(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025 년 1 월 16 일 (16.01.2025)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2025/014308 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 35/51 (2015.01) *A61P 27/02* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/009970

(22) 국제출원일: 2024 년 7 월 11 일 (11.07.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0090063 2023 년 7 월 11 일 (11.07.2023) KR

(71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (**THE ASAN FOUNDATION**) [KR/KR]; 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (**UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION**) [KR/KR]; 44610 울산광역시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).

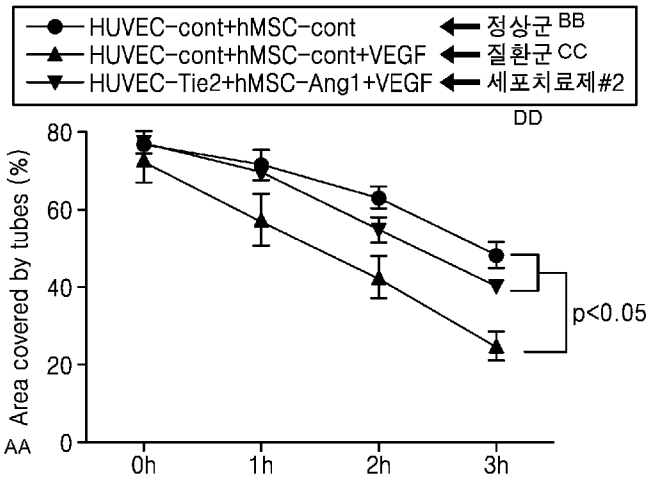
(72) 발명자: 황창모 (**HWANG, Chang Mo**); 05627 서울특별시 송파구 위례성대로4길 14, 102호., Seoul (KR). 김수미 (**KIM, Su Mi**); 06090 서울특별시 강남구 학동로68길 29, 102동 1401호., Seoul (KR). 김지연 (**KIM, Ji Yeon**); 05328 서울특별시 강동구 구천면로 192, 928호., Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인더웨이브 (**THEWAVE IP LAW FIRM**); 06097 서울특별시 강남구 선릉로 602 6층, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,

(54) **Title:** COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING RETINAL ANGIOGENIC DISEASES COMPRISING VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS OVEREXPRESSING TIE2

(54) **발명의 명칭:** TIE2을 과발현하는 혈관내피세포를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 조성물



AA ... Area covered by tubes (%)
BB ... Normal group
CC ... Disease Group
DD ... Cell therapeutic agent

(57) **Abstract:** A pharmaceutical composition comprising vascular endothelial cells overexpressing tyrosine kinase receptor 2 (Tie2) as an active ingredient according to one aspect induces the stabilization of vascular endothelial cells, even in a state of vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression or inflammation, and reduces vascular permeability to slow or inhibit retinal angiogenesis, thus having the effect of preventing or treating retinal angiogenic diseases. In addition, the present invention has the effects of reducing invasiveness during treatment compared to existing antibody therapies that require intraocular injections at intervals of 4 –8 weeks, enhancing vascular stability, and enabling early the diagnosis and treatment of retinal angiogenic diseases.

WO 2025/014308 A1

[다음 쪽 계속]

MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 일 양상에 따른 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 의 과발현 또는 염증상태에서도 혈관내피세포의 안정화를 유도하고 혈관 투과성을 감소시켜 망막 내 혈관 신생을 늦추거나 억제함으로써 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료하는 효과가 있다. 또한 4~8주 간격 안구 내 주사가 필요한 기존 항체 치료법에 비하여 치료시 침습성이 감소하고, 혈관 안정성이 강화되며, 망막 내 혈관신생 질환의 조기 진단 및 치료가 가능한 효과가 있다.

명세서

발명의 명칭: TIE2을 과발현하는 혈관내피세포를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] Tie2을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 해마다 전 세계적으로 수백만 명이 실명하게 되는 많은 안과질환은 혈관신생이 주된 원인이다. 특히, 비정상적인 혈관으로부터 기인하는 다양한 안구질환 중 대표적인 예로는 연령관련황반변성, 당뇨망막병증 등이 있다.

[3] 연령관련황반변성(age-related macular degeneration)은 노화과정에 동반되어 나타나는 황반의 붕괴 혹은 파괴를 지칭하는 질환명으로서, 50세 이상의 연령층에서 주로 발생한다. 이 질환은 드루젠이라고 불리워지는 작은 노폐물이 축적되면서 황반의 위축이 진행되어 시기능이 소실되는 비삼출성(건성 유형)과 망막 및 맥락막의 저산소증 및 산화스트레스의 축적으로 인하여 발생한 비정상적인 신생 혈관으로부터 삼출물이 새어 나와 황반의 부종이 유발되고 이 과정이 반복되면서 황반부의 시각세포 및 망막색소상피세포층이 영구적으로 변성되어 시력저하를 일으키는 삼출성(습성 유형)으로 나뉘어진다. 특히, 습성황반변성의 경우는 실명에 이르는 빈도가 높으며, 우리나라에서 유병률이 인구 1만명 당 37명에 달하는 것으로 추산되고 있다. 황반변성의 원인에 대해서는 아직 정확히 밝혀지지는 않았으나 위험인자로 알려져 있는 것은 나이이며, 그 외 주목받는 환경적 요인으로는 흡연, 고혈압, 비만, 유전적 소인, 과도한 자외선 노출, 낮은 혈중 항산화제 농도 등이 있다. 현재, 습성황반변성에 대한 치료법으로는 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 대한 항체주사 치료가 주를 이루고 있으며, 기타 레이저 광응고술, 광역학요법 및 초자체 절제술 등의 치료법이 알려져 있으나, 아직까지 완전한 치료법은 존재하지 않는 실정이다.

[4] 안지오포이에틴-1(Angiopoietin-1; Ang1)은 Tie2의 작용물질(agonist)로서, 혈관내피세포에 존재하는 수용체 Tie2의 길항적인 리간드(antagonistic ligand) 안지오포이에틴-2(Angiopoietin-2; Ang2)와 Tie2 결합에 대해 경쟁한다. Tie2 수용체를 활성화 시키는 리간드인 Ang1은 혈관내피세포의 장벽기능(barrier function)을 유지시킴으로써 혈관의 안정성을 유지하는 주요한 조절자로 작용한다. 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 과발현 또는 염증상태에서는 혈관내피세포가 활성화되며, 혈관 투과성이 증가되는데, Ang1은 혈관내피세포의 접합부통합(junctional integrity)을 촉진함으로써 혈관내피세포의 안정화를 유도하고 혈관 투과성을 감소시킨다.

[5] 연령관련황반변성(age-related macular degeneration, AMD) 중 하나인 습성황반변성(wet AMD)에 대한 치료법으로는 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)에 대한 항체주사 치료법(Anti-VEGF therapy), Ang2에 특이적으로 결합하고, Ang2와 함께 Tie2 수용체에 결합하는 항 Ang2 항체를 이용한 치료법, Tie2 수용체에 직접 결합하여 인산화 및 활성화를 유도하는 재조합 단백질이나 항체들을 이용한 치료법(Anti-Ang-2 therapy) 등을 이용되고 있다.

[6] 그러나, 혈관내피세포성장인자(VEGF)에 대한 항체주사 치료법(Anti-VEGF therapy)이나 항 Ang2 항체를 이용한 치료법(Anti-Ang-2 therapy) 등은 4 내지 8 주 간격으로 안구 내 주사를 해야하는 불편이 있다. 또한 짧은 주기의 안구 내 주사는 안구통증, 안구출혈 또는 혈관 파열, 안구염증 또는 감염, 시력변화 및 안구 내 압력 변화 등의 부작용을 일으킬 수 있어 환자에게 큰 부담이 된다. 이에 한 번의 안구 내 주사로 효과가 오래 지속 될 수 있는 Tie2의 발현이 증가된 혈관내피세포와 Ang1 생성기능이 향상된 세포를 이용한 망막혈관신생 억제용 세포치료제의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 일 양상은 Tie2을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[8] 다른 양상은 상기 약학적 조성물을 포함하는, 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.

[9] 또 다른 양상은 상기 조성물의 망막 내 혈관신생 질환을 예방 또는 치료하기 위한 용도를 제공하는 것이다.

[10] 또 다른 양상은 유효량의 상기 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[11] 또 다른 양상은 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 의약 제조에 사용하기 위한 상기 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 일 양상은 Tie2을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[13] 본 명세서에서 용어, "Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)"는 혈관 내피 세포의 표면에 존재하는 수용체인 티로신 키나제 수용체 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)를 의미한다. 상기 Tie2는 망막 혈관 신생 및 혈관의 정상적인 기능 유지에 관련된 신호 전달 경로를 조절하고, 혈관의 안정성과 투과성, 혈관 신생 및 염증과 관련된 혈관 장애 등에 영향을 준다. Tie2의 결핍 또는 기능 이상은 혈관의 불안정성, 비정상적인 혈관 증식, 혈액 응고 등과 관련된 문제를 초래할 수 있고, Tie2의 과발현은 혈관 안정성을 향상시키고 비정상적인 혈관 신생을 억제할 수 있다.

[14] 본 명세서에서 용어, "혈관내피세포 (Endothelial cells; EC) "는 혈관벽의 구성 요소 중 하나로서 혈관 내부를 덮고 있는 층을 이루는 세포를 의미할 수 있다. 상기 혈관내피세포는 맥락이나 동맥, 림프관 등 다양한 혈관 유형에 존재하며, 혈액과 조직 사이의 물질 교환, 혈액 응고 조절, 혈관 투과성 조절 등의 기능을 담당하고, 혈관 신생과 조직 재생에도 관여하는 것일 수 있다.

[15] 일 구체예에 있어서, 상기 혈관내피세포는 Tie2을 과발현하도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다. 상기 유전적으로 조작된 혈관내피세포는 Tie2를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것 일 수 있다.

[16] 본 명세서의 용어, 과발현(overexpression) 또는 발현(expression) 증가는 주어진 유전적으로 조작되지 않은 모세포(예를 들어, 야생형)가 갖는 내재적 단백질의 발현과 비교하여, 동일한 타입의 단백질의 발현이 보다 더 높은 수준을 갖는 것을 의미할 수 있다.

[17] 본 명세서의 용어, "유전적 조작(genetic engineering)" 또는 "유전적으로 조작된(genetically engineered)"은 세포에 대하여 하나 이상의 유전적 변형(genetic modification)을 도입하는 행위를 의미할 수 있다.

[18] 상기 유전적으로 조작된 혈관내피세포는 Tie2를 암호화하는 외인성 유전자(exogenous gene)가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것일 수 있다.

[19] 일 구현예에서, Tie2를 암호화하는 외인성 유전자가 도입된 바이러스 벡터를 이용하여 Tie2를 과발현하는 혈관내피세포를 제조할 수 있다.

[20] 상기 외인성 유전자(exogenous gene)는, 상기 혈관내피세포 또는 숙주 세포에서 그 모세포에 비하여 Tie2의 활성이 증가되기에 충분한 양으로 발현된 것일 수 있다. 상기 외인성 유전자는 발현 벡터를 통하여 모세포 내로 도입된 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 선형 폴리뉴클레오티드 형태로 모세포 내로 도입된 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 세포 내에서 발현 벡터(예를 들어, 플라스미드)로부터 발현되는 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 안정적인 발현을 위하여 세포 내의 유전물질(예를 들어, 염색체)에 삽입되어 발현되는 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 유전자에 작동 가능하게 연결된 외인성 프로모터에 의해 적절히 조절되는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 발현량 강화는 발현 조절 서열의 치환 또는 돌연변이에 의한 변형, 폴리뉴클레오티드 서열 자체의 변이 도입, 개시 코돈의 교체, 염색체에 삽입하는 것 또는 벡터를 통해 도입하는 것에 의한 카피수 증가, 또는 이의 조합에 의한 것일 수 있다.

[21] 본 명세서의 용어, "벡터"는 적합한 숙주 세포 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 유전자의 조절 서열과 염기서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드 제조물을 의미할 수 있다. 혹은 숙주 세포 내로 도입시켜 숙주의 게놈상의 내생적(endogenous) 유전자의 조절 서열을 바꾸거나, 게놈상의 특정 부위에 발현 가능한 목적 유전자를 삽입할 수 있도록 상동 재조합이 가능한 염기서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드 제조물을 의미할 수 있다. 상기 벡터는 숙주 내로의 도입 혹은 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할

수 있다. 상기 선별 마커는 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 의한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택 가능한 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나, 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[22] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 렌티바이러스 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 또한, 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예를 들면, λgt4λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[23] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[24] 일 구체예에 있어서, 상기 혈관내피세포(EC)는 인간탯줄정맥내피세포 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell; HUVEC), 인간 유도만능 줄기세포 분화 내피세포(iPSC differentiated endothelial cell), 망막내피세포(retinal endothelial cell), 중간엽줄기세포에서 분화된 내피세포(Mesenchymal stem cell differentiated endothelial cell), 혈관전구세포 분화 내피세포(Vascular progenitor cell differentiated endothelial cell)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[25] 본 명세서의 용어, "유효성분"은 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방에 유효한 세포 집단 또는 조성물을 의미할 수 있다.

[26] 본 명세서의 용어, "치료"는 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방을 지칭하거나, 그를 포함한다.

[27] 본 명세서의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 안 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[28] 일 구체예에 있어서, 상기 Tie2을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 Ang1을 발현하는 세포를 더 포함하는 약학적 조성물일 수 있다.

[29] 본 명세서에서 용어, "안지오포이에틴-1(Angiopoietin-1; Ang1)"은 혈관 내피세포에 특이하게 존재하는 Tie-2 수용체의 리간드로서, 혈관 내피세포 주위의 세포들을 내피세포 쪽으로 이동시켜 혈관을 형성하게 하고 혈관내피세포의 장벽기능(barrier function)을 유지시킴으로써 혈관의 안정성을 유지하는 주요한 조절자로 작용한다. 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor)의 과발현 또는

염증상태에서는 혈관내피세포가 활성화되며, 혈관 투과성이 증가되는데 Ang1은 혈관내피세포의 접합부통합(junctional integrity)을 촉진함으로써 혈관내피세포의 안정화를 유도하고 혈관 투과성을 감소시키는 기능을 한다.

[30] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang1을 발현하는 세포는 Ang1을 발현하거나 과발현하도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 유전적으로 조작된 Ang1을 발현하는 세포는 Ang1를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것일 수 있다.

[31] 상기 "과발현(overexpression)", "유전적으로 조작된(genetically engineered)", "재조합 벡터" 등은 전술한 바와 같다.

[32] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang1을 발현하는 세포는 혈관주변세포(pericyte), 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell, MSC), 내피세포(Endothelial cell, EC), 섬유아세포(fibroblast), 망막색소상피세포(Retinal Pigment Epithelium, RPE), 광수용체(photoreceptor), 수평세포(horizontal cell), 뮐러세포(Muller cell), 무축삭 세포(amacrine cell), 별상세포(astrocytes) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[33] 본 명세서에서 용어, "중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem cells, MSCs)"는 수정란이 분열하여 생긴 중배엽에서 분화된 연골, 골조직, 지방조직, 골수의 기질(stroma) 등에 존재하는 줄기세포를 의미할 수 있고, 포유류, 예를 들면 인간을 포함한 동물의 중간엽 줄기세포를 포함할 수 있다. 중간엽 줄기세포는 줄기세포능(stemness)과 자기재생능(self-renewal)을 유지하고 연골세포, 조골세포, 근육세포, 지방세포를 포함한 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지며, 골수(bone marrow), 지방조직(adipose tissue), 재대혈(umbilical cord blood), 활막(synovial membrane), 골조직(trabecular bone), 근육, 슬개건하 지방(infrapatellar fat pad) 등에서 추출할 수 있다. 중간엽 줄기세포는 T 림프구, B 림프구의 활성, 증식을 억제하며, 자연 살해 세포(natural killer cell, NK cell)의 활성을 억제하고, 수지상세포(dendritic cell)와 대식세포(macrophage)의 기능을 조절하는 면역조절 능력을 가지고 있으므로 동종이식(allotransplantation)과 이종이식(xenotransplantation)이 가능한 세포이다.

[34] 본 명세서의 용어 "분리된 세포", 예를 들어, "분리된 중간엽 줄기세포" 또는 "유래된 세포", 예를 들어, "유래된 중간엽 줄기세포"등은 세포가 기원하는 조직, 예를 들어, 제대혈로부터 실질적으로 분리된 세포를 의미한다.

[35] 일 구체예에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포(MSC)는 탯줄, 제대혈, 태반, 골수, 지방조직, 근육, 양수, 양막 및 치수로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[36] 상기 탯줄(umbilical cord)은 포유류의 태아가 태반에서 성장할 수 있도록 모체와 배를 연결해주는 줄을 의미할 수 있으며, 일반적으로 와튼 젤리(Wharton's jelly)로 둘러싸인 3개의 혈관, 즉, 2개의 배꼽 동맥과 1개의 배꼽 정맥으로 구성된 조직을 의미할 수 있으며, 제대로 불리기도 한다.

[37] 상기 제대혈은 포유 동물의 태반과 태아를 연결하는 탯줄정맥으로부터 채취된 혈액을 의미할 수 있다. 상기 제대혈은 출산시 공여자의 탯줄정맥으로부터 용이하게 채취할 수 있다. 구체적으로, 정상 질식 분만의 경우에는 출산 후 자궁 내에 아직 태반이 남아있는 상태에서 밖으로 만출된 제대정맥으로부터 채취할 수 있으며, 제왕 절개의 경우에는 출산 후 태반 역시 자궁 밖으로 만출된 상태에서 제대정맥으로부터 채취할 수 있다.

[38] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang1을 발현하는 세포는 감소된 면역원성을 나타내는 것일 수 있다.

[39] 본 명세서에서 용어, "면역원성(immunogenicity)"은 외부로부터 들어온 항원(antigen)에 대해 면역체계가 반응하는 정도와 성질을 의미한다. 항원이 면역체계에 의해 인식되고 항원-항체 반응이나 세포 기반의 면역반응을 유발할 수 있는 능력을 의미하며, 면역원성이 높은 항원은 면역체계에서 강력한 반응을 유도할 가능성이 높아지고, 면역원성이 낮은 항원은 면역체계에 의해 감지되지 않거나 약하게 인식되어 면역체계에 의한 강력한 반응이 발생하지 않는다.

[40] 본 명세서의 용어, "감소된 면역원성" 또는 "저면역원성 (hypoimmunogenic)은 세포치료제 투여 전후, 백혈구 수 변화, 림프구 수 비율 변화(예, CD4, CD8 등), 환자의 면역세포에 세포치료제를 반응시켜 분비되는 사이토카인(예, IL-γ, IL-2, TNF-α 등) 변화 등을 측정한 결과, 백혈구 수가 감소하거나, CD4/CD8 비율이 감소, 염증성 사이토카인인 IL-γ, IL-2, TNF-α 등의 분비가 감소하는 경우를 의미한다.

[41] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang1을 발현하는 세포와 상기 Tie2 과발현 혈관내피세포는 공배양시킨 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[42] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang1을 발현하는 세포와 상기 Tie2 과발현 혈관내피세포의 비율은 1:0.1 내지 1:10인 것일 수 있다. 예를 들어, 1:0.1, 1:0.2, 1:0.3, 1:0.4, 1:0.5, 1:0.6, 1:0.7, 1:0.8, 1:0.9, 1:1.0, 1:1.1, 1:2.1, 1:3.1, 1:4.1, 1:5.1, 1:6.1, 1:7.1, 1:8.1, 1:9.1, 1:10의 세포 수 비율일 수 있다. 바람직하게는 상기 Ang1을 발현하는 세포와 상기 Tie2 과발현 혈관내피세포의 비율은 1:0.5 내지 1:3 일 수 있다. 예를 들어, 1:0.5, 1:0.6, 1:0.7, 1:0.8, 1:0.9, 1:1.0, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9, 1:2.0, 1:2.1, 1:2.2, 1:2.3, 1:2.4, 1:2.5, 1:2.6, 1:2.7, 1:2.8, 1:2.9, 1:3.0 일 수 있다.

[43] 본 명세서의 용어, "망막 내 혈관신생 질환"은 망막의 혈관이 비정상적으로 성장하거나 변형되는 질환을 의미한다. 상기 망막 내 혈관신생 질환은 시력 저하, 중앙 시력 손실, 왜관을 따라 오는 혈관의 누출 등의 증상을 일으킬 수 있다. 상기 혈관 신생이란, 새로운 혈관이 기존의 혈관으로부터 생기는 과정을 의미한다.

[44] 일 구체예에 있어서, 상기 망막 내 혈관신생 질환은 망막색소변성증 (Retinal Pigment Epithelial Dystrophy), 망막색소상피하 피질하 봉막증 (Choroidal Neovascularization), 망막색소상피하혈관확장증 (Choroidal Vascular Expansion), 망막색소상피하혈관문신증 (Choroidal Vascular Occlusion), 망막색소상피하 신생

혈관증 (Choroidal Neovascular Membrane), 망막색소상피하혈관폐쇄증 (Choroidal Vascular Occlusive Disease), 망막색소상피하 출혈증 (Choroidal Hemorrhage), 망막색소상피하이완증 (Choroidal Effusion) 색소성 망막병증 (Proliferative Diabetic Retinopathy, PDR), 황반의 결막병증 (Macular Telangiectasia), 연령 관련성 황반변성 (Age-related Macular Degeneration, AMD), 고혈압성 망막병증 (Hypertensive Retinopathy), 당뇨성 망막병증 (Diabetic Retinopathy), 건성 황반변성 (Dry AMD), 습식 황반변성 (Wet AMD)등으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[45] 본 명세서의 용어, "혈관신생인자"란, 혈관의 발생, 혈관 신생, 내피세포 성장, 혈관의 안정성, 및/또는 맥관 형성 등을 촉진하는 성장 인자를 의미할 수 있다. 예를 들어, VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor) 및 VEGF 패밀리 멤버, PlGF(Placental Growth Factor), PDGF(Platelet-Derived Growth Factor) 패밀리, 섬유아세포 성장 인자 패밀리(FGF), TIE 리간드(앤지오포에틴), 에프린(ephrin), Del-1(Developmental Endothelial Locus-1), 섬유아세포 성장 인자(산성(aFGF) 및 알칼리성(bFGF)), 호리스타틴, 과립구 콜로니 자극인자(G-CSF), 간세포 성장 인자(HGF)/산란 인자(SF), 인터류킨-8(IL-8), 렙틴, 미드카인 (midkine), 태반 성장 인자, 혈소판 유래 내 가죽 세포 성장 인자(PD-ECGF), 혈소판 유래 성장 인자, 특히 PDGF-BB 또는 PDGFR-베타, 프레이오토로핀(PTN), 프로그라뉴린, 프로리페린, 형질전환 성장 인자 성장 인자-알파(TGF-알파), 형질전환 성장 인자-베타(TGF-베타), 종양괴사 인자-알파(TNF-알파), 혈관내가죽 성장 인자(VEGF)/혈관 투과 인자(VPF) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[46]

[47] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는, 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[48] 상기 "Tie2를 과발현하는 혈관내피세포", "Ang1을 발현하는 세포", "망막 내 혈관신생 질환" 등은 전술한 바와 같다.

[49]

[50] 또 다른 양상은 유효량의 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)를 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[51] 상기 조성물은 약물학적으로 적당하고 약학적으로 허용성인 담체, 부형제 및 비히클을 함유한다. 일반적으로, 이러한 담체에는 수성 또는 알코올성/수성 용액, 에멀젼 또는 현탁액이 있고, 구체적으로 인산염 완충 식염수(PBS)와 같은 식염수 및 완충 매질이 포함된다. 비경구 비히클에는 염화나트륨 용액, 링거 덱스트로스, 덱스트로스와 염화나트륨, 락트산첨가 링거 또는 고정유가 포함될 수 있다. 또한, 방부제 및 다른 첨가물과 같은 부형제가 제공될 수도 있으며, 그 예에는 항미생물제, 항산화제, 킬레이트제 및 불활성 기체 등이 있다. 적당한 조제 보조제, 담체, 다른 부형제 및 약제학적 조성물의 조제 방법에 대해서는 문헌

[Remington's Pharmaceutical Sciences, 14th Ed., Mack Publishing Co., 1970, 특히 Part VIII, "Pharmaceutical Preparation and Their Manufacture", pages 1461-1762]에 개시되어 있다.

[52] 본 명세서의 용어, "투여하는" "도입하는" 및 "이식하는"은 상호교환적으로 사용되고 일 구현예에 따른 조성물의 원하는 부위로의 적어도 부분적 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의한 개체내로의 일 구현예에 따른 조성물의 배치를 의미할 수 있다. 일 구현예에 따른 조성물의 세포 또는 세포 성분의 적어도 일부를 생존하는 개체 내에서 원하는 위치로 전달하는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 개체 투여 후 세포의 생존 기간은 짧으면 수 시간, 예를 들면 24시간 내지 수일 내지 길면 수년일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 치료학적으로 유효한 양 또는 약학적으로 유효한 양으로 환자에 투여될 수 있다.

[53] 상기 "치료학적으로 유효한 양" 또는 "약학적으로 유효한 양"이란 망막 내 혈관신생 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 세포 집단 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[54] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[55] 구체적으로, 상기 약학적 조성물에서 상기 Tie2 과발현 혈관내피세포의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 상기 약학적 조성물을 단회 혹은 반복하여 투여할 수 있다. 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로, 범위는 이에 한정되지 않는다.

[56] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 Ang1을 발현하는 세포를 더 포함하는 것일 수 있다.

[57] 일 구체예에 있어서, 상기 Tie2을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 상기 Ang1을 발현하는 세포를 포함하는 약학적 조성물과 병용투여 될 수 있다.

[58]

[59] 또 다른 양상은 망막 내 혈관신생 질환을 예방 또는 치료하기 위한 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

[60] 또 다른 양상은 Tie2을 과발현하는 혈관내피세포를 망막 내 혈관신생 질환 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공하는 것이다.

[61] 일 구체예에 있어서, Tie2을 과발현하는 혈관내피세포와 Ang1을 발현하는 세포를 함께 망막 내 혈관신생 질환 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 용도로 사용할 수 있다.

[62] 상기 "Tie2를 과발현하는 혈관내피세포", "Ang1을 발현하는 세포", "망막 내 혈관신생 질환" 등은 전술한 바와 같다.

[63]

[64] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[65]

발명의 효과

[66] 일 양상에 따른 Tie2을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 과발현 또는 염증상태에서도 혈관내피세포의 안정화를 유도하고 혈관 투과성을 감소시켜 망막 내 혈관 신생을 늦추거나 억제함으로써 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료하는 효과가 있다. 또한 4~8주 간격 안구 내 주사가 필요한 기존 항체 치료법에 비하여 치료시 침습성이 감소하고, 혈관 안정성이 강화되며, 망막 내 혈관신생 질환의 조기 진단 및 치료가 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[67] 도 1은 Tie2 과발현 인간탯줄정맥내피세포(HUVEC_Tie2)의 제조를 위한 벡터 구조 및 HUVEC_Tie2에서 Tie2 유전자 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다: 도 1a는 control vector로서 mCherry가 encoding되어있는 lentiviral vector pLV-mCherry-CMV의 구조를 나타낸 모식도이며, 도 1b는 human Tie2와 mCherry가 encoding되어있는 lentiviral vector pLV-mCherry-CMV의 구조를 나타낸 모식도이고, 도 1c은 lentiviral vector pLV-mCherry-CMV로 형질 감염시킨 인간탯줄정맥내피세포(HUVEC_Tie2)에서 형광 현미경으로 mCherry를 검출한 결과를 나타낸 사진이며, 도 1d는 RT-PCR을 통해 형질감염시키지 않은 HUVEC(control)과 Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)에서 Tie2 유전자 발현량을 GAPDH발현에 대한 상대정량으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이고, 1e는 HUVEC_NC와 HUVEC_Cont. 및 HUVEC_Tie2의 FACS 분석 결과를 나타낸 그림이다.

[68] 도 2은 Ang1 과발현 중간엽 줄기세포(MSC_Ang1)의 제조를 위한 벡터 구조 및 MSC_Ang1에서 Tie2 유전자 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다: 도 2a는 EGFP가 encoding되어있는 lentiviral vector pLV-EGFP-CMV의 구조를 나타낸 모식도이며, 도 2b는 human Angiopoietin-1와 EGFP가 encoding되어있는 lentiviral vector pLV-EGFP-CMV의 구조를 나타낸 모식도이고, 도 2c는 lentiviral vector pLV-EGFP-CMV로 형질감염시킨 인간 중간엽 줄기세포 (hMSCs)에서 형광 현미경으로 GFP를 검출한 결과를 나타낸 사진이며, 도 2d는 RT-PCR을 통해 형질감

염시키지 않은 인간 중간엽 줄기세포(control)과 Ang1 과발현 인간 중간엽 줄기세포(hMSC_Ang1)에서 Ang1 유전자 발현량을 GAPDH발현에 대한 상대정량으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 2e은 NC, Lv-cont. 및 Lv-Ang1에 대해 형질감염 후 최대 10일 동안 2일 간격으로 ELISA분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[69] 도 3은 필터 아래로 이동한 혈관세포를 crystal violet으로 염색한 결과를 나타낸 사진이다.

[70] 도 4는 염색된 세포들을 acetic acid로 녹여 Spectrofluorometer에서 595nm 흡광도로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[71] 도 5는 정상군(NC), 질환군, 세포치료군#1, 세포치료군#2로 나누어 HUVEC세포가 RPE층으로 이동하는 이미지를 공초점 현미경으로 찍은 사진이다.

[72] 도 6은 HUVEC을 37℃에서 24시간 배양 후 hMSC를 HUVEC 위에 넣고 37°C에서 6~8시간 공배양 후 VEGF 20ng/ml를 첨가하고, 37°C 인큐베이터에서 18~20시간 후에 migration assay를 수행하여 필터 아래로 이동한 혈관세포를 crystal violet으로 염색한 결과를 나타낸 사진이다:

[73] 도 6a은 Tie2를 과발현 시키지 않은 HUVEC(HUVEC-Cont.)과 Ang1을 과발현 시키지 않은 hMSC(hMSC-Cont.)을 공배양시킨 후 세포이동성평가를 실시한 결과 사진이고, 도 6b는 Tie2를 과발현 시키지 않은 HUVEC(HUVEC-Cont.)과 Ang1을 과발현시키지 않은 hMSC(hMSC-Cont.)을 공배양시킨 후, VEGF를 배양액에 첨가하여 세포 이동성평가를 실시한 결과 사진이며, 도 6c는 Tie2를 과발현 시킨 HUVEC(HUVEC_Tie2)과 Ang1을 과발현시킨 hMSC(hMSC_Ang1)을 공배양시킨 후, VEGF를 배양액에 첨가하여 세포 이동성평가를 실시한 결과 사진이다.

[74] 도 7은 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색된 세포들을 acetic acid 로 녹여 분광광도계(spectrophotometer)에서 595nm 흡광도로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[75] 도 8은 HUVEC세포와 hMSC 세포를 2:1비율로 Matrigel위에 세포 부착 후 관형 구조의 이미지를 실시간 time lapse 이미징으로 3시간 동안 매 1시간 간격 촬영한 결과를 나타낸 사진이다.

[76] 도 9은 시간에 따라 튜브로 덮인 면적을 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[77] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[78] **실시예 1. Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2) 제조**

[79] **1.1 세포 배양(cell culture)**

[80] 인간탯줄정맥내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)는 Life Technologies(Gibco; C-003-5C)에서 구입했으며 계대 1~8 사이의 세포로 실험에

사용하였다. 세포는 EGM-2 SingleQuot Kit가 보충된 EBM-2 기초 배지(Lonza)에서 37°에서 배양하였다.

[81] **1.2 Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)의 제조**

[82] 혈관내피세포 control(HUVEC_Cont.)를 제조하기 위해, 인간탯줄정맥내피세포(HUVEC)에 렌티바이러스(Lentivirus)를 이용하여 mCherry가 encoding되어있는 lentiviral vector를 형질감염시켰다. 또한, Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2) 제조하기 위해, 인간탯줄정맥내피 세포(HUVEC)에 렌티바이러스(Lentivirus)를 이용하여 형질감염시키고, 상기 형질감염시킨 HUVEC에 Tie2 유전자 발현 여부를 확인하였다.

[83] 구체적으로, lentiviral vector pLV-mCherry-CMV는 VectorBuilder에서 바이러스 입자에 사전 포장된 상태로 구입했다. 상기 바이러스 벡터의 구조는 도 1a에 나타내었다.

[84] 도 1a는 mCherry가 encoding되어있는 lentiviral vector pLV-mCherry-CMV의 구조를 나타낸 모식도이다. 또한, 도 1b는 human Tie2와 mCherry가 encoding되어있는 lentiviral vector pLV-mCherry-CMV의 구조를 나타낸 모식도이다.

[85] 6well plate에 HUVEC 세포를 well당 $1x10^5$cells를 seeding하였다. well당 1ml에 바이러스를 multiplicity of infection (MOI) 15으로 감염시키고 24시간동안 형질 감염시킨 후에 배지를 2ml로 교체하였다. 형질감염 효율을 평가하기 위해 형광 현미경으로 mCherry를 검출하였고, 그 결과를 도 1b에 나타내었다.

[86] 도 1c은 lentiviral vector pLV-mCherry-CMV로 형질감염시킨 인간탯줄정맥내피세포(HUVEC_Tie2)에서 형광 현미경으로 mCherry를 검출한 결과를 나타낸 사진이다.

[87] 도 1c에 나타낸 바와 같이, 렌티바이러스(Lentivirus)를 이용하여 형질감염시킨 인간탯줄정맥 내피 세포(HUVEC)에서 mCherry가 검출됨을 확인하였고, 이는 상기 lentiviral vector로 형질감염시킨 HUVEC(HUVEC_Tie2)에서 Tie2 유전자가 발현됨을 의미한다.

[88] **1.3 Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)의 Tie2 유전자 발현 확인**

[89] 실시예 1.2에 따라 렌티바이러스(Lentivirus)로 형질감염시킨 Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)에서 Tie2 유전자 발현 여부를 확인하기 위해, RT-PCR과 FACS분석을 사용하여 Tie2 유전자 발현을 검출하였다.

[90] 구체적으로, RT-PCR를 위해 제조업체의 지침에 따라 Total RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel)를 사용하여 배양된 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. RNA농도 및 순도는 Nanodrop으로 확인하였다. Tie2의 mRNA발현을 검출하기 위해 RT-PCR분석은 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems)를 사용하여 수행되었다. 사용된 primer는 IDT에서 구입하였고, primer 염기서열은 표 1에 나타내었다.

[91] [표1]

	서열	서열번호
Primer1(Tie2)	5'-GAGGCAATCAGGATACGAACC-3'	1
Primer2(Tie2)	5'-TCTCCCTTGTCCACAGTCAT-3'	2

[92] 각 샘플을 GAPDH발현에 대한 상대정량으로 분석하였고, 그 결과를 도 1c에 나타내었다.

[93] 도 1d는 RT-PCR을 통해 형질감염시키지 않은 HUVEC(control)과 Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)에서 Tie2 유전자 발현량을 GAPDH발현에 대한 상대정량으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[94] 도 1d에 나타낸 바와 같이, Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)에서 형질감염시키지 않은 HUVEC(control)에 비하여 Tie2 유전자 발현량이 많은 것을 확인하였다.

[95] 한편, 실시예 1.2에 따라 렌티바이러스(Lentivirus)로 형질감염시킨 Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)에서 Tie2 유전자 발현 효율을 평가하기 위해 BD Trucount쩨 Absolute Counting Tube을 사용하여 FACS로 분석하였다. FACS 분석 시 사용한 Tie2 antibody는 BD Pharmingen쩨 Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human Tie2 (CD202b)이다. 형질감염시킨 HUVEC의 Tie2 발현 효율을 도 1d에 나타내었다.

[96] 도 1e는 HUVEC_NC와 HUVEC_Cont. 및 HUVEC_Tie2의 FACS 분석 결과를 나타낸 그림이다. HUVEC_NC는 antibody를 넣지 않은 negative control를 의미하는 것이고, HUVEC_Cont.는 Tie2를 과발현시키지 않은 세포에 antibody를 넣은 control를 의미하는 것이며, HUVEC_Tie2는 HUVEC에서 Tie2를 과발현 시킨 것을 의미한다.

[97] 도 1e에 나타낸 바와 같이, lentiviral vector pLV-mCherry-CMV를 이용하여 형질감염시킨 HUVEC_Tie2에서 Tie2가 과 발현됨을 확인하였다.

[98]

[99] **실시예 2. Ang1 과 발현 중간엽 줄기세포(MSC_Ang1) 제조**

[100] **2.1 세포 배양(cell culture)**

[101] 인체 제대유래 중간엽 줄기세포 (Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells, UC-MSCs)는 서울아산병원 줄기세포센터에서 확보했다. 실험에 사용된 hMSCs는 계대 5~12 사이의 세포로 실험에 사용하였다. 세포는 10%FBS와 1%penicillin-streptomycin solution이 들어간 DMEM배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다.

[102] **2.2 Ang1 과발현 중간엽 줄기세포(MSC_Ang1)의 제조**

[103] 중간엽 줄기세포 control(hMSC_Cont.)를 제조하기 위해, 인간 중간엽 줄기세포 (hMSC)에 렌티바이러스(Lentivirus)를 이용하여 EGFP가 encoding되어있는 lentiviral vector를 형질감염시켰다. 또한, Ang1(Angiopoietin-1) 과발현 중간엽 줄기세포(MSC_Ang1)를 제조하기 위해, 인간 중간엽 줄기세포(hMSCs)에 렌티바이

러스(Lentivirus)를 이용하여 형질감염시키고, 상기 형질감염시킨 hMSCs에 Ang1 유전자 발현 여부를 확인하였다.

[104] 구체적으로, EGFP가 encoding되어있는 lentiviral vector pLV-EGFP-CMV는 VectorBuilder에서 바이러스입자에 사전 포장된 상태로 구입하였다. 상기 바이러스 벡터의 구조는 도 2a에 나타내었다. 또한, 도 2b는 human Angiopoietin-1와 EGFP가 encoding되어있는 lentiviral vector pLV-EGFP-CMV의 구조를 나타낸 모식도이다.

[105] 6well plate에 hMSCs를 well당 $1x10^5$cells를 seeding하였다. well당 1ml에 바이러스를 multiplicity of infection (MOI) 10으로 감염시키고 24시간동안 형질 감염시킨 후에 배지를 2ml로 교체하였다. 형질감염 효율을 평가하기 위해 형광 현미경으로 GFP를 검출하였고, 그 결과를 도 2b에 나타내었다.

[106] 도 2c는 lentiviral vector pLV-EGFP-CMV로 형질감염시킨 인간 중간엽 줄기세포(hMSCs)에서 형광 현미경으로 GFP를 검출한 결과를 나타낸 사진이다.

[107] 도 2c에서 본 바와 같이, 렌티바이러스(Lentivirus)를 이용하여 형질감염시킨 인간 중간엽 줄기세포(hMSCs)에서 GFP가 검출됨을 확인하였고, 이는 상기 lentiviral vector로 형질감염시킨 인간 중간엽 줄기세포 (hMSCs-Ang1)에서 Ang1 유전자가 발현됨을 확인하였다.

[108] **2.3 Ang1 과발현 중간엽 줄기세포(MSCs-Ang1)의 Ang1 유전자 발현 확인**

[109] 실시예 2.2에 따라 렌티바이러스(Lentivirus)로 형질감염시킨 Ang1 과발현 인간 중간엽 줄기세포(hMSC_Ang1)에서 Ang1 유전자 발현 여부를 확인하기 위해 RT-PCR과 ELISA분석을 사용하여 Ang1 유전자 발현을 검출하였다.

[110] 구체적으로, RT-PCR을 수행하기 위해 제조업체의 지침에 따라 Total RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel)를 사용하여 배양된 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. RNA농도 및 순도는 Nanodrop으로 확인하였다. Ang1의 mRNA발현을 검출하기 위해 RT-PCR분석은 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems)를 사용하여 수행되었다. 사용된 primer는 IDT에서 구입하였고, primer 염기서열은 표 2에 나타내었다.

[111] [표2]

	서열	서열번호
Primer 1 (Ang1)	5'-AACCAGCCTCCTCTCTCAG-3'	3
Primer 2 (Ang1)	5'-GCAGCTGTATCTCAAGTCGAG-3'	4

[112] 각 샘플은 GAPDH발현에 대한 상대정량으로 분석하였고, 그 결과를 도 2c에 나타내었다.

[113] 도 2d는 RT-PCR을 통해 형질감염시키지 않은 인간 중간엽 줄기세포(control)과 Ang1 과발현 인간 중간엽 줄기세포(hMSC_Ang1)에서 Ang1 유전자 발현량을 GAPDH발현에 대한 상대정량으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[114] 도 2d에 나타낸 바와 같이, Ang1 과발현 인간 중간엽 줄기세포(hMSC_Ang1)에서 Ang1을 과발현 시키지 않은 인간 중간엽 줄기세포(hMSC_control)에 비하여 Ang1 유전자 발현량이 많은 것을 확인하였다.

[115] 한편, 실시예 2.1에 따라 렌티바이러스(Lentivirus)로 형질감염시킨 Ang1 과발현 인간 중간엽 줄기세포(hMSC_Ang1)에 대해 ELISA분석 통해 Ang1 유전자 발현을 검출하였다.

[116]

[117] Ang1-특이적 ELISA는 Quantikine Human Angiopoietin-1 Immunoassay (R&D Systems)를 사용하여 수행되었다. 형질감염 후 최대 10일 동안 2일 간격으로 6well plate의 hMSC_Ang1 배양액 샘플을 수집하여 분석하였다.

[118] Ang1-특이적 ELISA를 수행한 결과를 도 2d에 나타내었다.

[119] 도 2e은 NC, Lv-cont. 및 Lv-Ang1에 대해 형질감염 후 최대 10일 동안 2일 간격으로 ELISA분석한 결과를 나타낸 그래프이다. 상기 NC는 형질감염을 시키지 않은 hMSC로 negative control를 의미하는 것이고, 상기 Lv-cont.는 Ang1를 포함고 있지 않은 lentiviral vector를 형질감염 시킨 control를 의미하는 것이며, 상기 Lv-Ang1는 Ang1을 포함하고 있는 lentiviral vector를 형질감염 시킨것을 의미하는 것이다.

[120] 도 2e에 나타낸 바와 같이, pLV[Exp]-EGFP:T2A:PuroCMV>hANGPT1를 이용하여 형질감염시킨 인간 중간엽 줄기세포(hMSCs-Ang1)에서 Ang1이 과발현됨을 확인하였다.

[121]

[122] **실시예 3. HUVEC와 hMSC의 공배양 방법을 이용한 세포치료제 제조**

[123] HUVEC 세포와 hMSC 세포를 공배양하는 방법으로 세포치료제를 제조하였다. HUVEC 세포와 hMSC 세포의 간의 크기 차이 및 각 세포에서 발현하는 Tie2와 Ang1의 발현 차이를 고려하여 공배양하였다. 구체적으로, HUVEC을 Transwell에 $3x10^4$cells/ml을 seeding 하여 24시간동안 37°C 인큐베이터에서 배양 하였다. hMSC를 $1.5x10^4$cells/ml(HUVEC 대비 0.5배의 수)로 HUVEC세포 위에 공배양 하였고 37°C에서 6~8시간 배양 후 VEGF 20ng/ml를 첨가하였다. 37°C 인큐베이터에서 18~20시간 후에 migration assay를 수행하였다.

[124]

[125] **실험예 1. Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC)의 이동감소효과 확인**

[126] **1.1 Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)의 이동 분석(Migration assay)**

[127] 구멍 크기가 8um인 6.5mm 직경의 폴리카보네이트 필터가 포함된 Transwell챔버 (CorningCostar)를 사용하였다. Tie2를 과발현 시키지 않은 HUVEC(HUVEC-Cont.) 또는 Tie2를 과발현 시킨 HUVEC(HUVEC_Tie2)를 $5x10^4$cells/ml으로 seeding을 하고, Ang1을 과발현시키지 않은 hMSC(hMSC-Cont.) 또는 Ang1을 과발현시킨 hMSC(hMSC_Ang1)의 배양액을 24시간 처리한 후 VEGF 20ng/ml를 첨

가하여 24시간 동안 인큐베이터에서 배양되었다. 배양 후 필터 위의 세포를 면봉을 이용하여 닦아내고 필터 아래로 이동한 세포를 PBS로 세척 한 후 메탄올로 20분 동안 고정하고, 1% crystal violet으로 20분 동안 염색하였다. PBS로 세척 한 후 이동한 세포를 현미경으로 관찰하였다. 1% acetic acid로 염색된 세포들을 녹여 Spectrofluorometer에서 595nm 흡광도로 측정하였고, 측정한 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[128] 도 3은 필터 아래로 이동한 혈관세포를 crystal violet으로 염색한 결과를 나타낸 사진이다. 도 3에 나타낸 바와 같이, VEGF 첨가여부 및 첨가량에 따라 혈관세포의 이동량이 달라졌으나, VEGF 20ng/ml과 VEGF 40ng/ml 첨가시 혈관세포 이동량에 별 차이가 없음을 확인하였다.

[129] 도 4는 염색된 세포들을 acetic acid로 녹여 Spectrofluorometer에서 595nm 흡광도로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[130] 도 3및 도 4에 나타낸 바와 같이, HUVEC 이동이 VEGF 첨가시 정상군(A)에 비해 유의미하게 증가함을 확인하였고(B: 질환군), VEGF첨가 및 Ang-1 없는 배양액에서 Tie2 발현된 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)의 이동성이 질환군(B)에 비해 감소함을 확인하였다(C: 세포치료제#1). 또한, VEGF첨가 및 Ang-1 있는 배양액에서 질환군(B)에 비해 Tie2발현 혈관내피세포 이동성 현저히 감소 및 정상군(A)과 비슷한 수준임을 확인하였다(D: 세포치료제#1+Ang_1).

[131] **1.2 망막색소상피세포(RPE)와 인간탯줄정맥내피세포(HUVEC)의 공동 배양을 통한 망막조직 모델 구축**

[132] Transwell 시스템을 이용하여, Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC)의 이동감소 효과를 확인하기 위한 망막색소상피세포(retinal pigment epithelial cell, RPE)와 혈관내피세포(HUVEC)를 배양한 망막조직 모델을 구축하였다.

[133] 구체적으로, RPE세포는 Transwell 바닥면에 세포를 seeding하게 위해 Vitronectin (VTN)으로 코팅한 Transwell을 6well plate에 거꾸로 고정하였다. RPE세포를 100ul배지에 $1x10^5$cells/ml이 되도록 하여 방울형태로 transwell 바닥면에 seeding하고 37°C 인큐베이터 안에서 2시간동안 배양하였다. RPE세포들이 잘 붙어있는 것을 확인하고 Trnaswell을 정상 위치로 뒤집어 배지가 담아있는 24well plate에 장착하였다. HUVEC을 Transwell안쪽 면에 $1x10^5$cells/ml으로 seeding 하고 24시간동안 배양하였다. hMSC (hMSC-Cont. or hMSC_Ang1)세포의 배양액을 넣고 다시 24시간동안 배양한 후 VEGF 20ng/ml를 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 공초점 현미경으로 HUVEC세포가 RPE층으로 이동하는 이미지를 획득하였다.

[134] **1.3 망막조직 모델에서 혈관내피세포 이동성 평가**

[135] 상기 실험예 1.2의 방법으로 구축한 Transwell 시스템을 사용하여, HUVEC세포의 이동에 대한 Ang1-Tie2 시스템의 효과를 확인하였다. 공초점 현미경으로 HUVEC세포가 RPE층으로 이동하는 이미지를 도 5에 나타내었다.

[136] 도 5는 정상군(NC), 질환군, 세포치료군#1, 세포치료군#2로 나누어 HUVEC 세포가 RPE층으로 이동하는 이미지를 공초점 현미경으로 찍은 사진이다. 정상군(NC)는 Tie2를 과발현 시키지 않은 HUVEC에 VEGF를 처리하지 않은 군이고, 질환군은 VEGF를 20ng/ml처리한 군이고, 세포치료군#1은 Tie2를 과발현 시킨 HUVEC(HUVEC_Tie2)에 VEGF를 20ng/ml처리한 군이며, 세포치료군#2SMS Tie2를 과발현시킨 HUVEC(HUVEC_Tie2)에 MSC Lv-Ang-1 배양액을 넣고, VEGF를 20ng/ml처리한 군을 의미한다. 혈관내피세포는 빨간색 형광을 발현하고, 빨간색 형광의 분포가 많이 보일수록 혈관내피세포의 이동이 증가한 것이다.

[137] 도 5에 나타낸 바와 같이, 질환군에서 빨간색 분포가 많은 것을 알 수 있고, Tie2를 과발현시킨 HUVEC_Tie2를 사용한 세포치료제군은 모두 빨갠색 분포가 많지 않은 것을 확인하였다. 이는 질환군에서 혈관내피세포의 이동이 증가하고, 세포치료제군(HUVEC_Tie2)에서 이동한 혈관내피세포 수가 질환군에 비해 현저히 적음을 의미하며, VEGF환경에서도 혈관신생 억제효과가 일어남을 의미한다.

[138] **1.4. HUVEC 세포와 hMSC 세포의 공배양시 세포 이동 세포이동성 평가**

[139] 두 세포 간의 크기 차이와 각각의 세포에서 발현하는 Ang1과 Tie2의 발현 차이를 고려하여 실시예 3과 같이, 세포이동이 가능한 다공성 트렌스웰의 한쪽에 먼저 HUVEC 세포를 배양 후 hMSC 세포를 0.5배의 수로 배양하였다. HUVEC 세포를 먼저 배양하여 세포와 세포 간의 tight junction 안정 후 hMSC 세포를 0.5배의 세포 수로 넣어 HUVEC세포 위에 공배양한 후, 혈관유래성장인자(VEGF)를 첨가하여 혈관유래성장인자(VEGF)환경에서 세포의 이동 정도를 비교 평가하였고, 그 결과를 도 6 및 도7에 나타내었다.

[140] 도 6은 은 HUVEC을 37℃에서 24시간 배양 후 hMSC를 HUVEC 위에 넣고 37°C에서 6~8시간 공 배양 후 VEGF 20ng/ml를 첨가하고, 37°C 인큐베이터에서 18~20시간 후에 migration assay를 수행하여 필터 아래로 이동한 혈관세포를 crystal violet으로 염색한 결과를 나타낸 사진이다: 도 6a은 Tie2를 과발현 시키지 않은 HUVEC(HUVEC-Cont.)과 Ang1을 과발현시키지 않은 hMSC(hMSC-Cont.)을 공배양시킨 후 세포이동성평가를 실시한 결과 사진이고, 도 6b는 Tie2를 과발현 시키지 않은 HUVEC(HUVEC-Cont.)과 Ang1을 과발현시키지 않은 hMSC(hMSC-Cont.)을 공배양시킨 후, VEGF를 첨가하여 세포 이동성평가를 실시한 결과 사진이며, 도 6c는 Tie2를 과발현 시킨HUVEC(HUVEC_Tie2)과 Ang1을 과발현시킨 hMSC(hMSC_Ang1)을 공배양시킨 후, VEGF를 첨가하여 세포 이동성평가를 실시한 결과 사진이다.

[141] 도 7은 crystal violet으로 염색된 세포들을 acetic acid로 녹여 분광광도계(Spectrofluorometer)에서 595nm 흡광도로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[142] 도 6및 도 7에 나타낸 바와 같이, 질환환경(VEGF 함유배양액)에서 일반 HUVEC은 매우 높은 세포이동성을 보이는 것을 확인하였고, 질환환경(VEGF 함유배양액)에서 HUVEC_Tie2와 MSC_Ang1 공배양 시 세포 이동이 정상군과 유사

한 결과를 보임을 확인하였다. 이는 HUVEC_Tie2와 MSC_Ang1 공배양한 세포치료제의 경우질환환경에서도 혈관신생이 정상인과 비슷한 수준으로 억제됨을 의미한다.

[143]

[144] **실험예 2. Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)의 체외 혈관신생 (Angiogenesis) 억제능 확인**

[145] Tie2 과발현 혈관내피세포(HUVEC_Tie2)의 체외 혈관신생(Angiogenesis) 억제능 평가하기 위하여, 혈관내피세포(HUVEC)를 젤에 배양하여 HUVEC 세포의 모세관 유사 관 형성 분석(tube formation assay)을 실시하였다. 구체적으로, HUVEC 세포의 모세관 유사 관 형성 분석(tube formation assay)은 tube formation assay kit(Abcam)를 사용하였다. 96well plate에 50ul/well의 extracellular matrix solution(ECM)을 첨가하여 용액이 겔을 형성하도록 37°C에서 1시간 동안 굳힌 후 각 well당 $2X10^4$cells/100μl의 HUVEC(HUVEC_Cont. or HUVEC_Tie2)세포와 $1X10^4$cells/100μl의 hMSC(hMSC-Cont. or hMSC_Ang1)세포를 mix하여 넣어주고 20ng/ml VEGF를 첨가하였다. 세포의 튜브 형성을 허용하기 위해 37°C에서 10시간 동안 배양하였다. 혈관과 같은 구조의 형성은 Juli쩨 Stage Real-Time History Recorder (NanoEnTek)에서 관찰하였다. 시간에 따른 튜브로 덮인 면적을 Image J 프로그램을 이용하여 측정하였고, 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다.

[146] 도 8은 HUVEC세포와 hMSC 세포를 2:1비율로 Matrigel위에 세포 부착 후 관형 구조의 이미지를 실시간 time lapse 이미징으로 3시간 동안 매 1시간 간격 촬영한 결과를 나타낸 사진이다.

[147] 도 9은 시간에 따라 튜브로 덮인 면적을 나타낸 그래프이다.

[148] 도 8 및 도 9에 나타낸 바와 같이, 정상군(Control)은 VEGF 환경(질환 환경)에서 빠르게 관 형성 구조를 만들고, 최종 관 형성 면적이 감소하는 것을 확인하였다. 실험군(세포치료제군)은 VEGF 환경에서도 관 형성이 천천히 진행되는 것을 확인하였고, 이는 혈관내피세포의 Tie2와 중간엽줄기세포의 Ang1 의한 Tight junction 형성으로 혈관신생을 늦추는 것으로 판단된다. 이는 Tie2를 과발현시킨 혈관내피세포와 Ang1을 과발현시킨 중간엽줄기세포의 세포치료제가 혈관신생을 늦추어 망막 내 혈관신생억제에 효과가 있음을 의미한다.

청구범위

[청구항 1] Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 혈관내피세포는 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)을 과발현하도록 유전적으로 조작된 것인, 약학적 조성물.

[청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 유전적으로 조작된 혈관내피세포는 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 혈관내피세포는 인간탯줄정맥내피세포 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC), 인간 유도만능 줄기세포 분화 내피세포(iPSC differentiated endothelial cell), 망막내피세포(retinal endothelial cell), 중간엽줄기세포에서 분화된 내피세포(Mesenchymal stem cell differentiated endothelial cell), 혈관전구세포 분화 내피세포(Vascular progenitor cell differentiated endothelial cell)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

[청구항 5] 청구항 1에 있어서, Ang1(Angiopoietin-1)을 발현하는 세포를 더 포함하거나 병용투여 되는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 6] 청구항 5에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)을 발현하는 세포는 Ang1을 발현하거나 과발현하도록 유전적으로 조작된 것인, 약학적 조성물.

[청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 유전적으로 조작된 Ang1(Angiopoietin-1)을 발현하는 세포는 Ang1(Angiopoietin-1)를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 8] 청구항 5에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)을 발현하는 세포는 혈관주변세포(pericyte), 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell, MSC), 내피세포(Endothelial cell, EC), 섬유아세포(fibroblast), 망막색소상피세포(Retinal Pigment Epithelium, RPE), 광수용체(photoreceptor), 수평세포(horizontal cell), 뮐러세포(Muller cell), 무축삭 세포(amacrine cell), 별상세포(astrocytes) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

[청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포(MSC)는 탯줄, 제대혈, 태반, 골수, 지방조직, 근육, 양수, 양막 및 치수로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나에서 유래된 것인, 약학적 조성물.

[청구항 10] 청구항 5에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)을 발현하는 세포는 감소된 면역원성을 나타내는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 11] 청구항 5에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)을 발현하는 세포와 상기 Tie2 과발현 혈관내피세포는 공배양시킨 것인, 약학적 조성물.

[청구항 12] 청구항 5에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)을 발현하는 세포와 상기 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2) 과발현 혈관내피세포의 비율은 1:0.1 내지 1:10인 것인, 약학적 조성물.

[청구항 13] 청구항 1에 있어서, 상기 망막 내 혈관신생 질환은 망막색소변성증 (Retinal Pigment Epithelial Dystrophy), 망막색소상피하 피질하 봉막증 (Choroidal Neovascularization), 망막색소상피하혈관확장증 (Choroidal Vascular Expansion), 망막색소상피하혈관문신증 (Choroidal Vascular Occlusion), 망막색소상피하 신생혈관증 (Choroidal Neovascular Membrane), 망막색소상피하혈관폐쇄증 (Choroidal Vascular Occlusive Disease), 망막색소상피하 출혈증 (Choroidal Hemorrhage), 망막색소상피하이완증 (Choroidal Effusion) 색소성 망막병증 (Proliferative Diabetic Retinopathy, PDR), 황반의 결막병증 (Macular Telangiectasia), 연령 관련성 황반변성 (Age-related Macular Degeneration, AMD), 고혈압성 망막병증 (Hypertensive Retinopathy), 당뇨성 망막병증 (Diabetic Retinopathy), 건성 황반변성 (Dry AMD), 습식 황반변성 (Wet AMD)등으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

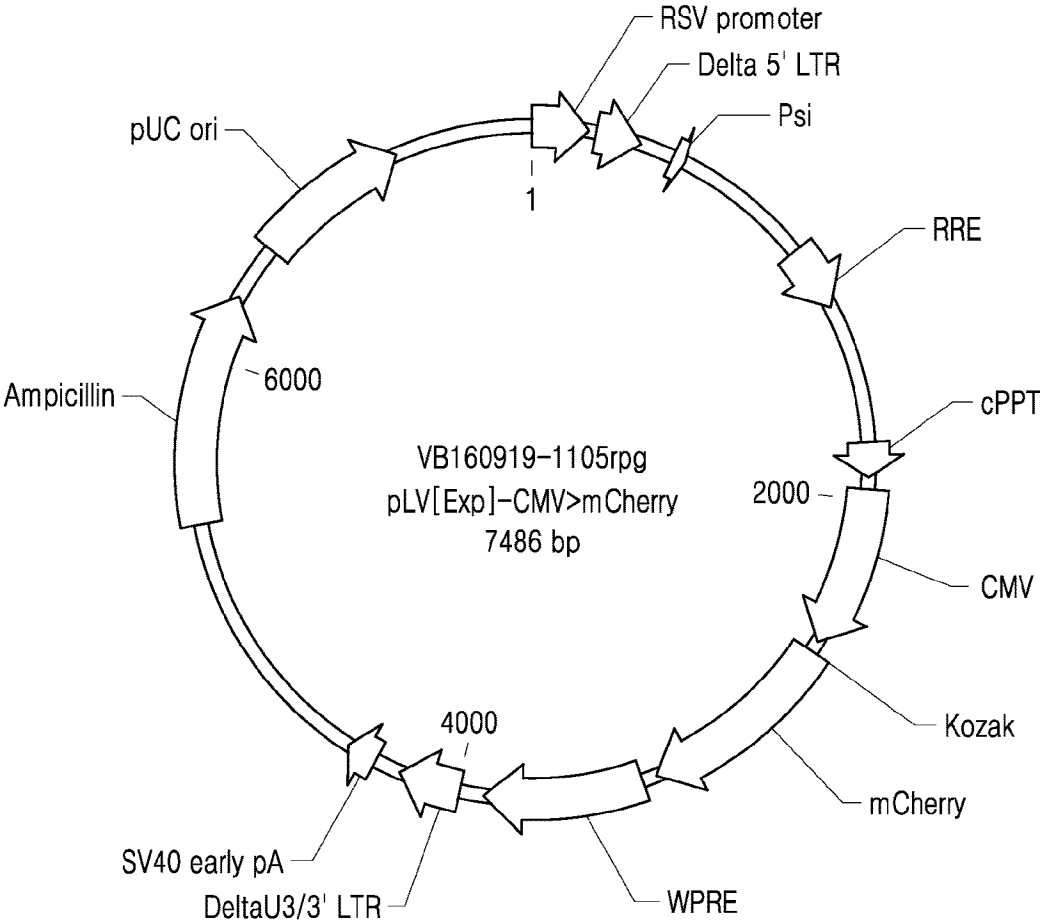
[청구항 14] 청구항 1 내지 13 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 키트.

[청구항 15] 망막 내 혈관신생 질환을 예방 또는 치료하기 위한 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도.

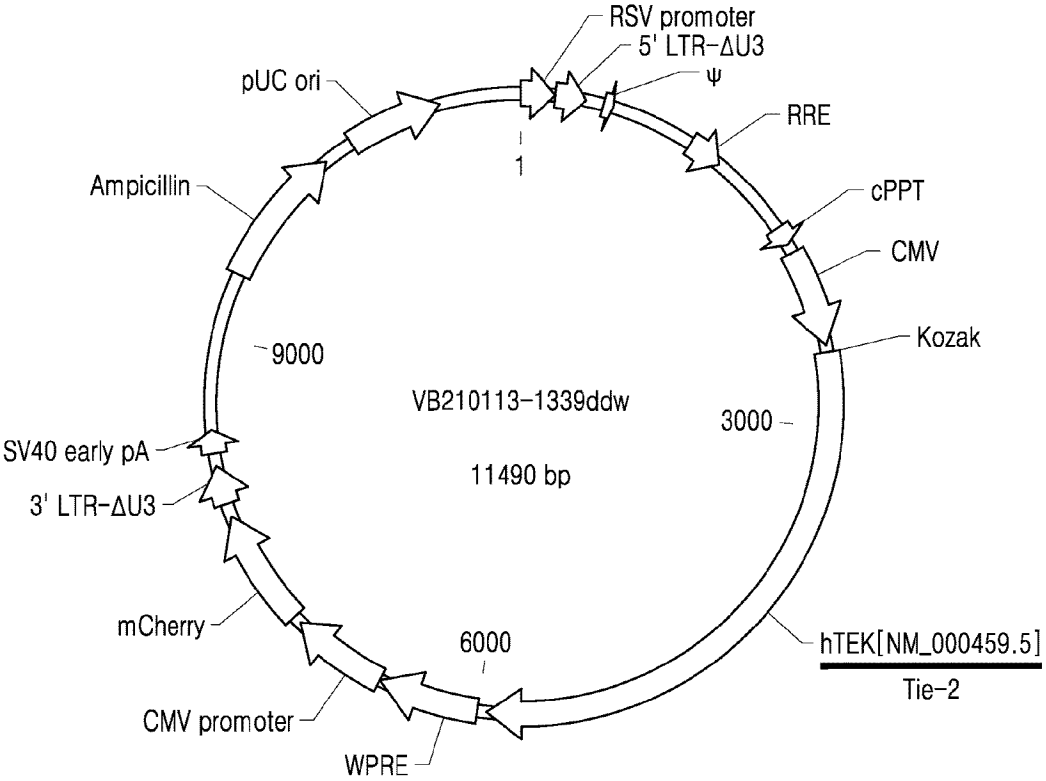
[청구항 16] 유효량의 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료 방법.

[청구항 17] 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 의약 제조에 사용하기 위한 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)을 과발현하는 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도.

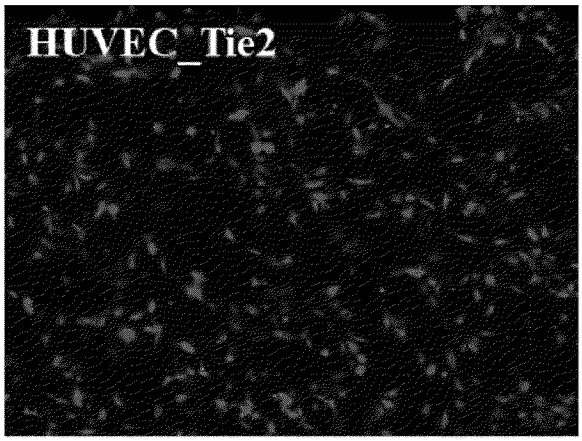
[도1a]


RSV promoter
Delta 5' LTR
Psi
RRE
cPPT
CMV
Kozak
mCherry
WPRE
DeltaU3/3' LTR
SV40 early pA
Ampicillin
pUC ori
1
2000
4000
6000
VB160919-1105rpg
pLV[Exp]-CMV>mCherry
7486 bp

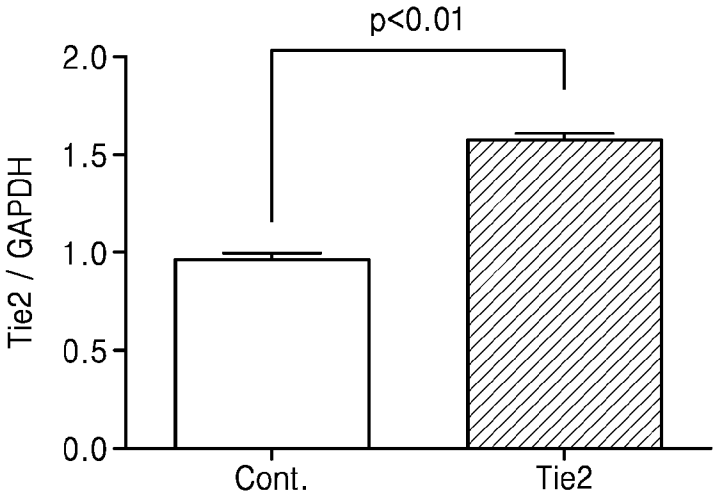
[도1b]


RSV promoter
5' LTR-ΔU3
Ψ
RRE
cPPT
CMV
Kozak
hTEK[NM_000459.5]
Tie-2
3000
6000
9000
1
pUC ori
Ampicillin
SV40 early pA
3' LTR-ΔU3
mCherry
CMV promoter
WPRE
VB210113-1339ddw
11490 bp

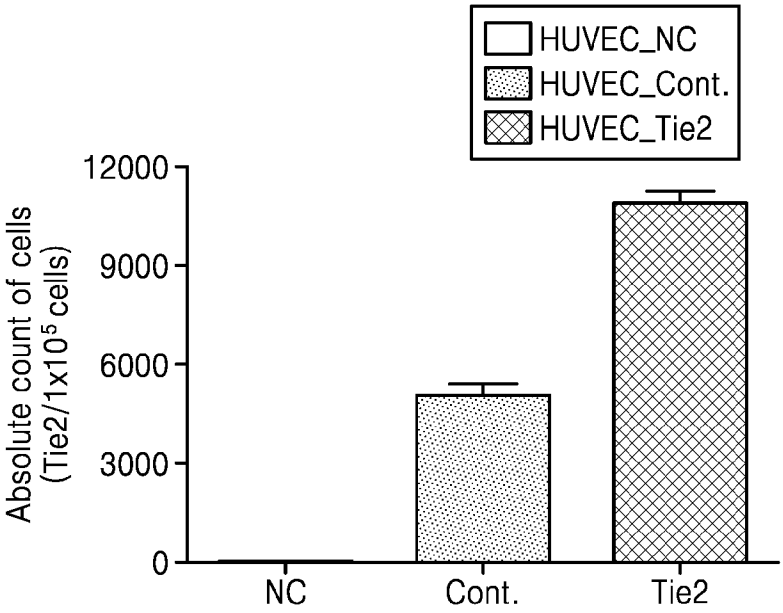
[도1c]


HUVEC_Tie2

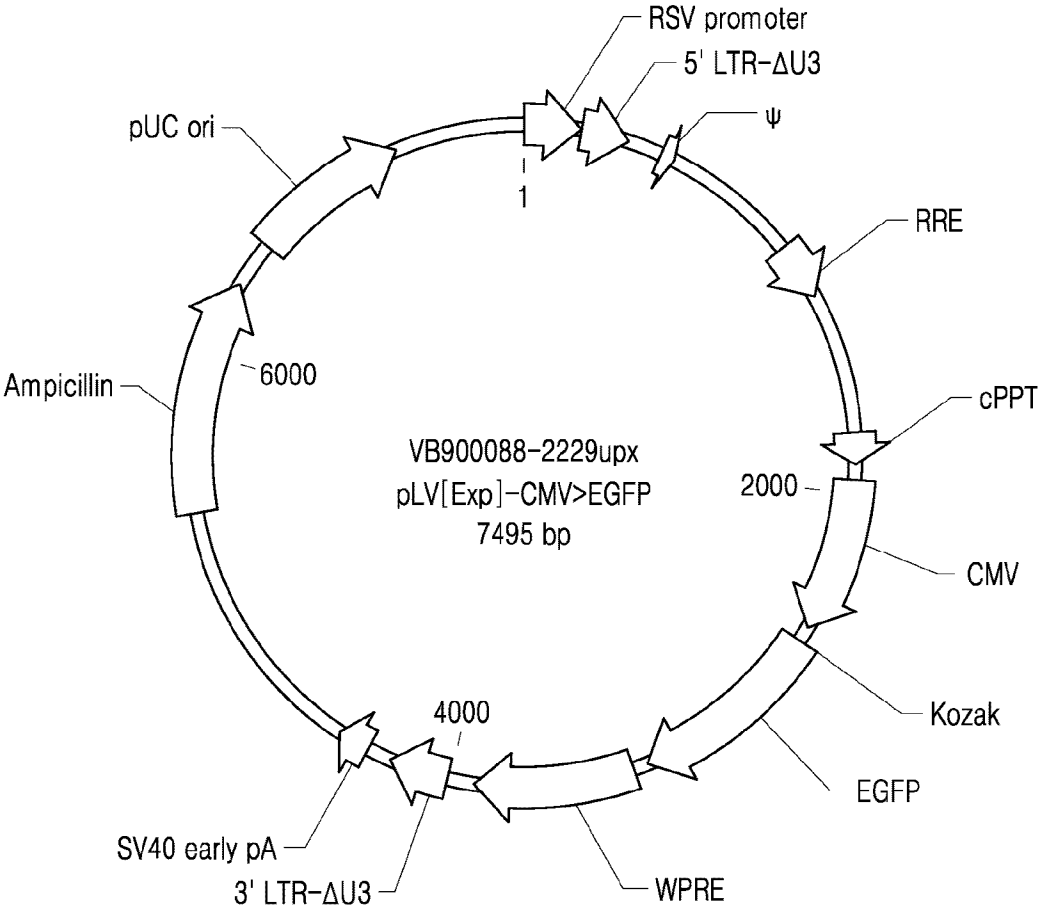
[도1d]


p<0.01
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Tie2 / GAPDH
Cont.
Tie2

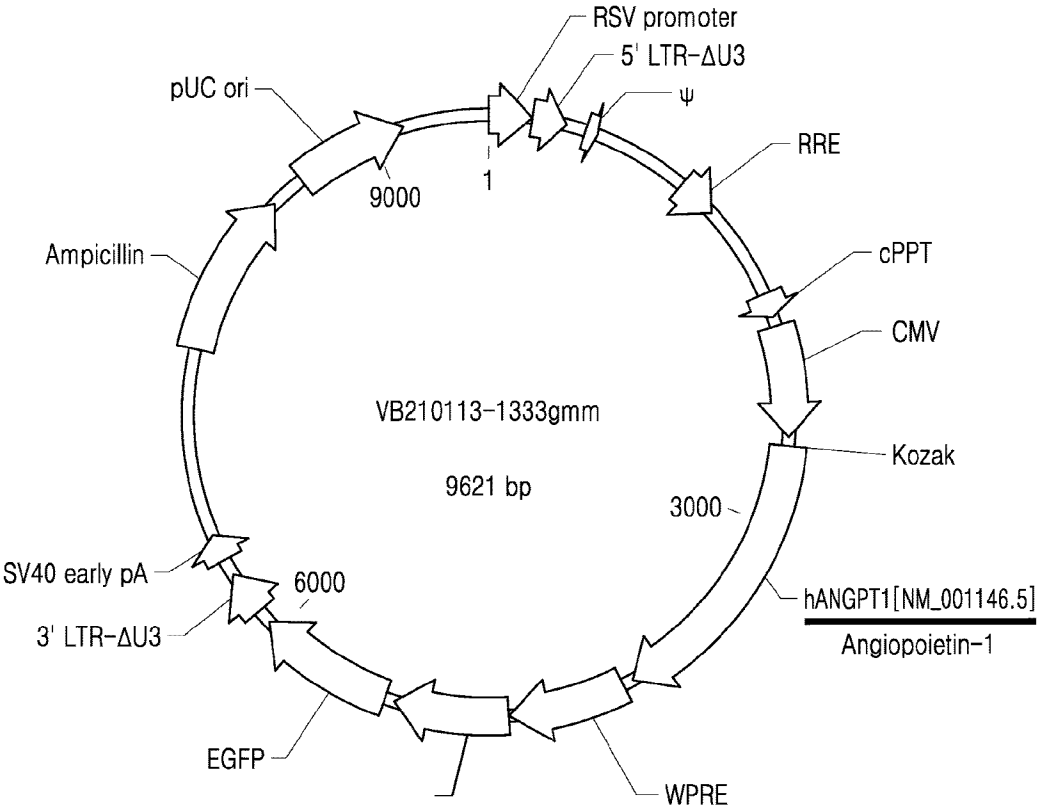
[도1e]


HUVEC_NC
HUVEC_Cont.
HUVEC_Tie2
12000
9000
6000
3000
0
Absolute count of cells
(Tie2/1x10⁵ cells)
NC
Cont.
Tie2

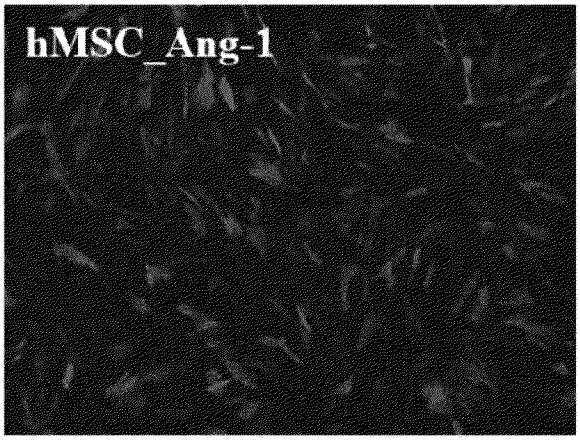
[도2a]


RSV promoter
5' LTR-ΔU3
Ψ
RRE
cPPT
CMV
Kozak
EGFP
WPRE
3' LTR-ΔU3
SV40 early pA
Ampicillin
pUC ori
1
2000
4000
6000
VB900088-2229upx
pLV[Exp]-CMV>EGFP
7495 bp

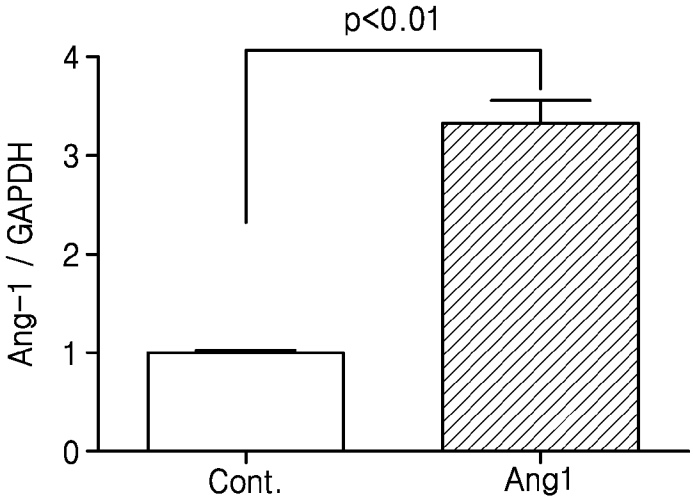
[도2b]


RSV promoter
5' LTR-ΔU3
Ψ
RRE
cPPT
CMV
Kozak
hANGPT1[NM_001146.5]
Angiopoietin-1
WPRE
EGFP
3' LTR-ΔU3
SV40 early pA
Ampicillin
pUC ori
1
3000
6000
9000
VB210113-1333gmm
9621 bp

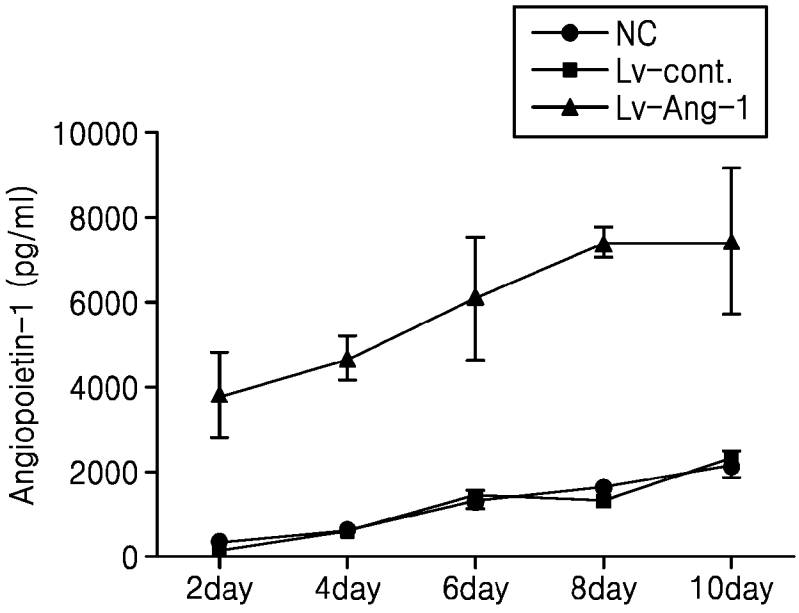
[도2c]


hMSC_Ang-1

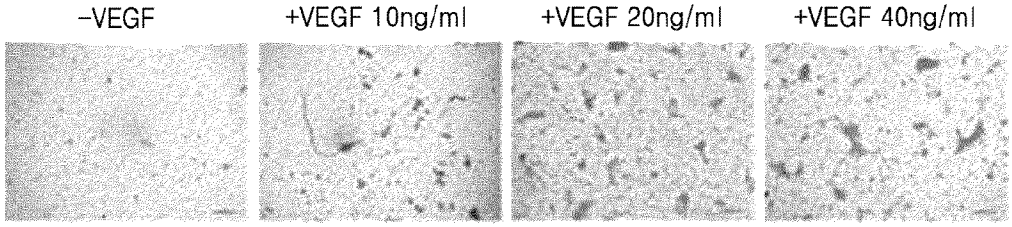
[도2d]


p<0.01
Ang-1 / GAPDH
0
1
2
3
4
Cont.
Ang1

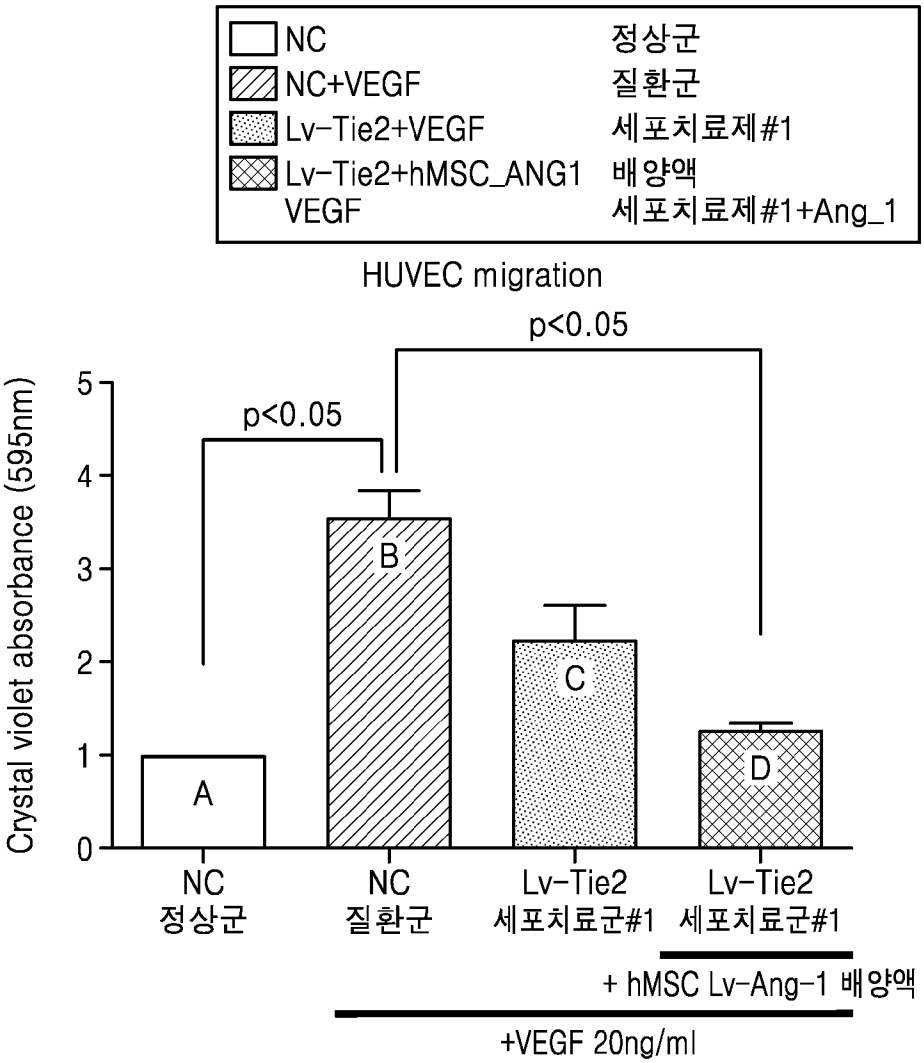
[도2e]


NC
Lv-cont.
Lv-Ang-1
Angiopoietin-1 (pg/ml)
0
2000
4000
6000
8000
10000
2day
4day
6day
8day
10day

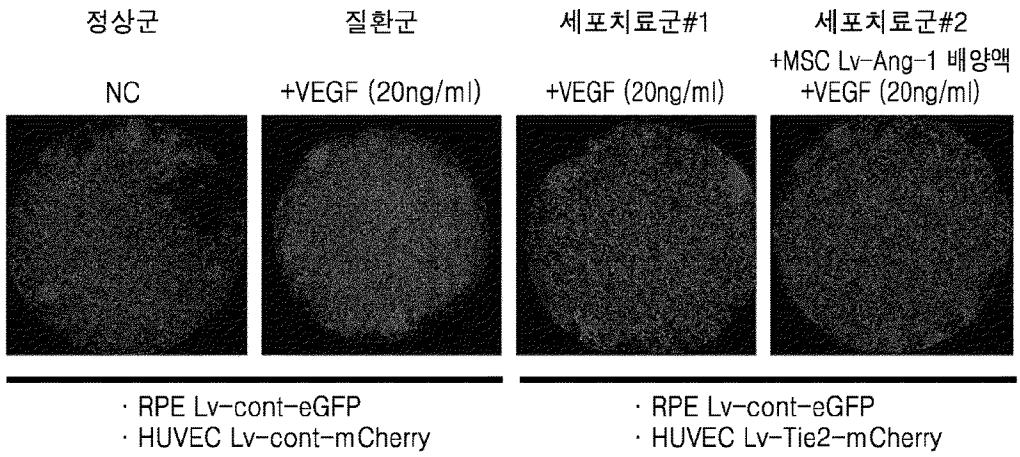
[도3]


-VEGF
+VEGF 10ng/ml
+VEGF 20ng/ml
+VEGF 40ng/ml

[도4]

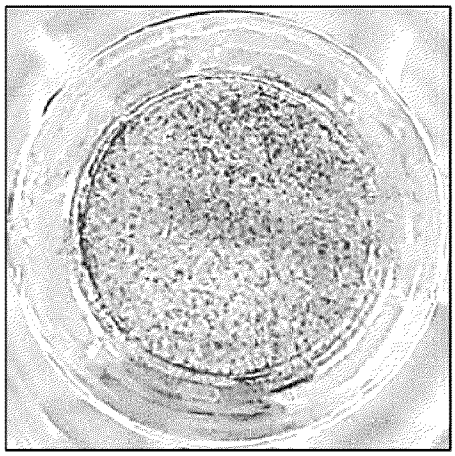

NC 정상군
NC+VEGF 질환군
Lv-Tie2+VEGF 세포치료제#1
Lv-Tie2+hMSC_ANG1 배양액
VEGF 세포치료제#1+Ang_1
HUVEC migration
p<0.05
p<0.05
Crystal violet absorbance (595nm)
0
1
2
3
4
5
A
B
C
D
NC 정상군
NC 질환군
Lv-Tie2 세포치료군#1
Lv-Tie2 세포치료군#1
+ hMSC Lv-Ang-1 배양액
+VEGF 20ng/ml

[도5]


정상군
NC
질환군
+VEGF (20ng/ml)
세포치료군#1
+VEGF (20ng/ml)
세포치료군#2
+MSC Lv-Ang-1 배양액
+VEGF (20ng/ml)
· RPE Lv-cont-eGFP
· HUVEC Lv-cont-mCherry
· RPE Lv-cont-eGFP
· HUVEC Lv-Tie2-mCherry

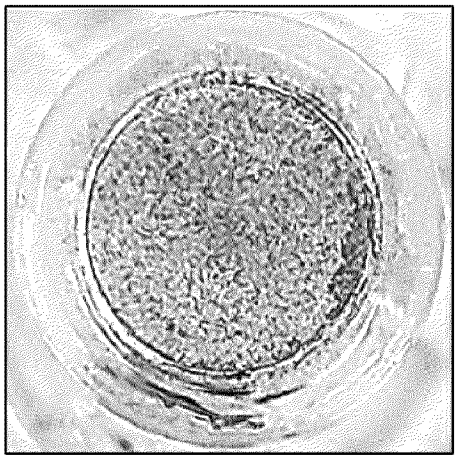
[도6a]

HUVEC-cont
hMSC-cont



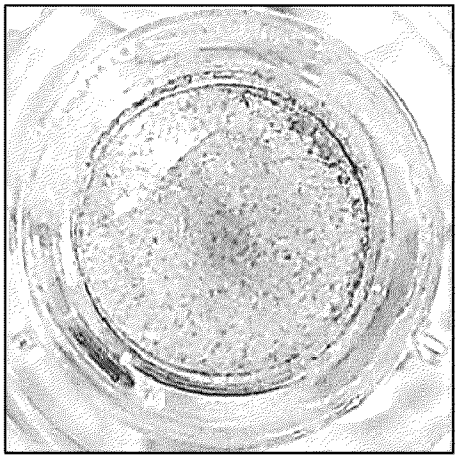
[도6b]

HUVEC-cont
hMSC-cont
+VEGF

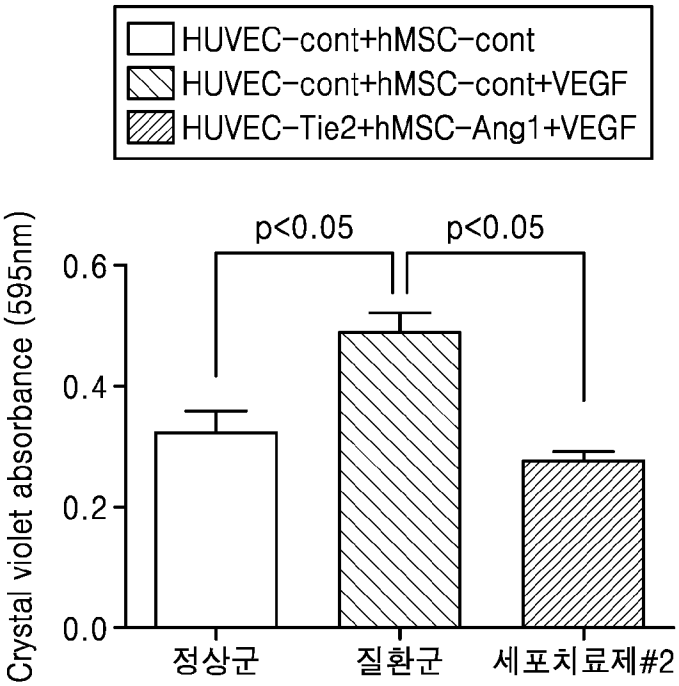


[도6c]

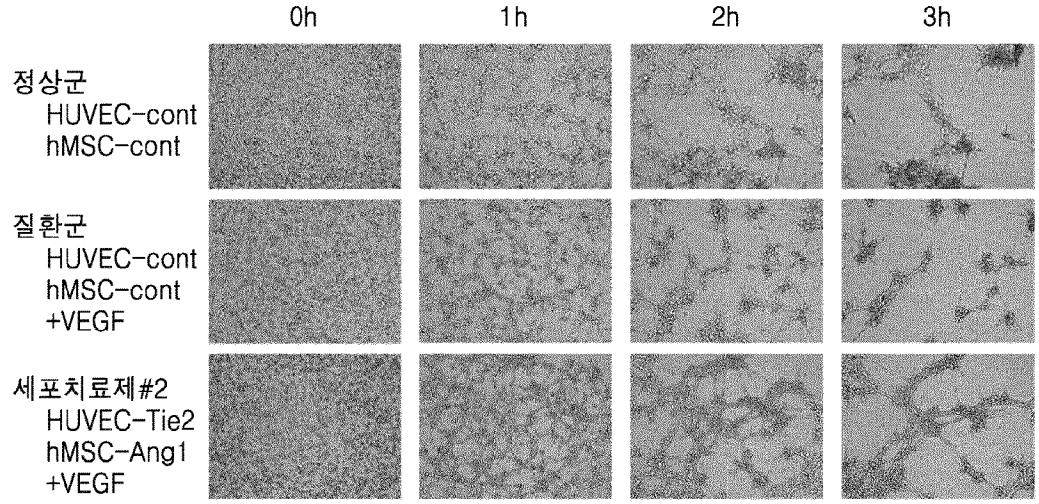
HUVEC-Tie2
hMSC-Ang1
+VEGF



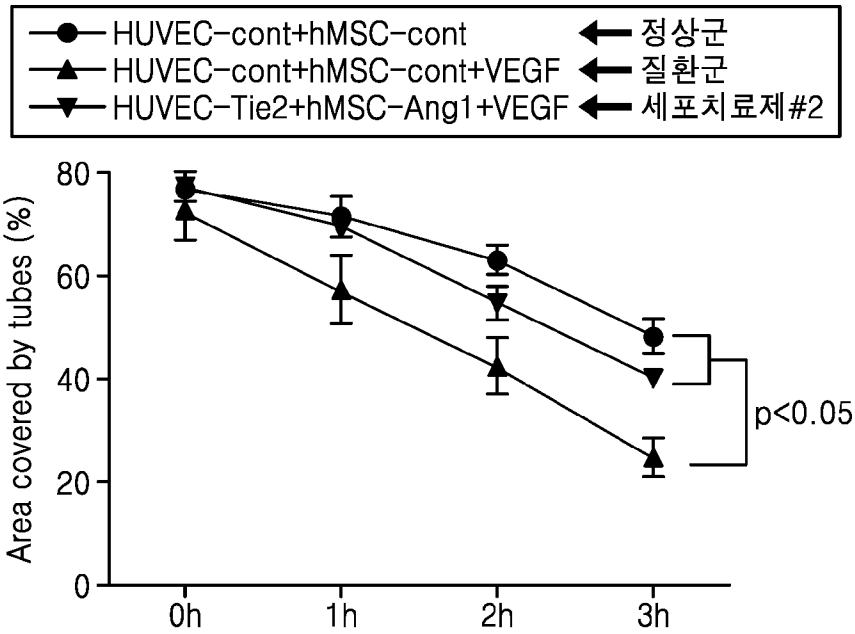
[도7]


HUVEC-cont+hMSC-cont
HUVEC-cont+hMSC-cont+VEGF
HUVEC-Tie2+hMSC-Ang1+VEGF
p<0.05
p<0.05
Crystal violet absorbance (595nm)
0.6
0.4
0.2
0.0
정상군
질환군
세포치료제#2

[도8]


0h
1h
2h
3h
정상군
HUVEC-cont
hMSC-cont
질환군
HUVEC-cont
hMSC-cont
+VEGF
세포치료제#2
HUVEC-Tie2
hMSC-Ang1
+VEGF

[도9]


HUVEC-cont+hMSC-cont
HUVEC-cont+hMSC-cont+VEGF
HUVEC-Tie2+hMSC-Ang1+VEGF
정상군
질환군
세포치료제#2
Area covered by tubes (%)
80
60
40
20
0
0h
1h
2h
3h
p<0.05

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/009970

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/51(2015.01)i; **A61P 27/02**(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)

A61K 35/51(2015.01); A61K 45/00(2006.01); A61K 49/00(2006.01); A61K 9/00(2006.01); C07K 16/40(2006.01); C12Q 1/686(2018.01)

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: Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2), 혈관내피세포(endothelial cell), 망막(retina), 혈관신생(angiogenesis), Ang1, 치료(therapy)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2018-0044432 A1 (AERPIO THERAPEUTICS, INC.) 15 February 2018 (2018-02-15) See abstract; and paragraph [0019].	1-15,17
A	CAI, Yuqi et al. Constitutive active mutant TIE2 induces enlarged vascular lumen formation with loss of apico-basal polarity and pericyte recruitment. Scientific Reports. 26 August 2019 (online publication date), vol. 9, article no. 12352, pp. 1-12. See abstract; page 2; and figure 5.	1-15,17
A	NGUYEN, Quan Dong et al. The Tie2 signaling pathway in retinal vascular diseases: a novel therapeutic target in the eye. International Journal of Retina and Vitreous. 13 October 2020 (online publication date), vol. 6, article no. 48, pp. 1-11. See entire document.	1-15,17
A	US 2020-0347436 A1 (MANNIN RESEARCH INC.) 05 November 2020 (2020-11-05) See entire document.	1-15,17
A	CN 106994185 A (HE, Yulong) 01 August 2017 (2017-08-01) See entire document.	1-15,17

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
"T" 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	Date of mailing of the international search report
10 October 2024	**14 October 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	황창모. 면역회피 만능줄기세포 기반 습성황반변성 세포치료제 개발. 최종보고서. 26 February 2024, pp. 1-41 (HWANG, Chang Mo. Development of hypo-immune induced pluripotent stem cell-based cell therapy for wet aged macular degeneration. Final Report). Retrieved from <URL: https://scienceon.kisti.re.kr/srch/selectPORSrchReport.do?cn=TRKO202400000271&SITE=CLICK>. See pages 20-27.	1-15,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/009970

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/009970

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.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 16 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/009970

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2018-0044432 A1	15 February 2018	CN 104066448 A	24 September 2014
		CN 107080843 A	22 August 2017
		EP 2766044 A1	20 August 2014
		EP 2766044 B1	11 December 2019
		EP 3501536 A1	26 June 2019
		JP 2014-532072 A	04 December 2014
		JP 2016-210811 A	15 December 2016
		JP 2016-210812 A	15 December 2016
		JP 2018-131466 A	23 August 2018
		JP 2018-131467 A	23 August 2018
		JP 6259503 B2	10 January 2018
		US 10329357 B2	25 June 2019
		US 2013-0095105 A1	18 April 2013
		US 2015-0232575 A1	20 August 2015
		US 2020-0010565 A1	09 January 2020
		US 2020-0231703 A1	23 July 2020
		US 8999325 B2	07 April 2015
		WO 2013-056233 A1	18 April 2013
US 2020-0347436 A1	05 November 2020	US 2016-0000871 A1	07 January 2016
		US 2017-0314063 A1	02 November 2017
		US 2019-0256889 A1	22 August 2019
		US 9719135 B2	01 August 2017
CN 106994185 A	01 August 2017	CN 106994185 B	06 April 2021
		CN 113171458 A	27 July 2021

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/009970

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/51(2015.01)i; **A61P 27/02**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/51(2015.01); A61K 45/00(2006.01); A61K 49/00(2006.01); A61K 9/00(2006.01); C07K 16/40(2006.01); C12Q 1/686(2018.01)

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: Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2), 혈관내피세포(endothelial cell), 망막(retina), 혈관신생(angiogenesis), Ang1, 치료(therapy)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2018-0044432 A1 (AERPIO THERAPEUTICS, INC.) 2018.02.15 요약; 단락 [0019] 참조.	1-15,17
A	CAI, YUQI 등, 'Constitutive active mutant TIE2 induces enlarged vascular lumen formation with loss of apico-basal polarity and pericyte recruitment', Scientific Reports, 2019.08.26(온라인 공개일), 9권, article no. 12352, 페이지 1-12 요약; 페이지 2; 도면 5 참조.	1-15,17
A	NGUYEN, QUAN DONG 등, 'The Tie2 signaling pathway in retinal vascular diseases: a novel therapeutic target in the eye', International Journal of Retina and Vitreous, 2020.10.13(온라인 공개일), 6권, article no. 48, 페이지 1-11 전체 문헌 참조.	1-15,17
A	US 2020-0347436 A1 (MANNIN RESEARCH INC.) 2020.11.05 전체 문헌 참조.	1-15,17
A	CN 106994185 A (HE, YULONG) 2017.08.01 전체 문헌 참조.	1-15,17

☑ 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
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년10월10일(10.10.2024)	**2024년10월14일(14.10.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/009970

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	황창모, '면역회피 만능줄기세포 기반 습성황반변성 세포치료제 개발', 최종보고서, 2024.02.26, 페이지 1-41, <URL: https://scienceon.kisti.re.kr/srch/selectPORSrchReport.do?cn=TRKO202400000271&SITE=CLICK> 페이지 20-27 참조.	1-15,17

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/009970

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/009970

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: **16**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 16은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

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.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/009970

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2018-0044432 A1	2018/02/15	CN 104066448 A	2014/09/24
		CN 107080843 A	2017/08/22
		EP 2766044 A1	2014/08/20
		EP 2766044 B1	2019/12/11
		EP 3501536 A1	2019/06/26
		JP 2014-532072 A	2014/12/04
		JP 2016-210811 A	2016/12/15
		JP 2016-210812 A	2016/12/15
		JP 2018-131466 A	2018/08/23
		JP 2018-131467 A	2018/08/23
		JP 6259503 B2	2018/01/10
		US 10329357 B2	2019/06/25
		US 2013-0095105 A1	2013/04/18
		US 2015-0232575 A1	2015/08/20
		US 2020-0010565 A1	2020/01/09
		US 2020-0231703 A1	2020/07/23
		US 8999325 B2	2015/04/07
		WO 2013-056233 A1	2013/04/18
US 2020-0347436 A1	2020/11/05	US 2016-0000871 A1	2016/01/07
		US 2017-0314063 A1	2017/11/02
		US 2019-0256889 A1	2019/08/22
		US 9719135 B2	2017/08/01
CN 106994185 A	2017/08/01	CN 106994185 B	2021/04/06
		CN 113171458 A	2021/07/27