



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년10월04일
 (11) 등록번호 10-0763477
 (24) 등록일자 2007년09월27일

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)

- (21) 출원번호 10-2005-7017036
- (22) 출원일자 2005년09월12일
 심사청구일자 2005년12월06일
 번역문제출일자 2005년09월12일
- (65) 공개번호 10-2006-0010725
 공개일자 2006년02월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2004/001246
 국제출원일자 2004년03월11일
- (87) 국제공개번호 WO 2004/081172
 국제공개일자 2004년09월23일
- (30) 우선권주장
 269/MUM/2003 2003년03월12일 인도(IN)
 60/520,048 2003년11월14일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2001088104A 2
 Mechanisms of Development Vol.105(1-2):93-104
 (2001)

전체 청구항 수 : 총 39 항

심사관 : 안규정

(54) 사람 배아 줄기세포로부터 최종적으로 분화된 도파민작용성 뉴런의 유도

(57) 요약

본원발명은 예를 들어, 사람 배아 줄기세포와 같은 다능성 줄기세포로부터 신경 원시세포 및 도파민 작용성 뉴런 및 세로토닌 작용성 뉴런과 같은 분화된 신경세포를 효과적으로 생산하는 개선된 방법에 관한 것이다. 개시된 방법을 사용하여, 도파민 작용성 뉴런에 대한 특이적 마커인, 티로신 수산화효소에 대하여 양성인 세포를 높은 비율로 함유하는 세포 집단이 분리되었다. 본원발명의 신경 원시세포 및 종국적으로 분화된 세포는 대량으로 생산될 수 있고 따라서, 파킨스 질환과 같은 신경계 질환에서 세포 대체 요법을 위한 훌륭한 공급원으로서 기능할 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

영장류 다능성 줄기세포를 분화시키는 것에 의해 얻어지고, TFG-β3 또는 인터루킨 1β 또는 이들 모두와 N-아세틸 시스테인의 존재하에서 배양됨으로써 네스틴 양성 세포 및 NCAM 양성 세포로 선별된 생체의 배양물 중의 분화된 세포 집단으로서, 분화된 세포의 60% 이상은 도파민 작용성 뉴런인 것을 특징으로 하는 세포 집단.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 영장류 다능성 줄기세포는 사람 배아 줄기세포인 것을 특징으로 하는 세포 집단.

청구항 3

영장류 다능성 줄기세포를 분화시키는 것에 의해 얻어지고, TFG-β3 또는 인터루킨 1β 또는 이들 모두와 N-아세틸 시스테인의 존재하에서 배양됨으로써 네스틴 양성 세포 및 NCAM 양성 세포로 선별된 생체의 배양물 중의 분화된 세포 집단으로서, 85% 이상은 네스틴 양성세포이고, 80%이상은 NCAM을 발현하는 농축된 집단이며, 60% 이상은 티로신 수산화효소를 발현하는 것을 특징으로 하는 세포 집단.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 영장류 다능성 줄기세포는 사람 배아 줄기세포인 것을 특징으로 하는 세포 집단.

청구항 5

- (a) 영장류 다능성 줄기세포 배양을 확장하는 단계;
- (b) 다능성 줄기 세포를 배양하여 네스틴에 대하여 양성인 신경 원시세포를 선택하는 단계;
- (c) 네스틴-양성 신경 원시세포를 선별하여 NCAM-양성 세포를 농축시키는 단계;
- (d) TGF-β3 또는 인터루킨-1β 또는 이들 모두를 포함하는 분화 배지에서 세포를 배양하는 것에 의해, 네스틴-양성, NCAM-양성 세포를 N-아세틸 시스테인의 존재하에 분화시켜서 분화된 신경 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는

영장류 다능성 줄기세포로부터 분화된 신경세포 집단을 생성하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 다능성 줄기세포는 레이저 절개 기술을 사용하여 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 다능성 줄기세포는 사람 배아 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 사람 배아 줄기세포는 레이저 절개 기술을 사용하여 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 5 항에 있어서, 분화된 신경 세포 집단은 60% 이상의 도파민 작용성 뉴런을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 5 항에 있어서, 분화 신경세포 집단은 30% 이상의 세로토닌 작용성 뉴런을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 5 항에 있어서, 분화 신경세포 집단은 25% 이상의 희소돌기아교세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 5 항에 있어서, 단계 (b)의 다능성 줄기세포를 배양시켜서 배양체를 형성하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 배양체를 배양하여 네스틴 양성 신경 원시세포에 대해서 선택되도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 5 항에 있어서, 네스틴에 양성인 신경 원시세포는 무혈청 배지에서 다능성 줄기세포를 배양하는 것에 의해서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 무혈청 배지는 ITSFn 무혈청 특정배지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 무혈청 배지는 인슐린, 아셀렌산나트륨, 트랜스페린, 및 섬유결합소로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 가용성 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 무혈청 배지는 인슐린, 아셀렌산나트륨, 트랜스페린, 및 섬유결합소를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 13 항에 있어서, 네스틴에 양성인 신경 원시세포는 무혈청 배지에서 배양체를 배양하는 것에 의해서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 무혈청 배지는 ITSFn 무혈청 특정배지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 18 항에 있어서, 무혈청 배지는 인슐린, 아셀렌산나트륨, 염기성 섬유아세포 성장인자, 트랜스페린, 및 섬유결합소로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 가용성 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 무혈청 배지는 인슐린, 아셀렌산나트륨, 트랜스페린, 및 섬유결합소를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 신경 원시세포는 95% 이상의 네스틴-양성 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 5 항에 있어서, 자기 세포 선별(MACS)에 의해 단계 (c)의 네스틴-양성 신경 원시세포를 선별하여 NCAM-양성 세포에 대해서 농축시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서, 네스틴-양성 신경 원시세포는 50-60% 이상의 NCAM-양성 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 5 항에 있어서, 확장배지에서 단계(c)의 네스틴-양성, NCAM-양성 신경 원시세포를 확장하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 확장 배지는 인슐린, 아셀렌산나트륨, 트랜스페린, 라미닌, 푸트레신, 프로게스테론, 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF), 표피증식인자(EGF), 소닉 헤지호그(SHH), 섬유아세포 성장인자-8(FGF-8), 및 뇌 유래 항신경성 인자(BDNF)로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 가용성 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 6-10일동안 확장배지에서 세포를 증식시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 26 항에 있어서, 세포를 배양하고 하나 이상의 집단 배가를 위해 연속적으로 계대시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제 26 항에 있어서, 세포를 액체질소에서 냉동보존하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제 5 항에 있어서, 분화배지는 송아지 태아 혈청, B27, 아스코르브산, 및 N-아세틸 시스테인으로 보충된 신경기초 배지를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제 5 항에 있어서, 분화배지는 아스코르브산, N-아세틸, 시스테인 신경아교세포주 유래 항신경성 인자(GDNF), 디부티릴-고리 AMP(db-cAMP), 뇌 유래 항신경성 인자(BDNF), 뉴르투린, 소닉 헤지호그 단백질(SHH), 및 섬유아세포 성장 인자-8(FGF-8)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 분화제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제 5 항에 있어서, 분화 배지에서 30-50일동안 네스틴-양성, NCAM-양성 세포를 증식시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

네스틴에 대해서 양성인 세포에 대해서 신경 원시세포를 농축시키는 단계, 및 TGF-β3 또는 인터루킨-1β 또는 이들 모두 및 N-아세틸 시스테인의 존재 하에서 세포를 배양하는 것에 의해, 네스틴-양성 세포를 도파민 작용성 뉴런으로 분화시키는 단계를 포함하는 신경 원시세포로부터 도파민 작용성 뉴런을 생성하는 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서, N-아세틸 시스테인의 존재하에서 40% 이상의 네스틴-양성 세포가 도파민 작용성 뉴런으로 분화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제 33 항에 있어서, NCAM에 양성인 세포에 대해서 신경 원시세포를 농축시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제 34 항에 있어서, 네스틴-양성, NCAM-양성세포는 분화되어서 도파민 작용성 뉴런을 생성하는 것을 특징으로

하는 방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서, 60% 이상의 네스틴-양성, NCAM-양성 세포가 도파민 작용성 뉴런으로 분화하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

네스틴 및 NCAM에 대해 양성인 세포에 대해서 신경 원시세포를 농축시키는 단계, 및 TGF-β3 또는 인터루킨-1β 또는 이들 모두의 존재하에서 세포를 배양하는 것에 의해서, 네스틴-양성, NCAM-양성 세포를 분화시켜서 세로토닌 작용성 뉴런을 생성하는 단계를 포함하는 신경 원시세포로부터 세로토닌 작용성 뉴런을 생성하는 방법.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 30% 이상의 네스틴-양성, NCAM-양성 세포가 세로토닌 작용성 뉴런으로 분화하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 사람 배아 줄기 세포와 같은 다능성 배아 줄기 세포에서 얻어진 도파민 작용성 뉴런 및 세로토닌 작용성 뉴런과 같은 최종적으로 분화된 신경세포를 생산하는 개선된 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라 생성된 도파민 작용성 뉴런 및 세로토닌 작용성 뉴런은 신경퇴행성 장애 및 신경계 질환에 있어서 세포 대체 요법에 대한 우수한 공급원으로 기능 할 수 있다.

배경기술

<2> 파킨스 질환, 알츠하이머 질환, 및 정신분열병과 같은 신경 퇴행성 장애 및 신경계 질환은 현대 사회에서 더욱 발생율이 높아지고 있는 파괴성 질환이다. 이들 많은 신경계 장애는 도파민 작용성 뉴런 또는 세로토닌 작용성 뉴런과 연관되어 있다. 도파민 작용성 뉴런은 중간뇌의 배쪽 및 복외측에 존재하며, 자세반사, 운동, 및 보상관련 거동을 조절한다. 이들 신경세포는 전뇌 중의 다수의 구조를 자극하고, 이들의 퇴행 또는 기능이상은 파킨스 질환, 정신분열병, 및 약물 중독과 연관되어 있다(Hynes 등, 1995, Cell 80:95-101). 세로토닌 작용성 뉴런은 마름뇌의 배쪽 및 복외측에 집중되어 있으며, 대뇌피질, 변연계 및 척수를 포함하는 중추신경계의 대부분의 부분을 자극한다. 이들 신경세포는 인지, 각성, 거동 특성, 및 식품섭취의 정도를 조절하고, 이들의 기능이상은 공격, 우울증, 및 정신분열병과 연관되어 있다 (Jacobs and Gelperin, 1981, Serotonin Neurotransmission and Behavior. The MIT Press, Cambridge, Mass.). 세로토닌 기능이상은 또한 예를 들어, 우울증(Asberg 등, 1986, J.Clin.Psychiatry 47:23-35), 자살(Lester, 1995, Pharmacopsychiatry 28(2):45-50), 및 폭력적인 공격 거동(Brown 등, J. Clin. Psychiatry, 1990, 54 : 31-41; Eichelman, 1990, Annu. Rev. Med. 41: 149-158)과 같은,

다양한 정신의학 질환, 신경계 질환, 및 다른 질환의 병태생리에서 작용할 수 있다.

- <3> 파킨스 질환은 운동을 조절하는 뇌 영역 중의 신경세포(뉴런)의 퇴행에 의해 유발된 진행성 신경계 장애이다. 퇴행은 도파민으로 알려진 뇌 신호전달 화학(신경전달물질)의 부족을 일으키고, 질환을 특징 지우는 운동 장애를 초래한다. 흑색질에서의 도파민 작용성 뉴런의 손실이 파킨스 질환의 원인이 될 수 있다는 것이 병리학적 연구로 밝혀졌다. 예를 들어, 흑질 선조체 경로의 양측 손상은 동물 모델에 있어서 파킨스 질환에서 관찰된 운동 기능이상(안정떨림, 경축, 운동불능증 및 자세이상)에 매우 유사한 증상을 나타낸다. 6-히드록시도파민(OHDA)로부터 결과된 흑질 선조체 경로의 양측 손상은 설치류에서 심각한 운동불능증, 무갈증, 못삼킴증, 및 감각 결핍을 유발하였다(Ungerstedt, 1971, U. Acta Physiol.Scand. Suppl. 367: 95-121; Yirek and Sladek, 1990, Annu. Rev. Neurosci. 13: 415-440).
- <4> 파킨스병에서, 도파민 수용체 상태의 변화는 질환의 진행 단계에 의존적이다. 파킨스병의 특징은 기저핵의 모든 성분에 있어서의 도파민의 심각한 감소이다(Hornykiewicz, 1988, Mt. Sinai J. Med. 55: 11-20). 도파민이 결핍된 경우에, 시상, 창백핵, 및 시상하부 핵과 같은 뇌의 다양한 다른 영역이 기능 이상을 일으키기 시작한다. 이들 영역은 뇌의 다른 부분에 신호를 방출하기 때문에, 이들 작은 영역에서의 기능 이상은 광범위한 뇌의 기능 이상을 유도할 수 있다.
- <5> 파킨스 질환의 이환율은 일본에서 100,000 명당 82명, UK에서 100,000 명당 108명 내지 북아메리카 인구의 거의 1%(약 1백만)에 이르기까지 다양하다. 인도의 경우에, 파킨스 질환의 이환율은 북인도에서 100,00 명당 14명이고, 남인도에서 100,00 명당 27명이고, 동인도에서 100,000 명당 16명이고, 서인도의 파시 공동체의 경우에 100,000 명당 363 명이다. 파킨스 질환은 현재 불치병으로 여겨진다. 그러나, 파킨스 질환의 증상 완화를 제공하는 다양한 약물이 입수가 가능하며, 약물은 레보도파, 브로모크립틴, 페르고리드, 세레기린, 항콜린성, 및 아만타딘을 포함한다. 이들 약물은 파킨스 질환의 증상의 완화를 제공할 수 있지만, 이들은 종종 유익한 부작용을 갖는다. 더욱이, 이들 약물은 질환을 치료할 수도 없고 신경세포의 진행성 손실을 늦추지도 않으며, 단지 증상을 완화할 수 있을 뿐이다(종종, 시간경과에 따라 유익한 효과는 소실된다). 어떤 환자는 약물에 덜 반응하는 반면에, 어떤 환자는 과민성이어서, 운동장애를 일으킨다.
- <6> 이러한 불만족스러운 결과는 질환을 치료하기 위한 다른 전략(도파-수용체 아고니스트 요법 및 창백핵절단술을 포함하는 외과적 접근, 창백핵의 깊은 뇌 자극(DBS), 및 과활성 뇌영역을 파괴하거나 또는 잠잠한 이들 영역에 DBS 전극을 배치시킴으로써 신경망 이상을 방해하려는 시도)의 개발을 유도하였다. 파킨스 질환을 갖는 환자에 대한 이들 및 다른 형태의 외과수술은 어떤 유익한 결과를 나타냈지만, 이들 외과수술의 장기간 효과는 아직 알 수 없다. 치료는 또한, 어떤 한계 및 부작용을 갖는다.
- <7> 이 불치병을 치료하기 위한 다른 전략은 유전자 요법이다. 신경계 질환의 분자적 기초의 발견 및 유전자 전달 시스템에 있어서의 진보는 다양한 중추신경계 장애에 대해서 치료 유전자의 국부적 및 광범위한 송달을 가능하게 하였다. 그러나, 유전자 요법은 트랜스진 발현의 안정성 및 조절, 및 벡터 및 발현된 트랜스진 모두의 안전성과 같은 어떤 한계가 있다(Costantini 등, 2000, Gene Therapy 7: 93-109). 유전자 요법에 사용될 수 있는 것으로 밝혀진 벡터는 이에 제한되는 것은 아니지만, 단순헤르페스 바이러스 1형(HSV-1)(During 등, 1994, Science 266: 1399-1403), 아테노바이러스 의존바이러스 벡터(AAV)(During 등., 1998, Gene Therapy 5: 820-827), 레트로바이러스, HSV/엡스테인-바 바이러스 (HSV/EBV) 혼성 벡터, 및 HSV/AAV 혼성 벡터를 포함한다. 유전자 요법은 동물 모델의 파킨스 질환을 치료하는데 유용하다는 것이 밝혀졌다. 캡슐화된, 신경세포 보호분자를 방출하는 유전적으로 설계된 세포주, 신경아교세포 세포주-유래 항신경성 인자 유전자(GDNF), 및 GDNF 유전자를 코딩하는 렌티바이러스 벡터는 이식편 생존 및 분화를 개선시켰고, 이에 의해서 동물 모델에서의 거동 회복이 촉진되었다(Zurn 등, 2001, Brain Res Rev. 36: 222-229; Date 등, 2001, Cell Transplant 10: 397-401). 신경계 줄기세포를 사용하는 유전자 요법은 생체내에서 치료적 수준의 GDNF를 발현하는데 있어서 효과적이라는 것이 증명되었다(Akerud 등, 2001, J. Neurosci. 21: 8108-8118).
- <8> 파킨스병 및 다른 신경 퇴행성 장애 및 신경계 질환에서 소실된 신경세포 대체 가능성을 제공하는 또 다른 치료적 전략은 세포 이식이다. 태아 조직 이식을 이용한 임상 시험으로(진행중) 뇌에 세포를 이식시키는 방법이 개발되었으며, 아이디어의 실행가능성이 증명되었으며 또한, 적어도 어떤 환자에 대해서는 긍정적인 결과를 얻었다. 파킨스병을 갖는 환자의 줄무늬체에 도파민 작용성 뉴런의 전구체를 직접 이식시키고자 하는 시도가 수행되었으며, 사람 태아 또는 배아 도파민 작용성 뉴런의 이식이 파킨스병을 갖는 환자에게 유익한 효과를 나타낸다는 것이 증명되었다(Freed 등, 2001, N.Engl.J. Med. 344:710-719). 그러나, 완전한 회복을 이루기 위해서는 이식편을 판곳에 위치시키는 것보다 경로를 해부학적으로 회복하는 것이 필요하다는 것을 데이터를 통해 알 수

있다(Winkler 등, 2000, Prog. Brain Res. 127:233-265). 또한, 태아 흑질 이식 요법이 환자에게서 임상적으로 신뢰가능한 개선(엄청난 윤리적, 법률적, 그리고 안전성 과제를 포함)을 이루기 위해서는 적어도 5-10 태아에서 얻은 사람 태아 조직을 필요로 한다. 따라서, 신경 퇴행성 장애 및 신경계 질환을 치료하기 위해서는 도파민 작용성 뉴런과 같은 신경세포의 대체 공급원이 시급하게 요구된다.

<9> 최근, 신경 줄기세포의 재생가능한 공급원이 성인 뇌에서 발견되었다. 자체적으로 재생가능하고 뇌의 모든 유형의 세포를 형성할 수 있는 신경 줄기세포는 뇌세포를 생산하는 도파민을 제한없이 공급할 수 있으며 따라서, 신경 퇴행성 장애 및 신경계 질환에 대해 완전히 새로운 치료적 접근을 가능하게 한다(Eriksson 등, 1998, Nature Medicine 4:1313-1317). 사람 전뇌 배아에서 유래된 신경 줄기세포의 배양물은 생체외에서 1,000 만까지 확장될 수 있다는 것이 보고되었다. 성인의 신경 줄기세포는 파킨스병에 관한 매우 특성화된 모델인 성체 래트에 이식되었다. 동물 모델의 세포는 이식 후 1년까지 생존하였으며, 신경세포로 분화하였고, 어떤 실험 동물에서는 운동 장애를 감소시킬 수 있었다(Svendsen 등, 1997, Exp. Neurol. 148:135-146). 유감스럽게도, 성인 신경 줄기 세포는 조직 배양에 있어서 한정된 수명을 갖는다(Kukekov 등, 1999, Exp. Neurol. 156:333-344).

<10> 다양한 신경퇴행성 장애 및 신경계 질환을 치료하는데 사용될 수 있는 도파민 작용성 뉴런, 및 다른 신경세포의 생존가능한 대체 공급원 중 하나는 다능성 배아 줄기(ES)세포, 특히 사람 ES 세포이다. ES 세포는 미분화 상태에서 무제한적으로 증식할 수 있으며, 다능성이다. 다능성은, 체내에 존재하는 거의 모든 유형의 세포로 분화할 수 있다는 것을 의미한다. ES 세포가 체내의 분화된 거의 모든 세포가 될 수 있기 때문에, 심장, 췌장, 신경 조직, 근육, 연골 등과 같은 광범위하게 위치한 조직 및 기관에 대한 대체 세포를 생성할 수 있는 가능성을 갖는다. ES 세포는 이식전에 일어나는 배아 발생 단계에 해당하는, 배반포의 속세포덩이(ICS)로부터 유래될 수 있다. 사람 ES 세포는 수정 후 4 내지 7일 유지되는 발생하는 배아의 초기 단계에 해당하는 사람 배반포로부터 유래될 수 있다. ICM 으로부터 유래된 ES 세포는 생체외에서 배양될 수 있고 적당한 조건하에서 무제한적으로 증식한다.

<11> 마우스(Evans 등, 1981, Nature 292: 154-156), 래트(Iannaccone 등, 1994, Dev. Biol., 163: 288-292), 돼지(Evans 등, 1990, Theriogenology 33: 125-128; Notarianni 등, 1990, J. Reprod. Fertil. Suppl. 41: 51-6), 양 및 염소(Meinecke-Tillmann and Meinecke, 1996, J. Animal Breeding and Genetics 113: 413-426; Notarianni 등, J. Reprod. Fertil. Suppl. 43: 255-60), 래빗(Giles 등, 1993, Mol. Reprod. Dev.36: 130-138; Graves 등, 1993, Mol. Reprod. Dev.36:424-433), 밍크(Sukoyan 등, Mol. Reprod. Dev. 1992,33: 418-431), 햄스터(Doetschman 등, 1988, Dev. Biol. 127:224-227), 가금류(Pain 등, 1996, Development 122(8): 2339-48), 영장류(U.S. 특허출원 일련번호 5,843,780), 및 사람(Thomson 등, 1998, Science 282: 1145-1147; Reubinoff 등, 2000, Nature Biotech. 18:399-403)을 포함하는 많은 종들에 대해서 ES 세포주가 성공적으로 확립되었다. 다른 포유동물 ES 세포와 마찬가지로, 면역결핍 마우스로 주입되는 경우에, 사람 ES 세포는 분화하고 3개의 모든 배엽층 조직을 형성함으로써 세포가 다능성이라는 것을 나타낸다. 공개 보고서는 사람 ES 세포가 1년 이상 배양 중에 유지되었으며, 이 기간동안 세포는 다능성, 자가-재생 능력, 및 정상적인 핵형을 유지하였다는 것을 증명한다(Thomson 등, 1995, PNAS 92:7844-7848).

<12> 연구는 ES세포가 신경 원시세포로 분화될 수 있다는 것을 보여준다(Zhang 등, 2001, Nature Biotech. 19:1129-33; WO 01/88104; U.S.일련번호 09/872, 183, 09/888,309, 10/157,288; WO 03/000868(각각의 문헌들이 본원에 참고문헌으로 수록된다)). 그 다음, 이들 세포는 더 분화되어서 도파민 작용성 뉴런이 될 수 있다(Rolletschek 등, 2001, Mech. Dev. 105:93-104). ES 세포 분화의 초기 단계에 배양체(胚樣體)가 형성될 수 있다. 예를 들어, 1 μM의 레티노산은 배양체로의 신경 분화를 촉진한다(Bain 등, 1995, Dev. Biol. 168: 342-357). 레티노산은 신경세포를 생성하는데 사용될 수 있는 동시에, 강력한 테라토겐이다. 스트로마 세포 유도 활성화(SIDA)를 사용하는 것에 의해서(Kawasaki 등, 2000, Neuron 28:1-20), 핵 수용체 관련-1 유전자(Nurr-1)를 발현시키는 것에 의해서(Kim 등, 2002, Nature 418: 50-56), 또는 미분화 ES 세포를 마우스 모델에 직접 이식하는 것에 의해서(Bjorklund 등, 2002, Proc. Natl Acad. Sci. 99: 2344-2349), ES 세포를 도파민 작용성 뉴런으로 분화시키는 것에 관한 다수의 보고서가 공개되었다. Lee 등은 (2000, Nat. Biotechnol.18:675-79) 생체외에서 ES 세포를 신경 원시세포로, 도파민 작용성 뉴런으로 그리고 세로토닌 작용성 뉴런으로 분화시키는 방법을 보고하고 있다. 그러나, 이들 모든 실험은 마우스 ES 세포를 사용하여 수행되었고, 분화 프로토콜로서 5-50%범위의 도파민 작용성 뉴런을 얻었다. 마우스 약 20%의 ES 세포가 Lee 등의 연구에서 도파민 작용성 뉴런으로 발달되었고(WO 01/83715), Studer 등의 연구에서는 5-50%였다(WO 02/086073). 사람 ES 세포로부터의 도파민 작용성 뉴런이 분화되는 동안에, 집단내 총 세포 비율과 비교하여 도파민 작용성 뉴런은 단지 5-7%의 수율로 얻어졌다(WO 03/000868).

- <13> 파킨스병은 중간뇌 흑색질중의 도파민 작용성 뉴런의 선택적이고 지속적인 손상을 특징으로 하기 때문에, 세포 이식에 있어서 특히 적절한 임상 표적이 될 수 있는 것으로 여겨진다. 환자가 운동을 조절 또는 지시할 수 없도록 하는 결과를 초래하는 특정 뇌부위 중의 도파민-생성 신경세포의 손실은 신경세포의 이상 자극을 유발한다. 그러나, 세포 대체 요법은 많은 도파민 작용성 뉴런을 필요로 한다. 따라서, 사람 ES 세포로부터 도파민 작용성 뉴런을 더욱 효과적으로 유도하는 대안의 프로토콜이 요구되어진다. 이것은, 파킨스병 치료의 이용가능성 및 치료 성공률의 증가 모두를 촉진시킬 것이다. 더욱이, 생체외에서 도파민 작용성 뉴런을 사용하여, 신경퇴행성 장애 및 신경계 질환을 앓는 도파민 생성 뇌세포의 사멸을 예방하거나 감소시키는 물질을 동정할 수 있다.
- <14> (발명의 개요)
- <15> 본 발명은 사람 배아 줄기세포와 같은 다능성 줄기세포로부터 신경 원시세포, 및 중국적으로 분화된 신경세포를 생산하는 개선된 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 본원발명은 사람 배아 줄기 세포 집단이 높은 비율로 티로신 수산화효소(TH)(도파민 작용성 뉴런에 대한 특이적 마커)에 양성인 신경세포로 분화될 수 있다는 것을 증명한다 (예를 들어, 적어도 약 60%). 본원발명은 또한 사람 배아 줄기 세포 집단이 높은 비율의 세로토닌 작용성 뉴런으로 분화할 수 있다는 것을 증명한다. 본원발명의 방법에 따라서 생성된 도파민 및 세로토닌 작용성 뉴런의 비율은 이전에 개시된 방법에서 얻어진 것보다 높다. 본원에 개시된 방법은 또한 사람 배아 줄기세포로부터 콜린성 신경세포 및 감각 신경세포, 및 별아교세포 및 희소돌기아교세포의 표현형 특성을 갖는 세포를 발생시키는데 사용될 수 있다.
- <16> 본원발명은 영양류 다능성 줄기 세포를 분화시킴으로써 얻어진 생체의 배양물 중의 분화된 세포 집단을 제공하며, 분화된 세포의 적어도 60%는 도파민 작용성 뉴런이고, 티로신 수산화효소를 발현하거나 또는, 티로신 수산화효소를 발현하는 도파민 작용성 뉴런이다. 다른 구체예에서, 분화된 세포의 적어도 약 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%는 도파민 작용성 뉴런이다. 본원발명은 또한 영양류 다능성 줄기세포를 분화시킴으로써 얻어진 생체의 배양물 중의 분화된 세포 집단을 제공하며, 분화된 세포의 적어도 30%는 세로토닌 작용성 뉴런이다. 다른 구체예에서, 분화된 세포의 적어도 약 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%는 세로토닌 작용성 뉴런이다. 바람직한 구체예에서, 신경 원시세포 또는 신경세포로 분화되는 영양류 다능성 줄기세포는 사람 배아 줄기세포이다.
- <17> 본원발명은 또한, 영양류 다능성 줄기세포로부터 분화된 신경세포 집단을 생성하는 방법을 제공하며, 이 방법은
- <18> (a) 영양류 다능성 줄기세포 배양을 확장하는 단계;
- <19> (b) 다능성 줄기 세포를 배양하여 네스틴에 대하여 양성인 신경 원시세포를 선택하는 단계;
- <20> (c) 네스틴-양성 신경 원시세포를 선별하여 NCAM-양성 세포를 농축시키는 단계;
- <21> (d) 분화 배지에서 세포를 배양하는 것에 의해 네스틴-양성, NCAM-양성 세포를 분화시켜서 분화된 신경 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다.
- <22> 바람직한 구체예에서, 영양류 다능성 줄기세포는 사람 배아 줄기세포이다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 방법에 사용된 다능성 줄기세포는 바람직하게는 레이저 절개 기술을 사용하여 유래된다.
- <23> 다른 구체예에서, 상기 방법은 단계 (b)의 다능성 줄기 세포를 배양하여 배양체를 형성하는 단계를 더 포함한다. 바람직하게는, 이들 배양체는 네스틴 양성인 신경 원시세포를 선별하는 조건하에서 배양되며, 예를 들어, 무혈청 배지중에서 다능성 줄기세포 또는 배양체가 배양될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 무혈청 배지는 ITSFn 무혈청 특정배지이고, 이것은 바람직하게는 인슐린, 아셀렌산나트륨, 염기성 섬유아세포 성장인자, 트랜스페린, 및 섬유결합소로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 가용성 인자를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 이들 방법은 신경 원시세포를 발생시킬 수 있으며, 이들 세포는 적어도 약 60-75% 네스틴-양성 세포, 더욱 바람직하게는 약 80-90% 네스틴-양성 세포, 및 가장 바람직하게는 약 95-99% 네스틴-양성 세포를 포함한다.
- <24> 그 다음, 면역표지화 및 형광 선별과 같은 적당한 면역 기술(자기 세포 선별(MACS), 고체상 흡착, 형광-활성 세포 선별(FACS), 세포-표면 마커에 대한 유동 면역세포계측법, 또는 유동 세포계측법)을 사용하여 네스틴-양성 신경 원시세포를 선별하여 NCAM-양성 세포가 농축되도록 하였다. 바람직한 구체예에서, 이들 방법으로 바람직하게는 적어도 약 40-70% NCAM-양성 세포, 더욱 바람직하게는 약 50-60% NCAM-양성 세포, 및 가장 바람직하게는 약 80-99% NCAM-양성 세포를 포함하는, 네스틴-양성 세포를 생성하였다. 어떤 구체예에서, 상기 방법은 바람직

하계는 6-10일동안, 확장 배지에서 단계(c)의 네스틴-양성, NCAM-양성 신경 원시세포를 확장하는 단계를 더 포함한다. 바람직하게는, 확장 배지는 인슐린, 아셀렌산나트륨, 트랜스페린, 라미닌, 푸트레신, 프로게스테론, 염기성 섬유아세포 성장인자 (bFGF), 표피증식인자(EGF), 소닉 헤지호그(SHH), 섬유아세포 성장인자-8(FGF-8), 및 뇌 유래 항신경성 인자(BDNF)로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 가용성 인자를 포함한다.

- <25> 네스틴-양성, NCAM-양성 신경 원시세포는 바람직하게는 배양 중에 확장되며, 1회 이상의 집단 배가를 위해 연속적으로 계대된다. 이들 세포는 또한 액체 질소 중에 냉동보존될 수 있다. NCAM-양성 신경 원시세포는 바람직하게는 상기 방법의 단계 (d)에 제시된 대로, 30-50일 동안 분화 배지에서 증식된다. 바람직한 구체예에서, 분화 배지는 송아지 태아 혈청, B27, 아스코르브산, 및 N-아세틸 시스테인이 보충된 신경기초 배지를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 분화 배지는 TGF-β3 또는 인터루킨-1β 또는 이들 모두를 포함할 것이다. 바람직하게는, 분화 배지는 아스코르브산, N-아세틸, 시스테인 신경아교세포주 유래 항신경 인자(GDNF), 디부티릴-고리 AMP(db-cAMP), 뇌 유래 항신경성 인자(BDNF), 뉴르투린, 소닉 헤지호그 단백질(SHH), 및 섬유아세포 성장인자-8(FGF-8)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 분화제를 더 포함한다.
- <26> 바람직한 구체예에서, 상기 개시된 방법은 약 40-60% 도파민 작용성 뉴런, 더욱 바람직하게는 약 70-80% 도파민 작용성 뉴런, 및 가장 바람직하게는 약 90-99% 도파민 작용성 뉴런을 포함하는, 분화된 신경 세포 집단을 생성하기 위해서 사용된다. 어떤 구체예에서, 이들 방법은 바람직하게는 약 20-50% 세로토닌 작용성 뉴런, 더욱 바람직하게는 약 30-70% 세로토닌 작용성 뉴런, 및 가장 바람직하게는 60-99% 세로토닌 작용성 뉴런을 포함하는, 분화된 신경 세포 집단을 생성하기 위해서 사용된다. 다른 구체예에서, 이들 방법은 바람직하게는 약 15-40% 희소돌기아교세포, 더욱 바람직하게는 약 25-50% 희소돌기아교세포, 및 가장 바람직하게는 약 60-99% 희소돌기아교세포를 포함하는, 분화된 신경 세포 집단을 생성하기 위해서 사용된다.
- <27> 본원발명은 신경 원시세포로부터 도파민 작용성 뉴런을 생성하는 방법을 제공하며, 이 방법은 네스틴에 양성인 세포에 대해서 신경 원시세포를 농축시키는 단계, 및 TGF-β3 또는 인터루킨-1β 또는 이들 모두의 존재하에서 세포를 배양시키는 것에 의해서 네스틴-양성 세포를 분화시켜서 도파민 작용성 뉴런을 생성하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 네스틴-양성 세포의 적어도 약 40-99%는 이들 방법을 사용하여 도파민 작용성 뉴런으로 분화된다. 다른 구체예에서, 이들 방법은 NCAM 에 양성인 세포에 대해서 신경 원시세포를 농축시키는 단계를 포함하고, 이들 네스틴-양성, NCAM-양성 세포는 바람직하게는 분화되어서 도파민 작용성 뉴런을 생성한다(예를 들어, 세포의 적어도 약 60-99%가 도파민 작용성 뉴런으로 분화된다). 본원발명은 또한 신경 원시세포로부터 신경세포를 생성하는 방법을 제공하며, 이 방법은 네스틴 및 NCAM 에 양성인 세포에 대해서 신경 원시세포를 농축시키는 단계, 및 TGF-β3 또는 인터루킨-1β 또는 이들 모두의 존재하에서 세포를 배양시키는 것에 의해서 네스틴-양성, NCAM 양성 세포를 분화시켜서 도파민 작용성 뉴런을 생성하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 네스틴-양성, NCAM-양성 세포의 적어도 약 30-99%는 이들 방법을 사용하여 세로토닌 작용성 뉴런으로 분화된다.
- <28> 본원발명은 본원에 개시된 대로, 피험체에 영장류 다능성 줄기세포로부터 유래된 분화된 신경세포를 투여하는 것에 의해서 신경퇴행성 장애 또는 신경계 질환을 갖는 피험체를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 분화된 신경 세포 집단을
- <29> (a) 영장류 다능성 줄기세포의 배양을 확장시키는 단계;
- <30> (b) 다능성 줄기세포를 배양하여 네스틴 대하여 양성인 신경 원시세포를 선택하는 단계;
- <31> (c) 네스틴-양성 신경 원시세포를 선별하여 NCAM-양성 세포를 농축시키는 단계;
- <32> (d) 분화 배지에서 세포를 배양하는 것에 의해서 네스틴-양성, NCAM-양성 세포를 분화시켜서 분화된 신경 세포 집단을 생성하는 단계;
- <33> (e) 분화된 신경 세포 집단의 치료적 유효량을 피험체의 중추신경계에 투여하는 단계로부터 얻어질 수 있다.
- <34> 바람직하게는, 분화 배지는 TGF-β3 또는 인터루킨-1β 또는 모두를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 피험체는 환자이고, 더욱 바람직하게는 사람 환자이고, 영장류 다능성 줄기세포는 사람 배아 줄기세포이다. 바람직하게는, 사람 배아 줄기세포는 환자와 조직적합성이고, 예를 들어, 사용된 다능성 줄기 세포가 본질적으로 환자와 동일한 계보를 갖는 경우이다. 어떤 구체예에서, 도파민 작용성 뉴런, 세로토닌 작용성 뉴런, 콜린성 신경세포, 또는 감각 신경세포, 또는 대안으로 별아교세포 또는 희소돌기아교세포는 분화된 신경 세포 집단으로부터 분리되고 환자에게 투여된다. 분화된 신경 세포 집단을 포함하는 이들 세포가 다양한 신경 퇴행성 장애 또는 신경계 질환(이에 제한되는 것은 아니지만, CNS 장애, 파킨슨 질환, 알츠하이머 질환, 헌팅톤 질환, 척수 상해, 근육위축 가쪽 경화증(ALS), 간질, 중풍, 및 허혈을 포함한다)을 치료하기 위해서 피험체에 투여될 수

있다. 바람직하게는, 이식(예를 들어, 피험체의 뇌에 원하는 세포를 이식)에 의해서 세포가 투여된다.

<35> 다른 구체예에서, 본원에 개시된 영장류 다능성 줄기세포에서 유래된 분화 신경세포는 분화된 신경세포 또는 이들 세포의 활성화에 영향을 미치는 화합물(예를 들어, 작은 분자 및 약물)을 스크리닝하기 위해서 사용될 수 있다. 화합물은 또한 신경세포 독성 또는 조절에 대해서 스크리닝될 수 있다. 화합물을 분화된 신경세포 집단에 첨가하는 것에 의해서 그리고 세포의 생존, 형태, 표현형, 기능 활성화, 또는 다른 특성과, 화합물에 노출된 것을 제외하고는 유사한 조건하에서 배양된 분화된 신경세포를 비교하는 단계에 의해서, 화합물이 평가될 수 있다. 예를 들어, 화합물이 신경전달물질 합성, 방출, 또는 세포에 의한 섭취 변화에 영향을 미치는지를 결정하기 위해서 스크리닝 될 수 있다.

발명의 상세한 설명

<51> 본원발명은 다능성 줄기세포로부터 분화된 신경계 세포의 효과적인 생성방법을 제공한다. 본원에서 생성된 세포는 이에 제한되는 것은 아니지만, 신경 원시세포, 도파민 작용성 뉴런, 세로토닌 작용성 뉴런, 콜린성 신경세포, 및 감각 신경세포, 및 별아교세포 및 희소돌기아교세포의 표현형 특징을 갖는 세포를 포함한다. 본원에서 생성된 세포는 표현형 특징, 형태적 특징, 및/또는 세포 마커에 의해서 식별되고, 이것은 이들 세포를 평가하는 당업자에게 용이하게 이해될 수 있다. 본원에 사용될 때, 용어 "신경원시세포"는 용어, "신경 원시세포" 또는 "신경 전구체 세포"와 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 신경 전구체 또는 신경세포와 같은 신경세포 또는 신경아교 전구체, 별아교세포 또는 희소돌기아교세포와 같은 신경아교 세포 중 어느 하나에 해당하는 자손을 생성할 수 있는 세포를 말한다. 본원에 개시된 방법은 세포의 신경계 세포로의 분화를 촉진하는 가용성 인자 및 환경 조건과 조합하여 세포를 배양시키는 단계를 포함한다. 더욱이, 원하는 신경세포 형태를 더 농축시키기 위해서 물리적 분리 또는 조작 기술이 사용될 수 있다.

<52> 이들 전구체 및 분화된 신경세포는 생체의 약물 개발 및 스크리닝(신경세포 독성에 대한 화합물 스크리닝 또는 화합물이 신경세포의 기능을 조정하는 능력을 갖는지에 대해서 스크리닝)뿐만 아니라, 치료적 용도 및 실험적 용도를 포함하는 다양한 용도에 사용될 수 있다. 다능성 줄기세포에서 유래된, 도파민 작용성 뉴런 및 세로토닌 작용성 뉴런과 같은 전구체 및 분화된 신경 세포, 및 다른 분화된 유형의 신경세포 생성은 이들 신경세포의 무제한적인 공급을 가능하게 하며, 쇠약성 신경퇴행성 장애 및 신경계 질환을 앓고 있는 개체에 있어서 매우 강력한 이점을 가진다. 본원에 개시된 전구체 및 분화 신경세포는 전형적으로 그들이 유래된 세포 집단의 자손이다. 따라서, 모 집단 (유전적으로 변형, 형질전환, 또는 트랜스펙션된 모 집단을 포함한다)과 본질적으로 동일한 개념을 가진다.

<53> 본원발명의 한 구체예는, 도파민 작용성 뉴런과 같은 중간뇌 신경세포의 특성을 갖는 다능성 줄기세포, 바람직하게는 영장류 배아줄기(ES)세포 또는 영장류 배아(EG)세포로부터 신경세포를 생성하는 개선된 방법에 관한 것이다. 다른 구체예는, 세로토닌 작용성 뉴런과 같은 마름뇌 신경세포의 특성을 갖는 다능성 줄기세포, 바람직하게는 영장류 ES 세포 또는 영장류 EG 세포로부터 신경세포를 생성하는 개선된 방법에 관한 것이다. 이들 방법에 사용될 수 있는 영장류 ES 세포 또는 EG 세포는 가장 바람직하게는 사람 ES 세포 또는 EG 세포이다. 이들 신경세포는 어떤 가용성 인자의 존재 및 환경 조건하에서 세포를 배양하는 것에 의해서 다능성 줄기세포로부터 유래될 수 있다.

<54> 본원에 사용될 때, 용어 "도파민 작용성 뉴런"는 티로신 수산화효소(TH)(도파민 합성의 비율-제한 효소)을 발현하는 신경세포를 말한다. 바람직하게는, 도파민 작용성 뉴런은 신경전달물질 도파민을 분비하고, 도파민-β-수산화효소를 거의 또는 전혀 발현하지 않는다. 도파민 작용성 뉴런은 생체내에서 줄무늬체, 변연계, 및 신피질을 자극하고, 운동 신경세포를 포함하는 몇몇 다른 부류의 신경세포와 함께 중간뇌 배쪽에 존재한다. 도파민 작용성 뉴런은 중간뇌 흑색질에 특이적으로 위치하고, 자세반사, 운동, 및 보상관련 거동을 조절한다. 정상적으로 기능하는 도파민 작용성 뉴런의 손실은 파킨스병을 초래하고, 이들의 기능이상은 정신분열병 및 약물 중독과 연관되어 있다. 본원에 사용될 때, "세로토닌 작용성 뉴런"는 신경전달물질 세로토닌(5-히드록시트립타민)을 분비하는 신경세포를 말한다. 세로토닌 작용성 뉴런은 생체내에서 마름뇌의 배쪽 및 복외측에 집중되어 있으며, 대뇌피질, 변연계 및 척수를 포함하는 중추신경계의 대부분의 부분을 자극한다. 이들 신경세포는 인지, 각성, 거동 특성, 및 식품섭취의 정도를 조절한다. 세로토닌 작용성 뉴런의 기능이상은 공격, 우울증(자살거동 포함), 및 정신분열병과 연관되어 있다.

<55> 본원발명은 다능성 줄기세포를 신경원시세포 및 신경계 세포와 유사한 표현형, 분자, 및/또는 세포 특성을 갖는 신경세포의 분화된 집단으로 분화시키는 개선된 방법에 관한 것이다. 다능성 줄기세포는 사람 ES 세포일 수 있으며, 분화된 신경 세포는 도파민 작용성 뉴런 또는 세로토닌 작용성 뉴런일 수 있다. 본원발명은 또한 개시된

방법에 의해서 생산된 세포 및 세포 집단에 관한 것이다. 어떤 구체예에서, 개시된 방법은 다음의 단계를 포함한다.

- <56> 1. 다능성 줄기세포 집단을 분리한다; 다능성 줄기세포는 바람직하게는 신규한 레이저 절개 기술을 사용하여 유래된 사람 ES 세포이다.
- <57> 2. 다능성 줄기세포를 확장시켜서 충분한 출발물질을 제공한다.
- <58> 3. 다능성 줄기세포를 현탁액에서 배양하여 배양체를 생성한다.
- <59> 4. 기질에 배양체를 다시 플레이팅하고 무혈청 배지에서 인큐베이션하여, 네스틴에 대해 양성인 신경원시세포를 선별한다.
- <60> 5. 네스틴-양성 세포를 선별하여 NCAM 에 대하여 양성인 농축된 세포 집단을 분리한다.
- <61> 6. 네스틴-양성 및/또는 NCAM-양성 신경 원시세포를 신경계와 연관된 가용성 인자를 포함하는 확장 배지에서 확장시켰다.
- <62> 7. 네스틴-양성 및/또는 NCAM-양성 신경 원시세포는 신경기초 배지(신경계와 연관된 가용성 인자의 조합을 포함한다)에서 성숙한 신경세포로 분화된다.

<63> **다능성 줄기 세포의 공급원**

<64> 다능성 줄기 세포로부터 신경 계통의 세포 분화에 대하여 본 명세서에 개시된 발명은 특이적인 배양 조건의 사용을 수반하는데, 이는 현저하게 높은 비율의 다능성 줄기 세포를 특이적인 신경세포 유형으로 분화시키는 것에 관한 것이다. 다능성 줄기 세포는 수정 후 어느 때이든 미성숙 배, 배 또는 태아 조직으로부터 유도되는데, 적당한 조건 하에서, 모든 세 가지 배층(내배엽, 중배엽 및 외배엽)의 유도물인 몇 가지 상이한 세포 유형으로 분화할 수 있다. 신경 계통의 세포도 신경 계통의 세포로 분화 또는 재프로그래밍되는 능력을 가진 태아 또는 성인 조직으로부터 분리된 줄기 세포로부터 유도될 수 있다. 다능성 줄기 세포로는, 한정하는 것은 아니지만, 포유류 ES 세포 및 EG 세포, 바람직하게는 영장류 또는 사람 ES 세포 및 EG 세포가 있다. 바람직하게는, 미분화 다능성 줄기 세포는 배양물 내에서 무한 분할 및 증식하는 능력을 가진다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "분화"는 미분화 다능성 줄기 세포 또는 전구 세포가 보다 특수화된 결말을 획득한다. 예를 들면, 분화된 세포는 특정 세포 유형 또는 조직의 특성인 표현형을 가진다.

<65> 바람직한 구체예에서, 본 발명에 사용되는 ES 세포 및 ES 세포주는 배반포의 속세포덩이로부터 유도된다. 이러한 배반포는 회수된 생체내 수정된 착상전 배로부터, 또는 시험관내 수정(IVF)로부터, 예를 들면 정액주입, 세포질내 정액 주입 또는 난형질 전이로부터 분리될 수 있다. 사람 배반포는 잉여 배를 자발적으로 기증하는 부부 또는 기증자로부터 입수한다. 이러한 배는 이들 부부 또는 기증자로부터 수의 동의를 얻은 후 연구 목적에 사용된다. 대안으로, 배반포는 체강 세포 또는 세포 핵을 사람 또는 비사람 기원의 핵을 적출한 난자에 옮긴 다음, 그 후 자극하여 배반포 단계로 성장시킴으로써 유도된다. 또한, 사용된 배반포는 세포보존될 수 있거나, 또는 초기 단계에 세포보존되고, 배반포 단계 배로 성장을 계속할 수 있던 배로부터 결과할 수 있다. 배반포와 속세포덩이의 성장은 중에 따라 다를 것이며, 당업자에게 널리 알려져 있다.

<66> 영장류 또는 사람 ES 세포는 미국 특허 제5,843,780호 및 제6,200,806호, 문헌(Thomson et al., Science 282: 1145-1147, 1998) 및 문헌(Reubinoff et al., Nature Biotech. 18: 399-403, 2000)에 개시된 바와 같은 표준 면역외과술을 사용하여 배반포로부터 유도될 수 있으며, 각각의 문헌들은 본 명세서에서 특별히 참고 인용한다. 당업자에게 공지된 다수의 방법으로 유도된 ES 세포가 본 발명의 방법에 사용될 수 있지만, 바람직한 구체예는 독특한 레이저 절개 방법(미국 특허 출원 번호 제10/226,711호, 본 명세서에서 특별히 참고 인용함)에 의해 유도된 사람 ES 세포를 사용한다. 간단히 말해서, 이 방법은 배반포의 투명층과 영양아층의 일부의 레이저 절개를 통하여 배반포의 속세포덩이로부터 세포를 분리하는데, 이는 속세포덩이의 세포가 흡입될 수 있는 배반포 내 개구 또는 구멍을 형성한다. 그 다음, 이들 세포를 더 배양하여 ES 세포주를 만들 수 있다. 이 기술은 종래의 면역외과술의 성가신 절차를 수행하지 않으면서 속세포덩이의 세포를 분리할 수 있기 때문에 유리하다. 또한, 이 기술을 사용하여 생성된 ES 세포주, 특히 사람 ES 세포주는 임의의 동물 발생 항체 및 혈청의 부재 하에 분리할 수 있으며, 동물 미소구가 ES 세포주에 전달되는 위험을 최소화한다. 다른 구체예에서, 사람 태아 물질에 존재하는 원시 배세포로부터 유도되는 사람 EG 세포가 사용된다(미국 특허 제6,090,622호 및 Shamblott et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726-13731, 각각 본 명세서에서 특별히 참고 인용함).

<67> 바람직하게는, ES 세포주는 장기간, 예를 들면 1 년 이상 동안 미분화 상태로 배양 유지되고, 정상 정배수성 핵

형을 유지할 수 있다. 사람 ES 세포는 고 핵 대 세포질 비율, 돌출 핵 및 밀집 콜로니 형성에 의해 형태학적으로 동정될 수 있으며, 종종 상이한 세포 경계 및 종종 마우스 ES 세포보다 더 편평한 콜로니를 갖는다. 또한, 사람 ES 세포는 사람 다능성 ES 세포에 대한 마커, 예를 들면 각각 본 명세서에서 특별히 참고 인용하는 문헌 (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000; Buehr and McLaren, 1993)에 기재된 바와 같은 SSEA-3, SSEA-4, GCTM-2 항원 및 TRA 1-60과 면역반응하는 것이 바람직하다. 또한, 사람 ES 세포는 알칼리성 포스파타제, 뿐만 아니라 OCT-4를 발현한다. 다른 구체예에서, 사람 ES 세포는 비고착 배양 조건 하에 배양체를 형성할 수 있다(미국 특허 제6,602,711호, 본 명세서에서 참고 인용함). 이러한 배양체는 내배엽, 중배엽 및 외배엽 배층, 뿐만 아니라 다른 소정의 세포 계통의 부화 유도를 유도하는 데 사용할 수 있다.

<68> 다능성 줄기 세포, 특히 사람 ES 또는 EG 세포는 실질적으로 미분화 상태로 세포를 유지하는 배양 조건 하에 연속적으로 증식시킬 수 있다. ES 세포는 적당한 세포 밀도로 유지해야 하며, 이들이 분화되는 것을 방지하기 위하여 자주 배양 배지를 교환하면서 반복적으로 해리시키고, 계대 배양한다. 세포 배양 및 ES 세포 배양에 관한 일반 기술에 대해서는 다음과 같은 표준 교본 및 논문을 참조할 수 있다: E.J. Robertson, "Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach" ed., IRL Press Ltd. 1987; Hu and Aunins, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8(2): 148-53; Kitano, 1991, Biotechnology 17: 73-106; Spier, 1991, Curr. Opin. Biotechnol. 2: 375-79; Birch and Arathoon, 1990, Bioprocess Technol. 10: 251-70; Xu et al., 2001, Nat. Biotechnol. 19(10): 971-4; 및 Lebkowski et al., 2001, Cancer J. 7 Suppl. 2: S83-93; 각각 본 명세서에서 특별히 참고 인용함.

<69> 통상적으로, ES 세포는 영양세포 층 상의 ES 배지에서 배양한다. 영양세포 층은 ES 세포와 공배양되고, ES 세포가 실질적인 분화를 수행하지 않으면서 성장할 수 있는 환경을 제공하는 한 조직 유형의 세포이다. 영양세포층 상에서 ES 세포를 배양하는 방법은 당업자에게 널리 알려져 있다(미국 특허 제5,843,780호 및 제6,200,806호, WO 99/20741호, 미국 특허 출원 번호 제09/530,346호 및 제09/849,022호, WO 01/51616호, 각각 본 명세서에서 특별히 참고 인용함). 영양세포층은 ES 세포의 분화를 감소, 억제 또는 방지하는 것이 바람직하다. 통상적으로, 영양세포층은 사람 또는 마우스 기원의 배 섬유아세포 영양세포층, 예를 들면 마우스 배 섬유아세포, 사람 배 섬유아세포, 사람 섬유아세포양 세포 또는 사람 배 줄기 세포에서 유도된 간엽 세포 또는 STO 세포이다.

<70> ES 세포는 ES 배지의 존재하에 배양하여 ES 세포의 분화를 감소, 억제 또는 방지하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, ES 세포를 배양하는 데 사용되는 ES 배지는 영양 혈청, 예를 들면 ES 세포의 성장 및 생존 가능성을 유지하는 데 효과적인 영양분을 공급하는 혈청 또는 혈청계 용액으로 보충한다. 영양 혈청은 태아 소 혈청(FBS) 또는 태아 송아지 혈청(FCS)와 같은 동물 혈청일 수 있다(미국 특허 제5,453,357호, 제5,670,372호 및 제5,690,296호, 본 명세서에서 참고 인용함). 또한, ES 배지는 무혈청일 수 있다(WO 98/30679호, WO 01/66697호, 미국 특허 출원 번호 제09/522,030호, 각각 본 명세서에서 특별히 참고 인용함). ES 세포를 배양하기 위한 혈청을 가진 적당한 ES 배지의 예는 피루브산나트륨을 함유하지 않고, 고 글루코스 함량(70 내지 90%)(GIBCO)을 가지며, FBS 또는 FCS(10 내지 30%), β -메르캅토에탄올(0.1 mM), 비필수 아미노산(1%) 및 L-글루타민 2 mM, 4 ng/ml 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 50 U/ml 페니실린, 50 μ g/ml 스트렙토마이신 및 백혈병 억제 인자(LIF) 1000 U/ml로 보충된 둘베코 변성 이글 배지(DMEM)이다. ES 배양에 적당한 무혈청 ES 배지의 예는 80% "넉아웃(KnockOut)" 둘베코 변성 이글 배지(DMEM)(GIBCO), 20% 넉아웃 SR(무혈청 대용물, GIBCO), β -메르캅토에탄올(0.1 mM), 비필수 아미노산(1%) 및 L-글루타민 1 mM이다.

<71> 또한, ES 세포는 영양세포 무함유 배양 조건 하에 배양할 수도 있다. 영양 무함유 배양물 내에서 ES 세포를 배양하는 방법은 당업자에게 널리 알려져 있다(미국 특허 공개 제2002/0022268호, WO 03/020920호, 미국 특허 출원 번호 제10/235,094호, 각각 본 명세서에서 특별히 참고 인용함). 영양 무함유 배양물 내 ES 세포는 적당한 배양 기질, 예를 들면 Matrigel®(백톤 디킨슨) 또는 라미닌과 같은 세포질외 매트릭스 상에서 성장시키는 것이 바람직하다. 또한, 영양 무함유 배양은 상태 조절된 배지를 사용하여 ES 세포의 성장을 지지하는 것이 바람직하다. 상태 조절된 배지는 실질적인 분화없이 ES 세포의 배양을 지지하는 "상태 조절된" 배지를 생성하기에 충분한 시간 동안 배지 내에서 쥐과 배 섬유아세포 또는 사람 배 섬유아세포의 제1 개체군을 배양함으로써 제조된다. 대안으로, 영양 무함유 배양물은 다른 세포 유형에 의해 상태 조절하지 않고 배양물에 새로 가한 유효 배지로 세포의 매트릭스를 배합할 수 있다(미국 특허 공개 제2003/0017589호, 본 명세서에서 특별히 참고 인용함).

<72> **신경 원시세포의 제조**

<73> 분리된 다능성 줄기 세포를 전개한 다음 이것을 신경 원시세포로 분화시키는 배양 조건에 둘 수 있다. 신경 분

화 경로를 따라 전진하는 다능성 줄기 세포의 경우, 이 세포는 본 명세서에 개시된 분화 프로토콜을 따라 배양한다. 다능성 줄기 세포는 가용성 인자 및 성장 인자와 같은 분화제를 함유하는 분화 영양 배지에서 적당한 기질 상에 배양한다. 적당한 기질로는, 한정하는 것은 아니지만, 양전하로 코팅된 고체 표면, 예를 들면 폴리-L-리신 또는 폴리오르니틴, 세포외 매트릭스 성분으로 코팅된 기질, 예를 들면 피브로넥틴, 라미닌 또는 Matrigel®, 또는 이들의 조합이 있다. 바람직한 분화 영양 배지는 소정의 신경세포 유형의 증식, 분화 및 생존을 지지하는 것이며, 1 이상의 적당한 분화제를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "성장 인자"는 세포 증식 및 분화 활성의 1차 결과로 세포 표면 상에서 수용체에 결합하는 단백질을 의미한다. 적당한 가용성 인자로는, 한정하는 것은 아니지만, 뉴로트로핀, 미토겐, 줄기 세포 인자, 성장 인자, 분화 인자(예를 들면, TGF-β 상과), TGF-β 상과 아고니스트, 향신경성 인자, 항산화제, 신경전달물질 및 생존 인자가 있다. 많은 가용성 인자는 상당히 휘발성이고, 수많은 상이한 세포 유형에서 세포 분화를 자극하는 반면에, 다른 것은 특정 세포 유형에 특이적이다.

<74> 신경세포 유형의 분화를 특이적으로 조장하는 적당한 분화제로는, 한정하는 것은 아니지만, 프로게스테론, 푸트레신, 라미닌, 인슐린, 아셀렌산나트륨, 트랜스페린, 뉴르투린, 소닉 헤지호그(SHH), 노긴, 폴리스타틴, 상피 성장 인자(EGF), 섬유아세포 성장 인자(예를 들면 FGF-4, FGF-8, 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)), 성장 및 분화 인자 5(GDF-5), 뉴로트로핀 부류의 일원(신경 성장 인자(NGF), 뉴로트로핀 3(NT-3), 뉴로트로핀 4(NT-4), 뇌 유도 향신경성 인자(BDNF)), 형질전환 성장 인자 α(TGF-α), 형질전환 성장 인자 베타-3(TGF β3), 혈소판 유도 성장 인자(PDGF-AA), 인슐린양 성장 인자(IGF-1), 골 형태형성 단백질(BMP-2, BMP-4), 신경아교 세포 유도 향신경성 인자(GDNF), 레티노산(RA), 미드카인, 아스코르브산, 디부티릴 cAMP, 도파민 및 gp130과 착화하는 수용체에 대한 리간드(예컨대, LIF, CNTF, SCF, IL-11 및 IL-6)가 있다. 또한, 분화 영양 배지는 신경세포의 지원 배양을 돕는 첨가제, 예를 들면 N2 및 B27 첨가제(킵코)를 함유할 수 있다.

<75> 다능성 줄기 세포는 먼저 배양체를 형성하도록 유도한다. 배양체는 피브로넥틴 또는 라미닌과 같은 세포외 매트릭스 성분의 유무 하에 적당한 기질에 직접 플레이팅하고, 신경 원시세포, 예컨대 네스틴 양성 신경 원시세포로의 분화를 촉진하는 데 적합한 적당한 분화 영양 배지에서 배양한다. 네스틴은 신경 전구 세포에 특징적인 세포 마커이다. 다른 구체예에서, 다능성 줄기 세포는 배양체를 형성함으로써, 예를 들면 다능성 줄기 세포를 현탁액 중에 배양함으로써 균질한 세포 개체군에 먼저 응집시킨다. 이들 세포는 혈청이 있거나 없는, 뿐만 아니라 전술한 분화제 1 종 이상을 함유하는 영양 배지에 배양하여 배양체 내 세포의 분화를 촉진할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "배양체"는 다능성 줄기 세포가 현탁 배양에서 성장하거나, 또는 단층 배양에서 과성장하는 경우 발생하는 분화된 세포의 응집체를 의미한다. 또한, 배양체는 세포의 응집에서 미분화 세포를 가질 수 있다. 바람직하게는, 세포의 이 응집은 원시 내배엽에 의해 에워싸인다. 통상적으로, 배양체는 모든 세 가지 배층, 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로부터 유도된 세포를 함유한다. 성숙 사람 배양체에서, 다양한 세포 유형, 예컨대 신경세포, 조혈 세포, 간 세포 및 심근 세포의 마커를 가진 세포를 식별할 수 있다. 성숙 배양체 내 일부 세포는 분화된 세포와 같이 기능적으로 거동한다. 예를 들면, 활성 심근 세포는 배양체로 하여금 맥동하게 할 수 있다. 바람직하게는, 다능성 줄기 세포의 분화는 특이적인 세포 유형이 치료 목적을 위해 얻어질 수 있도록 조절한다.

<76> 배양체는, 예를 들면 배양 3 내지 10 일 후 충분한 크기 또는 소정의 분화에 도달할 때까지 배양한 다음, 기질에 플레이팅한다. 바람직하게는, 기질은, 한정하는 것은 아니지만, 폴리-L-리신, 폴리-L-오르니틴, 라미닌, 콜라겐, 피브로넥틴, Matrigel® 또는 이들의 조합을 포함하는 세포외 매트릭스 성분으로 코팅한다. 바람직하게는, 배양체는 세포를 분산하지 않고 기질에 직접 플레이팅한다. 그 다음, 배양체는, 예를 들면 네스틴 양성 세포에 선택적인 ITSn(네스틴 선택) 무혈청 형성 배지 내에서 플레이팅된 세포의 분화를 더 조장하는 조건 하에서 배양한다. 네스틴은 신경상피에서 발현하는 중간체 필라멘트 단백질이다. 바람직하게는, 세포는 5 내지 16 일에 걸쳐서 네스틴 양성 세포에 선택적이다. 바람직하게는, 네스틴 양성 세포의 증량에 사용되는 ITSn 배지는 프로게스테론, 푸트레신, 라미닌, 인슐린, 아셀렌산나트륨, 트랜스페린, bFGF, SHH, EGF, FGF-2, FGF-8 및 BDNF로 구성된 군 중에서 선택되는 1 이상의 성장 인자로 보충된 DMEM:F-12이다.

<77> 이 후, 네스틴 양성 세포를 포함하는 이 불균질 세포 개체군은 중성 세포 고착 분자(NCAM) 양성 세포의 농축을 위해 증량 또는 저장된다. NCAM은 중성 세포의 특징을 가진 표면 마커이다. NCAM 양성 세포는 네스틴 양성 세포가 선택된 직후, 또는 네스틴 양성 세포가 배양 중에 증량된 직후 저장될 수 있다. 특정 구체예에서, 세포는 세포를 NCAM에 결합하는 항체 또는 리간드와 접촉시킨 다음, 면역표지 및 형광 분류와 같은 적당한 면역학적 기술, 예를 들면 고상 흡착, 형광 활성화 세포 분류(FACS), 세포 표면 마커를 위한 유동 면역세포계측법, 유동 세포계측법 또는 자기 세포 선별(MACS)을 사용하여 특이적으로 인식하는 세포의 분리에 의해 NCAM 양성 세포에

대해 분류한다. 한정하는 것은 아니지만, 차등 플레이트, 오염 세포의 면역 특이적인 용해 또는 수거 기술을 비롯한, NCAM 양성 세포를 분리하는 다른 방법은 당업자에게 널리 알려져 있다. 바람직한 구체예에서, 예를 들면 MACS에 의한 네스틴 양성 세포 분류는 NCAM을 발현하는 생존 가능한 네스틴 양성 세포의 개체군을 약 40 내지 70%, 바람직하게는 약 60% 내지 80%, 보다 바람직하게는 약 85% 내지 90%, 가장 바람직하게는 약 95% 내지 99%로 농축한다.

<78> 한 가지 구체예에서, 배양체는 적당한 배지 내 영양세포의 부재 하에 세균학적 플레이트 상에서 세포를 배양함으로써 사람 ES 세포로부터 생성된다. 바람직하게는, 사람 ES 세포는 클러스터로 분해한 다음, 비고착 플레이트에 플레이팅하여 배양체 발생을 촉진한다. 적당한 배지는 DMEM을 고 글루코스로 함유하고, 10 내지 20% FCS로 보충하는 것이 바람직하다. 또한, 다른 보충물, 예컨대 0.1 mM 2-메르캅토에탄올, 2 mM L-글루타민, 페니실린 50 U/ml 및 스트렙토마이신 50 µg/ml를 배지에 가할 수도 있다. 배양체는 4 내지 8 일 동안 성장시킨 다음, 배양체를, 네스틴 양성 세포의 선택을 위해 ITSFn 무혈청 배지 내에서 0.1% 젤라틴으로 코팅된 배양 플레이트 상에 재플레이팅하는 것이 바람직하다. ITSFn 무혈청 배지는 네스틴 양성 세포에 대해 선택하는 성장 인자 인슐린, 아셀렌산나트륨, 트랜스페린 및 피브로넥틴으로 보충된 기본 배지 DMEM: F-12(1:1) 또는 IMDM 배지를 함유한다.

<79> 바람직한 구체예에서, MACS에 의해 분류하여 NCAM 양성 세포를 분리한다. NCAM 양성 세포는 신경 원시세포의 백분율을 증가시키는 것을 돕고, 보다 분화된 표현형을 채택하도록 이들 세포를 유도하는 배지에서 계속해서 증량한다. 바람직하게는, NCAM 양성 세포는 세포질의 매트릭스 성분, 예컨대 폴리-1-오르니틴, 라미닌, 콜라겐, 피브로넥틴, Matrigel® 또는 이들의 조합으로 예비코팅된 기질에 배양한다. 배양 접시를 세포질의 매트릭스로 예비코팅하면, 증량 배지 내에서 고착 및 증식이 더 나을 뿐만 아니라, 도파민 작용성 뉴런 분화에 대한 더 나은 결과를 제공한다. 세포는 증량 배지, 예를 들면 프로게스테론, 푸트레신, 라미닌, 인슐린, 아셀렌산나트륨, 트랜스페린, bFGF, SHH, EGF, FGF-2, FGF-8, BDNF, PDGF, IGF-1, CTNF 및 NT-3으로 구성된 군 중에서 선택되는 1 이상의 성장 인자로 보충된 DMEM/F12 배지로 배양한다. 어떤 특정한 메카니즘에 얽매고 싶지는 않지만, 증량 배지에 존재하는 이들 다양한 인자는 신경세포의 전체 비율 증가에 기여하고, 도파민 작용성 표현형을 채택하도록 중뇌 신경 전구체를 더 유도하는 것으로 믿어진다. 바람직한 구체예에서, 네스틴 양성 NCAM 양성 전구체 세포는 3 내지 10 일 동안 증식시킨다. 또한, 이들 세포는 적어도 30 개체군 배가를 위해 연속적으로 계대하고, 분화 가능성의 손실없이 후에 사용하기 위하여 동결시킬 수 있다.

<80> **도파민 작용성 및 세로토닌 작용성 뉴런의 분화**

<81> 본 명세서에 개시된 발명에 따라 제조한 신경 원시세포는 고 비율의 성숙 뉴런, 예를 들면 도파민 작용성 뉴런 및 세로토닌 작용성 뉴런으로 더 분화될 수 있다. 또한, 신경 원시세포는 별아교세포 및 희소돌기아교세포로 더 분화될 수 있다. 바람직하게는, 네스틴 양성 및/또는 NCAM 양성 신경 원시세포는 말단에서 분화된 신경세포 또는 성숙 뉴런으로 기원 세포의 분화를 촉진하는 신경기초 배지에서 5 내지 60일부터 증량한다. 바람직한 구체예에서, 신경기초 배지(집코)는 10% FBS 또는 FCS, B27 및, 인터루킨-1β, 디부티릴 고리 AMP(db-cAMP), 향신경성 인자로부터 유도된 아교 세포(GDNF), 형질전환 성장 인자 베타 3(TGF-β3), 형질전환 성장 인자 α(TGFα), 뉴르투린, SHH, 아스코르브산, BDNF, FGF-2, FGF-8, N-아세틸 시스테인, c-키트 리간드, 레티노산, NT-3, BMP-2 및 BMP-4로 구성된 군 중에서 선택되는 1 이상의 성장 인자로 보충된다. 바람직한 구체예에서, 신경기초 배지는 다음 인자: 인터루킨-1β, db-cAMP, GDNF, TGF-3β, 뉴르투린, SHH, 아스코르브산, BDNF, FGF-8 및 N-아세틸 시스테인 중 1 이상을 포함한다. 또한, 분화는 신경 원시세포의 분화, 증식 또는 둘 다를 촉진하는 인자의 일부 또는 전부를 회수함으로써 촉진될 수 있다.

<82> 바람직하게는, 고 비율의 신경 원시세포는 도파민 작용성 뉴런, 세로토닌 작용성 뉴런 또는 희소돌기아교세포, 예를 들면 세포의 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 이상으로 분화한다. 또한, 한 신경세포 유형, 예를 들면 도파민 작용성 뉴런은 당업자에게 널리 알려진 방법, 예컨대 면역 표지 및 형광 분류, 예를 들면 고상 흡착, FACS, MACS 등에 의해 분화된 신경세포의 개체군으로부터 더 정제할 수 있다. 한 가지 바람직한 구체예에서, NCAM 양성 세포의 면역분류 농축 개체군은 적당한 배지에서 증량되고 분화되어 고 비율(약 60%)의 도파민 작용성 뉴런이 생성된다.

<83> **신경 원시세포 및 분화된 신경세포의 사용**

<84> 본 명세서에 기재된 신경 원시세포 및 분화된 신경세포(예를 들면, 성숙 뉴런, 별아교세포 및 희소돌기아교세포)는 다양한 용도, 예를 들면 치료 용도, 뿐만 아니라 시험관내 평가 및 이들 세포에 대한 효과를 위해 소형 분자 약물과 같은 다양한 화합물의 스크리닝에 사용할 수 있다. 또한, 이들 세포는 cDNA 발현 라

이브러리를 제조하여 이들 세포의 발현 패턴을 분석하고, 뿐만 아니라 당업자에게 널리 알려진 기술을 사용하여, 사용된 특정 세포에 대한 마커에 특이적인 모노클론 또는 폴리클론 항체를 제조하는 데 사용할 수 있다. 또한, 이들 세포는 쇠약한 신경 변성 장애 및 신경병을 가진 개체의 이익에 치료학적으로 사용할 수 있다.

<85> 본 발명은 치료가 필요한 피험자의 중추 신경계(CNS) 기능을 회복하기 위한 본 명세서에 기재된 신경 원시세포 및 분화된 신경세포의 용도를 제공한다. 예를 들면, 이들 세포는 치료하고자 하는 질환 또는 상태에 따라서 CNS의 실질 또는 경막내 부위로 직접 이식함으로써 치료적으로 사용할 수 있다. 이들 세포는 신경계에 대한 급성 또는 만성 손상, 뿐만 아니라, 쇠약한 신경변성 질환 및 신경병, 예컨대 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 척수 상해, 근육위축 가쪽 경화증(ALS), 간질, 중풍, 허혈 등을 치료하는 데 사용할 수 있다.

<86> 본 발명의 한 가지 구체예는 다능성 줄기 세포, 바람직하게는 사람 다능성 줄기 세포로부터 유도되는 치료학적 유효량의 도파민 작용성 뉴런을 투여 또는 이식함으로써 도파민 작용성 뉴런의 변성 또는 변형을 특징으로 하는 신경변성 장애 또는 신경병의 치료 방법에 관한 것이다. 다른 구체예에서, 본 발명은 다능성 줄기 세포, 바람직하게는 사람 다능성 줄기 세포로부터 유도되는 치료학적 유효량의 세로토닌 작용성 뉴런을 이식함으로써 세로토닌 작용성 뉴런의 변성 또는 변형을 특징으로 하는 신경변성 장애 또는 신경병의 치료 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 신경변성 장애 또는 신경병을 가진 사람 환자는 본 발명의 치료학적 유효량의 신경 원시세포 및 분화된 신경세포를 환자에게 주입함으로써 치료된다. 본 명세서에서 사용되는, 세포의 "치료학적 유효량"은 분화된 신경세포, 예컨대 성숙 뉴런(예를 들면, 도파민 작용성 및 세로토닌 작용성 뉴런), 별아교세포 및 희소돌기아세포의 손실, 손상 또는 변성에 의해 유발되는 환자의 생리학적 효과를 중지 또는 경감시키기에 충분한 양이다.

<87> 사용된 세포의 치료학적 유효량은 환자의 필요성, 환자의 연령, 생리학적 상태 및 건강, 소정의 치료 효과, 치료에 표적하고자 하는 조직의 크기 및 면적, 병변의 정도 및 선택된 전달 경로에 의존할 것이다. 예를 들면, 뇌의 더 큰 영역에 영향을 주는 장애의 치료는 보다 작은 표적 영역과 비교하였을 때 치료 효과를 달성하기 위하여 보다 다수의 세포를 요할 수 있다. 또한, 세포는 저 세포 투여량의 다중 소형 이식편으로 소정의 표적 조직 내 1 이상의 부위에 투여할 수 있다. 본 발명의 세포는 이식 전에 완전히 분리되어, 예컨대 단일 세포의 현탁액을 형성하거나, 또는 이식 전에 거의 완전히 분리되어, 예컨대 세포의 소형 응집물을 형성할 수 있다. 세포는 이들을 소정의 조직 부위로 이식 또는 이동시키고, 기능적으로 결핍된 영역을 재구성 또는 재생하는 방식으로 투여할 수 있다.

<88> 치료학적으로 유효하게 달성하도록 투여할 수 있는 세포의 적당한 범위는 약 100 내지 약 1,000,000 뉴런, 바람직하게는 약 500 내지 약 500,000 뉴런 또는 약 1000 뉴런 내지 약 100,000 뉴런일 수 있다. 또한, 환자에게 투여되는 신경세포의 치료 농도는 약학적으로 허용 가능한 담체의 ml 당 약 10, 100, 500, 1000, 5000, 10,000, 15,000, 20,000, 25,000, 30,000, 35,000, 40,000, 45,000, 50,000, 60,000, 70,000, 80,000, 90,000, 100,000, 150,000, 200,000, 250,000, 300,000, 350,000, 400,000, 450,000 내지 약 500,000 세포 범위일 수 있다. 담체 내 세포의 농도 범위의 예로는 100 내지 50,000 세포/ μ l, 1000 내지 10,000 세포/ μ l, 5000 내지 25,000 세포/ μ l, 15,000 내지 45,000 세포/ μ l, 20,000 내지 50,000 세포/ μ l, 55,000 내지 200,000 세포/ μ l, 100,000 내지 40,000 세포/ μ l, 150,000 내지 50,000 세포/ μ l 등이 있다. 또한, 이식 부위로 그래프트된 세포의 수는 치료 효능에 영향을 줄 수 있다.

<89> 치료 용도에 대하여, 전구체 또는 분화된 신경세포의 개체군이 임의의 미분화된 다능성 줄기 세포가 실질적으로 없는 것이 종종 바람직할 수 있다. 치료 제제로부터 다능성 줄기 세포를 제거하는 한 가지 전략은 미분화된 세포에서 우선적으로 발현된 유전자를 가진 벡터로 세포를 형질감염시키는 것인데, 그 발현은 다능성 줄기 세포에 대하여 선택된다. 미분화된 세포에서 우선적으로 발현되는 적당한 프로모터는 텔로머라제 역전사효소(TERT) 프로모터 및 OCT-4 프로모터이다. 벡터에서 발현된 유전자는, 예를 들면 독소와 같은 세포에 용해성일 수 있거나, 또는 외부 제제의 적용에 대하여 선택될 수 있다.

<90> 본 명세서에 개시된 바와 같은 다능성 줄기 세포로부터 도파민 작용성 뉴런 및 세로토닌 작용성 뉴런을 재생하는 능력은 다양한 신경변성 장애 및 신경병에 대한 이식 치료에 대하여 임상 관련성이 크다. 예를 들면, 도파민 작용성 뉴런은 자세 반사, 이동 및 보상 관련 거동 조절의 비정상성을 특징으로 하는 신경변성 장애 및 신경병, 예를 들면 파킨슨병, 정신분열증 및 약물 중독, 뿐만 아니라 외상, 또는 파킨슨 유사 상태, 예컨대 안정떨림, 경축, 운동불능증 및 자세 비정상, 예컨대 운동불능증, 무갈증, 못삼킴증 및 감각 무시를 초래하는 다른 질환으로 인한 병변을 치료하는 데 사용할 수 있다. 또한, 세로토닌 작용성 뉴런은 음식물 섭취, 호르몬 분비, 스트레스 반응, 통증 및 면역 기능의 조절, 성적 활동, 심혈관 기능 및 체온 조절의 이상을 특징으로 하는 신경변성

장애 및 신경병, 예를 들면 다양한 정신병, 신경병 및 기타 질환, 예컨대 정신적 우울증, 자살 경향, 폭력적 공격성 거동, 강박 거동 및 식욕부진/계절증 및 정신분열증을 치료하는 데 사용할 수 있다.

<91> 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 신경 생존 인자와 다능성 주기 세포로부터 유도된 본 발명의 신경 원시세포 및 분화된 신경세포를 공투여하여 신경변성 장애 또는 신경병을 치료하는 것에 관한 것이다. 신경 생존 인자(들)는 소정의 세포의 투여 전, 소정의 세포의 투여와 함께, 소정의 세포의 투여와 조합하여, 또는 소정의 세포의 투여 후에 투여할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "신경 생존 인자"는 인자와 접촉하는 뉴런(시험관내 또는 생체내)으로 하여금 인자가 존재하지 않고 일어나는 것보다 더 긴 시간 동안 생존하도록 하는 임의의 물질이다. 본 치료 구체예에 사용될 수 있는 신경 생존 인자로는, 한정하는 것은 아니지만, 아교 유도 항신경성 인자(GDNF), 신경 성장 인자(NGF), 섬모 향신경성 인자(CNTF), 뇌 유도 항신경성 인자(BDNF), 뉴로트로핀-3(NT-3), 뉴로트로핀(NT-4), FGF, IL-1 β , TNF α , 인슐린 유사 성장 인자(IGF-1, IGF-2) ALC 형질전환 성장 인자 베타(TGF- β , TGF- β 1)가 있다.

<92> GDNF는 시험관내 배 중뇌 후측 중간뇌 도파민 작용성 뉴런에 대한 양성 활성을 가진 것으로 알려져 있다(Lin et al., 1993, Science 260: 1130-1132; Lin et al., 1994, J. Neurochem. 63: 758-768). 또한, 재조합 사람 GDNF는 생체내 도파민 작용성 섬유를 유발하는 것(Hudson et al., 1993, Soc. Neurosci. Absir. 19: 652), 래트의 흑색질 내 도파민 반전을 증가시키는 것(Miller et al., 1994, Soc. Neurosci. Abstr. 20: 535-7), 6-OHDA 병변에 대하여 뉴런을 보호하는 것 및 안구 내 흑질 조직의 래트 태아 이식의 성장 및 섬유 형성을 증가시키는 것(Stromberg et al., 1993, Exp. Neurol. 124: 401-412)으로 설명되었다. BDNF는 말초 감각 뉴런, 도파민 작용성 뉴런 및 망막 신경절에 대한 양성 인자이고(Henderson et al., 1993, Restor. Neurol. Neurosci. 5: 15-28), 시험관내 및 생체내 세포 사멸이 정상적으로 일어나는 것을 방해하는 것으로 나타났다(Hofer and Barde, 1988, Nature 331: 161-262).

<93> 본 명세서에 사용되는 용어 "치료" 또는 "치료하다"는 치료학적 처치 및 예방 또는 방지 수단이다. 그러므로, 치료가 필요한 자들은 이미 신경변성 장애 또는 신경병을 가진 자, 뿐만 아니라 신경변성 장애 또는 신경병을 예방하고자 하는 자들을 포함한다. 본 발명의 방법은, 한정하는 것은 아니지만, 사람, 영장류 및 가축, 사육, 애완용 또는 스포츠 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 양, 돼지, 소 등을 비롯한 치료가 필요한 임의의 포유동물을 치료하는 데 사용할 수 있다. "장애"는 신경 원시세포, 분화된 신경세포 또는 본 발명의 세포의 두 가지 유형으로 치료하여 이익이 되는 임의의 상태이다. 도파민 작용성 뉴런의 이식으로부터 이익을 얻을 수 있는 장애의 예는 부적당한 자세 반사, 이동 및 보상 관련 거동, 예컨대 파킨슨병, 정신분열증, 약물 중독과 관련된 것들이다. 세로토닌 작용성 뉴런의 이식으로부터 이익을 얻을 수 있는 장애의 예는, 한정하는 것은 아니지만, 공격, 울증(자살 행동 포함), 정신분열증 및 식욕부진/계절증을 비롯한, 자각, 각성, 거동 및 음식물 섭취의 이상을 특징으로 하는 것들이다. 또한, 본 발명의 세포로 치료하여 이익을 얻을 수 있는 다른 장애는 알츠하이머병, 헌팅턴 병 및 히르쉬슈프룽병이다.

<94> 본 발명의 방법은 본 발명의 신경 원시세포 또는 분화된 신경세포를 병변 부위에 직접 이식함으로써 유리하게 수행될 수 있다. 신경 이식 및 세포 배양의 방법은 당업자에게 널리 알려져 있다(예를 들면, 미국 특허 제 5,514,552; Yurek and Sladek, 1990, Annu. Rev. Neurosci. 13: 415-440; Rosenthal, 1998, Neuron 20: 169-172; Vescovi et al., 1999, J. Neurotrauma 16(8): 689-93; Vescovi et al., 1999, Exp. Neuro. 156(1): 71-83; Brustle et al., 1999, Science 285: 754-56; 각각 본 명세서에서 특별히 참고 인용함). 한 가지 구체예에서, 본 발명의 도파민 작용성 뉴런은 파킨슨병을 가진 환자의 흑색질 또는 줄무늬체에 이식될 수 있다. 세포는 단독으로, 또는 다른 인자, 예를 들면 신경 생존 인자와 조합하여 전달할 수 있고, 약학적으로 허용 가능한 비히클과 함께 전달할 수 있다. 그러한 비히클은 세포의 안정성 및 전달 특성을 향상시키는 것이 이상적이다.

<95> 또한, 본 발명은 리포솜, 미세입자 또는 마이크로캡슐과 같은 적당한 비히클을 사용하여 투여할 수 있는 세포를 함유하는 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명의 세포는 등장성 부형제를 포함하는 약학 조성물의 형태로 공급될 수 있으며, 사람 투여에 대해 충분히 멸균된 조건 하에서 제조된다. 세포 조성물의 의약 제조의 일반 원리는 문헌(Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996, and Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000; 본 명세서에서 특별히 참고 인용함)에서 찾아볼 수 있다. 또한, 신경 생존 인자를 함유하는 약학 조성물을 치료가 필요한 부위에 국소적으로 투여하는 것이 요망될 수 있는데, 예를 들면 수술 중의 국소 흡입, 주사, 카테테르 수단 또는 임플란트 수단에 의해 달성될 수 있으며, 상기 임플란트는 멤브레인, 예컨대 실라스틱 멤브레인 또는 섬유를 포함하는 다공성, 비다공성 또는 젤라틴 물질일

수 있다.

- <96> 본 발명의 신경 원시세포 및 분화된 신경세포는 실질적으로 균질하거나, 거의 균질하거나 또는 불균질한 세포 개체군으로서 환자에게 이식될 수 있다. 실질적으로 균질한 세포 개체군은 75% 이상의 단일 세포 유형, 예컨대 도파민 작용성 또는 세로토닌 작용성 뉴런, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 내지 99%를 함유한다. 불균질한 세포 개체군은, 예를 들면 도파민 작용성 뉴런, 세로토닌 작용성 뉴런, 슈반 세포, 희소돌기 아교세포, 별아교세포, GABA 뉴런 및 아교세포가 혼합된 2 이상의 세포 유형으로 구성된다. 또한, 세포는 당업자에게 널리 알려진 방법에 의해, 뇌, 중추 신경계, 말초 신경계 또는 기타 조직의 손상된 부위에서 항성 인자, 성장 인자, 신경 생존 인자 또는 다른 치료 화합물을 발현 또는 방출하도록 유전적으로 변경할 수 있다. 단백질 발현을 위한 프로모터 및 세포 유형 조합의 사용은 분자 생물학 분야의 전문가에게 일반적으로 알려져 있다(예를 들면, Sambrook, et al. 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 참조. 본 명세서에서 특별히 참고 인용함).
- <97> 본 발명의 신경 원시세포 및 분화된 신경세포 내 항성 인자, 성장 인자, 신경 생존 인자 또는 다른 치료 화합물의 발현을 달성하기 위하여, 적당한 조절 요소를 다양한 공급원으로부터 유도할 수 있으며, 당업자라면 용이하게 선택할 수 있다. 조절 요소의 예로는 전사 프로모터, 증강인자 및 RNA 폴리머라제 결합 서열, 뿐만 아니라 리보솜 결합 서열, 예컨대 번역 개시 시그널이 있다. 다른 추가의 유전 요소, 예컨대 선택 가능한 마커도 재조합 분자에 도입할 수 있다. 재조합 분자는 시험관내 전달 비히클 또는 생체내 기술을 사용하여 다능성 줄기 세포 또는 다능성 줄기 세포로부터 유도된 신경 원시세포 또는 분화된 신경세포로 도입될 수 있다. 전달 기술의 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, DNA 바이러스 벡터, 리포솜, 물리적 기술, 예컨대 마이크로 주사, 및 전기영동 또는 인산칼슘 침전에 의한 형질감염 또는 재조합 세포를 생성하는 전사를 위한 분야에 공지된 다른 방법이 있다. 유전적으로 변경된 세포는 미소구 내에 캡슐화하고, 질병을 갖거나 손상된 조직으로 또는 인접하여 이식할 수 있다. 사용된 프로토콜은 당업자에게 널리 알려져 있으며, 예를 들면 문헌(Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1997)에서 찾아 볼 수 있으며, 본 명세서에서 참고 인용한다.
- <98> 파킨슨병을 가진 환자에게의 신경 이식을 수반하는 임상 실험은 뇌 손상 부위에 대한 태아 배 신경세포 또는 신경 주변 세포 이식편의 수용체로서 파킨슨병의 다양한 동물 모델을 사용하는 기본 과학 연구로부터 전개되었다. 태아 도파민 작용성 신경세포 이식편을 이용한 동물 실험은 그러한 이식편이 도파민 작용성 결함을 반전시키고, 흑질선조체 도파민 작용성 시스템의 실험 병변을 가진 동물에게서 운동 기능을 회복시킬 수 있다는 자극을 제공하였다. 예를 들면, 14 내지 16일령 배로부터 취한 쥐과 중간뇌 세포는 면역억제 처치없이 동종이식 또는 이종 이식으로서 이식에서 후에 임신한 기증자로부터 취한 것에 비하여 유리하게 사용되었다(Yurek and Sladek, 1990, *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 415-440). 흥미롭게도, 이들 연령은 도파민 작용성 뉴런이 그 최종 세포 분할을 수행하는 임신 연령에 해당한다(Lauder and Bloom, 1974, *J. Comp. Neurol.* 155: 469-82). 또한, 배 중간뇌 조직의 고품질 이식편은 이식을 위한 세포 핵타액으로 분해될 수 있다. 그러나, 그러한 현탁액의 통상적인 생존율은 그래프트된 도파민 작용성 세포의 약 10%로 제한되었다(Brudin et al., 1987, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 495: 473-96). 배 중간뇌 조직이 도파민 작용성 세포의 순수 공급원이 아니기 때문에 - 총 생존 가능한 세포의 약 0.1 내지 1.0%만이 생존하는 도파민 작용성 세포임 - 분해된 중간뇌 세포의 이식편은 도파민 작용성 손실을 효과적으로 보상하기 위하여 최소 100,000 내지 150,000 생존 가능한 세포를 함유하는 것이 바람직하다.
- <99> 또한, 바람직하게는, 본 발명의 세포 이식 치료는 이식 수술에 사용하기 위한 신경 원시세포 및 분화된 신경세포를 저장 및 보존하기 위한 수단, 예를 들면 냉동보존에 의한 장기 보존 또는 보존 배체 내 단기 보존을 위한 수단을 포함한다. 냉동보존된 배 중간뇌 조직은 70 일까지 성공적으로 저장하였으며 설치류(Collier et al., *Progress in Brain Research*, Vol. 78, New York, Elsevier (1988), pp. 631-36, 본 명세서에서 특별히 참고 인용함) 및 영장류(Collier et al., 1987, *Brain Res.* 436: 363-66, 본 명세서에서 특별히 참고 인용함)에게 동종이식으로서 이식하였다. 또한, 배 중간뇌 조직은 4°C 저장 매체에서 단기간(2 내지 5 일) 저장한 후, 신선한 조직과 유사한 생존하는 이식편 부피로 이식할 수 있다(Sauer et al., 1989, *Restor. Neurol. Neurosci.*, Suppl.: 3.sup.rd Int. Symp. Neural Tranplan.): 56, 본 명세서에서 참고 인용함).
- <100> 이식편 배치 및 이식편이 줄무늬체를 재자극하는 정도는 중간뇌 도파민 작용성 시스템의 기능적 회복을 위한 중요한 인자이다. 일반적으로 도파민 작용성 신경을 제거한 동물에게서, 피질에 배치한 도파민 작용성 이식편은 운동 비대칭을 감소시키는 것으로 나타났지만, 감각 무시에 대한 효과는 거의 없었다(Bjorklund et al., 1980, *Brain Res.* 199: 307-33; Dunnett et al., 1981, *Brain Res.* 215: 147-61). 대조적으로, 양측면으로 도파민 작용성 신경을 제거한 동물에게서 측면 줄무늬체에 인접하여 배치된 흑질 이식편은 감각 손상을 효과적으로 회복

시켰다(Dunnett et al., 1983, Acta Physio. Scan. Suppl. 522: 39-47). 더욱이, 양측면으로 병변을 가진 동물의 운동불능증의 반전은 측중격핵(nucleus accumbens)이 도파민 작용성 이식편에 의해 재자극될 때에만 관찰되었다(Nadaud et al., 1984, Brain Res. 304: 137-41).

<101> 도파민 작용성 이식편에 대한 이식 부위가 가장 흔하게는 이식편 생존을 제공하기 위하여 이들 영역 내의 바람직한 뇌척수액(CSF) 환경때문에 심실 영역에 근접하여 있지만, 파킨슨병의 도파민 작용성 퇴행 정도는 꼬리핵에서보다 조가비핵에서 보다 현저하다. 조가비핵 내 도파민 레벨은 꼬리핵에서보다 종종 10 내지 15% 더 낮다(Bemhimer et al., J. Neurol. Sci. 20: 415-55; Nyberg et al., 1983, Neurochem. Pathol. 1: 93-202). 또한, 꼬리 조가비핵은 입쪽 조가비핵보다 도파민 작용성 뉴런이 보다 심하게 고갈된다(Kish et al., 1986, Ann. Neurol. 20: 26-31). 두 줄무늬체 성분(꼬리핵 및 조가비핵) 중에서, 꼬리핵은 피질-시상-꼬리핵 경로를 경유하여 대부분의 운동 입력을 수용한다(DeLong & Georgopoulos, 1983, Handbook of Physiology, Section I: The Nervous System, Vol. 2, ed. Brookhard, Mountcastle, Geiger, pp. 1017-61, Bethesda, Md.: Am. Physiol. Soc.). 그러므로, 꼬리핵은 파킨슨병과 관련된 운동 장애를 표적화하는 도파민 작용성 이식편에 대한 보다 바람직한 부위일 수 있다.

<102> 또한, 본 명세서에 기재된 신경 원시세포 및 분화된 신경세포는 이들 세포의 표현형 또는 특성에 영향을 주는 약학 화합물, 용매, 소형 분자, 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 화합물, 뿐만 아니라 배양 조건 또는 조작과 같은 환경 인자를 스크리닝하는 데 사용할 수 있다. 또한, 이들 세포는 후보 성장 인자 또는 분화 인자를 평가하는 데 사용할 수 있다. 예를 들면, 후보 약학 화합물은 신경 원시세포 또는 성숙 뉴런에 단독으로 또는 다른 약물과 조합하여 첨가할 수 있으며, 형태, 표현형 또는 세포 내 기능 활성 변화를 평가하고 사정할 수 있다.

<103> 또한, 본 명세서에 기재된 신경 원시세포 및 분화 신경세포는 임의의 분화 단계에서 더 변형될 수 있다. 예를 들면, 이들 세포는 일시적 또는 안정한 방식으로 단일 또는 다중 유전자 변형을 갖도록 유전자 변형될 수 있다. 이들 세포의 유전자 변형은 많은 이유, 예를 들면 유전자 요법을 위한 변형된 세포 또는 그라프트 또는 이식을 위한 대체 조직을 제공하는 데 바람직할 수 있다. 본 발명의 세포는 당업자에게 널리 알려진 신경 특이적인 프로모터의 조절 하에 선택 가능한 마커를 발현하는 벡터에 도입함으로써 유전자 변형될 수 있다. 또한, 이들 세포는 다능성세포로부터 유도된 분화된 세포를 더 정제하는 데 사용할 수 있는 특정한 마커 또는 유전자를 발현하거나, 또는 대안으로 특정 세포 계열에 분화를 유도하도록 임의의 단계에서 변형할 수도 있다. 이들 세포는 이식 후 면역 거부를 감소 또는 방지하도록, 즉 소정의 수용체에게 조직적합성을 갖도록 변형할 수 있다.

<104> 본 발명을 사용하여 발생된 세포의 복제 용량을 증가시키기 위하여, 이들 세포는 적당한 벡터로 이들을 유전자 변형함으로써 텔로머화하여 이들이 텔로머라제 촉매 성분(TERT)을 발현할 수 있다. 사용되는 TERT 서열은 사람 또는 마우스(WO 98/14592호 및 WO 99/27113호, 본 명세서에서 특별히 참고 인용함), 뿐만 아니라 다른 포유류종으로부터 유도될 수 있다. 대안으로, 내생 TERT 유전자의 전사를 증가시킬 수 있다. 세포를 유전자 변형하는 데 사용되는 방법은 당업자에게 널리 알려져 있다. 이들 방법은 다양한 분자 생물학 기술을 이용하는 데, 이들 중 대부분은 문헌(Sambrook, et al. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 본 명세서에서 특별히 참고 인용함)에 일반적으로 설명되어 있다.

<105> 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구체예를 설명하고자 하는 것이다. 당업자라면, 하기 실시예에 개시된 기술이 본 발명의 실시에서 잘 기능하는 것으로 본 발명자들에 의해 발견된 기술을 나타내는 것이며, 따라서 그 실시를 위한 바람직한 방식을 구성하는 것으로 생각할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 그러나, 당업자라면, 본 발명의 개시 내용에 비추어 많은 변형이 개시된 특정 구체예 내에서 이루어지고, 본 발명의 사상 및 범주에서 벗어나지 않으면서 여전히 동일 또는 유사한 결과를 얻을 수 있다는 것을 이해해야 한다.

실시예

<106> (실시예 1)

<107> 다음 실시예에서, 본원인은 사람 배아 줄기세포로부터 도파민 작용성 뉴런 및 세로토닌 작용성 뉴런의 유도를 증명하고자 한다.

<108> 1) 사람 배아 줄기 세포

<109> 시작에 있어서, 사람 배반포의 속세포형이로부터 사람 ES 세포를 분리하였다. 환자로부터 배반포의 실험적 사용에 대한 동의서를 얻은 다음, 과량의 사람 배반포로부터 사람 다능성 ES 세포를 얻었다. 본원에 사용된 사람 ES

세포주는 U.S. 일련번호 10/226,711(본원에 참고문헌으로 수록됨)에 개시된 신규한 레이저 절개 기술을 사용하여 사람 배반포의 속세포덩이 세포로부터 얻었다. 요약하면, 투명구역을 갖는 사람 배반포, 영양세포층, 및 속세포덩이를 분리하였고, 1.48 μ m 비접촉 다이오드 레이저를 사용하여 사람 배반포의 투명영역 및 영양세포층에 구멍을 만들었다. 그 다음, 구멍을 통해 도입되어지는 흡인 피펫을 사용하여 흡인에 의해서 속세포덩이 세포를 분리하였다. 이들 세포를 ES 배지중의 미토마이신-C 처리 마우스 영양세포를 갖는 0.1% 젤라틴화 플레이트상에서 연속적으로 배양하였고, 속세포덩이가 형성되었다. ES 세포 배지는 송아지 태아 혈청(FCS)(Hyclone)을 갖는 10-20% ES 세포 또는 혈청 치환 너아웃 혈청(Gibco), 1% MEM 비필수 아미노산 용액, 2mM L-글루타민, 0.1mM β -메르캅토에탄올, 4 μ g/ml 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF)(Sigma), 50U/ml 페니실린, 및 50 μ g/ml 스트렙토마이신이 보충된, 돌베코 변성 이글 배지(DMEM) 또는 너아웃 DMEM (Gibco)로 구성된다. 이들 속세포덩이는 분리되고, ES 배지중의 마우스 영양세포층에 다시 플레이팅되어, 사람 ES 세포주를 유도하는데 사용된다.

<110> 형태학적으로, 유도된 사람 ES 세포는 높은 핵/세포질 비율을 가지며, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, OCT-4, 알카린 포스페이트, 텔로메라아제, 핵형분석, CD-30, 크립토-1, GNCf, c-키트 및 CD-90 과 같은 세포 표면 마커로 특징지어진다.

<111> 2) 사람 배아 줄기세포의 배양 및 확장

<112> 표준 성장 조건하에서 동결 스톱의 사람 ES 세포를 배양하고 증식하였다. 동결 스톱 바이알의 미분화 ES 세포를 LIF를 함유한 ES 배지에서 재현탁하였다. ES 세포 배지는 우태아 혈청(FBS)(Hyclone)을 갖는 20% ES 세포, 1% 비필수 아미노산(NEAA) 용액, 2mM L-글루타민, 0.1mM β -메르캅토에탄올, 50U/ml 페니실린, 및 1000 U/ml LIF 가 보충된, 돌베코 변성 이글 배지(DMEM)로 구성된다. 세포를 펠릿화하여 ES 배지를 사용하는 젤라틴-코팅 플라 스틱 배양 디쉬상의 마우스 영양세포층에 플레이팅하였다. ES 세포배지는 10-20% FCS, 2mM L-글루타민, 1% MEM 비필수 아미노산 용액, 0.1mM β -메르캅토에탄올, 50U/ml 페니실린, 50 μ g/ml 스트렙토마이신, 1000U/ml LIF, 및 4 μ g/ml bFGF 가 보충된 글루코스 함량이 높은 DMEM 으로 구성되며, 이것은 Thomson 등, 1998, Science 282: 1145-1147; Shablott 등, 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 13726-13731; 및 Reubinoff 등, 2000. Nature Biotech. 18: 399-403 에 개시된 방법에 따른 것이다. .

<113> ES 세포를 배양하고, 분화를 저해하기 위해서 정기적으로 계대하는 것에 의해서 사람 ES 세포를 확장하였다. 10 초동안 Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺ 가 결여된 돌베코 인산완충생리식염수로 세포를 세척한 다음, 5초동안 0.05% 트립신으로 세 포를 세척함으로써 세포를 계대시켰다. 5초 후에, 혈청을 함유하는 ES 배지를 첨가함으로써 트립신의 활성을 저 해하였다. 그 다음, 세포를 긁어모았고, 작은 클러스터로 분해하였다. 그 다음, 상기에 개시된대로, 0.1% 젤라 틴 코팅되고 또한, LIF 및 bFGF 를 함유한 ES 배지 중의 영양세포로 코팅된 100mm 페트리디쉬에 클러스터를 플 레이팅하였다. 세포를 4-6일동안 확장시켰다.

<114> 3) 배양체의 생성

<115> 미분화 사람 ES 세포를 증식시키고 확장시킨 다음, 이들을 배양하여 배양체를 형성하였다. 우선, ES 세포를 0.05% 트립신-EDTA 로 분리한 다음, 긁어모으고 세포를 작은 클러스터로 분해하였다. 그 다음, 영양세포의 부재 하에서 클러스터를 약 1x10⁵ 세포/ml 밀도로 세균 디쉬에 플레이팅하였다. 사용된 세균 디쉬는 부착을 방해하는 비부착 표면으로 되어 있어서, 이에 의해서 ES 세포의 분화 및 배양체의 형성을 자극한다. 이들 세포를 LIF 및 bFGF가 결여된 ES 배지중의 현탁 배양으로 배양하였다. 세포를 배양하기 위해 사용된 ES 배지는 글루코스 함량 이 높은 DMEM 또는 10-20% FCS 또는 너아웃 혈청 교환, 및 β -메르캅토에탄올, L-글루타민, 및 항체와 같은 다 른 보충물이 보충된 너아웃 DMEM을 함유하였다. bFGF는 ES배지에 첨가되지 않았다. 배양체는 4-8일동안 배양되 었다. 이 기간동안, 침전방법으로 2일에 한번 ES 배지를 교환하였다. 응집 현탁액을 원심분리 튜브에 옮기고, 응집물이 튜브 바닥에 침전되도록 한 다음, 배지를 흡인하고, 새로운 배지로 교체함으로써 침전 방법을 수행하 였다. 그 다음, 신선한 배지의 응집물을 배양 디쉬에 다시 넣었다. 4-8시간 후에, 배양체를 수집하고 낮은 속도 로 원심 침전시켜서 ES 세포 배지에서 재현탁하였다. LIF가 결여된 ES 배지 중의 0.1% 젤라틴으로 코팅된 조직 배양 플레이트상에 약 20-30 배양체를 플레이팅하였고 24시간동안 인큐베이션하였다.

<116> 4) 네스틴-양성 신경 원시세포의 선택 및 확장

<117> 24시간 후에, ES 배지를 IFSFn(네스틴 선택) 무혈청 특정 배지로 교체함으로써 네스틴-양성 세포(신경 원시세포)를 선택하였다. ITSFn 배지는 성장 인자 인슐린(5-25 μ g/ml)(Sigma), 아셀렌산나트륨(10-50nM)(Sigma), 트랜스페린(1-10 μ g/ml)(Gibco), 및 섬유결합소(1-5 μ g/ml)가 보충된 DMEM:F12 배지(Gibco)로 구 성된다. 배지는 네스틴-양성 세포의 선택을 가능하게 하며, 6-10일동안, 일반적으로 8-9일동안 ITSFn 배지가 2

일에 한번씩 공급되도록 하면서 수행하였다. 선택을 끝낸 다음, 면역형광 기술을 사용하여 네스틴 발현에 대해 신경 원시세포를 특성화하였으며, 약 95%의 세포가 네스틴을 발현하는 것으로 나타났다(도 1A).

- <118> 계속하여, 네스틴-양성 세포를 확장하거나 신경세포 부착분자(NCAM)가 농축되도록 자기 세포 선별(MACS)을 사용하여 선별하였다.
- <119> 5) 자기 선별에 의해서 NCAM-양성 세포의 선별
- <120> 다음 단계로, 네스틴-양성 세포를 분리하여 신경세포 부착분자(NCAM)의 농축을 위한 확장 또는 자기 세포 선별(MACS)을 수행하였다. NCAM 은 신경세포 특이적 표면 마커이다. NCAM 을 사용하는 MACS 에 의해서 네스틴-양성 세포를 선별하기 위해서는, 우선 0,05% 트립신-EDTA 로 세포를 인큐베이션함으로써 조직배양 플레이트로부터 네스틴-양성 세포를 수집하였다. 그 다음, 분리된 생존 세포를 PBS로 세척하고, 30분동안 표면 마커 NCAM(Chemicon)에 대한 항체로 염색하였다. 그 다음, 15분동안 MACS 염소 항-라빗 IgG 마이크로비드(Miltenyi Biotec)와 함께 인큐베이션하였다. PBS로 조심스럽게 세척한 다음 세포를 자기 선별되도록 하였다. 세포를 선별하기 위해서, 자기적으로 표지된 세포 현탁액(약 2×10^8 세포)을 MACS MS 분리 컬럼(Miltenyi Biotec)에 피펫팅하였고, 세포가 컬럼을 통해 흐르도록 하였고, 유출물(음성 분획)을 수집하였다. 그 다음, NCAM-양성 세포를 갖는 양성 분획을 PBS 로 용출시키는 것에 의해서 수집하였다.
- <121> 면역선별 전에, FACS로 네스틴-양성 세포를 분석하였고, 네스틴-양성 세포의 약 50-60%가 신경세포 표면 마커 NCAM을 발현하였다(도2A 및 2B). MACS를 이용한 면역선별 후에, NCAM 을 발현하는 생존가능한 네스틴-양성 세포 집단이 약 80-85%로 농축되었다(도 3A 및 3B).
- <122> 6) NCAM-양성 신경 원시세포의 확장:
- <123> 우선, 0.05% 트립신-EDTA를 이용하여 세포를 분리하고, 그 다음 확장 배지를 함유하는 폴리-L-오르니틴/라미닌 코팅 플레이트에 세포를 플레이트링함으로써 분리된 NCAM-양성 세포를 확장하였다. 이 방법에 따른 NCAM-양성 세포의 배양은 확장 배지에서의 향상된 부착 및 증식을 가능하게 한다. 확장 배지는 DMEM:F12, 인슐린(10-100 μ g/ml), 아셀렌산나트륨(10-50nM), 트랜스페린(1-10mg/ml), 푸트레신(50-200 μ M), 프로게스테론(5-40nM), 및 라미닌(10-50 μ g/ml)를 포함하였다. 무혈청 확장 배지에 bFGF(10-50ng/ml), EGF(10-50ng/ml), BDNF(50-200ng/ml), FGF-8(50-200 ng/ml), 및/또는 SHH(200-400ng/ml)와 같은 2 이상의 성장 인자를 함유시켰다. 확장 배지에 존재하는 이들 다양한 인자가 신경세포 비율의 전반적인 증가에 도움이 되고 더욱이, 이들 중간뇌 전구체 세포가 도파민 작용성 뉴런 표현형을 갖도록 유도한다. 확장 배지를 2일에 한번씩 교환하였고, 6-10일 동안 네스틴-양성, NCAM-양성 세포가 증식되도록 하였다(도 1B).
- <124> 이러한 배양 조건하에서, 세포의 약 50-60%가 신경돌기 과정으로 진행하였고, NCAM 에 대해 양성(이는 신경세포를 형성하는 능력을 증명한다)인 것을 염색하였다(도 3). 이들 세포는 또한 초기 신경세포 마커 β -튜불린에 면역반응성이었다(도 4B). 그 다음, 이들 신경 원시세포를 연속적으로 계대하였고, 신경 원시세포가 10번까지 계대될 수 있으며, 여전히 도파민 작용성 뉴런으로 분화할 수 있는 능력을 유지하고 있다는 것이 관찰되었다.
- <125> 7) 도파민 작용성 뉴런의 분화 및 성숙
- <126> 생체내 도파민 작용성 뉴런의 발생은 조절된 세포외 신호전달 분자의 작용에 의존적이다. 이들 분자는 계통-한정 발현을 하는 전사 인자의 연속단계를 활성화한다. 전사 인자는 도파민 작용성 뉴런 표현형의 발생에 관여하는 특정 세트의 유전자들의 발현을 증가시킨다. 상기 프로토콜을 사용하여 생성된 확장된 신경 원시세포가 기능적인 도파민 작용성 뉴런으로 되도록 하기 위해서, 우선 성장인자 bFGF 및 EGF를 세포로부터 추출하였다. 그 다음, 30-50일 동안 신경기초 배지 중에서 세포를 배양시킴으로써 신경 원시세포의 도파민 작용성 뉴런으로의 분화를 유도하였다. 신경기초 배지는 신경기초 A 배지(Gibco), FCS(10-20%)(HYCLONE), 및 B27(2-10%)(Gibco), 및 다양한 성장인자를 포함한다. 이 배지에 함유된 성장 인자는 인터루킨-1 β (IL-1 β) (1-2 μ g/ml)(Sigma), 아스코르브산(50-150nM)(Sigma), N-아세틸 시스테인(50-150nM) (ICN), db-cAMP(500-1000M)(Sigma), GDNF(1-5 μ g/ml)(Sigma), TGF- β 3(1-5 μ g/ml) (Sigma), 뉴르투린(100-500 μ g/ml)(Chemicon), BDNF(50-200ng/ml)(Sigma), FGF-8(50-200ng/ml)(R&D Systems), 및/또는 SHH(200-400ng/ml)(R&D Systems)이다. 신경기초 배지는 0.22 μ m 구멍의 주사기 필터로 무균 여과하였다.
- <127> 트립신 수산화효소(TH)는 도파민 합성에 대한 속도 제한 효소이다. 어떤 계통-한정 성장 인자는 TH 합성의 유도를 촉진한다. 배지에 이들 인자를 첨가함으로써 도파민 작용성 뉴런 표현형을 나타내는 세포의 비율이 높아졌다. 표 1에 제시된 바와 같이, 신경 분화동안 상이한 시간점에서 이들 인자를 첨가하였다. 신경 기초 배

지에 존재하는 IL-1β는 신경 원시세포의 도파민 작용성 뉴런으로의 분화에서 중요한 작용을 하는 것으로 여겨진다. 어떤 특정 메커니즘으로 한정하고 싶지는 않지만, IL-1β는 TH 양성 신경세포의 양, 및 배지 중의 신호전달 분자에 대한 세포의 반응성을 증가시키는 것이 분명하다. 30-50일의 조직 배양 기간동안 3일에 한번씩 신경기초 배지를 교환하는 것과 조합하여 이들 성장 인자를 적용한다.

<128> 신경 원시세포의 분화동안 상이한 시점에 첨가된 신경 기초 배지중의 성장인자의 반응혼합액이 표 1에 기재된다.

【표 1】

신경 원시세포의 분화 조건

분화를 위한 배양 조건			
1-4일	4-7일	8-50일	TH 양성 세포(%)
신경기초 배지, FCS, B27, IL-1β 선별안됨	신경기초 배지, FCS, B27, Shh, FGF-8, IL-1β, db-cAMP, GDNF,	신경기초 배지, FCS, B27, Shh, FGF-8, IL-1β, db-cAMP, GDNF, TGF-β 3, 뉴르투린	42%
신경기초 배지, FCS, B27, IL-1β	신경기초 배지, FCS, B27, Shh, FGF-8, IL-1β, db-cAMP, GDNF, Shh, FGF-8, 아스코르브산	신경기초 배지, Shh, FGF-8, B27, IL-1β, db-cAMP, GDNF, TGF-β 3, 뉴르투린, 아스코르브산	55%
신경기초 배지, FCS, B27, IL-1β	신경기초 배지, Shh, FGF-8, B27, IL-1β, db-cAMP, GDNF, N-아세틸 시스테인	신경기초 배지, Shh, FGF-8, B27, IL-1β, db-cAMP, GDNF, TGF-β 3, 뉴르투린, N-아세틸 시스테인	65%
신경기초 배지, FCS, B27	신경기초 배지, FCS, B27	신경기초 배지, FCS, B27	20%

<129>

<130> 신경 기초 배지를 사용하여 ES 세포가 분화되도록 유도되는 경우에, ES 세포는 도파민 작용성 뉴런, 세로토닌 작용성 뉴런, 및 희소돌기아교세포를 포함하는 다양한 신경세포 유형으로 발생한다(도 5, 6, 및 7). 도파민 작용성 뉴런으로 분화하는 세포의 비율은 표준 배양 조건하에서는 상대적으로 낮았다. 그러나, 배지에 표 1에 제시된 성장인자를 보충시키는 것에 의해서 생성된 도파민 작용성 뉴런의 비율을 증가시켰다. 예를 들어, ES 세포의 60% 이상이 TH에 대해 양성(도파민 작용성 뉴런에 대한 특이적 마커)인 세포로 분화되었다.

<131>

8) 분화된 신경세포의 특성화

<132>

세포의 전체적인 형태 및 면역형광에 의해서 식별된 표현형에 의해서 본 발명에 따라 생성된 분화된 신경 세포 유형을 평가하였다. 당업자에게 잘 알려진 표준 프로토콜을 사용하여 신경 원시세포 확장 단계(NCAM 양성 세포의 확장)에서 그리고, 다양한 분화의 시간점에서 면역형광 분석을 수행하였다. 우선, 세포의 기질로 미리 코팅된 2-웰 챔버 슬라이드에서 분리된 세포를 증식하였고, PBS 로 린스한 다음, 실온에서 10분동안 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 그 다음, 5분동안 PBS중의 0.2% 트리톤 X 를 세포에 침투시켰고, 2시간동안 1% 우혈청 알부민(BSA)/PBS로 차단하였고, 4℃에서 하룻밤동안 1차 항체(항체 희석액은 1% BSA/TBS로 제조되었다)와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 다음 1차 항체로 염색하였고, 이들은 모두 CHEMICON으로부터 입수하였다: 초기 신경세포 마커 β-튜불린, NCAM, 신경미세섬유, 후기 신경세포 마커 미세관 연관 단백질 2(MAP-2), 신경세포 표면 항원 A2B5, Nurr-1, 티로신 수산화효소, 도파민 전달체 DAT, 도파민 β-수산화효소(DBH), 별아교세포 마커 섬유성 신경아교세포 산성 단백질(GFAP), GABA, 희소돌기아교세포, 세로토닌, 및 시냅토피신. 최종적으로, 세포를 FITC 표지된 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 상기 각각의 단계후에, 세포를 PBS로 3회 세척하였다.

<133> 형광 현미경하에서 챔버 슬라이드를 관찰하여 면역양성 영역을 평가하였다. 면역형광 분석으로 분화된 세포의 상당한 비율이 신경세포 특이적 마커인 NCAM(도 3), MAP-2(도 4A), 및 β -튜불린(도 4B)에 면역반응성이라는 것을 밝혀냈다. 이들 주요 항원의 발현은 분화 배지에서 상당 시간 인큐베이션함으로써 증가되었다. 또한, 면역형광 분석으로 적은 비율의 세포만이 세로토닌(도 7), 및 별아교세포에 존재하는 비신경세포 마커 섬유성 신경아교세포 산성 단백질(GFAP), 및 희소돌기아교세포에 존재하는 GABA 및 글루타메이트(도 6)을 발현한다는 것을 밝혀냈다.

<134> 분화된 세포는 또한 각각, MAP-2, DAT, Nurr-1, β -튜불린, FITC-표지 2차 항체(Texas red)와 함께, TH(그린)에 대한 1차 항체를 이용하여 세포를 이중-표지화함으로써 분석되었다. 분석결과는 TH를 발현하는 MAP-2 양성 세포의 비율이 높아졌다는 것을 나타낸다. 40x 대물렌즈를 사용하여 TH-양성 세포의 수 및 무작위로 선택된 영역 중에서 영역당 MAP-2-양성 세포의 수를 계수함으로써 도파민 작용성 뉴런의 세포밀도를 정량화하였다. TH-양성 세포의 백분율을 계산하였다(도 9). TH-양성 신경세포는 또한 Nurr-1 및 DAT를 발현하였다. 그러나, DBH와 함께 TH가 함께 발현되지는 않으며, 따라서 세포의 도파민 작용성 뉴런 표현형이 확인되었다. 추가적으로, 시냅토피신을 이용한 면역 염색으로 시냅스 형성이 식별되었다.

<135> 또한, 면역형광 분석으로 TH를 발현하는 선별된 NCAM-양성 세포의 비율은 약 60%이며, 약 30%는 세로토닌을 발현한다는 것이 밝혀졌다(도 10). 또한, 약 40%의 네스틴-양성 세포를 TH에 대하여 양성적으로 염색하였고, 약 30%를 세로토닌에 대하여 양성적으로 염색하였고, 약 28%를 희소돌기아교세포에 대하여 양성적으로 염색하였다. 상이한 분화 단계에서 사용된 면역학적 마커는 표 3에 제시되고, 이것은 미분화 및 분화 ES세포의 표현형 특징을 나타낸다.

【표 3】

미분화 및 분화 ES세포의 표현형 특징

미분화 ES 콜로니	신경세포	도파민 신경세포	신경아교세포
SSEA-1 SSEA-3 SSEA-4 Tra-1-60 Tra-1-81 Oct-4 GCTM-2 CD-30 cripto-1 GCNF c-Kit	NCAM β tubulin Neurofilament A2B5 MAP-2 Serotonin GABA Synaptophysin	Nurr1 TH DAT DBH	A2B5 GFAP O4

<136>

<137> 9) 유전자 발현 프로파일

<138> 또한, 상이한 단계에서 수집된 세포의 유전자 발현 프로파일을 분석하였다. 개시된 방법의 상이한 단계에서 세포(미분화 ES 세포, 배양체, 네스틴-양성 신경 원시세포, NCAM-양성 세포, 및 신경기초 배지에서 분화 후 12, 17, 22, 27, 및 37일에 분리된 분화 세포)를 수집하여 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)으로 분석하였다. 세포를 수집하여 이를 펠릿화하였고, RNeasy Qiagen 키트를 사용하여 세포 펠릿으로부터 세포 총RNA를 추출하였다. 분리된 RNA는 -20°C에서 저장하였다.

<139> 몰로니 백혈병 바이러스 수퍼스크립트 II 역전사효소 및 올리고 (dT)₁₂₋₁₈을 사용하여 분리된 총 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 수집된 세포에서 어떤 유전자가 발현되는지를 결정하기 위해서, 역전사효소 반응으로 합성된 cDNA를 상이한 세트의 특정 프라이머를 갖는 PCR 증폭에 사용하였다. 주형으로서 cDNA를 사용하고 표준 PCR 조건하에서 플라티넘 Taq 폴리머라제를 사용하여 당업자에게 잘 알려진 PCR 반응을 수행하였다. DNA 생성물을 증폭시키기 위해서 사용된 일반적인 사이클링 변수는 다음과 같다.

<140>

1. 94°C에서 30초동안 주형 cDNA의 변성;

<141>

2. 사용된 프라이머에 따라 55-65°C에서 1분동안 프라이머의 어닐링; 및

<142>

3. 72°C에서 1분동안 반응물의 인큐베이션. 25 내지 40회 단계 1-3(사이클)을 반복한다.

<143> PCR반응 후에, DNA 사이즈 래더를 구비한 전기영동을 사용하여 1.5% 아가로스 겔에 생성물을 전개시켰다. 표 4에 제시된 프라이머를 사용하여 RT-PCR로 TH, D2RL, DBH, En-1, Nurr-1, 및 β -튜불린의 발현을 분석하였다.

[표 4]

도파민-특이적 유전자의 증폭에 사용된 프라이머 세트

유전자	프라이머 서열
TH (417 bp)	TGT CAG AGC AGC CCG AGG TC (SEQ ID NO:1) CCA AGA GCA GCC CAT CAA AG (SEQ ID NO:2)
D2RL (404 bp)	GCA GTC GAG CTT TCA GAG CC (SEQ ID NO:3) TCT GCG GCT CAT CGT CTT AAG (SEQ ID NO:4)
DBH (447 bp)	CAC GTA CTG GTG CTA CAT TAA GGA GC (SEQ ID NO:5) AAT GGC CAT CAC TGG CGT GTA ACA CC (SEQ ID NO:6)
En-1(390bp)	TGG TCA AGA CTG ACT CAC AGC A (SEQ ID NO:7) TCT CGT CTT TGT CCT GAA CCG T (SEQ ID NO:8)
Nurr1 (255bp)	TGA AGA GAG CGG AGA AGG AGA T (SEQ ID NO:9) TCT GGA GTT AAG AAA TCG GAG CT (SEQ ID NO:10)
β -튜불린(317bp)	GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC (SEQ ID NO:11) TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC (SEQ ID NO:12)

<144> <145> RT-PCR 에 의한 상기 분석은 도파민 작용성 뉴런 표현형 특이적 유전자, TH의 발현은 ES 세포의 신경 분화 후부터 도파민 작용성 뉴런으로 최종 분화될 때까지 계속되었다는 것을 보여준다(도 12). 예상한 대로, 편재적으로 발현된 유전자, β -튜불린은 모든 세포 샘플에서 관찰되었으나, DBH는 어떤 세포 샘플에서도 발현되지 않았다.

<146> 10) 도파민 검출용 역상 HPLC

<147> 도파민 작용성 뉴런의 분명한 특징은 도파민 생성이다. 따라서, 배아 줄기세포-유래 도파민 작용성 뉴런이 도파민을 생성하는 기능적 능력은 역상 HPLC(RP-HPLC)를 사용하여 세포내 도파민 수준을 직접 측정하는 것에 의해서 평가되었다. 각 샘플에서 검출된 도파민 농도는, 각 실험의 직전 및 직후에 컬럼에 주입된 도파민 표준 용액과 비교함으로써 측정되었다.

<148> 개시된 방법의 상이한 단계에서 세포(미분화 ES 세포, 배양체, 네스틴-양성 신경 원시세포, NCAM-양성 세포, 및 신경기초 배지에서 분화 후 7, 22, 및 37일에 분리된 분화 세포)를 수집하였다. 우선, 수집 전에, 15분동안 HBSS 중의 56mM KCl을 첨가함으로써 신경기초 배지중의 분화된 세포를 자극하여 도파민 분비를 유도하였다. 약 5×10^6 세포를 트립신처리하였고 원심분리로 펠릿화하였다. 그 다음, 항산화제(0.2g/l 나트륨 메타비술파이트)를 이용하여 차가운 1N 과염소산중에서 세포를 초음파처리하였고, 4°C에서 20분동안 15,000rpm/분에서 원심분리하였다. 상청액을 추출하였고, 다음 단계로 RP-HPLC 에 의해서 세포내 도파민 농도를 측정하기 위해서 -70°C에서 보관하였다. 세포 용해물 및 (마지막 배지 교환 후 48시간에서의) 배양 상청액 중의 도파민 수준을 측정하였다. 측정 후 즉시, 배양 상청액을 7.5% 오르토인산 및 나트륨 메타비술파이트로 안정화하였다.

<149> 미분화 ES 세포, 배양체와 같은, 개시된 방법의 초기 단계에서 얻은 세포 용해물을 RP-HPLC 로 분석하였다. 네스틴-양성 신경 원시세포, 및 NCAM-양성 세포는 어떤 검출가능한 도파민을 함유하지 않았다. 그러나, 신경기초 배지에서 1주 분화시킨 다음, RP-HPLC로 분석된 세포 용해물은 도파민을 함유하였다. 세포내 도파민 수준은, 세포 용해물중 도파민 작용성 뉴런의 수가 증가함에 따라서 유의하게 증가하였고, 시간 경과에 따라서 분화 신경기초 배지중에서 최종적으로 성숙하였다. 도 13에서 도시된 바와 같이, 정해진 시간점에서 성장인자로 처리된 세포배양물 중의 세포내 도파민 수준이 미처리 배양물 중의 세포내 도파민 수준에 비하여 높았다. N-메틸-4-페닐 1,2,3,6-테트라히드로피리딘 염산염(MPTP)(도파민 작용성 뉴런을 표적화하는 신경독)과 함께 세포 배양물의 인큐베이션 후에, 이들 세포에 의한 도파민의 생산을 더 확인하였다. MPTP와 함께 인큐베이션한 세포 배양물에서는, RP-HPLC 분석시 세포 용해물중에서 도파민이 검출되지 않았다. 대조적으로, 도파민의 조정배지로의 방출은 56mM KCl로 자극된 세포 배양에서 증가되었다(도 14). 분화 신경기초 배지에 일련의 성장인자를 첨가시키는

것 역시 세포 용해물의 세포내 도파민 수준을 증가시켰다(표 5).

【표 5】

HPLC 으로 검출된 세포 용해물중의 도파민 농도($\mu\text{g/ml}$)

번호	분화를 위한 배양 조건	분화 일수		
		7일	22일	37일
1	성장인자 부재	0.5	1.3	1.1
2	성장인자 첨가	5.0	21.5	5.5
3	56mL KCl로 자극	5.5	22	7.2
4	성장인자와 함께 N-아세틸 시스테인 첨가	4.93	20.9	9
5	56mM KCl로 자극	8.8	30.9	10
6	성장인자와 함께 아스코르브산 첨가	6.2	3.7	9.7
7	56mL KCl로 자극	6.9	5.5	10

<150>

<151>

본원에 개시되고 청구된 모든 조성물 및 방법은 본원발명의 관점에서 제조되고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 구체예의 관점에서 기술되어 있지만, 본 발명의 개념, 취지 및 범위에서 벗어나지 않고, 본원에 개시된 조성물 및/또는 방법에, 그리고 방법의 단계에서 또는 단계 순서에서 변형이 가해질 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다. 더욱 구체적으로는, 화학적으로 또는 생리적으로 관련된 어떤 제제는 본원에 개시된 약제와 대체될 수 있으며, 동일하거나 유사한 결과를 얻을 수 있다. 당업자에게 자명한 이러한 유사한 대체 및 변형은 수록된 청구범위에 한정된 본 발명의 취지, 범위 및 개념에 속하는 것으로 여겨진다.

도면의 간단한 설명

<36>

다음 도면은 본 명세서의 일부를 구성하며, 본 발명의 어떤 양태를 더 구체화하기 위해서 포함되며, 본원발명은 본원에 제시된 특정 구체예에 관한 상세한 설명과 조합하여 도면 중 하나 이상을 참조할 때 더욱 명확하게 이해될 것이다.

<37>

도 1은 네스틴에 대해 양성인 사람 배아 줄기세포로부터 유래된 신경 원시세포를 도시한다: (A)는 네스틴 마커와 면역반응하는 신경 원시세포를 나타내고; (B)는 무혈청 조건 및 선택된 성장인자의 존재하에서 확장된 네스틴-양성 세포의 위상차 현미경 사진이다.

<38>

도 2는 사람 배아 줄기세포로부터 유래되고 NCAM-FITC로 표지된 네스틴-양성 세포의 FACS 분석을 나타낸다: (A)는 항-래빗 FITC 로 처리된, 비표지 세포의 분석을 나타낸다; (B)는 NCAM에 대하여 1차 항체로 처리되고, 항-래빗 FITC(2차 항체)로 표지화된 세포의 분석을 나타낸다. 이 연구에서, 네스틴-양성 세포의 약 50-60%가 NCAM에 대하여 면역양성이었다.

<39>

도 3A 및 도 3B는 사람 배아 줄기세포로부터 유래되고, MACS를 사용하여 선별되고, 조직 배양 플레이트에 다시 플레이팅된 NCAM-양성 세포의 형광 현미경사진이다.

<40>

도 4A 및 도 4B는 사람 배아 줄기세포로부터 유래된 MAP-2 및 β 튜블린으로 표지화된 신경세포의 형광 현미경 사진이다.

<41>

도 5는 티로신 수산화효소(TH)에 대해 양성인 신경세포의 존재를 나타낸다: (A) MACS를 사용한 면역형광 분석은 NCAM-양성 세포의 농축 집단 중의 약 60%의 신경세포가 TH에 대하여 양성이라는 것을 보여준다; (B) 비선별 네스틴-양성 세포의 확장 및 분화 후에 면역형광 분석은 약 40%의 신경세포가 TH에 대하여 양성이라는 것을 보여준다.

<42>

도 6은 희소돌기아교세포의 대표적인 형광 현미경사진이다. 면역형광 분석은 분리된 네스틴-양성세포의 약 25-30%가 희소돌기아교세포로서 양성적으로 염색되었다는 것을 나타낸다.

<43>

도 7은 신경전달물질 세로토닌을 발현하는 신경세포의 대표적인 형광 현미경사진이다. 약 30%의 네스틴-양성 세포 및 약 20%의 NCAM-양성 세포는 세로토닌과 면역반응성이었다.

<44>

도 8은 TH(그린) 및 다른 신경세포 특이적 항원(레드)에 대해 면역표지된 도파민 작용성 뉴런의 형광 현미경 사진이다: (A) β 튜블린; (B) MAP-2; (C) Nurr1; 및 (D) DAT 와 함께 위치한 TH.

<45>

도 9는 TH에 대해 양성인 MAP-2 양성 신경세포(도파민 작용성 뉴런)의 비율을 보여주는 막대 그래프이다. 제시

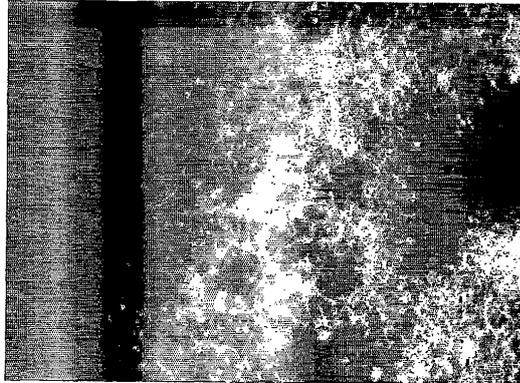
된 바와 같이, TH에 양성인 신경세포의 비율은 분화가 진행되는 7, 22, 및 37일에서 증가한다.

- <46> 도 10은 NCAM-양성 농축 세포중의 상이한 신경세포 집단의 정량 분석을 나타내는 막대 그래프이다: 약 60%의 NCAM-양성 세포가 또한 TH에 대해 면역반응성이었고; 약 30%가 세로토닌에 대해 면역반응성이었고; 약 15%가 GABA 및 글루타메이트에 대해 면역반응성이었다.
- <47> 도 11은 면역형광에 의해서 분석된 대로, 네스틴-양성 세포의 확장 및 분화 후에 상이한 신경세포 집단의 정량 분석을 나타내는 막대 그래프이다: 약 네스틴-양성 세포의 약 40%가 TH에 대해서 면역반응성이었다: 약 30%가 세로토닌에 대해서 면역반응성이었다; 약 28%가 희소돌기아교세포에 대해서 면역반응성이었고, 약 2%가 섬유성 신경아교세포 산성 단백질에 대해서 면역반응성이었다(GFAP, 별아교세포에 대한 마커).
- <48> 도 12는 실시예1에 개시된 조건하에서 생체의 이들 세포의 최종-분화동안의 사람 배아 줄기세포의 유전자 발현 프로파일을 도시한다: UD=미분화; EB=배양체; NS=네스틴-양성 세포; NE=네스틴 확장 세포; 및 나머지 시간점은 일수를 나타낸다. 세포를 신경기초 배지에서 배양하였고, 실시예 1에 개시된 대로 성장인자를 선택했다. Nurr1, En-1, D2RL과 같은 도파민 작용성 뉴런에 특이적인 인자의 전사는 분화 초기 단계동안에 발현된다. 도파민 작용성 뉴런 특이적 유전자 TH의 발현이 미분화 줄기세포를 제외한 모든 단계에서 관찰되었다. DBH의 어떤 발현의 부재로 이들 세포의 중간뇌 표현형을 확인하였다.
- <49> 도 13은 분화 후 7, 22, 및 37일에 RP-HPLC에 의해서 결정된 세포 용해물중의 도파민의 세포내 수준을 도시한다. 성장인자의 존재에서, 도파민 수준은 미처리 세포(1-4 μ g/ml)에서 보다 훨씬 높았다(4-6 μ g/ml). MPTP로 처리된 세포에서 7일 및 22일에 어떠한 도파민도 검출되지 않았고, 도파민의 수준은 37일에 감소되었다.
- <50> 도 14는 KCl이 분화 7, 22, 37일 후에 조정배지 중에서 배양된 분화세포에서 도파민 방출을 일으킨다는 것을 보여준다. 15분동안 56mM KCl로 세포를 자극하여 도파민의 분비를 유도하였다; RP-HPLC에 의한 분석전에 배양 상청액을 7.5% 오르토인산 및 나트륨 메타비술파이트로 안정화하였다.

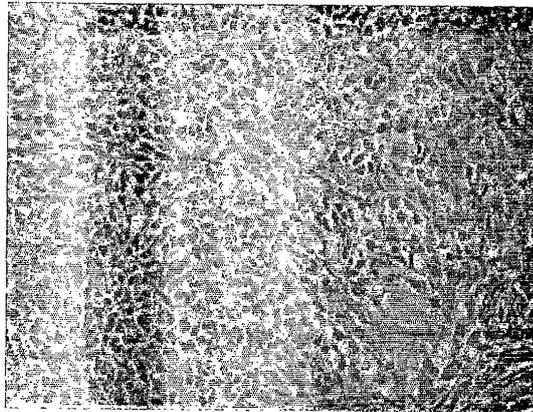
도면

도면1

A



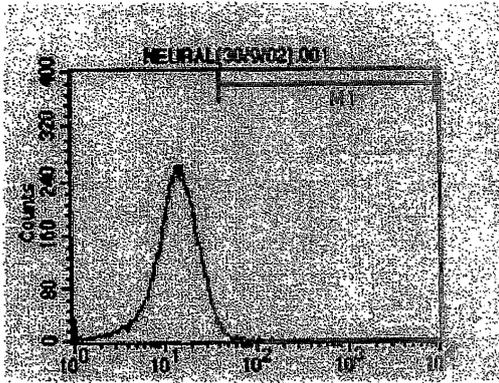
B



A-네스틴 양성 세포;
B-네스틴 양성 세포의 확장

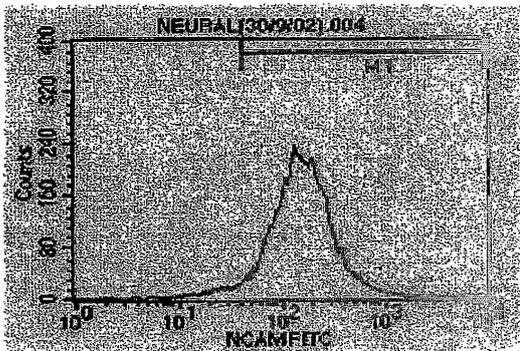
도면2

A



통계 히스토그램
 파일 : NEURAL(30/9/02)001
 샘플 ID: 대조표준/NCAM
 획득일 : 30-09-2002 게이트:G1
 게이트 횡수: 30448 총횡수:50000
 마커 횡수 % 게이트 %총
 모두 30448 10000 60.90
 M1 165 054 033

B

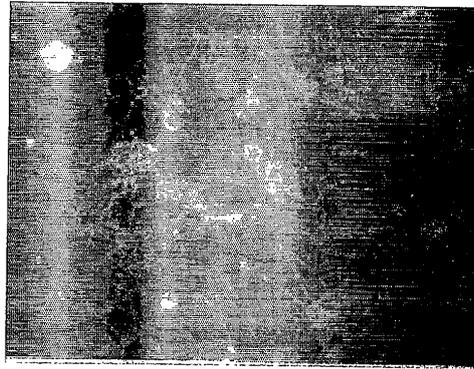


통계 히스토그램
 파일 : NEURAL(30/9/02)004
 샘플 ID: NCAM(FIXED/PERM)
 획득일 : 30-09-02 게이트:G1
 게이트 횡수 : 32566 총횡수: 50000
 마커 이벤트 % 게이트 %총
 모두 32566 10000 65.13
 M1 31434 9652 62.87

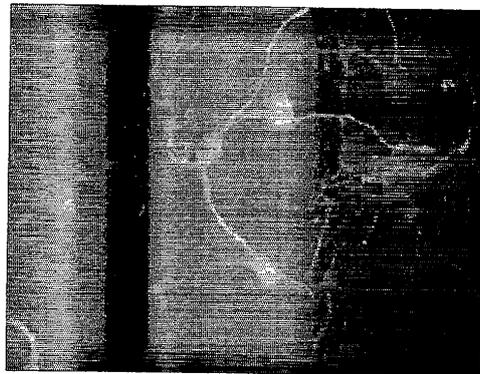
FACS 분석
 A-대조표준(비표지 세포)
 B-NCAM 양성 세포

도면3

A

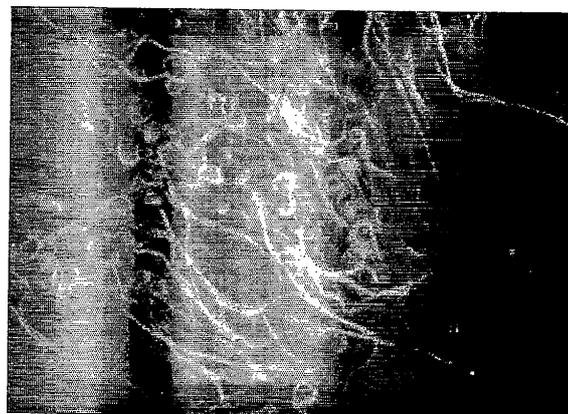


B



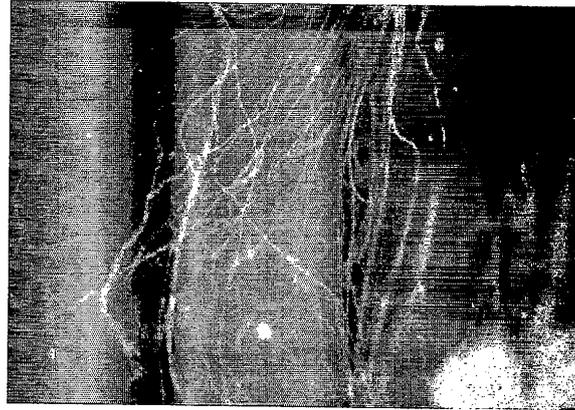
NCAM 양성 세포의 자기 선별
A,B-NCAM 양성 세포

도면4A



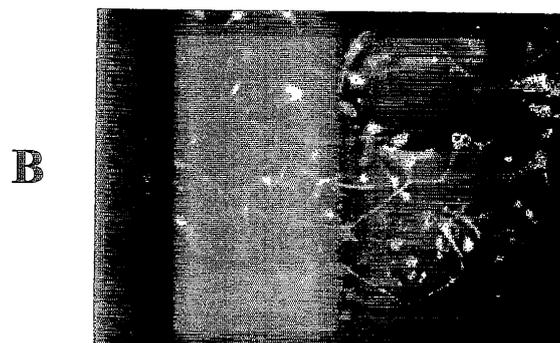
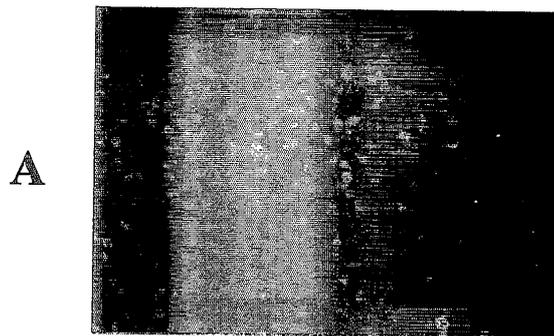
MAP-2 양성세포

도면4B



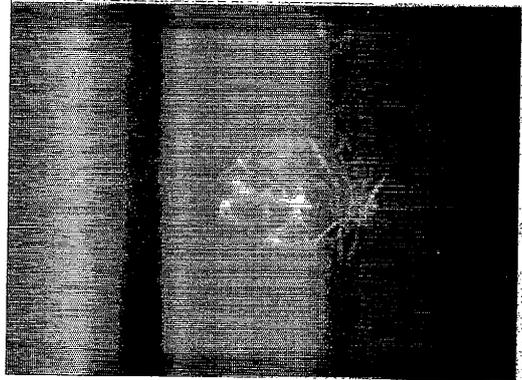
베타튜불린 양성 세포

도면5



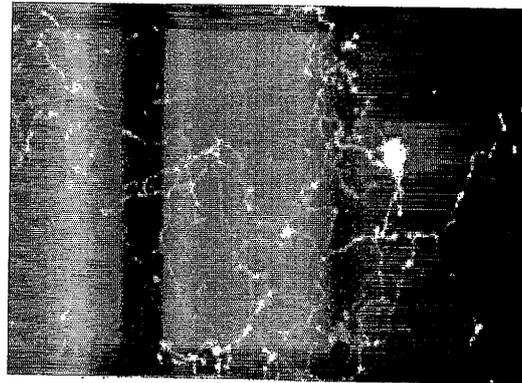
티로신 수산화효소에 대해 양성인 세포

도면6



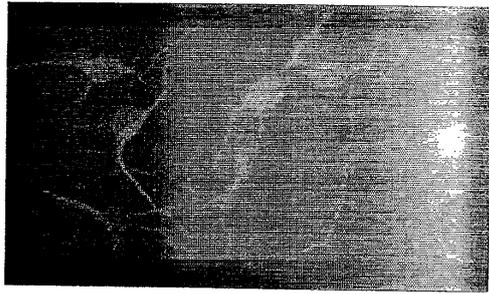
희소돌기아교세포

도면7



세로토닌

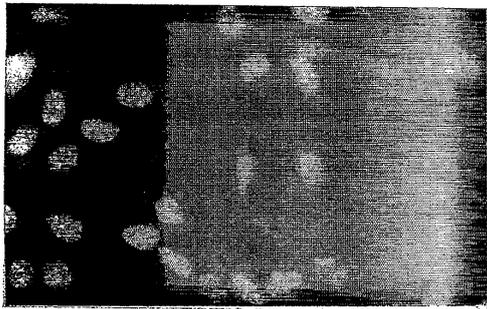
도면8



TH / β 튜불린



TH/MAP-2



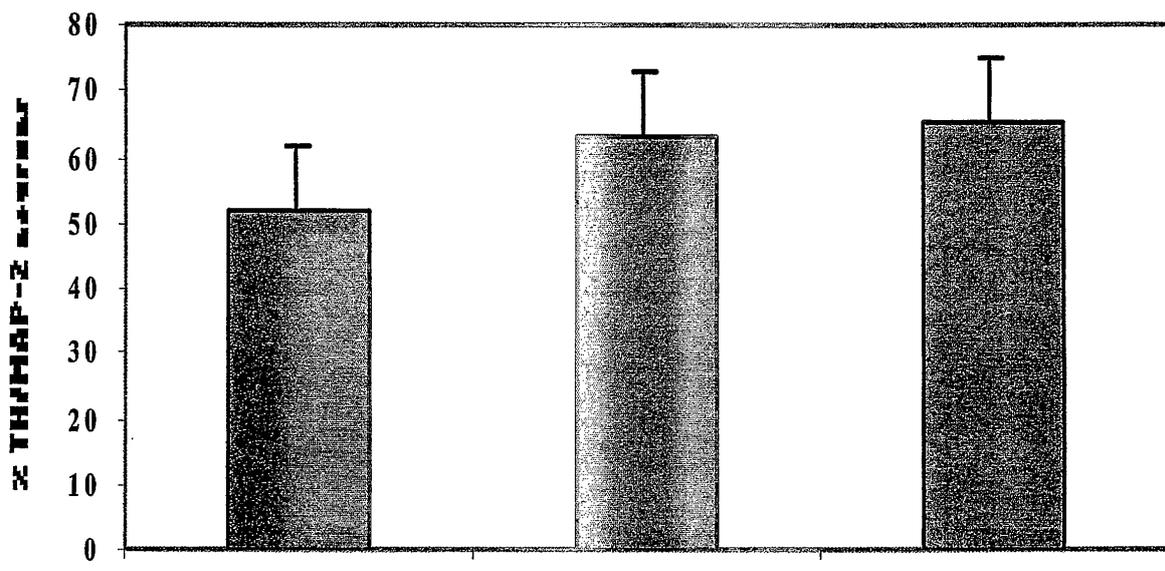
TH/Nurrl



TH/DAT

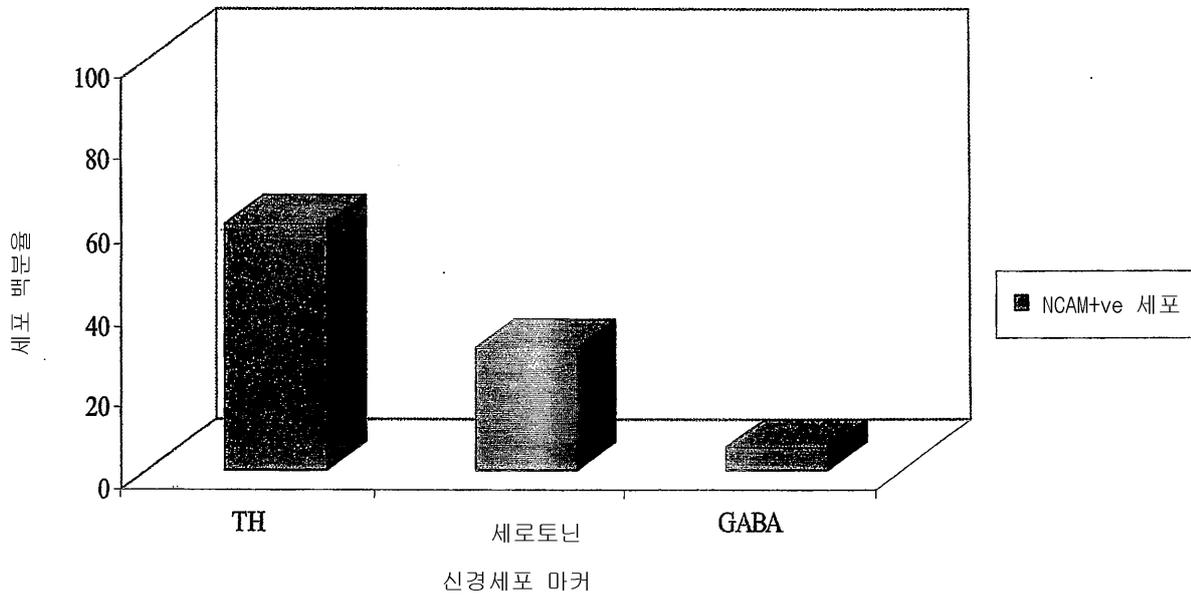
TH의 다른 신경세포 항원과의 공동배치

도면9



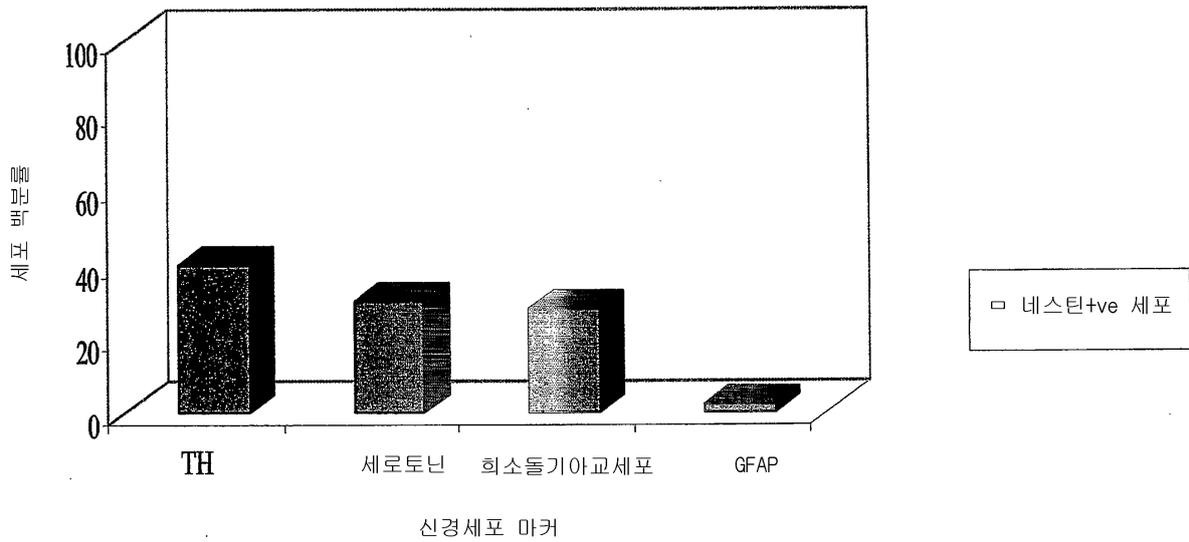
TH 양성 신경세포의 백분율

도면10



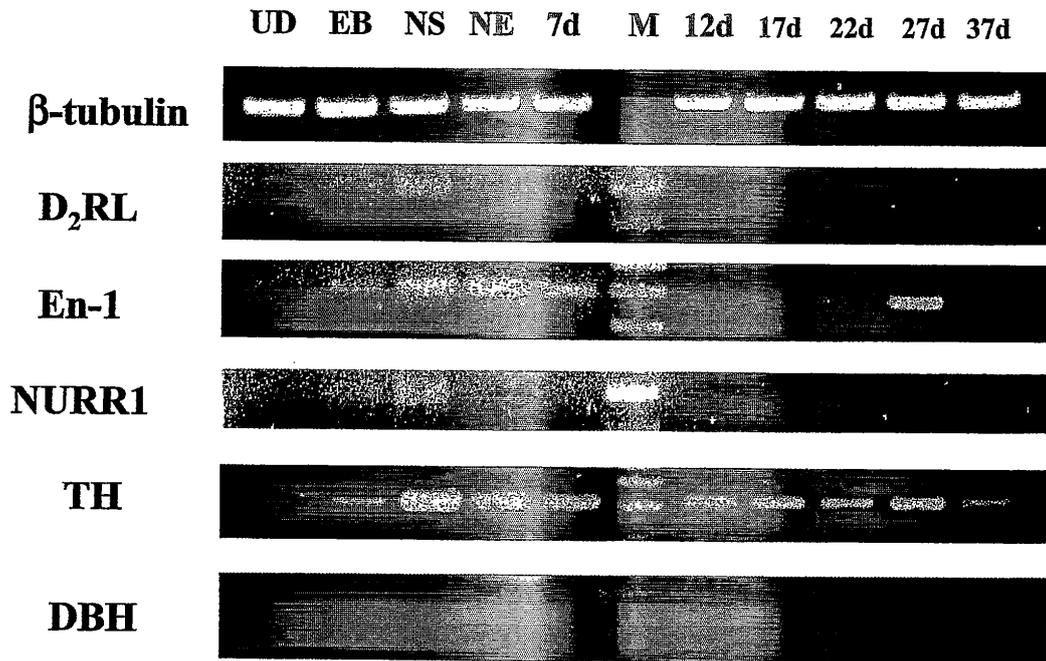
NCAM 농축 세포로부터 얻은 신경세포 집단의 정량 분석
 티로신 수산화효소 양성 세포는 60% 인것으로 밝혀졌다.

도면11



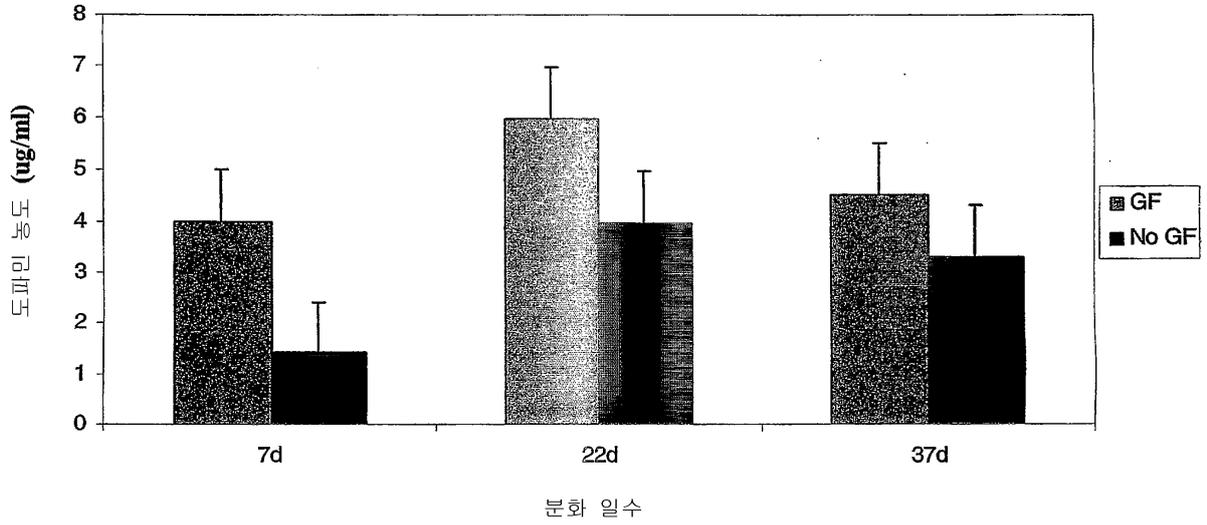
네스틴 확장 및 분화로부터 얻은 신경세포 집단의 정량 분석
 티로신 수산화효소 양성 세포는 40%인 것으로 밝혀졌다.

도면12



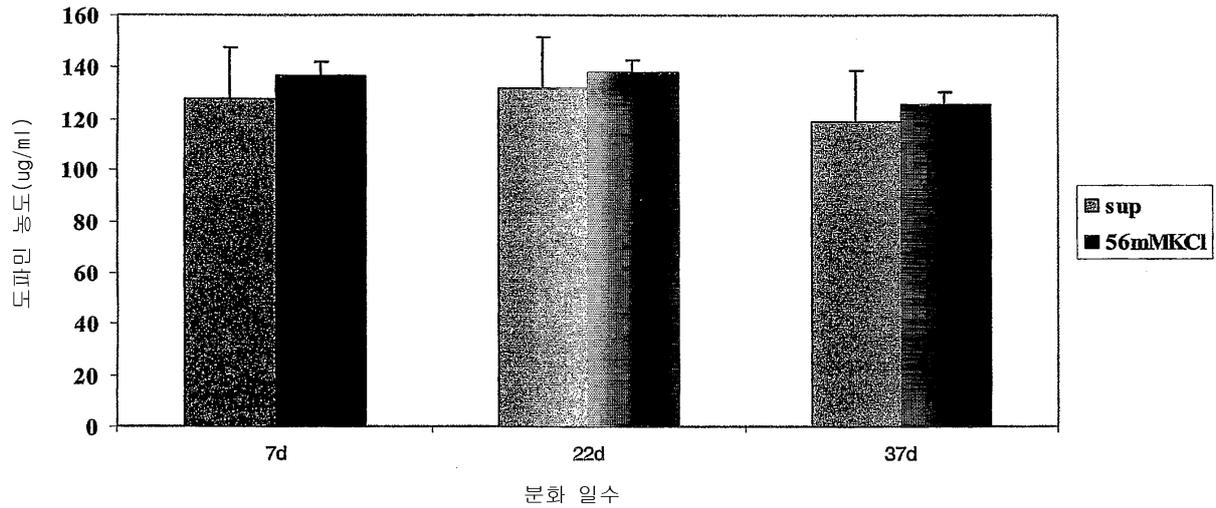
ES 유래 신경세포에서의 도파민 특이적 유전자의 발현

도면13



세포 용해물중의 세포내 도파민 분석

도면14



KCl 로 유발된 조정배지에서의 도파민 방출