



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0050277
(43) 공개일자 2019년05월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
C07K 17/14 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/4702 (2013.01)
A61K 38/18 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0111077
(22) 출원일자 2018년09월17일
심사청구일자 2018년09월17일
- (30) 우선권주장
1020170145305 2017년11월02일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
윤영섭
서울특별시 서대문구 수색로 100, 210동 901호 (북가좌동, DMC래미안e편한세상)
- 이기범
미국 08852 뉴저지, 몬마우스 정션, 킹스랜드 서킷 19
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인인벤싱크

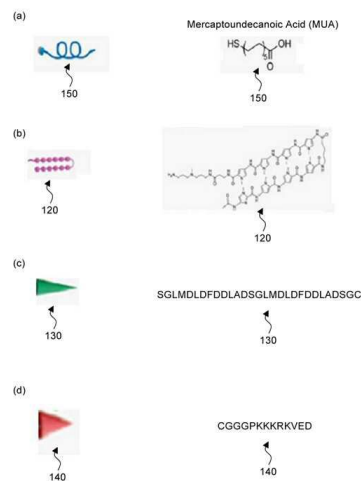
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물

(57) 요약

본 명세서에서는 ETV2 유전자에 대한 DNA 결합 도메인 (DNA binding domain) 을 포함하는 폴리아마이드, 핵 위치 신호 (nuclear localization signal) 펩타이드 및 나노 입자를 포함하는, ETV2 전사 인자가 제공된다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

A61K 38/1825 (2013.01)
C07K 17/14 (2013.01)
C12N 5/069 (2013.01)
C07K 2319/09 (2013.01)
C12N 2501/60 (2013.01)
C12N 2506/1307 (2013.01)

사이 통, 쉼

미국 08854 뉴저지, 나이트스브리지 로드 33, 피스 카타웨이

(72) 발명자

조현열

서울특별시 강남구 광평로34길 55, 109동 304호 (수서동, 강남테시아포레아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C2782
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 첨단의료기술개발/줄기세포, 재생의료분야 기반구축 국제협력
 연구과제명 나노입자를 이용한 혈관내피세포로의 직접세포전환법 개발
 기 여 율 40/100
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2015.12.01 ~ 2019.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C2211
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 줄기세포, 재생의료 실용화/성과창출형 중개연구
 연구과제명 유도만능줄기세포에서 분화된 혈관내피세포를 이용한 말초동맥질환의 세포치료법 개발
 기 여 율 30/100
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2016.11.08 ~ 2021.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3A9C6031514
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오의료기술개발사업
 연구과제명 유도만능줄기세포에서 심근세포 아형으로의 분화와 분리 및 이를 이용한 세포치료제 및 약물평가 기반기술 개발
 기 여 율 30/100
 주관기관 연세대학교
 연구기간 2015.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

ETV2 유전자에 대한 DNA 결합 도메인 (DNA binding domain) 을 포함하는 폴리아마이드;
핵 위치신호 (nuclear localization signal) 펩타이드;
및 상기 폴리아마이드 및 상기 핵 위치 신호 펩타이드가 결합하는 나노 입자를 포함하는, ETV2 전사 인자.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 ETV2 유전자의 전사 활성 도메인 (activation domain) 을 더 포함하는 활성 펩타이드, ETV2 전사 인자.

청구항 3

제2항에 있어서,
복수개의 MUA (mercaptoudecanoic acid) 를 더 포함하고,
상기 복수개의 MUA는 상기 폴리아마이드, 상기 활성 펩타이드 및 상기 핵 위치신호 펩타이드 중 적어도 하나와
상기 나노 입자를 연결하도록 구성된, ETV2 전사 인자.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 폴리아마이드는 상기 나노 입자의 전체 표면에 대하여 4 내지 10 %의 표면을 갖는, ETV2 전사 인자.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 핵 위치신호 펩타이드는 상기 나노 입자의 전체 표면에 대하여 60 내지 75 %의 표면을 갖는, ETV2 전사 인자.

청구항 6

제2항에 있어서,
상기 활성 펩타이드는 상기 나노 입자의 전체 표면에 대하여 20 내지 30 %의 표면을 갖는, ETV2 전사 인자.

청구항 7

제2항에 있어서,
상기 활성 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는, ETV2 전사 인자.

청구항 8

제1항에 있어서,
상기 핵 위치신호 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는, ETV2 전사 인자.

청구항 9

제1항에 있어서,
상기 폴리아마이드는 헤어핀 구조를 갖는, ETV2 전사 인자.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 나노 입자는, 금 나노 입자, 자기 핵 금 나노 입자, 은 나노 입자 및 주석 나노 입자 중 적어도 하나인, ETV2 전사 인자.

청구항 11

제1항에 있어서,

SAHA (suberanilo-hydroxamic acid-ammonium-adamatane) 유도체 또는, CTB (N-(4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-ethoxybenzamide) 유도체를 더 포함하는, ETV2 전사 인자.

청구항 12

ETV2 유전자에 대한 DNA 결합 도메인을 포함하는 폴리아마이드, 상기 ETV2 유전자의 발현 활성 도메인을 포함하는 활성 펩타이드, 핵 위치신호 펩타이드로 구성된 기능성 중합체 (functional polymer) 각각과 MUA (mercaptoudecanoic acid) 를 혼합하는 단계;

상기 폴리아마이드 및 상기 MUA 접합체, 상기 활성 펩타이드 및 상기 MUA 접합체, 및 상기 핵 위치신호 펩타이드 및 상기 MUA 접합체를 형성하도록, EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) 및 NHS (N-hydroxy succinimide) 를 첨가하는 단계; 및

ETV2 전사 인자를 형성하도록, 나노 입자와 상기 폴리아마이드 및 상기 MUA 접합체, 상기 활성 펩타이드 및 상기 MUA 접합체, 및 상기 핵 위치신호 펩타이드 및 상기 MUA 접합체 중 적어도 하나를 반응 시키는 단계를 포함하는, ETV2 전사 인자의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 반응시키는 단계 이후에 수행되는,

상기 ETV2 전사 인자에 SAHA 또는 CTB를 첨가하는 단계를 더 포함하는, ETV2 전사 인자의 제조 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 혼합하는 단계는,

상기 기능성 중합체 전체에 대하여 4 내지 10 %의 비율을 갖는 상기 폴리아마이드, 상기 기능성 중합체 전체에 대하여 20 내지 30 %의 비율을 갖는 상기 활성 펩타이드, 및 상기 기능성 중합체 전체에 대하여 60 내지 75 %의 비율을 갖는 상기 핵 위치신호 펩타이드 각각을 MUA와 혼합하는 단계를 포함하는, ETV2 전사 인자의 제조방법.

청구항 15

제1 항 내지 제11 항 중 어느 한 항에 기재된 ETV2 전사 인자를 포함하는, 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 조성물은,

정맥 주사, 근육내 주사, 피하 주사, 피내 주사, 기관내 주사 및 피부 국소 도포 중 적어도 하나의 방법으로 투여되는 형태인, 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 ETV2 전사 인자에 의해 분화된 직접 전환 혈관 내피세포 (directly reprogrammed endothelial cells) 를 더 포함하는, 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 18

인간을 제외한 포유 동물의 허혈성 조직에 제1 항 내지 제12 항 중 어느 한 항에 기재된 ETV2 전사 인자를 주입하는 단계를 포함하는, 허혈성 심혈관 질환의 치료 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 ETV2 전사 인자를 주입하는 단계는,

상기 포유동물의 허혈성 조직에 상기 ETV2 전사 인자에 의해 분화된 직접 전환 혈관 내피세포 (directly reprogrammed endothelial cells) 를 주입하는 단계를 더 포함하는, 허혈성 심혈관 질환의 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 허혈성 혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 허혈성 조직에서 혈관 형성 특이적인 전사 인자를 과발현 시킴으로써 허혈성 조직에 대하여 치료 효과를 제공하는, 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 허혈성 심혈관 질환은 (ischemic cardiovascular disease) 혈관을 통한 산소 및 영양 공급의 부족에 따른 유병률과 사망률이 높은 질환 중 하나이다. 이러한 허혈성 심혈관 질환은 전세계적으로 증가 추세에 있다.

[0003] 이에 따라, 허혈성 심혈관 질환의 치료를 위해, 화학적 치료법이 제시되었으나, 손상되거나 결함을 갖는 심장은 스스로 회복되기 어렵기 때문에 이들 질환에 대한 화학적 치료법은, 질환의 진행만을 지연시켜줄 뿐이다. 심장 이식은 심장 기능의 회복에 있어서, 근본적인 치료요법이 될 수 있다. 그러나, 장기 제공자의 부족, 의료 윤리, 환자의 육체적 및 경제적 부담 등의 문제를 야기할 수 있다.

[0004] 한편, 허혈성 심혈관 질환의 치료를 위한 새로운 전략으로, 줄기세포로부터 혈관을 새로 만드는 신혈관생성 (neovascularization) 을 유도하여 혈관을 생성하는 재생치료가 대안 치료법으로 제안되었다. 이러한 줄기세포 치료제를 이용한 혈관 재생치료에서, 성체 줄기세포가 주로 연구에 이용되고 있다. 그러나, 성체 줄기세포를 이용한 치료법은 여러 임상시험에서 그 효과가 미흡한 것으로 나타났고, 말초 혈관질환의 임상적용에 있어서 성체 줄기세포를 이용한 치료법의 효과는 증명되지 못한 실정이다. 성체 줄기세포를 이용한 세포 치료법의 미약한 치료 효과는, 성체 줄기세포의 태생적인 한계, 또는 혈관 내피세포, 심근 세포와 같은 표적 세포로의 분화능력이 떨어지는 것으로부터 기인할 수 있다.

[0005] 이에 따라, 이상의 한계를 극복하고 효과적으로 허혈성 심혈관 질환을 치료할 수 있는, 줄기세포를 이용한 혈관 재생치료법에 대한 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 한편, 만능 줄기세포 (pluripotent stem cell) 는 자가증식 능력을 갖추고, 다양한 세포로 분화할 수 있어, 혈관 재생치료에 이용될 수 있다. 이에 따라, 허혈성 조직 기능을 회복시킬 수 있는 새로운 전략으로, 배아로부터 분리한 배아 줄기세포 (ES cell, embryonic stem cell) 와 체세포로부터 만들어진 유도 만능 줄기세포 (induced pluripotent stem cell) 로부터 분화된 혈관 내피세포 (endothelial cells) 를 이용한, 혈관 재생치료법이 제시되었다.

- [0008] 한편, 본 발명의 발명자들은, 종양 및 이상 조직의 발생과 같은 만능 줄기세포가 갖는 잠재적 위험 요소들, 분화 과정에서 이용되는 동물성분의 이용, 혈관 내피세포로의 낮은 분화율 등이, 혈관 재생치료에 있어서 부작용 또는 미미한 치료효과를 야기시킬 수 있음을 인식하였다.
- [0009] 이에, 본 발명의 발명자들은, 세포 또는 조직 특이적 전사인자 유전자를 성체 체세포에 과발현시킴에 따라 만능 분화상태 (pluripotent state) 를 거치지 않고 다른 계열 (lineage) 의 체세포로 직접 전환 (directly reprogram) 되는, 직접 세포 전환법 (direct cellular reprogramming) 에 주목하였다.
- [0010] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 섬유아세포에 혈관 형성 특이적인 전사 인자인 ETV2를 과발현시킴으로써, 만능 분화상태를 거치지 않고 혈관 내피세포로 직접 전환되는 것을 발견할 수 있었다.
- [0011] 특히, 본 발명의 발명자들은 ETV2를 모사한 ETV2 전사 인자를 이용함으로써, 전사 인자의 과발현을 위해, 종래에 이용되던 레트로 바이러스 또는 렌티 바이러스를 매개로 하는 유전자 주입법이 갖는 세포의 유전체에 나타나는 삽입변이에 따른 임상적용의 문제를 해결할 수 있었다.
- [0012] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 섬유아세포와 같은 인간 체세포에 주입되어 인간 체세포로부터 혈관 내피세포로 직접 전환시킬 수 있는, ETV2 전사 인자 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는, 허혈성 조직에 임상적용 가능하고, 주입된 허혈성 조직 내에서 직접 전환 혈관 내피세포가 혈관신생을 유도하는, ETV2 전사 인자를 포함하는 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는, ETV2 전사 인자를 인간 체세포에 주입 시키고, 분화된 직접 전환 혈관 내피세포 (directly reprogrammed endothelial cell) 를 획득하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포의 직접 전환 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는, 인간을 제외한 포유 동물의 허혈성 조직에 ETV2 전사 인자를 주입하는 단계를 포함하는, 허혈성 심혈관 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, ETV2 유전자에 대한 DNA 결합 도메인 (DNA binding domain) 을 포함하는 폴리아마이드, 핵 위치신호 (nuclear localization signal) 펩타이드 및 나노 입자를 포함하는, ETV2 전사 인자가 제공된다.
- [0018] 본 명세서 사용되는 용어, "ETV2 전사 인자"는 ETV2 유전자에 결합하여 이의 전사를 활성화시키도록 합성된, 인공의 전사 인자를 의미할 수 있다. 이에, ETV2 전사 인자가 투입된 세포 내에서 ETV2 전사 인자에 의해 ETV2 유전자의 발현이 촉진될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 ETV2 전사 인자는, 나노 입자를 중심으로 하여 이의 표면에 ETV2 유전자의 DNA 결합 도메인을 포함하는 폴리아마이드 및 핵 위치 신호 펩타이드가 부착된 구조를 가질 수 있다.
- [0020] 본 명세서에 사용되는 용어, "ETV2 유전자"는 혈관 형성과 연관된 유전자로, 구체적으로 혈관 내피세포에 특이적으로 발현하는 유전자일 수 있다.
- [0021] 이에, 본 명세서에 사용되는 용어, "ETV2 유전자의 DNA 결합 도메인"은, ETV2 유전자의 결합 부위 (binding site) 에 상보적으로 결합할 수 있는 도메인을 의미할 수 있다.
- [0022] 이때, "ETV2 유전자의 DNA 결합 도메인을 포함하는 폴리아마이드"는, 헤어핀 구조를 이루는 파이롤 (pyrrole) 및 이미다졸 (imidazole) 서열과 DMAPA (dimethylaminopropylamine) 을 포함하는 헤어핀 구조의 폴리아마이드 화합물일 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리아마이드는 PyPyβ ImImPyImPyPyβ PyPyβ-DMAPA의 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, ETV2 유전자의 DNA 결합하는 한, 보다 다양한 구조적 다양성을 가질 수 있다.
- [0023] 본 명세서에 사용되는 용어, "핵 위치신호 펩타이드"는 세포 내에서 합성되어 핵에 이송해야 할 단백질의 1차 구조 내에 존재하는 도메인을 갖는 펩타이드를 의미할 수 있다. 이에, 핵 위치신호 펩타이드는 ETV2 전사 인자의 세포의 핵 내로의 유입을 촉진할 수 있다. 이때, 핵 위치 신호 펩타이드는, 서열번호 2의 아미노산 서열과

70 % 이상의 상동성을 가질 수 있다. 바람직하게 핵 위치 신호 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 80 % 이상의 상동성을 가질 수 있다. 보다 바람직하게, 핵 위치 신호 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 90 % 이상의 상동성을 가질 수 있다. 더욱 바람직하게, 핵 위치 신호 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 100 %의 상동성을 가질 수 있다.

- [0024] 한편, 본 명세서에 사용되는 용어, "나노 입자"는 나노 크기를 갖는 금속 입자일 수 있다. 이때, 나노 입자는, 금 나노 입자, 자기 핵 금 나노 입자, 은 나노 입자 및 주석 나노 입자 중 적어도 하나일 수 있다. 바람직하게 나노 입자는 자기 핵 금 나노 입자일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 표적 세포의 핵 안으로 들어 갈 수 있고, 전술한 한 ETV2 유전자의 DNA 결합 도메인을 포함하는 폴리아마이드 및 핵 위치 신호 펩타이드가 부착 가능한 다양한 입자일 수 있다.
- [0025] 한편, 나노 입자가 자기 핵 금 나노 입자일 경우, 자기 핵 금 나노 입자가 중심에 위치한 ETV2 전사 인자는 자성에 의해 표적 세포로 이동할 수 있고, 바이러스 또는 DNA 플라스미드와 같은 유전 물질을 이용하지 않고도 ETV2 유전자를 목표 세포 내에서 과발현시킬 수 있다. 나아가, 나노 입자를 포함하는 ETV2 전사 인자는 Raman/dark-field 이미징을 통해 비침습적 실시간 추적 가능성이 가능하고, MRI를 이용해 ETV2 전사 인자가 도입된 세포의 생체 내 존재와 위치를 추적할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 따르면, ETV2 전사 인자는 ETV2 유전자의 전사 활성 도메인 (activation domain) 을 더 포함하는 활성 펩타이드를 더 포함할 수 있다.
- [0027] 본 명세서에 사용되는 용어, "ETV2 유전자의 전사 활성 도메인"은 DNA 결합 도메인이 ETV2 유전자에 결합되면 ETV2 유전자의 전사를 개시하여 세포 내에서 ETV2 유전자의 발현을 활성화 시키는 도메인을 의미할 수 있다.
- [0028] 이때, "ETV2 유전자의 전사 활성 도메인을 포함하는 활성 펩타이드"는, 상기 ETV2 유전자의 전사 활성 도메인을 포함하는 펩타이드일 수 있다. 한편, 상기 활성 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 70 % 이상의 상동성을 가질 수 있다. 바람직하게 활성 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 80 % 이상의 상동성을 가질 수 있다. 보다 바람직하게, 활성 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 더욱 바람직하게, 활성 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 100%의 상동성을 가질 수 있다.
- [0029] 이때, 활성 펩타이드는, 전술한 ETV2 유전자에 대한 DNA 결합 도메인을 포함하는 폴리아마이드 및 핵 위치신호 펩타이드와 함께, 나노 입자 표면에 결합될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에 따르면, ETV2 전사 인자는, 복수개의 MUA (mercaptoudecanoic acid) 를 더 포함할 수 있다. 이때, 복수개의 MUA는 폴리아마이드, 활성 펩타이드 및 핵 위치신호 펩타이드 중 적어도 하나 및 나노 입자를 연결하도록 구성될 수 있다.
- [0031] 보다 구체적으로, MUA는, 폴리아마이드, 활성 펩타이드 및 핵 위치신호 펩타이드 중 적어도 하나의 기능성 중합체 (functional polymer) 와 결합하여 나노 입자 표면에 부착하는 링커의 역할을 할 수 있다. 예를 들어, MUA는 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) 및/또는 NHS (N-hydroxy succinimide) 에 의해 활성 펩타이드 및 핵 위치신호 펩타이드 중 적어도 하나의 기능성 중합체 (functional polymer) 와 결합할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 폴리아마이드는 나노 입자의 전체 표면에 대하여 4 내지 10 %의 표면적을 가질 수 있다. 바람직하게, 폴리아마이드는 나노 입자의 전체 표면에 대하여 7 내지 9 %의 표면적을 가질 수 있다. 보다 바람직하게, 폴리아마이드는 나노 입자의 전체 표면에 대하여 9 %의 표면적을 가질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 핵 위치신호 펩타이드는 나노 입자의 전체 표면에 대하여 60 내지 75 %의 표면적을 가질 수 있다. 바람직하게, 핵 위치신호 펩타이드는 나노 입자의 전체 표면에 대하여 65 내지 70 %의 표면적을 가질 수 있다. 보다 바람직하게, 핵 위치신호 펩타이드는 나노 입자의 전체 표면에 대하여 66 내지 69 %의 표면적을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 활성 펩타이드는 나노 입자의 전체 표면에 대하여 20 내지 30 %의 표면적을 가질 수 있다. 바람직하게, 활성 펩타이드는 나노 입자의 전체 표면에 대하여 21 내지 25 %의 표면적을 가질 수 있다. 보다 바람직하게, 활성 펩타이드는 나노 입자의 전체 표면에 대하여 22 내지 24 %의 표면적을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, ETV2 전사 인자는, SAHA (suberanilo-hydroxamic acid-ammonium-adamatane) 유도

체 또는, CTB (N-(4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-ethoxybenzamide) 유도체를 더 포함할 수 있다.

- [0036] 이때, SAHA 유도체는 HDAC (histone deacetylase) 의 활성을 억제시키고, CTB 유도체는 HAT (histone acetyl transferase) 의 활성을 촉진시킬 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 따르면, ETV2 유전자의 DNA 결합 도메인의 기능을 갖는 폴리아마이드, ETV2 유전자의 전사 활성 도메인의 기능을 갖는 활성 펩타이드 및 핵 위치 신호 펩타이드로 구성된 기능성 중합체 각각과 MUA (mercaptoudecanoic acid) 를 혼합하는 단계, 폴리아마이드 및 MUA, 활성 펩타이드 및 MUA, 및 핵 위치 신호 펩타이드 및 MUA가 각각 접합체를 형성하도록, EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) 및 NHS (N-hydroxy succinimide) 를 첨가하는 단계, 및 ETV2 전사 인자를 형성하도록, 나노 입자의 표면에 상기 접합체 각각을 반응시키는 단계를 포함하는 ETV2 전사 인자의 제조방법이 제공된다.
- [0038] 이때, 혼합하는 단계는, 기능성 중합체 전체에 대하여 4 내지 10 %의 비율을 갖는 상기 폴리아마이드, 기능성 중합체 전체에 대하여 20 내지 30 %의 비율을 갖는 상기 활성 펩타이드, 및 기능성 중합체 전체에 대하여 60 내지 75 %의 비율을 갖는 핵 위치신호 펩타이드 각각과 MUA와 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0039] 이에, ETV2 전사 인자 내에서 폴리아마이드 및 MUA 접합체는, 전체 기능성 중합체-MUA 접합체 대하여 4 내지 10 %의 개수로 나노 입자에 부착될 수 있다. 나아가, ETV2 전사 인자 내에서 활성 펩타이드 및 MUA 접합체는, 전체 기능성 중합체-MUA 접합체에 대하여 20 내지 30 %의 개수로 나노 입자에 부착될 수 있다. ETV2 전사 인자 내에서 핵 위치신호 펩타이드 및 MUA 접합체는, 전체 기능성 중합체-MUA 접합체에 대하여 60 내지 75 %의 개수로 나노 입자에 부착될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 따르면, ETV2 전사 인자에 SAHA 또는 CTB를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0041] 한편, ETV2 전사 인자는 섬유아세포와 같은 인간 체세포에 주입되어 피부 섬유아세포로부터 혈관신생능의 혈관 내피세포로 직접 전환시킬 수 있다. 이때, ETV2 전사 인자에 의해 전환된 직접 전환 혈관 내피세포는, 원천 세포인 섬유아세포에서 발현되지 않던 혈관 내피세포 특이적 유전자들 (예를 들어, ETV2 유전자) 이 발현될 수 있다. 이에, ETV2 전사 인자에 의해 전환된 직접 전환 혈관 내피세포는 허혈성 조직에 이식되는 세포 치료제 조성물로서 이용될 수 있다. 나아가, ETV2 전사 인자 또한, 허혈성 질환의 국소 부위에 주입 가능한 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물로서 이용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에 따르면, ETV2 전사 인자를 포함하는, 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물이 제공된다.
- [0043] 본 명세서 사용되는 용어, "허혈성 심혈관 질환"은 상동맥이 좁아지거나 막히게 되어 심장근육에 충분한 혈액 공급이 이루어지지 못할 때 나타나는 질환을 의미할 수 있다. 본원 명세서 내 개시된 허혈성 심혈관 질환은, 허혈성 심장 질환 (ischemic heart diseases) 과 동일한 의미로 해석될 수 있다.
- [0044] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따르면 ETV2 전사 인자를 포함하는 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물이 제공된다.
- [0045] 이때, 약학 조성물은 세포 치료제로서 제공될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은, 허혈성 조직의 복구를 위해, 결합부위 또는 그 인접 부위에 이식될 수 있다.
- [0046] 나아가, 본 발명의 약학 조성물은, ETV2 전사 인자에 의해 분화된 직접 전환 혈관 내피세포를 더 포함할 수 있다.
- [0047] 이에, ETV2 전사 인자에 의해 분화된 직접 전환 혈관 내피세포를 포함하는 본 발명의 약학 조성물은 허혈성 조직의 복구를 위해, 결합부위 또는 그 인접부위에 주입될 수 있다.
- [0048] 한편, 본 발명의 약학 조성물은 정맥 주사, 근육내 주사, 피하 주사, 피내 주사, 기관내 주사 및 피부 국소 도포 중 적어도 하나의 방법으로 투여되는 형태일 수 있다. 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 약학 조성물의 제형은 이에 제한되는 것은 아니며, 목적하는 해당 부위에 세포 치료제 조성물들이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따라 다양한 형태로 제형화될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학 조성물이 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되는 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성제, 희석제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 함황환원제, 산화방지제를 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물이 외용제 형태로 제형화 되는 경우, 상기 약학 조성물은 개별 치료제로서 기관 내 또는 피부에 도포되거나 다른 치료제와 병용하여 도포될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동

시에 투여될 수 있다. 허혈성 조직에 대한 본 발명의 약학 조성물의 투여에 있어서 이상의 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 본 발명의 약학 조성물의 투여량 및 도포량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0050] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 세포 치료제 조성물로서 이용되는 직접 전환 혈관 내피세포의 제조방법이 제공된다.
- [0051] 본 발명의 일 실시예에 따른, 혈관 내피세포의 제조방법은 피부 섬유아세포에 ETV2 전사 인자를 주입하는 단계, 및 직접 전환 혈관 내피세포 (directly reprogrammed endothelial cell) 를 분화시키는 단계를 포함한다.
- [0052] 이때, ETV2 전사 인자의 주입 방법은 레트로 바이러스와 렌티 바이러스를 매개로 하는 유전자 주입법과 상이할 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 치료제 조성물은, 허혈성 조직에 적용할 수 있는 임상적 안정성을 가질 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간을 제외한 포유 동물의 허혈성 조직에 본 발명의 ETV2 전사 인자를 주입하는 단계를 포함하는, 허혈성 심혈관 질환의 치료 방법이 제공된다.
- [0054] 이때 ETV2 전사 인자는 혈관의 손상으로 고통 받는 숙주, 예를 들어 인간을 제외한 포유 동물에 주입될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 허혈성 심혈관 질환의 치료 방법에서 ETV2 전사 인자는 심부전, 심장 마비, 관상동맥 질환, 심근 병증, 제한 심근 병증이나 비후성 심근 병증을 갖는 숙주에 적용될 수 있고, 나아가 뇌 혈관 질환, 당뇨 합병증, 창상에 대한 임상적 증상을 보이는 숙주에 주입될 수도 있다.
- [0055] 본 발명의 일 실시예에 따르면, ETV2 전사 인자를 주입하는 단계는, 인간을 제외한 포유 동물의 허혈성 조직에 ETV2 전사 인자에 의해 분화된 직접 전환 혈관 내피세포 (directly reprogrammed endothelial cells) 를 주입하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0056] 즉, ETV2 전사 인자에 의해 분화된 직접 전환 혈관 내피세포 (directly reprogrammed endothelial cells) 는 세포 치료제로서 숙주의 허혈성 조직에 주입될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 약학 조성물의 적용 범위는 이에 제한되는 것이 아니며, 조직의 허혈에 의해 야기되는 보다 다양한 질환에 적용될 수 있다.
- [0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

발명의 효과

- [0059] 본 발명은 ETV2 전사 인자 및 이의 제조 방법을 제공하여, 만능 분화상태를 거치지 않고 피부 섬유아세포로부터 혈관 내피세포로 직접 전환시킬 수 있는, 혈관 내피세포에 대한 효율적인 분화 방법을 제공할 수 있는 효과가 있다.
- [0060] 이에 본 발명은, 종양 및 이상 조직의 발생과 같은 만능 줄기세포가 갖는 잠재적 위험 요소들, 분화 과정에서 이용되는 동물성분의 이용, 혈관 내피세포로의 낮은 분화율에 따라 야기되는 혈관 재생치료의 부작용, 미미한 치료 효과를 극복할 수 있는 효과가 있다.
- [0061] 나아가, 본 발명은 임상적으로 허혈성 조직에 직접 적용되어 ETV2 유전자를 과발현시키는 ETV2 전사 인자를 제공할 수 있는 효과가 있다. 이에, 본 발명은 전사 인자의 과발현을 위해 종래에 이용되던 레트로 바이러스 또는 렌티 바이러스를 매개로 하는 유전자 주입법이 갖는 세포의 유전체에 나타나는 삽입변이에 따른 임상적용의 문제를 해결할 수 있는 효과가 있다.
- [0062] 또한, 본 발명은 자성 나노 입자를 포함하는 ETV2 전사 인자를 제공함으로써, 목표 세포 내 전달 효율을 높이고, 바이러스 또는 DNA 플라스미드와 같은 유전 물질을 이용하지 않고도 ETV2 유전자를 목표 세포 내에서 과발현시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0063] 본 발명은, ETV2 전사 인자를 포함하는 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물과, ETV2 전사 인자에 의해 분화되어 세포 치료제 조성물로 이용될 수 있는 직접 전환 혈관 내피세포를 제공할 수 있다. 구체적으로, 본 발명은 허혈성 조직에 혈관신생을 유도하여 허혈성 심혈관 질환, 뇌혈관 질환, 당뇨 합병증, 창상 치료 등의 혈관 생성이 필요한 질환에 대한 새로운 혈관 재생치료법에 이용될 수 있는 효과가 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에

포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0065]

도 1a 및 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 구조를 예시적으로 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 제조 방법의 절차를 도시한 것이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종에 따른 인간 피부 섬유아세포의 변화를 도시한 결과이다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종에 따른 인간 피부 섬유아세포에서의 혈관 내피세포 특이적 유전자의 발현 수준을 도시한 것이다.

도 3c는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종에 따른 인간 피부 섬유아세포에서의 혈관 내피세포 특이적 단백질의 수준을 도시한 것이다.

도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자를 인간 피부 섬유아세포에 접종한 후 분리한 KDR 양성 세포에 대한 혈관 내피세포 특이적 유전자의 발현 수준을 도시한 것이다.

도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자를 인간 피부 섬유아세포에 접종한 후 분리한 KDR 양성 세포에 대한 면역염색법의 수행 결과를 도시한 것이다.

도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자를 인간 피부 섬유아세포에 접종한 후 분리한 KDR 양성 세포에 대한 렉틴 흡착 수준을 도시한 것이다.

도 4d는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자를 인간 피부 섬유아세포에 접종한 후 분리한 KDR 양성 세포 및, KDR 음성 세포의 구조를 비교하여 도시한 것이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자에 의해 유도된 직접 전환 혈관 내피세포의 접종에 따른 심장 기능의 변화를 도시한 결과이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자에 의해 유도된 직접 전환 혈관 내피세포의 접종에 따른 심장 조직에 대한 면역염색법의 수행 결과를 도시한 것이다.

도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종 여부에 따른, 허혈성 조직에서의 혈관신생 연관 유전자의 발현 수준을 도시한 것이다.

도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종 여부에 따른, 심장 기능의 변화를 도시한 결과이다.

도 6c 및 6d는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종 여부에 따른, 허혈성 심장 조직에 대한 섬유화 정도를 분석한 결과를 도시한 것이다.

도 6e는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종 여부에 따른, 허혈성 심장 조직에 대한 심혈관 분포 분석 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066]

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0067]

이하에서는 도 1a 및 도 1b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 ETV2 전사 인자의 구조에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0068]

도 1a 및 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 구조를 예시적으로 도시한 것이다.

[0069]

도 1a를 참조하면, 본 발명의 ETV2 전사 인자 (100) 는, 나노 입자 (110) 나노 입자 (110) 의 표면에 결합되는 ETV2 유전자의 DNA 결합 도메인을 포함하는 폴리머 (120), ETV2 유전자의 전사 활성 도메인을 갖는 활성

펩타이드 (130) 및 핵 위치 신호 펩타이드 (140) 을 포함하는 기능성 중합체 (120, 130 및 140) 와 이들 기능성 중합체 (120, 130 및 140) 를 및 나노 입자 (110) 의 표면에 부착시키는 링커 (150) 를 포함한다. 이때, 나노 입자 (110) 는 자기 핵 금 나노 입자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0070] 보다 구체적으로, 도 1b의 (a)를 참조하면, 링커 (150) 는 MUA (mercaptoudecanoic acid) 일 수 있다. 이때, MUA의 링커 (150) 는 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) 및/또는 NHS (N-hydroxy succinimide) 에 의해 기능성 중합체 (120, 130 및 140) 와 커플링 (coupling) 될 수 있다.
- [0071] 도 1b의 (b)를 참조하면, ETV2 유전자의 DNA 결합 도메인을 포함하는 폴리아마이드 (120) 는, 표적 세포 내의 ETV2 유전자의 DNA에 결합하는 도메인으로 구성된 폴리아마이드일 수 있다. 이때, 폴리아마이드 (120) 는 헤어 핀 구조를 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 도 1b의 (c)를 참조하면, ETV2 유전자의 전사 활성 도메인을 갖는 활성 펩타이드 (130) 는, 29 개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드 일 수 있다. 이때, 활성 펩타이드 (130) 는 서열번호 1의 아미노산 서열과 70 %이상의 상동성을 가질 수 있다. 바람직하게, 서열번호 1의 아미노산 서열과 80 %이상의 상동성을 가질 수 있다. 보다 바람직하게, 활성 펩타이드 (130) 는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 이러한 구성의 활성 펩타이드 (130) 는 ETV2 유전자에 결합되어 ETV2 유전자의 전사를 개시하여 세포 내에서 ETV2 유전자의 발현을 활성화 시킬 수 있다.
- [0073] 도 1b의 (d)를 참조하면, 핵 위치 신호 펩타이드 (140) 는, 13 개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드 일 수 있다. 이때, 핵 위치 신호 펩타이드 (140) 는 서열번호 2의 아미노산 서열과 70 %이상의 상동성을 가질 수 있다. 바람직하게, 서열번호 2의 아미노산 서열과 80 %이상의 상동성을 가질 수 있다. 보다 바람직하게, 핵 위치 신호 펩타이드 (140) 는 서열번호 2의 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 이러한 구성의 핵 위치 신호 펩타이드 (140) 는 핵 위치신호 펩타이드는, 본 발명의 일 실시예에 따른 ETV2 전사 인자 (100) 를 표적 세포의 핵 내로 유입을 촉진할 수 있다.
- [0074] 도 2를 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는, ETV2 전사 인자의 제조 방법에 대하여 설명한다.
- [0075] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 제조 방법의 절차를 도시한 것이다.
- [0076] 도 2를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 ETV2 전사 인자는, 나노 입자를 중심으로 하여 이의 표면에 ETV2 유전자의 DNA 결합 도메인을 포함하는 폴리아마이드, ETV2 유전자의 전사 활성 도메인을 갖는 활성 펩타이드, 핵 위치 신호 펩타이드가 부착된 구조를 가질 수 있다.
- [0077] 보다 구체적으로, ETV2 전사 인자를 제조하기 위해, ETV2 유전자의 DNA 결합 도메인의 기능을 갖는 폴리아마이드, ETV2 유전자의 전사 활성 도메인의 기능을 갖는 활성 펩타이드, 핵 위치신호 펩타이드로 구성된 기능성 중합체 각각과 MUA를 혼합한다 (S210). 그 다음, 폴리아마이드 및 MUA, 활성 펩타이드 및 MUA, 및 핵 위치신호 펩타이드 및 MUA가 각각 나노 입자의 표면에 부착될 수 있는 접합체를 형성하도록, EDC 및 NHS를 첨가한다 (S220). 마지막으로, 본 발명의 나노 입자와 접합체들을 반응시킴으로써 (S230), 본 발명의 일 실시예에 따른 ETV2 전사 인자를 획득할 수 있다.
- [0078] 본 발명의 특징에 따르면, 혼합하는 단계 (S210) 에서, 기능성 중합체 전체에 대하여 4 내지 10 %의 비율을 갖는 상기 폴리아마이드, 기능성 중합체 전체에 대하여 20 내지 30 %의 비율을 갖는 상기 활성 펩타이드, 및 기능성 중합체 전체에 대하여 60 내지 75 %의 비율을 갖는 핵 위치신호 펩타이드 각각이 MUA와 혼합될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 다른 특징에 따르면, ETV2 전사 인자의 제조 방법에서는, 반응시키는 단계 (S230) 이후에 수행되는, ETV2 전사 인자에 SAHA 유도체 및 CTB 유도체의 후성 유전학 조절물질이 투입되는 단계가 더 수행될 수 있다. 보다 구체적으로, 후성 유전학 조절물질이 투입되는 단계에서는, SAHA 유도체에 의해 HDAC (Histone Deacetylase) 활성이 억제되고, CTB 유도체에 의해 HAT (Histone Acetyl Transferase) 의 활성이 촉진될 수 있다.
- [0080] 이상의 ETV2 전사 인자의 제조 방법에 따라, 허혈성 조직에서 ETV2 전사를 활성화 시킴으로써 신혈관생성을 유도할 수 있는, ETV2 전사 인자가 제조될 수 있다. 한편, ETV2 전사 인자의 제조 방법은, 전술한 것에 제한되는 것이 아니며, ETV2 전사 인자의 구조에 따라 보다 다양하게 설정될 수 있다.
- [0081] 이하에서는 다양한 실시예를 통해, 본 발명의 ETV2 전사 인자에 대한 허혈성 조직에서의 신혈관생성 효과에 대하여 구체적으로 설명한다. 이때, 평가에서는 비유전체 삽입성 매체로서 ETV2를 과발현 시킬 수 있는, ETV2 아데노바이러스 (Ad-ETV2) 가 ETV2 전사 인자로서 이용되었다. 따라서, 후술할 Ad-ETV2의 효과는 본 발명의 ETV2

전사 인자에 대한 효과와 동일하게 나타날 수 있다.

- [0082] 실시예 1: Ad-ETV2를 이용한 직접 전환 혈관 내피세포 (directly reprogrammed endothelial cell) 의 생성
- [0083] 이하에서는, 도 3a 내지 3c를 참조하여, Ad-ETV2를 이용한 직접 전환 혈관 내피세포 생성 결과에 대하여 설명한다. 본 실험에서는, 인간피부 섬유아세포 (human dermal fibroblast, HDF) 에 Ad-ETV2를 접종하여 직접 전환 혈관 내피세포의 생성 결과를 평가하였으나, 이의 효과는 인간피부 섬유아세포 에 제한되지 않고 보다 다양한 세포, 또는 조직에서도 나타날 수 있다.
- [0084] 보다 구체적으로 하기 실험에서는, 2×10^5 cell/well의 인간피부 섬유아세포가 배양된 웰 (well) 에 Ad-ETV2를 접종한 후, 상기 웰에 대하여 9 일 간 혈관 내피세포 생성과 관련한 분석이 수행되었다.
- [0085] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종에 따른 인간 피부 섬유아세포의 변화를 도시한 결과이다. 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종에 따른 인간 피부 섬유아세포에서의 혈관 내피세포 특이적 유전자의 발현 수준을 도시한 것이다. 도 3c는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종에 따른 인간 피부 섬유아세포에서의 혈관 내피세포 특이적 단백질의 수준을 도시한 것이다.
- [0086] 도 3a를 참조하면, Ad-ETV2를 인간 피부 섬유아세포에 주입한 후, 2일 후부터 인간 피부 섬유아세포가 조약돌 형태로 변화하는 것으로 나타난다. 이때, 조약돌 형태는 혈관 내피세포의 전형적 모양으로, 9 일 차로 시간이 지남에 따라 그 모양이 더 확실해 지는 것으로 나타난다. 즉, 이러한 결과는 Ad-ETV2에 의해 인간 피부 섬유아세포가 내피세포로 전환한다는 것을 의미할 수 있다.
- [0087] 도 3b의 (a), (b) 및 (c)를 참조하면, qRT-PCR을 이용하여, 혈관 내피세포 특이 유전자의 발현을 관찰한 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 혈관 내피세포 특이 유전자 중 CDH5와 KDR은 6일까지 발현량이 점차적으로 증가하는 것으로 나타난다. 나아가, 9 일까지 CDH5와 KDR의 발현량은 증가된 상태를 유지하는 것으로 나타난다. 특히, 혈관 내피세포 특이 유전자 중 PECAM1의 경우, 발현이 지속적으로 증가하고 9 일차에서 현저한 발현량 증가가 나타난다.
- [0088] 도 3c를 참조하면, 인간 피부 섬유아세포에 대한 유세포분석 (flow cytometry) 를 통해 혈관 내피세포 특이 단백질의 발현량을 분석한 결과가 도시된다. 보다 구체적으로 4 일차에 50 % 이상의 인간 피부 섬유아세포들이 CDH5와 KDR 단백질을 발현하며, 6 일차에 CDH5와 KDR 단백질의 가장 높은 발현량을 갖는 것으로 나타난다. 나아가, 인간 피부 섬유아세포에서 PECAM1 단백질의 발현은 9 일차까지 지속적으로 증가하는 것으로 나타난다. 이러한 결과는 전술한 도 3c의 qRT-PCR 결과와도 일치할 수 있다.
- [0089] 이상의 실시예 1의 결과는, 체세포인 인간 피부 섬유아세포가 Ad-ETV2의 주입에 의해 만능 분화상태 (pluripotent state) 를 거치지 않고 혈관 내피세포로 직접 전환된 것을 의미할 수 있다. 즉, 본 발명의 ETV2 전사 인자는, 체세포로부터 만능 분화상태를 거치지 않고 혈관 내피세포로의 직접적인 분화를 유도할 수 있다. 이에, 직접 전환된 혈관 내피세포는, 허혈성 조직에 대한 세포 치료제로서 적용될 수 있다.
- [0090] 실시예 2: Ad-ETV2에 의해 유도된 직접 전환 혈관 내피세포의 평가
- [0091] 이하에서는, 도 4a 내지 4d를 참조하여, Ad-ETV2의 주입에 의해 생성된 직접 전환 혈관 내피세포의 평가 결과를 설명한다.
- [0092] 보다 구체적으로, 하기 실험에서는 직접 전환 혈관 내피세포를 정제하기 위해, Ad-ETV2의 주입 후 6 일차에 혈관 내피세포 특이적 마커인 KDR을 발현하는 세포 (KDR 양성, KDR positive) 를 자기표지 세포 분류법 (Magnetic-Activated Cell Sorting, MACS) 을 이용하여 분리하였다. 이때 KDR을 발현하지 않는 세포 (KDR 음성, KDR negative) 를 대조군으로 설정하였다.
- [0093] 도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자를 인간 피부 섬유아세포에 접종한 후 분리한 KDR 양성 세포에 대한 혈관 내피세포 특이적 유전자의 발현 수준을 도시한 것이다. 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자를 인간 피부 섬유아세포에 접종한 후 분리한 KDR 양성 세포에 대한 면역염색법의 수행 결과를 도시한 것이다. 도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자를 인간 피부 섬유아세포에 접종한 후 분리한 KDR 양성 세포에 대한 렉틴 흡착 수준을 도시한 것이다. 도 4d는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자를 인간 피부 섬유아세포에 접종한 후 분리한 KDR 양성 세포 및, KDR 음성 세포의 구조를 비교하여 도시한 것이다.
- [0094] 도 4a의 (a), (b), (c), (d), (e) 및 (f)를 참조하면, KDR 양성의 직접 전환 혈관 내피세포에 대하여 qRT-

PCR을 이용한 혈관 내피세포 특이 유전자의 발현의 분석 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 도 4a의 (a), (b), (c), (d) 및 (e)를 참조하면, KDR 양성의 직접 전환 혈관 내피세포에서 CDH5, KDR, PECAM1, eNOS, vWF의 혈관 내피세포 특이 유전자들의 발현량은, KDR 음성 세포와 대조적으로 현저하게 증가된 것으로 나타난다. 한편, 도 4a의 (e)를 참조하면, KDR 음성 세포에서 ETV2의 발현이 증가된 결과는, KDR 양성 또는 음성의 세포 분리 전, 체세포 내 Ad-ETV2의 주입에 따라 ETV2 발현이 증가된 것을 의미할 수 있다.

[0095] 도 4b의 (a) 및 (b)를 참조하면, KDR 양성의 직접 전환 혈관 내피세포에 대하여 세포면역염색법 (immunocytochemistry) 을 통한 혈관 내피세포 특이 단백질의 발현 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, KDR 양성의 직접 전환 혈관 내피세포에서 혈관 내피세포 특이 단백질인 KDR, CDH5, PECAM1 및 VWF이 발현된 것으로 나타난다.

[0096] 도 4c를 참조하면, KDR 양성의 직접 전환 혈관 내피세포에서, 대표적인 혈관 내피세포의 세포 기능 형질 중의 하나인 Acetylated-LDL (Ac-LDL) 흡수 및 렉틴 (lectin) 흡착이 관찰된다.

[0097] 도 4d를 참조하면, 매트릭셀 (Matrigel) 에서 배양 시 KDR 음성 (KDR neg) 의 세포들과 비교하여 KDR 양성 (KDR pos) 의 직접 전환 혈관 내피세포들은 관 모양의 구조를 형성하는 것으로 나타난다.

[0098] 이상의 실시예 2의 결과에 따르면, 인간 피부 섬유아세포에 대한 Ad-ETV2의 주입이 ETV2의 과발현을 유도하고, 결과적으로 직접 전환된 혈관 내피세포가 획득할 수 있었다. 즉, 본 발명의 ETV2 전사 인자는, 체세포로부터 만능 분화상태를 거치지 않고 혈관 내피세포로의 직접적인 분화를 유도할 수 있다.

[0099] 실시예 3: Ad-ETV2에 의해 유도된 직접 전환 혈관 내피세포의 허혈성 조직에서의 치료 효과

[0100] 이하에서는, 도 5a 및 5b를 참조하여, Ad-ETV2의 주입에 의해 생성된 직접 전환 혈관 내피세포에 대한 허혈성 조직에서의 치료 효과를 설명한다.

[0101] 보다 구체적으로, 본 실험에서는, 실시예 2에서 전술한 방법으로 순수 분리된 직접 전환 혈관 내피세포를 심근 경색 유발된 누드 생쥐 모델 (athymic nude mice model) 의 심장의 허혈증 경계 부위 (ischemia boarder zone) 에 주사하였다. 이때, 심근경색 유발 모델은, 좌심실 (left ventricle) 의 좌전하강 동맥 (left anterior descending artery, LAD) 을 결찰 (ligation) 함으로써 획득할 수 있었다. 한편, 본 실험에서는 직접 전환 혈관 내피세포의 잔존 시간을 길게 하기 위하여 합성 생물질인 PA-RGDS (RGDS conjugated Peptide Amphiphile) 가 직접 전환 혈관 내피세포와 함께 주사되었다. 이때, 대조군으로 PBS (phosphate buffered saline) 가 주입된 심근경색 유발 모델이 설정되었다.

[0102] 도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자에 의해 유도된 직접 전환 혈관 내피세포의 접종에 따른 심장 기능의 변화를 도시한 결과이다. 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자에 의해 유도된 직접 전환 혈관 내피세포의 접종에 따른 심장 조직에 대한 면역염색법의 수행 결과를 도시한 것이다.

[0103] 도 5a의 (a), (b) 및 (c)를 참조하면, 심초음파 촬영 (echocardiography) 에 기초한 심장 기능 회복 결과가 도시된다. 이때, ETV2 전사 인자에 의해 유도된 직접 전환 혈관 내피세포의 주사 시점으로부터 1, 2, 4, 8, 12주에 심근경색 유발 모델들 (reprogrammed EC, rEC) 의 심장 기능을 관찰한 결과, 직접 전환 혈관 내피세포를 주입한 심근경색 유발 모델들 (rEC) 은 박출분율 (ejection fraction, EF), 분획단축율 (fractional shortening, FS) 및 전역 세포축 부하 (global longitudinal strain, GLS) 가 대조군 모델 (control) 에 비하여 회복된 것으로 나타난다.

[0104] 보다 구체적으로, 직접 전환 혈관 내피세포를 주입한 심근경색 유발 모델들의 심장 기능이 초기 4 주차까지는 대조군과 비슷한 것으로 나타난다. 한편, 8 주차, 12 주차로 갈수록 대조군은 심장 기능이 약화되는 것으로 나타나지만, 직접 전환 혈관 내피세포를 주입한 심근경색 유발 모델들은 심장 기능을 유지하거나 수술 전 (pre-OP) 수준으로 회복 하는 양상을 보인다. 이러한 결과는, 이것은 직접 전환 혈관 내피세포가 허혈성 심장 질환의 기능 악화를 막아주는 역할을 한다는 것을 의미할 수 있다.

[0105] 도 5b를 참조하면, 조직 검사 (histological assay) 를 이용한 생체 내 혈관 생성 능력 평가 결과가 도시된다. 이때, 본 평가는 직접 전환 혈관 내피세포를 주입한 심근경색 유발 모델에 대하여 12 주차에 녹색 형광 물질 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 로 표지된 렉틴을 관혈류에 흘려 혈관을 녹색 형광 물질로 표지하고, 상기 모델을 희생시킨 후 심장 조직을 동일 초점 형광 현미경 (confocal fluorescence microscope) 으로 검사함으로써 수행되었다. 직접 전환 혈관 내피세포는 적색 형광 물질인 CM-DiI로 표지하였다.

[0106] 보다 구체적으로, 직접 전환 혈관 내피세포가 주입된 심근경색 유발 모델의 심장 조직에서는 직접 전환 혈관 내

피세포의 주입이 12 주가 지났어도 붉은빛을 발하는 직접 전환 혈관 내피세포가 존재하는 것으로 나타난다. 나아가, 이러한 직접 전환 혈관 내피세포는, FITC로 표지된 렉틴에 의해 녹색빛을 발하는 혈관 주위에 있는 것으로 관찰된다. 나아가, 화살표로 표시된 부분과 같이, 직접 전환 혈관 내피세포가 모여 있는 부분에서 혈관이 선명하게 표지된 결과는, 주입된 직접 전환 혈관 내피세포가 신혈관생성에 관여한다는 것을 의미할 수 있다.

[0107] 이상의 실시예 3의 결과에 따르면, Ad-ETV2에 의해 유도된 직접 전환 혈관 내피세포가 신혈관생성을 유도하는 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 ETV2 전사 인자의 주입에 따라 유도된 직접 전환 혈관 내피세포는, 허혈성 조직 내에서 신혈관생성을 유도하여 심장 기능의 약화를 막고, 허혈성 심장 기능의 회복에 기여할 수 있다. 따라서, ETV2 전사 인자 및 ETV2 전사 인자에 의해 유도된 직접 전환 혈관 내피세포는, 허혈성 심장 질환의 치료용 및 예방용 약학 조성물로서 이용될 수 있다.

[0108] 실시예 4: Ad-ETV2의 허혈성 조직에서의 치료 효과

[0109] 이하에서는, 도 6a 내지 6e를 참조하여, Ad-ETV2의 직접 주입에 의한 허혈성 조직에서의 치료 효과를 설명한다.

[0110] 보다 구체적으로, 본 실험에서는, Ad-ETV2 (5×10^7 infectious viral particle/50 μ l/mouse) 를, 실시예 3에서 전술한 방법으로 획득한 심근경색 유발된 누드 생쥐 모델 (acute myocardial infarction, MI) 과 심근경색 유발되지 않은 정상 누드 생쥐 모델 (non-acute myocardial infarction, Non MI) 의 심장의 허혈증 경계 부위에 주사하였다. 이때, 대조군으로 PBS (phosphate buffered saline) 가 동일 용량으로 주입된 심근경색 유발 모델 및 심근경색 비-유발 모델이 설정되었다.

[0111] 도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종 여부에 따른, 허혈성 조직에서의 혈관신생 연관 유전자의 발현 수준을 도시한 것이다. 도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종 여부에 따른, 심장 기능의 변화를 도시한 결과이다. 도 6c 및 6d는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종 여부에 따른, 허혈성 심장 조직에 대한 섬유화 정도를 분석한 결과를 도시한 것이다. 도 6e는 본 발명의 일 실시예에 따른, ETV2 전사 인자의 접종 여부에 따른, 허혈성 심장 조직에 대한 심혈관 분포 분석 결과를 도시한 것이다.

[0112] 도 6a의 (a), (b) 및 (c)를 참조하면, 주입 3 일차 심근경색 유발 모델 및 심근경색 비-유발 모델로부터 심장 조직을 채취하고 RNA를 추출한 후, qRT-PCR를 이용하여 측정된 ETV2, Vegfa 및 Angpt1의 발현 수준이 도시된다. 이때, Vegfa 및 Angpt1는 혈관신생과 관련된 유전자일 수 있다. 보다 구체적으로, 인간 ETV2는 Ad-ETV2가 주사된 모델들 (Non MI 및 MI) 심장에서만 발현되는 것으로 나타난다. 나아가, Ad-ETV2가 주사된 심근경색 유발 모델의 심장에서, 혈관신생 관련 유전자인 Vegfa 및 Angpt1의 발현이 대조군에 비하여 증가하는 것으로 나타난다. 이러한 결과는, Ad-ETV2 주입에 따른 ETV2 과발현에 의해, 혈관신생 관련 유전자 발현이 유도된 것을 의미할 수 있다.

[0113] 도 6b의 (a), (b), (c) 및 (d)를 참조하면, 주입 시점으로부터 1 주차 및 4 주차에 심초음파 촬영을 진행하여 모델들의 심장 기능을 분석한 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 대조군 모델 및 Ad-ETV2 주입 모델 모두에서 EF 및 FS가 1 주차에 비해 4 주차에서 감소한 것으로 나타난다. 그러나, 대조군에 비하여 Ad-ETV2 주입 모델에서 EF 및 FS의 감소 수준이 적은 것으로 나타난다. 이러한 결과는, Ad-ETV2 주사로 유발된 ETV2 과발현이 허혈성 증상으로 인하여 심장 기능이 약화되는 것을 막아주는 것을 의미할 수 있다.

[0114] 도 6c 및 도 6d를 참조하면, 주입 4 주차에 각 모델로부터 허혈성 심장 조직을 채취하여 조직 검사를 수행한 결과가 도시된다. 이때, 심장의 좌심실에 섬유화 (fibrosis) 의 진행 여부를 조사하기 위하여 메이슨 트리크롬 (Masson's Trichrome) 염색법 및 H&E 염색법을 수행하였다. 한편, 섬유화 부분은 콜라겐 (collagen) 이 청색으로 염색될 수 있다. 보다 구체적으로, 대조군 (control) 과 Ad-ETV2 주입 모델 (Ad-ETV2) 은 심 조직에서 섬유화가 진행된 영역의 크기가 유사한 것으로 나타난다.

[0115] 한편, 도 6e의 (a) 및 (b)를 참조하면, 심혈관의 분포를 확인하기 위하여, 대조군 모델 (control) 및 Ad-ETV2 주입 모델 (Ad-ETV2) 에 대하여 FITC로 표지된 렉틴을 관혈류에 흘려 심장의 혈관들을 동일 초점 형광 현미경으로 검사한 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 대조군 (control) 에서는 녹색으로 염색된 혈관이 허혈성 조직 부분에서 발견되지 않은 반면, Ad-ETV2를 주입한 Ad-ETV2 주입 모델 (Ad-ETV2) 에서는 녹색으로 염색된 혈관이 허혈성 조직 부분에서 관찰된다. 이러한 결과는 허혈성 조직에서 Ad-ETV2 주입에 따른 ETV2 과발현에 의해, 신혈관생성이 유발된 것을 의미할 수 있다.

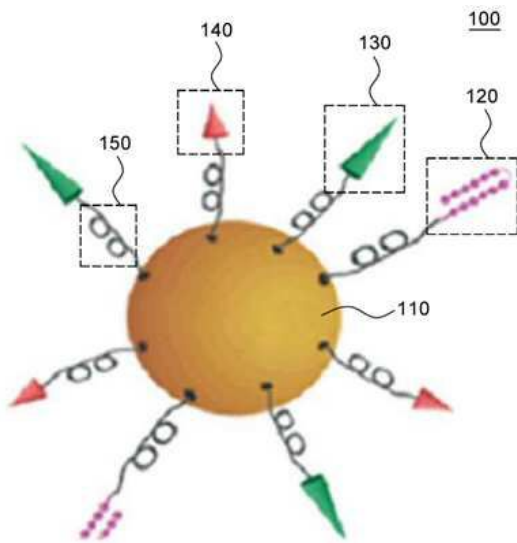
- [0116] 이상의 실시예 4의 결과에 따르면, Ad-ETV2가 허혈성 조직의 재생을 촉진하는 직접 주사제로서 기능을 하는 것으로 나타난다. 이에, 본 발명의 ETV2 전사 인자는, 허혈성 조직에 직접 주사 가능한 조성물로서 제공될 수 있다. 나아가, 본 발명의 TV2 전사 인자를 포함하는 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물은, 허혈성 조직에 직접 주사되어 신혈관생성을 유도할 수 있다.
- [0117] 이상의 실시예 1 내지 실시예 4에 개시된 ETV2 전사 인자 및 이의 제조 방법을 제공하는 본 발명은, 만능 분화 상태를 거치지 않고 피부 섬유아세포로부터 혈관 내피세포로 직접 전환시킬 수 있는, 혈관 내피세포에 대한 효율적인 분화 방법을 제공할 수 있는 효과가 있다.
- [0118] 이에 본 발명은, 종양 및 이상 조직의 발생과 같은 만능 줄기세포가 갖는 잠재적 위험 요소들, 분화 과정에서 이용되는 동물성분의 이용, 혈관 내피세포로의 낮은 분화율에 따라 야기되는 혈관 재생치료의 부작용, 미미한 치료 효과를 극복할 수 있다.
- [0119] 나아가, 본 발명은 임상적으로 허혈성 조직에 직접 적용되어 ETV2 유전자를 과발현 시키는 ETV2 전사 인자를 제공할 수 있는 효과가 있다. 이에, 본 발명은 전사 인자의 과발현을 위해 종래에 이용되던 레트로 바이러스 또는 렌티 바이러스를 매개로 하는 유전자 주입법이 갖는 세포의 유전체에 나타나는 삽입변이에 따른 임상적용의 문제를 해결할 수 있다.
- [0120] 나아가 본 발명은, ETV2 전사 인자를 포함하는 허혈성 심혈관 질환의 치료용 또는 예방용 약학 조성물, 및 ETV2 전사 인자에 의해 분화되어 세포 치료제 조성물로 이용될 수 있는 직접 전환 혈관 내피세포를 제공할 수 있다. 이에, 본 발명은 허혈성 조직에 혈관신생을 유도하여 허혈성 심혈관 질환, 뇌혈관 질환, 당뇨 합병증, 창상 치료 등의 혈관 생성이 필요한 질환에 대한 새로운 혈관 재생 치료법에 이용될 수 있다.
- [0121] 한편, 본 발명의 효과는 전술한 것에 제한되는 것이 아니다. 예를 들어, 본 발명은 자성의 나노 입자를 포함하는 ETV2 전사 인자를 제공함으로써, 목표 세포 내 전달 효율을 높이고, 바이러스 또는 DNA 플라스미드와 같은 유전 물질을 이용하지 않고도 ETV2 유전자를 목표 세포 내에서 과발현 시킬 수 있다.

부호의 설명

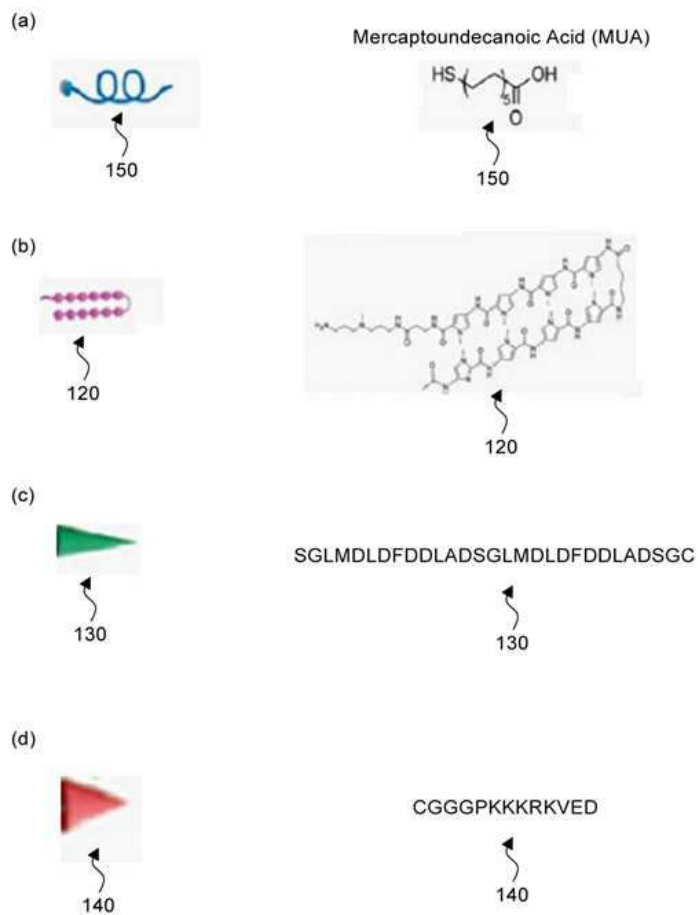
- [0122] 100: ETV2 전사 인자
 110: 나노 입자
 120: 폴리아마이드
 130: 활성 펩타이드
 140: 핵 위치 신호 펩타이드
 150: 링커

도면

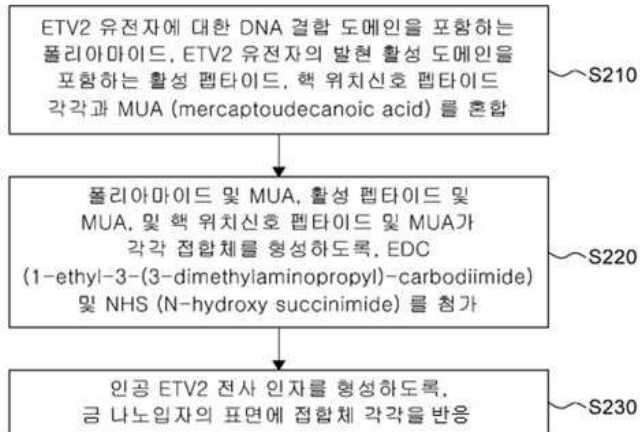
도면1a



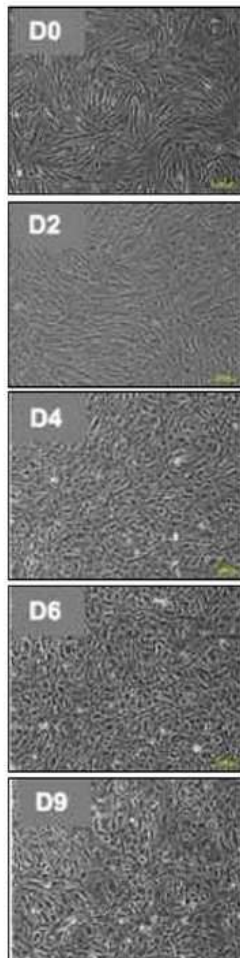
도면1b



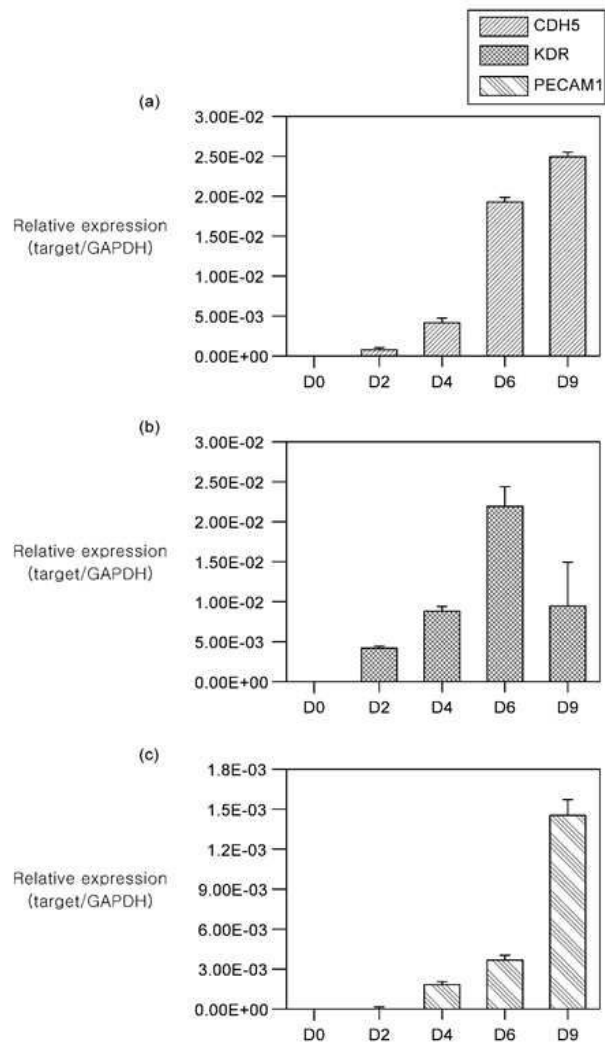
도면2



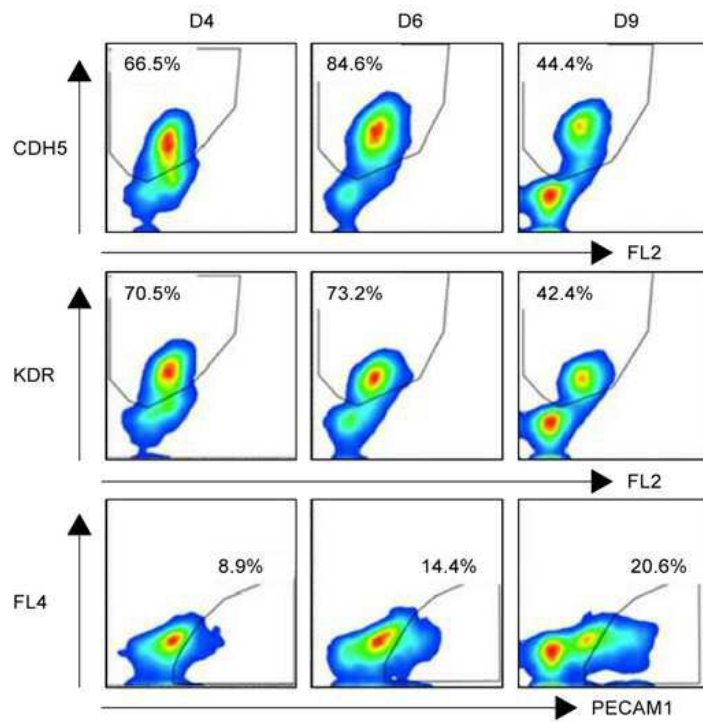
도면3a



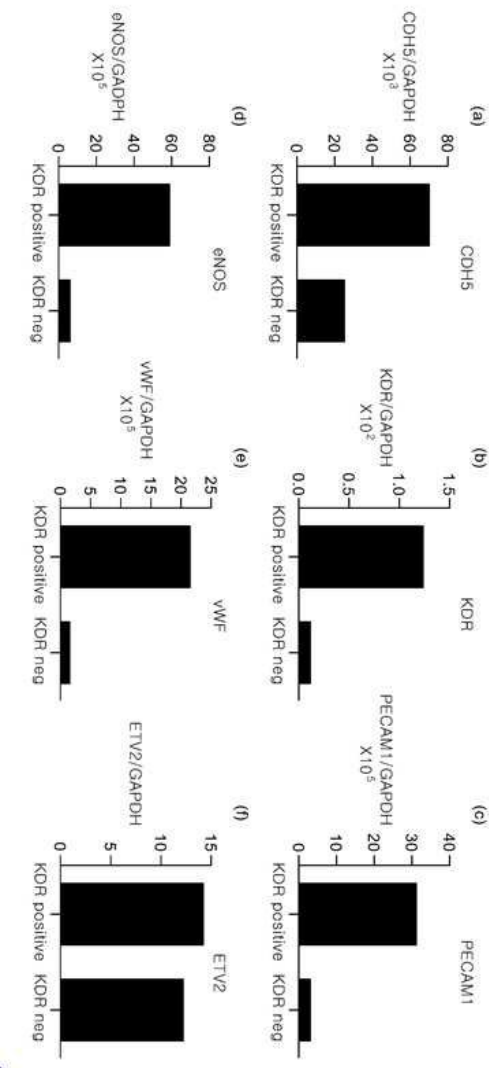
도면3b



도면3c

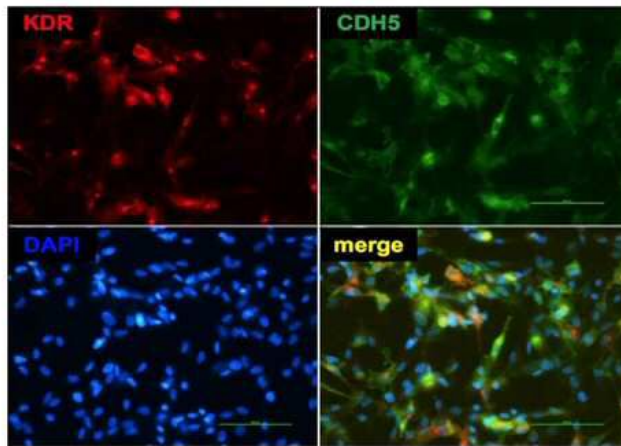


도면4a

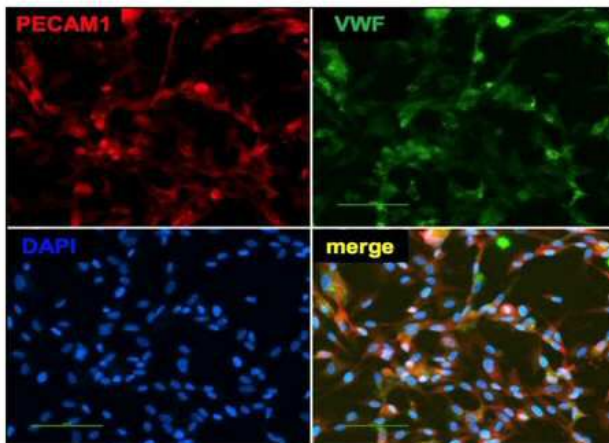


도면4b

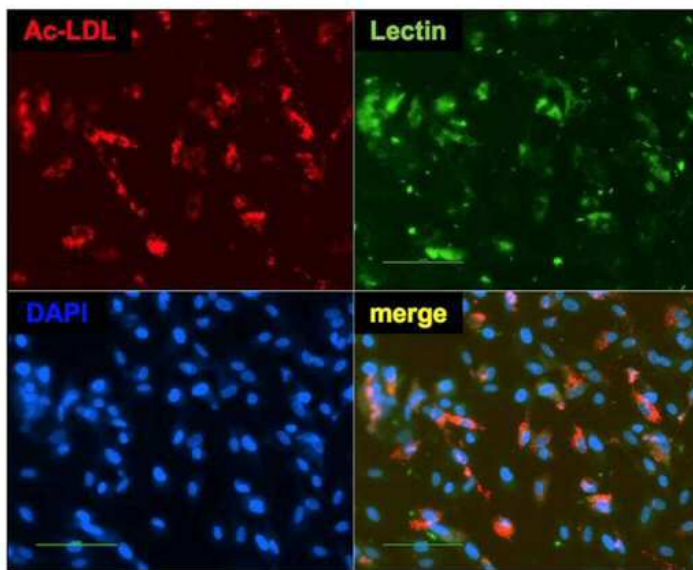
(a)



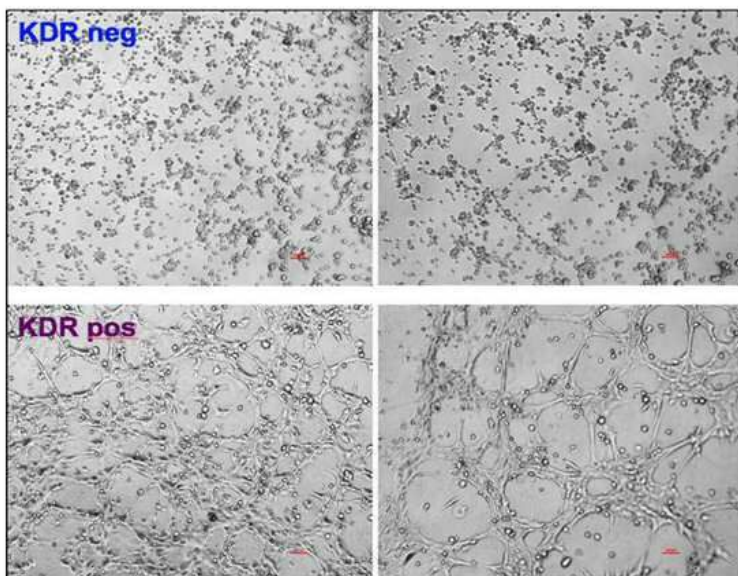
(b)



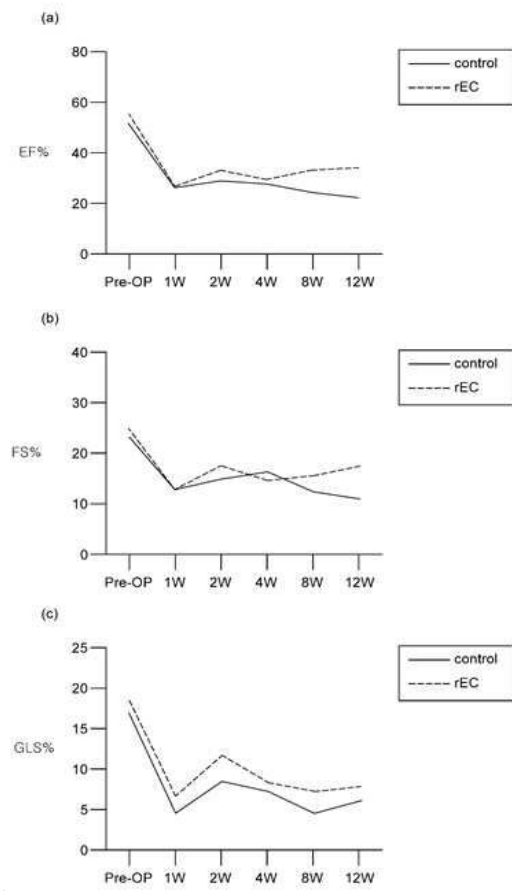
도면4c



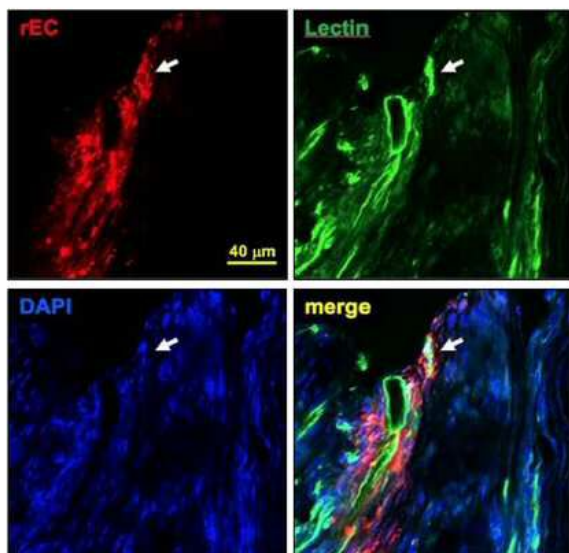
도면4d



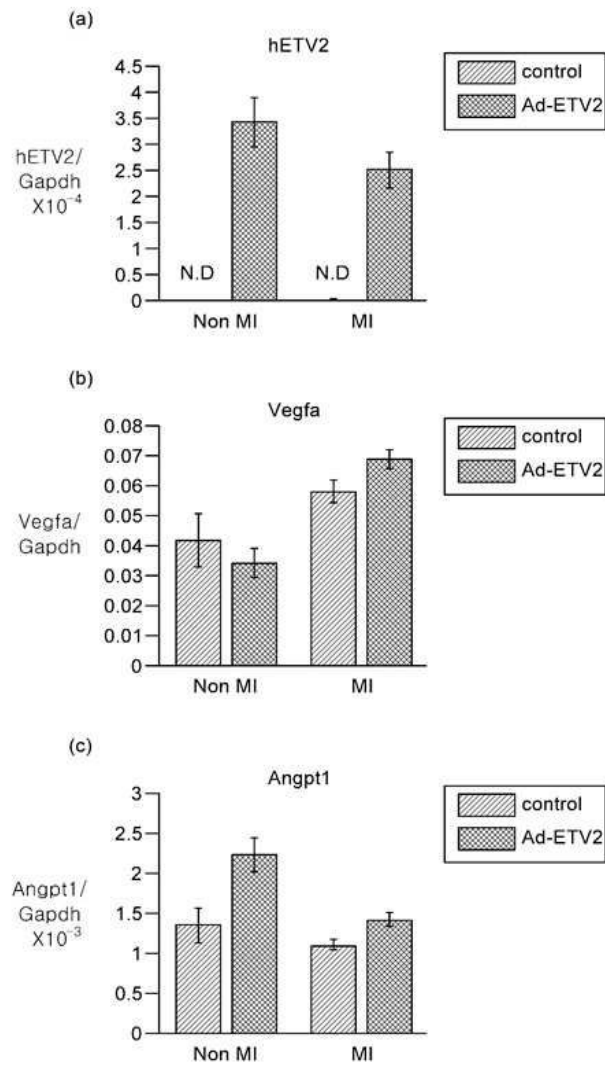
도면5a



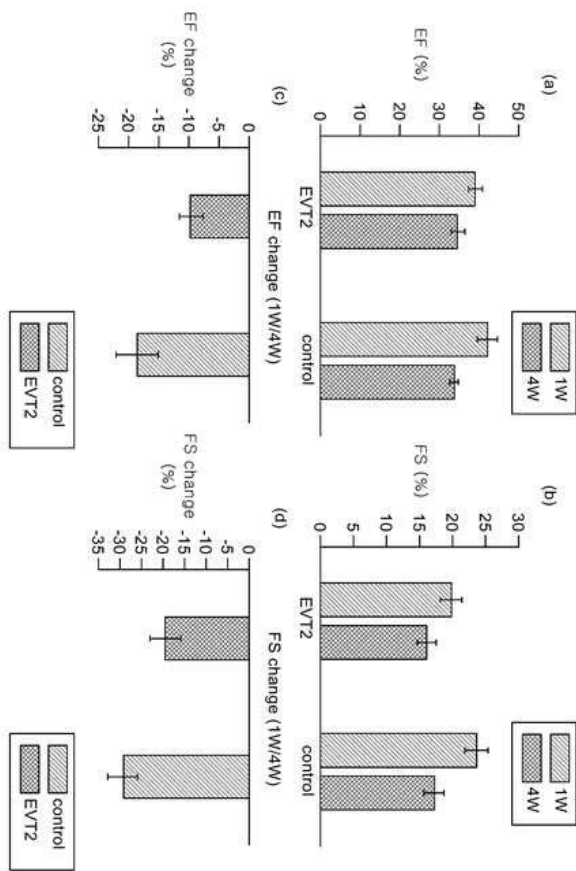
도면5b



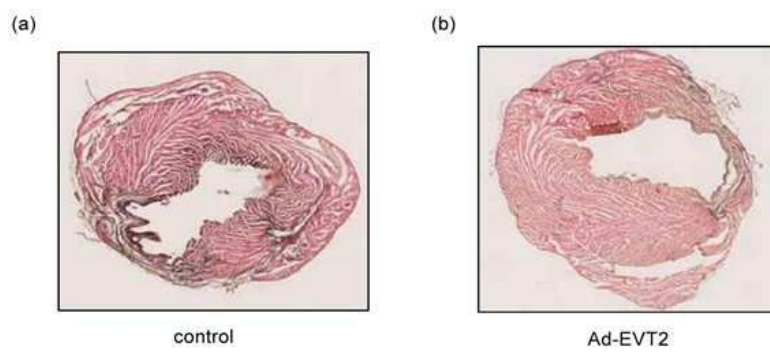
도면6a



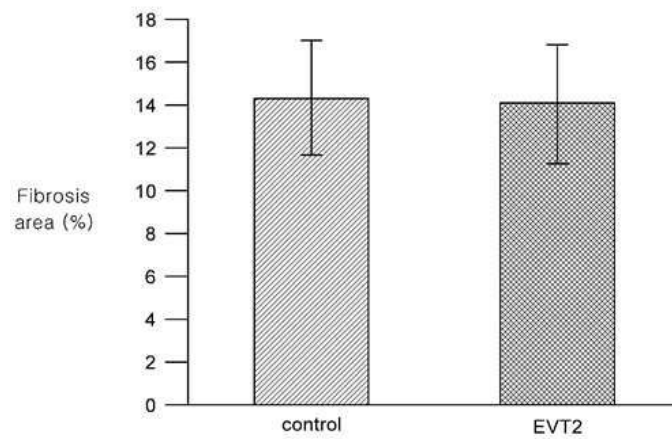
도면6b



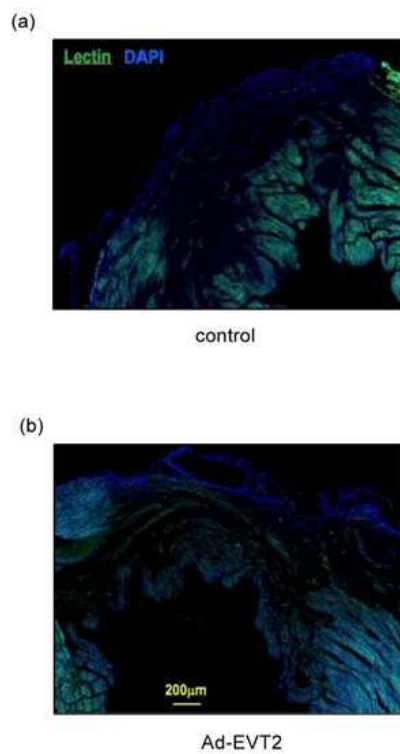
도면6c



도면6d



도면6e



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY
- <120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING OR PREVENTING ISCHEMIC CARDIOVASCULAR DISEASE
- <130> 18PD5474KR
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial sequence
 <400> 1
 Ser Gly Leu Met Asp Leu Asp Phe Asp Asp Leu Ala Asp Ser Gly Leu
 1 5 10 15
 Met Asp Leu Asp Phe Asp Asp Leu Ala Asp Ser Gly Cys

20 25
 <210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial sequence
 <400> 2
 Cys Gly Gly Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp
 1 5 10