



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월27일

(11) 등록번호 10-2257950

(24) 등록일자 2021년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/069 (2013.01)

C12N 2500/32 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0145348

(22) 출원일자 2019년11월13일

심사청구일자 2019년11월13일

(65) 공개번호 10-2021-0058185

(43) 공개일자 2021년05월24일

(56) 선행기술조사문헌

Circulation, vol.136(20), pp.1939~1954(2017)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이신정

서울특별시 서대문구 연세로 50-1

윤영섭

서울특별시 서대문구 연세로 50-1

(74) 대리인

특허법인인벤싱크

전체 청구항 수 : 총 19 항

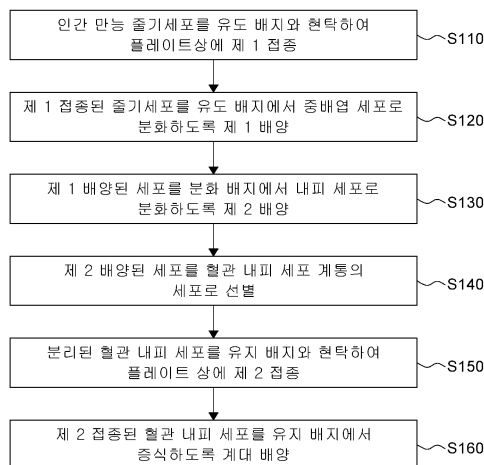
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 혈관 내피세포 특성 유지 배지 및 이를 포함하는 배양 방법

## (57) 요약

본 명세서에서는 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A, 20 내지 50 ng/ml의 아스코르빅산 및 DMEM/F-12를 유효성분으로 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배지 및 이를 포함하는 배양 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/11 (2013.01)  
 C12N 2501/115 (2013.01)  
 C12N 2501/165 (2013.01)  
 C12N 2501/42 (2013.01)  
 C12N 2501/727 (2013.01)  
 C12N 2533/54 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                 |
|-------------|---------------------------------|
| 과제고유번호      | HI16C2211                       |
| 부처명         | 보건복지부                           |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국보건산업진흥원                       |
| 연구사업명       | 첨단의료기술개발사업                      |
| 연구과제명       | 인간유도만능줄기세포유래 내피세포의 생산 및 치료효과 결정 |
| 기 여 율       | 1/1                             |
| 과제수행기관명     | 연세대학교 산학협력단                     |
| 연구기간        | 2019.04.01 ~ 2020.01.31         |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간 만능 줄기세포(human pluripotent stem cell, hPSC)를 유도 배지와 현탁하여 플레이트상에 제 1 접종하는 단계;

상기 제 1 접종된 줄기세포를 유도 배지에서 중배엽 세포로 분화하도록 제 1 배양하는 단계;

상기 제 1 배양된 세포를 분화 배지에서 내피세포로 분화하도록 제 2 배양하는 단계;

상기 제 2 배양된 세포를 혈관 내피세포 계통의 세포로 선별하는 단계;

선별된 상기 혈관 내피세포를 유지 배지와 현탁하여 플레이트상에 제 2 접종하는 단계, 및

상기 제 2 접종된 혈관 내피세포를 유지 배지에서 증식하도록 계대 배양하는 단계를 포함하고,

상기 유지 배지는,

4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A 및 20 내지 50 ng/ml의 아스코르빅산을 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 내피세포는,

혈관 내피세포인, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 유도 배지는,

4 내지 6 ng/ml의 FGF2 및 2 내지 4  $\mu$ M의 CHIR99021을 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 분화 배지는,

4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A 및 20 내지 30 ng/ml의 DLL4를 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 인간 만능 줄기세포는,

배아 줄기 세포(embryonic stem cell), 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 및 체세포 핵치환 줄기세포(somatic cell nuclear transfer cell, SCNT) 중 적어도 하나를 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서,  
상기 제 1 배양하는 단계는,  
3일 동안 매일 배지를 교체하며 배양하는 단계인, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 8

제 1 항에 있어서,  
상기 제 2배양하는 단계는,  
11 내지 13일 동안 매일 배지를 교체하며 배양하는 단계인, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 9

제 1 항에 있어서,  
상기 플레이트는,  
콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌, 라미닌 프래그먼트, 비트로넥틴, 기저막 매트릭스, 젤라틴, 히알루론산, 폴리리신 및 비트로넥틴 중 적어도 하나로 이루어진 코팅막을 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 10

제 9항에 있어서,  
상기 코팅막은,  
0.1 mg/ml의 상기 콜라겐을 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 11

제 1 항에 있어서,  
상기 계대 배양은,  
1 내지 4 계대까지 수행되는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 12

제 1 항 내지 제 4 항 및 제 6 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 방법으로 계대배양되고,  
자성 세포 분류 및 유세포 분류와 같은 항원-항체 기반의 세포 분류가 사용되지 않고도, 상기 계대배양된 전체 세포에 대하여 CDH5를 발현하는 동질성(homogenous)의 내피세포를 98% 이상 포함하는, 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 혈관 내피세포 주.

#### 청구항 13

4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A 및 20 내지 50 ng/ml의 아스코르빅산을 유효성분으로 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배지.

#### 청구항 14

혈관 내피세포 계통으로 분리된 세포를 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A 및 20 내지 50 ng/ml의 아스코르빅산을 유효성분으로 포함하는 유지 배지와 현탁하여 플레이트상에 접종하는 단계, 및

접종된 상기 혈관 내피세포를 상기 유지 배지에서 혈관 내피세포의 특성이 유지되도록 계대 배양하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 플레이트는,

콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌, 라미닌 프래그먼트, 비트로넥틴, 기저막 매트릭스, 젤라틴, 히알루론산, 폴리리신 및 비트로넥틴 중 적어도 하나로 이루어진 코팅막을 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 코팅막은,

0.1 mg/ml의 상기 콜라겐을 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법.

#### 청구항 17

제 14 항에 있어서,

상기 계대 배양은,

1 내지 4 계대까지 수행되는, 혈관 내피세포 특성 유지 계대 배양 방법.

#### 청구항 18

제 14 항에 있어서,

상기 계대 배양된 세포는,

CDH5 양성 세포 발현이 4계대까지 98 % 이상 유지되는, 혈관 내피세포 특성 유지 계대 배양 방법.

#### 청구항 19

제 14 항에 있어서,

상기 계대 배양된 세포는,

PECAM1 양성 세포 발현이 4계대까지 40 % 이상 유지되는, 혈관 내피세포 특성 유지 계대 배양 방법.

#### 청구항 20

제 14 항에 있어서,

상기 계대 배양된 세포는,

VWF 양성 세포 발현이 4계대까지 88 % 이상 유지되는, 혈관 내피세포 특성 유지 계대 배양 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 혈관 내피세포 특성 유지 배지 및 이를 포함하는 배양 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 줄기 세포로부터 분화된 혈관 내피세포의 배양시에 감소되는 혈관 내피세포의 증식력 및 마커 발현을 높임으로써, 짧은 시간 내에 다량의 고순도의 혈관 내피세포 수를 확보하기 위한 배지 및 이를 포함하는 배양 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 혈관 신생(Vasculogenesis)은 기존 혈관의 내피세포가 세포외 기질(Extracellular Matrix, ECM)을 분해하고, 이동, 분열 및 분화하여 새로운 모세혈관을 형성하는 과정을 의미한다. 이에, 이러한 혈관 형성은 상처 수복, 배아 발생, 종양 형성, 만성염증, 비만 등 여러 가지 생리적 및 병리적 현상에 관여할 수 있다.

[0003] 혈관 신생은 특히 상처 치유나 조직 재생에 필수적인 현상일 수 있다. 예를 들어 체내에서 혈관 신생의 결핍이 있을 경우, 괴사, 궤양 및 허혈이 일어남에 따라, 조직 또는 기관의 기능 이상을 유발할 수 있다. 나아가, 혈액

공급이 원활하지 못함에 따라, 허혈성 심장 질환, 동맥경화증, 심근경색증 및 협심증과 같은 심혈관계 질환 또한 야기될 수 있다. 이에 따라, 혈관 신생의 결핍으로 인한 조직 손상을 감소시키고, 이로 유발되는 심혈관계 질환을 치료하기 위한, 혈관 신생을 유도하거나 촉진시키는 치료법의 개발이 요구되었다.

[0004] 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

[0005] 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(Embryonic Stem Cell)와 체세포로부터 만들어진 유도 만능 줄기세포 (Induced Pluripotent Stem Cell)로부터 분화된 혈관 내피세포(Endothelial Cell, EC)를 이용한, 혈관 재생치료법이 제시되었다.

[0006] 한편, 본 발명의 발명자들은, 종양 및 이상 조직의 발생과 같은 만능 줄기세포가 갖는 잠재적 위험 요소들, 분화 과정에서 이용되는 동물성분의 이용, 줄기세포의 체외 배양에서 혈관 내피세포로의 낮은 분화율 등이, 혈관 재생치료에 있어서 부작용 또는 미미한 치료효과를 야기시킬 수 있음을 인식하였다.

[0007] 한편, 체외에서 인위적으로 만능 줄기세포를 내피세포로 분화 및 유지하기 위해서는 적합한 배양 배지를 공급하면서, 혈장이나 림프액과 같은 체액을 근거로 한 생체의 조건에 가까운 영양분, pH, 온도 및 삼투압 등의 환경 조건을 충분히 만족되는 환경을 제공해 주어야 한다. 줄기세포 및 내피세포는 체외에서 배양을 거듭하거나, 외부로부터 자극을 받을수록 세포의 형태, 크기 및 특성 등이 미세하게 변형되거나 달라지며, 세포의 재생능, 증식 및 분화능력이 낮아지는 즉, 노화가 진행된다는 문제점이 있다. 이에, 조건에 맞지 않은 배양 배지에서 줄기세포 및 내피세포를 체외 배양할 경우, 줄기세포 및 내피세포는 쉽게 노화되고, 증식 및 분화능력을 상실한다. 나아가, 줄기세포 및 내피세포는 배양 조건에 따라 원치 않는 세포로의 분화가 유발되는 이질성(Heterogeneity)을 갖기 때문에, 줄기세포 및 내피세포에 대한 배양 배지 및 배양 방법의 개발은 줄기 세포 연구에 있어서 필수적이며 매우 중요한 기술 분야이다.

[0008] 이에, 본 발명의 발명자들은 혈관 재생 치료의 효과에 있어서, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포의 순도 및 특성 유지의 중요성에 대하여 인지하였다.

[0009] 이에, 본 발명의 발명자들은, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 세포주로부터 혈관 형성능의 내피세포를 높은 순도로 분리하고, 이의 체외 배양시 세포 증식의 증진 및 세포의 특성이 초기 상태와 동일하게 유지되면서 장기 배양이 가능한 배양 배지 및 배양 방법에 대하여 연구하였다.

[0010] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 세포 성장인자인 FGF 및 EGF, 세포 신호 전달 물질인 VEGF-A 및 산화방지제인 아스코르빅산을 기본 배지인 DMEM/F-12에 첨가하여 세포 배양에 사용하였을 경우, 거듭되는 배양에서도 혈관 내피세포의 특성이 유지된 고순도의 혈관 내피세포를 생산할 수 있다는 것을 발견할 수 있었다. 이에, 본 발명의 발명자들은, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 혈관 내피세포를 고순도로 유지 및 증식시킬 수 있는, 혈관 내피세포 특성 유지 배지를 개발하는데 이르렀다.

[0011] 이에 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 혈관 내피세포를 거듭되는 배양에서도 특성이 유지되면서 증식할 수 있는, 혈관 내피세포 특성 유지 배지를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는, 인간 만능 줄기세포로부터 순도 높은 혈관 내피세포를 배양할 수 있는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법 및 이를 통해 배양된 고순도의 혈관 내피세포를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 만능 줄기세포(Human Pluripotent Stem Cell, hPSC)를 유도 배지와 현탁하여 플레이트상에 제 1 접종하는 단계, 제 1 접종된 줄기세포를 유도 배지에서 중배엽 세포로 분화하도록 제 1 배양하는 단계, 제 1 배양된 세포를 분화 배지에서 내피세포로 분화하도록 제 2 배양하는 단계, 제 2 배양된 세포를 혈관 내피세포 계통의 세포로 선별하는 단계, 선별된 혈관 내피세포를 유지 배지와 현탁하여 플레이트상

에 제 2 접종하는 단계, 및 제 2 접종된 혈관 내피세포를 유지 배지에서 증식하도록 계대 배양하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법이 제공된다.

- [0015] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간 만능 줄기세포"는 미분화 상태를 유지하면서 무한대로 자가 증식할 수 있는 능력 및 인체의 모든 세포로 분화할 수 있는 분화능력을 가진 세포를 의미하며, 배아 줄기 세포(embryonic stem cell), 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 및 체세포 핵치환 줄기세포(somatic cell nuclear transfer cell, SCNT) 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0016] 본 명세서에서 사용되는 용어, "내피세포"는 혈관과 림프관의 내벽을 덮고 있는 층을 구성하는 편평 세포를 의미할 수 있다. 이에, 내피세포는 "혈관 내피세포(Vascular Endothelial Cell)"와 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [0017] 한편, 혈관 재생 치료에 있어서 줄기세포, 예를 들어 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포는, 세포 치료제로서 생체 내에 이식되어 손상된 혈관을 재생하고 혈관의 형성 또는 혈관의 신생을 유도할 수 있다. 이때, 치료에 이용되는 내피세포의 순도는, 혈관 재생 치료에 대한 예후와도 연관될 수 있다. 보다 구체적으로, 미분화된 내피세포 또는 중배엽 계통의 다른 세포주를 포함하거나, 불순물이 혼합된 내피세포를 허혈성 조직에 이식할 경우, 내피세포의 생존률의 저하를 야기할 수 있다. 이에, 재생 치료에 있어서 이식된 내피세포는 오랜 기간 동안 혈관 형성에 기여할 수 없음에 따라, 순도가 낮은 내피세포의 이용은 치료 효과의 저하로 이어질 수 있다.
- [0018] 이에, 순도 높은 내피세포를 분류하고 이의 특성을 높은 수준으로 유지하는 것은, 내피세포 자체의 수득률을 높이는 것뿐만 아니라, 이를 이용한 세포 재생치료의 효과를 증진시키는 것과도 연관될 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 사용되는 용어 "배지"는, 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식 등에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외(In vitro)에서 줄기세포 등의 세포의 성장 및 증식을 위한 혼합물을 의미한다.
- [0020] 이때, 본 발명의 특징에 따르면, 본 발명은 유도 배지, 분화 배지 및 유지 배지를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 유도 배지는, 미분화 세포인 인간 만능 줄기세포가 중배엽으로 유도시킬 수 있는 배양 배지를 의미하며, 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 2 내지 4  $\mu$ M의 CHIR99021 및 DMEM/F-12를 포함할 수 있다.
- [0021] 또한, 분화 배지는, 중배엽으로 유도된 세포 혈관 내피세포 계통으로 분화시킬 수 있는 배양 배지를 의미하며, 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A, 20 내지 30 ng/ml의 DLL4 및 DMEM/F-12를 포함할 수 있다.
- [0022] 또한, 유지 배지는 분화된 혈관 내피세포를 유지 및 증식시킬 수 있는 배양 배지를 의미하며, 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A, 20 내지 50 ng/ml의 아스코르빅산 및 DMEM/F-12를 포함할 수 있다.
- [0023] 이때, DMEM/F-12는 기본 배지이다. 본 발명에서 사용되는 용어 "기본 배지"는 세포가 살아가기 위해 필요한, 당, 아미노산 및 물 등이 포함되어 있는 혼합물로서, 혈청, 영양 물질 및 각종 성장인자를 제외한 혼합물이다. 본 발명의 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조하여 사용하거나 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, 상업적으로 제조된 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12,  $\alpha$ -MEM( $\alpha$ -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 및 FBS (Fetal bovine serum) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 DMEM/F-12일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 본 발명의 배양 단계는 단계에 따른 다른 배양 기간을 가질 수 있다. 보다 구체적으로, 제 1 배양 단계는 인간 만능 줄기세포가 유도 배지에서 중배엽 세포로 분화되는 단계로서, 매일 배지를 교체해주며 3일 동안의 배양 기간을 가질 수 있다. 나아가, 제 2 배양 단계는 중배엽으로 유도된 세포가 내피세포로 분화되는 단계로서, 매일 배지를 교체해주며 11 내지 13일 동안의 배양 기간을 가질 수 있다.
- [0025] 한편, 본 발명에서 사용되는 용어 "플레이트"는, 세포의 배양, 즉 성장 및 증식이 이루어질 수 있는 용기로서, 상부표면이 세포가 부착가능한 기질의 코팅막을 포함할 수 있다. 이때, 코팅막은 콜라겐, 피브로넥틴, 라미딘, 라미딘 프래그먼트, 비트로넥린, 기저막 매트릭스, 젤라틴, 히알루론산, 폴리리신 및 비트로넥린 중 적어도 하나로 이루어진 코팅막을 포함할 수 있으며, 1 mg/ml 이하, 바람직하게는 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함할 수 있다.



- [0026] 이에, 분화된 세포를 1 mg/ml 이하, 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함하는 코팅막이 코팅된 플레이트에서 배양하여, 코팅막에 특이적을 부착된 혈관 내피세포 계통의 세포만을 자연선택(Natural Selection)하여 선별할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 내피세포의 증식을 위하여 계대 배양을 하는 경우, 계대 배양은 1 내지 4 계대까지 수행될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어 " 계대 배양 "은, 세포를 건강한 상태로 지속적으로 장기간 배양하기 위해, 주기적으로 세포의 일부를 새로운 배양 플레이트에 옮긴 후, 배양 배지를 갈아주면서 세포의 대(代)를 계속 이어서 배양하는 방법을 의미할 수 있다. 한정된 공간을 가진 배양 플레이트 내에서 세포의 수가 늘어나면서 일정시간이 지나면 증식 영양분이 소비되거나 오염 물질이 쌓여 세포가 자연히 죽게 될 수 있다. 이에, 건강한 세포의 수를 늘리기 위한 방법으로 계대 배양이 사용되며, 통상적으로 한 차례 배지(배양 플레이트)를 교체하는 것 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 1 계대(1 passage)라고 할 수 있다. 계대 배양의 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 효소적 분리로 수행될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A, 20 내지 50 ng/ml의 아스코르빅산 및 DMEM/F-12를 유효성분으로 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배지가 제공된다.
- [0030] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 혈관 내피세포 계통으로 선별된 세포를 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A, 20 내지 50 ng/ml의 아스코르빅산 및 DMEM/F-12를 유효성분으로 포함하는 유지 배지와 현탁하여 플레이트상에 접종하는 단계, 및 접종된 혈관 내피세포를 유지 배지에서 혈관 내피세포의 특성이 유지되도록 계대 배양하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법이 제공된다.
- [0031] 이때, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 혈관 내피세포는, 이에 특이적으로 높은 수준으로 발현하는 유전자 및 단백질을 가질 수 있다. 예를 들어, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 혈관 내피세포에서의 CDH5, PECAM1 및 VWF 유전자의 발현 수준은, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 다른 세포주에서 보다 높을 수 있다. 이에, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 혈관 내피세포에서 특이적으로 높은 수준으로 발현하는 유전자 및 단백질이 혈관 내피세포의 특성을 나타내는 마커(Marker)로 이용될 수 있다. 따라서, 전술한 마커의 확인을 통하여, 배양을 거듭하면서 야기될 수 있는 혈관 내피세포의 변질에 대한 문제점을 확인할 수 있으며, 분화된 다양한 세포주들 사이에서 혈관 내피세포를 높은 순도로 분리할 수 있다.
- [0032] 이에, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 방법에 의해 계대 배양된 혈관 내피세포는, 전술한 혈관 내피세포의 특이 발현 마커인, CDH5 양성 세포 발현이 4계대까지 98 % 이상 유지될 수 있다.
- [0033] 나아가, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 방법에 의해 계대 배양된 혈관 내피세포는, 전술한 혈관 내피세포의 특이 발현 마커인, PECAM1 양성 세포 발현이 4계대까지 40 % 이상 유지될 수 있다.
- [0034] 더 나아가, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 방법에 의해 계대 배양된 혈관 내피세포는, 전술한 혈관 내피세포의 특이 발현 마커인, VWF 양성 세포 발현이 4계대까지 88 % 이상 유지될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 플레이트는 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌, 라미닌 프래그먼트, 비트로넥틴, 기저막 매트릭스, 젤라틴, 히알루론산, 폴리리신 및 비트로넥틴 중 적어도 하나로 이루어진 코팅막을 포함할 수 있으며, 1 mg/ml 이하, 바람직하게는 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 방법의 계대 배양은, 1 내지 4 계대까지 수행될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 전술한 방법으로 제조된 혈관 내피세포가 제공될 수 있다. 이러한, 혈관 내피세포는 혈관 형성능 및 재생능을 가질수 있으며, 이에, 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 세포 치료제로서 이용될 수 있다.
- [0038] 본 명세서 사용되는 용어, " 심혈관계 질환 "은 심혈관계 질환은 심장과 주요 동맥에 발생하는 질환을 의미할 수 있다. 이의 원인으로는 혈관 형성의 결핍으로 인한 원활하지 못한 혈액 공급이 있을 수 있다. 본원 발명에서 심혈관계 질환은 허혈성 심장 질환, 동맥경화증, 심근경색증, 협심증, 뇌혈관 질환, 고혈압 또는 부정맥을 포함할 수 있으며, 특히, 다양한 심혈관계 질환 중, 허혈성 심혈관계 질환에 특히 효과적일 수 있다. 그러나, 내피세포에 대한 예방용 또는 치료용 세포 치료제로서의 효과는 허혈성 심혈관계 질환에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 명세서 사용되는 용어, " 세포 치료제 "는 세포와 조직의 기능을 복원하기 위하여 살아 있는 자가



(autologous), 동종 (allogenic), 이종 (xenogenic) 세포를 체외에서 증식, 선별하거나 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등 일련의 행위를 통하여 치료, 진단, 예방 목적으로 사용되는 모든 의약품을 의미할 수 있다. 본원 명세서에서 세포 치료제는 손상 조직의 회복을 위해 이식될 수 있는 세포 그 자체를 의미할 수 있다. 예를 들어, 세포 치료제는 허혈 부위에 이식되어 혈관 형성에 기여하는, 인간 만능 줄기 세포로부터 분화된 내피 세포일 수 있다.

[0040] 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

[0041] 본 발명은 동물 유래 혈청 또는 피더 세포(Feeder cell)를 이용에 따라 발생하는 면역반응을 유발하지 않는 혈관 내피세포, 이를 고순도로 증식 배양할 수 있는 혈관 내피세포 특성 유지 배지 및 이를 포함하는 배양 방법을 제공함으로써 안정적으로 임상에 적용할 수 있는 효과가 있다.

[0042] 구체적으로, 본 발명은 인간 만능줄기세포가 혈관 내피세포로 배양에 있어서 각각의 단계에 특화된 유도, 분화 및 유지 배지를 제공함에 따라, 분화된 세포의 수율을 증가시키고, 고순도의 혈관 내피세포를 제공할 수 있다.

[0043] 또한, 혈관 내피세포의 대량생산을 위한 혈관 내피세포의 계대 배양에 있어서 특화된 유지 배지를 제공함에 따라, 고순도의 혈관 내피세포를 짧은 시간 내에 제공할 수 있다.

[0044] 나아가, 본 발명은 혈관 신생을 촉진하고, 혈관 재생력이 뛰어난 혈관 내피세포를 제공함으로써, 심혈관계 질환에 대한 예방 또는 치료에 효과적인 세포 치료제로서 활용될 수 있는 효과가 있다.

[0045] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법의 절차를 도시한 것이다.

도 2a 내지 2d는 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포를 순수 혈관 내피세포로 선별하는 과정을 도시한 것이다.

도 3는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에서 배양 계대수에 따른 혈관 내피세포의 현미경 이미지를 나타내는 결과이다.

도 4a 내지 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에서 마커들에 대한 양성 혈관 내피세포의 상대적 발현 수준을 나타내는 결과이다.

도 5은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에서 혈관 내피세포의 계대수에 따른 세포 성장률을 나타내는 결과이다.

도 6a 내지 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에서 혈관 내피세포의 배양 배지에 따른 마커들에 대한 양성 혈관 내피세포의 상대적 발현 수준을 나타내는 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에서 혈관 내피세포의 계대수에 따른 혈관 내피세포의 배양 배지 별 세포 성장률을 나타내는 결과이다.

도 8는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에서 혈관 내피세포의 배양 배지에 따른 혈관 내피세포의 현미경 이미지를 나타내는 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 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.

[0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 분화(Differentiation) "는 세포가 특별한 기능을 갖는 특정한 세포나 조직의

복합체 또는 개체의 수준으로 발달하는 것을 의미한다.

- [0049] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 증식(Proliferation) "은 세포 수의 증가를 의미하는 것으로 성장(growth)과 동일한 의미로 사용된다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 재생능(Renewal ability) "은 세포가 자신과 똑같은 복사본을 만들어낼 수 있는 능력을 의미할 수 있으며, 재생능이 개선되는 경우 세포의 증식능이 우수할 수 있다.
- [0051] 이하에서는 도 1 내지 3을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에 대해서 구체적으로 설명한다.
- [0052] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법의 절차를 도시한 것이다. 이하에서는, 설명의 편의를 위해서 도 2a 내지 3을 참조하여 설명한다.
- [0053] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법은, 인간 만능 줄기세포를 유도 배지와 현탁하여 플레이트상에 제 1 접종하는 단계(S110), 제 1 접종된 줄기세포를 유도 배지에서 중배엽 세포로 분화하도록 제 1 배양하는 단계(S120), 제 1 배양된 세포를 분화 배지에서 내피세포로 분화하도록 제 2 배양하는 단계(S130), 제 2 배양된 세포를 혈관 내피세포 계통의 세포로 선별하는 단계(S140), 선별된 혈관 내피세포를 유지 배지와 현탁하여 플레이트상에 제 2 접종하는 단계(S150) 및 제 2 접종된 혈관 내피세포를 유지 배지에서 증식하도록 계대 배양하는 단계(S160)를 포함한다.
- [0054] 이때, 배양 환경 조건에서 온도는 36 °C 내지 38 °C 바람직하게는 36.5 °C 내지 37.5 °C이며, 공급 산소(O<sub>2</sub>)는 1 % 내지 25 %이며, 공급 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)는 1 % 내지 15 %일 수 있다.
- [0055] 보다 구체적으로, 먼저, 인간 만능 줄기세포를 유도 배지와 현탁하여 플레이트상에 제 1 접종하는 단계(S110)에서는, 미분화 상태의 인간 만능 줄기세포를 단백질 분해 효소를 이용하여 조직에서 분리한 후, 유도 배지와 현탁하여 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함하는 코팅막이 코팅된 플레이트상에 접종(Seeding)시킨다.
- [0056] 이때, 단백질 분해 효소는 생체 조직에 포함되는 세포 또는 세포 집합체를 유리시키기 위해서 세포간 매트릭스를 분리시킬 수 있는 효소를 의미하며, 조직으로부터 인간 만능 줄기세포를 분리 또는 세포 및 세포 집합체를 분리하기 위하여 콜라제네이즈(Collagenase), 디스페이즈(Dispase), 프로테아제(Protease) 및 트립신(Trypsin) 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 나아가, 플레이트는 세포 배양이 이루어질 수 있는 것이라면 한정되지 않고, 플라스크, 조직 배양용 플라스크, 디쉬, 페트리디쉬, 마이크로 플레이트, 마이크로 웰 플레이트, 마이크로 슬라이드, 램버 슬라이드, 샬레, 튜브, 트레이 및 배양 백 등 다양한 모양의 플레이트가 이용될 수 있으며, 상부표면의 세포부착층 코팅막을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 플레이트의 코팅막은, 콜라겐, 피브로넥틴, 라미딘, 라미딘 프래그먼트, 비트로넥틴, 기저막 매트릭스, 젤라틴, 히알루론산, 폴리리신 및 비트로넥틴 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 1 mg/ml 이하, 바람직하게는 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함할 수 있다. 이에, 0.1mg/ml의 콜라겐 코팅막을 포함하는 플레이트에 배양됨에 따라 세포의 접착 및 신전이 촉진되어, 중배엽 계통 세포의 분화 효율이 증가될 수 있다.
- [0058] 그 다음, 제 1 접종된 줄기세포를 유도 배지에서 중배엽 세포로 분화하도록 제 1 배양하는 단계(S120)에서는, 성장인자인 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, GSK3 $\beta$  저해제인 2 내지 4  $\mu$ M의 CHIR99021 및 DMEM/F-12를 포함하는 유도 배지에서 3 일간 매일 배지를 교체하며 배양함으로써, 줄기세포에서 중배엽 계통 세포로 분화를 유도할 수 있다.
- [0059] 이때, FGF2(Fibroblast growth factor)는 세포증식, 세포분화 등을 비롯해 분열 촉진, 혈관 생성, 뼈 형성 및 신경 성장 등의 다양한 생물학적 과정에 관련되어 있는 성장 인자이다.
- [0060] 또한, CHIR99021은 GSK(Glycogen synthase kinase)의 활성을 억제하는 물질이다. 보다 구체적으로, GSK가 억제됨에 따라 세포 증식에 관여하는 신호전달체계의  $\beta$ -catenin이 GSK에 의해 분해되지 않아 세포 증식에 관여하는 유전자 발현량이 증가되어, 세포의 생존 및 증식이 향상될 수 있다.
- [0061] 그 다음, 제 1 배양된 세포를 분화 배지에서 내피세포로 분화하도록 제 2 배양하는 단계(S130)에서는, 성장인자인 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A, 노치 신호 전달 리간드인 20 내지 30 ng/ml의 DLL4 및 DMEM/F-12를 포함하는 분화 배지에서 11 내지 13일간 매일 배지를 교체하며 배양함으로써, 중배엽 계통의 세포에서 내피세포 계통으로 분화를 유도할 수 있다. 나아가, 제 1 배양된 세포를 분화 배지에서 내피세포로 분화하도록 제 2 배양하는 단계(S130)에서 선택적으로 헤파린이 이용됨으로써, 내피세포

계통으로의 분화 효율이 증가될 수 있다.

- [0062] 이때, EGF(Epidermal growth factor)는 이의 수용체와 결합하여 세포의 증식, 성장 및 분화를 촉진할 수 있는 성장 인자이며, 상피세포의 증식을 촉진하는 활성을 가질 수 있다.
- [0063] 또한, VEGF-A(Vascular endothelial growth factor)는 VEGF 신호전달을 활성화하여 배아 순환계 형성 및 혈관 형성에 관여하는 신호전달 물질이며, 내피세포의 세포 분열 및 세포 이동을 자극할 수 있다.
- [0064] 또한, DLL4(Delta-like ligand 4)는 내피세포의 성장, 이동, 동/정맥 분화의 결정, 틱/스톡 세포 결정 및 틱 세포 형성을 감소시켜 과도한 혈관신생을 억제하는 역할을 하는 노치(Notch) 수용체에 작용하여 혈관신생 발아를 적절하게 조절하는 신호전달물질이다. 특히, DLL4의 추가로 인하여, 세포의 특성을 구별하고 유지하는데 작용하는 노치신호가 조절되어, 혈관 내피세포의 특성 즉, 마커의 발현 수준이 증가될 것으로 판단된다.
- [0065] 그 다음, 제 2 배양된 세포를 혈관 내피세포 계통의 세포로 선별하는 단계(S140)에서는, 줄기세포로부터 분화된 다양한 세포주들 즉, 내피세포 계통으로부터 혈관 내피세포를 선별함으로써, 높은 순도의 혈관 내피세포를 획득할 수 있다. 보다 구체적으로, 도 2a 내지 2d를 참조하여, 순수 혈관 내피세포로 선별하는 과정을 설명한다.
- [0066] 먼저, 도 2a의 (a)를 참조하면, 내피세포 계통으로 구성되는 콜로니(Colony)가 도시된다. 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포는 자율적으로 분화됨으로써 불균질(Heterogeneous)한 내피세포 계통으로 구성되는 콜로니를 형성할 수 있다. 이에, 도 2a의 (b)를 참조하면, 분화된 내피세포 계통들은 크기 및 형태면에서 다양한 종류가 섞여 있는 것으로 나타난다.
- [0067] 그 다음, 도 2b를 참조하면, 세포 선별에 앞서 분화된 내피세포 계통으로 구성되는 콜로니를 2개 이하의 플레이트상에 분할하여 접종할 수 있다. 이때, 플레이트가 2개를 초과하여 접종할 경우, 혈관 내피세포의 선별 효율이 감소할 수 있다.
- [0068] 그 다음, 높은 순도의 혈관 내피세포만을 획득하기 위하여 세포 선별이 수행될 수 있다. 세포 선별은 분화된 특정 세포를 고순도로 분리하기 위한 기술로서, 유세포 분류(Flow cell sorting) 및 자성 세포 분류(magnetic cell sorting) 등이 이용될 수 있으나, 세포 고유의 특성을 이용하여 세포를 선별할 수도 있다. 예를 들어, 도 2c의 (a)를 참조하면, 기질의 특이적 표면 부착성을 가지는 세포의 선택적 부착을 이용하여 세포가 분리 및 선별될 수 있다. 보다 구체적으로, 각 세포들은 특성에 따라, 기질에 부착되는 시간이 다르게 나타날 수 있다. 이에, 기질로 이루어진 코팅막을 포함하는 플레이트에 불균질한 내피세포 계통을 배양하여, 플레이트의 코팅막에 부착되는 세포들을 배양 시간에 따라 순차적으로 분류할 수 있다. 도 2c의 (b)를 참조하면, 특정 시간 내에 부착된 혈관 내피세포가 도시된다. 동일 시간에 부착된 세포는 모두 동일한 모양을 갖는 것으로 나타나며, 부유 세포들은 같은 특성을 가진 내피세포가 아닌 것으로 간주하여, 세척을 통하여 제거된다. 이때, 기질로 이루어진 코팅막은 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 혈관 내피세포가 시간에 따라 특이적으로 부착될 수 있는 다양한 기질을 포함하는 코팅막이 이용될 수 있다.
- [0069] 마지막으로, 도 2d의 (a)를 참조하면, 플레이트의 코팅막에 부착된 세포만을 선별한다. 도 2d의 (b)를 참조하면, 선별된 세포들은 동일한 형태인 것으로 나타나며, 이는, 동일한 특성을 가진 내피세포임을 의미할 수 있다. 이에, 전술한 방법에 의하여 순도 높은 혈관 내피세포만을 선별하여 이용할 수 있다. 부착시간은 4시간 내지 20시간일 수 있다. 즉, 세포 선별은 접종 후 4시간 내지 20시간에 내피세포 계통의 세포를 분리하는 것을 의미할 수 있다.
- [0070] 다시, 도 1의 선별된 혈관 내피세포를 유지 배지와 현탁하여 플레이트상에 제 2 접종하는 단계(S150)에서는, 고순도로 선별된 혈관 내피세포를 유지 배지와 현탁하여 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함하는 코팅막이 코팅된 플레이트상에 접종시킨다.
- [0071] 마지막으로, 제 2 접종된 혈관 내피세포를 유지 배지에서 증식하도록 계대 배양하는 단계(S160)에서는, 성장인자인 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A, 20 내지 50 ng/ml의 아스코르빅산 및 DMEM/F-12를 포함하는 유지 배지에서 계대 배양함으로써, 혈관 내피세포의 증식을 유도할 수 있다.
- [0072] 이때, 계대 배양은 1 내지 4 계대까지 수행될 수 있다. 보다 구체적으로, 혈관 내피세포는 배양이 4 계대 초과로 진행될 경우, 증식력 및 분화 능력이 감소될 뿐만 아니라, 장기간 배양할 경우 세포 집괴(Clump)등이 형성되고 염색체상의 변이를 동반할 수 있다. 이에, 도 3을 참조하면, 배양 계대수에 따른 혈관 내피세포의 현미경

이미지를 나타내는 결과가 도시된다. 각 계대에 따른 혈관 내피세포는 모두 동일한 크기 및 형태를 갖는 것으로 나타나며, 4계대까지 세포 집괴가 생성되지 않는 것으로 나타난다. 이때, 세포 집괴가 형성된 경우, 세포 주기 억류(Cell cycle arrest)가 발생하고, 이에 따라 자체 분화가 유도되어 원하고자 하는 세포 즉, 혈관 내피 세포로의 분화가 어려울 수 있다. 따라서, 혈관 내피세포의 특성이 유지되면서 고순도를 가진 다량의 세포 수를 확보할 수 있는 계대 배양은 바람직하게, 1 내지 4 계대까지 일 수 있다.

[0073] 나아가, 아스코르빅산(Ascorbic acid)는 산화방지제로 procollagen 합성에 관여하며, type 1 콜라겐 생산의 증가와 관련된 보조인자(Cofactor)이다. 아스코르빅산은 in vitro에서 지방세포, 조골세포, 연골세포와 같은 다양한 중배엽 유래의 세포 증식을 자극 및 조절할 수 있다. 나아가, 중간엽 줄기세포의 배양 배지에 특정 농도의 아스코르빅산을 첨가할 경우, 세포 성장 촉진제로 작용하여 세포의 증식력이 증가되고, DNA의 합성까지 촉진시킬 수 있다. 그러나, 아스코르빅산의 농도가 적절하지 못할 경우, 오히려 세포의 증식력을 억제시키고, 세포 독성(Cytotoxic)을 가짐으로 세포 자살(Apoptosis)을 일으킬 수 있다. 이에, 세포의 증식력을 향상시킬 수 있는 적정 아스코르빅산의 농도는 20 내지 50 ng/ml일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074] 이상의 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에 의하여, 인간 만능 줄기세포로부터 혈관 내피세포를 높은 수율로 생산할 수 있는 효과가 있다.

[0075] **본 발명의 일 실시예에 따른 유지 배지에서의 혈관 내피세포 특성 유지 확인**

[0076] 이하에서는, 도 4a 내지 5를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 유지 배지에서의 혈관 내피세포 특성 유지에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0077] 도 4a 내지 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양에서 마커들에 대한 양성 혈관 내피세포의 상대적 발현 수준을 나타내는 결과이다.

[0078] 먼저, 도 4a를 참조하면, 혈관 내피세포 양성 대조군(Positive control)의 상대적 마커 발현 수준이 도시된다. 보다 구체적으로, 혈관 내피세포 양성 대조군에서는 CDH5, PECAM1, TEK, KDR 및 VWF가 발현되는 것으로 나타난다. 이는, CDH5, PECAM1, TEK, KDR 및 VWF가 혈관 내피세포에서 특성을 나타내는 마커임을 의미할 수 있다. 이에, 혈관 내피세포에 특이적으로 발현하는 마커인, CDH5, PECAM1, TEK, KDR 및 VWF를 확인함에 따라, 혈관 내피세포의 특성 유지를 확인할 수 있다.

[0079] 이에, 도 4b를 참조하면, 유지 배지에서의 계대 배양에 따른 혈관 내피세포의 마커 발현 수준 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 유지 배지에서의 계대 배양에 따른 혈관 내피세포의 CDH5 마커에 대한 양성 발현 수준은 1 계대에서 99.7 %, 2 계대에서 99.0 %, 3 계대에서 99.2 % 및 4 계대에서 98.3 % 인 것으로 나타난다.

[0080] 또한, 유지 배지에서의 계대 배양에 따른 혈관 내피세포의 PECAM1 마커에 대한 양성 발현 수준은 1 계대에서 42.8 %, 2 계대에서 43.2 %, 3 계대에서 38.6 % 및 4 계대에서 45.4 % 인 것으로 나타난다.

[0081] 또한, 유지 배지에서의 계대 배양에 따른 혈관 내피세포의 TEK 마커에 대한 양성 발현 수준은 1 계대에서 28.8 %, 2 계대에서 63.4 %, 3 계대에서 30.2 % 및 4 계대에서 17.9 % 인 것으로 나타난다.

[0082] 또한, 유지 배지에서의 계대 배양에 따른 혈관 내피세포의 KDR 마커에 대한 양성 발현 수준은 1 계대에서 16.0 %, 2 계대에서 61.2 %, 3 계대에서 14.5 % 및 4 계대에서 4.6 % 인 것으로 나타난다.

[0083] 또한, 유지 배지에서의 계대 배양에 따른 혈관 내피세포의 VWF 마커에 대한 양성 발현 수준은 1 계대에서 98.4 %, 2 계대에서 93.1 %, 3 계대에서 88.3 % 및 4 계대에서 97.4 % 인 것으로 나타난다.

[0084] 따라서, 유지 배지에서의 계대 배양에 따른 혈관 내피세포는 혈관 내피세포 양성 대조군에서 확인된 마커인 CDH5, PECAM1, TEK, KDR 및 VWF에 대하여 높은 발현 수준을 나타내는 고순도의 분화된 혈관 내피세포임을 의미할 수 있다. 고순도는 98 % 이상의 순도를 의미할 수 있으며, 예를 들어, CDH5 양성 세포 발현이 4계대까지 98 % 이상 유지되는 것을 의미할 수 있다.

[0085] 나아가, 도 4c를 참조하면, 전술한 유지 배지에서의 계대 배양에 따른 혈관 내피세포의 마커에 대한 양성 발현 수준을 그래프로 나타낸 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, CDH5 마커에서는 4 계대까지 CDH5 발현 양성 세포수가 98 % 이상 유지되는 것으로 나타나며, PECAM1 마커에서는 4 계대까지 CDH5 발현 양성 세포수가 40 % 이상 유지되는 것으로 나타나며, VWF 마커에서는 4 계대까지 CDH5 발현 양성 세포수가 88 % 이상 유지되는 것으로 나타난다. 그러나, TEK 및 KDR 마커에서는 각 계대별 마커 발현 양성 세포수가 균일하지 못하거나, 감소하는 경향을 보이거나, 3 계대까지의 마커 발현 양성 세포수는 혈관 내피세포 양성 대조군보다 낮게 유지된 것으로 나타



난다. 따라서, 혈관 내피세포가 유지 배지에서 계대 배양된 경우, 혈관 내피세포 양성 대조군에서 확인된 마커인 CDH5, PECAM1, TEK, KDR 및 VWF의 발현이 4 계대까지 지속적으로 유지된 것으로 나타난다. 이는, 유지 배지에서의 혈관 내피세포의 배양은 혈관 내피세포의 특성을 유지하면서 증식시킬 수 있다는 것을 의미할 수 있다.

[0086] 더 나아가, 도 5를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에서 혈관 내피세포의 계대수에 따른 세포 성장률이 도시된다. 이때, 세포는 이분법을 이용하여 증식함에 따라, 세포 성장률은 한 개의 세포가 두 개의 세포로 되는 시간이 어느 정도인지에 따라 결정된다. 이를, 분열 시간(Doubling time)이라 하며 세포의 성장률 즉, 증식력을 평가할 수 있는 척도로 사용될 수 있다. 이에, 세포 성장률은 혈관 내피세포의 계대수에 따라 CPDL(Cumulative population doubling level) 값으로 나타났다. CPDL은 세포 성장률을 나타내는 지수이다. 보다 구체적으로, CPDL 값이 10이라 하면 세포가 10번의 분열을 하였음을 의미할 수 있으며, 이를 수치상으로 계산하면 하나의 세포가 약 1000개의 세포까지 증식함을 의미할 수 있다. CPDL은 아래의 수학적 식 1에 의해 계산되었다.

### 수학적 식 1

[0087]  $CPDL = \ln(N_f/N_i)/\ln 2$

[0088] 이때,  $N_i$ 는 초기 접종(Seeding)한 세포수,  $N_f$ 는 최종 세포수,  $\ln$ 은 자연로그를 의미한다.

[0089] 유지 배지에서 배양된 혈관 내피세포의 CPDL 값은 1 내지 4 계대에서 1 내지 2.5 범위 내의 값을 갖는 것으로 나타난다. 이는, 하나의 혈관 내피세포가  $2^{2.5}$  개까지 증식할 수 있음을 의미할 수 있다.

[0090] 이상의 결과로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 배지에서의 혈관 내피세포의 증식 배양은 거듭되는 배양에도 불구하고 세포의 형태 및 특성에 변화없이 균일한 혈관 내피세포로 증식시킬 수 있다.

[0091] **배지에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 비교**

[0092] 이하에서는, 도 6a 내지 도 8을 참조하여, 배지에 따른 혈관 내피세포 특성 유지에 대하여 구체적으로 설명한다. 이때, 실시예 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A, 20 내지 50 ng/ml의 아스코르빅산 및 DMEM/F-12을 포함하는 혈관 내피세포 특성 유지 배지로 설정하였다.

[0093] 나아가, 비교예 1은 hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, 아스코르빅산, hEGF, 헤파린 및 GA-1000을 포함하는 종래의 세포 배양 배지로, 비교예 2는 4 내지 6 ng/ml의 FGF2, 5 내지 10 ng/ml의 EGF, 10 내지 30 ng/ml의 VEGF-A, 20 내지 30 ng/ml의 DLL4 및 DMEM/F-12을 포함하는 본 발명의 혈관 내피세포 분화 배지로 설정하였다.

[0094] 먼저, 도 6a 내지 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에서 혈관 내피세포의 배양 배지에 따른 마커들에 대한 양성 혈관 내피세포의 상대적 발현 수준을 나타내는 결과이다.

[0095] 보다 구체적으로, 도 6a를 참조하면, 배양 배지에 따른 혈관 내피세포의 마커 발현 수준 결과가 도시된다. 혈관 내피세포의 CDH5 마커에 대한 양성 발현 수준은 비교예 1에서 96.2 %, 비교예 2에서 99.4 % 및 실시예 1에서 99.0 %인 것으로 나타난다.

[0096] 또한, 혈관 내피세포의 PECAM1 마커에 대한 양성 발현 수준은 비교예 1에서 42.9 %, 비교예 2에서 37.6 % 및 실시예 1에서 59.9 %인 것으로 나타난다.

[0097] 또한, 혈관 내피세포의 TEK 마커에 대한 양성 발현 수준은 비교예 1에서 57.3 %, 비교예 2에서 38.8 % 및 실시예 1에서 66.9 %인 것으로 나타난다.

[0098] 또한, 혈관 내피세포의 KDR 마커에 대한 양성 발현 수준은 비교예 1에서 19.2 %, 비교예 2에서 69.4 % 및 실시예 1에서 63.8 %인 것으로 나타난다.

[0099] 또한, 혈관 내피세포의 VWF 마커에 대한 양성 발현 수준은 비교예 1에서 85.0 %, 비교예 2에서 91.6 % 및 실시예 1에서 96.7 %인 것으로 나타난다.

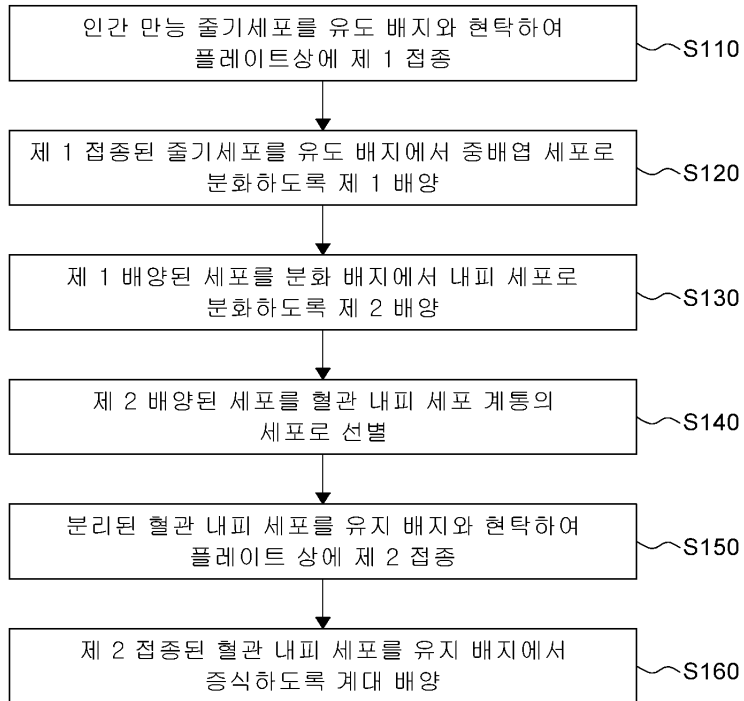
[0100] 따라서, 배양 배지에 따른 혈관 내피세포는 혈관 내피세포 양성 대조군에서 확인된 마커인 CDH5, PECAM1, TEK,

KDR 및 VWF에 대하여 발현을 나타내는 혈관 내피세포임을 의미할 수 있다.

- [0101] 그러나, 도 6b를 참조하면, 전술한 배양 배지에 따른 혈관 내피세포의 마커에 대한 양성 발현 수준을 그래프로 나타낸 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 도 6b의 (a) 및 (e)를 참조하면, 혈관 내피세포의 특징적인 지표인 CDH5 및 VWF 마커에서는 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1 모두가 높은 마커 발현 양성 세포수를 보이는 것으로 나타난다. 반면에, 도 6b의 (b), (c) 및 (d)를 참조하면, 혈관 내피세포의 특징적인 지표인 PECAM1, TEK 및 KDR 마커에서는, 실시예 1이 비교예 1 및 2 보다 높은 마커 발현 양성 세포수를 보이는 것으로 나타난다. 이때, 소수 지표의 발현 확인만으로는 분화된 세포가 혈관 내피세포임을 입증하기에 어려울 수 있다. 이에, 이와 관련된 다수의 지표가 높을수록 보다 순도가 높은 내피세포일 수 있다. 따라서, 혈관 내피세포에 특이적으로 발현하는 마커들에 대하여 모두 높은 마커 발현 양성 세포수를 보인, 실시예 1이 가장 고순도의 분화된 혈관 내피세포임을 의미할 수 있다.
- [0102] 나아가, 도 7을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에서 혈관 내피세포의 계대수에 따른 혈관 내피세포의 배양 배지 별 세포 성장률 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 비교예 1에서 배양된 혈관 내피세포의 CPDL 값은 1 내지 4 계대에서 1 내지 4.5 범위 내의 값을 갖는 것으로 나타난다. 이는, 하나의 혈관 내피세포가  $2^{4.5}$  개까지 증식할 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0103] 또한, 비교예 2에서 배양된 혈관 내피세포의 CPDL 값은 1 내지 4 계대에서 1 내지 3 범위 내의 값을 갖는 것으로 나타난다. 이는, 하나의 혈관 내피세포가  $2^3$  개까지 증식할 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0104] 또한, 실시예 1에서 배양된 혈관 내피세포의 CPDL 값은 1 내지 4 계대에서 1 내지 3.5 범위 내의 값을 갖는 것으로 나타난다. 이는, 하나의 혈관 내피세포가  $2^{3.5}$  개까지 증식할 수 있음을 의미할 수 있다. 따라서, 세포 성장률은 가장 많이 증식할 수 있는 비교예 1이 가장 좋을 수 있다. 그러나, 세포가 빠르게 폭발적으로 증가하는 경우, 세포는 세포 집괴가 형성될 수 있으며, 세포 집괴로 인하여 원하지 않는 세포로 분화가 유발될 수 있다.
- [0105] 이에, 도 8을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배양 방법에서 혈관 내피세포의 배양 배지에 따른 혈관 내피세포의 현미경 이미지가 도시된다. 보다 구체적으로, 비교예 1에서 배양된 혈관 내피세포에서 세포 집괴가 형성된 것으로 나타난다. 반면에, 실시예 1에서는 세포 집괴의 형성 없이 각각의 혈관 내피세포들로만 이루어진 것으로 나타난다. 따라서, 원하는 방향으로만 분화가 유도되면서, 증식력이 우수한 배지는 실시예 1일 수 있다.
- [0106] 이상의 결과로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 특성 유지 배지는 세포 배양이 진행될수록 증식력 및 재생능이 감소되고, 변이를 동반하여 혈관 내피세포의 특성이 변질되는 문제를 야기하지 않아, 혈관 내피세포를 고순도로 유지 및 증식할 수 있는 효과가 있다.
- [0107] 이에, 본 발명은 균일한 혈관 내피세포를 제공함으로써, 임상 적용에 있어 안정적으로 사용가능한 혈관 내피세포를 제공할 수 있다.
- [0108] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시 예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시 예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

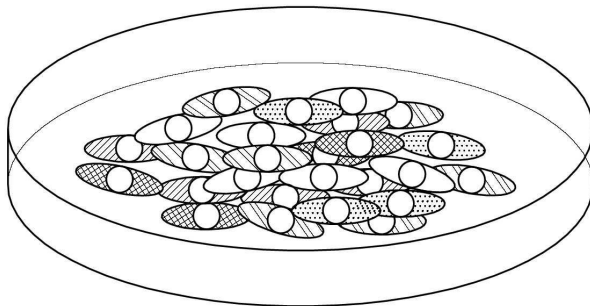
도면1





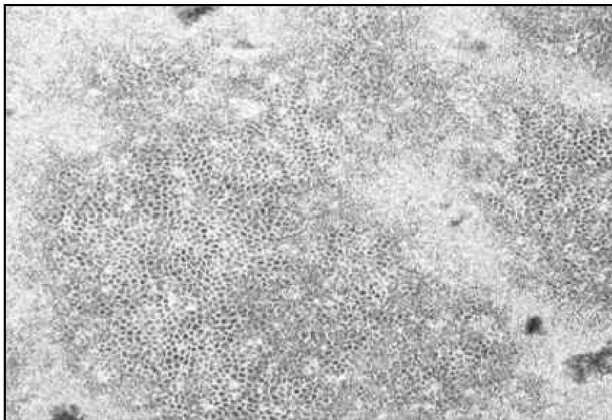
도면2a

(a)

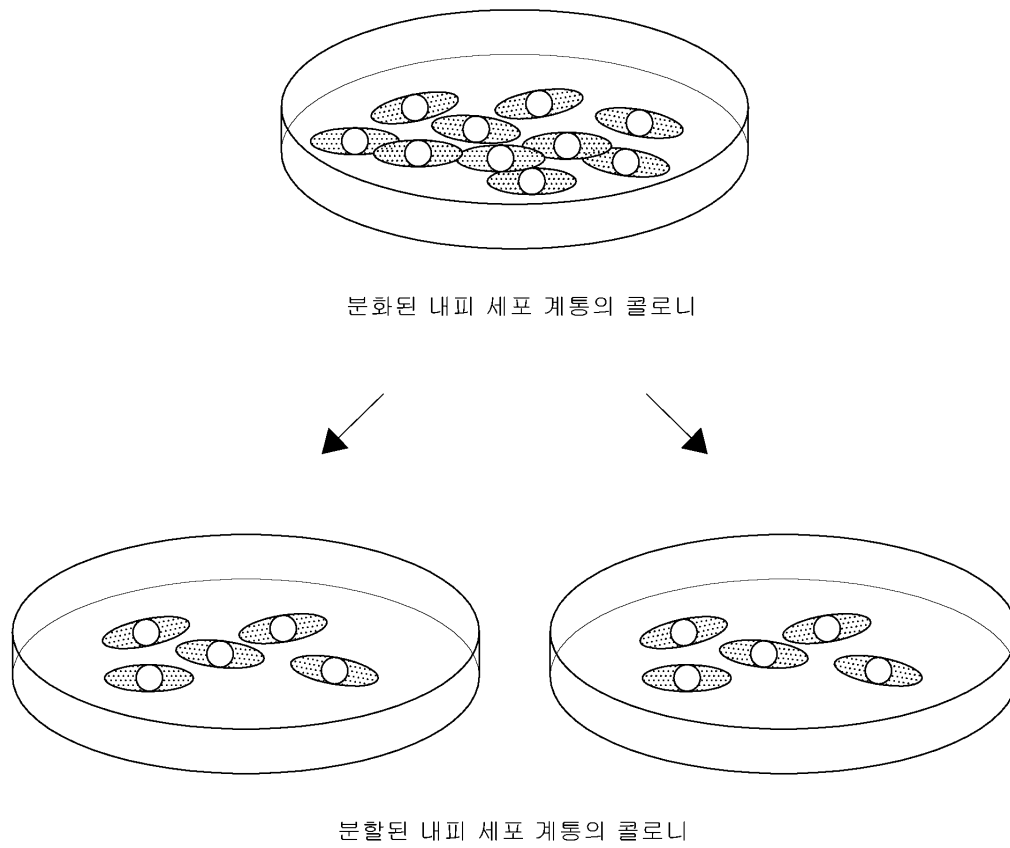


내피 세포 계통으로 구성되는 콜로니  
불균질 (Heterogeneous)

(b)

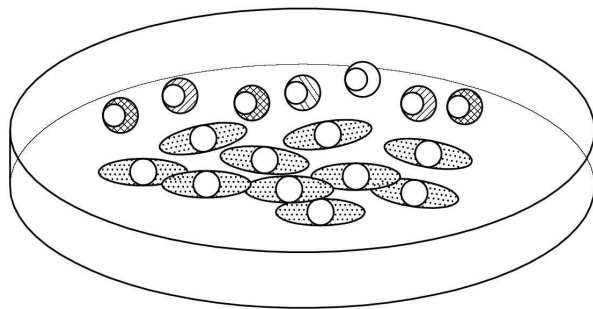


도면2b



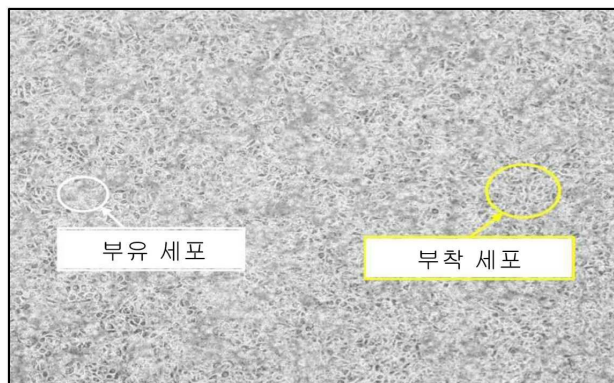
도면2c

(a)



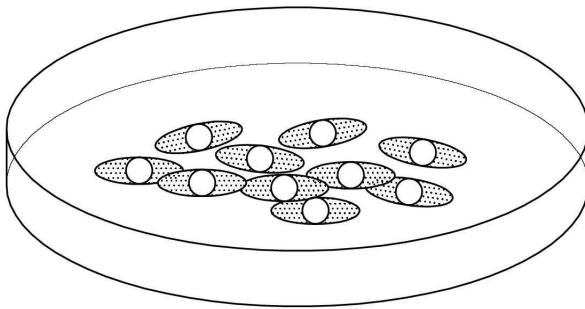
플레이트에 순차적 부착  
(부착된 세포 및 부유된 세포분리)

(b)



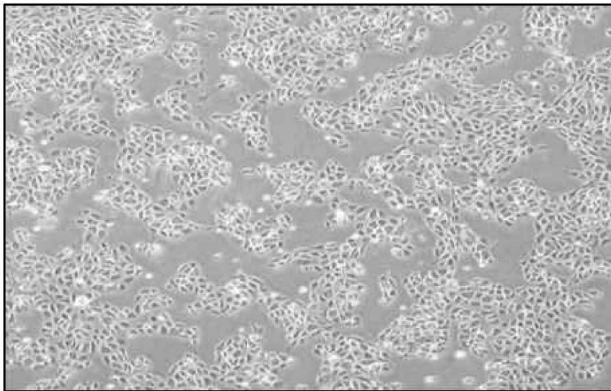
도면2d

(a)

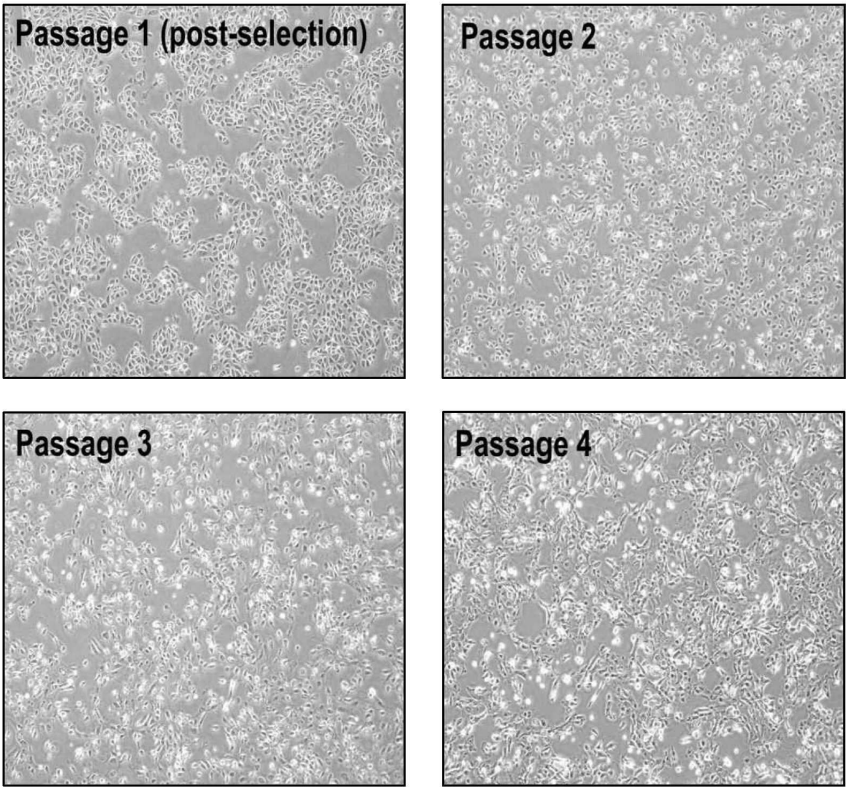


순수 내피 세포 선별

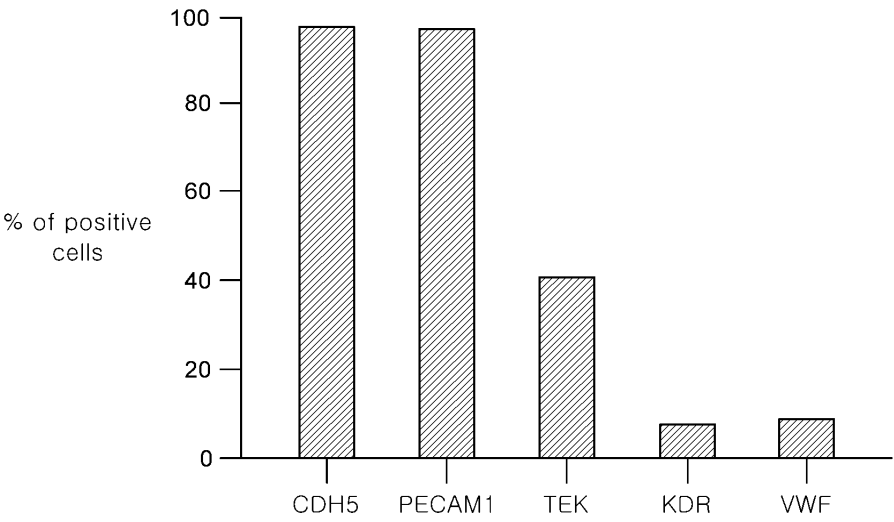
(b)



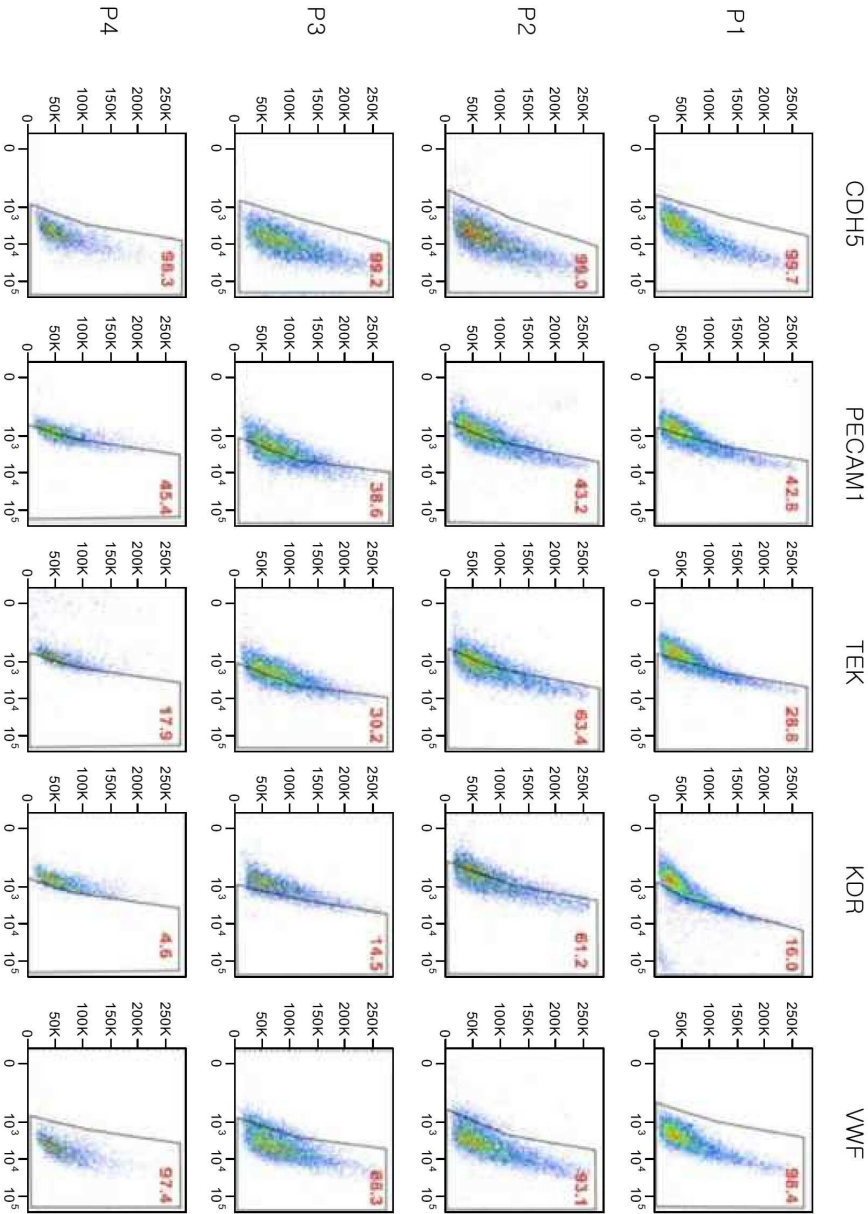
도면3



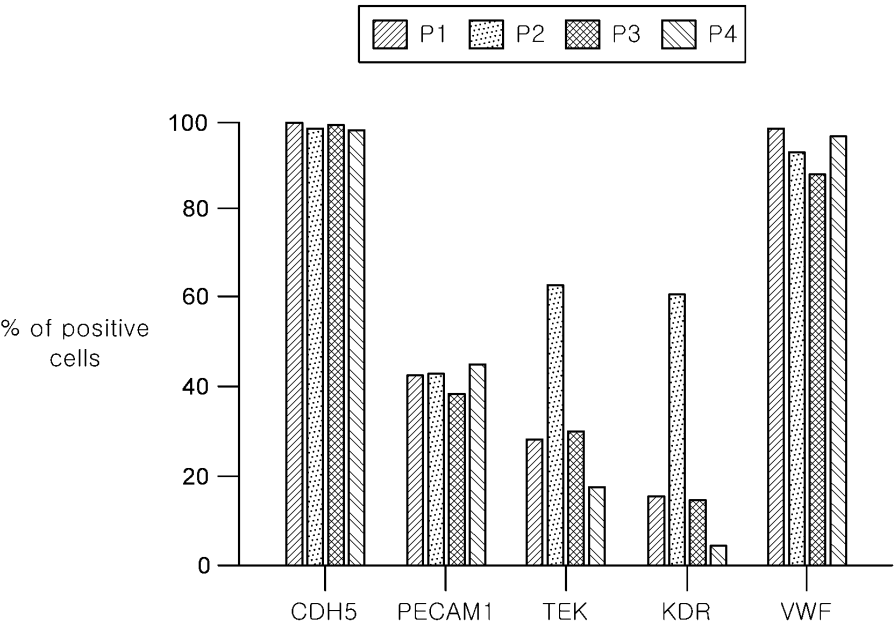
도면4a



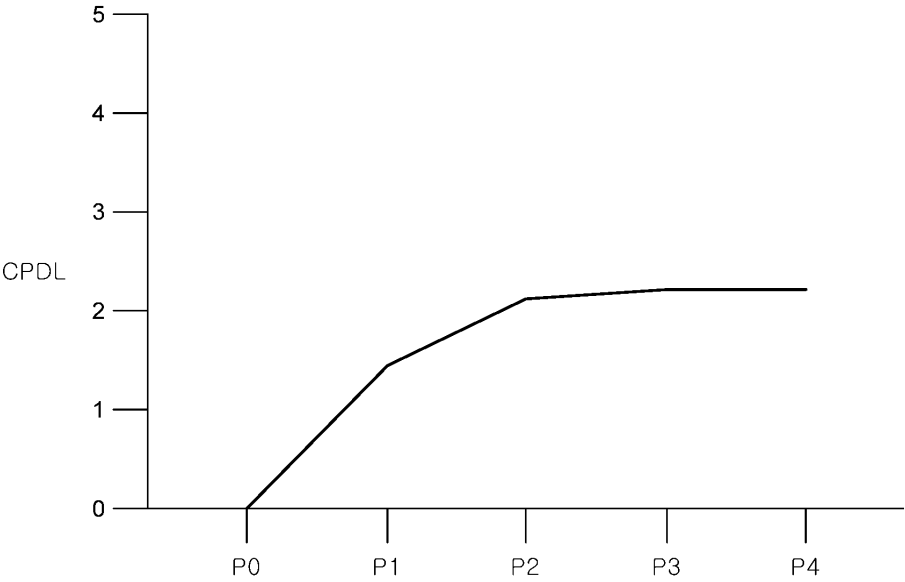
도면4b



도면4c

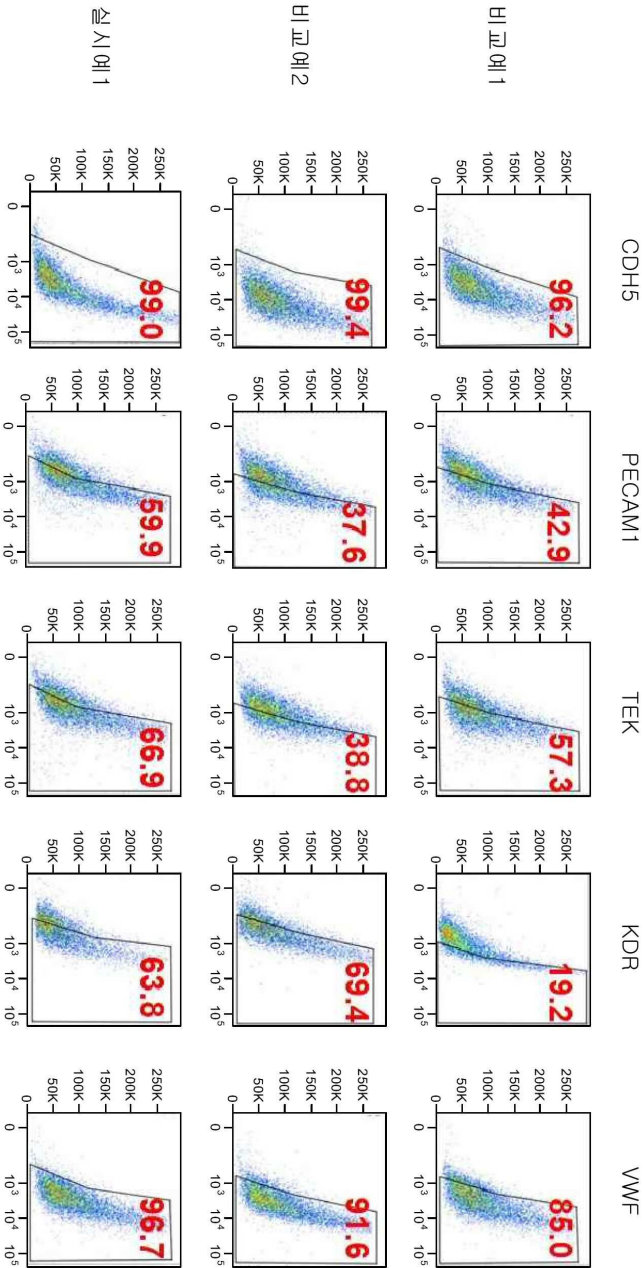


도면5

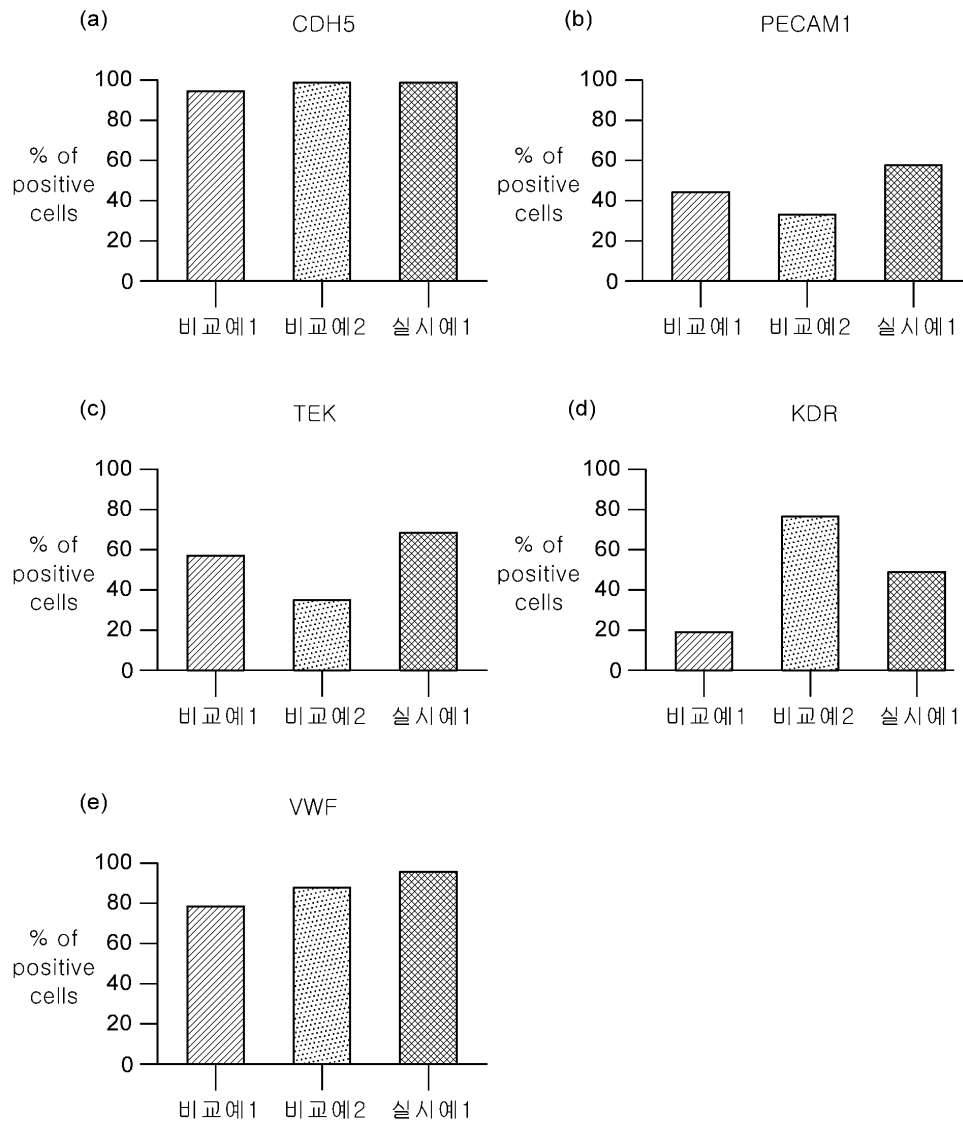




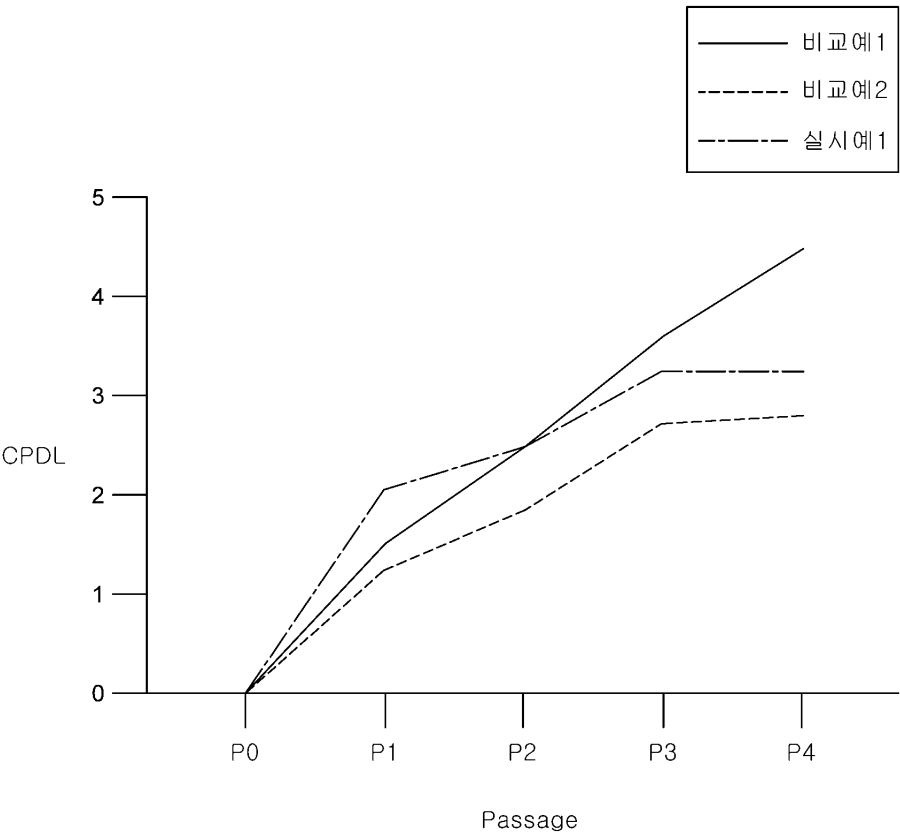
도면6a



도면6b



도면7



도면8

