



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월27일

(11) 등록번호 10-2258053

(24) 등록일자 2021년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) **A61K 35/44** (2015.01)
A61P 9/00 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 5/069 (2013.01)
A61K 35/44 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2019-0145337
 (22) 출원일자 2019년11월13일
 심사청구일자 2019년11월13일
 (65) 공개번호 10-2021-0058180
 (43) 공개일자 2021년05월24일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020170007694 A*
 Circulation, vol.136, pp.1939~1954(2017)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

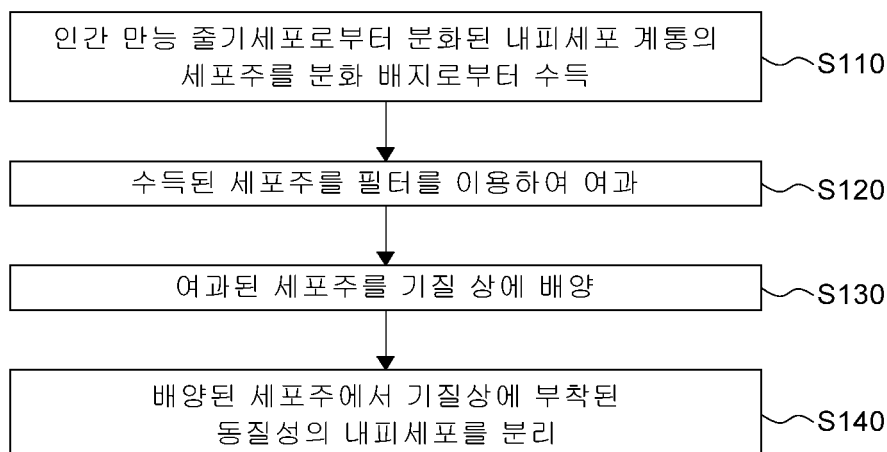
(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
 (72) 발명자
이신정
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1
윤영섭
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1
 (74) 대리인
특허법인인벤싱크

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **혈관 내피세포 순수 분리 방법****(57) 요약**

본 명세서에서는 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포 계통의 세포주에서 특정 시간 동안 기질 상에 부착된 동질성의 내피세포를 분리할 수 있는, 혈관 내피세포 순수 분리 방법 및 이를 통해 분리된 고순도의 혈관 내피세포를 제공한다.

대표도 - 도2

(52) CPC특허분류

A61P 9/00 (2018.01)
C12N 2500/38 (2013.01)
C12N 2501/10 (2013.01)
C12N 2509/00 (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 줄기세포로부터 분화된 내피세포 계통의 세포주를 분화 배지로부터 수득하는 단계;
수득된 상기 세포주를 필터를 이용하여 여과하는 단계;
여과된 상기 세포주를 기질 상에 배양하는 단계, 및
배양된 상기 세포주에서 기질 상에 부착된 동질성(homogenous)의 내피세포를 분리하는 단계를 포함하고,
상기 필터는,
공극 간격이 20 내지 40 μm 범위인, 혈관 내피세포 순수 분리 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,
상기 기질은,
콜라겐, 피브린, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 마트리젤, 젤라틴, 라미닌, 헤파린, 폴리리신 및 히알루론산 중 적어도 하나를 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,
상기 기질은,
콜라겐이고, 0.1 mg/ml의 상기 콜라겐을 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,
상기 배양하는 단계는,
세포 성장인자 및 아스코르빅산을 포함하는 DMEM/F-12 배지에서 배양하는, 혈관 내피세포 순수 분리 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
상기 세포 성장인자는,
FGF-1(fibroblast growth factor-1), FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, EGF(epidermal growth factor), KGF(keratinocyte growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), TGF- α (transforming growth factor- α), TGF- β TGF- β 엔지오포이에린 1(angipietin 1), 엔지오포이에린 2, 에리트로포이에린(erythropoietin), 뉴로필린, IGF-1, 오스테오폴린, 플레이오토로핀, 액티빈, 엔도텔린01 및 VEGF-A(vascular endothelial growth factor-A) 중 적어도 하나를 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 배양하는 단계는,

여과된 상기 세포주를 2개의 기질 상에 파종하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 배양하는 단계는,

4시간 내지 20시간 동안 배양되는, 혈관 내피세포 순수 분리 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 동질성의 내피세포는,

CDH5 및 VWF를 발현하는, 혈관 내피세포 순수 분리 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 CDH5의 유전자 발현 수준은,

분리되기 전 보다 12배 높은, 혈관 내피세포 순수 분리 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 VWF의 유전자 발현 수준은,

분리되기 전 보다 2배 높은, 혈관 내피세포 순수 분리 방법.

청구항 12

제 1 항 및 제 3항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 방법으로 분리되고,

세포의 양적 증가 및 유지를 위한 계대배양이 가능하고,

자성 세포 분류 및 유세포 분류와 같은 항원-항체 기반의 세포 분류가 사용되지 않고도,

전체 세포에 대하여 CDH5 및 VWF를 발현하는 동질성(homogenous)의 내피세포를 98 % 이상 포함하는, 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 혈관 내피세포 주.

청구항 13

제 12 항에 기재된 상기 혈관 내피세포 주를 포함하는, 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 세포 치료제 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 심혈관계 질환은,

허혈성 심장 질환, 심부전, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 심장관막증, 심실중격결손, 선천성 심장질환, 심근증, 심낭질환, 뇌졸중, 말초혈관질환, 동맥류, 동맥경화증, 고혈압, 협심증 및 심근경색증 중 적어도 하나인, 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 세포 치료제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈관 내피세포 순수 분리 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] 배아로부터 분리한 인간 배아 줄기 세포(hESC, human embryonic stem cell)와 체세포로부터 만들어진 인간 유도 만능 줄기 세포(hiPSC, human induced pluripotent stem cell)는, 혈관 형성에 있어 중요한 역할을 하는 내피 세포(endothelial cell)로 분화할 수 있어, 혈관 재생 치료에 이용될 수 있다. 이에 따라, 손상된 혈관을 재생하고, 나아가 혈관의 형성을 유도하는 새로운 전략으로, 인간 만능 줄기 세포로부터 분화된 내피 세포를 이용한 혈관 재생 치료법이 제시되었다.

[0006] 한편, 본 발명의 발명자들은 혈관 재생 치료의 효과에 있어서, 유도 만능 줄기 세포로부터 분화된 내피 세포의 순도 및 이의 생체 내 생존률의 중요성에 대하여 인지하였다.

[0007] 이에, 본 발명의 발명자들은, 인간 유도 만능 줄기 세포로부터 분화된 다양한 세포주(cell line)로부터 혈관 형성능의 내피 세포를 높은 순도로 분리할 수 있는 방법에 대하여 연구하였다.

[0008] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 분화된 내피세포의 특성에 따라 기질 부착성이 다르게 나타나는 것을 발견하였고, 기질 부착성으로 인해 나타나는 특정 부착 시간에 따라 세포를 분리할 경우, 동질성의 혈관 내피세포를 높은 순도로 분리할 수 있었다.

[0009] 이에 해결하고자 하는 과제는, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포 계통의 세포주에서 특정 시간 동안 기질 상에 부착된 동질성의 내피세포를 분리할 수 있는, 혈관 내피세포 순수 분리 방법 및 이를 통해 분리된 고순도의 혈관 내피세포를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포 계통의 세포주를 분화 배지로부터 수득하는 단계, 수득된 세포주를 필터를 이용하여 여과하는 단계, 여과된 세포주를 기질 상에 배양하는 단계 및 배양된 세포주에서 20시간 이하의 시간 동안 기질 상에 부착된 동질성(homogenous)의 내피세포만 분리하는 단계를 포함하는, 혈관 내피세포 순수 분리 방법이 제공된다.

[0012] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간 만능 줄기세포"는 미분화 상태를 유지하면서 무한대로 자가 증식할 수 있는 증식능력 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.

[0013] 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.

- [0014] 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.
- [0015] 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.
- [0016] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 필터(Filter) "는 세포 채집 장치로서, 유체 샘플로부터 일정 크기의 표적 세포를 분리하여 채집하기 위한 스크린을 의미할 수 있다. 예를 들어, 필터가 사용됨으로써, 세포의 순도를 낮출 수 있는 불순물이나 세포 집과(Clump)이 제거되고, 일정한 크기의 세포만이 선별되어 순도가 높아 질 수 있다. 이에, 본 발명의 특징에 따르면, 고순도의 혈관 내피세포를 선별하기 위한 필터의 공극 간격은 20 내지 40 μm 범위일 수 있다.
- [0017] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 기질(Matrix) "은 세포들이 붙어 있을 수 있는 성분으로서, 결합 조직의 기본 물질들을 의미할 수 있다. 보다 구체적으로, 살아있는 생물학적 세포들은 유기체의 기질에서 체외 배양될 수 있다. 이때, 체외 배양을 위해 의도된 기질은 표면의 관능화된 영역에 의하여 세포와의 상호작용 즉, 부착(Adhesion), 분화(Differentiation), 확산(proliferation), 및 이주(Migration) 등을 조절할 수 있다. 예를 들어, 세포는 각각의 종류에 따라 표면에 서로 다른 부착 단백질을 가지고 있다. 이러한, 부착 단백질은 세포의 종류마다 다르게 나타남에 따라, 선택적으로 기질의 관능화된 영역과의 부착 친화력을 가질 수 있다. 따라서, 세포의 분화 및 증식을 위한 배양이 진행되면서, 세포의 종류에 따라 나타나는 부착 단백질의 분비 차이에 의하여 기질과의 부착 친화력이 결정될 수 있으며, 이로 인하여 다른 시기에 기질에 대한 상호작용 즉, 부착이 나타날 수 있다. 이에, 혈관 내피세포는 배양 4 시간부터 최대 20시간까지 콜라겐 기질에 대한 부착이 이루어질 수 있다. 나아가, 20시간을 초과하여 배양이 진행될 경우, 혈관 내피세포가 아닌 다른 특성을 가진 세포가 부착되어 세포분리 시 순도가 낮아질 수 있다. 또한, 4시간 미만으로 배양이 진행될 경우, 혈관 내피세포가 부착되지 못하여 혈관 내피세포를 수득하지 못할 수 있다.
- [0018] 이에, 혈관 내피세포를 기질 상에 배양함으로써, 혈관 내피세포에서 나타나는 특이적 표면 부착성 즉, 기질과의 부착 친화력에 의하여 시간에 따른 선택적 배양이 이루어질 수 있다. 나아가, 본 발명의 다른 특징에 따르면, 기질은, 콜라겐, 피브린, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 매트릭셀, 젤라틴, 라미닌, 헤파린, 폴리리신 및 히알루론산 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 1 mg/ml 이하, 바람직하게는 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함할 수 있다. 그러나, 기질은 이에 제한되는 것은 아니며, 혈관 내피세포가 선택적으로 부착될 수 있는 물질이면 제한없이 사용될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 배양하는 단계에서는 세포 성장인자 및 아스코르빅산을 포함하는 DMEM/F-12 배지에서 여과된 내피세포 계통의 세포주가 배양될 수 있다. 이때, 성장인자(Growth factor)는 세포 분열, 세포 성장 및 분화를 촉진할 수 있는 물질을 의미하며, FGF-1(fibroblast growth factor-1), FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, EGF(epidermal growth factor), KGF(keratinocyte growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), TGF- α (transforming growth factor- α), TGF- β TGF- β 엔지오포이에린 1(angipointin 1), 엔지오포이에린 2, 에리트로포이에린(erythropoietin), 뉴로필린, IGF-1, 오스테오폴린, 플레이오토로핀, 액티빈, 엔도텔린01 및 VEGF-A(vascular endothelial growth factor-A) 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 나아가, 아스코르빅산(Ascorbic acid)는 산화방지제로 procollagen 합성에 관여하며, type 1 콜라겐 생산의 증가와 관련된 보조인자(Cofactor)를 의미할 수 있다. 아스코르빅산은 in vitro에서 내피세포, 지방세포, 조골세포 및 연골세포와 같은 다양한 중배엽 유래의 세포 증식을 자극 및 조절할 수 있다. 나아가, 세포의 배양 배지에 특정 농도의 아스코르빅산을 첨가할 경우, 세포 성장 촉진제로 작용하여 세포의 증식력이 증가되고, DNA의 합성이 촉진될 수 있다.
- [0021] 한편, DMEM/F-12는 기본 배지이다. 이때, 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 혼합물을 의미한다. 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, α -MEM(α -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.

[0022] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 전술한 배양하는 단계에서는 여과된 내피세포 계통의 세포주를 2개의 기질 상에 파종하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 2개 초과로 나누어 배양할 경우, 혈관 내피세포의 선별 수율이 감소하여, 계대 배양시에 혈관 내피세포의 증식 효율 및 특성 유지가 감소할 수 있다.

[0023] 한편, 본 명세서에서 사용되는 용어 " 동질성(Homogenous) "은 현미경 상에 관찰되는 형태학적 모양 및 마커의 발현 양상이 동일한 동종의 세포 유형을 의미할 수 있다. 이때, 마커(Marker)는 표적 세포와 주변의 다른 세포를 구별할 수 있도록 하는 모든 물질로서, 단백질, 당 지질, 핵산 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 혈관 내피세포에 대한 마커는 혈관 내피세포에서 특이적으로 발현되는 단백질일 수 있으며, CDH5, VWF, PECAM1, TEK 및 KDR을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 CDH5 및 VWF일 수 있다.

[0024] 이러한, 혈관 내피세포에 대한 마커는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여, 발현 수준이 증가될 수 있다. 보다 구체적으로, 혈관 내피세포에 대한 특이적인 마커인 CDH5의 유전자 발현 수준은 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여 분리되기 전 보다 12배 높을 수 있다. 또한, 혈관 내피세포에 대한 특이적인 마커인 VWF의 유전자 발현 수준은 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여 분리되기 전 보다 2배 높을 수 있다.

[0025] 나아가, 동질성의 내피세포의 증가는 고순도의 내피세포를 제공할 수 있음을 의미할 수 있다. 고순도의 내피세포를 이용하는 것은, 혈관 형성 또는 혈관 재생 효과와 연관될 수 있다. 예를 들어, 미분화된 줄기 세포 또는 중배엽 계통의 줄기 세포를 포함하는 낮은 순도의 내피 세포를 허혈 조직에 이식할 경우, 혈관 형성 또는 혈관 재생의 효과는, 높은 순도의 내피 세포를 이식했을 때 보다 낮을 수 있다. 이에 따라, 고순도의 내피 세포를 분리하는 것이 매우 중요할 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 전술한 방법으로 분리되어 CDH5 및 VWF를 발현하는 동질성의 내피세포를 98 % 이상 함유하는, 혈관 내피세포가 제공된다.

[0027] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명은 전술한 혈관 내피세포를 포함하는, 심혈관계 질환의 예방용 또는 치료용 세포 치료제 조성물이 제공된다.

[0028] 이때, 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, 심부전, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 심장관막증, 심실중격결손, 선천성 심장질환, 심근증, 심낭질환, 뇌졸중, 말초혈관질환, 동맥류, 동맥경화증, 혈압, 협심증 및 심근경색증 중 적어도 하나일 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.

[0029] 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 내피세포일 수 있다.

[0030] 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

- [0031] 본 발명은 세포의 특성에 따라 발현되는 기질 부착성에 기초하여, 고순도의 혈관 내피세포를 제공함으로써, 안정적으로 임상에 적용할 수 있는 효과가 있다.
- [0032] 보다 구체적으로, 본 발명은 혈관 내피세포에서 특이적으로 발현되는 부착 단백질 및 기질과의 상호작용 즉, 부착력을 이용하여, 특정 시간내에 분화되어 부착된 혈관 내피세포만을 분리할 수 있다. 나아가, 전술한 방법에 의하여 분리된 혈관 내피세포는 혈관 내피세포에서 특이적으로 발현하는 마커인 CDH5 및 VWF를 98 % 이상 발현함에 따라, 순도가 98 % 이상인 고순도의 혈관 내피세포를 제공할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 배양 용기 내에서 배양 과정을 통해 고순도의 혈관 내피세포를 분리하는 방법으로서, 자성 세포 분류 및 유세포 분류와 같은 종래의 방법보다 비교적 간단하고, 경제적이다.
- [0034] 또한, 혈관 내피세포의 대량생산을 위한 혈관 내피세포의 계대 배양에 있어서 고순도의 혈관 내피세포를 짧은 시간 내에 높은 수율로 제공할 수 있다.
- [0035] 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.
- [0036] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1은 순수 혈관 내피세포의 배양 방법의 절차를 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법의 절차를 도시한 것이다.
- 도 3a 내지 3d는 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포를 순수 혈관 내피세포로 분리하는 과정을 도시한 것이다.
- 도 4는 혈관 내피세포의 기질 부착성 메커니즘을 도시한 것이다.
- 도 5a 내지 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에서 필터 여부에 따른 마커 발현 및 현미경 이미지를 결과를 도시한 것이다.
- 도 6a 내지 6c는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리방법에 의하여 분리된 혈관 내피세포의 마커발현 결과를 도시한 것이다.
- 도 7는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 따른 계대 배양시 현미경 이미지를 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 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.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 분화(Differentiation) "는 세포가 특별한 기능을 갖는 특정한 세포나 조직의 복합체 또는 개체의 수준으로 발달하는 것을 의미한다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 증식(Proliferation) "은 세포 수의 증가를 의미하는 것으로 성장(growth)과 동일한 의미로 사용된다.
- [0041] 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.
- [0042] **혈관 내피세포 순수 분리 방법**
- [0043] 이하에서는 도 1 내지 3d를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 대해서 구체적으로 설명한다.

- [0044] 도 1은 순수 혈관 내피세포의 배양 방법의 절차를 도시한 것이다. 이하에서는, 설명의 편의를 위해서 도 2 내지 3d를 참조하여 설명한다.
- [0045] 도 1을 참조하면, 먼저, 만능 줄기세포가 유도 배지와 현탁하여 플레이트 상에 접종(Seeding)되고, 3일간 매일 유도 배지가 교체되며 중배엽 계통의 세포로 분화가 유도될 수 있다. 이때, 유도 배지는 성장인자 및 GSK3 β 저해제인 CHIR99021를 포함하는 DMEM/F-12 배지일 수 있다. 이때, 성장인자는 FGF-1(fibroblast growth factor-1), FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, EGF(epidermal growth factor), KGF(keratinocyte growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), TGF- α (transforming growth factor- α), TGF- β TGF- β 엔지오포이에린 1(angipoietin 1), 엔지오포이에린 2, 에리트르포이에린(erythropoietin), 뉴로필린, IGF-1, 오스테오폴린, 플레이오토로핀, 액티빈, 엔도텔린01 및 VEGF-A(vascular endothelial growth factor-A) 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 나아가, CHIR99021는 GSK(Glycogen synthase kinase)의 활성을 억제하는 물질이다. 보다 구체적으로, GSK가 억제됨에 따라 세포 증식에 관여하는 신호전달 체계의 β -catenin이 GSK에 의해 분해되지 않아 세포 증식에 관여하는 유전자 발현량이 증가되어, 세포의 생존 및 증식이 향상될 수 있다.
- [0046] 그 다음, 중배엽 계통의 세포는 분화 배지에서 11 내지 14일간 매일 분화 배지가 교체되며, 내피세포 계통의 세포주로 분화될 수 있다. 이때, 분화 배지는 성장인자 및 노치 신호 전달 리간드인 DLL4를 포함하는 DMEM/F-12 배지일 수 있다. 이때, DLL4(Delta-like ligand 4)는 신생혈관 형성 과정에서의 신호전달물질로서, 내피세포의 마커의 발현 수준의 증가와도 연관될 수 있다.
- [0047] 그 다음, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법을 이용하여 분화된 내피세포 계통의 세포주에서 동질성(Homogenous)의 내피세포가 분리될 수 있다. 보다 구체적으로, 도 2를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법의 절차가 도시된다. 혈관 내피세포 순수 분리 방법은 고순도의 혈관 내피세포를 선별하기 위한 방법으로, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포 계통의 세포주를 분화 배지로부터 수득하는 단계(S110), 수득된 세포주를 필터를 이용하여 여과하는 단계(S120), 여과된 세포주를 기질 상에 배양하는 단계(S130) 및 배양된 세포주를 기질 상에 부착된 동질성의 내피세포를 분리하는 단계(S140)를 포함할 수 있다.
- [0048] 먼저, 인간 만능 줄기세포로부터 분화된 내피세포 계통의 세포주를 분화 배지로부터 수득하는 단계(S110)에서는, 분화 배지로부터 분화된 내피세포 계통의 세포주를 수득하기 위하여 단백질 분해 효소 방법이 이용될 수 있다. 보다 구체적으로, 도 3a를 참조하면, 단백질 분해 효소 방법은, 단백질 분해 효소를 이용하여 세포 및 세포간 또는 세포 및 기질간을 분리하는 방법으로서, 분해 효소 물질로서 콜라제네이즈(Collagenase), 디스페이즈(Dispase), 프로테아제(Protease) 및 트립신(Trypsin) 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이에, 내피세포 계통의 세포주는 기질 및 세포간의 결합으로부터 각각의 하나의 세포로 분리될 수 있다. 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에서 전술한 단백질 분해 효소 방법을 이용하여 기질로부터 표적 세포를 분리할 수 있다.
- [0049] 그 다음, 수득된 세포주를 필터를 이용하여 여과하는 단계(S120)에서는, 일정 크기의 세포를 분리하기 위하여 공극 간격이 20 내지 40 μ m 범위의 필터가 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, 도 3b를 참조하면, 필터를 사용함으로써, 표적 세포와 형태학적 크기가 다른 세포, 불순물 및 세포 집괴(Clump)가 제거되고, 형태학적으로 동일한 크기의 세포만 분리될 수 있다. 이에, 보다 높은 동질성의 세포가 수득될 수 있다. 이때, 세포 집괴는 세포가 뭉쳐서져 생긴 덩어리를 의미하며, 세포 집괴가 형성된 경우, 세포 주기 억류(Cell cycle arrest)가 발생하고, 이에 따라 자체 분화가 유도되어 원하고자 하는 세포 즉, 혈관 내피세포로의 분화가 어려울 수 있다.
- [0050] 그 다음, 여과된 세포주를 기질 상에 배양하는 단계(S130)에서는, 세포주를 나누어 기질 상에 파종(Seeding)할 수 있다. 보다 구체적으로, 도 3c를 참조하면, 기질을 포함하는 하나의 플레이트로부터 수득된 내피세포 계통의 세포주를 필터를 이용하여 여과하고, 여과된 세포주를 2개의 기질 상에 나누어 파종하여 배양할 수 있다. 이때, 2개 초과로 나누어 배양할 경우, 혈관 내피세포의 선별 수율이 감소하여, 계대 배양시에 혈관 내피세포의 증식 효율 및 특성 유지가 감소할 수 있다.
- [0051] 또한, 여과된 세포주를 기질 상에 배양하는 단계(S130)에서는 4 시간 내지 20 시간 동안 배양될 수 있다. 보다 구체적으로, 도 4를 참조하면, 혈관 내피세포의 기질 부착성 메커니즘을 도시한 것이다. 세포는 인테그린(Integrin)과 같은 부착 단백질을 이용하여 세포와 기질 표면의 관능화된 영역과 상호작용할 수 있다. 이때, 부착 단백질은 세포가 분화되면서 발생하는 세포의 특성 및 종류에 따라 다른 발현 양상의 차이를 가질 수

있다. 이러한, 부착 단백질의 차이로 인하여 기질에 대한 부착 친화력이 결정될 수 있으며, 나아가, 세포의 특성 및 종류에 따른 부착 친화력으로 인하여 다른 시기에 기질에 대한 상호 작용 즉, 부착이 나타날 수 있다. 또한, 세포의 특성 및 종류는 마커를 통하여 구별될 수 있으며, 혈관 내피세포를 확인할 수 있는 마커로는 CDH5, VWF, PECAM1, TEK 및 KDR을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 CDH5 및 VWF일 수 있다.

[0052] 이에, CDH5 및 VWF 마커를 발현하는 혈관 내피세포는 4 시간 내지 20 시간 동안에 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함하는 기질에 대한 부착이 이루어질 수 있으며, 20시간을 초과하여 배양이 진행될 경우, CDH5 및 VWF 마커를 발현하는 혈관 내피세포가 아닌 마커의 발현 양상이 다른 종류의 세포가 부착될 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 대한 배양하는 단계의 시간은 4 시간 내지 20 시간 동안 배양될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 기질의 종류에 따라 배양 시간이 조절될 수 있다.

[0053] 나아가, 여과된 세포주를 기질 상에 배양하는 단계(S130)에서 사용되는 기질은 콜라겐, 피브린, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 매트릭셀, 젤라틴, 라미닌, 헤파린, 폴리리신 및 히알루론산 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 1 mg/ml 이하, 바람직하게는 0.1 mg/ml의 콜라겐을 포함할 수 있다. 그러나, 기질은 이에 제한되는 것은 아니며, 혈관 내피세포가 선택적으로 부착될 수 있는 물질이면 제한없이 사용될 수 있다.

[0054] 더 나아가, 여과된 세포주를 기질 상에 배양하는 단계(S130)에서는 세포 성장인자 및 아스코르빅산을 포함하는 DMEM/F-12 배지에서 여과된 내피세포 계통의 세포주가 배양될 수 있다. 이때, 성장인자(Growth factor)는 세포 분열, 세포 성장 및 분화를 촉진할 수 있는 물질을 의미하며, FGF-1(fibroblast growth factor-1), FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, EGF(epidermal growth factor), KGF(keratinocyte growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), TGF- α (transforming growth factor- α), TGF- β TGF- β 엔지오포이에린 1(angipointin 1), 엔지오포이에린 2, 에리트로포이에린(erythropoietin), 뉴로필린, IGF-1, 오스테오폴린, 플레이오토로핀, 액티빈, 엔도텔린01 및 VEGF-A(vascular endothelial growth factor-A) 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 더 나아가, 배양 환경 조건에서 온도는 36 °C 내지 38 °C 바람직하게는 36.5 °C 내지 37.5 °C이며, 공급 산소(O₂)는 1 % 내지 25 %이며, 공급 이산화탄소(CO₂)는 1 % 내지 15 %일 수 있다.

[0056] 그 다음, 배양된 세포주를 기질 상에 부착된 동질성의 내피세포를 분리하는 단계(S140)에서는, 혈관 내피세포에서 특이적으로 발현되는 마커에 대한 발현 양성세포를 98 % 이상 함유하는 고순도의 혈관 내피세포를 분리할 수 있다. 보다 구체적으로, 도 3d를 참조하면, 먼저, 4 시간 내지 20 시간 동안 부착되지 못한 세포들이 제거되어, 4 시간 내지 20 시간 동안 기질 상에 부착된 세포들만 분리될 수 있다. 이때, 4 시간 내지 20 시간 동안 기질 상에 부착된 세포들은 형태학적 모양 및 마커의 발현 양상이 동일한 동질성의 세포로서, 혈관 내피세포에서 특이적인 CDH5 및 VWF 마커를 발현하는 양성세포가 98 % 이상일 수 있다. 즉, 순도 98% 이상의 내피세포가 수득될 수 있다.

[0057] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여 혈관 내피세포에 대한 마커의 발현 수준이 증가될 수 있다. 보다 구체적으로, 혈관 내피세포에 대한 특이적인 마커인 CDH5의 유전자 발현 수준은 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여 분리되기 전 보다 12배 높을 수 있다. 또한, 혈관 내피세포에 대한 특이적인 마커인 VWF의 유전자 발현 수준은 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여 분리되기 전 보다 2배 높을 수 있다.

[0058] 다시, 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여 분리된 동질성의 내피세포는 세포의 양적 증가 및 세포의 유지를 위하여 계대 배양될 수 있다. 이때, 계대 배양에서 사용되는 배지는 순수 분리 단계에서 사용된 배지와 동일한, 세포 성장인자 및 아스코르빅산을 포함하는 DMEM/F-12 배지일 수 있다. 또한, 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 변이가 동반될 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.

[0059] 이상의 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여, 인간 만능 줄기세포로부터 동질성의 특성을 가진 고순도의 혈관 내피세포를 높은 수율로 생산할 수 있는 효과가 있다.

[0060] **본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에서의 필터 효과 확인**

[0061] 이하에서는, 도 5a 내지 5b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에서 필터에

따른 효과에 대하여 구체적으로 설명한다.

- [0062] 도 5a 내지 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에서 필터 여부에 따른 마커 발현 및 현미경 이미지를 결과를 도시한 것이다.
- [0063] 도 5a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에서 필터 여부에 따른 마커들에 대한 양성 혈관 내피세포의 발현 수준 결과가 도시된다. 이때, 필터에 여부 따른 혈관 내피세포들은 동형 대조군(Isotype control)과 함께 검사될 수 있다. 동형 대조군은 항원 특이성이 없는 동종의 면역글로불린과 검체를 반응시킨 대조군으로서, 동형 대조군에서 양성 비율이 2 % 미만인 되도록하여 혈관 내피세포의 양성에 대한 cut-off로 설정될 수 있다.
- [0064] 먼저, 도 5a의 (a)를 참조하면, 필터가 사용되지 않았을 경우, 혈관 내피세포의 CDH5 마커에 대한 양성 발현 수준은 72.8 %인 것으로 나타난다. 나아가, 필터가 사용되었을 경우, 혈관 내피세포의 CDH5 마커에 대한 양성 발현 수준은 99.7 %인 것으로 나타난다.
- [0065] 나아가, 도 5a의 (b)를 참조하면, 전술한 필터 유무에 따른 혈관 내피세포의 마커에 대한 양성 발현 수준을 그래프로 나타낸 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 필터의 사용으로 인하여, CDH5 마커를 발현하는 양성 세포가 72.8 %에서 99.7 %로 증가된 것으로 나타난다. 이는, 필터의 사용으로 인하여, CDH5 마커를 발현하는 양성 세포의 수가 증가될 수 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [0066] 더 나아가, 도 5b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에서 필터 여부에 따른 현미경 이미지 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 필터가 사용되지 않았을 경우, 관찰된 세포 군집(colony)들은 형태학적으로 균일하지 못한 세포들로 구성되어 있는 것으로 나타난다. 반면에, 필터가 사용되었을 경우, 세포 군집들은 형태학적으로 균일한 모양의 세포들로 구성되어 있는 것으로 나타난다. 이는, 필터의 사용으로 인하여, 동일한 형태학적 특성을 가진 세포들만 분리될 수 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [0067] 이상의 결과로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리방법에서 필터의 사용함에 따라, 혈관 내피세포에 대한 특이적인 마커인 CDH5를 발현하는 양성 세포수가 증가될 수 있으며, 형태학적으로도 동일한 모양의 세포를 분리할 수 있다. 이에, 필터의 사용으로 인하여, 보다 높은 고순도의 혈관 내피세포를 제공할 수 있는 효과가 있다.
- [0068] **본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여 분리된 혈관 내피세포의 순도 확인**
- [0069] 이하에서는, 도 6a 내지 6c 및 도 7을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여 분리된 혈관 내피세포의 순도 확인에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0070] 도 6a 내지 6c는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리방법에 의하여 분리된 혈관 내피세포의 마커발현 결과를 도시한 것이다.
- [0071] 먼저, 도 6a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에서 마커들에 대한 양성 혈관 내피세포의 발현 수준 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 혈관 내피세포의 CDH5 마커에 대한 양성 발현 수준은 본 발명의 순수 분리가 수행되지 않았을 경우에는 41.6 %인 것으로 나타나며, 순수 분리가 수행되었을 경우에는 99.7 %인 것으로 나타난다.
- [0072] 또한, 혈관 내피세포의 PECAM1 마커에 대한 양성 발현 수준은 본 발명의 순수 분리가 수행되지 않았을 경우에는 16.9 %인 것으로 나타나며, 순수 분리가 수행되었을 경우에는 42.6 %인 것으로 나타난다.
- [0073] 또한, 혈관 내피세포의 TEK 마커에 대한 양성 발현 수준은 본 발명의 순수 분리가 수행되지 않았을 경우에는 11.6 %인 것으로 나타나며, 순수 분리가 수행되었을 경우에는 28.8 %인 것으로 나타난다.
- [0074] 또한, 혈관 내피세포의 KDR 마커에 대한 양성 발현 수준은 본 발명의 순수 분리가 수행되지 않았을 경우에는 2.6 %인 것으로 나타나며, 순수 분리가 수행되었을 경우에는 16.0 %인 것으로 나타난다.
- [0075] 또한, 혈관 내피세포의 VWF 마커에 대한 양성 발현 수준은 본 발명의 순수 분리가 수행되지 않았을 경우에는 71.6 %인 것으로 나타나며, 순수 분리가 수행되었을 경우에는 98.4 %인 것으로 나타난다.
- [0076] 나아가, 도 6b를 참조하면, 전술한 혈관 내피세포 순수 분리 방법에서 마커들에 대한 양성 혈관 내피세포의 발현 수준을 그래프로 나타낸 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 혈관 내피세포의 특징적인 지표인 CDH5, PECAM1, TEK, KDR 및 VWF 마커 모두에서, 순수 분리에 의하여 마커 발현 양성 세포수가 증가된 것으로

나타난다. 특히, CDH5 및 VWF에 대한 마커 발현 양성 세포수가 98 % 이상인 것으로 나타남에 따라, 혈관 내피 세포의 순도가 98 % 이상인 것을 의미할 수 있다.

[0077] 더 나아가, 도 6c를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 따른 혈관 내피세포의 마커들에 대한 mRNA의 발현 수준이 나타난다. 이때, 마커들의 발현 수준은 GAPDH를 이용하여 표준화되었다. 보다 구체적으로, CDH5, PECAM1, TEK, VWF 및 NOS 마커들에 대한 혈관 내피세포의 mRNA 발현 수준은 순수 분리에 의하여 증가되는 것으로 나타난다. 나아가, 98 % 순도를 갖는 혈관 내피세포에서 특징적으로 발현되는 CDH5 마커에 대한 유전자 발현은 순수 분리에 의하여 순수 분리되지 전보다 12배 높은 것으로 나타난다.

[0078] 또한, 98 % 순도를 갖는 혈관 내피세포에서 특징적으로 발현되는 VWF 마커에 대한 유전자 발현은 순수 분리에 의하여 순수 분리되지 전보다 2배 높은 것으로 나타난다.

[0079] 반면에, KDR 마커에 대한 혈관 내피세포의 mRNA 발현 수준은 순수 분리 전에 높은 것으로 나타난다. 이는, KDR 마커의 경우, 혈관 내피세포의 분화 초기에 발현되고, 성숙한 혈관 내피세포로 분화되면 이들 성질을 서서히 잃게 된다. 반면에, VWF 마커의 경우, 분화 초기에 발현되지 않고, 성숙한 혈관 내피세포로 분화되는 과정에서 발현되는 물질이다. 이에, KDR에 대한 mRNA 발현 수준이 높은 순수 분리 전의 내피세포 군집의 경우, 미분화된 혈관 내피세포가 포함된 것으로 의미할 수 있다. 나아가, VWF에 대한 mRNA 발현 수준이 높은 순수 분리 후의 내피세포 군집의 경우, 완전 분화되어 성숙한 혈관 내피세포가 포함된 것으로 의미할 수 있다.

[0080] 예를 들어, 도 7을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 따른 계대 배양시 현미경 이미지가 도시된다. 순수 분리 방법이 수행되지 않은 혈관 내피세포의 계대 배양에서는 부착 세포 및 부유 세포가 섞여 있는 것으로 나타난다. 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에서의 혈관 내피세포는 인간 만능 줄기세포로부터 분화될 수 있다.

[0081] 이때, 인간 만능 줄기세포의 경우, 줄기 세포의 특성을 갖기 때문에 기질 부착성이 다른 세포에 비하여 현저히 떨어질 수 있으며, 이에 따라, 부유 배양될 수 있다. 그러나, 줄기세포가 혈관 내피세포로 분화가 이루어지면 서, 줄기세포에 대한 특성을 잃고, 혈관 내피세포에 대한 기질 부착성을 획득할 수 있다. 이에, 계대 배양시 부유 세포는 아직 기질 부착성이 떨어지는 줄기세포의 특성을 가지며, KDR 마커가 발현되는 분화 초기의 미분화된 세포임을 의미할 수 있다. 나아가, 부착 세포는 혈관 내피세포의 기질 부착성 특성이 나타난 성숙한 세포임을 의미할 수 있다.

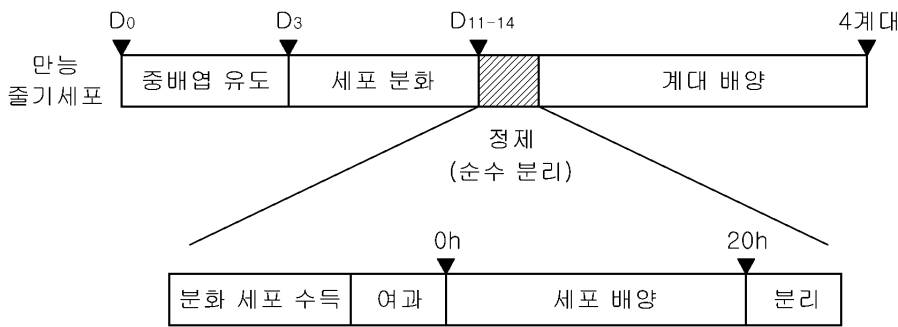
[0082] 더 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여 성숙한 혈관 내피 세포만 분리되어 계대 배양된 경우, 부착 세포만 존재하는 것으로 나타난다. 이는, 미분화 세포가 존재하지 않고, 성숙한 혈관 내피세포만 파종되어, 고순도의 혈관 내피세포로 증식되었음을 의미할 수 있다.

[0083] 이상의 결과로, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피세포 순수 분리 방법에 의하여 미분화된 세포 및 특성이 다른 세포를 분리함으로써, 계대 배양시 높은 순도의 혈관 내피세포를 제공할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이에, 혈관 내피세포의 특징적으로 발현되는 CDH5 및 VWF 마커 발현이 98 %이상, 즉 순도가 98 % 이상인 고순도의 혈관 내피세포를 제공할 수 있다.

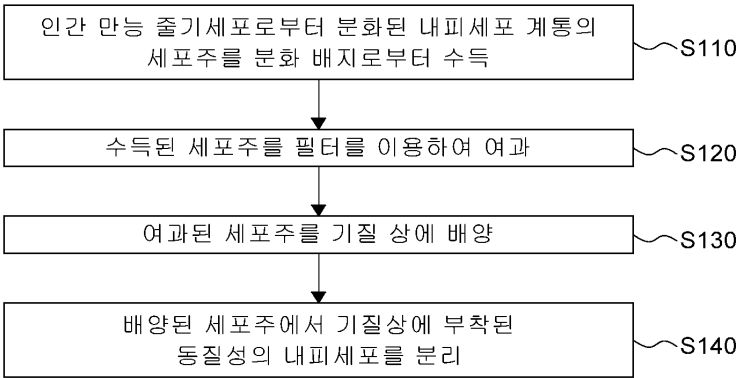
[0084] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시 예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시 예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

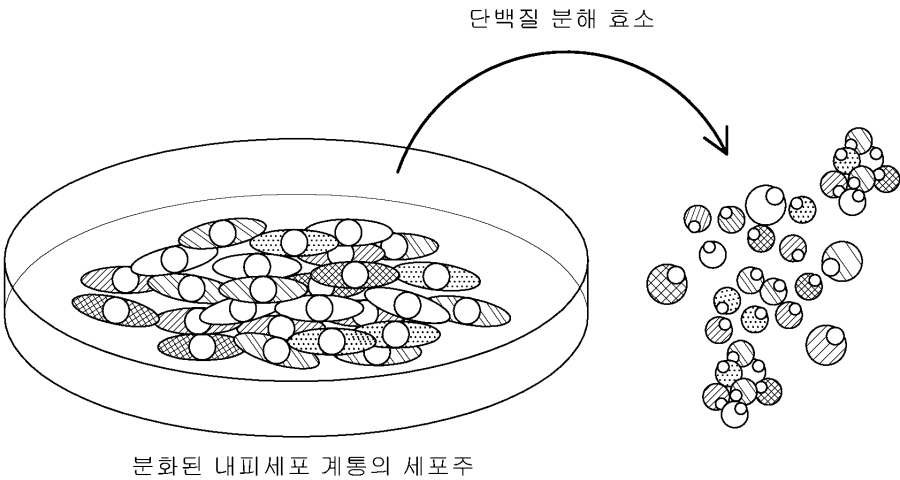
도면1



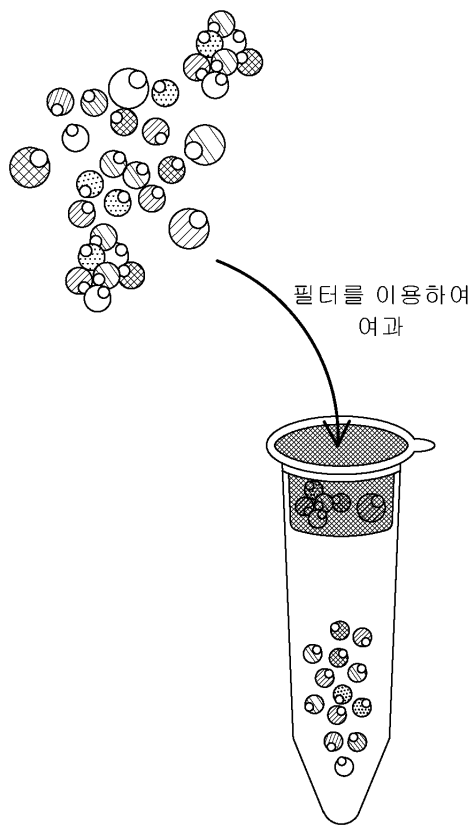
도면2



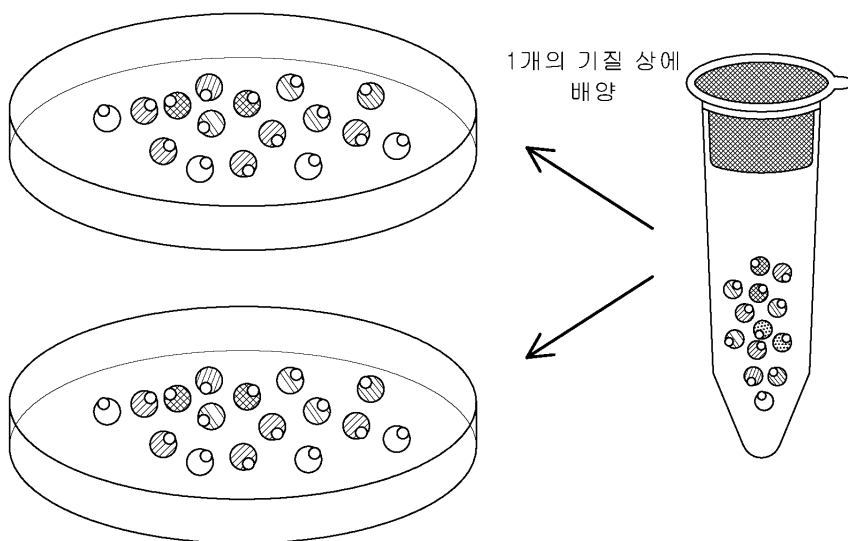
도면3a



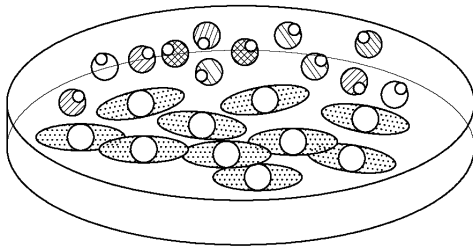
도면3b



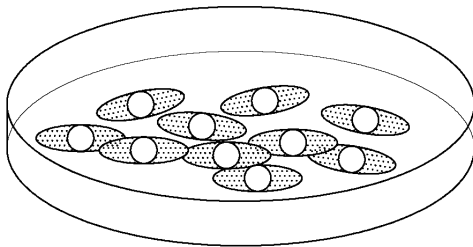
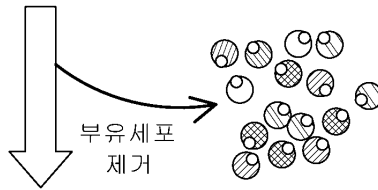
도면3c



도면3d

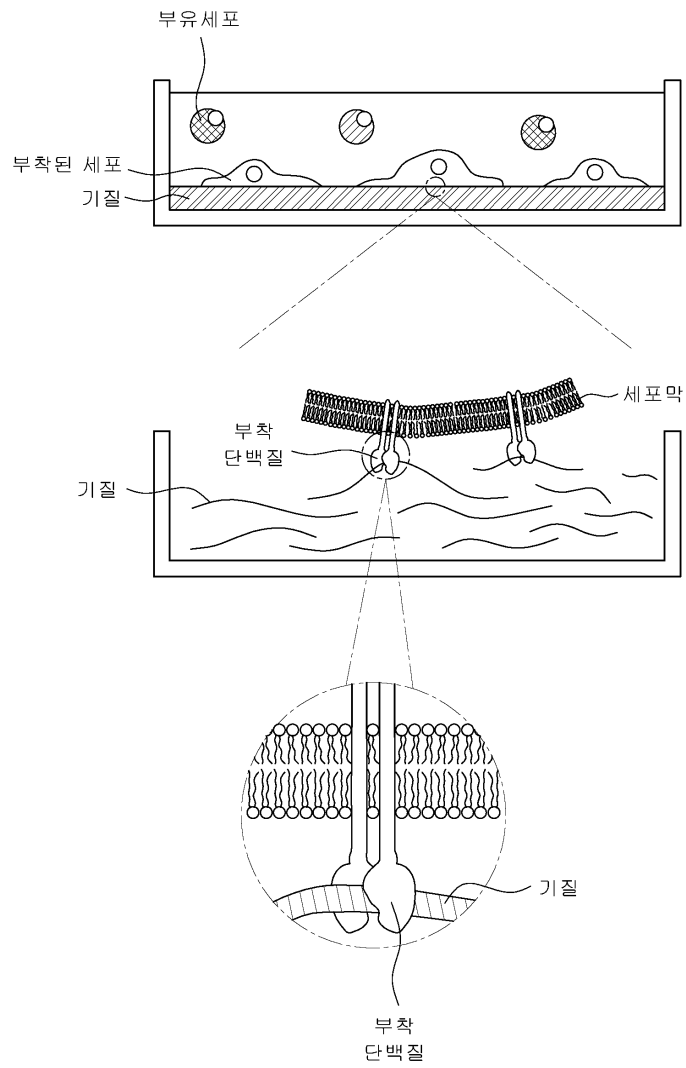


배양된 내피세포 계통의 세포주

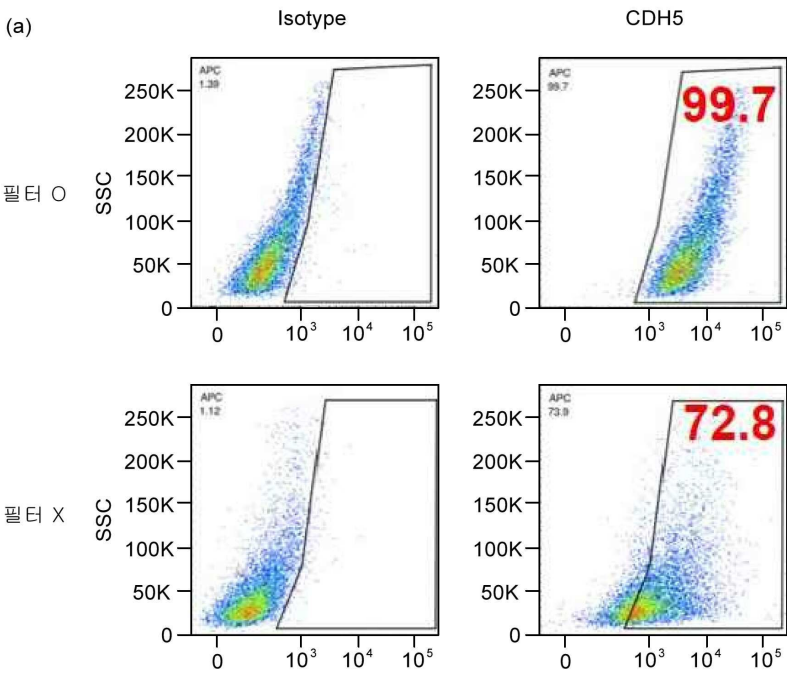


순수 혈관 내피세포 (동질성)

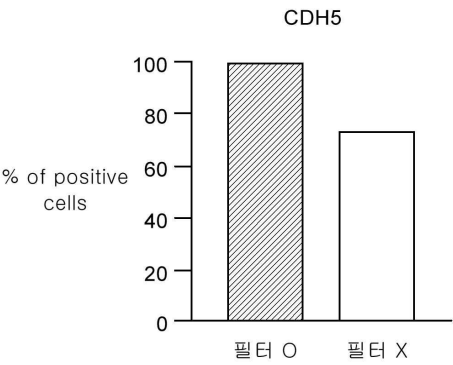
도면4



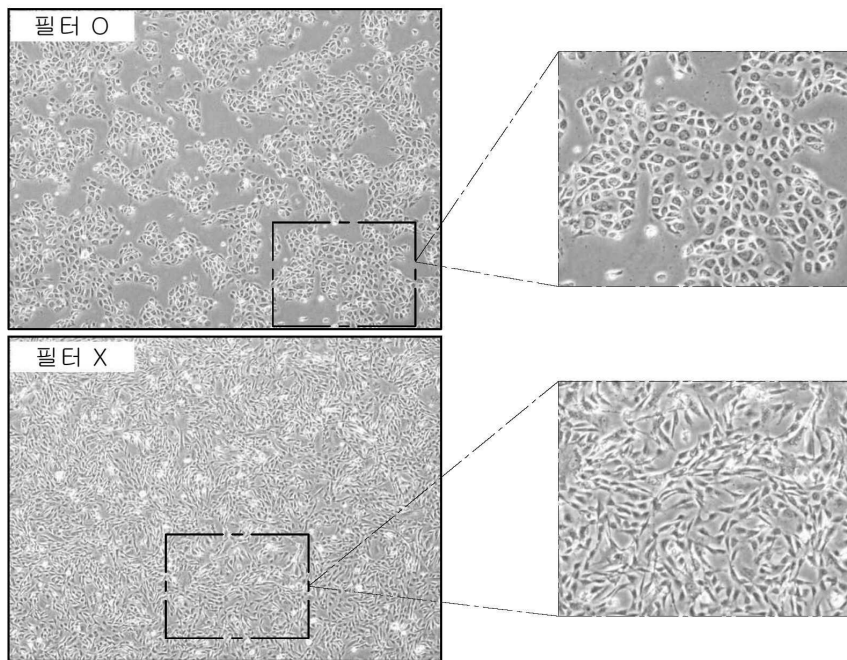
도면5a



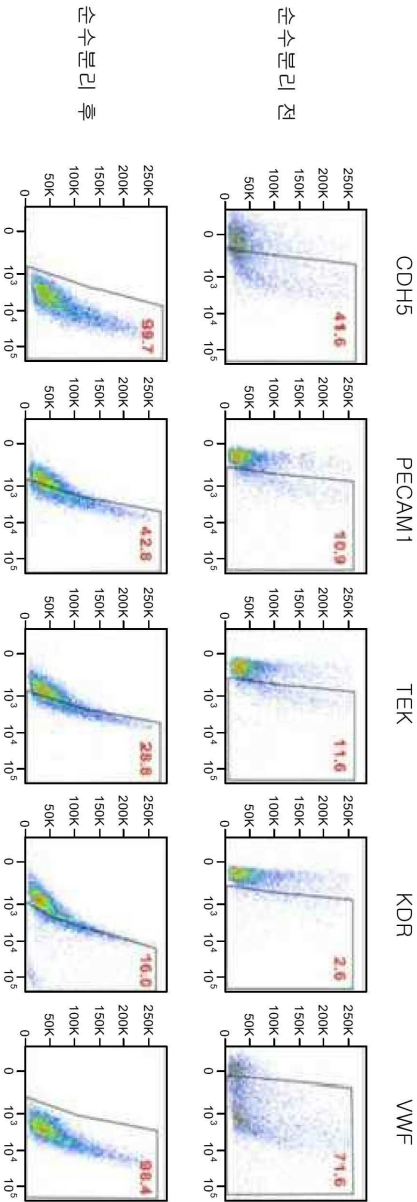
(b)



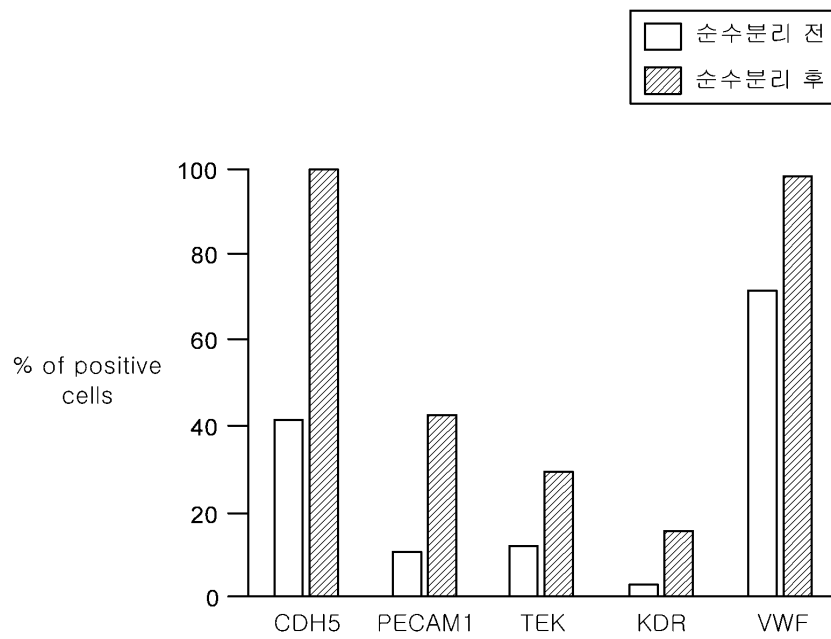
도면5b



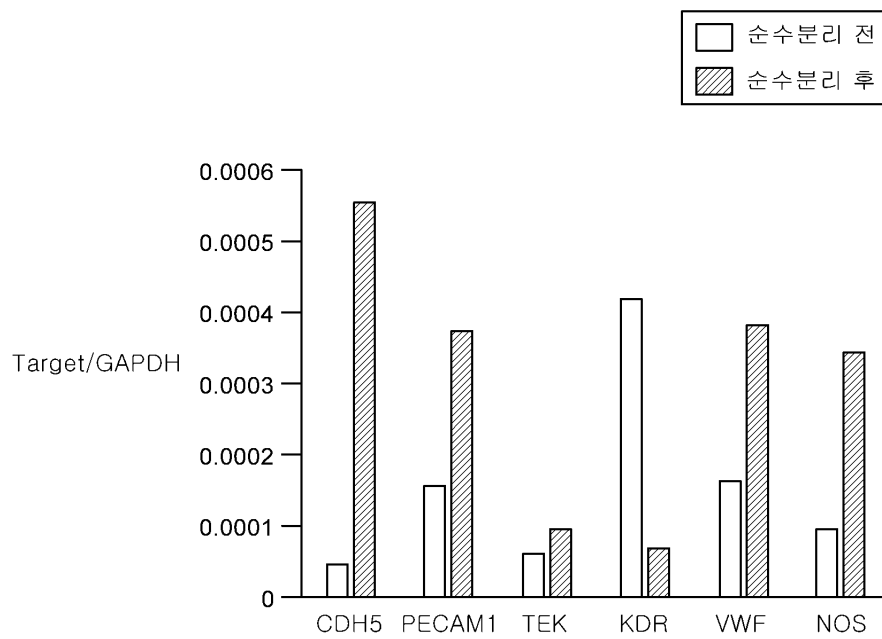
도면6a



도면6b



도면6c



도면7

