

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2025 년 5 월 15 일 (15.05.2025)



(10) 국제공개번호

WO 2025/100963 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 35/44 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/017514

(22) 국제출원일:

2024 년 11 월 7 일 (07.11.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0152585 2023 년 11 월 7 일 (07.11.2023) KR

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

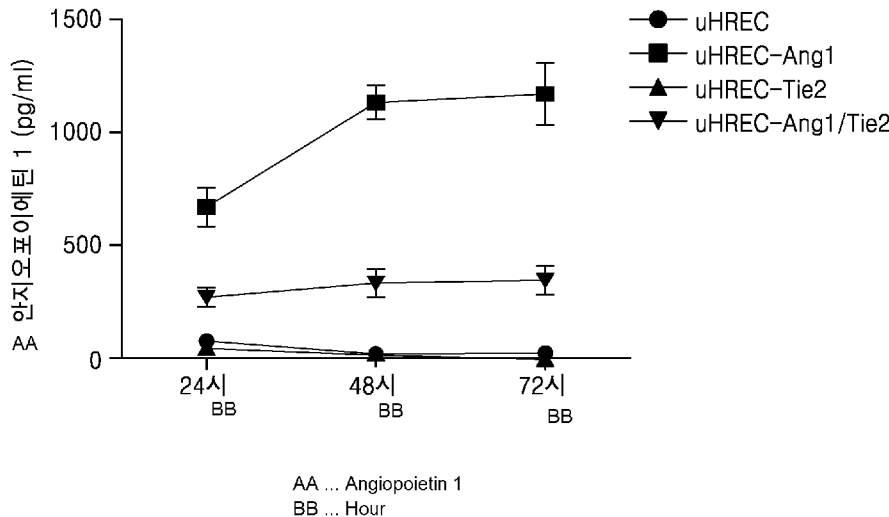
(72) 발명자: 황창모 (HWANG, Chang Mo); 05627 서울특별시 송파구 위례성대로4길 14, 102호 (KR). 이주용 (LEE, Joo Yong); 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (KR). 성영훈 (SUNG, Young Hoon); 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (KR). 김수미 (KIM, Su Mi); 06090 서울특별시 강남구 학동로 68길 29, 102동 1401호 (KR). 김윤전 (KIM, Yoon Jeon); 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (KR).

(74) 대리인: 특허법인더웨이브 (THEWAVE IP LAW FIRM); 06097 서울특별시 강남구 선릉로 602 6층 (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, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING INTRARETINAL ANGIOGENIC DISEASE, WHICH CONTAINS HUMAN RETINA-DERIVED VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS EXHIBITING REDUCED B2M EXPRESSION AND INCREASED TIE2 EXPRESSION

(54) 발명의 명칭: B2M 발현 감소 및 TIE 2 발현 증가된 인간망막유래 혈관내피세포를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: According to an aspect, a pharmaceutical composition for the prevention or treatment of an intraretinal angiogenic disease, which contains vascular endothelial cells exhibiting reduced expression or activity of beta-2 microglobulin (B2M) and increased expression or activity of tyrosine kinase receptor 2 (Tie2) compared to parent cells, as an active ingredient, induces stabilization of vascular endothelial cells and reduces vascular permeability even in a state of inflammation or over-expression of vascular endothelial growth factors (VEGF), so as to slow down or inhibit intraretinal angiogenesis, thereby preventing or treating an intraretinal angiogenic disease. In addition, since the cells of the present invention survives for a long period due to low immunogenicity, the effect of inhibiting angiogenesis lasts for a long period after a single intraocular injection, and thus the present invention allows the treatment to proceed less invasively compared to conventional antibody therapies, enhances vascular stability, and enables early diagnosis and treatment of an intraretinal angiogenic disease.

[다음 쪽 계속]

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))

(57) 요약서: 일 양상에 따른 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 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 저면역원성으로 인하여 세포 생존기간이 길어 한번의 안구내 주사로 장기간 동안 혈관신생을 억제하는 효과가 지속됨에 따라 기존 항체 치료법에 비하여 치료시 침습성이 감소하고, 혈관 안정성이 강화되며, 망막 내 혈관신생 질환의 조기 진단 및 치료가 가능한 효과가 있다.

발명의 설명

발명의 명칭: B2M 발현 감소 및 TIE 2 발현 증가 된 인간망막유래 혈관내피세포를 포함하는 망 막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 인간망막유래 혈관내피세포를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 해마다 전 세계적으로 수백만 명이 실명하게 되는 많은 안과질환은 혈관신생이 주된 원인이다. 비정상적인 혈관으로부터 기인하는 다양한 안구질환 중 대표적인 예로는 연령관련황반변성, 당뇨망막병증 등이 있다.
- [3] 연령관련황반변성(age-related macular degeneration)은 안구에서 진행되는 대표적인 신경퇴행성 질환으로, 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 새어나와 황반의 부종이 유발되고 이 과정이 반복되면서 황반부의 시각세포 및 망막색소상피세포층이 영구적으로 변성되어 시력 저하를 일으키는 삼출성(습성 유형)으로 나뉘어진다.
- [4] 특히, 습성황반변성의 경우에는 실명에 이르는 빈도가 높으며, 우리나라에서 유병률이 인구 1만명 당 37명에 달하는 것으로 추산되고 있다. 황반변성의 원인에 대해서는 아직 정확히 밝혀지지 않는으나 위험인자로 알려져 있는 것은 나이이며, 그 외 주목받는 환경적 요인으로서는 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 있다.
- [5] 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 혈관생성 억제기능을 가지는 세포를 이식하여 기능저하를 회복할 수 있는 재생치료법

이 여러 병인에 의한 공통적인 시세포 기능 저하를 극복할 수 있는 최종적인 수단으로 주목받고 있다.

- [6] 본 발명자들은 저면역원성으로 인해 세포 생존기간이 길어 한 번의 안구 내 주사로 장기간 동안 혈관신생을 억제 효과가 지속될 수 있는 Tie 2의 발현 또는 Ang 1발현이 증가된 저면역원성 혈관내피세포를 이용한 망막혈관신생 억제용 세포 치료제를 개발하여 비정상적인 혈관으로부터 기인하는 다양한 안구질환을 치료할 수 있는 새로운 길을 개척하였다.

발명의 내용

기술적 과제

- [7] 일 양상은 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 다른 양상은 상기 상기 약학적 조성물을 포함하는, 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.
- [9] 다른 양상은 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 다른 양상은 망막 내 혈관신생 질환의 예방하거나 치료하기 위한 약학적 제제의 제조에 사용하기 위한 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포의 용도를 제공하는 것이다.
- [11] 다른 양상은 망막 내 혈관신생 질환을 예방 또는 치료하기 위한 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 일 양상은 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [13] 본 명세서에서 용어, "Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)"는 혈관 내피 세포의 표면에 존재하는 수용체인 티로신 키나제 수용체 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)를 의미한다. 상기 Tie 2는 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. Tie 2의 결핍 또는 기능 이상은 혈관의 불안정성,

비정상적인 혈관 증식, 혈액 응고 등과 관련된 문제를 초래할 수 있고, Tie 2의 과발현은 혈관 안정성을 향상시키고 비정상적인 혈관 신생을 억제할 수 있다.

[14] 본 명세서에서 용어, "모세포"는 천연형 세포 자체이거나, 자연적 또는 인위적 요인에 의한 유전적 변이로 형질이 변화되기 전 세포를 의미하나, 세포에 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이를 포함하는 세포를 제외하는 것이 아니다.

[15] 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.

[16] 본 명세서의 용어, "저면역원성 혈관내피세포"는 면역 시스템의 공격을 피하거나 제한하는 능력을 가진 혈관 내피세포를 의미하는 것으로, 이식면역반응이 최소화된 저면역원성 세포를 의미하고, "면역회피 혈관내피세포" 또는 "감소된 면역원성 혈관내피세포"와 혼용하여 사용될 수 있다.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 일 구체예에 있어서, 상기 혈관내피세포는 B2M(Beta-2 microglobulin)이 발현되지 않도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 유전적으로 조작된 혈관내피세포는 B2M(Beta-2 microglobulin)유전자가 녹아웃(knock out)된 것일 수 있다.

[20] 본 명세서의 용어, "B2M(Beta-2 microglobulin)"은 MHC 클래스 I 분자의 구성 요소로서 면역체계에서 인식되는 세포막의 HLA 단백질 발현과 관련된 유전자이다.

[21] 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. 예를 들어, 모세포에 비하여 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)를 과발현하는 혈관내피세포에서 B2M(Beta-2 microglobulin) 유전자를 녹아웃(knock-out) 하는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제

한되는 것은 아니다. 상기 “녹아웃(knock-out)”은 특정 유전자를 표적으로 발현되지 않도록 비활성화시키는 유전자 조작의 한 형태를 의미한다.

- [22] 본 명세서의 용어 “활성 감소”는 주어진 유전적으로 조작되지 않은 모세포(예: 야생형)가 갖지 않는 또는 갖는 내재적 단백질 또는 효소의 활성화에 비해, 동일한 타입의 단백질 또는 효소의 활성이 보다 더 낮은 활성을 갖는 것을 의미할 수 있다.
- [23] 일 구체예에 있어서, 상기 혈관내피세포는 HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E), CD47(Cluster of Differentiation 47) 및 PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다.
- [24] 본 명세서의 용어, “HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E)”는 인간 면역시스템에서 중요한 역할을 하는 것으로, 인체의 주요 조직적합성 복합체(Human Leukocyte Antigen, HLA) 중 하나이다. HLA-E는 주로 세포 표면에서 발현되어 일부 면역세포, 특히 자연살해 세포(NK 세포)와 T 세포의 활동을 조절하는 데 중요한 역할을 한다.
- [25] 본 명세서의 용어, “CD47(Cluster of Differentiation 47)”은 면역 시스템 및 세포 간 상호 작용에서 중요한 역할을 하는 단백질 중 하나로서 세포 표면에서 발현되어 면역 세포, 특히 대식세포에게 공격당하는 것을 막는 역할을 한다.
- [26] 본 명세서의 용어, “PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)”은 주로 면역 세포와의 상호 작용을 통해 면역 응답을 조절하는 역할을 하는 것으로서, 세포 표면에서 발현되어 T 세포와 상호 작용하여 T 세포의 활성을 억제한다.
- [27] 일 구체예에 있어서, 상기 모세포에 비하여 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포에서 B2M(Beta-2 microglobulin) 유전자가 발현되지 않도록 유전적으로 조작되거나, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E), CD47(Cluster of Differentiation 47) 및 PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작된 세포는 감소된 면역원성을 나타내는 것일 수 있다.
- [28] 일 구체예에 있어서, 상기 혈관내피세포는 모세포에 비하여 Tie 2 (Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가되도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다.
- [29] 본 명세서의 용어, “과발현(overexpression)” 또는 “발현(expression) 증가”는 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.
- [30] 본 명세서의 용어 “활성 증가”는 주어진 유전적으로 조작되지 않은 모세포(예: 야생형)가 갖지 않는 또는 갖는 내재적 단백질 또는 효소의 활성화에 비해, 동일한 타입의 단백질 또는 효소의 활성이 보다 더 높은 활성을 갖는 것을 의미할 수 있다.

- [31] 상기 "유전적 조작(genetic engineering)" 또는 "유전적으로 조작된(genetically engineered)"은 세포에 대하여 하나 이상의 유전적 변형(genetic modification)을 도입하는 행위를 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 유전적으로 조작된 혈관내피세포에 Tie 2를 암호화하는 외인성 유전자(exogenous gene)가 도입된 재조합 벡터를 형질전환시키는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [32] 일 구체예에 있어서, 상기 혈관내피세포는 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, Tie 2를 암호화하는 외인성 유전자가 도입된 바이러스 벡터를 이용하여 모세포에 비하여 Tie 2의 발현 또는 활성이 증가한 저면역원성 혈관내피세포를 제조할 수 있다.
- [33] 상기 외인성 유전자(exogenous gene)는, 상기 혈관내피세포 또는 숙주 세포에서 그 모세포에 비하여 Tie 2의 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.
- [34] 본 명세서의 용어, "벡터"는 적합한 세포 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 유전자의 조절 서열과 염기서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드 제조물을 의미할 수 있다. 혹은 세포 내로 도입시켜 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 세포 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.
- [35] 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, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 본 명세서의 용어, "치료"는 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방을 지칭하거나, 그를 포함한다.
- [40] 본 명세서의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 안 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [41] 일 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 모세포에 비하여 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 더 포함하는 약학적 조성물일 수 있다.
- [42] 본 명세서에서 용어, "안지오포이에틴 1(Angiopoietin 1; Ang 1)"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, VEGF)의 과발현 또는 염증상태에서는 혈관내피세포가 활성화되며, 혈관 투과성이 증가되는데 Ang 1은 혈관내피세포의 접합부 통합(junctional integrity)을 촉진함으로써 혈관내피세포의 안정화를 유도하고 혈관 투과성을 감소시키는 기능을 한다.
- [43] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 B2M(Beta-2 microglobulin)이 발현되지 않도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다.
- [44] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E), CD47(Cluster of Differentiation 47) 및 PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)으로 이루어진 군으로부터

터 선택된 어느 하나 이상의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다.

[45] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 Ang 1을 과발현하도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 유전적으로 조작된 Ang 1의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 Ang 1를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것일 수 있다.

[46] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang 1을 과발현하는 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 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[47] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 상기 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 공동배양시킨 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[48] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 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, 1:1.2, 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, 1:3.1, 1:3.2, 1:3.3, 1:3.4, 1:3.5, 1:3.6, 1:3.7, 1:3.8, 1:3.9, 1:4.0, 1:4.1, 1:4.2, 1:4.3, 1:4.4, 1:4.5, 1:4.6, 1:4.7, 1:4.8, 1:4.9, 1:5.0, 1:5.1, 1:5.2, 1:5.3, 1:5.4, 1:5.5, 1:5.6, 1:5.7, 1:5.8, 1:5.9, 1:6.0, 1:6.1, 1:6.2, 1:6.3, 1:6.4, 1:6.5, 1:6.6, 1:6.7, 1:6.8, 1:6.9, 1:7.0, 1:7.1, 1:7.2, 1:7.3, 1:7.4, 1:7.5, 1:7.6, 1:7.7, 1:7.8, 1:7.9, 1:8.0, 1:8.1, 1:8.2, 1:8.3, 1:8.4, 1:8.5, 1:8.6, 1:8.7, 1:8.8, 1:8.9, 1:9.0, 1:9.1, 1:9.2, 1:9.3, 1:9.4, 1:9.5, 1:9.6, 1:9.7, 1:9.8, 1:9.9, 1:10의 세포 수 비율일 수 있다. 바람직하게는 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 상기 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포의 비율은 1:0.5 내지 1:4.0 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, 1:3.1, 1:3.2, 1:3.3, 1:3.4, 1:3.5, 1:3.6, 1:3.7, 1:3.8, 1:3.9, 1:4.0일 수 있다.

[49] 상기 “B2M(Beta-2 microglobulin)”, “HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E)”, “CD47(Cluster of Differentiation 47)”, “PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)” “과발현(overexpression)”, “유전적으로 조작된(genetically engineered)” 및 “재조합 벡터” 등은 전술한 바와 같다.

- [50] 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.
- [51] 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 황반 변성 (Age-related Macular Degeneration, AMD), 고혈압성 망막병증 (Hypertensive Retinopathy), 당뇨병 망막병증 (Diabetic Retinopathy), 건성 황반변성 (Dry AMD), 습식 황반변성 (Wet AMD)등으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [52] 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(엔지오포에틴), 에프린(ephlin), 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), 프로그래누린, 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.
- [53]
- [54] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는, 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [55] 상기 “Ang 1을 과발현하는 혈관내피세포” “Tie 2를 과발현하는 혈관내피세포”, “망막 내 혈관신생 질환” 등의 정의는 전술한 바와 같다.
- [56]
- [57] 또 다른 양상은 모세포에 비하여 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환을 치료하는 방법을 제공한다

다. 상기 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피 세포는 B2M(Beta-2 microglobulin)이 발현되지 않도록 유전적으로 조작되거나 HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E), CD47(Cluster of Differentiation 47) 및 PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작되어 감소된 면역원성을 나타내는 것일 수 있다.

- [58] 상기 조성물은 약물학적으로 적당하고 약학적으로 허용성인 담체, 부형제 및 비히클을 함유한다. 일반적으로, 이러한 담체에는 수성 또는 알코올성/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액이 있고, 구체적으로 인산염 완충 식염수(PBS)와 같은 식염수 및 완충 매질이 포함된다. 비경구 비히클에는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스와 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.
- [59] 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.
- [60] 상기 "치료학적으로 유효한 양" 또는 "약학적으로 유효한 양"이란 망막 내 혈관 신생 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.
- [61] 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.

- [62] 구체적으로, 상기 약학적 조성물에서 상기 Tie 2를 과발현하는 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.
- [63] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 모세포에 비하여 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 모세포에 비하여 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 B2M(Beta-2 microglobulin)이 발현되지 않도록 유전적으로 조작되거나 HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E), CD47(Cluster of Differentiation 47) 및 PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작되어 감소된 면역원성을 나타내는 것일 수 있다.
- [64] 일 구체예에 있어서, 상기 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 포함하는 약학적 조성물과 병용투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 포함하는 약학적 조성물을 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물과 순차적으로 또는 동시에 투여할 수 있으며, 단일 또는 다중 투여할 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.
- [65]
- [66] 또 다른 양상은 Tie 2를 과발현하는 혈관내피세포를 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료에 사용하기 위한 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도로 사용할 수 있다. 일 구체예에 있어서, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 함께 망막 내 혈관신생 질환 치료에 사용하기 위한 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도로 사용할 수 있다.
- [67] 또 다른 양상은 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [68] 또 다른 양상은 망막 내 혈관신생 질환의 예방하거나 치료하기 위한 약학적 제제의 제조에 사용하기 위한 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포의 용도를 제공한다.

- [69] 또 다른 양상은 망막 내 혈관신생 질환을 예방 또는 치료하기 위한 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포의 용도를 제공한다.
- [70] 상기 발명에 대해 기술한 용어 및 방법 등은 각 발명들 간에 동일하게 적용된다.
- [71] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

발명의 효과

- [72] 일 양상에 따른 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 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 저면역원성으로 인하여 세포 생존기간이 길어 한번의 안구내 주사로 장기간 동안 혈관신생을 억제하는 효과가 지속됨에 따라 기존 항체 치료법에 비하여 치료시 침습성이 감소하고, 혈관 안정성이 강화되며, 망막 내 혈관신생 질환의 조기 진단 및 치료가 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [73] 도 1은 일 양상에 따른 망막내피세포의 유세포 분석 결과를 나타낸 그림이다:
- [74] 도 1a는 구입한 인체 유래 망막 혈관내피세포(human retinal endothelial cells, HREC)의 유세포 분석 결과를 나타낸 것이고, 도 1b는 유전자 편집으로 일부 유전자 발현이 조절된 저면역원성 인간 망막 혈관 내피 세포(Universal Human Retinal Endothelial Cell, uHREC)의 유세포 분석 결과를 나타내는 것이다.
- [75] 도 2는 저면역원성 혈관내피세포(uHREC)에 Ang 1 유전자와 Tie 2 유전자 전달 여부를 GFP, RFP 발현으로 확인한 사진이다.
- [76] 도 3은 RT-PCR을 통해 Lentivirus vector(LV-mCherry-hTie 2)로 형질감염 시키지 않은 대조군(uHREC)과 Tie 2 과발현 저면역원성 인간망막 유래 혈관내피세포(uHREC_Tie 2)에서 Tie 2 유전자 발현량을 GAPDH 발현에 대한 상대정량으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [77] 도 4는 Lentivirus vector(LV-eGFP-hANG 1)로 형질감염 시키지 않은 대조군(uHREC)과 Ang 1과발현 저면역원성 인간망막 유래 혈관내피세포(uHREC_Ang 1)에서 Ang 1 유전자 발현량을 GAPDH 발현에 대한 상대정량으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [78] 도 5는 일 양상에 따른 uHREC, uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2의 유세포 분석 결과를 나타낸 그림이다.

- [79] 도 6은 uHREC, uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2에 대해 형질감염 후 24시간 간격으로 3일동안 ELISA 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [80] 도 7은 uHREC_Ang 1세포와 uHREC_Tie 2세포의 공동배양시 망막내피세포의 이동감소효과 확인한 결과이다:
- [81] 도 7a는 필터 아래로 이동한 혈관세포를 crystal violet으로 염색한 결과를 나타낸 사진이고, 도 7b는 염색된 세포들을 acetic acid로 녹여 Spectrofluorometer에서 595nm 흡광도로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [82] 도 8은 uHREC(uHREC_Cont. or uHREC_Tie 2)세포와 uHREC(uHREC-Cont. or uHREC_Ang 1)세포를 2:1비율로 Matrigel위에 세포 부착 후 관형 구조의 이미지를 실시간 time lapse 이미징으로 3시간 동안 매 1시간 간격 촬영한 결과를 나타낸 사진이다.
- [83] 도 9는 Ang 1 또는 Tie 2를 과발현하는 저면역성 혈관내피세포(uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2)에서 Tight junction 형성 정도를 TEER(Trans epithelial/endothelial electrical resistance) 측정하여 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [84] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [85]
- [86] 실시예 1. Tie 2 또는 Ang 1과발현 저면역원성 인간망막 유래 혈관내피세포 (uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2)의 제조
- [87] 1.1 저면역원성 혈관내피세포(Universal Human Retinal Endothelial Cell, uHREC)의 제조
- [88] 인체 유래 망막 혈관내피세포(human retinal endothelial cells)를 구입하여, 혈관 내피세포 배양액에서 유지 및 증식하였다. 혈관내피세포를 세포배양접시에 파종한 후 세포가 배양접시의 50~70%를 채웠을 때 유전자 편집용 CRISPR-Cas9 유전자가위가 포함된 기능성 렌티바이러스를 사용하여 B2M 녹아웃(knock out, KO), HLA-E, CD47 를 각각 transduction하였다.
- [89] 구체적으로, 유전자 가위와 Lentiviral 벡터를 이용한 유전자 편집으로 MHC 클래스 1을 구성하는 하나의 부속단백질인 hB2M 유전자의 기능상실을 유도하였다. hB2M에서 일어난 프레임시프트 돌연변이로 인해 MHC 클래스 1 발현이 완전히 사라지게 되면 NK 세포 매개 인식 및 제거를 유도하므로 숙주 NK 세포 반응성을 제한하기 위해 다른 면역 조절자로 HLA-E, PD-L1 및 CD47과 같은 NK 세포 억제 분자를 형질도입하였다.
- [90] B2M 녹아웃 세포는 HLA-A negative selection으로 분리하였고, HLA-E와 CD47은 항체를 사용하여 positive 세포를 분리하였다. HREC(human retinal endothelial

cells) 및 uHREC(Universal Human Retinal Endothelial Cell)의 유세포 분석 결과와 이를 이용한 세포 분리(sorting) 과정을 도 1에 나타내었다.

[91] 도 1은 일 양상에 따른 망막내피세포의 유세포 분석 결과를 나타낸 그림이다:

[92] 도 1a는 구입한 인체 유래 망막 혈관내피세포(human retinal endothelial cells, HREC)의 유세포 분석 결과를 나타낸 것이고, 도 1b는 유전자 편집으로 일부 유전자 발현이 조절된 저면역원성 인간 망막 혈관 내피 세포(Universal Human Retinal Endothelial Cell, uHREC)의 유세포 분석 결과를 나타내는 것이다.

[93] 도 1에 나타난 바와 같이, B2M 녹아웃(knock out, KO), HLA-E, CD47 를 발현하는 저면역원성 인간 망막 혈관 내피 세포(Universal Human Retinal Endothelial Cell, uHREC)를 확립하였다.

[94]

[95] **1.2 저면역원성 혈관내피세포(Universal Human Retinal Endothelial Cell, uHREC)에 혈관신생억제능 부여**

[96] 실시예 1.1의 방법으로 제조한 저면역원성 혈관내피세포(Universal Human Retinal Endothelial Cell, uHREC)를 두 군으로 나누어 Ang 1, Tie 2를 각각 유전자 편집 방법으로 transduction 하였다.

[97] 구체적으로, Tie 2 유전자가 전달된 세포는 항체를 사용하여 positive 세포분리법을 사용하고, Ang 1유전자가 전달된 세포는 유전자 가위에 GFP tagging 하여 형광 유세포분리기를 사용하여 세포를 분리하였다.

[98]

[99] **1.3 Tie 2 또는 Ang 1과발현 저면역원성 인간망막 유래 혈관내피세포 (uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2)에서 Ang 1또는 Tie 2 유전자 발현 여부 확인**

[100] 실시예 1.2의 방법으로 제작한 uHREC_Ang 1또는 uHREC_Tie 2에서의 Ang 1또는 Tie 2 유전자 발현 여부 및 정도를 확인하였다.

[101] 구체적으로, 저면역원성 혈관내피세포(uHREC)에 Ang 1, Tie 2 유전자 전달 성공 시 각각 GFP, RFP 발현으로 유전자 전달 확인이 가능하도록 Lentivirus vector에 형광물질을 표지 (LV-eGFP-hANG 1, LV-mCherry-hTie 2)하였다. 저면역원성 혈관내피세포(uHREC)에 Ang 1, Tie 2 유전자 전달 여부를 GFP, RFP 발현으로 현광현미경을 통해 확인한 결과를 도 2에 나타내었다.

[102] 도 2는 저면역원성 혈관내피세포(uHREC)에 Ang 1유전자와 Tie 2 유전자 전달 여부를 GFP, RFP 발현으로 확인한 사진이다.

[103] 도 2에 나타난 바와 같이, 실시예 1.2의 방법으로 제조한 Ang 1또는 Tie 2 과발현 저면역원성 인간망막 유래 혈관내피세포(uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2)에서 GFP, RFP가 발현되어 형광 신호가 검출됨을 확인하였다. 이는 저면역원성 혈관내피세포(uHREC)에서 Ang 1유전자 또는 Tie 2 유전자가 발현됨을 의미한다.

[104]

[105] **실시예 2. uHREC_Tie 2에서 Tie 2 유전자 발현량 확인**

- [106] 실시예 1에 따라 제작한 uHREC_Tie 2에서 Tie 2 유전자 발현 효율을 평가하기 위해 RT-PCR로 분석하였다.
- [107] 구체적으로, RT-PCR를 위해 제조업체의 지침에 따라 Total RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel)를 사용하여 배양된 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. RNA 농도 및 순도는 Nanodrop으로 확인하였다. Tie 2의 mRNA 발현을 검출하기 위해 RT-PCR분석은 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems)를 사용하여 수행되었다. 각 샘플은 GAPDH 발현에 대한 상대정량으로 분석하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [108] 도 3은 RT-PCR을 통해 Lentivirus vector(LV-mCherry-hTie 2)로 형질감염 시키지 않은 대조군(uHREC)과 Tie 2 과발현 저면역원성 인간망막 유래 혈관내피세포(uHREC_Tie 2)에서 Tie 2 유전자 발현량을 GAPDH 발현에 대한 상대정량으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [109] 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군(uHREC)에 비하여 uHREC_Tie 2에서 Tie 2 유전자 발현량이 더 증가함을 확인하였다. 또한, Ang 1 발현 혈관내피세포(uHREC_Ang 1), Tie 2 발현 혈관내피세포(uHREC_Tie 2)를 공동배양(uHREC_Ang 1/Tie 2)하는 경우, 대조군(uHREC)에 비하여 48시간 공동배양하는 경우에 Tie 2 유전자 발현량이 가장 증가한 것을 확인하였다.
- [110]
- [111] 실시예 3. uHREC_Ang 1에서 Ang 1(Angiopoietin 1) 유전자 발현량 확인
- [112] 실시예 1에 따라 제작한 uHREC_Ang 1에서 Ang 1 유전자 발현 효율을 평가하기 위해 RT-PCR로 분석하였다.
- [113] 구체적으로, RT-PCR을 수행하기 위해 제조업체의 지침에 따라 Total RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel)를 사용하여 배양된 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. RNA 농도 및 순도는 Nanodrop으로 확인하였다. Ang 1의 mRNA 발현을 검출하기 위해 RT-PCR분석은 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems)를 사용하여 수행되었다. 각 샘플은 GAPDH 발현에 대한 상대정량으로 분석하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [114] 도 4는 Lentivirus vector(LV-eGFP-hANG 1)로 형질감염 시키지 않은 대조군(uHREC)과 Ang 1 과발현 저면역원성 인간망막 유래 혈관내피세포(uHREC_Ang 1)에서 Ang 1 유전자 발현량을 GAPDH 발현에 대한 상대정량으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [115] 도 4에 나타난 바와 같이, 대조군(uHREC)에 비하여 Ang 1 과발현 저면역원성 인간망막 유래 혈관내피세포(uHREC_Ang 1)에서 Ang 1 유전자 발현량이 더 증가함을 확인하였다. 또한, Ang 1 발현 혈관내피세포(uHREC_Ang 1), Tie 2 발현 혈관내피세포(uHREC_Tie 2)를 공동배양(uHREC_Ang 1/Tie 2) 하는 경우, 대조군(uHREC)에 비하여 24시간 공동배양하는 경우에 Ang 1 유전자 발현량이 가장 증가하였고, 72시간까지 Ang 1 유전자 발현량이 유지되는 것을 확인하였다.
- [116]

- [117] 실시예 4. uHREC, uHREC-Ang 1 및 uHREC-Tie 2의 FACS 분석 결과
- [118] 실시예 1에 따라 제작한 uHREC, uHREC-Ang 1 및 uHREC-Tie 2에서 유전자 발현 패턴을 평가하기 위해 BD Trucount™ Absolute Counting Tube을 사용하여 FACS로 분석하였다. FACS 분석시 사용한 Tie 2 antibody는 BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human Tie 2 (CD202b)이다. Lentivirus vector(LV-mCherry-hTie 2)로 형질감염 시키지 않은 대조군(uHREC), Ang 1과 발현 저면역원성 인간망막 유래 혈관내피세포(uHREC_Ang 1), Tie 2 과 발현 저면역원성 인간망막 유래 혈관내피세포(uHREC_Tie 2)에서 유전자 발현 패턴을 분석하였다.
- [119] 저면역원성 uHREC-Ang 1 및 uHREC-Tie 2 세포주를 만들기 위해 HLA-ABC 발현이 negative인 세포의 구성비를 확인하였다. HLA-ABC negative 세포 중 HLA-E와 GFP(녹색형광) double positive를 세포를 분리하여 uHREC-Ang1 세포를 획득하였다. HLA-ABC negative 세포 중 HLA-E와 RFP(적색형광) double positive를 세포를 분리하여 uHREC-Tie2를 획득하였다.
- [120] 도 5는 일 양상에 따른 uHREC, uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2의 유세포 분석 결과를 나타낸 그림이다.
- [121] 도 5에 나타난 바와 같이, HLA-ABC 발현이 uHREC-Ang 1 및 uHREC-Tie 2에서 상대적으로 낮음을 확인하였다. HLA-ABC는 면역 반응에 관여하는 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 단백질로 발현이 낮아지면 저면역원성을 갖는 특성이 강화된다. 따라서, 이러한 결과는 uHREC_Ang 1 및 uHREC_Tie 2가 저면역원성 특성을 가지는 세포주임을 의미하는 것이다.
- [122]
- [123] 실시예 5. uHREC-Ang 1 및 uHREC-Tie 2에서 Angiopoietin 1 발현 측정
- [124] 실시예 1에 따라 제작한 uHREC, uHREC-Ang 1 및 uHREC-Tie 2에 대해 ELISA 분석 통해 Ang 1(Angiopoietin 1) 유전자 발현을 검출하였다.
- [125] Ang 1 특이적 ELISA는 Quantikine Human Angiopoietin 1 Immunoassay (R&D Systems)를 사용하여 수행되었다. uHREC, uHREC-Ang 1, uHREC-Tie 2에 대해 형질감염 후 3일 동안 24시간 간격 6well plate의 hMSC_Ang 1 배양액 샘플을 수집하여 분석하였다. 상기 uHREC는 B2M knock out, CD47, HLA-E 유전자 발현으로 저면역원성을 가지는 대조군(control)을 의미하는 것이고, 상기 uHREC-Ang 1은 Ang 1을 포함하고 있는 lentiviral vector를 형질감염 시킨 것을 의미하며, uHREC-Tie 2는 Tie 2를 포함하는 lentiviral vector를 형질감염 시킨 것이다. uHREC_Ang 1/ Tie 2는 uHREC_Ang 1과 uHREC_Tie 2를 공동배양한 것이다. Ang 1 특이적 ELISA를 수행한 결과를 도 6에 나타내었다.
- [126] 도 6은 uHREC, uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2에 대해 형질감염 후 24시간 간격으로 3일동안 ELISA 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [127] 도 6에 나타난 바와 같이, uHREC-Ang 1에서 Angiopoietin 1 발현량이 가장 높았으며, Angiopoietin 1의 발현량이 시간이 지남에 따라 꾸준히 증가하는 양상을 확인하였다.

- [128] 이러한 결과는 uHREC_Ang 1에서 Angiopoietin 1의 발현을 효과적으로 유도하고 있으며, 발현 지속시간이 72시간 이상임을 의미한다. 한편, uHREC_Ang 1과 uHREC_Tie 2를 공동배양(uHREC_Ang 1/Tie 2)하는 경우, Ang 1을 발현하는 uHREC_Ang1 세포와 Ang 1을 발현하지 않는 HREC_Tie2 세포가 혼합되어 있어, uHREC_Ang1 세포로만 이루어진 배양액에 비해 배양액 내 Ang 1 농도가 줄어듦을 확인하였다.
- [129]
- [130] **실험예 1. uHREC_Ang 1세포와 uHREC_Tie 2세포의 공동배양시 망막내피세포의 이동감소효과 확인**
- [131] 망막내피세포의 이동성 평가를 통해 uHREC_Ang 1세포와 uHREC_Tie 2세포 공동배양 효과를 평가하였다.
- [132] 구체적으로, uHREC_Ang 1세포와 uHREC_Tie 2세포의 공동배양시 망막내피세포의 이동감소효과 확인하기 위해 구멍 크기가 8um인 6.5mm 직경의 폴리카보네이트 필터가 포함된 Transwell 챔버 (CorningCostar)를 사용하였다. Tie 2를 과발현시키지 않은 uHREC(HREC_Cont.) 또는 Tie 2를 과발현시킨 uHREC(uHREC_Tie 2)를 5×10^4 cells/ml로 seeding을 하고, Ang 1을 과발현시키지 않은 uHREC(uHREC_Cont.) 또는 Ang 1을 과발현시킨 uHREC(uHREC_Ang 1)의 배양액을 24시간 처리한 후 VEGF 20ng/ml를 첨가하여 24시간 동안 인큐베이터에서 배양되었다. 배양 후 필터 위의 세포를 면봉을 이용하여 닦아내고 필터 아래로 이동한 세포를 PBS로 세척한 후 메탄올로 20분 동안 고정하고, 1% crystal violet으로 20분 동안 염색하였다. PBS로 세척한 후 이동한 세포를 현미경으로 관찰하였다. 1% acetic acid로 염색된 세포들을 녹여 Spectrofluorometer에서 595nm 흡광도로 측정하였고, 측정된 결과를 도 7에 나타내었다.
- [133] 도 7은 uHREC_Ang 1세포와 uHREC_Tie 2세포의 공동배양시 망막내피세포의 이동감소효과 확인한 결과이다:
- [134] 도 7a는 필터 아래로 이동한 혈관세포를 crystal violet으로 염색한 결과를 나타낸 사진이고, 도 7b는 염색된 세포들을 acetic acid로 녹여 Spectrofluorometer에서 595nm 흡광도로 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.
- [135] 도 7a 및 도 7b에 나타낸 바와 같이, 질환경(VEGF 함유배양액)에서 uHREC_Cont.세포는 매우 높은 세포이동성(VEGF가 없는 경우의 약 2배)을 보이는 반면, 질환경(VEGF 함유배양액)에서 uHREC_Ang 1세포와 uHREC_Tie 2세포를 공동배양했을 때 VEGF에 의한 망막내피세포의 이동을 효과적으로 감소함을 확인하였다. 특히 uHREC_Ang 1세포와 uHREC_Tie 2세포의 비율을 2:1 내지 1:1로 공동배양하는 경우, VEGF에 의한 망막내피세포의 이동이 가장 효과적으로 감소되었다. 이는 uHREC_Ang 1 세포와 uHREC_Tie 2 세포를 공동배양한 세포치료제의 경우 질환경에서도 망막내피세포의 이동이 효과적으로 억제됨을 의미한다.

[136]

- [137] 실험예 2. uHREC_Ang 1 세포와 uHREC_Tie 2 세포의 체외 혈관신생 (Angiogenesis) 억제능 확인
- [138] uHREC_Ang 1 세포와 uHREC_Tie 2 세포의 체외 혈관신생(Angiogenesis) 억제능 평가하기 위하여, uHREC_Ang 1 세포와 uHREC_Tie 2 세포를 젤에 배양하여 모세관 유사 관 형성 분석(tube formation assay)을 실시하였다.
- [139] 구체적으로, uHREC 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 젤을 형성하도록 37°C에서 1시간 동안 굳힌 후 각 well당 2×10^4 cells/100 μ l의 uHREC(uHREC_Cont. or uHREC_Tie 2)세포와 1×10^4 cells/100 μ l의 uHREC(uHREC_Cont. or uHREC_Ang 1)세포를 mix하여 넣어주고 20ng/ml VEGF를 첨가하였다. 세포의 튜브 형성을 허용하기 위해 37°C에서 10시간 동안 배양하였다. 혈관과 같은 구조의 형성은 Juli™Stage Real-Time History Recorder (NanoEnTek)에서 관찰하였다. 시간에 따른 튜브로 덮인 면적을 Image J 프로그램을 이용하여 측정하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [140] 도 8은 uHREC(uHREC_Cont. or uHREC_Tie 2)세포와 uHREC(uHREC-Cont. or uHREC_Ang 1)세포를 2:1비율로 Matrigel위에 세포 부착 후 관형 구조의 이미지를 실시간 time lapse 이미징으로 3시간 동안 매 1시간 간격 촬영한 결과를 나타낸 사진이다.
- [141] 도 8에 나타난 바와 같이, 정상군(uHREC_Cont/ uHREC_Cont)은 VEGF 환경(질환 환경)에서 빠르게 관 형성 구조를 만들고, 최종 관 형성 면적이 감소하는 것을 확인하였다. 실험군(uHREC_Tie 2/ uHREC_Ang 1)은 VEGF 환경에서도 관 형성이 천천히 진행되는 것을 확인하였다. 이는 Tie 2 또는 Ang 1을 과발현시킨 저면역원성 혈관내피세포(uHREC_Tie 2, HREC_Ang 1)에 의한 Tight junction 형성으로 혈관신생을 늦추기 때문으로 판단되며, Tie 2 또는 Ang 1을 과발현시킨 저면역원성 혈관내피세포(uHREC_Tie 2, uHREC_Ang 1)의 세포치료제가 혈관신생을 늦추어 망막 내 혈관신생억제에 효과가 있음을 의미한다.
- [142]
- [143] 실험예 3. Ang 1또는 Tie 2를 과발현하는 저면역성 혈관내피세포(uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2)에서 Tight junction 형성 정도 확인
- [144] uHREC_Ang 1세포와 uHREC_Tie 2세포의 Tight junction 형성도를 평가하기 위하여, TEER(Trans epithelial/endothelial electrical resistance)를 측정하였다.
- [145] 구체적으로, uHREC, uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2 세포를 투과성 멤브레인이 장착된 Transwell insert에 시딩하고, 세포가 완전히 confluency를 형성할 때까지 3일 간 배양하였다. 현미경으로 세포 형태를 관찰해 세포가 뽁뽁하게 증식하였는지 확인한 다음, TEER 측정을 준비하기 위해 전극을 깨끗하게 세척하고 멸균 상태로 준비하였다. 전극은 멸균 PBS나 세포 배양액으로 세척한 후, 사용 전 세포

배양 배지에 담가 두었다. Transwell에 있는 배양 매체는 신선한 매체로 완전히 교체해 전기적 접촉이 원활하도록 하고, 상부와 하부 챔버에 적절한 양의 세포배양 배지를 추가하여 준비를 마쳤다. 전극을 Transwell insert의 상부 챔버에 놓고, 반대쪽 전극은 하부 챔버에 위치시켰다. 전극이 세포층을 방해하거나 손상시키지 않도록 주의하며 배치하였다. 전극이 위치되면 TEER 측정 기기를 작동시켜 저항 값을 측정하고, 몇 번 반복해 평균값을 구하였다. TEER 값은 환산해 계산하며, 측정된 저항 값에 Transwell insert의 표면적을 곱해 구하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다. TEER 값이 일정한 수준을 유지하거나 증가하면 일단층이 건강하고 적절히 형성된 것으로 해석할 수 있으며, 반대로, TEER 값이 감소하면 세포층에 손상이 있거나 투과성이 증가했음을 의미할 수 있다.

[146] 도 9는 Ang 1 또는 Tie 2를 과발현하는 저면역성 혈관내피세포(uHREC_Ang 1, uHREC_Tie 2)에서 Tight junction 형성 정도를 TEER(Trans epithelial/endothelial electrical resistance) 측정하여 나타낸 그래프이다.

[147] 도 9에 나타난 바와 같이, uHREC+VEGF의 경우 시간이 지날수록 TEER 값이 낮아져 cell 간의 tight junction이 약화되었고, uHREC_Ang 1/Tie 2의 경우 VEGF를 처리하여도 TEER 값이 낮아지지 않음을 확인하였다. 또한, uHREC_Ang 1/Tie 2와 uHREC_Ang 1/Tie 2+VEGF의 TEER 값이 유의미한 차이를 보이지 않았다.

[148] 이러한 결과는 혈관내피세포의 증식과 혈관 투과성을 증가시키는 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)를 uHREC_Ang 1/Tie 2에 처리하더라도 tight junction이 약화되지 않음을 의미하는 것으로, uHREC_Ang 1/Tie 2가 망막 내 혈관신생억제에 효과가 있음을 의미한다.

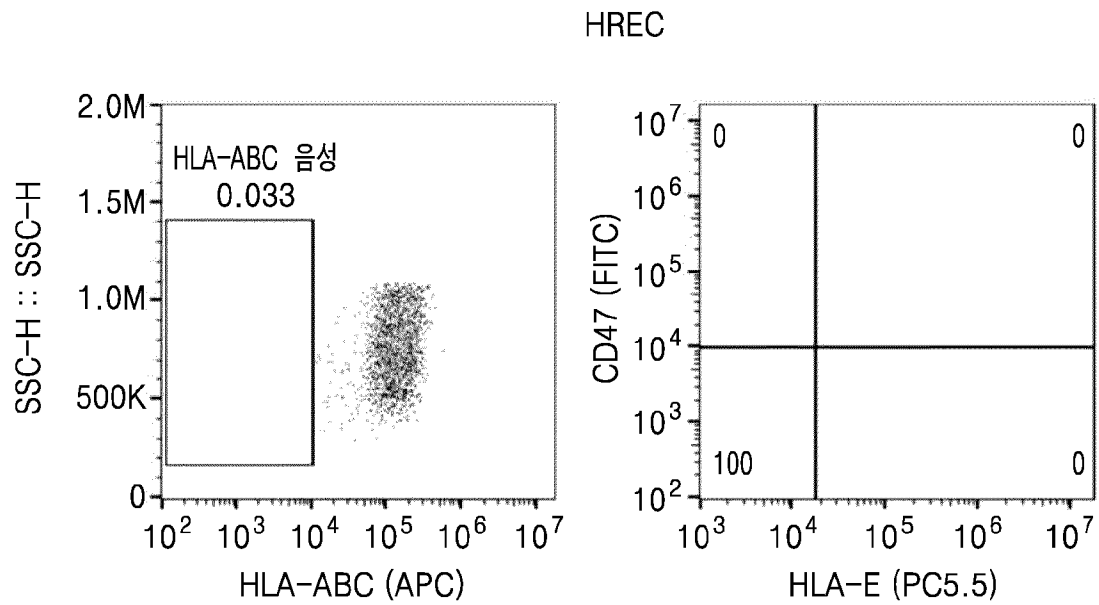
청구범위

- [청구항 1] 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 혈관내피세포는 HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E), CD47(Cluster of Differentiation 47) 및 PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작된 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 혈관내피세포는 B2M(Beta-2 microglobulin) 유전자가 녹아웃(knock out)된 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 혈관내피세포는 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 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 6] 청구항 1에 있어서, 상기 약학적 조성물은 모세포에 비하여 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 더 포함하거나 이와 병용투여되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E), CD47(Cluster of Differentiation 47) 및 PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작된 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 청구항 6에 있어서, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 Ang 1(Angiopoietin 1)를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 9] 청구항 6에 있어서, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 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

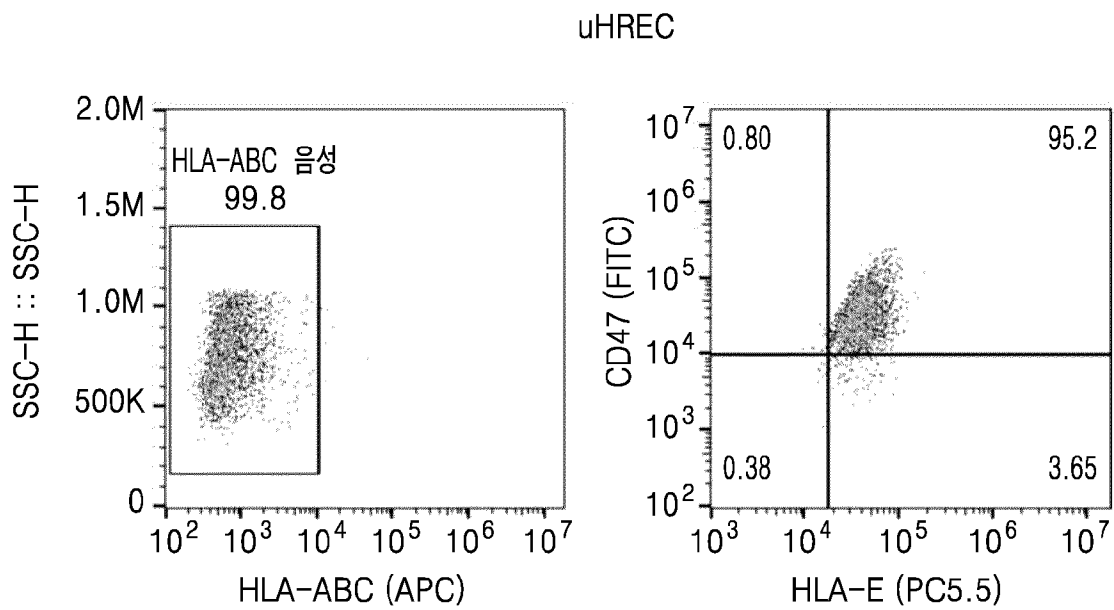
endothelial cell), 혈관전구세포 분화 내피세포(Vascular progenitor cell differentiated endothelial cell)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

- [청구항 10] 청구항 8에 있어서, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 청구항 1의 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 공동배양시킨 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 Ang 1(Angiopoietin 1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 상기 Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포의 비율은 1:0.1 내지 1:10인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 12] 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), 당뇨병성 망막병증 (Diabetic Retinopathy), 건성 황반변성 (Dry AMD), 습식 황반변성 (Wet AMD)등으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 청구항 1 내지 16 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 키트.
- [청구항 14] 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 15] 망막 내 혈관신생 질환의 예방하거나 치료하기 위한 약학적 제제의 제조에 사용하기 위한 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포의 용도.
- [청구항 16] 망막 내 혈관신생 질환을 예방 또는 치료하기 위한 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, Tie 2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포의 용도.

[도 1a]



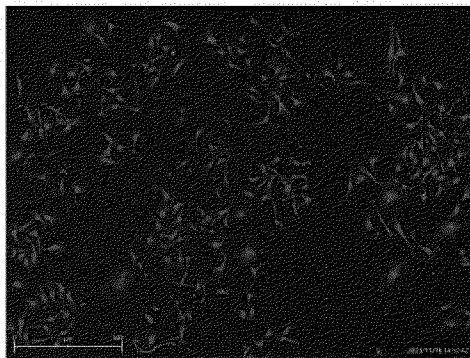
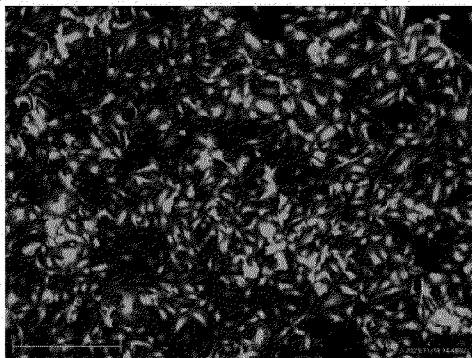
[도 1b]



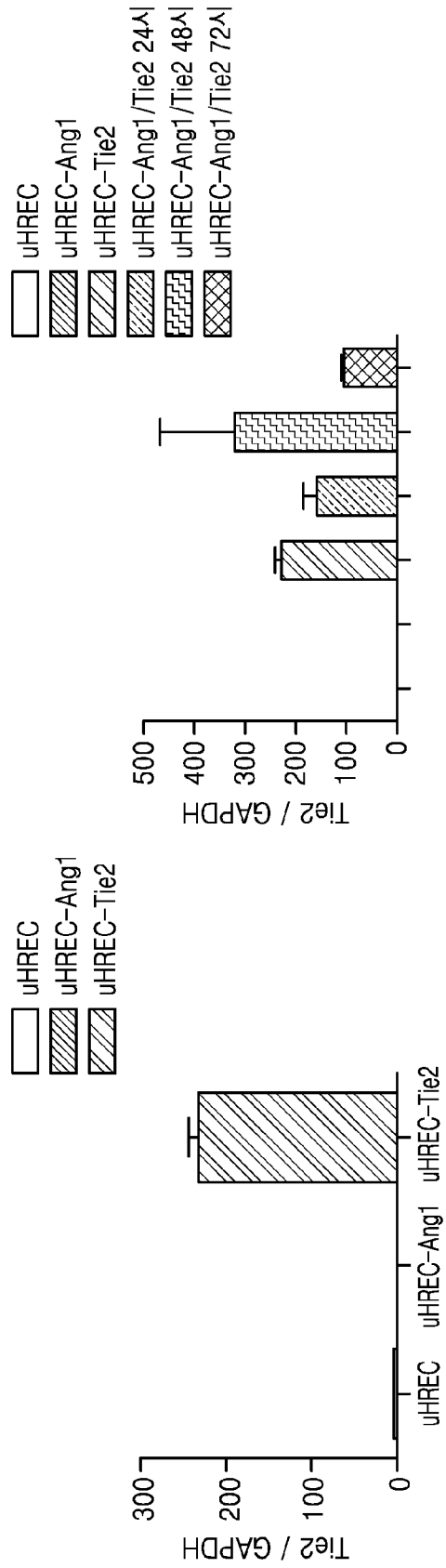
[도 2]

uHREC-Ang1

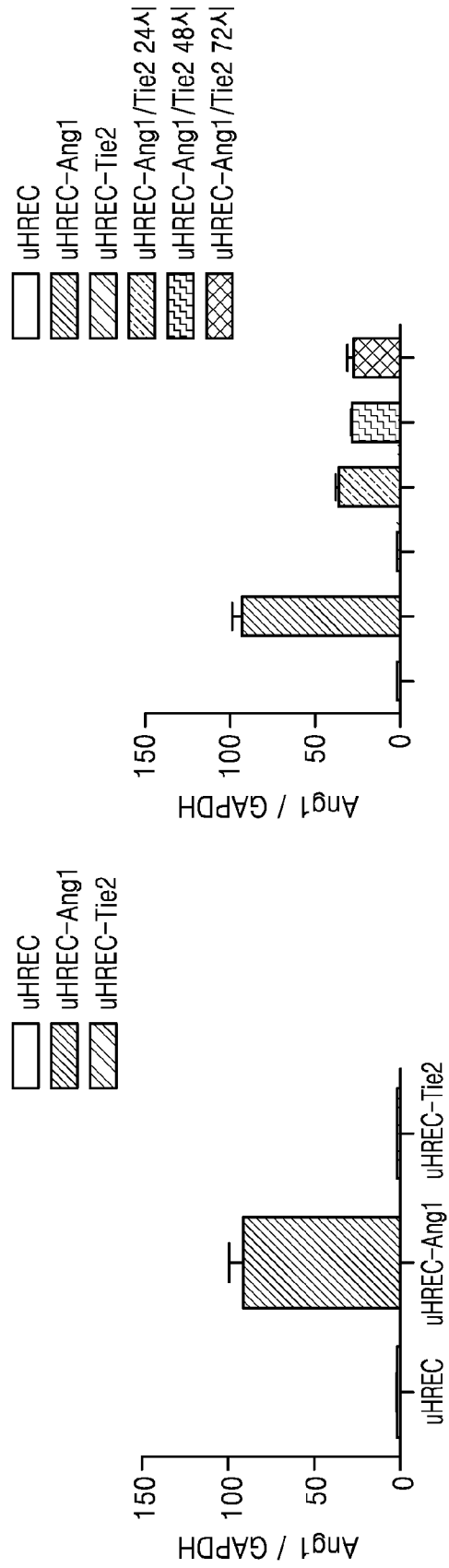
uHREC-Tie2



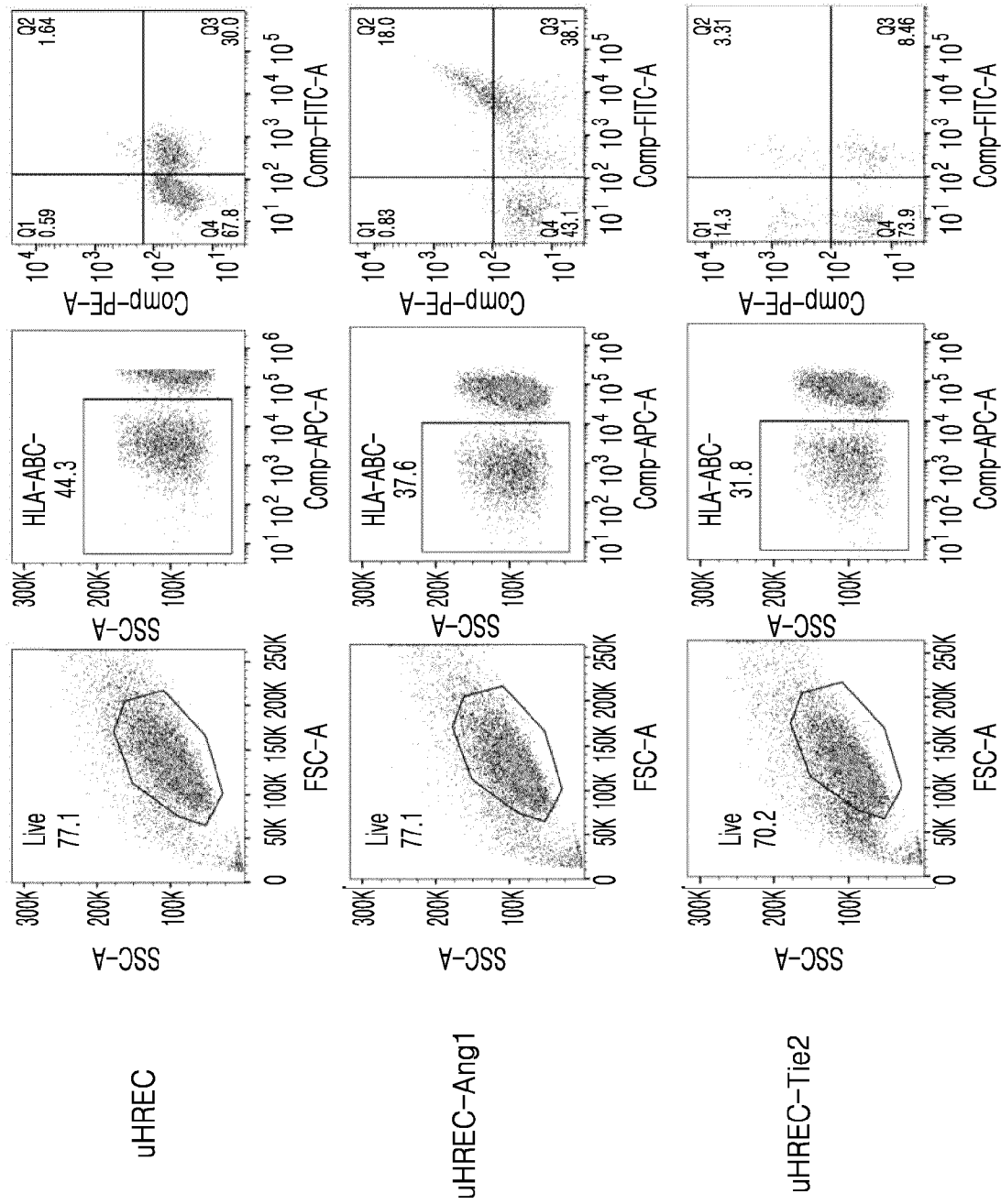
[도3]



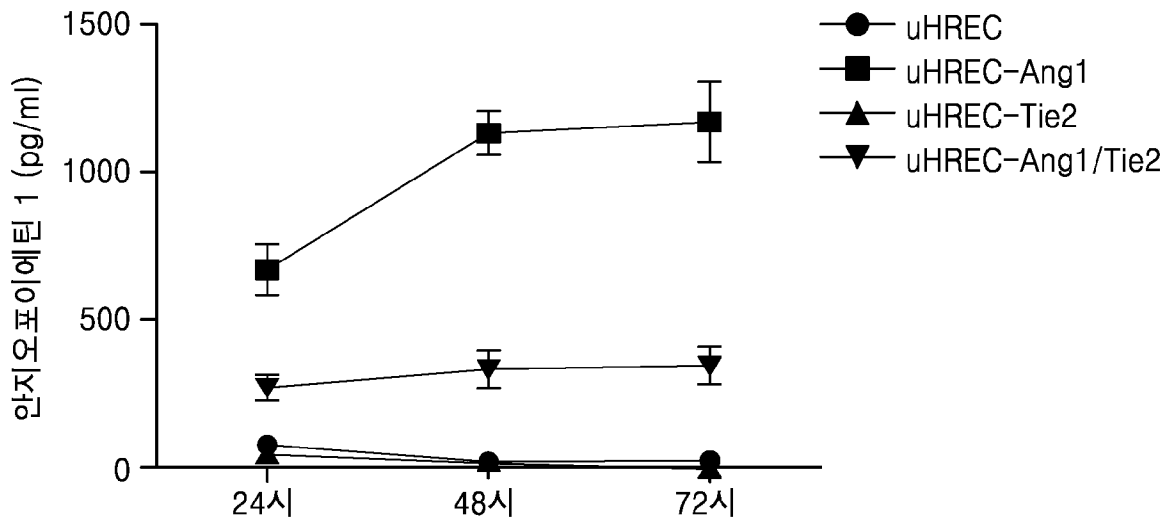
[도4]



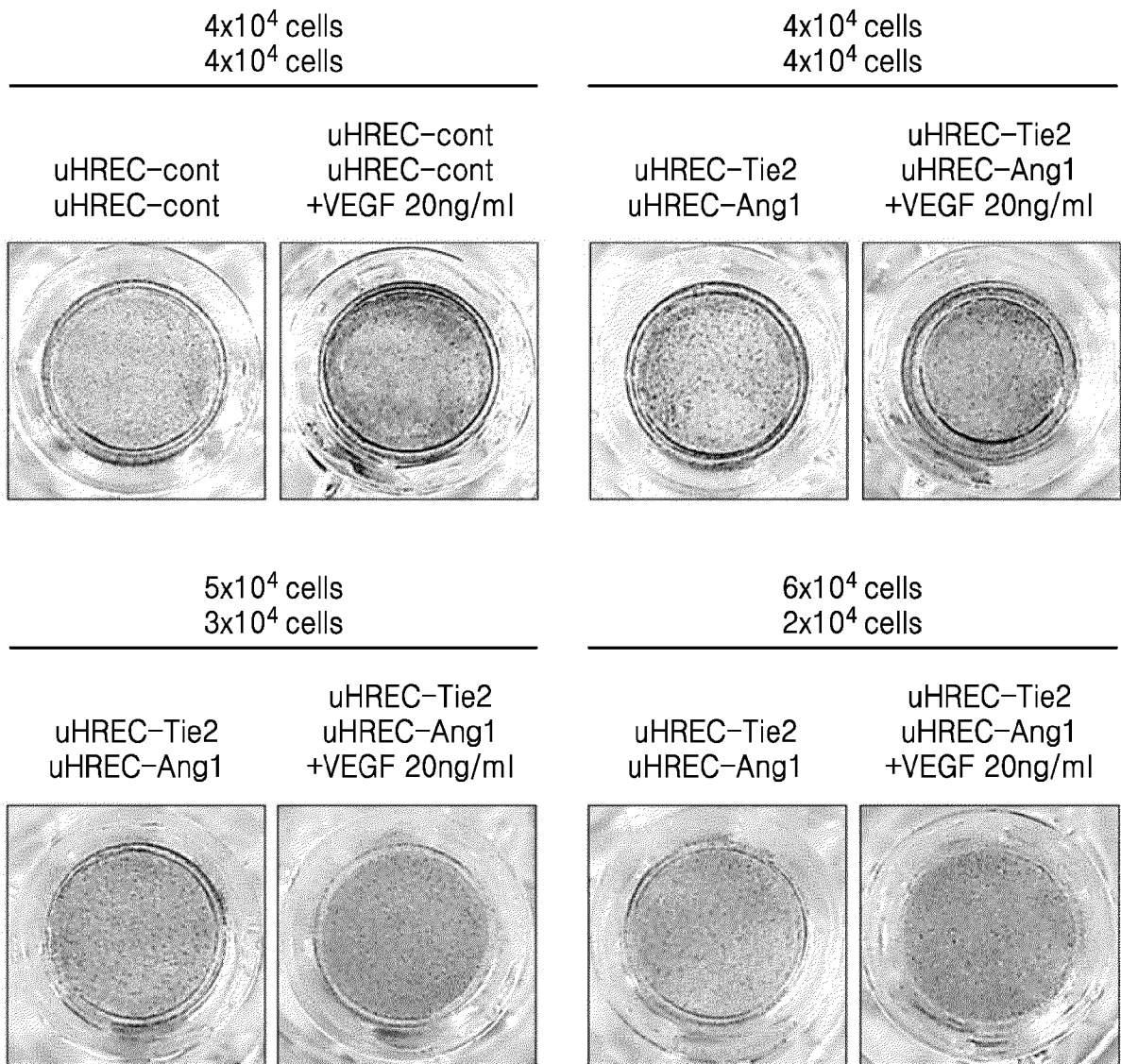
[도5]



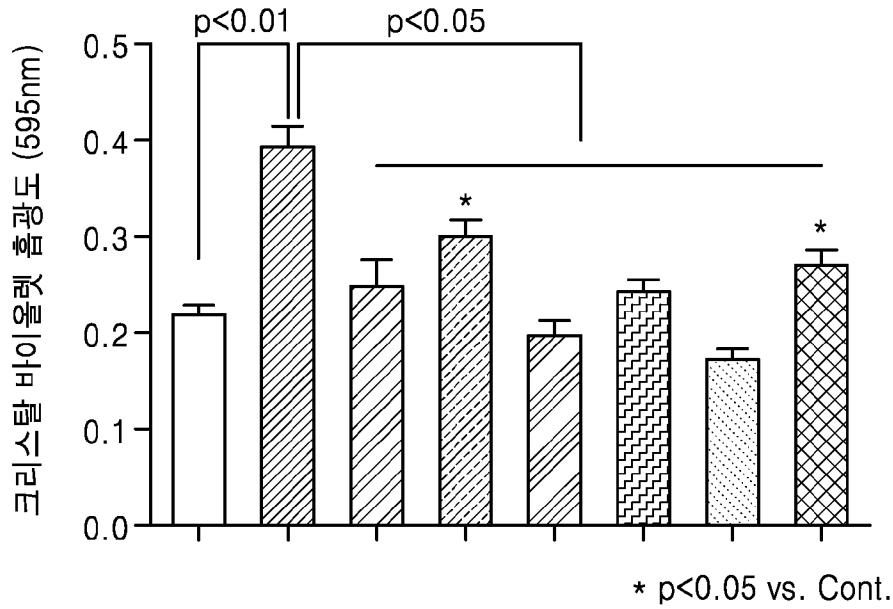
[도6]



[도7a]

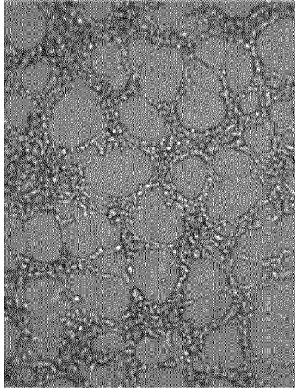
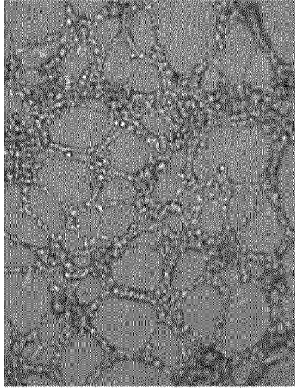
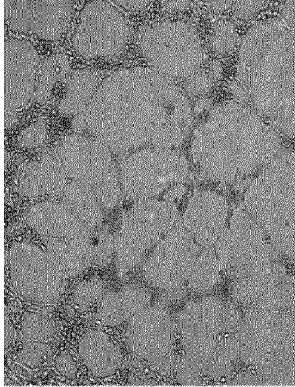
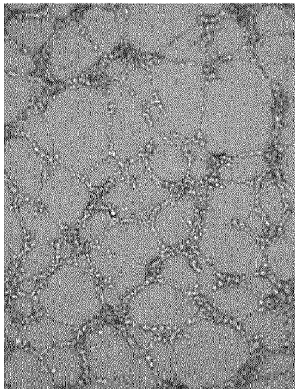


[도7b]

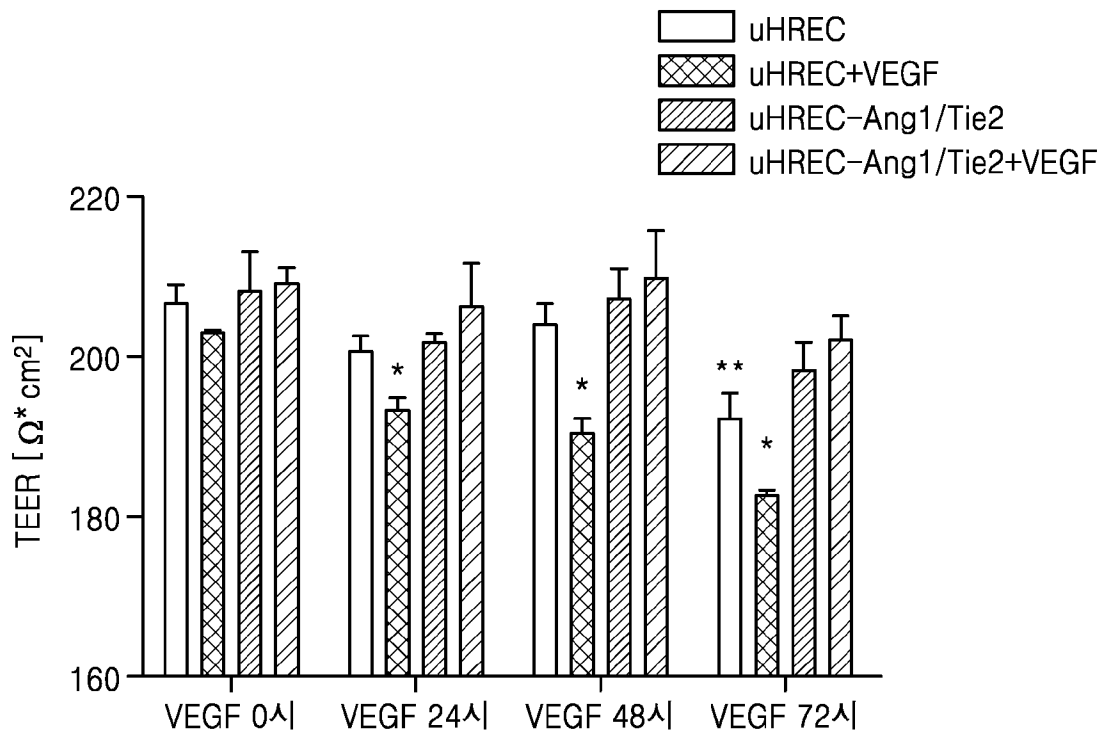


- Cont. (4x10⁴ cells)+Cont. (4x10⁴ cells)
- Cont. (4x10⁴ cells)+Cont. (4x10⁴ cells)+VEGF
- Tie2 (4x10⁴ cells)+Ang1 (4x10⁴ cells)
- Tie2 (4x10⁴ cells)+Ang1 (4x10⁴ cells)+VEGF
- Tie2 (5x10⁴ cells)+Ang1 (3x10⁴ cells)
- Tie2 (5x10⁴ cells)+Ang1 (3x10⁴ cells)+VEGF
- Tie2 (6x10⁴ cells)+Ang1 (2x10⁴ cells)
- Tie2 (6x10⁴ cells)+Ang1 (2x10⁴ cells)+VEGF

[도8]

uHREC-Ang1
uHREC-Tie2
+VEGFuHREC-Ang1
uHREC-Tie2uHREC-cont
uHREC-cont
+VEGFuHREC-cont
uHREC-cont

[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/017514

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/44(2006.01)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 35/44(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 35/17(2015.01); A61K 35/28(2006.01); A61K 38/17(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12N 15/86(2006.01); C12N 5/10(2006.01)

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: 베타-2 마이크로글로불린(Beta-2 microglobulin, B2M), 티로신 키나제 수용체 2(Tyrosine kinase receptor 2, Tie 2), 혈관내피세포(endothelial cell), 망막(retina), 혈관신생(angiogenesis)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2023-0074718 A (SANA BIOTECHNOLOGY, INC.) 31 May 2023 (2023-05-31) See paragraphs [0020], [0310], [0575], [0631], [0642], [0636] and [0673].	1-13,15,16
A	WO 2022-238478 A1 (INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) et al.) 17 November 2022 (2022-11-17) See paragraph [0041].	1-13,15,16
A	US 2021-0380981 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 09 December 2021 (2021-12-09) See paragraphs [0054] and [0056].	1-13,15,16
A	WO 2023-028004 A1 (AVIRMAX, INC.) 02 March 2023 (2023-03-02) See paragraphs [0006] and [0011].	1-13,15,16
A	US 2001-0037016 A1 (ZHANG, Ning et al.) 01 November 2001 (2001-11-01) See abstract.	1-13,15,16



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

“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

12 February 2025

Date of mailing of the international search report

12 February 2025

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/017514

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.: **14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 14 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/KR2024/017514

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2023-0074718	A	31 May 2023	CN	116490605	A	25 July 2023
				EP	4196568	A1	21 June 2023
				JP	2023-537923	A	06 September 2023
				US	2022-0049226	A1	17 February 2022
				US	2023-0293581	A1	21 September 2023
				WO	2022-036150	A1	17 February 2022
WO	2022-238478	A1	17 November 2022	EP	4337762	A1	20 March 2024
				US	2024-0255520	A1	01 August 2024
US	2021-0380981	A1	09 December 2021	EP	3413928	A1	19 December 2018
				EP	4094780	A2	30 November 2022
				US	11060088	B2	13 July 2021
				US	11851657	B2	26 December 2023
				US	2019-0048343	A1	14 February 2019
				WO	2017-139643	A1	17 August 2017
WO	2023-028004	A1	02 March 2023	CN	118139628	A	04 June 2024
				EP	4392038	A1	03 July 2024
				JP	2024-534159	A	18 September 2024
				KR	10-2024-0051989	A	22 April 2024
				US	2024-0269327	A1	15 August 2024
US	2001-0037016	A1	01 November 2001	US	6867348	B1	15 March 2005
				US	7196190	B2	27 March 2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 35/44(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 35/44(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 35/17(2015.01); A61K 35/28(2006.01); A61K 38/17(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12N 15/86(2006.01); C12N 5/10(2006.01) 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: 베타-2 마이크로글로불린(Beta-2 microglobulin, B2M), 티로신 키나제 수용체 2(Tyrosine kinase receptor 2, Tie 2), 혈관내피세포(endothelial cell), 망막(retina), 혈관신생(angiogenesis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2023-0074718 A (사나 바이오테크놀로지, 인크.) 2023.05.31 단락 [0020], [0310], [0575], [0631], [0642], [0636], [0673]	1-13,15,16
A	WO 2022-238478 A1 (INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 등) 2022.11.17 단락 [0041]	1-13,15,16
A	US 2021-0380981 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 2021.12.09 단락 [0054], [0056]	1-13,15,16
A	WO 2023-028004 A1 (AVIRMAX, INC.) 2023.03.02 단락 [0006], [0011]	1-13,15,16
A	US 2001-0037016 A1 (NING, ZHANG 등) 2001.11.01 요약	1-13,15,16
☐ 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 “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 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2025년02월12일(12.02.2025)	국제조사보고서 발송일 2025년02월12일(12.02.2025)	
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	

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.

- ☒ 청구항: **14**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 14는 치료에 의한 사람의 처치 방법에 해당됩니다(PCT 제 17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
- ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2023-0074718 A	2023/05/31	CN 116490605 A	2023/07/25
		EP 4196568 A1	2023/06/21
		JP 2023-537923 A	2023/09/06
		US 2022-0049226 A1	2022/02/17
		US 2023-0293581 A1	2023/09/21
		WO 2022-036150 A1	2022/02/17
WO 2022-238478 A1	2022/11/17	EP 4337762 A1	2024/03/20
		US 2024-0255520 A1	2024/08/01
US 2021-0380981 A1	2021/12/09	EP 3413928 A1	2018/12/19
		EP 4094780 A2	2022/11/30
		US 11060088 B2	2021/07/13
		US 11851657 B2	2023/12/26
		US 2019-0048343 A1	2019/02/14
		WO 2017-139643 A1	2017/08/17
WO 2023-028004 A1	2023/03/02	CN 118139628 A	2024/06/04
		EP 4392038 A1	2024/07/03
		JP 2024-534159 A	2024/09/18
		KR 10-2024-0051989 A	2024/04/22
		US 2024-0269327 A1	2024/08/15
US 2001-0037016 A1	2001/11/01	US 6867348 B1	2005/03/15
		US 7196190 B2	2007/03/27