영장류 다능성 줄기 세포를 사용하여 후기 단계의 심근세포 전구체 또는 최종 분화 세포의 성숙을 촉진하거나, 또는 그러한 세포의 장기간 배양 증식 및 유지를 촉진하는 인자를 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, 후보 성숙화 인자 또는 성장 인자는, 이들을 상이한 웰의 세포에 부가한 다음 추가 배양 및 세포 사용에 대한 바람직한 기준에 따라서 얻어진 임의의 표현형 변화를 결정하여 테스트한다.

[0124] 본 발명의 다른 스크리닝 용도는 심장 근육 조직의 유지 또는 수복에 미치는 영향에 대해 약제 화합물을 테스트하는 것이다. 화합물은 세포에 대한 약리 효과를 가지도록 고안되기 때문에, 또는 다른 곳에서 효과를 가지도록 고안된 화합물은 이 조직형의 세포에 대해서는 의도하지 않은 부작용을 나타낼 수 있기 때문에 스크리닝을 실시할 수 있다. 본 발명의 임의의 전구체 세포 또는 최종 분화 세포를 사용하여 스크리닝을 실시할 수 있다.

[0125] 독자는 일반적으로 표준서[in vitro Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, 1997] 및 미국 특허 5,030,015를 참조할 수 있다. 후보 약제 화합물의 활성 평가는 일반적으로 본 발명의 미분화 세포를 후보 화합물과만 또는 후보 화합물 및 다른 약물과 함께 조합하는 것을 포함한다. 연구자들은 (미처리된 세포 또는 불활성 화합물로 처리한 세포와 비교하여) 화합물에 기인할 수 있는 형태, 마커 표현형 또는 기능성 활성의 임의

의 변화를 결정한 다음, 화합물의 효과와 관찰된 변화를 연관시킨다.

- [0126] 세포독성은 우선 세포 생존력, 생존율, 형태 및 특정 마커와 수용체의 발현에 대한 영향으로 결정할 수 있다. 염색체 DNA에 대한 약물의 효과는 DNA 합성 또는 수복을 측정하여 결정할 수 있다. 특히 세포 주기 중 계획되지 않은 시점에서의 또는 세포 복제에 요구되는 수준 이상으로의 [<sup>3</sup>H]-티미딘 또는 BrdU 도입은 약물 효과와 일치한다. 원하지 않는 효과는 중기 확산(spread)에 의해 결정되는 자매 염색분체 교환의 비정상적인 속도를 포함한다. 독자는 추가의 상세한 설명에 대해서 A. Vickers의 문헌(In vitro Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, 1997, pp 375-410)을 참조할 수 있다.
- [0127] 마커 발현, 수용체 결합, 수축 작용 또는 전기생리학과 같은 심근세포의 활성 및 표현형을 관찰하는 임의의 표준 분석법을 사용하여 세포 배양물 또는 생체 내에서 세포 작용의 효과를 평가할 수 있다. 수축 정도 또는 빈도를 증가 또는 감소시키는 것과 같이, 수축 활성에 미치는 영향에 대해 약제 후보를 테스트할 수 있다. 효과가 관찰되는 경우, 화합물의 농도를 적정하여 중간 유효량(ED<sub>50</sub>)을 결정할 수 있다.
- [0128] 동물 테스트
- [0129] 본 발명은 또한, 임의의 인식된 요구, 예컨대 대사 기능의 선천적 오류, 질병 증상의 영향 또는 유의적인 외상 결과에 대한 심장 근육의 조직 유지 또는 수복을 증가시키기 위한 심근세포 및 전구체의 용도를 제공한다.
- [0130] 치료 투여를 위한 세포 조성물의 적합성을 결정하기 위해서, 우선 적당한 동물 모델에서 세포를 테스트할 수 있다. 한 단계로서, 생체내에서 생존하고 표현형을 유지하는 능력에 대해 세포를 평가한다. 세포 조성물을 면역결핍 동물(예, 누드 마우스 또는 화학적으로 또는 방사선에 의해 면역결핍으로 만든 동물)에게 투여한다. 재성장 기간 후에 조직을 수거하고, 다능성 줄기 유래의 세포가 존재하는 지 여부를 평가한다.
- [0131] 이는 검출가능한 표지(예, 녹색 형광 단백질 또는 β-갈락토시다제)를 발현하는 세포; (예를 들어 BrdU 또는 [<sup>3</sup>H]티미딘으로) 사전 표지된 세포를 투여하거나, 또는 (예를 들어 인간 특이적 항체를 사용하여) 구성성 세포 마커의 후속 검출에 의해 실시할 수 있다. 투여된 세포의 존재 및 표현형은, 인간 특이적 항체를 이용한 ELISA 또는 면역조직화학에 의해, 또는 공개된 서열 데이터에 따라 인간 폴리뉴클레오티드에 특이적이 되도록 증폭시키는 하이브리드화 조건 및 프라이머를 사용한 RT-PCR 분석에 의해 평가할 수 있다.
- [0132] 심근세포 계통의 세포군 처리로 일어나는 심장 회복도를 평가하여 적합성을 결정할 수도 있다. 그러한 테스트를 위해 다수의 동물 모델이 이용가능하다. 예를 들어, 사전 냉각시킨 알루미늄 막대기를 좌심실의 전벽 표면과 접촉시켜 심장에 저온 손상을 유발할 수 있다(Murry et al., J. Clin. Invest. 98:2209, 1996; Reinecke et al., Circulation 100:193, 1999; 미국 특허 6,099,832; Reinecke et al., Circ Res., Epub Mar 2004). 더 큰 동물에서는, 좌심실의 전벽에 액체 N<sub>2</sub> 중에 냉각된 30~50 mm 구리 원판 프로브를 ~20분 동안 두어 냉동 손상을 실시할 수 있다(Chiu et al., Ann. Thorac. Surg. 60:12, 1995). 좌측의 주 관상 동맥을 결찰시키거나(Li et al., J. Clin. Invest. 100:1991, 1997) 또는 동맥을 폐색하도록 점차 팽윤시키는 아메로이드 수축기(ameroid constriction device)를 사용하여 경색을 유도할 수 있다. 손상된 부위를 본 발명의 세포 조제물로 처리하고, 손상 부위에서의 세포의 존재에 대한 조직학으로 심장 조직을 검사한다. 좌심실 이완기말 압력, 수축기와 이완기의 압력 차이(developed pressure), 압력 증가 속도 및 압력 감소 속도 등의 매개인자를 측정하여 심장 기능을 모니터링할 수 있다.
- [0133] 인간에서의 치료 용도
- [0134] 적당한 테스트 후에, 본 발명의 분화 세포를, 그러한 치료를 요하는 인간 환자 또는 다른 피험체에서 조직 재구성 또는 재생에 사용할 수 있다. 세포를 목적하는 조직 부위로 이식 또는 이동시키고 기능 결여 영역을 재구성 또는 재생시키는 방식으로 세포를 투여한다. 심장 기능을 재구성할 수 있는 세포를 심장의 방, 심막 또는 목적하는 위치에서의 심장 근육의 내부에 직접 투여하는 데 적합한 특수 장치가 이용가능하다.
- [0135] 바람직한 경우, 심근세포 계통의 세포의 동종이식편을 수용한 환자를, 이식된 세포의 면역 거부반응이 저하되도록 치료할 수 있다. 관련된 방법은 시클로스포린 A와 같은 전형적인 면역억제 약물의 투여(Dunn et al., Drugs 61:1957, 2001), 또는 다능성 줄기 유도된 세포의 대용군을 사용한 면역내성 유도(WO 02/44343; 미국 특허 6,280,718; WO 03/050251)를 포함한다. 또 다른 방법은, 예를 들어 알로푸리놀로 치료하여 심근세포 계통의 세포군이 피험체로의 이식시 세포에 의해 생성되는 노산의 양을 감소시키도록 하는 것이다. 대안적으로 또는 병행하여, 환자에게 알로푸리놀 또는 노산을 대사하는 효소, 예컨대 우레이트 옥시다제를 투여한다

(PCT/US04/42917).

- [0136] 본 발명에 따른 재생성 의약을 수용하기에 적합한 환자는 각종 종류의 급성 및 만성 심장 병태, 예컨대 관상 심장 질환, 심근병증, 심내막염, 선천성 심혈관 장애 및 울혈성 심부전을 가지는 환자를 포함한다. 임상적으로 허용가능한 기준, 예컨대 협심증의 빈도 및 경중과, 반흔 조직의 재혈관형성 또는 반흔 조직이 점유하는 면적의 감소; 또는 수축기와 이완기의 압력 차이, 수축기압, 이완 말기압,  $\Delta$ 압력/ $\Delta$ 시간, 환자 이동성 및 시간의 개선에 의해 치료 효과를 모니터링할 수 있다.
- [0137] 본 발명의 심근세포 계통의 세포는, 인간 투여용으로 충분한 멸균 조건 하에 준비된 등장성 부형제를 포함하는 약학 조성물의 형태로 제공할 수 있다. 분화 절차가 심체로서 세포를 배양하는 것을 포함하는 경우, 프로테아제를 사용하거나, 또는 약간의 기계적 조작을 실시하여 세포를 단일 세포 또는 보다 작은 클러스터의 현탁액으로 분산시키는 것이 바람직할 수 있다. 이식시 세포사 위험을 줄이기 위해서, 투여 ~24 시간 전에 에리트르포이에틴 ~0.5 U/ml과 함께 세포를 배양하거나, 또는 열 충격으로 세포를 처리할 수 있다.
- [0138] 의약 조제에 있어서의 일반적인 원리에 대해서는, 문헌[Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; and Hematopoietic Stem Cell Therapy, E.D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000]을 참조할 수 있다. 세포 부형제와 조성물의 임의의 수반되는 성분들은 투여에 사용되는 경로와 장치에 따라서 적합하게 선택한다. 또한, 조성물은 심근세포 계통의 세포의 기능성 이동화 또는 이식을 촉진하는 하나 이상의 다른 성분을 포함하거나, 또는 이를 동반할 수 있다. 적절한 성분은 심근세포 계통의 세포 또는 보체성 세포 유형, 특히 내피 세포의 유착을 지원하거나 촉진하는 매트릭스 단백질을 포함한다.
- [0139] 본 발명은 또한 약물 제조, 유통 또는 사용 과정의 임의 시점에서 존재하는 세포 세트 또는 조합을 포함하는 시약 시스템을 포함한다. 세포 세트는 본 명세서에 개시된 2 이상의 세포군, 비제한적인 예로는 분화된 다능성 줄기 유도 세포(심근세포, 심근세포 전구체, 심체 등)의 임의의 조합을 포함하며, 흔히 동일한 계통을 공유하는 비분화된 영양류 다능성 줄기 세포 또는 다른 분화된 세포 유형과 함께 포함한다. 세트 중의 각 세포 유형은 함께 또는 별도 용기에, 동일한 설비에서 또는 다른 장소에서, 동시에 또는 상이한 시점에서, 사업 관계를 공유하는 상이한 기업 또는 동일한 기업 감독하에 포장할 수 있다.
- [0140] 경우에 따라서는 본 발명의 약학 조성물을, 질병 상태 또는 심장 근육의 비정상적 개선을 위한 심근세포 계통의 세포의 재구성과 같은 목적하는 용도에 대한 지시서와 함께 적절한 용기에 포장할 수 있다.
- [0141] 본 발명의 세포를 사용하여 다른 계통으로부터 유래한 세포에서 우선적으로 발현되는 cDNA로 비교적 오염되지 않은 cDNA 라이브러리를 준비할 수 있다. 예를 들어, 5분 동안 1000 rpm에서 원심분리하여 심근세포 계통의 세포를 수거한 다음, mRNA를 준비하여 역전사킨다. 심근세포 계통의 세포의 발현 패턴은, 일반적으로 Fritz 등 [Science 288:316, 2000; "Microarray Biochip Technology", L Shi, www.Gene-Chips.com]이 검토한 바 있는, 마이크로어레이 분석으로 다른 세포형과 비교할 수 있다.
- [0142] 본 발명의 분화 세포를 사용하여 심근세포 계통의 세포 마커에 특이적인 항체를 준비할 수 있다. 번역원성 형태의 본 발명의 세포를 척추 동물에게 주사하여 폴리클론 항체를 제조할 수 있다. 모노클론 항체는 문헌[Harrow & Lane(1988)], 미국 특허 4,491,632, 4,472,500 및 4,444,887, 및 문헌[Methods in Enzymology 73B:3(1981)] 등의 표준 문헌에 개시되어 있다.
- [0143] 본 출원에 언급된 모든 공개공보 및 특허는 임의의 목적으로 본원에 참고 인용된다.

**실시예**

- [0144] **실시예 1**
- [0145] **젤라틴/FBS에서의 3가지 분화 인자**
- [0146] 젤라틴/FBS 코팅 표면의 제조: 0.5% 젤라틴 용액 1 ml/웰을 6웰 플레이트의 웰에 첨가하고 37°C에서 밤새 항온 처리하였다. 젤라틴 용액을 제거하고, 20% FBS를 함유하는 충분한 배지(예, 너아웃 DMEM 중 20% FBS(시그마))를 첨가하여 웰 표면을 피복하였다. 플레이트를 37°C에서 추가의 5~6 시간 동안 항온처리하였다. 인간 배아 줄기 세포를 첨가하기 전에, 웰로부터 배지를 제거하였다.
- [0147] 후속 분화를 위한 미분화된 인간 배아 줄기 세포의 평판배양
- [0148] 미분화된 인간 배아 줄기 세포 6웰 플레이트 중 하나의 웰을 a) 배지를 제거하고; b) PBS로 1회 웰을 세척하고;

c) 0.25% 트립신/500 mM EDTA 용액 1 ml를 첨가하여 해리시켰다. 10분 동안 37°C에서 웰을 항온처리한 다음 1 ml 피펫터로 10회 분쇄하였다. 세포가 완전히 해리되었는지를 확인하기 위해 웰을 현미경 검사하였다. 20% PBS 함유 배지(예, 닉아웃 DMEM 중 20% FBS) 2 ml를 첨가하여 트립신을 불활성화하였다. 세포를 계수하고 이 수를 사용하여 남은 웰로부터 유도된 세포를 원하는 밀도로 평판배양하였다.

[0149] 남은 웰로부터 배지를 제거하였다. 20 유닛/ml 콜라게나제 용액을 웰(1 ml/웰)에 첨가하였다. 10분 동안 37°C에서 웰을 항온처리하고 콜라게나제 용액을 제거하였다. MEF 조정 배지 1 ml + 8 ng/ml bFGF를 웰에 첨가하였다. 세포가 (작은 클러스터로) 떨어질 때까지 웰을 5 ml 피펫터로 긁어내었다; 추가의 분쇄는 실시하지 않았다. 원하는 밀도로 세포를 희석하고, 상기 개시된 바와 같이 제조한 6웰 플레이트로 평판배양하였다(이 경우, 웰당 5 ml 부피로 670,000 세포; 3웰을 평판배양하였다). 사용한 배지를 제거하고 새로운 MEF-CM + 8 ng/ml bFGF으로 대체하여 ES 세포를 매일 재공급하였다(목요일에 평판 배양된 세포에 대해서는, 일요일의 공급은 일반적으로 생략한다).

[0150] *성장 인자 처리*

[0151] 상기 개시된 바와 같은 성장 6일 후에, 세포 배지를 제거하고 RPMI + 1X B27 보충재(Invitrogen) + 50 ng/ml 액티빈 A(R&D Systems)로 교체하였다. 18~24 시간 후에, 배지를 제거하고 RPMI + 1X B27 보충재 + 50 ng/ml BMP-4(R&D Systems)로 교체하였다. BMP-4 함유 배지 중에서 총 4일 후에, 배지를 제거하고, 액티빈 또는 BMP 없이 RPMI + 1X B27 보충재 + 50 ng/ml IGF-1(R&D Systems)로 교체하였다. 사용한 배지를 제거하고 액티빈 또는 BMP 없이 RPMI + 1X B27 보충재 + 50 ng/ml IGF-1로 교체하여 매 2~3 일마다 배양물을 재공급하였다.

[0152] 다수의 박동 세포 클러스터는 액티빈 A를 첨가한 지 대략 12일 후에 시작하여 나타난다. 액티빈 A를 첨가한 후 24일째에 세포를 계수하고(6웰 플레이트 중 총 3웰 플레이트로부터의 9백1십만 세포), 하기의 절차에 의해 심장 트로포닌 I 발현에 대해 FACS로 분석하였다.

[0153] *FACS 분석*

[0154] 흡인에 의해 배양물로부터 배지를 제거하였다. 칼슘/마그네슘 무함유 PBS 5 ml로 웰을 1회 세척하였다. 웰당 0.25% 트립신/500 mM EDTA 용액 1/2 ml를 웰에 첨가하고, 20분 동안 37°C에서 세포를 항온처리하였다. 단일 세포 현탁액이 얻어질 때까지 피펫터로 세포를 분쇄하였다. 20% FBS 함유 배지(닉아웃 DMEM 중 20% FBS) 1 ml를 첨가하여 트립신 분해를 중단시켰다. 계수하여 세포 농도를 측정하고, 각 염색을 위해 약 500,000 세포를 할당하였다(EMA, 아이소타입, cTnI, cTnI + EMA; 각각 15 ml 원뿔형 튜브내에 있음).

[0155] 세포를 함유하는 튜브를 5분 동안 400 x g에서 원심분리로 회전시켰다. 배지를 흡인하고 세포 펠릿을 염색 완충액(PBS + 1% 열 불활성화 염소 혈청 및 0.1% 나트륨 아지드) 1 ml 중에 재현탁시켰다. EMA 염색을 위해, 최종 농도 5 µg/ml로 세포에 EMA를 추가하였다. 이들 샘플을 15분 동안 암실의 얼음 위에서 항온처리한 다음, 상기한 바와 같이 펠릿화하였다. EMA 처리된 샘플을 PBS 500 µl 중에 재현탁시키고 10분 동안 빛에 노출시켰다. EMA 처리된 샘플에 4% 파라포름알데히드 500 µl를 첨가하고, 실온에서 15분 동안 암실에서 항온처리하였다. EMA가 첨가되지 않았지만 항체로 후속 염색된 샘플을 상기한 바와 같이 펠릿화하고, PBS 500 µl 중에 재현탁시킨 후, 4% 파라포름알데히드 500 µl를 추가하고, 실온에서 15분 동안 암실에서 항온처리하였다.

[0156] 모든 샘플을 상기한 바와 같이 펠릿화하고 PBS 100 µl 중에 재현탁시켰다. 이어서 모든 샘플에 얼음 냉각된 100% 메탄올 900 µl를 첨가하고 30분 동안 얼음 위에서 항온처리하였다. 모든 샘플에 염색 완충액(PBS + 1% 열 불활성화된 염소 혈청 및 0.1% 나트륨 아지드) 1 ml를 첨가하고 상기한 바와 같이 펠릿화하였다. 상청액을 흡인하고 약 500,000 세포/50 µl의 밀도로 블록킹 완충액(PBS + 20% 정상 염소 혈청 및 0.1% 나트륨 아지드) 중에 세포를 재현탁시켰다. 10~15분 동안 4°C에서 샘플을 항온처리하였다. 각 염색 샘플에 대해, 세포 분액 50 µl를 각각 12 x 75 mm 폴리스티렌 튜브에 분배하였다. 염색하고자 하는 각 샘플에 50 µl의 심장 트로포닌 I 항체(Spectral Diagnostics) 또는 이소타입 대조군(1개의 튜브당 항체 최종량은 1.2 µg이었음)를 첨가하였다. 30분 동안 4°C에서 샘플을 항온처리하였다.

[0157] 2 ml 염색 완충액을 첨가한 후에, 상기한 바와 같이 샘플을 펠릿화하였다. 이 세척 단계를 반복하였다. 제2 세척 상청액을 제거한 후에, 샘플을 2차 항체(alexa 488로 표지된 Molecular Probes 염소 항마우스 IgG) 0.25 µg을 함유하는 PBS 중 5% 정상 염소 혈청 50 µl에 재현탁시켰다. 샘플을 암실에서 30분 동안 4°C에서 항온처리하고, 2 ml 염색 완충액을 첨가하여 세척하고 상기한 바와 같이 펠릿화하였다. 상청액을 따라내고 FACScalibur 기기 상에서의 유세포 획득(flow acquisition)을 위해 샘플을 염색 완충액 300 µl 중에 재현탁시켰다.

[0158] 이 실험에서, 트립신 처리 후 총 세포의 54.49%가 생존하였다. 이들 생세포 중 세포 24.67-27.36%가 심근 근절

단백질 심장 트로포닌 I에 대해 유도된 항체로 염색되었다. 이들 결과는 도 1에 도시되어 있다.

[0159] 실시예 2

[0160] 매트릭셀 코팅된 표면에서의 3가지 직접적인 분화 인자

[0161] 성장 인자 감소된 매트릭셀 분액은 저온 너아웃 DMEM으로 미리 1:2 희석하고 -20℃에서 보관한 것이다. 매트릭셀 용액을 저온 너아웃 DMEM을 사용하여 1:15로 추가 희석하였다. 6웰 플레이트 중 빈 웰을 희석된 매트릭셀 용액으로 1 ml/웰로 코팅하고, 4~5 시간 동안 실온에서 플레이트를 항온처리하였다. 매트릭셀 용액을 제거하고, 웰의 사전 세척 없이 하기 개시된 바와 같이 인간 ES 세포를 평판배양하였다.

[0162] 후속 분화를 위한 미분화된 hES 세포의 평판 배양

[0163] 1) 미분화된 hES 세포의 6웰 플레이트 중 하나의 웰 내 세포를 a) 배지를 제거하고; b) PBS로 1회 웰을 세척하고; c) 0.05% 트립신/500 mM EDTA 용액 1 ml를 첨가하여 해리시켰다. 10분 동안 37℃의 항온기에서 웰을 항온처리하였다. 세포가 완전히 해리될 때까지 피펫터로 세포를 분쇄하였다. 20% FBS 함유 배지(예, 너아웃 DMEM 중 20% FBS) 2 ml를 첨가하여 트립신을 불활성화하였다. 세포를 계수하고 이 수를 사용하여 남은 웰로부터 유도된 세포를 원하는 밀도로 평판배양하였다.

[0164] 남은 웰로부터 배지를 제거하였다. 콜라게나제 용액(200 유닛/ml)을 1 ml/웰로 첨가하고, 10분 동안 37℃에서 웰을 항온처리하였다. 콜라게나제 용액을 제거하고, MEF 조정 배지 + 8 ng/ml bFGF를 첨가하였다. 세포가 (작은 클러스터로) 떨어질 때까지 웰을 피펫터로 긁어내었다; 추가의 분쇄는 실시하지 않았다. 원하는 밀도로 세포를 희석하고, 상기 개시된 바와 같이 제조한 6웰 플레이트로 평판배양하였다(이 경우, 웰당 5 ml 부피 중 1,850,000 세포). 사용한 배지를 제거하고 새로운 MEF-CM + 8 ng/ml bFGF으로 대체하여 평판배양된 hES 세포를 매일 공급하였다(단, 제2일 제외).

[0165] 성장 인자 처리

[0166] 상기 개시된 바와 같은 성장 6일 후에, 세포 배지를 제거하고 RPMI + 1X B27 보충재(Invitrogen) + 50 ng/ml 액티빈 A로 교체하였다. 18~24 시간 후에, 배지를 제거하고 액티빈 A를 함유하지 않는 RPMI + 1X B27 보충재 + 50 ng/ml BMP-4로 교체하였다. BMP-4 함유 배지 중에서 총 4일 후에, 배지를 제거하고, 액티빈 또는 BMP 없이 RPMI + 1X B27 보충재 + 50 ng/ml IGF-1로 교체하였다. 사용한 배지를 제거하고 액티빈 또는 BMP 없이 새로운 RPMI + 1X B27 보충재 + 50 ng/ml IGF-1로 교체하여 매 2~3 일마다 배양물을 재공급하였다.

[0167] 액티빈 A의 첨가 10~12일 후에 박동 세포가 나타났다. 21일째에 세포를 계수하고, 하기의 절차에 의해 심장 트로포닌 I 발현에 대해 FACS로 분석하였다.

[0168] FACS 분석

[0169] 흡인에 의해 배양물로부터 배지를 제거하였다. 칼슘/마그네슘 무함유 PBS 5 ml로 웰을 1회 세척하였다. 웰당 0.25% 트립신/500 mM EDTA 용액 1 ml를 첨가하고, 5분 동안 37℃에서 세포를 항온처리하였다. 트립신 중에서 떨어진 세포를 15 ml 원뿔형 튜브로 옮기고 추가 15~20분 동안 37℃에서 항온처리하였다. 단일 세포 현탁액이 얻어질 때까지 피펫터로 세포를 분쇄하였다. 2 ml의 20% FBS 함유 배지(너아웃 DMEM 중 20% FBS)를 첨가하여 트립신 분해를 중지시켰다. 계수하여 세포 농도를 측정하고, 각 염색을 위해 약 500,000 세포를 할당하였다(EMA, 아이소타입, cTnI, cTnI + EMA; 각각 원뿔형 튜브 중 15 ml). 세포를 함유하는 튜브를 5분 동안 400 x g에서 원심분리로 회전시켰다. 배지를 흡인하고 세포 펠릿을 염색 완충액(PBS + 2% 열 불활성화된 태아 소 혈청 및 0.1% 나트륨 아지드) 1 ml 중에 재현탁시켰다. EMA 염색을 위해, 최종 농도 5 µg/ml로 세포에 EMA를 추가하였다. 이들 샘플을 15분 동안 암실의 얼음 위에서 항온처리한 다음, 상기한 바와 같이 펠릿화하였다. EMA 처리된 샘플을 PBS 1 ml 중에 재현탁시키고 10분 동안 빛에 노출시켰다. EMA 처리된 샘플에 4% 파라포름알데히드 1 ml를 첨가하고, 실온에서 15분 동안 암실에서 항온처리하였다. EMA가 첨가되지 않았지만 항체로 후속 염색된 샘플을 상기한 바와 같이 펠릿화하고, PBS 500 µl 중에 재현탁시킨 후, 4% 파라포름알데히드 500 µl를 추가하고, 실온에서 15분 동안 암실에서 항온처리하였다. 모든 샘플은 상기한 바와 같이 펠릿화하고, PBS 100 µl 중에 재현탁시켰다.

[0170] 이어서 모든 샘플에 얼음 냉각된 100% 메탄올 900 µl를 첨가하고 30분 동안 얼음 위에서 항온처리하였다. 모든 샘플에 염색 완충액(PBS + 2% 열 불활성화된 태아 소 혈청 및 0.2 µg/0.5 x 10<sup>6</sup> 세포의 래트 항마우스 Fc 블록(BD)) 1 ml를 첨가하고 상기한 바와 같이 펠릿화하였다. 상청액을 흡인하고 약 500,000 세포/100 µl의 밀도로

블록킹 완충액(PBS + 20% 정상 염소 혈청 및 0.1% 나트륨 아지드)에서 세포를 재현탁시켰다. 10~15분 동안 4°C에서 샘플을 항온처리하였다. 각 염색 샘플에 대해, 세포 분액 100  $\mu$ l를 각각 12 x 75 mm 폴리스티렌 튜브에 분배하였다. 염색하고자 하는 각 샘플에 20  $\mu$ l의 심장 트로포닌 I 항체(Spectral Diagnostics) 또는 이소타입 대조군(1개의 튜브당 최종량은 1.2  $\mu$ g이었음)을 첨가하였다. 30분 동안 4°C에서 샘플을 항온처리하였다. 염색 완충액 4 ml의 첨가 후에, 전술한 바와 같이 샘플을 펠릿화하였다.

[0171] 제2 세척 상청액을 제거한 후에, 샘플을 2차 항체(alexa 647로 표지된 Molecular Probes 염소 항마우스 IgG1) 0.25  $\mu$ g을 함유하는 PBS 중 5% 정상 염소 혈청 50  $\mu$ l에 재현탁시켰다, 샘플을 암실에서 30분 동안 4°C에서 항온처리하고, 4 ml 염색 완충액을 첨가하여 세척하고 상기한 바와 같이 펠릿화하였다. 상청액을 따라내고 FACScalibur 기기 상에서의 유세포 획득을 위해 염색 완충액 + 0.5% 파라포름알데히드 300  $\mu$ l 중에 샘플을 재현탁시켰다. 결과는 Flojo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 이 실험에서, 총 세포의 69%가 트립신 해리 후에 생존하였다. 이들 생세포 중 8.9%가 심근세포 특이적 단백질 심장 트로포닌 I에 대한 항체로 염색되었다(도 2 참조).

[0172] **실시예 3**

[0173] 4상 원심분리법 농축의 실시예

[0174] 4일 동안 배양체를 형성하고 젤라틴 코팅된 플레이트에서 17일 동안 증식시켜(5-아자-데옥시-시티딘 및 성장 인자는 사용하지 않았음) H7 세포주의 hES 세포로부터 심근세포를 형성하였다. 이어서, 콜라게나제 B를 사용하여 세포를 해리시키고, 분화 배지에서 재현탁시켰다. 그 다음 세포 현탁액을 불연속 퍼콜 구배로 층화하고, 30분 동안 1,500 g에서 원심분리하였다. 4 분획을 수거하였다: I. 상부 계면; II. 40.5% 층; III. 하부 계면; IV. 58.5% 층. 세포를 세척하고 분화 배지에서 재현탁시켰다. 면역염색용 세포를 웰당  $10^4$  세포로 챔버 슬라이드에 접종하고, 2 또는 7 동안 배양한 다음 고정 및 염색하였다.

[0175] 결과는 표 3에 제시되어 있다. MHC 양성 세포의 비율(%)은 각 분획에 대해 삼중 웰로부터의 30 이미지의 세포를 계수하여 결정하고 3웰로부터의 세포의 평균  $\pm$  표준 편차로서 제시하였다.

**표 3**

[0176] 퍼콜 분리

분획	세포 계수	박동 세포	MHC에 대한 염색 비율(%)	
			2일	7일
분리전		+	17 $\pm$ 4.4 %	15 $\pm$ 4%
I	9.0 x 10 <sup>6</sup>	$\pm$	2.6 $\pm$ 0.5%	2.5 $\pm$ 3.0%
II	1.6 x 10 <sup>6</sup>	+	4.5 $\pm$ 1.5%	2.4 $\pm$ 0.9%
III	4.0 x 10 <sup>6</sup>	++	35.7 $\pm$ 2.7%	28.3 $\pm$ 9.4%
IV	1.3 x 10 <sup>6</sup>	+++	69. $\pm$ 5.0%	52.2 $\pm$ 14.5%

[0177] 모든 분획에서 박동 세포가 관찰되었으나, 분획 III 및 IV에서 최대 비율(%)로 포함되었다.

[0178] 간접 면역조직화학법으로 측정된 세포의 표현형은 표 4에 제시되어 있다.

**표 4**

[0179] 분리된 세포군의 특성

에피토프	심근세포 계통의 세포	비-심장 세포
cTnI	++	-
심장 특이적 $\alpha/\beta$ MHC	++	-
심장 $\beta$ MHC	++	-
근질(sarcomeric) MHC	++	-
N-카드헤린	++	$\pm$

평활근 액틴	++	서브세트
마이오제닌	-	-
$\alpha$ -페도단백질	-	-
$\beta$ -튜불린 III	-	-
Ki67	서브세트	서브세트
BrdU	서브세트	서브세트
SSEA-4	-	-
Tra-1-81	-	-

- [0180] 밀도 구배 원심분리로 분리한 심근세포군은 cTnI 및 MHC에 대한 염색으로 구별할 수 있다. 마이오제닌,  $\alpha$ -페도 단백질 또는  $\beta$ -튜불린 III에 대한 염색 부재는 골격근, 내배엽 세포형 및 뉴런의 부재를 나타내었다. SSEA-4 및 Tra-1-81에 대한 염색 결여로 미분화 hES 세포의 부재가 확인된다.
- [0181]  $\alpha$ -평활근 액틴(SMA)은 배아 및 태아 심근세포에 존재하나, 성인 심근세포에는 존재하지 않는 것으로 보고되고 있다(Leor et al., Circulation 97:I1332, 1996; Etzion et al., MoI. Cell Cardiol. 33:1321, 2001). 심근세포 분화 프로토콜에서 얻은 실질적으로 모든 cTnI 양성 세포와 cTnI 음성 세포의 서브세트가 SMA에 대해 양성을 나타내었으며, 이는 이들 세포가 초기 단계에 있으며 증식할 수 있다는 것을 시사하는 것이다.
- [0182] 분획 III 및 IV의 세포를 재평판배양하고, 추가의 2일 동안 배양하였다. MHC 양성 세포의  $43 \pm 4\%$ 가 BrdU를 발현하였는데, 이는 이들 세포가 세포 주기 중 S기에 있다는 것을 제시한다. 다른 실험에서, cTnI 양성 세포의 서브세트가 Ki-67을 발현하는 것으로 밝혀졌다. 이들 결과는 세포군 중 심근세포 약 20% 또는 40%가 활성 증식을 진행하는 중이라는 것을 보여준다.
- [0183] **실시예 4**
- [0184] *심체 형성에 의한 수축 세포 농축 실시예*
- [0185] 본 실시예는 심근세포 클러스터를 심체로서 후속 배양하여 치료 용도 및 기타 목적에 바람직한 특성을 가지는 세포를 농축시키는 방법을 예시한다.
- [0186] H7 세포주의 미분화 hES 세포의 225 cm<sup>2</sup> 플라스크 3개를 사용하여 이미 개시된 바와 같은 배상체를 형성하였다. 각 플라스크로부터의 EB를 배지 75 ml 중에 재현탁시키고, 3개의 저부착 6웰 플레이트(웰당 4 ml 세포 현탁액)로 옮겨, 현탁액 중 EB 플레이트 총 9개를 얻었다. 현탁액 중에서 1일 후에 새로 형성된 EB를 50 ml 원뿔형 튜브(튜브당 1개의 플레이트)로 옮기고, 10~20분간 교반하지 않으면서 실온에서 EB를 정치시킨 다음 배지를 제거하고, 새로운 배지(튜브당 25 ml)로 교체하여 EB를 재공급하였다.
- [0187] EB를 본래의 저 부착 플레이트로 다시 보내어 추가 3일 동안 20% FBS 함유 배지에서 현탁액으로 유지한 다음, 총 3개의 젤라틴 코팅된 225 cm<sup>2</sup> 조직 배양 플라스크로 옮겼다. 젤라틴 코팅된 플라스크로 옮긴 지 2일 후에, 배지를 제거하고 각 플라스크에 20% FBS 함유 배지 75 ml를 재공급하였다. 유사한 재공급을 8일, 11일, 13일, 15일 및 18일에 실시하였다. 20일째에 분화된 배양물을 Blendzyme(Roche Applied Sciences, 독일 펜츠베르크)으로 해리시키고, 전술한 바와 같은 불연속 퍼콜 구배로 분획화하였다. 분획 IV(최대 밀도 분획)를 회수하고 계수하여,  $\sim 3.7 \times 10^6$  단일 세포 및 작은 클러스터를 얻었다.
- [0188] 분획 IV 세포를 20% FBS 함유 배지  $\sim 6.5$  ml 중에 재현탁시키고, 15 ml 원뿔형 튜브로 옮기고, 10분 동안 교반없이 실온에서 정치시켰다. 배지( $2.8 \times 10^6$  세포를 함유하며, 이중 대부분은 단일 세포임)를 제거하고, 새로운 배지로 교체하였다. 세포 현탁액을 하나의 저 부착 6웰 플레이트(웰당  $\sim 4$  ml의 세포 현탁액)로 옮겼다. 매 48 시간마다 CB를 유사한 방식(50 ml 튜브로 옮김, 10분 동안 정치, 배지 제거 및 교체)으로 재공급하였다.
- [0189] 도 3은 실시간 PCR에 의해 측정된 근질 유전자  $\alpha$ -MHC 및 심장 트로포닌 I의 발현을 도시한다. 젤라틴에서 20일 배양한 후의 발현과 비교하여, 퍼콜로 세포를 분리하면 분획 IV 세포에서의 발현이 2~5배 증가하였다. 단일 세포를 제거하고 클러스터를 회수하면 발현이 5~20배로 증가하였다. 심체로서 세포를 배양한 지 8일 후에, 발현량은 비분리 세포보다 100~500 배 높았다.
- [0190] CB를 젤라틴 또는 매트릭셀 상에서 재평판배양하면, 클러스터가 부착하고, 평평해지고, 자발적으로 수축하는 세

포의 거대 패치를 생성한다. 동물 테스트에 사용하기 위해서, 심체를 직접 이식하거나, 또는 단일 세포의 현탁액으로 분산시킬 수 있다.

[0191] **실시예 5**

[0192] 분화는 6웰 플레이트 대신에 24웰 플레이트에서 실시하고 인자에 대한 부피가 웰당 1 ml인 것을 제외하고는 실시예 1에서와 같이 H7 hES 세포의 분화를 실시하였다. 또한, BMP-2 및 BMP-4를 25 ng/ml, 50 ng/ml, 및 100 ng/ml의 농도로 사용하였다. 각 농도를 삼중으로 실시하였다. 도 4는, 프로토콜의 실시를 포함하지만 액티빈, BMP 또는 IGF-I을 첨가하지 않은 대조군의 비교 배수로서 표시된 결과를 도시한다. BMP-2는 분화 프로토콜에서 역시 효과적인 것을 관찰할 수 있다.

[0193] **실시예 6**

[0194] 융합성 H7 hES 세포의 6웰 플레이트를 2 ml PBS로 세척하였다. 이어서, PBS 중 0.5 mM EDTA 2 ml를 각 웰에 첨가하고, 이 플레이트를 37°C에서 10분간 항온처리하였다. EDTA 용액을 1 ml 마우스 배아 섬유아세포 조정 배지(MEF-CM) + 8 ng/ml bFGF("배지 A") 1 ml로 교체하였다. 2~3회 피펫팅하여 미분화 ES 세포를 떼어내고, 배지 A 중에서 400,000 세포/웰로 24웰 플레이트에 접종하였다. 세포를 37°C에서 2일 동안 항온처리하였다.

[0195] hES 세포의 분화를 유도하기 위해서, 배지 A를 24웰 플레이트의 웰당 B27:RPMI(1:50)(둘다 Invitrogen에서 입수한 시약) 0.5 ml와 100 ng/ml 액티빈 A(R&D Systems)("배지 B")로 교체하였다. 세포를 24 시간 동안 항온처리하였다. 배지 B를, 24웰 플레이트의 웰당 1 ml의 양으로 1:50 B27:RPMI("배지 C") 중 10 ng/ml BMP-4(R&D Systems)로 교체하였다. 세포를 4일 동안 항온처리하였다.

[0196] 배지 C를, 24웰 플레이트의 웰당 1:50 B27:RPMI 1 ml로 교체하고, 플레이트를 15일 동안 항온처리하였다. 실시예 2에서와 같이 FACS로 생성되는 세포를 분석하였으나, 단 실시예 2에 사용된 20분 대신에 5분 동안 0.25% 트립신/500 mM EDTA 용액에서 세포를 항온처리하였다. 세포의 약 36%가 cTnI를 발현하였다.

**도면의 간단한 설명**

[0023] **도 1** - 실시예 1에 제시된 방법에 따라 젤라틴 및 FBS로 코팅된 웰에 H7 세포를 평판배양한 후 분화시켰다. 액티빈의 최초 첨가 후 24일째에, 배양물을 트립신-EDTA로 해리하고, 고정하고, 투과시키고 심장 트로포닌 I에 대한 항체로 염색하였다. 고정 전에, 세포를 EMA와 함께 배양하여 생세포(EMA가 배제된 세포)를 사세포(EMA가 도입된 세포)와 구별하였다. 샘플을 FACScalibur에서 분석하고, 사세포는 분석에서 제외하였다. 이 실험에서, 세포의 약 54%가 트립신 해리 과정에서 생존하였고; 이들 생세포 중 24~27%는 심장 트로포닌 I-특이적 항체로 표지하여 결정된 바와 같이 심근세포였다. 2가지 상이한 게이팅 방법이 2개의 패널에서 사용되었다(도 1A: 히스토그램 기반, 도 1B; 산점도 기반); 심근세포 비율은 어떤 방법에서나 비슷하였다.

[0024] **도 2** - 실시예 2에 제시된 방법에 따라서 H7 세포를 매트릭젤로 코팅한 웰에 평판배양한 후 분화시켰다. 액티빈의 최초 첨가 후 21일째에, 배양물을 트립신-EDTA로 해리하고, 고정하고, 투과시키고 심장 트로포닌 I에 대한 항체로 염색하였다. 고정 전에, 세포를 EMA와 함께 배양하여 생세포(EMA가 배제된 세포)를 사세포(EMA가 도입된 세포)와 구별하였다. 샘플을 FACScalibur에서 분석하고, 사세포는 분석에서 제외하였다. 이 실험에서, 세포의 약 69%가 트립신 해리 과정에서 생존하였고; 이들 생세포 중 8.9%는 심장 트로포닌 I-특이적 항체로 표지하여 결정된 바와 같이 심근세포였다.

[0025] **도 3** - 4개의 퍼콜 분획 각각으로부터 형성된 심체에서 측정된 cTnI 발현량을 도시한다. 미분화된 hES 세포는 음성 대조군으로서 사용된다. 분획 IV 세포를 심체로서 배양하면 αMHC 또는 cTnI 발현량이 100~500배 증가되었다.

[0026] **도 4** - 상이한 농도의 BMP-2 및 BMP-4를 사용하여 hES 세포의 분화로 생긴 세포군에서의 αMHC 발현량을 도시한다.

[0027] **정의**

[0028] 용어 "심근세포 계통의 세포(cardiomyocyte-lineage cell)"는 일반적으로 심근세포 전구체 세포 및 성숙 심근세포 둘다를 말한다. 본 명세서에서 심근세포 계통의 세포, 전구체 또는 심근세포는, 달리 특정되어 있지 않다면, 상기 정의한 바와 같이 제한 없이 심근세포 개체발생론의 임의 단계의 세포에 동일하게 적용할 수 있다. 전술한 바와 같이, 심근세포 계통의 세포는, 심장 트로포닌 I(cTnI), 심장 트로포닌 T(cTnT), 근절 마이오신 중쇄(MHC), GATA-4, Nkx2.5, N-카드헤린(cadherin), β1-아드레날린수용체(β1-AR), ANF, 전사 인자의 MEF-2 패밀

리, 크레아틴 키나제 MB(CK-MB), 마이오글로빈 또는 심방 나트륨 이노인자(ANF)로부터의 마커 하나 이상(때로는 적어도 3 또는 5개의 마커)을 가질 수 있다.

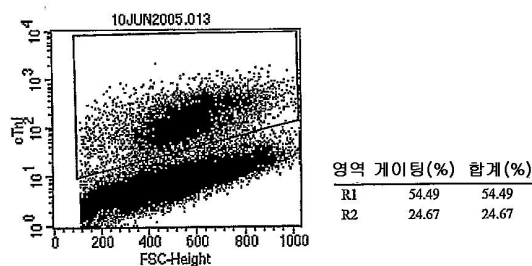
- [0029] 용어 "배상체(embryoid bodies)"는, 영양류 다능성 줄기 세포가 현탁 배양물 또는 응집체에서 비특이적 방식으로 분화될 때 나타나는 분화 또는 부분 분화 세포를 포함하는 불균일 클러스터를 의미한다.
- [0030] 본원에 사용된 바와 같이, "영양류 다능성 줄기 세포(primate pluripotent stem cell)"는, 8~12주령의 SCID 마우스에서 기형종을 형성하는 능력 또는 조직 배양물에서 확인가능한 모두 3배층의 세포를 형성하는 능력과 같이 표준 기술로 허용되는 테스트에 따라 임의 종류의 배아 조직(태아 또는 태아 이전 조직)으로부터 유도되고 3배층(내배엽, 중배엽 및 외배엽) 모두의 유도체인 상이한 세포 유형의 자손을 적당한 조건 하에 생산할 수 있는 특징을 가진 세포를 의미한다. 영양류 다능성 줄기 세포의 정의에는, 각종 종류의 배아 세포, 예를 들어 인간 배아 줄기(hES) 세포(예, Thomson et al. (Science 282:1145, 1998) 참고) 및 인간 배아 생식(hEG) 세포(예, Shambloott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998 참고); 붉은털 원숭이 줄기 세포(예, Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995 참고), 명주 원숭이 줄기 세포(예, Thomson et al., Biol. Reprod. 55:254, 1996 참고) 등의 기타 영양류 유래의 배아 줄기 세포도 포함된다.
- [0031] 본원에 사용된 바와 같은 "미분화 영양류 다능성 줄기 세포(undifferentiated primate pluripotent stem cell)"는 세포군 중 영양류 다능성 줄기 세포 및 이의 유도체의 상당 비율이 형태학상으로 미분화 세포의 특징을 나타내는 세포 배양물을 의미한다. 세포군 내의 미분화 세포의 콜로니는 흔히 부분 분화된 이웃 세포에 의해 둘러싸여 있을 것으로 이해된다.
- [0032] 본원에 사용된 바와 같은 "배아 줄기 세포(embryonic stem cell)"는 세포의 3배층으로의 실질적인 분화 전에 또는 배반포기에서 인간 배아로부터 유도된 다능성 줄기 세포를 의미한다. 달리 명백히 필요한 경우를 제외하고는, 이 용어는 hES 세포의 표현형 특징을 보유하는 1차 조직 및 확립 세포주와, 3배층 각각의 자손을 생성한 능력을 가지는 상기 세포주의 자손을 포함한다. 원형 "인간 배아 줄기 세포"(hES 세포)는 Thomson 등의 문헌(Science 282:1145, 1998; 미국 특허 6,200,806)에 개시되어 있다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같은 "액티빈(Activin)"은 트랜스포밍 성장 인자-β(TGF-β) 서브패밀리의 구성원인 폴리펩티드 성장 인자를 의미한다. 현재 4종의 액티빈 A, AB, B 및 C가 알려져 있다.
- [0034] 본원에 사용된 바와 같은 "골형성 단백질(Bone Morphogenetic Protein) (BMP)"은 TGF-β 서브패밀리의 폴리펩티드 성장 인자를 의미한다. 현재 BMP 패밀리 중 약 20종의 구성원이 알려져 있다. 본 출원에 있어서, 용어 "BMP"는 BMP-1을 포함하지 않는다. 본원에 사용된 용어 "농축(enrich)"은 혼합물 중 일정 성분의 농도를 증가시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 특정 구체예에서, 소정의 세포군 중 심근세포 계통의 세포 비율을 증가시켜 세포군을 농축시킬 수 있다.
- [0035] 본원에 사용된 바와 같은 "심체(cardiac body)"는 인간 심근세포 계통의 세포의 특징을 2 이상 보유하는, 현탁액 중의 영양류 다능성 줄기 세포 유도된 세포의 클러스터를 의미한다.
- [0036] 본원에서 사용된 바와 같은 "직접 분화(direct differentiation)"는 중간체로서 배상체를 형성하지 않고 특정 조직 유형의 세포가 농축된 자손으로 영양류 다능성 줄기 세포를 분화시키는 방법을 의미한다. 분명하게 하기 위해서, 용어 직접 분화는 소수의 세포 응집체가 우연히 형성되는 과정을 포함한다.
- [0037] 본원에 사용된 바와 같은 "유전자적으로 변경된(genetically altered)", "형질감염된(transfected)" 또는 "유전자적으로 형질전환된(genetically transformed)"은 임의의 적절한 인공 조작 수단에 의해 폴리뉴클레오티드를 세포로 전달하거나, 또는 세포가 본래 변경된 세포의 자손이고 그 폴리뉴클레오티드가 유전되는 과정을 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 종종 세포가 상승된 수준으로 단백질을 발현할 수 있는 관심 단백질을 코딩하는 전사가능한 서열을 포함하거나, 또는 그 자체가 단백질을 코딩하지 않고 (비변형 세포에 의해 발현되거나, 또는 또 다른 폴리뉴클레오티드 서열의 도입 결과 발현되는) 단백질의 발현에 영향을 미치는, siRNA 또는 안티센스 RNA와 같은 분자를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 유전자 변경은, 변경된 세포의 자손이 동일한 변경을 보유하는 경우 "유전가능하다"고 한다.
- [0038] 본원에서 사용된 바와 같은 "무혈청"은 언급한 조성물이 첨가된 혈청을 포함하지 않는 조건을 말한다.
- [0039] 본원에서 사용된 바와 같은 "영양공급 세포(feeder cell)"는, 함께 배양되는 세포의 증식을 촉진하고 및/또는 분화를 제어하는 작용을 할 수 있는 상이한 조직 유형 및 통상적으로 상이한 계통의 세포를 의미한다. 예를 들어, 미분화 영양류 다능성 줄기 세포는 미분화 상태의 유지에 도움이 되는 영양공급 세포와 함께 배양할 수 있

는 반면, 분화 과정 중의 영양류 다능성 줄기 세포는 특정 조직형(예, 심근세포 계통의 세포)으로의 분화를 지시하는 영양공급 세포와 함께 배양할 수 있다.

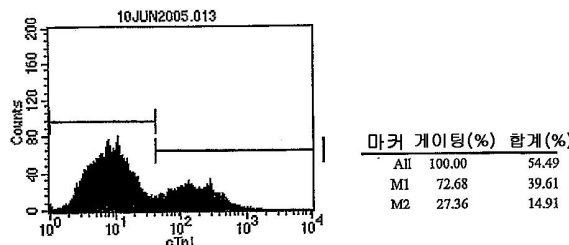
- [0040] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "영양공급 세포 무함유"는 언급된 조성물이 첨가된 영양공급 세포를 포함하지 않는 상태를 의미한다. 명백히 하기 위해서, 용어 영양공급 세포 무함유는, 특히 영양공급 세포를 포함하는 배양물로부터, 제1 배양물로부터 유래한 영양공급 세포 중 일부가 제2 배양물에 존재하더라도 영양공급 세포를 첨가하지는 않은 배양물로 영양류 다능성 줄기 세포를 계대배양한 상황을 포함한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같은 "배양"은 시험관 내에서 세포를 유지 및/또는 증식시키는 과정을 의미한다.
- [0042] 본원에 사용된 바와 같은 "동일한 계놈"이란 영양류 다능성 줄기 세포 및 그 영양류 다능성 줄기 세포로부터 유도된 분화 세포의 계놈을 말하며, 염색체 DNA는 제한 단편 길이 다형성(Restriction Fragment Length Polymorphism: "RFLP") 또는 SNP 분석으로 측정시 영양류 다능성 줄기 세포와 유도 세포 간의 동일성이 90% 이상이라는 것을 의미한다. 영양류 다능성 줄기 세포 또는 유도 세포가 유전자적으로 변경된 경우에도, 조작되지 않은 모든 유전자 성분은 보존되기 때문에 이들 세포는 그것이 유도된 세포 또는 이로부터 유도된 세포와 동일한 계놈을 가지는 것으로 간주될 것이다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같이, "매트리겔(Matrigel)은 라미닌과 같은 세포외 매트릭스 성분을 포함하고, 앵겔브레스-홀름-스윙 중앙 세포가 생산한 기저막의 시판 제제인 BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix를 의미한다. 매트릭셀은 벡톤, 디킨슨 및 캄파니(미국 뉴저지주 레이크스 프랭클린 소재)가 시판한다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같은 "RPMI"는 RPMI 배지 1640(미국 캘리포니아주 칼스배드의 인비트로젠)을 의미한다.

**도면**

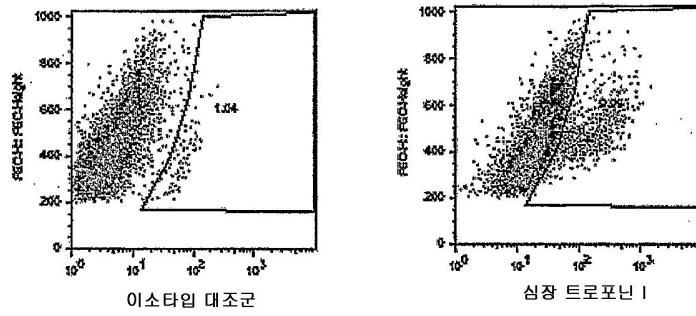
**도면1a**



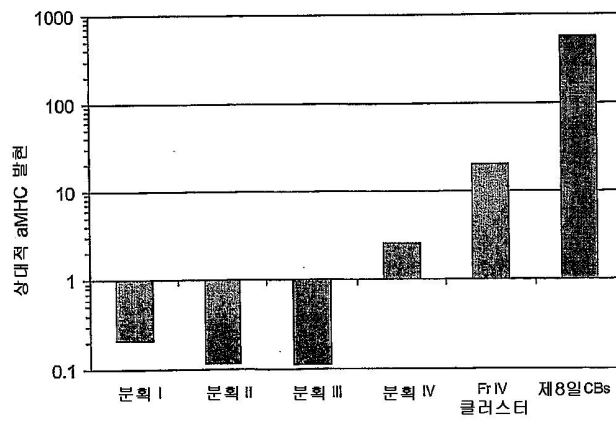
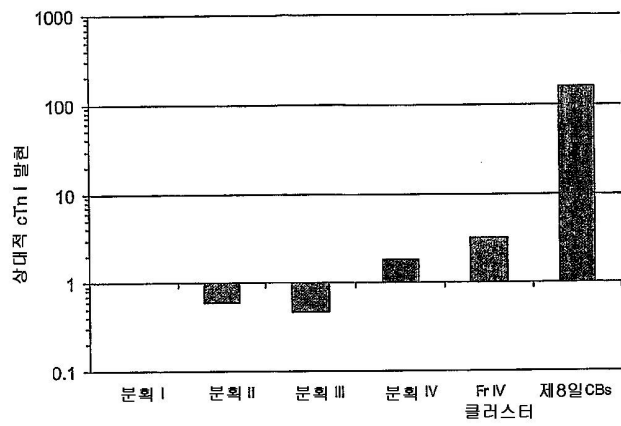
**도면1b**



도면2



도면3



도면4

