(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0046196
(43) 공개일자 2021년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/073 (2010.01) *A61K 35/50* (2015.01)
A61P 19/00 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0605 (2013.01)
A61K 35/50 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0129670
(22) 출원일자 2019년10월18일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
주식회사 인피니티
경기도 안양시 동안구 안양판교로 20 ,3층305-A34호(관양동,신한데뷰오피스텔)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김민규
대전광역시 유성구 죽동로 321, 102동 2401호(죽동, 금성백조예미지)
이은지
대전광역시 유성구 대학로76번안길 36, 최앤리 206(궁동)
임성빈
대전광역시 유성구 배울2로 134, 102동 401호(용산동, 대덕테크노밸리 푸르지오 하임 1단지)
(74) 대리인
원대규

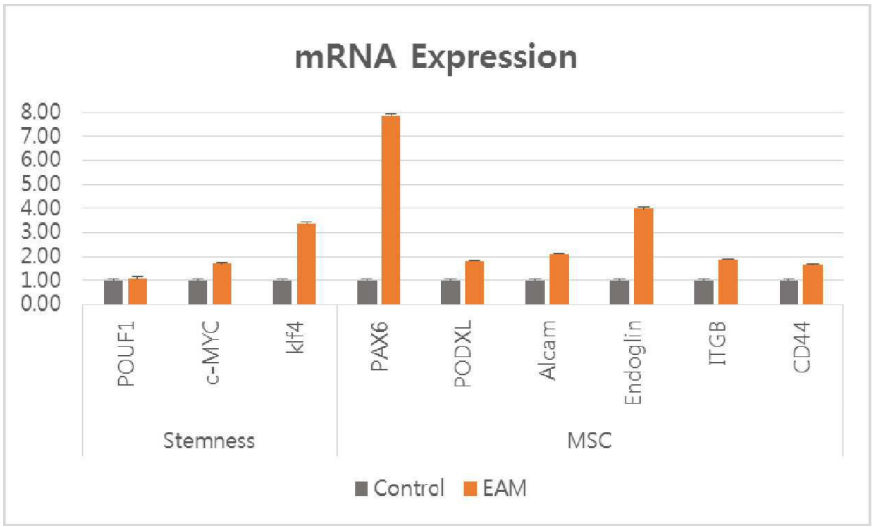
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **말과동물 양막-유래 중간엽 줄기세포 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은, 말과동물 양막-유래 중간엽 줄기세포(equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells; eAM-MSCs) 및 그 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, Oct4, c-Myc, Klf4, PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, 및 HCAM 유전자를 발현하고, CD14, CD34, CD45, 및 ELA-Ⅱ에 대하여 모두 음성이면서, CD44, CD90, 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, 미분화 상태로 14 계대 이상 배양되는 능력을 갖는, 말과동물 양막-유래 중간엽 줄기세포에 관한 것이다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61P 19/00 (2018.01)
A61P 21/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425121979
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	창업성장기술개발(R&D)
연구과제명	중간엽 유래 줄기세포를 이용한 말 근골격계 손상 치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인피니티
연구기간	2018.10.08 ~ 2019.10.07

명 세 서

청구범위

청구항 1

말과동물 양막에서 세포를 단리하는 단계;

단리한 세포를 배지에서 배양하는 단계; 및

배양된 세포를 회수하는 단계를 포함하여,

다음과 같은 특성을 나타내는 말과동물 양막-유래 다분화능 줄기세포의 제조방법:

(a) Oct4, c-Myc, Klf4, PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, 및 HCAM 유전자를 발현함;

(b) CD14, CD34, CD45, 및 ELA-Ⅱ에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, CD44, CD90, 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타냄;

(c) 미분화 상태로 14 계대 이상 배양되는 능력을 가짐.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 배지는 저농도 글루코스 DMEM(low-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium)인 것인 다분화능 줄기세포의 제조방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 배지는 8 내지 12 w/v% 소태아혈청(FBS)을 더 포함하는 것인 다분화능 줄기세포의 제조방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 배지에서 배양하는 단계는 부착배양하는 것인 다분화능 줄기세포의 제조방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 배양은 배양 접시의 표면적 6.0 내지 15 cm^2에 대해 $0.5x10^5$ 내지 $2.5x10^5$ 세포를 분주하여 배양하는 것인 다분화능 줄기세포의 제조방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 배양은 배양 접시의 표면적 9.0 내지 10 cm^2에 대해 $1x10^5$ 내지 $2x10^5$ 세포를 분주하여 배양하는 것인 다분화능 줄기세포의 제조방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 말과동물 양막-유래 다분화능 줄기세포는 미분화된 상태로 24 계대 이상 배양되는 능력을 갖는 것인 다분화능 줄기세포의 제조방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 Klf4, PAX6, 및 Endoglin 유전자가 과발현하는 것인 다분화능 줄기세포의 제조방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 과발현은 동일한 개체의 섬유아세포 대비 3 배 이상 과발현하는 것인 다분화능 줄기세포의 제조방법.

청구항 10

다음과 같은 특성을 갖는 말과동물 양막-유래 다분화능 줄기세포:

(a) Oct4, c-Myc, Klf4, PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, 및 HCAM 유전자를 발현함;

(b) CD14, CD34, CD45, 및 ELA-Ⅱ에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타내고, CD44, CD90, 및 CD105에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타냄;

(c) 미분화 상태로 14 계대 이상 배양되는 능력을 가짐.

청구항 11

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 다분화능 줄기세포, 또는 청구항 10의 다분화능 줄기세포, 이로부터 분화된 세포, 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는 세포 치료제.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 다분화능 줄기세포를 $5x10^6$ 내지 $1x10^7$ 세포수로 포함하는 것인 세포 치료제.

청구항 13

청구항 11에 있어서, FBS를 포함하는 PBS 완충액을 담체로서 포함하는 것인 세포 치료제.

청구항 14

청구항 11에 있어서, 상기 세포 치료제는 말과동물의 골관절염 치료용, 말과동물의 골 결실 질환 치료용, 말과동물의 지방 조직 형성용, 말과동물의 힘줄 조직 형성용 또는 말과동물의 근육 조직 형성용인 것인 세포 치료제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 말과동물 양막-유래 중간엽 줄기세포(equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells; eAM-MSCs) 및 그 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 우수한 증식능 및 분화능을 가져 세포 치료제로서 적합한 말과동물 양막-유래 중간엽 줄기세포에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생명공학 기술의 발달은 세포치료 및 재생의학 분야의 가능성을 열어 주었으며 현재 인간 질병 치료를 위한 줄기세포 치료제 분야는 놀라운 속도로 임상 시험 및 연구가 진행되고 있다. 줄기세포(Stem cell)는 스스로 자기복제가 가능하고 여러 다양한 조직의 세포로 분화 가능한 능력을 가진 세포로서, 손상 받은 신체 조직 및 세포 재생 능력을 가지고 있어 현재 확실한 치료법이 없는 퇴행성 질병이나 심한 외상과 같은 치료가 어려운 손상에 있어 의학적 활용도가 매우 높은 차세대 기술로 인식된다.

[0003] 줄기 세포는 다양한 유형의 세포 형태로 분화할 수 있다는 점에서 의약 및 생명공학 분야, 재생의학 분야 등에 유용하게 쓰일 수 있다. 줄기세포의 종류는 배아 줄기세포, 성체줄기세포, 및 iPSC 등이 있다. 그 중 성체 줄기세포의 종류 중 하나인 중간엽 줄기세포는 신체의 다양한 조직에서 얻을 수 있고, 유래한 조직에 따라 그 특성이 조금씩 다르다. 중간엽 줄기세포의 보편적 특징은 지방세포, 연골세포, 또는 골세포로 분화가 가능하고 자가증식능력이 뛰어나다. 그래서 세포 치료제로서 각광받고 있다. 가장 많이 연구된 중간엽 줄기세포는 골수에서 유래한 중간엽 줄기세포 인데, 이를 얻는 과정이 힘들다는 단점이 있다. 이에 그 단점을 보완하기 위하여, 다른 조직 유래 중간엽 줄기세포에 대한 연구들이 진행되고 있다.

[0004] 태아 유래 조직 중 양막은 가장 최근에 발견되어 연구되고 있는 중간엽 줄기세포 기원조직으로, 증식능이 우수하고 배아줄기세포에서 특징적으로 나타나는 세포 특이 마커를 다수 보유하고 있다는 연구 결과가 있다. 양막 유래 줄기세포는 제왕절개를 통한 출산 시 얻을 수 있어, 산모와 태아에게 전혀 해가 없는 비 침습적인 방법으로 채취가 가능하고, 다른 중간엽 줄기세포와 마찬가지로 자가 증식을 하며 여러 형태의 다양한 세포들로 분화할 수 있는 분화능을 갖는다. 위와 같은 결과들은 성체 줄기세포 기원 조직 중 태아와 함께 생성되어 가장 빨리 채취 가능한 조직으로서, 양막 유래 중간엽 줄기세포의 세포 치료제로서의 가능성을 보여준다.

[0005] 최근 줄기세포 시장의 규모는 지속적으로 성장하여 2025년에 3944억 달러에 이를 것으로 기대되고 있다. 현재는 북미가 가장 큰 줄기 세포 시장을 보유하고 있지만, 일본에서 지난 해 12월 세계 최초로 척수 손상 치료용 줄기세포 치료제의 상용화를 승인하였다. 이 치료제는 환자의 조직에서 얻을 수 있는 중간엽 줄기세포에서 기인한다. 올해 3월 첨단재생의료법의 국회 통과 가능성이 높아지면서 줄기세포 치료제와 같은 재생의료 산업에 대한 기대가 높아지고 있다. 따라서 줄기세포를 이용한 치료제의 활용 분야가 넓어질 것이며 말 산업 분야도 예외는 아닐 것이다. 실제로 줄기세포 시장의 성장과 함께 말 관련 산업의 가치도 상승하는 추세이다. 말의 양막에서 분리한 중간엽 줄기세포에서 기인한 세포 치료제를 이용함으로써, 신약 개발 뿐 아니라, 재생 의학 분야와 더불어 생명 공학 및 농업 분야 사이의 융복합적인 발전을 기대할 수 있을 것이다.

[0006] 따라서 균질한 말과동물의 태아 유래 줄기세포의 근·골격계 재생 능력을 이용하는 줄기세포 치료제의 확립은 앞으로 많은 질병치료에 도움이 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 양상은 말과동물 양막-유래 중간엽 줄기세포를 제공한다.

[0008] 본 발명의 다른 양상은 말과동물 양막-유래 중간엽 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 양상은 말과동물 양막-유래 중간엽 줄기세포 또는 이로부터 분화된 조직세포를 유효성분으로 함유하는 세포 치료제를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양상은, 말과동물 양막에서 세포를 단리하는 단계; 단리한 세포를 배지에서 배양하는 단계; 및 배양된 세포를 회수하는 단계를 포함하는 말과동물 양막-유래 다분화능 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

[0011] 상기 제조방법에 의해 제조된 다분화능 줄기세포는, Oct4, c-Myc, Klf4, PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, 및 HCAM 유전자를 발현하고, CD14, CD34, CD45, 및 ELA-Ⅱ에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, CD44, CD90, 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내며, 미분화 상태로 14 계대 이상 배양되는 능력을 갖는다.

[0012] 상기 양막에서 단리된 세포는 단핵세포를 의미할 수 있다. 상기 단핵세포를 적절한 배지에서 배양하여 다분화능 줄기세포를 얻을 수 있다. 상기 제조방법은, 양막 조직으로부터 세포를 단리하기 전, 상피세포들을 제거하기 위해 수거된 양막에 트립신-EDTA를 처리하고 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 양막으로부터 세포를 분리하는 단계는, 양막으로부터 단핵세포를 용이하게 단리하기 위해 효소를 처리할 수 있다. 상기 효소는 제1형 콜라겐 분해효소(collagenase type 1)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 용어 "말과동물"이란, 말과(Equidae; Genus Eauus)에 속하는 포유류 동물을 모두 포함하는 의미일 수 있다. 상기 말과동물은 단일 속인 말속으로서, 그레비얼룩말, 당나귀, 말, 산얼룩말, 얼룩말아속의 콰가, 아시아야생당나귀, 아프리카야생당나귀, 캉당나귀, 타르판, 프셰발스키말, 또는 시리아당나귀를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0014] 용어 "양막"이란, 융모막, 탈락막과 함께 삼중층의 구조로 태반을 구성하는 하나의 층으로, 상피 단층과 기질막의 이중층 구조를 갖는 얇은 무혈관 막으로 태아에 결합하여 환경을 구성하는 주머니를 의미할 수 있다.

[0015] 용어 "줄기세포"란, 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 의미할 수 있다. 상기 줄기세포는, 만능 줄기세포(totipotent stem cells), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 또는 다분화능(다능성) 줄기세포(multipotent stem cells)일 수 있다. 상기 줄기세포는 미분화상태로 계속 복제 가능하고, 특정 배양조건에서 특정 세포로 분화가 가능한 특성을 갖는 것이 바람직할 수 있다.

[0016] 용어 "다분화능 줄기세포"란, 줄기세포가 도입되는 조직 및 기관을 형성하는 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 세포를 의미할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따른 다분화능 줄기세포는, 지방세포, 골아세포, 또는 연골세포로 분화될 수 있다. 상기 다분화능 줄기세포는, 본 명세서에서 중간엽 줄기세포를 의미할 수 있다.

[0017] 일 구체예에서, 상기 배지는 저농도 글루코스 DMEM(low-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium)일 수 있다. 이러한 배지에서 양막에서 단리된 단핵세포를 배양함으로써 균질성이 향상된 줄기세포군을 얻을 수 있다.

저농도 글루코스 DMEM 중 글루코스의 농도는 800 내지 1200 mg/L, 보다 바람직하게는 900 내지 1100 mg/L일 수 있다.

[0018] 일 구체예에서, 상기 배지는 8 내지 12 w/v%의 소태아혈청(FBS)을 더 포함할 수 있다. 상기 소태아혈청은 보다 바람직하게는 9 내지 11 w/v%일 수 있다.

[0019] 일 구체예에서, 상기 저농도 글루코스 DMEM 배지에서 배양하는 단계는 부착배양하는 것이 바람직할 수 있다. 부착배양을 위해 예를 들어, 피브로넥틴으로 코팅된 배양 접시를 이용할 수 있다. 초기 단핵세포의 효율적인 부착을 돕고, 성장을 촉진시키기 위해 20w/v% 소태아 혈청, 내피세포성장용 배지(Endothelial cell Growth Medium-2; EGM-2), 인간-기반 섬유아세포 성장 인자(human-basic fibroblast growth factor; h-bFGF), 혈관내피세포성장인자 (vascular endothelial growth factor; VEGF), 장 R3-인슐린-유사 성장인자 (long R3-insulin-like growth factor; R3-IGF), 인간 표피 성정인자 (human epidermal growth factor; h-EGF), 또는 이들의 조합을 더 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 초기 배양에 20w/v% 소태아 혈청이 포함된 배지로 배양한 경우, 예를 들어, 양막으로부터 단리한 단핵세포를 배양한지 3일 내지 7일 후에 8 내지 12w/v%의 소태아혈청(FBS)을 포함하는 저농도 글루코스 DMEM으로 교체하는 것이 바람직할 수 있다.

[0020] 상기 부착배양에서 바닥에 부착하지 않은 세포 및 부유물을 제거함으로써 추가 계대 배양할 중간엽 줄기세포를 쉽게 수득할 수 있다. 추가 계대 배양시 부착된 세포가 70 내지 80 % 컨플루언시에 도달하면 배지는 교체하는 것이 바람직할 수 있다. 추가 계대 배양할 줄기세포는 단핵세포의 부착 배양 3 내지 7일 후에 방추형(spindle)의 형태를 갖는 것으로서, 피브로넥틴으로 코팅된 배양 접시에 성공적으로 부착된 것일 수 있다.

[0021] 일 구체예에서, 상기 배양은 배양 접시의 표면적 6 내지 15 cm^2에 대해 $0.5x10^5$ 내지 $2.5x10^5$ 세포를 분주하여 배양하는 것이 바람직할 수 있다. 보다 바람직하게는, 배양 접시의 표면적 9 내지 10 cm^2에 대해 $1x10^5$ 내지 $2x10^5$ 세포를 분주하여 배양하는 것일 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 줄기세포의 증식능이 저하되거나 의도하지 않은 분화가 일어나 줄기세포로서의 기능을 상실할 수 있다.

[0022] 일 구체예에 따른 줄기세포는, Oct4, c-Myc, Klf4, PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, 및 HCAM 유전자를 발현한다. Oct4 (octamer-binding transcription factor 4)는 POUF1으로도 알려져 있고, 서열참조 XM_001490108로 정의될 수 있다. c-Myc (Cellular myelocytomatosis gene)은 서열참조 XM_023655154, Klf4 (Krüppel-like factor 4)는 서열참조 XM_023629843.1, PAX6 (Paired box protein 6)는 서열참조 XM_023646553.1, ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule)은 서열참조 XM_001503380.6, Endoglin은 서열참조 XM_003364144 및 Integrin-β1은 서열참조 XM_005606848.3으로 정의될 수 있다. HCAM (homing cell adhesion molecule)은 CD44로도 알려져 있고, 서열참조 XM_005598012로 정의될 수 있다. 상기 줄기세포는 PODXL (Podocalyxin)을 더 발현할 수 있고, 이 유전자는 서열참조 XM_023639700.1로 정의될 수 있다.

[0023] 포유동물은 종에 따라, 역할 및 발현 부위에서 동일하게 인식되는 유전자임에도 서로 일부분 상이한 서열을 가질 수 있음이 잘 알려져 있다. 따라서, 상기 정의된 유전자는 포유동물의 종에 한정되지 않고, 동일 유사한 것으로 인식되는 유전자 서열에 의해 정의될 수 있다. 이러한 유전자는, 예를 들어, 서열번호 3 및 4, 서열번호 5 및 6, 서열번호 7 및 8, 서열번호 9 및 10, 서열번호 11 및 12, 서열번호 13 및 14, 서열번호 15 및 16 또는 서열번호 17 및 18의 프라이머에 의해 합성 가능한 유전자를 의미할 수 있다. 상기 줄기세포가 발현하는 유전자는, 상기 서열참조로 정의된 Oct4, c-Myc, Klf4, PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, 및 HCAM 각각에 대해 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 것을 의미할 수 있다.

[0024] 일 구체예에 따른 다분화능 줄기세포는, 다른 세포와 비교하여 상기 Oct4, c-Myc, Klf4, PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, HCAM, 및 PODXL 유전자가 각각 독립적으로 1 배, 1.2 배, 1.5 배, 1.8 배, 2 배, 3 배, 4 배, 5 배, 6배, 7 배 또는 그 이상 발현하는 특징을 갖는다. 예를 들어, 상기 다분화능 줄기세포는 섬유아세포, 보다 바람직하게는 피부 유래 섬유아세포와 비교하여, Oct4, c-Myc, Klf4, PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, 및 HCAM을 발현하면서 Klf4, PAX6, 및 Endoglin이 3 배 이상 과발현하는 특징을 가질 수 있다. PAX6의 경우, 6 배 이상 과발현할 수 있다. 이는 mRNA 발현 수준에서 정의되는 것일 수 있다.

[0025] 일 구체예에 따른 다분화능 줄기세포는, CD14, CD34, CD45, 및 ELA-II(Elastase 2)에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, CD44, CD90, 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타낼 수 있다. 상기 면역학적 특성을 결정짓는 마커는, 사람 마커로 정의될 수 있다. 상기 면역학적 분리는 상기 사람 마커에 대한 상

이한 종(species)간에도 교차반응하는 항체를 사용하는 것이 바람직하다. 현재까지 말과동물에 특이적인 항체는 다양하게 밝혀지지 않은 상태이다. 따라서, 본 발명은 말과동물 양막으로부터 분리한 다분화능 줄기세포의 면역학적 표현형을 사람 특이적 항체를 이용하여 특성화가 가능하다.

[0026] 일 구체예에 따른 다분화능 줄기세포는, 미분화된 상태로 14 계대 이상, 바람직하게는 19 계대 이상, 보다 바람직하게는 24 계대 이상 증식할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 다분화능 줄기세포는 배양 조건에 따라, 골 세포, 지방 세포, 또는 연골세포로 분화할 수 있다. 상기 다분화능 줄기세포는 각 세포에 적합한 환경으로 배양함으로써, 의도하는 세포로 분화시킬 수 있다. 예를 들어, 2-인산 아스코르브산, 덱사메타손, 및 베타-글리세로포스페이트를 포함하는 배양 배지에 배양함으로써 골세포로 분화시킬 수 있다. 바람직하게는 저농도 글루코스 DMEM에 50 μM 2-인산 아스코르브산(ascorbic acid 2-phosphate), 100 nM 덱사메타손, 10 mM β-글리세로포스페이트(β-glycerophosphate) 및 10w/v% 소태아혈청을 포함하는 골형성 분화 배지를 사용하여 배양할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또 다른 예로서, 상기 다분화능 줄기세포를 덱사메타손, 인도메타신, 3-이소부틸-1-메틸-크산틴 및 인슐린을 포함하는 배양 배지에 배양함으로써 지방세포로 분화시킬 수 있다. 바람직하게는 1 μM 덱사메타손, 60 μM 인도메타신, 500 μM 3-이소부틸-1-메틸-크산틴(3-isobutyl-1-metylxanthine; IBMX) 및 5 μg/ml 인슐린을 포함하는 지방세포화 분화 배지에 배양할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한, 증식능 및 분화능은, 본 발명의 방법으로 제조된 줄기세포가 다분화능 줄기세포임을 입증한다.

[0028] 용어 "골세포"란 촘촘한 골조직에 가장 풍부한 별모양의 세포로 핵과 세포질의 얇은 고리를 포함한다. 골모세포가 스스로 분비한 기질에 갇혀 골세포를 형성한다. 골세포는 간극결합을 통해 영양분과 폐기물을 교환하는데 사용되는 소관계라 불리는 작은 관을 채우는 긴 세포질 신장을 통해 서로 연결된다. 한편, 골세포는 합성 능력이 감소되어 유사분열하지 않으며 중간엽에서 생성되고, 수산화인회석, 탄산칼슘, 및 인산칼슘이 세포 주위에 축적된다.

[0029] 용어 "지방세포"란 지방의 형태로 에너지를 저장하는 지방 조직을 구성하는 주된 세포이다. 이는 세포질 층으로 둘러싸인 커다란 지방 방울을 포함하는 백색지방세포와 지방 방울이 고루 흩어져있는 상당량의 세포질을 포함하는 다각형의 갈색지방세포의 두가지 형태로 존재한다. 백색지방세포는 레지스틴, 아디포넥틴 및 렙틴과 같은 아디포카인(adipokine)으로 작용하는 단백질을 분비한다.

[0030] 용어 "연골세포"란 연골에서 발견되는 유일한 세포이다. 연골세포는 주로 콜라겐과 프로테오글리칸으로 구성되는 연골기질을 생산하고 유지한다. 연골 내에서 연골세포의 구성은 연골의 형태 및 조직의 위치에 따라 달라진다.

[0031] 본 발명의 또 다른 양상은, 다음과 같은 특성을 갖는 말과동물 양막-유래 다분화능 줄기세포를 제공한다: (a) Oct4, c-Myc, Klf4, PAX6, ALCAM, Integrin β1, Endoglin, 및 HCAM 유전자를 발현함; (b) CD14, CD34, CD45, 및 ELA-Ⅱ에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내고, CD44, CD90, 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타냄; (c) 미분화 상태로 14 계대 이상 배양되는 능력을 가짐.

[0032] 본 발명의 또 다른 양상은, 본 발명의 일 구체예에 의해 제조된 다분화능 줄기세포, 또는 다분화능 줄기세포, 상기 다분화능 줄기세포로부터 분화된 세포 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는 세포 치료제를 제공한다.

[0033] 용어 "세포치료제"란, 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0034] 상기 세포치료제는 상기 다분화능 줄기세포를 $5x10^6$ 내지 $1x10^7$ 세포수로 포함할 수 있다. 이 경우 담체로서, 0.1 내지 10 w/v% FBS를 포함하는 PBS 완충액을 사용할 수 있다. 상기 PBS 완충액에 포함된 FBS는 바람직하게는, 0.1 내지 5w/v%, 보다 바람직하게는 0.1 내지 1w/v% 일 수 있다. 상기 PBS 완충액의 조성은, 콜드 스프링하버 프로토콜 (cold spring harbor protocol)에 따른 것일 수 있고, 또 다른 예로서, NaCl, KCl, Na_2HPO_4, 및 KH_2PO_4의 조합을 포함하는 것일 수 있다. NaCl은 120 내지 150 mmol/L, 바람직하게는 130 내지 140 mmol/L일 수 있고, KCl은 1.5 내지 3.5 mmol/L, 바람직하게는 2.5 내지 3.0 mmol/L일 수 있고, Na_2HPO_4는 5 내지 15 mmol/L, 바람직하게는 8 내지 12 mmol/L, KH_2PO_4는 1.0 내지 3 mmol/L, 바람직하게는 1.5 내지 2.0

mmol/L일 수 있다. 상기 PBS 완충액은 pH 6.0 내지 8.0, 바람직하게는 pH 7.0 내지 7.5인 것일 수 있다.

[0035] 일 구체예에 따른, 세포치료 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수도 있다. 상기 "약학적으로 허용되는" 이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 것을 말한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명의 조성물인 세포치료제는 질병부위로 이동을 유도할 수 있다면 어떠한 경로를 통해서든지 투여 가능하다. 경우에 따라서는 줄기세포를 병변으로 향하게 하는 수단을 구비한 비히클에 로딩하는 방안을 고려할 수도 있다. 따라서 본 발명의 조성물은 국소 (협측, 설하, 피부 및 안내 투여를 포함), 비경구 (피하, 피내, 근육내, 점적, 정맥 내, 동맥 내, 관절 내 및 뇌척수액 내를 포함) 또는 경피성 투여를 포함한 여러 경로를 통해 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구로, 가장 바람직하게는 발병부위에 직접 투여한다. 일 양태로서 줄기세포는 적합한 희석제에 약 1×10^{3} 내지 5×10^{6} 세포/ml의 농도로 현탁시켜 개체에 투여할 수 있는데, 이 희석제는 세포를 보호 및 유지하고, 목적하는 조직에 주입시 사용에 용이하도록 하는 용도로 사용된다. 상기 희석제로는 생리식염수, 인산완충용액, HBSS 등의 완충용액, 혈장, 뇌척수액, 또는 혈액성분 등이 있을 수 있다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있도록 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 주사제이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액, Hank 용액 또는 멸균된 수용액 등의 수성용제, 올리브 오일 등의 식물유, 에틸올레인산 등의 고급 지방산 에스테르 및 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 또는 글리세린 등의 비수성용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 점막 투과를 위해, 통과할 배리어에 적합한 당업계에 공지된 비침투성제가 사용될 수 있으며, 변질방지를 위한 안정화제로 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등과, 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등의 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 등의 약학적 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0036] 일 구체예에서, 상기 세포 치료제는 말과동물의 골관절염 치료용, 말과동물의 골 결실 질환 치료용, 말과동물의 지방 조직 형성용, 말과동물의 힘줄 조직 형성용 또는 말과동물의 근육 조직 형성용으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 일 양상에 따른 제조방법으로 제조된 말과동물 양막-유래 중간엽 줄기세포는 우수한 증식능 및 다분화능 특성을 가져, 근·골격계 치료용으로 적합하다. 또한, 기존의 골수, 지방, 제대혈 유래 치료용 줄기세포와 비교하여 채취가 쉽고, 증식 및 분화능이 우수하여 세포 치료제로서 사용하기에 경제적이면서 우수한 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은, 본 발명의 일 실시예에 따른 초기 배양에서의 eAM-MSCs의 X100 이미지 (A) 및 Diff-quick 염색한 결과의 X100 배율 이미지(B)이다.

도 2는, 본 발명의 일 실시예에 따른 eAM-MSCs의 배가 시간 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 3은, 본 발명의 일 실시예에 따른 eAM-MSCs의 지방 세포 분화능을 나타낸 것이다. (A)는 분화 유도 전 eAM-MSCs의 오일 레드 오(Oil Red O) 염색 결과를 나타낸 X100 배율 이미지이고, (B)는 분화 유도 배지에서 배양 후 오일 레드 오 염색 결과를 나타낸 X100 배율 이미지이고, (C)는 도 3B의 결과를 X200 배율로 나타낸 이미지이다.

도 4는, 본 발명의 일 실시예에 따른 eAM-MSCs의 골아세포 분화능을 나타낸 것이다. (A)는 분화 유도 전 eAM-MSCs의 알리자린 레드 에스(Alizarin red S) 염색 결과를 나타낸 X100 배율 이미지이고, (B)는 분화 유도 배지에서 배양 후 알리자린 레드 에스 염색 결과를 나타낸 X100 배율 이미지이고, (C)는 도 4B의 결과를 X200 배율로 나타낸 이미지이다.

도 5는, 본 발명의 일 실시예에 따른 eAM-MSCs의 연골세포 분화능을 나타낸 것이다. (A)는 분화 유도 전 eAM-MSCs의 알시안 블루(Alcian blue) 염색 결과를 나타낸 X100 배율 이미지이고, (B)는 분화 유도 배지에서 배양 후 알시안 블루 염색 결과를 나타낸 X100 배율 이미지이고, (C)는 도 5B의 결과를 X200 배율로 나타낸 이미지이다.

도 6은, 본 발명의 일 실시예에 따른 eAM-MSCs의 유전자에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 수행한 결

과이다.

도 7은, 본 발명의 일 실시예에 따른 eAM-MSCs의 유전자 발현량을 실시간 정량 분석하여 그 결과를 보여주는 그래프이다.

도 8은, 본 발명의 일 실시예에 따른 eAM-MSCs의 유세포 분석 결과를 보여준다.

도 9는, 본 발명의 일 실시예에 따른 eAM-MSCs의 주사 후 상처 회복 효과를 보여주는 X-Ray 이미지이다. (A) 및 (D)는 좌측 연골 손상 부위의 eAM-MSCs 주사 전후의 상태, (B) 및 (E)는 제3 완골 골절 및 연골 손상 부위의 eAM-MSCs 주사 전후의 상태, 및 (C) 및 (F)는 요골 골절 부위의 eAM-MSCs 주사 전후의 X-Ray 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0041] **실시예 1: 말과동물 양막-유래 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양**

[0042] 양막 샘플은 임신이 확인된 암말의 분만 시 획득하였다. 양막의 획득 과정에서 노출될 수 있는 오염 및 손상을 줄이기 위해, 모든 샘플은 멸균된 장갑과 수술 도구를 사용하여 분만 후 즉시 채집되었다. 수거된 양막 샘플은 약 4℃에서 보관되어 약 3 시간 내로 실험실로 옮겨졌다. 채집된 양막 샘플을 식염수로 세척하고, 상피세포들을 제거한 후, 제1형 콜라겐 분해효소 분해하여 중배엽성 단일세포로 분리시켰다. 분리된 단일세포를 PBS 완충액으로 원심분리하여 펠렛(pellet)을 회수하고, 회수한 펠렛을 다시 PBS 완충액으로 세척 및 원심분리하는 과정을 2회 진행하여 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포를 피브로넥틴으로 코팅된 배양접시에 분주하여 약 38.5℃에서 5% CO_2 환경 하에 인큐베이터에 넣고 배양하였다. 상등액을 제거한 후, 세포 펠렛을 10% 소태아혈청(FBS)을 포함하는 저농도 글루코스 (low-DMEM: Gibco BRL, USA)로 재현탁 하였다. eAM-MSCs는 평균 약 5일 후 배양접시에 부착된 형태로 관찰되었다.

[0043] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1A에서 알 수 있는 바와 같이, 초기 배양에서 eAM-MSCs가 배양 접시 표면에 부착되어 섬유아세포와 유사한 방추형 모양으로 관찰되었다. 이는, 다른 중간엽 줄기세포에서 나타나는 형상과 유사하다. 도 1B의 Diff-quick 염색 결과로부터 세포 형태를 보다 자세히 관찰할 수 있다.

[0045] **실시예 2: eAM-MSCs의 자가 증식능력 검증**

[0046] 실시예 1에서 제조된 eAM-MSCs의 자가복제 및 증식능력의 자가 증식 능력을 확인하기 위해, 배가 시간 분석(Doubling time analysis)을 수행하였다. 배가 시간 분석은 세포가 처음의 수에서 두 배가 되는 시간 분석을 통해 세포의 증식율을 나타내는 지수로 표현되며, 다음과 같은 식으로 표현된다.

[0048] $\text{Doubling time(hr)}=\{(T-T0)\log 2\}/(\log N-\log N0)$

[0050] T-T0 : 세포 배양 시간 (hr)

[0051] N0 : 초기 분주한 세포 수, N : 최종 배양 된 세포 수

[0053] 실시예 1의 eAM-MSCs를 6웰 배양 접시에 1.5×10^5 세포/웰의 밀도로 분주한 후, 38.5℃에서 5% CO_2 환경 하에 인큐베이터에 넣고 배양하면서, 배양시간과 전체 활성 세포 수를 관측하였다.

[0054] 그 결과는, 도 2에 나타낸 바와 같이 eAM-MSCs는 24 계대까지 관찰한 결과 지속적으로 증식하는 것으로 관찰되었다. 줄기세포는 계속적인 세포 증식을 가짐으로써 자기 재생 능력을 갖는다. 상기 배가 시간 분석 결과는 실시예 1의 eAM-MSCs가 우수한 자가 복제 능력 및 증식 능력을 가짐을 의미한다.

[0056] **실시예 3: eAM-MSCs의 분화 능력 확인**

[0057] 실시예 1에서 제조된 eAM-MSCs의 분화 능력을 확인하기 위해, 각 세포 계통에 적합한 배지에서 배양하여 분화를 유도하였다.

[0059] **3-1. 지방세포로의 분화 (Adipogenic differentiation)**

[0060] 실시예 1에서 제조된 eAM-MSCs를 StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco, USA)를 제조사의 지침에 따라 배양하고, 분화 전 및 약 7일 배양 후 eAM-MSCs 각각을 오일 레드 오(Oil Red O)로 염색하였다.

[0061] 그 결과를, 도 3에 나타내었다. 도 3A의 분화 전 eAM-MSCs에서는 지질 방울이 관찰되지 않는 반면, 도 3B의 분화 유도 후에는 지질 방울의 형성이 관찰되어, eAM-MSCs가 지방세포로 성공적으로 분화할 수 있음이 확인되었다.

[0063] **3-2. 골아세포로의 분화 (Osteogenic differentiation)**

[0064] 실시예 1에서 제조된 eAM-MSCs를 StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco, USA)를 제조사의 지침에 따라 배양하고, 분화 전 및 약 21일 배양 후 eAM-MSCs 각각을 알리자린 레드 에스(Alizarin red S)로 염색하였다.

[0065] 그 결과를, 도 4에 나타내었다. 골아세포로 분화되면, 세포 외 기질(extracellular matrix)에 칼슘(calcium) 침전이 알리자린 레드 에스 염색에 의해 관찰된다. 도 4A의 분화 전 eAM-MSCs에서는 알리자린 레드 에스 염색에 음성 반응을 보이는 반면, 도 4B의 분화 유도 후에는 알리자린 레드 에스 염색에 양성으로 관찰되어, eAM-MSCs가 골아세포로 성공적으로 분화할 수 있음이 확인되었다.

[0067] **3-3. 연골세포로의 분화 (Chondrogenic differentiation)**

[0068] 실시예 1에서 제조된 eAM-MSCs를 StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, USA)를 제조사의 지침에 따라 배양하고, 분화 전 및 약 14일 배양 후 eAM-MSCs 각각을 알시안 블루(Alcian blue)로 염색하였다.

[0069] 그 결과를, 도 5에 나타내었다. 도 5A의 분화 전 eAM-MSCs에서는 알시안 블루 염색에 음성 반응을 보이는 반면, 도 5B의 분화 유도 후에는 알시안 블루 염색에 양성으로 관찰되어, eAM-MSCs가 연골세포로 성공적으로 분화할 수 있음이 확인되었다.

[0071] **실시예 4: eAM-MSCs의 다능성 및 면역표현형 특성 확인**

[0072] 실시예 1에서 제조된 eAM-MSCs의 다능성 및 면역표현형 특성을 확인하여 중간엽 줄기세포로서의 유효성을 평가하였다.

[0074] **4-2. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 및 실시간 정량 (Real time PCR)에 의한 eAM-MSCs의 특이 유전자 발현 확인**

[0075] 실시예 1의 eAM-MSCs로부터 제조사의 지침에 따라 RNA 추출 키트(Qiagen, Cat. No. 74104)를 사용하여 Total RNA를 추출하였다. 표 1의 프라이머를 이용하여 표적 유전자를 RT-PCR하여 cDNA를 합성하여 이를 DNA 염기서열 분석하였다. 실시간 정량을 위해 동일한 cDNA를 이용하였고, 대조군으로서 말의 피부 유래 섬유아세포의 유전자 발현양을 측정하여 실시예 1의 eAM-MSCs의 유전자 발현양과 비교하였다.

표 1

[0076]

유전자명	프라이머 서열		크기	Accession No.
beta-Actin	F	GGATGCAGAAGGAGATCACAG	125	NM_001081838.1
	R	CTGGAAGGTGGACAATGAGG		
OCT4	F	TCTCCCATGCACTCAAACTG	197	XM_001490108
	R	AACTTCACCTTCCCTCCAAC		
c-Myc	F	GCCCATAAAATTGCCAAGAGG	132	XM_023655154
	R	AGCCCTGACCTTTGAATGAC		
Klf4	F	ACCTCGCCTTACACATGAAG	218	XM_023629843.1
	R	TGGTTTCCTCATTGTCTCCTG		
PAX6	F	TGTTTGCCCGAGAAAGACTAG	224	XM_023646553.1
	R	AGAGGTGAAGGATGAAACAGG		
ALCAM	F	AGAAGGCAGGAAGTTTGTCG	147	XM_001503380.6
	R	GGAAAGTTGAGGATTGTGCG		
Integrin-β	F	CTTATTGGCCTTGCATTGCT	169	XM_005606848.3
	R	TTCCCTCGTACTTCGGATTG		
HCAM	F	ATCCTCACGTCCAACACCTC	165	XM_005598012
	R	CTCGCCTTTCTTGGTGTAGC		
Endoglin	F	AAGAGCTCATCTCGAGTCTG	162	XM_003364144
	R	TGACGACCACCTCATTACTG		

[0077] 그 결과, 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, RT-PCR 결과 줄기세포의 다능성을 나타내는 Oct4, c-Myc, 및 Klf4 유전자가 eAM-MSCs에서 정상적으로 발현되고, 중간엽 줄기세포에 특이적으로 나타나는 PAX6, ALCAM, Integrin-β1, Endoglin, 및 HCAM 유전자가 발현되는 것이 확인되었다.

[0078] 또한, 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 실시간 정량 결과 mRNA 수준에서도 eAM-MSCs의 경우 다능성을 나타내는 Oct4, c-Myc, 및 Klf4 유전자와 중간엽 줄기세포의 특이적 유전자인 PAX6, ALCAM, Integrin-β1, Endoglin, 및 HCAM 유전자의 발현양이 대조군인 피부 유래 섬유아세포와 비교하여 유의적으로 높게 측정되었다.

[0080] **4-2. 유세포 분석(Flow Analysis Cytometry System)에 의한 eAM-MSCs의 면역표현형 특성 확인**

[0081] 실시예 1의 eAM-MSCs의 시료 당 약 5 x 10^5 내지 8 x 10^5개의 세포에 대해 하기의 세포 표면 항원을 감지하는 항체와 반응시켰다: CD44, CD90, CD105, CD14, CD34, CD45 및 ELA-Ⅱ. 그 후 모든 항체는 유세포 분석을 위해 플루오레세인이소티오시안산염(FITC) 또는 피코에리트린(PE)으로 4℃에서 30분간 염색하고, PBS 완충액으로 세척한 후 다시 PBS 완충액에 재현탁하였다. 상기 분석은 FACS Calibur™ BD Biosciences) 및 Quest Pro™(BD Bioscience) 소프트웨어로 수행하였다.

[0083] 그 결과, 도 8에서 알 수 있는 바와 같이, CD44, CD90, 및 CD105에는 양성의 면역학적 표현형을 나타내었고, CD14, CD34, CD45, 및 ELA-Ⅱ에는 음성의 면역학적 표현형을 나타내었다. 따라서, eAM-MSCs가 중간엽 줄기세포의 특성을 가짐을 확인하였다.

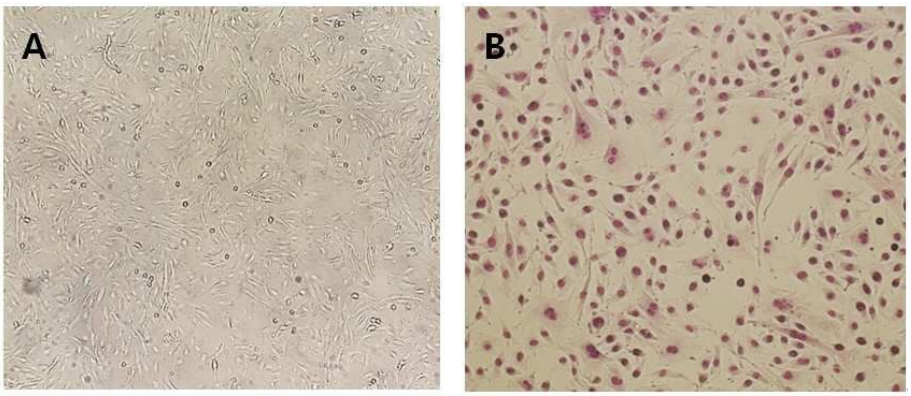
[0085] **실시예 5: eAM-MSCs의 근골격계 치료 효과 검증**

[0086] 3 내지 5 계대 사이의 eAM-MSCs를 주사 당일 배양 접시로부터 분리하고, 주사 부위에 따라 5 x 10^6 내지 1 x 10^7 세포를 준비하였다. 0.5 w/v% FBS가 포함된 PBS 완충액에 세포를 희석하여 3 ㎖ 주사기에 주입한 후 차광하여 4℃에 보관하였다. 세포가 준비된 후 3 시간 이내에 성체 말의 좌측 연골 손상 부위, 제3 완골 골절 및 연골 손상 부위, 및 요골 골절 부위에 주사를 완료하였다. 주사한 뒤 2 개월 간격으로 초음파를 이용하여 경과를 관찰하고, X-Ray 촬영하였다.

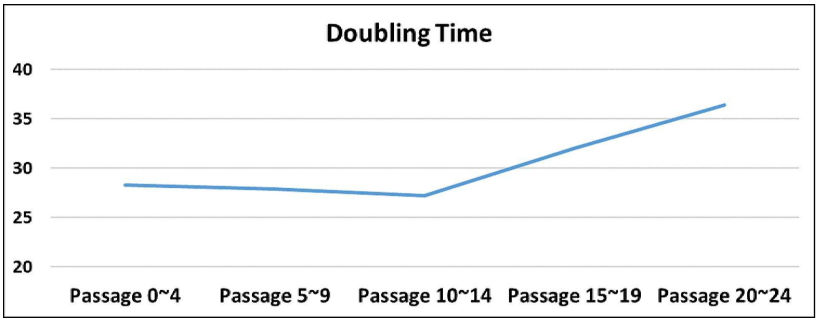
[0088] 그 결과, 도 9에서 알 수 있는 바와 같이, eAM-MSCs를 주사한 경우 현저히 빠른 속도로 성공적으로 상처가 회복되었다.

도면

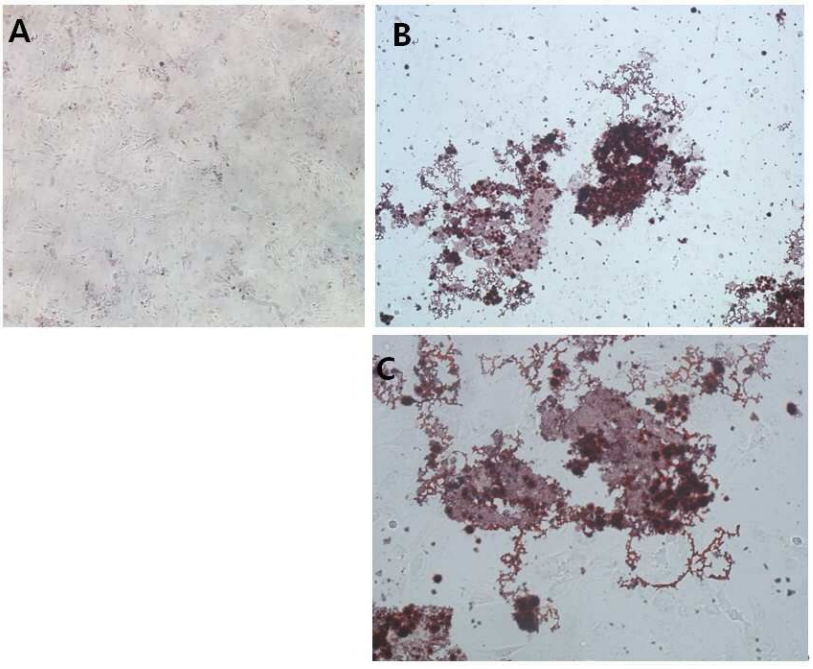
도면1



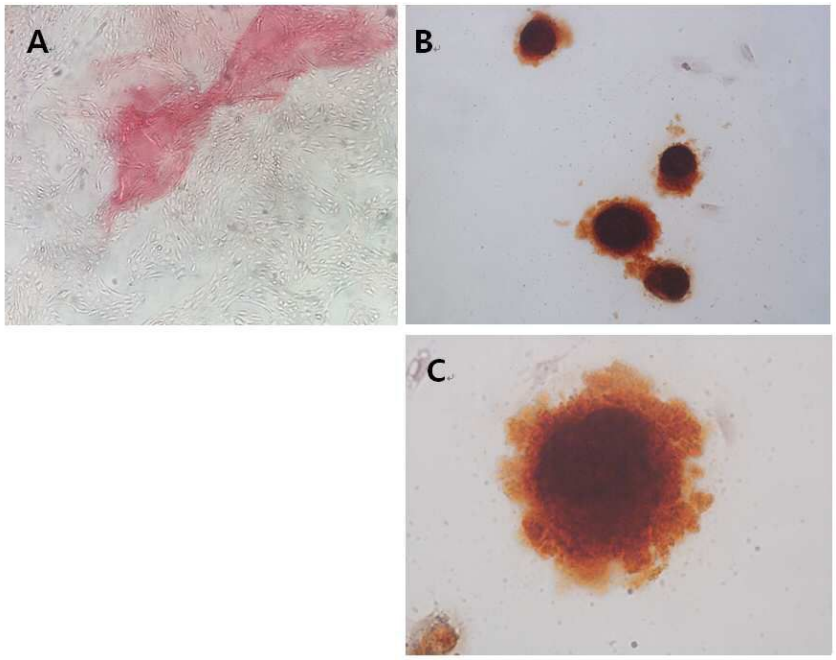
도면2



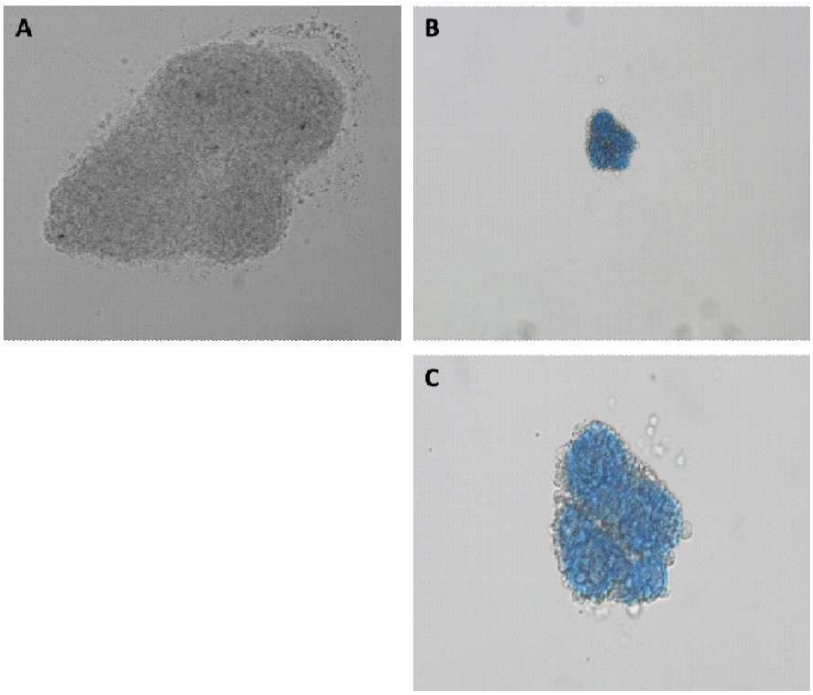
도면3



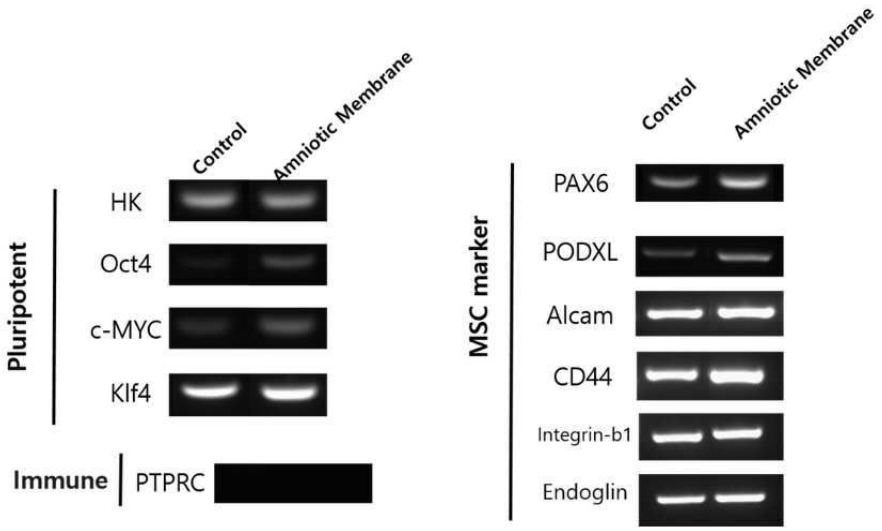
도면4



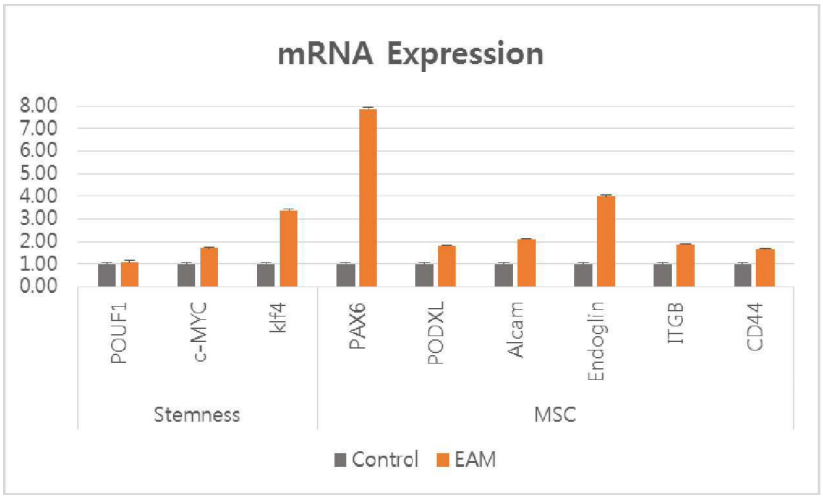
도면5



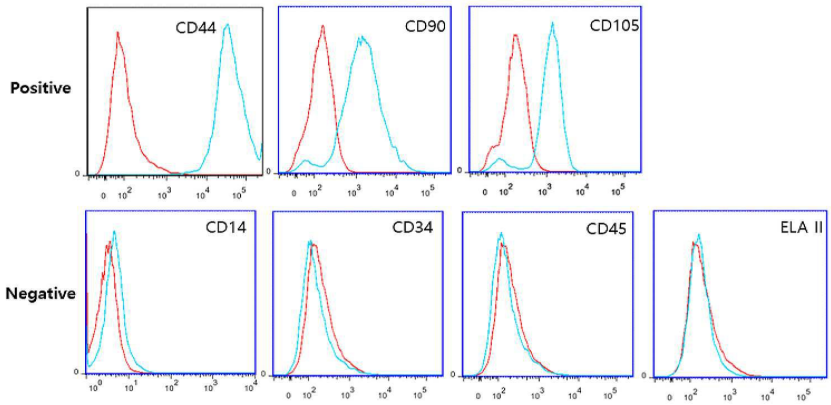
도면6


Control
Amniotic Membrane
Pluripotent
HK
Oct4
c-MYC
Klf4
Immune
PTPRC
MSC marker
PAX6
PODXL
Alcam
CD44
Integrin-b1
Endoglin

도면7


mRNA Expression
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
POUF1
c-MYC
klf4
PAX6
PODXL
Alcam
Endoglin
ITGB
CD44
Stemness
MSC
Control
EAM

도면8


Positive
CD44
CD90
CD105
Negative
CD14
CD34
CD45
ELA II

도면9



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Chungnam national university industry-cooperation foundation

<120> Mesenchymal stem cell originated from equine amniotic membrane and its use

<130> P-2019-0287

<160> 18

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 1

ggatgcagaa ggagatcaca g 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 2

ctggaaggtg gacaatgagg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 3

tctcccatgc actcaaactg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 4

aacttcacct tccctccaac 20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 5

gcccataaaa ttgccaagag g 21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 6

agccctgacc tttgaatgac 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 7

acctcgcctt acacatgaag 20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 8

tggtttcctc attgtctcct g 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 9

tgtttgcccg agaaagacta g 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 10

agaggtgaag gatgaaacag g 21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 11

agaaggcagg aagtttgtcg 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 12

ggaaagttga ggattgtgcg 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 13

cttattggcc ttgcattgct 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 14

ttccctcgta cttcggattg 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 15

atcctcacgt ccaacacctc 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 16

ctcgcctttc ttggtgtagc 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 17

aagagctcat ctcgagtctg 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Equus caballus

<400> 18

tgacgaccac ctcattactg 20