

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0015622

(43) 공개일자 2021년02월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0018 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0054946
- (22) 출원일자 2020년05월08일
심사청구일자 2020년05월08일
- (30) 우선권주장
1020190093754 2019년08월01일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
이진우
인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동 702호(송도동, 송도글로벌캠퍼스푸르지오)
- 김철훈
경기도 성남시 분당구 내정로 151(수내동, 양지마을금호3단지한양5단지아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인충현

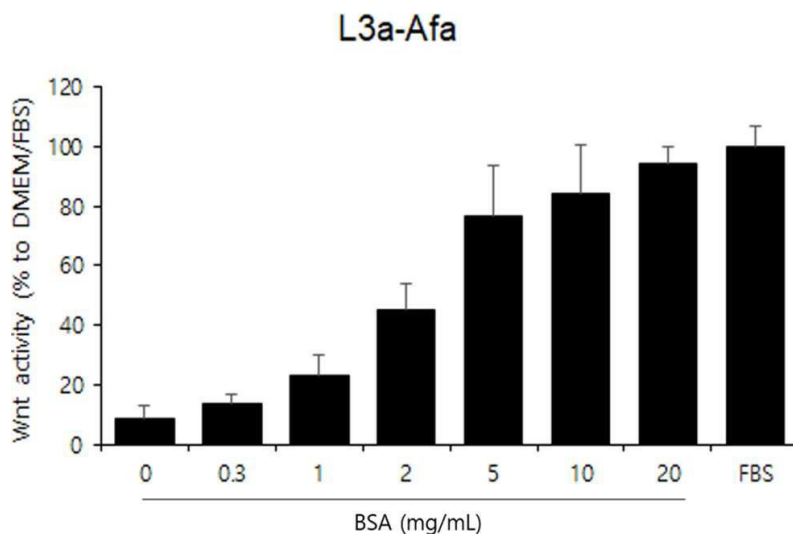
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 Wnt 단백질 활성 증진용 배지 조성물

(57) 요약

본 발명은 Wnt 단백질의 활성 증진 및 오가노이드 배양을 위한 무혈청 배지 조성물 및 이를 이용한 오가노이드 배양 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 2501/11 (2013.01)

C12N 2501/155 (2013.01)

C12N 2501/415 (2013.01)

C12N 2501/727 (2013.01)

(72) 발명자

권순성

서울특별시 종로구 통일로16길 8-3, 117동 201호(
무악동, 인왕산아이파크)

여주혜

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 1동 1006호(서
초동, 삼풍아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

기본 배지, Wnt 단백질 또는 이의 발현 세포, 아파민(Afamin) 또는 이의 발현 세포, 및 알부민(albumin)을 유효 성분으로 포함하는 세포, 세포 응집체, 조직 단편 또는 장기 유사체의 배양용 배지 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Wnt 단백질은 Wnt3a 단백질인 것을 특징으로 하는, 배지 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 알부민은 0.1 mg/mL 내지 20 mg/mL 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 배지 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 장기 유사체는 오가노이드인 것을 특징으로 하는, 배지 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 배지 조성물은 무혈청 배지 조성물인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 기본 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM-F12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), MacCoy's 5A 배지, AmnioMax, AminoMaxII complete Medium 및 Chang's Medium MesemCult-XF Medium으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 배지 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 배지 조성물은 상피 성장 인자(EGF), 노긴(Noggin), 티아조비빈, CHIR99021 및 CHIR99021의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 배지 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 배지 조성물에서 줄기세포, 줄기세포의 집단, 줄기세포로부터 분화된 세포 또는 단리된 조직단편을 배양하는 단계를 포함하는, 오가노이드 수득 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 배지 조성물은 상피 성장 인자(EGF), 노긴(Noggin), 티아조비빈, CHIR99021 및 CHIR99021의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것인, 오가노이드 수득 방법.

청구항 10

아파민(Afamin) 또는 이의 발현 세포 및 알부민(albumin)을 유효성분으로 포함하는 생물학적 시료 내 Wnt 단백질의 활성 증진용 조성물.

청구항 11

아파민(Afamin) 또는 이의 발현 세포 및 알부민(albumin)을 유효성분으로 포함하는 생물학적 시료 내 Wnt 단백질의 안정화용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Wnt 단백질의 활성 증진 및 오가노이드 배양을 위한 배지 조성물 및 이를 이용한 오가노이드 배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 오가노이드 제작기술은 이론적으로 거의 모든 종류의 장기를 줄기세포만으로 제작할 수 있기 때문에 다양한 질병에 이용 가능할 것으로 기대되고 있다. 오가노이드는 2차원에서 만든 세포 조직보다 신약의 안전성과 효능을 시험하는데 더 효과적일 수 있으며, 훼손되거나 제대로 발달하지 못한 장기에 오가노이드를 이식해 상태를 개선하는데 활용할 수 있을 것으로 여겨진다. 이에 따라 최근 재생의학 관점에서도 오가노이드 관련 연구가 더욱 활발해지는 추세에 있으며, 여러 분야에 오가노이드를 널리 이용할 수 있을 것으로 전망되고 있다.

[0004] 한편, 오가노이드 제작에 있어 필수 인자 중 하나인 Wnt 단백질은 일반적으로 보존된 Ser 잔기에 지질이 공유결합된 형태로 존재한다. Wnt 단백질은 결합되어 있는 지질로 인해 강한 소수성(hydrophobic)의 성질을 띠기 때문에 응집되어 순수한 단백질을 분리하여 사용하는데 어려움이 있어왔다. 이에 태아 소혈청(Fetal bovine serum, FBS)을 넣은 배지를 이용할 경우 안정적인 Wnt 단백질을 얻을 수 있음이 밝혀짐에 따라 오가노이드 제작에 있어 태아 소혈청을 포함하는 Wnt 단백질을 이용해왔다.

[0005] 그러나 태아 소혈청은 오가노이드 성장을 억제하는 물질을 포함하고 있어, 장기간 오가노이드를 배양할 경우에는 여전히 적합하지 않은 문제점이 있다. 이에 따라, Wnt 단백질의 활성을 유지하면서도 지속적인 성장이 가능하도록 하는 배지의 개발이 요구되고 있다. 또한, 태아 소혈청을 포함한 Wnt 생산 배지로부터 Wnt를 정제하게 되면 동물성 불순물의 오염의 피할 수 없어, 사람에게 사용할 Wnt 치료제제를 만드는데 큰 제한점이 되기 때문에, 태아 소혈청을 포함하지 않는 Wnt 생산 배지의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1966523호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 기본 배지, Wnt 단백질 또는 이의 발현 세포, 아파민(Afamin) 또는 이의 발현 세포, 및 알부민(albumin)을 유효성분으로 포함하는, 세포, 세포 응집체, 조직 단편 또는 장기 유사체의 배양용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 배지 조성물을 이용한 오가노이드 획득 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 생물학적 시료 내 Wnt 단백질의 활성 증진용 또는 안정화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 기본 배지, Wnt 단백질 또는 이의 발현 세포, 아파민(Afamin) 또는 이의 발현 세포, 및 알부민(albumin)을 유효성분으로 포함하는, 세포, 세포 응집체, 조직 단편 또는 장기 유사체의 배양용 배지 조성물에 관한 것이다.

[0015] 본 발명에서 “배지(culture media)”는 세포 성장 및 생존을 지지할 수 있도록 하는 배지를 의미하며, 세포의 배양에 적절한 것으로 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다.

[0016] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 배양 배지는 무혈청 배지일 수 있다.

[0017] 본 발명에서, “무혈청 배지”는 혈청이 포함되지 않거나 배양환경 내에서의 혈청의 생물학적 및 생리학적 기능이 발휘될 수 있을 만큼의 유효량 미만으로만 포함된 배지를 말한다. 혈청은 FBS(fetal bovine serum), FCS(fetal calf serum), 투석우태혈청(dialyzed fetal bovine serum), 신생우아혈청(newborn calf serum, NCS) 등 통상 세포 배양에 포함되는 혈청(serum)을 통칭한다. 혈청은 광범위한 고분자 단백질, 저분자 영양분, 불용성 물질들에 대한 운반체, 호르몬 등을 포함하고 있으며 통상 기본 배지에 첨가되는 경우가 많으나, 본 발명에서의 배지 조성물은 혈청을 포함하지 않거나 유효량 미만으로만 포함하고도 오가노이드 등의 배양에 필수적인 Wnt 단백질을 활성 형태로 유지할 수 있다.

[0018] 본 발명에서 “Wnt 단백질”은 많은 세포 유형에서 증식 및 분화 사이의 균형에 영향을 미치며, 뼈 형성, 면역 조절, 암, 줄기 세포 재생 등에 관계있는 시스템이 풍부한 분비되는 폴리펩타이드 계열의 단백질이다. 특히, 동물 세포에서 조직과 장기의 형성을 조정하는데 Wnt 단백질 의존적인 Wnt 신호전달 경로가 중요하다.

[0019] 상기 Wnt 단백질은 오가노이드 제작에 있어 필수적인 성장인자 중 하나로서, Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt9A, Wnt9B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11 및 Wnt16을 포함한다. 구체적으로, 상기 Wnt 단백질은 Wnt3a 단백질일 수 있다.

[0020] 본 발명에서 “아파민(Afamin)”은 체액 중의 소수성 분자의 운반체로서 기능하는 당단백질로, Wnt1, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt5A, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8, Wnt9A, Wnt9B, Wnt10A 및/또는 Wnt10B를 포함한 지질화된 Wnt 패밀리의 활성 및 용해에 필수적인 단백질이다. 그 외에도 비타민 E와 결합하여, 지질단백질 시스템이 충분하지 않은 조건에서 비타민 E를 운반하거나, 혈액-뇌 장벽(Blood-brain barrier, BBB)를 가로질러 비타민 E를 운반하는데 관여할 수 있다.

- [0021] 아파민을 암호화하는 유전자, AFM 유전자는 인간 아파민(e.g., NCBI Accession No. NP_001124) 또는 마우스 아파민(NP_660128)을 암호화하는 유전자, 예컨대, NCBI Accession No. NM_001133, NM_145146로 표현되는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 배양액 내 Wnt 단백질의 안정성과 활성 유지에 알부민과 아파민의 조합이 핵심적인 역할을 한다는 사실을 최초로 규명하였다. 본 발명의 배지에서 Wnt 단백질과 아파민은 펩타이드 형태로 배지에 첨가될 수도 있고, Wnt 단백질 및/또는 아파민 단백질을 발현하는 세포를 공배양함으로써 공급될 수도 있다.
- [0024] 본 명세서에서 “Wnt 단백질(아파민)을 발현하는 세포”는 Wnt 단백질(아파민)을 내재적(endogenously)으로 발현하는 세포와 유전자 전달체를 통해 각 단백질의 코딩 핵산 분자가 도입된 형질 도입(transfection) 세포를 모두 포괄한다.
- [0025] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0026] 본 명세서에서 용어 “유전자 전달체”는 원하는 타겟 유전자를 대상 세포에 도입하여 발현시키기 위한 매개체를 의미한다. 이상적인 유전자 전달체는 인체에 무해하고 대량생산이 용이하며 효율적으로 유전자를 전달할 수 있어야 한다.
- [0027] 본 명세서에서, 용어 “유전자 전달”은 유전자가 세포 내로 운반되는 것을 의미하며, 유전자의 세포내 침투(transduction)와 동일한 의미를 가진다. 세포 및 조직 수준에서, 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달체는 유전자 침투 시스템 및 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.
- [0028] Wnt 단백질과 아파민이 이의 발현 세포를 이용한 제조합적 형태로 공급될 경우, 두 가지 단백질이 각각의 상이한 숙주 세포를 통해 발현될 수도 있고 하나의 숙주 세포에서 공발현(co-expression)될 수도 있다.
- [0029] 본 발명에서, “알부민(albumin)”은 혈청, 혈장 등에 포함되어 있는 단백질로서, 전체 혈청 단백질의 약 55-60%를 차지한다. 알부민은 수분을 끌어들이는 작용을 하여 혈액 속의 수분함량을 유지하는 것으로 알려져 있다. 현재 널리 사용되는 혈청으로는 FBS, FCS 등이 있으나, 인간 광우병 발병의 원인으로 보고된 바 있어 안전성 문제가 지적된 바 있다. 특히, 오가노이드 배양에 있어 혈청을 이용하는 경우 알부민 외 다른 성분 및 불순물에 의하여 오가노이드의 성장이 억제되어 오가노이드의 장기 배양이 불가능한 문제가 있어, 혈청을 포함하지 않으면서도 오가노이드 배양에 필요한 Wnt 단백질의 활성을 이끌어낼 수 있는 기술의 개발이 요구되었다.
- [0030] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 사용되는 알부민은 혈청 알부민(serum albumin)이다.
- [0031] 구체적으로, 상기 알부민은 0.1 mg/mL 내지 20 mg/mL 농도로 포함되는 것일 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 알부민은 0.3 mg/mL 내지 20 mg/mL 농도로 포함될 수 있으며, 가장 구체적으로 5 mg/mL 내지 20 mg/mL 농도로 포함될 수 있다.
- [0032] 본 발명 일 실시예에서는 Wnt3가 포함된 조건배지, Wnt3a 및 아파민이 포함된 조건배지에서 알부민의 첨가량이 증가할수록 농도 의존적으로 Wnt 단백질의 활성이 증가하는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2). 또한, 소혈청 알부민 뿐 아니라 인간 알부민을 포함한 경우에도 농도 의존적으로 Wnt 단백질의 활성이 증가하였다(도 3).
- [0033] 이는 오가노이드의 장기 배양에 장애가 되는 FBS 등의 혈청을 포함하지 않더라도 본 발명의 조성물을 이용하여 오가노이드 배양에 필요한 Wnt 단백질의 활성을 나타낼 수 있음을 나타내는 것이다.
- [0034] 이에 따라, 상기 본 발명의 배지 조성물은 Wnt 단백질의 활성 증진용인 것일 수 있다.
- [0035] 또한 구체적으로, 본 발명의 배지 조성물은 혈청을 포함하지 않더라도 오가노이드 배양에 필요한 Wnt 단백질의 활성을 나타냄을 확인하였는 바, 본 발명의 배지 조성물은 오가노이드 배양용인 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 “오가노이드”는 줄기세포나 장기 기원 세포로부터 분리한 세포를 다시 배양을 통해 응집, 제조합하여 만들어진 세포집합체를 의미하는 것으로, 서스펜션 세포 배양물로부터 형성된 오가노이드 또는 세포 클러

스터를 포함할 수 있다. 예를 들면, 위 오가노이드, 소장 오가노이드, 결장 오가노이드, 간 오가노이드, 갑상선 오가노이드, 폐 오가노이드, 또는 뇌 오가노이드 일 수 있으며, 조직 부위에 따라 달리 적용될 수 있다.

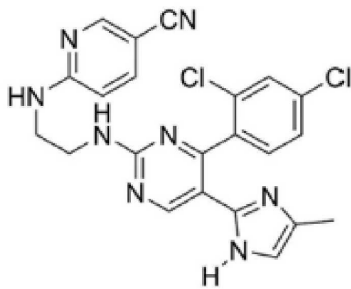
[0037] 본 발명에서 “오가노이드 수득”은 오가노이드를 생성하거나 유지시킬 수 있는 모든 행위를 포함한다. 예를 들어 오가노이드를 생존, 성장 또는 증식시키는 것일 수 있으며, 줄기세포 또는 특정 조직으로부터 분리된 세포가 특정 기능을 갖는 조직이나 기관 세포로 분화시키는 것일 수 있다.

[0038] 또한 구체적으로, 본 발명에서, “기본 배지”는 동물 세포의 배양에 통상적으로 사용되는 공지의 배지들로서, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM-F12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), MacCoy's 5A 배지, AmnioMax, AminoMaxII complete Medium 및 Chang's Medium MesemCult-XF Medium으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 페니실린-스트렙토마이신과 같은 항생제, 또는 보충제 등이 더 첨가된 것일 수 있다.

[0039] 또한 구체적으로, 상기 배지 조성물은 상피 성장 인자(EGF), 노긴(Noggin), 티아조비딘, CHIR99021 및 CHIR99021의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 상기 CHIR99021은 하기 화학식 1의 화합물로서, 6-[[2-[[4-(2,4-디클로로페닐)-5-(5-메틸-1H-이미다졸-2-일)-2-피리미디닐]아미노]에틸]아미노]-3-피리딘카보니트릴(CAS 번호 252917-06-9)을 말한다.

[0041] [화학식 1]



[0042]

[0043] 본 발명의 다른 측면은, 상기 본 발명의 배지 조성물에서 줄기세포, 줄기세포의 집단, 줄기세포로부터 분화된 세포 또는 단리된 조직단편을 배양하는 단계를 포함하는, 오가노이드 수득 방법에 관한 것이다.

[0044] 예를 들면, 다분화성 줄기세포, 성체 줄기세포를 배양 및 분화되도록 하여 오가노이드를 배양할 수 있으며, 상기 다분화성 줄기세포는 배아줄기세포 또는 역분화줄기세포일 수 있다.

[0045] 상기 오가노이드 배양에 사용되는 배지 조성물은 상피 성장 인자(EGF), 노긴(Noggin), 티아조비딘, CHIR99021 및 CHIR99021의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 아파민(Afamin) 또는 이의 발현 세포 및 알부민(albumin)을 유효 성분으로 포함하는 생물학적 시료 내 Wnt 단백질의 활성 증진용 조성물을 제공한다.

[0047] 본 발명에서 이용되는 아파민 및 알부민에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재 생략한다.

[0048] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, Wnt 단백질 또는 이를 발현하는 세포를 포함하는 모든 시료로서, 조직, 기관, 기관 유사체, 세포 또는 이들의 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명에서, “Wnt 단백질의 활성 증진”은 대조군에 비하여 Wnt 단백질의 양 또는 생체 내 고유한 기능이 측정 가능할 정도로 유의하게 증가하는 것을 말한다. 활성(activity)의 증가는 단순한 기능(function)의 증가 뿐 아니라 안정성(stability)의 증가로 기인한 궁극적인 활성 증가를 포함한다. 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 아파민과 알부민을 포함하는 본 발명의 조성물은 Wnt 단백질의 시료 내 양 뿐 아니라 그 활성을 유지 및 증가시키고 Wnt 단백질을 활성형의 가용성 형태(soluble form)로 유지하여 응집(aggregation)을 차단함으로써 구

조적 안정성을 증가시킨다. 이에, 본 발명의 용어 “활성 증진용 조성물”은 “안정성 증진용 조성물” 또는 “안정화용 조성물”로 표현될 수도 있다.

발명의 효과

- [0051] 본 발명의 배지조성물은 Wnt 단백질의 활성을 혈청 없이도 현저히 증가시킬 수 있는 바, 장기간 오가노이드 배양하는데 활용될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0054] 도 1은 Wnt3a가 포함된 조건배지에서의 소혈청 알부민(BSA) 농도에 따른 Wnt 단백질의 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 Wnt3a 및 아파민이 포함된 조건배지에서의 소혈청 알부민(BSA) 농도에 따른 Wnt 단백질의 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 각 조건배지에서의 인간 알부민(rhALB) 농도에 따른 Wnt 단백질의 활성을 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것으로, Wnt3a가 포함된 조건배지(도 3a) 및 Wnt3a 및 아파민이 포함된 조건배지(도 3b)에서의 결과를 각각 보여준다.
- 도 4a와 도 4c는 아파민 및 Wnt3a를 발현하는 세포(L3a-Afa)를 5mg/mL 농도의 소혈청 알부민(BSA)(-) 및 (+) 조건에서 5일간 배양한 후 생성한 조건배지의 안정도를 나타내는 결과이다. 도 4a는 생성된 배지를 37℃에서 0, 24 또는 48시간 동안 배양한 후 측정한 Wnt3a 단백질 양을 보여주는 웨스턴 블롯 결과이며, 도 4c는 생성된 배지를 37℃에서 0, 24 또는 48시간 동안 배양한 후 측정한 Wnt 단백질의 시간별 활성 변화를 보여주는 결과이다. 도 4b는 Wnt3a만을 발현하는 세포(L3a)에 10%의 태아 소혈청(FBS)을 넣고 5일간 배양한 후 생성한 배지의 안정도를 나타내는 결과로서, 생성된 배지를 37℃에서 0, 24 또는 48 시간 동안 배양한 후 Wnt3a 단백질 양을 웨스턴 블롯으로 측정한 결과(왼쪽, 오른쪽 검은 선) 및 Wnt 단백질의 시간별 활성 변화(오른쪽 빨간 선)를 각각 보여준다. 도 4d는 L3a-Afa 세포를 BSA(-) 및 (+) 조건으로 5일간 배양하여 생성한 조건배지를 수크로스 구배 원심분리를 하여 총 13개의 분획을 얻은 후, 각각의 분획에서의 Wnt3a 단백질 양을 웨스턴 블롯을 통해 본 결과이다.
- 도 5는 L3a-Afa 세포를 BSA(-) 및 (+) 조건으로 5일간 배양하여 생산한 조건배지를 이용하여 인간 대장 오가노이드를 배양함으로써 오가노이드 형성 효율을 측정한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0057] 실시예 1. Human Afamin(hAfamin) 발현 세포 제작을 위한 플라스미드 구축

- [0058] hAfamin을 발현하는 세포를 제작하기 위한 플라스미드를 구축하였다.
- [0059] 먼저, pLVX-EF1a-IRES-Puro (Clontech)의 퓨로마이신 아세틸트랜스퍼라아제(puromycin acetyltransferase) 유전자를 블라스티시딘-S디아미나아제(Blasticidin S deaminase) 유전자로 교체하여 pLVX-EIBla를 제작하였다. 이후 인간 아파민 코딩 시퀀스(human Afamine CDS)를 PCR하여 플라스미드에 삽입하였다.
- [0060] pCR-BluntII-TOPO-Afamin (MHS6278-211689548, Dharmacon)을 주형으로, 서열 2,3을 프라이머로 하여 pfu DNA polymerase(Solgent)로 증폭하였다. 준비된 PCR 기계에 샘플을 넣어 70℃ 정지(Pause), 95℃ 2 분 이후, 95℃ 20초, 50℃ 20초, 68℃ 2분 조건으로 5회 사이클(cycle) 및, 95℃ 20초, 60℃ 20초, 68℃ 2분 조건으로 20회 사이클 반복 후, 68℃ 3분, 4℃ 정지 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR이 진행되는 동안 1% 아가로스 겔(agarose

gel)을 준비한 후 반응이 끝난 샘플들을 1% 아가로즈 겔에 내려 사이즈를 분리하였으며, 겔 추출(gel extraction)과정을 통해 hAfinin을 수득하였다. hAfinin 절편은 XbaI 제한효소로 절단하였으며 이후, pLVXEIBla 플라스미드의 XbaI 제한효소 자리에 삽입하여 pLVX-EIBla-hAfinin 플라스미드를 제작하였다.

[0061] hAfinin 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1로 나타내었으며, PCR에 사용된 프라이머 쌍은 하기 표 1에 기재된 바와 같다.

표 1

서열번호	프라이머	서열
2	XbaI-hAfinin U1	tctaga gccacc atgg TGAACTACTAAACTTACAGG
3	hAfinin -XbaI L1	tatat tctaga T TCAGTTGCCAATTTTGGAC

[0064] 실시예 2. hAfinin 발현 세포 제작을 위한 렌티바이러스 제작

[0065] HEK293T 세포를 6 웰(well) 플레이트에 4x10⁵ cells/well의 농도로 플레이팅한 후, 24시간 후 pLVX-EIBla-hAfinin : pxPAX2(addgene 12260) : pMD2.G(addgene 12259) = 4 : 3 : 1의 비율로 총 2 µg DNA를 형질전환 시켰다. 다음날 배지를 교체한 후 48시간 동안 배양한 배지를 수집하였다. 렌티바이러스가 포함된 이 배지를 0.45 µm 필터를 통과시킨 후, 4℃에 보관하였다.

[0067] 실시예 3. 아파민 발현세포(L-Wnt3a-Afinin, L3a-Afa) 제작

[0068] L-Wnt3a(이하 L3a) 세포를 Dr. Hans Clevers(위트레흐트 연구소, 네덜란드)로부터 받아서 사용하였다. 상기 L3a 세포는 Wnt3a가 발현되도록 제작된 세포이다. 24 웰(well) 플레이트에 30% 컨플루언시(confluency)가 되도록 L3a 세포를 배양한 후, 깨끗한 배지(fresh medium) 200 µL 및 pLVX-EIBla-hAfinin 바이러스 200 µL를 섞어 감염시켰다. 12시간 감염시킨 후 배지를 교체하였으며, 72시간 경과 후, 60mm 디쉬(dish)로 옮기면서 블라스티시딘(blasticidin) 10 ug/mL를 처리하여 1주일 간 선별하여 아파민 발현세포(L3a-Afa)를 얻었다.

[0070] 실시예 4. 인간 알부민(human albumin)의 준비

[0071] 인간 알부민(human albumin)은 Sigma에서 구입하여 사용하였다(Catalog Number A9731).

[0073] 실시예 5. Conditioned media(조건배지) 제조

[0074] L3a 세포 배양에 의한 Wnt3a가 포함된 조건배지 및 L3a-Afa 세포 배양에 의한 Wnt3a 및 아파민이 포함된 조건배지를 각각 수득하였으며, 각 조건배지에는 소혈청 알부민 또는 인간 알부민이 농도를 달리하여 첨가되도록 하였다.

[0076] 5-1. 소혈청 알부민(Bovine serum albumin, BSA)이 포함된 조건배지의 제조

[0077] L3a 세포 및 L3a-Afa 세포 각각을 100 mm 디쉬(dish)에서 90%에 이를 때까지 배양시켰다. 12 mL PBS로 2회 세척시킨 후 소혈청 알부민(Bovine serum albumin, BSA)을 0, 0.3, 1, 2, 5, 10 및 20 mg/mL로 각각 첨가한 DMEM/F12 배지 및 10% FBS를 포함한 DMEM로 각각 교체하였다. 이후 5일 간 배양한 조건배지를 걷어서 1,000rpm에서 3분간 원심분리하여 세포를 제거한 후, 0.45 µm 필터로 여과하였다.

[0079] 5-2. 인간 알부민(human albumin)이 포함된 조건배지의 제조

[0080] 소혈청 알부민에 포함된 불순물이 Wnt 단백질 활성화에 영향을 줄 수 있는 점을 고려하여, 상기 실시예 4에서 제작한 인간 알부민을 이용한 조건배지를 제조하였다. 구체적으로, L3a 세포 및 L3a-Afa 세포 각각을 100 mm 디쉬(dish)에서 90%에 이를 때까지 배양시켰다. 12 mL PBS로 2회 세척시킨 후 인간 알부민을 0, 5 mg/mL로 첨가한

DMEM/F12 배지로 교체하였다. 이후 5일간 배양한 조건 배지(conditioned medium)를 걷어서 1,000 rpm에서 3분 간 원심분리하여 세포를 제거한 후, 0.45 μ m 필터로 여과하였다.

실험예 1. Wnt 단백질 활성 확인

1-1. 소혈청 알부민 포함 조건배지 적용시의 Wnt 단백질 활성 확인

상기 실시예 5-1에서 제조한 조건배지에서의 배양시의 Wnt 단백질의 활성을 측정하였다. 구체적으로, 293-STF(ATCC) 세포를 이용한 리포터 에세이(reporter assay)를 실시하였다. 0.05% poly-L-lysine으로 코팅한 96 웰(well) 플레이트에 293-STF 세포를 70% 컨플루언시(confluency)가 되도록 플레이트하고, 다음날 깨끗한 배지(fresh medium) 100 μ L로 배지를 교체한 후, 조건배지 50 μ L를 첨가하였다. 10-14 시간 경과 후, 통상적인 루시페라제 에세이(luciferase assay)를 수행하였으며, 측정된 Wnt 단백질의 활성은 FBS(fetal bovine serum)를 넣었을 때의 활성에 대한 %로 나타내었다.

그 결과, Wnt3가 포함된 조건배지를 가한 경우, 소혈청 알부민의 첨가량이 증가할수록 Wnt 단백질의 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 소혈청 알부민을 5 mg/mL 이상 첨가한 경우, 소혈청 알부민 미첨가(0 mg/mL)된 조건배지를 가한 경우에 비해 눈에 띄게 Wnt 단백질의 활성이 증가되어 있음을 확인하였다(도 1).

또한, Wnt3a 및 아파민이 포함된 조건배지를 가한 경우, Wnt3만 포함된 조건 배지에 비해 Wnt 단백질의 활성이 현저히 증가됨을 확인하였다. 특히, 소혈청 알부민까지 추가된 경우 FBS가 가해진 수준까지 Wnt 단백질의 활성이 증가되었다(도 2). 이로부터 오가노이드의 장기 배양에 장애가 되는 FBS 등의 혈청을 포함하지 않더라도 본 발명의 조성물을 이용하여 오가노이드 배양에 필요한 Wnt 단백질의 활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

1-2. 인간 알부민 포함 조건배지 적용시의 Wnt 단백질 활성 확인

상기 실시예 5-2에서 제조한 조건배지에서의 배양시의 Wnt 단백질의 활성을 측정하였다. 측정 방법은 상기 실험예 1-1의 방법과 동일하다.

그 결과, 소혈청 알부민을 첨가하였을 때와 유사하게 인간 알부민을 첨가한 배지에서 Wnt3a 단백질 활성이 증가함을 확인하였다. 나아가 아파민 및 인간 알부민을 5mg/mL을 모두 포함하는 배지에서 아파민을 포함하지 않는 배지에 비해, Wnt3a 단백질 활성이 더욱 증가된 효과를 나타내었다(도 3).

상기 결과는 소혈청 알부민 뿐 아니라, 인간 알부민을 이용할 수 있으며, 소혈청 알부민의 불순물로 인한 영향까지 배제시킴으로써 Wnt 단백질 활성을 더욱 증대시킬 수 있음을 시사한다.

실험예 2. 배지 조성에 따른 Wnt 단백질의 양 및 활성 측정

L3a-Afa 세포를 BSA(-) 및 (+) 조건으로 5일간 배양함으로써 Wnt3a와 아파민이 축적된 조건배지를 제작하였다. 상기 제작된 Wnt3a 및 아파민 축적 조건배지를 37°C에서 0, 24 또는 48시간 동안 배양 후 Wnt3a 단백질 양을 사람 혹은 쥐의 항-Wnt3a 또는 항-Wnt3 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 통해 측정을 하였고(도 4a, 왼쪽), 시간 별 Wnt3a 단백질 양의 변화를 그래프로 도식화하였다(도 4a, 오른쪽). 그 결과, BSA(+)배지에서는 Wnt3a 양이 유지되는 반면 BSA(-) 배지에서는 배양 48시간 쯤에 Wnt3a 양이 50% 미만으로 감소함을 확인하였다. 이를 통해 배지 내에 아파민이 존재하더라도 알부민이 함께 존재할 경우에만 Wnt 단백질의 양이 유지됨을 알 수 있었다(도 4a).

또한 동일한 조건 배지를 사용하여 37°C에서 0, 24, 또는 48시간 동안 배양을 한 후 시간 별 Wnt 단백질 활성 변화를 TOPflash 어세이를 수행하여 측정하였다 (도 4c). 요약하면, Wnt 신호전달에 반응하는 루시페레이즈 발현 세포인 HEK 293 STF를 5×10^5 /mL로 96웰 플레이트에 씨딩하고 24시간 동안 배양한 후, 상기 제작한 조건 배지를 넣었다. 이후 12 내지 24시간 후 루시페레이즈 어세이를 통해 Wnt 활성을 측정하였다. 그 결과, BSA(+) 배지에서는 48시간 쯤에도 Wnt3a의 활성이 약 70% 수준으로 유지되는 반면 BSA(-) 배지에서는 배양 대부분의 활성이 소실됨을 확인하였다. 이를 통해 Wnt 단백질의 양 뿐 아니라 활성에 있어서도 아파민과 알부민의 조합이 필수적임을 알 수 있었다(도 4c).

아울러, Wnt 단백질의 형태를 조사하기 위해 L3a-Afa 세포를 BSA(-) 및 (+) 조건으로 5일간 배양함으로써 제작

된 조건배지를 수크로스 구배 원심분리를 하고 이후 각 분획물에 대한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 4d에서 보는 바와 같이, 알부민이 결합된 시료에서는 Wnt 단백질이 응집되어 불활성화되는 반면(분획 13), 알부민이 존재하는 시료는 가용성의 기능적 형태(functional form)가 유지됨을 관찰하여(분획 2 내지 6), Wnt 단백질의 활성 형태 유지에 있어서도 아파민과 알부민의 조합이 중요함을 알 수 있었다.

[0098] **실험예 3. 배지 조성에 따른 Wnt 단백질의 인간 오가노이드 형성 효율 측정**

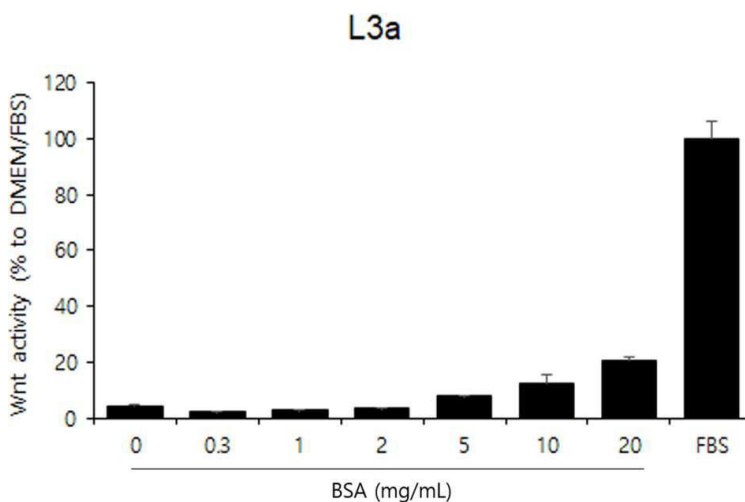
[0099] L3a-Afa 세포를 BSA(-) 및 (+) 조건으로 5일간 배양함으로써 제작된 조건배지를 이용하여 인간 대장 오가노이드를 배양하였다. 인간 대장 오가노이드에는 조건배지 외에 N-아세틸시스테인(1mM), B-27 보충제 (2%), R-스폰딘-1 조건배지 (10%), EGF (50ng/ml), 노킨 (100ng/ml), 니코틴아마이드(10mM), TGF β 억제제 (A83-01, 500nM), p38 억제제(10uM)를 포함시켰다. 대장의 성체 줄기세포를 매트리지얼 돔(matrigel dome)안에 넣고, 여기에 상기 배지를 첨가하여 오가노이드를 배양하였다. 대장 오가노이드는 10일에 한번씩 계대배양(passage)하게 되며, 계대배양시마다 세포수를 세어 오가노이드 형성 및 성장 효율을 측정하였다. 그 결과, BSA(+) 배지에서는 계대를 거듭하며 지속적으로 오가노이드 형성이 유지되는 반면, BSA(-) 배지에서는 초기에 성장이 중지됨을 관찰하였다. 이를 통해 아파민과 알부민의 조합에 의해 Wnt 단백질의 활성이 유지되어야만 오가노이드가 효율적으로 형성됨을 알 수 있었다 (도 5).

[0101] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

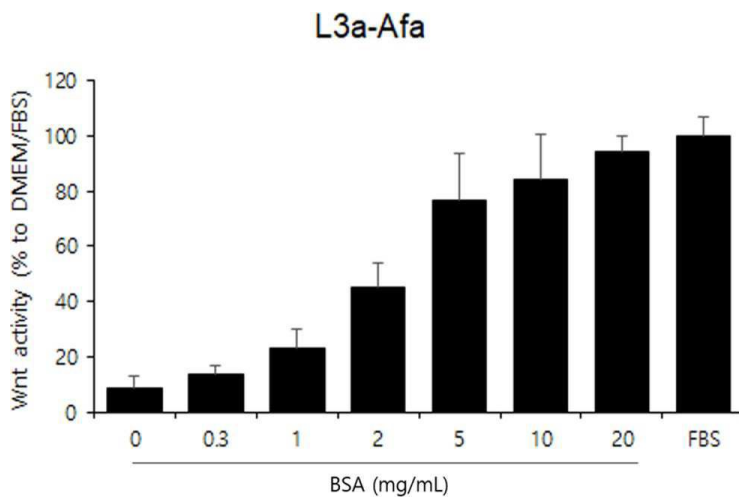
[0102] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

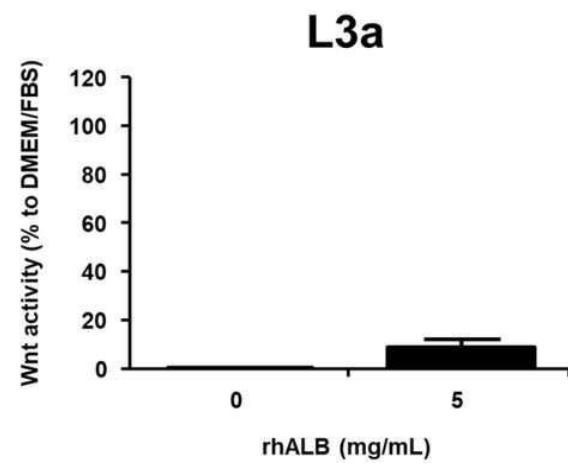
도면1



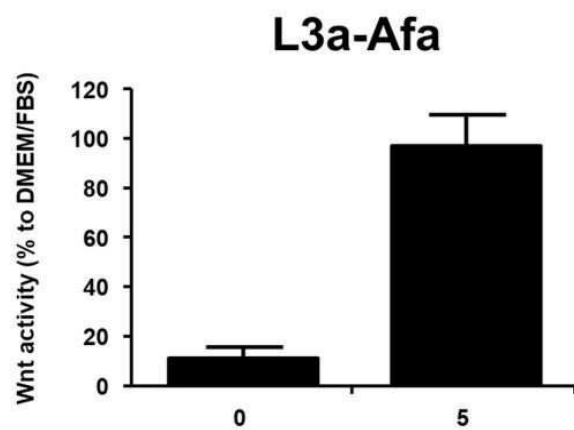
도면2



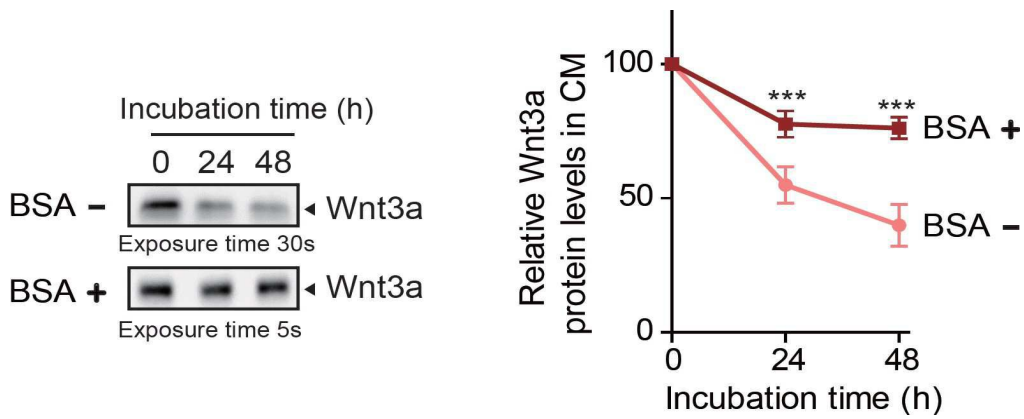
도면3a



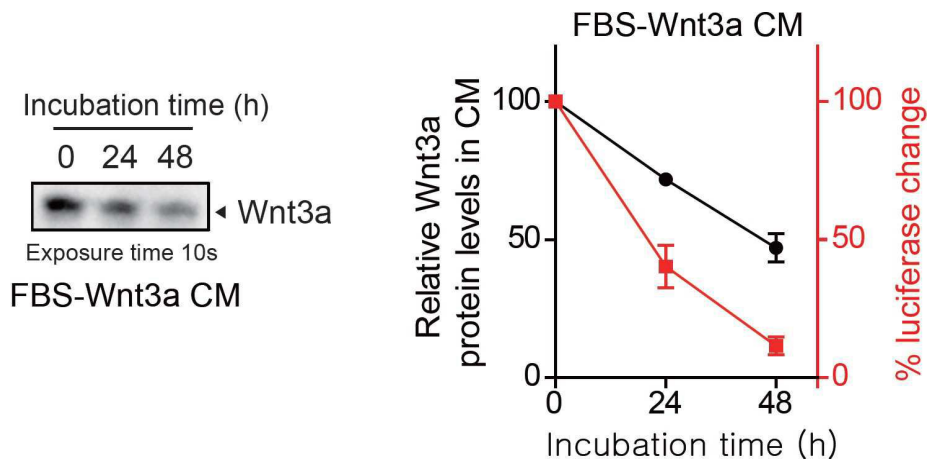
도면3b



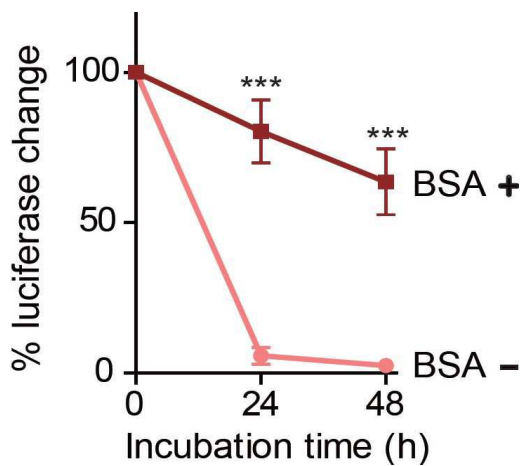
도면4a



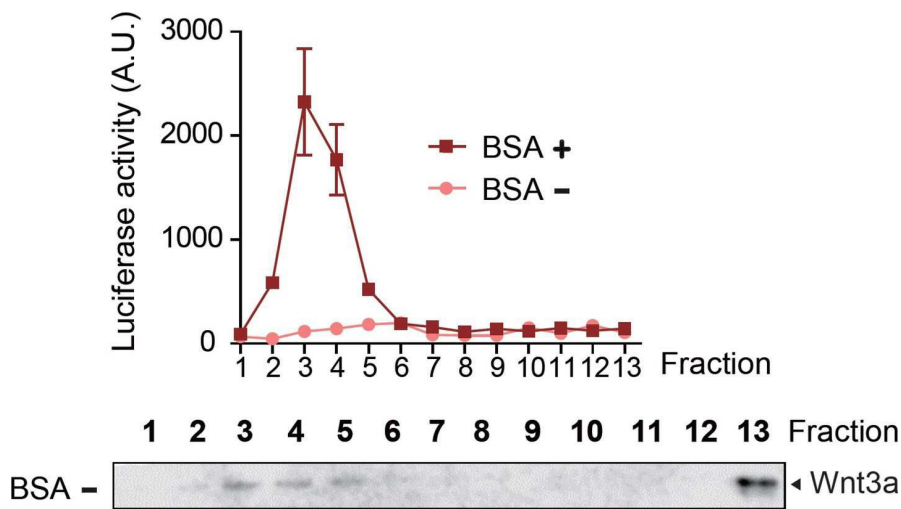
도면4b



도면4c



도면4d



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> SERUM-FREE MEDIUM FOR ENHANCING WNT ACTIVITY
- <130> 19PP30336
- <160> 3
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1803
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> hAfinin
- <400> 1

```

atggtgaaac tactaaaact tacaggtttt atttttttct tgtttttttt gactgaatcc      60
ctaaccctgc ccacacaacc tcgggatata gagaacttca atagtactca aaaatttata      120
gaagataata ttgaatacat caccatcatt gcatttgctc agtatgttca ggaagcaacc      180

tttgaagaaa tggaaaagct ggtgaaagac atggtagaat acaaagacag atgtatggct      240
gacaagacgc tcccagagtg ttcaaaatta cctaataatg ttttacagga aaaaatatgt      300
gctatggagg ggctgccaca aaagcataat ttctcacact gctgcagtaa ggttgatgct      360
caaagaagac tctgtttctt ctataacaag aaatctgatg tgggatttct gcctcctttc      420
cctaccctgg atcccgaaga gaaatgccag gcttatgaaa gtaacagaga atccctttta      480
aatcactttt tatatgaagt tgccagaagg aaccatttg tcttcgcccc tacacttcta      540
actgttgctg ttcattttga ggaggtggcc aaatcatgtt gtgaagaaca aaacaaagtc      600
    
```

aactgccttc aaacaagggc aatacctgtc acacaatatt taaaagcatt ttcttcttat	660
caaaaacatg tctgtggggc acttttgaaa ttggaacca aagtgtgaca ctttatatat	720
attgcgatac tcagtcaaaa attccccaag attgaattta aggagcttat ttctcttgta	780
gaagatgttt cticcaacta tgatggatgc tgtgaagggg atgttgtgca gtgcatccgt	840
gacacgagca aggttatgaa ccatatttgi tcaaaacaag attctatctc cagcaaaatc	900
aaagagtgct gtgaaaagaa aataccagag cgcggccagt gcataattaa ctcaaaaaa	960
gatgatagac caaaggattt atctctaaga gaaggaaaat ttactgacag tgaaaatgtg	1020
tgtcaagaac gagatgctga cccagacacc ttctttgcga agtttacttt tgaatactca	1080
aggagacatc cagacctgtc tataccagag cttttaagaa ttgttcaaat atacaaagat	1140
ctcctgagaa attgctgcaa cacagaaaac cctccagggt gttaccgtta cgcggaagac	1200
aaattcaatg agacaactga gaaaagcctc aagatggtac aacaagaatg taaacatttc	1260
cagaatttgg ggaaggatgg ttgaaatac cattacctca tcaggctcac gaagatagct	1320
ccccaaactc cactgaaga actggtgtct cttggcgaga aaatggtgac agctttcact	1380
acttgcctga cgctaagtga agagtttgcc tgtgttgata atttggcaga tttagttttt	1440
ggagagttaa gtggagtaaa tgaaaatcga actatcaacc ctgctgtgga ccactgctgt	1500
aaaacaaact ttgccttcag aaggccctgc ttgagagtt tgaaagctga taaaacatat	1560
gtgcctccac ctttctctca agatttattt acctttcacg cagacatgtg tcaatctcag	1620
aatgaggagc ttcagaggaa gacagacagg ttctttgtca acttagtgaa gctgaagcat	1680
gaactcacag atgaagagct gcagtccttg tttaaaaatt tcgcaaatgt agtggataag	1740
tgctgcaaag cagagagtc tgaagtctgc tttaatgaag agagtcctaaa aattggcaac	1800
tga	1803

<210> 2

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> XbaI-hAfin U1

<400> 2

tataatctag agccaccatg gtgaaactac taaaacttac agg	43
---	----

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hAfamin -XbaI L1

<400> 3

tatattctag attcagttgc caatttttgg ac

32