

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0040864 (43) 공개일자 2012년04월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/24 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(21) 출원번호 10-2010-0102352		(72) 발명자 서준규 서울특별시 강남구 영동대로 230, 우성 아파트 3동 803호 (대치동)
(22) 출원일자 2010년10월20일 심사청구일자 2010년10월20일		김우진 서울특별시 성북구 길음로 16, 래미안3차아파트 609동 1504호 (길음동) (뒷면에 계속)
		(74) 대리인 양부현

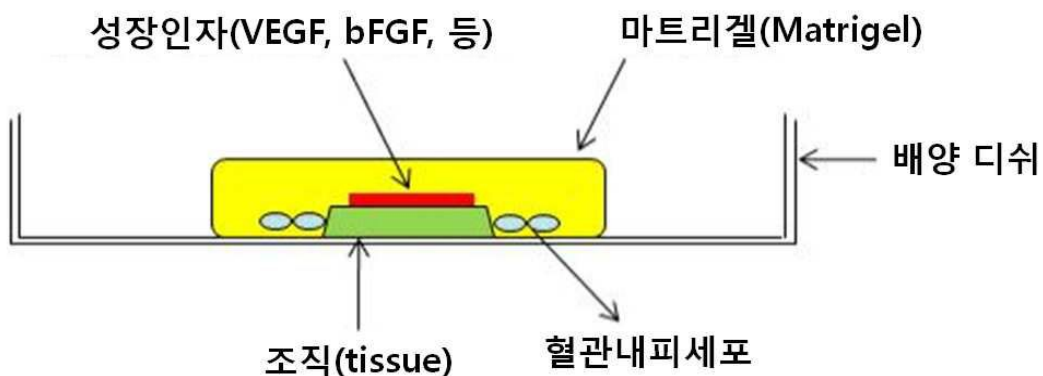
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 매트릭젤을 이용한 혈관내피세포 분리방법

(57) 요약

본 발명은 다음의 단계를 포함하는 혈관내피세포(vascular endothelial cells)의 분리방법을 제공한다: (a) 동물에서 조직을 적출하여 배양 디쉬에 위치시키는 단계; (b) 상기 적출된 조직을 매트릭젤(Matrigel)로 도포하여 상기 배양 디쉬 내의 배지에서 배양시키는 단계; 및 (c) 상기 매트릭젤 내의 조직으로부터 성장한 혈관내피세포를 분리하는 단계. 항체 반응과 같은 여러 반응을 통해 분리하는 종래기술에 비해, 본 발명의 방법은 조직을 배양 디쉬 내에서 간단한 배양 과정을 통해 분리할 수 있는 매우 효율적이고 경제적인 방법이고, 저-비용으로 많은 양의 혈관내피세포를 용이하게 획득할 수 있는 방법이다. 따라서, 본 발명은 조직-특이적인 혈관내피세포를 효과적으로 분리함으로써, 혈관내피세포의 조절기전의 연구 및 혈관신생억제제 같은 신약개발 또는 혈관신생 부전-연관 질환의 치료에 적용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

류지간

인천광역시 연수구 청능대로 175, 우성 1차 아파트
107동 1802호 (연수동)

신선화

인천광역시 중구 서해대로 366, 정석빌딩 A동 2층
241호 인하대의대 임상의학연구소 음경혈관신경재
생연구실 (신흥동3가)

윤국남

인천광역시 중구 서해대로 366, 정석빌딩 A동 2층
241호 인하대의대 임상의학연구소 음경혈관신경재
생연구실 (신흥동3가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090083072

부처명 교육과학기술부

연구사업명 도약연구지원사업 (구. 국가지정연구실사업)

연구과제명 질환-특이 동물모델에서 국소적 혈관생성-신경재생 제어기술을 이용한 음경기능 재생

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2007.07.01 ~ 2012.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A090520

부처명 보건복지가족부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 발기부전 치료제 개발에 있어서의 angiotensin-1의 작용기전 연구

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2009.05.01 ~ 2010.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 혈관내피세포(vascular endothelial cells)의 분리방법:

- (a) 동물에서 조직을 적출하여 배양 디쉬에 위치시키는 단계;
- (b) 상기 적출된 조직을 마트리젤(Matrigel)로 도포하여 상기 배양 디쉬 내의 배지에서 배양시키는 단계; 및
- (c) 상기 마트리젤 내의 조직으로부터 성장한 혈관내피세포를 분리하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 동물은 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 조직은 심장, 폐, 뇌 또는 음경으로부터 유래된 조직인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 마트리젤은 세포성장인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 세포성장인자는 섬유아세포 성장인자-1(fibroblast growth factor-1, FGF-1), FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, 표피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 케라티노사이트 성장인자(keratinocyte growth factor, KGF), hepatocyte growth factor, HGF), 형질전환 성장인자(transforming growth factor- α , TGF- α), TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, 혈소판-유래 성장인자(Platelet Derived Growth Factor, PDGF), 엔지오포이에틴 1(angiopoietin 1), 엔지오포이에틴 2, 에리트로포이에틴(erythropoietin), 뉴로필린, IGF-1, 오스테오폰틴, 플레이오토로핀, 액티빈, 엔도텔린-1 및 혈관내피 성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성장인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 혈관내피세포는 세포 이동능을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 혈관내피세포는 관 형성능(tube formation)을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

마트리젤(Matrigel)을 유효성분으로 포함하는 혈관내피세포 분리용 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 매트릭셀은 세포성장인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 세포성장인자는 FGF-1, FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, EGF, KGF, HGF, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, PDGF, 엔지오포이에틴 1, 엔지오포이에틴 2, 에리트로포이에틴, 뉴로필린, IGF-1, 오스테오폰틴, 플레이오토로핀, 액티빈, 엔도텔린-1 및 VEGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성장인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 마트로젤을 이용하여 엑스-비보(*ex-vivo*) 조건에서 혈관내피세포를 효율적으로 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 혈관은 혈액을 보내는 가느다란 관이다. 혈관은 인체의 구석구석 모든 기관 및 세포들에 산소와 영양분을 공급하는 생명체에 있어서 가장 중요한 구조물 중 하나이다. 사람의 혈관의 총 길이는 120,000 km이며, 동맥, 정맥, 모세혈관으로 나뉜다. 동맥은 산소나 영양을 함유한 혈액을 심장에서 온몸으로 보내는 관으로, 점차 가늘어져 모세혈관으로 이행하며, 여기에서 조직과의 사이에 물질 교환을 하고, 다시 모여 정맥이 되어 심장으로 돌아간다. 따라서 동맥이 흐르는 혈액은 압력이 높고, 굵은 동맥일수록 혈액이 흐르는 속도도 빠르기 때문에 이들에 적응하여 동맥관벽도 정맥과는 다른 발달을 하고 있다. 동맥 내의 혈액에는 상완부에서 최저 80 mmHg, 최고 120 mmHg의 혈압이 관찰되는데, 대동맥에서 가장 높고, 가느다란 동맥일수록 낮아진다. 혈압은 혈액이 심장에서 밀려나올 때의 압력에 의한 것이다. 어떤 원인으로 탄력성이 나빠지면 관벽은 확장되지 못하고 저항하게 되어 혈압은 비정상적으로 높아진다(동맥 경화증).

[0003] 혈관은 혈관내피세포가 관을 형성하여 이루어진 것으로, 이 혈관내피세포는 구조적 및 환경적으로 기관마다 많은 차이점이 있는데, 이는 각 기관별 환경 및 기관 주변에 존재하는 세포들의 차이로 인하여 혈관에서 발현되는 유전자들의 발현이 달라지고 그로 인하여 구성 단백질들이 달라지기 때문이다. 예를 들어, 뇌혈관의 경우, 혈액으로부터의 이물질이나 영양분등이 쉽게 뇌조직 안으로 침투 또는 전달되는 것을 방지하기 위해 밀착연접단백질(tight junction protein) 등의 많은 방어벽 역할을 하는 단백질들이 무수히 발현되고 있다. 또한, 음경의 경우에는, 음경은 일정한 구조를 가지기는 하나, 그 크기가 자유롭게 조절이 되어야 하므로, 다른 기관에 비해 혈관의 형태가 비정형화되어 있다고 볼 수 있다. 즉, 각 기관들은 그 주위 환경과 역할에 따라 혈관도 다른 구조를 가지게 된다는 것이다.

[0004] 조직 특이적 혈관내피세포를 분리하는 기존의 방법들을 살펴보면 대부분 혈관내피세포 특이적 단백질을 타겟으로 해서 그 단백질에 항원-항체 반응을 시킨 후 항체에 붙여진 세포들을 분리하는 것이 일반적이다. 그러나, 항체는 하나의 단백질에만 특이적인 반응을 하지 않는다. 따라서, 다른 세포들도 오염이 될 수 있는 단점을 가지고 있다. 또한, 항체는 상당히 고가의 시약이므로, 많은 비용이 든다. 또한, 기존의 방법은 혈관내피세포를 분리한 이후에도 극소량의 세포만이 분리되기 때문에, 적절량의 세포를 획득하기까지 오랜 시간이 필요하였다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명

의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명자들은 조직-특이적 혈관내피세포를 분리하는 신규한 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 마트리젤을 이용하여 보다 특이적이고 경제적인 혈관내피세포를 효율적으로 분리할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 본 발명의 목적은 혈관내피세포(vascular endothelial cells)의 분리방법을 제공한다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 혈관내피세포 분리용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 혈관내피세포(vascular endothelial cells)의 분리방법을 제공한다: (a) 동물에서 조직을 적출하는 단계; (b) 상기 적출된 조직을 마트리젤(Matrigel)로 도포하여 상기 배양 디쉬 내의 배지에서 배양시키는 단계; 및 (c) 상기 마트리젤 내의 조직으로부터 성장한 혈관내피세포를 분리하는 단계.
- [0011] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 마트리젤(Matrigel)을 유효성분으로 포함하는 혈관내피세포 분리용 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명자들은 조직-특이적 혈관내피세포를 분리하는 신규한 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 마트리젤을 이용하여 보다 특이적이고 경제적인 혈관내피세포를 효율적으로 분리할 수 있음을 발견하였다.
- [0013] 마트리젤은 EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스 육종세포에 의해 배출되는 젤라틴성 단백질 복합체에 대한 상표명(BD Biosciences)이다. 이 복합체는 많은 조직에서 발견되는 복잡한 세포외 환경을 제공함으로써 세포생물학자들에 의해 세포 배양을 위한 기질로서 이용되고 있다. 마트리젤에서 배양된 세포들은 이를 이용하지 않으면 실험실 조건에서 관찰하기 어려운 복잡한 세포내 행동을 연구하는 데 유용하다. 예를 들어, 마트리젤-코팅된 표면에서 배양된 내피세포는 플라스틱 표면에서의 배양과는 다르게 얽힌 거미줄-유사 네트워크를 나타낸다. 이러한 네트워크는 혈액을 포함하는 살아있는 조직을 가득채운 미세 모세혈관 시스템을 나타내는 지시자(suggestive)이다. 그러므로, 내피세포가 상술한 네트워크를 구축하는 과정은 생물학 연구자들에게 매우 흥미로운 주제로서, 마트리젤을 이용하여 이를 관찰하는 것이 가능하다.
- [0014] 몇몇 예에서, 연구자들은 두꺼운 3-차원 젤을 제조하기 위해 더 많은 용량의 마트리젤을 이용하는 것을 선호한다. 두꺼운 젤을 이용하는 장점은 세포가 젤의 표면으로부터 안쪽으로 이동하는 것을 유도할 수 있다는 것이다. 이러한 이동 패턴은 종양세포 전이의 모델로서 연구되고 있다.
- [0015] 한편, 약학 분야에서 마트리젤은 약물 분자를 스크리닝 하는데 이용된다. 전형적인 실험은 시험 분자를 마트리젤에 첨가하여 세포 반응(cellular behavior)을 관찰하는 것으로 구성된다. 내피세포 네트워크 형성을 촉진시키는 시험 분자들은 조직 재생 치료법을 위한 후보들인 반면에, 내피세포 네트워크 형성을 억제시키는 시험 분자들은 항-암 치료법을 위한 후보들이다. 또한, 종양세포 이동을 억제시키는 시험 분자들은 항-암 약물로서의 활성(potential)을 가질 수 있다. 일반적으로 마트리젤은 암 약물 발견 프로그램의 일부로서 설치류에서 인간 종양 이종이형체(human tumor xenografts)를 제조하기 위해 이용되고 있다.
- [0016] 복잡한 세포 행동을 자극하는 마트리젤의 기능은 이종적 조성물의 결과이다. 마트리젤의 주요 구성성분은 부착성 펩타이드 서열을 가진 배양된 세포에 존재하는 라미닌 및 콜라겐 같은 구조 단백질들이다. 또한, 마트리

겔은 많은 세포의 분화 및 증식을 촉진시키는 성장인자들을 포함한다. 더욱이, 마트리겔은 작은 양의 많은 다른 단백질들을 포함하고 이들의 정확한 구성은 알려져 있지 않다.

[0017] 또한, 마트리겔은 배아줄기세포 배양에서 부착 기질로서 이용되고 있다. 배아줄기세포가 지지세포(feeder cells)의 부재 하에서 배양되는 경우, 마트리겔 같은 세포의 매트릭스 구성성분들이 전능성 또는 비분화된 상태 [자기-재생산(self-renewal)]을 유지하기 위해 필요하다.

[0018] 본 발명자는 마트리겔을 이용하여 특이적 혈관내피세포를 효율적으로 분리하는 방법을 규명하였다. 상술한 마트리겔의 특성은 혈관내피세포를 분리하는 데 매우 효율적으로 이용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 혈관내피세포의 제조방법은 종래 기술과 비교하여 매우 간편하고 효율이 우수하다.

[0019] 보다 상세하게는, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 혈관내피세포(vascular endothelial cells)의 분리방법을 제공한다: (a) 동물에서 조직을 적출하여 배양 디쉬에 위치시키는 단계; (b) 상기 배양 디쉬 내 적출된 조직을 혈관내피세포 성장과 관련된 인자들이 포함된 마트리겔(Matrigel)로 도포하여 실온 또는 배양기(culture incubator)에서 경화시키는 단계; (c) 상기 배양 디쉬에 마트리겔이 잠기도록 배지를 첨가하여 1 내지 2주 동안 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양기에서 배양하는 단계; (d) 1-2주 후 마트리겔 내에 생성된 혈관내피세포를 육안으로 확인하고 상기 마트리겔을 튜브로 옮겨 마트리겔을 녹이는 단계; (e) 상기 마트리겔로부터 조직을 제거하고 효소(바람직하게는, 트립신-EDTA)를 처리하여 방출된 혈관내피세포를 수거하는 단계; 및 (f) 분석을 위해 상기 혈관내피세포를 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양기에서 배양하는 단계.

[0020] 본 명세서의 용어 “혈관내피세포(vascular endothelial cells)”는 혈관의 내피를 구성하는 세포를 의미하며, PECAM, CD31, α-SMA, CD34, VE 카드헤린, eNOS 등의 마커를 발현시키는 세포를 말한다.

[0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 동물은 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 포유동물이고, 보다 바람직하게는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이를 포함하며, 보다 더 바람직하게는 인간 또는 마우스를 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 동물로부터 적출될 수 있는 조직은 내피세포를 포함하는 조직을 포함하고, 보다 바람직하게는 심장, 간, 비장, 췌장, 방광, 위, 장, 신장, 대뇌, 대동맥, 뇌후엽, 폐 또는 음경 조직을 포함하며, 보다 더 바람직하게는 심장, 대동맥(aorta), 대뇌, 뇌후엽, 폐 또는 음경 조직을 포함한다.

[0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 마트리겔은 세포성장인자를 포함한다. 보다 바람직하게는, 본 발명에서 이용될 수 있는 세포성장인자는 섬유아세포 성장인자-1(fibroblast growth factor-1, FGF-1), FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, 표피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 케라티노사이트 성장인자(keratinocyte growth factor, KGF), hepatocyte 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 형질전환 성장인자(transforming growth factor-α, TGF-α), TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, 혈소판-유래 성장인자(Platelet Derived Growth Factor, PDGF), 엔지오포이에틴 1(angiopoietin 1), 엔지오포이에틴 2, 에리트로포이에틴(erythropoietin), 뉴로필린, IGF-1, 오스테오펀틴, 플레이오토로핀, 액티빈, 엔도텔린-1 및 혈관내피 성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성장인자를 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명에서 이용될 수 있는 세포성장인자는 VEGF 또는 bFGF이다.

[0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지는 혈관내피세포의 성장에 필요한 성분인 세포성장인자 이외에 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 성분을 포함할 수 있다. 본 발명의 배지를 이루는 기본배지는 당업계에서 통상적인 배지, 예컨대 DMEM[Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., virology 8: 396(1959)], Eagle's MEM[Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130: 142(1959)], α-MEM[Stanner, C.P. et al., NAT. New Biol. 230: 52(1971)], Iscove's MEM[Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)], 199 medium[Morgan et al., Proc. Soc. Exp. BioMed., 73: 1(1950)], CMRL 1066, RPMI 1640[Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199: 519(1967)], F12[Ham, Pro. Natl. Acad. Sci. USA 53: 288(1965)], F10[Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29: 515(1963)], DMEM 및 F12의 혼합물[Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102: 225(1980)], Waymouth's MB752/1[Waymouth, C. J. Natl. Cancer Inst. 22: 1003(1959)], 이스코브 변형 둘베코 배지(Iscove's modified Dulbecco's medium), 이스코브 변형 피셔 배지 또는 이스코브 변형 이글 배지, McCoy's 5A [McCoy, T. A., et al, Pro. soc. Exp. Bio. Med. 100: 115(1959)], MCDB의 시리즈[Ham, R.G et al., In Vitro 14: 11(1978)], AIM-V 배지 및 이의 변형배지를 포함한다. 배지의 상세한 설명은 R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, Alan R. Liss, Inc., New York에서 알 수 있으며, 상기 내용은 본 명세서에 참조로 포함된다. 또한, 본 발명의 배

지는 항생제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 예를 들어 페니실린, 스트렙토마이신, 젠타마이신, 네오마이신, 폴리믹신 또는 암포테리신 B를 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 매트릭셀을 이용하여 혈관내피세포를 분리하고자 하는 본 발명은 배지 내에 매트릭셀을 포함하여 혈관내피세포를 분리할 수 있으며, 이때 매트릭셀만을 사용할 수도 있고 세포성장인자를 함께 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0025] 도 1에 기재된 바와 같이, 배양 디쉬 내에 매트릭셀에 임베드된 조직을 위치시키고, 이에 배양 배지를 첨가하여 1-2주 동안 배양시킴으로써, 매우 간편하고 효율적으로 혈관내피세포를 분리/수득할 수 있다. 본 발명의 매트릭셀을 이용하여 혈관내피세포를 분리하는 방법은 조직의 기원과 종류에 따른 배양 방법, 배지의 종류와 배지에 포함되는 성분 등 당 분야에서 잘 알려진 요소에 따라 다양한 형태로 응용될 수 있다. 즉, 도 1의 모식도와 같은 방법으로 예시할 수 있으나, 본 발명의 목적에 적합하게 다양한 응용도 가능하며 이는 당업자에게 자명할 것이다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 분리된 혈관내피세포는 엑스-비보 또는 인 비트로에서 세포 이동능을 가지고, 혈관형성능(tube formation)을 가진다(참고: 도 7 및 도 8).
- [0027] 본 발명에서 혈관내피세포의 확인은 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, CD31 또는 α -SMA 단백질 양의 변화는 FACS(flow cytometry), 면역염색, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 웨스턴 블롯팅, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0029] 예를 들어, 본 발명의 방법이 FACS 방법에 따라 실시되는 경우, 본 발명은 (i) 분리된 혈관내피세포를 배양하고 고정하는 단계; (ii) 일차항체로서의 타겟(예를 들어, CD31, α -SMA)에 대한 항체와 상기 세포를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합되거나 또는 형광물질이 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성 또는 형광물질의 활성을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0030] 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명은 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 타겟에 대한 항체와 상기 세포 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0032] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.
- [0033] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 및 사이토크롬 P₄₅₀을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), σ -페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate)와 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing

antibody)로서 본 발명의 타겟에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, 과립형성 인자 단백질에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.

[0035] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화합물(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P₄₅₀), 방사능물질((예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.

[0036] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 본 발명의 타겟의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

[0037] 또한, 혈관내피세포에 대한 바이오마커로서 CD31 또는 α -SMA 유전자의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufman et al., *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 또는 인시투(*in situ*) 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.

[0038] RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시료를 처리한 세포에서 총 RNA를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 제1쇄 cDNA를 제조한다. 이어, 제1쇄 cDNA를 주형으로 이용하고, CD31 또는 α -SMA 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 CD31 또는 α -SMA 유전자의 발현량 변화를 측정한다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0040] (a) 본 발명은 마트리젤을 이용한 혈관내피세포 분리방법에 대한 것이다.

[0041] (b) 항체 반응과 같은 여러 반응을 통해 분리하는 종래기술에 비해, 본 발명의 방법은 조직을 배양 디쉬 내에서 간단한 배양 과정을 통해 분리할 수 있는 매우 효율적이고 경제적인 방법이다.

[0042] (c) 또한, 본 발명의 방법은 저-비용으로 많은 양의 혈관내피세포를 용이하게 획득할 수 있는 방법이다.

[0043] (d) 본 발명은 조직-특이적인 혈관내피세포를 효과적으로 분리함으로써, 혈관내피세포의 조절기전의 연구 및 혈관신생억제제 같은 신약개발 또는 혈관신생 부전-연관 질환의 치료에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 엑스 비보(*Ex vivo*) 조직으로부터 마트리젤을 이용하여 혈관내피세포를 분리하는 방법을 나타내는 모식도이다.

도 2A와 도 2B는 조직의 배양시 혈관내피세포가 조직 밖으로 분리되는 것을 보여준다.

도 3A는 심장과 연결되어 있는 대동맥(aorta) 조직으로부터 혈관내피세포를 분리한 결과이며, 도 3B는 대뇌 조직으로부터 혈관내피세포를 분리한 결과를 나타낸다.

도 4A는 폐 조직으로부터 혈관내피세포를 분리한 결과이며, 도 4B는 음경 조직으로부터 혈관내피세포 분리한 결

과를 나타낸다.

도 5A는 뇌후엽(olfactory lobe) 조직으로부터 혈관내피세포를 분리한 결과이며, 도 5B는 심장조직으로 혈관내피세포를 분리한 결과를 나타낸다.

도 6A는 음경 조직으로부터 혈관내피세포를 분리한 뒤 혈관내피세포만 다시 배양한 후 2, 7, 10 일 쯤 세포들의 성장을 확인한 결과로, 세포의 형태는 HUVEC과 유사하다.

도 7는 분리한 세포가 혈관내피세포임을 혈관내피세포 특이적 단백질인 PECAM-1 항체를 이용하여 확인한 결과이다.

도 8은 분리한 혈관내피세포의 관(tube) 형성능을 살펴본 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0046] 실시예

[0047] 실시예 1: 엑스 비보 상에서 조직-특이적 혈관내피세포의 분리

[0048] 대동맥(aorta), 대뇌, 폐, 음경, 뇌후엽 조직, HUVEC(human umbilical vein endothelial cells; 양성 대조군)이 이용되었다. 10% FBS(Fetal bovine serum), 항생제(antibiotics) 및 50 ng/ml bFGF(Carl Zeiss, Germany)가 첨가된 배지를 사용하였다. 마트리젤, VEGF(Sigma-Aldrich, MO, USA), bFGF이 사용되었다.

[0049] 0.3 cm³ 크기의 사람 또는 쥐(그 외 모든 고등생물체) 조직을 배양 디쉬에 놓았다. 준비된 조직을 50 ng/ml의 VEGF 혹은 bFGF 등의 혈관내피세포 성장과 관련된 단백질이 포함된 마트리젤(50μl)로 도포한 다음 실온 또는 배양기(culture incubator)에서 약 10분 동안 유지시켜 마트리젤이 굳게 하였다. 마트리젤 층이 모두 잠기도록 배지를 첨가하여 1 내지 2주 정도 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양기에서 배양하였다. 배지는 2 내지 3일 간격으로 교환하였다. 1-2주 후에 마트리젤 내에 스프라우팅(sprouting)된 혈관내피세포를 확인하고 조직이 포함된 마트리젤을 1.5 ml 튜브로 옮겼다. 1.5 ml 튜브를 얼음 속에서 약 10분 동안 배양하여 마트리젤을 녹였다. 마트리젤이 녹으면, 조직을 제거하고 1.5 ml 튜브 안에 있는 혈관내피세포에 100 μl 트립신-EDTA(Sigma-Aldrich, MO, USA)를 첨가한 다음 파이프 또는 핀셋(또는 칼)을 사용하여 조직 밖으로 방출된 세포를 분리하였다.

[0050] 단일 세포로 된 조직-특이적 혈관내피세포를 60 mm 디쉬로 옮긴 다음 배지를 첨가하여 분석을 수행할만한 개체 수가 될 때까지 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0051]

[0052] 실시예 2: 내피세포의 확인

[0053] 인간 또는 마우스의 내피세포를 사용하였으며, 콜라겐 또는 젤라틴 등의 ECM(extra cellular matrix) 코팅된 60 mm 디쉬가 필요하다. 10 내지 20% FBS, 항생제 및 50 ng/ml bFGF 첨가된 배지를 사용하였다. 3.7% 파라포름알데하이드, FITC-항-CD31 항체(BioLegend), 항-αSMA 항체(Santa-Cruz), 텍사스-레드-라벨된-항-래빗 항체(Texas-Red-labeled-anti-rabbit antibody; Molecular Probe) 및 FACS 튜브가 사용되었다.

[0054] 약 2 X 10⁵ 개의 조직 특이적 혈관내피세포를 콜라겐 코팅된 60 mm 디쉬에 분주한 후, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 하룻밤 동안 배양하였다. 24시간 후에 혈관내피세포들을 트립신-EDTA를 이용하여 수거한 후 3.7% 파라포름알데하이드에서 약 5분 동안 고정시켰다. 고정된 혈관내피세포들을 세척 완충액(2% FBS + 0.1% Sodium Azide in PBS)에 한번 세척한 후에 일차항체(항-SMA)를 1:100 비율로 얼음 위에서 1시간 동안 반응시켰다. 혈관내피세포들을 세척 완충액으로 두 번에 걸쳐서 세척한 다음, 이차항체(Texas-Red-labeled-anti-rabbit antibody)를 1:200 비율로 얼음 위에서 1시간 동안 반응시켰다. 이차항체를 반응시킬 때 FITC-항-CD31 항체를 1:100 비율로 첨가하여 함께 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 세척 완충액으로 세 번에 걸쳐서 세척한 후에 혈관내피세포들

을 FACS 튜브로 옮긴 다음, 유세포분석기(FACStar flow cytometry)를 통하여 CD31과 α -SMA의 발현 정도를 분석하였다.

[0055] 실시예 3: 튜브 형성 분석(Tube formation assay)

[0056] 인간 또는 마우스의 내피세포를 사용하였으며 매트릭셀이 필요하다. 10-20% FBS, 항생제 및 50 ng/ml bFGF 첨가된 배지를 사용하였다.

[0057] 30 mm 디쉬 바닥을 200 μ l의 매트릭셀로 코팅한 후 37°C에서 30분 동안 매트릭셀을 굳혔다. 30 mm 디쉬에 약 2×10^5 개의 조직 특이적 혈관내피세포를 심었다. 1-72시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 하룻밤 동안 배양하면서 혈관형성(tube formation)을 관찰하였다. 각 관찰 시간마다 현미경하에서 이미지를 캡처하거나 염색 버퍼를 이용해서 혈관내피세포를 염색하여 현미경하에서 튜브 길이 및 면적을 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[0058] 실시예 4: 사람 또는 동물 조직으로부터 혈관내피세포 분리

[0059] 도 1의 모식도와 같이 각 기관에서 조직을 약 0.3 cm³의 크기로 절단하여 60 mm 디쉬에 놓은 후에 20 ng/ml의 VEGF 또는 bFGF가 들어간 약 50 μ l의 매트릭셀로 조직을 도포하였다. 매트릭셀로 도포된 조직은 혈관내피세포 배양액을 첨가한 후에 약 2주 동안 배양하였다(도 2, 왼쪽 사진). 약 2주의 기간에 걸쳐 배양하는 동안 조직으로부터 혈관내피세포의 줄기가 뻗어 나오는 것을 매일 관찰한 결과 시간이 지남에 따라 조직으로부터 매트릭셀로 혈관내피세포가 뻗어 나오는 것을 볼 수 있었다(도 2, 오른쪽 사진).

[0060] 실시예 5: 분리된 조직별 혈관내피세포의 확인

[0061] 약 2주 후에 조직을 제거한 다음에 조직(심장, 대동맥, 대뇌, 뇌후엽, 폐 또는 음경 조직)으로부터 뻗어 나온 혈관내피세포들은 트립신-EDTA를 사용하여 단일 세포로 만들어서 혈관내피세포 배양액(ECM, Sceincell)으로 배양을 하였다. 배양된 혈관내피세포들을 사람 특이적 혈관내피세포의 바이오마커인 CD31 항체로 면역염색 과정을 통하여 FACS 분석을 실시하여 분리된 세포들이 혈관내피세포인지를 분석하였다. 분리된 혈관내피세포에서 CD31 항체를 처리하지 않은 대조군(IgG control)과 비교하여 CD31 항체를 처리한 군에서 CD31의 발현이 증가함을 관찰하였다(도 3-6).

[0062] 실시예 6: 분리된 혈관내피세포의 이동

[0063] 혈관내피세포의 특징 중 하나인 세포이동을 상처치유분석(wound healing assay)로 24시간 후에 관찰하였다. 분리된 혈관내피세포의 활발한 세포의 이동을 가진다는 것을 알 수 있었다(도 7).

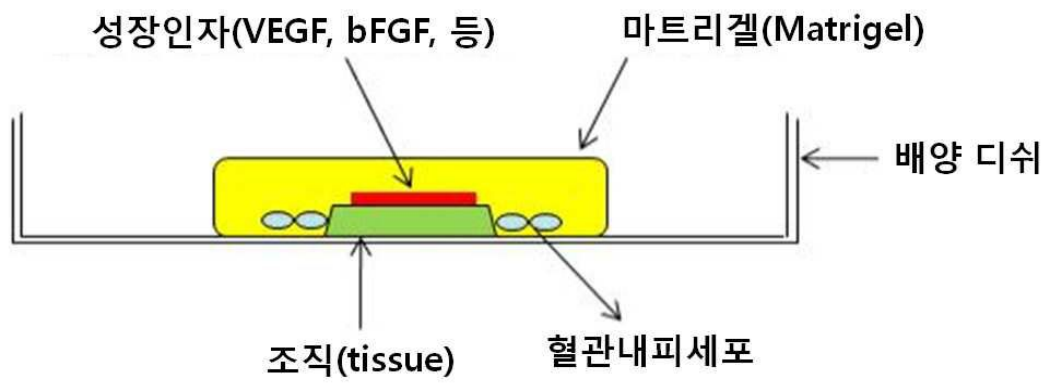
[0064] 실시예 7: 분리된 조직특이적 혈관내피세포의 혈관형성 (Tube formation)

[0065] 세포의 이동과 더불어 혈관형성은 혈관내피세포의 가장 큰 특징 중에 하나이다. 실제적으로 분리된 혈관내피세포가 혈관을 형성하는지를 매트릭셀-기반 인 비트로 혈관형성 분석(matrigel-based *in vitro* tube formation assay)를 통해 확인한 결과, 혈관 형성 네트워크를 가장 잘 형성시키는 것을 알 수 있었다(도 8).

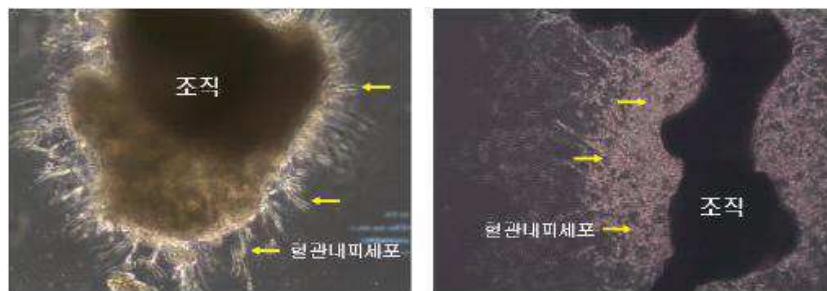
[0066] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명 의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

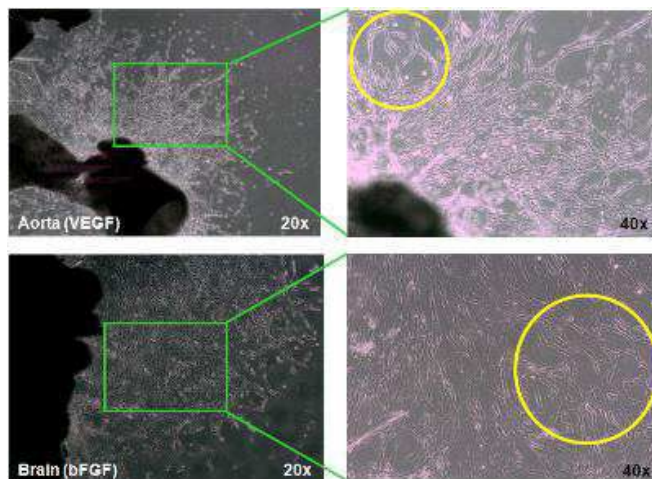
도면1



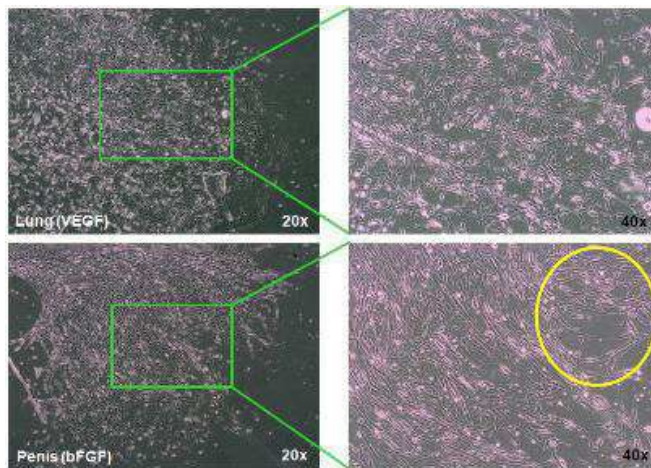
도면2



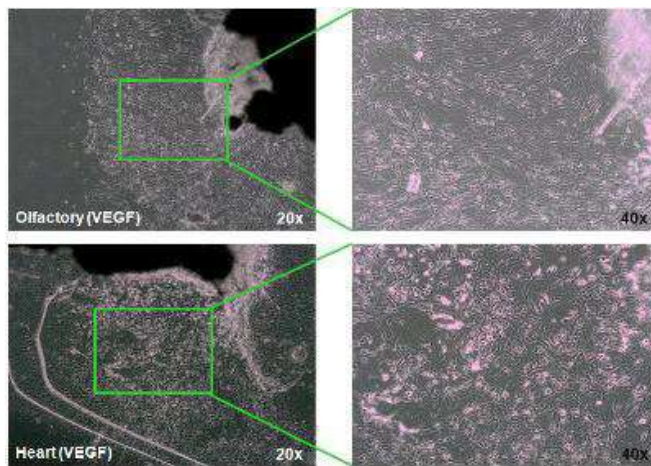
도면3



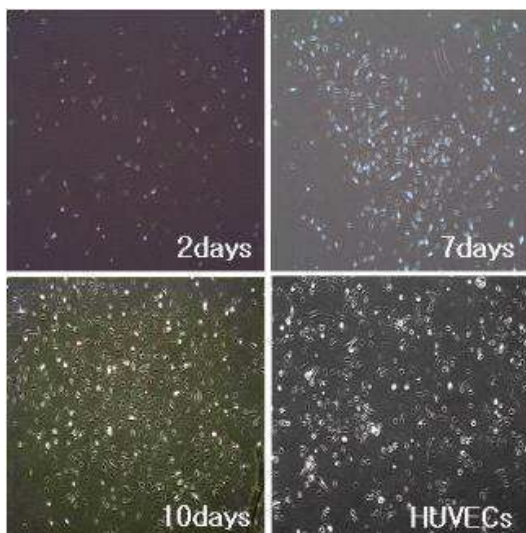
도면4



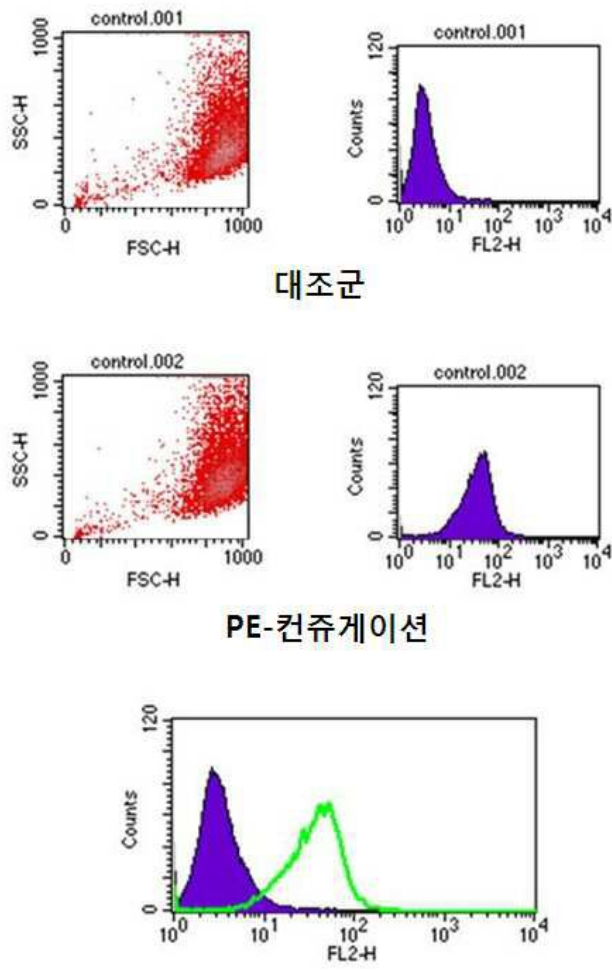
도면5



도면6



도면7



도면8

