(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년04월25일
(11) 등록번호 10-1258292
(24) 등록일자 2013년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/12 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7016837
(22) 출원일자(국제) 2005년01월24일
심사청구일자 2010년01월21일
(85) 번역문제출일자 2006년08월22일
(65) 공개번호 10-2007-0069087
(43) 공개일자 2007년07월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/002273
(87) 국제공개번호 WO 2005/070011
국제공개일자 2005년08월04일
(30) 우선권주장
60/538,964 2004년01월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Developmental Dynamics. 2003, Vol.228, pages 664-671.*
Nature Biotechnology, 2000, Vol.18, pages 399-404.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
어드밴스드 셀 테크놀로지, 인코포레이티드
미국 01752 매사추세츠주 말보로우 로크 드라이브 33
(72) 발명자
클리만스카야, 이리나, 브이.
미합중국 매사추세츠주 01568, 업톤, 75 메카닉 스트리트
란자, 로버트
미합중국 매사추세츠주 01510 클린톤 싸우쓰 메도우 로드 35
(74) 대리인
양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 **망막 변성 질환 치료를 위한 개선된 양식**

(57) 요 약

본 발명은 망막 변성에 대한 개선된 세포 기반의 치료 방법과, 분화 중인 인간 배아 줄기 세포와 인간 배 유도체의 망막 색소 상피 (RPE) 세포 및 기타 망막 선구 세포로의 분화 방법에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

마우스 배아 섬유모세포(MEF) 상에서 인간 배아 줄기 세포의 장기간 배양에 의해 인간 배아 줄기 세포로부터 유래되는 망막 색소 상피(RPE) 세포, RPE-유사 세포, RPE 선구체(progenitor) 세포 또는 RPE-유사 선구체 세포 중 하나 이상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포의 단리된 집단을 포함하는, 망막 변성 치료용 또는 예방용 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 망막 변성 질병이 망막 색소 변성증(retinitis pigmentosa) 및 황반 변성 중 하나 이상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 안구의 망막하 공간 내로의 이식에 사용되는 제약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 이식에 사용되는 조성물이 세포를 현탁물, 매트릭스 또는 기재(substrate)의 형태로 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

인간 배아 줄기(hES) 세포의 망막 색소 상피(RPE) 세포, RPE-유사 세포 또는 RPE 선구 세포로의 자발적 분화 방법으로서,

a) hES 세포 배양물이 마우스 배아 섬유모세포(MEF) 상에서 과다 성장하게 하는 단계;

b) hES 세포 배양물이 두꺼운 세포 다중층을 형성하게 하는 단계;

c) hES 세포를 배양하는 단계; 및

d) 색소 침착된 RPE 세포, RPE 유사 세포, 및/또는 RPE 선구 세포를 생성된 세포 배양물로부터 단리 및 배양하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, RPE 세포, RPE-유사 세포 또는 RPE 선구 세포의 단리 및 배양이

a) 배양된 hES 세포를 효소로 분해시키는 단계;

b) 색소 침착된 세포를 선택적으로 단리하는 단계;

c) 단리된 세포를 젤라틴 또는 라미닌 상에서 1-2일 동안 플레이팅하여 일차 배양물(P0)을 형성하는 단계;

d) 일차 배양물을 최대 3주의 기간 동안 계속하여 배양하는 단계; 및

e) RPE 세포, RPE-유사 세포 또는 RPE 선구 세포를 단리하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 효소가 트립신, 콜라게나제 및 디스파제 중 하나 이상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, RPE 세포, RPE-유사 세포 또는 RPE 선구 세포를 성장시켜 새로운 RPE 세포주를 확립하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 배양 중의 RPE 세포주를 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF) 또는 섬유모세포 성장 인자(FGF)로 처리하는 단계를 포함하는, RPE 세포주를 대체적인(alternate) 가계로 분화시키는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 새로운 RPE 세포주는, RPE-유사 세포가 상이한 hES 세포주로부터 유래될 경우, RPE-유사 세포의 성장 속도, 색소 발현, 배양 중의 탈분화 및 배양 중의 재분화로 이루어진 군으로부터 선택되는 특징들 중 하나 이상이, 이미 확립된 RPE 세포주와는 다른 것인 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

명 세 서

[0001] 본 출원은 미국을 제외한 모든 지정국에서는 출원인을 미국 국내 기업인 어드밴스드 셀 테크놀로지, 인코포레이티드(Advanced Cell Technology, Inc)로 하고, 오직 지정국 미국에서만 출원인을 미국 시민인 이리나 브이. 클리만스카야 (Irina V. Klimanskaya)로 하여, 2005년 1월 24일에 국제 특허 출원으로서 출원된 것이고, 본 출원은 2004년 1월 23일자로 출원된 미국 가출원 제60/538,964호를 우선권으로 한다.

기 술 분 야

[0002] 본 발명은 일반적으로 망막 변성 및 기타 시각 장애의 개선된 세포 기반 치료 방법과, 파킨슨병의 치료 방법 및 포유류 배아 줄기 세포와 포유류 배아 유래 세포를 망막 색소 상피 (retinal pigment epithelium, RPE) 세포 및 간상 세포, 원추 세포, 이극 세포, 각막 세포, 신경 세포, 홍체 상피 세포 및 선구 세포를 포함하지만 이로 한정되지는 않는 기타 안조직으로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 중추 신경계 (CNS)의 다수의 부분은 판상 구조를 나타내며, 신경 병리학적 과정은 일반적으로 이러한 다수 세포

층들 중의 하나보다 많은 층에 연관한다. CNS 질환은 종종 뉴런 세포 손실을 포함하며, 내인성 세포 재증식(endogenous repopulation)의 부재로 인해, CNS-관련 질환 이후에는 기능의 효과적인 회복이 극도로 제한되거나 존재하지 않는다. 특히, 연령 관련 황반 변성 (age-related macular degeneration, AMD)으로 공지된 일반적인 망막 질병은 광수용기와 망막 색소 상피 (RPE)의 손실로부터 발생하며, 이는 속핵층 (inner nuclear layer, INL)의 개재 ("중계") 뉴런이 추가적으로 가변성있게 연관되어 있다. 따라서, 중도 내지 고도의 시력 복구는 손상된 세포층의 일부 또는 모두의 기능적 대체를 필요로 한다.

[0004] 해부학적으로, 유전성 망막 변성 패밀리인 망막 색소 변성증 (retinitis pigmentosa, RP)은 광수용기 세포의 핵의 수가 계속하여 감소되며 이것에 의해 시력을 상실하게 된다. 표현형은 대부분의 RP 형태에 유사하지만, 근본적인 세포 기작은 다양하며 다수 유전자에서의 다양한 돌연변이로 인해 생길 수 있다. 대부분은 광수용기-세포-특이적 유전자의 발현을 변경시키는 돌연변이를 포함하지만, 로돕신 유전자에서의 돌연변이가 이들 중 대략 10%를 차지한다. 다른 형태의 질환에 있어서는, 아폽토시스 (apoptosis)의 조절 유전자가 변경된다 (예를 들어 Bax 및 Pax2). AMD는 분자 수준에서의 병인이 상이할 가능성이 있는 일련의 변성 질병을 포함하는 임상적 진단이다. 모든 경우의 AMD는 중심 망막 내에서의 광수용기 세포 손실의 특징을 공유한다. 그러나, 이러한 일반적인 종점은 RPE의 수준, 신혈관형성, 및 기저 브루흐 막 (Bruch's membrane) 수준의 보다 초기적인 이상들의 이차적인 결과인 것으로 보인다. 후자는 광수용기 막의 턴오버 (turnover)에서의 곤란함과 관련될 수 있는데, 상기 곤란함은 지금까지 잘 이해되지 않고 있다. 추가로, 망막 색소 상피는 안구에서 가장 중요한 세포 유형 중 하나인데, 이는 상기 상피가 광수용기 기능의 지지에 결정적이기 때문이다. 이것은 간상 세포 및 원추 세포의 떨어진 외부 절편의 식균 작용, 비타민 A의 대사 작용, 망막하 공간에서 대사 산물 교환에 연루되는 뮤코폴리사카라이드의 합성, 대사 산물의 수송, 혈관 신생 (angiogenesis)의 조절, 광 흡수, 상 (image)의 해상도 증강과, 프로테아제 및 프로테아제 억제제와 같은 분비 단백질을 통한 망막에서의 다수의 다른 기능의 조절을 포함하는 여러 복잡한 임무를 수행한다.

[0005] 몇몇 AMD 예들에서 존재하는 추가의 특징은 이상 혈관의 존재인데, 이는 맥락막 신생 혈관 (choroidal neovascularization, CNV)으로 공지된 질병으로 이어진다. 이러한 신생 혈관형 (습성) AMD는 특히 유해하며, 혈관 신생의 적당한 조절의 손실로 인해 생기는 것으로 보인다. RPE 기능 장애의 결과로 인한 브루흐 막의 파괴는 망막하 공간으로 접근하는 맥락막 순환으로부터 새로운 맥관이 생성되게 하는데, 상기 새로운 맥관은 외부 절편 구조를 물리적으로 파괴하며 도관 누출 또는 출혈을 야기하여 추가로 광수용기가 손실되게 할 수 있다.

[0006] CNV는 레이저 치료에 의해 표적화될 수 있다. 따라서, "습성" 형태의 AMD의 레이저 치료가 미국에서 일반적으로 사용 중에 있다. 그러나 흔히 바람직하지 못한 부작용이 있으며, 따라서 환자들이 치료 결과에 불만족스러워한다. 이는, 발생할 경우 레이저 화상이 광수용기 사멸 및 시야의 상응하는 부분 내에서의 절대적인 회복될 수 없는 실명과 관련된다는 사실로 인한 것이다. 또한, 레이저 치료는 근본적인 CNV 발병 소인을 해결하지 못한다. 실제, 레이저 화상은 원숭이에서 CNV를 유발하는 편리한 방법으로 사용되었다 (Archer and Gardiner, 1981). CNV에 대한 황반부 레이저 치료법은 영국과 같은 다른 국가에서는 훨씬 더 조금 사용된다. 황반 및 드루젠 (drusen)으로 불리우는 관련된 세포외 물질에서의 RPE 위축의 불규칙적 패치 위에 있는 광수용기가 손실되는 보다 일반적인 "건성" 형태의 AMD에 대한 일반적으로 인지된 치료법은 전혀 없다.

[0007] RPE는 광수용기 유지 및 혈관 신생의 조절에서 중요한 역할을 하기 때문에, 생체 내에서의 다양한 RPE 기능 부전이 시력을 변경시키는 병, 예를 들어 망막 색소 변성증, RPE 박리, 이형성증, 위축, 망막병증, 연령 관련 황반 변성을 포함하는 황반 이영양증 또는 변성과 관련되는데, 이는 광수용기 손상 및 실명으로 이어질 수 있다. 구체적으로는, 그리고 AMD 외에도, 황반에 영향을 주는 다양한 다른 변성 질병은 원추 세포 이영양증, 원추체-간상체 이영양증(cone-rod dystrophy), 말라티아 레벤티네세 (malattia leventinese), 도인 허니콤 이영양증 (Doyne honeycomb dystrophy), 소르스비 이영양증 (Sorsby's dystrophy), 스타가르트병 (Stargardt disease), 패턴형/나비형 (pattern/butterfly) 이영양증, 베스트 난황형 이영양증 (Best vitelliform dystrophy), 노쓰캐롤라이나형 이영양증 (North Carolina dystrophy), 중심성 원형 맥락막 이영양증, 혈관무늬 망막병증, 및 중독성 황반병증을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0008] 이차적으로 황반에 영향을 미칠 수 있는 일반적인 망막 질환은 망막 박리, 병적 근시, 망막 색소 변성증, 당뇨성 망막병증, CMV 망막염, 폐색성 망막 혈관 질환, 미숙아 망막병증 (retinopathy of prematurity, ROP), 맥락막 파열, 안구 히스토플라스마증 증후군 (POHS), 톡소플라스마증, 및 레버 선천성 흑암시 (Leber's congenital amaurosis)를 포함한다. 상기 목록 중 어느 것도 총망라된 것이 아니다.

[0009] 상기 질병 모두는 광수용기의 손실을 포함하며, 따라서 치료 상의 선택 사항은 거의 없고 불충분하다.

[0010] RPE는, 그의 창상 치유능 때문에, 이식 치료에의 적용에 있어서 광범하게 연구되었다. 시험한지 1년째인 2002년에, 환자들은 30-50%의 개선을 나타내었다. 여러 동물 모델 및 인간에 있어서 RPE 이식이 우수한 시력 회복 잠재력을 갖는다는 것이 밝혀졌다(Gouras et. al., 2002, Stanga et. al., 2002, Binder et. al., 2002, Schraermeyer et. al., 2001, reviewed by Lund et. al., 2001). 그러나, 심지어 안구와 같은 면역-특혜 부위에서도 이식 거부에서 문제점이 있어, 동종 (allogenic) 이식이 이용될 경우 이 접근법의 진전은 방해된다. 새로운 광수용기 (PRC)가 이식에 의해 실험적으로 도입되었지만, 이식된 PRC는 두드러지게 숙주 망막의 생존 뉴런과 연합되는 것을 꺼려함이 나타났다. 태아 조직으로부터 유래되는 RPE 세포에 대한 의존은 다른 문제인데, 이는 상기 세포가 매우 낮은 증식 잠재력을 나타내었기 때문이다. Emory University 연구자들이 시험을 수행하였는데, 그들은 시험관 내에서 인간 안구 공여자 유래의 RPE 세포를 배양하고 이를 말기 (advanced) 파킨슨병에 걸린 6명의 환자 내로 이식하였다. 이식한지 1년 후에 증상이 30-50% 감소되었음이 밝혀졌지만, 안구 공여자가 부족하며, 이것은 아직 FDA의 승인을 받지 못하였고, 기증된 안조직에 의해 조우될 수 있는 것 이상으로 필요한 것이 여전히 존재한다.

[0011] 지금까지는 전위(ectopic) RPE 세포를 사용한 치료법이 섬유모세포와 유사하게 거동하는 것으로 밝혀졌으며 망막 박리를 갖는 증식성 유리체망막병증 (PVR) (Cleary and Ryan, 1979) 및 축삭 손실 (Villegas-Perez, et. al., 1998)을 포함하는 다수의 파괴적 망막 합병증과 관련되었다. 느슨한 시트 (loose sheet)로 전달되는 RPE는 위로 말리는 경향이 있다. 이는 광수용기의 열등한 유효 범위 (coverage)와, 부정확한 극성을 갖는 다층 RPE로 이어지며, 이는 아마도 낭종 형성 또는 황반 부종으로 이어진다.

[0012] 질환에 걸린 인간 안구의 망막하 (황반하) 공간에 신경 망막 이식체를 전달하는 것은 문헌[Kaplan et. al. (1997)], 문헌[Humayun et. al. (2000)], 및 문헌[del Cerro et. al. (2000)]에 기술되어 있다. 신경 망막 이식체는 전형적으로 숙주 망막과 기능적으로 통합되지 않는다는 점에서 심각한 문제점이 존재한다. 또한, 온전한 RPE 단일층의 부재는 브루흐 막의 파괴 또는 RPE 기능 이상이 바로잡아지지 않았음을 의미한다. 이 둘 모두 시력 상실의 기본적인 선례이다.

[0013] 이와 같이, 종래의 치료법 중 어느 것에서도 RPE를 재구성하는 효과적인 수단이 전혀 존재하지 않으며, 각각에 있어서 결함이 남아있으며, 특히 이식체와 숙주 망막 사이의 기능적 분리라는 본질적인 문제점이 남아있다. 따라서 개선된 망막 치료법에 대한 필요성이 존재한다.

[0014] **발명의 개요**

[0015] 본 발명의 목적은 수평 세포 및 아마크린 세포를 포함하는 신경 세포, 망막 세포, 예를 들어 간상 세포 및 원추 세포, 각막 세포, 맥관 세포와, 줄기 세포 유래의 RPE 및 RPE-유사 세포를 포함하지만, 이로 한정되지는 않는 안세포의 개선된 유도 방법을 제공하고 망막 변성의 치료를 위한 개선된 방법 및 치료법을 제공하는 것이다. 특히, 이 방법들은 인간 배아 줄기 세포로부터 유래되는 RPE 및 RPE-유사 세포의 사용을 포함한다.

[0016] 본 발명의 일 실시 형태는 망막 색소 변성증 및 황반 변성과 관련 질병을 포함하지만 이로 한정되지는 않는 다양한 질병의 치료를 위하여 포유류 배아 줄기 세포로부터 유래되는 RPE 세포, RPE-유사 세포, 이들 세포의 선구체 및 전술한 것 중 임의의 2가지 또는 3가지의 세포의 조합을 사용하여 망막 변성을 치료하기 위한 세포의 개선된 생성 방법을 제공한다. 본 발명을 이용하여 제조될 수 있는 세포 유형은 RPE, RPE-유사 세포 및 RPE-선구체를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 또한 제조될 수 있는 세포는 홍채 색소 상피 (iris pigmented epithelial, IPE) 세포를 포함한다. 개재 뉴런 (예를 들어 속핵층 (INL)의 "중개" 뉴런) 및 아마크린 세포를 포함하는 시력 관련 신경 세포 (광수용기-양극 세포-신경절 세포의 사슬로 이루어진 수직적 직접 경로의 두번째의 시냅스 수준에서 상호 작용하는 중간 뉴런 - 이들은 내망상층 (inner plexiform layer, IPL)에서 시냅스 활성을 가지며 신경절 세포에 제시되는 시각적 메시지에 관자놀이 (temporal) 도메인을 통합, 조정 및 개재시키는 기능을 함)도 본 발명을 이용하여 제조할 수 있다. 추가로, 망막 세포, 간상 세포, 원추 세포 및 각막 세포가 제조될 수 있다. 본 발명의 추가의 실시 형태에 있어서, 안구의 혈관 구조를 제공하는 세포도 제조될 수 있다. 본 발명의 세포는 유리체 절제 수술을 이용하여 망막하 공간 내로 이식될 수 있다. 비제한적 예는 현탁물, 매트릭스 또는 기재 형태의 이들 세포의 이식을 포함한다. 치료될 수 있는 망막 색소 변성증의 동물 모델은 설치류 (rd 마우스, RRPE-65 넉아웃(knockout) 마우스, 튜비-유사(tubby-like) 마우스, RCS 래트, 고양이 (아비시니아 (Abyssinian) 고양이), 및 개 (원추 세포 변성 "cd" 개, 진행성 간상체-원추체 변성 "prcd"개, 초기 망막 변성 "erd" 개, 간상체-원추체 이형성증 1, 2 및 3 "rcd1, rcd2 및 rcd3" 개, 광수용기 이형성증 "pd" 개, 및 브리아르 (Briard) "RPE-65" (개)를 포함한다. 평가는 거동 시험, 형광 혈관 조영술 (fluorescent angiography), 조직학적 방법, 또는 기능 시험, 예를 들어 세포가 식균 작용을 수행하는 능력 (광수용기 단편), 비타민 A 대사

작용, 밀집 연접부 전도성의 측정, 또는 전자 현미경을 사용한 평가를 이용하여 수행한다. 본 발명에서 제시되는 방법에 대한 다수의 장점 중 하나는 안구 공여체 조직의 사용에 제한을 받는 경우 치료할 수 있는 것보다 많은 다수의 환자를 치료하고 생성하는 능력이다.

[0017] 본 발명의 추가의 실시 형태는 hES 세포를 RPE의 다수의 특징들을 갖는 세포로 자발적으로 분화시키는 방법을 제공한다. 이러한 RPE 제제는 배양 중에 표현형 변화가 가능하며 다수의 계대 내내 RPE 특징을 유지할 수 있다. 본 발명은 확립된 RPE 세포주를, bFGF 또는 FGF의 사용을 통하여 비제한적 예로서 택일적 뉴런 가계, 각막 세포, 망막 세포로 분화시키는 방법도 제공한다.

[0018] 본 발명의 다른 실시 형태는 기존의 ES 세포주 및 새로운 ES 세포주 유래의 새로운 RPE 주 및 선구 세포의 유도 방법이다. RPE-유사 세포는, 상이한 ES 세포주로부터 유래될 경우 배양 중에 그의 성장 속도, 색소의 발현, 또는 탈분화 및 재분화와 같은 특성들이 변할 수 있다. 이들의 기능성 및 핵형 안정성에 있어서 소정 변이가 존재할 수 있으며, 그래서 순수한 고품질의 RPE-유사 세포 집단을 생성하도록 클로닝에 의해 선발될 수 있는 원하는 특성을 갖는 주가 선택되게 하는 새로운 RPE 주 및 새로운 ES 세포주의 유래 방법을 제공하는 것이 바람직하다.

[0019] 기존의 ES 세포주 및 새로운 ES 세포주로부터 또한 유래될 수 있는 세포는 홍채 색소 상피 (IPE) 세포이다. 추가의 실시 형태에 있어서, 개재 뉴런 (예를 들어 속핵층 (INL)의 "중개" 뉴런) 및 아마크린 세포를 포함하는 시력 관련 신경 세포도 본 발명을 이용하여 제조될 수 있다. 추가로, 망막 세포, 간상 세포, 원추 세포 및 각막 세포가 제조될 수 있다. 본 발명의 추가의 실시 형태에 있어서, 안구의 혈관 구조를 제공하는 세포도 제조될 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 실시 형태는 RPE 주 또는 전구체의 신혈관생성을 방지하는 능력이 증가된 RPE 세포로의 유도 방법이다. 그러한 세포는 텔로머라제 (telomerase)가 단축되도록 환자 유래의 체세포를 노화시키는 단계 - 여기서, 세포의 정상적인 복제 수명의 10% 이상은 지나감 - 와, 그 후 상기 체세포를 핵 이식 공여 세포로서 사용하여 혈관 신생 억제제, 예를 들어 색소 상피 유래 인자 (PEDF/EPC-1)를 과다 발현하는 세포를 생성하는 단계에 의해 제조할 수 있다. 대안적으로는, 그러한 세포는 신혈관생성을 억제하는 외인성 유전자로 유전적 변형시킬 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 실시 형태에서는 HLA 영역에서 동형 접합성을 갖는 ES 또는 배 유래 세포의 은행 (bank)을 이용하여서 상기 세포가 감소된 HLA 항원 복잡성을 갖도록 하였다.

[0022] 따라서, 본 발명의 추가의 실시 형태는 ES-유래 RPE-유사 세포의 특징을 포함한다. ES-유래 색소 상피 침착 세포는 형태, 거동 및 분자 마커가 RPE와 꼭 닮았지만, 그의 치료적 가치는 RPE 기능을 수행하고 비-발암성으로 남아있는 그의 능력에 의존적일 것이다. 따라서, ES-유래 RPE 세포는 하기 기술 중 하나 이상의 기술을 사용하여 특성화된다: (i) 기능성, 즉, 광수용기 단편의 식균 작용, 비타민 A 대사 작용, 창상 치유 잠재력의 평가; (ii) 동물 모델 이식 (비제한적 예로서, 이는 SCID 마우스를 포함할 수 있음)을 통한 RPE-유사 ES 세포 유도체의 다능성의 평가; (iii) RPE-유사 세포의 표현형 분석 및 핵형 분석; (iv) 유전자 발현 프로필화에 의해 ES 세포-유래된 RPE-유사 세포 및 RPE 조직의 평가; (v) 단백질 수준에서 베스트로핀, CRALBP, RPE-65, PEDF를 포함하는 RPE의 분자 마커의 발현의 평가. 이 세포는 또한 rx/rax, chx10/vsx-2/alx, ots-1, otx-2, six3/optx, six6/optx2, mitf, pax6/mitf, 및 pax6/pax2를 포함하는, 안구 발달에 정상적으로 필요한 전사 활성자의 발현을 기초로 하여 평가할 수 있다 (Fischer and Reh, 2001, Baumer et. al., 2003).

[0023] 본 발명의 추가의 실시 형태는 (i) ES-유래된 RPE-유사 세포의 기능성의 평가; (ii) 동물 모델 이식을 통한 RPE-유사 ES 세포 유도체의 다능성의 평가; (iii) RPE-유사 세포의 표현형 분석 및 핵형 분석; (iv) 유전자 발현 프로필화의 평가; (v) 단백질 수준에서의 RPE의 분자 마커의 발현의 평가; 및 (vi) 안구 발달에 정상적으로 필요한 전사 활성자의 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 기술을 이용한 ES-유래된 RPE-유사 세포의 특성화 방법이다. 추가의 실시 형태에 있어서, 이 기술을 다수의 hES 세포-유래된 세포 유형의 평가에 사용할 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 실시 형태는 ES 세포주의 생성 없이 인간 및 인간외 동물 상실배 또는 배반포 단계의 배로부터 직접 유도되는 RPE 세포 및 RPE 전구체 세포 (EDC)의 유도 방법이다.

[0025] 배아 줄기 세포 (ES)는 시험관 내에서 미분화 상태로 무기한 유지될 수 있지만 실제적으로 모든 세포 유형으로 분화될 수 있다. 따라서 인간 배아 줄기 (hES) 세포는 인간 세포의 분화에 대한 연구에 유용하며 이식 치료법의 잠재적인 공급원(source)으로 간주될 수 있다. 현재, 심근 세포 [Kehat et. al. 2001, Mummery et. al.,

2003 Carpenter et. al., 2002], 뉴런 및 신경 전구체 (Reubinoff et. al. 2000, Carpenter et.al. 2001, Schuldiner et. al., 2001), 지방 세포 (Bost et. al., 2002, Aubert et. al., 1999), 간세포-유사 세포 (Rambhatla et. al., 2003), 조혈모 세포 (Chadwicket. al., 2003), 난모 세포 (Hubner et. al., 2003), 흉선 세포-유사 세포 (Lin RY et. al., 2003), 췌장 섬 세포 (Kahan, 2003), 및 조골 세포 (Zur Nieden et. al., 2003)를 포함하는, 인간 및 마우스 ES 세포의 다수의 세포 유형으로의 분화가 보고되었다 (Smith, 2001에 의해 개관됨). 본 발명의 다른 실시 형태는 RPE 세포, 조혈모 세포, 근육 세포, 간 세포, 췌장 베타 세포, 뉴런, 내피 세포, 선구 세포 또는 세포 치료법 또는 연구에 유용하며 배로부터 유래되는 기타 세포, 배아 줄기 세포주, 또는 유용한 세포 유형으로 분화되는 능력을 갖는 기타 배아 세포와 같은 세포의 확인 방법으로서, 그러한 세포의 메신저 RNA 전사체를 생체 내에서 유래된 세포와 비교하는 단계를 포함하는 방법이다. 이 방법은 정상적인 표현형을 가지며 연구용의 세포 치료법에 최적화된 세포를 유도하기 위한 세포의 확인을 용이하게 한다.

[0026] 본 발명은 뉴런 가계의 특수 세포, 망막 색소 상피 (RPE)로의 인간 ES 세포의 분화법을 제공한다. RPE는 맥락막과 신경 망막 사이의 짙게 색소 침착된 상피 단일층이다. RPE는 혈류와 망막 사이의 장벽의 일부로서 기능하며, 그의 기능은 떨어진 간상 세포 및 원추 세포의 외부 절편의 식균 작용, 미광의 흡수, 비타민 A 대사 작용, 레티노이드의 재생 및 조직 회복을 포함한다 (Grierson et. al., 1994, Fisher and Reh, 2001,Marmorstein et. al., 1998). RPE는 흑색 색소 침착 (black pigmented) 세포의 조약돌형 세포 형태에 의해 용이하게 인식된다. 또한, 세포 레틴알데히드-결합 단백질 (cellular retinaldehyde-binding protein, CRALBP), 꼭대기 미세융모 (apical microvilli)에서 또한 발견되는 세포질 단백질 (Bunt-Milam and Saari, 1983); 레티노이드 대사 작용에 연루되는 세포질 단배질인 RPE65, (Ma et. al., 2001, Redmond et. al., 1998); 베스트 난황형 이영양증 유전자 산물인 베스트로핀 (VMD2, Marmorstein et. al., 2000), 및 혈관 억제 특성을 갖는 48kD의 분비 단백질인 색소 상피 유래 인자 (pigment epithelium derived factor, PEDF) (Karakousis et. al., 2001, Jablonski et. al., 2000)를 포함하는, RPE의 여러 공지된 마커가 존재한다.

[0027] RPE의 독특한 특징은 그의 외관상의 유연성이다. RPE 세포는 보통 유사 분열이 휴지 상태이나, 상해 또는 광응고에 응답하여 분열하기 시작할 수 있다. 상해에 인접한 RPE 세포는 평평해지며 증식하여 새로운 단일층을 형성한다 (Zhao et. al, 1997). 여러 연구에 의하면 RPE 단일층은 후에 원래의 RPE 형태로 복귀할 수 있는 섬유모세포 외관의 세포를 생성할 수 있음이 나타났다 (Grierson et. al., 1994, Kirchhof et. al., 1988, Lee et. al., 2001). 분열 세포 및 색소 침착 상피층이 동일한 계통 유래인지는 명확하지 않은데, 이는 RPE 세포의 두 집단, 즉, 상피형 및 방추형 (fusiform)이 단리되었기 때문이다 (McKay and Burke, 1994). 시험관 내에서, 성장 인자 및 기층 (substratum)의 조합에 따라, RPE는 상피로 유지되거나, 급속하게 탈분화되어 증식성으로 될 수 있다 (Zhao 1997, Opas and Dziak, 1994). 흥미롭게도, 상피 표현형은 장기간 휴지 배양물에서 재확립될 수 있다 (Griersion et. al., 1994).

[0028] 포유류 발달에 있어서, RPE는 안포의 신경상피인 신경 망막과 동일한 선구체를 공유한다. 소정 조건 하에서, RPE는 뉴런 선구체 (Opas and Dziak, 1994), 뉴런 (Chen et. al., 2003, Vinores et al., 1995), 및 수정체 상피 (Eguchi, 1986)로 트랜스분화 (transdifferentiation)할 수 있다는 것이 제안되었다. RPE의 뉴런으로의 변화를 자극할 수 있는 인자들 중 하나는 bFGF이다 (Opaz and Dziak, 1994, a process associated with the expression of transcriptional activators normally required for the eye development, including rx/rax,chxl0/vsx-2/alx, ots-1, otx-2, six3/optx, six6/optx2, mitf, and pax6/pax2 (Fischer and Reh, 2001, Baumer et. al., 2003). 최근에, 병아리 망막의 변연부가 신경 줄기 세포를 포함하며 (Fischer and Reh, 2000) pax6/mitf를 발현하는 이 지역의 색소 침착 세포가 FGF에 응답하여 뉴런 세포를 형성할 수 있다 (Fisher and Reh, 2001)는 것이 밝혀졌다.

[0029] 본 발명은 녹내장의 치료를 위한 hES 유래의 섬유주 세포의 유도체와 또한 유전자 변형 섬유주 세포를 제공한다.

[0030] 또한 본 발명은 녹내장의 치료를 위한 RPE 선구체 및 RPE-유사 세포 유래의 섬유주 세포의 유도체와 또한 유전자 변형 섬유주 세포를 제공한다.

[0031] 본 발명은 ES 세포주의 생성 없이 인간 및 인간외 동물의 상실배 또는 배반포 단계의 배로부터 직접 유래되는 RPE 세포 및 RPE 전구체 세포 (EDC)의 유도 방법으로서, a) 시험관 내에서 ES 세포를 미분화 상태로 유지하는 단계; b) ES 세포를 RPE 및 RPE 전구체 세포로 분화시키는 단계; 및 c) 그러한 세포의 메신저 RNA 전사체를 생체 내에서 유래된 세포와 비교함으로써 세포를 RPE 세포로 확인하는 단계를 포함한다.

[0032] 본 발명에 의해 추가로 제공되는 것은 신생혈관생성을 방지하는 능력이 증가된 RPE 주 또는 RPE 세포 전구체의

유도 방법으로서, 이 방법은 a) 텔로머라제가 단축되도록 동물 유래의 체세포를 노화시키는 단계 - 여기서, 세포의 정상적인 복제 수명의 10% 이상은 지나감 - ; 및 b) 체세포를 핵 이식 공여 세포로서 사용하여 혈관 신생 억제제를 과다 발현하는 세포를 생성하는 단계 - 여기서, 혈관 신생 억제제는 색소 상피 유래 인자(PEDF/EPC-1)일 수 있음 - 를 포함한다.

[0033] 본 발명은 hES 세포-유래의 RPE, RPE-유사 및/또는 RPE 선구 세포로 파킨슨병을 치료하는 방법을 제공한다. 이들은 미세담체를 이용한 정위 선조체내 이식에 의해 또는 미세담체에 의해 전달될 수 있다. 다르게는, 이들은 미세담체의 사용 없이 전달될 수있다. 또한 세포는 배양으로 확장되며 당업계의 숙련자에게 공지된 임의의 방법에 의한 파킨슨병의 치료에 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 다른 특징 및 장점이 하기의 발명의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다.

발명의 상세한 설명

[0042] 본 발명의 다양한 실시 형태를 상세하게 설명하고 제공된 실시예로 추가로 예시할 수 있다. 본원 발명의 상세한 설명과 이하의 청구의 범위 전반에 걸쳐 사용되는 바와 같이, "단수형 (a 또는 an)"과 "정관사 (the)"의 의미는 문맥이 명확하게 다른 것을 지시하지 않는 한 복수의 참고체를 포함한다. 또한, 본원 발명의 상세한 설명에서 사용되는 바와 같이, "에서 (in)"의 의미는 문맥이 명확하게 다른 것을 지시하지 않는 한 ""에서" 및 "상에서 (on)"를 포함한다.

[0043] 본 명세서에 사용되는 용어는 일반적으로 본 발명의 문맥 내에서, 그리고 각각의 용어가 사용되는 특정 문맥에서 당업계의 통상적인 의미를 가진다. 본 발명을 설명하기 위하여 사용되는 소정 용어는, 본 발명의 조성물 및 방법과 그의 제조 및 사용 방법을 설명함에 있어서 실행자에게 추가의 지침을 제공하기 위하여 본원 명세서에서 하기에 또는 다른 곳에서 논의되어 있다. 편의를 위하여, 소정 용어는 예를 들어 이탤릭체 및/또는 인용 부호를 사용하여 하일라이트될 수 있다. 하일라이트의 사용은 용어의 범주 및 의미에 전혀 영향을 미치지 못하며, 용어의 범주 및 의미는 하일라이트되어 있든지 그렇지 않든지 간에 동일한 문맥에서 동일하다. 동일한 것이 한 가지보다 많은 방식으로 말해질 수 있다는 것을 알 것이다. 결과적으로, 용어가 본원에서 상술되거나 논의되든지 그렇지 않든지 간에 특별한 의미가 두어지지 않는다면, 다른 학술어 및 동의어가 본원에 논의되어 있는 임의의 하나 이상의 용어에 대하여 사용될 수 있다. 소정 용어의 동의의가 제공되어 있다. 하나 이상의 동의어의 설명은 다른 동의어의 사용을 배제하지 않는다. 본원에 논의되어 있는 임의의 용어의 예를 포함하여, 본 명세서의 어딘가에서의 예의 사용은 단지 예시적인 것이며, 특정의 작용 체계 또는 이론을 고려하지 않고 본 발명에 따라 데이터를 가공하거나, 샘플링하거나 변환시키는 등을 행하는 한 어떠한 방식으로든 본 발명의 범주 및 상기 예의 범주를 한정하지 않는다.

[0044] 정의

[0045] "배" 또는 "배아"는 모계 숙주의 자궁막 내로 이식되지 않은 발달 세포군을 의미한다. "배아 세포"는 배아로부터 단리되거나 배아 중에 포함된 세포이다. 이는 또한 2세포기만큼 초기에 얻어지는 할구 및 응집 할구를 포함한다.

[0046] "배아 줄기 세포"라는 용어는 배 유래 세포를 말한다. 더 구체적으로는 이 용어는 배반포 또는 상실배의 내엽 세포군으로부터 단리되며 세포주로서 연속적으로 계대된 세포를 말한다.

[0047] "인간 배아 줄기 세포" (hES 세포)라는 용어는 인간 배 유래 세포를 말한다. 더 구체적으로는 hES는 인간 배반포 또는 상실배의 내엽 세포군으로부터 단리되며 세포주로서 연속적으로 계대된 세포를 말하며 또한 할구 및 응집 할구를 포함할 수 있다.

[0048] "인간 배 유래 세포" (hEDC)라는 용어는 상실배 유래 세포, 내엽 세포군의 세포를 포함하는 배반포 유래 세포, 배순 (embryonic shield), 또는 외배엽, 또는 원시 내배엽, 후생 동물의 외배엽 (ectoderm), 및 중배엽과 그 유도체를 포함하는, 또한 할구 또는 응집된 단일 할구 유래의 세포군 또는 다양한 발달기로부터의 배를 포함하지만 세포주로서 계대된 인간 배아 줄기 세포는 배제된 초기 배의 다른 전능성 또는 다능성 줄기 세포를 말한다.

[0049] 실제적으로 인체의 모든 조직으로 분화되는 능력을 갖는 배아 줄기 (ES) 세포는 이식 치료법을 위한 재생된 (rejuvenated) 조직 적합성 세포를 무한정 공급할 수 있는데, 이는 면역 거부 문제가 핵 이식 및 단위 생식 기술로 극복될 수 있기 때문이다. Hirano 등 (2003)의 최근의 발견에 의하면, 마우스 ES 세포가 시험관 내에서의 분화 실험에서 안구-유사 구조를 생성할 수 있음이 밝혀졌다. 그 중에서도, 망막 색소 상피를 닮은 색소 침착

상피 세포가 개시되었다.

[0050] 영장류 및 인간 ES 세포주를 이용하여 어드밴스트 셀 테크놀로지에서 실시한 예비 시험에 의하면 특수 배양 시스템에서 상기 세포는 RPE-유사 세포로 분화될 수 있으며 이는 단리 및 계대될 수 있음이 밝혀졌다. 인간 및 마우스 Nt, 시노 (Cyno) 단위 생식 생물(parthenote) ES 세포 유도체는 RPE의 다수의 특징을 갖는데, 상기 색소 침착 상피 세포는 RPE의 4가지의 분자 마커, 즉, 베스트로핀, CRALBP, PEDF, 및 RPE65을 발현하며, RPE와 같이 배양 중의 그의 분화는 탈분화, 즉, 상피 형태 및 색소의 손실을 동반하는데, 이 둘 모두는 세포가 단일층을 형성하고 휴지 상태로 된 후에 복구된다. 그러한 RPE-유사 세포는 용이하게 계대되고, 냉동 및 해동될 수 있으며, 따라서 그의 확장이 가능하다.

[0051] 또한 본 발명자들은 시험관 내에서의 분화 실험에서 인간 ES 세포가 다수의 안구 (유리체)-유사 구조도 생성한다는 것을 밝혀내었다. 이 구조의 조직학적 분석에 의하면 간상 세포 및 원추 세포와 유사한 세포의 응집체를 포함하는, 초기 망막 발달과 일치하는 세포 패턴이 나타난다.

[0052] RPE 이식

[0053] 현재, RPE 타가 이식의 만성적인 느린 거부에 의해 과학자들은 이 RPE 이식의 치료 효능을 측정하지 못하게 된다. 여러 방법이 이 장애를 극복하기 위하여 고려되고 있다. 가장 쉬운 방법은 전신 면역 억제법을 사용하는 것인데, 상기 전신 면역 억제법은 암 및 감염과 같은 심각한 부작용과 관련된다. 두번째 접근법은 환자 자신의 RPE를 이식하는 것 - 즉, 동종 이식(homograft) - 이지만, 이것은 질환에 걸린 오래된 RPE를 사용하여 질환이 더욱 더 심한 RPE를 대체하는 결점이 있다. 그러나, 세번째 접근법은 동일 환자 유래의 홍채 상피 (IPE)를 사용하는 것이지만, 이것은 IPE가 RPE의 모든 시력 관련 기능을 수행할 수는 없다는 결점이 있다. 궁극적으로, 거부를 제거하는 방법을 발견할 필요가 있으며 그러면 과학자들은 AMD 및 ARMD에서 RPE 이식의 실제 효능을 측정할 수 있다. 핵 이식 및 단위 생식은 분쇄한(grated) RPE 세포 및 선구체의 조직 적합성을 촉진한다.

[0054] 망막 색소 변성증에서의 RPE의 단점

[0055] 망막 색소 변성증은 시각 수용기가 비정상적 유전자 프로그래밍을 통하여 서서히 파괴되는 유전성 질병이다. 몇몇 형태는 상대적으로 연소한 연령에서 완전 실명을 야기하며, 다른 형태는 특징적인 "침상골" 망막 변화를 보이고 시력 파괴는 거의 없다. 이러한 질환은 전세계적으로 150만명의 사람들에게 영향을 준다. 상동염색체 열성 RP를 야기하는 두 가지의 유전자 결함이 RPE에서 배타적으로 발현되는 유전자에서 발견되었는데, 하나는 비타민 A 대사 작용에 연루되는 RPE 단백질 (시스 레틴알데히드 결합 단백질)로 인한 것이며 두번째는 RPE에 특유한 다른 단백질, RPE65를 포함한다. 일단 거부가 정복되면, 상기 형태의 RP 둘 모두는 RPE 이식에 의해 즉시 치료가능함이 분명하다. 이러한 치료법은 RP가 절망적으로 치료 불가능하고 잘 알려지지 않은 형태의 실명이었던 수년 전에는 상상할 수도 없었다.

[0056] RPE 이식에 있어서의 새로운 연구는 황반부 변성을 포함하는 망막 변성의 치료의 보증을 시사하고 있다. 또한, 말기 RP에 걸린 다수의 환자는 태아 망막 세포 이식 이후 몇몇 유용한 시각을 회복하였다. 예를 들어 환자들 중 한 명은 빛을 거의 못보는 것에서 환자의 안면으로부터 약 6피트 떨어진 거리에 유지된 손가락을 셀수 있는 것으로 개선되었다. 두번째 경우에 있어서, 터널을 통과하면서 편지를 보는 능력의 시력으로 시력이 개선되었다. 이 연구에 있어서 이식은 기존의 신경 망막 아래에 새로운 망막 세포를 주사로 도입함으로써 수행되었다. 생존한 세포가 다른 뉴런과 연결부를 형성하고 그 주위에서 광수용기와 같은 기능을 하기 시작하지만, 이식된 태아 세포가 타가 이식되었기 때문에 (즉, 유전자 매치되지 않음) 모든 세포가 생존하는 것은 아니었다. 첫번째 8명의 사람들이 이식체를 수여받은지 대략 1년 후에, 4명은 약간의 시각 기능을 회복하였으며 다섯번째는 그렇게 되고 있는 징후를 보이고 있다.

[0057] 3종의 새롭게 유도된 인간 배아 줄기 세포주는 이전에 개시된 것과 특성이 유사한데 (Thomson et. al. 1998, Reibunoff et. al., 2000, Richards et. al., 2000, Lanzendorf et. al., 2001), 이들은 미분화 표현형을 유지하며 배양 중에 45회의 계대를 통하여 또는 130회의 집단 배가에 걸쳐서 미분화 hES 세포의 공지된 마커, Oct-4, 알칼리 포스파타제, SSEA-3, SSEA-4,TRA-1-60, TRA-1-81을 발현한다. 모든 hES 세포주는 EB 또는 장기간 유착 배양에 있어서 그리고 기형종에 있어서 3개의 배엽 (germ layer)의 유도체로 분화된다. hES 세포의 분화 유도체 중 하나는 하기의 척도에 의해 망막 색소 상피와 유사한데, 즉, 형태상으로 이들은 전형적인 상피 조약돌형 단일층 외관을 가지며 그의 세포질 내에 짙은 갈색의 색소를 포함하는데, 이 색소는 인체에서 단지 멜라닌 세포, 각질 형성 세포, 망막 및 홍채 색소 상피 (IPE)에서 존재하는 것으로 공지되어 있다. 그러나, 멜라닌 세포는 비-상피 세포이며 케라틴 형성 세포는 멜라닌을 분비하는 것이 아니라 축적하기만 한다. 상기 세포 중에

존재하는 RPE-특이적 단백질 세트 - 베스트로핀, CRALBP, PEDF - 는 이들이 RPE와는 유사하지만 IPE와는 유사하지 않을 가능성이 있음을 나타낸다. 다른 유사성은, 증식 세포에서 색소가 거의 보이지 않거나 전혀 보이지 않지만 색소가 세포가 휴지 상태로 된 후에는 새롭게 확립된 조약돌형 단일층에서 재발현되거나 밀집되게 패킹된 상피 섬 내에 보유되었을 경우의 배양 중의 단리된 색소 침착 세포의 거동이다. 그러한 거동은 배양 중의 RPE에 대하여 기술되었으며 (Zhao et. al., 1997에 의해 개관됨), 뉴런 마커인 튜뷸린 베타 III이 시험관 내에서 탈분화 RPE 세포에 특이적으로 국소화되지만 전형적인 RPE 형태를 갖는 세포에서는 그러하지 않음이 이전에 보고되었는데 (Vinores et. al., 1995) 이는 그것이 RPE의 유연성과 신경 계통으로 탈분화되는 그의 능력을 반영한다는 것을 시사한다. 본 발명자들은 RPE 및 RPE-유사 세포의 일차 및 계대 배양에서 튜뷸린 베타 III의 동일한 국소화 패턴을 관찰하였는데 이는 배양 중의 그러한 세포의 탈분화를 반영하거나 뉴런으로 될 운명으로 보내지는 개별적인 세포 집단을 나타낼 수 있으며, 상기 세포는 원래 장기간 배양 중의 hES 세포의 분화를 통하여 색소 침착 세포 다음에 위치하였으며 RPE-유사 세포와 함께 동시 단리될 수 있었다.

[0058] 성장하고 있는 안포에 있어서 RPE 및 신경 망막은 동일한 2잠재능성 신경상피 선구체를 공유하며, 이들의 운명은 Pax2, Pax6, 및 Mitf에 의해 결정되는 것으로 밝혀졌는데 (Baumer et. al., 2003), 후자는 첫번째 둘의 표적이다. 초기 단계의 Pax6은 전신경 유전자의 활성자로 작용하며 추가의 발달에 있어서 RPE가 하향 조절되고, 성숙 망막에서 아마크린 및 신경절 세포에서는 그대로 남아있다 (Ashery-Padan and Gruss, 2001에 의해 개관됨). 골드피시에 있어서, 재생 뉴런의 유사 분열 활성 선구체에서도 이것이 발견되었다 (Hitchcock et. al., 1996). 본 발명자들은 다수의 RPE-유사 세포가 튜뷸린 베타 III과 유사한 패턴으로 mitf 및 Pax6를 발현하며 장기간 배양 중에 또는 "부분적" RPE 표현형을 갖는 세포 (연하게 색소 침착되고 느슨하게 패킹됨)에서 색소 침착 상피 섬을 둘러싸는 비-상피 형태의 색소 비침착 세포에서만 발견된다는 것을 밝혀내었다. 최근에 계대된 배양물중의 증식 세포에 있어서 모든 이러한 마커는 거의 모든 세포에서 발견되었는데, 이는 증식의 착수에서 RPE-유사 세포의 선구체 단계로의 전환 또는 망막 선구체의 대량 증식을 시사하는 것이다. 흥미롭게도, 상피 형태의 색소 침착 세포의 섬이 또한 발견된 기형종에 있어서, Pax6은 색소 침착 영역에 인접한 색소 비침착 세포에서 발현되었다 (데이터는 예시되어 있지 않음). 다수의 연구에 의하면 이전에 배양 중의 RPE의 탈분화 및 뉴런 표현형의 세포 (Reh and Gretton, 1987, Skaguchi et. al., 1997, Vinores et. al., 1995, Chen et. al., 2003), 뉴런, 아마크린 및 광수용기 세포 (Zhaoet. al., 1995), 신경교 (Skaguchi et. al., 1997), 신경 망막 (Galy et. al., 2002), 및 뉴런 선구체 (Opaz and Dziak, 1993)로의 그의 트랜스분화가 밝혀졌다. 그러한 선구체는 다시 배양 중의 성숙 RPE-유사 세포와 공존하거나 RPE-유사 세포의 탈분화의 결과물로서 나타날 수 있다. 이와 동시에, 신경 망막 세포는 시험관 내에서 RPE로 트랜스분화할 수 있으며 (Opas et. al., 2001), 그래서 대안적으로는 튜뷸린 베타 III 및 Pax6 양성 세포는 동시 단리된 신경 세포 또는 신경 선구체의 RPE-유사 세포로의 그러한 트랜스분화의 일시적 단계를 나타낼 수 있다.

[0059] hES 세포의 RPE-유사 세포로의 분화는 하기 실시예에 기술된 방법을 사용할 경우 자발적으로 일어났으며, 본 발명자들은 6-8주령보다 오래된 배양물에서 색소 착색 상피 세포가 신뢰할 수 있게 나타나며 시간이 지남에 따라 그 갯수가 향상되는데, 즉, 3-5개월의 배양물에 있어서 거의 모든 EB가 색소 침착된 큰 영역을 갖는다는 것을 알아내었다. 상기한 hES 주 외에도, 6종의 추가의 새롭게 유도된 hES 주가 RPE-유사 세포로 되었는데, 이는 신경으로 될 운명이 일반적으로 ES 세포에 의해 자발적으로 선택되기 때문에 RPE-유사 세포는 그러한 경로의 진전된 단계로서 디폴트로 생성될 수 있음을 시사하는 것이다. 분화 중인 hES 세포가 다중층화 환경을 형성하는 그러한 장기간 배양물에 있어서, 소극적 및/또는 지시적 분화 신호는 hES 세포의 분화 중인 유도체에 의해 생성되는 성장 인자 및 세포외 매트릭스로부터 생기는 것이 또한 가능하다. hES 세포의 RPE-유사 세포로의 분화 모델은 그러한 미시환경이 어떻게 RPE 분화 및 트랜스분화를 조정하는지를 연구하기 위한 유용한 도구일 수 있다.

[0060] RPE는 광수용기 유지에서 중요한 역할을 하며, 생체 내에서의 다양한 RPE 기능 부전은 다수의 시력을 변경시키는 병, 예를 들어 RPE 박리, 이형성증, 위축, 망막병증, 망막 색소 변성증, 연령 관련 황반 변성을 포함하는 황반 이영양증 또는 변성과 관련되는데, 이는 광수용기 손상 및 실명으로 이어질 수 있다. RPE는, 그의 창상 치유능 때문에, 이식 치료에의 적용에 있어서 광범하게 연구되었다. 여러 동물 모델 및 인간에 있어서 (Gouras et. al., 2002, Stanga et. al., 2002, Binder et. al., 2002, Schraermeyer et. al., 2001, reviewed by Lund et. al., 2001) RPE 이식이 우수한 시력 회복 잠재력을 갖는다는 것이 밝혀졌다. 최근에 RPE 이식에 대한 다른 유망한 니치 (niche)가 제안되었으며, 심지어 임상 시험 단계에 도달하였는데, 이러한 세포는 도파민을 분비하기 때문에 이들은 파킨슨병의 치료에 사용될 수 있다 (Subramanian, 2001). 그러나, 심지어 면역 특혜 안구에 있어서도 이식 거부 문제점이 존재하여, 타가 이식체가 사용되는 경우 이 접근법의 진보는 방해된다. 다른 문제점은 태아 조직에 의지하는 것인데, 이는 성체 RPE가 매우 낮은 증식 잠재력을 갖기 때문이다.

[0061] 면역 적합성 조직 공급원으로서, hES 세포는 이식 치료법에 대한 약속을 지키는데, 이는 면역 거부 문제가 핵 이식 기술로 극복될 수 있기 때문이다. 인간 ES 세포의 새로운 분화 유도체, 망막 색소 상피-유사 세포 및 그러한 분화 시스템의 신뢰성과 간편성에 의해 이식에 있어서 RPE 세포의 매력적인 잠재적인 공급물이 제공될 수 있다.

실 시 예

[0062] **실시예 1**

[0063] *장기간 배양에 있어서 색소 침착 상피 세포로의 자발적인 분화*

[0064] LIF, FGF 및 플라스마네이트의 부재 하에 MEF 상에서 hES 세포 배양물을 성장시키면, 이 배양물은 세포의 두꺼운 다중층을 형성한다. 약 6주 후, 보다 큰 클러스터 (cluster) 내에서 어두운 세포 섬이 나타난다 (도 1). 이러한 어두운 세포는 육안으로 용이하게 보이며 도 1A에 예시되어 있는 바와 같이 세포 플레이트에서 "주근깨"처럼 보인다. 보다 높은 배율에서 이 섬은 세포질에서 갈색 색소를 갖는, 전형적인 상피 세포의 조약돌형 단일층 내에 밀집되게 패킹된 다각형 세포로 나타난다 (도 1C). 세포 내의 색소의 양은 차이가 있으며 섬의 중앙부의 세포에 가장 많은 색소가 있고 에지에 가까운 세포에 가장 적은 색소가 있다 (도 1, E, F).

[0065] hES 세포가 배상체 (embryoid bodies, EB)를 형성할 경우, 색소 침착된 상피 세포는 처음 6-8주 후에 EB 중 약 1-2%에서 나타난다 (도 1B). 시간이 지남에 따라 더욱 더 많은 EB가 색소 침착 세포를 발달시키며, 3개월째에는 거의 모든 EB가 색소 침착 상피 세포 영역을 갖는다 (도 1D). EB의 색소 침착 영역에서의 세포의 형태는 유착성 배양물의 형태와 매우 유사하였다 (도 1D).

[0066] **실시예 2**

[0067] *색소 침착된 상피 세포의 단리 및 배양*

[0068] 본 발명자들은 유착성 hES 세포 배양물 및 EB 둘 모두로부터 색소 침착된 상피 세포를 단리하였다. 색소 침착된 다각형 세포는 효소 (트립신 및/또는 콜라게나제 및/또는 디스파제)로 분해시키고 상기 색소 침착된 섬 유래의 세포를 유리 모세관으로 선택적으로 골랐다. 색소 침착된 세포만을 고르기 위하여 조심하였지만, 단리된 세포 집단은 몇몇 색소 비침착 세포를 변함없이 포함하였다. 젤라틴 또는 라미닌 상에 세포를 1-2일 동안 플레이팅한 후 세포를 일차 배양물 (P0)로 간주하였다. 일차 배양물은 색소 침착된 다각형 세포의 섬과, 몇몇의 단일한 색소 침착 세포를 포함하였다. 배양한지 3-4일 후에, 상피 형태가 손실된 것으로 보이는 색소 비침착 세포 (보다 평평하며, 라멜리포디아 (lamellipodia)를 갖는 세포)가 몇몇 섬의 주변부에 나타났다 (도 2). 그러한 주변 세포의 갯수는 시간이 지남에 따라 증가하였는데, 이는 상기 세포가 증식하고 있음을 시사하는 것이며, 2주 후 새롭게 형성된 단일층 중의 대부분의 세포는 색소를 거의 포함하지 않거나 전혀 포함하지 않았다. 추가의 2-3주 동안의 계속된 배양 후, 색소 침착된 상피 세포는 다시 나타나기 시작하여 원래의 배양물 중의 것과 가시적으로 구별할 수 없었다 (도 2).

[0069] **실시예 3**

[0070] *RPE 마커의 검출*

[0071] RPE로서의 상기 분화 인간 세포의 예비 특성화는 전술한 RPE 배양물에 대한 그의 유사성, 주로 그의 상피 형태 및 색소의 보유를 기초로 한다. 인체에서 하기의 세 가지 유형의 색소 침착 상피 세포, 즉, 망막 및 홍채 색소 침착 상피 및 각질 형성 세포가 존재하지만, 후자는 색소를 분비하지 않는다. 상피 구조 및 조약돌 형태는 다른 색소 침착 세포, 예를 들어 멜라닌 세포에 의해 공유되지 않는다. RPE 세포는, 배양 중에 성장할 때 그의 색소 및 상피 형태를 손실하고 되찾는 것으로 밝혀진 것도 주목할 만하며 (Zhao 1997, Opas and Dziak, 1994), 색소 침착된 세포는 유사한 방식으로 거동하여, ES 유래 세포가 RPE일 수 있다는 가설을 시험하기 위하여 상기 세포는 공지된 RPE 마커, 즉, 베스트로핀 및 CRALBP에 대한 항체로 염색하였다. 도 4 (좌측 패널)에는 둘 모두 색소 침착된 상피 섬에서 발견되는 베스트로핀 (A) 및 CRALBP (C)의 막 국소화가 예시되어 있다. 일부 세포가 상기 항체로 염색되며 염색 강도는 색소 발현 및 콜로니의 "밀집성"과 상관 관계가 있는데, 세포가 보다 크며 보다 느슨하게 패킹된 각각의 색소 침착 섬의 가장자리는 보다 낮은 상기 단백질 둘 모두의 발현을 나타내었다.

[0072] 아마도 RPE 세포를 추가로 특성화하기 위해서, 웨스턴 블로팅으로 베스트로핀, CRALBP의 발현에 대한 분석을 수행하였다. 도 4 (우측 패널)에는 세포 용해물 중 베스트로핀, 68 kD (a), CRALBP, 36 kD (b)에 상응하는 밴드가 예시되어 있다. 모든 상기 단백질은 일차 배양물 및 그 후의 계대 배양물 둘 모두에서 발견되었다.

[0073] 다른 공지된 PRE 마커인 RPE65는 실시간 RT-PCR에 의해 RPE-유사 세포에서 발견되었으며 (도 4, 우측 패널, 하단), PEDF ELISA 분석에 의하면 모든 추정된 RPE 배양물의 세포 용해물 중에 PEDF가 존재함이 밝혀졌으며, 웨스턴 블롯에 의하면 대략 48 kD의 밴드가 나타났다 (예시되어 있지 않음).

[0074] RPE-유사 배양물에서의 뉴런 및 망막 선구체의 마커의 검출

[0075] 도 4에는 최근에 계대하거나 오래된 hES 세포-유래 RPE의 배양물에서의 PAX-6, Pax2, mitf, 및 튜뷸린 베타 III의 국소화가 예시되어 있다. 증식하고 있는 세포의 RPE-유사 형태가 손실되는 증식 배양물 (트립신 처리 3일 후, 예시되어 있지는 않음)에 있어서, 거의 모든 세포에서 mitf, Pax6, 튜뷸린 베타 III 및 네스틴이 존재함이 밝혀졌다 (예시되어 있지 않음). Pax2는 mitf-음성인 것으로 나타난 세포의 작은 서브세트에서만 발견되었으며, 반면, Pax6/mitf, mitf/튜뷸린 베타 III, 및 Pax6/튜뷸린 베타 III의 동시 국소화 정도는 강력하였다. 색소 침착 상피 섬이 재확립된지 21일 후의 오래된 휴지 배양물에 있어서, PAX-6 및 mitf 그룹은 색소 침착된 상피 섬들 사이의 비-상피 형태의 색소 비침착 세포에서 대부분 발견되었으며 (도 4, A-C), 튜뷸린 베타 III은 분포 패턴이 유사하였다 (예시되어 있지 않음). 그러나, mitf-양성 및 Pax6-음성 세포의 집단은 색소 침착 섬의 주변부에 근접하여 위치하였다 (도 4, A-C). Pax2는 mitf-음성 세포의 매우 작은 서브세트에서만 발견되었다 (도 4, E-H). 상기 단백질 중 어느 하나가 존재하지 않는 것은 "성숙한" 색소 침착 상피 섬의 세포에서는 탐지되었다. 그러나, 몇몇 RPE 특징만을 갖는 세포 내의 이러한 마커는 종종 가시적이었으며, 즉, 상피로 보이지만 색소는 전혀 없거나 소정의 단일한 색소 침착 세포에서는 색소 침착 상피 섬과 떨어져 있었다.

[0076] **실시예 4**

[0077] *hES 세포주 H9으로부터 유래되는 RPE-유사 세포 및 시노-1 ES 세포 유래의 ACT J-1의 특성화 및 기존의 hES 세포주 H1 및 H7 유래의 RPE-유사 세포의 유도*

[0078] RPE-유사 세포주를 확장시키고, 냉동 및 회복에 대하여 시험하고, 하기 방법 및 RPE 세포의 분자 마커를 사용하여 특성화하였다: 웨스턴 블롯 및 면역형광법에 의한 베스트로핀 및 CRALBP, ELISA 및 웨스턴 블롯에 의한 PEDF와, RT-PCR에 의한 REP65. 이 세포를 SCID 마우스에 주사하고 미분화 hES 또는 시노-1 세포는 대조로 이용하여 종양 발생성을 평가하였다. 임상 실험실에 의해 시판 제품을 기초로 하여 RPE-유사 세포의 핵형 분석을 행한다. 이어서 RPE-유사 세포의 기능적 특성의 특성화 및 그의 이식 잠재력에 대한 연구는, 다르게는 본원에 기술되어 있는 바와 같이, 그리고 또한 당업계에 공지된 기술을 사용하여 실시한다.

[0079] 유전자 발현 프로필화 실험은 Affymetrix 인간 게놈 어레이 (array)를 사용하여 행한다. 유전자 발현은 ES 세포로부터 유래되는 RPE-유사 세포에서 그리고 부검체 유래의 망막 샘플에서 비교한다. 붉은털 원숭이, 래트 및 토끼를 포함하지만 이로 한정되지는 않는 여러 동물 모델을 사용하여 이식된 RPE-유사 세포의 유효성을 검증할 수 있다.

[0080] **실시예 5**

[0081] *고수율의 RPE-유사 세포를 보장하는 분화 배양 시스템의 최적화*

[0082] ES 세포는 계단식 첨가를 포함하는, bFGF, 인슐린, TGF-베타, IBMX, bmp-2, bmp-4 또는 그의 조합의 존재 하에 영양 세포 (feeder cell) 상에서 배양하거나 배상체 (EB)로서 배양한다. 대안적으로는, ES 세포는 RPE 형성에서의 ECM의 역할의 평가에 있어서 다양한 세포외 매트릭스-코팅된 플레이트 (라미닌, 피브로넥틴, 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 마트리겔 (Matrigel) 등) 상에서 배양한다. 초기 RPE 선구체의 분자 마커 (Pax6, Pax2, mitf) 및 RPE 세포의 분자 마커 (CRALBP, 베스트로핀, PEDF, REP65)의 발현을 다양한 시간 간격으로 실시간 RT-PCR에 의해 평가하여 RPE-유사 세포 또는 그의 선구체에 있어서의 풍부함을 생성하는 상기 제제 및 계단식 절차의 성공적인 조합을 검증 및 결정한다. 또한 이 접근법을 사용하여 일반적인 RPE 선구체 및 기타 안조직, 예를 들어 광수용기 또는 신경 망막을 생성할 수 있는데, 이들은 단리되어 추가로 그의 분화 잠재력에 대하여 특성화되고 이식 연구에 사용될 수 있다.

[0083] **실시예 6**

[0084] *기존의 ES 세포주 및 새로운 ES 세포주 유래의 RPE 및 기타 안조직 선구체의 유도*

[0085] RPE 선구 세포에 있어서의 표면 마커들의 특유한 조합을 찾기 위하여, 유전자 발현 프로필화로부터의 데이터를 사용하여, RPE 선구체 마커의 발현과 그 표면 단백질의 발현과의 상관 관계를 입증한다. 그러한 마커가 발견되는 경우, 표면 단백질에 대한 항체를 사용하여 순수한 RPE 선구체 집단을 단리할 수 있으며 이는 그 후 배양하

고 배양 중에 추가로 분화시키거나 이식 연구에 사용하여 이식 후에 분화되게 할 수 있다.

[0086] 유전자 발현 프로필화 실험으로부터의 데이터가 불충분할 경우, RPE 선구체의 단리를 위하여 하기 접근법을 이용한다. ES 세포 및 RPE-유사 세포를 Pax6 프로모터의 제어 하의 GFP로 트랜스펙션시키고, 안정한 트랜스펙션체를 선발한다. 트랜스펙션된 분화 ES 세포 또는 증식 (탈분화) RPE 세포의 배양물로부터, GFP/Pax6-양성 세포를 FACS로 단리하고 이를 마우스 주사용의 항원 공급원으로 사용하여 Pax6 양성 세포의 표면 분자에 대한 단일클론 항체를 증대시킨다. Pax6는 RPE 선구체에서만 존재하지 않기 때문에 스크리닝은 a) 증식 RPE-유사 세포에 대하여, b) Pax2-양성 RPE 세포에 대하여, c) mitf-양성 RPE 세포에 대하여 여러 방법을 사용하여 (FACS로) 행한다. b) 및 c)에 있어서 RPE 세포는 상응하는 프로모터 하의 GFP로 트랜스펙션시키고, 음성 대조로서 상기 항원이 음성인 RPE 또는 ES 세포를 사용한다. 상기의 모든 세 가지 방법으로 선발되는 양성 클론의 확장 후, 항체는 스크리닝에서 사용되는 모든 세포 유형에 대하여 시험하며 추가로 분석하며, RPE 선구체에 특이적이거나 비특이적인 세포 표면을 인식하는 항체가 상기 방법에서 생성될 수 있기 때문에, 상기 항체로 선발되는 분화하고 있는 ES 세포 또는 RPE 세포의 전체 집단 유래의 세포는 RPE 선구체의 분자 마커 및 이 선구체의 RPE 생성 능력에 대하여 평가한다.

[0087] RPE 또는 안조직의 기타 초기 선구체와 그의 특유한 표면 마커에 대한 항체를 생성하기 위한 최적화된 규정된 계단식 절차를 사용하여, 그러한 선구체를 분화된 ES 세포로부터 단리하고 시험관 내에서 배양한다. 다양한 안조직으로 분화하는 그의 능력은 목적 2에 기술되어 있는 방법을 사용하여 조사한다.

[0088] 목적 1 및 2에 기술되어 있는 바와 같이 이미 RPE-유사 세포를 생성한 3종의 ES 세포주 (H9, ACT J-1, 시노-1), RPE-유사 세포를 사용하여 RPE-유사 세포 및 그의 선구 세포를 계속하여 유도하고, H1 및 H7 hES 세포주를 사용하여 새로운 RPE-유사 세포주를 제조한다. 확장 및 RPE의 분자 마커의 특성화 후, 상기 주를 단일 클론화하고, 생성된 주를 목적 1에 기술되어 있는 바와 같이 특성화한다. RPE 세포에 대한 기준을 충족시키는 주를 이식 연구에 사용한다. 새로운 인간 ES 세포주는 핵 이식 기술을 사용하여, 미사용 IVF 배, 수정 없이 발달하도록 자극된 기증된 난모 세포 (단위 생식 생물), 및 기증된 난모 세포로부터 수득되는 생성된 발달 배반포로부터 유래한다. RPE-유사 세포 및 일반적인 안구 선구체는 목적 2에서의 접근법을 사용하여 상기 주로부터 유도하고 생성된 주를 목적 1에서와 같이 특성화한다. [선택적으로] 새로운 인간 ES 세포주는 무-바이러스 시스템에서 유도하고, 특성화하고 임상 시험을 한다.

[0089] **실시예 7**

[0090] *망막 색소 변성증 및 황반 변성의 다양한 동물 모델에서의 RPE-유사 세포 및 선구체의 치료 잠재력*

[0091] 영장류 ES 세포를 시노몰로구스 (cynomologus) 원숭이 (머카크)에서 시험한다. 처음에, 유리체 절제 수술을 수행하고 세포를 동물의 망막하 공간 내로 이식한다. 제1 단계는 현탁물 포맷의 세포를 이식한 후 기재 또는 매트릭스를 사용하여 단일층 이식체를 생성하는 것이다. 이는 또한 인간 ES-세포로부터 유래되는 세포를 사용하여 면역 억제된 토끼에서, 그리고 또한 설치류 (rd 마우스, RRPE-65 넉아웃 마우스, 튜비-유사 마우스, RCS 래트, 고양이 (아비시니아 고양이), 및 개 (원추 세포 변성 "cd" 개, 진행성 간상체-원추체 변성 "prcd"개, 초기 망막 변성 "erd" 개, 간상체-원추체 이형성증 1, 2 및 3 "rcd1, rcd2 및 rcd3" 개, 광수용기 이형성증 "pd" 개, 및 브리아르 (Briard) "RPE-65" (개)를 포함하는 망막 색소 변성증의 다양한 다른 동물 모델에서 수행할 수 있다. 평가는 형광 혈관 조영술, 조직학적 방법 (광수용기 회복이 있든지 없든지간에) 및 가능하게는 FRG를 사용하여 수행한다. 식균 작용 (광수용기 단편), 비타민 A 대사 작용, 밀집 연접부 전도성, 및 전자 현미경을 포함하여, 기능 시험도 실시한다.

[0092] **실시예 8**

[0093] *인간 배-유래 세포로부터의 RPE 세포의 직접적 분화*

[0094] 영양세포층(trophectoderm)을 제거하기 위하여 면역 절제술을 행하거나 행하지 않고 뮤린 또는 병아리 배 섬유모세포의 존재 하에 인간 배반포기 배를 플레이팅하거나 이를 세포외 매트릭스 단백질-코팅된 조직 배양 용기 상에 직접 플레이팅한다. 이 세포를 배양 및 계대하여 인간 ES 세포주를 생성하는 대신, 세포를 직접 분화시킨다.

[0095] hEDC 세포 배양물을 LIF, FGF 및 플라스마네이트의 부재 하에 MEF 상에서 과다 성장시킬 경우, 이들은 두꺼운 다중층의 세포를 형성한다 (당업계의 숙련자에게 공지되어 있는 바와 같이 택일적 성장 인자, 배지, 및 FBS를 사용하여 직접적 분화가 교대로 일어나게 할 수 있음). 약 6주 후, 보다 큰 클러스터 내에서 어두운 세포 섬이 나타난다. 이러한 어두운 세포는 육안으로 용이하게 보이며 도 5B에 예시되어 있는 바와 같이 세포 플레이트에

서 "주근깨"처럼 보인다. 보다 높은 배율에서 이 섬은 세포질에서 갈색 색소를 갖는, 전형적인 상피 세포의 조약돌형 단일층 내에 밀집되게 패킹된 다각형 세포로 나타난다 (도 5A). 세포 내의 색소의 양은 차이가 있으며 섬의 중앙부의 세포에 가장 많은 색소가 있고 에지에 가까운 세포에 가장 적은 색소가 있다 (도 5B).

[0096] hEDC 세포를 직접 분화시킬 경우, 이들은 전형적으로는 배상체 (EB)를 형성하지 않지만, 배상체 (EB)를 형성할 수도 있다. 색소 침착된 상피 세포는 처음 6-8주 후에 상기의 분화된 세포 및/또는 EB 중 약 1-2%에서 나타난다. 시간이 지남에 따라 더욱 더 많은 EB가 색소 침착 세포를 발달시키며, 3개월째에는 거의 모든 EB가 색소 침착 상피 세포 영역을 갖는다. EB의 색소 침착 영역에서의 세포의 형태는 유착성 배양물의 형태와 매우 유사하였다.

[0097] *재료 및 방법:*

[0098] MEF 배지: 2mM GlutaMAXI, 및 500 u/ml의 페니실린, 500 ㎍/ml의 스트렙토마이신 (모두 Invitrogen제) 및 16% FCS (HyClone)가 보충된 고 글루코스 함량의 DMEM. hES 세포 성장용 배지: 500 u/ml의 페니실린, 500 ㎍/ml의 스트렙토마이신, 1%의 비필수 아미노산 용액, 2mM GlutaMAXI, 0.1 mM 베타-메르캅토에탄올, 4 ng/ml의 bFGF (Invitrogen), 1-ng/ml의 인간 LIF (Chemicon, 미국 캘리포니아주 네메쿨라 소재), 8.4%의 혈청 대체물 (SR, Invitrogen) 및 8.4%의 플라스마네이트 (Bayer)가 보충된 넉아웃용 고 글루코스 함량 DMEM. 유도용 배지는 성장용 배지와 비교하여 보다 낮은 농도의 SR 및 플라스마네이트 (각각 4.2%)와 8.4%의 FCS 및 2x 농도의 인간 LIF 및 bFGF를 포함하는 것을 배제하고는 성장용 배지와 동일한 성분을 함유한다. EB 배지: bFGF, LIF, 및 플라스마네이트를 배제하고는 성장용 배지와 동일하며; SR 농도는 13%였다. RPE 배지: 50%의 EB 배지 및 50%의 MEF 배지.

[0099] *hES 세포주*

[0100] 본 연구에 사용한 세포주 hES 35, 36, 45은 이전에 보고된 절차의 변형 절차로 유도하였다 (Thomson et. al., 1998, Reubinoff et. al., 2000, Lanzendorf et. al., 2001). 인간 냉동 배반포 (hES35 주) 또는 절단된 배 (hES36 주 및 hES45 주)는 수정 치료가 완료된 커플이 두 기관 심사 위원회에 의해 승인된 연구에 기증하였다.

[0101] 분화 시험은 유착성 hES 세포 또는 배상체 (EB)를 이용하여 수행하였다. 유착 분화에 있어서, hES 세포는 hES 콜로니에서 그의 밀집 가장자리가 손실될 때까지 MEF 상에서 과다 성장시켰으며, 이 시점에서 배양용 배지를 EB 배지로 대체하였다 (일반적으로, 계대한지 8-10일 후). 배지는 매 1-2일에 교환하였다. EB 형성에 있어서, hES 세포를 트립신으로 처리하고 저 유착성 플레이트 (Costar) 상에서 EB 배지 중에 배양하였다.

[0102] *면역염색*

[0103] 세포를 2% 파라포름알데히드로 고정시키고, 세포내 항원의 국소화를 위하여 0.1% NP-40을 투과시키고, PBS (Invitrogen) 중 10% 염소 혈청, 10% 당나귀 혈청 (Jackson Immunoresearch Laboratories, 미국 펜실베니아주 웨스트 그로브 소재)으로 1시간 이상 동안 차단하였다. 일차 항체와 함께 인큐베이션하는 것은 4℃에서 하룻밤 실시하였으며, 이차 항체 (Jackson Immunoresearch Laboratories, 미국 펜실베니아주 웨스트 그로브 소재)를 1시간 동안 첨가하였다. 모든 인큐베이션 사이에는 표본을 PBS 중 0.1% 트윈-20 (Sigma)으로 3-5회 세척하였으며, 각각의 세척은 10-15분간 하였다. 표본은 DAPI가 있는 Vectashield (Vector Laboratories, 미국 캘리포니아주 벌린게임 소재)를 사용하여 적재하고 형광 현미경 (Nikon) 하에서 관찰하였다. 간 세포로의 알칼리 포스파타제의 국소화는 Vector Red (Vector Laboratories, 미국 캘리포티아주 벌린게임 소재)에 의해 또는 제조업자의 지시에 따라 면역염색 동안의 두번째 세척 후에 행하였다. 사용한 항체: 베스트로핀 (Novus Biologicals, 미국 콜로라도주 리틀톤 소재), 항-CRALBP 항체는 유니버시티 오브 와싱턴의 Saari 박사가 관대하게 증여한 것이었다. 이차 항체는 Jackson Immunoresearch Laboratories제였으며, 스트렙타비딘-FITC는 Amersham으로부터 구매하였다.

[0104] *RPE-유사 세포의 단리 및 계대*

[0105] EB 또는 hES 세포의 유착성 배양물은 PBS로 2회 헹구고 단일층이 느슨해질 때까지 37℃에서 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen)에서 인큐베이션하였다. 색소 침착 영역 유래의 세포를 유리 모세관으로 긁어내고, MEF 배지로 옮기고, 200X g에서 원심분리하고, 젤라틴-코팅된 플레이트에 RPE 배지 중에 플레이팅하였다. 배지는 세포가 부착된 후 (일반적으로 1-2일 후), 그리고 그 후 매 5-7일마다 교환하고, 세포를 0.05% 트립신/0.53mM EDTA (Invitrogen)를 이용하여 매 2-4주에 계대하였다.

[0106] *웨스턴 블롯 및 ELISA*

[0107] 샘플은 5% 메르캅토에탄올 및 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche)이 보충된 라에믈리 (Laemmli) 완충제 (Laemmli, 1970) 중에 제조하고, 5분 동안 끓이고 8-16%의 구배 겔 (Bio-Rad, 미국 캘리포니아주 헤라클레스 소재) 상으로 Mini-Protean 장치를 사용하여 로딩하고; 이 겔을 겔 당 25-30 mA로 러닝시키고 (runned); 단백질을 20볼트에서 하룻밤 0.2 니트로셀룰로오스 막 (Schleicher and Shull, 미국 뉴햄프셔주 킨 소재)으로 옮겼다. 블롯을 Ponceau Red (Sigma)로 잠시 염색시켜 밴드를 가시화하고, Milli-Q 물로 세척하고, 0.1 % TBST 중 5% 탈지유(Bio-Rad)로 1시간 동안 차단하였다. 베스트로핀, CRALBP 또는 PEDF에 대한 일차 항체 (Chemicon)를 2시간 동안 첨가하고 이어서 TBST로 15분 동안 3회 세척하고; 퍼옥시다제-콘쥬게이션된 이차 항체를 1시간 동안 첨가하고, 세척을 반복하였다. 블롯은 Super-Signal 시약을 포함하는 ECL 시스템 (Pierce)을 사용하여 검출하였다. PEDF ELISA는 제조업자의 프로토콜에 따라 PEDF ELISA 키트 (Chemicon)를 사용하여 세포 용해물 상에서 수행하였다.

[0108] *실시간 RT-PCR*

[0109] 전체 RNA는 2-단계 절차로 분화 중인 ES 배양물로부터 정제하였다. 조 RNA를 트리아졸 (Trizol) 시약 (Invitrogen)을 사용하여 단리하고 RNeazy 미니컬럼 (Qiagen) 상에서 추가로 정제하였다. 제조업자 (Qiagen)의 프로토콜에 따라 RPE65 검출을 위한 시판 프라이머 세트 (Assay on Demand # Hs00165642_ml, Applied Biosystems) 및 Quantitect Probe RT-PCR 시약 (Qiagen)을 사용하여 실시간 PCR로 RPE65 전사체의 수준을 모니터링하였다.

[0110] *미분화 hES 세포주의 유도 및 특성화*

[0111] 2명의 여성, 1명의 남성의 hES 세포주를 본 연구에 사용하였다. 이 hES 주의 유도에 대한 설명은 다른 곳에 보고되어 있다. 모든 주는 50회보다 많이 계대하였으며, 이 시간 동안 이들은 미분화 콜로니 형태, 고 알칼리 포스파타제 활성을 유지하며 Oct-4, SSEA-3, SSEA- 4, TRA I-60, 및 TRA I-81을 발현한다 (데이터는 예시되어 있지 않음). 두 주는 정상 핵형을 가지며 (hES36, hES35), 반면 hES45에서는 정상 및 이수체 (aneuploid) 소집단 둘 모두가 존재하였다. 시험관 내 및 기형종 둘 모두에서의 자발적 분화시, 모든 주는 하기의 3가지의 배엽 (germ layer) 마커를 발현하였다: 근육 액틴, 알파-태아 단백질 (fetoprotein) 및 튜뷸린 베타 III.

[0112] **실시예 9**

[0113] *엑스 비보 (ex vivo)에서 분화시킨 정상 분화 세포를 확인하기 위한 전사체 게놈학의 사용*

[0114] 전사체학 - hES-세포 유도체는 미래의 재생 의학에서 중요한 역할을 할 가능성이 있다. 기능 게놈학을 이용하여 접근될 수 있는 이러한 줄기 세포 유도체 및 기타 줄기 세포 유도체의 정성적 평가는 도전 중에 있다. 본 발명자들은 hES-RPE의 전사 프로필을 그의 생체 내 상대인 태아 RPE 세포에 대하여 비교하였는데, 상기 태아 RPE 세포는 이식 상의 가치에 대하여 광범하게 연구되었다. 이어서 둘 모두의 프로필을 이전에 공개된 인간 RPE 세포주에 대한 전사체학적 데이터 (Rogojina et. al., 2003)와 비교하였다.

[0115] 본 발명자들의 데이터 세트의 유전자 발현 프로필을 2종의 인간 RPE 세포주 (비-형질전환 ARPE-19 및 형질전환 D407, Rogojina et. al., 2003)와 비교하여 hES-RPE가 유사한 범용의 전사 프로필을 갖는지를 결정하였다. 모든 세포에서 발현되는 공통 세포 정비 유전자 (housekeeping genes)를 설명하기 위하여, 본 발명자들은 공통 세포 정비 유전자 및 상피 유전자가 배제되게 하고 RPE-특이적 유전자가 확인되게 하는 일반적인 상피 기원을 기초로 하는 대조로서 기관지 상피 세포 (bronchial epithelial cells) (BE, Wright et. al., 2004)와, 미분화 hES 세포 (H1 주, h1-hES,-- sato et. al., 2003)로부터의, 공용으로 입수가능한 Affymetrix 데이터 세트를 사용하였다.

[0116] hES-RPE, hES-RPE-TD, ARPE-19, D407 사이에는 유사성 및 차이가 있었다. 유사성은 hES-RPE/ARPE-19에는 존재하지만 BE에는 존재하지 않는 유전자들 (1026개의 유전자) 사이의 배타적 공통성 (exclusive intersection)을 분석함으로써 추가로 입증하였다. 배경을 설명하기 위하여, 본 발명자들은 이것을 BE/hES-RPE에는 존재하지만 ARPE-19에는 존재하지 않는 유전자 (186개의 유전자)의 배타적 공통성과 비교하였는데, 이는 BE와 비교할 경우 hES-RPE 및 ARPE-19에서 유사성이 5 내지 6배 더 컸다. D407/ARPE19는 RPE 특이적 유전자, 예를 들어 RPE65, 베스트로핀, CRALBP, PEDF를 상실하는 것으로 나타났는데, 이는 장기간 계대된 세포에 전형적인 것이다 (도 6). 추가의 데이터 분석에 의하면, 공지된 RPE 특이적인 존재학적 특성, 예를 들어 멜라닌 생합성, 시력, 레티놀 결합이 태아 RPE 및 ES-RPE에서만 나타나고 ARPE19에서는 그러하지 아니하다는 것이 나타났다.

[0117] hES-RPE, ARPE-19 및 D407을 그의 생체 내 상대인 신선하게 단리된 인간 태아 RPE (feRPE)와 비교하면 본 발명자들의 이전 데이터와 일치하였는데, 이는 hES-RPE의 인간 feRPE에 대한 전사의 동일함이 feRPE에 대한 D407 (2.3배의 차이- 849개의 유전자/373개의 유전자) 및 feRPE에 대한 ARPE-19 (1.6배의 차이- 588개의 유전자/364개의 유전자)보다 유의하게 더 크다는 것을 입증하는 것이다 (도 5c/5d). 상기에서 확인된 RPE 특이적 마커는 hES-RPE에서만 존재하였으며 ARPE-19 또는 D407에서는 존재하지 않았고, 또한 feRPE에서는 존재하였는데, 이는 hES-RPE가 배양된 RPE 주보다 그의 생체 내 상대에 대한 유사성이 더 높다는 것을 입증하는 것이다.

[0118] hES-RPE에 존재하는 700개 및 84개의 유전자는 feRPE 및 ARPE-19 데이터 세트에는 존재하지 않았다. "줄기 세포성 (stemness)" 유전자의 보유는, 환자 내로 이식될 경우의 hES 유도체의 악성 기형종으로의 형질전환을 잠재적으로 야기할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 현재 이용가능한 Affymetrix 마이크로어레이 데이터 세트를 사용하여 보존성의 잠재적인 "줄기 세포성" 유전자 데이터를 생성하였다 (Abeyta et. al. 2004 Sato 2003). 이것에 의해 모든 12개의 데이터 세트 (공통 세포 정비 유전자를 포함함)에 존재하는 3806개의 유전자의 목록을 생성한다. hES-RP에는 존재하지만 feRPE-ARPE-19에는 존재하지 않는 784개의 유전자 중 36개의 유전자만이 3806개의 잠재적인 줄기 세포성 유전자에 공통적인 것이었다. 이들 중 어느 것도 공지된 줄기 세포성 유전자, 예를 들어 Oct4, Sox2, TDGF1이 아니었다.

[0119] **실시예 10**

[0120] *파킨슨병의 치료에 있어서의 RPE 세포의 사용*

[0121] hRPE는 L-DOPA를 분비하기 때문에 이를 파킨슨병의 세포 치료법에 있어서의 대안적인 세포 공급원으로 사용할 수 있다. 연구에 의하면, 젤라틴-코팅된 미세담체에 부착된 그러한 세포는 반신파킨슨 (hemiparkinsonian) 원숭이에서 성공적으로 이식되고 주목할 만한 개선을 생성할 수 있으며 (10000-50000개의 세포/표적) 2000년에 시작된 FDA-승인 시험에서 환자들은 부작용 없이 hRPE 선조체내 이식체를 수여받았다. hES 세포 유래의 RPE의 사용에 대한 다수의 장점 중 하나는 이것이 공여 안조직의 부족을 회피한다는 것이다. 또한 이것은 유전자 치료법의 이용을 용이하게 한다.

[0122] 기타 실시 형태

[0123] 전술한 상세한 설명으로부터, 본원에 기술되어 있는 본 발명에 변형 및 변경을 가하여 본 발명을 다양한 용도 및 상태에 맞추어서 바꿀 수 있다는 것이 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1A-F는 자발적으로 분화하는 hES 세포에 있어서 색소 침착 지역 (RPE 세포의 특징)의 출현을 도시하는 일련의 사진이다. 도 1A는 스캐닝된 6-웰 플레이트의 웰의 2.5개월령의 유착성 배양물 중의 색소 침착 영역의 사진이며; 도 1B는 45x 배율의, 2.5개월령의 EB로 배양된 배양물에서의 색소 침착 영역의 사진이며; 도 1C는 유착성 배양물의 색소 침착 지역의 사진이며; 도 1D는 EB 배양된 배양물의 색소 침착 영역의 사진이며; 도 1E는 x200의, 배양물의 색소 침착 영역과 나머지 사이의 경계의 사진이며; 도 F는 x400 배율인 것을 배제하고는 도 E와 동일하다. 도 A 및 B의 화살표는 색소 침착 영역을 가리킨다.

[0036] 도 2A-F는 배양 중의 상피 형태 및 색소 침착의 손실과 회복을 예시하는 일련의 사진이다. 도 2A는 1주에서의 일차 EB 생육을 예시하는 사진이며; 도 2B는 트립신에 의해 단리된 일차 세포 배양물을 예시하는 사진이며; 도 2C는 증식 세포로 둘러싸인 상피 섬을 예시하는 사진이며; 도 2D는 1개월령의 배양 중의 상피 형태 및 색소 침착의 회복을 예시하는 사진이며; 도 2E는 3회 계대 후 배양물을 예시하는 x200 배율의 사진이며; 도 2F는 E에서와 동일한 배양물로서, Hoffman 현미경으로 x400 배율의 것을 예시한다. 흑색 화살표는 색소 침착 세포를 가리키며, 백색 화살표는 색소를 포함하지 않는 생육 세포를 나타낸다.

[0037] 도 3의 좌측 패널 (A-D) 및 우측 패널은 일련의 사진들과 하나의 그래프인데, 이들은 hES 세포 유래의 색소 침착 상피 세포에서의 RPE의 마커를 예시한다. 도 3A 및 3B는 RPE 마커, 베스트로핀의 면역국소화 및 x200 배율의 상응하는 위상 현미경 시계를 예시하는 사진이다. 도 3C 및 3D는 CRALBP 및 x400 배율의 상응하는 위상차 현미경 시계를 예시하는 사진이다. 화살표는 베스트로핀 (A) 및 CRALBP (C)의 색소 침착 세포 (C, D)에의 동시 국소화를 나타내며; 화살표는 색소 비침착 영역 (C, D)에서의 상기 단백질의 염색의 부재 (A, B)를 나타낸다.

[0038] 도 3의 우측 패널은 베스트로핀 (a) 및 CRALBP (b)에 대한 항체를 이용한 세포 용해물 (36번 hES 주)의 웨스턴 블롯의 그래프 및 사진을 예시하며; c,d - 미분화 hES 세포, c--항-CRALBP 항체에 대한 대조, d--항-베스트로핀

항체에 대한 대조를 나타낸다.

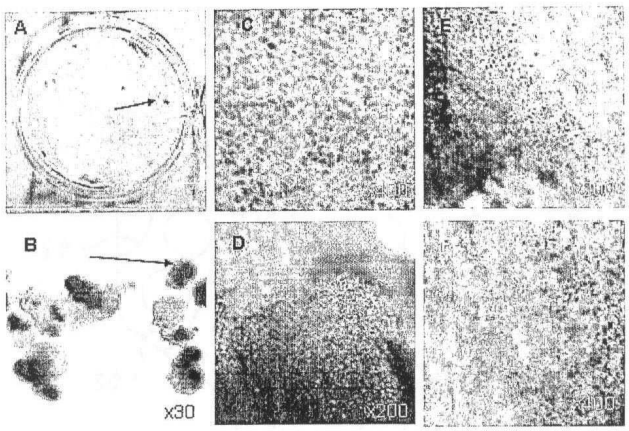
[0039] 도 4는 장기간 휴지 배양물 중의 RPE-유사 세포에서의 Pax6 (도 4A), Pax2 (도 4E) 및 mitf (도 4B, 도 4F)의 마커의 발현을 입증하는 사진을 예시한다. 도 4C, 도 4G - 위상차 현미경, 도 4D, 도 4H - Pax6/mitf/위상차 현미경 (도 4A, 도 4B, 도 4C) 및 Pax2/mitf/위상차 현미경 (도 4E, 도 4F, 도 4G)의 병합 이미지.

[0040] 도 5A-B는 인간 배 유래 세포의 배양물에서의 RPE 분화의 사진을 예시하는데, 이것은 ES 세포주의 유래 단계를 우회한다.

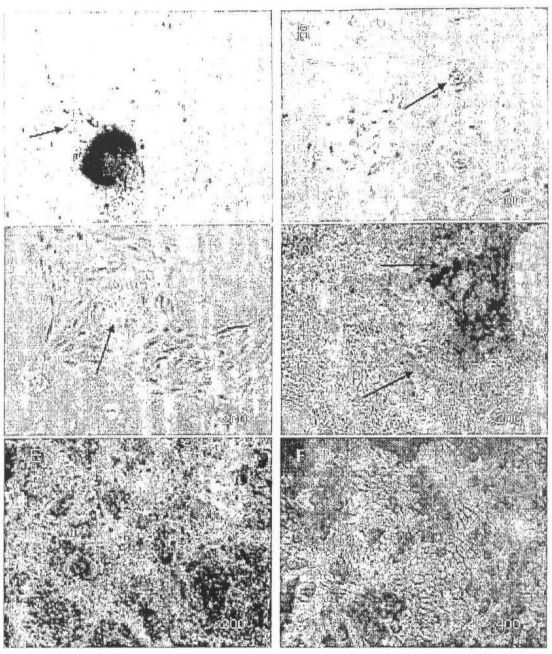
[0041] 도 6은 RPE 제제의 전사 단계에서의 비교를 도시한다. 도 6A-F - 존재론적 주석을 기초로 하면, 이 표는 hES-세포 유래 망막 색소 상피 (hES-RPE), hES 세포 유래 트랜스분화된 (hES-RPE-TD), ARPE-19 및 D407과, 신선하게 단리된 인간 RPE (fe-RPE)에 있어서의 RPE 관련 유전자의 발현 패턴을 나타낸다. 도 6G - 추가로 데이터를 분석해 보면, 멜라닌 생합성, 시력, 레티놀-결합과 같은 공지된 RPE 특이적인 존재론적 특성이 태아 RPE 및 ES-RPE에만 나타나고 ARPE-19에서는 나타나지 않음이 나타났다.

도면

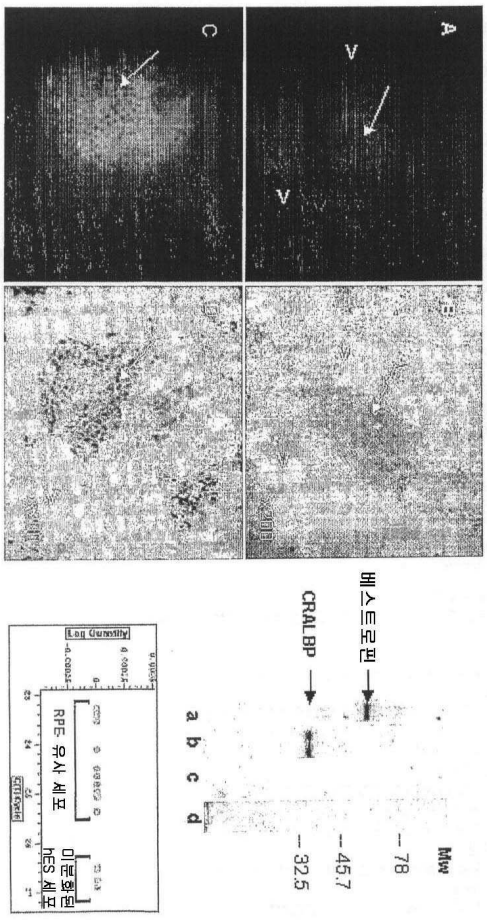
도면1



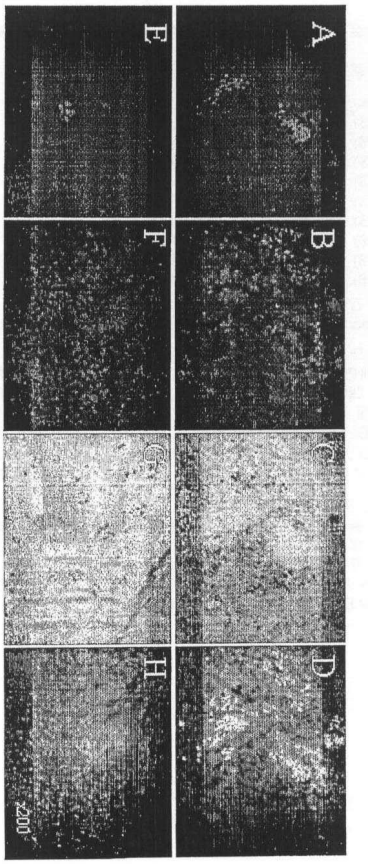
도면2



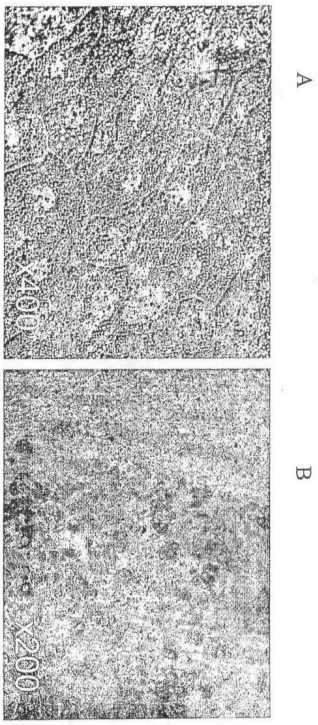
도면3


A
V
V
C
Mw
78
45.7
32.5
베스트로핀
CRALBP
a b c d
Log Quantity
RPE 유사 세포
미분화된 hES 세포

도면4



도면5



도면6A

배아-RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
베스트로핀	베스트로핀	-	-	베스트로핀
카텝신 D	카텝신 D	카텝신 D	카텝신 D	카텝신 D
클러스테린-유사 1 (망막)	클러스테린-유사 1 (망막)	-	-	-
-	세포 레틴산 결합 단백질 1	-	-	-
시스타틴 C	시스타틴 C	시스타틴 C	시스타틴 C	시스타틴 C
수정체 내인성 막 단백질 2, 19 kDa	수정체 내인성 막 단백질 2, 19 kDa	-	-	-
레시틴 레티놀 아실트랜스퍼라제 (포스파티딜콜린-레티놀 O-아실트랜스퍼라제)	레시틴 레티놀 아실트랜스퍼라제 (포스파티딜콜린-레티놀 O-아실트랜스퍼라제)	-	-	-
소안구증-관련 전사 인자	소안구증-관련 전사 인자	소안구증-관련 전사 인자	소안구증-관련 전사 인자	소안구증-관련 전사 인자
-	NCAM1	-	-	NCAM1
NCAM2	NCAM2	NCAM2	-	-
안구 발달-관련 유전자	안구 발달-관련 유전자	안구 발달-관련 유전자	안구 발달-관련 유전자	안구 발달-관련 유전자
제II형 안피부성 알비니즘 (빨간 눈 다일루션 호몰로그, 마우스)	제II형 안피부성 알비니즘 (빨간 눈 다일루션 호몰로그, 마우스)	-	-	-
옵신 3	옵신 3	옵신 3	옵신 3	옵신 3
-		PAX4	-	-

도면6B

배아-RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
PAX6	PAX6	PAX6		PAX6
PAX8	PAX8	PAX8	PAX8	PAX8
PEDF	PEDF			PEDF
포스듀신-유사	포스듀신			
	프로미닌 1			
망막 G 단백질 커플링된 수용체	망막 G 단백질 커플링된 수용체			
망막 외부 절편 막 단백질 1	망막 외부 절편 막 단백질 1		망막 외부 절편 막 단백질 1	
	망막 색소 상피 유래 로돕신 호몰로그			
				로돕신
망막 색소 상피 특이적 단백질 65 kDa	망막 색소 상피 특이적 단백질 65 kDa			
레틴알데히드 결합 단백질 1	레틴알데히드 결합 단백질 1			
레티놀 데히드로게나제 5 (11-시스 및 9-시스)	레티놀 데히드로게나제 5 (11-시스 및 9-시스)			
SOX10	SOX10			
SOX11	SOX11			SOX11
SOX12	SOX12	SOX12	SOX12	SOX12
		SOX13	SOX13	
SOX15			SOX15	

도면6C

배아-RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
SOX17	SOX17		SOX17	
SOX4	SOX4	SOX4	SOX4	SOX4
SOX9	SOX9	SOX9		SOX9
트랜스타이레틴	트랜스타이레틴			
	시각계 호메오박스 1 호몰로그, CHX10-유사 (제브라피시)			시각계 호메오박스 1 호몰로그, CHX10-유사 (제브라피시)
레트리큘로칼빈 1, EF-핸드 칼슘 결합 도메인	레트리큘로칼빈 1, EF-핸드 칼슘 결합 도메인	레트리큘로칼빈 1, EF-핸드 칼슘 결합 도메인	레트리큘로칼빈 1, EF-핸드 칼슘 결합 도메인	레트리큘로칼빈 1, EF-핸드 칼슘 결합 도메인
레트리큘로칼빈 2, EF-핸드 칼슘 결합 도메인	레트리큘로칼빈 2, EF-핸드 칼슘 결합 도메인	레트리큘로칼빈 2, EF-핸드 칼슘 결합 도메인	레트리큘로칼빈 2, EF-핸드 칼슘 결합 도메인	레트리큘로칼빈 2, EF-핸드 칼슘 결합 도메인
		레티큘론 1		
레티큘론 2	레티큘론 2	레티큘론 2	레티큘론 2	레티큘론 2
레티큘론 3	레티큘론 3	레티큘론 3	레티큘론 3	레티큘론 3
레티큘론 4	레티큘론 4	레티큘론 4	레티큘론 4	레티큘론 4
망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 2	망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 2	망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 2	망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 2	망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 2
망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 3	망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 3	망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 3		망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 3

도면6D

배아-RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 4	망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 4	망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 4	망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 4	망막 단쇄 데히드로게나제/리덕타제 4
망막 색소 변성증 2 (X-연관 열성)	망막 색소 변성증 2 (X-연관 열성)	망막 색소 변성증 2 (X-연관 열성)	망막 색소 변성증 2 (X-연관 열성)	망막 색소 변성증 2 (X-연관 열성)
망막 색소 변성증 GTPase 조절자	망막 색소 변성증 GTPase 조절자	망막 색소 변성증 GTPase 조절자		
		망막 색소 변성증 GTPase 조절자 상호작용 단백질 1	망막 색소 변성증 GTPase 조절자	
망막모세포종 1 (골육종 포함)	망막모세포종 1 (골육종 포함)	망막모세포종 1 (골육종 포함)	조절자 상호작용 단백질 1	
		망막모세포종-유사 1 (p107)	망막모세포종 1 (골육종 포함)	망막모세포종 1 (골육종 포함)
망막모세포종 결합 단백질 1	망막모세포종 결합 단백질 1	레티놀 결합 단백질 1, 세포성	망막모세포종-유사 1 (p107)	
망막모세포종 결합 단백질 1-유사 1	망막모세포종 결합 단백질 1-유사 1	망막모세포종 결합 단백질 1-유사 1	망막모세포종 결합 단백질 1	망막모세포종 결합 단백질 1, 세포성
망막모세포종 결합 단백질 2	망막모세포종 결합 단백질 2	망막모세포종 결합 단백질 2	망막모세포종 결합 단백질 1-유사 1	망막모세포종 결합 단백질 1-유사 1
망막모세포종 결합 단백질 4	망막모세포종 결합 단백질 4	망막모세포종 결합 단백질 4	망막모세포종 결합 단백질 2	망막모세포종 결합 단백질 2
망막모세포종 결합 단백질 5		망막모세포종 결합 단백질 5	망막모세포종 결합 단백질 4	망막모세포종 결합 단백질 4

도면6E

배아-RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
망막모세포종 결합 단백질 6	망막모세포종 결합 단백질 6	망막모세포종 결합 단백질 6	망막모세포종 결합 단백질 5	
망막모세포종 결합 단백질 7	망막모세포종 결합 단백질 7	망막모세포종 결합 단백질 7	망막모세포종 결합 단백질 6	망막모세포종 결합 단백질 6
망막모세포종 결합 단백질 8	망막모세포종 결합 단백질 8	망막모세포종 결합 단백질 8	망막모세포종 결합 단백질 7	망막모세포종 결합 단백질 7
	망막모세포종 결합 단백질 9		망막모세포종 결합 단백질 8	망막모세포종 결합 단백질 8
망막모세포종-관련 인자 600	망막모세포종-관련 인자 600	망막모세포종-관련 인자 600		망막모세포종 결합 단백질 9
망막모세포종-관련 인자 140	망막모세포종-관련 인자 140	망막모세포종-관련 인자 140	망막모세포종-관련 인자 600	망막모세포종-관련 인자 600
망막모세포종-유사 2 (p130)	망막모세포종-유사 2 (p130)	망막모세포종-유사 2 (p130)	망막모세포종-관련 인자 140	망막모세포종-관련 인자 140
		레틴산- 및 인터페로노-유도성 단백질 (58 kD)	망막모세포종-유사 2 (p130)	망막모세포종-유사 2 (p130)
	레틴산 유도형 1		레틴산- 및 인터페로노-유도성 단백질 (58 kD)	
		레틴산 유도형 3		레틴산 유도형 1
레틴산 유도형 14	레틴산 유도형 14	레틴산 유도형 14	레틴산 유도형 3	레틴산 유도형 3
레틴산 유도형 16	레틴산 유도형 16	레틴산 유도형 16	레틴산 유도형 14	레틴산 유도형 14
레틴산 유도형 17	레틴산 유도형 17	레틴산 유도형 17	레틴산 유도형 16	레틴산 유도형 16

도면6F

배아-RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
	레틴산 유도형 2		레틴산 유도형 17	레틴산 유도형 17
레틴산 수용체 응답자 (타자로텐 유도형) 2				
	레틴산 수용체 응답자 (타자로텐 유도형) 3	레틴산 수용체 응답자 (타자로텐 유도형) 3	레틴산 수용체 응답자 (타자로텐 유도형) 3	
레틴산 수용체, 베타	레틴산 수용체, 베타		레틴산 수용체, 알파	레틴산 수용체, 알파
	레틴산 수용체, 알파		레틴산 수용체, 베타	레틴산 수용체, 베타
레틴산 억제성 단백질	레틴산 억제성 단백질	레틴산 억제성 단백질	레틴산 억제성 단백질	레틴산 억제성 단백질
레티노이드 X 수용체, 알파	레티노이드 X 수용체, 알파	레티노이드 X 수용체, 알파	레티노이드 X 수용체, 알파	레티노이드 X 수용체, 알파
레티노이드 X 수용체, 베타	레티노이드 X 수용체, 베타	레티노이드 X 수용체, 베타	레티노이드 X 수용체, 베타	레티노이드 X 수용체, 베타
레티놀 결합 단백질 1, 세포성	레티놀 결합 단백질 1, 세포성			레티놀 결합 단백질 1, 세포성
레티놀 데히드로게나제 11 (모두-트랜스 및 9-시스)	레티놀 데히드로게나제 11 (모두-트랜스 및 9-시스)	레티놀 데히드로게나제 11 (모두-트랜스 및 9-시스)	레티놀 데히드로게나제 11 (모두-트랜스 및 9-시스)	레티놀 데히드로게나제 11 (모두-트랜스 및 9-시스)
레티놀 데히드로게나제 14 (모두-트랜스 및 9-시스)	레티놀 데히드로게나제 14 (모두-트랜스 및 9-시스)	레티놀 데히드로게나제 14 (모두-트랜스 및 9-시스)	레티놀 데히드로게나제 14 (모두-트랜스 및 9-시스)	레티놀 데히드로게나제 14 (모두-트랜스 및 9-시스)
				망막 분리증 (X-연관, 연소성(juvenile)) 1

도면6G

멜라닌 생합성	망막 색소 변성증	시력	레티놀 결합
도파크롬 토토머라제 (도파크롬 델타-이소머라제, 티로신-관련 단백질 2)	망막 외부 절편 막 단백질 1	망막 외부 절편 막 단백질 1	망막 외부 절편 막 단백질 1
도파크롬 토토머라제 (도파크롬 델타-이소머라제, 티로신-관련 단백질 2)	c-mer 원암 티로신 키나제	c-mer 원암 티로신 키나제	트랜스타이레틴 (프리알부민, 제I형 아밀로이드증)
티로시나제 (안피부성 알비니즘 IA)	레틴알데히드 결합 단백질 1	레틴알데히드 결합 단백질 1	
실버 호몰로그 (마우스)	망막 G 단백질 커플링된 수용체	망막 G 단백질 커플링된 수용체	
막 관련 수송자	망막 색소 상피 특이적 단백질, 65 kDa	망막 색소 상피 특이적 단백질, 65 kDa	
막 관련 수송자		난황형 황반부 이영양증 (베스트병, 베스트로핀)	
		레티놀 데히드로게나제 5 (11-시스 및 9-시스)	
		막 관련 수송자	