



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월01일
(11) 등록번호 10-2150489
(24) 등록일자 2020년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) A61K 35/22 (2015.01)
A61P 13/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0686 (2013.01)
A61K 35/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0041289
(22) 출원일자 2019년04월09일
심사청구일자 2019년04월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160115908 A*
KR102016257 B1*
US20160304838 A1*
KR1020160050091 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
유승권
경기도 용인시 처인구 양지면 새실로 43-3 (평창리)
김인용
서울특별시 동대문구 제기로4길 33 (제기동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이치영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 6 항

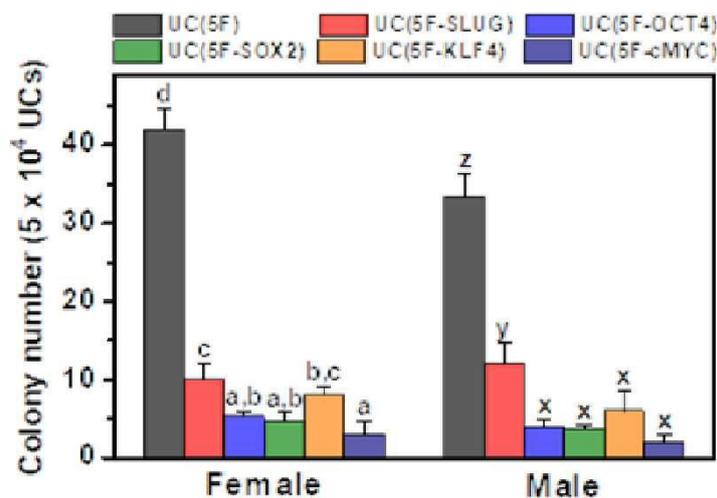
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 소변세포로부터 신장전구세포로의 직접 역분화를 유도하는 방법 및 이의 방법으로 역분화된 신장전구세포를 포함하는 신장세포 손상 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 소변세포로부터 신장전구세포로의 직접 역분화를 유도하는 방법 및 상기 방법으로 역분화된 신장전구세포를 포함하는 신장세포 손상 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 불편과 고통 없이 용이하게 반복적으로 얻을 수 있는 체세포인 소변세포를 이용하여 개인 맞춤형 역분화 신장전구세포의 대량생산이 가능하므로, 신장손상 치유와 신장재생 분야로 확대 가능한 난치병분야 및 세포치료제의 생산에 적용이 가능하다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

- A61P 13/12 (2018.01)
- C12N 2501/10 (2013.01)
- C12N 2501/155 (2013.01)
- C12N 2501/727 (2013.01)
- C12N 2501/91 (2013.01)
- C12N 2506/24 (2013.01)
- C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

고위위

서울특별시 성북구 안암로 145 안암학사 G-house
527호 (안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)

강필준

경기도 안양시 동안구 안양판교로 42, 108동 1501
호 (관양동, 인덕원마을삼성아파트)

윤원진

경기도 용인시 기흥구 예현로35번길 21, 107동 30
2호 (서천동, 예현마을현대홈타운아파트)

박규만

경기도 성남시 분당구 장미로 55, 125동 803 (야탑
동, 장미마을)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2014M3A9D3034158
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	면역기전제어기술개발
연구과제명	환자유래 자가전구세포를 활용한 신장세포 대량 배양 및 분화기술 활용 기반 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2014.06.26 ~ 2019.06.25

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 소변세포로부터 신장전구세포로의 직접 역분화를 유도하는 방법:

- (a) 소변으로부터 소변 유래 체세포를 분리하여 배양하는 단계;
- (b) 상기 배양된 소변세포에 역분화 인자 i) Oct4 단백질을 코딩하는 핵산, ii) Sox2 단백질을 코딩하는 핵산, iii) Klf4 단백질을 코딩하는 핵산, iv) c-Myc 단백질을 코딩하는 핵산 및 v) Slug 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계;
- (c) 상기 역분화 인자가 도입된 소변세포를 FGF9, BMP7, CHIR99021 및 Y-27632를 포함하는 신장전구세포 배양배지에서 배양하여 신장전구세포로 역분화를 유도하는 단계; 및
- (d) 상기 신장전구세포로 직접 역분화가 유도된 세포에서 신장전구세포의 특성 가지고 있는 역분화 신장전구세포를 선별하는 단계.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계는 상기 역분화 인자가 삽입된 바이러스 벡터를 직접 소변세포에 도입시키는 것을 특징으로 하는 소변세포로부터 신장전구세포로의 직접 역분화를 유도하는 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 신장전구세포 배양배지는 헤파린, LDN-193189 또는 L-글루타민을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 소변세포로부터 신장전구세포로의 직접 역분화를 유도하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 매트릭셀, 라미닌, 피브로넥틴, 젤라틴 또는 콜라겐이 코팅된 배양접시에서 배양하는 것을 특징으로 하는 소변세포로부터 신장전구세포로의 직접 역분화를 유도하는 방법.

청구항 7

제1항의 방법으로 역분화 유도된 신장전구세포를 유효성분으로 포함하는 신장세포 손상 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 신장세포 손상 질환은 급성/만성 신부전 (acute/chronic renal failure), 사구체신염

(glomerulonephritis), 신증후군 (nephrotic syndrome), 신우신염 (nephropylitis), 다낭성 신증 (polycystic nephropathy) 및 말기 신질환 (end-stage renal disease)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 신장세포 손상 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소변세포로부터 신장전구세포로의 직접 역분화를 유도하는 방법 및 상기 방법으로 역분화된 신장전구세포를 포함하는 신장세포 손상 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 줄기세포 (stem cell)란 신체 내에 특정 조건 및 환경이 주어지거나 자체 내에서 필요에 의해 정도에 따른 무한 자가 증식능력, 및 신체 내에서 필요한 특정 세포 및 조직으로의 분화능력을 가지고 있는 세포를 지칭한다. 줄기세포는 3가지로 분류되며, 초기 배아에서 분리한 배아 줄기세포 (embryonic stem cell, ES 세포), 배아의 원시 생식세포에서 분리한 배아 생식세포 (embryonic germ cell, EG 세포) 및 성체의 골수에서 분리한 다능성 성체줄기/전구세포 (multipotent adult progenitor cell, MAPC 세포)가 있다.

[0004] 줄기세포는 각각의 특화된 기능을 가지는 세포들로 발달하는 잠재력을 가지고 있으므로, 각종 장기의 기능회복 및 조직재생을 위한 세포치료제로 연구되고 있고, 최근에는 성형과 미용에 이르기까지 그 활용범위가 확대되고 있는 추세다.

[0005] 생체 내에서 성체줄기세포의 역할은 크게 두 가지로 요약할 수 있는데 첫째는 줄기세포 자체가 우리 몸에서 손상된 조직과 세포들로 분화되어 다시 재생시키는 역할이며, 두 번째는 일생동안 지속적으로 성장인자 및 사이토카인 등의 치료 인자들을 분비하여 인근 세포의 성장 및 재생을 돕는 역할을 수행한다.

[0006] 한편, 직접 역분화 (direct reprogramming) 방식은 체세포를 목표로 하는 다른 타입의 고유 기능을 갖은 세포로 전환 및 생산할 수 있는 기술이다. 일본의 야마나카 교수의 역분화 (reprogramming)된 유도 만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell, iPSC)와는 달리, 만능줄기세포 상태 (pluripotency state)를 거치지 않기 때문에, 핵형 (karyotypic) 안정성, 목표로 하는 세포의 균질성, 세포원 간의 변동성, 종양발생 위험, 환자에 따른 특이성, 시간 및 노력의 효율성 측면에서 장점이 있다. 그러나, 현재 수행되고 있는 직접 역분화 방식은 세포원으로 마우스 세포를 주로 이용하여 인간 체세포에서 동일하게 재현될 확률이 높지 않으며, 인간의 체세포 중에서는 흔히 피부세포 (섬유아세포)를 사용하지만, 이 경우 침습적 방식의 세포원 채취 방법이 필요하여 공여자의 고통, 안전성 위험을 초래할 수 있고 편이성이 떨어진다.

[0007] 손상 후 자연 재생에 있어 매우 제한적인 능력을 갖는 신장에 신장전구세포의 존재 유무는 현재까지 의문으로 남아 있지만, 학계에서 합의된 신장재생의 기작은 다음과 같다. 손상 후 살아남은 신장세포들이 일시적으로 탈분화하여 성장할 수 있고 손상조직을 대체할 수 있는 신장전구세포의 결정적인 역할에 기반한다 (Benigni A *et al.*, *Lancet* 375(9722):1310-7, 2010; Sallustio F *et al.*, *Biores Open Access* 4(1):326-33, 2015). 즉, 이 재생과정은 신장전구세포로부터 증식된 전구세포가 손상된 지역으로 이동하여 성장 및 분화를 통해 기능성 신장 조직으로 재구성된다. 또한, 이러한 재생과정에서 줄기세포에 의한 자기분비 (autocrine), 주변분비 (paracrine), 내분비 (endocrine) 상호작용을 통해 신장의 생리학적 세포 전환 및 신장 각 구획의 재생에 기여한다 (Bussolati B *et al.*, *Am J Pathol.* 66(2):545-55, 2005; Sagrinati C *et al.*, *J Am Soc Nephrol.* 17(9):2443-56, 2006).

[0008] 전구세포를 이용한 치료접근들은 염증반을 줄이는데 기여한다. 신장 손상 후, 염증인자 및 관련 혈관내 작동인자에 의한 활성산소 스트레스는 조직재생의 또다른 장벽으로 여겨진다. 이것은 신장손상을 확대할 뿐만 아니라 신부전 환자들에게 있어 심혈관계 질병을 유발할 위험이 있다.

[0009] 신장손상에 있어, 체세포로부터 유도된 신장전구세포의 생산 그리고 이를 이용한 의약품 소재 개발기술은 효율성 및 환자 맞춤형, 치료 효능성 측면에서 신장 조직 치료와 재생을 위한 높은 가치를 갖고 있으며, 새로운 신장 개척과 함께 새로운 바이오 산업의 모델을 제시한다는 측면에서 그 의미가 크다고 할 수 있다 (Takasato M *et al.*, *Semin Nephrol.* 4(4):462-80, 2014; Sallustio F *et al.*, *Biores Open Access.* 4(1):326-33, 2015).

[0010] 신장전구세포의 경우 단순 세포 대체 역할 뿐만 아니라 신장 재생에 중요한 역할을 하는 치료인자들을 분비하는 역할도 있어서 신장 손상을 예방 및 재생치료 제재를 개발하는데 신장 특화된 신장전구세포를 이용한다는 것은 과학적으로도 치료기대 효과에서도 지극히 당연한 접근방식이다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 손상된 신장조직의 재생 또는 대체할 수 있는 신장전구세포를 제조하고자 예의 노력한 결과, 역분화 인자 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 Slug를 도입하여 과발현시킨 소변세포를 신장 발달과정에서 중요하게 여겨지는 인자들이 포함된 환경 (niche)에서 배양함으로써 신장전구세포와 비슷한 특성 가지고 있는 역분화 신장전구세포로 유도하고, 이러한 역분화 신장전구세포를 이용하여 조직재생 효능을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 신장손상 치유와 신장재생 및 신장세포 손상 질환의 치료에 적용 가능한 신장전구세포와 비슷한 특성 가지고 있는 역분화 신장전구세포를 유도하기 위하여, 소변세포에 역분화 인자 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 Slug를 도입한 다음 신장 발달과정에서 중요하게 여겨지는 인자들이 포함된 환경 (niche)에서 배양하는 단계를 포함하는 소변세포로부터 신장전구세포로의 직접 역분화를 유도하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 소변으로부터 소변세포를 분리하여 배양하는 단계; (b) 상기 배양된 소변세포에 역분화 인자 i) Oct4 단백질을 코딩하는 핵산, ii) Sox2 단백질을 코딩하는 핵산, iii) Klf4 단백질을 코딩하는 핵산, iv) c-Myc 단백질을 코딩하는 핵산 및 v) Slug 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; (c) 상기 역분화 인자가 도입된 소변세포를 신장전구세포 배양배지에서 배양하여 신장전구세포로 역분화를 유도하는 단계; 및 (d) 상기 신장전구세포로 직접 역분화가 유도된 세포에서 신장전구세포의 특성 가지고 있는 역분화 신장전구세포를 선별하는 단계를 포함하는 소변세포로부터 신장전구세포로의 직접 역분화를 유도하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 역분화 유도된 신장전구세포를 유효성분으로 포함하는 신장세포 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 불편과 고통 없이 용이하게 반복적으로 얻을 수 있는 체세포인 소변세포를 이용하여 개인 맞춤형 역분화 신장전구세포의 대량생산이 가능하므로, 신장손상 치유와 신장재생 분야로 확대 가능한 난치병분야 및 세포치료제의 생산에 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1a는 직접 역분화 기술을 이용하여 신장전구세포로 유도하기 위해 시도된 전사인자들의 조합을 보여주고, 이를 통해 유도된 세포들의 콜로니 형성능과 자가증식능을 나타낸 결과이다.

도 1b는 여성과 남성 유래 소변세포에 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 Slug 전사인자들의 조합에 따라, 유도된 세포들의 콜로니 형성능을 비교한 결과이다 (5F : Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 Slug 조합; 5F-Slug : Oct4, Sox2, Klf4 및 c-Myc의 조합).

도 1c는 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 Slug 전사인자들의 조합에 따라, 신장전구세포 마커 유전자 SIX2의 발현 정도를 비교한 결과이다.

도 2는 소변세포를 직접 역분화 기술을 이용하여 신장전구세포로 유도하고 콜로니를 얻은 후, 해당 콜로니 배양을 통해 신장전구세포 수를 확대하고 신장세포로 분화하기까지의 전체 공정을 도식한 것이다.

도 3은 소변세포로부터 OCT4 및 SOX2, KLF4, cMYC, SLUG 유전자를 도입하여 역분화 신장전구세포 유도한 후, 배아줄기세포에서 유래한 신장전구세포를 양성 대조군으로 하여 RT-PCR에 의한 mRNA 수준 분석을 통해 SIX2 및 CITED1, WT1와 같은 신장전구세포 마커 유전자를 발현하는지 여부를 유도시간에 따라 확인한 결과이다.

도 4는 여성 또는 남성 유래 소변세포를 이용하여 역분화 신장전구세포를 유도한 콜로니를 선별 후 확장배양하

여, RT-PCR에 의한 mRNA 수준 분석을 통하여 SIX2 및 CITED1, WT1와 같은 신장전구세포 마커 유전자를 발현하는지 여부를 확인한 결과이다.

도 5는 소변세포를 이용하여 역분화 신장전구세포를 유도한 후, RT-PCR에 의한 mRNA 수준 분석을 통하여 NANOG 및 OCT4와 같은 만능성 마커 유전자 발현 여부를 통해, 유도 만능성 줄기세포와 같은 종양발생 위험으로부터의 안정성을 확인한 결과이다.

도 6은 면역분석법을 통하여 역분화 신장전구세포가 SIX2 및 CITED1와 같은 신장전구세포 마커 유전자를 발현하는지 여부를 확인한 결과이다.

도 7은 여성 또는 남성 유래 소변세포를 이용하여 역분화 신장전구세포가 SIX2 및 CITED1와 같은 신장전구세포 마커 단백질의 발현 여부를 웨스턴 블랏 분석을 통해 확인한 결과이다.

도 8은 여성 또는 남성 유래 소변세포를 이용하여 역분화 신장전구세포가 정상적인 염색체를 보존하고 있는지 여부를 시간에 따라 핵형분석을 통해 확인한 결과이다.

도 9는 역분화 신장전구세포가 SIX2와 CITED1 같은 신장전구세포 마커 유전자가 신장전구세포 확장배양 배지에서 긴시간 동안 발현유지가 되는지 mRNA 수준 분석과 FACS 분석을 통해 확인한 결과이다.

도 10a 내지 10d는 총 RNA 시퀀싱 (sequencing)을 통해 전체 유전자 발현 수준 (global gene expression level)에서 역분화 신장전구세포가 본래의 여성 또는 남성 소변유래 세포보다 H9, BG01 배아줄기세포에서 유래한 신장전구세포와 유사한 mRNA 및 lnc-RNA(long non-coding - RNA) 발현 패턴을 보이는지 여부를 확인한 결과이다.

도 11은 총 RNA 시퀀싱을 통해 전체 유전자 중 신장발달과 관련된 유전자 발현 수준에서 역분화 신장전구세포가 본래의 여성 또는 남성 소변유래 세포보다 H9, BG01 배아줄기세포에서 유래한 신장전구세포와 유사한 mRNA 및 lnc-RNA(long non-coding - RNA) 발현 패턴을 보이는지 여부를 확인한 결과이다.

도 12는 총 RNA 시퀀싱을 통해 전체 유전자 발현 수준에서 여성 또는 남성 소변세포로부터 역분화 신장전구세포와 BG01 배아줄기세포에서 유래한 신장전구세포 사이에서 신장발달 관련 mRNA 발현 공통성을 벤 다이어그램으로 보여주는 결과이다.

도 13은 총 RNA 시퀀싱을 통해 전체 유전자 발현 중 신장발달과 연관된 세부적으로 나누어 각 그룹의 유전자 발현 수준에서 소변세포로부터 유도된 신장전구세포와 BG01 배아줄기세포에서 유래한 신장전구세포 사이 유사성을 비교한 결과이다.

도 14는 역분화 신장전구세포의 사구체 발세포 (Glomerular Podocyte)로의 분화능력을 검증하기 위해 사구체 발세포 유전자 마커인 Nephin, Synaptopodocin, podocalyxin의 발현을 RT-PCR에 의한 mRNA 수준 분석을 통하여 확인한 결과이다.

도 15는 역분화 신장전구세포의 사구체 발세포로의 분화능력을 검증하기 위해 사구체 발세포의 특이적인 형태를 분화전 형태와 현미경으로 비교하고 사구체 발세포 유전자 마커인 Synaptopodocin, POXDL의 발현을 면역염색법을 통해 확인한 결과이다.

도 16은 역분화 신장전구세포의 요세관 세포 (renal tubular cells)로의 분화능력을 검증하기 위해 요세관 세포 유전자 마커인 CD13, AQP1의 발현을 RT-PCR에 의한 mRNA 수준 분석을 통하여 확인한 결과이다.

도 17은 역분화 신장전구세포가 요세관 세포로의 분화능력을 검증하기 위해 요세관 세포 유전자 마커인 AQP1, LTL의 발현을 면역염색법을 통해 확인한 결과이다.

도 18은 역분화 신장전구세포의 신단위 유사 조직으로의 분화능력을 검증하기 위해 신단위 유사 조직의 특이적인 형태를 확인하고 사구체 발세포 유전자 마커 PODXL과 요세관 세포 유전자 마커인 LTL의 발현을 면역염색법을 통해 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0023] 본 발명에서는 소변으로부터 소변세포를 분리, 배양하고 Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc 및 Slug 역분화 인자 조합이 도입된 벡터를 소변세포에 도입시켰다. 해파린, LDN-193189, L-글루타민이 포함된 Advanced RPMI 1640 배지에 FGF9, BMP7, CHIR99021 및 Y-27632를 첨가하여 상기 역분화 인자들이 도입된 소변세포를 배양함으로써, 신장전구세포로 역분화를 유도하였다.
- [0024] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 소변으로부터 소변세포를 분리하여 배양하는 단계; (b) 상기 배양된 소변세포에 역분화 인자 i) Oct4 단백질을 코딩하는 핵산, ii) Sox2 단백질을 코딩하는 핵산, iii) Klf4 단백질을 코딩하는 핵산, iv) c-Myc 단백질을 코딩하는 핵산 및 v) Slug 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 단계; (c) 상기 역분화 인자가 도입된 소변세포를 신장전구세포 배양배지에서 배양하여 신장전구세포로 역분화를 유도하는 단계; 및 (d) 상기 신장전구세포로 직접 역분화가 유도된 세포에서 신장전구세포의 특성 가지고 있는 역분화 신장전구세포를 선별하는 단계를 포함하는 소변세포로부터 신장전구세포로의 직접 역분화를 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "역분화 신장전구세포"란 분화된 세포에 역분화 기술을 이용하여 신장줄기세포와 유사 또는 동일한 다분화능(pluripotency)을 가진 미분화 상태의 줄기세포를 확립하는 방식으로 만들어진 세포들을 의미한다. 유도 신장전구세포는 신장전구세포와 동일 또는 유사한 특성을 가지고 있는데, 구체적으로는 비슷한 세포 형태를 보여주고, 유전자 및 단백질 발현 패턴이 유사하며, 생체 내에서 다분화능을 가질 수 있다. 따라서 본 발명의 역분화 신장전구세포는 사구체 발세포(Glomerular Podocyte) 또는 요세관 세포(renal tubular cells) 등으로 분화 가능한 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 사용된 용어 "신장전구세포"는 신장조직 구성 세포로 분화 가능한 다능성(multipotent) 미분화 세포(줄기세포 및/또는 전구세포)로써, 발세포와 요세관세포로 분화할 수 있는 미분화 세포 또한 포함한다.
- [0027] 본 발명에서 역분화(dedifferentiation)는 분화된 세포가 하나 이상의 서로 다른 조직 형태로 분화하기 전에 '줄기세포'-유사 또는 다능성 세포 상태(multipotent state)를 획득하는 현상에 대한 것이다.
- [0028] 본 발명에서 용어 "분화(differentiation)"란 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 세포의 구조나 기능이 특수화되는 현상을 의미한다. 다능성 중간엽 줄기세포는 계통이 한정된 전구세포(예컨대, 중배엽성 세포)로 분화한 후, 다른 형태의 전구세포로 더 분화될 수 있고, 그 뒤 특정 조직에서 특징적인 역할을 수행하는 말기 분화세포(예컨대, 지방세포, 골세포, 연골세포 등)로 분화될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 "신장전구세포"는 특정 조직(예컨대, 신장조직)에서 특징적인 역할을 수행하는 말기 분화세포들, 즉 신장구성세포들로부터 분화할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 용어 "소변세포(Urine cells; UCs)"는 환자의 나이나 성별, 건강상태와 관련 없이 저비용으로 안전하고 간단하게 아무런 불편과 고통 없이 언제든지 용이하게 반복적으로 획득 가능하고, 특별한 분리과정 없이 소변으로부터 얻을 수 있는 체세포로 알려져 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 소변세포는 소변 유래 체세포인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서는 소변세포에서 역분화 인자인 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc와 동시에 전사인자 Slug을 발현시킬 경우, 이미 분화된 세포 타입인 소변세포가 분화능을 가지는 신장전구세포로 역분화(de-differentiation)하는 가능성을 발견하였다.
- [0033] 본 발명의 용어 "역분화 인자"는 2006년 야마나카(Yamanaka) 교수팀에 의해 도입된 개념인 역분화(Reprogramming)에서부터 시작되었다. 성체의 모든 조직은 정상 발달 과정을 거치면서 분화되지 않은 미분화 상태에서 점차적으로 분화되어 각 기능이 전문화된 세포로 변화한다. 그 중 수정란의 세포들은 전능성(Totipotent)을 가지고 있고, 이후 발달 단계가 진행되면서 배반포가 되면 내부 세포괴(inner cell mass)와 바깥쪽 세포들로 구분이 가능하다. 이때의 내부 세포괴 세포들이 배아 체세포와 생식세포로 발생할 수 있으며 이를 만능성(pluripotent)라 부른다. 이 배아 줄기세포는 만능성 특유의 유전자 발현 양상을 보여주는데 그 대표적인 예가 Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 등이다. 역분화는 체세포에 이러한 특이적인 유전자 발현을 유도하여 배아 줄기세포 및 성체 줄기세포 등 미분화세포와 유사한 성질로 되돌리는 기술이라 할 수 있다. Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc은 그에 따른 일련의 연구들에서 사용되어 왔던 다양한 인자들로써, 본 발명에서 소변세포로부터 신장전구세포로 역분화 시키는데 이용하였다.
- [0034] 본 발명의 "Slug"는 또한 "Snai2"라고도 알려져 있어서, Slug와 Snai2는 동일한 것으로 이해될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug(또는 Snai2)는 인간과 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의

동물 유래의 모든 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2)을 포함하며, 바람직하게는 인간 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2)이다. 또한, 신장전구세포로의 역분화에 사용되는 본 발명의 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질은 이의 야생형 (wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라, Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질의 변이체를 포함할 수 있다.

- [0036] 구체적인 일 실시예에서, 역분화에 사용된 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2)의 유전자 서열은 Cell 2007 Nov 30; 131(5):861-72에 게시된 것을 사용하였다.
- [0037] Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질의 변이체란 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2)의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 상기 변이체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이거나, 필요에 의해서 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체일 수 있다. 물리, 화학적 환경에 대한 구조적 안정성이 증대되거나 생리학적 활성이 증대된 변이체이다.
- [0038] 상기 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 핵산은 야생형 또는 상이한 바와 같은 변이체 형태의 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 핵산으로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0039] 상기 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA) 또는 RNA 분자일 수 있다.
- [0040] 하나의 바람직한 양태에서, 본 발명에서 소변세포를 신장전구세포로 역분화를 유도하는 역분화 인자는 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산이 도입된 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug(or Snai2) 단백질을 발현하는 벡터를 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 상기 역분화 인자가 삽입된 바이러스 벡터를 직접 소변세포에 도입시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 용어, “벡터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [0043] 본 발명에서 용어 “작동가능하게 연결된 (operably linked)”은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결 (functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0044] 본 발명의 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리 아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.
- [0045] 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 바람직하게는, 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스 (Retrovirus), 예를 들어 HIV (Human immunodeficiency virus) MLV (Murine leukemia virus) ASLV (Avian sarcoma/leukosis), SNV (Spleen necrosis virus), RSV (Roussarcoma virus), MMTV (Mouse mammary tumor virus) 등, 아데노바이러스 (Adenovirus), 아데노 관련 바이러스 (Adeno-associated virus), 헤르페스 심플렉스 바이러스 (Herpes simplex virus) 등에서 유래한 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, MMLV-기반-바이러스 벡터 (Murine Moloney leukemia virus based virus vector)로 pMXs 벡터를 이용하였다.
- [0046] 본 발명에서 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 당 분야의 공지 방법, 예를 들어 벡터 형태의 네이키드 DNA로 세포내로 전달하거나 (Wolff et al. Science, 1990; Wolff et al. J Cell Sci. 103:1249-59, 1992), 리포솜 (Liposome), 양이온성 고분자 (Cationic polymer)등을 이용하여 세포 내로 전달할 수 있다. 리포솜은 유전자 전달을 위하여 DOTMA나 DOTAP 등의 양이온성 인지질을 혼합하여 제조한 인지질 막으로, 양이온성의 리포솜과 음이온성의 핵산이 일정 비율로 혼합하면 핵산-리포솜 복합체가 형성된다.

- [0047] 또 다른 바람직한 양태로서, 본 발명에서 소변세포를 신장전구세포로 역분화를 유도하는 조성물은 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 핵산을 포함하는 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 발현하는 바이러스를 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 용어 “바이러스”는 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 패키징 세포로 형질전환 및 감염시켜 제작한 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2)을 발현하는 바이러스를 의미한다.
- [0049] 본 발명의 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 발현하는 바이러스 제조에 사용될 수 있는 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 등을 포함하며 이로 제한되지 않는다. 바람직하게는, 레트로바이러스이다.
- [0050] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, pMXs 벡터에 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 삽입하여 제조한 벡터(pMXs-Oct4 및 pMXs-Sox2, pMXs-Klf4, pMXs-c-Myc, pMXs-Slug (또는 pMXs-Snai2))를 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 광범위한 포유류 숙주세포에 감염이 가능한 고역가 바이러스를 생성하는 패키징 세포인 293gpg 세포에 형질전환시켜 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2) 단백질을 발현시키는 바이러스를 제조하여 소변세포를 감염시켰다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (a)에서 소변세포의 배양은 FBS (fetal bovine serum) 및 bFGF (basic fibroblast growth factor), EGF(epithelial growth factor) 함유 배지에서 이루어질 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 사용된 용어, “배지 (culture medium)”는 *in vitro* 상에서 세포들의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 소변세포 및 역분화 신장전구세포 유도 및 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포의 종류에 따라 배지 및 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지 (cell culture minimum medium; CCMM)로 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 최소 배지에는 예를 들어, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, αMEM (α Minimal essential Medium), GMEM (Glasgow's Minimal essential Medium), 및 IMEM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한 상기 배지는 페니실린 (penicillin), 스트렙토마이신 (streptomycin) 또는 겐타마이신 (gentamicin) 등의 항생제를 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 소변에서 분리한 세포들을 FBS, bFGF 및 EGF를 함유하는 기본 배지에서 배양함으로써 수득할 수 있으며, 구체적으로 FBS가 포함된 하이 글루코즈 DMEM 및 REGM (Renal Epithelial Cell Growth Medium, Lonza사) 배지에 bFGF 및 EGF를 첨가하여 배양함으로써 수득할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 하이 글루코즈 DMEM 및 REGM 배지는 L-글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신을 추가로 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b)에서 역분화 인자를 소변세포에 도입하는 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 세포에 핵산분자 또는 단백질을 제공하는 방법을 제한없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 역분화 인자를 분화된 세포의 배양액에 투여하는 방법 또는 역분화 인자를 분화된 세포에 직접 주입하는 방법을 사용할 수 있으며, 이때 사용되는 역분화 인자는 해당 인자의 유전자를 삽입한 바이러스 벡터로 형질감염시킨 패키징 세포로부터 수득한 바이러스, 시험관 내 전사 (*in vitro* transcription)에 의해 생산한 mRNA, 또는 다양한 세포주 내에서 생산된 단백질 등의 형태로 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, 소변세포로의 상기 역분화 인자의 도입은 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug (또는 Snai2)를 코딩하는 DNA를 사용하였다.
- [0055] 상기 DNA를 분화된 세포에 직접 주입하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 선택하여 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 미세주입법 (microinjection), 전기천공법 (electroporation), 입자 분사법 (particle bombardment), 직접근육주입법, 인슐레이터 (insulator) 및 트랜스포존을 이용한 방법 중에서 적절하게 선택하여 적용할 수 있다. 구체적으로 본 발명의 실시예에서 역분화 인자의 DNA는 전기천공법을 이용하여 소변세포에 도입하였었다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (c)에서 Oct4 및 Sox2, Klf4, c-Myc, Slug 단백질을 코딩하는 핵산이 도입된 소변세포를 신장전구세포로 유도하는 배지 (신장전구세포 유도배지)는 LDN-193189, CHIR99021, FGF9, BMP7 중 하나 이상이 함유된 기본 배지에서 배양함으로써 신장전구세포로의 역분화를 유도할 수 있으며, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 배지는 Advanced RPMI 1640 배지에 Y-27632, CHIR99021, FGF9, BMP7 모두 첨가하고 추가적으로, LDN-193189, Heparin, L-glutamine를 첨가한 배지에서의 신장전구세포 전환률이 가장 우수함을 확인하였다.

- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 (c)단계의 배양배지는 FGF9, BMP7, CHIR99021 및 Y-27632을 포함하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 헤파린, LDN-193189 또는 L-글루타민을 추가로 포함하는 것이며, Advanced RPMI 1640 기본배지에 포함되는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 또한, 상기 배양 배지에서의 배양은 Matrigel, laminin, fibronectin, gelatin 및 collagen 중 하나 또는 하나 이상의 코팅 조건에서 수행되는 경우 유도 효율이 증가할 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 상기 단계 (d)에서 유도된 신장전구세포들의 선별은 상기 단계 (c)를 수행한 후 생성된 신장전구세포 콜로니를 채취하는 것이며, 상기 선별된 신장전구세포는 신장전구세포 배지에서 배양할 수 있다.
- [0060] 상기 신장전구세포 배지는 Advanced RPMI 1640 배지에 FGF9, BMP7, Y-27632, CHIR99021, Heparin, LDN-193189, L-glutamine 모두 첨가한 배지일 수 있다. 추가로, 상기 역분화 신장전구세포는 0.5mM EDTA 용액 혹은 Accutase 용액을 이용하여 계대 배양할 수 있다.
- [0062] 본 발명은 다른 관점에서, 상기의 방법으로 역분화 유도된 신장전구세포를 유효성분으로 포함하는 신장세포 손상 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기의 방법으로 역분화 유도된 신장전구세포를 투여하는 단계를 포함하는 신장세포 손상 질환 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0064] 본 발명은 또 다른 관점에서, 신장세포 손상 질환 예방 또는 치료 방법에 사용하기 위한 상기 방법으로 역분화 유도된 신장전구세포에 관한 것이다.
- [0065] 본 발명은 또 다른 관점에서, 신장세포 손상 질환 예방 또는 치료 방법에 사용하기 위한 상기 방법으로 역분화 유도된 신장전구세포를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0066] 본 발명은 또 다른 관점에서, 신장세포 손상 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 방법으로 역분화 유도된 신장전구세포의 용도에 관한 것이다.
- [0067] 본 발명의 역분화 신장전구세포는 사구체 발세포 (Glomerular Podocyte) 또는 요세관 세포 (renal tubular cells) 등으로 분화 가능한 다분화능을 가진 세포로, 손상되거나 소실된 신장 세포들을 복구할 수 있어, 상기 신장 세포들의 손상 또는 소실로 인해 발생하는 질환을 제한 없이 치료가 가능하다.
- [0068] 구체적으로, 상기 신장세포 손상으로 발생하는 질환은 급성/만성 신부전 (acute/chronic renal failure), 사구체신염 (glomerulonephritis), 신 증후군 (nephrotic syndrome), 신우신염 (nephropylitis), 다낭성 신증 (polycystic nephropathy), 말기 신질환 (end-stage renal disease)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 상기 약제학적 조성물은 그 지속적으로 효과를 증진시키기 위하여 약물전달 시스템을 추가로 도입할 수 있다. 예컨대, 고분자 수화젤, 고분자 마이셀, 에멀전, 리포솜, 고분자 입자, 미세침 등의 형태의 전달시스템에 담지될 수 있으며, 이러한 시스템을 구성하고 있는 재료로는 천연 및 합성 고분자, 무기물을 포함될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의

기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0071] 본 발명의 일 실시예에 따른 약학 조성물에 포함된 상기 제제의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 10 중량%의 함량으로 포함할 수 있다.

[0072] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[0073] 본 발명의 약학조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 10 내지 100 mg/kg, 보다 바람직하게는 10 내지 30 mg/kg으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 내지 3회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.

[0074] 본 발명의 용어 "예방"이란, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여로 신장세포 손상 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0075] 본 발명에서 용어 "치료"란, 본 발명의 약학 조성물을 투여함으로써, 신장세포 손상 질환이 호전되거나 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[0076] 본 발명의 용어 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 행위를 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0077] 본 발명의 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있다.

[0079] **[실시예]**

[0080] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0082] **실시예 1: 소변으로부터 소변세포 (Urine cell)의 분리**

[0083] 소변으로부터 소변세포를 분리하는 방법은 1972년 영국의 Sutherland와 Bain가 개발한 기술을 기본으로 하였으며, 구체적으로는 다음과 같다.

[0084] 먼저 공여자에게 제공받은 소변을 1000g로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거 후 하층에 남은 펠릿을 1% Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B 항생제가 포함된 PBS 용액 20ml에 희석하였다. 그 다음 희석된 PBS + 펠릿 용액을 1000g로 10분간 원심분리하였다. 다시 상층액을 제거 후 하층에 남은 펠릿을 젤라틴이 코팅된 12-웰 세포배양 접시에 DMEM/F12를 기본으로 하여 1% Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B 항생제, 1% L-글루타민, 10% FBS가 포함된 기본배지 1ml로 희석하여 시딩하였다. 이후 3일간 기본배지를 1ml씩 첨가하여 배양한 후 DMEM과 REGM (Renal Epithelial Cell Growth Medium, Lonza사)을 1:1로 섞은 배지를 기본으로 하여 1% Penicillin/Streptomycin 항생제, 1% L-글루타민, 5% FBS, 10ng/ml bFGF, 10g/ml EGF가 포함된 성장배지로 변경하여 배양하였다.

[0086] **실시예 2: 소변세포에 역분화 인자 도입**

[0087] pMXs벡터에 Oct4 및 Klf4, Sox2, c-Myc, Slug, Six1, Six2, Osr1, Pax2, Eya1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입하여 제조한 벡터 pMXs-Oct4 및 pMXs-Klf4, pMXs-Sox2, pMXs-cMyc, pMXs-Slug, pMXs-Six1,

pMXs-Six2, pMXs-Osr1, pMXs-Pax2, pMXs-Eya1를 인간 293-유래 레트로바이러스 패키징 세포주인 293GPG를 이용하여 상기 역분화 인자 조합이 도입된 벡터를 제조하였다. 이러한 역분화 인자 조합이 도입된 벡터를 실시예 1에서 분리, 배양한 소변유래 세포에 Lipofectamine 2000 (Life Technologies)을 통해 주입시켜, 역분화 인자가 도입된 소변세포를 제조하였다.

[0088] 상기 역분화 인자들을 도입한 소변세포는 젤라틴이 코팅된 6-웰 세포배양 접시에 DMEM과 REGM을 1:1로 섞은 배지를 기본으로 하여 1% Penicillin/Streptomycin 항생제, 1% L-글루타민, 5% FBS, 10ng/ml bFGF, 10g/ml EGF을 포함한 환경에서 2일 동안 배양하였다.

[0090] **실시예 3: 소변유래 역분화 신장전구세포 유도**

[0091] 매트릭젤 (Matrigel)이 코팅된 세포배양 접시에 상기 역분화 인자들이 도입된 소변유래 세포를 시딩한 후 1ug/ml의 헤파린, 125nM의 LDN-193189, 0.5%의 L-글루타민이 포함된 Advanced RPMI 1640 (Gibco) 배지를 기본으로 100ng/ml의 FGF9, 30ng/ml의 BMP7, 1.25uM의 CHIR99021, 10uM의 Y-27632를 첨가한 신장전구세포 유도 및 확장 배지로 10-13일간 배양하였다. 유도 완료시 신장전구세포 콜로니의 발생 여부를 확인할 수 있었다 (도 1a 및 도 2).

[0092] 특히, 야마나카 인자 조합 (Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc)에 Slug가 추가된 조합 (5F : Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Slug)에서 자가증식능과 콜로니 형성능이 우수한 것으로 확인되었다 (도 1b). 그러나, 5개 인자 모두가 도입된 경우와 비교해서, 각 인자가 하나씩 제거된 4개 인자 조합들로부터 유도된 남성과 여성 유래 신장전구세포는 매우 적은 콜로니 형성능을 보여주었다 (도 1b). 또한, 대표적인 신장전구세포 마커 유전자인 SIX2 mRNA 수준 분석에서도, 5개 인자 모두가 도입된 신장전구세포는 4개 조합들 또는 배아줄기세포로부터 유도되었을 경우보다 훨씬 높은 발현 정도를 보여주었다 (도 1c).

[0093] 유도된 역분화 신장전구세포 콜로니를 채취하여 매트릭젤이 코팅된 세포배양 접시에 상기 신장전구세포 유도 및 확장 배지를 넣어 배양하였다. 역분화 신장전구세포는 이후 0.5mM EDTA 용액 혹은 Accutase 용액을 이용하여 계대 배양하고, 이후 다음의 실시예에서 상기 역분화 신장전구세포의 다양한 특성을 검증하였다.

[0095] **실시예 4: 역분화 신장전구세포의 분자생물학적 특성 분석**

[0096] 4-1: 신장전구세포 마커 유전자 발현 확인

[0097] 배아줄기세포에서 유래한 신장전구세포를 양성 대조군으로 하여 RT-PCR에 의한 mRNA 수준 분석을 통하여 역분화 신장전구세포가 SIX2, CITED1, WT1, NCAM1와 같은 신장전구세포 마커 유전자를 발현하고 있음을 확인하였다 (도 3 및 도 4). 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[0098] SIX2: forward-CTCAAGGCACACTACATCGAG (서열번호 1)

[0099] reverse-GTTGTGGCTGTTAGAATTGGA (서열번호 2)

[0100] CITED1: forward-CAGCATCACTTCCCGCCAATTT (서열번호 3)

[0101] reverse-TTGCGATCTTTCACCGCAAGG (서열번호 4)

[0102] WT1: forward-TGTGTGCTTACCCAGGCTGCAA (서열번호 5)

[0103] reverse-CCGGGAGAAGTTTCGCTGACAA (서열번호 6)

[0104] NCAM1: forward-CGATCTCATGGTTTCGGGATGG (서열번호 7)

[0105] reverse-TCATCAAAGTGCACCTGGGCTG (서열번호 8)

[0107] 4-2: 만능성 마커 유전자 발현 확인

[0108] NANOG 및 OCT4와 같은 만능성 마커 유전자 발현 여부를 통해, 유도 만능성 줄기세포와 같은 종양발생 위험으로부터의 안전성을 확인하였다.

[0109] 유도 만능성 줄기세포를 양성 대조군으로 하여 역분화 신장전구세포에서 NANOG 및 OCT4와 같은 만능성 마커 유전자의 발현 유무를 RT-PCR에 의한 mRNA 수준 분석을 통하여 확인하였다 (도 5). 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[0110] NANOG: forward-ATAGCAATGGTGTGACGCAG (서열번호 9)

- [0111] reverse-GATTGTTCCAGGATTGGGTG (서열번호 10)
- [0112] OCT4: forward-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG (서열번호 11)
- [0113] reverse-CTTCCCTCCAACCAAGTTGCCCAAAC (서열번호 12)
- [0115] 4-3: 단백질 수준에서 신장전구세포 마커 발현 확인
- [0116] 역분화 신장전구세포에서 SIX2 및 CITED1과 같은 신장전구세포 마커의 단백질 수준의 발현을 면역염색법을 통해 확인하였다 (도 6). 항체는 SIX2 (11562-1-AP, Proteintech) 및 CITED1 (H00004435, Abnova)을 사용하였다.
- [0117] 또한, 웨스턴 블랏을 통해 여성과 남성 소변 유래 세포로부터 역분화 신장전구세포가 SIX2 및 CITED1과 같은 신장전구세포 마커 단백질을 발현하고 있음을 확인하였다 (도 7).
- [0119] 4-4: 핵형 분석 및 신장전구세포 마커 mRNA의 양적 분석
- [0120] 역분화 신장전구세포의 분자생물학적 특성을 검증하기 위하여, 역분화 신장전구세포가 정상적인 염색체를 시간에 따라 보존하고 있음을 핵형분석을 통해 확인하였다 (도 8).
- [0121] 다음으로, mRNA의 양적 분석을 통해 역분화 신장전구세포가 SIX2와 같은 신장전구세포 마커 유전자 발현을 시간 지남에도 일정량을 유지하고 있음을 qRT-PCR과 FACS에 의해 확인하였다 (도 9).
- [0123] 4-5: 신장발달과 관련된 유전자 발현 수준 확인
- [0124] 총 RNA 시퀀싱(sequencing)을 통해 신장발달과 관련된 유전자 발현 수준 (global gene expression level)에서 역분화 신장전구세포가 본래의 소변 유래 세포보다 배아줄기세포에서 유래한 신장전구세포와 유사한 mRNA 및 lnc-RNA 발현 패턴을 보임을 확인하였다 (도 9).
- [0125] 또한, 총 RNA 시퀀싱을 통해 전체 유전자 중 신장발달과 관련된 유전자 발현 수준에서 역분화 신장전구세포가 본래의 여성 또는 남성 소변 유래 세포보다 배아줄기세포에서 유래한 신장전구세포와 유사한 mRNA 및 lnc-RNA(long non-coding - RNA) 발현 패턴을 보이는지 여부를 확인하고, 신장발달 관련 mRNA 발현 공통성을 벤다이어그램 분석을 통해 확인하였다 (도 11 및 도 12).
- [0126] 더 나아가, 총 RNA 시퀀싱을 통해 전체 발현 유전자 중 신장발달과 관련된 유전자를 세부적으로 나누고, 각 그룹의 유전자 발현 수준에서 소변세포로부터 역분화 신장전구세포와 BG01 배아줄기세포에서 유래한 신장전구세포 사이 유사성을 확인하였다 (도 13).
- [0128] **실시예 5: 역분화 신장전구세포의 분화능력 분석**
- [0129] 5-1: 사구체 발세포로의 분화능력 분석
- [0130] 역분화 신장전구세포를 사구체 발세포로 분화시키기 위해, 신장전구세포를 DMEM/F12 배지에 1% Penicillin/Streptomycin 항생제, 1% L-글루타민, 10% FBS, 100nM 비타민 D3와 60uM all-trans retinoic acid를 첨가한 사구체 발세포 분화배지에 7일간 배양하여 분화를 유도하였다. 그 결과, 사구체 발세포 마커 유전자인 Nephin, Synaptopodocin, podocalyxin를 발현하는 것을 확인하였다 (도 14).
- [0131] 사구체 발세포 마커 유전자 분석을 위해 사용된 RT-PCR 프라이머 서열은 다음과 같다.
- [0132] Nephin: forward-TGGCTCGGACCAAACCAACATT (서열번호 13)
- [0133] reverse-AGGGCCTCATACCTGATGCAGA (서열번호 14)
- [0134] Synaptopodocin: forward-CGCTACCACACCAACTTCTAA (서열번호 15)
- [0135] reverse-CTAGAAAGTGGCAGGCTCTGTG (서열번호 16)
- [0136] podocalyxin: forward-CTTGAGACACAGACAGAG (서열번호 17)
- [0137] reverse-CCGTATGCCGCACTTATC (서열번호 18)
- [0138] 또한, 면역염색법을 통해 각각 Synaptopodocin, POXDL를 염색하여 역분화 신장전구세포가 사구체 발세포로 분화할 수 있음을 확인하였다 (도 15). 항체는 naptopodocin (SC-21537, Santa cruz bitechology) 및 POXDL (AF1658, R&D Systems)를 사용하였다.

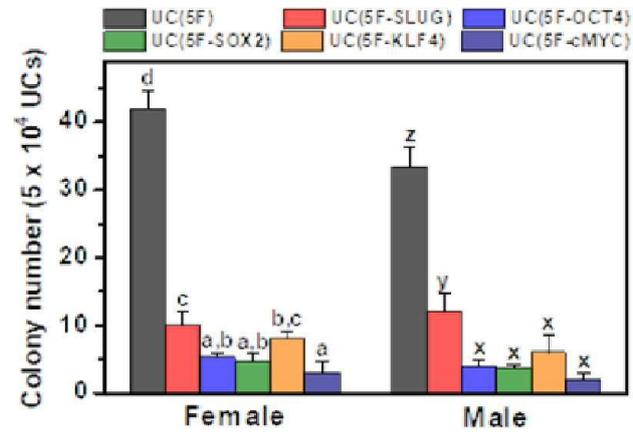
- [0140] 5-2: 요세관 세포로의 분화능력 분석
- [0141] 신장전구세포를 DMEM/F12 배지에 1% Penicillin/Streptomycin 항생제, 1% L-글루타민, 10% FBS, 1X ITS, 20 ng/mL hEGF (human epidermal growth factor), 1nM tri-iodothyronine와 100ng/ml hydrocorticone를 첨가한 요세관 세포 분화배지에서 21일간 배양하여 요세관 세포로 분화를 유도하였다. 그 결과, 요세관 세포 마커 유전자인 CD13, AQP1을 발현하는 것을 확인하였다 (도 16).
- [0142] 요세관 세포 마커 유전자 분석을 위해 사용된 RT-PCR 프라이머 서열은 다음과 같다.
- [0143] CD13: forward-CCATGAAGGCCGAGTTCAACA (서열번호 19)
- [0144] reverse-ATGAAGCCAGCAAGTACGTG (서열번호 20)
- [0145] AQP1: forward-ATGCCGACGACATCAACTCCAG (서열번호 21)
- [0146] reverse-TGAGTCGGTGAGCAACTTTGGG (서열번호 22)
- [0147] 또한, 면역염색법을 통해 각각 LTL, AQP1, E-cadherin를 염색하여 역분화 신장전구세포가 요세관 세포로 분화할 수 있음을 확인하였다 (도 17). 항체는 LTL (B-1325, Vector Labs), AQP1 (SC32737, Santa cruz biotechnology). E-cadherin (610181, BD Biosciences)를 사용하였다.
- [0149] 5-3: 신단위 유사 조직으로의 분화능력 분석
- [0150] Advanced RPMI 1640(Gibco)에 1% Penicillin/Streptomycin(P/S), 1% L-글루타민(L/G), 100ng/ml FGF9, 30ng/ml BMP7, 1.25 uM CHIR, 125nM LDN, 10uM Y27632 및 10ng/ml 헤파린를 첨가한 NPEM에서 신장전구세포를 1일간 배양한 후, ARPMI 배지에 1% P/S, 1% L/G, 10ng/ml FGF9, 3 uM CHIR를 첨가한 분화배지에서 2일간 배양하고, ARPMI 배지에 1% P/S, 1% L/G, 10ng/ml FGF9를 첨가한 분화배지에서 3일간 배양한 다음, ARPMI 배지에 1% P/S, 1% L/G를 첨가한 배지에서 7-14일간 배양하여 신단위 유사 조직으로 분화를 유도하였다. 그 결과, 사구체 발세포 마커 유전자인 PODXL 및 요세관 세포마커 유전자인 LTL을 발현하고 있음을 면역염색법을 통해 확인하였다 (도 18). 항체는 PODXL (AF1658, R&D Systems), LTL (B-1325, Vector Labs)를 사용하였다.
- [0152] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

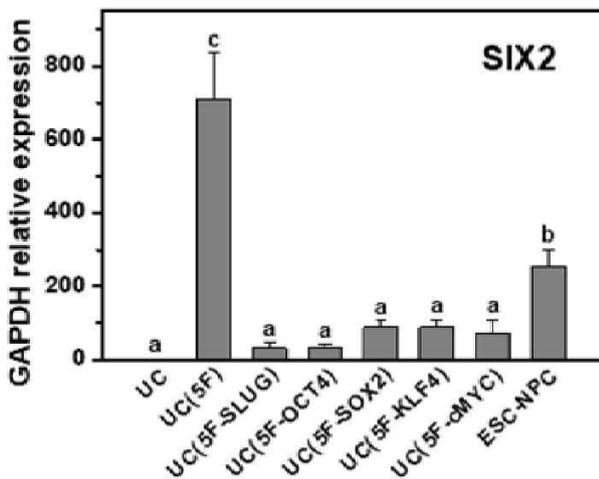
도면1a

시도된 전사인자 조합	소스 세포	신장 줄기/전구세포 대표 발현 마커						자가 증식능 /뿌르니형성
		SIX2	CITFD1	WT1	GNDP	NCAM	SALL1	
OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, SIX1, SIX2, OSR1, PAX2, EYA1, SLUG (10인자)	피부 섬유아세포	○	○	○	○	○	○	X/O
	소변 세포	○	○	○	○	○	○	X/O
OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, SIX2, OSR1, PAX2, EYA1, SLUG (10인자 중 SIX1제외)	소변 세포	○	○	○	X	○	○	X/O
SIX1, SIX2, OSR1, PAX2, EYA1, SLUG (10인자 중 OCT4, SOX2, KLF4, cMYC 제외)	소변 세포	X	○	X	X	○	N/A	X/X
OCT4, SOX2, KLF4, cMYC (10인자 중 SIX1, SIX2, OSR1, PAX2, EYA1, SLUG 제외)	소변 세포	○	○	○	○	○	○	O/O (적은 뿌르니형성)
OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, SLUG (10인자 중 SIX1, SIX2, OSR1, PAX2, EYA1 제외)	피부 섬유아세포	○	○	○	○	○	○	X/O
	소변 세포	○	○	○	○	○	○	O/O

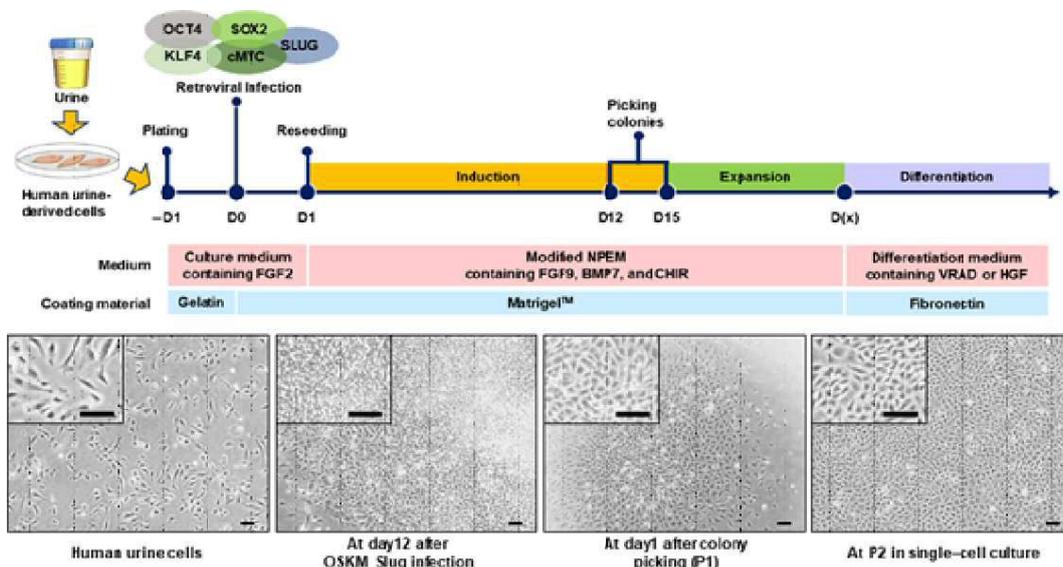
도면1b



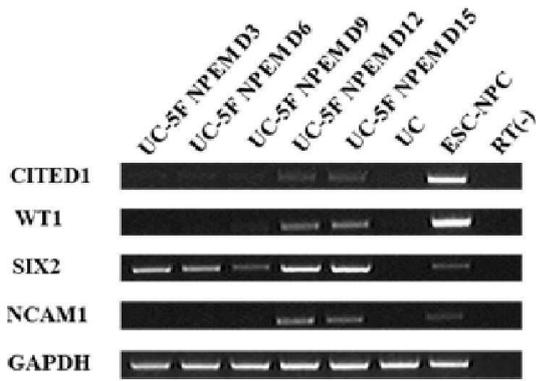
도면1c



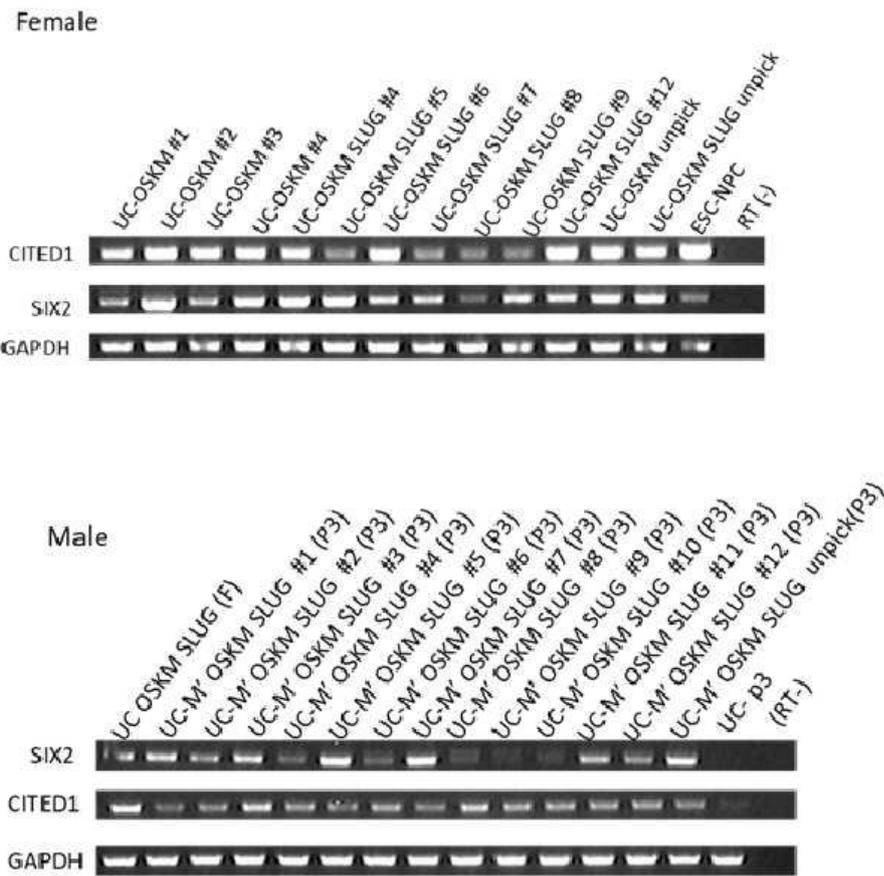
도면2



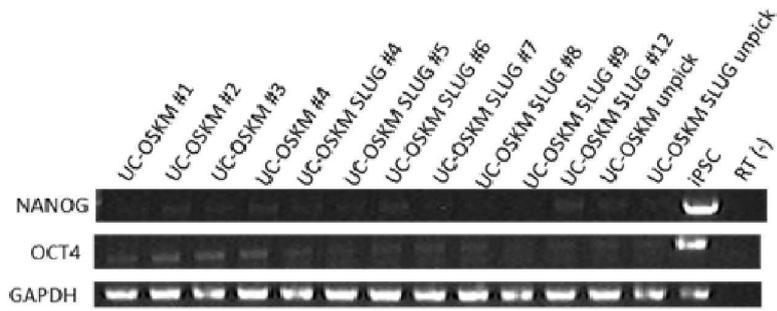
도면3



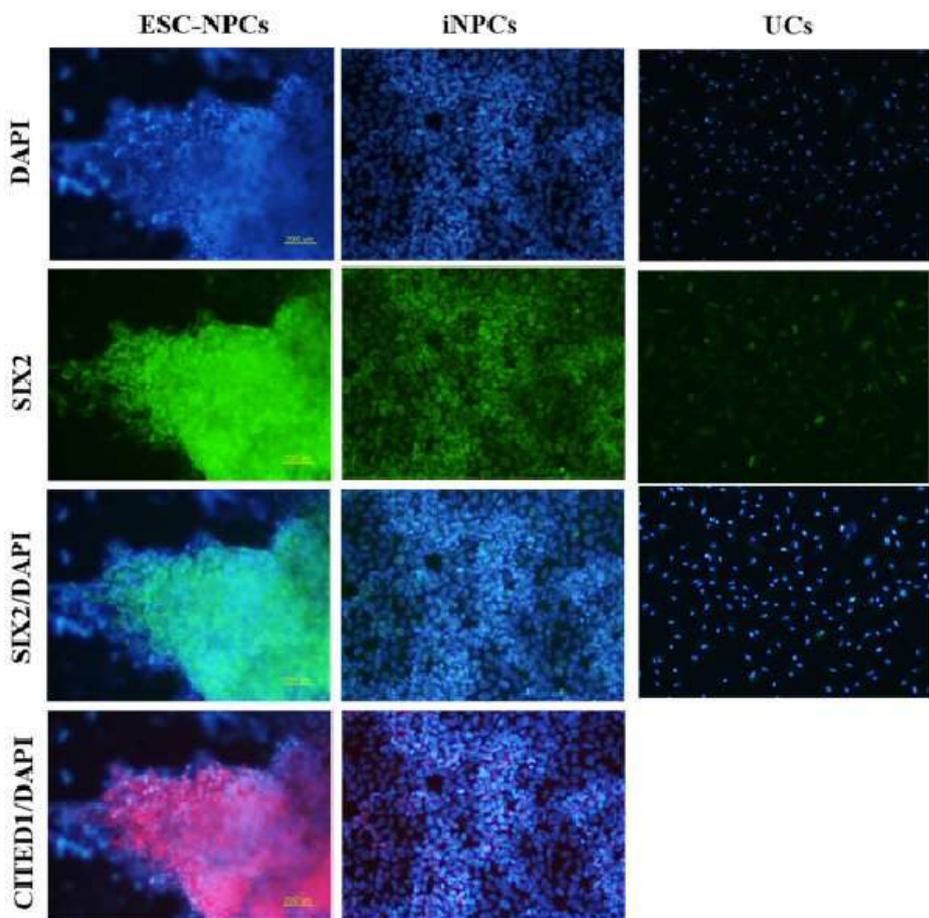
도면4



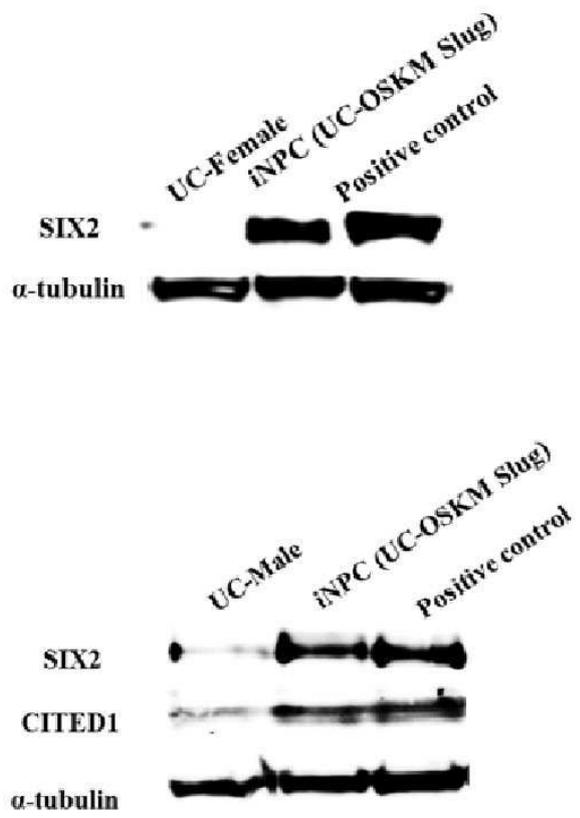
도면5



도면6



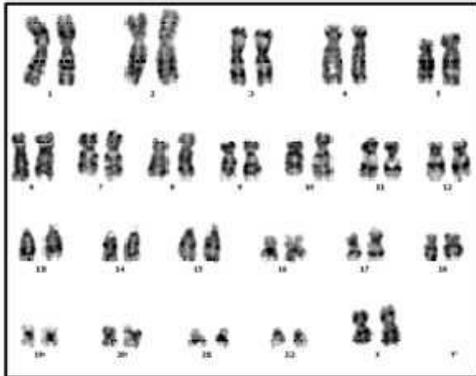
도면7



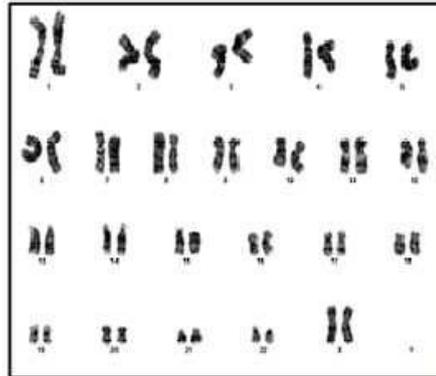
도면8

Female

iNPC-F(P5)

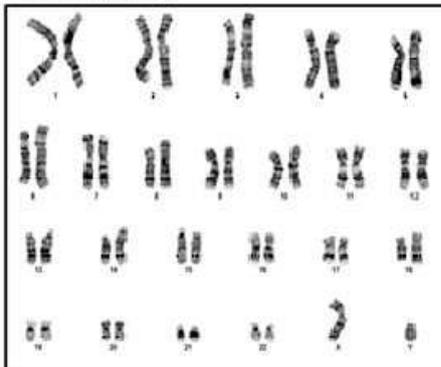


iNPC-F(P20)

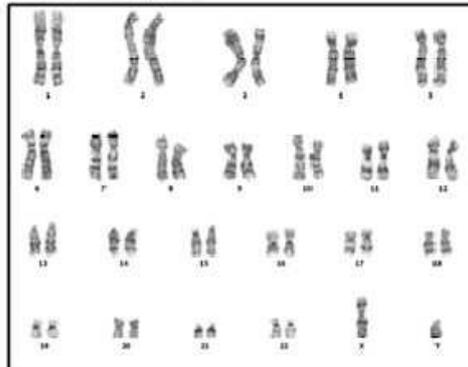


Male

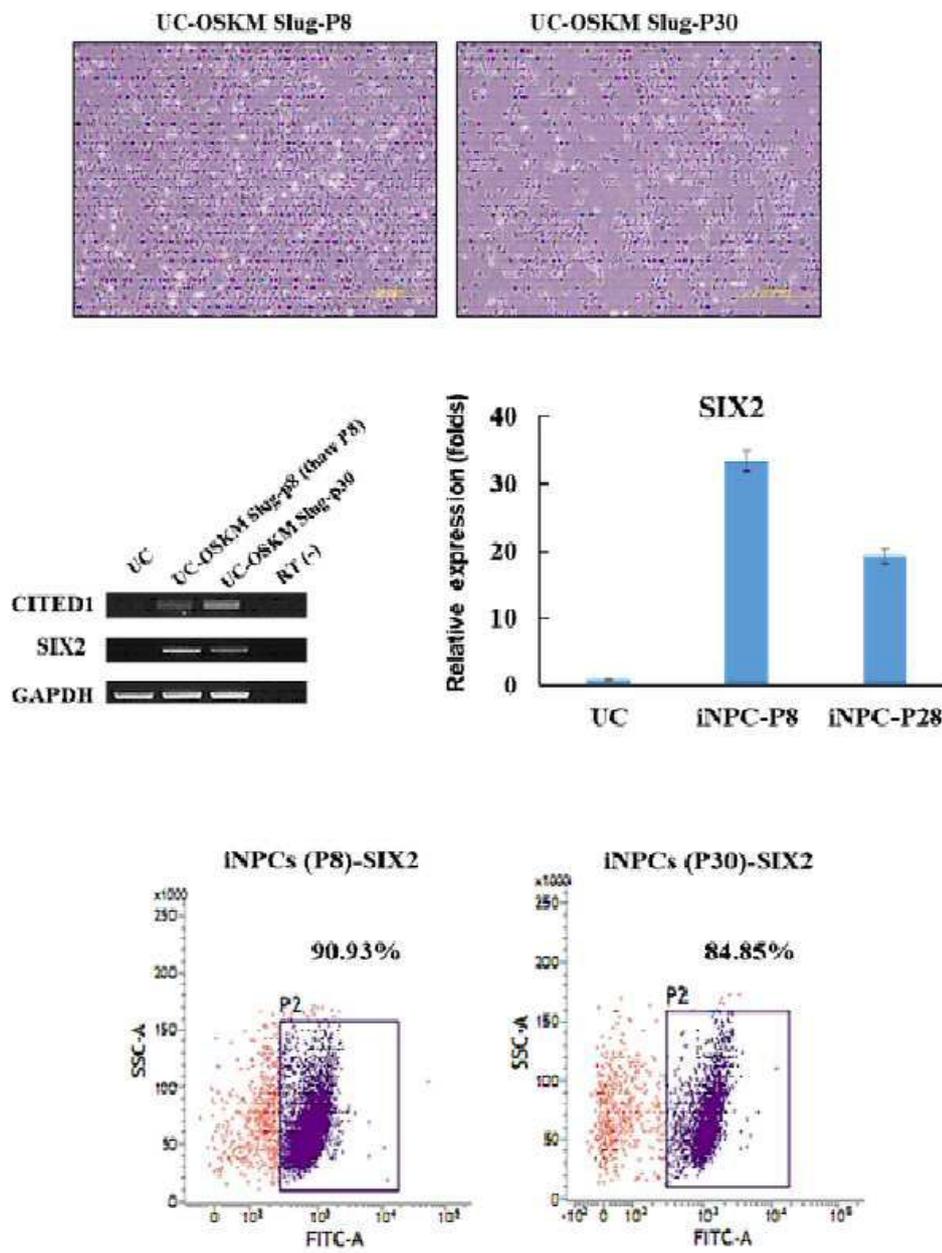
iNPC-M (P5)



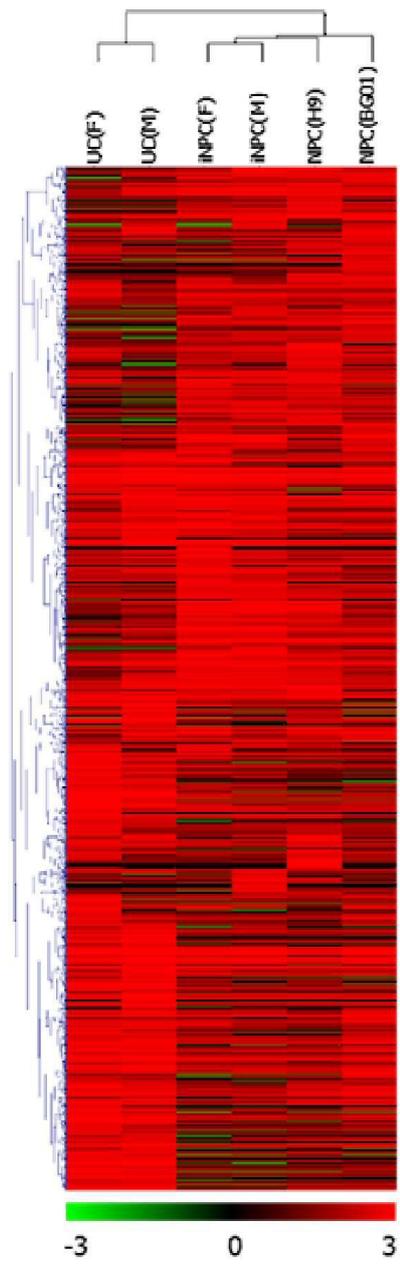
iNPC-M (P10)



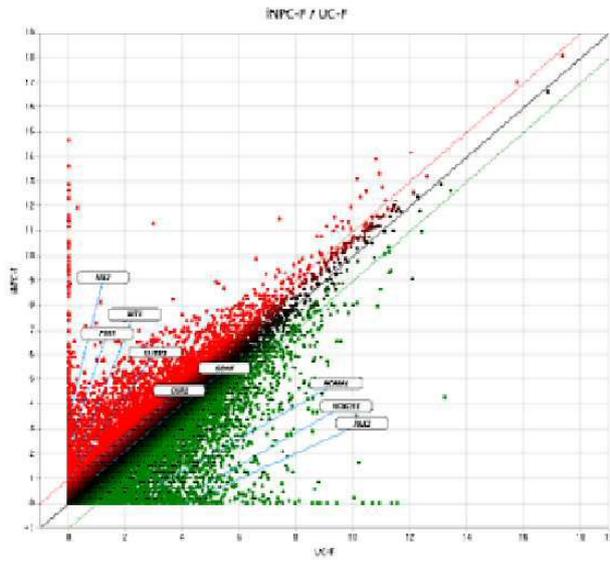
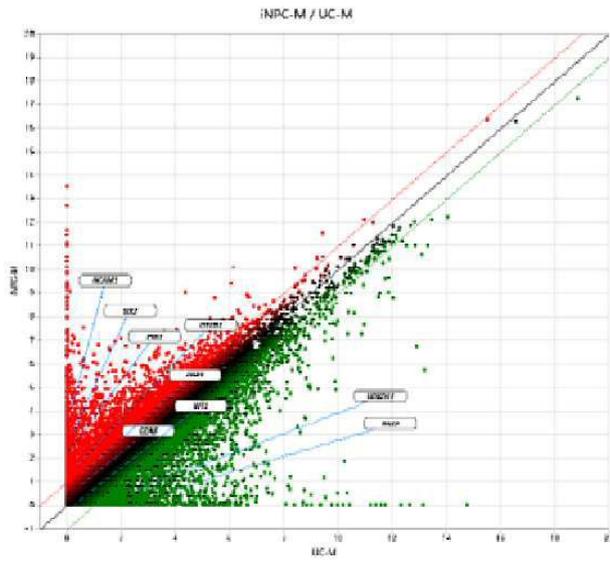
도면9



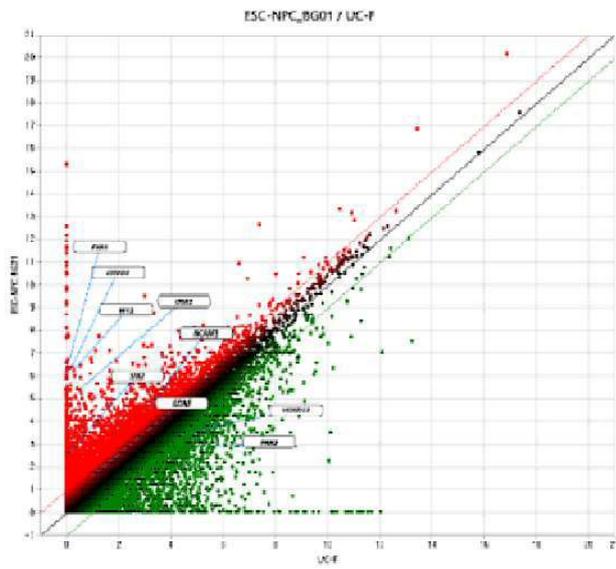
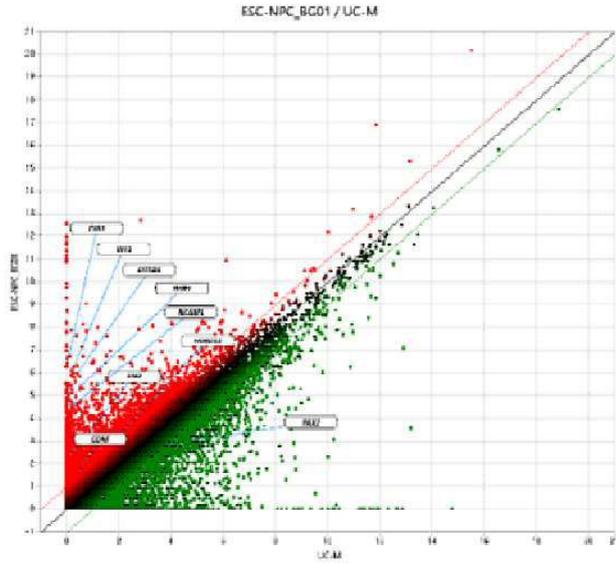
도면10a



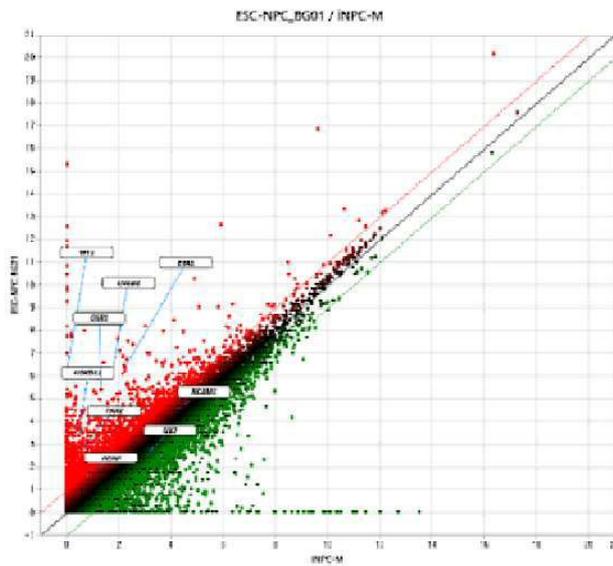
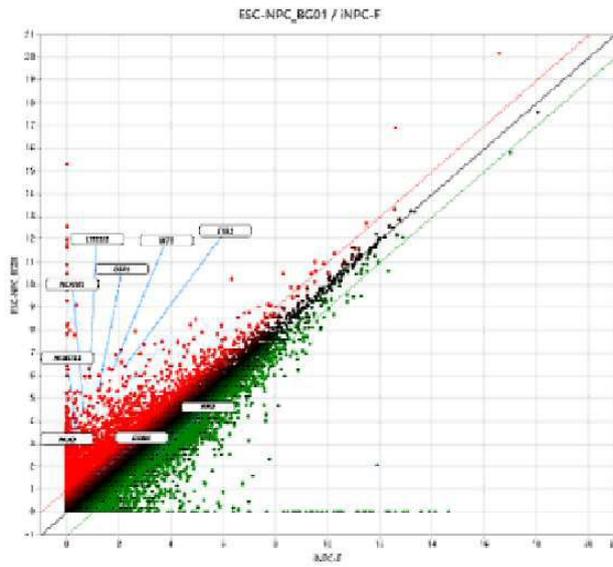
도면10b



도면10c

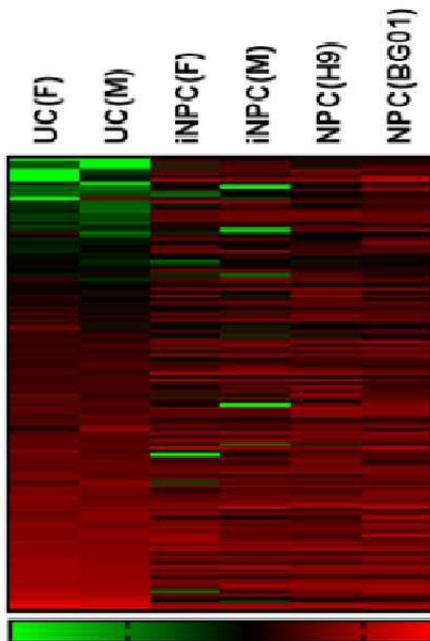


도면10d

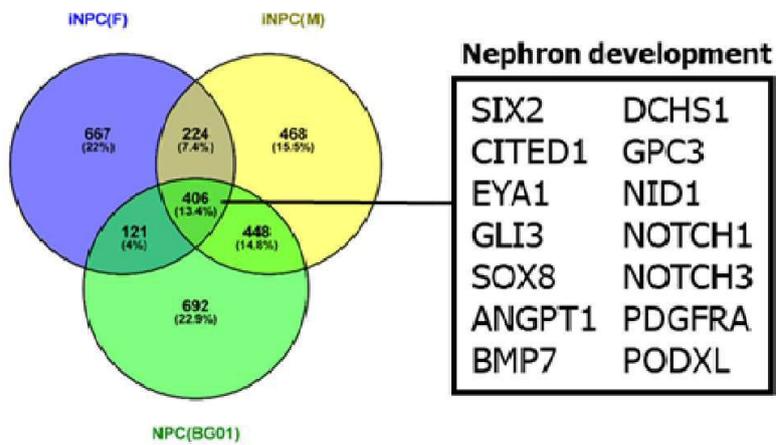


도면11

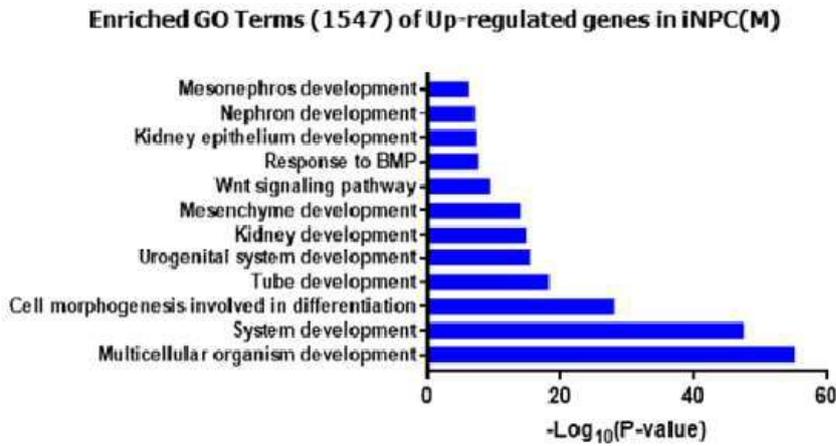
Nephron development



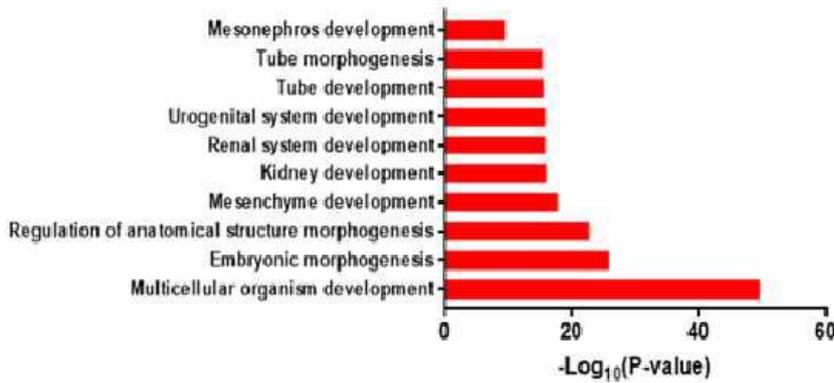
도면12



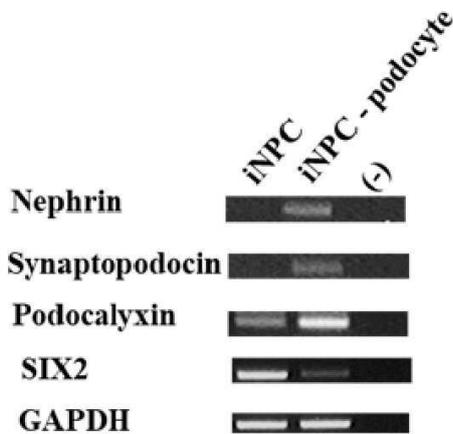
도면13



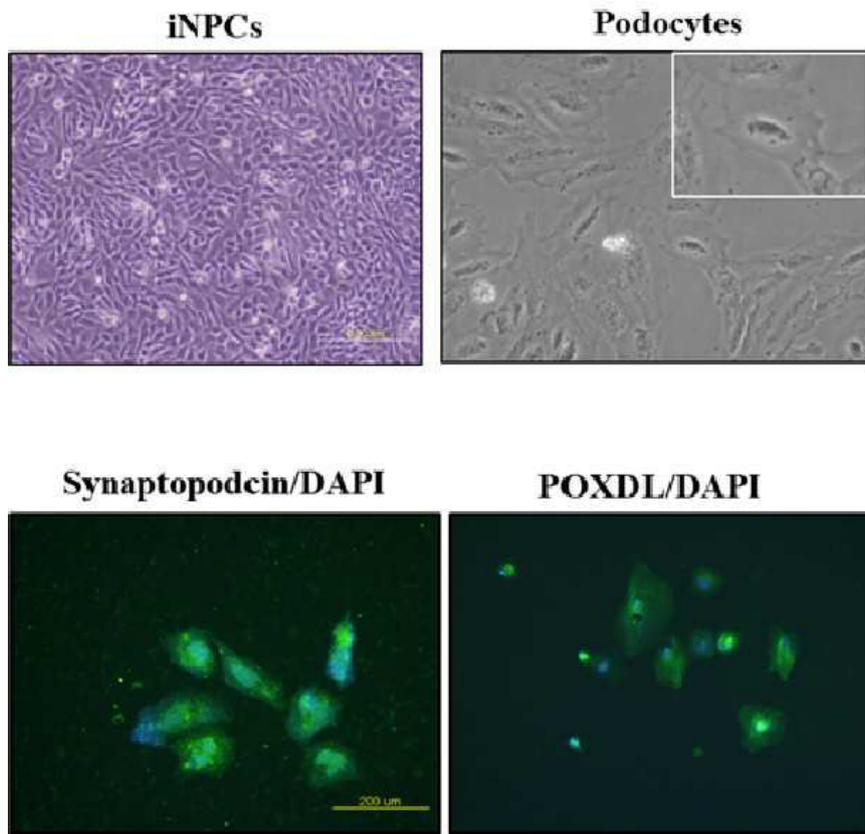
Enriched GO Terms (1668) of Up-regulated genes in NPC(BG01)



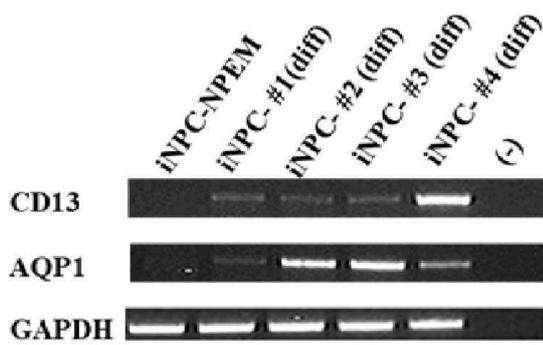
도면14



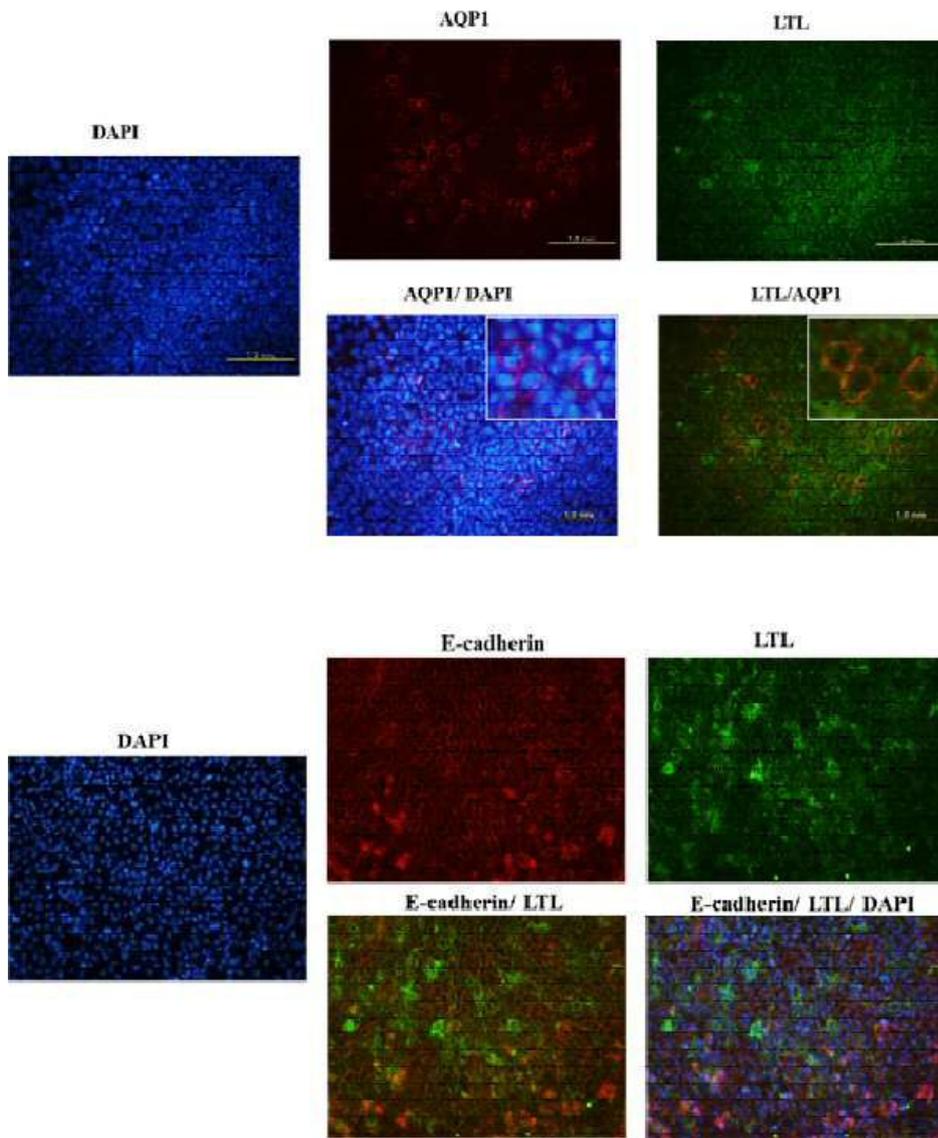
도면15



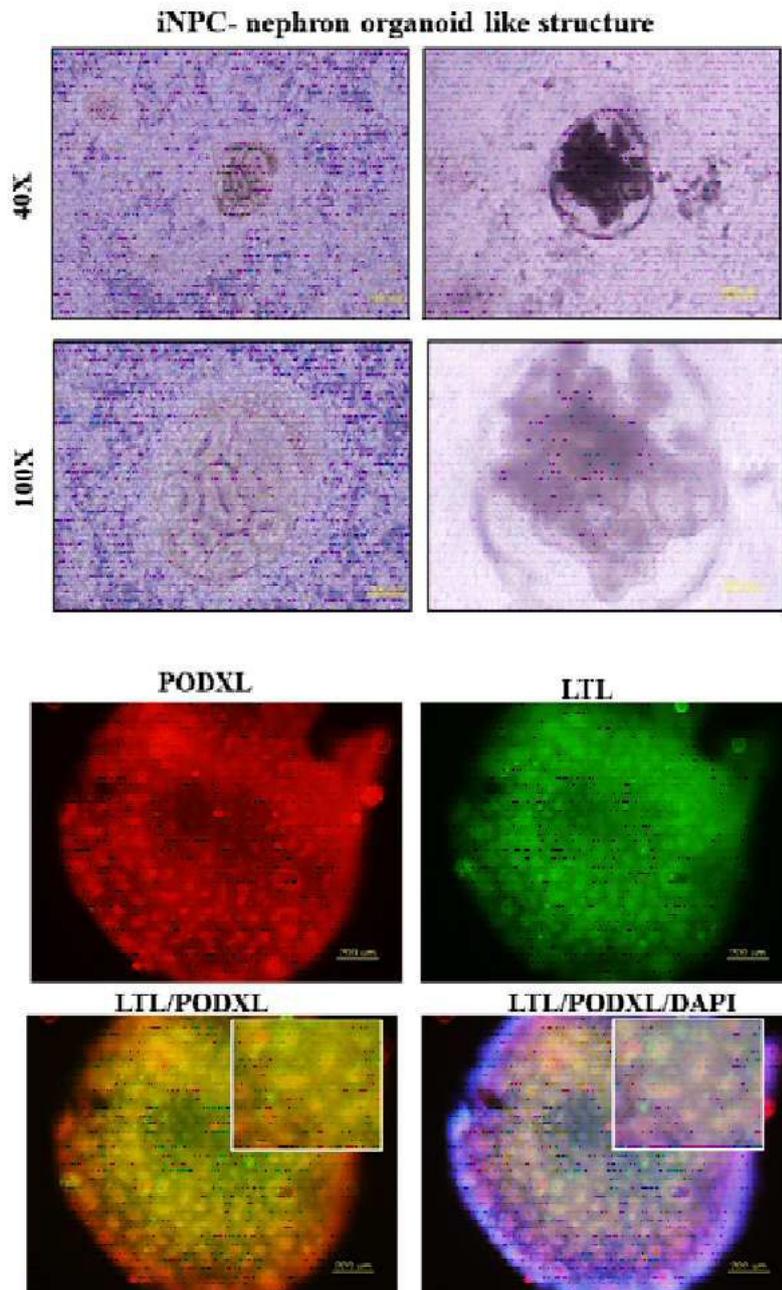
도면16



도면17



도면18



서열목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Direct Conversion from Human Urine Cells into Nephron Progenitor Cells and Composition for Preventing or Treating Kidney Failure Comprising Induced Nephron Progenitor Cells Thereof
- <130> P19-B061
- <160> 22
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SIX2-f
 <400> 1
 ctcaaggcac actacatcga g 21

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SIX2-r
 <400> 2
 gttgtggctg ttagaattgg a 21

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CITED1-f
 <400> 3
 cagcatcact tccgccaat tt 22

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CITED1-r
 <400> 4
 ttgcgatctt tcaccgcaag g 21

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> WT1-f

<400> 5
 tgtgtgctta cccaggctgc aa 22

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> WT1-r

<400> 6
 ccgggagaac tttcgctgac aa 22

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NCAM1-f

<400> 7
 cgatctcatg gtttcgggat gg 22

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NCAM1-r

<400> 8
 tcatcaaact gcacctgggc tg 22

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NANOG-f

<400> 9
 atagcaatgg tgtgacgcag 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> NANOG-r
 <400> 10
 gattgttcca ggattgggtg 20

 <210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OCT4-f
 <400> 11
 gacaggggga ggggaggagc tagg 24
 <210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OCT4-r
 <400> 12
 cttccctcca accagttgcc ccaaac 26
 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nephtrin-f
 <400> 13
 tggctcggac caaccaaca tt 22

 <210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nephtrin-r
 <400> 14
 agggcctcat acctgatgca ga 22
 <210> 15
 <211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synaptopodocin-f
 <400> 15
 cgctcaccac accaacttct aa 22
 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synaptopodocin-r
 <400> 16

 ctagaaagtg gcaggctctg tg 22
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> podocalyxin-f
 <400> 17
 cttgagacac agacacagag 20
 <210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> podocalyxin-r
 <400> 18
 ccgtatgccg cacttate 18
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD13-f
 <400> 19
 ccatgaaggc cgagttcaac a 21

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD13-r
 <400> 20
 atgaaggcca gcaagtacgt g 21
 <210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AQP1-f
 <400> 21
 atgccgacga catcaactcc ag 22

 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AQP1-r
 <400> 22
 tgagtcggtg agcaacttg gg 22