(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0133373
(43) 공개일자 2017년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0797 (2010.01) *A61K 35/30* (2015.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0623 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7028171
(22) 출원일자(국제) 2016년03월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년09월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/020649
(87) 국제공개번호 WO 2016/141162
국제공개일자 2016년09월09일
(30) 우선권주장
62/128,247 2015년03월04일 미국(US)

(71) 출원인
더 유니버시티 오브 노쓰 캐롤라이나 엣 채플 힐
미국 27516 노쓰 캐롤라이나주 채플힐 처치 스트리트 109
(72) 발명자
힛첸, 션 디
미국 27599 노스캐롤라이나 채플 힐 노스 세레니티 힐 서클 327
두미투루 라루카
미국 27516 노스캐롤라이나 채플 힐 델라 스트리트 216
로드리게스 바고 홀리오
미국 27517 노스캐롤라이나 채플 힐 빌리지 크로싱 드라이브 1803
(74) 대리인
특허법인 피씨알

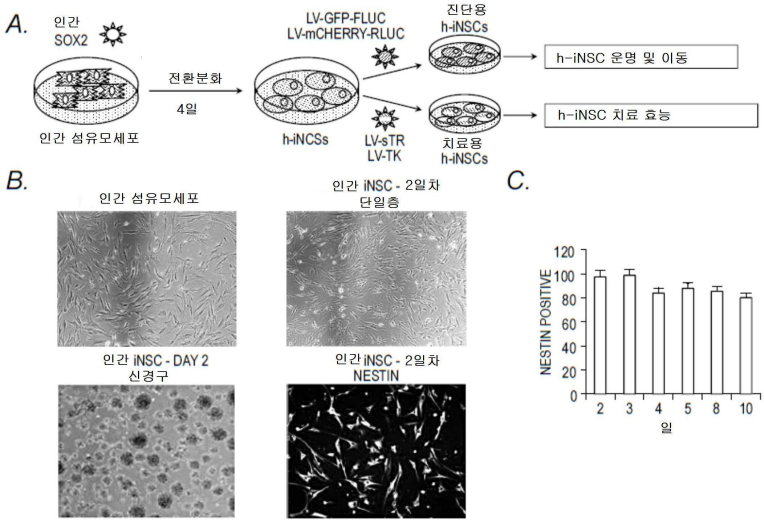
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **신경 줄기 세포를 제조하는 방법 및 그의 용도**

(57) 요 약

일부 구체예에 따라, 유도 신경 줄기 세포(Insc)를 제조하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 체세포를 제공하는 단계; 상기 체세포 내로 Sox2를 코딩하는 핵산을 (예를 들면, 형질감염 또는 형질도입에 의해) 도입하고, 상기 세포가 Sox2를 발현하는 단계; 및 상기 체세포를 (신경 전구세포 배지(neural progenitor medium)에서 세포를 증식시키는 것에 의해) 전환분화시켜 유도 신경 줄기 세포를 생성시키는 단계 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 전환분화는 1 내지 10일, 1 내지 5일, 1 내지 3일, 또는 12 내지24시간 또는 48시간의 시간 동안 수행된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 2501/602 (2013.01)
C12N 2506/09 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

체세포를 제공하는 단계;

상기 체세포를 Sox2를 코딩하는 핵산으로 형질감염 또는 형질도입시키는 단계; 및

상기 체세포를 전환분화시키고, 상기 전환분화는 신경 전구세포 배지(neural progenitor medium)에서 상기 체세포를 증식키는 것에 의해 수행되는 것인 단계를 포함하는, 유도 신경 줄기 세포를 제조하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 전환분화(transdifferentiation)는 1 내지 10일 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 전환분화는 1 내지 5일 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 전환분화는 1 내지 3일 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 체세포는 섬유모세포인 것인 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 체세포는 피부 섬유모세포인 것인 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유도 신경 줄기 세포는 네스틴(nestin)을 발현하고 및/또는 Nanog 또는 OCT3/4를 발현하지 않는 것인 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유도 신경 줄기 세포는 신경/성상 세포(neural/astrocyte cell)로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 체세포를 상기 Sox2를 코딩하는 핵산을 포함하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전환분화는 피더 세포 없이 수행되는 것인 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경 전구세포 배지는 DMEM/F12; N2 보충제; 인슐린; 신경기초 배지(neurobasal medium); B27 보충제; 비-필수 아미노산; bME; L-글루타민; Glutamax; SB431542; LDN193189; 레티노산; BSA; CHIR99021; 트랜스페린; 소디움 셀레나이트(sodium selenite); 및 cAMP로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 체세포를 TERT (예를 들면, hTERT)를 코딩하는 핵산으로 형질감염 또는 형질도입시키는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 유도 신경 줄기 세포에 치료제 및/또는 리포터 분자를 적재(load)시키는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 적재는 상기 유도 신경 줄기 세포를 치료제를 제조할 수 있는 핵산으로 형질감염 또는 형질도입시키는 단계를 포함하고, 상기 치료제는 단백질 독소, 항암 바이러스(oncolytic virus), 세포사멸 유도제(pro-apoptotic agent), 또는 효소/전구약물 치료법을 위해 유용한 효소인 것인 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 치료제를 제공할 수 있는 핵산 및 상기 Sox2를 코딩하는 핵산은 동일한 벡터로 제공되는 것인 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 유도 신경 줄기 세포를 확장시켜 유도 신경 줄기 세포의 집단을 형성시키는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 유도 신경 줄기 세포를 히드로겔 중에 캡슐화시키거나 또는 상기 유도 신경 줄기 세포를 스캐폴드에 접종하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 필요로 하는 개체에게 상기 유도 신경 줄기 세포를 투여하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 유도 신경 세포는 상기 개체에 대해 동종이계(allogeneic)이거나, 동계(syngeneic)이거나, 또는 자가이식성(autologous)인 것인 방법.

청구항 20

청구항 18 또는 19에 있어서, 상기 개체는 인간 개체인 것인 방법.

청구항 21

청구항 18 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 뇌 암의 치료를 필요로 하는 것인 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 뇌 암은 교모세포종인 것인 방법.

청구항 23

청구항 21 또는 청구항 22에 있어서, 상기 투여는 뇌종양의 적어도 일부의 외과수술에 의한 제거 후 강내(intracavity) 투여에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 24

청구항 18 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유도 신경 줄기 세포는 상기 개체에 대해 자가이식성이고, 상기 투여는 상기 체세포의 제공 후에 1일 내지 14일 또는 21일에 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 그 개시 전체가 참조에 의해 본 명세서에 포함된, 2015년 3월 4일자로 출원된 미국 임시 특허 출원 제62/128,247호에 기초한 우선권을 주장한다.

배 경 기 술

[0003] 뇌의 암은 치료가 가장 어려운 암으로 남아있다. 매년 10,000 명 이상의 환자가 가장 흔한 원발성 뇌종양인 교모세포종(GBM)으로 진단된다. GBM은 통상적으로 외과적 수술 및 화학-방사선 요법(chemo-radiation therapy)으로 치료되나, 불행하게도 현재 이용가능한 치료 옵션 하에서 이 질환은 일반적으로 치명적이다. 재발까지의 평균 기간은 6개월에 불과하고, GBM 환자들은 단지 평균 12-15개월 생존한다.

[0004] 신경 줄기 세포(neural stem cell: NSC)는 고형 및 미만성 GBM 침착물(solid and diffuse GBM deposit)로 회귀(home)하는 고유의 내재된 능력을 갖고, 다양한 세포독성제(cytotoxic agent)를 갖도록 조작된 NSC는 종양-보유 마우스의 생존을 유의성있게 연장하면서, GBM 이종이식(xenograft)을 70-90% 감소시키는 것으로 확인되었다. 그러나, 뇌에는 천연적으로 존재하는 소수의 NSC가 있고, 그들은 수질 내에 깊숙이 존재한다.

[0005] 세포 리프로그래밍(cellular reprogramming)의 도래는 세포 치료법에서 새로운 길을 열었으나, 한계가 있다. 예를 들면, 섬유모세포의 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)로의 탈-분화(de-differentiation) 및 원하는 치료 세포 유형으로의 재-분화(re-differentiation)는 시간이 소요되는 과정이고, iPSC 생성의 효율은 낮고, 이식된 iPSC 또는 유도체에 의한 암성 기형종(cancerous teratoma)의 형성에 대한 상당한 안전성 우려가 남아있다.

[0006] 전환분화(transdifferentiation: TD)는 세포가 중간 iPSC 단계를 거치지 않고 상이한 계통(lineage)의 분화된 체세포로 직접 전환되는 것인 방법이다. 이러한 TD에 의한 직접적인 전환은 iPSC 상태와 연관된 안전성 우려를 제거하고 원하는 치료 세포 유형의 보다 신속한 생성을 가능하게 한다.

[0007] 유도 신경 줄기 세포(iPSC)라 불리는 신경 줄기 세포가 TD에 의해 생성되었다. 2012년에 Matsui 등은 4가지 Yamanaka 인자를 이용하여, 인간 섬유모세포를 iPSC로 부분적으로 리프로그래밍하는 것에 의해 20일 내에 h-iNSC 생성이 달성될 수 있다는 것을 입증하였다. h-iNSC 생성은 또한 섬유모세포에서 Sox2를 발현시키는 것에 의해 달성되었으나, 이 전략은 확장 및 계대(passing)를 위한 h-iNSC를 수득하기 위해 특정한 피더 세포(feeder cell)에서 40일 동안 배양하는 것을 필요로 했다.

[0008] 세포-기반 치료법에서 사용하기 위한 조작된(engineered) NSC를 신속하게 제공할 수 있는 대안적인 방법에 대한 요구가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 요약

[0010] 일부 구체예에 따라, 유도 신경 줄기 세포(Insc)를 제조하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 체세포를 제공하는 단계; 상기 체세포 내로 Sox2를 코딩하는 핵산을 (예를 들면, 형질감염(transfect) 또는 형질도입(transduce)에 의해) 도입하고, 상기 세포가 Sox2를 발현하는 단계; 및 상기 체세포를 (신경 전구세포 배지(neural progenitor medium)에서 세포를 증식시키는 것에 의해) 전환분화시켜 유도 신경 줄기 세포를 생성시키는 단계 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 전환분화는 1 내지 10일, 1 내지 5일, 1 내지 3일, 또는 12 내지 24 시간 또는 48시간의 시간 동안 수행된다.

[0011] 일부 구체예에서, 상기 세포는 또 다른 전환분화 인자(transdifferentiation factor)로 형질감염 또는 형질되입되지 않는다.

[0012] 일부 구체예에서, 상기 체세포는 섬유모세포(예를 들면, 피부 섬유모세포)이다.

[0013] 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 체세포를 Sox2를 코딩하는 핵산을 포함하는 렌티 바이러스벡터로 형질도입

시키는 단계를 포함한다.

[0014] 일부 구체예에서, 상기 방법은 유도 신경 줄기 세포에 치료제 또는 리포터 분자를 적재(load)시키는 단계를 더 포함한다.

[0015] 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 유도 신경 줄기 세포를 히드로겔 또는 생분해성 스캐폴드 매트릭스(biodegradable scaffold matrix) 내에 캡슐화시키거나 또는 스캐폴드에 접종(seeding)하는 단계를 더 포함한다.

[0016] 일부 구체예에서, 상기 방법은 필요로 하는 개체(예를 들면, 인간 개체)에게 상기 유도 신경 줄기 세포를 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 유도 신경 줄기 세포는 상기 개체에 대해 동종이계(allogeneic)이다. 일부 구체예에서, 상기 유도 신경 줄기 세포는 상기 개체에 대해 동계(syngeneic)이다. 일부 구체예에서, 상기 유도 신경 줄기 세포는 상기 개체에 대해 자가이식성(autologous)이다. 일부 구체예에서, 상기 개체는 뇌암의 치료를 필요로 한다.

[0017] 일부 구체예에서, 상기 유도 신경 줄기 세포는 상기 개체에 대해 자가이식성이고, 상기 투여는 상기 체세포의 제공 후에 1일, 2일, 3일, 또는 4일 내지 7일, 10일, 14일 또는 21일차에 수행된다.

[0018] 본 명세서에 교시된 유도 신경 줄기 세포의 뇌 암을 치료하기 위한 용도가 또한 제공된다. 또한, 본 명세서에 교시된 유도 신경 줄기 세포의 뇌 암 치료용 약제의 제조에서의 용도가 제공된다.

과제의 해결 수단

[0019] 상세한 설명

[0020] 본 명세서에 인용된 모든 특허 문헌의 개시는 그들이 본 명세서에 기술된 개시와 일치하는 정도까지 참조에 의해 본 명세서에 포함된다. 문맥상 명확하게 달리 표시되지 않으면, 본 발명의 설명 및 첨부된 청구항에서 사용된, 단수 형태("a," "an" 및 "the")는 복수 형태도 포함하도록 의도된다.

[0021] 본 명세서에서 사용된 "신경 줄기 세포(neural stem cell)"는 신경 세포(neuron), 성상 세포(astrocyte), 및/또는 희소 돌기 교세포(oligodendrocyte)와 같은 중추신경계 세포로 분화될 수 있는 다분화능(multipotent) 세포를 의미한다.

[0022] "전환분화(transdifferentiation)" 또는 "전환분화하는(transdifferentiating)"은 분화된 체세포가 중간 다분화능 줄기 세포(intermediate pluripotent stem cell: iPSC) 단계를 거치지 않고 상이한 계통(lineage)의 분화된 체세포 또는 다분화능 체세포로 직접 분화되는 방법이다. 전환분화는 세포를 하나 이상의 전환분화 인자에 노출시키고 및/또는 원하는 세포 타입으로의 전환분화를 촉진하는 배지에서 세포를 증식시키는 것에 의해 수행될 수 있다. 전환분화를 모니터링하는 것은 당해 기술 분야에서 공지된 방법을 이용하여, 예를 들면, 분화된 체세포 및/또는 줄기 세포를 나타내는 마커 발현을 모니터링하는 것에 의해 수행될 수 있다.

[0023] 분화된 체세포는 접근가능한 공급원(source), 예를 들면, 조직, 체액(예를 들면, 혈액, 소변) 등으로부터 수집될 수 있다. 일부 구체예에서, 체세포는 섬유모세포, 예를 들면, 피부 섬유모세포이다. 예를 들면, 피부 세포는 외과수술 절개(surgical incision)의 경계로부터, 예를 들면, 수반되는 수술 시술 동안, 또는 단독 시술(stand-alone procedure)로 전통적인 피부 펀치(skin punch)를 이용하여 수집될 수 있다. 피부는 두피 또는 팔뚝으로부터의 수집을 포함한, 임의의 영역으로부터 수집될 수 있다.

[0024] 본 명세서에 교시된 일부 구체예에서, 전환분화는 1일, 2일, 또는 3일 내지 8일, 9일, 또는 10일의 시간, 1일, 2일, 4일 내지 5일, 6일, 또는 7일의 시간, 1일, 또는 2일 내지 3일, 또는 12시간 내지 24시간, 48시간, 또는 72시간의 시간 동안 수행된다.

[0025] 본 명세서에서 사용된 "전환분화 인자(transdifferentiation factor)"는 하나의 체세포 타입의 또 다른 타입으로의 직접적인 전환을 촉진하는 전사인자와 같은 단백질이다. 예는 Oct4, Sox2, Klf4, Myc, Ascl1, Brn2, Myt1l, Olig2, Zic1, 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구체예에서, 전환분화 방법은 단 하나의 전환분화 인자가 이용된다는 점에서 단일-인자 전환분화(single-factor transdifferentiation)이다.

[0026] "Sox2"는 전사인자의 Sox 패밀리의 일원이고, 신경관에서 발생하는 세포 및 중추신경계의 증식하는 전구 세포(progenitor cell)에서 발현된다. 일부 구체예에서, Sox2는 교시된 방법에서 전환분화 인자로 이용된다. 일부 구체예에서, Sox2는 단일-인자 전환분화를 수행하기 위해 이용된다.

[0027] "네스틴(Nestin)"은 중추신경계의 줄기세포에서 우세하게 발현되고, 그의 발현은 통상적으로 분화된 중추신경세포에는 존재하지 않는다. "GFAP" 또는 "신경교 섬유질 산성 단백질(glial fibrillary acidic protein)"은 성상세포를 포함한 중추신경계 세포에 의해 발현되는 중간 필라멘트 단백질(intermediate filament protein)이다.

[0028] "Tuj-1" 또는 "βIII tubulin"은 신경 마커(neural marker)이다.

[0029] "Nanog" 및 "OCT3/4"는 공지된 줄기 세포 마커이다.

[0030] 본 명세서에 교시된 일부 구체예에서, 전환분화는 피더 세포(feeder cell)의 사용 없이, 예를 들면, 신경 전구세포 배지(neural progenitor medium)에서 수행된다. 당해 기술 분야에서 공지된, 피더 세포는 세포 증식을 지지(support)하기 위해, 동일한 배양 디쉬 또는 용기에서, 종종 층(layer)(예를 들면, 배양 디쉬 상의 마우스 섬유모세포 층)으로 증식된 추가적인 세포이다.

[0031] 본 명세서에서 사용된, "신경 전구세포 배지(neural progenitor medium)"는 체세포의 신경줄기세포("유도(induced)" 신경 줄기 세포)로의 전환분화를 촉진하는 배지이다. 일부 구체예에서, 신경 전구세포 배지는 성장-촉진 인자 및/또는 영양분 혼합물을 포함하는 세포 배양 배지(예를 들면, DMEM/F12, MEM/D-발린, 신경기저 배지(neurobasal medium) 등, 그들의 혼합물을 포함); 호르몬, 단백질, 비타민, 및/또는 아미노산을 포함하는 배지 보충제(media supplement) (예를 들면, N2 보충제, B27 보충제, 비-필수 아미노산(NEAA), L-글루타민, Glutamax, BSA, 인슐린, 모든 트랜스 레티노산, 등, 그들의 혼합물을 포함); 및 선택적으로 소형 분자 억제제(small molecule inhibitor)(예를 들면, SB431542 (BMP 억제제), LDN193189 (TGF-β1 억제제), CHIR99021 (GSK3β 억제제), 등, 그들의 혼합물을 포함)로부터 선택된 하나 이상의 성분을 포함한다. 성분은 또한 베타-머캅토에탄올, 트랜스페린; 소디움 셀레나이트(sodium selenite); 및 cAMP 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 이러한 성분 각각의 적합한 농도는 당해 기술분야의 당업자에게 알려져 있고 및/또는 실험에 근거해 결정될 수 있다. 성분들의 예시 농도가 또한 하기의 실시예 2에 제공된다. 일부 구체예에서, 신경 전구세포 배지는 미리 제조된(premade) 배지, 예를 들면, STEMdiff™ Neural Induction Medium (STEMCELLTM Techologies, Vancouver, British Columbia, Canada)이다.

[0032] 일부 구체예에서, 신경 줄기 세포는 그들의 수명을 연장(promote)하고 및/또는 세포 배양에 의해 확장되는 능력을 강화시키기 위해 TERT(telomerase reverse transcriptase) 가 적재된다. 일부 구체예에서, TERT는 인간 텔로머라아제 역전사효소(human telomerase reverse transcriptase) ("hTERT")이다.

[0033] 본 명세서에서 사용된 "치료하다(Treat)" 또는 "치료(treatment)"는 환자의 상태(예를 들면, 하나 이상의 증상)의 개선, 질병의 진행의 지연, 질병의 발병 또는 재발의 지연, 등을 포함한, 암, 신경퇴행성 질환 또는 신경외상(neural trauma)과 같은 질병 또는 질환에 걸린 환자에 혜택(benefit)을 부여하는, 임의의 유형의 치료를 의미한다.

[0034] 본 발명은 주로 인간 개체의 치료에 관한 것이나, 본 발명은 또한 수의학적 목적을 위해, 및 약물 스크리닝 및/또는 약물 개발 목적을 위해 동물 개체, 구체적으로, 포유동물 개체, 예를 들면, 마우스, 랫트, 개, 고양이, 가축, 및 말에 수행될 수 있다. 개체는 유아, 청소년(juvenile), 청년(adolescent), 성인 및 노년층 개체를 포함한, 임의의 연령일 수 있다. 일부 구체예에서, 유도 신경 줄기 세포는 개체에 대해 동종이계 또는 자가이식이다.

[0035] 치료 대상 암은 원발성(primary) 또는 이차 뇌암일 수 있는, 뇌암을 포함한다. "원발성 뇌암(primary brain cancer)"은 중추신경계 세포의 두개내 암(intracranial cancer)이다. 뇌암의 종류는 신경아교종(glioma)(예를 들면, 교모세포종, 또는 다형교모세포종(glioblastoma multiforme)(GBM)), 수막종(meningioma), 수모세포종(medulloblastoma), 뇌하수체 샘종(pituitary adenoma) 및 신경초 종양(nerve sheath tumor)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. "이차 뇌암(secondary brain cancer)"은 신체의 다른 부위, 예를 들면, 뇌암, 흑색종, 폐암, 전립선암, 등으로부터 전이된 세포를 포함하는 중추신경계에 위치한 암이다.

[0036] 일부 구체예에서, 본 명세서에서 교시된 신경 줄기 세포에 치료제, 리포터 분자 및/또는 이들을 발현할 수 있는 핵산이 적재된다(즉, 포함된다). 일부 구체예에서, 치료제는 단백질 독소(예를 들면, 박테리아 내독소 또는 외독소(exotoxin), 항암 바이러스(oncolytic virus) (예를 들면, 조건부 복제성 항암 아데노바이러스(conditionally replicative oncolytic adenovirus), 레오바이러스(reovirus), 홍역 바이러스(measles virus), 헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus)(예를 들면, HSV1716), 뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus), 백시니아 바이러스, 등), 또는 세포사멸 유도제(예를 들면, 분비성 종양 괴사 인자(TNF)-연관 세포사멸-유도 리간드(secretable tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)(S-TRAIL))이다.

예를 들면, Weiss 등의 WO 19940/16718; Shah 등의 WO 2014/018113; Martuza 등의 WO 2009/148488; Subbiah 등의 US 2009/0175826을 참조한다.

[0037] 일부 구체예에서, 치료제는 염증 촉진성(pro-inflammatory) 단백질, 예를 들면, 인터루킨, 사이토카인, 또는 항체이다.

[0038] 일부 구체예에서, 치료제는 효소/전구약물 치료법에 유용한 효소(예를 들면, 티미딘 키나아제(예를 들면, 간시클로비르(gancyclovir) 전구약물 수반), 카르복시에스테라아제(예를 들면, CTP-11 수반), 시토신 탈아민효소, 등)이다.

[0039] 일부 구체예에서, 치료제는 RNAi 분자, 예를 들면, miRNA 또는 siRNA이다.

[0040] 일부 구체예에서, 신경 줄기 세포에 나노입자/약물 접합체가 적재된다.

[0041] 리포터 분자가 당해 기술 분야에서 알려져 있고, 그린 형광 단백질(Green Fluorescent Protein), b-갈락토시다아제, 알칼리 포스파타아제, 루시퍼라아제, 및 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제 유전자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. *예를 들면,* Pomper 등의 US 2013/0263296 참조한다.

[0042] 신경 줄기 세포의 적재는 당해 기술 분야에서 공지된 방법, 예를 들면, 세포를 치료제 또는 리포터 단백질을 생산할 수 있는 핵산으로 형질감염시키는 방법, 세포에 바이러스 벡터를 형질도입하는 방법, 세포의 치료제 및/또는 리포터 분자의 지질-기반 또는 폴리머 적재(lipid-based or polymeric loading of the cells with a therapeutic agent and/or reporter molecule), 등을 이용하여 달성될 수 있다.

[0043] "형질감염(transfecting)"은 세포 내로 이종기원(heterologous) 유전 물질을 종종 벡터(즉, 외래 유전 물질을 또 다른 세포 내로 운반하기 위해 비히클로 이용되는 분자)의 사용을 통해 전달하는 것이다. 진핵 세포를 형질감염시키는 방법은 알려져 있고, 전기천공, 양이온성 리포좀 기반 시약의 사용, 나노입자 폴리머 리포좀, 등을 포함할 수 있으나, 그에 한정되지 않는다.

[0044] "형질도입(transducing)"은 바이러스에 의해, 이종기원 유전 물질을 세포 내로 전달하는 것이다. 이러한 바이러스 벡터가 알려져 있고, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 등을 포함할 수 있으나, 그에 한정되지 않는다.

[0045] 신경 줄기 세포의 투여는 당해 기술 분야에서 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들면, 세포의 두개내 투여가 뇌암의 치료를 위해 수행될 수 있고, 바람직하게는 뇌종양의 적어도 일부의 수술에 의한 제거 후에 종양내 투여, 또는 강내(intracavity) 투여가 수행된다.

[0046] 일부 구체예에서, 세포는 히드로겔 매트릭스(예를 들면, 합성 세포외 매트릭스)와 같은 매트릭스에 의해 캡슐화되고 및/또는 스캐폴드에 접종되고, 이들은 예를 들면, 두개내로 투여되거나, 이식될 수 있다. *예를 들면,* 각각 참조에 의해 본 명세서에 포함된, Shah의 PCT 특허출원 공개 WO 2014/035474; Shah의 US 2014/0086907를 참조한다.

도면의 간단한 설명

[0047] ***도 1. 진단 및 치료용 iNSC의 생성 및 규명(characterization).*** (A) h-iNSC의 치료 및 진단 변이체(therapeutic and diagnostic variant)를 생성하기 위해 이용되는 전략의 개략적 묘사(schematic depiction). 인간 섬유모세포를 Sox2로 형질도입시키고 NSC-유도 신경 전구세포 배지에 배치했다. 4일 후에, h-iNSC를 확장시키고 광학적 리포터(optical reporter) 또는 종양억제성 형질전환 유전자(tumoricidal transgene)를 형질도입시켰다. (B) 단일층, 신경구(neurosphere)로 증식되거나, 네스틴에 대한 항체로 염색된 인간 섬유모세포 및 h-iNSC의 백색광 및 형광 현미경사진(white light and fluorescent photomicrograph). (C) h-iNSC 생성의 유도 후 상이한 일자에 네스틴의 발현을 보여주는 요약 그래프. (D) NSC 마커 네스틴의 h-iNSC-GFP 발현을 보여주는 면역형광 염색. GFAP+ 성상세포 및 Tuj1+ 신경세포(neuron)를 미토겐(mitogen) 제거에 의해 h-iNSC-GFP로부터 분화시켰다. 대조적으로, 다분화능(pluripotency) 마커 TRA-160 또는 OCT4에 대해 염색이 관찰되지 않았다. 이차 항체 채널만을 보여주는 형광 이미지가 하단 열에 표시된다. (E) 정상 인간 섬유모세포, h-iNSC, 및 h-iPSC중 Nestin, Sox2, Nanog, 및 OCT3/4 발현의 RT-PCR 분석.

도 2. 조작된(engineered) h-iNSC의 GBM으로의 회귀(home). (A) h-iNSC-GFPFL을 mCherry-발현 인간 GBM 세포로부터 500 ㎛ 떨어지게 접종하고 형광 인큐베이터 현미경(fluorescence incubator microscope)에 배치했다. 24시간 동안 10분 간격으로 저속도 형광 이미지(time-lapse fluorescent image)를 캡처하고 실시간으로 iNSC의 이동을 보여주는 동영상을 제작하기 위해 이용했다. (B) 플레이팅(plating) 후 0시간차 및 24시간차에 h-iNSC-

GFPFL 또는 부모 인간 섬유모세포(parental human fibroblast)의 U87-mCFL을 향한 이동을 보여주는 요약 이미지. (C) 24시간에 걸친 GBM을 향한 h-iNSC-GFPFL 지향 이동의 경로를 보여주는 단일 세포 추적(single cell tracing). 추가적인 이미지는 부모 인간 섬유모세포의 제한된 이동을 보여준다. 점선은 GBM 접종의 부위를 나타낸다. (D-F) 실시간 동작 분석(real-time motion analysis)으로부터 결정된 GBM 세포를 향한 h-iNSC 또는 섬유모세포 이동의 방향성(directionality) (D), 거리 (E), 및 속도 (F)를 보여주는 요약 그래프. (G-H) 고형GBM으로의 h-iNSC 이동을 평가하기 위해, U87 GBM 스페로이드(spheroid)를 3D 부상(levitation) 시스템에서 h-iNSC와 함께 공-배양하였다. (G) 형광 이미징은 시간의 경과에 따른, h-iNSC-GFPFL의 U87 스페로이드로의 이동 및 종양 스페로이드의 코어로의 침투(penetration)를 보여주었다 (H).

도 3. 마우스 뇌에 이식된 iNSC의 인 비보 규명(characterization). (A) 비변형 h-iNSCs 및 mCherry-FLuc를 발현하도록 조작된 h-iNSC의 증식을 보여주는 요약 그래프. (B-C) h-iNSC를 마우스의 전두엽에 이식하고 3주 동안 그들의 존속(persistence)을 모니터링하기 위해 연속 생물발광 이미징(serial bioluminescence imaging)을 이용했다. 요약 그래프는 h-iNSC가 25일차부터 점진적으로 제거(clear)되나, 뇌에서 존속되었다는 것을 보여주었다 (B). 뇌로의 이식 후 14일차 h-iNSC의 면역형광 분석은 Nestin+ 및 Tuj+ 세포를 보여주나, h-iNSC 와 다분화능 마커 Oct-4 및 TRA-160의 공동-국재화(co-localization)는 관찰되지 않았다 (C).

도 4. 고형 GBM을 위한 h-iNSC-매개 TRAIL 치료법. (A-B) 세포사멸 유도제(pro-apoptotic agent), TRAIL을 분비하도록 조작되고 단일층(monolayer)으로 증식된h-iNSC의 증식(A) 또는 부유 신경구(floating neurosphere)로 증식된 h-iNSC의 증식(B)을 보여주는 대표적인 형광 현미경 사진(fluorescent photomicrograph). (C) 1:2 또는 1:2의 비율로 치료용 h-iNSC-sTR 또는 대조군 세포와 혼합된 mCherry+ human U87 GBM 스페로이드의 생존력을 보여주는, 3D 현탁 배양물의 이미지 및 요약 데이터. GBM 스페로이드 생존력은 치료 후 48시간차에 루시페라아제 이미징에 의해 결정했다. (D) SCID 마우스의 실질(parenchyma)로 h-iNSC-sTR과 U87 GBM의 혼합물을 이종이식시키는 것에 의해 고형 GBM을 위한 h-iNSC-sTR 치료법을 수행했다. (E-F) 대조군-처리(control-treated) 마우스 대비 h-iNSC-sTR 치료법에 의한 고형 U87 GBM 진행의 억제를 보여주는 대표적인 BLI 이미지 (E) 및 요약 데이터 (F). (G) h-iNSC-대조군 대비 h-iNSC-sTR-처리 동물에서 생존의 연장을 보여주는 Kaplan-Meier 곡선. (H) 처리 후 h-iNSC-sTR에서 세포독성 마커, 분화 마커, 및 다분화능 마커의 발현을 보여주는 대표적인 이미지. 치료 후 14일차에 소그룹(subset)의 동물을 희생시키고, 뇌 절편(brain section)을 nestin, TRAIL, GFAP, Tuj-1, Oct-4, 또는 TRA-160에 대한 항체로 염색시키고, 염색과 GFP+ h-iNSC-sTR 간의 공동-국재화(co-localization)를 시각화시켰다.

도 5. 인간 환자-유래 GBM을 위한 h-iNSC 전구약물/효소 치료법. (A-D) 두 개의 상이한 3D 배양 모델에서 h-iNSC-TK 치료법의 항-종양 효과를 측정하였다. h-iNSC-TK를 GFP+ GBM4 환자-유래 GBM 세포 (A, B)와 혼합하거나 확립된 GBM4 스페로이드에 인접하게 접종하고(C, D), 종양 사멸(tumor killing)을 개시하기 위해 GCV를 첨가했다. 연속 형광 이미지(serial fluorescent image)가 h-iNSC-TK/GCV 치료법에 의한 GBM4 스페로이드 부피의 시간-의존적 감소를 보여주었다. (E) h-iNSC-TK/GCV 치료법에 의한 7일 동안의 GMB4 스페로이드 부피의 감소를 보여주는 요약 그래프. (F-J) 마우스의 뇌에 10일 전에 확립된 GBM4 종양에 h-iNSC-세포를 주사하는 것에 의해 h-iNSC-TK 치료법을 인 비보로 평가했다 (F). 연속 BLI는 GBM4 종양의 진행이 h-iNSC-TK/GCV 치료법에 의해 유의성 있게 억제되었다는 것을 보여주었다 (G). h-iNSC-TK/GCV 치료법 또는 대조군 h-iNSC로 처리된 GMB4 종양을 가진 마우스의 생존을 보여주는 Kaplan-Meier 생존 곡선(H). (I-J) h-iNSC-대조군 (I) 또는 h-iNSC-TK (J)를 확립된 GBM4 종양으로 전달한 후 21일차 GBM4 부피 및 h-iNSC-TK 분포를 보여주는 대표적인 전뇌(whole brain) 및 고-확대(high-magnification) 이미지. 대형 GBM4 종양이 대조군-치료 동물에 존재했고, 소형 GBM4 포커스만이 h-iNSC-TK-처리 뇌에서 검출되었다.

도 6. 외과수술에 의해 절제된 미만형 GBM을 위한 강내(intracavity) h-iNSC-TK 치료법. (A-C) 환자-유래 GBM8 스페로이드에 대한 합성 세포외 매트릭스(sECM)-캡슐화 h-iNSC-TK의 이동 및 항-종양 효능을 결정하기 위해 3D 현탁 배양을 이용하였다(A). sECM 에 캡슐화된 h-iNSC-TK는 접종 후 3일차에 매트릭스로부터 이동하고 GBM8 스페로이드에 정착(populate)하는 것으로 확인되었다(B). 대표적인 이미지 및 요약 데이터는 sECM 에 캡슐화된 h-iNSC-TK가 대조군-처리 스페로이드 대비 GBM8 스페로이드의 부피를 유의성 있게 감소시켰다는 것을 보여주었다 (C). (D) 외과수술에 의해 절제된 GBM을 위한 임상 h-iNSC 치료법을 모사하기 위해, h-iNSC-TK를 sECM 에 캡슐화시키고 mCherry-FLuc 를 발현하는 미만성 환자-유래 GMB8 종양의 절제 후에, 수술 강(surgical cavity) 내로 이식시켰다. (E) 수술 후 최소GBM8 종양(post-operative minimal GBM8 tumor)을 위한 강내 h-iNSC-TK 치료법 후 종양 재발에서 유의성 있는 억제를 보여주는 연속 이미징의 대표적인 이미지 및 요약 데이터. (F) 외과수술에 의한 절제를 받고, sECM 에 캡슐화되고, 수술 강(surgical cavity)에 이식된 대조군 h-iNSC 또는 h-iNSC-TK

로 처리된 마우스의 Kaplan-Meier 생존 곡선.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명은 하기의 비-한정적인 실시예에서 보다 상세하게 설명된다.

[0049] 실시예

[0050] 실시예 1: 인간 피부 세포의 신속한 전환분화

[0051] 인간 피부로부터 h-iNSC를 신속하게 생성하는 능력은 환자-특이적 치료법으로 암을 치료할 수 있게 한다. iNSC 생성의 효율은 다른 세포 리프로그래밍 전략보다 훨씬 더 높아서, 소량의 피부로부터 다수의 h-iNSC가 생성될 수 있다는 것을 시사했다. 환자-특이적 유도(patient-specific derivation)는 면역 거부를 회피하여, 종양 사멸 및 치료 지속기간(treatment durability)을 최대화할 수 있게 한다.

[0052] 빠르게 진행되는 암을 가진 환자를 치료하기 위해 세포-기반 약물 담체가 신속하게 생성되어야 하고, h-iNSC가 수주 내에 생성될 수 있다. 또한, iPSC와 달리, h-iNSC는 이식 후 기형종을 형성하지 않는다.

[0053] 본 연구에서, 인간 환자를 위한 자가이식성(autologous) GBM 치료법으로 TD-유래 h-iNSC 치료법의 잠재성을 조사하였다. 이 방법들은 기존의 방법보다 6배 빠르게 인간 피부를 h-iNSC로 전환시킬 수 있고, 이는 시간이 GBM 환자 치료법을 위한 우선사항이기 때문에 중요하다. 세포독성제 및 광학적 리포터(optical reporter)를 갖도록 조작된 최초의 h-iNSC를 생성하기 위해 이 전략을 이용했다. 실시간 분자 이미징, 3-D 세포 배양 및 다수의 인간 GBM 이종이식 모델(human GBM xenografts model)의 조합을 이용하여, 고형 및 외과수술에 의해 절제된 GBM에 대한 h-iNSC 치료법의 운명, 종양-특이적 회귀(tumor-specific homing), 및 효능을 조사하였다.

[0054] **재료 및 방법**

[0055] **세포주:** U87, GBM8, GBM4, 293T, 및 인간 섬유모세포(CCD-1099Sk, 기타)는 이전에 개시된 바와 같이 증식시켰다 (Hingtgen et al., Stem Cells 28, 832-841, 2010; Wakimoto et al., Cancer Res 69, 3472-3481, 2009). hTERT 및 Sox2를 코딩하는 렌티바이러스 벡터(LV)를 Addgene (Cambridge. MA, USA)으로부터 구매했다. 모든 cDNA는 테트라사이클린 프로모터의 제어 하에 있었다.

[0056] 단일-인자 Sox2 및 피더-프리 방법(single-factor Sox2 and feeder-free method)에 따라 인간 iNSC (h-iNSC)를 생성했다. 요약하면, 200,000개의 인간 섬유모세포를 6-웰 플레이트에 접종하고 프로타민 술페이트(5 ㎍/ml, Sigma)를 포함하는 배지에서 hTERT 및 Sox2를 포함하는 LV 칵테일로 형질감염시켰다. 감염 2일 후에, 배지를 독시사이클린(10 ㎍/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 포함하는 STEMdiff™ Neural Induction Medium (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) 로 교체했다. 배지를 3일마다 교체했다. 저-부착성 플라스크(low-adherent flask)에서 배양하는 것에 의해 신경구(neurosphere) 형성을 유도했다.

[0057] **렌티바이러스 벡터:** 리프로그래밍 벡터 외에, 본 연구에서 하기의 렌티바이러스 벡터를 이용했다: LV-GFP-FL, LV-GFP-RLuc, LV-mC-FL, LV-sTR, LV-diTR 및 LV-mRFP-hRLuc-ttk. 각각 벡터 루시퍼라아제-pcDNA3 및 pAC-hRluc (Addgene)를 이용하여 Renilla 루시퍼라아제 또는 반딧불이(firefly) 루시퍼라아제를 코딩하는 cDNA를 증폭시켜 GFP-RLuc 및 GFP-FL을 작제했다. 프라이머에 제한효소 인식부위(restriction site)를 내포시켰고, 결과적으로 수득된 단편을 BglII 및 SalI으로 처리하고, BglII/SalI 처리 pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA, USA)에 프레임 내로(in frame) 라이게이션시켰다. GFP-FL 또는GFP-RLuc 단편을 AgeI (평활형(blunted)) 및 SalI으로 처리하고, BamHI (blunted) 및 XhoI으로 처리된 pTK402 (UNC Gene Therapy Center의 Dr. Tal Kafri에 의해 제공됨)에 라이게이션시켜서 LV-GFPFL 또는 LV-GFP-RLuc를 생성했다. 마찬가지로, luciferase-pcDNA3로부터의 반딧불이 루시퍼라아제를 코딩하는 cDNA를 증폭시키고, BglII/SalI 처리mCherry-C1 (Clontech)에 라이게이션시키고, mC-FL 단편을 blunt/XhoI 부위를 이용하여 pTK402 LV 백본에 라이게이션시켜, mCFL을 생성시켰다. LV-sTR 및 LV-diTR을 생성하기 위해, sTR 또는 diTR을 코딩하는 cDNA 서열을 맞춤-합성된 올리고뉴클레오티드 주형(custom-synthesized oligonucleotide template)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 PCR증폭시켰다. 프라이머에 제한효소 인식 부위를 포함시키고, 결과적으로 수득된 단편을 BamH1 및 XhoI으로 처리하고, BamH1/XhoI 처리pLVX 플라스미드에 프레임 내로(in-frame) 라이게이션시켰다. LV-sTR 및LV-diTR은 백본 내에 IRES-GFP (internal ribosomal entry sites-green fluorescent protein) 요소 및 CMV-구동 퓨로마이신 요소(CMV-driven puromycin element)를 갖는다. 모든 LV 구조체(construct)를 전술된 바와 같이(Sena-Esteves et al., Journal of virological methods 122, 131-139, 2004), 헬퍼-바이러스-불포함 패키징 시스템(helper

virus-free packaging system)을 이용하여 293T 세포 내에 LV 벡터로서 패키징하였다. 5 mg/ml 프로타민 술페이트(Sigma)를 포함하는 배양 배지에서 비리온(virion)을 인큐베이팅시키는 것에 의해 다양한 감염다중도(multiplicity of infection: MOI)로 h-iNSCs 및 GBM 세포를 LV로 형질도입시키고, 세포를 형광 현미경에 의해 형광 단백질 발현에 대해 시각화시켰다.

[0058] **세포 생존력 및 계대수(passage number)**: 변형 및 비변형 h-iNSC의 증식 및 계대수를 평가하기 위해, GFP-FL, sTR 을 발현하는 h-iNSC 또는 비변형 세포를 96-웰 플레이트에 접종하였다. CellTiter-Glo® luminescent cell viability kit (Promega)를 이용하여 접종 후 2일, 3일, 4일, 5일, 8일, 및 10일차에 세포 생존력을 평가했다. 형태, 증식 속도(growth rate), 또는 형질도입(transduction) 효율의 변화 없이 iNSCs, iNSC-sTR, 또는 WT-NSC가 계대배양(subculture)되는 횟수를 모니터링하는 것에 의해 최대 계대수(maximum passage number)를 평가했다.

[0059] **면역조직화학 및 인 비트로 분화**: h-iNSC 분화에 대한 LV 변형의 효과를 결정하기 위해, h-Insc에 LV-GFP-FL 또는 LV-sTR을 형질도입시켰다. 조작된(engineered) 세포 또는 비변형 세포를 고정시키고, 투과화하고(permeabilize), 항-네스틴 다중클론 항체(Millipore, MAB353, 1:500, Billerica, MA, USA)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 세척하고 적절한 이차 항체(Biotium, Hayward, CA, USA) 와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 세포를 세척하고, 봉입(mount)시키고, 형광 공초점 현미경(fluorescence confocal microscopy)을 이용하여 이미징하였다. 분화를 위해, 조작된 h-iNSC 또는 형질도입하지 않은(non-transduced) h-iNSC를 독시사이클린, EGF, 및 FGF가 고갈된(depleted) N3 배지에서 12일 동안 배양했다. 그 후, 세포를 네스틴(nestin), GFAP(glial fibrillary acidic protein; Millipore, MAB3405, 1:250), 또는 Tuj-1 (Sigma, T8578, 1:1000)에 대한 항체로 염색시키고 적절한 이차 항체(Biotium)로 검출했다. 핵을 Hoechst 33342로 대비염색(counterstain)시키고, FV 1200 레이저 공초점 현미경 (Olympus, Center Valley, PA)을 이용하여 결과를 분석했다.

[0060] **삼차원 조직 배양**: Bio-Assembler Kit (Nano3D Biosciences, Houston, TX)를 이용하여 3차원 부상 세포 배양(three-dimensional levitation cell culture)을 수행했다. GBM 또는 h-iNSC를 포함하는 컨플루언트(confluent) 6 웰 플레이트를 밤샘 인큐베이션(overnight incubation)을 위해 자성 나노입자 조립체(magnetic nanoparticle assembly) (8 $\mu\ell$ cm^{-2} 의 세포배양 표면적 또는 50 $\mu\ell$ ml^{-1} 배지, NanoShuttle (NS), Nano3D Biosciences) 로 처리하여 세포의 나노입자로의 결합을 가능하게 했다. 세포 흡수(cellular uptake)를 촉진하기 위해 산화철과 폴리-l-라이신과 가된 금 나노입자와 혼합하는 것에 의해 NS를 제조(fabricate)하였다 (Souza, G.R.,et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. Nat Nanotechnol 5, 291, 2010). 처리된 GBM 및 h-iNSC를 트립신으로 탈착시키고, 재현탁시키고, 2 ml의 배지를 포함하는 초-저 부착 6-웰 플레이트(ultra-low attachment 6 well plate)에서 상이한 비율(1:1 및 1:0.5)로 혼합했다. 세포를 공기-액체 인터페이스까지 부상시키기 위해, 6-웰 플레이트를 위해 설계된 50G의 전계 강도(field strength)를 갖는 6개의 네오디뮴 자석(neodymium magnet)의 자성 드라이버(magnetic driver) 및 플라스틱 마개 삽입물(plastic lid insert)을 웰 플레이트 위에 배치했다. GBM과 ttk를 발현하는 h-iNSC의 공-배양물에 4 μg/ml GCV를 함유하는 배지를 첨가했다. (미리 상이한 형광으로 표지된) 두 집단의 세포 생존력을 추적하기 위해 시간의 경과에 따라 형광 이미지를 수득했다. 3D 세포 배양물의 BLI를 위해, Fluc 기질 스톡 시약 100 $\mu\ell$/웰을 배지에 첨가하고 5분 획득 시간(acquisition time)으로 IVIS Kinetic Optical System (PerkinElmer) 을 이용하여 이미징하였다. LivingImage 소프트웨어(PerkinElmer)를 이용하여, 이미지를 처리하고, 광자 방출을 정량하였다.

[0061] **실시간 이미징 및 동작(motion) 분석**: 신규한 2-차원 및 3-차원 배양 시스템에서 이동(migration)을 평가했다.

[0062] *2-차원 이동:* RFP를 발현하는 h-iNSC를 2-챔버 세포 배양 삽입물(2-chamber cell culture insert)(ibidi, Verona, WI, USA)을 이용하여 유리 바닥 마이크로웰 디쉬(MatTek, Ashland, MA, USA) 중 마이크로-배양 삽입물에 접종했다. GFP를 발현하는 U87 교모세포종 세포를 인접한 웰(0.5 mm 분리)에 플레이팅하거나, 웰을 공백으로 두었다. 플레이팅 후 24시간 경과시, 세포를 VivaView 살아있는 세포 이미징 시스템(Olympus)에 배치하고 평형화되도록 두었다. 삽입물을 제거하고, 3회의 독립적인 실험에서, (충분한 개수의 세포를 모니터링하기 위해) 웰당 6개의 위치에서 36시간 동안 20분마다 10X 확대율로 세포를 이미징하였다. 그 후, NIM 이미지를 이용하여, 동영상(movie)을 생성하고, 이동 속도, 총 이동 거리, 및 이동의 방향성을 결정했다.

[0063] *3-차원 이동:* 전술된 바와 같이, 부상 배양을 이용하여 h-iNSC 및 GBM 스페로이드를 생성하는 것에 의해 3-D 배양 시스템에서 GBM 스페로이드로의 h-iNSC 이동을 평가했다. 부상 시스템에서 h-iNSC 및 GBM 스페로이드를 공-

배양시켰다. 현탁된 h-iNSC에 의한 GBM 스페로이드의 침투를 시각화하기 위해 실시간 이미징을 수행했다.

[0064] **공-배양 생존력 분석**: sTR을 발현하는 mNSC 또는 대조군 GFP-RL ($5x10^3$)을 96 웰 플레이트에 접종했다. 24시간 후에, U87-mC-FL, LN18-mC-FL, 또는 GBM8-mC-FL 인간 GBM 세포($5x10^3$)를 웰에 접종하고 24시간 후에 정량적 인 비트로 생물발광 이미징에 의해 GBM 세포 생존력을 측정했다. 또한, 18시간 차에, GBM 세포를 케이지된(caged), 카스파아제 3/7-활성화가능한 DEVD-아미노루시페린(Caspase-Glo 3/7, Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여, 카스파아제-3/7 활성에 대해 평가했다.

[0065] ***인 비보* h-iNSC 생존 및 운명(fate)**: 인 비보 h-iNSC의 생존을 결정하기 위해, mCherry-FL 을 발현하는 h-iNSC($7.5x10^6$ 개 세포/마우스)를 PBS에 현탁시키고, 마우스의 우측 전두엽에 정위로(stereotaxically) 이식했다(n=7). 20일 동안 수행된 연속 생물발광 이미징에 의해 h-iNSC 생존을 결정했다. 세포 해상도(cellular resolution)에서 h-iNSC의 운명을 결정하기 위해, 이식 후 21일차에 동물을 희생시키고, 뇌를 추출하여 절편화(section)하였다. 조직 절편을 네스틴, GFAP, Tuj-1, Oct-4, 및 TRA-160에 대한 항체로 염색하고, CF™488로 표지된 이차 항체를 이용하여 시각화시켰다.

[0066] **공-배양 생존력 분석(Co-culture viability assay)**: 3개의 개별적인 인 비트로 세포독성 연구에서 3-D 부상 배양을 이용했다. 1개의 확립된 GB 세포주(U87) 및 2개의 환자-유래 GBM 세포주(GBM4, GBM8)를 처리하기 위해 2개의 상이한 세포독성제를 발현하는 h-iNSC를 이용했다. 1) TRAIL 치료법의 세포독성을 결정하기 위해, 1:2 또는 1:1의 iNSC:GBM 비율로h-iNSC-sTR 또는 h-iNSC-mCherry 스페로이드를 U87-GFP-FLuc 스페로이드와 현탁으로 공-배양시켰다. FLuc 이미징에 의해 48시간 후에 GBM 스페로이드 생존력을 결정했다. 2) 환자-유래 GBM에 대한 전구-약물 효소 치료법(pro-drug enzyme therapy)의 세포독성을 결정하기 위해, h-iNSC-TK 스페로이드를 구(sphere) 형성 전에 GBM 세포와 혼합하거나 또는 환자-유래 GBM4-GFP-FLuc 스페로이드와 현탁으로 공-배양했다. 스페로이드를 간시클로비르(GCV)의 존재 또는 부재 하에 배양하고, FLuc 이미징에 의해 전구-약물의 첨가 후 0일, 2일, 4일, 또는 7일차에 GBM 스페로이드 생존력을 결정했다. 3) sECM-캡슐화 iNSC 전구-약물/효소 치료법의 세포독성을 결정하기 위해, h-iNSC-TK를 sECM 에 캡슐화시키고 환자-유래 GBM8-GFP-FLuc 스페로이드와 함께 부상 배양에 배치했다. FLuc 이미징에 의해 생존력을 결정했다.

[0067] h-iNSC 치료법의 *인 비보* 항-GBM 효능: h-iNSC 치료법의 항-GBM 효과를 평가하기 위해 3개의 상이한 이종이식(xenograft) 연구를 수행했다. h-iNSC-sTR 및 h-iNSC-TK 치료법을 고형(U87), 미만성 환자-유래 (GBM8), 및 외과수술에 의해 절제된 환자-유래(GBM4) 이종이식 모델에 대해 테스트했다.

[0068] 1) 고형 인간 U87 종양에 대한 h-iNSC-TRAIL의 치료 효능을 결정하기 위해, h-iNSC-TRAIL 또는 iNSC-GFP-RLuc ($7.5x10^5$ 개 세포/마우스)의 조합을 U87-mC-FL 세포($1 x10^6$ 개 세포/마우스)와 함께 마우스의 우측 전두엽(n=7) 내로 정위로 이식시켰다. 전술된 바와 같이, FL 생물발광 이미징으로 종양 부피를 추적하는 것에 의해 치료 반응을 결정했다. 요약하면, 마우스에 D-루시페린 (150 ㎕의 염수 중 4.5 mg/마우스)의 복막내 주사를 시술하고, 5분의 획득 시간(acquisition time)으로 IVIS Kinetic Optical System (PerkinElmer) 을 이용하여 5분 뒤에 광자 방출을 측정하였다. LivingImage 소프트웨어 (PerkinElmer)를 이용하여 이미지를 처리하고 광자 방출을 정량하였다. 추가적으로, 시간의 경과에 따라 생존율에 대해 마우스를 추적하였다.

[0069] 2) 침습성 환자-유래 GBM에 대한 h-iNSC 전구약물/효소 치료법의 효능을 조사하기 위해, mC-FL을 발현하는 GBM8 세포($1.5x10^5$ 개 세포/마우스)를 우측 전두엽에 정위로 이식했다. 3일 후에, 종양 이식 부위에 h-iNSC-TK (n=7, $7.5x10^5$ 개 세포/마우스) 또는 h-iNSC-mRFP-hRLuc (n=7, $7.5x10^5$ 개 세포/마우스)를 이식했다. 100 mg/kg의 용량으로, GCV를 2주 동안 매일 복막내로(i.p.) 주사했다. 전술된 바와 같이 FLuc 이미징에 의해 종양 부피의 변화를 평가하고 시간의 경과에 따라 생존에 대해 마우스를 추적했다.

[0070] 3) 수술후 최소 GBM(post-surgical minimal GBM)에 대한 h-iNSC 치료법의 효능을 결정하기 위해, 본 발명자들의 이전에 보고된 전략에 따라, 마우스에서 이미지-유도 GBM 절제(image-guided GBM resection)를 수행했다. 환자-유래 GBM8-GFP-FLuc를 80% 합류(confluency)에서 수집하고 우측 전두엽에 정위로($5x10^5$ 개 세포): 전정(bregma)으로부터 측면으로 2 mm 및 경막(dura)으로부터 0.5 mm에 이식했다. 정위 프레임(stereotactic frame) 상에 고정화한 후, 마우스를 Olympus MVX-10 현미경 하에 배치했다. Hamamatsu ORCA 03G CCD (high resolution) 카메라 및 소프트웨어 (Olympus)를 이용하여 시술 내내 수술내(intraoperative) 현미경 백색광, GFP, 및 RFP 이미지를 획득했다. 두개골 위의 피부에서 중간선 절개(midline incision)를 수행하여 마우스의 두

개골을 노출시켰다. GFP 형광을 이용하여 두개골내 이종이식(intracranial xenograft)을 식별하였다. 종양을 뒤덮은 두개골의 일부를 뼈 천공기(bone drill) 및 겸자(forcep)를 이용하여 외과수술에 의해 제거하고, 종양을 노출시키기 위해 피질 표면으로부터 피개 경막(overlying dura)을 부드럽게 벗겨냈다. GFP 형광 하에, 외과수술에 의한 절제 및 흡입의 조합을 이용하여, GBM8-GFPFL 종양을 수술에 의해 절제하고, GFP-유도 외과수술 절제의 정확성을 평가하기 위해 GFP의 이미지를 지속적으로 획득했다. 종양 제거 후에, 결과적으로 수득된 절제 강(resection cavity)을 충분히 관주(irrigate)시키고 피부를 7-0 Vicryl 봉합으로 폐쇄시켰다. 시술-관련 사망률(procedure-related mortality)은 관찰되지 않았다. 모든 실험 프로토콜은 채플 힐에 있는 노스캐놀라이나 대학교의 동물관리 및 이용 위원회(the Animal Care and Use Committees at The University of North Carolina at Chapel Hill)로부터 승인받고, 마우스의 관리는 국립보건원의 실험동물 관리 및 이용에 대한 가이드(the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*), USDA 규정, 및 미국 수의학 협회(the American Veterinary Medical Association)에 의해 수립된 표준에 따랐다. 외과수술에 의한 절제 후에, h-iNSC-TK 또는 h-iNSC-mC-FL ($5x10^5$ 개 세포) 을 히알루론산 sECM 히드로겔 (Sigma)에 캡슐화시키고, 수술후 GBM 강(post-operative GBM cavity) 내에 이식했다. 전술된 바와 같이, FLuc 이미징에 의해 GBM 재발을 시각화하고, 생존율에 대해 마우스를 추적했다.

[0071] **조직 처리(Tissue processing):** 마지막 이미징 세션의 직후에, 마우스를 희생시키고, 포르말린을 주입시키고, 뇌를 추출했다. 조직을 포르말린에 즉시 침지시켰다. 진동 박절기(vibrating microtome)(Fisher Waltham, MA, USA)를 이용하여 30 ㎛ 관상 절편(coronal section)을 생성했다. 네스틴, GFAP, 및 Tuj-1 염색을 위해, 절편을 실온에서 블록킹 용액(blocking solution)(0.3% BSA, 8% 염소 혈청, 및 0.3% Triton X-100)에 1시간 동안 인큐베이션시키고, 뒤이어, 블록킹 용액에 희석시킨 하기의 일차 항체와 함께 4° C에 밤새 인큐베이션시켰다: (1) 항-인간 네스틴(Millipore), (2) 항 GFAP (Millipore), (3) 항 TRAIL (ProSci, Poway, CA) 및 (4) 항-Tuj-1 (Sigma). 절편을 PBS로 3회 세척하고, 적절한 이차 항체와 인큐베이션시키고, 공초점 현미경(Olympus)을 이용하여 시각화시켰다.

[0072] **결과**

[0073] ***인간 섬유모세포의 h-iNSC로의 신속한 전환분화.*** h-iNSC 치료법의 신속하고 효율적인 생성이 공격성 암을 가진 환자를 치료하기 위해 필수적이다. 새로운 전략으로서, 인간 섬유모세포를 Sox2로 형질도입시키고, 피더 세포 없이, h-iNSC 생성을 수행했다. 그 후, 광학적 리포터를 발현하는 진단용 h-iNSC 또는 상이한 세포독성제를 발현하는 치료용 h-iNSC를 생성했다(도 1A). 먼저, 피더-불포함/Sox2 전략을 이용한 h-iNSC 생성의 역학(kinetics)을 평가했다. 인간 섬유모세포를 Sox2로 형질도입시키고, NSC-유도 배지에서 배양했다(도 1B). Sox2 발현 활성화의 48시간 이내에 세포 형태의 변화를 관찰했다. 추가적으로, 광범위한(wide-spread) 네스틴 발현이 검출되었고, h-iNSC는 신경구(neurosphere)를 형성할 수 있었다. 정량은 h-iNSC 중 네스틴 발현이 2일차부터 10일차까지 일정하게 유지된다는 것을 보여주었다(도 1C). 분화되도록 유도된 경우, h-iNSC는 성상세포 마커 GFAP 및 신경 마커(neural marker) Tuj-1을 발현했다. 염색은 세포가 다분화능 마커 TRA-160 또는 OCT4를 발현하지 않았다는 것을 밝혔다 (도 1D). 이러한 발견은 RT-PCR 분석에 의해 확인되었다(도 1E). h-iNSC는 부모 섬유모세포 또는 인간 iPSC (h-iPSC)에는 존재하지 않는, 고 수준의 네스틴 발현을 보였다. Sox2 과다 발현이 h-iNSC 및 h-iPSC 세포주를 생성하기 위해 이용되었기 때문에, 두 세포주 모두에서 Sox2 발현은 높은 수준이었다. h-iPSC와 달리, h-iNSC는 고 수준의 다분화능 마커 Nanog 또는 OCT3/4를 발현하지 않았다. 함께, 이러한 데이터는 단일-인자 Sox2 발현을 이용하여 48시간 이내에 다능성(multi-potent) h-iNSC를 생성하는 능력을 입증했다.

[0074] *h-iNSC는 GBM으로 선택적으로 이동한다.* 고형 및 침습성 GBM 침착물로 회귀(home)하는 능력이 NSC-기반 암 치료법의 가장 유용한 특징 중 하나이다. h-iNSC의 종양-회귀성(tumor-tropic nature)을 조사하기 위해, 본 발명자들은 인간 GBM 세포와 공배양된 h-iNSC의 실시간 동작 분석을 이용하였다 (도 2A에 요약됨). 기준(reference)을 위해, h-iNSC 이동을 그들이 유래한 부모 인간 섬유모세포와 비교했다. h-iNSC 가 공배양된 GBM 세포를 향해 신속하게 이동하여, 22시간에 500 ㎛ 갭을 커버하는 것으로 확인되었다(도 2B). 단일 세포 이동 경로 분석은 GBM 세포의 존재가 h-iNSC가 선택적으로 공배양된 GBM 세포를 향해 이동하도록 유도했다는 것을 보여주었다 (도 2C). 대조적으로, 인간 섬유모세포는 매우 적은 이동을 보였다 (도 2B). 인간 섬유모세포의 단일 세포 이동 분석은 공배양된 GBM 세포를 향한 매우 적은 변위(displacement)를 갖는, 무작위 이동 패턴(random migratory pattern)을 확인했다 (도 2C). h-iNSC의 이동의 방향성을 완벽한 단일 방향 이동(perfect single direction movement)은 1.0의 비를 산출하고, 완벽하게 비-방향성(non-directional) 운동은 0.0의 비를 산출하는 것으로, 전체 누적 거리에 대한 유클리드 거리의 비(ratio of Euclidian distance to overall accumulated distance)를 계산하는 것에 의해 분석했다. 이 분석을 이용하여, 본 발명자들은 인간 섬유모세포(0.28)보다 h-iNSC에 대해

훨씬 더 높은 평균 방향성 비(0.65)를 계산했다(도 2D). 단일 세포 이동 패턴의 추가적인 분석은 인간 섬유모세포(200 ㎛) 대비 유의성있게 증가된 h-iNSC 에 의해 이동된 평균 유클리드 거리 (340 ㎛)를 보여주었다(도 2E). h-iNSC에 의한 평균 세포 속도는 인간 섬유모세포에 비해 더 낮았다 (0.4 vs 0.62) (도 2F). 마지막으로, 본 발명자들은 h-iNSC의 GBM 부위(foci)로의 인 비보 이동을 모사(mimic)하기 위해 3-D 이동 분석을 수행했다. mCherry+ h-iNSC 스페로이드를 GFP+ GBM 스페로이드와 공 배양하고, 두 세포 유형 모두를 자기력을 이용하여 부상시켰다(도 2G). 본 발명자들은 h-iNSC가 접종 후 수 시간 내에 GBM 스페로이드에 침투하기 시작했다는 것을 발견했다. h-iNSC 스페로이드는 지속적으로 GBM 스페로이드에 침투해서, 8일 내에 광범위하게 공동-국재화되었다. 종합하면, 이러한 발견은 h-iNSC가 종양회귀성(tumoritropic properties)을 갖고 GBM 세포로 회귀한다는 결론을 뒷받침한다.

[0075] *h-iNSC 존속(persistence) 및 인 비트로 운명(In Vivo Fate).* 다음으로, 본 발명자들은 조작된 h-iNSC를 이용하여 뇌에서 인 비보로 이 세포들의 생존 및 운명을 조사하였다. GFPFL 및 mCFL 에 의한 h-iNSC 의 조작(engineering) 후 인 비트로 증식(proliferation)의 이전 연구는 조작되지 않은(non-engineered) h-iNSC 와 유의성 있는 차이를 보이지 않았다 (도 3A). 인 비보 연구를 위해, mCFL 을 갖도록 조작된 h-iNSC 를 마우스의 뇌에 정위로 이식하고 시간의 경과에 따른 세포 생존율(cell survival)을 모니터링하기 위해 실시간 비-침습적 이미징을 이용했다. 주기적으로 이미지를 캡쳐하여, 본 발명자들은 h-iNSC 가 이식 후 20일보다 길게 생존하는 것으로 확인했다 (도 3B). 사후분석(post-mortem) IHC는 h-iNSC-mCFL 의 약 절반이 NSC 마커 네스틴을 발현했고 (도 3D), 나머지 절반은 신경세포 마커 Tuj-1에 대해 양성이라는 것을 밝혔다 (도 3D). 성상세포 마커 GFAP는 관찰되지 않았다. 추가적인 IHC는 이식된 h-iNSC가 다분화능 마커 Oct-4 및 TDR-160을 발현하지 않았다는 것을 보여주었다.

[0076] *항종양(tumoricidal) iNSC 를 이용한 악성 및 침습성 GBM의 효과적인 치료.* h-iNSC-기반 GBM 처리(treatment)의 치료 효능을 조사하기 위해, 본 발명자들은 먼저 Gaussia 루시퍼라아제를 포함하는 프레임에 및 IRES-GFP 요소의 상류에 세포사멸 유도성(pro-apoptotic) 분자 TNFα-관련 세포사멸 유도 리간드(TNFα-related apoptosis-inducing ligand)(TRAIL; diTR)의 분비된 변이체를 발현하도록 h-iNSC를 조작했다(iNSC-diTR). 조작된 세포 담체로부터 전달된 경우, TRAIL의 항암 효과는 이전에 확립되었다; 따라서, 신규한 h-iNSC 전달 비히클을 규명하기 위한 이상적인 항종양 분자이다. h- iNSC 의 형질도입 후 GFP 리포터의 강건한 발현이 검출되었다 (도 4A). 본 발명자들은 현탁으로 배양된 경우, h-iNSC-diTR이 효율적으로 신경구(neurosphere)를 형성하고(도 4B), 비변형 세포와 동등한 정도로 증식능력 및 계대수를 보인다(데이터 미도시)는 것을 관찰했다. 네스틴 발현 및 분화 능력은 이전에 조작된 h-iNSC 및 조작되지 않은 h-iNSC 에서 관찰된 것과 동일하여, TRAIL에 의한 h-iNSC 의 변형이 줄기 세포로서의 특성을 간섭하지 않는다는 것을 시사했다.

[0077] 조작된 h-iNSC의 항-GBM 효능을 평가하기 위해, h-iNSC-diTR 또는 대조군 iNSC-GFPRL을 mCherry 및 반딧불이 루시퍼라아제(mC-FL)를 발현하는 인간 GBM 세포와 함께 상이한 비율로 공-배양했다. 인 비보 특징을 모사하기 위해, GBM과 h-iNSC 를 혼합하고, 48시간 동안 삼차원 부상 시스템에서 배양했다. 형광 및 BLI는 h-iNSC-Str과 공-배양된 GBM의 생존력의 유의성 있는 감소를 밝혔다. 이러한 감소는 보다 높은 h-iNSC:GBM 비율이 이용된 경우, 훨씬 더 높았다 (도 4C).

[0078] *세포사멸 유도제(pro-apoptotic agent)의 h-iNSC 분비는 고형 GBM을 감소시킨다.* h-iNSC-sTR 기반 치료법의 인 비보 효능을 테스트하기 위해, 본 발명자들은 단독(solitary) 인간 GBM에 대한 h-iNSC-sTR 처리의 효과를 측정했다. mC-FL 을 발현하는 인간 U87 GBM 세포를 iNSC-sTR 또는 대조군 iNSC-GFP와 함께 두개골 내에 (intracranially) 이식하고 (도 D) 연속 생물발광 이미징을 이용하여 종양 부피를 추적하였다. 본 발명자들은 h-iNSC-sTR 처리가 3일차까지 종양 증식의 통계적으로 유의성 있는 감소를 유도했고 24일차까지 GBM 부피를 50배 감소시켰다는 것을 발견했다 (도 4F). 또한, h-iNSC-sTR-처리 동물이 51일보다 길게 생존했고, 대조군 동물은 단 25일 내에 GBM 증식에 굴복했다 (도 4G). 마우스 뇌의 IHC 검사는 2주 후에 h-iNSC-sTR에 의한 TRAIL의 강건한 발현을 보여주었다. GBM 중 h-iNSC-sTR은 Nestin 및 Tuj-1의 발현에 대해 양성이고, GFAP 및 다분화능 마커 Oct-4 및 TRD-160에 대해 음성이었다 (도 4H).

[0079] *항종양iNSC 를 이용한 악성 및 침습성 GBM CD133+ 의 효과적인 치료.* 환자-유래 CD133+ 인간 GBM-개시 세포(human GBM-initiating cell)를 위한 h-iNSC 전구약물/효소 치료법의 효능을 결정하기 위해, 본 발명자들은 GFP 및 반딧불 루시퍼라아제를 발현하는 GBM 세포(GBM4-GFPFL)와 Rluc, RFP 및 티미딘 키나아제(TK) 활성을 포함하는 삼기능 키메라 리포터(trifunctional chimeric reporter)를 발현하는 h-iNSC를 공-배양하여 h-iNSC-TK를 생성하였다. 헤르페스 심플렉스 바이러스에 의해 코딩되는 티미딘 키나아제(HSV-TK)가 최초의 세포 자살 유전자 치료법 원칙의 입증(first cell suicide gene therapy proof of principle)에서 이용되었고 여전히 임

상 및 실험 응용에서 가장 널리 사용되는 시스템 중 하나이다. GBM4-GFPFL과 h-iNSC-TK를 두가지 상이한 모델로 3차원 부상 시스템에서 공-배양하였다. 제1 모델 (도 5A)에서, 두 가지 세포 타입을 혼합하였고 시간의 경과에 따라 세포 생존율을 형광에 의해 모니터링하였다(도 5B). 제2 모델에서, 두 가지 세포 타입을 나란히 배양하여 확립된 GBM의 처리를 모사하였다(도 5C). 시간의 경과에 따라, 세포 생존율을 형광에 의해 모니터링하였다(도 5D). 두 경우 모두에서, 시간의 경과에 따라 GBM 생존율의 유의성 있는 감소가 관찰되었고, 혼합 모델에서 더 유의했다 (도 5E).

[0080] 그 후, 본 발명자들은 마우스의 실질에 GBM4-GFPFL 암세포를 이식하는 것에 의해 확립된 GBM4에 대한 h-iNSC-TK 치료법의 인 비보 효능을 결정했다. 3일 후에, h-iNSC-TK 또는 대조군 세포를 직접 확립된 종양에 투여했다(도 5F). 연속 생물발광 이미징은 h-iNSC-TK 처리가 GBM4 종양의 진행을 둔화시켜서, 주사 후 28일차에 대조군 대비 종양 부하(tumor burden)를 9배 감소시켰다는 것을 보여주었다 (도 5G). h-iNSC-TK 처리 동물이 대조군-처리 마우스에서의 단 37일 대비 평균 67일 생존하여, h-iNSC-TK 치료법은 또한 생존율의 유의성 있는 연장을 가져왔다 (도 5H). 사후(post-mortem) IHC는 h-iNSC-TK주사에 의한 종양 부피의 유의성 있는 감소를 검증했다 (도 5I-5J). 종합하면, 이러한 결과는 h-iNSC-TK 치료법이 악성 및 침습성 GBM에 대한 유의성 있는 치료 효과를 갖고 종양-함유 마우스의 생존율을 현저하게 연장한다는 것을 보여준다.

[0081] *강내(Intracavity) h-iNSC-TK 치료법은 외과수술에 의해 절제된 GBM 재발을 억제한다.* 외과수술에 의한 절제는 GBM 환자를 위한 관리의 임상 표준의 일부이다. 본 발명자들은 이전에 줄기 세포의 캡슐화(encapsulation)가 효과적으로 GBM 재발을 억제하기 위한 강내 치료법을 위해 요구된다는 것을 발견했다. 합성 세포외 매트릭스(sECM)에 캡슐화된 h-iNSC 치료법의 효능을 결정하기 위해, 본 발명자들은 HLA 히드로겔에 임베딩된 h-iNSC-TK와 GBM-8 GFPFL (환자-유래 CD133+ 인간 GBM-개시 세포)을 공배양했다 (도 6A). 본 발명자들은 mCherry+ h-Insc가 sECM 매트릭스로부터 이동하여 3일 내에 GFP+ GBM8 스페로이드에 정착(populate)했다는 것을 확인했다. 추가적으로, sECM/h-iNSC-TK 치료법은 3일 내에 GBM8 스페로이드의 생존력을 크게 감소시켰다.

[0082] 수술로 절제된 인간 GBM 환자를 위한 h-iNSC 치료법을 모사(mimic)하기 위해, 본 발명자들은 GBM 절제의 마우스 모델에서 고 미만성 환자(highly diffuse patient)-유래 GBM8 세포에 대해 h-iNSC-TK 치료법을 테스트했다(도 6D). GBM 감축술(debulking) 후에, HLA에 임베딩된 h-iNSC-TK를 수술 절제 강(surgical resection cavity) 내에 이식했다. 연속 생물발광 이미징(Serial bioluminescence imaging)은 h-iNSC-TK 치료법이 GMB8 종양의 재발을 감소시켜서, 이식 후 14일차에 대조군 대비 종양 부하를 350% 감소시켰다는 것을 보여주었다 (도 6E). h-iNSC-TK 처리 동물은 대조군-처리 마우스에서의 46일 대비 평균 59일 생존하여, h-iNSC-TK 치료법은 또한 생존율의 유의성 있는 연장을 가져왔다(도 6E).

[0083] 실시예 2: 인간 피부 세포의 신속한 전환분화를 위한 대안적 배지

[0084] 실시예 1에서 전술된 바와 같이, 인간 피부 세포의 전환분화를 수행하였으나, STEMdiff™ Neural Progenitor Basal Medium 대신, 하기와 같은 N-2 배지와 B-27 배지의 1:1 혼합물이었다. 화합물은 표시된 바와 같이, Gibco® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California), Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) 또는 Selleck Chemicals (Houston, Texas) 에서 구매하였다.

[0085] **N-2 배지:**

[0086] DMEM/F12 (Gibco®)

[0087] 1 X N2 보충제(supplement) (Gibco®)

[0088] 5㎍/ml 인슐린 (Sigma)

[0089] 1mM L-글루타민 (Gibco®)

[0090] 1mM Glutamax (Gibco®)

[0091] 100μM MEM 비-필수 아미노산(NEAA) (Gibco®)

[0092] 100M 베타-머캅토엔탄올(bME)

[0093] **B-27 배지:**

[0094] 신경기초(Neurobasal) 배지 (Gibco®)

[0095] 1 X B-27 보충제 (Gibco®)

[0096] 200 mM L-글루타민 (Gibco®)

[0097] 1:1 믹스(mix)에 우혈청 알부민(BSA, Sigma)을 5㎍/ml의 최종 농도까지 첨가했다.

[0098] 이 배지에 하기 성분을 보충하였다: SB431542 (Selleck Chemicals)를 10μM의 최종 농도까지; LDN193189 (Selleck Chemicals)를 100nM의 최종 농도까지; 모든 트랜스 레티노산을 10μM (Sigma)의 최종 농도까지; 및 CHIR99021 (Selleck Chemicals)을 3μM의 최종 농도까지 첨가했다.

[0099] 이 배지를 이용하여, Sox2 형질도입시 사용하여, nestin+ iNSC를 생성시켰다.

[0100] 배지는 또한 인슐린(25㎍/ml), 트랜스페린(100㎍/ml), 소디움 셀레나이트(sodium selenite)(30nM), 및/또는 cAMP (100ng/ml)를 포함하도록 제조될 수 있다.

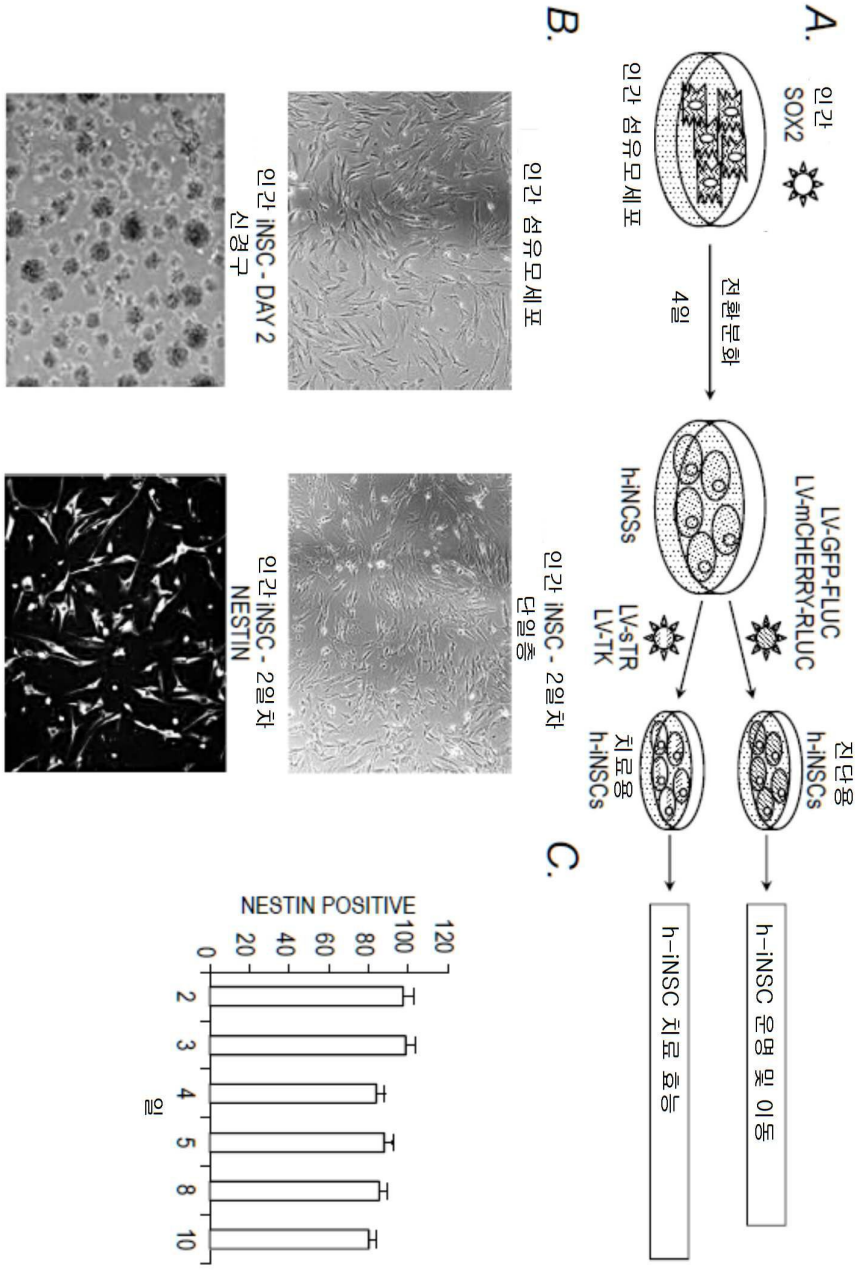
[0101] 실시예 3: 뇌암의 치료에서 iNSC의 용도

[0102] 환자는 뇌암(예를 들면, 교모세포종)으로 진단받고, 그 후 바로(예를 들면, 1주, 2주, 또는 3주 내에) 종양을 제거받도록 계획된다. 피부 섬유모세포를 얻기 위해 환자로부터 피부 펀치(skin punch)를 채취한다. 본 명세서에 교시된 바와 같이 세포를 유도된 신경줄기 세포로 전환분화시키고 치료제 및/또는 리포트 분자(reporting moleculre)를 적재한다. 외과수술 동안 및 종양의 제거 후에, 적재된 iNSC를 종양이 제거되어 결과적으로 생성된 강(cavity)으로 투여한다. iNSC는 잔류 암세포를 향해 이동하고 그들의 치료제/리포트 분자 적재물(payload)를 전달한다.

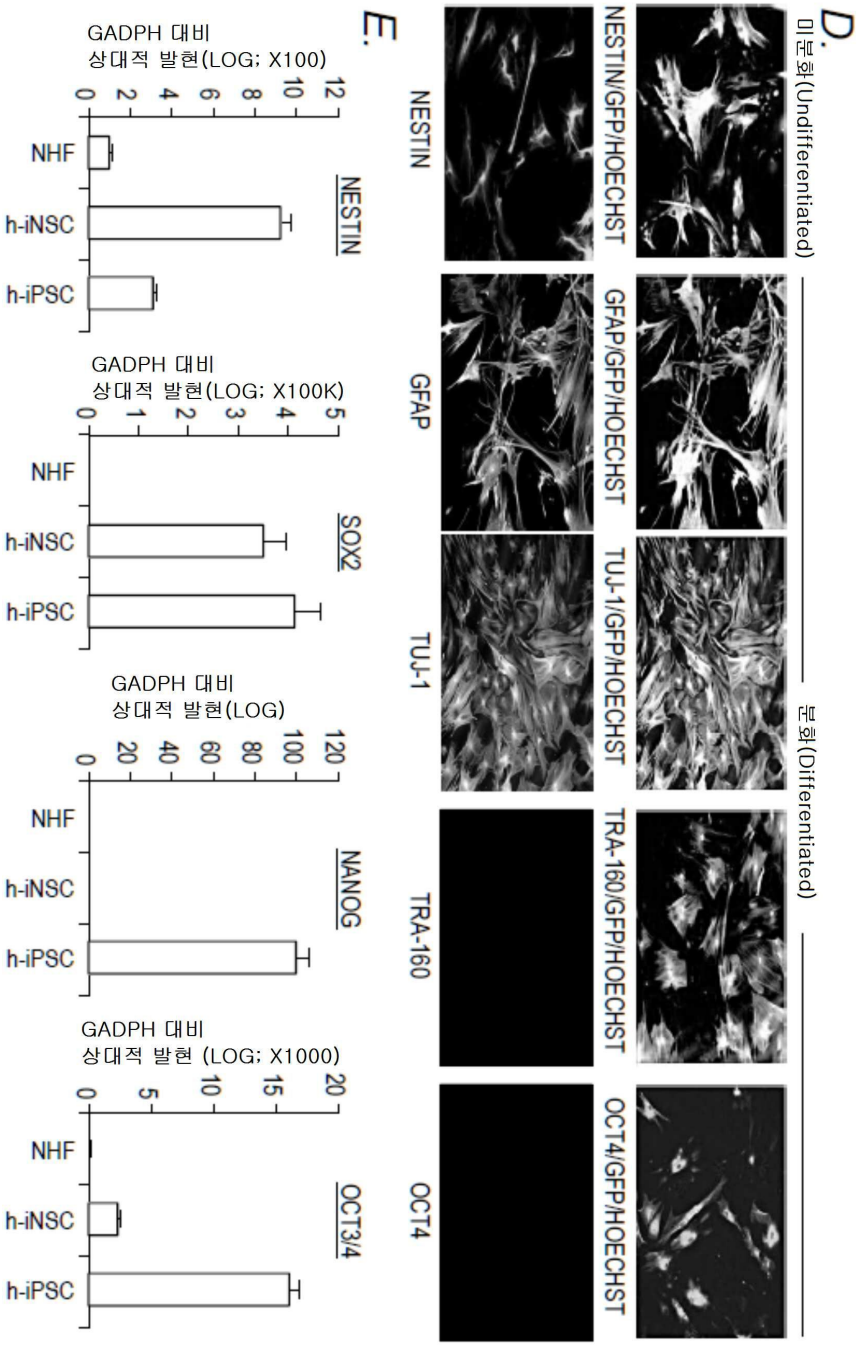
[0103] 전술은 본 발명을 예시하고, 그를 한정하는 적으로 해석되지 않는다. 본 발명은 하기의 청구항에 의해 정의되고, 상기 청구항의 균등물은 그에 속한다.

도면

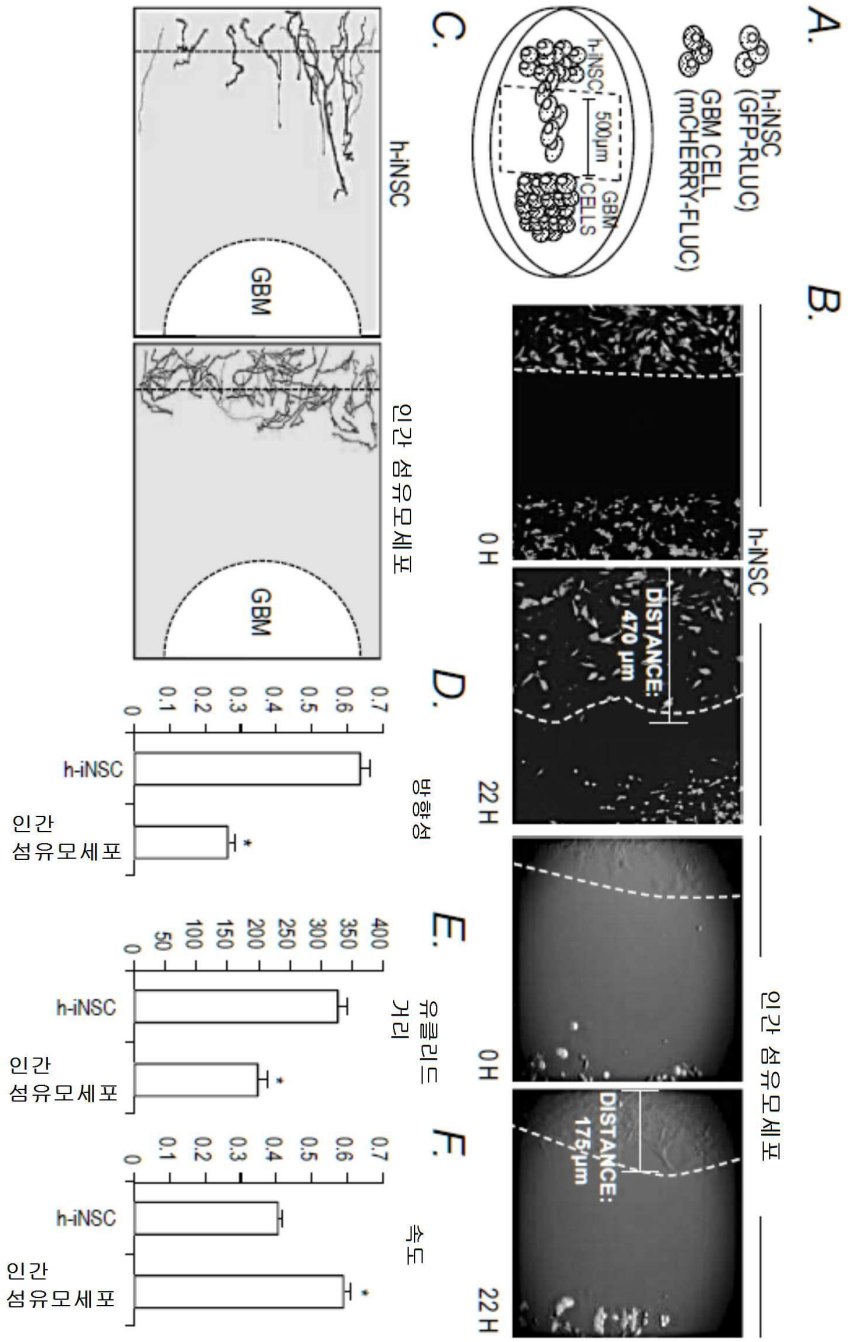
도면1a


A.
인간
SOX2
인간 섬유모세포
전환분화
4일
LV-GFP-FLUC
LV-mCHERRY-RLUC
h-iNCSs
LV-sTR
LV-TK
진단용
h-iNSCs
치료용
h-iNSCs
h-iNSC 운명 및 이동
h-iNSC 치료 효능
B.
인간 섬유모세포
인간 iNSC - DAY 2
신경구
인간 iNSC - 2일 차
단일층
인간 iNSC - 2일 차
NESTIN
C.
NESTIN POSITIVE
0
20
40
60
80
100
120
2
3
4
5
8
10
일

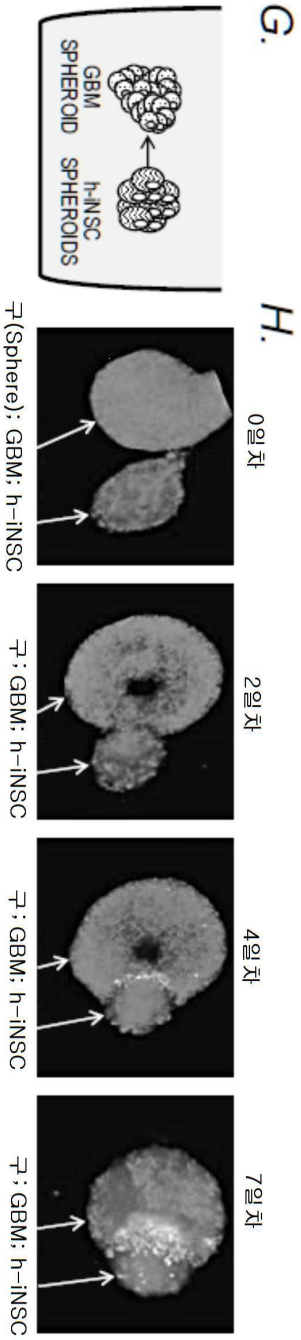
도면1b


D.
미분화(Undifferentiated)
분화(Differentiated)
NESTIN/GFP/HOECHST
GFAP/GFP/HOECHST
TUJ-1/GFP/HOECHST
TRA-160/GFP/HOECHST
OCT4/GFP/HOECHST
NESTIN
GFAP
TUJ-1
TRA-160
OCT4
E.
GADPH 대비
상대적 발현(LOG; X100)
NESTIN
GADPH 대비
상대적 발현(LOG; X100K)
SOX2
GADPH 대비
상대적 발현(LOG)
NANOG
GADPH 대비
상대적 발현 (LOG; X1000)
OCT3/4
NHF
h-iNSC
h-iPSC

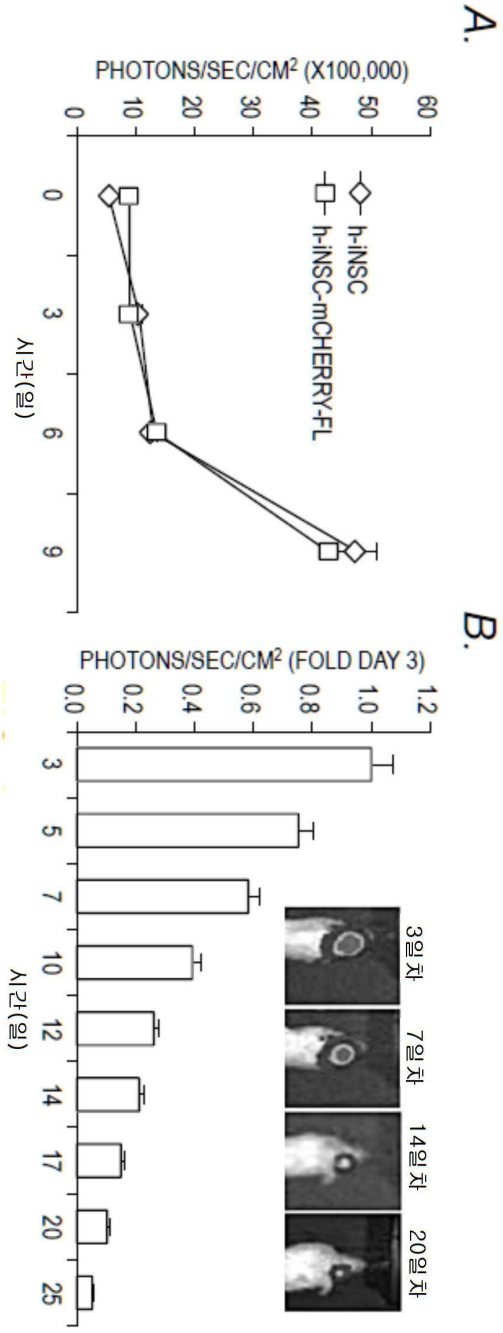
도면2a


A.
h-iNSC (GFP-RLUC)
GBM CELL (mCHERRY-FLUC)
h-iNSC
500μm
GBM CELLS
B.
h-iNSC
인간 섬유모세포
0 H
22 H
DISTANCE: 470 μm
DISTANCE: 175μm
C.
h-iNSC
인간 섬유모세포
GBM
D.
방향성
E.
유클리드 거리
F.
속도
h-iNSC
인간 섬유모세포

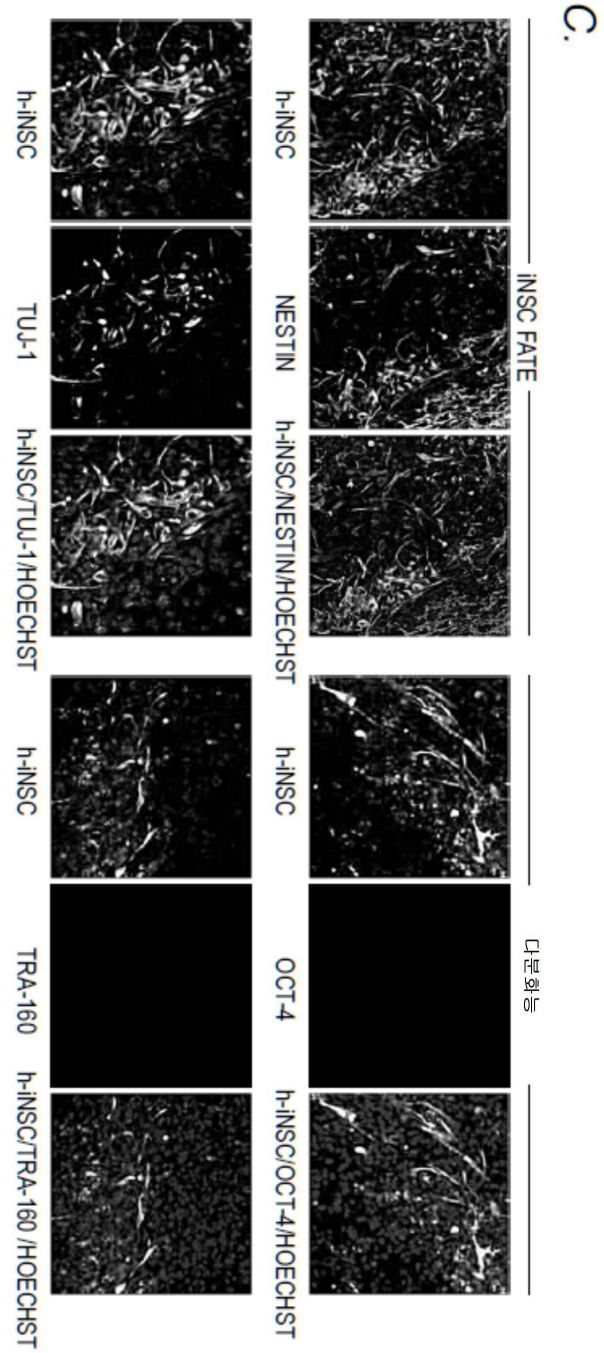
도면2b


G.
GBM SPHEROID
h-iNSC SPHEROIDS
H.
0일 차
2일 차
4일 차
7일 차
구(Sphere); GBM; h-iNSC
구; GBM; h-iNSC
구; GBM; h-iNSC
구; GBM; h-iNSC

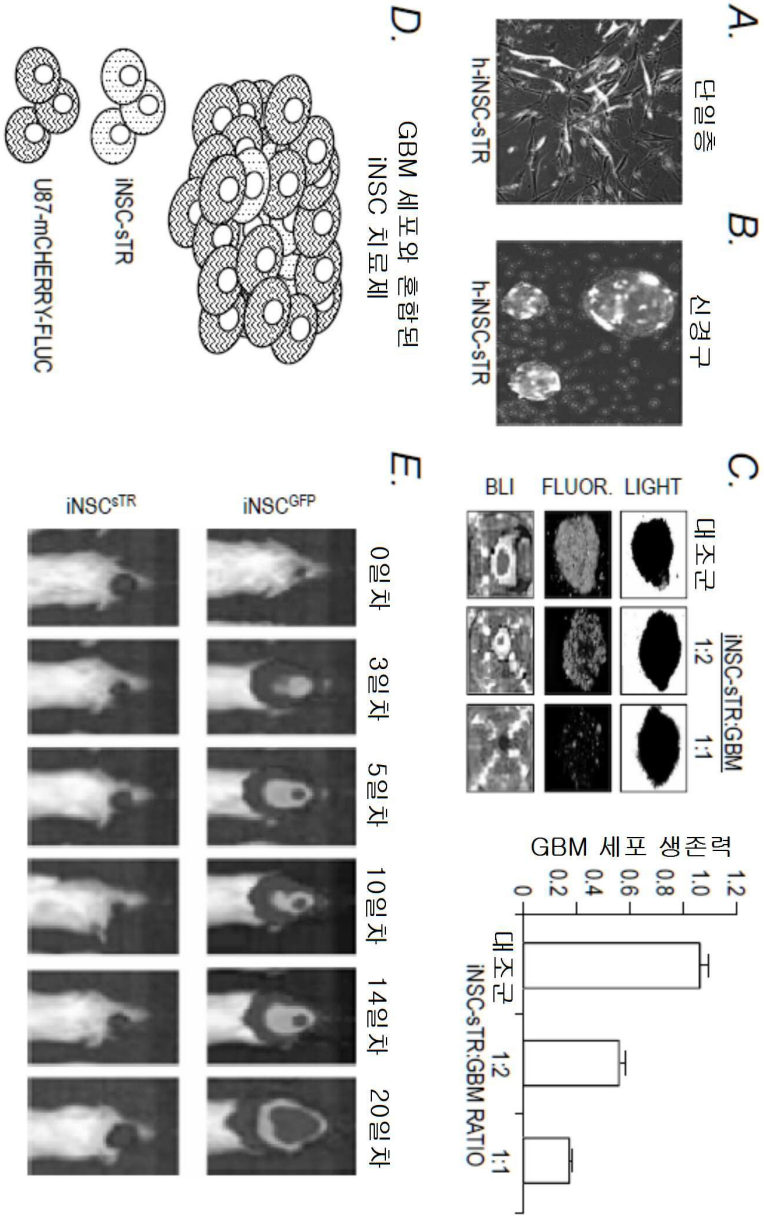
도면3a


A.
PHOTONS/SEC/CM2 (X100,000)
0
10
20
30
40
50
60
h-iNSC
h-iNSC-mCHERRY-FL
시간(일)
0
3
6
9
B.
PHOTONS/SEC/CM2 (FOLD DAY 3)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
시간(일)
3
5
7
10
12
14
17
20
25
3일차
7일차
14일차
20일차

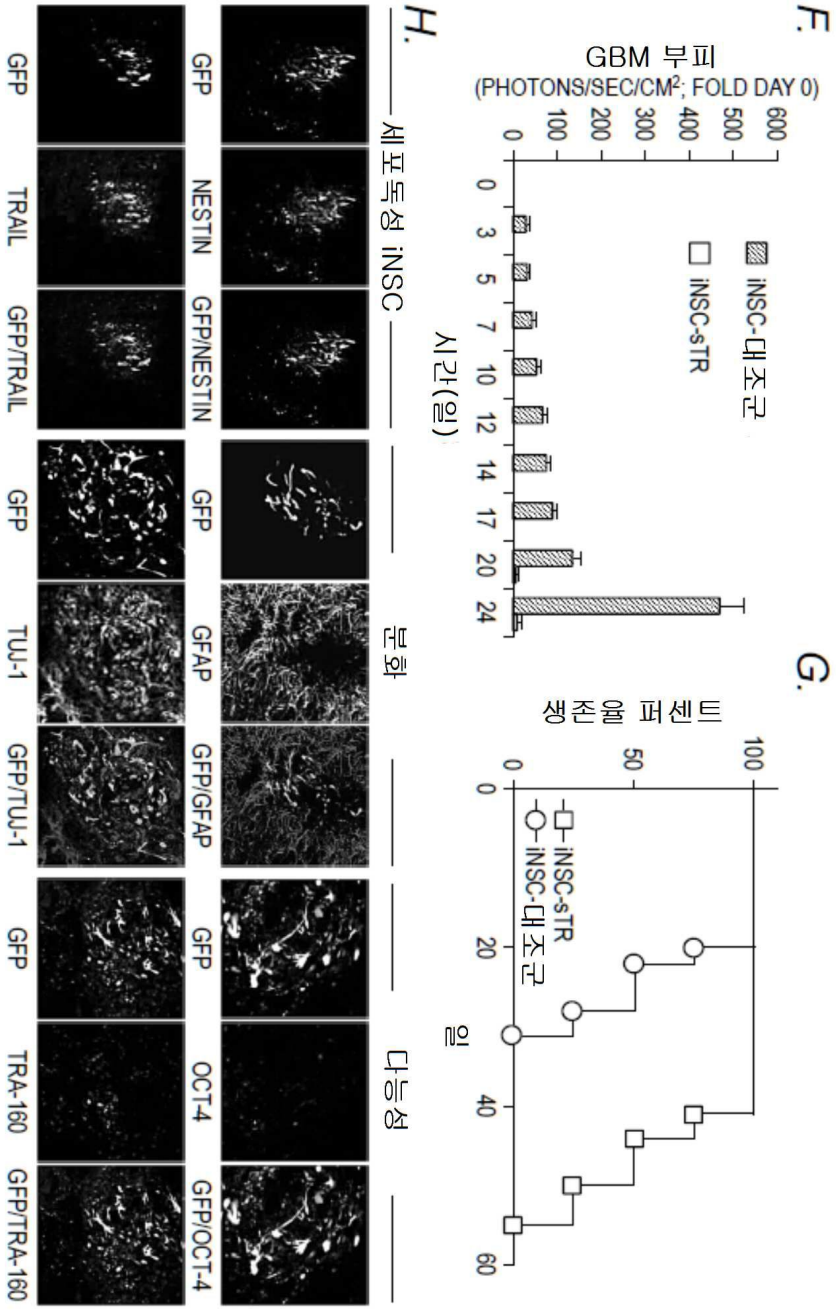
도면3b


C.
iNSC FATE
다분화능
h-iNSC
NESTIN
h-iNSC/NESTIN/HOECHST
h-iNSC
OCT-4
h-iNSC/OCT-4/HOECHST
h-iNSC
TUJ-1
h-iNSC/TUJ-1/HOECHST
h-iNSC
TRA-160
h-iNSC/TRA-160 /HOECHST

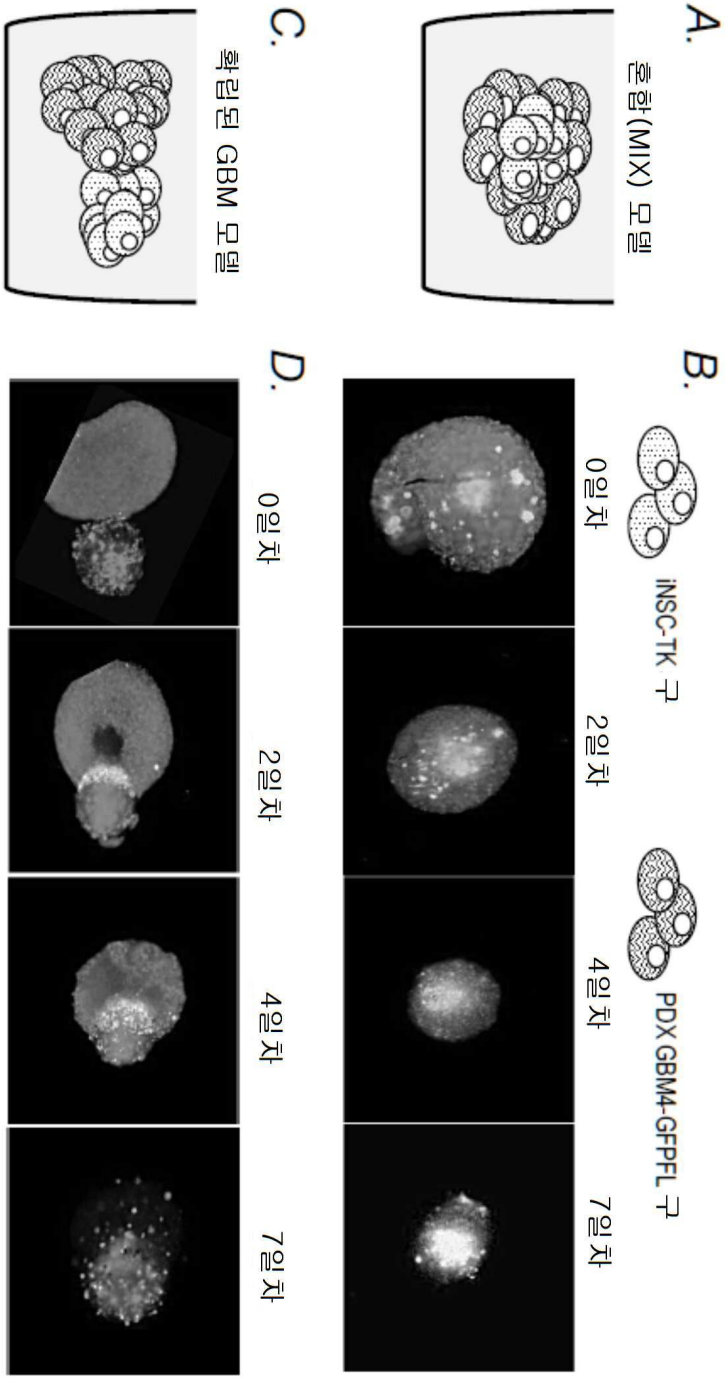
도면4a


A.
단일층
h-iNSC-sTR
B.
신경구
h-iNSC-sTR
C.
BLI
FLUOR.
LIGHT
대조군
iNSC-sTR:GBM
1:2
1:1
GBM 세포 생존력
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
대조군
1:2
1:1
iNSC-sTR:GBM RATIO
D.
GBM 세포와 혼합된
iNSC 치료제
iNSC-sTR
U87-mCHERRY-FLUC
E.
iNSCGFP
iNSCsTR
0일차
3일차
5일차
10일차
14일차
20일차

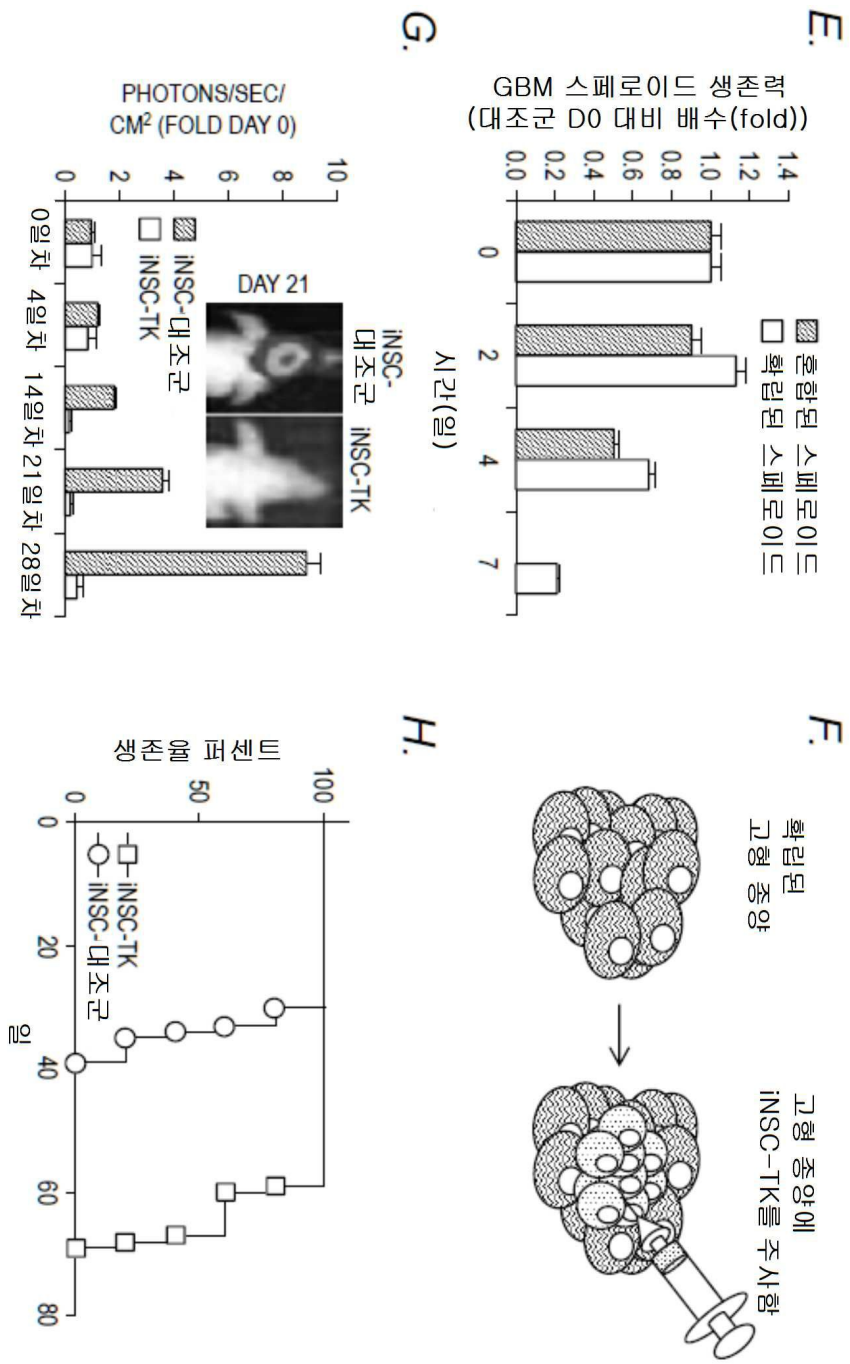
도면4b


F.
GBM 부피
(PHOTONS/SEC/CM2; FOLD DAY 0)
600
500
400
300
200
100
0
iNSC-대조군
iNSC-sTR
0 3 5 7 10 12 14 17 20 24
시간(일)
G.
생존율 퍼센트
100
50
0
iNSC-sTR
iNSC-대조군
0 20 40 60
일
H.
세포독성 iNSC
분화
다능성
GFP
NESTIN
GFP/NESTIN
TRAIL
GFP/TRAIL
TUJ-1
GFP/TUJ-1
GFAP
GFP/GFAP
OCT-4
GFP/OCT-4
TRA-160
GFP/TRA-160

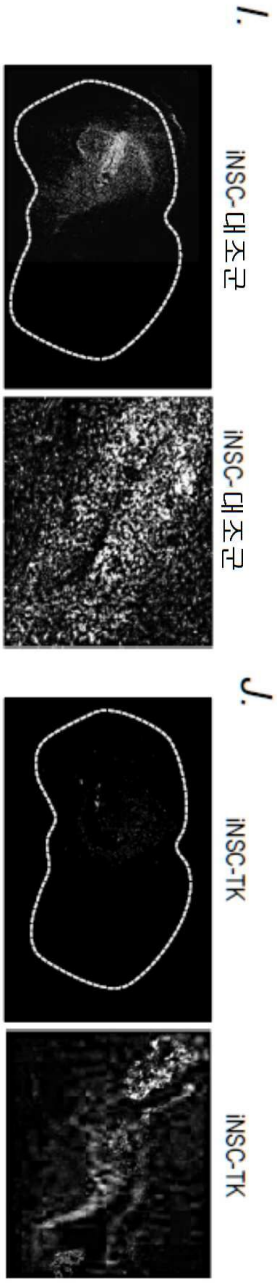
도면5a


A.
혼합(MIX) 모델
B.
iNSC-TK 구
PDX GBM4-GFPFL 구
0일차
2일차
4일차
7일차
C.
확립된 GBM 모델
D.
0일차
2일차
4일차
7일차

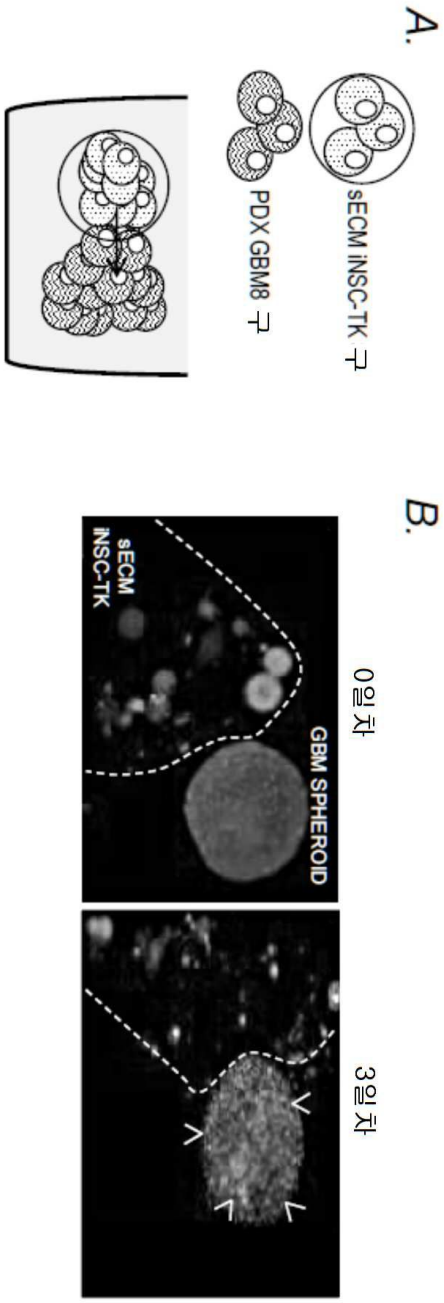
도면5b


E.
GBM 스페로이드 생존력
(대조군 D0 대비 배수(fold))
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
0
2
4
7
시간(일)
혼합된 스페로이드
확립된 스페로이드
G.
PHOTONS/SEC/
CM2 (FOLD DAY 0)
0
2
4
6
8
10
0일차
4일차
14일차
21일차
28일차
iNSC-대조군
iNSC-TK
DAY 21
iNSC-
대조군
iNSC-TK
F.
확립된
고형 종양
고형 종양에
iNSC-TK를 주사함
H.
생존율 퍼센트
0
50
100
0
20
40
60
80
일
iNSC-TK
iNSC-대조군

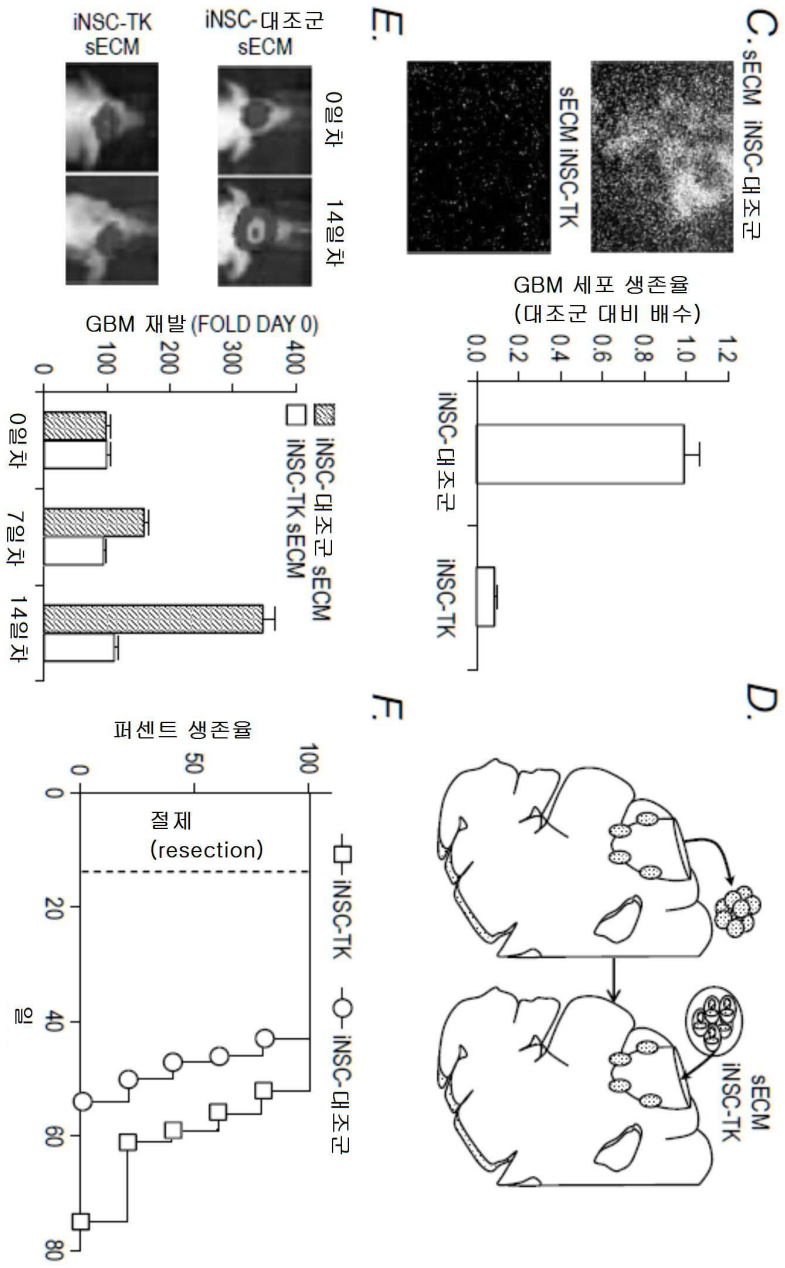
도면5c



도면6a



도면6b


C.
sECM iNSC-대조군
sECM iNSC-TK
GBM 세포 생존율
(대조군 대비 배수)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
iNSC-대조군
iNSC-TK
D.
sECM
iNSC-TK
E.
iNSC-TK
sECM
iNSC-대조군
sECM
0일차
14일차
GBM 재발 (FOLD DAY 0)
0
100
200
300
400
iNSC-대조군 sECM
iNSC-TK sECM
0일차
7일차
14일차
F.
퍼센트 생존율
0
50
100
절제
(resection)
iNSC-TK
iNSC-대조군
일
0
20
40
60
80