



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0084792
(43) 공개일자 2023년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/12 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/0793 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12M 25/02 (2013.01)
C12N 5/0068 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0172850

(22) 출원일자 2021년12월06일
심사청구일자 2021년12월06일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

전진평

경기도 용인시 수지구 동천로 75(동천동)

김중태

강원도 춘천시 춘천로255번길 6, 302호(후평동)

윤동혁

충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8

(74) 대리인

김남혁

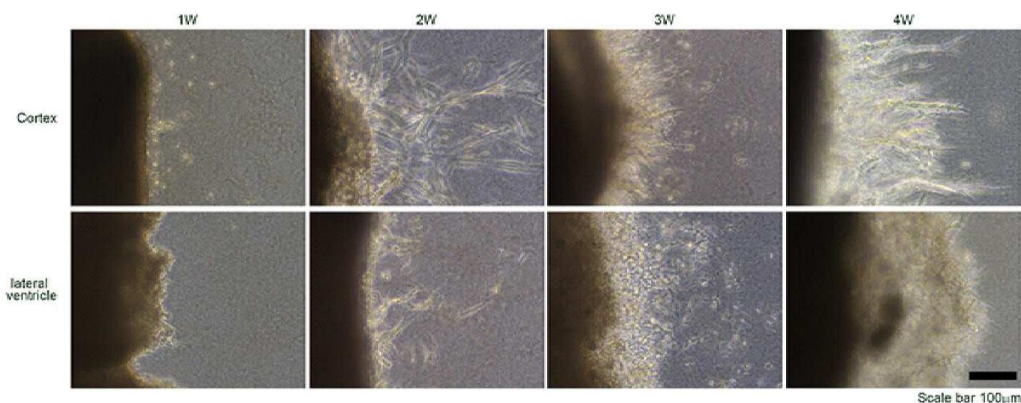
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양 시트 및 신경줄기세포의 분리 배양 방법

(57) 요약

본 발명은 세포 배양 시트 및 신경줄기세포 배양 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 신경조직, 콜라겐 및 피브린을 포함하는 하이드로겔을 포함하고, 상기 하이드로겔은 ROCK 억제제가 투여되는 안정화 단계를 거친 것인, 세포 배양 시트 및 이를 포함하는 신경줄기세포 배양 방법을 제공하는 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 5/0619 (2013.01)

C12N 2501/727 (2013.01)

C12N 2509/00 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

C12N 2533/56 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465034383
과제번호	HR21C0198040021
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성R&D
연구과제명	유전체 · 인공지능 기반 환자맞춤형 신치료 개발 및 관리 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2021.07.01 ~ 2029.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

신경조직, 콜라겐 및 피브린을 포함하는 하이드로겔을 포함하고,
상기 하이드로겔은 ROCK 억제제가 투여되는 안정화 단계를 거친 것인, 세포 배양 시트.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 신경조직은 뇌조직인 것인, 세포 배양 시트.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 하이드로겔 100 중량부에 대하여, 상기 콜라겐은 2 중량부 이하로 포함되는 것인, 세포 배양 시트.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 안정화 단계는 120rpm 이하의 범위에서 교반하는 과정을 포함하는 것인, 세포 배양 시트.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 안정화 단계는 2일 이상 7일 이하의 기간 동안 이루어지는 것인, 세포 배양 시트.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 세포 배양 시트에 대하여, 3일 이상 30일 이하의 기간 동안 배양하는 제1 배양 단계를 포함하는, 신경줄기세포 배양 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,
시트 용해제를 투여하고, 신경세포를 분리하는 분리 단계; 및
분리된 상기 신경세포를 배양하는 제2 배양 단계;를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 시트 용해제는 콜라게나제를 포함하고, 상기 시트 용해제 100 중량부에 대하여 콜라게나제를 0.01 중량부 이상 1 중량부 이하로 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 제2 배양 단계는 상기 신경세포의 밀집도가 60% 이상 90% 이하에서 설정된 기준치 이상일 때까지 배양하는 것인, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 신경세포를 동결보존하는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 신경조직으로부터 유래된 신경줄기세포.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 신경줄기세포는 SOX2, nestin, PAX6, DCX 및 Olig2로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 것인, 신경줄기세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 배양 시트 및 신경줄기세포 배양 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 신경조직, 콜라겐 및 피브린을 포함하는 하이드로겔을 포함하고, 상기 하이드로겔은 ROCK 억제제가 투여되는 안정화 단계를 거친 것인, 세포 배양 시트 및 이를 포함하는 신경줄기세포 배양 방법을 제공하는 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 세포치료제로 가장 많이 이용되는 줄기세포는 비교적 쉽게 얻을 수 있는 지방, 골수, 제대혈 등에서 분리한 중간엽줄기세포이다. 하지만 중간엽줄기세포의 경우 특정 신경세포로의 분화 효율이 떨어져 치료적 효과가 제한적이라는 것이 한계로 지적된다.

[0003] 신경줄기세포(neural stem cell)는 뉴런(neuron) 및 신경교세포(glial cell) 등으로 분화가 가능하다. 최근 설치류뿐 아니라 사람의 뇌에도 신경줄기세포의 존재가 확인되었으며 지속적으로 뇌세포의 항상성 유지 및 재생을 담당하는 것으로 밝혀졌다.

[0004] 퇴행성 신경질환 또는 신경손상 치료를 위해서 다양한 기원의 신경줄기세포를 활용한 치료제 개발이 시도되고 있으나, 치료효과를 얻기 위한 충분한 신경줄기세포의 확보에 많은 어려움이 있었다.

[0005] 기존의 연구는 물리적, 화학적 방법을 이용하여 뇌조직에서 신경줄기세포를 분리 배양하는 방법이었으나, 뇌 조직 질량에 비례하여 1회에 분리되는 세포의 수율에 한계가 있었다. 또한 물리적, 화학적 방법을 사용하여 반복적으로 세포분리를 할 경우에는 세포손상이 발생할 수 있는 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1389851호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1705245호
(특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-1994640호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기한 실정을 고려하여 소량의 뇌조직을 활용하여 신경줄기세포를 분리 및 배양하는 방법을 제공할 수 있고, 이를 통하여 질량 대비 1회 획득할 수 있는 신경줄기세포의 수율을 극대화할 수 있는 분리 및 배양 방법을 제공할 수 있다.
- [0008] 또한 본 발명은 미분화 상태로 신경줄기세포를 유지 및 증폭 배양할 수 있는 방법을 제공할 수 있다.
- [0009] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 의하면, 신경조직, 콜라겐 및 피브린을 포함하는 하이드로겔을 포함하고, 상기 하이드로겔은 ROCK 억제제가 투여되는 안정화 단계를 거친 것인, 세포 배양 시트에 관한 것이다.
- [0011] 또한 본 발명에서, 상기 신경조직은 뇌조직인 것일 수 있다.
- [0012] 또한 본 발명에서, 상기 하이드로겔 100 중량부에 대하여, 상기 콜라겐은 2 중량부 이하로 포함되는 것일 수 있다.
- [0013] 또한 본 발명에서, 상기 안정화 단계는 120rpm 이하의 범위에서 교반하는 과정을 포함하는 것일 수 있다.
- [0014] 또한 본 발명에서, 상기 안정화 단계는 2일 이상 7일 이하의 기간 동안 이루어지는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 세포 배양 시트에 대하여, 3일 이상 30일 이하의 기간 동안 배양하는 제1 배양 단계를 포함하는, 신경줄기세포 배양 방법을 제공할 수 있다.
- [0016] 또한 본 발명에서, 시트 용해제를 투여하고, 신경세포를 분리하는 분리 단계; 및 분리된 상기 신경세포를 배양하는 제2 배양 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 또한 본 발명에서, 상기 시트 용해제는 콜라게나제를 포함하고, 상기 시트 용해제 100 중량부에 대하여 콜라게나제를 0.01 중량부 이상 1 중량부 이하로 포함하는 것일 수 있다.
- [0018] 또한 본 발명에서, 상기 제2 배양 단계는 상기 신경세포의 밀집도가 60% 이상 90% 이하에서 설정된 기준치 이상 일 때까지 배양하는 것일 수 있다.
- [0019] 또한 본 발명에서, 상기 신경세포를 동결보존하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 신경조직으로부터 유래된 신경줄기세포를 제공하는 것일 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명에서, 상기 신경줄기세포는 SOX2, nestin, PAX6, DCX 및 Olig2로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 뇌조직 유래 신경줄기세포는 뇌에서 항상성 유지와 재생을 위해서 활성 되는 신경모세포 특이 표지자를 발현하며, 뉴런 및 성상교세포, 희소돌기세포 등의 뇌를 구성하는 세포로 분화할 수 있는 능력을 나타낸다.

또한 소량의 뇌조직으로 상대적으로 많은 세포를 확보할 수 있어 이를 활용하여 퇴행성신경질환 및 뇌손상 치료를 위한 세포치료제로 개발하는데 적용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급된 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 실시예에 있어서 각기 다른 부위 뇌조직에서 신경줄기세포가 증폭되는 것을 나타낸 이미지이다.

도 2는 본 발명의 실시예에 있어서 콜라겐젤에서 신경줄기세포를 분리하여 매트릭셀이 코팅된 배양접시에서 배양된 신경줄기세포의 형태를 나타낸 이미지이다.

도 3은 본 발명의 실시예에 있어서 분리된 신경줄기세포가 신경모세포 특이 표지자를 발현하는지 확인하기 위하여 면역형광염색을 실시한 결과이다.

도 4는 본 발명의 실시예에 있어서 분리된 신경줄기세포가 뉴런 및 성상교세포, 혈관평활근세포, 대식세포 특이 표지자를 발현하는지 확인하기 위하여 면역형광염색을 실시한 결과이다.

도 5는 본 발명의 실시예에 있어서 분리된 신경줄기세포가 뉴런 및 성상교세포, 혈관평활근세포, 대식세포 특이 표지자를 발현하는지 확인하기 위하여 면역형광염색을 실시한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0026] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0027] 본 발명의 일 구현 예에 따르면,

[0028] 신경조직, 콜라겐 및 피브린을 포함하는 하이드로겔을 포함하고, 상기 하이드로겔은 ROCK 억제제가 투여되는 안정화 단계를 거친 것인, 세포 배양 시트에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에서, 상기 신경조직은 뇌조직인 것일 수 있다. 상기 신경조직은 뇌조직인 것일 수 있고, 상기 뇌조직은 피질(Cortex) 또는 측뇌실(lateral ventricle)에서 유래된 것일 수 있다.

[0030] 본 발명에서, 상기 콜라겐은 콜라겐 1 내지 5에서 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0031] 본 발명에서, 상기 하이드로겔 100 중량부에 대하여, 상기 콜라겐은 2 중량부 이하로 포함되는 것일 수 있고, 상기 콜라겐은 1.5 중량부, 1.2 중량부, 1 중량부, 0.5 중량부, 0.3 중량부 또는 0.1 중량부 이하로 포함되는 것일 수 있다.

[0032] 본 발명에서, 상기 피브린은 피브리노겐 및 트롬빈의 반응에 의해 생성된 것일 수 있다.

[0033] 본 발명에서, 상기 ROCK 억제제는 ROCK 저해제, Rho 키나제 억제제 또는 Rho 관련 단백질 키나제 억제제라고도 하며, AT-13148, BA-210, beta-Elementine, Chroman 1, DJ4, Fasudil, GSK-576371, GSK429286A, H-1152, Hydroxyfasudil, Ibuprofen, LX-7101, Netarsudil, RKI-1447, Ripasudil, TCS-7001, Thiazovivin, Verosudil(AR-12286), Y-27632, Y-30141, Y-33075 및 Y-39983을 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, ROCK 경로를 억제하는 화합물이라면 제한없이 포함될 수 있다.

- [0034] 본 발명에서, 상기 안정화 단계는 120rpm 이하의 범위에서 교반하는 과정을 포함하는 것일 수 있고, 1rpm 이상 80rpm 이하의 범위, 60rpm 이하의 범위, 40rpm 이하의 범위, 30rpm 이하의 범위, 20rpm 이하의 범위, 10rpm 이하의 범위, 6rpm 이하의 범위 또는 1rpm 이하의 범위에서 교반하는 과정을 포함하는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명에서, 상기 안정화 단계는 2일 이상 7일 이하의 기간 동안 이루어지는 것이거나, 상기 안정화 단계는 2일 이상 3일 이하, 3일 이상 4일 이하, 4일 이상 5일 이하, 5일 이상 6일 이하 또는 6일 이상 7일 이하의 기간 동안 이루어지는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면,
- [0037] 본 발명에 따른 세포 배양 시트에 대하여, 3일 이상 30일 이하의 기간 동안 배양하는 제1 배양 단계를 포함하는, 신경줄기세포 배양 방법을 제공할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서, 상기 제1 배양 단계는 3일 이상 5일 이하의 기간, 5일 이상 10일 이하의 기간, 10일 이상 15일 이하의 기간, 15일 이상 20일 이하의 기간, 20일 이상 25일 이하의 기간 또는 25일 이상 30일 이하의 기간 동안 배양하는 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서, 시트 용해제를 투여하고, 신경세포를 분리하는 분리 단계; 및 분리된 상기 신경세포를 배양하는 제2 배양 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서, 상기 시트 용해제는 콜라게나제를 포함하고, 상기 시트 용해제 100 중량부에 대하여 콜라게나제를 0.01 중량부 이상 1 중량부 이하로 포함하는 것일 수 있고, 상기 시트 용해제 100 중량부에 대하여 콜라게나제를 0.01 중량부 이상 0.02 중량부 미만, 0.02 중량부 이상 0.04 중량부 미만, 0.04 중량부 이상 0.06 중량부 미만, 0.06 중량부 이상 0.08 중량부 미만, 0.08 중량부 이상 0.1 중량부 미만, 0.1 중량부 이상 0.5 중량부 미만 또는 0.5 중량부 이상 1 중량부 이하로 포함하는 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명에서, 상기 제2 배양 단계는 상기 신경세포의 밀집도가 60% 이상 90% 이하에서 설정된 기준치 이상일 때까지 배양하는 것일 수 있고, 상기 신경세포의 밀집도가 60% 이상 65% 미만의 기준치, 65% 이상 70% 미만의 기준치, 70% 이상 75% 미만의 기준치, 75% 이상 80% 미만의 기준치 또는 80% 이상 90% 이하의 기준치 이상일 때까지 배양하는 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 신경세포를 동결보존하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 예시에 따르면, 뇌조직을 재단하여 콜라겐젤에 함입하는 단계; 3일간 뇌조직의 세포 피사를 방지하는 단계; 3주간 뇌조직에서 신경줄기세포를 증폭하는 단계; 콜라겐젤을 분해하여 증폭된 신경줄기세포를 분리하는 단계; 분리된 신경줄기세포를 배양접시에 파종하여 증폭하는 단계를 포함하는 신경모세포 표지자를 발현하는 신경줄기세포의 효율적인 분리 배양방법을 제공할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 뇌조직은 성인의 뇌조직일 수 있고, 재단한 크기는 1mm 이하 일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 실시예에 있어서, 콜라겐젤의 농도는 0.05% 또는 0.1% 일 수 있으며, 다른 세포 외 기질 단백질을 첨가하여 겔을 제조시 총 비율은 0.2%(W/V)를 넘지 않는다.
- [0046] 본 발명의 실시예에 있어서, 뇌조직의 피사를 방지를 위해 첨가하는 용액은 ROCK inhibitor(Y27632)에 국한되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 실시예에 있어서, 콜라겐을 분해하는 효소 용액은 콜라게나제(collagenase) type 1, 2, 3, 4를 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 실시예에 있어서, 배양접시에 파종하여 시행되는 증폭배양은 matrigel, Poly-D-lysine, Poly-L-ornithine, fibronetin, laminin으로 코팅된 배양 접시를 사용할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 실시예에 있어서, 분리된 신경줄기세포는 SOX2, nestin, PAX6, DCX 및 Olig2로 이루어진 군에서 하나 이상의 신경모세포 표지자에서 양성인 면역학적 특성을 나타낼 수 있다.
- [0050] 본 발명의 실시예에 있어서, 분리된 신경줄기세포는 Tuj-1(Neuron-specific class III beta-tubulin), GFAP(Glial fibrillary acidic protein)로 이루어진 군에서 음성인 면역학적 특성을 나타낼 수 있고, Olig2(Oligodendrocyte transcription factor 2) 로 이루어진 군에서 양성인 면역학적 특성을 나타낼 수 있다.

[0051] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 본 발명의 나머지에서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면,

[0053] 본 발명의 신경조직으로부터 유래된 신경줄기세포를 제공하는 것일 수 있다.

[0054] 본 발명에서, 하기 표 1에서와 같이, 상기 신경줄기세포는 SOX2, nestin, PAX6, DCX 및 Olig2로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 것일 수 있고, 상기 신경줄기세포는 SOX2 및 nestin 마커를 발현하는 것일 수 있고, 상기 신경줄기세포는 SOX2, nestin, PAX6, DCX 및 Olig2 마커를 모두 발현하는 것일 수 있다.

표 1

[0055]

순번	마커	서열번호
1	SOX2	서열번호 1
2	nestin	서열번호 2
3	PAX6	서열번호 3
4	DCX	서열번호 4
5	Olig2	서열번호 5

[0056] 본 발명에서, 상기 SOX는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 배아줄기세포 및 신경줄기세포의 유지에 중요한 역할을 하여, 상기 마커를 발현하는 줄기세포의 경우 고품질의 정제된 신경줄기세포인 것을 확인할 수 있다.

[0057] 또한, 상기 nestin은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 축삭의 방사상 성장과 관련된 신경세포에서 주로 발현되는 것으로, 상기 마커를 발현하는 줄기세포의 경우 고품질의 정제된 신경줄기세포인 것을 확인할 수 있다.

[0058] 또한, 상기 PAX6은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 신경 및 표피 조직과 같은 외배엽 조직에서 유래하는 상동 구조의 발달을 위한 마스터 컨트롤 역할 하는 것으로, 상기 마커를 발현하는 줄기세포의 경우 고품질의 정제된 신경줄기세포인 것을 확인할 수 있다.

[0059] 또한, 상기 DCX는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 신경전구세포 및 미성숙 뉴런에 의해 발현되는 미세소관 관련 단백질로, 상기 마커를 발현하는 줄기세포의 경우 고품질의 정제된 신경줄기세포인 것을 확인할 수 있다.

[0060] 또한, 상기 Olig2는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 뇌와 척수의 제한된 영역에서 발현되는 것으로, 상기 마커가 발현되는 경우 고품질의 정제된 신경줄기세포인 것을 확인할 수 있다.

[0061] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 본 발명의 나머지에서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0062] 이하, 본 발명의 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0063] 1. 실시예

[0064] 1.1. 뇌조직 추출

[0065] University of Wisconsin solutions(UW 용액) 또는 histidine-tryptophan-ketoglutarate(HTK 용액)의 장기보관 용액에 보관된 뇌조직을 배양 접시로 옮긴 다음 100 µg/mL의 겐타마이신(gentamycin)이 포함된 차가운 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)를 사용하여 뇌조직을 3회 세척하였다. 다음으로 멸균된 블레이드를 사용하여 뇌 조직에 포함된 혈관을 박리하고, 혈관이 박리된 뇌 조직을 1mm 크기로 재단하여 50mL 튜브에 형체가 유지된 채로 옮겼다. 다음으로 DPBS를 사용하여 3회 세척한 후 아이스에 5분 간 보관하였다.

[0066] 1.2. 콜라겐 하이드로겔의 준비

[0067] 50mL 튜브에 10mL 용량의 0.1%의 콜라겐 용액을 제조하여 아이스에서 보관 후, 0.1%의 피브리노겐과 혼합하여 최종 0.2%의 혼합된 용액을 준비하였다. 다음으로 뇌조직이 포함된 튜브에 DPBS를 제거한 후, 0.2%의 콜라겐/피브리노겐 용액 6mL을 첨가한 다음, 트롬빈 0.5단위를 첨가하여 충분히 혼합하여 100mm 배양접시에 고르게 펼쳤다. 다음으로 상기 배양접시를 세포 배양 인큐베이터에 넣고 30분간 반응시켜 하이드로겔을 준비하였다.

[0068] 1.3. 뇌조직 배양

[0069] 상기 하이드로겔에 포함된 뇌조직을 배양하기 위해, 기본적으로 DMEM/F12와 신경세포배양용 배지(Neurobasal media)를 1:1 혼합한 배양 배지에 1% N2, 2% B27 without vitamin A, 1% Glutamax, 20 µg/mL human epidermal growth factor(human EGF), 20 µg/mL human basic fibroblast growth factor(human bFGF)를 첨가한 일반 배양 배지를 제조하였다. 뇌조직 배양 0일째 배양 상기 일반 배양 배지에 20 µM ROCK inhibitor(Y27632)가 첨가된 배지를 사용하였고, 1시간 마다 2회 교환하였다. 다음 3일 동안 1일 1회 20 µM ROCK inhibitor(Y27632)가 첨가된 배지로 교환하여 신경줄기세포의 생존을 강화하는 방법을 사용하였다. 상기 배지는 인큐베이터에서 60rpm으로 교반되었고, 상기 교반에는 회전식 셰이커가 이용되었다.

[0070] 1.4. 뇌조직 하이드로겔에서 신경줄기세포의 증폭배양

[0071] 상기 배양된 뇌조직을 2주간 배양하였고, 이때 배지는 주 2회 교환하였다. 다음으로 도 1에 나타난 것처럼 신경줄기세포를 뇌조직에서 콜라겐 하이드로겔로 이동시켜 증폭배양시켰다. 그 결과 도 1에 나타난 것처럼, 피질(Cortex) 및 측뇌실(lateral ventricle)의 각기 다른 부위에서 4주에 걸쳐 신경줄기세포가 증식하는 것을 확인할 수 있었다.

[0072] 1.5. 신경줄기세포의 회수

[0073] 증폭된 신경줄기세포에서 잔존 배지를 제거한 후, DPBS를 사용하여 10분씩 3회 셰이커에 올려 세척과정을 거쳤다. 다음으로 세척된 신경줄기세포에, 37℃ 워터배스로 데워진 0.05% 콜라게나제 타입 1(collagenase type 1)이 포함된 DMEM/F12 배지 10mL을 첨가하고, 다시 셰이커에 올린 후 15분간 반응시켰다. 여기에 0.05% 콜라게나제가 포함된 DMEM/F12 배지를 5mL 추가로 첨가하고 5분 간 반응시켰고, 10mL 파이프트로 콜라겐 하이드로겔을 충분히 녹인 후, 50mL 튜브에 옮겼다. 이후 옮겨진 튜브에 0.1%의 FBS를 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후, 400 x g에서 원심분리 시켰다. 원심분리로 생성된 상층액을 제거하고, 조직 및 펠렛을 10 µM의 Y27632가 첨가된 배양 배지에 현탁시켰다.

[0074] 1.6. 매트릭스에서 신경줄기세포의 증폭배양

[0075] 뇌조직 하이드로겔에서 신경줄기세포를 분리하여, 도 2에서와 같이 매트릭셀(matrigel)이 코팅된 배양접시에서 배양하였다. 세포 배양을 준비하기 위하여, 클린벤치 내에서 25mL의 차가운 DMEM/F12 배지를 50mL 튜브에 옮긴 후, 50 ~ 125 µL의 매트릭셀을 첨가하여 0.2% ~ 0.5%로 정량하고 충분히 혼합한 다음, 100mm 배양접시에 6mL씩 넣고 고르게 펼친 후, 상온에서 1시간 유지하여 배양접시를 코팅하였다. 세포를 바이알(vial) 파종하기 직전 배양접시에 남은 매트릭셀을 제거하고, 튜브에 담긴 세포를 10mL씩 배양접시에 파종하여 배양을 시작하였다. 배양 다음날, 부착되지 않은 조직과 콜라겐 조각을 DPBS로 세척하여 제거한 다음, 기본 배양 배지를 첨가하고 3 ~ 4일 마다 교체하여 증폭배양 시켰다.

[0076] 1.6. 계대배양 및 동결보존

[0077] 계대배양 및 동결보존은 80% 이상의 밀집도 및 배양접시 기준 1:4 ~ 1:6의 비율로 실시하였다. 먼저, 배양된 세포가 80% 이상의 밀집도를 보일 때, 세포를 37℃ 항온수조에서 데워진 DPBS를 사용하여 3회 세척시킨 후, 0.05%

trypsin/EDTA가 첨가된 DPBS를 사용하여 세포를 바닥에서 탈락시켰다. 다음으로 1mL의 트립신 억제제(trypsin inhibitor)가 포함된 50mL 튜브를 준비하여, 탈락된 세포를 파이프트로 옮긴 후, 300 x g에서 원심분리 하여 계대배양 및 동결보존을 위한 준비를 하였다.

[0078] 계대배양의 경우, 상층액을 제거하고 남은 펠렛을 10 μ M Y27632가 포함된 배양 배지와 함께 100mm 배양접시에 나누어 실시하였다. 동결보존의 경우, 일반적으로 시중에 판매되는 줄기세포 전용 동결보존용액을 첨가하여 현탁한 후, 배양접시 기준으로 2vial로 나누어 실시하였다.

[0079] 2. 평가예

[0080] 2.1. 신경모세포 마커 확인

[0081] 분리된 신경줄기세포가 신경모세포 특이 표지자(마커)를 발현하는지 확인하기 위하여 면역형광염색을 실시하였다. 그 결과 도 3에 나타난 것처럼, 분리된 신경줄기세포는 SOX2, nestin, PAX6, DCX 및 Olig2로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 신경모세포 특이 표지자에서 양성인 면역학적 특성을 나타낼 수 있다.

[0082] 2.2. 뉴런 및 성상교세포 마커 확인

[0083] 분리된 신경줄기세포가 뉴런 및 성상교세포 특이 표지자를 발현하는지 확인하기 위하여 면역형광염색을 실시하였다. 그 결과 도 4에서 나타난 것과 같이, 분리된 신경줄기세포는 Tuj-1(Neuron-specific class III beta-tubulin), GFAP(Glial fibrillary acidic protein)로 이루어진 군에서 음성인 면역학적 특성을 나타낼 수 있고, Olig2(Oligodendrocyte transcription factor 2) 로 이루어진 군에서 양성인 면역학적 특성을 나타낼 수 있다.

[0084] 2.3. 대식세포, 혈관평활근세포 및 혈관평활근세포 마커 확인

[0085] 분리된 신경줄기세포가 뉴런 및 성상교세포, 혈관평활근세포, 대식세포 특이 표지자가 포함되었는지 확인하기 위하여 면역형광염색을 실시하였다. 그 결과 도 5에 나타난 것처럼, 분리된 신경줄기세포는 혈관내피세포 및 혈관평활근세포 특이 표지자인 SMA(smooth muscle actin) 마커가 음성이었고, 또한 대식세포(macrophage) 특이 표지자인 IBA-1(ionized calcium-binding adapter molecule 1) 마커가 음성인 것을 확인하여, 면역학적 특성을 확인할 수 있었다.

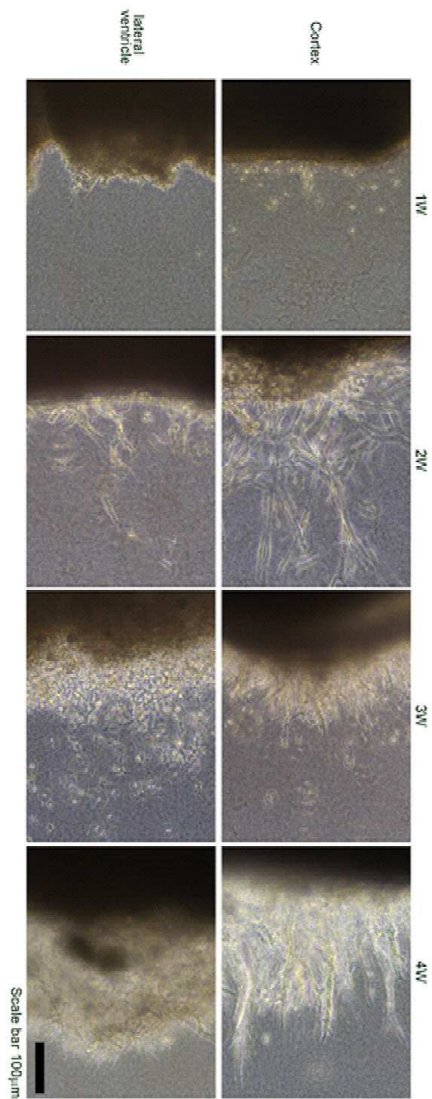
[0086] 또한 분리된 신경줄기세포는 혈관내피세포 및 혈관평활근세포 특이 표지자인 CD31, CD34 마커가 음성이었고, 또한 대식세포(macrophage) 특이 표지자인 CD14 마커가 음성이었고, 또한 조혈계 세포 특이 표지자인 CD45 마커가 음성인 것을 확인하여, 면역학적 특성을 확인할 수 있었다.

[0087] 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 수 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

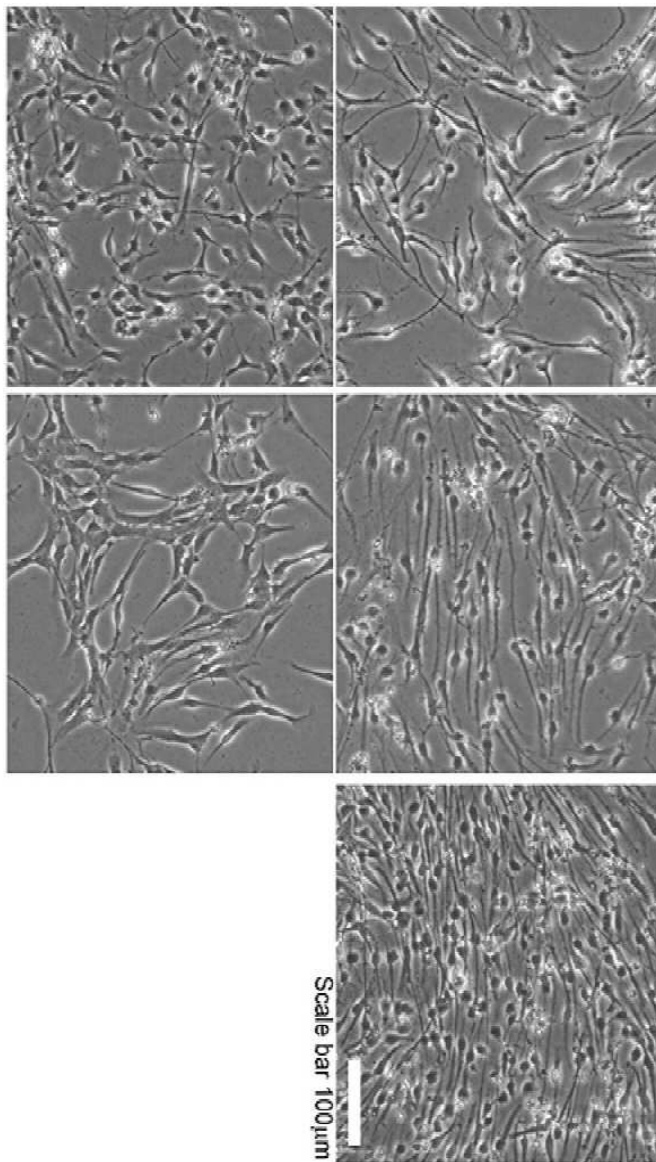
[0088] 본 발명의 범위는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

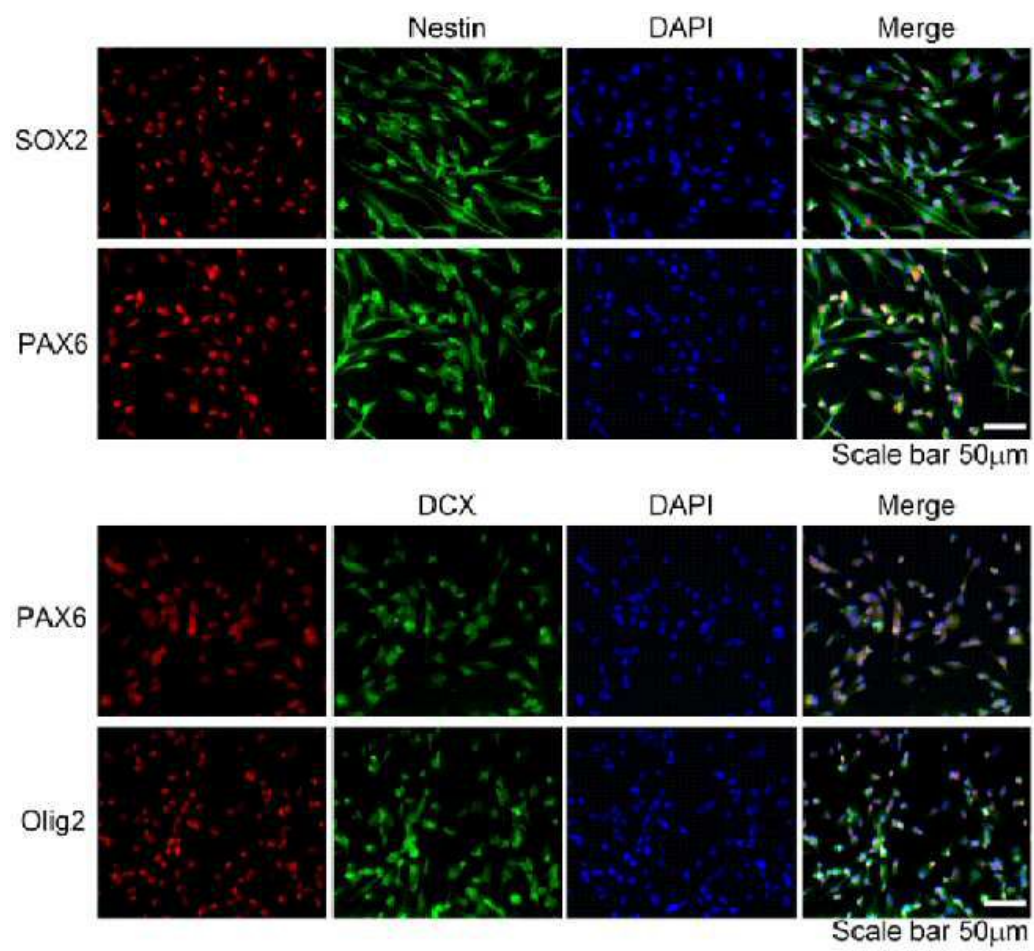
도면1



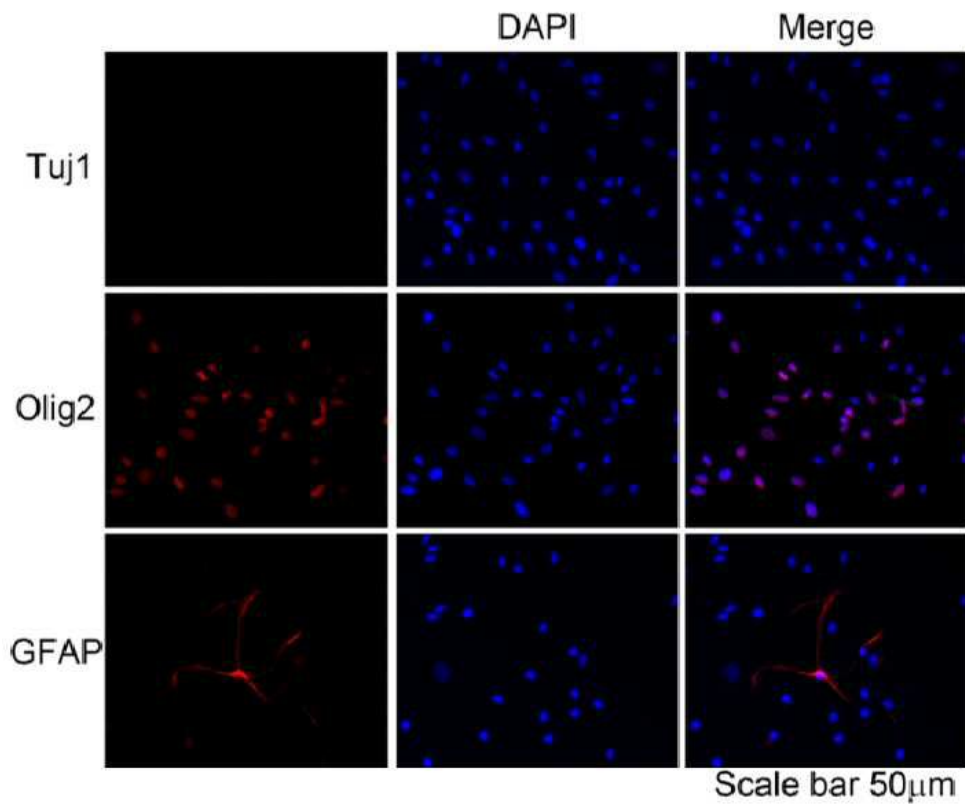
도면2



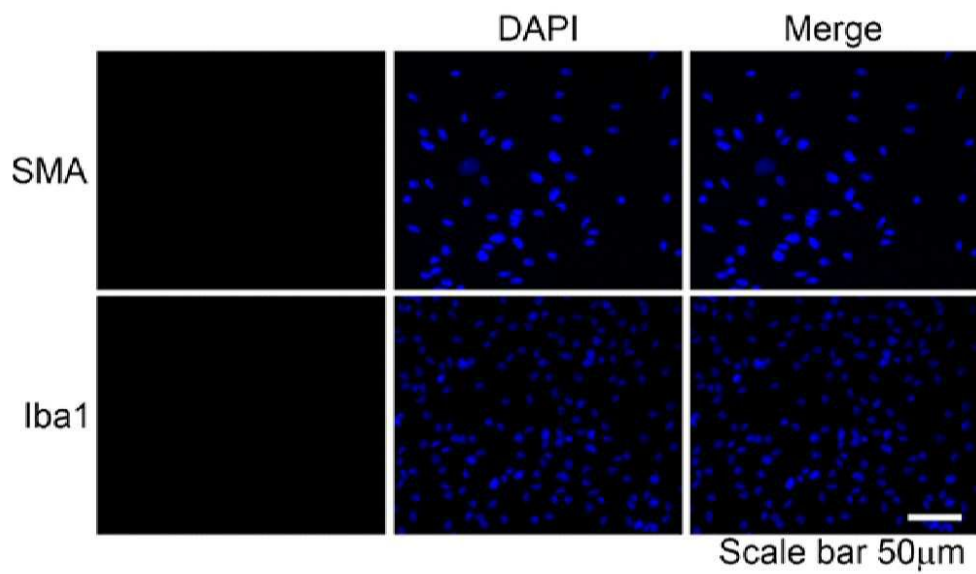
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation Hallym University
- <120> Cell culture sheet and method for separating and culturing neural stem cells
- <130> P213840

<160> 5
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Tyr Asn Met Met Glu Thr Glu Leu Lys Pro Pro Gly Pro Gln Gln
 1 5 10 15
 Thr Ser Gly Gly Gly Gly Asn Ser Thr Ala Ala Ala Ala Gly Gly
 20 25 30
 Asn Gln Lys Asn Ser Pro Asp Arg Val Lys Arg Pro Met Asn Ala Phe
 35 40 45
 Met Val Trp Ser Arg Gly Gln Arg Arg Lys Met Ala Gln Glu Asn Pro
 50 55 60
 Lys Met His Asn Ser Glu Ile Ser Lys Arg Leu Gly Ala Glu Trp Lys
 65 70 75 80
 Leu Leu Ser Glu Thr Glu Lys Arg Pro Phe Ile Asp Glu Ala Lys Arg
 85 90 95
 Leu Arg Ala Leu His Met Lys Glu His Pro Asp Tyr Lys Tyr Arg Pro
 100 105 110
 Arg Arg Lys Thr Lys Thr Leu Met Lys Lys Asp Lys Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Gly Gly Leu Leu Ala Pro Gly Gly Asn Ser Met Ala Ser Gly Val Gly
 130 135 140
 Val Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Val Asn Gln Arg Met Asp Ser Tyr
 145 150 155 160
 Ala His Met Asn Gly Trp Ser Asn Gly Ser Tyr Ser Met Met Gln Asp
 165 170 175
 Gln Leu Gly Tyr Pro Gln His Pro Gly Leu Asn Ala His Gly Ala Ala
 180 185 190
 Gln Met Gln Pro Met His Arg Tyr Asp Val Ser Ala Leu Gln Tyr Asn

195 200 205
 Ser Met Thr Ser Ser Gln Thr Tyr Met Asn Gly Ser Pro Thr Tyr Ser
 210 215 220
 Met Ser Tyr Ser Gln Gln Gly Thr Pro Gly Met Ala Leu Gly Ser Met
 225 230 235 240
 Gly Ser Val Val Lys Ser Glu Ala Ser Ser Ser Pro Pro Val Val Thr

245 250 255
 Ser Ser Ser His Ser Arg Ala Pro Cys Gln Ala Gly Asp Leu Arg Asp
 260 265 270
 Met Ile Ser Met Tyr Leu Pro Gly Ala Glu Val Pro Glu Pro Ala Ala
 275 280 285
 Pro Ser Arg Leu His Met Ser Gln His Tyr Gln Ser Gly Pro Val Pro
 290 295 300
 Gly Thr Ala Ile Asn Gly Thr Leu Pro Leu Ser His Met
 305 310 315

<210> 2
 <211> 1621
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met Glu Gly Cys Met Gly Glu Glu Ser Phe Gln Met Trp Glu Leu Asn
 1 5 10 15
 Arg Arg Leu Glu Ala Tyr Leu Ala Arg Val Lys Ala Leu Glu Glu Gln
 20 25 30
 Asn Glu Leu Leu Ser Ala Glu Leu Gly Gly Leu Arg Ala Gln Ser Ala
 35 40 45
 Asp Thr Ser Trp Arg Ala His Ala Asp Asp Glu Leu Ala Ala Leu Arg

50 55 60
 Ala Leu Val Asp Gln Arg Trp Arg Glu Lys His Ala Ala Glu Val Ala
 65 70 75 80
 Arg Asp Asn Leu Ala Glu Glu Leu Glu Gly Val Ala Gly Arg Cys Gln
 85 90 95

Gln Leu Arg Leu Ala Arg Glu Arg Thr Thr Glu Glu Val Ala Arg Asn
100 105 110

Arg Arg Ala Val Glu Ala Glu Lys Cys Ala Arg Ala Trp Leu Ser Ser
115 120 125

Gln Val Ala Glu Leu Glu Arg Glu Leu Glu Ala Leu Arg Val Ala His
130 135 140

Glu Glu Glu Arg Val Gly Leu Asn Ala Gln Ala Ala Cys Ala Pro Arg
145 150 155 160

Cys Pro Ala Pro Pro Arg Gly Pro Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val Glu
165 170 175

Glu Leu Ala Arg Arg Leu Gly Glu Ala Trp Arg Gly Ala Val Arg Gly
180 185 190

Tyr Gln Glu Arg Val Ala His Met Glu Thr Ser Leu Gly Gln Ala Arg
195 200 205

Glu Arg Leu Gly Arg Ala Val Gln Gly Ala Arg Glu Gly Arg Leu Glu
210 215 220

Leu Gln Gln Leu Gln Ala Glu Arg Gly Gly Leu Leu Glu Arg Arg Ala
225 230 235 240

Ala Leu Glu Gln Arg Leu Glu Gly Arg Trp Gln Glu Arg Leu Arg Ala
245 250 255

Thr Glu Lys Phe Gln Leu Ala Val Glu Ala Leu Glu Gln Glu Lys Gln
260 265 270

Gly Leu Gln Ser Gln Ile Ala Gln Val Leu Glu Gly Arg Gln Gln Leu
275 280 285

Ala His Leu Lys Met Ser Leu Ser Leu Glu Val Ala Thr Tyr Arg Thr
290 295 300

Leu Leu Glu Ala Glu Asn Ser Arg Leu Gln Thr Pro Gly Gly Gly Ser
305 310 315 320

Lys Thr Ser Leu Ser Phe Gln Asp Pro Lys Leu Glu Leu Gln Phe Pro
325 330 335

Arg Thr Pro Glu Gly Arg Arg Leu Gly Ser Leu Leu Pro Val Leu Ser

340 345 350
 Pro Thr Ser Leu Pro Ser Pro Leu Pro Ala Thr Leu Glu Thr Pro Val
 355 360 365
 Pro Ala Phe Leu Lys Asn Gln Glu Phe Leu Gln Ala Arg Thr Pro Thr
 370 375 380
 Leu Ala Ser Thr Pro Ile Pro Pro Thr Pro Gln Ala Pro Ser Pro Ala
 385 390 395 400
 Val Asp Ala Glu Ile Arg Ala Gln Asp Ala Pro Leu Ser Leu Leu Gln
 405 410 415

 Thr Gln Gly Gly Arg Lys Gln Ala Pro Glu Pro Leu Arg Ala Glu Ala
 420 425 430
 Arg Val Ala Ile Pro Ala Ser Val Leu Pro Gly Pro Glu Glu Pro Gly
 435 440 445
 Gly Gln Arg Gln Glu Ala Ser Thr Gly Gln Ser Pro Glu Asp His Ala
 450 455 460
 Ser Leu Ala Pro Pro Leu Ser Pro Asp His Ser Ser Leu Glu Ala Lys
 465 470 475 480
 Asp Gly Glu Ser Gly Gly Ser Arg Val Phe Ser Ile Cys Arg Gly Glu

 485 490 495
 Gly Glu Gly Gln Ile Trp Gly Leu Val Glu Lys Glu Thr Ala Ile Glu
 500 505 510
 Gly Lys Val Val Ser Ser Leu Gln Gln Glu Ile Trp Glu Glu Glu Asp
 515 520 525
 Leu Asn Arg Lys Glu Ile Gln Asp Ser Gln Val Pro Leu Glu Lys Glu
 530 535 540
 Thr Leu Lys Ser Leu Gly Glu Glu Ile Gln Glu Ser Leu Lys Thr Leu
 545 550 555 560

 Glu Asn Gln Ser His Glu Thr Leu Glu Arg Glu Asn Gln Glu Cys Pro
 565 570 575
 Arg Ser Leu Glu Glu Asp Leu Glu Thr Leu Lys Ser Leu Glu Lys Glu
 580 585 590
 Asn Lys Glu Leu Leu Lys Asp Val Glu Val Val Arg Pro Leu Glu Lys

595 600 605
 Glu Ala Val Gly Gln Leu Lys Pro Thr Gly Lys Glu Asp Thr Gln Thr
 610 615 620
 Leu Gln Ser Leu Gln Lys Glu Asn Gln Glu Leu Met Lys Ser Leu Glu

 625 630 635 640
 Gly Asn Leu Glu Thr Phe Leu Phe Pro Gly Thr Glu Asn Gln Glu Leu
 645 650 655
 Val Ser Ser Leu Gln Glu Asn Leu Glu Ser Leu Thr Ala Leu Glu Lys
 660 665 670
 Glu Asn Gln Glu Pro Leu Arg Ser Pro Glu Val Gly Asp Glu Glu Ala
 675 680 685
 Leu Arg Pro Leu Thr Lys Glu Asn Gln Glu Pro Leu Arg Ser Leu Glu
 690 695 700

 Asp Glu Asn Lys Glu Ala Phe Arg Ser Leu Glu Lys Glu Asn Gln Glu
 705 710 715 720
 Pro Leu Lys Thr Leu Glu Glu Glu Asp Gln Ser Ile Val Arg Pro Leu
 725 730 735
 Glu Thr Glu Asn His Lys Ser Leu Arg Ser Leu Glu Glu Gln Asp Gln
 740 745 750
 Glu Thr Leu Arg Thr Leu Glu Lys Glu Thr Gln Gln Arg Arg Arg Ser
 755 760 765
 Leu Gly Glu Gln Asp Gln Met Thr Leu Arg Pro Pro Glu Lys Val Asp

 770 775 780
 Leu Glu Pro Leu Lys Ser Leu Asp Gln Glu Ile Ala Arg Pro Leu Glu
 785 790 795 800
 Asn Glu Asn Gln Glu Phe Leu Lys Ser Leu Lys Glu Glu Ser Val Glu
 805 810 815
 Ala Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Ile Leu Glu Ser Leu Lys Ser Ala
 820 825 830
 Gly Gln Glu Asn Leu Glu Thr Leu Lys Ser Pro Glu Thr Gln Ala Pro
 835 840 845

Leu Trp Thr Pro Glu Glu Ile Asn Gln Gly Ala Met Asn Pro Leu Glu
 850 855 860
 Lys Glu Ile Gln Glu Pro Leu Glu Ser Val Glu Val Asn Gln Glu Thr
 865 870 875 880
 Phe Arg Leu Leu Glu Glu Glu Asn Gln Glu Ser Leu Arg Ser Leu Gly
 885 890 895
 Ala Trp Asn Leu Glu Asn Leu Arg Ser Pro Glu Glu Val Asp Lys Glu
 900 905 910
 Ser Gln Arg Asn Leu Glu Glu Glu Glu Asn Leu Gly Lys Gly Glu Tyr
 915 920 925
 Gln Glu Ser Leu Arg Ser Leu Glu Glu Glu Gly Gln Glu Leu Pro Gln
 930 935 940
 Ser Ala Asp Val Gln Arg Trp Glu Asp Thr Val Glu Lys Asp Gln Glu
 945 950 955 960
 Leu Ala Gln Glu Ser Pro Pro Gly Met Ala Gly Val Glu Asn Glu Asp
 965 970 975
 Glu Ala Glu Leu Asn Leu Arg Glu Gln Asp Gly Phe Thr Gly Lys Glu
 980 985 990
 Glu Val Val Glu Gln Gly Glu Leu Asn Ala Thr Glu Glu Val Trp Ile
 995 1000 1005
 Pro Gly Glu Gly His Pro Glu Ser Pro Glu Pro Lys Glu Gln Arg Gly
 1010 1015 1020
 Leu Val Glu Gly Ala Ser Val Lys Gly Gly Ala Glu Gly Leu Gln Asp
 1025 1030 1035 1040
 Pro Glu Gly Gln Ser Gln Gln Val Gly Ala Pro Gly Leu Gln Ala Pro
 1045 1050 1055
 Gln Gly Leu Pro Glu Ala Ile Glu Pro Leu Val Glu Asp Asp Val Ala
 1060 1065 1070
 Pro Gly Gly Asp Gln Ala Ser Pro Glu Val Met Leu Gly Ser Glu Pro
 1075 1080 1085
 Ala Met Gly Glu Ser Ala Ala Gly Ala Glu Pro Gly Pro Gly Gln Gly
 1090 1095 1100

Val Gly Gly Leu Gly Asp Pro Gly His Leu Thr Arg Glu Glu Val Met
1105 1110 1115 1120
Glu Pro Pro Leu Glu Glu Glu Ser Leu Glu Ala Lys Arg Val Gln Gly
1125 1130 1135
Leu Glu Gly Pro Arg Lys Asp Leu Glu Glu Ala Gly Gly Leu Gly Thr
1140 1145 1150
Glu Phe Ser Glu Leu Pro Gly Lys Ser Arg Asp Pro Trp Glu Pro Pro
1155 1160 1165
Arg Glu Gly Arg Glu Glu Ser Glu Ala Glu Ala Pro Arg Gly Ala Glu
1170 1175 1180
Glu Ala Phe Pro Ala Glu Thr Leu Gly His Thr Gly Ser Asp Ala Pro
1185 1190 1195 1200
Ser Pro Trp Pro Leu Gly Ser Glu Glu Ala Glu Glu Asp Val Pro Pro
1205 1210 1215
Val Leu Val Ser Pro Ser Pro Thr Tyr Thr Pro Ile Leu Glu Asp Ala
1220 1225 1230
Pro Gly Pro Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Gln Glu Ala Ser Trp Gly
1235 1240 1245
Val Gln Gly Arg Ala Glu Ala Leu Gly Lys Val Glu Ser Glu Gln Glu
1250 1255 1260
Glu Leu Gly Ser Gly Glu Ile Pro Glu Gly Pro Gln Glu Glu Gly Glu
1265 1270 1275 1280
Glu Ser Arg Glu Glu Ser Glu Glu Asp Glu Leu Gly Glu Thr Leu Pro
1285 1290 1295
Asp Ser Thr Pro Leu Gly Phe Tyr Leu Arg Ser Pro Thr Ser Pro Arg
1300 1305 1310
Trp Asp Pro Thr Gly Glu Gln Arg Pro Pro Pro Gln Gly Glu Thr Gly
1315 1320 1325
Lys Glu Gly Trp Asp Pro Ala Val Leu Ala Ser Glu Gly Leu Glu Ala
1330 1335 1340
Pro Pro Ser Glu Lys Glu Glu Gly Glu Glu Gly Glu Glu Cys Gly

1345 1350 1355 1360
 Arg Asp Ser Asp Leu Ser Glu Glu Phe Glu Asp Leu Gly Thr Glu Ala
 1365 1370 1375
 Pro Phe Leu Pro Gly Val Pro Gly Glu Val Ala Glu Pro Leu Gly Gln
 1380 1385 1390
 Val Pro Gln Leu Leu Leu Asp Pro Ala Ala Trp Asp Arg Asp Gly Glu
 1395 1400 1405
 Ser Asp Gly Phe Ala Asp Glu Glu Glu Ser Gly Glu Glu Gly Glu Glu
 1410 1415 1420

 Asp Gln Glu Glu Gly Arg Glu Pro Gly Ala Gly Arg Trp Gly Pro Gly
 1425 1430 1435 1440
 Ser Ser Val Gly Ser Leu Gln Ala Leu Ser Ser Ser Gln Arg Gly Glu
 1445 1450 1455
 Phe Leu Glu Ser Asp Ser Val Ser Val Ser Val Pro Trp Asp Asp Ser
 1460 1465 1470
 Leu Arg Gly Ala Val Ala Gly Ala Pro Lys Thr Ala Leu Glu Thr Glu
 1475 1480 1485
 Ser Gln Asp Ser Ala Glu Pro Ser Gly Ser Glu Glu Glu Ser Asp Pro

 1490 1495 1500
 Val Ser Leu Glu Arg Glu Asp Lys Val Pro Gly Pro Leu Glu Ile Pro
 1505 1510 1515 1520
 Ser Gly Met Glu Asp Ala Gly Pro Gly Ala Asp Ile Ile Gly Val Asn
 1525 1530 1535
 Gly Gln Gly Pro Asn Leu Glu Gly Lys Ser Gln His Val Asn Gly Gly
 1540 1545 1550
 Val Met Asn Gly Leu Glu Gln Ser Glu Glu Val Gly Gln Gly Met Pro
 1555 1560 1565

 Leu Val Ser Glu Gly Asp Arg Gly Ser Pro Phe Gln Glu Glu Glu Gly
 1570 1575 1580
 Ser Ala Leu Lys Thr Ser Trp Ala Gly Ala Pro Val His Leu Gly Gln
 1585 1590 1595 1600
 Gly Gln Phe Leu Lys Phe Thr Gln Arg Glu Gly Asp Arg Glu Ser Trp

1605 1610 1615
Ser Ser Gly Glu Asp
1620
<210> 3
<211> 422
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Met Gln Asn Ser His Ser Gly Val Asn Gln Leu Gly Gly Val Phe Val
1 5 10 15
Asn Gly Arg Pro Leu Pro Asp Ser Thr Arg Gln Lys Ile Val Glu Leu
20 25 30
Ala His Ser Gly Ala Arg Pro Cys Asp Ile Ser Arg Ile Leu Gln Val
35 40 45
Ser Asn Gly Cys Val Ser Lys Ile Leu Gly Arg Tyr Tyr Glu Thr Gly
50 55 60
Ser Ile Arg Pro Arg Ala Ile Gly Gly Ser Lys Pro Arg Val Ala Thr
65 70 75 80
Pro Glu Val Val Ser Lys Ile Ala Gln Tyr Lys Arg Glu Cys Pro Ser
85 90 95
Ile Phe Ala Trp Glu Ile Arg Asp Arg Leu Leu Ser Glu Gly Val Cys
100 105 110
Thr Asn Asp Asn Ile Pro Ser Val Ser Ser Ile Asn Arg Val Leu Arg
115 120 125
Asn Leu Ala Ser Glu Lys Gln Gln Met Gly Ala Asp Gly Met Tyr Asp
130 135 140
Lys Leu Arg Met Leu Asn Gly Gln Thr Gly Ser Trp Gly Thr Arg Pro
145 150 155 160
Gly Trp Tyr Pro Gly Thr Ser Val Pro Gly Gln Pro Thr Gln Asp Gly
165 170 175
Cys Gln Gln Gln Glu Gly Gly Gly Glu Asn Thr Asn Ser Ile Ser Ser
180 185 190

Asn Gly Glu Asp Ser Asp Glu Ala Gln Met Arg Leu Gln Leu Lys Arg
 195 200 205
 Lys Leu Gln Arg Asn Arg Thr Ser Phe Thr Gln Glu Gln Ile Glu Ala
 210 215 220

 Leu Glu Lys Glu Phe Glu Arg Thr His Tyr Pro Asp Val Phe Ala Arg
 225 230 235 240
 Glu Arg Leu Ala Ala Lys Ile Asp Leu Pro Glu Ala Arg Ile Gln Val
 245 250 255
 Trp Phe Ser Asn Arg Arg Ala Lys Trp Arg Arg Glu Glu Lys Leu Arg
 260 265 270
 Asn Gln Arg Arg Gln Ala Ser Asn Thr Pro Ser His Ile Pro Ile Ser
 275 280 285
 Ser Ser Phe Ser Thr Ser Val Tyr Gln Pro Ile Pro Gln Pro Thr Thr

 290 295 300
 Pro Val Ser Ser Phe Thr Ser Gly Ser Met Leu Gly Arg Thr Asp Thr
 305 310 315 320
 Ala Leu Thr Asn Thr Tyr Ser Ala Leu Pro Pro Met Pro Ser Phe Thr
 325 330 335
 Met Ala Asn Asn Leu Pro Met Gln Pro Pro Val Pro Ser Gln Thr Ser
 340 345 350
 Ser Tyr Ser Cys Met Leu Pro Thr Ser Pro Ser Val Asn Gly Arg Ser
 355 360 365

 Tyr Asp Thr Tyr Thr Pro Pro His Met Gln Thr His Met Asn Ser Gln
 370 375 380
 Pro Met Gly Thr Ser Gly Thr Thr Ser Thr Gly Leu Ile Ser Pro Gly
 385 390 395 400
 Val Ser Val Pro Val Gln Val Pro Gly Ser Glu Pro Asp Met Ser Gln
 405 410 415
 Tyr Trp Pro Arg Leu Gln
 420

<210> 4

<211> 365

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Leu Asp Phe Gly His Phe Asp Glu Arg Asp Lys Thr Ser Arg

1 5 10 15
Asn Met Arg Gly Ser Arg Met Asn Gly Leu Pro Ser Pro Thr His Ser

20 25 30
Ala His Cys Ser Phe Tyr Arg Thr Arg Thr Leu Gln Ala Leu Ser Asn

35 40 45
Glu Lys Lys Ala Lys Lys Val Arg Phe Tyr Arg Asn Gly Asp Arg Tyr

50 55 60
Phe Lys Gly Ile Val Tyr Ala Val Ser Ser Asp Arg Phe Arg Ser Phe

65 70 75 80

Asp Ala Leu Leu Ala Asp Leu Thr Arg Ser Leu Ser Asp Asn Ile Asn
85 90 95

Leu Pro Gln Gly Val Arg Tyr Ile Tyr Thr Ile Asp Gly Ser Arg Lys
100 105 110

Ile Gly Ser Met Asp Glu Leu Glu Glu Gly Glu Ser Tyr Val Cys Ser
115 120 125

Ser Asp Asn Phe Phe Lys Lys Val Glu Tyr Thr Lys Asn Val Asn Pro
130 135 140

Asn Trp Ser Val Asn Val Lys Thr Ser Ala Asn Met Lys Ala Pro Gln

145 150 155 160
Ser Leu Ala Ser Ser Asn Ser Ala Gln Ala Arg Glu Asn Lys Asp Phe

165 170 175
Val Arg Pro Lys Leu Val Thr Ile Ile Arg Ser Gly Val Lys Pro Arg

180 185 190
Lys Ala Val Arg Val Leu Leu Asn Lys Lys Thr Ala His Ser Phe Glu

195 200 205
Gln Val Leu Thr Asp Ile Thr Glu Ala Ile Lys Leu Glu Thr Gly Val

210 215 220

Val Lys Lys Leu Tyr Thr Leu Asp Gly Lys Gln Val Thr Cys Leu His
225 230 235 240
Asp Phe Phe Gly Asp Asp Asp Val Phe Ile Ala Cys Gly Pro Glu Lys
245 250 255
Phe Arg Tyr Ala Gln Asp Asp Phe Ser Leu Asp Glu Asn Glu Cys Arg
260 265 270
Val Met Lys Gly Asn Pro Ser Ala Thr Ala Gly Pro Lys Ala Ser Pro
275 280 285
Thr Pro Gln Lys Thr Ser Ala Lys Ser Pro Gly Pro Met Arg Arg Ser
290 295 300
Lys Ser Pro Ala Asp Ser Gly Asn Asp Gln Asp Ala Asn Gly Thr Ser
305 310 315 320
Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Lys Ser Lys Gln Ser Pro Ile Ser Thr
325 330 335
Pro Thr Ser Pro Gly Ser Leu Arg Lys His Lys Asp Leu Tyr Leu Pro
340 345 350
Leu Ser Leu Asp Asp Ser Asp Ser Leu Gly Asp Ser Met
355 360 365

<210> 5
<211> 323
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

Met Asp Ser Asp Ala Ser Leu Val Ser Ser Arg Pro Ser Ser Pro Glu
1 5 10 15
Pro Asp Asp Leu Phe Leu Pro Ala Arg Ser Lys Gly Ser Ser Gly Ser
20 25 30
Ala Phe Thr Gly Gly Thr Val Ser Ser Ser Thr Pro Ser Asp Cys Pro
35 40 45
Pro Glu Leu Ser Ala Glu Leu Arg Gly Ala Met Gly Ser Ala Gly Ala
50 55 60
His Pro Gly Asp Lys Leu Gly Gly Ser Gly Phe Lys Ser Ser Ser Ser

[illegible]