

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 3 월 19 일 (19.03.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/055083 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/071 (2010.01) *G01N 33/50* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/011676
- (22) 국제출원일: 2019 년 9 월 10 일 (10.09.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0109535 2018 년 9 월 13 일 (13.09.2018) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 장혜련 (JANG, Hye Ryoum); 06214 서울시 강남구 언주로 420, 101-403, Seoul (KR). 김윤구 (KIM, Yoon Goo); 06001 서울시 강남구 압구정로 151, 120동 1201

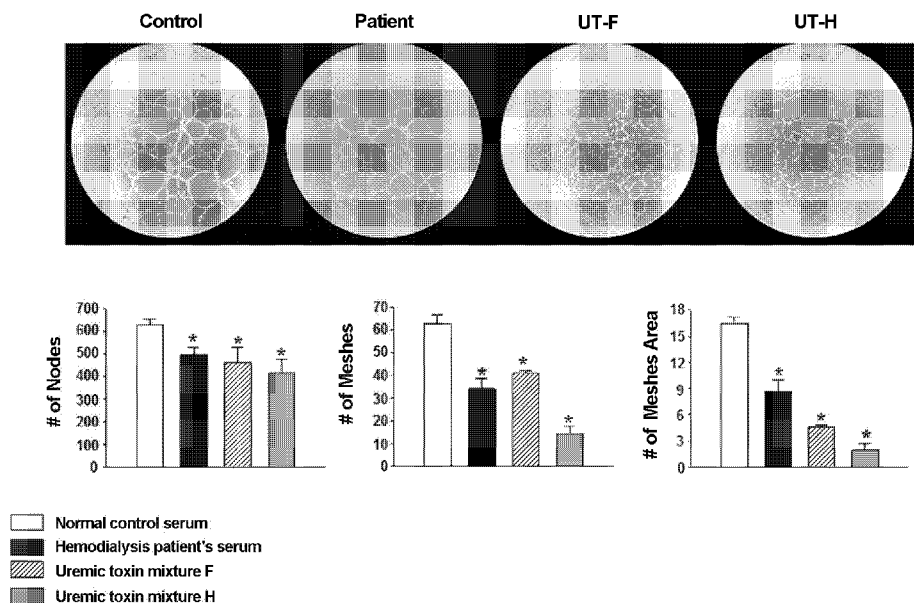
호, Seoul (KR). 허우성 (HUH, Woo Seong); 06354 서울시 강남구 광평로 31길27, 106-503, Seoul (KR). 고재욱 (KO, Jae Wook); 06295 서울시 강남구 언주로 118, 1동 1303호, Seoul (KR). 김정렬 (KIM, Jung Ryul); 05720 서울시 송파구 성내천로 6, 101동 902호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20, 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: UREMIC VASCULOPATHY MODEL USING ENDOTHELIAL CELLS DERIVED FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AND UREMIC COMPLEX, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 유도만능줄기세포 유래 내피세포와 요독 복합체를 사용한 요독성 혈관병증 모델 및 이의 이용



(57) Abstract: The present invention relates to a model of uremic vasculopathy and uses of same. More specifically, the present invention relates to: a medium composition for producing an endothelial cell model of uremic vasculopathy, using a uremic complex that comprises urea and uric acid and may further comprise indoxyl sulfate, creatinine, or advanced glycation end products (AGEs); a preparation method for an endothelial cell model of uremic vasculopathy, comprising the step of treating endothelial cells with the uremic complex; an endothelial cell model of uremic vasculopathy, prepared by the preparation method; screening and toxicity testing methods, using the model, for agents that inhibit or treat uremic vasculopathy. The uremic complex comprising urea and uric acid of the present invention, merely by using said uremic toxins among other various kinds of uremic toxins, can enable creating a uremic environment in endothelial cells conveniently in a manner similar to when using the blood serum of a patient with chronic kidney disease. In addition, the uremic complex of the present invention, when used for preparing an endothelial cell model of uremic angiopathy, can produce an endothelial cell model capable of reflecting various symptoms of uremic angiopathy. Furthermore, by using endothelial

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

cells differentiated from induced pluripotent stem cells when preparing the endothelial cell model of uremic vasculopathy, it is possible to produce an endothelial cell model of uremic vasculopathy with genetic characteristics reflected therein, which can be beneficially used in personalized drug screening for the treatment of patients with uremic vasculopathy, the development of new drugs, toxicity testing, and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 요독성 혈관병증 모델 및 이의 이용에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하며, 인독실 황산염(indoxyl sulfate), 크레아티닌(creatinine) 또는 최종 당화 독소(advanced glycation end products, AGE)를 더 포함할 수 있는 요독 복합체를 이용하는 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물, 내피세포에 요독 복합체를 처리하는 단계를 포함하는 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조방법, 상기 제조방법으로 제조된 요독성 혈관병증 내피세포 모델 및 상기 모델을 이용한 요독성 혈관병증 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법 및 독성 검사 방법에 관한 것이다. 본 발명의 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 이용하면 여러 가지 요독 중에서도 상기 요독만으로도 실제 만성 신질환 환자의 혈청을 이용하였을 때와 유사하게 내피세포에 요독 환경을 간편하게 조성할 수 있다. 또한 본 발명의 요독 복합체를 사용하여 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제조하면 여러 가지 요독성 혈관병증의 징후를 반영할 수 있는 내피세포 모델을 제조할 수 있으며, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조 시 유도만능줄기세포에서 분화시킨 내피세포를 사용함으로써 유전적 특성이 반영된 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제조할 수 있어 이를 요독성 혈관병증 환자의 치료를 위한 맞춤형 약물 스크리닝, 신약 개발 및 독성 검사 등에 유용하게 사용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 유도만능줄기세포 유래 내피세포와 요독 복합체를 사용한 요독성 혈관병증 모델 및 이의 이용

기술분야

- [1] 본 발명은 요독성 혈관병증 모델 및 이의 이용에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하며, 인독실 황산염(indoxyl sulfate), 크레아티닌(creatinine) 또는 최종 당화 독소(advanced glycation end products, AGE)를 더 포함할 수 있는 요독 복합체를 활용한 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물, 유도만능줄기세포 유래 내피세포에 요독 복합체를 처리하는 단계를 포함하는 요독성 혈관병증 모델 제조방법, 상기 제조방법으로 제조된 요독성 혈관병증 모델 및 상기 모델을 이용한 요독성 혈관병증의 진행 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법 및 독성 검사 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 요독증은 혈액 속에 축적되는 다양한 요독 물질에 의해 야기된다. 이러한 요독증은 몇몇 대사 작용 기능에서의 장애가 임상적 문제로 나타남으로써 다인성 문제를 야기하는 배설물 정체의 복합 "중독"이다. 내피세포의 기능 장애를 일으키며 몇몇 장기 및 장기 시스템에 영향을 끼친다. 예컨대 심혈관계 합병증 (고혈압, 심막염 및 심부전), 말초 신경계 장애 (다발성신경장애), 중추 신경계 장애 (기억력, 집중력 저하 및 지능 수준의 저하), 혈액학적 이상 (빈혈증, 출혈성 소인, 응고), 면역 기능 장애 (면역 억제), 소화 장애 (메스꺼움, 구토) 등이 있다. 그러나 이들 요독 물질 중에서 어느 물질이 요독으로 인한 합병증의 발생 및 진행에 본질적으로 관여하고 있는지는 아직 불분명하고, 요독의 합병증이 단독물질로만 생기는 것인지, 이들 복수의 물질에 의한 복합 작용인지도 판명되어 있지 않다.
- [3] 이러한 요독증에는 만성과 급성이 있는데, 만성 요독증은 신조직이 비가역적으로 손상되어 요독증이 일어나는 것이다. 이 중 만성 신질환은 3개월 이상 신장의 구조적 이상이나 조직학적 손상이 지속되거나 신장 기능 감소가 지속적으로 나타나는 것을 말한다. 만성 신질환은 신장의 손상 정도와 기능의 감소 정도에 따라 5단계로 나누어지며, 잘 관리하지 않으면 마지막 단계인 말기 신부전으로까지 악화되어 결국 투석이나 신장이식과 같은 신대체요법을 해야 한다. 국내에서 만성 신질환의 주된 발병 원인은 당뇨병성 신질환(41%), 고혈압(16%), 사구체신염(14%) 등이며, 그 밖의 원인으로는 다낭성 신질환과 기타 신장요로계질환이 있다. 신장 기능이 저하되면 피곤함, 가려움증, 식욕부진 등의 요독 증상이 나타난다. 말기 신부전에 이르면 호흡곤란, 식욕부진 및 구토 등의 증상이 더욱 심해지면서 투석이나 신장이식 등의 치료를 받지 않으면

정상적인 생활을 할 수 없는 상태가 된다. 이러한 만성 신질환, 특히 말기 신부전 환자들의 가장 큰 사망 요인은 심혈관계 합병증이다. 말기 신부전 환자들에서는 요독에 의해 혈관 내피세포의 기능 이상이 초래되면서 동맥경화증이 매우 급속도로 진행되는 요독성 혈관병증으로 인해 관상동맥질환이나 말초혈관 및 뇌혈관 질환이 발생률 및 중증도가 증가한다. 요독성 혈관병증은 심혈관계 합병증의 근본 원인으로 말기 신부전 환자들의 사망률을 증가시키며 의료비를 증가시키는 주요 원인이기 때문에 요독성 혈관병증을 효과적으로 치료할 수 있는 방법이 필요하다.

- [4] 만성 신질환의 진단과 치료를 위해서는 혈액검사로 요독 수치나 전해질 농도, 산-염기 상태 등을 검사한다. 만성 신질환과 이로 인한 요독성 혈관병증의 진행을 막기 위해서는 만성 신질환의 원인에 따른 치료뿐만 아니라, 고혈압, 당뇨, 고지혈증의 관리 및 치료가 필수적이다.

- [5] 이에 요독으로 인해 여러 가지 심각한 합병증이 발생하므로 이를 효과적으로 치료할 수 있는 방법이 필요하다. 만성 신질환, 특히 말기 신질환 환자들의 사망률 및 의료비를 증가시키는 주요 요인으로 손꼽히는 요독성 혈관병증을 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 약물 개발 및 약물의 효과적인 검증 방법의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 이에 본 발명자들은 요독성 혈관병증의 근간을 이루는 내피세포 기능 이상(endothelial dysfunction)을 유도만능줄기세포 유래 내피세포와 요독 복합체를 이용하여 평가하기 위해 연구하던 중, 요독의 조합과 농도를 달리하여 세포 배양액에 혼합하였을 때 실제 만성 신질환 환자의 혈청을 직접 이용하였을 때와 유사하게 내피세포에 기능 이상을 유도하는 환경을 조성할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [7] 따라서 본 발명의 목적은, 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하며, 인독실 황산염(indoxyl sulfate), 크레아티닌(creatinine) 또는 최종 당화 독소(advanced glycation end products, AGE)를 더 포함할 수 있는 요독 복합체를 포함하는 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물, 내피세포에 요독 복합체를 처리하는 단계를 포함하는 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조방법, 상기 제조방법으로 제조된 요독성 혈관병증 내피세포 모델 및 상기 모델을 이용한 요독성 혈관병증 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법 및 독성 검사 방법을 제공하는 것이다.

- [8]

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 포함하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지

조성물을 제공한다.

- [10] 또한 본 발명은 내피세포에 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 처리하는 단계를 포함하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조방법을 제공한다.
- [11] 또한 본 발명은 상기 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조방법으로 제조된 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제공한다.
- [12] 또한 본 발명은 (S1) 상기 요독성 혈관병증 내피세포 모델에 후보 물질을 처리하는 단계; (S2) 상기 후보 물질이 처리된 요독성 혈관병증 내피세포 모델에서 활성화 산소 생성 수준, 관형성 수준 및 세포사멸 수준을 평가하는 것으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 수준을 측정하는 단계; 및 (S3) 상기 (S2) 단계에서 후보 물질이 처리되지 않은 요독성 혈관병증 내피세포 모델에 비해, 활성화 산소 생성 수준이 감소된 경우, 관형성 수준이 증가된 경우, 또는 세포사멸 수준이 감소된 경우, 상기 후보 물질을 요독성 혈관병증 억제 또는 치료 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 요독성 혈관병증 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [13] 또한 본 발명은 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조를 위한, 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 포함하는 배지 조성물을 제공한다.
- [14] 또한 본 발명은 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물의 제조를 위한 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 포함하는 배지 조성물의 용도를 제공한다.
- [15]

발명의 효과

- [16] 본 발명의 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 이용하면 여러 가지 요독 중에서도 상기 요독만으로도 실제 만성 신질환 환자의 혈청을 이용하였을 때와 유사하게 내피세포에 요독 환경을 간편하게 조성할 수 있다. 또한 본 발명의 요독 복합체를 사용하여 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제조하면 여러 가지 요독성 혈관병증의 징후를 반영할 수 있는 내피세포 모델을 제조할 수 있으며, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조 시 유도만능줄기세포에서 분화시킨 내피세포를 사용함으로써 환자의 유전적 특성이 반영된 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제조할 수 있어 이를 요독성 혈관병증 환자의 치료를 위한 맞춤형 약물 스크리닝, 신약 개발 및 독성 검사 등에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 본 발명의 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제조하기 위한 유도만능줄기세포를 나타낸 도이다.
- [18] 도 2는 도 1의 유도만능줄기세포에서 분화시킨 내피세포를 나타낸 도이다.
- [19] 도 3은 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독 환경을 확인하기 위하여

내피세포의 활성화 산소 생성 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

[20] 도 4는 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독 환경의 효과를 확인하기 위하여 내피세포의 세포사멸 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

[21] 도 5는 본 발명의 요독 복합체가 내피세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 요독 복합체 처리 후 적용 4일째에 내피세포의 활성화 산소 생성 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

[22] 도 6은 본 발명의 요독 복합체가 내피세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 요독 복합체 적용 후 2일째 및 4일째에 내피세포의 활성화 산소 생성 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

[23] 도 7은 본 발명의 요독 복합체가 내피세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 요독 복합체를 4시간 동안 처리 후 내피세포의 세포사멸 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

[24] 도 8은 본 발명의 요독 복합체가 내피세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 요독 복합체를 처리 후 control 1, 2, 4, 5, UA 1 및 UT 1 군에서 내피세포의 관형성 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

[25] 도 9는 본 발명의 요독 복합체가 내피세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 요독 복합체를 처리 후 control 1, 3, UA 3, UT E, UT F 및 UT H 군에서 내피세포의 관형성 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

[26] 도 10은 본 발명의 요독 복합체를 내피세포에 처리하여 제조한 요독성 혈관병증 모델의 효용성을 확인하기 위해, 관형성 수준을 측정하여 말기 신부전 환자의 혈청(serum)과 본 발명 요독 복합체의 효과를 비교한 결과를 나타낸 도이다.

[27] 도 11은 본 발명의 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 이용하여 약물의 효과를 검증할 수 있는지 확인하기 위하여, SD-208 및 로살탄(losartan) 처리 후 내피세포의 관형성 수준을 비교한 결과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[28] 본 발명은 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 포함하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물을 제공한다.

[29]

[30] 본 발명의 "요독 복합체"란, 여러 가지 요독 중 요소 및 요산을 기본적인 구성으로 포함하는 요독 혼합물을 의미한다. 또한 본 발명의 요독 복합체는 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독 환경을 구현해 내기 위한 복합체로서, 내피세포에 요독성 혈관병증을 유발시킬 수 있는 요독 혼합물이다.

[31] 상기 요산은 0.55 내지 1, 바람직하게는 0.8 mM (13 mg/dL) 내지 1 mM (17 mg/dL) 농도로 요독 복합체에 포함될 수 있다. 요산이 0.55 mM (9 mg/dL) 미만으로 포함되면 내피세포의 활성화 산소 생성량이 증가하지 않으며 관형성 능력이 저하되지 않아 내피세포에서 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독

환경이 용이하게 구현되지 않는다. 또한 요산의 농도를 1 mM 을 초과하여 포함시키는 것은 만성 신질환 환자가 흔히 보이는 고요산혈증 (hyperuricemia)의 범위를 벗어나는 것으로 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독 환경 이상으로 내피세포의 과도한 손상을 유발할 수 있다.

[32] 상기 요소는 20 내지 55, 바람직하게는 25 mM (71 mg/dL) 내지 50 mM (143 mg/dL) 농도로 요독 복합체에 포함될 수 있다. 요소가 상기와 같은 농도 범위로 요독 복합체에 포함되면 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독 환경을 더욱 효과적으로 구현해낼 수 있다.

[33] 상기 요독 복합체는 인독실 황산염(indoxyl sulfate) 또는 최종 당화 독소(advanced glycation end products, AGE)를 더 포함할 수 있으며, 포함할 수 있는 요독 종류는 이에 제한되지는 않는다. 상기 인독실 황산염은 0.3 내지 1.5 mM, 바람직하게는 0.5 내지 1 mM, 최종 당화 독소는 0.5 내지 15 mg/L, 바람직하게는 1 내지 10 mg/L 농도로 요독 복합체에 포함될 수 있다. 인독실 황산염 또는 최종 당화 독소가 상기와 같은 농도 범위로 요독 복합체에 포함되면 기본 구성(요소 및 요산)을 포함한 본 발명의 요독 복합체로 구현한 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독 환경에서 나타나는 수준을 더욱 증대시키거나 유지시킬 수 있다.

[34] 또한 상기 요독 복합체는 크레아티닌(creatinine)을 더 포함할 수 있으며, 상기 크레아티닌은 0.05 내지 1.5, 바람직하게는 0.1 mM (1 mg/dL) 내지 1 mM (11 mg/dL) 농도로 요독 복합체에 포함될 수 있다. 크레아티닌이 상기와 같은 농도 범위로 요독 복합체에 포함되면 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독 환경을 더욱 효과적으로 구현해낼 수 있다.

[35] 상기 "요독성 혈관병증"은 만성 신질환으로 인해 농도가 상승된 혈중 요독 성분이 내피세포 기능 장애(endothelial dysfunction)를 유발함으로써 결국 동맥경화증이 촉진되는 특징을 보이는 질병이다. 만성 신질환에서는 여러 가지 요독 성분의 배설이 저하되어 체내 요독 수치가 높아지게 되며, 지속적인 신장 기능 감소에 따른 내피세포 기능 장애가 유발된다. 내피세포 기능 장애로 인한 혈관병증은 내피세포의 손상으로 유발되는 혈관질환이며 요독으로 인한, 혹은 요독으로 인한 질병에 의해 내피세포 손상을 유발하는 여러 가지 요독의 자극으로 인해 내피세포가 손상되어 나타난다.

[36] 본 발명의 "내피세포"는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs)에서 분화시킨 내피세포일 수 있으며 이에 제한되지는 않는다. 이와 같이 유도만능줄기세포에서 분화시킨 내피세포를 사용하는 경우, 유전적 특성이 반영된 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제조할 수 있다. 상기 유도만능줄기세포는 정상인 유래 또는 만성 신질환 환자 유래 유도만능줄기세포를 모두 포함할 수 있다. 만성 신질환 환자 특이 유도만능줄기세포 유래 내피세포는 요독성 혈관병증 중증도별 특성이 반영된 내피세포이므로, 이에 따라 환자의 혈관 합병증 정도에 따라 성격이 다른

내피세포를 이용할 수 있어 유전적 및 기능적으로 구별되는 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제조할 수 있다. 또한 이와 같은 모델은, 각 환자의 유전적, 기능적 특성에 적합한 약물을 스크리닝하고 각 환자에 대한 약물의 독성 유무를 검사하는데 유용하게 이용될 수 있다.

- [37] 상기 "배지(culture media)"는 생체 외 실험실적 조건 (in vitro)에서 세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 상기 배지는 세포가 최소 증식 및/또는 생존하는데 필요한 필수 및 비필수 아미노산, 비타민, 에너지원, 지질 및 미량원소 등을 포함할 수 있다.
- [38] 본 발명의 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 포함하는 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물을 이용하면, 여러 가지 요독 중에서도 상기 요독만으로도 실제 만성 신질환 환자의 혈청을 이용하였을 때와 유사한 요독 환경을 갖는 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 간편하고 효과적으로 얻을 수 있다.
- [39] 또한 본 발명은 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조를 위한, 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 포함하는 배지 조성물을 제공한다.
- [40] 또한 본 발명은 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물의 제조를 위한 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 포함하는 배지 조성물의 용도를 제공한다.
- [41] 본 발명은 또한, 내피세포에 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 처리하는 단계를 포함하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조방법을 제공한다. 상기 내피세포는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs)에서 분화시킨 내피세포, 예컨대 만성 신질환 환자 특이 유도만능줄기세포 유래 내피세포일 수 있으며 이에 제한되지는 않는다. 상기 제조방법은 바람직하게는 in vitro 에서 수행될 수 있다.
- [42] 내피세포에 본 발명의 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 처리하는 단계를 거쳐 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제조하면, 상기 요독만으로도 실제 만성 신질환 환자의 혈청을 이용하였을 때와 유사한 환경을 갖는 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 간편하고 효과적으로 제조할 수 있다. 본 발명 제조방법의 각 구성에 대한 설명은 상기 배지 조성물에 관한 기재와의 중복성을 피하고자 생략한다.
- [43] 본 발명은 또한, 상기 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조방법으로 제조된 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제공한다. 상기 내피세포는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs)에서 분화시킨 내피세포, 예컨대 만성 신질환 환자 특이 유도만능줄기세포 유래 내피세포일 수 있으며 이에 제한되지는 않는다.
- [44] 본 발명의 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조방법으로 제조된 요독성 혈관병증 내피세포 모델은 실제 만성 신질환 환자의 혈청을 이용하였을 때와

유사한 요독 환경, 예컨대 유사한 활성화 산소 생성 수준, 관형성 수준 및 세포사멸 수준을 가질 수 있으며 이에 제한되지는 않는다. 따라서 본 발명의 내피세포 모델은 본 발명의 요독 복합체를 사용하여 간편하게 요독성 혈관병증의 징후를 반영시킨 모델로서 이를 요독성 혈관병증 환자의 치료를 위한 약물 스크리닝 및 독성 검사에 효과적으로 사용할 수 있다.

[45]

[46] 본 발명은 또한, (S1) 상기 요독성 혈관병증 내피세포 모델에 후보 물질을 처리하는 단계; (S2) 상기 후보 물질이 처리된 요독성 혈관병증 내피세포 모델에서 활성화 산소 생성 수준, 관형성 수준 및 세포사멸 수준을 평가하는 것으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 수준을 측정하는 단계; 및 (S3) 상기 (S2) 단계에서 후보 물질이 처리되지 않은 요독성 혈관병증 내피세포 모델에 비해, 활성화 산소 생성 수준이 감소된 경우, 관형성 수준이 증가된 경우, 또는 세포사멸 수준이 감소된 경우, 상기 후보 물질을 요독성 혈관병증 억제 또는 치료 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 요독성 혈관병증 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[47] 상기 (S1) 단계는 본 발명의 요독 복합체로 요독 환경이 조성된 요독성 혈관병증 내피세포 모델에 후보 물질을 처리하는 단계이다. 상기 (S1) 단계에서 "후보 물질"은, 만성 신질환으로 인한 내피세포 기능 장애로 유발되는 요독성 혈관병증을 치료, 예방 또는 개선할 수 있을 것으로 기대되는 물질로서, 화합물, 올리고뉴클레오타이드, 펩티드, 유전자, 단백질, 식품, 제형, 화합물, 조성물, 의약, 영양보조제, 건강관리제품 또는 음료 등의 물질을 제한 없이 포함한다. 또한 상기 "처리"는 후보 물질을 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물에 포함시키는 방법일 수 있으며 이에 제한되지는 않는다.

[48] 상기 (S2) 단계는 후보 물질이 처리된 요독성 혈관병증 내피세포 모델의 요독 환경 개선 여부를 확인하기 위해 여러 가지 수준 변화를 측정하는 단계로서, 활성화 산소 생성 수준, 관형성 수준 및 세포사멸 수준으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 수준을 측정할 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다. 상기 "측정"은 당 분야에 공지된 통상의 방법들로 수행될 수 있다.

[49] 상기 (S3) 단계는 (S2) 단계의 측정 결과, 요독성 혈관병증 내피세포 모델의 요독 환경을 개선함으로써 선별된 후보 물질을 요독성 혈관병증 억제 또는 치료 물질로 판정하는 단계이다. (S3) 단계에서는 상기 (S2) 단계에서 후보 물질이 처리되지 않은 요독성 혈관병증 내피세포 모델에 비해, 활성화 산소 생성 수준이 감소된 경우, 관형성 수준이 증가된 경우, 또는 세포사멸 수준이 감소된 경우, 상기 후보 물질을 요독성 혈관병증 억제 또는 치료 물질로 판정할 수 있다.

[50] 상기 내피세포는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs)에서 분화시킨 내피세포일 수 있고, 정상 유도만능줄기세포 또는 만성 신질환 환자 특이 유도만능줄기세포 유래 내피세포일 수 있으며 이에 제한되지는 않는다. 유도만능줄기세포에서 분화시킨 내피세포를 사용함으로써 유전적 특성이

반영된 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 이용하여 요독성 혈관병증 억제 또는 치료제를 스크리닝할 수 있다. 특히 상기 환자 특이 유도만능줄기세포에서 분화시킨 내피세포를 이용한 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 이용하게 되면, 환자의 혈관 합병증의 특성 및 정도에 따라 효과를 나타내는 요독성 혈관병증 억제 또는 치료 물질을 스크리닝할 수 있다.

[51]

[52] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[53]

발명의 실시를 위한 형태

[54] 실시예 1. 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조

[55] 실시예 1-1. 내피세포 분화

[56] 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조를 위하여 우선, 정상 대조군의 유도만능줄기세포를 기존 문헌 (Gimbrone et al. Circ Res. 2016;118:620-636 / Chen et al. Nat Rev Cardiol. 2016;13:333-349 / Paik et al. Circ Res. 2018 Jul 9.Epub ahead of print)에서 입증된 방법으로 내피세포를 분화시켰다.

[57] 도 1에 정상 대조군 유도만능줄기세포를, 도 2에 정상 대조군 유도만능줄기세포에서 분화시킨 내피세포를 나타내었다.

[58]

[59] 실시예 1-2. 요독 복합체 종류 및 조성 결정

[60] 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제조하기 위해서는 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독 환경(uremic milieu)을 구현해야 한다. 이를 실험적으로 구현하기 위해 임상적 의의를 고려하여 다음과 같이 여러 가지 조합의 요독 복합체(uremic toxin mixture)를, 분화시킨 내피세포에 적용시켜 각 조합의 요독 복합체가 내피세포에 끼치는 영향을 알아보았다. 요독성 혈관병증 모델 내피세포 제조를 위해 실험에 사용한 요독 및 요독 복합체 목록과 조성을 표 1 및 표 2에 나타내었다. 표 2의 모든 대조군 및 실험군으로 시행한 실험에는 배지(media)만 사용한 control 1군을 공통으로 포함하였다.

[61]

[표1]

요독	Conventional unit	SI unit
요소질소(Urea nitrogen)	14.01 mg/dL	5 mmol/L
	70.01 mg/dL	25 mmol/L
	140.06 mg/dL	50 mmol/L
	210.08 mg/dL	75 mmol/L
크레아티닌(Creatinine, Cr)	1.13 mg/dL	0.1 mmol/L
	11.3 mg/dL	1 mmol/L
요산(Uric acid, UA)	4.2025 mg/dL	0.25 mmol/L
	8.405 mg/dL	0.5 mmol/L
	13.45 mg/dL	0.8 mmol/L
	16.81 mg/dL	1 mmol/L
인독실 황산염(Indoxyl sulfate, IS)		0.5 mmol/L
최종 당화 독소(Advanced glycation end products, AGE)	1 mg/L, 10 mg/L	

[62]

[표2]

No	명 칭	요소(mM))	크레아티 닌(mM)	요산(mM))	인독실 황산염(mM)	최종 당화 독소(mg/ L)	NaOH(μ L /mL)
1	Control 1(media only)						
2	Control 2(normal physiologic levels)	5	0.1				
3	Control 3	5	0.1	0.25			11
4	Control 4	5	0.1	0.25			
5	Control 5						16
6	UA 1			0.5			
7	UA 2			1			
8	UA 3	5	0.1	0.8			
9	Urea	50					
10	Cr		1				
11	IS			1			
12	Uremic toxin mixture 1(UT 1)	50	1				
13	Uremic toxin mixture 2(UT 2)	50	1	1			
14	Uremic toxin mixture 3(UT 3)	50	1	1	0.5		
15	Uremic toxin mixture 4(UT 4)	50	1	1	0.5	1	
16	Uremic toxin mixture 5(UT	25	1	1	0.5	10	

	5)						
17	Uremic toxin mixture 6(UT 6)	50	1	1	0.5	10	
18	Uremic toxin mixture A(UT A)	25	1	0.5			
19	Uremic toxin mixture B(UT B)	25	1	1			
20	Uremic toxin mixture C(UT C)	50	1	0.5			
21	Uremic toxin mixture D(UT D)	50	1	1			
22	Uremic toxin mixture E(UT E)	25	1	0.8			
23	Uremic toxin mixture F(UT F)	25	1	0.8	1		
24	Uremic toxin mixture G(UT G)	50	1	0.8			
25	Uremic toxin mixture H(UT H)	50	1	0.8	1		

[63]

[64]

[65]

비교예 1. 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독 환경 수준 측정

본 발명의 요독 복합체를 처리한 요독성 혈관병증 내피세포 모델의 효용성을 확인하기 위해 앞서, 본 발명 내피세포 모델에 실제 혈액투석 (hemodialysis)을 시행 받는 말기 신부전 환자의 혈청(serum)을 처리하여 만성 신질환 환자에서 발생하는 체내 요독 환경 수준 측정 결과를 확인함으로써 이후 본 발명 요독 복합체와의 효과를 비교하고자 하였다. 상기 말기 신부전 환자의 혈청은

삼성서울병원에서 혈액투석을 시행 받고 있는 환자의 혈청을 이용하였다
(삼성서울병원 IRB file number 2016-11-025).

[66]

[67] 비교예 1-1. 내피세포의 활성화 산소(reactive oxygen species, ROS) 생성량 측정

[68] 본 발명 내피세포 모델에 환자의 혈청을 처리한 후 ROS-Glo™ H₂O₂ assay kit (Promega, catalog number G8820)를 이용하여 설명서에 따라 활성화 산소 생성 수준을 측정하였으며 이에 대한 결과를 도 3에 나타내었다.

[69] 도 3에 나타낸 바와 같이, 정상 혈청에 비해 혈액투석 환자의 혈청이 내피세포의 활성화 산소 생성을 유의하게 증가시키는 것을 확인하였다.

[70]

[71] 비교예 1-2. 내피세포의 세포사멸(apoptosis) 수준 측정

[72] 본 발명 내피세포 모델에 환자의 혈청을 처리한 후 Caspase-Glo 3/7 assay systems kit (Promega, catalog number G8091)를 이용하여 설명서에 따라 내피세포의 세포사멸(apoptosis) 수준을 측정하였으며 이에 대한 결과를 도 4에 나타내었다.

[73] 도 4에 나타낸 바와 같이, 환자의 혈청을 24시간 동안 처리한 내피세포에서 세포사멸이 유의하게 촉진되는 것을 확인하였다.

[74]

[75] 따라서 본 실시예의 결과를 통해 내피세포 모델에 실제 만성 신질환 환자의 혈청을 처리하였을 때 활성화 산소 생성 수준 및 세포사멸 수준이 증가하는 것을 확인하였다.

[76]

[77] **실시예 2. 요독 복합체가 내피세포에 미치는 영향 확인 및 최적 요독 복합체 조성 확인**

[78] 실시예 2-1. 활성화 산소 생성량 측정

[79] 표 2에 나타낸 요독 단독 물질 또는 요독 복합체를 적용시킨 내피세포 모델에서도 비교예 1에서 실제 환자의 혈청을 적용했을 때와 같이 체내 요독 환경이 조성되는지 확인하기 위해, 활성화 산소의 생성량을 측정하여 이를 도 5 및 6에 나타내었다. 요독 복합체 적용 4일째에 대한 결과를 도 5에, 적용 2일째 및 4일째에 대한 결과를 도 6에 나타내었다.

[80] 도 5에 나타낸 바와 같이, 일반 배지만이 첨가된 control 1 및 요소와 크레아티닌이 일반적인 생리 농도로 첨가된 control 2 과 비교하여, 요소와 크레아티닌을 고농도로 처리하여도 변화가 나타나지 않았으나(UT 1) 요산을 혼합하여 첨가할 경우(UT 2 내지 UT 6) 활성화 산소 생성량이 급증하는 것을 확인하였다. 또한 UT2 내지 UT6 에서의 결과를 보면, 인독실 황산염 또는 최종 당화 독소를 더 추가한 요독 복합체를 처리하여도(UT 3 내지 UT 6) 이들을 추가하지 않은 실험군(UT 2)과 유사하게 활성화 산소 생성량이 증가하는 것을 확인하였다.

- [81] 따라서 유의한 활성화 산소 생성 증가에 있어서 요독 복합체에 요소, 크레아티닌 및 요산을 기본적인 구성으로 필요한 것을 확인하였다. 이에 추가적으로 인독실 황산염 또는 최종 당화 독소를 추가하면 활성화 산소 생성량을 더욱 증가시키거나 유사한 생성량 수준을 유지시킬 수 있음을 확인하였다.
- [82] 또한 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 요독 복합체 기본 구성인 요소, 크레아티닌 및 요산을 포함한 control 3 과 비교하였을 때 요산의 농도를 0.8 mM 이상(UA 3) 포함한 실험군에서 유의한 차이가 나타나는 것을 확인하였다. 또한 UT F 및 UT H 실험군의 결과를 보면, 기본적인 구성인 요소, 크레아티닌 및 요산에 인독실 황산염을 더 첨가하여도 활성화 산소 생성량이 증가하는 것을 확인하였다.
- [83]
- [84] 실시에 2-2. 세포사멸(apoptosis) 촉진 확인
- [85] 또한 마찬가지로 표 2에 나타낸 요독 단독 물질 또는 요독 복합체를 적용시킨 내피세포 모델에서도 비교예 1에서 실제 환자의 혈청을 적용했을 때와 같이 체내 요독 환경이 조성되는지 확인하기 위해, 세포사멸 수준을 측정하여 도 7에 나타내었다.
- [86] 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 요독 복합체(요소, 크레아티닌, 요산, 인독실 황산염)(UT H)를 4시간 동안 처리한 내피세포에서 세포사멸이 유의하게 촉진되는 것을 확인하였다. 한편 상기 요독 복합체 구성을 단독으로 처리한 군에서의 결과를 보면 요소(50 mM), 크레아티닌(1mM) 및 인독실 황산염(1mM)의 경우 단독으로 처리하여도 세포사멸이 유의하게 촉진되지 않는 것을 확인하였으며 요산의 경우에만 1mM로 첨가하였을 때 내피세포에서 세포사멸을 유의하게 촉진시킴을 확인하였다.
- [87]
- [88] 실시에 2-3. 관형성(tube formation) 능력 측정
- [89] 또한 표 2에 나타낸 요독 단독 물질 또는 요독 복합체를 적용시킨 내피세포 모델에서도 실제 환자의 혈청을 적용했을 때와 같이 체내 요독 환경이 조성되는지 확인하기 위해, 관형성 수준을 다음과 같이 측정하여 비교하였다.
- [90] 혈관 구조를 형성할 수 있는 내피세포의 기능적 이상 여부를 평가하기 위하여 관형성 능력을 측정하였는데, Matrigel (Corning, catalog number CB-40234)을 도포한 24 또는 12-well plate에 내피세포를 분주한 후 16-24 시간 배양한 후에 관형성 정도를 비교 분석하였다. 이에 대한 결과를 도 8 내지 도 10에 나타내었다.
- [91] 도 8에 나타낸 바와 같이, 요산을 포함하지 않거나 요산을 0.8 mM 이상 포함하지 않은 실험군(control 1, 2, 4, 5, UA 1, UT 1)에서는 모두 내피세포의 관형성 능력이 잘 유지되는 것을 확인하였다.
- [92] 또한 도 9에 나타낸 바와 같이, 요산을 0.8 mM 이상 포함한 실험군(UA 3, UT

E)에서 관형성 수준이 억제되는 것을 확인하였으며, 인독실 황산염이 더 포함된 실험군(UT F, UT H)에서는 관형성이 강력하게 억제되는 것을 확인하였다.

[93] 따라서 상기 세 가지 수준 측정 결과를 살펴봤을 때, 실제 환자의 혈청을 적용했을 때와 같이 체내 요독 환경이 조성되는지 확인하기 위한 여러 가지 측정 수준들에서 공통적으로 유의한 결과를 나타내는 요독 복합체는 요소와 요산을 기본 구성으로 포함한 요독 복합체인 것을 확인하였다.

[94]

[95] 실시예 3. 요독성 혈관병증 내피세포 모델 효용성 확인

[96] 본 발명의 요독 복합체를 내피세포에 처리하여 제조한 요독성 혈관병증 모델의 효용성을 확인하기 위해, 관형성 수준을 측정하여 혈액투석 (hemodialysis)을 시행 받는 말기 신부전의 환자의 혈청(serum)과 본 발명 요독 복합체의 효과를 비교하였다. 이에 대한 결과를 도 10에 나타내었다.

[97] 도 10에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 요독 복합체(UT F, UT H)는 실제 환자 혈청의 효과와 유사하게 내피세포의 관형성 능력을 유의하게 억제시킴을 확인하였다.

[98] 따라서 본 발명의 요독 복합체가 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 제조하는데 효과적임을 확인하였다.

[99]

[100] 실시예 4. 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 이용한 약물 효과 검증 실험

[101] 본 발명의 요독 복합체를 처리하여 제조된 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 이용하여 약물의 효과를 검증할 수 있는지 확인하기 위하여, 정상 대조군 유도만능줄기세포 유래 내피세포에 본 발명의 요독 복합체 또는 말기 신질환 환자 혈청을 적용하였다. 그 후 SD-208(TGF- β 저해제)와 로살탄(losartan, 안지오텐신 수용체 차단제)를 처리하여 각각의 효과를 알아보기 위해 관형성 정도를 측정하여 도 11에 나타내었다. 본 발명의 요독 복합체(UT-F, UT-H, uric acid 3(UA 3)), 만성 신질환 환자의 혈청(patient 2, patient 4), 정상 대조군 혈청(control 1) 및 세포 배양액 단독(media only) 군에서 내피세포의 관형성 능력을 측정하여 비교한 결과는 다음과 같다.

[102] 도 11에 나타낸 바와 같이, 내피세포의 관형성 능력은 정상 대조군 혈청과 세포 배양액 단독 군에서 잘 유지되었고, 본 발명의 요독 복합체 및 만성 신질환 환자의 혈청 군에서는 관형성이 모두 억제됨을 확인하였다. 또한 상기 요독 복합체 및 말기 신질환 환자의 혈청 군에 SD-208 및 로살탄을 처리하였을 때, 모두 내피세포 관형성 억제가 완화되는 것을 확인하였다.

[103] 따라서 본 발명에서 선별한 요독으로 구성된 요독 복합체를 처리하면 요독성 혈관병증의 징후를 반영할 수 있는 내피세포 모델을 제조할 수 있으며, 실제 환자의 혈청을 사용한 것과 유사한 결과를 유도함으로써 본 발명의 요독 복합체를 처리하여 제조되는 요독성 혈관병증 내피세포 모델을 요독성 혈관병증 환자의 치료를 위한 약물 스크리닝에 사용 가능함을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 포함하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 요산은 0.55 내지 1 mM 농도로 요독 복합체에 포함되는 것을 특징으로 하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 요소는 20 내지 55 mM 농도로 요독 복합체에 포함되는 것을 특징으로 하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 요독 복합체는 인독실 황산염(indoxyl sulfate) 또는 최종 당화 독소(advanced glycation end products, AGE)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 인독실 황산염은 0.3 내지 1.5 mM, 최종 당화 독소는 0.5 내지 15 mg/L 농도로 요독 복합체에 포함되는 것을 특징으로 하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 요독 복합체는 크레아티닌(creatinine)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 요독성 혈관병증은 만성 신질환으로 인한 내피세포 기능 장애로 유발되는 것을 특징으로 하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조용 배지 조성물.
- [청구항 8] 내피세포에 요소(urea) 및 요산(uric acid)을 포함하는 요독 복합체를 처리하는 단계;를 포함하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 내피세포는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs) 유래 내피세포인 것을 특징으로 하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조방법.
- [청구항 10] 제8항의 요독성 혈관병증 내피세포 모델 제조방법으로 제조된, 요독성 혈관병증 내피세포 모델.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 내피세포는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs) 유래 내피세포인 것을 특징으로 하는, 요독성 혈관병증 내피세포 모델.
- [청구항 12] (S1) 제8항의 요독성 혈관병증 내피세포 모델에 후보 물질을 처리하는 단계;

(S2) 상기 후보 물질이 처리된 요독성 혈관병증 내피세포 모델에서 활성화 산소 생성 수준, 관형성 수준 및 세포사멸 수준을 평가하는 것으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 수준을 측정하는 단계; 및

(S3) 상기 (S2) 단계에서 후보 물질이 처리되지 않은 요독성 혈관병증 내피세포 모델에 비해, 활성화 산소 생성 수준이 감소된 경우, 관형성 수준이 증가된 경우, 또는 세포사멸 수준이 감소된 경우, 상기 후보 물질을 요독성 혈관병증 억제 또는 치료 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 요독성 혈관병증 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법.

[청구항 13]

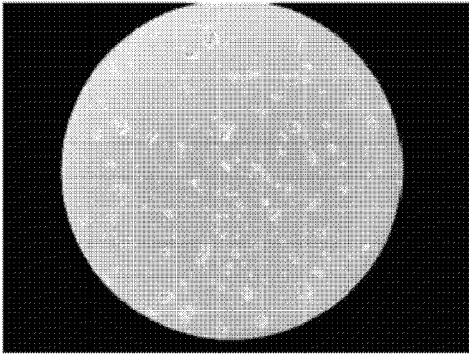
제12항에 있어서,

상기 내피세포는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs) 유래 내피세포인 것을 특징으로 하는, 요독성 혈관병증 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법.

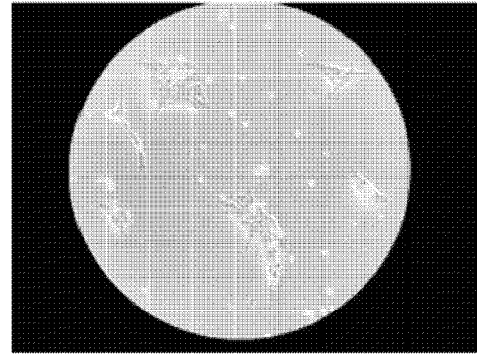
[도1]

Day 1

(x 40)

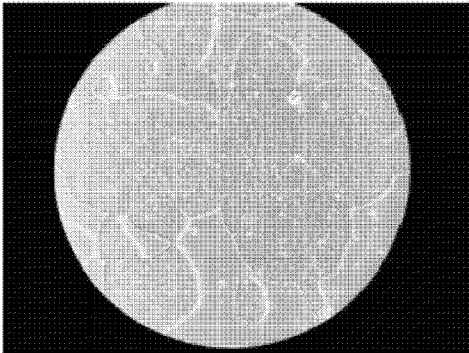


(x 200)

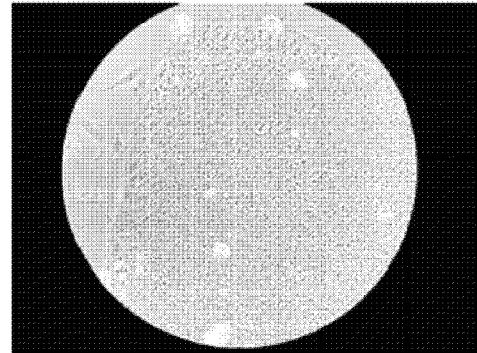


Day 4

(x 40)

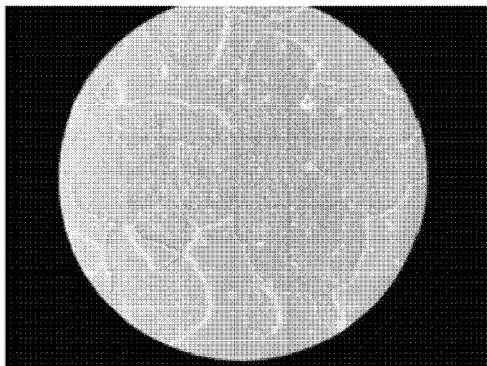


(x 200)

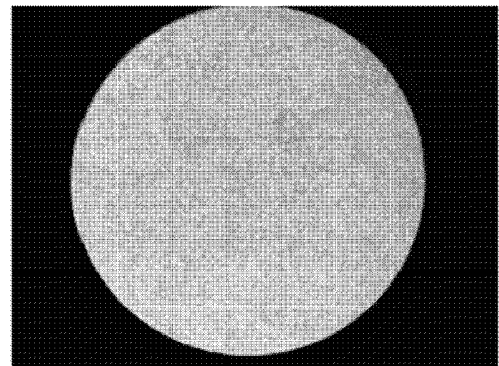


[도2]

(x 40) iPSCs confluency 70 % on D0

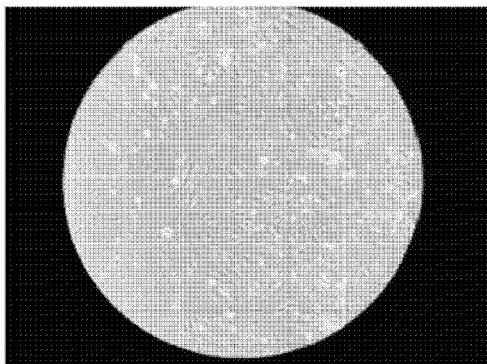


D2

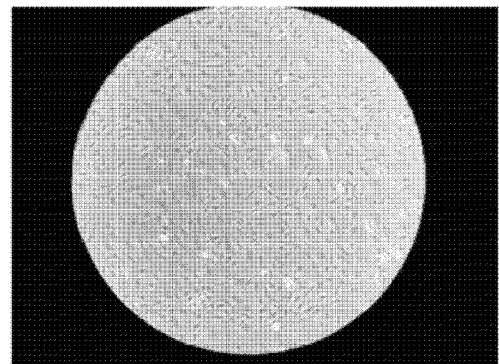


(x 100)

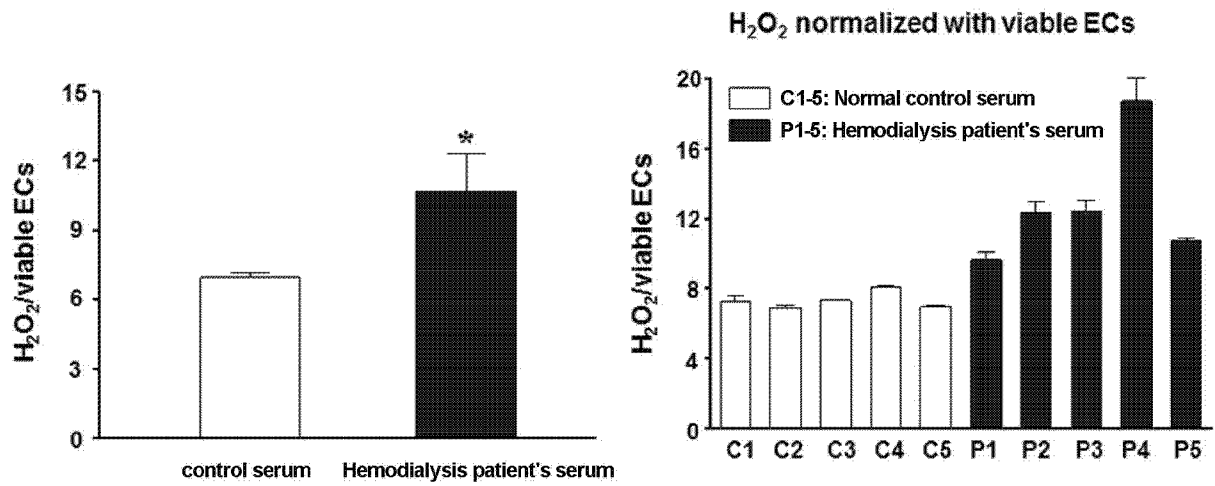
Passage0 D4



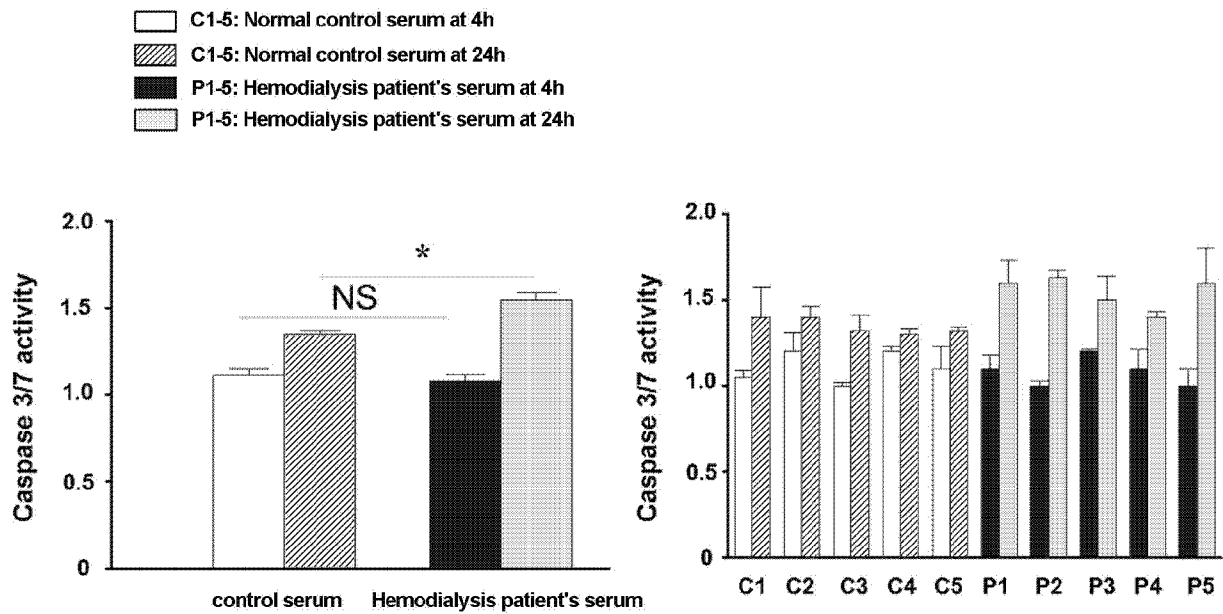
Passage1 D4



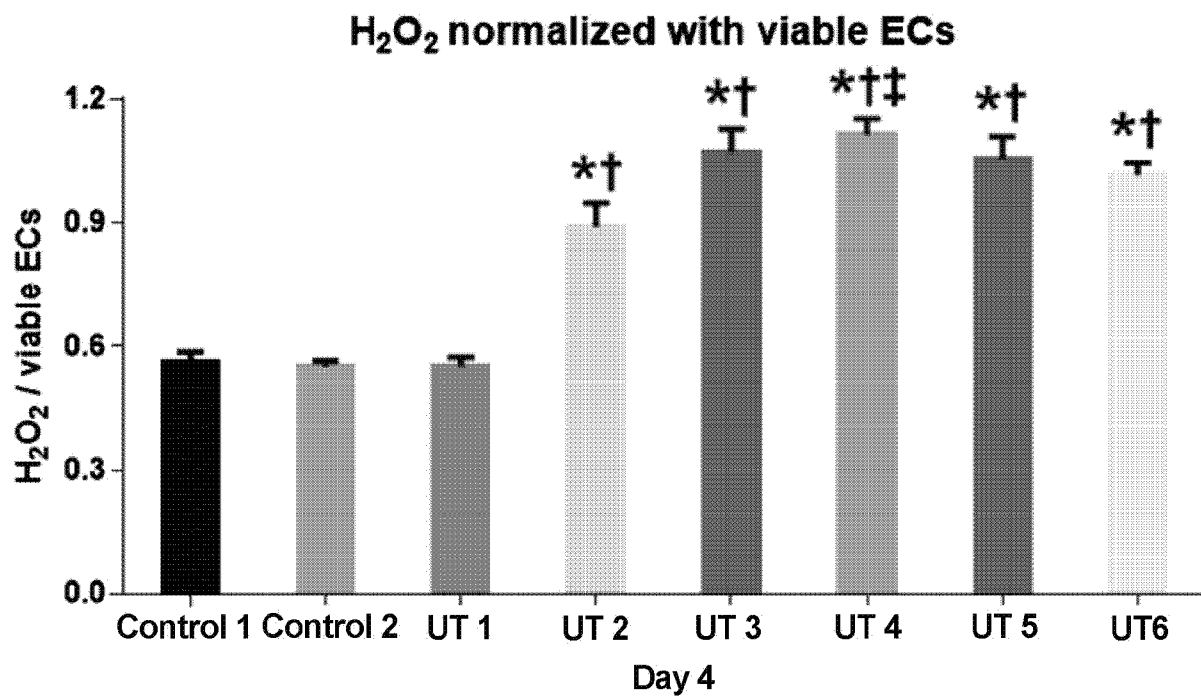
[도3]



[도4]



[도5]

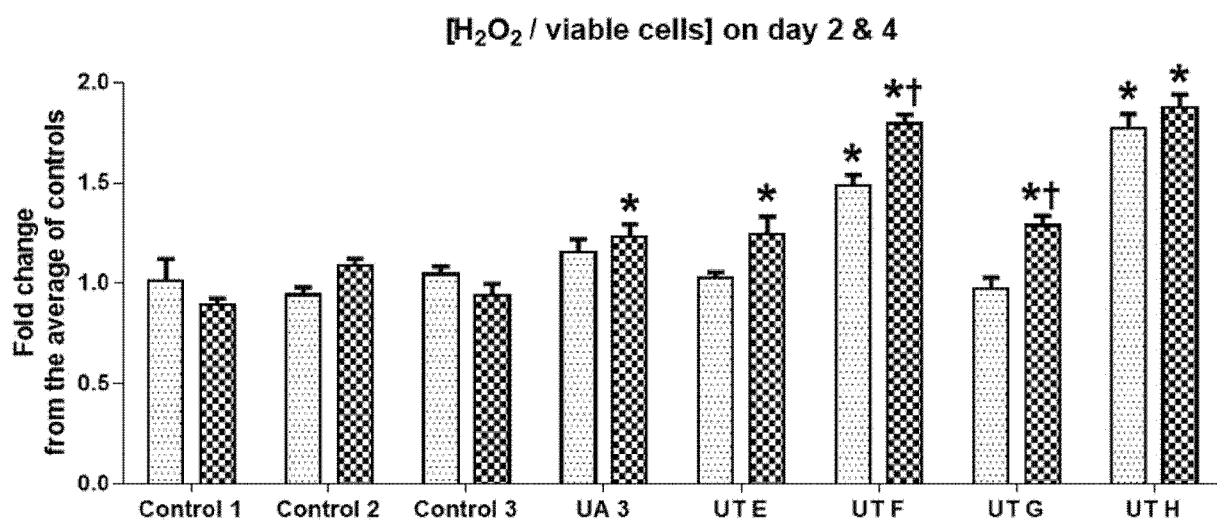


*: P<0.05 compared with control 1 or control 2

†: P<0.05 compared with UT 1

‡: P<0.05 compared with UT 2

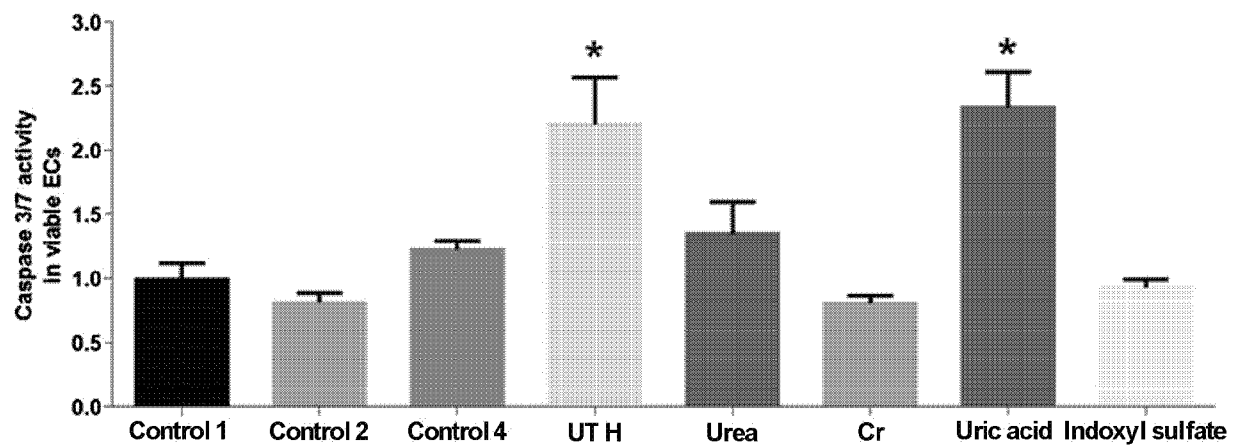
[도6]



*: P < 0.05 compared with control 1 or control 2 or control 3 at the same time point

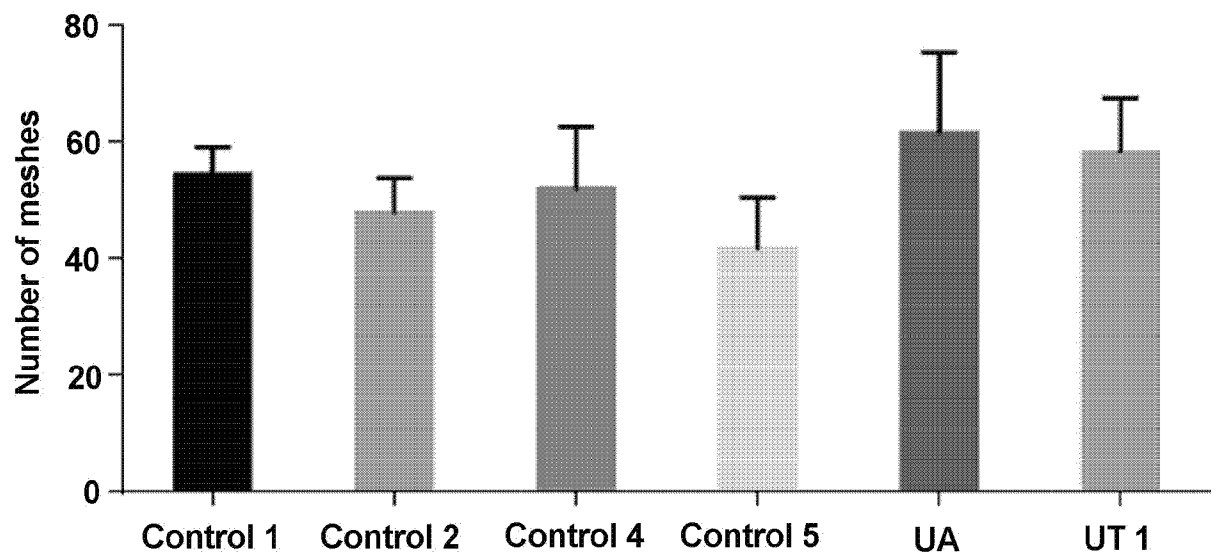
†: P < 0.05 compared to day 2 within the same group

[도7]



*: P<0.05 compared with control 1 or control 2

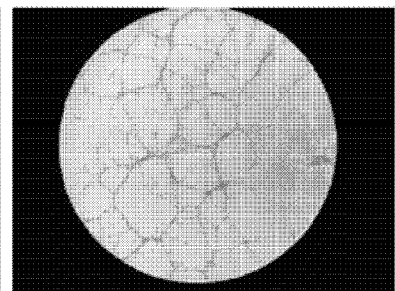
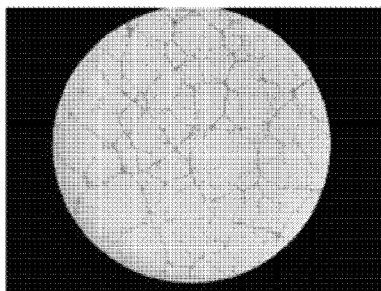
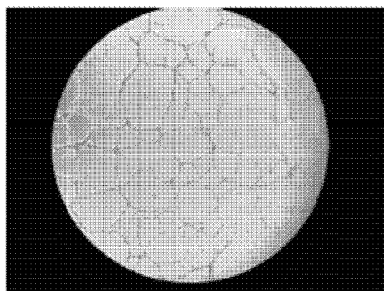
[도8]



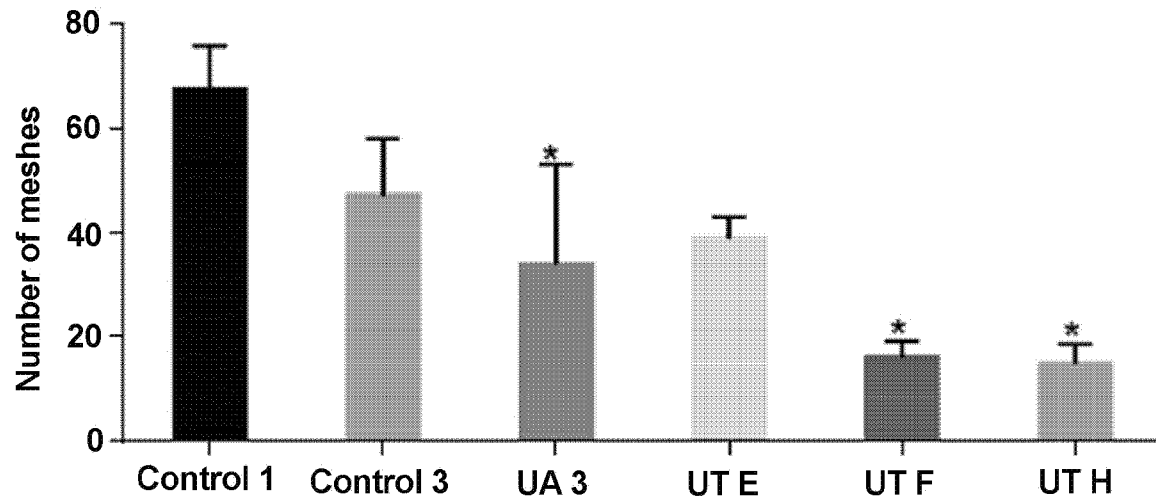
Control 1

Control 4

UT 1



[도9]

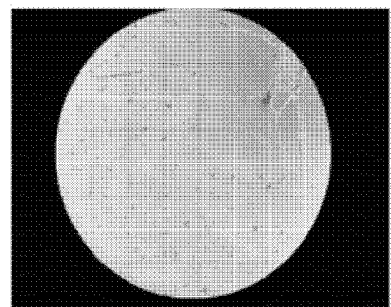
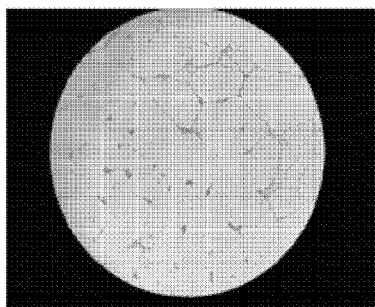
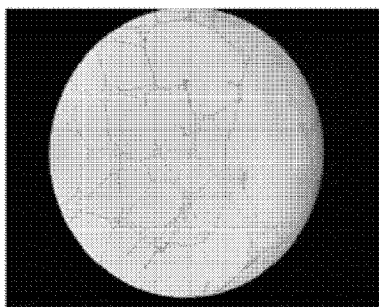


* : P < 0.05 compared to Control 1

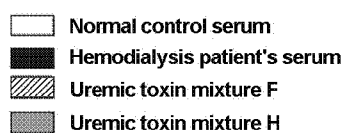
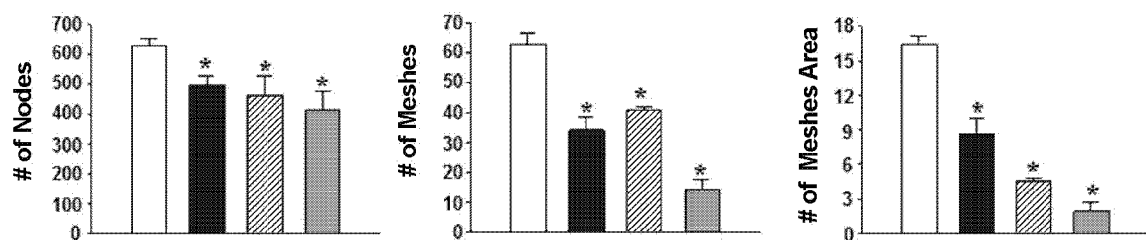
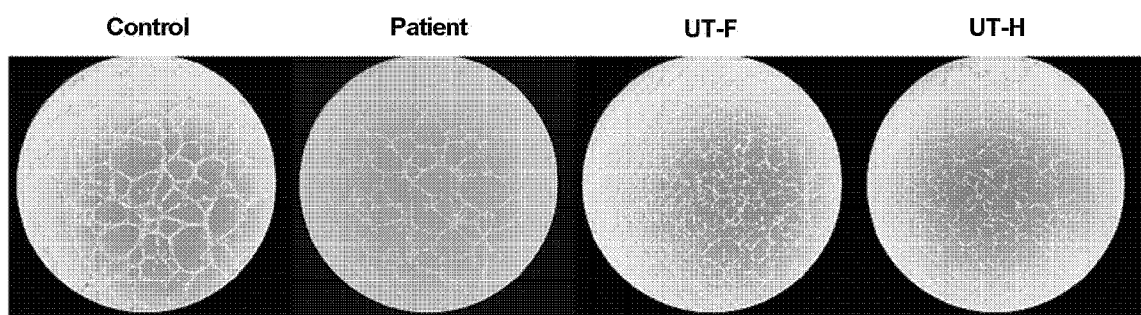
Control 1

UA 3

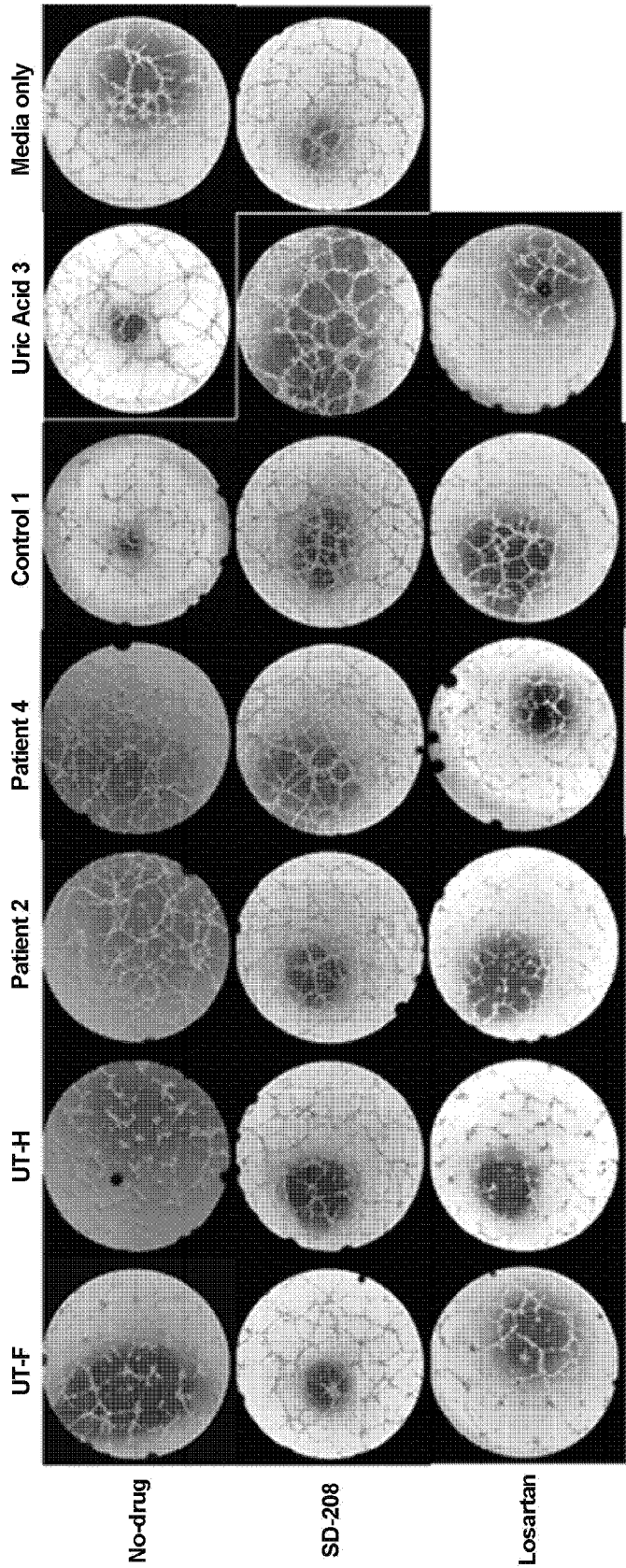
UT H



[도10]



[도 11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/011676

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i, G01N 33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/071; A61K 38/16; A61K 38/17; G01N 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: induced pluripotent stem cell, endothelial cell, uremia, vasculopathy, urea, uric acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUO, J. et al. Vasculopathy in the setting of cardiorenal syndrome: Roles of protein-bound uremic toxins. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 21 April 2017, vol. 313, pages H1-H13 See abstract.	1-13
A	HENAUT, L. et al. The impact of uremic toxins on vascular smooth muscle cell function. Toxins. 29 May 2018, vol. 10, article no.: 218, pages 1-21 See the entire document.	1-13
A	KR 10-2015-0058836 A (GREEN CROSS CORPORATION et al.) 29 May 2015 See the entire document.	1-13
A	DOU, L. et al. P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines. Kidney international. 2002, vol. 62, pages 1999-2009 See the entire document.	1-13
A	HUR, I. et al. Serum uric acid and mortality risk among maintenance hemodialysis patients. Kidney research and clinical practice. 2017, vol. 36, pages 302-304 See the entire document.	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 DECEMBER 2019 (20.12.2019)

Date of mailing of the international search report

20 DECEMBER 2019 (20.12.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

Information on patent family members

PCT/KR2019/011676

05/02/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/071(2010.01)i, G01N 33/50(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/071; A61K 38/16; A61K 38/17; G01N 33/50

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 유도만능줄기세포 (Induced pluripotent stem cell), 내피세포 (endothelial cell), 요독 (uremia), 혈관병증 (vasculopathy), 요소 (urea), 요산 (uric acid)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	GUO, J. 등, "Vasculopathy in the setting of cardiorenal syndrome: Roles of protein-bound uremic toxins", American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2017.04.21, 313권, 페이지 H1-H13 초록	1-13
A	HENAUT, L. 등, "The impact of uremic toxins on vascular smooth muscle cell function", Toxins, 2018.05.29, 10권, 아티클번호: 218, 페이지 1-21 전체 문헌	1-13
A	KR 10-2015-0058836 A (주식회사 녹십자 등) 2015.05.29 전체 문헌	1-13
A	DOU, L. 등, "P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines", Kidney international, 2002, 62권, 페이지 1999-2009 전체 문헌	1-13
A	HUR, I. 등, "Serum uric acid and mortality risk among maintenance hemodialysis patients", Kidney research and clinical practice, 2017, 36권, 페이지 302-304 전체 문헌	1-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 12월 20일 (20.12.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 12월 20일 (20.12.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

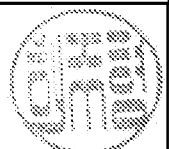
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2015-0058836 A

2015/05/29

KR 10-1592309 B1

2016/02/05