(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년10월17일
(11) 등록번호 10-1073411
(24) 등록일자 2011년10월07일

(51) Int. Cl.
C12N 5/0735 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7000243(분할)
(22) 출원일자(국제출원일자) 2002년07월12일
심사청구일자 2010년01월06일
(85) 번역문제출일자 2010년01월06일
(65) 공개번호 10-2010-0010951
(43) 공개일자 2010년02월02일
(62) 원출원 특허 10-2004-7000469
원출원일자(국제출원일자) 2002년07월12일
심사청구일자 2007년06월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/022245
(87) 국제공개번호 WO 2003/006950
국제공개일자 2003년01월23일
(30) 우선권주장
60/305,087 2001년07월12일 미국(US)
60/322,695 2001년09월10일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Mol. & Cell. Biol., 제15권, 제1호, 제141-151면.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
제론 코포레이션
미국 캘리포니아주 멘로 파크 콘스티튜션 드라이브 230
(72) 발명자
쉬 춘후이
미국 95014 캘리포니아주 쿠퍼티노 루실 애브뉴 20200 넘버16
(74) 대리인
특허법인코리아나

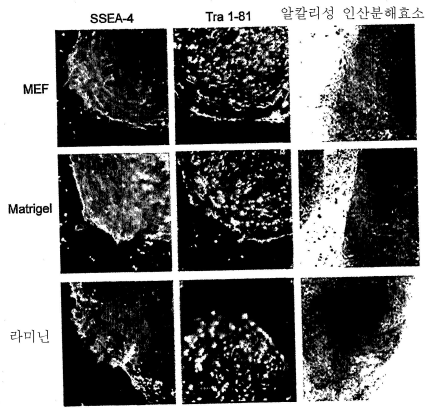
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 이효진

(54) 인간 다분화능 줄기 세포로부터 제조된 심근 세포 계통의 세포

(57) 요 약

본 발명은 심근 세포 계열의 개체군 인간 세포를 제공한다. 세포는 다분화능 줄기 세포의 배양물을 시험관 내에서 분화하도록 한 후, 특정한 표현형 특징을 가진 세포를 수합함으로써 수득된다. 분화된 세포는 심근 세포의 세포 표면 및 형태학적 마커 특징을 보유하며, 이들의 일부는 지속적인 주기적 수축을 한다. 고밀도의 심근 세포 개체군 및 이들의 복제 전구체를 수득할 수 있으며, 약물 스크리닝 및 심장 질환의 치료와 같은 다양한 응용에서의 용도에 적합할 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

액티빈(activin) A, IGF II 및 TGF-β1 을 함유하는 배지에서 영장류 다분화능 줄기 (primate pluripotent stem; pPS) 세포를 배양하고, 이어서 상기 pPS 세포를 BMP-4, FGF4, 인슐린, bFGF, PDGF-BB 및 5-아자-데옥시-싸이티딘과 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관 내에서 (in vitro) 영장류 다분화능 줄기 세포를 αMHC를 발현하는 세포로 분화시키는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 영장류 다분화능 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 영장류 다분화능 줄기 세포가 SSEA-3 및 SSEA-4 를 발현하고, TRA-1-60 및 TRA-1-81 에 양성인 세포인 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1 항에 있어서, αMHC 를 발현하는 세포가 추가로 GATA-4 를 발현하는 것인 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, αMHC 를 발현하는 세포가 추가로 HNF3b 를 발현하는 것인 방법.

청구항 9

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 배아 세포 및 이의 분화의 세포 생물학 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 특별한 배양 조건 및 선별 기술을 이용하여 심근 세포 및 이의 전구체 세포를 형성하는 인간 다분화능 줄기 세포의 조절된 분화를 제공한다.

[0002] 관련 출원에 관한 참고

[0003] 본 출원은 미국 가출원 60/305,087 (2001.7.12 출원); 및 60/322695 (2001.9.10 출원)의 우선권 이익을 주장한다. 미국 및 허용된 다른 기관에서, 우선권 서류는 국제특허 공개공보 WO 01/51616 과 함께, 전부 본원에 참고로 포함된다.

배 경 기 술

[0004] 심장 질환은 서양 세계에서 가장 심각한 건강 관심사 중 하나이다. 6100만 미국인들 (거의 5 명의 남성 및 여성 중에 한명) 이 한 가지 이상의 유형의 심혈관 질환을 가진 것으로 추산된다 (National Health and Nutrition

Examination Survey III, 1988-94, Center of Disease Control and the American Heart Association). 널리 알려진 병상에는 관상동맥질환 (1240만명), 선천성 심혈관 결함 (100만명), 및 울혈성 심부전 (470만명)이 포함된다. 재생 의약의 연구에 대한 집중적인 도전은 상기 병상에서 심장 기능을 재건하는 것을 도울 수 있는 세포 조성물을 개발하는 것이다.

[0005] 지금까지 행해진 연구의 대부분은 설치류 동물 모델을 이용하여 개발된 다양한 종류의 줄기 세포를 이용하여 수행되었다.

[0006] Maltsev, Wobus 등 (Mechanisms Dev. 44:41, 1993) 은 배와 유사한 응집물을 통해 시험관 내에서 분화된 마우스 유래의 배아 줄기 (ES) 세포가 자발적으로 박동하는 심근 세포로 응집된다는 것을 보고했다. Wobus 등 (Ann. N.Y. Acad. Sci. 27: 460, 1995)은 다분화능 마우스 ES 세포가 비위임 배아 세포에서 전문화된 세포 표현형의 심근으로 심근 세포 발생을 재생한다는 것을 보고했다. 배상체 (Embryogenic body) 를 플레이팅하고, 배양하고, 해리하고, 면역형광법 및 전기생리학적 연구에 의해 분석했다. 세포는 심장 특이적 유전자 및 모든 주요 심장 특이적 이온 채널을 발현하는 것으로 보고되었다. Wobus 등 (J. Mol. Cell Cardiol. 29:1525, 1997)은 레틴산이 ES 세포 유래 심장 분화를 가속하고, 심실 심근 세포의 발생을 증진시킨다는 것을 보고했다. 조사에서는 MLC-2v 프로모터의 조절하에 β-갈락토시다아제를 발현하기 위해 트랜스펙션된 세포 클론을 사용했다.

[0007] Kolossov 등 (J. Cell Biol. 143:2045, 1998) 은 심장 α-액틴 프로모터의 조절하에 녹색 형광 단백질을 포함하는 벡터를 이용하여 마우스 ES 세포로부터 심장 전구체 세포의 분리를 보고했다. 패치 클램프 및 Ca^{++} 이미징 (imaging) 은 배상체 발생의 제 7 일에서 시작하는 L 형 칼슘 채널의 발현을 제안했다. Narita 등 (Development 122:3755, 1996) 은 GATA-4 결함 마우스 ES 세포에 의한 심근 세포 분화를 보고했다. 키메라 마우스에서, GATA-4 결함 세포가 심장내막, 심근 및 심장외막에서 발견되었다. 저자는 다른 GATA 단백질이 GATA-4 의 결함을 보충할 수 있을 것이라고 제안했다.

[0008] 미국 특허 6,015,671 (Field) 및 Klug 등 (J. Clin. Invest. 98:216, 1996)은 분화하는 마우스 ES 세포로부터 유전적으로 선별된 심근 세포는 안정한 심장내 그라프트를 형성한다는 것을 보고했다. α-심장 미오신 중쇄 (MHC) 프로모터 구동 아미노글리코시드 포스포트랜스퍼라아제 또는 neo^r 을 이용하고, 항생제 G418 을 이용하여 선별함으로써, 분화하는 쥐과동물 ES 세포로부터 세포를 선별했다. 영양장애 (dystrophic) 성체 마우스의 심장으로 이식한 후, 표지된 심근 세포는 보고에 의하면 이식 후에 7 주 동안 발견되었다. 국제 특허 공개공보 WO 00/78119 (Field 등) 에서는 사이클린 D2 활성을 증가시킴으로써 심근 세포의 증식능을 증가시키는 방법이 제안되었다.

[0009] Doevendans 등 (J. Mol Cell Cardiol. 32: 839, 2000)은 부유하는 배상체에서의 심근 세포의 분화가 태아 심근 세포에 필적할만하다는 것을 제안했다. 설치류 줄기 세포 유래의 심근 세포는 나트륨, 칼슘 및 칼륨 전류를 갖는 심실 근세포로 분화한다고 보고되었다.

[0010] Muller 등 (FASEB J. 14: 2540, 2000)은 심실 특이적 2.1 kb 미오신 경쇄-2v 프로모터 및 CMV 인핸서 (enhancer) 의 조절하에 녹색 형광 단백질로 트랜스펙션된 마우스 ES 세포로부터 심실과 유사한 심근 세포의 분리를 보고했다. 전기생리학적 연구는 심실 표현형의 존재를 제안하였으나, 맥박 조정기와 유사한 심근 세포를 제안하지는 않았다. Gryschenko 등 (Pflugers Arch. 439:798, 2000) 은 마우스 ES 세포 유래 심근 세포에서 외향 전류를 조사했다. 초기 단계 ES 유래 심근 세포에서 우세한 재분극 전류는 4-아미노피리딘 감수성 일시적 외향 전류였다. 저자는 초기 단계 심근 세포에서, 상기 일시적 외향 전류는 전기 활성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 결론지었다.

[0011] 국제 특허 공개공보 WO 92/13066 (Loyola University) 은 발암유전자 (oncogene) *v-myc* 또는 *v-ras* 를 이용하여 유전적으로 변경된 태아 물질 유래의 래트 근세포주의 구축을 보고했다. 미국 특허 6,099,832 및 6,110,459 (Mickle 등, Genzyme) 은 래트 모델에서 심장 기능을 개선하기 위해 성체 심근 세포, 소아 심근 세포, 섬유아세포, 평활근세포, 내피 세포, 또는 근육모세포의 다양한 조합의 이용에 관하여 보고한다. 미국 특허 5,919,449 (Diacrin)은 이종 (xenogeneic) 대상체에서 심부전을 치료하기 위한 돼지 심근 세포의 이용에 관하여 보고한다. 세포를 임신 후 약 20 - 30 일째의 돼지 배아로부터 수득한다.

[0012] Makino 등 (J. Clin. Invest. 103: 697, 1999) 및 K. Fukuda (Artificial Organs 25: 1878, 2001)은 심혈관 조직공학을 위해 중간엽 줄기 세포로부터 재생성 심근 세포를 개발했다. 심장근 세포주는 골수 스트로마로부터 발생되었고, 4 개월 이상 동안 배양되었다. 세포 분화를 유도하기 위해, 5-아자싸이티딘으로 24 시간 동안

세포를 처리하여 세포의 30% 가 근관 유사 구조를 형성도록 하고, 심근 세포 마커를 수득하게 하고, 박동을 시작하게 하였다.

[0013] 대부분의 확립된 심근 세포주는 동물 조직으로부터 수득되었다. 인간 심장 치료에서 널리 알려진 용도로 승인된 확립된 심근 세포주는 없다.

[0014] Liechty 등 (Nature Med. 6:1282, 2000) 은 인간 중간엽 줄기 세포가, 양으로의 자궁내 이식 후에 그라프트화 (engraft) 되어 부위 특이적 분화를 증명한다는 것을 보고했다. 보고에 의하면, 장기간의 그라프트화는 이식 후에 13 개월의 긴 기간 동안 달성되었고, 이는 면역능의 예상된 발생 이후이다. 국제 특허 공개공보 WO 01/22978 은 자가유래 골수 스트로마 세포를 심근으로 이식하여 신규 근섬유를 성장하게 하는 것을 포함하는, 심부전이 있는 환자에서 심장 기능을 개선하는 방법을 제안한다.

[0015] 국제 특허 공개공보 WO 99/49015 (Zymogenetics) 는 비유착성 다분화능 심장 유래 인간 줄기 세포의 분리를 제안한다. 심장 세포를 현탁하고, 밀도 구배 상에서 원심분리하고, 배양하고, 심장 특이적 마커에 대해 시험했다. 증식 및 분화시, 요구된 세포주는 섬유아세포, 근세포, 심근 세포, 케라틴 세포, 뼈모세포, 또는 연골세포인 후손 세포를 생산한다.

[0016] 상기 공보에서 예시된 임의의 세포 제제가 심장 기능을 재생하기 위한 치료 조성물로서 대량 유통되기 위한 충분한 양으로 생산될 수 있는지는 명확하지 않다.

[0017] 심장 질환을 치료하기 위한 재생 세포의 더욱 유력한 공급원은 배아 조직으로부터 수득된 인간 다분화능 줄기 세포이다.

[0018] Thomson 등 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844, 1995)은 모델로서 붉은털원숭이 및 마모셋 (marmoset) 을 이용하여 영장류로부터 배아 줄기 세포를 최초로 성공적으로 배양했다. 이들은 이어서 인간 낭배기 배아로부터 인간 배아 줄기 (hES) 세포주를 유도했다 (Science 282: 114, 1998). Gearhart와 동료는 태아 생식선 조직으로부터 인간 배아 생식 세포 (hEG) 세포주를 유도했다 (Shamblott 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726, 1998). 국제 특허 공개공보 WO 00/70021 은 분화된 인간 배아 세포, 및 hES 세포로부터 이들을 제조하는 방법에 관한 것이다. 국제 특허 공개공보 WO 01/53465 는 hEG 세포로부터 배상체 유래 세포의 제조를 개요한다.

[0019] 배아 줄기 세포 및 배야 생식 세포 모두는 분화하지 않고 시험관 내에서 증식할 수 있고, 이들은 정상 핵형을 보유하고, 다양한 성체 세포 유형을 생산하기 위해 분화하는 능력을 보유한다. 그러나, 인간 다분화능 줄기 세포의 증식 및 분화가 설치류 줄기 세포의 배양을 위해 개발된 것과 매우 상이한 규칙을 따른다는 것은 명백하다.

[0020] Geron Corporation 은 본질적으로 피더 세포 (feeder cell) 가 없는 환경에서 인간 다분화능 줄기 세포의 연속적인 증식을 허용하는 신규 조직 배양 환경을 개발했다. 호주 특허 AU 729377, 및 국제 특허 공개공보 WO 01/51616 참고. 피더가 없는 환경에서 줄기 세포를 배양할 수 있는 것은 인간 치료를 위한 조절 조건에 따른 세포 조성물이 용이하게 제조될 수 있는 시스템을 제공한다.

[0021] 인간 건강 및 질환의 관리에서 다분화능 줄기 세포의 잠재력을 인식하기 위해, 상기 세포를 치료학적으로 중요한 조직 유형의 개체군으로 유도하는 신규 패러다임을 개발하는 것이 지금 필요하다.

발명의 내용

[0022] **발명의 개요**

[0023] 본 발명은 다분화능 세포에서 심근 세포 계통의 세포로 분화된 영장류 세포의 효율적인 생산 시스템을 제공한다.

[0024] 본 발명의 한 구현예는 심근 세포 계통의 세포를 포함하는 개체군이다. 세포는 상기 개시에서 언급된 특별한 특성을 가진다. 예컨대, 이들은 하기일 수 있다:

[0025] ● 최종 단계 심근 세포임

[0026] ● 시험관 내에서 증식할 수 있고, 시험관 내 또는 생체내에서 임의의 상기 열거된 특징을 갖는 세포로 분화할 수 있는 심장 전구체 세포임

[0027] ● 내재 유전자로부터 하나 이상의 하기 마커를 발현함: 심장 트로포닌 I (cTnI), 심장 트로포닌 T (cTnT), 및

심방 나트륨배설 인자 (ANF).

[0028] ● 상기 개시에서 언급된 3 개 이상의 다른 표현형 마커를 발현함

[0029] ● 영장류 다분화능 줄기 (pPS) 세포의 분화에 의해 생산될 수 있음

[0030] ● 확립된 인간 배아 줄기 (hES) 세포주와 동일한 게놈을 가짐

[0031] ● 자발적인 주기적 수축 활성을 발현함

[0032] ● 심근 세포의 기타 특성, 예컨대, 이온 채널 또는 적당한 전기생리를 발현함

[0033] 본 발명의 세포 개체군은 세포의 약 5, 약 20, 또는 약 60% 가 언급된 특징을 가지는 시점까지 농후해질 수 있다. 원한다면, 세포는 또한 텔로머라아제 역전사효소를 이용하여 복제능을 확장하도록 또는 성장인자, 강심인자, 또는 전사 조절 요소를 발현하도록 유전적으로 변경될 수 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현예는 적당한 성장 환경에서 pPS 세포 또는 이들의 후손을 분화시키는 것을 포함하는, 상기 세포 개체군의 제조 방법이다. 전형적인 방법에서, hES 세포는 본질적으로 피더 세포가 없는 환경에서 배양된 후, 상기 언급된 하나 이상의 특징을 갖는 심근 세포 또는 심근 세포 전구체 세포로 분화하도록 한다. 일부 상황에서, 분화 방법은 하기 중 하나 이상의 단계가 수반될 수 있다: 배상체 또는 세포 응집물을 형성하기 위해 현탁 배양액에서 pPS 세포를 배양하는 단계, 하나 이상의 강심 인자를 포함하는 성장 환경에서 배양하는 단계, 개체군에서 다른 세포로부터 자발적으로 수축성 세포를 분리하는 단계, 또는 하나 이상의 심근 세포 농후화 인자를 포함하는 성장 환경에서 배양하는 단계.

[0035] 본 발명의 또 다른 구현예는 심근 세포 상의 효과를 위한 화합물의 스크리닝 방법이다. 이것은 화합물을 본 발명의 세포 개체군과 조합한 후, 상기 화합물에 기인하는 임의의 조절 효과를 측정하는 것이 수반된다. 이것은 독성, 대사 변화, 또는 수축 활성 상의 효과에 대한 세포의 검사를 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명의 또 다른 구현예는 인간 또는 동물체의 치료를 의도한 본 발명의 세포 개체군을 포함하는 약물 또는 전달 장치이다. 세포 개체군은 심장의 병상을 치료하기 위한 의약으로서 제형화될 수 있다. 본 발명의 추가의 구현예는 심장 조직을 본 발명의 세포 개체군과 접촉시키는 단계를 포함하는, 심장 조직에서 수축 활성을 재건하거나 또는 보충하는 방법이다. 개체에게 적당한 제형물 중에 본 발명의 세포 개체군이 투여되는, 개체에게서 심장 병상의 치료가 포함된다.

[0037] 본 발명의 상기 및 다른 구현예가 하기 기재로부터 명백할 것이다. 본 개시에 기재된 조성물, 방법 및 기술은 진단, 약물 스크리닝, 및 치료 적용에서 사용하기 위한 상당한 가망을 갖는다.

[0038] 본 발명은 영장류 다분화능 줄기 세포 유래의 심근 세포 및 이들의 전구체 세포의 제조 및 규명 시스템을 제공한다.

[0039] 수 많은 장애가, 영장류 다분화능 줄기 (pPS) 세포로부터 심근 세포 계통 세포가 실질적으로 농후한 개체군을 수득하는 패러다임을 개발하는 것을 방해했다. 일부는, 영장류 기원의 다분화능 세포의 상대적인 연약함, 이들 배양에서의 난점, 및 배양 환경에 존재하는 다양한 인자에 대한 이들의 정교한 감수성 및 의존성으로부터 비롯된다. 다른 장애는 심장 선조세포가 내장 배아 내배엽 및 말단 분화를 위한 원시 획선접종 (primitive streak) 을 필요조건으로 한다는 것의 발견으로부터 비롯된다 (Arai 등, Dev. Dynamics 210:344, 1997). 시험관 내에서 pPS 세포를 심장 선조세포로 분화시키려면, 상기 세포의 천연 개체 발생에서 일어나는 모든 사건을 발생하는 태아에서 모방하거나 또는 대체하는 것이 필요할 것이다.

[0040] 상기 장애에도 불구하고, 세포 개체군이 심장 세포의 특성을 발현하는 세포에 대해 상당히 농후한 pPS 배양물로부터 수득될 수 있다는 것을 발견했다. 도 4 는 트로포미오신, 티틴, 미오신 중쇄 (MHC), α-액티닌, 데민, 심장 트로포닌 I (cTnI), 및 심장 트로포닌 T (cTnT) 에 대해 염색된 개별적인 세포를 보여주며, 근섬유분절 구조의 특징인 줄무늬를 보여 준다. 세포는 조직 배양에서 자발적인 주기적인 수축을 한다. 도 5 는 수축 활성이 L 형 칼슘 채널 저해제인 딜티아젬에 의해 저해되고, 아드레날린 수용체 아고니스트인 이소프레날린 및 페닐에프린에 응답하여 증가되는 것을 보여준다.

[0041] 인간 다분화능 줄기 세포로부터 심근 세포를 제조하는 경로는 마우스 심근 세포를 제조하는 전술한 경로와 수많은 방식에서 상이하다는 것이 명백하다. 우선, 비분화 상태 및 심근 세포 분화의 준비가 된 인간 pPS 세포

의 증식은 상이한 배양 시스템을 요구한다. 마우스 배아 줄기 세포는 배지에 단지 백혈병 저해인자 (LIF) 를 간단히 포함함으로써 분화없이 증식될 수 있다. 그러나, LIF 자체로는 통상적으로 일차 배아 섬유아세포의 피더층에서 증식되는, 인간 ES 세포의 분화를 막는 것은 불충분하다 (Thomson 등, 상기 문헌). 더욱이, 마우스 줄기 세포로부터 심근 세포를 생성하는 인자, 예컨대, 레틴산 (Wobus 등, J. Mol. Cell Cardiol. 29: 1525, 1997) 및 DMSO (McBurney 등, Nature 299: 165, 1982) 는 유사한 조건하에 인간 줄기 세포와 함께 사용될 경우에 훨씬 덜 효과적이다 (실시예 6).

[0042] 본 발명은 수득되는 심근 세포 계통 세포의 매우 농후한 개체군을 허용하는 신규 시스템을 제공함으로써 인간 다분화능 줄기 세포로부터 중요한 유도체 세포를 제조하는 문제를 해결한다. 상기 시스템은 그 자체로 용이하게 상업적인 규모로 수행가능하게 한다. 심근 세포 생성을 증가시키기 위해 사용될 수 있는 절차에는 하기 단계가 포함된다:

[0043] 1. 분화 과정을 시작하는 배양 패러다임 (배상체를 형성하거나 또는 직접 분화에 의함) 으로 비분화 pPS 세포를 처리하는 단계.

[0044] 2. 세포를 심근 세포 계통으로 이끄는 것을 돕는 것으로 인정되는, 하나 이상의 강심 인자의 존재 하에 세포를 배양하는 단계.

[0045] 3. 밀도 원심분리 또는 또 다른 적당한 분리 수단에 의해 다른 세포로부터 심근 세포를 분리하는 단계.

[0046] 4. 원하는 세포 유형의 우선적인 성장을 돕는 것으로 믿어지는, 심근 세포 농후화제 (enrichment agent) 의 존재하에 심근 세포 계통 세포를 포함하는 세포 개체군을 배양하는 단계.

[0047] 본 개시에 기재된 상기 및 다른 것과 같은 단계가 단독으로 또는 임의의 효과적인 조합으로 사용될 수 있다. 실시예 9 에 예시된 바와 같이, 조합된 상기 몇 개의 전략이 69% 이상의 심근 세포 계통 세포를 포함하는 신규 세포 개체군을 제공한다.

[0048] 본 개시에 따라 제조된 세포의 현저한 균일성 및 기능성은 이들을 신규 치료 양식 및 시험관 내에서 심장 조직을 연구하는 도구로서 개발하는데 가치있게 한다.

[0049] 정의

[0050] 본 발명의 기술 및 조성물은 pPS 유래 심근 세포 및 이들의 전구체 세포에 관한 것이다. 심근 세포의 표현형 특성이 본 개시의 이후 섹션에서 제공된다. 심근 세포 전구체 세포에 대해 결정적인 특이한 특성이 존재하지는 않으나, 개체 발생의 정상적인 과정에서, 비분화 pPS 세포가 먼저 중배엽 세포로 분화한 후, 다양한 전구체 세포 단계를 통해 기능성 (최종 단계) 심근 세포로 분화한다는 것을 인식한다.

[0051] 따라서, 본 개시의 목적상, "심근 세포 전구체 세포" 는 심근 세포를 포함하는 후손을 제공할 수 있고 (탈분화 또는 재프로그래밍 없이), 하기 열거로부터의 하나 이상의 마커 (바람직하게는 3 개 이상 또는 5 개 이상의 마커) 를 발현하는 세포로서 정의된다: 심장 트로포닌 I (cTnI), 심장 트로포닌 T (cTnT), 근섬유분절 미오신 중쇄 (MHC), GATA-4, Nkx2.5, N-캐드헤린, β1-아드레날린 수용체 (β1-AR), ANF, 전사 인자의 MEF-2 패밀리, 크레아틴 키나아제 MB (CK-MB), 미오글로빈 또는 심방 나트륨배설 인자 (ANF).

[0052] 본 개시를 통해, "심근 세포" 또는 "심근 세포 전구체 세포" 를 언급하는 기술 및 조성물은, 달리 지정되지 않는다면, 상기 정의된 바와 같이, 제한 없이 심근 세포 개체 발생의 임의의 단계의 세포에 동일하게 적용되는 것으로 간주될 수 있다. 세포는 증식 또는 수축 활성을 나타내는 능력을 가지거나 또는 가지지 않을 수 있다.

[0053] 본 발명의 특정 세포는 자발적인 주기적 수축 활성을 나타낸다. 이는 세포가 적당한 Ca^{++} 농도 및 전해질 밸런스를 가진 적합한 조직 배양 환경에서 배양되는 경우, 배양 배지에 임의의 추가 성분을 첨가할 필요없이, 세포는 세포의 하나의 축을 교차하는 주기적 방식으로 수축하고, 수축으로부터 이완되는 것이 관찰될 수 있음을 의미한다.

[0054] 프로토타입 "영장류 다분화능 줄기 세포" (pPS 세포) 는 임의 종류의 배아 조직 (태아 또는 태아전 조직) 에서 유래된 다분화능 세포이고, 8-12 주령 SCID 마우스에서 기형종을 형성시키는 능력 또는 조직 배양에서 3 가지의 생식세포 층 (내배엽, 중배엽 및 외배엽) 모두의 동정가능한 세포를 형성시키는 능력과 같은, 표준 기술 허용 시험에 따라, 3 개의 생식 세포 층 모두의 유도체인 상이한 세포 유형의 후손을 적당한 조건 하에 생산할 수 있음을 특징으로 한다.

[0055] pPS 세포의 정의에는 인간 배아 줄기 (hES) 세포 (Thomson 등, Science 282: 1145, 1998); Rhesus 줄기 세포

(Thomson 등., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844, 1995), 마모셋 (marmoset) 줄기 세포 (Thomson 등., Biol. Reprod. 55:254, 1996) 및 인간 배아 생식세포 (hEG) 세포 (Shamblott 등., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726; 1998)와 같은 기타 영장류 유래의 배아 줄기 세포로 예시되는, 다양한 유형의 배아 세포가 포함된다. 이러한 세포 유형은 확립된 세포주의 형태로 제공될 수 있거나, 또는 이는 일차 배아 조직으로부터 직접적으로 수득하여 분화에 즉시 이용될 수 있다. 또한 다분화능 세포의 기타 유형이 상기 용어에 포함된다. 3 가지의 생식세포 층 모두의 유도체인 후손을 생산할 수 있는 영장류 기원의 임의의 세포는, 배아 조직, 태아 조직 또는 기타 원으로부터 유래되었는지의 여부와 무관하게 포함된다. pPS 세포는 악성 종양 원으로부터는 유래되지 않는다. 세포는 핵형적으로 정상인 것이 바람직하다 (그러나 필요 조건은 아니다).

[0056] pPS 세포 배양물은, 개체군 중 상당한 비율의 줄기 세포 및 이의 유도체가 배아 또는 성체 기원의 분화 세포와 비분화 세포를 확연히 구별시키는 비분화 세포의 형태적 특징을 보이는 경우, "비분화" 된 것으로 나타낸다. 비분화 pPS 세포는 당업자에 의해 용이하게 인지되며, 통상적으로 현미경 시야의 2 차원에서 고 핵/세포질 비율 및 현저한 핵소체를 가진 세포의 콜로니가 나타난다. 개체군내의 비분화 세포의 콜로니는 종종 분화된 인접 세포에 의해서 포위되는 것으로 이해된다.

[0057] 세포 개체발생의 맥락에서, 형용사 "분화된" 은 상대적 용어이다. "분화된 세포" 는 비교되는 세포보다 발달적 경로가 추가로 진행된 세포이다. 따라서, 다분화능 배아 줄기 세포는 계열 한정 (lineage-restricted) 전구체 세포 (예컨대, 중배엽 줄기 세포) 로 분화되어, 다시 상기 경로가 추가로 진행된 기타 유형의 전구체 세포 (예컨대, 심근 세포 전구체) 로 분화된 후, 말기 분화된 세포로 분화될 수 있으며, 이는 특정 조직 유형에서 특징적 역활을 하며, 추가로 증식하는 능력을 보유하거나 보유하지 않을 수 있다.

[0058] "피더 세포 (feeder cell) " 또는 "피더 (feeder)" 는 제 2 유형의 세포가 성장할 수 있는 환경을 제공하기 위해, 다른 유형의 세포와 함께 공동 배양되는 한 유형의 세포를 기술하기 위해 사용된 용어이다. pPS 세포 개체군은 만일 세포가 새로운 피더 세포가 pPS 의 성장을 지지하기 위해 첨가되지 않는 분할 후 1 회 이상의 라운드를 거쳐 성장하면 피더 세포가 "본질적으로 없는" 것으로 언급한다. 피더 세포를 포함하는 예비 배양물을 피더 세포를 포함하지 않는 새로운 배양물에 대한 pPS 의 원으로 사용하면, 계대 중 생존하는 일부 피더 세포가 존재하리라는 것은 인정된다. 존재하는 생존 피더 세포가 약 5% 미만인 경우, 상기 배양물에는 본질적으로 피더 세포가 존재하지 않는 것이다. 1%, 0.2%, 0.05%, 또는 0.01% 미만의 피더 세포 (배양물중 총 세포의 % 로 표시) 를 포함하는 조성물이 더욱더 바람직하다. 세포주가 자발적으로 동일한 배양물내에서 다양한 세포 유형으로 분화하는 경우, 상이한 세포 유형은 비록 지지적 방식으로 상호작용할 수 있다고 하더라도, 상기 정의의 의미 내에서는 상호 피더 세포로서 작용하는 것으로 생각되지는 않는다.

[0059] "성장 환경" 은 목적하는 세포가 시험관내에서 증식, 분화 또는 성숙되는 환경이다. 이러한 환경의 특징에는 세포가 배양되는 배지, 존재할 수 있는 임의의 성장 인자 또는 분화 유도 인자 및, 존재한다면, 지지성 구조체 (예컨대, 고형 표면상의 기질 (substrate)) 이 포함된다.

[0060] 세포는, 인공적 조작의 임의의 적합한 수단으로 폴리뉴클레오티드를 세포로 옮기는 경우 또는 세포가 폴리뉴클레오티드를 유전받은 원래 변경된 세포의 후손인 경우 "유전적으로 변경" 된 것으로 부른다. 폴리뉴클레오티드는 종종 목적하는 단백질을 코딩하는 전사가능한 서열을 포함할 것이며, 이는 세포가 상승된 수준에서 단백질을 발현가능케 한다. 변경된 세포의 후손이 동일한 변경을 가지면 유전적 변경은 "유전성" 인 것으로 부른다.

[0061] 본 개시에서 사용하는 용어 "항체"는 폴리클로날 및 모노클로날 항체 모두를 의미한다. 용어의 범위는 신중히 온전한 면역글로불린 분자 뿐만아니라, 당해 기술에 공지된 기술로 제조될 수 있으며, 목적하는 항체 결합 특이성을 보유하는 상기 면역글로불린의 단편 및 유도체 (예컨대, 단쇄 Fv 구축물, 디아바디(diabody) 및 융합 구조체) 를 포함한다.

[0062] 일반 기술

[0063] 본 발명의 실행에 유용한 일반 기술의 추가의 상술을 위해, 실행자는 표준 교과서 및 세포 생물학, 조직 배양, 태생학 및 심장생리학에서의 개론을 참조할 수 있다.

[0064] 조직 배양 및 배아 줄기 세포와 관해서는, 하기의 문헌을 참조할 수 있다: [Teratocarcinomas 및 embryonic stem cells: A practical approach (E.J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); Guide to Techniques in Mouse Development (P.M. Wasserman 등. 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 등., Reprod. Fertil. Dev. 10:31, 1998). 심장 세포의 배양과 관련하여서는, 표준 참고문헌에는 하기가 포함된다 : The Heart Cell in Culture (A. Pinson ed., CRC Press 1987), Isolated Adult Cardiomyocytes (Vols. I & II, Piper & Isenberg eds., CRC Press 1989), Heart Development (Harvey & Rosenthal, Academic Press 1998), I Left my Heart in San Francisco (T. Bennet, Sony Records 1990); 및 Gone with the Wnt (M. Mitchell, Scribner 1996).

[0065] 분자 및 세포 생화학에서의 일반적 방법은 하기와 같은 표준 교과서에 찾을 수 있다: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook 등., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel 등. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag 등., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner 등. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplitt & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); 및 Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). 본 개시에서 참조된 시약, 클로닝 벡터 및 유전적 조작을 위한 키트는 BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich 및 ClonTech 와 같은 회사들로부터 구입할 수 있다.

[0066] 줄기 세포의 공급원

[0067] 본 발명은 다양한 유형의 다분화능 줄기 세포, 특히 배아 조직으로부터 유래되고, 전술한 바와 같이, 3 가지의 생식 세포 층 모두의 후손을 생산할 수 있는 것을 특징으로 하는 다분화능 줄기 세포로 실행할 수 있다.

[0068] 기존의 세포주로 사용되는 또는 인간을 포함한 영장류 종의 일차 배아 조직으로부터 확립된 배아 생식 세포 및 배아 줄기 세포를 예로 들 수 있다.

[0069] *배아 줄기 세포*

[0070] 배아 줄기 세포는 영장류 종의 구성원의 낭배로부터 분리된다 (Thomson 등., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995). 인간 배아 줄기 (hES) 세포는 문헌 [Thomson 등. (U.S.P 5,843,780; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998) 및 Reubinoff 등, Nature Biotech. 18:399,2000] 에 기재된 기술을 이용하여 인간 낭배 세포로부터 제조할 수 있다.

[0071] 간략히는, 인간 낭배는 인간 생체내 착상전 배아로부터 수득한다. 이와 달리, 시험관 수정 (IVF) 배아를 사용하거나, 또는 단일(one)-세포 인간 배아를 낭배 단계까지 발전시킬 수 있다 (Bongso 등., Hum Reprod 4: 706, 1989). 배아는 G1.2 및 G2.2 배지에서 낭배 단계로 배양한다 (Gardner 등., Fertil. Steril. 69:84, 1998). 투명대 (zona pellucida) 를 프로나아제 (Sigma) 에 단시간 노출시켜 발생된 낭배로부터 제거한다. 내부 세포 덩어리는 면역외과술로 분리시키며, 여기에서 낭배는 토끼 항-인간 비장 세포 항혈청의 1:50 희석액에 30 분간 노출 시킨 후, DMEM 으로 5 분간 3 회 세정하고, 기니 피그 보체 (Gibco) 의 1:5 희석액에 3 분간 노출시킨다 (Solter 등., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:5099, 1975). 추가로 2 회 더 DMEM 로 세정한 후, 용해된 영양막배엽 세포를 살며시 피펫팅하여 온전한 내부 세포 덩어리 (ICM) 로부터 제거하고, ICM 을 mEF 피더 층상에 플레이팅한다.

[0072] 9 내지 15 일후, 내부 세포 덩어리 유래의 성장물을, 1 mM EDTA 가 있는 칼슘 및 마그네슘이 없는 포스페이트 완충 식염수 (PBS) 에 노출시키거나, 디스파아제 또는 트립신에 노출시키거나, 또는 마이크로피펫으로 기계적으로 분리시켜 덩어리로 해리하고; 이어서, 새로운 배지 중의 mEF 상에 다시 플레이팅한다. 비분화 형태를 갖는 성장 콜로니를 개별적으로 마이크로피펫으로 선별하고, 기계적으로 덩어리로 해리해, 다시 플레이팅한다. ES 유사 형태는 일견 높은 핵 대 세포질 비율 및 현저한 핵소체를 가진 밀집된 콜로니를 특징으로 한다. 이어서, 생성된 ES 세포를 단시간 트립신화하여, Dulbecco PBS (2 mM EDTA 함유) 에 노출시키고, IV 형 콜라게나아제 (약 200 U/mL; Gibco) 에 노출시키거나, 또는 마이크로피펫으로 각 콜로니를 선별하여 매 1-2 주마다 루틴하게 분할한다. 약 50 내지 100 세포의 덩어리 크기가 최적이다.

[0073] *배아 생식 세포*

[0074] 인간 배아 생식 (hEG) 세포는 마지막 월경 주기후 약 8-11 주에서 취한 인간 태아 물질내 존재하는 시원 생식 세포로부터 제조할 수 있다. 적당한 제조 방법은 문헌 [Shamblott 등., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998 및 U.S.P 6,090,622] 에 기재되어 있다.

[0075] 간략히는, 생식융선을 등장 완충액으로 헹군 후, 0.1 mL 0.05% 트립신/0.53 mM 나트륨 EDTA 용액 (BRL)에 넣고,

<1 mm^3 토막으로 절단한다. 이어서 이 조직을 100 μL 팁으로 피펫팅하여 세포를 더 해리시킨다. 이것을 37℃ 에서 약 5 분간 인큐베이션시킨후, 약 3.5 mL EG 성장 배지를 첨가한다. EG 성장 배지는 DMEM, 4500 mg/L D-글루코오스, 2200 mg/L mM $NaHCO_3$; 15% ES 제한 우태아 혈청 (BRL); 2 mM 글루타민 (BRL); 1 mM 나트륨 피루베이트 (BRL); 1000-2000 U/mL 인간 재조합 백혈병 억제 인자 (LIF, Genzyme); 1-2 ng/mL 인간 재조합 bFGF (Genzyme); 및 10 μM 포스콜린 (10% DMSO 중)이다. 대안적 접근법으로는, EG 세포를 히알루로니다아제/콜라게나아제/DNAse 를 이용하여 분리시킨다. 장간막을 가진 생식 융선 또는 생식선 안라겐 (anlagen) 을 태아 물질로부터 절개하고, 생식 융선을 PBS 으로 헹군 후, 0.1 mL HCD 소화 용액 (0.01 % 히알루로니다아제 V 형, 0.002% DNA제 I, 0.1% 콜라게나아제 IV 형, 이들은 모두 EG 성장 배지에서 제조된 Sigma 사 제품이다)에 넣는다. 조직을 잘게 썰어, 1 시간 또는 밤새 37℃에서 인큐베이션시키고, 1-3 mL 의 EG 성장 배지에 현탁시켜, 피더 층상에 플레이팅한다.

[0076] 96 웰 조직 배양 플레이트를 LIF, bFGF 또는 포스콜린이 없는 개질된 EG 성장배지에서 3 일간 배양시키고, 5000 rad γ-조사로 불활성화시킨 피더 세포 (예컨대, STO 세포, ATCC No. CRL 1503) 의 서브컨플루언트 (sub-confluent) 층으로 제조한다. 약 0.2 mL 의 일차 생식 세포 (PGC) 현탁액을 각각의 웰에 첨가한다. 제 1 계대를 EG 성장 배지에서 7-10 일후 수행하고, 각 웰을 조사된 STO 마우스 섬유아세포로 미리 제조된 24-웰 배양 디쉬의 웰에 옮긴다. 세포를, EG 세포와 일치하는 세포 형태가 관찰될 때까지 (통상적으로 7-30 일 또는 1-4 계대후) 배지를 매일 교환하여 배양한다.

[0077] *비분화 상태에서 pPS 세포의 증식*

[0078] pPS 세포는 분화를 촉진하지 않고도, 분화를 촉진하는 배양 조건을 이용하여, 배양물내에서 연속적으로 증식시킬 수 있다. 예시적 함혈청 ES 배지는 80% DMEM (예컨대, Knock-Out DMEM, Gibco), 20% 의 규정된 우태아 혈청 (FBS, Hyclone) 또는 혈청 치환체 (WO 98/30679), 1% 비필수 아미노산, 1 mM L-글루타민 및 0.1 mM β-메르캅토에탄올로 제조한다. 사용 직전에, 인간 bFGF 를 4 내지 8 ng/mL 의 수준으로 첨가한다 (WO 99/20741, Geron Corp.).

[0079] 통상적으로, ES 세포는 피더 세포, 전형적으로는 배아 또는 태아 조직 유래의 섬유아세포의 층상에서 배양한다. 배아는 임신 13 일째 CF1 마우스로부터 수합하여, 2 mL 트립신/EDTA 로 옮기고, 미세하게 잘게 썰어, 5 분간 37℃ 에서 인큐베이션시킨다. 10% FBS 를 첨가하고, 찌꺼기를 침강시키고, 세포를 90% DMEM, 10% FBS, 및 2 mM 글루타민에서 증식시킨다. 피더 세포 층을 제조하기 위해, 세포를 조사하여 증식을 억제시키지만, ES 세포를 지지하는 인자의 합성은 허용한다 (약 4000 rads γ-조사). 배양 플레이트를 0.5% 젤라틴으로 밤새 코팅하고, 웰 당 375,000 조사 mEF 로 플레이팅한 후, 5 시간 내지 4 일후 사용한다. 배지는 pPS 세포를 시딩하기 직전에 새로운 hES 배지로 치환한다.

[0080] Geron Corporation 은 본질적으로 피더 세포가 없는 환경에서 다분화능 줄기 세포의 연속적 증식을 가능케하는 새로운 조직 배양 환경을 개발하였다. 참고 문헌, 호주 특허 AU 729377 및 국제특허공보 WO 01/51616. 세포는 피더 세포로 조건화된 배지 또는 FGF 및 SCF 와 같은 성장 인자로 보충된 배지에서, Matrigel® 또는 라미닌의 세포외 매트릭스상에서 배양할 수 있다. 피더가 없는 환경에서의 줄기 세포의 배양가능성은 인간 치료의 규제 요건에 부합하는 세포 조성물을 용이하게 제조할 수 있는 시스템을 제공한다. 미국에서 본 출원 및 이 출원에 우선권을 주장하는 임의의 출원의 실행을 위해서, 참고 문헌으로 국제 특허 공보 W001/51616 의 전문을 본 명세서 포함시켰다.

[0081] 피더가 없는 배양을 위한 환경에는 적당한 배양 기질, 특히 Matrigel® 또는 라미닌과 같은 세포외 매트릭스가 포함된다. pPS 세포는 >15,000 세포 cm^{-2} (최적으로는 90,000 cm^{-2} 내지 170,000 cm^{-2})으로 플레이팅한다. 통상적으로, 효소성 소화는 세포가 완전히 분산되기 전에 중지한다 (즉, 콜라게나아제 IV 로 약 5 내지 20 분). 이어서, 약 10 - 2000 세포의 덩어리를 추가의 분산없이 기질 상에 직접 플레이팅한다. 피더가 없는 배양물을 조사된 일차 마우스 배아 섬유아세포, 텔로머화 마우스 섬유아세포 또는 pPS 세포에서 유도된 섬유아세포 유사 세포를 배양하여 통상적으로 조건화된 영양 배지로 지지한다. 배지는 20% 혈청 대체물 및 4 ng/mL bFGF 로 보충된 KO DMEM 과 같은 무혈청 배지에서 약 5-6 × 10^4 cm^{-2} 의 밀도로 피더를 플레이팅하여 조건화될 수 있다. 24 시간 동안 조건화된 배지를 0.2 ㎛ 막을 통해 여과하고, 추가로 약 8 ng/mL bFGF 으로 보충하여, 1-2 일동안 pPS 세포 배양물을 지지하는데 사용한다.

[0082] 현미경 하에서, 높은 핵/세포질 비율, 현저한 핵소체를 가진 ES 세포, 및 불안전하게 식별가능한 세포 연접

(junction) 을 가진 밀집된 콜로니 형성이 나타난다. 영장류 ES 세포는 하나 이상의 단계 특이적 배아 항원 (SSEA) 3 및 4, 및 Tra-1-60 및 Tra-1-81 (Thomson 등, Science 282:1145, 1998) 로 나타낸 항체를 이용하여 검출가능한 마커를 발현시킬 수 있다. 비분화 hES 세포는 또한 통상적으로 RT-PCR 로 검출되는, Oct-4 및 TERT, 및 효소분석으로 검출되는 알칼리 포스파타아제 활성을 발현한다. 시험관 내에서 hES 세포의 분화는 통상적으로 상기 마커 (존재한다면) 의 손실 및 SSEA-1 의 발현 증가를 초래한다.

[0083] 심근 세포의 제조 절차

[0084] 본 발명의 세포는 목적하는 표현형을 가진 세포를 강화하는 특별한 성장 환경에서 줄기 세포를 배양 또는 분화시켜 (목적하는 세포의 성장물에 의해 또는 기타 세포 유형의 억제 또는 사멸을 통해) 수득할 수 있다. 이러한 방법은 많은 유형의 줄기 세포, 특별히 전술한 섹션에 기재된 영장류 다분화능 줄기 (pPS) 세포에 적용가능하다.

[0085] 분화는 통상적으로 배상체 또는 응집물의 형성에 의해 개시된다; 예컨대, 공여체 (donor) pPS 세포 배양물의 과성장, 또는 EB 형성을 가능케하는 낮은 유착 특성을 가진 기질이 있는 배양 용기 중에서의 현탁액 중에서의 pPS 세포 배양으로 개시한다. pPS 세포는 단시간의 콜라게나아제 소화로 수합하여, 덩어리로 해리시키고, 비유착성 세포 배양 플레이트에 플레이팅한다. 응집물은 매일 며칠 간 공급한 후, 적당한 기간, 통상적으로 4-8 일후 수확한다. 이어서 수확된 집합체를 고형 기질 상에 플레이팅하고, 응집물 내의 세포가 심근 세포 표현형을 채택하도록 하는 기간동안 배양한다. 통상적으로, 총 분화 기간은 적어도 8 일이며, 길게는 10 또는 12 일 이상일 수 있다.

[0086] 대안적으로 또는 부가적으로, 분화 공정은 분화 패러다임에서 세포를 배양하여 개시시킬 수 있다. hES 세포의 이질성 개체군으로의 분화를 유도하는 조건에는 레틴산 (RA) 또는 디메틸 술폭시드 (DMSO) 를 배양 배지에 첨가하는 것; 또는 세포를 이들이 배양되는 통상의 세포외 매트릭스로부터 회수하는 것이 포함된다. 참조, U.S. 특허출원 60/213,740 및 국제특허공보 WO 01/51616. 그러나, 일부의 경우, 상기 효과제는 수득된 심근 세포의 비율을 감소시키기 때문에 주의가 요망된다 (실시예 6).

[0087] 특정 환경 하에서는, 배지 중에 이상의 "강심 인자 (cardiotropic factor)" 를 포함하는 것이 유익하다. 이것은 단독으로 또는 조합되어 심근 세포 유형의 세포의 증식 또는 생존을 강화시키거나, 또는 기타 세포 유형의 성장을 억제하는 인자이다. 이 효과는 세포 자체에 대한 직접적인 영향에 기인하거나, 또는 다른 세포 유형에 대한 영향에 기인하는 것일 수 있으며, 이는 다시 심근 세포의 형성을 증강시킨다. 예컨대, 하배엽 또는 원외배엽 (epiblast) 동등 세포의 형성을 유도하거나, 또는 이런 세포가 이들 자신의 심장 촉진 원소를 생산케 하는 인자 모두 강심 인자의 규정에 포함된다.

[0088] pPS 세포의 중배엽 층 세포로의 분화를 유도하거나, 또는 추가로 심근 세포 계통의 세포로의 분화를 촉진하는 것으로 생각되는 인자에는 하기의 것들이 포함된다 :

[0089] ● DNA 메틸화 및 심근 세포 관련 유전자의 변경된 발현에 영향을 미치는 뉴클레오티드 유사체

[0090] ● TGF-β 리간드 (예컨대, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 및 후술되는 TGF-β슈퍼패밀리의 기타 구성원). 리간드는 TGF-β 수용체에 결합하여 Type I 및 Type II 세린 키나아제를 활성화시키고, Smad 이펙터 (effector) 의 포스포릴화를 유발한다.

[0091] ● 액티빈 A 및 액티빈 B (TGF-β 슈퍼패밀리의 원) 과 같은 형태형성자 (morphogen)

[0092] ● 인슐린 유사 성장인자 (예컨대, IGF II)

[0093] ● 골형성단백질 (TGF-β슈퍼패밀리의 구성원, 예컨대, BMP-2 및 BMP-4)

[0094] ● 섬유아세포 성장 인자 (예컨대, bFGF, FGF-4 및 FGF-8) 및 세포질 키나아제 raf-1 및 미토겐 활성화 단백질 키나아제 (MAPK)를 활성화하는 기타 리간드

[0095] ● 혈소판 유래 성장 인자 (예컨대, PDGFβ).

[0096] ● 나트륨배설 인자 (예컨대, 심방 나트륨배설 인자 (ANF), 뇌 나트륨배설인자 펩티드 (BNP)

[0097] ● 인슐린, 백혈병 억제 인자 (LIF), 표피 성장 인자 (EGF), TGFα 및 *cripto* 유전자의 생성물과 같은 관련 인자

[0098] ● 동일한 수용체에 대해 아고니스트 활성을 갖는 특정 항체.

[0099] 대안적으로 또는 부가적으로, 세포는 심근 세포 분화 증강 인자를 분비하는 세포 (예컨대, 다양한 종류의 내피 세포) 와 함께 공동 배양될 수 있다.

[0100] 실시예 6 에서 설명된 바와 같이, DNA 메틸화에 영향을 미치는 (따라서 유전자 발현에 영향을 미침) 뉴클레오티드 유사체는 초기 분화후 나타나는 심근 세포 계통 세포의 비율을 증가시키는데 효과적으로 사용될 수 있다. 예컨대, 배양 배지내 5-아자-데옥시-싸이티딘의 함유는 개체군내에서 수축성 세포의 빈도, 및 심장 αMHC 의 발현을 증가시킨다는 것을 발견하였다. 일부의 환경 하에서는, 상기 단계만에 의한 강화는 개체군의 약 1 % 내지 약 3% 이상으로 수축성 심근 세포를 증가시킬 수 있다.

[0101] 강심제의 평가는 추가로 실시예 7 에 설명되어 있다. 강심제의 특히 효과적인 조합에는, 하나 이상의 섬유아세포 성장 인자, 골형성 단백질 및 혈소판 유래 성장인자와 같은 추가의 심근 세포로 임의로 보충된, 액티빈 A (Activin A) 와 같은 형태형성인자 및 복수의 성장 인자, 예컨대, 초기 위임 단계동안 TGF-β 및 IGF 패밀리내 포함되는 것의 사용이 포함된다.

[0102] 본 발명의 실행 동안, 인슐린-유사 성장 인자 II (IGF II) 및 시험관내 분화의 최종 단계 유래의 관련 분자와 같은 생략성(omitting) 인자는 실제적으로 심장 유전자 발현의 수준을 증가시킨다는 것이 밝혀졌다. 비관련 연구에서, IGF II 는 섬유아세포중 GSK3β의 수준을 감소시키는 것으로 밝혀졌다 (Scalia 등., J. Cell. Biochem. 82:610, 2001). 따라서, IGF II 는 배양 배지내 존재하거나 또는 세포에 의해서 분비되는 Wnt 단백질의 효과를 증강시킬 수 있다. Wnt 단백질은 일반적으로 전사 인자 TCF 의 일부를 포함하는 세포질 분자, β 카테닌의 핵 전위를 유발하고, 안정화시킨다. 이는 다양한 유전자의 전사 활성을 변화시킨다. Wnt 의 부재하, β 카테닌은 키나아제 GSK3β 에 의해서 포스포릴화되고, 이 둘은 β 카테닌을 불안정하게 하며, 이를 세포질내 유지시킨다.

[0103] IL II 와 같은 Wnt 활성화제는 명확히 심근 세포 분화를 제한하기 때문에, Wnt 안타고니스트를 사용한 배양은 hES 세포의 심근 세포 분화의 정도 및 비율을 증가시킬 수 있을 것으로 여겨진다. Wnt 신호전달은 DKK-1 또는 Crescent (Wnt 에 결합 및 불활성화시키는 분비되는 단백질)을 코딩하는 합성 mRNA 를 주입하여 (Schneider 등., Genes Dev. 15:304, 2001), 또는 DKK-1 을 코딩하는 레트로바이러스로 감염시켜 (Marvin 등., Genes Dev. 15:316, 2001) 억제시킬 수 있다. 이와 달리, Wnt 경로는 키나아제 GSK3β의 활성을 증가시켜, 예컨대, IL-6 또는 글루코코르티코이드와 같은 인자와 함께 세포를 배양하여 억제시킬 수 있다.

[0104] 물론, 통상적으로 본 발명에 따른 분화 패러다임에서 강심 인자를 사용하기 위해 강심 인자의 작용 방식을 이해할 필요는 없다. 심근 세포 생산 강화에 유효한 상기 화합물의 조합 및 양은, 비분화 또는 초기 분화 hES 세포 또는 이들의 후손을 상기 인자가 도입된 배양 환경에서 배양한 후, 화합물이 후술된 표현형 마커에 따라 개체군 내 심근 세포 계통 세포의 수를 증가시키는지의 여부를 결정하여 실험적으로 결정할 수 있다.

[0105] pPS-유래 심근 세포는 표현형 특징의 확장, 강화, 클로닝 및 결정을 위해 재플레이팅 및 단일 세포 현탁액으로 분리시킬 수 있음을 발견하였다. 실시예 2 는 콜라게나아제 B 용액을 이용하여 단일 분리된 심근 세포의 제조를 설명한다. 또한, 콜라게나아제 II, 또는 Blendzyme IV (Roche) 와 같은 콜라게나아제들의 혼합물이 적합하다. 해리 후, 세포를 챔버 슬라이드에 시딩하고, 분화 배지에서 배양한다. 재배양된 단일 심근 세포 세포는 생존하고, 계속적으로 박동한다.

[0106] pPS 유래 세포의 현탁액은 기계적 분리 또는 세포 분류 (cell sorting) 와 같은 방법으로, 바람직한 특징을 갖는 세포를 위해서 추가로 농후화할 수 있다. 수축성 세포의 백분율은 적당한 기술을 이용한 밀도 분리로 약 20 배 강화될 수 있음을 발견하였다. 등밀도 원심분리로 강화된 심근 세포 개체군의 분리는 실시예 4 및 9 에 설명되어 있다. 적어도 약 5%, 약 20%, 약 60%, 및 가능하게는 약 90% 세포 이상의 심근 세포 계통을 포함하는 개체군을 수득할 수 있다. 본 개시에 참조되어 있는 연구 및 치료적 용도의 대부분은 심근 세포의 비율의 강화로부터 이익을 얻을 것이나, 종종 완전한 동질성이 요구되지는 않는다.

[0107] 초기 분화 (및 이용되는 경우, 분리 단계 전 또는 후) 후, "심근 세포 강화제" 를 포함하는 환경에서 배양하여 심근 세포 계통 세포의 백분율을 증가시키는 것이 가능하다. 이것은 단지 심근 세포 계통의 세포의 증식을 촉진하거나, 또는 기타 조직 유형의 세포의 성장의 억제 (또는 에이팝토시스 (apoptosis) 를 유발) 하여, 목적하는 세포 유형의 성장을 촉진하는 표면 기질 상의 또는 배지 중의 인자이다. 전술한 강심 인자의 일부가 상기 목적에 적합하다. 또한 생체내 심근 세포에 유익한 것으로 공지된 특정 화합물 또는 이들의 유사체가 적합하다. 고 에너지 포스페이트 결합을 형성할 수 있는 화합물 (예컨대, 크레아틴); 아실기 담체 분자 (예컨대, 카르니틴); 및 심근 세포 칼슘 채널 조절제 (예컨대, 타우린) 가 포함된다.

[0108] 심근 세포 계열 세포 (cardiomyocyte lineage cell) 의 특징

[0109] 본 발명의 기술에 따라 수득되는 세포는 다수의 표현형 기준에 따라 규명될 수 있다. 심근 세포 및 pPS 세포 주로부터 유도되는 전구체 세포는 종종 다른 근원으로부터의 심근 세포의 형태학적 특징을 갖는다. 이들은 면역염색법 (실시예 3) 으로 검출가능한 근섬유분절 구조의 줄무늬 특징을 갖는, 방추형, 원형, 삼각형 또는 다각형일 수 있다. 이들은 근관형 구조를 형성할 수 있으며, 전자 현미경으로 검사할 경우, 전형적인 근섬유분절 및 심방 과립 (atrial granule) 을 나타낸다.

[0110] pPS 유도 심근 세포 및 이들의 전구체는 전형적으로는 하기의 심근 세포 특이적인 마커들 중 하나 이상을 갖는다:

[0111] ● 심장 트로포닌 I (cTnI), 횡문근 수축 조절을 위한 칼슘-감응성 분자 스위치를 제공하는 트로포닌 복합체의 서브유닛.

[0112] ● 심장 트로포닌 T (cTnT),

[0113] ● 심방 나트륨배설 인자 (ANF), 심장 및 태아 심근 세포의 발생에서 발현되나, 성인에서는 하향조절되는 호르몬. 이는 심장 세포에서는 매우 특이적인 방식으로 발현되지만, 골격 근세포에서는 발현되지 않으므로 심근 세포에 대한 우수한 마커로 간주된다.

[0114] 세포들은 또한 전형적으로는 하나 이상 (종종, 3, 5 가지 이상) 의 하기 마커를 발현한다:

[0115] ● 근섬유분절 미오신 중쇄 (MHC)

[0116] ● 티틴, 트로포미오신, α-액티닌 및 데스민

[0117] ● GATA-4, 심장 중배엽에서 고발현되며, 심장 발생에서 지속되는 전사 인자. 이는 다수의 심장 유전자를 조절하며, 심장발생에서 역할을 담당한다.

[0118] ● Nkx2.5, 초기 마우스 배아 발생동안 심장 중배엽에서 발현되는 심장 전사 인자로서, 심장 발생동안 지속된다.

[0119] ● MEF-2A, MEF-2B, MEF-2C, MEF-2D; 심장 중배엽에서 발현되며, 심장 발생동안 지속되는 전사 인자.

[0120] ● N-캐드헤린, 심장 세포들 사이의 유착을 중재한다.

[0121] ● 코넥신 43, 심근 세포들 사이의 간극 연접 (gap junction) 을 형성한다.

[0122] ● β1-아드레날린 수용체 (β1-AR)

[0123] ● 크레아틴 키나아제 MB (CK-MB) 및 미오글로빈, 근세포 경색 후 혈청 중에서 상승된다.

[0124] 심근 세포 및 이들의 전구체 상에서 양성일 수 있는 기타 마커들에는 α-심장 액틴, 초기 성장 응답자-I 및 싸이클린 D2 가 포함된다.

[0125] 조직 특이적 마커들은 임의의 적합한 면역학적 기술-예컨대 유세포면역분석 (flow immunocytochemistry) 또는 세포 표면 마커에 대한 친화성 흡착, 세포내 또는 세포 표면 마커에 대한 면역세포화학 (예를 들어, 고정된 세포 또는 조직 섹션에 대한 것), 세포 추출물의 웨스턴 블랏 분석, 및 세포 추출물 또는 매질로 분비되는 생성물에 대한 효소-연계 면역검정이 포함된다. 임의로는 세포의 고정 후에, 표지를 증폭하기 위해 표지된 제 2 항체 또는 기타 콘쥬게이트 (예컨대 바이오틴-아비딘 콘쥬게이트) 를 임의로 이용하여, 확연히 검출가능한 양의 항체가 표준 면역세포 화학 또는 유세포 검정에서 항원에 결합하는 경우, 세포에 의한 항원의 발현이 항체-검출가능하다고 언급한다.

[0126] 조직 특이적 유전자 생성물의 발현은 또한, 노던 블랏 분석 (Northern blot analysis), 도트-블랏 하이브리디제이션 분석 (dot-blot hybridization analysis), 또는 표준 증폭법에서 서열 특이성 프라이머를 이용하는 역전사효소 개시 중합 연쇄 반응 (RT-PCR) 에 의해 mRNA 수준에서 검출될 수 있다. 일반적인 기술의 상세한 점은 U.S. 특허 5,843,780 를 참조한다. 본 발명의 개시에서 열거된 기타 마커들에 대한 서열 데이터는 공지된 데이터베이스, 예컨대 GenBank (URL www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez) 로부터 입수할 수 있다. 전형적인 통제된 실험의 표준 과정에 따라, 세포 샘플 상에서의 검정 수행이 명확하게 식별가능한 하이브리디제이션 또는 증폭 생산물을 제공하는 경우, 본 발명의 개시에 기재된 검정들 중 한 가지에 따라 mRNA 수준에서의 발현이 검출가능하다고 언급한다. 단백질 또는 mRNA 수준에서 검출된 바와 같은 조직 특이성 마커의 발현이, 그의 수준이

비분화 pPS 세포 또는 기타 무관한 세포 유형과 같은 대조군 세포의 것에 비해 2 배 이상, 바람직하게는 10- 또는 50-배를 초과하는 경우 양성인 것으로 간주된다.

[0127] 일단 마커가 원하는 표현형의 세포 표면 상에서 동정되면, 이들은 이뮤노패닝 (immunopanning) 또는 항체중재 형광 활성화 세포 분리 (antibodymediated fluorescence-activated cell sorting) 와 같은 기술로 개체군을 더 풍부하게 하기 위한 면역선별법 (immunoselection) 에 이용될 수 있다.

[0128] 적절한 상황 하에서, pPS-유도 심근 세포는 종종 자발적인 주기적 수축 활성을 나타낸다. 이는, 이들이 적당한 Ca^{++} 농도 및 전해질 균형이 있는 적합한 조직 배양 환경에서 배양되는 경우, 배양 배지에 임의의 추가적인 성분을 첨가하지 않더라도, 세포들이 세포의 한 축에 따라 수축한 후, 수축으로부터 이완되는 것이 관찰될 수 있음을 의미한다. 수축이 주기적인 것은, 이들이 매 분 약 6 내지 200 수축, 종종 매 분 약 20 내지 약 90 수축의 빈도로 규칙적으로 또는 불규칙적으로 반복한다는 것을 의미한다 (도 5). 개별적인 세포들이 이들 스스로 자발적인 주기적 수축 활성을 나타낼 수 있거나, 또는 이들이 조직, 세포 응집물 또는 배양된 세포 덩어리에서 이웃하는 세포와 함께 일치하여 자발적인 주기적 수축 활성을 나타낼 수 있다.

[0129] 세포들의 수축 활성은 자연적인 배양 조건의 영향 및 수축 빈도에 따라 규명될 수 있다. 이용가능한 Ca^{++} 농도를 감소시키거나 또는 그렇지 않으면 Ca^{++} 의 막통과 수송을 방해하는 화합물들은 종종 수축 활성에 영향을 준다. 예를 들어, L-유형 칼슘 채널 차단제 딜티아젬은 투여량 의존성 방식으로 수축 활성을 저해한다 (도 5). 한편, 아드레날린 수용체 아고니스트 유사 이소프레날린 및 페닐레프린은 양성 심장박동수 변동 (chronotropic) 효과를 갖는다. 세포의 기능적 특성의 추가적인 규명에서는 Na^{+}, K^{+} 및 Ca^{++} 에 대한 채널을 규명하는 것을 수반할 수 있다. 전기생리학은 심근 세포 유사 작동 전위에 대한 팻치 클램프 분석에 의해 연구될 수 있다. 문헌 [Igelmund 등, Pflugers Arch. 437: 669, 1999; Wobus 등, Ann. N.Y. Acad. Sci. 27: 752, 1995; 및 Doevendans 등, J. Mol. Cell Cardiol. 32: 839, 2000] 을 참조.

[0130] 기능적 속성은 시험관 내에서의 세포 및 이들의 전구체를 규명하는 방식을 제공하나, 본 발명의 개시에서 참조하는 일부 응용에서 필수 조건은 아닐 수 있다. 예를 들어, 일부 상기 열거된 마커를 가진 세포가 농후하게 된 혼합 세포 개체군은, 이들이 손상된 심장 조직에 그라프트될 수 있고, 보충되는 심장 기능에 필요한 기능적 특성을 생체내에서 획득할 수 있는 경우, 치료적으로 이익이 되는 것으로 간주될 수 있다.

[0131] pPS 세포의 확립된 세포주로부터 유도되는 경우, 본 발명의 세포 개체군 및 분리된 세포들은, 이들이 유도되는 세포주와 동일한 게놈을 가진 것으로 규명될 수 있다. 이는 pPS 세포와 심장 세포의 크로모좀 DNA 가 90% 이상 동일하다는 것을 의미하며, 이는 정상적인 유사 분열 과정을 통해 비분화 세포주로부터 심장 세포가 수득되는 경우 추론될 수 있다. 형질전환 유전자 (transgene, 예컨대 TERT) 를 도입하거나 또는 내재 유전자를 넉아웃 (knock out) 하는 재조합 방법에 의해 처리된 세포는 또한, 모든 비-취급 유전자 원들이 보존되므로 이들이 분화된 세포주와 동일한 게놈을 갖는 것으로 간주된다. DNA 핑거프린트 (fingerprinting) 와 같은 표준 기술에 의해 두 개의 세포 개체군이 동일한 게놈을 갖는다는 것을 나타낼 수 있다. 대안적으로는, 관계성은 세포의 유도 동안 유지되는 기록의 고찰로 확립될 수 있다. 심근 세포 계열 세포가 모 세포 개체군으로부터 유도되는 특징은 여러가지 면에서 중요하다. 특히, 비분화 세포 개체군 (심장 세포의 추가적인 뱃치 (batch) 이거나, 또는 치료에 유용할 수 있는 또다른 세포 유형), 예컨대, 심장 동종이식의 조직적합 유형에 환자를 예비관용화 (pretolerize) 할 수 있는 개체군은 할당 게놈을 가진 추가적인 세포 제조에 사용될 수 있다

[0132] 치료 용도를 위해, 본 발명의 분화된 세포 개체군에는 비분화 pPS 세포가 실질적으로 없는 것이 종종 요망된다. 개체군으로부터 비분화 줄기 세포 (stem cell) 를 없에는 한 가지 방법은, 프로모터의 제어 하의 효과 유전자 (effector gene) 가 있는, 비분화 세포에서 우세한 발현을 초래하는 벡터에 이들을 트랜스펙션하는 것이다. 적합한 프로모터에는 TERT 프로모터 및 OCT-4 프로모터가 포함된다. 효과 유전자는 직접 세포가 용해되도록 할 수 있다 (예를 들어, 독소 또는 에이팝토시스 (apotosis) 의 매개자를 코딩함). 다시 말하면, 효과 유전자는 세포가 외부 효과제, 예컨대 항체 또는 프로드러그의 독성 효과에 적용되기 쉽게 만들 수 있다. 예시로는 헤르페스 심플렉스 티미딘 키나아제 (herpes simplex thymidine kinase (tk)) 유전자로, 이는 갠시클로비르 (ganciclovir) 에 적용되기 쉽게 발현되는 세포를 초래한다. 적합한 pTERT-tk 구축물은 WO 98/14593 (Morin 등) 에 기재되어 있다.

[0133] 현재 심근 세포 및 이들의 전구체는 pPS 세포로부터 생성될 수 있다는 것이 알려졌으므로, 독자들의 영역 내에서 본 발명의 개시에 상술된 분화 패러다임은 목적에 맞게 잘 조정된다. 독자들은 특정 배양 조건의 적합성,

예를 들어 pPS 세포 또는 이들의 유도체를 본 발명의 개시에서의 서술에 따라 수득되는 세포 및 다른 대조군 세포 유형 (예컨대, 1 차 인간 심근 세포, 간 세포 또는 섬유아세포) 을 동시에 시험 조건에서 배양한 후, 상기 열거한 마커에 따라 수득되는 세포의 표현형을 비교함으로써 특정 배양 조건의 적합성을 즉시 시험할 수 있다. 특정 성분을 변화시키기 위한 배양 및 세포 분리 조건의 조정은, 상기 종류의 배양법에 대해 정상적으로 예상되는 일상적인 최적화의 문제이며, 청구되는 본 발명의 본의로부터 이탈하지 않는다.

[0134] 분화된 세포의 유전적 변경

[0135] 세포가 특정 약물 스크리닝 및 치료 적용에서 복제하며, 심근 세포 및 이들의 전구체 세포의 생성을 위한 저장소를 제공하는 성능을 갖는 것이 요망될 수 있다. 본 발명의 세포는, 이들이 제한 발생 계열 세포 또는 말단 분화 세포로 진행하는 전 또는 후에, 임의로는 말단화 (telomerize) 되어 이들의 복제 잠재성을 증가시킬 수 있다. 말단화된 pPS 세포가 초반에 기재된 분화 경로로 들어가거나; 또는 분화된 세포가 직접 말단화될 수 있다.

[0136] 세포는 적합한 벡터, 동종 재조합 또는 기타 적절한 기술을 사용해 트랜스펙션되거나 또는 형질도입에 의해 유전적으로 변경됨으로써 말단화되어, 이들이 전형적으로는 내재 프로모터 하에 발생하는 것을 초과하여 텔로머라제 (telomerase) 발현을 증가시키는 이종 프로모터 하에서, 텔로머라제 촉매 성분 (TERT) 을 발현한다. 특히 적합한 것은 국제 특허 출원 WO 98/14592 에서 제공되는 인간 텔로머라제의 촉매 성분 (hTERT) 이다. 특정 적용에서는, 마우스 TERT (WO 99/27113) 와 같은 동족체 (species homologs) 가 또한 이용될 수 있다. 인간 세포에서의 텔로머라제의 트랜스펙션 및 발현은 문헌 [Bodnar 등, Science 279:349, 1998 및 Jiang 등, Nat. Genet. 21:111, 1999] 에 기재되어 있다. 또다른 예에서, hTERT 클론 (WO 98/14592) 은 hTERT 코딩 서열의 원으로서 사용되며, MPSV 프로모터의 제어 하의 PBBS212 벡터의 EcoRI 부위, 또는 LTR 프로모터의 제어 하의 시판되어 구입가능한 pBABE 레트로바이러스 벡터의 EcoRI 부위에 스플라이싱된다.

[0137] 분화 또는 비분화 pPS 세포는 8-16 시간의 기간에 걸쳐 상청액을 함유하며 벡터를 이용하여 유전적으로 변경된 후, 1-2 일 동안 성장 배지로 교환된다. 유전적으로 변경된 세포는 푸로마이신 (puromycin), G418, 또는 블라스트시딘 (blasticidin) 과 같은 선별 시약을 이용하여 선별된 후, 재배양된다. 이어서, 이들은 RT-PCR, 텔로머라제 활성 (TRAP 검정), hTERT 에 대한 면역세포화학적 염색법, 또는 증식 용량에 의해 hTERT 발현에 대해 평가될 수 있다. 하기의 검정 키트는 연구 목적을 위해 시판되어 입수가능한 것들이다: TRAPeze® XL Telomerase Detection Kit (Cat. s7707; Intergen Co., Purchase NY); 및 TeloTAGGG Telomerase PCR EILISAplus (Cat. 2,013,89; Roche Diagnostics, Indianapolis IN). TERT 발현은 또한 RT-PCR 에 의해 mRNA 로 평가될 수 있다. 연구 목적을 위해 시판되어 입수가능한 것은 LightCycler TeloTAGGG hTERT quantification kit (Cat. 3,012,344; Roche Diagnostics) 이다. 지속적으로 복제되는 콜로니들은 증식을 지지하는 조건 하에 추가적 배양함으로써 농후하게 될 것이며, 원하는 표현형을 가진 세포를 임의로는 희석을 제한함으로써 클로닝될 수 있다.

[0138] 본 발명의 특정 구현예에서, pPS 세포는 심근 세포 전구체로 분화한 후, TERT 를 발현하도록 유전적으로 변경된다. 본 발명의 또다른 구현예에서, pPS 세포는 TERT 를 발현하도록 유전적으로 변경된 후, 심근 세포 전구체 또는 면역 분화 세포로 분화한다. TERT 발현을 증가시키기 위한 성공적인 변형은 TRAP 검정에 의해, 또는 세포의 복제 용량이 개선되었는지 여부를 측정함으로써 측정될 수 있다.

[0139] 세포의 의도하는 용도에 따라, 불멸화의 다른 방법들도 허용될 수 있으며, 예컨대 DNA 코딩 myc, SV40 대형 T 항원, 또는 MOT-2 로 세포를 형질전환하는 방법 (U.S. Patent 5,869,243, 국제 특허 공보 WO 97/32972 및 WO 01/23555) 일 수 있다. 세포를 치료 목적으로 이용하는 경우, 종양유전자 또는 종양바이러스 생성물을 사용한 트랜스펙션은 덜 적합하다.

[0140] 말단화된 세포는, 이들의 핵형을 증식 및 유지할 수 있는 세포를 가질 수 있는 본 발명의 응용 (예를 들어, 약제학적 스크리닝, 및 분화된 세포를 심장 기능 확대를 위해 개인에게 투여하는 치료 프로토콜) 에서 특히 관심 대상이다.

[0141] 본 발명의 세포는 또한 조직 재생에 수반되는 이들의 성능을 향상시키거나, 또는 치료 유전자를 투여 부위에 전달하기 위해 유전적으로 변경될 수 있다. 벡터는 총체적으로 특이적 (pan-specific) 이거나 또는 분화된 세포 유형에서 특이적이로 활성인 프로모터에 작동적으로 연결된 원하는 유전자에 대한 공지된 코딩 서열을 이용하여 고안된다. 특히 관심대상인 것은 각종 유형의 하나 이상의 성장 인자들, 강심 인자들, 예컨대 심방 나트륨배설 인자, 크립토 (cripto) 및 심장 전사 조절 인자, 예컨대 GATA-4, Nkx2.5, 및 MEF2-C 를 발현하도록 유전적

으로 변경된 세포이다. 투여 부위에서의 상기 인자들의 생성은 기능성 표현형의 채택을 촉진하거나, 투여 세포의 이로운 효과를 향상시키거나 또는 처리 부위에 이웃하는 숙주 세포의 증식 또는 활성을 증가시킬 수 있다.

[0142] 심근 세포 및 이들의 전구체의 용도

[0143] 본 발명은 다량의 심근 세포 계열의 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 세포 개체군들은 다수의 중요한 연구, 개발 및 상업적 목적을 위해 이용될 수 있다.

[0144] 본 발명의 세포들은 다른 계열로부터의 세포에서 우세하게 발현되는 cDNA 로 비교적 오염되지 않는 cDNA 라이브러리를 준비하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 심근 세포는 1000 rpm 에서 5 분 동안 원심분리여 수집한 후, 표준 기술로 펠렛으로부터 mRNA 를 제조한다 (Sambrook 등, 상기 문헌). cDNA 로의 역전사 후, 제조된 것은 비분화 pPS 세포, 다른 원시 세포 (progenitor cell), 또는 심근 세포로부터의 말기 세포 (end-stage cell) 또는 임의의 다른 발생 경로로부터 cDNA 를 공제한다.

[0145] 본 발명의 분화된 세포들은 또한 심근 세포 및 이들의 전구체의 마커에 특이적인 항체를 제조하는데 사용될 수 있다. 폴리클로날 항체는 척추 동물에 면역원 형태의 본 발명의 세포를 주입함으로써 제조할 수 있다. 모노클로날 항체의 제조는 문헌 [U.S. 특허 4,491,632, 4,472,500 및 4,444,887, 및 Methods in Enzymology 73B:3 (1981)] 과 같은 참고 문헌에 기재되어 있다. 특이적인 항체 분자는 또한 면역 적격 세포 (immunocompetent) 의 라이브러리 또는 바이러스 입자를 표적 항원에 접촉시키고, 양성으로 선별되는 클론을 배양함으로써 제조될 수 있다. 참고 문헌 [Marks 등, New Eng. J. Med. 335:730, 1996, 및 McGuiness 등, Nature Biotechnol. 14:1449, 1996]. 추가적인 대안은 EP 특허 출원 1,094,108 A 에 기재된 바와 같이, 랜덤 DNA 절편을 항체 코딩 영역으로 리어셈블리 (reassembly) 하는 것이다.

[0146] 본 발명의 특이적인 세포를 이용하여 양성인 것을 선별하고, 더욱 광범위하게 분포하는 항원 (예컨대, 다른 표현형을 가진 배아 세포) 을 보유하는 세포 또는 성체 유래의 심근 세포를 이용하여 음성인 것을 선별함으로써, 원하는 특이성을 수득할 수 있다. 또한, 조직 샘플을 이용한 면역진단 동안의 공염색 (co-staining) 및 말단 분화 심근 세포 및 다른 계열의 세포로부터의 전구체 세포 분리와 같은 목적을 위해, 항원은 혼합된 세포 개체군으로부터 원하는 표현형의 심장 세포를 동정 또는 구조하기 위해 이용될 수 있다.

[0147] 본 발명의 세포는 또한 전사물의 발현 패턴 및 심근 세포에 특징적인 새로 합성되는 단백질을 동정함에 있어서 흥미로우며, 분화 경로 또는 세포간 상호작용 촉진에 대하여 보조할 수 있다. 분화된 세포의 발현 패턴을 수득하여 대조군 세포주, 예컨대 비분화 pPS 세포, 기타 유형의 수용되는 전구체 세포 (예컨대, 다른 계열로 분화되는 pPS 세포), 또는 말단 분화 세포와 비교한다.

[0148] 유전자 발현 분석에서의 마이크로어레이의 사용은 일반적으로 문헌 [Fritz 등, Science 288: 316, 2000; Microarray Biochip Technology, L Shi, www.Gene-Chips.com] 에서 개관되었다. 예시적인 방법은 Genetic Microsystems array generator 및 Axon GenePix™ Scanner 를 이용하여 수행된다. 마이크로어레이는 분석될 마커 서열을 코딩하는 cDNA 절편을 먼저 증폭한 후, 글래스 슬라이드 상에 직접 스팟팅하여 준비한다. 관심있는 두 세포 유래의 mRNA 제조물을 비교하기 위해, 한 제조물을 Cy3-표지 cDNA 로 전환하고, 다른 하나는 Cy5-표지 cDNA 로 전환한다. 두 cDNA 제조물을 마이크로어레이 슬라이드에 동시에 하이브리다이즈시킨 후, 비특이적인 결합을 제거하기 위해 세척한다. 이어서, 슬라이드를 각각의 표지에 적합한 파장에서 스캐닝하여, 생성된 형광을 정량하고, 어레이 상에서의 각각의 마커에 대한 mRNA 의 상대적인 양의 표시를 수득할 수 있도록 결과를 포맷한다.

[0149] *약물 스크리닝*

[0150] 본 발명의 심근 세포는 인자 (예컨대, 용매, 소형 분자 약물, 펩티드, 올리고뉴클레오티드) 또는 상기 세포 및 이들의 후손의 특징에 영향을 주는 각종 환경 조건 (예컨대, 배양 조건 또는 취급법) 을 스크리닝하기 위해 이용될 수 있다.

[0151] 일부 응용에서, pPS 세포 (비분화 또는 분화) 는 후기 심근 세포 전구체, 또는 말단 분화 세포로의 성숙을 촉진하거나, 또는 장기간 배양에서 상기 세포의 증식 및 유지를 촉진하는 인자들을 스크리닝하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 이들을 상이한 웰 내의 세포에 첨가한 후 수득되는 임의의 표현형 변화를 추가적인 배양 및 세포의 용도에 대한 요망되는 기준에 따라 측정함으로써, 후보 성숙 인자 또는 성장 인자를 시험한다.

[0152] 본 발명의 다른 스크리닝 응용은, 심장 근육 조직 유지 또는 수리 (repair) 를 위한 약제학적 화합물의 시험에

관한 것이다. 화합물은 세포 상에 약학적인 영향을 갖도록 고안되거나, 또는 화합물이 상기 세포유형의 세포 상에 의도하지 않은 부작용을 가질 수도 있는 영향을 갖도록 고안되었으므로 스크리닝이 수행되어야 한다. 스크리닝은 본 발명의 임의의 전구체 세포 또는 말단 분화 세포를 이용하여 수행될 수 있다.

[0153] 독자들에게는 일반적으로 표준 교과서인 [In vitro Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, 1997] 및 U.S. 특허 5,030,015 가 참고가 된다. 후보 약제학적 화합물의 활성 평가에 일반적으로 본 발명의 분화된 세포와, 단독적이거나 또는 다른 약물과 조합한 후보 화합물을 조합하는 것을 수반한다. 연구자들은 화합물로 인한, 세포의 형태, 마커 표현형 또는 기능적 활성의 임의의 변화를 (비처리 세포 또는 불활성 화합물로 처리된 세포와 비교하여) 측정한 후, 화합물의 효과를 관찰된 변화와 연관짓는다.

[0154] 세포독성은 세포 생활력 (viability), 생존성 (survival), 형태 및 특정 마커 및 수용체의 발현 상의 영향에 의해 가장 먼저 결정될 수 있다. 크로모좀 DNA 상의 약물의 효과는 DNA 합성 또는 수리를 측정함으로써 결정될 수 있다. 특히 세포 주기에서의 계획되지 않은 시점에서, 또는 세포 복제를 위해 필요한 수준 이상의 [^{3}H]-티미딘 또는 BrdU 의 혼입은, 약물 효과와 일관된다. 원하지 않는 효과에는 또한, 중기 스프레드 (metaphase spread) 에 의해 결정되는 자매 크로마티드 (sister chromatid) 교환의 비정상적 비율이 포함된다. 독자들은 추가적인 고찰을 위해서는 문헌 A. Vickers (pp 375-410 in In vitro Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, 1997)] 을 참조할 수 있다.

[0155] 세포 기능의 영향은, 심근 세포의 표현형 또는 활성을 관찰하기 위한 임의의 표준 검정법, 예컨대 세포 배양 또는 생체 내에서의 마커 발현, 수용체 결합, 수축 활성, 또는 전기생리학을 이용하여 평가될 수 있다. 약제학적 후보들은 또한 수축 활성에 대한 이들의 영향 (예컨대, 이들이 수축의 강도 또는 빈도를 증가 또는 감소시키는지 여부) 를 시험할 수 있다. 효과가 관찰되는 곳에서, 화합물의 농도는 평균 유효 투여량 (ED_{50}) 을 결정하기 위해 적정될 수 있다.

[0156] *치료 용도*

[0157] 본 발명은 또한 조직 유지를 촉진하거나 또는 임의의 파악된 필요성, 예컨대 대사 기능에서의 선천적 이상, 질병 조건의 영향 또는 심각한 충격의 결과에 대한 심장 근육을 수리하기 위한 심근 세포 및 이들의 전구체의 용도를 제공하는 것이다.

[0158] 치료용 조성물에 대한 세포 조성의 적합성을 결정하기 위해, 세포는 우선 적합한 동물 모델에서 시험될 수 있다. 한 수준에서는, 세포는 생체내에서의 생존성 및 표현형을 유지하는 이들의 능력에 대해 시험한다. 세포 조성물은 면역결핍 동물 (예컨대, 누드 마우스, 또는 화학적으로 또는 방사선 조사로 면역결핍으로 만든 동물) 에 투여한다. 재성장의 기간 후 조직을 수합하여, pPS 유도 세포가 여전히 존재하는지를 평가한다.

[0159] 이는 미리 표지된 (예를 들어, BrdU 또는 [^{3}H]티미딘을 이용) 탐지가능한 표지 (예컨대, 녹색 형광 단백질, 또는 P-갈락토시다아제) 를 발현하는 세포를 투여하거나; 또는 구성 세포 마커 (예를 들어, 인간 특이적 항체를 이용) 의 후속적인 탐지로 수행될 수 있다. 투여된 세포의 존재성 및 표현형은 인간 특이적 항체를 이용한 ELISA 또는 면역조직화학에 의해, 또는 공지된 서열 데이터에 따라 인간 폴리뉴클레오티드에 특이적인 증폭을 초래하는 하이브리디제이션 조건 및 프라이머를 이용한 RT-PCR 분석에 의해 평가될 수 있다.

[0160] 적합성은 또한 pPS-유래 심근 세포의 세포 개체군을 이용한 처리로 인해 발생하는 심장 회복 정도를 평가함으로써 결정될 수 있다. 다수의 동물 모델이 상기 시험을 위해 이용가능하다. 예를 들어, 심장은 미리냉각된 알루미늄 막대기를 앞 좌심실벽의 표면과 접촉시켜 급냉상해 (cryoinjury) 를 입을 수 있다 (Murry 등, J. Clin. Invest. 98:2209, 1996; Reinecke 등, Circulation 100:193, 1999; U.S. 특허 6,099,832). 더 큰 동물에서는, 급냉상해는 액체 N_2 로 냉각된 30-50 mm 구리 디스크 프로브를 좌심실의 앞 벽에 약 20 분 동안 위치시켜 유발시킬 수 있다 (Chiu 등, Ann. Thorac. Surg. 60:12, 1995). 균열골절 (Infraction) 은 좌측의 주요 심장 동맥을 결찰시켜 유도될 수 있다 (Li 등, J. Clin. Invest. 100:1991, 1997). 상해 부위를 본 발명의 세포 제조물로 처리하고, 손상된 영역에서의 세포의 존재성에 대해서는 심장 조직을 조직학적으로 염색하여 검사한다. 심장 기능은, 좌심실 끝-확장 압력, 발생 압력, 압력 상승 속도, 및 압력 감쇠 속도와 같은 파라미터를 결정함으로써 모니터할 수 있다.

[0161] 적절한 시험 후, 본 발명의 분화된 세포는 상기 치료가 필요한 인간 환자 또는 다른 대상체에서의 조직 재건 또는 재생을 위해 이용될 수 있다. 세포는 이들이 의도하는 조직 부위에 그라프트 (graft) 또는 이동하도록 하는 방식으로 투여되며 기능적으로 결핍된 영역을 재건 또는 재생한다. 심실, 심막, 또는 심장 근육 내부에 대

한 심장 기능을 직접 재건할 수 있는 세포를 원하는 위치에서 투여하기 위해 채택될 수 있는 특별한 도구를 이용할 수 있다.

[0162] 상기 치료를 위한 의학적 지표에는, 각종 급성 및 만성 심장 병상, 예컨대 관상 동맥 질환, 심장 근육병, 심근내막염, 선천성 심혈관 결함 및 울혈성 심부전이 포함된다. 처리의 효능은 임상적으로 허용되는 기준, 예컨대, 반흔 세포 (scar tissue) 로 점령된 영역의 감소 또는 반흔 조직의 혈관 재형성, 및 협심증의 빈도 및 정도; 또는 발생되는 압력, 심장수축 압력, 심실확장 말기압, Δ압력/Δ시간, 환자 운동능, 및 삶의 질의 개선에 의해 모니터될 수 있다.

[0163] 본 발명의 심근 세포는, 인간 투여를 위한 충분한 멸균 조건 하에서 등장성 부형제를 함유하는 약제학적 조성물의 형태로 공급될 수 있다. 의약 제형물에서의 일반적인 원칙에 대해서는, 독자들은 문헌 [Cell Therapy. Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; 및 Hematopoietic Stem Cell Therapy, E.D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000] 를 참조한다. 세포 부형제 및 임의의 동반 성분들의 선택은 투여에 이용되는 경로 및 기구에 따라 채택된다. 조성물은 또한 심근 세포의 이식 또는 기능적 운동을 촉진하는 하나 이상의 다른 성분들을 함유하거나 또는 동반될 수 있다. 적합한 성분에는 심근 세포, 또는 상보성 세포 (complementary cell) 유형, 특히 내피 세포의 유착을 지지 또는 촉진하는 매트릭스 단백질이 포함된다.

[0164] 조성물은 임의로는, 원하는 목적, 예컨대 심장 근육의 일부 비정상의 개선을 위한 심근 세포 기능의 재건을 위해, 지시사항이 기재된 적합한 용기에 포장될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0165] **도 1** 은 비분화 인간 배아 줄기 (hES) 세포에 대한 면역조직화학법에 의해 검출된 마커 발현을 보여준다. 배양물을 마우스 배아 피더 세포 상에서 종래의 방법에 따라, 또는 조건화된 배지에서 세포외 매트릭스 Matrigel® 또는 라미닌을 포함하는 피더가 없는 환경에서 키웠다. 피더가 없는 배양물에서 키운 hES 세포는 일차 마우스 섬유아세포의 피더층 상에서 성장시킨 hES 의 것과 유사한 표현형 마커를 가진다.

도 2 는 pPS 세포로부터 심근 세포를 수득하는 모식도 (상단 패널), 및 심근 세포 형성의 동역학 (하단 패널)이다. 실시예 2 는 배상체를 형성하기 위해 현탁액에서 hES 세포를 배양함으로써 분화가 개시되는 예시를 제공한다. 현탁 배양에서 4 일 후에, 배상체를 젤라틴 코팅된 플레이트로 옮겼다. 자발적으로 수축성 세포가, 세포 덩어리의 60% 이상이 수축성 세포를 포함할 때까지 다음 주에 걸쳐 숫적으로 증가하면서, 분화 제 8 일째에 배양물의 다양한 영역에서 관찰되었다.

도 3 은 인간 배아 줄기 (hES) 세포로부터 분화된 심근 세포에서 검출되는 마커를 보여준다. 상단 패널은 마커 심장 트로포닌 I (cTnI), GATA-4, 및 β-액틴에 대한 웨스턴 블롯 분석의 결과를 보여준다. cTnI 및 GATA-4 는 수축성 세포에서 관찰되었으나, 수축성 세포를 포함하지 않은 다른 웰에서는 관찰되지 않았다. 하단 패널은 발생 과정 동안 심장 미오신 중쇄 (αMHC) 의 발현 역학을 보여준다. αMHC의 발현은 수축성 세포가 배양물에서 풍부하게 되는 시간에 해당하는 제 8 일째까지 현저했다.

도 4 는, 트로포미오신, 티틴, 미오신 중쇄 (MHC), α-액티닌, 데스민, 심장 트로포닌 I (cTnI), 및 심장 트로포닌 T (cTnT) 를 분리하여 염색한 단세포 및 세포 덩어리를 보여준다. 단세포 및 덩어리는 상기 모든 마커에 대해 양성으로 염색되었다. 수축 활성을 나타내는 세포의 능력과 일치하는 특징이기도 한, 근섬유분절 구조의 특징인 줄무늬를 볼 수 있다.

도 5 는 hES 유래 심근 세포의 수축 활성에 대한 약리제의 효과를 보여준다. L 타입 칼슘 채널 저해제인 딜티아젬 (diltiazem) 은 투여량에 의존하는 방식으로 수축 활성을 저해했다. 아드레날린 수용체 아고니스트인 이소프레날린, 페닐에프린, 및 클렌부테롤은 심장 박동수 변동 효과 (chronotropic eggect) 를 가졌다.

도 6 은 심근 세포 분화 유도제로서 작용하는 시토신 유사체 5-아자-데옥시-싸이티딘의 능력을 보여준다. 배상체를 4 일 동안 현탁 배양한 후, 젤라틴 코팅된 플레이트 상에서 플레이팅한 hES 세포로부터 형성되었다. 5-아자-데옥시-싸이티딘이 1-4, 4-6 또는 6-8 일 동안 배양 배지에 포함되었다. 상기 효과제는 hES 세포의 분화가 잘 진행된 후에 가장 효과적이었다.

도 7 은 상기 개체군에서 심근 세포 계통 세포의 비율을 증가시키는 강심 인자들의 능력에 대한 잠재적인 강심 인자의 평가를 예시한다. 액티빈 및 특정 성장 인자가 배상체 형성 동안 도입되었고 (그룹 I); 젤라틴 상에

플레이팅한 후에 다른 성장 인자 (그룹 II) 및 5-아자-데옥시-싸이티딘이 도입되었고; 이후에 분화 동안 추가적인 인자 (그룹 III) 가 첨가되었다. 조합을 3 가지 농도 수준으로 시험했다. 5-아자-데옥시-싸이티딘과 조합된 저농도의 성장 인자가 가장 효과적이었다.

도 8a 및 **8b** 는 인자의 각 그룹을 독립적으로 조절함으로써 절차의 추가의 개량을 보여준다. 심근 세포의 특징인 α-MHC 마커가, 그룹 I 및 II 의 인자를 저 수준으로 사용한 후, 5-아자-데옥시-싸이티딘을 사용했을 때, 가장 많이 생성되었다. 이후, 분화 동안 사용된 그룹 III 인자는 실제로 심근 세포 형성을 저해했다. 초기 심근 세포 관련 유전자 GATA-4 의 발현은 또한 상기 조건하에 개선되었다. 임의의 성장 인자 조합을 이용하여 증가되는 내배엽 관련 유전자 HNF3b 와 비교하여 α-MHC 및 GATA-4 에 대한 효과는 선별적이나, 5-아자-데옥시-싸이티딘에 대해서는 선별적이지 않았다.

도 9 는 크레아틴, 카르니틴, 및 타우린 (CCT) 을 포함하는 배지에서 1-2 주 동안 심근 세포를 포함하는 개체군을 배양함으로써 달성된 농후화를 보여준다. 각 라인은 실험 과정에 걸쳐 단일 웰에서 나타낸 박동 영역을 나타낸다. CCT 배지는 표준 분화 배지에서 배양된 세포와 비교하여, 배양물에서 박동 영역의 수치가 약 4 배 더 배가되었다.

도 10 은 불연속 Percoll™ 구배 상에서 hES 세포로부터 분화된 세포 개체군을 분리하는 효과를 보여준다. 분획 I. 상단 접촉면; II. 40.5% 층; III. 하단 접촉면; IV. 58.5% 층. 실시간 RT-PCR 분석으로 측정된 바와 같이, 심근 세포 마커 α-미오신 중쇄의 발현은 고밀도 분획에서 가장 높았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0166] *본 발명의 특정 구현예의 비제한적이고 추가적인 예시로서*

[0167] *하기의 실시예를 제공한다.*

[0168] 실시예

[0169] 실시예 1 : 피더 세포 (feeder cell) 부재 하의 배아줄기세포의 증식

[0170] 인간 배아 줄기 (hES) 세포의 비분화된 확립된 세포주는 본질적으로 피더 세포가 없는 배양 환경에서 유지되었다.

[0171] 피더 세포가 없는 배양액을, 표준 절차 (WO 01/51616) 에 따라, 분리된 1차 마우스 배아 섬유아세포를 사용하여 제조한 조건화된 배지 (conditioned medium) 를 사용하여 유지시켰다. T150 플라스크로부터 Ca^{++}/Mg^{++} 가 없는 PBS로 1 회 세척하고, 1.5 - 2 ㎖의 트립신/EDTA (Gibco 사) 중에서 약 5 분간 인큐베이션 함으로써 섬유아세포를 수합했다. 섬유아세포를 플라스크로부터 분리한 후, mEF 배지 (DMEM + 10% FBS) 내에서 수집했다. 세포를 4000 rad 로 조사하고, 계수하고, mEF 배지 중에 ㎠ 당 약 55,000 개의 세포로 시딩 (seeding) 했다 (6 웰 플레이트의 웰 당 525,000 개의 세포).

[0172] 적어도 4 시간 후에, 상기 배지를 4 ng/㎖ 재조합 인간 기재 섬유아세포 성장인자 (bFGF; Gibco 사)가 보충된, ES 배지 (80% 넉 아웃 DMEM (Gibco BRL 사, Rockville MD), 20% 넉 아웃(knockout) 혈청 대체물 (Gibco 사), 1% 비필수 아미노산 (Gibco 사), 1mM L-글루타민 (Gibco 사), 0.1 mM β-메르캅토에탄올 (Sigma 사, St. Louis, MO)) 을 함유하는 SR 로 교체했다. 플레이트 표면적의 ㎠ 당 약 0.3 - 0.4 ㎖의 배지를 조건화했다. hES 배양액에 첨가하기 전에, 조건화된 배지를 4 ng/㎖의 인간 bFGF로 보충했다.

[0173] Matrigel® (Becton-Dicinson 사, Bedford, MA) 의 원액을 냉각된 KO DMEM으로 약 1:30 으로 희석하고, 9.6 ㎠ 웰 당 0.75 - 1.0 ㎖로 분배하고, 실온에서 1 - 4 시간 동안 또는 4℃에서 밤새 인큐베이션 함으로써, hES 세포 배양용 플레이트를 Matrigel® 로 코팅했다.

[0174] hES 배양액을 37℃에서 약 5 - 10 분간 약 200 U/㎖의 콜라게나제 IV 중에서 인큐베이션하여 계대시켰다. 세포를 긁어낸 후, 조건화된 배지에서 작은 덩어리 (cluster)로 조심스럽게 해리시켜 수합한 후, Matrigel® 로 코팅된 플레이트 상에 접종했다. 시딩 약 1 주 후, 배양액은 컨플루언트되어, 계대시킬 수 있었다. 상기 조건 하에서 180 일을 초과하여 유지된 배양액은 계속 ES와 유사한 형상을 나타냈다.

[0175] 샘플을 37℃에서 30 분간 넉 아웃 DMEM 으로 희석한 SSEA-4 에 대한 1 차 항체 (1:20), Tra-1-60 (1:40) 및 Tra-1-81 (1:80) 과 함께 인큐베이션 함으로써, 면역세포화학 검사를 수행했다. 세포를 가온된 넉 아웃 DMEM

으로 세척하고, 2% 파라포름알데히드에서 15 분간 고정시킨 후, PBS로 세척했다. 세포를 실온에서 PBS 중 5%의 염소 혈청과 함께 30 분간 인큐베이션한 후, FITC-컨쥬게이션된 (FITC-conjugated) 염소 항-마우스 IgG (1:125) (Sigma 사)와 함께 30 분간 인큐베이션 했다. 세포를 세척하고, DAPI로 염색하고, 마운팅시켰다.

[0176] 또한, 세포를 비분화 ES 세포용 마커인 알칼리성 인산분해효소의 발현에 대해 조사했다. 이는, 챔버 슬라이드 상에서 세포를 배양하고, 4 % 파라포름알데히드로 15 분간 고정시킨 후, PBS 로 세척함으로써 수행했다. 이어서, 세포를 암실에서 실온 하 1 시간 동안 알칼리성 인산분해효소 기질 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)과 함께 인큐베이션 했다. 슬라이드를 마운팅하기 전에 100 % 에탄올로 2 - 5 분간 린스했다.

[0177] **도 1** 은 조직화학적으로 검출된 hES 세포 상에서의 마커의 발현을 나타낸다. SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, 및 알칼리성 인산분해효소가, 피더 세포 상의 세포에 대해서는 보이나 콜로니 사이의 분화된 세포에서는 보이지 않듯이, hES 콜로니에 의해 발현되었다.

[0178] 비분화 hES 세포 마커의 발현은 역전사효소 (reverse-transcriptase) PCR 증폭에 의해 분석했다. 개별적 유전자 생성물의 방사능 관련 정량화를 위해, QuantumRNA™ Alternate18S Internal Standard 프라이머 (Ambion 사, Austin TX, USA) 를 제조사의 지침에 따라 사용했다. 간략하게, 특정 프라이머 쌍의 증폭의 선형 범위를 결정한 후, alternate18S 프라이머:컴피타이머 (competimer)의 적당한 혼합물과 함께 공증폭시켜서, 선형 범위가 일치하는 PCR 생성물을 수득했다. AmpliTaq™ (Roche 사) 를 PCR 반응에 첨가하기 전에, 제조사의 지침에 따라 효소를 TaqStart™ 항체 (ProMega 사) 와 함께 미리 인큐베이션했다. 방사능 PCR 반응을 5 % 비-변성 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분석하고, 건조시키고, 포스포이미지 스크린 (phosphoimage screen) (Molecular Dynamics 사)에 1 시간 동안 노출시켰다. 스크린을 Molecular Dynamics Storm 860 으로 스캔하고, ImageQuant™ 소프트웨어를 사용하여 밴드의 강도를 정량화했다. 결과는, 18s 밴드 내로 혼입된 방사능에 대해 표준화시킨, hTERT 또는 Oct-4 밴드 내로 혼입된 방사능의 비율로서 나타낸다. 상기 실험에 사용된 프라이머 서열은 국제 특허출원 공보 WO 01/51616 호에서 찾을 수 있다.

[0179] 전사인자 Oct-4 는 보통 비분화 hES 세포에서 발현되며, 분화 시에는 하향조절된다. 조건화된 배지 중의 Matrigel® 상에서 유지된 세포는 hTERT 및 Oct-4를 발현했다. 텔로머라제 활성을 TRAP 분석 (Kim 등, Science 266: 2011, 1997; Weinrich 등, Nature Genetics 17: 498, 1997) 으로 측정했다. 피더가 없는 배양 환경에서 유지된 세포는 배양액에서 180 일 초과 후 양성 텔로머라제 활성을 나타냈다.

[0180] 피더가 없이 배양된 비분화 세포의 다분화능은, 현탁 배양액에서 4 일간 배상체를 형성한 후, 폴리-오르니틴으로 코팅된 플레이트 상에서 7 일간 배양함으로써 측정했다. 면역세포화학 검사는 뉴런 및 심근 세포 계통의 세포, 및 내배엽 계통의 마커인 α-페토프로틴 (fetoprotein) 에 대해 염색되는 세포와 일치하는 염색 패턴을 나타냈다. 또한 비분화 세포를, SCID 마우스로의 근육내 주사에 의해 기형종(teratoma)을 형성하는 능력에 대해 시험했다. 수득한 종양을 78 - 84 일 후에 절단했다. 3 개의 배엽 (germ layer) 전부로부터의 세포 유형을 조직학적 분석에 의해 확인했다.

[0181] 실시예 2: hES 세포의 심근 세포로의 분화

[0182] hES 세포주인 H1, H7, H9 및 H9.2 (H9로부터 유래한 클론 세포주) 를 초기에는 피더 세포 상에 유지시키고, 이후 실시예 1 과 같이 피더 세포가 없는 조건 하에서 유지시켰다. 배양액은 37℃에서 약 5 - 10 분간 200 U/㎖의 콜라게나제 IV 중에 인큐베이션하고, 해리시킨 후, Matrigel® 로 코팅된 플레이트 상에 약 90,000 - 170,000 개 세포/㎠ 로 1:3 내지 1:6의 비율로 시딩하고, 1차 마우스 배아 섬유아세포로 조건화된 배지 중에 유지시킴으로써 매주 계대시켰다.

[0183] **도 2** (상부 패널)는 hES 세포가 심근 세포로 분화하는 것에 대한 도식을 나타낸다. 분화는, hES 세포를 현탁 상태로 배양하여 배상체를 형성시킴으로써 개시되었다. hES 세포를 37℃에서 약 5 - 10 분간 1 ㎎/㎖의 콜라게나제 IV 에서 인큐베이션함으로써 작은 덩어리로 분리시킨 후, 분화 배지 중의 현탁 상태로 배양하여 응집체를 형성시켰다. 분화 배지는 80 % 넉 아웃 Dulbecco 변형 Eagle 배지 (KO-DMEM) (Gibco BRL 사, Rockville, MD), 1 ㎜ L-글루타민, 0.1 ㎜ β-메르캅토에탄올 및 1 % 비필수 아미노산 원액 (Gibco BRL 사, Rockville, MD)을 함유하고, 20 % 우태아혈청으로 보충했다.

[0184] 4 일간 현탁 상태에서 배양 후, 배상체 (EB)를 젤라틴으로 코팅된 플레이트 또는 챔버 슬라이드로 옮겼다. EB는 시딩 후 표면에 부착되어, 증식하고 불균일한 세포 개체군으로 분화했다. 분화 제 8 일째에 배양액의 다양한 영역에서 자발적으로 수축성 세포가 관찰되었다.

[0185] **도 2** (하부 패널)는, 세포가 계속해서 분화하는 동안, 박동 세포를 함유하는, 플레이팅된 배상체의 비율이 증가함을 나타낸다. 수축성 세포는 장기간 배양에서 제 32 일째까지도 관찰할 수 있었다.

[0186] 박동 심근 세포를 EB 생성물로부터 분화 제 11 - 14 일째에 기계적으로 분리하고, 저칼슘 배지 또는 PBS를 함유하는 15-㎖ 시험관 내로 수집한 후, 세척했다. 트립신, EDTA, 콜라게나제 IV 또는 콜라게나제 B 를 포함한 다양한 작용제를, 생존가능한 심근 세포의 단세포 현탁액을 생성할 수 있는 능력에 대해 시험했다. 콜라게나제 활성에 따라, 37℃에서 60 - 120 분간 콜라게나제 B 용액에서 인큐베이션된 세포를 사용하여 생존가능한 수축성 단일 심근 세포를 수득했다. 이어서, 세포를 KB 배지 (85 mM KCl, 30 mM K_2HPO_4, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM EGTA, 5 mM 크레아틴, 20 mM 글루코오스, 2 mM Na_2ATP, 5 mM 피루베이트, 및 20 mM 타우린, pH 7.2 로 완충됨) (Maltsev 등, Circ. Res. 75: 233, 1994)에 재현탁시켰다. 세포를 37℃의 배지에서 15 - 30 분간 인큐베이션하고, 해리시킨 후, 챔버 슬라이드로 시딩하고, 분화 배지에서 배양했다. 계대배양 시, 단일 심근 세포들이 살아남아 계속 박동했다.

[0187] H1, H7, H9, H9.1 및 H9.2 를 포함하여, 시험한 모든 hES 세포주는 50 회 초과의 계대 (약 260 개체군 배가)에 대해 유지된 후에도 박동 심근 세포를 생성할 수 있는 잠재력을 갖는다.

[0188] 실시예 3: 심근 세포의 규명

[0189] 실시예 2 에서 제조된 hES-유래 세포를 심근 세포에 특징적인 표현형 마커의 존재에 대해 분석했다.

[0190] EB 성장 배양물 또는 해리된 심근 세포의 면역 염색을 하기와 같이 수행했다. 분화된 배양물을 -20℃의 메탄올/아세톤 (3:1) 에서 20 분간 고정시켰다. 이어서 세포를 PBS 로 2 회 세척하고, 4℃에서 밤새 PBS 중의 5% 정상 염소 혈청 (NGS) 으로 블록킹한 후, 실온에서 2 시간 동안 1 차 항체 희석용 완충액 (Biomeda Corp. 사, Foster City, CA) 으로 1:20 내지 1: 800으로 희석된 1차 항체 또는 PBS 중 1% NGS 와 함께 인큐베이션했다. 세척 후, 세포를 실온에서 30 - 60 분간 해당 FITC 또는 PBS 중 1% NGS 로 희석된 Texas Red™-컨쥬게이션된 2 차 항체와 함께 인큐베이션했다. 세포를 다시 세척하고, DAPI로 염색하고, Vectashield™ (Vector Laboratories, Inc. 사, Burlingame CA) 로 마운팅했다. 에피플루오르센스 (epifluorescence) 및 SPOT CCD 냉각 카메라를 장착한 Nikon Labphot™ 상에서 형광현미경법을 수행했다.

[0191] H9.2 세포의 분화된 배양 내 개별적인 수축 초점 (contracting foci)을 15 일째에 사진찍어, 배양물을 고정시키기 전에 수축 면적을 기록했다. 이어서 배양액을 심장 트로포닌 I (cTnI)에 대해 염색하고, 광학 현미경과 대응시켜 cTnI 염색에 대해 양성인 수축 면적의 백분율을 결정했다. 수축 면적의 100 %가 cTnI 에 대해 양성으로 염색된 반면, 비-박동성 세포에서는 염색이 거의 관찰되지 않았다.

[0192] cTnI 발현에 대한 웨스턴 블랏팅을 하기와 같이 수행했다. 비분화 세포 및 분화 세포를 용해 완충액 (lysis buffer)에 용해시키고, 10 % SDS-PAGE로 분리한 후, 니트로셀룰로오스 막 (Schleicher & Schuell 사) 에 전이시켰다. 상기 막을 실온에서 0.05 % Tween™ 20 으로 보충된 PBS (PBST) 중 5 % 탈지건조유로 1 시간 동안 블록킹하고, 4℃에서 PBST 중 1 % 탈지건조유로 1:2000 으로 희석된, cTnI 에 대한 단일클론 항체와 함께 밤새 인큐베이션했다. 이어서 블랏 (blot) 을, PBST 중 1 % 탈지건조유로 1:8000 으로 희석된, 양고추냉이 과산화효소 (horseradish peroxidase) (Vector Laboratories Inc. 사, Burlingame CA) 로 컨쥬게이션된 말 항-마우스 IgG (H+L) 항체와 함께 실온에서 1.5 시간 동안 인큐베이션했다. 항체의 결합에 대한 시그널을 SuperSignal™ West Pico 화학발광 (chemiluminescence) 시스템 (Pierce 사, Rockford, IN) 으로 검출했다. 대조군으로서, β-액틴을 동일한 블랏 상에서 하기와 같이 검사했다: 첫 번째 ECL 검출 후에 PBS 로 블랏을 세척하고, 약 5 분간 Vector™-SG 기질 (Vector Laboratories Inc. 사, Burlingame, CA) 에 노출시킨 후, β-액틴 (Sigma 사) 에 대한 모노클로날 항체로 재검사했다.

[0193] **도 3** (상부 패널)은 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸다. 수축성 세포 (레인 2 및 3) 를 포함하는 웰에서는 약 31 kDa (인간 cTnI 의 크기에 해당) 에서 밴드가 존재하지만, 비분화 hES 세포 (레인 1) 또는 비수축성 세포 (레인 4) 를 포함하는 웰에서는 밴드가 존재하지 않는다. 모든 레인을 β-액틴의 존재에 대해 염색했다 (단백질 회수를 위한 표준).

[0194] 실시간 역전사 PCR 를 LightCycler 를 사용하여 수행했다. αMHC 의 상대적 정량을 위해, RNA 샘플 및 프라이머를 RT-PCR 반응 혼합물 (LightCycler RNA 증폭 키트 - 하이브리디제이션 프로브 (hybridization probe), Roche Molecular Biochemicals 사) 과 함께, 키트의 지침을 따라 혼합했다. 반응 조건은 하기와 같다: 55℃에서 10 분간 RT; 95℃에서 30 초간 변성; 95℃에서 0 초 동안, 60℃에서 15 초 동안, 그리고 72℃에서 13 초

동안인 사이클 45 회로 증폭. 반응을 LigthCycler 3 프로그램으로 분석했다. 상대적 MHC 수준을, 각각의 샘플에 대한 3 회 반응으로부터의 MHC 및 28S 의 비율로 나타냈다.

[0195] **도 3** (하부 패널)은 그의 결과를 나타낸다. αMHC 의 수준은 분화 제 7 일 후에 현저히 증가하였으나, 비분화 hES 세포 또는 분화 세포의 초기 단계에서는 검출되지 않았다. 발현 수준은 박동 세포의 출현과 함께 그후에도 계속 증가했다. hTERT 의 발현은 분화동안 감소하는 것으로 발견되었다.

[0196] 콜라게나제 B를 사용하여, 실시예 2 에 기재한 바와 같이 hES-유래 심근 세포를 단세포로 해리했다. 해리된 심근 세포를, 근섬유분절 미오신 중쇄 (myosin heavy chain; MHC), 티틴 (titin), 트로포미오신, α-액티닌, 데스민, cTnI 및 심장 트로포닌 T (cTnT)의 발현에 대해 검사했다.

[0197] **도 4** 는 그 결과를 나타낸다. 단세포 및 덩어리는 상기 마커 모두에 대해 양성으로 염색되었다. 염색된 단일 심근 세포는 방추형, 원형, 및 삼각형 또는 다각형 모양을 가졌다. 근섬유 분절 구조에 특징적인 줄무늬가 또한 보이며, 근육 기능에 필요한 수축성 기관과 일치한다.

[0198] GATA-4 는 심장 중배엽 (mesoderm)에서 많이 발현되는 전사인자이다. 강한 GATA-4 면역 반응성이 모든 cTnI-양성 세포의 핵에서 관찰되었다. 웨스턴 블랏은, GATA-4 가 수축성 세포를 함유하는 분화 hES 세포 (도 1, 레인 2 및 3) 에서 강하게 발현되나, 수축성 세포의 증거가 없는 분화된 배양액 (도 1, 레인 4) 에서는 검출되지 않음을 나타냈다. 약한 신호가 비분화 세포 (레인 1) 에서도 검출되었다. 이는, GATA-4 를 또한 발현하는 장측 내배엽 (vesceral endoderm) 으로의 자발적인 분화로 인한 것이거나, 비분화 세포 자체에 의한 GATA-4 의 저수준 발현으로 인한 것일 수 있다.

[0199] MEF2 심장 전사인자를 면역세포화학법에 의해 모든 cTnI-양성 세포의 핵에서 검출했다. 심장 전사인자 Nkx2.5 에 대한 반정량적 (semiquantitative) RT-PCR 은 (Xu 등, Dev Bio. 196:237, 1998), 상기 전사인자가 박동 심근 세포를 함유하는 배양액에서는 강하게 발현되나, 비분화 세포에서는 검출되지 않음을 나타냈다. 유착 마커 N-캐드헤린 및 간극 연접 마커 코넥신 43 에 대한 양성 시그널이 cTnI 또는 MHC 발현에 의해 확인된 심장세포 사이에서 검출되었으나, 주위의 비-심장세포에서는 검출되지 않았다. 또한, β1-아드레날린 수용체 (β1-AR) 및 cTnI 에 대한 항체를 가진, 부분적으로 해리된 세포를 염색했다. 표면 마커의 특이적 염색은, 세포가 상기 마커를 근거로 한 분류 기술에 의해 더욱 농후해질 수 있음을 나타낸다.

[0200] 또한, 크레아틴 키나아제 MB (CK-MB) 및 미오글로빈을, MHC와 공염색 (costaining) 시키는, hES-유래 심근 세포의 면역 염색에 의해 검출했다. CK-MB 는 고에너지 저장소의 역할을 하는 것으로 여겨지며, 근육세포 계통의 세포로 대부분 제한된다. 미오글로빈은 근육세포 내의 O_2 의 저장 및 확산을 담당하는 세포질 산소 결합 단백질이다. CK-MB 및 미오글로빈은 모두 급성 심근경색의 진단에 흔히 사용된다. β1-아드레날린 수용체 (β1-AR) 에 대한 강한 면역반응성이 cTnI-양성 세포에서 관찰되었다.

[0201] 심방 나트륨배설 인자 (ANF)는 반정량적 RT-PCR 에 의해 검출되는 바와 같이 hES 세포의 심장 분화 중에 고발현된다. cTnI 양성 세포의 18 %가 Ki-67 (활발히 분열하는 세포에는 존재하나 G0 휴지 세포에는 존재하지 않는 단백질) 에 대해 이중염색되었으며, 이는 상기 세포가 여전히 증식 능력을 갖고 있음을 나타낸다.

[0202] 결론적으로, 상기 데이터는 hES-유래 심근 세포가 초기 단계 (태아) 심근 세포의 표현형과 일치하는 적절한 유전자 발현 패턴을 가짐을 나타낸다.

[0203] 실시예 4: 밀도 원심분리에 의한 심근 세포의 농후화

[0204] 심근 세포를 Percoll™ (콜로이드성 PVP-코팅 실리카를 함유하는 밀도 분리 배지) 의 비연속적 구배 상에서 밀도 분리함으로써 추가로 농후화했다. 심근 세포를 현탁액에서 4 일간 hES 분화의 유도로 생성시키고, 젤라틴-코팅 플레이트 상에서 15 일간 추가 분화시켰다. 상기 세포를 37℃에서 2 시간 동안 콜라게나제 B 로 해리했다. 세포를 세척하고, 분화 배지 중에 재현탁시켰다. 5 분간 정치시킨 후, 세포 현탁액을 58.5 % Percoll™ (Pharmacia) (약 1.075 g/㎖) 위에 40.5 % Percoll™ (약 1.05 g/㎖) 의 층으로 로오딩했다. 이어서 세포를 1500 g 으로 30 분간 원심분리했다. 원심분리 후, Percoll™의 상부의 세포 (분획 I) 및 두 층의 Percoll™의 계면 내의 세포층 (분획 II) 을 수집했다. 수집한 세포를 세척하고, 분화 배지에 재현탁시키고, 챔버 슬라이드 내 웰 당 10^4 개로 시딩했다.

[0205] 1 주 후, 세포를 고정시키고, 미오신 중쇄 (MHC)의 발현 (실시예 3)에 대해 염색했다. MHC 양성 세포의 백분율을, 각 분획에 대해 3 개 웰로부터 30 개의 이미지에서 세포를 계수함으로써 결정하고, 3 개 웰로부터의 세포의 평균 ±표준편차로서 나타냈다. 박동 세포는 양 분획 모두에서 관찰되었으나, 분획 II 가 더 많이 함유했

다. 결과를 표 1 에 나타낸다. 분획 II 에서 수득된 농후화는 출발 세포 개체군에서보다 20 배 이상 더 높았다.

표 1

[0206]

hES-유래 심근 세포의 Percoll™ 분리				
분획	세포 계수	증식	박동 세포	MHC에 대한 염색 %
I	1.92×10^6	+++	+	2.7 ±3.3 %
II	0.56×10^6	+	++	26.8 ±4.1 %

[0207] 실시예 5: 약학적 반응

[0208] hES-유래 심근 세포의 기능을, 심근 세포가 심장에 작용하는 약물의 심장 박동수 변동 효과에 적절히 반응하는지의 여부를 측정함으로써 시험했다.

[0209] 약학적 반응 연구

[0210] EB를 젤라틴-코팅 24-웰 플레이트 상에 플레이팅하고, 실시예 2 와 같이 분화시켰다. 분화 제 15-21 일째의 수축성 심근 세포를 약학적 반응 검사에 사용했다. 역상 현미경 (inverted microscope) 의 37℃ 가열 챔버 내 분화 배지에서 유지된 박동 면적의 수축율을 측정함으로써, 자발적 박동의 빈도를 측정했다. 이어서, 세포를 시험 화합물과 함께 인큐베이터 내에서 20 - 30 분간 인큐베이션하고, 수축율에 대해 관찰했다. 각 기질의 농도를 증가시키면서 누적 적용하여, 투여량-의존성 효과를 측정했다. 데이터는 10 - 20 개의 박동 면적에서 측정된 평균 박동율 (mean pulsation rate) ±평균의 표준 오차를 나타낸다.

[0211] 상기 세포가, 심장 수축 기능에서 결정적인 역할을 하는 기능성 L-타입 칼슘 채널을 발현함을 입증하기 위해, L-타입 칼슘 채널 블록커인 딜티아젬(diltiazem)의 hES-유래 심근 세포의 박동에 대한 효과를 검사했다. 분화 세포를 약물의 다양한 농도에서 인큐베이션하고, 분 당 박동수를 계수했다. 이어서, 세포를 배지로 세척하고, 분화 배지에서 24 시간 동안 유지시키고, 수축성을 회복하기까지 걸리는 시간에 대해 관찰했다.

[0212] **도 5** (패널 A)는, 박동율이 딜티아젬에 의해 농도-의존성 방식으로 억제됨을 나타낸다. 세포를 10^{-5} M 딜티아젬으로 처리하였을 때, 박동 면적의 100% 가 수축을 중단했다. 수축은 약물 제거 후 24 - 48 시간 후에 정상 수준으로 회복되었다. 각각의 데이터 포인트는 평균 박동율의 평균 ±표준 오차로 나타낸다. 통계적 유의성을 Fisher의 PLSD 시험으로 시험했다: *$p < 0.05$, **$p < 0.005$, ***$p < 0.0005$. 상기 관찰은 hES-유래 심근 세포가 기능성 L-타입 칼슘 채널을 갖는다는 것을 나타낸다. 별도의 실험에서, 클렌부테롤이 제 72 일째에 채취한 세포에 대해 박동율을 약 72 박동/분에서 약 98 박동/분으로 증가시킨다는 것을 발견했다 (1 - 10 nM, $p < 0.005$).

[0213] 패널 B 및 C 는 이소프레날린 (β-아드레날린 수용체 아고니스트) 및 페닐에프린 (α-아드레날린 수용체 아고니스트) 에 의해 유도되는 양성 심장 박동수 변동 효과가 있음을 나타낸다. 패널 D 및 E 는 포스포디에스테라제 저해제인 IBMX 및 β2-아드레날린 수용체 아고니스트인 클렌부테롤이 유사한 효과를 가짐을 나타낸다. 따라서, hES 세포 유래 세포는, 심근 세포 계열의 세포에 적합한 방식으로 심장에 작용하는 약물에 응답한다.

[0214] 실시예 6: 분화 유도제로서의 강심 인자

[0215] 배상체로서 배양된 H1 또는 H9 세포주의 hES 세포를 분화 제 1 - 4, 4 - 6, 또는 6 - 8 일째에, DNA 메틸화에 영향을 줘 유전자 발현을 활성화하는 시토신 유사체인 5-아자-데옥시-싸이티딘으로 처리했다. 세포를 제 15 일째에 수확하고, 실시간 RT-PCR 에 의해 심장 α-MHC에 대해 분석했다.

[0216] 실시예 3 의 RT-PCR 검정을, 동일한 프라이머를 사용하는 Taqman™ 7700 서열 탐지 시스템에 대해 조정하여, 95℃에서 15 초간, 그리고 60℃에서 1 분간의 40 회 사이클로 증폭시켰다. Taqman™ 리보솜 RNA 조절 시약 (Applied Biosystems 사)용 키트를 사용하여, 18S 리보솜 RNA를 대조군 용으로 증폭시켰다. 반응을 ABI Prism™ 7700 서열 탐지 시스템으로 분석했다.

[0217] **도 6** 은 5-아자-데옥시-싸이티딘을 분화 유도제로서 사용한 결과 (평균 ±S.D., 3 회 측정에서의 18S RNA에 대한 αMHC의 비율) 를 나타낸다. 데이터는 1 내지 10 μM의 5-아자-데옥시-싸이티딘이 6 - 8 일째에 심장 α-MHC의 발현을 현저히 증가시킴을 나타내며, 이는 배양 내 박동 면적의 증가된 비율과 관련있다.

[0218] 심근 세포 분화를 유도하는 능력에 대해 검사한 다른 시약에는 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및 총-트랜스 레틴산 (RA) 가 포함되었다. 제 0 - 4 일째로부터 0.5 % DMSO로 처리된 배상체는 비처리된 배양에 비해 더 적은 수의 박동 면적을 생성했다. 박동 세포는 0.8 % 또는 1 % DMSO 로 처리한 배양에서는 부재하였고, 1.5 % DMSO 는 실제로는 세포에 독성이었다. DMSO 처리는 또한 비처리된 배양에 비해 α-MHC 발현을 상당히 감소시켰다.

[0219] 레틴산은, 분화하는 hES 배양에 10^{-9} 내지 10^{-5} M의 투여량으로 적용했다. 제 0 - 4 일 째에, RA는 세포에 독성인 반면, 제 4 - 8, 8 - 15 또는 4 - 15 일째에는 비처리된 배양에 비해 박동 세포가 증가하지 않았다.

[0220] 따라서, 5-아자-데옥시-싸이티딘은 효과적인 심근 세포 분화 유도제로서, 개체군 내 심근 세포의 비율을 증가시켰다. 반면, DMSO 및 레틴산은 배아 종양 (embryonic carcinoma) 또는 배아줄기세포로부터 심근 세포를 생성하더라도, 심근 세포의 분화를 억제한다 (Wobus 등, J. Mol. Cell Cardiol. 29:1525, 1997; McBurney 등, Nature 299: 165, 1982).

[0221] 심근 세포 분화는 또한 직접적인 분화 패러다임에 따라 달성된다. H7 세포주의 비분화 hES 세포를 해리하고, 배상체 단계를 거치지 않고 젤라틴-코팅된 플레이트 상에 직접 플레이팅했다. 플레이팅한 세포를 분화 배지 (80 % KO-DMEM, 1 mM L-글루타민, 0.1 mM β-메르캅토에탄올, 1 % 아미노산, 및 20 % 우태아혈청) 에서 배양했다. 수축성 심근 세포는 제 10 - 12 또는 12 - 14 일째에, 10 μM의 5-아자-데옥시-싸이티딘으로 처리된 배양에서는 제 18 일째에 발견되었고, 이후에는 모든 배양에서 발견되었다.

[0222] 실시예 7: 강심 인자의 효과적인 조합

[0223] 본 실시예는, 인간 ES 세포의 심근 세포로의 분화에 대한 첨가된 성장인자 및 5-아자-데옥시-싸이티딘의 조합된 효과를 조사하는 것이다.

[0224] H1 로 명명된 인간 ES 세포주는 표준 배상체 프로토콜 후에 H7 또는 H9 세포주에 비해 더 적은 수의 박동 심근 세포를 생성한다. 심근 세포의 수율을 증가시키기 위해, 일련의 성장인자 및 5-아자-데옥시-싸이티딘을 첨가하여, H1 배양을 분화시켰다.

[0225] 논리는 하기와 같다. 그룹 I 인자를, 초기 위임 동안 하배엽 (hypoblast)의 기능을 공급할 수 있는 것으로서 선택했다. 그룹 II 인자를, 후속 발생 동안 I 군 인자와 조합되어 내배엽의 기능을 공급할 수 있는 것으로서 선택했다. 그룹 III 인자를, 확장 배양에서의 심근 세포를 위한 생존인자로서 선택했다. 전형적인 조작 농도를 "중간"수준으로 정의하고, 4 배 더 낮은 수준 및 4 배 더 높은 수준은 "저"수준 및 "고"수준으로 정의했다. 농도를 하기에 나타낸다:

표 2

[0226]

강심 인자의 예			
성장 인자	저농도	중간 농도	고농도
I 군			
액티빈 A	6.25 ng/㎖	25 ng/㎖	100 ng/㎖
TGF β1	2.5 ng/㎖	10 ng/㎖	40 ng/㎖
IGF II	6.25 nM	25 nM	100 nM
II 군			
BMP 4	1.25 ng/㎖	5 ng/㎖	20 ng/㎖
FGF 4	12.5 ng/㎖	50 ng/㎖	200 ng/㎖
인슐린	6.25 ng/㎖	25 ng/㎖	100 ng/㎖
bFGF	12.5 ng/㎖	50 ng/㎖	200 ng/㎖
PDGF-BB	12.5 ng/㎖	50 ng/㎖	200 ng/㎖
5-아자-데옥시-싸이티딘	10 μM	10 μM	10 μM
III 군			
IGF I	6.25 nM	25 nM	100 nM
IGF II	6.25 nM	25 nM	100 nM
LIF	5 ng/㎖	20 ng/㎖	80 ng/㎖
EGF	6.25 ng/㎖	25 ng/㎖	100 ng/㎖
PDGF-BB	0.9 ng/㎖	3.6 ng/㎖	14.4 ng/㎖
bFGF	2.5 ng/㎖	10 ng/㎖	40 ng/㎖
인슐린	6.25 nM	25 nM	100 nM

[0227] **도 7** (상부 패널)은 상기 인자의 사용에 대한 도식을 나타낸다. 계대 48 회의 H1 세포를 사용하여, 콜라게나제 처리 후에 디쉬로부터 세포를 5 ㎖ 피펫으로 긁어서 기계적으로 제거함으로써, 배상체를 생성시켰다. 세포의 10 ㎠ 웰 하나의 내용물을 저 유착성 플레이트의 단일 10 ㎠ 웰에 전이시키고, 부가적 인자의 존재 또는 부재 하 4 ㎖의 DMEM 및 20 % FBS에서 4 일간 배양했다. 제 4 일째의 마지막에, 배상체의 각 현탁액을 2 부분의 분액으로 나누어, 젤라틴-코팅 유착성 6 웰 조직 배양 플레이트 (10 ㎠/웰) 중 2 개의 웰에 플레이팅했다. 유착성 배상체 및 이들의 생성물을 부가적 인자의 존재 또는 부재 하에 4 ㎖의 DMEM 및 20 % FBS 에서 11 일간 배양하고, 그 후 각 웰의 박동 영역의 수를 광학 현미경으로 관찰하고, RNA를 후속의 정량적 PCR 분석에 대해 각각의 웰로부터 수확했다.

[0228] I 군 인자는 제 0 일 (비분화 세포를 현탁 상태 배양으로 옮겨 배상체를 생성시키는 날) 째에 첨가되고, 제 8 일 (배상체를 젤라틴-코팅된 웰에 플레이팅시킨 후로부터 제 4 일째)까지 계속 존재했다. II 군 인자는 제 4 일 (플레이팅 시) 째에 첨가되고, 제 8 일까지 계속 존재했다. III 군 인자는 제 8 일째에 첨가되고 실험의 종료일 (제 15 일째)까지 계속 존재했다. 배양의 일부 (subset) 를 5-아자-데옥시-싸이티딘에 48 시간 (제 6 - 8 일) 동안 노출시켰다. 제 6, 8, 11 및 13 일째에 인자를 더하거나 뺀 신선한 배지를 배양액에 재공급했다.

[0229] 대조군 배양 (보충 인자/5-아자-데옥시-싸이티딘의 부재 하에 유지된 것), 또는 5-아자-데옥시-싸이티딘의 부재 하 성장인자의 존재 하에서 유지된 것에서는 박동 영역이 관찰되지 않았으나, 성장인자 및 5-아자-데옥시-싸이티딘의 조합을 공급받은 모든 웰에서는 박동 면적이 관찰되었다.

[0230] **도 7** (하부 패널)은 심장 유전자 α 미오신 중쇄 (αMHC)의 발현에 대한, 정상 심장 RNA 에서의 수준과 비교한 정량적 PCR 분석 (Taqman™)을 나타낸다. 발현의 수준은 성장인자 (GF) 및 5-아자-데옥시-싸이티딘에 노출된 세포에서 현저히 더 높았다. 시험된 가장 낮은 농도도 더 높은 αMHC 발현 (대조군에서 보인 수준보다 30 배 더 높음) 을 달성하기에 충분했다.

[0231] 이러한 결과는 후속의 실험에서 부연된다. H1 세포 (계대 38 회)를 하기 사항을 제외하고는 전과 같이 배양했다: a) 이전 실험에서 사용된 인자의 가장 낮은 농도만을 사용하였고; b) 샘플 한 셋트에서는 III 군 처리가 생략되었다. 이어서 마커 발현의 수준을 실시간 PCR 분석으로 비분화 세포와 비교하여 측정했다.

[0232] **도 8** 은 상기 프로토콜에서의 III 군의 생략이 αMHC mRNA 발현량을 3 배 더 증가시켰음을 나타낸다. 초기 심근 세포 연관 유전자 GATA-4의 발현의 증가도 또한 검출되었다. 반면, 내배엽 연관 유전자 HNF3b 는 이러한 조건 하에서 특이적으로 유도되지 않았다. α-MHC 및 GATA-4의 효과는, 내배엽에 관련된 유전자 HNF3b 와 비교하여 선택적이며, 임의의 성장인자 조합의 사용에서는 증가하였으나, 5-아자-데옥시-싸이티딘에서는 증가하지 않았다.

[0233] 이러한 결과는 I 군 및 II 군 내의 인자가 심근 세포의 특징을 갖는 세포의 비율을 증대시킴을 입증한다.

[0234] 실시예 8: 농후화제를 함유하는 배지에서의 배양

[0235] hES 세포의 H9 세포주를 5 일간의 현탁 상태에서 배상체를 형성시킴으로써 분화시켰고, 이어서 Matrigel® 로 코팅된 플레이트 상에서 분화 배지 중 12 일간 더 분화시켰다. 200 U/㎖ 콜라게나제 II (Worthington 사), 0.2 % 트립신 (Irvine Scientific 사) 및 PBS 중 0.02 % 글루코오스를 함유하는 용액을 사용하여 세포를 해리했다. 이를 분화 배지 중에서 Matrigel® 로 코팅된 플레이트 상에 플레이팅하고, 14 일간 추가 배양했다.

[0236] 이어서 세포를, 10^{-7} M 인슐린 (Sigma 사), 0.2 % 소 알부민 (Sigma), 5 mM 크레아틴 (Sigma), 2 mM 카르니틴 (Sigma) 및 Gibco® 배지 199 중 5 mM 타우린 (Sigma)을 함유하는 "CCT" 배지로 교체했다. 문헌 [Volz 등, J. Mol. Cell Cardiol. 23:161, 1991; 및 Li 등, J. Tiss. Cult. Meth. 15:147, 1993] 참조. 비교를 위해, 대조군 배양을 20 % FBS 함유 표준 분화 배지에서 유지시켰다.

[0237] **도 9** 는 CCT 배지로 교체한 후의 박동 면적의 수치를 나타낸다 (각각의 선은 연구 중에 따로따로 추적한 개별 웰에 대한 관찰을 나타낸다.) CCT 배지에서 성장시킨 세포는 7 내지 14 일 후에 박동 면적의 수치의 증가를 나타냈다. 이는 작용제 크레아틴, 카르니틴 및 타우린이 따로따로 또는 조합되어 작용하여, 배양액 내 심근 세포 계통 세포의 비율을 농후화하는 것을 나타낸다.

[0238] 실시예 9: 4-기 원심분리 방법

[0239] H7 세포주의 hES 세포에 대해 4 일간 배상체를 형성시킨 후에, 젤라틴 코팅 플레이트에서 17 일간 증식시킴으로써 (5-아자-데옥시-싸이티딘 및 성장인자는 사용하지 않았다), 상기 세포로부터 심근 세포를 생성시켰다. 이어서, 콜라게나제 B 를 사용하여 세포를 해리하고, 분화 배지에 재현탁시키고, 정치시켰다. 이어서 세포 현탁액을 Percoll™의 비연속적 구배 상에 층상으로 쌓고, 1500 g 로 30 분간 원심분리했다. 4 개의 분획을 수집했다: I. 상부 계면; II. 40.5 % 층; III. 하부 계면; IV. 58.5 % 층. 세포를 세척하고 분화 배지에 재현탁시켰다. 면역염색용 세포를 챔버 슬라이드에 웰 당 10^4 개의 세포로 시딩하고, 2 또는 7 일간 배양한 후, 고정시키고 염색했다.

[0240] 결과를 표 3 에 나타낸다. MHC 양성 세포의 백분율은, 각 분획에 대해 3 개의 웰로부터의 30 개의 이미지에서 세포를 계수함으로써 구하고, 3 개의 웰로부터의 세포의 평균 ±표준 편차로서 나타냈다.

표 3

[0241]

Percoll™분리				
분획	세포 계수	박동 세포	MHC 에 대한 염색 %	
			2 일째	7 일째
분리 전		+	17 ±4.4 %	15 ±4 %
I	9.0×10^6	±	2.6 ±0.5 %	2.5 ±3.0 %
II	1.6×10^6	+	4.5 ±1.5 %	2.4 ±0.9 %
III	4.0×10^6	++	35.7 ±2.7 %	28.3 ±9.4 %
IV	1.3×10^6	+++	69. ±5.0 %	52.2 ±14.5 %

[0242] 박동 세포는 모든 분획에서 관찰되었으나, 분획 III 및 IV는 보다 더 높은 비율을 함유했다.

[0243] **도 10** 은 H1 세포주의 hES 세포를 사용하여 유사한 작업을 수행한 결과를 나타낸다. 분화 제 22 일째에 Percoll™을 사용하여 세포를 분리했다. 실시간 RT-PCR 분석에 의해 검출된 심장 MHC의 수준은 분리 전의 세포에 비해 현저히 높았다. 상기 데이터는, 분획 III 및 IV 가, 표준으로서 18S RNA를 사용한 완전 전사의 비율로서, 가장 높은 수준의 MHC 발현을 나타낸다.

[0244] 간접 면역세포화학법으로 측정된 세포의 표현형을 표 4 에 나타낸다.

표 4

[0245]

분리된 세포 개체군의 특징		
에피토프	심근 세포 계통	비-심장세포
cTnI	++	-
심장특이적 α/βMHC	++	-
심장 βMHC	++	-
근섬유절 MHC	++	-
N-캐드헤린	++	±
평활근 액틴	++	일부
미오게닌	-	-
α-페토프로틴	-	-
β-튜불린 III	-	-
Ki67	일부	일부
BrdU	일부	일부
SSEA-4	-	-
Tra-1-81	-	-

[0246] 밀도 구배 원심분리에 의해 분리된 심근 세포 개체군은 cTnI 및 MHC 에 대한 염색으로써 구별될 수 있었다. 미오게닌 (myogenin), α-페토프로틴 또는 β-튜불린 III 에 대한 염색의 부재는 골격근, 내배엽 세포 타입 및

뉴런의 부재를 나타냈다. SSEA-4 및 Tra-1-81에 대한 염색의 부재는 비분화 hES 세포의 부재를 확인시킨다.

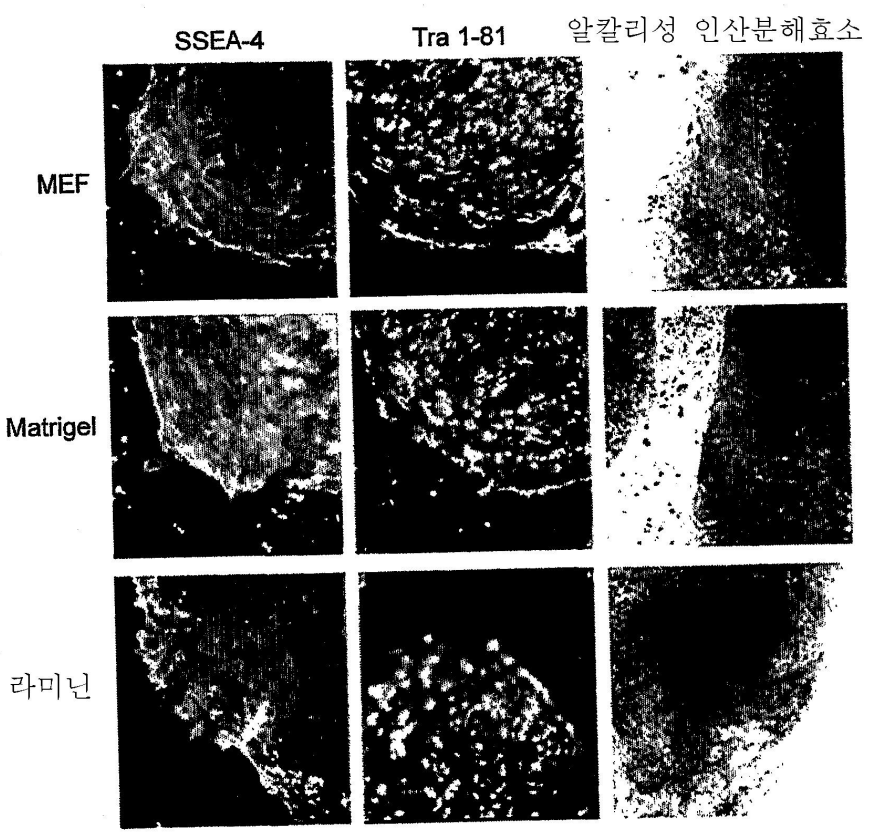
[0247] α-평활근 액틴 (SMA) 은 배아 및 태아 심근 세포에 존재하나 성인 심근 세포에는 존재하지 않는 것으로 보고되었다 (Leor 등, Circulation 97: I1332, 1996; Etzion 등, Mol. Cell Cardiol. 33:1321, 2001). 심근 세포 분화 프로토콜에서 수득된 거의 모든 cTnI-양성 세포, 및 cTnI 음성 세포의 일부가 SMA 에 대해 양성이었으며, 이는 이들이 초기 단계에 있거나 증식이 가능할 수 있음을 시사한다.

[0248] 분획 III 및 IV의 세포를 다시 플레이팅하고, 추가로 2 일간 배양했다. 43 ±4 %의 sMHC 양성 세포가 BrdU를 발현하였는데, 이는 이들이 세포 사이클의 S 기에 있음을 나타냈다. 다른 실험에서는, cTnI-양성 세포의 일부가 Ki-67을 발현하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과는 개체군 내 심근 세포의 약 20 % 또는 40 %가 활성 증식을 겪음을 나타낸다.

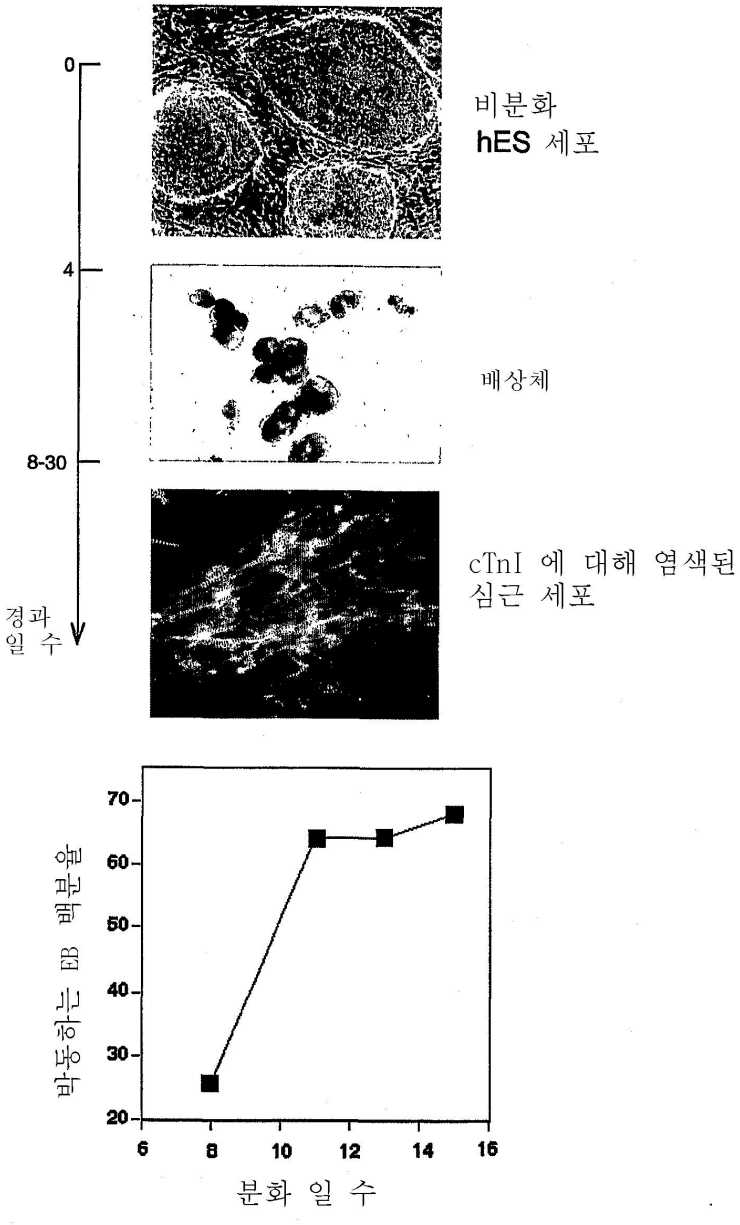
[0249] *본 상세한 설명에서 제공된 조성물 및 절차는 하기의 청구범위에서 구현된* 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않으면서 당업자에 의해 효과적으로 변경될 수 있다.

도면

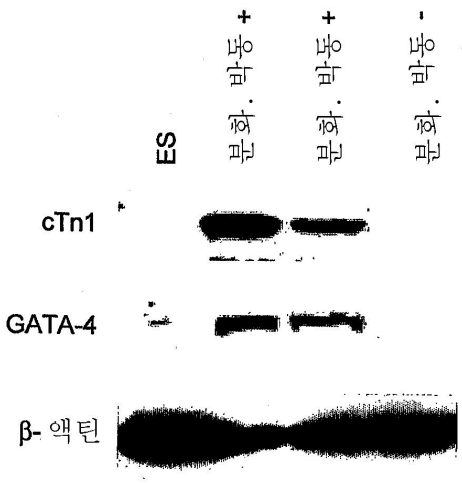
도면1

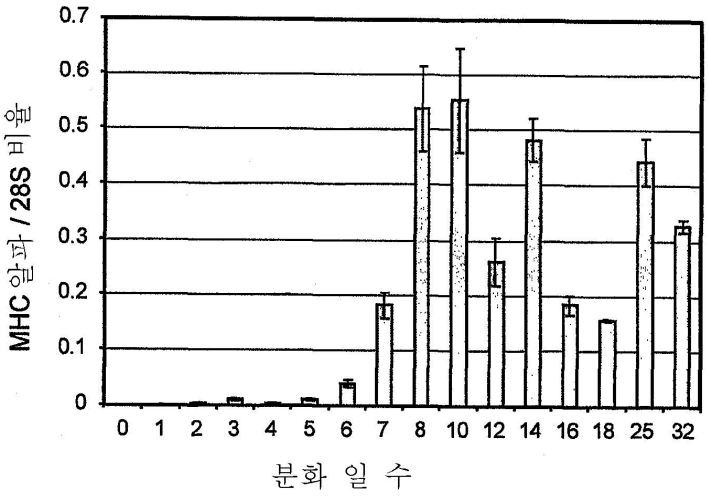


도면2


0
4
8-30
경과
일 수
비분화
hES 세포
배상체
cTnI 에 대해 염색된
심근 세포
박동하는 EB 백분율
70
60
50
40
30
20
6
8
10
12
14
16
분화 일 수

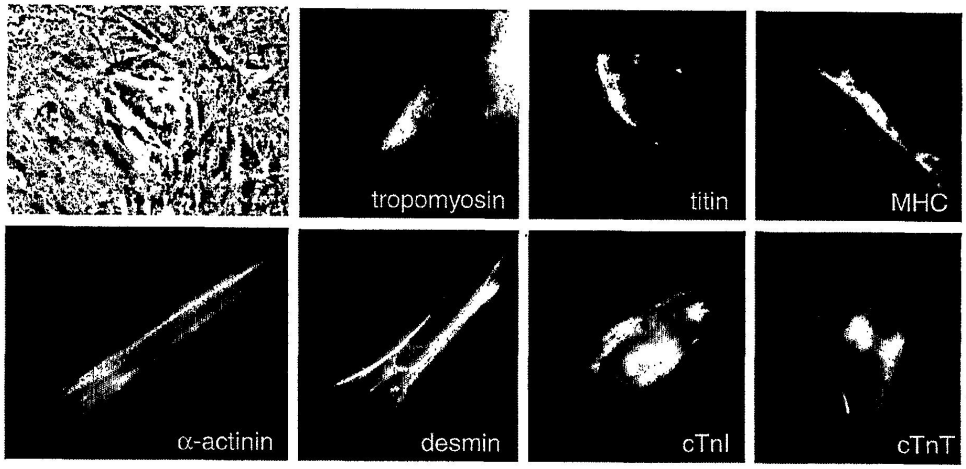
도면3



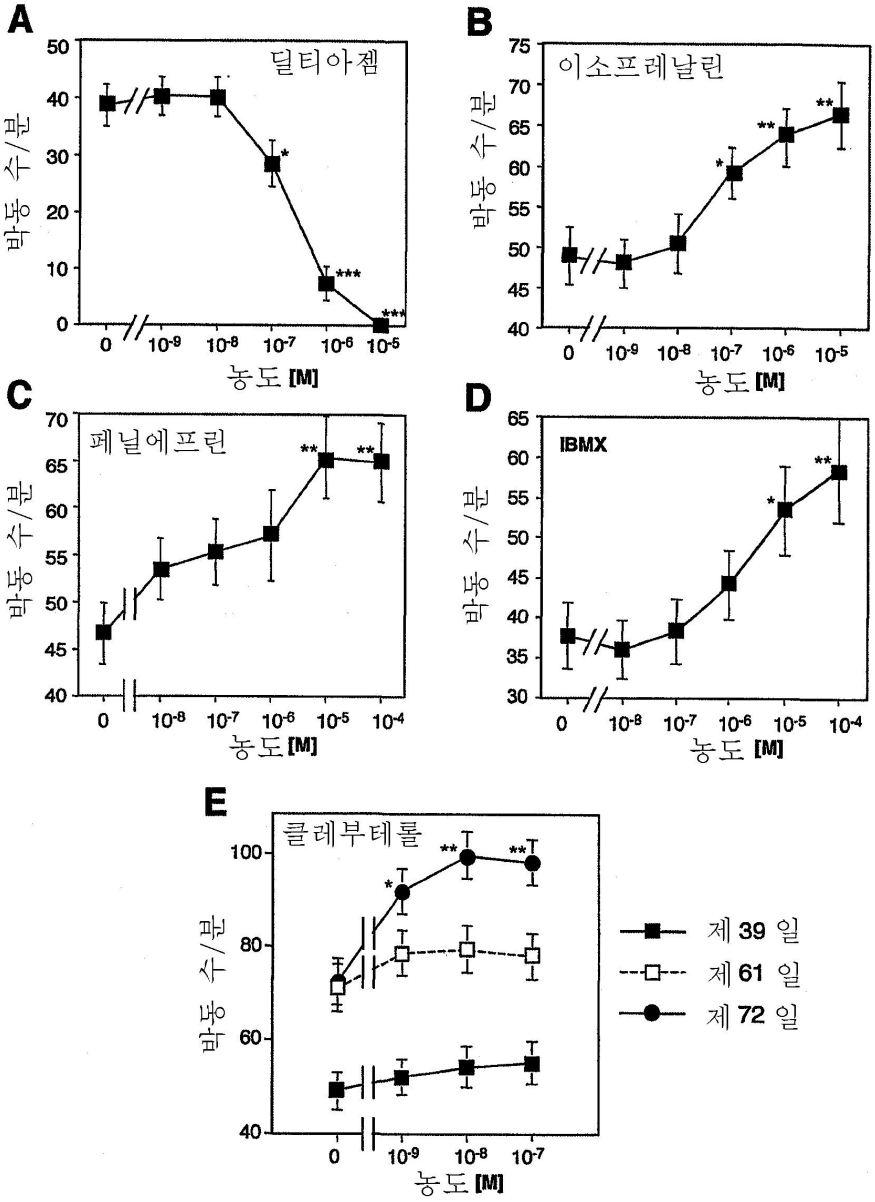


도면4

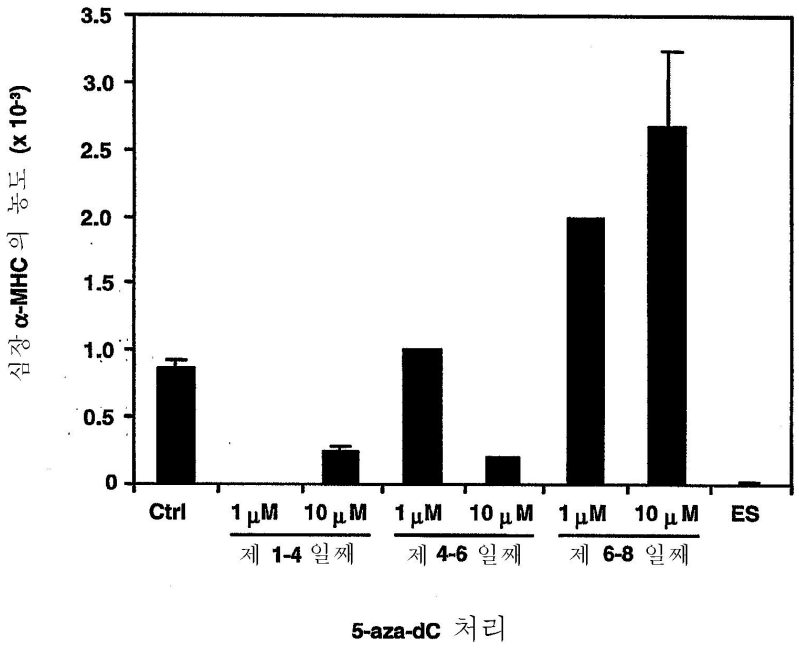
효소로 해리된 hES-유도 심근 세포



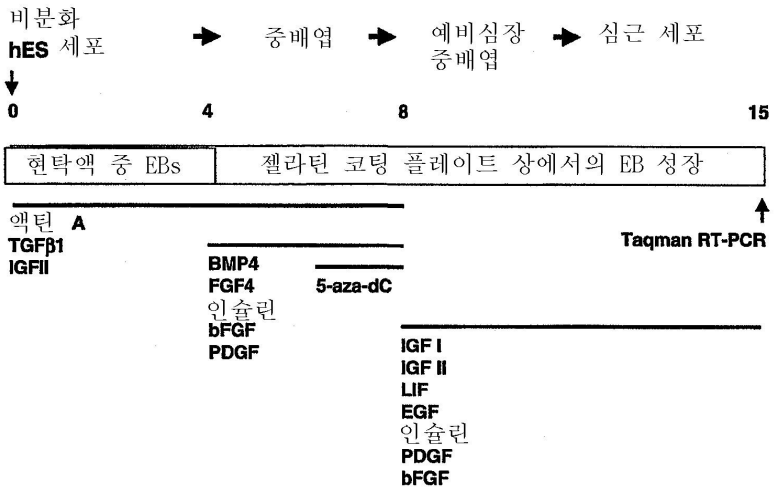
도면5

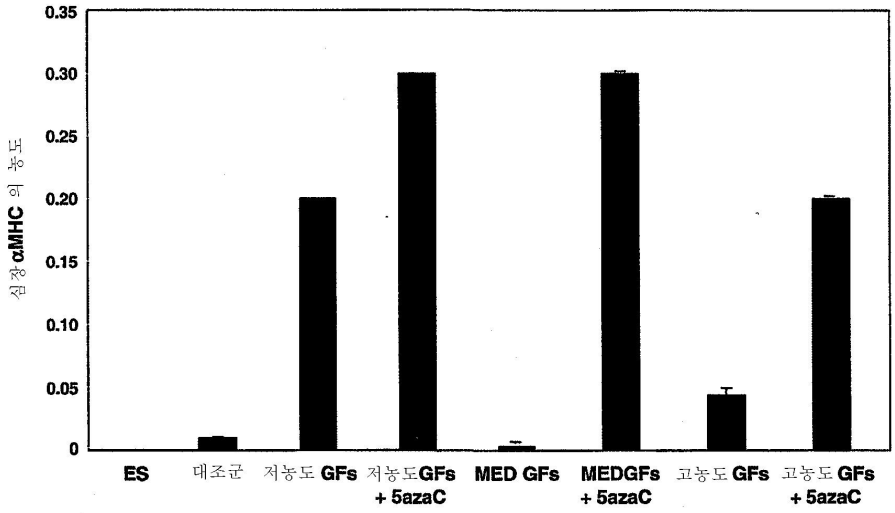

A
딜티아젬
박동 수/분
농도 [M]
B
이소프레날린
박동 수/분
농도 [M]
C
페닐에프린
박동 수/분
농도 [M]
D
IBMX
박동 수/분
농도 [M]
E
클레부테롤
박동 수/분
농도 [M]
제 39 일
제 61 일
제 72 일

도면6


3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
심장 α-MHC 의 농도 (x 10-3)
Ctrl
1 μM
10 μM
1 μM
10 μM
1 μM
10 μM
ES
제 1-4 일째
제 4-6 일째
제 6-8 일째
5-aza-dC 처리

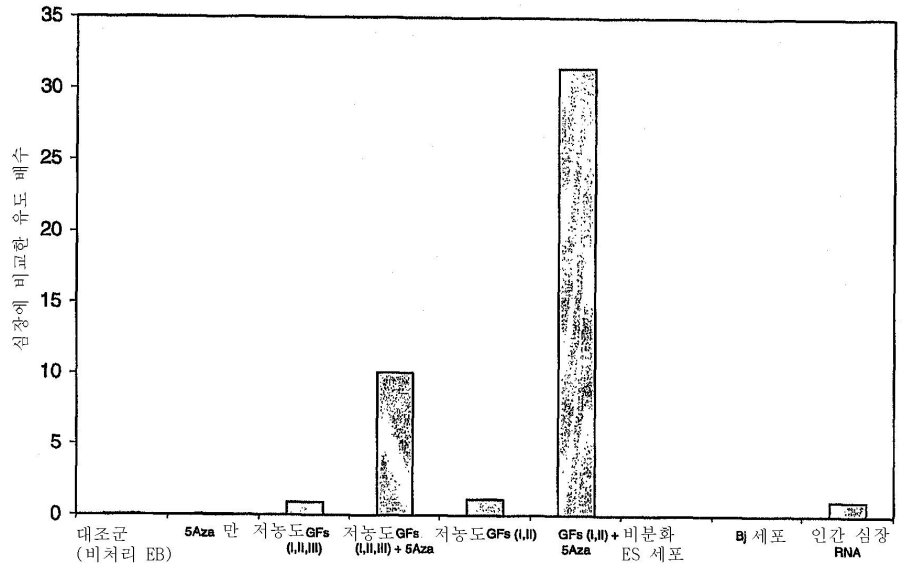
도면7


비분화
hES 세포
중배엽
예비심장
중배엽
심근 세포
0
4
8
15
현탁액 중 EBs
젤라틴 코팅 플레이트 상에서의 EB 성장
액틴 A
TGFβ1
IGFII
BMP4
FGF4
인슐린
bFGF
PDGF
5-aza-dC
IGF I
IGF II
LIF
EGF
인슐린
PDGF
bFGF
Taqman RT-PCR

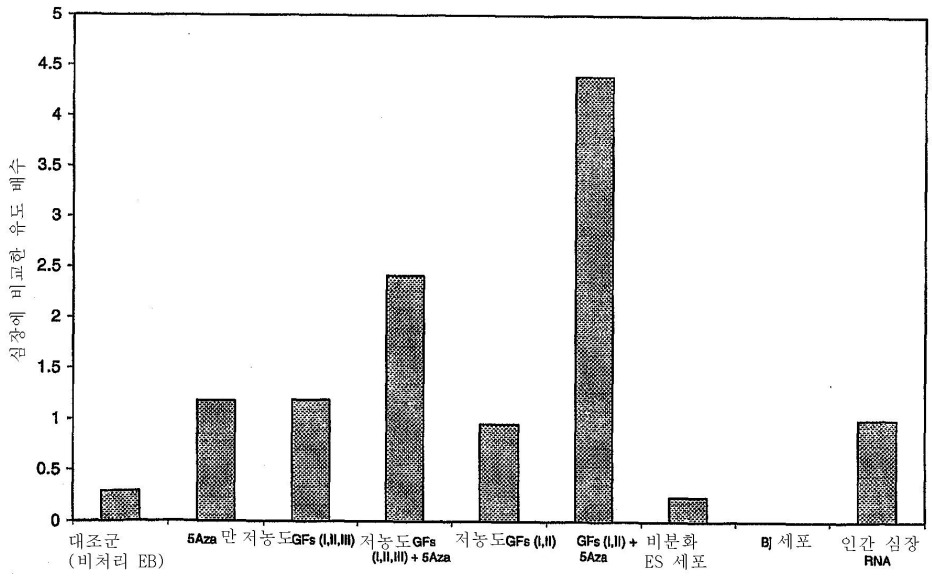

심장 αMHC 의 농도
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
ES
대조군
저농도 GFs
저농도GFs + 5azaC
MED GFs
MEDGFs + 5azaC
고농도 GFs
고농도 GFs + 5azaC

도면8a

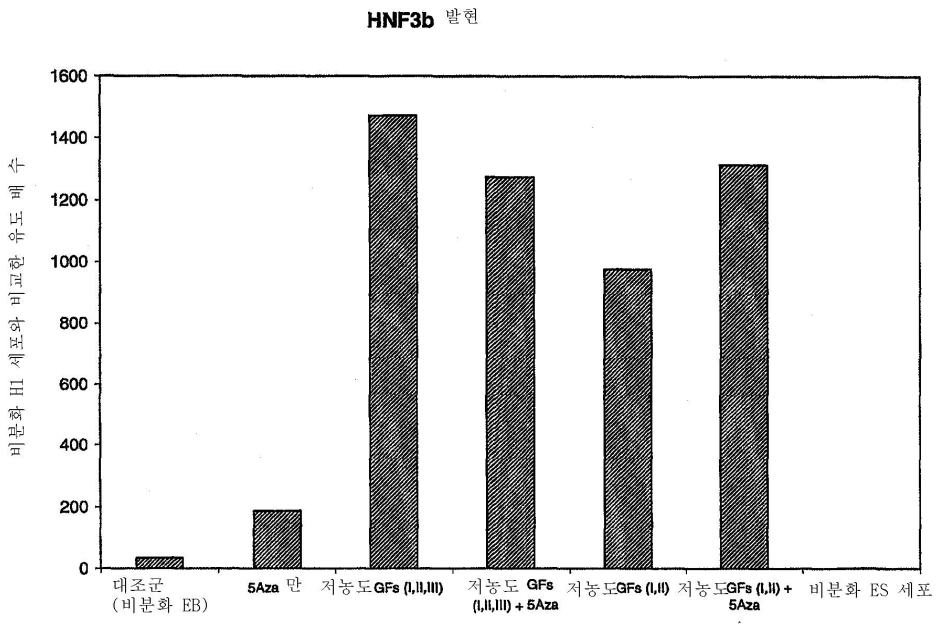
αMHC 발현



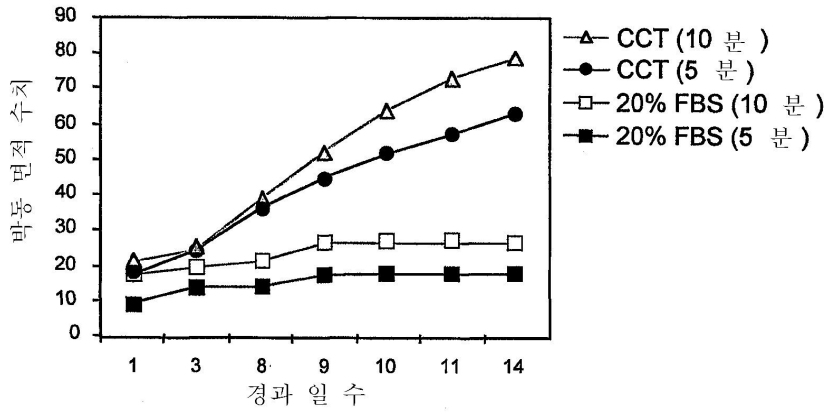
GATA-4 발현

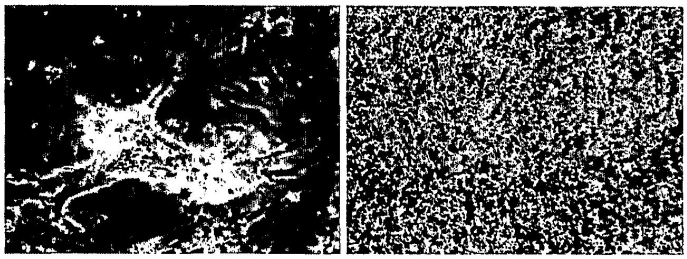


도면8b



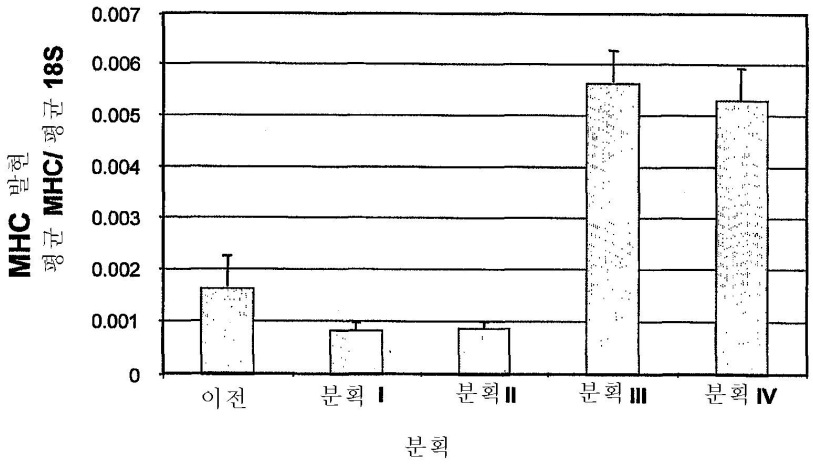
도면9





크레아틴, 카르니틴 및 타우린 20% FBS

도면10


MHC 발현
평균 MHC/ 평균 18S
0.007
0.006
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0
이전
분획 I
분획II
분획III
분획IV
분획