



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월20일
 (11) 등록번호 10-1850778
 (24) 등록일자 2018년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 31/12 (2006.01) *A61L 31/16* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61L 31/125 (2013.01)
A61L 31/10 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2016-0102956
 (22) 출원일자 2016년08월12일
 심사청구일자 2016년08월12일
 (65) 공개번호 10-2018-0018052
 (43) 공개일자 2018년02월21일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020110031075 A
 KR1020040105704 A
 KR1020060131882 A
 KR1020070008714 A

(73) 특허권자
 서울대학교산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
 (72) 발명자
 조계열
 서울특별시 강남구 삼성로51길 37, 106동 805호
 (대치동, 래미안 대치 팰리스(1단지))
 손연성
 경기도 고양시 덕양구 고양대로1395번길 4, 101동
 1002호 (성사동, 하림이벨리타운)
 (74) 대리인
 특허법인다래

전체 청구항 수 : 총 13 항

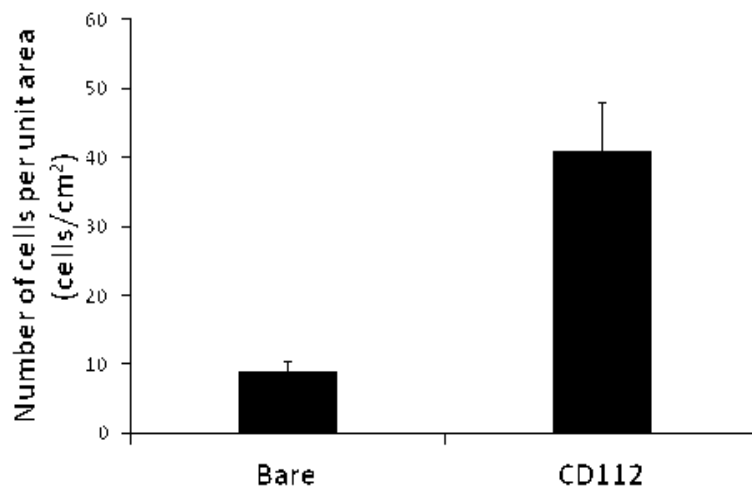
심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 후기내피진구세포의 포획 및 증식을 위한 Nectin-2 스텐트 코팅 조성물 및 이를 이용한 스텐트

(57) 요약

본 발명은 후기내피진구세포의 포획 및 증식을 유도하는 의료기구 코팅 조성물에 있어서, 상기 코팅 조성물은 Nectin-2와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물 및 이를 이용한 의료기구에 대한 것이며, 상기 코팅조성물을 통해 혈관의 재협착을 방지하고, 혈관의 재내피화를 촉진할 수 있다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61L 31/16 (2013.01)

A61L 2300/40 (2013.01)

A61L 2420/04 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 550-20150086

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 수의과대학

연구사업명 바이오 의료기술개발사업

연구과제명 관상동맥스텐트용 제대혈줄기세포 기반 내피전구세포 분화제어 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교

연구기간 2015.10.01 ~ 2016.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 의료기구 코팅 조성물에 있어서, 상기 코팅 조성물은 Nectin-2와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 모노클로날 항체는 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 의료기구는 스텐트인 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물.

청구항 5

의료기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅을 포함하는 의료기구에 있어서, 상기 코팅은 Nectin-2와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 코팅된 의료기구.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 코팅은 의료기구의 표면을 코팅하는 매트릭스층을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기구.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 매트릭스층은 상기 항체와 결합하는 것을 특징으로 하는 의료기구.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 의료기구.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 모노클로날 항체는 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 의료기구.

청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 매트릭스층은 폴리우레탄, 단편화된 폴리우레탄, 우레아, 폴리-L-락트산, 폴리-D,L-락티드, 셀룰로오스 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 콜라겐, 라미닌, 헤파린, 피브린, 엘라스틴, 셀룰로오스 및 탄소에 이루어진 그룹에서 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기구.

청구항 11

제 5항에 있어서, 상기 의료기구는 스텐트인 것을 특징으로 하는 의료기구.

청구항 12

- (a) 의료기구 표면에 합성 또는 자연 발생 물질을 포함하는 한층 이상의 매트릭스로 이루어진 매트릭스 코팅층을 형성하는 단계; 및
- (b) Nectin-2와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 상기 매트릭스 코팅층에 첨가하는 단계를 포함하는 의료기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅층이 형성된 의료기구의 제조방법.

청구항 13

- (a) 의료기구 표면에 아민기를 유도하는 단계;
- (b) Nectin-2 항체의 카르복시기를 활성화하는 단계 및
- (c) 아민기가 유도된 의료기구 표면에 카르복시기가 활성화된 Nectin-2 항체를 가하여, 의료기구 표면에 Nectin-2 항체를 결합시키는 단계를 포함하는 의료기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅층이 형성된 의료 기구의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 후기내피전구세포(outgrowth endothelial cell, OECs)의 포획 및 증식을 위한 스텐트 코팅 조성물 및 이를 이용한 스텐트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 관상동맥질환은 심장 근육에 혈액을 공급하는 관상동맥이 동맥경화와 혈전에 의해 좁아져 심장근육에 충분한 혈액공급이 이루어지지 못하는 경우를 말한다. 관상동맥질환의 종류에는 대표적으로 협심증과 심근경색이 있다. 이를 치료하기 위한 치료법은 약물치료, 관상동맥 풍선확장술 또는 관상동맥 스텐트 삽입술이 있습니다.

[0003] 그러나 스텐트 삽입의 부작용중 하나는 스텐트내에 신생내막과증식이 발생하여 혈관의 재협착이 여전히 발생한다는 것이다. 스텐트 삽입중에 필연적으로 발생하는 관상동맥 내피에 손상이 발생하고, 이때 신생내막 증식이 발생하게 되어 스텐트 재협착과 스텐트 혈전증이 발생하게 되는 것이다. 이를 방지하기 위해, 약물방출 스텐트가 개발되었으나, 약물방출 스텐트 표면에 입혀진 항증식 물질로 인하여 스텐트가 혈관내피세포로 잘 덮여지지 않는 문제가 발생하였다. 결국 스텐트 삽입후 스텐트 표면의 재내피화(re-endothelialization)를 촉진시킬 수 있는 방법이 혈관의 재협착을 막는 중요한 대안으로 연구되었다.

[0004] 한편 내피전구세포(Endothelial progenitor cell, EPC)는 내피손상 복구에 중요한 역할을 수행하는 것으로 발견되었으며, 말초혈액으로부터 CD34+ 세포를 분리하면서 발표하였다. 최초 발표 이후, 수많은 연구자들이 말초혈액, 골수, 태아의 간, 체대혈로부터 EPC를 분리하였다. 이전 연구에서 CD34, CD133, KDR/FLK-1/VEGFR2, VEG-cadherin/CD144, Tie-2 또는 이들의 조합과 같은 세포 표면 단백질이 사용되었다.

[0005] 이 중에서 CD34 항체를 코팅한 스텐트로 재내피화를 촉진시키는 기술이 개발되었으나, 골수조혈모세포의 표면에 공통적으로 발현되기 때문에 CD34 항체 코팅 스텐트는 혈중 EPC를 선택적으로 붙잡기 어려운 문제가 발생하였고, 결과적으로 재협착을 효과적으로 개선하기 위해서는 다른 방법이 요구되는 실정이었다.

[0006] 이러한 문제들을 개선하고자, 계속된 연구끝에 EPC의 하위개념으로서, 후기내피전구세포(outgrowth endothelial cells (OECs) , circulating or late EPCs, endothelial colony-forming cells (ECFCs))가 확인되었다. 후기내피전구세포는 증식 및 혈관생성 (angiogenesis) 촉진에 대한 상당한 잠재력을 보여준다. EPC의 또 다른 하위개념이며, 단핵세포의 배양중 초기에 발생하며, 이질성(heterogenous) 비-증식성을 보이는 초기내피전구세포(early EPC)와는 달리, 후기내피전구세포는 단핵세포의 최초배양으로부터 14일 경과후 발생하고, 동질성(homogenous)을 보인다. 게다가 후기내피전구세포는 초기내피전구세포보다 더 큰 이동잠재력 및 모세혈관 튜브-생성능을 갖는다. 이러한 이유 때문에, 후기내피전구세포는 심혈관재생분야에서 신혈관형성 치료법을 위한 새로운 패러다임을 이끌고 있다.

[0007] 그러나, 후기내피전구세포에 대한 수많은 연구에도 불구하고, 후기내피전구세포를 이용한 세포치료제는 많은 어려움을 겪고 있다. 후기내피전구세포의 명확한 마커가 존재하지 않기 때문이다. 많은 연구자들이 치료제 개발

성공은 타겟 세포의 분리 및 평가에 달려있다고 지적한다. 아직까지 소수의 단백질이 후기내피전구세포의 분리 및 평가를 위해 사용되고 있다. 예를 들면, Flk-1, VE-cadherin, PECAM-1 및 CD34가 후기내피전구세포의 마커로서 사용되고 있다. 그러나 이것중 어느 무엇도 후기내피전구세포의 마커로서 유용성을 입증하지 못하고 있다. 그러므로, 후기내피전구세포의 분리를 위해, 특이적인 후기내피전구세포 표면 마커를 확인하는 것이 중요하다. 본 발명자들은 질량분석기 기반의 프로테오믹스 분석을 통해 후기내피전구세포의 고유한 표면마커로서 Nectin-2를 확인하였다. 또한 본 발명자들은 스텐트등의 의료기구에 상기 Nectin-2 항체를 부착하여 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유발하고, 결과적으로 혈관의 재협착을 방지하고 재내피화를 촉진할 수 있을 것으로 보고있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 2006-0091028 A

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 의료기기 코팅 조성물에 있어서, 상기 코팅 조성물은 Nectin-2와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기기 코팅조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 의료 기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅을 포함하는 의료기구에 있어서, 상기 코팅은 Nectin-2와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 코팅된 의료기구를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 의료기구 표면에 합성 또는 자연 발생 물질을 포함하는 한층 이상의 매트릭스로 이루어진 매트릭스 코팅층을 형성하는 단계; 및 (b) Nectin-2와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 상기 매트릭스층에 첨가하는 단계를 포함하는 의료기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅층이 형성된 의료 기구의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 a) 의료기구 표면에 아민기를 유도하는 단계; (b) Nectin-2 항체의 카르복시기를 활성화하는 단계 및 (c) 아민기가 유도된 의료기구 표면에 카르복시기가 활성화된 항체를 가하여, 의료기구 표면에 Nectin-2 항체를 결합시키는 단계를 포함하는 의료기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅층이 형성된 의료 기구의 제조방법.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위해, 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 의료기구 코팅 조성물에 있어서,
- [0014] 상기 코팅 조성물은 Nectin-2와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 의료기구 코팅조성물을 제공한다.
- [0015] 상기 항체는 모노클로날 항체일 수 있다.
- [0016] 상기 모노클로날 항체는 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 포함할 수 있다.
- [0017] 상기 의료기구는 스텐트일 수 있다.
- [0018] 또한, 의료 기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅을 포함하는 의료기구에 있어서,
- [0019] 상기 코팅은 Nectin-2와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 코팅된 의료기구를 제공한다.
- [0020] 상기 코팅은 의료 기구의 표면을 코팅하는 매트릭스층을 더 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 매트릭스층은 상기 항체와 결합할 수 있다.
- [0022] 상기 항체는 모노클로날 항체일 수 있다.

- [0023] 상기 모노클로날 항체는 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 매트릭스층은 폴리우레탄, 단편화된 폴리우레탄, 우레아, 폴리-L-락트산, 폴리-D,L-락티드, 셀룰로오스 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 콜라겐, 라미닌, 헤파린, 피브린, 엘라스틴, 셀룰로오스 및 탄소로 이루어진 그룹에서 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 의료기구는 스텐트일 수 있다.
- [0026] 또한, (a) 의료 기구를 합성 또는 자연 발생 물질을 포함하여 이루어지는 한층 이상의 매트릭스로 매트릭스 코팅층을 형성하는 단계; 및 (b) Nectin-2와 반응하는 치료에 유효한 양의 일종 이상의 항체 또는 이의 단편을 상기 매트릭스층에 첨가하는 단계를 포함하는 의료 기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅층이 형성된 의료 기구의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 또한, (a) 의료기구 표면에 아민기를 유도하는 단계; (b) Nectin-2 항체의 카르복시기를 활성화하는 단계 및 (c) 아민기가 유도된 의료기구 표면에 카르복시기가 활성화된 항체를 가하여, 의료기구 표면에 항체를 결합시키는 단계를 포함하는 의료기구의 표면에 후기내피전구세포의 포획 및 증식을 유도하는 코팅층이 형성된 의료기구의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0028] 후기내피전구세포의 신규한 마커인 Nectin-2에 대한 항체를 의료기구 및 스텐트에 부착하여, 혈액내의 Nectin-2 양성 후기내피전구세포를 포획하고, 포획된 후기내피전구세포의 증식을 촉진하여, 혈관재협착을 방지하고 혈관의 재내피화를 촉진할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도1은 후기내피전구세포의 특징을 분석하기 위한 것으로, 도 1a는 단핵세포(MNCs), 후기내피전구세포 및 HUVEC 세포의 mRNA 발현에 대한 정량적 실시간 RT-PCR 분석 결과(±SD (**p<0.01))이며, 도 1b는 항-human CD31-FITC 및 항-human CD144-FITC 항체에 대한 후기내피전구세포에 대한 면역형광분석결과이다. 도1c는 CD105, VE-cadherin 및 CD146에 대한 후기내피전구세포의 FACS 분석결과이다.
- 도 2는 후기내피전구세포에서 강하게 발현되는 Nectin-2에 대한 것으로, 도2a는 후기내피전구세포 및 HUVEC 세포에서 발현되는 당단백질에 대한 질량분석결과이며, 도2b는 Nectin-2 mRNA 발현수준을 하우스 키핑 마커와 비교한 결과이며, 도2c는 항-인간 Nectin-2 항체를 이용한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 2d는 mAb가 컨쥬게이트된 항-Nectin-2-FITC를 이용한 면역염색결과이며(화살표는 후기내피전구세포 표면에서의 Nectin-2에 대한 신호를 나타낸다). 도 2e는 세포-표면 Nectin-2 및 내피세포 마커에 대한 FACS 분석결과이다. Nectin-2 (CD112)와 일반적인 내피세포 마커인 CD105, CD144, CD146 및 CD31와 내피전구체 마커인 CD34에 대한 FACS 분석한 결과이다.
- 도3은 항-Nectin-2 모노클로날 항체 및 Nectin-2 녹다운에(knock down) 의한 Nectin-2 억제를 통해 세포이동 및 튜브생성이 촉진되는지를 알아보기 위한 것으로, 도3a는 항-Nectin-2 mAb 처리에 의한 튜브형성 촉진결과이며, 항-Nectin-2 mAb로 처리한 후기내피전구세포와 20 ng/ml VEGF 조건에서 배양된 후기내피전구세포를 비교하였다. 도3b는 Nectin-2 녹다운에 의한 튜브형성 촉진결과를 관찰한 것이며, 후기내피전구세포를 shRNA 로 형질 전환후 0.5 µg/ml Puromycin selection을 3일간 수행하였다. 도3c는 항-Nectin-2 mAb로 처리한 후기내피전구세포의 세포이동능을 평가하기 위한 Boyden-chamber 어세이 결과이다. 도 3d는 Scramble shRNA 또는 Nectin-2 shRNA로 처리한 후기내피전구세포에 대한 Boyden-chamber 어세이 결과이며, scramble shRNA 대조군과 비교시, Nectin-2 shRNA 실험군에서 후기내피전구세포 및 HUVEC 세포주의 세포이동을 더욱 증가시켰다. 도 3e는 in vitro 후기내피전구세포 스크래치-상처 치료 어세이(scratch-wound healing assay)에 대한 결과이다.
- 도4는 Nectin-2 녹다운에 의한 후기내피전구세포의 증식 촉진여부에 대한 실험으로써, 도 4a는 Nectin-2 mRNA 발현수준에 대한 정량 RT-PCR 분석 결과이며, 도4b는 Nectin-2 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과이며, 도4c는 후기내피전구세포에서의 Nectin-2 녹다운에 대한 FACS 분석결과이다. Nectin-2 녹다운에 의해 VE-cadherin 및 VEGFR2 세포표면 발현이 감소되었으며, BrdU 및 MTT 어세이를 통해 세포증식여부를 평가하였다. 도4d는 후기내피전구세포 및 HUVEC 세포에서의 scramble shRNA 및 Nectin-2 shRNA에 대한 BrdU 세포증식 분석결과이다. 도 4e는 MTT 어세이 결과이며, 도 4f는 항-CD112 Ab를 이용하여 녹다운 효율을 보기 위한 웨스턴 블롯 결과이다.
- 도5는 Nectin 패밀리 단백질 및 유전자에 의한 Nectin-2 기능 보완정도를 살펴보기 위한 것으로, 도5a는 단핵세포, 후기내피전구세포 및 HUVEC 세포에서의 Nectin-1, 2 및 3, 연관 유전자인 Nec1-1 및 Nec1-4에 대한 실시간

RT-PCR 측정결과이며, 도5b는 Nectin-2 녹다운 후기내피전구세포에서의 Nectin 패밀리와 관련유전자 발현정도를 측정한 결과이며, 도5c 및 도5d는 후기내피전구세포(도5c) 또는 HUVEC 세포(도5d)에서 CdCl₂ 처리후 Nectin-2 mRNA 발현수준을 측정한 결과이며, 도5e에서는 후기내피전구세포를 24시간 배양한 후, 튜브-생성 후기내피전구세포를 수확하여 Nectin 및 Nectin 유사 분자의 발현을 측정한 결과이다(**p < 0.01).

도6는 후기내피전구세포에 대한 flow cytometric 분석결과이다(PE는 phycoerythrin, ; FITC는 fluorescein isothiocyanate를 의미함).

도7은 단핵세포에서의 CD14 (hematopoietic surface marker) 및 Nectin-2 (CD112)의 발현에 대한 Flow cytometry 분석결과이다.

도8은 후기내피전구세포의 연속 계대 배양에 대한 Nectin-2 발현 패턴에 대한 것으로, 연속 계대배양을 하는 동안 후기내피전구세포에서의 마커발현을 정량 PCT 분석한 결과이다.

도9는 HUVEC세포에서 Nectin-2 녹다운에 의한 Nectin-2 활성의 다운조절에 대한 것으로, 도9a는 정량 RT-PCR에 의한, Nectin-2 mRNA 발현수준 측정결과이며, 도9b는 HUVEC 세포에서의 Nectin-2 녹다운에 의한 정량 FACS 분석 결과이며, 도9c는 MTT 어세이 결과이다.

도10은 HUVEC 세포 shRNA에 의한 Nectin-2 녹다운이후 Nectin-연관 유전자의 발현 결과에 대한 것이다.

도11은 CdCl₂ 처리된 HUVEC 세포 및 후기내피전구세포에서의 투여량 비례 Nectin-2의 다운조절에 대한 것으로, 후기내피전구세포(도11a) 및 HUVEC 세포(도11b)에서의 Nectin 및 Nectin 유사 분자의 mRNA 발현 수준 결과에 대한 것이며, 도11c는 CdCl₂ 처리된 HUVEC 세포 및 후기내피전구세포에서 추출된 단백질에 대한 웨스턴 블롯의 결과이다.

도12는 항-Nectin-2 항체가 고정된 시편에 의한 EPC 포획정도를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 'Nectin-2', poliovirus 수용체-연관 2 단백질(poliovirus receptor-related 2 protein)은 타입I 막관통 당단백질 및 Ig gene superfamily의 일원이다. Nectin-2는 또한 CD112로 알려져 있으며, 세포접합체 형성 및 다른 Nectin-family 분자와의 상호작용에 관여하는 결합분자이다. Nectin-2는 다양한 nectin-like(Necl)분자, 예를 들면 Nectin-1, Nectin-3, PVR (Necl-5), and DNAM-1 (CD226)과 교차-상호작용하는 것으로 알려져있다. Nectin-2는 또한 다른 스캐폴드 단백질과 상호작용하며 간접적으로 E-cadherin 시스템과 연결되어 있다. Nectin들은 다중 세포기능 예를 들면 세포이동, 증식, 극성화, 생존, 분화 및 세포 결합을 조절한다. 그러나 Nectin-2에 대한 많은 연구에도 불구하고, 후기내피전구세포에서의 발현 및 역할에 대해서는 연구된 바 없다. 본 발명에서는 후기내피전구세포의 Nectin-2의 생물학적 역할을 발견하였으며, Nectin-2(서열 번호1 참조)이 후기내피전구세포의 고유한 세포 표면 마커로서 후기내피전구세포의 이동, 증식, 혈관생성을 조절할 수 있음을 발견하였다.

[0031] '의료기구'는 의학적 상태의 예방 또는 치료를 위하여 포유류에 일시적 또는 영구적으로 도입되는 기구를 의미한다. 이러한 기구에는, 피하, 경피 또는 수술로 도입되어 장기, 조직 또는 관강에 남겨지는 모든 것이 포함된다. 의료기구에는, 스텐트, 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE) 또는 팽창된 폴리테트라플루오로에틸렌(ePTFE)으로 도포된 스텐트와 같은 도포 스텐트, 합성 이식편, 인공 심장 밸브, 인공 심장 및 인공삽입 장기를 혈관 순환에 연결하는 고정장치, 정맥 밸브, 복강 대동맥 동맥류(abdominal aortic aneurysm)(AAA) 이식편, 하방 정맥 대정맥 필터(inferior venal caval filters), 영구 약물 주입 카테터, 색전 코일, 혈관 전색에 사용되는 색전 물질 및 혈관 봉합선이 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물 및 방법으로 의료 기구를 코팅하면, 의료 기구 표면에 내피 세포층의 생성이 자극되어, 재발협착증 및 의료 기구 이식에 따른 다른 혈전색전증 합병증을 막을 수 있다.

[0033] '스텐트'라는 용어는, 혈관 관강 내에 삽입되는 경우에 혈관의 단면 관강을 팽창시키는 모든 의료 기구를 의미한다.

[0034] Nectin-2 항체를 포함하는 의료기구 코팅조성물은 의료기구의 표면에 항체를 코팅하기 위한 조성물로서, 매트릭스층을 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 의료 기구를 코팅하는 '매트릭스'는 폴리우레탄, 단편화된 폴리우레탄,우레아, 폴리-L-락트산,

폴리-D,L-락티드, 셀룰로오스 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 콜라겐, 라미닌, 헤파린, 피브린, 엘라스틴, 셀룰로오스 및 탄소등 합성 또는 자연물질로 구성될 수 있다. 매트릭스는 합성 또는 자연 발생 물질로 구성되는 제 1층과 항체로 구성되는 제 2층을 갖는 수개의 층을 포함하여 이루어질 수 있다. 이 층들은, 제 1층이 스텐트 또는 합성 이식편 표면과 직접 접촉하고, 제 2층의 한쪽 표면이 제 1층과 접촉하며, 반대쪽 표면이 혈관 관강과 접촉하면서, 순차적으로 정렬될 수 있다. 매트릭스는 의료 기구에 비공유 또는 공유결합으로 부착시킬 수 있다. 항체는 이중- 또는 동중 이작용성 가교결합제를 사용하여 매트릭스에 공유 결합으로 부착될 수 있다.

- [0036] Nectin-2 항체를 포함하는 의료기구 코팅조성물은 의료기구의 표면에 Nectin-2 항체를 코팅하기 위한 것으로, 의료기구의 표면에 아민기를 포함하는 여러 작용기중 어느 하나를 유도하고, Nectin-2 항체의 카르복시기를 활성화하고, 의료기구의 작용기에 Nectin-2 항체를 연결시켜 의료기구의 표면을 항체로 코팅할 수 있다.
- [0037] 의료기구 표면에 아민기를 유도하기 위한 방법으로, 플라즈마 코팅방법을 사용할 수 있으며, APTES(3-aminopropyltriethoxysilane 10mM in anhydrous toluene)를 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0038] '항체'는 하나의 항원 또는 이 항원의 기능적 등가물에 결합하는 일종의 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 의미한다. 항체라는 용어는, Fab, F(ab')₂ 또는 Fc 단편과 같은 항체 단편을 포함한다. 항체는, 항체 몰당 6.022x10²³ 분자에 상당하는 다수의 개별 항체 분자를 포함한다.
- [0039] 본 발명의 'Nectin-2 항체'는 Nectin-2에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 항체의 절편을 포함한다. Nectin-2의 항체는 Nectin-2과의 결합을 통해 Nectin-2을 포획할 수 있고, Nectin-2의 기능을 블로킹할 수 있다.
- [0040] Nectin-2 항체가 코팅된 의료기구는 후기내피전구세포를 선택적으로 포획할 수 있다. 기존의 CD34항체 코팅 스텐트는 혈관중에 존재하는 후기내피전구세포를 선택적으로 포획하기 어렵다. 후기내피전구세포의 표면 마커인 Nectin-2 항체를 스텐트에 코팅함으로써 내피세포로 분화되기 바로 전단계인 후기내피전구세포를 포획하여 스텐트 내면의 재내피화를 촉진하고, 혈관의 재협착을 효과적으로 막을 수 있다.
- [0041] 의료기구에 코팅된 Nectin-2 항체는 후기내피전구세포를 선택적으로 포획함과 동시에 후기내피전구세포의 Nectin-2의 기능을 억제할 수 있다. 후기내피전구세포에서 Nectin-2의 기능이 억제되는 경우, 후기내피전구세포의 이동을 촉진하고, 후기내피전구세포에 의한 튜브형성을 촉진할 수 있다.
- [0042] 본 명세서의 '치료에 유효한 항체의 양'은, 의료 기구에 대한 후기내피전구세포의 부착을 촉진하는 항체의 양을 의미한다. 본 발명의 실시예에 필요한 항체의 양은, 사용되는 항체의 성질에 따라, 예를 들어, 사용되는 항체의 양은, 항체 및 이와 반응하는 항원 간의 결합 상수에 따라 결정될 것이다. 특정 항원에 사용하기 위한, 치료에 유효한 항체의 양을 결정하는 방법은, 당업자에게 주지되어 있다.
- [0044] 본 발명자들은 후기내피전구세포의 표면마커를 확인하고 Nectin-2가 후기내피전구세포에서 상당히 발현되는 표면마커인지를 확인하기 위해 후기내피전구세포 및 HUVEC세포에 당단백질 농축 및 프로테오믹스를 도입하였다. 그리하여 정량 RT-PCR, 면역세포화학분석 및 flow cytometry를 통해 Nectin-2 발현을 다시 확인하였다. 실험 결과 Nectin-2는 일반적인 내피세포 표면 마커와 공동으로 발현되는 것으로 확인되었다(도2e). Nectin-2-positive 후기내피전구세포의 95.2%, 99.7%, 93.1%,99.9%가 내피세포 마커인 CD31, CD105, CD144 및 CD146 각각에 대해서 양성이었다. 따라서 Nectin-2 는 내피세포적 특징을 갖는 후기내피전구세포의 세포-표면 마커라고 볼 수 있다. 게다가 본 발명자들은 Nectin-2의 발현이 다른 세포 계통으로 분화할 수 있는 초기단계세포인 단핵세포에서 극히 제한됨을 발견하였고, 더욱 중요하게는, 내피세포 분화의 마지막 단계이며 증식할 수 없는 튜브생성 내피세포에서는 Nectin-2 발현이 극히 억제되었음을 발견하였다. 이는 Nectin-2이 후기내피전구세포 및 HUVEC세포의 증식을 억제함을 의미한다고 볼 수 있다. 결국 Nectin-2는 후기내피전구세포의 분리 및 농축을 위한 신규한 표면 마커로서 활용될 수 있다.
- [0045] Nectin-2는 세포-세포간 상호작용 및 이동성 조절에 관여한다. Nectin-2는 후기내피전구세포의 이동을 억제하며, 항-nectin-2 mAb로 Nectin-2 을 억제시 후기내피전구세포의 이동을 촉진한다. ShRNA 로 Nectin-2을 녹다운하는 경우에도 유사하게 후기내피전구세포의 이동을 촉진한다. 또한 Nectin-2는 후기내피전구세포에 의한 튜브형성을 억제한다. 이는 결국 튜브가 형성되는 동안 내피세포에서는 Nectin-2의 수준이 낮고, 항체 블로킹과 Nectin-2 녹다운은 튜브형성을 촉진함을 의미한다. 종합하면, 후기내피전구세포의 Nectin-2는 세포 이동 및 튜브-형성 내피세포로의 마지막 분화를 억제한다고 볼 수 있다.
- [0046] 후기내피전구세포는 혈액내에서 순환하며, 혈관생성에 참여한다. 후기내피전구세포의 증식성과 혈관생성능을 고려해 볼 때, 본 발명자들이 Nectin-2은 후기내피전구세포의 기능을 억제한다고 보기 때문에 Nectin-2가 후기내

피전구세포에서 상당히 발현된다는 것은 모순적으로 보일 수 있다. 그러나 실험결과에 의하면, Nectin-2 발현은 튜브형성에 관하는 후기내피전구세포에서 감소된다. 이는 결국 Nectin-2는 말초혈액을 떠도는 휴지상태 (quiescent)의 후기내피전구세포에서 작동하며, 혈관생성에 왕성하게 참여하는 후기내피전구세포에서는 그렇지 않음을 의미한다.

[0048] 실시예1. 후기내피전구세포의 특성분석

[0049] 분리된 후기내피전구세포를 특징짓기 위해서, 본 발명자들은 단핵세포 및 후기내피전구세포에 대한 실시간 정량 RT-PCR, 면역세포화학실험, 유동세포계수법(flow cytometry) 분석을 실시하였다. 정량 RT-PCR을 위한 프라이머는 다음과 같다.

Gene Name	Primer type	Primer sequence 5' -> 3'	Product Size (bp)
Nectin-1	Forward	CAACTACCACATGGACCGCT	250
	Reverse	TGCCAGGCTGTAGTTGATGG	
Nectin-2	Forward	CGGAAGTGTCACTGTCACCA	150
	Reverse	GACACTTCAGGAGGGTAGCG	
Nectin-3	Forward	CACTGGAAAACCCGTTGCAC	186
	Reverse	CGGATGTCCTTTTCCAAGGC	
Nect-1	Forward	ACAAGGCTTAACCCGGGAAG	218
	Reverse	AATCCGAGTGAGCTTCCCC	
Nect-4	Forward	GCCGTCTGCACCAGTATGAT	209
	Reverse	GTGGTGGGTGTCTTCTGTGT	
Tie 2	Forward	GGCCAAGTTCTTAAGCGCGCG	213
	Reverse	GGGCGGCTACTCAATGGCCA	
CD105	Forward	TCACCACAGCGGAAAAGGT	162
	Reverse	CAGGAACTCGGAGACGGATG	
C-Kit (CD117)	Forward	TTATTCCTGACCCEAAGGCG	161
	Reverse	AGACACAACAGGCACAGCTT	
CD146 (MCAM)	Forward	TGGGCGCTATGAATGTCAAG	176
	Reverse	CGAGGTCTGGCTACTCTCT	
VE-Cadherin (CD144)	Forward	ATCACAGATGGGACGAGCC	169
	Reverse	AGAACTGGCCCTTGTCACTG	
VEGFR2 (KDR)	Forward	GGAGGACTTCCAGGGAGGAA	151
	Reverse	TCTCCGACTTTGTTGACCG	
WVF	Forward	ATGGTCCGGCATGAGAACAG	150
	Reverse	ACACACATGGTCTGTGCAGTT	
CD14	Forward	TCCCTCAATCTGTCGTTTCGC	152
	Reverse	GGATTCCTCCAGTGTGTCAG	
CD45	Forward	AAACGGAGATGCAGGGTCAA	218
	Reverse	CCTCTTCCATTGACGGCCAG	
GAPDH	Forward	ATCCCATCACCATCTTCCAG	170
	Reverse	CCATCAGCCACAGTTTCC	

[0050]

[0051] 후기내피전구세포에서의 내피세포 마커 및 줄기세포 마커들의 발현이 분석되었으며, 단핵세포와 HUVEC세포의 발현 프로파일을 비교하였다. 본 발명의 데이터는 조혈세포마커 CD45 및 단핵구/대식세포 마커 CD14는 후기내피전구세포에서는 완전히 음성이었다. 그러나 내피세포 마커, 예를 들면 CD105, CD144 (VE-cadherin) 및 CD146은 단핵세포와 비교시 더 많이 발현되었다. CD117 (c-Kit), 조혈마커, CD144 및 CD146 은 HUVEC세포보다 후기내피전구세포에서 더 많이 발현되었다(도1a).

[0052] 정량 RT-PCR외에도, 면역세포화학분석을 실시하였다. 후기내피전구세포에서 내피마커 CD31(PECAM) 및 CD144(VE-cadherin)의 발현은 탐지되었으나, isotype IgG1는 탐지되지 않았다(도1b). 게다가 double-labeling flow cytometry 분석이 단일세포수준에서 실시되었으며, 후기내피전구세포에서의 D105-PE/CD31-FITC, CD105-PE/CD144-FITC 및 CD105-PE/CD146-FITC가 분석되었다. CD105-PE/CD146-FITC 를 위한 Double-labeling은 Double positive인 후기내피전구세포와 99%이상으로 동질성 개체군임이 밝혀졌다. CD105-PE/CD31-FITC 분석에서, 핵심 개체군은 CD31-positive (94%)이나, 대략 5%의 세포는 CD105-positive이었다. 게다가, CD105-PE/CD144-FITC 분석은 후기내피전구세포의 주요 개체군이 CD144-positive이지만, 10%는 CD105-positive임을 보였다(도1c). 추가적으로, 상이한 제대혈 출처로부터 얻어진 후기내피전구세포의 세포-표면 마커 발현이 flow cytometry에 의해 분석되었다. 내피 표면 마커의 기증자에 따라 상이하였다(도6a-c).

[0054] 실시예2. 후기내피전구세포에서 고발현되는 Nectin-2

[0055] 후기내피전구세포의 세포-표면 마커를 확인하기 위해, 본 발명자들은 프로테오믹스-기반 분석을 실시하여 후기 내피전구세포 및 HUVEC세포의 표면에 다르게 발현되는 단백질을 확인하였다. 본 발명자들은 프로테오믹스 분석을 위해 세포파쇄물과 세포막 분획을 준비하였다. 당단백질이 가장 풍부하게 발현되는 세포-표면 마커이기 때문에, 본 발명자들은 lectin 기반의 glyco-포획을 통해 세포 파쇄물 및 세포막 분획물의 당단백질을 농축시켰다. 전체 세포 파쇄물 분석에서, 57 당단백질이 확인되었다(40 for OECs; 45 for HUVECs). 세포질 세포막 분획에서는, 전체 118개의 당단백질이 확인되었다(112 for OECs; 36 for HUVECs) (도2a). 본 발명자들은 양쪽 방법에서 HUVEC 세포가 아닌 후기내피전구세포에서 선택적으로 높은 수준으로 발현되는 단백질을 집계하였고, 양쪽 방법에서 공

동 단백질을 모집하였다. 후기내피전구세포-선택적 세포-표면 세포막 당단백질로서 3개의 단백질(Cadherin-5 (CD144, VE-Cadherin), Nectin-2 (CD112) 및 MRC-2 (CD280))이 선별되었다. VE-Cadherin은 후기내피전구세포 및 HUVEC세포 모두에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서 VE-Cadherin은 후기내피전구세포에서 탐지가 가능한 수준으로 발현되었으나, HUVEC세포에서는 발현되지 않는 것으로 확인되었다. 본 발명은 후기내피전구세포와 관련하여 그 기능이 기존에 보고된 바 없는 Nectin-2에 대한 것이다.

[0057] 본 발명자들은 단핵세포(MNCs), 후기내피전구세포 및 HUVEC세포에서 Nectin-2의 발현을 비교하였다. 3종의 세포 타입중에서, 후기내피전구세포의 Nectin-2가 전사수준 (도2b) 및 단백질 수준(도2c)이 가장 높았다. 항-Nectin-2-FITC 항체를 사용하는 면역세포화학에서 Nectin-2이 후기내피전구세포의 세포 표면에서 밀도있게 표시되었다. 게다가 본 발명자들은 표면 마커의 패널을 flow cytometry로 테스트하였다. 후기내피전구세포는 내피세포 표면 마커인 CD31, CD34, CD105, CD144 및 CD146 (도2e)와 함께, Nectin-2(CD112)로 공동-염색되었다. 도2e에서 보듯이, Nectin-2-positive 후기내피전구세포의 95.2%, 99.7%, 93.1% 및 99.9%가 CD31, CD34, CD105, CD144 및 CD146 의 발현에 대해서 각각 양성이었다. 그러나, 후기내피전구세포의 4.7%만이 CD34 및 CD112에 대해서 공동 발현되었다. 그리하여, CD112는 내피전구세포(EPC) 및 내피세포에서 활발하게 발현된 것으로 보이지만 CD34-positive 후기내피전구세포는 그렇지 않다. 본 발명자들은 단핵세포의 표면에서 Nectin-2 발현이 매우 낮은 것을 확인하였다(도 7 참조). 후기내피전구세포의 연속된 계대배양에서 발현이 증가하는 vWF 및 Tie2와 달리, Nectin-2의 수준은 후기내피전구세포의 연속 계대배양후에 감소한다. Nectin-2의 수준은 후기내피전구세포보다 HUVEC세포에서 보다 낮다(도 8 참조). 이러한 결과들은 Nectin-2의 높은 수준이 후기내피전구세포의 잠재적인 세포 표면 마커로서 작용할 수 있음을 의미한다.

[0059] **실시예3. 후기내피전구세포의 이동 및 튜브형성을 억제하는 Nectin-2**

[0060] Nectin-2의 기능을 시험하기 위해, Nectin-2에 대한 블로킹 모노클로날 항체가 후기내피전구세포의 기능을 억제 하기 위해 사용되었다. 후기내피전구세포는 항-Nectin-2 mAbs (20ug/ml)로 처리되었고, 그들의 튜브형성능은 Matrigel 튜브형성능 어세이로 측정되었다. 후기내피전구세포는 VEGF로 처리한 EGM-2 배지에서 튜브구조 형성능 을 갖는다. 블로킹 Nectin-2 mAb 및 Nectin-2 녹다운 shRNA로 처리된 후기내피전구세포는 향상된 말초혈관 형성 능을 보이고, 이는 VEGF 처리후 튜브출현시간 및 튜브 갯수로 측정가능하다(도3a, 도3b). 여러 개의 결합분자가 튜브형성을 조절한다고 알려져 있다. DICAM 녹다운은 또한 더 확장적인 모세혈관망을 형성하는 것으로 보여지지만, Necl-5 녹다운은 감소된 망(network)형성을 보여준다. 다음으로, 본 발명자들은 Nectin-2 억제가 세포이동 에 미치는 효과를 측정하였다. 항-Nectin-2 mAb 처리는 후기내피전구세포의 이동을 상당히 촉진하며, 이는 Boyden-chamber assay (도3c)에 의해 측정된다. 유사한 패턴이 mAb로 처리된 HUVEC세포에서 관찰되었다. 이러한 결과는 Nectin-2이 튜브형성 및 후기내피전구세포의 이동에 부정적인 효과를 갖을 수 있음을 의미한다. Nectin-2이 후기내피전구세포에서 녹다운(knock down)되었다. Boyden-chamber assay는 Nectin-2 녹다운이 후기내피전 구세포 및 HUVEC세포의 이동을 상당히 증가시켰다고 보고 있다(도3d). 유사하게 상처-치료 세포 이동 어세이도 Nectin-2이 녹다운된 후기내피전구세포에서 이동능이 향상되었음을 보여준다. 이러한 결과들은 항-Nectin-2 mAb 처리 결과와 일치하며 Nectin-2 가 후기내피전구세포 이동을 억제함을 보여준다.

[0062] **실시예4. 후기내피전구세포의 증식을 억제하는 Nectin-2**

[0063] 본 발명자들은 Nectin-2 녹다운 후기내피전구세포주를 제조하여 Nectin-2 다운-조절의 효과를 실험하였다. 렌티 바이러스(lentivirus)-매개 형질도입 및 서열 특이적 short hairpin RNA(shRNA)의 발현을 사용하여 Nectin-2의 특이적 감소를 수행되었다. Nectin-2 shRNA 렌티바이러스의 감염은 두개의 후기내피전구세포주에서 Nectin-2 mRNA의 발현수준을 22+-2% 및 18+-5%까지 상당히 감소시켰다(도4a). Nectin-2 단백질 수준은 대조군인 shRNA-형질전이된 세포주에 비해, Nectin-2 shRNA-형질전이된 후기내피전구세포에서 상당히 다운조절되었다(도4b). 타 겿 Nectin-2-녹다운 세포주는 또한 flow cytometry 분석에 적용되었다. Nectin-2 발현이 3개의 독립된 shRNA로 녹다운되었을때, Nectin-2 세포군은 92.8%~ 19.4% 감소하였다. Flow cytometry 분석은 Nectin-2 녹다운이 CD31, CD105 또는 CD146 내피세포마커 발현에 영향을 주지 못함을 의미한다. 그러나 CD144(VE-cadherin) 및 CD309(VEGFR-2)-발현 세포 세포군은 93.2% ~ 58.61%, 97.4%~ 86.01%까지 각각 감소시킨다. HUVEC세포에서도 유사한 결과가 얻어졌다(도 9a,b). 내피세포는 Adherens Junction(AJs)에서의 CD144와 tight Junctions (TJs)에서의 Claudins 및 Occluding 및 JAM과 같은 세포-타입-특이적 막관통 결합 단백질을 발현시킨다. Nectin-Afadin 시스템은 AJ와 TJ 기관 둘다에서 중요한 역할을 수행한다. Nectin- Afadin 복합체에서, ponsin은 Afadin, inculin 및 알파-catenin에 결합함으로써, 액틴에 복합체가 고정되는 것을 돕는다. CD144는 CD309와 복합체를 형성한다. 그러므로, nectin-2가 액틴 복합체에서 CD144및 CD309의 발현수준을 조절할 수 있음을 의미한다.

[0065] 다음으로, 본 발명자들은 Nectin-2이 후기내피전구세포 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 분열지수(mitotic index)는 bromodeoxyuridine(BrdU) incorporation에 의해 측정된 바와 같이, 대조군 세포주에 비해서 Nectin-2 녹다운 세포주에서 상당히 증가한다(도4d). 세포 생존성은, MTT에세이에 의해 측정된 바와 같이, Nectin-2 녹다운 후기내피전구세포주에서 상당히 향상되었다(도4e). HUVEC세포주에서도 유사한 결과를 얻을 수 있었다(도 9c). 이러한 결과는 Nectin-2가 후기내피전구세포의 증식을 억제함을 의미한다. 이후에, 본 발명자들은 ERK/2 신호전달의 활성화를 측정하였으며, 이는 세포증식 및 이동에 중요하다고 볼 수 있다. 실제로, Nectin-2 녹다운 세포주는 HUVEC 세포주 및 후기내피전구세포에서 phospho-ERK1/2 수준이 증가하였다(도4f).

[0067] **실시예5. 다른 Nectin family 단백질과 Nectin-2의 결합**

[0068] 본 발명자들은 Nectin-2가 Nectin family member 및 관련 유전자에 영향을 미치는지에 대해서 조사하였다. 첫째, 실시간 PCR을 통해 후기내피전구세포에서의 Nectin family member 및 Necl-1(CDAM1) 및 Necl-4(CDAM4)의 발현을 HUVEC세포와 단핵세포에서의 발현 프로파일과 비교하였다(도 5a). 이전 리포트들은 Nectin-3 및 Necl-4(CDAM4)가 내피세포에서 발현되지만, Nectin-1은 그렇지 않음을 보여주었다. 본 실험결과는 Nectin-3 뿐만 아니라 Nectin-2가 단핵세포에 비해, 후기내피전구세포 및 HUVEC세포에서 현저하게 발현됨을 보여주었다. 그러나, Nectin-2 녹다운은 후기내피전구세포에서, sh-대조군보다 모든 Nectin family member 및 Necls(Nectin-1, Nectin-3, Necl-1 및 Necl-4)의 발현을 증가시켰다(도5b). 다른 한편, HUVEC세포에서 Nectin-2 녹다운은 Nectin-1 및 Necl-4에 대해서는 정반대의 패턴을, Necl-1에 대해서는 유사한 변화를, Nectin-3에서는 변화가 없음을 보여줬다. Nectin-2 family gene에 대한 Nectin-2의 효과를 테스트하기 위해, 후기내피전구세포는 CdCl₂로 처리하였고, 이것은 프로모터 구역에 전사인자의 결합을 방해하여 Nectin-2 유전자의 전사를 감소시키는 것으로 알려졌다(도 5b). CdCl₂ 처리는 후기내피전구세포(도11a) 및 HUVEC세포(도11b)에서 Nectin-2 mRNA 수준을 투여량에 의존하여 감소시켰다. Nectin-2 단백질 수준은 또한 24시간 1.25um CdCl₂ 처리에 의해 감소된다. CdCl₂에 의한 Nectin-2의 다운조절은 후기내피전구세포 및 HUVEC세포에서 Nectin-family gene(Nectin-1, Nectin-3, Necl-1 및 Necl-4)의 상당한 발현증가를 초래한다(도5c, d). ShRNA-매개 녹다운 실험을 확장하였다. 이러한 발현 증가는 Nectin-2 기능 녹다운에 대한 보상에 부분적으로 기여할 것으로 보인다.

[0069] 이후에, 본 발명자들은 Nectin family가 in vitro 튜브 형성에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 테스트하였다. 도5e 에서 보듯이, Nectin-1 및 Nectin-2의 형질전환은 후기내피전구세포 및 HUVEC세포의 튜브형성을 상당히 감소시킨다. 그러나 흥미롭게도, Necl-4가 현저하게 튜브 생성을 증가시키고, 이는 Necl-4가 Nectin-2와 반대로 작동함을 의미한다.

[0071] **실시예6. 항체가 고정된 실리콘 나노 섬유**

[0072] 코발트 크롬 금속 시편(CoCr plate, 10×10×1mm)의 한 쪽 표면을 0.3µm 산화 알루미늄 현탁액(alumina suspension)을 이용하여 기계 연마하였다. 상기 연마한 시편은 산소 플라즈마 장비(Femto Science, Korea)를 사용하여 50 sccm 의 산소유량, 50 W의 전압 조건에서 5분간 플라즈마 처리하여 표면에 수산기(hydroxyl group)를 유도하였다. 무수 톨루엔(Toluene anhydrous, Sigma-Aldrich, USA) 200 ml를 테플론 반응조에 채운 뒤 테플론 홀더에 금속 시편을 세워놓고 무수 톨루엔 용액에 완전히 잠기게 하였다. 반응조를 밀봉하고 200 RPM으로 용액을 교반하면서 33% 습도의 질소기체를 반응조로 30분간 주입한 뒤 TCMS(trichloro(methyl)silane, Sigma-Aldrich, USA) 200 µl를 넣고 상온에서 90분간 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 시편을 톨루엔, 에틸 알코올, 50% 에틸 알코올로 각각 세 번씩 세척하고 120℃ 오븐에서 2시간 동안 어닐링(annealing)하였다. 제작된 실리콘 나노 섬유 시편은 상기 조건과 동일한 산소 플라즈마 처리를 한 뒤 10mM APTES(3-aminopropyltriethoxysilane 10mM in anhydrous toluene)와 2 시간 동안 반응시켜 표면에 아민기를 유도하였다. EDC, NHS(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, N-hydroxysulfosuccinimide, Sigma-Aldrich, USA)를 동 질량비로 MES 완충액(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid buffer)에 녹인 용액에 각 항체(anti-Nectin 2)를 첨가한 뒤 시편이 담긴 용기에 넣고 2시간 동안 반응시켜 표면에 항체를 고정시켰다.

[0074] **실시예7. 세포배양 및 EPC 포획여부**

[0075] 후기내피전구세포를 5% 소태아혈청(fetal bovine serum), 재조합 인간 혈관내피 성장인자(recombinant human vascular endothelial growth factor), 재조합 인간 섬유아세포 성장인자-B(recombinant human fibroblast growth factor-B), 재조합 인간 상피 성장인자(recombinant human epidermal growth factor), 아스코르브산(ascorbic acid), 재조합 인슐린유사 성장인자-1(recombinant long R insulin-like growth factor-1), 겐타마이신황산염 암포테리신-B(gentamicin sulfate amphotericin-B)를 포함하는 EBM-2(endothelial basal medium-2,

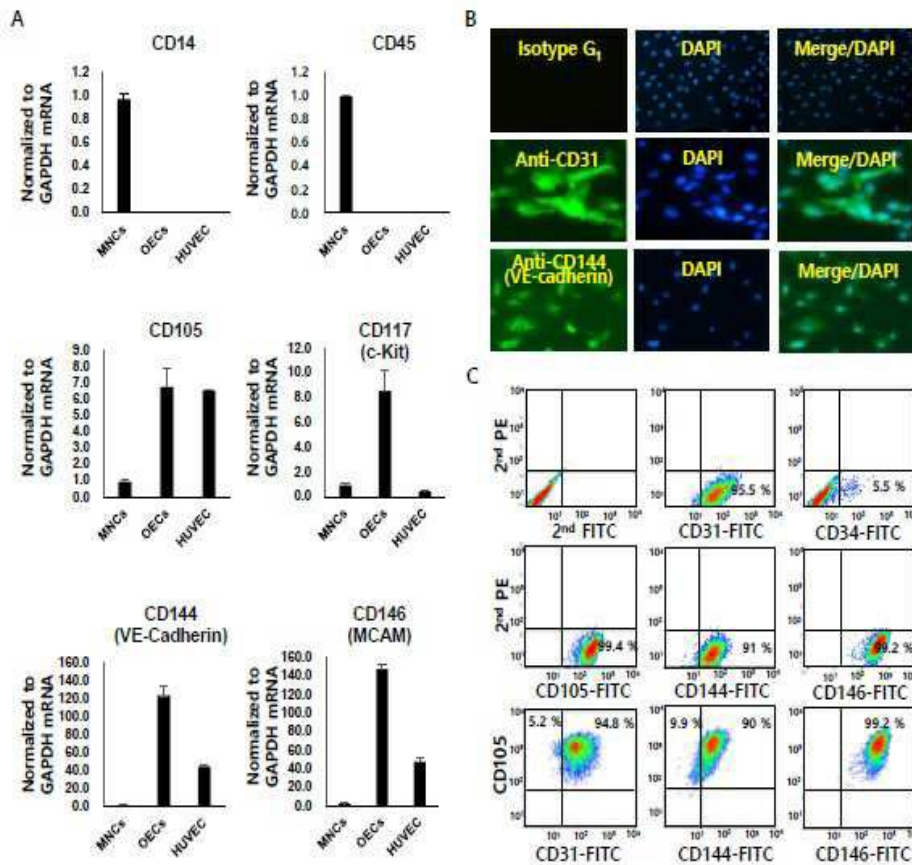
Lonza, USA) 배지에 37°C, 5% 농도의 이산화탄소 조건이 갖춰진 세포배양기에서 배양하였다. 이들에 한 번씩 배지를 교환하였으며 배양 용기의 70% 내지 80%가 세포로 찼을 때 계대배양하였다.

[0076]

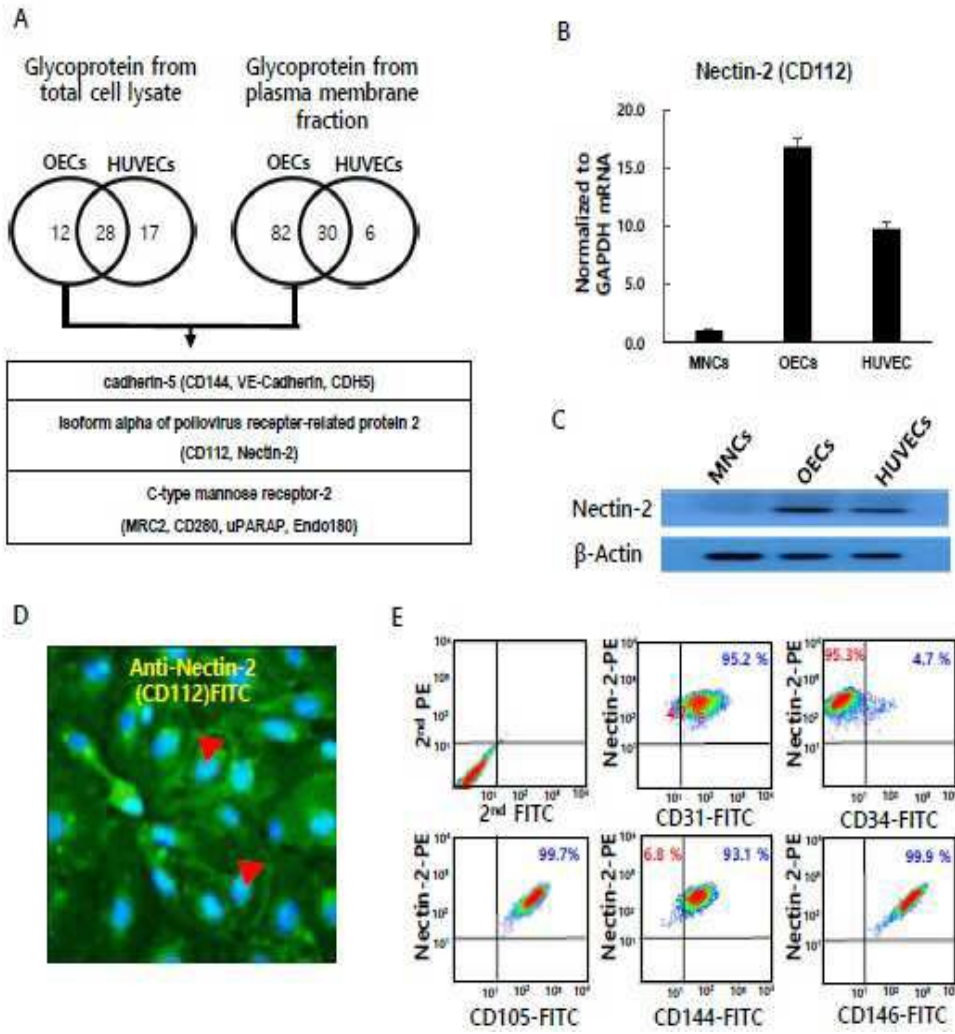
금속시편을 끼울 수 있는 구멍이 나있는 형태로 제작된 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane; PDMS)형판에 항체가 고정된 금속시편을 끼운 뒤 Stick-Slide I^{0.6} Luer (Ibidi®, Germany) 미세유체칩을 덮고 튜브를 연결해 시편위로 배지가 흐를 수 있는 조건을 만들었다. 단위 체적당 10,000개의 EPCs가 들어있는 배지를 바닥 면이 일정한 방향으로 15 dyne/cm²의 전단응력(shear stress)을 받도록 펌프와 유체 조절기(ibidi pump, fluidic unit, Ibidi®, Germany)를 이용해 흘려 보냈다. 37°C 배양기에 미세유체칩과 유체 조절기를 넣은 상태로 1시간 동안 배지를 순환시켰으며 1시간 뒤 칩을 꺼내 내부에 순수한 배지를 세 번 흘려 보내 포획되지 않은 EPCs를 제거하였다. 포획된 EPCs는 Hoechst 33342(Thermo Fisher, USA) 5?g/ml로 20분간 처리하여 세포핵을 염색했으며 부착된 세포의 총 개수를 Image J 프로그램을 이용해 계산하였다(도12참조). 실험한 결과, Nectin-2 항체가 코팅되지 않은 시편(bare)보다 Nectin-2 항체가 코팅된 시편(CD112)에서 보다 많은 후기내피전구세포가 포획되었으며, 결국 Nectin-2 항체가 후기내피전구세포의 포획에 매우 효과적임이 확인되었다.

도면

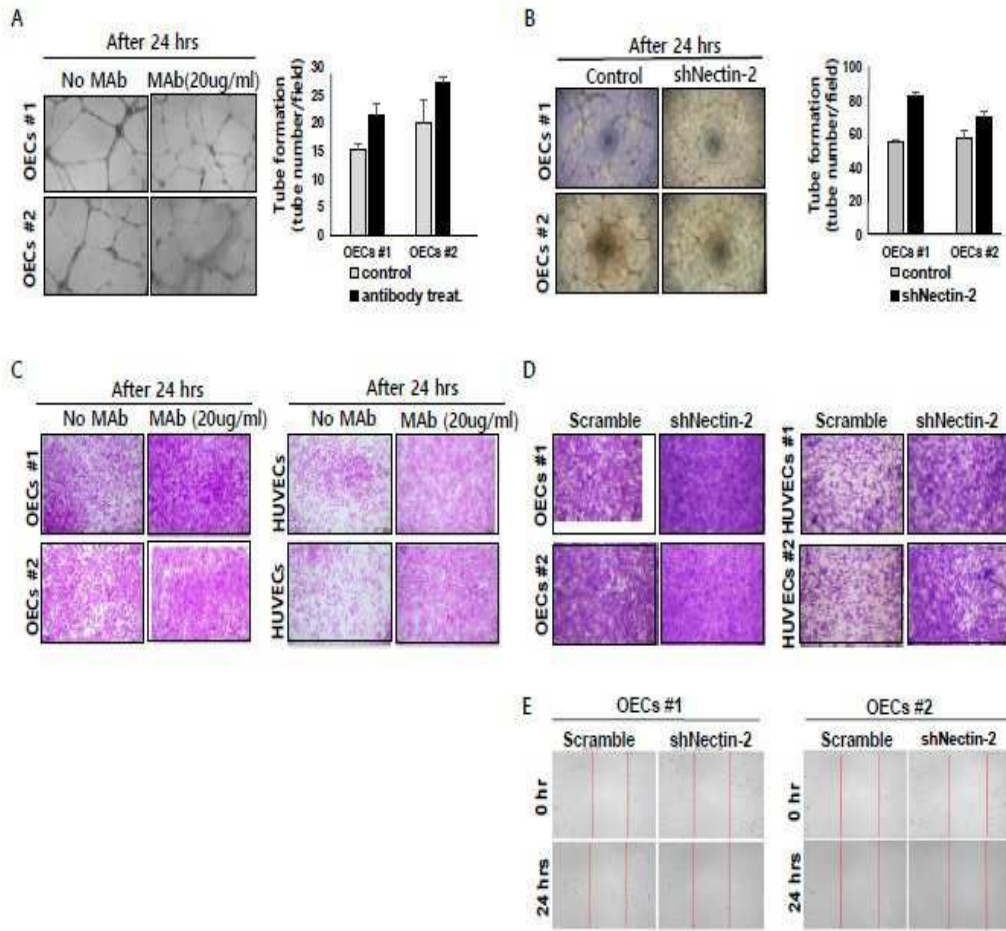
도면1



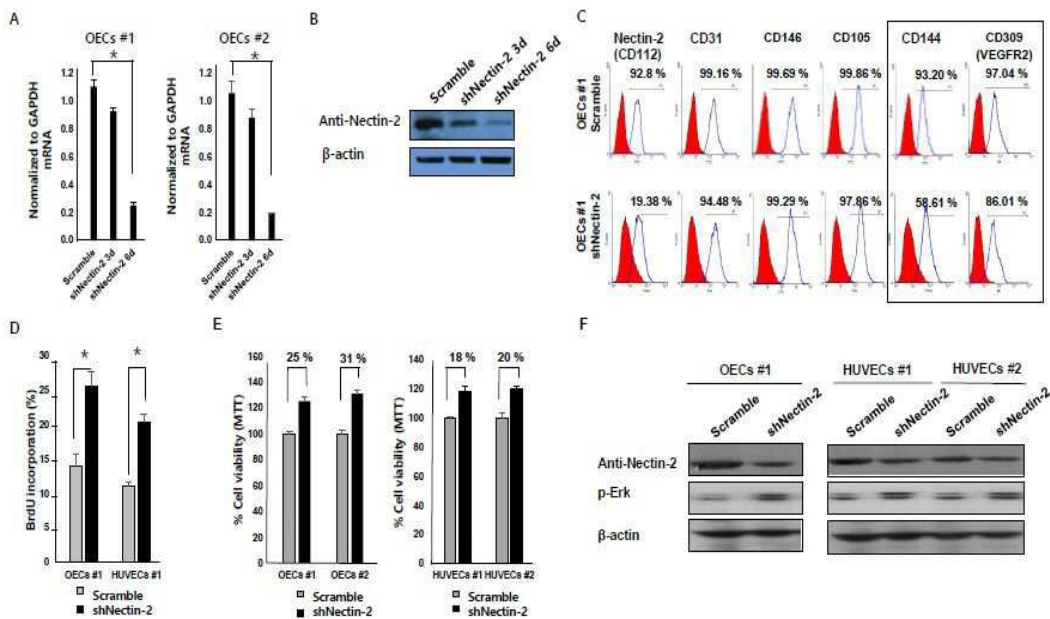
도면2



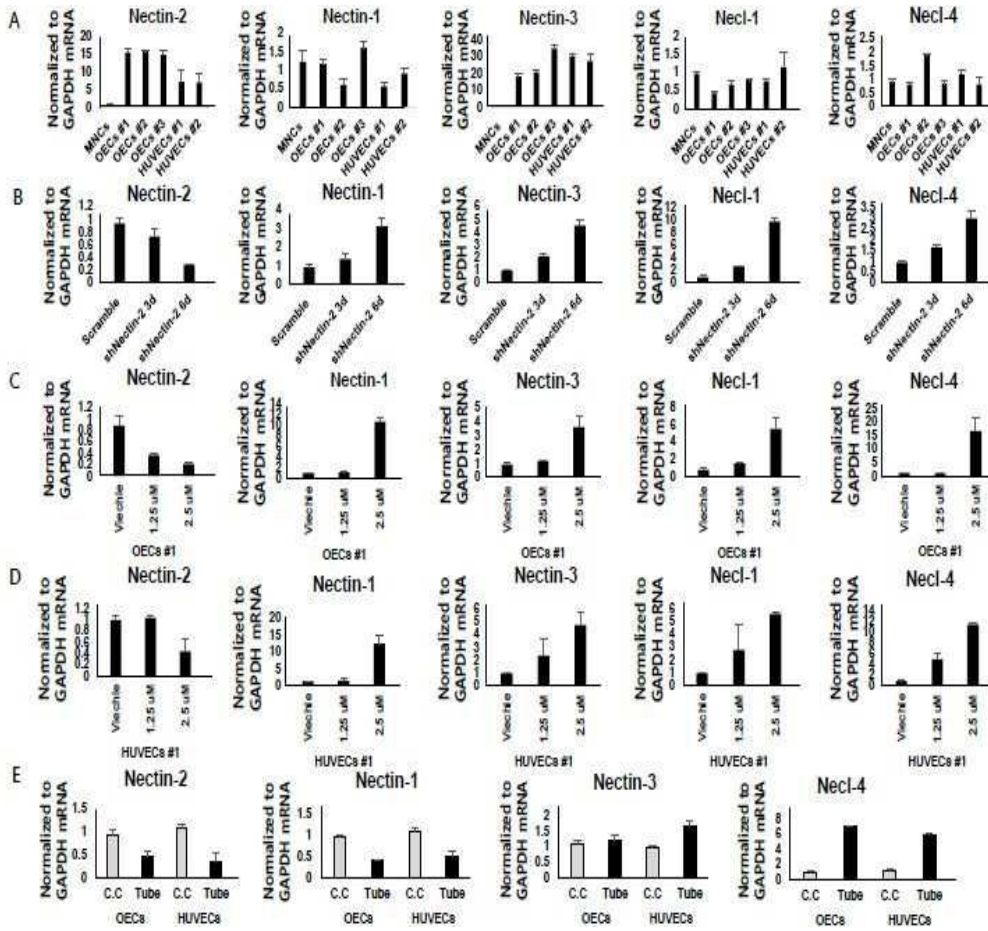
도면3



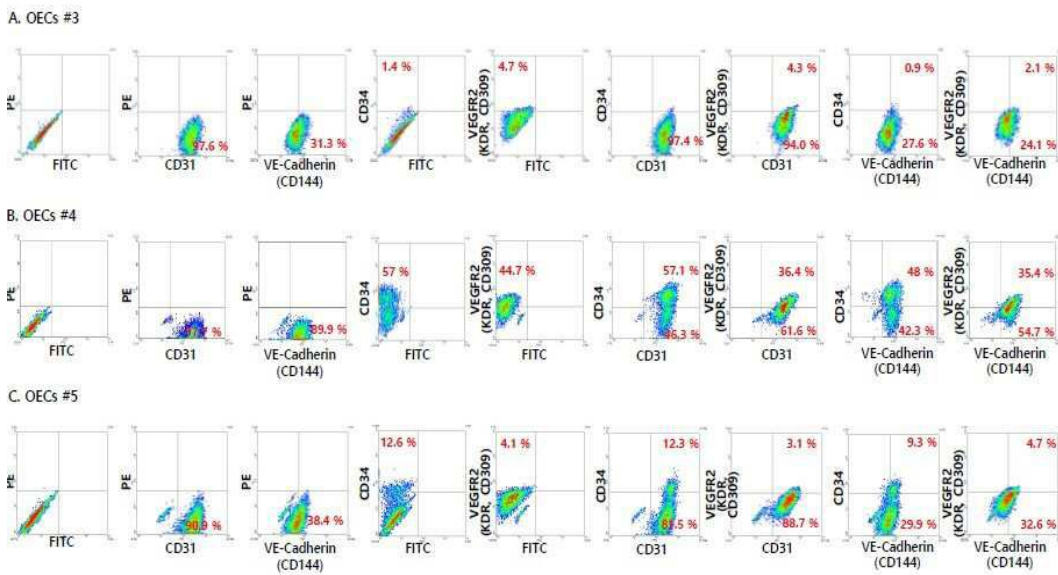
도면4



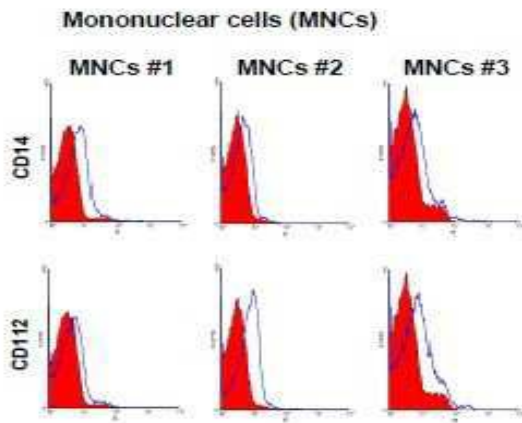
도면5



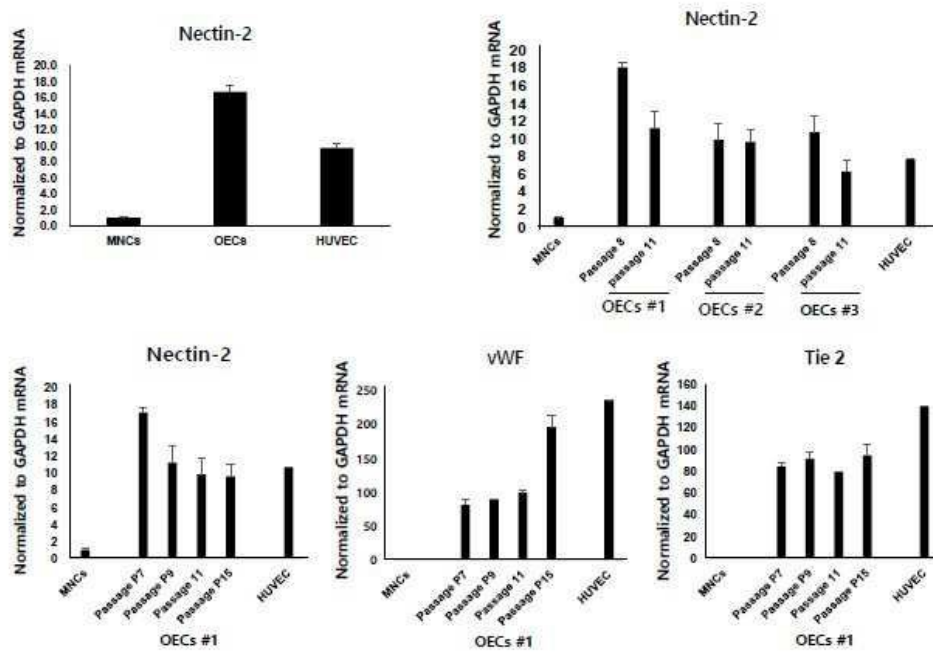
도면6



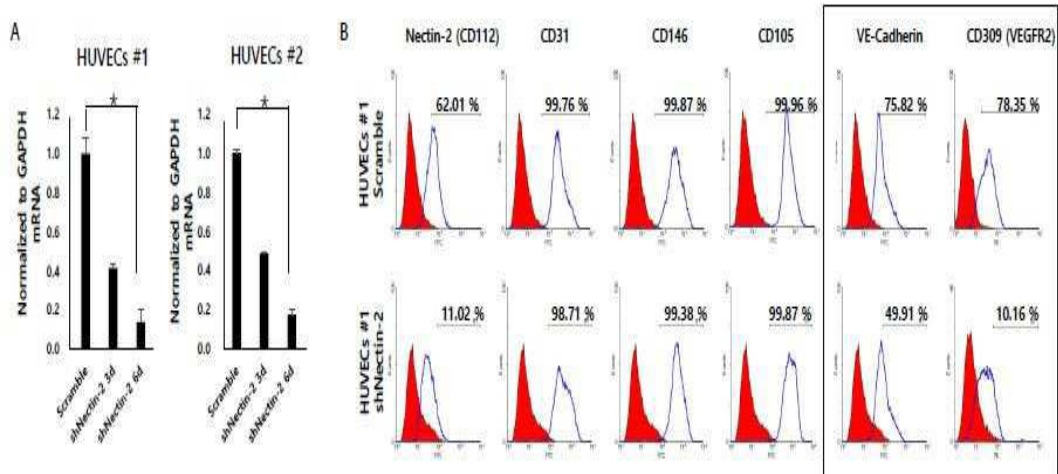
도면7



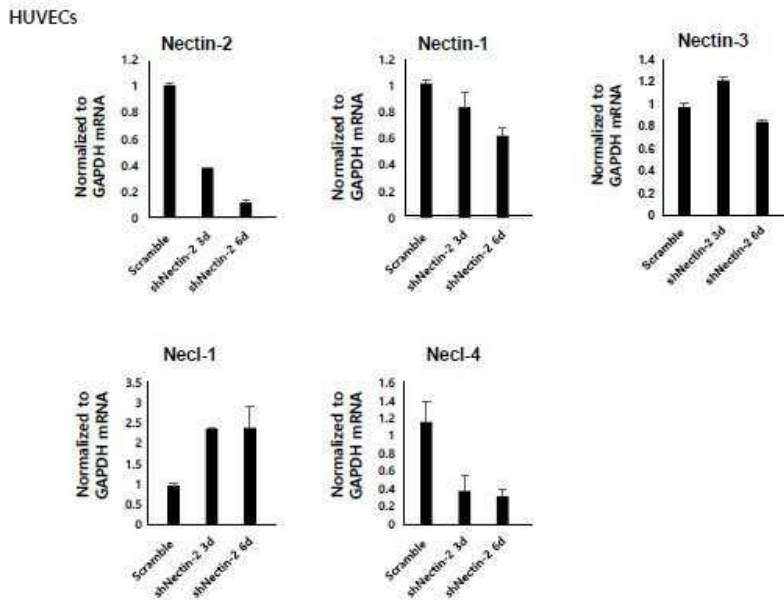
도면8



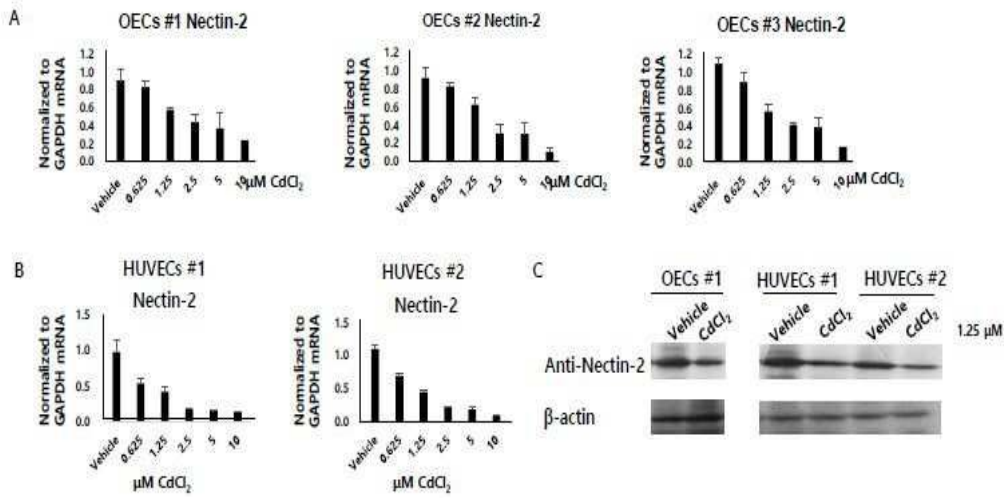
도면9



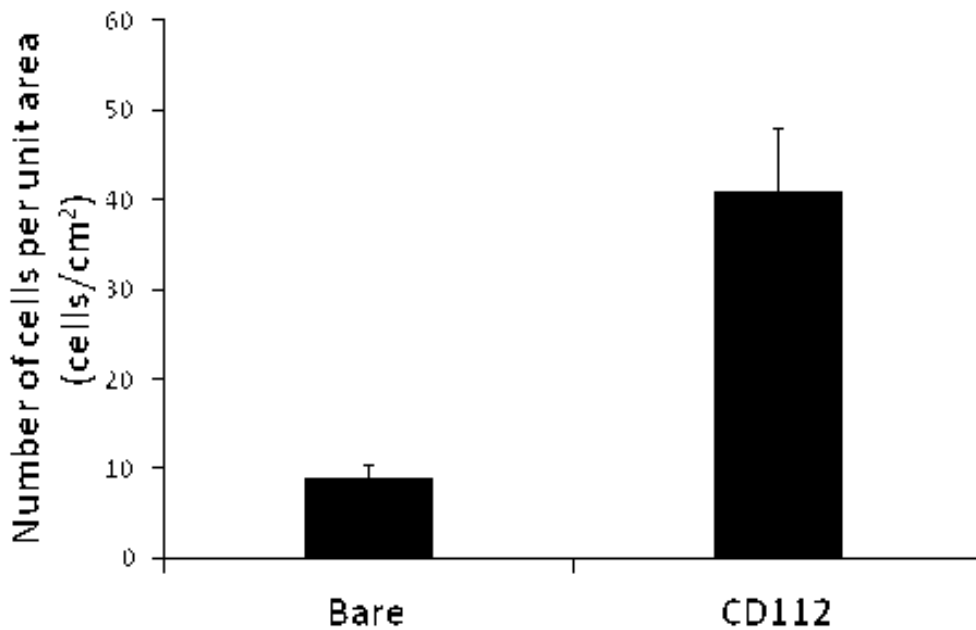
도면10



도면11



도면12



서열목록

- <110> SNU R&BD Foundation
- <120> The Nectin-2 stent coating composition for capturing and proliferating outgrowth endothelial cell and stent using thereof
- <130> 16p1205
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> Human nectin-2
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(538)
 <223> human nectin-2 amino acid sequence
 <400> 1

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln
 20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
 35 40 45

Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr
 50 55 60

Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln
 65 70 75 80

Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
 85 90 95

Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
 100 105 110

Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His
 115 120 125

Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr
 130 135 140

Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
 145 150 155 160

Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp
 165 170 175

Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala
 180 185 190

Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln
 195 200 205
 Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr
 210 215 220
 Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser
 245 250 255
 Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp
 260 265 270
 Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn
 275 280 285
 Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro
 290 295 300
 Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp
 305 310 315 320
 Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly
 325 330 335
 Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr
 340 345 350
 Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala
 355 360 365
 Ile Ile Ala Thr Ala Val Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln
 370 375 380
 Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu
 385 390 395 400
 Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu
 405 410 415
 Ala Gln Glu Met Pro Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His
 420 425 430
 Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu

