(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0020721
(43) 공개일자 2017년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01) *A61K 35/30* (2015.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
C12N 5/079 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0619 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7001697
(22) 출원일자(국제) 2015년06월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년01월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/038182
(87) 국제공개번호 WO 2015/200897
국제공개일자 2015년12월30일
(30) 우선권주장
62/018,056 2014년06월27일 미국(US)

(71) 출원인
앤지오크린 바이오사이언스 인코포레이티드
미국 92130 캘리포니아주 샌디에이고 카멜 마운틴 로드 3570
(72) 발명자
창 량
미국 19144 펜실베이니아주 필라델피아 에이-613 위사이콘 애비뉴 5450
데이비스 클로드 제프리
미국 95602 캘리포니아주 오번 벨 로드 5190
놀란 다니엘 조지프
미국 10532 뉴욕주 호손 암스테르담 애비뉴 56
(74) 대리인
유미특허법인

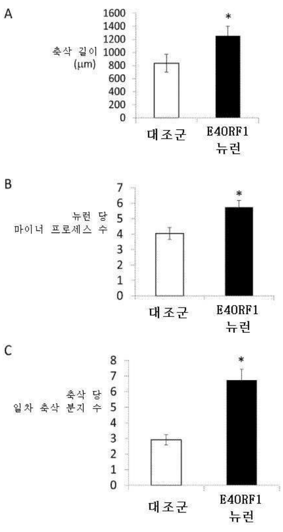
전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭 **아데노바이러스 E4ORF1을 발현하는 신경 세포 및 그 제조 방법과 용도**

(57) 요 약

본 발명은, 일부 측면에서, 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는/또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 제공한다. 또한, 본 발명은 이러한 조작된 세포의 제조 및 이용 방법과, 이러한 조작된 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 5/0622 (2013.01)

C12N 2710/10333 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 신경 세포 (engineered neural cell), 신경계 줄기 세포 (neural stem cell) 또는 신경계 전구 세포 (neural progenitor cell) 집단.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포가 뉴런 세포인, 세포 집단.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 조작된 뉴런 세포가 해마 뉴런인, 세포 집단.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 뉴런 세포가 βIII 투불린, MAP2, tau, NeuN 및 신경미세섬유(neurofilament)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는, 세포 집단.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포가 신경교 세포 (glial cell)인, 세포 집단.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 신경교 세포가 성상세포, 희돌기세포, 상의세포, 방사 신경교 (radial glia), 슈반 세포, 위성 세포 및 장 신경교 세포 (enteric glial cell)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포 집단.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 신경교 세포가 성상세포인, 세포 집단.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 조작된 신경교 세포가 신경교 백색질 산성 단백질 (GFAP: glial fibrillary acid protein), 신경교 세포-유래 신경영양 인자 (GDNF: glial cell-derived neurotrophic factor) 및 GLT-1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는, 세포 집단.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 조작된 신경교 세포가 GFAP-양성 성상세포인, 세포 집단.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포가 원시 신경 세포 (primary neural cell)이거나 또는 원시 신경 세포로부터 유래되는, 세포 집단.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포가 줄기 세포, 전구 세포 또는 비-신경 세포 (non-neural cell)로부터 유래되는, 세포 집단.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포가 만능성 (pluripotent) 줄기 세포로부터 유래되는, 세포 집단.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 만능성 줄기 세포가 배아 줄기 세포 또는 유도된 만능성 줄기 세포 (iPSC, induced pluripotent stem cell)인, 세포 집단.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포가 비-신경 세포의 리프로그래밍 (reprogramming)에 의해 유도된, 세포 집단.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포가 비-신경 세포의 트랜스-분화 (trans-differentiation)에 의해 유도된, 세포 집단.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포가 포유류 세포인, 세포 집단.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포가 인간 세포인, 세포 집단.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포가 단리된 세포인, 세포 집단.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 세포 집단이 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포로 된 실질적으로 순수한 세포 집단인, 세포 집단.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포가 시험관내 상태인, 세포 집단.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포가 살아있는 개체의 생체내 상태인, 세포 집단.

청구항 22

생체내 이식 시술용으로서의 제1항에 따른 세포 집단의 용도.

청구항 23

신경 세포 결함, 신경 세포 결핍 또는 신경 세포 손상과 관련된 질환, 장애 또는 병태의 치료 방법에서의 활용을 위한 제1항에 따른 세포 집단의 용도.

청구항 24

신경 세포 결함, 신경 세포 결핍 또는 신경 세포 손상과 관련된 질환, 장애 또는 병태의 치료 방법으로서,

제1항에 따른 조작된 신경 세포 집단을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 병태가 외상성 뇌 손상, 척추 손상, 다발성 경화증 (MS), 바이러스성

급성 탈수초화 (post viral acute demyelination), 횡단성 척수염, 만성 염증성 탈수초 다발성신경병증 (CIDP), 귈랑 바레 증후군, 진행성 다초점 백색질 뇌병증 (progressive multifocal leukoencephalopathy, PML), 백질이영양증 (leukodystrophies), 부신백질이영양증 (adrenoleukodystrophy), 크라베 백질이용양증 (Krabbe leukodystrophy), 이염성 백질이영양증 (metachromatic leukodystrophy), 알렉산더병 (Alexander disease), 카나반병 (Canavan disease), 코케인 증후군 (Cockayne syndrome) 및 펠리제우스 메르츠바하 병 (Pelizaeus-Merzbacher disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 치료 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 병태가 신경퇴행성 질환, 신경발달 질환, 또는 뉴런의 탈수초화 또는 수초형성부전 (dysmyelination)과 관련된 질환인, 치료 방법.

청구항 27

제1항에 따른 세포 집단 및 담체 용액을 포함하는 조성물.

청구항 28

제1항에 따른 세포 집단 및 살아있는 개체에 투여하기에 적합한 담체 용액을 포함하는 치료학적 조성물.

청구항 29

조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포 집단의 제조 방법으로서,

아데노바이러스 E4ORF1 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 하나 이상의 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포에 도입하여, 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 제조하는 단계

를 포함하는, 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포 집단의 제조 방법.

청구항 30

조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포 집단의 제조 방법으로서,

(a) 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포 집단을 수득하는 단계, 및

(b) 상기 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 배양하는 단계

를 포함하는, 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포 집단의 제조 방법.

청구항 31

조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포 집단의 제조 방법으로서,

(a) 하나 이상의 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 수득하는 단계;

(b) 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을, 상기 하나 이상의 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포에 도입하여, 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 배양하는 단계

를 포함하는, 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포 집단의 제조 방법.

청구항 32

조작된 신경 세포 집단의 제조 방법으로서,

(a) 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 하나 이상의 줄기 세포 또는 전구 세포에 도입하여, 조작된 줄기 세포 또는 전구 세포를 제조하는 단계, 및

(b) 상기 조작된 줄기 세포 또는 전구 세포를 신경 세포로 분화시켜, 조작된 신경 세포 집단을 제조하는 단계

를 포함하는, 조작된 신경 세포 집단의 제조 방법.

청구항 33

조작된 신경 세포 집단의 제조 방법으로서,

(a) 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 조작된 줄기 세포 또는 전구 세포 집단을 수득하는 단계, 및

(b) 하나 이상의 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 분화시켜, 조작된 신경 세포를 제조하는 단계

를 포함하는, 조작된 신경 세포 집단의 제조 방법.

청구항 34

제29항, 제32항 또는 제33항 중 어느 한항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 배양하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 35

제29항 내지 제33항 중 어느 한항에 있어서, 상기 조작된 신경 세포가 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 발현하는, 방법.

청구항 36

제29항 내지 제33항 중 어느 한항에 있어서, 상기 핵산 분자가 시험관내에서 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포로 도입되는, 방법.

청구항 37

제29항 또는 제32항에 있어서, 상기 핵산 분자가 생체내에서 신경 세포, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포로 도입되는, 방법.

청구항 38

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 줄기 세포 또는 전구 세포가 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포인, 방법.

청구항 39

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 줄기 세포가 만능성 줄기 세포인, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 만능성 줄기 세포가 배아 줄기 세포 또는 유도된 만능성 줄기 세포 (iPSC)인, 방법.

청구항 41

제29항, 제31항 또는 제32항 중 어느 한항에 있어서, 상기 도입하는 단계가 형질감염에 의해 수행되는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 형질감염이 리포좀-매개 형질감염, 폴리브렌-매개 형질감염, DEAE 덱스트란-매개 형질감염, 전기천공, 칼슘 포스페이트 석출, 미세주입 및 미립자 충격 (micro-particle bombardment)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 이용해 수행되는, 방법.

청구항 43

제29항, 제31항 또는 제32항에 있어서, 상기 도입하는 단계가 바이러스-매개 형질전이에 의해 수행되는, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 바이러스-매개 형질전이가 렌티바이러스-매개 형질전이, 아데노바이러스-매개 형질전이,

레트로바이러스-매개 형질전이, 아데노-관련 바이러스-매개 형질전이 (adeno-associated virus-mediated transduction) 및 헤르페스 바이러스-매개 형질전이로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 이용해 수행되는, 방법.

청구항 45

뉴런 집단을 배양하기 위한 공동-배양 방법으로서,

뉴런 집단과 조작된 신경교 세포 집단을 함께 동일 배양조에서 배양하는 단계를 포함하며,

상기 조작된 신경교 세포가 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 뉴런 집단을 배양하기 위한 공동-배양 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 조작된 신경교 세포가 상기 배양조의 표면 위에 피더 세포 층 (feeder cell layer)을 형성하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 뉴런이 상기 피더 세포 층 상에 놓여지는, 방법.

청구항 48

뉴런의 배양 방법으로서,

뉴런의 집단을, 신경교 세포로 컨디셔닝화된 배지 (glial-cell conditioned medium)와 접촉시키는 단계를 포함하며,

상기 신경교 컨디셔닝화된 배지는, 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 신경교 세포의 배양으로부터 수득되는, 뉴런의 배양 방법.

청구항 49

뉴런의 배양 방법으로서,

(a) 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 신경교 세포 집단을 수득하는 단계,

(b) 상기 조작된 신경교 세포를 배양조에서 배양하는 단계,

(c) 상기 배양조로부터 컨디셔닝화된 배지를 수집하는 단계,

(d) 상기 컨디셔닝화된 배지를 뉴런의 배양물에 첨가하는 단계, 및

(e) 뉴런을 배양하는 단계

를 포함하는, 뉴런의 배양 방법.

청구항 50

아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 신경교 세포를 배양하여 수득되는, 컨디셔닝화된 세포 배양 배지.

청구항 51

조작된 신경교 세포 집단을 포함하는 시험관내 혈액 뇌 장벽 모델 시스템으로서,

상기 조작된 신경교 세포가 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 시험관내 혈액 뇌 장벽 모델 시스템.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 조작된 신경교 세포가 성상세포인, 시스템.

청구항 53

하기 (a) 내지 (c)를 포함하는, 시험관내 혈액 뇌 장벽 모델 시스템 또는 키트:

(a) 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 신경교 세포 집단,

(b) 혈관 주위 세포, 및

(c) 내피 세포.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 조작된 신경교 세포가 성상세포인, 시스템 또는 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2014년 6월 27일자 미국 가출원 번호 62/018,056호에 대해 우선권을 주장하며, 이 미국 특허 출원의 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003] 참조에 의한 병합

[0004] 단순 원용에 의한 병합을 허용하는 법을 가진 국가들에 대해, 본원에 인용되는 모든 문헌들의 내용은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

배 경 기 술

[0005] 아데노바이러스의 초기 4 (E4) 영역은 6개 이상의 오픈 리딩 프래임 (E4ORF)을 포함한다. E4 전체 영역은 혈관 신생을 조절하고, 내피 세포의 생존을 증진하는 것으로 이전에 확인된 바 있다 (Zhang et al. (2004), J. Biol. Chem. 279(12):11760-66). 또한, E4 전체 영역 중, E4ORF1 서열이 내피 세포에서 이러한 생물학적 작용을 담당한다는 것도 밝혀져 있다. 미국 특허 제 8,465,732호와 Seandel et al. (2008), "Generation of a functional and durable vascular niche by the adenoviral E4ORF1 gene," PNAS, 105(49):19288-93을 참조한다. 그러나, 출원인이 아는 한, 본 발명 이전에는, 아데노바이러스 E4 영역, 특히 E4ORF1 서열이 뉴런 세포 또는 신경교 세포 (glial cell)에 유익한 작용을 할 수도 있음을 시사하는 증거는 존재하지 않았다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은, 부분적으로는, 아데노바이러스 E4ORF1 서열의 발현이 뉴런 세포 및 신경교 세포 - 이를 총괄하여 본원에서 신경 세포라 함 - 에 특별한 유익한 효과를 발휘할 수 있다는 놀라운 발견을 기초로 한다. 예를 들어, 아데노바이러스 E4ORF1을 발현하는 신경교 세포가, E4ORF1을 발현하지 않는 신경교 세포와 비교해, 증식율 증가를 나타내며, 더 많은 집단 배가 횟수로 시험관내에서 계대배양가능하다는 것을 밝혀내었다. 마찬가지로, 아데노바이러스 E4ORF1을 발현하는 뉴런 세포도, E4ORF1을 발현하지 않는 뉴런 세포와 비교해, 축삭의 길이 증가, 마이너 프로세스 (minor process)의 횟수 증가 및 축삭 당 분지의 수 증가를 나타낸다는 것을 확인하였다. 이러한 효과들은 신경 세포의 어떠한 명백한 탈-분화나 또는 형질전환 없이 달성되었으며 - E4ORF1-발현 뉴런 세포와 신경교 세포는 특정 세포 타입에 특이적인 마커를 계속 발현하여, 그 세포 타입에 특징적인 세포 형태를 유지하였다. 이러한 사실을 기반으로, 일부 구현예에서, 본 발명은, 세포를 형질전환하지 않거나 또는 세포의 정상적인 표현형 특징 및/또는 계통 아이덴터티 (lineage identity)를 파괴하지 않으면서도, 신경 세포를 수득, 유지 또는 배양하는 새로운 방법을 제공한다. 마찬가지로, 다른 구현예에서, 본 발명은, 비-제한적인 예로, 치료학적인 용도 등의 다양한 상황에 이용될 수 있는 새로운 조작된 신경 세포를 제공한다. 예를 들어, 뉴런에서 축삭의 길이와 마이너 프로세스 횟수 증가 및 축삭 분지의 수를 증가시키는 능력은, 뉴런 재생 및/또는 회복을 수반하는 치료학적인 용도에 이점을 제공할 수 있는 것으로 여겨진다. 마찬가지로, 신경교 세포 또는 증식율이 높은 신경교 세포를 대량 제조하는 능력 역시 신경교의 재생 및/또는 회복을 수반하는 치료학적인 용도에 이점

을 제공할 수 있는 것으로 여겨진다. 본 발명의 이러한 측면과 그외 측면들은 아래에서 본원의 전체에서 더 상세히 기술된다.

[0007] 일부 구현예에서, 본 발명은, 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체 - 본 발명의 "상세한 설명"에 기술 및 정의됨)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조작된 신경 세포의 집단, 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)를 포함하는 조작된 신경 세포의 집단을 제공한다. 일부 이러한 구현예에서, 신경 세포는 뉴런 세포이다. 또 다른 이러한 구현예에서, 신경 세포는 신경교 세포이다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단, 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)를 포함하는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단을 제공한다. 일부 이러한 구현예에서, 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포는 뉴런 전구 세포이다. 또 다른 이러한 구현예에서, 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포는 신경교 전구 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포의 집단 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단)은 단리된 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포의 집단 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단)은 실질적으로 순수한 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포의 집단 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단)은 시험관내에, 예를 들어 세포 배양물로 존재한다. 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포의 집단 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단)은 생체내, 예를 들어 살아있는 개체에 존재한다.

[0008] 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 조작된 신경 세포의 집단 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단)을 포함하는 조성물을 제공한다. 이 조성물은 생리식염수와 같은 담체 용액을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 이 조성물은 - 조작된 신경 세포의 집단 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단)과 인간 개체 등의 개체에게 투여하기 적합한 담체 용액을 포함하는 - 치료학적 조성물일 수 있다.

[0009] 세포 집단, 및 본원에 기술된, 이러한 세포 집단을 포함하는 조성물은 (본 특허 내용의 다른 섹션에서 추가로 기술된 바와 같이) 다양한 용도로 이용될 수 있다. 일반적으로, 본원에 제공되는 조작된 신경 세포 및 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포는, 비-제한적인 예로, 기초 과학 연구 용도, 세포 배양법 (뉴런/신경교 공동-배양 방법), 신경 질환에 대한 모델 시스템, 조직 모델 시스템 (예, 혈액 뇌 작별 모델 시스템), 타겟 발견, 약물 개발, 및 약물 효능, 독성 및/또는 안전성 검사 등의, 비-조작된 (즉, E4OFR1-비발현성) 신경 세포 또는 신경계 줄기 또는 전구 세포가 현재 사용되거나 또는 사용될 수 있었던, 모든 용도로 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포)는, 비-제한적인 예로, 생체내 세포 이식 시술 등의 치료학적인 용도로 유용할 수 있다.

[0010] 일부 구현예에서, 본 발명은, 신경 세포에서 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이 또는 단편)를 코딩하는 핵산 서열의 발현, 또는 신경 세포로의 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)의 전달을 수반하는, 다양한 방법들을 제공한다. 이에 대한 일부 구현예에서, 신경 세포는 뉴런 세포이다. 이에 대한 다른 구현예에서, 신경 세포는 신경교 세포이다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포에서 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이 단편 또는 펩타이드 모방체)를 코딩하는 핵산 서열의 발현, 또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포로의 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)의 전달을 수반하는, 다양한 방법들을 제공한다. 일부 구현예에서, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포는 뉴런 줄기 세포 또는 뉴런 전구 세포일 수 있다. 다른 구현예에서, 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포는 신경교 줄기 세포 또는 신경교 전구 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)는 단리된 세포이다. 일부 구현예에서, 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)는 실질적으로 순수한 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)는 시험관내에, 예를 들어 세포 배양물로 존재한다. 일부 구현예에서, 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)는 생체내, 예를 들어 살아있는 개체에 존재한다.

[0011] 예를 들어, 일 구현예에서, 본 발명은, 아데노바이러스 E4ORF1 단백질 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)을 코딩하는 핵산 분자를 하나 이상의 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)에 도입하여 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포)를 제조하는 단계를 포함하며, 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포)가 E4ORF1 폴리펩타이드를 발현

하는, 조작된 신경 세포의 집단 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단)의 제조 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은, (a) 아데노바이러스 E4ORF1 단백질 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)을 코딩하는 핵산을 하나 이상의 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)에 도입하여 E4ORF1 폴리펩타이드를 발현하는 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 조작된 신경계 전구 세포)를 제조하는 단계, 및 (b) 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포)를 시험관내에서 배양하는 단계를 포함하는, 조작된 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)의 집단을 시험관내에서 수득하는 방법을 제공한다. 이와 유사하게, 다른 구현예에서, 본 발명은, (a) E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)를 발현하는 조작된 신경 세포의 집단 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단)을 수득하는 단계, 및 (b) 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포)를 배양하는 단계를 포함하는, 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)의 배양 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은, (a) 하나 이상의 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)를 수득하는 단계, (b) 아데노바이러스 E4ORF1 단백질 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)을 코딩하는 핵산 분자를 하나 이상의 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)에 도입하여, E4ORF1 폴리펩타이드를 발현하는 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 조작된 신경계 전구 세포)를 제조하는 단계, 및 (c) 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포)를 배양하는 단계를 포함하는, 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)의 배양 방법을 제공한다. 또 다른 예시적인 구현예에서, 본 발명은, (a) 아데노바이러스 E4ORF1 단백질 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)을 코딩하는 핵산 분자를 하나 이상의 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포에 도입하여 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 제조하는 단계, 및 (b) 하나 이상의 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 분화시켜, E4ORF1 단백질을 발현하는 조작된 신경 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다. 또 다른 예시적인 구현예에서, 본 발명은, (a) 아데노바이러스 E4ORF1 단백질 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)을 발현하는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포의 집단을 수득하는 단계, 및 (b) 하나 이상의 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 분화시켜, E4ORF1 단백질을 발현하는 조작된 신경 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다. 또 다른 예시적인 구현예에서, 본 발명은, (a) 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포의 집단을 수득하는 단계, (b) 아데노바이러스 E4ORF1 단백질 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)을 코딩하는 핵산 분자를 하나 이상의 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포에 도입하여, 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 제조하는 단계, 및 (c) 하나 이상의 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 분화시켜, E4ORF1 단백질을 발현하는 조작된 신경 세포를 제조하는, 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 이러한 구현예들과 그외 구현예들이 본원의 다른 부분들에서 추가로 설명된다. 또한, 당해 기술 분야의 당업자에게 자명한 바와 같이, 본원에 기술된 다양한 구현예들에 대한 일부 변형 및 조합들은 본 발명의 범위에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1. 해마 뉴런에서 축삭 길이 (도 1A), 뉴런 당 마이너 프로세스의 수 (도 1B) 및 축삭 당 일차 축삭 분지의 수 (도 1C)에 대한 E4ORF1의 발현 효과를 나타낸 그래프. 데이타는 E4ORF1 + GFP ("E4ORF1") 또는 GFP 단독 ("대조군")을 형질도입한 후 수득하였다. "*" 기호는 통계적인 유의성을 표시한다 ($p < 0.05$). E4ORF1-발현성 해마 뉴런은 축삭 길이, 뉴런 당 마이너 프로세스의 횟수 및 축삭 당 일차 축삭 분지의 갯수에 대해 대조군과 비교해 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다.

도 2. 대조군 (도 2A, 2B 및 2C) 및 E4ORF1-발현성 해마 뉴런 (도 2D, 2E 및 2F)의 예시적인 형광 현미경 사진. 대조군 및 E4ORF1 그룹 둘다, 뉴런은 푸른 형광 단백질 (GFP)을 발현한다. 발생되는 푸른 형광은 본원에 제공된 사진의 흑백톤 버전으로 (어두운 백그라운드 대비) 밝은/백색으로 보여진다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본원의 "발명의 내용", "도면", "도면의 간단한 설명", "실시예" 및 "청구항" 부분들은 본 발명의 주요 구현예들 중 일부를 기술한다. "발명에 대한 구체적인 내용" 부분에서는 본 발명의 조성물 및 방법에 대한 구체적인 설명을 제시하며, 본원의 다른 모든 부분들과 연결시켜 읽히도록 의도된다. 아울러 당해 기술 분야의 당업자에게 자명한 바와 같이, 본원 전체에 기술된 여러가지 구현예들은 다양한 여러 방식으로 조합될 수 있으며, 그렇게 의도된다. 본원에 기술된 구체적인 구현예들에 대한 이러한 조합은 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 의도

된다.

[0015] I. 정의

[0016] 몇가지 정의들이 하기에 제공된다. 본원의 도처에서 다른 용어들이 정의되어 있으며, 용어들은 그 용어가 사용된 문맥에서 명확한 의미를 가지거나 또는 당해 기술 분야에서 그 용어의 통상적인 의미로 사용된다.

[0017] 본원에서, "약" 및 "대략"이라는 용어들은 수치 값에 대해 사용되는 경우 언급된 값에서 ± 20%를 의미한다.

[0018] 본원에서, 세포 또는 세포군 세포 (예, 대조군 세포, 대조 세포군 등)를 기술하기 위해 형용사 또는 명사로서 사용되는 용어 "대조군"은 확립된 과학적 의미로 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 몇몇 구현예들은 "조작된" 세포와 "대조군" 세포 간의 비교를 수반한다. 이러한 구현예에서, "조작된 세포"는 전형적으로 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는 반면, "대조군" 세포는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드는 포함하지 않지만, "조작된" 세포와 동일한 타입의 세포이고 (예, 조작된 세포가 성상세포인 경우, 대조군 세포 역시 성상세포여야 함), "조작된" 세포와 유사하게 (또는 기본적으로는 동일하게 또는 동일하게) - 표준적인 과학 실무에 따라 - 처리된다는 점에서 "조작된" 세포와 비교가능하다. 예를 들어, 조작된 세포 및 대조군 세포는 동등한 방식으로 또는 기본적으로 동일한 방식으로 취급 및/또는 배양되어야 한다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 조작된 세포가 유래된 세포의 집단을 포함할 수 있으며 - 예를 들어, 대조 세포군은, 후속적으로 예를 들어 E4ORF1 서열의 형질도입에 의해 조작하여 조작된 세포를 제조하는, (예, E4ORF1 서열의 형질도입 전) 출발 세포 집단을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 대조군 세포는 조작된 세포가 유래된 출발 세포 집단을 포함하지 않을 수도 있지만, 조작된 세포와 동일한 타입의 세포의 다른 집단을 대신 포함할 수 있다.

[0019] 본원에서, 용어 "배양"은 다양한 유형의 배지 상에서 또는 배지 내에서의 세포 증식을 의미한다. "공동-배양"은 다양한 유형의 배지 상에서 또는 배지 내에서 2종 이상의 구분되는 타입의 세포들을 증식시키는 것을 의미하며, 예를 들어, 일부 구현예에서, 뉴런 세포와 신경교 세포가 공동-배양될 수 있다.

[0020] 본원에서, 용어 "E4ORF1" 및 "아데노바이러스 E4ORF1"은, 아데노바이러스 초기 4 ("E4") 게놈 영역의 오픈-리딩 프래임 1 (또는 "ORF1")을 지칭하며, 이는 아래에서 보다 상세하게 기술된다. 구체적으로 그렇지 않은 것으로 언급되지 않은 한, "E4ORF1" 또는 "아데노바이러스 E4ORF1"에 대한 언급은 "E4ORF1" 단백질/폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 "E4ORF1" 단백질/폴리펩타이드를 지칭하는 것일 수 있다. "E4ORF1" 뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩타이드를 수반하는 본원에 제공된 각각의 구현예에서, 이들 구현예는 또한 상기한 뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩타이드의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체를 이용해 수행될 수 있으며 - 이러한 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체는 본원에 기술된 하나 이상의 기능적인 특성 (비-제한적인 예로, 신경교 세포에서 발현되었을 때 세포 증식을 증가시키는 능력과 뉴런 세포에서 발현되었을 때 축삭의 길이를 증가시키는 능력)을 가지거나 또는 보유한다. E4ORF1과 관련된 추가적인 설명과 정의는 하기에 제공된다.

[0021] 본원에서, 용어 "유효량"은, 본원에 기술된 바람직한 한가지 이상의 성과에 대해 검출가능한 수준의 긍정적인 효과를 달성하기에 충분한, 본원에 기술된, 명시된 물질 또는 세포 집단 (예, E4ORF1 핵산 분자 또는 벡터, 또는 E4ORF1-발현성 신경 세포의 집단)의 양을 의미한다. 예를 들어, 신경교 세포에서 E4ORF1을 발현하는 경우, 신경교 세포에 도입/전달되어야 하는 E4ORF1 뉴클레오티드 서열 (예, 벡터) 또는 E4ORF1 폴리펩타이드의 유효량은, 대조군 (E4ORF1-비발현) 세포과 비교해 신경교 세포의 증식율에 검출가능한 수준의 증가를 야기하는 양일 수 있다. 마찬가지로, 뉴런 세포에서 E4ORF1을 발현하는 경우, 뉴런 세포에 도입/전달되어야 하는 E4ORF1 뉴클레오티드 (예, 벡터) 또는 E4ORF1 폴리펩타이드의 유효량은, 대조군 (E4ORF1-비발현) 세포와 비교해 뉴런 세포의 축삭 길이에 검출가능한 수준의 증가를 야기하는 양일 수 있다. E4ORF1 뉴클레오티드 서열 (예, 벡터), E4ORF1 폴리펩타이드 또는 E4ORF1 발현성 신경 세포를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법의 경우, 개체에게 투여되는 유효량은, 한가지 이상의 바람직한 생물학적 또는 치료학적 지표를, 예를 들어 E4ORF1을 사용하지 않은 대조군과 비교해, 검출가능한 수준으로 개선시키는 (예, 뉴런 재생 개선, 재수초화 (remyelination) 개선 등) 양일 수 있다. 임의의 개개 사례에서 적절한 "유효량"은, 예를 들어, 용량 증가 실험 등의 당해 기술 분야에 공지된 표준 기법을 이용해 실험적으로 결정할 수 있으며, 계획된 용도, 계획된 전달/투여 방식, 바람직한 전달/투여 횟수 등과 같은 인자들을 고려하여 결정할 수 있다. 아울러, "유효량"은 다양한 뉴런 세포 및 신경교 세포의 표현형 특징에 대한 효과를 평가하기 위해 본 명세서의 실시예 부분에 기술된 바와 같은 분석을 이용해 결정할 수 있다.

[0022] 용어 "조작된"은 본원에서 세포에 대해 사용되었을 때 아데노바이러스 E4ORF1 뉴클레오티드 서열 또는 E4ORF1 폴리펩타이드를 발현하도록 조작된 세포를 의미한다. 용어 "조작된 세포"는 임의의 천연적으로 발생되는 세포를 포괄하기 보다는, 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 뉴클레오티드 서열을 세포에 도입한 결과로서의 세포를 아우르기 위한 것으로 의도된다. 이러한 조작된 세포를 제조하기 위해 사용될 수 있는 적합한 재조합 뉴클레오티드 서열에 대한 추가적인 상세 내용은 하기에 제공되며, 예를 들어, 적합한 E4ORF1 서열 (예, cDNA), 적정 벡터, 적정 프로모터 등에 대해 제공된다.

[0023] 본원에서, 용어 "증폭 (expansion)" 또는 증폭 (expanding)"은 세포 또는 세포 배양의 맥락에서, 동일하거나 또는 동일하지 않을 수 있는 세포들로 된 초기 집단으로부터 특정 타입의 세포들의 수적 증가를 의미한다. 증폭에 사용되는 초기 세포들이 증대의 결과로서 생성된 세포와 동일해야 하는 것은 아니다. 예를 들어, 증폭된 세포는 초기 집단의 세포들의 생장 및 분화에 의해 생겨날 수 있다.

[0024] "유전자 변형" 또는 "유전자-변형된"은 세포의 정상적인 뉴클레오티드 서열의 또는 이에 대한 임의의 부가, 결손 또는 파괴를 의미한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 신경 세포는, E4ORF1 서열을 함유 및/또는 발현할 뿐만 아니라, 바람직한 경우 하나 이상의 다른 유전자 변형도 포함할 수 있다. 용어 "유전자 변형"은 유전자 전달 비히클의 사용을 포괄하며, 비-제한적인 예로는, 형질도입 (생체내 또는 시험관내에서의 핵산의 바이러스 매개 수여체로의 전달), 형질감염 (단리된 핵산의 세포로의 흡수), 리포좀 매개 전달 및 당해 기술 분야에 널리 공지된 기타 수단들을 포함한다.

[0025] 본원에서, 용어 "단리된"은, 자연적이든 또는 합성에 의해 제조되든 간에, 본래 생성된 상태에서는 조합된 하나 이상의 다른 생성물, 화합물 또는 조성물로부터 분리되어진 생성물, 화합물 또는 조성물을 지칭한다.

[0026] 본원에서, 용어 "개체" 및 "환자"는 상호 호환적으로 사용되며, 언급된 경우를 제외하고는 인간 및 인간을 제외한 영장류 뿐 아니라 토끼, 랫, 마우스, 염소, 돼지 및 그외 포유류 종 등의 포유류를 지칭한다.

[0027] 본원에서, 세포 집단에 대한 "실질적으로 순수한"이라는 표현은, (예, 하나 이상의 특정 세포 마커, 형태적 특징 또는 기능적 특징의 발현에 의해 측정되는), 명시된 타입의 세포들로 된 집단, 또는 2가지 이상의 서로 다른 세포 타입들이 함께 사용된 구현예에서는 명시된 타입들 (복수)로 된 집단을 지칭하며, 즉, 전체 세포 집단에서 그 세포가 차지하는 비중이 적어도 약 50%, 바람직하게는 적어도 약 75-80%, 더 바람직하게는 적어도 약 85-90%, 가장 바람직하게는 적어도 약 95%인 것을 의미한다. 즉, "실질적으로 순수한 세포 집단"은 명시된 타입 또는 타입들이 아닌 세포를 약 50% 미만으로, 바람직하게는 약 20-25% 미만으로, 더 바람직하게는 약 10-15% 미만으로, 가장 바람직하게는 약 5% 미만으로 포함하는, 세포 집단을 의미한다.

[0028] II. <u>E4ORF1</u>

[0029] E4ORF1 핵산 서열 또는 E4ORF1 폴리펩타이드를 수반하거나 또는 언급하는 본 발명의 각 구현예에서, 사용되는 E4ORF1 서열은 전체 아데노바이러스 E4ORF1 서열이거나, 또는 본원에 기술된 하나 이상의 기능적 특성 (비-제한적인 예로, 신경교 세포에서 세포 증식을 증가시키는 능력 또는 뉴런에서 축삭의 길이를 연장시키는 능력)을 가진 이의 유도체, 변이체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체를 포함할 수 있다. 아데노바이러스 E4ORF1 서열은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 그러한 임의 서열이 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 예를 들어, 인간 아데노바이러스 타입 5 E4 영역 (ORF1 함유)의 서열은 Genbank (예, 등재 번호 D12587)에서 이용가능하다. 본 발명의 일 구현예에서, 사용되는 E4ORF1 서열은 당해 기술 분야에 널리 공지된 인간 아데노바이러스 타입 5의 서열이거나, 또는 인간 아데노바이러스 타입 5의 E4ORF1 서열과 85% 이상의 서열 동일성을 가진 서열이다. 다른 구현예에서, E4ORF1 서열의 변이체 또는 돌연변이는, 본원에 기술된 다양한 세포들의 생존 및 증식을 촉진시키는 능력을 보유한, 인간 아데노바이러스 타입 5의 E4ORF1 서열과 약 85%의 동일성을 가진 서열, 또는 인간 아데노바이러스 타입 5의 E4ORF1 서열과 약 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 서열이다. 다른 구현예에서, E4ORF1의 단편은 인간 아데노바이러스 타입 5의 E4ORF1 서열에 대해 ±30개의 뉴클레오티드 길이 차이, 또는 인간 아데노바이러스 타입 5의 E4ORF1 서열에 대해 약±28개의 뉴클레오티드, ±26개의 뉴클레오티드, ±24개의 뉴클레오티드, ±22개의 뉴클레오티드, ±20개의 뉴클레오티드, ±18개의 뉴클레오티드, ±16개의 뉴클레오티드, ±14개의 뉴클레오티드, ±12개의 뉴클레오티드, ±10개의 뉴클레오티드, ±9개의 뉴클레오티드, ±8개의 뉴클레오티드, ±7개의 뉴클레오티드, ±6개의 뉴클레오티드, ±5개의 뉴클레오티드, ±4개의 뉴클레오티드, ±3개의 뉴클레오티드, ±2개의 뉴클레오티드 또는 ±1개의 뉴클레오티드 길이 차이가 있는 서열이며, 서열은 모두 본원에 기술된 특성, 비-제한적인 예로 본원에 기술된 다양한 세포들의 생존 및 증식을 촉진하는 능력을 보유할 수 있다.

[0030] 다른 예로, 사용되는 E4ORF1 서열은 다른 타입 또는 계통균주 (strain)의 아데노바이러스의 서열이거나 또는 이로부터 유래될 수 있다. 다른 아데노바이러스 E4ORF1 서열에 대한 예로는, 비-제한적으로, 인간 아데노바이러스 9 (Genbank 등재 번호 CAI05991), 인간 아데노바이러스 7 (Genbank 등재 번호 AAR89977), 인간 아데노바이러스 46 (Genbank 등재 번호 AAX70946), 인간 아데노바이러스 52 (Genbank 등재 번호 ABK35065), 인간 아데노바이러스 34 (Genbank 등재 번호 AAW33508), 인간 아데노바이러스 14 (Genbank 등재 번호 AAW33146), 인간 아데노바이러스 50 (Genbank 등재 번호 AAW33554), 인간 아데노바이러스 2 (Genbank 등재 번호 AP.sub.--000196), 인간 아데노바이러스 12 (Genbank 등재 번호 AP.sub.--000141), 인간 아데노바이러스 35 (Genbank 등재 번호 AP.sub.--000607), 인간 아데노바이러스 7 (Genbank 등재 번호 AP.sub.--000570), 인간 아데노바이러스 1 (Genbank 등재 번호 AP.sub.--000533), 인간 아데노바이러스 11 (Genbank 등재 번호 AP.sub.--000474) 및 인간 아데노바이러스 3 (Genbank 등재 번호 ABB 17792) 등이 있다.

[0031] 일부 구현예에서, E4ORF1 핵산 서열은, E4ORF2, E4ORF3, E4ORF4, E4ORF5 및/또는 E4ORF6 서열 또는 이의 변이체, 돌연변이 또는 단편 등의 E4 영역으로부터 유래된 하나 이상의 다른 핵산 서열과, 조합 사용될 수 있다. 예를 들어, E4ORF1 서열은 E4ORF1-발현 세포를 제조하기 위해 E4 영역으로부터 유래되는 하나 이상의 다른 서열과 조합되어 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, E4ORF1 서열은 전체 E4 영역의 컨텍스트 형태가 아니거나, 전체 E4 영역에서 발견되는 각각의 ORF 영역의 컨텍스트 형태가 아니거나, 또는 E4ORF2, E4ORF3, E4ORF4, E4ORF5 및/또는 E4ORF6 영역의 컨텍스트 형태가 아니다. 예를 들어, E4ORF1 서열은 다른 서열, 유전자 또는 코딩 영역 (예, 마커 유전자, 항생제 내성 유전자 등)을 포함하는 구조체 (예, 바이러스 벡터)에 사용될 수 있지만, 특정 구현예에서, E4ORF1 서열은 전체 E4 영역을 포함하지 않거나 또는 E4ORF2, E4ORF3, E4ORF4, E4ORF5 및/또는 E4ORF6 등의 전체 E4 영역으로부터 유래되는 다른 ORF를 포함하지 않는, 구조체에 사용된다.

[0032] E4ORF1 서열은 원하는 용도에 따라 다양한 다른 서열, 유전자 또는 코딩 영역을 포함하는 구조체에 사용될 수 있다. 예를 들어, E4ORF1 핵산 서열은 항생제 내성 유전자, 리포터 유전자 또는 발현 테그 (예, GFP) 또는 발현하는 것이 바람직할 수 있는 임의의 기타 서열 또는 유전자와 조합되어 사용될 수 있다. 또한, E4ORF1 핵산 서열은 융합 단백질의 일부로서 발현될 수 있다. 또한, E4ORF1 서열은, 사용되길 원하는 바람직한 발현 벡터 또는 바이러스 벡터에 존재할 수 있는, 임의의 다른 바람직한 핵산 서열, 유전자, 코딩 영역 또는 비-코딩 영역과 함께, 또는 원하는 임의의 다른 핵산 서열, 유전자, 코딩 영역 또는 비-코딩 영역과 함께 조합되어 사용될 수 있다.

[0033] 일부 구현예에서, E4ORF1 핵산 서열은 발현을 허용하기 위한 하나 이상의 프로모터의 통제 하에 있을 수 있다. 원하는 세포 타입에서 E4ORF1 핵산 서열의 발현을 구동시킬 수 있는 임의의 프로모터가 사용될 수 있다. 적합한 프로모터의 예로는, 비-제한적으로, CMV, SV40, RSV, HIV-Ltr 및 MML 프로모터 등이 있다. 또한, 프로모터는 아데노바이러스 게놈 유래 프로모터 또는 이의 변이체일 수 있다. 예를 들어, 프로모터는 아데노바이러스에서 E4ORF1의 발현을 지시하기 위해 사용되는 프로모터일 수 있다.

[0034] 일부 구현예에서, E4ORF1 핵산 서열은 유도성 프로모터의 통제 하에 배치되어, E4ORF1 핵산 서열의 발현을 필요에 따라 수행하거나 (turn on) 또는 정지 (turn off)시킬 수 있다. 임의의 적절한 유도성 발현 시스템이, 예를 들어, 테트라사이클린 유도성 발현 시스템 또는 호르몬 유도성 발현 시스템이 사용될 수 있다. 이는 생체내 이용에 유용할 수 있다. 예를 들어, E4ORF1 핵산 서열은 이것이 필요한 동안 발현시킨 다음, 원하는 경과가 달성되었을 때, 예를 들어 E4ORF1을 발현하는 세포의 충분한 생장 또는 증식이 이루어졌을 때, 발현을 정지시킬 수 있다. E4ORF1 서열의 발현을 정지시키는 능력은 생체내 이용에 유용할 수 있다.

[0035] 아데노바이러스 E4ORF1을 코딩하는 핵산 서열을 수반하는 본 발명의 구현예에서, 핵산 서열(들)은 자연적으로 생성된 뉴클레오티드, 합성 뉴클레오티드 또는 이들의 조합으로 제조된 것이든 간에 임의의 적합한 핵산 서열(들)일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 핵산(들)은, 세포내에서 안정적이며 세포내에서 직접 단백질의 발현/생산을 진행하도록 사용될 수 있는 합성 변형 RNA 등의 RNA를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 핵산(들)은 DNA를 포함할 수 있다. DNA가 사용되는 구현예에서, E4ORF1을 코딩하는 DNA 서열은 세포내에서 발현을 허용 (및/또는 촉진, 강화 또는 규제)하기 위해 하나 이상의 적절한 프로모터 및/또는 조절 인자와 작동가능하게 연결될 수 있으며, 하나 이상의 적절한 벡터 또는 구조체내에 존재될 수 있다. E4ORF1을 코딩하는 핵산 서열들은 같은 핵산 구조체 형태로 내피 세포에 도입되거나, 또는 개별 핵산 구조체로 도입될 수 있다.

[0036] 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 세포내로 도입하는 단계를 포함하는 본 발명의 구현예에서, E4ORF1을 코딩하는 핵산 서열은 자연적으로 생성된 뉴클레오티드, 합성 뉴클레오티드 또는 이들의 조합으로 제조된 것이든 간에 임의의 적절한 핵산일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 핵산(들)은 세포내에

서 안정적이며 세포내에서 직접 단백질의 발현/생산을 진행하도록 사용될 수 있는 합성 변형 RNA 등의 RNA를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 핵산(들)은 DNA를 포함할 수 있다. DNA가 사용되는 구현예에서, E4ORF1을 코딩하는 DNA 서열은 세포내에서 발현을 허용 및/또는 촉진, 강화 또는 규제하기 위해 하나 이상의 적절한 프로모터 및/또는 조절 인자와 작동가능하게 연결될 수 있으며, 하나 이상의 적절한 벡터 또는 구조체내에 존재될 수 있다. E4ORF1을 코딩하는 핵산 서열은 동시에 또는 분리하여 (한 시기에 하나를 도입하고, 다른 것은 다른 시기에 도입함) 도입될 수 있다. 또한, E4ORF1을 코딩하는 핵산 서열은 동일한 핵산 구조체 형태로 도입되거나, 또는 개별 핵산 구조체로 도입될 수 있다.

[0037] E4ORF1 서열을 도입하는 단계는, 비-제한적인 예로, 형질감염 기법 및 바이러스-매개 형질전이 기법 등의, 당해 기술 분야에 공지된 임의의 적절한 시스템을 이용해 수행될 수 있다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 형질감염 방법으로는, 비-제한적인 예로, 리포좀-매개 형질감염, 폴리브렌-매개 형질감염, DEAE 덱스트란-매개 형질감염, 전기천공, 칼슘 포스페이트 석출, 미세주입 및 미립자 충격이 있다. 사용될 수 있는 바이러스-매개 형질전이 방법으로는, 비-제한적으로, 렌티바이러스-매개 형질전이, 아데노바이러스-매개 형질전이, 레트로바이러스-매개 형질전이, 아데노-관련 바이러스-매개 형질전이 및 헤르페스 바이러스-매개 형질전이가 있다.

[0038] 세포를 E4ORF1 핵산 서열로 형질감염 또는 형질전이하는 임의의 적합한 수단들이 사용될 수 있다. 예를 들어, E4ORF1 핵산 서열은, 비-제한적인 예로, 리포좀-매개 형질감염, 폴리브렌-매개 형질감염, DEAE 덱스트란-매개 형질감염, 전기천공, 칼슘 포스페이트 석출, 미세주입 또는 미립자 충격 등의 당해 기술 분야에 공지된 표준 방법을 이용해 세포내로 형질감염될 수 있다. 마찬가지로, E4ORF1 핵산 서열은 렌티바이러스, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노-관련 바이러스 또는 헤르페스 바이러스 전달 시스템과 같은 바이러스 전달 시스템을 이용해 세포로 전달될 수 있다. 일 구현예에서, E4ORF1 핵산 서열은 렌티바이러스 유전자 전달 시스템을 이용해 세포로 전달된다.

[0039] 또한, 본 발명은, E4ORF1 핵산 서열을 포함하는, 발현 벡터 및 바이러스 벡터 등의 벡터를 제공한다. 일부 구현예에서, 이들 서열은 E4 전체 영역을 수반하는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 이들 서열은 E4ORF 2-6 등의 다른 아데노바이러스 E4ORF를 수반하지 않는다. 일 구현예에서, 본 발명은, E4 전체 영역을 수반하지 않거나 또는 아데노바이러스 E4ORF 2, 3, 4, 5 및/또는 6를 수반하지 않는 E4ORF1 서열을 포함하는 렌티바이러스 벡터를 제공한다.

[0040] 일부 구현예에서는 E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이 또는 단편)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 사용될 수 있으며, 다른 구현예에서는 E4ORF1 폴리펩타이드 (또는 이의 변이체, 유도체, 돌연변이, 단편 또는 펩타이드 모방체)가 사용될 수 있다. 펩타이드 모방체는 펩타이드를 모방하도록 설계된 소형 단백질-유사 체인이다. 이 분자는 E4ORF1 폴리펩타이드를 모방하도록 설계될 수 있다. 펩타이드 모방체를 제조하기 위해 펩타이드를 변형하거나 또는 펩타이드 모방체를 설계하는 다양한 여러 방법들이 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 이를 이용해 E4ORF1 펩타이드 모방체를 제조할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 E4ORF1 서열의 취급, 조작 및 발현은 분자 생물학 및 세포 생물학의 통례적인 기법들을 이용해 수행할 수 있다. 이러한 기법들은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 한가지로 Sambrook, Fritsch and Maniatis eds., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1989); the series Methods of Enzymology (Academic Press, Inc.), 또는 E4ORF1 서열의 취급, 조작 및 발현에 사용하기에 적합한 기법 안내에 대한 임의의 다른 표준 문서에 기술된 교시 내용들을 들 수 있다.

[0042] III. <u>조성물</u>

[0043] 일부 구현예에서, 본 발명은, 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하거나 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, "조작된 신경 세포" 및/또는 "조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포", 및 이러한 조작된 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 제공하는 본 발명의 구현예에서, 이들 세포는 분화되어 조작된 신경 세포 (예, 조작된 뉴런 또는 신경교)를 형성할 수 있다. 역으로, 조작된 신경 세포를 제공하는 본 발명의 구현예에서, 이들 세포는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포 등의 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 신경 세포 및/또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포는, 포유류 세포, 예를 들어 인간 또는 인간을 제외한 영장류 세포, 또는 토끼, 랫, 마우스, 염소, 돼지 또는 그외 포유류 세포이다.

[0044] 본원에서 용어 "신경 세포"는 뉴런 세포와 신경교 세포 둘다를 통칭한다. 본원에서, "신경계 줄기 세포"와 "신경계 전구 세포"라는 용어는 당해 기술 분야에서 용인되는 의미에 따라 사용된다. 줄기 세포와 전구 세포는 분화 잠재성에 차이가 있다 (줄기 세포는 일반적으로 적어도 만능성을 가지고 있는 반면, 전구 세포는 일반적으로 보다 제한적인 분화 잠재성을 가진다). 용어 "신경계 줄기 세포" 및 "신경계 전구 세포"는 본원에서 사용되는 바와 같이 뉴런 세포와 신경교 세포를 생산할 수 있는 능력을 가진 세포를 지칭하는데 사용된다. 본 발명에 대한 일부 구현예들은 뉴런 전구체와 신경교 전구체를 이용한다. 이들 용어는, 본원에서, 신경계 전구체 보다 잠재성이 훨씬 제한적인 전구 세포를 지칭하는데, 뉴런 전구체는 뉴런 세포를 생산할 수 있는 능력을 가지며, 신경교 전구체는 신경교 세포를 생산할 수 있는 능력을 가지고 있다.

[0045] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 조작된 신경 세포 (또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포)는, 이것이 E4ORF1의 발현과 더불어 이와는 별개로 하나 이상의 유전자 변형을 포함하도록, 유전자-변형된 세포이거나, 또는 그러한 세포로부터 유래된다. 예를 들어, 이러한 세포는 신경 세포에 발병하는 질환 또는 장애에 관여하거나 또는 관여하는 것으로 의심되는 공지된 유전자의 교정된 버전 (corrected version)을 포함할 수도 있다.

[0046] 본 발명의 조작된 신경 세포는 다양한 형태로 존재하거나 또는 제공될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포는 단리된 세포 집단과 같은 세포 집단을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포는 시험관내 세포 집단을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포는 실질적으로 순수한 세포 집단을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 전체 세포 집단을 구성하는 세포들 중 적어도 약 50%, 바람직하게는 적어도 약 75-80%, 더 바람직하게는 적어도 약 85-90%, 가장 바람직하게는 적어도 약 95%가 본 발명의 조작된 신경 세포, 예를 들어 E4ORF1-발현성 신경 세포, 또는 1, 2, 3 또는 그 이상의 신경 세포 마커, 뉴런 세포 마커 또는 신경교 세포 마커, 예를 들어 본원에 언급된 신경 세포 마커, 뉴런 세포 마커 또는 신경교 세포 마커 중 하나를 발현하는 E4ORF1-발현성 신경 세포일 것이다. 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포)는 조작된 세포와 하나 이상의 부가적인 성분을 포함하는 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 조작된 신경 세포의 집단 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단)과 담체 용액, 예를 들어 생리 식염수, 세포 현탁 매질, 세포 배양 배지 등을 함께 포함하는 조성물을 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 조성물은, 조작된 신경 세포의 집단 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단), 및 인간 개체 등의 개체에 투여하기에 적합한 담체 용액을 포함하는, 치료학적 조성물일 수 있다. 필요에 따라서는 치료학적으로 허용되는 다른 물질이 포함될 수도 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면 계획된 용도에 따라 치료학적 조성물에 포함시킬 적절한 물질을 쉽게 선택할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포)는, 조작된 신경 세포와 하나 이상의 부가적인 세포 타입을 포함하는 조성물 (예, 치료학적 조성물) 형태로 제공될 수 있다. 상기한 부가적인 세포 타입은, 예를 들어, 조작된 신경 세포의 유지 또는 배양에 유용한 세포 타입 (예, "피더" 세포, 영양인자를 생산하는 세포 등) 또는 예를 들어 시험관내 모델 시스템 또는 개체에게 공동-투여로 사용하기 위해 조작된 신경 세포와 함께 사용되도록 계획된 세포 타입일 수 있다. 이러한 부가적인 세포 타입의 예로는, 비-제한적으로, 기타 신경 세포 (예, 성상세포, 희돌기세포, 슈반 세포, 및/또는 뉴런), 기타 신경계 전구 세포, 내피 세포 및 혈관 주위 세포가 있다. 내피 세포가 이용되는 경우, 내피 세포는 그 자체가 E4ORF1 폴리펩타이드를 발현하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 사용될 E4ORF1-발현성 내피 세포는 미국 특허 제 8,465,732호에 기술된 바와 같이 제조할 수 있으며, 상기 문헌의 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0047] i. <u>뉴런 세포</u>

[0048] 뉴런 세포를 제공 또는 수반하는 본 발명의 구현예에서, 뉴런 세포는, 중추 뉴런 또는 말초 뉴런 등의 임의 타입의 뉴런 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 뉴런 세포는 특히 해마 뉴런이다. 일부 구현예에서, 뉴런 세포는 원시 뉴런 세포 (primary neuronal cell)이거나 또는 이로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 뉴런 세포는 줄기 세포, 전구 세포 또는 비-뉴런 세포로부터 유래된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 뉴런 세포는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포 또는 뉴런 전구 세포로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 뉴런 세포는 만능성 줄기 세포, 예를 들어 배아 줄기 세포 또는 유도된 만능성 줄기 세포 (iPCS)로부터 유래될 수 있다. 이와 유사하게, 일부 구현예에서, 뉴런 세포는 분화된 비-뉴런 세포와 같은 다른 분화된 세포로부터 트랜스-분화에 의해 유래될 수도 있다. 일부 구현예에서, 뉴런 세포는, E4ORF1의 발현 외에도 이와는 별개로 유전자 변형되거나 또는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 세포이거나, 또는 그러한 세포로부터 유래된다. 예를 들어, 이러한 세포는 뉴런에 영향을 미치는 질환 또는 장애에 관여되거나 또는 관여되는 것으로 추정되는 공지된 유전자를 교정된 버전으로 포함할 수 있다.

[0049] 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 (E4ORF1-발현성) 뉴런 세포는 대조군 뉴런 세포의 축삭 길이 보다 평균적으로 (또는 약) 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200% 또는 200% 이상 긴 축삭 길이를 가진다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 (E4ORF1-발현성) 뉴런 세포는 대조군 뉴런 세포의 축삭 100 ㎛ 당 축삭 분지의 갯수에 비해 평균적으로 (또는 약) 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200% 또는 200% 이상 많은 축삭 100 ㎛ 당 축삭 분지 갯수를 가진다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 (E4ORF1-발현성) 뉴런 세포는 평균적으로 대조군 뉴런 세포의 뉴런 당 프로세스의 횟수가 평균적으로 (또는 약) 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200% 또는 200% 이상 높은 뉴런 당 프로세스 횟수를 가진다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 (E4ORF1-발현성) 뉴런 세포는, 대조군 뉴런 세포의 축삭 분지의 갯수 보다 평균적으로 (또는 약) 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200% 또는 200% 이상 많은 축삭 분지 갯수를 가진다. 이에 대한 일부 구현예에서, 상기에 언급되는 측정 결과는 조작된 세포를 E4ORF1 서열로 형질도입 또는 형질감염시킨 후 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일째에 수득된다. 이에 대한 일부 구현예에서, 상기에 언급된 측정 결과는 이러한 뉴런 특징을 측정하기 위한 당해 기술 분야에 공지된 임의의 표준 방법을 이용해 수득된다. 이에 대한 일부 구현예에서, 상기에 언급되는 측정 결과는 본원의 실시예 2에 기술된 방법을 이용해 또는 이 방법에 임의의 적절하게 변형시켜 수득된다.

[0050] 뉴런 세포 타입 등의 많은 세포 타입들은, 배양물로 배양시, 특히 배양물로 증식을 용이하기 위해 형질전환한 경우, 본래의 정상적인 표현형 특징들을 일부 상실하는 경향을 나타낸다. 예를 들어, 세포가 배양물로 증식되는 경우, 세포는 덜 분화되게 되거나 및/또는 일반적인 표현형 특징들 중 한가지 이상의 감소 또는 소실을 보일 수 있다. 본 발명의 조작된 뉴런 세포가 세포에서 아데노바이러스 E4ORF1 서열 발현시 일부 전형적인 뉴런-세포 특이적인 표현형 특징들을 유지한다는 것이, 본 발명의 특별한 장점이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 조작된 뉴런 세포는, 비-제한적인 예로, 범 뉴런 마커 (pan neuronal marker) βIII 투불린, MAP2, tau, NeuN 및/또는 신경미세섬유 (neurofilament) 등의, 한가지 이상의 뉴런 세포 서브타입에 의해 정상적으로 발현되는 하나 이상의 마커를 발현한다. 또한, 본 발명의 조작된 뉴런 세포는, 비-제한적인 예로, 계통 아이덴티티 (lineage identity), 형태/구조 특징들 (예, 축삭, 수상돌기, 시냅스 말단 (synaptic terminal), 뉴런들 간의 시냅스와 다른 연결, 신경교 세포와의 형태적 상호작용 등), 전기생리학적 또는 기타 생리학적 특징 (전기 흥분성 (electrical excitability), 이온 채널 활성, 신경전달물질 수용체 활성, 활동 전위 전달 (action potential transmission), 시냅스 전달, 시냅스 가소성 (synaptic plasticity), 장기 증강 (long-term potentiation) 등이 포함됨), 생화학적 특징 (예, 신경전달물질의 발현 및/또는 방출, 신경전달물질 수용체의 발현 및/또는 활성화, 뉴런 마커 단백질의 발현 등) 및/또는 당해 기술 분야에 공지된 뉴런에 대한 임의의 기타 생물학적 특징 등의, 뉴런 세포의 한가지 이상의 그외 특징들을 보유할 수 있다.

[0051] ii. <u>신경교 세포</u>

[0052] 신경교 세포를 수반하는 본 발명의 구현예에서, 신경교 세포는 성상세포, 희돌기세포, 상의세포, 방사 신경교 (radial glia), 슈반 세포, 위성 세포, 장 신경교 세포 (enteric glial cell) 또는 미세신경교 세포 (microglial cell)일 수 있다. 일부 구현예에서, 신경교 세포는 특히 성상세포이다. 일부 구현예에서, 신경교 세포는 원시 신경교 세포 (primary glial cell)이거나, 또는 원시 신경교 세포로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 신경교 세포는 줄기 세포, 전구 세포 또는 비-신경교 세포로부터 유래된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 신경교 세포는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포 또는 신경교 전구 세포로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 신경교 세포는 배아 줄기 세포와 같은 만능성 줄기 세포 또는 유도된 만능성 줄기 세포 (iPSC)로부터 유래될 수 있다. 마찬가지로, 일부 구현예에서, 신경교 세포는 분화된 비-신경교 세포 등의 다른 분화된 세포로부터의 트랜스-분화에 의해 유래될 수 있다.

[0053] 일부 구현예에서, 신경교 세포는, E4ORF1의 발현 외에도 이와는 별개로 유전자-변형되거나 또는 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 세포이거나 또는 이러한 세포로부터 유래된다. 예를 들어, 상기한 세포는 신경교 세포에 영향을 미치는 질환 또는 장애에 관여되거나 또는 관여되는 것으로 추정되는 것으로 공지된 유전자를 교정된 버전으로 포함할 수 있다.

[0054] 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 (E4ORF1-발현성) 신경교 세포는, 대조군 신경교 세포와 비교해 적어도 또는 적어도 약 평균적으로 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 8배, 10배 또는 10배 이상 높은, 증식율을 가진다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 (E4ORF1-발현성) 신경교 세포는, E4ORF1으로의 형질전이 또는 형질감염 후 약 3주째에, 대조군 신경교의 세포 수 증가와 비교해, 4배, 5배, 6배 또는 6배 이상 또는 약 4배, 약 5배, 약 6배 또는 약 6배 이상, 또는 적어도 또는 적어도 약 4배, 5배, 6배 또는 6배 이상 높은, 세포 수 증가를 나타낸다.

일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 (E4ORF1-발현성) 신경교 세포는, (예, 성상세포의 경우 신경교섬유질 산성 단백질 (GFAP)과 같이, 신경교 세포의 마커의 발현 및/또는 형태로 측정된 바와 같이) 높은 생존성을 여전히 유지하면서 및/또는 신경교 표현형을 계속 유지하면서, 2회 이상, 3회 이상, 또는 더 바람직하게는, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 이상의 계대 배양 동안에 배양을 유지할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 (E4ORF1-발현성) 신경교 세포는, (예, GFAP와 같은 신경교 마커의 발현 및/또는 형태로 측정된 바와 같이) 생존성의 현저한 감소 및/또는 신경교 표현형의 상당한 소실 없이도, 대조군 신경교 세포와 비교해, 더 많은 계대 배양 횟수 동안 배양을 유지할 수 있다. 이러한 일부 구현예에서, 신경교 세포에서 증식율과 세포 수 측정 및 계대 배양 성공 평가는, 이러한 특징을 측정/평가하기 위해, 당해 기술 분야에 공지된 임의의 표준 방법을 이용해 수행할 수 있다. 이러한 일부 구현예에서, 상기에 언급된 측정은 본원의 실시예 1에 기술된 방법을 이용해 또는 이 방법에 임의의 적절하게 변형시켜 수득된다.

[0055] 본 발명의 조작된 신경교 세포가 세포에서 아데노바이러스 E4ORF1 서열 발현시 일부 전형적인 신경교-세포 특이적인 표현형 특징들을 유지한다는 것이, 본 발명의 특별한 장점이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 조작된 신경교 세포는, 비-제한적인 예로, 신경교 섬유질 산성 단백질 (GFAP), 신경교 세포-유래 신경영양인자 (GDNF) 및 GLT-1 등의, 한가지 이상의 신경교 세포 서브타입에 의해 정상적으로 발현되는 하나 이상의 마커를 발현한다. 예를 들어, 신경교 세포가 성상세포인 구현예에서, 신경교 세포는 GFAP를 발현할 수 있다. 또한, 본 발명의 조작된 신경교 세포는 신경교 세포에 전형적인 한가지 이상의 다른 표현형 특징을 보유할 수도 있다. 예를 들어, 조작된 성상세포의 경우에, 유지될 수 있는 표현형 특징으로는, 비-제한적으로, 형태/구조 특징 (예, 성상세포의 전형적인 별 형상의 분지형 형태, 뉴런 시냅스와의 연합, 성상세포를 모세혈관벽 (capillary wall)과 연결시키는 "혈관 발 (vascular feet)" 등), 전기생리학적 특징 및 그외 생리학적 특징 (이온 채널 활성, 세포외 공간에서 이온 농도 조절 등), 생화학적 특징 (예, 글루타메이트와 같은 신경전달물질의 발현 및/또는 방출 및/또는 흡수, 성상세포 마커 단백질의 발현, 뉴런으로의 대사적 지지 등), 뉴런 유도 (neuronal guidance), 신경교 반흔 조직 (glial scar tissue)의 형성 및/또는 당해 기술 분야에 공지된 성상세포의 임의의 기타 생물학적 특징 등이 있다.

[0056] IV. <u>방법 및 활용</u>

[0057] 본 발명으로부터 제공되는 조작된 신경 세포 및/또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 조작된 신경계 전구 세포는, 이를 다양한 여러가지 용도로 이용가능하게 할 수 있는 특정한 특성들을 가진다. 마찬가지로, 이러한 조작된 신경 세포 및/또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 조작된 신경계 전구 세포를 제조하기 위해 본원에 제공되는 방법들은 다양한 여러 상황에 이용될 수 있다. 일반적으로, 본원에 제공되는 조작된 신경 세포 및 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포는, 비-조작된 (즉, E4OFR1-비발현성) 신경 세포 또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포가 현재 이용되거나 또는 사용될 수 있는, 임의의 용도로 사용될 수 있다. 예를 들어, 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포의 경우, 이들 세포는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포가 현재 사용되거나 또는 사용될 수 있는 임의의 용도로 사용될 수 있거나 (비-제한적인 예로, 연구 목적 및/또는 치료학적 용도, 예컨대 신경계에 발생하는 기타 질환 또는 장애의 재생 요법, 예를 들어, 파킨슨병, 헌팅턴병, 다발성 경화증을 치료하기 위한 개체로의 이식 등을 포함함), 또는 이를 이용해 조작된 분화된 신경 세포의 집단을 제조한 다음 이를 분화된 신경 세포가 현재 이용되거나 또는 이용될 수 있는 임의의 용도로, 비-제한적인 예로 - 신경계 줄기 세포 및 전구 세포에 대한 전술한 용도와 마찬가지로 - 연구 목적 및 치료학적 목적 등으로 사용될 수 있다.

[0058] 대조군 (즉, E4ORF1-비발현) 신경교 세포 대비, E4ORF1-발현성 신경교 세포에서 나타나는 세포 증식율 및 계대 배양 횟수 증가는, 신경교 세포의 배양물 제조 또는 유지 방법, 줄기 또는 전구 세포로부터 신경교 세포의 유도 방법, 분화된 비-신경교 세포로부터 (예, 트랜스-분화에 의한) 신경교 세포의 유도 방법, 기초 과학 연구 용도, 타겟 발견 용도, 약물 개발 용도 및 약물 효능, 독성 및/또는 안전성 검사 용도 등의 다양한 방법에, 다른 신경교 세포 대신 본 발명의 조작된 신경교 세포의 사용을 유리하게 할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 신경교 세포는 공동-배양법 - 예를 들어, 신경교 세포와 뉴런 세포의 공동-배양을 수반하는 -에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 신경교 세포는 질환 모델 또는 혈액-뇌 장벽 모델 시스템과 같은 기타 생물학적 모델 시스템에 이용될 수 있다. 아울러, 일부 구현예에서, 조작된 신경교 세포는, 비-조작된 신경교 세포가 사용되거나 또는 사용될 수 있는, 비-제한적인 예로, 생체내 이식 시술 등의 치료학적인 용도로, 예를 들어 재생 의학 용도로 유용할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 신경교 세포 또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포는 생체내 이식 시술과 관련하여 제조되거나 또는 사용될 수 있으며, 예를 들어, 신경교 세포 결함, 신경교 세포 결핍 또는 신경교 세포 손상과 관련된 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위해,

제조 또는 사용될 수 있다. 이러한 질환, 장애 및 병태에 대한 예로는, 비-제한적으로, 외상성 뇌 손상, 척추 손상, 신경퇴행성 질환, 신경발달 질환, 및 비-제한적인 예로, 다발성 경화증 (MS), 바이러스성 급성 탈수초화 (post viral acute demyelination), 횡단성 척수염, 만성 염증성 탈수초 다발성신경병증 (CIDP), 귈랑 바레 증후군, 진행성 다초점 백색질 뇌병증 (progressive multifocal leukoencephalopathy, PML), 백질이영양증 (leukodystrophies), 부신백질이영양증 (adrenoleukodystrophy), 크라베 백질이용양증 (Krabbe leukodystrophy), 이염성 백질이영양증 (metachromatic leukodystrophy), 알렉산더병 (Alexander disease), 카나반병 (Canavan disease), 코케인 증후군 (Cockayne syndrome) 및 펠리제우스 메르츠바하 병 (Pelizaeus-Merzbacher disease) 등의, 뉴런의 탈수초화 또는 수초형성부전 (dysmyelination)과 관련된 질환이 있다.

[0059] 마찬가지로, 대조군 (즉, E4ORF-1 비발현성) 뉴런 세포와 비교해, E4ORF1-발현성 뉴런 세포에서 나타나는 축삭 길이 증가, 마이너 프로세스 횟수 증가 및 축삭 당 분지의 갯수 증가는, 뉴런 세포의 배양물 제조 또는 유지 방법, 줄기 세포 또는 전구 세포로부터 뉴런 세포 유도 방법, (예, 트랜스분화에 의한) 분화된 비-뉴런 세포로부터 뉴런 세포를 유도하는 방법, 기초 과학적 연구 용도, 타겟 개발 용도, 약물 개발 용도 및 약물 효능, 독성 및/또는 안전성 검사 용도 등의, 다양한 방법들에, 본 발명의 조작된 뉴런 세포 (또는 조작된 뉴런 세포가 될 수 있는 전구 세포의 신경계 줄기)를 다른 뉴런 세포 (또는 전구 세포의 신경계 줄기) 대신 사용하는데 유리하게 할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 뉴런 세포는, 예를 들어, 신경교 세포를 뉴런 세포와 공동-배양하는 단계를 수반하는, 공동-배양 방법들에 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 뉴런 세포는 질환 모델 또는 기타 생물학적 모델 시스템, 예를 들어 혈액-뇌 장벽 모델 시스템에 이용될 수 있다. 또한, 일부 구현예에서, 조작된 뉴런 세포 (또는 조작된 뉴런 세포가 될 수 있는 전구 세포의 신경계 줄기)는, 비-조작된 뉴런 세포 또는 뉴런 줄기 또는 전구 세포가 사용되거나 또는 사용될 수 있는, 치료학적 용도로, 비-제한적인 예로, 재생 의학 용도로 유용할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 뉴런 세포 또는 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포는 생체내 이식 시술에 사용될 수 있으며, 예를 들어, 뉴런 세포 결함, 뉴런 세포 결핍 또는 뉴런 세포 손상과 관련된 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위해, 사용될 수 있다. 이러한 질환, 장애 및 병태에 대한 예로는, 비-제한적으로, 외상성 뇌 손상, 척추 손상, 신경퇴행성 질환 및 신경발달 질환, 비-제한적인 예로, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 헌팅턴 질환 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS) 등이 있다.

[0060] 전술한 바와 같이, 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 세포는 다양한 치료학적 용도로 사용될 수 있다. 즉, 일부 측면에서, 본 발명은, 조작된 E4ORF1-발현성 신경 세포 (또는 조작된 E4ORF1-발현성 신경 세포를 포함하는 조성물)를 유효량으로, 또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 신경계 전구 세포를 유효량으로 개체에게 투여함으로써 치료가 필요한 개체를 치료하는 방법 등의 다양한 치료 방법들을 제공한다. 이러한 치료 방법들에서, 세포는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 적절한 수단을 이용하여 개체에게 투여할 수 있다. 예를 들어, 세포는 적절한 위치에서 혈류 또는 조직으로 주사 또는 주입함으로써 투여할 수 있다. 예를 들어, 신경계의 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 경우에, 본 발명에 따른 조작된 세포는 신경계의 발병된 부위에 직접 또는 근처로 투여할 수 있다. 특정한 신경 손상 또는 특정한 신경 병소를 치료하는 경우, 세포는 손상부 또는 병소 부위, 예를 들어, 척추 손상부 또는 병소 부위에 직접 또는 근처에 투여할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 신경 세포 (또는 조작된 신경계 줄기 세포 또는 전구 세포)는 하나 이상의 부가적인 세포 타입과 함께 투여할 수 있다. 이러한 부가적인 세포 타입은, 예를 들어, 조작된 신경 세포 (예, "피더" 세포, 영양성 인자 (trophic factor)를 생산하는 세포 등)의 유지 또는 생존을 뒷받침하는데 유용한 세포 타입, 및/또는 일부 부가적인 치료학적 이점을 제공할 수 있는 세포 타입일 수 있다. 이러한 부가적인 세포 타입의 예로는, 비-제한적으로, 그외 신경 세포 (예, 성상세포, 희돌기세포, 슈반세포 및/또는 뉴런), 기타 신경계 전구 세포, 내피 세포 및 혈관 주위 세포가 있다. 내피 세포를 사용하는 경우, 내피 세포는 또한 E4ORF1 폴리펩타이드를 발현하도록 그 자체가 조작될 수 있다. 이러한 E4ORF1-발현성 내피 세포는 미국 특허 제 8,465,732호에 기술된 바와 같이 제작할 수 있으며, 이 특허의 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 조작된 세포는 1회 투여 또는 다회 투여로 투여할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면 원하는 용도에 따라 적합한 투약 용법과 적절한 투여 방법을 선택할 수 있을 것이다.

[0061] 마찬가지로, 다른 구현예에서, 본 발명의 조작된 세포는 다양한 치료학적인 용도로 생체내에서 형성될 수 있다. 즉, 일부 측면에서, 본 발명은, 개체에서 신경 세포를 E4ORF1 서열로 형질감염시키거나 또는 형질전이시켜 생체내에서 조작된 신경 세포가 되게 하도록, E4ORF1-코딩 뉴클레오티드 서열 (예, 적정 벡터 형태, 및/또는 적절한 프로모터의 통제 하에)을 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료가 필요한 개체를 치료하는 방법 등의 다양한 치료학적 방법들을 제공한다. 이러한 치료 방법들에서, 뉴클레오티드 분자는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 적절한 수단을 이용해 개체에게 투여할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오티드 분자 (예, 적절한 벡터 형태)는 혈류 또는 조직으로 적절한 위치에서 주사 또는 주입함으로써 투여할 수 있다. 예를 들어, 신경계의

질환, 장애 또는 병태를 치료하는 경우, 이 핵산 분자는 신경의 발병된 부위에 직접 또는 근처로 투여할 수 있다. 특정한 신경 손상 또는 특정한 신경 병소를 치료하는 경우, 핵산 분자는 손상부 또는 병소 부위, 예를 들어, 척추 손상부 또는 병소 부위에 직접 또는 근처에 투여할 수 있다. 핵산 분자는 1회 투여로 또는 다회 투여로 투여할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면 원하는 용도에 따라 적합한 투약 용법과 적절한 투여 방법을 선택할 수 있을 것이다.

[0062] 많은 신경 세포들은 피더 세포를 사용하지 않고는 또는 불멸화 없이는 증식 또는 배양 유지하기 어렵다는 것이 주지의 사실이다. 이 세포에서 아데노바이러스 E4ORF1을 발현함으로써, 본 발명은 세포의 표현형 온전성 (phenotypic integrity) 또는 계통 아이덴터티를 손상시키지 않으면서, 이들 세포 타입의 배양을 용이하게 하기 위한 수단을 제공할 수 있다. 예를 들어, 조작된 E4ORF1-발현성 신경 세포가 세포 배양을 용이하게 할 수 있거나 또는 우수한 세포 배양물을 제조할 수 있는 일부 특징들을 가진다는 점이 본 발명의 특별한 장점이다. 예를 들어, 본 발명의 조작된 신경교 세포는 대조군 신경교 세포 보다 증식율이 높고, 조작된 신경교 세포는 대조군 신경 세포와 비교해 특정한 강화된 형태적 특징을 가진다. 세포 배양 방법들은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 임의의 적절한 세포 배양 방법들이 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조작된 신경교 세포는 비-조작된 신경교 세포를 배양하는데 유용한 것으로 공지된 방법들을 이용해 배양할 수 있으며, 본 발명의 조작된 뉴런 세포는 비-조작된 뉴런 세포를 배양하는데 유용한 것으로 공지된 방법들을 이용해 배양할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 배양은 혈청의 부재 하에 또는 외인성 성장인자의 부재 하에, 또는 혈청과 외인성 성장인자의 부재 하에 수행할 수 있다. 또한, 본 발명의 조작된 세포는 동결보존할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면, R. Ian Freshney ("Freshney")의 Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th Edition (2000)에 기술된 방법 등의 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 방법을 이용해, 본 발명의 E4ORF1-발현성 신경 세포 등의 세포를 쉽게 배양 및 동결보존할 수 있으며, 상기 문헌의 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0063] 일부 구현예에서, 본 발명은, 본 발명의 조작된 신경 세포를 포함하거나 또는 이로부터 유래되며 다른 신경 세포 (비-조작된 신경 세포 포함) 등의 다른 세포의 생존 또는 증식을 뒷받침하는데 유용할 수 있는, 피더 세포, 컨디셔닝화된 배지 (conditioned medium), 및 세포 생성물을 제공한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 조작된 신경교 세포의 집단은 뉴런의 증식을 뒷받침하기 위한 피더 세포로서 사용되거나, 또는 조작된 뉴런 세포의 집단은 신경교 세포의 증식을 뒷받침하기 위한 피더 세포로서 사용될 수 있다. 마찬가지로, 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 조작된 신경 세포의 배양으로부터 수득되는 컨디셔닝화된 세포 배양 배지, 또는 본 발명의 조작된 신경 세포의 배양으로부터 수득되는 세포 생성물 (예, 전체 세포 용혈물, 세포 분획 또는 특정 세포 생성물)을 제공할 수 있다.

[0064] 일부 구현예에서, 본 발명은, 뉴런 집단과 조작된 신경교 세포 집단을 동일한 배양조에서 함께 배양하는 단계를 포함하며, 조작된 신경교 세포가 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 뉴런 집단의 공동-배양 방법을 제공한다. 이에 대한 일부 구현예에서, 조작된 신경교 세포는 배양조의 표면에 피더 세포 층을 형성하며, 이 피더 세포 층 위에 뉴런이 놓이게 할 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 뉴런 집단을 신경교 세포로 컨디셔닝화된 배지와 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 신경교 세포로 컨디셔닝화된 배지가 조작된 신경교 세포의 배양으로부터 수득되며, 상기 조작된 신경교 세포는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 뉴런 배양 방법을 제공한다. 마찬가지로, 다른 구현예에서, 본 발명은, (a) 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 신경교 세포의 집단을 수득하는 단계, (b) 조작된 신경교 세포를 배양조에서 배양하는 단계, (c) 배양조에서 컨디셔닝화된 배지를 수득하는 단계, (d) 컨디셔닝화된 배지를 뉴런 배양물에 첨가하는 단계, 및 (e) 뉴런을 배양하는 단계를 포함하는, 뉴런의 배양 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 또한, 본 발명은, 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 신경교 세포의 배양물로부터 수득되는 컨디셔닝화된 세포 배양 배지를 제공한다.

[0065] 일부 구현예에서, 본 발명의 조작된 신경 세포는 시험관내 혈액 뇌 장벽 모델 시스템에 사용가능할 수 있다. 예를 들어, 이러한 시스템은, 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 신경교 세포의 집단을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 일부 구현예에서, 본 발명은, (a) 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 아데노바이러스 E4ORF1 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 신경교 세포의 집단, (b) 혈관 주위 세포, 및 (c) 내피 세포를 포함하는, 시험관내 혈액 뇌 장벽 모델 시스템 또는 키트를 제공한다.

[0066] V. 키트

[0067] 본 발명은 또한 본원에 기술된 다양한 방법들을 수행하고 및/또는 본원에 제공된 조작된 세포를 생산하기 위한 키트를 제공한다. 이 키트는, 비-제한적인 예로, E4ORF1 서열 (예, 벡터 형태), 신경 세포 (예, 뉴런 또는 신경교), 조작된 신경 세포의 집단 (예, 조작된 뉴런 또는 신경교), 대조군 비-조작된 신경 세포, 샘플/표준 조작된 신경 세포, E4ORF1 서열 또는 E4ORF1 폴리펩타이드 (예, 핵산 프로브, 항체 등)를 검출하기 위한 수단 또는 조성물, 신경 세포 또는 조작된 신경 세포를 유지 또는 증폭시키는데 사용가능한 배지 또는 조성물, 조작된 신경교 세포에 의해 컨디셔닝화된 배지, 조작된 신경 세포를 개체에게 투여하기 위한 수단 또는 조성물, 또는 이들의 임의 조합 등의, 본원에 기술된 임의의 성분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명은, 시험관내 혈액 뇌 장벽 모델 시스템에 사용하기 위한 성상세포 등의 조작된 신경교 세포를 포함하는 키트를 제공한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 조작된 성상세포의 집단과 혈관 주위 세포 및 내피 세포를 포함하는 키트를 제공한다. 이러한 키트들 모두 사용 설명서, 용기, 배양조 등을 선택적으로 포함할 수 있다. 키트에 표지물질이 수반될 수 있으며, 전자 또는 컴퓨터 판독가능한 형태 (예, 디스크, 광학 디스크, 메모리 칩 또는 테이프)일 수 있는 임의의 필기 용품 또는 기록 용품을 포함하여, 키트 내용물의 사용에 대한 지침 또는 기타 정보를 제공할 수 있다.

[0068] 본 발명의 일부 측면들은 아래 비-제한적인 실시예들에서 추가로 설명될 수 있다.

[0069] 실시예

[0070] 실시예 1: E4ORF1-발현성 성상세포의 제조 및 특징 규명

[0071] 방법. 생후 P1 새끼 마우스 10-12마리를 희생시키고, 뇌를 적출하여 해부 매질에 넣었다. 뇌를 2개의 반구로 분리시키고, 뇌척수막과 후각 신경구 (olfactory bulb)를 조심스럽게 제거하였다. 날카로운 가위를 사용해 조직을 작은 조각 (직경 약 0.5 mm)으로 잘랐다. 작은 조직 조각들을 수집하여, 15 ml 코니칼 튜브에 해부 매질과 함께 넣었다. 조직 조각들을 정치시킨 다음 (약 1-2분), 조심스럽게 해부 배지를 제거하였다. 코니칼 튜브에 TrypLE 6-8 ml을 넣고, 뚜껑을 잘 밀봉하였다. 튜브를 위아래로 3번 뒤집은 다음 튜브를 37℃ 수조에 15분간 두면서 튜브를 이따금 흔들었다. 그런 후, 절단된 조직을 건드리지 않으면서 TrypLE를 제거한 다음, 성상세포 배양 배지 1-2 ml을 첨가하였다. DNAse를 첨가하고, 튜브를 자주 톡톡 치면서 1분간 두었다. 이후, 조직 조각들을 성상세포 배양 배지로 3번 헹구었다. 조직 조각들과 배지를 플라스틱 P1000 파이펫 팁으로 15회 상하 파이펫팅하여, 조직 조각을 성상세포 배양 배지 약 1 ml로 트리투레이션한 다음, 조직과 배지를 화염 연마된 유리 파이펫을 사용해 1회 트리투레이션하였다. 트리투레이션한 세포 현탁물을 400g에서 5분간 원심분리하고, 상층물을 제거하였다. 세포 펠렛을 5 ml 성상세포 배양 배지에 재현탁한 다음 T25 플라스크에 세포를 접종하고 표준 세포 배양 인큐베이터에서 배양하였다. 플라스크를 5-8회 확실하게 두드린 후 6일간 매일 배지를 신선한 성상세포 배양 배지로 교체하여, 약하게 부착된 비-성상 신경교 세포를 제거하였다. 7일째, 세포에 E4ORF1 렌티바이러스 (40-50 ㎕의 농축 바이러스)를 폴리브렌 (polybrene) (8 ㎍/ml, 항생제 무 첨가 배지)을 사용해 형질도입시켰다. 24시간 후, 감염 배지를 표준 성상세포 배양 배지로 교체하였다. 세포를 컨플루언스에 도달할 때까지 계대 배양하였다.

[0072] 재료. P1 B6 생후 마우스 새끼를 사용하였다. 해부 매질은 1X B27 첨가물 및 1X 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 L15 배지였다. 성상세포 배양 배지는 10% 말 혈청, 0.6% 글루코스, 1X GlutaMax 및 1X 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 MEM 배지였다. T25/T75 배양 플라스크, TrypLE/Accutase 및 DNAse도 사용하였다.

[0073] 결과. E4ORF1 형질도입 1주일 후, E4ORF1-발현성 성상세포는, E4ORF1이 형질도입되지 않은 대조군 성상세포와 비교해, 3-5배의 세포 수 증가를 나타내었다. E4ORF1 형질도입 3주째까지, E4ORF1-발현성 성상세포는 대조군 성상세포와 비교해 5-6배의 세포 수 증가를 나타내었다. 또한, E4ORF1 성상세포는 대조군과 비교해 많은 집단 배가 횟수 동안 어떠한 유해한 효과의 발현 없이 계대 배양가능하였다. E4ORF1 성상세포는 4번의 계대 배양 후 높은 생존성을 유지하였으며, 성상교세포 표현형을 유지하는 것으로 나타났는데, 이들 세포는 신경교섬유질 산성 단백질 (GFAP)을 발현하였으며, 이의 형태 및 형태학적 이종성 (morphological heterogeneity)은 대조군 세포와 유사하였다. NG2나 CD31의 발현은 검출되지 않았다.

[0074] 실시예 2: E4ORF1-발현성 뉴런의 제조 및 특징 규명

[0075] 방법. 수정 18일차 (E18) 마우스 배아를 안락사시키고, 뇌를 분리하여 해부 매질에 넣었다. 뇌를 2개의 반구로 분리시키고, 뇌척수막과 후각 신경구를 조심스럽게 제거하였다. 해마에서 해마채 (hippocampi)를 조심스럽게 분리하였다. 날카로운 가위를 사용해 조직을 작은 조각 (직경 약 0.5 mm)으로 잘랐다. 작은 조직 조각들을

수집하여, 15 ml 코니칼 튜브에 해부 매질과 함께 넣었다. 조직 조각들을 정치시킨 다음 (약 1-2분), 조심스럽게 해부 배지를 제거하였다. 코니칼 튜브에 TrypLE 6-8 ml을 넣고, 뚜껑을 잘 밀봉하였다. 튜브를 위아래로 3번 뒤집은 다음 튜브를 37℃ 수조에 15분간 두면서 튜브를 이따금 흔들었다. 그런 후, 절단된 조직을 건드리지 않으면서 TrypLE를 제거한 다음, 뉴런 배양 배지 1-2 ml을 첨가하였다. DNAse를 첨가하고, 튜브를 자주 톡톡 치면서 1분간 두었다. 이후, 조직 조각들을 뉴런 배양 배지로 3번 헹구었다. 조직 조각들과 배지를 플라스틱 P1000 파이펫 팁으로 10회 상하 파이펫팅하여, 조직 조각을 뉴런 배양 배지 약 1 ml로 트리투레이션한 다음, 조직과 배지를 화염 연마된 유리 파이펫을 사용해 1회 트리투레이션하였다. 트리투레이션한 세포 현탁물을 400g에서 5분간 원심분리하고, 상층물을 제거하였다. 세포 펠렛을 5 ml 뉴런 배양 배지에 재현탁한 다음 24웰 플레이트의 폴리-L-라이신 코팅된 표면 또는 폴리라이신으로 코팅된 유리 커버슬립에 세포를 접종하고 (24웰 플레이트의 웰에서 커버슬립 당 100,000), 표준 세포 배양 인큐베이터에서 배양하였다. 다음날 (3일), 세포에, 폴리브렌 (polybrene) (8 ㎍/ml, 항생제 무 첨가 배지)을 사용해, E4ORF1 렌티바이러스 (2 ㎕의 농축 바이러스), 또는 E4ORF1 렌티바이러스와 turboGFP 렌티바이러스 (Evrogen Inc., 5-10 ㎕의 농축 바이러스, 총 부피)를 형질도입시켰다. 16시간 또는 24시간 후, 감염 배지를 표준 뉴런 배양 배지 또는 뉴런 배양 배지 + 라미닌 (0.01 mg/ml)로 교체하였다. 4-5일마다 배양 배지를 절반 교체하였다. 영상 촬영에 사용할 세포는 4-5일간 유지시킨 후 고정시키고 공초점 현미경으로 영상을 촬영하였다.

[0076] 재료. E18 임신 B6 마우스. 해부 매질은 1X B27 첨가물 및 1X 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 L15 배지였다. 배양 배지는 5% FBS, 0.6% 글루코스, 1X GlutaMax 및 1X 페니실린/스트렙토마이신, 1X B27 첨가물이 첨가된 Neurobasal 배지였다. 폴리-L-라이신 (1 mg/ml)이 코팅된 24웰 플레이트, TrypLE 및 DNAse도 사용하였다.

[0077] 결과. E4ORF1을 발현하는 뉴런은 E4ORF1을 발현하지 않는 뉴런과 비교해 축삭 길이가 길고 (평균 축삭 길이 1254.5±137.2 ㎛ vs 대조군 835.3±146.2 ㎛)(도 1A 참조), E4ORF1을 발현하지 않는 뉴런과 비교해 뉴런 당 마이너 프로세스 횟수가 증가되고 (뉴런 당 5.73±0.43 vs 대조군 뉴런 당 4.04±0.38)(도 1B 참조), E4ORF1을 발현하지 않는 뉴런과 비교해 축삭 당 일차 축삭 분지의 갯수가 증가 (6.74±0.71 vs 대조군 2.91±0.33)(도 1C 참조)된 것으로 나타났다. 이러한 차이들은 모두 통계학적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). 아래 표 1, 2, 3 및 4는 이들 실험에서 수득한 일부 추가적인 데이타들을 제시한다. 조작된 (E4ORF1-발현성) 해마 뉴런은 전형적인 뉴런 형태를 유지하고 있으며, βIII 투불린, MAP2, tau, NeuN 및 신경미세섬유와 같은 범 뉴런 마커를 발현하는 것으로 확인되었다. 도 2는 대조군 (도 2A, 2B 및 2C)과 E4ORF1-발현성 뉴런 (도 2D, 2E 및 2F)의 예시적인 몇가지 현미경 사진을 보여준다.

[0078] 표 1. E4ORF1-발현성 뉴런의 특징

[0079] *표 1*

축삭 길이 (㎛)	축삭 분지	프로세스 수	축삭 100 ㎛ 당 분지 수
1746	8	5	0.46
1359	10	7	0.74
2003	12	5	0.60
1393	5	7	0.36
1535	3	4	0.20
359	11	9	3.06
552	7	11	1.27
1324	7	10	0.53
2138	17	5	0.80
943	6	5	0.64
1217	9	3	0.74
736	8	6	1.09
1161	6	7	0.52
2407	3	5	0.12
845	5	4	0.59
1568	7	7	0.45
379	3	6	0.79
2529	5	5	0.20
2036	4	3	0.20
731	6	1. 5	0.82
677	6	5	0.89

853	3	4	0.35
362	4	4	1.10
평균 1254.48	평균 6.74	평균 5.74	평균 0.72

[0080] 표 2. 대조군 (E40RF1-비발현성) 뉴런의 특징

표 2

[0081]

축삭 길이 (㎛)	축삭 분지	프로세스 수	축삭 100 ㎛ 당 분지 수
1555	4	8	0.26
773	2	4	0.26
1649	4	5	0.24
2741	3	6	0.11
443	3	4	0.68
205	1	5	0.49
573	4	4	0.70
316	1	5	0.32
245	2	2	0.82
1395	3	1	0.22
458	1	6	0.22
936	2	4	0.21
318	4	3	1.26
344	2	1	0.58
2417	7	3	0.29
421	3	5	0.71
851	5	3	0.59
249	1	4	0.40
1026	3	3	0.29
1106	4	4	0.36
620	1	3	0.16
210	2	2	0.95
361	5	8	1.39
평균 835.30	평균 2.91	평균 4.04	평균 0.50

[0082] 표 3. E40RF1 vs. 대조군 뉴런의 특징

표 4

[0083]

	E40RF1 축삭 길이	대조군 축삭 길이	E40RF1 프로세스 수	대조군 프로세스 수
평균	1254.5	835.3	5.7	4.0
표준 오차	137.2	146.2	0.4	0.4
중앙값	1217.0	573.0	5.0	4.0
모드	#N/A	#N/A	5.0	4.0
표준 편차	658.1	701.2	2.1	1.8
표본 분산	433118.1	491721.0	4.3	3.4
첨도	-0.8	1.8	1.0	0.3
비대칭도	0.4	1.5	1.1	0.5
범위	2170.0	2536.0	8.0	7.0
최소	359.0	205.0	3.0	1.0
최대	2529.0	2741.0	11.0	8.0
합	28853.0	19212.0	132.0	93.0
카운트	23.0	23.0	23.0	23.0

[0084] 표 4. E40RF1 vs. 대조군 뉴런의 부가적인 특징

표 5

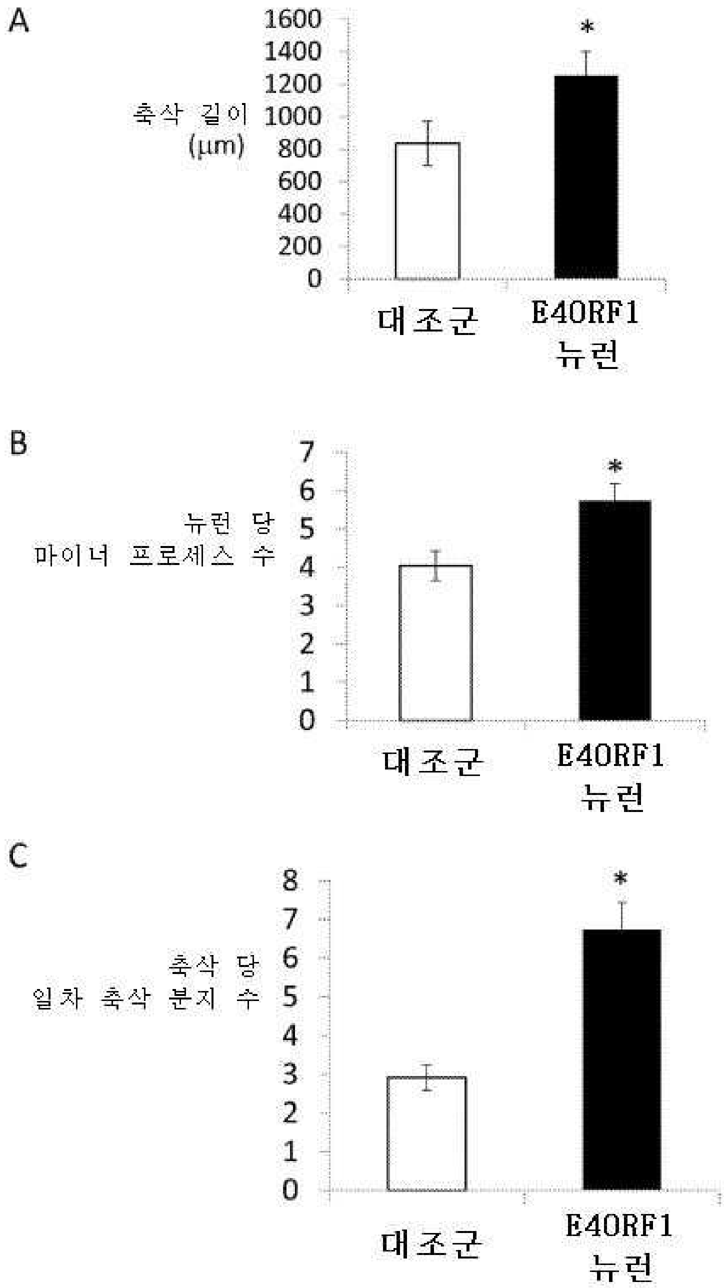
[0085]

	E40RF1 축삭 100 ㎛ 당 분지	대조군 축삭 100 ㎛ 당 분지	E40RF1 축삭 분지	대조군 축삭 분지
평균	0.72	0.50	6.74	2.91
표준 오차	0.12	0.07	0.70	0.33
중앙값	0.60	0.36	6.00	3.00
모드	#N/A	#N/A	3.00	4.00
표준 편차	0.60	0.35	3.39	1.56
표본 분산	0.36	0.12	11.48	2.45
첨도	11.10	1.01	2.55	0.48
비대칭도	2.91	1.25	1.39	0.70
범위	2.94	1.28	14.00	6.00
최소	0.13	0.11	3.00	1.00
최대	3.06	1.39	17.00	7.00
합	16.50	11.49	155.00	67.00
카운트	23.00	23.00	23.00	23.00

[0086] 본 발명은 아래 청구항에서 추가로 기술된다.

도면

도면1


A
축삭 길이 (μm)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
*
대조군
E4ORF1 뉴런
B
뉴런 당 마이너 프로세스 수
7
6
5
4
3
2
1
0
*
대조군
E4ORF1 뉴런
C
축삭 당 일차 축삭 분지 수
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
대조군
E4ORF1 뉴런

도면2