



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0140532
(43) 공개일자 2022년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/343 (2006.01) A61K 31/55 (2006.01)
A61K 35/34 (2015.01) A61P 9/06 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/343 (2013.01)
A61K 31/55 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7029054
(22) 출원일자(국제) 2021년02월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년08월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/017220
(87) 국제공개번호 WO 2021/163037
국제공개일자 2021년08월19일
(30) 우선권주장
62/972,330 2020년02월10일 미국(US)

(71) 출원인
유니버시티 오브 워싱턴
미국 98105-4721 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트 웨이 노쓰이스트 4545
벤더르빌트 유니버시티
미국, 테네시 37240, 내쉬빌, 웨스트 엔드 애비뉴 2201, 커클랜드 홀 305
(72) 발명자
크놀만 비온
미국 테네시 37240 내쉬빌 커클랜드 홀 305 웨스트 엔드 애비뉴 2201 벤더르빌트 유니버시티 내
티에스 로버트 스콧
미국 98105 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트 웨이 노쓰이스트 4545 유니버시티 오브 워싱턴 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
문두현

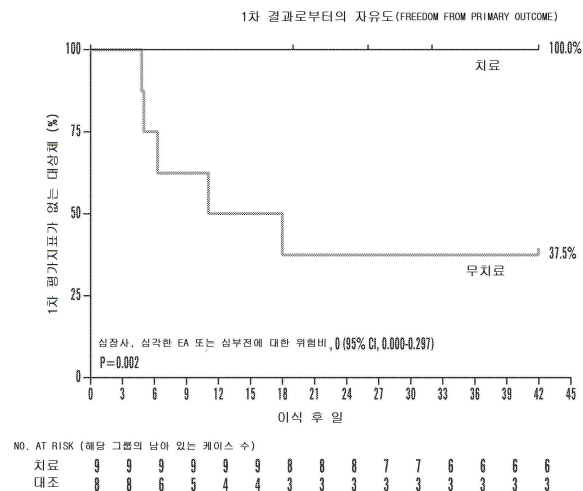
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 이식 부정맥의 치료 및 예방 방법

(57) 요약

유효량의 아미오다론 및 이바브라딘으로 이식 부정맥을 치료 및 예방하는 것과 관련된 방법 및 조성물이 본 명세서에 기재되어 있다. 또한 본원에는 심근세포 이식 방법이 기재되어 있으며, 이 방법은 시험관내 분화된 심근세포를 이를 필요로 하는 대상체의 심장 조직에 투여하는 단계; 및 상기 대상체의 이식 부정맥을 감소시키는 유효량의 아미오다론 및 유효량의 이바브라딘을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/34 (2013.01)

A61P 9/06 (2018.01)

C12N 5/0657 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

C12N 2506/02 (2013.01)

(72) 발명자

맥켈란 윌리엄 룽

미국 98105 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트
웨이 노쓰이스트 4545 유니버시티 오브 워싱턴 내

나카무라 겐타

미국 98105 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트
웨이 노쓰이스트 4545 유니버시티 오브 워싱턴 내

머리 찰스 이.

미국 98105 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트
웨이 노쓰이스트 4545 유니버시티 오브 워싱턴 내

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에게 유효량의 아미오다론(amiodarone) 및 유효량의 이바브라딘(ivabradine)을 투여하는 것을 포함하는, 심근세포의 심장 이식편의 수용 대상체에서 이식 부정맥(engraftment arrhythmia)을 치료 또는 개선하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 심근세포의 심장 이식편이 시험관내 분화된 심근세포를 포함하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 시험관내 분화된 심근세포가 유도만능줄기(iPS)세포 또는 배아 줄기(ES)세포로부터 분화되는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 심근세포의 심장 이식편이 대상체의 자기 유래의 줄기세포로부터 유래하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 심근세포의 심장 이식편이 대상체와 동종이계의 줄기세포로부터 유래하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘이 심근세포의 심장 이식편과 동시에 투여되는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론의 투여가 심근세포의 심장 이식편의 투여 전에 개시되는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘의 투여가 심근세포의 심장 이식편의 투여 전에 개시되는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘 둘 모두의 투여가 심근세포의 심장 이식편의 투여 전에 개시되는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘의 투여가 심근세포의 심장 이식편의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시되는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론의 투여가 심근세포의 심장 이식편의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시되는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론의 투여가 단일 일시 투여(single bolus administration)인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 연속적 또는 반복적 투여인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 경구 투여 및/또는 정맥내 주사인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론이, 1일 3회, 100~800 mg의 용량으로 경구 투여되는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론이 100~300 mg의 용량으로 정맥내 일시(IV bolus) 투여되는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론이 1.5~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈청 농도로 투여되는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘이, 1일 2회, 5~15 mg의 용량으로 경구 투여되는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘이, 빈맥(tachycardia)이 있을 때 투여되는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘이 150 비트/분(bpm) 이하의 안정시 심박수를 유지하도록 투여되는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여 없이 동일한 유형의 세포의 이식편을 받은 대상체에 비해, 이식편 수용자가 경험하는 이식후 가속 심박수(post-graft accelerated heart rate)를 적어도 10% 감소시키는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여 없이 동일한 유형의 심근세포의 심장 이식편을 받은 대상체에 비해, 대상체가 이식 부정맥을 경험하는 시간의 비율을 적어도 10% 감소시키는 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가 단기인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가 부정맥의 재발 없이 이식 부정맥 부담이 0에 도달한 후 종료되는 방법.

청구항 25

다음을 포함하는 심근세포 이식 방법:

- a) 시험관내 분화된 심근세포를 이를 필요로 하는 대상체의 심장 조직에 투여하는 단계;
- b) 상기 대상체의 이식 부정맥을 감소시키는 아미오다론의 유효량 및 이바브라딘의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계.

청구항 26

제25항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘을 투여받지 않고 시험관내 분화된 심근세포를 투여받은 대상체에 비해 대상체에서 이식 부정맥이 감소되는 방법.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 시험관내 분화된 심근세포가 배아줄기세포 또는 iPS세포로부터 시험관내 분화된 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, iPS세포가 대상체 자기 유래인 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, iPS세포가 대상체에 대해 동종이계인(allogeneic) 방법.

청구항 30

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘이 시험관내 분화된 심근세포와 동시에 투여되는 방법.

청구항 31

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론의 투여가 시험관내 분화된 심근세포의 투여 전에 개시되는 방법.

청구항 32

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘의 투여가 시험관내 분화된 심근세포의 투여 전에 개시되는 방법.

청구항 33

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘 둘 모두의 투여가 시험관내 분화된 심근세포의 투여 전에 개시되는 방법.

청구항 34

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘의 투여가 시험관내 분화된 심근세포의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시되는 방법.

청구항 35

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론의 투여가 시험관내 분화된 심근세포의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시되는 방법.

청구항 36

제25항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘의 투여가 단일 일시 투여인 방법.

청구항 37

제25항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 연속적 또는 반복적 투여인 방법.

청구항 38

제25항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 경구 투여 및/또는 정맥내(IV) 주사인 방법.

청구항 39

제25항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론이, 1일 3회, 100~800 mg의 용량으로 경구 투여되는 방법.

청구항 40

제25항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론이 100~300 mg의 용량으로 정맥내 일시(IV bolus) 투여되는 방법.

청구항 41

제25항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론이 1.5~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈청 농도로 투여되는 방법.

청구항 42

제25항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘이, 1일 2회, 5~15 mg의 용량으로 경구 투여되는 방법.

청구항 43

제25항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘이, 빈맥이 있을 때 투여되는 방법.

청구항 44

제25항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 이바브라딘이 150 비트/분 (bpm) 이하의 안정시 심박수를 유지하도록 투여되는 방법.

청구항 45

제25항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가 단기(short-term)인 방법.

청구항 46

제25항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가 부정맥의 재발 없이 이식 부정맥 부담이 0에 도달한 후 종료되는 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 약 1천만 개의 심근세포~약 100억 개의 심근세포가 대상체에게 투여되는 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 심혈관 질환 또는 심장 사건(cardiac event)을 갖거나 가질 위험이 있는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 심혈관 질환 또는 심장 사건이 죽상경화성 심장 질환(atherosclerotic heart disease), 심근경색증(myocardial infarction), 심근병증(cardiomyopathy), 심장 부정맥(cardiac arrhythmia), 판막 협착증(valvular stenosis), 선천성 심장 질환(congenital heart disease), 만성 심부전(chronic heart failure), 역류(regurgitation), 허혈(ischemia), 세동(fibrillation), 및 다형성 심실 빈맥(polymorphic ventricular tachycardia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 51

시험관내 분화된 심근세포, 아미오다론 및 이바브라딘을 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] [관련 출원에 대한 상호 참조]

[0002] 본원은 2020년 2월 10일에 출원된 미국 가출원 제62/972,330호의 35 U.S.C. § 119(e)에 따른 이익을 주장하며, 그 내용은 전부 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0003] [기술분야]

[0004] 본 명세서에 설명된 기술은 심혈관 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 심혈관 질환은 여전히 전 세계 남성과 여성 모두의 주요 사망 원인이며, 개발도상국에 미치는 영향이 빠르게 증가하고 있다. 심근세포 대체 요법은 심혈관 질환 치료를 위해 활발히 연구되고 있는 분야로, 심근경색 후 심장 기능을 회복시킬 수 있다. 시험관 내에서 배양된 인간줄기세포는 손상된 심장에의 이식을 위해 인간 심근세포를 생성하기 위한 출발 물질로 작용할 수 있다. 그러나, 심장 이식과 관련된 합병증이 있으며, 그 중 하나는 시험관 내 분화된 심근세포의 성숙도가 부족하여 일시적인 심장 부정맥이 발생할 수 있다는 것이다. 심근세포 대체 요법 후 환자의 결과를 개선하기 위해서는 심장 이식편으로 인한 부정맥을 예방 및 치료하는 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0006] 본 명세서에 설명된 방법은, 부분적으로, 아미오다론(amiodarone)과 이바브라딘(ivabradine) 치료의 조합이 심장 이식편을 받는 대상체에서 생존률을 개선하고 부정맥 부담을 감소시킨다는 발견과 관련이 있다. 본 명세서에 설명된 방법은 일시적인 이식편 관련 부정맥을 감소시키고 두 항부정맥제로 치료받은 대상체의 안전성 및 생존률을 유의하게 개선시킨다.

[0007] 일 양태에서, 본원은 심근세포의 심장 이식편의 수용 대상체에서 이식 부정맥을 치료 또는 개선하는 방법으로서, 대상체에게 유효량의 아미오다론 및 유효량의 이바브라딘을 투여하는 것을 포함하는 방법을 기재한다.

[0008] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 한 실시형태에서, 심근세포의 심장 이식편은 시험관내(*in vitro*) 분화된 심근세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 시험관내 분화된 심근세포는 유도만능줄기(iPS)세포 또는 배아줄기(ES)세포로부터 분화된다.

[0009] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 심근세포의 심장 이식편은 대상체의 자기 유래의 줄기세포로부터 유래한다.

[0010] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 심근세포의 심장 이식편은 대상체와 동종이계의 줄기세포로부터 유래한다.

[0011] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘은 심근세포의 심장 이식편과 동시에 투여된다.

[0012] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론의 투여는 심근세포 이식편의 투여 전에 개시된다. 한 실시형태에서, 투여는 예를 들어 이식 1일 전, 2일 전, 3일 전, 4일 전, 5일 전, 6일 전, 또는 7일 또는 그 이상 전일 수 있다.

[0013] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘의 투여는 심근세포 이식편의 투여 전에 개시된다. 한 실시형태에서, 투여는 예를 들어 이식 1일 전, 2일 전, 3일 전, 4일 전, 5일 전, 6일 전, 또는 7일 또는 그 이상 전일 수 있다.

[0014] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘 둘 모두의 투여는 심근세포의

심장 이식편의 투여 전에 개시된다. 한 실시형태에서, 투여는 예를 들어 이식 1일 전, 2일 전, 3일 전, 4일 전, 5일 전, 6일 전, 또는 7일 또는 그 이상 전일 수 있다. 다른 실시형태에서, 아미오다론은 이바브라딘보다 더 빨리, 예를 들어, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일 또는 6일 더 빨리 투여될 수 있다.

- [0015] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘의 투여는 심근세포의 심장 이식편의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시된다.
- [0016] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론의 투여는 심근세포의 심장 이식편의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시된다.
- [0017] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론의 투여는 단일 일시 투여이다.
- [0018] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 투여는 연속적 또는 반복적 투여이다.
- [0019] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 투여는 경구 투여 및/또는 정맥내 주사이다.
- [0020] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론은, 1일 3회, 100~800 mg의 용량으로 경구 투여된다.
- [0021] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론은 100~300 mg의 용량으로 정맥내 일시 투여된다.
- [0022] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론은 1.5~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈청 농도로 투여된다.
- [0023] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘은, 1일 2회, 5~15 mg의 용량으로 경구 투여된다.
- [0024] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘은 빈맥이 있을 때 투여된다.
- [0025] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘은 150 비트/분 (bpm) 이하의 안정시 심박수를 유지하도록 투여된다. 다른 실시형태에서, 이바브라딘은 60~150 bpm, 예를 들어, 60~140 bpm, 60~130 bpm, 60~120 bpm, 60~110 bpm, 60~100 bpm, 60~90 bpm 또는 60~80 bpm의 안정시 심박수(resting heart rate)를 유지하도록 투여된다.
- [0026] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여는, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여 없이 동일한 유형의 세포의 이식편을 받은 대상체에 비해, 이식편 수용자가 경험하는 이식후 가속 심박수를 적어도 10% 감소시킨다.
- [0027] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여는, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여 없이 동일한 유형의 심근세포의 이식편을 받은 대상체에 비해, 대상체가 이식 부정맥을 경험하는 시간의 비율을 적어도 10% 감소시킨다. 다른 구체예에서, 대상체가 이식 부정맥을 경험하는 시간의 비율은 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 그 이상 감소된다.
- [0028] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 심근세포 이식 방법은 a) 시험관내 분화된 심근세포를 이를 필요로 하는 대상체의 심장 조직에 투여하는 단계; 및 b) 상기 대상체의 이식 부정맥을 감소시키는 유효량의 아미오다론 및 유효량의 이바브라딘을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0029] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 한 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘을 투여받지 않고 시험관내 분화된 심근세포를 투여받은 대상체에 비해 대상체에서 이식 부정맥이 감소된다.
- [0030] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 시험관내 분화된 심근세포는 배아줄기세포 또는 iPS세포로부터 시험관내 분화된 것이다.
- [0031] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, iPS세포는 대상체 자기 유래이다.
- [0032] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, iPS세포는 대상체에 대해 동종이계이다.
- [0033] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘은 시험관내 분화된 심근세포와 동시에 투여된다.
- [0034] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론의 투여는 시험관내 분화된 심근세포의 투여

전에 개시된다.

- [0035] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘의 투여는 시험관내 분화된 심근세포의 투여 전에 개시된다.
- [0036] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘 둘 모두의 투여는 시험관내 분화된 심근세포의 투여 전에 개시된다.
- [0037] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘의 투여는 시험관내 분화된 심근세포의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시된다.
- [0038] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론의 투여는 시험관내 분화된 심근세포의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시된다.
- [0039] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘의 투여는 단일 일시 투여이다.
- [0040] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 투여는 연속적 또는 반복적 투여이다.
- [0041] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여는 단기이다.
- [0042] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여는 부정맥의 재발 없이 이식 부정맥 부담이 0에 도달한 후 종료된다.
- [0043] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 투여는 경구 투여 및/또는 정맥내(IV) 주사이다.
- [0044] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론은, 1일 3회, 100~800 mg의 용량으로 경구 투여된다.
- [0045] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론은 100~300 mg의 용량으로 정맥내 일시 투여된다.
- [0046] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 아미오다론은 1.5~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈청 농도로 투여된다.
- [0047] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘은, 1일 2회, 5~15 mg의 용량으로 경구 투여된다.
- [0048] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘은 빈맥이 있을 때 투여된다.
- [0049] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 이바브라딘은 150 비트/분 (bpm) 이하의 안정시 심박수를 유지하도록 투여된다.
- [0050] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 약 1천만 개의 심근세포~약 100억 개의 심근세포가 대상체에게 투여된다.
- [0051] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 대상체는 인간이다.
- [0052] 이 양태 또는 임의의 다른 양태의 다른 실시형태에서, 대상체는 심혈관 질환 또는 심장 사건을 갖거나 가질 위험이 있다. 다른 실시형태에서, 심혈관 질환 또는 심장 사건은 죽상경화성 심장 질환, 심근경색증, 심근병증, 심장 부정맥, 판막 협착증, 선천성 심장 질환, 만성 심부전, 역류, 허혈, 세동 및 다형성 심실 빈맥으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0053] 또 다른 양태에서, 시험관내 분화된 심근세포, 아미오다론 및 이바브라딘을 포함하는 조성물이 본원에 기재된다.

도면의 간단한 설명

- [0054] **도 1A-1B**는 아미오다론 및 이바브라딘 요법이 심장 이식편을 받은 무치료 돼지와 비교하여 심장 이식편을 받은 돼지에서 심박수 및 부정맥 부담을 감소시킨다는 것을 입증한다. **도 1A**는 이식 요법 과정(일)에서 무치료 돼지(흰색 원, 항부정맥제 없음, $n = 6$)와 비교하여 아미오다론/이바브라딘 치료(검은색 사각형, 아미오다론 $\pm$ 이바브라딘, $n = 6$)를 받은 돼지의 평균 심박수를 나타낸다. **도 1B**는 이식 요법 과정(일)에서 무치료 돼지(흰색 원, 항부정맥제 없음, $n = 6$)와 비교하여 아미오다론/이바브라딘 치료(검은색 사각형, 아미오다론 $\pm$ 이바브라딘, $n = 6$)를 받은 돼지에 대해 관찰된 부정맥의 평균 백분율 시간을 나타낸다.

도 2는 심장 이식편에 의한 치료 돼지(검정색 실선, 아미오다론 ± 이바브라딘, n = 6) 및 무치료 돼지(점선, 항부정맥제 없음, n = 6)에서 심장 생존의 백분율을 나타낸다.

도 3~14는 아미오다론/이바브라딘 치료의 존재 및 부재 하에 심장 이식편을 받은 각각의 개별 돼지에 대한 심박수 및 부정맥 %를 나타낸다. 비트/분으로 보고되는 심박수(heart rate)는 도면의 좌측 종축에 회색으로 표시된다. 정상 굴 리듬(normal sinus rhythm)과 비교하여 부정맥의 시간 백분율로 보고되는 부정맥 부담은 우측 종축에 검은색 원으로 표시된다.

항부정맥제로 치료받은 돼지를 **도 3~8**에 나타낸다. 아미오다론 치료는 각 그래프 상단에 검은색 막대로 표시되고, 이바브라딘 치료는 체크 막대로 표시된다.

심장 이식편을 받았지만 항부정맥 치료를 받지 않은 돼지는 **도 9~14**에 나타나 있다.

도 15는 돼지(pig)(swine) 및 인간에 대한 항부정맥 요법 용량의 실시형태를 나타낸다. BID: 1일 2회; PO: 경구 투여.

도 16은 연구 설계의 흐름도를 나타낸다. 1상(phase 1)은 총 아홉의 대상체로 구성되었으며, 넷은 이식 부정맥(EA: engraftment arrhythmia)의 자연 이력을 연구하는 데 사용되었고 다섯은 7개의 후보 항부정맥제를 스크리닝하는 데 사용되었다. 아미오다론과 이바브라딘은 유망한 효과 징후가 있는 것으로 밝혀졌으며 추가 연구를 위해 진행되었다. 2상은 총 열아홉의 대상체로 구성되었으며, 아홉은 아미오다론 및 이바브라딘에 의한 치료, 여덟은 무치료, 둘은 가짜 이식(sham transplant) 및 항부정맥제 치료를 받지 않은 경색증에 배정되었다.

도 17는 만성(chronic) 아미오다론 및 부가적(adjunctive) 이바브라딘 요법의 2상 약물 시험에 대한 연구 타임라인을 나타낸다. 심근경색증(MI: Myocardial infarction)은 인간배아줄기세포 유래 심근세포 이식(0일차) 2주 전에 중좌 전하행 동맥(mid-left anterior descending artery)의 90분 풍선 폐색(balloon occlusion)에 의해 유도되었다. 모든 대상체는 다중 약물 면역 억제를 받았다. 치료 코호트는 경구 아미오다론과 부가적 경구 이바브라딘의 조합에 의해 속도(rate)와 리듬(rhythm)의 조절을 받았다.

도 18은 돼지의 혈장 아미오다론 수준을 나타낸다. 아미오다론 수준은 액체 크로마토그래피-질량 분석 시험에 의해 혈장에서 측정되었다. 6마리의 돼지에서 만성 경구 아미오다론은 전기 성숙(electrical maturation) 및 이식 부정맥의 안정화를 달성한 후 중단되었다. 아미오다론의 혈청 농도는 중단 후 3-4주를 포함하여 매주 분석되었다.

도 19는 한 마리의 돼지에 있어서의 이식 부정맥(EA)의 다양한 형태를 나타낸다. 정상 굴 리듬(NSR: normal sinus rhythm)의 예와 가속 접합 리듬(AJR: accelerated junctional rhythm), 심실 빈맥(VT: ventricular tachycardia) 및 가속 심실 고유 리듬(AIVR: accelerated idioventricular rhythm)을 담은 EA의 세 가지 형태가 이 한마리의 돼지에서 관찰된다(대상체 12). 속도(rate), 전기 축(electrical axis) 및 QRS 지속 시간의 변화에 유의. 연속 리듬 기록은 EA를 유도하는 호스트 전도 시스템의 다양한 수준에서 상호 작용하는 hESC-CM 이식편으로부터의 임펄스 생성의 동시 다발(multiple foci)을 나타낸다. 수술 가짜 대조군(surgical sham control)에서는 지속성 부정맥이 관찰되지 않았다.

도 20은 hESC-CM 이식편 조직학 및 위치를 나타낸다. 왼쪽 패널: 콜라겐(경색)을 식별하기 위해 피크로시리우스 레드(picrosirius red)로 염색하고 생존 가능한 심근을 식별하기 위해 패스트 그린(fast green)으로 염색한 조직학적 섹션. 인간 cTnT로 표지된 인접 섹션은, 염색되지 않은 돼지 심근 및 흉터 조직 내에서 이식된 hESC-CM 이식편을 식별한다. 이식 후 42일차에 치료 및 무치료 섹션 모두를 얻었다. 오른쪽 패널: 이식된 hESC-CM 이식편은 치료(단한 사각형)와 무치료(열린 원) 간에 유사하게 위치되었으며 전벽(anterior wall)의 경색 및 경색 주변 영역을 성공적으로 표적화했다.

도 21A-21B는 이식 부정맥에 대한 아미오다론 및 이바브라딘의 급성 효과를 입증한다. 아미오다론은 이식 부정맥을 정상 굴(normal sinus) 또는 더 낮은 심박수로 심장율동전환하기(cardiovert) 위한 정맥내 일시 투여로서 효과적이었다(**도 21A**). 경구 투여된 이바브라딘은 EA를 유의하게 느리게 했지만 심장율동전환하지는 않았다(**도 21B**). 이러한 데이터는 EA의 리듬 및 속도 조절을 위한 아미오다론 및 이바브라딘 조합 항부정맥 전략을 뒷받침한다.

도 22A-22B는 돼지의 이식 부정맥에 대한 아미오다론 및 이바브라딘을 사용한 항부정맥 치료를 나타낸다. (**도 22A**) 심장사, 불안정한 EA 또는 심부전의 1차 결과로부터의 자유도에 대한 카플란-마이어 곡선(Kaplan-Meier curve)은, 무치료와 비교하여 치료에 의해 유의하게 개선되었다(p=0.002). 치료 라인의 틱 마크(tic mark)는,

기회 감염(19일차 및 26일차) 또는 계획된 안락사(30일차)로 인한 비심장사를 나타낸다. (도 22B) 전체 생존에 대한 카플란-마이어 곡선은, 무치료와 비교하여 치료에 의한 통계적으로 경계선의 개선을 나타낸다($p=0.051$). *주폐포자충 폐렴으로 인한 사망. **돼지 거대세포바이러스로 인한 사망. 약어: CI, 95% 신뢰 구간.

도 23A-23F는 심박수 및 부정맥 부담에 대한 항부정맥 치료의 효과를 입증한다. 1일 평균 심박수의 모음(도 23A) 및 1일 평균 부정맥 부담의 모음(도 23B), 무치료(회색)에 비교하여 치료(검은색). 이식 후 30일차에는 치료와 무치료 간에 심박수 또는 부정맥 부담의 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 가짜 이식(밝은 회색)은 빈맥이나 부정맥을 유발하지 않았다. 항부정맥 치료(검은색), 무치료(밝은 회색) 및 가짜 이식(회색)에 대한 대상체 수준의 평균 일일 심박수(도 23C) 및 부정맥 부담(도 23D). 검은색 기호로 표시된 예기치 않은 죽음 또는 안락사. 피크 심박수(도 23E) 및 피크 부정맥 부담(도 23F)은 무치료(밝은 회색)에 비해 치료(검정색)에 의해 유의하게 감소하였다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

도 24A-24B는 이식된 hESC-CM 이식편이 돼지 심근에서 분산 푸르키네 전도계(diffuse Purkinje conduction system)와 상호작용함을 나타낸다. 푸르키네 섬유는 천연 돼지 심근 전체에 망상 네트워크로 분포되어 있다(도 24A). 좌심실 자유벽의 횡단면에 있는 심내막하 및 심근내 코넥신 40(Cx40)+ 푸르키네 섬유(PF, 흰색), 스케일 바 2mm. 심근 내 PF는 더 고배율의 삽입도로 나타낸다. 흰색 상자 영역의 더 확대된 뷰는, Cx40이, 주변 심근 세포와 대조적으로 더 낮은 근절 함량(sarcomere content)(F-액틴)(i.) 및 T-세관(T-Tubules) 부족(WGA)(ii.)을 나타내는 푸르키네 세포의 겹 접합부에 국재함을 보여줌, 스케일 바 20 μm . 인간 특이적 느린 골격 심장 트로포닌 I(ssTnI)로 표시된 hPSC-심근세포 이식편은 Cx40+(백색) PF와 상호작용한다(도 24B). 박스 영역의 고배율은, 푸르키네-전환 세포 이식편(즉, 흰색 화살촉) 및 직접 푸르키네-이식편(ii., 흰색 화살표) 상호 작용의 예를 보여줌, 스케일 바 500 μm (상단) 또는 50 μm (하단).

도 25는 코넥신 40이 푸르키네 섬유를 특이적으로 염색함을 입증한다. 코넥신 40(Cx40)은 푸르키네 섬유(PF)를 표지하고(mark), 주변 심근세포와 대조적으로 더 낮은 근절 함량(F-액틴) 및 T-세관(WGA)이 부족한 PF의 겹 접합부에 국재함, 스케일 바 20 μm .

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 심혈관 질환 치료를 위한 심장 세포 대체 요법의 주요 과제 중 하나는, 인간줄기세포 유래 심근세포(ES 및 iPS 심근세포)가 본래의 심장 조직과 완전히 통합할 수 있는 기능적 성숙이 부족하다는 것이다. 그 결과, 시험관 내 분화된 심근세포가 이식된 직후 이식편 유도 부정맥이 나타나며, 이 기간 동안 수용자는 돌연 심장사 및 심부전의 위험이 있다. 몇 주 후, 이식 절차에서 살아남은 대상체는 이식된 심근세포의 생체내 성숙을 반영하는 정상 굴 리듬으로의 복귀가 관찰된다. 이를 위해서는, 부정맥을 방지하고 심장 이식 후 생존율을 향상시키기 위해 호스트 심근과의 충분한 전기적 통합이 필요하다.
- [0056] 본원에 기재된 방법은, 부분적으로, 아미오다론 및 이바브라딘 치료의 조합이 심장 이식편을 받는 대상체에서 생존율을 개선하고 빈맥을 예방하며 부정맥 부담을 감소시킨다는 발견과 관련이 있다. 본 명세서에 설명된 방법은 일시적인 이식편 관련 부정맥을 감소시키고 항부정맥제로 치료받은 대상체의 안전성 및 생존율을 상당히 개선시킨다.
- [0057] 정의:
- [0058] 편의상, 명세서, 실시예 및 특허청구범위에 사용된 일부 용어 및 구문의 의미를 아래에 제공한다. 달리 명시되지 않거나 문맥에서 암시되지 않는 한, 다음 용어 및 구문에는 아래 제공된 의미가 포함된다. 정의는 특정 실시형태를 설명하는 데 도움을 주기 위해 제공되며, 기술의 범위는 청구범위에 의해서만 제한되므로, 본 정의는 청구된 기술을 제한하도록 의도되지 않는다. 달리 정의되지 않는 한, 여기에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 이 기술이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 해당 기술 분야의 용어 사용과 여기에 제공된 정의 사이에 명백한 불일치가 있는 경우, 명세서 내에서 제공된 정의가 우선한다.
- [0059] 세포 및 분자 생물학, 그리고 생화학에서의 일반적인 용어의 정의는 Merck Sharp & Dohme Corp.에서 발행한 The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, 2011(ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 발행: Blackwell Science Ltd., 1999-2012(ISBN 9783527600908); 및 Robert A. Meyers(ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 발행: VCH Publishers, Inc., 1995(ISBN 1-56081-569-8); Elsevier에서 출판한 Werner Luttmann의 Immunology, 2006년; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey

Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); 2014년 Jones & Bartlett Publishers에서 발행한 Lewin's Genes XI(ISBN-1449659055); Michael Richard Green 및 Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA(2012)(ISBN 1936113414); Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA(2012)(ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch(ed.) Elsevier, 2013(ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; 및 Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737)에서 찾을 수 있고, 그 내용은 모두 전적으로 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0060] 본 명세서에 언급된 심장 장애, 심장 질환, 사건 또는 심장 손상(예: 심근경색증)의 "치료"란, 심장 기능의 향상, 이식 부정맥의 감소, 및/또는 심근세포 이식(engraftment)의 향상 및/또는 심근 이식(transplant) 또는 치료 받은 영역에서 이식편 혈관화(graft vascularization)의 향상에 의해, 예를 들어 심장의 기능을 개선하기 위한, 치료적 개입을 의미한다. 즉, 심장의 "치료"는 심장의 기능(예를 들어, 경색 영역 내에서 향상된 기능), 및/또는 본원에 기재된 조성물로 치료되는 다른 부위의 기능을 지향한다. 예를 들어, 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90%, 100% 또는 그 이상, 적절한 대조군에 비해 예를 들어 2배, 5배, 10배 또는 그 이상, 최대 기능까지 그리고 최대 기능을 포함하도록, 감소된 심박수 및 부정맥 빈도를 측정함으로써 평가되는 바와 같은, 심장의 기능을 개선하는 치료적 접근은, 효과적인 치료로 간주된다. 효과적인 치료가 효과적인 치료로 간주되기 위해 심장 질환 또는 장애의 근본 원인을 치료하거나 직접적인 영향을 미칠 필요는 없다.

[0061] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "단기(short term)"라는 용어는 이식 부정맥에 대한 아미오다론 및 이바브라딘 치료에 적용될 때, 이식 부정맥이 계속 발생하는 동안만의 치료를 의미한다. 이러한 약물 조합에 의한 치료는, 이식 부정맥 부담을 감소시키고, 부정맥의 재발 없이 이식 부정맥이 해소된 후 안전하게 철회될 수 있음이 입증되었다. 따라서, 정확한 시기는 대상체에 따라 다를 수 있지만, 일부 실시형태에서 단기 치료는 이식 후 수주(예를 들어, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 14주, 15주, 16주 또는 그 이하)~수개월(예를 들어, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월 또는 그 이하) 정도일 것이다.

[0062] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 질환, 장애 또는 이의 증상과 관련하여 사용될 때 "예방" 또는 "예방하는"은, 개체가 질환 또는 장애, 일 예이지만, 심근경색증 후 심부전으로 발전할 가능성의 감소를 가리킨다. 예를 들어, 질환 또는 장애에 대한 하나 이상의 위험 인자를 가진 개체가, 장애를 발병하지 않거나, 동일한 위험 인자를 갖고 여기에 설명된 치료를 받지 않는 집단에 비해, 통계적으로 말하여, 더 나중에 또는 덜 심각하게 발병하는 경우, 질환 또는 장애가 발병할 가능성은 감소한다. 질환의 증상이 나타나지 않거나 증상 발달의 감소(예: 해당 질환 또는 장애에 대해 임상적으로 허용되는 척도에서 10% 이상) 또는 지연(예: 수일, 수주, 수개월 또는 수년)은 효과적인 예방으로 간주된다.

[0063] 용어 "환자(patient)", "대상체(subject)" 및 "개체(individual)"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 예방적 치료를 비롯한 치료가 제공되는 동물, 특히 인간을 가리킨다. 본 명세서에 사용된 용어 "대상체"는 인간 및 비인간 동물을 가리킨다. "비인간 동물" 및 "비인간 포유동물"이라는 용어는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물, 예를 들어 비인간 영장류(특히 고등 영장류), 양, 개, 설치류(예: 마우스 또는 랫트), 기니피그, 염소, 돼지, 고양이, 토끼, 소, 및 비포유동물, 예를 들어 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다. 임의의 양태의 한 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 임의의 양태의 다른 실시형태에서, 대상체는 실험 동물 또는 질환 모델로서의 동물 대체물이다. 임의의 양태의 다른 실시형태에서, 대상체는 반려 동물(예를 들어, 개, 고양이, 랫트, 돼지, 기니피그, 햄스터 등)을 포함하는 가축이다. 대상체는 심혈관 질환 또는 심장 사건에 대한 치료를 이전에 받았을 수 있고 심혈관 질환 또는 심장 사건에 대한 치료를 받은 적이 없을 수도 있다. 대상체는 이전에 심혈관 질환이 있는 것으로 진단받았을 수 있고 심혈관 질환으로 진단된 적이 없을 수도 있다.

[0064] 본원에 사용된 용어 "인간줄기세포(human stem cell)"는 자기 재생(self-renew) 및 적어도 하나의 세포 유형으로 분화할 수 있는 인간세포를 가리킨다. "인간줄기세포"라는 용어는 인간줄기세포주(human stem cell line), 인간유래유도만능줄기세포(human-derived induced pluripotent stem (iPS) cell), 인간배아줄기세포(human embryonic stem cell), 인간만능세포(human pluripotent cell), 인간다능줄기세포(human multipotent stem

cell), 양수줄기세포(amniotic stem cell), 태반줄기세포(placental stem cell) 또는 인간성체줄기세포(human adult stem cell)를 포함한다.

- [0065] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "시험관내 분화된 심근세포(*in vitro*-differentiated cardiomyocyte)"는 전형적으로 인간배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 초기 중배엽 세포(early mesoderm cell), 측판 중배엽 세포(lateral plate mesoderm cell) 또는 심장전구세포(cardiac progenitor cell)와 같은 전구체 세포로부터의 단계적 분화를 통해 배양에서 생성된 심근세포를 가리킨다.
- [0066] 본원에 사용된 용어 "항-부정맥(anti-arrhythmic)" 또는 "항-부정맥제(anti-arrhythmic agent)"는 심장 부정맥의 발병, 빈도 및/또는 중증도를 감소시키는 임의의 작용제(agent)(예를 들어, 소분자 또는 약제학적 조성물)를 가리킨다. 항부정맥제는 불규칙한 심장 리듬을 치료하고, 빈맥에서 심박수를 감소시키고, 서맥에서 심박수를 증가시키거나, 그렇지 않으면 정상 굴 리듬을 촉진하고 심장 돌연사를 예방하는 데 사용할 수 있다.
- [0067] 줄기세포와 관련하여 사용되는 용어 "유래하다(derived from)"는, 줄기세포가, 분화된 세포의 줄기세포 표현형으로의 재프로그래밍에 의해 생성되었음을 의미한다. 분화된 세포와 관련하여 사용된 용어 "유래된"은 세포가 줄기세포의 분화, 예를 들어 시험관내 분화의 결과임을 의미한다. 본원에 사용된 "iPSC-CM" 또는 "유도만능줄기세포 유래 심근세포"는 상호교환적으로 사용되어 유도만능줄기세포로부터 유래된 심근세포를 가리킨다.
- [0068] "약제학적으로 허용되는"이라는 문구는, 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합리적인 이점/위험 비율에 적합한, 작용제(agent), 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 가리키기 위해 본원에서 사용된다.
- [0069] 용어 "축소하다", "감소된", "감소" 또는 "억제"는 모두 통계적으로 유의한 양만큼의 특성, 수준 또는 기타 파라미터의 감소 또는 감소를 의미하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 일부 실시형태에서, "감소하다", "감소" 또는 "축소하다" 또는 "억제하다"는 일반적으로 참조 수준(예를 들어, 주어진 치료의 부재)과 비교하여 적어도 10% 축소를 의미하고, 예를 들어, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 그 이상의 축소를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 "감소" 또는 "억제"는 참조 수준과 비교하여 완전한 억제 또는 감소를 포함하지 않는다. "완전한 억제"는 참조 수준과 비교하여 100% 억제이다. 축소는 바람직하게는 주어진 장애가 없는 개체에 대해 정상 범위 내로 허용되는 수준까지 낮을 수 있다.
- [0070] 용어 "증가된", "증가", "증가", 또는 "향상하다" 또는 "활성화하다"는 모두 일반적으로 통계적으로 유의한 양만큼 특성, 수준 또는 기타 파라미터의 증가를 의미하기 위해 본 명세서에서 사용되며; 의심의 여지를 없애기 위해 "증가된", "증가하다" 또는 "향상하다" 또는 "활성화하다"라는 용어는 참조 수준과 비교하여 적어도 10%의 증가, 예를 들어 약 20% 이상의 증가, 또는 참조 수준과 비교하여 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 또는 100% 이하의 증가 또는 10~100% 사이의 임의의 증가, 또는 참조 수준에 비해 적어도 약 2배, 또는 적어도 약 3배, 또는 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배 또는 적어도 약 10배 증가, 적어도 약 20배 증가, 적어도 약 50배 증가, 적어도 약 100배 증가, 적어도 약 1000배 증가 또는 그 이상의 증가를 의미한다.
- [0071] 본원에 사용된 "참조 수준(reference level)"은 정상, 그렇지 않으면 영향을 받지 않은 세포 집단 또는 조직(예: 건강한 대상체로부터 얻은 세포, 조직 또는 생물학적 샘플, 또는 이전 시점의 대상체로부터 획득된 생물학적 샘플, 예: 질환으로 진단되기 전에 환자로부터 획득된 세포, 조직 또는 생물학적 샘플, 또는 본원에 개시된 작용제 또는 조성물과 접촉되지 않은 생물학적 샘플)의 마커 또는 파라미터의 수준을 가리킨다.
- [0072] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "적절한 대조군(appropriate control)"은, 주어진 치료에 접촉 또는 주어진 치료로 처리된 세포, 조직, 생물학적 샘플, 또는 집단과 비교하여, 처리되지 않은 것을 제외하면 동일한, 세포, 대상체, 유기체 또는 집단(예를 들어, 본 명세서에 기재된 작용제 또는 조성물에 의해 접촉되지 않은 세포, 조직, 또는 생물학적 샘플)을 의미한다. 예를 들어, 적절한 대조군은 아미오다론 및 이바브라딘이 투여되지 않은 대상체 또는 조직일 수 있다.
- [0073] "통계적으로 유의한(statistically significant)" 또는 "유의하게(significantly)"라는 용어는 통계적 유의성을 나타내며 일반적으로 2표준편차(2SD) 이상의 차이를 의미한다.
- [0074] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "포함하는"이라는 용어는 제시된 정의된 요소에 더하여 다른 요소가 더 존재할

수 있음을 의미한다. "포함하는"의 사용은 제한이 아니라 포함을 나타낸다.

[0075] "으로 구성된"이라는 용어는 실시형태의 설명에서 인용되지 않은 임의의 요소를 제외한 본 명세서에 설명된 바와 같은 조성물, 방법 및 이들의 각각의 구성요소를 가리킨다.

[0076] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "본질적으로 구성되는(consisting essentially of)"이라는 용어는 주어진 실시형태에 필요한 요소들을 가리킨다. 이 용어는 본 발명의 해당 실시형태의 기본적이고 신규한 또는 기능적 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 추가 요소의 존재를 허용한다.

[0077] 단수 용어 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 달리 명백하게 나타내지 않는 한 복수 지시 대상을 포함한다. 유사하게, "또는"이라는 단어는 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는 한 "및"을 포함하도록 의도된다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 방법 및 재료가 본 개시내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 하기에 기재되어 있다. 약어 "예"는 라틴어 *exempli gratia*에서 파생되었으며 비제한적인 예를 나타내기 위해 본 명세서에서 사용된다. 따라서 약어 "eg"는 "예를 들어"라는 용어와 동의어이다.

[0078] 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하고 복수 용어는 단수를 포함한다.

[0079] 작동 예에서, 또는 달리 지시된 경우를 제외하고, 본원에서 사용된 성분 또는 반응 조건의 양을 나타내는 모든 숫자는 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수정된 것으로 이해되어야 한다. 백분율과 관련하여 사용될 때 용어 "약"은 $\pm 1\%$ 를 의미할 수 있다.

[0080] 심혈관 질환(Cardiovascular Disease)

[0081] 심혈관 질환은 대상체의 심장 및/또는 순환계에 영향을 미치는 질환이다. 심장 질환의 비제한적인 예는 죽상경화성 심장 질환, 심근병증, 심장 부정맥, 선천성 심장 질환, 심근 경색, 심부전, 심장 비대, 판막 협착증, 역류, 허혈, 세동 및 다형성 심실 빈맥을 포함한다. 심혈관 질환의 증상은 실신, 피로, 숨가쁨, 흉통 및 심계항진을 포함할 수 있지만 이에 국한되지 않는다. 심혈관 질환은 일반적으로 신체 검사, 혈액 검사 및/또는 심전도(EKG)로 진단된다. 비정상적인 EKG는 대상체가 비정상적인 심장 리듬 또는 심장 부정맥이 있다는 표시이다. 부정맥을 진단하는 방법은 당 기술분야에 공지되어 있다.

[0082] "심장 사건(cardiac event)"이라는 용어는 심근 손상, 심근경색증, 심실 세동, 협착증, 부정맥 등의 사건을 말한다.

[0083] 심장의 전기생리학 및 수축 기능은 엄격하게 통제되는 과정이다. 이온 채널 조절 또는 수축 기능이 심장 세포 또는 조직에서 방해를 받으면 때때로 치명적일 수 있는 심장 부정맥이 발생할 수 있다. 심장 질환은 여전히 전 세계적으로 주요 사망 원인이다.

[0084] 인간줄기세포 유래 심근세포는 심근 경색으로 인한 심혈관 질환 및 심장 손상에 대한 유망한 치료법으로 부상했다. 그러나 기존 모델에서 시험관내 분화된 심근세포의 기능적 성숙도는 일반적으로 부족하며 이러한 심근세포는 이식 후 부정맥을 유발할 수 있다.

[0085] 일 양태에서, 심혈관 질환을 치료하는 방법이 본원에 기재된다. 또 다른 양태에서, 심근세포의 심장 이식편의 수용 대상체에서 이식 부정맥을 치료하거나 개선하는 방법이 본원에 기술되고, 이 방법은 대상체에게 유효량의 아미오다론 및 유효량의 이바브라딘을 투여하는 것을 포함한다.

[0086] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 대상체는 심혈관 질환 또는 심장 사건을 갖거나 가질 위험이 있다.

[0087] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 심혈관 질환이 있는 대상체는 심장 이식편을 필요로 하거나 받은 적이 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 이식 부정맥을 갖거나 갖는 것으로 진단된다. 일부 양태에서, 본 명세서에는 이식 부정맥을 예방하거나 감소시키는 방법이 기재되어 있다.

[0088] 이식 부정맥은 심장 세포 또는 심근세포 이식편을 투여한 후 발생하는 새롭고 비정상적인 심장 리듬이다. 이식 부정맥은 심장 이식편 이식 후 관찰되며 일반적으로 수일에서 수주 동안 일시적으로 지속된다. 이식 부정맥은 대상체에게 돌연 심장사 및 심부전을 유발할 수 있다.

[0089] 심혈관 질환 및 부정맥을 치료하는 방법은 당 기술분야에 공지되어 있다. 심혈관 질환, 특히 부정맥의 치료에 사용되는 치료제의 한 가지 고전적인 예는 항부정맥제를 포함한다.

[0090] 심장 이식을 위한 심근세포

[0091] 심장 이식은 심근세포를 심장의 심장 손상 부위에 투여한다. 숙련된 의사는 당 기술분야에 공지된 방법으로 손

상 부위를 결정할 수 있다. 심장 이식의 주요 목표는 약물 치료만으로는 달성할 수 없는 손상된 심근에 전기적 및 기계적 안정성을 제공하는 것이다.

[0092] 다음은 대상체로의 이식을 위해 심근세포를 준비하는 데 사용할 수 있는 다양한 소스 및 줄기세포에 대해 설명한다.

[0093] 줄기세포는 유사분열 세포 분열을 통해 스스로 재생하는 능력을 유지하고 보다 전문화된 세포 유형으로 분화할 수 있는 세포이다. 포유류 줄기세포의 세 가지 광범위한 유형에는 배반포에서 발견되는 배아줄기(ES)세포, 체세포에서 재프로그래밍되는 유도만능줄기세포(iPSC) 및 성체 조직에서 발견되는 성체줄기세포가 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cell)의 다른 공급원은 양막 유래 또는 태반 유래 줄기세포를 포함할 수 있다. 만능줄기세포는 3개의 배엽 중 어느 하나에서 유래한 세포로 분화할 수 있다.

[0094] 본원에 기재된 조성물 및 방법에 유용한 심근세포는 그 중 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포 둘 모두로부터 분화될 수 있다. 한 실시형태에서, 본원에서 제공되는 조성물 및 방법은 배아줄기세포로부터 분화된 인간 심근세포를 사용한다. 대안적으로, 일부 실시형태에서, 본원에서 제공되는 조성물 및 방법은 생존 가능한 인간 배아로부터 채취한 세포로부터 제조된 인간 심장성 세포의 생성 또는 사용을 포함하지 않는다.

[0095] **배아줄기세포:** 배아줄기세포 및 이의 검색(retrieval) 방법은 당 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [Trounson AO Reprod Fertil Dev (2001) 13:523, Roach ML Methods Mol Biol (2002) 185:1], 및 Smith AG Annu Rev Cell Dev Biol (2001) 17:435를 참조할 수 있다. 용어 "배아줄기세포"는 배아 배반포의 내부 세포 덩어리의 만능줄기세포를 가리키기 위해 사용된다(예를 들어, 미국 특허 번호 5,843,780, 6,200,806 참조). 이러한 세포는 체세포 핵 이식으로부터 유래된 배반포의 내부 세포 덩어리로부터 유사하게 획득될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 5,945,577, 5,994,619, 6,235,970 참조).

[0096] 배아 공급원에서 유래한 세포는 줄기세포 은행 또는 기타 인정된 기탁 기관에서 얻은 배아 줄기세포 또는 줄기세포주를 포함할 수 있다. 줄기세포주를 생산하는 다른 수단은 배반포 형성 전의(8세포기경) 초기 단계 배아로부터의 할구 세포의 사용을 포함하는 방법을 포함한다. 이러한 기술은 보조 생식 클리닉에서 일상적으로 시행되는 착상 전 유전자 진단 기술(pre-implantation genetic diagnosis technique)에 해당한다. 단일 할구 세포는 확립된 ES-세포주와 공동 배양된 다음 완전히 유능한(competent) ES 세포주를 형성하기 위해 이들로부터 분리된다.

[0097] 미분화 배아줄기(ES)세포는 당 기술분야의 숙련된 기술자에 의해 용이하게 인식되고, 전형적으로 높은 핵/세포질 비율 및 현저한 핵소체를 갖는 세포 콜로니에서 2차원적 현미경 관찰에 나타난다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 인간 심근세포는 배아줄기세포 또는 배아 기원의 임의의 다른 세포로부터 유래되지 않는다.

[0098] **유도만능줄기세포(iPSC):**

[0099] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 유도만능줄기세포로부터 시험관내 분화된 심근세포를 이용한다. 본원에 기재된 조성물을 위한 심근세포를 생성하기 위해 iPSC를 사용하는 것의 이점은, 원하는 경우, 원하는 인간 심근세포가 투여되는 동일한 대상체로부터 세포가 유래될 수 있다는 점이다. 즉, 대상체로부터 체세포를 채취하여 유도만능줄기세포로 재프로그래밍한 후 인간 심근세포로 재분화하여 그 대상체에게 투여할 수 있다(예: 자기 유래 세포). 그 심근세포(또는 이들의 분화된 자손)는 본질적으로 자기 유래 기원에서 유래하기 때문에, 다른 대상체 또는 대상체 그룹으로부터의 세포를 사용하는 것과 비교하여 이식 거부 또는 알레르기 반응의 위험이 감소된다. 이것이 iPSC세포의 장점이지만, 대안적 실시형태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 심근세포는 비-자기 유래 공급원(예를 들어, 동종이계(allogenic))으로부터 유래한다. 또한, iPSC를 사용하면 배아 공급원에서 얻은 세포가 필요하지 않다. 따라서, 한 실시형태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용하기 위한 심근세포를 생성하는 데 사용되는 줄기세포는 배아줄기세포가 아니다.

[0100] 분화(differentiation)는 생리학적 맥락에서 일반적으로 비가역적이지만, 최근 몇 년 동안 체세포를 유도만능줄기세포로 재프로그래밍하는 몇 가지 방법이 개발되었다. 예시적인 방법은 당 기술분야의 숙련된 기술자에게 공지되어 있고 아래에 간략하게 설명되어 있다.

[0101] 재프로그래밍(reprogramming)은 분화된 세포(예: 체세포)의 분화 상태를 변경하거나 역전시키는 과정이다. 다시 말해서, 재프로그래밍은 세포의 분화를 더 미분화되거나 더 원시적인 유형의 세포로 역전시키는 과정이다. 많은 1차 세포를 배양에 두면 완전 분화된 특성이 일부 손실될 수 있다. 그러나, 분화된 세포라는 용어에 포함된 이러한 세포를 단순히 배양한다고 해서 이러한 세포가 비분화 세포(예: 미분화 세포) 또는 만능세포로 되는 것은 아니다. 분화된 세포를 만능으로 전환하려면, 분화된 세포가 배양에 두어질 때 분화된 특성의 부분적 손

실을 초래하는 자극을 넘어서는 재프로그래밍 자극이 필요하다. 재프로그래밍된 세포는 또한 일반적으로 배양에서 제한된 수의 분열에 대한 능력을 갖는 1차 세포 부모에 비해 성장 잠재력의 손실 없는 연장된 계대 능력(passaging)의 특징을 갖는다.

[0102] 재프로그래밍된 세포는 재프로그래밍 전에 부분적으로 또는 최종적으로 분화될 수 있다. 따라서, 세포는 성체 줄기세포 또는 체세포 줄기세포뿐만 아니라 최종 분화된 체세포일 수 있다.

[0103] 일부 실시형태에서, 재프로그래밍은 분화된 세포(예를 들어, 체세포)의 분화 상태를 만능 상태 또는 다능 상태로 완전 복귀시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재프로그래밍은 분화된 세포(예를 들어, 체세포)의 분화 상태를 미분화된 세포(예를 들어, 배아-유사 세포)로 완전히 또는 부분적으로 복귀시키는 것을 포함한다. 재프로그래밍은 세포에 의한 특정 유전자의 발현을 초래할 수 있으며, 그 발현은 재프로그래밍에 추가로 기여한다. 본원에 기재된 특정 실시형태에서, 분화된 세포(예를 들어, 체세포)의 재프로그래밍은, 분화된 세포가 모든 3배엽 계통의 세포로의 자기 재생 및 분화 능력을 갖는 미분화 상태를 갖도록 한다. 이들은 유도만능줄기세포(iPSC 또는 iPS세포)이다.

[0104] 체세포를 iPSC세포로 재프로그래밍하는 방법은 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,129,187 B2; 8,058,065 B2; 미국 특허 출원 2012/0021519 A1; Singh *et al.* *Front. Cell Dev Biol.* (2015); 및 Park *et al.* *Nature* (2008); 전체 내용이 참조로 포함된다. 구체적으로, iPSC는 재프로그래밍 전사 인자의 조합을 도입함으로써 체세포로부터 생성된다. 재프로그래밍 인자는 예를 들어 핵산, 벡터, 소분자, 바이러스, 폴리펩티드, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 재프로그래밍 인자의 비제한적인 예는 Oct4(옥타머 결합 전사 인자-4), Sox2(성 결정 영역 Y)-박스 2, Klf4(Kruppel 유사 인자-4), 및 c-Myc를 포함한다. 인자(예: LIN28 + Nanog, Esrrb, Pax5 shRNA, C/EBPα, p53 siRNA, UTF1, DNMT shRNA, Wnt3a, SV40 LT(T), hTERT) 또는 화합물(예: BIX-01294, BayK8644, RG108, AZA 텍사메타손, VPA, TSA, SAHA, PD025901 + CHIR99021(2i), A-83-01)은 기초 재프로그래밍 인자에서 하나 또는 다른 재프로그래밍 인자를 대체하거나 재프로그래밍의 효율성을 향상시키는 것으로 밝혀졌다.

[0105] 체세포(예: 생식 세포, 섬유아세포 등을 제외한 신체의 임의의 세포)로부터 만능줄기세포를 생성하기 위해 사용되는 특정 접근 또는 방법은 청구된 발명에 중요하지 않다. 따라서, 체세포를 만능 표현형으로 재프로그래밍하는 임의의 방법이 본원에 기재된 방법에 사용하기에 적절할 것이다.

[0106] Shi, Y., *et al.* (2008) *Cell-Stem Cell* 2: 525-528, Huangfu, D., *et al.* (2008) *Nature Biotechnology* 26(7):795-797, 및 Marson, A., *et al.* (2008) *Cell-Stem Cell* 3:132-135에 나타난 바와 같이, 시작 세포 집단에서 유래된 재프로그래밍의 효율성(즉, 재프로그래밍된 세포의 수)은 다양한 소분자의 추가에 의해 향상될 수 있다. 재프로그래밍 효율을 향상시키는 작용제의 일부 비제한적 예에는 가용성 Wnt, Wnt 조절 배지, BIX-01294(G9a 히스톤 메틸트랜스퍼라제), PD0325901(MEK 억제제), DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제, 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제, 발프로산, 5'-아자시티딘, 텍사메타손, 수베로일아닐리드, 하이드록삼산(SAHA), 비타민 C, 트리코스타틴(TSA) 등이 포함된다.

[0107] 본원에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 만능줄기세포의 유도를 확인하기 위해, 단리된 클론을 하나 이상의 줄기세포 마커의 발현에 대해 시험할 수 있다. 체세포에서 유래된 세포에서의 이러한 발현은 그 세포를 유도만능줄기세포로 식별한다. 줄기세포 마커는 SSEA3, SSEA4, CD9, Nanog, Oct4, Fbx15, Ecat1, Esg1, Eras, Gdf3, Fgf4, Cripto, Dax1, Zfp296, Slc2a3, Rex1, Utf1 및 Nat1을 포함할 수 있지만 이에 국한되지 않는다. 한 실시형태에서, Oct4 또는 Nanog를 발현하는 세포는 만능으로서 확인된다. 이러한 마커의 발현을 검출하는 방법은 예를 들어 RT-PCR 및 코딩된 폴리펩티드의 존재를 검출하는 면역학적 방법, 예컨대 웨스턴 블롯 또는 유세포 분석을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출은 RT-PCR 뿐만 아니라 단백질 마커의 검출도 포함한다. 세포 내 마커는 RT-PCR을 통해 가장 잘 식별될 수 있는 반면, 세포 표면 마커는 예를 들어 면역세포화학(immunocytochemistry)에 의해 쉽게 식별된다.

[0108] 단리된 세포의 만능줄기세포 특성은 iPSC가 3배엽 각각의 세포로 분화하는 능력을 평가하는 테스트에 의해 확인할 수 있다. 한 예로서, 누드 마우스에서 기형종(teratoma) 형성을 사용하여 단리된 클론의 만능 특성을 평가할 수 있다. 세포를 누드 마우스에 도입하고 세포에서 발생하는 종양에 대해 조직학 및/또는 면역조직화학을 수행한다. 예를 들어, 모든 3배엽으로부터의 세포를 포함하는 종양의 성장은 그 세포가 만능줄기세포임을 추가로 나타낸다.

[0109] **성체줄기세포:** 성체줄기세포는 출생 후 또는 신생아 이후 유기체 또는 성체 유기체의 조직에서 유래한 줄기세포

이다. 성체줄기세포는 그것이 배아줄기세포에 비해 발현하거나 발현하지 않는 마커뿐만 아니라 후성 유전적 차이, 예를 들어 DNA 메틸화 패턴의 차이의 존재에 의해 배아줄기세포와 구조적으로 구별된다. 성체줄기세포로부터 분화된 심근세포는 또한 본원에 기재된 바와 같은 심장 이식편에 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 성체줄기세포를 분리하는 방법은 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 9,206,393 B2; 및 미국 출원 번호 2010/0166714 A1; 그 전체가 참조로 여기에 포함된다.

[0110] 시험관내 분화(In Vitro-Differentiation)

[0111] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 시험관내 분화된 심근세포를 사용한다. ESC 또는 iPSC로부터 세포 유형을 분화시키는 방법은 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 심근세포의 분화를 설명하는 LaFlamme *et al.*, *Nature Biotech* 25:1015-1024 (2007)를 참조하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0112] 특정 실시형태에서, ESC 또는 iPSC에서 심근세포로의 단계적 분화는 ESC 또는 iPSC > 심장인성 중배엽(cardiogenic mesoderm) > 심장전구세포(cardiac progenitor cell) > 심근세포(cardiomyocyte)의 순서로 진행된다(예를 들어, Lian *et al.* *Nat Prot* (2013); 미국 출원 번호 2017/0058263 A1, 2008/0089874 A1, 2006/0040389 A1, 미국 특허 번호 10,155,927 B2, 9,994,812 B2, 및 9,663,764 B2에 기술되어 있으며, 이들의 전체 내용이 여기에 참조로 포함된다). ESC 및 iPSC를 심근세포로 분화시키기 위한 다수의 프로토콜이 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 세포 배양 배지로부터 작용제(agent)를 첨가하거나 제거하여 단계적 방식으로 심근세포로의 분화를 지시할 수 있다. 심근세포 분화를 촉진할 수 있는 인자 및 작용제의 비제한적 예는 소분자(예를 들어, Wnt 억제제, GSK3 억제제), 폴리펩티드(예를 들어, 성장 인자), 핵산, 벡터 및 패턴화된 기질(예를 들어, 나노패턴)을 포함한다. 섬유아세포 성장 인자 2(FGF2), 변형 성장 인자 β (TGF β) 슈퍼패밀리 성장 인자-액티빈 A 및 BMP4, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 Wnt 억제제 DKK-1를 포함하지만 이에 국한되지 않는 심혈관 발달에 필요한 성장 인자의 첨가는 또한 심장 계통을 따른 분화를 지시하는 데 도움이 될 수 있다. 심근세포 분화를 촉진하는 데 도움이 되는 인자 및 상태(condition)의 추가 예에는 인슐린 결핍 B27 보충제(B27 supplement lacking insulin), 세포 조절 배지(cell-conditioned media), 외부 전기 페이스팅(external electrical pacing) 및 나노패턴화 기질(nanopatterned substrate) 등이 포함되지만 이에 국한되지 않는다.

[0113] 심장/심근세포 이식편(Cardiac/Cardiomyocyte graft)

[0114] 일 양태에서, 본원에 기재된 심근세포 이식(graft) 또는 이식(transplant) 방법은 a) 이를 필요로 하는 대상체의 심장 조직에 심근세포를 투여하는 단계; 및 b) 상기 대상체에서 이식 부정맥을 감소시키는 아미오다론의 유효량 및 이바브라딘의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0115] 본원에 사용된 용어 "이식(transplanting)" 또는 "이식하다(transplant)"는, 본원에 기재된 바와 같은 세포, 예를 들어 심근세포를, 대상체에게, 원하는 효과(들)가 생성되도록 손상 또는 복구 부위와 같은 원하는 부위에 그 도입된 세포가 적어도 부분적 국소화되게 하는 방법 또는 경로에 의해, 배치하는 맥락에서 사용된다. 세포, 예를 들어 심근세포, 또는 이들의 분화된 자손(예를 들어, 심장 섬유아세포 등) 및 심근세포는 직접적으로 또는 수용자의 심장 조직 내에, 예를 들어 심장 질환을 가진 대상체의 심장 조직 내에 또는 부위 근처에, 임플란트(implant)될 수 있다. 당 기술분야의 숙련된 기술자가 이해하는 바와 같이, 심근세포는 일반적으로 심장이 세포 사멸을 포함하는 급성 손상으로부터 치유될 수 있는 정도로 증식하지 않기 때문에 심근세포의 장기간 이식이 바람직하다. 일부 실시형태에서, 세포는 임플란트된 심근세포의 생존력(viability)을 지원하고/하거나, 예를 들어, 이식을 위해 원하는 위치에 투여된 세포를 유지하는 것을 보조하거나 대상체의 천연 심장 세포와의 통합을 촉진하는 스캐폴드 또는 생체적합성 물질 상에 또는 그 내부에 필요에 따라 이식된다. 바람직하게는, 심근세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 인간줄기세포 유래 심근세포 또는 시험관내 분화된 심근세포이다. 일부 실시형태에서, 시험관내 분화된 심근세포는 시험관내에서 배아줄기세포 또는 iPSC세포로부터 분화된다.

[0116] 스캐폴드(scaffold)는 원하는 위치에 세포를 포함할 수 있지만 생존 및 기능에 필요한 환경에서 인자의 진입 또는 분산을 허용하는 겔, 시트 또는 격자를 포함하지만 이에 국한되지 않는 생체 적합성 물질을 포함하는 구조이다. 스캐폴드에 적합한 다수의 생체적합성 중합체가 당 기술분야에 공지되어 있다.

[0117] 당 기술분야의 숙련된 기술자는 이식편에 필요한 심근세포의 수를 결정할 수 있다. 일부 실시형태에서, 약 1천만 개~약 100억 개의 심근세포가 대상체에게 투여된다. 본원에 기재된 다양한 양태에서 사용하기 위해, 유효량의 인간 심근세포는 적어도 1×10^7 , 적어도 1.1×10^7 , 적어도 1.2×10^7 , 적어도 1.3×10^7 , 적어도 1.4×10^7 , 적어도 1.5×10^7 , 적어도 1.6×10^7 , 적어도 1.7×10^7 , 적어도 1.8×10^7 , 적어도 1.9×10^7 , 적어도 2×10^7 , 적어도

3×10^7 , 적어도 4×10^7 , 적어도 5×10^7 , 적어도 6×10^7 , 적어도 7×10^7 , 적어도 8×10^7 , 적어도 9×10^7 , 적어도 1×10^8 , 적어도 2×10^8 , 적어도 5×10^8 , 적어도 7×10^8 , 적어도 1×10^9 , 적어도 2×10^9 , 적어도 3×10^9 , 적어도 4×10^9 , 적어도 5×10^9 , 적어도 6×10^9 , 적어도 7×10^9 , 적어도 8×10^9 , 적어도 9×10^9 , 적어도 1×10^{10} , 또는 그 이상의 이식을 위한 심근세포를 포함할 수 있다.

[0118] 심장 이식편 심근세포를 투여받는 대상체에서 이식 부정맥의 발병 및 중증도를 감소시키기 위해, 본원에 기재된 방법은 대상체에게 유효량의 아미오다론 및 유효량의 이바브라딘을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 이들 항부정맥제의 조합은 이식 부정맥을 감소시키고 치료하기 위한 실시예를 통해 본원에서 입증된다.

[0119] 아미오다론은 심장 마비, 심실 빈맥 및 심방 세동의 치료를 위해 처방되는 클래스 III 항부정맥제이다. 아미오다론의 유사체 및 유도체는 당 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 번호 7,799,799 B2; 9,018,250 B2; 및 Carlsson *et al.* *J Med Chem.* 2002 Jan 31;45(3):623-30에 기재되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 아미오다론 유사체 및 유도체는 또한 이식 부정맥을 치료하는데 유익할 수 있는 것으로 고려된다.

[0120] 아미오다론의 작용 기전은, 약물이 전압 개폐 칼륨 채널과 전압 개폐 칼슘 채널을 억제하고, 이것이 차례로 심장 활동 전위의 3단계(phase 3)를 연장하는 것이다. 구체적으로, 아미오다론은 칼륨 이온 채널의 기공 형성 소단위인 $K_{v11.1}$ (KCNH2 유전자에 의해 코딩됨)을 억제하고 전압 개폐 칼슘 채널(CACNA2D2 유전자에 의해 코딩됨)을 억제한다. 그러나 아미오다론은 전압 개폐 나트륨 채널 활성화도 억제하는 것으로 나타났으며, 이는 약물의 부정맥 촉진 가능성에 기여할 수 있다.

[0121] 아미오다론의 투여는 대상체에게 투여될 때 심박수를 감소시킨다는 점에서 베타-차단제 유사 활성을 나타낸다. 아미오다론의 임상 효과에는 심실, His 다발(bundles of His) 및 푸르키네 섬유의 불응기(refractory period) 증가로 인한 QT 간격(QT interval) 연장이 있다. 이 효과는 심방세동과 같은 부정맥의 치료에 유익하지만 이 효과는 친부정맥적(pro-arrhythmic)이 될 수 있다. 아미오다론 및 기타 항부정맥제가 용량 및 치료 요법에 따라 약물-유도 QT 연장을 유발할 수 있다는 것은 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 이것은 다른 약물이나 항부정맥제와 함께 사용하면 악화될 수 있다.

[0122] 이바브라딘은 협심증, 빈맥 및 심부전 치료에 사용되는 클래스 I_f 항부정맥제이다. 이바브라딘의 유사체 및 유도체는 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 7,879,842; 7,361,650; 7,867,996; 및 7,361,649에 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 특정 이바브라딘 유사체 및 유도체가 또한 본원에 기재된 방법에 유익할 수 있는 것으로 고려된다.

[0123] 이바브라딘은 심장의 퍼니 채널(funny channel)(HCN 채널이라고도 함)을 억제하는 것으로 알려져 있다. HCN 유전자, *HCN1-HCN4*에 의해 코딩된 HCN 채널의 4가지 동형 단백질(isoform)이 있다. 심장에서 퍼니 전류(funny current)(I_f)의 주요 기능은 SA 노드(node)에서 심박조율기(pacemaker) 활동을 유지하는 것이다. 이바브라딘으로 퍼니 채널을 차단하면 심박수가 전반적으로 감소한다.

[0124] 본 명세서에 설명된 바와 같은 아미오다론과 이바브라딘의 조합은 심근세포 이식편이 있는 대상체에서 부정맥의 비율 및 부담을 감소시킨다. 항부정맥제의 이러한 조합은 실시예에서 보이는 바와 같이 대상체의 심혈관 생존률의 개선을 시사하였다.

[0125] 투여 및 효능

[0126] 일 양태에서, 심장 질환, 장애, 사건 또는 손상을 치료하거나 개선하는 방법이 본원에 기재되어 있으며, 이는 이를 필요로 하는 대상체에게 심근세포를 투여하고 유효량의 아미오다론 및 이바브라딘을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 방법은 예상되는 장애, 예를 들어 이식 부정맥을 예방한다.

[0127] 또 다른 양태에서, 본 명세서에는 이식 부정맥을 치료하거나 개선하는 방법이 기재되어 있다.

[0128] 본원에 기재된 항부정맥제는 대상체에서 부정맥 부담을 감소시키는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 용어 "투여"는 하나 이상의 작용제를 포함하는 약제학적 조성물의 투여를 가리킨다. 투여는 이를 필요로 하는 대상체에게 직접 주사(예를 들어, 표적 세포 또는 조직에 직접 투여), 피하 주사, 근육내 주사, 경구, 또는 비강 전달, 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있다.

[0129] 위에서 논의한 바와 같이, 세포는 심장 조직에 직접 투여된다. 항부정맥제, 예를 들어 아미오다론 및 이바브라

딘은 경구, 비경구, 정맥내(IV), 근육내, 피하, 경피, 기도(에어로졸), 폐, 피부, 국소, 또는 주사 투여를 포함 하나 이에 국한되지 않는 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 국소적이거나 전신적(systemic)일 수 있다.

[0130] 아미오다론 및 이바브라딘의 투여는 두 약물 모두에 대해 IV 또는 경구일 수 있다. 따라서, 두 약물(또는 이의 유사체)은 경구로, 둘다 IV로, 또는 하나는 경구로 다른 하나는 IV로 조합하여 투여될 수 있는 것으로 고려된다. 그러나 투여의 용이성과 환자 순응도를 위해 두 약물 모두 경구 투여하는 것이 바람직하다.

[0131] 본원에 사용된 "유효량"은 이식 부정맥을 완화하는데 필요한 아미오다론 및/또는 이바브라딘 또는 이의 유사체의 양을 가리킨다. 이식 부정맥을 예방하거나 완화함으로써, 이식된 세포의 이식 및 통합이 촉진될 수 있고 심부전 또는 돌연 심장사의 위험 감소를 포함하여 대상체에 대한 임상 결과가 개선될 수 있다. 이러한 맥락에서 "완화하다(alleviate)"는 본원에 기재된 바와 같은 아미오다론 및 이바브라딘의 투여 없이 발생하거나 발생할 것으로 예상되는 부정맥에 비해 부정맥 부담이 10% 이상 감소하는 것을 의미한다. 부정맥 부담은 본 명세서의 실시예에 기술된 바와 같이 또는 당 기술분야에 공지된 바와 같이 계산될 수 있다. 설명된 약물 요법이 없는 부정맥 부담은 75% 이상일 수 있다. 이는 아미오다론 및 이바브라딘의 투여로 적어도 10% 감소할 수 있다. 임의의 주어진 경우에 대해, 적절한 "유효량"은 단지 일상적인 실험을 사용하여 당 기술분야의 숙련된 기술자에 의해 결정될 수 있음이 이해된다.

[0132] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘 또는 이의 유사체의 투여는, 아미오다론 및 이바브라딘 투여 또는 이의 유사체 없이 동일한 유형의 세포 이식편을 받는 대상체에 비해, 이식편 수용자가 경험하는 이식후 가속 안정시 심박수를 적어도 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상 감소시킨다.

[0133] 따라서, 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘 또는 이의 유사체의 투여는, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여 없이 동일한 유형의 심근세포의 이식편을 받는 대상체에 비해, 이식 부정맥 부담, 즉 대상체가 이식 부정맥을 경험하는 시간의 비율을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 그 이상 감소시킨다. 적어도 10%의 감소는 효과적인 치료로 간주되지만, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여는 이식 부정맥의 완전한 중단을 가능하게 하는 것으로 고려된다.

[0134] 유효 용량은 초기에 세포 배양 분석으로부터 추정할 수 있으며, 용량 범위는 동물(예: 돼지)에서 공식화할 수 있다. 세포 배양 분석 및 동물 연구에서 얻은 데이터는 인간에 사용할 투여량 범위를 공식화하는 데 사용할 수 있다. 이러한 항부정맥제의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED₅₀을 포함하는 순환 농도 범위 내이다. 투여량은 채용된 투여 형태와 이용된 사용 또는 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 다양할 수 있다.

[0135] 일반적으로, 조성물은 아미오다론이 적어도 50 mg, 적어도 100 mg, 적어도 150 mg, 적어도 200 mg, 적어도 250 mg, 적어도 300 mg, 적어도 350 mg, 적어도 400 mg, 적어도 450 mg, 적어도 500 mg, 적어도 550 mg, 적어도 600 mg, 적어도 650 mg, 적어도 700 mg, 적어도 750 mg, 적어도 800 mg, 적어도 850 mg, 적어도 900 mg, 약 1000 mg까지의 용량으로 사용되거나 주여지도록 투여된다.

[0136] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론 또는 이의 유사체는, 1일 3회, 100~800 mg의 용량으로 경구 투여된다. 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론은 100~300 mg의 용량으로 정맥 일시로 투여된다. 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론은 1.5~2.5 µg/ml의 혈청 농도로 투여된다.

[0137] 일부 실시형태에서, 이바브라딘은 적어도 1 mg, 적어도 2 mg, 적어도 3 mg, 적어도 4 mg, 적어도 5 mg, 적어도 6 mg, 적어도 7 mg, 적어도 8 mg, 적어도 9 mg, 적어도 10 mg, 적어도 11 mg, 적어도 12 mg, 적어도 13 mg, 적어도 14 mg, 적어도 15 mg, 적어도 16 mg, 적어도 17 mg, 적어도 18 mg, 적어도 19 mg, 약 20 mg까지의 용량으로 투여된다.

[0138] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 이바브라딘 또는 이의 유사체는, 1일 2회, 5~15 mg의 용량으로 경구 투여된다.

[0139] 일부 실시형태에서, 아미오다론의 투여는 단일 일시 투여이다. 일부 실시형태에서, 투여는 연속적 또는 반복적 투여이다. 일부 실시형태에서, 투여는 경구 투여 및/또는 정맥내 주사이다. 일부 실시형태에서, 아미오다론은, 1일 3회, 100~800 mg의 용량으로 경구 투여된다. 일부 실시형태에서, 아미오다론은 100~300 mg의 용량으로 IV 일시 투여된다. 일부 실시형태에서, 아미오다론은 1.5~2.5 µg/ml의 혈청 농도로 투여된다. 일부 실시형태에서, 이바브라딘은, 1일 2회, 5~15 mg의 용량으로 경구 투여된다. 일부 실시형태에서, 이바브

라딘은 빈맥이 있을 때 투여된다. 일부 실시형태에서, 이바브라딘은 150 비트/분 (bpm) 이하의 안정시 심박수를 유지하도록 투여된다. 일부 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여는 단기이다. 일부 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여는 부정맥의 재발 없이 이식 부정맥 부담이 0에 도달한 후 종료된다.

[0140] 본원에 기재된 항부정맥제, 아미오다론 및 이바브라딘 또는 이의 유사체는 이식 부정맥 및/또는 심혈관 질환을 치료하기 위해 조합하여 사용된다. 본원에 사용된 "조합하여" 투여되는 것은 2가지(또는 그 이상)의 상이한 치료가 대상체가 장애로 고통받는 과정 동안 대상체에게 전달됨을 의미하며, 예로서 대상체가 장애(심혈관계 질환 또는 이식 부정맥)로 진단된 후로서 그 장애가 치유 또는 제거 또는 다른 이유로 치료가 중단되기 전에, 2가지 이상의 치료가 전달되는 것을 들 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나의 치료의 전달은 두번째 치료의 전달이 시작될 때 여전히 일어나고 있으므로 투여 기간(term)에 있어서 중복이 있다. 이것은 때때로 "동시(simultaneous)" 또는 "동시 전달(concurrent delivery)"로 본 명세서에서 언급된다. 다른 실시형태에서, 한 치료의 전달은 다른 치료의 전달이 시작되기 전에 종료된다. 이들 중 어느 경우의 일부 실시형태에서, 치료는 조합 투여로 인해 더 효과적이다. 예를 들면, 두번째 치료가 더 효과적이거나(예로서, 더 적은 양의 두번째 치료에서 동등한 효과가 나타나거나, 두번째 치료가, 첫번째 치료 없이 두번째 치료가 투여되었을 때보다 더 큰 정도로, 증상을 감소시킴), 또는 첫번째 치료에 있어서 상기와 유사한 상황이 나타날 수 있다. 일부 실시형태에서, 전달은, 다른 치료 없이 하나의 치료가 전달될 때보다 장애와 관련된 증상 또는 다른 파라미터의 감소가 더 크도록 하는 것이다. 두 가지 치료의 효과는 부분적으로 가산적이거나 전체적으로 가산적이거나 가산적인 것보다 더 클 수 있다. 전달은 전달된 첫번째 치료의 효과가 두번째 치료가 전달될 때 여전히 감지될 수 있도록 할 수 있다. 본원에 기재된 항부정맥제 및/또는 적어도 하나의 추가 요법은 동일 또는 별도의 조성물로 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적 투여의 경우, 본원에 기재된 아미오다론이 먼저 투여될 수 있고, 이바브라딘이 두번째로 투여될 수 있거나, 투여 순서가 역전될 수 있다. 작용제(agent) 및/또는 기타 치료제(therapeutic agent), 절차(procedure) 또는 양식(modality)은 활성 장애 기간 동안(예를 들어, 이식 부정맥 동안), 또는 완화 또는 덜 활성인 질환 기간 동안(예를 들어, 이식 전 또는 후에) 투여될 수 있다. 항부정맥제는 심장 이식 전, 그 치료와 동시에, 치료 후, 또는 이식 후 심혈관 질환의 표출(flare) 동안 투여될 수 있다.

[0141] 조합하여 투여되는 경우, 아미오다론 및 이바브라딘은, 예를 들어 단독요법과 같이 개별적으로 사용되는 각 항부정맥제의 양 또는 투여량과 동일하거나 더 높거나 더 낮은 양 또는 용량으로 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 아미오다론, 이바브라딘, 또는 둘 모두의 투여된 양 또는 투여량은 개별적으로 사용되는 각 항부정맥제의 양 또는 투여량에 비해 적다(예를 들어, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%). 다른 실시형태에서, 원하는 효과(예를 들어, 심혈관 질환의 치료)를 초래하는 아미오다론, 이바브라딘 또는 둘 모두의 양 또는 투여량은 동일한 치료 효과를 달성하기 위해 개별적으로 필요한 각 작용제의 양 또는 투여량보다 더 적다(예를 들어, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 더 적음).

[0142] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘 또는 이의 유사체는 심근세포 이식편과 동시에 투여된다. 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론의 투여는 심근세포 이식편의 투여 전에 개시된다. 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 이바브라딘의 투여는 심근세포 이식편의 투여 전에 개시된다. 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론 및 이바브라딘 둘 모두의 투여는 심근세포 이식편의 투여 전에 개시된다. 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 이바브라딘의 투여는 심근세포 이식편의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시된다. 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론의 투여는 심근세포 이식편의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시된다.

[0143] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론은 이식 전 적어도 1시간, 적어도 5시간, 적어도 10시간, 적어도 15시간, 적어도 20시간, 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 이식 전 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일에 투여가 개시된다. 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 이바브라딘은 이식 전 적어도 1시간, 적어도 5시간, 적어도 10시간, 적어도 15시간, 적어도 20시간, 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일에 투여가 개시된다.

[0144] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 이바브라딘은 심박수를 조절하기 위해, 즉, 이식 부정맥에서 일반적으로 발생하는 빈맥을 제한하거나 조절하기 위해 필요에 따라 투여된다. 이러한 실시형태에서, 아미오다론은 이식편 투여 전(예를 들어, 시작 7일, 6일, 5일, 4일, 3일, 2일, 1일)에 또는 이식편 투여와 동시에 투여되고 이식 후 계속된다.

- [0145] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 아미오다론은 적어도 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 그 이상 투여된다. 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 이바브라딘은 적어도 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 그 이상 투여된다.
- [0146] 추가 실시형태에서, 다른 유형의 항부정맥제는 대상체의 치료를 돕기 위해 아미오다론 및 이바브라딘과 동시에 또는 추가로 투여될 수 있다.
- [0147] 특정 실시형태에서, 아미오다론 및/또는 이바브라딘 또는 이의 유사체는 대상체의 속도 조절 및 이식 부정맥의 적어도 하나의 증상을 완화하기 위해 필요에 따라 투여될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물의 투여량은 의사에 의해 결정될 수 있고, 치료의 관찰된 효과에 적합하도록 필요에 따라 조정될 수 있다. 치료 기간 및 빈도와 관련하여, 숙련된 임상가는 치료가 언제 치료적 이점을 제공하는지 결정하고, 투여량을 증가 또는 감소, 투여 빈도를 증가 또는 감소, 치료 중단, 치료 재개, 또는 치료 요법에 다른 변경을 가할지의 여부를 결정하기 위해, 대상을 모니터링하는 것이 일반적이다.
- [0148] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 방법은 이식 부정맥 및/또는 심혈관 질환의 적어도 하나의 증상을 완화시키기 위해 대상체에게 유효량의 아미오다론 및 이바브라딘을 투여하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 "심혈관 질환의 적어도 하나의 증상 완화" 또는 "이식 부정맥의 적어도 하나의 증상 완화"는 심혈관 질환과 관련된 임의의 상태 또는 증상(예: 피로, 숨가쁨, 실신, 흉부 통증)의 완화이고, 예를 들어 부정맥 자체의 감소를 포함한다. 동등한 미처리 대조군과 비교하여, 이러한 감소는 임의의 표준 기술에 의해 측정된 바에 따라 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 그보다 더 큰 감소이다.
- [0149] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 초기 치료 요법 후, 치료는 덜 빈번하게 투여될 수 있다. 예를 들어, 3주 동안 매일 투여, 투여는 격일, 3일마다, 매주 또는 대상체의 부정맥 발병률에 의해 보증되는 더 적은 빈도로 감소될 수 있다. 대안적으로, 투여는 빈번하게 유지되지만 양이 감소될 수 있다.
- [0150] 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 대상체는 본원에 기재된 바와 같은 심근세포 이식편을 투여하기 전에 심혈관 질환 또는 장애를 갖는 것으로 먼저 진단된다. 일부 실시형태에서, 대상체는 세포를 투여하기 전에 먼저 심장 질환(예를 들어, 심근 손상) 또는 장애가 발병할 위험이 있는 것으로 진단된다.
- [0151] 일부 실시형태에서, 이바브라딘 또는 이의 유사체는 빈맥이 있을 때 투여된다. 성인의 안정시 심박수는 일반적으로 60~100 bpm이다. 빈맥은 이보다 더 큰 안정시 심박수이다. 그러나 안정시 심박수는 60~100 bpm이 목표이지만 환자는 일반적으로 150 bpm 미만의 속도로 관리할 수 있다. 따라서, 이바브라딘은 안정시 심박수를 100~150 bpm, 바람직하게는 140 bpm 미만, 130 bpm 미만, 120 bpm 미만 또는 110 bpm 미만으로 유지하는 것을 목표로 이식 후 빈맥에 투여할 수 있다.
- [0152] 달리 설명되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0153] 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약 등에 제한되지 않으며, 따라서 달라질 수 있음을 이해해야 한다. 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정한 실시형태를 설명하기 위해 사용된 것으로서 본 발명의 범위를 한정하려는 의도가 아니며, 본 발명의 범위는 특허청구범위에 의해서만 한정된다.
- [0154] 확인된 모든 특허 및 기타 간행물은 예를 들어 본 개시와 관련하여 사용될 수 있는 그러한 간행물에 기재된 방법론을 설명하고 개시하기 위한 목적으로 여기에 참조로 명시적으로 포함된다. 이러한 간행물들은 오로지 그 간행물들이 본원의 출원일 이전에 공개되었기 때문에 제공된다. 이와 관련하여 그 어떤 것도 발명자가 선 공개 또는 다른 이유로 상기 공개에 선행할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이들 문헌의 날짜 또는 내용에 대한 모든 진술은 출원인이 입수가능한 정보를 기반으로 하며 이러한 문서의 날짜 또는 내용의 정확성에 대한 어떠한 승인도 구성하지 않는다.
- [0155] 여기에 설명된 기술의 일부 실시형태는 다음의 번호가 매겨진 단락 중 하나에 따라 정의될 수 있다:
- [0156] 1. 대상체에게 유효량의 아미오다론 및 유효량의 이바브라딘을 투여하는 것을 포함하는, 심근세포의 심장 이식편의 수용 대상체에서 이식 부정맥을 치료 또는 개선하는 방법.
- [0157] 2. 단락 1에 있어서, 심근세포의 심장 이식편이 시험관내 분화된 심근세포를 포함하는 방법.
- [0158] 3. 단락 2에 있어서, 시험관내 분화된 심근세포가 유도만능줄기(iPS)세포 또는 배아줄기(ES)세포로부터 분화되는 방법.
- [0159] 4. 단락 1~단락 3 중 어느 한 단락에 있어서, 심근세포의 심장 이식편이 대상체의 자기 유래의 줄기세포로부터

유래하는 방법.

- [0160] 5. 단락 1~단락 3 중 어느 한 단락에 있어서, 심근세포의 심장 이식편이 대상체와 동종이계의 줄기세포로부터 유래하는 방법.
- [0161] 6. 단락 1~단락 5 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘이 심근세포의 심장 이식편과 동시에 투여되는 방법.
- [0162] 7. 아미오다론의 투여가 심근세포의 심장 이식편의 투여 전에 개시되는 단락 1~단락 5 중 어느 한 단락의 방법.
- [0163] 8. 단락 1~단락 5 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘의 투여가 심근세포의 심장 이식편의 투여 전에 개시되는 방법.
- [0164] 9. 단락 1~단락 5 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘 둘 모두의 투여가 심근세포의 심장 이식편의 투여 전에 개시되는 방법.
- [0165] 10. 단락 1~단락 5 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘의 투여가 심근세포의 심장 이식편의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시되는 방법.
- [0166] 11. 단락 1~5 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론의 투여가 심근세포의 심장 이식편의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시되는 방법.
- [0167] 12. 단락 1~단락 11 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론의 투여가 단일 일시 투여인 방법.
- [0168] 13. 단락 1~단락 11 중 어느 한 단락에 있어서, 투여가 연속적 또는 반복적 투여인 방법.
- [0169] 14. 단락 1~단락 13 중 어느 한 단락에 있어서, 투여가 경구 투여 및/또는 정맥내 주사인 방법.
- [0170] 15. 단락 1~14 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론이, 1일 3회, 100~800 mg의 용량으로 경구 투여되는 방법.
- [0171] 16. 단락 1~14 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론이 100~300 mg의 용량으로 정맥내 일시 투여되는 방법.
- [0172] 17. 단락 1~단락 15 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론이 1.5~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈청 농도로 투여되는 방법.
- [0173] 18. 단락 1~단락 17 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘이, 1일 2회, 5~15 mg의 용량으로 경구 투여되는 방법.
- [0174] 19. 단락 1~단락 18 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘이, 빈맥이 있을 때 투여되는 방법.
- [0175] 20. 단락 1~단락 19 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘이 150 비트/분 (bpm) 이하의 안정시 심박수를 유지하도록 투여되는 방법.
- [0176] 21. 단락 1~단락 20 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가, 아미오다론 및 이바브라딘 투여 없이 동일한 유형의 세포의 이식편을 받는 대상체에 비해, 이식편 수용자가 경험하는 이식후 가속 심박수를 적어도 10% 감소시키는 방법.
- [0177] 22. 단락 1~단락 21 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여 없이 동일한 유형의 심근세포의 이식편을 받은 대상체에 비해, 대상체가 이식 부정맥을 경험하는 시간의 비율을 적어도 10% 감소시키는 방법.
- [0178] 23. 단락 1~단락 22 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가 단기인 방법.
- [0179] 24. 단락 1~단락 22 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가 부정맥의 재발 없이 이식 부정맥 부담이 0에 도달한 후 종료되는 방법.
- [0180] 25. 다음을 포함하는 심근세포 이식 방법:
- [0181] a) 시험관내 분화된 심근세포를 이를 필요로 하는 대상체의 심장 조직에 투여하는 단계;
- [0182] b) 상기 대상체의 이식 부정맥을 감소시키는 아미오다론의 유효량 및 이바브라딘의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계.
- [0183] 26. 단락 25에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘을 투여받지 않고 시험관내 분화된 심근세포를 투여받은 대상

체에 비해 대상체에서 이식 부정맥이 감소되는 방법.

- [0184] 27. 단락 25 또는 단락 26에 있어서, 시험관내 분화된 심근세포가 배아줄기세포 또는 iPS세포로부터 시험관내 분화된 것인 방법.
- [0185] 28. 단락 27에 있어서, iPS세포가 대상체 자기 유래인 방법.
- [0186] 29. 단락 27에 있어서, iPS세포가 대상체에 대해 동종이계인 방법.
- [0187] 30. 단락 25~단락 29 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘이 시험관내 분화된 심근세포와 동시에 투여되는 방법.
- [0188] 31. 단락 25~단락 29 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론의 투여가 시험관내 분화된 심근세포의 투여 전에 개시되는 방법.
- [0189] 32. 단락 25~단락 29 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘의 투여가 시험관내 분화된 심근세포의 투여 전에 개시되는 방법.
- [0190] 33. 단락 25~단락 29 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘 둘 모두의 투여가 시험관내 분화된 심근세포의 투여 전에 개시되는 방법.
- [0191] 34. 단락 25~단락 29 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘의 투여가 시험관내 분화된 심근세포의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시되는 방법.
- [0192] 35. 단락 25~단락 29 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론의 투여가 시험관내 분화된 심근세포의 투여와 동시에 또는 투여 후에 개시되는 방법.
- [0193] 36. 단락 25~단락 35 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘의 투여가 단일 일시 투여인 방법.
- [0194] 37. 단락 25~단락 36 중 어느 한 단락에 있어서, 투여가 연속적 또는 반복적 투여인 방법.
- [0195] 38. 단락 25~단락 37 중 어느 한 단락에 있어서, 투여가 경구 투여 및/또는 정맥내(IV) 주사인 방법.
- [0196] 39. 단락 25~단락 38 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론이, 1일 3회, 100~800 mg의 용량으로 경구 투여되는 방법.
- [0197] 40. 단락 25~단락 39 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론이 100~300 mg의 용량으로 정맥내 일시 투여되는 방법.
- [0198] 41. 단락 25~단락 40 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론이 1.5~2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈청 농도로 투여되는 방법.
- [0199] 42. 단락 25~단락 41 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘이, 1일 2회, 5~15 mg의 용량으로 경구 투여되는 방법.
- [0200] 43. 단락 25~단락 42 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘이, 빈맥이 있을 때 투여되는 방법.
- [0201] 44. 단락 25~단락 43 중 어느 한 단락에 있어서, 이바브라딘이 150 비트/분 (bpm) 이하의 안정시 심박수를 유지하도록 투여되는 방법.
- [0202] 45. 단락 25~단락 44 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가 단기인 방법.
- [0203] 46. 단락 25~단락 45 중 어느 한 단락에 있어서, 아미오다론 및 이바브라딘의 투여가 부정맥의 재발 없이 이식 부정맥 부담이 0에 도달한 후 종료되는 방법.
- [0204] 47. 단락 1~단락 46 중 어느 한 단락에 있어서, 약 1천만 개의 심근세포~약 100억 개의 심근세포가 대상체에 투여되는 방법.
- [0205] 48. 단락 1~단락 47 중 어느 한 단락에 있어서, 대상체가 인간인 방법.
- [0206] 49. 단락 1~단락 48 중 어느 한 단락에 있어서, 대상체가 심혈관 질환 또는 심장 사건을 갖거나 가질 위험이 있는 방법.
- [0207] 50. 단락 49에 있어서, 심혈관 질환 또는 심장 사건이 죽상경화성 심장 질환, 심근경색증, 심근병증, 심장 부정맥, 판막 협착증, 선천성 심장 질환, 만성 심부전, 역류, 허혈, 세동 및 다형성 심실 빈맥으로 이루어진 군으로

부터 선택되는 방법.

[0208] 51. 시험관내 분화된 심근세포, 아미오다론 및 이바브라딘을 포함하는 조성물.

[0209] 실시예

[0210] 실시예 1: 아미오다론/이바브라딘 요법은 이식편 관련 부정맥(graft-associated arrhythmias)을 감소시킨다

[0211] 심근세포 대체 요법은 활발한 연구 분야이며 심근경색 후 심장 기능을 회복할 수 있다. 인간만능줄기세포(hPSC)는 시험관 내에서 인간 심근세포를 생산하기 위한 출발 물질로 작용할 수 있다. 심근경색의 대형 동물 모델은 이 후보 치료제의 복원 잠재력을 입증했다(Chong *et al.*, 2014; Shiba *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). 그러나 hPSC 유래 심근세포는 전기생리학적으로 미성숙하고, 대형 동물 모델에서 심장 부정맥을 유발한다(ibid., Romagnuolo *et al.*, 2019). 이러한 이식편 유도 부정맥은 hPSC 유래 심근세포가 이식된 직후에 나타나, 3-4주 동안 일시적으로 지속되며, 이 기간 동안 수용자는 심장 돌연사 및 심부전의 위험이 있다. 관찰된 정상 굴 리듬(sinus rhythm)으로의 복귀는, 이식된 hPSC 유래 심근세포의 생체내 성숙을 반영하는 것으로 가정되며, 숙주 심근과의 완전한 전기적 통합을 시사한다.

[0212] 이러한 일시적 이식편 관련 부정맥을 감소시키면 심근경색증 환자에서 이 치료제의 안전성 프로파일을 유의하게 개선할 수 있다. 심장병 환자가 사용할 수 있는 항부정맥제는 여러 가지가 있지만, 미성숙 심근세포 이식은 자연 발생하는 심장 질환 병리나 선행 요법과는 같지 않기 때문에 심근세포 대체 요법에서 그 효능을 예측하기는 어렵다. 결과적으로 이러한 목적에 효과적인 하나 이상의 항부정맥제를 식별하는 것은 실증적으로 결정될 필요가 있다. 본원은 돼지에서 hPSC 유래 심근세포 이식으로 인한 가속 심박수와 부정맥 부담을 감소시킨 두 가지 약물의 조합을 설명한다.

[0213] **실험 설계:** 체중 30-40 kg의 유카탄 미니어처 돼지(Yucatan miniature pig)를 사용하여 심근 경색을 모델링했다. 이를 위해 동물은 경피적 경관적 관상동맥 성형술 풍선(percutaneous transluminal coronary angioplasty balloon)을 사용하여 좌 전하행 관상동맥(left anterior descending coronary artery)을 90분간 폐쇄하였다. 임플란트된 심전도 장치를 통해 연구 기간 동안 심장을 지속적으로 원격 모니터링할 수 있었다. 경색 2주 후 hPSC 유래 심근세포를 투여하고, 이식된 세포의 면역거부반응을 방지하기 위해 돼지에 면역 억제제를 시행하였다. 총 5억 개의 심근세포가 경피적 경심내막(percutaneous transendocardial) 주사를 통해 전달되었다. 설계상 이식 후 연구 기간은 적어도 30일이었다. 대조군(n=6)은 항부정맥제를 투여받지 않았다. 치료군(n = 6)은, 목표 혈청 수준 1.5 및 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 위한 아미오다론의 로딩 및 유지 투여와, 경구 이바브라딘의 1 일 2회 5~15 mg로 구성된, 조합 항부정맥제 요법을 받았다.

[0214] **새로운 발견:** 아미오다론/이바브라딘 요법의 사용은 치료받은 돼지에서 가속화된 심박수 및 부정맥 부담을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 이는 연구 과정에 걸쳐 치료받은 동물 및 대조군 동물에 대한 하기의 데이터 모음에 반영된다(도 1A-1B). 가장 놀라운 결과는 아미오다론/이바브라딘 조합이 사망률에 미치는 영향이었다(도 2). 아미오다론/이바브라딘 요법의 부재 하에, 대조군 돼지 6마리 중 2마리는 심실 세동으로 사망하고(도 9, 도 11) 4마리는 생존하였다(도 10, 도 12-14). 대조적으로, 아미오다론 및 이바브라딘으로 치료받은 6마리의 돼지 중 심혈관 합병증으로 사망한 돼지는 없었다(도 3-8).

[0215] **결과:** 이 연구에서의 개별 동물에 대한 데이터가 여기에 제공된다(도 1A-14). 치료군(아미오다론 ± 이바브라딘)의 마지막 두 동물은 면역억제(CMV 감염 재활성화)와 관련된 합병증으로 인해 안락사되었으며 병인이 심장이 아니었음을 주목해야 한다(도 7-8).

[0216] 요약하면, 본원에서 제공되는 결과는 아미오다론 및 이바브라딘 요법이 미처리 동물과 비교하여 심장 이식편을 받은 동물에서 심박수 및 부정맥 부담을 감소시키고(도 1A-1B), 이들 항부정맥제의 조합이 세포 대체 요법을 받은 동물의 생존률을 개선함을 나타낸다(도 2).

[0217] 참고문헌

[0218] Chong, JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van Biber B, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE (2014) Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510(7504):273-277.

[0219] Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, Couture L, Vogel KW, Astley CA, Baldessari A, Ogle J, Don CW, Steinberg ZL, Seslar SO, Tuck SA, Tsuchida H, Naumova A, Lyu MS, Lee J,

Hailey DW, Reinecke H, Pabon L, Fryer BH, MacLellan WR, Thies RS, Murry CE (2018) Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nature Biotech* 36(7):597-605.

[0220] Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sanchez A, Qiang B, Barry J, Laskary A, Qi X, Masse S, Magtibay K, Kawajiri H, Wu J, Sadikov TV, Rothberg J, Panchalingham KM, Titus E, Ren-Ke L, Zandstra PW, Wright GA, Nanthakumar K, Ghugre NR, Keller G, Laflamme MA (2019) Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes regenerate the infarcted pig heart but induce ventricular tachyarrhythmias. *Stem Cell Reports* 12:1-15

[0221] Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U (2016) Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538(7625):388-391.

[0222] **실시예 2: 이식 부정맥의 치료를 위해 시험된 항부정맥제**

[0223] 30-40kg 무게의 유카탄 미니어처 돼지가 심근경색증을 모델링하는 데 사용되었다. 이를 위해 동물은 경피적 경관적 관상동맥 성형술 풍선을 사용하여 좌 전하행 관상동맥을 90분 동안 폐쇄하였다. 임플란트된 심전도 장치를 통해 연구 기간 동안 심장을 지속적으로 원격 모니터링할 수 있었다. 경색 2주 후 hPSC 유래 심근세포를 투여하고, 이식된 세포의 면역거부반응을 방지하기 위해 돼지에 면역억제제를 시행하였다. 총 5억 개의 심근세포가 경피적 경심내막 주사를 통해 전달되었다. 대조군에는 항부정맥제를 투여하지 않은 반면, 치료군에는 표 1에 나타난 항부정맥제를 투여하였다. 다수의 항부정맥 요법을 시험하여 이식 부정맥을 치료하고 예방하는 효능을 확인했다. 표 1은 이러한 결과를 요약한 것이다(아래).

표 1

[0224]

표 1: 항부정맥제 시험			
테스트된 모델	항부정맥제	농도	결과
돼지 (swine)	리도카인(Lidocaine)(Ib)	100 mg IV	보통의(modest) HR 효과, 드문 심장율동 전환
돼지	플레카이니드(Flecainide)(Ic)	2 mg/kg PO, 4 mg/kg PO, 6 mg/kg PO, 10 mg/kg PO	HR 또는 EA 부담에 대한 응답 없음
돼지	프로파페논(Propafenone)(Ic)	1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV, 3 mg/kg IV	HR에 대한 응답 없음, 일시적인 심장율동 전환 * 용량 제한 구토(Dose limited emesis)
돼지	아미오다론(Amiodarone)(III)	150 mg IV	보통의 HR 효과, 빈번한 심장율동 전환
돼지	소탈롤(Sotalol)(III)	1 mg/kg PO, 2 mg/kg PO, 4 mg/kg PO	HR 또는 EA 부담에 대한 응답 없음
돼지	메토프롤롤(Metoprolol)(β_1 AR)	5 mg IV, 25 mg PO BID, 50 mg PO BID, 75 mg PO BID	중간 정도의(moderate) HR 효과(IV만), EA 부담에 대한 반응 없음
돼지	이바브라딘(Ivabradine)(I _f)	2.5 mg PO, 5 mg PO BID, 10 mg PO BID, 15 mg BID; 1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV	강력한 용량 의존적 HR 효과*(PO만), EA 부담에 대한 반응 없음 *심각한 굴 서맥(sinus bradycardia), R-on-T 이벤트 및 다형성 VT
돼지	단트롤렌(Dantrolene)(RyR ₁)	2mg/kg IV	HR 또는 EA 부담에 대한 응답 없음
비인간 영장류	베라파밀(Verapamil)(CCB)		갑작스런 심장사

[0225] 단독 투여 시, 아미오다론은 심박수 감소에 중간 정도의 효과를 내고 심장율동전환(cardioversion)을 제공했다. 이바브라딘은 심박수를 늦출 수 있었지만 이식 모델에서 부정맥 부담을 줄이는 데 큰 영향을 미치지 않았다.

테스트된 추가의 항부정맥제는, 심박수 또는 이식 동물의 부정맥 부담의 감소에 대해 중간 정도의 또는 유의하지 않은 효과를 발휘했다.

[0226] 테스트한 약물에서 아미오다론과 경구용 이바브라딘의 조합은 돼지의 심박수와 부정맥 부담 둘다를 줄이는 데 가장 효과적인 것으로 밝혀졌다. 특히, 하기 아미오다론 및 이바브라딘 요법이 이식 동물 모델에서 가장 효과적인 것으로 밝혀졌다(도 15 참조).

[0227] **돼지**

[0228] 리듬/속도 조절 **아미오다론** 200-1200 mg BID PO 시작일 이식-7

[0229] 최저 목표(trough goal) 1.5-2.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 적정

[0230] 속도 조절 **이바브라딘** 2.5-15 mg PO BID 필요에 따라(prn) HR $\geq$ 150

[0231] HR 목표 <125 bpm으로 적정

[0232] 비교를 위해 인간 대상체에서 아미오다론 및 이바브라딘의 일반적인 임상 투여량은 다음과 같다.

[0233] **인간**

[0234] 리듬/속도 조절 **아미오다론** 100-800 mg TID PO 시작일 이식-7

[0235] 속도 조절 **이바브라딘** 5-15 mg PO BID 필요에 따라(prn) 빈맥.

[0236] 요약하면, 아미오다론 및 이바브라딘의 특정 조합은 아미오다론 및 이바브라딘으로 치료되지 않은 동물과 비교하여 세포 요법을 받은 동물에서 심박수를 감소시키고 이식 부정맥 부담을 감소시킨다(도 1A-2).

[0237] **실시예 3: 인간 심근세포의 이식에 의해 유도된 이식 부정맥에 대한 약리 요법**

[0238] **배경** 심근경색증에 대한 인간만능줄기세포 유래 심근세포(hPSC-CM)의 심근내 이식에 대한 대규모 동물 연구에서 이식 부정맥(EA)이 관찰된다. 일시적이기는 하지만 EA에 의해 제기되는 위험은 임상 해석에 장벽이 된다.

[0239] **방법** hPSC-CM은 EA를 유도하기 위해 외과적 또는 경피적 전달에 의해 경색된 돼지 심장에 이식되었다. 항부정맥제 스크리닝 후, 심장사를 예방하고 EA를 억제하는 데 있어 아미오다론 플러스 이바브라딘의 효과를 확인하기 위한 전향적 연구가 수행되었다.

[0240] **결과** 모든 대상체에서 EA가 관찰되었으며, 아미오다론-이바브라딘 치료는 내약성이 우수했다. 대조군 코호트에서 5/8(62.5%)와 비교하여 치료받은 대상체 중 어느 대상체도 심장사, 불안정한 EA 또는 심부전의 1차 평가지표(primary endpoint)를 경험하지 않았다(위험비 0.00; 95% 신뢰 구간, 0-0.297, $p = 0.002$). 치료 코호트에서 감염으로 인한 2건의 사망을 포함한 전체 생존율은 치료로 개선된 것으로 나타났다(위험비 0.21; 95% 신뢰 구간, 0.03-1.01; $p = 0.05$). 치료받지 않은 경우 피크 심박수는 평균 305 ± 29 비트/분인 반면 치료받은 동물에서 피크 심박수는 185 ± 9 비트/분으로 유의하게 억제되었다($p=0.001$). 유사하게, 치료는 피크 EA 부담을 $96.8 \pm 2.9\%$ 에서 $76.5 \pm 7.9\%$ 로 감소시켰다($p=0.03$). 항부정맥제 치료는 부정맥의 재발 없이 치료 약 1개월 후에 안전하게 중단되었다.

[0241] **결론** hPSC-CM 이식 후 이식 부정맥 및 관련 후유증의 위험은 아미오다론과 이바브라딘 약물 요법의 조합으로 유의하게 감소될 수 있다.

[0242] **서론**

[0243] 심근경색증(MI)은 미국과 전 세계에서 심부전 및 사망의 주요 원인으로 남아 있다(1). MI 동안 약 10억 개의 심근세포가 영구적으로 상실되어 종종 심신을 쇠약하게 하는 심부전에 이르게 한다. 현재의 치료법은 심부전의 시작과 진행을 늦출 수 있지만, 심근 상실을 대체할 수 있는 치료법은 없으며, 동소 심장 이식(orthotopic heart transplantation)은 부족하여, 여전히 이용 가능성과 적응증이 제한된다(2). 배아줄기세포[ESC]를 포함하는 인간만능줄기세포(hPSC), 및 이들의 재프로그래밍된 사촌(reprogrammed cousins)인 유도만능줄기세포(iPSC)는 심근세포(CM)의 재생 가능한 공급원이다. hPSC 유래 심근세포(hPSC-CM)를 작은 동물(마우스, 랫트, 기니피그)의 경색된 심근에 이식하는 것은 안정적인 이식을 보여주었다(3-7). 인간만능줄기세포 hPSC-CM의 이식 후 경색된 비인간 영장류(NHP)의 재근육화 및 기능적 이점이 설명되었다(8-10). 기능적 재근육화에 추가하여, 인간 이식편은 이식 후 1개월 이내에 숙주 심근에 혈관을 형성하고 전기기계적으로 결합하며 적어도 3개월까지 내구성을 유지한다.

[0244] 더 작은 동물에서는 부정맥이 관찰되지 않았지만, 본 발명자들 및 다른 사람들은, NHP(8-10) 및 돼지(11)에서, 본원에서 이식 부정맥(EA)으로 지칭되는, hPSC-CM 이식 후의 이소성 부정맥(ectopic arrhythmias)을 일관되게 관찰한다. EA는 일반적으로 일시적이며, 이식 후 1주일 이내에 발생하고 일반적으로 1개월 후에 자발적으로 해결된다. 전기 매핑, 오버드라이브 페이스팅(overdrive pacing) 및 심장율동전환(cardioversion) 연구에 기초하면, EA는 이식편 또는 이식편 주변 심근을 중심으로 발생하며, 재진입 경로(reentrant pathway)보다는 자동 병소(automatic foci)로 기능하는 것으로 보인다(9,11). EA는 NHP에서 상당히 잘 견디어지나, Laflamme 그룹은 EA가 일부 돼지에서 치명적일 수 있다고 보고했다(11). 이러한 이유로 EA는 인간 심근세포 이식의 임상 해석에 가장 큰 장애로 등장했다(12).

[0245] 돼지는 EA에 대한 높은 민감도를 나타내고, 심혈관 연구(13) 및 세포 치료(14)에서 잘 정립된 모델이며, 그것의 더 큰 크기 때문에 경피 전달 카테터를 사용할 수 있으므로, EA의 위험과 후유증을 완화하기 위한 접근 방식이, 이 대형 동물 모델에서 테스트되었다. 연구의 1상에서 항부정맥제 패닐을 스크리닝했다. 아미오다론과 이바브라딘은 각각 리듬과 속도 조절에 가장 유망한 약물로 독립적으로 나타났다. 아미오다론과 이바브라딘 조합 치료의 효과를 결정하기 위해 2상 시험을 수행했다. 흥미롭게도 이 요법은 심장 돌연사를 감소시켰을 뿐만 아니라 빈맥과 부정맥을 억제했다.

[0246] **방법**

[0247] **hESC-CM 생산**

[0248] 이 연구에서는 2개의 hESC 세포주가 사용되었다. 초기 대상체들은, 이전에 기술된 바와 같이(8,9,15), 현탁 배양에서 배양, 확장 및 분화된 H7(WiCell) 유래 심근세포를 받았다. 대부분의 대상체들은 RUES2 (Rockefeller University) 유래 심근세포를 교반 현탁액 배양 형식으로 받았다. 간단히 말해서, RUES2 hESC를 배양하여 응집체를 형성하고 상업적으로 이용 가능한 배지(Gibco Essential 8)에서 확장시켰다. 심장 분화를 위해, 소분자 GSK-3 억제제 및 Wnt/ β -카테닌 신호 경로 억제제(Tocris)의 적시 사용(timed use)에 의해, B-27(Gibco) 또는 혈청 알부민이 보충된, RPMI-1640(Gibco), MCDB-131(Gibco) 또는 M199(Gibco)에서, 현탁 적응(suspension-adapted) 만능 응집체가 분화되도록 유도되었다. 수확, 동결보존, 해동 및 이식 후의 생존률을 강화하기 위해, 동결보존 24시간 전에 RUES2 hESC-CM에 열 충격을 가했다. Liberase TH(Fisher) 및 TrypLE(Gibco)로 처리하여 심근세포 응집체를 분리하고, 조절 속도 액체 질소 냉동기를 사용하여, 10 μ M Y-27632(Stem Cell Technologies)가 보충된 CryoStor CS10(Stem Cell Technologies)에서 동결 보존했다. 이식 약 3시간 전에 동결보존된 hESC-CM을 극저온 저장소(-150°C ~ -196°C)에서 꺼내어 37°C 수조에서 해동했다(2분 $\pm$ 30초). B-27 및 ≥ 200 Kunitz Units/mL DNase I(Millipore)이 보충된 RPMI-1640을 세포 현탁액에 첨가하여 동결보존 배지를 희석했다. 세포 현탁액을 농축하기 위해 점진적으로 더 작은 부피의 RPMI-1640 기본 배지를 사용하여 후속 세척 단계를 수행했다. 마지막 원심분리 단계의 경우, 세포 펠릿을 충분한 부피의 RPMI-1640에 재현탁하여 1.6mL에 $\sim 0.3 \times 10^9$ cells/mL의 주입을 위한 표적 세포 밀도를 달성했다. 한 경우에는, 더 많은 용량의 세포가, 약 2.3mL에 0.43×10^9 cells/mL의 밀도로, 혈청 알부민이 보충된 RPMI에 재현탁되었다. 그 세포 현탁액의 최종 부피는 최종 원심분리 단계 전에 샘플링된 계수의 결과에 의해 결정되었다. 세포 계수는 500×10^6 살아있는 세포의 최종 총 용량을 달성하기 위해 이전에 기술된 바와 같이 수행되었다(9).

[0249] **연구 디자인**

[0250] 이 연구의 목적은 심장 재근육화 요법 후의 부정맥을 약화시키는 약리학적 요법을 확인하는 것이었다. 이 연구는 2개의 상(phase)으로 설계되었다. 1상은 EA의 자연 이력을 관찰하고 다양한 항부정맥제의 효능을 스크리닝하는 것이며, 2상은 효능 테스트이다(도 16). 모든 대상체는 6-13개월 사이의 30-40kg 거세 수컷 유카탄 미니 피그이었다(S&S Farms). 1상에서 아홉 대상체는 직접 외과적 경심외막 주사(direct surgical transepical injection) 또는 이후에 경피적 경심내막 주사(percuteaneous transendocardial injection)에 의해 전달되는 500×10^6 hESC-CM으로 심장 재근육화 요법을 받았다. 처음 네 대상체(1마리는 비경색, 3마리는 경색)는 EA의 자연 이력을 학습하고 2상 약물 시험을 위한 임상 평가지표 및 파라미터를 설정하기 위해 추적되었다. 후속의 다섯 대상체는 리듬과 속도에 대한 효과를 결정하기 위해 지속적인 심전도(ECG) 모니터링과 함께 항부정맥제를 전신 투여(systematic dosing) 했다(표 2). 1상에서 아홉 대상체 중 높은 사망률이 관찰되었으며, 아홉 중 여섯은 안락사를 요하는 심실 세동(VF) 또는 빈맥 유발 심부전을 경험했다. VF는 불안정한 EA > 350 비트/분(bpm)의 빈번한 비지속성 에피소드 및 만성적으로 상승된 심박수 > 150 bpm을 갖는 심부전과 관련이 있었으며, 이는 빈맥에 의해 유발될 수 있다. 1상의 유망한 결과를 바탕으로 2상은 EA 관련 사망을 예방하기 위한 전향적

파일렛 약물 시험으로서 시작되었다.

표 2

[0251]

표 2 - 약물, 투여량 및 효과		
약물	투여량	효과
리도카인(Ib)	100 mg IV	보통의 HR 효과, 드문 심장율동전환
플레카이니드(Ic)	2 mg/kg PO, 4 mg/kg PO, 6 mg/kg PO, 10 mg/kg PO	HR 또는 EA 부담에 대한 응답 없음
프로파페논(Ic)	1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV, 3 mg/kg IV	HR에 대한 응답 없음, 일시적인 심장율동전환*
아미오다론(III)	150 mg IV	보통의 HR 효과, 빈번한 심장율동전환
소탈롤(III)	1 mg/kg PO, 2 mg/kg PO, 4 mg/kg PO	HR 또는 EA 부담에 대한 응답 없음
메토프롤롤(β_1 AR)	5 mg IV, 25 mg PO BID, 50 mg PO BID, 75 mg PO BID	중간 정도의 HR 효과(IV만), EA 부담에 대한 반응 없음
이바브라딘(I_f)	2.5 mg PO, 5 mg PO BID, 10 mg PO BID, 15 mg BID; 1 mg/kg IV, 2 mg/kg IV	강력한 용량 의존적 HR 효과(PO만)**, EA 부담에 대한 반응 없음
* 치료 용량에서 심각한 구역/구토가 관찰되어 임상적 유용성이 제한됨		
** 심한 서맥		

[0252]

약어: β_1 AR, β_1 -아드레날린 수용체; BID, 일 2회; HR, 심박수; EA, 이식 부정맥; I_f , 퍼니 전류; PO, 경구; RyR₁, 리아노딘 수용체 1; VT, 심실 빈맥

[0253]

2상에서는 아미오다론과 이바브라딘을 사용한 2종 약물(two-drug) 항부정맥 연구를 수행했으며, MI 및 MI 후 2주에 경피 hESC-CM 재근육화술을 받은 추가 15 대상체(7 치료, 6 무치료 및 2 가짜 이식)를 등록했다. 가짜 이식 대조군으로서 작용하도록 두 추가 대상체에 가짜 비히를 주사로 MI를 하였다(도 16, 도 17). 1차 평가지표는 복합 심장사(부정맥 또는 심부전으로 인한 자연사, 또는 350 bpm 초과와 빈맥 또는 심부전의 징후로 인하여 필요하게 된 임상적으로 지시된 안락사)로 사전 지정되었다. 사전 지정된 2차 평가지표는 빈맥 억제, 부정맥 지속 백분율 시간(부정맥 부담) 및 부정맥 해소였으며, 전기적 성숙(electrical maturation)이라고 명명되고 연속 48시간 동안 부정맥 부담이 25% 미만인 것으로 정의되었다. 항부정맥제 요법은 전기적 성숙 또는 이식 후 30일 중 더 이른 날짜 후에 중단되었다. 과도한 사망률을 방지하기 위해 목표 심박수와 부정맥 부담을 각각 <150 bpm 및 <25%로 유지하도록 치료를 적정했다. 350 bpm 초과와 빈맥이 종종 VF로 퇴화되었다는 초기 경험에 따라, 심박수가 350 bpm 초과에 도달하면 대상체를 인도적으로 안락사시켰다. 연속 원격 측정 ECG는 총 8주 동안 모니터링되었다(MI 후 2주 및 이식 후 6주). 참고로, 대상체 1 및 2 (무치료) 및 3 및 4 (치료)는 H7 hESC-CM을 받았고, 대상체 1, 2 및 3은 경피 전달을 채택하기(adopt) 전에 외과적으로 이식되었다. 대상체 5는 연장된 치료 워시아웃(washout) 및 모니터링을 위해, 연구 기간을 이식 후 6주로 연장하기 전에, 전기적 성숙 후 미리 지정된 평가지표로 37일차에 안락사되었다.

[0254]

동물 관리

[0255]

모든 프로토콜은 University of Washington (UW) 동물 복지 사무국과 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Office of Animal Welfare and the Institutional Animal Care and Use Committee)에 따라 승인 및 수행되었다. 동물에게 물을 무제한 제공하고 하루에 두 번 먹였다(Lab Diet-5084 Laboratory Porcine Grower Diet). 수술 절차를 위해 근육 내 부토르파놀(butorphanol), 아세프로마진(acepromazine) 및 케타민(ketamine)의 조합으로 마취를 유도했다. 동물을 삽관하고 이소플루란과 산소를 사용하여 기계적으로 환기시켜 수술 가능한 수준의 마취를 유지했다. 활력 징후는 각 절차 전반에 걸쳐 지속적으로 모니터링되었다. 모든 동물은 수술 후 진통을 위해 피하 부프레노르핀(Buprenorphine) SR-Lab(ZooPharm)을 받았고 정맥내 유타솔(Euthasol)(Virbac)로 안락사시켰다. 모든 사후 검사는 블라인드의 면허 있는 수의병리학자에 의해 수행되었다.

[0256]

돼지 심근경색 모델(Porcine myocardial infarction model)

[0257]

NHP에서 이전에 기술된 것(9)을 돼지 모델을 위해 수정하여 경피적 허혈/재관류 손상을 유도하였다. 대퇴 삼각부에 5-8cm 절개를 가하고 둔부 박리로 대퇴동맥을 노출시켰다. 혈관 접근을 얻기 전에 치료적 항응고를 달성하기 위해 헤파린을 투여했다(활성화된 응고 시간 >250초). 5-프렌치 가이드와이어/인트로듀서 시스템(5-French guidewire/introducer sheath system)(Terumo Medical)을 대퇴 동맥 내에 배치하고 고정했다. 지속적

인 ECG, 침습성 동맥 혈압, 맥박 산소 측정 및 카프노그래피(capnography)를 절차 전반에 걸쳐 모니터링했다. 부정맥의 위험을 최소화하기 위해, 허혈 전에 정맥내 아미오다론 150 mg과 리도카인 100 mg이 단일 일시(single bolus) 투여되었다. 형광투시 안내(OEC 9800 Plus, GE Medical Systems) 하에 5-French Judkins right 2 또는 하키 스틱 가이드 카테터(hockey stick guide catheter)(Boston Scientific)를 상행 대동맥으로 진행하여 왼쪽 주관상동맥의 소공을 선택적으로 결합(engage) 했다. 조영제(Visipaque)를 손으로 주입하여 관상동맥 조영술을 수행하고 0.035" 관상동맥 가이드와이어(Runthrough NS Extra Floppy, Terumo Medical)를 원위 좌 전하행 관상동맥(LAD: left anterior descending coronary artery)에 배치했다. 적절한 크기의 혈관성형술 풍선 카테터를 첫번째 대각선 분지 동맥의 원위부 중앙 LAD(mid-LAD)에 배치하고 혈관 조영술에 의해 확인된 바와 같이 원위 관류의 전체 폐쇄에 필요한 최소 압력으로 팽창시켰다. 허혈은 ECG에서 ST-분절 상승에 의해 확인되었다. 동물을 90분 동안 환기장치 및 혈액학적 지지에 의해 마취하에 유지한 후 풍선을 수축시켜 원위 관류를 회복시켰으며, 형광투시(fluoroscopy) 및 ECG로 다시 확인했다. 동물을 재관류 부정맥에 대해 관찰하고 심실 세동이 발생한 경우 외부적으로 심장율동전환하였다. 회복 전에 모든 대상체에 임플란트 가능한 원격측정유닛(telemetry units)과 중심 정맥 카테터 배치를 하였다. 간단히 말해서, 경정맥 고랑(jugular furrow)의 외부 경정맥을 노출하고 5-프렌치 중심 정맥 카테터(Access Technologies)를 삽입하여 등쪽 견갑골 부위로 뚫고 나오게 하였다. 원격 측정 송신기(EMKA easyTEL+)를 상기 경정맥 고랑의 동일한 절개부를 사용하여 피하 주머니에 임플란트하고, 피하 리드(subcutaneous leads)를 뚫어 심장의 정점부터 기저부까지 캡처했다. 경색을 포함한 전체 시술 사망률은 10% 미만이었다.

[0258] 심장 재근육화 요법(Cardiac remuscularization therapy)

[0259] 세 초기 대상체(1-3)에 대한 세포 이식은, 이전에 NHP에 대해 기술한 바(9)에 약간의 수정을 하여, 경색 주변 영역에 직접 경심외막 주사하여 수행되었다. 간단히 말해서, 부분 정중 흉골절개술(partial median sternotomy)을 행하여 경색된 전방 좌심실을 노출시켰다. 지갑 끈 봉합(purse-string sutures)은 LAD가 대항하는 5개의 개별 위치에 미리 배치되었으며, 이는 중앙 허혈성 영역과 측면 경계 영역을 표적으로 한다. 500×10^6 hESC-CM의 총 용량을 전달하기 위한 총 15회의 주사를 위해, 바늘 주위에 지갑 끈(purse-string)을 단단히 조인 후, 부분적 절수 및 측면 재배치로 각각 100 μ 씩 3회 주입하였다. 모든 후속 대상체(4-19)에게는 NOGA-MyoStar 플랫폼(BioSense Webster)을 사용하여 경피적 경심내막 주사를 통해 세포 이식을 하여 먼저 좌심실의 경색 영역을 매핑한 다음, 500×10^6 hESC-CM의 총 용량을 위해 각각 100 μ 의 16회의 개별 심내막 주사를 전달했다. 우수한 위치와 루프 안정성, ST-분절 상승, 그리고 전기해부학적 맵(electroanatomical map) 및 단극성 전압에 의한 적절한 위치에의 바늘 삽입에 의한 조기 심실 수축(PVC: premature ventricular contraction)의 존재와 함께, 주사가 수행되었다. 외과적 및 경피적 세포 이식 둘다에 대하여, 주사의 2/3는 시각적으로 또는 5-7.5 mV의 단극 전압으로 정의된 경색 주변 경계 영역에 배치되었고 나머지 1/3은 시각적으로 또는 <5 mV의 단극 전압으로 정의된 중심 허혈 영역에 배치되었다. 두 대상체(9 및 10)는 프로토콜에 따라 경색되었지만 가짜 이식 대조군으로서 역할을 하는 세포 없이 RMI-1640 비히클의 가짜 주사를 받았다.

[0260] 면역억제 요법(Immunosuppression therapy)

[0261] 모든 대상체들은 이전에 기술된 것에(9) 수정을 하여 이중이식 거부반응을 예방하기 위해 3종 약물 면역억제 요법을 받았다. 초기 요법(대상체 1-6)의 경우, 세포 이식 5일 전에 경구 사이클로스포린 A를 시작하여 연구 기간 동안 >400 ng/mL(약 250-1000 mg 1일 2회)의 최저 혈청 수준을 유지했다. 이식 2일 전에 경구 메틸프레드니솔론(methylprednisolone)을 2주 동안 3mg/kg으로 시작한 다음 연구의 나머지 기간 동안 1.5 mg/kg으로 낮추어 적정했다. 이식 당일 아바타셉트(Abatacept)(CTLA4-Ig, Bristol-Myers Squibb) 12.5 mg/kg을 정맥내 투여하고 이후 2주 간격으로 투여하였다. 면역 억제와 관련된 합병증(주로 돼지 거대세포바이러스(porcine cytomegalovirus) 및 주폐포자충 폐렴(Pneumocystis pneumonia)) 때문에, 거부에 대한 조직학적 증거가 없는 대상체 7-19에 대해 사이클로스포린 A 최저 수준이 >300 ng/mL로 축소되고 메틸프레드니솔론이 1.0 mg/kg으로 감소되었다. 유치 중심 정맥 카테터의 감염을 예방하기 위해 예방적 경구 세파렉신(cephalexin)을 모든 대상체에게 투여했다. 대상체 3이 주폐포자충 폐렴을 발병한 후에 예방적 설파메톡사졸(sulfamethoxazole)/트리메토프림(trimethoprim)이 추가되었다. 대상체 6에서 내인성 돼지 거대세포바이러스의 활성화가 발견된 후 예방적 발간시클로버(valganciclovir) 및 프로바이오틱스가 추가되었다.

[0262] 항부정맥 치료(Antiarrhythmic treatment)

[0263] 치료 대상체는 세포 이식 7일 전부터 시작하여 1일 2회 경구 아미오다론 1000~1200 mg을 경구 투여한 후 1.5-4.0 μ g/mL의 정상 상태 혈장 수준을 유지하기 위해 1일 2회 경구로 400~1000 mg의 유지 용량을 투여했다(도

18). 이바브라딘은 지속성 빈맥이 150 bpm 이상에 도달한 때 1일 2회 2.5 mg을 경구 투여하기 시작하여, 목표 심박수 < 125 bpm을 위해 1일 2회 15 mg까지 3일마다 적정했다(titrate). 하나의 대상체(대상체 1)를 제외한 모든 대상체는 추가 심박수 조절을 위해 부가적 이바브라딘을 요했다. 전기적 성숙에 도달한 후 또는 이식 후 30일차 중 더 이른 날짜에 항부정맥제를 중단하여 치료를 위시아웃(washout) 하고 부정맥의 재발을 평가했다. 모든 대상체들은 합병증 없이 항부정맥 요법을 견딜 수 있었다. 무치료 및 가짜 이식 대조군 대상체는 MI 절차에 따라 항부정맥제를 투여받지 않았지만, 그 외에는 모든 면역억제 및 표준 치료를 받았다.

[0264] 아미오다론 약물 모니터링

[0265] 돼지 모델에서 정상 상태 혈청 수준을 모니터링하고 효능을 보장하고 용량 관련 독성을 피하기 위한 경구 투여를 가이드하기 위해 아미오다론에 대한 새로운 액체 크로마토그래피-질량 분석 시험이 확립되었다. 선행의 인간 약동학 연구(16,17)로부터 1.5-4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 목표 혈청 수준이 외삽되었다. 경구 아미오다론 요법 중단 후의 제거 동역학은 6마리의 돼지(대상체 6, 7, 8, 13, 14, 16)에서 매주 최저(trough) 농도를 얻어 연구되었다(도 18).

[0266] 심전도(ECG: Electrocardiography) 분석

[0267] 심근 경색 시점부터 실시간으로 원격 측정 ECG를 지속적으로 모니터링하여 심장사 또는 불안정한 EA의 1차 평가 지표를 검출했다. ecgAUTO 3.3.5.10 소프트웨어 패키지(EMKA Technologies)를 사용하여 면허를 가진 심장 전문의가 심박수 및 부정맥 부담의 자동 정량화를 오프라인으로 수행했다. 부정맥은 이소성 박동(ectopic beat)(예: 조기 심실 수축) 또는 리듬(예: 특발성 심실 리듬(idioventricular rhythm), 심실 빈맥)으로 정의되었다. EA는 일반적으로 다양한 속도 및 형태의 지속성 및 비지속성 심실 빈맥으로 관찰되었지만 느리고 좁은 복합 이소성 리듬도 포함했다(도 19). 심박수와 부정맥 부담을 5분마다 연속 2분간 정량화하고(총 리듬의 40%를 카운트) 일일 평균으로 표시했다.

[0268] 조직학적 분석(Histologic analysis)

[0269] 조직학적 연구는 이전에 기술된 바에(8,9) 수정을 하여 수행되었다. 간단히 말해서, 파라포름알데히드로 고정된 심장을 해부하여 심방과 우심실을 제거한 후 단축 단면을 2.5mm 간격으로 절단했다. 조직 카세트에 추가 분할하기 전에 전체 심장, 좌심실 및 각 슬라이스의 무게를 얻었다. 그런 다음 조직을 처리하고 파라핀에 포매한 다음 염색을 위해 4 μm 섹션을 절단했다. 형태 측정을 위해, 경색 영역은 Picro-Sirius Red 염색에 의해 식별하고: 인간 이식편은 항-인간 심장 트로포닌 T에 의해 식별하고, 아비딘-비오틴 반응(ABC Kit, VectorLabs)을 사용하여 염색한 후, 디아미노벤지딘(Sigmafast, Sigma Life Science)을 통해 발색 검출(도 20)하였다. 전체 슬라이드 스캐너(Nanozoomer, Hamamatsu)를 사용하여 슬라이드를 디지털화하고, NDP.view 2.6.13(Hamamatsu)으로 이미지를 보고 송출했다. ImageJ 오픈 소스 소프트웨어 플랫폼에서 맞춤형 알고리즘을 사용하여 경색 및 이식편의 면적(area)을 분석했다(18). 간단히 말해서, TIFF 형식(19)으로 이미지를 추출한 후, 이미지 전경(foreground)을 픽셀의 밝기 분포에 유래하는 임계값에 의해 세그먼트화하여, 이미지화된 조직 섹션을 묘사하는 이진 마스크(binary mask)가 생성되었다. 색조, 밝기 및 채도를 임계값으로 지정하는 후속의 색상 디컨볼루션(color de-convolution)을 통해, Picro-Sirius Red 염색으로 염색된 영역 또는 인간 심장 트로포닌-T에 대해 면역표지된 면적을 세그먼트화할 수 있었다. 분산 섬유증(diffuse fibrosis)으로부터 흉터(scar)를 구분짓기 위해 입자 크기에 대한 컷오프(cut-off)가 적용되었다. 경색 크기 및 이식편 크기는, (백분율 면적(percent area)×블록 중량(block weight))으로 계산되고, 전체 심실에 대해 합산되었으며, 각각 좌심실 질량 또는 경색 질량의 백분율로 표시되었다. 푸르키네 섬유 염색을 위한 보충적 방법을 참조.

[0270] 통계적 분석

[0271] 통계 분석 및 그래프 작성은 Prism 8.4.2 소프트웨어(GraphPad) 및 Stata 15(StataCorp, College Station, Texas)를 사용하여 수행되었다. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)로 표시된다. 달리 명시되지 않는 한 유의 임계값 $P < 0.05$ 로 양측 스튜던트 t-검정을 사용하여 비교를 수행했다. 오차 막대 도표는 심박수 및 부정맥 부담의 평균 $\pm$ SEM이 두 치료군에서 시간이 지남에 따라 어떻게 변하는지를 나타낸다. Kaplan-Meier 플롯은 심장사, 불안정한 EA 또는 심부전의 1차 평가지표에 대한 생존 곡선 및 모든 원인으로 인한 사망을 나타낸다. Cox 비례 회귀 모델은 1차 결과와 사망률에 대한 두 치료군 간의 위험비(HR: hazard ratio)를 추정하는 데 사용된다. 유의성은 우도 비율 테스트(likelihood ratio test)를 기반으로 하고 HR의 신뢰 구간은 Stata의 stcox 절차에서 오프셋 항을 변경하여 가능성 테스트(likelihood test)를 반전하여 계산된다.

[0272] 결과

[0273] 경색 돼지 모델에서 hESC-CM의 경피적 전달

[0274] hESC-CM의 카테터 기반 심내 전달은 경색된 돼지 심장을 재근육화하는데 안전하고 효과적이었다(도 20). 심근 경색 또는 심근세포 이식편 크기의 유의한 차이는 치료군 간에 관찰되지 않았다. 치료 및 무치료 코호트에 대한 평균 경색 크기는 각각 좌심실의 $11.7 \pm 1.1\%$ 및 $10.5 \pm 2.0\%$ 로 비슷했다($p=0.59$). 경색 크기에 대한 이식편 크기도 치료와 무치료를 위해 각각 $2.3 \pm 0.7\%$ 및 $2.8 \pm 1.3\%$ 로 비슷했다($p=0.74$). hESC-CM의 전달은 의도한 대로 경색 주변 경계 영역과 중심 허혈성 영역을 성공적으로 표적화했으며, 이전에 보고된 바와 같이 뚜렷한 hPSC-CM 이식편이 숙주 심근에 이식되었다(8-11). 모든 이식편은 전방, 중격(antero-septal) 및 전방 측벽(antero-lateral walls)에 위치했으며, 이전에 돼지에서 보고된 바와 같이, 연구 종료까지 성숙도가 증가하면서 이식 후 2주 전의 초기 시점에서 구조적으로 미성숙한 것으로 나타났다(11).

[0275] 이식 부정맥의 임상력(Clinical history)

[0276] 연구의 모든 동물에 대한 순서도가 도 16에 나타나 있다. 심근 경색 및 비히클의 경피적 심장내 주사를 받은 두 가짜 이식 대상체(9 및 10)에서 유의한 부정맥이 관찰되지 않았다. 인간 심근세포 이식편을 받은 모든 대상체는 세포 이식 후 2-6일차 사이에 EA가 발생했다. EA의 시작은 비지속성 VT의 일제 사격(salvo)으로 특징지어졌으며, 이는 일반적으로 110~250 bpm 범위의 속도(rate)를 갖는 지속성 VT 기간으로 진행되었다(도 19). VT는 종종 다형성이었고, 동일한 동물이 다른 전기 축(electrical axes)과 넓은 및 좁은 복합 빈맥 모두를 다른 시간에 나타내었다. 8마리의 무치료 동물 중 4마리에 있어서, EA는 불안정한 빈맥(지속 심박수 >350 bpm으로 정의됨)의 사전 지정된 평가지표로 인해, 치명적이거나 안락사를 요했다. 하나의 추가적인 무치료를 경우(대상체 12)에서, 급성 심부전이 300 bpm의 속도로 EA의 시작 직후 임상적으로 기록되었으며, 수의사 스태프의 권고에 따라, 대상을 안락사시켰다. 이후 부검에서 심부전의 징후가 확인되었다. 다른 모든 경우에서, EA는 >350 bpm 까지 빠르게 가속되고(대상체 11 및 12), 두 경우에서, 안락사 전 VF로 악화되는 것으로 나타났다(대상체 1 및 2)(표 3). 부정맥 평가지표 4건 중 3건은 EA 발생 후 처음 3일 이내에 발생했으며, 빈맥이 거의 일정할 때 발생했다. 평균 심박수는 이식 후 8일차에 최고조에 달하고 그 이후 감소하기 시작한 반면, 부정맥 부담은 8~16일차에 정체되어 그 후 정상화되기 시작했다. 무치료 코호트의 세 생존체 중 둘은 연구 종료 시 리듬이 정상화되지 않았고 평균 42%의 부정맥 부담을 경험했다(대상체 15 및 17). 심박수와 리듬이 정상화한 무치료 코호트의 하나의 대상체는 이식 후 26일차에 정상화되었다(대상체 11).

표 3

표 3- 대상체 결과

대상체	나이 - 월	무게 - kg	MI	세포 주	접근 방식	cTnT - %	생존력 - %	정색 크기 - %LV	이식편 크기 - % 경색	HR - bpm		부정맥 부담- 하루 중 %		결과
										7 일 차	30 일차	7 일차	30 일 차	
치료														
3	7.7	34.7	Yes	H7	Surg	98%	89%	-	-	72.8	n/a	2.0	n/a	안락사, 26 일차 (PCP)
4	7.6	32.0	Yes	H7	Perc	98%	89%	-	-	92.7	93.9	86.0	97.8	생존
5	7.9	33.0	Yes	RUE S2	Perc	91%	89%	-	-	162.6	80.9	25.6	0.5	생존
6	7.7	33.4	Yes	RUE S2	Perc	91%	90%	10.1%	1.4%	99.6	n/a	47.1	n/a	안락사, 19 일차 (pCMV)
7	7.7	37.0	Yes	RUE S2	Perc	91%	93%	9.6%	0.3%	89.4	78.6	45.8	28.2	생존
8	10.0	33.5	Yes	RUE S2	Perc	86%	88%	15.9%	3.4%	72.8	77.4	67.6	4.7	생존
15	9.0	33.0	Yes	RUE S2	Perc	89%	88%	10.9%	4.2%	79.4	75.7	35.4	44.9	생존
16	8.8	34.0	Yes	RUE S2	Perc	88%	85%	14.6%	0.7%	74.2	68.6	43.9	7.6	생존
18	12.7	32.5	Yes	RUE S2	Perc	94%	75%	9.3%	3.7%	69.0	78.2	1.6	1.6	생존
Avg± SEM	8.8± 0.6	33.7± 0.5				90± 1%	87± 2%	11.7± 1.1%	2.3± 0.7%	90.3± 9.7	79±2.9	39.5± 9.2	26.5± 13.4	
무치료														
1	8.9	32.0	No	H7	Surg	98%	88%	-	-	328.2	n/a	100.0	n/a	1 차 평가지표 7 일차 (VF)
2	10.5	32.0	Yes	H7	Surg	98%	90%	-	-	120.2	n/a	62.7	n/a	1 차 평가지표 18 일차 (VF)
11	9.4	33.5	Yes	RUE S2	Perc	82%	87%	9.7%	1.1%	165.6	n/a	94.0	n/a	1 차 평가지표 12 일차(EA)
12	9.5	35.0	Yes	RUE S2	Perc	86%	90%	13.2%	1.0%	n/a	n/a	n/a	n/a	1 차 평가지표 5 일차 (EA)
13	9.7	35.5	Yes	RUE S2	Perc	87%	83%	16.5%	1.7%	162.0	82.6	95.9	1.9	생존
14	9.0	33.0	Yes	RUE S2	Perc	87%	90%	4.6%	9.1%	n/a	n/a	n/a	n/a	1 차 평가지표 6 일차 (EA/HF)
17	7.0	33.0	Yes	RUE S2	Perc	98%	70%	13.5%	0.4%	106.0	115.2	49.1	75.7	생존
19	6.4	33.5	Yes	RUE S2	Perc	92%	74%	5.4%	3.6%	98.5	84.3	71.5	51.7	생존
Avg± SEM	8.8± 0.5	33.4± 0.4				91±2%	84±3%	10.5±2 %	2.8±1.3 %	163.4 ±34.9	94±10.6	78.9± 8.5	43.1± 21.7	
P-값†	0.97	0.73				0.77	0.31	0.59	0.74	0.03	0.09	0.01	0.52	
가짜 이식														
9	8.30	33.5	Yes	RUE S2	Perc	n/a	n/a	-	n/a	71.5	67.6	0.8	0.0	생존
10	7.77	33.0	Yes	RUE S2	Perc	n/a	n/a	-	n/a	76.5	69.4	1.2	0.8	생존
Avg± SEM	8.0± 0.3	33.3± 0.3								74± 2.5	68.5± 0.9	1.0± 0.2	0.4± 0.4	

† 치료 vs 무치료

[0277]

[0278]

표의 약호: bpm, beats per minute; EA, 이식 부정맥 (engraftment arrhythmia); hESC-CM, 인간배아줄기세포 유래 심근세포 (human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte); HF, 심부전 (heart failure); HR, 심박수 (heart rate); MI, 심근경색증 (myocardial infarction); surg, 수술(surgery); PCP, 주폐포자충 폐렴 (pneumocystis pneumonia); pCMV, 돼지 거대세포바이러스 (porcine cytomegalovirus); perc, 경피적 (percutaneous); VF, 심실세동 (ventricular fibrillation); n/a, 해당사항 없음

[0279]

항부정맥 효과에 대한 약물 스크리닝

[0280]

연구의 1상에서는, 나트륨 채널, 칼륨 채널 및 베타-아드레날린성 수용체를 광범위하게 표적으로 하는 6가지 표준적(canonical) 항부정맥제인 리도카인(lidocaine)(Ib, 나트륨 채널 억제제), 플레카이니드(flecainide)(Ic, 나트륨 채널 억제제), 프로파페논(propafenone)(Ic, 나트륨 채널 억제제), 아미오다론(III, 칼륨 채널 억제제), 소탈롤(sotalol)(III, 칼륨 채널 억제제) 및 메토프롤롤(metoprolol)(β1-아드레날린성 수용체 억제제)을, EA 심박수 및 리듬에의 영향에 대하여 스크리닝하였다. 또한 페니 전류/HCN4 채널 길항제인 이바브라딘을 테스트

했다(표 1 및 2). 이 시리즈는 한정적인 것은 아니고 후보 작용제(agent)를 신속하게 식별하기 위한 것이었다. EA인 동안 동물들을 실험실로 데려와, 마취하고, 항부정맥제의 단기 정맥 주입 효과를 연구했다. 세 경우에서, 정맥내 아미오다론은, 짧게나마, 불안정한 EA를 >350 bpm로부터 더 낮은 심박수 일반적으로 굴 리듬(sinus rhythm)으로 성공적으로 심장을동전환했다(도 21A). 경구 이바브라딘은 심박수에 대한 강력한 용량 의존적 효과를 나타내었지만 굴 리듬을 회복시키지는 못했다(도 21B). 다른 약물 중 다섯은 이 스크리닝에서 유의미한 효과가 없었다(리도카인, 플레카이니드, 소탈롤, 및 메토프롤롤). 프로파페논은 2종 약물 첼린지에서 심박수를 잠시 감소시키고 굴 리듬을 회복시켰지만, 이 약물은 상당한 위장 독성과 관련이 있었고 더 이상 연구되지 않았다(데이터는 표시되지 않음).

[0281] **아미오다론-이바브라딘은 생존률(survival)을 향상시킴**

[0282] 이 연구의 2상에서 부가적 이바브라딘과 함께 만성 아미오다론이 심장사, 불안정한 EA >350 bpm 및 심부전의 조합된 1차 평가지표를 감소시키는 것으로 고려되었다. 유사한 베이스라인(baseline) 및 세포 이식 특성을 가진, 총 아홉의 치료 대상체, 여덟의 무치료 대상체, 및 두 가짜 이식 대상체가 본 연구에 등록되었다(표 3). 방법란에 자세히 설명된 바와 같이, 치료받은 동물들은 아미오다론의 일시(bolus) 및 유지(maintenance) 용량을 받았고, 심박수를 <150 bpm으로 유지하기 위해 필요에 따라 이바브라딘이 주어졌다. 모든 치료 대상체(100%)는 무치료 대상체의 3/8(37.5%)과 비교하여 1차 심장 평가지표 없이 생존했다(도 22A). 1차 평가지표의 위험비(hazard ratio)는 항부정맥 치료 시 0.000 (95% CI, 0.000-0.297, p=0.002)이었다. 참고로, 치료 대상체 중 둘(3 및 6)은 이식 후 19일차(day 19) 및 26일차(day 26)에 면역 억제 관련 합병증(각각 주폐포자충 폐렴 및 돼지 거대세포바이러스)으로 인해 비 심장 사망을 경험했다. 전체 생존에 대한 치료 의향 분석(intention-to-treat analysis)은 위험비가 0.212인 치료 코호트를 선호했다(95% CI, 0.030-1.007; p = 0.051)(도 22B).

[0283] **빈맥 및 부정맥 부담 억제**

[0284] 심박수 및 부정맥 부담의 집단 및 개별 대상체 수준 데이터는 각각 도 23A-23B 및 23C-23D에 제공된다. 평균 심박수는 무치료의 경우와 비교하여 항부정맥제 치료를 받은 경우 유의하게 낮았다. 평균 심박수는 이식 후 7 일차에 무치료 동물에서 163 ± 35 bpm에서 정점에 이르렀고, 치료 그룹의 심박수는 평균 90 ± 10 bpm (p = 0.03)이었다(표 3 및 도 23). 치료 동물의 심박수는 MI 및 이식 전의 정상 안정시 심박수와 유의한 차이가 없었다(84 ± 1 bpm, p = 0.21). 이식 후, 피크 심박수는 무치료 동물에서 평균 305±29 비트/분인 반면, 치료는 빈맥을 185±9 비트/분으로 유의하게 억제하였다(p=0.001)(도 23E). 부정맥 부담은 부정맥으로 보낸 하루 중 백분율(the percentage of the day spent in arrhythmia)로 정의되었다. 치료는 피크 부정맥 부담을 96.8±2.9%에서 76.5±7.9%로 감소시켰다(p=0.03)(도 23F). 심박수 또는 부정맥 부담의 차이는 이식 후 30일차에는 관찰되지 않았는데, 이는 대부분의 부정맥이 치료와 무관하게 해소되었기 때문이다(도 23A-23B)(각각 p=0.09 및 p=0.52). 항부정맥제 치료는 부정맥의 재발 없이 전기적 성숙(electrical maturation)을 달성한 모든 치료 대상체에서 30일차까지 안전하게 중단되었다(도 23). 두 치료 대상체와 두 무치료 대상체(각각 3, 4와 15, 17)는 전기적으로 성숙하지 못했고 연구 종료 시 심각한 부정맥을 보였다. 이 4마리의 동물에서 심박수는 치료와 상관없이 잘 조절되었으며 이들은 연구가 완료될 때까지 생존했다. 평균 혈청 아미오다론은 중단 1주 이내에 0.42±0.12 µg/ml로 치료 이하(sub-therapeutic)였다(도 19).

[0285] **숙주 푸르키네 전도 시스템과의 이식편 상호 작용**

[0286] 돼지 심근에서 hESC-CM 이식편의 현미경 검사는 숙주 돼지 심장의 분산 푸르키네 전도 시스템(diffuse Purkinje conduction system)과의 상호작용을 입증한다(도 24). 이전 보고서(20, 21)와 일관되게, 근접한 hESC-CM 이식편과 함께 국소화하는, 좌심실 전체에 걸친 벽내(intramural) 푸르키네 섬유(PF)의 망상 네트워크(도 24A, 표시되지 않은 비디오 데이터에 의해, 천연 돼지 심근 전체에 걸쳐 망상 네트워크가 확인되었음)가 관찰되었다(도 24B; 표시되지 않은 비디오 데이터에 의해, 느린 골격 트로포닌 I(ssTnI: slow skeletal troponin I)로 표지된 hPSC-심근세포가, 코넥신 40+ 푸르키네 섬유와 상호작용함이 확인되었음). 코넥신 40(Cx40)은 예상대로 더 낮은 근절 함량과 T-세관의 결여가 관찰되는 푸르키네 세포 겹 접합부(20,22)를 특이적으로 염색한다(도 25).

[0287] **논의**

[0288] hPSC-CM의 심근내 이식은 경색된 심장을 재근육화하고 기능을 회복시키는 유망한 전략이다(2). 심부전을 예방하고 치료하기 위한 그러한 치료법은 충족되지 않은 큰 요구 사항을 해결함에 있어서 획기적인 발전이 될 것이다. 대형 동물을 대상으로 한 연구에서 장기간의 효능이 입증되었으며, 일시적이지만 잠재적으로 치명적인 부정맥의 유의한 안전 신호도 정의되었다. 이전 연구(9-11)에서 입증된 바와 같이, EA는 심근경색증에 대한 심장

재근육화 요법의 예측 가능한 합병증이다(23). NHP에서 EA는 일반적으로 가변 전기 축을 갖는 광범위하고 복잡한 빈맥으로 나타나며, (8,9) 이는 최근 Laflamme laboratory에서 돼지에서 재현되었다(11). EA는 다른 이식 병소에서 유래하는 이소체(ectopy)로서 전기 축의 관찰된 변화로 인해 다형성으로 본원에 기술되어 있다. 흥미롭게도 돼지에서 좁은 복합 VT가 넓은 복합 빈맥과 교대로 관찰되었으며, NHP에서는 볼 수 없는 패턴이다. 이론에 구속되기를 바라지 않고, 천연 및 이식된 돼지 심근의 조직학은, 넓은 복합 박동(wide-complex beats)은, 느린 전도를 갖는 작업형 심근(working-type)과 접촉하는 이식편에서 기원하고, 좁은 복합 박동(narrow complex beats)은, 이식편이 돼지 심장에 분산적으로 침투하는 벽내 푸르키네 섬유와 접촉할 때 기원한다는, 가설을 지지한다(20,21). 500×10^6 hESC-CM이 이식된 모든 17 대상체는 유의한 부정맥의 부담을 나타내었으며, 이는 일반적으로 일시적이지만, 돼지의 높은 사망률과 관련이 있다. Laflamme와 동료들의 최근 연구와 비교할 때, 본 연구에서 EA와 관련된 더 높은 이환율(morbidity)과 사망률(mortality)이 관찰되었다(11). 이는 유카탄 미니피그 모델(Yucatan minipig model), 경피 세포 전달 또는 세포 생산물에 있어서의 차이를 반영한다. 여기에 설명된 실험은 심장 이환율의 두 가지 주요 메커니즘을 제안한다. 첫째, 빠른 EA>350 bpm은 치명적인 심실세동으로 퇴행할 수 있고, 둘째, 만성 빈맥>230 bpm을 가진 돼지에서 심부전이 일반적으로 뒤따른다(24). 결과로서, 1차 평가지표는 항부정맥제 시험에서 과도한 사망률을 제한하기 위해 이들 파라미터를 포함했다.

[0289] 베이스라인(baseline) 아미오다론 및 부가적 이바브라딘과 항부정맥 치료의 조합은, 치료받은 모든 대상체에서 심장사, 불안정한 EA 및 심부전의 1차 평가지표를 안전하게 예방했으며, 이는 약리학을 통해 EA의 위험을 완화할 수 있음을 나타낸다. 치료는 유의하게 감소된 피크 빈맥 및 부정맥과 관련이 있었다. 대상체들이, 전기적 성숙이라고 하는, 부정맥 부담의 지속적인 개선을 경험하였을 때, 모든 대상체들에서 항부정맥 요법이 성공적으로 철회되었다. 따라서 단기의 아미오다론 및 이바브라딘 치료는 이식편이 부정맥을 덜 유발하게 될 때까지 전기적 안정성을 촉진했다.

[0290] 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 항부정맥 치료에 대한 이점의 기전은, 자동성(automaticity)의 억제와 관련될 수 있으며, 이는 심박수와 부정맥 부담 둘다를 감소시킨다. 약물은 VF로 악화될 위험이 가장 큰 EA의 초기 단계에서 특히 유익했다. NHP(9)와 돼지(11)에서 각각 수행된 전기생리학 연구는, EA의 병인이, 임상적 심실 빈맥에서 일반적으로 관찰되는 거시적 재진입(macro-reentry)보다는, 증가된 병소 자동성(focal automaticity)임을 시사한다(25). 무치료 동물에서 EA가 불안정해짐에 따라, 심박수는 >350 bpm으로 빠르게 가속되었으며, 이러한 상승은 별개의 기전(예를 들어, 재진입으로 이어지는 자동성)일 가능성이 배제되지 않았다. 이는 치료가 불안정하고 치명적인 부정맥을 성공적으로 억제했지만 EA를 완전히 예방할 수 없었던 이유를 시사한다. 속도-조절(rate-control) EA에 대한 이바브라딘의 효능은, 그것의 약리학적 표적인, 미성숙 심근세포 및 hPSC-CM(26)에서 고도로 발현되는 HCN4 채널에 의해 전달되는 I_f 전류가, 중요한 매개자(mediator)일 수 있음을 시사한다. 이바브라딘 그 자체는 EA를 폐지하지 않았으며, 이는 I_f 전류가 부정맥의 속도 조절자(rate-modulator)이지만 유일한 원인은 아님을 시사한다. 대조적으로, 아미오다론은 일부 급성 주입 실험에서 만성적으로 EA의 부담을 감소시키고 굴 리듬을 명확하게 회복시켰다(도 21A-21B). 주로 K^+ 채널 차단제로 분류되지만, 아미오다론은 또한 Na^+ 채널, Ca^{2+} 채널 및 β -아드레날린성 수용체를 길항하는 것으로도 잘 알려져 있다(27). 따라서, 여기에 개시된 효과적인 약물 조합의 발견의 중요성을 감소시키는 것은 아니지만, 아미오다론의 효능으로부터 EA의 기전에 대한 통찰력을 얻기는 어렵다. EA의 소멸은 줄기세포 유래 이식편의 성숙과 일치하며(8,9,28), 부정맥 발생의 창(window)은 숙주의 심근과 보다 유사한 상태에 도달하기 전의 생체 내 이식편 성숙의 기간을 반영할 수 있다고 생각된다(26,29-33). 이식 전 성숙 촉진, 유전자 편집, 및 숙주/세포 상호작용 조절과 같은 추가 전략은 부정맥 조절의 추가 수단을 제공할 수 있다. EA 기저의 기전에 대한 추가 조사는, 대형 동물 모델에서의 표현형 분석 전에, 약리학 및 전기 생리학 연구를 수행하기 위한 더 높은 처리량의 플랫폼의 개발에 의해 가속화될 것이다.

[0291] 이식 부정맥은 심장 재근육화 요법의 임상 해석에 가장 중요한 장벽이다. NHP에서 나온 EA의 자연 이력과, 더 최근의 돼지 데이터는, 일단 EA가 해결되면 추가 부정맥의 위험이 낮다는 것을 시사한다. 이 연구는, 임상적으로 관련된 항부정맥제 치료가, 치명적인 부정맥을 성공적으로 억제하고 빈맥을 조절하여 전기적 정지(electrical quiescence)를 달성할 수 있다는 개념 증명(proof-of-concept)을 제공한다. 이는 심장 재근육화 요법을 위한 심근세포 이식의 임상적 안전성과 관련하여 중요한 진전이다.

[0292] 이 연구는 EA가 약리학적 억제에 반응함을 나타낸다. 이 연구에서는 임상적으로 관련된 용량의 아미오다론 및 이바브라딘이 투여되었다.

[0293] **결론**

[0294] 심장 재근육화 요법의, 돼지 경색 모델을 활용한 이 연구에서, EA는 보편적으로(universally) 관찰되었으며 유의한 사망률과 연관되었다. 부가적인 이바브라딘과 조합된 만성 아미오다론 치료는, 심장사, 불안정한 EA 및 심부전의 조합된 1차 평가지표를 성공적으로 예방했다. 전체 생존률은 항부정맥 치료에 의해 유의하게 개선되었으며 심박수 및 리듬 조절과 관련이 있었다.

[0295] **실시예 5: 보충적 방법**

[0296] **돼지에서 파일럿 항부정맥 스크리닝(Pilot antiarrhythmic screening)**

[0297] 5마리의 경색된 돼지는 모든 정형화된(stereotypic) EA를 나타내는 hESC-CM 이식을 받았다. 대상체들은 항부정맥제를 여러 차례 투여받았고 지속적인 ECG 모니터링을 통해 급성 반응이 관찰되었다. 정맥 내 작용제(agent)는 2분에 걸쳐 일시 투여로 전달되었다. 경구 작용제는 최소량의 사과, 사과 소스 또는 호박 쿼레를 매일 먹이면서 직접 관찰하여 투여되고, 용량 증량을 위해 매일 투여되었다. 작용제들 사이에 최소 3일의 워시아웃 기간(washout period)이 제공되었다. 아미오다론은 연장된 반감기 및 제거 동역학에 대한 우려가 있는 테스트를 위한 마지막 작용제로 투여되었다. 모든 작용제는 적어도 두 대상체에서 테스트되었다.

[0298] **푸르키네 섬유 조직학(Purkinje fiber histology)**

[0299] 얇은 절편을 위해, 조직을 1cm×1cm×3mm로 잘라 트리밍하고, 이소펜탄에서 급속 동결하고, OCT(TissueTek)에 포매했다. 10 μm 섹션을 -20℃에서 15분 동안 100% 메탄올에 담그고 아래에 설명된 염색을 사용하여 표준 면역형광 기술로 염색했다. 이미지는 Leica SP8 공초점 현미경으로 획득했다.

[0300] 두꺼운 절편을 위해, 이식편을 포함하는 1cm×1cm×3mm 조각의 조직을 20℃에서 1시간 동안 100% 메탄올에서 배양하고 재수화했다(80% 메탄올, 60% 메탄올, 0% 메탄올, PBS에 희석, 각 시약에 대해 -20℃에서 15분 배양). Leica VT1200s 비브라토(vibratome) 상에서 150 μm 섹션을 절단하고 아래에 설명된 염색을 사용하여 표준 면역형광 기술로 염색했다. 그런 다음 이전에 보고된 대로 BABBB를 사용하여 염색된 섹션을 지우고(34) Leica SP8 공초점 현미경에서 1 μm z-단계 증분으로 이미지화했다.

[0301] **푸르키네 섬유 염색**

[0302] 섹션은 Hoechst 33342(DNA, Thermo Fisher Scientific, #62249), 휘트 겐 아글루티닌-오레곤 그린(Wheat germ agglutinin-Oregon Green)(WGA, Thermo Fisher Scientific, #W6748), 팔로이딘-647(Phalloidin-647)(F-Actin, Thermo Fisher Scientific, # A22287), 항-코넥신 40 (anti-Connexin 40)(Cx40, Alpha Diagnostics, #CXN40A) 또는 항-느린 골격 트로포닌 I (anti-slow skeletal troponin I)(ss-TnI, Novus, #NBP2-46170)과, 2개의 항 토끼 2차 항체 (Alexa Fluor 555/647, Thermo Fisher Scientific, #A-31570/A-31573) 중 하나의 시약으로 염색되었다.

[0303] **참고문헌**

- [0304] 1. Collaborators GBDCoD. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 2018;392:1736-1788.
- [0305] 2. Nakamura K, Murry CE. Function Follows Form- A Review of Cardiac Cell Therapy. Circ J 2019;83:2399-2412.
- [0306] 3. Caspi O, Huber I, Kehat I et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. J Am Coll Cardiol 2007;50:1884-93.
- [0307] 4. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. Nat Biotechnol 2007;25:1015-24.
- [0308] 5. Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ et al. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. Nature 2012;489:322-5.
- [0309] 6. van Laake LW, Passier R, Monshouwer-Kloots J et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial

infarction. *Stem Cell Res* 2007;1:9-24.

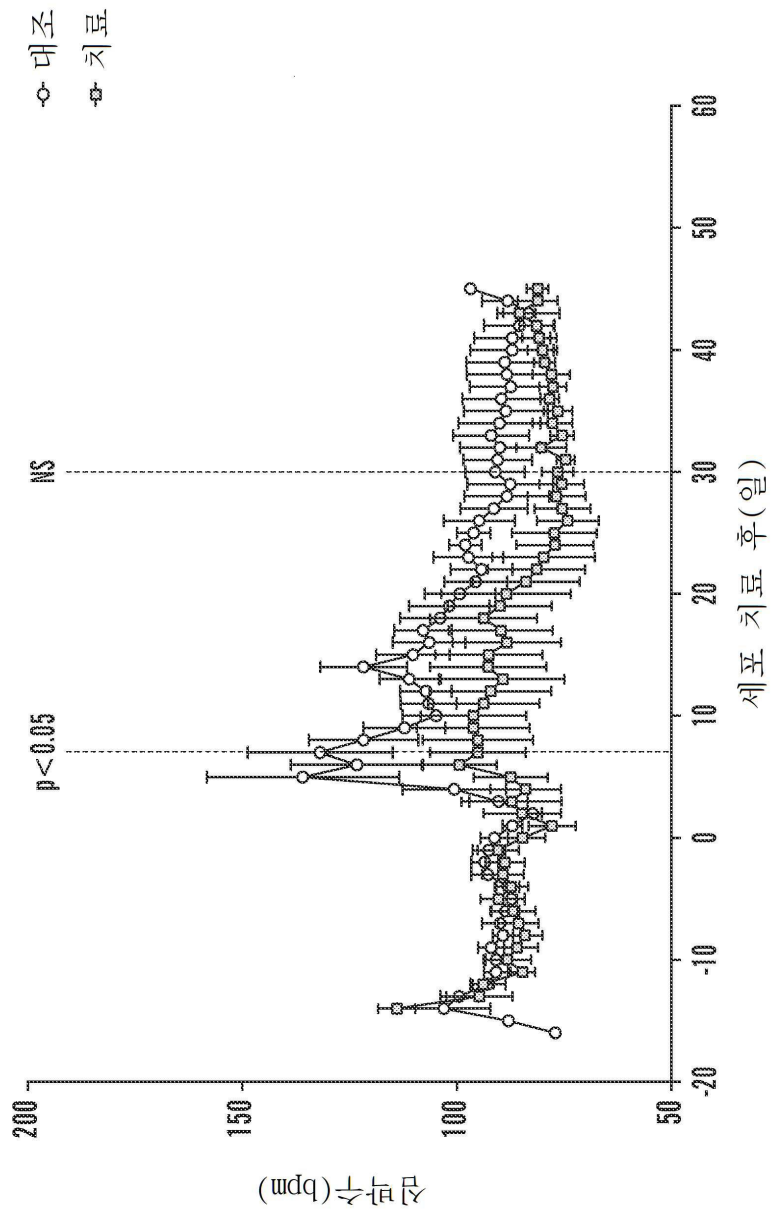
- [0310] 7. Shiba Y, Filice D, Fernandes S et al. Electrical Integration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Guinea Pig Chronic Infarct Model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014;19:368-381.
- [0311] 8. Chong JJ, Yang X, Don CW et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 2014;510:273-7.
- [0312] 9. Liu YW, Chen B, Yang X et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol* 2018;36:597-605.
- [0313] 10. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T et al. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 2016;538:388-391.
- [0314] 11. Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sanchez A et al. Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias. *Stem Cell Reports* 2019;12:967-981.
- [0315] 12. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T et al. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation* 2017;136:680-686.
- [0316] 13. Lelovas PP, Kostomitsopoulos NG, Xanthos TT. A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2014;53:432-8.
- [0317] 14. van der Spoel TI, Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni P et al. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2011;91:649-58.
- [0318] 15. Chen VC, Ye J, Shukla P et al. Development of a scalable suspension culture for cardiac differentiation from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 2015;15:365-75.
- [0319] 16. Staubli M, Bircher J, Galeazzi RL, Remund H, Studer H. Serum concentrations of amiodarone during long term therapy. Relation to dose, efficacy and toxicity. *Eur J Clin Pharmacol* 1983;24:485-94.
- [0320] 17. Mostow ND, Rakita L, Vrobel TR, Noon DL, Blumer J. Amiodarone: correlation of serum concentration with suppression of complex ventricular ectopic activity. *Am J Cardiol* 1984;54:569-74.
- [0321] 18. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* 2015;82:518-29.
- [0322] 19. Deroulers C, Ameisen D, Badoual M, Gerin C, Granier A, Lartaud M. Analyzing huge pathology images with open source software. *Diagn Pathol* 2013;8:92.
- [0323] 20. Garcia-Bustos V, Sebastian R, Izquierdo M, Molina P, Chorro FJ, Ruiz-Sauri A. A quantitative structural and morphometric analysis of the Purkinje network and the Purkinje-myocardial junctions in pig hearts. *J Anat* 2017;230:664-678.
- [0324] 21. Panescu D, Kroll M, Brave M. Limitations of animal electrical cardiac safety models. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2014;2014:6483-6.
- [0325] 22. Pallante BA, Giovannone S, Fang-Yu L et al. Contactin-2 expression in the cardiac Purkinje fiber network. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3:186-94.
- [0326] 23. Yu JK, Franceschi W, Huang Q, Pashakhanloo F, Boyle PM, Trayanova NA. A comprehensive, multiscale framework for evaluation of arrhythmias arising from cell therapy in the whole post-myocardial infarcted heart. *Sci Rep* 2019;9:9238.
- [0327] 24. Chow E, Woodard JC, Farrar DJ. Rapid ventricular pacing in pigs: an experimental model of congestive heart failure. *Am J Physiol* 1990;258:H1603-5.
- [0328] 25. Josephson M, Marchlinski F, Buxton A et al. Electrophysiologic basis for sustained ventricular tachycardia: role of reentry. *Tachycardias: Mechanisms, Diagnosis, Treatment Philadelphia, Pa: Lea and*

Febiger 1984:305-323.

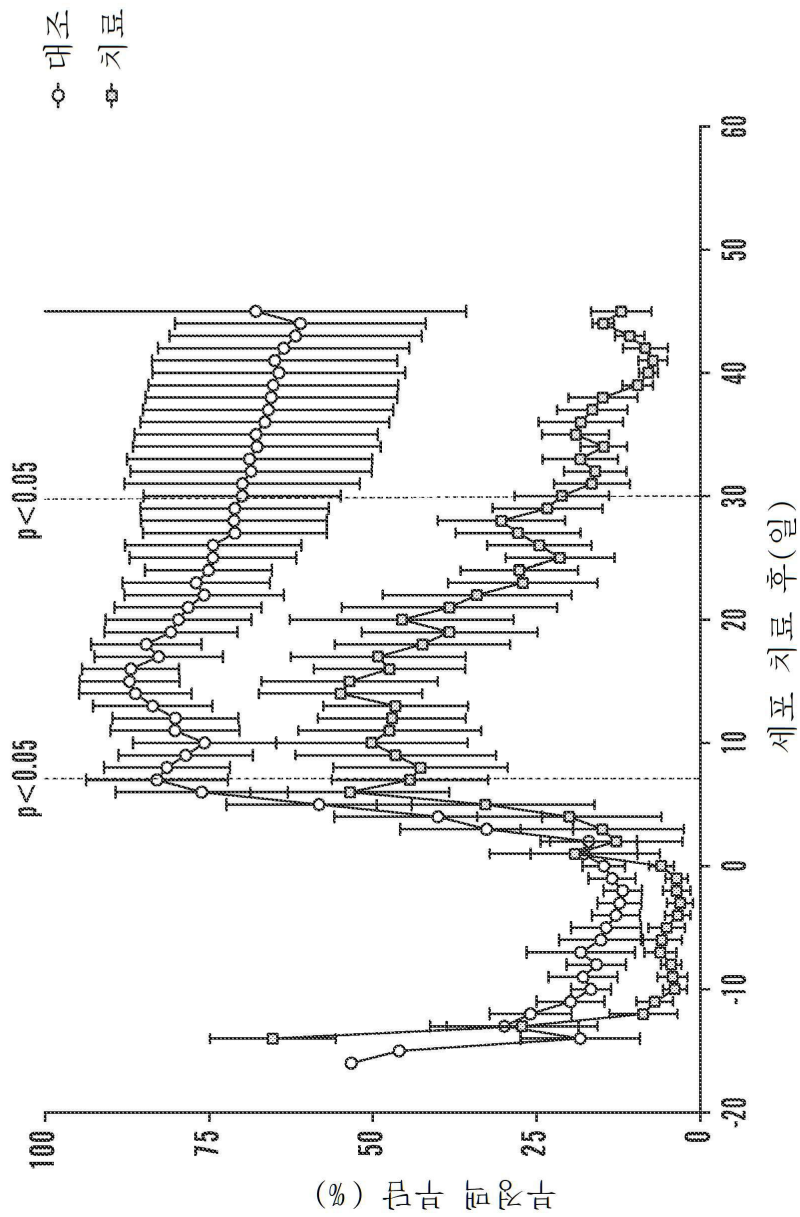
- [0329] 26. Karbassi E, Fenix A, Marchiano S et al. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol* 2020.
- [0330] 27. Waks JW, Zimetbaum P. Antiarrhythmic Drug Therapy for Rhythm Control in Atrial Fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2017;22:3-19.
- [0331] 28. Kadota S, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. In Vivo Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Neonatal and Adult Rat Hearts. *Stem Cell Reports* 2017;8:278-289.
- [0332] 29. Marchiano S, Bertero A, Murry CE. Learn from Your Elders: Developmental Biology Lessons to Guide Maturation of Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Pediatr Cardiol* 2019;40:1367-1387.
- [0333] 30. Guo Y, Pu WT. Cardiomyocyte Maturation: New Phase in Development. *Circ Res* 2020;126:1086-1106.
- [0334] 31. Kannan S, Kwon C. Regulation of cardiomyocyte maturation during critical perinatal window. *J Physiol* 2020;598:2941-2956.
- [0335] 32. Maroli G, Braun T. The long and winding road of cardiomyocyte maturation. *Cardiovasc Res* 2020.
- [0336] 33. Ichimura H, Kadota S, Kashiwara T et al. Increased predominance of the matured ventricular subtype in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vivo. *Sci Rep* 2020;10:11883.
- [0337] 34. El-Nachef D, Oyama K, Wu YY, Freeman M, Zhang Y, MacLellan WR. Repressive histone methylation regulates cardiac myocyte cell cycle exit. *J Mol Cell Cardiol* 2018;121:1-12.

도면

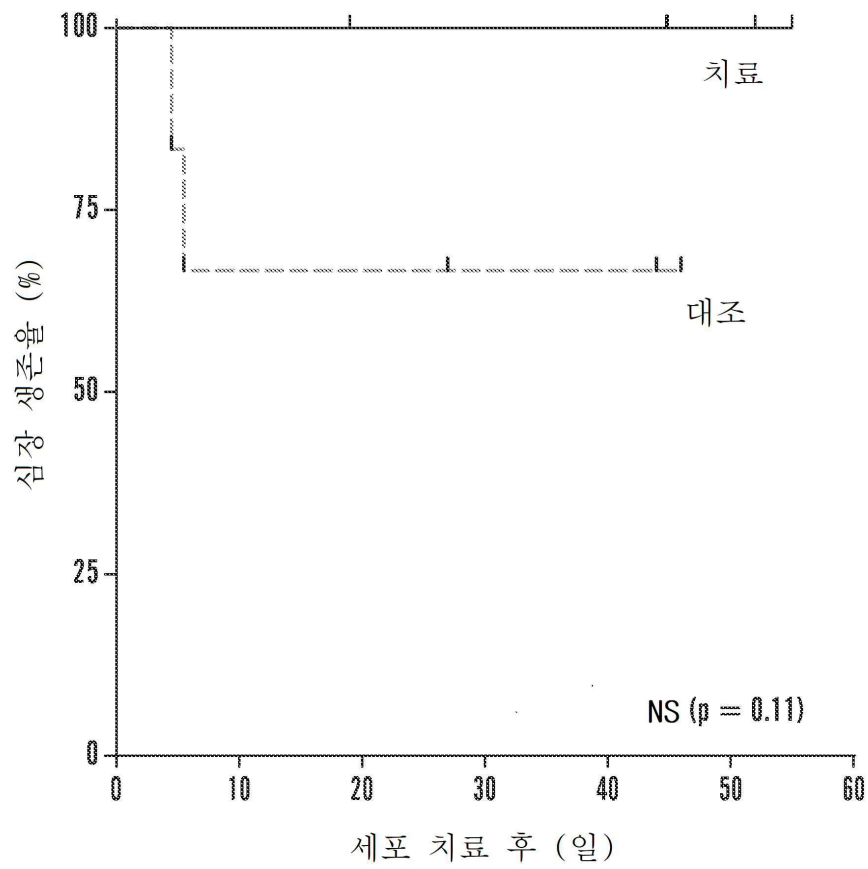
도면1a



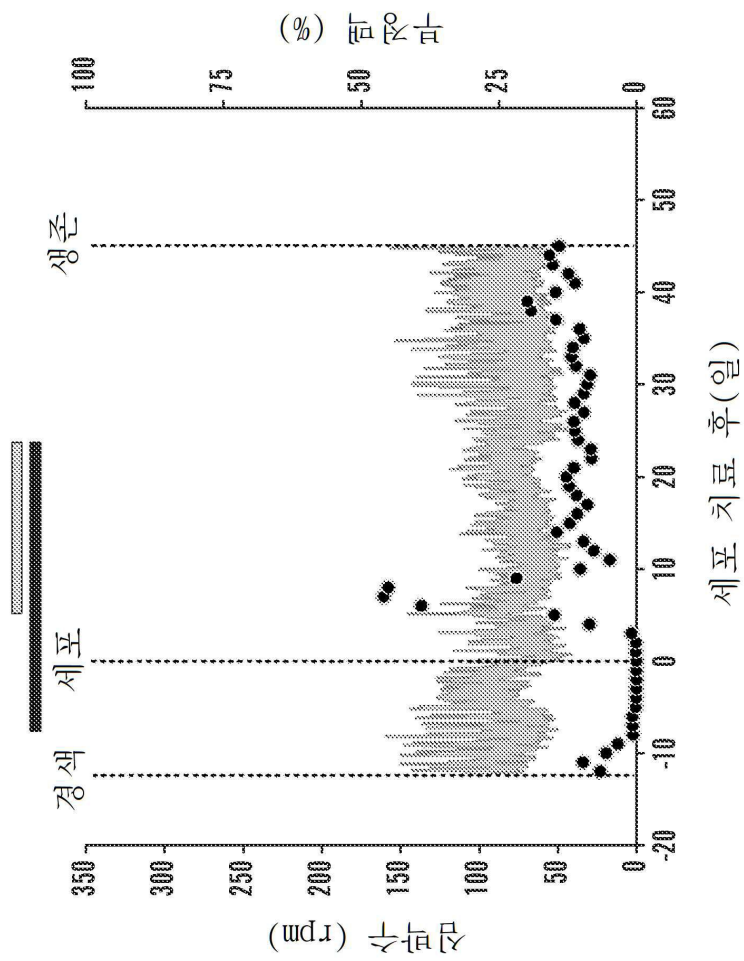
도면1b



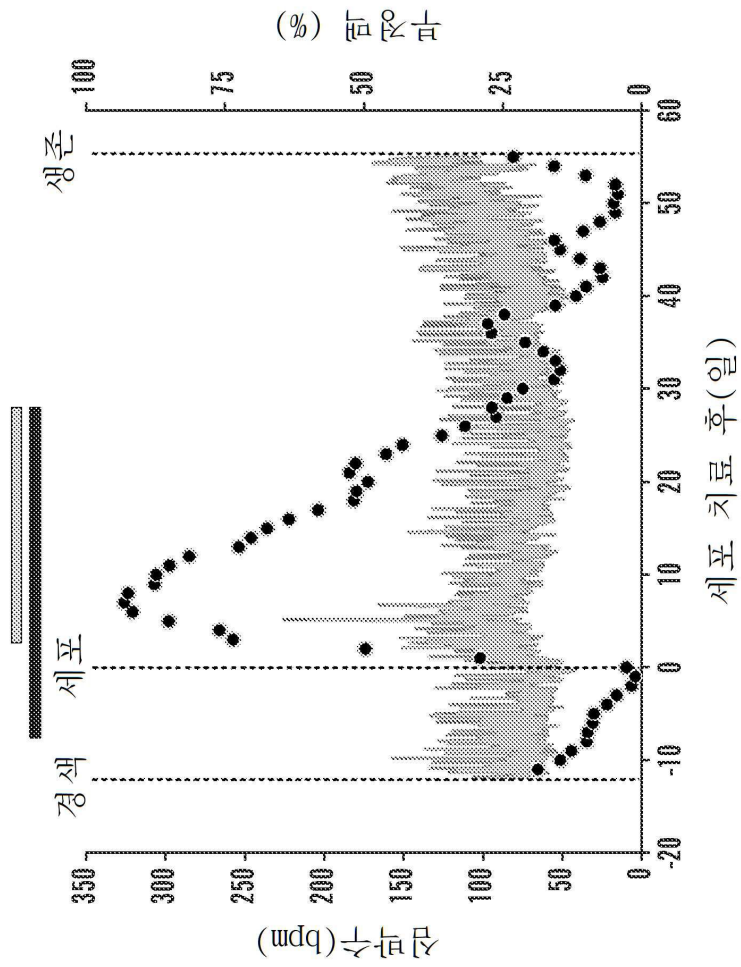
도면2



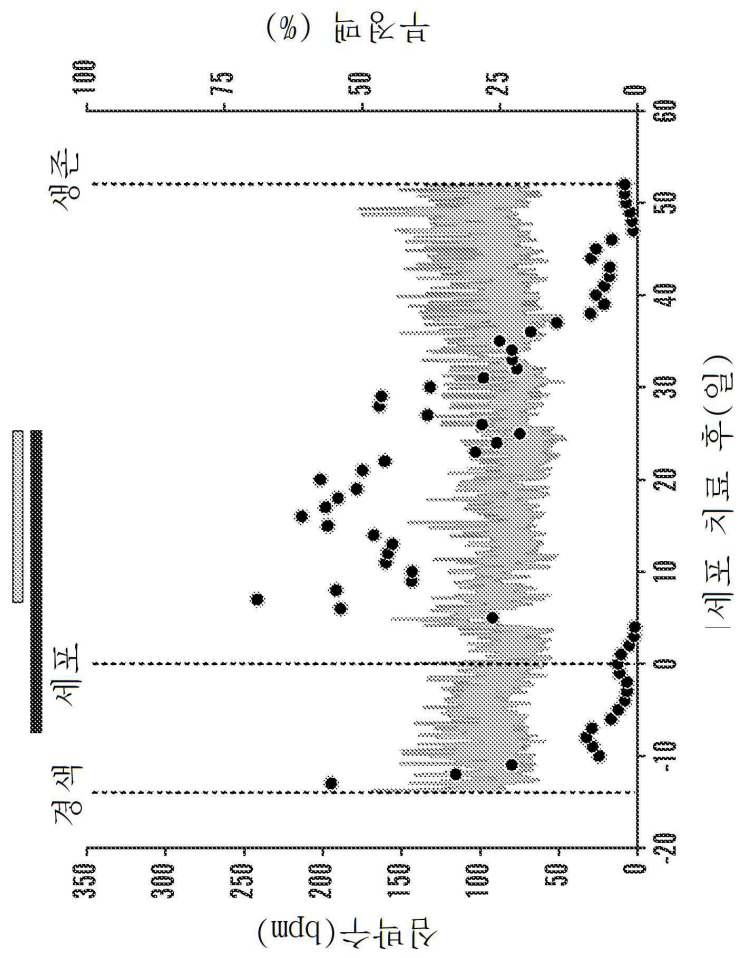
도면3



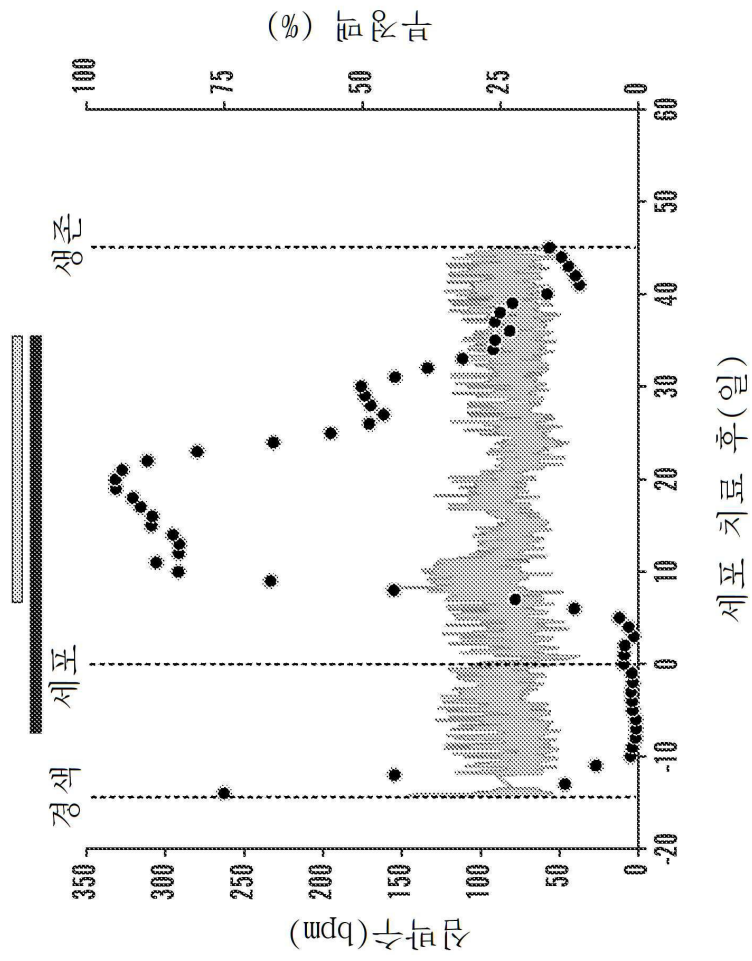
도면4



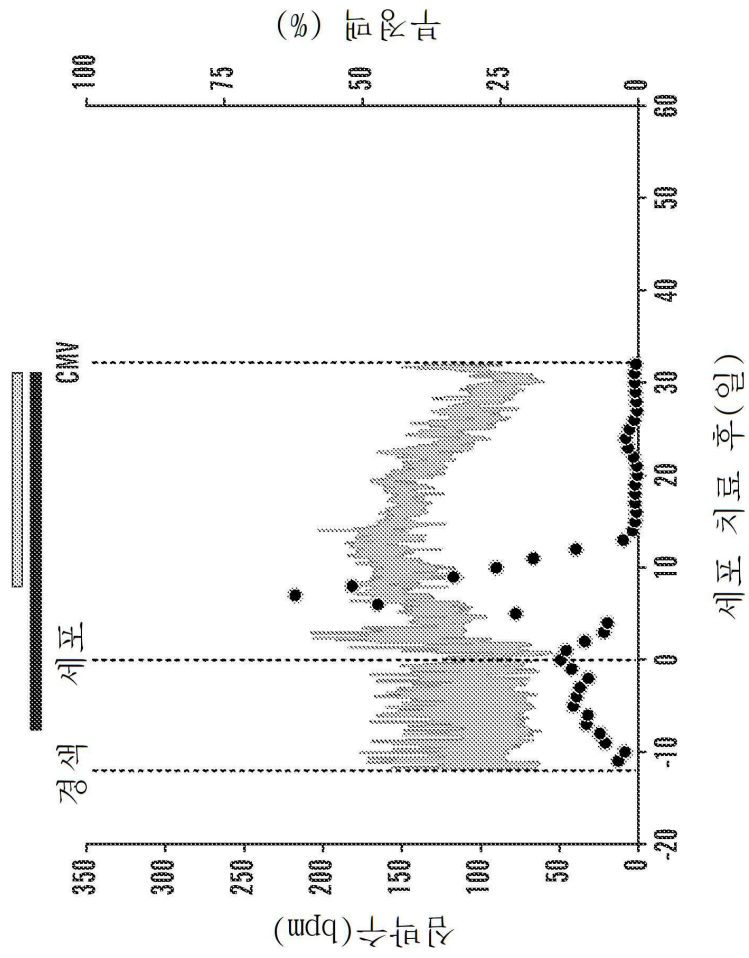
도면5



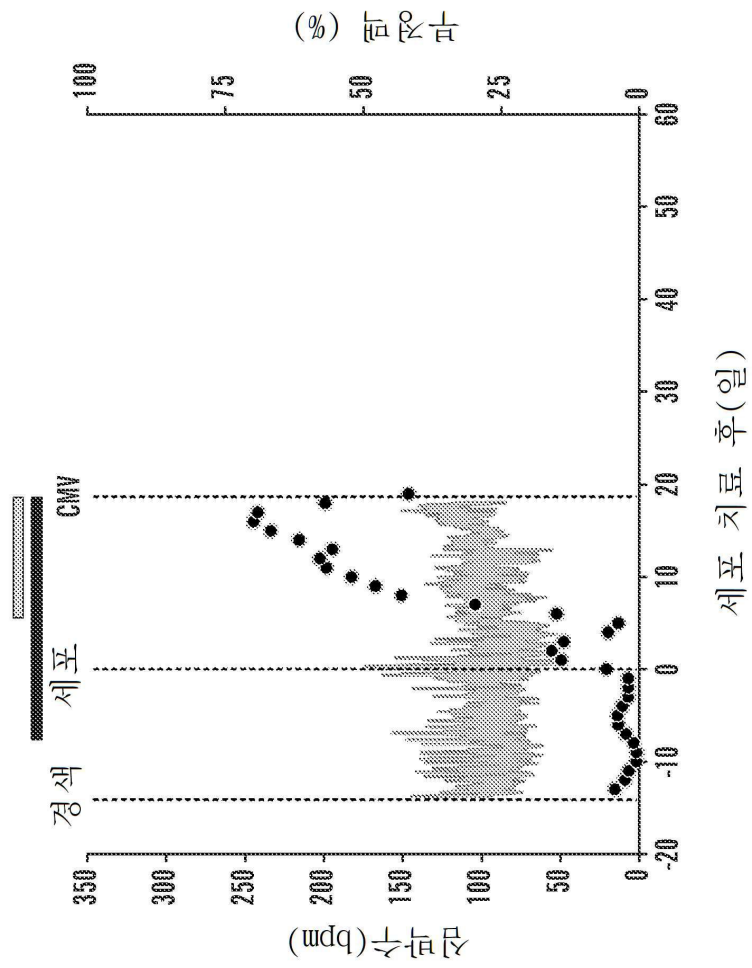
도면6



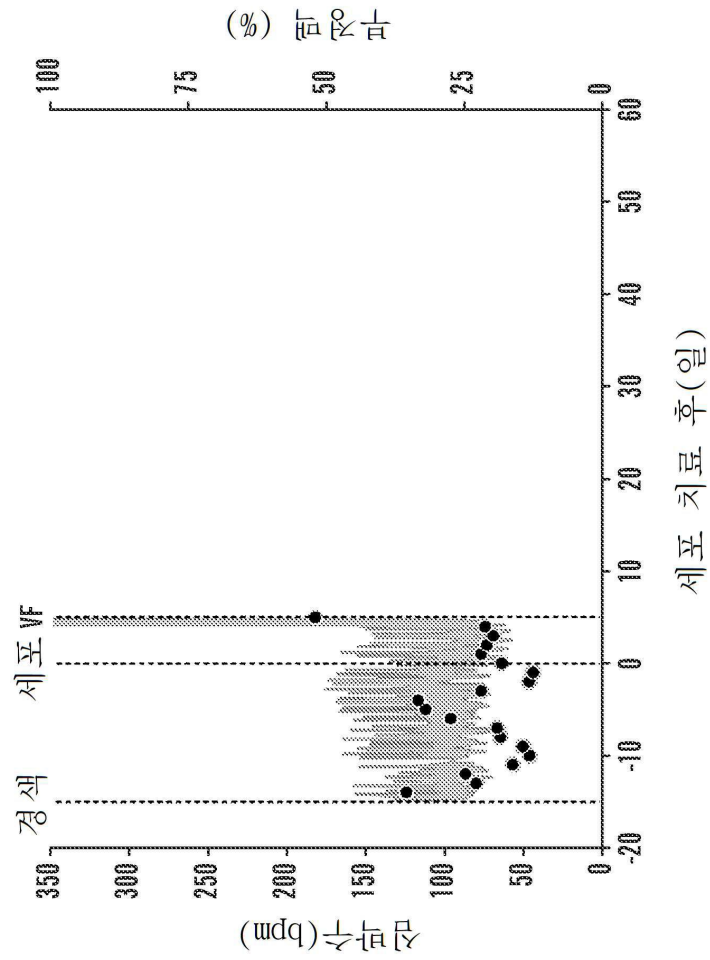
도면7



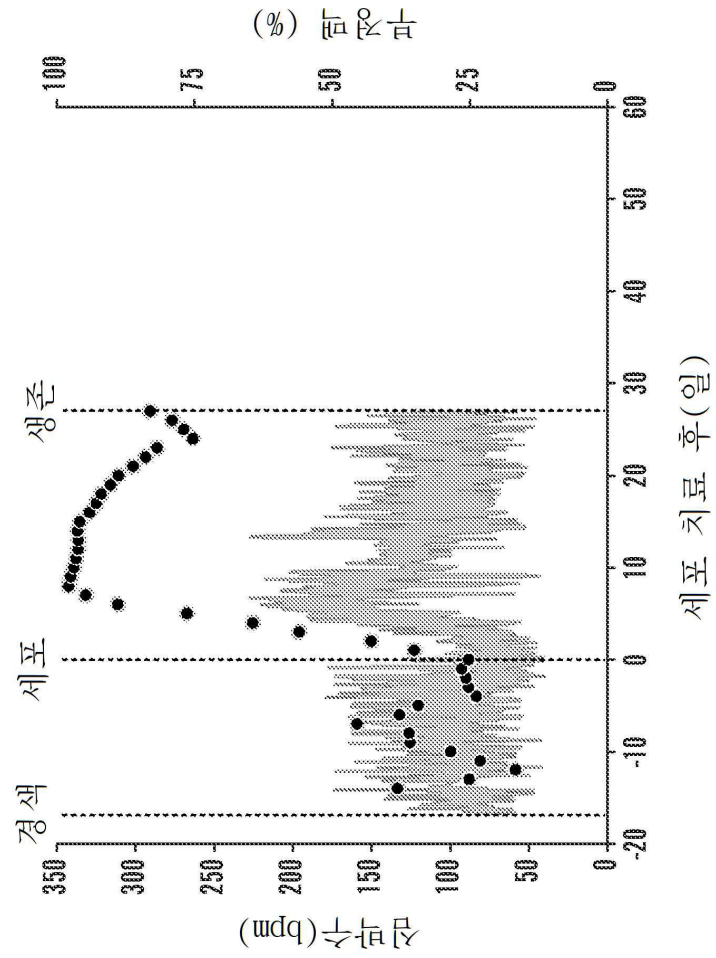
도면8



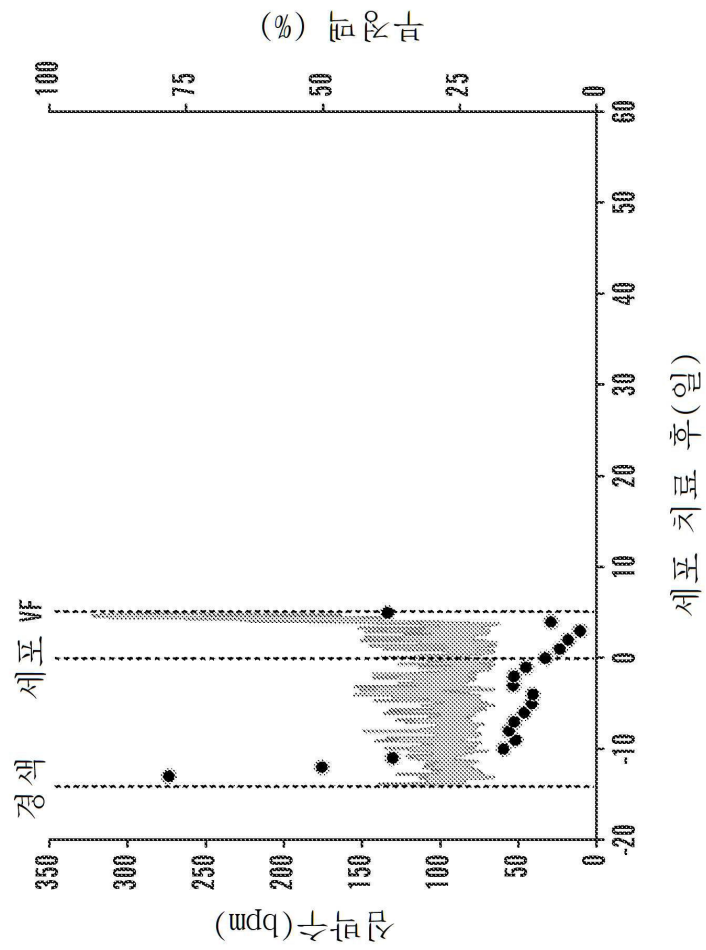
도면9



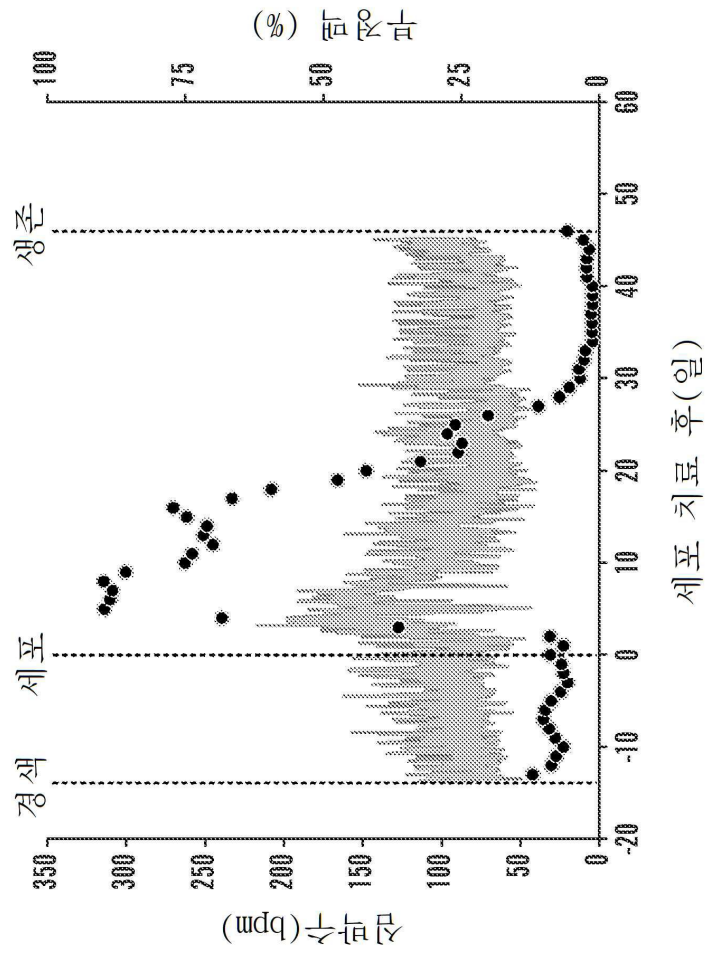
도면10



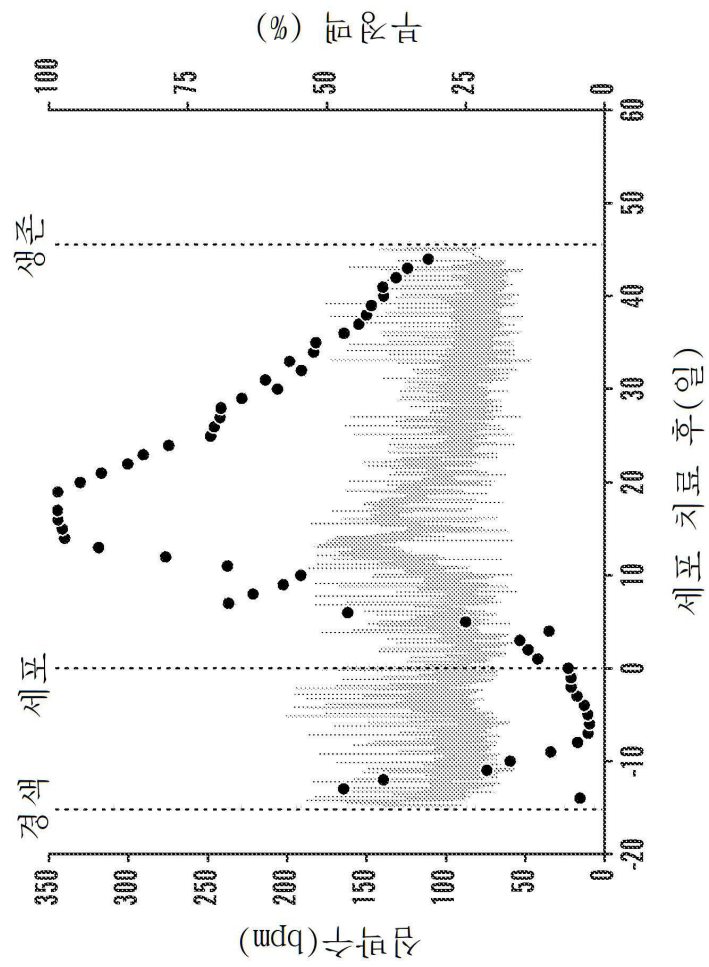
도면11



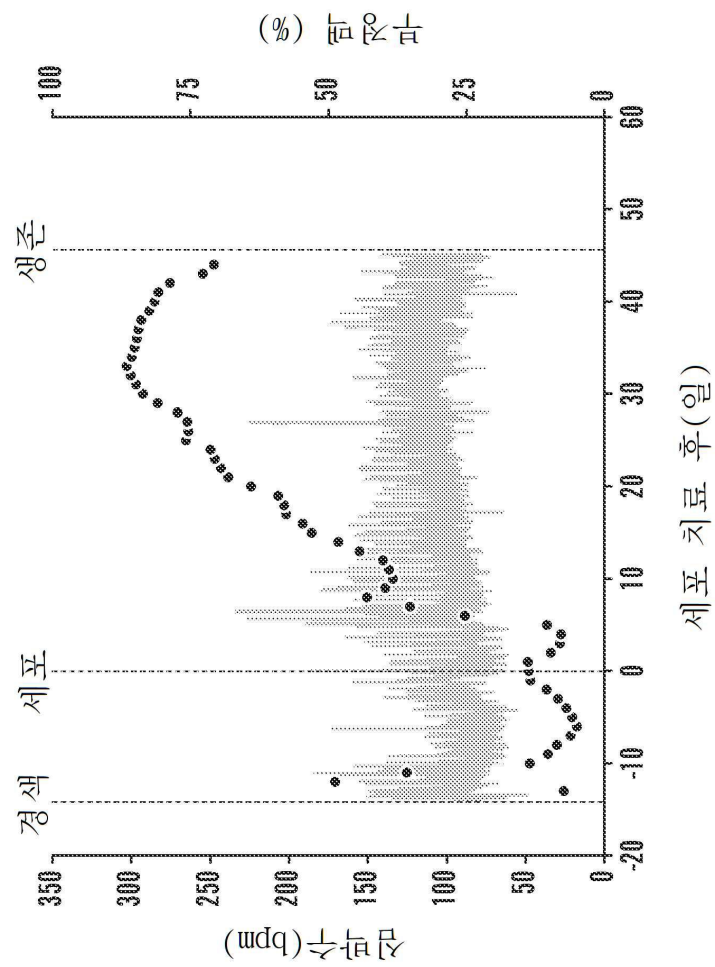
도면12



도면13



도면14



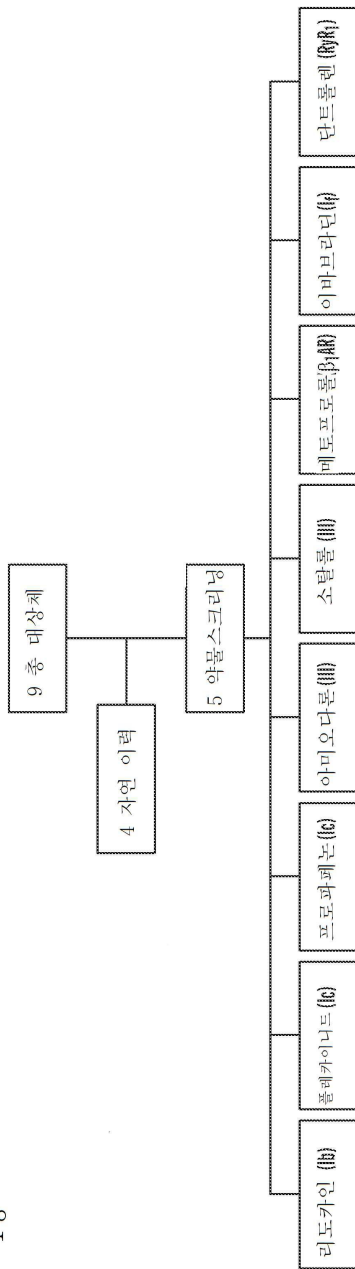
도면15

항부정맥 요법 용량

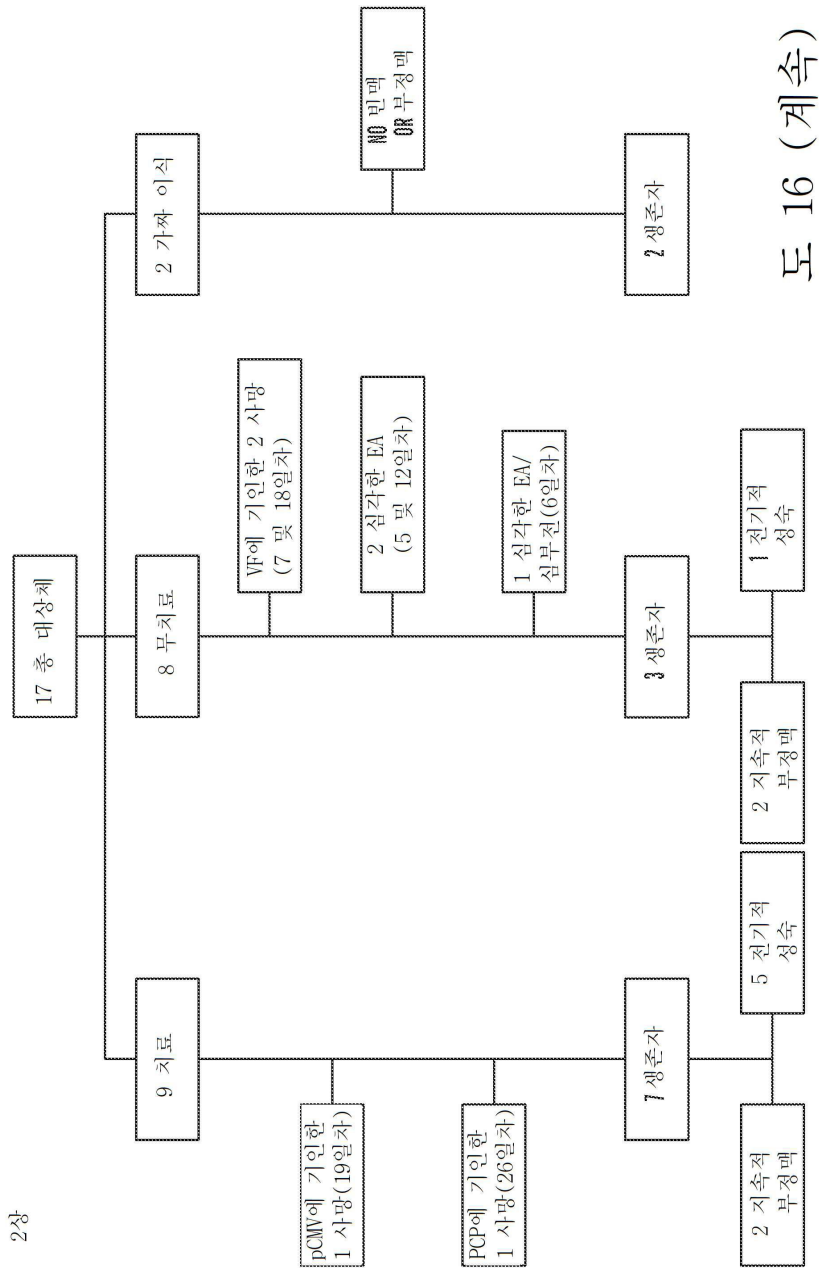
폐지	• 리듬/속도 조절	아미오다론 200-1200 mg BID PO 시작일 이식-7 최저 목표(trough goal) 1.5-2.5 µg/mL로 적정
		아미오다론 150 mg 정맥내 일시 필요에 따라(prn) 금성 부정맥
	• 속도 조절	이바브라딘 2.5-15 mg PO BID 필요에 따라(prn) HR ≥ 150 HR 목표 <125 bpm으로 적정
인간	• 리듬/속도 조절	아미오다론 100-800 mg TID PO 시작일 이식-7
		아미오다론 100-300 mg 정맥내 일시 필요에 따라(prn) 금성 부정맥
	• 속도 조절	이바브라딘 5-15 mg PO BID 필요에 따라(prn) 빈맥

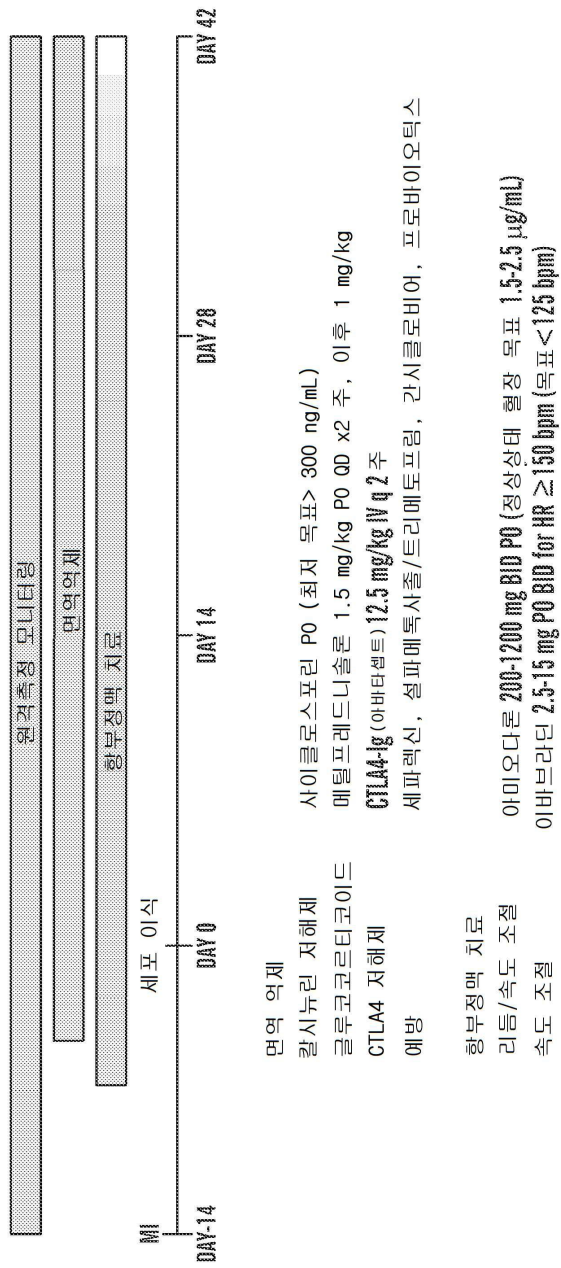
도면16a

1상

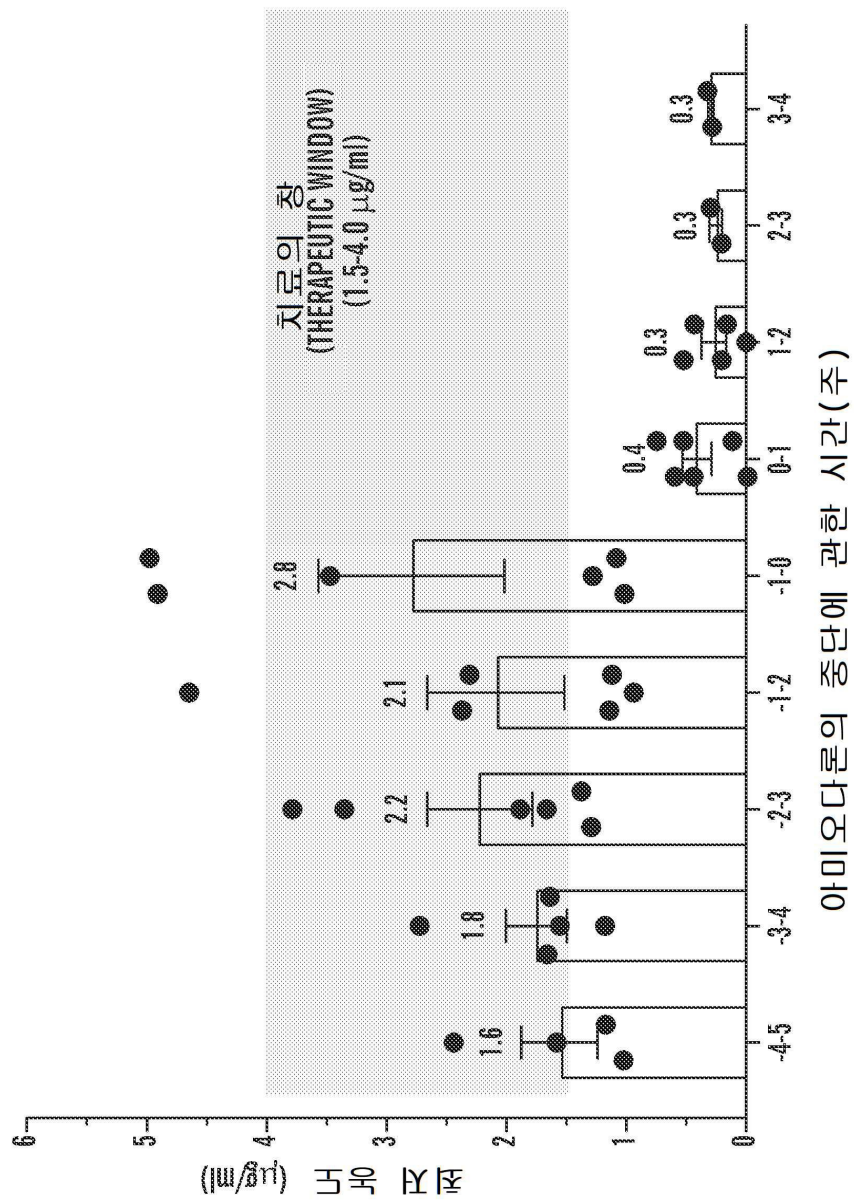


도면16b

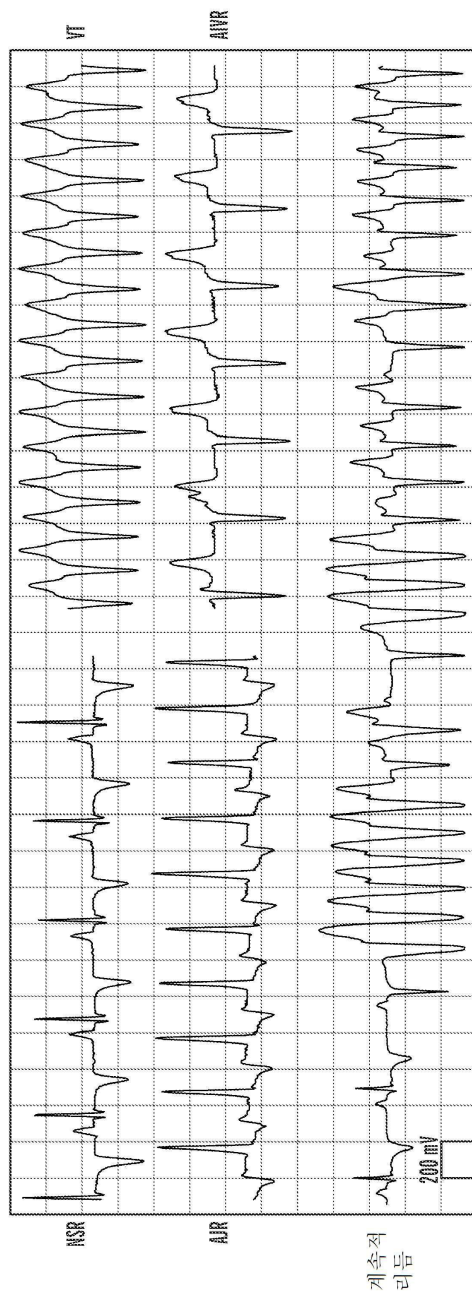




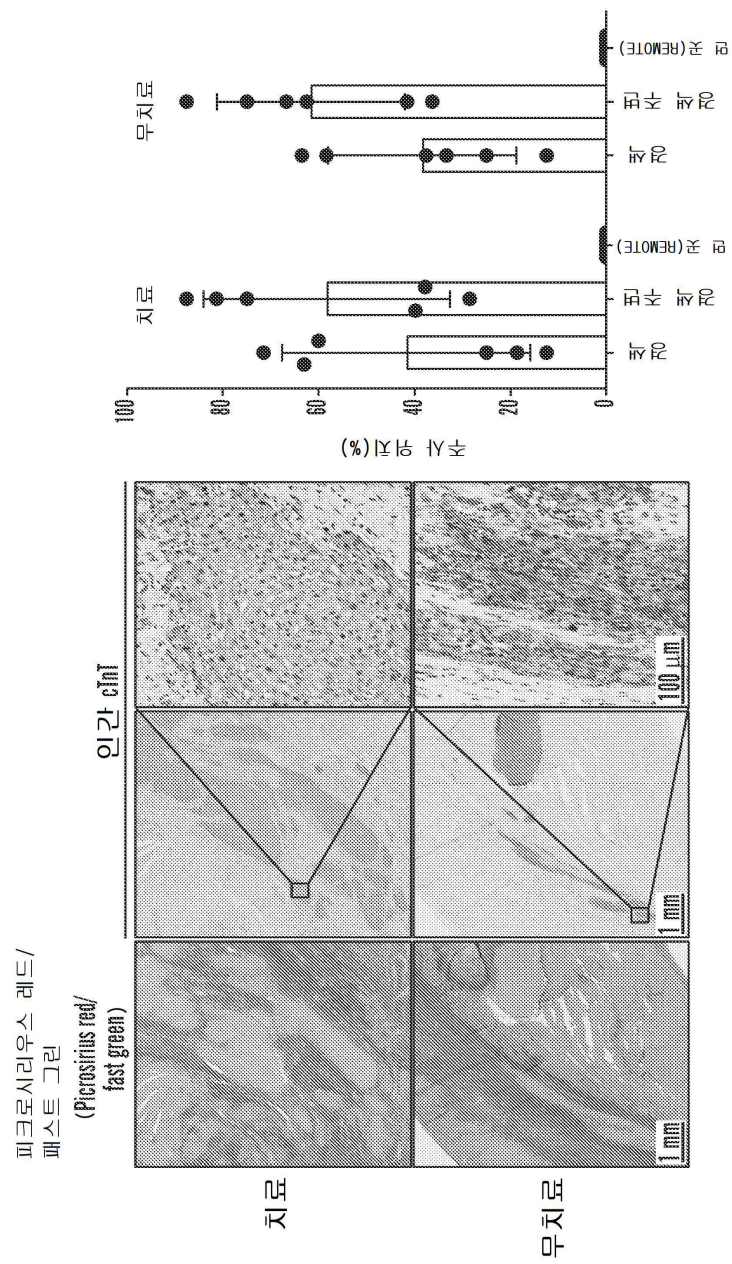
도면18



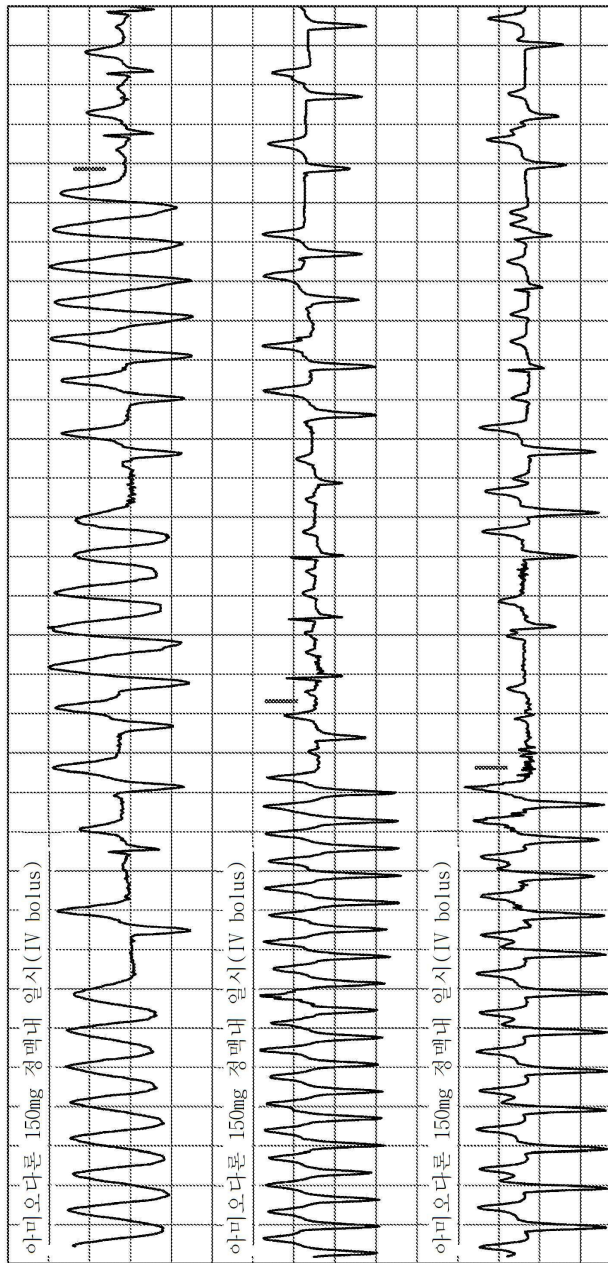
도면19



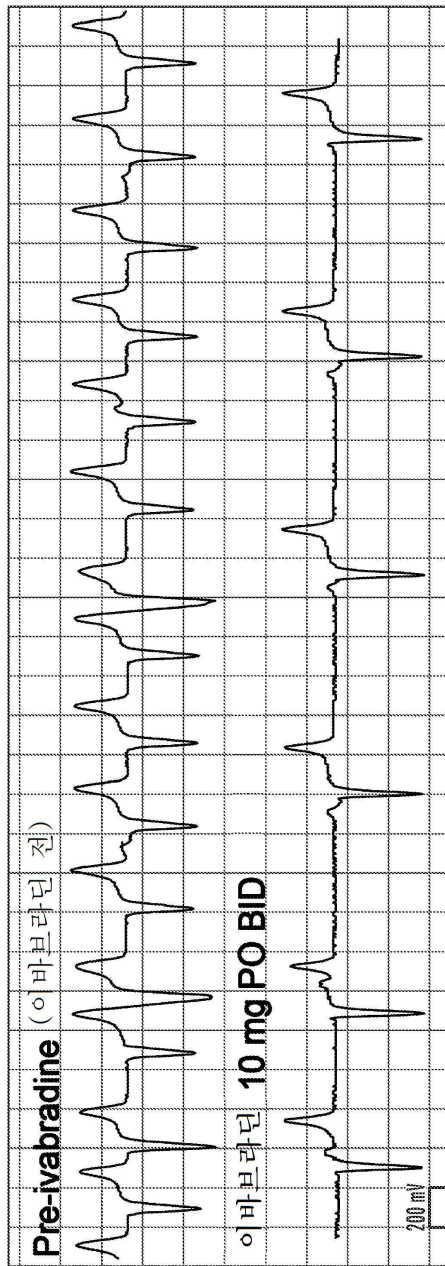
도면20



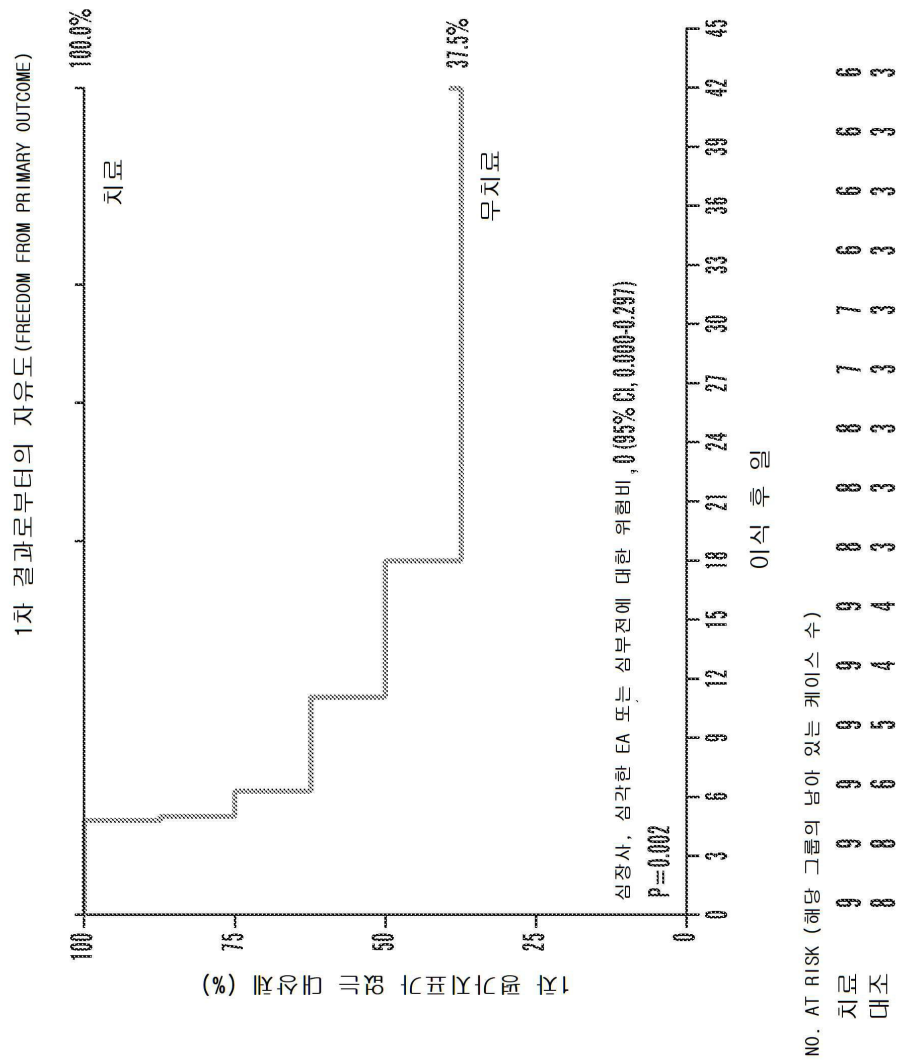
도면21a



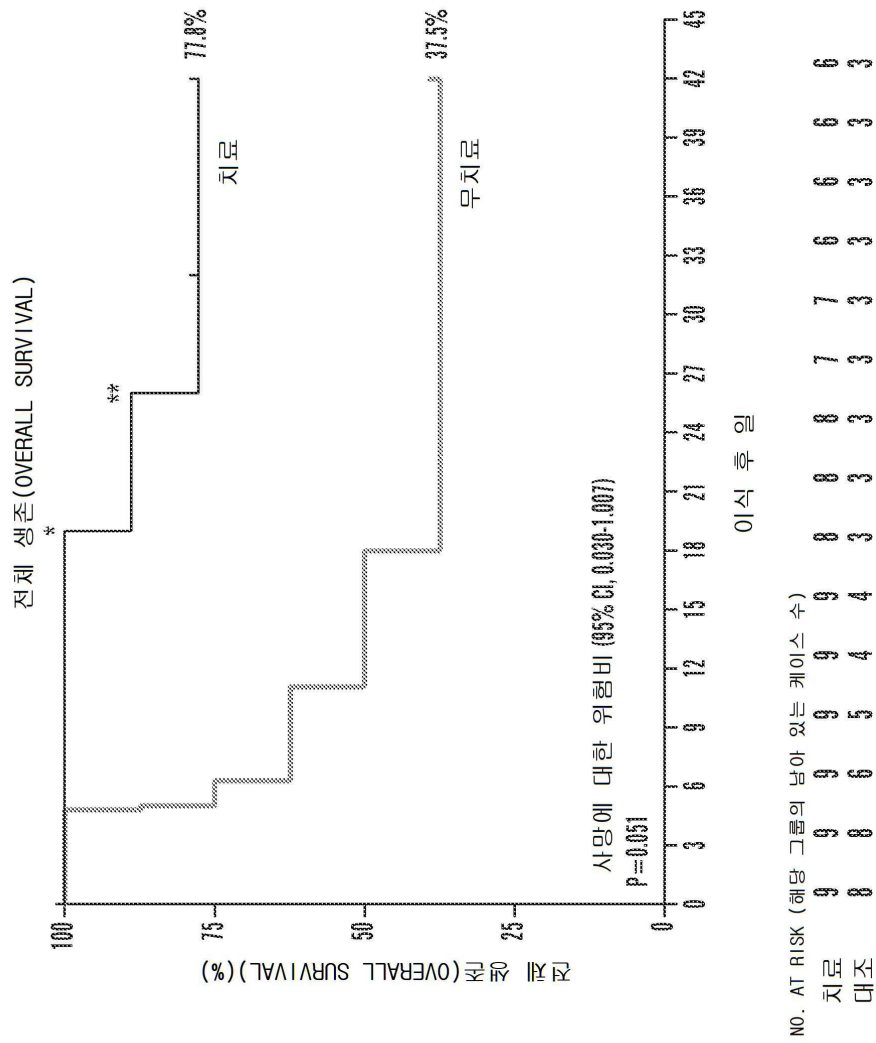
도면21b



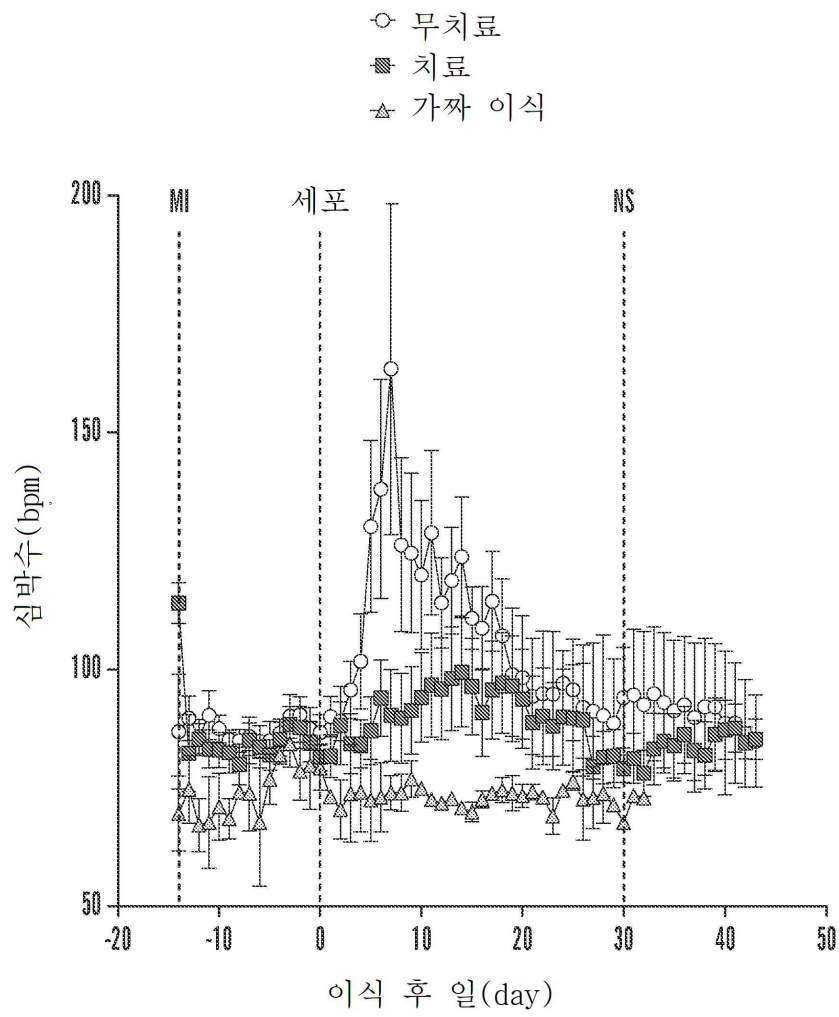
도면22a



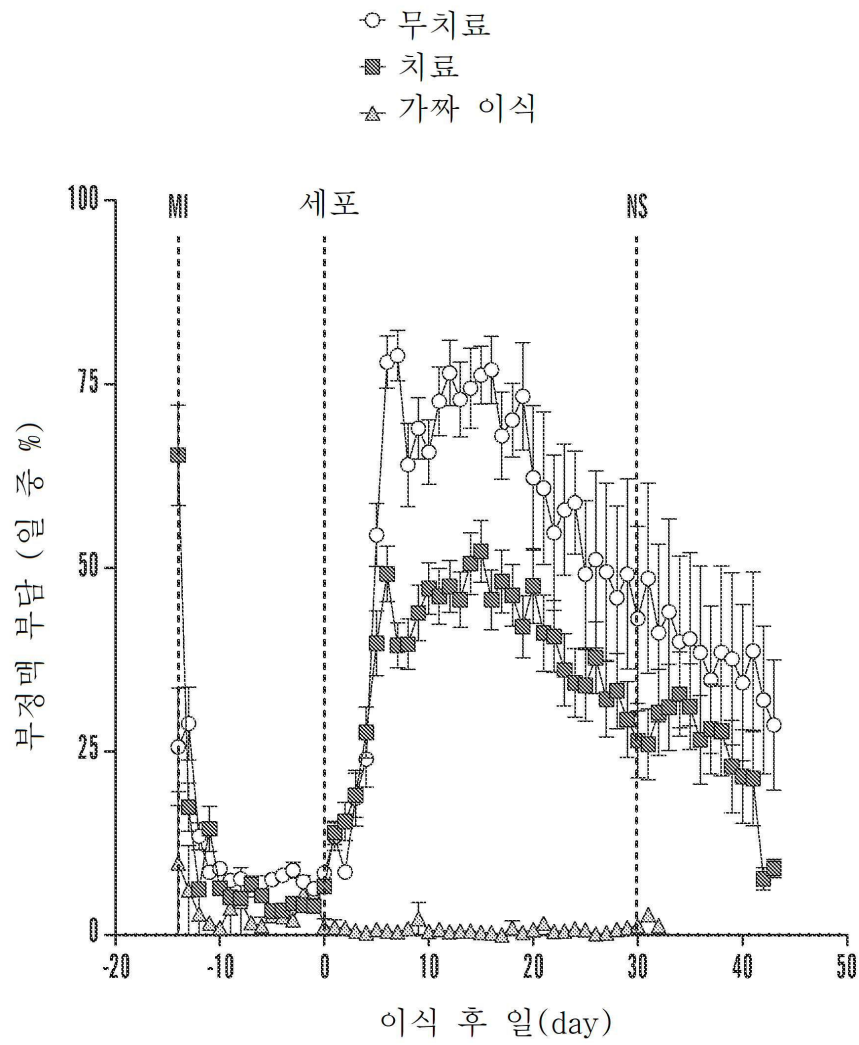
도면22b



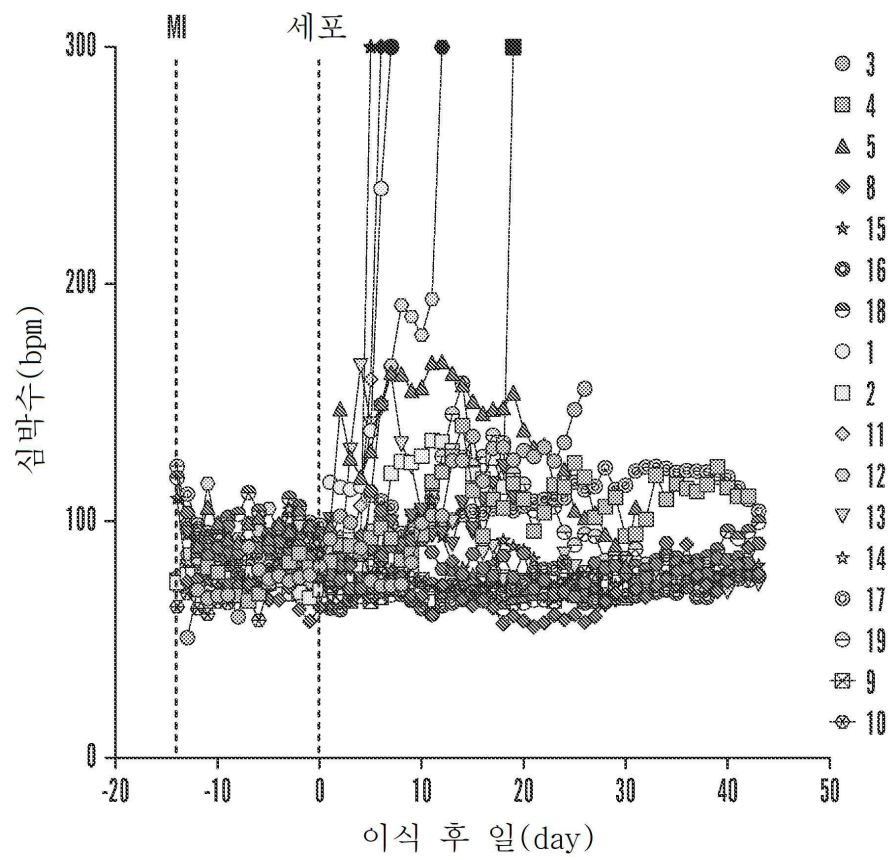
도면23a



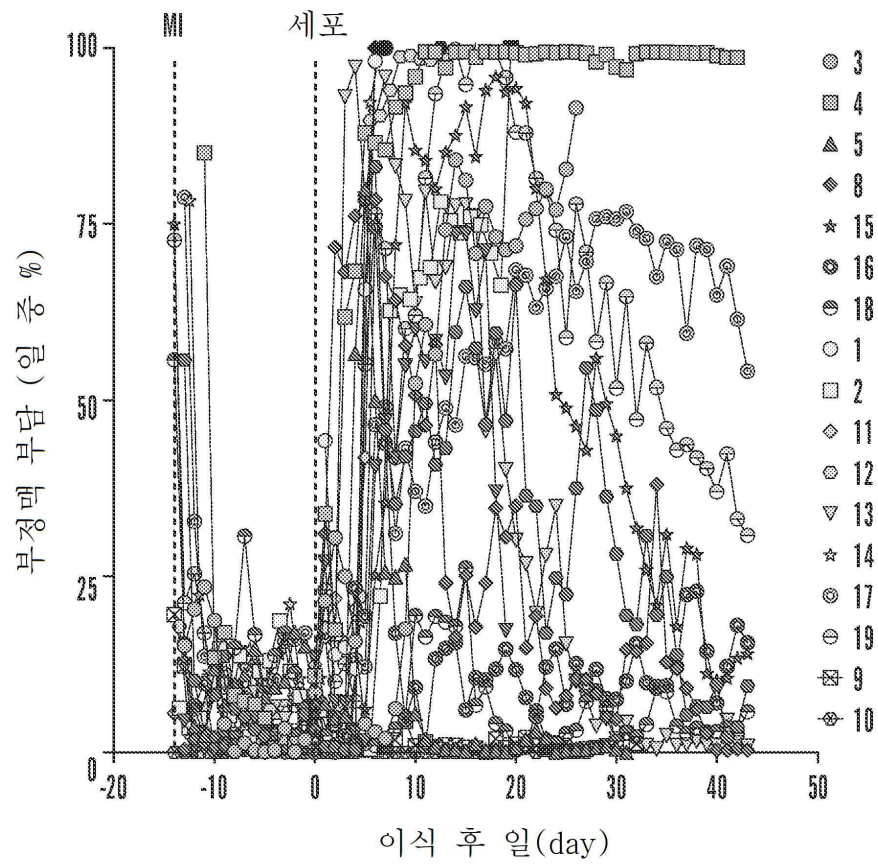
도면23b



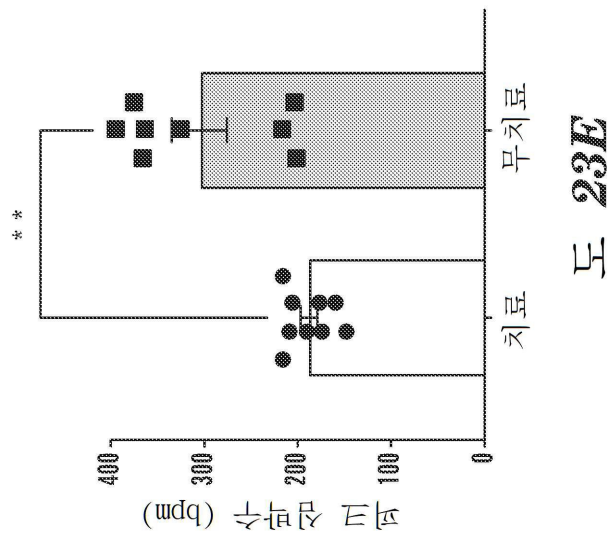
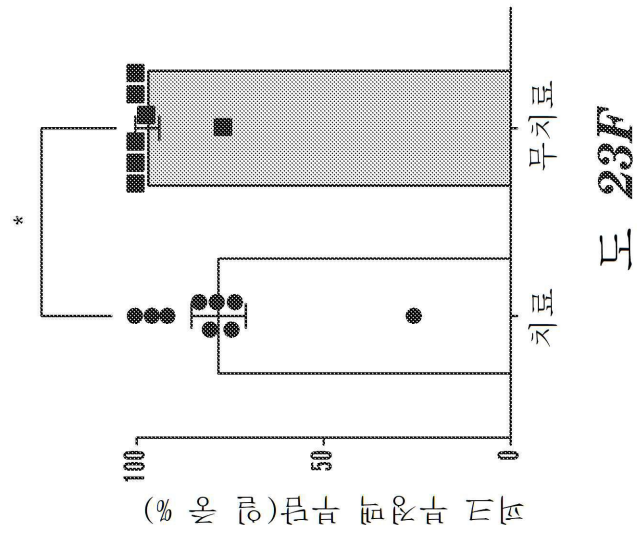
도면23c



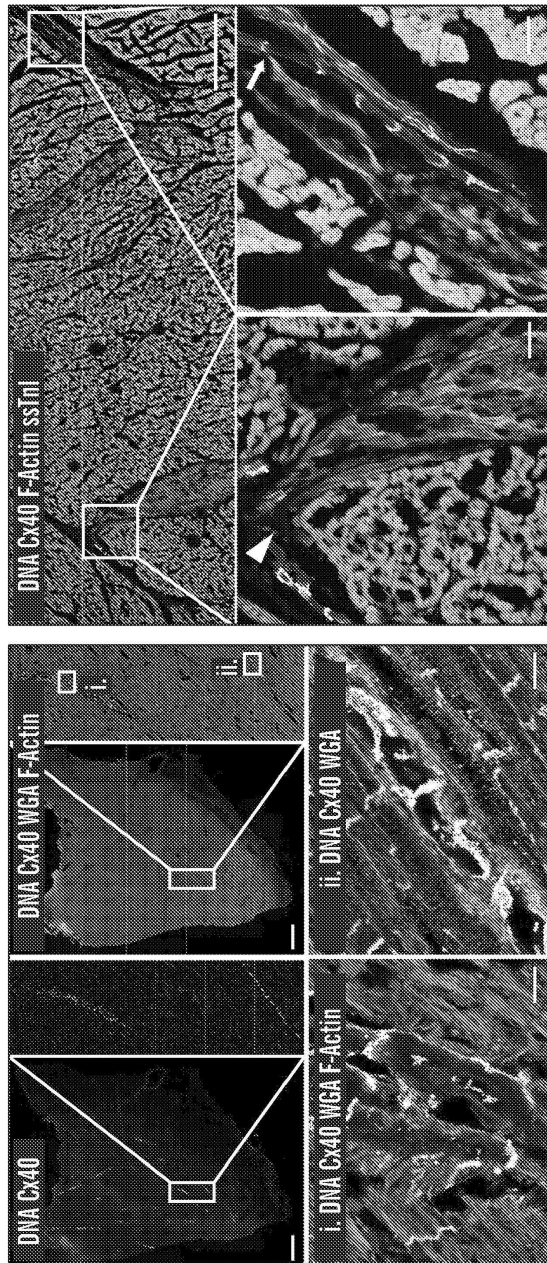
도면23d



도면23ef



도면24



도 24B

도 24A

도면25

