



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월07일

(11) 등록번호 10-2574856

(24) 등록일자 2023년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/22 (2015.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)

G01N 33/569 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/22 (2013.01)

A01K 67/027 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0016870

(22) 출원일자 2021년02월05일

심사청구일자 2021년02월05일

(65) 공개번호 10-2022-0113589

(43) 공개일자 2022년08월16일

(56) 선행기술조사문헌

KR102146274 B1

비특허문헌 1

비특허문헌 2

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

남기택

경기도 고양시 일산동구 강송로 156, 207동 902호

이유라

서울특별시 성북구 한천로76길 73, 2동 1402호

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 이재영

전체 청구항 수 : 총 15 항

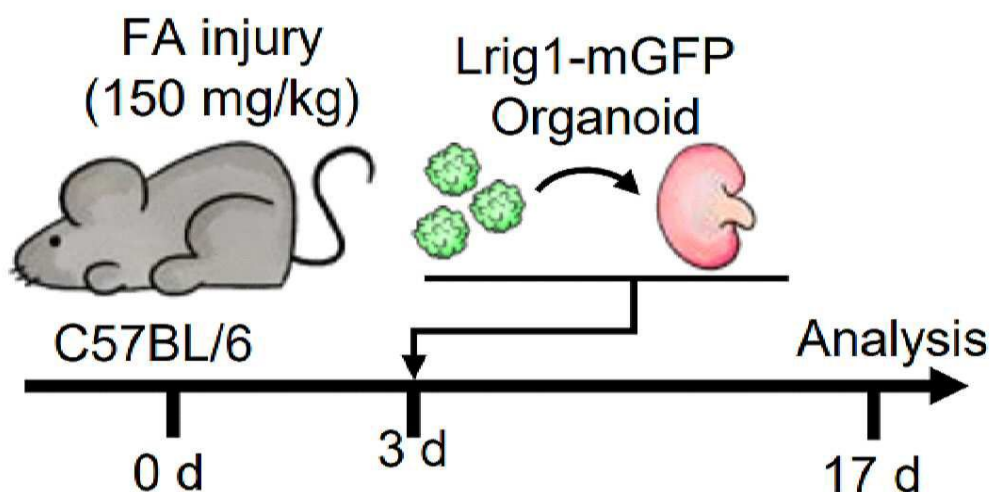
심사관 : 박희연

(54) 발명의 명칭 신장 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명에 따른 신장 조직유래 줄기세포; 또는 오가노이드는 치료를 위한 시술이 용이하고, 높은 자가 증식능으로 대량 공급이 가능하며, 신장 세포로 분화능이 뛰어나고, 종양 형성의 가능성이 낮을 뿐만 아니라, 병변에 직접 주입되는 경우 손상된 조직을 재생하는 능력이 매우 탁월하다. 따라서, 이와 같은 줄기세포 중에서, 특히 성체줄기세포 기반 재생치료에 매우 적합하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 조성물은 신장 세포 중에서 특히 신장 줄기세포만을 특이적으로 선별해낼 수 있다. 나아가, Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 줄기세포는 재생능력 및 다능성이 매우 뛰어나고, 네프론으로 분열할 수 있는 능력을 가지고 있으므로 신장 질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2020.05)

A61P 13/12 (2018.01)

C07K 14/47 (2013.01)

C12N 5/0686 (2013.01)

C12N 5/0697 (2013.01)

C12Q 1/686 (2018.05)

G01N 33/56966 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

Lrig1(Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서, 상기 신장 질환은 급성 신손상(Acute kidney injury; AKI)인 것인, 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신장 조직유래 줄기세포는 Klf6(Krueppel-like factor 6) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 추가로 더 발현하는, 약학 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 조직유래 줄기세포를 포함하는 신장 오가노이드.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 신장 조직유래 줄기세포는 Klf6(Krueppel-like factor 6) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 추가로 더 발현하는, 신장 오가노이드.

청구항 6

제4항 또는 제5항의 신장 오가노이드를 유효성분으로 포함하는, 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 신장 질환은 급성 신손상(Acute kidney injury; AKI)인 것인, 약학 조성물.

청구항 7

(a) 목적하는 개체로부터 분리된 신장 상피세포에서 Lrig1(Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 발현된 세포를 분리하는 단계;

(b) 상기 Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 발현된 세포를 배양하는 단계; 및

(c) 상기 배양된 세포를 마트릭젤에 넣고 오가노이드를 형성하는 단계;를 포함하는 신장 오가노이드의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 분리된 세포는 Klf6(Krueppel-like factor 6) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 추가로 더 발현하는 것인, 제조 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 (b) 단계에서, 상기 유전자가 발현된 세포를 배양하는 단계는 우태아혈청, 성장인자 및 항생제가 포함된

세포 배양 배지를 이용하는 것인, 제조 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 (c) 단계에서, 상기 오가노이드를 형성하는 단계는 B27 보충제, 조건 배지, 성장인자, N-아세틸시스테인 및 ALK 5(TGF β kinase/activin receptor-like kinase) 억제제가 포함된 세포 배양 배지를 이용하는 것인 제조 방법으로서,

상기 조건 배지는 Wnt3a 조건 배지, 노긴(noggin) 조건 배지 및 Rspo1 조건 배지로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상인 것인, 제조 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 매트릭셀은 성장인자 감소 매트릭셀인 것인, 제조 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, Lrig1(Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1) 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자가 발현되는 세포를 분리하는 단계;를 포함하는 신장 조직유래 줄기세포의 분리 방법으로서,

상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는 혈액, 소변(urine), 정액(semen), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 및 세포 추출물(cell extract)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나인 것인, 분리 방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 분리되는 세포는 Klf6(Krueppel-like factor 6) 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자를 추가로 더 발현하는 것인, 분리 방법.

청구항 25

제23항에 있어서,

상기 분리하는 단계는 자기 활성 세포 분류법(Magnetic activated cell sorting; MACS) 또는 유세포 분석(Flow cytometry Analysis)을 통해 수행되는 것인, 분리 방법.

청구항 26

Lrig1(Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1) 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 조직유래 줄기세포를 분리하는 단계; 및

상기 분리된 신장 조직유래 줄기세포를 배양하는 단계;를 포함하는 신장 조직 유래 줄기세포를 배양하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 분리되는 세포는 Klf6(Krueppel-like factor 6) 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자를 추가로 더 발현하는 것인, 배양하는 방법.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신장 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신장은 생체의 항상성(homeostasis)을 유지하는 중요한 장기로, 체내 체액량, 혈액 내의 이온 농도와 pH를 조절하고, 대사성 노폐물, 독소, 약물 등의 노폐물을 배설하며, 혈압 조절 및 기타 대사성, 내분비 기능을 수행한다. 또한, 비타민 D를 활성화시켜서 소장에서 칼슘이 흡수되도록 도와주며 여러 가지 호르몬의 합성에도 관여한다. 상기 신장이 배설, 조절, 대사 및 내분비적 기능을 정상적으로 수행하지 못하고 전체적으로 기능이

저하되거나 이상이 초래된 상태를 신장 질환이라고 한다. 신장의 손상으로 인한 기능의 저하는 신장 및 관련 구조의 증대, 신장의 위축, 체액량의 변화, 전해질 불균형, 대사성 산증, 가스교환장애, 항감염 기능 손상, 요독성 독소의 축적 등을 초래한다. 특히, 급성 신부전은 여러 가지 원인에 의해 신장기능이 저하되어 높은 치사율을 보이는 난치성 질환이다. 신장기능이 회복되더라도 손상의 원인과 정도에 따라 재발하거나 치료되지 않을 경우 만성 및 말기 신부전(end-stage renal failure)으로 진행되기도 한다.

[0003] 현대의학의 발전에도 불구하고 병원에 입원하는 많은 환자들이 신장 기능의 저하로 인하여 많은 고통을 받고 있으며, 특히 병의 중증도가 높은 환자는 신장 기능의 저하로 인하여 신대체요법이 필요한 경우가 많이 있다. 급성 신손상의 유병률은 입원환자의 약 5%에서, 중환자실에 입원하는 환자의 약 30-50%까지 보고되고 있으며 이러한 유병률은 새로운 치료법의 개발에도 불구하고 꾸준히 증가하고 있는 추세에 있다.

[0004] 이와 같은 신장 질환을 치료하기 위하여, 줄기세포에 대한 전임상 보고서와 임상 시험이 현재 활발하게 진행되고 있는 실정이다. 구체적으로, 중간엽 줄기세포, 지방유래 줄기세포, 양수 줄기세포 및 신장 전구세포 등에 이르는 다양한 유형의 줄기세포가 신장을 복구하는데 다양하게 연구되고 있다. 이와 같은 줄기세포 중에서, 특히 성인의 신장에서 유래된 성체 줄기세포를 이용한 세포치료제는 향상된 신장 생착 및 분화의 잠재적인 이점이 있으며, 자가 치료에 매우 유용하게 활용될 수 있다는 등의 이점이 존재한다.

[0005] 이와 같은 맥락에서, 신장의 경우 근위 세뇨관 말단, 사구체 및 신장 유두부(Renal papilla)에 성체 줄기세포가 존재한다고 보고되어 있으며, 이와 같은 줄기세포에 의해 손상된 신장 세포의 재생을 유도할 수 있는 세포치료제에 대한 다양한 연구가 지속되고 있다.

[0006] 그러나, 아직까지 이와 같은 신장 줄기세포를 식별하고 치료제로 적용하기 위한 줄기세포를 동정하고, 임상에 활용하기 위한 적용 가능성 등에 대한 연구는 미비한 실정이다.

(선행문헌 1) Nat Cell Biol. 2012 Mar 4;14(4):401-8.

(선행문헌 2) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 318: G796-G802.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 목적은 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 신장 오가노이드의 제조 방법; 이를 통해 제조된 신장 오가노이드; 및 신장 오가노이드를 유효성분으로 포함하는 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 신장 조직유래 줄기세포 검출용 조성물; 및 이를 포함하는 신장 줄기세포 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 신장 조직유래 줄기세포 검출 방법; 및 신장 줄기세포를 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 신장 조직유래 줄기세포를 배양하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 1. 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물

[0014] 본 발명의 일 구현 예에서는 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 상기 신장 줄기세포는 Lrig1(Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현한다.

[0016] 본 발명의 상기 Lrig1 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 상피세포는 다른 세포와는 달리 줄기세포능을 갖는 신장 조직유래 줄기세포로서, 특히 신장의 후기 발달 단계인 투불로제네시스(Tubulogenesis)에 관여

하여 네프론으로 분열할 수 있는 능력을 가질 수 있다. 따라서, 본 발명의 목적상 상기 줄기세포능을 갖는 Lrig1 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 상피세포를 이용하는 경우에는 신장 질환을 매우 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0017] 본 발명의 상기 "Lrig1"은 EGFR-계통, MET 및 RET 단백질 등의 수용체 티로신 카이네이즈와 상호작용하는 막통과 단백질(transmembrane protein)이다. 상기 Lrig1은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류, 등을 포함하는 포유류로부터 유래하는 것일 수 있으며, 예를 들면, 인간의 Lrig1(접근번호: NM_015541에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드 또는 NP_056356, 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 또한, 본 발명에서 상기 신장 조직유래 줄기세포는 Klf6(Krueppel-like factor 6) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 추가로 발현할 수 있다.

[0019] 본 발명의 상기 "Klf6"는 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene)에 해당하는 KLF6 유전자에 의해 암호화되는 단백질이다. 상기 Klf6는 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류, 등을 포함하는 포유류로부터 유래하는 것일 수 있으며, 예를 들면, 인간의 Lrig1(접근번호: NP_001153596.1에 의해 암호화되는 폴리펩타이드 또는 NM_001160124.1; NP_001153597.1에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드 또는 NM_001160125.1 [Q99612-3]; NP_001291.3에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드 또는 NM_001300.5 [Q99612-1], 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 상기 "신장 조직유래 줄기세포"는 신장의 조직내 존재하는 줄기세포로서, 신장의 모든 세포 유형으로 분화될 수 있는 자기 재생성(Self-renewing) 및 다능성 줄기세포를 의미한다. 이와 같은 줄기세포는 신장 손상의 재생 및 항상성에 관여할 수 있다.

[0021] 본 발명의 상기 신장 조직유래 줄기세포는 세포치료제로 사용되는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 상기 "세포치료제"는 환자에 직접 주입하는 치료 방법에 사용되는 살아있는 세포로서, 살아있는 자가 세포, 동종세포 또는 이종세포를 체외에서 배양, 증식하거나 선별하는 등 물리적, 화학적 또는 생물학적 방법으로 조작하여 제조하는 의약품을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 신장 조직유래 줄기세포는 환자의 신장에 존재하는 Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 발현되어 있는 줄기세포능이 매우 뛰어나므로, 이식 거부 반응 등과 같은 부작용이 매우 적을 수 있다는 이점이 존재한다.

[0023] 본 발명의 상기 "신장 질환"은 신장 기능의 악화를 초래하는 질환으로서, 신장 기능의 악화가 진행되는 속도에 따라 급성 신손상(Acute kidney injury; AKI) 및 만성 신손상(Chronic kidney disease; CKD)가 포함되며, 예를 들면 급성 신손상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 상기 신장 질환은 예를 들면, 사구체 신염, 만성 신부전, 급성 신부전, 신증후군, 신우염, 신장결석 및 신장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 상기 "예방"은 동물의 병리학적 세포의 발생 또는 세포의 손상, 소실의 정도의 감소를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 병리학적 세포의 발생 또는 비정상적인 면역 작용 등이 상기 신장 질환의 예방 및 치료용 조성물을 사용하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다.

[0026] 본 발명의 상기 "치료"는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 전이를 예방하거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다. 즉, 상기 치료는 상기 조성물에 의해 신장 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 포괄하는 것으로 해석될 수 있다.

[0027] 본 발명의 상기 신장 조직유래 줄기세포는 1×10^7 내지 1×10^8 , 1×10^8 내지 2×10^8 , 2×10^8 내지 4×10^8 , 4×10^8 내지 6×10^8 , 6×10^8 내지 8×10^8 , 8×10^8 내지 1×10^9 , 1×10^9 내지 2×10^9 , 2×10^9 내지 4×10^9 , 4×10^9 내지 1×10^{10} , 2×10^8 내지 6×10^8 , 6×10^8 내지 1×10^9 , 1×10^8 내지 2×10^8 , 2×10^8 내지 2×10^9 , 1×10^7 내지 1×10^8 , 1×10^8 내지 1×10^9 , 1×10^9 내지 1×10^{10} 또는 1×10^7 내지 1×10^9 개 중 어느 하나의 세포/kg의 투여량으로 투여

될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0028] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0030] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함되며, 예를 들면, 경구 또는 비경구 투여될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 목적상 상기 약학 조성물은 신장에 직접 주사되는 방식으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0035] **2. 오가노이드**
- [0036] 본 발명에서 후술하여 기재되는 신장 오가노이드는 치료를 위한 기술이 용이하고, 높은 자가 증식능으로 대량 공급이 가능하며, 신장 세포로 분화능이 뛰어나고, 종양 형성의 가능성이 낮을 뿐만 아니라, 병변에 직접 주입되는 경우 손상된 조직을 재생하는 능력이 매우 탁월하다. 따라서, 성체 줄기세포 기반 재생치료에 매우 적합하게 사용될 수 있다. 특히, 이와 같은 신장 오가노이드는 기존의 중간엽 줄기세포, 배아 줄기세포 또는 역분화 만능 줄기세포를 이용하는 세포 치료제와 비교하여 직접 재생 효과가 매우 뛰어나다는 장점이 존재한다.
- [0038] 이하, 신장 오가노이드, 신장 오가노이드의 제조 방법 및 그 용도에 대해 자세히 설명한다.
- [0040] **(1) 신장 오가노이드**
- [0041] 본 발명의 다른 구현 예에서는 신장 오가노이드를 제공한다.
- [0042] 본 발명의 상기 신장 오가노이드는 Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 조직유래 줄기세포를 포함한다.
- [0043] 본 발명의 상기 Lrig1 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 상피세포는 다른 세포와는 달리 줄기세포능을 갖는 신장 조직유래 줄기세포로서, 특히 신장의 후기 발달 단계인 투불로제네시스(Tubulogenesis)에 관여하여 네프론으로 분열할 수 있는 능력을 가질 수 있다. 따라서, 본 발명의 목적상 상기 줄기세포능을 갖는

Lrig1 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 상피세포는 매우 효과적으로 오가노이드를 형성할 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명에서 상기 신장 조직유래 줄기세포는 Klf6 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 추가로 발현할 수 있다.

[0045] 본 발명의 상기 신장 오가노이드에서, Lrig1 또는 Klf6 단백질 또는 이에 의해 암호화되는 유전자, 신장 조직유래 줄기세포 등과 관련된 내용은 앞서 "1. 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물"에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.

[0046] 본 발명의 상기 "오가노이드"는 3D 입체구조를 가지는 세포를 의미하며, 동물 등에서 수집, 취득하지 않은 인공적인 배양 과정을 통해 제조한 조직과 유사한 모델을 의미한다. 2D 배양과는 달리, 3D 세포 배양은 체외에서 세포가 모든 방향으로 성장할 수 있다.

[0048] (2) 신장 오가노이드의 제조 방법

[0049] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 신장 오가노이드의 제조 방법을 제공한다.

[0050] 본 발명의 상기 제조 방법은 (a) 목적하는 개체로부터 분리된 신장 상피세포에서 Lrig1(Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 발현된 세포를 분리하는 단계; (b) 상기 Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 발현된 세포를 배양하는 단계; 및 (c) 상기 배양된 세포를 매트릭스에 넣고 오가노이드를 형성하는 단계;를 포함한다.

[0051] 본 발명의 상기 Lrig1 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 상피세포는 다른 세포와는 달리 줄기세포능을 갖는 신장 조직유래 줄기세포로서, 특히 신장의 후기 발달 단계인 투불로제네시스(Tubulogenesis)에 관여하여 네프론으로 분열할 수 있는 능력을 가질 수 있다. 따라서, 본 발명의 목적상 상기 줄기세포능을 갖는 Lrig1 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 조직유래 줄기세포를 이용하는 경우에는 신장 오가노이드를 매우 높은 수율로 제조할 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명의 상기 (a) 단계에서 분리되는 세포는 Klf6(Kruppel-like factor 6) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 발현되는 것일 수 있다.

[0053] 본 발명의 상기 신장 오가노이드의 제조 방법에서, Lrig1 또는 Klf6 단백질 또는 이에 의해 암호화되는 유전자, 신장 조직유래 줄기세포, 오가노이드 등과 관련된 내용은 앞서 "1. 신장 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물" 및 "(1) 신장 오가노이드"에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.

[0054] 본 발명의 상기 (a) 단계에서, 세포를 분리하는 단계는 목적하는 개체로부터 분리된 샘플을 해리시킨 뒤, 통상의 방법에 따라 자기 활성 세포 분류법(Magnetic activated cell sorting; MACS) 또는 유세포 분석(Flow cytometry Analysis)을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명의 상기 샘플을 해리시키는 단계는 콜라게나제(Collagenase)를 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 본 발명의 상기 (b) 단계에서, 상기 유전자가 발현된 세포를 배양하는 단계는 우태아혈청, 성장인자 및 항생제가 포함된 세포 배양 배지를 이용하는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명의 상기 (c) 단계에서, 상기 오가노이드를 형성하는 단계는 B27 보충제, 조건 배지, 성장인자, N-아세틸시스테인 및 ALK 5(TGF β kinase/activin receptor-like kinase) 억제제가 포함된 세포 배양 배지를 이용하는 것일 수 있다.

[0058] 본 발명의 상기 "성장인자"는 세포의 성장에 필요한 물질로서, 예를 들면, VEGF(Vascular endothelial growth factor), HGF(Hepatocyte growth factor), IGF(Insulin-like growth factor), EGF(Epidermal growth factor), FGF(Fibroblast growth factor) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명의 상기 "조건 배지"는 Wnt3a 조건 배지, 노긴(noggin) 조건 배지 및 Rspo1 조건 배지로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상인 것일 수 있고, 예를 들면, Wnt3a 조건 배지, 노긴(noggin) 조건 배지 및 Rspo1 조건 배지를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들면, 40% Wnt3a 조건 배지, 10% 노긴 조건 배지, 10% Rspo1 조건 배지를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 상기 "세포 배양 배지"는 생체 외(In vitro)에서 세포주의 성장 및 유지를 위한 기본적인 성분이 포

함된 것으로서, 예를 들면, DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI-1640, DMEM/F10, DMEM/F12, ADMEM/F12, GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 등일 수 있고, 상기 (b) 단계의 세포 배양 배지는 RPMI-1640일 수 있고, 상기 (c) 단계의 세포 배양 배지는 ADMEM/F12일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명의 일 구체 예에서, 상기 (b) 단계에서, 상기 세포 배양 배지에는 10% 우태아 혈청, 20 ng/ml의 EGF(Epidermal growth factor) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명의 일 구체 예에서, 상기 (c) 단계에서, 상기 세포 배양 배지에는 1.5% B27 보충제, 40% Wnt3a 조건 배지, 10% 노킨 조건 배지, 10% Rspo1 조건 배지, 50 ng/ml EGF, 100 ng/ml FGF-10, 1.25 mM의 N-아세틸시스테인 및 5 μ M의 A8301(CAS no. CAS Number 909910-43-6)가 포함된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 본 발명의 상기 매트릭셀은 성장인자 감소 매트릭셀인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] (3) 신장 오가노이드

[0066] 본 발명의 다른 구현 예에서는 본 발명에 따른 상기 신장 오가노이드의 제조 방법에 의해 제조된 신장 오가노이드를 제공한다.

[0067] 본 발명의 상기 신장 오가노이드는 매우 뛰어난 줄기세포능을 갖는 Lrig1 또는 이를 암호화하는 유전자, 바람직하게는 Lrig1 및 Klf6 단백질 또는 이들을 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 조직유래 줄기세포를 이용하여 제조된 것으로서, 신장을 매우 효과적으로 구현하여 신장 손상 치료제를 효과적으로 스크리닝할 수 있을 뿐만 아니라, 직접 신장 손상에 사용되는 세포 치료제로서 사용될 수 있다.

[0068] 본 발명의 상기 신장 오가노이드에서, Lrig1 또는 Klf6 단백질 또는 이에 의해 암호화되는 유전자, 신장 오가노이드 및 제조 방법 등과 관련된 내용은 앞서 "1. 신장 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물" 및 "(1) 신장 오가노이드" 에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.

[0070] (4) 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

[0071] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 신장 오가노이드를 유효성분으로 포함하는 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0072] 본 발명의 상기 신장 오가노이드는 세포치료제로 사용되는 것일 수 있다.

[0073] 본 발명의 상기 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에서, Lrig1 단백질 또는 이에 의해 암호화되는 유전자, 약학 조성물, 예방, 치료, 신장 오가노이드 및 제조 방법 등과 관련된 내용은 앞서 "1. 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물" 및 "(1) 신장 오가노이드" 에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.

[0074] 본 발명의 상기 신장 오가노이드는 1×10^7 내지 1×10^8 , 1×10^8 내지 2×10^8 , 2×10^8 내지 4×10^8 , 4×10^8 내지 6×10^8 , 6×10^8 내지 8×10^8 , 8×10^8 내지 1×10^9 , 1×10^9 내지 2×10^9 , 2×10^9 내지 4×10^9 , 4×10^9 내지 1×10^{10} , 2×10^8 내지 6×10^8 , 6×10^8 내지 1×10^9 , 1×10^8 내지 2×10^8 , 2×10^8 내지 2×10^9 , 1×10^7 내지 1×10^8 , 1×10^8 내지 1×10^9 , 1×10^9 내지 1×10^{10} 또는 1×10^7 내지 1×10^9 개 중 어느 하나의 세포/kg의 투여량으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0076] 4. 검출용 조성물, 키트 및 검출 방법

[0077] (1) 신장 조직유래 줄기세포의 검출용 조성물

[0078] 본 발명의 다른 구현 예에서는 신장 조직유래 줄기세포 검출용 조성물을 제공한다.

[0079] 본 발명의 상기 검출용 조성물은 Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함한다.

[0080] 또한, 본 발명의 상기 검출용 조성물은 Klf6 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 체제를 더 포함할 수 있다.

[0081] 본 발명의 상기 검출용 조성물에서, Lrig1 또는 Klf6 단백질 및 신장 조직유래 줄기세포 등과 관련된 내용은 앞

서 "1 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물"에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.

- [0082] 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 생물학적 시료 내에 존재하는 DNA 또는 이에 의해 전사되는 mRNA의 발현 수준을 측정할 수 있는 것이라면 모두 포함될 수 있고, 예를 들면 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0083] 본 발명의 상기 "프라이머"란, 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.
- [0084] 본 발명의 상기 "프로브"란, 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 상기 "LNA(Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다. LNA 뉴클레오사이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고 뉴클레오티드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오티드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.
- [0086] 본 발명의 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로 이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오티드 염기의 서열 및 서브 유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.
- [0087] 본 발명의 상기 유전자의 정보는 상기 NCBI 접근 번호를 통해 확인 가능한 사이트에 의해 통상의 기술자가 쉽게 확인할 수 있으므로, 통상의 기술자가 도출된 유전자 서열을 바탕으로 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 용이하게 제작할 수 있다.
- [0088] 본 발명의 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 생물학적 시료 내에 존재하는 단백질의 양을 측정할 수 있는 것이라면 모두 포함될 수 있고, 예를 들면 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 압타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0089] 본 발명의 상기 "단백질"은 그 단백질 자체뿐만 아니라, 스플라이싱 및 가변 프로모터에 의해 생성되거나, 돌연변이 또는 다형성과 같은 유전적 변화로 인해 생성될 수 있는 단백질 이성체(Isoform) 또는 단백질 변이체(Variant)를 포함한다.
- [0090] 본 발명의 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 바이오마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법, 또는 파지 항체 라이브러리 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란,

적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 모두 포함하는 것을 의미한다.

[0091] 본 발명의 상기 "PNA"란, 인공적으로 합성된 DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. 상기 PNA는 본 발명의 기술분야에 널리 알려진 배경 기술을 참고하여 더욱 구체화할 수 있다.

[0092] 본 발명의 상기 "압타머"란, 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 압타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "Anartificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24): 142727(1998)]을 참고하여 구체화할 수 있다.

[0093] 본 발명의 상기 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA 및 압타머 등은 상기 NCBI 접근 번호를 통해 확인 가능한 사이트에 의해 확인 가능한 아미노산 서열을 바탕으로 통상의 기술자에 의해 용이하게 제작할 수 있다.

[0095] (2) 신장 조직유래 줄기세포의 검출용 키트

[0096] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 본 발명에 따른 상기 검출용 조성물을 포함하는 신장 조직유래 줄기세포의 검출용 키트를 제공한다.

[0097] 본 발명의 상기 키트에서, Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 신장 조직유래 줄기세포, 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제, 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제 등과 관련된 내용은 앞서 "1. 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물" 및 "(1) 신장 줄기세포의 검출용 조성물"에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.

[0098] 본 발명의 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0099] 본 발명의 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다.

[0100] 본 발명의 일 구체 예에서, 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 상기 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오티드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자(예를 들면, 하우스 키핑 유전자)의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0101] 본 발명의 다른 구체 예에서, 본 발명의 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자(예를 들면, 하우스 키핑 유전자) 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0102] 본 발명의 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 상기 ELISA 키트는 대조군(예를 들면, 하우스 키핑 단백질) 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0104] (3) 신장 조직유래 줄기세포의 검출 방법

[0105] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 신장 조직유래 줄기세포의 검출 방법을 제공한다.

[0106] 본 발명의 상기 검출 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함한다.

[0107] 또한, 본 발명의 상기 발현 수준을 측정하는 단계 시 상기 생물학적 시료로부터 Klf6 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 추가로 측정할 수 있다.

[0108] 본 발명의 상기 검출 방법에서, 신장 조직유래 줄기세포, Lrig1 또는 Klf6 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자 등과 관련된 내용은 앞서 "1. 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물" 및 "(1) 신장 줄기세포의 검출용 조성물"에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.

[0109] 본 발명의 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는 혈액, 소변(urine), 정액(semen), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell) 또는 세포 추출물(cell extract)을 포함할 수 있고, 예를 들면 신장 조직 또는 신장 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0110] 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나인 유전자의 발현 수준을 측정하는 체제를 이용하여, 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0111] 본 발명의 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 압타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나인 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 이용하여, 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatographyMass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 또는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0112] 본 발명의 상기 검출 방법에서 상기 Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 신장 조직유래 줄기세포로 검출하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0114] 5. 신장 조직유래 줄기세포의 분리 방법

[0115] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 신장 조직유래 줄기세포의 분리 방법을 제공한다.

[0116] 본 발명의 상기 분리 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 발현되는 세포를 분리하는 단계;를 포함한다.

[0117] 본 발명의 세포를 분리하는 단계 시 상기 세포는 Klf6 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 추가로 발현되는 것일 수 있다.

[0118] 본 발명의 상기 분리 방법에서, Lrig1 또는 Klf6 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 신장 조직유래 줄기세포, 생물학적 시료 등과 관련된 내용은 앞서 "1. 신장 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물", "(1) 신장 줄기세포의 검출용 조성물" 및 "(3) 신장 조직유래 줄기세포의 검출 방법"에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.

[0119] 본 발명의 상기 분리하는 단계는 자기 활성화 세포 분류법(Magnetic activated cell sorting; MACS) 또는 유세포 분석(Flow cytometry Analysis)을 통해 수행될 수 있다.

[0121] 6. 신장 조직유래 줄기세포를 배양하는 방법

[0122] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 신장 조직유래 줄기세포를 배양하는 방법을 제공한다.

- [0123] 본 발명의 상기 배양하는 방법은 Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 조직유래 줄기세포를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 신장 조직유래 줄기세포를 배양하는 단계;를 포함한다.
- [0124] 본 발명의 상기 분리하는 단계 시 상기 신장 조직유래 줄기세포는 Klf6 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 추가로 발현되는 것일 수 있다.
- [0125] 본 발명의 상기 분리 방법에서, Lrig1 또는 Klf6 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 신장 조직유래 줄기세포 등과 관련된 내용은 앞서 "1. 신장 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물"에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.
- [0126] 본 발명의 상기 배양하는 방법은 본 발명의 상기 5. 신장 조직유래 줄기세포를 분리하는 방법에 기재된 방법에 따라, 신장 조직유래 줄기세포를 분리한 뒤에 이를 배양, 예를 들면 시험관 내(In vitro)에서 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0127] 본 발명의 상기 배양하는 단계에서, "배양"이란, 세포의 임의의 시험관 내 배양을 의미한다. 본 발명의 배양은 세포 배양 배지를 이용할 수 있으며, 세포 배양 배지는 세포를 배양하는 환경에서 쓰는 모든 종류의 배지를 의미하고, 예를 들면, 아미노산, 에너지원으로서 적어도 하나의 탄수화물, 미량원소, 비타민, 염 및 가능한 추가 성분(예: 세포의 성장, 생산성, 또는 생산물의 품질에 영향을 미치기 위함)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0129] **7. 동물 모델의 제조 방법**
- [0130] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 신장 질환의 예방 또는 치료를 위한 세포치료제의 스크리닝용 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.
- [0131] 본 발명의 상기 동물 모델의 제조 방법은 목적하는 유전자가 CreERT2-LoxP 시스템에 의해 조건적으로 발현되는 동물에 신장 손상을 유도하는 단계; 및 상기 동물에 에스트로겐 길항제를 처리하여, 목적하는 유전자의 발현을 유도하는 단계;를 포함한다.
- [0132] 본 발명의 상기 동물 모델의 제조 방법에서, 신장 조직유래 줄기세포, 신장 질환, 세포치료제에 대한 내용은 앞서 "1. 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물"에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.
- [0133] 본 발명의 상기 "CreERT2-LoxP 시스템"은 프로모터 특이적으로 발현된 Cre-ERT2 폴리펩티드가 두개의 LoxP 뉴클레오티드 서열을 인식하고, 두 개의 LoxP 뉴클레오티드 서열 사이를 부위 특이적 재조합을 촉매하여, 상기 LoxP 뉴클레오티드 하류의 유전자를 특이적으로 발현시키는 시스템을 말한다. 이와 같은 시스템의 구축 방법은 Lab Anim Res. 2018 Dec; 34(4): 147-159. 등에 기재된 내용에 따라 통상의 기술자가 쉽게 구축할 수 있다.
- [0134] 본 발명의 상기 "목적하는 유전자"는 세포치료제로 사용될 수 있는 가능성이 있는 세포에서 특이적으로 발현되거나, 또는 발현될 것으로 예상되는 유전자로서, 본 발명의 목적상 Lrig1을 암호화하는 유전자, 바람직하게는 Lrig1을 암호화하는 유전자 및 Klf6를 암호화하는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0135] 본 발명의 상기 "동물 모델"은 사람의 질병 등과 매우 유사한 형태를 나타낼 수 있는 동물을 의미한다. 이러한 동물 모델을 이용하는 경우에는 다양한 질병의 원인과 발병과정 등을 연구할 수 있으며, 치료제 선별, 독성 검사 등과 같은 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다.
- [0136] 본 발명의 상기 동물은 인간을 제외한 임의의 포유류 동물을 의미하며, 배아, 태아, 신생아, 성인을 포함하는 모든 연령의 동물을 포함한다. 이와 같은 동물은 토끼, 설치류(생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 또는 기니피그), 소, 양, 돼지, 염소, 말, 개, 고양이, 새(닭, 칠면조, 오리, 거위) 및 영장류(침팬지, 원숭이, 붉은털 원숭이)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0137] 본 발명의 상기 신장 손상을 유도하는 단계는 염산의 복강내 투여; 허혈/재관류 손상을 유도; 및 일측성 요관 폐쇄 유도로 구성된 방법 중 어느 하나를 수행하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0138] 본 발명의 상기 염산은 100 mg/kg 내지 300 mg/kg으로 복강내 투여되는 것일 수 있고, 예를 들면, 150 mg/kg 또는 250 mg/kg으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 염산의 투여 용량이 100 mg/kg 미만인 경우에는 신장에 급성 신장 손상이 유도되지 않을 수 있고, 300 mg/kg 초과인 경우에는 동물 모델에 독성이 존재하여 목적하는 실험 결과의 해석에 영향을 미치거나, 또는 동물 모델이 사망할 수 있다.

[0139] 본 발명의 상기 에스트로겐 길항제는 타목시펜, 4-히드록시타목시펜, 클로미펜(Clomifene), 라록시펜(Raloxifene), 또는 이들의 조합인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0141] **8. 동물 모델**

[0142] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 본 발명의 상기 제조 방법에 의해 제조된 신장 질환의 예방 또는 치료를 위한 세포치료제 스크리닝용 동물 모델을 제공한다.

[0143] 본 발명의 상기 동물 모델에서, 제조 방법, 세포치료제, 신장 질환 등과 관련된 내용은 앞서 "1. 신장 조직유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물" 및 "6. 동물 모델의 제조 방법"에 기재된 바와 동일하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0144] 본 발명에 따른 신장 조직유래 줄기세포; 또는 오가노이드는 치료를 위한 기술이 용이하고, 높은 자가 증식능으로 대량 공급이 가능하며, 신장 세포로 분화능이 뛰어나고, 종양 형성의 가능성이 낮을 뿐만 아니라, 병변에 직접 주입되는 경우 손상된 조직을 재생하는 능력이 매우 탁월하다. 따라서, 이와 같은 줄기세포 중에서, 특히 성체줄기세포 기반 재생치료에 매우 적합하게 사용될 수 있다.

[0145] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 신장 세포 중에서 특히 신장 줄기세포만을 특이적으로 선별해낼 수 있다. 나아가, Lrig1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 발현하는 신장 줄기세포는 재생능력 및 다능성이 매우 뛰어나고, 네프론으로 분열할 수 있는 능력을 가지고 있으므로 신장 질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0146] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 생체 내 계통 추적 연구에서 사용되는 생쥐 동물 모델을 이용한 실험 프로세스 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 생체 내 계통 추적 연구에서 사용되는 배아 상태의 생쥐 동물 모델을 이용한 실험 프로세스 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 고용량(250 mg/kg) 엽산 유도 급성 신장 손상 동물 모델의 제조 방법에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 고용량(150 mg/kg) 엽산 유도 급성 신장 손상 동물 모델에 본 발명에 따른 신장 오가노이드를 이식한 뒤, 분석 과정에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 허혈/재관류 손상 유도 급성 신장 손상 동물 모델의 제조 방법에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 일측성 요관 폐쇄 유도 급성 신장 손상 동물 모델의 제조 방법에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 생쥐의 신장에서 tdTomato+ 세포(Lrig1tdT+)의 존재 여부를 조직 염색 결과를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 생쥐의 신장에서 tdTomato+ 세포(Lrig1tdT+)의 수를 정량화한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 발생 단계의 생쥐에서 tdTomato+ 세포(Lrig1tdT+)의 존재 여부를 조직 염색 결과를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 발생 단계의 생쥐에서 tdTomato+ 세포(Lrig1tdT+)의 수를 정량화한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드를 형광 현미경을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드에서 발현되는 유전자의 발현 수준을 실시간 중합효소연쇄반응을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드를 1일에서 19일까지 장기간 배양하였을 때, 신장 오가노이드 수가 증가되는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 고용량(150 mg/kr) 엽산 유도 급성 신장 손상 동물 모델에 PBS 또는 본 발명에 따른 신장 오가노이드를 이식하고 신장 복구 존재 여부를 확인하기 위하여, 조직 염색 및 KIM1의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 고용량(150 mg/kr) 엽산 유도 급성 신장 손상 동물 모델에 PBS 또는 본 발명에 따른 신장 오가노이드를 이식하고 신장 복구 존재 여부를 확인하기 위하여, 혈중 BUN 및 크레아틴 농도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드에서 Ki-67의 발현을 형광 현미경으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드에서 근위세뇨관(PT) 클러스터를 PT^{S1} , PT^{S2} , PT^{S3} 및 PT^{QPs} 의 4개의 서브-클러스터로 분류한 것을 나타내었다.

도 18 및 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드에서 PT^{S1} , PT^{S2} , PT^{S3} 및 PT^{QPs} 의 클러스터 별 유전자의 발현 수준을 확인한 결과를 버블-플롯으로 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드를 이식한 뒤 Cre-loxp 유도 후 1일째와 365일째에서 PT^{S1} , PT^{S2} , PT^{S3} 및 PT^{QPs} 클러스터 세포의 비율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드를 이식한 뒤 Cre-loxp 유도 후 1일째 대비 365일째에서 PT^{S1} , PT^{S2} , PT^{S3} 및 PT^{QPs} 클러스터 세포 수의 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드에서 PT^{S1} , PT^{S2} , PT^{S3} 및 PT^{QPs} 각 클러스터 별 자기-재생 관련 유전자, 정지(quiescence) 관련 유전자, 및 다능성/미성숙 세포 관련 유전자의 발현 수준을 확인한 결과를 바이올린-플롯으로 나타낸 것이다.

도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드에서 PT^{S3} 및 PT^{QPs} 클러스터에서 높게 발현되는 상위 10개의 유전자를 나타낸 것이다.

도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드를 이식한 뒤 Cre-loxp 유도 후 1일째와 365일째 신장 절편에서 LTL(PT 마커) 및 KLF6를 염색한 면역 형광 염색 사진을 나타낸 것이다.

도 25는 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드를 이식한 뒤 Cre-loxp 유도 후 1일째와 365일째 신장 절편에서 20X 필드(field) 당 LTL+KLF6+ 세포를 정량화한 결과를 나타낸 것이다(N=3, 24개의 이미지).

도 26은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드를 이식한 뒤 Cre-loxp 유도 후 1일째와 365일째에서 각 클러스터별 tdTomato+ 세포의 비율을 나타낸 것이다.

도 27은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드의 근위세뇨관(PT)에서 슈도타임(pseudotime) 계통을 3개의 상이한 상태로 구분한 것으로, PT^{S1} , PT^{S3} 및 PT^{QPs} 클러스터는 각각 상이한 색깔로 나타내었다. 흑색 화살표는 슈도타임의 방향을 나타내었다.

도 28은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드를 이식한 뒤 Cre-loxp 유도 후 1일째와 365일째에서 tdTomato+ 세포를 계통 그래프에 플로팅하고, 발현 수준을 색으로 구분한 결과를 나타낸 것이다. 여기서, 저발현은 회색, 고발현은 적색으로 나타내었다.

도 29는 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드를 이식한 뒤 Cre-loxp 유도 후 1일째와 365일째의 신장 절편을 Lrig1tdTomato+ 및 KLF6 염색한 면역 형광 염색 사진을 나타낸 것이다.

도 30은 본 발명의 일 실시예에 따른 신장 오가노이드를 이식한 뒤 Cre-loxp 유도 후 1일째와 365일째 신장 절편에 있어서 20X 필드(field) 당 Lrig1tdTomato+KLF6+ 세포를 정량화한 결과를 나타낸 것이다(N=5, 42개의 이미지).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0147] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0149] **실시예**
- [0151] **[실험 방법]**
- [0153] **[실험 방법 1] 실험 동물**
- [0154] 본 명세서에서 수행된 모든 생체 내(*In vivo*) 실험은 연세대학교 동물윤리심의위원회(IACUC 2017-0325)의 승인을 받아 수행되었다.
- [0155] 광암 주기 12시간 교대 하에서, 특정 병원체가 없는(Specific pathogen-free; SPF) 장벽 시설에 실험 동물을 수용하고, 피코랩 랩 설치류 다이어트 20(PicoLab Lab Rodent Diet 20, LabDiet, St. Louis, MO, 미국) 사료를 공급하는 방식으로 실험 동물을 사육하였다.
- [0156] 생체 내(*In vivo*) 실험에서 사용된 실험 동물의 경우, 1) $Lrig1^{CreERT2/+}$ 는 벤터빌트 대학의 로버트 J. 코피(Robert J. Coffey)로부터 제공받았고, 2) $B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)/Hze}/J(R26R-LSL-tdTomato; The Jackson Laboratory, 007914)$ 는 연세대학교 복진웅 교수로부터 제공받았으며, 3) $B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato-EGFP)Luo}/J(ACTB-mT/mG; The Jackson Laboratory, 007676)$ 는 연세대학교 기현웅 교수로부터 제공받았다.
- [0158] **[실험 방법 2] 생체 내 계통 추적 연구 방법**
- [0159] 도 1에 도시된 바와 같이, 상기 실험 방법 1의 동형의 리포터 마우스인 $Lrig1^{CreERT2/+}$ 생쥐 및 R26R-LSL-tdTomato 생쥐를 교배시켜 이형의 생쥐를 생산하였다. 상기 생쥐에 옥수수 오일에 포함된 타목시펜(Sigma-Aldrich) 2 mg을 3일 연속으로 복강내에 주입하여 Cre-loxp 재조합 유도한 뒤, 1일, 3일, 10일, 30일, 60일, 90일, 180일 또는 365일째에 분석을 수행하였다.
- [0160] 또한, 도 2에 도시된 바와 같이, 동형의 리포터 마우스인 $Lrig1^{CreERT2/+}$ 생쥐 및 R26R-LSL-tdTomato 생쥐를 교배시켜 발생된지 E9.5, E10.5, E13.5 및 E18.5 배아에. 옥수수 오일에 포함된 4-히드록시타목시펜(Sigma-Aldrich) 2 mg을 한번 주입하고, 산후 6주에 분석을 수행하였다.
- [0162] **[실험 방법 3] 생체 외(*In vitro*) 2D 및 오가노이드 배양 방법**
- [0163] 2D 및 오가노이드 배양을 위하여, $Lrig1^{CreERT2/+}$ 생쥐 및 R26R-ACTB-mT/mG 생쥐를 교배시켜 생산된 동형의 리포터 생쥐를 6주 내지 10주 사육한 뒤, 일차 신장 상피세포를 채취하였다. 상기 채취된 일차 신장 상피세포에 2 mg/ml의 1형 콜라게나제를 넣고, 37 °C에서 30분 동안 부드럽게 교반하면서 배양하였다. 그런 다음, 필터를 이용하여 상기 일차 신장 상피세포를 거른 뒤에 분리된 단일 세포들을 배양하였다. 이후, $Lrig1$ 단백질이 발현된 세포를 RPMI 1640(10% 우태아혈청(Fetal bovine serum; FBS), 20 ng/ml의 EGF, 1% 페니실린-스트렙토마이신 포함) 배지에 넣고, 5% CO₂ 및 37 °C 조건에서 컨플루언스(Confluence)가 80%가 될 정도인 7일 내지 8일 동안 배양하였다. 이후, 성장인자 감소 매트릭셀 및 배양 배지가 포함되어 있는 웰에 1×10^3 수의 상기 배양된 세포를 분주하고 배양하였다. 여기서, 상기 배양 배지는 1% 페니실린-스트렙토마이신, 헵스(HEPS) 및 글루타맥스가 포함된 ADMEM/F12 배양 배지를 기초로하여, 1.5% B27 보충제, 40% Wnt3a 조건 배지(produced using stably transfected L cells), 10% noggin 조건 배지, 10% Rspo1 조건 배지, 50 ng/ml의 EGF, 100 ng/mL의 FGF-10, 1.25 mM의 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine) 및 5 μM의 A8301(CAS no. CAS Number 909910-43-6)가 포함된 것을 사용하였다.
- [0164] 매트릭셀에서 상기 세포가 충분히 폴리머리제이션(Polymerizaion)되도록 한 이후, 오가노이드 배양 배지를 추가하였으며, 오가노이드 배양 배지는 3일마다 교체해 주었다.
- [0166] **[실험 방법 4] 급성 신장 손상 동물 모델 제작**
- [0167] **[4-1] 고용량 염산 유도 급성 신장 손상 동물 모델 제작**

- [0168] 도 3에 도시된 바와 같이, 성인(8 내지 10주령) Lrig1-CreER^{T2};LSL-tdTomato 생쥐에 상기 실험 방법 2에 기재된 바와 같이, 타목시펜을 주입하는 과정을 통해 Lrig1 단백질이 발현될 수 있도록 하였다. 이후, 급성 신장 손상을 위하여 250 mg/kg의 엽산(Folic acid; FA)을 복강내에 주입하였다.
- [0169] 또한, 도 4에 도시된 바와 같이, C57BL/6 생쥐에 150 mg/kg의 엽산을 복강내에 주입하여 급성신장손상을 유도하고, 엽산을 주입한지 3일 후에 상기 실험 방법 3에서 제작한 신장 오가노이드를 직접 이식하는 방식으로 이식하였다. 구체적으로, 이소플루란을 이용하여 상기 급성신장손상이 유도된 C57BL/6 생쥐(n=3)를 마취하고, 옆구리를 절개하여 신장을 외부로 노출시켰다. 그런 다음, 대조군인 PBS 또는 상기 실험 방법 3에서 제작된 신장 오가노이드 대략 40개를 상기 신장의 피질 부위에 최소 15회 이상 직접 주입하였다. 이후, 분석을 위해 11일 동안 생쥐를 사육하였다. 이후, 14일 후에 생쥐로부터 혈장 크레아티닌(Creatinine) 및 BUN의 수치를 측정하기 위하여 혈액 샘플을 채취하였다.
- [0171] **[4-2] 허혈/재관류 손상 유도 급성 신장 손상 동물 모델 제작**
- [0172] 도 5에 도시된 바와 같이, 성인(8 내지 10 주령) Lrig1-CreER^{T2};LSL-tdTomato 생쥐에 상기 실험 방법 2에 기재된 바와 같이, 타목시펜을 주입하는 과정을 통해 Lrig1 단백질이 발현될 수 있도록 하였다. 이후, 상기 생쥐의 신동맥을 겸자로 20분 동안 폐쇄하는 과정을 통해 급성 신장 손상을 유도하였다. 3일 후, 상기 생쥐의 신장 조직을 채취하여 확인한 결과, 급성 신장 손상이 유도된 것을 확인할 수 있었다.
- [0174] **[4-3] 일측성 요관 폐쇄 유도 급성 신장 손상 동물 모델 제작**
- [0175] 도 6에 도시된 바와 같이, 성인(8 내지 10 주령) Lrig1-CreER^{T2};LSL-tdTomato 생쥐에 상기 실험 방법 2에 기재된 바와 같이, 타목시펜을 주입하는 과정을 통해 Lrig1 단백질이 발현될 수 있도록 하였다. 이후, 요관을 겸자로 7일 동안 폐쇄하는 과정을 통해 급성 신장 손상을 유도하였다. 7일 후, 상기 생쥐의 신장 조직을 채취하여 확인한 결과, 급성 신장 손상이 유도된 것을 확인할 수 있었다.
- [0177] **[실험 결과]**
- [0179] **[실험 결과 1] 생쥐의 신장에서 Lrig1-tdTomato 자손의 타목시펜 유도에 의한 혈통 분석**
- [0180] 신장에서 Lrig1을 발현하는 세포와 그들의 자손의 행동양식을 분석하기 위해, R26R-LSL-tdTomato 생쥐 모델을 이용하여 계통 추적 분석을 수행하였다.
- [0181] 도 7에서 보는 바와 같이, 첫째 날에는 코르텍스(Cortex)에서 매우 적은 수준의 tdTomato+ 세포가 관찰된 반면, 365일째에는 Lrig1을 발현하는 세포 의해 유도된 자손 세포들은 전체 신장에서 관 구조의 12(±2.4)%를 생성하는 것으로 확인되었다.
- [0182] 도 8에서 보는 바와 같이, 날짜에 따라 Lrig1을 발현하는 세포의 수(Lrig1^{tdT+})를 정량화하였을 때, 이와 같은 세포 클론은 시기가 지속됨에 따라 순차적으로 함께 증가되었으며, 이와 같은 증가는 Lrig1 발현 후 365일까지 지속되었다.
- [0183] 도 9 및 도 10에서 보는 바와 같이, 수포관 버드 가지 단계(Ureteric bud branching stage)인 E9.5 및 E10.5에서는 tdTomato+ 세포(Lrig1^{tdT+})가 관찰되지 않았다. 그러나, 네프로제네시스 단계(Nephrogenesis stage)인 E13.5에서는 tdTomato+ 세포가 관찰되었으며, 대부분의 세포는 튜브 구조를 형성하도록 확장되어 있었다.
- [0184] 이와 같은 결과를 통해, Lrig1이 초기에서 성숙된 신장으로 발달한 이후 네프론 분열을 생성하는데 관여하는 줄기세포 집단임을 알 수 있다.
- [0186] **[실험 결과 2] 고농도 엽산에 의해 유도된 급성 신장 손상 동물 모델에서 신장 오가노이드 직교이식을 통한 치료 효과 확인**
- [0187] 도 11에서 보는 바와 같이, 상기 실험 방법 3에 기재된 방법에 의해 제작된 신장 오가노이드를 형광현미경을 이용하여 분석한 결과, 신장 오가노이드를 배양한지 7일째 및 9일째에서 초록색의 Lrig1 세포가 다수 관찰되었다.
- [0188] 또한, 도 12에서 보는 바와 같이, 신장 오가노이드를 배양한지 17일째에서 유전자 발현 수준을 통상의 방법에 따라 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 실시간 증합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 수행하여 확인하였을 때, Lrig1의 발현 수준 뿐만 아니라, Sall1, Six2, Foxo1, Cited, Osr1, Hoxp7, Jagged1 및 Gata3과 같은 신장 줄기세포의 유전자의 발현 수준 역시 함께 증가되어 있는 것을 확인하였다. 나아가, 도 13에서 보는 바와 같이,

Lrig1 양성인 신장 오가노이드의 경우에는 생성되는 오가노이드 수가 9일째부터 19일째까지 약 40개 이상의 수로 증가되었다.

표 1

[0189]

서열번호	유전자	특징	염기 서열
서열번호 3	mLrig1	정방향	GGTGAGCCTGGCCTTATGTGAATA
서열번호 4		역방향	CACCACCATCCTGCACCTCC
서열번호 5	Osr1	정방향	TACTCTTTCCTTCAGGCAGTGA
서열번호 6		역방향	GATCGAGGCAAGTGCATGG
서열번호 7	Six2	정방향	CACCTCCACAAGAATGAAAGCG
서열번호 8		역방향	CTCCGCCTCGATGTAGTGC
서열번호 9	1	정방향	AACCTTGAGTGAAGGATCGC
서열번호 10		역방향	GTAGGAGAGCCTATTGGAGATGT
서열번호 11	Sal11	정방향	CTCAACATTTCCAATCCGACCC
서열번호 12		역방향	GGCATCCTTGCTCTTAGTGGG
서열번호 13	WT1	정방향	GAGAGCCAGCCTACCATCC
서열번호 14		역방향	GGGTCCTCGTGTTTGAAGGAA
서열번호 15	Hoxb1	정방향	AAGTTCGGTTTTCGCTCCAGG
서열번호 16		역방향	ACACCCCGGAGAGGTTCTG
서열번호 17	Gata3	정방향	CTCGGCCATTTCGTACATGGAA
서열번호 18		역방향	GGATACCTCTGCACCGTAGC
서열번호 19	cRet	정방향	GCGTCAGGGAGATGGTAAAG
서열번호 20		역방향	CATCAGGGAAACAGTTGCAG
서열번호 21	Foxd1	정방향	CGCTAAGAATCCGCTGGTGAAG
서열번호 22		역방향	GGATCTTGACGAAGCAGTCGTT
서열번호 23	Jagged1	정방향	CCTCGGGTCAGTTTGAGCTG
서열번호 24		역방향	CCTTGAGGCACACTTTGAAGTA

[0190]

도 14에서 보는 바와 같이, 상기 실험 방법 4의 [4-1]에 기재된 고농도 염산에 의해 유도된 급성 신장 손상 동물 모델에 PBS(FA+PBS) 또는 신장 오가노이드(FA+Organoid)를 실험 방법 5에 따라 신장에 직접 주입하고, 14일 후에 통상의 방법에 따라 H&E 염색을 수행하였다. 그 결과, PBS만을 주입한 경우(FA+PBS)에는 고농도 염산에 의해 손상된 신장이 복구되지 않으며, KIM1의 발현 수준이 높은 반면, 신장 오가노이드를 주입한 경우에는 고농도 염산에 의해 손상된 신장이 복구되며, KIM1의 발현 수준이 감소되었다. 이와 같은 결과를 통해 신장 오가노이드의 주입은 손상된 신장을 매우 효과적으로 복구시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0191]

또한, 도 15에서 보는 바와 같이, 고농도 염산(FA)만을 처리한 경우 및 고농도 염산을 처리하고 PBS를 주입한 경우(FA+PBS)에는 혈중 BUN 및 크레아틴(Creatine)이 존재하는 수준이 매우 높은 반면, 신장 오가노이드를 주입한 경우에는 BUN 및 크레아틴이 존재하는 수준이 정상(Normal)과 유사한 정도로 감소되었다. 이와 같은 결과를 통해, Lrig1 양성 신장 오가노이드는 손상된 신장의 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있음을 직접적으로 알 수 있다.

[0192]

또한 도 16에서 보는 바와 같이, 형광 현미경을 통해 확인한 결과, 면역형광염색을 통하여 신장 내 주입된 오가노이드를 확인하였으며, Ki-67과 같은 증식 마커가 발현되는 것을 볼 수 있었는 바, 신장 내 주입된 오가노이드는 증식성이 있음이 확인되었다.

[0194]

[실험 결과 3] Lrig1 및 그 자손 세포들의 성인 신장에서 줄기세포 니체 형성 효과

[0195]

앞선 실험 결과를 통해, Lrig1 양성 세포는 근위세뇨관(proximal tubule; PT)에서 장기간 생존하며 잠재적인 신장 줄기/전구 세포에 해당하며, 상기 Lrig1 양성 세포 유래의 자손 세포들(descendants)이 PT 항상성을 유지하는 데에 실질적으로 공헌을 하는 것을 알 수 있었다. PT에서 Lrig1+ 세포와 그 유래 세포의 세포적 이질성을 확인하기 위하여, 도 17에서 보는 바와 같이, PT 클러스터를 PT^{S1}, PT^{S2}, PT^{S3} 및 PT^{OPs}의 4개의 서브-클러스터로 분류하였다. 이때, PT^{S1}의 분류를 위하여 Slc5a12 및 Slc5a2 마커, PT^{S2} 분류를 위하여 Slc13a3 및 Ddah1 마커, PT^{S3} 분류를 위하여 Slc16a9 및 Slc7a13 마커를 이용하였다. 그리고, 도 18에서 보는 바와 같이, 급성 신장 손상 상태에서 상향 조절되는 피루베이트 디하이드로제네이스 신장 4(Pyruvate dehydrogenase kidney 4; Pdk4)

및 시스테인-풍부 단백질(Cystein-rich protein 61; Cyr61)이 풍부하게 발현하는 서브-클러스터인 PT^{QPs}를 발견하였다. 보다 구체적으로 정의하고자, PT^{QPs}를 다른 PT 서브-클러스터와 비교하였다. PT^{QPs}에서 발현되는 상위 50개 유전자의 발현 수준을 확인한 결과, 도 19에서 보는 바와 같이, PT^{QPs}에서는 신장 손상 및 회복 관련 유전자가 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었고, 2 네프론 전구체 유전자(2 nephron progenitor genes) 또한 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 각 PT 서브-클러스터에서 세포 수를 측정된 결과, 도 20에서 보는 바와 같이, Cre-loxp 재조합 후 365일째에서는 PT^{S2} 및 PT^{QPs} 세포 수가 증가하였다. 또한, 도 21에서 보는 바와 같이, Cre-loxp 재조합 후 365일째 신장에서 PT^{QPs} 클러스터 세포 수가 1일째 신장에서와 비교하여 5배 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 PT 세포는 시간이 경과함에 따라 증가하며, 특히 PT^{QPs} 및 PT^{S2} 클러스터 세포 수가 증가하는 것을 알 수 있었다. 다음으로, 성인 줄기세포 유전자 모듈을 사용하여 신장의 PT^{QPs} 클러스터를 정의하였다. 그 결과, DEGs에서 총 650 개의 유전자를 검출하였다. 도 22에서 보는 바와 같이, PT^{QPs} 클러스터에서 줄기-관련 유전자가 높게 발현되었고, 자기-재생 관련 유전자(Klf5는 제외하고, Ptbpl, Ncl, Ctr9 및 Cited2), 정지(quiescence) 관련 유전자(Hif1a, Myc, 및 Foxo3), 그리고 다능성 또는 미성숙 세포 관련 유전자(Id2, Btg2, Tubb6, 및 Klf2)가 상향 조절된 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 PT^{QPs} 클러스터는 신장 손상-회복 관련 유전자와 성숙 PT 세포의 마커를 포함하여 줄기성 관련 유전자가 발현되는 것을 알 수 있었고, 이러한 결과로부터 해당 클러스터를 "PT 정지 전구체(PT quiescent progenitors; PTQPs)"로 명명한 것이다.

[0196] 다음으로, PT^{S3}와 구별되는 PT^{QPs} 마커를 확인한 결과, 도 23에서 보는 바와 같이, DEGs에서 높게 발현되는 줄기 세포 니체로 알려진 유전자들을 확인할 수 있었다. PT^{S3} 클러스터에서는 PT 세그먼트 3(PT segment 3) 특이적 유전자가 높게 발현된 반면, PT^{QPs}에서는 높게 발현되지 않았다. PT^{QPs} 마커를 검증하기 위하여, Jun, Klf6 및 Cyr61을 이용하여 신장 절편을 IF 염색하였다. Jun 및 Cyr61은 PT 뿐만 아니라 다양한 네프론 절편에서 높게 발현되어, 이들을 제외하였다. 다음으로, PT에서 발현되는 지 확인하기 위하여 1일째 및 365일째 신장 절편에서 KLF6 및 LTL를 염색하였다. 도 24에서 보는 바와 같이, 1일째 신장 절편에서 Klf6+LTL+ PT 튜블이 약하게 발현된 반면, 365일째 신장 절편에서는 Klf6+LTL+ PT 튜블이 강하게 발현되었다. 정량화 결과, 도 25에서 보는 바와 같이, KLF6+ 발현 PT 튜블은 365일째 신장에서 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 365일째 신장에서 PTQPs 분포의 증가는 Klf6를 이용하여 확인할 수 있음을 알 수 있었다.

[0197] Lrig1 양성 세포로부터 유래된 자손 세포들이 PT^{QPs} 집단을 이루는 지 확인하기 위하여, 1일째 및 365일째 신장 절편에서 tdTomato 발현 세포를 확인하였다. 그 결과, 도 26에서 보는 바와 같이, 1일째 신장 절편에서는 tdTomato+ 세포는 PT^{S1} 세포의 54%, PT^{S3}의 27%를 이루었으나, 365일째 신장 절편에서는 각각 50% 및 11%로 감소하였다. 반면, 1일째 신장 절편에서 PT^{S2} 세포의 12%, PT^{QPs} 세포의 17.8%를 이루었으나, 365일째에서는 각각 20% 및 18%로 증가하였다. 이로부터 Lrig1 양성 세포로부터 유래된 자손 세포들이 PT^{QPs} 세포 집단을 이루는 것을 알 수 있었다. 또한, 단일 세포에서의 정보를 통해 분화로의 진행을 보이는 세포 동선(trajecory)을 분석하였다. 동선의 초기 단계에서는 PT 줄기 세포 니체로 알려진 PT^{S3}와 새로운 줄기 세포 니체로 밝혀진 PT^{QPs}에 해당하였다. 이러한 세포군 집단은 PT^{S1}으로의 두개의 구분되는 동선으로 나뉘어 질 수 있는데(도 27), 1일째 신장에서는 PT^{S3}가 우세하였다가 PT^{S1} 클러스터로 분화하는 양상을 보였고, 365일째에서는 PT^{QPs} 클러스터가 주로 PT^{S1} 클러스터 세포 항상성을 수행하는 것을 볼 수 있었다. 1일째 및 365일째에서 PT^{S3} 및 PT^{QPs}와 tdTomato-발현 세포를 얼라인해 본 결과, 도 28에서 보는 바와 같이 1일째에서는 PT^{S3} 클러스터에서 tdTomato 발현 세포는 PT^{S1}으로 분화되는 것을 확인할 수 있었고, 365일째에서는 PT^{QPs} 클러스터에서 tdTomato 발현 세포는 주로 PT^{S1}를 유지시키는 것을 알 수 있었다. Klf6 및 tdTomato+ 세포를 염색하면, 도 29 및 30에서 보는 바와 같이, 1일째와 비교하여 365일째에서 Klf6+tdTomato+ 튜블이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 Lrig1 양성 세포 및 이로부터 유래한 자손 세포들이 PT^{QPs} 클러스터를 이루는 것을 알 수 있었다. 실험 조건에서도 1일째 신장은 6주령 마우스로부터 취하였으나, 365일째 신장은 13개월령의 마우스로부터 취하였다. 앞선 실험 결과로부터 신장 항상성은 젊은 신장(1일째 신장)에서는 PT^{S3}에 의해 조절되며, 그리고 노화된 신장(365일째 신장)에서는 PT^{QPs}가

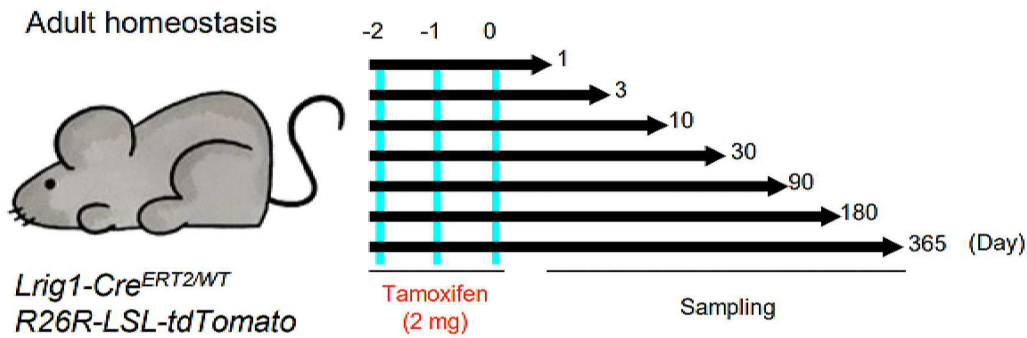
새로운 줄기 세포 니체를 보이는 것을 알 수 있었다.

[0199]

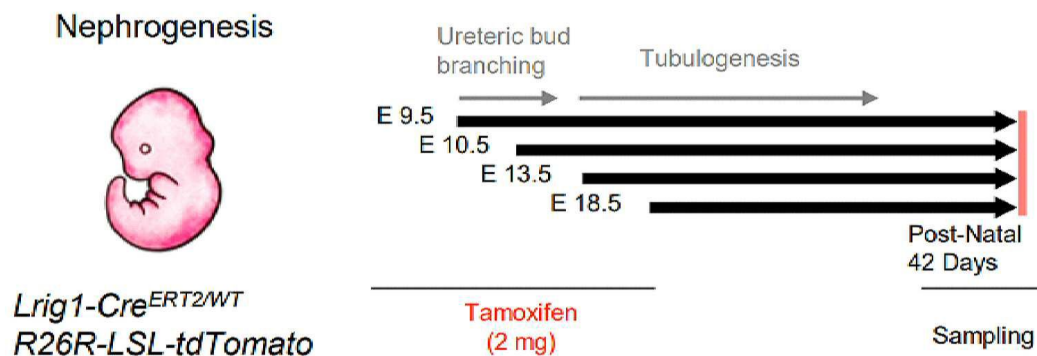
이상에서 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

도면

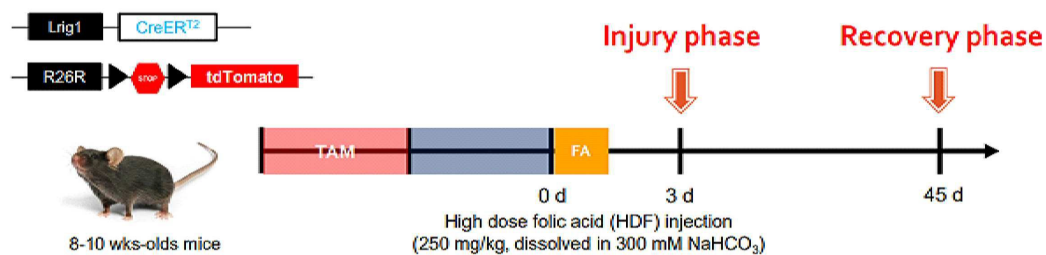
도면1



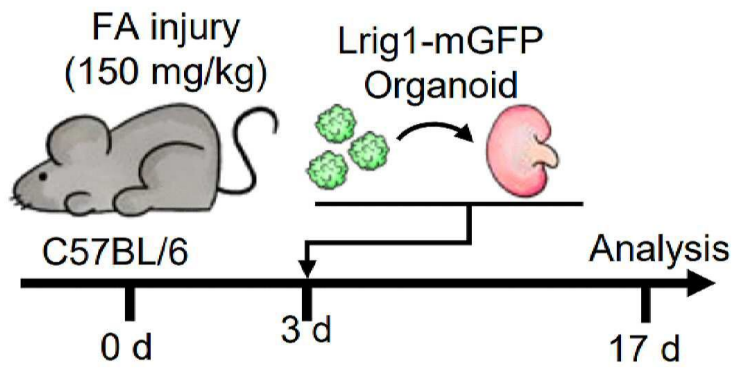
도면2



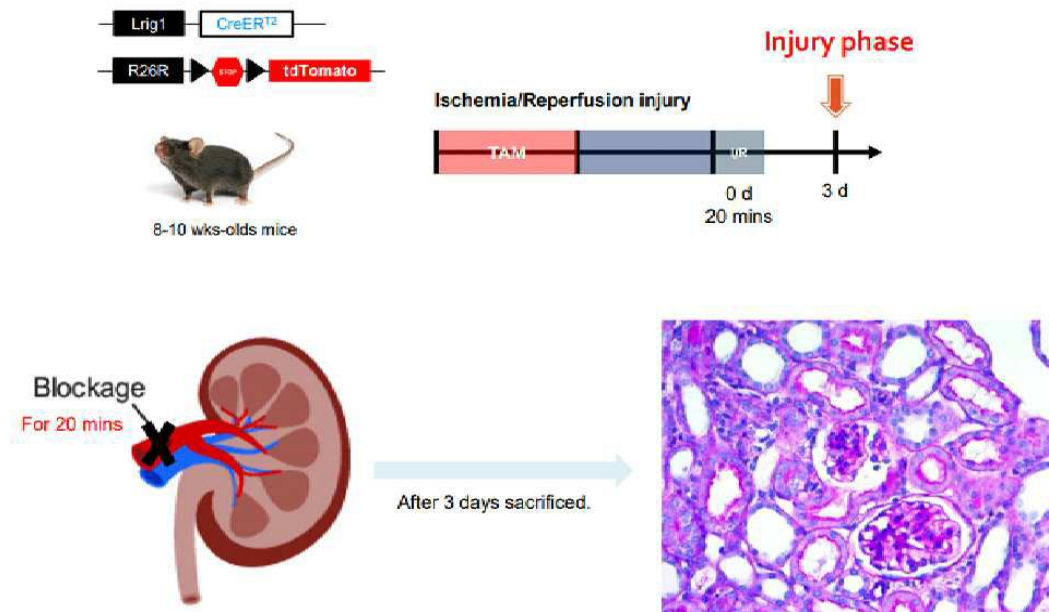
도면3



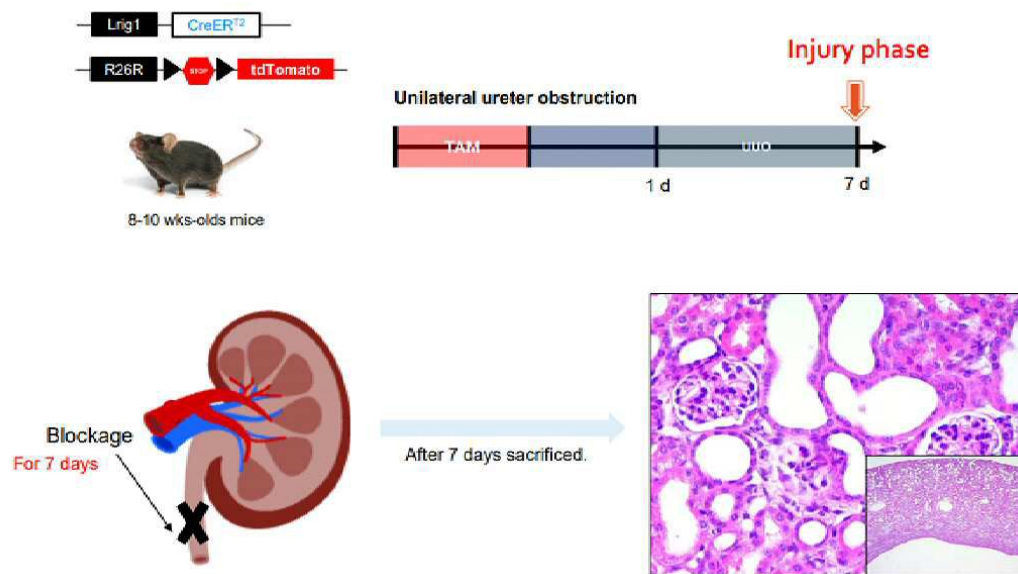
도면4



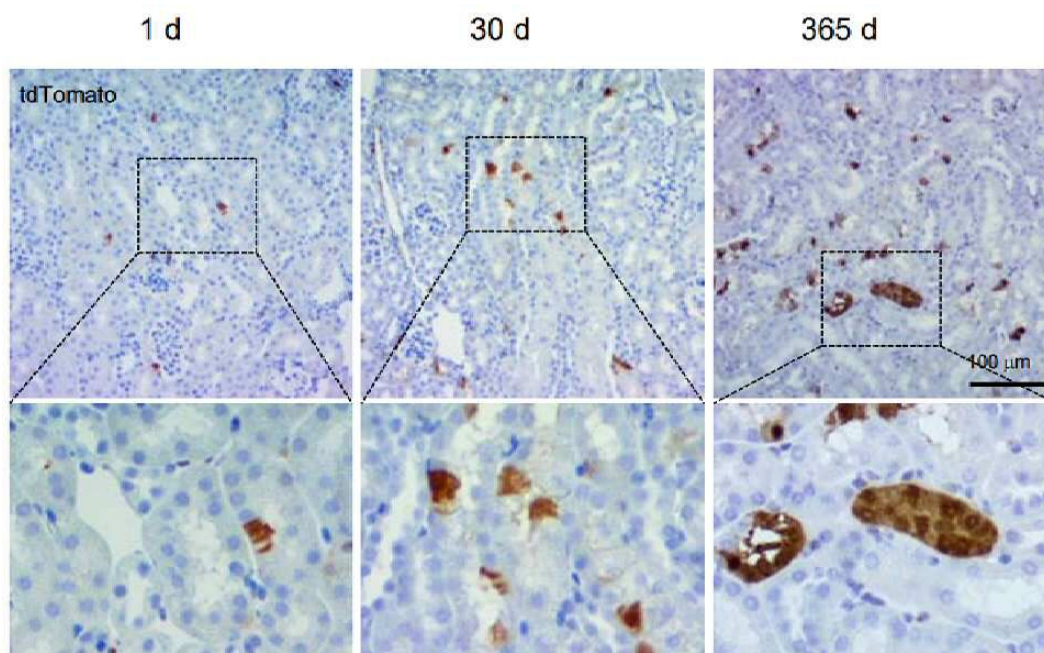
도면5



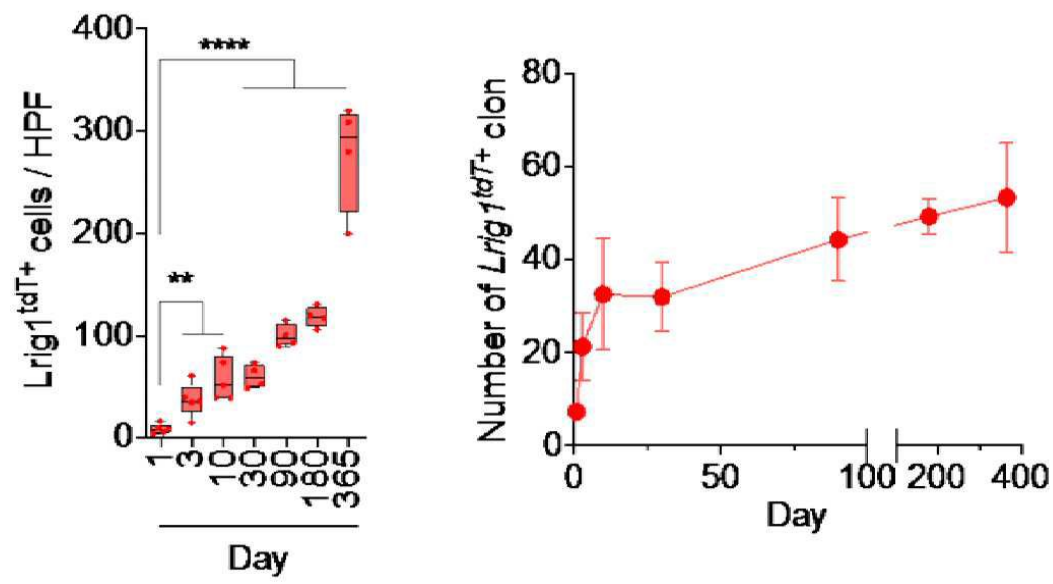
도면6



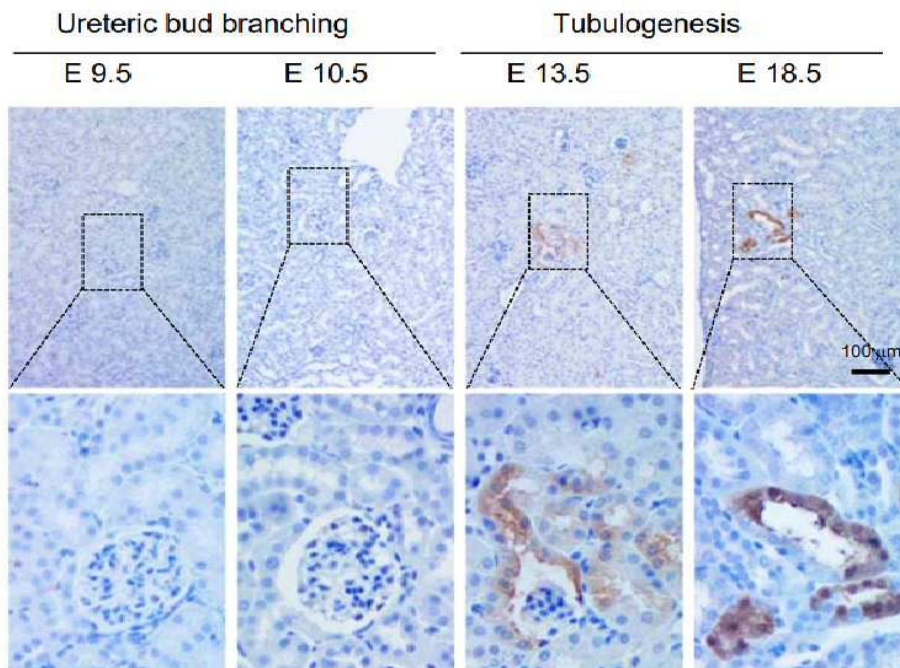
도면7



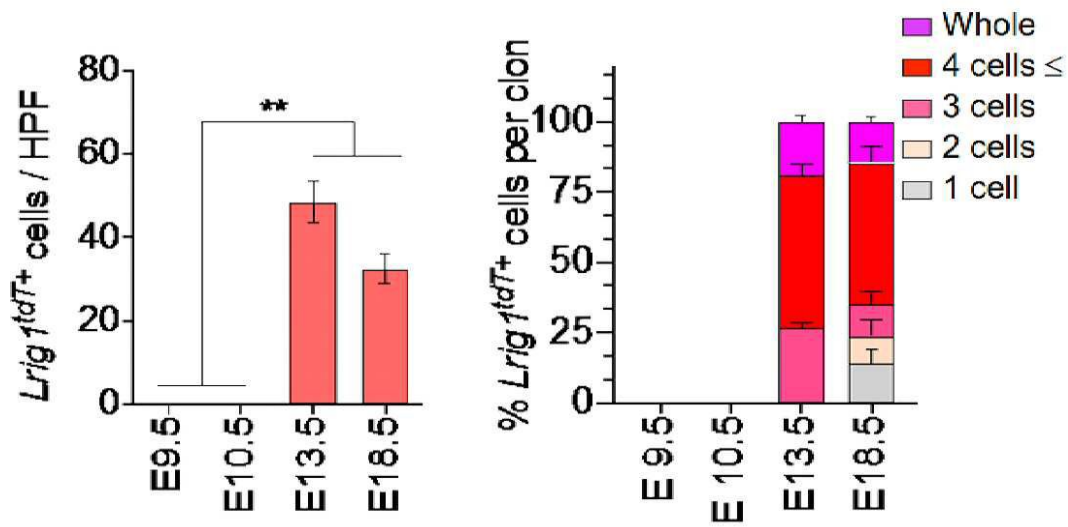
도면8



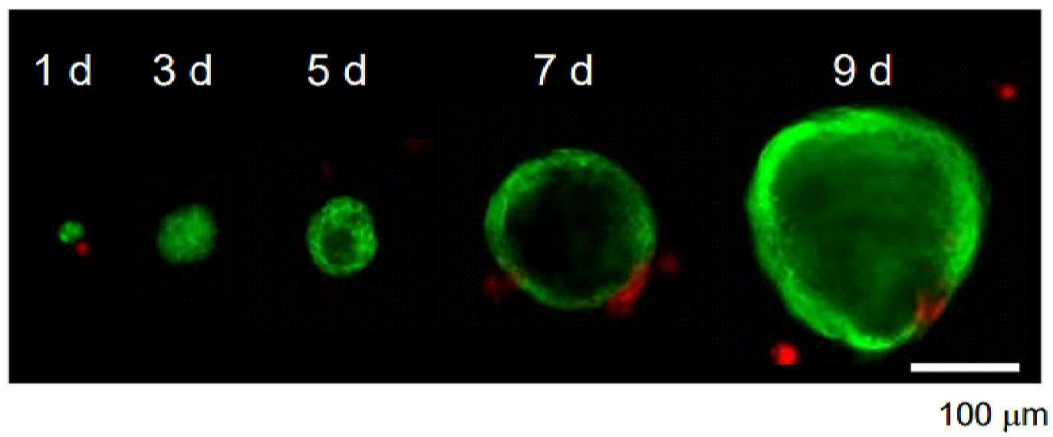
도면9



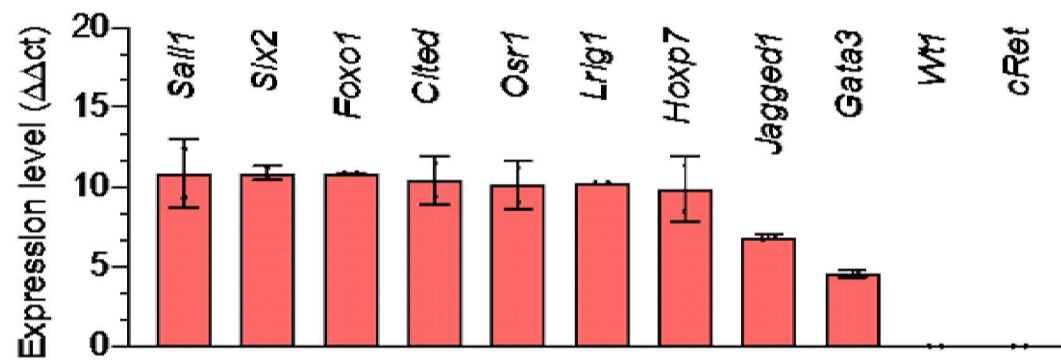
도면10



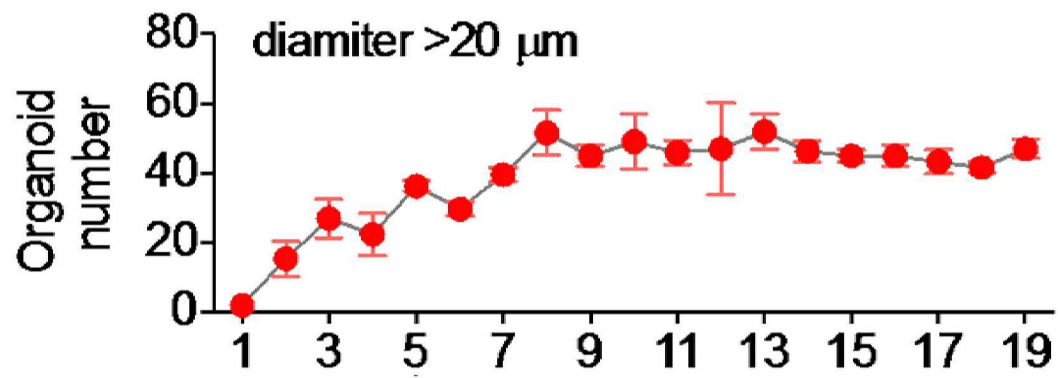
도면11



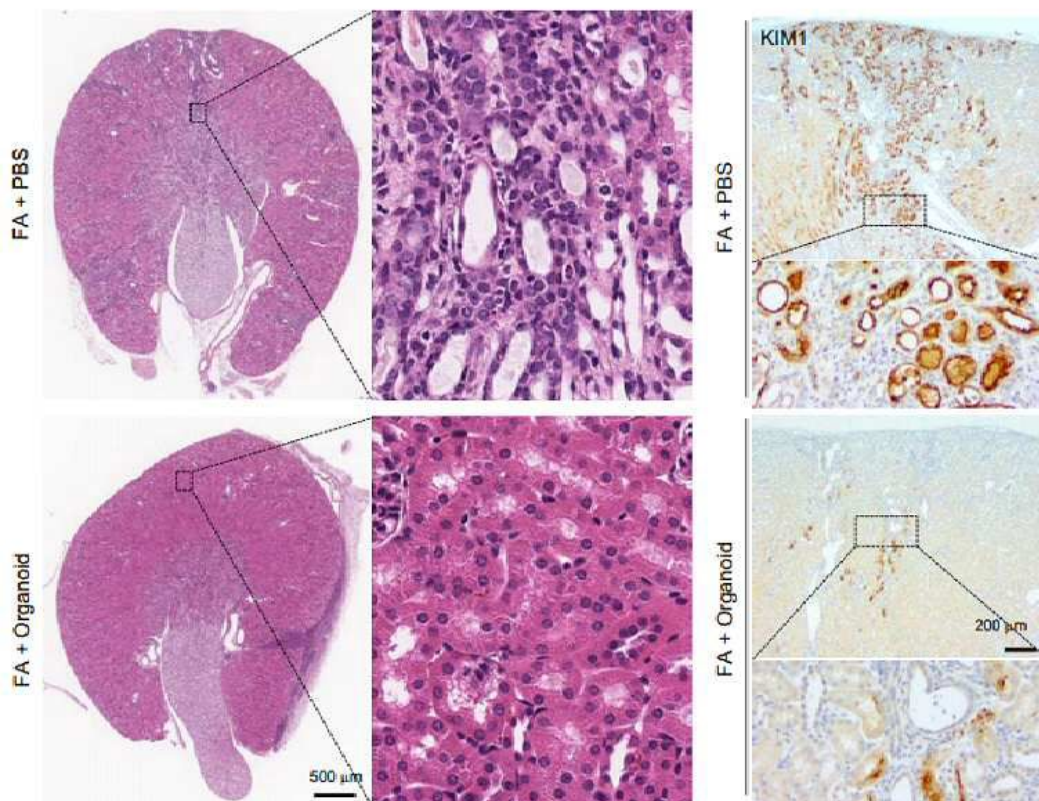
도면12



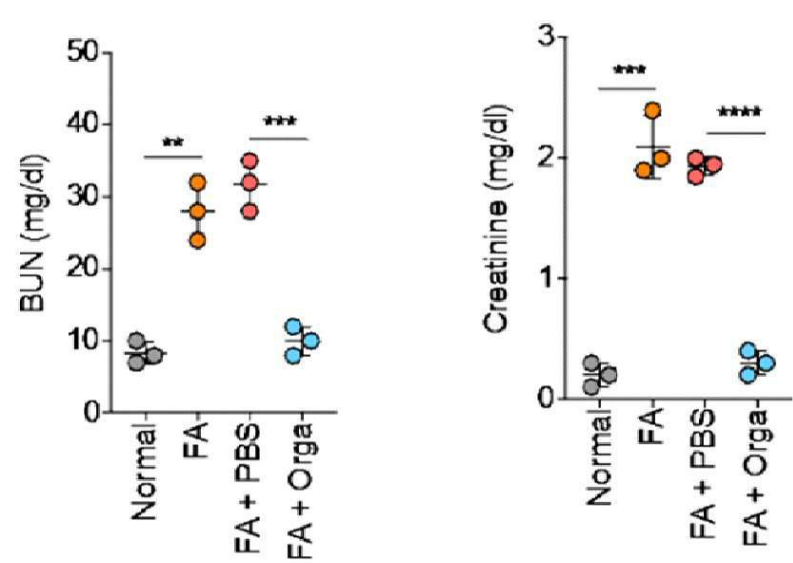
도면13



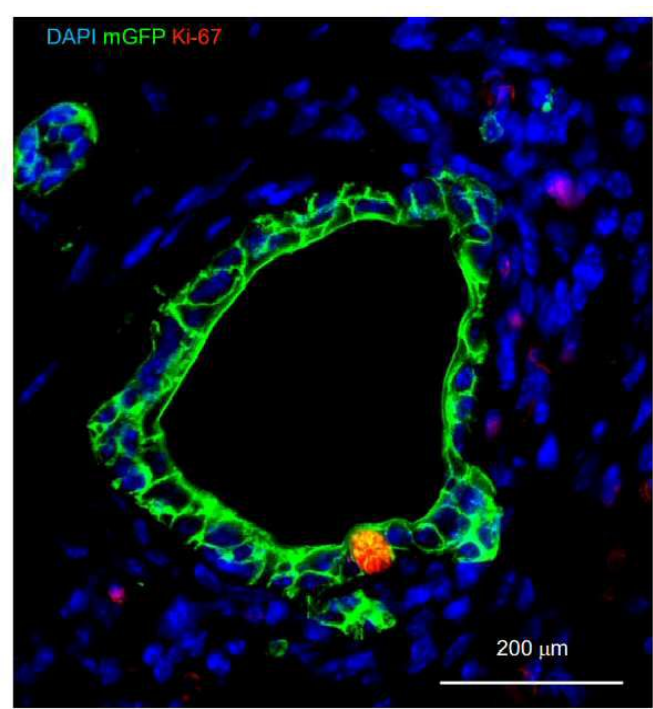
도면14



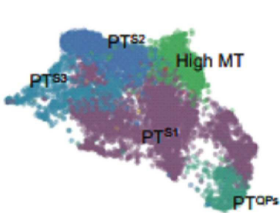
도면15



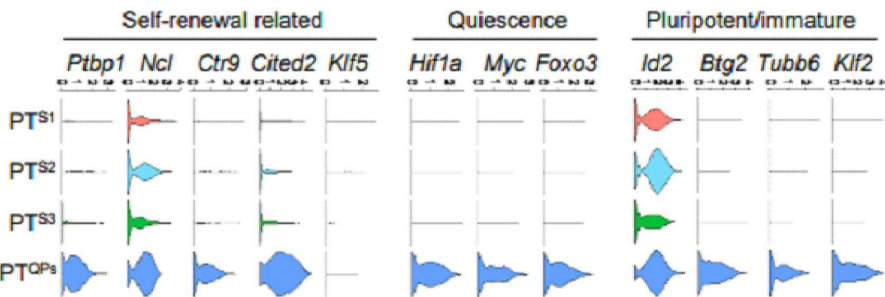
도면16



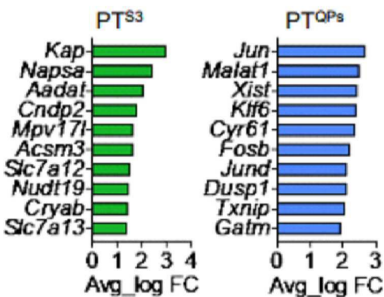
도면17



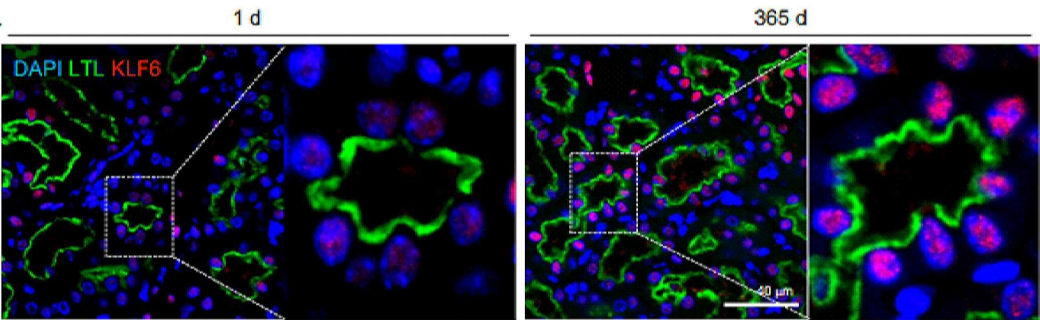
도면22



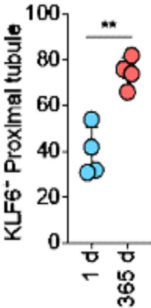
도면23



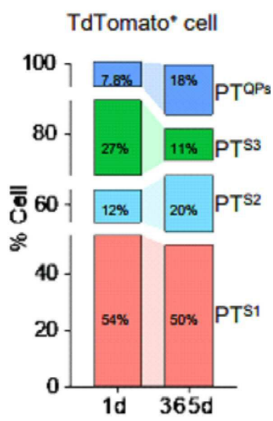
도면24



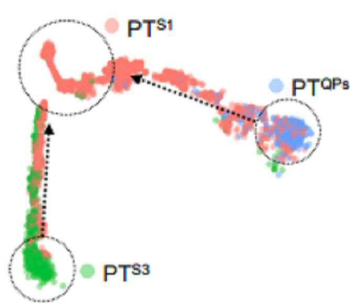
도면25



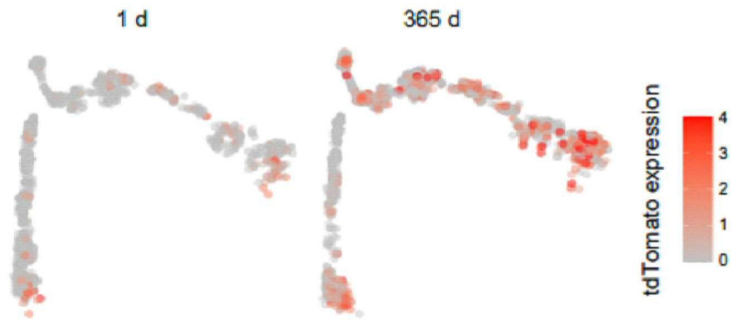
도면26



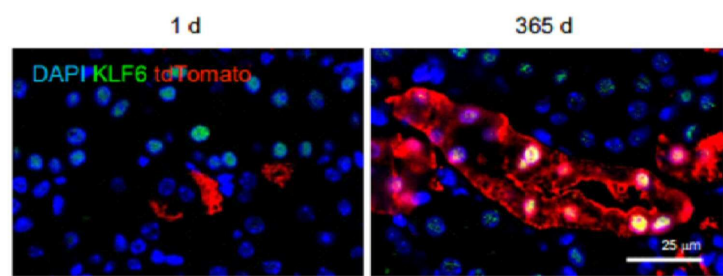
도면27



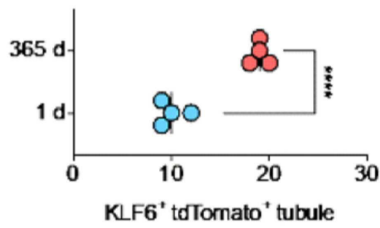
도면28



도면29



도면30



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Composition for preventing or treating renal disease
- <130> PDPB201483
- <160> 24
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1093
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Ala Arg Pro Val Arg Gly Gly Leu Gly Ala Pro Arg Arg Ser Pro

1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Leu Trp Leu Val Leu Val Arg Leu Glu Pro Val Thr

20 25 30

Ala Ala Ala Gly Pro Arg Ala Pro Cys Ala Ala Ala Cys Thr Cys Ala

35 40 45

Gly Asp Ser Leu Asp Cys Gly Gly Arg Gly Leu Ala Ala Leu Pro Gly

50 55 60

Asp Leu Pro Ser Trp Thr Arg Ser Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Lys Leu

65 70 75 80

Ser Glu Ile Asp Pro Ala Gly Phe Glu Asp Leu Pro Asn Leu Gln Glu

85 90 95

Val Asn Leu Ser Tyr Asn Lys Leu Ser Glu Ile Asp Pro Ala Gly Phe

100 105 110

Glu Asp Leu Pro Asn Leu Gln Glu Val Tyr Leu Asn Asn Asn Glu Leu

115	120	125	
Thr Ala Val Pro Ser Leu Gly Ala Ala Ser Ser His Val Val Ser Leu			
130	135	140	
Phe Leu Gln His Asn Lys Ile Arg Ser Val Glu Gly Ser Gln Leu Lys			
145	150	155	160
Ala Tyr Leu Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Ser Leu Asn Asn Ile Thr			
165	170	175	
Glu Val Arg Asn Thr Cys Phe Pro His Gly Pro Pro Ile Lys Glu Leu			
180	185	190	
Asn Leu Ala Gly Asn Arg Ile Gly Thr Leu Glu Leu Gly Ala Phe Asp			
195	200	205	
Gly Leu Ser Arg Ser Leu Leu Thr Leu Arg Leu Ser Lys Asn Arg Ile			
210	215	220	
Thr Gln Leu Pro Val Arg Ala Phe Lys Leu Pro Arg Leu Thr Gln Leu			
225	230	235	240
Asp Leu Asn Arg Asn Arg Ile Arg Leu Ile Glu Gly Leu Thr Phe Gln			
245	250	255	
Gly Leu Asn Ser Leu Glu Val Leu Lys Leu Gln Arg Asn Asn Ile Ser			
260	265	270	
Lys Leu Thr Asp Gly Ala Phe Trp Gly Leu Ser Lys Met His Val Leu			
275	280	285	
His Leu Glu Tyr Asn Ser Leu Val Glu Val Asn Ser Gly Ser Leu Tyr			
290	295	300	
Gly Leu Thr Ala Leu His Gln Leu His Leu Ser Asn Asn Ser Ile Ala			
305	310	315	320
Arg Ile His Arg Lys Gly Trp Ser Phe Cys Gln Lys Leu His Glu Leu			
325	330	335	
Val Leu Ser Phe Asn Asn Leu Thr Arg Leu Asp Glu Glu Ser Leu Ala			
340	345	350	
Glu Leu Ser Ser Leu Ser Val Leu Arg Leu Ser His Asn Ser Ile Ser			
355	360	365	
His Ile Ala Glu Gly Ala Phe Lys Gly Leu Arg Ser Leu Arg Val Leu			

370 375 380
 Asp Leu Asp His Asn Glu Ile Ser Gly Thr Ile Glu Asp Thr Ser Gly

 385 390 395 400
 Ala Phe Ser Gly Leu Asp Ser Leu Ser Lys Leu Asn Leu Gly Gly Asn
 405 410 415
 Ala Ile Arg Ser Val Gln Phe Asp Ala Phe Val Lys Met Lys Asn Leu
 420 425 430
 Lys Glu Leu His Ile Ser Ser Asp Ser Phe Leu Cys Asp Cys Gln Leu
 435 440 445
 Lys Trp Leu Pro Pro Trp Leu Ile Gly Arg Met Leu Gln Ala Phe Val
 450 455 460

 Thr Ala Thr Cys Ala His Pro Glu Ser Leu Lys Gly Gln Ser Ile Phe
 465 470 475 480
 Ser Val Pro Pro Glu Ser Phe Val Cys Asp Asp Phe Leu Lys Pro Gln
 485 490 495
 Ile Ile Thr Gln Pro Glu Thr Thr Met Ala Met Val Gly Lys Asp Ile
 500 505 510
 Arg Phe Thr Cys Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Pro Met Thr Phe
 515 520 525
 Ala Trp Lys Lys Asp Asn Glu Val Leu Thr Asn Ala Asp Met Glu Asn

 530 535 540
 Phe Val His Val His Ala Gln Asp Gly Glu Val Met Glu Tyr Thr Thr
 545 550 555 560
 Ile Leu His Leu Arg Gln Val Thr Phe Gly His Glu Gly Arg Tyr Gln
 565 570 575
 Cys Val Ile Thr Asn His Phe Gly Ser Thr Tyr Ser His Lys Ala Arg
 580 585 590
 Leu Thr Val Asn Val Leu Pro Ser Phe Thr Lys Thr Pro His Asp Ile
 595 600 605

 Thr Ile Arg Thr Thr Thr Val Ala Arg Leu Glu Cys Ala Ala Thr Gly
 610 615 620

His Pro Asn Pro Gln Ile Ala Trp Gln Lys Asp Gly Gly Thr Asp Phe
 625 630 635 640
 Pro Ala Ala Arg Glu Arg Arg Met His Val Met Pro Asp Asp Asp Val
 645 650 655
 Phe Phe Ile Thr Asp Val Lys Ile Asp Asp Ala Gly Val Tyr Ser Cys
 660 665 670
 Thr Ala Gln Asn Ser Ala Gly Ser Ile Ser Ala Asn Ala Thr Leu Thr

 675 680 685
 Val Leu Glu Thr Pro Ser Leu Val Val Pro Leu Glu Asp Arg Val Val
 690 695 700
 Ser Val Gly Glu Thr Val Ala Leu Gln Cys Lys Ala Thr Gly Asn Pro
 705 710 715 720
 Pro Pro Arg Ile Thr Trp Phe Lys Gly Asp Arg Pro Leu Ser Leu Thr
 725 730 735
 Glu Arg His His Leu Thr Pro Asp Asn Gln Leu Leu Val Val Gln Asn
 740 745 750

 Val Val Ala Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Thr Cys Glu Met Ser Asn Thr
 755 760 765
 Leu Gly Thr Glu Arg Ala His Ser Gln Leu Ser Val Leu Pro Ala Ala
 770 775 780
 Gly Cys Arg Lys Asp Gly Thr Thr Val Gly Ile Phe Thr Ile Ala Val
 785 790 795 800
 Val Ser Ser Ile Val Leu Thr Ser Leu Val Trp Val Cys Ile Ile Tyr
 805 810 815
 Gln Thr Arg Lys Lys Ser Glu Glu Tyr Ser Val Thr Asn Thr Asp Glu

 820 825 830
 Thr Val Val Pro Pro Asp Val Pro Ser Tyr Leu Ser Ser Gln Gly Thr
 835 840 845
 Leu Ser Asp Arg Gln Glu Thr Val Val Arg Thr Glu Gly Gly Pro Gln
 850 855 860
 Ala Asn Gly His Ile Glu Ser Asn Gly Val Cys Pro Arg Asp Ala Ser
 865 870 875 880

His Phe Pro Glu Pro Asp Thr His Ser Val Ala Cys Arg Gln Pro Lys

885 890 895

Leu Cys Ala Gly Ser Ala Tyr His Lys Glu Pro Trp Lys Ala Met Glu

900 905 910

Lys Ala Glu Gly Thr Pro Gly Pro His Lys Met Glu His Gly Gly Arg

915 920 925

Val Val Cys Ser Asp Cys Asn Thr Glu Val Asp Cys Tyr Ser Arg Gly

930 935 940

Gln Ala Phe His Pro Gln Pro Val Ser Arg Asp Ser Ala Gln Pro Ser

945 950 955 960

Ala Pro Asn Gly Pro Glu Pro Gly Gly Ser Asp Gln Glu His Ser Pro

965 970 975

His His Gln Cys Ser Arg Thr Ala Ala Gly Ser Cys Pro Glu Cys Gln

980 985 990

Gly Ser Leu Tyr Pro Ser Asn His Asp Arg Met Leu Thr Ala Val Lys

995 1000 1005

Lys Lys Pro Met Ala Ser Leu Asp Gly Lys Gly Asp Ser Ser Trp Thr

1010 1015 1020

Leu Ala Arg Leu Tyr His Pro Asp Ser Thr Glu Leu Gln Pro Ala Ser

1025 1030 1035 1040

Ser Leu Thr Ser Gly Ser Pro Glu Arg Ala Glu Ala Gln Tyr Leu Leu

1045 1050 1055

Val Ser Asn Gly His Leu Pro Lys Ala Cys Asp Ala Ser Pro Glu Ser

1060 1065 1070

Thr Pro Leu Thr Gly Gln Leu Pro Gly Lys Gln Arg Val Pro Leu Leu

1075 1080 1085

Leu Ala Pro Lys Ser

1090

<210> 2

<211> 283

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Val Leu Pro Met Cys Ser Ile Phe Gln Glu Leu Gln Ile Val

1 5 10 15
His Glu Thr Gly Tyr Phe Ser Ala Leu Pro Ser Leu Glu Glu Tyr Trp
20 25 30
Gln Gln Thr Cys Leu Glu Leu Glu Arg Tyr Leu Gln Ser Glu Pro Cys
35 40 45
Tyr Val Ser Ala Ser Glu Ile Lys Phe Asp Ser Gln Glu Asp Leu Trp
50 55 60
Thr Lys Ile Ile Leu Ala Arg Glu Lys Lys Glu Glu Ser Glu Leu Lys
65 70 75 80

Ile Ser Ser Ser Pro Pro Glu Asp Thr Leu Ile Ser Pro Ser Phe Cys
85 90 95
Tyr Asn Leu Glu Thr Asn Ser Leu Asn Ser Asp Val Ser Ser Glu Ser
100 105 110
Ser Asp Ser Ser Glu Glu Leu Ser Pro Thr Ala Lys Phe Thr Ser Asp
115 120 125
Pro Ile Gly Glu Val Leu Val Ser Ser Gly Lys Leu Ser Ser Ser Val
130 135 140
Thr Ser Thr Pro Pro Ser Ser Pro Glu Leu Ser Arg Glu Pro Ser Gln

145 150 155 160
Leu Trp Gly Cys Val Pro Gly Glu Leu Pro Ser Pro Gly Lys Val Arg
165 170 175
Ser Gly Thr Ser Gly Lys Pro Gly Asp Lys Gly Asn Gly Asp Ala Ser
180 185 190
Pro Asp Gly Arg Arg Arg Val His Arg Cys His Phe Asn Gly Cys Arg
195 200 205
Lys Val Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Gln Arg Thr His
210 215 220

Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Arg Cys Ser Trp Glu Gly Cys Glu Trp Arg
225 230 235 240

Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Phe Arg Lys His Thr Gly
245 250 255
Ala Lys Pro Phe Lys Cys Ser His Cys Asp Arg Cys Phe Ser Arg Ser
260 265 270
Asp His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Leu

275 280

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 3

ggtgagcctg gccttatgtg aata 24

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 4

caccaccatc ctgcacctcc 20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 5

tactctttcc ttcaggcagt ga 22

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 6

gatcgaggca agtgcattgg	19
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer	
<400> 7	
cacctccaca agaattgaaag cg	22
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer	
<400> 8	
ctccgcctcg atgtagtgc	19
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer	
<400> 9	
aaccttgag tgaaggatcg c	21
<210> 10	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer	
<400> 10	
gtaggagagc ctattggaga tgt	23
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer	

<400>	11	
ctcaacattt ccaatccgac cc		22
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	12	
ggcatccttg ctcttagtgg g		21
<210>	13	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	13	
gagagccagc ctaccatcc		19
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	14	
gggtcctcgt gtttgaagga a		21
<210>	15	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	15	
aagttcggtt ttcgctccag g		21
<210>	16	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	16	
acacccccgga gaggttctg		19
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	17	
ctcggccatt cgtacatgga a		21
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	18	
ggatacctct gcaccgtagc		20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	19	
gcgtcaggga gatggtaaag		20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	20	
catcaggga acagttgcag		20
<210>	21	

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 21
 cgctaagaat ccgctgggtga ag 22
 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 22
 ggatcttgac gaagcagtcg tt 22
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 23
 cctcgggtca gtttgagctg 20
 <210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 24
 ccttgaggca cactttgaag ta 22