



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년08월03일
(11) 등록번호 10-1169261
(24) 등록일자 2012년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/10 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7020854
(22) 출원일자(국제) 2004년04월28일
심사청구일자 2009년04월27일
(85) 번역문제출일자 2005년11월02일
(65) 공개번호 10-2006-0008968
(43) 공개일자 2006년01월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/012989
(87) 국제공개번호 WO 2004/098499
국제공개일자 2004년11월18일
(30) 우선권주장
10/628,783 2003년07월25일 미국(US)
60/467,051 2003년05월02일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Nature Medicine, 제8권, 제9호, 제1004-1010면
(2002.9.)
전체 청구항 수 : 총 3 항

(73) 특허권자
더 스크립스 리서치 인스티튜트
미국 캘리포니아주 92037 라 졸라 노스 토리 파
인 로드 10550
(72) 발명자
프리들랜더 마틴
미국 캘리포니아주 92014 델 마 자포 스트리트
1720
오타니 아쓰시
미국 캘리포니아주 92122 샌 디에고 2110번 토스
카나 웨이 5265
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

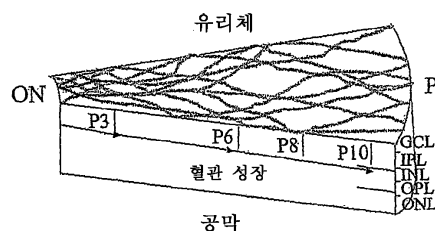
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 조혈 줄기세포 및 이를 포함하는 약제학적 조성물

(57) 요약

분리된, 포유동물 성체의 골수 유래의 계통 음성 조혈 줄기세포 집단(Lin⁻ HSC)은 안구의 망막 혈관 및 신경세포 망을 구제할 수 있는 내피 전구세포(EPC)를 함유한다. 분리된 Lin⁻ HSC의 약 20% 이상의 세포가 세포 표면 항원 CD31을 발현하는 것이 바람직하다. 분리된 Lin⁻ HSC 집단은 안구 혈관 질환의 치료에 유용하다. 바람직한 양태에서, Lin⁻ HSC는, 포유동물 성체로부터 골수를 추출하는 단계; 이 골수로부터 다수의 단핵구를 분리하는 단계; 당해 단핵구를 1종 이상의 계통 표면 항원에 대한 바이오틴 접합된 계통 패널 항체로 표지하는 단계; 다수의 단핵구로부터 상기 계통 표면 항원에 대해 양성인 단핵구를 제거하여, EPC를 함유하는 Lin⁻ HSC 집단을 회수하는 단계를 통해 분리된다. 또한, 치료학적으로 유용한 유전자로 형질감염된, 분리된 Lin⁻ HSC도 제공하며, 이는 세포 기반 유전자 치료요법에서 유전자를 안구로 전달하는데 유용하다. 또한, 본 발명의 분리된 줄기세포 집단을 제조하는 방법, 및 안질환 및 손상을 치료하는 방법도 기재하고 있다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

다실바 카렌

미국 캘리포니아주 92612 어빈 아도브 씨클 로드
사우스 6275

하네캄프 스테이지

미국 캘리포니아주 91977 스프링 밸리 뱅크로프트
드라이브 3817

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

(a) 성인으로부터 유래하는 골수로부터 다수의 단핵구를 분리하는 단계;

(b) 단핵구를 CD2, CD3, CD4, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD33, CD38, CD45RA, CD64, CD68, CD86 및 CD235a의 계통 표면 항원들에 대한 바이오틴 접합된 계통 패널 항체들로 표지하는 단계;

(c) 다수의 단핵구로부터 상기 계통 표면 항원들에 대해 양성인 단핵구를 제거하고, 내피 전구세포를 포함하는 계통 음성 조혈 줄기세포 집단을 회수하는 단계; 및

(d) 단계 (c)의 내피 전구세포를 포함하는 계통 음성 조혈 줄기세포 집단으로부터 CD133 양성 및 CD133 음성 세포를 분리하는 단계를 포함하는, 내피 전구세포를 포함하는 성인 골수 유래의 계통 음성 조혈 줄기세포 집단의 분리방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

제10항에 있어서, 단계 (d)를, 단핵구를 바이오틴 접합된 CD133 항체로 표지하고, CD133 양성 및 CD133 음성 조혈 줄기세포 집단을 회수함으로써 수행하는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 단계 (d)를, 단핵구를 바이오틴 접합된 CD133 항체로 표지하고, CD133 양성 세포를 제거하며, CD133 음성의 계통 음성 조혈 줄기세포 집단을 회수함으로써 수행하는 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

명세서

[0001] 관련 출원의 상호참조

[0002] 본 출원은 2002년 7월 25일자로 출원된 가특허 출원 제60/398,522호 및 2003년 5월 2일자로 출원된 가특허출원 제60/467,051호의 이익을 주장하는, 2003년 7월 25일자로 출원된 미국 특허출원 제10/628,783호의 CIP 출원이며, 이 출원들은 전문이 본원의 상세한 설명에 참조 인용된다.

[0003] 정부 권리의 언급

[0004] 본원에서 기술된 연구의 일부는 미국국립암연구소(National Cancer Institute)로부터 허가 번호 CA92577 및 미국국립보건연구소(National Institute of Health)로부터 허가 번호 EY11254, EY12598 및 EY125998에 의해 지원되었다. 미연방정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 갖는다.

기술분야

[0005] 본 발명은 골수로부터 유래된 분리된 포유동물 계통(lineage) 음성 조혈 줄기세포(Lin⁻HSC) 집단 및 이의 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 내피 전구세포(EPC)를 함유하는, 분리된 포유동물 계통 음성 조혈 줄기세포(Lin⁻HSC) 집단에 관한 것이다. 본 발명은 또한 Lin⁻HSC 및 형질감염된 Lin⁻HSC 집단을 안구에 투여함으로써 안구의 혈관 질환을 치료하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] 유전적 망막 변성은 3500명 중 1명꼴로 다수가 앓고 있는 질환으로서, 진행성 야맹증, 시야 상실, 시신경 위축, 세동맥 약화, 혈관 투과성 변화 및 완전 실명으로 종종 진행되는 중심 시력 상실을 특징으로 한다[참조: Heckenlively, J.R., editor, 1988; Retinitis Pigmentosa, Philadelphia; JB Lippincott Co.]. 이러한 질환의 분자 유전학 분석으로 공지된 질환자 중 비교적 적은 비율에서만 원인이 되는 110가지 상이한 유전자에서의 돌연변이가 밝혀졌다[참조: Humphries et al., 1992, Science 256:804-808; Farrar et al., 2002, EMBO J.21:857-864]. 다수의 이들 돌연변이들은 로돕신, cGMP 포스포디에스테라제, rds 페리페린 및 RPE65를 비롯한 광변환 기구의 효소 성분 및 구조 성분과 관련이 있다. 이러한 발견에도 불구하고, 이러한 망막 변성 질환의 진행을 지연 또는 역전시키는 효과적인 치료법은 여전히 없는 상황이다. 최근 유전자 치료법의 진보는 특정 돌연변이를 보유한 동물의 광수용체 또는 망막 색소상피(RPE)로 야생형 전이유전자가 전달될 때, 마우스의 rds 표현형[참조: Ali et al. 2000, Nat. Genet. 25:306-310] 및 rd 표현형[참조: Takahashi et al., 1999, J. Virol. 73:7812-7816]과 개의 RPE65 표현형[참조: Acland et al., 2001, Nat. Genet. 28:92-95]의 역전을 성공적으로 이끌었다.

[0007] 노화 관련 황반변성(ARMD) 및 당뇨병성 망막병증(DR)은 선진국에서 시력 상실의 주된 원인이며 비정상적 망막 신생혈관형성의 결과로서 발생한다. 망막은 신경, 아교 및 혈관 요소의 잘 한정된 층으로 이루어지기 때문에, 혈관 증식 또는 부종에서 보여지는 바와 같은 비교적 적은 장애라도 현저한 시각기능 상실을 유도할 수 있다. 망막 색소 변성증(RP)과 같은 유전적 망막 변성도 또한 세동맥 수축 및 혈관 위축과 같은 혈관 비정상성과 연관된다. 혈관신생을 촉진하고 억제하는 인자들을 동정하는데 있어 상당한 진전이 이루어지긴 하였으나, 현재 안구 혈관 질환을 특별히 치료하기 위한 치료법은 없다.

[0008] 다년간, 줄기세포 집단이 정상 성인 순환계 및 골수에 존재한다는 것은 공지되어 있다. 이러한 세포들의 상이한 아집단은 조혈 계통 양성(Lin⁺) 또는 계통 음성(Lin⁻) 계통을 따라서 분화할 수 있다. 또한, 계통 음성 조혈 줄기세포(HSC) 집단은 최근에 시험관내 및 생체내에서 혈관을 형성할 수 있는 내피 전구세포(EPC)를 함유하는 것으로 나타났다[참조: Asahara et al. 1997, Science 275:964-7]. 이들 세포는 출생후 정상적인 및 병리학적인 혈관신생에 관여할 수 있을뿐만 아니라[참조: Lyden et al. 2001, Nat. Med. 7:1194-201; Kalka et al. 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:3422-7; and Kocher et al. 2001, Nat. Med. 7:430-6], 간세포[참조: Lagasse et al. 2000, Nat. Med. 6:1229-34], 미세아교세포[참조: Priller et al. 2002, Nat. Med. 7:1356-61], 심근세포[참조: Orlac et al. 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:10344-9] 및 상피[참조: Lyden et al. 2001, Nat. Med. 7:1194-201]를 포함하는 각종 비-내피세포형으로 분화될 수 있다. 이들 세포가 혈관신생의 몇가지 실험 모델에서 사용되어왔다 해도, 신생혈관계를 표적으로 하는 EPC의 기작은 공지되어 있지 않으며, 특정 혈관계에 기여하는 세포의 수를 효과적으로 증가시킬 전략은 확인되지 않았다.

[0009] 골수 유래의 조혈 줄기세포는 현재 치료 용도에 일반적으로 사용되는 줄기세포의 유일한 종류이다. 골수의 HSC는 이식에 40년 이상 동안 사용되어왔다. 현재는, 백혈병, 림프종 및 유전적 혈액 질환들을 치료하는 치료법의 개발을 위해 동정된 줄기세포를 수거하는 발전된 방법이 연구되고 있다. 사람 줄기세포의 임상 용도는 제한된 수의 사람 환자에서 당뇨병 및 진행성 신장암의 치료에 대해서도 조사되고 있다.

[0010] 발명의 요약

[0011] 본 발명은 세포 표면에 계통 표면 항원(Lin)을 발현하지 않는 조혈 줄기세포(HSC), 즉 포유동물의 분리된 계통 음성 조혈 줄기세포(Lin⁻HSC)의 집단을 제공한다. 본 발명의 Lin⁻HSC 집단에는 안구의 유리체내 주사 시 활성화된 망막 성상교세포를 선택적으로 표적화하는 내피 전구세포(EPC; 내피 전구체 세포로도 공지되어 있음)가 포함된다. 본 발명의 Lin⁻HSC는 바람직하게는 포유동물 성체의 골수, 보다 바람직하게는 성인 골수에서 유래된다.

- [0012] 바람직한 양태에서, 본 발명의 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 집단은 포유동물 성체로부터 골수를 추출하는 단계; 추출된 골수로부터 복수의 단핵구를 분리하는 단계; 분리된 단핵구를 1종 이상의 계통 표면 항원에 대한 바이오틴 접합된 계통 패널 항체로 표지시키는 단계; 계통 표면 항원 양성인 단핵구를 제거하는 단계; 및 EPC를 함유하는 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 집단을 회수하는 단계를 통해 분리된다. 바람직하게는, 단핵구는 CD2, CD3, CD4, CD11, CD11a, Mac-11, CD14, CD16, CD19, CD24, CD33, CD36, CD38, CD45, Ly-6G, TER-119, CD45RA, CD56, CD64, CD68, CD86, CD66b, HLA-DR 및 CD235a(글리코포린 A)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 1종 이상의 계통 표면 항원에 대한 바이오틴 접합된 계통 패널 항체로 표지된다. 바람직하게는, 본 발명의 분리된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 집단의 세포 중 약 20% 이상은 표면 항원 CD31을 발현한다.
- [0013] 본 발명의 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 집단에 속하는 EPC는 발달중인 망막 혈관대로 다량으로 혼입되어 안구의 신생혈관계로 혼입된 상태로 안정하게 유지된다. 본 발명의 분리된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 집단은 포유동물의 변성 망막 혈관계를 구제하여 안정화시키고, 신경세포 망을 구제하며, 허혈 조직의 복구를 촉진시키는데 사용할 수 있다.
- [0014] 바람직한 하나의 양태에서, 분리된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 집단의 세포는 치료적으로 유용한 유전자로 형질감염된다. 예컨대, 이러한 형질감염된 세포는 신생혈관계를 선택적으로 표적화하여, 세포계 유전자 치료요법 형태를 통해 이미 확립된 혈관에 영향을 주지 않으면서 새로운 혈관 형성을 억제하는, 신경영양 체제 혈관신생 억제제를 작동적으로 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 형질감염될 수 있다. 하나의 양태에서, 본 발명의 분리된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 집단은 혈관신생 억제성 펩타이드를 암호화하는 유전자를 포함한다. 혈관신생 억제성 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 는 ARMD, DR 및 비정상적 혈관계와 관련되는 특성의 망막 변성과 같은 질환에서 비정상적 혈관 성장을 조절하는데 유용하다. 다른 바람직한 양태에서, 본 발명의 분리된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 는 신경영양성 펩타이드를 암호화하는 유전자를 포함한다. 이러한 신경영양성 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 는 녹내장, 망막 색소 변성증 등과 같은 망막 신경 변성을 수반한 안질환의 신경세포 구제의 촉진에도 유용하다.
- [0015] 본 발명의 분리된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 집단을 이용한 안구 치료법의 특별한 이점은 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 로 유리체내로 처리된 안구에서 관찰되는 혈관영양성 및 신경영양성 구제 효과이다. 본 발명의 분리된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 로 처리된 안구에서는 망막 신경 세포 및 광수용체가 보존되고 시각기능이 유지된다. 본 발명은 활성화된 망막 성상교세포를 선택적으로 표적화하는 내피 전구세포를 함유하는 골수 유래의 분리된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포를 투여하는 것을 포함하는 망막 변성의 치료방법을 제공하고, 여기서, 분리된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포의 적어도 약 50%가 표면 항원 CD31을 발현하고, 분리된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 의 적어도 약 50%가 표면 항원 CD117(c-kit)을 발현한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 포유동물 성체 골수, 바람직하게는 성인 골수로부터의 내피 전구세포를 함유하는 계통 음성 조혈 줄기세포를 분리하는 방법을 제공한다. 또한, 망막 혈관계의 재생 또는 복구 치료 뿐만 아니라 망막 신경세포 조직 변성의 치료 또는 경감에도 유용한 사람 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 로부터 유전자적으로 동일한 세포 주(즉, 클론)가 생성될 수도 있다.

발명의 상세한 설명

- [0043] 줄기세포는 일반적으로 세포 표면에 존재하는 항원의 분포에 의해 동정된다[상세한 설명은 본 상세한 설명에 관련된 정도까지 참조원용된 문헌(Stem Cells: Scientific Progress and Future Directions, 미보건원 과학정책국에서 작성된 보고서, 2001.6., Appendix E: Stem Cell Markers) 참조].
- [0044] 조혈 줄기세포는 다양한 혈액 세포 종류, 예컨대, B 세포, T 세포, 과립구, 혈소판 및 적혈구로 발달할 수 있는 줄기세포이다. 계통 표면 항원은 성숙한 혈액 세포 계통의 마커인 세포 표면 단백질의 그룹으로서, 예컨대 CD2, CD3, CD11, CD11a, Mac-1(CD11b:CD18), CD14, CD16, CD19, CD24, CD33, CD36, CD38, CD45, CD45RA, 쥐 Ly-6G, 쥐 TER-119, CD56, CD64, CD68, CD86(B7.2), CD66b, 사람 백혈구 항원 DR(HLA-DR) 및 CD235a(글리코포린 A)가 포함된다. 이러한 항원을 유의적인 수준으로 발현하지 않는 조혈 줄기세포를 일반적으로 계통 음성

(Lin⁻)이라 부른다. 사람 조혈 줄기세포는 일반적으로 다른 표면 항원, 예컨대 CD31, CD34, CD117(c-kit) 및/또는 CD133을 발현한다. 쥐 조혈 줄기세포는 일반적으로 CD34, CD117(c-kit), Thy-1 및/또는 Sca-1과 같은 다른 표면 항원을 발현한다.

[0045] 본 발명은 세포표면에 "계통 표면 항원"(Lin)을 유의적인 수준으로 발현하지 않는 분리된 조혈 줄기세포를 제공한다. 본 상세한 설명에서는 이러한 세포를 "계통 음성" 또는 "Lin⁻" 조혈 줄기세포라 한다. 구체적으로, 본 발명은 발생성 혈관계로 혼입된 후 혈관 내피세포로 분화될 수 있는, 내피 전구세포(EPC)를 포함한 Lin⁻ 조혈 줄기세포(Lin⁻HSC)의 집단을 제공한다. 이러한 분리된 Lin⁻HSC 집단은 인산염 완충 식염수(PBS)와 같은 배양 배지에 존재하는 것이 바람직하다.

[0046] 본원에 사용되고, 후속되는 청구의 범위에 사용된, 골수와 관련된 "성체"란 용어는 출생 후 분리된 골수, 즉 유년기에서 성체 사이에 분리된 골수를 포함하는 것으로서, 배아와 대조되는 표현이다. 따라서, "포유동물 성체"란 용어는 유년기 포유동물과 완전 성숙한 포유동물을 모두 의미한다.

[0047] 본 발명은 내피 전구세포(EPC)를 함유하는 분리된 포유동물 계통 음성 조혈 줄기세포(Lin⁻HSC) 집단을 제공한다. 본 발명의 분리된 Lin⁻HSC 집단은 바람직하게는 약 20% 이상의 세포가 내피 세포에 일반적으로 존재하는 표면 항원 CD31을 발현하는 포유동물 세포를 포함한다. 다른 양태에서, 약 50% 이상의 세포, 보다 바람직하게는 약 65% 이상, 보다 바람직하게는 약 75% 이상의 세포가 CD31을 발현한다. 바람직하게는, 본 발명의 Lin⁻HSC 집단의 약 50% 이상의 세포가 인테그린 α6 항원을 발현한다.

[0048] 쥐 Lin⁻HSC 집단의 바람직한 하나의 양태에서, 약 50% 이상의 세포는 CD31 항원을 발현하고, 약 50% 이상의 세포는 CD117(c-kit) 항원을 발현한다. 바람직하게는, 약 75% 이상, 보다 바람직하게는 약 81% 이상의 Lin⁻HSC 세포는 표면 항원 CD31을 발현한다. 쥐의 바람직한 다른 양태에서, 약 65% 이상의 세포, 보다 바람직하게는 약 70%의 세포가 표면 항원 CD117을 발현한다. 본 발명의 특히 바람직한 양태는 약 50% 내지 약 85%의 세포가 표면 항원 CD31을 발현하고, 약 70% 내지 약 75%의 세포가 표면 항원 CD117을 발현하는 쥐 Lin⁻HSC의 집단이다.

[0049] 다른 바람직한 양태는 CD133 음성이고, 여기서, 약 50% 이상의 세포가 CD31 표면 항원을 발현하며, 약 50% 이상의 세포가 인테그린 α6 항원을 발현하는 사람 Lin⁻HSC 집단이다. 또 다른 바람직한 양태는, CD133 양성이고, 여기서, 약 30% 미만의 세포가 CD31 표면 항원을 발현하고 약 30% 미만의 세포가 인테그린 α6 항원을 발현하는 사람 Lin⁻HSC 집단이다.

[0050] 본 발명의 분리된 Lin⁻HSC 집단은 이들 세포가 분리되어진 포유동물 종(예컨대, 마우스 또는 사람)의 안구에 유리체내로 주사된 경우 성장교세포를 선택적으로 표적화하여 망막의 신생혈관계로 혼입된다.

[0051] 본 발명의 분리된 Lin⁻HSC 집단은 내피 세포로 분화하여 망막내에 혈관 구조를 생성시키는 내피 전구세포를 포함한다. 특히, 본 발명의 Lin⁻HSC 집단은 망막 신생혈관 질환 및 망막 혈관 변성 질환의 치료와 망막 혈관 손상의 복구에 유용하다. 본 발명의 Lin⁻HSC 세포는 망막의 신경세포 구조를 촉진하고 아포토시스 억제 유전자의 상향조절을 촉진한다. 발견된 놀라운 사실은 본 발명의 성인 Lin⁻HSC 세포가 망막 변성을 앓고 있는 중증 복합 면역결핍증(SCID) 마우스에서도 망막 변성을 억제할 수 있다는 점이다. 또한, Lin⁻HSC 집단은 산소 유도성 망막병증 또는 미숙 망막병증을 앓고 있는 포유동물과 같은 신생 포유동물의 안구에서 나타나는 망막 결함을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명은 또한, 포유동물의 골수로부터 내피 전구세포를 포함하는 계통 음성 조혈 줄기세포 집단을 분리하는 단계 및 상기 분리된 줄기세포를 안질환을 정지시키기에 충분한 수로 상기 포유동물의 안구에 유리체내로 주사하는 단계를 포함하는, 안질환의 치료방법을 제공한다. 본 방법을 사용하여 신생기, 유년기 또는 완전 성숙한 포유동물의 망막 변성 질환, 망막 혈관 변성 질환, 허혈성 망막병증, 혈관 출혈, 혈관 누출 및 맥락막병증과 같은 안질환을 치료할 수 있다. 이러한 질환의 예에는 노화 관련 황반변성(ARMD), 당뇨병성 망막병증(DR), 추정된 안구 히스토플라스마증(POHS), 미숙아 망막병증(ROP), 겸상적혈구 빈혈증 및 망막색소변성 뿐만 아니라 망막 손상이 포함된다.

- [0053] 안구내로 주사된 줄기 세포의 수는 환자의 안구의 질병 상태를 정지시키기에 충분하다. 예를 들어, 세포의 수는 안구의 망막 손상을 복구시키고 망막 신생혈관계를 안정화시키며 망막 신생혈관계를 성숙시키고 혈관 누출 및 혈관 출혈을 예방 또는 복구하기에 효과적일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 분리된 Lin⁻HSC 집단 내에 존재하는 세포는 치료학적으로 유용한 유전자, 예를 들어, 안구의 세포계 유전자 치료요법에서 사용하기 위한 항-혈관신생 단백질을 암호화하는 유전자 및 신경세포 구제 효과를 향상시키는 신경영양 인자를 암호화하는 유전자로 형질감염시킬 수 있다.
- [0055] 형질감염된 세포는 망막 질환 치료에 치료학적으로 유용한 어떠한 유전자라도 포함할 수 있다. 바람직한 하나의 양태에서, 본 발명의 형질감염된 Lin⁻HSC는 공동 소유의 공계류중인 미국 특허원 제10/080,839호[이의 내용은 본원에서 참조로 인용된다]에 상세히 기재되어 있는 TrpRS 또는 이의 항-혈관신생 단편(예: TrpRS의 T1 및 T2 단편)과 같은 단백질이나 단백질 단편을 포함한 항-혈관신생 펩타이드를 작동적으로 암호화하는 유전자를 포함한다. 본 발명의 항혈관신생 펩타이드를 암호화하는 형질감염된 Lin⁻HSC는 당뇨병 망막병증 및 유사 질환과 같은 비정상적 혈관 발생을 수반하는 망막 질환의 치료에 유용하다. Lin⁻HSC는 사람 세포인 것이 바람직하다.
- [0056] 다른 바람직한 양태에서, 본 발명의 형질감염된 Lin⁻HSC는 신경 성장인자, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 뉴로트로핀-5, 섬모상 신경영양 인자, 망막 색소 상피 유래 신경영양 인자, 인슐린계 성장 인자, 아교세포주 유래 신경영양 인자, 뇌유래 신경영양 인자 등과 같은 신경영양 인자를 작동적으로 암호화하는 유전자를 포함한다. 이러한 신경영양성 Lin⁻HSC는 녹내장 및 망막 색소 변성증과 같은 망막 신경세포 변성 질환의 신경세포 구제의 촉진, 망막 신경 손상 치료 등에 유용하다. 섬모상 신경영양 인자의 이식은 망막 색소 변성증의 치료에 유용한 것으로 보고된 바 있다[참조: Kirby et al., 2001, Mol. Ther. 3(2):241-8; Farrar et al., 2002, EMBO Journal 21: 857-864]. 뇌 유래 신경영양 인자는 손상된 망막 신경절의 성장 관련 유전자를 조절하는 것으로 보고되어 있다[참조: Fournier et al., 1977, J. Neurosci. Res. 47:561-572]. 아교세포주 유래 신경영양 인자는 색소망막증의 광수용체 변성을 지연시키는 것으로 보고되어 있다[참조: McGee et al., 2001, Mol Ther. 4(6):622-9].
- [0057] 또한, 본 발명은 포유동물의 골수로부터 내피 전구세포를 함유하는 계통 음성 조혈 줄기세포를 분리하는 방법을 제공한다. 본 방법은 (a) 포유동물 성체로부터 골수를 추출하는 단계; (b) 상기 골수로부터 다수의 단핵구를 분리하는 단계; (c) 단핵구를 1종 이상의 계통 표면 항원, 바람직하게는 CD2, CD3, CD4, CD11, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD24, CD33, CD36, CD38, CD45, Ly-6G(쥐), TER-119(쥐), CD45RA, CD56, CD64, CD68, CD86(B7.2), CD66b, 사람 백혈구 항원 DR(HLA-DR) 및 CD235a(글리코포린 A)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 계통 표면 항원에 대한 바이오틴 접합된 계통 패널 항체로 표지하는 단계; 및 (d) 다수의 단핵구로부터 전술한 1종 이상의 계통 표면 항원에 대해 양성인 단핵구를 제거하고, 내피 전구세포를 함유하는, 바람직하게는 약 20% 이상의 세포가 CD31을 발현하는 계통 음성 조혈 줄기세포 집단을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0058] Lin⁻HSC가 성인 골수에서 분리된 경우, 단핵구는 계통 표면 항원 CD2, CD3, CD4, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD33, CD38, CD45RA, CD68, CD86(B7.2) 및 CD235a에 대한 바이오틴 접합된 계통 패널 항체로 표지되는 것이 바람직하다. Lin⁻HSC이 쥐 성체 골수로부터 분리된 경우에는, 단핵구는 계통 표면 항원 CD3, CD11, CD45, Ly-6G 및 TER-119에 대한 바이오틴 접합된 계통 패널 항체로 표지되는 것이 바람직하다.
- [0059] 바람직한 방법에서, 세포는 성인 골수에서 분리되고, CD133 계통에 의해 추가 분리된다. 사람 Lin⁻HSC를 분리하는 바람직한 1가지 방법은 단핵구를 바이오틴 접합된 CD133 항체로 표지시킨 후, CD133 양성의 Lin⁻HSC 집단을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것이다. 일반적으로, 이러한 세포의 약 30% 미만은 CD31을 발현하고, 약 30% 미만은 인테그린 α6을 발현한다. 본 발명의 사람 CD133 양성의 Lin⁻HSC 집단은 혈관신생이 일어나지 않는 안구에 주사되었을 때 말초 허혈 유도 혈관신생의 부위를 표적화할 수 있다.
- [0060] 사람 Lin⁻HSC를 분리하는 바람직한 다른 방법은 단핵구를 바이오틴 접합된 CD133 항체로 표지시키고, CD133 양성 세포를 제거한 후, CD133 음성의 Lin⁻HSC 집단을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것이다. 일반적으로, 이러한 세포의 적어도 약 50%는 CD31을 발현하고, 이러한 세포의 적어도 약 50%는 인테그린 α6을 발현한다. 본 발명의 사람 CD133 음성의 Lin⁻HSC 집단은 혈관신생이 진행되고 있는 안구에 주사되었을 때 발생성 혈관계로 혼

입될 수 있다.

[0061] 본 발명은 또한 본 발명의 형질감염된 Lin⁻HSC 세포를 안구에 유리체내로 주사하여 투여함으로써 안구 혈관신생 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 형질감염된 Lin⁻HSC 세포는 항-혈관신생 또는 신경영양성 유전자 산물을 암호화하는 유전자와 같은 치료학적으로 유용한 유전자로 형질감염된 Lin⁻HSC를 포함한다. 형질감염된 Lin⁻HSC 세포는 사람 세포인 것이 바람직하다.

[0062] 바람직하게는, 약 1×10^5 개 이상의 Lin⁻HSC 세포 또는 형질감염된 Lin⁻HSC 세포는 망막 변성 질환에 걸린 포유동물 안구에 유리체내로 주사함으로써 투여한다. 주사될 세포의 수는 망막 변성의 중증도, 포유동물의 연령 및 망막 질환의 치료에 있어 당해 분야의 숙련가가 용이하게 인지할 수 있는 기타 요인에 따라 좌우될 것이다. Lin⁻HSC는 치료 담당 주치의에 의해 결정되는 바와 같이 1회 투여량으로 투여하거나 또는 일정 시간에 걸쳐 투여되는 분할 투여량 투여로 투여할 수 있다.

[0063] 본 발명의 Lin⁻HSC는 망막 신경세포 변성이나 망막 혈관계의 방해 또는 분해를 수반하는 망막 손상 및 망막 결함의 치료에 유용하다. 또한, 사람 Lin⁻HSC는 망막 혈관계의 재생 또는 복구 치료 뿐만 아니라 망막 신경세포 변성의 치료 또는 경감에 유용한, 유전자적으로 동일한 세포주, 즉 클론을 생산하는 데에도 사용될 수 있다.

[0064] 방법

[0065] 실시예 1. 세포 분리 및 농축; 쥐 Lin⁻HSC 집단 A 및 B의 제조

[0066] 일반적 과정. 모든 생체내 평가는 실험실 동물의 관리 및 사용에 관한 NIH 지침에 따라서 수행하였고, 모든 평가 과정은 더 스크립스 리서치 인스티튜트(The Scripps Research Institute, TSRI, La Jolla, CA) 실험동물관리위원회(Animal Care and Use Committee)에 의해 승인되었다. 골수 세포를 B6.129S7-Gtrosa26, Tie-2GFP, ACTbEGFP, FVB/NJ(rd/rd 마우스) 또는 Balb/cBYJ 성체 마우스(공급원: The Jackson Laboratory, ME)로부터 추출하였다.

[0067] 이어서, 단핵구를 HISTOPAQUE[®] 폴리슈크로스 구배(제조원: Sigma, St. Louis, MO)를 사용하여 밀도 구배 분리에 의해 분리하고, 마우스의 Lin⁻ 선별을 위해 바이오틴 접합된 계통 패널 항체(CD45, CD3, Ly-6G, CD11, TER-119, 제조원: Pharmingen, San Diego, CA)로 표지하였다. 계통 양성(Lin⁺) 세포를 자기 분리 장치(AUTOMACS[™] 분리기, 제조원: Miltenyi Biotech, Auburn, CA)를 사용하여 Lin⁻HSC로부터 분리하여 제거하였다. 내피 전구세포를 함유하는, 수득된 Lin⁻HSC 집단을 다음 항체들을 사용한 FACS[™] Calibur 유세포분석기(제조원: Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 추가로 특성화하였다: PE-접합된-Sca-1, c-kit, KDR 및 CD31(제조원: Pharmingen, San Diego, CA). Tie-2-GFP 골수 세포를 Tie-2의 특성화용으로 사용하였다.

[0068] 성체 마우스 내피세포를 수거하기 위해, 장간막 조직을 외과술에 의해 ACTbEGFP 마우스로부터 떼어내어 콜라게나제(제조원: Worthington, Lakewood, NJ) 속에 놓아서, 이 조직을 분해시킨 다음, 45 μ m 필터를 사용하여 여과하였다. 유동물을 수집하고 내피 증식 배지(제조원: Clonetics, San Diego, CA)와 함께 항온처리하였다. 내피의 특성을, 형태상 조약돌 모양의 외관을 관찰하고 CD31 mAb (Pharmingen)으로 염색하고 MATRIGEL[™] 매트릭스(제조원: Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 내의 관상 구조의 형성에 대해 배양물을 검사함으로써 확인하였다.

[0069] 쥐 Lin⁻HSC 집단 A. 골수 세포를 상기 언급한 일반적 과정에 의해 ACTbEGFP 마우스로부터 추출하였다. Lin⁻HSC 세포를 CD31, c-kit, Sca-1, Flk-1 및 Tie-2 세포 표면 항원 마커에 대한 FACS 유세포분석법으로 특성화하였다. 결과는 도 1c에 제시한다. 약 81%의 Lin⁻HSC가 CD31 마커를 나타냈으며, 약 70.5%의 Lin⁻HSC가 c-kit 마커를 나타냈으며, 약 4%의 Lin⁻HSC가 Sca-1 마커를 나타냈고, 약 2.2%의 Lin⁻HSC가 Flk-1 마커를 나타냈으며, 약 0.91%의 Lin⁻HSC 세포가 Tie-2 마커를 나타냈다. 대조적으로, 이들 골수 세포로부터 분리된

Lin⁺HSC는 유의적으로 상이한 세포 마커 프로필을 지녔다(즉, CD31: 37.4%; c-kit: 20%; Sca-1: 2.8%; Flk-1: 0.05%)

[0070] 쥐 Lin⁻HSC 집단 B. 골수 세포를 상기한 일반적 과정에 의해 Balb/C, ACTbEGFP 및 C3H 마우스로부터 추출하였다. Lin⁻HSC 세포를 세포 표면 마커(Sca-1, KDR, c-kit, CD34, CD31 및 각종 인테그린: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, α_M , α_V , α_X , α_{IIb} , β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , β_5 및 β_7)의 존재에 대해 분석하였다. 결과는 하기 표 1에 제시한다.

표 1

Lin-HSC 집단 B의 특성화	
세포 마커	Lin ⁻ HSC
$\alpha 1$	0.10
$\alpha 2$	17.57
$\alpha 3$	0.22
$\alpha 4$	89.39
$\alpha 5$	82.47
$\alpha 6$	77.70
α_L	62.69
α_M	35.84
α_X	3.98
α_V	33.64
α_{IIb}	0.25
β_1	86.26
β_2	49.07
β_3	45.70
β_4	0.68
β_5	9.44
β_7	11.25
CD31	51.76
CD34	55.83
Flk-1/KDR	2.95
c-kit (CD117)	74.42
Sca-1	7.54

[0071]

실시예 2. 쥐 모델에서의 세포의 유리체내 투여

[0072]

[0073] 예리한 칼을 이용하여 마우스 눈꺼풀에 틈을 생성시켜 P2 내지 P6 안구를 노출시켰다. 이어서, 본 발명의 계통 음성HSC 집단 A(세포 배양 배지 약 0.5 μ l 내지 약 1 μ l 중의 약 10⁵개 세포)을 33-게이지(Hamilton, Reno, NV) 바늘의 주사기를 사용하여 유리체내로 주사하였다.

[0074]

실시예 3. EPC 형질감염

[0075]

쥐 Lin⁻HSC(집단 A)를 제조업자의 프로토콜에 따라서 FuGENETM 6 형질감염 시약(제조원: Roche, Indianapolis, IN)을 사용하여, His₆ 태그를 포함한 TrpRS의 T2 단편을 암호화하는 DNA(서열번호 1, 도 7)로 형질감염시켰다. Lin⁻HSC 세포(ml당 약 10⁶개 세포)를 줄기세포 인자(PeproTech, Rocky Hill, NJ)를 함유하는 opti-MEM[®] 배지(제조원: Invitrogen, Carlsbad, CA) 속에 현탁시켰다. 이어서, DNA(약 1 μ g)와 FuGENE 시약(약 3 μ l) 혼합물을 첨가하고, 혼합물을 약 37℃에서 18시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 세포를 세척하고 수집하였다.

당해 시스템의 형질감염율은 약 17%였으며 이는 FACS 분석으로 확인하였다. T2 생산을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다. His₆-태그된 T2-TrpRS의 아미노산 서열은 서열번호 2(도 8)로서 제시한다.

[0076] **실시예 4. 면역조직화학 및 공초점 분석**

[0077] 마우스 망막을 다양한 시점에서 수거하고 전조직 표본 제작 또는 동결 절편 제작을 위해 준비하였다. 전조직 표본의 경우, 망막을 4% 파라포름알데히드로 고정시키고 실온에서 1시간 동안 50% 소태아 혈청(FBS) 및 20% 표준 염소 혈청 속에서 차단하였다. 망막을 1차 항체에 대해 처리하고 2차 항체로 검출하였다. 사용된 1차 항체는 항-콜라겐 IV(Chemicon, Temecula, CA), 항-β-gal(Promega, Madison, WI), 항-GFAP(Dako Cytomation, Carpinteria, CA), 항-α-평활근 액틴(α-SMA, Dako Cytomation)이었다. 사용된 2차 항체는 알렉사 488 또는 594 형광 마커(Molecular Probes, Eugene, OR)에 접합시켰다. MRC 1024 공초점 현미경(Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 영상을 포착하였다. LASERSHARP[®] 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 3차원 영상을 생성시켜 망막의 전조직 표본내에서의 3가지의 상이한 혈관 발달 층을 검사하였다. 공초점 현미경검사법으로 구별되는, 증가된 GFP(eGFP) 마우스 및 GFAP/wtGFP 마우스 사이의 GFP 픽셀 강도의 차이를 사용하여 3D 영상을 생성시켰다.

[0078] **실시예 5. 마우스의 생체내 망막 혈관신생 정량 측정**

[0079] T2-TrpRS 분석을 위해, 1차 혈관층 및 심재성 혈관층을 마우스 망막의 3차원 영상으로부터 재구성하였다. 1차 혈관층은 2개의 부류로 나뉘었다: 정상적 발달 또는 정지된 혈관 진행. 심재성 혈관 발달의 억제 부류는 다음 기준을 포함하여 혈관억제율(%)에 기초하여 구성하였다: 심층 혈관층 형성의 완전한 억제는 "완전한"으로 표시하고, 정상 혈관 발달(25% 미만의 억제를 포함)은 "정상"으로 표시하고, 나머지는 "부분적"으로 표시하였다. rd/rd 마우스 구조 데이터의 경우, 각 망막의 전조직 표본내의 4개의 개별적인 심재성 혈관층 영역을 10x 렌즈를 이용하여 포착하였다. 혈관계의 총 길이를 각 영상에 대해 계산하고 요약하여 그룹들 간에 비교하였다. 정확한 정보를 획득하기 위해, Lin⁻HSC를 한쪽 안구에 주사하고, Lin⁺HSC를 동일한 마우스의 다른쪽 안구에 주사하였다. 주사되지 않은 대조군 망막은 동일한 동복자 마우스로부터 채취하였다.

[0080] **실시예 6. 성체 망막 손상 쥐 모델**

[0081] 레이저 및 흉터 모델을 다이오드 레이저(150mW, 1초, 50mm)를 이용하여 생성시키거나, 27게이지 바늘로 마우스 망막에 구멍을 뚫어서 기계적으로 생성시켰다. 손상 5일 후, 세포를 유리체내 방법을 사용하여 주사하였다. 5일 후에 마우스로부터 안구를 수거하였다.

[0082] **실시예 7. 망막 재생의 신경영양성 구제**

[0083] 성체 쥐 골수 유래의 계통 음성 조혈 줄기세포(Lin⁻HSC)는 마우스 망막 변성 모델에서 혈관영양성 및 신경영양성 구제 효과를 갖는다. 10일령 마우스의 우측 안구에 약 10⁵개의 본 발명의 Lin⁻HSC를 함유하는 약 0.5μl를 유리체내로 주사하고, 2개월 후에 망막 혈관계의 존재 및 신경세포 층의 핵 계수에 대해 평가하였다. 동일한 마우스의 좌측 안구에 거의 동일한 수의 Lin⁺HSC를 대조군으로서 주사하고 유사하게 평가하였다. 도 9에 제시한 바와 같이, Lin⁻HSC 처리된 안구에서 망막 혈관계는 거의 정상으로 보이며, 내부 핵 층도 거의 정상으로 보이고, 외부 핵 층(ONL)은 약 3개 내지 4개의 핵 층을 지녔다. 대조적으로, 반대쪽의 Lin⁺HSC 처리된 안구는 현저하게 위축된 중재성 망막 혈관 층, 완전히 수축된 외부 망막 혈관 층을 지녔으며, 내부 핵 층은 현저하게 수축되었고, 외부 핵 층은 완전히 소멸되었다. 이는 마우스 3 및 마우스 5에서 극적으로 예시되었다. 마우스 1에서는 구제 효과가 없었으며 이는 주사된 마우스의 약 15%에서도 마찬가지였다.

[0084] 시각기능을 망막전위도(ERG)로 평가한 경우, 양성 ERG의 복구는 혈관 구제 및 신경 구제가 둘다 관찰되었을 때(마우스 3 및 5) 관찰되었다. 혈관 구제 또는 신경 구제가 없었을 때(마우스 1)에는 양성 ERG가 관찰되지 않았다. 이러한 본 발명의 Lin⁻HSC에 의한 혈관영양성 및 신경영양성 구제 간의 상관관계는 도 10에 제시한 회귀분석 도표로 예시된다. 신경 회복(y축) 및 혈관 회복(x축) 간의 상관관계는 중재성 혈관계 유형(r=0.45) 및 심재성 혈관계(r=0.67)에서 관찰되었다.

[0085] 도 11은 Lin⁺HSC에 의한 혈관 및 신경 구제 간에는 통계학적으로 유의적인 어떠한 상관관계도 없음을 도시한 것이다. 혈관 구제를 정량하고 데이터를 도 12에 제시한다. 도 12에 제시한, 주사 후 1개월(1M), 2개월(2M) 및 6개월(6M)째에서의 마우스에 대한 데이터는, 혈관 길이가, 특히 주사 후 1개월 및 2개월째에서 동일한 마우스로

부터의 미처리된 안구에서의 혈관 길이(흰색 막대)와 비교하여 본 발명의 Lin⁻HSC로 처리된 안구(검정 막대)에서 유의적으로 증가되었음을 입증한다. 신경영양성 구체 효과는 Lin⁻HSC 또는 Lin⁺HSC를 주사한 후 약 2개월째에서 내부 및 외부 핵 층 내의 핵을 계수함으로써 정량하였다. 결과는 도 13 및 14에 제시한다.

[0086] 실시예 8. 사람 Lin⁻HSC 집단

[0087] 골수 세포는 전술한 일반 절차에 따라서 건강한 성인 지원자로부터 추출했다. 그 다음, HISTOPAQUE[®] 폴리스크로스 구배(Sigma, St. Louis, MO)를 사용하여 밀도구배 분리로 단핵구를 분리했다. 사람 골수 단핵세포로부터 Lin⁻HSC 집단을 분리하기 위해, 자기 분리 시스템(AUTOMACS[™] 분류기, 제조원: Miltenyi Biotech, Auburn, CA)에 다음과 같은 바이오틴 접합된 계통 패널 항체를 사용했다: CD2, CD3, CD4, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD33, CD38, CD45RA, CD64, CD68, CD86, CD235a(Pharmingen).

[0088] CD133 발현에 근거하여 사람 Lin⁻HSC 집단을 2가지 아집단으로 추가로 분류했다. 각 세포를 바이오틴 접합된 CD133 항체로 표지하고, CD133 양성 및 CD133 음성 아집단으로 분류했다.

[0089] 실시예 9. 쥐의 망막 변성 모델에서의 사람 및 쥐 세포의 유리체내 투여

[0090] 망막 변성 모델로서 C3H/HeJ, C3SnSmn.CB17-Prkdc SCID 및 rd10 마우스 계열을 사용했다. C3H/HeJ 및 C3SnSmn.CB17-Prkdc SCID 마우스(The Jackson Laboratory, Maine)는 초기 발병 중증 망막 변성을 유발하는 돌연변이인, 망막 변성 1(rd1) 돌연변이에 대해 동종접합성이다. 이 돌연변이는 간체 광수용체 cGMP 포스포디에스터라제 β 서브유닛을 암호화하는 Pde6b 유전자의 엑손 7에 위치한다. 이 유전자의 돌연변이는 상염색체 (autosomal) 열성 색소망막증(RP)이 있는 사람 환자에서 발견되었다. 또한, C3SnSmn.CB17-Prkdc SCID 마우스는 중증 복합 면역결핍 자발성 돌연변이(Prkdc SCID)에 대해 동종접합성으로서, 사람 세포 전달 실험에 사용되었다. rd10 마우스의 망막 변성은 Pde6b 유전자의 엑손 13의 돌연변이에 의해 유발된다. 이는 또한 rd1/rd1보다 후기 발병성이며 병도가 보통인 망막 변성을 보유한 임상적으로 관련있는 RP 모델이다. 모든 평가는 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 NIH 안내서에 따라 수행했고, 모든 절차는 더 스크립스 리서치 인스티튜트(The Scripps Research Institute, TSRI, La Jolla, CA) 실험동물관리위원회(Animal Care and Use Committee)에 의해 승인되었다.

[0091] 예리한 칼을 이용하여 마우스 눈꺼풀에 틈을 생성시켜 P2 내지 P6 안구를 노출시켰다. 이어서, 쥐 집단 A 또는 사람 집단 C의 계통 음성 HSC 세포(세포 배양 배지 약 0.5 μ l 내지 약 1 μ l 중의 약 10⁵개 세포)을 33-게이지(Hamilton, Reno, NV) 바늘의 주사기를 사용하여 마우스 안구에 유리체내로 주사하였다. 주사된 사람 세포를 확인하기 위하여, 주사 전에 세포를 염료(세포 추적체 녹색 CMFDA, Molecular Probes)로 표지시켰다.

[0092] 망막을 다양한 시점에서 수거하고 4% 파라포름알데히드(PFA) 및 메탄올로 고정시킨 후, 50% FBS/20% NGS 중에서 실온에서 1시간 동안 차단시켰다. 망막 혈관계 염색을 위해, 망막을 항-CD31(Pharmingen) 및 항-콜라겐 IV(Chemicon) 항체 및 이어서 Alexa 488 또는 594 접합된 2차 항체(Molecular Probes, Eugene, Oregon)와 함께 항온처리하였다. 망막을 전조직 표본 제작을 위해 4 방사상의 이완 절제로 평면화시켰다. 중재성 또는 심재성 망막 혈관층의 혈관계의 영상[참조: Dorrell et al., 2002 Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 43:3500-3510]을 Radiance MP2100 공초점 현미경 및 LASERSHARP[®] 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 포착했다. 혈관계 정량을 위해, 독립된 4 부위(900 μ m x 900 μ m)를 중재성 혈관층 또는 심재성 혈관층의 중앙부에서 무작위로 채취하고, LASERPIX[®] 분석 소프트웨어(Biorad)를 사용하여 혈관계의 총 길이를 측정했다. 동일한 혈관층에서의 이러한 4 부위의 총 길이는 이후 분석에 이용했다.

[0093] 편평하게 표본제작된 망막을 동결 절편으로 제조하기 위해 다시 재매립시켰다. 망막을 4% PFA에서 밤새 방치한 후, 20% 슈크로스과 함께 항온처리하였다. 이러한 망막을 적당한 절단 온도 화합물(OCT: Tissue-Tek; Sakura FineTech, Torrance, CA)에 매립시켰다. 동결 절편(10 μ m)은 핵 염료 DAPI(Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri)를 함유하는 PBS에서 재수화시켰다. 시신경유두를 함유하는 단일 절편 중 다른 3 부위(280 μ m 폭, 공정한 샘플링) 및 전체 주변 망막의 DAPI 표지된 핵 영상을 공초점 현미경으로 촬영했다. 단일 절편의 다른 3 부위의 ONL에 존재하는 핵수를 계수하고, 분석을 위해 총합했다. 간단한 선형 회귀 분석을 수행하여 심재성 혈관층의 혈관계 길이와 ONL에 존재하는 세포핵 수 사이의 관련성을 조사했다.

[0094] 밤새 암실에 적응시킨 후, 케타민 15 μ g/g과 크실라진 7 μ g/g을 복강내 주사하여 마우스를 마취시켰다. 동공 확

장(1% 아트로핀 설페이트) 후 각 안구의 각막 표면으로부터 망막전위도를 구강의 대조전극과 꼬리 접지전극과 함께 금 루프 각막 전극을 사용하여 기록했다. 자극은, 고도 반사성인 간즈펠드 돔 표면에 고정시킨 광 자극기(PS33 Plus, Grass Photoc Stimulator, Grass Instruments, Quincy, MA)로 부여했다. 광자극기에 의해 부여될 수 있는 최대 세기(0.668 cd-s/m^2) 이하의 일정 범위의 세기에서의, 단파장(Wratten 47A; $\lambda_{\text{max}}=470\text{nm}$) 섬광의 광에 대하여 간체 반응을 기록했다. 반응 신호는 증폭시키고(CP511 AC 증폭기, Grass Instruments), 계수화한 뒤(PCI-1200, National Instruments, Austin, TX), 컴퓨터 분석했다. 각 마우스마다 처리된 안구와 미처리된 안구로부터 ERG를 기록하여 자체의 내부 대조군으로 사용했다. 가장 약한 신호들에 대해서 100회 이하의 측정을 평균했다. 미처리 안구의 평균 반응을 처리된 안구의 반응으로부터 계수적으로 감하고, 이러한 신호의 차이를 기능성 구제의 지표로 삼았다.

[0095] Lin⁻HSC 표적화된 망막 유전자의 발현 평가에는 마이크로어레이 분석을 사용했다. P6 rd/rd 마우스에게 Lin⁻ 또는 CD31^{-HSC}를 주사했다. 이러한 마우스의 망막을 주사 40일 후에 RNase 비함유 배지에서 절제했다(주사 후 이 시점에서 망막 혈관계 및 광수용체 층의 구제가 명백하다). 각 망막의 1/4을 전조직 표본으로 분석하여 혈관계 및 신경세포 보호 뿐만 아니라 정상 HSC 표적화가 이루어지는지 확인했다. 성공적으로 주사한 망막의 RNA를 TRIzol(Life Technologies, Rockville, MD), 페놀/클로로포름 RNA 분리 프로토콜을 사용하여 정제했다. 이러한 RNA를 아피메트릭스(Affymetrix) Mu74Av2 칩에 하이브리드화시키고, GENESPRING[®] 소프트웨어(SiliconGenetics, Redwood City, CA)를 사용하여 유전자 발현을 분석했다. 정제된 사람 또는 마우스 HSC를 P6 마우스의 유리체내로 주사했다. P45에, 망막을 절제하고, 1) 사람 HSC 주사된 구제된 마우스 망막, 2) 사람 HSC 주사된, 구제되지 않은 마우스 망막, 및 3) 마우스 HSC 주사된, 구제된 마우스 망막의 분획으로 나누어, RNA 정제와 사람 특이적 U133A 아피메트릭스 칩 하이브리드화에 사용했다. GENESPRING[®] 소프트웨어를 사용하여 배경값 이상으로 발현되고 사람HSC 구제된 망막에서 더 많이 발현되는 유전자를 동정했다. 이러한 각 유전자마다 그 다음 프로브-쌍 발현 프로필을 독립적으로 분석하고, dChip을 이용한 정상인의 U133A 마이크로어레이 실험 모델과 비교하여 사람 중 특이적인 하이브리드화를 측정하고, 교차종 하이브리드화에 의한 거짓 양성을 가려냈다.

[0096] CD133 양성 및 CD133 음성 Lin⁻HSC 아집단을 신생 SCID 마우스의 안구로 유리체내 주사했을 때, 발생성 혈관계로 혼입되는 정도가 가장 큰 실험군은 CD31과 인테그린 $\alpha 6$ 표면 항원을 모두 발현하는 CD133 양성 아집단이었다(도 21, 하단 참조). CD31이나 인테그린 $\alpha 6$ 을 발현하지 않는 CD133 양성 아집단(도 21, 상단)은 주변 허혈 유도 혈관신생 부위를 표적으로 삼지만, 혈관신생이 진행되는 안구에 주사되었을 때에는 그렇지 않았다.

[0097] 실시예 10. 산소 유도성 망막 변성의 쥐 모델에서의 쥐 세포의 유리체내 투여

[0098] 산소 유도성 망막 변성(OIR) 모델로서, 신생 야생형 CD57B16 마우스를 출생 후 P7 내지 P12일 사이에 고산소증(75% 산소)에 노출시켰다. 도 22는 P0부터 P30까지의 C57B16 마우스의 정상적인 출생후 혈관 발달을 도시한 것이다. P0에서는 시신경유두 주변에서 표재성 혈관의 발아만이 관찰되었다. 다음 몇 일이 경과되면서, 1차 표재성 망이 주변으로 뻗어서, P10에는 먼 주변에 도달했다. P7과 P12 사이에, 2차(심재성) 혈관층이 발달했다. P17에는 다량의 표재성 및 심재성 혈관망이 존재했다(도 22, 삽입도). 이후 경과일에서는, P21에 거의 성숙 구조가 될 때까지 3차(중재성) 혈관층의 발달과 함께 리모델링이 일어났다.

[0099] 이에 반해, OIR 모델에서는 P7 내지 P12에 75% 산소에 노출된 후 정상적인 발달 순서가 심각하게 붕괴되었다(도 23). P3에서, 본 발명의 성체 쥐 Lin⁻HSC 집단을 유리체내로 주사하고, 그 다음 이 마우스의 하나의 안구에는 OIR을 처리하고, 다른 안구에는 대조군으로서 PBS 또는 CD31 음성 세포를 주사했다. 도 24는 본 발명의 Lin⁻HSC 집단이 발생성 마우스 망막에 고산소 수준의 변성 효과를 역전시킬 수 있음을 예시한 것이다. 처리된 안구에서는 P17에 완전 발달된 표재성 및 심재성 망막 혈관계가 관찰된 반면, 대조군 안구에서는 심재성 혈관이 사실상 존재하지 않는 커다란 무혈관 부위를 보여주었다(도 24). OIR 모델에 속하는 약 100개의 마우스 안구를 관찰했다. 본 발명의 Lin⁻HSC 집단으로 처리된 안구 중 58%에서는 정상 혈관형성이 관찰된 반면, PBS로 처리된 대조군 안구에서는 3%, CD31⁻ 세포 처리된 대조군 안구에서는 12%가 정상 혈관형성을 나타냈다.

[0100] 결과

[0101] 쥐 망막의 혈관 발달; 안구 혈관신생 모델

[0102] 마우스 안구는 포유동물 망막의 혈관 발달, 예를 들어, 사람 망막의 혈관 발달 연구용으로 인정된 모델을 제공한다. 쥐 망막 혈관계의 발달 동안, 허혈로 유도된 망막의 혈관은 성상교세포와 밀접하게 연접되어 발달한다. 이러한 아교세포 요소는 시신경원반으로부터 신경절 세포 층을 따라서 임신 제3기의 태아 또는 신생아 설치류 망막상으로 이동하여 급속하게 확산된다. 쥐의 망막 혈관이 발달함에 따라 내피 세포는 이러한 이미 확립된 성상교세포 주형을 이용하여 망막의 혈관 패턴을 결정한다(도 1a 및 1b 참조). 도 1(a 및 b)는 발달중인 마우스 망막의 도면을 도시한 것이다. 도 1a는 성상교세포 주형(호린 선)에 겹쳐놓여진 1차 혈관층(도면의 상단 좌측에 있는 진한 선)의 발달을 도시한 것이며, 도 1b는 제2 망막 혈관 형성기를 도시한 것이다. 도면에서, GCL은 신경절 세포 층을 의미하고, IPL은 내부 혈관층 층을 의미하며, INL은 내부 핵 층을 의미하고; OPL은 외부 혈관층 층을 의미하며; ONL은 외부 핵 층을 의미하고; RPE는 망막 색소 상피를 의미하며; ON은 시신경을 의미하고; P는 주변부를 의미한다.

[0103] 출생시 망막 혈관계는 사실상 존재하지 않는다. 생후 14일(P14)까지 망막은 시력의 생김과 동시에 망막 혈관의 발달된 복합적인 1차(표재성) 및 2차(심재성) 층을 갖는다. 먼저, 스포크 형상의 말초혈관이 기존의 성상교세포 망 상에서 주변부를 향하여 급속히 성장하여 모세 혈관층 형성과 점차적으로 연결된다. 이들 혈관은 P10 후에 신경 섬유내에서 단층으로서 성장한다(도 1a). P7 내지 P8에 걸쳐가 이러한 1차 혈관층으로부터 뻗어나와 망막을 통과하여 외부 혈관층 층내로 침투하고, 여기서 2차 또는 심재성 망막 혈관층을 형성한다. P21까지 전체 망은 집중적으로 리모델링되고 3차 또는 중재성 혈관층이 내부 핵 층의 내부 표면에서 형성된다(도 1b).

[0104] 신생아 마우스 망막 혈관신생 모델은 몇가지 이유로 안구 혈관신생 동안의HSC의 역할을 연구하는데 유용하다. 이러한 생리학적으로 관련된 모델에서, 내인성 혈관이 출현하기 전에 거대 성상교세포 주형이 존재함으로써 신생혈관 과정 동안 세포-세포 표적화에 대한 역할을 평가할 수 있게 한다. 또한, 이와 같은 일관되고 재생가능한 신생아 망막의 혈관 과정은 저산소증에 의해 유도되는 것으로 공지되어 있는데, 이러한 점에서 허혈이 관여한다고 공지된 다수의 망막 질환과 유사성을 갖는다.

[0105] 골수 유래의 내피 전구세포(EPC)의 농축

[0106] 세포 표면 마커 발현이 HSC 제제 중에서 발견된 EPC 집단에 대해 널리 평가되었다 해도, 독특하게 EPC를 동정하는 마커는 여전히 거의 정의되지 않고 있다. EPC를 농축시키기 위해, 조혈 계통 마커 양성 세포(Lin⁺), 즉 B 림프구(CD45), T 림프구(CD3), 과립구(Ly-6G), 단핵구(CD11) 및 적혈구(TER-119)를 마우스의 골수 단핵 세포로부터 고갈시켰다. Sca-1 항원을 사용하여 EPC를 추가로 농축시켰다. 동일한 개수의 Lin⁺HSC Sca-1⁺ 또는 Lin⁻세포를 유리체내로 주사한 후 수득된 결과를 비교한 결과, 두 그룹 간에 차이는 검출되지 않았다. 사실상, Lin⁻ Sca-1⁻ 세포가 주사된 경우에만, 발달중인 혈관내로 훨씬 다량이 혼입되는 것으로 관찰되었다.

[0107] 기능성 검정에 기초하여, 본 발명의 Lin⁻HSC 집단에는 EPC가 농축되어 있다. 추가로, Lin⁺HSC 집단은 기능면에서 Lin⁻HSC 집단과 상당히 다르게 행동한다. 각 분획(이미 보고된 시험관내 특성화 연구에 기초함)에 대해 EPC를 동정하기 위해 통상적으로 사용되는 에피토프를 또한 평가하였다. 이들 마커 중 어떠한 것도 Lin⁻ 분획과 광범위하게 연관되지 않았지만, 모두, Lin⁺HSC 분획과 비교하여 Lin⁻HSC에서 약 70 내지 약 1800% 증가되었다(도 1c). 도 1c는 골수 유래의 Lin⁺HSC 및 Lin⁻HSC 분리된 세포의 유세포분석법에 의한 특성화를 예시한 것이다. 도 1c의 최상단 줄은 항체로 표지되지 않은 세포의 조혈 줄기세포 점도표 분포를 도시한 것이다. R1은 양성 PE-염색의 정량가능한-개폐 면적을 나타내고; R2는 GFP-양성을 나타낸다. Lin⁻HSC의 점도표는 중간 줄에 제시되어 있으며 Lin⁺HSC의 점도표는 하단 줄에 제시되어 있다. C57B/6 세포를 Sca-1, c-kit, Flk-1/KDR, CD31에 대한 PE-접합된 항체로 표지하였다. Tie-2 데이터는 Tie-2-GFP 마우스로부터 입수하였다. 점도표의 모퉁이의 백분율은 전체 Lin⁻ 또는 Lin⁺HSC 집단 중 양성-표지된 세포의 %를 나타낸다. 흥미롭게도, Flk-1/KDR, Tie-2 및 Sca-1와 같은 채택된 EPC 마커는 불량하게 발현되었으므로 추가의 분획화용으로 사용되지 못했다.

[0108] 유리체내 주사된 HSC Lin⁻ 세포는 성상교세포를 표적화하고 발달중인 망막의 혈관계내로 혼입되는 EPC를 함유한다.

[0109] 유리체내로 주사된 Lin⁻HSC가 망막의 특정 세포형을 표적화하고 성상교세포 주형을 사용하고 망막 혈관신생에 참

여할 수 있는지를 결정하기 위해, 성체(GFP 또는 LacZ 형질전환) 마우스의 골수로부터 분리된, 본 발명의 Lin^- HSC 조성물로부터의 약 10^5 개 세포 또는 $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ (대조군, 약 10^5 개 세포)를 생후 2일(P2)의 마우스 안구에 주사하였다. 주사 후 4일째(P6)에, GFP 또는 LacZ 형질전환 마우스로부터 유래된 본 발명의 Lin^- HSC 조성물로부터의 다수의 세포들은 망막에 부착되었고 내피 세포의 특징적인 연장된 외관을 지녔다(도 2a). 도 2는 발달중인 마우스 망막내로의 Lin^- 세포의 이식을 예시한 것이다. 도 2a에 제시한 바와 같이, 주사 후 4일째(P6)에 유리체내로 주사된 $\text{eGFP}^+ \text{Lin}^- \text{HSC}$ 는 망막상에 부착되어 분화한다.

[0110] 망막의 많은 영역에서 GFP를 발현하는 세포는 기저 성상교세포 및 유사한 혈관에 부합되는 패턴으로 배열되었다. 이러한 형광 세포는 내인성의 발달중인 혈관 망의 전방부에서 관찰되었다(도 2b). 대조적으로, 단지 소수의 $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ (도 2c) 또는 성체 마우스 장간막 내피 세포(도 2d)만이 망막 표면에 부착되었다. 주사된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물로부터의 세포가 이미 확립된 혈관을 갖는 망막에도 부착할 수 있는지를 결정하기 위해서, 본 발명자들은 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물을 성체 안구에 주사하였다. 흥미롭게도, 어떠한 세포도 망막에 부착되거나, 확립된 정상 망막 혈관내로 혼입되는 것으로 관찰되지 않았다(도 2e). 이는 본 발명의 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물이 정상적으로 발달된 혈관계를 붕괴시키지 않거나 정상적으로 발달된 망막에서 비정상적 혈관화를 개시하지 않을 것임을 나타낸다.

[0111] 본 발명의 주사된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물과 망막 성상교세포 간의 관련성을 결정하기 위해, 아교 섬유상 산성 단백질(GFAP, 성상교세포의 마커) 및 프로모터-유도된 녹색 형광 단백질(GFP)를 발현한 형질전환 마우스를 사용하였다. eGFP 형질전환 마우스로부터의 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 가 주사된 이러한 GFAP-GFP 형질전환 마우스의 망막 검사는 주사된 eGFP EPC와 기존의 성상교세포의 공동 국제화를 입증하였다(도 2f 내지 2h, 화살표). $\text{eGFP} + \text{Lin}^- \text{HSC}$ 의 과정은 기저 성상교세포 망에 부합되는 것으로 관찰되었다(화살표, 도 2g). 이러한 안구 검사로, 주사된 표지된 세포만이 성상교세포에 부착되었음이 입증되었으며, 망막 주변부가 아직 내인성 혈관을 갖지 않는 P6 마우스 망막에서, 주사된 세포는 이러한 아직 혈관화되지 않은 영역내의 성상교세포에 부착된 것으로 관찰되었다. 놀랍게도, 주사된 표지된 세포는 망막의 보다 심층에서, 이후에 정상적 망막 혈관이 발달될 정확한 위치(도 2i, 화살표)에서 관찰되었다.

[0112] 본 발명의 주사된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 가 발달중인 망막 혈관계내로 안정하게 혼입되는지를 결정하기 위해서, 이후의 몇가지 시점에서 망막 혈관을 검사하였다. P9(주사한지 7일 후)만큼 이른 시점에서, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 는 CD31^+ 구조내로 혼입되었다(도 2j). P16(주사한지 14일 후)까지, 세포는 세포는 이미 망막의 혈관 형상 구조내로 광범위하게 혼입되었다(도 2k). 동물을 희생시키기 전에 (기능적 망막 혈관을 확인하기 위해) 로다민-텍스트란을 정맥내로 주사한 경우, 다수의 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 는 모(母) 혈관관 함께 정렬되었다(도 2l). 다음의 2가지 패턴의 표지된 세포 분포가 관찰되었다: (1) 한가지 패턴에서 세포는 표지되지 않은 내피 세포들 간에서 혈관을 따라 산재되었으며, (2) 다른 패턴은 혈관이 전적으로 표지된 세포만으로 이루어졌음을 나타냈다. 주사된 세포는 또한 심재성 혈관층의 혈관내로도 혼입되었다(도 2m). 신생혈관계내로 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 유래의 EPC가 산발적으로 혼입된다는 것은 이미 보고된 바 있으나, 혈관 망이 전적으로 이러한 세포만으로 이루어진다는 것은 최초의 보고이다. 이는 유리체내로 주사된 본 발명의 골수 유래의 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 집단의 세포가 형성중인 망막 혈관층의 어떠한 층내로도 효율적으로 혼입될 수 있음을 입증한다.

[0113] 비-망막 조직(예: 뇌, 간, 심장, 폐, 골수)의 조직학적 검사로는, 유리체내 주사한지 5일 또는 10일 후까지 검사한 경우에 어떠한 GFP 양성 세포의 존재도 입증하지 못했다. 이는 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 분획내 세포 아집단이 망막 성상교세포를 선택적으로 표적화하여 발달중인 망막 혈관계내로 안정하게 혼입됨을 나타낸다. 이들 세포가 (망막 성상교세포와 연합됨, 연장된 형태, 모 세포내로의 안정한 혼입 및 세포의 위치에 존재하지 않음) 내피 세포의 많은 특징을 지니기 때문에, 이들 세포는 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 집단내에 존재하는 EPC를 대표한다. 표적화된 성상교세포는 다수의 저산소증 망막병증에서 관찰된 동일한 유형의 것이며, 아교세포가 DR 및 기타 유형의 망막 손상에서 관찰된 신생혈관 염상체의 주된 성분임은 익히 공지되어 있다. 반응성 신경아교증 및 허혈-유도된 신생혈관형성의 조건하에, 활성화된 성상교세포는, 사람을 포함한 다수의 포유동물 중에서 신생아 망막 혈관 주형 형성 동안

관찰된 바와 동일하게, 증식하고 사이토킨을 생성하여 GFAP를 상향조절한다.

[0114] 본 발명의 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물이 신생아 마우스 안구에서와 같이 성체 마우스 안구에서도 활성화된 성상교세포를 표적화할 수 있는지를 시험하기 위해서, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포를 광응고술(도 3a) 또는 바늘 팁(도 3b)에 의해 망막이 손상된 성체 안구에 주사하였다. 모델 둘다에서, 현저하게 GFAP로 염색된 세포 집단은 손상 부위 주변에서만 관찰되었다(도 3a 및 3b). 주사된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물로부터의 세포는 손상된 부위로 국재화되고 GFAP-양성 성상교세포와 특이적으로 연합된 상태를 유지하였다(도 3a 및 3b). 이들 부위에서, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포는 신생아의 심재성 망막 혈관계 형성 동안 관찰된 수준과 유사한 수준으로 망막의 심층내로 이동한 것으로도 관찰되었다. 망막의 손상되지 않은 부분은, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 를 정상의 손상되지 않은 성체 망막에 주사한 경우에 관찰된 바와 동일하게 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포를 함유하지 않았다(도 2e). 이러한 데이터는 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물이 신경아교증을 앓는 손상된 성체 망막뿐만 아니라 혈관화중인 신생아 망막에서도 활성화된 아교세포를 선택적으로 표적화할 수 있음을 나타낸다.

[0115] **유리체내로 주사된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 는 변성 혈관계를 구제하고 안정화시킬 수 있다.**

[0116] 유리체내로 주사된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물이 성상교세포를 표적화하고 정상적인 망막 혈관계로 혼입되기 때문에, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포는 또한 신경아교증 및 혈관 변성과 관련된 허혈성 또는 변성 망막 질환에서 변성 혈관계를 안정화시킨다. rd/rd 마우스는 출생 후 1개월까지 광수용체 및 망막 혈관 층의 심각한 변성을 나타내는 망막 변성 모델이다. 이러한 마우스의 망막 혈관계는 P16까지 정상적으로 발달하며, 이 시점에서 보다 심재성 혈관층은 퇴화되며, 대부분의 마우스에서 심재성 및 중재성 혈관층은 P30까지 거의 완전하게 변성되었다.

[0117] HSC가 퇴화중인 혈관을 구제할 수 있는지를 결정하기 위해서, $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ 또는 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ (Balb/c 마우스 유래)를 P6에서 rd/rd 마우스에 유리체내로 주사하였다. P33까지, $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ 를 주사한 후, 망막의 가장 심층의 혈관은 거의 완전히 존재하지 않았다(도 4a 및 4b). 대조적으로, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 가 주사된 대부분의 망막은 P33까지 3개의 대등한, 잘 형성된 혈관 층을 갖는 거의 정상적인 망막 혈관계를 지녔다(도 4a 및 4d). 이러한 효과의 정량화는, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 가 주사된 rd/rd 안구의 심재성 혈관층내 혈관의 평균 길이가, 미처리되었거나 $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ 가 주사된 안구보다 거의 3배 더 길다는 것을 입증하였다(도 4e). 놀랍게도, rd/rd 성체 마우스(FVB/N) 골수로부터 유래된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물의 주사는 변성중인 rd/rd 신생아 마우스 망막 혈관계도 구제하였다(도 4f). rd/rd 마우스 안구내의 혈관계의 변성은 출생 후 2주 내지 3주만큼 이른 시점에서 관찰되었다. P15만큼 늦은 시점에서 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 를 주사해도 1개월 이상 동안 rd/rd 마우스에서 변성 혈관계가 부분적으로 안정화되었다(도 4g 및 4h).

[0118] 보다 어린(예를 들어, P2) rd/rd 마우스에게 주사된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물도 발달중인 표재성 혈관계내로 혼입되었다. P11까지, 이들 세포는 심재성 혈관층의 수준으로 이동하여 야생형 외부 망막 혈관 층에서 관찰된 패턴과 동일한 패턴을 형성하였다(도 5a). 주사된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물로부터의 세포가 rd/rd 마우스에서 발달중인 망막 혈관계내로 혼입되어 이를 안정화시키는 방식을 보다 명확히 기술하기 위해서, Balb/c 마우스로부터 유래된 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물을 Tie-2-GFP FVB 마우스 안구에 주사하였다. FVB 마우스는 rd/rd 유전형을 가지며, 융합 단백질 Tie-2-GFP를 발현하기 때문에 모든 내인성 혈관이 형광을 발한다.

[0119] 표지되지 않은, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물로부터의 세포가 신생아의 Tie-2-GFP FVB 안구에 주사되고 이어서 발달중인 혈관계내로 혼입된 경우, 내인성의 Tie-2-GFP 표지된 혈관들에는 주사되어 혼입된 표지되지 않은 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 에 상응하는 표지되지 않은 갭(gap)이 있어야 한다. 이어서, 다른 혈관 마커(예: CD-31)로의 후속적 염색은 전체 혈관의 윤곽을 잡도록 하여, 비-내인성 내피 혈관이 혈관계의 일부인지를 결정할 수 있도록 하였다. 주사한지 2개월 후, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물이 주사된 안구의 망막에서 CD-31 양성인면서 Tie-2-GFP 음성인 혈관이 관찰되었다(도 5b). 흥미롭게도, 대다수의 구제된 혈관은 Tie-2-GFP 양성 세포를 함유하였다(도 5c). 평활근 액틴 염색으로 측정된 혈관주위세포의 분포는, 혈관 구제가 있었는지에 관계없이, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 주사에 의해 변화되지 않았다(도 5d). 이러한 데이터는, 유리체내로 주사된 본 발명의 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 조성물이 유전적 결손 마우스의 망막내로 이동하고 정상적인 망막 혈관의 형성에 참여하여 내인성 변성 혈관계를 안정시킴을 명백히 입증한다.

[0120] Lin⁻HSC로부터 형질감염된 세포에 의한 망막 혈관신생의 억제

[0121] 대다수의 망막 혈관 질환에는 혈관 변성보다는 오히려 비정상적 혈관 증식이 관여한다. 성상교세포로 표적화되는 형질전환 세포를 사용하여 항-혈관신생 단백질을 전달하고 혈관신생을 억제할 수 있다. Lin⁻HSC 조성물로부터의 세포를 T2-트립토판닐-tRNA 신테타제(T2-TrpRS)로 형질감염시켰다. T2-TrpRS는 잠재적으로 망막의 혈관신생을 억제하는 TrpRS의 43kD 단편이다(도 6a). P12에서, P2에서 대조군 플라스미드-형질감염된 Lin⁻HSC 조성물(T2-TrpRS 유전자를 함유하지 않음)이 주사된 안구의 망막은 정상적인 1차(도 6c) 및 2차(도 6d) 망막 혈관총을 지녔다. T2-TrpRS 형질감염된 본 발명의 Lin⁻HSC 조성물을 P2 안구에 주사하고 10일 후에 평가한 경우, 1차 망은 현저한 비정상성(도 6e)을 가졌으며 심재성 망막 혈관의 형성은 거의 완전히 억제되었다(도 6f). 이들 안구에서 관찰된 소수의 혈관은 혈관 사이의 갭이 커짐에 따라 현저하게 감소되었다. T2-TrpRS를 분비하는 Lin⁻HSC 세포에 의한 억제 범위는 하기 표 2에 상세히 기재한다.

[0122] T2-TrpRS는 시험관내에서 Lin⁻HSC 조성물 내의 세포에 의해 생산되고 분비되며, 이들 형질감염된 세포를 유리체내로 주사한 후, 망막내에서 T2-TrpRS의 30kD 단편(도 6b)가 관찰되었다. 이러한 30kD 단편은 특히, 본 발명의 형질감염된 Lin⁻HSC가 주사된 망막에서만 관찰되며, 재조합 또는 시험관내-합성된 단백질에 비해서 이렇게 외관적 분자량이 감소된 것은 생체내의 T2-TrpRS의 프로세싱 또는 분해 때문일 수 있다. 이들 데이터는 Lin⁻HSC를 사용하여, 혈관신생억제성 분자를 발현하는 유전자와 같은 기능적 활성 유전자를 활성화된 성상교세포로 표적화함으로써 망막 혈관계로 전달할 수 있음을 나타낸다. 관찰된 혈관생성억제 효과가 세포 매개성 활성으로 인한 것일 가능성이 있지만, 동일하지만 T2로 형질감염되지 않은 Lin⁻HSC 조성물로 처리된 안구가 정상 망막 혈관계를 가졌기 때문에 이는 거의 불가능하다.

표 2

[0123] T2-TrpRS를 분비하는 Lin⁻HSC 세포에 의한 혈관 억제

	1차 혈관총		심재성 혈관총		
	억제됨	정상	완전한	부분적	정상
TsTrpRS (15개의 안구)	60% (9개 안구)	40% (6개 안구)	33.3% (5개 안구)	60% (9개 안구)	6.7% (1개 안구)
대조군 (13개의 안구)	0% (0개 안구)	100% (13개 안구)	0% (0개 안구)	38.5% (5개 안구)	61.5% (8개 안구)

[0124] 유리체내로 주사된 Lin⁻HSC 집단은 망막 성상교세포로 국제화되어 혈관내로 혼입되었으며, 다수의 망막 질환의 치료시에 유용할 수 있다. 주사된 HSC 조성물로부터의 대부분의 세포가 성상교세포 주형에 부착되나, 소수는 망막내로 깊숙이 이동하여, 후속적으로 심재성 혈관 망이 발달될 영역으로 이동한다. 출생후 42일 전에 상기 영역에서 GFAP-양성 성상교세포가 관찰되지 않았다 해도, 이는 GFAP-음성 아교세포가 이미 존재하여 Lin⁻HSC 국제화에 대한 시그널을 제공할 수 있다는 가능성을 배제하지는 않는다. 이전의 연구는 다수의 질환이 반응성 아교증과 관련됨을 제시하였다. DR에서, 특히 아교세포 및 이의 세포외 매트릭스는 병리학적 혈관신생과 관련된다.

[0125] 주사된 Lin⁻HSC 조성물로부터의 세포가 특이적으로 GFAP-발현 아교세포에 부착되었기 때문에, 손상의 유형에 관계없이, 본 발명의 Lin⁻HSC 조성물을 망막내의 혈관신생진 병소를 표적화하는데 사용할 수 있다. 예를 들어, 당뇨병과 같은 허혈성 망막병증에서, 신생혈관형성은 저산소증에 대한 반응이다. Lin⁻HSC 조성물을 병리학적 신생혈관형성 부위로 표적화함으로써 신생혈관계의 발달을 안정화시켜 출혈 또는 부종(DR과 관련된 시력 상실의 원인)과 같은 신생혈관계의 비정상성을 예방할 수 있고, 처음에 신생혈관형성을 자극한 저산소증을 잠재적으로 경감시킬 수 있다. 비정상적 혈관은 정상 상태로 회복될 수 있다. 게다가, T2-TrpRS와 같은 혈관신생억제성 단백질을 형질감염된 Lin⁻HSC 조성물 및 성상교세포의 레이저-유도된 활성화를 사용하여 병리학적 혈관신생 부위

로 전달할 수 있다. 레이저 광응고술은 임상 안과학에서 통상적으로 사용되기 때문에, 이러한 접근법은 다수의 망막 질환용으로 적용된다. 이러한 세포계 접근법은 암 치료요법에서 조사되어 왔으며, 안질환에 대한 이의 사용은 보다 유리한데, 이는 안내 주사로 수많은 세포를 질환 부위로 직접 전달할 수 있기 때문이다.

[0126] **Lin⁻HSC에 의한 신경영양성 및 혈관영양성 구제**

[0127] 상기한 바와 같은 증가된 녹색 형광 단백질(eGFP), C3H(rd/rd), FVB(rd/rd) 마우스의 골수로부터 Lin⁻HSC를 분리시키기 위해 MACS를 사용하였다. 이들 마우스로부터의 EPC를 함유하는 Lin⁻HSC를 P6 C3H 또는 FVB 마우스 안구에 유리체내로 주사하였다. 주사 후 다양한 시점(1개월, 2개월 및 6개월)에서 안구를 수집하였다. CD31에 대한 항체로 염색한 후의 공초점 레이저 주사현미경 및 DAPI로 핵 염색 후의 망막 조직학에 의해 혈관계를 검사하였다. 또한, 다양한 시점에서의 망막으로부터의 mRNA의 마이크로어레이 유전자 발현(microarray gene expression) 분석을 사용하여 당해 효과에 잠재적으로 관여하는 유전자를 동정하였다.

[0128] rd/rd 마우스의 안구는 P21까지 감각신경 망막 및 망막 혈관계 둘다가 심각하게 변성되어 있었다. P6에서 Lin⁻HSC로 처리된 rd/rd 마우스의 안구는 6개월 동안 정상적인 망막 혈관계를 유지하였으며, 심층 및 중간층은 둘다 대조군과 비교하여 모든 시점(1개월, 2개월 및 6개월)에서 현저하게 개선되었다(도 12 참조). 또한, 본 발명자들은 또한 Lin⁻HSC로 처리된 망막이 대조군으로서 Lin⁺HSC로 처리된 안구에 비해서 보다 두꺼웠으며(1개월: 1.2배, 2개월: 1.3배, 6개월: 1.4배) 외부 핵 층에 다수의 세포(1개월: 2.2배, 2개월: 3.7배, 6개월: 5.7배)를 가졌음을 관찰하였다. 대조군(미처리되거나 Lin⁻HSC로 처리되지 않음) rd/rd 망막과 비교한 "구제된"(예: Lin⁻HSC) rd/rd 망막의 대규모 계층 분석으로 sHSP(소형 열충격 단백질; small heat shock protein), 및 도 20의 패널 A 및 B에 제시한 단백질을 암호화하는 유전자를 비롯한 혈관 및 신경 구조와 상관관계가 있는 특이적 성장 인자를 암호화하는 유전자의 현저한 상향 조절이 입증되었다.

[0129] 본 발명의 골수 유래의 Lin⁻HSC 집단은 rd/rd 마우스에서 정상 혈관계의 유지를 현저하고 재현가능하게 유도하고 광수용체 및 기타 신경 세포 층을 급격하게 증가시켰다. 이러한 신경영양성 구제 효과는 소형 열충격 단백질 및 성장 인자의 현저한 상향 조절과 상관관계가 있으므로, 현재로서는 치료불가능한 망막 변성 질환의 치료학적 접근법에 관한 식견을 제공한다.

[0130] **Rd1/rd1 마우스 망막은 심각한 혈관 및 신경세포 변성을 나타낸다.**

[0131] 마우스의 정상적인 출생후 망막의 혈관 및 신경세포의 발달은 충분히 설명되어 있고, 3/3분기 사람 태아에서 관찰되는 변화와 유사하다[참조: Dorrell et al., 2002 Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 43:3500-3510]. rd1 유전자에 대해 동종접합성인 마우스는 사람의 망막 변성 시 나타나는 많은 특징을 공유하며[참조: Frasson et al., 1999, Nat. Med. 5:1183-1187], PR cGMP 포스포디에스테라제를 암호화하는 유전자의 돌연변이 결과로서 심각한 혈관 위축을 수반한 급성 광수용체(PR) 상실을 나타낸다[참조: Bowes et al. 1990, Nature 347: 677-680]. 망막 발생과 후속 변성 중에 나타나는 혈관계를 조사하기 위해, 콜라겐 IV(CIV), 성숙 혈관계의 세포외 기질(ECM) 단백질, 및 내피세포의 마커인 CD31(PECAM-1)에 대한 항체를 사용했다(도 15). rd1/rd1(C3H/HeJ)의 망막은 광수용체 함유 외부 핵 층(ONL)의 변성이 개시되는 시기인 출생후 약 8일(P8)까지는 정상적으로 발달했다. 이러한 ONL은 급속히 변성되어 아포토시스로 세포가 사망하여 P20일에는 하나의 핵 층만이 존재했다. 전조직 표본화된 망막을 CIV 및 CD31 모두에 대한 항체로 이중 염색한 결과, 다른 문헌[참조: Blanks et al., 1986, J. Comp. Neurol. 254:543-553]들에 기재된 것과 유사한 rd1/rd1 마우스의 혈관 변성이 세부적으로 확인되었다. 1차 및 심재성 망막 혈관층은 P12일지라도 정상적으로 발달하는 것으로 보였지만, 그 이후에는 CD31 염색 부재로 확인되듯이 내피 세포가 급격히 상실되었다. CD31 양성 내피 세포는 P12일지라도 정상적인 분포로 존재했으나, 그 후 급격히 사라졌다. 흥미로운 사실은, CIV 양성 염색이 전 조사 시점 동안 양성으로 유지되어, 혈관 및 관련 ECM이 정상적으로 형성됨을 암시하지만, CD31 양성 세포가 전혀 관찰되지 않는 P13 후에는 기질만이 남아있었다(도 15, 중간 패널). 또한, 중재성 혈관층은 P21후 변성되지만, 그 진행은 심재성 혈관층에서 관찰되는 것보다 느렸다(도 15, 상단 패널). 정상 마우스의 망막 혈관 및 신경 세포 층은 rd1/rd1 마우스의 비교군으로 함께 제시했다(우측 패널, 도 15).

[0132] **rd1/rd1 마우스의 골수 유래 Lin⁻HSC의 신경보호 효과**

[0133] 유리체내 주사된 Lin⁻HSC는 총 3가지 혈관층에 속하는 내인성 망막 혈관계로 혼입되어, 혈관의 변성을

차단한다. 흥미롭게도, 주사된 세포는 외부 핵 층에서는 사실상 관찰되지 않았다. 이 세포들은 형성되는 망막 혈관으로 혼입되거나 이러한 혈관에 인접한 것으로 관찰되었다. 쥐 Lin⁻HSC(C3H/HeJ 유래)를 변성 발병 직전인 P6에 C3H/HeJ(rd1/rd1) 마우스 안구에 유리체내로 주사했다. P30까지, 대조군 세포(CD31⁺) 주사된 안구는 전형적인 rd1/rd1 표현형을 나타내어, 즉 심재성 혈관층 및 ONL의 거의 완전한 변성이 조사된 모든 망막에서 관찰되었다. 이에 반해, Lin⁻HSC 주사된 안구는 정상으로 보이는 중재성 및 심재성 혈관층을 유지했다. 놀라운 사실은, 대조군 세포 주사된 안구에서보다 Lin⁻HSC 주사된 안구의 내부 핵 층(INL) 및 INL에서 유의적으로 많은 세포가 관찰된다는 점이다(도 16A). 이러한 Lin⁻HSC의 구제 효과는 2개월째 관찰할 수 있었고(도 16B), 주사 후 6개월까지 관찰되었다(도 16C). Lin⁻HSC 주사된 안구의 중재성 및 심재성 혈관층 뿐만 아니라 신경세포 함유 INL 및 ONL의 혈관계의 차이는 구제된 안구와 구제되지 않은 안구를 비교했을 때 측정된 모든 시점에서 현저하게 드러났다(도 16B 및 도 16C). 이러한 효과는 혈관계의 총 길이를 측정하고(도 16D), ONL에서 관찰되는 DAPI 양성 세포 핵수를 계수(도 16E)하여 정량분석했다. 모든 시점의 데이터에 대해 간단한 선형 회귀 분석을 적용했다.

[0134] Lin⁻HSC 주사된 안구에서는 P30(p<0.024) 및 P60(p<0.034)에서의 혈관 구제 및 신경세포(예컨대, ONL 두께) 구제 사이에 통계적으로 유의적인 상관관계가 관찰되었다(도 16F). 이러한 상관관계는 Lin⁻HSC 주사된 망막과 대조군 세포 주사된 망막을 비교했을 때 P180에서 통계적 유의성은 없지만(p<0.14), 높은 수준으로 유지되었다(도 16F). 이에 반해, 대조군 세포 주사된 망막에서는 어떤 시점에서도 혈관계의 보존과 ONL의 보존 사이에 유의적 상관관계가 관찰되지 않았다(도 16F). 이러한 데이터는 Lin⁻HSC의 유리체내 주사에 의해 수득되는, rd1/rd1 마우스의 망막내 동시적인 망막 혈관 구제 및 신경 구제를 입증하여준다. 주사된 세포는 망막 혈관내 또는 이의 근접 위치 외의 다른 어떤 위치 또는 ONL에서는 관찰되지 않았다.

[0135] Lin⁻HSC 주사된 rd/rd 망막의 기능적 구제

[0136] 대조군 세포 또는 쥐 Lin⁻HSC를 주사한 후 2개월된 마우스에 대하여 망막전위도(ERG)를 실시했다(도 17). ERG 기록 후 각 안구에 대해 면역조직화학 및 현미경 분석을 실시하여 혈관 및 신경세포 구제의 발생 여부를 확인했다. 처리되어 구제된 안구와 대조군의 구제되지 않은 안구에서 수득된 대표적인 ERG 기록은 구제된 안구에서 계수적으로 감소된 신호(처리된 안구 - 미처리된 안구)가 8 내지 10 마이크로볼트 정도의 진폭으로 분명하게 검출할 수 있는 신호를 생산한다는 것을 보여주었다(도 17). 분명한 사실은 두 안구의 신호가 심각하게 비정상적이라는 점이다. 하지만, 일정하면서 검출할 수 있는 ERG는 Lin⁻HSC 처리된 안구로부터 기록되었다. 모든 경우마다 대조군 안구의 ERG는 검출할 수 없었다. 구제된 안구에서 기록되는 신호의 진폭은 정상보다는 상당히 적었지만, 이러한 신호는 조직학적 구제가 있을 때마다 일관되게 관찰되었고, 다른 유전자 기반 구제 연구에서 보고된 진폭의 정도와 유사했다. 이러한 결과를 종합하면, 본 발명의 Lin⁻HSC로 처리된 안구에서 어느 정도의 기능적 구제가 일어났음이 증명된다.

[0137] 사람 골수(hBM) 유래 Lin⁻HSC도 변성 망막을 구제한다.

[0138] 사람 골수에서 분리된 Lin⁻HSC는 쥐 Lin⁻HSC와 유사하게 작용한다. 골수는 사람 제공자에게서 수집하고 Lin⁺HSC를 제거하여 사람 Lin⁻HSC(hLin⁻HSC) 집단을 수득했다. 이러한 세포를 형광성 염료로 생체외에서 표지시키고 C3SnSmn.CB17-Prkdc SCID 마우스 안구에 주입했다. 이와 같이 주사된 hLin⁻HSC는 쥐 Lin⁻HSC를 주사했을 때 관찰되는 것과 동일한 방식으로 망막 혈관신생 부위로 이동하여 그 부위를 표적화했다(도 18A). 혈관 표적화 외에도, 사람 Lin⁻HSC는 또한 rd1/rd1 마우스의 혈관 세포층 및 신경 세포층 모두에 대해 강력한 구제 효과를 제공했다(도 18B 및 도 18C). 이러한 관찰은 망막 혈관계를 표적화하고 망막 변성을 예방할 수 있는 세포가 사람 골수 중에 존재함을 확인시켜준다.

[0139] Lin⁻HSC는 rd10/rd10 마우스에서 혈관영양 및 신경영양성 효과를 나타낸다.

[0140] rd1/rd1 마우스는 망막 변성의 가장 널리 사용되고 최다 특성화된 모델[참조: Chang et al. 2002, Vision Res. 42:517-525]이지만, 변성이 매우 빨라서, 이러한 점이 보통 보다 느리게 진행되는 사람 질환 중의 변성과 상이

하다. 이러한 계통에서, 광수용체 세포 변성은 망막 혈관계가 여전히 빠르게 팽창하는 시기인 P8경에 개시된다(도 15). 후속되는 심재성 망막 혈관계의 변성도 중재성 혈관층이 형성되고 있는 동안에도 일어나서, 이 질환을 보유한 대부분의 사람에서 관찰되는 것과 달리, rd1/rd1 마우스의 망막은 결코 완전하게 발달하지 못한다. 이에 반해, rd10 마우스 모델은 변성 과정이 보다 느려서, 사람 망막 변성 상태와 매우 유사하기 때문에 Lin⁻HSC 매개 혈관 구제 연구에 사용했다. rd10 마우스에서, 광수용체 세포 변성은 P21경에 개시되고 그 후 즉시 혈관 변성도 개시된다.

[0141] 정상적인 신경감각 망막 발달은 대부분 P21쯤에 완결되는데, 변성은 망막이 분화를 완결한 후 개시되는 것으로 관찰되며, 이러한 점에서 rd1/rd1 마우스 모델보다 사람 망막 변성과 더 유사하다. rd10 마우스 유래의 대조군 세포 또는 Lin⁻HSC를 P6 안구에 주사하고, 망막의 평가를 다양한 시점에서 수행했다. P21에서 Lin⁻HSC 및 대조군 세포 주사된 안구 유래의 망막은 모든 혈관층이 완전하게 발달하고 INL 및 ONL도 정상적으로 발달하여 정상인 것으로 보였다(도 18D 및 도 18H). 약 P21 경에 망막 변성은 개시되어 노화와 함께 진행되었다. P30경, 대조군 세포 주사된 망막은 심한 혈관 및 신경세포 변성을 나타냈다(도 18I). 이에 반해, Lin⁻HSC 주사된 망막은 거의 정상적인 혈관 층 및 광수용체 세포를 유지했다(도 18E). 구제된 안구와 구제되지 않은 안구 사이의 차이는 이후 관찰 시점에서 더욱 현저해졌다(도 18F 및 도 18G와 도 18J 및 도 18K 비교). 대조군 세포 처리된 안구에서는 혈관 변성의 진행이 CD31 및 콜라겐 IV에 대한 면역조직화학 염색을 통해 매우 분명하게 관찰되었다(도 18I 내지 도 18K). 대조군 세포 처리된 안구는 CD31에 대해 거의 완전한 음성인 반면, 콜라겐 IV 양성 혈관 "트랙"은 분명하게 남아있었는데, 이는 불완전한 혈관 형성보다는 혈관 퇴화의 발생 사실을 시사한다. 이에 반해, Lin⁻HSC 처리된 안구는 정상적인 야생형 안구와 매우 유사해 보이는, CD31 및 콜라겐 IV 양성 혈관을 갖고 있었다(도 18F 및 도 18I 비교).

[0142] Lin⁻HSC 처리 후의 rd/rd 마우스 망막의 유전자 발현 분석

[0143] 신경영양성 구제의 추정상의 매개인자를 동정하기 위한 구제 망막 및 비구제 망막의 분석에, 대규모 게놈학(마이크로어레이 분석)을 이용했다. Lin⁻HSC로 처리된 rd1/rd1 마우스 망막의 유전자 발현을 미주사된 망막 및 대조군 세포(CD31⁻) 주사된 망막의 유전자 발현과 비교했다. 이러한 비교는 각각 3반복으로 실시했다. 존재하는 것으로 간주되기 위해서는, 유전자의 발현 수준이 총 3회의 3반복 실험에서 배경 수준 보다 적어도 2배 이상 높아야 했다. Lin⁻HSC 보호된 망막에서 3배 상향조절된 유전자를 대조군 세포 주사된 rd/rd 마우스 망막 및 주사되지 않은 rd/rd 마우스 망막과 비교하여 도 20의 패널 A 및 B에 제시했다. MAD 및 Ying Yang-1(YY-1)을 비롯하여, 유의적으로 상향조절된 유전자의 대부분은 아포토시스로부터 세포를 보호하는 작용과 관련된 기능을 가진 단백질을 암호화한다. 스트레스로부터 세포를 보호하는 작용과 관련된 공지의 열충격 단백질과 유사한 기능과 서열 상동성을 가진 다수의 크리스탈린 유전자도 Lin⁻HSC 처리된 망막에 위해 상향조절되었다. α-크리스탈린의 발현은 면역조직화학 분석을 통해 ONL에 국재적인 것으로 나타났다(도 19).

[0144] 사람 Lin⁻HSC로 구제된 rd1/rd1 마우스 망막 유래의 전령 RNA를 사람 특이적 Affymetrix U133A 마이크로어레이 칩에 하이브리드화시켰다. 엄중 분석 후, mRNA 발현이 사람 특이적이고, 배경 수준보다 높으며, 쥐 Lin⁻HSC 구제된 망막 및 사람 대조군 세포 주사된 비구제된 망막에 비해 사람 Lin⁻HSC 구제된 망막에서 유의적으로 높은 다수의 유전자가 확인되었다(도 20, 패널 C). 원시 및 새롭게 분화된 CD34⁺ 조혈 줄기세포의 표면에서 발현된 세포 부착 분자인 CD6 및 조혈 줄기세포에 의해 발현되는 또 다른 유전자인 인터페론 알파 13이 모두 이러한 마이크로어레이 생명정보학 기술을 통해 확인되는 바, 이 평가 프로토콜의 유효성을 확인했다. 또한, 여러 성장 인자 및 신경영양성 인자도 사람 Lin⁻HSC 구제된 마우스 망막 샘플에서 배경 수준보다 높게 발현되었다(도 20, 패널 D).

[0145] 논의

[0146] 계통-관련 조혈 세포에 대한 마커를 사용하여, EPC를 함유하는 골수 유래의 Lin⁻HSC의 집단을 음성적으로 선별하였다. EPC로서 사용할 수 있는 골수 유래의 Lin⁻HSC의 아집단은 통상적으로 사용되는 세포 표면 마커에 의해서는 특성화되지 않지만, 발달중인 또는 손상된 망막 혈관계에서의 이들 세포의 성향은 Lin⁺ 또는 성체 내피

세포 집단에서 관찰된 성향과는 전적으로 상이하다. 이들 세포는 망막 혈관신생 부위로 선택적으로 표적화되어 모 혈관의 형성에 참여한다.

[0147] 유전적 망막 변성 질환은 흔히 망막 혈관계의 손실을 동반한다. 이러한 질환의 효과적 치료는 기능 회복뿐만 아니라 복잡한 조직 구조의 유지를 필요로 한다. 최근의 몇몇 연구는 지향성 인자의 세포계 전달 또는 줄기세포 자체의 사용을 조사하여 왔으며 이들 둘다의 몇가지 조합이 필수적일 수 있다. 예를 들어, 망막 변성 질환을 치료하기 위한 성장인자 치료요법의 사용은 혈관의 과성장을 조절하지 못하여 정상 망막 조직 구조의 심각한 붕괴를 초래한다. 망막 변성 질환을 치료하기 위한 신경 또는 망막 줄기세포의 사용은 신경 기능을 재구성할 수 있으나, 기능성 혈관계는 망막의 기능적 완전성을 유지하는 것도 필수적일 수 있다. 본 발명의 Lin⁻ HSC 조성물로부터의 세포를 rd/rd 마우스의 망막 혈관내로 혼입시키는 것은 망막 구조를 붕괴시키지 않으면서 변성 혈관계를 안정화시켰다. 이러한 구체 효과는 상기 세포를 P15 rd/rd 마우스에게 투여한 경우에도 관찰되었다. 혈관 변성이 rd/rd 마우스에서 P16에서 시작하기 때문에, 이러한 관찰 결과는 효과적인 Lin⁻ HSC 치료에 대한 치료 범위를 확장시킨다. 본 발명의 Lin⁻ HSC가 주사된 안구에서 망막 신경세포 및 광수용체가 보존되며 시각 기능이 유지된다.

[0148] 성체 골수 유래 Lin⁻ HSC는 망막 변성 질환을 앓고 있는 마우스에게 유리체내로 주사했을 때 상당한 혈관영양성 및 신경영양성 효과를 발휘한다. 이러한 구체 효과는 치료 후 6개월까지 지속되고, 특히 망막 변성이 완결되기 전에(통상 생후 30일까지 완전한 망막 변성을 나타내는 마우스의 경우 출생 후 16일까지) Lin⁻ HSC를 주사할 때 가장 효과적이다. 이러한 구체는 두 마우스의 망막 변성 모델에서 관찰되며, 놀랍게도 수용자가 망막 변성이 있는 면역결핍성 설치류(예, SCID 마우스)이거나 또는 제공자가 망막 변성이 있는 마우스일 때에도 사람 성체 골수 유래 HSC에 의해 달성될 수 있다. 여러 최신 논문에서는 망막 변성을 가진 마우스 또는 개에서 야생형 유전자를 이용한 바이러스 기반 유전자 구체 후 나타나는 부분 표현형 구체에 대해 개시한 바 있으나[참조: Ali, et al. 2000, Nat Genet 25:306-310; Takahashi et al. 1999, J. Virol. 73:7812-7816; Acland et al. 2001, Nat. Genet. 28:92-95], 본 발명은 혈관 구체를 통해 달성되는 최초의 일반 세포 기반 치료 효과를 개시한다. 따라서, 공지된 관련 돌연변이가 100개 이상인 일 군의 질환(예, 색소망막증)을 치료하는데 있어서 이러한 시도의 잠재적 유용성은 공지된 각 돌연변이를 치료하기 위해 개발되는 개별 유전자 치료요법보다 훨씬 실용적인 것이다.

[0149] 신경영양성 구체 효과의 정확한 분자 기전은 알지 못하지만, 이는 동시적인 혈관 안정화/구제가 있는 경우에만 관찰된다. 즉, 주사된 줄기세포의 존재 자체가 신경영양성 구체 발생에 충분한 것이 아니며, 외부 핵 층에 줄기세포 유래 신경세포의 명백한 부재로 인해 주사된 세포가 광수용체로 형질전환된다는 가능성은 배제된다. 마이크로어레이 유전자 발현 분석으로 획득되는 데이터는 아포토시스 억제 효과가 있는 것으로 알려진 유전자의 유의적 상향조절을 증명했다. 망막 변성에서 관찰되는 대부분의 신경세포 사멸은 아포토시스에 의한 것이므로, 이러한 보호는 이러한 질환에서 시각 기능에 중요한 광수용체 및 다른 신경세포의 수명을 연장시키는데 있어서 지대한 치료 효과로 작용할 수 있다. c-myc는 다양한 전위 아포토시스 유도 인자의 상향조절을 통해 아포토시스에 관여하는 전사 인자이다. c-myc 발현은 야생형보다 rd/rd 마우스에서 4.5배 증가했고, 이는 rd1/rd1 마우스에서 관찰되는 광수용체 변성과의 강력한 관련성을 시사한다. Lin⁻ HSC 보호된 망막에서 급격하게 상향조절된 두 유전자인 Mad1 및 YY-1(도 20, 패널 A)은 c-myc의 활성을 억제하는 것으로 공지되어 있는 바, c-myc 유도 아포토시스도 억제한다. 또한, Mad1의 과잉발현은 아포토시스 경로의 또 다른 주요 성분인 카스파제-8의 Fas 유도적 활성화를 억제하는 것으로 밝혀져 있다. 따라서, 이러한 두 분자의 상향조절은 일반적으로 rd/rd 마우스에서 변성을 유도하는 아포토시스의 개시를 억제하여 혈관 및 신경 변성으로부터 망막을 보호하는데 중요한 역할을 할 수 있다.

[0150] Lin⁻ HSC 보호된 망막에서 상당히 상향조절되는 또 다른 유전자 세트는 크리스탈린 계열의 성분들이다(도 20, 패널 B). 열충격 단백질 및 다른 스트레스 유도성 단백질과 유사하게, 크리스탈린은 망막 스트레스에 의해 활성화될 수 있고 아포토시스에 대한 보호 효과를 제공한다. αA-크리스탈린의 비정상적으로 낮은 발현은 래트의 망막 영양 장애 모델에서의 광수용체 상실과 상관성이 있으며, 최근의 rd/rd 마우스 망막에 대한 프로테오믹 분석은 망막 변성에 대한 응답반응으로 크리스탈린의 상향조절이 유도됨을 입증했다. 본 출원인의 EPC 구체된 rd/rd 마우스 망막의 마이크로어레이 데이터를 근거할 때, 크리스탈린의 상향조절은 EPC 매개 망막 신경보호에서 주요 역할을 하는 것으로 보인다.

- [0151] c-myc, Mad1, Yx-1 및 크리스탈린과 같은 유전자는 신경세포 구제의 후위 매개인자인 것으로 보인다. 본원에서 마우스 줄기세포로 구제된 망막의 마이크로어레이 분석에서 공지된 신경영양성 인자의 수준이 증가 유도됨을 입증하지는 못했으나, 신경영양성 제제는 아포토시스 억제 유전자 발현을 조절할 수 있다. 한편, 사람 특이적 칩을 이용하여 실시한, 사람 골수 유래 줄기세포 매개 구제의 분석은 낮지만 유의적인 다수 성장 인자 유전자 발현의 증가를 확인시켜준다.
- [0152] 이러한 상향조절된 유전자에는 섬유아세포 성장 인자 계열의 여러 구성원과 오토페를린(otoferlin)이 포함된다. 오토페를린 유전자의 돌연변이는 청각 신경병증으로 인한 난청을 유도하는 유전자 질환과 관련이 있다. 주사된 Lin⁻ HSC에 의한 오토페를린 생산 역시 망막 신경병증의 예방에 기여할 가능성이 있다. 역사적으로, 망막 변성이 있는 환자 및 동물에서 관찰되는 혈관 변화는 광수용체 사멸로 인해 대사 요구량 감소에 부차적인 것으로 오랫동안 생각되어왔다. 본 발명의 데이터는 적어도 유전 망막 변성이 있는 마우스의 경우, 정상 혈관계의 보존이 외부 핵 층의 성분도 유지시켜 줄 수 있음을 시사한다. 최근 문헌을 통한 보고서에서 지지되는 개념은 조직 특이적 혈관계가 혈관 "영양공급"을 단순히 제공함으로써 예상되는 것 이상의 영양 효과를 나타낸다는 것이다. 예를 들어, 간의 내피세포는 VEGFR1 활성화 후 간 상해 면에서 간세포 재생 및 유지에 중요한 성장인자를 생산하도록 유도될 수 있다[참조: LeCouter et al., 2003, Science 299:890-893].
- [0153] 이와 유사한 혈관 내피세포와 인접 간 실질세포 사이의 유사하게 나타나는 상호작용은 기능적 혈관 형성 혈전 전에 간 기관형성에 관여하는 것으로 보고되어 있다. 망막 변성을 앓고 있는 개체의 내인성 망막 혈관계는 구제를 매우 극적으로 촉진시킬 수 없지만, 이러한 혈관계가 골수 조혈 줄기세포 집단 유래의 내피 전구세포로 지지되는 경우 상기 혈관계를 변성에 보다 저항성이며 동시에 망막 신경세포 뿐만 아니라 혈관세포의 생존 촉진성이 될 수 있게 한다. 망막 변성이 있는 사람에 있어서, 완전한 망막 변성의 개시를 지연시킨다는 것은, 시력 보유 연수를 증가시킬 것이다. 본 발명의 Lin⁻ HSC로 처리된 동물은 시력 지원에 충분할 수 있는 ERG가 유익적으로 보존되었다.
- [0154] 임상적으로, 기능적 시력은 보존되지만 광수용체 및 다른 신경세포가 실질적으로 상실될 수 있는 경우도 널리 알려져 있다. 이러한 경우, 몇가지 점에서 임계치를 벗어나 시력은 상실된다. 거의 모든 사람의 유전 망막 변성은 초기에 느리게 발병되므로, 망막 변성에 걸린 개체를 확인하고, 자가 골수 줄기세포 이식으로 유리체내로 치료하여, 망막 변성과 이에 수반되는 시력 상실을 지연시킬 수 있다. 이러한 줄기세포의 표적화 및 혼입을 증진시키기 위해 활성화된 성상교세포의 첨가가 바람직할 것이다. 이러한 효과는 신경아교증이 수반된 경우에는 초기 치료를 이용하거나 또는 활성화된 성상교세포의 국소 증식을 자극하는 레이저를 이용하여 달성할 수 있다.
- [0155] 본 발명의 Lin⁻ HSC 집단은 반응성 성상아교세포를 표적화함으로써 혈관신생을 촉진할 수 있으며, 망막 구조를 붕괴시키지 않으면서, 확립된 주형대로 혼입될 수 있는 EPC 집단을 함유한다. 본 발명의 Lin⁻ HSC는 또한 망막 변성을 앓는 안구에서 놀랄만한 장기간의 신경영양성 구제 효과를 제공한다. 또한, EPC를 함유하는, 유전적으로 변형된 자가 Lin⁻ HSC 조성물은 허혈성 또는 비정상적으로 혈관화된 안구에 이식될 수 있으며 신생 혈관대로 안정하게 혼입되어 장시간 동안 국소적으로 치료학적 분자를 연속적으로 전달할 수 있다. 약리학적 제제를 생리학적으로 의미있는 용량으로 발현하는 유전자의 이러한 국소 전달은 현재는 치료불가능한 안질환을 치료하기 위한 신규한 패러다임을 대표한다.
- [0156] 이상 설명한 양태들에 대한 다양한 변형예와 수정예는 본 발명의 신규한 특징의 취지와 범위를 벗어나지 않는 한도 내에서 실시될 수 있다. 따라서, 본 상세한 설명에 예시한 특정 양태들에는 어떤 제한적 의도나 암시가 있는 것이 전혀 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1(a 및 b)는 발달중인 마우스 망막의 도면을 도시한 것이다. 도 1a: 1차 혈관총의 발달. 도 1b: 망막 혈관 형성 2기. GCL, 신경절 세포 층; IPL, 내부 혈관총 층; INL, 내부 핵 층; OPL, 외부 혈관총 층; ONL, 외부 핵 층; RPE, 망막 색소 상피; ON, 시신경; P, 주변부.
- [0018] 도 1c는 골수 유래의 Lin⁺ HSC 및 Lin⁻ HSC로 분리된 세포의 유동세포분석법 특성화를 도시한 것이다. 최상단 줄: 비-항체 표지된 세포의 점도표(여기서, R1은 양성 PE-염색의 정량가능한-개폐 면적을 의미하고, R2는 GFP-양성

을 나타낸다); 중간 줄: $\text{Lin}^- \text{HSC}(\text{C57B/6})$ 및 하단 줄: $\text{Lin}^+ \text{HSC}(\text{C57B/6})$ 세포, 각각의 세포주는 Sca-1, c-kit, Flk-1/KDR, CD31에 대한 PE-접합된 항체로 표지된다. Tie-2 데이터는 Tie-2-GFP 마우스로부터 획득되었다. %는 전체 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 또는 $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ 집단 중 양성-표지된 세포의 %를 나타낸다.

[0019] 도 2는 발달중인 마우스 망막내로의 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 의 이식을 도시한 것이다. 도 2a: 주사(P6) 후 4일째에, 유리체내로 주사된 $\text{eGFP}^+ \text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포는 망막에 부착하여 분화한다. 도 2b: $\text{Lin}^- \text{HSC}(\text{B6.129S7-Gtrosa26})$ 마우스, $\beta\text{-gal}$ 항체로 염색됨)는 그 자체를 콜라겐 IV 항체로 염색된 혈관계의 전방부에 확립시킨다(*는 혈관계의 끝부분을 나타낸다). 도 2c: 주사(P6) 후 4일째에서 대부분의 $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ 세포(eGFP^+)는 분화되지 못하였다. 도 2d: 주사(P6) 후 4일째의 장간막 eGFP^+ 쥐 EC. 도 2e: 성체 마우스 안구에 주사된 $\text{Lin}^- \text{HSC}(\text{eGFP}^+)$. 도 2f: GFAP-GFP 형질전환 마우스에서 기존의 성상교세포 주형을 따라서 이동하여 분화되는 $\text{eGFP}^+ \text{Lin}^- \text{HSC}$ (화살표)의 저배율상. 도 2g: Lin^- 세포(eGFP)와 기저 성상교세포 사이의 연합(화살표)의 고배율상. 도 2h: 주사되지 않은 GFAP-GFP 형질전환 대조군. 도 2i: 주사(P6) 후 4일째, $\text{eGFP}^+ \text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포는 보다 심층의 혈관층 영역으로 이동하여 분화된다. 좌측 도면은 전조직 표본 안구에서의 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 활성을 포착한 것이고, 우측 도면은 망막내 Lin^- 세포의 위치(화살표)를 나타낸 것이다(상단은 유리체 측면이고, 하단은 공막 측면이다). 도 2j: $\alpha\text{-CD31-PE}$ 및 $\alpha\text{-GFP-알렉사 488}$ 항체에 의한 이중 표지화. 주사한지 7일 후, 주사된 $\text{Lin}^- \text{HSC}(\text{eGFP}$, 적색)는 혈관계(CD31)내로 혼입되었다. 화살촉은 혼입된 영역을 나타낸다. 도 2k: $\text{eGFP}^+ \text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포는 주사 후 14일째(P17)에 혈관을 형성한다. 도 2l 및 2m: 로다민-텍스트란의 심장내 주사는 혈관이 1차 혈관층(l) 및 심재성 혈관층(m) 둘다에서 온전하며 기능적임을 나타낸다.

[0020] 도 3(a 및 b)는, $\text{eGFP}^+ \text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포가 성체 망막에서 레이저(a) 및 기계적(b) 유도된 손상(*는 손상된 부위를 나타낸다)에 의해 유도된 신경아교증(GFAP를 발현하는 성상교세포로 나타남, 가장 좌측 영상)으로 이동됨을 도시한 것이다. 가장 우측의 영상은 $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 와 성상교세포의 밀접한 연합을 나타내는 고배율상이다. 눈금 막대 = 20 μM .

[0021] 도 4는, $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포가 망막 변성 마우스의 혈관계를 구제함을 나타낸다. 도 4a 내지 4d: 콜라겐 IV로 염색한, 주사 후 27일째(P33)의 망막; 도 4a 및 4b, $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ 세포가 주사된 망막(Balb/c)은 정상 FVB 마우스로부터의 혈관과 차이가 없는 것으로 보인다; 도 4c 및 4d: $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 가 주사된 망막(Balb/c)은 야생형 마우스와 유사한 풍부한 혈관 망을 나타냈다; 도 4a 및 4c: DAPI로 염색한 전체 망막의 동결된 절편(상단은 유리체 측면이고, 하단은 공막 측면이다); 도 4b 및 4d: 망막 전조직 표본의 심재성 혈관층; 도 4e: $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포-주사된 망막($n=6$)에 형성된 심재성 혈관층의 혈관분포정도의 증가를 예시하는 막대 그래프. 심재성 망막의 혈관화 범위는 각 영상내의 혈관의 총 길이를 계산함으로써 정량하였다. $\text{Lin}^- \text{HSC}$, $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ 또는 대조군 망막의 혈관의 평균 총 길이/고배율 시야(마이크론 단위)를 비교하였다. 도 4f: rd/rd 마우스로부터의 $\text{Lin}^- \text{HSC}(\text{R}$, 우측 안구) 세포 또는 $\text{Lin}^+ \text{HSC}(\text{L}$, 우측 안구) 세포를 주사한 후 심재성 혈관층 길이의 비교. 6마리의 독립적 마우스의 결과를 제시한다(각 색상은 각 마우스를 나타낸다). 도 4g 및 4h: $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 세포는 또한(Balb/c) P15 안구에 주사된 경우 rd/rd-혈관계를 구제하였다. $\text{Lin}^- \text{HSC}(\text{G})$ 또는 $\text{Lin}^+ \text{HSC}(\text{H})$ 세포가 주사된 망막의 (주사한지 한달 후) 중재성 및 심재성 혈관층을 제시한다.

[0022] 도 5는 마우스 망막 조직의 현미경사진을 도시한 것이다: 도 5a, 가시성 $\text{eGFP}^+ \text{Lin}^- \text{HSC}$ (회색)를 주사한 후 5일째(P11)에서 망막 전조직 표본(rd/rd 마우스)의 심층. 도 5b 및 5c: P6에서 Balb/c Lin^- 세포(b) 또는 $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ 세포(c)가 주사된 Tie-2-GFP (rd/rd) 마우스의 P60 망막 혈관계. (b)와 (c)의 좌측 패널에서는 내인성 내피세포(GFP 염색된 세포)만이 관찰된다. (b)와 (c)의 중간 패널은 CD31 항체로 염색된 것으로서, 화살표는 GFP가 아닌 CD31로 염색된 혈관을 나타내고, (b)와 (c)의 우측 패널은 GFP 및 CD31로 염색한 결과를 도시한 것이다. 도 5d: $\text{Lin}^- \text{HSC}$ 주사된 망막(좌측 패널) 및 대조군 망막(우측 패널)의 $\alpha\text{-SMA}$ 염색.

- [0023] 도 6은 T2-TrpRS-형질감염된 Lin⁻HSC가 마우스 망막 혈관계의 발달을 억제함을 도시한 것이다. 도 6a: 아미노 말단에 Igk 시그널 서열을 갖는 사람 TrpRS, T2-TrpRS 및 T2-TrpRS의 도식적 설명. 도 6b: T2-TrpRS 형질감염된 Lin⁻HSC가 주사된 망막은 생체내에서 T2-TrpRS 단백질을 발현한다. (1) 이. 콜라이에서 생산된 재조합 T2-TrpRS; (2) 이. 콜라이에서 생산된 재조합 T2-TrpRS; (3) 이. 콜라이에서 생산된 재조합 T2-TrpRS; (4) 대조군 망막; (5) Lin⁻HSC + pSecTag2A(벡터 단독)가 주사된 망막; (6) Lin⁻HSC + pKLe135(pSecTag 내의 Igk-T2-TrpRS)가 주사된 망막. 도 6a: 내인성 TrpRS. 도 6b: 재조합 T2-TrpRS. 도 6c: Lin⁻HSC가 주사된 망막의 T2-TrpRS. 도 6c 내지 6f: 주사 후 7일째의 주사된 망막의 대표적인 1차(표재성) 및 2차(심재성) 혈관총; 도 6c 및 6d: 공(空) 플라스미드-형질감염된 Lin⁻HSC가 주사된 안구는 정상적으로 발달하였다; 도 6e 및 6f: 대다수의 T2-TrpRS-형질감염된 Lin⁻HSC가 주사된 안구는 심재성 혈관총의 억제를 나타냈다; 도 6c 및 6e: 1차(표재성) 혈관총; 도 6d 및 6f: 2차(심재성) 혈관총. 도 6f에서 관찰된 혈관의 희미한 외곽선은 도 6e에 도시한 1차 혈관 망의 "출혈" 영상이다.
- [0024] 도 7은 His₆-태그된 T2-TrpRS의 DNA 서열(서열번호 1)을 도시한 것이다.
- [0025] 도 8은 His₆-태그된 T2-TrpRS의 아미노산 서열(서열번호 2)를 도시한 것이다.
- [0026] 도 9는 안구에 본 발명의 Lin⁻HSC 및 Lin⁺HSC(대조군)이 주사된 마우스의 망막의 현미경사진과 망막전위도(ERG)를 예시한 것이다.
- [0027] 도 10은 Lin⁻HSC로 처리된 rd/rd 마우스 안구의 중재성(Int.) 및 심재성 혈관 층 둘다에 대한 신경 구조(y-축) 및 혈관 구조(x-축) 간의 상관관계를 보여주는 통계학적 플롯을 도시한 것이다.
- [0028] 도 11은 Lin⁺HSC로 처리된 rd/rd 마우스 안구에 대한 신경 구조(y-축) 및 혈관 구조(x-축) 간에는 상관관계가 없음을 보여주는 통계학적 플롯을 도시한 것이다.
- [0029] 도 12는 주사 후 1개월(1M), 2개월(2M) 및 6개월(6M)의 시점에서, Lin⁻HSC로 처리된 rd/rd 마우스 안구(검은색 막대) 및 미처리된 rd/rd 마우스 안구(흰색 막대)에 대한 임의 상대 단위의 혈관 길이(y-축)의 막대 그래프이다.
- [0030] 도 13은 주사 후 1개월(1M), 2개월(2M) 및 6개월(6M)의 시점에서 rd/rd 마우스의 외부 신경세포 층(ONR) 내의 핵의 수에 대한 3개의 막대 그래프를 포함하며, Lin⁺HSC로 처리된 대조군 안구(흰색 막대)에 비해서 Lin⁻HSC로 처리된 안구(검은색 막대)의 경우에 핵의 수가 현저하게 증가했음을 입증한다.
- [0031] 도 14는 (주사 후) 1개월(1M), 2개월(2M) 및 6개월(6M)의 시점에서 우측 안구(R, Lin⁻HSC로 처리됨)를 좌측 안구(L, Lin⁺HSC로 처리된 대조군 안구)에 대해 비교하는, 개개의 rd/rd 마우스에 대한 외부신경 층 내의 핵의 수에 대한 플롯을 도시한 것으로, 소정의 플롯에서 각각의 선은 개개의 마우스의 안구를 비교한다.
- [0032] 도 15는 rd1/rd1(C3H/HeJ, 좌측 패널) 마우스 또는 야생형 마우스(C57BL/6, 우측 패널)의 망막 혈관계 및 신경 세포의 변화를 도시한 것이다. 전조직 표면 망막의 중재성(상단 패널) 또는 심재성(중간 패널) 혈관총의 망막 혈관계(적색: 콜라겐 IV, 녹색: CD31) 및 동일 망막 절편의 혈관계(적색: DAPI 및 녹색: CD31, 하단 패널)(GCL: 신경절 세포층, INL: 내부 핵 층, ONL: 외부 핵 층)를 도시했다(P: 출생후 경과일).
- [0033] 도 16은 Lin⁻HSC 주사가 rd1/rd1 마우스의 신경세포 변성을 억제하는 것을 보여준다. A, B 및 C는 P30(A), P60(B), 및 P180(C)에서 관찰되는 Lin⁻HSC 주사된 안구(우측 패널) 및 대측성 대조군 세포(CD31⁺) 주사된 안구(좌측 패널)의 중재성(int.) 또는 심재성 혈관총 및 절편의 망막 혈관계를 도시한 것이다. D는 P30(좌측, n=10), P60(중간, n=10) 및 P180(우측, n=6)에서 관찰되는 Lin⁻HSC 주사된 망막 또는 대조군 세포(CD31⁺) 주사된 망막의 혈관계의 평균 총 길이(+ 또는 -는 평균값의 표준 오차이다)를 나타낸 것이다. 중재성(Int) 혈관총과 심재성 혈관총의 데이터를 각각 나타냈다(Y축: 혈관계의 상대적 길이). E는 대조군 세포(CD31⁺) 또는 Lin⁻HSC 주사된 망막에서 P30(좌측, n=10), P60(중간, n=10) 또는 P180(우측, n=6)에 관찰되는 ONL 중의 세포핵의

평균 수를 도기한 것이다(Y축: ONL 중의 세포핵의 상대적 수). F는 Lin⁻HSC 또는 대조군 세포 주사된 망막의 P30(좌측), P60(중간) 및 P180(우측)에 관찰되는 혈관계의 길이(X축)와 ONL 중의 세포 핵의 수(Y축) 사이의 직선 상관관계를 도기한 것이다.

[0034] 도 17은 Lin⁻HSC 주사로 망막 기능이 구제됨을 입증하는 도면이다. 망막전위도(ERG) 기록을 사용하여 Lin⁻HSC 또는 대조군 세포(CD31⁻)가 주사된 망막의 기능을 측정했다. A 및 B는 주사 2개월 후 구제된 망막 및 구제되지 않은 망막의 대표예를 도기한 것이다. 동일한 동물의 Lin⁻HSC 주사된 우측 안구(A)와 CD31⁻ 대조군 세포 주사된 좌측 안구(B)의 망막 절편이다(녹색: CD31 염색된 혈관계, 적색: DAPI 염색된 핵). C는 A와 B에 제시했던 동일한 동물의 ERG 결과를 도기한 것이다.

[0035] 도 18은 사람 골수 세포의 집단이 rd1 마우스의 변성 망막을 구제할 수 있음을 도기한 것이다(A 내지 C). 또한, 다른 망막 변성 모델인 rd10에서도 구제가 관찰되었다(D-K). A는 녹색 염료로 표지된 사람 Lin⁻HSC(hLin⁻HSC)가 C3SnSmm.CB17-Prkdc SCID 마우스의 유리체내 주사 후, 망막 혈관 세포로 분화할 수 있음을 보여준다. B 및 C는 주사후 1.5개월째의 hLin⁻HSC 주사된 안구(B) 또는 대측성 대조군 안구(C)의 망막 혈관계(좌측 패널; 상단: 중재성 혈관총, 하단: 심재성 혈관총) 및 신경세포(우측 패널)이다. D-K는 Lin⁻HSC(P6에 주사됨)에 의한 rd10 마우스의 구제를 도기한 것이다. P21(D: Lin⁻HSC, J: 대조군 세포), P30(E: Lin⁻HSC, I: 대조군 세포), P60(F: Lin⁻HSC, J: 대조군 세포) 및 P105(G: Lin⁻HSC, K: 대조군 세포)에 관찰되는 대표적인 망막을 도기했다(각 시점에서 처리된 안구와 대조군 안구는 동일한 동물의 것이다). 망막 혈관계(각 패널의 상단 영상은 중재성 혈관총이고, 각 패널의 중간 영상은 심재성 혈관총이다)는 CD31(녹색) 및 콜라겐 IV(적색)으로 염색했다. 각 패널의 하단 영상은 동일한 망막 유래의 절편을 나타낸 것이다(적색: DAPI, 녹색: CD31).

[0036] 도 19는 대조군 세포로 처리된 대측성 안구가 아닌, Lin⁻HSC 처리 후의 구제된 외부 핵 층 세포에서 크리스탈린 αA가 상향조절됨을 보여주는 것이다. 좌측 패널: 구제된 망막의 IgG 대조군, 중간 패널: 구제된 망막의 크리스탈린 αA, 우측 패널: 구제되지 않은 망막의 크리스탈린 αA.

[0037] 도 20은 본 발명의 Lin⁻HSC로 처리된 쥐 망막에서 상향조절되는 유전자를 도표화한 것이다. (A) 쥐 Lin⁻HSC로 처리된 마우스 망막에서 발현이 3배 증가되는 유전자. (B) 쥐 Lin⁻HSC로 처리된 마우스 망막에서 상향조절되는 크리스탈린 유전자. (C) 사람 Lin⁻HSC로 처리된 마우스 망막에서 발현이 2배 증가되는 유전자. (D) 사람 Lin⁻HSC로 처리된 마우스 망막에서 발현이 상향조절되는 신경영양 인자 또는 성장 인자의 유전자.

[0038] 도 21은 본 발명에 따른 CD133 양성(CD133⁺) 및 CD133 음성(CD133⁻) 사람 Lin⁻HSC 집단에서 관찰되는 CD31 및 인테그린 α6 표면 항원의 분포를 도기한 것이다.

[0039] 도 22는 출생후 P0에서 P30일까지 관찰한, 정상 산소 수준(정상산소증)에서 발생하는 야생형 C57/B16 마우스의 출생후 망막 발달을 도기한 것이다.

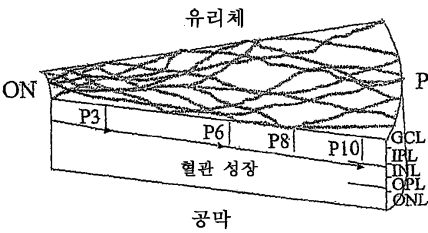
[0040] 도 23은 P7 내지 P12 사이에는 고산소 수준(고산소증; 75% 산소)이고 P12 내지 P17까지 정상산소증일 때 발생하는 C57/B16 마우스의 산소 유도성 망막병증의 모델을 도기한 것이다.

[0041] 도 24는 산소 유도성 망막병증 모델에서 본 발명의 Lin⁻HSC 집단으로 치료 시 관찰되는 혈관 구제를 입증하는 것이다.

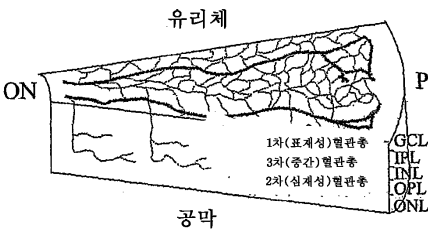
[0042]

도면

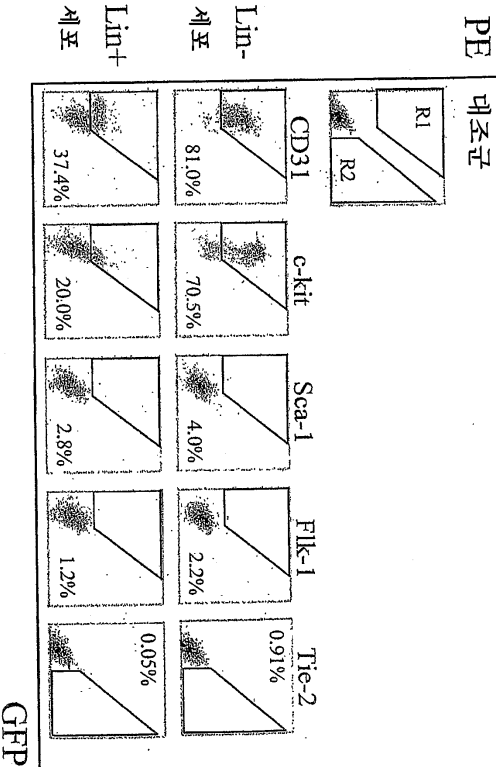
도면1a



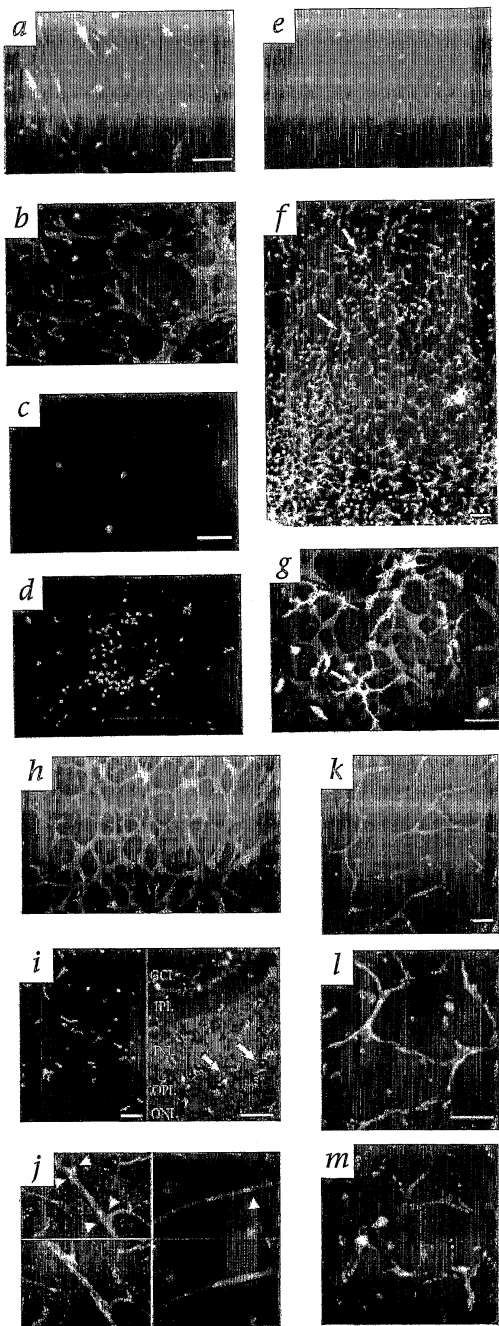
도면1b



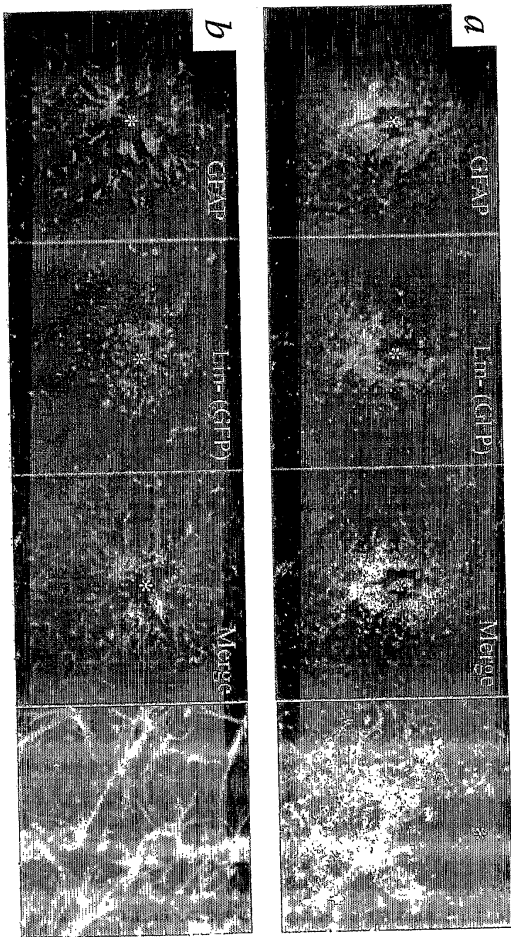
도면1c



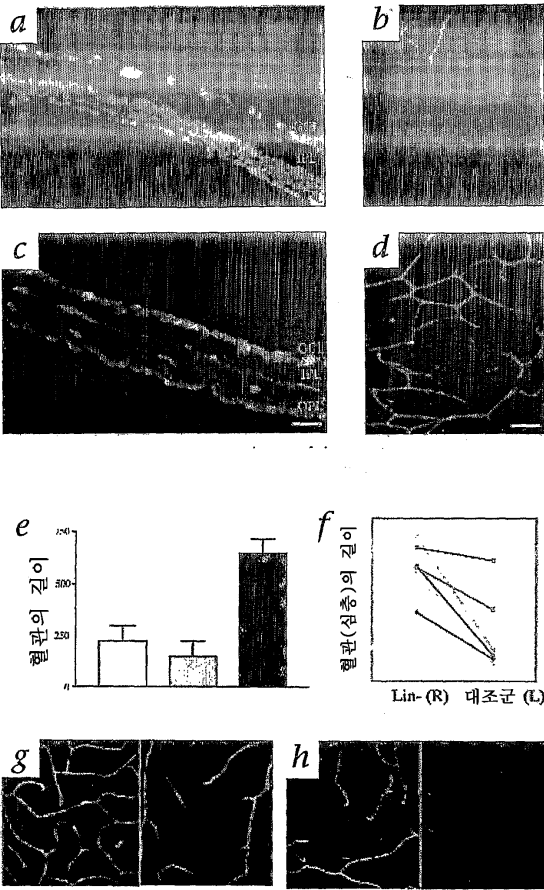
도면2



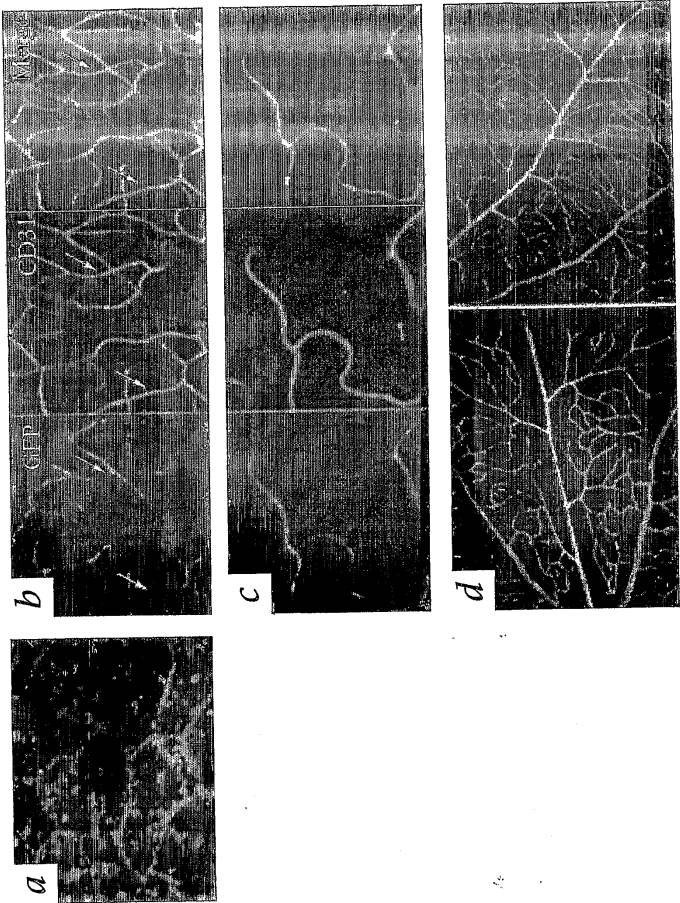
도면3



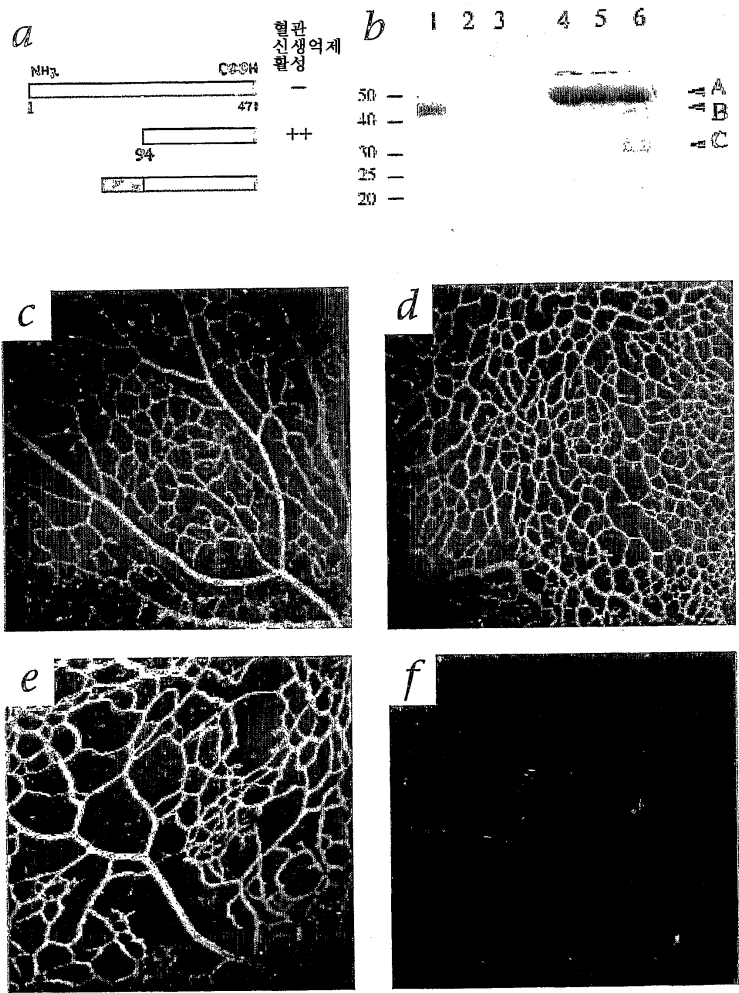
도면4



도면5



도면6



도면7a

사람 TrpRs의 His-태그된 T2단편을 암호화하는 DNA

```

tggcgaatgg gacgcgcgcgt gtagcggcgcg attaaagcgcg gggggtgtgg tgggtacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcgcgt agcgccgcgt cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgcgcg gctttcccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
gttcgcgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtgagg ccatcgccct gatagacggg ttttcgcctt ttgacgttgg agtccaogtt 300
ctttaatagt ggactcctgt tccaaactgg aacaacactc aacctatct cgtctattc 360
ttttgattta taagggattt tgcgatttcc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tcgcgtcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600
gagtatccaa catttccgtg tcgcctttat tccctttttt gcggcatttt gcttccctgt 660
ttttgctcac ccagaaaagc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720
agtgggttac atcgactgg atctcaacag cgttaagatc cttgagagtt ttgcgccga 780
agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 840
tattgacgac ggcaagagc aactcggcgc cgcatacac tttctcaga atgacttggt 900
tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960
cagtgcctgc ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020
aggaccgaag gagtaaccgg ctttttttga caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga 1080
tcgttgaggaa ccggagctga atgaagccat accaaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140
tgcagcaatg gcaacaaagt tgcgcaaat attaaactggc gaactactta ctctagcttc 1200
ccggcaacaa ttaataagat ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc 1260
ggcccttcgg gctggcgtgg ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320
cggtatcatt gcagcactgg ggcagatgg taagocctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380
gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440
actgattaag catttgtaac tgtcagacca agttactca tatatacttt agattgattt 1500
aaaaacttoat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560
caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgaggtgca gaccccgtag aaaagatcaa 1620
aggatcttct tgagatcctt tttttctcgc cgtaatctgc tgcctgcaaa caaaaaaac 1680
accgctacca ggggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 1740
aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800
ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacataacct gctctgctaa tctgtttacc 1860
agtggctgct gccagtgccg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920
acgggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga 1980
gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt 2040
tcccgaaggg agaaaaggcg acaggtatcc ggtgaagcgc aggttcggaa caggagagcg 2100
cacgaggggg cttccagggg gaaacgcctg gtaotttat agtctgtcgc ggtttcgcca 2160
cctctgactt gagcgtcgat tttgtgatg ctgtcagggg ggcgggagcc tatggaaaaa 2220
cgccagcaac ggggcttttt tacggttctt ggcttttgc tggccttttg ctcaactggt 2280
ctttctcgcc ttatccctg attctgtgga taacogtatt acgcctttg agtgagctga 2340
tacgcctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtoa gtgagcgagg aagcggaaga 2400
gcgcctgatg cgggtatttc tcttaacgca tctgtcggtt atttcacacc gcataatag 2460
tgcaactctca gtacaactcg cctgatgccc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520
cgctacgtga cttgggtcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacacccgct gacgccccct 2580
gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgacgctc tccgggagct 2640
gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaacgcgcg gaggcagctg cgttaaagct 2700
catcagcgtg gtctgtgaagc gattcacaga tgtctgctg ttcatccgag ttcagctcgt 2760
tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcggggccatg ttaagggcgg 2820
ttttttctcg tttggtcact gatgcctcgc tgttaagggg atttctgttc atgggggtta 2880
tgataccgat gaaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940
ggttactgga acgtttgtgag ggttaaacac tggcgggtat gatgoggcgg gaccagagaa 3000
aaatacaotca ggttcaatgc cagcgcctcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggta 3060
gccagcagca tctcgcgatg cagatccgga acataatggt gcaggggcgt gacttccgag 3120
tttcagactt ttacgaaaaa cggaaaacga agaccattca tgtttgttgc caggtcgag 3180
acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cgggtattca ttctgctaac 3240
cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcttcaacga caggagcacg atcatgcca 3300

```

도면7b

```

cccggtggcca ggaccacaag ctgcccgaga tctcgatccc gogaaattaa tacgactcac 3360
tatagggaga ccacaacggt ttccctotag aaataatttt gtttaacttt aagaaggaga 3420
tatacat atg agt gca aaa ggc ata gac tac gat aag cto att gtt cgg 3469
ttt gga agt agt aaa att gac aaa gag cta ata aac cga ata gag aga 3517
gcc acc ggc oaa aga cca cac cac tto ctg cgc aga ggc atc ttc ttc 3565
tca cac aga gat atg aat cag gtt ctt gat gcc tat gaa aat aag aag 3613
coa ttt tat ctg tac acg ggc cgg ggc ccc tct tot gaa gca atg cat 3661
gta ggt cac cto att cca ttt att tto aca aag tgg cto cag gat gta 3709
ttt aac gtg ccc ttg gtc atc cag atg acg gat gac gag aag tat ctg 3757
tgg aag gac ctg acc ctg gac cag gcc tat ggc gat gct gtt gag aat 3805
gcc aag gac ato atc gcc tgt ggc ttt gac atc aac aag act tto ata 3853
tto tct gac ctg gac tac atg ggg atg agc tca ggt ttc tao aaa aat 3901
gtg gtg aag att caa aag cat gtt acc ttc aac caa gtg aaa ggc att 3949
tto ggc ttc act gac agc gac tgc att ggg aag atc agt ttt cct gcc 3997
atc oag gct gct ccc tcc tto agc aac toa ttc oca cag atc ttc cga 4045
gac agg acg gat atc oag tgc ctt atc oca tgt gcc att gac cag gat 4093
cct tac ttt aga atg aca agg gac gtc gcc ccc agg atc ggc tat oot 4141
aaa oca gcc ctg ttg cac tcc acc tto tto oca gcc ctg cag ggc gcc 4189
cag acc aaa atg agt gcc agc gac cca aac tcc tcc atc tto cto acc 4237
gac acg gcc aag cag atc aaa acc aag gtc aat aag cat gcg ttt tot 4285
gga ggg aga gac acc atc gag gag cac agg cag ttt ggg ggc aac tgt 4333
gat gtg gac gtg tct ttc atg tac ctg acc tto tto cto gag gac gac 4381
gac aag cto gag cag atc agg aag gat tac acc agc gga gcc atg cto 4429
acc ggt gag cto aag aag gca cto ata gag gtt ctg cag ccc ttg atc 4477
gca gag cac cag gcc ogg cgc aag gag gtc acg gat gag ata gtg aaa 4525
gag tto atg act ccc cgg aag ctg tcc tto gac ttt cag aag ctt gcg 4573
gcc gca cto gag cac cac cac cac ccc tgagatccgg ctgctaaca 4623
agcccgaaaag gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag caataactag cataaccct 4683
tggggcctct aacagggtct tgagggggtt tttgtgaaa ggaggaaacta tatccggat 4742

```

도면8

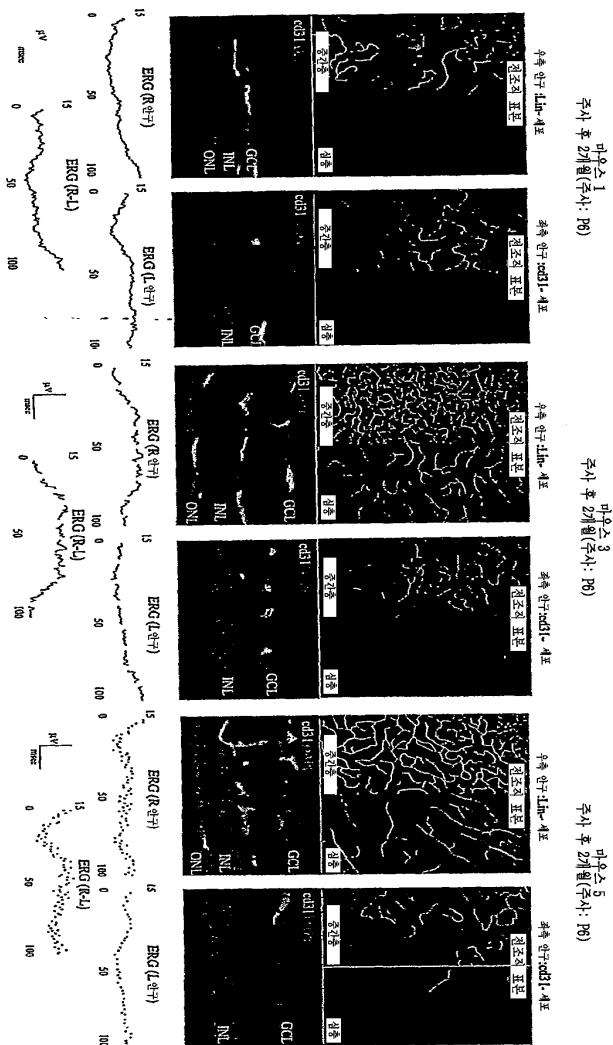
사람 TrpRs의 His-태그된 T2단편

```

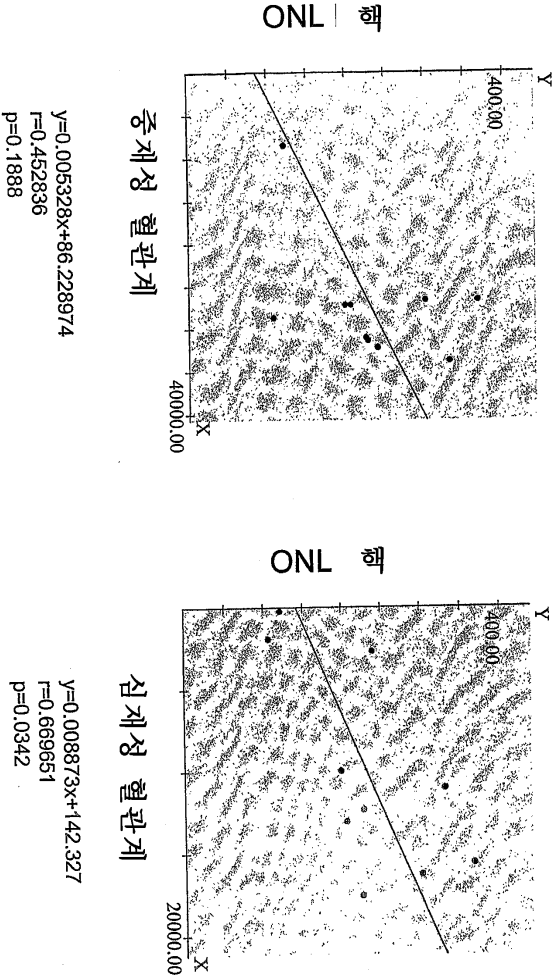
Met Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly
 1      5      10      15
Ser Ser Lys Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr
 20      25      30
Gly Gln Arg Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Ser His
 35      40      45
Arg Asp Met Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe
 50      55      60
Tyr Leu Tyr Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly
 65      70      75      80
His Leu Ile Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn
 85      90      95
Val Pro Leu Val Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys
100      105      110
Asp Leu Thr Leu Asp Gln Ala Tyr Gly Asp Ala Val Glu Asn Ala Lys
115      120      125
Asp Ile Ile Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser
130      135      140
Asp Leu Asp Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val
145      150      155      160
Lys Ile Gln Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly
165      170      175
Phe Thr Asp Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln
180      185      190
Ala Ala Pro Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg
195      200      205
Thr Asp Ile Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr
210      215      220
Phe Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro
225      230      235      240
Ala Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr
245      250      255
Lys Met Ser Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr
260      265      270
Ala Lys Gln Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly
275      280      285
Arg Asp Thr Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val
290      295      300
Asp Val Ser Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys
305      310      315      320
Leu Glu Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly
325      330      335
Glu Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu
340      345      350
His Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe
355      360      365
Met Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln Lys Leu Ala Ala Ala
370      375      380
Leu Glu His His His His His
385      390

```

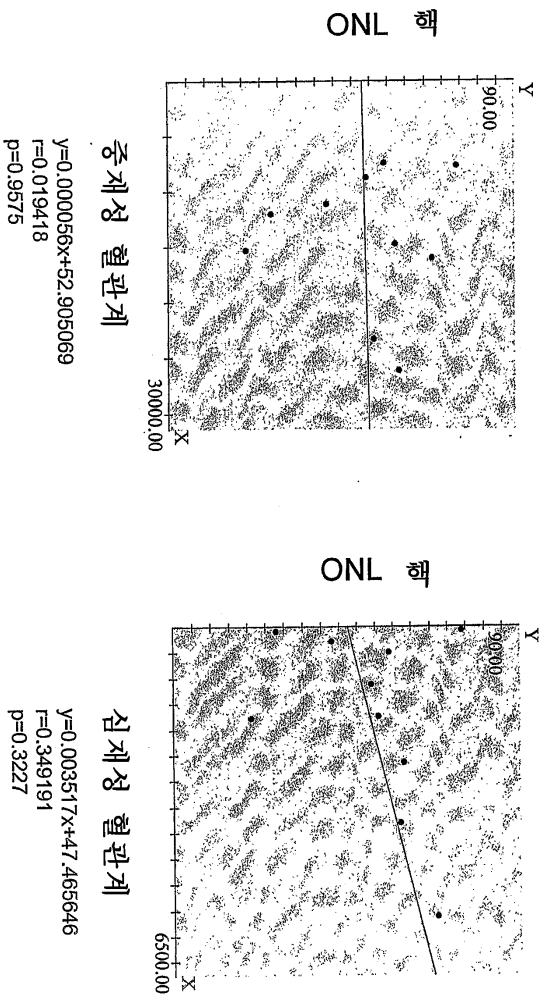
도면9



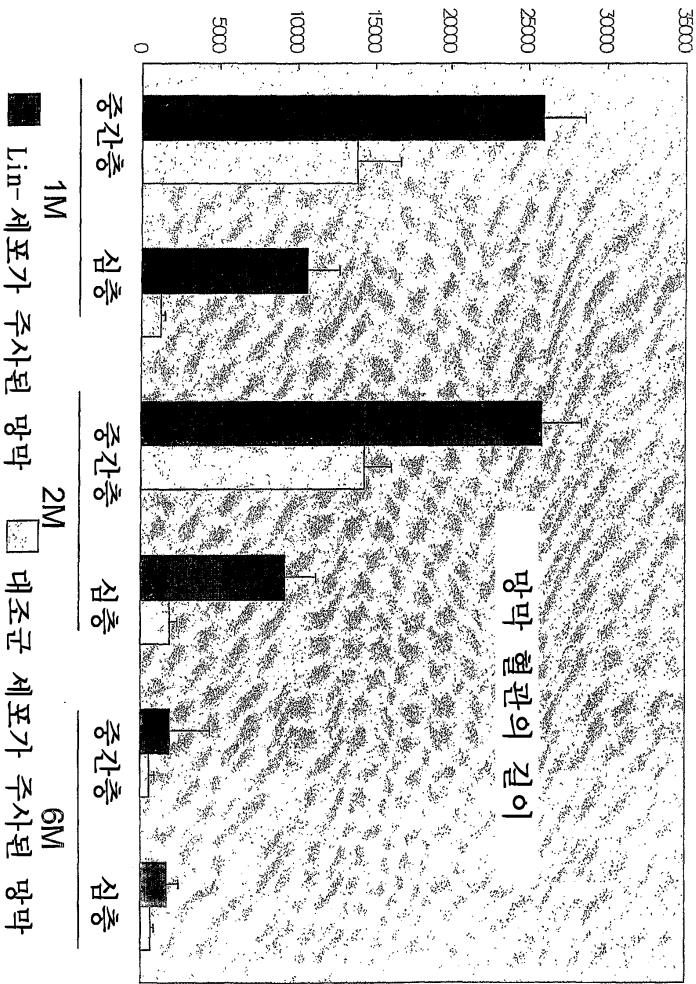
단순 회귀 분석 - 2개월



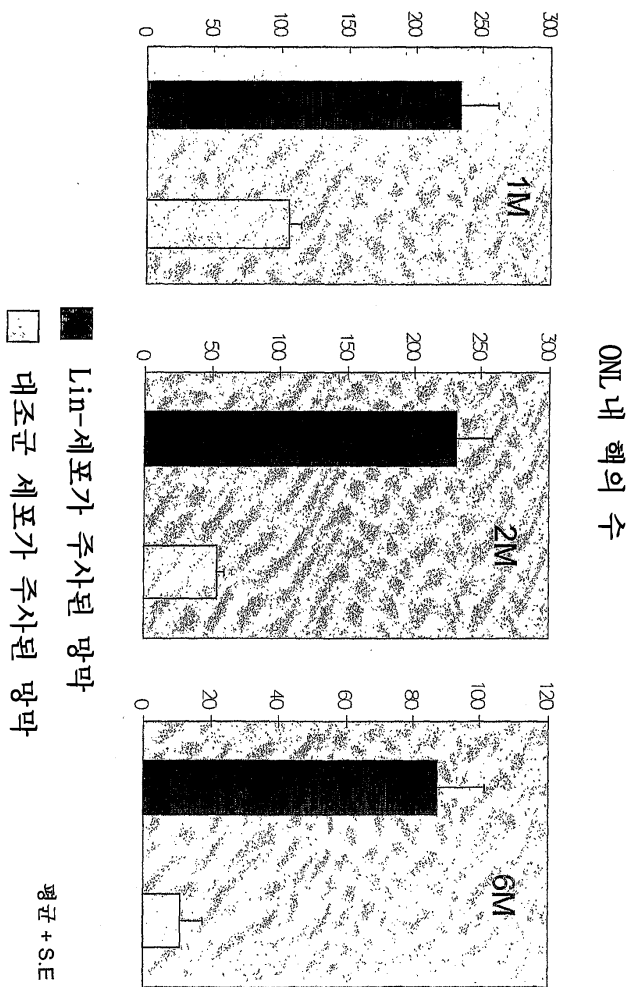
단순 회귀 분석 - 2개월 대조군



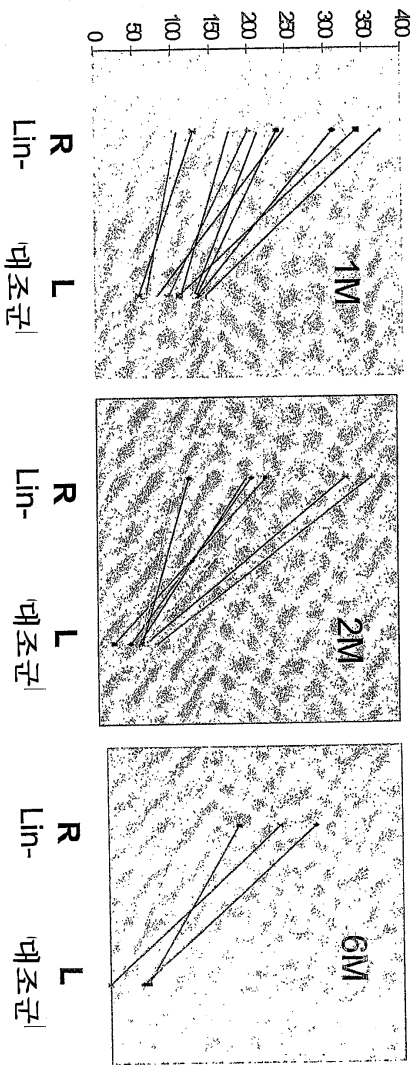
도면12

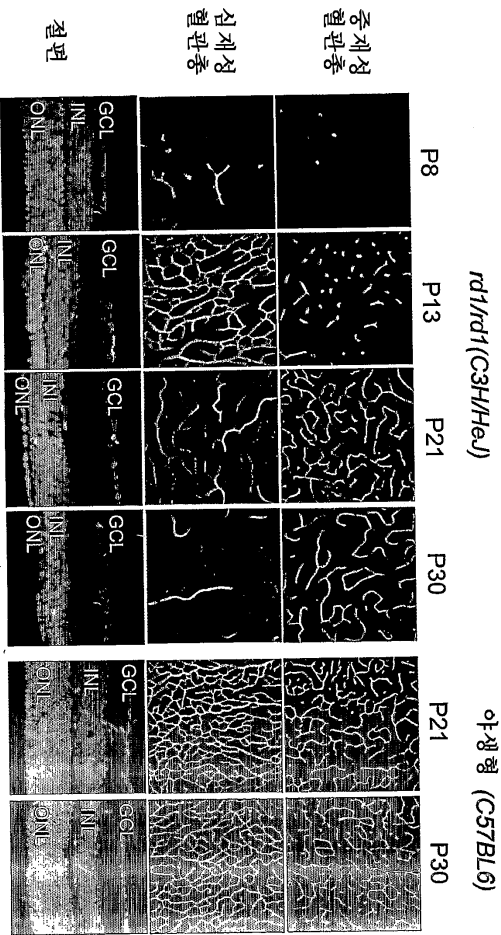


도면13



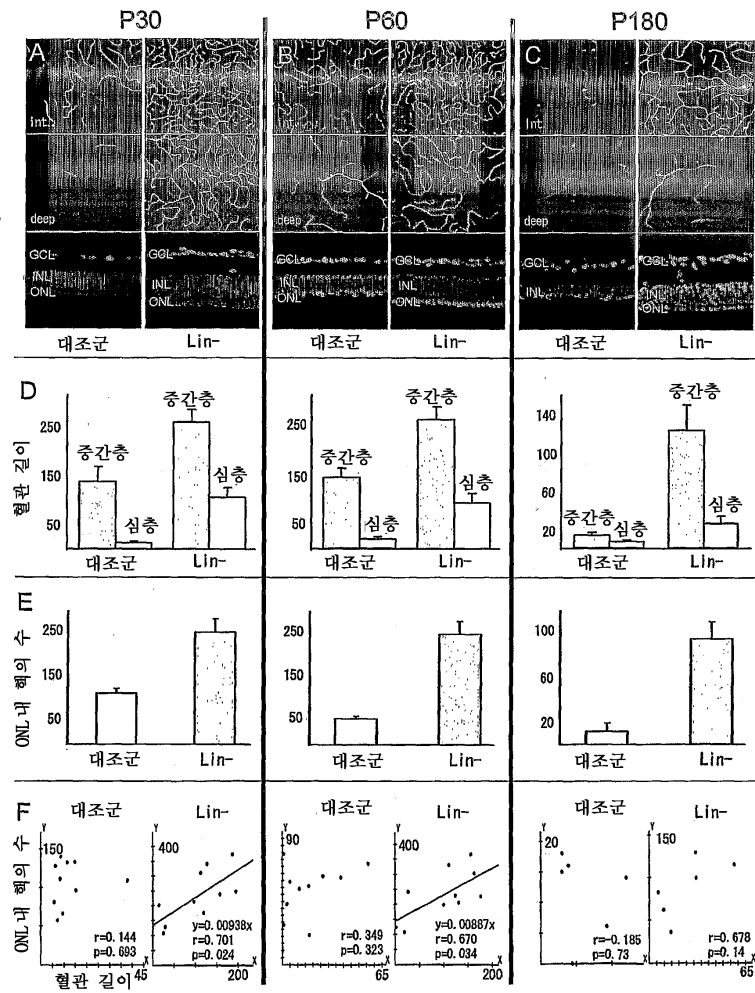
ONL 내 핵의 수



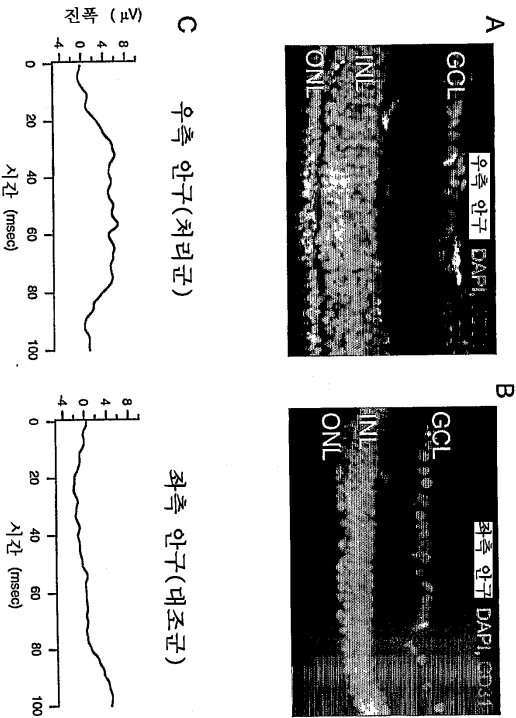


도면15

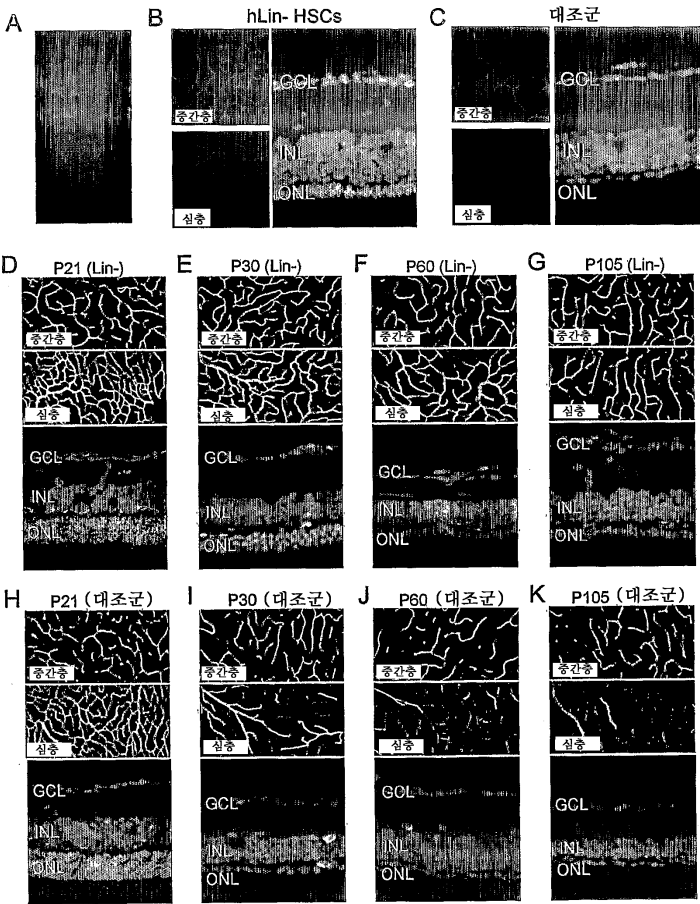
도면16



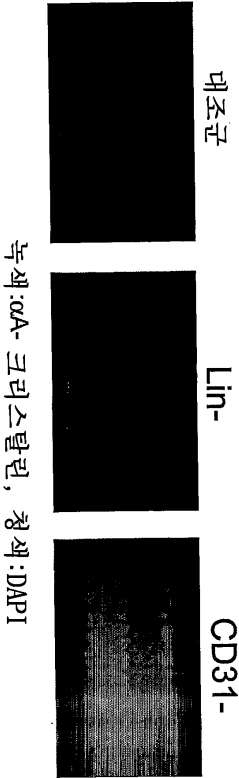
도면17



도면18



구제된 rd/rd 망막에서의 α A-크리스탈린 발현



도면19

도면20

(A) Lin⁻ HSC 주사된 망막에서 발현이 3배 증가된 유전자

일반명	(규정화된 데이터)			진뱅크	설명
	Lin (-)	CD31 (-)	Nl rd/rd		
Tgfp	11.86	0.53	0.66	L38444	T-세포 특이적 단백질
H-2D4(q)	7.09	0.92	0.69	X52914	이식 항원
H2-K2; H-2K2	4.51	0.70	0.55	M27134	세포 표면 당단백질
Lzp-s	6.51	0.65	0.99	X51547	리소자임; 리소자임 P
Kcnj5	4.50	0.85	0.72	U33631	G-단백질 개폐 K ⁺ 채널
Scya8	5.19	0.47	1.00	AB023418	MCP-2 전구체
Ly6a	4.02	0.96	0.79	X04653	Ly-6 대립형질
Apna1	2.49	0.60	0.51	AV003419	EST
Plo5k1c	3.40	0.94	0.78	AB008918	포스포타타일노시톨키나제
MAD	3.76	0.56	0.88	X83106	MAX 이항체와 단백질
Cxadr	3.98	0.81	1.00	U90715	루삭키-아드노바이러스 수용체
Isg15	2.22	0.64	0.45	X56602	인터페론 유도성 단백질
EST	3.51	0.90	0.98	AA790936	EST
Tm4sf1	3.02	0.49	0.70	AV087000	EST
IgG VH-II	2.64	0.95	0.91	X02463	Ig 중쇄; 가변 영역
YY1	2.97	0.85	0.87	M74590	텔타-전사 인자
Psmb9	3.29	0.49	0.97	D44456	폴리케타이드 복합체 서브유닛 2
H2-Aa	2.63	0.88	0.94	X52643	I-E 알파 NON, MIC

(B) 크리스탈린 유전자

일반명	(규정화된 데이터)			진뱅크	설명
	Lin (-)	CD31 (-)	Nl rd/rd		
Crybb2	8.73	0.55	0.83	M80559	베타-B2-크리스탈린
Cryaa	4.00	0.57	1.00	J00376	알파-A-크리스탈린
CrygD	2.09	0.74	0.97	AJ224342	감마-D-크리스탈린
Cryba1	6.52	0.93	0.60	AJ239052	베타-A3/A1-크리스탈린
Crygs	2.89	0.97	0.85	AF032995	감마-S-크리스탈린
Cryc	5.07	1.00	0.83	Z22574	감마-C-크리스탈린
CrygF	1.94	1.00	0.69	AJ224343	감마-F-크리스탈린

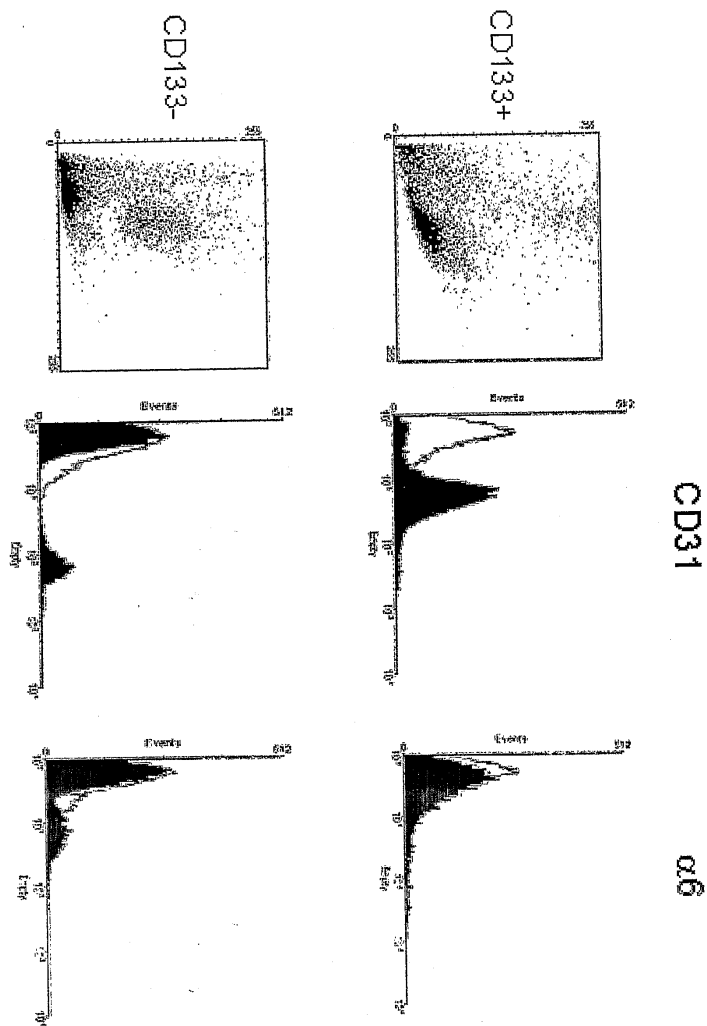
(C) 사람 줄기세포 구제된 망막에서 2배 이상 상승조절된 유전자

일반명	MR	HR	HNR	진뱅크	설명
EST	397	1885	489	AK024177	EST
CD6	960	2155	840	NM_006725	CD6 항원
IFN α 13	241	506	220	NM_006900	인터페론, 알파 13
TRAG3	269	543	229	NM_004909	역술 저항성 관련 유전자 3
ELA2	229	442	187	NM_001972	엘라스타제 2, 호중구
PP32D	179	345	146	NM_012404	산성 핵 단백질 320
otoferlin	232	485	239	NM_004802	오도페린
acyl oxidase	175	332	184	NM_004035	아실-코엘자임 A 옥시다제
HS6ST1	204	385	210	NM_004807	핵막 단백질 6-O-설포트란스퍼라제
ACCN3	187	337	181	NM_004769	경소 아틸로라이드 민감성 양이온 채널 3

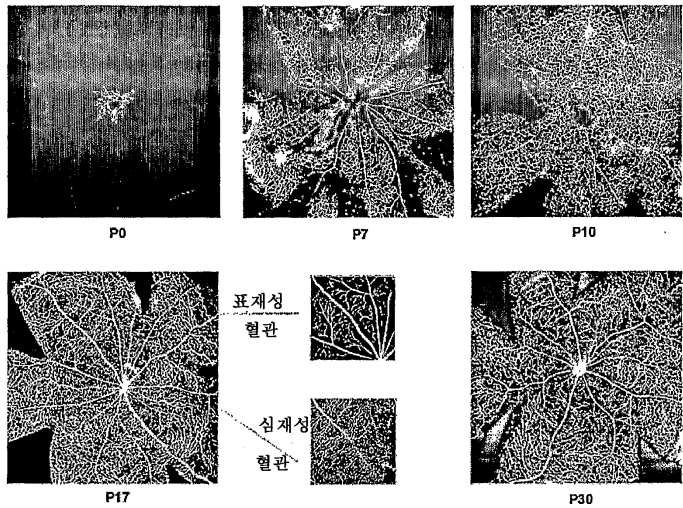
(D) 사람 줄기 세포로 구제된 망막에서 상승조절된 신경영양성 인자 또는 성장 인자의 유전자

일반명	MR	HR	HNR	진뱅크	설명
IGF2	743	1245	839	NM_016412	인슐린계 성장 인자 2
SCGF	474	547	402	NM_002975	줄기세포 성장 인자
TGF β 1	841	1011	819	NM_000660	행질전환 성장인자 베타 1
EGFR S8	499	593	491	A1343292	상피 성장인자 수용체 경도 기질 8 관련 단백질 1
FGF-6	524	611	526	NM_020996	섬유아세포 성장인자 6
IGFBP	927	991	895	AW338791	인슐린계 성장인자 결합 단백질
FGF-12	471	523	507	AL119322	섬유아세포 성장인자 12
EGF-like	991	1092	1088	M60278	디프테리아 독소 수용체, BGF계
FGF-21	592	615	590	NM_019113	섬유아세포 성장인자 21

도면21

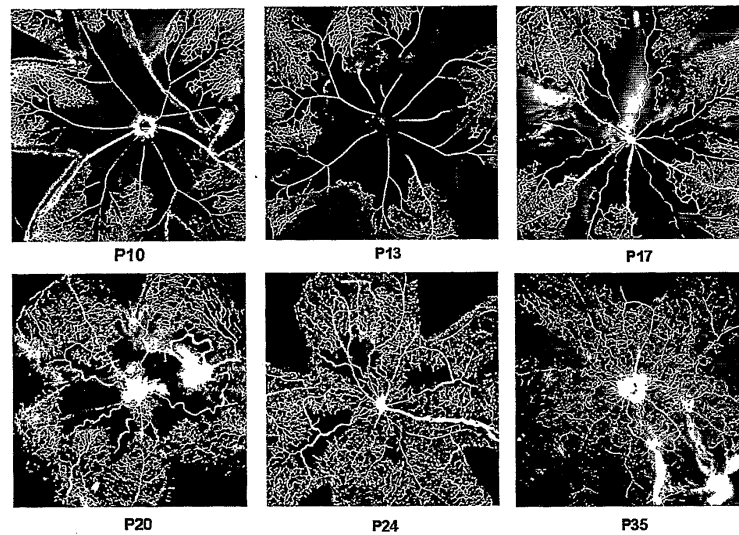


도면22



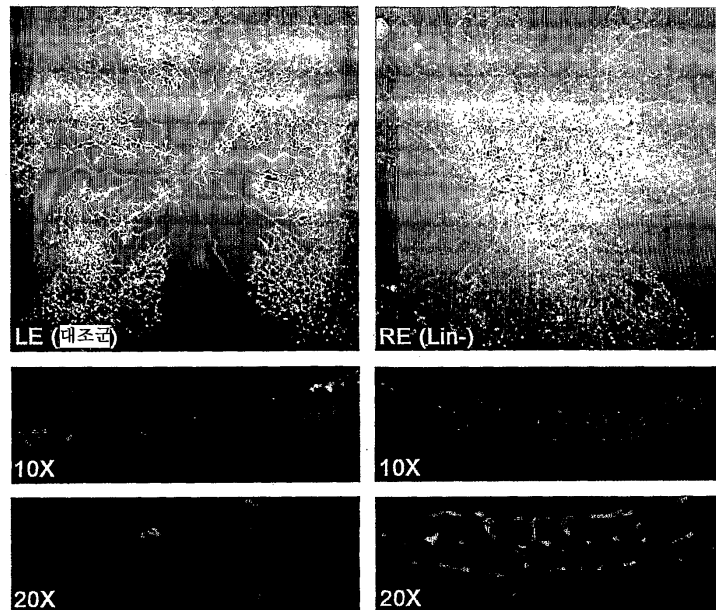
정상산소증에서 발생된 야생형 C57/B16 마우스의 망막 혈관계의 생후 발달

도면23



산소 유도성 망막병증 모델: P7과 P12 사이에 75% 산소하에서 발생되고, P12에서 P17 사이에는 정상산소증으로 복귀된 후, P17에서 공초점현미경으로 플루오레세인 텍스트란 영상법으로 분석한, C57/B16 마우스 망막 혈관계의 생후 발달

도면24



OIR 모델에서의 Lin- HSC 구제 효과. CD31-CD34-CD11b- HSC (좌측 패널, "대조군") 또는 Lin- HSC(우측 패널)를 동일 동물의 좌측 또는 우측 안구에 각각 P3에 유리체내로 주사했다. P7에 동물을 75% 산소 하에 5일 동안 방치하고, P12에 정상산소증으로 복귀시킨 뒤, P17에 공초점 현미경으로 분석했다. 적색은 렉틴이고 청색은 DAPI 염색이다.

서열 목록

<110> The Scripps Research Institute

<120> HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND METHODS OF
TREATMENT OF NEOVASCULAR EYE DISEASES THEREWITH

<130> TSRI-988.1

<150> 10/628,783

<151> 2003-07-25

<150> 60/467,051

<151> 2003-05-02

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 4742

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA encoding His-tagged human T2-TrpRS

<400> 1

```
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcgccct agcgcgccgt cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggtc 240
acgtagtggg ccacgcgccg gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aacctatct cgggtctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg agctgattta 420
```

```
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600
gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tcctttttt gcggcatttt gccttctctg 660
ttttgctcac ccagaaacgc tgggtgaaag aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720
agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagt ttcgccccga 780
agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccc 840
tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt 900
```

```
tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960
cagtgtctgc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020
aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga 1080
```

tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140
 tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc 1200
 ccggcaacaa ttaatagact ggatggagc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260
 ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320
 cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380

gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc 1440
 actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tataacttt agattgattt 1500
 aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560
 caaaatccct taacgtgagt ttctgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620
 aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcctgcaaa caaaaaaacc 1680
 accgctacca gcggtggttt gtttcccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaagg 1740
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacttc gctctgctaa tcctgttacc 1860

agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920
 accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 1980
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgt 2040
 tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgga caggagagcg 2100
 cagaggggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtctgtcg ggtttcgcca 2160
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctctcaggg gggcgagacc tatggaaaaa 2220
 cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggccctttgc tggccttttg ctacatggt 2280
 ctttctctcg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340

taccgtcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 2400
 gcgctgatg cggatatttc tcttacgca tctgtcgggt atttcacacc gcataatgg 2460
 tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520
 cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgccct 2580
 gacgggcttg tctgtcccg gcacccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640
 gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700
 catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgctg ttcacccgc tccagctcgt 2760
 tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaaggcgcg 2820

tttttctctg ttgggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880
 tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc 2940
 ggttactgga acgttgtgag ggtaaacacac tggcgggatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000
 aaatcactca gggtaaatgc cagcgttctg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggta 3060
 gccagcagca tcttgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 3120
 tttccagact ttacgaaaca cggaaccga agaccattca tgttgttgct caggctcgag 3180
 acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 3240
 cagtaaggca accccgccag cctagccggg tctcaacga caggagcacg atcatgcga 3300

cccgaggcca ggacccaacg ctgcccgaga tctcgatccc gcgaaattaa tacgactcac 3360
 tatagggaga ccacaacggg ttccctctag aaataatttt gtttaacttt aagaaggaga 3420
 tatacatatg agtgcaaaag gcatagacta cgataagctc attgttcggg ttggaagtag 3480
 taaaattgac aaagagctaa taaaccgaat agagagagcc accggccaaa gaccacacca 3540
 cttctgcgc agaggcatct tcttctcaca cagagatatg aatcaggttc ttgatgccta 3600
 tgaataaag aagccatttt atctgtacac gggccggggc cctcttctg aagcaatgca 3660
 tgtaggtcac ctcatccat ttattttcac aaagtggctc caggatgtat ttaacgtgcc 3720
 cttggtcatc cagatgacgg atgacgagaa gtatctgtgg aaggacctga ccctggacca 3780

ggcctatggc gatgctgttg agaatgcca ggacatcatc gcctgtggct ttgacatcaa 3840
 caagactttc atattctctg acctggacta catggggatg agctcaggtt tctacaaaaa 3900
 tgtgtgaag attcaaaagc atgttacctt caaccaagtg aaaggcattt tcggcttcac 3960
 tgacagcgac tgcatggga agatcagttt tcttgccatc caggctgctc cctccttcag 4020
 caactcattc ccacagatct tccgagacag gacggatata cagtgcctta tccatgtgc 4080
 cattgaccag gatccttact ttagaatgac aaggacgtc gccccagga tcggctatcc 4140

taaaccagcc ctgttgcaact ccacattctt cccagccctg cagggcgccc agacaaaat 4200
gagtgccagc gacccaaact cctccatctt cctcacgcac acggccaagc agatcaaac 4260

caaggtcaat aagcatgcgt tttctggagg gagagacacc atcgaggagc acaggcagtt 4320
tgggggcaac tgtgatgtgg acgtgtcttt catgtacctg accttcttcc tcgaggacga 4380
cgacaagctc gagcagatca ggaaggatta caccagcgga gccatgctca ccggtgagct 4440
caagaaggca ctcatagagg ttctgcagcc cttgatcgca gagcaccagg cccggcgcaa 4500
ggaggtcacg gatgagatag tgaaagagtt catgactccc cggaagctgt ccttcgactt 4560
tcagaagctt gcggccgcac tcgagcacca ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa 4620
caaagcccga aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc 4680
ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg ttttttctg aaaggaggaa ctatatccgg 4740

at 4742

<210> 2

<211> 392

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> His-tagged human T2-TrpRS

<400> 2

Met	Ser	Ala	Lys	Gly	Ile	Asp	Tyr	Asp	Lys	Leu	Ile	Val	Arg	Phe	Gly
1				5				10					15		
Ser	Ser	Lys	Ile	Asp	Lys	Glu	Leu	Ile	Asn	Arg	Ile	Glu	Arg	Ala	Thr
			20					25					30		
Gly	Gln	Arg	Pro	His	His	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Ile	Phe	Phe	Ser	His
			35				40					45			
Arg	Asp	Met	Asn	Gln	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr	Glu	Asn	Lys	Lys	Pro	Phe
		50				55					60				
Tyr	Leu	Tyr	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Ser	Glu	Ala	Met	His	Val	Gly
65				70				75						80	
His	Leu	Ile	Pro	Phe	Ile	Phe	Thr	Lys	Trp	Leu	Gln	Asp	Val	Phe	Asn
				85				90						95	
Val	Pro	Leu	Val	Ile	Gln	Met	Thr	Asp	Asp	Glu	Lys	Tyr	Leu	Trp	Lys
			100					105					110		
Asp	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Asn	Ala	Lys
		115				120					125				
Asp	Ile	Ile	Ala	Cys	Gly	Phe	Asp	Ile	Asn	Lys	Thr	Phe	Ile	Phe	Ser
	130					135					140				
Asp	Leu	Asp	Tyr	Met	Gly	Met	Ser	Ser	Gly	Phe	Tyr	Lys	Asn	Val	Val
145				150						155				160	
Lys	Ile	Gln	Lys	His	Val	Thr	Phe	Asn	Gln	Val	Lys	Gly	Ile	Phe	Gly
			165					170					175		
Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Ile	Gly	Lys	Ile	Ser	Phe	Pro	Ala	Ile	Gln
		180						185					190		
Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Ser	Asn	Ser	Phe	Pro	Gln	Ile	Phe	Arg	Asp	Arg
		195					200					205			
Thr	Asp	Ile	Gln	Cys	Leu	Ile	Pro	Cys	Ala	Ile	Asp	Gln	Asp	Pro	Tyr
		210				215						220			

Phe Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro
225 230 235 240
Ala Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr
245 250 255

Lys	Met	Ser	Ala	Ser	Asp	Pro	Asn	Ser	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Asp	Thr
			260					265					270		
Ala	Lys	Gln	Ile	Lys	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	His	Ala	Phe	Ser	Gly	Gly
			275					280				285			
Arg	Asp	Thr	Ile	Glu	Glu	His	Arg	Gln	Phe	Gly	Gly	Asn	Cys	Asp	Val
			290			295					300				
Asp	Val	Ser	Phe	Met	Tyr	Leu	Thr	Phe	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Lys
305					310					315					320

Leu	Glu	Gln	Ile	Arg	Lys	Asp	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ala	Met	Leu	Thr	Gly	
				325					330						335	
Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu	
				340				345						350		
His	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Phe	
				355			360					365				
Met	Thr	Pro	Arg	Lys	Leu	Ser	Phe	Asp	Phe	Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala	
	370					375					380					

Leu Glu His His His His His His
385 390