



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0011761
(43) 공개일자 2018년02월02일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) G01N 15/14 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/84 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
G01N 33/5005 (2013.01)
G01N 15/14 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7030540</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년03월23일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년10월23일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/023839</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/154357
국제공개일자 2016년09월29일</p> <p>(30) 우선권주장
62/136,660 2015년03월23일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
아스텔라스 인스티튜트 포 리제너러티브 메디슨
미국 01752 매사추세츠주 말보로우 로크 드라이브 33</p> <p>(72) 발명자
클리멘스카야 이리나 브이
미국 01568 매사추세츠주 업톤 메카닉 스트리트 75
카슨 줄리 캐서린
미국 01760 매사추세츠주 나티크 커먼 스트리트 25 아파트먼트 2
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
김진희, 김태홍</p> |
|---|--|

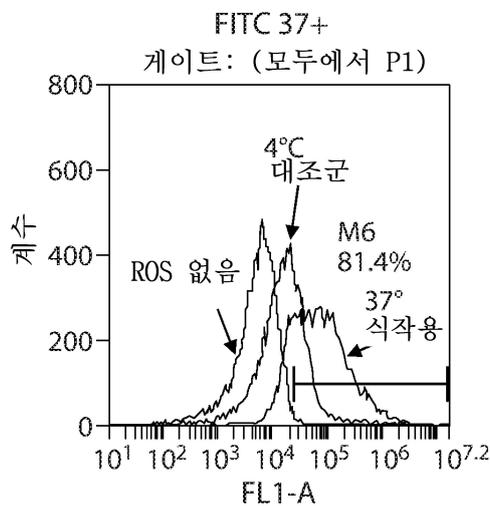
전체 청구항 수 : 총 73 항

(54) 발명의 명칭 인간 망막 색소 상피(RPE) 세포 및 광수용체 전구 세포의 효능에 대한 개선된 검정법

(57) 요약

본 발명은 pH 민감성 형광 표지를 사용하여 RPE 세포 및 광수용체 전구 세포의 기능을 테스트하기 위한 새로운 식작용(phagocytosis) 검정법을 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 21/6486 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

G01N 33/84 (2013.01)

G01N 2800/164 (2013.01)

(72) 발명자

게이 로저

미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 윌리 로드 18

이바노바 요르단카 기코바

미국 01566 매사추세츠주 스티브리지 그래스하퍼
레인 4

명세서

청구범위

청구항 1

세포가 광수용체 외분절(POS; photoreceptor outer segment)을 식작용하기에 충분한 온도에서 충분한 시간 동안 상기 세포를 POS와 함께 인큐베이션하는 단계로서, POS는 더 높은 pH에서보다 산성 pH에서 더 많은 형광을 내는 것인 단계, 및

인큐베이션 후 상기 세포의 형광 강도를 검출하는 단계로서, 대조군과 비교하여 형광의 증가는 상기 세포에 의한 POS의 식작용을 나타내는 것인 단계

를 포함하는, 식작용 활성을 평가하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포를 약 실온 내지 약 37°C, 또는 약 실온 내지 약 40°C 범위의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 세포를 약 실온, 약 생리학적 온도, 또는 약 37°C에서 POS와 함께 인큐베이션하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 약 16 내지 20시간 동안 POS와 함께 인큐베이션하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 세포 배양물로서 제공되는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 융합성(confluent) 세포 배양물인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 RPE 세포인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 인간 RPE 세포인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 광수용체 전구 세포인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 인간 광수용체 전구 세포인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, POS가 pHrodo[®] Red 염료로 표지되는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군이 실온보다 낮은 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된 세포인

방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군이 4℃에서 POS와 함께 인큐베이션된 세포인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 형광을 유세포분석에 의해 검출하는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 형광을 플레이트 판독기를 사용하여 검출하는 것인 방법.

청구항 16

세포 외에 존재할 때의 형광 신호와 비교하여, 세포 내 저 pH 구획 내로 식작용에 의해 내재화될 경우 변경된 형광 신호를 갖는 형광 표지로 표시된 광수용체 외분질(POS)을 제공하는 단계;

표지된 POS의 식작용을 허용하는 조건 하에 테스트 세포를 상기 표시된 POS와 함께 인큐베이션하는 단계; 및

표지된 POS와의 인큐베이션 후 테스트 세포에 변경된 형광이 존재한다면 그 형광을 검출하고, 그로부터 테스트 세포의 식작용 활성을 정량화하는 단계

를 포함하는, 식작용 활성을 평가하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 변경된 형광 신호가, 형광 표지가 세포 외에 존재할 때와 비교하여 형광 신호 강도의 증가인 방법.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 변경된 형광 신호가 유세포분석에 의해 검출 가능한 것인 방법.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 변경된 형광 신호가, 식작용에 의해 내재화된 표지된 POS와, 테스트 세포의 표면 상에 결합되었으나 내재화되지 않은 표지된 POS를 구별하는 것인 방법.

청구항 20

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 테스트 세포의 식작용 활성을 정량화하기 위해, 테스트 세포에서 검출되는 변경된 형광 신호를, 표지된 POS와 함께 인큐베이션된 대조군 세포 집단과 비교하는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 대조군 세포 집단을 실온보다 낮은 온도에서, 표지된 POS와 함께 인큐베이션하는 것인 방법.

청구항 22

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 테스트 세포가 망막 색소 상피(RPE; retinal pigmented epithelial) 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 테스트 세포가 광수용체 전구 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 테스트 세포가 인간 세포인 방법.

청구항 25

제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 테스트 세포가 만능 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 생성되는 것인 방법.

청구항 26

제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 테스트 세포가 동결보존되고, 사용 전에 해동되는 것인 방법.

청구항 27

제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 형광 표지가 pHrodo[®] Red인 방법.

청구항 28

제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, POS가 pHrodo[®] Red 및 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자(*E. coli* BioParticles)로 표시되는 것인 방법.

청구항 29

테스트 세포 집단의 식작용 활성을 평가하기 위한 표시된 광수용체 외분질(POS) 조제물로서, 상기 POS는, 형광 표지가 세포 외에 존재할 때의 형광 신호와 비교하여, 세포 내 저 pH 구획 내로 식작용에 의해 내재화될 경우 변경된 형광 신호를 갖는 형광 표지로 표시되는 것인, 표시된 광수용체 외분질(POS) 조제물.

청구항 30

제29항에 있어서, 변경된 형광 신호가, 형광 신호가 세포 외에 존재할 때와 비교하여 형광 신호 강도의 증가인 조제물.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 변경된 형광 신호가 유세포분석에 의해 검출 가능한 것인 조제물.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 형광 표지가 pHrodo[®] Red인 조제물.

청구항 33

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, POS가 pHrodo[®] Red 및 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자로 표시되는 것인 조제물.

청구항 34

세포 집단의 식작용 활성을 측정하는 방법으로서,

비-FITC 형광 표시된 광수용체 외분질(POS)과 접촉된 테스트 세포 집단에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및 측정된 테스트 형광을 대조군 형광과 비교하는 단계를 포함하며,

상기 비-FITC 형광 표시된 POS는 산성 pH에서는 형광을 내지만 더 높은 pH에서는 형광을 내지 않거나 최소한으로 형광을 내는 것인, 세포 집단의 식작용 활성을 측정하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 테스트 세포 집단을 약 실온 내지 약 생리학적 온도, 또는 약 실온 내지 약 40°C 범위의 온도에서 비-FITC 형광 표시된 POS와 접촉시키는 것인 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 대조군 형광이 실온보다 낮은 온도에서 비-FITC 형광 표시된 POS와 접촉된 세포 집단의 형광

인 방법.

청구항 37

제34항에 있어서, 테스트 세포 집단을 약 15℃ 내지 40℃의 온도, 또는 약 생리학적 온도에서 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉시키는 것인 방법.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군 형광이 4℃에서 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉된 세포 집단의 형광인 방법.

청구항 39

식작용 활성을 측정하는 방법으로서,

(1) 약 실온 내지 약 생리학적 온도, 또는 약 실온 내지 약 40℃ 범위의 온도에서, pHrodo[®] Red 염료로 표지된 형광 표지된 광수용체 외분질(POS)과 함께 인큐베이션된 세포 집단의 제1 분액(aliquot)에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및

(2) 실온보다 낮은 온도에서, pHrodo[®] Red 염료로 표지된 형광 표지된 POS와 함께 인큐베이션된 세포 집단의 제2 분액에서 대조군 형광을 측정하는 단계

를 포함하며,

대조군 형광보다 더 큰 테스트 형광은 세포 집단의 식작용 활성을 나타내는 것인 식작용 활성을 측정하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 세포 집단이 RPE 세포 집단인 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 세포 집단이 광수용체 전구 세포 집단인 방법.

청구항 42

식작용 활성을 측정하는 방법으로서,

(1) 약 실온 내지 약 생리학적 온도, 또는 약 실온 내지 약 40℃ 범위의 온도에서, pHrodo[®] Red로 표지된 광수용체 외분질(POS) 단독과 함께, 또는 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자와 함께 인큐베이션된 세포 집단의 제1 분액에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및

(2) 실온보다 낮은 온도에서, pHrodo[®] Red로 표지된 광수용체 외분질(POS) 단독과 함께, 또는 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자와 함께 인큐베이션된 세포 집단의 제2 분액에서 대조군 형광을 측정하는 단계

를 포함하며,

대조군 형광보다 더 큰 테스트 형광은 세포 집단의 식작용 활성을 나타내는 것인 식작용 활성을 측정하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 세포 집단이 RPE 세포 집단인 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 세포 집단이 인간 RPE 세포 집단인 방법.

청구항 45

제42항에 있어서, 세포 집단이 광수용체 전구 세포 집단인 방법.

청구항 46

제42항에 있어서, 세포 집단이 인간 광수용체 전구 세포 집단인 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단이 사용 전 효소 분해된 것인 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단이 부착 세포 집단으로서 제공되는 것인 방법.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, POS가 단편화된 POS인 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, POS가 초음파처리된 POS인 방법.

청구항 51

세포 집단의 식작용 활성을 평가하는 방법으로서,

부착 세포 집단의 세포가 광수용체 외분절(POS)을 식작용하기에 충분한 온도에서 충분한 시간 동안 상기 세포 집단을 POS와 함께 인큐베이션하는 단계로서, 상기 POS는 더 높은 pH에서보다 산성 pH에서 더 많은 형광을 내는 것인 단계, 및

인큐베이션 후 상기 세포 집단의 형광 강도를 검출하는 단계로서, 대조군과 비교하여 형광의 증가는 세포에 의한 POS의 식작용을 나타내는 것인 단계

를 포함하며, 경우에 따라, 상기 세포 집단은 단일층, 추가로 경우에 따라 융합성 단일층으로서 제공되는 것인, 세포 집단의 식작용 활성을 평가하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 약 17℃ 내지 40℃, 또는 약 25℃ 내지 40℃, 또는 약 34℃ 내지 40℃ 범위의 온도, 또는 약 37℃의 온도에서 세포 집단을 POS와 함께 인큐베이션하는 것인 방법.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 세포가 RPE 세포 또는 광수용체 전구 세포인 방법.

청구항 54

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 인간 세포인 방법.

청구항 55

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, POS가 pHrodo[®] Red 염료로 표지되는 것인 방법.

청구항 56

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군이 약 12℃ 내지 15℃의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된 세포 집단인 방법.

청구항 57

제51항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 플레이트 판독기를 사용하여 형광을 검출하는 것인 방법.

청구항 58

세포 외에 존재할 때의 형광 신호와 비교하여, 세포 내 저 pH 구획 내로 식작용에 의해 내재화될 경우 변경된 형광 신호를 갖는 형광 표지로 표지된 광수용체 외분질(POS)을 제공하는 단계;

표지된 POS의 식작용을 허용하는 조건 하에 약 17°C 내지 40°C 범위의 온도에서 부착 테스트 세포를 상기 표지된 POS와 함께 인큐베이션하는 단계; 및

표지된 POS와의 인큐베이션 후 부착 테스트 세포에 변경된 형광이 존재한다면 그 형광을 검출하고, 그로부터 부착 테스트 세포의 식작용 활성을 정량화하는 단계

를 포함하는, 식작용 활성을 평가하는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 약 25°C 내지 40°C, 또는 약 34°C 내지 40°C 범위의 온도, 또는 약 37°C의 온도에서, 부착 테스트 세포를 표지된 POS와 함께 인큐베이션하는 것인 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 부착 테스트 세포의 식작용 활성을 정량화하기 위해, 약 12°C 내지 15°C 범위의 온도에서, 표지된 POS와 함께 인큐베이션된 대조군 세포 집단을 부착 테스트 세포에서 검출된 변경된 형광 신호와 비교하는 것인 방법.

청구항 61

제58항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 부착 테스트 세포가 망막 색소 상피(RPE) 세포 또는 광수용체 전구 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제58항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 부착 테스트 세포가 인간 세포인 방법.

청구항 63

제58항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 부착 테스트 세포가 만능 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 생성되는 것인 방법.

청구항 64

제58항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 형광 표지가 pHrodo[®] Red인 방법.

청구항 65

제58항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, POS가 pHrodo[®] Red 및 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자로 표지되는 것인 방법.

청구항 66

부착 세포 집단에서 식작용 활성을 측정하는 방법으로서,

비-FITC 형광 표지된 광수용체 외분질(POS)과 접촉된 부착 테스트 세포 집단에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및

측정된 테스트 형광을 대조군 형광과 비교하는 단계

를 포함하며,

비-FITC 형광 표지된 POS는, 산성 pH에서는 형광을 내지만 더 높은 pH에서는 형광을 내지 않거나 최소한으로 형광을 내는 것인, 부착 세포 집단에서 식작용 활성을 측정하는 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 약 17℃ 내지 40℃, 또는 약 25℃ 내지 40℃, 또는 약 34℃ 내지 40℃ 범위의 온도, 또는 약 37℃의 온도에서 테스트 세포 집단을 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉시키는 것인 방법.

청구항 68

제66항 또는 제67항에 있어서, 대조군 형광이 약 12℃ 내지 15℃의 온도에서 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉된 부착 세포 집단의 형광인 방법.

청구항 69

식작용 활성을 측정하는 방법으로서,

(1) 약 17℃ 내지 40℃, 또는 약 25℃ 내지 40℃, 또는 약 34℃ 내지 40℃ 범위의 온도, 또는 약 37℃의 온도에서, pHrodo[®] Red 염료로 표지된 형광 표지된 광수용체 외분질(POS)과 함께 인큐베이션된 부착 세포 집단의 제1 분액에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및

(2) 약 12℃ 내지 15℃ 범위의 온도에서, pHrodo[®] Red 염료로 표지된 형광 표지된 POS와 함께 인큐베이션된 부착 세포 집단의 제2 분액에서 대조군 형광을 측정하는 단계

를 포함하며,

대조군 형광보다 더 큰 테스트 형광은 세포 집단의 식작용 활성을 나타내는 것인 식작용 활성을 측정하는 방법.

청구항 70

식작용 활성을 측정하는 방법으로서,

(1) 약 17℃ 내지 40℃, 또는 약 25℃ 내지 40℃, 또는 약 34℃ 내지 40℃ 범위의 온도, 또는 약 37℃의 온도에서, pHrodo[®] Red로 표지된 광수용체 외분질(POS) 단독과 함께, 또는 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자와 함께 인큐베이션된 부착 세포 집단의 제1 분액에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및

(2) 약 12℃ 내지 15℃ 범위의 온도에서, pHrodo[®] Red로 표지된 광수용체 외분질(POS) 단독과 함께, 또는 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자와 함께 인큐베이션된 부착 세포 집단의 제2 분액에서 대조군 형광을 측정하는 단계

를 포함하며,

대조군 형광보다 더 큰 테스트 형광은 세포 집단의 식작용 활성을 나타내는 것인 식작용 활성을 측정하는 방법.

청구항 71

제51항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단이 사용 전에 효소 분해된 것인 방법.

청구항 72

제51항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, POS가 단편화된 POS인 방법.

청구항 73

제51항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, POS가 초음파처리된 POS인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[관련 출원]

[0001]

[0002]

본 출원은 2015년 3월 23일에 출원된 "인간 RPE 세포 및 광수용체 전구 세포의 효능에 대한 개선된 검정법"이라

는 명칭의 미국 가출원 62/136,660에 대해 35 U.S.C. § 119(e)에 따라 이익을 주장하며, 상기 출원은 그 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003] [기술분야]

[0004] 본 발명은 광수용체 간상체 외분절(outer rod segment)의 식작용을 측정하기 위한 시험관내 세포 기반 방법의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 망막 색소 상피(RPE; retinal pigment epithelium)는 아래의(underlying) 맥락막(choroid)(망막 뒤에 있으며 혈관이 존재하는 층)과 위의(overlying) 망막 시세포(예를 들어, 광수용체 - 간상체(rod) 및 추상체(cone)) 사이에서, 감각신경 망막의 외부에 존재하는 유색(pigmented) 세포층이다. RPE는 광수용체 및 망막의 기능 및 건강에 중요하다. RPE는 광색소를 재생시키고, 비타민 A를 전달, 대사 및 저장하고, 간상체 광수용체 외분절을 포식하고, 망막과 맥락막 사이에서 철 및 소분자(small molecule)를 수송하고, 부르크 막(Bruch's membrane)을 유지시키고, 미광(stray light)을 흡수하여, 보다 우수한 이미지 분해를 가능하게 함으로써, 광수용체 기능을 유지한다. 예를 들어, WO 2009/051671; 문헌[Engelmann and Valtink(2004) "RPE Cell Cultivation." Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 242(1): 65-67]; [Irina Klimanskaya, *Retinal Pigment Epithelium Derived From Embryonic Stem Cells*, in Stem Cell Anthology 335-346(Bruce Carlson ed., 2009)]을 참조한다.

[0006] RPE의 변성은, 맥락막 결손증(choroideremia), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 황반 변성(macular degeneration)(노화 관련 황반 변성, AMD(age-related macular degeneration) 포함) 및 스타가르트 황반 이영양증(SMD; Stargardt's macular dystrophy)과 같이 광수용체 손상 및 실명을 초래하는 다수의 시력을 바꾸는 병(vision-altering ailment)들과 연관이 있는 망막 박리, 망막 이형성(retinal dysplasia) 또는 망막 위축증(retinal atrophy)을 유발할 수 있으며, 상기 황반 변성 및 스타가르트 황반 이영양증은 전세계적으로 각각 성인 및 청소년의 실명의 주된 원인이다. 상기 질병 둘 다 현재로서는 치료 불가능하긴 하지만, 황반 변성의 예비 임상 모델에서, hESC 유래의 RPE의 이식이 광수용체를 구제하고 시력 상실을 예방할 수 있다는 증거가 존재한다 (문헌[Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, et al. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic rats. *Cloning and Stem Cells* 2006; 8,189-199]; [Lu B, Malcuit C, Wang S, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 2009; 21, 2125-2135]).

[0007] 또한, 체세포분열 후(post-mitotic) 신경 세포의 부가적인 손실이 상기 언급된 질병들 중 일부에 기여한다. 이들 망막 질병 중에는, 간상체 또는 추상체 이영양증, 망막 변성, 색소성 망막염(RP; retinitis pigmentosa), 당뇨병성 망막증, 황반 변성, 레베르 선천성 흑암시(Leber congenital amaurosis) 및 스타가르트 질병이 있다. 망막 변성의 대부분의 사례에서, 세포 손실은 주로, 간상체 및 추상체 광수용체를 포함하는 외부 핵 층(ONL; outer nuclear layer)에 존재한다.

[0008] 광수용체 세포의 잠재적인 대체 공급원은 줄기 세포를 포함한다. 초기 연구들은 마우스 세포, 마우스 줄기 세포, 또는 망막 전구 세포들의 불균질 집단을 상실된 광수용체에 대한 가능한 대체 세포 공급원으로서 평가하였다. 이들 초기 연구들은 출생 후 제1 일 마우스 망막 유래의 광수용체 전구체 세포의 이식(문헌[Maclaren *et al.* *Nature* 444(9):203-207, 2006]), 마우스 배아 줄기 세포 유래의 망막 전구체 세포의 시험관내 발생(문헌 [Ikeda *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(32):11331-11336, 2005]), 출생 후 제1 일 마우스 망막 유래의 망막 전구 세포의 발생(문헌[Klassen *et al.* *Invest. Ophthal. Vis. Sci.* 45(11):4167-4175, 2004]), 망막 변성의 RCS 래트 모델에서 골수 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell)의 이식(문헌[Inoue *et al.* *Exp. Eye Res.* 8(2):234-241, 2007]), H1 인간 배아 줄기 세포주로부터 신경절 세포, 무축삭 세포, 총 세포의 0.01%가 S-옵신 또는 로돕신을 발현한 광수용체, 쌍극 세포 및 수평 세포를 포함하는 망막 전구 세포의 생성(문헌[Lamba *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10(34):12769-12774, 2006]) 및 인간 섬유아세포로부터 망막 전구 세포를 생성하기 위한, 유도 만능 줄기 세포(iPS; induced pluripotent stem cell)의 유도(문헌[Lamba *et al.* *PLoS ONE* 5(1):e8763. doi:10.1371/ journal.pone.0008763])를 기재하였다. 이들 접근법 중 어느 것도, 이식용의 광수용체 전구 세포 또는 광수용체 세포의 균질한 집단을 생성하지 못하였다. 이들 접근법 중 어느 것도, 생체내 간상체 또는 추상체 기능(예를 들어, 시력(visual acuity)의 개선을 부여함으로써 검출 가능함)을 나타낸 광수용체 전구 세포 또는 광수용체 세포의 균질한 집단을 생성하지 못하였다. 광수용체 및 광수용체 전구 세포가 단리될 수 있는 공여자 유래 조직의 공급원(예컨대, 카데바, 태아 조직 및 살아 있는 동물)은 한정되어 있다. 줄기 세

포는 시험관내에서 무한정으로 증식 및 확장되어, 인간 치료법을 위한 비공여자 유래 세포의 잠재적으로 무궁무진한 공급원을 제공할 수 있다. 줄기 세포를 광수용체 전구 세포 또는 광수용체로 구성된 균질한 집단으로 분화시키는 것은, 이식 및 망막 질병 치료용 비공여자 유래 세포의 풍부한 공급을 제공할 수 있다. 광수용체 전구 세포는 식작용 활성을 가질 수 있다.

[0009] RPE 세포의 제조 방법, RPE 세포의 조성물, 및 RPE 세포에 대한 방출 검정법(식작용 검정법 포함)을 포함한 소정의 주제들은 2010년 11월 17일에 출원된 공유(co-owned) 미국 출원 13/510,426 및 PCT US2012/65091에 개시되어 있으며, 이러한 교시는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 광수용체 전구 세포의 제조 방법, 광수용체 전구 세포의 조성물, 및 기능 테스트 방법(식작용 검정법 포함)을 포함한 소정의 주제들은 공유 PCT US2014/029790에 개시되어 있으며, 이러한 교시는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

발명의 내용

[0010] FITC로 표지된 광수용체 외분절(OS)(통상 소 또는 패지)은 시험관내에서 망막 색소 상피(RPE)에 의한 식작용을 연구하는 데 사용되어 왔다. 그러나, 식작용 평가(FACS, 형광 플레이트 판독기)에 사용된 대부분의 정량적 방법들은 표면에 결합된 입자와 내재화된(internalized) 입자 사이를 구별하지 못하므로, 당업자는 식작용의 표면 수용체 결합 및 내재화 단계에 관여하는 메커니즘을 구체적으로 말하지 못한다. 또한, FITC 형광은 pH 민감성이고 pH 6 미만에서 상당히 감소되는 한편, 리소좀, 및 리소좀과 융합된 식포(phagosome)의 pH는 5 미만이다. 따라서, FITC로 표지된 OS의 형광은 사실상, 내재화된 OS의 양을 대표하지 않을 수 있다.

[0011] 본 발명은 망막 질병, 예컨대 간상체 또는 추상체 이영양증, 망막 변성, 색소성 망막염, 맥락막 결손증, 당뇨병성 망막증, 황반 변성(노화 관련 황반 변성 및 근시성 황반 변성(myopic macular degeneration) 포함), 레베르 선천성 흑암시 및 스타가르트 질병(노란점 안저(fundus flavimaculatus))의 치료에 사용되는, 광수용체 외분절의 내재화된 식작용을 검출하기 위한 보다 민감하고 정확한 검정법, RPE 세포 및 광수용체 전구 세포 기능의 중요한 측정, 및 결과적으로 RPE 세포 및 광수용체 전구 세포에 대한 중요한 방출 기준을 제공한다. 예를 들어, WO 2009/051671을 참조한다.

[0012] 본원에 기재된 RPE 세포는 이식 후 기능성이다. 이를 위해, RPE 세포는 이식된 세포를 수여받은 피험자(또는 환자)에서 감각신경 망막과 맥락막 사이에서 단일층을 형성한다. RPE 세포는 또한, 인접한 광수용체에 영양분을 공급할 수 있고, 탈락된(shed) 광수용체 외분절을 식작용에 의해 폐기할 수 있다.

[0013] 이식에 적합한 RPE 세포는 비제한적으로 식작용 활성을 포함한 다수의 기능적 및/또는 표현형 특징들을 기반으로 선택될 수 있다. 예를 들어, 이식에 적합한 RPE 세포들은 이들의 식작용 활성뿐만 아니라 이들의 증식 잠재성에 따라 평가될 수 있다. 예를 들어, RPE 세포는 안구 공여자로부터 유래된 세포보다 더 큰 증식 잠재성을 가질 수 있다(예를 들어, RPE 세포는 안구 공여자의 세포보다 "더 젊다"). 이로써, 본원에 기재된 RPE 세포는 안구 공여자로부터 유래된 세포보다 더 긴 유용 수명(useful lifespan)을 가질 수 있다.

[0014] 임상적 맥락에서 RPE 세포 효능에 대한 주요 파라미터들 중 하나는 RPE 세포의 약학적 조제물의 외분절 식작용 활성의 정량적 측정이다. 외분절의 식작용은 포식된 세포 단편들이 RPE 세포 내 저 pH 구획에 축적되게 한다. 본 발명은 분광광도적 신호를 제공하기 위해, 분광광도적으로 검출될 수 있는 검출 가능한 마커와 (즉, 공유 또는 비공유) 연관된 광수용체 외분절을 제공하며, 이러한 검출 가능한 마커는 중성 pH 또는 생리학적 pH, 즉 pH 7 내지 pH 7.5에 존재하는 경우 제1 분광광도적 신호를 갖고, 세포내 구획 중 낮은 pH 환경, 예컨대 리소좀, 식포, 엔도솜 등에 존재하는 경우 제2 분광광도적 신호를 갖는 데 선택적이다. 제1 분광광도적 신호와 제2 분광광도적 신호 사이의 차이는 형광 방출도(중성 pH와 비교하여 낮은 pH에서 증가된 강도), 중성 pH와 낮은 pH 사이에서 형광 방출 파장의 변화, 중성 pH와 낮은 pH 사이에서 형광 여기 파장의 변화 등 중 하나 이상일 수 있다.

[0015] 특정 실시형태에서, 검출 가능한 마커는 형광 pH 센서, 예컨대 형광 염료일 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 예시적인 형광 염료는 pH 민감성 지시약 모이어티로서 아미노기(지방족 또는 방향족)를 가진 형광 염료 모이어티일 수 있으며, 즉, RPE 세포 및 외분절이 함께 인큐베이션되는 배양 배지의 pH(즉, 중성 pH 또는 생리학적 pH)에서는 비양자화(unprotonated)되어 있으며, 외분절이 식작용에 의해 세포, 예컨대 RPE 세포에 의해 흡수되는 세포내 구획의 pH에서 양자화되는 아민일 수 있다. 이러한 염료가 광자를 흡착하여, 여기된 전자 상태를 만드는 경우, 아미노기의 비공유 전자쌍의 전자가 여기에 의해 비워진(vacated) 오비탈로 이동한다. 광유도 전자 이동(PET; Photoinduced Electron Transfer)으로 지칭되는 이러한 전자 이동은 여기된 분자가 방출 전이(emission transition)하지 않도록 하여, 염료의 형광이 소멸된다. 아미노기의 양자화는 전자쌍의 오비탈의 성질 및 에너지를 변화시키고, PET를 중단시킨다. 그 결과, 형광 리포터 모이어티는 pH 변화에 반응한다. 아미노

기의 양자화가 소멸을 취소시키기 때문에, PET 기반 센서는 pH가 감소함에 따라 더욱 형광을 띠게 된다.

- [0016] 특정 실시형태에서, 형광 염료는 예컨대 WO 2005/098437에 기재된 로다민 기반 pH 민감성 염료이다. 이들 염료는 -OH 또는 -SH(또는 이들의 탈양자화된 형태)에 의해 크산텐 모이머티에 대해 오르토 치환된 벤젠 고리를 가진다. 이들 염료는 아민 PET 지시약과 유사한 pH 의존성을 나타내지만, pH 6 미만의 세포 구획을 표적으로 할 pH 센서에 대한 인지된 필요성을 기반으로 6 미만의 pKa 값을 갖도록 디자인되었다.
- [0017] 또 다른 예시적인 실시형태에서, 형광 마커는 pH 민감성 형광 나노입자이다. pH 민감성 형광 나노입자는 주로, 소분자(small molecular) pH 민감성 염료와 컨쥬게이트된 중합체를 이용하거나(문헌[Srikun, D., J. Chem. Sci. 2011, 2, 1156; Benjaminsen, R. V., ACS Nano 2011, 5, 5864]; [Albertazzi, L., J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 18158; Urano, Y., Nat. Med. 2009, 15, 104]), pH 둔감성 염료를 컨쥬게이트하기 위해 pH 민감성 링커의 사용을 이용한다(문헌[Li, C, Adv. Fund. Mater. 2010, 20, 2222]; [Almutairi, J. Am. Chem. Soc. 2007, 130, 444]). 더 예시하기 위해, WO 2013152059는 본 검정법에 이용하도록 개조될 수 있는 pH 조정성의 고도로 활성화 가능한 다색 형광 나노플랫폼을 기재하고 있다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 일 양태에서, 세포가 광수용체 외분절(POS)을 식작용하기에 충분한 온도에서 충분한 시간 동안 상기 세포를 POS와 함께 인큐베이션하는 단계, 및 인큐베이션 후 상기 세포의 형광 강도를 검출하는 단계를 포함하는, 식작용 활성을 평가하는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 POS는 더 높은 pH에서보다 산성 pH에서 더 많은 형광을 내고, 대조군과 비교하여 형광의 증가는 세포에 의한 POS의 식작용을 나타낸다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 세포는 약 실온 내지 약 37°C, 또는 약 실온 내지 약 40°C 범위의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된다. 일부 실시형태에서, 세포는 약 실온에서, 약 생리학적 온도에서 또는 약 37°C에서 POS와 함께 인큐베이션된다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 대조군은 실온보다 낮은 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된다. 일부 실시형태에서, 대조군은 4°C에서 POS와 함께 인큐베이션된다.
- [0021] 본 발명은 또한, 부착 세포 집단이 광수용체 외분절(POS)을 식작용하기에 충분한 온도에서 충분한 시간 동안 상기 세포 집단을 POS와 함께 인큐베이션하는 단계, 및 인큐베이션 후 상기 세포 집단의 형광 강도를 검출하는 단계를 포함하는, 부착 세포 집단의 식작용 활성을 평가하는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 POS는 더 높은 pH에서보다 산성 pH에서 더 많은 형광을 내고, 대조군과 비교하여 형광의 증가는 세포에 의한 POS의 식작용을 나타낸다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 부착 세포 집단은 약 17°C 내지 40°C, 또는 약 25°C 내지 40°C, 또는 약 34°C 내지 40°C 범위의 온도, 또는 약 37°C의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된다. 일부 실시형태에서, 대조군은 약 10°C 내지 약 16°C의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된다. 일부 실시형태에서, 대조군은 약 12°C 내지 15°C의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된다.
- [0023] 본 발명은 또한, 세포 외에(extracellularly) 존재할 때의 형광 신호와 비교하여, 세포 내 저 pH 구획 내로 식작용에 의해 내재화될 경우 변경된 형광 신호를 갖는 형광 표지로 표지된 광수용체 외분절(POS)을 제공하는 단계; 표지된 POS의 식작용을 허용하는 조건 하에 테스트 세포를 상기 표지된 POS와 함께 인큐베이션하는 단계; 및 표지된 POS와의 인큐베이션 후 테스트 세포에 변경된 형광이 존재한다면 그 형광을 검출하고, 그로부터 테스트 세포의 식작용 활성을 정량화하는 단계를 포함하는, 식작용 활성을 평가하는 방법을 제공한다.
- [0024] 일부 실시형태에서, (표지가 식작용에 의해 저 pH 구획 내로 내재화될 경우) 변경된 형광 신호는, 형광 표지가 세포 외에 존재할 때와 비교하여 형광 신호 강도의 증가이다. 일부 실시형태에서, (표지가 식작용에 의해 저 pH 구획 내로 내재화될 경우) 변경된 형광 신호는 유세포분석에 의해 검출 가능하다. 일부 실시형태에서, 변경된 형광 신호는, 식작용에 의해 내재화된 표지된 POS와 테스트 세포의 표면 상에 결합되었으나 내재화되지 않은 표지된 POS를 구별한다. 일부 실시형태에서, 테스트 세포의 식작용 활성을 정량화하기 위해, 테스트 세포에서 검출되는 변경된 형광 신호는 표지된 POS와 함께 인큐베이션된 대조군 세포 집단과 비교된다.
- [0025] 일부 실시형태에서, 테스트 세포는 약 실온, 약 생리학적 온도, 약 37°C, 약 15°C 내지 약 40°C, 또는 실온 내지 37°C, 또는 실온 내지 40°C에서, 표지된 POS와 함께 인큐베이션된다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 대조군 세포 집단은 약 4°C를 포함하여 실온보다 낮은 온도에서, 표지된 POS와 함께 인큐베이션된다.
- [0027] 본 발명은 또한, 세포 외에 존재할 때의 형광 신호와 비교하여, 세포 내 저 pH 구획 내로 식작용에 의해 내재화

될 경우 변경된 형광 신호를 갖는 형광 표지로 표지된 광수용체 외분질(POS)을 제공하는 단계; 표지된 POS의 식작용을 허용하는 조건 하에 부착 테스트 세포를 상기 표지된 POS와 함께 인큐베이션하는 단계; 및 표지된 POS와 인큐베이션 후 부착 테스트 세포에 변경된 형광이 존재한다면 그 형광을 검출하고, 이로부터 부착 테스트 세포의 식작용 활성을 정량화하는 단계를 포함하는, 식작용 활성을 평가하는 방법을 제공한다.

[0028] 일부 실시형태에서, 테스트 세포는 약 17°C 내지 40°C, 또는 약 25°C 내지 40°C, 또는 약 34°C 내지 40°C 범위의 온도, 또는 약 37°C의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된다. 일부 실시형태에서, 부착 테스트 세포의 식작용 활성을 정량화하기 위해, 부착 테스트 세포에서 검출되는 변경된 형광 신호는, 세포의 생존력을 유지시키지만 낮은 식작용을 유도하거나 또는 식작용을 유도하지 않는 온도에서, 표지된 POS와 함께 인큐베이션된 대조군 세포 집단과 비교되며, 경우에 따라 이러한 온도는 약 12°C 내지 15°C의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대조군 세포 집단은 약 10°C 내지 약 16°C의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된다.

[0029] 본 발명은 또한, 테스트 세포 집단의 식작용 활성을 평가하기 위한 표지된 광수용체 외분질(POS) 조제물을 제공하며, POS는 형광 표지가 세포 외에 존재할 때의 형광 신호와 비교하여, 세포 내 저 pH 구획 내로 식작용에 의해 내재화될 경우 변경된 형광 신호를 갖는 형광 표지로 표지된다. 일부 실시형태에서, (표지가 식작용에 의해 저 pH 구획 내로 내재화될 경우) 변경된 형광 신호는, 형광 신호가 세포 외에 존재할 때와 비교하여 형광 신호 강도의 증가이다. 일부 실시형태에서, (표지가 식작용에 의해 저 pH 구획 내로 내재화될 경우) 변경된 형광 신호는 유세포분석에 의해 검출 가능하다. 일부 실시형태에서, 형광 표지는 pHrodo[®] Red이다. 일부 실시형태에서, POS는 pHrodo[®] Red 및 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오파티클(*E. coli* BioParticles)를 사용하여 표지된다.

[0030] 본 발명은 또한, 비-FITC 형광 표지된 광수용체 외분질(POS)과 접촉된 테스트 세포 집단에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및 측정된 테스트 형광을 대조군 형광과 비교하는 단계를 포함하는, 세포 집단의 식작용 활성을 측정하는 방법을 제공하며, 여기서, 비-FITC 형광 표지된 POS는 산성 pH에서는 형광을 내지만 더 높은 pH에서는 형광을 내지 않거나 최소한으로 형광을 낸다.

[0031] 일부 실시형태에서, 테스트 세포 집단은 예를 들어 약 37°C(즉, 약 실온 내지 약 37°C), 또는 약 실온 내지 약 40°C를 포함하여 약 실온 내지 약 생리학적 온도 범위의 온도에서 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 테스트 세포 집단은 예를 들어 약 37°C를 포함하여 약 15°C 내지 약 40°C의 온도, 또는 약 생리학적 온도에서 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 대조군 형광은 실온보다 낮은 온도에서 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉된 세포 집단의 형광이다. 일부 실시형태에서, 대조군 형광은 4°C에서 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉된 세포 집단의 형광이다.

[0032] 본 발명은 또한, 비-FITC 형광 표지된 광수용체 외분질(POS)과 접촉된 부착 테스트 세포 집단에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및 측정된 테스트 형광을 대조군 형광과 비교하는 단계를 포함하는, 부착 세포 집단에서 식작용 활성을 측정하는 방법을 제공하며, 여기서, 비-FITC 형광 표지된 POS는 산성 pH에서는 형광을 내지만 더 높은 pH에서는 형광을 내지 않거나 최소한으로 형광을 낸다.

[0033] 일부 실시형태에서, 테스트 세포 집단은 약 17°C 내지 40°C, 또는 약 25°C 내지 40°C, 또는 약 34°C 내지 40°C 범위의 온도, 또는 약 37°C의 온도에서, 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉된다.

[0034] 일부 실시형태에서, 대조군 형광은 약 12°C 내지 15°C의 온도에서 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉된 부착 세포 집단의 형광이다. 일부 실시형태에서, 대조군 형광은 약 10°C 내지 약 16°C의 온도에서 비-FITC 형광 표지된 POS와 접촉된 부착 세포 집단의 형광이다.

[0035] 본 발명은 또한, (1) 예를 들어 37°C를 포함하여 약 실온 내지 약 생리학적 온도, 또는 약 실온 내지 약 40°C 범위의 온도에서 pHrodo[®] Red 염료로 표지된 형광 표지된 광수용체 외분질(POS)과 함께 인큐베이션된 세포 집단의 제1 분액(aliquot)에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및 (2) 실온보다 낮은 온도에서 pHrodo[®] Red 염료로 표지된 형광 표지된 POS와 함께 인큐베이션된 세포 집단의 제2 분액에서 대조군 형광을 측정하는 단계를 포함하는, 식작용 활성을 측정하는 방법을 제공하며, 여기서, 대조군 형광보다 더 큰 테스트 형광은 세포 집단의 식작용 활성을 나타낸다.

[0036] 본 발명은 또한, (1) pHrodo[®] Red 염료로 표지된 형광 표지된 광수용체 외분질(POS)과 함께 인큐베이션된 부착 세포 집단의 제1 분액에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및 (2) pHrodo[®] Red 염료로 표지된 형광 표지된 POS와 함께 인큐베이션된 부착 세포 집단의 제2 분액에서 대조군 형광을 측정하는 단계를 포함하는, 식작용 활성을 측

정하는 방법을 제공하며, 여기서, 대조군 형광보다 더 큰 테스트 형광은 세포 집단의 식작용 활성을 나타낸다.

- [0037] 일부 실시형태에서, 부착 세포 집단의 제1 분액은 약 17°C 내지 40°C, 또는 약 25°C 내지 40°C, 또는 약 34°C 내지 40°C 범위의 온도, 또는 약 37°C의 온도에서, 표지된 POS와 함께 인큐베이션된다. 일부 실시형태에서, 부착 세포 집단의 제2 분액은 약 10°C 내지 약 16°C, 또는 약 12°C 내지 15°C 범위의 온도에서, 표지된 POS와 함께 인큐베이션된다.
- [0038] 본 발명은 또한, (1) 37°C를 포함하여 약 실온 내지 약 생리학적 온도, 또는 약 실온 내지 약 40°C 범위의 온도에서 pHrodo[®] Red로 표지된 광수용체 외분질(POS) 단독과 함께, 또는 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자와 함께 인큐베이션된 세포 집단의 제1 분액에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및 (2) 4°C를 포함하여 실온보다 낮은 온도에서 pHrodo[®] Red로 표지된 광수용체 외분질(POS) 단독과 함께, 또는 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자와 함께 인큐베이션된 세포 집단의 제2 분액에서 대조군 형광을 측정하는 단계를 포함하는, 식작용 활성을 측정하는 방법을 제공하며, 여기서, 대조군 형광보다 더 큰 테스트 형광은 세포 집단의 식작용 활성을 나타낸다.
- [0039] 본 발명은 또한, (1) 약 17°C 내지 40°C, 또는 약 25°C 내지 40°C, 또는 약 34°C 내지 40°C 범위의 온도, 또는 약 37°C의 온도에서 pHrodo[®] Red로 표지된 광수용체 외분질(POS) 단독과 함께, 또는 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자와 함께 인큐베이션된 부착 세포 집단의 제1 분액에서 테스트 형광을 측정하는 단계, 및 (2) 약 10°C 내지 약 16°C 또는 약 12°C 내지 15°C 범위의 온도에서 pHrodo[®] Red로 표지된 광수용체 외분질(POS) 단독과 함께, 또는 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자와 함께 인큐베이션된 부착 세포 집단의 제2 분액에서 대조군 형광을 측정하는 단계를 포함하는, 식작용 활성을 측정하는 방법을 제공하며, 여기서, 대조군 형광보다 더 큰 테스트 형광은 세포 집단의 식작용 활성을 나타낸다.
- [0040] 다양한 실시형태들이 상기 언급된 양태들 중 임의의 양태 및 모든 양태들에 동일하게 적용된다. 이들은 하기에 언급되어 있다.
- [0041] 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단은 약 실온, 약 생리학적 온도, 또는 약 37°C, 또는 약 실온 내지 약 40°C, 또는 약 실온 내지 약 37°C, 또는 약 15°C 내지 약 40°C에서 POS와 함께 인큐베이션된다. 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단은 약 17°C 내지 40°C, 또는 약 25°C 내지 40°C, 또는 약 34°C 내지 40°C 범위의 온도, 또는 약 37°C의 온도에서, 표지된 POS와 함께 인큐베이션된다.
- [0042] 일부 실시형태에서, 대조군 세포, 대조군 세포 집단, 대조군 테스트 세포 또는 대조군 테스트 세포 집단은 실온보다 낮은 온도, 약 10°C 내지 약 16°C 또는 약 12°C 내지 15°C 범위의 온도, 또는 약 4°C의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된다.
- [0043] 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단은 망막 색소 상피(RPE) 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단은 광수용체 전구 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단은 인간 세포이다.
- [0044] 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단은 만능 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 생성된다.
- [0045] 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단은 동결보존되었고 사용 전 해동되었다.
- [0046] 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단은 융합성(confluent) 단일층으로서 제공된다.
- [0047] 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단은 사용 전 효소 분해된 것이다.
- [0048] 일부 실시형태에서, 세포, 세포 집단, 테스트 세포, 또는 테스트 세포 집단은 부착 세포 집단으로서 제공된다.
- [0049] 일부 실시형태에서, POS는 단편화된 POS이다. 일부 실시형태에서, POS는 초음파처리된 POS이다.
- [0050] 일부 실시형태에서, 형광 표지는 pHrodo[®] Red이다. 따라서, 일부 실시형태에서, POS는 pHrodo[®] Red 염료로 표지된다. 일부 실시형태에서, POS는 pHrodo[®] Red 및 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자로 표지된다. 일부 실시

형태에서, 세포는 pHrodo[®] Red로 표지된 POS 및 pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자와 함께 인큐베이션된다.

- [0051] 일부 실시형태에서, 형광은 유세포분석에 의해 검출된다. 일부 실시형태에서, 형광은 플레이트 판독기를 사용하여 검출된다.
- [0052] 일부 실시형태에서, 세포는 약 15시간 내지 약 30시간, 또는 16시간 내지 20시간, 또는 20시간 내지 28시간 동안 POS와 함께 인큐베이션된다.
- [0053] 일부 실시형태에서, 세포는 세포 배양물로서 제공된다. 일부 실시형태에서, 세포는 융합성 세포 배양물이다.
- [0054] 테스트 세포 및 대조군 세포는 동일한 세포 집단의 상이한 분액들일 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0055] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은, 동일한 수의 1차 세포에 대한 POS의 식작용 속도보다 적어도 50% 더 큰 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도를 가진 것을 특징으로 하는, 단리된 세포 집단을 제공한다. 일부 실시형태에서, 세포 집단은 RPE 세포 집단이다. 일부 실시형태에서, 세포 집단은 만능 줄기 세포의 시험관내 분화에 의해 수득된 RPE 세포 집단이고, 1차 세포는 단리된 성인 안구 유래의 RPE 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포 집단은 광수용체 전구 세포이다.
- [0056] 이들 및 다양한 다른 양태 및 실시형태들은 본원에서 보다 상세히 기재될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1a 내지 도 1c. RPE에 의한 식작용의 FACS 분석. (a) FITC로 표지된 ROS. (b) pHrodo[®]로 표지된 ROS. ROS가 첨가되지 않은 대조군, ROS가 첨가되고 세포가 4°C에서 인큐베이션된 대조군, 및 ROS가 첨가되고 세포가 37°C에서 인큐베이션된 시험군에 대한 플롯들이 도시되어 있다. (c) pHrodo[®]로 표지된 바이오입자(박테리아 단편). 입자가 첨가되지 않은 대조군, 입자가 첨가되고 세포가 4°C에서 인큐베이션된 대조군, 및 입자가 첨가되고 세포가 37°C에서 인큐베이션된 시험군에 대한 플롯들이 도시되어 있다. POS 및 ROS는 본원에서 광수용체 간상체 외분절을 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용되는 것으로 이해되어야 한다.

도 2a 내지 도 2b. FITC (a) 및 pHrodo[®] (b) 표지된 ROS의 형광의 pH 의존성. 중성 pH 및 산성 pH에서의 형광이 도시되어 있다.

도 3a 내지 도 3f. 단일층에서 ARPE19 세포에 의한 형광 표지된 ROS의 식작용의 FACS 분석. 상이한 농도의 형광 표지된 ROS들이 세포 단일층에서 ARPE-19와 함께 24시간 동안 인큐베이션된 경우, 식작용의 용량 의존적 반응이 관찰되지 않았다. (a) 37°C에서 6x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 ARPE-19. (b) 37°C에서 3x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 ARPE-19. (c) 37°C에서 1.5x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 ARPE-19. (d) 15°C에서 6x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 ARPE-19. (e) 15°C에서 3x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 ARPE-19. (f) 15°C에서 1.5x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 ARPE-19. 각각에서, ROS와 함께 인큐베이션되지 않은 세포, 및 ROS와 함께 인큐베이션된 세포에 대한 플롯이 도시되어 있다.

도 4a 내지 도 4f. hESC 유래 RPE 세포에 의한 형광 표지된 ROS의 식작용의 FACS 분석. 상이한 농도의 형광 표지된 ROS들이 세포 단일층에서 RPE와 함께 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션된 경우, 식작용의 용량 의존적 반응이 관찰되지 않았다. 재구성(reconstitution) 동안 형광 표지된 ROS의 감작 초음파처리(pulse sonication)는 식작용을 대략 10%만큼 증가시켰다. (a) 초음파처리 없이 재구성된 3.75x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 RPE 세포. (b) 초음파처리 없이 재구성된 5x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 RPE 세포. (c) 초음파처리 없이 재구성된 7.5x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 RPE 세포. (d) 초음파처리 없이 재구성된 10x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 RPE 세포. (e) 초음파처리와 함께 재구성된 10x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 RPE 세포. (f) 초음파처리와 함께 재구성된 13.5x10⁶개의 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS와 함께 인큐베이션된 RPE 세포.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 식작용(효능 검정법)은 pHrodo[®] Red 염료(Life Technologies, Molecular Probes)로 표지된 광수용체 외분절(POS)에 노출된 RPE 배양물의 정량적 형광 활성화된 세포 소팅(FACS) 분석에 의해 평가될 수 있다.
- [0059] 식작용은 pHrodo[®] Red 염료(Life Technologies, Molecular Probes)로 표지된 POS를 사용하여 FACS 기반 검정법에 의해 평가될 수 있다. 염료 및 표지된 POS는 세포내 식포의 감소된 pH 환경에서 내재화될 경우 형광을 낸다. POS는 본원에 기재된 바와 같이 표지될 수 있다.
- [0060] 일부 실시형태에서, RPE 세포 배양물은 융합성이다. 일례로, 융합성 RPE는 다중웰 플레이트에서 배양될 수 있고, 경우에 따라 CO₂ 독립적 배지(Invitrogen)의 존재 하에, pHrodo[®] Red 염료로 표지된 POS와 함께 인큐베이션될 수 있다. 인큐베이션은 RPE 세포가 POS를 식작용하기에 충분한 임의의 시간 동안 수행될 수 있다. 일례로, 인큐베이션은 16시간 내지 20시간 동안 수행될 수 있다. 검정법은 RPE 세포가 POS를 식작용하기에 충분한 온도에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 검정법은 약 생리학적 온도 또는 약 37°C에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 검정법은 실온에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 대조군(또는 음성 대조군) 플레이트는 4°C에서 인큐베이션된다. 세포는 현미경 하에 검사될 수 있으며, 형광은 플레이트 판독기를 사용하여 측정될 수 있고/있거나 세포는 효소 분해(예를 들어, 트립신 분해) 후 수집된 다음 유세포분석에 의해 분석될 수 있다.
- [0061] 예시적인 비제한적인 검정법은 하기와 같다:
- [0062] 이전에 기재된 바와 같이 만능 줄기 세포(예컨대 비제한적으로 ES 세포 및 iPS 세포)로부터 제작된 RPE의 식작용 능력에 대해 이들 RPE를 테스트한다. 동결보존된 RPE를 이전에 동결한 다음, 사용 전에 해동시킬 수 있다. RPE 세포를 적합한 배지 내 배양물에 접종하고, 융합(confluence)될 때까지 성장시키고, pHrodo[®] Red 염료로 표지된 POS를 식작용하는 이들 세포의 능력에 대해 테스트하기 전에 배양물에 유지시키며, 상기 염료는 RPE 세포의 식포의 산성 환경에 내재화될 경우 형광을 낸다. RPE 세포를 표지된 POS와 함께 37°C에서 인큐베이션하여 식작용을 허용하거나, 음성 대조군으로서 4°C에서 인큐베이션한다. 형광 강도의 시프트(shift)는 37°C에서 인큐베이션된 세포에 대한 유세포분석에 의해 검출될 수 있으며, 이러한 시프트는 표지된 POS의 식작용을 나타낸다. 피크의 통계학적 적분을 통해, RPE 세포 및 인큐베이션 온도의 각각의 로트(lot)에 대한 식작용 양성 세포의 퍼센트를 얻는다.
- [0063] 본 개시내용에 의해 이해되는 바와 같이, 식작용은, RPE 세포를 산성 식포 환경에서 적색 스펙트럼에서 형광을 내는 표지된 POS와 함께 인큐베이션함으로써 검출된다. 식작용 양성 세포의 퍼센트를 유세포분석에 의해 검출된 바와 같이, 37°C 또는 4°C(음성 대조군)에서 인큐베이션된 세포에 대해 나타낼 수 있다.
- [0064] 얻어진 RPE 세포 집단은 본원에 제공된 방법에 따라 이의 식작용 활성을 기초로 특성화될 수 있다. 식작용 속도가 확인될 수 있고, 이로써 RPE 세포가 특성화될 수 있다. 예를 들어, RPE 세포는, 단리된 성인 안구 유래의 동일한 수의 RPE 세포에 대한 POS의 식작용 속도보다 적어도 50% 더 크거나, 단리된 성인 안구 유래의 동일한 수의 RPE 세포에 대한 POS의 식작용 속도보다 적어도 75%, 100%, 150% 또는 200% 더 큰 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도를 가진 것으로 특성화될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, RPE 세포는 24시간 후 총 POS 농도의 적어도 20%, 또는 24시간 후 총 POS 농도의 적어도 25%, 30%, 25%, 40% 또는 50%인 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도에 의해 특성화될 수 있다.
- [0065] 따라서, 본원에 기재된 방법을 사용하여, 단리된 성인(즉, 25세 내지 80세의 인간 성인 환자, 보다 바람직하게는 50세 내지 80세의 성인) 안구 유래의 동일한 수의 RPE 세포에 대한 POS의 식작용 속도보다 적어도 50% 더 크고, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 100%, 150% 또는 심지어 200% 더 큰 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도를 가진 RPE 세포 집단이 달성되어 왔다.
- [0066] 본원에 기재된 방법을 사용하여, 24시간 후 총 POS 농도의 적어도 20%, 보다 바람직하게는 24시간 후 총 POS 농도의 적어도 25%, 30%, 25%, 40% 또는 심지어 50%인 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도를 가진 RPE 세포 집단이 달성되어 왔다.
- [0067] 따라서 일 양태에서, 본 개시내용은 비-FITC 형광 표지된 형광 표지된 광수용체 외분절(POS)과 접촉된 RPE 세포(또는 RPE 세포 집단)에서 형광(테스트 형광 또는 일반적으로 "테스트"로 간주됨)을 검출 또는 측정하는 단계, 및 검출 또는 측정된 형광을 대조군(대조군 형광 또는 일반적으로 "대조군"으로 간주됨)과 비교하는 단계를 포

합하는 방법을 제공한다. 이러한 테스트는 약 실온인 온도, 또는 약 15°C 내지 약 40°C의 온도, 또는 약 생리학 적 온도(예를 들어, 약 37°C)에서 수행될 수 있다. 대조군은 약 4°C에서 수행될 수 있다. 따라서, 대조군 형광 은 RPE 세포를 비-FITC 표지된 POS와 함께 4°C에서 인큐베이션한 후 검출 또는 측정된 형광일 수 있다. 비-FITC 형광 표지된 POS는 FITC가 아닌 형광단으로 표지된 POS이다. 비-FITC 형광 표지는 산성 pH, 예컨대 식포, 특히 RPE 세포의 식포의 pH에서는 형광을 내지만, 더 높은 pH, 예컨대 중성 pH(또는 세포의 환경 pH)에서는 형광을 내지 않거나 최소의 형광을 내는 표지이다. 비-FITC 형광 표지는 표면 표지화와 내재화된 표지를 구별하는 데 유용하다. 이러한 형광단의 일례는 pHrodo[®] Red 염료(Life Technologies, Molecular Probes)이다. 테스트에서 더 높은 식작용도(degree of phagocytosis)는 대조군과 비교하여 더 높은 형광에 의해 표시된다.

- [0068] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은
- [0069] (1) 37°C에서 pHrodo[®] Red 염료로 표지된 형광 표지된 광수용체 외분질(POS)과 접촉(및 인큐베이션)된 RPE 세포(또는 RPE 세포 집단)의 제1 분액에서 형광(테스트 형광 또는 일반적으로 "테스트"로서 간주됨)을 검출 또는 측정하는 단계, 및
- [0070] (2) 4°C에서 pHrodo[®] Red 염료로 표지된 형광 표지된 광수용체 외분질(POS)과 접촉(및 인큐베이션)된 RPE 세포(또는 RPE 세포 집단)의 제2 분액에서 형광(대조군 형광 또는 일반적으로 "대조군"으로서 간주됨)을 검출 또는 측정하는 단계, 및
- [0071] (3) 경우에 따라, 테스트 형광 및 대조군 형광을 비교, 확인 및/또는 정량화하는 단계로서, 여기서, 대조군 형광보다 더 큰 테스트 형광은 RPE 세포(또는 세포 집단)의 식작용 활성의 지표(indication)인 단계
- [0072] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0073] 본원에 기재된 방법은 또한, 광수용체 전구 세포(또는 전구체) 세포에서 식작용 활성을 검정하는 데에 사용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0074] 특정 실시형태에서, RPE 및 광수용체 전구 세포는 식작용 활성, 예컨대 단리된 pHrodo[®] Red 광수용체 외분질, pHrodo[®] Red 이 콜라이 바이오입자 또는 둘 다를 식작용하는 능력을 가지고 있으며, 본원에 제공된 방법은 이들 기능 중 하나 이상을 검정한다.
- [0075] 일 양태에서, 본 개시내용은 복수의 망막 색소 상피(RPE) 세포 또는 광수용체 전구 세포; 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물의 효능을 확인하기 위한 검정법을 제공한다. 일 실시형태에서, 상기 복수의 RPE 세포의 평균 멜라닌 함량은 8 pg/세포 미만이다. 상기 RPE 세포 또는 광수용체 전구 세포는 현탁액, 젤, 콜로이드, 매트릭스, 기질, 스캐폴드(scaffold) 또는 그래프트(graft)에 함유될 수 있다.
- [0076] 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 삼투질농도(osmolality)를 약 290 mOsm/kg 내지 약 320 mOsm/kg, 또는 약 300 mOsm/kg 내지 310 mOsm/kg, 또는 약 305 mOsm/kg으로 갖는 멸균 용액을 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 균형잡힌(balanced) 염 용액을 포함할 수 있다. 상기 균형잡힌 염 용액은 물에서 각각의 mL 에, 염화나트륨 7.14 mg, 염화칼륨 0.38 mg, 염화칼슘 이수화물 0.154 mg, 염화마그네슘 육수화물 0.2 mg, 제2 인산나트륨 0.42 mg, 중탄산나트륨 2.1 mg, 텍스트로스 0.92 mg, 이황화글루타티온(산화된 글루타티온) 0.184 mg, 및 염산 및/또는 수산화나트륨(pH를 대략 pH 7.4로 조정하기 위한 것임)을 포함하거나, 구성되거나 또는 본질적으로 구성될 수 있다.
- [0077] 상기 약학적 조성물의 부피는 약 100 μ l 내지 1000 μ l일 수 있거나, 적어도 약 150 μ l일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 약 1,000개 내지 약 1×10^9 개의 살아있는 RPE 세포를 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 약 333개의 생존 RPE 세포/ μ l 내지 약 2,000개의 생존 RPE 세포/ μ l, 약 444개의 생존 RPE 세포/ μ l 내지 약 1766개의 생존 RPE 세포/ μ l, 약 333개의 생존 RPE 세포/ μ l, 약 444개의 생존 RPE 세포/ μ l, 약 666개의 생존 RPE 세포/ μ l, 약 888개의 생존 RPE 세포/ μ l, 약 999개의 생존 RPE 세포/ μ l, 또는 약 1,333개의 생존 RPE 세포/ μ l를 포함할 수 있다.
- [0078] 상기 약학적 조성물 내 RPE 세포의 농도는, 상기 RPE 세포 중 약 30% 이하가 60분 이내에 생존력을 상실하고, 경우에 따라 상기 RPE 세포 중 약 10% 이하가 4시간 이내에 생존력을 상실할 정도로 충분히 높을 수 있다. RPE 세포의 상기 농도는 적어도 약 1,000개 세포/ μ l, 적어도 약 2,000개 세포/ μ l, 약 1,000~10,000개 세포/ μ l, 또는 약 2,000~5,000개 세포/ μ l일 수 있다.

- [0079] 약학적 조성물은 RPE 세포가 아닐 수 있는 세포를 약 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.01%, 0.001% 또는 0.0001% 미만으로 포함할 수 있다.
- [0080] 상기 RPE 세포의 평균 멜라닌 함량은 8 pg/세포 미만, 7 pg/세포 미만, 6 pg/세포 미만, 5 pg/세포 미만, 4 pg/세포 미만, 3 pg/세포 미만, 2 pg/세포 미만, 적어도 0.1 pg/세포, 선택적으로 적어도 0.5 pg/세포 또는 1 pg/세포; 0.1~8 pg/세포, 0.1~7 pg/세포, 0.1~6 pg/세포, 0.1~5 pg/세포, 0.1~4 pg/세포, 0.1~3 pg/세포, 0.1~2 pg/세포, 0.1~1 pg/세포, 1~7 pg/세포, 0.5~6 pg/세포 또는 1~5 pg/세포일 수 있다.
- [0081] 상기 약학적 조성물 내 세포 중 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70% 또는 적어도 80%는 베스트로핀+(bestrophin+)일 수 있다. 상기 약학적 조성물 내 세포 중 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99%는 PAX6+ 및/또는 MITF+일 수 있다. 상기 약학적 조성물 내 세포 중 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99%는 PAX6+ 및/또는 베스트로핀+일 수 있다. 상기 약학적 조성물 내 세포 중 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99%는 ZO-1+일 수 있다. 약학적 조성물 내 세포 중 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%는 PAX6+ 및 베스트로핀+일 수 있다. 상기 약학적 조성물 내 세포 중 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99%는 PAX6+일 수 있다.
- [0082] 예시적인 실시형태에서, 상기 약학적 조성물 내 10^6 개 세포당 약 1개 이하의 세포, 및 경우에 따라 9×10^6 개 세포당 2개 이하의 세포는 OCT-4 발현 및 알칼리 포스파타제(AP) 발현 둘 다에 대해 양성일 수 있다.
- [0083] 바늘(needle) 또는 인젝션 캐놀라(injection cannula)는 상기 RPE 세포의 적어도 일부를 함유할 수 있다. 상기 바늘 또는 인젝션 캐놀라 내로의 로딩(loading) 시 상기 RPE 세포의 농도는 약 444개의 생존 세포/ μl 내지 약 1,766개의 생존 세포/ μl 일 수 있다. 상기 바늘 또는 인젝션 캐놀라로부터 전달되어야 하는 살아있는 RPE 세포의 농도는 약 333개의 생존 세포/ μl 내지 약 1,333개의 생존 세포/ μl 일 수 있다. 상기 바늘 또는 인젝션 캐놀라의 직경은 약 0.3 mm 내지 약 0.9 mm일 수 있다. 상기 바늘 또는 인젝션 캐놀라의 직경은 약 0.5 mm 내지 약 0.6 mm일 수 있다. 상기 바늘 또는 인젝션 캐놀라는 약 0.09 mm 내지 약 0.15 mm의 직경을 가진 팁(tip)을 포함할 수 있다. 상기 캐놀라는 MEDONE POLYTIP[®] 캐놀라 25/38g(0.12 mm (38 g) x 5 mm 팁을 가진 0.50 mm(25 g) x 28 mm 캐놀라) 또는 Synergetics Angled 39g 인젝션 캐놀라일 수 있다.
- [0084] 상기 RPE 세포는 동결보존되고 해동된 적이 있는 RPE 세포를 포함할 수 있다.
- [0085] 상기 RPE 세포는 인간일 수 있다.
- [0086] 상기 RPE 세포, 예컨대 인간 RPE 세포는 만능 세포, 예컨대 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포뿐만 아니라 공여자 성인 또는 태아 조직을 포함하여 임의의 공급원으로부터 생성될 수 있다. 상기 만능 줄기 세포는, OCT-4, 알칼리 포스파타제, Sox2, TDGF-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 및/또는 TRA-1-81을 포함할 수 있는 하나 이상의 마커의 발현에 대해 양성일 수 있다. 상기 만능 세포는, 유색 상피 세포가 상기 배양물에서 나타나기에 충분한 시간 동안 다층 집단 또는 배양체(embryoid body)에서 배양될 수 있는 인간 만능 세포일 수 있다. 유색 상피 세포가 상기 배양물에서 나타나기에 충분한 상기 시간은 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 4주, 적어도 약 5주, 적어도 약 6주, 적어도 약 7주 또는 적어도 약 8주를 포함할 수 있다. 상기 다층 집단 또는 배양체는 DMEM을 포함할 수 있는 배지에서 배양될 수 있다. 상기 배지는 EB-DM을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 상기 유색 상피 세포는 단리되고 배양될 수 있으며, 이로써 RPE 세포의 집단을 생성할 수 있다. 상기 단리는 세포 또는 세포 덩어리를 배양물로부터 효소적으로, 화학적으로 또는 물리적으로 해리시키는 단계, 및 유색 상피 세포, 또는 유색 상피 세포를 포함할 수 있는 세포 덩어리를 선별하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 배양체는 현탁액에서 및/또는 부착 배양물로서(예를 들어, 현탁액에서, 후속해서 부착 배양물로서) 배양될 수 있다. 부착 배양물로서 배양된 상기 배양체는 유색 상피 세포를 포함하는 하나 이상의 증식물(outgrowth)을 생성할 수 있다. 상기 만능 줄기 세포는 감소된 HLA 항원 복잡성을 가진다. RPE 형성 전에, 상기 만능 세포는 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴(vitronectin), 프로테오글리칸, 엔탁틴(entactin), 콜라겐, 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 콜라겐 VIII, 헤파란 설페이트, 매트릭셀(TM; Matrigel)(엔겔브레쓰-홀름-스웸(EHS; Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스 육종 세포 유래의 가용성 조제물), 셀스타트(CellStart), 인간 기저막 추출물 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있는 매트릭스 상에서 배양될 수 있다. 상기 매트릭스는 매트릭셀(TM)(엔겔브레쓰-홀름-스웸(EHS) 마우스 육종 세포 유래의 가용성 조제물)을 포함할 수 있다.
- [0087] 약학적 조성물은 하나 이상의 배아 줄기 세포 마커의 실질적인 발현이 결여된 세포를 포함할 수 있다. 상기 하나 이상의 배아 줄기 세포 마커는 OCT-4, NANOG, Rex-1, 알칼리 포스파타제, Sox2, TDGF-1, SSEA-3, SSEA-4,

TRA-1-60 및/또는 TRA-1-81을 포함할 수 있다.

- [0088] 상기 RPE 세포는 하나 이상의 RPE 세포 마커의 발현에 대해 양성일 수 있다. 상기 하나 이상의 RPE 세포 마커는 RPE65, CRALBP, PEDF, 베스트로핀, MITF, Otx2, PAX2, PAX6, ZO-1 및/또는 티로시나제를 포함할 수 있다.
- [0089] 상기 RPE 세포는 상기 평균 멜라닌 함량을 달성하기에 충분한 시간 동안 RPE 세포를 휴지기 세포로서 유지시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다. 상기 RPE 세포는, 상기 RPE 세포 중 적어도 50%에서 베스트로핀 발현을 구축하기에 충분한 시간 동안 RPE 세포를 휴지기 세포로서 유지시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0090] 상기 약학적 조성물에는 마우스 배아 영양 세포(MEF) 및 인간 배아 줄기 세포(hES)가 실질적으로 없을 수 있다.
- [0091] RPE 세포는 표 1에 언급된 기준 및/또는 우수 제조 관리 기준(GMP; Good Manufacturing Practices)에 따라 제작된 기준들 중 적어도 하나를 충족시킬 수 있다.
- [0092] 상기 동결보존된 망막 색소 상피(RPE) 세포 또는 광수용체 전구 세포는 동결보존된 조성물로서 제공될 수 있다.
- [0093] 상기 RPE 세포는, 단리된 성인 안구 유래의 동일한 수의 RPE 세포에 대한 POS의 식작용 속도보다 적어도 50% 더 크거나, 단리된 성인 안구 유래의 동일한 수의 RPE 세포에 대한 POS의 식작용 속도보다 적어도 75%, 100%, 150% 또는 200% 더 클 수 있는 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도; 또는 24시간 후 총 POS 농도의 적어도 20%, 또는 24시간 후 총 POS 농도의 적어도 25%, 30%, 25%, 40% 또는 50%일 수 있는 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도를 나타낼 수 있다. 상기 광수용체 전구 세포는, 단리된 성인 안구 유래의 동일한 수의 광수용체 전구 세포에 대한 POS의 식작용 속도보다 적어도 50% 더 크거나, 단리된 성인 안구 유래의 동일한 수의 광수용체 전구 세포에 대한 POS의 식작용 속도보다 적어도 75%, 100%, 150% 또는 200% 더 클 수 있는 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도; 또는 24시간 후 총 POS 농도의 적어도 20%, 또는 24시간 후 총 POS 농도의 적어도 25%, 30%, 25%, 40% 또는 50%일 수 있는 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도를 나타낼 수 있다. 식작용의 속도 및 규모(extent)는 인큐베이션 시간 및 세포의 성숙도(maturity)에 따라 다를 수 있다. POS의 결합 속도 및 내재화는 세포의 성숙도 및 색소침착을 기반으로 상이할 수 있다. 식작용을 할 수 있는 세포의 퍼센트는 세포 배양물의 성숙도를 기반으로 상이할 수 있다.
- [0094] 중성 pH에서는 비형광이거나 약하게 형광이지만 산성화 시 더 많은 형광을 띠게 되는 염료로 광수용체 외분절을 표지화함으로써, 식작용 검정법에서 RPE 세포 또는 광수용체 전구 세포 내 내재화된 POS의 더욱 민감한 측정이 가능해진다. 식작용 평가에 사용되는 대부분의 정량적 방법들(FACS, 형광 플레이트 판독기)은 내재화된 형광 입자와 표면 결합된 형광 입자를 구별하지 못한다. 부가적으로, FITC 형광은 pH 민감성이고 pH 6 미만에서 상당히 감소되며, 한편 리소솜, 및 리소솜과 융합된 식포의 pH는 5 미만이다. 따라서, 일부 경우 FITC로 표지된 OS의 형광은 내재화된 OS의 실제 양을 반영하지 않는다. pH 민감성 로다민 기반 pHrodo[®] Red 염료는 이의 제조업체(Life Technologies, Molecular Probes)에 따르면, 중성 pH에서는 비형광이지만 산성화 시 밝은 적색으로 변한다. 이 염료는 형광발생성(fluorogenic) 및 pH 민감성 둘 다이고, 따라서, 식작용 후 식포의 산성화가 적색 형광으로 표시되는 식작용 사건의 특이적인 센서로서 사용될 수 있다.
- [0095] 광수용체 외분절을 표지하기 위해, 중성 pH에서는 비형광이거나 약하게 형광이지만 산성화 시 더 많은 형광을 띠게 되는 염료, 예컨대 pHrodo[®] Red, 및 산성 환경에서 최대로 형광성이기도 한 CypHer5E, Life Technologies 염료에 의한 리소센서(LysoSensor)를 사용하는 것은 선행 기술의 방법 및 시약을 능가하는 상당한 개선이다. 본 발명자들은, 내재화된 입자를 특이적으로 측정하고자 소(bovine) OS를 표지하기 위해 이러한 pH 민감성 로다민 기반 pHrodo[®] Red 염료를 사용하였다.
- [0096] FITC 표지된 광수용체 외분절, pHrodo[®]-바이오입자 및 pHrodo[®]-표지된 광수용체 외분절을 비교하는 경우, 이들은 모두 식작용 검정법에서 4°C와 비교하여 37°C에서 형광의 상당한 증가를 보여주었다(도 1a 내지 도 1c). 그러나, 정량적 분석은, 식작용 검정법에서 FITC로 표지된 입자(도 1a)와 함께 인큐베이션된 경우 37°C에서 RPE 세포 집단 중 오로지 약 1/2만 4°C 대조군을 능가하는 형광 증가를 나타내었으며, 4°C 대조군에서 RPE 세포 집단 중 약 1/2 또한 형광의 상당한 증가를 보여주었으며, 이는 아마도 세포 표면 상에 결합되었지만 비-내재화된 입자의 존재를 나타낸다. 세포 표면 상의 이러한 입자는 특이적인 결합 및 비특이적인 결합 둘 다를 나타낼 수 있을 것이다. 부가적으로, FITC로 표지된 광수용체 외분절 FACS 데이터의 해석은, FITC 형광 중 일부가 낮은 pH에서 상실될 수 있을 것이며(도 2), 따라서 일단 입자가 내재화되고 식포가 리소솜과 융합하면, 최종 낮은 pH(4.5 내지 5.5)에서 FITC 형광 중 일부가 상실되기 때문에, 매우 정확하지 않다. 따라서, 측정된 바와 같은

형광은 내재화된 입자로부터의 일부 신호의 상실, 및 표면 상에 비특이적으로 결합된 입자로부터의 추가적인 신호를 포함한다. pHrodo[®]-표지된 바이오입자 및 pHrodo[®]-표지된 광수용체 외분절은 둘 다 4°C에서 입자의 형광 증가를 나타내지 않았으나(도 1b 및 도 1c), 37°C에서는 증가를 나타내었으며, 따라서 리소솜과 융합된 내재화된 입자만 특이적으로 측정할 수 있었다.

[0097] 본원에 기재된 바와 같이, pHrodo[®]-표지된 ROS는 낮은 pH에서 형광을 띠게 되어, 관찰된 형광 시프트는 내재화된 입자를 나타낸다. FITC 또는 다른 비-pH 민감성 염료-표지된 ROS의 사용은 세포 표면 상의 비특이적으로 결합된 입자, 특이적으로 결합되지만 내재화되지 않은 POS, 및/또는 내재화되지만 리소솜과 융합되지 않은 POS를 보여주는 경향이 있다. 형광이 산성과 역상관계(inverse correlation)를 갖는 통상 사용되는 FITC 대신 pHrodo[®] 또는 또 다른 pH 민감성 염료를 이용한 광수용체 외분절의 표지화, 또는 pHrodo[®]로 표지된 POS와 다른 pH 민감성 및/또는 비 민감성 염료의 병용은, 생리학적으로 관련된 표적의 식작용의 측정을 가능하게 하고 식작용의 메커니즘의 정밀한 분석을 가능하게 하므로, 식작용 검정법의 정확성의 개선이다.

[0098] 일부 실시형태에서, POS는 관심 세포와 함께 사용되기 전에 단편화된다. POS는 예를 들어 초음파처리 또는 전단(shearing), 또는 당업계의 다른 방법을 사용하여 단편화될 수 있다. 일부 경우, 단편화된 POS는 세포로부터의 식작용 판독을 더 높이는 것으로 확인되었다. 이는 양성 활성과 대조군 활성을 구별하는 데 유용할 수 있다.

[0099] 식작용 검정법들은 세포의 단일 세포 현탁액을 사용하여 수행될 수 있거나, 이들 검정법들은 세포의 단일층을 사용하여 수행될 수 있다. 따라서, 세포는 세포 현탁액으로서 제공될 수 있거나, 세포는 배양된 단일층을 포함하여 단일층으로서 제공될 수 있다. 특히 세포가 단일층으로서 정상적으로 성장한다면, 세포의 식작용 활성이 이러한 세포가 정상적으로 존재할 때처럼 확인되게 하므로 이러한 후자의 실시형태가 유용하다. 세포는 표지된 POS와 함께 부착층, 예컨대 단일층으로서 인큐베이션될 수 있으며, 그런 다음 효소 분해(예를 들어 트립신 분해)되어 세포는 단일 세포 집단으로 될 수 있고, 그런 다음 이러한 단일 세포 집단은 예를 들어 유세포분석을 사용하여 분석될 수 있다.

[0100] 일부 실시형태에서, 세포는 17°C 이상, 18°C 이상, 19°C 이상 또는 20°C 이상의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된다. 온도 범위의 상한은 42°C 이하, 41°C 이하, 40°C 이하, 39°C 이하, 38°C 이하 또는 37°C 이하일 수 있다. 테스트 식작용 활성은 이들 온도에서 측정될 수 있다. 세포는 배양된 단일층을 포함하여 단일층으로서 제공될 수 있다.

[0101] 일부 실시형태에서, 테스트 세포 또는 테스트 세포 집단은 17°C 내지 40°C, 또는 20°C 내지 40°C, 또는 25°C 내지 40°C, 또는 30°C 내지 40°C, 또는 35°C 내지 40°C 범위의 온도, 또는 약 37°C의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된다. 음성 대조군은 약 4°C 내지 16°C, 5°C 내지 16°C, 6°C 내지 16°C, 7°C 내지 16°C, 8°C 내지 16°C, 9°C 내지 16°C, 10°C 내지 16°C, 11°C 내지 16°C, 또는 12°C 내지 16°C 범위의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된 세포에 상응할 수 있다. 음성 대조군은 약 4°C 내지 15°C, 5°C 내지 15°C, 6°C 내지 15°C, 7°C 내지 15°C, 8°C 내지 15°C, 9°C 내지 15°C, 10°C 내지 15°C, 11°C 내지 15°C, 또는 12°C 내지 15°C 범위의 온도에서 POS와 함께 인큐베이션된 세포에 상응할 수 있다. 세포는 배양된 단일층을 포함하여 단일층으로서 제공될 수 있다.

[0102] 일부 경우에, 세포는 이전에 동결보존되었으며, 단일층을 구축하기 위해 해동되고 간략하게 배양된다. 일단 단일층에서, 세포의 식작용 활성은 본원에 기재된 바와 같이 테스트될 수 있다.

[0103] 일부 실시형태에서, 세포는 형광 표지된 POS에 대한 식작용을 측정하기 위해, 일정한 기간 동안 비표지된 POS에 노출될 수 있으며, 그런 다음 이러한 형광 표지된 POS에 노출될 수 있다. 이러한 방식으로, 세포는 표지된 POS의 도입 전에 프라이밍될 수 있다.

[0104] 정의

[0105] 본원에 기재된 본 발명이 완전히 이해될 수 있도록 하기 위해, 하기 상세한 설명이 기재되어 있다. 본 발명의 다양한 실시형태들이 상세히 기재되어 있고, 제공된 실시예에 의해 더 예시될 수 있다.

[0106] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속한 당업계의 당업자가 보편적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질들이 본 발명 또는 본 발명의 테스트에 사용될 수 있긴 하더라도, 적합한 방법 및 물질은 하기에 기재되어 있다. 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적일 뿐이며 제한하려는 것이 아니다. 하기 용어 및 정의가 본원에 제공되어 있다.

[0107] 본원의 상세한 설명 및 후속하는 청구항 전체에 사용된 바와 같이, 단수형("a," "an," 및 "the")의 의미는 문맥

상 명확하게 다르게 지시하지 않는 한 복수형을 포함한다. 또한, 본원의 상세한 설명에 사용된 바와 같이, "~에(in)"의 의미는 문맥상 명확하게 다르게 지시하지 않는 한 "~에(in)" 및 "~상(on)"을 포함한다.

- [0108] 본 명세서 전체에서, 단어 "포함하다" 또는 변화형, 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 임의의 다른 완전체 또는 완전체들의 그룹을 배제하는 것은 아니면서 언급된 정수 또는 정수들의 그룹의 포함을 내포하는 것으로 이해될 것이다.
- [0109] 본원에 사용된 바와 같이, "배아 줄기 세포"(ES 세포)는 광범위하게는, 세포주로서 연속 계대배양된 배반포(blastocyst) 또는 상실배(morulae)의 내부 세포 덩어리(mass)로부터 유래된 세포를 지칭한다. ES 세포는 난세포와 정세포 또는 DNA와의 수정(fertilization), 핵 이동(nuclear transfer), 단위 생식(parthenogenesis), 또는 HLA 영역 내에 동형 접합성을 가진 ES 세포를 발생시키기 위한 수단으로부터 유래될 수 있다. ES 세포는 또한, 정세포와 난세포의 융합, 핵 이동, 단위 생식, 또는 세포를 생성하기 위한 염색질의 재프로그래밍(reprogramming) 및 원형질막 내로의 재프로그래밍된 염색질의 후속적인 혼입에 의해 생성된 접합자(zygote), 분할세포(blastomere) 또는 배반포-단계 포유류 배아로부터 유래된 세포를 지칭할 수 있다. 배아 줄기 세포들은 이들의 공급원 또는 이들을 생성하는 데 사용된 특정한 방법과는 상관 없이, (i) 모든 3개의 배엽들의 세포로의 분화 능력, (ii) 적어도 Oct-4 및 알칼리 포스파타제의 발현, 및 (iii) 면역손상된(immunocompromised) 동물 내로 이식 시 기형종(teratoma)을 생성하는 능력을 기반으로 식별될 수 있다. 이러한 용어 ES 세포는 또한, 바람직하게는 배아의 나머지 부분들을 파괴하지 않으면서, 배아의 하나 이상의 분할세포로부터 단리된 세포를 포함한다(예를 들어, 문헌[Chung et al., Cell Stem Cell. 2008 Feb 7;2(2):113-7]; U.S. PGPub No. 20060206953; U.S. PGPub No. 2008/0057041을 참조하며, 이들은 각각 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함되어 있음). 이러한 용어 ES 세포는 또한, 심지어 비-배아 세포가 공정에 사용되는 경우에도, 체세포 핵 이동에 의해 생성되는 세포를 포함한다. ES 세포는 난세포와 정세포 또는 DNA와의 수정, 핵 이동, 단위 생식, 또는 HLA 영역에 동형 접합성을 가진 ES 세포를 발생시키는 수단으로부터 유래될 수 있다. ES 세포는 또한, 정세포와 난세포의 융합, 핵 이동, 단위 생식, 또는 세포를 생성하기 위한 염색질의 재프로그래밍 및 원형질막 내로의 재프로그래밍된 염색질의 후속적인 혼입에 의해 생성된 접합자, 분할세포 또는 배반포-단계 포유류 배아로부터 유래된 세포이다. 본 개시내용의 인간 배아 줄기 세포로는, MA01, MA09, ACT-4, No. 3, H1, H7, H9, H14 및 ACT30 배아 줄기 세포 등이 있을 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 특정 실시형태에서, RPE 세포를 생성하는 데 사용되는 인간 ES 세포는 GMP 표준에 따라 유래되고 유지된다.
- [0110] 본원에 사용된 바와 같이, "황반 변성"은 광범위하게는, 부르크막, 신경 망막 및 망막 색소 상피의 비정상과 연관된 중심시(central vision)의 점진적인 상실을 특징으로 하는 질병을 지칭한다. 황반 변성 질병으로는, 노화 관련 황반 변성, 노스 캐롤라이나 황반 이영양증, 소르스비 안저 이영양증(Sorsby's fundus dystrophy), 스타가르트 질병, 패턴 이영양증, 베스트병(Best disease), 말라티아 레벤티네스(malattia leventinese), 도이네 벌집모양 맥락막염(Doyne's honeycomb choroiditis), 우성 드루젠(dominant drusen) 및 방사상 드루젠(radial drusen) 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0111] 본원에 사용된 바와 같이, "만능 줄기 세포"는 광범위하게는, 이의 미분화된 상태를 보유하며 안정한(바람직하게는 정상적인) 핵형을 나타내고 적절한 조건 하에 모든 3개의 배엽들(즉, 외배엽, 중배엽 및 내배엽)로 분화하는 능력을 가지면서도, 시험관내에서 연장된 증식 또는 사실상 무한정 증식할 수 있는 세포를 지칭한다.
- [0112] 본원에 사용된 바와 같이, "RPE 세포," "분화된 RPE 세포," 및 "ES 유래 RPE 세포"는 예를 들어 본원에 개시된 방법을 사용하여 만능 줄기 세포로부터 분화된 RPE 세포를 광범위하게 지칭하기 위해 전반적으로 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 이러한 용어는 일반적으로, 세포의 성숙도 수준과는 상관 없이 분화된 RPE 세포를 지칭하는 데 사용되고, 따라서 다양한 성숙도 수준을 가진 RPE 세포를 포함할 수 있다. RPE 세포는 이의 조약돌 모양 및 색소의 초기 출현에 의해 시각적으로 인지될 수 있다. RPE 세포는 또한, 배아 줄기 세포 마커, 예컨대 Oct-4 및 NANOG의 발현의 실질적인 결여를 기반으로 할 뿐만 아니라 RPE 마커, 예컨대 RPE 65, PEDF, CRALBP 및 베스트로핀의 발현을 기반으로 분자적으로 식별될 수 있다. 예를 들어, 세포는, 예상된 염색 패턴, 예를 들어 핵에 국소화된 PAX6, 다각형 패턴으로 원형질막에 국소화된 베스트로핀(세포의 주변부에서 날카로운 선으로 국소화된 베스트로핀 염색을 보여줌), 다각형 패턴으로 세포의 윤곽을 만드는 밀착연접에 존재하는 ZO-1 염색, 및 핵에 국한되어 검출된 MITF 염색이 관찰된다면, 주어진 마커에 대해 양성인 것으로 계수될 수 있다. 다르게 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이, RPE 세포는 시험관내에서 만능 줄기 세포로부터 분화된 RPE 세포를 지칭한다.
- [0113] 본원에 사용된 바와 같이, "성숙한 RPE 세포" 및 "성숙한 분화된 RPE 세포"는 RPE 세포의 초기 분화 후 발생하

는 변화를 광범위하게 지칭하기 위해 전반적으로 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 구체적으로, RPE 세포는 부분적으로는 색소의 초기 출현을 기반으로 인지될 수 있긴 하지만, 분화 후 성숙한 RPE 세포는 증강된 색소침착을 기반으로 인지될 수 있다.

- [0114] 본원에 사용된 바와 같이, "유색"은 광범위하게는, 임의의 수준의 색소침착, 예를 들어 RPE 세포가 ES 세포로부터 분화할 때 초기에 발생하는 색소침착을 지칭한다. 색소침착은 분화된 RPE 세포의 세포 밀도 및 성장도에 따라 다양할 수 있다. RPE 세포의 색소침착은 RPE 세포의 최종 분화 후 평균 RPE 세포와 동일할 수 있다. RPE 세포의 색소침착은 RPE 세포의 최종 분화 후 평균 RPE 세포보다 유색이 더 진할 수 있다. RPE 세포의 색소침착은 최종 분화 후 평균 RPE 세포보다 유색이 더 열을 수 있다.
- [0115] "광수용체 전구 세포"는 신경 망막의 세포를 지칭하며, 이러한 광수용체 전구 세포는 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포로부터 분화될 수 있고 마커 CHX10은 발현하지 않으면서(즉, CHX10(-)) 마커 PAX6은 발현한다. 이들 세포는 망막 신경 전구 세포 단계에서 CHX10을 일시적으로 발현하지만, CHX10 발현은 세포가 광수용체 전구 세포 단계로 분화할 때 중단된다. 광수용체 전구 세포에 의해 발현되는 다른 마커로는, Pax6, Nr2e3, Trβ2, Mash1, RORβ 및 NRL이 있을 수 있다. 또한, "광수용체"는 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포로부터 분화되고 세포 마커 로돕신 또는 3개의 추상체 유전자 중 임의의 유전자를 발현하고, 선택적으로 간상체 또는 추상체 cGMP 포스포다이에스테라제를 발현하는 체세포분열-후 세포를 지칭할 수 있다. 광수용체는 또한, 광수용체에서 발견되는 마커 레코베린(recoverin)을 발현할 수 있다. 광수용체는 간상체 및/또는 추상체 광수용체일 수 있다.
- [0116] 세포 마커: 발현에 대해 평가될 수 있는 예시적인 세포 마커로는, 단백질 및/또는 mRNA에서 평가될 수 있는 PAX6, RX1, SIX3, SIX6, LHX2, TBX3, SOX2, CHX10, 네스틴(Nestin), TRβ2, NR2E3, NRL, MASH1, RORβ, 레코베린, 로돕신, 간상체 및 추상체 cGMP 포스포다이에스테라제 등이 있다(문헌[Fischer AJ, Reh TA, Dev Neurosci. 2001;23(4-5):268-76]; [Baumer et al., Development. 2003 Jul;130(13):2903-15], [Swaroop et al., Nat Rev Neurosci. 2010 Aug;11(8):563-76], [Agathocleous and Harris, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2009. 25:45-69]를 참조하며, 이들은 각각 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 상기 마커 식별자는 일반적으로 문헌 및 당업계, 특히 이들 유전자 식별자가 본원에서 언급된 맥락과 관련된 기술 분야에서와 같이 사용되며, 광수용체, 간상체, 추상체, 광수용체 분화, 광수용체 전구 세포, 신경 분화, 신경 줄기 세포, 만능 줄기 세포와 관련된 문헌, 및 문맥에 의해 지시된 바와 같은 다른 분야를 포함할 수 있다. 부가적으로, 마커는 문맥상 다르게 지시하지 않는 한 일반적으로 예를 들어 인간이다. 세포 마커는 종래의 면역세포화학 방법 또는 종래의 PCR 방법을 사용하여 식별될 수 있으며, 이들 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0117] 본원에 사용된 바와 같이, 질병의 "징후"는 광범위하게는, 환자의 검사 시 발견될 수 있는, 질병을 나타내는 임의의 비정상; 질병의 주관적인 지표인 증상과는 대조적으로 질병의 객관적인 지표를 지칭한다.
- [0118] 본원에 사용된 바와 같이, 질병의 "증상"은 광범위하게는, 환자가 경험하고 질병을 나타내는, 구조, 기능 또는 감각에 있어서 임의의 병적인 현상 또는 정상으로부터의 이탈을 지칭한다.
- [0119] 본원에 사용된 바와 같이, "치료법," "치료적," "치료하는," "치료하다" 또는 "치료"는 광범위하게는, 질병의 치료, 질병 또는 이의 임상적 증상의 발병의 억제 또는 감소, 및/또는 질병 또는 이의 임상적 증상의 퇴행을 유발하는 질병의 완화를 지칭한다. 치료법은 질병, 질병의 징후 및/또는 증상으로부터의 예방, 방지, 치료, 치유, 해소, 감소, 경감 및/또는 완화의 제공을 포함한다. 치료법은 진행중인 질병 징후 및/또는 증상(예를 들어, 실명, 망막 악화)을 가진 환자에서 징후 및/또는 증상의 경감을 포함한다. 치료법은 또한, "예방" 및 "방지"를 포함한다. 예방은 환자에서 질병의 치료 후 후속적으로 발생하는 질병의 방지, 또는 환자에서 질병의 발생 또는 중증도의 감소를 포함한다. 치료법의 목적에서 용어 "감소된"은 광범위하게는, 징후 및/또는 증상의 임상적으로 유의한 감소를 지칭한다. 치료법은 재발 또는 되풀이되는 징후 및/또는 증상(예를 들어, 망막 변성, 시력 상실)의 치료를 포함한다. 치료법은, 징후 및/또는 증상의 출현을 언제든지 배제하는 것뿐만 아니라 기존의 징후 및/또는 증상의 감소 및 기존의 징후 및/또는 증상의 소멸을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니다. 치료법은 만성 질병("유지") 및 급성 질병의 치료를 포함한다. 예를 들어, 치료는 징후 및/또는 증상(예를 들어, 실명, 망막 변성)의 재발 또는 되풀이를 치료하거나 방지하는 것을 포함한다.
- [0120] 조제물의 RPE 또는 광수용체 전구 세포는, 단리된 성인(즉, 25세 내지 80세의 인간 성인 환자, 보다 바람직하게는 50세 내지 80세의 성인) 안구 유래의 동일한 수의 RPE 세포에 대한 POS의 식작용 속도보다 적어도 50% 더 크고, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 100%, 150% 또는 심지어 200% 더 큰 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도를 가질 수 있다. 조제물의 광수용체 전구 세포는, 단리된 성인(즉, 25세 내지 80세의 인간 성인 환자, 보다 바람직하게는 50세 내지 80세의 성인) 안구 유래의 동일한 수의 광수용체 전구 세포에 대한 POS의 식작용 속도보다

적어도 50% 더 크고, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 100%, 150% 또는 심지어 200% 더 큰 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도를 가질 수 있다.

- [0121] 조제물의 RPE 또는 광수용체 전구 세포는 24시간 후 총 POS 농도의 적어도 20%, 보다 바람직하게는 24시간 후 총 POS 농도의 적어도 25%, 30%, 25%, 40% 또는 심지어 50%인 광수용체 외분절(POS)의 식작용 속도를 가질 수 있다. POS 식작용은 하나의 예시적이고 비제한적인 예로서, 문헌[Bergmann et al. FASEB Journal March 2004 vol. 18 pages 562-564]에 기재된 프로토콜을 본원에 기재된 비-FITC 표지된 POS의 변화와 함께 사용하여 측정될 수 있다.
- [0122] RPE 또는 광수용체 전구 세포 집단은 다양한 수준의 성숙도를 가진 분화된 RPE 세포를 포함할 수 있거나, 특정 수준의 성숙도를 가진 분화된 RPE 세포와 비교하여 실질적으로 순수할 수 있다. RPE 세포는 다양한 수준의 성숙도/색소침착을 가진 RPE 세포를 포함하는 실질적으로 정제된 조제물일 수 있다.
- [0123] RPE 세포의 동결보존된 조제물
- [0124] RPE 세포 또는 광수용체 전구 세포는 당업계에 알려진 임의의 적절한 방법에 의해 저장(예를 들어 극저온 동결)될 수 있고, 세포의 저장에 적절한 임의의 온도에서 동결될 수 있다. 이들 세포의 사용 전, 이들은 세포의 식작용 활성 및/또는 효능을 확인하기 위해 본 발명의 검정법에서 테스트될 수 있다.
- [0125] 본 발명의 식작용 검정법에서 효능을 보이는 RPE 세포 또는 광수용체 전구 세포는 망막 박리, 망막 이형성, 혈관양신조(Angioid streak), 근시성 황반 변성 또는 망막 위축증으로 인한 망막 변성 질병, 또는 광수용체 손상 및 실명을 초래하는 다수의 시력-변경 병과 연관이 있는 망막 변성 질병, 예컨대 맥락막 결손증, 당뇨병성 망막증, 황반 변성(예를 들어, 노화 관련 황반 변성), 색소성 망막염 및 스타가르트 질병(노란점 안저)의 치료에 사용될 수 있다.
- [0126] 본원에 제공된 RPE 또는 광수용체 전구 세포는 인간 RPE 또는 광수용체 전구 세포일 수 있다. 그러나, 인간 세포는 인간 환자뿐만 아니라 동물 모델 또는 동물 환자에서 사용될 수 있음을 주지한다. 예를 들어, 인간 세포는 망막 변성의 마우스, 래트, 고양이, 개 또는 비-인간 영장류 모델에서 테스트될 수 있다. 부가적으로, 인간 세포는 예컨대 수의학에서 이를 필요로 하는 동물을 치료하기 위해 치료적으로 사용될 수 있다.
- [0127] 스크리닝 검정법
- [0128] 본 개시내용은 RPE 세포 또는 광수용체 전구 세포 식작용 활성을 조정하는 제제를 식별하기 위한 방법을 제공한다.
- [0129] **실시예**
- [0130] 이제, 본 발명은 일반적으로 기재되며, 하기 실시예를 참조로 하여 보다 쉽게 이해될 것이고, 이러한 실시예는 본 발명의 소정의 양태 및 실시형태를 예시하기 위해 포함된 것일 뿐이며 본 발명을 제한하려는 것이 아니다.
- [0131] RPE 세포를 이전에 기재된 바와 같이(Klimanskaya et al, 2004) 인간 배아 줄기 세포(hESC)로부터 유래하였으며, 유색 클러스터 분화 배양물로부터 단리 후 계대배양 2번째 내지 5번째에 사용하였다. 세포를, 이들 세포가 융합 상태(confluence)에 도달할 때까지 EGM-2 배지(Lonza)에서 배양하였으며, 실험에 사용되는 해당 세포가 육각형 모양, 다양한 수준의 갈색 색소, 입방 세포 외양, 분극화 및 밀착연접을 특징으로 하는 분화된 RPE 표현형을 구축한 후에는 RPE 유지 배지(Klimanskaya et al, 2004)에서 유지시켰다. 대안적으로, 여전히 세포가 융합성으로 된 후이지만 완전히 성숙되기 전에 세포를 실험에 사용하였다.
- [0132] 소 간상체 외분절(카탈로그 번호 98740)은 InVision Bioresources사로부터 입수하였다. FITC Isomer(카탈로그 번호 F1906) I은 Life Technologies사로부터 입수하였다. pHrodo[®] Red 식작용 입자 표지화 키트(카탈로그 번호 A10026)는 Life Technologies사로부터 입수하였다.
- [0133] **FITC를 이용한 POS의 표지화**
- [0134] 0.1 M 탄산나트륨 완충제, pH 9.5에서 10 mg FITC Isomer I의 1개 바이얼을 2 mg/mL까지 재현탁시켰다. 3000 g에서 10분 동안 스핀 다운(spin down)시켜, 비희석된 입자를 제거하고, 오로지 상층액만 소 ROS의 표지화에 사용하였다. ROS의 가치가 있는 25개의 소 안구를 해동시키고, 5 mL 세척 완충제(20 mM 인산염 완충제 + 5 mM 타우린 중 10% 수크로스, pH 7.2)에 재현탁시켰다. 재현탁화된 ROS에 2 mg/mL FITC 상층액 1.5 mL를 첨가하고, 이들을 RT에서 1시간 동안 흔들면서 암실에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, ROS-FITC 절편을 3000 g에서 스핀 다운시키고, 10 mL 세척 완충제에 재현탁하였다. 이러한 세척 단계를 총 2회 반복하였다. 세척 후,

DMEM(Gibco # 11960) 중 10 mL 2.5% 수크로스에서 재현탁시키고, 3000 g에서 10분 동안 다시 스핀 다운시켰다. 마지막으로, 세포를 DMEM 중 10 mL 2.5% 수크로스에 재현탁시키고, 혈구계수기를 사용하여 ROS-FITC 입자를 계수하고, DMEM 중 2.5% 수크로스에서의 농도를 1×10^8 개 입자/mL까지 조정한다. 다음, 입자를 -80°C 에서 동결시켰다.

[0135] pHrodo[®]를 이용한 POS의 표지화

[0136] ROS의 가치가 있는 25개의 소 안구를 pHrodo[®] Red 식작용 입자 표지화 키트로부터의 4.165 mL 0.1 M 중탄산나트륨 완충제에 재현탁시켰다. ROS를 마이크로원심분리 튜브에서 4750 μl 분액로 분취하였다. 상기 튜브를 10000 RPM에서 1분 동안 원심분리한 다음, 750 μl 0.1 M 중탄산나트륨 완충제에 다시 재현탁하였다. pHrodo[®] 염료를 DMSO 중 10 mM의 최종 농도까지 재현탁하였다. pHrodo[®] 염료를 중탄산나트륨 완충제 중 ROS에 0.5 mM의 최종 농도까지 첨가하고, 암실에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 45분 후, 500 μl "구성성분 C"(키트 유래)를 첨가하고, 10000 RPM에서 1분 동안 원심분리하였다. 상층액을 흡인하고, 1 mL 100% 메탄올에 재현탁시켰다. 상기 튜브를 30초 동안 보텍싱(vortexing)하고, 10000 RPM에서 1분 동안 스핀 다운시켰다. 메탄올을 흡인하고, 1 mL "구성성분 C"(키트 유래의 세척 완충제)에 재현탁시킨 다음, 10000 RPM에서 1분 동안 다시 원심분리하였다. 이 세척 단계를 총 2회 반복하였다. 모든 입자를 총 20 mL "완충제 B"(키트 유래)에 재현탁시켰다. ROS-pHrodo[®]를 3000 RPM에서 10분 동안 스핀 다운시키고, ROS-pHrodo[®]를 DMEM 중 2.5% 수크로스에 재현탁시킨 다음, DMEM 중 2.5% 수크로스에서의 농도를 1×10^8 개 입자/mL까지 조정하고, 입자를 -80°C 에서 동결시켰다.

[0137] RPE 세포를, pHrodo[®]-컨쥬게이트된 바이오입자, 또는 FITC 또는 pHrodo[®]로 표지된 소 외분절과 함께 37°C 에서 2시간 내지 24시간의 다양한 시간 동안 인큐베이션하였다. 해당 세포를 세척한 후, 트립신/해리 완충제, 1:1에 의해 수집하고, 원심분리한 다음, 유세포분석에 의해 분석하였다. 음성 대조군으로서, 세포를 4°C 에서 동일한 기간 동안 인큐베이션하였다.

[0138] 추가로, FITC로 표지된 ROS FACS 데이터의 해석은, FITC 형광 중 일부가 낮은 pH에서 상실될 수 있을 것이며(도 2a 내지 도 2b), 따라서 일단 입자가 내재화되고 식포가 리소좀과 융합하면, 최종 낮은 pH(4.5 내지 5.5)에서 FITC 형광 중 일부가 상실되기 때문에, 매우 정확하지 않다. 따라서, 측정된 바와 같은 형광은 내재화된 입자로부터의 일부 신호의 상실, 및 표면 상에 비특이적으로 결합된 입자로부터의 부가적인 신호를 포함한다.

[0139] pHrodo[®]는 pH 민감성 형광 염료이고, pHrodo[®]-표지된 바이오입자 및 pHrodo[®]-표지된 ROS는 둘 다 4°C 에서 임의의 형광 증가를 나타내지 않았으며(도 1b 및 도 1c), 따라서 리소좀과 융합된 내재화된 입자만 특이적으로 측정할 수 있었다.

[0140] ROS를 pHrodo[®]로 표지화하는 것은 식작용 검정법의 정확도의 개선이고, 식작용의 복잡한 메커니즘의 정밀한 분석을 위해 FITC로 표지된 ROS 대신에 또는 이를 보완하여 사용될 수 있다.

[0141] pHrodo[®] 이 콜라이 형광 바이오입자를 이용한 표지화

[0142] 식작용을, 세포내 식포의 감소된 pH 환경에서 내재화될 경우 형광을 내는 pHrodo[®] 이 콜라이 형광 바이오입자 (Invitrogen)를 사용하여 FACS 기반 검정법에 의해 평가한다. 바이오입자를 제조업체의 지시사항에 따라 제조하였다. 융합성 RPE를 CO₂ 독립적 배지(Invitrogen)가 든 4웰 플레이트의 1개 웰당 50 μl 내지 200 μl 바이오입자와 함께 37°C 에서 16시간 내지 20시간 동안 인큐베이션하였다. 음성 대조군 플레이트를 4°C 에서 인큐베이션하였다. 세포를 현미경 하에 검사하고, 트립신에 의해 수집한 다음, C6 유세포분석기 상에서 10,000 사건을 계수하는 FACS에 의해 분석하였다.

[0143] 표 1. RPE 세포 특성화 및 안전성 테스트

표 1

테스트	사양	테스트 로트
멸균성	음성	음성
마이코플라즈마	음성	음성
세포 밀도	1~2x10 ⁶ 개의 생존 세포/mL (회석 후)	2x10 ⁶ 개의 생존 세포/mL
세포 생존력	최종 수집: > 85%	99%
	해동 후: > 70%	95%
모양	융합성, 조약돌 상피, 중간 색소침착	통과
핵형	46, XX, 정상	46, XX, 정상
DNA 핑거프린팅	hESC MCB에 순응함	순응함
BEST-1 RPE-65 PAX6 MITF 에 대한 hRPE mRNA	hESC와 비교하여 최소 1 log ₁₀ 상향조절됨	RPE-6 1.32 PAX6 2.80 MITF 2.89 BEST-1 3.81
OCT-4 NANOG SOX-2 에 대한 hESC mRNA	hESC(log ₁₀)와 비교하여 하향조절됨: OCT-4 ≤ -2.13 NANOG ≤ -1.95 SOX-2 ≤ -0.63	OCT-4 -3.18 NANOG -2.49 SOX-2 -2.07
베스트로핀 염색에 의한 성숙도	> 70% 염색	71%
면역염색에 의한 순도	> 95% PAX6 및/또는 MITF	100%
	> 95% PAX6 및/또는 베스트로핀	100%
	> 95% ZO-1	100%
hESC 단백질 마커	조사된 9x10 ⁶ 개 세포에서 OCT-4 및 AP로 염색된 세포 2개 미만	0
잔류 유린 DNA	음성	음성
MAP에 의한 유린 바이러스	음성	음성
무스 둔니(<i>Mus dunni</i>) 콩 배양에 의한 레트로바이러스	음성	음성
동종숙주역(ecotropic) 유 린 바이러스	음성	음성
내독소	< 0.50 EU/mL	0.312 EU/mL
식작용에 의한 효능	양성	양성

[0144]

[0145] RPE 세포에 의한 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS의 식작용

[0146] hESC 유래 RPE 및 ARPE-19 세포를 내피 세포 성장 배지(Lonza, 카탈로그 번호 CC-3162, CC-3156)로 구성된 RPE 성장 배지(RPE-GM)에서 배양하였다.

[0147] 식작용 검정법을 위해, RPE 세포를 96웰 배양 플레이트(Becton-Dickinson)에 5x10⁵개 세포/cm²의 밀도로 접종하고, 수분 공급되는 인큐베이터에서 37°C, 5% CO₂에서 유지시켰다. 최적 검정법 관독을 위해, RPE 세포를 RPE-GM에서 3일 내지 5일 동안 배양한 후, 식작용 능력을 평가하였다. 세포를 5일 넘게 배양한 경우, RPE-GM을 10% 태아 소 혈청, 글루타막스(GlutaMax) 및 노르모신(Normocin)이 보충된 DMEM으로 구성된 RPE 유지 배지(RPE-MM)로 바꾸었다. 상기 배지를 2일 내지 3일마다 교환하여, 충분한 영양을 공급하였다. RPE 세포의 식작용 활성의 확인을 위해, pH 민감성 로다민 기반 pHrodo[®] Red로 표지된 간상체 외분절(ROS)(InVision Bioresources, 카탈로그 번호 98740)을 사용하였다. pHrodo[®] Red 마이크로스케일 표지화 키트(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 P35363)를 이용한 ROS 표지화는 이전에 기재되었다. 융합성 RPE 세포가 들어 있는 각각의 웰에 10% FBS 및 노르모신을 함유하는 0.1 mL DMEM 배지 및 0.1 mL 표지된 ROS를 접종하고, 10% FBS 및 노르모신이 보충된 DMEM에서 재구성하였다. RPE 세포의 최적 식작용 능력을 평가하기 위해, 96웰 플레이트 내 상이한 ROS 농도의 1.5x10⁶, 3x10⁶, 3.75x10⁶, 5x10⁶, 6x10⁶, 7.5x10⁶, 10x10⁶ 및 13.5 x10⁶개 ROS/웰을 테스트하였다. ROS 응집을 감소시키고 식작용 효율을 증가시키기 위해, 직접 감각-초음파처리 단계를 간상체 외분절의 재구성 동안 도입하였다. RPE 세포 및 ROS를, 5% CO₂ 및 95% 공기의 분위기 하에 테스트 시료의 경우 37°C에서, 음성 대조군의 경우 12°C 내지 15°C에서 20시간 내지 28시간 동안 인큐베이션하였다. 다음날, ROS를 RPE 세포 단일층과 함께 20시간 내지 28시간 동안 인큐베이션한 후, 배양 배지를 흡인하고, 각각의 웰을 0.2 mL Ca/Mg 무함유

PBS(Gibco/Invitrogen #14190-250)를 이용하여 3회 세척하였다. 0.25% 트립신/EDTA(Sigma, 카탈로그 번호 T4049) + 세포 해리 완충제(Gibco/Invitrogen, 카탈로그 번호 13151) 0.2 mL를 각각의 웰에 1:1의 비율로 첨가하고, 단일 세포 현탁액이 보일 때까지(10분 내지 20분) 실온에서 인큐베이션하였다. 각각의 시료의 세포 현탁액을, 반응을 중화시키기 위해 2 mL DMEM + 10% FBS를 함유하는 적절하게 표지된 둥근 바닥, 폴리스티렌 튜브로 옮기고, 160 g에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 경사분리하여, 약 0.2 mL 내지 약 0.25 mL의 액체를 남겨 두었다. 시료 튜브를 보텍싱하고, RPE 세포에 의한 ROS의 식작용(uptake)을 이전에 기재된 바와 같이 BD Accuri C6 유세포분석기를 사용하여 평가하였다.

[0148] 식작용 능력을 더 증가시키기 위해, 단일층의 나이브(naive) RPE 세포를, 상기 기재된 절차에 따라 pHrodo[®] Red로 표지된 ROS의 식작용을 수행하기 전에 회수 단계와 함께 또는 없이 정해진 기간 동안 비표지된 ROS에 노출시킴으로써 "컴피턴트(competent)"로 만들 수 있다.

참고문헌

Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012 Feb 25;379(9817):713-20. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60028-2. Epub 2012 Jan 24. PubMed PMID: 22281388.

Klimanskaya I. Retinal pigment epithelium. *Methods Enzymol*. 2006;418:169-94. PubMed PMID: 17141036.

Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, Holmes T, Ramos-Kelsey R, Lu B, Girman S, Bischoff N, Sauvé Y, Lanza R. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells*. 2006 Fall;8(3):189-99. PubMed PMID: 17009895.

Klimanskaya I, Hipp J, Rezaei KA, West M, Atala A, Lanza R. Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells*. 2004;6(3):217-45. PubMed PMID: 15671670.

Mao Y, Finnemann SC. Analysis of photoreceptor outer segment phagocytosis by RPE cells in culture. *Methods Mol Biol*. 2013;935:285-95. doi: 10.1007/978-1-62703-080-9_20. PubMed PMID: 23150376; PubMed Central PMCID: PMC3590840.

Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 25;94(24):12932-7. PubMed PMID: 9371778; PubMed Central PMCID: PMC24241.

Miksa M, Komura H, Wu R, Shah KG, Wang P. A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *J Immunol Methods*. 2009 Mar 15;342(1-2):71-7. doi: 10.1016/j.jim.2008.11.019. Epub 2009 Jan 9. PubMed PMID: 19135446; PubMed Central PMCID: PMC2675277.

[0149]

Lu B, Malcuit C, Wang S, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 2009; 21, 2125-2135.

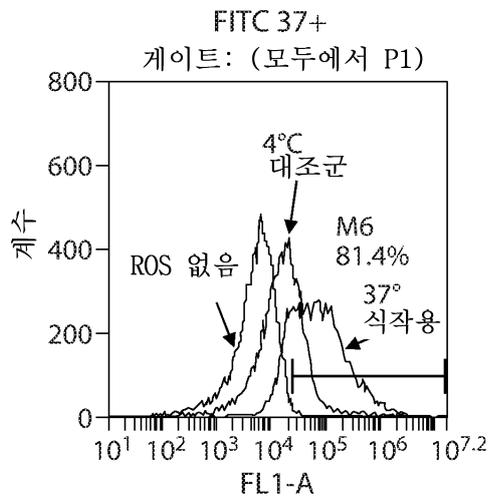
Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 2010; 10, 802-823.

Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005; 85, 845-881.

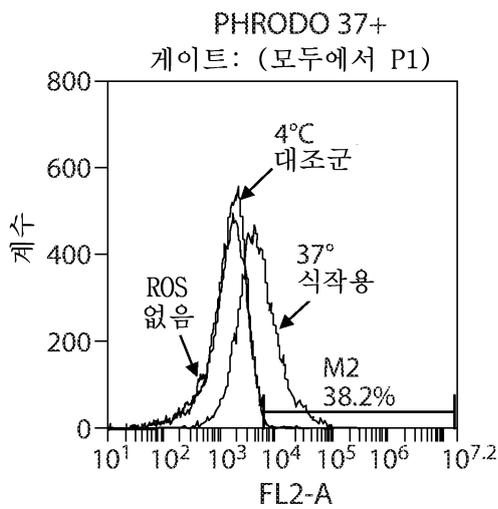
[0150]

도면

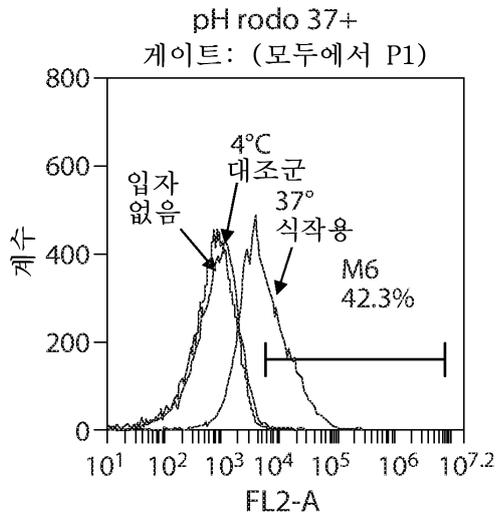
도면1a



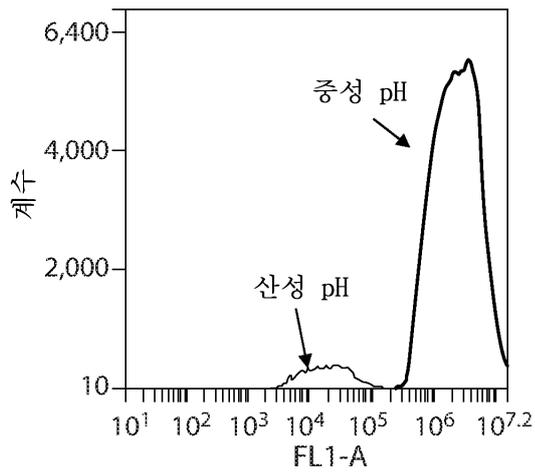
도면1b



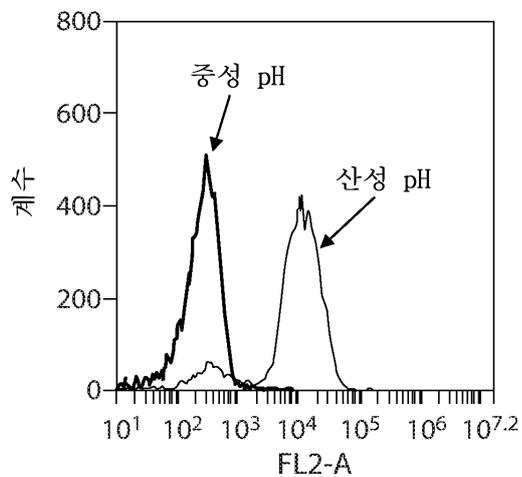
도면1c



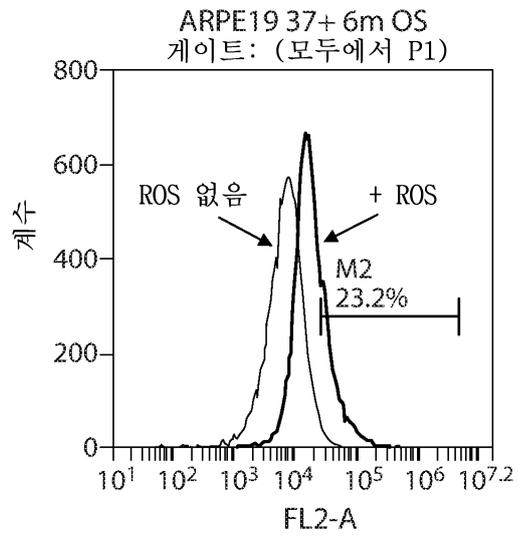
도면2a



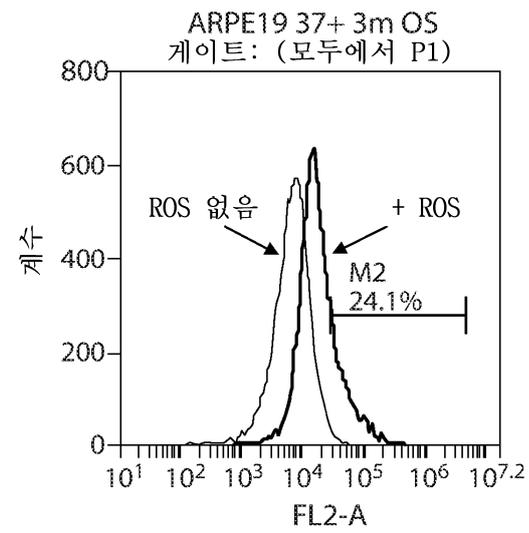
도면2b



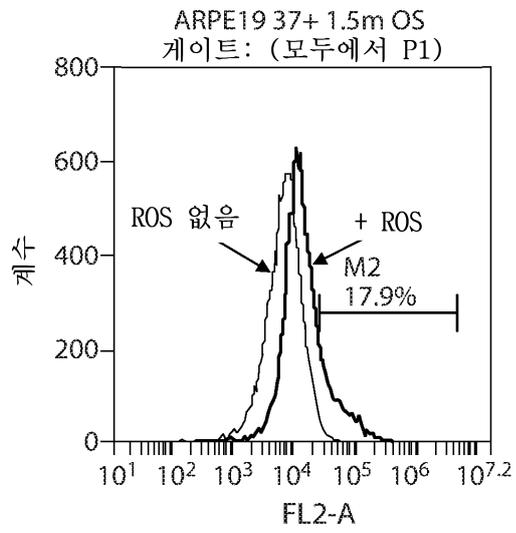
도면3a



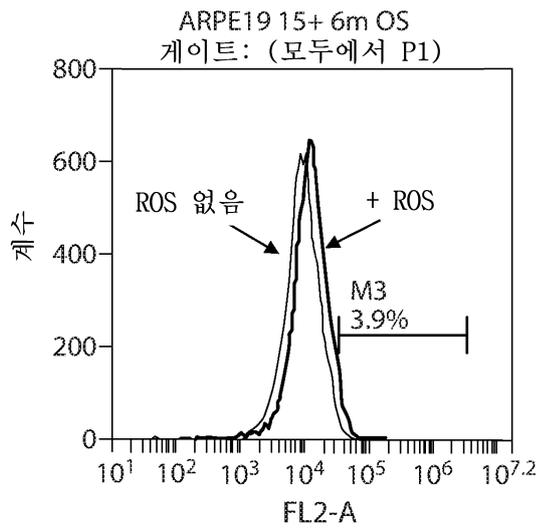
도면3b



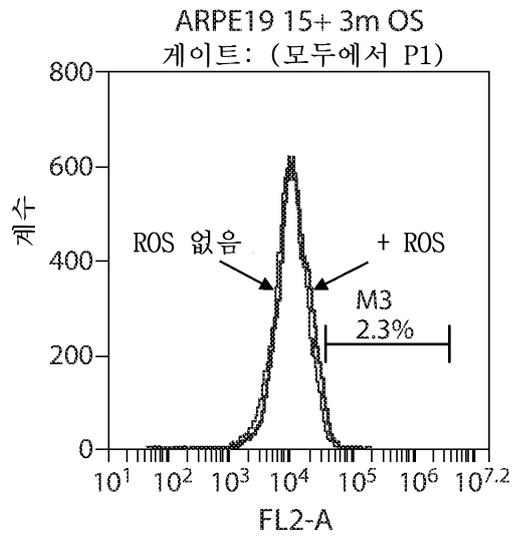
도면3c



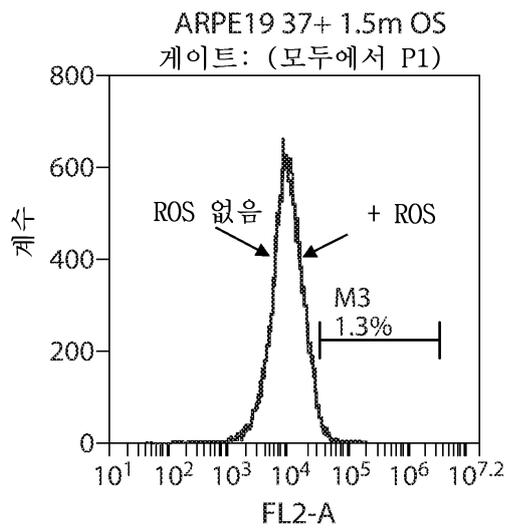
도면3d



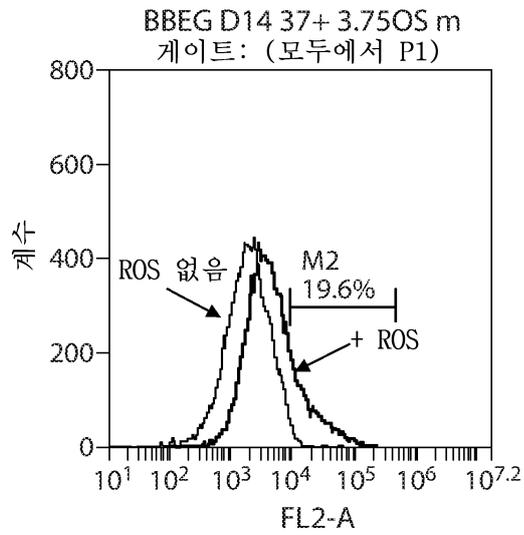
도면3e



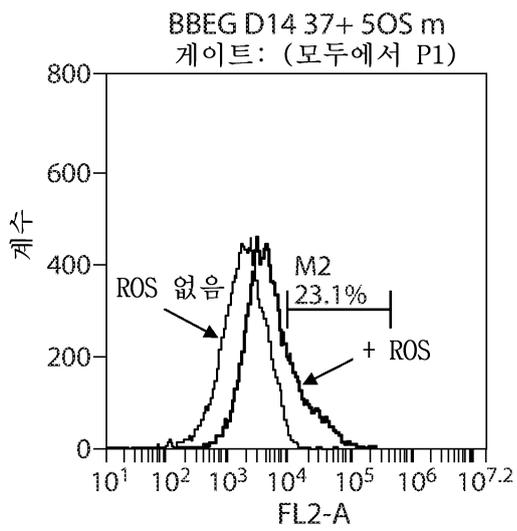
도면3f



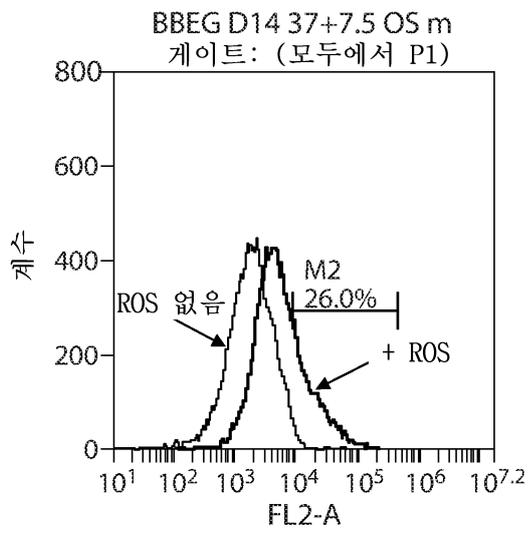
도면4a



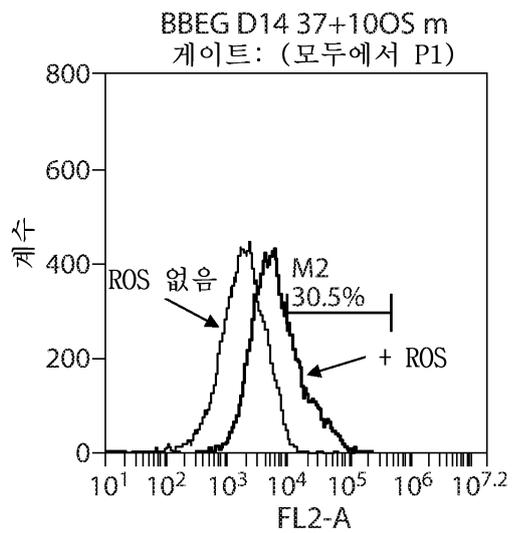
도면4b



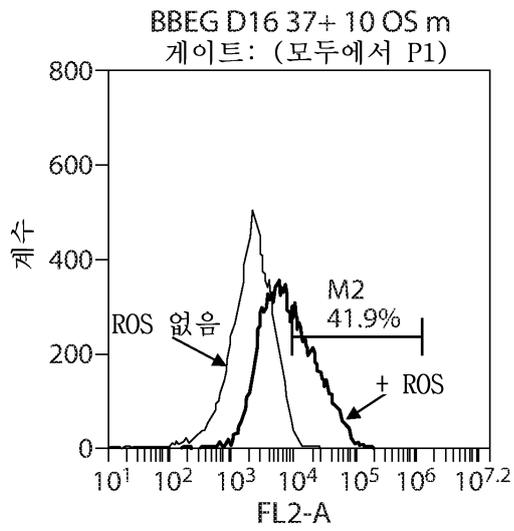
도면4c



도면4d



도면4e



도면4f

