(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0101014
(43) 공개일자 2021년08월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/30 (2015.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) *C12N 5/079* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/30 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0015109
(22) 출원일자 2020년02월07일
심사청구일자 2020년02월07일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
이주용
서울 서초구 신반포로 267, 340동 702호 (잠원동, 신반포21차 아파트)
정선호
경기도 이천시 이섭대천로 1451, 107동 603호(증포동, 증포동 한솔솔파크)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

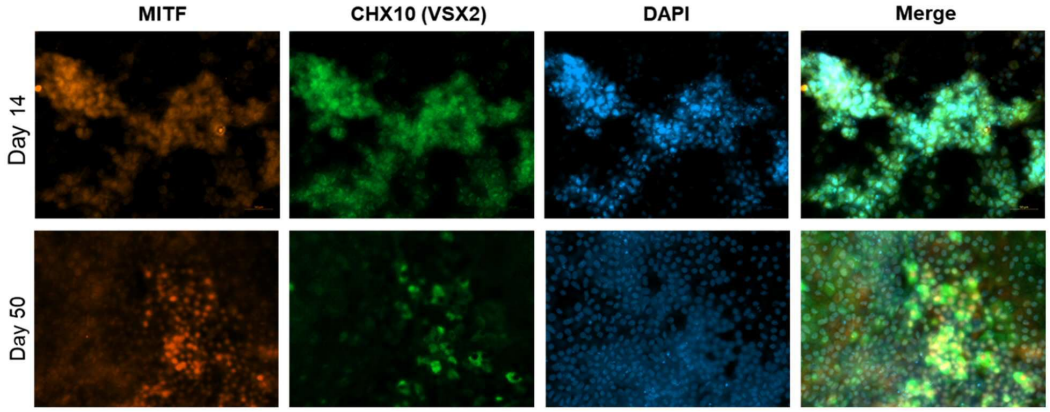
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 포함하는 세포 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 포함하는 세포 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 일정기간 동안 일정한 농도로 ROCK 억제제를 처리하여 인간 전분화능 줄기세포 (배아줄기세포 혹은 역분화줄기세포)로부터 분화시킨, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 포함하는 세포 조성물, 이를 포함하는 망막질환의 예방 또는 치료용 세포 치료제, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법 및 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로 분화시키기 위한 분화용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 9/0048 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
C12N 5/0621 (2013.01)
C12N 2501/105 (2013.01)
C12N 2506/03 (2013.01)
(72) 발명자
강은주
서울특별시 중구 다산로 32, 8동 1606호(신당동, 남산타운)
소성준
경상남도 창원시 마산회원구 내서읍 광려천동로 3, 2층 201호

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 전분화능 줄기세포로부터 분화된, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 포함하는 세포 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인간 전분화능 줄기세포는 배아 또는 체세포 유래인, 세포 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 망막세포는 CHX10 및 MITF를 동시에 발현하는, 세포 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포는 ROCK 억제제 처리에 의해 수득되는, 세포 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 인간 전분화능 줄기세포로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로의 분화 기간에 있어서 적어도 12일 동안 처리하는, 세포 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 5 μM/일 내지 15 μM/일로 처리하는, 세포 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 세포 조성물을 포함하는, 망막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 막망질환은 망막미형성, 망막변성(retinal degeneration), 노인성황반변성(age-related macular degeneration), 당뇨병성 망막질환 (diabetic retinopathy), 망막색소변성(retinitis pigmentosa), 선천성망막위축증, 레버씨 선천성 흑암시 (Leber congenital amaurosis), 망막박리, 녹내장(glaucoma) 및 시신경병증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환인, 망막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 세포 치료제는 주사제로 투여되는, 망막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 세포 치료제는 망막 하에 투여되는, 망막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.

청구항 11

(a) ROCK 억제제를 처리하여, 인간 전분화능 줄기세포를 망막색소상피세포로 분화시키는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 수득하는 단계;를 포함하는, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 (a) 단계는 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) 배지

에 인간 전분화능 줄기세포를 배양하는 것인, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 배지는 N2, B27 및 비필수 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상을 포함하는, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 배지는 니코틴아미드, BMP 신호전달 억제제, Wnt 신호전달 억제제, IGF1R 작용제, FGF 신호전달 작용제, 액티빈, SU5402 및 CHIR 99021로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상으로 보충되는, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 (a) 단계는 인간 전분화능 줄기세포를 12일 내지 16일 동안 배양하여 망막색소상피세포로 분화시키는 것인, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 적어도 12일 동안 처리되는, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 17

제11항에 있어서, 상기 (b) 단계 전에, (a-1) 상기 (a) 단계에서 분화된 망막색소상피세포를 농축 및 팽창시키는 단계를 추가로 포함하는, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 (a-1) 단계에서 ROCK 억제제가 0일 내지 48일 동안 처리되는, 광수용체와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 (a-1) 단계는 X-VIVO 10 및 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군으로부터 선택되는 배지에 분화된 망막색소상피세포를 배양하여 농축 및 팽창시키는 것인, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 20

제11항 또는 제18항에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 5 μM/일 내지 15 μM/일로 처리되는, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 21

제11항에 있어서, 상기 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포는 CHX10 및 MITF를 동시에 발현하는 것인, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법.

청구항 22

ROCK 억제제를 포함하는, 인간 전분화능 줄기세포로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로 분화시키기 위한 분화용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 포함하는 세포 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 일정기간 동안 일정한 농도로 ROCK 억제제를 처리하여 인간 전분화능

줄기세포 (배아줄기세포 혹은 역분화줄기세포)로부터 분화시킨, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 포함하는 세포 조성물, 이를 포함하는 망막질환의 예방 또는 치료용 세포 치료제, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법 및 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로 분화시키기 위한 분화용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 많은 사람들이 망망색소상피세포(retinal pigment epithelium, RPE), 간체시세포 (rod photoreceptor), 추체시세포(cone photoreceptor), 양극세포(bipolar cells), 아마크린세포, 망막절제포, 뮐러세포(muller cells), 및 수평세포를 포함하는 신경 망막의 세포, 부르크막(bruch's membrane) 및/또는 맥락막의 기능장애, 손상, 또는 상실과 관련된 망막 질환으로 고통 받고 있다. 질환의 진행은 종종 광수용체/RPE/부르크막/맥락막 복합체의 불안정화, 및 그에 따른 RPE와 신경 망막층의 기능 장애와 사멸을 수반한다. 노인성황반변성 (age-related macular degeneration, AMD)의 경우, 세포 사멸의 위치가 황반에 있어서, 중심 시력의 손상을 초래한다. 망막 자체와 RPE의 변성 또는 퇴화와 관련된 특정 장애는 AMD, 베스트병(Best disease, 노른자모양 황반 이영양증), 망막색소변성(RP)의 서브타입, 및 스타가르트 질환 및 스타가르트 유사 질환과 같은 황반 이영양증(macular dystrophies)을 포함한 유전성 황반 변성이다.

[0003] 망막 변성 질환 및 손상의 치료에 사용될 수 있는 인간 줄기세포로부터 망막색소상피세포(RPEC)를 생산할 필요가 있다. 유사하게, 일부 질환 상태에서 RPEC의 생존 및 기능을에 의존하는 광수용체(PhR)를 교체할 필요가 있다. 이러한 질병에 대한 잠재적 치료법은 이들 질병, 장애 또는 상태에 영향을 받는 사람들의 망막에 RPEC를 이식하는 것이다. 대상체의 망막에 건강한 이식된 RPE 세포의 첨가는 현재 변성을 지연, 정지 또는 역전시킬 수 있고, 망막 기증을 개선시키며, 상기 언급된 질환, 질병, 또는 상태에 의해 야기될 수 있는 실명을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다. AMD 또는 광수용체 특이적 변성의 경우, 치료적 이점을 제공하기 위해 RPEC, 광수용체세포, 또는 이 둘 다를 교체해야 할 수도 있다.

[0004] 망막의 중요한 부분인 황반은 망막의 중앙에 위차하고 있으며, 세밀한 시각적 부분 및 색 인식을 담당하고, 얼굴 인식 및 읽기와 같은 많은 일상적인 활동에 중요하다. 질병의 진행에서 황반은 망막색소변성(RP), 노인성황반변성 및 베스트병과 같이 유해한 영향을 받을 수 있다. 꽤 자주, RPE는 이들 질환이 강력해진 경우 기능을 잃거나 심지어 불능(fail)이 된다. 이는 RPEC가 망막 재생 및 시력에 결정적인 광수용체 기능을 지원하기 때문에 치명적일 수 있다. 이러한 부전으로 인해 시력이 왜곡되고, 궁극적으로 실명에 이를 수도 있다.

[0005] 한편, 최초의 인간 배아줄기세포주가 확립된 이후부터, 인간 배아줄기세포 및 역분화줄기세포는 매우 다양한 종류의 세포로 분화될 수 있는 능력을 가지고 있으며, 상기 분화된 세포들이 각종 장기에서 발생하는 질환들을 치료할 수 있는 인간 세포 치료법에 적용될 수 있을 것으로 제안되어 왔다. 이에 따라, 인간 전분화능 줄기세포(human pluripotent stem cells, hPSCs)의 분화를 통해 광수용체세포 또는 망막색소상피세포를 수득하기 위한 노력이 있었지만, 이들 세포를 각각 분화시키는 방법만 개발되어 왔을 뿐, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포 및 이의 제조방법에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 인간 전분화능 줄기세포로부터 망막상피세포로의 분화 과정 중 일정 기간 동안 ROCK 억제제를 처리하는 경우, 하나의 세포에서 광수용체세포와 망막상피세포의 특성이 동시에 발현되는 신규한 망막세포의 형태가 수득됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 망막변성의 치료와 관련하여, 국내 공개특허 제10-2017-0049775호는 중간엽 줄기세포에 miR-410 억제제를 처리하여 망막색소상피로 분화시키는 방법 및 이로부터 분화된 망막색소상피를 망막질환 세포 치료제로 사용하는 것을 개시하고 있으나, 하나의 세포에서 광수용체세포와 망막상피세포의 특성이 동시에 발현되는 세포 형태에 대해서는 언급된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 전술한 특성을 갖는 망막세포를 포함하는 망막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 인간 전분화능 줄기세포로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로 분화시키기 위한 분화용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 인간 전분화능 줄기세포로부터 분화된, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 포함하는 세포 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 인간 전분화능 줄기세포는 배아 또는 체세포 유래일 수 있다.

[0014] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 망막세포는 CHX10 및 MITF를 동시에 발현할 수 있다.

[0015] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 망막세포는 ROCK 억제제 처리에 의해 수득될 수 있다.

[0016] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 ROCK 억제제는 인간 전분화능 줄기세포로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로의 분화 기간에 있어서 적어도 12일 동안 처리할 수 있다.

[0017] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, ROCK 억제제는 5 μM/일 내지 15 μM/일로 처리할 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한, 전술한 세포 조성물을 포함하는, 망막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제를 제공한다.

[0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 막망질환은 망막미형성, 망막변성(retinal degeneration), 노인성 황반변성(age-related macular degeneration), 당뇨병성 망막질환 (diabetic retinopathy), 망막색소변성(retinitis pigmentosa), 선천성망막위축증, 레버씨 선천성 흑암시 (Leber congenital amaurosis), 망막박리, 녹내장(glaucoma) 및 시신경병증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환일 수 있다.

[0020] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 세포 치료제는 주사제로 투여될 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 세포 치료제는 망막 하에 투여될 수 있다.

[0022] 본 발명은 또한, (a) ROCK 억제제를 처리하여, 인간 전분화능 줄기세포를 망막색소상피세포로 분화시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 수득하는 단계;를 포함하는, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (a) 단계는 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) 배지에 인간 전분화능 줄기세포를 배양하여 망막상피세포로 분화시키는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 배지는 N2, B27 및 비필수 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상을 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 배지는 니코틴아미드, BMP 신호전달 억제제, Wnt 신호전달 억제제, IGF1R 작용제, FGF 신호전달 작용제, 액티빈, SU5402 및 CHIR 99021로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상으로 보충될 수 있다.

[0026] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (a) 단계는 인간 전분화능 줄기세포를 12일 내지 16일 동안 배양하여 망막색소상피세포로 분화시키는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (a) 단계에서 ROCK 억제제는 적어도 12일 동안 처리될 수 있다.

[0028] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (b) 단계 전에, (a-1) 상기 (a) 단계에서 분화된 망막색소상피세포를 농축 및 팽창시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (a-1) 단계에서 ROCK 억제제는 0일 내지 48일 동안 처리될 수 있다.

[0030] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (a-1) 단계는 X-VIVO 10 및 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군으로부터 선택되는 배지에 분화된 망막색소상피세포를 배양하여 농축 및 팽창시키는 것일 수 있다.

[0031] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 ROCK 억제제는 5 μM/일 내지 15 μM/일로 처리될 수 있다.

[0032] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포는 CHX10 및 MITF를 동시에 발현하는 것일 수 있다.

[0033] 본 발명은 또한, ROCK 억제제를 포함하는, 인간 전분화능 줄기세포로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로 분화시키기 위한 분화용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0034] 본 발명에 따른 망막세포는 하나의 세포에서 광수용체세포의 마커인 MITF와 망막색소상피세포의 마커인 CHX10이 동시에 발현되어 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 신규 망막세포의 형태로, 이를 세포 치료제로 사용 시 광수용체세포 또는 망막상피세포를 단독으로 사용하는 것보다 훨씬 더 효과적으로 망막질환을 치료할 수 있다. 또한, 기존에 공지된 인간 전분화능 줄기세포로부터 망막색소상피세포로의 분화방법에 일정 기간 동안 일정 농도로 ROCK 억제제를 처리하는 간단한 방식으로 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 수득이 가능하여, 인간 전분화능 줄기세포로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포로 각각 분화시키는 기존의 방법에 비해 경제성이 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 인간 전분화능 줄기세포로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로의 분화 프로토콜을 나타낸 것이다.

도 2는 도 1의 분화 프로토콜에서 RPEC로의 분화 14일 동안 ROCK 억제제를 처리한 후 수득된 RPEC에서 RPEC 마커인 PAX6와 MIFT의 발현 및 생존율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 도 1의 분화 프로토콜에서 RPEC로의 분화 및 성숙과정 (농축 및 팽창) 50일 동안 ROCK 억제제인 파수딜을 처리한 후 수득된 망막세포에서 광수용체세포 마커인 CHX10과 RPEC 마커인 MIFT의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 PDE6B 결손 망막변성 실험동물 랫드의 망막 하에 망막세포 현탁액을 주입하는 방법을 나타낸 것이다.

도 5는 PDE6B 결손 망막변성 실험동물 랫드로 투여하기 전 촬영한 망막세포 사진이다.

도 6의 a) 내지 g)는 PDE6B 결손 망막변성 실험동물 랫드의 망막 하에 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포 현탁액을 투여한 후, 시간 경과에 따른 망막세포의 증식 양상을 안저촬영으로 확인한 것이고 h)는 빛간섭단층촬영으로 확인한 것이다.

도 7의 a) 내지 d)는 다른 PDE6B 결손 망막변성 실험동물 랫드의 망막 하에 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포 현탁액을 투여한 후, 시간 경과에 따른 망막세포의 증식 양상을 안저촬영으로 확인한 것이고, e)는 빛간섭단층촬영으로 확인한 것이고.

도 8은 PDE6B 결손 망막변성 실험동물 랫드의 망막 하에 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포 현탁액을 투여한 후, 2주 째에 안구의 H&E 염색 조직 검사 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 PDE6B 결손 망막변성 실험동물 랫드의 망막 하에 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포 현탁액을 투여한 후, 8주 째에 안구의 H&E 염색 조직 검사 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 PDE6B 결손 망막변성 실험동물 랫드의 망막 하에 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포 현탁액을 투여한 후, 23주 째에 전기생리학적검사를 수행한 결과를 나타낸 것으로, 상단은 정상군의 ERG 소견을 나타낸 것이고, 하단은 망막세포 현탁액이 투여된 실험군과 투여되지 않은 대조군 사이의 추세포 (cone cell) 및 간세포 (rod cell)의 진폭 차이를 비교한 것이다.

도 11은 망막세포 현탁액을 투여한 PDE6B 결손 망막변성 실험동물 랫드의 안구 조직 절편에서 망막세포가 증식하는 부위의 망막세포가 인간 기원의 세포인지를 확인하기 위해 미토콘드리아 DNA PCR을 수행한 결과를 나타낸

것이다.

도 12는 망막세포 현탁액을 투여한 PDE6B 결손 망막변성 실험동물 랫드의 안구 조직 절편에서 망막세포가 증식하는 부위의 망막세포가 인간 기원의 세포인지를 확인하기 위해 인간 유래 세포에 반응하는 MITF 조직 염색을 수행한 결과를 나타낸 것으로, a)는 전체 안구 단면의 염색 사진이고, 사각형으로 표시된 부분은 확대 부위의 위치를 나타낸다. b)의 왼쪽 상단은 확대 부위의 H&E 조직 염색 사진이고, 왼쪽 하단은 확대 부위를 DAPI 염색한 사진이며, 오른쪽 하단은 망막 하 색소를 가진 이식세포의 MITF 염색 사진이고, 오른쪽 상단은 DAPI와 MITF 염색 결과를 병합한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 상술한 바와 같이, 망막질환의 치료를 위해 주로 사용되는 광수용체세포 및 망막색소상피세포는 인간 배아줄기세포로부터 각각 단독으로 분화되어 세포 치료제로 활용되고 있으나, 보다 효과적인 치료를 위해 이들 두 가지 세포의 특성을 모두 나타내는 망막세포의 필요성이 대두되고 있다. 이에, 본 발명자들은 인간 배아줄기세포로부터 망막상피세포로의 분화 과정 중 일정 기간 동안 ROCK 억제제를 처리하는 경우, 하나의 세포에서 광수용체세포와 망막상피세포의 특성이 동시에 발현되는 신규한 망막세포의 형태가 수득됨을 확인함으로써 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다. 본 발명에 따른 망막세포는 하나의 세포에서 광수용체세포의 마커인 MITF와 망막색소상피세포의 마커인 CHX10이 동시에 발현되어 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 신규 망막세포의 형태로, 이를 세포 치료제로 사용 시 광수용체세포 또는 망막상피세포를 단독으로 사용하는 것보다 훨씬 더 효과적으로 망막질환을 치료할 수 있다. 또한, 기존에 공지된 인간 전분화능 줄기세포로부터 망막색소상피세포로의 분화방법에 일정 기간 동안 일정 농도로 ROCK 억제제를 처리하는 간단한 방식으로 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 수득이 가능하여, 인간 전분화능 줄기세포로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포로 각각 분화시키는 기존의 방법에 비해 경제성이 우수하다.

[0037] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0038] 본 발명은 인간 전분화능 줄기세포로부터 분화된, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 포함하는 세포 조성물을 제공한다.

[0039] 본 발명의 세포 조성물에 있어서, 용어 "인간 전분화능 줄기세포"란 내배엽, 중배엽, 및 외배엽의 세포로 분화할 수 있는 전분화능 (Pluripotency)을 가지는 세포, 또는 인간의 몸을 구성하는 근육, 뼈, 뇌, 피부, 심장 등의 서로 다른 조직 또는 기능에 있어 밀접하게 관련된 세포로 분화할 수 있는 다분화능(Multipotency)을 가지는 세포를 의미한다. 바람직하게 본 발명의 인간 전분화능 줄기세포는 인간 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell, iPS cell)일 수 있고, 상기 유도만능줄기세포는 섬유아세포 (Fibroblast), 각질형성세포 (Keratinocyte), 간세포 (Hepatocyte), 멜라닌세포 (Melanocyte), 양막세포 (Amniotic cells), 제대혈세포 (Cord blood cells), 지방유래줄기세포 (Adipose derived stem cells), 또는 혈액 (예를 들어, 말초혈액) 또는 소변으로부터 수득된 체세포 유래일 수 있다.

[0040] 본 발명에서 용어 "인간 유도만능줄기세포"란 인간의 체세포에 역분화 유전자를 삽입하여 배아줄기세포와 유사한 분화능을 가진 미분화 상태의 줄기세포를 확립하는 방식으로 만들어진 것으로, 분화능력이 배아줄기세포와 비슷한 수준인 줄기세포를 의미한다. 또한, 상기 인간 배아줄기세포 또는 인간 유도만능줄기세포는 공지의 방법에 의해 당업자에 의해 용이하게 구축될 수 있다.

[0041] 본 발명에서 용어 "분화"란 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 각각의 구조나 기능이 특수화되는 현상, 즉, 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위해 형태나 기능이 변하는 것을 의미한다. 구체적으로 본 발명에서는 인간 전분화능 줄세포로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 모두 나타내는 망막세포로의 분화를 의미한다.

[0042] 본 발명에서 용어 “광수용체세포 (photoreceptor cell)” 란 각막과 렌즈를 통해서 들어온 빛 에너지를 세포 내 시각색소를 이용해 전기에너지로 변환시켜 뇌로 전달케하는, 형태와 색채를 인지하게 하는 시각의 가장 중요한 세포를 의미한다. 광수용체세포층에는 밝은 빛을 수용하는 원추체 세포와 약한 빛을 수용하는 간상체 세포가 있다. 원추체 세포는 망막의 중앙부인 황반 부근에 많이 분포하여, 형태와 색채를 인지하는 역할을 하는 반면, 간상체 세포는 망막의 주변부에 주로 분포하며, 형태와 명암을 인지하는 역할을 한다. 본 발명의 세포 조성물에 있어서, 상기 광수용체세포의 특성은 광수용체세포의 마커인 CHX10(VSX2)의 발현 여부로 확인될 수 있다.

[0043] 본 발명에서 용어 본 발명의 용어 "망막색소상피(retinal pigment epithelium, RPE)"란, 외부 혈관 망막 베리

어의 일부분을 형성하는 단층의 색소세포들은 의미한다. 이들 세포들은 망막의 기능을 유지하는데 있어서 중요한 역할을 수행하는 것을 특징으로 하며, 광에너지를 흡수, 시각 사이클의 유지를 위한 광수용체와 상호작용, 광수용체와 맥락모세혈관층의 결합구조를 유지하는 다양한 성장인자들을 분비하고, 이온, 물, 대사 산물을 서브레티날 공간으로부터 혈액으로 이송하는 역할, 광수용체의 외절 (outer segment)의 식세포 작용을 수행할 수 있다고 알려져 있다. 본 발명의 세포 조성물에 있어서, 상기 망막색소상피세포의 특성은 망막색소상피세포의 마커인 PAX6 및 MITF의 발현 여부로 확인될 수 있고, 보다 바람직하게는 MITF의 발현 증가 여부로 확인될 수 있다.

[0044] 본 발명의 세포 조성물에 있어서, 인간 전분화능 줄기세포로부터 분화된 망막세포는 망막색소상피세포의 마커인 CHX10이 동시에 발현되어 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 신규한 망막세포의 형태로, 종래의 인간 전분화능 줄기세포로부터 망막색소상피세포로의 분화 프로토콜에 ROCK (Rho-associated kinase) 억제제를 처리함으로써 수득될 수 있다.

[0045] 본 발명의 세포 조성물에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 파수딜 (Fasudil), Y-27632, HA-1077, Y-39983 및 Wf-536로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 1종일 수 있다.

[0046] 본 발명의 세포 조성물에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 인간 전분화능 줄기세포에 적어도 12일 동안 처리할 수 있다. 바람직하게 ROCK 억제제는 종래에 공지된 인간 전분화능 줄기세포로부터 망막색소상피세포로의 전체 분화 프로토콜에서 12일 내지 60일 동안 처리할 수 있으며, 보다 바람직하게는 14일 내지 50일 동안 5 μM/일 내지 15 μM/일의 농도로 처리할 수 있다.

[0047] 만일 상기 ROCK 억제제가 12일 미만으로 처리되는 경우 종양이 발생하는 문제가 있을 수 있고, 60일을 초과하여 처리되는 경우 광수용체의 발현이 감소하는 문제가 발생할 수 있다. 또한, 상기 ROCK 억제제가 하루에 상기 농도 범위 미만으로 처리되는 경우 분화세포가 자연사멸 (apoptosis)하는 문제가 발생할 수 있고, 상기 농도 범위를 초과하여 처리되는 경우 또한 세포가 약물 중독에 의해 사멸 (death)하는 문제가 발생할 수 있다.

[0048] 본 발명은 또한, 전술한 세포 조성물을 포함하는, 망막질환 예방 또는 치료용 세포 치료제를 제공한다.

[0049] 본 발명에서 용어 "세포 치료제(cellular therapeutic agent)"란, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0050] 본 발명의 세포 치료제에 있어서, 상기 망막질환은 광수용체세포 및 망막색소상피세포의 약화로 발생하는 모든 망막질환을 포함하며, 예를 들어, 망막미형성, 망막변성(retinal degeneration), 노인성황반변성(age-related macular degeneration), 당뇨병성 망막질환 (diabetic retinopathy), 망막색소변성(retinitis pigmentosa), 선천성망막위축증, 레버씨 선천성 흑암시 (Leber congenital amaurosis), 망막박리, 녹내장(glaucoma) 및 시신경병증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명의 세포 치료제는 체외에서 인간 전분화능 줄기세포로부터 광수용체세포 및 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로의 분화를 유도하여, 이를 상기 질환을 갖는 환자에게 투여하기 위한 것으로서, 당업계에 일반적인 제형, 예컨대, 주사제의 형태로 제조될 수 있으며, 외과수술적으로 망막부위에 직접 이식하거나, 정맥에 투여된 후 망막부위로 이동하거나 또는 망막 하에 주입될 수 있다. 바람직하게는 주사제의 형태로 망막 하에 투여될 수 있다.

[0052] 본 발명의 세포 치료제는 하나의 망막세포에서 광수용체세포의 특성 및 망막색소상피세포의 특성이 모두 발현되는바, 이들 두 가지 세포 유형으로 각각 분화된 세포만을 단독으로 사용하는 것보다 망막질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

[0053] 본 발명의 세포 치료제는 이식 시 면역 거부 반응이 일어나지 않도록 면역반응 억제제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 세포 치료제의 투여량은 환자의 중함 정도, 투여 경로, 투여 방법, 투여 횟수, 치료기간, 환자의 나이 및 성, 및 질병의 정도에 따라 변할 수 있으며, 이는 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0054] 본 발명은 또한, 전술한 세포 치료제를 개체에게 투여하는 것을 포함하는 망막질환을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 세포 치료제의 투여는 임의의 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개, 마우스, 랫드 및 고양이 등의 가축을 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 세포 치료제를 도입하는 것을 의미하며, 분화된 세포의 이식을 포함한다. 본 발명의 세포 치료제의 투여 경로는 눈에 도달할 수 있는 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 바람직하게는 망막 하에 투여될 수 있다.

[0056] 본 발명의 세포 치료제는 생리학적으로 양립가능한 담체에 현탁될 수 있다. 본 발명에서 용어 "생리학적으로 양립가능한 담체(physiologically compatible carrier)"는 제형의 다른 성분들과 양립가능하며, 이의 수용자에게 유해하지 않은 담체를 가리킨다. 당해 기술분야의 숙련가는 생리학적으로 양립가능한 담체에 대해 잘 알고 있다. 적합한 담체의 예에는 세포 배양배지(예컨대, 이글의 최소필수배지), 인산완충식염수, 행크 의 균형잡힌 염 용액 +/-글루코오스(Hank's balanced salt solution: HBSS), 및 다중 전해질 용액, 예컨대 Plasma-Lyte™ A (Baxter)가 포함된다.

[0057] 본 발명의 세포 치료제는 광수용체세포 및 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 치료학적 유효량으로 포함한다. 본 발명에서 용어 "치료학적 유효량(therapeutically effective amount)"은 특정 장애의 치료에 효과를 발휘하기 위해 즉, 망막질환과 관련된 증상의 양 및/또는 중증도의 감소를 위해 필요한 세포의 개수를 말한다. 치료학적 유효량은 망막질환의 유형 및 범위에 따라 다양하고, 또한 개체의 전체적인 상태에 따라 달라질 수 있다.

[0058] 본 발명은 또한, (a) ROCK 억제제를 처리하여, 인간 전분화능 줄기세포를 망막색소상피세포로 분화시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포를 수득하는 단계;를 포함하는, 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포의 제조방법을 제공한다.

[0059] 본 발명의 제조방법은 종래에 공지된, 인간 전분화능 줄기세포로부터 망막색소상피세포로의 분화 프로토콜을 기반으로 하되, 전체 분화 프로토콜에서 12일 내지 60일 동안 ROCK 억제제를 처리하는 것을 포함한다.

[0060] 본 발명의 제조방법에 있어서, (a) 단계는 인간 전분화능 줄기세포를 망막색소상피세포로 분화시키는 단계로, 상기 (a) 단계의 배지는 인간 전분화능 줄기세포를 망막색소상피세포로 분화시키기 위해 사용되는 것으로 공지된 모든 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 예를 들어, DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) 배지를 사용할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 배지는 인간 전분화능 줄기세포로부터 망막색소상피세포로 분화시키기 위해 배지에 첨가되는 것으로 공지된 모든 물질을 제한 없이 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 (a) 단계의 배지는 N2, B27 및 비필수 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상을 포함할 수 있으며, 추가로 니코틴아미드, BMP 신호전달 억제제, Wnt 신호전달 억제제, IGF1R 작용제, FGF 신호전달 작용제, 액티빈, SU5402 및 CHIR 99021로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이 보충될 수 있다.

[0062] 본 발명에서 용어 본 발명에서 용어, “BMP (bone morphogenetic protein: 골형성단백질) 신호전달 억제제”란 BMP 신호전달을 억제하는 물질군을 의미한다. BMP들은 TGF-β (transforming growth factor-β) 슈퍼 패밀리에 속하는 신호전달계 단백질로서 초기 태생기 분화, 태생기 조직형성 및 성인 조직의 항상성 유지 등을 조절한다. 특히, 초기 태생기에서 BMP의 농도 차이는 배아의 등배 형성과정에서 축 형성에 결정적 작용을 한다. 또한, BMP의 활성화 억제는 태생기의 척추동물과 무척추동물의 신경형성에 필수적이다. 세포 외로 분비된 BMP들은 세포막의 Type I과 Type II 세린/트레오닌 키나제 (serine/threonine kinase) 수용체들에 결합하여 BMP 신호전달을 시작하게 된다. Type II 수용체는 Type I 수용체를 인산화시키고, 인산화된 Type I 수용체는 세포내의 기질인 Smad 단백질을 인산화시켜 세포 내의 신호전달이 이루어진다. 수용체에 의해 조절되는 Smad 단백질을 R-Smad (Receptor regulated Smad)라고 하며, Smad-1, 2, 3, 5 및 8 들이 R-Smad에 속한다. 이들은 세포 내의 파트너인 Co-Smad (Common partner Smad)인 Smad-4와 결합하여 세포핵 내로 이동하여 전사인자와 결합하여 목표 유전자들의 전사를 조절한다 (Yamamoto & Oelgeschlager, Naturwissenschaften, 2004; 91: 519-34). BMP 신호전달 억제제는 세포 외에 존재하는 BMP와 세포표면의 수용체와의 결합을 막는 물질들을 말한다. BMP 신호전달 억제제로는 노긴 (Noggin), 코르딘 (Chordin), 트위스트 낭배형성 인자 (Twisted gastrulation, Tsg), 서버러스 (Cerberus), 코코 (Coco), 그렘린 (Gremlin), PRDC (Protein related to DAN and Cerberus), DAN (differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma), 단테 (dante), 폴리스타틴 (follistatin), USAG-1 (uterine sensitization-associated gene 1), 도조모르핀 (dorsomorphin) 또는 스클레로스틴 (Sclerostin) 등이 있다. 이 중 노긴은 BMP 신호전달의 활성을 억제하여 신경조직을 유도하고 배쪽의 신경 외배엽이나 중배엽을 등쪽화시킨다. 노긴은 BMP 그룹 중 BMP-2, BMP-4, BMP-7과 결합하여, 상기 BMP가 그들

의 수용체에 결합하는 것을 방해한다 (Yanagita, Cytokine Growth Factor Rev., 2005; 16: 309-17).

[0063] 본 발명의 제조방법에 있어서, BMP 신호전달 억제제는 BMP 신호전달을 억제시킬 수 있는 물질은 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 노긴, 코르딘, 트위스티드 낭배형성 인자, 서버러스, 코코, 그렘린, PRDC, DAN, 단테 (dante), 폴리스타틴 (follistatin), USAG-1 (uterine sensitization-associated gene 1), 도조모르핀 (dorsomorphin) 또는 스클레로스틴을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 노긴이다.

[0064] 본 발명에서 용어 "Wnt 신호전달 억제제"란 세포 외에 존재하는 Wnt 단백질과 세포막에 존재하는 Frizzled 수용체나 보조수용체인 LRP 사이의 결합을 방지하거나 또는 세포 내에서 Wnt에 의해 매개되는 신호전달을 억제하는 물질을 의미한다 (Kawano & Kypta, J Cell Sci. 2003; 116: 2627-34). Wnt 신호전달 억제제는, Wnt 에 의해 매개되는 신호전달을 억제할 수 있는 것인 한 특별히 한정되지 않는다. Wnt 신호전달 억제제로서는 예를 들면, 보조수용체인 LRP의 억제제의 일종인 Dkk (Dickkopf) 패밀리 (Dkk-1, Dkk-2, Dkk-3 및 Dkk-4), Wise, Wnt 수용체 억제제 (sFRP: secreted Frizzled-related protein) 패밀리, Frizzled의 CRD 결합 도메인 (Frizzled-CRD domain), WIF-1 (Wnt inhibitory factor-1), IWP-2, IWP-3, IWP-4, 서버러스, Wnt 항체, 도미넌트 네가티브 Wnt 단백, Axin의 과발현, GSK (글루코겐 합성효소 키나제)의 과발현, 도미넌트 네가티브 TCF, 도미넌트 네가티브 Dishevelled 또는 카제인 키나제 억제제 (CKI-7, D4476 등) 등을 들 수 있다. 바람직하게는 Dkk-1이다.

[0065] 본 발명에서 용어 "IGF1R (Insulin-like growth factor 1 receptor) 작용제"란 세포막에 존재하는 타이로신 키나제 수용체의 일종인 IGF-1 수용체 (insulin-like grwoth factor-1 receptor: IGF1R)와 결합하여 IGF1R을 활성화시키고, 활성화된 IGF1R을 세포내에서 인슐린 수용체의 기질 (insulin receptor substrate: IRS)들의 결합 장소가 되도록 작용하는 물질을 의미한다. IGF1R에 의해 활성화된 IRS은 다시 PI3K, Akt, mTOR로 이루어진 경로와 Raf, MEK, ERK의 경로를 활성화시킴으로써 세포에 작용하게 된다 (Ryan & Goss, Oncologist. 2008; 13:16-24). IGF1R 작용제에는 IGF-1, IGF-2 등이 있다. IGF-1은 인슐린과 유사한 분자구조를 지니며 세포성장, 세포증식, 분화, 세포사멸 등에 관여한다.

[0066] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 IGF1R 작용제는 IGF1R을 활성화시킬 수 있는 물질이라면 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 IGF-1 또는 IGF-2이며, 가장 바람직하게는 IGF-1이다.

[0067] 본 발명에서 용어 "FGF (fibroblast growth factor) 신호전달 작용제"란 세포증식, 세포분화 등을 비롯해 분열 촉진 인자, 혈관 생성 인자, 뼈 형성 인자 및 신경 영양 인자 등으로 작용하는 물질로서, FGF 패밀리는 지금까지 22 종류가 알려져 있다. 이들은 4 종류의 FGF 수용체들 (FGFR) 각각의 mRNA가 선택적으로 짜깁기된 다양한 (alternatively spliced) 형태의 수용체와 결합하여 FGFR을 활성화시킨다. 활성화된 FGFR은 세포질 내 Ras, Raf, Mek 등의 단계별 반응을 통해 MAP 키나제를 활성화시키고, 활성화된 MAP 키나제가 핵 내로 유입되어 목표 유전자의 전사인자로 작용하게 된다 (Bottcher & Niehrs, Endocr. Rev., 2005; 26: 63-77). FGF 패밀리 중 FGF2는, bFGF(basic FGF)라고도 불리며, 주로 FGFR 1b, FGFR 1c, FGFR 2c, FGFR 3c, FGFR 4Δ를 활성화시키며, 특히 FGFR 1c, FGFR 3c를 강력히 활성화시킨다. FGFR 1c, FGFR 3c를 활성화시키는 작용제와 FGF1, FGF4, FGF8, FGF9, FGF17, FGF19 등이 대체물질로 사용될 수 있다.

[0068] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 FGF 신호전달 작용제는 FGF 신호전달을 활성화 시킬 수 있는 물질이라면 제한없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 FGFR 1c 또는 FGFR 3c를 활성화시키는 물질, FGF1, FGF2, FGF4, FGF8, FGF9, FGF17 또는 FGF19를 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 FGF2이다.

[0069] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계는 인간 전분화능 줄기세포를 12일 내지 16일 동안, 바람직하게는 13일 내지 15일 동안 배양하여 망막색소상피세포로 분화시키는 것일 수 있다. 이때, ROCK 억제제는 (a) 단계의 전체 배양 기간동안 처리될 수 있으며, 예를 들어, 적어도 12일, 바람직하게는 적어도 14일 동안 처리될 수 있다.

[0070] 본 발명의 제조방법은 상기 (b) 단계 전에, (a-1) 상기 (a) 단계에서 분화된 망막색소상피세포를 농축 및 팽창시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0071] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 (a-1) 단계에서 ROCK 억제제는 0일 내지 48일, 바람직하게는 0일 내지 38일 동안 5 μM/일 내지 15 μM/일로 처리될 수 있다.

[0072] 본 발명의 제조방법에 있어서, (a-1) 단계의 배지는 분화된 망막색소상피세포를 농축 및 팽창시키기 위해 사용되는 것으로 공지된 모든 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 예를 들어, X-VIVO 10 및 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군으로부터 선택되는 배지일 수 있으나, 이로 제한

되는 것은 아니다.

[0073] 보다 구체적인 ROCK 억제제의 처리 기간, 농도 및 ROCK 억제제의 종류는 전술한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.

[0074] 본 발명의 제조방법으로 제조되는 망막세포는 광수용체세포의 마커인 MITF와 망막색소상피세포의 마커인 CHX10이 동시에 발현되어 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내므로, 광수용체세포와 망막색소상피세포가 약화된 모든 망막질환의 치료에 유용하다.

[0075] 본 발명은 또한, ROCK 억제제를 포함하는, 인간 배아줄기세포로부터 광수용체와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로 분화시키기 위한 분화용 조성물을 제공한다.

[0076] 본 발명자들은 종래에 공지된, 인간 배아줄기세포로부터 망막색소상피세포로의 분화 프로토콜을 기반으로 하되, 전체 분화 프로토콜에서 12일 내지 60일 동안, 하루에 5 내지 15 μM로 처리하는 경우 하나의 세포에서 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성이 동시에 나타나는 것을 확인하였는바, ROCK 억제제는 광수용체세포와 망막색소상피세포가 손상된 망막질환을 보다 효과적으로 치료할 수 있는 신규한 망막세포 조성물을 제공하기 위한 분화용 조성물로서 활용될 수 있다.

[0077] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실 시 예 1

[0078] **유도만능줄기세포로부터 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로의 분화**

[0079] 분화 프로토콜

[0080] 다능성 인간 만능유도줄기세포(hiPSC)로부터 광수용체세포 및 망막색소상피세포의 특성을 동시에 나타내는 망막세포로의 분화를 위한 프로토콜은 Buchholz et al., 2013 (PLoS One. 2017 Mar 10;12(3):e0173575.)에 개시된 방법을 변형하여 사용하였으며, 구체적인 분화 프로토콜은 도 1에 나타내었다.

[0081] 분화를 위해, 1일 차에 배지를 교체하여, 2일 동안 니코틴아미드 (10mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 노긴 (50ng/ml) (PeproTech), Dkk-1 (10ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN.) 및 IGF-1 (10ng/ml) (R&D Systems)로 보충된 기초신경유도배지 (DMEM/F12+ 1X N2+ 1X B27 + 1X 비필수 아미노산, Thermo Fisher Scientific)에서 1X Matrigel (Corning) 또는 Synthemax (3535XX1 Corning, Corning NY) 또는 비트로넥틴 (PeproTech)으로 코팅된 9.6cm^2 웰 상에 iPSC를 70-80%의 컨플루언스로 도말하였다.

[0082] 3일차 및 4일차에 노긴의 농도를 10 ng/ml으로 감소시키고 bFGF를 5ng/ml (R&D Systems) 로 첨가하였다. 5일차에 니코틴아미드, bFGF 및 노긴을 배지로부터 제거하고, 5일차 및 6일차에 기초배지 (basal medium)를 Dkk-1 (10ng/ml), IGF1 (10ng/ml) 및 액티빈 A (100ng/ml) (PeproTech)로 보충하였다. 이어서 DKK 및 IGF1을 제거하고 7일차부터 14일차까지 기초배지에 액티빈 A (100ng/ml), 및 SU5402 (10μm) (Sigma-Aldrich)을 보충하였다. CHIR 99021(3μM) (TOCRIS, Bristol, UK.)를 8일차부터 14일차까지 첨가하였고, 모든 배지 보충물을 iPSC-유래 RPEC의 팽창을 위해 제거하였다.

[0083] 14일차에 세포를 Accumax (A7089, Sigma-Aldrich)를 이용하여 1X Matrigel, Synthemax 또는 비트로넥틴으로 코팅된 디쉬 상의 XVIVO-10 (04-743Q, Lonza, Basel, Swizerland)에 $1x10^5/cm^2$의 밀도로 7일 동안 계대배양하였고, 각각 1일 후 (day +1) 및 5일 후 (day +5)에 배지를 교체하였다. 이들 세포는 계대 0 (Passage 0, P0)으로 지칭하였다. 7일 후, P0 세포를 XVIVO 10 배지에 35일 동안 배양하였고 주당 2회 배지를 교체하였다. 세포를 Accumax로 분리하고 $1x10^5$ 세포/cm^2로 계대배양하였다. P1 부터 P5까지, RPEC를 각 계대마다 30일 동안 배양하였다.

[0084] ROCK 억제제인 파수딜은 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 전체 분화 프로토콜 과정에서 하루에 10μM씩 처리되었다.

실 시 예 2

[0085] **ROCK 억제제 처리에 따른 세포 특성의 분석**

[0086] 2-1. RPEC 분화 14일 동안 ROCK 억제제 처리에 따른 세포 특성 분석

[0087] 상기 실시예 1의 분화 프로토콜에서 RPEC로의 분화 14일 동안 ROCK 억제제를 처리하여 수득된 RPEC의 특성을 유세포분석법 및 면역세포화학법으로 분석하였다.

[0088] 분화 14일째의 RPEC 를 Trypsin/EDTA 를 이용하여 떼어낸 후 10% 포르말린(Formalin)을 이용해 세포를 고정하였다. 그 후 0.1% Triton X-100을 처리해 투과(permeabilization)시킨 후 MITF 및 PAX6의 1차 및 2차 항체를 처리하고 FACS canto2 기계를 이용하여 유세포분석을 수행하였다.

[0089] 면연세포화학법은 14일 동안 분화시킨 RPEC 를 배양 접시에 붙은 상태로 10% 포르말린을 처리하여 고정한 다음 0.1% Triton X-100을 처리해 투과 (permeabilization)시킨 후 MITF 및 PAX6 의 1차 및 2차 항체를 처리하고 형광현미경을 이용해 분석하였다.

[0090] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 PAX6 발현은 유의한 차이가 없었으나, MITF의 경우 ROCK 억제제를 처리했을 때 유의적으로 높은 값을 나타냈다. MITF는 RPEC 분화의 중요한 마커로 STAT3에 의해 억제되는데, ROCK2가 이러한 STAT3를 활성화시키는 역할을 하므로, ROCK 억제제를 처리하게 되면 STAT3가 억제되고 MITF 발현은 증가하여 RPEC로의 분화가 더 잘 이루어지는 것으로 판단된다. 생존율 또한 ROCK 억제제를 처리하였을 때 유의적으로 증가된다는 것을 확인하였다.

[0091] 2-2. RPEC 분화 및 성숙 50일 동안 ROCK 억제제 처리에 따른 세포 특성 분석

[0092] 상기 실시예 1의 분화 프로토콜에서 RPEC 분화 및 성숙과정 (농축 및 팽창) 50일 동안 ROCK 억제제 처리 후 수득된 망막세포의 특성을 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 분석하였다.

[0093] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 광수용체세포의 마커인 CHX10과 RPEC 마커인 MITF가 동시에 발현되어, 하나의 세포에서 광수용체세포와 망막색소상피세포의 특성이 동시에 나타나는 망막세포가 유도되었음을 확인하였다.

[0094] 그러나, RPEC의 성숙, 즉 농축 및 팽창이 진행될수록 CHX10과 MITF를 동시에 발현하는 세포가 줄어들기 때문에, 두 가지 세포의 특성을 모두 나타내는 망막세포를 수득하기 위해서는 분화 후 성숙 초기 단계까지 배양하는 것이 바람직하다.

실 시 예 3

[0095] **Pde6b 넉아웃 랫드 모델에서의 망막세포 증식 양상 확인**

[0096] 3-1. PDE6B 넉아웃 랫드 모델의 준비

[0097] 국내공개특허 제10-2019-0132069호에 개시된 바와 같이 제조된 PDE6B 유전자가 넉아웃된 망막변성 랫드 모델을 준비하였으며, 구체적인 제조과정은 상기 공개특허공보에 기재된 실시예 1 내지 2의 내용을 참조한다.

[0098] 3-2. 망막세포의 투여 전 관찰

[0099] 망막하 투여 전 광학현미경을 통한 iPSC 유도 망막세포의 세포 성상을 관찰한 결과, 도 5에서 확인되는 바와 같이 짙은 색소를 함유한 세포와 색소 함유 정도가 적은 세포들이 혼재한 양상을 보이며 단층의 증식 소견을 보였다.

[0100] 3-3. 망막세포의 투여

[0101] 2주령의 PDE6B KO 랫드를 틸레타민 하이포클로라이드(tiletamine hypochloride)와 졸라제팜 하이드로클로라이드(zolazepam hyprochloride) (Zoletil;virbac, Carros, France)의 혼합물 0.6 ml/kg 및 자일라진 하이드로클로라이드(xylazine hydrochloride) (Rompun; Bayer Korea, seoul, Korea) 0.4 ml/kg을 이용하여 마취 후, 상기 실시예 1로부터 제조된 망막세포 현탁액 $7.4x10^5$/μl 농도를 33 가우지 해밀턴 시린지(gauge Hamilton syringe)를 이용하여 우측 안구 망막 하에 망막 하에 5 μl 투여하였다.

[0102] 이후 시간 경과에 따른 망막세포의 증식 양상을 확인하기 위해 안저 촬영 (Fundus photograph), 빛간섭단층촬영 (OCT: Optical coherence tomography) 및 안구 조직을 이용한 H&E 조직 염색 절편을 획득하여 평가를 시행하였다.

[0103] 3-4. 안저촬영

[0104] 망막세포 현탁액 투여 후, 각 시점에서 안저 촬영을 시행하였다. 구체적으로, PDE6B KO 랫드의 안구를 정막 마취제로 마취하고, 5mg/ml 트로피카마이드(Tropicamide) 및 5mg/ml 페닐레프린 HCl(Phenylephrine HCl)을 점안하여 동공의 산동을 유도하였다. 안저 촬영 중 각막의 건조를 방지하기 위해 안과용 인공누액연고를 사용하였다. 망막 촬영은 수술용 현미경 혹은 Micron IV 안저 카메라를 사용하였다(Phoenix Research Labs, Inc., Pleasanton, CA, USA).

[0105] 도 6의 a) 내지 g) 및 도 7의 a) 내지 d)에 나타난 바와 같이, 망막 하에 투여한 망막세포 현탁액이 안착 및 증식하면서, 안저 검사를 통해 색소를 가진 세포의 존재를 확인할 수 있었다. 또한, 시간 경과에 따라 투여되었던 세포군의 경계가 주변과 명확해지고, 일정 시간 이후에는 색소의 강도가 감소되는 양상을 보였다.

[0106] 3-5. 빛간섭단층 촬영

[0107] 망막세포 현탁액 투여 후, 각 시점에서 스펙트럼 빛 간섭 단층 촬영(Spectral-domain optical coherence tomography, SD-OCT)을 통해 망막의 단층 소견을 확인하였다. 구체적으로, 망막세포의 망막 하 투여 후, 23주 또는 29주째에 빛 간섭 단층 촬영(Eyemera OCT, IIScience, Busan, South Korea)을 수행하였다. 6 번 반복하여 망막 단층을 스캔하고, 그 값을 평균화하여 영상을 획득하였다. 획득된 영상은 태그된 이미지 파일(.tif) 형식으로 출력하여, 망막의 두께 및 망막색소상피 (retinal pigment epithelium), 망막의 외핵층 (outer nuclear layer), 외망상층 (outer plexiform layer), 내핵층 (inner nuclear layer) 및 내망막층 (inner plexiform layer) 등의 양상을 비교하였다.

[0108] 그 결과, 도 6의 h) 및 도 7의 e)에 나타난 바와 같이 망막하 이식 세포의 증식 부위에서는 망막하 고반사점의 소견을 확인할 수 있었다.

[0109] 3-6. H&E 염색 조직 검사

[0110] 망막세포 이식 후 시간 경과에 따른 망막조직의 변화 소견을 확인하기 위해, 실험군의 안구를 획득하여 H&E 염색을 시행하고, 이식 망막 세포의 존재, 이식 부위 망막 세포의 변화 소견을 비교하였다.

[0111] 구체적으로, 망막세포 이식 후 2주 및 8주 후에 랫드의 복강 내에 Zoletil® 0.01 ㎖ (틸레타민 125 ㎎/㎖ 및 졸라제팜 125 ㎎/㎖, Virbac, France)을 주사하여 마취한 다음, 안구를 적출하여 4% 파라포름알데히드 용액(pH 7.4)에서 고정하였다. 고정된 안구는 시신경을 중심으로 절개하여 파라핀에 포매한 후, 4 ㎛ 두께로 잘라 H&E 염색(hematoxylin-eosin staining)을 수행하여, 조직화학적 표본을 제작하였다. 제작된 조직 표본에서 조직 병리적인 소견을 확인하였다.

[0112] 도 8 및 9에 나타난 바와 같이, 망막세포 이식 후 2주 및 8주 후에, 망막세포를 이식한 우안(R)과 이식하지 않은 좌안(L)을 비교한 결과, 우안에서 전반적인 망막 두께 감소 정도가 적고, 망막 내핵 세포층 (inner nuclear layer)과 광수용체 (photoreceptor)가 존재하는 망막 외핵 세포층 (outer nuclear layer) 두께가 보존되는 양상을 나타냈다 (*: 망막 내핵 세포층 (inner nuclear layer), †: 망막 내핵 세포층 (inner nuclear layer)).

[0113] 3-7. 전기생리학적 검사

[0114] 상기 실시예 3-3에서 망막세포 이식 후, 이식된 망막세포의 기능적 평가를 위해 시간 경과에 따른 전기생리학적 검사 (ERG: Electroretinogram)를 시행하였다.

[0115] 구체적으로, 망막세포 이식 후 23주 후, 랫드에 대해 망막전위도 검사(Electroretinogram)를 수행하여 전기생리학적 검사를 실시하였다. 망막전위도 검사 전 실험군 랫드는 각각 12 시간 이상 암순응을 유도하였고, 조도(λ) 600 nm 미만의 어두운 환경에서 망막 전위도 측정을 준비하였다. 준비 후, 각각의 실험군 랫드에 Zoletil®(틸레타민 125 ㎎/㎖ 및 졸라제팜 125 ㎎/㎖, Virbac, France)을 0.01 ㎖씩 복강 내 주사하여 마취하였다. 또한, 미드린-피점안제®(페닐레프린 하이드로클로라이드 5 ㎎/㎖ 및 트로픽아미드 5 ㎎/㎖, Santen, Japan)를 점안하여 동공을 산동시켰다. 또한, 안구 마취를 위해 Alcaine®(프로파라케인 하이드로클로라이드 0.5 %, Alcon Laboratories Inc.)을 점안하였다. 마취된 랫드는 실험동물용 지지대에 안정적으로 고정시켜, 재현성 높은 전기생리학적 검사를 위한 체위를 유지하였다.

[0116] 망막전위도 검사는 간츠펠트 ERG 시스템 (Ganzfeld ERG system) (Phoenix Research Labs)을 이용하여 빛 자극 및 전기 신호 측정으로 시행하였다. 망막전위도 신호는 실험동물 쥐 우안을 활용하였으며, 백색 빛의 강도를 높여가면서 순차적으로 전기 신호를 측정하였다. 빛 노출 시간은 10 msec으로 하였고, 각 빛의 강도에서 10 회의 평균값을 이용해서 전기 신호를 기록하였다. 순금으로 제작된 각막 전극을 각막 주변에 위치하였고, 기준 전극과 접지 전극을 두피와 꼬리 피하에 위치시켰다. 또한, 망막의 간세포 (rod cell)과 추세포 (cone cell) 각각의

기능을 확인하기 위하여, 암순응, 명순응 반응 a, b 파를 확인하였다.

[0117] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 망막 간세포 (rod cell) 반응에서 망막세포를 투여한 치료군과 투여하지 않은 대조군 간에 b파 진폭이 유의적인 차이를 나타냄을 확인하였다.

실 시 예 4

[0118] **미토콘드리아 DNA PCR**

[0119] 상기 실시예 3-6에서 수득된 조직 절편을 이용하여, 망막세포가 증식하는 부위를 확인하고 해당 부위의 망막세포를 획득하여 인간 기원의 세포임을 확인하기 위해 미토콘드리아 DNA PCR을 시행하였다. 망막세포 이식 후 2주 및 17주째에 각각 개체에서 인간 기원의 세포를 확인하였다.

[0120] DNA PCR 검사는 미토콘드리아 DNA (mitochondiral DNA, mtDNA) 추출은 PicoPure® DNA 추출 키트를 사용하여 시행하였고, 주입한 인간 유래 mtDNA를 확인하기 위해 프라이머와 PCR 마스터 믹스 (Master mix)를 이용해 수행했다. 샘플은 인간 iPS RPE를 주입한 안구의 색소가 관찰되는 조직 부분을 채취하여 사용하였고, 주사 후 2, 8, 17주째의 샘플로 시행했다. 양성 대조군은 인간 유래 DNA, 음성 대조군은 뉴클레아제 무첨가 수 (nuclease-free water)이다. 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다: F-5'-GCCTTCCCCCGTAAATGATA-3' R-5'-CTTCTGTGGAACGAGGGTTT-3&#39. 최종 PCR 볼륨은 20ug로 2x PCRBIO Taq Mix Red 10ul와 정방향 및 역방향 프라이머(1uM) 각각 1ul, DNA 주형 1ul, 뉴클레아제 무첨가 수 7ul가 포함되어 있다. DNA 주형은 2주 및 8주의 샘플의 경우 500ng/ul 17주 샘플의 경우 5000ng/ul이다. 어닐링 (annealing) 온도는 56℃로 15초, 연장 (extension) 온도는 68℃로 1분, 35사이클이다. 증폭된 샘플은 2% 아가로스 겔 전기영동 (Agarose gel electrophoresis) 100V 시행 후 Geldoc XR+ 이미징 시스템 (Bio-Rad)을 사용하여 mtDNA 존재를 확인했다.

[0121] 그 결과, 도 11에서 확인되는 바와 같이 인간 iPS RPE 세포 이식 후 각각 2주 및 17주에 적출한 안구에서 주입한 인간 세포의 성질을 갖는 mtDNA 존재 유무를 확인할 수 있는 밴드가 확인되었다. 주입 후 2주 후 샘플은 17주 후 샘플보다 적은 농도를 사용하였지만 밴드의 존재를 확인할 수 있었다. 즉, 주사 후 17주까지 주입한 인간 기원의 세포의 생착을 확인할 수 있었다.

실 시 예 5

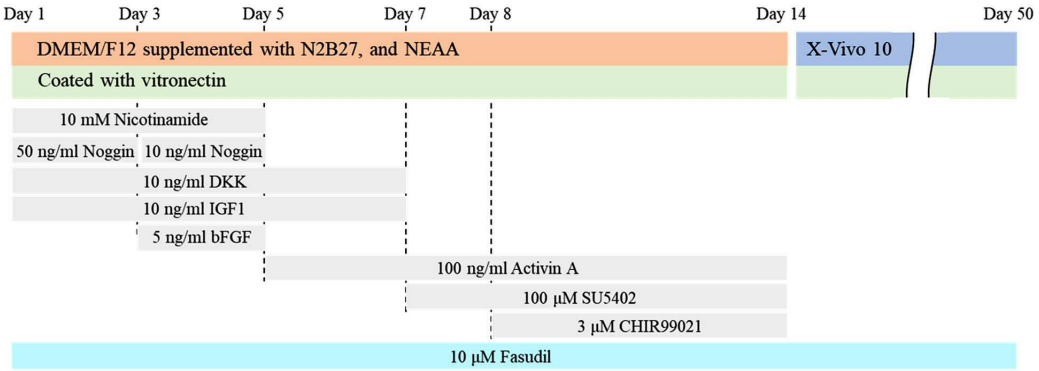
[0122] **H&E 염색 및 형광염색분석**

[0123] 상기 실시예 3-6에서 수득된 조직 절편을 이용하여, 망막세포가 증식하는 부위를 확인하고 해당 부위의 망막세포를 획득하여 인간 기원의 세포임을 확인하기 위해 인간 유래 세포에 반응하는 MITF 조직 염색을 수행하였다. 실험방법은 실시예 2-1과 동일하게 수행하였다.

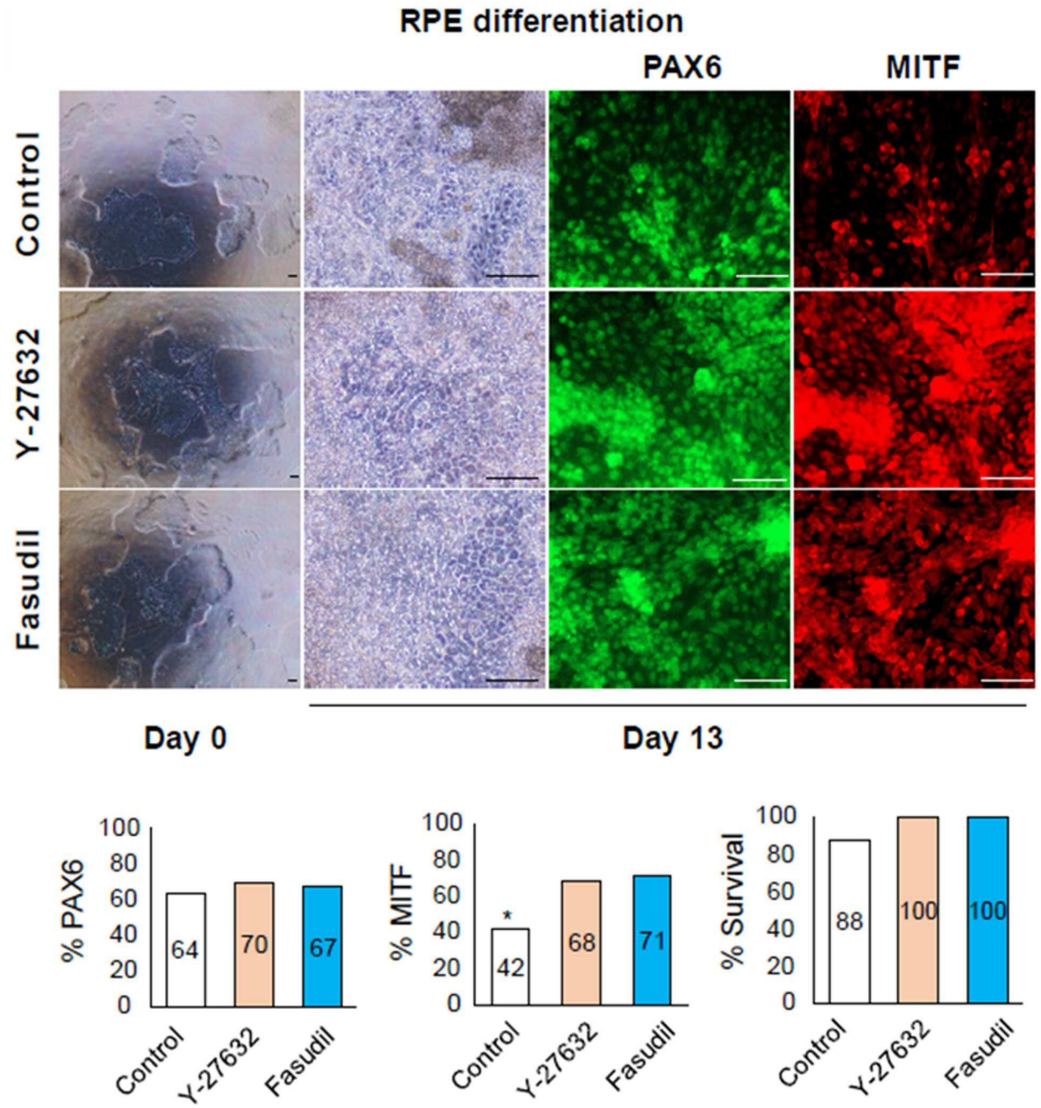
[0124] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 망막세포가 증식하는 부위에 MITF 발현이 확인되어 증식하고 있는 부위의 망막세포가 이식된 망막세포, 즉 인간 기원의 세포임을 확인하였다.

도면

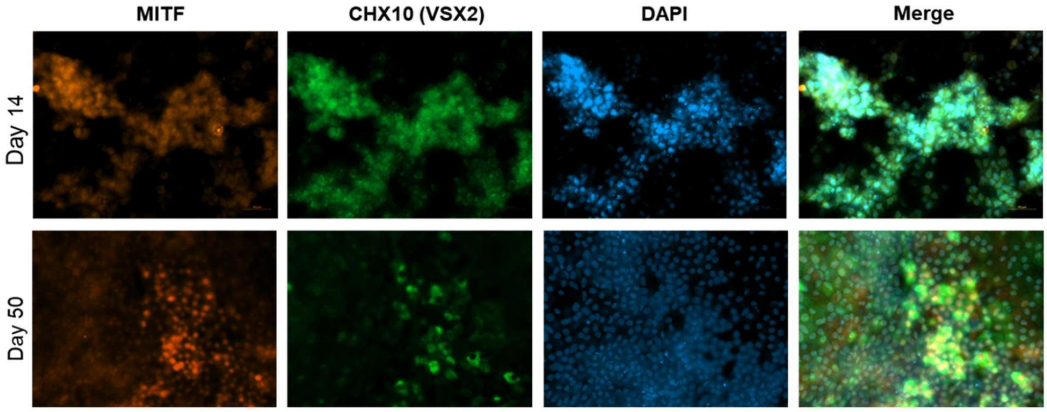
도면1



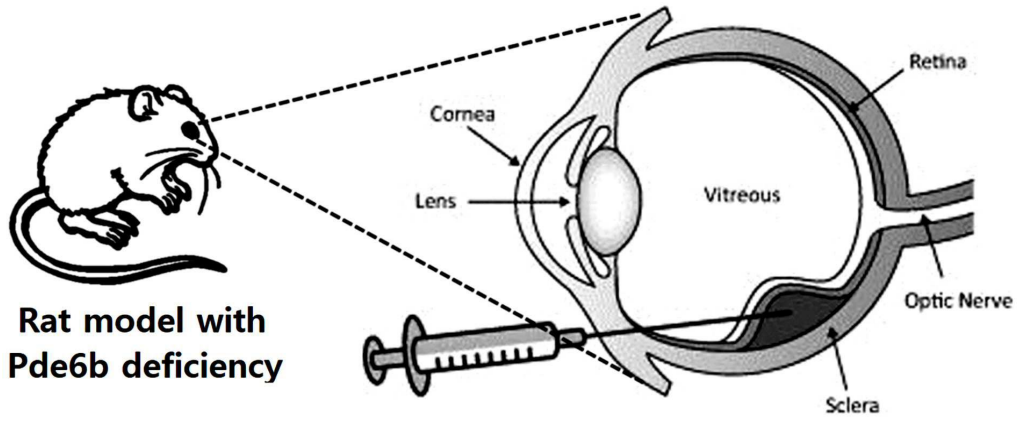
도면2


RPE differentiation
PAX6
MITF
Control
Y-27632
Fasudil
Day 0
Day 13
% PAX6
100
80
60
40
20
0
64
70
67
Control
Y-27632
Fasudil
% MITF
*
42
68
71
% Survival
88
100
100

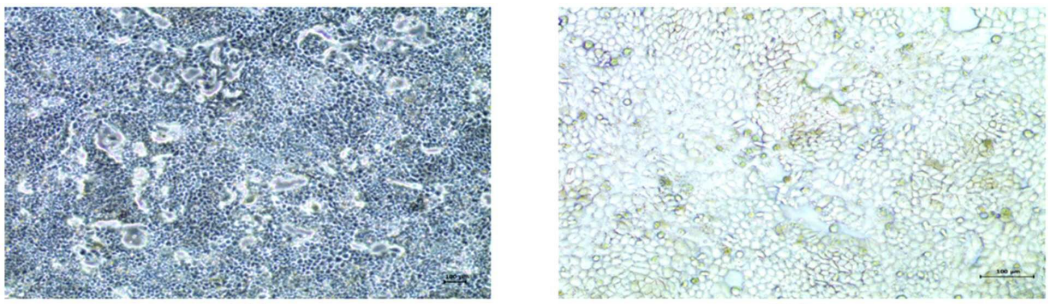
도면3


MITF
CHX10 (VSX2)
DAPI
Merge
Day 14
Day 50

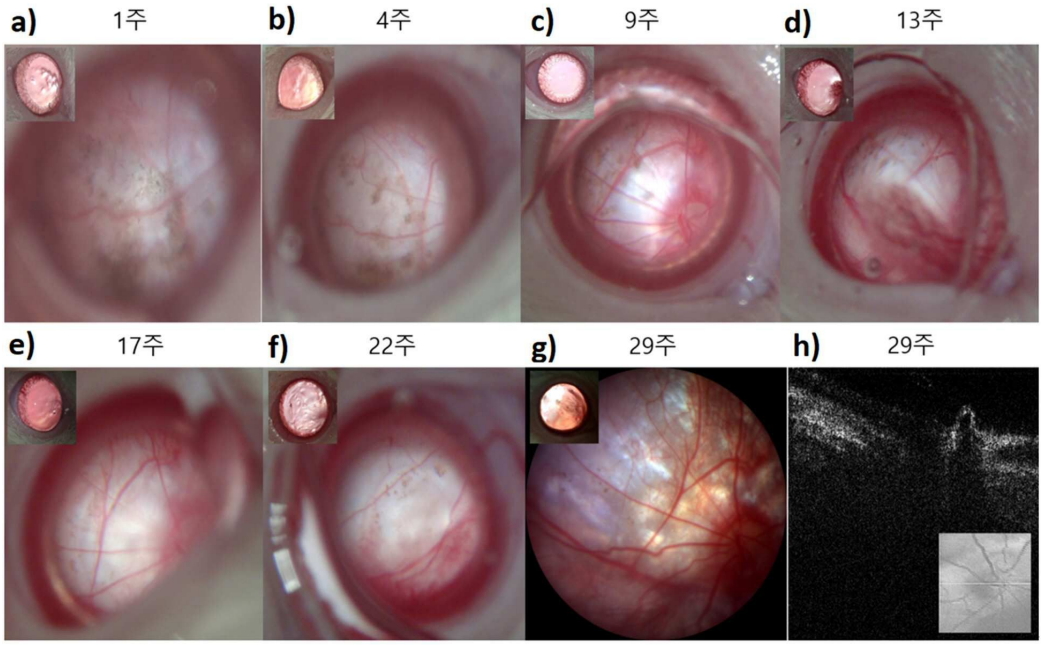
도면4


Rat model with
Pde6b deficiency
Cornea
Lens
Vitreous
Retina
Optic Nerve
Sclera

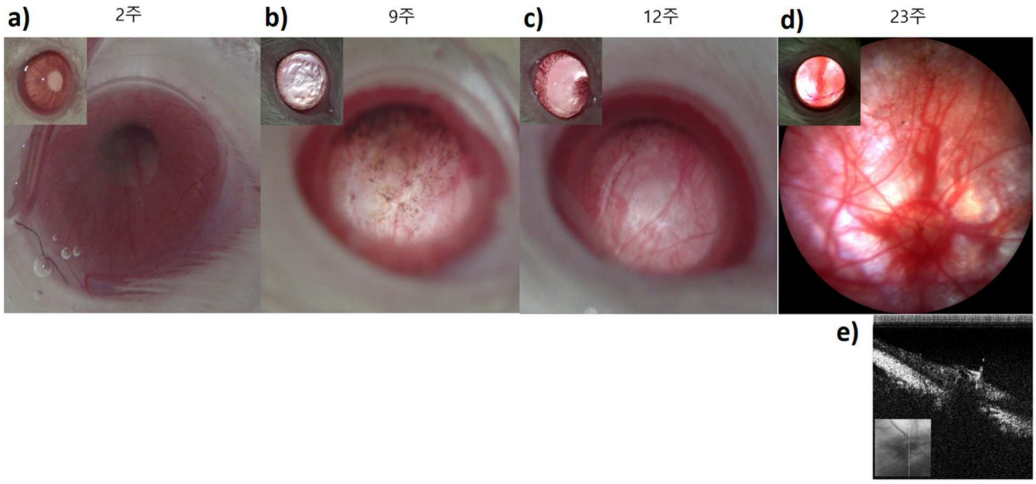
도면5


X4
X10

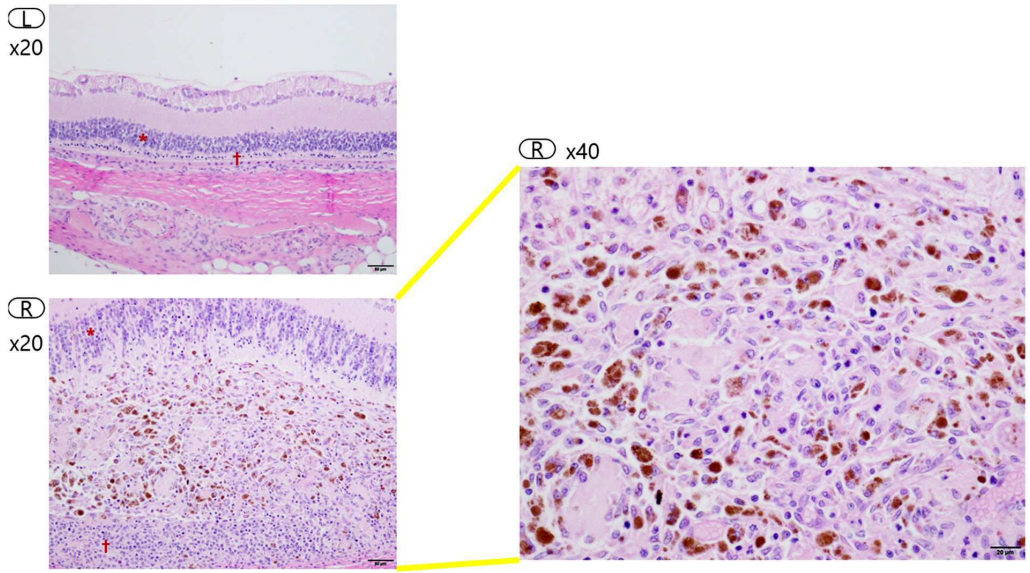
도면6


a) 1주
b) 4주
c) 9주
d) 13주
e) 17주
f) 22주
g) 29주
h) 29주

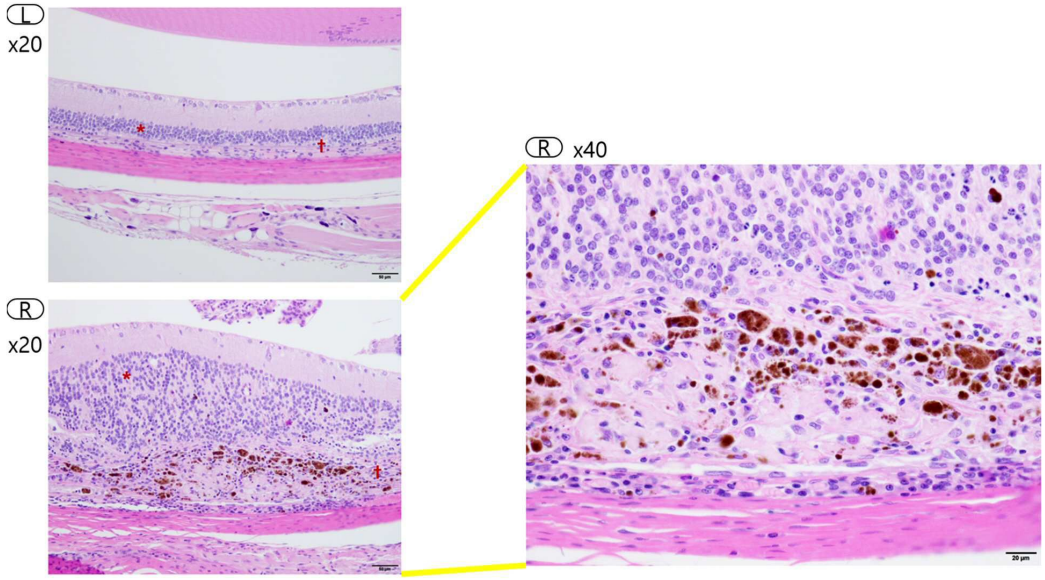
도면7



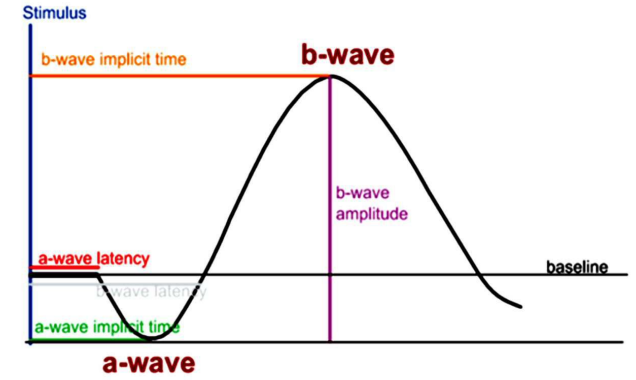
도면8

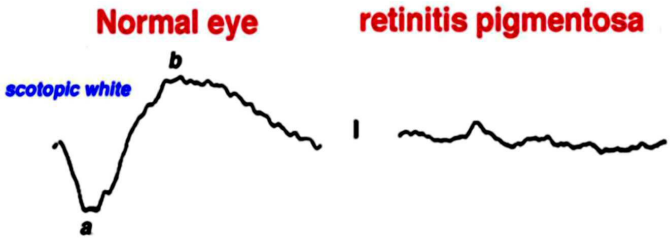


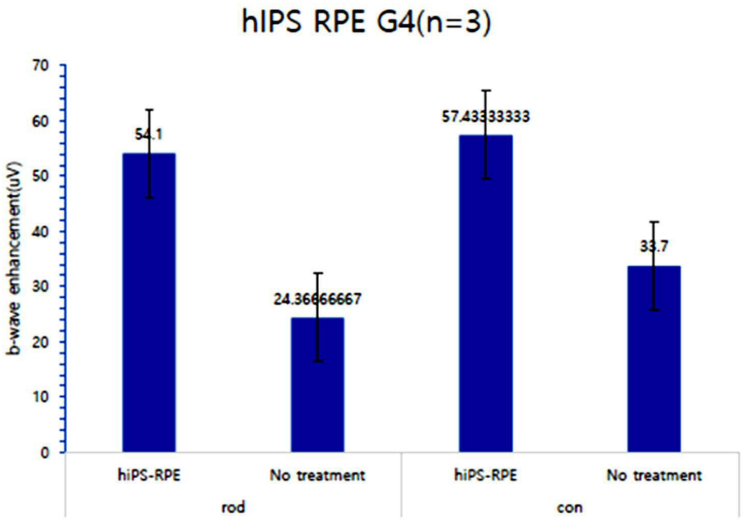
도면9



도면10

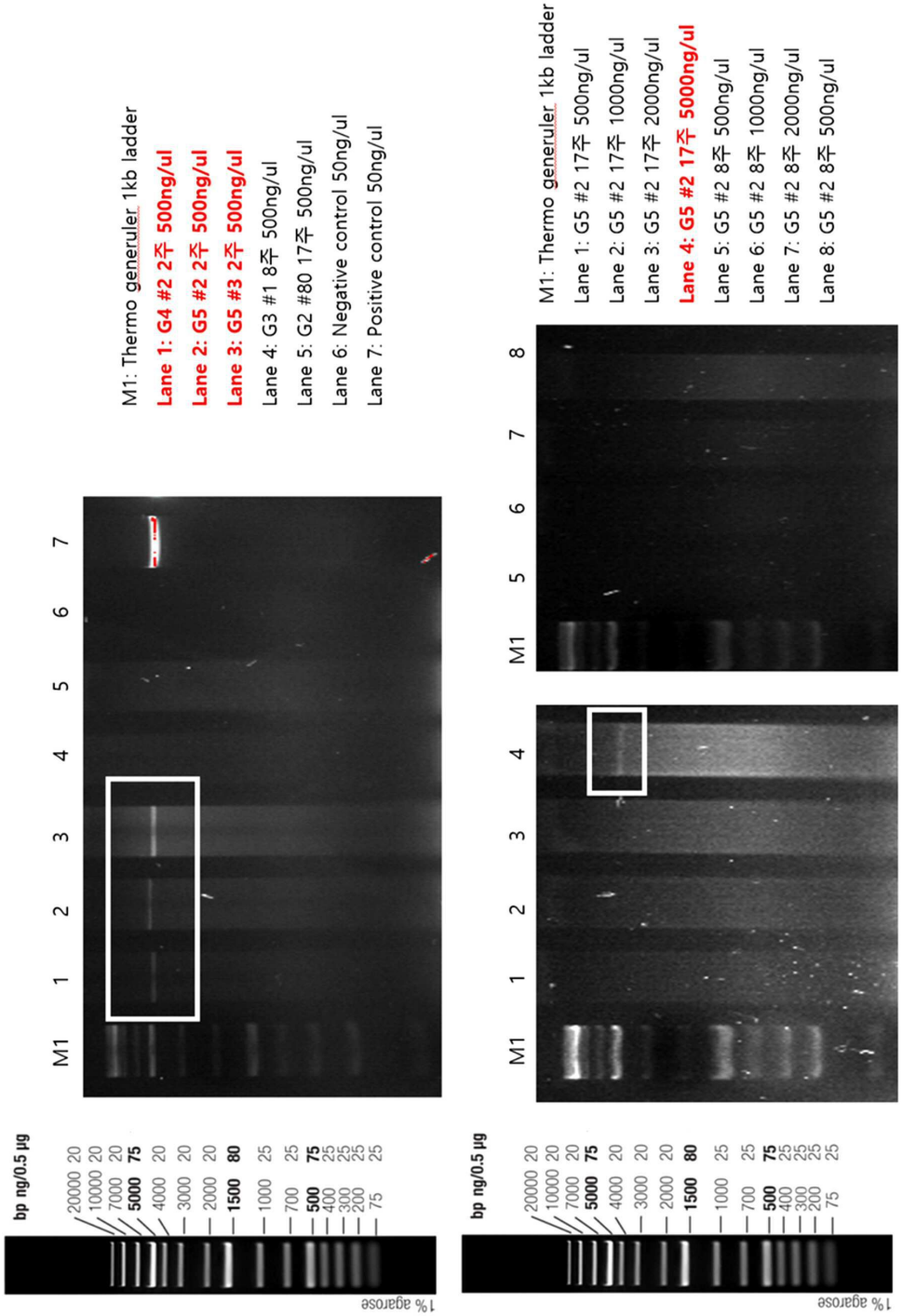




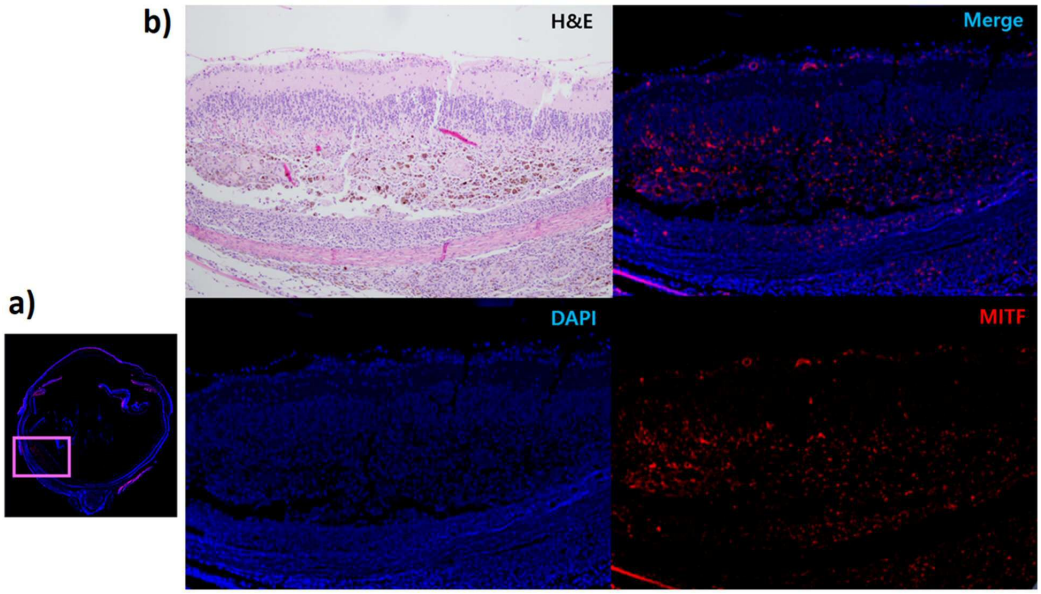


Paired t-test ROD cell p value=0.038<0.05
Paired t-test CONE cell p value=0.169>0.05

도면11


M1: Thermo generuler 1kb ladder
Lane 1: G4 #2 2주 500ng/ul
Lane 2: G5 #2 2주 500ng/ul
Lane 3: G5 #3 2주 500ng/ul
Lane 4: G3 #1 8주 500ng/ul
Lane 5: G2 #80 17주 500ng/ul
Lane 6: Negative control 50ng/ul
Lane 7: Positive control 50ng/ul
M1 1 2 3 4 5 6 7
bp ng/0.5 μg
20000 20
10000 20
7000 20
5000 75
4000 20
3000 20
2000 20
1500 80
1000 25
700 25
500 75
400 25
300 25
200 25
75 25
1% agarose
M1: Thermo generuler 1kb ladder
Lane 1: G5 #2 17주 500ng/ul
Lane 2: G5 #2 17주 1000ng/ul
Lane 3: G5 #2 17주 2000ng/ul
Lane 4: G5 #2 17주 5000ng/ul
Lane 5: G5 #2 8주 500ng/ul
Lane 6: G5 #2 8주 1000ng/ul
Lane 7: G5 #2 8주 2000ng/ul
Lane 8: G5 #2 8주 500ng/ul
M1 1 2 3 4 5 6 7 8
bp ng/0.5 μg
20000 20
10000 20
7000 20
5000 75
4000 20
3000 20
2000 20
1500 80
1000 25
700 25
500 75
400 25
300 25
200 25
75 25
1% agarose

도면12



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> A cell composition comprising retinal cell having characteristics of photoreceptor cells and retinal pigment epithelial cell simultaneously and use thereof

<130> 1066546

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> #39 forward primer

<400> 1

gccttccccc gtaaatgata 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> #39 reverse primer

<400> 2

cttctgtgga acgagggttt 20