



공개특허 10-2020-0039707



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0039707  
(43) 공개일자 2020년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 5/077* (2010.01) *G01N 33/50* (2017.01)  
(52) CPC특허분류  
*C12N 5/0657* (2013.01)  
*G01N 33/5014* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-7006161  
(22) 출원일자(국제) 2018년08월16일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2020년03월02일  
(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/056169  
(87) 국제공개번호 WO 2019/035032  
국제공개일자 2019년02월21일  
(30) 우선권주장  
62/546,438 2017년08월16일 미국(US)

(71) 출원인  
유니버시티 오브 워싱톤  
미국 98105-4721 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트 웨이 노쓰이스트 4545  
(72) 별명자  
김덕호  
미국 98105 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트 웨이 노쓰이스트 4545 박스 354950 코모션 이노베이션 센터 유니버시티 오브 워싱톤 내  
마카당당 제시  
미국 98105 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트 웨이 노쓰이스트 4545 박스 354950 코모션 이노베이션 센터 유니버시티 오브 워싱تون 내  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
문두현

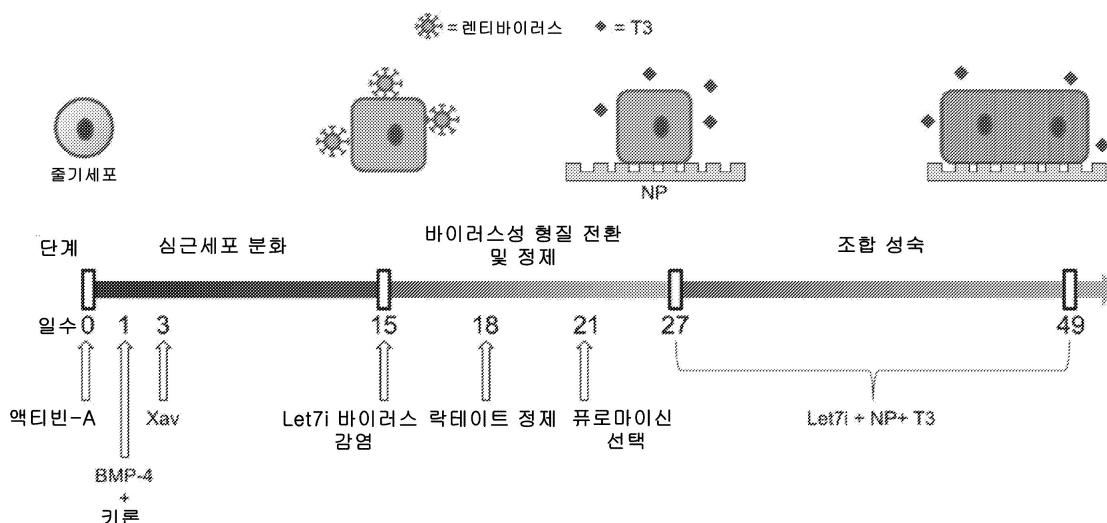
전체 청구항 수 : 총 58 항

(54) 발명의 명칭 건강한 및 병든 심근세포의 성숙 상태를 향상시키기 위한 조성물 및 방법

### (57) 요 약

본 명세서에서 개시되는 바와 같은 방법 및 조성물은 다른 용도 중에서도 질환 모델링, 심독성 스크리닝, 약물 스크리닝 및 동정과 같은 적용을 위한 성숙한 줄기세포-유래 심근세포의 제조를 기술한다. 본 발명의 방법은 줄기세포-유래 심근세포가 태아 표현형에서 성인 심근세포의 것과 매우 유사한 보다 성숙한 표현형으로의 전이를 촉진하는 물리적 및 생화학적 단서를 포함한다.

### 대 표 도



(52) CPC특허분류

*G01N 33/5061* (2013.01)

*G01N 33/5073* (2013.01)

*C12N 2501/375* (2013.01)

*C12N 2503/02* (2013.01)

*C12N 2535/10* (2013.01)

*G01N 2800/32* (2013.01)

(72) 발명자

스미스 알렉스.티.

미국 98105 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트

웨이 노쓰이스트 4545 박스 354950 코모션 이노베

이션 센터 유니버시티 오브 워싱턴 내

루오홀라-베이커 한넬

미국 98105 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트

웨이 노쓰이스트 4545 박스 354950 코모션 이노베

이션 센터 유니버시티 오브 워싱턴 내

---

미클라스 제이슨 웨인

미국 98105 워싱턴주 시애틀 스위트 400 루즈벨트

웨이 노쓰이스트 4545 박스 354950 코모션 이노베

이션 센터 유니버시티 오브 워싱턴 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

줄기세포-유래 심근세포를 제조하는 방법으로서,

상기 줄기세포-유래 심근세포를,

(a) 나노패턴화 기재;

(b) 갑상선 호르몬 T3; 및

(c) Let7i microRNA

와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 나노패턴화 기재가 그루브(groove) 및 럿지(ridge)의 실질적으로 평행한 어레이를 가진 나노패턴화된 표면을 포함하는, 방법.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 각각의 그루브 또는 럿지의 치수가 길이, 폭 또는 높이에서 1000 나노미터 미만인, 방법.

#### 청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 그루브 및 럿지의 폭이 800 nm이고, 그루브의 깊이가 600 nm인, 방법.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 Let7i microRNA가 상기 줄기세포-유래 심근세포에 의해 발현되는, 방법.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 심근세포를 상기 Let7i microRNA와 접촉시키는 단계가 상기 줄기세포-유래 심근세포를 바이러스 백터와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 인간 심근세포인, 방법.

#### 청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 유도성 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)(iPS 세포) 또는 배아줄기세포로부터 분화되는, 방법.

### 청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래되는, 방법.

### 청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 유전자 변형되는, 방법.

### 청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 심근세포가, Let7i microRNA를 인코딩하는 백터와 접촉한 후 나노패턴화 기재 및 갑상선 호르몬 T3과 접촉되는, 방법.

### 청구항 12

제 1 항에 있어서,

생성되는 줄기세포-유래 심근세포가, 나노패턴화 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA와 접촉하기 이전의 줄기세포-유래 심근세포와 비교하였을 때 보다 성숙한 심근세포 표현형을 갖는, 방법.

### 청구항 13

제 1 항에 있어서,

상기 나노패턴화 기재가 심근세포 전기 생리학적 특성의 전기적 자극 및/또는 측정을 허용하는 마이크로 전극 어레이를 포함하는, 방법.

### 청구항 14

줄기세포-유래 심근세포를 성숙시키는 방법으로서, 상기 방법이,

상기 줄기세포-유래 심근세포를

(a) 나노패턴화 기재;

(b) 갑상선 호르몬 T3; 및

(c) Let7i microRNA와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 나노패턴화 기재가 그루브 및 럿지의 실질적으로 평행한 어레이를 가진 나노패턴화된 표면을 포함하는, 방법.

### 청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 각각의 그루브 또는 럿지의 치수가 길이, 폭 또는 높이에서 1000 나노미터 미만인, 방법.

### 청구항 17

제 15 항에 있어서,

상기 그루브 및 럿지의 폭이 800 nm이고, 그루브의 깊이가 600 nm인, 방법.

### 청구항 18

제 14 항에 있어서,

상기 Let7i microRNA가 상기 줄기세포-유래 심근세포에 의해 발현되는, 방법.

### 청구항 19

제 14 항에 있어서,

상기 심근세포를 상기 Let7i microRNA와 접촉시키는 단계가 상기 줄기세포-유래 심근세포를 바이러스 백터와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 20

제 14 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 인간 심근세포인, 방법.

### 청구항 21

제 14 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 유도성 만능 줄기세포(iPS 세포) 또는 배아 줄기세포로부터 분화되는, 방법.

### 청구항 22

제 14 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래되는, 방법.

### 청구항 23

제 14 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 유전자 변형되는, 방법.

### 청구항 24

제 23 항에 있어서,

상기 심근세포가, Let7i microRNA를 인코딩하는 백터와 접촉한 후 나노패턴화 기재 및 갑상선 호르몬 T3과 접촉되는, 방법.

### 청구항 25

제 14 항에 있어서,

생성되는 줄기세포-유래 심근세포가, 나노패턴화 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA와 접촉하기 이전의 줄기세포-유래 심근세포와 비교하였을 때 보다 성숙한 심근세포 표현형을 갖는, 방법.

### 청구항 26

제 14 항에 있어서,

상기 나노패턴화 기재가 심근세포 전기 생리학적 특성의 전기적 자극 및/또는 측정을 허용하는 마이크로 전극 어레이를 포함하는, 방법.

### 청구항 27

작용제(agent)의 심독성을 평가하는 방법으로서, 상기 방법이,

제 1 항 또는 제 14 항에 의해 제조되는 줄기세포-유래 심근세포를 상기 작용제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 28

제 27 항에 있어서,

상기 심근세포의 적어도 하나의 표현형 특성을 검출하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 29

제 27 항에 있어서,

상기 작용제가 소분자, 항체, 웨티드, 게놈 편집 시스템 및 핵산으로 이루어진 군 중에서 선택되는, 방법.

### 청구항 30

제 27 항에 있어서,

상기 작용제의 심독성이 세포 생존력, 세포 크기, 근원섬유마디 길이, 조직내 근원섬유마디의 조직, 줄기세포-유래 심근세포의 집단의 생체 전위 또는 전기적 특성, 미토콘드리아 기능, 유전자 발현, 심박동수, 박동 강도, 및 수축성 중의 하나 이상에 대한 작용제의 효과에 의해 나타나는, 방법.

### 청구항 31

심근세포의 기능적 특성을 조절하는 작용제를 동정하기 위한 분석 방법으로서, 상기 분석 방법이,

(a) 제 1 항 또는 제 14 항의 방법에 의해 제조되는 줄기세포-유래 심근세포의 집단을 후보 작용제와 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 심근세포의 적어도 하나의 기능적 특성을 검출하는 단계

를 포함하며, 여기서 상기 심근세포의 적어도 하나의 기능적 특성에 있어서의 변화를 검출하는 단계가 상기 심근세포의 기능적 특성을 조절할 수 있는 것으로서 작용제를 동정하는 접촉 단계(a) 이후에 수행되는, 분석 방법.

### 청구항 32

제 31 항에 있어서,

상기 검출 단계(b)가, 세포 생존력, 세포 크기, 근원섬유마디 길이, 조직내 근원섬유마디의 조직, 생체전위 또는 전기적 특성, 미토콘드리아 기능, 유전자 발현, 심박동수, 박동 강도, 및 수축성 중의 적어도 하나를 검출하는 단계를 포함하는, 분석 방법.

### 청구항 33

제 1 항 또는 제 14 항의 방법에 의해 제조되는 줄기세포-유래 심근세포를 포함하는 질환 모델로서,

여기서 상기 줄기세포가 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래되거나, 또는 상기 줄기세포-유래 심근세포 또는 이들이 유래되는 줄기세포가, 상기 심근세포가 질환 표현형을 발현하도록 유전자 변형되는, 질환 모델.

### 청구항 34

.

### 청구항 35

제 33 항에 있어서,

상기 근육 질환 또는 장애가 심장 기능장애를 가진 표현형을 갖는, 질환 모델.

### 청구항 36

제 33 항에 있어서,

상기 근육 질환 또는 장애가 심장 표현형의 성인 발병을 특징으로 하는, 질환 모델.

### 청구항 37

제 33 항에 있어서,

상기 근육 질환 또는 장애가 뒤시엔느 근육 디스트로피(Duchenne Muscular Dystrophy)인, 질환 모델.

#### 청구항 38

나노패턴화 기재 상에 줄기세포-유래 심근세포를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물이 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA를 추가로 포함하는, 조성물.

#### 청구항 39

제 37 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래되는, 조성물.

#### 청구항 40

제 37 항에 있어서,

상기 심근세포가 인간 심근세포인, 조성물.

#### 청구항 41

제 37 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포 또는 이들이 유래되는 줄기세포가, 상기 줄기세포-유래 심근세포가 심장 기능장애 표현형을 나타내도록 유전자 변형되는, 조성물.

#### 청구항 42

시험관내-분화된 심근세포를 나노패턴화 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA와 접촉시킴으로써 제조된 심근세포를 포함하는 조성물로서,

상기 심근세포가 나노패턴화 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA와 접촉하지 않은 시험관내-분화된 심근세포와 비교하였을 때 보다 성숙한 표현형을 갖는, 조성물.

#### 청구항 43

제 41 항에 있어서,

상기 심근세포가 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래되는, 조성물.

#### 청구항 44

제 41 항에 있어서,

상기 시험관내-분화된 심근세포 또는 그들이 분화되는 줄기세포가, 그들이 심장 기능장애 표현형을 나타내도록 유전자 변형되는, 조성물.

#### 청구항 45

줄기세포-유래 심근세포, 나노패턴화 기재, 갑상선 호르몬 T3, Let7i microRNA를 인코딩하는 백터, 및 이들을 패키징하는 물질을 포함하는 키트.

#### 청구항 46

제 44 항에 있어서,

세포 배양 배지 및 줄기세포-유래 심근세포로부터 성숙한 시험관내 분화된 심근세포의 제조를 가능하게 하는 설명서를 추가로 포함하는, 키트.

#### 청구항 47

제 44 항에 있어서,

상기 나노패턴화 기재가 그루브 및 럿지의 실질적으로 평행한 어레이를 가진 나노패턴화된 표면을 포함하는, 키트.

#### 청구항 48

제 46 항에 있어서,

상기 각각의 그루브 또는 럿지의 치수가 길이, 폭 또는 높이에서 1000 나노미터 미만인, 키트.

#### 청구항 49

제 46 항에 있어서,

상기 그루브 및 럿지의 폭이 800 nm이고, 그루브의 깊이가 600 nm인, 키트.

#### 청구항 50

제 44 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 인간 심근세포인, 키트.

#### 청구항 51

제 44 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래되는, 키트.

#### 청구항 52

제 44 항에 있어서,

상기 줄기세포-유래 심근세포가 동결되는, 키트.

#### 청구항 53

줄기세포-유래 심근세포를 제조하는 방법으로서, 상기 방법이,

상기 줄기세포-유래 심근세포를,

- (a) 그루브 및 럿지의 실질적으로 평행한 어레이(여기서, 상기 그루브 및 럿지의 폭은 800 nm이며, 상기 그루브의 깊이는 600 nm이다)를 포함하는 나노패턴화 기재;
- (b) 갑상선 호르몬 T3; 및
- (c) Let7i microRNA

와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 54

나노패턴화 기재 상에 줄기세포-유래 심근세포를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물이,

- (a) 그루브 및 럿지의 실질적으로 평행한 어레이(여기서, 상기 그루브 및 럿지의 폭은 800 nm이며, 상기 그루브의 깊이는 600 nm이다)를 포함하는 나노패턴화 기재;
  - (b) 갑상선 호르몬 T3; 및
  - (c) Let7i microRNA
- 를 추가로 포함하는, 조성물.

#### 청구항 55

제 1 항 내지 제 32 항 및 제 53 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노패턴화 기재가 그 위에서 배양된 심근세포의 기계적 자극을 가능하게 하는 엘라스토머성 기재를 포함

하며, 상기 심근세포에 이러한 기계적 자극을 가하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 56

제 38 항 내지 제 41 항 및 제 54 항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 또는 제 45 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 따른 키트에서, 상기 나노패턴화 기재가 그 위에서 배양된 심근세포의 기계적 자극을 가능하게 하는 엘라스토머성 기재를 포함하는, 조성물 또는 키트.

### 청구항 57

제 43 항 내지 제 51 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 심근세포가 상기 나노패턴화 기재 상에 있는, 키트.

### 청구항 58

제 43 항 내지 제 51 항 및 제 57 항 중 어느 한 항에 있어서,

실온 내지 4°C의 온도에서의 운송이 가능한, 키트.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은, 2017년 8월 16일자 출원된 미국 가출원 제 62/546,438 호에 대한 35 U.S.C. § 119(e)에 따른 우선권을 주장하며, 그의 전문은 본 명세서에서 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명은 심장 기능 및 질환에 대한 시험관내 모델에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0004] 심혈관 질환은 전세계 남성과 여성 모두에게 사망의 주요 원인이 되고 있으며, 개발 도상국에 급속히 영향을 미치고 있다. 유전성 심근병증은 어린이와 젊은이, 그리고 건강한 성인을 포함한 모든 연령대에서 심장 질환의 주요 원인이다. 인간 만능 줄기세포-유래 심근세포(hPSC-CMs)는 심근병증 연구를 위한 유망한 도구로, 이는 그들이 인간 심장에서 발견되는 이온 채널, 단백질 이소형(protein isoform), 유전자 및 대사기구의 전체 어레이(full array)를 발현할 수 있는 인간 심근세포에 대한 접근성을 크게 증가시키기 때문이다.

[0005] 인간 만능 줄기세포(hPSCs)의 심근세포로의 지시된 분화는 전형적으로는 태아 심장에 존재하는 것들과 가장 유사한 구조적, 기능적 및 생화학적 특성을 가진 세포를 생성한다. 그러나, 새롭게 분화된 hPSCs와 비교하였을 때 향상된 근원섬유마디 발달(enhanced sarcomere development), 향상된 수축 기능, 감소된 심박동수, 향상된 미토콘드리아 용량, 및 보다 성숙한 전사체를 포함하는 성인 심근세포 표현형을 갖는 hPSC-CMs을 개발할 필요성이 있다. 현재의 심장 질환 모델링에 대한 노력의 주요 목표는 보다 효과적인 치료 전략을 설계하기 위한 첫 단계로서 심근병증의 발병 및 진행에 대한 통찰력을 얻는 것이다. 본원에 기술된 방법 이전에는, 뒤시엔느 근육 디스트로피(Duchenne muscular dystrophy)와 같은 성인-발병 근육 장애 및 심혈관 질환은 hPSC-CMs에 의해 정확하게 모델링되지 않았다. 이는 질병 모델링 및 약물 스크리닝 응용 분야에서 사용되는 줄기세포 분화 및 성숙 방법에 대한 개선의 필요성을 강조하는 것이다.

### 발명의 내용

[0006] 본 명세서에서는 성숙한 줄기세포-유래 심근세포를 생성하기 위해 발달하고 있는 심장 니치 플랫폼(developmental cardiac niche platform)을 조작하는 방법이 기술된다. 이러한 방법은 줄기세포-유래 심근세포를 태아 표현형에서 성인 심근세포의 표현형과 보다 더 유사한 보다 성숙한 표현형으로의 전이를 촉진하는 물리적 및 생화학적 단서(cue)를 포함한다.

[0007] 본 명세서에서 기술되는 접근법은 줄기세포로부터 시험관내에서 분화된 보다 성숙한 심근세포를 제공함으로써, 다른 용도들 중에서도 심근세포 또는 심장 기능을 조절하는 새로운 약물을 동정하기 위해 심근 독성 및 스크리닝을 위한 약물을 평가하기 위한 플랫폼을 제공한다. 시험관내 분화 전에 줄기세포를 유전적으로 변형시키는 능

력뿐만 아니라 정상 개체(subject) 및 질환이 있는 개체로부터 줄기세포, 예를 들면, 유도성 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells)(iPS 세포)를 생성하는 능력은 개선된 질병 모델링 및 약물 스크리닝 및 동정을 위한 플랫폼을 제공한다.

- [0008] 따라서, 하나의 양태에서, 본 명세서에서는 줄기세포-유래 심근세포를 제조하는 방법이 기술되며, 상기 방법은 줄기세포-유래 심근세포를 나노패턴화 기재; 갑상선 호르몬 T3; 및 Let7i microRNA와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0009] 하나의 실시형태에서, 나노패턴화 기재는 그루브(groove) 및 럿지(ridge)의 실질적으로 평행한 어레이를 가진 나노패턴화된 표면을 포함한다.
- [0010] 하나의 실시형태에서, 각각의 그루브 또는 럿지의 치수는 길이, 폭 또는 높이가 1000 나노미터 미만이다.
- [0011] 하나의 실시형태에서, 그루브 및 럿지의 폭은 약 800 nm이고, 그루브의 깊이는 약 600 nm이다.
- [0012] 하나의 실시형태에서, Let7i microRNA는 줄기세포-유래 심근세포에 의해 발현된다.
- [0013] 하나의 실시형태에서, 심근세포를 Let7i microRNA와 접촉시키는 단계는 줄기세포-유래 심근세포를 바이러스 벡터와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0014] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 인간 심근세포이다.
- [0015] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 유도성 만능 줄기세포(iPS 세포) 또는 배아 줄기세포로부터 분화된다.
- [0016] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래된다.
- [0017] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 유전자 변형된다.
- [0018] 하나의 실시형태에서, 심근세포는 Let7i microRNA를 인코딩하는 벡터와 접촉한 후 나노패턴화 기재 및 갑상선 호르몬 T3과 접촉된다.
- [0019] 하나의 실시형태에서, 생성된 줄기세포-유래 심근세포는 나노패턴화 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA와 접촉하기 이전의 줄기세포-유래 심근세포와 비교하였을 때 더욱 성숙한 심근세포 표현형을 갖는다.
- [0020] 하나의 실시형태에서, 나노패턴화 기재는 심근세포 전기 생리학적 특성의 전기적 자극 및/또는 측정을 허용하는 마이크로 전극 어레이를 포함한다.
- [0021] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서는 줄기세포-유래 심근세포를 성숙시키는 방법이 기술되며, 상기 방법은 줄기세포-유래 심근세포를 나노패턴화 기재; 갑상선 호르몬 T3; 및 Let7i microRNA와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0022] 하나의 실시형태에서, 나노패턴화 기재는 그루브 및 럿지의 실질적으로 평행한 어레이를 가진 나노패턴화된 표면을 포함한다.
- [0023] 하나의 실시형태에서, 각각의 그루브 또는 럿지의 치수는 길이, 폭 또는 높이가 1000 나노미터 미만이다.
- [0024] 하나의 실시형태에서, 그루브 및 럿지의 폭은 약 800 nm이고, 그루브의 깊이는 약 600 nm이다.
- [0025] 하나의 실시형태에서, Let7i microRNA는 줄기세포-유래 심근세포에 의해 발현된다.
- [0026] 하나의 실시형태에서, 심근세포를 Let7i microRNA와 접촉시키는 단계는 줄기세포-유래 심근세포를 바이러스 벡터와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0027] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 인간 심근세포이다.
- [0028] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 유도성 만능 줄기세포(iPS 세포) 또는 배아 줄기세포로부터 분화된다.
- [0029] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래된다.
- [0030] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 유전자 변형된다.
- [0031] 하나의 실시형태에서, 심근세포는 Let7i microRNA를 인코딩하는 벡터와 접촉한 후 나노패턴화 기재 및 갑상선 호르몬 T3과 접촉된다.

- [0032] 하나의 실시형태에서, 생성된 줄기세포-유래 심근세포는 나노페던화 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA와 접촉하기 이전의 줄기세포-유래 심근세포와 비교하였을 때 보다 성숙한 심근세포 표현형을 갖는다.
- [0033] 하나의 실시형태에서, 나노페던화 기재는 심근세포 전기 생리학적 특성의 전기적 자극 및/또는 측정을 허용하는マイ크로 전극 어레이를 포함한다.
- [0034] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서는 작용제(agent)의 심독성을 평가하는 방법이 기술되며, 상기 방법은 본 명세서에서 기술되는 방법에 의해 제조되는 줄기세포-유래 심근세포를 작용제와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0035] 하나의 실시형태에서, 상기 방법은 심근세포의 적어도 하나의 표현형 특성을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0036] 하나의 실시형태에서, 작용제는 소분자, 항체, 펩티드, 게놈 편집 시스템 및 핵산으로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0037] 하나의 실시형태에서, 작용제의 심독성은 세포 생존력, 세포 크기, 근원섬유마디 길이, 조직내 근원섬유마디의 조직, 줄기세포-유래 심근세포의 집단의 생체 전위 또는 전기적 특성, 미토콘드리아 기능, 유전자 발현, 심박동수, 박동 강도, 및 수축성 중의 하나 이상에 대한 작용제의 효과에 의해 지시된다.
- [0038] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서는 심근세포의 기능적 특성을 조절하는 작용제를 동정하기 위한 분석법이 기술되며, 상기 분석법은 본 명세서에서 기술되는 방법에 의해 제조되는 줄기세포-유래 심근세포의 집단을 후보 작용제와 접촉시키는 단계; 및 심근세포의 적어도 하나의 기능적 특성을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 심근세포의 적어도 하나의 기능적 특성에 있어서의 변화를 검출하는 것은 심근세포의 기능적 특성을 조절할 수 있는 것으로 작용제를 동정한다.
- [0039] 하나의 실시형태에서, 검출 단계는 세포 생존력, 세포 크기, 근원섬유마디 길이, 조직내 근원섬유마디의 조직, 생체전위 또는 전기적 특성, 미토콘드리아 기능, 유전자 발현, 심박동수, 박동 강도, 및 수축성 중의 적어도 하나를 검출하는 것을 포함한다.
- [0040] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서는 본 명세서에서 기술되는 방법에 의해 제조되는 줄기세포-유래 심근세포를 포함하는 질환 모델이 기술되며, 여기서 상기 줄기세포는 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래되거나, 또는 줄기세포-유래 심근세포 또는 이들이 유래되는 줄기세포는 심근세포가 질환 표현형을 발현하도록 유전자 변형된다.
- [0041] 하나의 실시형태에서, 근육 질환 또는 장애는 심장 기능장애를 가진 표현형을 갖는다.
- [0042] 하나의 실시형태에서, 근육 질환 또는 장애는 심장 질환 표현형의 성인 발병을 특징으로 한다.
- [0043] 하나의 실시형태에서, 근육 질환 또는 장애는 뒤티엔느 근육 디스트로피가다.
- [0044] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서는 나노페던화 기재 상에 줄기세포-유래 심근세포를 포함하는 조성물이 기술되며, 상기 조성물은 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA를 추가로 포함한다.
- [0045] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래된다.
- [0046] 하나의 실시형태에서, 심근세포는 인간 심근세포이다.
- [0047] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포 또는 이들이 유래되는 줄기세포는 줄기세포-유래 심근세포가 심장 기능장애 표현형을 나타내도록 유전자 변형된다.
- [0048] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서는 시험관내-분화된 심근세포를 나노페던화 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA와 접촉시킴으로써 제조된 심근세포를 포함하는 조성물이 기술되며, 여기서 상기 심근세포는 나노페던화 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA와 접촉하지 않은 시험관내-분화된 심근세포와 비교하였을 때 보다 성숙한 표현형을 갖는다.
- [0049] 하나의 실시형태에서, 심근세포는 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래된다.
- [0050] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서는 시험관내-분화된 심근세포 또는 그들이 분화되는 줄기세포가, 그들이 심장 기능장애 표현형을 나타내도록 유전적으로 변형된 조성물이 기술된다.
- [0051] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서는 줄기세포-유래 심근세포, 나노페던화 기재, 갑상선 호르몬 T3, Let7i microRNA를 인코딩하는 벡터, 및 이들을 폐키징하는 물질을 포함하는 키트가 기술된다.

- [0052] 하나의 실시형태에서, 상기 키트는 세포 배양 배지 및 줄기세포-유래 심근세포로부터 성숙한 시험관내 분화된 심근세포의 제조를 가능하게 하는 설명서를 포함한다.
- [0053] 하나의 실시형태에서, 나노패턴화 기재는 그루브 및 럿지의 실질적으로 평행한 어레이를 가진 나노패턴화된 표면을 포함한다.
- [0054] 하나의 실시형태에서, 각각의 그루브 또는 럿지의 치수는 길이, 폭 또는 높이가 1000 나노미터 미만이다.
- [0055] 하나의 실시형태에서, 그루브 및 럿지의 폭은 약 800 nm이며, 그루브의 깊이는 약 600 nm이다.
- [0056] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 인간 심근세포이다.
- [0057] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 근육 질환 또는 장애를 가진 개체로부터 유래된다.
- [0058] 하나의 실시형태에서, 심근세포는 나노패턴화 기재 상에 있다.
- [0059] 하나의 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 동결된다.
- [0060] 하나의 실시형태에서, 키트는 실온 내지 4°C의 온도에서의 운송을 가능하게 한다.
- [0061] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서는 줄기세포-유래 심근세포를 제조하는 방법이 기술되며, 상기 방법은 줄기세포-유래 심근세포를 그루브 및 럿지의 실질적으로 평행한 어레이(여기서 상기 그루브 및 럿지의 폭은 800 nm이며, 상기 그루브의 깊이는 600 nm이다); 갑상선 호르몬 T3; 및 Let7i microRNA를 포함하는 나노패턴화 기재와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0062] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서는 나노패턴화 기재 상에 줄기세포-유래 심근세포를 포함하는 조성물이 기술되며, 상기 조성물은 그루브 및 럿지의 실질적으로 평행한 어레이(여기서 상기 그루브 및 럿지의 폭은 800 nm이며, 상기 그루브의 깊이는 600 nm이다); 갑상선 호르몬 T3; 및 Let7i microRNA를 포함하는 나노패턴화 기재를 추가로 포함한다.
- [0063] 하나의 실시형태에서, 본 명세서에서는 나노패턴화 기재가 그 위에서 배양된 심근세포의 기계적 자극을 가능하게하는 엘라스토머성 기재를 포함하며, 상기 심근세포에 이러한 기계적 자극을 가하는 단계를 추가로 포함하는 방법이 기술된다.
- [0064] 하나의 실시형태에서, 본 명세서에서 기술되는 조성물 또는 본 명세서에서 기술되는 키트에서, 나노패턴화 기재는 그 위에서 배양된 심근세포의 기계적 자극을 가능하게하는 엘라스토머성 기재를 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0065] **도 1a** 내지 **도 1f**는 콤보매트 플랫폼(ComboMat platform)이 보다 성숙한 전사 프로파일(transcriptional profile)을 촉진한다는 것을 나타낸다. **도 1a**는 콤보매트 플랫폼의 개략적인 타임 라인(timeline)을 나타낸다. 심근세포 분화는 소분자 및 인간 재조합 단백질 기반 프로토콜을 사용하여 달성된다. 심근세포 생성 후, hPSC-CMs를 Let7i 렌티바이러스로 형질 감염시키고, 대사 시도를 통해 정제하고, 바이러스 형질 감염을 위해 선택한다. 이어서, 바이러스 벡터를 발현하는 고순도 hPSC-CMs를 NPs 상에 플레이팅한 다음 3주 동안 T3에 노출시킨다. **도 1b**는 주요 성분 분석의 3 차원 시각화를 나타낸다. hPSC-CMs를 PC2를 따라 T3 클러스터에 노출시켰다. 콤보매트 그룹을 성숙 자극의 다른 조합으로부터 분리하고 구별한다. **도 1c**는 상이한 처리의 결과로서 차별적으로 발현된 유전자의 심장 성숙 경로에서의 순 농축(net enrichment)을 나타낸다. **도 1d**는 EV-Flat 대조군과 비교한 Let7i-NP-T3 조합 처리에서의 상향 조절된 유전자의 유전자 온톨로지(GO) 농축 결과를 나타낸다. 색상 변화율 및 막대 길이는 농축의 중요성을 나타낸다. **도 1e** 및 **도 1f**는 EV-Flat을 Let7i-NP-T3(**도 1e**)와 비교하고 태아 심장 심근세포를 성인 심장 심근세포(**도 1f**)와 비교하는 RNAseq 샘플의 분리에 대한 유전자 기여를 보여주는 PCA 로딩의 베를 플롯을 도시한다. **도 1e** 및 **도 1f**의 베를 플롯은 콤보매트-처리된 hPSC-CMs와 성인 CMs 사이의 특정 유전자의 유사한 상향/하향 조절 패턴을 강조한다.

**도 2a** 내지 **도 2f**는 hPSC-CMs의 구조적 성숙을 나타낸다. **도 2a**는 콤보매트 프로토콜 또는 각각의 단서에 분리되어 노출된 hPSC-CMs의 면역형광 이미지를 나타낸다. 적색 = 알파-액티닌, 녹색 = F-액틴, 청색 = DAPI. 삽도 (Inset)는 hPSC-CMs 내의 근원섬유마디 구조의 근접 사진을 나타낸다. **도 2b**는 콤보매트 플랫폼의 표지된 단서에 노출된 hPSC-CMs로부터의 근원섬유마디의 TEM 이미지를 나타낸다. 대조군 조건에 노출된 hPSC-CMs는 단지 Z-소체(Z-body) 구조를 나타내는 반면, 콤보매트 플랫폼에 노출된 hPSC-CMs는 훨씬 더 한정된 Z-판(Z-disc) 구조를 갖는다. **도 2c** 내지 **도 2f**는 콤보매트 프로토콜 또는 각각의 단서에 분리되어 노출된 hPSC-CMs에 대한 형태

론적 변화의 정량화를 나타낸다. 도 2c는 주문형 2D 푸리에 변환 이미지 분석을 통해 측정된 근원섬유마디 길이를 나타낸다. 도 2d는 적색선으로 표시된 평균 Z-밴드 폭을 가진 TEM 이미지로부터 측정된 Z-밴드 폭의 상자-수염 그림(box-and-whisker plot)을 도시한다. 도 2e는 콤보매트 그룹이 생리적 이핵화 백분율에 근접하고 있음을 보여주는 이핵화된 세포의 막대 차트를 도시한다. 도 2f는 콤보매트 플랫폼에 대해 명확한 비대성 반응을 나타내는, 면역형광 이미지로부터 측정된 세포 면적을 나타낸다. 막대는 평균 ± S.E.M. \*P<0.05를 나타낸다.

도 3a 내지 도 3g는 전기 기계적 성숙 및 대사성 성숙을 나타낸다. 도 3a는 주문형 CCQ 방법을 통해 측정하였을 때 대조군 또는 콤보매트 hPSC-CMs에 대해 전체 비디오 프레임에 걸쳐 평균화된 수축 속도의 흔적을 나타낸다. 피크 수축 속도 및 피크 이완 속도가 나타나 있다. 도 3b는 피크 수축 및 이완 속도의 정량화를 나타낸다. 도 3c는 대조군 또는 콤보매트 hPSC-CMs에 대한 수축각 분포 히스토그램을 나타낸다. 히스토그램 중앙에 있는 선은 평균 수축각을 나타내는 반면, 선의 길이는 분포가 평균과 정렬되는 정도를 나타낸다. 도 3d는 종향 및 횡방향에서의 수축의 크기의 수축 이방성비(anisotropic ratio)(AR)를 나타낸다. 도 3e는 대조군과 콤보매트 hPSC-CMs 사이의 FPD의 변화를 나타내는 대표적인 전계 전위 기록을 나타낸다. 도 3f는 FPD의 정량화를 나타내며, 도 3g는 콤보매트 플랫폼 또는 각각의 단서에 개별로 노출된 hPSC-CMs에 대한 분당 박동 수로 표현된 심박동수를 나타낸다. 도 3h는 팔미테이트를 사용한 지방산 스트레스 테스트에 대한 대표적인 OCR 트레이스를 나타낸다. 도 3i는 팔미테이트 첨가 후의 OCR의 최대 변화의 정량화를 나타낸다. 막대는 평균 ± S.E.M. \*P<0.05를 나타낸다.

도 4a 내지 도 4e는 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs가 정상 대조군과 유사하게 콤보매트 플랫폼에 반응한다는 것을 나타낸다. 도 4a는 정상 hPSC-CMs와 비교하여 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출된 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs의 해마 대사 프로파일을 나타낸다. 도 4b는 FCCP 첨가 후의 OCR의 최대 변화의 정량화를 나타낸다. 정상 및 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs 둘 모두 콤보매트 플랫폼에 노출되었을 때 최대 호흡 능력에 있어서의 증가를 나타낸다. 도 4c 및 도 4d는 MEA 기반 전기 생리학적 측정값을 나타낸다. 도 4c는 정상 또는 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에 대한 분당 박동수로 표현된 심박동수를 나타낸다. 도 4d는 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출된 정상 또는 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에 대한 평균 FPD를 나타낸다. 도 4e는 대조군(왼쪽) 및 콤보매트(오른쪽) 조건에 노출된 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs의 면역형광 이미지를 나타낸다. 삽도는 각각의 조건에서의 근원섬유마디 구조의 근접 부분을 나타낸다. 막대는 평균 ± S.E.M. \*P<0.05를 나타낸다.

도 5a 내지 도 5f는 내인성 DMD 질환 표현형이 노출된 것을 나타낸다. 도 5a는 하나 걸러서 박동 간격에 주석이 달린 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출된 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs로부터의 대표적인 전계 전위 기록을 나타낸다. 도 5b는 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출된 정상 및 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에 대한 30회의 연속 박동에 대해 플롯팅된 박동 간격에 있어서의 변화( $\Delta BI$ )를 나타낸다. 성숙 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs은 정상 hPSC-CMs에 비해  $\Delta BI$ 에서 훨씬 더 큰 불안정성을 나타낸다. 도 5c는 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출된 정상 또는 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에 대한  $\Delta BI > 250\text{ms}$ 에서의 평균 박동 백분율을 나타낸다. 미성숙 정상 hPSC-CMs은  $\Delta BI > 250\text{ms}$ 의 발생률을 전혀 나타내지 않았다. 도 5d는 총 30회 박동 기록에 대한 평균  $\Delta BI$ 를 나타낸다. 미성숙 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs는 MEAs 상에서 구별되는 질환 표현형을 전혀 나타내지 않는 반면, 콤보매트 플랫폼을 사용하여 성숙된 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs는 정상 대조물과 유의하게 다르다. 도 5e는 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출된 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs의 대표적인  $\text{Fura-2 Ca}^{2+}$  이미징 트레이스를 나타낸다. 도 5f는 사이토졸(cytosol) 중에서의 이완기  $\text{Ca}^{2+}$  함량의 5F 정량화를 나타낸다. DMD 돌연변이체 hPSC-CMs은 콤보매트 플랫폼을 사용하여 성숙되었을 때 유의적으로 더 높은 사이토졸성  $\text{Ca}^{2+}$  함량을 나타낸다. 막대는 평균 ± S.E.M. \*P<0.05를 나타낸다.

도 6a 내지 도 6f는 성숙한 hPSC-CMs을 사용한 DMD 심근병증 표현형 약물 스크린을 나타낸다. 도 6a는 삼투성 스트레스에 대한 반응에서 세포 사멸의 감소에 대해 Z-스코어로 등급을 매긴 약물 라이브러리를 나타낸다. 특정 화합물의 화학 구조가 또한 도시되어 있다. 도 6b는 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출된 정상 및 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에 대한 기준선 평균  $\Delta BI$ 의 정량화를 나타낸다. 도 6c 및 도 6d는 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출된 정상 및 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에 대한 7일 후의 니트렌디핀 및 실데나필에 대한 반응에 있어서의 용량-반응 곡선을 나타낸다. 도 6e는 니트렌디핀 세척 48시간 후의 평균  $\Delta BI$ 의 측정값을 나타낸다. 도 6f는 성숙 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에 대한 대표적인  $\text{Fura-2 Ca}^{2+}$  트레이스를 나타낸다. 도 6g는 니트렌디핀이 있을 때 및 없을 때의 이완기  $\text{Ca}^{2+}$  함량의 정량화를 나타낸다. 니트렌디핀은 성숙한 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에서 사이토졸성  $\text{Ca}^{2+}$  부하를 감소시키는데 도움이 된다. 막대는 평균 ± S.E.M. \*P<0.05를 나타낸다.

도 7a 내지 도 7c는 디스트로핀 돌연변이체 분석을 나타낸다. 도 7a는 염기쌍 263에서 G 결실을 나타내는 정상

(서열 번호: 18) 및 DMD 돌연변이체(서열 번호: 19) hPSC-CMs 둘 다에서 DMD 유전자 서열 분석을 위한 프라이머 디자인의 대표적인 표현을 나타낸다. 도 7b는 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs의 bp263에서의 CRISPR 조작된 결실 주위의 DMD 유전자의 크로모그래프를 나타낸다. 도 7c는 엑손 1에서 프레임 시프트 결실의 결과로서 조기 정지 코돈 (STOP codon)으로서 제안하는 정상(상단) 및 DMD 돌연변이체(하단) hiPSC-CM에서의 예측된 단백질 서열을 나타낸다.

도 8a 내지 도 8f는 패치 클램프 전기생리검사 결과를 나타낸다. 도 8a는 hPSC-CMs의 전류-클램프 전기생리학적 측정 결과를 나타낸다. 콤보매트 조건에 노출된 hPSC-CMs는 상당히 빠른 상행각 속도(upstroke velocity)를 나타내었지만, 모든 다른 파라미터들(도 8b 내지 도 8f)은 대조군과 콤보매트 hPSC-CMs 사이에서 통계적으로 다르지 않았다. 막대는 평균 ± S.E.M. \*P<0.05를 나타낸다. 오르막 경사(Up Slope) = 활동 전위의 상행각 속도, RMP = 안정막 전위(resting membrane potential), APD90 = 90% 재분극의 활동 전위 지속시간, 타우 붕괴(Decay Tau) = 이완의 시간 상수, 진폭 = 활동 전위의 진폭, MDP = 최대 이완기 전위.

도 9a 내지 도 9e는 hPSC-CMs의 대사 프로파일링을 나타낸다. 도 9a는 미토스트리(MitoStree) 분석 도중의 ATP 합성효소 억제제 올리고마이신, 전자 수송 및 산화적 인산화(FCCP)의 언커플러, 및 전자 수송 사슬 차단제 로테논 및 안티마이신에 대한 반응에서의 대표적인 OCR 프로파일을 나타낸다. 도 9b는 기초 호흡 능력 및 최대 호흡 능력의 정량화를 나타낸다. 도 9c는 팔미테이트를 사용하는 지방산 스트레스 테스트에 대한 대표적인 OCR 트레이스를 나타낸다. 도 9d 및 도 9e는 정상 hiPSC-CMs에 대해 팔미테이트에 반응하는 OCR 변화의 정량화를 나타낸다. 도 9e는 콤보매트 hPSC-CMs를 사용하는 지방산 장애 및 BSA 대조군에 대한 대표적인 OCR 프로파일을 나타낸다. 세포들은 BSA 캐리어에 반응하지 않았다. 막대는 평균 ± S.E.M. \*P<0.05를 나타낸다.

도 10a 내지 도 10f는 질환 상태 계층화에 전체 콤보매트가 필요하다는 것을 나타낸다. 길크리스트(Gilchrist) 등의 문헌<sup>25</sup>에 요약되어 있는 바와 같은 부정맥 메트릭스. 성숙 단서가 분리되어 사용되는 경우에는 정상 및 DMD 돌연변이 hPSC-CMs 사이에는 통계적 차이가 없지만, 콤보매트 프로토콜에 결합되는 경우에는 건강한 정상 및 질환 DMD 돌연변이 hPSC-CMs 사이에는 분리(separation)가 있다. 막대는 평균 ± S.E.M. \*P<0.05를 나타낸다.

도 11a 내지 도 11f는 hPSC-CMs에서 장기 T3 노출의 효과를 나타낸다. 도 11a 및 도 11b는 면역 조직 화학을 통해 측정하였을 때 후처리후 7일, 14일 및 21일째에 측정된 hPSC-CMs의 근원섬유마디 길이 및 세포 면적에 대한 T3의 효과를 나타낸다. NPs와 T3를 단독으로 조합한 결과 근원섬유마디 구조 및 비대에 장기적으로 부정적인 영향을 미쳤다. 도 11c 및 도 11d는 후처리후 7일, 14일 및 21일째에 측정된 hPSC-CMs의 수축(도 11c) 및 이완 속도(도 11d)의 CQ 측정값을 나타낸다. 다시 NPs와 T3를 단독으로 조합한 결과 수축 성능을 저해하였다. 도 11e 및 도 11f는 후처리후 7일, 14일 및 21일째에 대조군 또는 T3 조건에 노출되고 MEAs를 통해 측정된 hPSC-CMs의 전기 생리 학적 성능을 나타낸다. 도 11e는 T3 처리된 세포에서 D14일째에 절정에 도달한 박동 기간을 나타낸다. 도 11f는 T3에 단독으로 노출된 hPSC-CMs에서 실질적으로 증가된 심박동수 변동성을 나타낸다. 막대는 평균 ± S.E.M. \*P<0.05를 나타낸다.

도 12a 내지 도 12e는 대사 유발을 통한 심근세포 정체를 나타낸다. 도 12a 및 도 12b는 저순도 심장 시작 집단에 대한 젖산 농축 이전(도 12a) 및 이후(도 12b)의 cTnT + 세포에 대한 유세포 분석 결과를 나타낸다. 도 12c는 IgG 아이소형 대조군 유세포 분석 결과가 cTnT 항체의 비특이적 결합을 전혀 나타내지 않음을 나타낸다. 도 12d 및 도 12e는 고순도 심장 시작 집단에 대한 젖산 농축 이전(도 12d) 및 이후(도 12e)의 cTnT + 세포에 대한 유세포 분석 결과를 나타낸다.

도 13a 내지 도 13g는 hPSC-CMs의 나노 지형 크기(nanotopographic size)-의존성 구조적 발달을 나타낸다. 도 13a는 다양한 치수를 가진 NP 표면의 주사 전자 현미경 사진(상단부), 다양한 치수의 NPs 상에서 배양된 hPSC-CMs의 공초점 면역 형광 이미지(하단부)를 나타낸다. 도 13b는 표지된 지형 치수 상에서 배양된 hPSC-CMs의 세포 면적 및 세포 이방성 비율을 나타낸다. 도 13c는 상이한 지형 치수 상에서의 hPSC-CMs의 초기 시딩 밀도에 대한 세포 단층 밀도를 나타낸다. 도 13d는 다양한 지형 상에서의 hPSC-CMs의 상대적 세포골격 섬유 정렬을 나타낸다. 도 13e 및 도 13f는 flat 및 800 nm NPs 사이의 hPSC-CMs의 Fluo-4 칼슘 이미징 및 시간-피크(time-to-peak)  $Ca^{2+}$  측정 결과를 나타낸다. 도 13g는 flat과 비교한 800 nm NPs 상에서의 hPSC-CMs의 심장 성숙 마커의 RT-PCR 발현 수준을 나타낸다. 막대는 평균 ± S.E.M. \*P<0.05를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0066] 본 명세서에서 기술되는 조성물 및 방법은 부분적으로는, 세포를 나노패턴화 기재; 갑상선 호르몬(T3); 및 Let7i microRNA와 접촉시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 보다 성숙한 줄기세포-유래 심근세포가 생성될 수 있다는 발견에 관한 것이다. 구조적 및 기능적 표현형을 가진 줄기세포-유래 심근세포는 표준 방법보다 성인 심근세포의 특징을 더 많이 가지고 있다. 또한, 본 명세서에서는 표준 방법보다 개선된 근원섬유마디 발달, 전기 생리학, 수축 기능, 미토콘드리아 용량 및 보다 성숙한 전사체를 가진 hPSC-유래 심근세포(hPSC-CMs)를 생성하기 위해 발달하고 있는 조작된 심장 니치 플랫폼을 확립하는 방법 및 조성물이 기술된다.
- [0067] 플랫폼의 능력은 본 명세서에서는 이를 조작된 디스트로핀 유전자 돌연변이를 가진 세포에 적용함으로써 입증된다. 이러한 발달하고 있는 심장 니치가 디스트로핀 돌연변이체 hPSC-CMs에 적용된 경우, 나노패턴화 기재, 갑상선 호르몬(T3) 또는 Let7i microRNA와 접촉하지 않은 미성숙된 질환이 있는 hPSC-CMs에서 이전에는 관찰되지 않았던 강건한 질환 표현형이 나타난다. 성숙된 디스트로핀 돌연변이체 hPSC-CMs는, 심박동수 변동성을 통해 측정하였을 때 부정맥에 대해 더 큰 성향을 나타내었으며, 추가의 실험에서는 그 효과가 더 안정한 사이토졸성 칼슘 함량에 기인하는 것으로 나타났다. 발달하고 있는 심장 니치 플랫폼 내에서의 hPSC-CM 기능을 스크리닝하기 위해 주문형 나노패턴화된 마이크로 전극 어레이 플랫폼을 사용하는 추가적인 능력이 본 명세서에서 본 명세서에서 입증되며, 여기서, 예를 들면, 칼슘 채널 차단제인 니트렌디핀은 부정맥유발성 거동을 경감시켰으며, 분석 결과 실험 결과를 가양성(false positive)으로서 정확하게 동정하였다.
- [0068] 이를 종합하여 보면, 본 명세서에서 기술되는 방법은, 다른 많은 것들 중에서도 강건한 hPSC-CM 성숙을 가능하게 하여 질환 모델링, 심독성 평가, 및 예측 약물 스크리닝을 보다 정밀하게 할 수 있는 발달하고 있는 심장 니치 플랫폼을 제공한다.
- [0069] 정의
- [0070] 편의상, 명세서, 실시예 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 특정의 용어들을 여기에 수록한다. 달리 언급되거나 문맥상 암시하지 않는 한, 다음의 용어 및 문구는 아래에 제공된 의미를 포함한다. 달리 명시적으로 언급되거나 문맥상 명백하지 않은 한, 아래의 용어 및 문구는 이를 용어 또는 문구가 관련 기술 분야에서 습득한 의미를 배제하지 않는다. 정의는 특정 실시형태를 설명하는데 도움을 주기 위해 제공되는 것으로, 특허청구된 발명을 제한하려는 것이 아니며, 이는 본 발명의 범위가 단지 특허청구범위에 의해서만 제한되기 때문이다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다.
- [0071] 본 명세서에서 사용되는 "접촉(contacting)"이란 용어는, 세포와 관련하여 사용되었을 경우, 세포가 작용제, 표면, 호르몬 등과의 물리적 접촉을 허용하는 방식으로 작용제, 표면, 호르몬 등을 세포에 도입하고, miRNA, 폴리펩티드, 또는 다른 발현 생성물과 같은 작용제를 발현할 수 있는 요소, 예를 들면 유전자 구성체 또는 벡터를 세포 내에 도입하는 것을 모두 포함한다. 작용제를 발현하도록 유전자 변형된 세포는 작용제를 발현하는 세포의 자손과 마찬가지로 작용제와 "접촉"된다는 것으로 이해되어야 한다.
- [0072] 본 명세서에서 사용되는 "줄기세포-유래 심근세포(stem cell-derived cardiomyocyte)"라는 용어는 배양시에, 즉 시험관 내에서 줄기세포로부터 분화되는 심근세포이다. 따라서, 생체내 심근세포는 궁극적으로는, 즉, 조직 또는 유기체의 발달 도중에 줄기세포로부터 유래되는 반면, 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 줄기세포-유래 심근세포는 시험관내 분화에 의해 생성된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 줄기세포, 예를 들면, 유도 만능 줄기(iPS) 세포 또는 배아 줄기세포("ES 세포" 또는 "ESC")로부터 시험관 내에서 분화된 세포는, 그것이 최소한 자발적인 박동 또는 수축, 및 심장 트로포닌 T(cTnT)의 발현을 갖는 경우에 "줄기세포-유래 심근세포"이다. 줄기세포를 시험관 내에서 심근세포로 분화시키는 방법은 당 업계에 공지되어 있으며 본 명세서의 다른 곳에 기술되어 있다.
- [0073] 본 명세서에서 사용되는 "줄기세포(stem cell)" 또는 "미분화 세포(undifferentiated cell)"라는 용어는 자가-재생(self-renewal) 특성을 가지며, 발달 가능성(즉, 전능성, 만성, 다능성 등)과 관련한 특정의 암시없이 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있는 발달 가능성을 갖는 미분화되거나 또는 부분적으로 분화된 상태의 세포를 지칭한다. 줄기세포는 발달 가능성을 유지하면서 이러한 줄기세포를 더 많이 증식하고 순치할 수 있다. 이론적으로, 자가-재생은 두 가지 주요 메커니즘 중의 어느 하나에 의해 발생할 수 있다. 줄기세포는 어미 줄기세포(parent stem cell)의 발달 가능성을 유지하는 하나의 딸 세포 및 어미 세포로부터 일부 구별되는 다른 특정 기능, 표현형 및/또는 발달 가능성을 발현하는 다른 하나의 딸 세포로 비대칭적으로 분열(이는 필연적 비대칭 분화(obligatory asymmetric differentiation)로 알려져 있음)할 수 있다. 딸 세포 자체는 차후에 하나 이상의 성숙한 세포 유형으로 분화하는 동시에 또한 어미의 발달 가능성을 가진 하나 이상의 세포를 잠재적으로 보유하

는 자손을 증식 및 생산하도록 유도될 수 있다. 분화된 세포는 그 자체가 다능성 세포 등으로부터 유래되는 다능성 세포로부터 유래될 수 있다. 이러한 다능성 세포 각각이 줄기세포로 간주될 수 있지만, 각각의 이러한 줄기세포가 야기할 수 있는 세포 유형의 범위, 즉 이들의 발달 가능성은 상당히 다양할 수 있다. 대안적으로, 하나의 집단의 줄기세포의 일부는 확률론적 분화로 알려진 2개의 줄기세포로 대칭적으로 분할될 수 있어서 집단 내의 일부 줄기세포를 전체로서 유지할 수 있는 반면, 집단 내의 다른 세포들은 단지 분화된 자손만을 야기할 수 있다. 따라서, "줄기세포"라는 용어는, 특정 상황 하에서 보다 전문화되거나 또는 분화된 표현형으로 분화하는 발달 가능성을 가지고 있으며, 특정 상황 하에서 실질적으로 분화하지 않고 증식하는 능력을 보유하고 있는 세포의 임의의 부분 집합을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 줄기세포라는 용어는 일반적으로는, 그의 자손(자손세포)이, 종종 상이한 방향으로, 분화에 의해, 예를 들면 배아 세포 및 조직의 점진적 다각화에서 발생하는 바와 같이 완전히 개별적인 특성을 획득함으로써 전문화되는 자연 발생성 어미 세포를 지칭한다. 일부 분화된 세포는 또한 발달 가능성이 더 큰 세포를 생성하는 능력을 갖는다. 이러한 능력은 자연적이거나 또는 다양한 인자로 처리할 때 인위적으로 유도될 수 있다. 줄기세포로서 시작하는 세포는 분화된 표현형으로 진행될 수 있지만, 줄기세포 표현형을 "역전시키고" 재발현하도록 유도될 수 있으며, 이러한 용어는 당해 기술 분야의 통상의 전문가에 의해 종종 "탈분화(dedifferentiation)" 또는 "리프로그래밍(reprogramming)" 또는 "역분화(retrodifferentiation)"로 지칭되고 본 명세서에서 사용된다.

[0074] 예시적인 줄기세포는 배아 줄기세포, 성체 줄기세포, 만능 줄기세포, 신경 줄기세포, 간 줄기세포, 근육 줄기세포, 근육 전구체 줄기세포, 내피 전구 세포, 골수 줄기세포, 연골 발생 줄기세포, 림프 줄기세포, 간엽 줄기세포, 조혈 줄기세포, 중추 신경계 줄기세포, 말초 신경계 줄기세포 등을 포함한다. 줄기세포의 분리 및 배양 방법을 포함한 줄기세포에 대한 설명은 다른 많은 것들 중에서도 문헌[참조: Embryonic Stem Cells, Methods and Protocols, Turksen, ed., Humana Press, 2002; Weismann et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 17:387 403; Pittenger et al., Science, 284:143 47, 1999; Animal Cell Culture, Masters, ed., Oxford University Press, 2000; Jackson et al., PNAS 96(25):14482 86, 1999; Zuk et al., Tissue Engineering, 7:211 228, 2001 ("Zuk et al."); Atala et al., 특히 Chapters 33 41; 및 미국 특히 제 5,559,022 호, 제 5,672,346 호 및 제 5,827,735 호]에서 확인할 수 있다.

[0075] 세포 개체 발생의 맥락에서, "분화하다(differentiate)" 또는 "분화하는(differentiating)"이란 용어는 "분화세포(differentiated cell)"가 그의 전구체 세포보다 발달 경로 아래로 더 진행된 세포라는 것을 나타내는 상대적인 용어이다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 정의되는 용어인 줄기세포는 실제로는 경로 아래의 다른 유형의 전구체 세포(예를 들면, 심근세포 전구체와 같은 조직 특이적 전구체)로 더 분화될 수 있는 계통-제한 전구체 세포(lineage-restricted precursor cell)(예를 들면, 인간 심장 전구 세포 또는 중간-원시선(mid-primitive streak) 심장 발생 중배엽 전구 세포)로 분화되고, 이어서 특정 조직 유형에서 특징적인 역할을 하고 더 증식하는 능력을 유지할 수 있거나 또는 유지할 수 없는 말기-단계 분화 세포로 분화될 수 있다. 줄기세포에서 심근세포로의 시험관내 분화 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있고/있거나 본원에 기술되어 있다. 세포의 분화 상태는 일반적으로 하나 이상의 특징적인 유전자 또는 마커 발현 패턴, 대사 활동(들) 및 형태에 의해 결정된다.

[0076] 본 명세서에서 사용되는 "만능(pluripotent)"이란 용어는, 상이한 조건하에서, 3 가지의 모든 배아세포 층(내배엽, 중배엽 및 외배엽)의 특징적인 세포 유형으로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포를 지칭한다. 만능 세포는 주로, 예를 들면, 누드 마우스 및 기형종 형성 분석(teratoma formation assay)을 이용하여 3 가지의 모든 배엽 층으로 분화하는 그들의 능력을 특징으로 한다. 만능성에 대한 바람직한 시험은 3 가지의 배엽 층 각각의 세포로 분화하는 능력을 실증하는 것이지만, 만능성은 배아 줄기(ES) 세포 마커의 발현에 의해 입증된다.

[0077] 당 업계에 공지된 방법에 의해 제조된 줄기세포-유래 심근세포는 일반적으로는 성인 조직으로부터의 심근세포보다는 태아 심근세포와 더 유사한 표현형을 갖는다. 본원에 기술되는 바와 같이 나노패턴화 기재상에서 배양하고 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i microRNA로 처리함으로써, 줄기세포-유래 심근세포는 보다 성숙한 표현형, 즉, 비패턴화된 기재상에서 배양되고 갑상선 호르몬 T3 또는 Let7i microRNA로 처리하지 않은 동일한 세포보다는 출생 후 조직 또는 성체 조직 내의 심근세포와 더 유사한 표현형으로 유도될 수 있다. 태아 또는 심지어 성인 조직으로부터의 일차 심근세포의 배양은 본 명세서에서 기술되는 조건으로부터 도움을 받아, 다른 조건들에서 보다 더 성숙한 표현형을 나타내거나 심근세포 표현형을 더 오랫동안 유지할 수 있을 것으로 예상된다. 배양된 심근세포의 맥락에서 "보다 성숙한 표현형"이란 근원섬유마디 길이, Z-밴드 폭, 수축 속도, 전계 전위 지속 시간, 상행각 속도, 심근세포 직경, 심근세포 길이 및 미토콘드리아 능력 중의 하나 이상에서의 하나 이상의 표현형 특성이, 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i 처리없이 비패턴화된 표면상에서 배

양된 동일한 심근세포에 비해, 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i 처리한 나노페던화 기재상에서 배양된 줄기세포-유래 심근세포에서 (본 명세서에서 정의된 바와 같이) 능력이 증가된다는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 근원섬유마디 길이, Z-밴드 폭, 수축 속도, 전계 전위 지속 시간, 상행각 속도, 심근세포 직경, 심근세포 길이 및 미토콘드리아 능력 각각은 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i 처리없이 비페던화된 표면상에서 배양된 동일한 심근세포에 비해 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i 처리한 나노페던화 기재상에서 배양된 줄기세포-유래 심근세포에서 증가된다. 일부 실시형태에서, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i miRNA 없이 나노페던화 기재상에서 배양된 줄기세포-유래 심근세포에 비해, 또는 대안적으로는 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i miRNA 둘 다가 아닌 어느 하나와 함께 나노페던화된 표면상에서 배양된 줄기세포-유래 심근세포에 비해 근원섬유마디 길이, Z-밴드 폭, 수축 속도, 전계 전위 지속 시간, 상행각 속도, 심근세포 직경, 심근세포 길이 및 미토콘드리아 능력 중의 하나 이상에서 증가가 발생한다.

[0078] "보다 성숙한 표현형"의 증거는 또한, 예를 들면, Let7i miRNA 또는 갑상선 호르몬 T3 없이 편평 표면상에서 배양된 줄기세포-유래 심근세포에서의 발현에 비해 1.5배 이상, 또는 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i miRNA 둘 다가 아닌 어느 하나와 함께 나노페던화된 표면상에서 배양된 줄기세포-유래 심근세포에서의 발현에 비해 10% 이상 증가된, 모발 성장 관련 유전자 HR(라이신 테메틸라제 및 핵 수용체 코레프레서(corepressor)), 크루펠-유사 인자(Krupel-like factor) KLF9, 사이토크롬 c 옥시다제 서브유닛 6A2(COX6A2), 미오신 경쇄 2(MYL2) 및 MYOM3를 포함하는 하나 이상의 유전자의 상향 조절 또는 증가된 발현을 포함할 수도 있다.

[0079] 본 명세서에서 기술되는 "성숙 줄기세포-유래 심근세포" 또는 "성인 표현형을 가진 심근세포"는, 성인-발병 근육 질환을 가진 개체로부터 유래되었을 때 또는 성인-발병 표현형을 가진 근육 질환에 대한 질환 모델을 제공하도록 변형된 줄기세포로부터 유래되었을 때, 성인-발병 근육 질환의 질환 표현형을 나타낸다. 예를 들면, 뒤시엔느 근육 디스트로피를 가진 개체 또는 디스트로핀 유전자를 돌연변이 시키도록 변형된 줄기세포로부터 유래된 줄기세포-유래 심근세포는, 본 명세서에서 기술되는 성숙 촉진 조건(즉, 나노페던화 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i miRNA를 사용)하에 배양되었을 때, 갑상선 호르몬 T3 또는 Let7i miRNA 없이 편평 표면상에서 동일한 세포를 배양할 때 보이지 않았던 심박동수 변화에 의해 명백해지는 부정맥을 나타낸다.

[0080] 본 명세서에서 사용되는 "리프로그래밍(reprogramming)"이란 용어는 분화된 세포(예를 들면, 체세포)의 분화 상태를 변경 또는 역전시키는 과정을 지칭한다. 달리 말하면, 리프로그래밍은 세포의 분화를 더 미분화된 유형 또는 더 원시적인 유형의 세포로 반대 방향으로 구동하는 과정을 지칭한다. 리프로그래밍되는 세포는 리프로그래밍 전에 부분적으로 또는 완전하게 분화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 리프로그래밍은 분화된 세포(예를 들면, 체세포)의 분화 상태에서 만능 상태로의 완전한 회귀를 포함한다. 일부 실시형태에서, 리프로그래밍은 또한 분화된 세포(예를 들면, 체세포)의 분화 상태에서 다능성 상태로의 부분적 회귀를 포함한다. 일부 실시형태에서, 리프로그래밍은 분화된 세포(예를 들면, 체세포)의 분화 상태에서 미분화 세포로의 완전한 또는 부분적 회귀를 포함한다. 리프로그래밍은 또한 추가로 조작될 때 체세포의 분화 상태에서 세포를 만능 상태로 완전히 리프로그래밍하기에 더 쉬운 상태로의 부분적인 회귀를 포함한다.

[0081] 리프로그래밍은 접합체가 성인으로 발달함에 따라 세포 분화 중에 발생하는 핵산 변형(예를 들면, 메틸화), 크로마틴 농축, 후성적 변화, 게놈 각인 등의 유전적 패턴 중의 적어도 일부의 변형, 예를 들면, 역전을 포함한다.

[0082] 본 명세서에서 사용되는 "hPSC 세포" 및 "인간 만능 줄기세포"라는 용어는 상호 교환적으로 사용되며, 분화된 체세포로부터 인위적으로 유래되는 만능 세포를 지칭한다. hPSC 세포는 다양한 유형의 성숙 세포뿐만 아니라 심장 계통의 세포를 포함하여 세포 사멸-수입 줄기세포로의 자가-재생 및 분화가 가능하다.

[0083] 줄기세포와 관련하여 사용되는 "~로부터 유래된(derived from)"이란 용어는 분화된 세포를 줄기세포 표현형으로 리프로그래밍함으로써 줄기세포가 생성되었다는 것을 의미한다. 분화된 세포와 관련하여 사용되는 "~로부터 유래된"이란 용어는 세포가 줄기세포의 분화, 예를 들면, 시험관내 분화의 결과라는 것을 의미한다.

[0084] 본 명세서에서 사용되는 "기재(substrate)"란 용어는 넓은 의미에서 세포가 배양될 수 있는 생체 적합성 매트릭스, 스캐폴드 등을 포함하는 조성물을 지칭한다. 단층 또는 3차원 배양(현탁 배양과 반대되는 유착 배양)에서 성장할 수 있는 세포는 일반적으로는 기재에 유착될 것이다. 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 나노페던화 기재는 생체 내에서 심근세포와 유사한 형태적 및 기능적 특성을 가정하도록 심근세포를 촉진시키는 구조적 단서를 제공한다. 특정 실시형태에서, 기재는 합성 또는 반합성 물질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 기재는 중합체 스캐폴드와 같은 골격 또는 지지체를 포함한다.

[0085]

본 명세서에서 사용되는 "나노패턴화기재(nanopatterned substrate)"이란 용어는 1000 나노미터 미만의 폭 및 높이를 갖는 럿지 및 그루브의 평행한 어레이를 가진 패턴화 표면을 지칭한다. 깊이 또는 폭이 약 50 내지 100 나노미터 미만인 패턴화는 더 큰 나노 치수를 가진 패턴화보다도 보다 성숙한 심근세포 표현형을 촉진시킬 가능성이 더 적다. 따라서, 그루브의 깊이/높이는 100 나노미터 이상, 또는 150 나노미터 이상, 또는 200 나노미터 이상, 또는 250 나노미터 이상, 또는 300 나노미터 이상, 또는 350 나노미터 이상, 또는 400 나노미터 이상, 또는 450 나노미터 이상, 또는 500 나노미터 이상, 또는 550 나노미터 이상, 또는 600 나노미터 이상, 또는 650 나노미터 이상, 또는 700 나노미터 이상, 또는 750 나노미터 이상, 또는 800 나노미터 이상, 또는 850 나노미터 이상, 또는 900 나노미터 이상, 또는 950 나노미터 이상일 수 있지만, 1000 나노미터를 초과하지 않는다. 나노 패턴화된 기재 상의 나노 패턴의 그루브 또는 그루브들 사이의 럿지의 폭은 100 나노미터 이상, 또는 150 나노미터 이상, 또는 200 나노미터 이상, 또는 250 나노미터 이상, 또는 300 나노미터 이상, 또는 350 나노미터 이상, 또는 400 나노미터 이상, 또는 450 나노미터 이상, 또는 500 나노미터 이상, 또는 550 나노미터 이상, 또는 600 나노미터 이상, 또는 650 나노미터 이상, 또는 700 나노미터 이상, 또는 750 나노미터 이상, 또는 800 나노미터 이상, 또는 850 나노미터 이상, 또는 900 나노미터 이상, 또는 950 나노미터 이상일 수 있지만, 1000 나노미터를 초과하지 않는다. 하나의 실시형태에서, 그루브의 깊이, 그루브의 폭, 및 그루브들 사이의 럿지의 폭은 모두 동일한 치수, 예를 들면, 100 나노미터 이상, 150 나노미터 이상, 200 나노미터 이상, 250 나노미터 이상, 300 나노미터 이상, 350 나노미터 이상, 400 나노미터 이상, 450 나노미터 이상, 500 나노미터 이상, 550 나노미터 이상, 600 나노미터 이상, 650 나노미터 이상, 700 나노미터 이상, 750 나노미터 이상 800 나노미터 이상, 850 나노미터 이상, 900 나노미터 이상, 또는 950 나노미터 이상일 수 있지만, 1000 나노미터를 초과하지 않는다. 다른 실시형태에서, 그루브의 깊이, 그루브의 폭 및 그루브들 사이의 럿지의 폭은, 예를 들면, 100 나노미터의 그루브 깊이; 100, 150, 200, 250, 300, 350 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 또는 950 나노미터의 그루브 폭; 및 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 또는 950 나노미터의 럿지 폭을 포함한다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 200 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 300 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 400 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 500 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 600 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 700 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 800 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 900 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다.

400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 900 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 본 명세서에서 예로서 제공되는 치수는 50 또는 100 nm의 짹수 배수이지만, 50 또는 100 nm의 짹수 배수가 아닌 다른 치수도 또한 이러한 나노패턴을 가진 기재 상에서 배양되는 줄기세포-유래 심근세포의 표현형에 대한 이점을 제공할 수 있는 것으로 고려된다.

- [0086] 나노패턴 치수에 있어서의 유의미한 차이는 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 배양된 심근세포 표현형의 차이를 초래하는 것임을 이해해야 한다.
- [0087] 나노패턴화 기재는 중합체, 하이드로겔, 폴리디메틸실록산, 플라스틱, 유리, 수지, 매트릭스, 또는 나노패턴을 제조할 수 있고 자연적으로 또는 표면 처리 또는 코팅한 다음 줄기세포-유래 심근세포를 유착시킬 수 있는 것으로 당 업계에 공지된 임의의 다른 물질로 구성될 수 있다. 심근세포 상호 작용을 촉진시키기를 원하는 경우, 나노패턴화 기재는 파이브로네틴, 콜라겐, 라미닌, 또는 당 업계에 공지된 다른 세포외 매트릭스 물질과 같은 세포외 매트릭스 단백질로 코팅될 수 있다.
- [0088] 본 명세서에서 사용되는 "작용제(agent)"라는 용어는 소분자, 핵산, 폴리펩티드, 펩티드, 약물, 이온 등을 비롯한 임의의 화합물 또는 물질을 의미하지만, 이에 국한되지는 않는다. "작용제"는 합성 및 자연 발생 단백성 및 비단백성 물질을 포함한 임의의 화학 물질 또는 잔기일 수 있지만, 이에 국한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 작용제는 단백질, 올리고뉴클레오티드, 리보자임, DNA자임, 당단백, siRNA, 리포 단백질, 및 이들의 변형물 및 조합을 포함한 핵산, 핵산 유사체, 단백질, 항체, 펩티드, 앱타머, 뉴클레오티드의 올리고머, 아미노산 또는 탄수화물이지만, 이에 국한되지는 않는다. 특정 실시형태에서, 작용제는 비치환 또는 치환된 알킬, 방향족 또는 매크로라이드, 텝토마이신 및 관련 천연 생성물 또는 그의 유사체를 포함하는 헤테로사이클린 잔기를 포함한 화학적 잔기를 포함하거나 이로 이루어진 소분자이다. 작용제는 목적하는 활성 및/또는 특성을 갖는 것으로 알려진 것일 수 있거나, 또는 다양한 화합물의 라이브러리로부터 선택될 수 있다.
- [0089] 본 명세서에서 사용되는 "소분자"라는 용어는 몰당 약 5,000 그램 미만의 분자량을 갖는 유기 또는 무기 화합물(이중 유기 화합물 및 유기 금속 화합물을 포함함), 몰당 약 1,000 그램 미만의 분자량을 갖는 유기 또는 무기 화합물, 몰당 약 500 그램 미만의 분자량을 갖는 유기 또는 무기 화합물, 및 이러한 화합물의 염, 에스테르 및 다른 약학적으로 허용되는 형태를 포함할 수 있는 화학 작용제를 지칭한다.
- [0090] "심독성(cardiotoxicity)"이란 용어는, 이에 국한되는 것은 아니지만, 수축, 생체 전위 또는 전기 생리학적 특성 또는 그의 리듬(rhythm), 또는 적절한 심장 기능에 필요한 유전자 발현을 포함한 심근세포 생존력, 구조 또는 기능 중의 하나 이상을 억제하는 약물 또는 작용제의 특성을 지칭한다.
- [0091] 본 명세서에서 사용되는 "핵산", "폴리뉴클레오티드", 및 "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 일반적으로는 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리-데옥시리보뉴클레오티드를 지칭하며, 변형되지 않은 RNA, 변형되지 않은 DNA, 변형된 RNA, 및 변형된 DNA를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 및 이중 가닥 DNA 및 RNA 폴리뉴클레오티드를 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다. 본 명세서에서 사용되는 폴리뉴클레오티드라는 용어는 화학적, 효소적 또는 대사적으로 변형된 형태의 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 바이러스 및, 예를 들면, 단순(원핵) 세포 및 복합(진핵) 세포를 포함한 세포 내에서 발견되거나 또는 이들의 특징을 가진 DNA 및 RNA의 자연 발생 화합물 형태를 포함한다. 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 핵산, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 그의 동족 상보적 가닥에 하이브리드화하는 능력을 보유한다.
- [0092] 따라서, "핵산", "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 또한 프라이머 및 프로브뿐만 아니라 올리고뉴클레오티드 단편을 포함하며, 폴리데옥시리보뉴클레오티드(2-데옥시-D-리보스 함유), 폴리리보뉴클레오티드(D-리보스 함유), 및 퓨린 또는 피리미딘 염기, 또는 변형된 퓨린 또는 피리미딘 염기(무염기성 부위를 포함하거나 이에 제한되지 않음)의 N-글리코시드인 임의의 다른 유형의 폴리뉴클레오티드에 일반적이다. 용어 "핵산", "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드" 사이의 길이에 있어서의 의도된 구별은 없으며, 이를 용어는 상호교환적으로 사용된다. 이들 용어는 분자의 기본 구조만을 지칭한다. 올리고뉴클레오티드는 반드시 임의의 기존 또는 자연 서열로부터 물리적으로 유래될 필요는 없지만, 화학적 합성, DNA 복제, DNA 증폭, 시험관내 전사, 역전사 또는 이들의 임의의 조합을 포함한 임의의 방식으로 생성될 수 있다.

[0093]

본 명세서에서 기술되는 바와 같이, "유전자 변형 세포"는 이종 유전 물질 또는 구성물을 운반하거나, 또는, 예를 들면, 부위 지향적 돌연변이를 포함하지만 이에 국한되지 않는 돌연변이에 의해 조작된 계놈을 포함하는 세포이다. 이종 유전 물질을 도입하면 일반적으로는 변형되지 않은 세포에 비해 유전자 또는 단백질 발현에서 변화를 초래한다. RNA를 도입하면 세포 내에서 통합되거나 복제되지 않는 벡터의 도입과 마찬가지로 외래 또는 이종 생성물의 발현을 일시적으로 촉진할 수 있다. 세포의 계놈에 통합되거나 세포의 핵산과 복제되는 구성물을 도입하면 연속적인 세포 분열을 통해 보다 안정화될 것이다. 하나의 실시형태에서, 유전자 변형은 체세포를 iPS 세포 표현형과 같은 줄기세포 표현형으로 리프로그래밍하는 구성물 또는 구성물들의 도입에 추가되거나 그로부터 분리된다. 다른 실시형태에서, 유전자 변형은 Let7i miRNA 또는 이를 인코딩하는 구성물의 도입에 추가되거나 그로부터 분리된다. 유전자 변형은 바이러스 벡터를 통한 유전자 물질의 도입 또는 부위 특이적 재조합을 위한 CRISPR/Cas 또는 유사 시스템을 이용한 변형을 포함할 수 있지만, 이에 국한되지는 않는다.

[0094]

본 명세서에서 사용되는 "기능 분석(functional assay)"이란 용어는 세포 활성을 측정함으로써, 다른 많은 것들 중에서도, 세포의 유전자 발현, 대사, 발달 상태 또는 성숙도와 같은 세포의 특성을 평가하는 시험을 지칭한다. 기능 분석은, 예를 들면, 세포 생존율 측정(예를 들면, 색소배제검사, 영양소 흡수 및/또는 전환, 대사 산물 생성 등에 의한 측정), 전위 또는 다른 전기 생리학적 특성 측정, 수축 강도, 속도 또는 리듬 측정, 미토콘드리아 기능 측정 등을 포함한다.

[0095]

본 명세서에서 사용되는 "질환 모델(disease model)"이란 용어는 인간 질환의 하나 이상의 양태를 재현하는 동물 또는 세포 배양 시스템을 지칭한다. 질환의 동물 모델, 예를 들면, 마우스 또는 래트 모델은 종종 질환 관련 유전자에 대한 하나 이상의 돌연변이 또는 하나 이상의 질환 관련 생성물을 발현하는 이종 구성물의 도입으로 인해 인간 질환과 상당히 유사할 것이다. 인간 질환의 세포 배양 모델은 질환이 있는 인간 개체로부터의 세포, 또는 하나 이상의 질환 관련 유전자의 발현을 발현 또는 방해하도록 변형된 인간 세포 또는 다른 세포를 포함할 수 있다. 그러나, 일례로서, 뒤시엔느 근육 디스트로피가 있는 인간 또는 디스트로핀 유전자가 비활성화된 세포로부터 유래된 hPSC는, 심근세포로 분화되고 성숙을 촉진하기 위해 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 처리되었을 때, 뚜렷한 부정맥에 의해 표지되는 DMD 심근병증의 세포 배양 모델을 제공할 수 있다.

[0096]

본 명세서에서 사용되는 "마커(marker)"는 소정 세포의 표현형에 기여하거나 그와 연관된 하나 이상의 특성을 지칭한다. 마커는 관심있는 특성을 포함하는 세포를 선택하는데 사용될 수 있다. 마커는 특이 세포에 따라 달라질 수 있고, 특히 세포 또는 조직 유형에 특이적이거나 또는 질병 상태 또는 표현형에 특이적인, 형태학적, 기능적 또는 생화학적인 특징일 수 있으며, 세포외 분자 및 세포내 분자, 예를 들면, 세포 또는 조직에 의해 발현되거나 나타난 단백질, RNA, 글리코실화 패턴 등을 모두 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 마커는 당해 분야에서 이용 가능한 항체 또는 다른 결합 분자에 대한 에피토프를 가진 단백질을 포함한 단백질을 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다. 다른 마커로는, 다른 많은 것들 중에서도, 웨타이드, 지질, 다당류, 핵산 및 스테로이드를 포함할 수 있다. 형태학적 특성 또는 형질의 예로는 형상, 크기 및 핵 대 세포질 비를 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다. 기능적 특성 또는 형질의 예로는 특정 기재에 부착하는 능력, 특정 엔도를 포함 또는 배제하는 능력, 특정 조건하에서 이행하는 능력, 특정 계통, 수축, 박동 등을 구별하는 능력 등을 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다. 마커는 당업자에게 이용 가능한 임의의 적절한 방법에 의해 검출될 수 있다.

[0097]

본 명세서에서 사용되는 "전기 생리학(electrophysiology)" 또는 "생체 전위(biopotential)"라는 용어는 세포의 전기적 특성을 지칭한다. 구체적으로, 이를 용어는 세포를 통한 이온 전류의 흐름 및, 예를 들면, 세포-세포 접촉에 의해 전송되는 전기 단서에 대한 이온 채널 거동의 특성을 설명한다. 생체 전위 또는 전기 생리학적 특성은 전 세포 폐치 클램프 전기 생리학적 기록(whole cell patch clamp electrophysiological recording)(자동 또는 수동), 마이크로 전극 어레이, 칼슘 이미징, 광학 매핑, 또는 엑스셀리전스™(xCelligence™) 실시간 세포 분석(아체아 바이오사이언시즈, 인코포레이티드(Acea Biosciences, Inc), 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재)을 포함한 많은 기술에 의해 측정될 수 있지만, 이에 국한되지는 않는다.

[0098]

"전기 기계적 자극"은 세포 또는 세포의 접단과 접촉하는 기재에 의해 생성된 전위에서의 임의의 변화이고/이거나 세포에 대한 기계적 운동 또는 자극을 추가로 생성한다. 전기적 및 기계적 자극은 계측용 기재(Instrumented substrate)에 의해 동시에(동일 위상에서) 또는 다른 시간에(다른 위상에서) 생성될 수 있다. 기계적 자극의 비제한적인 예는 신장, 강성 변화, 위상 변화제, 압력, 진동, 또는 당 업계에 공지된 임의의 다른 유형의 기계적 자극을 포함한다.

[0099]

본 명세서에서 사용되는 "계측용(Instrumented)"이란 용어는, 기재와 관련하여 사용되었을 때, 측정, 시험, 제어, 또는 자극과 같은 특정 기능을 수행하도록 개조되거나 설계된 기재 또는 장치를 지칭한다. 계측용 기재의

예는 나노패턴화된 마이크로 전극 어레이이다.

[0100] "마이크로 전극 어레이(microelectrode array)", "다중 전극 어레이(multielectrode array)" 또는 "MEA"는, 전극 어레이와 접촉하는 세포의 생체 전위를 측정하고/하거나 상기 어레이와 접촉하는 세포에 전기적 자극을 제공할 수 있는 마이크로-크기 또는 나노-크기의 와이어 전극의 어레이를 가진 장치이다. MEA의 전극은 전형적으로는 인듐 주석 산화물, 티타늄 또는 금으로 구성되지만, 다른 유형의 전도성 재료 또는 전도성 재료 및 비전도성 재료를 포함하는 조성물로 구성될 수 있다. MEA는, 예를 들면, 조직 또는 조작된 조직(예를 들면, 나노패턴화 기재과 접촉하는 줄기세포-유래 심근세포)의 전계 전위를 결정하거나 조작하기 위한 시험관내 연구에 사용된다.

[0101] 본 명세서에서 사용되는 "감소하다(decrease)", "감소된(reduced)", "감소(reduction)", "감소하다(decrease)" 또는 "억제하다(inhibit)"라는 용어는 일반적으로는 통계적으로 유의미한 양만큼 감소하는 것을 지칭한다. 그러나, 의심의 여지를 피하기 위해, "감소된", "감소" 또는 "감소하다" 또는 "억제하다"는 기준과 비교하였을 때 적어도 10%의 감소, 예를 들면 기준과 비교하였을 때 적어도 약 20%, 또는 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%(예를 들면, 기준 샘플과 비교하였을 때 하나도 없는 수준) 이하의 감소, 또는 기준과 비교하였을 때 10%와 100% 사이의 임의의 감소를 의미한다.

[0102] 본 명세서에서 사용되는 "증가된(increased)", "증가하다(increase)", 또는 "향상시키다(enhance)", 또는 "활성화하다(activate)"라는 용어는 일반적으로는 정적으로 유의미한 양의 증가를 지칭한다. 그러나, 의심의 여지를 피하기 위해, "증가된", "증가하다", 또는 "향상시키다", 또는 "활성화하다"라는 용어는 기준과 비교하였을 때 적어도 10%의 증가, 예를 들면 기준과 비교하였을 때 적어도 약 20%, 또는 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%와 100% 사이의 임의의 증가, 또는 기준에 대해 적어도 약 2배, 또는 적어도 약 3배, 또는 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배 또는 적어도 약 10배의 증가를 의미한다.

[0103] 본 명세서에서 사용되는 "조절하다(modulates)"라는 용어는 본원에 정의되는 바와 같이 소정의 파라미터를 증가 또는 감소시키는 것을 포함하는 효과를 지칭한다.

[0104] 본 명세서에서 사용되는 "기능적 특성(functional property)"이란 용어는, 심근세포 또는 심근세포의 배양에 적용되었을 때, 심근세포 기능 또는 성숙한 심근세포 기능의 척도로서 본 명세서에서 기술되는 임의의 파라미터를 지칭한다. "기능적 특성의 변화"는 기능적 특성에서의 통계적으로 유의미한 증가 또는 감소로 표시된다.

[0105] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "근육 질환 또는 장애"는 질환 또는 장애의 주요 효과로서 또는 근육 기능에 영향을 미치는 다른 시스템에 대한 질환 또는 장애의 효과의 결과로서 정상적인 근육 기능에 악영향을 미치는 것이다. 심장 질환 또는 장애는 심장 근육의 고유 기능에 필연적으로 영향을 미치며, 심장 부정맥, 심근병증(예를 들면, 비대 및 확장), QT 연장 증후군, 부정맥유발성 우심실 형성이상(ARVD), 카테콜아민성 다형성 심실성 빈맥(CPVT) 또는 바르트 증후군을 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다. 뒤시엔느 근육 디스트로피는 말기의 심장 근육 기능에 영향을 미친다.

[0106] "통계적으로 유의미한(statistically significant)" 또는 "유의미하게"라는 용어는 통계적 유의성을 나타내며, 일반적으로는 기준에 대한 두 가지 표준 편차(2SD)의 변화를 의미한다. 이러한 용어는 차이가 있다는 통계적 증거를 지칭한다. 이는 귀무가설(null hypothesis)이 실제로 참일 때 귀무가설을 기각할 결정을 내릴 확률로서 정의된다.

[0107] 본 명세서에서 사용되는 "수축성(contractility)"이란 용어는 심근세포를 포함하는 근육 세포의 거동을 말하며, 이에 의해 이들은 단독으로, 또는 대개는 그룹으로 수축한다. 수축성은 수축 또는 이완 속도 및, 예를 들면, 수축력으로 측정될 수 있다. 복수의 세포의 수축성은 힘 전달의 생체 물리학적 및 생체 역학적 특성에 의해 측정된다. 수축성은 심장 세포의 단층 또는 다층 위상차 현미경 및 전산 해석을 이용하여 측정하고, 이를 힘 변환기를 이용하여 직접적 힘 측정으로 검정한다.

[0108] "조직(tissue)"이라는 용어는 특정의 특수 기능을 함께 수행하는 유사하게 분화된 세포의 그룹 또는 층을 지칭한다. "조직-특이적(tissue-specific)"이라는 용어는 특이 조직으로부터의 세포의 공급원 또는 결정적인 특징을 지칭한다.

[0109] 본 명세서에서 사용되는 어구 "심혈관 상태, 질환 또는 장애"는 불충분하거나, 바람직하지 않거나 비정상적인 심장 근육 기능, 예를 들면, 부정맥, 허혈성 심장 질환, 고혈압성 심장 질환 및 폐 고혈압성 심장 질환, 선천성 심장 질환, 및 개체, 특히 인간 개체에서 심장 근조직의 기능 장애를 유발하는 임의의 상태를 특징으로 하는 모

든 장애를 포함하는 것으로 의도된다. 불충분하거나 비정상적인 심장 근육 기능은 질환, 부상 및/또는 노화의 결과일 수 있다.

[0110] 단수 "a" 및 "an" 은 본 명세서에서는 물품의 문법적 대상 중의 하나 또는 하나 이상(예를 들면, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들면, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0111] 작동 예를 제외하거나 또는 달리 지시된 경우, 본 명세서에서 사용되는 치수, 성분의 양 또는 반응 조건을 나타내는 모든 숫자는 모든 경우에 "약"이라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. "약"이라는 용어는 백분율과 관련하여 사용될 때 ± 1%를 의미할 수 있다. 나노페턴 치수와 관련하여 사용되는 경우, "약"이라는 용어는 소정 패턴에 대해 달성 가능한 해상도 내에서의 변화를 지칭한다. 예를 들면, 패턴 생성을 위해 달성될 수 있는 해상도가 ± 50 nm 이내에 있는 경우, 600 나노미터의 치수는 550 나노미터 내지 650 나노미터를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 나노 패턴을 생성하는 상이한 방법이 상이한 해상도를 가질 것임을 이해하고, 소정 방법에 대한 해상도가 무엇인지를 이해할 것이다.

[0112] 본 명세서에서 사용되는 "포함하는(comprising)"이란 용어는 제시되는 정의된 요소 외에도 다른 요소가 존재할 수 있다는 것을 의미한다. "포함하는"은 제한이 아니라 포함을 나타내는 것으로 사용된다. 다른 말로 표현하면, "포함하는"이라는 용어는 "주로 포함하지만, 반드시 필요한 것은 아니다"를 의미한다. 또한, "~을 포함하다(comprise)" 및 "~들을 포함하다(comprises)"와 같은 "포함하는"이라는 단어의 변형은 대응하는 동일한 의미를 갖는다. 하나의 양태에서, 본 명세서에서 기술되는 기술은 본 발명에 필수적인 본 명세서에서 기술된 조성물, 방법 및 그의 개개의 성분(들)에 관련된 것이지만, 아직도 필수적이거나 필수적이지 않은("포함하는") 지정되지 않은 요소들을 포함하는 것에 대해 개방된다.

[0113] "필수적으로 이루어진(consisting essentially of)"이라는 용어는 "주로 적어도 하나를 포함하지만, 반드시 적어도 하나만이 필요한 것은 아니다"라는 것을 의미하며, 따라서 "하나 이상, 및 임의의 조합의 선택"을 의미하는 것으로 의도된다. 다른 방식으로 말하면, 다른 요소들이 ("필수적으로 이루어진") 본 발명의 기본적인 및 신규 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것으로 국한되는 한, 다른 요소들이 조성물, 방법 또는 그의 개개의 성분의 설명에 포함될 수 있다. 이는 기술된 방법의 조성물 및 성분들뿐만 아니라 이러한 방법 내의 단계에도 동일하게 적용한다.

[0114] 본 발명, 조성물, 방법 및 이들의 개개의 성분과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 "~로 이루어진(consisting of)"이라는 용어는 성분, 조성 또는 방법에 필수적인 요소로 간주되지 않는 임의의 성분을 배제하도록 의도된다.

### 심장 근육 기능 및 근육 질환

[0116] 본 명세서에서 기술되는 방법 및 조성물을 사용하여 줄기세포로부터 유래될 수 있는 많은 유형의 인간 근육 세포가 존재한다.

[0117] 근육 세포는 다양한 세포, 조직 및 기관 수준의 기능을 수행하기 위해 근육의 수축을 촉진하는 액틴 및 미오신의 단백질 필라멘트를 함유하는 연조직 세포이다. 근육 세포는 팔다리 운동에 필요하지만, 또한 다른 것들 중에서도, 소화 시스템을 통한 음식물의 이동, 심장 박동, 혈압을 조절하는 혈관 수축 및 팽창, 출생 중의 자궁 수축, 정상 시력에 대한 홍채의 초점 조정, 및 기도의 수축도 포함한다.

[0118] 근육에 의해 생성되는 힘은 수축하는 동안 액틴 필라멘트를 가로지르는 미오신 단백질 헤드의 움직임에 의해 생성된다. 일련의 단서전달 사건은 근육 세포 내에서 발생하여 일반적으로는: 1) 인근 근육 세포(nearby muscle cell) 및/또는 뉴런의 전기 충격의 자극; 2) 세포의 근소포체(sarcoplasmic reticulum)에서 칼슘의 방출을 유발하는 세포내 칼슘 이온의 유입; 3) 칼모듈린의 칼슘 활성화; 4) ATP의 존재하에 키나제에 의한 미오신의 인산화(예를 들면, 미오신 경쇄 키나제, MLCK); 및 5) 미오신 헤드와 액틴 필라멘트 사이의 "교차 결합" 형성을 포함하는 수축을 생성한다. 이러한 단서전달 사건은 근육 수축이 정상적으로 일어나는데 중요하다.

[0119] 뒤판엔느/베커 근육 디스트로피 및 팔다리 이음 근육 디스트로피와 같은 근육 디스트로피는 소아 환자에게 가장 흔한 골격근 질환이며, 예를 들면, 디스트로핀 및 관련 분자를 포함한 유전자에서의 유전자 돌연변이에 의해 발생된다. 이러한 퇴행성 근육 장애의 주요 증상에는 진행성 근육 소모 및 근육 약화, 균형 불량, 빈번한 낙상, 보행 곤란, 동요성 보행, 종아리 통증, 제한된 운동 범위, 근육 수축, 처진 눈꺼풀(눈꺼풀 치집), 생식샘 위축, 척추 측만증(척추 만곡) 및 보행 불능을 포함한다. 종종 혈액 중에 존재하는 근육 단백질 크레아틴 키나아제의 양이 많은 근육 괴사가 있다.

- [0120] 뒤시엔느 근육 디스트로피(DMD)는 근육의 유전적(X-연관성) 진행성 퇴행으로 유전자 산물인 세포 골격 단백질 디스트로핀의 결핍으로 인해 발생되며 약 3,500명의 남아 출생자 중 대략 1명에게 영향을 미친다. 디스트로핀의 결핍은 이러한 근섬유 단백질을 인코딩하는 유전자의 돌연변이로 인해 발생된다. 디스트로핀은 디스트로핀 당단 백 복합체(DGC)라 지칭되는 막-결합 단백질의 대형 복합체와 연관이 있다. 디스트로핀 및 연관 DGC의 손실은 근육 형질막의 구조적 통합성을 손상시켜 근육 괴사 및 재생의 손상 사이클을 생성한다. 근육에 대한 지속적인 손상 후, 근육 세포는 궁극적으로는 비수축성 섬유질 또는 지방 조직으로 대체된다. DMD 환자의 골격근은 서서히 점진적으로 손상되어 질환 증상을 유발한다.
- [0121] 골격근, 횡격막 및 심장 근육이 영향을 받을 수 있다. DMD는 심각한 심혈관 기능 장애를 초래하는 골격근 장애의 일례이다. DMD 환자는 종종 심장 부정맥이나 돌연사로 사망한다. 이는 골격근 기능과 병행하여 심장 근육 기능이 점진적으로 약화되기 때문이다. 그러나, DMD 환자에게서 심장 근육의 약화는 질환의 후반부에 발생하며, 심장 발병은 일반적으로는 성년기에 이르러서야 시작된다.
- [0122] 심장 전기 생리학적 기능 및 수축 기능은 엄격하게 제어되는 과정이다. 심장 세포 또는 조직에서 이온 채널 조절 또는 수축 기능이 중단되는 경우, 이는 때로는 치명적일 수 있는 심장 부정맥을 유발시킬 수 있다. 심장 부정맥, 심근병증(예를 들면, 비태 및 확장), QT 연장 증후군, 부정맥유발성 우심실 형성이상(ARVD), 카테콜아민 성 다형성 심실성 빈맥(CPVT), 또는 바르트 증후군을 포함한 많은 질환들이 심장 근육에 영향을 미치지만, 이에 국한되지는 않는다.
- [0123] 줄기세포-유래 심근세포는 이러한 질환 및 질환 표현형을 모델링하는데 사용되어 왔다[참조 문헌: Itzhaki et al., *Nature*. 2011; Moretti et al., *NEJM*. 2010; Ma et al., *European Heart Journal*. 2012; Kim et al. *Nature*. 2013; Wang and McCain et al. *Nature Medicine*. 2014; Jung et al. *EMBO Molecular Medicine*. 2012]. 그러나, 기존의 모델에서 hPSC-CMs의 기능 성숙도는 일반적으로 결여되어 있으며, 정상 및 질환 hPSC-CMs에 걸쳐 잘 제어되지 않거나 일관성이 유지되지 않았다. hPSC-CMs의 성숙을 위한 품질 관리 표준 및 방법이 필요하다. 예를 들면, 질병 표현형이, 경우에 따라서는, 이러한 질환 및 장애를 효과적으로 치료하기 위한 치료제를 확인하기 위해 심장 질환 및 장애의 성인-발병을 나타내는 것을 보장하기 위해서는 신뢰할 만한 hPSC-CM 성숙 방법이 필요하다.
- [0124] 질환 모델링과는 별개로, 일반적으로는 심장 기능과 관련이 없는 질환 또는 장애의 치료를 위한 약물 또는 작용제의 심독성이 조사 약물의 실패의 일반적인 원인이다. 심근세포의 기존의 세포 배양이 보다 더 태아적이거나 또는 미성숙한 표현형을 갖는 경향이 있는 경우, 이들은 심장 조직에 대한 약물의 예상되는 생체내 효과를 정확하게 반영하지 못한다. 본 명세서에서 기술되는 방법 및 세포 배양 플랫폼은 또한 이러한 맥락에서 심독성 평가 시에 이점을 제공한다. 본 명세서에서 제공되는 방법 및 조성물은 DMD 심근병증과 같은 질환 표현형의 생성을 가능하게 하며, 표현형의 성인-발병을 갖는 다른 심장 질환 및 장애에 적용될 수 있다. 본 명세서에서 기술되는 방법 및 조성물은 본 명세서에서 기술되는 다수의 기능 분석에 기초하여 성인 표현형을 더 많이 가진 기능적으로 성숙한 hPSC-CMs를 생성한다.
- [0125] 본 명세서에서 기술되는 방법은, Let7i microRNA 대신에 세포-특이적 microRNA를 사용하여 다른 유형의 근육 세포(예를 들면 골격근)에 적용하여 줄기세포를 태아-유사 상태에서 성인형 근육 세포 또는 조직으로 성숙시킬 수 있는 것으로 고려된다. 운동에 중요한 근육 조직의 한 예는 골격근이다. 골격근은 체세포 신경계의 자발적인 통제하에 있는 가로무늬근 조직이다. 본 명세서에서 기술되는 방법은 줄기세포-유래 골격근 세포에 의한 DMD와 같은 근육 질환의 질환 모델링에 적용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0126] 또한, 본 명세서에서 기술되는 방법은 평활근에 적용될 수 있음이 추가로 고려된다. 평활근의 비제한적 예는 눈의 홍채, 폐의 세기관지, 후두근(성대), 위의 근육층, 식도, 위장관의 소장 및 대장, 요관, 방광 배뇨관, 자궁근막, 음경 또는 전립선에 있는 것을 포함한다. 본 명세서에서 기술되는 것과 유사한 줄기세포-유래 근육 세포 성숙 방법이 줄기세포-유래 평활근 세포의 성숙에 적용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0127] **줄기세포-유래 심근세포의 제조**
- [0128] 따라서, 하나의 실시형태에서, 본 명세서에서 기술되는 조성물 및 방법에서 사용하기 위한 심근세포는 심장 조직, 즉 일차 심근세포로부터 얻을 수 있다. 첫 번째 문제로서, 본 개시는 줄기세포로부터 시험관내 분화된 심근세포의 사용에 초점을 맞추고 있지만, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i miRNA를 가진 나노패턴화 기재상에서 배양함으로써 제공되는 심근세포 표현형을 유지 또는 촉진하기 위한 단서가 일차 세포에 유리할 수 있다.
- [0129] 또한, 개체, 환자 또는 기증자로부터 유래된 체세포로 시작하는 줄기세포-유래 심근세포의 생성 방법이 본 명세

서에서 기술된다. 체세포는 유도성 만능 줄기세포 (iPS 세포, iPSCs)로 리프로그래밍되고, 이후 심근세포로 분화된다. 따라서, 체세포를 iPS 세포로 리프로그래밍하는 방법이 본 명세서에서 기술되고, 또한 iPS 세포를 줄기세포-유래 심근세포(예를 들면, 인간 만능 줄기세포-유래 심근세포, hPSC-CMs)로 분화시키는 방법이 본 명세서에서 기술된다. 배아 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법은 당 업계에 공지되어 있으며, iPS 세포를 심근세포로 분화시키는 방법과 대체로 유사하다.

[0130] iPS 세포로 리프로그래밍하기 위한 체세포의 공급원:

줄기세포-유래 심근세포는 만능 줄기세포 표현형으로 유도된 공여체 세포로부터 생성된 다음, 심근세포 계통을 따라 분화된다. 제한없이, iPS 세포는 인간 이외의 임의의 동물로부터 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 기증자는 포유동물이다. 일반적으로, 동물은 영장류, 설치류, 가축 또는 게임 동물과 같은 척추 동물이다. 영장류로는 침팬지, 사이노몰로거스 원숭이, 거미 원숭이 및 마카크 원숭이, 예를 들면 붉은털 원숭이를 포함한다. 설치류로는 마우스, 래트, 우드척, 흰담비, 토끼 및 햄스터를 포함한다. 가축 및 게임 동물은 소, 말, 돼지, 사슴, 들소, 벼룩, 고양이과 동물, 예를 들면, 집고양이, 개과 동물, 예를 들면, 개, 여우, 늑대, 조류, 예를 들면, 닭, 애뮤, 타조 및 물고기, 예를 들면, 송어, 메기 및 연어를 포함한다. 세포 기증자, 환자 또는 개체는 소정 용도에 적절한 상기의 서브 세트 중의 임의의 것을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 기술되는 양태의 특정 실시형태에서, 개체는 포유동물, 예를 들면 영장류, 예를 들면 인간이다.

[0132] iPS 세포는 또한 기증자 줄기세포로부터 생성될 수도 있다. 예시적인 줄기세포는 성체 줄기세포, 신경 줄기세포, 간 줄기세포, 근육 줄기세포, 내피 전구세포, 골수 줄기세포, 연골 발생 줄기세포, 림프 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 조혈 줄기세포, 중추 신경계 줄기세포, 말초 신경계 줄기세포 등을 포함한다

[0133] 줄기세포의 분리 및 배양 방법을 포함한 줄기세포에 대한 설명은, 다른 많은 것들 중에서도, 문헌[참조: *Embryonic Stem Cells, Methods and Protocols*, Turksen, ed., *Humana Press*, 2002; Weisman et al., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:387 403; Pittenger et al., *Science*, 284:143 47, 1999; *Animal Cell Culture*, Masters, ed., *Oxford University Press*, 2000; Jackson et al., *PNAS* 96(25):14482 86, 1999; Zuk et al., *Tissue Engineering*, 7:211 228, 2001 ("Zuk et al."); Atala et al., 특히 Chapters 33-41; 및 미국 특허 제 5,559,022 호, 제 5,672,346 호 및 제 5,827,735 호]에서 확인할 수 있다.

[0134] 대개, iPS 세포는 성인 유기체의 섬유 아세포, 기질 세포, 근육 세포 또는 임의의 많은 수의 조직 중의 임의 조직의 세포를 포함한 유핵 체세포를 포함하는 분화된 기증자 세포로부터 생성될 것이다. 실제로, 본 명세서에서 기술되는 실시예는 소변으로부터 분리하여 iPS 세포로 리프로그래밍된 인간 세포를 사용한다[참조: 실시예 및 예를 들면, Zhou et al., *J. Urology*, 2012, Guan et al., *Stem Cell Research*, 2014]. 기증자 세포는, 다른 많은 방법들 중에서도, 피부 생검, 소변 샘플, 또는 혈액 채취에 의해 개체로부터 얻을 수 있다.

[0135] 일부 실시형태에서, iPS 세포는 심장 세포, 예를 들면, 심장 섬유아세포 또는 개체, 예를 들면, 인간 개체를 포함하는 포유동물 개체로부터 얻은 심실 심근세포로부터 리프로그래밍될 수 있다. 적합한 심장 조직 공급원으로부터의 세포의 혼합물은 당 업계에 공지된 방법에 의해 포유동물 기증자로부터 채취될 수 있다. 심장 조직은 해리되고 세포는 배양물에서 도금된다. 심장 섬유아세포는 배양 접시의 표면에 부착되고, 심장 섬유아세포를 수집하여 iPS 세포로 리프로그래밍할 것이다.

[0136] 체세포의 iPS 세포로의 리프로그래밍:

[0137] 분화된 세포를 iPS 세포로 리프로그래밍하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 일반적으로는 세포에서 Oct ¾, Sox2, Klf4, 및 c-Myc의 강제 발현을 포함하지만, 당 업계에는 수많은 변형이 공지되어 있다. 예를 들면, 본원에 제공된 실시예에서, 인간 Oct ¾, Sox2, Klf4, 및 c-Myc를 인코딩하는 폴리시스트론성 렌티바이러스 벡터를 사용하여 클린-캐치 소변 샘플로부터 수집된 세포를 iPSCs로 리프로그래밍하였다. hiPSCs는 본 명세서에서 기술되는 방법 또는 미분화된 만능 표현형의 세포 생존률 및 유지에 유리한 다른 조건에 따라 배양, 확장 및 계대 배양된다. hiPSCs는 예를 들면 저산소 조건(예를 들면, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>)에서 유지된다.

[0138] 제한없이, iPS 세포는 또한 폴리시스트론성 벡터, mRNA 종, miRNAs 및 단백질의 사용을 포함하지만 비바이러스 적 방법에 국한되지 않는 다른 방법, 예를 들면, 국제 특허출원 제W02010/019569호, 제W02009/149233호, 제W02009/093022호, 제W02010/022194호, 제W02009/101084호, 제W02008/038148호, 제W02010/059806호, 제W02010/057614호, 제W02010/056831호, 제W02010/050626호, 제W02010/033906호, 제W02009/126250호, 제W02009/143421호, 제W02009/140655호, 제W02009/133971호, 제W02009/101407호, 제W02009/091659호, 제W02009/086425호, 제W02009/079007호, 제W02009/058413호, 제W02009/032456호, 제W02009/032194호, 제

WO2008/103462호, 일본 특허 제JP4411362호, 유럽 특허 제EP2128245호, 및 미국 특허 출원 제US2004/0072343호, 제US2009/0253203호, 제US2010/0112693호, 제US2010/07542호, 제US2009/0246875호, 제US2009/0203141호, 제US2010/00625343호, 제US2009/0269763호, 및 제US2010/059806호에 기술된 방법을 포함한 방법들을 이용하여 생성시킬 수도 있으며, 각각의 이들 문현의 전문은 본 명세서에서 참조로 포함된다. 임의의 조직이 심근세포로 분화하기 위해 iPS 세포를 생성하기 위한 공급원 세포를 제공할 수 있지만, 심장 조직으로부터 유래된 세포는, 예를 들면, iPS 세포-유래 심근세포를 생성하기 위해 본 명세서에서 기술되는 방법에서 사용될 때 성숙한 심근세포의 생성을 향상시킬 수 있는 이점, 예를 들면 후성 기억을 가질 수 있는 것으로 생각된다.

[0139] 줄기세포를 줄기세포-유래 심근세포로 분화

본 명세서에서 기술되는 바와 같이, iPSC는 세포 해리 시약(예를 들면, 트립신 또는 에틸렌디아민테트라아세트산)을 사용하여 단일 세포로 해리시키고, 심근세포로의 분화를 준비하기 위해 줄기세포 배양 배지(문현: *Current Protocols in Stem Cell Biology*. 2:1C.2.1-1C2.16, 2007 참조)에서 매트릭스-코팅된(예를 들면 Matrigel™ 코팅된) 플레이트 상에 플레이팅시킨다. 다른 세포와 매트릭스 단백질 표면 처리가 iPS 세포의 표준 단일층 배양을 위해 사용될 수 있다. 배양 접시의 표면 처리의 비제한적 예는 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴 등과 같은 단백질 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

[0141] 심근세포로의 분화를 위한 iPS 세포를 제조하기 위해, iPS 세포는 고밀도 (250,000 세포/mm<sup>2</sup> 이상)로 시딩된다. 단일 층이 형성되면, 세포는 본 명세서의 실시예에 기술된 바와 같이, 또는, 예를 들면, 문현[참조: Macadangdang J, et al., *Cell. Mol. Bioeng.* 8: 320-332 (2015)]에 의해 기술된 바와 같이 심근세포로 분화될 수 있다. 또한, 만능 줄기세포(iPS 또는 ES 세포)를 심근세포로 분화시키기 위한 당 업계에 공지된 다른 접근법이 사용될 수도 있다.

[0142] 일부 실시형태에서, iPS 세포는 만능 상태 이후 또는 만능 상태가 유지되고 있는 동안 유전자 변형된다. 예를 들면, 질환 모델 세포주(예를 들면, DMD 돌연변이 인간 iPS 세포)는 CRISPR-Cas 기술을 사용하여 생성되어 정상 어미 세포주(예를 들면, UC3-4)로부터 동종 유전자 쌍을 생성할 수 있다. 또한, 바이러스 벡터, 리포좀-매개 형질 감염, 미량주사법 등의 도입을 포함한 iPS 또는 기증자 세포를 유전자 변형시키는 다른 접근법이 사용될 수도 있지만, 이에 국한되지는 않는다. 유전자 변형은 하나 이상의 인자의 발현을 증가시키는 변화, 또는 반대로, 하나 이상의 인자의 발현을 비활성화시키거나 달리는 억제하는 변화 둘 다를 포함할 수 있다.

[0143] CRISPR-Cas 접근법에서, 표적 디스트로핀 유전자의 근육-특이적 엑손을 표적으로 하는 가이드 서열이 유전자를 돌연변이시키기 위해 사용된다. 이어서, 당 업계에 공지된 시퀀싱 방법에 의해 돌연변이가 확인된다. 이어서, 질환 모델 세포주는 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 정상 또는 야생형 세포주와 동일한 방식 및 조건으로 유지된다.

[0144] 줄기세포-유래 심근세포 성숙을 위한 갑상선 호르몬 및 Let7i microRNA 처리

본 명세서에서 기술되는 방법 및 조성물은 줄기세포-유래 심근세포의 성숙을 위한 Let7i microRNA 및 갑상선 호르몬 T3의 전달을 포함한다.

[0146] 갑상선 호르몬 및 Let7i miRNA의 전달:

[0147] Let7i miRNA

[0148] Let7i miRNA를 전달하는 맥락에서, "접촉하는(contacting)", "전달하는(delivering)" 또는 "전달(delivery)"이라는 용어는 세포 외측으로부터의 Let7i miRNA의 전달 및 세포 내부로부터의 전달 둘 다를 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들면, miRNA는 세포 외측으로부터, 예를 들면, 지질 복합체(예를 들면, 리포좀) 내로 도입될 수 있다. 대안적으로, miRNA는 외인성 구성물, 예를 들면, 바이러스 또는 다른 발현 벡터로부터 세포 내로 발현에 의해 전달될 수 있다. 이러한 구성물은 에피솜과 유사할 수 있거나 또는 세포의 게놈 내에 안정하게 통합될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 심근세포를 Let7i miRNA와 접촉시키는 단계는 구성물로부터 Let7i를 안정하게 발현하는 심근세포의 사용을 포함한다. 내인성 Let7i miRNA 유전자 서열의 발현이 Let7i miRNA 전달에 영향을 미치도록 상향 조절될 수 있다는 것도 또한 고려된다.

[0149] 나노 패턴화된 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i miRNA의 조합은 줄기세포-유래 심근세포의 효율적인 성숙을 제공하며, 이러한 다양한 자극의 타이밍은 성숙에 영향을 미칠 수 있다. 하나의 실시형태에서, 시험관내-분화된

심근세포는 그들이 비-페턴화된 기재 상에 형성되는 최소한의 박동 단층을 갖고 심장 트로포닌 T를 발현하는 지점에서 Let7i miRNA- 인코딩 바이러스 백터로 감염된다. 타이밍은 다양할 수 있지만, 하나의 실시형태에서, 이는 분화 유도후 약 15일이다. 이어서, 갑상선 호르몬 T3을 배지에 첨가한 다음, 세포를 나노페턴화 기재에 도입한다. 이론에 국한시키려는 것은 아니지만, Let7i miRNA의 하나의 기능은 갑상선 호르몬 T3의 효과를 적어도 부분적으로 억제하는 것으로 생각되는데, 이는 성숙에 유익한 영향을 미치는 것으로 밝혀졌지만 장기간 노출 후에는 해로운 영향을 포함하는 것으로 생각된다. 이러한 상황에서, Let7i miRNA가 갑상선 호르몬 이전보다는 이후에 투여되는 경우에 최상의 이점을 제공할 것으로 기대할 수 있다. 그러나, 바이러스 백터로부터의 Let7i miRNA의 발현은 전이 유전자의 발현을 확립하는데 약간의 지연을 수반하고; miRNA를 더 신속하게 제공하는 다른 Let7i miRNA 전달 수단이 갑상선 호르몬과 동시에 또는 이후에 투여되는 경우에 효과적일 수 있다고 생각된다.

[0150] 갑상선 호르몬 T3:

[0151] 갑상선 호르몬 T3 또는 트리요오도티로닌(본 명세서에서는 또한 간단하게 "T3"이라 지칭됨)은 갑상선에 의해 생성되고 방출되는 티로신계 호르몬이다. T3는 주로 생체 내에서 대사, 성장 및 발달, 체온, 및 심박동수의 조절을 담당한다. T3는 그들의 표적 세포 내에서 핵 호르몬 수용체에 결합하며, 여기서 갑상선 호르몬 수용체가 결합하여 대사, 세포 성장 및 발달에 관여하는 유전자의 조절 영역에서 반응 요소를 통해 전사를 활성화시킨다. 대부분의 세포 유형의 경우, T3는 전형적으로는 기본 대사율의 증가를 초래하고, 이는 신체의 산소 및 에너지 소비를 전반적으로 증가시킬 수 있다.

[0152] 심장에서, 갑상선 호르몬 T3는 심근내의 미오신 및  $\beta$ -아드레날린 수용체 수준을 증가시킴으로써 심박동수 및 수축력을 증가시켜 심박출량을 증가시킨다. 또한, T3의 작용은 (갑상선 기능 항진증이 있는 동물 모델에 의해 입증된) 심전도 상에서의 QRS 복합체 사이의 시간을 단축시킬 수 있다. T3는 또한 출기세포-유래 심근세포의 칼슘 취급성을 개선할 수 있다. 출생 후, 갑상선 호르몬 T3의 혈청 수치는 즉시 급등한다. 이는 유아 심장을 추가적으로 성숙시키고 수축 기능을 개선시킬 수 있다.

[0153] 20 ng/ml 농도의 갑상선 호르몬 T3는 본 명세서에서 제공된 실시예에서 심근세포 성숙에 유익한 영향을 미치는 것으로 입증되었다. 그러나, 이러한 농도는, 예를 들면, 1 ng/ml와 50 ng/ml 사이에서, 또는 이들 사이의 임의의 농도로 변할 수 있다. 또한, 갑상선 호르몬 T3는 대사적으로 활성 형태의 호르몬인 반면, 세포 탈이온 효소에 의해 활성 T3 형태로 탈이온화되는 갑상선 호르몬 T4가 사용될 수 있지만, 단 세포가 T4 형태를 탈이온화하는 능력을 가지고 있어야 하는 것으로 생각된다. T4의 탈이온화에 관여하는 탈이온 효소는 셀레늄을 함유하므로, 셀레늄을 함유하는 배지가 이러한 활성을 촉진할 수 있다. 갑상선 호르몬 수용체 활성을 촉진하는 갑상선 호르몬 T3의 유사체도 또한 본 명세서에서 기술되는 심근세포 성숙 과정에서 사용하기 위해 고려된다. 이러한 유사체의 예는 3,3',5'-트리요오도티로아세트산(Triac), 3,3',5,5'-테트라요오도티로아세트산(Tetraac), 3,5-디요오도티로프로피온산(DIPTA) 및 엑스트로(D)-T4(콜록신)을 포함한다. 유사체, 및 그들의 활성에 대해 분석하는 방법이, 예를 들면, 슈메이커(Shoemaker) 등의 문헌[참조: Endocrin. Pract. 18: 954-964 (2012)], 및 그로네베그(Groeneweg) 등의 문헌[참조: Mol. Cell. Endocrinol. 458: 82-90 (2017)]에 기술되어 있다.

[0154] T3는, 조절된 배지를 사용하여 T3-생산 갑상선 난포 세포, 예를 들면, 세포주 PCCL3[팔메로(Palmero) 등의 문헌 (Mol. Cell Endocrinol. 376: 12-22 (2013)) 참조]를 배양함으로써 제공될 수 있는 것으로 고려된다.

[0155] Let-7i miRNA:

[0156] miRNAs는 캡핑되고 폴리아데닐화된 1차 전사체(pr-i-miRNAs)의 일부로서 RNA 폴리머라제 II에 의해 전사된다. 1차 전사체는 드로샤 리보뉴클레아제 III 효소에 의해 분할되어 대략 70-nt 출기-루프 전구체 miRNA(pre-miRNA)를 생성한다. pre-miRNA는 세포질 다이아리보뉴클레아제(Dicer ribonuclease)에 의해 추가로 분할되어 성숙한 miRNA 및 안티센스 miRNA (때로는 miRNA 스타 또는 miRNA<sup>\*</sup>로 지칭됨) 생성물을 생성한다. 성숙한 miRNA는 RNA 유도성 사일런싱 복합체(RISC)에 통합되는데, 이는 miRNA와의 불완전한 염기쌍을 통해 표적 mRNA에 결합하며, 가장 일반적으로는 표적 mRNA의 번역 억제 또는 불안정화를 초래한다.

[0157] 척추 동물에서 microRNAs의 Let7 패밀리는 말단 분화를 촉진하기 위해 많은 발달 과정 동안 시간적 발현을 갖는 종에 걸쳐 보존된 서열이다. microRNAs의 Let7 패밀리는, 예를 들면, 다른 것들 중에서도, 원발암유전자(protooncogene), 세포주기 조절제, 세포 증식 조절제, 아포프토시스, 및 면역 물질, 예를 들면 RAS, HMGA2, 사이클린 A2, CDC34, 오로라 A 및 B 키나제, E2F5, CDK8, CDC25A, CDK6, Casp3, Bc12, Map3k1, Cdk5, 사이토카인, 톤-유사 수용체를 포함하는 많은 표적을 갖는다.

[0158] Let-7i는, 다른 유전자들 중에서도, 갑상선 호르몬 수용체를 포함한 많은 핵 수용체의 전사적 공동 억제제로서

작용하는 모발 성장 관련 유전자 HR의 발현을 조절한다.

[0159] Let-7 패밀리의 구성원은 16개의 뉴클레오티드 서열 UGAGGUAGUAGUUUGU에서 정확한 서열 동일성을 공유하는 Let-7a, Let-7b, Let-7c, Let-7g 및 Let-7i와 함께 고도로 보존된 18개의 뉴클레오티드 코어 서열을 특징으로 한다. 인간 Let-7i는 염색체 12q14.1에서 인코딩된다. 인간 Let-7i 전구체 서열은 (5'-3')(서열 번호 5)이다:

[0160] CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCG

[0161] GGUUGUGACAUUGCCCGCUGUGGAGAUACUG

[0162] CGCAAGCUACUGCCUUGCUAG

[0163] 인간 Let-7i 성숙형 분자는 서열(5'-3')을 갖는 듀플렉스(duplex)(서열 번호 6):

[0164] UGAGGUAGUAGUUUGUGCU

[0165] 및 그의 보체(complement)(서열 번호 7)이다.

[0166] 하기와 나타낸 Let-7a 내지 Let-7i의 성숙 형태에 대한 서열은 패밀리의 다른 구성원에 비해 가장 유의미한 변이가 성숙 형태의 서열의 3' 말단에 있음을 나타낸다. 따라서, 3' 말단에서 또는 그 근처에서 Let-7i 분자에 대한 변화는 심근세포 성숙에서 Let-7i 분자의 특이성 또는 기능에 영향을 미칠 것으로 예상할 수 있다. 이와 대조적으로, 성숙 형태 서열의 5' 말단 또는 중심을 향한 변화는 심근세포 성숙에서 분자의 기능을 허용한다는 점에서 더 잘 견딜 가능성이 크다. Let-7 miRNAs는 표적 서열과의 불완전한 염기쌍 혼성화 상호 작용을 겪는 경향이 있으며, 이는 표적 RNA와의 100% 상보성이 필요하지 않다는 것을 의미한다. 따라서, 5개 이하, 예를 들면, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 단일의 뉴클레오티드(바람직하게는 서열의 5' 또는 그 이상의 중심 영역에서)의 서열 변이는 심근세포 성숙에서 기능을 유지하면서 견딜 수 있는 것으로 고려된다. 인간 성숙 형태 서열에 비해 하나 이상의 서열 차이가 있는 경우, 연속적인 차이가 나란히 위치하지 않는 것이 바람직할 수 있는데, 예를 들면 3, 4 또는 5개의 차이가 있는 경우, 이들은 인접한 뉴클레오티드에 있지 않는 것이 바람직할 수 있다. 결국, 본 명세서에서 기술되는 방법 및 조성물의 맥락에서 Let-7i miRNA에 가장 중요한 문제는 miRNA가 줄기세포-유래 심근세포에서 단독으로 또는 갑상선 호르몬 T3 및 나노패턴화 기재과의 조합으로 보다 성숙한 심근세포 표현형을 촉진한다는 것이다. 본 명세서에서 기술되는 방법을 사용하여 이러한 활성에 대해 소정의 서열 변이체를 분석하는 것은 간단한 문제이다.

[0167] 따라서, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "Let-7i miRNA"는 UGAGGUAGUAGUUUGUGCU(서열 번호 6)의 5'-3' 서열을 가진 듀플렉스 RNA 분자 및 그의 보체(서열 번호 7), 또는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 보다 성숙한 심근세포 표현형을 촉진하는(즉, 심근세포 성숙을 촉진하는), 상술된 바와 같이 5개 이하의 뉴클레오티드 위치에서 상이한 분자이다. Let-7i miRNAs는, 예를 들면, 베타로부터 pri-mRNA로서 또는 세포에서 성숙한 형태의 듀플렉스로 처리되는 pre-miRNA로서 발현될 수 있다. 대안적으로, 경우에 따라서는, 성숙한 형태의 듀플렉스가, 예를 들면, 지질 복합체 또는 다른 직접 전달 형태를 통해 세포에 도입될 수 있는 것으로 고려된다. 또한, 전구체 miRNA 또는 miRNA 서열을 갖는 헤어핀 분자의 직접 전달이 이용 될 수 있으며; 이러한 상황에서, 세포의 프로세싱 효소는 세포에서 성숙한 형태의 miRNA를 생성하는데 사용된다.

### 표 1

표 1: 인간 성숙 Let-7 microRNA 서열

성숙 miRNA	성숙 miRNA 서열	상응하는 전구체	서열 번호
명칭	(5' 내지 3')	마이크로RNA(s)	
let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	let-7a-1; let-7a-2; let-7a-3; let-7a-4	10
let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGGUU	let-7b	11
let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGUU	let-7c	12
let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU	let-7d; let-7d-v1	13
let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU	let-7e	14
let-7f	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	let-7f-1; let-7f-2-1; let-7f-2-2	15
let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGU	let-7g	16
let-7i	UGAGGUAGUAGUUUGUGCU	let-7i	17

- [0169] Let-7i miRNA가 직접 전달되는 경우, 즉, 세포에서 발현되지 않는 경우, miRNA는, 예를 들면, 분자의 안정성 및 /또는 표적 분자와의 그의 상호 작용을 향상시키는 변형을 포함할 수 있다. 변형은, 예를 들면, 핵염기 또는 골격에 대한 것일 수 있다. 변형된 핵염기의 비제한적인 예로는 5- 메틸사이토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 사이토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오사이토신, 5-할로우라실 및 사이토신, 5-프로피닐 우라실 및 사이토신, 6-아조 우라실, 사이토신 및 티민, 5-우라실(의사 우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오 알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 사이토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌, 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함한다.
- [0170] microRNA 골격 변형은 데옥시리보핵산(DNA, 서열 번호 1-5), 웹타이드 핵산(PNA), 모르폴리노, 잠금 핵산(locked nucleic acid)(LNA), 글리콜 핵산(GNA), 트레오스 핵산(TNA), 또는 당 업계에 공지된 다른 제노 핵산(XNA) 형태를 포함할 수 있지만, 이에 국한되지는 않는다. 임의의 핵염기 또는 골격 변형의 경우, 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 심근세포 성숙 또는 보다 성숙한 심근세포 표현형의 촉진이 본 명세서에서 기술되는 방법 및 조성물에서 변형된 miRNA를 사용하는데 있어서 필수적이라는 것을 이해해야 한다.
- [0171] Let7i miRNA 벡터는 또한 miRNA를 발현하는 줄기세포-유래 심근세포의 양성적 또는 음성적 선택을 허용하는 선택 가능한 마커를 함유할 수도 있다. 대부분의 경우, 선택 가능한 마커는 항생제와 같은 작용제에 세포의 내성을 부여한다. 선택 가능한 마커의 비제한적 예로는, 다른 것들 중에서도, 퓨로마이신, 암페실린, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신, 블레오마이신, 메토트렉세이트, G418 세ЛЕ레이트에 대한 내성 유전자를 포함한다. 선택은 적절한 양의 선택 작용제를 세포 배양 배지에 첨가하여 Let7i miRNA를 발현하는 성공적으로 형질 도입된 줄기세포-유래 심근세포를 동정함으로써 일어날 수 있다.
- [0172] 줄기세포-유래 근육 세포 성숙을 위한 생체 모방 나노패턴화 기재의 제조 및 사용
- [0173] 줄기세포-유래 심근세포의 배양 및 성숙을 위해 생체 모방성 나노패턴화 기재를 사용하는 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 조성물 및 방법의 경우, 나노패턴화 기재는 사용된 기재 물질에 적합한 당 업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제조 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 나노패턴화는, 예를 들면, 킴(Kim) 등의 문헌[참조: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107: 565-570 (2010)], 마카당당(Macadangdang) 등의 문헌[참조: J. Vis. Exp. 88: 50039 (2014)], 또는 미국 특히 제 9,994,812 호에 기술되어 있는 바와 같이 기재에 도입될 수 있으며, 여기서 이들 참고 문헌의 전문은 본 명세서에서 참조로 포함된다. 나노패턴화된 어레이의 평행한 그루브 및 럿지는 모세관력 리소그래피, 나노 인텐레이션, e-빔 리소그래피, 전기 방사 또는 당업자에게 공지된 다른 방법을 포함하는 공정을 이용하여 제조할 수 있다. 일부 실시형태에서, 모세관력 리소그래피가 사용된다.
- [0174] 일부 실시형태에서, 중합체 기재는 열 또는 UV-기반 경화 방법과 호환가능한 생체 적합성 하이드로겔 또는 모세관력 리소그래피를 사용할 수 있는 물질로 구성된다. 일부 실시형태에서, 중합체 기재는 PEG, PUA, PLGA, PMMA, PUA-PGMA 또는 이들의 화학적 변이체로 구성된다. 일부 실시형태에서, 중합체 기재는 UV 경화성 하이드로겔 중합체, 감열성 하이드로겔 중합체 또는 용매 증발에 의해 생성된 중합체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 감열성 중합체는 PNIPAM이다.
- [0175] 예를 들면, UV-보조 모세관력 리소그래피를 사용하여 깊이가 600 나노미터이고 폭이 800 나노미터인 럿지 및 그루브를 가진 이방성으로 나노제작된 기재를 제조할 수 있다 (Macadangdang J, et al., *Cell Mol Bioeng.* 2015, WO2013151755A1 참조). 다른 치수가 사용될 수 있다. 깊이 또는 폭이 약 50 내지 100 나노미터 미만인 패턴화는 더 큰 나노 치수를 가진 패턴화보다도 보다 성숙한 심근세포 표현형을 촉진시킬 가능성이 더 적다. 따라서, 그루브의 깊이/높이는 100 나노미터 이상, 또는 150 나노미터 이상, 또는 200 나노미터 이상, 또는 250 나노미터 이상, 또는 300 나노미터 이상, 또는 350 나노미터 이상, 또는 400 나노미터 이상, 또는 450 나노미터 이상, 또는 500 나노미터 이상, 또는 550 나노미터 이상, 또는 600 나노미터 이상, 또는 650 나노미터 이상, 또는 700 나노미터 이상, 또는 750 나노미터 이상, 또는 800 나노미터 이상, 또는 850 나노미터 이상, 또는 900 나노미터 이상, 또는 950 나노미터 이상일 수 있지만, 1000 나노미터를 초과하지 않는다. 나노 패턴화된 기재 상의 나노 패턴의 그루브 또는 그루브들 사이의 럿지의 폭은 100 나노미터 이상, 또는 150 나노미터 이상, 또는 200 나노미터 이상, 또는 250 나노미터 이상, 또는 300 나노미터 이상, 또는 350 나노미터 이상, 또는 400 나노미터 이상, 또는 450 나노미터 이상, 또는 500 나노미터 이상, 또는 550 나노미터 이상, 또는 600 나노미터 이상, 또는 650 나노미터 이상, 또는 700 나노미터 이상, 또는 750 나노미터 이상, 또는 800 나노미터 이상, 또는 850 나노미터 이상, 또는 900 나노미터 이상, 또는 950 나노미터 이상일 수 있지만, 1000 나노미터를 초과하지 않는다.

미터 이상, 또는 900 나노미터 이상, 또는 950 나노미터 이상일 수 있지만, 1000 나노미터를 초과하지 않는다. 하나의 실시형태에서, 그루브의 깊이, 그루브의 폭, 및 그루브들 사이의 럿지의 폭은 모두 동일한 치수, 예를 들면, 100 나노미터 이상, 150 나노미터 이상, 200 나노미터 이상, 250 나노미터 이상, 300 나노미터 이상, 350 나노미터 이상, 400 나노미터 이상, 450 나노미터 이상, 500 나노미터 이상, 550 나노미터 이상, 600 나노미터 이상, 650 나노미터 이상, 700 나노미터 이상, 750 나노미터 이상 800 나노미터 이상, 850 나노미터 이상, 900 나노미터 이상, 또는 950 나노미터 이상이지만, 1000 나노미터를 초과하지 않는다. 다른 실시형태에서, 그루브의 깊이, 그루브의 폭 및 그루브들 사이의 럿지의 폭은, 예를 들면, 100 나노미터의 그루브 깊이; 100, 150, 200, 250, 300, 350 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 또는 950 나노미터의 그루브 폭; 및 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 또는 950 나노미터의 럿지 폭을 포함한다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 200 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 300 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 400 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 500 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 600 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 700 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 800 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 다른 실시형태에서, 그루브 깊이는 900 나노미터이고; 그루브 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이며; 럿지 폭은 100, 또는 150, 또는 200, 또는 250, 또는 300, 또는 350, 또는 400, 또는 450, 또는 500, 또는 550, 또는 600, 또는 650, 또는 700, 또는 750, 또는 800, 또는 850, 또는 900, 또는 950 나노미터이다. 본 명세서에서 예로서 제공되는 치수는 50 또는 100 nm의 짹수 배수이지만, 50 또는 100 nm의 짹수 배수가 아닌 다른 치수도 또한 이러한 나노패턴을 가진 기재 상에서 배양되는 줄기세포-유래 심근세포의 표현형에 대한 이점을 제공할 수 있는 것으로 고려된다.

[0176] 일부 실시형태에서, 나노패턴화 기재는 실질적으로 평면인 기재의 일면 또는 양면 상에 평행한 그루브 및 럿지의 나노텍스처 어레이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 심근세포 또는 줄기세포는 나노패턴화 기재의 일면 또는 양면 상에 존재할 수 있다.

[0177]

본 명세서에서 제공된 실시예에서 설명되고 입증된 그루브 및 럿지는, 예를 들면, 그루브의 측면이 그루브 사이의 럿지와 수직으로 교차하거나, 또는 이와 유사하게 그루브의 측면이 그루브의 바닥과 교차하는 곳에서 일반적으로 직각이다. 그러나, 생체내 세포와 매트릭스의 패턴화는 수직 또는 직각 전이하는 모양으로 구성되지 않는다. 따라서, 본 명세서에서는 또한 럿지와 그루브 사이의 전이는, 예를 들면, 정현과 모양일 수 있는 것으로 고려된다. 중요한 것은 패턴화가 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 높이 및 폭의 나노 스케일 치수를 갖는 실질적으로 평행한 그루브 및 럿지를 갖는다는 것이다. 평행이라는 일반적인 의미, 즉, 인접한 그루브 또는 럿지가 배양 표면의 스팬에서 교차하지 않는다는 의미로 사용된다. 그러나, 텍스처의 이점을 회생시키지 않으면서 어느 정도의 불완전성 또는 심지어 어느 정도의 인접한 그루브의 설계 교차점이 용인될 수 있는 것으로 인식된다. 따라서, 무명수가 감내할 수 있는 정도의 평행하지 않거나 또는 교차하는 그루브 및 럿지를 완전히 캡처할 수는 없지만, 나노패턴화 기재의 사용시에 심근세포 구조 또는 기능이 측정될 배양 표면의 스팬 상에서, 2개의 인접한 그루브 또는 럿지가 교차하지 않거나, 또는 그루브 또는 럿지의 길이를 감안하였을 때 20% 이하의 시간 및 단지 20도 미만의 예각에서만 교차하는 경우에 "실질적으로 평행(substantially parallel)" 것으로 이해되어야 한다. 전반적으로, 선택된 지형은 슬라이딩 액틴 및 미오신 필라멘트의 정렬된 Z-밴드 및 H-영역을 나타내도록 정상 또는 야생형 줄기세포-유래 심근세포의 근원섬유마디 형성을 허용해야만 한다. 근원섬유 벤들링의 지표인 세포 내의 Z-밴드 폭은 비패턴화된 세포 단독과 비교하였을 때 성숙한 심근세포에서 상당히 더 크다. 근원섬유마디 형성은, 예를 들면, 줄기세포-유래 심근세포의 면역조직화학에 의해 검증될 수 있다.

[0178]

나노패턴화 기재는, 예를 들면, 세포와 매트릭스 단백질 제제 또는 다른 생체 적합성 표면 처리제로 코팅 처리함으로써 세포 부착을 촉진시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 생체 적합성 표면 처리제는, 예를 들면, 폴리-L-라이신, 폴리-D-라이신, 폴리-오리니틴, 또는 비트로넥틴, 에리트로넥틴, 젤라틴, 콜라겐 I 형, 콜라겐 IV 형, 피브로넥틴, 피브로넥틴 도메인, 라미닌, 또는 조작된 세포와 매트릭스 단백질 또는 웨타이드와 같은 세포와 매트릭스 단백질을 포함할 수 있다. 조작된 단백질은, 예를 들면, CS1, RGD, 인테그린 수용체에 결합하는 세포와 매트릭스 단백질 내의 도메인, 및 당업자에게 일반적으로 알려진 다른 것들을 포함하는 웨티드 세그먼트일 수 있다.

[0179]

일부 실시형태에서, 나노패턴화 기재는 줄기세포-유래 심근세포의 전계 전위 기록을 위해 다중 전극 어레이 상에서 직접 제작된다. 일부 실시형태에서, 나노패턴화 기재는 수축성을 측정하기 위해 심근세포에 의해 포스트의 편향을 허용하는 나노 또는 마이크로 포스트로 제작된다. 일부 실시형태에서, 나노패턴화 기재는 심근세포가 수축하거나 전기적으로 자극받을 때 편향되는 층상 박막 상에서 제작된다. 일부 실시형태에서, 나노패턴화 기재는 심근세포가 수축하거나 전기적으로 자극받을 때 편향되는 층상 박막 상에서 제작된다. 일부 실시형태에서, 나노패턴화 기재는 심근세포(예를 들면 실리콘 또는 하이드로겔)의 연신이 가능한 장치 상에서 제작된다. 다른 물질들이 사용될 수 있지만, 심근세포의 기계적 자극 및 연신을 통해 그의 성숙도를 추가로 향상시킬 수 있는 엘라스토머 기재의 예는 폴리디메틸실록산(PDMS)이다. 나노패턴화 기재가 제작될 수 있는 플랫폼의 다른 예로는 듀(DU) 등의 문헌[참조: *Nat Commun.* 8: 400 (2017)], 미국 특허 제 9,994,812 호, 미국 특허출원 공개 제 20120027807 A1 호 및 제 20120004716 A1 호에 기술되어 있는 것들을 포함한다.

[0180]

상술된 바와 같이, 예를 들면, 심근세포를 연신에 의해 기계적으로 자극하여, 예를 들면, 심근세포를 연신 및 이완의 반복 사이클로 처리하여 보다 성숙한 표현형을 촉진할 수 있다. 나노패턴화 기재, 갑상선 호르몬 T3 및 Let7i 처리의 조합이 우수한 심근세포 성숙을 제공하지만, 이러한 단서를 다른 자극 또는 조건과 조합함으로써 이러한 성숙이 더욱 촉진될 수 있을 것으로 예상된다. 비한적인 예로는, 상술된 바와 같이, 기계적 연신/이완 주기의 적용, 및 배양 배지에 지방산을 첨가하는 것을 포함한다. 따라서, 하나의 실시형태에서, 본 명세서에서 기술되는 나노패턴화 기재/갑상선 호르몬 T3/Let7i 처리된 심근세포는, 예를 들면, 연신/이완 주기의 적용을 위한 장치와 결합된 엘라스토머성 나노패턴화 기재를 사용하여 추가로 연신시킴으로써 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 보다 성숙한 표현형을 추가로 촉진시킬 수 있다. 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 분석 및 측정은 이러한 추가적인 자극에 의해 추가적으로 성숙된 표현형의 측정치를 제공할 수 있다.

[0181]

다른 실시형태에서, 팔미테이트, 올레산 및 리놀레산을 포함한 지방산의 존재하에 배양하여 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 보다 성숙한 표현형을 추가로 촉진시킬 수 있지만, 이에 국한되지는 않는다. 비제한적인 예로서, 소 혈청 알부민(BSA)에 접합된 팔미테이트(예를 들면, 대략 50 □M), 올레산(예를 들면, 대략 15 □g/ml), 또는 리놀레산(예를 들면, 대략 10 □g/ml), 또는 이들의 조합을 기초 배지에 첨가하여 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 보다 성숙한 표현형을 추가로 촉진시킬 수 있다.

[0182]

다른 실시형태에서, 나노패턴화 기재/갑상선 호르몬 T3/Let7i 처리를 기계적 자극 및 지방산 노출 둘 다와 조합

하여 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 보다 성숙한 표현형을 추가로 촉진시킬 수 있다.

**[0183] 줄기세포-유래 심근세포의 기능적 특성화**

본 명세서에서 기술되는 조건하에서 성숙된 줄기세포-유래 심근세포는 다양한 처리 또는 자극에 대한 성숙한 심근세포의 반응의 평가할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포의 정량 가능한 파라미터는 수축력, 수축성, 변경된 수축, 수축 빈도, 수축 지속 시간, 수축 스템퍼, 심근세포 크기, 근원섬유마디 조직, 길이, 원주, 구조, 다크 상태, 대사 호흡 능력, 산소 소비량, 전기 생리학적 및 생물 물리학적 파라미터를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 정량 가능한 파라미터는 줄기세포-유래 심근세포의 생존 및/또는 분열 또는 재생을 포함한다.

[0185] 대부분의 파라미터는 정량적 판독 정보를 제공하지만, 일부 경우에는 반정량적 또는 정성적 결과가 허용된다. 판독 정보는 단독 결정값을 포함할 수 있거나, 또는 평균값, 중간값 또는 변량 등을 포함할 수 있다. 특징적으로, 파라미터 판독 정보의 값의 범위는 다수의 동일한 분석법으로부터 각각의 파라미터에 대해 수득될 것이다. 가변성이 예상되며, 일련의 시험 파라미터 각각에 대한 값의 범위는 유용한 값을 제공하기 위해 표준 통계 방법을 사용하여 얻을 수 있을 것이다.

[0186] 심근세포 상태 또는 기능을 평가하는데 유용한 다양한 파라미터의 측정 방법들이 아래에 기술되어 있다.

[0187] 면역 분석: 당 업계에 공지되어 있고 구체적으로 기술되어 있지 않은 면역학 분야의 표준 방법은 일반적으로는 스티테스(Stites)(편집자) 등의 문헌[참조: Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. (1994)]; 및 미셸(Mishell) 및 샤이기(Shigi)(편집자)의 문헌[참조: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., New York (1980)]에 따른다.

[0188] 일반적으로, 면역 분석은, 세포가 분석을 위해 어떻게 준비되는지에 따라 세포 표면 또는 세포내 마커에 대한 표본을 평가하기 위해 사용된다. 면역 세포 화학적 분석법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 다클론성 및 단클론성 항체 모두가 이러한 분석에 사용될 수 있다. 경우에 따라, 효소 결합 면역 흡착 분석법(ELISA), 방사성 면역 분석법 및 유세포 분석법과 같은 다른 면역 분석법이 세포 유형 특이적 마커를 검출하는데 이용될 수 있다.

[0189] 이용 가능한 면역 분석법은 특허 및 과학 문헌에 광범위하게 기술되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제3,791,932호; 제3,839,153호; 제3,850,752호; 제3,850,578호; 제3,853,987호; 제3,867,517호; 제3,879,262호; 제3,901,654호; 제3,935,074호; 제3,984,533호; 제3,996,345호; 제4,034,074호; 제4,098,876호; 제4,879,219호; 제5,011,771호; 및 제5,281,521호; 및 샘브루크(Sambrook) 등의 문헌[참조: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor, N.Y., 1989] 등등 참조.

[0190] 면역-기반 방법을 이용하여 분석할 수 있는 심장-특이적 마커의 비제한적 예는 심장 트로포닌-T, 심장 트로포닌-C, 트로포미오신, 카베올린-3, GATA-4, 미오신 중쇄, 미오신 경쇄-2a, 미오신 경쇄-2v, 리아노딘 수용체, 심방나트륨 이뇨인자 등을 포함한다.

**[0191] 근원섬유마디 조직화:**

[0192] 본 명세서에서 기술되는 방법은 줄기세포-유래 심근세포 분화 및 성숙의 척도로서 근원섬유마디 형태학 및 액틴 및 미오신 필라멘트의 구조적 특성화의 이용을 포함한다. 근원섬유마디는 현미경 사진에서 일련의 어두운 선으로 나타나는 근육 세포의 2개의 인접한 Z-라인(또는 Z-디스크 또는 Z 바디) 사이의 세그먼트로 정의된다. Z-라인은 근육 수축을 위한 액틴 및 미오신 필라멘트의 고정점 역할을 한다. 심장 근원섬유마디는 (i) 미오신 헤드가 필라멘트에 거의 수직인, 두꺼운 미오신 단백질 필라멘트, (ii) 얇은 액틴 필라멘트, 및 (iii) 티틴 필라멘트를 포함한다. 각각의 Z-라인 사이에는 두꺼운 미오신 필라멘트에 의해 중첩되지 않는 얇은 필라멘트의 I 밴드가 있다. 심장 근육 세포 조직화의 다른 구조적(및 가변) 특징은 단일의 굵은 미오신 필라멘트의 전체 길이인 A 밴드를 포함한다. H 구역은 얇은 액틴 필라멘트에 의해 중첩되지 않는 두꺼운 필라멘트의 구역이다. M-라인은 세포질 세포 골격의 교차 연결 요소에 의해 형성된다.

[0193] 액틴 필라멘트 및 티틴 분자는 Z-라인 단백질 알파-액티닌을 통해 Z-디스크내에서 가교결합된다. 심장의 충상 조직 내에서, 알파-액티닌은 액틴 및 미오신 필라멘트에 수직이다. 심장 근원섬유마디의 구조는 잘 정돈되어 있기 때문에, 당업자는 성숙한 근육 세포 및 조직을 동정하기 위한 마커로서 배양된 세포의 조직 또는 집합에서의 이들 단백질(액틴, 미오신, 알파-액티닌, 티틴) 및 그들의 배열을 인지하고 있을 것이다. 발달하는 심장 세포는 세포 내에서 새로운 근원섬유마디 단위를 생산하는 "근원섬유마디 형성 발달(sarcomerogenesis)" 과정을 일으킨다. 근원섬유마디 조직화의 정도는 심근세포 성숙도의 척도를 제공한다.

- [0194] 특히, 미오신, 액틴, cTnT, 트로포미오신을 위한 면역 형광 분석 및 전자 현미경을 사용하여 근원섬유마디 구조를 동정하고 측정할 수 있다.
- [0195] 면역 형광 이미지는 근원섬유마디 정렬 상태, 패턴 강도 및 근원섬유마디 길이에 대해 정량화될 수 있다. 이는 스캐닝 구배 및 푸리에 변환 스크립트를 사용하여 단백질의 위치를 결정함으로써 달성될 수 있다. 이는 개별 분석을 위하여 각각의 이미지를 여러 개의 작은 세그먼트로 분리하여 수행한다. 방향도 함수를 이용하여, 각각의 세그먼트에 대한 이미지 구배를 계산하여 근원섬유마디의 국소 정렬을 결정할 수 있다. 구배의 방향으로 일차원 푸리에 변환의 최대 피크를 계산하여 패턴 강도를 결정할 수 있다. 근원섬유마디의 길이는 이와 동일한 구배 방향을 따라 근원섬유마디의 강도 프로파일을 측정함으로써 계산할 수 있다. 강도 프로파일이 그들의 평균을 교차하는 지점의 주파수는 각각의 이미지 세그먼트 내에서의 국소 근원섬유마디 길이를 정확하게 계산할 수 있다. 이러한 분석은 나노토포그래피에 의해 제공되는 정렬 단서가 없는 세포에서도 근원섬유마디 패턴화의 편향되지 않은 세포내 해상도 맵핑을 가능하게 한다.
- [0196] 세포 형태학은 구조적으로 성숙한 줄기세포-유래 심근세포를 동정하는데 사용될 수 있다. 형태학적 및 구조적 파라미터의 비제한적 예로는 근원섬유마디 길이, Z-밴드 폭, 이해화 백분율, 핵 이심률, 세포 면적 및 세포 종횡비가 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다.
- [0197] 대안적으로, 근원섬유마디 구조의 정성적 분석이 또한 사용될 수 있다. 당업자를 위하여, 성인 심근세포 표현형에 대한 표준은 알파-액틴이 액틴 필라멘트에 대해 약 90 도라는 것이다. 태아 심근세포는 알파-액티닌을 발현하지 않거나, 알파 액티닌 구조는 본 명세서에서 기술되는 근원섬유마디 구조로부터 무질서하다.
- [0198] 전기 생리학:
- [0199] 성숙한 심근세포는 심근세포 사이에서 단서를 발생시키는 전위를 생성하는 기능성 이온 채널을 가지고 있어서서 심장 근육 수축을 동기화시킬 수 있다. 줄기세포-유래 심근세포의 전기적 기능은 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다. 이러한 방법의 비제한적인 예로는, 다른 것들 중에서도, 전세포 패치 클램프(수동 또는 자동), 다중 전극 어레이, 칼슘 이미징 및 광학 매핑을 포함한다. 줄기세포-유래 심근세포는 전세포 전류 클램프 또는 다중 전극 어레이 기록 중에 전기적으로 자극되어 전기적 반응 또는 수축 반응을 생성할 수 있다. 또한, 줄기세포-유래 심근세포는, 예를 들면, 세포의 광학적 자극이 가능한 채널로 돋신을 발현하도록 유전자 변형될 수 있다.
- [0200] 줄기세포-유래 심근세포의 전계 전위 및 생체 전위를 측정하여 분화 단계 및 세포 성숙도를 결정할 수 있다. 제한없이, 줄기세포-유래 심근세포의 전기 생리학적 기능을 결정하는데 다음의 파라미터들이 사용될 수 있다: FPD의 변화, FPD의 정량화, 진동 주파수, 분당 박동수, 상향 스트로크 속도, 안정막 전위, 활동 전위의 진폭, 최대 이완기 전위, 이완의 시간 상수, 90% 재분극의 활동 전위 지속 시간, 인터스파이크 간격, 박동 간격의 변화, 전류 밀도, 활성화 및 비활성화 동역학 등.
- [0201] 질환 상태 동안, 심근세포의 전기 생리학적 기능이 손상될 수 있으며, 이는 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 성숙된 심근세포를 사용하는 질환 모델에 의해 요약될 수 있다. 예를 들면, QT 연장 증후군과 같은 심장 부정맥을 모델링하는데 사용되는 줄기세포-유래 심근세포는 정상적인 줄기세포-유래 심근세포와 비교하였을 때 연장된 FPD 및 APD를 나타낼 수 있다.
- [0202] 대사 분석:
- [0203] 성인 심근세포는 증가된 미토콘드리아 기능 및 여분의 호흡 능력으로 표시되는 태아 심근세포와 비교하였을 때 향상된 세포 대사를 갖는 것으로 나타났다. 대사 분석법을 이용하여 본 명세서에서 기술되는 줄기세포-유래 심근세포의 분화 단계 및 세포 성숙도를 결정할 수 있다. 대사 분석의 비제한적 예로는 세포 생체에너지 분석(예를 들면, 씨호스 바이오사이언스(Seahorse Bioscience) XF 세포외 플러스 분석기) 및 산소 소비량 테스트를 포함한다.
- [0204] 보다 구체적으로, 세포 대사는, 다른 파라미터들 중에서도, 산소 소비율(OCR), 지방산 스트레스 테스트 중의 OCR 추적, OCR의 최대 변화율, FCCP 첨가 후의 OCR의 최대 변화율, 및 최대 호흡 능력에 의해 정량화될 수 있다.
- [0205] 또한, 대사 반응 검사 또는 락테이트 농축도 분석은 줄기세포-유래 심근세포 성숙도의 척도 또는 이러한 세포의 다양한 처리 효과의 척도를 제공할 수 있다. 포유류 세포는 일반적으로 주요 에너지원으로 글루코오스를 사용한다. 그러나, 심근세포는 락테이트 또는 지방산과 같은 다른 공급원으로부터 에너지를 생산할 수 있다. 일부 실시형태에서, 락테이트가 보충되고 글루코오스가 고갈된 배양 배지, 또는 에너지원으로서 락테이트 또는 지방산

을 사용하는 세포의 능력은 성숙한 줄기세포-유래 심근세포 및 그의 기능의 변화를 확인하는데 유용하다.

[0206] **심장 수축성을 측정하는 방법:**

[0207] 수축성은 전형적으로는 비디오 추적 방법에 의해 측정된다. 수축 크기, 속도 및 각도와 같은 기능적 출력은 각각의 비디오 프레임에 대한 벡터 필드로서 출력되며, 공간적으로 또는 시간적으로 평균화될 수 있다. 비디오 추적 방법의 경우, 줄기세포-유래 심근세포의 수축(또는 수축기)은 세포 또는 심장 조직이 가장 짧은 길이에 있는 시간 및 공간의 시점으로 간주된다. 이완(이완기)은 세포 또는 심장 조직이 가장 긴 길이에 있는 시간 또는 공간의 시점으로 간주된다. 이를 파라미터는 비디오 내의 기준 프레임을 사용하고, 이러한 기준 프레임을 가이드로 사용하여 심근세포 또는 심장 조직의 움직임을 추적함으로써 결정된다.

[0208] 비디오 추적 외에, 임피던스 측정을 수행할 수도 있다. 예를 들면, 본 명세서에서 기술되는 줄기세포-유래 심근세포는 xCelligence™ 실시간 세포 분석(Acea Biosciences, Inc., San Diego, CA)에 의해 결정된 수축성 또는 심박동수 측정값을 가질 수 있다.

[0209] 줄기세포-유래 심근세포 기능의 중요한 파라미터는 비트율이다. 수축 빈도, 심박동수, 박동 간격의 변화율( $\Delta$  BI) 또는 박동 주기는 줄기세포 분화 단계, 줄기세포-유래 심근세포 성숙도 및 이러한 비율에 대한 소정의 처리 효과를 결정하는데 사용될 수 있다. 심박동수는 일반적으로는 태아 심근세포에서는 증가되고 심근세포가 발달함에 따라 감소된다. 질병 상태에 있는 동안, 심박동수의 변화는 가변적일 수 있으며, 전기 생리 학적 또는 구조적 불안정성으로 인해 빈도가 일정하지 않을 수 있다. 제한없이, 수축성 파라미터는 또한 수축 속도, 이완 속도, 수축 각도 분포 또는 수축 이방성비를 포함할 수도 있다.

**질환 모델**

[0211] DMD는 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 제조되고 성숙된 줄기세포-유래 심근세포가 모델링되도록 적응될 수 있는 심장 기능에 영향을 미치는 많은 질환들 중의 하나일 뿐이다. 다양한 심장 질환을 가진 개체로부터 유래되는, 심장 세포가 iPS 세포로부터 분화되는 많은 심장 질환 모델이 설명되어 왔다. 예를 들면, 에베르트(Ebert) 및 스벤센(Svendsen)의 문헌[참조: Nat. Rev. Drug Discov 9: 367-372 (2010)] 참조.

[0212] 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 제조되고 성숙된 줄기세포-유래 심근세포를 사용하여 모델링할 수 있는 심장 질환은, 예를 들면, 스미스(Smith) 등의 문헌[참조: Biotechnol. Adv. 35: 77-94 (2017)]에서 논의된 것들을 포함한다. 보다 구체적으로, 이러한 질환은 QT 연장 증후군과 같은 이온 채널 병증을 포함하며, iPS 세포로부터 유래된 심근세포를 사용하는 모델이 모레티(Moretti) 등의 문헌[참조: New Engl. J. Med. 363: 1397-1409 (2010)]에 기술되어 있다. 다른 모델은, 에가시라(Egashira) 등의 문헌[참조: Cardiovasc. Res. 95: 419-429 (2012)]에 기술되어 있는 LQT1 아형에 대한 모델; 이츠하키(Itzhaki) 등의 문헌[참조: Nature 471: 225-229 (2011)], 라흐티(Lahti) 등의 문헌[참조: Dis. Model Mech. 5: 220-230 (2012)], 및 마싸(Matsa) 등의 문헌[참조: Eur. Heart J. 32: 952-962 (2011)]에 기술되어 있는 LQT2 아형에 대한 모델; 및 마(Ma) 등의 문헌[참조: Int. J. Cardiol. 168: 5277-5286 (2013)] 및 테레노어(Terrenoire) 등의 문헌[참조: J. Gen. Physiol. 141: 61-72 (2013)]에 기술되어 있는 LQT3 아형에 대한 모델을 포함한다. LQT3 및 브루가다 증후군(Brugada Syndrome) 아형 둘 다를 일으키는 모델은 데이비스(Davis) 등의 문헌[참조: Circulation 125: 3079-3091 (2012)]에 기술되어 있으며, 티모시 신드롬(Timothy Syndrome) 환자로부터의 LTQ8에 대한 모델은 야자와(Yazawa) 등의 문헌[참조: J. Cardiovasc. Transl. Res. 6: 1-9 (2013)]에 기술되어 있다.

[0213] 이러한 질환을 가진 환자로부터 분화된 심장 세포를 사용하여 모델링될 수 있는 추가의 심장 질환은 이온 채널 병증인 카테콜아민성 다형성 심실성 빈맥(CPVT)을 포함한다. 심근세포로 분화된 iPS 세포에 기초한 이러한 질환에 대한 모델은 이츠하키(Itzhaki) 등의 문헌[참조: J. Am. Coll. Cardiol. 60: 990-1000 (2012)]; 파티마(Fatima) 등의 문헌[참조: Cell Physiol. Biochem. 28: 579-592 (2011)]; 정(Jung) 등의 문헌[참조: EMBO Mol. Med. 4: 180-191 (2012)]; 디파스퀴알(DiPasquale) 등의 문헌[참조: Cell Death Dis. 4: e843 (2013)]; 및 파아볼라(Paavola) 등의 문헌[참조: Europace: European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology: journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology (2015) for CPVT1]; 및 노바크(Novak) 등의 문헌[참조: Rambam Maimonides Med. J. 3: e0015 (2012) for CPVT2]에 기술되어 있는 것들을 포함한다.

[0214] 질환을 가진 개체로부터의 iPS 세포 분화를 이용하여 모델링된 다른 장애는 비대성 심근병증(HCM)[참조: Carvajal-Vergara et al., Nature 2010 465: 808-812 (2010) 및 Lan et al., Cell Stem Cell 12: 101-113 (2013)]; 및 가족성 확장형 심장병증(DCM)[참조: Sun et al., Sci Transl. Med. 4: 130ra47 (2012), Siu et

al., Aging 4: 803-822 (2012), Tse et al., Hum. Mol. Genet. 22: 1395-1403 (2013)]; 폼페병(Pompe disease)[참조: Huang et al., Hum. Mol. Genet. 20: 4851-4864 (2011)]; 프리드리히 운동 실조증(Friedrich's ataxia)(FRDA)[참조: Hick et al., Dis. Model. Mech. 6: 608-621 (2013)]; 바르트 증후군[참조: Wang et al., Nat. Med. 20: 616-623 (2014)]; 부정맥유발성 우심실 형성이상/심근병증(ARVD/C)[참조: Calkins, Circulation Journal: official Journal of the Japanese Circulation Society 79: 901-913 (2015), Caspi et al., Circulation Cardiovascular Genetics 6: 557-568 (2013), Kim et al., Nature 494: 105-110 (2013), Malik and Rao, Meth. Mol. Biol. 997: 23-33 (2013)]을 포함한다.

[0215] 다양한 질환을 가진 개체로부터 유래된 iPS 세포로부터 분화된 심장 세포를 사용하는, 상술된 임의의 또는 모든 질환 모델은 본 명세서에서 기술되는 방법으로부터 줄기세포-유래 심근세포를 제조 및 성숙시키는 것이 유리할 수 있다.

#### 줄기세포-유래 심근세포를 이용한 약물 스크리닝 플랫폼

[0216] 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 제조된 성숙한 심근세포는 생체내 심근세포 또는 심장 조직에 대한 공지 또는 실험 약물의 유망한 효과의 연구 또는 평가를 위한 플랫폼을 제공한다. 이것은 가능한 심장 부작용 또는 심독성에 대한 비심장 적응증 치료에 사용될 약물을 평가하는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 예를 들면, 잠재적 약물 또는 작용제의 라이브러리 또는 수집물을 스크리닝함으로써, 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 제조되고 성숙된 심근세포는 또한 심근세포 또는 심장 기능에 유리한 효과를 갖는 새로운 약물을 확인하는데 사용될 수도 있다. 정상 기증자 세포에서 유래된 심근세포는 두 상황 모두에서 유용한 정보를 제공할 수 있으며, 심장 질환 또는 다른 질환을 가진 기증자로부터 유래되거나 또는 심장 질환 또는 장애를 모방하도록 가공된 세포로부터 유래된 심근세포는 이러한 질환들을 치료할 새로운 약물 또는 작용제를 동정하는데 매우 유용할 수 있다. 어느 경우에나, 본 명세서에서 기술되거나 당 업계에 공지된 기능적 또는 구조적 파라미터의 평가는 소정의 작용제의 효과와 관련하여 유익한 정보를 얻을 수 있다. 일반적으로, 이러한 분석은 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 제조되고 성숙된 심근세포를 작용제와 접촉시키고 본 명세서에서 기술되는 심근세포의 하나 이상의 파라미터를 작용제의 효과(들)의 지표로서 측정하는 것을 포함한다. 효과가 관찰되는 경우, 또한 작용제의 농도 및/또는 접촉 기간을 변화시킴으로써 용량 반응을 평가할 수도 있다. 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 성숙된 심근세포의 한 가지 이점은, 그들이 덜 성숙한 배양된 심근세포에 비해 배양(수주 이상, 최적 조건하에서)시에 연장된 기간 동안 그들의 성숙 표현형을 유지한다는 것이다. 이는 또한, 예를 들면, 또 다른 플랫폼에서 심근세포에 대해 불가능한 작용제에 대한 장시간 낮은 수준의 노출에 대한 데이터 수집만을 허용할 수 있다.

[0217] [0218] 따라서, 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 제조되고 성숙된 줄기세포-유래 심근세포는 마카의 발현, 세포 생존율, 근원섬유마디 배열, 수축성, 전기 생리학적 반응, 심박동수, 또는 본 명세서에서 기술되거나 당 업계에 공지된 다른 파라미터와 같은 파라미터에 대한 효과에 대하여 작용제를 확인하거나 또는 작용제를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0219] 일부 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 분석에서 소분자, 핵산 또는 이의 유사체, 앱타미; 세포에 대해 유해하거나 유익한 효과를 나타내는 다른 작용제 중에서 단백질 또는 폴리펩티드 또는 이의 유사체 또는 단편으로부터 선택되는 작용제를 스크리닝하기 위한 분석시에 사용될 수 있다. 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 제조되고 성숙된 심근세포가 심장 조직에 대한 약물의 효과를 재현하거나 모방할 수 있는 범위까지, 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 제조되고 성숙된 심근세포는 비심장 적응증에 유용한 다른 약물의 심장 부작용에 대응하는 작용제를 스크리닝하는데 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0220] 일부 실시형태에서, 작용제는 유기 금속 분자, 무기 분자, 유전자 서열 등을 포함할 수 있는 다수의 화합물 부류, 주로 유기 분자를 포함하는 공지된 화합물 및 미지의 화합물을 포함한 관심있는 작용제이다. 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 줄기세포-유래 심근세포의 사용의 중요한 양태는 독성 시험 등을 포함한 후보 약물을 평가하는 것이다. 후보 물질은 또한 구조적 상호 작용에 필요한 작용기, 특히 수소 결합을 포함하는 유기 분자를 포함하며, 전형적으로는 하나 이상의 그러한 화학적 작용기인 아민, 카보닐, 하이드록실 또는 카복실기를 포함한다. 후보 물질은 종종 하나 이상의 상기 작용기로 치환된 사이클릭 탄소 또는 헤테로사이클릭 구조 및/또는 방향족 또는 폴리방향족 구조를 포함한다. 후보 물질은 또한 웨პ티드, 폴리뉴클레오티드, 사카라이드, 지방산, 스테로이드, 퓨린, 퍼리미딘, 유도체, 구조적 유사물 또는 이들의 조합을 포함하는 생체 분자 중에서 발견된다.

[0221] 약리학적 활성 약물, 유전자 활성 분자 등이 또한 작용제로서 포함된다. 관심있는 화합물은, 예를 들면, 화학 요법제, 호르몬 또는 호르몬 길항제, 성장 인자 또는 재조합 성장 인자 및 이의 단편 및 변이체를 포함한다. 본 발명에 적합한 예시적인 약학 제제는 모두 본 명세서에서 참고로 포함된 문헌[참조: "The Pharmacological

Basis of Therapeutics," Goodman and Gilman, McGraw-Hill, New York, N.Y., (1996), Ninth edition, under the sections: Water, Salts and Ions; Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism; Drugs Affecting Gastrointestinal Function; Chemotherapy of Microbial Diseases; Chemotherapy of Neoplastic Diseases; Drugs Acting on Blood-Forming organs; Hormones and Hormone Antagonists; Vitamins, Dermatology; and Toxicology]에 기술되어 있는 것들이다. 또한, 독소, 및 생물학적 및 화학적 작용제도 포함된다. 예를 들면, 소마니, 에스. 엠(Somani, S. M.) (편집자)의 문헌[참조: "Chemical Warfare Agents", Academic Press, New York, 1992] 참조.

[0222] 후보 물질을 포함하는 화합물은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리를 포함하는 다양한 공급원으로부터 얻을 수 있다. 다양한 수단을 랜덤 올리고뉴클레오티드 및 올리고펩티드의 발현을 포함한, 생체 분자를 포함하는 광범위한 유기 화합물의 랜덤 합성 및 직접 합성에 이용할 수 있다. 대안적으로, 박테리아, 진균, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리가 이용 가능하거나 쉽게 생산된다. 또한, 천연 또는 합성 생산된 라이브러리 및 화합물이 통상적인 화학적, 물리적 및 생화학적 수단을 통해 쉽게 변형되고 조합 라이브러리를 생성하는데 사용될 수 있다. 공지된 약리학적 제제는 구조적 유사물을 생성하기 위해 아실화, 알킬화, 에스테르화, 아미드화 등과 같이 직접적으로 또는 랜덤하게 화학적으로 변형 처리될 수 있다.

[0223] 후보 물질은 상술된 모든 종류의 분자를 포함하며, 미지의 함량의 샘플을 추가로 포함할 수 있다. 식물과 같은 천연 공급원으로부터 유래된 천연 화합물의 복합 혼합물이 관심 대상이다. 많은 샘플이 용액 중에 화합물을 포함할 것이지만, 적합한 용매에 용해될 수 있는 고체 샘플이 또한 분석될 수 있다. 관심있는 샘플로는 환경 샘플, 예를 들면 지하수, 해수 등; 생물학적 샘플, 예를 들면 작물로부터 제조된 용해물, 조직 샘플 등; 제조 샘플, 예를 들면 의약품 제조 중의 시간 경과; 뿐만 아니라 분석을 위해 준비된 화합물의 라이브러리; 등을 포함한다.

[0224] 일부 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포의 정량 가능한 파라미터에 의해 결정되는 작용제의 효과는 수축력, 수축성, 변경된 수축, 수축 빈도, 수축 지속 시간, 수축 스템리너, 심근세포 크기, 근원섬유마디 조직, 길이, 구조, 대사성 호흡 능력, 산소 소비량, 및 전기 생리학적 및 생물 물리학적 파라미터를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 정량 가능한 파라미터는 줄기세포-유래 심근세포의 분화, 생존 및 재생을 포함한다.

[0225] 줄기세포-유래 심근세포를 포함하는 복수의 분석은 상이한 작용제 농도와 병렬로 진행되어 다양한 농도에 대한 차등 반응을 얻을 수 있다. 당 업계에 공지된 바와 같이, 작용제의 유효 농도를 결정하는 것은 전형적으로는 1:10 또는 다른 대수 범위로 희석된 농도를 생성하는 농도 범위를 사용한다. 경우에 따라, 농도는 2차로 희석시켜 추가로 정제할 수 있다. 전형적으로, 이들 농도 중의 하나는 음성 대조군, 즉 제로 농도 또는 작용제의 검출 수준 이하 또는 표현형에서 검출 가능한 변화를 제공하지 않는 작용제의 농도 이하로 제공한다.

[0226] 선택적으로, 스크리닝에 사용되는 줄기세포-유래 심근세포는 원하는 유전자 산물을 발현하도록 조작될 수 있다.

## 키트

[0228] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 기술되는 조성물은 키트로 제조될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 키트는 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 나노패턴화 기체, 갑상선 호르몬 T3 또는 그의 유사체, Let7i microRNA를 인코딩하는 백터 또는 Let7i miRNA를 포함하는 제제, 및 이를 위한 포장 재료를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 키트는 대사 활성 또는 동결될 수 있는 iPS 세포 또는 ES 세포 제제를 추가로 포함하며, 임의로 iPS 세포 또는 ES 세포 제제의 세포를 심근세포 표현형으로 분화시키기 위한 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 시약을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 나노패턴화된 기판 상에 예비 코팅되거나 부착된다.

[0229] 다른 실시형태에서, 키트는 세포 배양 배지 및 줄기세포-유래 심근세포로부터 성숙한 시험관내 분화된 심근세포를 제조할 수 있는 지침을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 키트는 조직 배양 배지에 첨가하기에 적합한 지방산 제제를 포함한다. 지방산 제제는, 예를 들면, 팔미테이트, 올레산, 리놀레산 또는 이들의 조합을 포함하는 제제를 포함할 수 있다.

[0230] 다른 실시형태에서, 키트는 대사 활성 또는 동결될 수 있는 줄기세포-유래 심근세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 키트 및/또는 그의 임의의 구성 요소는 주위온도 또는 실온, 또는, 예를 들면, 4°C에서 선적 및/또는 저장될 수 있다.

[0231] 일부 실시형태에서, iPS 세포, ES 세포 또는 줄기세포-유래 심근세포는 인간 세포, 설치류 세포, 개 세포 등이다. 일부 실시형태에서, 줄기세포-유래 심근세포는 근육 질환 또는 장애를 갖는 개체로부터 유래되거나, 예를

들면, 심장 질환 또는 장애를 포함한 근육 질환 또는 장애를 모방하도록 유전자 변형된다.

[0232] 실시예

[0233] 실시예 1: 조작된 발달하고 있는 니치는 인간 디스트로피성 심근병증에서 예측 표현형 스크리닝을 가능하게 한다

[0234] 심혈관 질환은 전세계 남성과 여성 모두에게 사망의 주요 원인으로 남아 있으며, 개발 도상국에 급속히 영향을 미치고 있다<sup>1</sup>. 유전성 심근병증(inherited cardiomyopathy)은 어린이와 젊은이, 그리고 건강한 성인을 포함한 모든 연령대에서 심장 질환의 주요 원인이다<sup>2</sup>. 인간 만능 줄기세포-유래 심근세포(hPSC-CMs)는 심근병증 연구를 위한 유망한 도구로, 이론적으로는 그들이 인간 심장에서 발견되는 이온 채널, 단백질 이소형, 유전자 및 대사 기구의 전체 어레이를 발현할 수 있는 인간 심근세포에 대한 접근성을 크게 증가시키기 때문이다<sup>3</sup>. 현재의 심장 질환 모델링에 대한 노력의 주요 목표는 보다 효과적인 치료 전략을 설계하기 위한 첫 단계로서 심근병증의 발병 및 진행에 대한 통찰력을 얻는 것이다. 그러나 유전성 심근병증이 있는 많은 환자는 청소년기 말기 또는 성인기 초기까지 심장병 증상을 나타내지 않는다<sup>2</sup>. 이는, 현재의 분화 프로토콜이 태아 심장의 세포와 가장 유사한 구조적, 기능적, 생화학적 특성을 가진 심근세포를 생성하기 때문에 hPSC-CM 질환 모델링의 가능성을 제한한다<sup>4</sup>.

[0235] 발달 성숙은 심장 질환 모델에서 hPSC-CMs에 대한 기술적 장애물을 나타낸다. 현재까지, 태아-유사 표현형을 나타내는 hPSC-CMs는 이온 채널 병증<sup>5-7</sup>, 대사 증후군<sup>8</sup>, 비대성 및 확장성 심근병증<sup>9,10</sup>, 뿐만 아니라 뒤시엔느 근육 디스트로피(DMD) 심근병증<sup>11,12</sup>과 같은 다른 지역-발병 심장 질환을 연구하는데 사용되어 왔다. 이러한 보고는 확실히 획기적이고 가치가 있는 반면<sup>13</sup>, 발견의 대부분은 불완전한 구조적 조직을 가진, 아직은 순수한 심근세포의 성능과 태아 및 성인 단백질 이소형 발현의 혼합에 기초하고 있다. hPSC-CMs의 발달을 가속화하는 방법을 개발하기 위하여 많은 노력을 기울여 왔다<sup>4,13</sup>. 이러한 전략이 hPSC-CM 개발의 특정 양태를 향상시키는데는 효과적인 것으로 입증되었지만, 단 하나의 방법이 발달하고 있는 심장 미세 환경 니치를 완전하게 재현할 가능성은 거의 없다. 시험관내에서 hPSC-CMs의 성숙을 가속화하기 위해 발달하고 있는 심장 니치를 보다 완전하게 모방하는 것을 목표로 하여 나노토크그래피 기재 단서, 갑상선 호르몬 T3 및 Let-7i miRNA 과발현을 포함하는 다면적이고 조합된 성숙(콤보매트(ComboMat)) 플랫폼이 만들어졌다. 완전히 발달된 심장 내에서의 적절한 구조-기능 관계와 hPSC-CMs에서의 형태학적 발달에 중요한 이방성 세포외 매트릭스 단서<sup>14</sup>도 또한 심장 발달 및 루팡 도중에 중요한 인자인 것으로 밝혀졌다<sup>15</sup>. 출생 직후 혈청 T3 수준의 스파이크를 시뮬레이션하는 갑상선 호르몬 처리는 hPSC-CMs에서의 힘 생산 및 칼슘 췌급을 개선하는 것으로 나타난 반면<sup>16</sup>, Let-7 miRNAs의 상향 조절은 hPSC-CMs에서 대사 발달을 향상시킨다<sup>17</sup>.

[0236] 시험관내 심장 조직 공학 적용을 위한 성숙한 심장 표현형의 유용성을 강조하기 위한 수단으로서, 디스트로피성 심근병증의 보다 성숙한 모델이 개발되었다. 뒤시엔느 근육 디스트로피(DMD) 및 베커 근육 디스트로피(BMD)와 같은 디스트로피성 심근병증은 돌연변이된 디스트로핀 유전자로부터 야기되는 X-연관 유전자 장애이다. 치료의 표준으로서의 지지 환기(supportive ventilation)의 출현으로 인하여 DMD 환자의 주요 사망 원인인 호흡 부전이 심장 합병증으로 대체되었다<sup>18</sup>. 그러나, *mdx* 마우스와 같은 디스트로피성 설치류 모델에서의 심근병증은 클리닉에서의 치료적 처리에 대한 환자의 반응에 대한 나쁜 예측인자인 것으로 입증되었다<sup>19,20</sup>. 실제로, 실험실에 대한 최근의 임상 시험은 *mdx* 마우스에서 심장 기능 장애를 완화시키는데 도움이 되었고<sup>21</sup>, DMD 환자의 심장 증상을 악화시켰으며, 따라서 조기에 종료시켜야만 했다<sup>20</sup>. 따라서, 디스트로피성 심근병증의 개선된 인간 모델에 대해 충족되지 않은 의학적 요구가 존재한다. 디스트로핀 돌연변이체 인간 심근세포가 건강한 대조군과 비교하였을 때 표현형 차이를 나타냈던 것으로 이전에 보고된 바 있지만, 이러한 차이는 경증이거나 저혈압 장애와 같은 외인성 급성 스트레스에 의해 유발되었다<sup>11,22</sup>. 린(Lin)<sup>12</sup> 등 및 영(Young) 등<sup>23</sup>에 의해 개발된 다른 디스트로핀 돌연변이체 모델은 DMD-특이적 질환 메커니즘 및 잠재적인 치료적 처리 옵션에 대한 귀중한 통찰을 제공하지만, 두 보고서 모두 태아-유사 hPSC-CMs에 기반한 것이었다. 특정 이론에 구속되지 않기 위해, 보다 성숙한 hPSC-CMs이 환자에게서 발견되는 디스트로피성 심근병증의 예측 모델을 개선할 것이라는 가설을 세웠다.

[0237]

이러한 가설을 시험하기 위해, 콤보매트 플랫폼을 CRISPR-생성된 디스트로핀 돌연변이체(DMD 263delG) hPSC-CMs에 적용하여 시험관내에서 성인-발병 심장 질환 표현형의 발현을 촉진시켰다. *DMD* 유전자에서 유사한 엑손 1 돌연변이를 가진 환자(도 7)는 절단된 디스트로핀 단백질을 발현하고 BMD 표현형과 함께 존재한다<sup>24</sup>. 조합을 사용하여 성숙되었을 때, *DMD* 돌연변이체 hPSC-CMs는 주문형 나노패턴화된 다중 전극 어레이(nanoMEA) 심장 스크리닝 플랫폼 상에서 훨씬 더 심한 부정맥 경향을 나타낸다. 발달하고 있는 심장 니치 단서 없이는, 건강한 동종 대조군 세포로부터 *DMD* 돌연변이체 hPSC-CMs의 기능적 프로파일을 구별할 수 없었다. 따라서, 콤보매트 플랫폼은 질환 모델링 및 약물 스크리닝 응용을 위해 보다 생리학적으로 관련된 hPSC-CMs을 생성하였다.

[0238]

#### 결과: 콤보매트-처리된 심근세포의 전사체 프로파일링

[0239]

생체 모방 나노패턴화된 형태(NP)<sup>14,15</sup>, 갑상선 호르몬 T3(T3)<sup>16</sup>, 및 Let7i miRNA 과발현(Let7i)<sup>17</sup>을 포함하는 3 가지의 별개의 단서의 조합 효과를 조사하여 콤보매트 플랫폼(도 1a에 개략적으로 도시됨)이라 불리는 단일 절차에 통합하였다. 3 가지의 성숙 단서의 상이한 조합에 노출된 hPSC-CMs의 전체 전사체를 보기 위해 RNA-seq를 수행하였다. 주요 성분 분석(도 1b)은 콤보매트 그룹(모두 세 가지 요소가 함께 결합됨)이 다른 모든 조건과 분리되어 있음을 나타내었다. 이어서, 심근세포 성숙의 7 가지 특징 경로로 이루어진 농축 열지도가 생성되었다(도 1c). 더 많은 성숙 조건이 서로의 위에 겹쳐짐에 따라, 심근세포는 점진적으로 더 성숙해지는 것으로 나타났다. 콤보매트 그룹은 6 가지 경로에서 상향-조절 및 세포주기 경로에서 하향-조절과 함께 가장 강건한 성숙을 보였다. 도 1D는 콤보매트와 대조군 (편평한 표면상의 빈 벡터 세포; EV-Flat) 그룹 사이의 *P*-값에 기초한 8 개의 상향 조절된 유전자 온톨로지(GO) 기간을 나타낸다. 글루코오스 대사 과정, 장쇄 지방산 도입 및 해당 과정과 같은 대사와 관련된 경로는 상향 조절되었다. 근육 조직 발달, 근육 수축 및 가로무늬근 세포 분화를 포함한 근육 과정과 관련된 GO 기간도 상향 조절되었다.

[0240]

PC1을 따라 콤보매트 및 대조군의 유전자 발현을 비교하기 위해 베블 플롯을 생성하였다(도 1e). 성인 대 태아 및 콤보매트 대 대조군 모두에서 유의하게 더 높은 53 개의 유전자와 유의하게 더 낮은 13개의 유전자가 발견되었다. 콤보매트 그룹에서 PC1을 따라 가장 상향 조절된 유전자는 갑상선 호르몬 코레프레서인 모발 성장 관련 유전자(HR)이었다. 전사 인자인 크루펠-유사 인자(KLF9)도 또한 유의하게 상향 조절되었다. KLF9는 지방산 대사에서 중요한 유전자인 PPAR-감마( $\gamma$ ) 프로모터에 결합하는 것으로 보고되었다<sup>25</sup>. 심장 대사와 관련된 또 다른 유전자인 사이토크롬 c 옥시다제 서브 유닛 6A2(COX6A2)도 또한 콤보매트 그룹에서 상향 조절되었다. 또한, 심실 이소형 및 심근세포 성숙의 특징인 미오신 경쇄 2(MYL2)가 상향 조절되었다. 베블 플롯은 도 1e에서 강조된 동일한 유전자와 비교하였을 때 인간 태아 및 성인 심근세포 유전자 발현(도 1f)을 나타낸다. 콤보매트 그룹에서 고도로 상향 조절된 유전자는 또한 태아 대조군과 비교하였을 때 성인 심근세포에서 상향 조절된다.

[0241]

#### 콤보매트-처리된 심근세포의 구조적 성숙

[0242]

이러한 연구 및 모든 후속 기능 분석을 위해, 전체 콤보매트 플랫폼(Let7i + NP + T3)을 바이러스 벡터 대조군(EV + Flat + No T3) 및 각각의 성숙 단서와 분리하여 비교하였다: NP (EV + NP + No T3), T3 (EV + Flat + T3) 및 Let7i (Let7i + Flat + No T3). 면역 형광 이미징(도 2a)은, NPs상에서 배양된 hPSC-CMs이 나노토포그래피 방향으로 연장되었고 보다 이방성인 막대형 형태를 나타내었다는 것을 확인하였다. 근원섬유마디는 NPs 상에서 더 높은 수준의 방향성과 순서로 발달하여 더 많은 근원섬유마디가 서로 레지스터에서 생성되었다(도 2b). 대조군과 비교하였을 때, 단지 T3 또는 Let7i에 노출된 hPSC-CMs는 유의하게 더 컸지만(도 2f) 둑글거나 불규칙한 형태를 형성하였다. 콤보매트 플랫폼에서 3 개의 모든 단서에 노출된 경우, hPSC-CMs는 막대 모양이 되었고 각각의 단서를 분리한 것보다 더 컸다(도 2f, \*p < 0.05). 콤보매트 플랫폼에 노출된 hPSC-CMs도 또한 대조군에서 확인된 원주 밴딩과는 대조적으로 세포의 길이를 따라 반복적인 근원섬유마디 밴딩 패턴을 보여주었으며, 약 1.8 마이크로미터( $\mu\text{m}$ ) ± 0.012 마이크로미터( $\mu\text{m}$ )의 더 긴 안정한 근원섬유마디 길이를 가졌다(도 2c, \*p < 0.05). 콤보매트 그룹의 hPSC-CMs도 또한 높은 이핵화 백분율을 나타내었다(도 2e, \*p < 0.05).

[0243]

hPSC-CMs의 초미세 구조는 투과 전자 현미경(TEM)을 통해 조사되었다. 대조군 조건에 노출된 hPSC-CMs는 저밀도의 무질서한 근섬유 및 단지 반점 형태의 Z-바디 형성을 나타낸 것으로 관찰되었다(도 2b). NPs, T3, 또는 Let7i의 적용은 개별적으로 보다 체계적이고 더 넓은 Z-밴드의 발달을 개선하였지만(도 2d), 전체 근원섬유마디는 다소 조직화되지 않고 여전히 밀도가 낮았다. 이와 대조적으로, 콤보매트 플랫폼으로 배양된 hPSC-CMs는 Z-밴드 및 H-영역의 출현과 함께 훨씬 더 질서가 있는 근원섬유마디를 발달시켰다(도 2b). 근섬유 번들링의 지표인 세포내의 Z-밴드 폭도 또한 대조군 또는 각각의 단서를 분리한 경우보다 콤보매트 그룹에서 유의하게 더 컸다.

[0244] 콤보매트-처리된 심근세포의 전기 기계적 성숙 및 대사적 성숙

[0245] 콤보매트 플랫폼에 의해 부여된 유전적 및 구조적 변화가 hPSC-CMs의 향상된 기능적 성능으로 나타나는지를 시험하기 위해, 2 가지의 비침입성 측정법을 이용하여 전자 기계적 기능을 결정하였다. 상관-기반 수축 정량화 방법(CCQ)<sup>22</sup>을 사용하여 hPSC-CM 단층의 수축을 측정하고 1Hz에서 속도를 유지하고 초당 30 프레임으로 촬영하였다. 이들 수축 벡터를 공간적으로 함께 평균화함으로써, 대조군, NP, T3, Let7i 및 콤보매트 조건에 대해 최대 수축 및 이완 속도를 측정(도 3a에서 적색 및 청색 마크로 표시됨)하였고, 콤보매트 플랫폼에 노출된 세포는 대조군 또는 임의의 성숙 단서를 분리하여 비교하였을 때 유의하게 더 빠르게 수축되었음을 확인하였다(도 3b). 이의 설명을 돋기 위해, 수축하는 동안 변위 각도를 조사한 결과 NP 상에서 배양된 hPSC-CMs이 편평한 기재 상에서 배양된 세포보다 더 균일한 방향으로 수축한다는 것을 발견하였다(도 3c). 이러한 바람직한 방향성을 정량화하기 위해, 수축 이방성 비(AR)를 측정하였고, 콤보매트 플랫폼에서와 같은 NP 상의 세포가 수직 방향보다는 하단의 나노토포그래피와 평행한 방향으로 2배 이상 큰 수축 크기를 갖는다는 것을 결정하였다. (콤보매트 AR = 2.39 ± 0.01) (도 3d). 이는 수축이 무작위로 배향되고 모든 방향에서 유사한 크기를 나타내는 전통적인 편평한 기질에서 성장한 세포와 대조적이었다(대조군 AR = 1.04 ± 0.02).

[0246] 수축 역학에 더하여,マイ크로 전극 어레이(MEAs)를 사용하여 심근세포 전기 활성을 측정하였다. NP 및 콤보매트 조건에서 hPSC-CM 정렬을 용이하게 하는 동시에 하부 전극으로부터의 고해상도 전기 생리학적 데이터 캡처를 가능하게 하기 위해 이온 투과성 수지인 나피온(Nafion)을 사용하여 MEAs(nanoMEAs) 상에 나노토포그래피 표면을 생성시켰다. 도 3e는 대조군 및 콤보매트 배양물로부터 시간적으로 평균화된 전계 전위 기록을 나타낸다. 심장 단층의 자발적인 전기 활성을 측정한 결과, 콤보매트 플랫폼에 노출된 hPSC-CMs는 대조군, NP 및 T3 그룹보다 전계 전위 지속 시간이 유의하게 길다는 것을 발견하였다(도 3f). 또한, 콤보매트 플랫폼은 대조군 또는 각각의 성숙 단서와 분리하여 비교하였을 때 심근세포의 심박동수를 유의하게 늦추었다(도 3g). 콤보매트 플랫폼에 노출된 hPSC-CMs도 또한 패치 클램프를 통해 측정했을 때 더 빠른 상행각 속도를 나타내었다(도 8).

[0247] RNA-seq 분석은 콤보매트 플랫폼에 의해 부여된 심장 대사에 의미있는 변화를 제안하였다. 따라서, 외인성 지방산을 이용하는 심근세포의 능력을 해마 미토콘드리아 플러스 분석기(Seahorse mitochondrial flux analyzer)에서 "팔미테이트 분석"을 통해 탐색되었다(도 3h). 콤보매트 플랫폼에 노출된 hPSC-CMs는 200 μM 내지 400 μM 사이의 팔미테이트 농도에서 측정된 산소 소비율(OCR)에서 유의하게 더 큰 최대 변화를 나타낸 것으로 관찰되었다(도 3i). 최대 호흡 능력도 또한 대조군에 비해 콤보매트 그룹에서 유의하게 더 컸다(도 9).

[0248] 콤보매트 처리된 디스트로핀 돌연변이체 hPSC-CMs는 질환 표현형을 나타낸다.

[0249] 먼저, *DMD* 돌연변이체 hPSC-CMs이 그들의 정상 (UC3-4) 동종 대응물로서 콤보매트 플랫폼과 유사한 방식으로 반응하였는지를 시험하였다. 해마 미토스트레스 분석(Seahorse MitoStress assay)을 이용하여(도 4a), *DMD* 돌연변이체 hiPSC-CMs가 대조군 조건과 비교하였을 때 콤보매트 플랫폼에서 배양하였을 때 최대 호흡 능력이 증가하였다는 것을 관찰하였다(도 4b). 그러나, 대조군 또는 콤보매트 조건 내에서, 정상 및 *DMD* 돌연변이체 그룹 사이에는 통계적 차이가 전혀 없었다. 주문형 nanoMEA 플랫폼을 사용하여 *DMD* 돌연변이체 세포의 기준 전기 생리학적 특성을 측정하였다. *DMD* 돌연변이체 hiPSC-CMs의 심박동수는 콤보매트 플랫폼에 반응하여 정상 hiPSC-CMs와 동일한 범위까지 감소하였다(도 4c). 또한, *DMD* 돌연변이체 hiPSC-CMs의 전계 전위 지속 시간(FPD)은 대조군과 비교하여 콤보매트에 노출되었을 때 정상 hiPSC-CMs로 이루어진 미러링 관찰에서 증가하였다(도 4d). 구조적인 관점에서, *DMD* 돌연변이체 hiPSC-CMs는 콤보매트 플랫폼에 노출되었을 때 레지스터내 근원섬유마디를 가진 특징적인 장방형 형태로 발달한 반면, 대조군 조건에 노출된 *DMD* 돌연변이체 hiPSC-CMs는 더 불규칙한 근원섬유마디를 가진 더 둥근 형태로 발달하였다(그림 4e).

[0250] 특정 이론에 구속되지 않고서, 비대 및 전 심근세포 성숙을 유도함으로써, 디스트로피성 hPSC-CMs이 더 큰 기계적 스트레스 및 세포 손상을 받게 되고, 불규칙한 기능적 활성을 초래하여 미성숙 세포에는 존재하지 않을 것이라는 가설을 세웠다. NanoMEA 플랫폼을 사용하여 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출된 정상 및 *DMD* 돌연변이체 hPSC-CMs의 동질 유전자 쌍의 자발 박동성 단층(spontaneously beating monolayer)의 전기 활성을 기록하였다. 심박동수 변동성에 의존하는 부정맥 검출 방법을 사용하여<sup>26</sup>, 콤보매트 플랫폼에 노출된 *DMD* 돌연변이체 hPSC-CMs은 대조군 조건에서 덜 성숙한 *DMD* 돌연변이체 hPSC-CMs보다 현저하게 더 부정맥성인 것으로 관찰되었다. 도 5a는 개별 박동 간격이 주석 처리된 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출 된 *DMD* 돌연변이체 hPSC-CMs의 대표적인 전계 전위 트레이스를 나타낸다. 하나의 박동에서 다음 박동까지의 박동 간격의 시간차(ΔBI)를 측정하고, 30개의 연속 박동에 대한 이러한 변화를 플로팅(도 5b)한 결과, 성숙된 *DMD* 돌연변이체 hPSC-CMs가 심박동수에 있어

서 현저한 불안정성을 갖는다는 것을 발견하였다.  $\Delta BI > 250$  ms을 가진 박동의 백분율(도 5c) 및 30 회의 연속 박동에 대한  $\Delta BI$ 의 산술 평균(도 5d)을 측정한 결과, 더 부정맥성인 상태를 나타내는 박동 간격의 비교적 큰 변화가 관찰되었다. 시험관내에서 자율 신경계 없이, hPSC-CMs는 박동마다 큰 변동없이 일정한 박동 패턴을 발달시켜야 한다. 이 일정한 거동은 정상 및 DMD 심근세포 둘 다에 대한 대조군 조건뿐만 아니라 건강한 성숙 정상 세포에서 명백하다(도 5b). 중요하게, 정상 및 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs 사이의 기능적 차이를 관찰하기 위해서는 완전한 콤보매트 플랫폼이 필요한 것으로 관찰되었다. 성숙 단서가 분리되어 적용될 때, 건강한 정상 세포와 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs 사이는 전혀 구분되지 않는다(도 10).

[0251] 이러한 심박동수 변동에 대한 잠재적 메커니즘을 확인하기 위해, 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 계산하도록 보정된 IonOptix 이미징 셋업 장치 상에서 비율 계량용  $Ca^{2+}$  인디케이터 Fura-2를 사용하여 세포내 칼슘( $Ca^{2+}$ )을 측정하였다. 도 5e는 대조군 또는 콤보매트 조건에 노출된 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs로부터의 대표적인  $Ca^{2+}$  트레이스를 도시한다. 성숙 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs는 대조군에서 덜 성숙된 세포와 비교하였을 때 상승된 기준선 또는 이 완기의 안정한  $Ca^{2+}$  농도를 갖는 것으로 밝혀졌다. 이러한 이완기  $Ca^{2+}$  농도를 정량화한 결과, 전술한 바와 같이 전기적 불안정성과 유사한 경향이 관찰되었다. 대조군의 정상 및 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs는 서로 통계적으로 다르지 않은 사이토졸성  $Ca^{2+}$  농도를 가졌다(도 5f). 그러나, 콤보매트 플랫폼을 사용하여 성숙된 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs는 정상 hPSC-CMs에 비해 증가된 사이토졸성  $Ca^{2+}$  농도를 갖는다.

#### [0252] 성숙한 hPSC-CMs를 사용한 표현형 약물 스크리닝

[0253] 보다 상세한 표현형 약물 스크리닝을 위한 잠재적인 약물 표적 또는 약물 부류를 동정하기 위해, 예비 배지 처리량을 가진 반자동 스크리닝을 다양한 작용 메커니즘을 가진 2,000개의 다양한 분자의 작은 라이브러리로 수행하였다. 세포내 ATP(고 처리량 스크리닝에서 널리 사용되는 세포 생존율의 분석)를 저긴장성 스트레스 후에 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에서 측정하였다. 분석의 Z-프라임 전체는 0.71이었다. 8,000개의 데이터 포인트(4 가지 농도에서 2,000 가지의 화합물)를 Z-스코어를 기준으로 순위를 정하고 플로팅하였다(도 6a). Z-스코어 순위(>3), 반복 실험의 표준 편차 및 증가 용량-범위 반응을 고려하여, 2000 가지의 유입 화합물에서 39개의 히트(hit)(~2% 히트율(hit rate))가 확인되었다(표 2). 이들 중에서 9개(~ 23%)는  $Ca^{2+}$  채널 차단제로 분류되었다.

#### 표 2

표 2: 1차 스크리닝 히트

화합물	평균 생존율 %	Z 스코어	작용 메커니즘
아세프로마진 말레이트	239.1±38.37	6.57	진정
아시클로버	258.33±14.16	7.44	항바이러스성
아크로미드	276.60±12.37	8.26	항원생동물성, 항콕시듐증
알트레타민	188.22±2.87	4.27	항종양성
아미노히푸르산	207.49±7.09	5.14	신장 기능 진단
아미오다론 하이드로클로라이드	168.14±8.45	3.37	아드레날린 작용제, 관상혈관확장제, $Ca^{2+}$ 채널 차단제
안티마이신 A	180.04±1.89	3.90	항진균성, 항바이러스성, 사이토크롬 산화 억제제
아스코르브산	181.48±23.68	3.97	피혈병 치료, 항바이러스성
아테놀올	171.27±1.77	3.51	베타 아드레날린 차단제
벤즈알코늄 클로라이드	194.64±23.10	4.56	항감염성(국소용)
베프리딜 하이드로클로라이드	178.65±3.48	3.84	부정맥 치료제
바이오텐	315.95±51.89	10.04	비타민 B 복합체
칸타리딘	239.59±14.65	6.59	수포작용제 (테르페노이드)
세프디니르	185.70±45.76	4.16	항균성
클로르사이클리진 하이드로클로라이드	238.84±35.23	6.56	H1-항히스타민
신코펜	168.44±44.63	3.38	진통제, 해열제, 항염증
클로피도글 살페이트	194.84±50.3	4.57	혈소판응집 억제제
코르티손 아세테이트	205.92±12.32	5.07	글루코코티코이드
코티닌	188.79±56.0	4.30	항우울제
크로타미톤	178.25±27.22	3.82	항소양제, 살개선제
디카바진	177.63±45.35	3.79	항종양성

독소루비신	207.98±34.29	5.16	항종양성
에스트로피테이트	208.65±30.77	5.19	에스트로겐
기톡시게닌 디아세테이트	177.20±1.17	3.77	강심 배당체
할로페리돌	197.30±19.03	4.68	항이상운동, 항정신성
하이드록시우레아	187.65±49.61	4.25	항종양성, 리보뉴클레오시드 다이포스파이트 환원 효소 억제제
메브하이드롤린 나프탈렌설포네이트	172.81±39.86	3.58	H1 항히스타민제
나프록솔	168.76±2.61	3.39	항염증, 진통제, 해열제
니코티닐 알콜 타르트레이트	262.12±57.89	7.61	헬관화장제
니모디핀	292.38±56.17	8.97	칼슘 채널 차단제, 혈관화장제
니트렌디핀	275.48±52.16	8.21	칼슘 채널 차단제, 혈관화장제
옥시펜부타준	176.96±42.53	3.76	항염증
포도필록스	168.46±28.98	3.38	항종양성, 미세관 부속장치, 및 인간 DNA 국소이성화효소 II 억제; 항유사분열제
프로글루미드	175.69±50.35	3.71	항콜린제
퓨로마이신 하이드로클로라이드	187.84±39.68	4.25	항종양성, 항원생동물성
렌티닐 팔리테이트	236.79±46.63	6.46	프로비타민, 안구건조증 치료제
셀라메틴	172.91±25.29	3.58	항기생충성, 항진드기
설파독신	195.32±23.52	4.59	항균성
테르페나딘	211.28±22.46	5.31	H1 항히스타민, 졸음 방지,
틸로론	172.53±15.79	3.56	항바이러스성

[0255] 이러한 예비 약물 스크리닝 데이터를 세포내  $Ca^{2+}$  함량 상승 결과와 통합하고(도 5f), nanoMEA 플랫폼을 사용하여 디하이드로페리딘  $Ca^{2+}$  채널 차단제인 니트렌디핀(도 6a에서 과란색 상자로 강조 표시)이 성숙한 DMD 돌연변이체 hiPSC-CMs의 부정맥성 거동을 감소시킬 수 있었는지의 여부를 테스트하였다. 이전에 DMD 환자<sup>20</sup>에게 도움이 되지 않는 것으로 입증되었던 실데나필에 대해서도 또한 시험하였다. 초기 시점(콤보매트 노출 4일째)에서 조차도 성숙한 정상 hPSC-CMs와 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs 사이의 기준 심박동수 변동율에 유의한 차이가 있었던 반면, 미성숙 세포는 서로 구별할 수 없었다(도 6a).

[0256] 세포를 7일 동안 다양한 농도의 니트렌디핀 또는 실데나필 시트레이트에 노출시키고, 그들의 심박동수 변동율을 측정하였다. 도 6c 및 도 6d는 니트렌디핀 및 실데나필 각각에 대한 용량-반응 곡선을 나타낸다. 니트렌디핀은 DMSO 운반체 대조군과 비교하였을 때 성숙한 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에서 평균  $\Delta BI$ 를 유의하게 감소시켰다. 1  $\mu M$  이하의 니트렌디핀 용량으로 생리학적으로 유의미한 범위(<50ms) 내의 수준으로 심박동수 변동율을 회복시켰다. 그러나, 더 많은 용량은 자발적인 박동을 중지시켰다. 이와 대조적으로, 실데나필은 용량과 무관하게 심박동수 변동율에 영향을 미치지 않았다. 니트렌디핀 또는 실데나필은 대조군 조건에 노출된 세포 또는 콤보매트 플랫폼에 노출된 정상 hPSC-CMs에 대한 심박동수 변동율에 유의한 영향을 미치지 않았다. 니트렌디핀의 이점은 세포 배양 배지에서 제거된 경우 48 시간 이내에 사라졌다(도 6e).  $Ca^{2+}$  이미징은 100 nM 니트렌디핀이 DMSO 대조군과 비교하였을 때 성숙한 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에서 이완기  $Ca^{2+}$  함량을 감소시켰음을 나타내었다(도 6f 및 도 6g). 니트렌디핀은 대조군 조건에 노출된 세포에서 이완기  $Ca^{2+}$  함량에 영향을 미치지 않았다(도 6g).

## 2.5. 논의

[0257] 콤보매트 플랫폼은 시험관 내에서 심근세포 발달을 조절하고, 세포 면적을 증가시키고, 더 긴 안정한 근원섬유 마디 길이를 생성하고, 보다 생리학적으로 유의미한 이핵화 백분율을 달성하는 강력한 도구인 것으로 입증되었다. 콤보매트 플랫폼에서 관찰된 많은 기능적 향상은 RNAseq 분석으로 예측되었다. 콤보매트 그룹에서 근육 발달 및 수축에 대한 GO 기간이 상향 조정되어 CCQ 수축 매핑에 의해 측정된 바와 같이 수축 운동 속도가 더 빨라졌다. 지방산 도입과 같은 대사성 GO 기간도 또한 콤보매트 그룹에서 상향 조절되었으며, 그 후에 콤보매트 그룹에 노출된 세포는 더 큰 최대 호흡 능력 및 외인성 지방산을 이용할 수 있는 능력을 갖는 것으로 관찰되었다. 따라서, 본 명세서에서 제공되는 방법의 검증을 제공하는 콤보매트 플랫폼에 의해 부여된 전사 및 기능적 변화 사이에 일치가 있었다.

[0258] 본 명세서에서 기재되는 방법의 중요한 양태는 성공적인 표현형 약물 스크리닝 플랫폼의 개발이다. 콤보매트 플

랫폼과 같은 방법은 nanomea 전기 생리학적 스크리닝 시스템과 함께 새로운 화합물의 고처리량 스크리닝을 위해 확장될 수 있다. 비침입성 측정은 세포 기능을 종방향으로 모니터링하기 위해 사용될 수 있으며, 질병 표현형의 강한 계증화는 약물 치료가 기능의 회복과 상관 관계가 있는 경우 건강한 대조군과 쉽게 비교할 수 있다. 중요한  $Ca^{2+}$  채널 차단제는 스크리닝에서 검증되었으며, mdx 마우스 모델 연구에서 잘못된 양성 약물 히트를 제외할 수 있었다<sup>20</sup>.

[0260] 디스트로피성 심근병증의 이전의 hPSC-CM 모델은 측정 가능한 질환 표현형을 이끌어 내기 위한 저긴장성 도전에 크게 의존하여 왔다<sup>11,23</sup>. 효과는 있지만, 저긴장성 도전은 생리학적으로 정확하지 않으며, 일시적인 조치일뿐이다. 따라서, 콤보매트 플랫폼으로 DMD 돌연변이체 hPSC-CMs을 성숙시키면, 세포는 부분적으로는 칼슘 과부하로 인한 심박동수 변동성을 제공한다. 반응성 산소 종(ROS) 및 미토콘드리아성 아폽토시스 단서 전달 경로를 통한 세포 손상의 매개에 관여하는 외에도,  $Ca^{2+}$  과부하는 오랫동안 심장 부정맥을 매개하는 것으로 알려져 왔으며<sup>28</sup>, 시험관내 및 생체내 모두에서 DMD 병리생리학의 원동력이 되어 왔다<sup>29</sup>. 따라서, DMD 돌연변이체 hPSC-CMs에서 성숙-의존성 질환 표현형은 환자에게서 발견된 초기 질환 표현형을 재현하는 것으로 입증되었다. 이는 이전의 DMD 질환 모델과의 중요한 차이점이며 심장 질환 모델링 분야에서 타당한 진행임을 나타낸다. 웬(Wen) 등은 또한 질환 표현형을 유발하기 위해 부정맥유발성 우심실 형성이상증의 hPSC-CM 모델에서 성숙의 필요성을 보고 하였으며<sup>30</sup>, 티버시(Tiburcy) 등은 만성 카테콜아민 자극을 통한 성숙이 심부전을 모델링하는 그들의 능력을 향상시켰다는 것을 입증하였다<sup>31</sup>. 이러한 발견에 기초하여, 다른 심근병증은 본 명세서에서 기술되는 방법 및 조성물을 사용하여 표준 지향성 분화 방법의 전형적인 테아 단계를 넘어 성숙된 hPSC-CMs을 사용함으로써 정확하게 모델링될 수 있다.

[0261] DMD 환자가 이완기 기능 장애 및 부정맥을 나타내는 것으로 알려져 있지만, 이러한 질환 표현형의 병인은 완전히 이해되지 않았다<sup>18</sup>.  $Ca^{2+}$  과부하는 디스트로피성 심근병증의 병태 생리학에서 중심적인 역할을 하는 것으로 오랫동안 추정되어 왔다<sup>28</sup>. 세포막 및 근소포체 상의 누출된  $Ca^{2+}$  채널, 비정상적인 NO 단서 전달 및 근섬유막의 인열은 모두  $Ca^{2+}$ 를 세포로 유입되는 수단으로서 제안되어 왔지만 합의되지는 않았다. 증가된  $Ca^{2+}$  수준으로 인한 내인성 전기 생리학적 질환 표현형을 갖는 본 발명의 모델은 이러한 의문 중의 일부를 해결하기 위한 유용한 도구인 것으로 입증되었다. 종합하면, 본 발명의 데이터는 심장 성숙이 DMD 심근병증과 같은 성인 발병 질환을 정확하게 모델링하는데 중요한 요소이며, 콤보매트 플랫폼이 보다 성숙한 hPSC-CMs 생성에 필수적이라는 것을 나타낸다. 또한, 잠재적인 치료 목표를 효과적으로 스크리닝하기 위해 nanomea 플랫폼이 함께 사용될 수 있다.

## 0262] 실시예 2: 방법

### 0263] 실험군

[0264] RNaseq는 NPs, T3 및 Let7i의 3 가지 성숙 단서의 모든 상이한 조합에 노출 된 세포 상에서 수행되었다. 바이러스 노출을 위해 빈 벡터(empty vector)(EV) 음성 대조군을 포함시켰다. 다른 모든 분석법에 대해, 완전한 콤보매트 플랫폼(Let7i+NP+T3)을 바이러스 벡터 대조군(EV+Flat+No T3) 및 각각의 성숙 단서와 분리하여 비교하였다: NP (EV+NP+No T3), T3 (EV+Flat+T3), 및 Let7i (Let7i+Flat+No T3). 콤보매트 플랫폼은 배양 기간 동안 특정 시점에서 나노토포그래피 기재 단서, 갑상선 호르몬 T3 및 Let-7i microRNA(miR) 과발현을 이용하여 hPSC-CMs의 향상된 구조적 및 표현형 발달을 유도한다. 각각의 단서는 hPSC-CM 발달의 특정 측면에 영향을 주기 위해 선택되었다. 나노토포그래피 기재 단서는 일차적 및 hPSC-CMs의 구조적 성숙을 촉진하는 것으로 나타났다<sup>14,32</sup>. 그러나, 이러한 생물 물리학적 단서는 hPSC-CMs의 대사 발달에 최소한의 영향을 미친다. 따라서, 갑상선 호르몬 T3를 생화학적 단서로 도입하여 hPSC-CMs의 대사, 칼슘 취급, 및 수축 성능을 향상시켰다<sup>16</sup>. 그러나, 예비 결과는 장기간의 T3 노출이 갑상선 기능 항진증으로 인한 합병증을 연상시키는 근원섬유마디 발달 및 심박동수 변동성에 부정적인 영향을 미친다는 것을 발견하였다(도 11). 이러한 유해한 영향에 대응하기 위해, Let7 패밀리와 같은 miRs를 사용하여 전사체를 조작하였다. Let7i는 신진 대사 능력, 비대 및 유전자 프로필을 향상시키는 동시에<sup>17</sup>, 갑상선 호르몬 수용체를 포함한 많은 핵 수용체의 전사 보조 억제제로서 작용하는 모발 성장 관련 유전자의 발현을 조절하는데 도움을 준다.

### 0265] hiPS 세포주 생성 및 유지

[0266] 정상 소변-유래 인간 유도성 만능 줄기세포(hiPSC)는 전술된 바와 같이 IRB-승인 프로토콜로부터 얻었다<sup>11</sup>. 간략하게, 인간 Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc<sup>33</sup>을 인코딩하는 폴리시스트론성 렌티바이러스 벡터를 사용하여 클린-캐치 소변 샘플로부터 수집된 세포를 iPSCs<sup>11</sup>로 리프로그래밍하였다. 유도체 hiPSC 세포주(UC3-4)는 핵형화되었고 정상 46,XY 핵형인 것으로 나타났다. hiPSC를 매트리겔(Matrigel)-코팅된 조직 배양 플라스틱상에서 배양하고, mTeSR 배양 배지(StemCell Technologies)를 공급한 다음, 1.9 U/mL 디스파제(ThermoFisher)를 사용하여 계대시켰다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 5% O<sub>2</sub>에서 저산소 조건에서 세포를 배양 하였다. 정상 모계 세포주 UC3-4로부터 동질 쌍을 생성하기 위하여 CRISPR-Cas9 기술을 사용하여 DMD 돌연변이체 hiPSCs(UC1015-6)를 생성시켰다. 간략하게, 인간 디스트로핀의 제 1 근육 특이 엑손을 표적으로 하는 가이드 서열을 사용하여 디스트로핀 유전자의 263번 위치에서 단일 G 염기를 결실시켜 돌연변이 대립 유전자를 생성시켰다(도 7). 디스트로핀 유전자의 돌연변이는 시퀀싱을 통해 확인되었다. DMD 돌연변이체 hiPSC를 정상 UC3-4 모계와 동일한 방식으로 유지시켰다.

#### [0267] 심장 지향적 분화 및 세포 배양

[0268] 단층-기반 지향적 분화 프로토콜은 전술한 바와 같이 사용되었다<sup>22</sup>. hiPSCs를 베르센(Versene)(ThermoFisher)을 사용하여 단일 세포로 해리시키고, mTeSR 중 고밀도(250,000 세포/cm<sup>2</sup>)에서 매트리겔-코팅된 플레이트 상에 풀레이팅하였다. 단층이 형성되었을 때, 세포를 B27 마이너스 인슐린(RPMI/B27/Ins-)이 보충된 RPMI 1640(ThermoFisher)에서 100nM 액틴-A(R&D Systems)로 유도될 때까지 mTeSR에서 1 μM 치론(Chiron) 99021(Stemgent)로 처리한 다음, 0일 째에 노목식 상태(normoxic condition)(37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 주변 O<sub>2</sub>)로 전환시켰다. 18시간 후, 세포에 RPMI/B27/Ins- 배지에서 5 ng/mL BMP4(R&D Systems) 및 1 μM 치론 99021을 공급하였다. 유도 3일 후, 세포에 RPMI/B27/Ins- 배지에서 1 μM Xav 939(Tocris)를 공급하였다. 유도 5일 후, 세포에 새로운 RPMI/B27/Ins- 배지를 공급하였다. 유도 7일 후, 세포를 인슐린을 함유하는 RPMI-B27 배지로 전환하고, 배지(RPMI/B27/Ins<sup>+</sup>)를 격일마다 다시 채웠다. T3 처리 군의 경우, 20 ng/ml T3을 RPMI/B27/Ins<sup>+</sup>에 새로 첨가하였다.

#### [0269] Let7i miRNA의 렌티바이러스 형질 도입 및 심근세포의 정제

[0270] Let7i 과발현(OE) 구성물의 생성에 대한 자세한 설명은 커프사미(Kuppusamy) 등의 문헌<sup>17</sup>에서 확인할 수 있다. Let7i에 대한 대조군 벡터는 U6 프로모터 하에서 eGFP 발현 pLKO.1 TRC 벡터(Addgene)였다. eGFP 구성물을 pLKO.1 TRC 벡터의 AgeI 및 EcoRI 부위 사이에서 클로닝하였다. 렌티바이러스 입자를 생성하기 위해, 형질 감염 하루 전에 293FT 세포를 플레이팅하였다. 형질 감염 당일, 293FT 세포를 psPAX2(Addgene # 12260), pMD2.G(Addgene # 12259), 벡터 및 폴리에틸렌이민(PEI)으로 함께 형질 감염시켰다. 24시간 후에 배지를 교체한 다음, 24시간 및 48시간 후에 렌티바이러스 입자를 채취하였다. 렌티바이러스 입자를 PEG-it 바이러스 침전 용액(5x)(System Biosciences)을 사용하여 농축시켰다.

[0271] 유도 15일 후에, hiPSC-CMs의 박동 단층을 37°C에서 1시간 동안 칼슘 및 10 U/mL DNase를 함유하는 DPBS에서 10 U/mL 콜라제나제 타입 I로 해리시켰다. 이어서, 세포를 수집하고, 회전시키고, 10 U/mL DNase를 함유하는 TrypLE(ThermoFisher) 중에 5분 동안 재현탁시켰다. P1000 마이크로피펫을 사용하여 단일 세포가 얻어질 때까지 TrypLE 중에서 hiPSC-CMs의 덩어리를 분쇄하였다. 이어서, 세포를 100,000 세포/cm<sup>2</sup>에서 매트리겔-코팅된 상에 풀레이팅하였다. 다음날, 세포의 바이러스 형질 도입을 밤새 RPMI/B27/Ins<sup>+</sup> 배지 중에서 헥사디메트린 브로마이드(폴리브렌(Polybrene), 6 μg/ml)의 존재하에 바이러스를 희석하여 수행하였다. 다음날, 세포를 PBS로 세척한 다음, RPMI/B27/Ins<sup>+</sup>를 교체하였다.

[0272] 이어서, 심근세포를 글루코스, 나이트륨 피루베이트, 또는 2% 말 혈청 및 4 mM 락테이트를 함유하는 글루타민(ThermoFisher) 없이 세포 DMEM에 배지 교환없이 3일 동안 공급함으로써 대사 챠린지<sup>34</sup>를 통해 정제하였다. 고순도 샘플을 확인하기 위해 심장 순도에 대한 유세포 분석을 수행하였다(도 12). 그 후, hiPSC-CMs를 2 μg/mL 퓨로마이신 디하이드로클로라이드를 함유하는 RPMI/B27/Ins<sup>+</sup> 배지로 3일 동안 다시 전환시켜 성공적으로 형질 도입된 hiPSC-CMs을 선택하였다.

#### [0273] 나노 패턴화된 기재 및 nanoMEA의 제작

[0274] 나노패턴화된 기판은 전술한 바와 같이 모세관력 리소그래피를 통해 제작되었다<sup>35</sup>. 의도된 나노 지형학적 형상

(800nm 폭의 럿지 및 그루브, 600nm 깊이)을 가진 딥-이온 에칭 실리콘 마스터 상에 액체 PUA 예비중합체를 적하 분배한 다음, 그의 상부에 투명한 폴리에스테르(PET) 필름을 배치하여 폴리우레탄 아크릴레이트(PUA) 마스터 몰드를 제작하였다. 나노패턴 치수는 hPSC-CMs의 구조 및 기능을 향상시키도록 선택되었다(도 13). 고출력 UV 광원 하에서 경화시킨 후, PUA 및 PET 필름을 실리콘 마스터로부터 박리하여 PUA 마스터 몰드를 생성시켰다. 나노패턴화된 세포 배양 기재를 생성시키기 위해, 폴리우레탄계 UV-경화성 중합체(NOA76, Norland Optical Adhesive)를 18mm, # 1 커버슬립(Fisher Scientific)으로 처리된 유리 프라이머 상에 적하 분배한 다음, 그 위에 PUA 마스터 몰드를 위치시켰다. UV 광원으로 경화한 후, PUA 마스터 몰드를 벗겨 내어 나노패턴화된 표면(NP)을 남겨 놓았다. 동일한 공정을 사용하여 나노패턴화된 PUA 마스터를 패턴화되지 않은 PET 필름으로 교체하여 대조용 편평 기재를 제조하였다.

[0275] 세포 배양을 위한 표면을 제조하기 위해, PU-기반 NPs 및 대조용 편평 기재를 70% 에탄올로 세척하고, 50W에서 5분 동안 산소 플라즈마로 처리하고, UV-C 광원하에 1시간 동안 놓아 두어 멸균한 다음,  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  인간 피브로넥틴(Life Technologies)과 함께 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. hPSC-CMs을 150,000 세포/ $\text{cm}^2$  의 밀도로 플레이팅 하였다.

[0276] 나노패턴화된 MEA(nanoMEA)는 미국 특허 제20160017268A1호에 기술되어 있는 바와 같이 제조하였다. 간단히, 이온 투과성 중합체 나피온(Sigma-Aldrich)을 용매-매개 모세관력 리소그래피를 통해 시판되고 있는 멀티-웰 MEA 플레이트(Axon Biosystems) 상에 패턴화시켰다. 세포 시딩 전에, 대조용 편평 또는 nanoMEA 나피온 표면을 UV-C 광으로 멸균 한 다음,  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  인간 피브로넥틴(Life Technologies)과 함께 37°C에서 6시간 동안 배양하였다. hPSC-CMs을 MEA 플레이트의 웰당 25,000 세포에서 액적 방식으로 플레이팅하였다.

#### 면역 형광 이미징 및 형태학적 분석

[0277] 콤보매트 플랫폼에서 3주 후, 4% 파라포름알데하이드(Affymetrix) 중에서 15분 동안 실온에서 고정시켜 면역 형광 분석을 위한 세포를 제조하였다. 이어서, 샘플에 PBS 중 0.1% 트리톤 X-100(Sigma-Aldrich)을 투과시키고 5% 염소 혈청으로 차단하였다. 이어서, 세포를 마우스 항- $\alpha$ -액티닌 모노클로날 항체(1:1000, Sigma-Aldrich)와 1% 염소 혈청 중 4°C에서 밤새 배양하였다. PBS로 세척한 후, 샘플을 알렉스(Alexa)-594 접합 염소-항-마우스 이자 항체 (1:200, Invitrogen)뿐만 아니라 알렉사플루오(Alexafluo) 488 표지된 팔로이딘(Phalloidin)(1:200, Invitrogen)으로 염색하였다. DAPI(Vector Labs)를 함유하는 벡타쉴드(Vectashield)로 핵 대조 염색을 수행하였다. Nikon CFI Plan Apo VC 60x 침수 대물렌즈가 있는 Nikon A1R 공초점 현미경을 사용하여 근원섬유마디 분석을 위한 상세한 면역 형광 이미지를 캡처하는 동시에, 20x 공기 대물렌즈를 사용하여 세포 이핵화 백분율을 측정하기 위한 저전력 이미지의 세포를 얻었다. 두 대물렌즈 전력으로부터의 세포를 사용하여 세포 크기를 측정하였다. 형태 및 근원섬유마디 분석을 위해, hPSC-CMs를 10,000 세포/ $\text{cm}^2$  에서 플레이팅 하였다. 각각의 조건에 대해, 적어도 3개의 생물학적 시편에 시편 당 적어도 7개의 세포를 플레이팅하여 이미지화하였다.

#### 정량적 근원섬유마디 분석

[0279] MATLAB(Mathworks)에서 스캐닝 구배/푸리에 변환 스크립트를 사용하여 근원섬유마디 정렬, 패턴 강도 및 근원섬유마디 길이에 대해 면역 형광 이미지를 정량화하였다. 각각의 이미지를 여러 개의 작은 세그먼트로 나누어 개별적으로 분석하였다. 방향도 함수를 사용하여, 각각의 세그먼트에 대한 이미지 구배를 계산하여 근원섬유마디의 국소 정렬을 결정하였다. 이어서, 구배 방향으로 1 차원 푸리에 변환의 최대 피크를 계산함으로써 패턴 강도를 결정하였다. 근원섬유마디의 길이는 이와 동일한 구배 방향을 따라 근원섬유마디의 강도 프로파일을 측정함으로써 계산하였다. 강도 프로파일이 평균을 교차하는 빈도로 각각의 이미지 세그먼트 내의 국소 근원섬유마디 길이를 정확하게 계산할 수 있었다. 완결되었을 때, 이러한 분석은 나노토포그래피에 의해 제공된 정렬 단서가 없는 세포에서 조차도 근원섬유마디 패턴화의 공평한 준세포 해상도 맵핑을 가능하게 하였다.

#### 칼슘 이미지화

[0280] 세포내 칼슘 함량은 전술한 바와 같이 비율 계량용 인디케이터 염료 fura2-AM을 사용하여 측정하였다<sup>36</sup>. 요약하면, 세포를 37°C에서 20분 동안 티로드(Tyrode) 용액중  $0.2 \mu\text{M}$  fura2-AM 염료에서 배양한 다음 PBS로 세척 하였다. 이어서, Nikon 역형광 현미경에 연결된 이옵틱스 스테파 스위치 시스템으로 자발적  $\text{Ca}^{2+}$  과도 상태를 모니터링하였다. 40x 올림푸스 대물렌즈를 사용하여 형광 단서를 획득하고, 510 nm 필터에 통과시킨 다음, 광전자 증배관을 사용하여 단서를 정량화하였다. 이완기의 안정한 칼슘 농도는 다음 공식을 사용하여 이온옵틱스

(IonOptix) 소프트웨어 이온위자드(IonWizard)에서 정량화하였다:

$$[0283] [Ca^{2+}] = K_d * \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} * \frac{Sf2}{Sb2}$$

[0284] 상기 식에서,

[0285]  $K_d$  = fura2 칼슘 해리 상수 = 225nM 이고,

[0286]  $R_{max}$  및  $R_{min}$  = 포화 칼슘 수준 및 칼슘 부재 하에서 각각 측정된 비율 값이며,

[0287]  $Sf2/Sb2 = 0$ 에서 배경을 뺀 파장 2 여기 형광과 포화 칼슘 용액 사이의 비이다.

#### [0288] 전자 현미경 및 초미세 구조 분석

[0289] 콤보매트 플랫폼 하에서 3주 후, hiPSC-CMs를 투과 전자 현미경(TEM) 분석을 위해 나트륨 카코딜레이트 완충액 중 4% 글루타르알데히드 중에서 실온에서 2시간 동안 고정시켰다. 이어서, 샘플을 완충액으로 세척하고, 얼음상에서 30분 동안 완충된 1% 오스뮴 테트라옥사이드로 염색하였다. 이어서, 샘플을 물로 세척하고 일련의 등급화된 에탄올에서 탈수시켰다. 다음으로, 샘플을 1:1 에탄올:에폰-아랄다이트(Epon-Araldite) 에폭시 수지에 이어 순수한 에폰-아랄다이트의 두 가지 변화로 침윤시켜 처리하였다. 이 시점에서, 중합을 위해 두 번째 커버 슬립을 60°C 오븐에서 샘플 상부에 놓았다. 다음날, 불화수소산을 사용하여 커버 슬립을 용해시키고, 샘플을 구획화하기 위해 블록 상에 장착하였다. 80 kV에서 JEOL JEM 1200EXII로 이미징하기 전에 단일 세포의 초박형(70-80 nm) 축 섹션을 시트르산납과 대조하였다. ImageJ(National Institutes of Health)는 근원섬유마디 구조 내에서 연속 전자 밀도 밴드의 폭으로 정의된 Z-밴드 폭을 측정하는데 사용되었다.

#### [0290] MEA 전기 생리학적 분석

[0291] 자발 박동 심근세포의 전기 생리학적 분석은 AxIS 소프트웨어(Axion Biosystems)를 사용하여 2분 동안 수집하였다. 미가공 데이터를 수집한 후, 버터워스(Butterworth) 밴드-통과 필터 및 90  $\mu$ V 스파이크 검출 임계값을 사용하여 단서를 필터링되었다. 전계 전위 지속 시간은 다항식 적합 T 과 검출 알고리즘을 사용하여 자동으로 결정되었다. 30 개의 연속적인 박동에 대한 박동 간격 분석은 이전에 발표된 바와 같이 수행하였다<sup>26</sup>(표 3 참조).

표 3

표 3 : 박동 간격 분석 파라미터

파라미터	설명
표준편차 BI	박동 간격의 표준편차
평균 $\Delta BI$	연속 박동 사이의 차이의 평균 절대값
중간 $\Delta BI$	연속 박동 사이의 차이의 중간 절대값
표준편차 $\Delta BI$	연속 박동 사이의 차이의 절대값의 표준편차
% $\Delta BI > 100ms$	100 ms를 초과하는 절대 $\Delta BI$ 값의 백분율
% $\Delta BI > 250ms$	250 ms를 초과하는 절대 $\Delta BI$ 값의 백분율

#### [0293] 미토콘드리아 기능 분석

[0294] 세포 대사 기능은 이전에 발표된 Seahorse XF96 세포의 플러스 분석기를 사용하여 측정하였다<sup>17</sup>. 콤보매트 플랫폼으로 3주 동안 처리한 후, 세포를 트립신 처리하고, 웨딩 30,000 세포의 밀도로 피브로네틴 코팅된(5  $\mu$  g/cm<sup>2</sup>) XF96 플레이트 상에 다시 플레이팅하였다. 미토스트레스 및 팔미테이트 분석은 XF96 플레이트 상에 다시 플레이팅한 후 3일 후에 수행하였다. 실험 1시간 전에, RPMI/B27/Inst+ 배지를, 나트륨 피루베이트(Gibco/Invitrogen, 1 mM) 및 미토스트레스 분석용의 25 mM 글루코오스 또는 팔미테이트 분석용의 0.5 mM 카르니틴을 함유한 25 mM 글루코오스로 보충된 Seahorse XF 분석 배지로 교체하였다. 미토스트레스 분석의 경우, 1  $\mu$ M(FCCP; Seahorse Biosciences), 올리고 마이신(2.5  $\mu$ M), 안티마이신(2.5  $\mu$ M) 및 로테논(2.5  $\mu$ M)에서 4-(트리플루오로메톡시) 폐닐하이드라존의 최종 농도를 달성하기 위해 측정 중에 기재 및 억제제를 주입하였다. 팔미테이트 분석의 경우, 200  $\mu$ M 팔미테이트 또는 33  $\mu$ M BSA의 최종 농도를 달성하기 위해 측정 중에 기재 및 억제제를 주입하였다. 각 웰에 존재하는 세포의 수에 대해 OCR 값을 추가로 표준화한 다음, 355 nm 여기 및 460 nm 방출에서 형광을 사용하여 측정된 바와 같이 흐스트(Hoechst) 염색제(Hoechst 33342; Sigma-Aldrich)에 의해

정량화하였다. 미토스트레스 분석에서의 기저 호흡은 올리고마이신 첨가 전의 OCR로서 정의된 반면, 최대 호흡 능력은 올리고마이신 첨가 후 OCR로부터 FCCP에 대한 반응에서 OCR의 변화로 정의되었다. 외인성 지방산 이용은 팔미테이트 첨가 후 기준선으로부터의 OCR의 최대 변화로 정의되었다.

#### [0295] 수축 분석

상관-기반 수축 정량화 방법(CCQ)이라 불리우는 비디오 기반 수축 분석 알고리즘이 사용되었으며, 입자 이미지 속도 측정법과 디지털 이미지 상관 알고리즘<sup>37</sup>을 사용하여 이전에 발표된 명시야 비디오 기록<sup>22</sup>에서의 세포의 움직임을 추적하였다. 수축 크기, 속도 및 각도와 같은 기능적 출력은 각 비디오 프레임에 대한 벡터 필드로 출력되며 공간적으로 또는 시간적으로 평균화될 수 있다. 간단히 말해서, 참조 프레임은 설정된 크기의 윈도우의 그리드로 분할된다. 움직임을 추적하기 위해, 각각의 윈도우는 제 2 프레임을 비교하는 상관식을 통해 실행되어, 제 2 프레임에서 해당 윈도우의 위치를 제공한다. 사용된 상관 방정식은 하위 픽셀 정확도를 제공하는 확률적 특성을 가진 가우시안(Gaussian) 상관 피크를 제공하였다. 이러한 분석에 사용된 비디오는 니콘 카메라를 사용하여 20배 배율 및 초당 30 프레임으로 촬영하였다.

#### [0297] RNA-seq 분석

RUES2 hESC-CMs로부터 트리졸(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 RNA 전체를 추출하였다. RNA-seq 샘플을 토팫(Tophat)(PMID: 19289445, 버전 2.0.13)을 사용하여 hg19에 정렬시켰다. 앙상블(Ensembl) GRCh37 유전자 주석을 사용하는 htseq-count(PMID: 25260700)를 사용하여 유전자 수준 관독 카운트를 정량화하였다. RNA-seq 샘플에 걸쳐 합산된 3 RPKM 초과의 총 발현을 가진 유전자를 추가 분석을 위해 유지 하였다. R로부터의 프린콤 함수(*princomp* function)는 주성분 분석에 사용되었다. DESeq(PMID : 20979621)은 시차 유전자 발현 분석에 사용되었다. >1.5 초과의 배수 변화를 가진 유전자는 미분적으로 발현되는 것으로 간주되었다. 유전자 온톨로지 농축 분석에는 topGO R 패키지(PMID: 16606683)가 사용되었다.

경로 강화의 열 지도에 대해, 각각의 조건을 대조군(EV-Flat) 조건과 비교하고, 상향 조절된 유전자(> 1.5 배 변화) 및 하향 조절된 유전자(< -1.5 배 변화)를 동정하였다. 심장 성숙에 유익한 선별된 경로 세트에 대해 풍부하게 하기 위하여 상향 및 하향 조절된 유전자에 대해 초기하학적 테스트를 수행하였고, n 매트릭스에 의해 m을 생성하였는데, 여기서 m은 경로의 수( $m = 7$ )이고 n은 조건의 수 ( $n = 10$ )이다. 상향-및 하향-조절된 유전자에 대한 농축 p-값 사이의 비율의 음의  $\log_{10}$ 은 처리의 전체 순"이익"을 나타내도록 계산되었다: 큰 양의 값(> 0)은 심장 성숙 경로에서 유전자의 상향 조절이 이들 유전자의 하향 조절에서 보다 처리 결과가 더 많은 것을 의미하며, 더 많은 음의 값은 심장 성숙 경로에서 유전자의 하향 조절의 처리 결과가 더 많은 것을 의미한다.

#### [0300] 유세포 분석

락테이트 정제 및 퓨로마이신 선택 전후에 유세포 분석을 위해 세포를 해리 및 제조하여 선택 효율을 결정하였다. 세포를 먼저 4% 파라포름알데히드에 15분 동안 고정시켰다. 이어서, 세포에 0.75% 사포닌을 침투시킨 다음, 1:100 마우스 항-cTnT 또는 이소 타입 대조군 마우스 IgG 항체로 5% FBS를 함유하는 PBS 중에서 염색하였다. 알렉사(Alexa)-488 접합 염소-항-마우스 이차 항체(1:200, Invitrogen)를 사용하여 시각화하였다. BD 사이언스 FACS 칸토(BD Sciences FACS Canto) 유세포 분석기 상에서 샘플의 분석을 실행하고 플로우조(FlowJo) 소프트웨어로 분석하였다.

#### [0302] 고 처리량 약물 스크리닝(High-throughput drug screening)

분화 후 14 일째에 심근세포를 TrypLE(Life Technologies)에서 5분 배양하여 단일 세포 혼탁액으로 해리시키고, 37°C에서 1 시간 동안 1 mg/mL 매트리겔(Matrigel)(Corning)로 사전 코팅된 불투명한 바닥 384-웰 플레이트 (Nunc) 상에 웰당 10,000개 세포로 플레이팅하였다. 이어서, 세포를 72 시간마다 배지를 교환하면서 추가로 16 일 동안 384-웰 플레이트 상에서 배양하였다. 15일 후, DMSO 중에 용해된 화합물을 CyBidnpf 바리오(CyBi Well Vario) 384/25 액체 처리기(Cybio, Germany)를 사용하여 플레이트에 분배하여  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M의 농도를 2회 달성하였다. 배양 18시간 후, 배지를 흡인하고 바이오테크(BioTek) EL406 워셔 디스펜서(BioTek, Winooski, VT)를 사용하여 12.5% 규정 삼투압 농도에 도달할 때까지 순수한 물을 주입하였다. 배양 30분 후, 상청액을 제거한 다음, 제조사의 지침에 따라 셀타이터(CellTiter) Glo (Promega)를 첨가하여 플레이트를 분석하였다. 5분 후, 엔비전 멀티레이블 리사(EnVision Multilable Resaer)(PerkinElmer)를 사용하여 발광을 측정하였다. 모든 데이터는 텁코 스폿화이어(Tibco Spotfire)(Tibco Spotfire, Boston, MA)에 의해 처리하고 시각화하였다. 각각의 웰로부터의 단서를 DMSO 단독으로 처리된 대조군 웰의 평균(플레이트 당 32개의 대조군 웰)과

비교하여 생존율을 계산하였다.

[0304] **통계 분석**

달리 언급되지 않는 한, 그룹들 사이의 통계적 유의성은 일괄처리식 쌍별 사후 비교분석 방식으로 일방향 또는 양방향 아노바(ANOVA)를 사용하여 시그마플롯(SigmaPlot) 소프트웨어로부터 결정되었다. 모든 통계적 분석에서, 0.05 미만의 p-값은 유의한 것으로 간주되었다. 오차 막대는 평균의 표준오차(SEM)를 나타낸다.

[0306] **[참조 문헌]**

[0307] 1. Celermajer, D. S., Chow, C. K., Marijon, E., Anstey, N. M. & Woo, K. S. Cardiovascular Disease in the Developing World. *JAC* **60**, 1207-1216 (2012).

[0308] 2. Watkins, H., Ashrafi, H. & Redwood, C. Inherited Cardiomyopathies. *The New England Journal of Medicine* **364**, 1-14 (2011).

[0309] 3. Kim, C. iPSC technology—Powerful hand for disease modeling and therapeutic screen. *BMB Reports* **48**, 256-265 (2015).

[0310] 4. Yang, X., Pabon, L. & Murry, C. E. Engineering Adolescence: Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circulation Research* **114**, 511-523 (2014).

[0311] 5. Moretti, A. *et al.* Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *N Engl J Med* **363**, 1397-1409 (2010).

[0312] 6. Itzhaki, I. *et al.* Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 225-229 (2012).

[0313] 7. Novak, A. *et al.* Cardiomyocytes generated from CPVT. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 468-482 (2012).

[0314] 8. Huang, H.-P. *et al.* Human Pompe disease-induced pluripotent stem cells for pathogenesis modeling, drug testing and disease marker identification. *Human Molecular Genetics* **20**, 1-14 (2011).

[0315] 9. Lan, F. *et al.* Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 101-113 (2013).

[0316] 10. Sun, N. *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Science Translational Medicine* **4**, 130ra47-130ra47 (2012).

[0317] 11. Guan, X. *et al.* Dystrophin-deficient cardiomyocytes derived from human urine: New biologic reagents for drug discovery. *Stem Cell Research* **12**, 467-480 (2014).

[0318] 12. Lin, B. *et al.* Modeling and study of the mechanism of dilated cardiomyopathy using induced pluripotent stem cells derived from individuals with Duchenne muscular dystrophy. *Disease Models & Mechanisms* **8**, 457-466 (2015).

[0319] 13. Smith, A. S. T., Macadangdang, J., Leung, W., Laflamme, M. A. & Kim, D.-H. Human iPSC-derived cardiomyocytes and tissue engineering strategies for disease modeling and drug screening. *Biotechnology Advances* **35**, 77-94 (2017).

[0320] 14. Carson, D. *et al.* Nanotopography-Induced Structural Anisotropy and Sarcomere Development in Human Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 21923-21932 (2016).

[0321] 15. Shiraishi, I., Takamatsu, T. & Fujita, S. Three-dimensional observation with a confocal scanning laser microscope of fibronectin immunolabeling during cardiac looping in the chick embryo. *Anatomy and Embryology* **191**, 1-8 (1995).

[0322] 16. Yang, X. *et al.* Tri-iodo-l-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **72**, 296-304 (2014).

[0323] 17. Kuppusamy, K. T. *et al.* Let-7 family of microRNA is required for maturation and adult-like

metabolism in stem cell-derived cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E2785–E2794 (2015).

[0324] 18. Finsterer, J. & Cripe, L. Treatment of dystrophin cardiomyopathies. **11**, 168–179 (2014).

[0325] 19. Mourkioti, F. *et al.* Role of telomere dysfunction in cardiac failure in Duchenne muscular dystrophy. **15**, 895–904 (2013).

[0326] 20. Leung, D. G. *et al.* Sildenafil does not improve cardiomyopathy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Ann Neurol.* **76**, 541–549 (2014).

[0327] 21. Adamo, C. M. *et al.* Sildenafil reverses cardiac dysfunction in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 19079–19083 (2010).

[0328] 22. Macadangdang, J. *et al.* Nanopatterned Human iPSC-Based Model of a Dystrophin-Null Cardiomyopathic Phenotype. *Cellular and Molecular Bioengineering* **8**, 320–332 (2015).

[0329] 23. Young, C. S. *et al.* A Single CRISPR-Cas9 Deletion Strategy that Targets the Majority of DMD Patients Restores Dystrophin Function in hiPSC-Derived Muscle Cells. 1–9 (2016). doi:10.1016/j.stem.2016.01.021

[0330] 24. Gurvich, O. L. *et al.* DMDexon 1 truncating point mutations: Amelioration of phenotype by alternative translation initiation in exon 6. *Hum. Mutat.* **30**, 633–640 (2009).

[0331] 25. Pei, H., Yao, Y., Yang, Y., Liao, K. & Wu, J.-R. Kruppel-like factor KLF9 regulates PPARgamma transactivation at the middle stage of adipogenesis. *Cell Death and Differentiation* **18**, 315–327 (2010).

[0332] 26. Gilchrist, K. H., Lewis, G. F., Gay, E. A., Sellgren, K. L. & Grego, S. High-throughput cardiac safety evaluation and multi-parameter arrhythmia profiling of cardiomyocytes using microelectrode arrays. *Toxicology and Applied Pharmacology* **288**, 249–257 (2015).

[0333] 27. Vassalle, M. & Lin, C.-I. Calcium Overload and Cardiac Function. *J Biomed Sci* **11**, 542–565 (2004).

[0334] 28. Thadroyen, F. T. *et al.* Intracellular calcium transients and arrhythmia in isolated heart cells. *Circulation Research* **69**, 810–819 (1991).

[0335] 29. van Westering, T., Betts, C. & Wood, M. Current Understanding of Molecular Pathology and Treatment of Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecules 2015, Vol. 20, Pages 8823–8855* **20**, 8823–8855 (2015).

[0336] 30. Wen, J.-Y. *et al.* Maturation-Based Model of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ J* 1–7 (2015). doi:10.1253/circj.CJ-15-0363

[0337] 31. Tiburcy, M. *et al.* Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and RepairClinical Perspective. *Circulation* **135**, 1832–1847 (2017).

[0338] 32. Kim, D.-H. *et al.* Nanoscale cues regulate the structure and function of macroscopic cardiac tissue constructs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 565–570 (2010).

[0339] 33. Warlich, E. *et al.* Lentiviral Vector Design and Imaging Approaches to Visualize the Early Stages of Cellular Reprogramming. *Mol Ther* **19**, 782–789 (2009).

[0340] 34. Tohyama, S. *et al.* Distinct Metabolic Flow EnablesLarge-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell* **12**, 127–137 (2013).

[0341] 35. Macadangdang, J. *et al.* Capillary Force Lithography for Cardiac Tissue Engineering. e50039 (2014).

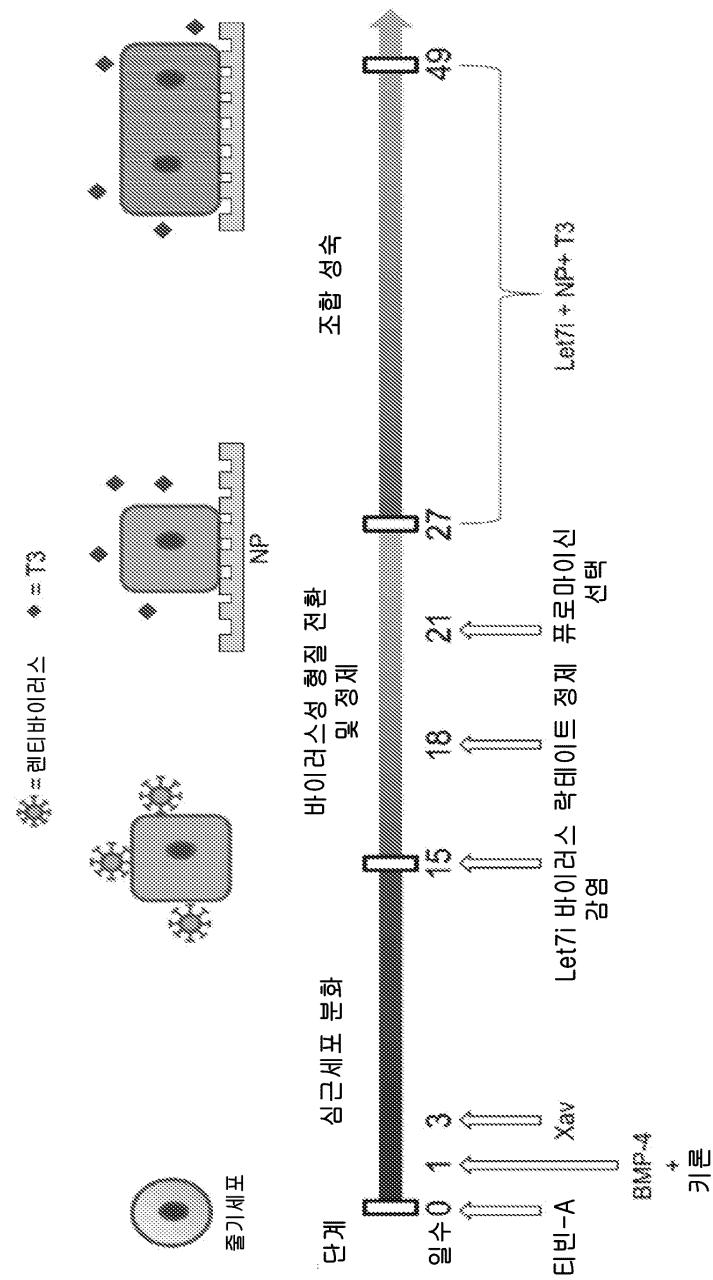
[0342] 36. Lundy, S. D., Zhu, W.-Z., Regnier, M. & Laflamme, M. A. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development* **22**, 1991–2002 (2013).

- [0343] 37. Milde, F. *et al.* Cell Image Velocimetry (CIV): boosting the automated quantification of cell migration in wound healing assays. *Integr. Biol.* **4**, 1437 (2012).
- [0344] [서열목록]
- [0345] 서열 번호 1
- [0346] CTGGCTGAGG TAGTAGTTG TGCTGTTGGT CGGGTTGTGA CATTGCCCGC TGTGGAGATAACTGCGCAAG CTACTGCCTT GCTA
- [0347] 서열 번호 2
- [0348] CTGGCTGAGG TAGTAGTTG TGCTGTTGGT CGGGTTGTGA CATTGCCCGC TGTGGAGATAACTGCGCAAG CTACTGCCTT GCTAG
- [0349] 서열 번호 3
- [0350] CTGGCTGAGG TAGTAGTTG TGCTGTTGGT CGGGTTGTGA CATTGCCCGC TGTGGAGATAACTGCGCAAG CTACTGCCTT GCT
- [0351] 서열 번호 4
- [0352] GGGCCCTGGC TGAGGTAGTA GTTGTGCTG TTGGTCGGGT TGTGACATTG CCCGCTGTGGAGATAACTGC GCAAGCTACT GCCTTGCTAG TG
- [0353] 서열 번호 5
- [0354] CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUUGUGACAUUGCCCGCUGUGGAGAUACUGCGCAAGCUACUGCCUUGCUAG
- [0355] 서열 번호 6
- [0356] UGAGGUAGUAGUUUGUGCU
- [0357] 서열 번호 7
- [0358] UCTCCUTCUTCUUUCUCGU
- [0359] 서열 번호 8 (서열 번호 6의 역 상보 서열)
- [0360] UGCUCUUUCTUCTUCCCU
- [0361] 서열 번호 9 (서열 번호 6의 역 서열)
- [0362] UCGUGUUUGAUGAUGGAGU
- [0363] 서열 번호 10
- [0364] UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
- [0365] 서열 번호 11
- [0366] UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
- [0367] 서열 번호 12
- [0368] UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
- [0369] 서열 번호 13
- [0370] AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
- [0371] 서열 번호 14
- [0372] UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU
- [0373] 서열 번호 15
- [0374] UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
- [0375] 서열 번호 16
- [0376] UGAGGUAGUAGUUUGUACAGU
- [0377] 서열 번호 17

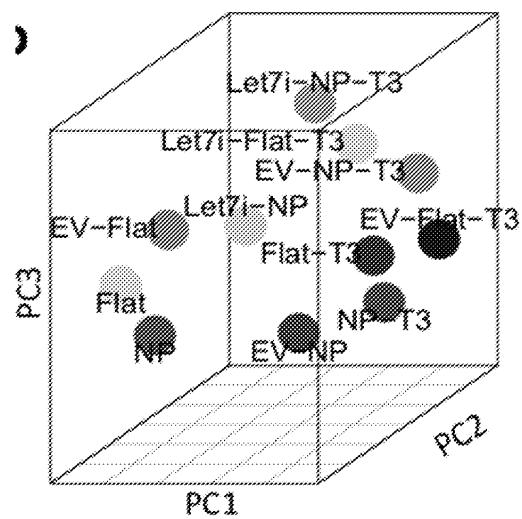
- [0378] UGAGGUAGUAGUUUGUGCU
- [0379] 서열 번호 18
- [0380] ATGCTTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTGTT
- [0381] 서열 번호 19
- [0382] ATGCTTGGTGGGAAGAATAGAGGACTGTT

도면

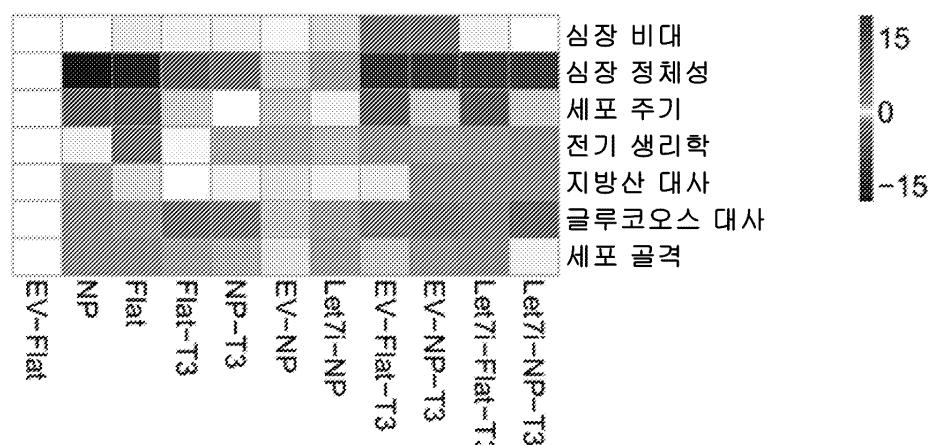
도면 1a



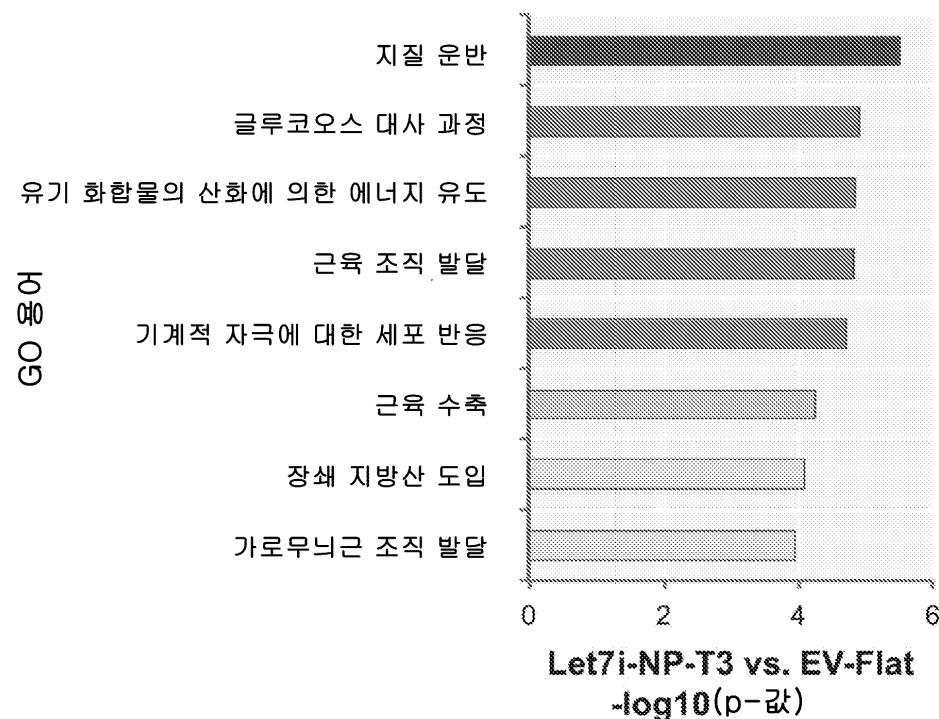
도면1b



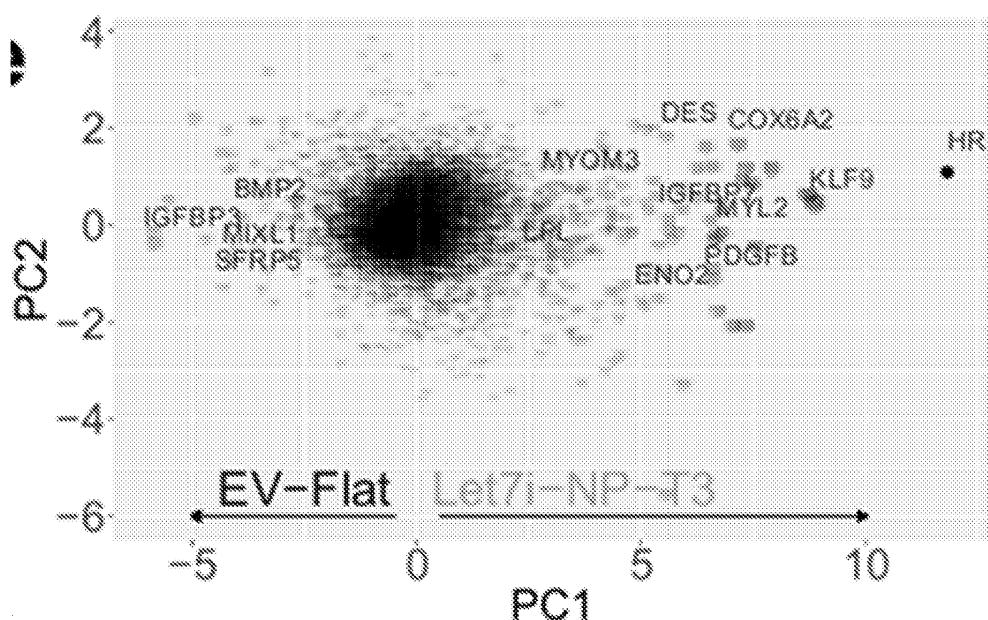
도면1c



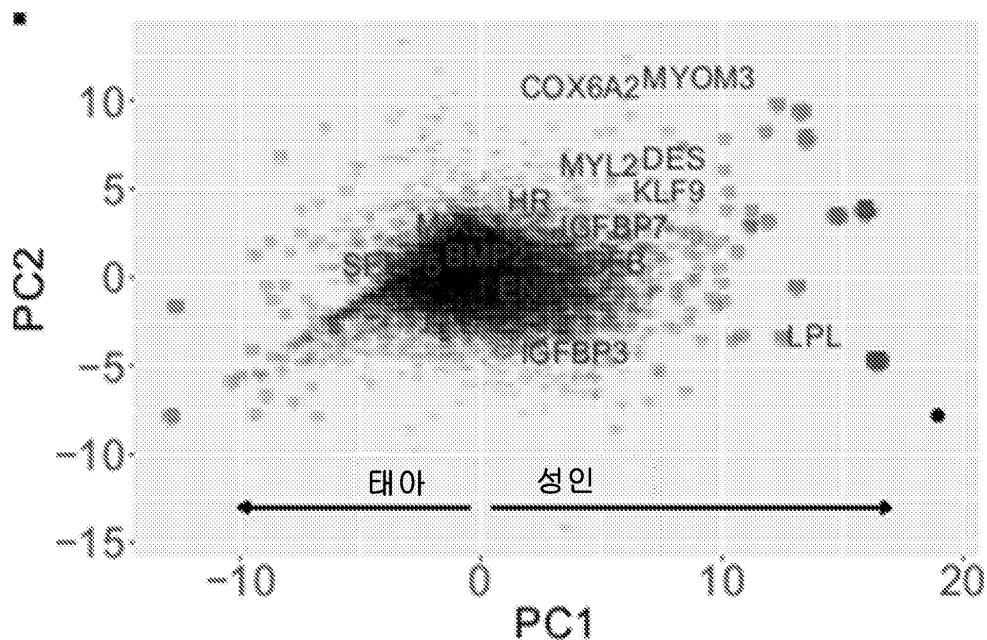
## 도면1d



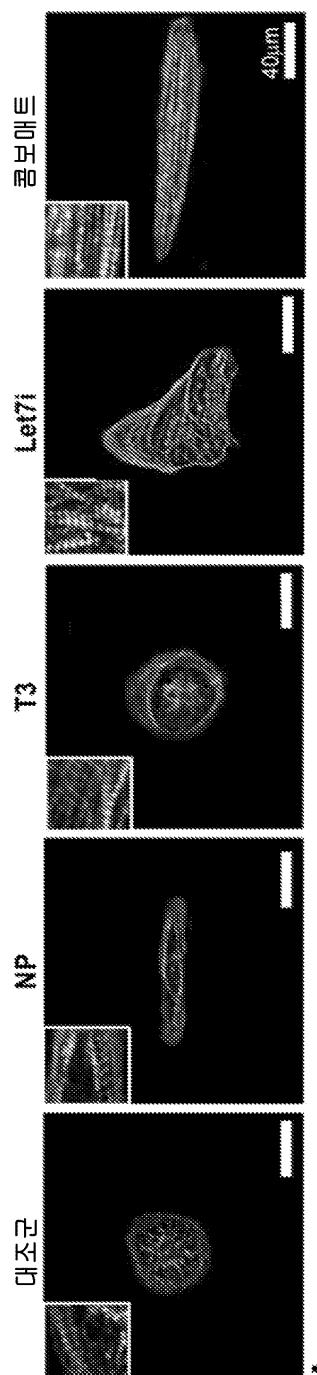
## 도면1e



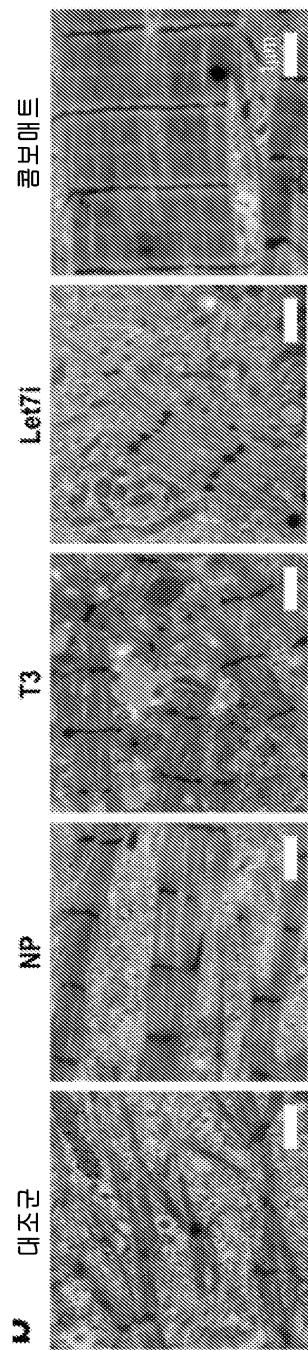
도면1f



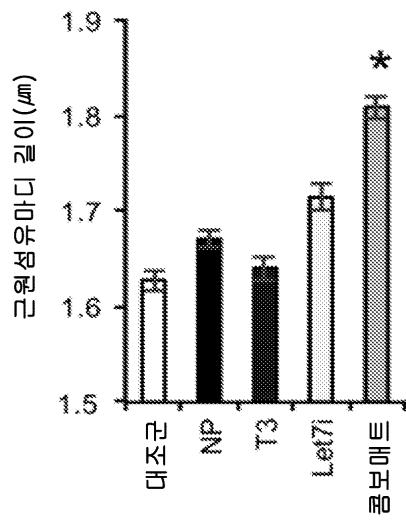
도면2a



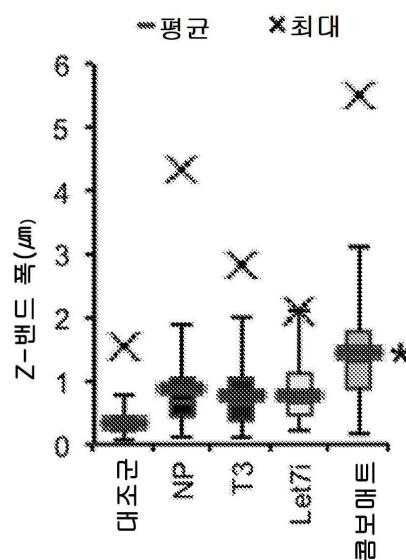
도면2b



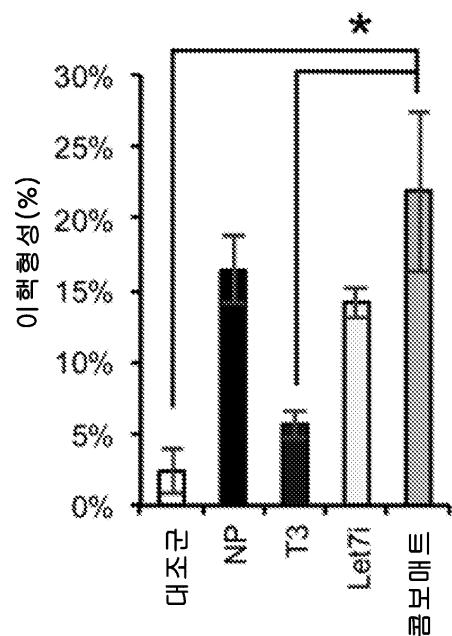
도면2c



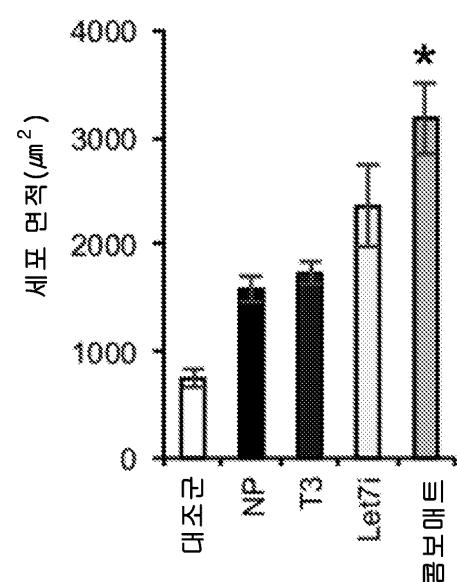
도면2d



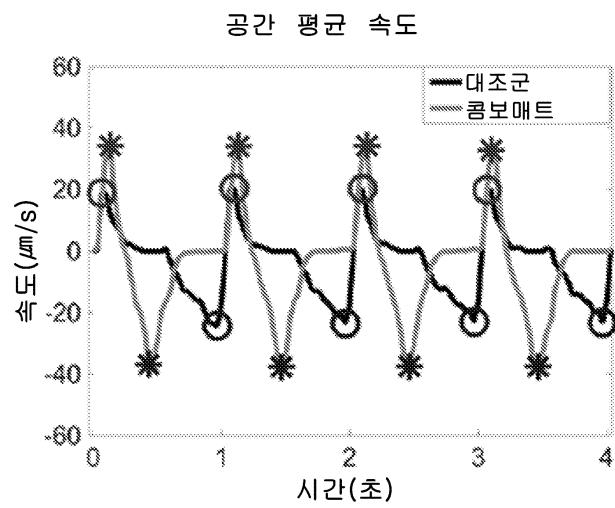
도면2e



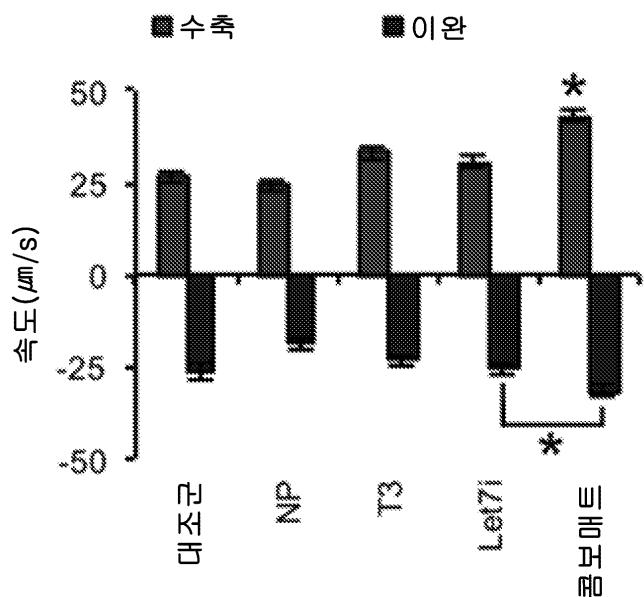
도면2f



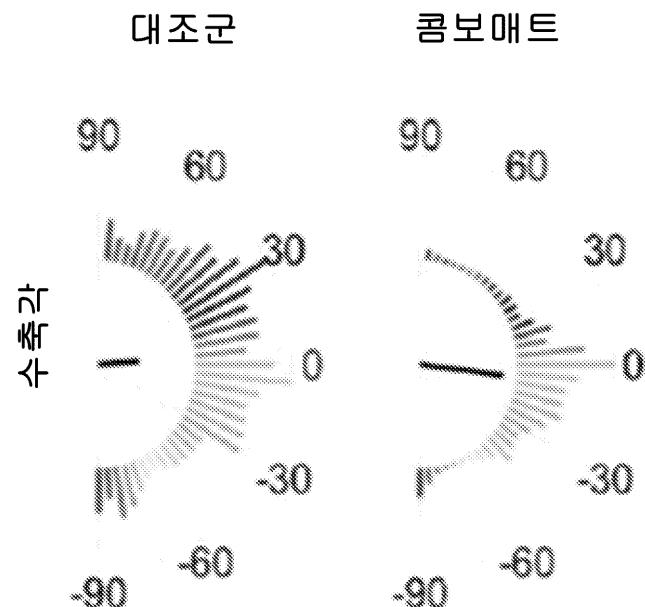
도면3a



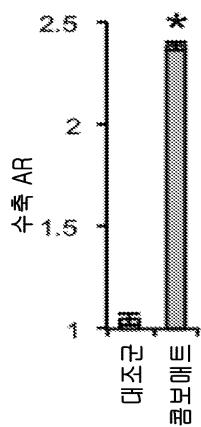
도면3b



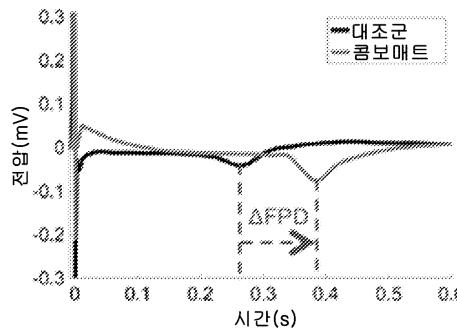
### 도면3c



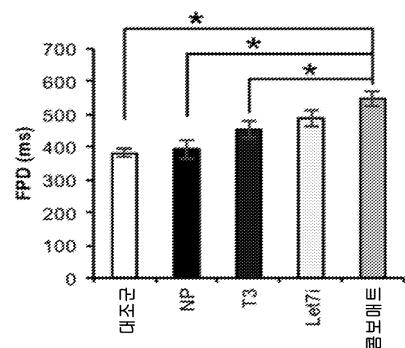
### 도면3d



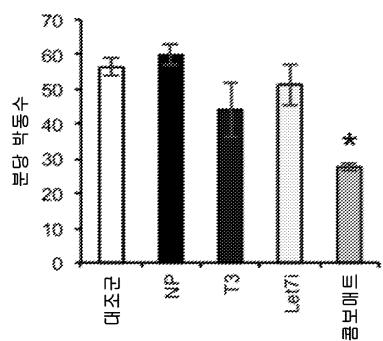
## 도면3e



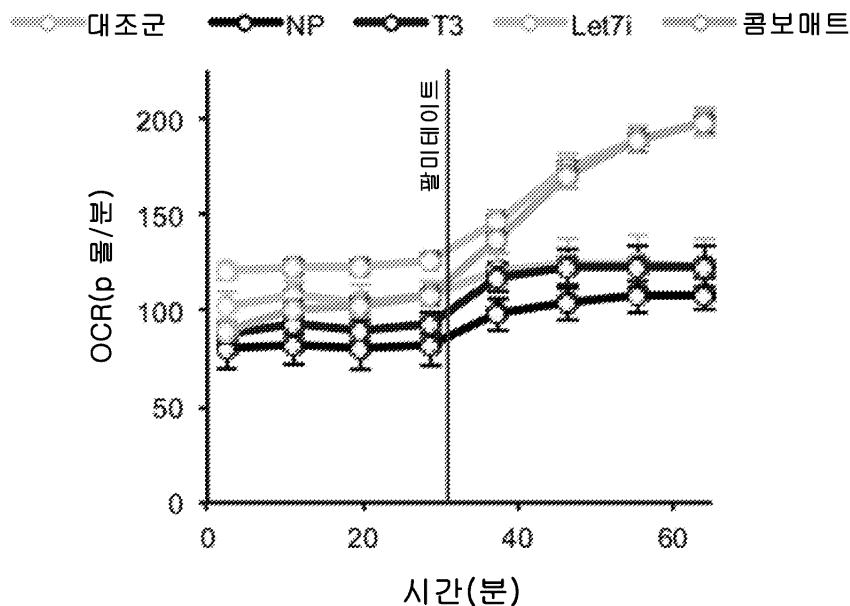
도면3f



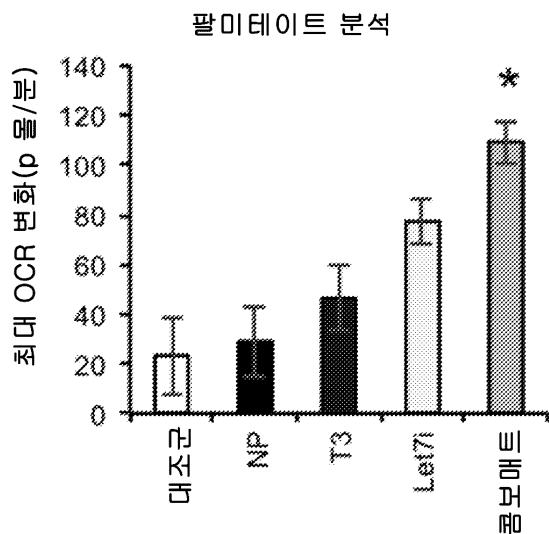
도면3g



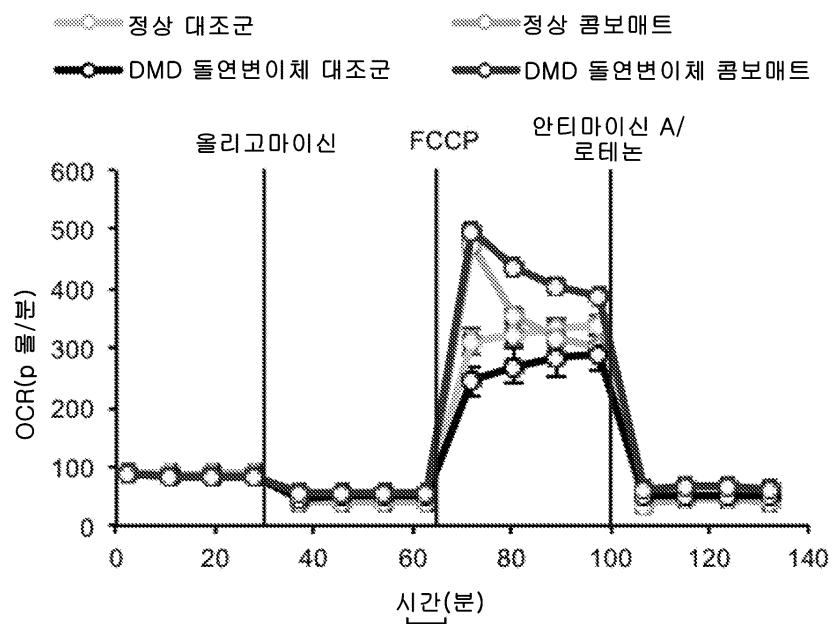
도면3h



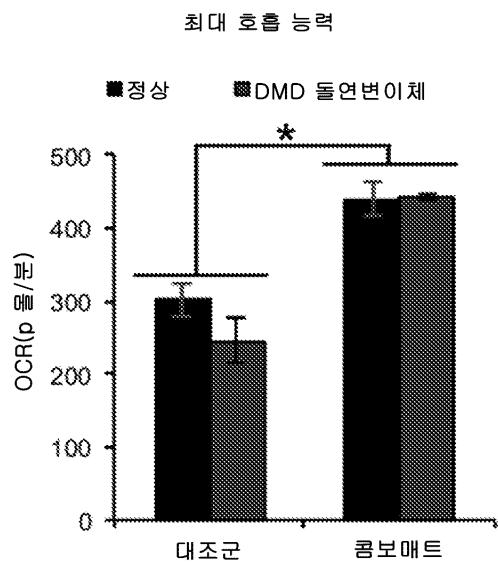
## 도면3i



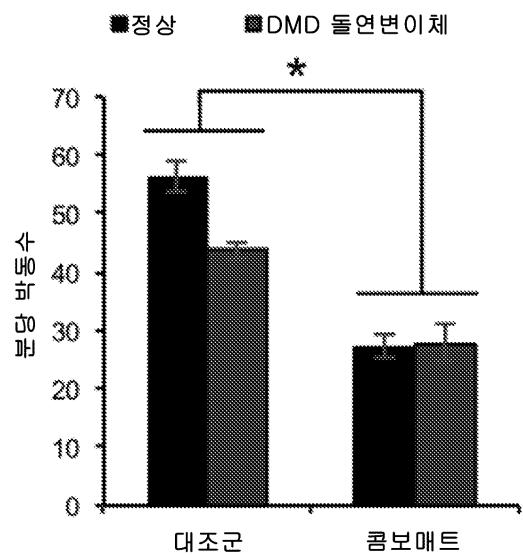
## 도면4a



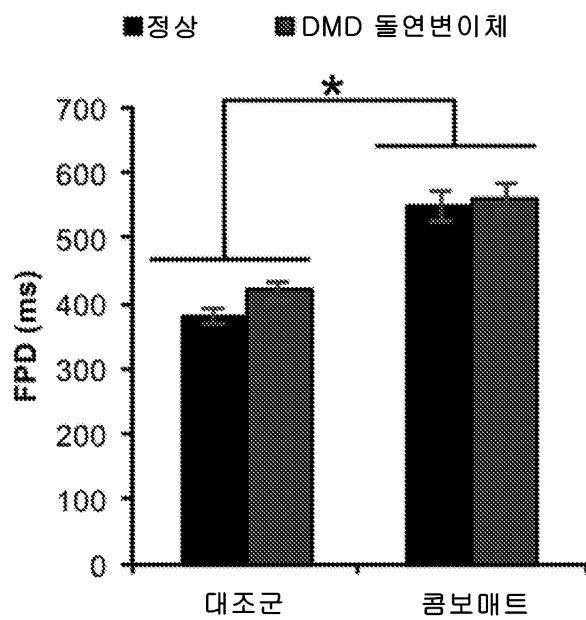
## 도면4b



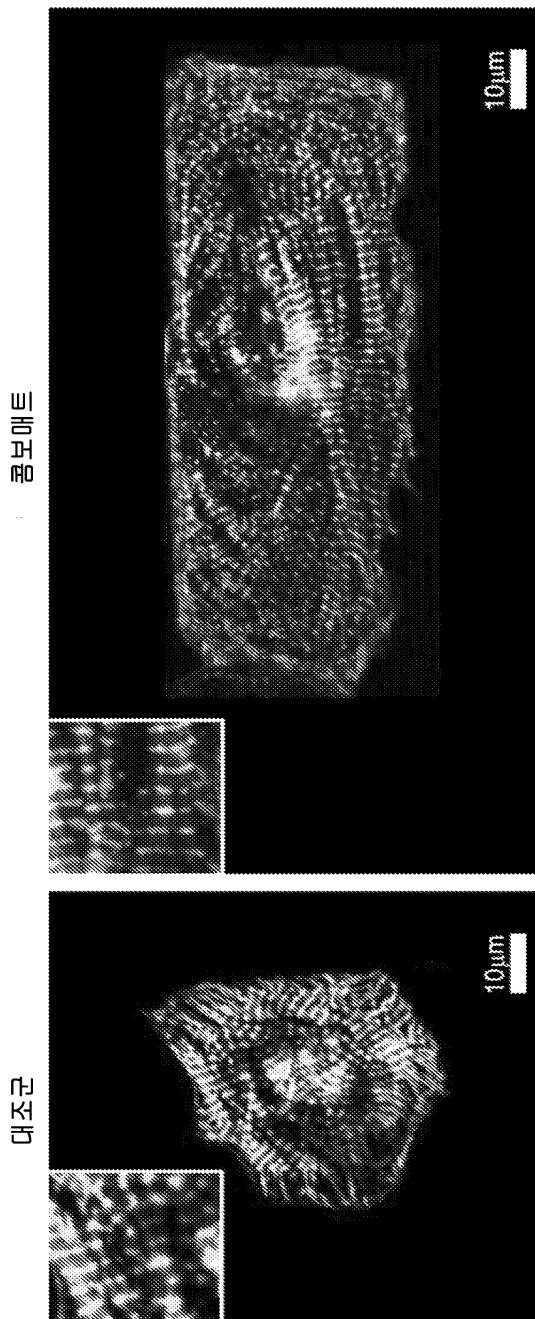
## 도면4c



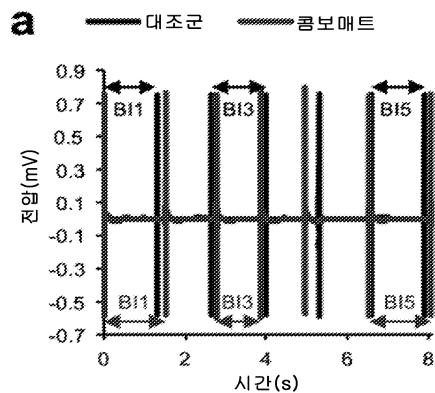
도면4d



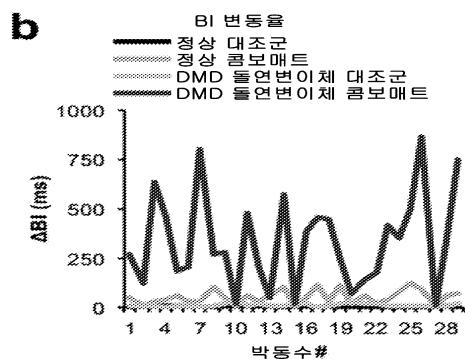
도면4e



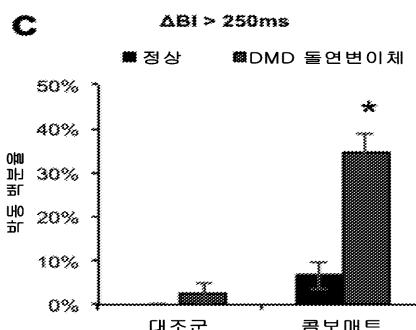
도면5a



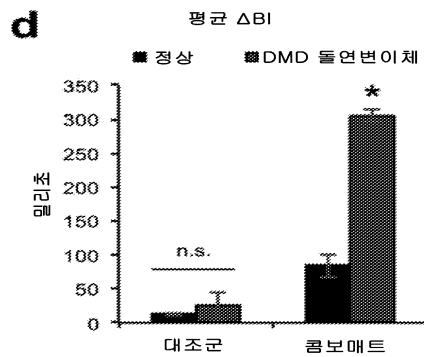
도면5b



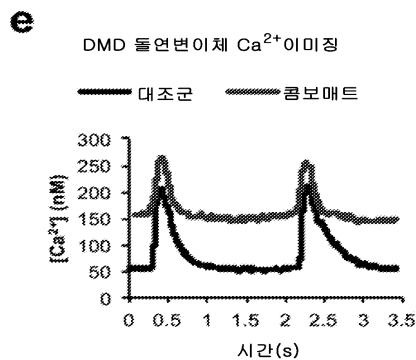
도면5c



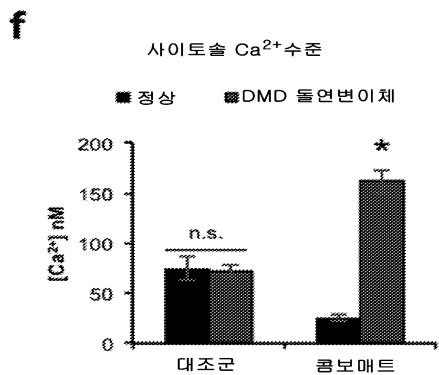
## 도면5d



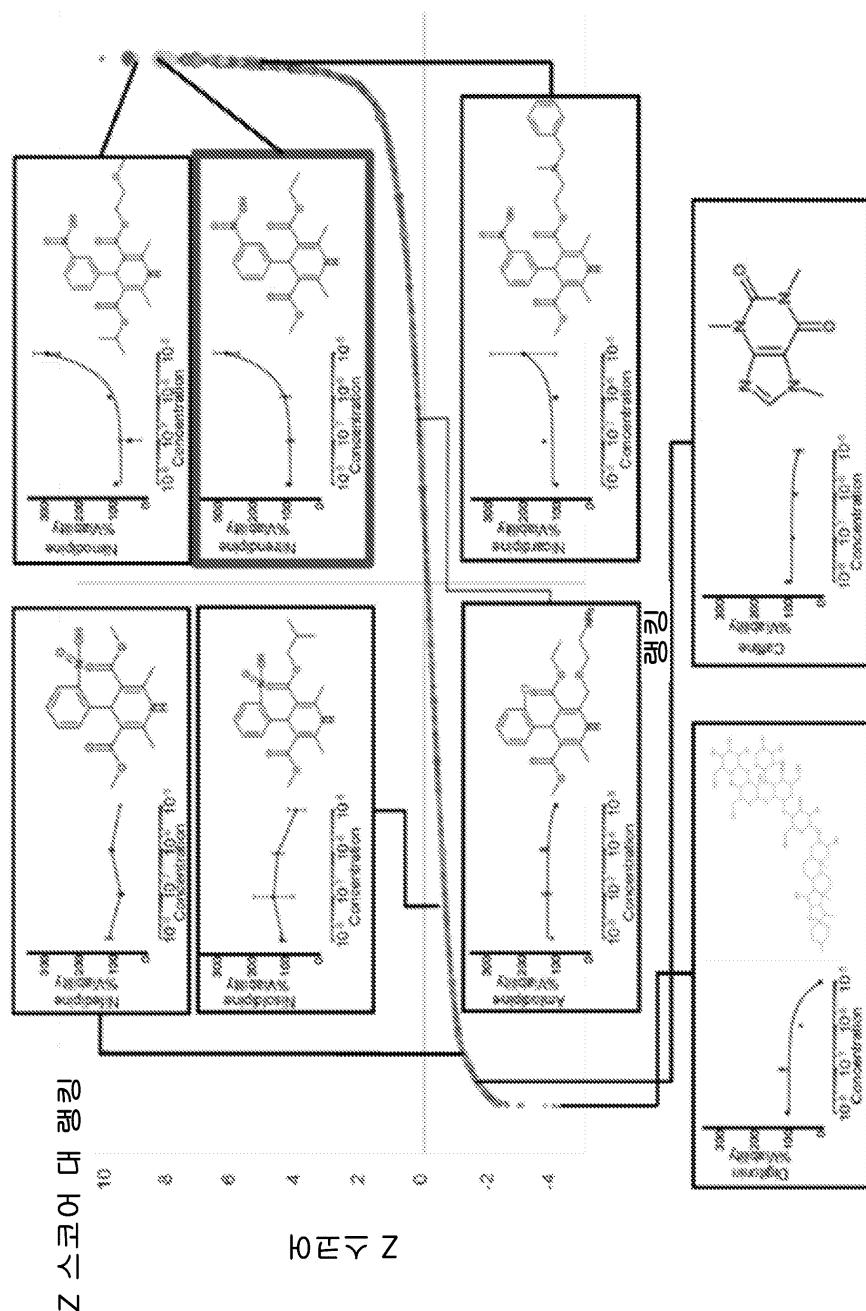
## 도면5e



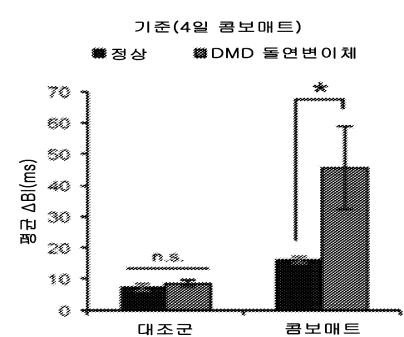
## 도면5f



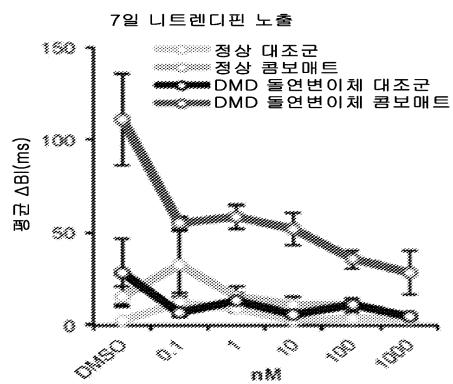
도면6a



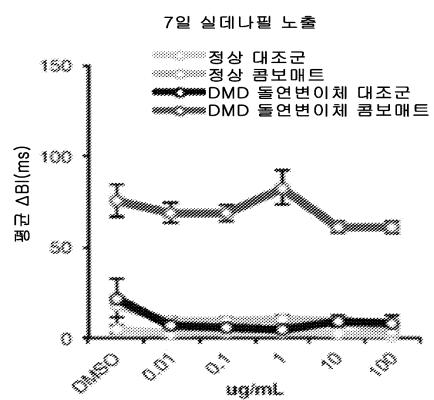
도면6b



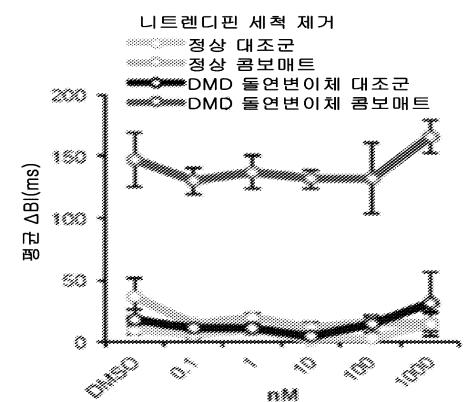
## 도면6c



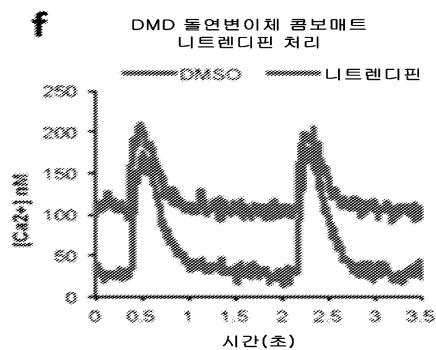
## 도면6d



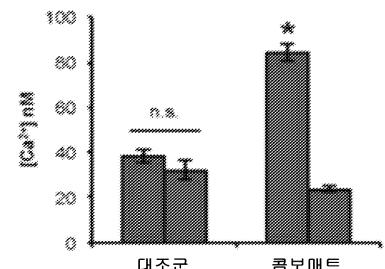
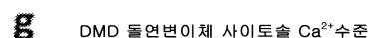
## 도면6e



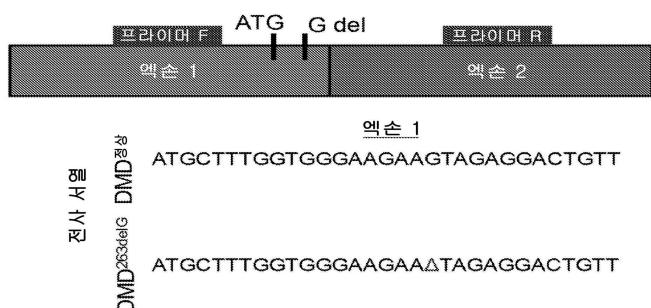
## 도면6f



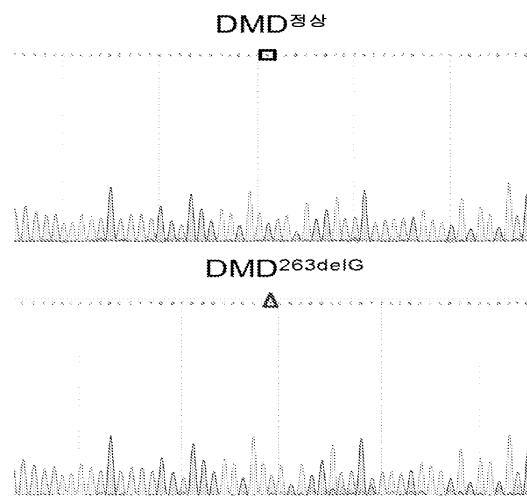
## 도면6g



### 도면7a



## 도면7b



## 도면7c

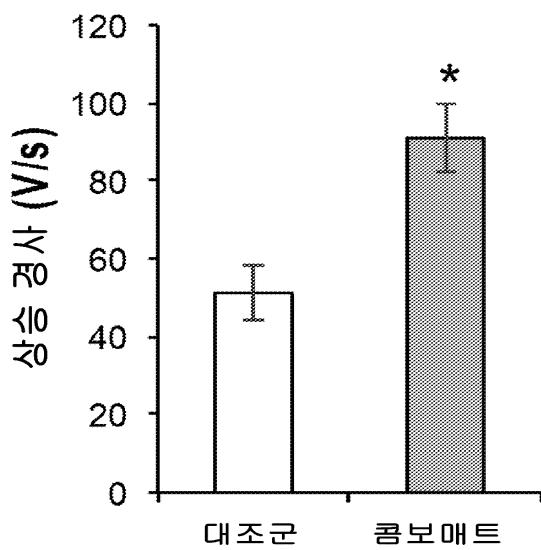
단백질 서열

액손 1

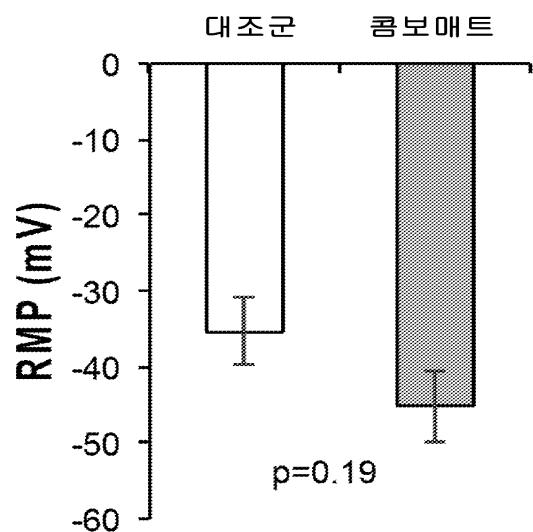
DMD<sup>WT</sup>      Met L W W E E V E D C

DMD<sup>263delG</sup>      Met L W W E E Stop

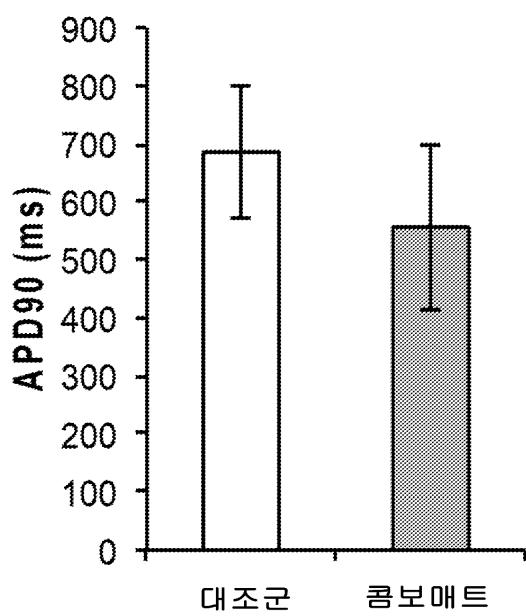
## 도면8a



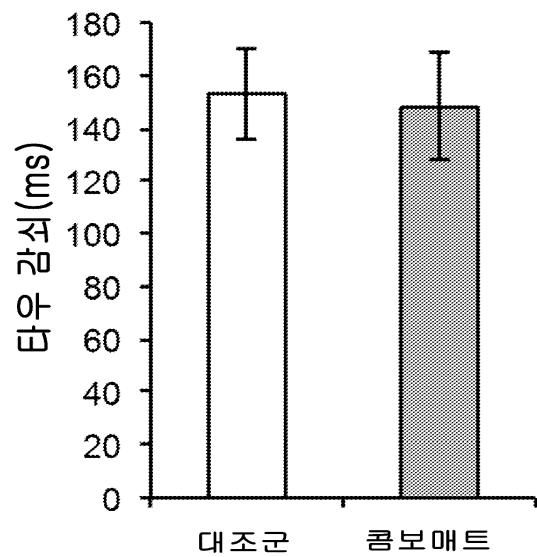
도면8b



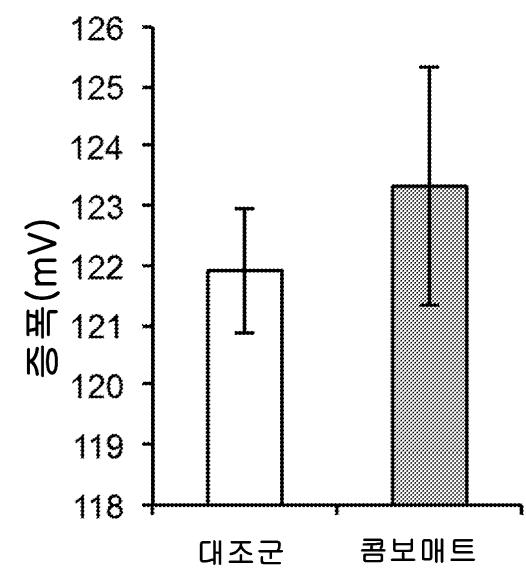
도면8c



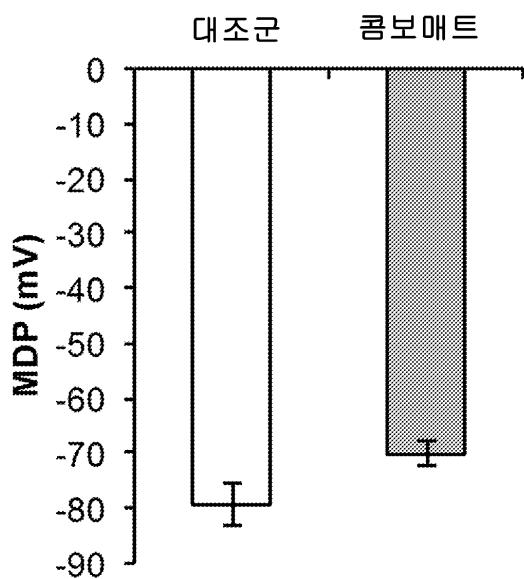
도면8d



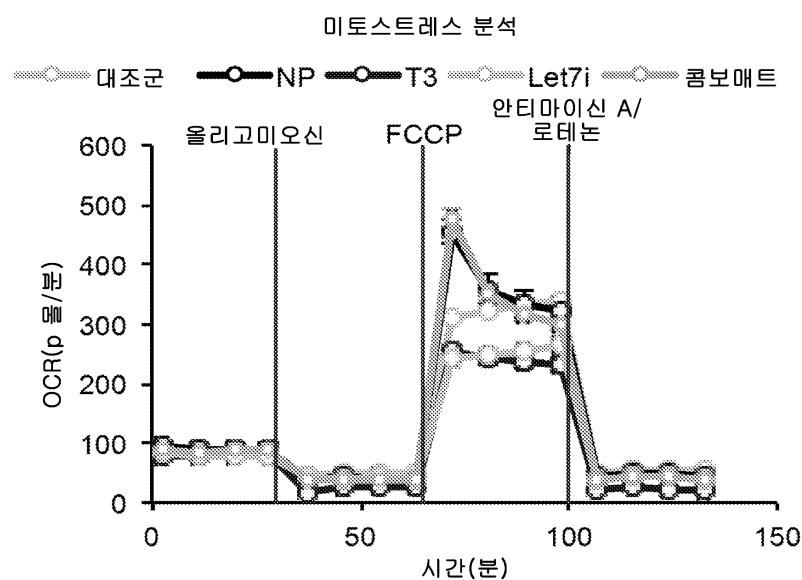
도면8e



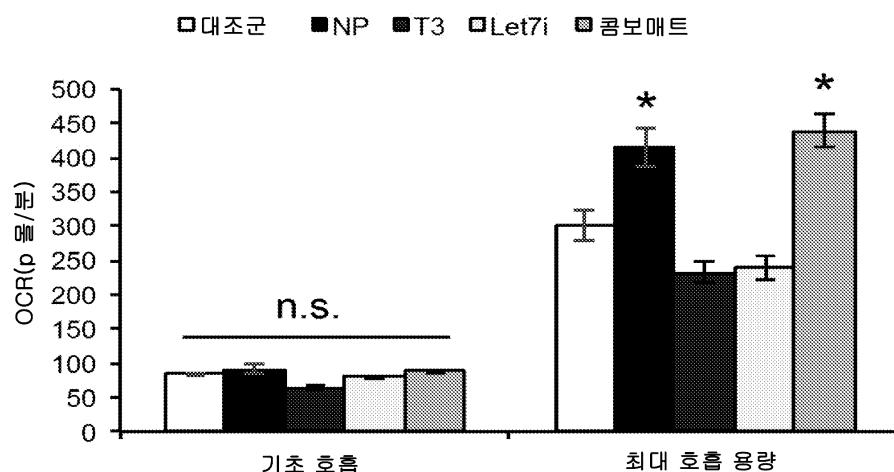
도면8f



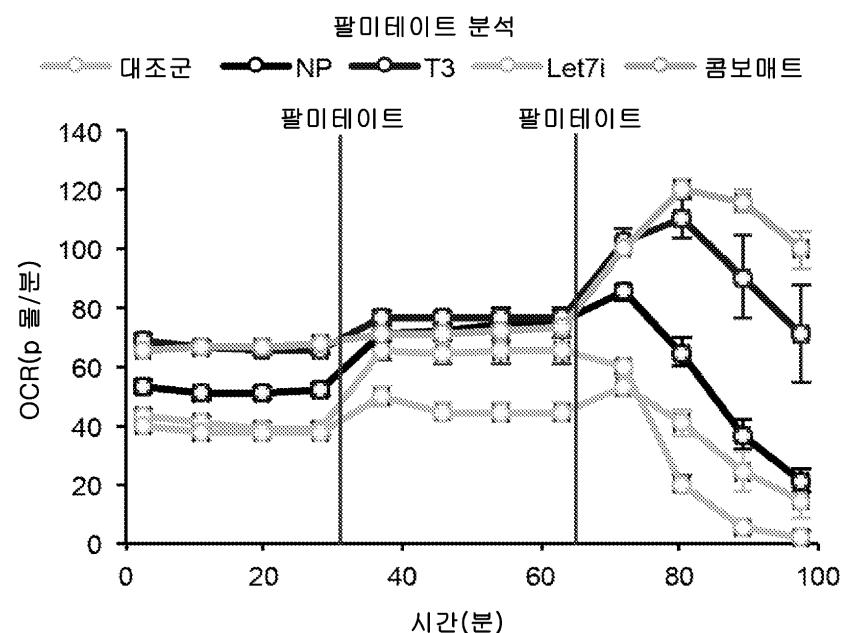
도면9a



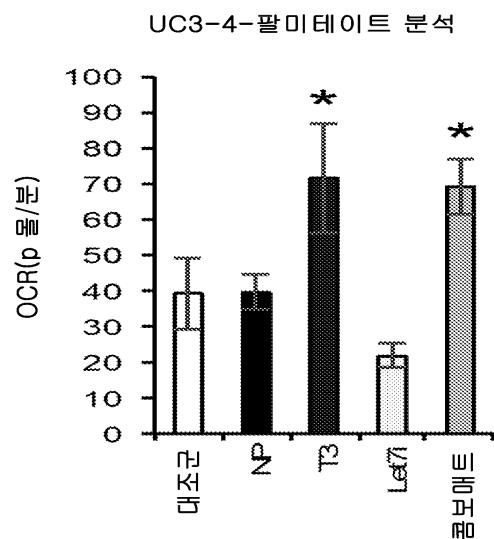
## 도면9b



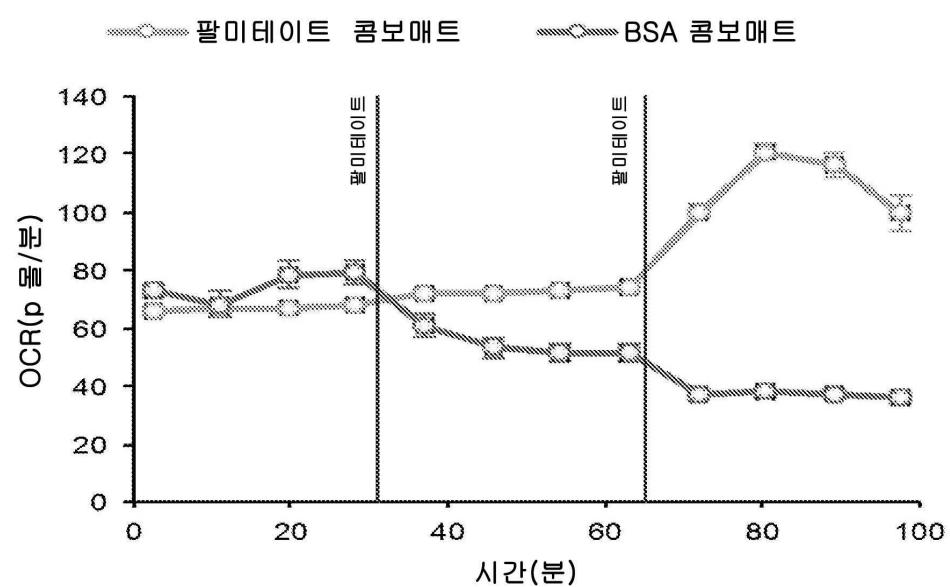
## 도면9c



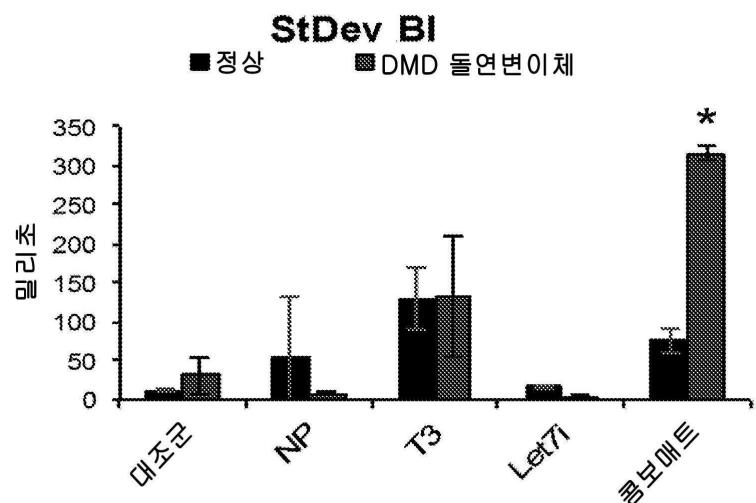
## 도면9d



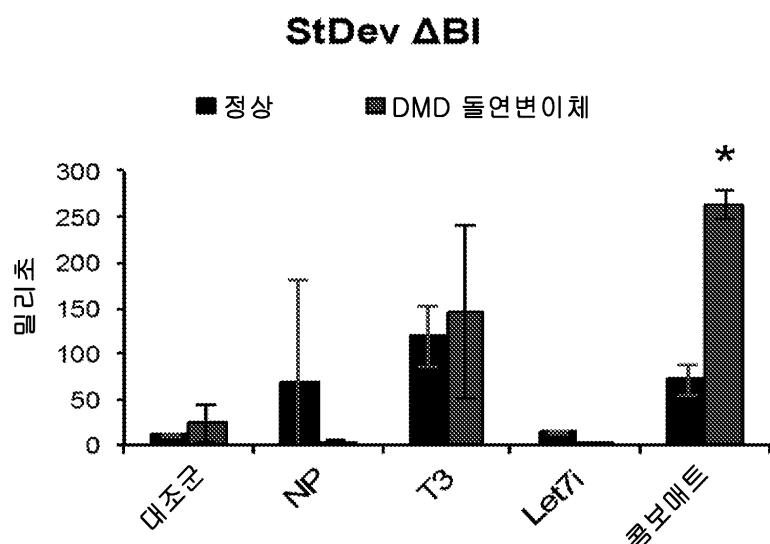
## 도면9e



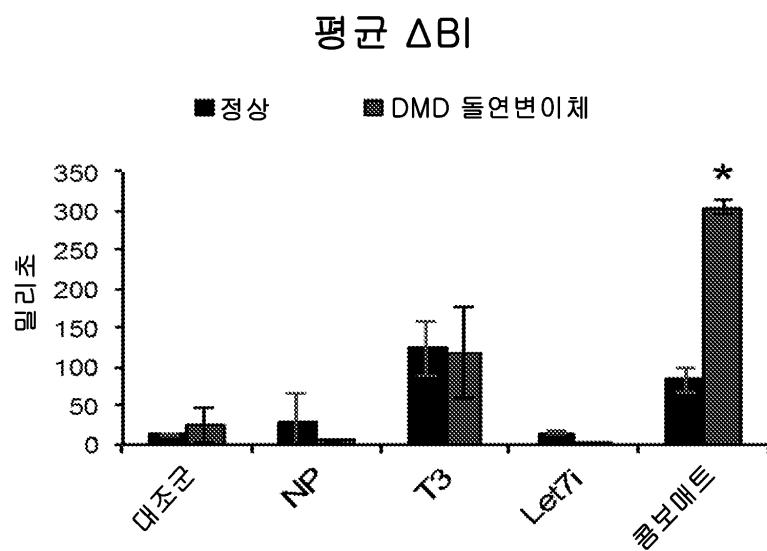
도면10a



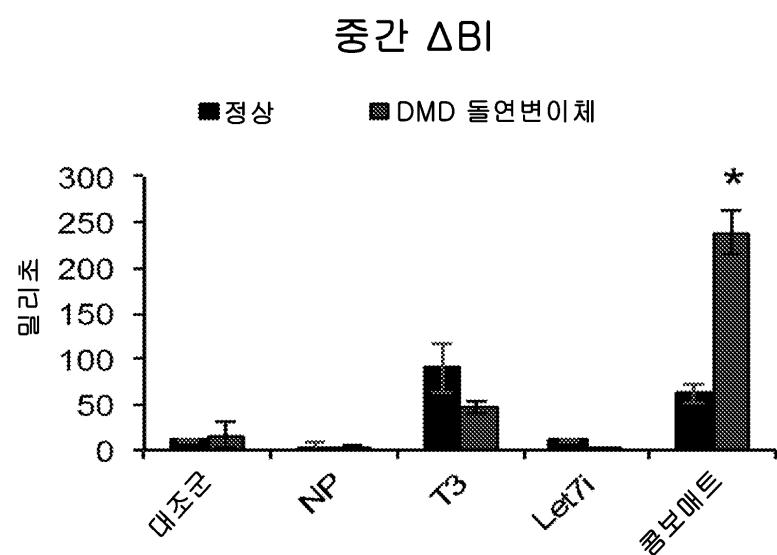
도면10b



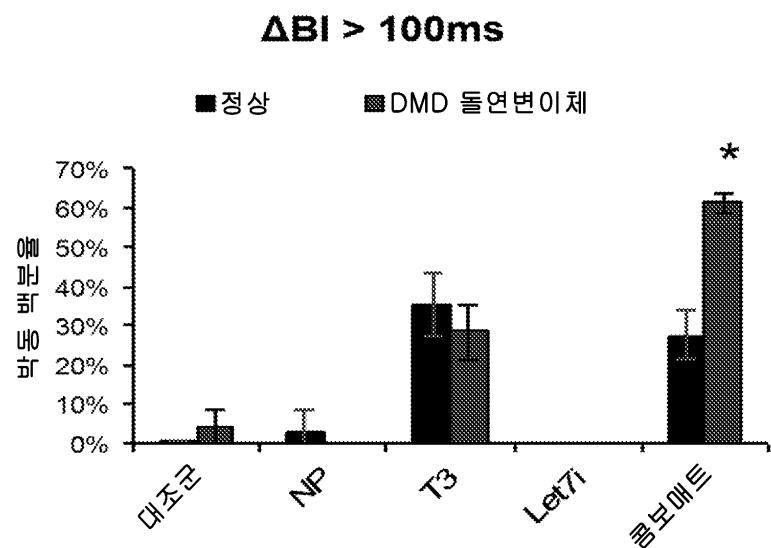
도면10c



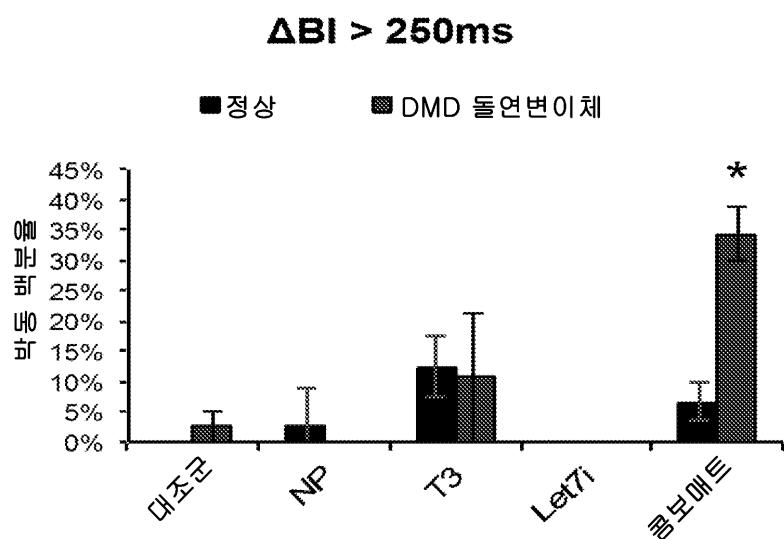
도면10d



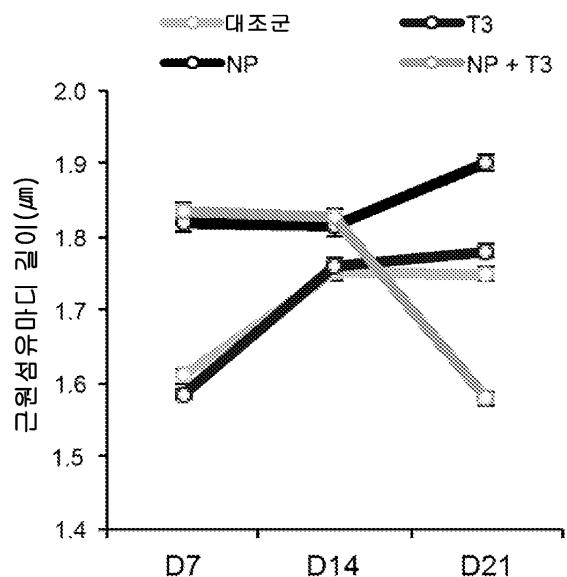
도면10e



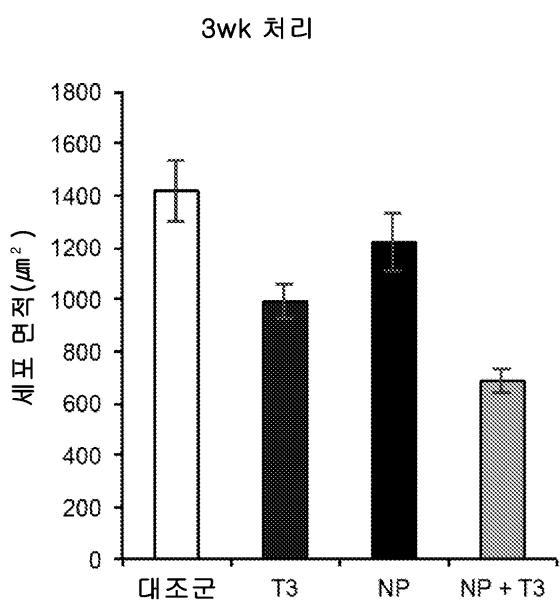
도면10f



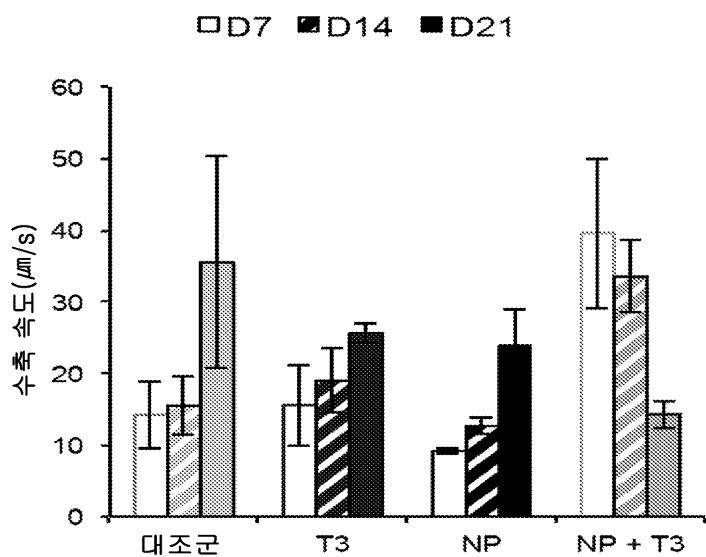
도면11a



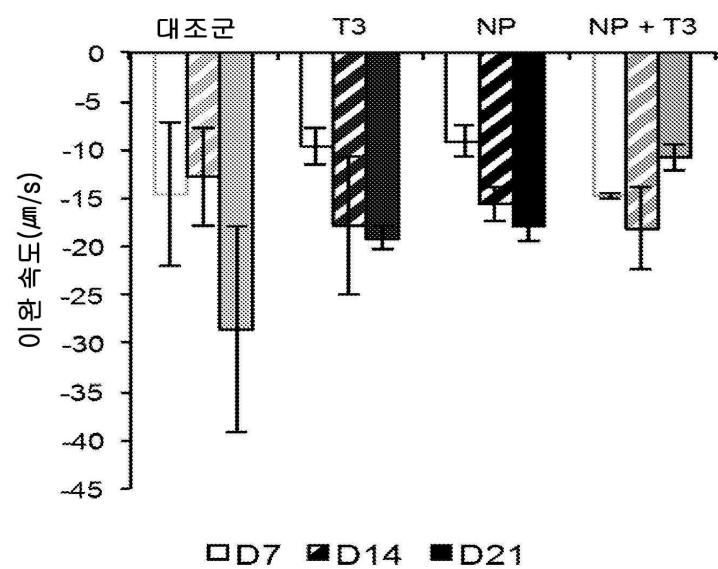
도면11b



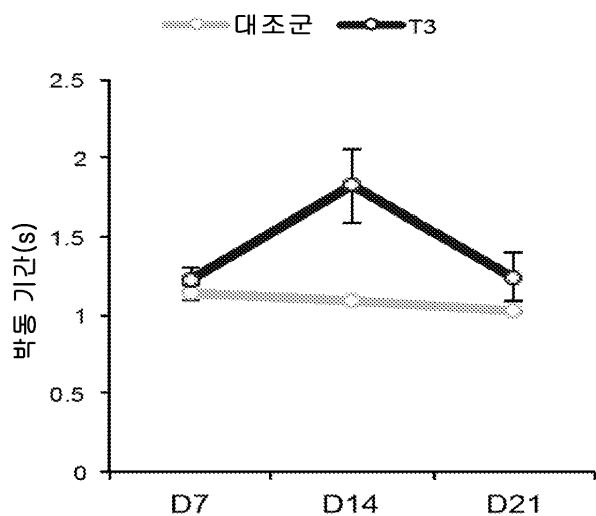
도면11c



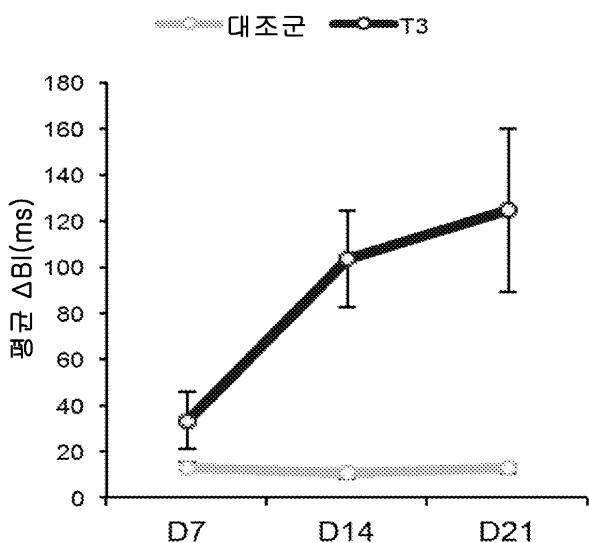
도면11d



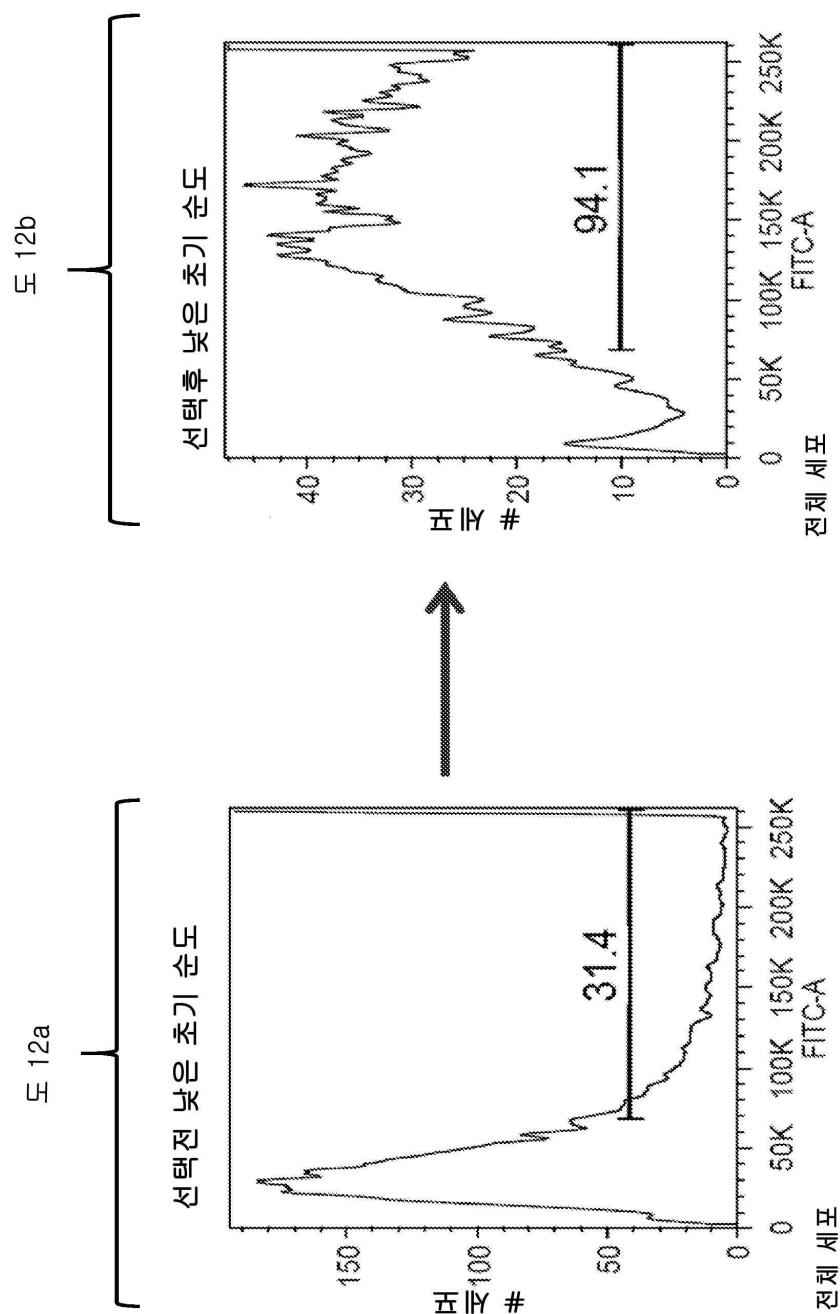
도면11e



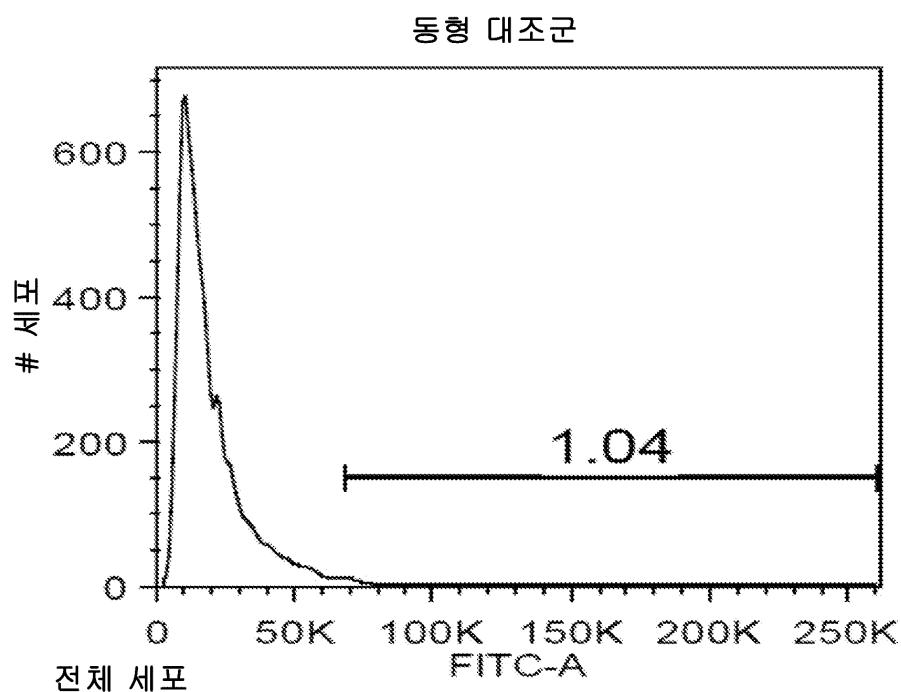
도면11f



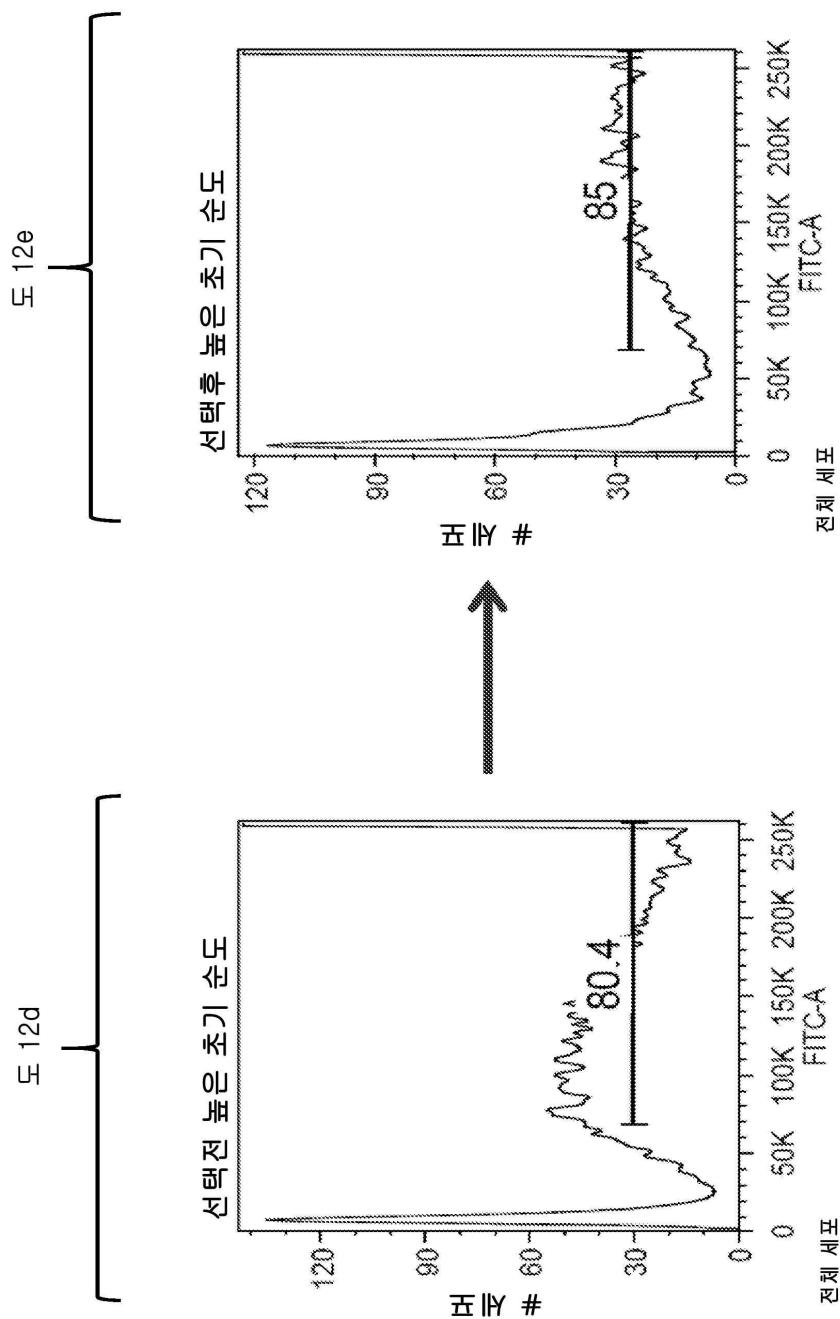
도면 12ab



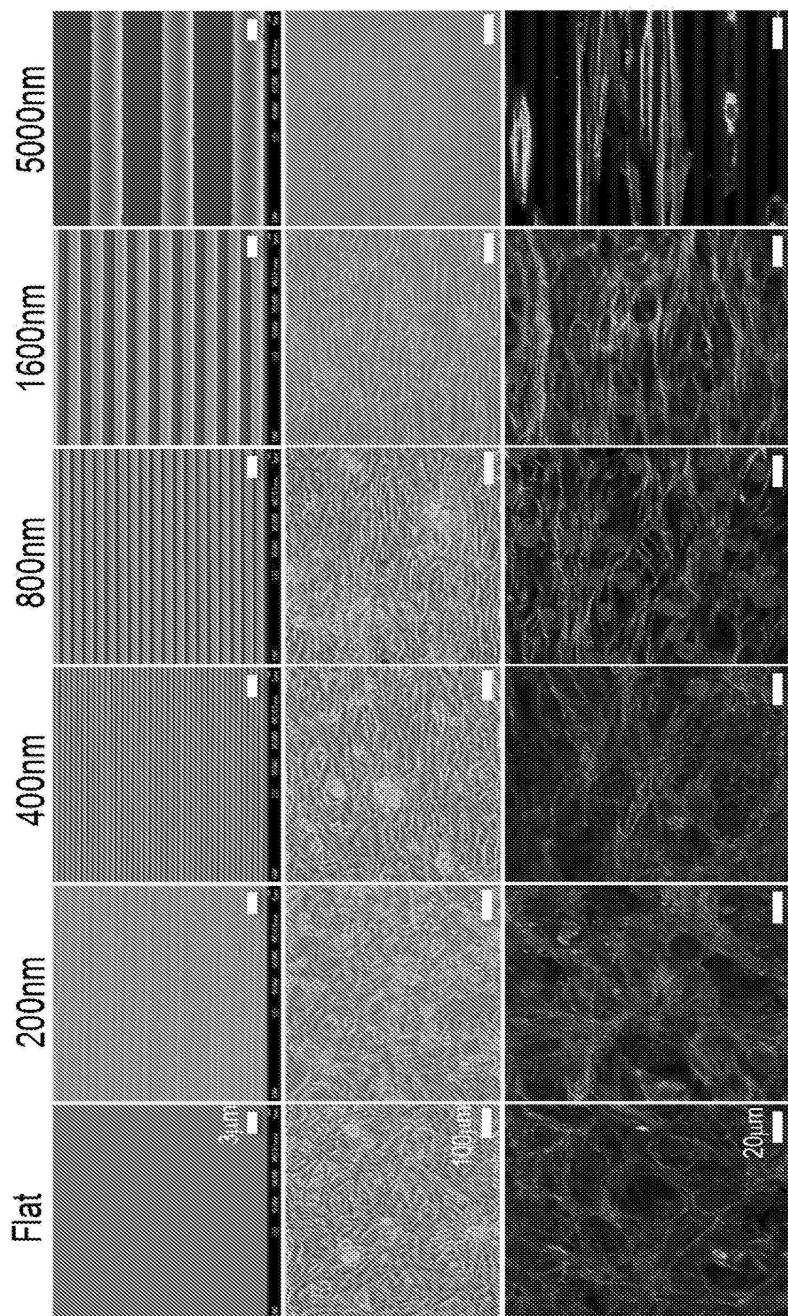
도면12c



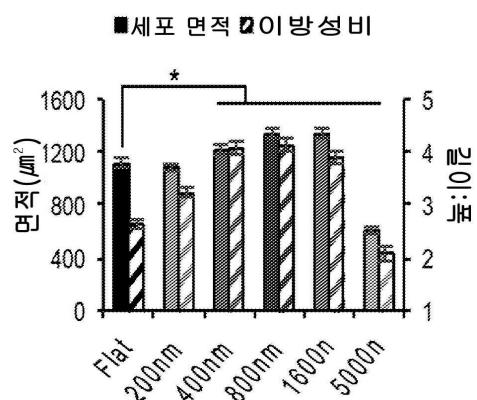
도면 12de



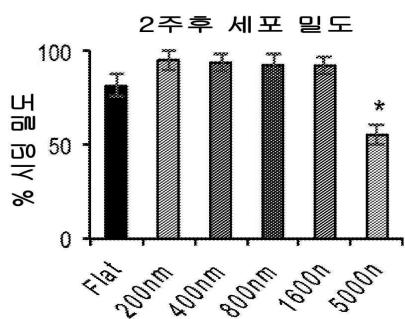
도면13a



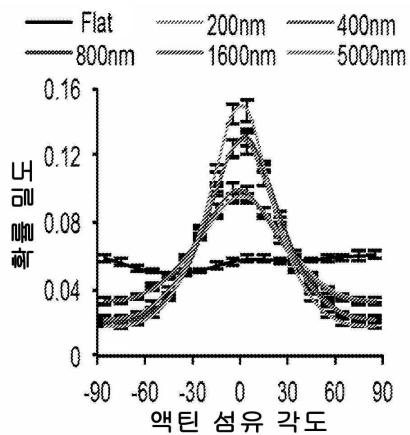
도면13b



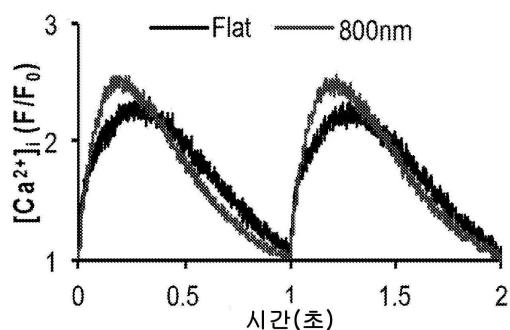
도면13c



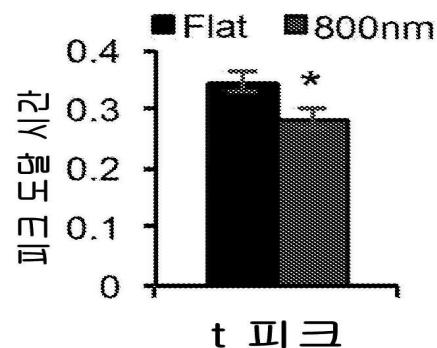
도면13d



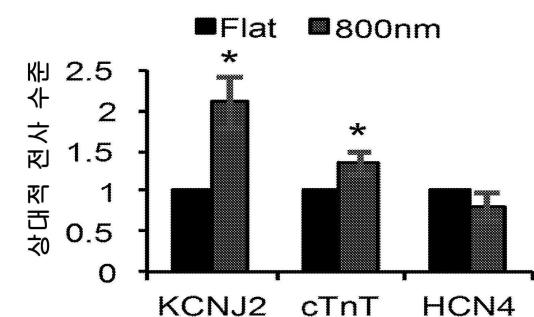
도면13e



도면13f



도면13g



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; UNIVERSITY OF WASHINGTON

&lt;120&gt; COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCING MATURATION STATES OF

HEALTHY AND DISEASED CARDIOMYOCYTES

&lt;130&gt; 034186-092680WOPT

&lt;140&gt; PCT/IB2018/056169

&lt;141&gt; 2018-08-16

&lt;150&gt; 62/546,438

&lt;151&gt; 2017-08-16

&lt;160&gt; 24

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 84

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 1

ctggctgagg tagtagttt tgctgttgtt cgggttgta cattgcccgc tgtggagata 60

actgcgcagg ctactgcctt gcta 84

<210> 2

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 2

ctggctgagg tagtagttt tgctgttgtt cgggttgta cattgcccgc tgtggagata 60

actgcgcagg ctactgcctt gctag 85

<210> 3

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 3

ctggctgagg tagtagttt tgctgttgtt cgggttgta cattgcccgc tgtggagata 60

actgcgcagg ctactgcctt gct 83

<210> 4

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 4

ggccctggc tgaggtagta gtttgtctg ttggtcgggt tgtgacattg cccgctgtgg 60

agataactgc gcaagctact gccttgctag tg 92

<210> 5

<211> 85

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

cuggcugagg uaguaguuug ugcuguuggu cggguuguga cauugccgc uguggagaua	60
acugcgcaag cuacugccuu gcuag	85

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ugagguagua guuugugcu	19
----------------------	----

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 7

uctccutcut cuuucucgu	19
----------------------	----

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<400> 8

ugcucuuuct uctucctu	19
---------------------	----

<210> 9

<211> 19

<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 9	
ucguguuga ugauggagu	19
<210> 10	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 10	
ugagguagua gguuguauag uu	22
<210> 11	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 11	
ugagguagua gguugugugg uu	22
<210> 12	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 12	
ugagguagua gguuguaagg uu	22
<210> 13	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 13	
agagguagua gguugcauag u	21
<210> 14	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	

ugagguagga gguuguauag uu	21
<210> 15	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	
ugagguagua gauuguauag uu	22
<210> 16	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 16	
ugagguagua guuuguacag uu	21
<210> 17	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 17	
ugagguagua guuugugcu	19
<210> 18	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 18	
atgcggatgg gggaaatgtt agaggactgt t	31
<210> 19	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 19	
atgcggatgg gggaaatgtt agaggactgt t	30
<210> 20	

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 20

ugagguagua guuugu

16

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 53

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 21

tttcaaaatg cttgggtgg aagaagtaga ggactgttat gaaagagaag atg

53

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 52

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

&lt;400&gt; 22

tttcaaaatg cttgggtgg aagaatagag gactgttatg aaagagaaga tg

52

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 23

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys

1

5

10

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

&lt;400&gt; 24

Met Leu Trp Trp Glu Glu

1

5