



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월11일

(11) 등록번호 10-2263956

(24) 등록일자 2021년06월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01) **A61K 35/30** (2015.01)
A61K 9/00 (2006.01) **C12N 5/0797** (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/062 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7029814
(22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 2019년03월14일
- (85) 번역문제출일자 2015년10월15일
(65) 공개번호 10-2016-0002779
(43) 공개일자 2016년01월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/029790
(87) 국제공개번호 WO 2014/145108
국제공개일자 2014년09월18일
- (30) 우선권주장
61/793,168 2013년03월15일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
Proc Natl Acad Sci U S A. 106(39):16698-703
(2009.09.29.)*
Stem Cells. 30(4):673-86 (2012.04.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

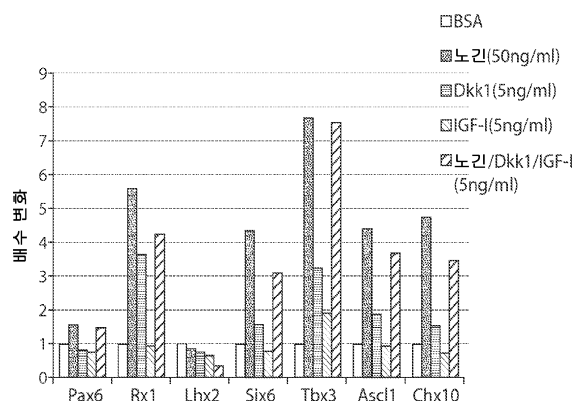
- (73) 특허권자
아스텔라스 인스티튜트 포 리제너러티브 메디슨
미국 01752 매사추세츠주 말보로우 로크 드라이브 33
- (72) 발명자
란자 로버트 피.
미국 01510 매사추세츠주 클린턴 사우쓰 메도우 로드 35
루 시지앙
미국 01545 매사추세츠주 슈루즈버리 베가 드라이브 22
왕 웨이
미국 02467 매사추세츠주 체스넛 힐 손턴 로드 31
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 26 항

심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 **만능 줄기 세포로부터 제조된 광수용기 및 광수용기 전구체****(57) 요약**

본 발명은 만능 줄기 세포로부터 광수용기 세포 및 광수용기 전구체 세포의 생성을 위한 방법을 제공한다. 부가적으로, 광수용기 세포의 조성물 및 광수용기 세포를 비롯하여, 이의 치료적 사용 방법을 제공한다. 예시적인 방법은 광수용기 세포의 실질적으로 순수한 배양 및/또는 광수용기 세포를 생성시킬 수 있다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

A61K 9/0051 (2013.01)

C12N 5/0623 (2013.01)

C12N 2506/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

광수용기 전구체 세포의 조제물로서,

다수의 광수용기 전구체 세포, 및

광수용기 전구체 세포의 생존도를 유지하기 위한 매체

를 포함하며, 조제물 내 세포의 90% 초과는 면역세포화학적으로 PAX6+ 및 CHX10-이고, qPCR로 검출시 MASH1에 대한 mRNA 전사물 양성인 조제물.

청구항 2

제1항에 있어서, 다수의 광수용기 전구체 세포는 만능 줄기 세포, 망막 신경절 세포, 성숙한 광수용기, 및 아마 크린 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이 없는 것인 조제물.

청구항 3

포유동물 환자에서 사용하기 위한 광수용기 전구체 세포의 약학 조제물로서,

(a) 다수의 광수용기 전구체 세포로서, 조제물 내 세포의 90% 초과가 면역세포화학적으로 PAX6+ 및 CHX10-이고, qPCR로 검출시 MASH1에 대한 mRNA 전사물 양성인 광수용기 전구체 세포; 및

(b) 포유동물 환자로의 이식을 위해 광수용기 전구체 세포의 생존도를 유지하기 위한 약학적 허용가능한 담체를 포함하는 조제물.

청구항 4

10⁹ 개 이상의 광수용기 전구체 세포(PRPC)를 포함하는 극저온(cryogenic) 세포 조제물로서,

(a) 다수의 광수용기 전구체 세포로서, 조제물 내 세포의 90% 초과가 면역세포화학적으로 PAX6+ 및 CHX10-이고, qPCR로 검출시 MASH1에 대한 mRNA 전사물 양성인 광수용기 전구체 세포; 및

(b) 해동시 광수용기 전구체 세포의 생존도를 유지하기 위한 냉동보존제

를 포함하는 조제물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 만능 줄기 세포에서 유래되는 것인 조제물.

청구항 6

제5항에 있어서, 만능 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포 및 유도 만능 줄기 세포로 이루어진 군에서 선택되는 것인 조제물.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 인간 세포인 조제물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포의 50% 이상은 qPCR로 검출시 Nr2e3, Tr β 2, ROR β 및 NRO에 대한 mRNA 전사물 양성인 조제물.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 분비된 단백질의 면역분석법에 의하거나 또는 mRNA 전사물 수준의 qPCR에 의한 검출시, uPA, 테나신-C, CXCL16, CX3CL1 및 키티나아제 3 유사-1에서 선택된 하나 이상의 마커를, 망막 신경 전구체 세포에 비해 2배 이상 더 발현하는 것인 조제물.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 세포 배양에서 20회 이상의 집단 배가 (population doubling)를 겪는 복제 능력을 갖고, 세포의 25% 미만은 20번째 배가까지 세포 사멸, 노화 또는 표현형적으로 비광수용기 세포로의 분화를 겪는 것인 조제물.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 트랜스페린 단백질 또는 트랜스페린 mRNA 수준이 각각 글리세르알데히드 3-포스페이트 데히드로게나아제 단백질 또는 mRNA 수준보다 25% 이상 낮은 것인 조제물.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 HLA-유전자형적으로 동일한 것인 조제물.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 게놈적으로 동일한 것인 조제물.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 평균 말단 제한 절편 길이(TRF)가 8 kb보다 긴 것인 조제물.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 (i) 세포 주기 조절 및 세포 노화, (ii) 세포 에너지, 지질 대사, 또는 둘다, 및 (iii) 아포토시스 중 하나 이상에 관여된 단백질의 함량, 효소 활성, 또는 둘다가, 태아 유래된 광수용기에 비해 통계적으로 유의하게 감소된 것인 조제물.

청구항 16

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 세포골격 구조 및 이와 관련된 세포 역학에 관여된 단백질의 함량, 효소 활성, 또는 둘다가, 태아 유래된 광수용기에 비해 통계적으로 유의하게 증가된 것인 조제물.

청구항 17

제3항에 있어서, 인간외 수의학적 환자(non-human veterinarian patient)에게 투여하기 위해 사용되는 조제물.

청구항 18

제5항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 공통 만능 줄기 세포 공급원으로부터 분화되는 것인 조제물.

청구항 19

제1항에 있어서, 광수용기 전구체 세포의 생존도를 유지하기 위한 매체는 배양 배지, 냉동보존제, 및 인간 환자에게 주사하기 위한 생체적합성 주사 매체로 이루어진 군에서 선택되는 것인 조제물.

청구항 20

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 간상체 및 추상체 둘다로 분화되는 가소성을 유지하는 것인 조제물.

청구항 21

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는, ELOVL4-TG2 마우스의 망막하 공간 내로의 이식시, 외부 유핵층으로 이동하여 ELOVL4-TG2 마우스에서 암소시 및 명소시 ERG 반응을 개선시키는 것인 조제물.

청구항 22

제3항에 있어서, 발열원-무함유 및 마이코젠(mycogen)-무함유인 조제물.

청구항 23

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 식세포 활성화, 경우에 따라, 단리된 광수용기 외절, pHrodo™ Red E. coli BioParticles 또는 둘다를 식세포 작용하는 능력을 갖는 것인 조제물.

청구항 24

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 광수용기 전구체 세포는 하나 이상의 신경보호 인자를 분비하는 것인 조제물.

청구항 25

제3항에 있어서, 환자에서 광수용기의 소실로 인해 야기된 질환 또는 장애를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 약학 조제물.

청구항 26

제25항에 있어서, 방법은 환자의 망막하 공간 내에 약학 조제물을 주사하는 단계를 포함하는 것인 약학 조제물.

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2013년 3월 15일 출원된 "만능 줄기 세포로부터 생성된 광수용기 및 광수용기 전구체"의 명칭의 미국 가출원 제61/793,168호의 35 U.S.C. § 119(e)의 혜택을 청구하며, 이의 전체 내용을 참조하여 본원에 편입시킨다.

배경 기술

[0003] 망막 질환은 종종 유사분열 후 뉴런 세포의 소실로 인한 실명을 야기한다. 망막 질환 중에는 간상체 또는 추상체 이영양증, 망막 변성, 망막 색소변성증, 당뇨병성 망막병증, 황반 변성, 레버 선천성 흑내장 및 스타르가르트 질환이 있다. 대부분의 망막 변성에서, 세포 소실은 간상체 및 추상체 광수용기를 포함하는 외부 핵층에서 주로 일어난다. 유사분열 후 뉴런 세포 개체군이 소실되면, 광수용기 세포에 대한 대체물로서, 새로운 세포의 외래 공급원이 필요하다.

[0004] 광수용기 세포의 가능한 대체 공급원은 줄기 세포를 포함한다. 초기 연구에서는 소실된 광수용기를 대체하기 위한 가능한 세포 공급원으로서 마우스 세포, 마우스 줄기 세포 또는 망막 전구체 세포의 이중성 개체군의 사용을 도입하였다. 이들 초기 연구들은 생후 1일의 마우스 망막 유래 광수용기 선구체 세포의 이식(Maclaren *et al.* Nature 444(9):203-207, 2006), 마우스 배아 줄기 세포로부터 망막 선구체 세포의 시험관내 생성(Ikeda *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 102(32):11331-11336, 2005), 생후 1일 마우스 망막 유래 망막 전구체 세포의 생성(Klassen *et al.* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45(11):4167-4175, 2004), 망막 변성의 RCS 래트 모델에서 골수 간엽 줄기 세포의 이식(Inoue *et al.* Exp. Eye Res. 8(2):234-241, 2007), H1 인간 배아 줄기 세포주로부터, 신경절 세포, 아마크린 세포, 전체 세포 중 0.01%가 S-옵신 또는 로돕신을 발현한 광수용기, 양극 세포 및 수평 세포를 포함한, 망막 전구체 세포의 생산(Lamba *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 10(34):12769-12774, 2006) 및 망막 전구체 세포를 생산하기 위해 인간 섬유아세포로부터 유도 만능 줄기 세포(iPS)의 유도(Lamba *et al.* PLoS ONE 5(1):e8763. doi:10.1371/journal.pone.0008763)를 기술하였다. 이들 접근법 중 어떠한 것도 이식을 위한 광수용기 전구체 세포 또는 광수용기 세포의 균질한 개체군을 생성시키지 못하였다. 이들 접근법 중 어떠한 것도 생체내 간상체 또는 추상체 기능(예를 들면, 시력 향상을 부여하여 검출가능)을 보여주는 광수용기 전구체 세포 또는 광수용기 세포의 균질한 개체군을 생성시키지 못하였다. 광수용기 및 광수용기 전구체를 분리할 수 있는 도너-유래 조직(예컨대 사체, 태아 조직, 및 살아있는 동물)의 공급이 제한적이다. 줄기 세포는 시험관내에서 무한하게 증식 및 확장될 수 있어서, 인간 요법을 위한 비도너-유래 세포의 가능한 고갈되지 않는 공급원

을 제공한다. 광수용기 전구체 또는 광수용기의 균질한 개체군으로 줄기 세포의 분화는 망막 질환의 치료 및 이식을 위한 비도너 유래 세포의 풍부한 공급처를 제공할 수 있다.

발명의 내용

- [0005] 일정 실시양태에서, 본 발명은 다수의 광수용기 전구체 세포, 및 광수용기 전구체 세포의 생존도를 유지하는데 적합한 매체를 포함하는, 광수용기 전구체 세포의 실질적으로 순수한 조제물을 제공한다.
- [0006] 일정 실시양태에서, 본 발명은 적어도 50%의 광수용기 전구체 세포를 함유하는 다수의 세포, 및 광수용기 전구체 세포의 생존도를 유지하는데 적합한 매체를 포함하는, 광수용기 전구체 세포의 조제물을 제공한다.
- [0007] 일정 실시양태에서, 만능 줄기 세포, 망막 신경절 세포, 성숙한 광수용기, 및/또는 아마크린 세포가 실질적으로 없는, 즉, 이들 세포를 10% 미만으로, 보다 바람직하게는 5%, 2%, 1%, 0.1% 미만으로 또는 0.01% 미만의 안구 영역 만능 줄기 세포, 망막 신경절 세포, 성숙한 광수용기, 및/또는 아마크린 세포를 포함하는, 다수의 광수용기 전구체 세포; 및 광수용기 전구체 세포의 생존도를 유지하는데 적합한 매체를 포함하는, 광수용기 전구체 세포의 조제물을 제공한다.
- [0008] 일정 실시양태에서, 본 발명은 다수의 광수용기 전구체 세포; 및 포유동물 환자에 이식을 위해 광수용기 전구체 세포의 생존도를 유지하기 위한 약학적 허용가능한 담체를 포함하는, 포유동물 환자에서 사용하기 적합한 광수용기 전구체 세포의 약학 조제물을 제공한다.
- [0009] 일정 실시양태에서, 본 발명은 본 발명은 10^9 개 이상의 광수용기 전구체 세포, 및 광수용기 전구체 세포와 상용성이고 해동 후 이러한 세포의 생존도를 유지할 수 있는 냉동보존 시스템(cryopreservative system)을 포함하는 극저온(cryogenic) 세포 제조물을 제공한다.
- [0010] 상기 조제물의 바람직한 실시양태에서, 조제물 내 세포의 적어도 70%는 면역세포화학적으로 PAX6+ 및 CHX10-이고, (비록 경우에 따라서이지만) qPCR을 통해 검출시 MASH1에 대한 mRNA 전사물 양성이며, 보다 더 바람직하게는 조제물 내 세포의 적어도 80%, 90%, 95% 또는 98%가 면역세포화학적으로 PAX6+ 및 CHX10-이고, (비록 경우에 따라서이지만) qPCR로 검출시 MASH1에 대한 mRNA 전사물 양성이다.
- [0011] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포의 대부분은 qPCR을 통해 검출시 Nr2e3, Tr β 2, ROR β 및 NRO에 대한 mRNA 전사물 양성이다.
- [0012] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 분비된 단백질의 면역분석법에 의하거나 또는 mRNA 전사물 수준의 qPCR에 의한 검출시, uPA, 테나신-C, CXCL16, CX3CL1 및 키티나아제 3 유사-1에서 선택된 1 이상의 단백질이, 망막 신경 전구체 세포에 대해, 적어도 2배, 3배, 4배, 5배 또는 심지어 10배 더 발현된다.
- [0013] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 10번째, 20번째, 30번째, 50번째, 또는 심지어 100번째 배가(doubling)까지 세포 사멸, 노화 또는 표현형적으로 비광수용기 세포로 분화를 겪는 세포가 25% 미만인 세포 배양에서 적어도 10회, 20회, 30회, 50회 또는 심지어 1000회의 집단 배가(population doubling)를 겪는 복제 능력을 갖는다.
- [0014] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 글리세르알데히드 3-포스페이트 데히드로게나아제에 대한 것보다 적어도 10, 25, 50 또는 심지어 75% 미만인 트랜스페린 단백질 및 또는 트랜스페린 mRNA를 갖는다.
- [0015] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 HLA-유전자형이 동일하고, 바람직하게는 계통적으로 동일하다.
- [0016] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 평균 말단 제한 절편 길이(TRF)가 7kb, 7.5kb, 8kb, 8.5kb, 9kb, 9.5kb, 10kb, 10.5kb, 11kb, 11.5kb 또는 심지어 12kb 보다 길다.
- [0017] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 (i) 세포 주기 조절 및 세포 노화, (ii) 세포 에너지 및/또는 지질 대사, (iii) 아포토시스 중 1 이상에 관여하는 단백질의 함량 및/또는 효소 활성이 태아 유래 광수용기에 비해, 통계적으로 유의하게 감소된다.
- [0018] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 세포골격 구조 및 그와 관련된 세포 역학에 관여하는 단백질의 함량 및/또는 효소 활성이 태아 유래 광수용기에 비해, 통계적으로 유의하게 증가된다.
- [0019] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 인간 환자에 투여하기 적합하다.
- [0020] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 인간의 수의학적 환자(non-human veterinarian patient)에 투여하

기 적합하다.

- [0021] 상기 조제물의 바람직한 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 포유동물 만능 줄기 세포, 특히 바람직하게는 배아 줄기 세포 및 유도 만능 줄기 세포로 이루어진 군에서 선택된, 인간 만능 줄기 세포에서 유래된다.
- [0022] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 공통 만능 줄기 세포 공급원에서 분화된다.
- [0023] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 간상체 및 추상체로 분화되는 가소성을 유지한다.
- [0024] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 ELOVL4-TG2 마우스의 망막하 공간으로 이식될 수 있고, 외부 유핵 층으로 이동하여, ELOVL4-TG2 마우스에서 암소시 및 명소시 ERG 반응을 개선시키게 된다.
- [0025] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 식세포 활성화, 예컨대 단리된 광수용기 외절, pHrodo™ Red E. coli BioParticles 또는 돌다를 식균작용하는 능력을 갖는다.
- [0026] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 1 이상의 신정보호 인자를 분비한다.
- [0027] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포의 생존도를 유지시키는데 적합한 매체는 배양 배지, 냉동보존제(cryopreservative), 및 인간 환자에 주사하기 적합한 생체적합성 주사 매체로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0028] 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포 조제물은 발열원 무함유 및 마이코젠(mycogen) 무함유이다.
- [0029] 세포의 70%, 80%, 90%, 95% 또는 심지어 98% 이상이 면역세포화학적으로 PAX6+, CHX10-이고 로돕신+ 및/또는 옵신+인, 만능 줄기 세포 유래된 광수용기 세포; 및 포유동물 환자에 이식을 위해 광수용기 세포의 생존도를 유지시키기 위한 약학적 허용가능한 담체를 포함하는, 포유동물 환자에서 사용하기 적합한 광수용기의 약학적 조제물을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 측면은 망막 색소 상피 세포, 및 광수용기 전구체 세포, 광수용기 세포 또는 둘 모두; 및 포유동물 환자에 이식을 위한 광수용기 세포의 생존도를 유지하기 위한 약학 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조제물을 제공한다. 세포의 조제물은 세포 현탁물(함께 혼합되거나, 결합해서 전달되는 세포의 개별 용량과의 키트 형태로), 또는 다층 세포 그래프트(경우에 따라 생체적합성 매트릭스 또는 고상 지지체 상에 배치됨)로서 제공된다. 다층 세포 그래프트의 경우, RPE 세포는 단층, 바람직하게는 편향된 단층으로 제공될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 기술된 바와 같은 약학 조제물, 예컨대 광수용기 전구체 세포 또는 광수용기 세포, 또는 둘 모두의 조제물을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 광수용기의 소실에 의해 야기된 질환 및 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 조제물은 국소적으로, 예컨대 환자의 망막하 공간에, 환자의 유리체에 주사되거나, 또는 전신 전달되거나 또는 세포가 지속될 수 있는 다른 체강에 주사될 수 있다.
- [0032] 광수용기의 소실에 의해 야기되는 질환 또는 장애는 황반 변성 예컨대 초기 또는 후기에 무관하게 나이 관련 황반 변성, 및 망막 색소변성증을 포함한다.
- [0033] 일정 실시양태에서, 본 발명은
- [0034] (a) 안구 영역 전구체 세포를, 바람직하게 세포 클러스터로서, 바람직하게 저부착 또는 미부착 조건 하에 상기 세포 클러스터가 개개의 세포 구체를 형성하기에 충분한 시간의 기간 동안 신경 분화 배지에서 배양시키는 단계;
- [0035] (b) 배양물 중 대부분의 세포가 PAX6+, CHX10+ 및 SOX2-으로 특징되는 망막 신경 전구체 세포일 때까지, 세포 구체를 부착 조건 하의 신경 분화 배지에서, 바람직하게 매트릭스(예컨대 생체물질 스캐폴드) 상에서, 배양하는 단계;
- [0036] (c) 그 후에, 망막 신경 전구체 세포가 개개의 세포 구체를 형성시키기에 충분한 시간의 기간 동안 저부착 또는 미부착 조건 간에 배양 조건을 1회 이상 교호시키고, 이어서 세포 구체를 함유하는 세포를 부착 조건 하에 배양하고, 이러한 교호하는 배양 조건을 대부분의 세포가 광수용기 전구체 세포일때까지 계속하는 것인 단계를 포함하는, 광수용기 전구체 세포를 생성시키는 방법을 제공한다.
- [0037] 바람직한 실시양태에서, 안구 영역 전구체 세포는 예컨대, 면역세포화학적으로, PAX6+ 및 RX1+ 및 OCT4- 및 NANOG-으로 특징되고, 보다 더 바람직하게 또한 Six3+, Six6+, Lhx2+, Tbx3+, SOX2+ 및 네스틴+을 특징으로 하고, 예컨대 면역염색법 및/또는 유세포 분석 또는 세포의 특징적인 마커 발현을 이용하는 다른 표준 어세이법을 통해 측정될 수 있다.

- [0038] 바람직한 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 예컨대 면역세포화학적으로, PAX6+ 및 CHX10-(예컨대 면역염색법 및/또는 유세포 분석 또는 세포의 특징적인 마커 발현을 이용하는 다른 표준 어세이를 통해 측정됨)을 특징으로 하고, 보다 더 바람직하게는 또한 qPCR을 통해 검출시 Mash1, Nr2e3, Tr β 2, ROR β 및 NRO에 대한 mRNA 전사물 양성으로서 특징된다.
- [0039] 바람직한 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 레티노산 처리시 광수용기 세포로 분화할 수 있음을 특징으로 한다.
- [0040] 바람직한 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 간상체 및 추상체 둘 모두로 분화되는 가소성을 유지한다.
- [0041] 바람직한 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는, ELOVL4-TG2 마우스의 망막하 공간으로 이식시, 외부 유핵층으로 이동하여 대조군(세포 주사 안함) ELOVL4-TG2 마우스에 비해 ELOVL4-TG2 마우스에서 암소시 및 명소시 ERG 반응을 개선시킨다.
- [0042] 일정 실시양태에서, 부착 조건은 단지 예시를 위해, 폴리에스테르, 폴리프로필렌, 폴리알킬렌, 폴리플루오로클로로에틸렌, 염화폴리비닐, 불화폴리비닐 수지, 폴리스티렌, 폴리설폰, 폴리우레탄, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 셀룰로스, 유리 섬유, 세라믹 입자, 생체 재료 스캐폴드(biomaterial scaffold), 폴리락트산, 텍스트란, 불활성 금속 섬유, 실리카, 나트론 유리, 보로실리케이트 유리, 키토산, 또는 수세미 중 1 이상을 포함해도 되는, 부착 재료를 포함하는 세포가 부착할 수 있는 표면을 갖는 배양 시스템을 포함한다. 일부 실시양태에서, 부착 재료는 정전기적으로 하전된다. 일정 실시양태에서, 생체 재료 스캐폴드는 세포외 매트릭스, 예컨대 콜라겐(예컨대 IV형 또는 I형 콜라겐), 804G-유도된 매트릭스, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 콘드로넥틴, 라미닌 또는 Matrigel™이다. 다른 실시양태에서, 생체 재료는 젤라틴, 알기네이트, 폴리글리콜리드, 피브린, 또는 자가-조립 펩티드이다.
- [0043] 일정 실시양태에서, 안구 영역 전구체 세포, 및 결과로서 망막 신경 전구체 세포 및 광수용기 전구체 세포는 만능 줄기 세포, 예컨대 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포에서 유도된다.
- [0044] 바람직한 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포의 최종 조제물은 만능 줄기 세포가 실질적으로 없게 제공되며, 즉, 10% 미만의 만능 줄기 세포, 보다 더 바람직하게는 5%, 2%, 1%, 0.1% 미만 또는 0.01% 미만의 만능 줄기 세포를 포함한다.
- [0045] 바람직한 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포의 최종 조제물은 안구 영역 전구체 세포 및 망막 신경 전구체 세포가 실질적으로 없게 제공되고, 즉 10% 미만의 이들 세포, 및 보다 더 바람직하게, 5%, 2%, 1%, 0.1% 미만 또는 0.01% 미만의 안구 영역 전구체 세포 및 망막 신경 전구체 세포를 포함한다.
- [0046] 바람직한 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포의 최종 조제물의 세포 성분은 다른 세포 유형(즉, 광수용기 전구체 세포가 아닌 세포)에 대해 적어도 50% 순도이고, 바람직하게는 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 약 100% 순도이다.
- [0047] 일정 실시양태에서, 상기 방법은 광수용기 전구체 세포를 냉동보존하는 단계를 더 포함한다. 세포는 궁극적으로 냉동된 세포의 해동에 상용성인 냉동보존제로 바람직하게는 냉동되고, 경우에 따라 냉동보존제를 제거하도록 세포를 세척한 후, 광수용기는 적어도 25% 세포 생존도(예컨대 배양 효율 기준), 보다 바람직하게는 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 적어도 90% 세포 생존도를 유지한다.
- [0048] 광수용기 세포뿐만 아니라 다양한 전구체 세포를 냉동보존할 수 있다. 일부 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 구체로서 냉동보존된다.
- [0049] 일정 실시양태에서, 신경 분화 배지(또는 때때로 본원에서 배지라고 언급)는 D-글루코스, 페니실린, 스트렙토마이신, GlutaMAX™, N2 보충제, B27 보충제, MEM 비필수 아미노산 용액을 포함할 수 있고 경우에 따라 노킨을 포함한다.
- [0050] 신경 분화 배지는 Notch 경로를 활성화시키는 작용제, 예컨대 Notch 리간드 또는 항체를 포함할 수도 있다.
- [0051] 일정 실시양태에서, 신경 분화 배지는 본질적으로 혈청 무함유 배지, 예컨대 MEII 조건화 배지일 수 있다. 일정 실시양태에서, 신경 분화 배지는 DMEM/F12, FGF-2 및 MEDII 조건화 배지를 포함할 수 있다. 일정 실시양태에서, 신경 분화 배지는 대략 10% 내지 대략 50% > MEDII 조건화 배지이다. 일정 실시양태에서, MEDII 조건화 배지는 HepG2 조건화 배지이다. MEDII 배지는 거대 분자량 세포외 매트릭스 단백질을 포함할 수 있다. MEDII 배지는 프롤린을 포함하는 저분자량 성분을 포함할 수 있다.

- [0052] 일정 실시양태에서, 신경 분화 배지는 5% 미만의 혈청을 포함하는 본질적으로 혈청 무함유 세포 분화 환경이다.
- [0053] 일정 실시양태에서, 신경 분화 배지는 본질적으로 LIF 무함유이다.
- [0054] 신경 분화 배지는 또한 다양한 보충제 예컨대 B27 보충제(Invitrogen) 및 N2 보충제(역시 Invitrogen에서 입수)를 포함할 수 있다. B27 보충제는 다른 성분들 중에서도, SOD, 카탈라아제 및 다른 항산화제(GSH), 및 고유한 지방산, 예컨대 리놀레산, 리놀렌산, 리포산을 함유할 수 있다. N2 보충제는 예를 들면, 다음의 각테일로 교체될 수 있다: 트랜스페린(10 g/L), 인슐린(500mg/L), 프로게스테론(0.63mg/L), 푸트레신(1611 mg/L) 및 셀레나이트(0.52mg/L).
- [0055] 전술한 측면 및 실시양태의 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 만능 줄기 세포 공급원, 예컨대 OCT4, 알칼리 포스파타아제, SOX2, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, 및 TRA-1-80를 발현하는 만능 줄기 세포(예컨대, 제한 없이 배아 줄기(ES) 세포주 또는 유도 만능 줄기(iPS) 세포주), 보다 바람직하게는 공통 만능 줄기 세포 공급원에서 분화된다.
- [0056] 전술한 측면 및 실시양태의 일정 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 7kb, 7.5kb, 8kb, 8.5kb, 9kb, 9.5kb, 10kb, 10.5kb, 11kb, 11.5kb 또는 심지어 12kb 보다 긴 평균 말단 제한 절편 길이(TRF)를 갖는다.
- [0057] 전술한 측면 및 실시양태의 일정 실시양태에서, 조제물은 인간 환자에 투여하기 적합하고, 보다 바람직하게는 발열원 무함유 및/또는 인간의 동물 생성물 무함유이다.
- [0058] 전술한 측면 및 실시양태의 일정 실시양태에서, 조제물은 인간이외의 수의학적 포유동물, 예컨대 제한없이 개, 고양이 또는 말에 투여하기 적합하다.
- [0059] 일 측면에서, 본원은 (a) 망막 유도 배양 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 안구 영역 전구체 세포를 생성시키는 방법을 제공한다. 상기 만능 줄기 세포는 인간일 수 있다.
- [0060] 상기 망막 유도 배양 배지는 인슐린을 포함할 수 있다. 상기 인슐린은 인간일 수 있다. 상기 인슐린은 약 5-50 $\mu\text{g/ml}$ 인간 인슐린 또는 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 존재할 수 있다. 상기 망막 유도 배양 배지는 DMEM/F12, DMEM/고 글루코스, 또는 DMEM/넉-아웃을 포함할 수 있다.
- [0061] 상기 망막 유도 배양 배지는 D-글루코스를 포함할 수 있다. 망막 유도 배양 배지 약 450 mg/ml D-글루코스 또는 약 400 내지 약 500 mg/ml D-글루코스를 포함할 수 있다.
- [0062] 망막 유도 배양 배지는 1 이상의 항생제를 포함할 수 있다. 상기 항생제는 경우에 따라 약 0-100 유닛/ml의 페니실린 및 경우에 따라 약 0-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마이신의 농도, 및 더욱 경우에 따라 약 100 유닛/ml의 페니실린 및 경우에 따라 약 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마이신의 농도로, 페니실린 및 스트렙토마이신 중 하나 또는 둘 모두를 포함할 수 있다.
- [0063] 망막 유도 배양 배지는 N2 보충제를 포함할 수 있다. 상기 N2 보충제는 약 0.1 내지 5% 또는 약 1%의 농도로 존재할 수 있다.
- [0064] 망막 유도 배양 배지는 B27 보충제를 포함할 수 있다. 상기 B27 보충제는 약 0.05-2.0% 또는 약 0.2%의 농도로 존재할 수 있다.
- [0065] 망막 유도 배양 배지는 비필수 아미노산 또는 MEM 비필수 아미노산 또는 글루타민 또는 GlutaMAX™을 포함할 수 있다. 상기 비필수 아미노산 또는 MEM 비필수 아미노산은 약 0.1 mM의 농도로 존재할 수 있다.
- [0066] 망막 유도 배양 배지는 BMP 신호전달 억제제를 포함할 수 있다. 상기 BMP 신호전달 억제제는 노킨 예컨대 노킨 폴리펩티드, 돌소몰핀, LDN-193189, 및 이의 임의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0067] 망막 유도 배양 배지는 노킨, 예컨대 노킨 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 상기 노킨은 약 5-100 ng/ml 또는 약 10-100 ng/ml 또는 약 50 ng/ml의 농도로 존재할 수 있다.
- [0068] 일부 실시양태에서, 배지는 노킨, DKK1 및 IGF-1을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 배지는 5 ng/ml 노킨, 5 ng/ml DKK1, 및 5 ng/ml IGF-1을 포함할 수 있다.
- [0069] 상기 만능 줄기 세포는 인간 ES 세포, 인간 iPS 세포, 또는 인간 STAP 세포를 포함할 수 있다. 상기 만능 줄기 세포는, 인슐린을 포함하는 상기 망막 유도 배양 배지에서 배양하기 전에, 공급세포-무함유(feeder-free system) 및/또는 제노-무함유 조건 하 및/또는 경우에 따라 Matrigel™(EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스 육

중 세포 유래 수용성 조제물)을 포함하는 기재 상에서, 및 경우에 따라 mTESR1 배지에서 배양될 수 있다.

- [0070] 상기 망막 유도 배양 배지는 신선한 망막 유도 배양 배지로 날마다 교체될 수 있다. 단계 (a)에서 상기 배양은 약 1-10 일 또는 약 2-7 일, 또는 약 5-6 일 동안 지속될 수 있다.
- [0071] 상기 방법은 (b) 신경 분화 배지에서 세포를 배양시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 신경 분화 배지는 신경기저 배지를 포함할 수 있다.
- [0072] 상기 신경 분화 배지는 D-글루코스를 포함할 수 있다. 신경 분화 배지는 약 450 mg/ml D-글루코스 또는 약 400 내지 약 500 mg/ml D-글루코스를 포함할 수 있다.
- [0073] 신경 분화 배지는 1 이상의 항생제를 포함할 수 있다. 상기 항생제는 경우에 따라 약 0-100 유닛/ml의 페니실린 및 경우에 따라 약 0-100 µg/ml의 스트렙토마이신의 농도, 및 더욱 경우에 따라 약 100 유닛/ml의 페니실린 및 경우에 따라 약 100 µg/ml의 스트렙토마이신의 농도로, 페니실린 및 스트렙토마이신 중 하나 또는 둘 모두를 포함할 수 있다.
- [0074] 신경 분화 배지는 N2 보충제를 포함할 수 있다. 상기 N2 보충제는 약 0.1 내지 5% 또는 약 2%의 농도로 존재할 수 있다.
- [0075] 신경 분화 배지는 B27 보충제를 포함할 수 있다. 상기 B27 보충제는 약 0.05-5.0%, 약 0.05-2.0% 또는 약 2%의 농도로 존재할 수 있다.
- [0076] 신경 분화 배지는 비필수 아미노산 또는 MEM 비필수 아미노산 또는 글루타민 또는 GlutaMAX™을 포함할 수 있다. 상기 비필수 아미노산 또는 MEM 비필수 아미노산은 약 0.1 mM의 농도로 존재할 수 있다.
- [0077] 신경 분화 배양 배지는 BMP 신호전달 억제제를 포함할 수 있다. 상기 BMP 신호전달 억제제는 노킨 예컨대 노킨 폴리펩티드, 돌소몰핀, LDN-193189, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0078] 신경 분화 배양 배지는 노킨, 예컨대 노킨 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 상기 노킨은 약 10-100 ng/ml 또는 약 50 ng/ml의 농도로 존재할 수 있다.
- [0079] 상기 세포는 약 10-60 일 또는 약 15-35 일 또는 약 24 일 동안 상기 신경 분화 배지에서 배양될 수 있다.
- [0080] 상기 안구 영역 전구체 세포는 상기 배양물 중 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 약 100%의 세포를 포함할 수 있다.
- [0081] 상기 안구 영역 전구체 세포는 마커 PAX6 및 RX1 중 하나 또는 둘 모두를 발현한다. 따라서, 안구 영역 전구체 세포는 PAX6(+) 및/또는 RX1(+)일 수 있다. 상기 안구 영역 전구체 세포는 SIX3(+), SIX6(+), LHX2(+), TBX3(+), 및/또는 네스틴(+) 중 1 이상일 수 있다. 상기 안구 영역 전구체 세포는 SOX2(+) 및 OCT4(-) 및 Nanog(-) 중 1 이상일 수 있다. 상기 안구 영역 전구체 세포는 인간일 수 있다.
- [0082] 상기 방법은 상기 안구 영역 전구체 세포를 망막 신경 전구체 세포로 분화시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0083] 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된, 예를 들면 앞선 단락에서 기술된 바와 같은 방법을 이용해 생성된 안구 영역 전구체 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 경우에 따라, 인간인, 인간 영역 전구체 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0084] 상기 안구 영역 전구체 세포는 인간일 수 있다. 상기 안구 영역 전구체 세포는 상기 배양물 내 세포의 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 약 100%를 포함할 수 있다. 상기 안구 영역 전구체 세포는 마커 PAX6 및 RX1 중 하나 또는 둘 모두를 발현한다. 따라서, 안구 영역 전구체 세포는 PAX6(+) 및/또는 RX1(+)일 수 있다. 상기 안구 영역 전구체 세포는 SIX3(+), SIX6(+), LHX2(+), TBX3(+), 및/또는 네스틴(+) 중 1 이상일 수 있다. 상기 안구 영역 전구체 세포는 SOX2(+) 및 OCT4(-) 및 Nanog(-) 중 1 이상일 수 있다. 상기 안구 영역 전구체 세포는 냉동보존될 수 있다.
- [0085] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체의 치료 방법을 제공하고, 이 방법은 상기 개체에게 안구 영역 전구체 세포를 포함하는 조성물(예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 조성물 또는 본원에 기술된 바와 같은 방법을 이용해 생성된 조성물)을 투여하는 단계를 포함한다. 상기 조성물은 눈, 망막하 공간, 또는 정맥내로 투여될 수 있다. 이러한 개체는 나이 관련 황반 변성을 포함한, 황반 변성을 가질 수 있고, 이러한 황반 변성은 초기 또는 후기일 수 있다. 이러한 개체는 망막 색소변성증, 망막 이형성증, 망막 변성, 당뇨병성 망막병증, 선천성 망막 이영양증, 레버 선천성 흑내장, 망막 박리, 녹내장, 또는 시력 신경병증을 가질 수 있다.

- [0086] 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 신경 분화 배지에서 안구 영역 전구체 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 망막 신경 전구체 세포 또는 광수용기 전구체 세포를 생성시키는 방법을 제공한다. 상기 신경 분화 배지는 신경기저 배지를 포함할 수 있다.
- [0087] 상기 신경 분화 배지는 D-글루코스를 포함할 수 있다. 신경 분화 배지는 약 450 mg/ml D-글루코스 또는 약 400 내지 약 500 mg/ml D-글루코스를 포함할 수 있다.
- [0088] 신경 분화 배지는 1 이상의 항생제를 포함할 수 있다. 상기 항생제는 경우에 따라 약 0-100 유닛/ml의 페니실린 및 경우에 따라 약 0-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마이신의 농도, 및 더욱 경우에 따라 약 100 유닛/ml의 페니실린 및 경우에 따라 약 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마이신의 농도로, 페니실린 및 스트렙토마이신 중 하나 또는 둘 모두를 포함할 수 있다.
- [0089] 신경 분화 배지는 N2 보충제를 포함할 수 있다. 상기 N2 보충제는 약 0.1 내지 5% 또는 약 2%의 농도로 존재할 수 있다.
- [0090] 신경 분화 배지는 B27 보충제를 포함할 수 있다. 상기 B27 보충제는 약 0.05-5.0%, 약 0.05-2.0% 또는 약 2%의 농도로 존재할 수 있다.
- [0091] 신경 분화 배지는 비필수 아미노산 또는 MEM 비필수 아미노산 또는 글루타민 또는 GlutaMAX™을 포함할 수 있다. 상기 비필수 아미노산 또는 MEM 비필수 아미노산은 약 0.1 mM의 농도로 존재할 수 있다.
- [0092] 신경 분화 배양 배지는 경우에 따라 외생적으로 부가된 BMP 신호전달 억제제를 포함하지 않는다. 신경 분화 배지는 경우에 따라 외생적으로 부가된 노킨, 예컨대 노킨 폴리펩티드를 함유하지 않는다.
- [0093] 단계 (a)는 (i) 세포가 구체를 형성할 때까지 안구 영역 전구체 세포를 배양하는 단계, 및 (ii) 부착 조건 하에서 구체를 플레이팅하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0094] 단계 (i)는 저-부착 플레이트 상에 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 단계 (i)는 세포를 현적 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 단계 (i)의 배양은 배양된 세포를 기계적으로 또는 효소적으로 단일 세포 현탁물로 파쇄하여 형성될 수 있다. 단계 (i)은 1-10, 3-8, 또는 약 5 일 동안 지속될 수 있다.
- [0095] 단계 (ii)는 구체를 Matrigel™ 상에서 플레이팅하는 단계를 포함할 수 있다. 단계 (ii)는 라미닌 또는 콜라겐 상에서 구체를 플레이팅하는 단계를 포함할 수 있다. 단계 (ii)는 상기 배양이 합류될 때까지 계속할 수 있다.
- [0096] 단계 (i) 및 (ii)는 교호 방식으로 반복될 수 있다.
- [0097] 상기 세포는 약 10-60 일 또는 약 15-35 일 또는 약 25 일 동안 상기 신경 분화 배지에서 배양될 수 있다.
- [0098] 상기 망막 신경 전구체 세포는 상기 안구 영역 전구체 세포로부터 분화되고 상기 배양에서 높은 수로 존재할 수 있다. 상기 망막 신경 전구체 세포는 상기 배양 내 세포의 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 약 100%를 포함할 수 있다.
- [0099] 상기 망막 신경 전구체 세포는 마커 PAX6 및 RX1 중 하나 또는 둘 모두를 발현할 수 있다. 따라서, 신경 전구체 세포는 PAX6(+) 및/또는 CHX10(+)일 수 있다. 상기 망막 신경 전구체 세포는 SOX2(-)일 수 있다. 상기 망막 신경 전구체 세포는 Tuj1(+) 또는 Tuj1(-)일 수 있다.
- [0100] 상기 세포는 약 10-330 일 또는 약 15-300 일 또는 약 10-100 일 또는 약 15-100 일 또는 약 100 일 동안 상기 신경 분화 배지에서 배양될 수 있다.
- [0101] 상기 광수용기 전구체 세포는 상기 망막 신경 전구체 세포로부터 분화될 수 있고 상기 배양에서 높은 수로 존재할 수 있다. 상기 광수용기 전구체 세포는 상기 배양 내 세포의 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 약 100%를 포함할 수 있다.
- [0102] 상기 광수용기 전구체 세포는 PAX6(+) 및/또는 CHX10(-)일 수 있다. 상기 광수용기 전구체 세포는 마커 Nr2e3, Tr β 2, Mash1, ROR β 및/또는 NRO 중 1 이상을 발현시킬 수 있고, 따라서 Nr2e3(+) 및/또는 Tr β 2(+) 및/또는 Mash1(+) 및/또는 ROR β (+) 및/또는 NRO(+)일 수 있다.
- [0103] 상기 세포는 적어도 약 130 일, 적어도 약 160 일, 적어도 약 190 일, 또는 그 이상 동안 상기 신경 분화 배지를 배양하여서, 상기 광수용기 전구체 세포는 간상체를 형성하는 능력을 유지하면서 추상체로 분화되는 능력은 감소되어 나타내거나 또는 나타내지 않는다.

- [0104] 방법은 상기 광수용기 전구체 세포를 광수용기로 분화시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0105] 상기 안구 영역 전구체 세포는 만능 줄기 세포, 예컨대 ES 세포 또는 iPS 세포 또는 STAP 세포로부터 분화될 수 있고, 이러한 만능 줄기 세포, 예컨대 ES 세포 또는 iPS 세포 또는 STAP 세포는 경우에 따라 인간일 수 있다.
- [0106] 다른 측면에서, 상기 망막 신경 전구체 세포는 인간일 수 있다.
- [0107] 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 방법, 예를 들면, 앞선 문단에서 기술한 방법에 따라서 생성된 망막 신경 전구체 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 경우에 따라, 인간인 망막 신경 전구체 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0108] 상기 망막 신경 전구체 세포는 상기 배양 내 세포의 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 약 100%를 포함할 수 있다.
- [0109] 상기 망막 신경 전구체 세포는 PAX6 및 CHX10 마커 중 하나 또는 둘 모두를 발현할 수 있고, 따라서 PAX6(+) 및/또는 CHX10(+)이다. 상기 망막 신경 전구체 세포는 SOX2(-)일 수 있다. 상기 망막 신경 전구체 세포는 Tuj1(+) 또는 Tuj1(-)일 수 있다.
- [0110] 상기 망막 신경 전구체 세포는 냉동보존될 수 있다.
- [0111] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로하는 개체의 치료 방법으로서, 상기 개체에게 망막 신경 전구체 세포를 포함하는 조성물, 예를 들면 본원에 기술된 조성물 또는 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법을 제공한다. 상기 조성물은 눈, 망막하 공간, 또는 정맥내에 투여될 수 있다. 상기 광수용기 전구체 세포는 인간일 수 있다. 이러한 개체는 나이 관련 황반 변성을 포함하는 황반 변성을 가질 수 있고, 이러한 황반 변성은 초기이거나 또는 후기일 수 있다. 이러한 개체는 망막 색소변성증, 망막 이형성증, 망막 변성, 당뇨병성 망막병증, 선천성 망막 이영양증, 레버 선천성 흑내장, 망막 박리, 녹내장, 또는 시력 신경병증을 가질 수 있다.
- [0112] 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 방법, 예를 들면 전술한 단락에 따른 방법에 따라 생성된 광수용기 전구체 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 경우에 따라, 인간인 광수용기 전구체 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0113] 상기 광수용기 전구체 세포는 상기 배양 내 세포의 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 약 100%를 포함할 수 있다.
- [0114] 상기 광수용기 전구체 세포는 PAX6(+) 및/또는 CHX10(-)일 수 있다. 상기 광수용기 전구체 세포는 Nr2e3, Tr β 2, Mash1, ROR β 및/또는 NRO 마커 중 1 이상을 발현하고, 따라서, Nr2e3(+) 및/또는 Tr β 2(+) 및/또는 Mash1(+) 및/또는 ROR β (+) 및/또는 NRO(+)일 수 있다.
- [0115] 상기 광수용기 전구체 세포는 냉동보존될 수 있다.
- [0116] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로하는 개체의 치료 방법으로서, 상기 개체에게, 광수용기 전구체 세포를 포함하는 조성물, 예를 들면 전술한 단락에서 본원에 기술한 바와 같은 조성물, 또는 예를 들면 전술한 단락에서 본원에 기술한 방법에 따라 생성된 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법을 제공한다. 상기 조성물은 눈, 망막하 공간, 또는 정맥내에 투여될 수 있다. 이러한 개체는 나이 관련 황반 변성을 포함하는 황반 변성을 가질 수 있고, 이러한 황반 변성은 초기이거나 또는 후기일 수 있다. 이러한 개체는 망막 색소변성증, 망막 이형성증, 망막 변성, 당뇨병성 망막병증, 선천성 망막 이영양증, 레버 선천성 흑내장, 망막 박리, 녹내장, 또는 시력 신경병증을 가질 수 있다.
- [0117] 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 광수용기 전구체 세포를 광수용기 분화 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 광수용기 세포를 생성시키는 방법을 제공한다. 상기 광수용기 분화 배지는 신경기저 배지를 포함할 수 있다.
- [0118] 상기 광수용기 분화 배지는 D-글루코스를 포함할 수 있다. 광수용기 분화 배지는 약 450 mg/ml D-글루코스 또는 약 400 내지 약 500 mg/ml D-글루코스를 포함할 수 있다.
- [0119] 광수용기 분화 배지는 1 이상의 항생제를 포함할 수 있다. 상기 항생제는 약 0-100 유닛/ml의 페니실린 및 경우에 따라 약 0-100 μ g/ml의 스트렙토마이신의 농도, 및 더욱 경우에 따라 약 100 유닛/ml의 페니실린 및 경우에 따라 약 100 μ g/ml의 스트렙토마이신의 농도로, 페니실린 및 스트렙토마이신 중 1 이상 또는 전부를 포함할 수 있다.

- [0120] 광수용기 분화 배지는 N2 보충제를 포함할 수 있다. 상기 N2 보충제는 약 0.1 내지 5% 또는 약 2%의 농도로 존재할 수 있다.
- [0121] 광수용기 분화 배지는 B27 보충제(예를 들면, 포물러 번호 080085-SA)를 포함할 수 있다. 상기 B27 보충제는 약 0.05-5.0% , 약 0.05-2.0% 또는 약 2%의 농도로 존재할 수 있다.
- [0122] 광수용기 분화 배지는 비필수 아미노산 또는 MEM 비필수 아미노산 또는 글루타민 또는 GlutaMAX™을 포함할 수 있다. GlutaMAX™은 L-글루타민의 안정화 형태인, L-알라닐-L-글루타민이다. 상기 비필수 아미노산 또는 MEM 비필수 아미노산은 약 0.1 mM의 농도로 존재할 수 있다.
- [0123] 상기 광수용기 분화 배지는 포스폴린을 포함할 수 있다. 상기 포스폴린은 약 1-100 μ M 또는 약 5 μ M의 농도로 광수용기 분화 배지에 존재할 수 있다.
- [0124] 상기 광수용기 분화 배지는 BDNF를 포함할 수 있다. 상기 BDNF는 약 1-100 ng/ml 또는 약 10 ng/ml의 농도로 광수용기 분화 배지에 존재할 수 있다.
- [0125] 상기 광수용기 분화 배지는 CNTF를 포함할 수 있다. 상기 CNTF는 약 1-100 ng/ml 또는 약 10 ng/ml의 농도로 광수용기 분화 배지에 존재할 수 있다.
- [0126] 상기 광수용기 분화 배지는 LIF를 포함할 수 있다. 상기 LIF는 약 5-50 ng/ml 또는 약 10 ng/ml의 농도로 광수용기 분화 배지에 존재할 수 있다.
- [0127] 상기 광수용기 분화 배지는 DATP를 포함한다. 상기 DATP는 약 1-100 μ M 또는 약 10 μ M의 농도로 광수용기 분화 배지에 존재할 수 있다.
- [0128] 상기 광수용기 전구체 세포는 경우에 따라, 인간인 망막 신경 전구체 세포로부터 분화될 수 있다. 상기 광수용기 세포는 인간일 수 있다.
- [0129] 일부 실시양태에서, 광수용기 전구체 세포는 광수용기 분화 배지에서 배양 전에, ND 배지 중 레티노산 및 타우린으로 전처리된다. 레티노산은 약 100-1000 ng/ml의 농도로 사용될 수 있고, 타우린은 약 20-500 μ M의 농도로 사용될 수 있다. 이러한 배양 단계는 일부 실시양태에서, 약 1-2주 동안 일어날 수 있다. 배지는 일부 예에서, 2일 마다 교체(예를 들면, 절반 교체)될 수 있다. 이어서 배지는 레티노산 및 타우린이 결여된 ND 배지로 교체될 수 있고, 세포는 약 추가의 1-2주 동안, 또는 그들의 합류될 때까지 배양될 수 있다.
- [0130] 다른 측면에서, 본 발명은 경우에 따라, 인간인, 예를 들면 전술한 단락에서, 본원에 기술한 바와 같은 방법에 따라 생성된 광수용기 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0131] 상기 광수용기 세포는 PAX6(-)일 수 있다. 상기 광수용기 세포는 상기 배양 내 세포의 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 약 100%를 포함할 수 있다. 상기 광수용기 세포는 냉동보존될 수 있다.
- [0132] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 개체의 치료 방법으로서, 상기 개체에서, 광수용기 세포를 포함하는 조성물, 예컨대 전술한 단락에서 본원에 기술한 바와 같은 조성물 또는 예를 들면 전술한 단락에서 본원에 기술한 바와 같은 방법에 의해 생성된 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법을 제공한다. 상기 조성물은 눈, 망막하 공간, 또는 정맥내로 투여될 수 있다. 이러한 개체는 나이 관련 황반 변성을 포함하는 황반 변성을 가질 수 있고, 이러한 황반 변성은 초기이거나 또는 후기일 수 있다. 이러한 개체는 망막 색소변성증, 망막 이형성증, 망막 변성, 당뇨병성 망막병증, 선천성 망막 이영양증, 레버 선천성 흑내장, 망막 박리, 녹내장, 또는 시력 신경병증을 가질 수 있다.
- [0133] 다른 실시양태에서, 본 발명은 마우스 섬유아세포 공급세포 플랫폼상에서 성장시키지 않은 세포로부터 기원된, 인간 기원의 광수용기 전구체 세포(PRPC) 또는 광수용기 세포(PR), 바람직하게는 비도나 유도된 광수용기 전구체 세포 또는 광수용기 세포의 실질적으로 순수한 조제물에 관한 것이다. 예를 들면, 조제물은 85%-95% 순수하다. 일 실시양태에서, 본 발명은 마우스 섬유아세포 공급세포 플랫폼에서 유래된 세포에 대한 필요성을 생략한 인간 기원의 PRPC 또는 PR의 실질적으로 순수한 조제물을 제조하는 방법을 제공한다. 공급세포 시스템을 본 발명의 방법으로 교체하여 예를 들면 75%-100% 또는 85%-95%로 광수용기 세포의 보다 큰 균질성을 생성시킨다. 공급세포 무함유 줄기 세포의 분화는 또한 외생성 유도 인자의 도입없이 일어날 수 있고, 이는 종래보다 실질적인 개선점이다. 그러나, 노인의 선택적 부가는 분화가 발생할 필요가 없음에도, 줄기 세포의 분화를 가속시킬 수 있다. 최종적인 광수용기 전구체 세포는 면역세포화학적으로 PAX6 양성(PAX6(+)) 및 CHX10 음성(CHX10(-))을 고

유한 특징으로 한다.

도면의 간단한 설명

[0134]

컬러 도면(들)을 구비한 본 특허 또는 특허 출원 공개물의 복사본은 필요 요금의 납부 및 요청 시 사무국에서 제공하게 된다.

도 1: 상이한 조건 하에서 분화된 세포에서 안구 영역 전사 인자의 전사물의 실시간 PCR 분석을 도시한 도면이다.

도 2: 분화된 세포의 형상을 도시한 도면이다. (A) 세포 분화 후 1일에, 콜로니 주변부의 세포는 컬럼 형상(화살표)이었다. (B) 분화 후 10일에, 가장자리 세포는 크고 편평(화살표 머리)해졌고 중심 세포는 작고 조밀(화살표)하였다. (C) 21일에 로제트 유사 구조가 형성되었다.

도 3: 분화 개시 후 21일에 배양된 세포는 안구 영역 전사 인자를 발현하였다. (A) 도면의 천연색상 버전으로 분명한 바와 같이, PAX6(녹색) 및 RX1(적색)의 공동발현. (B) 이중 색상 유세포 분석으로 도시한 바와 같이, 세포의 93%가 PAX6 및 RX1을 공발현함. (D) 세포가 SOX2(적색)를 발현함. (C) 및 (D) 둘 모두에서, DAPI(파란색)는 세포 핵을 표지함. (E) 안구 영역 전사 인자: RX1, PAX6, LHX2, SIX3, SIX6, TBX3 및 SOX2의 전사물의 RT-PCR 분석.

도 4: 분화 개시 후 30일에 배양된 세포는 망막 신경 전구체 마커를 발현하였다. (A) 세포의 형상. Matrigel™ 상에 플레이팅 후, 뉴런은 세포 응집물로부터 이동해 나갔다(화살표). 소수의 상피 유사 세포(화살표 머리)가 세포 응집물 주변에서 관찰되었다. (B) 상층 패널, 이동하는 뉴런의 위상차 영상; 하층 패널, 이동하는 뉴런은 Tuj1(적색)을 발현하였다. (C) 도면의 천연색상 버전으로 명확한 바와 같이, 세포는 PAX6(적색) 및 CHX10(녹색)을 공발현하였다.

도 5: 분화 개시 후 3개월에 배양된 세포. (A) 세포의 형상. (B) 세포는 세포 일부의 적색 염색은 보이고 녹색 염색은 보이지 않는 도면의 천연색상 버전으로 명확한 바와 같이, PAX6은 발현하지만 CHX10은 발현하지 않는다. (C) 리커버린 발현은 도면의 천연색상 버전으로 명확한 바와 같이, 세포 몸체의 세포질에 제한되었다. d) 망막 신경 전구체(RNPs) 및 광수용기 전구체 세포(RhRPs로 표시)에서 로돕신, 옵신, 및 리커버린 전사물의 실시간 RT-PCT 분석.

도 6: 분화된 세포는 광수용기 세포 마커를 발현하였다. 세포는 (A) 로돕신(적색), (B) 로돕신(적색) 및 리커버린(녹색), (C) 옵신(녹색), 및 (D) 포스포디에스테라아제 6A 알파 서브유닛(PDE6a)(적색)을 발현하였다. DAPI(파란색)는 세포 핵을 표지하였다. 이들 마커의 발현은 도면의 천연색상 버전에서 명확하다.

도 7: ELOVL4-형질전환 마우스에서의 동물 실험에 대한 개략적인 다이어그램이다.

도 8: 망막하 세포 주사 후 1개월에 기록한 암소시 ERG 강도-반응 함수를 도시한 도면이다. PBS(검은선) 또는 광수용기 전구체 세포(PhRP로 표시, 회색선)를 투여한 ELOVL4-TG2 마우스로부터의 암소시 a-파(상층 패널) 및 b-파(하층 패널)에 대한 자극 강도 곡선이다. * $p < 0.001$ (vs. PBS).

도 9: 전신 세포 주사 후 1개월에 기록한 암소시 ERG 강도-반응 함수를 도시한 도면이다. PBS, 광수용기 전구체 세포(PhRPs로 표시) 또는 레티노산 처리된 광수용기 전구체 세포(PhRPs-RA)를 투여한 ELOVL4-TG2 마우스로부터의 암소시 a-파(상층 패널) 및 b-파(하층 패널)에 대한 자극 강도 곡선이다. 블랭크는 미처리 마우스를 나타낸다. # $p < 0.01$ (vs. PBS).

도 10A-B. 광수용기 전구체 세포 전신 주사는 세포 이식 후 1개월 내지 2개월 사이에 간상체 기능을 회복하였다. PBS(PBS) 또는 레티노산 처리된 광수용기 전구체 세포(PhRPs-RA)를 투여한 ELOVL4-TG2 마우스로부터의 세포 주사 후 1개월 및 2개월에 a-파(A) 및 b-파(B)의 암소시 ERG 진폭.

도 10C: 전신 세포 주사 후 2개월에 기록된 암소시 ERG 강도-반응 함수를 도시한 도면이다. PBS 또는 레티노산 처리된 광수용기 전구체 세포(PhRPs-RA)를 투여한 ELOVL4-TG2로부터의 암소시 a-파(상층 패널) 및 b-파(하층 패널)에 대한 자극 강도 곡선. 블랭크는 미처리된 마우스를 나타낸다. 기본값은 4주에 기록된 값이다. * $p < 0.001$ (vs. PBS).

도 11: PBS 또는 레티노산 처리된 광수용기 전구체(PhRPs-RA)를 투여한 ELOVL4-TG2 마우스로부터의 세포 주사 후 1개월 및 2개월에 a-파(상층 패널) 및 b-파(하층 패널)의 암소시 ERG 진폭을 도시한 도면이다. * $p < 0.001$ (vs.

PBS 2개월).

도 12: 미처리 ELOVL4-TG2 마우스(블랭크) 및 PBS, 광수용기 전구체 세포(PhRPs), 또는 레티노산 처리된 광수용기 전구체 세포(PhRPs-RA)를 투여한 마우스로부터 세포 주사 후 1개월 및 2개월에 OCT로 측정된 전체 중심 망막 두께를 도시한 도면이다.

도 13: (A) PBS(좌측 패널) 및 레티노산 처리된 광수용기 전구체 세포(우측 패널)를 투여한 ELOVL4-TG2 마우스로부터의, 세포 주사 후 2개월에 망막 HE 염색의 대표적인 영상을 도시한 도면이다. ONL, 외부 핵층. INL, 내부 핵층. (B), 미처리 ELOVL4-TG2 마우스(블랭크) 및 PBS 또는 레티노산 처리된 광수용기 전구체(PhRPs-RA)를 투여한 마우스로부터의, 세포 주사 후 2개월에 망막의 ONL의 두께에 대한 정량화.

도 14. RCS 래트 동물 실험의 개략적인 다이어그램을 도시한 도면이다.

도 15. 인간 ES 세포-유래된 광수용기 전구체 세포의 이식 후 숙주 광수용기 세포의 보존을 도시한 도면이다. DAPI로 염색된 P90에서의 망막 섹션: (A) 외부 핵층(ONL)은 대조군 래트에서 0-1층으로 감소하였다.(B) 2-4 세포 깊이인, 정맥내 세포 주사 후, RCS 래트에서 구제된 ONL 세포. (C) 3-5 세포 깊이인, 유리체내 세포 주사를 받는 RCS 래트에서 구제된 ONL 세포. INL, 내부 핵층; GL, 신경절 세포층.

도 16. 인간 ES 세포-유래된 광수용기 전구체 세포의 이식 후 숙주 간상체 광수용기 세포 외절(OS)의 보존. 로돕신(녹색)에 대해 염색된 P90에서 망막 섹션. (A) 대조군 래트에서 간상체 OS의 완전한 소실(화살표). (B) 광수용기 전구체 세포의 정맥내 주사 후 RCS 래트 망막에서 숙주 간상체 광수용기 세포의 OS 내 로돕신 발현(화살표). (C) 광수용기 전구체 세포의 유리체내 이식 후 RCS 래트 망막에서 숙주 간상체 광수용기 세포의 OS에서 로돕신의 발현(화살표). 로돕신의 발현은 도면의 천연색상 버전에서 명확하다.

도 17. 인간 ES 세포-유래된 광수용기 전구체 세포의 이식 후 숙주 추상체 광수용기 세포 외절(OS)의 보존. 옵신(녹색)에 대해 염색된 P90에서 망막 섹션. (A) 대조군 래트에서 추상체 OS의 완전한 소실(화살표). (B) 광수용기 전구체 세포의 정맥내 주사 후 RCS 래트 망막에서 숙주 추상체 광수용기 세포의 OS에서 옵신의 발현(화살표). (C) 광수용기 전구체의 유리체내 이식 후 RCS 래트 망막에서 숙주 추상체 광수용기 세포의 OS에서 옵신의 발현(화살표). 옵신의 발현은 도면의 천연색상 버전에서 명확하다.

도 18. RCS 래트의 유리체로 이식된 인간 ES 세포-유래된 광수용기 전구체 세포는 성숙한 간상체 광수용기 세포로 분화되었다. 로돕신(A에서 녹색), 리커버린(B에서 녹색)에 대해 염색된 P90에서 망막 섹션. 인간 세포를 항-HuNu 항체(적색)로 표지하였다. DAPI는 모든 핵을 표지하였다. 로돕신 및 리커버린의 발현 및 DAPI의 염색은 도면의 천연색상 버전에서 명확하다.

도 19는 실시예 1-2의 광수용기 발생에서 사용된 전반적인 방법을 예시하며 과정의 각 단계에서 사용된 배지를 더욱 예시한다.

도 20은 실시예 1-2에서 광수용기 세포 및 광수용기 전구체 세포 발생 시기를 예시한다.

도 21은 실시예에서 사용된 배양 배지 및 배지 보충제의 성분을 도시한다.

도 22는 인간 만능 줄기 세포로부터 시험관내 분화 동안 ESC, 안구 영역 전구체 세포, 망막 신경 전구체 세포, 광수용기 전구체 세포, 및 광수용기 세포의 유전자 발현 패턴을 예시한다.

도 23은 대조군(생체입자 없음)과 비교한, 37℃ 및 4℃에서 hES-RPE 및 hES-광수용기 전구체에 의한 pHrodo™ Red E. coli BioParticles(Invitrogen) 형광발광 생체입자의 식균작용의 상대적인 수준을 도시한 유세포측정 히스토그램을 제공한다. 광수용기 전구체 세포에 대한 히스토그램은 RPE 세포처럼, 형광발광 신호의 강도가 세포를 4℃의 비교적 허용되지 않는 온도에서 37℃의 생리적으로 관련있는 온도로 이동시 증가함을 보여주고, 이는 광수용기 전구체 세포가 생체입자를 식균할 수 있음을 의미한다. 생체입자는 눈의 드루젠 및 탈피 외절에 대한 대용물이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은 광수용기 세포(PRC) 및 광수용기 전구체 세포(PRPC)를 생성하는 방법을 제공한다. 이들 방법은 만능 줄기 세포, 안구 영역(EF) 전구체, 및 망막 신경 전구체 세포를 포함하는 초기 전구체로부터 시험관내 분화를 포함한다. 본원에서 제공하는 방법은 임의의 전술한 전구체(줄기 세포 포함) 개체군의 출발 물질로서 사용될 수 있다.

[0135]

- [0136] 본 발명은 또한 초대(primary) 안구 영역(EF) 전구체 및 망막 신경 전구체 세포(즉, 초대 세포는 더 미성숙한 전구체의 시험관내 분화보다는 피험체로부터 얻은 세포를 의미함)로부터 광수용기 세포(PRC) 및 광수용기 전구체 세포(PRPC)를 시험관내에서 생성시키는 것을 고려한다.
- [0137] 광수용기 발생은 수많은 발생기를 통해 발생하며, 그 각각은 표현형적으로(예를 들면 마커 발현 프로파일에 의함) 및/또는 기능적으로 정의될 수 있다. 이러한 발생은 도 22에 계략적으로 예시하였다. 시험관내 만능 줄기 세포는 EF 전구체로 분화되고, 이는 이어서 망막 신경 전구체 세포로 분화되며, 이어서 광수용기 전구체 세포로 분화되고, 이어서 광수용기 세포로 분화된다.
- [0138] 본원에서 사용되는, 전구체 세포는 유사분열을 유지하고 동일하거나 또는 보다 제한된 분화능의 전구체 세포를 보다 더 생성시키거나, 또는 최종 세포계통으로 분화될 수 있는 세포를 의미한다. 용어 전구체 및 선구체는 상호교환적으로 사용된다. 이들 각 시기의 세포는 본원에서 보다 상세하게 설명할 것이다.
- [0139] 본원에서 제공된 광수용기 전구체 세포(광수용기 전구체라고도 함) 및 광수용기 세포는 광범위한 생체내 및 시험관내 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들면, 광수용기 전구체 세포는 제한없이 황반 변성 및 망막 색소변성증을 포함한, 망막의 병태를 생체내에서 치료하는데 사용된다. 광수용기 전구체 세포 및 광수용기 세포는 추정 치료 또는 예방 치료 후보물을 동정하기 위한 시험관내 스크리닝 어세이에서 사용될 수 있다.
- [0140] 본 발명은 본원에 기술된 방법으로 획득된 광수용기 전구체 세포 및 광수용기 세포를 더욱 제공한다. 광수용기 전구체 세포 및 광수용기 세포는 만능 줄기 세포 또는 그들의 분화된 자손 예컨대 안구 영역 전구체 세포의 시험관내 분화에 의해 얻었다. 안구 영역 전구체 세포는 만능 줄기 세포의 시험관내 분화로부터 얻은 그들 자체일 수 있거나, 이들은 피험체로부터 얻은 초대 안구 영역 전구체일 수 있다.
- [0141] 본 발명은 초대 공급원으로부터 얻지 못했거나 또는 얻을 수 없는 광수용기 전구체 세포의 개체군 및 광수용기 세포의 개체군을 제공한다. 이들 개체군은 그들 세포 함량이 균질하거나 또는 거의 균질하다. 예를 들면, 이러한 개체군 내 세포의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 약 100%는 광수용기 전구체 세포일 수 있다. 다른 예에서, 이러한 개체군 내 세포의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 약 100%는 광수용기 세포일 수 있다. 이들 개체군 내 이들 세포는 단일 일배체형일 수 있다. 예를 들면, 이들은 HLA-일치될 수 있다. 이들 개체군 내 이들 세포는 유전적으로 동일할 수 있다.
- [0142] 본 발명은 전구체 세포 예컨대 제한없이 만능 줄기 세포로 직접적으로 분화시키는 개시된 방법의 능력을 기반으로 다양하 세포 개체군의 실질적으로 순수한(또는 균질한) 조제물을 제공한다. 본원에서 사용되는 유도된 분화는 전구체 세포 개체군이 부분적으로 이러한 전구체 세포에 제공되는 인자들 또는 다른 자극에 기인하여 바람직한 계통으로 또는 그를 향해 분화되어서, 다른 원치않고, 따라서 잠재적으로 오염된 계통으로의 분화를 피하는 것을 의도한다. 본원에서 제공된 방법은 배상체(EB) 생성없이 안구 영역 전구체로 예를 들면 만능 줄기 세포의 분화를 유도한다. 이하에 기술된 바와 같이, EB는 제한없이 배아 줄기(ES) 세포를 포함하는, 만능 줄기 세포의 분화동안 형성될 수 있고, 전형적으로 중배엽, 외배엽 및 내배엽 계통의 전구체를 포함하는, 세포를 함유하는 3차원 세포 집단이다. EB의 3차원적 성질은 본원에 기술된 비-EB 기반 방법에서 생성된 것과는 상이한 세포-세포 상호작용 및 상이한 세포-세포 신호전달을 포함하는, 상이한 환경을 생성시킬 수 있다. 또한, EB 내 세포는 외생적으로 부가된 작용제, 예컨대 주변 배지에 존재하는 분화 인자의 유사한 용량을 전부 받는 것은 아니고, EB의 발생 동안 다양한 분화 사건 및 결정을 일으킬 수 있다.
- [0143] 대조적으로, 전구체 세포를 배양하는 본 발명의 배양 방법은 EB 형성을 요구하지 않고 바람직하게는 EB 형성을 피한다. 대신, 이들 방법은 그러한 배지 내 인자를 포함하여, 주변 배지와 균등한 접촉을 세포에 제공하는 조건에서 세포를 배양한다. 세포는 예를 들면, 배양 표면에 부착된 단층 또는 거의 단층으로 성장될 수 있다.
- [0144] 대량 균등한 정도로 그들의 주변 배지 및 따라서 그러한 배지 내 인자와 접촉되는 전구체 세포의 전부 또는 대부분의 능력은 이들 전구체 세포를 유사한 시기 및 유사한 정도로 분화시키게 된다. 전구체 세포의 개체군에 대한 유사한 분화 타임라인은 그러한 세포가 동시발생됨을 의미한다. 세포는 또한 일부 예에서 세포주기 동시발생적일 수 있다. 이러한 동시발생성은 그들 세포 메이크업이 균질하거나 또는 거의 균질한 세포 개체군을 생성시킨다. 예로서, 본원에 기술된 방법은 세포 개체군을 생성시킬 수 있고, 여기서 세포의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 약 100%는 특정한 관심 세포이다. 관심 세포는 예를 들면, 세포내 또는 세포외 마커 발현에 의해 표현형적으로 정의될 수 있다. 관심 세포는 안구 영역 전구체 세포, 신경 망막 전구체 세포, 광수용기 전구체 세포, 또는 광수용기 세포일 수 있다.

- [0145] 본원에서 사용되는 바와 같은, 대부분의 세포는 적어도 50%를 의미하고, 실시양태에 의존적으로, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 약 100%의 세포를 포함할 수 있다.
- [0146] 본 발명의 방법을 이용해 달성할 수 있는 순도는 이러한 세포 개체군이 치료 또는 예방 목적으로 생체내에서 사용되는 경우에 특히 중요하다. 높은 세포 순도의 개체군을 얻는 능력은 필요치않은 세포 소실을 일으킬 수 있는, 다른 조작 예컨대 강화 또는 선별 단계의 수행을 피한다. 이는 특히 세포 개체군이 적거나 또는 세포수가 한정된 경우에 특히 중요하다.
- [0147] **정의:** 여기서 정의되는 바와 같이, 단수형은 예시적인 목적으로 제공되며, 어구의 복수형에도 적용될 수 있다. 이하의 정의는 당분야의 숙련가가 이해하는 바와 같이 용어의 보충적인 통상적 정의를 의미한다.
- [0148] "실질적으로 순수한 광수용기 전구체 세포의 조제물(PRPC)". 본원에서 사용된 바와 같이, 이러한 어구는 세포의 조제물(예를 들면, 세포를 포함하는 조성물)을 의미하고 여기서 세포는 적어도 75% 순수하거나 또는 바람직하게는 적어도 85% 순수하거나, 적어도 95% 순수하거나, 또는 약 85% 내지 95% 순수하다. 예를 들면, 순도는 예를 들면 1 이상의 마커를 발현하거나 또는 발현하지 않는 세포를 검출하여, 조제물 내 세포의 총수에 대해, 1 이상의 마커, 예를 들면 PRPC의 마커(본 출원에서 동정된 마커 또는 당분야에 공지된 다른 것들 포함)를 발현하는 조제물 내 세포의 개체군의 비율을 측정하여 정량할 수 있다. 경우에 따라, 비-PRPC 세포를 의미하는 마커의 발현을 또한 검출하여, 상기 세포의 검출 및/또는 정량화를 용이하게 할 수 있다. 이용할 수 있는 예시적인 방법은 제한없이, 형광발광 활성화 세포 분류법(FACS), 면역조직화학법, 인시츄 혼성화, 및 당분야에 공지된 다른 적합한 방법을 포함한다. 경우에 따라, 순도의 결정은 제조물에 존재하는 비생존 세포를 무시하고 수행할 수 있다.
- [0149] "인간 기원의 광수용기 세포(PR)의 실질적으로 순수한 조제물". 본원에서 사용하는 이 어구는 세포의 조제물(예를 들면, 세포를 포함하는 조성물)을 의미하고 여기서 세포는 적어도 75% 순수하거나 또는 바람직하게 적어도 85% 순수하거나, 적어도 95% 순수하거나, 또는 약 85% 내지 95% 순수하다. 예를 들면, 순도는 예를 들면 1 이상의 마커를 발현하거나 또는 발현하지 않는 세포를 검출하여, 조제물 내 세포의 총수에 대해, 1 이상의 마커, 예컨대 PR의 마커(본 출원에서 동정한 마커 또는 당분야에 공지된 다른 것들을 포함)를 발현하는 조제물 내 세포의 비율을 결정하여 정량할 수 있다. 경우에 따라 비-PR 세포를 의미하는 마커의 발현을 역시 검출하여, 상기 세포의 검출 및/또는 정량화를 용이하게 할 수 있다. 이용할 수 있는 예시적인 방법은 제한없이, 형광발광 활성화된 세포 분류법(FACS), 면역조직화학법, 인시츄 혼성화, 및 당분야에 공지된 다른 적합한 방법을 포함한다. 경우에 따라, 순도의 결정은 조제물에 존재하는 비생존 세포를 무시하고 수행할 수 있다.
- [0150] "배상체"는 미부착 조건 하에, 예를 들면 저부착 기질 상에서 또는 "현적"으로 만능 세포를 배양하여 형성시킬 수 있는 만능 세포(예를 들면, iPSC 또는 ESC)의 클럼프 또는 클러스터를 의미한다. 이들 배양에서, 만능 세포는 배상체라고 명명된 세포의 클럼프 또는 클러스터를 형성할 수 있다. 예를 들면, 문헌 [Itskovitz-Eldor et al., Mol Med. 2000 Feb;6(2):88-95]을 참조하여, 이의 전체를 참조하여 본원에 편입시킨다. 전형적으로, 배상체는 초기에 만능성 세포의 고휘 클럼프 또는 클러스터로서 형성되고, 시간 경과에 따라, 배상체의 일부는 유체 충전된 체강을 포함하게되고, 전자는 문헌에서 "단순" EB라고 하고 후자는 "낭성" 배상체라고 한다.
- [0151] 용어 "배아 줄기 세포"(ES 세포 또는 ESC)는 당분야에서 사용되는 바와 같이 본원에서 사용된다. 이 용어는 세포주로서 연속적으로 계대된 것을 포함하여, 인간 배반포 또는 상실배의 내부 세포 질량으로부터 유래된 세포를 포함한다. ES 세포는 DNA, 핵 전이, 처녀생식을 이용하거나, 또는 HLA 영역 내 동형접합성을 갖는 ES 세포를 생성시켜서, 정자와 난자 세포의 수정으로부터 유도시킬 수 있다. ES 세포는 또한 정자와 난자 세포의 융합, 핵 전이, 처녀생식, 동정생식, 또는 염색질의 재프로그래밍화 및 이후 세포가 생성되도록 원형질막으로 재프로그래밍된 염색질의 도입에 의해 생성된 접합체, 난할구, 또는 배반포-기 포유동물 배아에서 유도된 세포이다. 그들의 공급원 또는 그들을 생성시키는데 사용되는 특정 방법과 무관하게, 배아 줄기 세포는 (i) 모든 3종 배엽층의 세포로 분화되는 능력, (ii) 적어도 OCT 4 및 알칼리 포스파타아제의 발현, 및 (iii) 면역결핍 동물에 이식시 기형종을 생성시키는 능력을 기반으로 동정될 수 있다. 본 발명의 실시양태에서 사용될 수 있는 배아 줄기 세포는 제한없이, 인간 ES 세포("ESC" 또는 "hES 세포") 예컨대 MA01, MA09, ACT-4, No. 3, H1, H7, H9, H14 및 ACT30 배아 줄기 세포를 포함한다. 추가의 예시적인 세포주는 NED1, NED2, NED3, NED4, NED5, 및 NED7을 포함한다. 또한 NIH 인간 배아 줄기 세포 등록소를 참조한다. 사용할 수 있는 예시적인 인간 배아 줄기 세포주는 MA09 세포이다. MA09 세포의 단리 및 조제물은 [Klimanskaya, et al.(2006) "Human Embryonic Stem Cells Derived from Single Blastomeres." Nature 444: 481-485]에 이전에 기술되었었다. 본 발명의 예시적인 실시양태에 따라 사용되는 인간 ES 세포는 GMP 표준에 따라 유도 및 유지될 수 있다.

- [0152] 용어 "ES 세포"는 배아의 파괴를 통해 생성되는 세포를 의미하지 않고, 그를 의미해서도 안된다. 대조적으로, 배아, 예컨대 인간 배아를 파괴하지 않고 ES 세포를 생성시키는데 다양한 방법이 이용가능하고 이용될 수 있다. 예로서, ES 세포는 이식전 유전자 진단(PGD)을 위한 난할구의 추출과 유사한 방식으로, 배아로부터 유도된 단일 난할구에서 생성될 수 있다. 이러한 세포의 예에는 NED1, NED2, NED3, NED4, NED5, 및 NED7이 포함된다. 사용될 수 있는 예시적인 인간 배아 줄기 세포주는 MA09 세포이다. MA09 세포의 단리 및 조제물은 [Klimanskaya, et al.(2006) "Human Embryonic Stem Cells Derived from Single Blastomeres." Nature 444: 481-485]에 기술되어 있다. 또한, [Chung et al. 2008, Cell Stem Cell, 2:113]을 참조한다. 이들 세포주 모두는 배아 파괴없이 생성되었다.
- [0153] 본원에서 사용되는, 용어 "만능 줄기 세포"는 제한없이, 만능 줄기 세포를 유도시키는 방법과 무관하게, 조직 유래 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 배아 유래 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포, 및 자극-촉발된 다능성 획득(STAP) 세포를 포함한다. 이 용어는 또한 이러한 세포를 생성시키는데 사용되는 방법과 무관하게 상기 언급된 세포의 기능 및 표현형 특징을 갖는 만능 줄기 세포를 포함한다. 만능 줄기 세포는 (a) 면역결핍(SCID) 마우스에 이식시 기형종을 유도시킬 수 있고; (b) 모든 3종의 배엽층의 세포 유형으로 분화할 수 있고(예를 들면, 외배엽, 중배엽, 및 내배엽 세포 유형으로 분화될 수 있음); (c) 배아 줄기 세포의 1 이상의 마커를 발현하는(예를 들면, OCT4, 알칼리 포스파타아제, SSEA-3 표면 항원, SSEA-4 표면 항원, Nanog, TRA-1-60, TRA-1-81, SOX2, REX1 등) 줄기 세포로서 기능적으로 정의된다. 일정 실시양태에서, 만능 줄기 세포는 OCT4, 알칼리 포스파타아제, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 마커를 발현한다. 예시적인 만능 줄기 세포는 예를 들면, 당분야에 공지된 방법을 이용해 생성시킬 수 있다. 예시적인 만능 줄기 세포는 배반포기 배아의 ICM에서 유래된 배아 줄기 세포를 비롯하여, 분열 단계 또는 상실기 배아의 1 이상의 난할구에서 유래된 배아줄기 세포를 포함한다(경우에 따라, 배아의 나머지를 파괴하지 않고). 이러한 배아 줄기 세포는 체세포 핵 전이(SCNT), 처녀생식, 및 동정생식을 포함하는, 수정 또는 무성 수단에 의해 생성된 배아 물질로부터 생성될 수 있다. 추가의 예시적인 만능 줄기 세포는 인자(여기서는 재프로그래밍 인자들)의 조합을 발현하여 체세포를 재프로그래밍해서 생성된 유도 만능 줄기 세포(iPCS)를 포함한다. iPSC는 태아, 생후, 신생, 어린이 또는 성인 체세포를 이용해 생성될 수 있다.
- [0154] 일정 실시양태에서, 체세포를 만능 줄기 세포로 재프로그래밍하는데 사용될 수 있는 인자는 예를 들면, OCT 4 (때때로 OCT 3/4라고 함), SOX2, c-Myc, 및 KLF4의 조합을 포함한다. 다른 실시양태에서, 체세포를 만능 줄기 세포로 재프로그래밍하는데 사용될 수 있는 인자를 예를 들면, OCT 4, SOX2, Nanog, 및 Lin28의 조합을 포함한다. 일정 실시양태에서, 적어도 2의 재프로그래밍 인자는 체세포에서 발현하여 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다. 다른 실시양태에서, 적어도 3의 재프로그래밍 인자는 체세포에서 발현되어 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다. 다른 실시양태에서, 적어도 4의 재프로그래밍 인자는 체세포에서 발현되어 성공적으로 체세포를 리프로그래밍한다. 다른 실시양태에서, 추가의 재프로그래밍 인자를 동정하고 단독으로 또는 체세포를 만능 줄기 세포로 리프로그래밍하기 위한 1 이상의 기지의 재프로그래밍 인자와의 조합으로 사용된다. 유도 만능 줄기 세포는 기능적으로 정의되고 임의의 다양한 방법(통합 벡터, 비통합 벡터, 화학 수단 등)을 이용해 재프로그래밍되는 세포를 포함한다. 만능 줄기 세포는 유전적으로 개질되거나 또는 아니면 수명, 역가, 귀소를 증가시키거나, 동종면역 반응을 예방 또는 감소시키거나 또는 이러한 만능 세포로부터 분화된 세포(예를 들면, 광수용기, 광수용기 전구체 세포, 간상체, 추상체 등, 및 본원, 예를 들면 실시예에 기술된 다른 세포 유형)에서 바람직한 인자를 전달하도록 개질될 수 있다.
- [0155] "유도 만능 줄기 세포"(iPS 세포 또는 iPSC)는 체세포에서 재프로그래밍 인자의 단백질 형질도입에 의해 생성될 수 있다. 일정 실시양태에서, 적어도 2의 재프로그래밍 단백질은 체세포에 형질도입시켜서 성공적으로 체세포를 재프로그래밍한다. 다른 실시양태에서, 적어도 3의 재프로그래밍 단백질을 체세포에 형질도입시켜 성공적으로 체세포를 재프로그래밍한다. 다른 실시양태에서, 적어도 4의 재프로그래밍 단백질을 체세포에 형질도입시켜 성공적으로 체세포를 재프로그래밍한다.
- [0156] 만능 줄기 세포는 임의 종에서 유래될 수 있다. 배아 줄기 세포는 예를 들면, 마우스, 인간외 영장류의 다수종, 및 인간에서 성공적으로 유래되고, 배아 줄기-유사 세포는 수많은 추가 종으로부터 생성되었다. 따라서, 당분야의 숙련가는 제한없이, 인간, 인간의 영장류, 설치류(마우스, 래트), 유제류(소, 양 등), 개(가정 및 야생 개), 고양이(가정 및 야생 고양이 예컨대 사자, 호랑이, 치타), 토끼, 햄스터, 저빌쥐, 다람쥐, 기니 피그, 염소, 코끼리, 판다(자이언트 판다 포함), 돼지, 라쿤, 말, 얼룩말, 수중 포유동물(돌고래, 고래 등) 등을 포함한, 임의 종 유래의 배아 줄기 세포 및 배아 유래 줄기 세포를 생성시킬 수 있다. 일정 실시양태에서, 종은 멸종위기 종이다. 일정 실시양태에서, 종은 현재 멸종된 종이다.

- [0157] 유사하게, iPS 세포는 임의 중에서 유래될 수 있다. 이들 iPS 세포는 마우스 및 인간 세포를 이용해 성공적으로 생성되었다. 또한, iPS 세포는 배아, 태아, 신생아, 및 성인 조직을 이용해 성공적으로 생성되었다. 따라서, 임의 중 유래의 도너 세포를 이용해 쉽게 iPS 세포를 생성시킬 수 있다. 따라서, 제한없이, 인간, 인간의 영장류, 설치류(마우스, 래트), 유제류(소, 양 등), 개(가정 및 야생 개), 고양이(가정 및 야생 고양이, 예컨대 사자, 호랑이, 치타), 토끼, 햄스터, 염소, 코끼리, 판다(자이언트 판다 포함), 돼지, 라쿤, 말, 얼룩말, 수중 포유동물(돌고래, 고래 등) 등을 포함한, 임의 중에서 유래된 iPS 세포를 생성시킬 수 있다. 일정 실시양태에서, 종은 멸종위기 종이다. 일정 실시양태에서, 종은 현재 멸종된 종이다.
- [0158] 유도 만능 줄기 세포는 출발점으로서, 임의의 발생기의 임의의 체세포를 이용해 생성될 수 있다. 예를 들면, 세포는 배아, 태아, 신생아, 어린이, 또는 성인 도너로부터 유래될 수 있다. 사용할 수 있는 예시적인 체세포는 섬유아세포, 예컨대 피부 샘플 또는 생검에 의해 얻은 피부 섬유아세포, 윤활 조직 유래의 활막세포, 포피 세포, 뺨 세포, 또는 폐 섬유아세포를 포함한다. 피부 및 뺨은 쉽게 입수할 수 있고 쉽게 얻을 수 있는 적절한 세포의 공급원이 제공되더라도, 실제 임의의 세포를 사용할 수 있다. 일정 실시양태에서, 체세포는 섬유아세포가 아니다.
- [0159] 유도 만능 줄기 세포는 체세포에서 1 이상의 재프로그래밍 인자를 발현하거나 또는 이의 발현을 유도하여 생성시킬 수 있다. 체세포는 섬유아세포, 예컨대 피부 섬유아세포, 활막 섬유아세포, 또는 폐 섬유아세포, 또는 비-섬유아세포성 체세포일 수 있다. 체세포는 적어도 1, 2, 3, 4, 5 재프로그래밍 인자의 발현(예컨대 바이러스 형질도입, 통합 또는 비통합 벡터 등을 통해) 및/또는 접촉(예를 들면, 단백질 형질도입 도메인, 전기천공, 미세주사, 양이온성 양친매성, 세제 투과성을 함유하는 지질 이중층과의 융합 등) 야기를 통해서 재프로그래밍될 수 있다. 재프로그래밍 인자는 OCT 3/4, SOX2, NANOG, LIN28, C-MYC, 및 KLF4에서 선택될 수 있다. 재프로그래밍 인자의 발현은 체세포를 1 이상의 작용제, 예컨대 재프로그래밍 인자의 발현을 유도하는 소형 유기 분자 제제와의 접촉을 통해 유도될 수 있다.
- [0160] 추가의 예시적인 만능 줄기 세포는 인자("재프로그래밍 인자")의 조합을 발현시키거나 또는 이의 발현을 유도하여 체세포를 재프로그래밍하여 생성된 유도 만능 줄기 세포를 포함한다. iPS 세포는 세포 은행으로부터 얻을 수 있다. iPS 세포의 제조는 분화된 세포의 생성에서의 초기 단계일 수 있다. iPS 세포는 조직-일치된 PHRPS 또는 광수용기 세포를 생성하는 목적과 일치되는 도너 또는 특정 환자 유래의 물질을 이용해 특별하게 생성될 수 있다. iPSC는 의도하는 수용자에서 실질적으로 면역원성이 아닌 세포로부터 생성될 수 있고, 예를 들면, 자가유래 세포로부터 또는 의도하는 수용자에 조직적합성인 세포로부터 생성될 수 있다.
- [0161] 체세포는 또한 병용 접근법을 이용해 재프로그래밍될 수 있고 여기서 재프로그래밍 인자가 발현되고(예를 들면, 바이러스 벡터, 플라스미드 등을 이용함), 재프로그래밍 인자의 발현이 유도된다(예를 들면, 소형 유기 분자를 이용함). 예를 들면, 재프로그래밍 인자는 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터를 이용한 감염에 의해 체세포에서 발현될 수 있다. 또한, 재프로그래밍 인자는 비통합 벡터, 예컨대 에피솜 플라스미드를 이용해 체세포에서 발현될 수 있다. 예를 들면, 문헌 [Yu et al., Science. 2009 May 8;324(5928):797-801]을 참조하며, 이는 그 전체로 참조하여 본원에 편입된다. 재프로그래밍 인자가 비통합 벡터를 이용해 발현시, 인자는 벡터를 이용한 전기천공, 형질감염, 또는 형질전환을 사용해 세포에서 발현될 수 있다. 예를 들면, 마우스 세포에서, 통합 바이러스 벡터를 이용한 4종의 인자(OCT3/4, SOX2, C-MYC, 및 KLF4)의 발현은 체세포를 재프로그래밍에 충분하다. 인간 세포에서, 통합 바이러스 벡터를 이용한 4종 인자(OCT3/4, SOX2, NANOG, 및 LIN28)의 발현은 체세포를 재프로그래밍하는데 충분하다.
- [0162] 재프로그래밍 인자를 세포에서 발현하면, 세포를 배양할 수 있다. 시간 경과하면, ES 특징을 갖는 세포가 배양 디쉬에서 나타난다. 예를 들면, ES 형성을 기반으로, 또는 선별 또는 검출 마커의 발현을 기반으로 세포를 선택하고 서브배양할 수 있다. 세포는 ES 세포를 닮은 세포의 배양물을 생성하도록 배양될 수 있다 - 이들은 추정 iPS 세포이다.
- [0163] iPS 세포의 다능성을 확증하기 위해서, 세포는 1 이상의 다능성 어세이에서 검사될 수 있다. 예를 들면, 세포는 ES 세포 마커의 발현에 대해 검사될 수 있다. 세포는 SCID 마우스에 이식시 기형종을 생성시키는 능력에 대해 평가될 수 있다. 세포는 모든 3종 배엽층의 세포 유형을 생성시키도록 분화되는 능력에 대해 평가될 수 있다. 만능 iPSC가 얻어지면, 본원에 개시된 세포 유형, 광수용기 전구체 세포, 광수용기 세포, 간상체, 추상체 등, 및 본원, 예를 들면 실시예에 기술된 다른 세포 유형을 생성시키는데 사용될 수 있다.
- [0164] 자극-촉발된 다능성 획득(STAP) 세포는 아치사 자극 예컨대 저-pH 노출을 이용해 체세포를 재프로그래밍시켜 생성된 만능 줄기 세포이다. 재프로그래밍은 체세포의 유전자 조작 또는 핵전이를 필요로하지 않는다. 문헌

[Obokata et al., Nature, 505:676-680, 2014]을 참조한다.

- [0165] "줄기 세포"는 성숙한 세포로 증식 및/또는 분화할 수 있고 경우에 따라, 인간 기원인 만능 세포를 의미하는데 사용된다.
- [0166] "성인 줄기 세포"는 성인 조직에서 단리된 다능 세포를 의미하며 골수 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포 및 지방 줄기 세포를 포함할 수 있고 인간 기원이다.
- [0167] "망막"은 광수용기, 수평 세포, 양극 세포, 아마크린 세포, 플러 신경교 세포 및 신경절 세포로 구성된 3종의 핵층으로 적층된, 눈의 신경 세포를 의미한다.
- [0168] "전구체 세포"는 최종 세포계통으로 분화될 수 있는 세포를 의미한다. 본 발명의 실시양태에서, "안구 영역 전구체 세포"는 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포로부터 분화되고 마커 PAX6 및 RX1을 발현한다. 본 발명의 실시양태에서, "망막 신경 전구체 세포"는 세포 마커 PAX6 및 CHX10을 발현하는, 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포로부터 분화된 세포를 의미한다. 본 발명의 실시양태에서, "광수용기 전구체"는 마커 PAX6를 발현하지만 마커 CHX10을 발현하지 않는(즉, CHX10(-)) 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포로부터 분화된 세포를 의미한다. 이들 세포는 망막 신경 전구체 단계에서 CHX10을 일시적으로 발현하지만 세포가 광수용기 전구체 단계로 분화될 때 CHX10 발현이 꺼진다. 또한, "광수용기"는 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포로부터 분화된 유사분열후 세포를 의미하고 세포 마커 로돕신 또는 3종 추상체 옵신 중 임의의 것을 발현하고, 경우에 따라 간상체 또는 추상체 cGMP 포스포디에스테라아제를 발현한다. 광수용기는 또한 광수용기에서 발견되는, 마커 리커버린을 발현할 수 있다. 광수용기는 간상체 및/또는 추상체 광수용기일 수 있다.
- [0169] 본원에서 사용되는 질환의 "징후"는 질환의 주관적인 표시인, 증상과 대조적으로, 질환의 객관적인 표시인, 환자의 검사 시 발견될 수 있는, 질환의 임의의 비정상적인 표시를 광범위하게 의미한다.
- [0170] 본원에서 사용되는 질환의 "증상"은 광범위하게 환자가 경험하고, 질환을 의미하는, 구조, 기능, 또는 감각에 있어 정상으로부터의 이탈 또는 임의의 병적인 현상을 의미한다.
- [0171] 본원에서 사용되는 "요법", "치료적", "치료하는", "치료하다", 또는 "치료"는 광범위하게 질환의 치료, 질환의 발생 또는 이의 임상적 증상의 중지 또는 감소, 및/또는 질환의 완화, 질환 또는 이의 임상적 증상의 후퇴 야기를 의미한다. 요법은 예방, 방지, 치료, 치유, 교정, 감소, 완화, 및/또는 질환, 질환의 징후 및/또는 증상의 경감 제공을 포함한다. 요법은 질환 징후 및/또는 증상이 진행되는 환자에서 징후 및/또는 증상의 완화를 포함한다. 요법은 또한 "예방" 및 "방지"를 포함한다. 예방은 환자에서 질환의 치료 후 발생하는 질환의 방지 또는 환자에서 질환의 발생률 또는 중증도의 감소를 포함한다. 요법의 목적으로 "감소된"은 광범위하게 징후 및/또는 증상의 임상적으로 유의한 감소를 의미한다. 요법은 재발 또는 빈발한 징후 및/또는 증상의 치료를 포함한다. 요법은 제한없이, 언제든지 징후 및/또는 증상의 출현의 방지를 비롯하여 존재하는 징후 및/또는 증상의 감소 및 존재하는 징후 및/또는 증상의 제거를 포함한다. 요법은 만성 질환("유지") 및 급성 질환의 치료를 포함한다. 예를 들면, 치료는 징후 및/또는 증상의 재발 또는 빈발의 치료 또는 방지를 포함한다.
- [0172] 본 발명에 따르면 그에 따라 본원에 제공된 제조물 중 1 이상을 이용해 치료되는 병태는 제한없이, 나이 관련 황반 변성을 포함하는 황반 변성을 포함하고, 이러한 황반 변성은 초기 또는 후기일 수 있다. 치료되는 다른 병태는 제한없이, 망막 색소변성증, 망막 이형성증, 망막 변성, 당뇨병성 망막병증, 선천성 망막 이영양증, 레버 선천성 흑내장, 망막 박리, 녹내장, 시력 신경병증, 및 눈에 영향을 주는 외상을 포함한다.
- [0173] **세포 마커:** 발현에 대해 평가될 수 있는 예시적인 세포 마커는, 단백질 및/또는 mRNA에서 평가될 수 있는, 다음의 것들을 포함한다: PAX6, RX1, SIX3, SIX6, LHX2, TBX3, SOX2, CHX10, 네스틴, TRβ2, NR2E3, NRL, MASH1, RORβ, 리커버린, 옵신, 로돕신, 간상체 및 추상체 cGMP 포스포디에스테라아제([Fischer AJ, Reh TA, Dev Neurosci. 2001;23(4-5):268-76; Baumer et al., Development. 2003 Jul;130(13):2903-15, Swaroop et al., Nat Rev Neurosci. 2010 Aug;11(8):563-76, Agathocleous 및 Harris, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2009. 25:45-69]를 참조하며, 이들은 그 전체를 참조하여 본원에 편입됨). 상기 마커 식별자는 일반적으로 문헌 및 당 분야, 특히 광수용기, 간상체, 추상체, 광수용기 분화, 광수용기 전구체, 신경 분화, 신경 줄기 세포, 만능 줄기 세포와 관련된 문헌을 포함하는, 유전자 식별자를 본원에서 인용한 문맥과 관련된 분야, 및 문맥에서 언급한 다른 분야에서처럼 사용된다. 부가적으로, 마커는 예를 들면, 문맥에서 달리 언급한 경우를 제외하고, 대체로 인간이다. 세포 마커는 당분야의 숙련자에게 잘알려진 기술인 통상적인 면역세포화학 방법 또는 통상적인 PCR 방법을 이용해 식별할 수 있다.
- [0174] **세포 배양 배지:** 본 발명의 실시양태에서, 세포는 다양한 세포 배양 배지에서 저장, 증식 또는 분화된다. 망막

유도 배지는 안구 영역 전구체 세포로의 줄기 세포 생성을 위해 이용된다. 망막 유도 배지는 D-글루코스, 페니실린, 스트렙토마이신, N2 보충제(예를 들면, 0.1- 5%), B27 보충제(예를 들면, 0.005 내지 0.2%), MEM 비필수 아미노산 용액을 포함하고, 경우에 따라 인슐린 및/또는 노킨을 포함하며, DMEM/F12(Invitrogen) 또는 유사한 기본 배지에 존재할 수 있다. 예를 들면, 망막 유도 배지는 적어도 인슐린을 포함한다. 부가적으로, 인슐린 농도는 세포 생존 및/또는 분화된 세포의 산출을 촉진할 수 있게, 다양하거나 또는 증가될 수 있다. 예를 들면, 인슐린 농도는 이들 속성 중 하나 또는 둘 모두를 개선시키는 인슐린 농도를 동정하기 위해서 모니터링된 생존 및/또는 분화 및 범위에 따라 다양할 수 있다. 노킨의 부가는 필수적이지 않다고 여겨지지만 안구 영역 전사 인자의 발현을 증가시키는 것으로 관찰되었다.

[0175] DMEM/F12, 신경기저 배지, N2 혈청 보충제, 및 B27 혈청 보충제의 성분은 도 21에 제공한다. 본 발명은 이들 특정한 배지 및 보충제 또는 이들 성분을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 이로 실질적으로 이루어진 배지 또는 보충제의 사용을 고려함을 이해한다.

[0176] 본원에서 기술된 방법은 인간 인자 예컨대 인간 노킨, 인간 인슐린 등을 사용할 수 있다.

[0177] 노킨은 보고에 따르면 TGF β 패밀리의 활성을 차단하는 높은 활성으로 보고에 따르면 BMP2, BMP4, 및 BMP7에 결합하는 분비 BMP 억제제이다. SB431542는 보고에 따르면 ACTRIB, TGF β R1, 및 ACTRIC 수용체의 인산화를 차단하여 TGF β /액티빈/노달을 억제하는 소형 분자이다. SB431542는 액티빈- 및 Nanog-매개 다능성 네트워크를 탈안정화시킬 뿐만 아니라 내생성 액티빈 및 BMP 신호를 차단하여 BMP 유도된 영양막, 중배엽, 및 내배엽 세포 운명을 억제한다. 상기 언급한 활성의 1 이상을 갖는 제제는 예를 들면 개시된 방법의 문맥에서 사용되는 바와 같이, 노킨 및 SB431542 중 하나 또는 둘 모두의 기능을 교체하거나 또는 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 예를 들면, 출원자는 단백질 노킨 및/또는 소형 분자 SB4312542가 다음의 3가지 표적 영역 중 어느 것 또는 모두에 영향을 미치는 1 이상의 억제제에 의해 교체되거나 또는 증가될 수 있을 것으로 구상하였다: 1) 수용체의 리간드의 결합을 방지; 2) 수용체의 활성화 차단(예를 들면, 돌소몰핀) 및 3) SMAD 세포내 단백질/전사 인자의 억제. 예시적인 잠재적으로 적합한 인자는 천연 분비된 BMP 억제제 콜딘(BMP4를 차단함) 및 폴리스타틴(액티빈을 차단함)을 비롯하여 이의 유사체 또는 모방체를 포함한다. 노킨의 효과를 모방할 수 있는 추가의 예시적인 인자는 BMP2, BMP4, 및/또는 BMP7을 격리시키는 우성 음성 수용체 또는 차단 항체의 사용을 포함한다. 부가적으로, 수용체 인산화에 대해서, 돌소몰핀(또는 화합물 C)은 줄기 세포에 대해 유사한 효과를 갖는 것으로 보고되었다. SMAD 단백질의 억제는 가용성 억제제 예컨대 SIS3(6,7-디메톡시-2-((2E)-3-(1-메틸-2-페닐-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일-프로프-2-에노일))-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린, Specific Inhibitor of Smad3, SIS3), 억제제 SMAD(예를 들면, SMAD6, SMAD7, SMAD10) 중 1 이상의 과발현 또는 수용체 SMAD(SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8/9) 중 하나에 대한 RNAi를 사용하여 실시될 수 있다. 신경 전구체를 생성시키는데 적합한 것으로 예상되는 인자의 다른 조합은 신경능 줄기 세포를 생성하는데 효과적인 것으로 이전에 확인된 백혈병 억제 인자(LIF), GSK3 억제제(CHIR 99021), 화합물 E(γ 시크리타아제 억제제 XXI) 및 TGF β 억제제 SB431542의 콤비네이션을 포함한다(Li et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 May 17;108(20):8299-304). 추가의 예시적인 인자는 SB431542의 유도체, 예를 들면, 1 이상의 부가되거나 또는 상이한 치환체, 유사한 작용기 등을 포함하고, 1 이상의 SMAD 단백질에 대해 유사한 억제 효과를 갖는 분자를 포함할 수 있다. 적합한 인자 또는 인자의 조합은 예를 들면, 만능 세포를 상기 인자(들)과 접촉시키고 안구 영역 전구체 세포 표현형의 채택, 예컨대 특징적인 유전자 발현(본원에 기술된 마커의 발현, 안구 영역 전구체 세포 프로모터와 커플링된 유전자의 발현 등을 포함) 또는 본원에 개시된 세포 유형, 예컨대 망막 신경 전구체 세포, 광수용기 전구체, 간상체 전구체, 추상체 및/또는 간상체를 형성하는 능력에 대해 모니터링하여 동정할 수 있다.

[0178] 바람직하게 신경 분화 배지에서 배양전에 망막 유도 배지로 처리되거나 또는 그에서 배양된다. 신경 분화 배지는 망막 신경 전구체 세포로의 안구 영역 전구체 세포 생성을 위해 사용된다. 신경 분화 배지는 D-글루코스, 페니실린, 스트렙토마이신, GlutaMAX™, N2 보충제, B27 보충제, MEM 비필수 아미노산 용액을 포함하고, 경우에 따라 노킨을 포함한다. 신경 분화 배지는 또한 노킨의 포함없이, 광수용기 전구체 세포로의 망막 신경 전구체 세포 생성을 위해 이용될 수 있다. 경우에 따라 레티노산 및 타우린이 보충된 신경 분화 배지의 사용과 이어서, 경우에 따라 D-글루코스, 페니실린, 스트렙토마이신, GlutaMAX™, N2 보충제, B27 보충제(예를 들면, 포물라 번호 080085-SA)를 포함하는 광수용기 분화 배지(Invitrogen)가 이용되며 포스폴린, BDNF, CNTF, LIF 및 DATP의 부가를 광수용기 세포로 광수용기 전구체 세포 생성에 이용된다. 예를 들면, 광수용기 분화 배지는 전술한 배지에 존재하는 양으로, 또는 상이하거나 또는 보다 많은 양으로, 갑상선 호르몬을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 배지는 외인적으로 부가된 갑상선 호르몬을 포함한다. 예시적인 실시양태에서, 광수용기 분화 배지는 1, 2, 또는 3종 모두의 BDNF, CNTF 및 DATP, 예를 들면, BDNF, CNTF, DATP, BDNF 및 CNTF, CNTF 및 DATP, BDNF 및

DATP, 또는 3종의 모든 BDNF, CNTF 및 DATP를 포함하고, 배지는 경우에 따라 신경기저 배지를 포함하고/하거나 경우에 따라 갑상선 호르몬을 포함할 수 있다.

[0179] 신경 분화 배지 성분은 다음과 같다: N2: 1%(100 mL 당 1 mL의 N2), B27: 2%(100 mL 당 2 mL의 B27), 및 노킨: 50 ng/mL.

[0180] 노킨은 세포가 모두 안구 영역 전구체가 된 후에는 필요하지 않다.

[0181] **배아 줄기 세포(ESC) 또는 성체 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포(iPS):** 본원에서 사용되는 ESC, 또는 성체 줄기 세포 또는 iPS 세포는 공급세포 무함유 시스템, 예컨대 예컨대 Matrigel™(EHS 마우스 육종 세포 유래의 가용성 조제물) 또는 다른 매트릭스에서 증식될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 상기 만능 세포는 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 콜라겐, 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 콜라겐 VIII, 헤파란 설페이트, Matrigel™(EHS 마우스 육종 세포 유래 가용성 조제물), 셀스타트, 인간 기저막 추출물, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 매트릭스에서 배양될 수 있다. 상기 매트릭스는 Matrigel™(EHS 마우스 육종 세포 유래 가용성 조제물)을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 실질적으로 이루어진다. 줄기 세포는 종래 기술에서의 개선점인, 배양에서 배상체를 형성하지 않는다. 세포는 외부 인자 부재 하에서 안구 영역 전구체 세포로 분화된다. 실시양태에서, ESC는 노킨 존재 하에서 안구 영역 전구체 세포로 분화된다.

[0182] **안구 영역 전구체 세포(EFPC):** EFPC는 ESC, 성체 줄기 세포 또는 유도 만능성 세포(iPC)로부터 PAX6(+) 및 RX1(+)으로 분화된다. EFPC는 또한 SIX3(+), SIX6(+), LHX2(+), TBX3(+) 네스틴(+) 및/또는 SOX2(+) 및 OCT4(-) 및 NANOG(-)일 수 있다. EFPC로의 분화는 DMEM/F12, D-글루코스, 페니실린, 스트렙토마이신, N2 보충제, B27 보충제, MEM 비필수 아미노산 및 인슐린을 포함하는 망막 유도 배지에서 일어난다. 5일에, 세포가 합류에 도달하면, 세포를 신경 분화 배지로 교체해준다. 바람직하게, EFPC를 생성하는 단계는 이러한 배양 조건이 역으로 만능 세포 생존도에 영향을 미칠 수 있음이 관찰된 바와 같이, 이하에 기술된 신경 분화 배지에서 만능 세포를 배양하기 전에 수행된다.

[0183] **망막 신경 전구체 세포(RNPC):** RNPC는 외부 인자의 부재 하에서 EFPC로부터 분화된다. RNPC는 PAX6(+) 및 CHX10(+)이다. 이 상태에서 세포는 Tuj1+ 또는 Tuj1-일 수 있다. 경우에 따라, 방법은 이 단계에서 Tuj1+ 또는 Tuj1- 세포의 강화 또는 정제 단계, 및/또는 강력한 Tuj1+ 세포의 정제 또는 제거 단계 및/또는 강력한 Tuj1- 세포(예를 들면, 심지어 이의 낮은 수준의 검출가능 발현이 결여)의 정제 및 제거 단계 및 이들 개체군 중 하나 또는 나머지와 후속 방법의 단계를 진행하는 것을 포함한다. 실시양태에서, 노킨은 EFPC로부터 RNPC로의 분화를 가속하기 위해 부가된다. RNPC로의 분화는 신경기저 배지(Invitrogen), D-글루코스, 페니실린, 스트렙토마이신, GlutaMAX™, N2 보충제, B27 보충제 및 MEM 비필수 아미노산 용액을 포함하는 신경 분화 배지에서 일어난다. 노킨은 5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도로 부가된다.

[0184] **광수용기 전구체 세포(PhRPC):** PhRPC는 노킨 부재하에 신경 분화 배지에서 RNPC로부터 분화될 수 있다. PRPC는 PAX6(+) 및 CHX10(-)이다. 실시양태에서, PRPC의 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는 PAX6(+) 및 CHX10(-)이다. PRPC는 또한 Nr2e3(+), Tr β 2(+), Mash1(+), ROR β (+) 및/또는 NRO(+)이다. CHX10의 존재는 양극 세포계통을 시사하지만, 본 발명의 방법에서, PRPC는 광수용기 계통으로 분화되고, 따라서 이 단계에서 CHX10을 보유하지 않는다. 세포는 구체 또는 신경구로부 성장된다(예를 들면, 저부착 플레이트 상에 또는 경우에 따라 현적 배양으로, 저중력 환경에서, 또는 다른 적합한 배양 조건에서).

[0185] **광수용기(PR):** PR은 2 단계 분화 과정: 1) 2주 동안 신경 분화 배지에 레티노산 및 타우린 부가 및 2) 광수용기 분화 배지의 부가로 PhRPC로부터 분화된다. - 실시예 2를 참조한다.

[0186] PR은 로돕신(+), 리커버린(+), PE6a(+) 또는 옵신(+)이다. 옵신은 임의의 추상체 옵신이다. PR은 추상체 또는 간상체에 대해 쌍전위성일 수 있다. 이러한 방법으로 생성된 예시적인 광수용기는 일부 이전에 기술된 알려진 광수용기 세포와 대조적으로, PAX6-이다. 예시적인 실시양태에서 이하에 기술된 바와 같이, 1) 2주 동안 ND 배지 및 레티노산 및 타우린 부가, 및 2) 광수용기 분화 배지의 사용의 2 단계 분화 과정이 존재하고, 이 방법은 이하 실시예에서 더욱 설명한다.

[0187] 예시적인 실시양태에서, 방법은 출발 1백만 만능 세포 당 4-6천만 EFPC, 6-9천만 RNPC, 또는 5-10억 PhRPC를 생성한다.

[0188] 예시적인 실시양태에서, 세포는 이를 필요로 하는 래트, 예를 들면 RCS 래트, 또는 다른 질환 동물 모델(예를 들면, 야맹 또는 색맹)에 이식될 수 있고, 시기능에 대한 최종 효과는 시운동 반응 검사, ERG, 발광 역치 기록법

및/또는 시중심 혈류 어세이를 통해 검출될 수 있다.

[0189]

응용 및 용도

[0190]

스크리닝 어세이

[0191]

본 발명은 망막 전구체 세포의 분화를 조정하는 다양한 제제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 또한 망막 전구체 세포로부터 배양에서 생성되는 성숙한 광수용기를 지지 및/또는 규제하는 치료제를 발견하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서, "작용제"는 제한없이, 생물학적 또는 화학적 화합물 예컨대 단순 또는 복합 유기 또는 무기 분자, 펩티드, 단백질(예를 들면, 항체), 폴리뉴클레오티드(예를 들면, 안티센스) 또는 리보자임을 포함한다. 화합물의 방대한 어레이, 예를 들면 중합체 에커대 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드, 및 다양한 코어 구조를 기반으로하는 합성 유기 화합물을 합성할 수 있고, 이들은 또한 용어 "작용제"에 포함된다. 또한, 다양한 천연 공급원은 스크리닝용 화합물, 예컨대 식물 또는 동물 추출물 등을 제공할 수 있다. 항상 명확하게 언급하지는 않지만, 작용제는 단독으로 사용되거나 또는 본 발명의 스크리닝을 통해 동정된 작용제와 같거나 다른 생물학적 활성을 갖는, 다른 작용제와 조합되어 사용될 수 있음을 이해한다.

[0192]

시험관내 스크리닝 방법을 실시하기 위해서, 세포의 단리된 개체군은 본원에서 기술된 대로 얻을 수 있다. 작용제가 DNA 또는 RNA 이외의 조성, 예컨대 상기 기술된 바와 같은 소형 분자인 경우, 작용제는 세포에 직접적으로 부가되거나 또는 부가를 위해 배양 배지에 부가된다. 당분야의 숙련가에게 자명한 바와 같이, "유효"량은 경험적으로 결정되어 부가되어야 한다. 작용제는 폴리뉴클레오티드인 경우, 유전자총 또는 전기천공의 이용을 통해 직접 부가될 수 있다. 다르게, 유전자 전달 비히클 또는 상기 기술된 다른 방법을 이용해 세포에 삽입될 수 있다. 양성 및 음성 대조군은 약물 또는 다른 작용제의 알려진 활성을 입증하기 위해 어세이될 수 있다.

[0193]

감각신경 망막 구조

[0194]

광수용기 전구체 세포, 및 경우에 따라 이로부터 분화된 광수용기 세포는 감각신경 망막 구조를 생성하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명은 망막 색소 상피(RPE) 세포 및 광수용기 세포(또는 광수용기 전구체 세포)를 구성하는 다층 세포 구조의 생성을 고려한다. 이들 구조는 약물 스크리닝, 질환 모델로서, 또는 약학 조제물로서 또는 그 안에 사용될 수 있다. 후자의 경우, 약학 조제물은 "패치"처럼 이식될 수 있는 생체적합성 고상 지지체 또는 매트릭스(바람직하게, 생체재흡수 매트릭스 또는 지지체) 상에 배치될 수 있는, RPE-광수용기 그라프트일 수 있다.

[0195]

추가 예시를 위해서, 세포에 대한 생체적합성 지지체는 망막 전구체 세포에 대한 생분해성 폴리에스테르 필름 지지체일 수 있다. 생분해성 폴리에스테르는 망막 전구체 세포의 증식 및 분화를 지지하는 기질 또는 스캐폴드로서 사용하기 적합한 임의의 생분해성 폴리에스테르일 수 있다. 폴리에스테르는 박막, 바람직하게는 미소구조막을 형성할 수 있어야 하고, 조직 또는 세포 이식에 사용하는 경우 생분해성이어야 한다. 본 발명에서 사용하기 적합한 생분해성 폴리에스테르는 폴리락트산(PLA), 폴리락티드, 폴리히드록시알카노에이트, 동중중합체와 공중합체, 예컨대 폴리히드록시부티레이트(PHB), 폴리히드록시부티레이트 코-히드록시발레레이트(PHBV), 폴리히드록시부티레이트 코-히드록시헥사노에이트(PHBHx), 폴리히드록시부티레이트 코-히드록시옥토노에이트(PHBO) 및 폴리히드록시부티레이트 코-히드록시옥타데카노에이트(PHBod), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리에스테르아미드(PEA), 지방족 코폴리에스테르, 예컨대 폴리부티렌 숙시네이트(PBS) 및 폴리부티렌 숙시네이트/아디페이트(PBSA), 방향족 코폴리에스테르를 포함한다. 고 및 저 분자량 폴리에스테르, 치환 및 미치환 폴리에스테르, 블록, 분지 또는 무작위, 및 폴리에스테르 혼합물 및 블렌드를 사용할 수 있다. 바람직하게 생분해성 폴리에스테르는 폴리카프로락톤(PCL)이다.

[0196]

일정 실시양태에서, 생체적합성 지지체는 폴리(p-크실릴렌) 중합체, 예컨대 파릴렌 N, 파릴렌 D, 파릴렌-C, 파릴렌 AF-4, 파릴렌 SF, 파릴렌 HT, 파릴렌 VT-4 및 파릴렌 CF, 및 가장 바람직하게는 파릴렌-C이다.

[0197]

중합성 지지체는 전형적으로 공지의 기술을 이용해 박막으로 형성될 수 있다. 막의 두께는 유리하게는 약 1 미크론 내지 약 50 미크론이고, 바람직하게는 약 5 미크론 두께이다. 필름의 표면은 부드럽거나, 또는 필름 표면은 부분적으로 또는 완전하게 미소구조일 수 있다. 적합한 표면 구조는 예를 들면, 미세그루브 또는 미세포스트를 포함한다. 필름은 자르고 성형하여 이식에 적합한 형상을 형성시킬 수 있다.

[0198]

RPE 및/또는 광수용기 세포s 또는 광수용기 전구체 세포는 생체적합성 스캐폴드를 형성하도록 필름 상에 함께 또는 순차적으로(예를 들면, RPE 층이 형성된 후 광수용기 세포 또는 광수용기 전구체 세포) 직접 플레이팅할 수 있다. 다르게, 중합체 필름은 적합한 코팅 물질 예컨대 폴리-D-리신, 폴리-L-리신, 피브로넥틴, 라미닌, 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 비트로넥틴 및 Matrigel™로 코팅될 수 있다. 세포는 임의의 바람직한 밀도로 플레이팅될

수 있지만, RPE 세포의 단일 층(RPE 단층)이 바람직하다.

[0199]

치료 용법

[0200]

본 발명은 또한 본 발명의 광수용기 전구체 세포, 또는 이로부터 유래된 광수용기 또는 이의 조합을 포함하는 약학 조제물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 이러한 치료를 필요로하는 환자에서 광수용기 세포를 교체 또는 복수시키는 방법을 제공한다. 본원에 기술된 바와 같이, 약학 조제물은 시험관내에서 이식가능한 조직으로 형성된 세포 또는 세포의 현탁물일 수 있다. 많은 예에서, 세포는 질환이 있거나 또는 퇴행된 망막의 망막하 공간에 투여될 수 있다. 그러나, 본 발명의 광수용기 전구체 세포가 또한 신경보호 효과를 가지므로, 세포는 국소적으로 그러나 망막의 외부(예컨대 유리체에)에 또는 세포에 의해 또는 신체의 다른 부분에 전신 전달로 투여될 수 있다.

[0201]

본 발명의 약학 조제물은 망막 변성 관련 질환을 포함하는, 시각계 악화를 초래하는, 광범위한 질환 및 질병에서 사용될 수 있다, 이러한 질환 및 질병은 노화에 의해 야기되어서, 악화의 실질적인 소스로서 확인될 수 있는 손상 또는 질환의 부재를 나타낸다. 숙련가는 이러한 질환 상태의 진단, 및/또는 이러한 손상의 기저 징후의 검사를 위한 확립된 방법을 이해할 것이다. 또한, 동물의 시각계 측면에서 나이 관련 쇠퇴 또는 악화에 대한 정보가 풍부한 문헌이 존재한다. 용어 "망막 변성-관련 질환"은 선천적 또는 생후 망막 변성 또는 이상으로 초래되는 임의의 질환을 의미하고자 한다. 망막 변성-관련 질환의 예에는 망막 이형성증, 망막 변성, 노화 황반 변성, 당뇨병성 망막병증, 망막 색소변성증, 선천성 망막 이영양증, 레버 선천성 흑내장, 망막 박리, 녹내장, 시력 신경병증, 및 외상이 포함된다.

[0202]

부가적으로 또는 대안적으로, 시계 성분, 예컨대 신경감각 망막의 악화는 손상, 예를 들면 시각계 자체(예를 들면, 눈), 머리 또는 뇌, 또는 보다 일반적으로 신체에 대한 외상에 의해 야기될 수 있다. 일부 이러한 손상은 나이 관련 손상, 즉 나이에 따른 그들의 가능성 또는 빈도 증가로 알려져 있다. 이러한 손상의 예에는 망막 열공, 황반 천공, 망막 전막, 및 망막 박리를 포함하고, 이들 각각은 임의 연령의 동물에서 일어날 수 있지만, 아니면 건강한 노령 동물을 포함하여, 노령 동물에서 더 일어날 수 있거나, 또는 보다 높은 빈도로 일어날 수 있다.

[0203]

시각계 또는 이의 성분의 악화는 또한 질환에 의해 야기될 수 있다. 질환중에서도 시각계에 영향을 미치는 다양한 나이 관련 질환이 포함된다. 이러한 질환은 젊은층보다는 보다 늙은 동물에서 보다 큰 가능성 및/또는 빈도로 발생한다. 예를 들면, 신경감각 망막층을 포함하는, 시각계에 영향을 미치고, 이의 악화를 야기하는 질환에는 다양한 형태의 망막염, 시신경염, 황반 변성, 증식성 또는 미증식성 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 황반 부종, 진행성 망막 위축증, 진행성 망막 변성, 급성 망막 변성, 면역-매개 망막병증, 망막 이형성증, 맥락망막염, 망막 빈혈, 망막 출혈(전망막, 망막내 및/또는 망막하), 고혈압 망막병증, 망막 염증, 망막 부종, 망막아세포종, 또는 망막 색소변성증이 포함된다.

[0204]

전술한 질환 중 일부는 일부 동물 예컨대 반려 동물, 예를 들면 개 및/또는 고양이에 특이적인 경향이 있다. 질환의 일부는 충칭적으로 열거하였으며, 즉, 많은 유형의 망막염, 또는 망막 출혈이 존재할 수 있고, 따라서, 질환의 일부는 하나의 특이적인 기병성인자에 의해 야기되지 않지만, 질환의 유형 또는 그 결과를 보다 기술한다. 시각계의 1 이상의 성분의 쇠퇴 또는 악화를 야기할 수 있는 많은 질환은 동물의 시각계에 대해 원발성 및 속발성 또는 보다 원격의 효과를 갖는다.

[0205]

유리하게, 본 발명의 약학 조성물은 광수용기 세포 기능의 결여 또는 감소를 보상하는데 사용될 수 있다. 망막 줄기 세포 개체군 및 본 발명의 방법에 의해 치료되는 망막 이상기능의 예에는 제한없이, 광수용기 변성(예를 들면, 망막 색소변성증, 추상체(망막 색소변성증, 추상체 이영양증, 추상체-간상체 및/또는 간상체-추상체 이영양증, 및 황반 변성에서 발생하는 바와 같이); 망막 박리 및 망막 외상; 레이저 또는 일광에 의한 광변성; 황반 천공; 황반 부종; 야맹증 및 색맹; 당뇨병 또는 혈관 폐색에 의한 허혈성 망막병증; 조숙/조산에 의한 망막병증; 감염성 병태, 예를 들면, CMV 망막염 및 톡소플라즈마증; 염증성 병변, 예컨대 포도막염; 종양, 예컨대 망막아세포종 및 안구 흑색종; 및 녹내장, 외상성 시력 신경병증, 및 방사선 시력 신경병증 및 망막병증을 포함한, 안구 신경병증에 영향을 주는 내망막 뉴런의 교체를 포함한다.

[0206]

일 측면에서, 세포는 치료를 필요로하는 환자에서 망막 색소변성증의 증상을 치료 또는 완화시킬 수 있다. 다른 측면에서, 세포는 치료를 필요로하는 환자에서, 황반 변성, 예컨대 나이 관련 황반 변성(습식 또는 건식), 스타르가르트 질환, 근시성 황반 변성 등의 증상을 치료하거나 또는 완화시킬 수 있다. 이러한 모든 치료를 위해서, 세포는 환자에 대해 자가조직성 또는 동종이계성이다. 추가 측면에서, 본 발명의 세포는 다른 치료와 병용하여

투여될 수 있다.

- [0207] 망막 색소변성증(RP)은 광수용기의 점진적인 변성에 의한 진행성 시력 소실을 특징으로 하는 유전적 눈 질환의 이종성 군을 의미한다. 미국에서 대략 100,000명이 RP를 갖는다. 한가지 규정 하에서 이러한 질병군의 분류는 이들 환자에서 가장 일반적으로 관찰되는 임상적 특징을 기반으로 한다. RP의 특징은 야맹증 및 주변시야 감소, 망막 혈관의 협소화, 파괴된 망막 색소 상피로부터 망막으로의 색소 이동, 흔히 망막 혈관 옆에 다양한 크기의 클럼프 형성 등이다.
- [0208] 전형적으로, 환자는 먼저 간상체 광수용기의 소실로 인해 밤에 보는 것에 대해 어려움을 인식하게 되고, 나머지 추상체 광수용기가 이어서 시각 기능의 중심이 된다. 그러나, 수십여년간, 추상체는 또한 변성되어서, 시력의 점진적인 소실을 일으킨다. 대부분의 RP 환자에서, 시각 영역 결함은 응시로부터 30° 내지 50° 의 망막 중앙대에서 시작된다. 결함 영역은 점차적으로 확대되어서, 주변부 및 수축된 중심 영역에 시야의 섬(터널시라고 함)을 남긴다. 시야계가 20° 또는 그이하로 수축되고/되거나 중심 시야가 20/200 또는 더 악화되면, 환자는 정식으로 실명이 된다.
- [0209] 유전 패턴은 RP가 X-연결(XLRP), 상염색체 우성(ADRP), 또는 열성(ARRP) 모드로 전승될 수 있음을 의미한다. RP의 3가지 유전자 유형 중에서, ADRP가 가장 흔하다. 이들 환자는 종종 60세 및 그 이상까지 우수한 중심 시력을 유지한다. 대조적으로, XLRP 형의 질환을 갖는 환자는 일반적으로 30세 내지 40세까지 정식으로 실명이다. 그러나, 증상의 중증도 및 개시 연령은 동일한 RP 유전자형을 갖는 환자간에 상당히 다양하다. 이러한 가변성은 아마도 모든 영향받은 구성원이 동일한 유전자 돌연변이를 가지는 경우, 동일 패밀리에 있어서도 명백하다. 많은 RP-유도 돌연변이가 이제 설명되었다. 동정된 유전자 중에서, 많은 것들이 광수용기-특이적 단백질을 코딩하고, 몇몇은 간상체, 예컨대 로돕신, cGMP 포스포디에스테라아제의 서브유닛, 및 cGMP-게이팅 Ca^{2+} 채널에서의 광전이와 연관된다. 클로닝된 유전자 각각에서 다수의 돌연변이가 발견되었다. 예를 들면, 로돕신 유전자의 경우, 90개의 상이한 돌연변이가 ADRP 환자에서 동정되었다.
- [0210] 특이적 돌연변이와 무관하게, RP 환자에 가장 결정적인 시력 소실은 추상체의 점진적인 변성에 의한다. 많은 경우에서, RP-야기된 돌연변이가 영향을 주는 단백질은 추상체에서 발견되지 않으며, 주요한 예에는 로돕신-간상체-특이적 시각 색소가 있다. 따라서, 추상체의 소실은 간상체-특이적 돌연변이의 간접적인 결과일 수 있다. 손상된 광수용기를 교체하는 능력은 이 질환의 치료를 위한 접근법을 제공한다.
- [0211] 나이 관련 황반 변성(AMD)은 중심 시각의 점진적인 소실을 야기하고, 55세 이상의 사람들에서 시력 소실의 가장 일반적인 원인이다. 기본적 병리는 광수용기의 변성이다. 다양한 연구들은 유전적 인자, 심혈관 질환, 환경 인자 예컨대 흡연 및 광 노출, 및 AMD 발병 위험에 기여하는 영양적 원인이 연루됨을 보여주었다. RPE 변성은 위에 놓인 광수용기 및 아래의 맥락막 관류 둘 모두의 가변적인 소실을 수반한다. 시력 상실 또는 시야 상실은 RPE 위축증이 공급된 위의 광수용기 세포의 이차적인 소실을 일으킬 때 발생된다. RPE 및 광수용기 세포를 교체하는 능력은 확립된 AMD를 치료하는 수단을 제공한다.
- [0212] 황반 변성은 광범위하게 2가지 유형으로 나뉜다. 모든 사례의 10%를 차지하는, 삼출성-신경혈관 형, 또는 "습식" AMD에서, 비정상적인 혈관 성장이 황반 하에서 일어난다. 망막내 출혈, 망막하 액, 색소 상피 박리, 및 과색소침착과 연관된 맥락막 신생혈관생성의 망막하 네트워크의 형성이 존재한다. 실제로, 이러한 복합체는 수축하고 후극에서 별개의 높은 상흔을 남긴다. 이들 혈관은 액체 및 혈액을 망막으로 유출시키고 따라서 광수용기에 손상을 일으킨다. 습식 AMD는 신속하게 진행되는 경향이 있고, 심각한 손상을 일으킬 수 있으며, 중심 시력의 급속한 소실은 단지 수 개월 동안 발생할 수 있다.
- [0213] AMD 사례의 나머지 90%는 위축성 황반 변성(건식형)이며, 이때 황반 영역에 색소 교란이 존재하지만 황반 영역에서 높은 황반 반흔 및 출혈 또는 삼출은 존재하지 않았다. 이들 환자에서, 망막 색소 상피(RPE)의 점진적인 소실이 존재하고, 그 결과 위축증의 국한된 영역이 생긴다. 광수용기 소실은 RPE의 소실이 후속되므로, 영향받은 망막 영역은 시기능이 거의 없거나 또는 전혀 없다. 건식 AMD로부터의 시력 소실은 수년 동안 보다 점진적으로 일어난다. 이들 환자는 일반적으로 일부 중심 시력을 유지하지만, 소실은 시력 사항을 요구하는 일의 성과를 위태롭게할만큼 충분히 심각할 수 있다.
- [0214] 적절한 연령 및 임상적 발견이 시력, 시야, 또는 다른 시기능의 소실과 수반되는 경우, 종종 병태는 AMD로 분류된다. 가끔은 시력 상실의 개시전 단계는 환자가 특징적인 드루센 및 관련 가족력을 가지면 AMD로 분류되었다.
- [0215] 가끔, 황반 변성은 상당히 어린 나이에 발생된다. 많은 이들 사례는 유전적 돌연변이에 의해 야기된다. 많은 형태의 유전적 황반 변성이 존재하고, 그 각각은 그 자체의 임상적 징후 및 유전적 원인을 갖는다. 가장 일반적인

형태의 청소년 황반 변성은 스타르가르트 질환이라고 알려져 있으며, 상염색체 열성으로 유전된다. 환자는 일반적으로 20세 이하에 진단받는다. 시력 상실의 진행이 가변적이지만, 이들 환자 대부분은 50세까지 정식으로 실명이다. 스타르가르트 질환을 야기하는 돌연변이는 광수용기 막을 통해 레티노이드를 수송하는 단백질을 코딩하는, ABCR 유전자에서 동정되었다.

[0216] 본 발명의 광수용기 전구체 세포는 퇴행성 질환의 치료에서 용도를 발견하였고, 예를 들면, 관심있는 광수용기 계통의 투입 후, 전구체 세포로서, 이의 분화된 자손(간상체 및 추상체)로서 전달될 수 있다. 세포는 그들을 그라프트시키거나 또는 목적하는 망막 부위, 예컨대 외부 유핵층으로 이동시키고, 기능적으로 결핍된 영역을 재구성 또는 재생시키는 방식으로 투여된다.

[0217] 유전적으로 조작된 전구체 세포 또는 광수용기는 또한 퇴행 부위로 유전자 생성물을 표적화하는데 사용될 수 있다. 이들 유전자 생성물은 천연 퇴행 뉴런을 대체하기 위한 생존 촉진 인자, 부위 특이적 뉴런에 그라프트된 세포의 생존 및 분화를 촉진하거나 또는 기능적 회복을 허용하는 신경전달물질(들)을 전달하도록 자가분비 방식으로 작용하는 인자를 포함한다. 생체의 유전자 요법, 예를 들면 배양중인 전구체 세포 또는 광수용기의 재조합적인 조작은 그 인자들이 망막 변성 모델에서 세포 사멸 과정을 유의하게 지연시키는 것으로 확인된, 성장 인자 및 뉴로트로핀 예컨대 FGF2, NGF, 섬모 향신경성 인자(CNTF), 및 뇌 유래 신경영양 인자(BDNF)의 전달을 통해서, RP, AMD, 및 녹내장 및 망막 박리를 야기하는 질환에서 망막 세포 소실을 방지하는 신경 보호 전략으로서 효과적으로 이용될 수 있다. 성장인자 또는 성장 인자의 조합을 합성하기 위해 조작된 광수용기 전구체 및/또는 광수용기 세포를 이용한 요법은 신경보호제의 지속적인 전달을 보장할뿐만 아니라, 손상된 망막을 재구성시킬 수 있다.

[0218] 본 발명의 방법에서, 이식되는 세포는 인간 투여를 위해 충분히 멸균한 조건 하에서 제조된 등장성 부형제를 포함하는 임의의 생리적으로 허용되는 부형제로 수용자에게 전달된다. 의약 제제의 일반적인 원리에서, 독자는 [G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996]에 의해 세포 요법: 줄기 세포 이식, 유전자 요법, 및 세포 면역요법을 참조한다. 세포 부형제 및 조성물의 임의의 수반 성분의 선택은 투여에 사용되는 장치 및 경로에 따라 적용된다. 세포는 주사, 카테터 등에 의해 도입될 수 있다. 세포는 액체 질소 온도에서 동결되고 장기간 동안 보관되며, 해동시 사용될 수 있다. 동결되면, 세포는 일반적으로 10% DMSO, 50% FCS, 40% RPMI 1640 배지에 저장된다.

[0219] 본 발명의 약학 조제물은 경우에 따라서, 바람직한 목적을 위해 작성된 지시서와 함께 적합한 용기에 포장된다. 이러한 제제는 광수용기 전구체 또는 광수용기 세포와의 배합을 위해 적합한 형태로, 망막 분화 및/또는 영양성 인자의 각테일을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 동물에 전달하기 적절한 적합한 완충제 및/또는 부형제를 더 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 그라프트되는 세포를 더 포함할 수 있다.

[0220] 약학 조제물

[0221] PRPC 또는 광수용기 세포는 약학적으로 허용되는 담체와 제제화될 수 있다. 예를 들면, PRPC 또는 광수용기 세포는 단독으로 또는 약학 제제의 성분으로 투여될 수 있다. 대상 화합물은 의약에서 사용하기 위한 임의의 편리한 방식으로 투여를 위해 제제화될 수 있다. 투여에 적합한 약학 조제물은 항산화제, 완충제, 살균제, 용질 또는 현탁제 또는 증점제를 함유할 수도 있는, 1 이상의 약학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액 (예를 들면, 평형 염 용액(BSS)), 분산물, 현탁물 또는 에멀션, 또는 사용전 멸균 주사액 또는 분삭액에 재구성될 수 있는 멸균 분말과 조합하여, PRPC 또는 광수용기 세포를 포함할 수 있다. 예시적인 약학 조제물은 ALCON® BSS PLUS®(각 mL 당, 수중에 염화나트륨 7.14 mg, 염화칼륨 0.38 mg, 염화칼슘 2수화물 0.154 mg, 염화마그네슘 6수화물 0.2 mg, 2염기 인산나트륨 0.42 mg, 중탄산나트륨 2.1 mg, 텍스트로스 0.92 mg, 글루타티온 디설피드(산화된 글루타티온) 0.184 mg, 염산 및/또는 수산화나트륨(pH를 대략 7.4로 조정)를 함유하는 평형 염 용액)와 조합하여 PRPC 또는 광수용기 세포를 포함한다.

[0222] 투여시, 본원에서 사용하는 약학 조제물은 발열원-무함유, 생리적 허용 형태일 수 있다.

[0223] 본원에 기술된 방법에서 사용되는 PRPC 또는 광수용기 세포를 포함하는 조제물은 현탁물, 겔, 콜로이드, 슬러리, 또는 혼합물로 이식될 수 있다. 또한, 조제물은 바람직하게는 망막 또는 맥락막 손상 부위로 전달하기 위해 유리액에 점성 형태로 주사하거나 또는 캡슐화할 수 있다. 또한, 주사시, 냉동보존된 PRPC 광수용기 세포는 망막하 주사에 의한 투여에 바람직한 삼투압 및 농도를 달성하도록 상업적으로 입수되는 평형 염 용액에 재현탁된다. 조제물은 투여된 세포의 부착 및/또는 생존을 촉진할 수 있는, 질환에 완전하게 소실되지 않은 주변 황반 영역에 투여될 수 있다.

- [0224] PRPC 및/또는 광수용기 세포는 본원에 기술된 대로 냉동(냉동보존)될 수 있다. 해동시, 이러한 세포의 생존도는 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 약 100%이다(예를 들면, 해동후 회수된 세포의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 약 100%가 생존하거나 또는 처음에 냉동된 세포수의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 약 100%가 해동 후 생존 상태로 회수됨).
- [0225] 본원의 PRPC 또는 광수용기 세포는 안내 주사에 의해 약학적으로 허용되는 안과 제제로 전달될 수 있다. 유리체 내 주사에 의해 제제를 투여시, 예를 들면, 용액은 최소 부피가 전달되도록 농축될 수 있다. 주사를 위한 농축은 본원에 기술된 인자에 의존적으로, 효과적이고 무독성인 임의의 양이게 할 수 있다. 환자에 치료를 위한 PRPC 또는 광수용기 세포의 약학 조제물은 적어도 약 10^4 세포/мл의 용량으로 제제화될 수 있다. 환자의 치료를 위한 PRPC 또는 광수용기 세포 조제물은 적어도 약 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 또는 10^{10} PRPC 또는 광수용기 세포/мл의 용량으로 제제화될 수 있다. 예를 들면, PRPC 또는 광수용기 세포는 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제로 제제화될 수 있다.
- [0226] 본원에 기술된 PRPC 또는 광수용기 세포의 약학 조제물은 적어도 약 1,000; 2,000; 3,000; 4,000; 5,000; 6,000; 7,000; 8,000; 또는 9,000 PRPC 또는 광수용기 세포를 포함한다. PRPC 또는 광수용기 세포의 약학 조제물은 적어도 약 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 또는 9×10^{10} 의 PRPC 또는 광수용기 세포를 포함한다. PRPC 또는 광수용기 세포의 약학 조제물은 적어도 약 1×10^2 - 1×10^3 , 1×10^2 - 1×10^4 , 1×10^4 - 1×10^5 , 또는 1×10^3 - 1×10^6 의 PRPC 또는 PRPC 또는 광수용기 세포를 포함한다. PRPC 또는 광수용기 세포의 약학 조제물은 적어도 약 10,000, 20,000, 25,000, 50,000, 75,000, 100,000, 125,000, 150,000, 175,000, 180,000, 185,000, 190,000, 또는 200,000 PRPC 또는 광수용기 세포를 포함한다. 예를 들면, PRPC 또는 광수용기 세포의 약학 조제물은 적어도 약 50-200 μ l의 부피로 적어도 약 20,000-200,000 PRPC 또는 광수용기 세포를 포함한다. 또한, PRPC 또는 광수용기 세포의 약학 조제물은 150 μ l의 부피로 약 50,000 PRPC 또는 광수용기, 150 μ l의 부피로 약 200,000 PRPC 또는 광수용기 세포, 또는 적어도 약 150 μ l의 부피로 적어도 약 180,000 PRPC 또는 광수용기 세포를 포함한다.
- [0227] 상기 약학 조제물 및 조성물에서, PRPC 또는 광수용기 세포의 수 또는 PRPC 또는 광수용기 세포의 농도는 생존 세포를 계측하고 비생존 세포는 배제하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 비생존 PRPC 또는 광수용기는 생염료(예컨대, 트리판 블루) 배제를 실패하거나, 또는 기능성 어세이(예컨대 배양 기관에 부착능, 식균작용 등)를 이용해 검출될 수 있다. 부가적으로, PRPC 또는 광수용기 세포의 수 또는 PRPC 또는 광수용기 세포의 농도는 1 이상의 PRPC 또는 광수용기 세포 마커를 발현하는 세포를 계측하고/하거나 PRPC 또는 광수용기 이외의 세포 유형을 의미하는 1 이상의 마커를 발현하는 세포를 배제하여 결정할 수 있다.
- [0228] PRPC 또는 광수용기 세포는 약학적으로 허용되는 안구 비히클에서 전달되도록 제제화되어서, 이러한 제제는 눈의 영향받은 영역, 예를 들면, 전안방, 후안방, 유리체, 수양액, 유리액, 각막, 홍채/모양체, 수정체, 맥락막, 망막, 공막, 맥락막상 공간, 결막, 결막하 공간, 공막의 공간, 각막내 공간, 각막외 공간, 초자체 절제, 외과적으로 유도된 무혈관 영역 또는 황반을 세포가 침투하기에 충분한 시간 시간의 기간 동안 안구 표면과 접촉된다.
- [0229] PRPC 또는 광수용기 세포는 세포 시트에 함유될 수 있다. 예를 들면, PRPC 또는 광수용기 세포를 포함하는 세포 시트는 온전한 세포 시트가 박리될 수 있는 기재, 예를 들면 세포가 부착되고 배양 온도에서 증식되면, 온도를 이동시 표면 특징이 변화되어 세포 배양 시트를 방출(예를 들면, 저임계 온도(LCST) 이하로 냉각(예를 들면, [da Silva et al., Trends Biotechnol. 2007 Dec;25(12):577-83]; [Hsiue et al., Transplantation. 2006 Feb 15;81(3):473-6]; [Ide, T. et al.(2006)]; [Biomaterials 27, 607-614, Sumide, T. et al.(2005), FASEB J. 20, 392-394]; [Nishida, K. et al.(2004), Transplantation 77, 379-385]; 및 [Nishida, K. et al.(2004), N. Engl. J. Med. 351, 1187-1196]을 참조하며, 이들 각각을 그 전체로 참조하여 본원에 편입시킴)시키는, 열반응성 중합체 예컨대 열반응성 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)(PNIPAAm)-그래프트된 표면에서 PRPC 또는 광수용기 세포를 배양하여 제조된다. 세포 시트는 이식에 적합한 기재, 예컨대 숙주 유기체에 시트를 이식시 생체내에

서 용해될 수 있는 기재 상에 부착될 수 있고, 예를 들면 세포를 이식에 적합한 기재 상에서 배양하거나, 또는 이식에 적합한 기재 상의 다른 기재(예컨대, 열반응성 중합체)로부터 세포를 방출시켜 제조된다. 이식에 잠재적으로 적합한 예시적인 기재는 젤라틴(Hsue et al., 상동)을 포함한다. 이식에 적합한 대안적인 기재는 피브린 게 매트릭스 등을 포함한다. 세포 시트는 망막 변성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약물의 제조에서 사용될 수 있다. PRPC 또는 광수용기 세포의 시트는 이를 필요로하는 피험체의 눈에 도입되도록 제제화될 수 있다. 예를 들면, 세포의 시트는 PRPC 또는 광수용기 세포의 시트를 이식하는 중심와하 막절제술을 통해 이를 필요로하는 눈에 도입되거나, 또는 중심와하 막절제술 후 이식을 위한 약물의 제조에 사용될 수 있다.

[0230] 본원에 기술된 방법에 따라 투여되는 조제물의 부피는 요인들, 예컨대 투여 방식, PRPC 또는 광수용기 세포의 수, 환자의 연령 및 체중, 치료하려는 질환 유형 및 중증도에 따라 좌우될 수 있다. 주사로 투여시, 본원의 PRPC 또는 광수용기 세포의 약학 조제물은 적어도 약 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 또는 5 mL이다. 부피는 적어도 약 1-2 mL이다. 예를 들면, 주사로 투여시, 본원의 PCPCS 또는 광수용기 세포의 약학 조제물의 부피는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 100, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 또는 200 μ l(마이크로리터)일 수 있다. 예를 들면, 본원의 조제물의 부피는 적어도 약 10-50, 20-50, 25-50, 또는 1-200 μ l이다. 본원의 조제물의 부피는 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 또는 200 μ l 또는 그 이상이다.

[0231] 예를 들면, 조제물은 μ l 당 적어도 약 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 또는 9×10^4 PRPC 또는 광수용기 세포를 포함한다. 조제물은 μ l 당 2000 PRPC 또는 광수용기 세포, 예를 들면, 50 μ l 당 100,000 PRPC 또는 광수용기 세포 또는 90 μ l 당 180,000 PRPC 또는 광수용기 세포를 포함한다.

[0232] 망막 변성을 치료하는 방법은 면역억제제의 투여를 더 포함할 수 있다. 사용할 수 있는 면역억제제는 제한없이, 항립프구 글로불린(ALG) 다클론 항체, 항흉선세포 글로불린(ATG) 다클론 항체, 아자티오프린, BASILIXIMAB®(항-IL-2R α 수용체 항체), 사이클로스포린(사이클로스포린 A), DACLIZUMAB®(항-IL-2R α 수용체 항체), 에버롤리무스, 마이코페놀산, RITUXIMAB®(항-CD20 항체), 시롤리무스, 및 타클로리무스를 포함한다. 면역억제제는 적어도 약 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 mg/kg의 용량이다. 면역억제제를 사용시, 이들은 전신으로 또는 국소적으로 투여될 수 있고, 이들은 PCPCS 또는 광수용기 세포의 투여 전에, 이와 동시에 또는 이후에 투여될 수 있다. 면역억제 요법은 PRPC 또는 광수용기 세포의 투여후 수주, 수개월, 수년 동안, 또는 무한적으로 지속될 수 있다. 예를 들면, 환자는 PRPC 또는 광수용기 세포의 투여 후 6주 동안 5 mg/kg 사이클로스포린을 투여받을 수 있다.

[0233] 망막 변성을 치료하는 방법은 PRPC 또는 광수용기 세포의 단일 용량의 투여를 포함할 수 있다. 또한, 본원의 치료 방법은 PRPC 또는 광수용기 세포를 일부 기간 동안 복수회 투여하는 요법 과정을 포함할 수 있다. 치료의 예시적인 과정은 매주, 격주, 매월, 분기별, 반년마다 또는 매년 치료를 포함할 수 있다. 대안적으로, 치료는 단계적으로 진행하여서 복수 용량을 초기에 투여하고(예를 들면, 첫주 동안 매일 투약), 이어서 소수 및 적은 빈도 용량을 필요로 한다.

[0234] 안구내 주사에 의해 투여하면, PRPC 또는 광수용기 세포는 환자 생애 동안 주기적으로 1회 이상 전달될 수 있다. 예를 들면, PRPC 또는 광수용기 세포는 1년에 1회, 6-12개월 마다 1회, 3-6개월 마다 1회, 1-3개월 마다 1회, 또는 1-4주마다 1회 전달될 수 있다. 대안적으로, 일정 병태 또는 질병에 대해 보다 빈번한 투여가 바람직할 수 있다. 임플란트 또는 장치에 의해 투여시, PRPC 또는 광수용기 세포는 특정 환자 및 치료하려는 질병 및 병태에서 필요시, 환자 생애 전반에서 주기적으로 1회, 또는 1회 이상 투여될 수 있다. 유사하게 시간 경과에 따라 변화되는 치료 계획을 고려한다. 예를 들면, 개시시에는 보다 빈번한 치료가 필요할 수 있다(예를 들면, 매일 또는 매주마다 치료). 시간경과에 따라, 환자의 병태가 호전되면, 덜 빈번한 치료가 요구되거나 또는 더이

상 추가 치료를 필요로 하지 않을 수 있다.

- [0235] 본원에 기술된 방법은 피험체에서 망막전위도 반응, 안운동 시력 역치, 또는 발광 역치를 측정하여 치료 또는 예방의 효율을 모니터링하는 단계를 더 포함할 수 있다. 방법은 또한 눈에서 세포의 이동 또는 세포의 면역원성을 모니터링하여 치료 또는 예방의 효율을 모니터링하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0236] PRPC 또는 PR은 망막 변성을 치료하기 위한 약물의 제조에서 사용될 수 있다. 본원은 또한 실명의 치료에서 PRPC 또는 PR을 포함하는 조제물의 사용을 포함한다. 예를 들면, 인간 PRPC 또는 PR을 포함하는 조제물은 광수용기 손상 및 실명을 일으키는 다수의 시력-변경 질병, 예컨대, 당뇨병성 망막병증, 황반 변성(나이 관련 황반 변성, 예를 들어, 습식 나이 관련 황반 변성 및 건식 나이 관련 황반 변성 포함), 망막 색소변성증, 및 스타트가르트 질병(황반안저), 야맹증 및 색맹과 관련된 망막 변성을 치료하는데 사용될 수 있다. 조제물은 광수용기 손상 및 실명을 일으킬 수 있는 다수의 시력-변경 질병, 예컨대 당뇨병성 망막병증, 황반 변성(나이 관련 황반 변성 포함), 망막 색소변성증 및 스타트가르트 질환(황반안저)과 관련된 망막 변성을 치료하기 위해 망막에 투여되는 적어도 약 5,000-500,000 PRPC 또는 PR(예를 들면, 100,00 PRPC 또는 PR)을 포함한다.
- [0237] 본원에서 제공되는 PRPC 또는 PR은 PRPC 또는 PR이다. 그러나, 인간 세포는 인간 환자를 비롯하여, 동물 모델 또는 동물 환자에서 사용될 수 있음을 주목한다. 예를 들면, 인간 세포는 망막 변성의 마우스, 래트, 고양이, 개 또는 인간의 영장류 모델에서 시험될 수 있다. 부가적으로, 인간 세포는 이를 필요로 하는 동물을 치료하기 위해 치료적으로, 예컨대 수의학 약물에서 사용될 수 있다. 수의학적 피험체 또는 환자는 제한없이, 개, 고양이, 및 다른 반려 동물, 및 경제적으로 가치있는 동물 예컨대 가축 및 말을 포함할 수 있다.
- [0238] 이하 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이고, 본 발명의 범주를 한정하려는 것이 아니다.
- [0239] **실시예**
- [0240] 실시예 1: 광수용기 전구체 세포의 생성
- [0241] 인간 배아 줄기 세포는 Matrigel™(EHS 마우스 육종 세포 유래의 수용성 조제물, BD Biosciences) 표면 상에서 mTESR1 배지(Stem Cell Technology)에서 공급세포 무함유 조건 하에서 배양하였다. 80-90% 합류시, 세포를 계대하거나 냉동하였다. 줄기 세포의 계대는 효소적(디스파아제) 또는 비효소적(EDTA계 세포 해리 완충액, Invitrogen) 기술을 이용해 수행하였다.
- [0242] 직접 분화 방법을 안구 영역 전구체 세포, 망막 신경 전구체 세포, 광수용기 전구체 세포 및 망막 광수용기 세포의 생성을 위해 사용하였다. 배상체의 형성은 필요하지 않았다.
- [0243] 이 실시예에서 광수용기 발생을 위해 사용된 전반적인 방법은 도 19에 개략적으로 도시하였고, 과정의 각 단계에서 사용된 배지를 추가적으로 예시하였다.
- [0244] 세포가 7일-30일 사이에 EFPC가 되는 것으로 확인된 염색 데이터를 기준(이 세포의 정체를 확인하는 20일에 수행된 염색으로 표시)으로, 이들은 21일-45일에 RNPC(30일에 수행된 염색으로 표시)가 되었고, 1-4개월에 PhRPC(90일에 수행된 염색 기준)가 되었다.
- [0245] 부가적으로, 실시예 1에 기술된 방법을 이용해 상이한 세포 유형이 발생하는 시기를 다음과 같이 추정하였다:
- [0246] 안구 영역 전구체(EFPC): 7-30 일/65% - 98% 순도
- [0247] 망막 신경 전구체(RNPC): 21-45 일/70%-95% 순도
- [0248] 간상체 광수용기 및 추상체 광수용기 둘 모두가 될 수 있는 광수용기 전구체(PhRP): 1-4 개월/85%-95%
- [0249] 간상체 광수용기(추상체 광수용기는 아님)가 되는 그들 능력을 잃거나 또는 감소를 경험한 것으로 여겨지는 광수용기 전구체(PhRP): 5-12 개월/85%-95% 순도.
- [0250] 0일: 인간 만능 줄기 세포의 세포 분화는 15-20% 합류시 유도하였다. 배양 배지는 망막 유도(RI) 배지로 교체하였다: DMEM/F12로서 450 mg/ml D-글루코스, 100 유닛/ml의 페니실린, 100 µg/ml의 스트렙토마이신, 1%(또는 경우에 따라 0.1 내지 5%) N2 보충제(Invitrogen), 0.2%(또는 경우에 따라 0.05-2.0%) B27 보충제, 0.1 mM MEM 비필수 아미노산 용액을 보충하고, 25 µg/ml(또는 경우에 따라 5-50 µg/ml) 인간 인슐린을 RI 배지에 부가하였다. Smad 억제제 노킨을 역시 포함시켰고 10-100 ng/ml 또는 바람직하게는 50 ng/ml의 농도로 포함시 안구 영역 전사 인자의 발현이 증가되었다. 도 1에 도시된 바와 같이, 50 ng/ml 노킨, 5 ng/ml Dkk1, 5 ng/ml IGF-1을 포함하는 상이한 인자, 또는 5 ng/ml 노킨, 5ng/ml Dkk1, 및 5 ng/ml IGF-1의 조합의 포함은 21일에 분화된 안구

영역 전구체 세포에서 안구 영역 전사 인자의 발현도에 영향을 주었다. 이들 조건 중에서도, 50 ng/ml 노킨의 포함이 안구 영역 전구체 마커의 발현을 상당히 유도하였다.

- [0251] RI 배지 조성은 다음을 포함한다:
- [0252] N2: 1%(100 mL 배지 당 1 mL의 N2)
- [0253] B27: 0.2 %(100 mL 당 0.2 mL의 b27)
- [0254] 인간 인슐린: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인슐린이외에도 N2가 공급). 인슐린의 최종 농도는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.
- [0255] 노킨: 50 ng/ml 최종 농도.
- [0256] 1일 - 4일: 날마다 완전하게 배지를 교체하였다. 이러한 빈도가 바람직하지만, 예를 들면, 대량의 배지가 사용되면 덜 빈번한 배지 교체, 예를 들면, 2-3일 마다 교체가 특히 적절한 것으로 여겨졌다. 이전 단계에서와 동일한 농도의 인슐린 및 노킨을 포함하는 RI 배지에서 세포 콜로니를 계속 성장시켰다. RI 배지에 노출 1일 후, 콜로니 주변부에 위치한 세포는 도 2A에 도시된 바와 같이, 가늘고 길고 컬럼 형상이었다.
- [0257] 5일: 세포 배양은 5일에 80-90% 합류되었다. 배지는 신경 분화(ND) 배지: 450 mg/ml D-글루코스, 100 유닛/ml의 페니실린, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 스트렙토마이신, 1x GlutaMAX™(L-글루타민, L-알라닌-L-글루타민 유래의 안정한 형태 디펩티드), 1%(또는 경우에 따라 0.1 내지 5%) N2 보충제(1 mM 인간 트랜스페린(Holo), 0.0861 mM 인슐린 재조합 전체 사슬, 0.002 프로게스테론, 10.01 mM 푸트레신, 및 0.00301 mM 셀레나이트를 포함하는 보텐슈타인 N-1 제제 기반의 화학적으로 한정된, 혈청-무함유 보충제, Invitrogen), 2%(또는 경우에 따라 0.05-2.0%) B27 보충제(도 21에 열거된 성분), 0.1 mM MEM 비필수 아미노산 용액이 보충된 신경기저 배지(도 21에 열거된 성분, Invitrogen). 노킨이 또한 50 ng/ml(또는 경우에 따라 10-100 ng/ml)의 최종 농도로 ND 배지에 부가되었다.
- [0258] 6일 - 20일: 세포를 ND 배지에서 유지시켰다. 배지의 절반을 2일마다 교체하였다. 세포 콜로니는 ND 배지에서 계속 성장시켰다. 주변부 세포가 편평해지고 커졌으며, 반면 중심 세포는 보다 작아지고 조밀한 세포 집단을 형성하였다(도 2B). 대략 14일경에, 콜로니 중심에 위치한 세포는 로제트 유사 구조를 형성하기 시작하였다(도 2C). 21일에, 면역염색 및 유세포 분석으로 확인시 세포의 90% 초과가 PAX6 및 RX1을 공발현하였다(도 3A-3B). 면역염색을 통해서, 세포는 네스틴 및 SOX2에 대해 양성이었다(도 3C-3D). 세포는 ES 세포 마커(특히 OCT4) 및 망막 신경 전구체 마커(특히 CHX10)에 대해 음성이었다. RT-PCR을 통해서 세포는 다음의 안구 영역 전사 인자를 발현하였다: PAX6, RX1, LHX2, SIX3, SIX6, TBX3 및 SOX2(도 3E). 이들 결과는 세포가 안구 영역 전구체 세포임을 의미한다.
- [0259] 세포는 약 7-8일(ND 배지에서 약 2-3일 배양)로부터, 신경 분화 배지에서 배양시킨 후, 안구 영역 전구체가 된다. 이 시점에서, 검출가능한 pax6/rx1 이중 양성 세포가 나타난다. 약 14일(14-30일 사이) 후, 높은 순도(>90%)의 안구 영역 전구체가 생성된다.
- [0260] 약 7-30일 사이에 "안구 영역 전구체 세포" 또는 "EFPC"가 형성된다.
- [0261] 21일 - 24일: 21일에, 세포는 성장 표면으로부터 들어올려지고, 노킨없는 ND 배지에서 물리적으로 클러스터로 해체된다. 세포 집단은 100 mm 초저 부착 배양 디쉬로 옮겼다. 세포 집단은 둥글어지고 현탁 배양에서 개별 구체(고형 클러스터)를 형성하였다. 23일에 배양 배지의 절반을 교체하였다.
- [0262] 25일에, 구체를 회수하고 죽은 세포는 ND 배지로 구체를 세척하여 제거하였다. 세포 구체를 Matrigel™ 코팅된 유리 챔버 슬라이스(면역염색용) 또는 ND 배지의 조직 배양 디쉬에 플레이팅하였다. 12시간 내에 구체가 부착되었다. 이들을 계속 성장시키고 뉴런 표현형이 보였으며, 구체적으로 응집물로부터 일부 세포는 이동해 나가고 엑손 유사 신경돌기가 확장된 구체 내 세포 응집물이 보였다(도 4A). 세포 계대 동안 제거할 수 있는 일부 거대한 상피 유사 세포가 존재하였다(이하 "2개월 - 3개월" 참조). 배양은 세포 배양이 합류될 때까지 2일마다 배양 배지의 절반을 교체하면서 유지하였다. 구체 불이 플레이트에 부착된 것이 관찰되었다.
- [0263] 30일에, 이동한 세포는 미성숙 및 성숙 뉴런을 표지한, Tuj1에 대해 양성이었다(도 4B). 응집물 내 세포는 Tuj1에 대해 음성이었다. 95% 이상의 세포(응집물 내 세포 또는 응집물 밖으로 이동한 세포 포함)는 PAX6 및 CHX10을 공발현하여서, 이들이 망막 신경 전구체가 되었음을 시사하였다(도 4C).
- [0264] 2개월 - 3개월: ND 배지에서 성장 및 세포 계대. 이전 단계의 세포는 이들이 합류될 때까지 계대하였다. 2단계 연속 계대 기술을 이용하여 비뉴런 표현형 세포 대부분을 제거하여 고순도 신경 배양을 생성하였다. 제1 단계: 신경 구체 배양. 세포를 효소적으로(예를 들면, 아쿠타아제 사용) 또는 물리적으로 단일 세포 및 세포 집단의

혼합물로 해리시켰다. 세포를 ND 배지의 초저 부착 디쉬로 옮겼다. 뉴런 표현형의 모든 세포는 현탁 배양에서 신경 구체를 형성하였다. 3일에, 배지의 절반을 교체하고 5일까지 세포를 유지시켰다. 제2 단계: 부착 배양. 신경 구체를 5일에 회수하고 죽은 세포와 찌꺼기는 ND 배지로 세척하여 제거하였다. 구체는 합류될때까지 Matrigel™-코팅된 조직 배양 디쉬에 플레이팅하였다. 제1 및 제2 단계는 교호식이었고 세포는 3개월 종료까지 유지되었다.

[0265] 3개월째의 종료시에, 세포는 신경 표현형을 보였다. 구체적으로, 세포는 배양물에서 신경돌기를 형성하였다(도 5A). 이들은 증식할 수 있었다. 면역염색으로 측정시 PAX6은 발현되었지만 CHX10은 음성이었다(도 5B). 면역염색을 통해서, 세포는 세포체의 세포질에서 발현된, 리커버린에 대해 양성이었다(도 5C). 세포는 또한 로돕신, 읍신 및 리커버린 mRNA(도 5D)를 발현하였다. 실시간 PCR 분석은 간상체 및/또는 추상체 광수용기 분화를 제어하는 전사 인자의 발현이 고도로 발현됨을 밝혀주었다(표 1). 이들 결과는 세포가 광수용기 전구체임을 의미한다. 부가적으로, 이 시점에, 배양중인 모든 세포 또는 실질적으로 모든 세포는 광수용기 전구체라는 관찰을 기초로 이루어졌다.

표 1

[0266]

광수용기 분화 및 재생을 제어하는 전사 인자의 정량적 RT-PCT 분석		
전사 인자	간상체/추상체	배수 변화(vs. ESC)
TR β 2	추상체	3.5-5
NR2E3	간상체	7-11
NRL	간상체	4-8
MASH1	간상체	1000-1200
CRX	간상체, 추상체	-
ROR β	간상체, 추상체	40-60
OTX2	간상체, 추상체	-

[0267] 4개월 - 9개월/또는 그 이상: 광수용기 전구체의 시험관내 발현. 일부 실험에서, 세포는 상기 기술된 2단계 연속 계대 기술을 이용해 더욱 증식시켰다("2개월 - 3개월"). 그러나, 시간경과에 따라 세포는 추상체 광수용기로 분화되는 그들 능력을 상실하는 것으로 관찰되었다(비록 그들이 간상체 광수용기로 분화되는 능력은 유지하였으나). 구체적으로, 광수용기 전구체를 9개월 동안 2단계 연속 계대 기술로 배양을 유지하고 이어서 분화를 유지시킨 후, 세포는 오직 간상체 광수용기 마커를 발현하는 세포를 생성하였고 추상체 광수용기 마커를 발현하는 세포는 생성시키지 않았다. 이러한 특성은 간상체 광수용기를 우선적으로 생성시키는 전구체 세포가 간상체 형성이 유리한 질환의 치료에서 유용할 수 있거나, 또는 광수용기 전구체 운명 결정에 관여하는 인자의 연구를 위한 시약으로서 잠재적으로 유리하게 사용될 수 있게 한다.

[0268] 실시예 2: 광수용기 전구체 세포의 분화: 레티노산 및 타우린을 이용한 세포 치료

[0269] 부착된 광수용기 전구체는 2주 동안 다음의 조건에서 레티노산으로 처리하였다: 100 ng/ml(또는 경우에 따라 10-1000 ng/ml) 레티노산 및 100 μ M(또는 경우에 따라 20-500 μ M) 타우린이 공급된 ND 배지. 배양 배지의 절반을 2일마다 교체하였다.

[0270] 광수용기 분화 배지에서 세포 분화: 배지를 450 mg/ml D-글루코스, 100 unit/ml의 페니실린, 100 μ g/ml의 스트렙토마이신, 1x GlutaMAX™, 1% N2 보충제(Invitrogen), 2% B27 보충제(포물라 번호 080085-SA)가 보충되고, 5 μ M(또는 경우에 따라 1-100 μ M) 포스콜린, 10 ng/ml(또는 경우에 따라 1-100 ng/ml) BDNF, 10 ng/ml(또는 경우에 따라 1-100 ng/ml) CNTF, 10 ng/ml(또는 경우에 따라 5-50 ng/ml) LIF 및 10 μ M(또는 경우에 따라 1-100 μ M) DATP가 부가된, 신경기저 배지(Invitrogen)를 포함하는 광수용기 분화 배지로 교체하였다. 배지 절반을 2일마다 교체하였다. 구체적으로, 각 인자의 양은 다음과 같다: 포스콜린(5 μ M), BDNF(10 ng/ml), CNTF(10 ng/ml), LIF (10 ng/ml) 및 DATP(10 μ M). LIF는 필수적이지 않은 것으로 확인되어서 배제할 수 있다.

[0271] 세포 분화를 개시한 후 2주에, 로돕신, 읍신(녹색/적색), 리커버린 및 포스포디에스테라아제 6A 알파 서브유닛(PDE6a)의 발현을 세포체의 세포질 및 신경돌기에서 검출하였다(도 6A-6D). 이들 유전자 발현 결과는 이들이 광수용기 세포임을 의미한다.

[0272] 실시예 3: 인간 ESC-유래된 망막 신경 전구체의 냉동보존.

[0273] 본 발명의 망막 신경 전구체, 본 발명의 광수용기 전구체, 및 본 발명의 레티노산 처리된 광수용기 전구체는 동

물 무함유 냉동보존 완충액, 예컨대 Cryostor CS10, 또는 다른 냉동보존 완충액 예컨대 90% FBS 및 10% DMSO에서 냉동될 수 있다. 광수용기 전구체의 경우, 세포-세포 접촉의 유리함에 기인하여, 신경구로서 세포의 냉동이 유리한 것으로 관찰되었다. 바람직하게, 신경구는 너무 크기 않은 크기로, 예컨대 예컨대 50-250 세포로 냉동하였다.

[0274] 실시예 4: 스타르가르트 황반 이영양증 동물 모델에서 동물 실험

[0275] 동물 실험은 스타르가르트 황반 이영양증 동물 모델, ELOVL4 형질전환 2(TG2) 마우스에서 수행하였다(도 7).

[0276] 광수용기 전구체(실시예 1에서 기술된 대로 생성) 및 개별적으로, 레티노산 및 타우린 처리된 광수용기 전구체(즉, 실시예 2에 기술된 대로 생성된, 미성숙한 광수용기 세포)를 아쿠타아제를 이용해 단일 세포로 해리시켰다. 세포를 PBS 완충액에 재현탁시켰다.

[0277] 28일령 TG2 마우스는 망막하 공간으로 5×10^5 세포를 함유하는 $1 \mu\text{l}$ 의 세포 현탁액을 주사받거나 또는 꼬리 정맥으로 1×10^6 세포를 함유하는 $150 \mu\text{l}$ 의 세포 현탁액을 주사받았다. 모든 마우스는 세포 주사 전에 기본 ERG 및 OCT 검사를 받았다.

[0278] 마우스는 사이클로스포린 A(USP 개질)이 공급된 물을 공급받았다.

[0279] 세포 주사 후 1개월에, 광수용기 전구체의 망막하 주사를 받은 마우스는 a-파 및 b-파 둘 모두의 암소시 ERG 진폭의 유의한 증가를 통해 밝혀진 간상체 광수용기 기능의 유의한 개선을 나타냈다(도 8). 광수용기 전구체 및 레티노산 및 타우린-처리된 광수용기 전구체의 정맥 꼬리 주사를 받은 마우스는 a-파 및 b-파 둘 모두의 암소시 ERG 진폭의 유의한 증가를 통해 밝혀진 간상체 광수용기 기능의 유의한 개선을 나타내었다(도 9).

[0280] 세포 주사 후 2개월에, 레티노산-처리된 광수용기 전구체의 꼬리 정맥 주사를 받은 마우스는 암소시 ERG 반응 곡선의 a-파 및 b-파 둘 모두의 진폭의 추가 증가를 통해 밝혀진 간상체 광수용기 기능의 추가적인 개선을 보였다(도 10A-10C). 추상체 광수용기의 기능은 a-파 및 b-파 둘 모두의 명소시 ERG 진폭의 유의한 증가에 의해 밝혀진바와 같이 유의하게 개선되었다(도 11).

[0281] 주사 후 2개월에, 레티노산 및 타우린으로 처리된 미성숙한 광수용기 세포의 꼬리 정맥 주사를 받은 마우스는 OCT에 의해 밝혀진 전체 망막 두께의 유의한 증가를 보였다(도 12).

[0282] 세포 이식 후 2개월에, 레티노산 및 타우린 처리된 광수용기 전구체를 받은 마우스에서 ONL 내 광수용기 뉴런의 유의한 보존이 존재하였다(도 13).

[0283] 실시예 5: 색맹의 동물 모델 및 밤눈 개선

[0284] 실시예 1 또는 실시예 2에 기술된 방법에 따라 생성된 세포를 색맹의 마우스, 양, 및/또는 개 모델에서 시험하였다. 다음의 모델을 사용하였다:

[0285] 마우스:(1) cpf15 마우스: CNGA3 돌연변이를 갖는 색맹의 천연 발생 마우스 모델; (2) CNGA3 녹아웃 마우스; (3) GNAT2cpf13 마우스: GNAT2와 관련된 돌연변이; (4) PDE6C-cpf11: pde6c와 관련된 돌연변이.

[0286] 양: 아와시 양 어린양: CNGA3에 돌연변이

[0287] 개: CNGA3에 돌연변이된 2마리의 천연 발생 개를 동정하였다: 알래스카 말라무트 및 독일산 단모 포인터의 상염색체 열성 개 추상체 변성.

[0288] 광수용기 전구체(실시예 1에 기술된 대로 생성)는 아쿠타아제를 이용해 단일 세포로 해리시켰다. 세포는 PBS 완충액에 재현탁시켰다. 동물들은 유리체 강에 2×10^5 세포 또는 그 이상을 주사받거나 꼬리 정맥(, 예를 들면 그러한 꼬리 정맥)에 5×10^6 세포 또는 그 이상을 주사받았다. 대조군 동물은 PBS 완충액을 주사하였다. 1 또는 2개월 후 또는 다른 시점에, 동물들에 대해서 시운동 반응 검사를 수행하여 이의 가능한 개선을 검출하기 위해 시기능을 검토하였다. 부가적으로, 조직학적 분석을 수행하여서, 광수용기 뉴런의 성장 또는 광수용기 뉴런의 임의의 유의한 보존 여부를 결정하였과 부가적으로, 유리체강에 이식된 세포가 주사 후 양호한 생존을 보여는지 여부, 및 세포가 이의 마커를 발현하는 간상체 또는 추상체 광수용기 세포로 분화되었는지 여부를 검출하였다.

[0289] 실시예 6: 광수용기 변성 래트 모델, 로얄 컬리지 오브 서전(RCS) 래트에서 동물 실험.

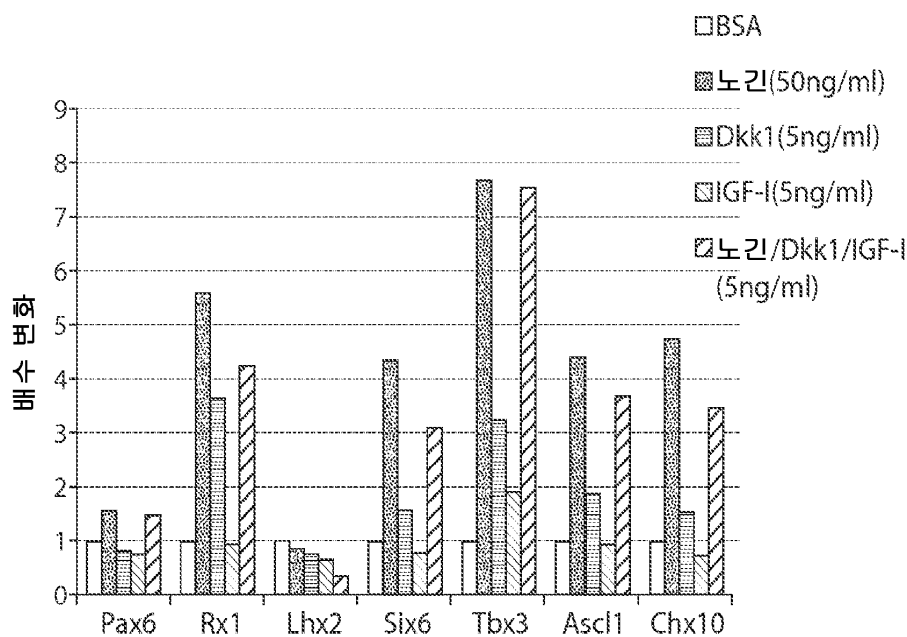
[0290] 광수용기 전구체(실시예 1에서 기술된 대로 생성)는 아쿠타아제를 이용해 단일 세포로 해리시켰다. 세포를 PBS

완충액에 재현탁시켰다.

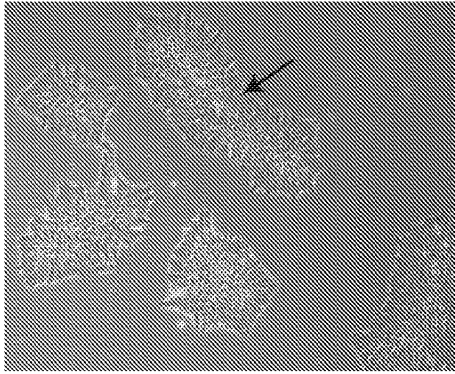
- [0291] 생후 30일경, RCS 래트는 유리체강에 2×10^5 세포 또는 꼬리 정맥에 5×10^6 세포를 주사받았다. 대조군 래트는 PBS 완충액을 주사받았다.
- [0292] RCS 래트는 사이클로스포린 A(USP 개질)이 공급된 물을 공급받았다.
- [0293] 세포 주사 후 1개월 및 2개월에, 래트는 시운동 반응 검사를 수행하여 시기능을 검토하였다. 처리한 래트의 시 기능에는 유의한 개선이 없었다(데이타는 도시하지 않음).
- [0294] 시기능에 대한 최종 효과는 시운동 반응 검사, ERG, 발광 역치 기록법 및/또는 시중심 혈류 어레이를 통해 검출하였다.
- [0295] 세포 주사 후 2개월에, 조직학은 세포 치료물을 투여한 RCS 래트의 망막의 ONL에서 광수용기 뉴런의 유의한 보존을 밝혀주었다(도 15).
- [0296] 로돕신(간상체) 및 옵신(추상체)의 면역염색으로 밝혀진 간상체 및 추상체 광수용기 외절의 보존이 세포 처리군에서 관찰되었다(유리체내 및 꼬리 정맥 주사 둘 모두, 도 16 및 도 17).
- [0297] 유리체강으로 이식한 세포는 주사 후 2개월에 양호한 생존을 보였고, 이어 간상체 광수용기 마커를 발현하는 간상체 광수용기 세포로 더 분화되었다(도 18).

도면

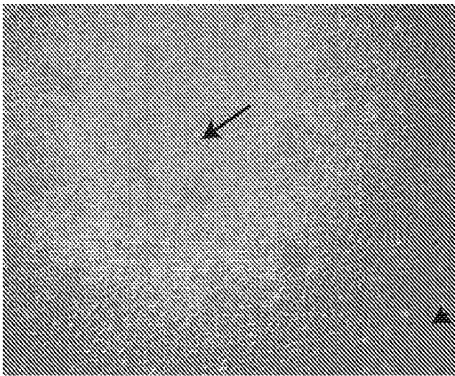
도면1



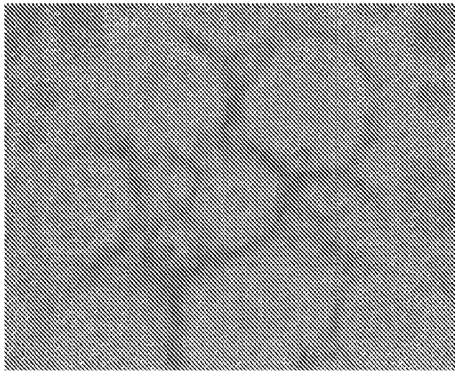
도면2a



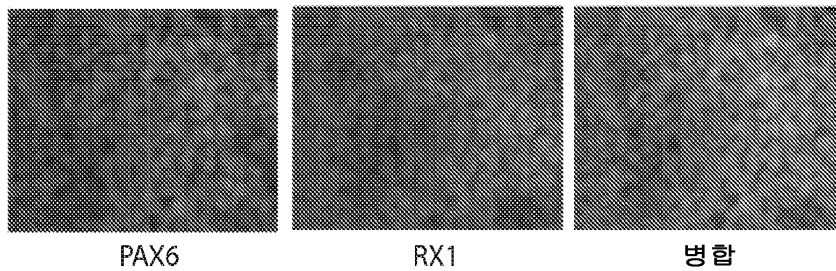
도면2b



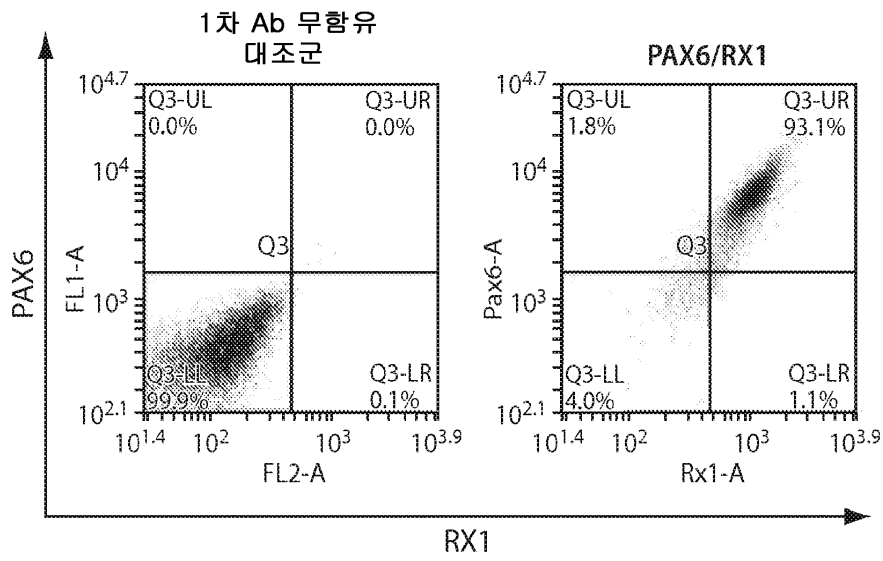
도면2c



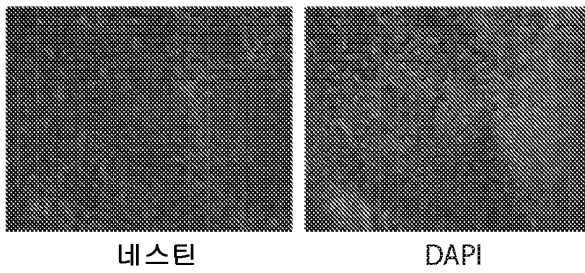
도면3a



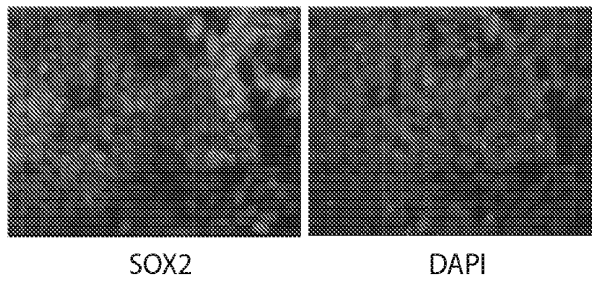
도면3b



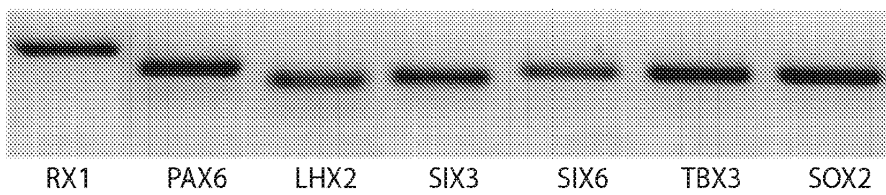
도면3c



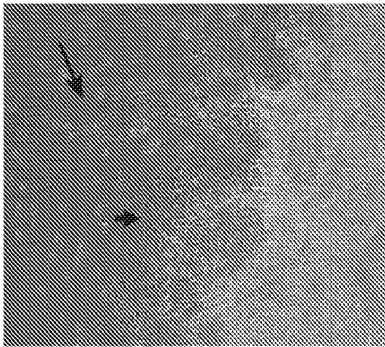
도면3d



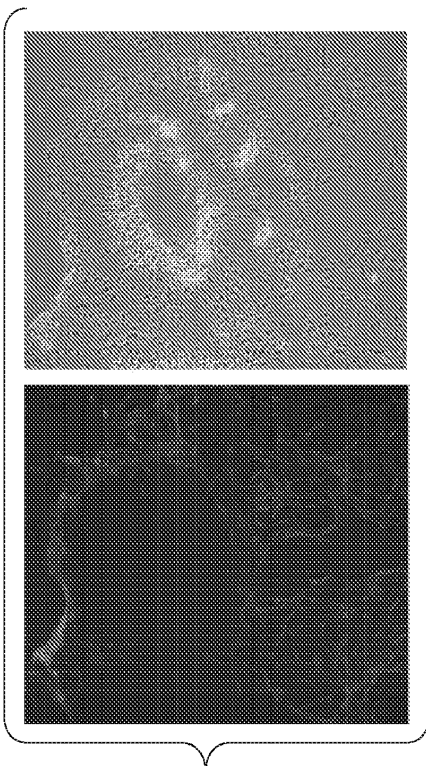
도면3e



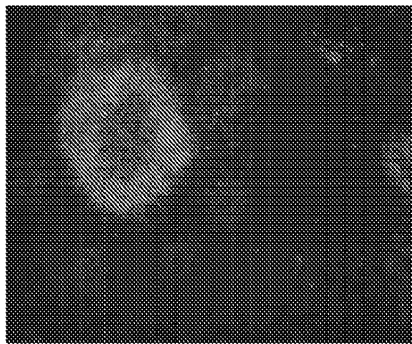
도면4a



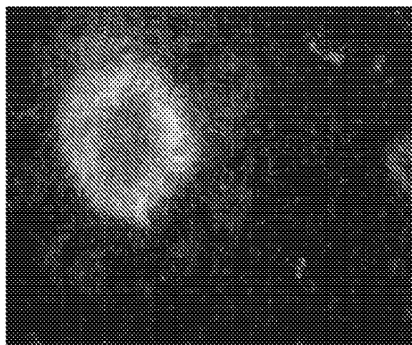
도면4b



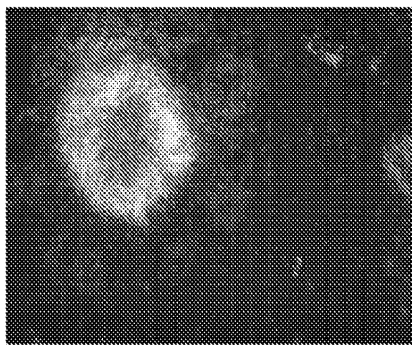
도면4c



PAX6

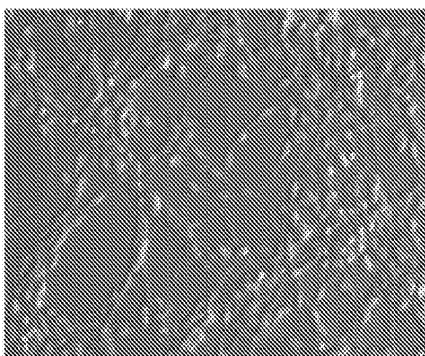


CHX10

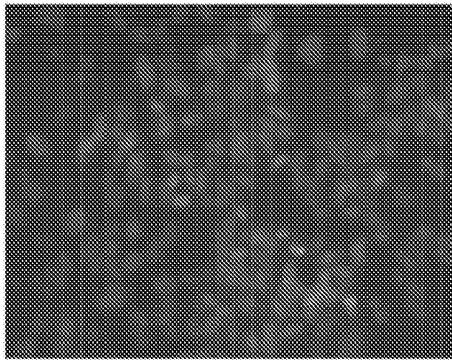


병합

도면5a

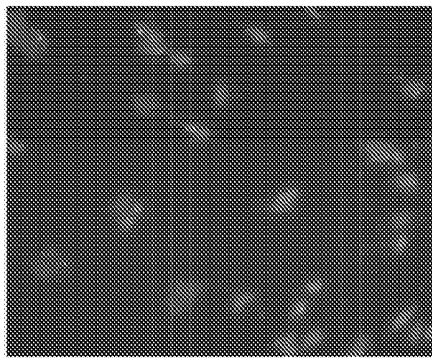


도면5b



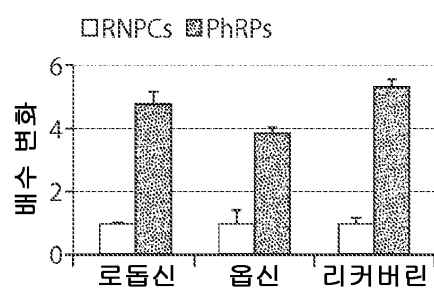
Pax6/CHX10/DAPI

도면5c

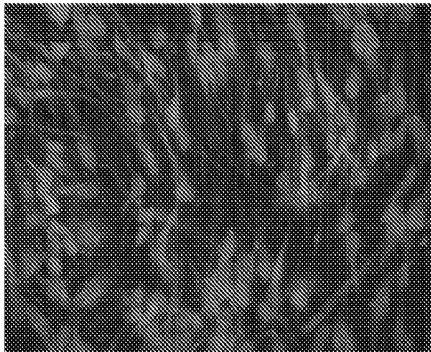


리커버린/DAPI

도면5d

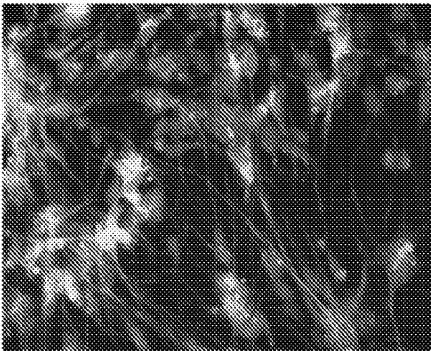


도면6a



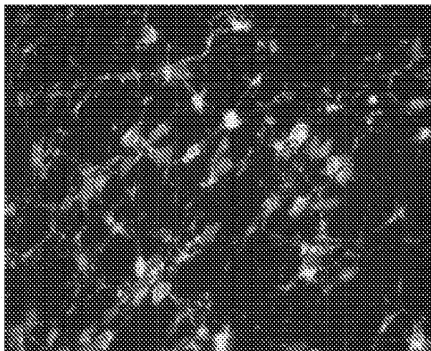
로돕신/DAPI

도면6b



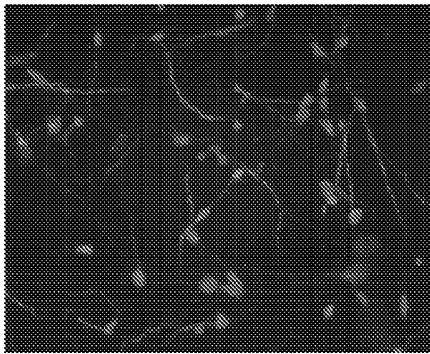
로돕신/리커버린/DAPI

도면6c



옵신 (녹색/적색)/DAPI

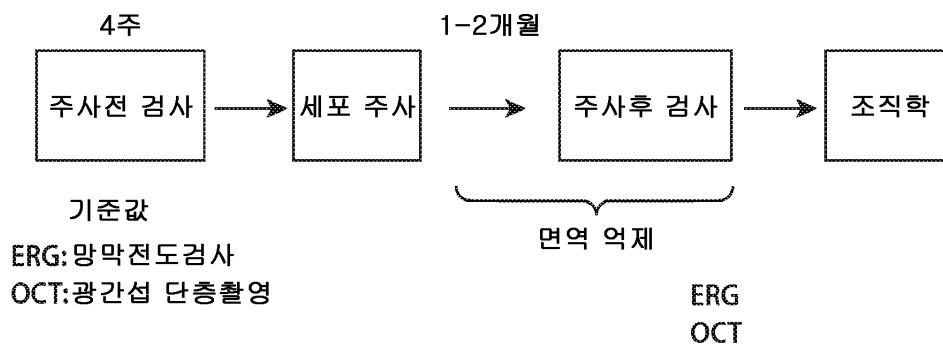
도면6d



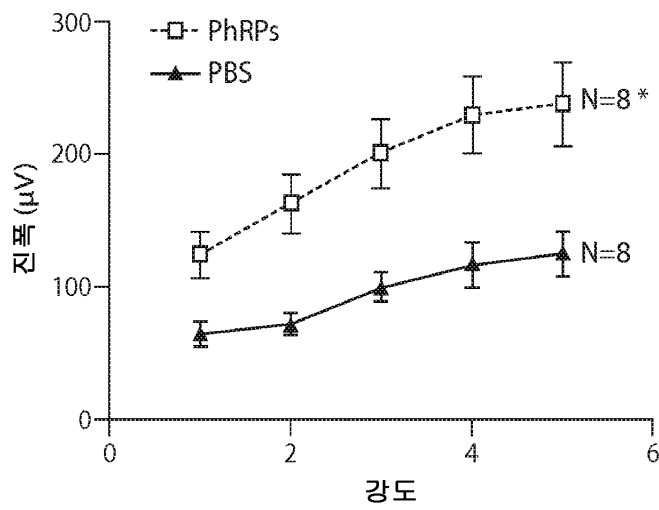
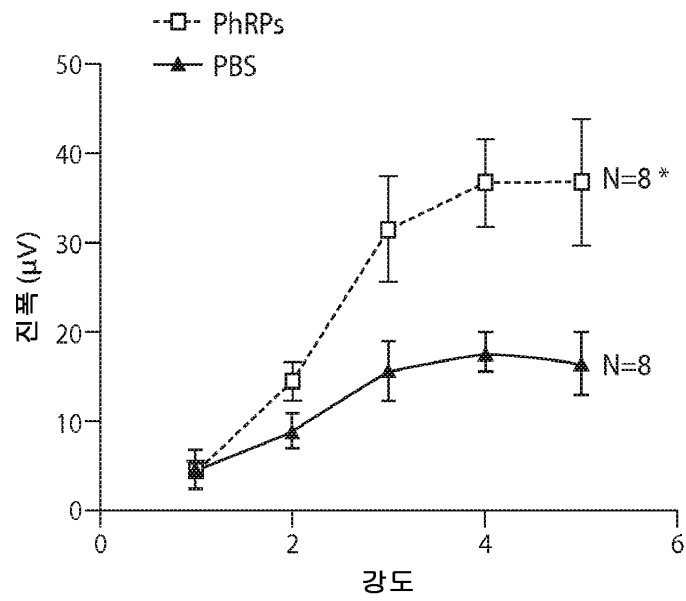
PDE6a/DAPI

도면7

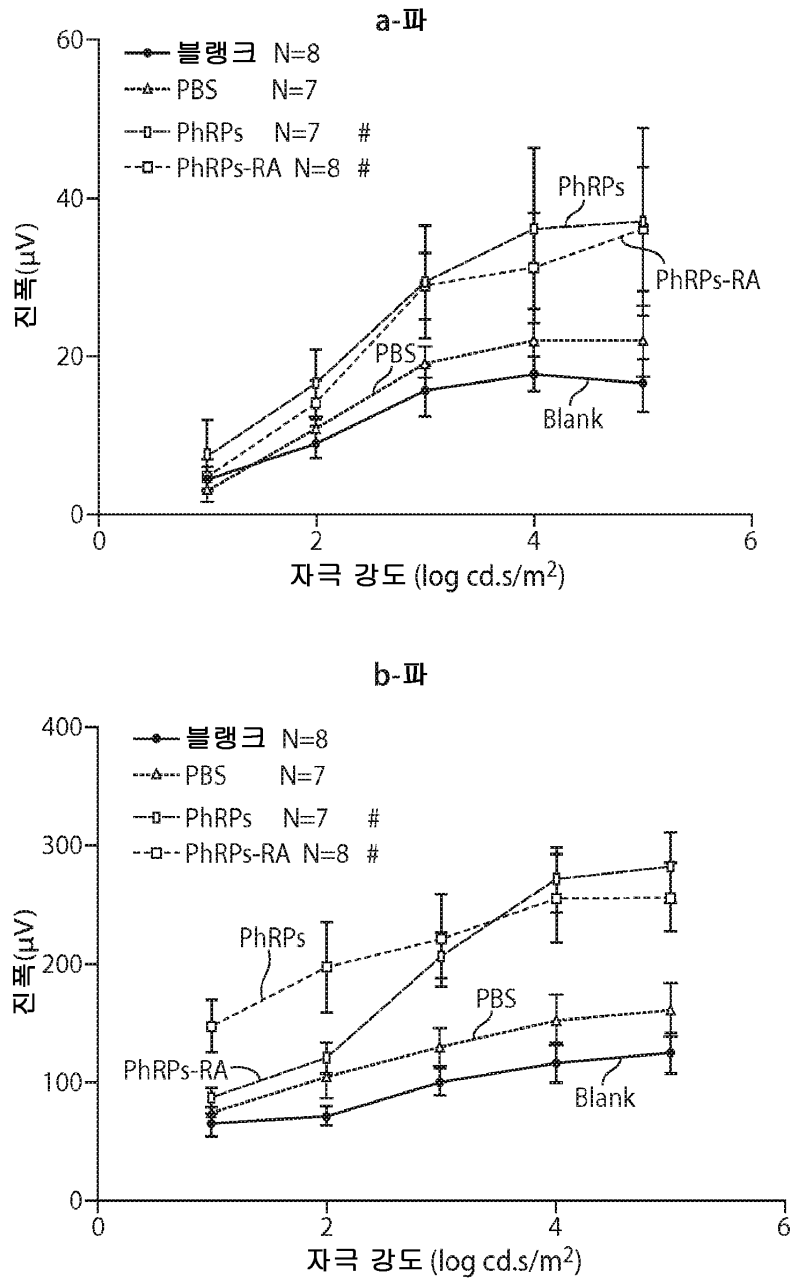
망막하 주사: 50,000/눈
꼬리 정맥 주사: 1×10^6 /마우스
대조군: 블랭크 (세포 주사 안함) & PBS



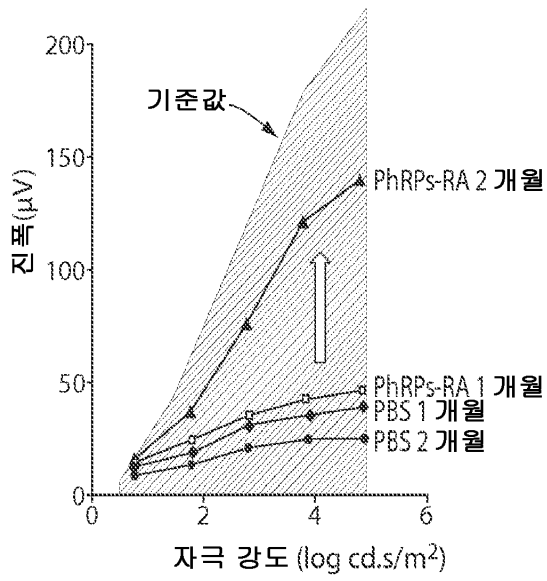
도면8



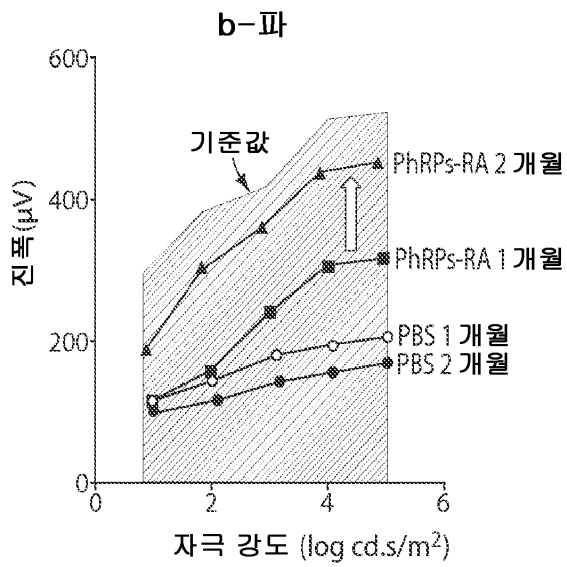
도면9



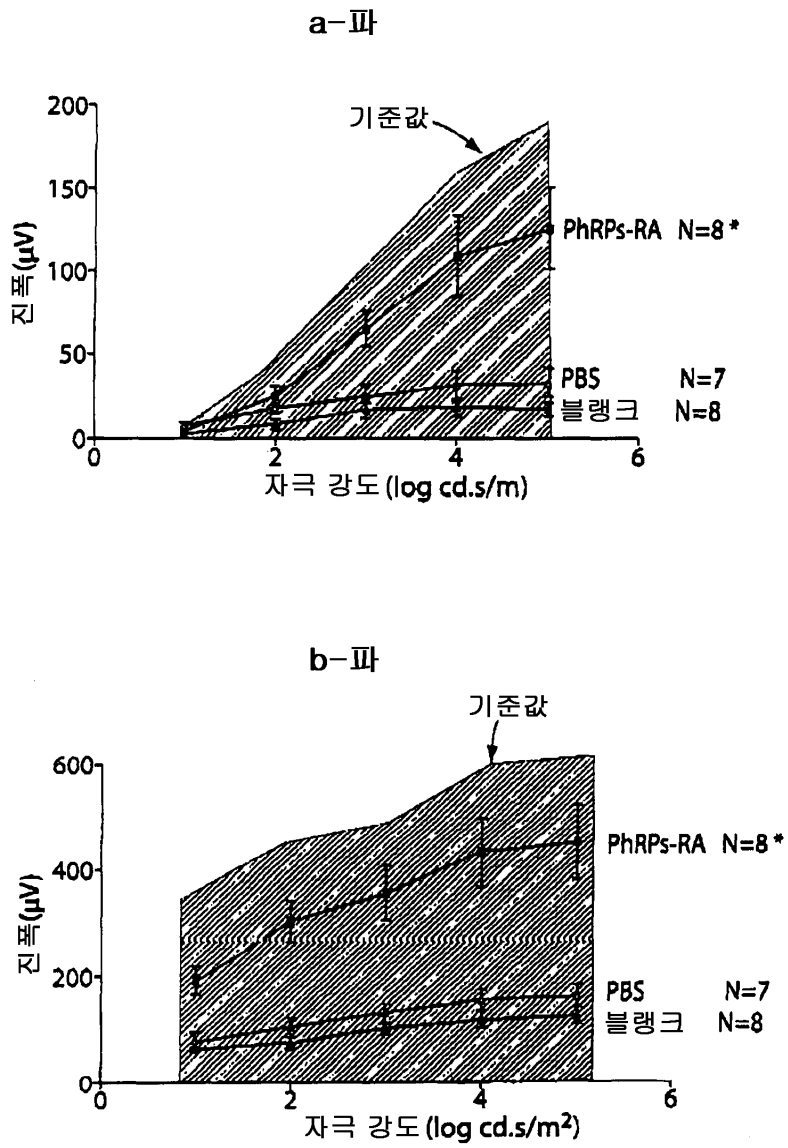
도면10a



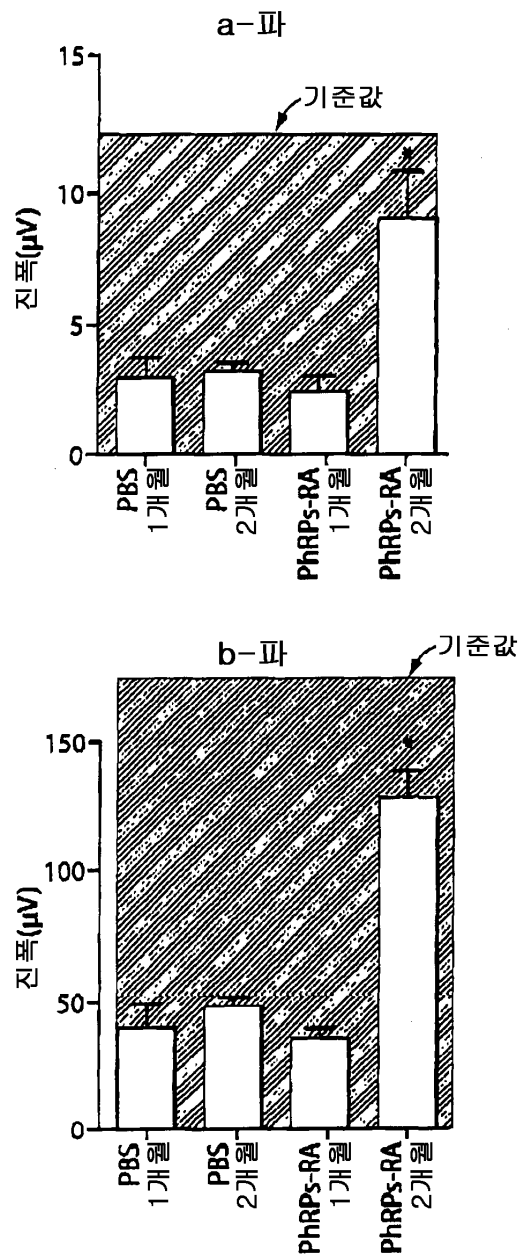
도면10b



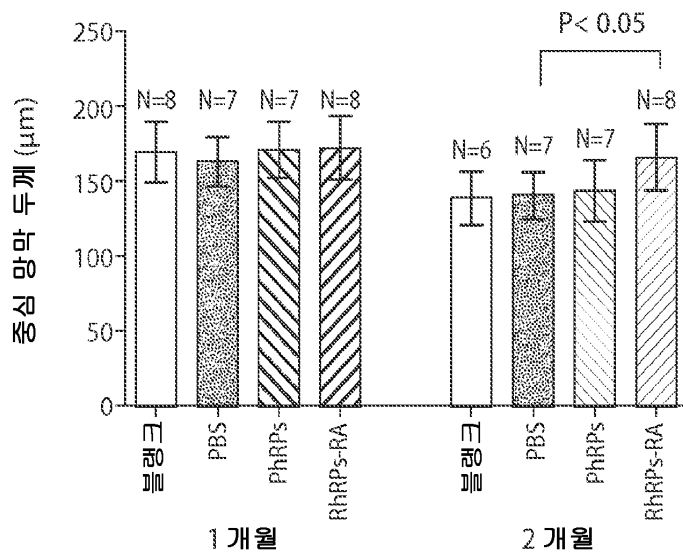
도면10c



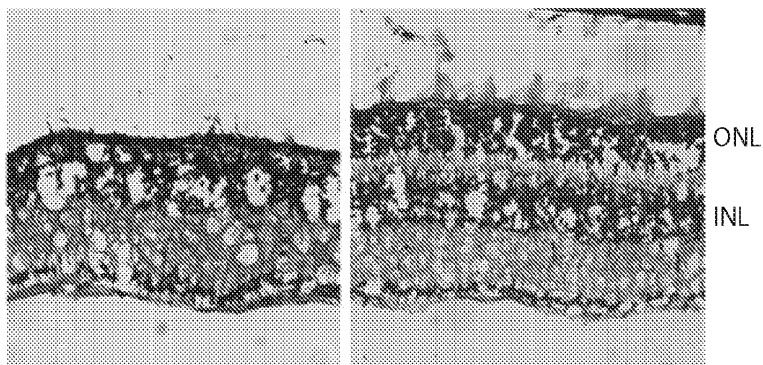
도면11



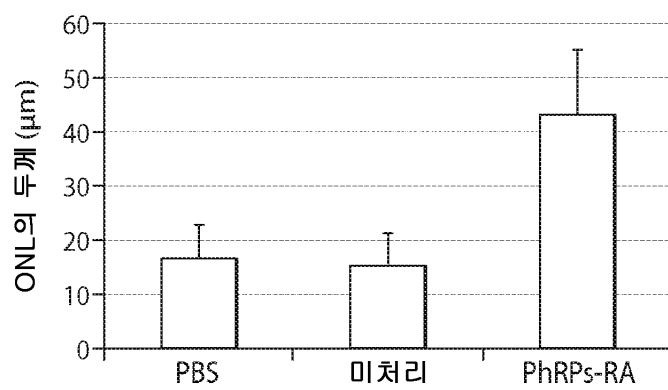
도면12



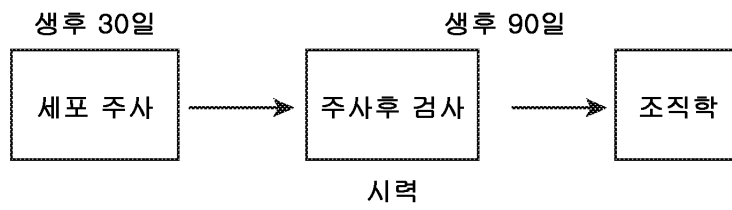
도면13a



도면13b

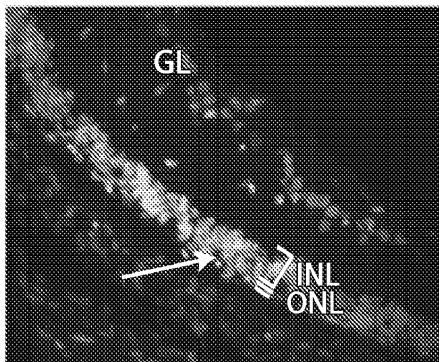


도면14

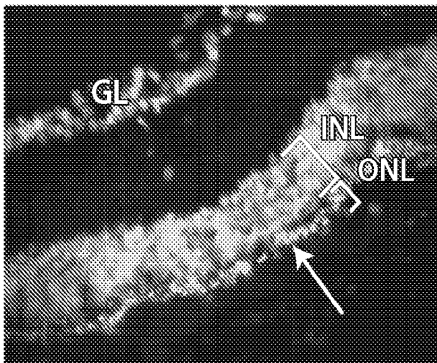


꼬리 정맥 주사: 5백만 세포
 유리체내 주사: 200K 세포
 대조군: 1) PBS 주사
 2) 미처리

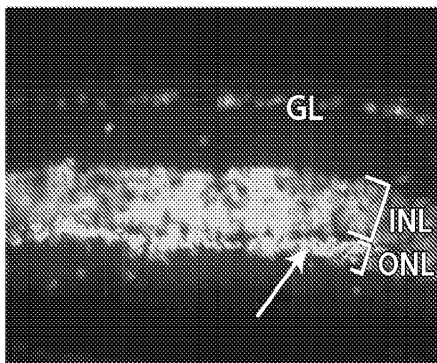
도면15a



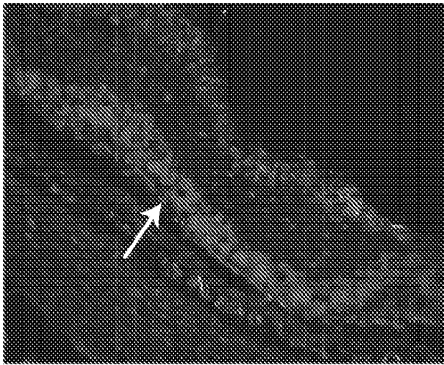
도면15b



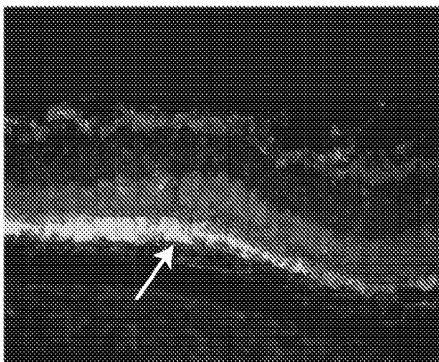
도면15c



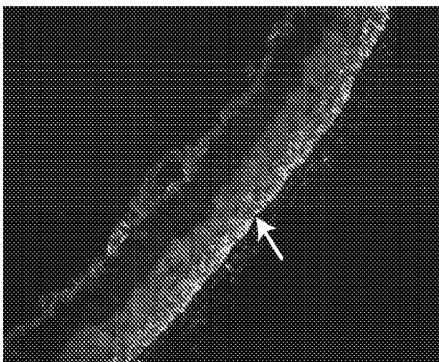
도면16a



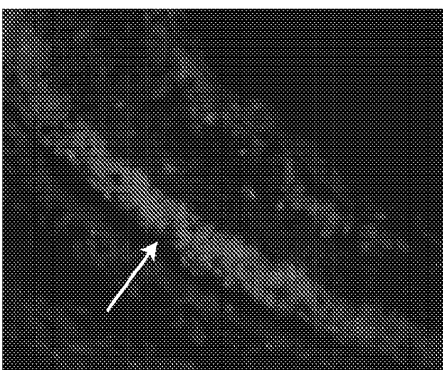
도면16b



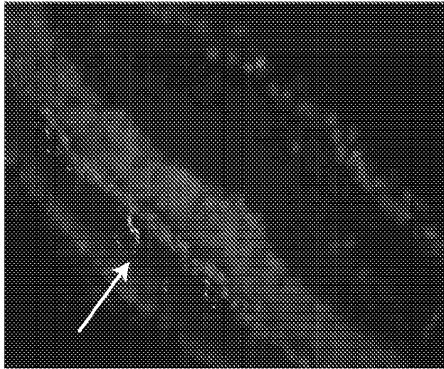
도면16c



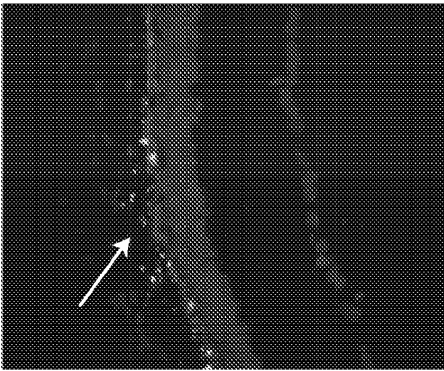
도면17a



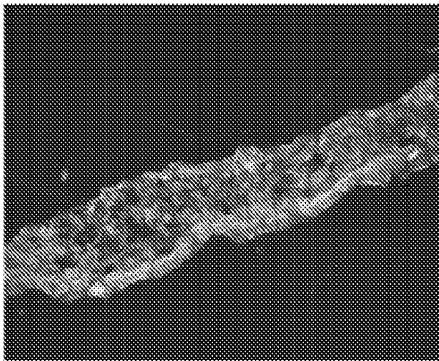
도면17b



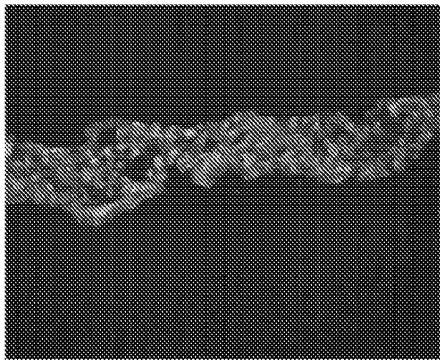
도면17c



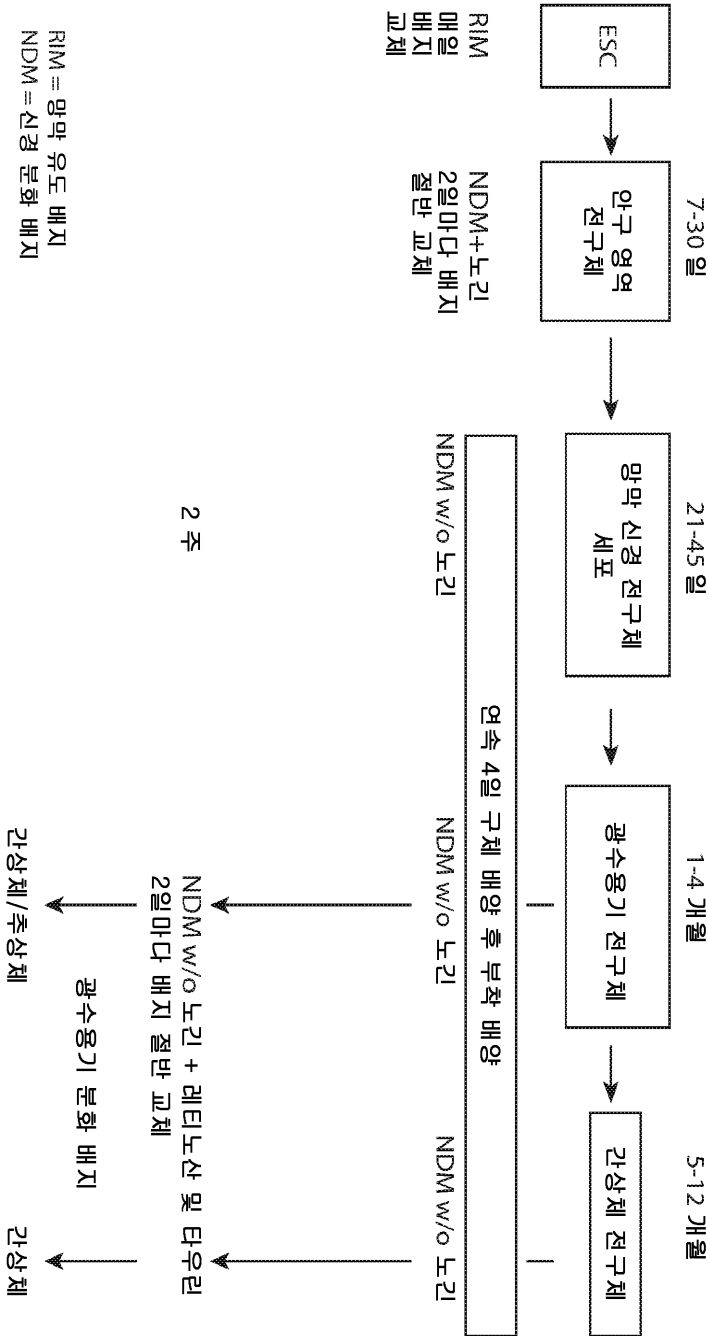
도면18a



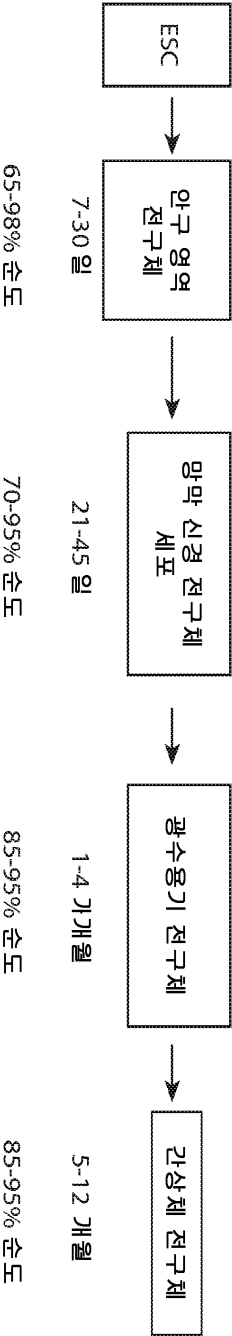
도면18b



도면19



도면20



도면21a

DMEM/F12 성분	분자량	농도 (mg/L)	mM
아미노산			
글리신	75	18.75	0.25
L-알라닌	89	4.45	0.05
L-아르기닌 히드로클로라이드	211	147.5	0.699
L-아스파라긴-H ₂ O	150	7.5	0.05
L-아스파르트산	133	6.65	0.05
L-시스테인 히드로클로라이드-H ₂ O	176	17.56	0.0998
L-시스틴 2HCl	313	31.29	0.1
L-글루탐산	147	7.35	0.05
L-글루타민	146	365	2.5
L-히스티딘 히드로클로라이드-H ₂ O	210	31.48	0.15
L-이소류신	131	54.47	0.416
L-류신	131	59.05	0.451
L-리신 히드로클로라이드	183	91.25	0.499

도면21b

L-메티오닌	149	17.24	0.116
L-페닐알라닌	165	35.48	0.215
L-프롤린	115	17.25	0.15
L-세린	105	26.25	0.25
L-트레오닌	119	53.45	0.449
L-트립토판	204	9.02	0.0442
L-티로신 2나트륨 염 2수화물	261	55.79	0.214
L-발린	117	52.85	0.452
비타민			
바이오틴	244	0.0035	1.43E-05
엽화콜린	140	8.98	0.0641
D-칼슘 판토테네이트	477	2.24	0.0047
폴산	441	2.65	0.00601
니아신아미드	122	2.02	0.0166
피리독신 히드로클로라이드	206	2	0.00971
리보플라빈	376	0.219	0.000582
티아민 히드로클로라이드	337	2.17	0.00644
비타민 B12	1355	0.68	0.000502
i-이노시톨	180	12.6	0.07
무기 염			
염화칼슘 (CaCl ₂) (anhyd.)	111	116.6	1.05
황산구리 (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	250	0.0013	5.2E-06
질산제2철 (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404	0.05	0.000124
황산제2철 (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	278	0.417	0.0015
염화마그네슘 (무수)	95	28.64	0.301
황산마그네슘 (MgSO ₄) (anhyd.)	120	48.84	0.407
염화칼륨 (KCl)	75	311.8	4.16

도면21c

중탄산나트륨 (NaHCO ₃)	84	1200	14.29
염화나트륨 (NaCl)	58	6995.5	120.61
인산나트륨 2염기 (Na ₂ HPO ₄) 무수	142	71.02	0.5
인산나트륨 1염기 (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138	62.5	0.453
황산아연 (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	288	0.432	0.0015
다른 성분			
D-글루코스 (덱스트로스)	180	3151	17.51
HEPES	238	3574.5	15.02
하이포잔틴 Na	159	2.39	0.015
리놀레산	280	0.042	0.00015
리포산	206	0.105	0.00051
페놀 레드	376.4	8.1	0.0215
푸트레신 2HCl	161	0.081	0.000503
피루브산나트륨	110	55	0.5
티미딘	242	0.365	0.00151

신경기저 성분	분자량	농도 (mg/L)	mM
아미노산			
글리신	75	30	0.4
L-알라닌	89	2	0.0225
L-아르기닌 히드로클로라이드	211	84	0.398
L-아스파라긴-H ₂ O	150	0.83	0.00553
L-시스테인	121	31.5	0.26
L-히스티딘 히드로클로라이드-H ₂ O	210	42	0.2
L-이소류신	131	105	0.802
L-류신	131	105	0.802
L-리신 히드로클로라이드	183	146	0.798
L-메티오닌	149	30	0.201
L-페닐알라닌	165	66	0.4
L-프롤린	115	7.76	0.0675
L-세린	105	42	0.4
L-트레오닌	119	95	0.798
L-트립토판	204	16	0.0784
L-티로신	181	72	0.398
L-발린	117	94	0.803
비타민			
염화콜린	140	4	0.0286
D-칼슘 판토텐네이트	477	4	0.00839
폴산	441	4	0.00907

도면21d

니아신아미드	122	4	0.0328
피리독신 히드로클로라이드	204	4	0.0196
리보플라빈	376	0.4	0.00106
티아민 히드로클로라이드	337	4	0.0119
비타민 B12	1355	0.0068	0.000005
i-이노시톨	180	7.2	0.04
무기 염			
염화칼슘 (CaCl ₂) (anhyd.)	111	200	1.8
질산제2철 (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404	0.1	0.000248
염화마그네슘 (무수)	95	77.3	0.814
염화칼륨 (KCl)	75	400	5.33
중탄산나트륨 (NaHCO ₃)	84	2200	26.19
염화나트륨 (NaCl)	58	3000	51.72
인산나트륨 1염기 (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138	125	0.906
황산아연 (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	288	0.194	0.000674
다른 성분			
D-글루코스 (덱스트로스)	180	4500	25
HEPES	238	2600	10.92
페놀 레드	376.4	8.1	0.0215
피루브산나트륨	110	25	0.227

N2 보충 성분	분자량	농도 (mg/L)	mM
단백질			
인간 트랜스페린 (홀로)	10000	10000	1
인슐린 재조합 전체 사슬	5807.7	500	0.0861
다른 성분			
프로게스테론	314.47	0.63	0.002
푸트레신	161	1611	10.01
셀레나이트	173	0.52	0.00301

도면21e

B27 성분

비타민

바이오틴

DL 알파 토크페롤 아세테이트

DL 알파 토크페롤

비타민 A (아세테이트)

단백질

BSA, 지방산 무함유 분획 V

카탈라아제

인간 재조합 인슐린

인간 트랜스페린

수퍼옥시드 디스뮤타아제

다른 성분

코르티코스테론

D-갈락토스

에탄올아민 HCl

글루타민 (환원)

L-카르니틴 HCl

리놀레산

리놀렌산

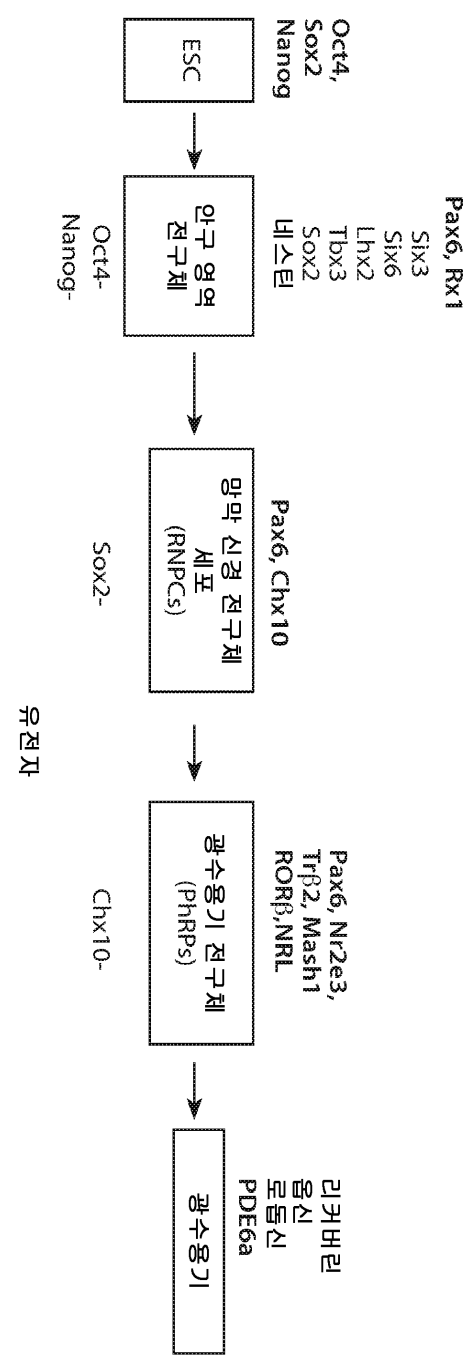
프로게스테론

푸트레신 2HCl

나트륨 셀레나이트

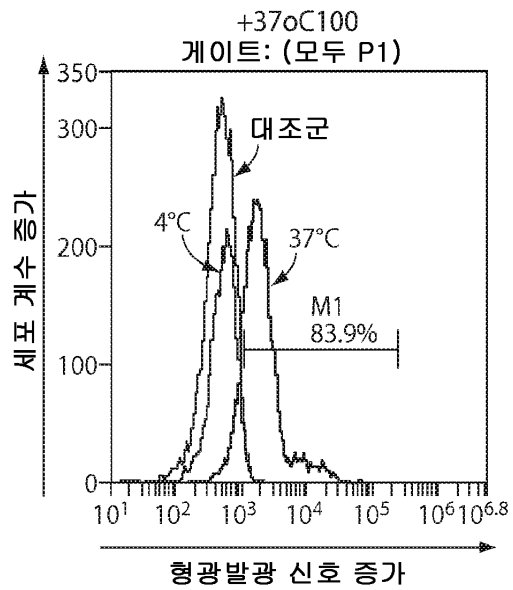
T3 (트리오도-L-티로닌)

도면22



도면23

망막 색소 상피 세포



광수용기 전구체 세포

