

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 7월 25일 (25.07.2013)



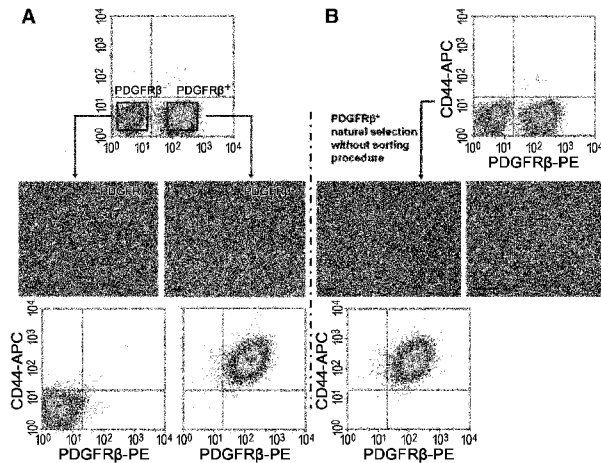
(10) 국제공개번호
WO 2013/108949 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 5/071 (2010.01) C12Q 1/37 (2006.01)
C12N 1/02 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)
C12Q 1/24 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/000769
- (22) 국제출원일: 2012년 1월 31일 (31.01.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2012-0006371 2012년 1월 19일 (19.01.2012) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): (주) 차바이오앤디오스텍 (CHABIO&DIOSTECH CO., LTD.) [KR/KR]; 449-884 경기도 용인시 처인구 남사면 당하로 113-12, Gyeonggi-do (KR). 차의과학대학교 산학협력단 (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 487-010 경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김정모 (KIM, Jung Mo) [KR/KR]; 135-907 서울특별시 강남구 봉은사로 26길 10, 3층 (역삼동, 한양빌딩), Seoul (KR). 송원경 (SONG, Won Kyung) [KR/KR]; 463-712 경기도 성남시 분당구 야탑로 59, 분당차병원 안과 (야탑동), Gyeonggi-do (KR). 정형민 (CHUNG, Hyung Min) [KR/KR]; 135-907 서울특별시 강남구 논현로 105길 8, 차바이오앤디오스텍 (역삼동), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-973 서울 강남구 테헤란로 87길 36, 6층, 한열국제특허사무소(삼성동, 도심공향타워), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING HUMAN EMBRYONIC STEM CELL-DERIVED PERIVASCULAR PROGENITOR CELLS, AND COMPOSITION FOR CELL THERAPY CONTAINING SAME

(54) 발명의 명칭 : 인간 배아줄기세포 유래 혈관주위 전구세포의 제조방법 및 이를 포함하는 세포치료 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing perivascular progenitor cells from stem cell embryoid bodies, a cell therapy composition for preventing or treating cardiovascular diseases or retinal diseases containing the same as an active ingredient, and a method for treating cardiovascular diseases or retinal diseases using the composition, and more specifically, to a method for preparing perivascular progenitor cells from stem cells comprising the steps of: treating stem cell embryoid bodies with the BMP4 growth factor to induce the differentiation thereof into mesodermal cells; separating embryoid bodies containing the differentiated mesodermal cells into single cells; and culturing the same in a substrate-coated culture dish to proliferate only the adhered cells by natural selection, and to perivascular progenitor cells prepared by the method, a cell therapy composition for preventing or treating cardiovascular diseases or retinal diseases containing the same as an active ingredient, and a method for treating cardiovascular diseases or retinal diseases using the composition.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2013/108949 A1



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 줄기세포의 배상체로부터 혈관주위 전구세포를 제조하는 방법, 이를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 또는 망막질환의 예방 또는 치료용 세포치료 조성물, 및 상기 조성물을 이용하여 심혈관 질환 또는 망막질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 줄기세포 배상체에 BMP4 성장인자를 처리하여 중배엽성 세포로의 분화를 유도하고, 상기 분화된 중배엽성 세포를 포함하는 배상체를 단일세포로 분리한 후, 기질이 코팅된 배양접시에 배양하여 부착된 세포만을 자연선택으로 증식시키는 줄기세포로부터의 혈관주위 전구세포 제조방법, 상기 방법으로 제조된 혈관주위 전구세포, 이를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 또는 망막질환의 예방 또는 치료용 세포치료 조성물, 및 상기 조성물을 이용하여 심혈관 질환 또는 망막질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 인간 배아줄기세포 유래 혈관주위 전구세포의 제조방법 및 이를 포함하는 세포치료 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 줄기세포 유래의 배상체로부터 혈관주위 전구세포를 제조하는 방법, 상기 방법으로 제조된 혈관주위 전구세포, 이를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 또는 망막질환의 예방 또는 치료용 세포치료 조성물, 및 상기 조성물을 이용하여 심혈관 질환 또는 망막질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 줄기세포 유래의 배상체에 BMP4 성장인자를 처리하여 중배엽성 세포로의 분화를 유도하고, 상기 분화된 중배엽성 세포를 포함하는 배상체를 단일세포로 분리한 후, 기질이 코팅된 배양접시에 배양하여 부착된 세포만을 자연선택으로 증식시키는 줄기세포로부터의 혈관주위 전구세포 제조방법, 상기 방법으로 제조된 혈관주위 전구세포, 이를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환 또는 망막질환의 예방 또는 치료용 세포치료 조성물, 및 상기 조성물을 이용하여 심혈관 질환 또는 망막질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 혈관계에는 다양한 종류의 세포들이 미세혈관(microvascular) 기저막(basement membrane; BM)과 닿아 있으며, 이러한 세포들은 혈관내피세포들과 상호작용하여 미세혈관들의 특징을 유지하고 결정하는데 관여하게 된다. 이런 세포들 중 혈관내피세포와 BM 사이에서 상호작용하며 특이하게 분포하는 세포가 바로 혈관주위 전구세포(perivascular progenitor cell)이다. 혈관주위 전구세포는 중간엽 줄기세포의 일종으로 태반, 골수 및 지방조직 등 여러 인체 조직의 모세혈관, 전모세관동맥, 후모세관동맥 또는 집합관에 존재하는 것으로 알려져 있다. 비록 혈관주위 전구세포는 혈관 평활근세포와 유사한 면이 있지만, 마커, 모양 그리고 혈관내피와 접촉하고 있는 위치 등을 통하여 구분된다. 대동맥 혹은 정맥에서 혈관 평활근세포는 특별한 구조를 이루며, 세포 외 기질이 존재하는 BM과 분리되어 있어 혈관주위세포와 구별될 수 있다. 반면, 혈관주위 전구세포는 혈관내피 기저막 내에 존재한다.

[4]

- [5] 혈관주위 전구세포는 혈관내피의 바깥쪽 부위를 10 내지 50% 가량 둘러싸고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 차이는 혈관주위 전구세포와 혈관내피세포의 형태와 비율에 따라 혈관을 둘러싸고 있는 정도가 다르다는 것을 보여준다. 골격근에서 이들의 비율은 1:100(혈관주위 전구세포:혈관내피세포) 정도이며 망막에서는 그 비율이 1:1에 달한다. 혈관주위 전구세포가 혈관을 가장 많이

둘러싸고 있는 곳은 중추신경계에 존재하는 미세혈관이다. 다른 기관보다 중추신경계에 혈관주위 전구세포의 분포가 높은 이유는 아직 분명하지 않지만, 아마도 뇌혈관장벽(blood-brain barrier)의 형성과 유지에 기여할 것이라는 가능성이 있다. 또한, 혈관주위 전구세포는 존재하는 기관에 따라 형태적인 다양성이 나타난다. 중추신경계에서 혈관주위 전구세포의 형태는 평평하거나 길쭉한 모양이다. 그리고 혈관 바깥쪽 부위에 접촉하고 있는 방사성 형태를 가진 혈관주위세포에서부터 사구체의 사구체 관막세포(mesangial cell)처럼 둥글거나, BM에 국지적인 접촉을 하고 있는 형태까지 다양하게 나타난다.

[6]

[7] 혈관주위 전구세포는 발달 과정 중에 혈관이 성장하거나 리모델링이 되는 과정에서 혈관 평활근세포로 분화가 가능하며, 반대로 혈관 평활근세포 역시 혈관주위 전구세포로 분화가 가능하다. 또한 혈관주위 전구세포는 섬유아세포, 조골세포, 연골세포 그리고 지방세포 등으로 분화될 수 있는 능력을 가진 중간엽 줄기세포의 특성도 지닌다. 최근에는 인체에서 동정된 혈관주위 전구세포가 심근세포로의 분화능을 가지는 것으로 보고되었다.

[8]

[9] 오랜 기간 동안 혈관주위 전구세포의 존재와 역할이 과소평가 되었지만, 최근 혈관주위 전구세포는 다양한 분화능력을 통해 전구세포로서 역할을 수행함으로써 미세혈관계의 형성에 꼭 필요한 요소로서 주목받고 있으며, 혈관의 발생, 안정화, 성숙 및 리모델링에 중요한 조절자로 인식되고 있다. 또한 이는 혈관생리학을 이해하고, 혈관질환의 원인과 치료법을 연구하는데 있어 중요한 타깃으로 여겨지고 있다. 최근 인체조직에서 동정된 혈관주위 전구세포 연구들은 이들의 새로운 기능을 규명하고 있으며, 혈관주위 전구세포가 생물학적으로 큰 의미를 갖는다는 사실을 강조하고 있다. 이에 혈관주위 전구세포의 대량 공급에 대한 요구가 증가하고 있다. 하지만, 혈관주위 전구세포에 대한 전형적인 마커들이 부족하고, 인체 조직에서 수요에 맞는 충분한 세포를 동정하는 것은 현실적으로 불가능하다. 아울러, 한정적인 조직 내의 혈관주위 전구세포의 양은 혈관주위 전구세포에 대한 요구에 미치지 못하고 있다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명자들은 혈관주위 전구세포의 대량 제조 방법을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 인간 배아줄기세포로부터 유래된 배상체로부터 코팅기질 의존 단일세포 부착기술을 적용하여 혈관주위 전구세포를 얻을 수 있는 분화기술을 개발하였다. 이 과정에서 고수율로 순도 높은 혈관주위 전구세포를 분리, 획득할 수 있음을 발견하고, 이에 본 발명을 완성하였다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 본 발명의 목적은 줄기세포 유래의 배상체(embryoid body)에 BMP4 성장인자를 처리하여 중배엽성 세포로의 분화시키는 단계, 상기 분화된 중배엽성 세포를 단일세포로 분리하는 단계, 및 이를 기질이 코팅된 배양접시에서 배양하여 부착된 세포만 자연선택으로 증식시키는 단계를 포함하는, 줄기세포로부터 혈관주위 전구세포를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 혈관주위 전구세포를 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 혈관주위 전구세포를 혈관주위세포, 평활근세포, 근세포, 지방세포 또는 골세포로 분화시키는 방법을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 혈관주위 전구세포를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 혈관주위 전구세포를 유효성분으로 포함하는 망막질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 심혈관 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 망막질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[20]

발명의 효과

[21] 본 발명의 기질 특이적 부착배양에 의한 자연선택을 특징으로 하는 줄기세포로부터 유도된 혈관주위 전구세포의 제조방법에 의해 유세포 분류 또는 자성 세포 분류 등의 추가적인 과정없이, 혈관주위 전구세포를 순수하게 분리하여 증식시킬 수 있음을 확인하였다. 또한 혈관주위 전구세포의 특징적 다분화능을 가짐을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 방법으로 제조된 줄기세포 유래 혈관주위 전구세포는 심혈관 질환 또는 망막질환의 치료 또는 예방을 위한 세포치료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[22]

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 BMP4의 중배엽 특이적 유도 분화를 나타내는 도이다. (A)는 배양 시작일(EB day 0)로부터 EB day 8까지 첨가된 BMP4에 의한 H9 hESC 배상체의 유도 분화를 나타낸다. (B)는 EB day 6에 유세포 분석에 의해 결정된 KDR 및 PDGFR β 에 대해 양성인 살아있는 세포의 백분율을 나타낸다. 바는 NT 그룹과 비교한 3회의 독립적인 실험의 평균에 대한 표준 오차를 나타낸다; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

- [24] 도 2는 BMP4-EB로부터 유도된 단일 세포의 기질 의존적 부착성을 나타내는 도이다. (A)는 세포 배양 접시에 분주된 미분화 H9 hESC의 단일세포, (B)는 코팅되지 않은 플라스틱 페트리접시에 분주된 BMP4 유도 분화 6일째 EB로부터의 단일 세포, (C, D)는 콜라겐 코팅된 접시에 분주된 자연분화된 EB로부터의 단일 세포, (E, F) 콜라겐 코팅된 접시에 분주된 BMP4 유도 분화 6일째 EB로부터의 단일 세포를 나타낸다. 검은 스케일 바, 20 μm .
- [25] 도 3은 BMP4-EB에서 PDGFR β -양성 세포 군집의 기질 의존적 자연 선택을 나타내는 도이다. (A)는 FACS sorter를 이용한 구별된 PDGFR β -양성 및 음성 군집의 분리 후, 콜라겐 코팅된 접시에 분주된 각각의 세포를 나타내며, (B)는 분리 없이 BMP4-EB로부터 유도된 단일 세포의 콜라겐 기질 의존적 부착을 나타낸 도이다. 검은 스케일 바, 20 μm .
- [26] 도 4는 hESC-PVPC의 유세포 분석결과를 나타낸 도이다. (A)는 유세포 분석결과, (B)는 8개 독립적인 hESC-PVPC에 대한 각각의 히스토그램의 겹침을 나타낸다.
- [27] 도 5는 hESC-PVPC의 일반화된 혈관주위세포 가능성을 나타낸 도이다. (A, B)는 각각 장기 배양한 H9 hESC-PVPC와 인간 태반 유도 혈관주위세포의 현미경분석 결과이고, (C, D)는 hESC-PVPC와 혈관주위세포의 공초점 이미지 분석 결과이다. 청색인 DAPI, 녹색인 NG2의 발현에 대해 양성이고 적색인 SMA에 대해서는 음성을 나타낸다. (E) 3차원 콜라겐 기질에서 EC-혈관주위세포 튜브 공조립(coassembly)을 사용하여 혈관 유도 터널 내에서 DiI-표지 HUVECs 세포주의 abluminal 표면에 DiO-표지 hESC-PVPCs 도입을 나타낸다.(F) DiO-표지 HUVECs (내부) 및 DiI-표지 hESC-PVPCs (외부)의 이중층 타원체 형성을 나타낸다. 흰색 스케일 바, 20 mm.
- [28] 도 6은 hESC-PVPC로부터 유도된 평활근의 특성을 나타내는 도이다. (A)는 hESC, hESC-PVPC, PVPC-유도 day 2 내지 4 SMLC 및 성숙 SMLC에서 αSMA 발현에 대한 RT-PCR 분석, (B)는 실시간 PCR 분석결과이다(n=3). 유의도는 * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ 수준이다. 면역세포화학은 hESC (C), SMLC (D) 및 수축 SMLC (E 및 F)에서 αSMA 의 발현을 나타낸다. αSMA (적색), DAPI(청색), SM-MHC(녹색, E) 및 칼포닌(녹색, F). 스케일 막대는 100 μm .
- [29] 도 7은 hESC-PVPC로부터 유도된 근세포의 특성을 나타내는 도이다. 근세포 분화 조건하에서 hESC-PVPC의 형태 변화를 나타낸다. (A, D)는 hESC-PVPC, (B, E)는 근세포 분화 배지, (C, D)는 각각 근세포 성장 배지에서의 전형적인 세포형태이다. (A 내지 C)의 검은 스케일 바는 20 μm (D 내지 F) 면역세포화학은 근세포 특이적 데스민(Desmin) 발현을 나타낸다. 데스민은 적색, DAPI는 청색이다.
- [30] 도 8은 hESC-PVPC의 골격형성 분화 가능성을 나타내는 도이다. (A)와 (B)에 지방생성 조건에서 분화 후 현미경분석과 오일 레드 염색으로 지방생성을 확인하였고, (C)와 (D)에 골형성 조건에서 분화에 따른 현미경분석 및 알리자린

레드 염색으로 골형성을 확인하였다.

- [31] 도 9는 hESC-PVPC와 다른 혈관계 간의 색소 전이 분석을 나타낸 도이다. DiI-표지 hESC-PVPC(상부 패널: 적색)를 칼신(calcein)-표지 HUVEC(중양 패널, 좌측: 녹색), UASMC(중양 패널, 중앙: 녹색) 또는 심근세포(중양 패널, 우측: 녹색)와 5% CO₂의 37°C 항온배양기에서 1시간 동안 공배양하였다. 칼신의 녹색-형광은 hESC-PVPC(하부 패널)에서 DiI의 적색-형광과 함께 검출되었다(하부 패널: 적녹색, 별표).
- [32] 도 10은 hESC-PVPC 이식 후 허혈성 후지에서 허혈 사지 구제/혈류의 개선을 나타낸 도이다. (A)는 처치 후 0일 및 28일에서 일련의 하지 회복정도를 나타낸 이미지 분석을 나타내고, (B)는 처치 후 0일 및 28일에서 일련의 레이저 도플러 이미지로 측정된 허혈 사지의 혈액 관류율을 나타낸다.
- [33] 도 11은 hESC-PVPC 이식에 의해 증가된 허혈 심근 내 모세혈관 밀도를 나타낸 도이다. (A 내지 C)는 마송 삼색-염색된 심장 단면의 대표적 사진들로 (A)는 배지를 주입한 샴그룹, (B)는 hESC-PVPC를 주입한 그룹 및 (C)는 CB-EPC를 주입한 그룹에 대한 사진이다. (D)는 경색증 심근의 섬유화 면적, (E)는 경색증 심근의 상흔 길이, (F)는 경색증 심근에서 모세혈관 밀도 및 (G)는 경색증 심근의 경색증 벽두께를 나타낸다. (H, I)는 심근중 부위 모세혈관을 염색한 GS-렉틴(녹색)을 나타낸다.
- [34] 도 12는 당뇨병 망막질환모델에서 이식한 hESC-PVPC의 손상된 혈관의 혈관주위 영역에서의 생착을 나타낸 도이다. 스트렙토조토신(streptozotocin, STZ)에 의해 당뇨가 유발된 쥐에 DiI(적색)를 표지한 hESC-PVPC를 망막 내 주입하여 4주 후 생착여부를 확인하였다. 사용한 동물모델은 당뇨 유발 최초 5회(1일 1회)의 STZ 주입 후 혈당수치가 250 mg/dl 이상인 마우스를 사용하였으며, 망막병증 유발에 소요되는 기간을 감안하여 당뇨 유발 8주 이후에 사용하였다. 망막혈관 표지를 위해 망막추출 전 꼬리혈관에 FITC가 표지된 덱스트란(dextran-FITC, 녹색)을 주입하였다. 이로부터 이식된 hESC-PVPC는 망막 내에, 특히 손상된 혈관의 혈관주위에 위치함을 확인하였다.
- [35] 도 13은 당뇨병 망막질환모델에서 hESC-PVPC, 인간골수유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC) 및 인간태반유래 중간엽 줄기세포(placenta-MSC)를 이식하고, 이식 후 한달간 생착여부를 확인한 도이다. STZ에 의한 당뇨 유발 8주 후 마우스의 망막에 DiI를 표지한 각각의 세포를 이식하여 1, 2, 4주 후 각각의 망막을 추출하여 생착여부를 확인하였다. hESC-PVPC의 경우 혈관주위 영역에 생착되어 추가적인 망막혈관 형태 손상을 일으키지 않는 반면, 성체유래 중간엽 줄기세포 이식군에서는 이식된 세포가 생착되지 못하고 망막박리, 렌즈-망막협착 과도한 염증반응을 유발하여 사망에 이르게 하는 것을 확인하였다.

[36]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 줄기세포 유래의 배상체(embryoid body)에 BMP4 성장인자를 처리하여 중배엽성 세포로 분화시키는 제1단계; 분화된 중배엽성 세포를 포함하는 배상체를 단일세포로 분리하는 제2단계; 및 분리된 단일세포를 기질이 코팅된 배양접시에서 배양하여 부착된 세포만을 자연선택(natural selection)으로 증식시키는 제3단계를 포함하는, 줄기세포로부터 혈관주위 전구세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [38] 상기 제1단계는 줄기세포로부터 유래한 배상체에 BMP 4 성장인자를 처리하여 중배엽성 세포로 분화시키는 단계이다. 중배엽성 세포로 분화된 줄기세포로부터 유래한 배상체를 적정 분화조건에서 배양하여 중배엽성 표지인자들의 발현이 적어도 하나 이상 증가한 세포군집이 증가함을 의미한다. 이때, 중배엽성 표지인자의 발현은 생화학적 또는 면역화학적 방법으로 검출할 수 있으며, 중배엽성 표지인자를 검출할 수 있는 방법을 제한없이 사용할 수 있다. 이를 위해 중배엽성 표지인자에 결합하는 특이적인 다클론성 항체 또는 단일 클론 항체를 사용할 수 있다. 개개의 특이적 마커를 표적으로 하는 항체는 시판용이나 공지의 방법에 의해 제조된 것을 제한없이 사용할 수 있다. 대표적인 중배엽성 표지인자로는 KDR, PDGFR α/β , CD29, CD31, CD34, CD73, CD90 및 CD105 등을 들 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 제1단계는 6 내지 8일간 수행할 수 있으며, 바람직하게는 6일간 수행할 수 있다.
- [39] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 당업계에 공지된 방법에 따라 자가-응집(self-aggregation)에 의해 형성된 배상체를 BMP4 성장인자가 포함된 10% SR을 함유한 DMEM/F12배지에 6일간 배양한 경우 배상체 내에서 중배엽성 세포 표지인자인 KDR과 PDGFR β 발현이 각각 30%와 50% 이상 증가하는 것을 유세포 분석기를 통해 확인하였다(도 1B).
- [40] 본 발명의 용어 "줄기세포"란, 동물의 내배엽(endoderm), 중배엽(mesoderm) 및 외배엽(ectoderm) 유래의 세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency), 또는 조직 또는 기능에 있어 밀접하게 관련된 세포로 분화할 수 있는 다분화능(multipotency)을 가지는 세포를 의미한다. 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 의미하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cells), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능(다능성) 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.
- [41] 본 발명에서 용어, "배아줄기세포"란 동물 수정란이 모체의 자궁에 착상하기 직전인 포배기 배아에서 내세포괴(inner cell mass)를 추출하여 체외에서 배양한 것으로 동물의 모든 세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency)을 가진 세포를 의미하며, 이에 제한되는 것은 아니나, 넓은 의미로는 배아줄기세포로부터 유래한 배아체(embryoid body) 또는 유도 전분화능 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS cell)와 같은 유사 줄기세포들도

포함한다.

- [42] 본 발명에서 용어, "성체줄기세포"란 각 조직 내 존재하는 줄기세포를 분리해 체외에서 배양한 것으로 다분화능(multipotency)을 가지는 세포를 의미하며, 골수줄기세포, 망막줄기세포, 망막 내 뿔리아교세포, 신경줄기세포 등이 있다. 상기 줄기세포는 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개, 쥐, 랫트 및 고양이 등의 가축을 포함하는 포유 동물 유래일 수 있으며, 바람직하게는 인간 유래이다.
- [43] 본 발명의 줄기세포는 인간 배아줄기세포(embryonic stem cell), 유도 전분화능 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPSC) 및 체세포 핵치환 줄기세포(somatic cell nuclear transfer cell, SCNT)일 수 있으며, 바람직하게는 배아줄기세포일 수 있고, 보다 바람직하게는 인간 배아줄기세포일 수 있다. 상기 줄기세포는 인간을 포함한 포유동물 유래일 수 있으며, 가장 바람직하게는 인간 유래 세포일 수 있다.
- [44] 본 발명의 용어 "BMP4"란 인간에서 BMP4 유전자에 의해 인코딩되는 단백질로서 성장인자를 의미한다. BMP(bone morphogenetic protein)는 TGF- β (transforming growth factor- β) 슈퍼 패밀리에 속하는 신호전달계 단백질로서 초기 태생기 분화, 태생기 조직형성 및 성인 조직의 항상성 유지 등을 조절한다. 특히, 초기 태생기에서 BMP의 농도 차이는 배아의 등배 형성과정에서 축 형성에 결정적 작용을 한다. 세포 외로 분비된 BMP는 세포막의 제1형과 제2형 세린/트레오닌 키나제(type I and type II serine/threonine kinase) 수용체들에 결합하여 BMP 신호전달을 시작한다. 제2형 수용체는 제1형 수용체를 인산화시키고, 인산화된 제1형 수용체는 세포내의 기질인 Smad 단백질을 인산화시켜 세포 내의 신호전달이 이루어진다. 수용체에 의해 조절되는 Smad 단백질을 R-Smad(receptor regulated Smad)라고 하며, Smad-1, 2, 3, 5 및 8이 R-Smad에 속한다. 이들은 세포 내의 파트너인 Co-Smad(common partner Smad)인 Smad-4와 결합하여 세포핵 내로 이동하여 전사인자와 결합하여 목표 유전자들의 전사를 조절한다(Yamamoto & Oelgeschlager, *Naturwissenschaften*, 91: 519-34, 2004).
- [45] 본 발명의 용어 "배상체(embryoid body)"란 배아줄기세포로부터 유래된 세포 응집체를 의미한다. 세포 응집은 전형적인 집락 증식을 형성하기 위해 표면에 세포가 부착하는 것을 방지하는 방울 배양, 비처리 세포 배양 접시 배양 또는 교반 배양에 의해 발생한다. 응집과 함께 분화가 시작되고, 세포는 제한된 정도의 배발생을 반복하기 시작한다. 상기 배상체는 다분화능 세포로부터 유도되고 따라서 매우 다양한 분화된 세포형으로 구성될 수 있다. 그러나 배상체 내에서의 분화는, 3차원적 방식으로 발생함에도 불구하고, 신중히 조직된 정상 배발생의 경우에 비해 매우 체계적이지 못하다. 하지만 배상체는 여전히 연구가 어려운 발생 초기단계에서의 세포 및 분자 상호작용을 연구하기 위한, 특히 인간에서, 좋은 모델 시스템이다. 따라서, 본 발명에서는 배상체를 중배엽성

세포로 분화시키기 위해 배상체를 형성한 첫날부터 BMP4 성장인자를 처리하여 배양하여 분화를 유도하였다.

[46] 본 발명의 용어 "중배엽성 세포"는 혈액세포, 혈관내피세포, 평활근 및 심근 등을 포함하는 근육세포, 골세포, 연골세포, 지방세포, 망상세포 또는 기타 결합조직세포로 분화할 수 있는 세포를 의미한다.

[47]

[48] 상기 제2단계는 상기 분화된 중배엽성 세포를 포함하는 배상체를 단일세포로 분리시키는 단계로, 본 발명에서는 배상체의 단일세포화를 위하여 효소를 처리하였다. 상기 효소는 세포간 결합에 관여하는 세포 표면 단백질을 분해하여 세포간 결합을 저해할 수 있는 것이면 제한없이 사용될 수 있다. 그 예로 트립신, 트립신-EDTA, 콜라게네이즈(collagenase) 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 저자극성 효소일 수 있으며, 보다 바람직하게는 TrypLE(Invitrogen)일 수 있다.

[49]

[50] 상기 제3단계는 분리된 단일세포를 기질이 코팅된 배양접시에서 배양하여 부착된 세포만을 자연선택으로 증식시키는 단계이다.

[51] 본 발명의 용어 "자연선택(natural selection)"이란, 당업계에서 분화된 특정세포를 고순도로 분리하기 위해 사용하는 유세포 분류(flow cell sorting) 또는 자성 세포 분류(magnetic cell sorting) 기술을 이용하지 않고 세포 고유의 특성을 이용하여 자연스럽게 분리하는 것을 의미한다. 상기 유세포 분류 또는 자성 세포 분류 기술의 경우 세포특이적 표지인자를 통해 순도를 확인할 수 있는 장점이 있는 반면, 그 이유를 충분히 설명할 수 없는 변형을 줄 수 있다는 단점이 있다. 아울러, 다양한 시약, 기계 등의 사용으로 비용이 증가하는 문제점이 있다. 그러나, 본 발명의 방법은 기계 등이 필요없으며, 단순한 자연선택을 이용하여 세포의 변형이나 고비용의 문제점이 없이 분화시키는 장점이 있다. 즉, 본 발명의 자연선택 기술은 세포 특이적 표지인자에 초점을 두는 것이 아니라, 구별될 수 있는 세포의 기능적 특성에 집중하고 있다. 배지 적합성 또는 특이적 표면 부착성에 기인한 선택적 배양이 그 예이다. 본 발명의 "기질"은 배양접시에 대한 세포의 선택적 부착을 도울 수 있는 것이면 제한없이 사용될 수 있으며, 그 예로 콜라겐 또는 라미닌이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 콜라겐이 사용될 수 있다. 상기 제3단계는 16 내지 24시간 동안 수행할 수 있으며, 바람직하게는 18시간 동안 수행할 수 있다. 이와 같이 자연선택된 고순도의 혈관주위 전구세포는 계속하여 증식시키거나, 다양한 조직세포로 분화시키거나, 회수하여 냉동보관할 수 있다.

[52] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 특이 기질로서 5 mg/ml 콜라겐을 배양접시에 코팅하여 사용하였다. 상기 BMP4 성장인자 유도 중배엽성 세포 배상체를 효소 처리하여 단일세포화 한 후, 콜라겐이 코팅된 배양접시에 18시간 동안 배양하였다. 이후 배지교환을 통해 콜라겐 특이적으로 부착된 세포만을

자연선택하였다.

[53] 상기 제3단계에서 자연선택된 혈관주위 전구세포는 PDGFR β (platelet-derived growth factor receptor β)에 대하여 양성의 발현을 나타낸다. PDGFR β 는 인간에서 PDGFRB 유전자에 의해 인코딩되는 단백질이다. 상기 유전자는 PDGF 패밀리에 속하는 세포 표면 타이로신 키나아제 수용체를 인코딩한다. 상기 성장인자는 중간엽 유래 세포에 대한 분열촉진물질로 중배엽성 세포의 특이적 표지인자 중 하나이다.

[54] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 자연선택 기술에 의한 배양 전과 후 세포에 대하여 유세포 분석으로 확인한 결과 자연선택 기술에 의한 배양 후 증식되는 세포는 PDGFR β 대해 양성인 세포들만이 고순도로 배양 증식되고 있음을 확인할 수 있었고 이는 유세포 분류에 의해 PDGFR β 대해 양성인 세포들만을 선택 배양한 것과 유사한 수준의 순도를 보여주었다(도 3).

[55]

[56] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 혈관주위 전구세포를 제공한다.

[57] 본 발명에 의해 제조된 혈관주위 전구세포는 혈관주의 전구세포 특이적인 PDGFR, CD44, CD146 및 NG2와 중간엽 줄기세포 특이적 마커인 CD73 및 CD90 등에 양성의 발현 패턴을 보이는 한편, 혈관내피세포 특이적 마커인 CD31 및 CD144와 조혈세포 특이적 마커인 CD34 및 CD45 등은 발현하지 않는다(도 4). 더불어 상기 혈관주위 전구세포는 연골, 조골 및 지방세포와 같은 중간엽세포 유래 분화체, 평활근세포 및 근세포로의 분화능을 가지며(도 5 내지 8), 심혈관 질환 모델에서 세포치료 조성물로 적용시 상실된 기능을 회복시킬 수 있는 가능성을 가진다(도 10 및 11).

[58] 본 발명의 용어 "전구세포(progenitor cell)"란 비대칭적 분열(asymmetric division)을 할 수 있는 세포를 의미하는 것으로 전구체(precursor)라고도 불리며, 비대칭적 분열로 인해 각 세포마다 계대수가 같더라도, 분화되는 부분도 있고, 증식되는 부분도 있어, 나이 및 성질이 다를 수 있다.

[59]

[60] 또 하나의 양태로서 본 발명은, 상기 방법에 의해 제조된 혈관주위 전구세포를 혈관형성 성장인자(angiogenic growth factors), FGF(fibroblast growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), IGF(insulin-like growth factor), EGF(epidermal growth factor), 아스코르브산, GA-1000을 포함하는 EGM-2MV(SingleQuots, Cambrex Bio Science) 배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 혈관주위 전구세포를 혈관주위 세포로 분화시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는 EGM-2MV 배지에 5% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 10 ng/ml angiogenic growth factor, 10 ng/ml FGF, 20 ng/ml VEGF, 10 ng/ml IGF, 10 ng/ml EGF, 아스코르브산, GA-1000을 포함하는 혈관주위 세포화 분화 배지에 배양할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[61] 본 발명의 용어 "혈관주위 세포(pericyte)"란, 혈관내피와 특이한 국소접촉을 형성하는, 미세혈관계의 기저막 내에 묻혀있는 혈관 벽세포를 말한다. Rouget 세포, 외막세포(adventitial cell) 또는 벽세포(mural cell)로도 불리는 소혈관 주위에 생기는 결합조직 세포로, 혈관내피의 바깥쪽 부위를 10 내지 50% 가량 둘러싸고 있는 것으로 알려져 있다. 가늘고 긴 수축성 세포이며 기저막 밖에서 모세혈관이전세동맥 주위를 싸고 있다. 상대적으로 미분화된 다분화능 세포이며 혈관을 지지하는 기능을 한다. 필요에 따라서는 섬유아세포, 평활근 또는 대식세포로도 분화할 수 있다. 혈관 신생 뿐 아니라 혈-뇌 장벽 안정성에 중요한 역할을 한다. 혈관 내 세포에 대한 접착력으로 미세혈관계에서 혈류 조절인자로 대두되고 있으며, 사실상 모세혈관 수준에서 혈류조절이 가능하다. 따라서 이러한 혈관주위세포에 대한 연구는 혈관생리학을 이해하고, 혈관질환의 원인과 치료법을 연구하는 중요한 타겟으로 여겨지고 있다.

[62]

[63] 또 하나의 양태로서 본 발명은, 상기 방법에 의해 제조된 혈관주위 전구세포를 최소 필수 배지 비필수 아미노산(minimum essential medium non-essential amino acids; NEAA, Invitrogen), 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; PS, Invitrogen), β -머캅토에탄올(Invitrogen)을 포함하는 배양 배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 혈관주위 전구세포를 평활근 세포로 분화시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium) 배지에 5% FBS, 1% NEAA, 1% PS, 0.1 mM β -머캅토에탄올을 포함하는 평활근 세포화 분화 배지에 배양할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[64]

본 발명의 용어 "평활근 세포(smooth muscle cell)"란, 근육 중에서 가로무늬가 없는 근으로 척추동물의 심장근 이외의 내장근은 모두 민무늬 근이다. 수축속도는 느리지만, 쉽게 피로를 느끼지 않는 불수의 근이다. 가늘고 긴 방추형이며, 드물게는 다핵인 것도 있으나 보통 중앙부에 하나의 타원형의 핵을 가진다. 혈관벽과 위, 장, 자궁과 같은 속이 빈 장기의 벽 등, 신체의 각 부위에 존재한다. 각종 인체기능의 조절에 중추적인 역할을 하므로 상당수의 인체 질환이 평활근의 기능이상과 관련이 있다.

[65]

[66] 또 하나의 양태로서 본 발명은, 상기 방법에 의해 제조된 혈관주위 전구세포를 말혈청(horse serum; HS, Invitrogen), 계배추출물(chicken embryo extract; CEE, Sera Lab, Sussex, UK), PS를 포함하는 배양 배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 혈관주위 전구세포를 근세포로 분화시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는 고농도 글루코스 DMEM(DMEM high glucose) 배지에 10% FBS, 10% HS, 1% CEE, 1% PS를 포함하는 근세포화 분화 배지에 배양할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[67]

본 발명의 용어 "근세포(myocyte)"란, 일명 근육세포(muscle cell)로 근모세포(myoblast)로부터 발생한다. 각각의 근세포는 긴 근원섬유(myofibril),

근섬유분절(sarcomere)의 긴 사슬, 세포의 수축단위를 포함한다. 근세포는 심장, 골격, 또는 평활근 세포를 포함하는 다양한 성질의 다양한 분화된 형태를 갖는다.

[68]

[69] 또 하나의 양태로서 본 발명은, 상기 방법에 의해 제조된 혈관주위 전구세포를 인슐린(Sigma-Aldrich), 덱사메타손(dexamethasone, Sigma-Aldrich), 이소부틸메틸크산틴(isobutylmethylxanthine, Sigma-Aldrich), 인도메타신(indomethacin, Sigma-Aldrich)을 포함하는 배양 배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 혈관주위 전구세포를 지방세포로 분화시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는 저농도 글루코스 DMEM 배지에 10% FBS, 5 $\mu\text{g/ml}$ 인슐린, 1 μM 덱사메타손, 0.5 mM 이소부틸메틸크산틴, 60 μM 인도메타신을 포함하는 지방세포화 분화 배지에 배양할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[70] 본 발명의 용어 "지방세포(adipocyte)"란 지방의 형태로 에너지를 저장하는 지방 조직을 구성하는 주된 세포이다. 이는 세포질 층으로 둘러싸인 커다란 지방 방울을 포함하는 백색지방세포와 지방 방울이 고루 흩어져있는 상당량의 세포질을 포함하는 다각형의 갈색지방세포의 두가지 형태로 존재한다. 백색지방세포는 레지스틴, 아디포넥틴 및 렙틴과 같은 아디포카인(adipokine)으로 작용하는 단백질을 분비한다.

[71]

[72] 또 하나의 양태로서 본 발명은, 상기 방법에 의해 제조된 혈관주위 전구세포를 덱사메타손, β -글리세로포스페이트, 아스코르브산-2-인산을 포함하는 배양 배지에 배양하는 것을 특징으로 하는 혈관주위 전구세포를 골세포로 분화시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는 저농도 글루코스 DMEM 배지에 10% FBS, 1 μM 덱사메타손, 10 mM β -글리세로포스페이트, 60 μM 아스코르브산-2-인산을 포함하는 골세포화 분화 배지에 배양할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[73] 본 발명의 용어 "골세포(osteocyte)"란 촘촘한 골조직에 가장 풍부한 별모양의 세포로 핵과 세포질의 얇은 고리를 포함한다. 골모세포가 스스로 분비한 기질에 갇혀 골세포를 형성한다. 골세포는 간극결합을 통해 영양분과 폐기물을 교환하는데 사용되는 소관계라 불리는 작은 관을 채우는 긴 세포질 신장을 통해서로 연결된다. 한편, 골세포는 합성 능력이 감소되어 유사분열하지 않으며 중간엽에서 생성되고, 수산화인회석, 탄산칼슘, 및 인산칼슘이 세포 주위에 축적된다.

[74]

[75] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 제조된 혈관주위 전구세포를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[76] 본 발명의 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해

심혈관 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 심혈관 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

- [77] 본 발명의 조성물은 심혈관 질환의 예방 또는 치료에 제한없이 사용될 수 있다. 본 발명의 용어 "심혈관 질환"이란, 심장질환과 혈관질환을 포함하는 것으로, 심장을 비롯한 동맥, 정맥에 발생하여 심장 및 혈관에 영향을 미치는 질병을 의미한다. 고지혈증, 당뇨병 및 흡연 등의 위험인자는 모두 혈관을 손상시키는 원인이며, 심혈관질환을 발병시킬 수 있다. 그러나 보통 뚜렷한 증상이 없어 보통 침묵의 질환이라고 한다. 무증상으로 시작하고 자각하지 못하는 사이에 악화되어 증상이 나타났을 때는 이미 질환이 심각해진 상태가 대부분이다. 또한 이들 심혈관 질환의 다수가 성인병과 관계된다. 그 예로는, 혈액순환이 안되어 혈관 속에 노폐물인 콜레스테롤과 지방성분이 많이 축적되어 나타나는 고지혈증, 동맥이 노쇠하여 굳어가는 동맥경화증, 심장이 수축과 이완을 하는 과정에서 압력이 높아져 생기는 고혈압, 낮아져 생기는 저혈압, 심장주위 관상동맥의 이상으로 생기는 협심증, 심장 근육의 이상에 의해 생기는 심근경색증 등이 대표적이다.
- [78] 따라서, 본 발명에 의해 치료 가능한 심혈관 질환은 그 예로, 심부전, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 심장관막증, 심실중격결손, 선천성 심장질환, 심근증, 심낭질환, 뇌졸중, 말초혈관질환, 동맥류, 동맥경화증, 관상동맥질환 또는 고혈압 등이 포함될 수 있으나 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [79] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 마우스에 이식시킨 본 발명의 혈관주위 전구세포가 허혈성 후지에서 허혈 사지 구제/혈류의 개선의 효과가 있음을 확인하였다(도 10). 또한 허혈성 심근에서 모세혈관 밀도를 증가시키는 효과가 있음을 확인하였다(도 11). 따라서, 본 발명의 줄기세포로부터 유래된 혈관주위 전구세포는 세포치료 조성물로서 심혈관 질환을 치료할 가능성이 있음을 확인하였다.
- [80] 본 발명의 용어 "약학적 조성물"은 "세포치료 조성물"과 혼용될 수 있으며, 이는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [81] 상기 본 발명의 세포치료 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수도 있다. 상기 "약학적으로 허용되는"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 것을 말한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 각종 제형의

형태로 통용되는 기법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명의 조성물인 세포치료제는 질병부위로 이동을 유도할 수 있다면 어떠한 경로를 통해서든지 투여 가능하다. 경우에 따라서는 줄기세포를 병변으로 향하게 하는 수단을 구비한 비히클에 로딩하는 방안을 고려할 수도 있다. 따라서 본 발명의 조성물은 국소 (협측, 설하, 피부 및 안내 투여를 포함), 비경구 (피하, 피내, 근육내, 점적, 정맥 내, 동맥 내, 관절 내 및 뇌척수액 내를 포함) 또는 경피성 투여를 포함한 여러 경로를 통해 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구로, 가장 바람직하게는 발병부위에 직접 투여한다. 일 양태로서 줄기세포는 적합한 희석제에 약 1×10^3 내지 5×10^6 세포/ml의 농도로 현탁시켜 개체에 투여할 수 있는데, 이 희석제는 세포를 보호 및 유지하고, 목적하는 조직에 주입시 사용에 용이하도록 하는 용도로 사용된다. 상기 희석제로는 생리식염수, 인산완충용액, HBSS 등의 완충용액, 혈장, 뇌척수액, 또는 혈액성분 등이 있을 수 있다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있도록 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 주사제이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액, Hank 용액 또는 멸균된 수용액 등의 수성용제, 올리브 오일 등의 식물유, 에틸올레인산 등의 고급 지방산 에스테르 및 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 또는 글리세린 등의 비수성용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 점막 투과를 위해, 통과할 배리어에 적합한 당업계에 공지된 비침투성제가 사용될 수 있으며, 변질방지를 위한 안정화제로 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등과, 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등의 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 등의 약학적 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.

[82]

[83] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 제조된 혈관주위 전구세포를 유효성분으로 포함하는 망막질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[84] 본 발명의 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 망막질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 망막질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[85] 또한 본 발명의 조성물은 망막질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 용어 "망막질환"이란, 시혈관 주위세포(pericyte)가 손상된 후 재생되지 않아 혈관내피세포의 비정상적인 증식을 수반하거나 혈액 또는 체액이 누출되어 망막변성을 일으킴으로 발생하는 질환을 의미한다. 따라서, 망막에 혈관주위세포 또는 이로 분화가 가능한 세포를 이식함으로써 치료될 수 있다. 본 발명에 의해 치료 가능한 망막질환의 예로는 습성 황반변성(wet age related macular degeneration, neovascular or exudative AMD), 녹내장(glaucoma), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 습성 망막병증(wet age related retinopathy), 미숙아

망막변증(retinopathy of prematurity) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[86] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 당뇨병 망막질환 마우스모델의 망막에 이식시킨 본 발명의 줄기세포로부터 유래된 혈관주위 전구세포가 손상된 혈관의 혈관주위에 정착하여 손상을 완화시키는 효과가 있음을 확인하였다(도 12). 또한 성체유래 줄기세포를 이식한 경우와 비교하였을 때, 이식된 성체유래 줄기세포는 원하는 위치에 정착되지 못하고 망막박리, 렌즈-망막협착 과도한 염증반응을 유발하여 사망에 이르게 하는 것을 확인하였다(도 13). 따라서, 본 발명의 줄기세포로부터 유래된 혈관주위 전구세포는 세포치료 조성물로서 망막질환을 치료할 가능성이 있음을 확인하였다.

[87]

[88] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 심혈관 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[89] 본 발명의 용어 "개체"란 위와 같은 심혈관 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여함으로써 상기 질환들을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[90] 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[91] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[92]

[93] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 망막질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 심혈관 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[94] 본 발명의 용어 "개체" 및 "투여"는 상기 본문에 정의된 바와 동일하다.

[95]

- [96] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 줄기세포유래 혈관주위 전구세포의 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 용도를 제공한다.
- [97] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 줄기세포유래 혈관주위 전구세포의 심혈관 질환 치료제의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [98] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 줄기세포유래 혈관주위 전구세포의 망막질환의 예방 또는 치료용 용도를 제공한다.
- [99] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 줄기세포유래 혈관주위 전구세포의 망막질환 치료제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

[100]

발명의 실시를 위한 형태

- [101] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[102]

- [103] **실시예 1: 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cell; hESC)의 배양**

- [104] 미분화 상태의 인간 배아줄기세포(H9, CHA11-hESC)를 0.1% 젤라틴으로 코팅한 배양접시(Nunc, Roskilde, Denmark)에서, 세포 성장 억제물질인 미토마이신 C(mitomycin C; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 10 µg/ml의 농도로 90분간 처리하여 준비한 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblast; MEF)를 지지세포로 하여 공배양하였다. 이때, hESC는 DMEM/F12(50:50, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20%(v/v) 혈청 대체물(serum replacement; SR), 1% 비필수 아미노산(Invitrogen), 1% 페니실린 스트렙토마이신(Invitrogen), 0.1% 베타-머캅토에탄올(Invitrogen), 4 ng/ml bFGF(basix fibroblast growth factor; Invitrogen)로 구성된 배양액을 사용하였다. 배양액은 매일 교체해주고, 5일 내지 7일 간격으로 새로운 지지세포에 계대배양하였으며, 세포배양은 37°C, 5% 이산화탄소, 95% 습도를 유지하면서 배양하였다.

[105]

- [106] **실시예 2: 배상체(embryoid body)의 형성**

- [107] 분화 유도를 위한 배상체를 형성하기 위하여 인간 배아줄기세포를 디스파아제로 지지세포와 분리시킨 후 새로운 배양접시(Falcon/BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 옮겨, 한번 세척하고, DMEM/F12(50:50, Invitrogen)에 2%(v/v) 혈청 대체물(serum replacement; SR; Invitrogen)가 첨가된 배양액에 45분 동안 부유배양하면서 응집을 유도하였다. 응집된 배상체는 10%(v/v) SR, 1 mM L-글루타민(Invitrogen), 1% 비필수 아미노산(nonessential amino acid; NEAA; Invitrogen), 1% 페니실린 스트렙토마이신(Invitrogen), 0.1% 베타-머캅토에탄올(Invitrogen)로 조성된 배양액으로 옮겨 부유배양하였다. 배양액은 이틀에 한번씩 교체하였고, 5 내지 6일 동안 유지배양하였다.

[108]

[109] 실시예 3: BMP4 성장인자 처리에 의한 배상체 내 중배엽성 세포군집의 증가
 [110] 상기 방법으로 제조된 배상체를 중배엽성 세포로 분화시키기 위해, 배상체를 형성한 첫 날 1 mM L-글루타민, 1% 비필수 아미노산, 0.1% 베타-머캅토에탄올 및 10% SR을 첨가한 DMEM/F12 배양액에 20 ng/ml BMP4 성장인자(Peprotech Inc., Rocky Hill, NJ, USA)를 처리하였으며, 다음 날부터 이틀에 한 번씩 BMP4 성장인자를 처리한 배양액으로 교체해 주었다.

[111] 그 결과, BMP4 성장인자를 처리한 배양일 수가 증가함에 따라 중배엽성 세포의 마커인 KDR과 PDGFR β 대해 양성을 나타내는 세포의 비율이 증가하는 것을 확인하였다(도 1A 및 1B). 또한 BMP4를 처리하지 않은 대조군(NT)과 배양 6일째에 상기 두가지 마커 KDR과 PDGFR β 발현을 유세포 분석을 통해 비교한 결과, 특히 KDR의 발현 비율이 BMP4를 처리한 실험군에서 대조군에 비해 크게 향상된 것을 확인하였다(도 1B).

[112]

[113] 실시예 4: 저자극 효소처리에 의한 중배엽성 배상체의 단일세포화

[114] BMP4 성장인자 처리에 의한 중배엽 세포군집 유도 배상체를 인산완충용액(Invitrogen 1X)으로 1 내지 2회 세척하고, 35 mm 배양 접시에 상기 배상체를 두고천연물질 유래 저자극 효소인 Tryp-LE(Invitrogen)를 처리하여 배상체의 세포간 결합이 풀어지는 것을 현미경으로 관찰하여 확인하였다. 상기 결합이 풀어진 세포들을 에펜도르프 튜브에 옮겨 인산완충용액으로 세척하고 35 μ m 나일론 그물 세포 여과기(35 μ m nylon mesh cell strainer)를 이용하여 여과하여 단일세포를 제조하였다.

[115] 이때, 하나의 60 mm 배양접시에 유지배양된 인간 배아줄기세포로부터 얻어지는 배상체는 평균 80 내지 100개이며, 하나의 배상체는 평균 2,500개의 세포로 이루어진다. 따라서 본 발명의 1회 공정에 있어, 6개의 60 mm 배양접시의 인간 배아줄기세포로부터 얻어지는 배상체는 평균적으로 500 내지 600개이며, 이들로부터 얻어지는 단일세포는 1.5 내지 2×10^6 개이다.

[116] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2A는 세포배양접시에 분주한 미분화 H9 hESC 단일세포, 도 2B는 코팅되지 않은 플라스틱 페트리접시에 분주한 BMP4 유도 6일째 EB로부터의 단일세포, 2C 및 2D는 콜라겐 코팅된 접시에 분주한 자연분화된 EB로부터의 단일세포, 및 2E 및 2F는 콜라겐 코팅된 접시에 분주한 BMP4 유도 6일째 EB로부터의 단일세포의 현미경 사진이다. 도 2C 및 2D는 상피세포와 섬유세포 등이 함께 관찰되는 균일하지 않은 세포 군집을 보이는 반면, 도 2E 및 2F는 균일한 세포군집을 보인다.

[117]

[118] 실시예 5: 코팅 기질 특이적인 부착배양을 통한 혈관주위 전구세포의 자연선택(Natural selection)

[119] 상기 실시예 4에서 제조된 단일세포를 미리 준비한 콜라겐 코팅 배양접시에

EGM2-MV(Lonza) 배지와 함께 37°C, 5% 이산화탄소 조건의 세포배양기에서 밤새도록 배양하였다. 상기 과정에서 배양된 단일세포는 부유군집과 부착군집으로 나누어지고, 부유군집은 인산완충용액 세척과 배지교환 과정을 통해 자연선택에 의해 제거되었다. 상기 과정에서 자연선택을 통해 부착된 세포를 계대 0으로 정하였다. 2 내지 3일 마다 계대배양하고, 계대 0으로부터 배양 10일 이내에 계대 3까지 증식된다. 본 발명의 1회 공정에 있어 1.5 내지 2×10⁶개의 단일세포는 35 mm 콜라겐 코팅 배양접시에 50 내지 80%가 부착되고, 계대 3에서는 5개의 T-75 플라스크에 3 내지 5×10⁷개로 증식된다.

[120] 코팅에 사용된 콜라겐은 3 mg/ml 농도의 콜라겐 용액(Stem Cell Tech.)의 3차 증류수 희석용액을 사용하였다. 계대 0을 위한 콜라겐 코팅은 5배 희석된 콜라겐 용액을 사용하였고, 이후의 계대배양에는 20배 희석된 콜라겐 용액을 사용하였다. 코팅은 상온의 무균작업대에서 배양접시를 해당 농도의 콜라겐 용액에 1시간 이상 노출시켜 수행하였다.

[121] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 먼저 유세포 분석기로 PDGFR β 의 발현 정도에 따라 각각 양성과 음성의 세포 군집을 분류하여 배양한 세포의 형태 및 각각에 대한 유세포 분석 결과를 도 3A에 나타내었다. 더불어 본 발명의 자연선택 방법에 따라 배양된 세포를 도 3B에 나타내었다. 수일의 배양 후 유세포 분석 결과로부터 본 발명의 배양 방법의 특징적인 단계인 기질 특이적 자연선택에 의해, 유세포 분류 또는 자성 세포 분류 등의 추가적인 과정없이, 혈관주위 전구세포를 순수하게 분리할 수 있음을 확인하였다.

[122]

[123] 실시예 6: 혈관주위 전구세포의 표지마커 검색

[124] 상기 실시예 1 내지 5의 과정을 통해 제조된 세포를 혈관주위 전구세포의 표지마커를 이용하여 유세포 분석기(FACSCalibur flow cytometer; BD Bioscience, San Jose, CA, USA)로 분석하였다. 계대 3에서 배양된 세포를 저자극 효소인 Tryp-LE를 이용하여 부유시키고, 상기 세포들을 에펜도르프 튜브에 옮겨 인산완충용액으로 세척하고 35 μ m 나일론 그물 세포 여과기를 이용하여 여과하여 2% 소태아혈청(Terracell, Webtec Inc., Charlotte, NC, USA)이 함유된 인산완충용액으로 부유시킨 후 유세포 분석을 실시하였다. 대조군 마커로는 IgG_{isotype}(PE, APC; BD Biosciences)를, 그 외에 PDGFR α (PE; R&D systems), PDGFR β (PE; R&D systems), CD44(PE, APC; R&D systems), KDR(PE; R&D systems), Tie-2(PE; R&D systems), Flt-1(PE; R&D systems), VE-CAD(PE; R&D systems), CD31(PE; R&D systems), CD146(PE; R&D systems), NG2(PE; R&D systems), CD34(PE; R&D systems), CD45(PE; R&D systems), CD105(PE; R&D systems), CD90(PE; R&D systems), CXCR4(PE; R&D systems), SSEA4(PE; R&D systems) 및 CD133(APC; MiltenyiBiotec Inc.) 등을 사용하였다.

[125] 상기 유세포 분석 결과를 도 4에 나타내었다. 그 결과, 도 4a로부터, 본 발명의 혈관주위 전구세포는 PDGFR α , PDGFR β , CD44, CD73, CD90, CD105, CD146,

NG2, KDR, Tie2 및 Flt1에 대해 양성이며, CD31, CD34, CD45, CD133, CD144, CXCR4 및 c-kit에 대해서는 음성인 면역 표현형을 나타내었다.

[126]

[127] 실시예 7: 혈관주위 전구세포의 분화능

[128] 상기 실시예 6의 방법으로 확인된 혈관주위 전구세포를 지속적으로 5% FBS, 10 ng/ml angiogenic growth factors, 10 ng/ml FGF, 20 ng/ml VEGF, 10 ng/ml IGF, 10 ng/ml EGF, 아스코르브산 및 GA-1000을 포함하는 EGM-2MV(SingleQuots, Cambrex Bio Science) 배지에서 배양 시 성체 유래의 혈관주위세포와 유사한 특성을 나타내었다. 이를 인간 태반 유도 혈관주위세포와 비교하여 도 5에 나타내었다.

[129] 그 결과, 도 5A(H9 hESC-PVPC) 및 도 5B(인간 태반 유도 혈관주위세포)에서 세포형태상의 유사성을 관찰할 수 있었으며, 도 5C 및 도 5D에서 혈관주위세포의 특이적 마커인 NG2(Green)의 발현을 확인할 수 있었으나, 성체조직 특이적 마커인 SMA(red)의 발현은 관찰되지 않았다. 도 5E의 3차원 콜라겐 젤 및 도 5F의 저부착 배양접시에서 혈관내피세포와 인간 배아줄기세포 유래 혈관내피 전구세포의 공동배양을 통해 분화된 혈관주위 전구세포가 혈관내피세포에 의해 형성된 구조(도 5E에서는 유사혈관형태, 도 5F에서는 타원형 내부세포괴)의 외부, 즉 혈관주위영역에 위치함을 확인하였다.

[130] 상기 실시예 6의 방법으로 확인된 혈관주위 전구세포를 평활근 세포화 분화배지 즉, 5% FBS, 1% NEAA, 1% PS, 0.1 mM β -머캅토에탄올을 포함하는 DMEM 배지에서 분화시켜, 본 발명의 혈관주위 전구세포가 평활근세포로 분화가능함을 보였다. 이를 평활근세포 특이적 마커인 α SMA의 발현을 성숙 SMLC와 비교하여 RT-PCR, 실시간 PCR 및 면역세포화학으로 확인하였다.

[131] 그 결과, 도 6A 및 도 6B는 평활근 분화배지로 분화 유도 경과일에 따라 점진적으로 증가함을 나타내었다. 면역형광염색은 분화 전 혈관주위 전구세포에서는 α SMA(red)가 발현하지 않고, 평활근세포로 분화됨에 따라 발현됨을 나타내었다(도 6C 및 도 6D). 도 6E 및 도 6F는 성숙한 평활근세포 특이적 마커인 SM-MHC(도 6E, green) 및 칼포닌(calponin; 도 6F, green)이 α SMA와 동시에 발현됨을 보였다.

[132] 상기 실시예 6의 방법으로 확인된 혈관주위 전구세포를 10% FBS, 10% HS, 1% CEE 및 1% PS를 포함하는 고농도 글루코스 DMEM 배지에 배양하여 근세포로 분화시켰다. 도 7A 및 7D는 분화 전 혈관주위 전구세포를, 도 7B 및 도 7E는 상기 근분화배지에서 근세포로 분화하는 세포를, 도 7C 및 도 7F는 최종적으로 근성장배지하에서 근섬유의 형태를 나타낸다. 이를 확인하기 위하여 근세포 특이적 마커인 테스민(red)을 사용하였다.

[133] 상기 실시예 6의 방법으로 확인된 혈관주위 전구세포를 10% FBS, 5 μ g/ml 인슐린, 1 μ M 텍사메타손, 0.5 mM 이소부틸메틸크산틴 및 60 μ M 인도메타신을 포함하는 저농도 글루코스 DMEM 배지와 10% FBS, 1 μ M 텍사메타손, 10 mM

β -글리세로포스페이트 및 60 μ M 아스코르브산-2-인산을 포함하는 저농도 글루코스 DMEM 배지로 배양하여 각각 지방세포와 골세포로 분화시켜 골격형성 분화 가능성을 확인하였다. 상기 조건하에서 분화하여 생성된 지방세포를 오일 레드 염색으로, 골세포를 알리자린 레드 염색으로 확인하였고 이를 도 8에 나타내었다.

[134]

[135] **실시예 8: 혈관주위 전구세포의 심혈관 세포와의 상호물질 교환성**

[136] 본 발명의 인간 배아줄기세포 유래 혈관주위 전구세포(hESC-PVPC)와 다른 심혈관계 세포간의 색소 전이 분석을 통해 상호물질 교환성을 확인하였다. 칼신(calcein)은 세포 상호작용의 일환인 갭-정선(gap-junction)을 통해서만 이동되는 형광물질이다. 따라서, 다른 심혈관세포에 표지된 칼신이 hESC-PVPC로 전이되기 위해서는 세포간 갭-정선 형성이 필수적이다. DiI-표지 hESC-PVPC(도 9, 상부 패널, red)를 칼신-표지 HUVEC(도 9, 중앙 패널 좌측, green), UASMC(도 9, 중앙패널 중앙, green) 또는 심근세포(도 9, 중앙 패널 우측, green)와 5% 이산화탄소의 37°C 항온배양기에서 1시간 동안 공배양하였다. 칼신의 녹색 형광은 hESC-PVPC(도 9, 하부 패널)에서 DiI의 적색 형광과 함께 검출되었다(도 9, 하부 패널, 적녹색, 별표). 이로부터 hESC-PVPC가 다른 심혈관계 세포와 갭-정선을 형성함으로써 물질이동 등의 상호작용이 가능함을 확인하였다.

[137]

[138] **실시예 9: 혈관주위 전구세포의 허혈성 심혈관 질환 모델에서의 치료효과**

[139] 본 발명의 인간 배아줄기세포 유래 혈관주위 전구세포(hESC-PVPC)를 허혈성 질환 동물 모델에 이식하여 세포치료제로서의 응용가능성을 확인하였다. 허혈성 심혈관 질환 마우스 모델에 hESC-PVPC를 이식하고 이식 전과 이식 후 치료효과를 관찰하였다. 도 10은 hESC-PVPC 이식 후 허혈성 후지에서의 허혈 사지 구제/혈류 개선을 나타낸 도이다. 이식 직후와 28일에 일련의 하지 회복정도를 구분하고 이미지를 관찰하여 분석하고 레이저 도플러 이미지로 허혈사지의 혈액 관류율 회복을 측정하였다. 도 11은 hESC-PVPC 이식으로 증가된 허혈 심근 내 모세혈관 밀도를 나타낸다. 배지를 주입한 삼그룹(도 11A), hESC-PVPC를 이식한 실험군(도 11B) 및 CB-EPC를 주입한 비교군(도 11C)의 심장 단면을 마송 삼색 염색하여 비교하였다. 도 11D 내지 도 11G는 hESC-PVPC 이식으로 인한 경색증 심근 섬유화 면적 및 경색증 심근 상흔 길이 감소와 경색증 심근에서의 모세혈관 밀도 및 경색증 벽두께의 증가를 나타낸다. 도 11H 및 도 11I는 심근중 부위 모세혈관을 GS-렉틴(green)으로 염색한 것이다. 상기 일련의 결과로부터 hESC-PVPC 이식 실험군에서 모세혈관 재생을 통한 허혈성 심근경색의 회복효과가 나타남을 확인하였다.

[140] 이와 같은 결과는 본 발명의 혈관주위 전구세포가 심혈관 질환을 치료할 수 있음을 시사하는 것이다.

[141]

[142] 실시예 10: 혈관주위 전구세포의 당뇨병성 망막병증 질환모델에서의 치료효과

[143] 동물모델로서 당뇨병성 망막질환을 유도한 마우스에 hESC-PVPC를 이식하여 치료효과를 확인하였다. 우선 스트렙토조토신(streptozotocin, STZ)을 마우스에 투여하여 당뇨를 유발하였다. 당뇨 유발 모델로는 최초 5회(1일 1회)의 STZ 투여 후 혈당수치를 측정하여 250 mg/dl 이상의 수치를 나타내는 마우스를 선별하여 사용하였으며, 망막병증 유발에 소요되는 시간을 감안하여 당뇨 유발 8주 이후의 것을 사용하였다. 시각화를 위하여 DiI(적색)을 표지한 hESC-PVPC를 사용하였고, 망막 내 주입 4주 후 생착여부를 확인하였다. 망막혈관 표지를 위해서는 망막추출 전 꼬리혈관에 FITC 표지된 덱스트란(dextran-FITC, 녹색)을 주입하였다. 도 12에 나타난 바와 같이, 이식된 hESC-PVPC는 망막 내로 생착되었고, 특히 손상된 혈관의 혈관주위에 위치함을 확인하였다.

[144] 아울러, 성체유래 중간엽 줄기세포를 이식하여 그 결과를 비교하였다.

인간골수유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC)와 인간태반유래 중간엽 줄기세포(placenta-MSC)를 동일한 방법으로 이식하고 이후 한 달 동안 생착여부를 확인하여 그 결과를 상기 hESC-PVPC의 이식결과와 비교하였다. 상기 hESC-PVPC와 동일하게 각각의 세포는 DiI로 표지하여 STZ로 당뇨 유발 8주된 마우스의 망막에 이식하였고 1, 2, 4주 후 각각의 망막을 추출하여 생착여부를 확인하였다. hESC-PVPC의 경우 혈관주위 영역에 생착되어 추가적인 망막혈관 형태 손상을 일으키지 않는 반면, 성체유래 중간엽 줄기세포 이식군에서는 이식된 세포가 생착되지 못하고 망막박리, 렌즈-망막협착 과도한 염증반응을 유발하여 사망에 이르게 하는 것을 확인하였다. 이를 도 13에 나타내었다. 도면의 성체유래 중간엽 줄기세포 이식군에서 나타나는 적색의 표지는 DiI에 의한 것인 아닌 염증반응에 의한 면역세포들의 자가형광발색에 기인한다. 이는 세포의 이식 경로와는 무관하게 망막혈관 내부에 존재하는 것으로 명확히는 녹색적색의 발광이다.

[145] 이와 같은 결과는 본 발명의 혈관주위 전구세포가 망막 내 생착능이 우수하여, 시혈관 주위세포가 손상된 후 재생되지 않는 망막질환을 치료할 수 있음을 시사하는 것이다.

[146]

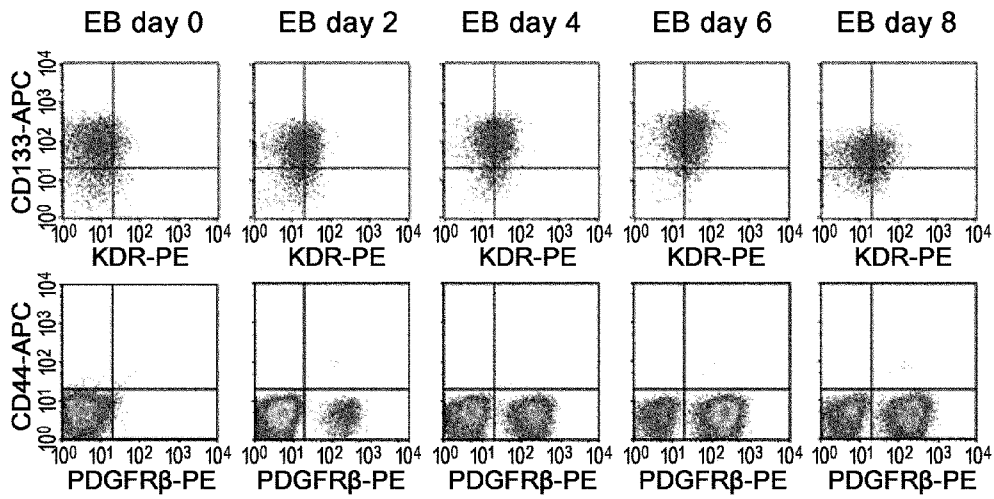
청구범위

- [청구항 1] 1) 줄기세포 유래의 배상체(embryoid body)에 BMP4(bone morphogenetic protein 4) 성장인자를 처리하여 중배엽성 세포로 분화시키는 단계;
2) 상기 1)단계에서 분화된 중배엽성 세포를 포함하는 배상체를 단일세포로 분리하는 단계; 및
3) 상기 2)단계의 분리된 단일세포를 기질이 코팅된 배양접시에서 배양하여 부착된 세포만을 자연선택으로 증식시키는 단계를 포함하는, 줄기세포로부터 혈관주위 전구세포를 제조하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 1)단계의 줄기세포는 인간 배아줄기세포(embryonic stem cell), 유도 전분화능 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPSC) 및 체세포 핵치환 줄기세포(somatic cell nuclear transfer cell, SCNT)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 줄기세포는 인간 유래인 것인 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 2)단계의 세포분리는 트립신 효소를 처리하여 이루어지는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 3)단계의 기질은 콜라겐 또는 라미닌인 것인 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 단계 3)의 자연선택된 혈관주위 전구세포는 PDGFR β (platelet-derived growth factor receptor β)에 양성인 방법.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 혈관주위 전구세포.
- [청구항 8] 제7항의 혈관주위 전구세포를 혈관형성 성장인자(angiogenic growth factors), FGF(fibroblast growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), IGF(insulin-like growth factor), EGF(epidermal growth factor), 아스코르브산, 및 GA-1000을 포함하는 EGM-2MV 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 혈관주위 전구세포를 혈관주위 세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 9] 제7항의 혈관주위 전구세포를 NEAA(minimum essential medium non-essential amino acids), PS(penicillin/streptomycin), 및 β -머캅토에탄올을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 혈관주위 전구세포를 평활근세포로 분화시키는 방법.

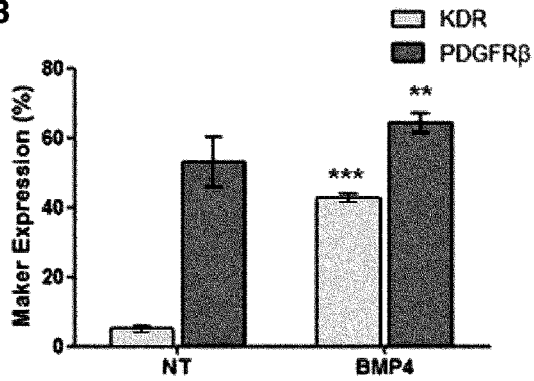
- [청구항 10] 제7항의 혈관주위 전구세포를 말혈청, 계배추출물, 및 PS를 포함하는 고농도 글루코스 DMEM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 혈관주위 전구세포를 근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 11] 제7항의 혈관주위 전구세포를 인슐린, 텍사메타손, 이소부틸메틸크산틴, 및 인도메타신을 포함하는 저농도 글루코스 DMEM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 혈관주위 전구세포를 지방세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 12] 제7항의 혈관주위 전구세포를 텍사메타손, β -글리세로포스페이트, 및 아스코르브산-2-인산을 포함하는 저농도 글루코스 DMEM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 혈관주위 전구세포를 골세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 13] 제7항의 혈관주위 전구세포를 유효성분으로 포함하는 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
심혈관 질환은 심부전, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 심장판막증, 심실중격결손, 선천성 심장질환, 심근증, 심낭질환, 뇌졸중, 말초혈관질환, 동맥류, 동맥경화증, 관상동맥질환 및 고혈압으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제7항의 혈관주위 전구세포를 유효성분으로 포함하는 망막질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
망막질환은 습성 황반변성, 녹내장, 당뇨병성 망막증, 습성 망막병증 및 미숙아 망막병증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제13항에 따른 심혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학적조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 심혈관 질환을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 18] 제15항에 따른 망막질환의 예방 또는 치료용 약학적조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 망막질환을 예방 또는 치료하는 방법.

[Fig. 1]

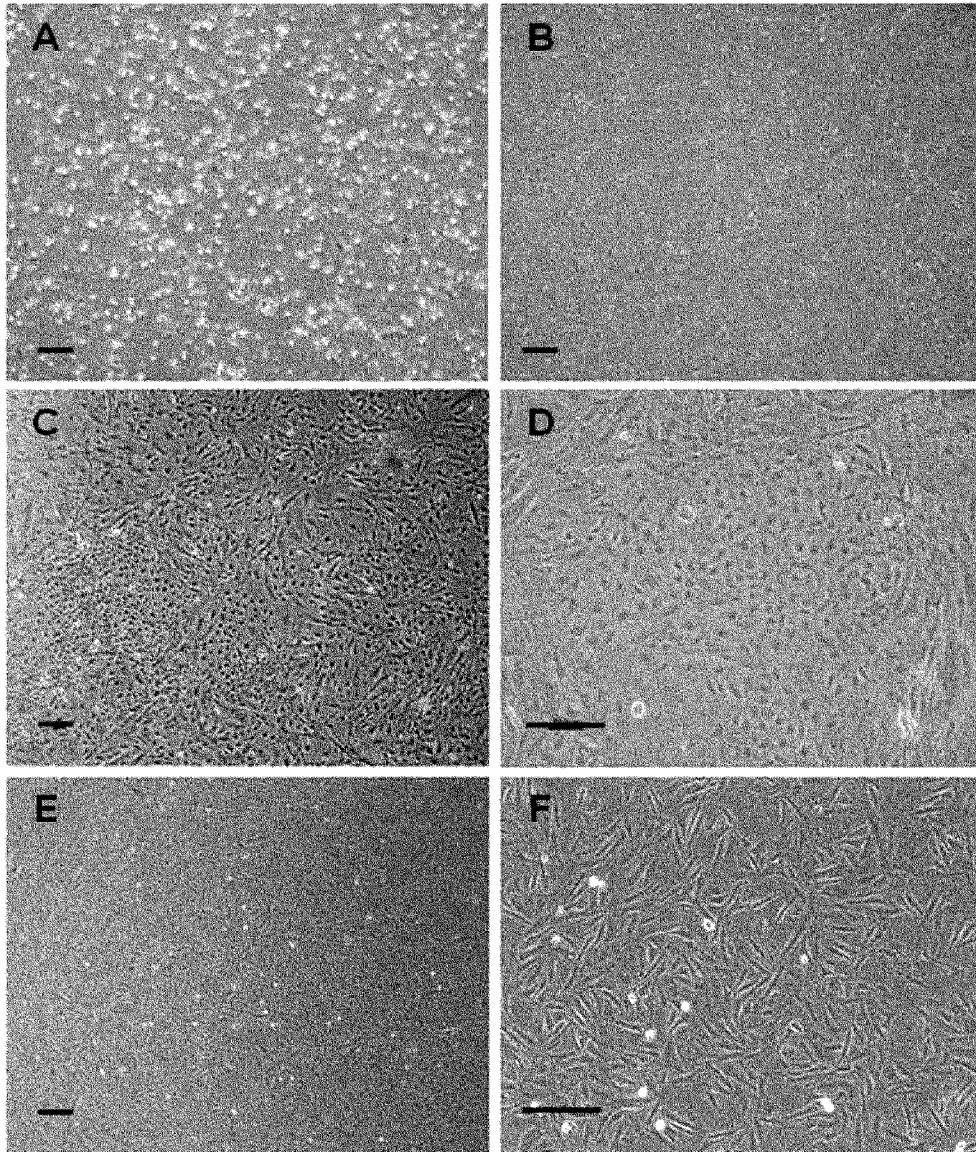
A



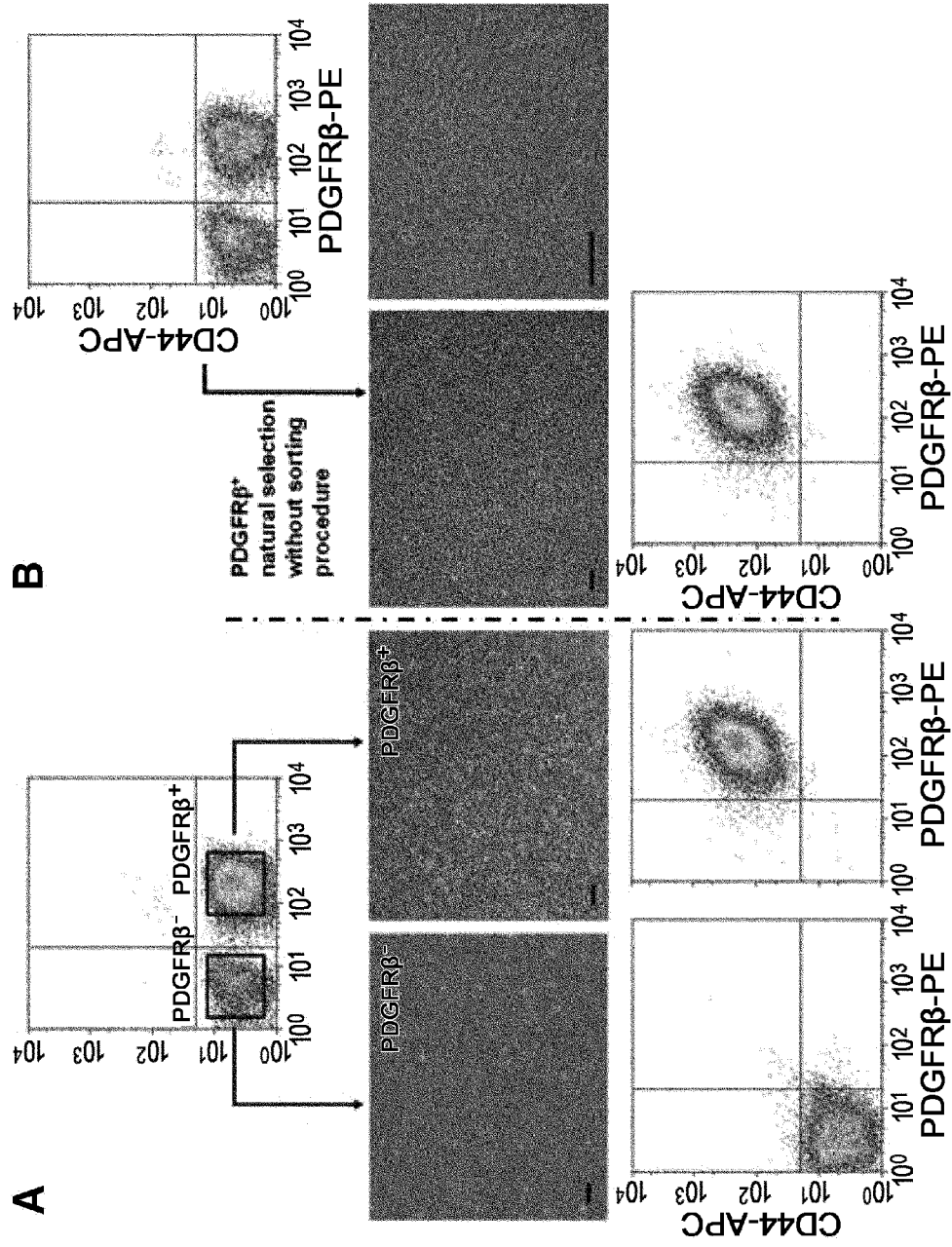
B



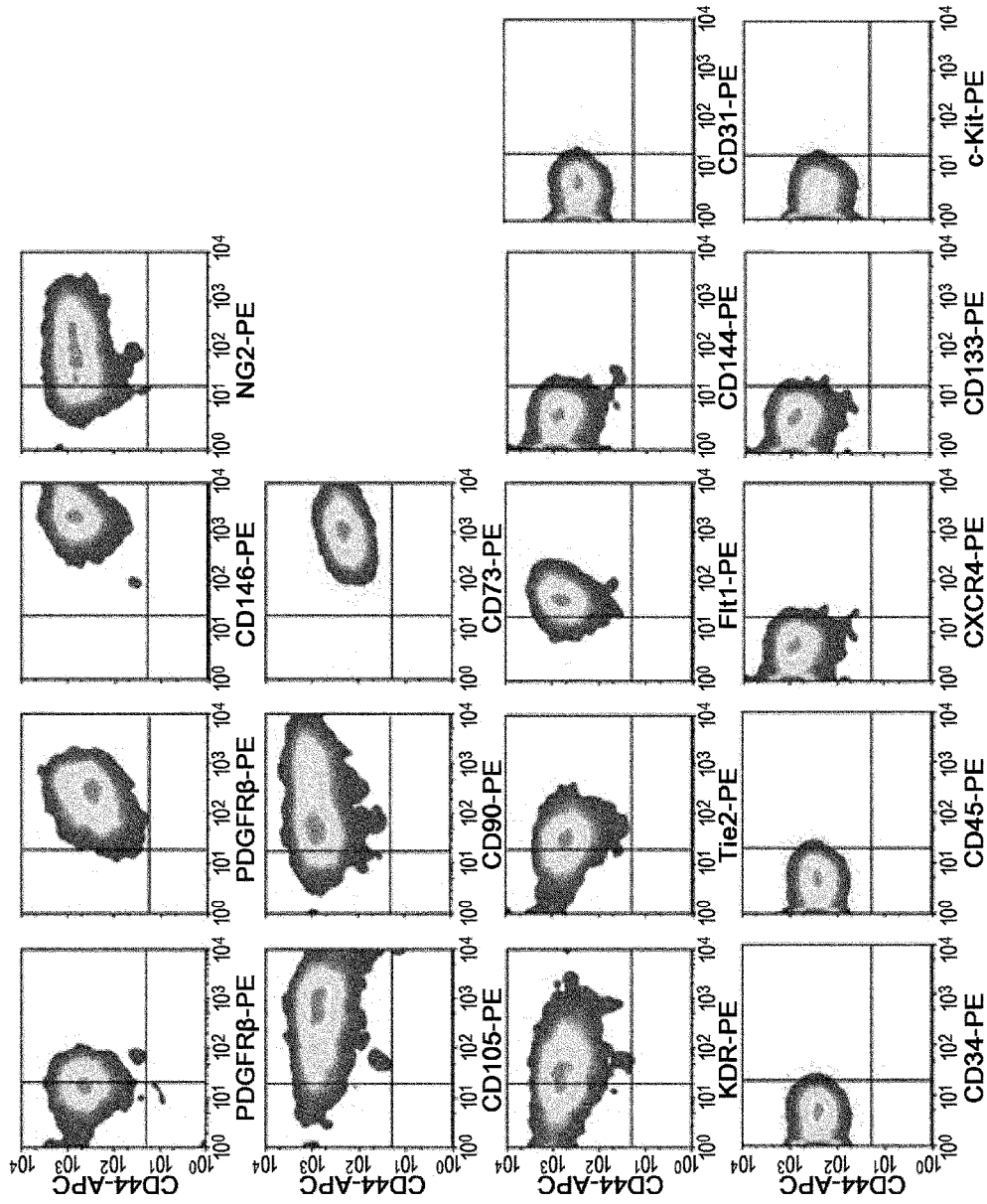
[Fig. 2]



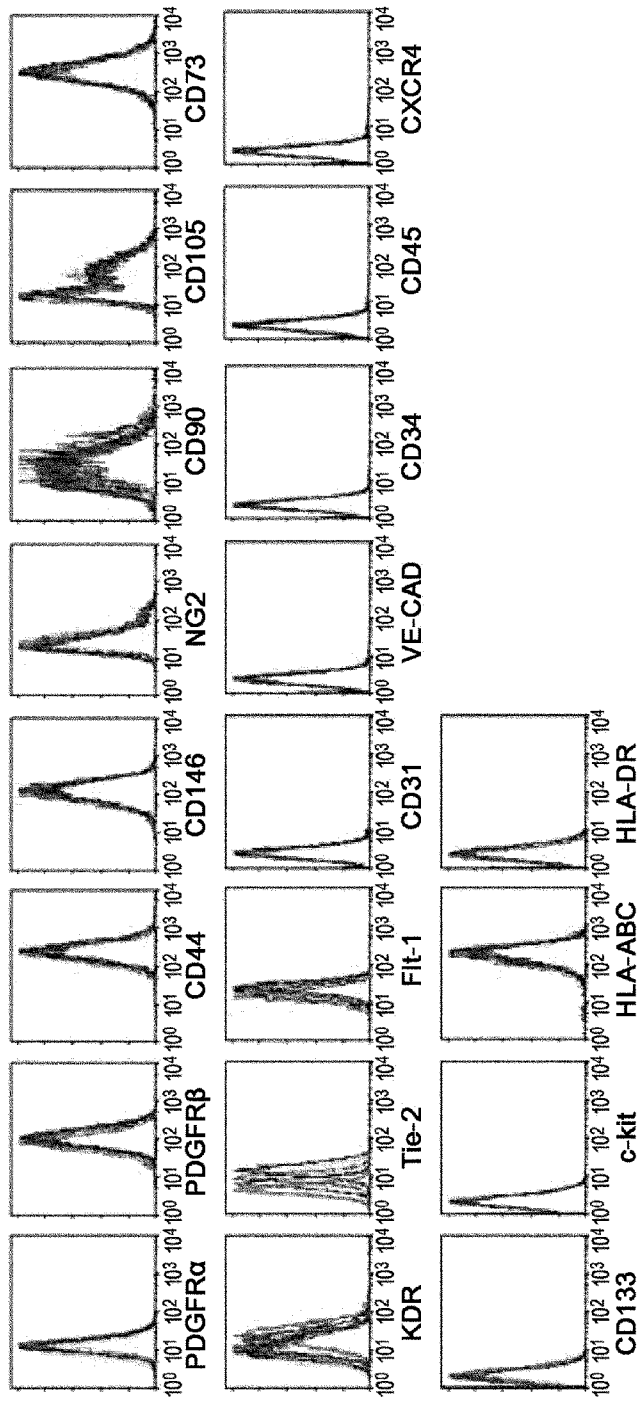
[Fig. 3]



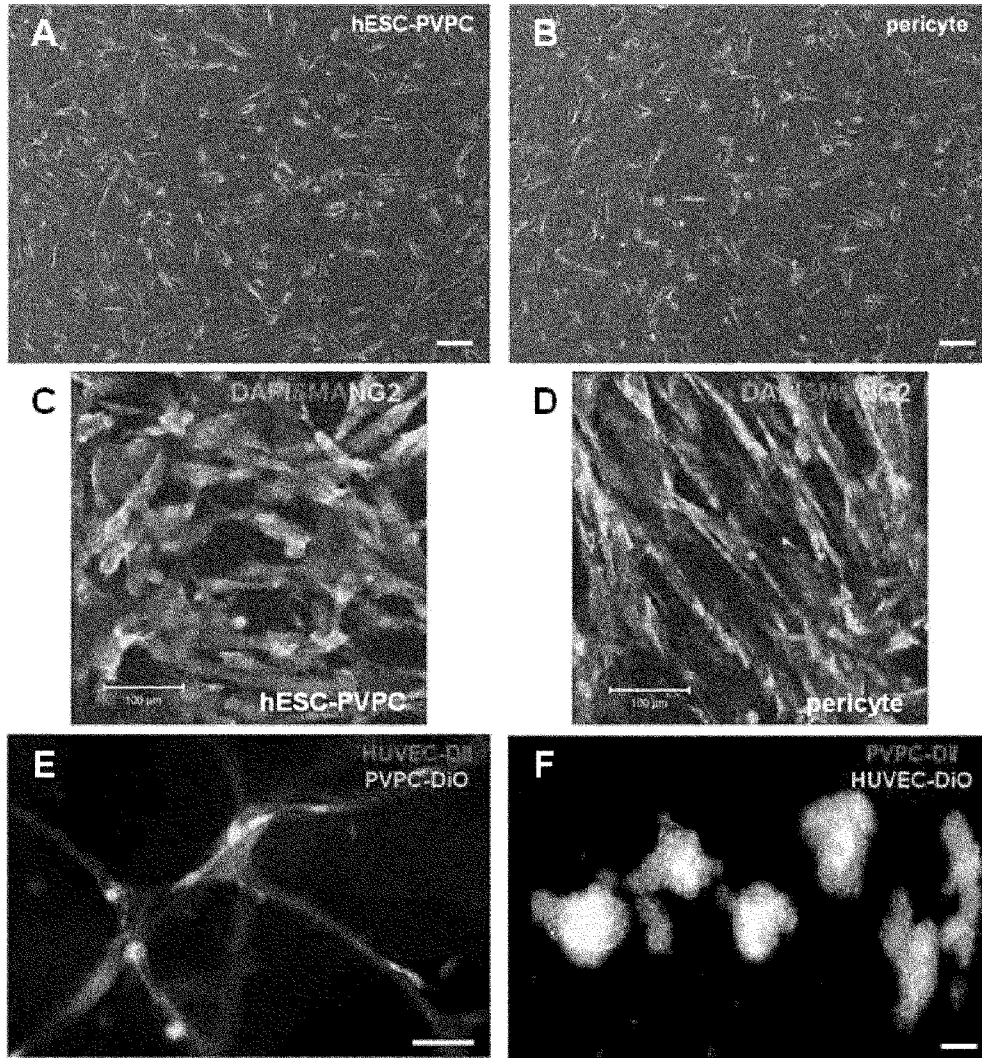
[Fig. 4a]



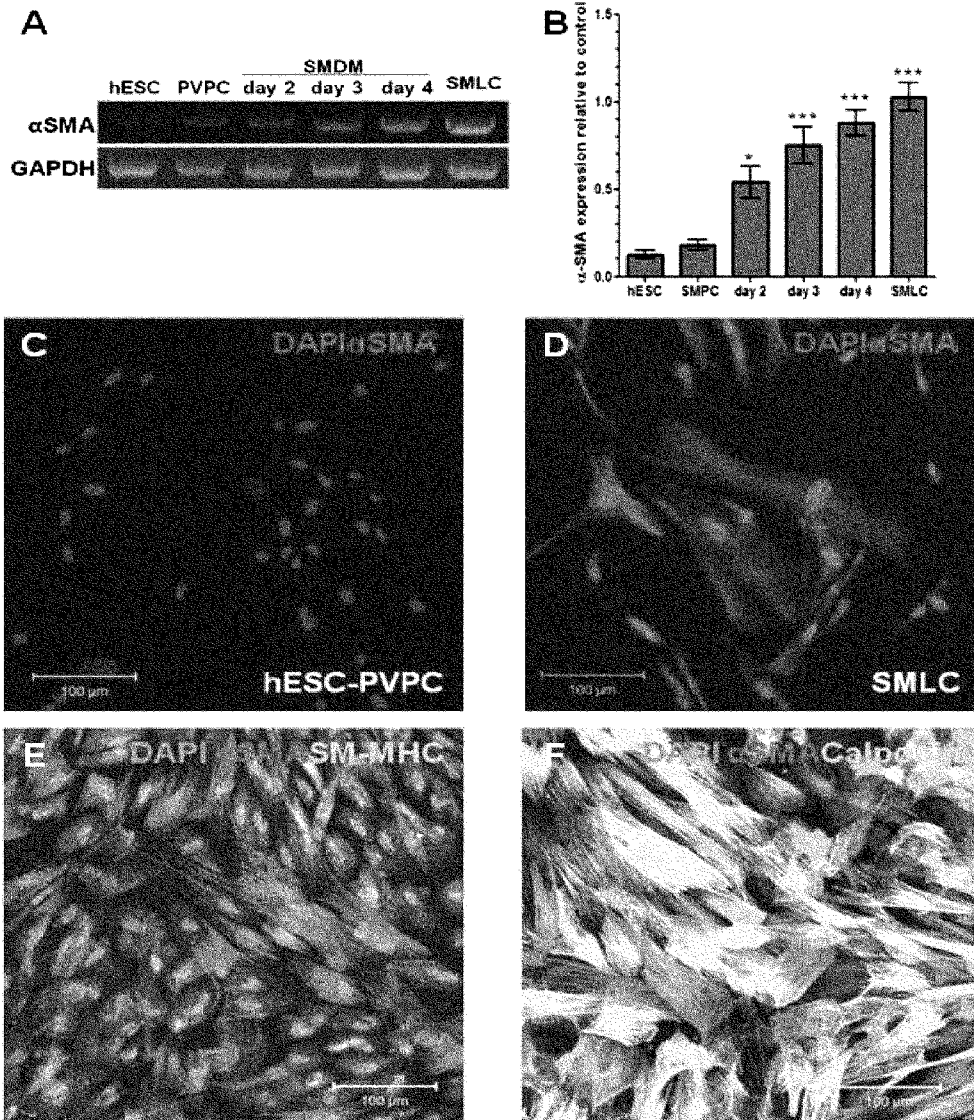
[Fig. 4b]



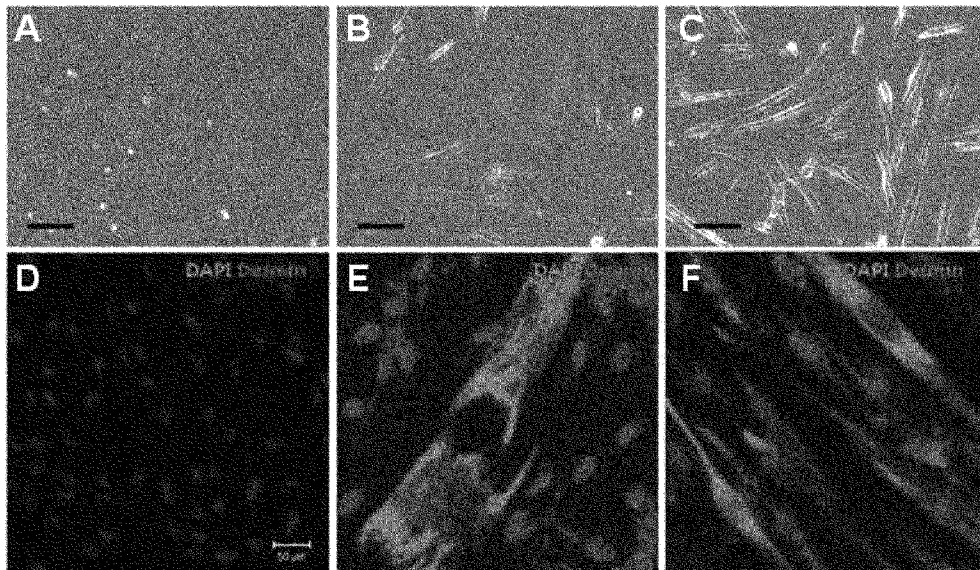
[Fig. 5]



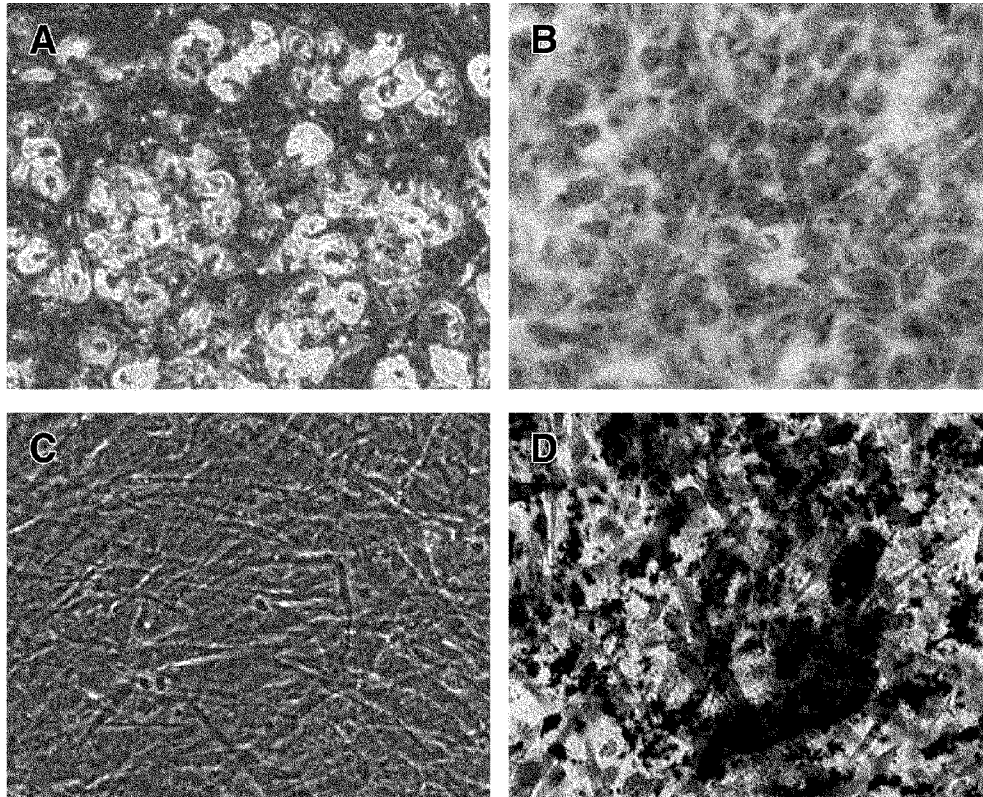
[Fig. 6]



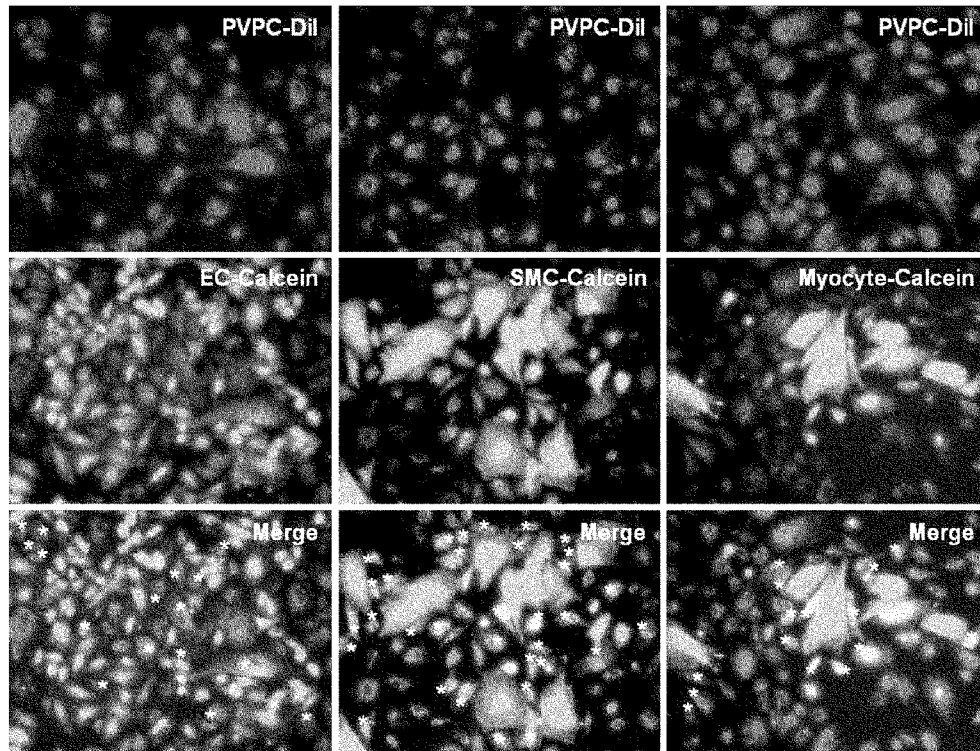
[Fig. 7]



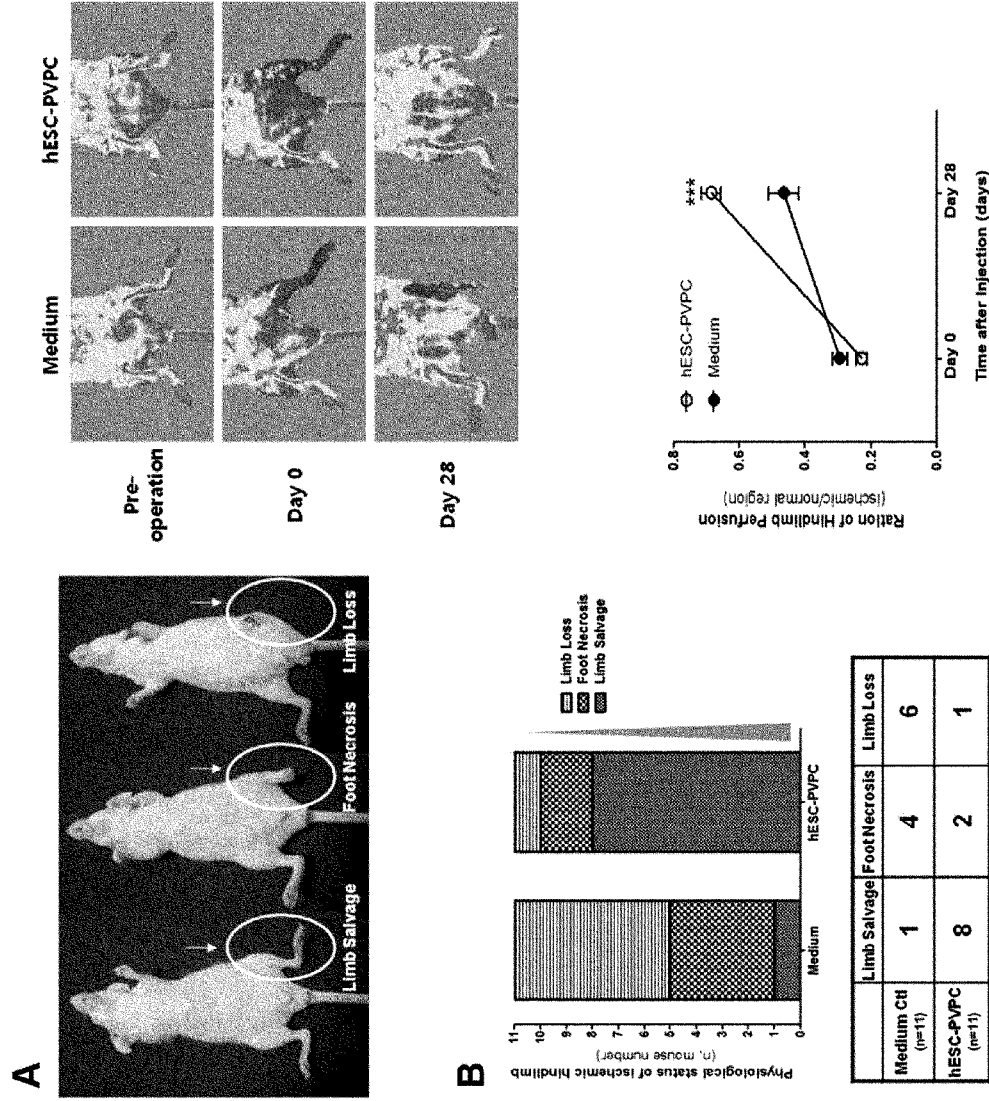
[Fig. 8]



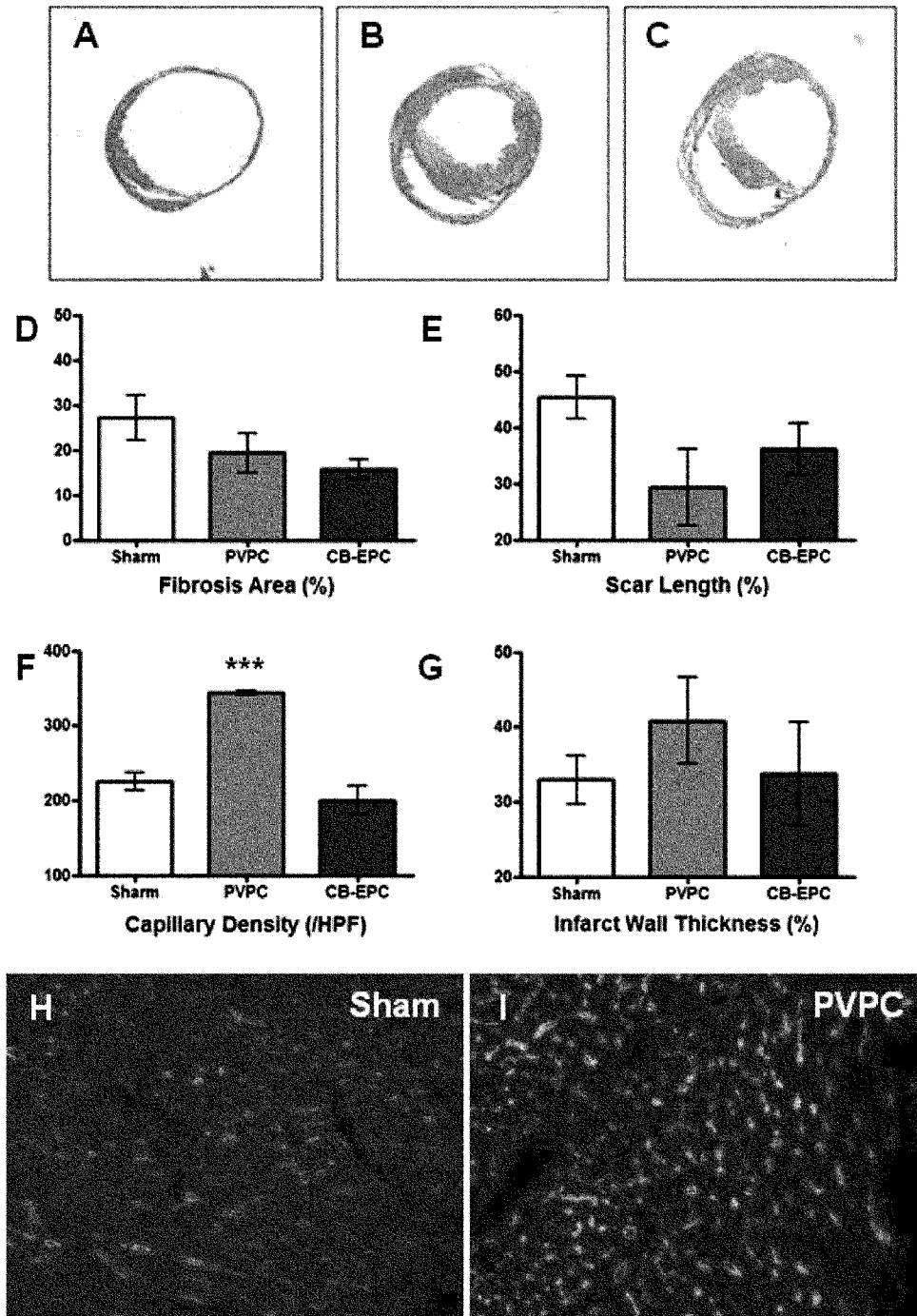
[Fig. 9]



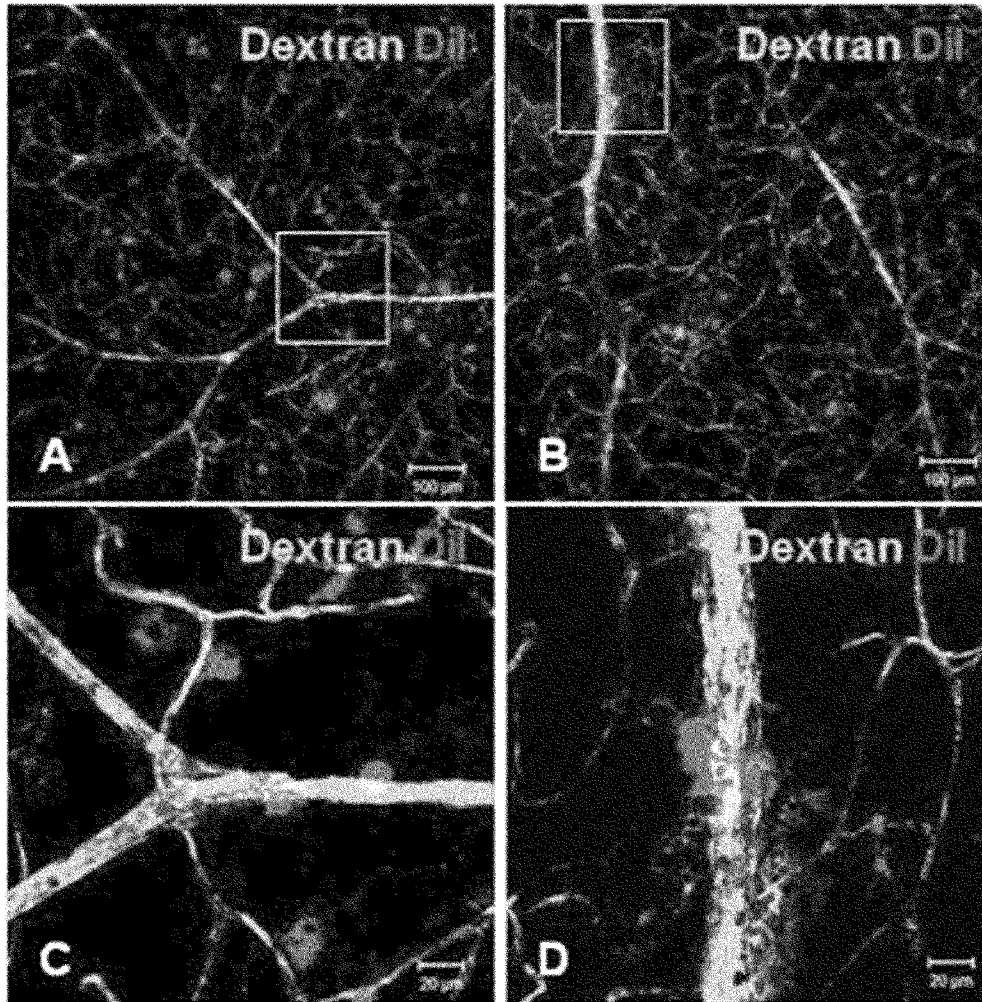
[Fig. 10]



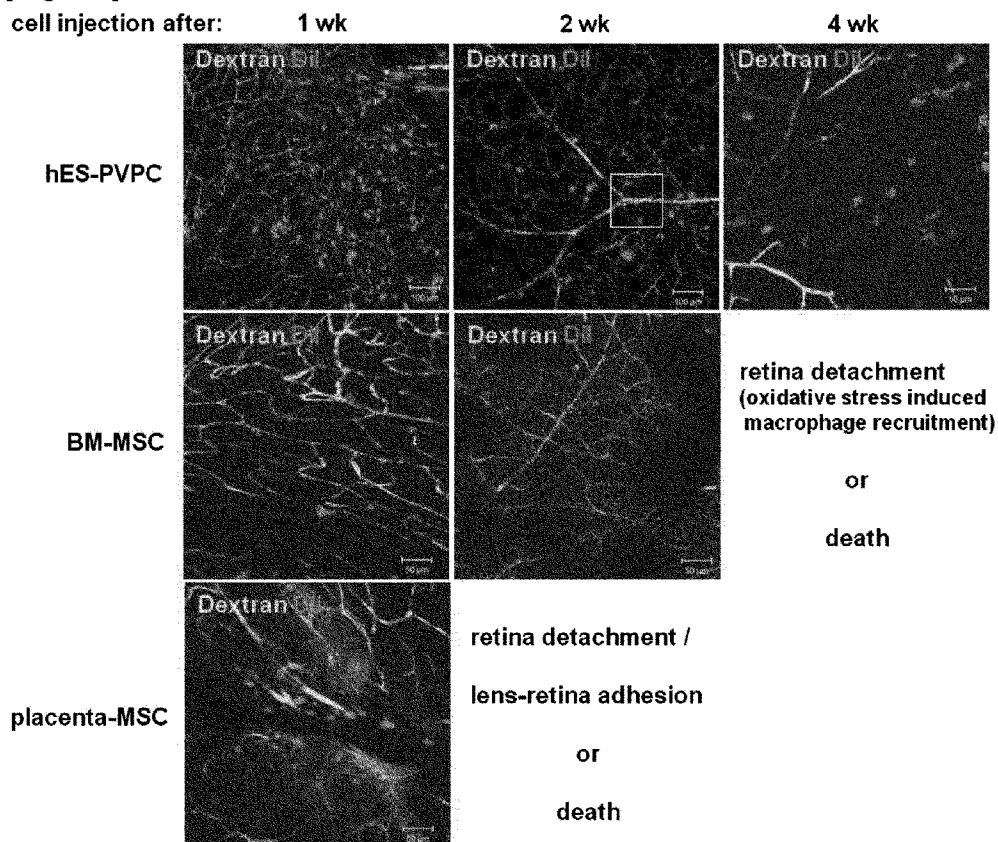
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/000769

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i, C12N 1/02(2006.01)i, C12Q 1/24(2006.01)i, C12Q 1/37(2006.01)i, C12N 5/02(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/071; A61K 35/12; A61K 35/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: perivascular progenitor cell, stem cell, BMP4, PDGFR-beta

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DAR et al., "Multipotent vasculogenic pericytes from human pluripotent stem cells promote recovery of murine ischemic limb" Circulation, Vol. 125, pp. 87-99 (17 November 2011)	7,13-16
A	See the entire document, especially figures 3-7, supplemental material pages 7-8	1-6,8-12
A	MANCUSO et al., "Circulating perivascular progenitors: a target of PDGFR inhibition" International Journal of Cancer, Vol. 129, pp. 1344-1350 (02 December 2010) See the entire document	1-16
A	KR 10-2009-0089206 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 21 August 2009 See the entire document	1-16
A	KR 10-2009-0129230 A (CHABIO&DIOSTECH CO., LTD.) 16 December 2009 See the entire document	1-16
A	KR 10-2011-0129842 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 02 December 2011 See the entire document	1-16

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

14 DECEMBER 2012 (14.12.2012)

Date of mailing of the international search report

17 DECEMBER 2012 (17.12.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/000769**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **17-18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 17-18 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provision of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/000769

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0089206 A	21.08.2009	KR 12-0948170 B1	10.03.2010
KR 10-2009-0129230 A	16.12.2009	KR 10-1045492 B1	30.06.2011
		WO 2009-151301 A2	17.12.2009
		WO 2009-151301 A3	11.03.2010
KR 10-2011-0129842 A	02.12.2011	KR 10-1109125 B1	15.02.2012
		US 2012-0134965 A1	31.05.2012
		WO 2010-110596 A2	30.09.2010
		WO 2010-110596 A3	10.03.2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 5/071(2010.01)i, C12N 1/02(2006.01)i, C12Q 1/24(2006.01)i, C12Q 1/37(2006.01)i, C12N 5/02(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i

B. 조사된 분야
 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
 C12N 5/071; A61K 35/12; A61K 35/14

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: perivascular progenitor cell, stem cell, BMP4, PDGFR-beta



C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	DAR 외, 'Multipotent vasculogenic pericytes from human pluripotent stem cells promote recovery of murine ischemic limb' Circulation, Vol.125, pp.87-99 (2011.11.17.)	7,13-16
A	전체 문헌, 특히 figures 3-7, Supplemental Material pp.7-8 참조	1-6,8-12
A	MANCUSO 외, 'Circulating perivascular progenitors: a target of PDGFR inhibition' International Journal of Cancer, Vol.129, pp.1344-1350 (2010.12.02.) 전체 문헌 참조	1-16
A	KR 10-2009-0089206 A (한국과학기술원) 2009.08.21 전체 문헌 참조	1-16
A	KR 10-2009-0129230 A ((주)차바이오앤디오스텍) 2009.12.16 전체 문헌 참조	1-16
A	KR 10-2011-0129842 A (한국과학기술연구원) 2011.12.02 전체 문헌 참조	1-16

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 윌리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2012년 12월 14일 (14.12.2012)	국제조사보고서 발송일 2012년 12월 17일 (17.12.2012)
--	--

ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 김승범 전화번호 82-42-481-8746 
--	--

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: 17-18
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 17-18은 인체에 대한 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

- 이의신청에 관한 기재
- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
 - 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
 - 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0089206 A	2009.08.21	KR 12-0948170 B1	2010.03.10
KR 10-2009-0129230 A	2009.12.16	KR 10-1045492 B1	2011.06.30
		WO 2009-151301 A2	2009.12.17
		WO 2009-151301 A3	2010.03.11
KR 10-2011-0129842 A	2011.12.02	KR 10-1109125 B1	2012.02.15
		US 2012-0134965 A1	2012.05.31
		WO 2010-110596 A2	2010.09.30
		WO 2010-110596 A3	2011.03.10