



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0067080  
(43) 공개일자 2025년05월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 35/44 (2015.01) A61P 27/02 (2006.01)  
C12N 15/86 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 35/44 (2013.01)  
A61P 27/02 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0157179  
(22) 출원일자 2024년11월07일  
심사청구일자 없음
- (30) 우선권주장  
1020230152590 2023년11월07일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
재단법인 아산사회복지재단  
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)  
울산대학교 산학협력단  
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
- (72) 발명자  
황창모  
서울특별시 송파구 위례성대로4길 14, 102호  
성영훈  
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인더웨이브

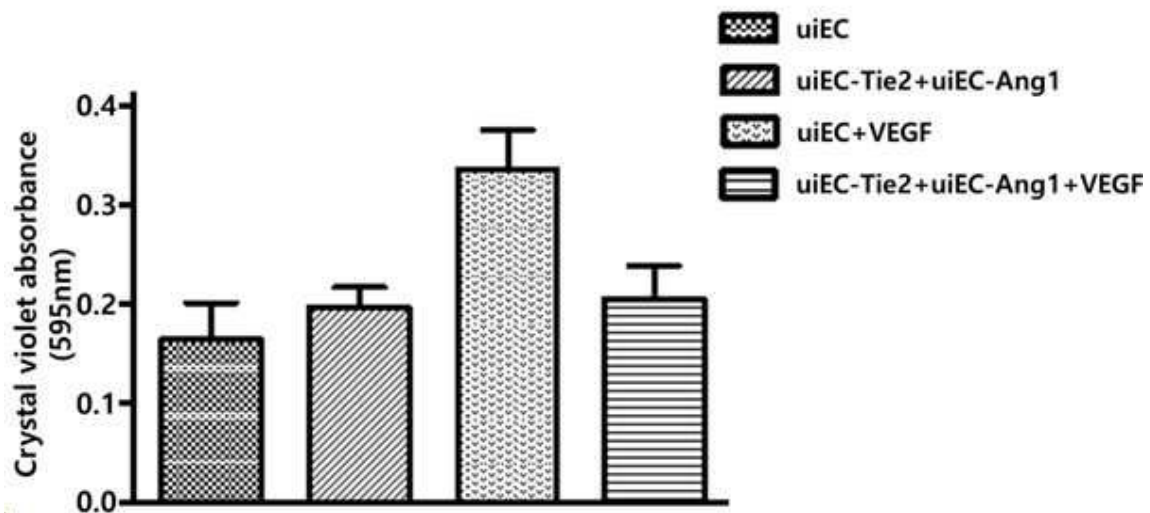
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 저면역원성 만능줄기세포에서 분화된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

일 양상에 따른 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 Tie2(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.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

**C12N 15/86** (2013.01)

**C12N 5/069** (2013.01)

**C12N 2510/00** (2013.01)

(72) 발명자

**이주용**

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88

**김수미**

서울특별시 강남구 학동로68길 29, 102동 1401호

**김윤전**

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1465038737

과제번호

HH21C0015000023

부처명

보건복지부

과제관리(전문)기관명

한국보건산업진흥원

연구사업명

범부처재생의료기술개발사업

연구과제명

면역회피 만능줄기세포 기반 습성항반변성 세포치료제 개발 연구

과제수행기관명

서울아산병원

연구기간

2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1465039015

과제번호

HI21C1692030023

부처명

보건복지부

과제관리(전문)기관명

한국보건산업진흥원

연구사업명

공익적의료기술연구사업

연구과제명

환자맞춤형 유전질환 교정 iPSC 분화 망막조직 재생 연구

과제수행기관명

울산대학교 산학협력단

연구기간

2023.01.01 ~ 2023.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 Tie2(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 모세포에 비하여 CD47(Cluster of Differentiation 47)의 발현 또는 활성이 증가된 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 혈관내피세포는 줄기세포(stem cell)로부터 유래된 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 줄기세포는 저면역원성을 갖도록 변형된 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 저면역원성을 갖도록 변형된 줄기세포는 T 세포 및 NK 세포에 대해 모두 면역원성이 제거된 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 혈관내피세포는 B2M(Beta-2 microglobulin) 유전자가 녹아웃(knock out)된 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 혈관내피세포는 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 약학적 조성물은 모세포에 비하여 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 더 포함하거나 이와 병용투여되는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E)의 발현 또는 활성이 증가된 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 모세포에 비하여 CD47(Cluster of Differentiation 47)의 발현 또는 활성이 증가된 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 줄기세포로부터 유래된 것인, 약학적 조성물.

## 청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 줄기세포는 저면역원성을 갖도록 변형된 것인, 약학적 조성물.

## 청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 저면역원성을 갖도록 변형된 줄기세포는 T세포 및 NK 세포에 대해 모두 면역원성이 제거된 것인, 약학적 조성물.

## 청구항 14

청구항 8에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 Ang1(Angiopoietin-1)를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

## 청구항 15

청구항 8에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 청구항 1의 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 공동배양시킨 것인, 약학적 조성물.

## 청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 약학적 조성물은 청구항 8의 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 청구항 1의 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 1:0.1 내지 1:10로 공동배양시킨 것인, 약학적 조성물.

## 청구항 17

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), 당뇨병 망막병증 (Diabetic Retinopathy), 건성 황반변성 (Dry AMD), 습성 황반변성 (Wet AMD)등으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

## 청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 키트.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 저면역원성 만능줄기세포에서 분화된 혈관내피세포를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 해마다 전 세계적으로 수백만 명이 실명하게 되는 많은 안과질환은 혈관신생이 주된 원인이다. 비정상적인 혈관으로부터 기인하는 다양한 안구질환 중 대표적인 예로는 연령관련황반변성, 당뇨망막병증 등이 있다.

[0003] 연령관련황반변성(age-related macular degeneration)은 안구에서 진행되는 대표적인 신경퇴행성 질환으로, 노화과정에 동반되어 나타나는 황반의 붕괴 혹은 파괴를 지칭하는 질환이다. 특히, 습성황반변성의 경우에는 실명에 이르는 빈도가 높으며, 우리나라에서 유병률이 인구 1만명 당 37명에 달하는 것으로 추산되고 있다. 습성황

반면성은 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 것으로 알려져있다.

[0004] 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. 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 재생치료가 여러 병인에 의한 공통적인 시세포 기능 저하를 극복할 수 있는 최종적인 수단으로 주목받고 있다.

[0005] 재생의학에서 줄기세포는 원천재료로서 매우 중요하다. 하지만 인간배아를 이용한 배아줄기세포는 윤리적 문제로 활용에 제한적이다. 윤리적 문제를 해결하기 위하여 체세포에 역분화유도 유전자 혹은 단백질을 도입하여 역분화 유도만능줄기세포를 제작할 수 있다. 이미 구축되어 있는 타인의 유도만능줄기세포는 환자 자신의 고유 세포가 아니므로 면역거부반응을 일으키게 된다. 또한, 구축되어 있는 유도만능줄기세포의 경우, HLA 일배체형(haploptype)이 일치하지 않을 경우 이식에 사용할 수 없다.

[0006] 면역학적 관점에서는 자가세포 이식이 이상적이다. 하지만 세포의 분리에서부터 줄기세포로의 역분화와 다시 필요한 세포로의 재분화를 포함한 전 단계는 상당한 시간과 비용이 발생하는 비효율성이 존재한다. 따라서 최대한 HLA-class I이 제거되고 NK 세포의 공격을 받지 않는 유도만능줄기세포의 개발이 필요하다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및/또는 CD47(Cluster of Differentiation 47)의 발현 또는 활성을 증가시켜 HLA-class I이 제거되고 NK 세포의 공격을 받지 않는 유도만능줄기세포주를 개발하고, 이를 이용하여 Tie 2 또는 Ang 1 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 포함하는 망막혈관신생 억제용 세포치료제를 개발하였다. 상기 세포치료제는 저면역원성으로 인해 세포 생존기간이 길어 한 번의 안구 내 주사로 장기간 동안 혈관신생을 억제 효과가 지속될 수 있는 것으로, 비정상적인 혈관으로부터 기인하는 다양한 안구질환을 치료할 수 있는 새로운 길을 개척하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 상기 상기 약학적 조성물을 포함하는, 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 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.

[0012] 본 명세서의 용어, "B2M(Beta-2 microglobulin)"은 MHC 클래스 I 분자의 구성 요소로서 면역체계에서 인식되는 세포막의 HLA 단백질 발현과 관련된 유전자이다. 구체적으로, 상기 B2M 유전자는 HLA-class I 유전자에서 발현되는 알파체인(alpha chain)과 결합하는  $\beta$ 2 microglobulin을 발현하는 유전자를 의미할 수 있다.  $\beta$  microglobulin은 HLA-class I의 HLA-A, B, C, E, F, G 여섯 개의 유전자에서 발현된 알파체인과 결합하여 이중이량체(heterodimer)를 형성하여 HLA 단백질을 형성하여 세포막 표면에 표현되어 기능하고, 이를 통해 면역체

계 내에서 항원을 T 세포에 인식시키거나, 면역적합성을 결정할 수 있다.

- [0013] 본 명세서의 용어, “발현(expression) 감소는 주어진 유전적으로 조작되지 않은 모세포(예를 들어, 야생형)가 갖는 내재적 단백질의 발현과 비교하여, 동일한 타입의 단백질의 발현이 보다 더 낮은 수준을 갖는 것을 의미할 수 있다.
- [0014] 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.
- [0015] 본 명세서의 용어, "HLA (human leukocyte antigen)"는 조직적합항원 (histocompatibility antigen)과 동의어이며, 주요면역적합항원 (Major Histocompatibility Antigen Complex; MHC)라고도 불리는 세포 표면 단백질이다. HLA 유전자는 HLA-class I과 HLA-class II, 두 개의 클래스가 존재하며, Class I은 HLA-A, B, C, E, F, G, 여섯 개의 유전자로, class II는 HLA-DR, DQ, DP 세 개의 유전자로 구성된다. HLA-class I과 class II는 각각 CD8+ T 세포와 CD4+ T 세포의 T 세포 수용체 (T cell receptor; TCR)와 결합하여 면역 반응을 유도하며, 항원을 T 세포에 인식시켜주거나, 자가세포 여부를 구분하게 한다. 다만, 줄기세포의 경우 HLA의 일배체형 (haplotype)이 일치하지 않을 경우 이식에 사용할 수 없다. 이와 관련하여 본 발명은, HLA class I 중 HLA-A, B, C, F, G의 발현을 억제하면서 HLA-E의 발현만 가능하게 하는 줄기세포를 제공한다.
- [0016] 본 명세서의 용어, “HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E)”는 주로 세포 표면에서 발현되어 일부 면역세포, 특히 자연살해 세포(NK 세포)와 T 세포의 활동을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 구체적으로, HLA-E는 NK 세포막에 있는 CD94/NKG2의 리간드 (ligand)로 작동하며 NK 세포의 활성을 억제하여 세포사멸을 억제할 수 있다.
- [0017] 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.
- [0018] 본 명세서의 용어, “발현(expression) 증가” 또는 “과발현(overexpression)”은 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.
- [0019] 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.
- [0020] 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 맥락막이나 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.
- [0021] 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.
- [0022] 본 명세서의 용어, "치료"는 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방을 지칭하거나, 그를 포함한다.
- [0023] 본 명세서의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 안 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0024] 일 구체예에 있어서, 상기 혈관내피세포는 모세포에 비하여 CD47(Cluster of Differentiation 47)의 발현 또는 활성이 증가된 것일 수 있다.
- [0025] 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.

- [0026] 일 구체예에 있어서, 상기 혈관내피세포는 줄기세포(stem cell)로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0027] 본 명세서의 용어, 줄기세포(stem cell)는 미분화된 세포로서 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 서로 다른 종류의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말한다. 줄기세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있다.
- [0028] 일 구체예에 있어서, 상기 줄기세포는 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPSC)인 것일 수 있다.
- [0029] 본 명세서의 용어 “유도만능 줄기세포”는 체세포와 같은 이미 분화된 세포에 역분화(dedifferentiation)를 유도하여 초기의 미분화된 상태로 돌아가, 전분화능(pluripotency)을 가지게 된 세포를 의미한다. 인위적인 역분화 과정은 레트로바이러스 및 렌티바이러스를 이용한 바이러스-매개 또는 비바이러스성 벡터 이용, 단백질 및 세포 추출물 등을 이용하는 비바이러스-매개 역분화 인자의 도입에 의해 수행되거나, 줄기세포 추출물, 화합물 등에 의한 역분화 과정을 포함할 수 있다. 구체적으로, 분화된 세포에 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf-4를 발현하는 레트로바이러스를 도입하는 과정을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 유도만능줄기세포는 배아줄기세포와 유사한 특성을 가지며, 구체적으로는 유사한 세포 형태를 나타내고, 유전자, 단백질 발현 패턴이 유사할 수 있으며, 예를 들어 Oct4, Sox2, Nanog, TRA-1-60 등의 단백질이 강하게 발현될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0030] 일 구체예에 있어서, 상기 줄기세포는 저면역원성을 갖도록 변형된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 저면역원성을 갖도록 변형된 줄기세포는 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 CD47의 발현 또는 활성이 증가된 유도만능줄기세포 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 명세서의 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.
- [0032] 본 명세서의 용어, “감소된 면역원성” 또는 “저면역원성(hypoimmunogenic)”은 이식면역반응이 최소화된 것을 의미할 수 있다. 예를 들어, 줄기세포 또는 세포의 이식 시에 이식되는 개체 내에서 면역거부 반응을 일으키지 않도록 억제하는 것을 의미한다. 구체적으로, 면역 거부반응의 원인인 유전자의 발현을 감소 또는 억제하여 이식되는 세포, 조직 또는 기관이 이식적합성을 갖도록 할 수 있다. 더욱 구체적으로, 세포치료를 투여 전후, 백혈구 수 변화, 림프구 수 비율 변화(예, CD4, CD8 등), 환자의 면역세포에 세포치료를 반응시켜 분비되는 사이토카인(예, IL- $\gamma$  IL-2, TNF- $\alpha$  등) 변화 등을 측정한 결과, 백혈구 수가 감소하거나, CD4/CD8 비율이 감소, 염증성 사이토카인인 IL- $\gamma$  IL-2, TNF- $\alpha$  등의 분비가 감소하는 경우를 의미할 수 있다.
- [0033] 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.
- [0034] 일 구체예에 있어서, 상기 혈관내피세포는 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, Tie2를 암호화하는 외인성 유전자가 도입된 바이러스 벡터를 이용하여 모세포에 비하여 Tie2의 발현 또는 활성이 증가한 면역회피 혈관내피세포를 제조할 수 있다.
- [0035] 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.
- [0036] 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.

- [0037] 본 명세서의 용어, “녹아웃(knock-out)”은 특정 유전자를 표적으로 발현되지 않도록 비활성화시키는 유전자 조작의 한 형태를 의미한다.
- [0038] 일 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 모세포에 비하여 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 더 포함하거나 이와 병용투여되는 것일 수 있다.
- [0039] 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, VEGF)의 과발현 또는 염증상태에서는 혈관내피세포가 활성화되며, 혈관 투과성이 증가되는데 Ang1은 혈관내피세포의 접합부통합(junctional integrity)을 촉진함으로써 혈관내피세포의 안정화를 유도하고 혈관 투과성을 감소시키는 기능을 한다.
- [0040] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 Ang1을 과발현하도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 유전적으로 조작된 Ang1의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 Ang1를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 벡터를 포함하는 것일 수 있다.
- [0041] 본 명세서의 용어, “병용투여”는 적어도 2개의 별개의 조성물을 사용한 임의 형태의 동시 또는 병행 치료를 지칭한다. 병용투여되는 성분들은 동시에, 순차적으로 또는 임의의 순서로 투여될 수 있다. 성분들은 상이한 복용량으로 또는 상이한 투여 빈도로 또는 상이한 경로를 통해 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 상기 “병용투여”는 “병용 요법” 또는 “병용하여(in combination)”와 혼용해서 사용할 수 있다.
- [0042] 일 구체예에 있어서, 상기 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 상기 모세포에 비하여 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 포함하는 약학적 조성물과 병용투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 포함하는 약학적 조성물을 상기 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하여 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.
- [0043] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E)의 발현 또는 활성이 증가된 것일 수 있다.
- [0044] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 모세포에 비하여 CD47(Cluster of Differentiation 47)의 발현 또는 활성이 증가된 것일 수 있다.
- [0045] 일 구체예에 있어서, 상기 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 CD47(Cluster of Differentiation 47)의 발현 또는 활성이 증가된 것일 수 있다.
- [0046] 일 구체예에 있어서, 상기 모세포에 비하여 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 줄기세포(stem cell)로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0047] 일 구체예에 있어서, 상기 줄기세포는 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPSC)인 것일 수 있다.
- [0048] 일 구체예에 있어서, 상기 줄기세포는 B2M(Beta-2 microglobulin)이 발현되지 않도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다.
- [0049] 일 구체예에 있어서, 상기 줄기세포는 HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 CD47(Cluster of Differentiation 47)의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다.
- [0050] 일 구체예에 있어서, 상기 줄기세포는 저면역원성을 갖도록 변형된 것일 수 있다.

- [0051] 일 구체예에 있어서, 상기 저면역원성을 갖도록 변형된 줄기세포는 T 세포 및 NK 세포에 대해 모두 면역원성이 제거된 것일 수 있다.
- [0052] 일 구체예에 있어서, 상기 만능줄기세포는 모세포에 비하여 Tie2(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) 및 CD47(Cluster of Differentiation 47)의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다.
- [0053] 일 구체예에 있어서, 상기 모세포에 비하여 Tie2(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) 및 CD47(Cluster of Differentiation 47)의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작된 세포는 감소된 면역원성을 나타내는 것일 수 있다.
- [0054] 상기 "유전적 조작(genetic engineering)" 또는 "유전적으로 조작된(genetically engineered)"은 전술한 바와 같다.
- [0055] 본 명세서의 용어, "벡터"는 적합한 세포 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 유전자의 조절 서열과 염기 서열을 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.
- [0056] 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.
- [0057] 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.
- [0058] 일 구체예에 있어서, 상기 모세포에 비하여 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 CD47 발현 또는 활성이 증가된 유도만능줄기세포를 분화시킨 혈관내피세포 일 수 있다.
- [0059] 일 구체예에 있어서, 상기 모세포에 비하여 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 CD47 발현 또는 활성이 증가된 유도만능줄기세포를 분화시킨 혈관내피세포 일 수 있다.
- [0061] 일 구체예에 있어서, 상기 모세포에 비하여 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 상기 모세포에 비하여 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 혼합하여 혈관신생을 억제하기 위해 투여할 수 있다.
- [0062] 일 구체예에 있어서, 상기 모세포에 비하여 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 상기 모세포에 비하여 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포의 혼합 투여 시 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 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 상기 Tie2(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, 1:4.0 일 수 있다.

[0063] 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, 혈관의 누출 등의 증상을 일으킬 수 있다. 상기 혈관 신생이란, 새로운 혈관이 기존의 혈관으로부터 생기는 과정을 의미한다.

[0064] 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 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 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 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, 혈관내피세포성장인자(VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) 및 VEGF 패밀리 멤버, 태반성장인자(PIGF: Placental Growth Factor), 혈소판유래 성장인자(PDGF: Platelet-Derived Growth Factor) 패밀리, 섬유아세포 성장 인자 패밀리(FGF), TIE 리간드(엔지오포에틴), 에프린(efrin), 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), 랩틴, 미드카인(midkine), 혈소판 유래 혈관내피세포 성장 인자(PD-ECGF), 혈소판 유래 성장 인자, 특히 PDGF-BB 또는 PDGFR-베타, 프레이오토로핀(PTN), 프로그래누린, 프로리페린, 형질전환 성장 인자-알파(TGF-알파), 형질전환 성장 인자-베타(TGF-베타), 종양괴사 인자-알파(TNF-알파), 혈관내피세포 성장 인자(VEGF)/혈관 투과 인자(VPF) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는, 망막 내 혈관신생 질환 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[0067] 상기 “Ang1을 과발현하는 혈관내피세포” “Tie2를 과발현하는 혈관내피세포”, “망막 내 혈관신생 질환” 등의 정의는 전술한 바와 같다.

[0069] 또 다른 양상은 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 CD47의 발현 또는 활성이 증가된 유도만능줄기세포에서 분화된 혈관내피세포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 망막 내 혈관신생 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포는 B2M(Beta-2 microglobulin)이 발현되지 않도록 유전적으로 조작되거나 HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및/또는 CD47(Cluster of Differentiation 47)의 유전자가 발현되도록 유전적으로 조작되어 감소된 면역원성을 나타내는 것일 수 있다.

[0070] 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.

[0071] 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.

[0072] 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.

[0073] 구체적으로, 상기 약학적 조성물에서 상기 Tie2 또는 Ang1을 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.

[0074] 또한, 상기 약학적 조성물은 약물학적으로 적당하고 약학적으로 허용성인 담체, 부형제 및 비히클을 함유할 수 있다. 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.

[0076] 또 다른 양상은 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 CD47의 발현 또는 활성이 증가된 만능줄기세포에서 분화시킨 혈관내피세포를 망막 내 혈관신생 질환 치료에 사용하기 위한 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도로 사용할 수 있다. 일 구체예에 있어서, 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 CD47의 발현 또는 활성이 증가된 만능줄기세포에서 분화시킨, Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포와 Ang1(Angiopoietin-1)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 함께 망막 내 혈관신생 질환 치료에 사용하기 위한 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도로 사용할 수 있다.

[0078] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

## 발명의 효과

[0080] 일 양상에 따른 모세포에 비하여 B2M(Beta-2 microglobulin)의 발현 또는 활성이 감소되고, HLA-E(Human Leukocyte Antigen-E) 및 Tie2(Tyrosine Kinase Receptor 2)의 발현 또는 활성이 증가된 혈관내피세포를 유효 성분으로 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

[0081] 도 1은 일 구체예에 따른 만능줄기세포의 저면역원성을 유도하기 위한 유전자 가위의 구조를 나타낸 모식도이다.

도 2는 일 구체예에 따른 저면역원성을 유도하기 위한 렌티바이러스 벡터의 구조를 나타낸 모식도이다: 도 2a는 hCD47을 발현시키기 위한 렌티바이러스 벡터의 구조이고, 도 2b는 HLA-E를 발현시키기 위한 렌티바이러스 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

도 3은 HLA-A 미발현, HLA-E 발현, CD47 발현을 동시에 나타내는 유도만능줄기세포를 선별하기 위한 FACS(형광 활성화세포분류) 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 계대배양시 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포의 특성이 유지되는지를 확인하기 위해, 혈관내피세포 마커(CD31+, CD144+) 및 저면역원성 관련 마커(B2M-, HLA-E+, PD-L+) 유지 비율을 FACS를 이용해 측정한 결과이다:

도 4a는 혈관내피세포 마커(CD31+, CD144+)의 유지 비율을 측정한 결과이고, 도 4b는 저면역원성 관련 마커(B2M-, HLA-E+, PD-L+) 유지 비율을 측정한 결과이다.

도 5는 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)에 Ang1 유전자와 Tie2 유전자 전달 여부를 GFP, RFP 발현으로 확인한 사진이다.

도 6은 NSG 마우스에서 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC) 및 저면역원성 유전자 전달과정을 거치지 않은 만능줄기세포에서 분화된 혈관내피세포(iEC)의 생존성 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 필터 아래로 이동한 혈관세포를 crystal violet으로 염색한 세포들을 acetic acid로 녹여 Spectrofluorometer에서 595nm 흡광도로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(uiEC; 형질감염을 시키지 않은 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관 내피세포, uiEC-Tie2; Tie2를 과발현시킨 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포, uiEC-Ang1; Ang1을 과발현시킨 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포).

도 8은 다공성 멤브레인에 배양된 uiEC, uiEC-Ang1+uiEC-Tie2를 VEGF 첨가 또는 첨가되지 않은 배양 배지에서 일정 시간 경과 후 멤브레인 양쪽의 저항을 측정한 TEER 결과를 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### [0084] 실시예 1. 저면역원성 만능줄기세포의 제조

##### [0085] 1.1 유도만능줄기세포의 준비

[0086] 저면역원성 만능줄기세포를 제조하기 위해 유도만능줄기세포(iPSC)를 준비하였다. 구체적으로, 태줄혈액에서 분리된 단핵세포에 유도만능줄기세포로 유도하는 야마나카 팩터를 처리하여 유도만능줄기세포를 확립하고 증식하였다.

##### [0088] 1.2 저면역원성 만능줄기세포 제조를 위한 유전자 가위 제작

[0089] 저면역원성 만능줄기세포를 제조하기 위해, 실시예 1.1의 방법으로 준비한 유도만능줄기세포(iPSC)를 저면역원성으로 만들기 위한 유전자 가위를 제작하였다. 구체적으로, AsCpf1과 crRNA를 동시에 발현할 수 있는 lentivirus 발현백터를 구입하여 crRNA가 인간 B2M 유전자에 특이적인 염기서열을 가지도록 하였다. 상기 방법으로 제작한 유전자 가위의 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0090] 도 1은 일 구체예에 따른 만능줄기세포의 저면역원성을 유도하기 위한 유전자 가위의 구조를 나타낸 모식도이다.

##### [0092] 1.3 저면역원성 만능줄기세포 제조를 위한 렌티바이러스 벡터 제작

[0093] 저면역원성 만능줄기세포를 제조하기 위해, 실시예 1.1의 방법으로 준비한 유도만능줄기세포(iPSC)를 저면역원성으로 만들기 위한 렌티바이러스 벡터를 제작하였다.

[0094] 구체적으로, B2M-HLA-E fusion의 발현은 B2M KO genetic background에서 HLA-E의 효과를 발휘한다고 보고되었고, 일반적으로 B2M KO genetic background에서 HLA-E 단백질의 단독 발현이 불가능하기 때문에 MHC에 의해 presentation 잘 되는 것으로 알려진 Human HLA-G signal peptide를 추가적으로 fusion 시켜서 MHC complex의 형성 촉진시키도록 하였다.

[0095] 도 2는 일 구체예에 따른 저면역원성을 유도하기 위한 렌티바이러스 벡터의 구조를 나타낸 모식도이다: 도 2a는 hCD47을 발현시키기 위한 렌티바이러스 벡터의 구조이고, 도 2b는 HLA-E를 발현시키기 위한 렌티바이러스 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

#### [0097] 1.4 저면역원성 만능줄기세포주 확립

[0098] 저면역원성 만능줄기세포를 제조하기 위하여, 실시예 1.1의 방법으로 준비한 유도만능줄기세포(iPSC)에 B2M 유전자를 녹아웃(knock out)시키고, HLA-E 유전자 및 CD47 유전자를 과발현하였다.

[0099] 구체적으로, 실시예 1.1의 방법으로 준비한 유도만능줄기세포를 배양액에서 유지 증식하였다. 상기 유도만능줄기세포를 세포배양접시에 파종한 후 세포가 배양접시의 50~70%를 채웠을 때 실시예 1.2의 방법으로 제조한 유전자 편집용 CRISPR-Cas9 유전자 가위가 포함된 기능성 렌티바이러스를 혼합하여 넣어 MHC 클래스 1을 구성하는 하나의 부속단백질인 hB2M 유전자의 기능상실(knock out, KO)을 유도하였다. 이후, 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 및 CD47과 같은 NK 세포 억제 분자를 실시예 1.3의 방법으로 제조한 렌티바이러스 벡터를 이용하여 각각 형질도입(transduction)하였다.

[0100] B2M 녹아웃 세포는 HLA-A negative selection으로 분리하였고, HLA-E와 CD47은 항체를 사용하여 positive 세포를 분리하였다. 최종적으로 HLA-A 미발현, HLA-E 발현, CD47 발현을 동시에 나타내는 세포를 골라내어 배양하여 저면역원성 만능줄기세포를 확립하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0101] 도 3은 HLA-A 미발현, HLA-E 발현, CD47 발현을 동시에 나타내는 유도만능줄기세포를 선별하기 위한 FACS(형광 활성화세포분류) 결과를 나타낸 것이다.

[0102] 도 3에 나타난 바와 같이, B2M 녹아웃, HLA-E 발현, CD47 발현을 동시에 나타내는 저면역원성 만능줄기세포주를 확립하였다.

#### [0104] 실시예 2. 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포의 제조

##### [0105] 2.1 저면역원성 유도만능줄기세포로부터 혈관내피세포로의 분화

[0106] 실시예 1의 방법으로 제조한 저면역원성 만능줄기세포를 혈관내피세포로 분화하기 위하여, 혈관내피세포 분화용 배지에서 배양하였다.

[0107] 구체적으로, 유도만능줄기세포(iPSC)를 혈관내피세포로 분화시키는 프로토콜은 다음과 같은 순서로 진행하였다.

[0108] Day 0: iPSCs 시딩 Matrigel로 코팅된 플레이트를 사용하였다. Matrigel은 -80° C에서 보관되며, 사용 전에 4° C에서 해동하는 데 약 30분이 걸렸다. 해동된 Matrigel을 차가운 DMEM/F12 매체에 희석해 사용하였다. Matrigel을 희석한 후 6well 플레이트에 1ml씩 분주해 37° C에서 30분 동안 코팅하였다. 코팅 후에는 mTeSR(+Fasudil) 매체를 분주하고, iPSCs를 각 well에  $6 \times 10^5$  cells씩 시딩하였다. 이 밀도가 혈관내피세포 마커 비율이 가장 높게 나오는 것으로 알려져 있다.

[0109] Day 1: 중배엽 유도 STEMdiff Mesoderm Medium을 실온에서 해동한 후, 기존 매체를 제거하고 STEMdiff Mesoderm Induction Medium 3mL를 천천히 well 벽면에 분주하였다. 세포를 24시간 동안 인큐베이션하며, 이 단계에서 세포 손실이 발생할 수 있으므로 매체 제거 시에는 1000P 팁을 사용하였다.

[0110] Day 2: 중배엽 유도 반복 Day 1의 중배엽 유도 단계를 동일하게 반복하였다.

[0111] Day 3: 내피세포 유도 Stemdiff Endothelial Induction Medium을 사용하였다. 이 매체는 2-8° C에서 오버나이트 해동하거나, 사용 전에 실온에서 워밍할 수 있다. 기존의 매체를 제거한 후 Endothelial Induction Medium 4mL를 well 벽면에 천천히 분주하고, 48시간 동안 인큐베이션하였다. 이때 세포 모양의 변화를 관찰하였다.

[0112] Day 5: 내피세포 유도 반복 Day 3의 내피세포 유도 단계를 동일하게 반복하였다.

[0113] Day 7: 수확 및 서브컬처 STEMdiff Endothelial Expansion Medium을 준비하였다. 세포 수확 2시간 전에 ACF 세포 부착 서브스트레이트로 플레이트를 코팅하였다. ACF를 D-PBS에 100배 희석해 사용하며, 코팅된 플레이트는 필요할 경우 4° C에서 최대 3일간 보관할 수 있다. 코팅 후 D-PBS로 한 번 세척한 뒤, 바로 매체를 분주하였다.

세포 수확 과정에서는 Accutase를 실온에서 워밍하고, D-PBS로 세포를 부드럽게 세척하였다. 각 well에 Accutase 1mL를 처리하고, 37° C에서 4-5분간 인큐베이션하였다. 세포가 떨어지면 부드럽게 탭핑해 수집하였다. 세포가 충분히 떨어지지 않으면 추가로 1-2분 더 인큐베이션하였다. 인큐베이션은 7분을 초과하지 않도록 하였다. PBS 1mL를 분주해 세포를 싱글 셀 서스펜션으로 만든 후, 모든 세포를 튜브에 옮기고 한 번 더 PBS로 세척한 후 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, 세포 펠릿을 STEMdiff Endothelial Expansion Medium에 재현탁하였다. 세포 계수 및 시딩 세포를 계수한 후, 5000-15000 cells/cm<sup>2</sup> 로 시딩하였다. EC 마커인 CD144(+)와 HLA-ABC(-)로 정렬을 진행하였다. 세포를 3일 동안 배양하며, 충분히 자라지 않았다면 매체를 새로 교체하고 인큐베이션을 계속하였다. 세포가 90-100% 밀도로 자라면 패시지나 확장을 진행하였다.

[0114] 분화된 세포 중 혈관내피세포의 마커인 CD31, CD144를 동시에 발현하는 세포를 분리하였다.

## [0116] 2.2 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포주의 확립

[0117] 실시예 2.1의 방법으로 분화시킨 혈관내피세포의 계대배양시 세포 특성이 유지되는지 검증하기 위하여, FACS를 이용하여 혈관내피세포 마커(CD31+, CD144+) 및 저면역원성 관련 마커(B2M-, HLA-E+, PD-L+) 유지 비율을 확인하였다.

[0118] 구체적으로, 세포를 준비하기 위해 먼저 배지를 제거한 후, PBS(1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)와 10% FBS 포함)로 3회 세척하였다. 이후 트립신 처리를 하고, 세포를 conical 튜브에 옮겨 12,000rpm으로 3분 동안 원심분리한 다음, 1.5ml 튜브를 준비해 필요한 수만큼 샘플을 나눠 담고, 네거티브 컨트롤(염색하지 않은 세포)도 함께 준비하였다. 클린벤치의 불을 끈 후, CD31+, CD144+ 혼합 형광시약과, HLA-E, CD47, HLA-ABC 혼합 형광시약을 제조하며, 제조는 PBS 85μl에 antibody 5μl로 진행하고, 이 혼합물을 얼음에 보관하였다. 원심분리가 완료되면 상층액을 제거하고, 펠릿에 형광시약 100μl를 첨가해 거품이 생기지 않도록 천천히 피펫팅하였다. 네거티브 컨트롤에는 PBS 100μl를 넣어 준비하였다. 모든 샘플을 1.5ml 튜브로 옮긴 후, 튜브를 록 호일로 감싸서 4° C에서 30분 동안 보관하였다. 30분 보관 후, 클린벤치의 불을 끄고 PBS를 첨가한 다음 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 최종적으로 세포를 FACS 튜브에 옮기고, 거품이 생기지 않도록 피펫팅해 500-800μl의 PBS에 혼합하였다. 이후 튜브를 호일로 덮어 보관한 후 FACS sorting을 진행하였다. Sorting이 끝난 세포는 1% P/S가 포함된 인산완충식염수(PBS)로 3회 세척한 후 피브로넥틴(FN) coated-60mm cell culture dish에 배양하였다.

[0119] 상기 과정을 통해 확인한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0120] 도 4는 계대배양시 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포의 특성이 유지되는지를 확인하기 위해, 혈관내피세포 마커(CD31+, CD144+) 및 저면역원성 관련 마커(B2M-, HLA-E+, PD-L+) 유지 비율을 FACS를 이용해 측정된 결과이다:

[0121] 도 4a는 혈관내피세포 마커(CD31+, CD144+)의 유지 비율을 측정한 결과이고, 도 4b는 저면역원성 관련 마커(B2M-, HLA-E+, PD-L+) 유지 비율을 측정한 결과이다.

[0122] 도 4에 나타난 바와 같이, 계대배양을 통해서도 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포의 특성이 잘 유지됨을 확인할 수 있다.

## [0124] 실시예 3. 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포에 혈관신생억제능 부여

### [0125] 3.1 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포에 Ang1, Tie2 도입

[0126] 실시예 2의 방법으로 제조한 저면역원성 만능줄기세포유래 혈관내피세포를 두 군으로 나누어 Ang1, Tie2를 각각 형질 도입(transduction) 하였다.

[0127] 구체적으로, Day 0에 uiEC 세포를 Fibronectin으로 코팅된 6-well plate에 각 well당 1x10<sup>5</sup> 세포를 seeding한 후, 37° C, 5% CO2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. Day 1에 B2M KO 렌티바이러스를 이용해 트랜스덕션을 수행하였다. EGM-2 배지 1ml 기준으로 각 well에 B2M KO 렌티바이러스 10μl와 polybrene 1μl를 섞어 준비한 후, 24시간 배양한 세포의 배지를 제거하고 혼합물을 각 well에 1ml씩 분주하였다. Day 2, Day 4, Day 6에는 plate에 있는 배지를 제거하고 EGM-2 배지로 교체하였다. Day 8에 CD47, HLA-E, Ang1, 또는 Tie2 유전자의 과발현을 위해 렌티바이러스를 이용해 트랜스덕션을 진행하였다. EGM-2 배지 500μl 기준으로 각 유전자별로 렌티바이러스 10μl와 polybrene 1μl를 섞어 혼합물을 제조하였다. Ang1 과발현의 경우 CD47, HLA-E, Ang1 렌티바

이러스를 각각 500  $\mu$ l씩 well에 분주하고, Tie2 과발현의 경우 CD47, HLA-E, Tie2 렌티바이러스를 각각 500  $\mu$ l씩 well에 분주하였다. Day 9, Day 10, Day 11에는 배지를 제거하고 EGM-2 배지로 교체하였다. 필요한 양의 세포가 증식되면 FACS를 이용해 HLA-ABC negative, CD47 positive, HLA-E positive, Ang1 또는 Tie2 positive인 세포를 sorting하였다.

[0128] 상기 Ang1, Tie2를 각각 형질 도입(transduction)한 저면역원성 만능줄기세포유래 혈관내피세포 중, Tie2 유전자가 전달된 세포(uiEC\_Tie2)와 Ang1 유전자가 전달된 세포(uiEC\_Ang1)를 분리하였다. Tie2 유전자가 전달된 세포(uiEC\_Tie2)는 항체를 사용하여 positive 세포분리법을 사용하였고, Ang1 유전자가 전달된 세포(uiEC\_Ang1)는 유전자 가위에 GFP tagging 하여 형광 유세포 분리를 사용하였다. 상기한 과정을 통해 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포에 Tie2와 Ang1을 각각 형질 전환한 uiEC\_Tie2 및 uiEC\_Ang1를 확립하였다.

### [0130] 3.2 Tie2 또는 Ang 1 과발현 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Tie2, uiEC\_Ang1) 확인

[0131] 실시예 3.1의 방법으로 제작한 uiEC\_Tie2, uiEC\_Ang1에서의 Tie2 또는 Ang1 유전자 발현 여부 및 정도를 확인하였다.

[0132] 구체적으로, 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)에 Tie2, Ang1, 유전자 전달 성공 시 각각 GFP, RFP 발현으로 유전자 전달 확인이 가능하도록 Lentivirus vector에 형광물질을 표지 (LV-mCherry-hTie2, LV-eGFP-hANG1)하였다. 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)에 Tie2, Ang1 유전자 전달 여부를 RFP, GFP 발현으로 현광현미경을 통해 확인하였다

[0133] 도 5는 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)에 Ang1 유전자와 Tie2 유전자 전달 여부를 GFP, RFP 발현으로 확인한 사진이다.

[0134] 도 5에 나타난 바와 같이, 실시예 3.1의 방법으로 제조한 Tie2 또는 Ang 1 과발현 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Tie2, uiEC\_Ang1)에서 RFP, GFP가 발현되어 형광 신호가 검출됨을 확인하였다. 이는 저면역원성 유도만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)에서 Ang1 유전자 또는 Tie2 유전자가 발현됨을 의미한다.

### [0136] 실시예 4. Tie2 또는 Ang 1 과발현 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Tie2, uiEC\_Ang1)에서 Tie2 또는 Ang 1 유전자 발현량 확인

[0137] 실시예 3에 따라 제작한 Tie2 또는 Ang1 과발현 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Tie2, uiEC\_Ang1)에서 Tie2 또는 Ang1 유전자 발현 효율을 평가하기 위해 RT-PCR 및 FACS로 분석하였다.

[0138] 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. Tie2 또는 Ang1의 mRNA 발현을 검출하기 위해 RT-PCR분석은 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems)를 사용하여 수행되었다. 각 샘플은 GAPDH 발현에 대한 상대정량으로 분석하였다. Tie2 또는 Ang1 과발현 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Tie2, uiEC\_Ang1)에서 Tie2 또는 Ang1 유전자가 유의미하게 발현이 증가하였으며, 높은 발현 수준을 나타냈다.

### [0140] 실험예 1. 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)의 저면역원성 확인

#### [0141] 1.1자연살해세포 killing assay

[0142] 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)의 저면역원성을 확인하기 위해, 자연살해세포 killing assay를 수행하였다.

[0143] 구체적으로, NK 세포 분리는 건강한 공여자의 말초혈액에서 단핵세포(PBMC)를 분리한 후 유세포 분석(FACS)을 이용하여 NK 세포를 분리하였다.

[0144] 표적 세포로 uiEC, uiEC-Ang1, uiEC-Tie2을 준비하였고, 대조군으로 A549세포주를 배양하였다. 공배양 단가에서 NK 세포와 표지된 표적 세포를 다양한 비율(예: 5:1, 10:1, 20:1)로 혼합하고, 37° C, 5% CO2 조건에서 4-6시간 동안 배양 하였다. 세포 사멸을 측정하기 위해서 LDH release assay를 사용했으며, 사멸된 세포에서 방출되

는 lactate dehydrogenase(LDH) 효소의 양을 측정하였다.

[0145] 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)의 저면역원성을 확인하기 위한 자연살해세포 killing assay 수행 결과, 야생형 유도만능줄기세포(iPSC)에 비하여 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)에서 자연살해세포 면역반응 cell death와 관련된 LDH(lactate dehydrogenase)가 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 유도만능줄기세포에서 B2M을 녹아웃(knock out, KO)시킨 경우 LDH가 현저히 증가하였으나, CD47 및 HLA-E를 발현시키는 경우, LDH 수준이 감소하는 것을 확인하였다.

[0146] 이는 MHC class 1 HLA 항원 미발현에 따라 NK 세포가 활성화되어 나타나는 면역 거부 반응을 CD47, HLA-E를 발현 백터를 추가 전달하여 NK 세포 활성화 를 방지하고, 저면역원성 세포를 제작할 수 있음을 의미한다.

## [0148] 1.2 인간면역을 보유한 마우스에서 저면역원성 확인

[0149] 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)의 저면역원성을 확인하기 위해 인간면역이 도입된 NSG 마우스에 면역회피 혈관내피세포를 이식하여 장기간 생존선을 검증하는 실험을 진행하였다. 저면역원성 유전자 전달 과정(B2M 녹아웃, HLA-E 발현, PD-L1 발현)을 거치지 않은 만능줄기세포(Ipsc)에서 분화된 혈관내피세포(iEC)를 대조군으로 사용하였다.

[0150] 구체적으로, 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC) 및 저면역원성 유전자 전달과정을 거치지 않은 만능줄기세포에서 분화된 혈관내피세포(iEC)의 생존성 관찰 용이성을 위해 NSG 마우스에 이식되는 혈관내피세포의 표면에 근적외선 형광 표지자를 고정한 후, 세포분열이 발생하지 않도록 X-ray를 20Gy 처리 후 이식하였다. 그 후 21일 동안 각각의 상기 혈관내피세포를 이식한 NSG마우스를 관찰하였다. 상기 이식된 혈관내피세포는 면역형광 동물관찰용 면역형광 이미징 장비(IVIS)를 사용하여 주기적으로 이미징 관찰하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0151] 도 6은 NSG 마우스에서 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC) 및 저면역원성 유전자 전달과정을 거치지 않은 만능줄기세포에서 분화된 혈관내피세포(iEC)의 생존성 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

[0152] 도 6에 나타난 바와 같이, 인간면역을 보유한 마우스 피하에 이식된 상태에서 저면역원성(면역회피) 기능이 없는 만능줄기세포에서 분화된 혈관내피세포(iEC)는 생존기간이 상대적으로 짧은 반면, 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC)는 인간면역을 보유한 마우스 피하에 이식된 상태에서 장기간 생존함을 확인하였다.

## [0154] 실험예 3. uiEC\_Tie2와 uiEC\_Ang1의 공동배양시 혈관내피세포의 이동감소효과 확인

[0155] 망막내피세포의 이동성 평가를 통해 실시예 3에 따라 제작한 Tie2 과발현 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Tie2)와 Ang1 과발현 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Ang1)의 공동배양 효과를 평가하였다.

[0156] 구체적으로, 혈관내피세포의 이동성 평가를 위한 모델에 대해서는 한국 출원(10-2023-0090063)의 명세서에 기재된 혈관내피세포 이동성 평가 모델을 참조한다. 상기 출원의 명세서에는 그 전체로서 본 명세서에 참조된다.

[0157] 간단하게는 uiEC\_Tie2와 uiEC\_Ang1의 공동배양시 혈관내피세포의 이동감소효과 확인하기 위해 구멍 크기가 8um 인 6.5mm 직경의 폴리카보네이트 필터가 포함된 Transwell챔버 (CorningCostar)를 사용하였다. Tie2를 과발현시키지 않은 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Cont., NC) 또는 Tie2를 과발현시킨 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Tie2, Lv-Tie2)를  $5 \times 10^4$  cells/ml로 seeding을 하고, Ang1을 과발현시키지 않은 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Cont.) 또는 Ang1을 과발현시킨 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포(uiEC\_Ang1, Lv-Ang1)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 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 7에 나타내었다.

[0158] 도 7은 필터 아래로 이동한 혈관세포를 crystal violet으로 염색한 세포들을 acetic acid로 녹여 Spectrofluorometer에서 595nm 흡광도로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(uiEC; 형질감염을 시키지 않은 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관 내피세포, uiEC-Tie2; Tie2를 과발현시킨 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내

피세포, uiEC-Ang1; Ang1을 과발현시킨 저면역원성 만능줄기세포 유래 혈관내피세포).

[0159] 도 7에 나타난 바와 같이, 질환환경(VEGF 함유배양액)에서 uiEC\_Cont.세포는 매우 높은 세포이동성(VEGF가 없는 경우의 약 2배)을 보이는 반면, 질환 환경(VEGF 함유배양액)에서 uiEC\_Ang1세포와 uiEC\_Tie2세포를 공동배양했을 때 VEGF에 의한 망막내피세포의 이동을 효과적으로 감소함을 확인하였다. 특히 uiEC\_Ang1과 uiEC\_Tie2의 비율을 3:5로 공동배양하는 경우, VEGF에 의한 망막내피세포의 이동이 가장 효과적으로 감소되었다. 이는 uiEC\_Ang1세포와 uiEC\_Tie2세포를 공동배양한 세포치료제의 경우 질환환경에서도 망막내피세포의 이동이 효과적으로 억제됨을 의미한다.

[0161] **실험예 4. uiEC\_Ang1 세포와 uiEC\_Tie2 세포에서 Tight junction 형성 정도 확인**

[0162] uiEC-Ang1 세포와 uiEC-Tie2 세포의 Tight junction 형성도를 평가하기 위하여, TEER(Trans epithelial/endothelial electrical resistance)를 측정하였다.

[0163] 구체적으로, uiEC, uiEC-Tie2, uiEC-Ang1 세포를 투과성 멤브레인이 장착된 Transwell insert에 시딩하고, 세포가 완전히 confluency를 형성할 때까지 3일 간 배양하였다. 현미경으로 세포 형태를 관찰해 세포가 뽀뽀하게 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 8에 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.

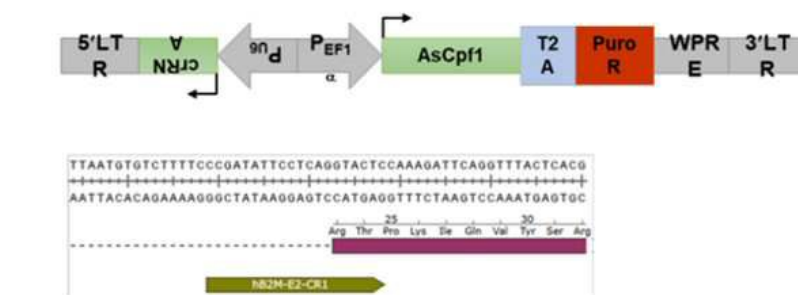
[0164] 도 8은 다공성 멤브레인에 배양된 uiEC, uiEC-Ang1+uiEC-Tie2를 VEGF 첨가 또는 첨가되지 않은 배양 배지에서 일정 시간 경과 후 멤브레인 양쪽의 저항을 측정한 TEER(Trans epithelial/endothelial electrical resistance) 결과를 나타낸 그래프이다.

[0165] 도 8에 나타난 바와 같이, uiEC +VEGF의 경우 시간이 지날수록 TEER 값이 낮아져 cell 간의 tight junction이 약화되었고, uiEC-Ang1+uiEC-Tie2의 경우 VEGF를 처리하여도 TEER 값이 낮아지지 않음을 확인하였다.

[0166] 이러한 결과는 혈관내피세포의 증식과 혈관 투과성을 증가시키는 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)를 uiEC-Ang1+uiEC-Tie2에 처리하더라도 tight junction이 약화되지 않음을 의미하는 것으로, uiEC-Ang1+uiEC-Tie2가 망막 내 혈관신생억제에 효과가 있음을 의미한다.

## 도면

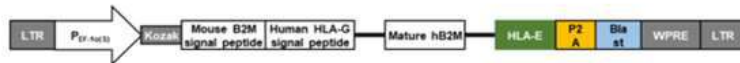
### 도면1



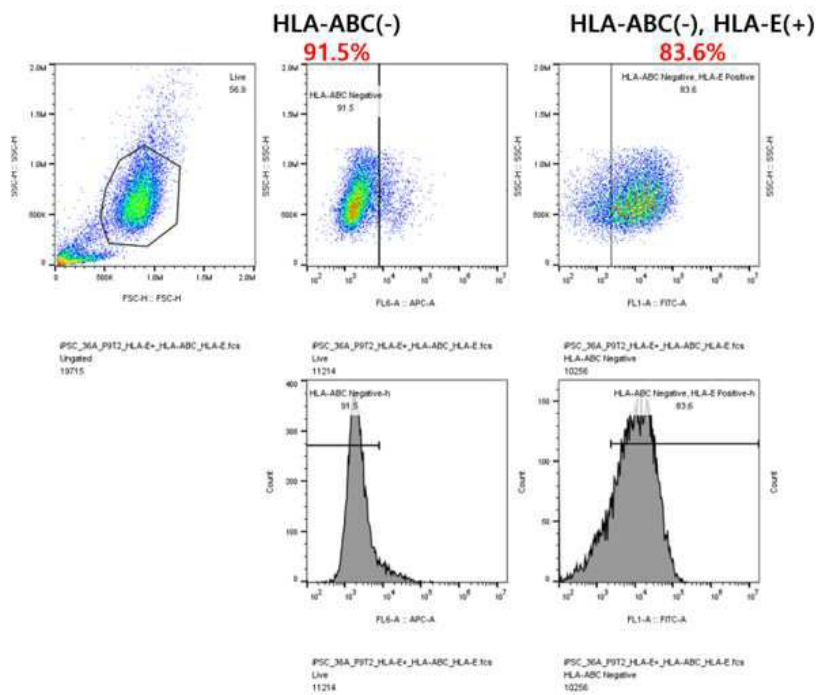
도면2a



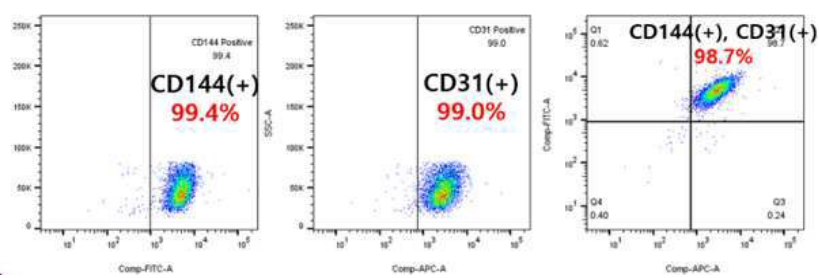
도면2b



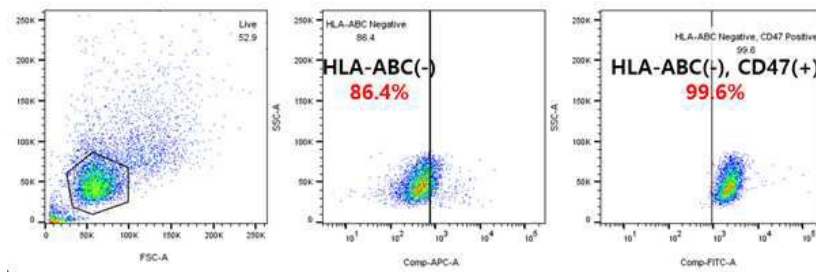
도면3



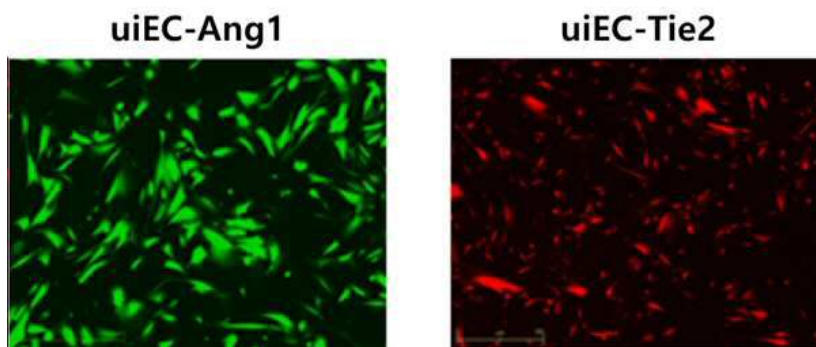
도면4a



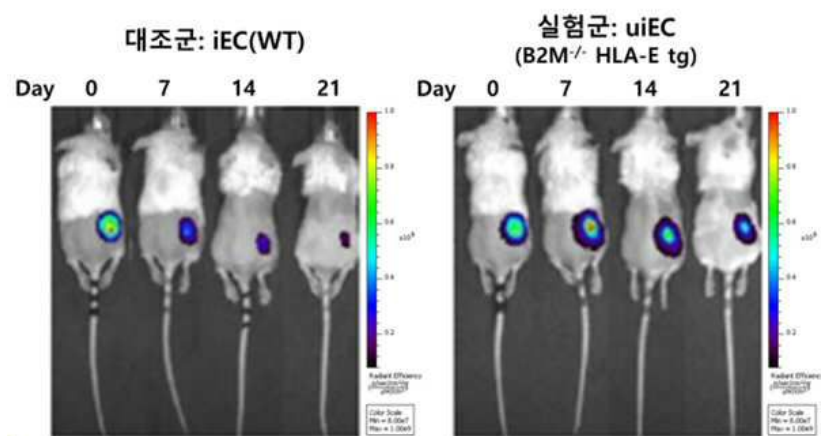
도면4b



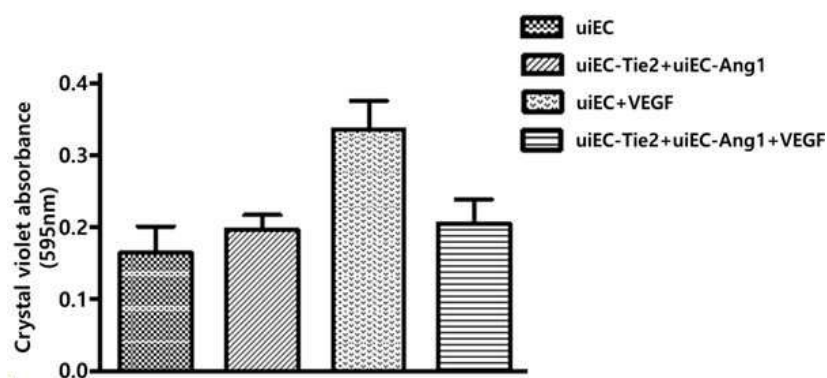
도면5



도면6



도면7



도면8

