

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 10월 9일 (09.10.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/163380 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/10 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 5/079 (2010.01) G01N 33/15 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/002794
- (22) 국제출원일: 2014년 4월 1일 (01.04.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0035739 2013년 4월 2일 (02.04.2013) KR
10-2014-0038467 2014년 4월 1일 (01.04.2014) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 135-710 서울시 강남구 일원로 81 삼성의료원, Seoul (KR). 주식회사 종근당 (CHONG KUN DANG PHARMACEUTICAL CORP) [KR/KR]; 120-756 서울시 서대문구 충정로 8 종근당빌딩, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김윤태 (KIM, Yuntae); 446-916 경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 315-20, Gyeonggi-do (KR). 최병옥 (CHOI, Byung-Ok); 135-836 서울시 강남구 삼성로 151 선경아파트 6동 104호, Seoul (KR). 우소연 (WOO, So-Youn); 130-070 서울시 동대문구 고산자로 29길 18 래미안 허브리츠 102동 601호, Seoul (KR). 김지연 (KIM, Ji-Yon); 150-889 서울시 영등포구 국제금

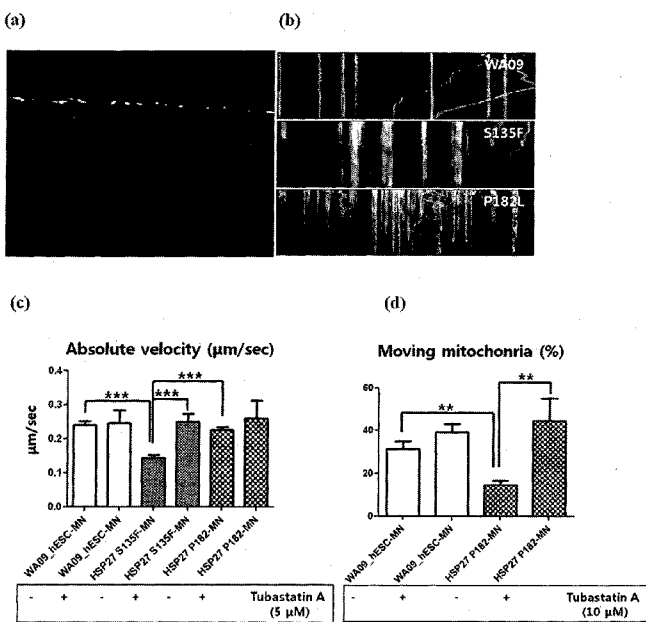
용로 7길 20 대교아파트 2동 1101호, Seoul (KR). 정성철 (JUNG, Sung Chul); 137-867 서울시 서초구 명달로 4길 68 서초네스피아 A동 502호, Seoul (KR). 홍영빈 (HONG, Young Bin); 151-764 서울시 관악구 관악로 30길 27 관악푸르지오아파트 119-1503, Seoul (KR). 박진모 (PARK, Jin-Mo); 158-877 서울시 양천구 목동서로 57 현대파라지앙 531호, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-080 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: SCREENING METHOD FOR THERAPEUTIC AGENTS FOR CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE AND SELF-DIFFERENTIATION MOTOR NEURONS USED THEREFOR

(54) 발명의 명칭 : 샤르코-마리-투스 질환 치료제의 스크리닝 방법 및 이에 이용되는 자가분화운동신경세포



(57) Abstract: The present invention relates to induced pluripotent stem cells and a method for screening a therapeutic agent for Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease by using motor neurons differentiated from the induced pluripotent stem cells. Particularly, the present invention enables the induced pluripotent stem cells to be prepared from a human fibroblast derived from a CMT patient, the effectiveness of a drug to be ascertained through the screening of a candidate material for a CMT therapeutic agent by using motor neurons differentiated from the induced pluripotent stem cells, and an autologous motor neurons to be prepared through the method for preparing the induced pluripotent stem cell, thereby being used for screening a patient personalized treatment drug and patient personalized treatment.

(57) 요약서: 본 발명은 역분화 유도만능 줄기세포 및 이를 분화한 운동신경세포를 이용한 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT) 질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 구체적으로 CMT 환자로 부터 유래된 인간 섬유아세포에서 역분화 유도만능 줄기세포를 제조하였고, 상기 역분화 유도만능 줄기세포에서 분화된 운동신경세포를 이용하여 샤르코-마리-투스 질환 치료제 후보물질의 스크리닝을 통해 약물의 효능의 유무를 확인이 가능하며, 상기 역분화 유도만능 줄기세포 제조 방법을 통한 자가(autologous) 운동신경 세포(moter neurons)를 제작하여 환자 맞춤형 치료제 스

크리닝 및 환자 맞춤형 치료에 이용할 수 있다.



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 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

샤르코-마리-투스 질환 치료제의 스크리닝 방법 및 이에 이용되는 자가 분화 운동신경세포

5

【기술분야】

본 발명은 역분화 유도만능 줄기세포 제조 방법 및 역분화 유도만능 줄기세포에서 분화한 자가 세포를 이용한 샤르코-마리-투스 질환 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

10

【배경기술】

샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT) 또는 유전운동감각신경병은 운동신경 및 감각 신경이 특정한 유전자 돌연변이에 의해 손상되는 질환을 말한다. 유전되는 말초신경병에는

15 유전운동감각신경병(Hereditary motor and sensory neuropathies; HMSN), 유전운동신경병(Hereditary motor neuropathies; HMN) 및 유전감각신경병(Hereditary sensory neuropathies; HSN)의 3개로 분류되며 유전운동감각신경병은 이중 하나이다. 1886년에 샤르코, 마리 및 투스에 의해 처음으로 보고된 후 이들의 이름을 따서 샤르코-마리-투스

20 질환(Charcot-Marie-Tooth disease), 또는 첫 글자를 따서 CMT라고 줄여서 부른다. 그런데, 20세기 후반에 Dyck 등이 CMT를 유전운동감각신경병으로 바꾸어서 명명하였고, 현재는 CMT와 HMSN을 함께 사용하고 있다. 샤르코-마리-투스 질환은 유전되는 양상에 따라 상염색체 우성유전을 하는 1형, 2형, 상염색체 열성유전을 하는 4형 및 X-염색체 연관유전을 하는 CMTX형으로

25 나누어진다. 그리고 같은 1형인 경우에는 유전자변이 등이 보고된 순서에 따라 1A, 1B, 1C 등의 차례로 명명되었다.

상기 샤르코-마리-투스 질환의 발생빈도는 2500명 당 한명으로 유전되는 희귀질환 가운데 높은 빈도를 보인다. 샤르코-마리-투스 질환 환자들은 발과

손의 근육들이 점점 위축되어 힘이 약해지며, 발 모양과 손 모양의 변형이 발생한다. 환자들의 증상은 유전자 돌연변이의 종류에 따라 거의 정상에 가까운 가벼운 상태에서부터 아주 심하여 보행에 도움이 필요하거나 또는 휠체어에 의존해야 하는 정도까지 다양하다.

5

기존의 CMT 치료는 주로 재활치료, 보조기구, 통증조절 등에 국한되었으나 관련된 유전자들의 발견은 유전상담과 가족계획을 가능하게 하였고, 이와 함께 과학적인 근거에 기반을 둔 임상치료의 시도는 점차 발전하고 있다. 현재 유전운동감각신경병의 진행을 바꿀 수 있는 실질적인
10 치료나 보조는 아직 부족하나 최근의 동물실험에서는 가능성 있는 결과를 보였다. 이와 함께 최근에는 치료방법으로 유전자 치료, 세포 대체 치료(cell replacement therapy), 축삭이송에 관여하는 방법, 미토콘드리아의 기능교정, 면역시스템을 이용한 방법, 인테그린(integrin)을 이용한 치료법 등이 연구되고 있다.

15

지난 수 십년간 희귀성 질환 연구의 괄목할 만한 성장에 힘입어 환자의 치료에 있어 양적, 질적인 팽대로 진단에서부터 치료까지 진료가이드라인에도 현격한 변화가 있어왔다. 특히, 분자생물학의 발달에 따른 진단기법의 변화와 그에 따른 치료의 개별화(individualization), 즉 맞춤형치료(tailored therapy)로 대별되는 희귀성 질환의 분자생물학적 기원의 차이에 따른
20 표적치료(targeted therapy)와 이에 더하여 같은 약물이라도 환자나 희귀성 질환의 유전적 특성에 따른 약물유전체(pharmacogenetics)의 발달로 기존의 질환이 같은 병기라도 치료가 현저히 다를 수 있는, 분자유전학적 시대라고 할 수 있다. 특히, CMT의 경우 약물요법에서부터 추가적인 치료로 증상의 완화를 목표로 하는 대증요법(symptomatic treatment)과 각종 부작용과 합병증을
25 조절하고 완화시키기 위해 지지요법(supportive therapy)에 이르기까지 희귀성 질환 중 가장 다양한 치료적 선택과 예후를 가질 수 있는 경우로, 특히 CMT는 유전자의 이상에 의해 발생하므로 증상이 계속 진행하며 완치되는 질환이 아니다. 따라서, 현재까지 일반적인 CMT 치료는 증상을 완화하고 진행을

지연시키며, 삶의 질을 향상시키는데 목적이 있었다. 현재 계속해서 유전적, 분자생물학적 연구를 통해 생물학적 치료방법이 시도되고 있으며 가능성 있는 결과들이 보고되고 있으나, 희귀성 질환의 특성상 이환된 사람들의 수가 적고 연구에 대한 관심도가 적다는 한계가 있고 아직까지 적절한 치료법이

5 확립되어있지 않고 희귀성 질환을 중심으로 진단 및 치료하는 의사 및 연구진들의 부재가 현실이다(Acta Paediatrica, 2012).

CMT 치료를 위한 약물들 가운데 프로그레스테론 수용체의 길항제인 오나프리스톤(onapristone)을 투여한 형질전환 마우스에서 Pmp22 mRNA의 과발현을 감고시키고 부작용이 없이 유전운동감각신경병의 표현형을 호전시킨

10 보고가 있었고, 말초신경에서 수초형성에 필수적인 물질인 아스코르빈산(ascorbic acid)은 CMT1A 형질전환 마우스에서 수초 재형성 및 유전 운동감각신경병의 표현형을 개선하였고, 뉴트로핀-3(neurotrophin-3; NT-3)은 CMT1A 환자군에서 수초화된 신경섬유를 증가시켜 감각 증상 개선효과를 나타냈다고 보고되었다. 하지만, 상기 치료제들의 경우 CMT 1형에

15 국한되어있고, CMT는 수십여 종류의 유전자변이에 의해 발병되고 있으며, CMT의 치료를 위해서는 각 유전자의 결함에 맞는 맞춤형 치료기술개발과 이를 검증할 수 있는 모델 도입이 시급한 실정이며, CMT 환자들의 약물에 대한 효과가 현저하게 차이가 있어서 CMT 환자 및 증상에 따른 약물 선택에 있어서 제약이 있다.

20

환자에서 얻은 피부조직을 통해 얻어진 줄기세포는 환자의 유전적인 돌연변이의 특성을 그대로 가지고 있기 때문에, 신경세포로 분화시켰을 경우 환자의 질병 특성을 그대로 가지는 신경세포를 얻을 수 있으며, 이는 치료제 선별 또는 맞춤형치료에 이용될 수 있다.

25

유전성말초신경병의 대표적인 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT)의 경우는 단일유전자 질환으로 환자의 피부세포에서 유래한 역분화 줄기세포를 체외에서 분화시켜 그 병을 재현하는 질병모델을 만들 수 있으며, 이러한 질병모델을 사용하여 질병을 치료하는

신약을 만들 수 있다. 척수근위축증, 가족성 자율신경 실조증(familial dysautonomia), 레오파드증후군(LEOPARD syndrome)을 겪는 환자로부터 유래한 역분화 줄기세포를 이용해서 환자들이 보여준 세포의 이상증상과 똑같은 증상을 체외에서 재현하였으며, 체외에서 배양된 세포에 이들 질병을 위한 실험 약물을 처리했을 때 호전되는 현상을 보였다(Ebert AD. et al, Nature, 2009, 457:277-280, Lee G. et al, Nature, 2009, 461:402-406, Cavajal-Vergara X. et al, Nature, 2010, 465:808-812, Hanna J. et al, Science, 2007, 318:1920-1923). 이러한 결과를 볼 때 역분화 유도만능 줄기세포 및 이를 분화한 자가세포는 치료약이 없는 많은 다른 질병들에 있어서 환자 맞춤형 신약개발의 하나의 방법으로써 난치성 희귀질환 환자들에게 도움이 될 수 있을 것이다.

이에, 본 발명자들은 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT)의 환자 맞춤형 치료법을 연구하던 중, CMT 환자로부터 유래된 인간 섬유아세포에서 역분화 유도만능 줄기세포를 제조하였고, 상기 역분화 유도만능 줄기세포에서 분화된 운동신경세포를 이용하여 샤르코-마리-투스 질환 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 통해 약물의 효능의 유무를 확인이 가능하며, 본 발명의 제조방법을 통한 자가(autologous) 운동신경세포(moter neurons)를 제작하여 환자 맞춤형 치료제 스크리닝 및 환자 맞춤형 치료에 이용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT) 환자로부터 유래된 체세포에서 운동신경세포의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 CMT 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 역분화 유도만능 줄기세포로부터 분화된 CMT 환자의 자가(autologous) 운동신경세포(motor neurons)를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 CMT 환자의 자가 운동신경세포를 이용한 CMT 유형별 환자 치료를 위한 맞춤형 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

본 발명은 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT) 환자로부터 유래된 체세포에서 운동신경세포의 제조방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 CMT 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 역분화 유도만능 줄기세포로부터 분화된 CMT 환자의 자가(autologous) 운동신경세포(motor neurons)를 제공한다.

아울러, 본 발명은 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 CMT 환자의 자가 운동신경세포를 이용한 CMT 유형별 환자 치료를 위한 맞춤형 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명의 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT) 환자로부터 유래된 인간 섬유아세포에서 역분화 유도만능 줄기세포를 제조할 수 있고, 상기 역분화 유도만능 줄기세포에서 분화된 운동신경세포를 이용하여 샤르코-마리-투스 질환 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 통해 약물의 효능의 유무를 확인 가능하며, 상기 역분화 유도만능 줄기세포 제조 방법을 통한 자가(autologous) 운동신경세포(moter neurons)를 제작하여 환자 맞춤형 치료제 스크리닝 및 환자 맞춤형 치료에 이용할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에서 사용된 인간 섬유아세포의 형태를 나타낸 도이다.

도 2는 CMT 유래의 역분화 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)에서 운동신경세포로 분화하는 방법을 나타낸 도이다.

도 3은 CMT 유래의 역분화 유도만능 줄기세포(CMT 2F-iPSC)에서 CMT의
5 원인 유전자인 *HSP27* 유전자 변이 확인을 나타낸다.

도 4는 CMT 2F-iPSC의 콜로니(colony)의 형태를 나타낸 도이다. 배양
20일째 관찰한 사진이며 역분화 유도만능 줄기세포 콜로니는 속이 짝 들어찬
밀집한 세포를 나타내었다.

도 5는 CMT 2F-iPSC의 내인성(endogenous) 다분화능 유전자의 발현을
10 확인한 도이다.

도 6은 CMT 2F-iPSC의 다분화능 마커(stemness marker) 단백질의 발현을
확인한 도이다.

도 7은 CMT 2F-iPSC로부터 유도된 배상체(embryoid body, EB)의 시험관
내 (*in vitro*) 분화능력을 확인한 것으로, 외배엽(ectoderm)의 마커인
15 네스틴(Nestin), 중배엽(mesoderm) 마커인 평활근액틴(smooth muscle actin;
SMA) 및 내배엽(endoderm) 마커인 알파-페토프로테인(α -fetoprotein; AFP)
발현의 확인을 나타낸다.

도 8은 생체 내(*in vivo*)에서 CMT 2F-iPSC의 기형종(teratoma) 형성을
통한 분화능을 확인한 도이다.

20 도 9는 CMT 2F 환자로부터 분화된 운동신경세포(CMT 2F-MN)의 마커 단백질
발현 및 신경근육 이음부(neuromuscular junction) 형성을 확인한 도이다;

도 9a는 CMT 2F-MN의 마커 단백질인 HB9, ISL1, SMI32, Tuj1, MAP2
Synapsin 및 ChAT의 발현을 확인한 도이며;

도 9b는 CMT 2F-MN의 SMI32 및 MPA2 양성 단백질의 비율을 확인한
25 도이고; 및

도 9c는 CMT 2F-MN의 축삭 돌기의 길이를 측정한 도이다.

도 10은 CMT 2F-MN의 신경근육 이음부(neuromuscular junction) 형성을
확인한 도이다.

도 11은 CMT 2F-MN에서 투바스타틴 A(tubastatin A)의 처리 유무에 따른 축삭 운송(axonal transport) 효율을 확인하기 위한 CMT 지표로서 아세틸화(acetylation)된 α -튜블린(α -tubulin)의 발현을 확인한 도이다;

5 도 11a는 CMT 2F-MN에서 α -튜블린(α -tubulin)의 아세틸화를 확인한 도이며;

도 11b는 투바스타틴 A의 처리 유무에 따른 CMT 2F-MN에서 α -튜블린(α -tubulin)의 아세틸화를 확인한 웨스턴 블릿을 나타낸 도이고; 및

도 11c는 투바스타틴 A의 처리 유무에 따른 CMT 2F-MN에서 α -튜블린(α -tubulin)의 아세틸화를 정량화하여 비교한 도이다.

10 도 12는 CMT 2F-MN에서 투바스타틴 A의 처리 유무에 따른 축삭 운송 효율을 확인하기 위한 CMT 지표로서 미토콘드리아 운송량(moving mitochondria)을 확인한 도이다;

도 12a는 CMT-2F-MN에 형질전환된 mito-RED2를 통해 운동 뉴런의 축삭 미토콘드리아를 관찰한 도이며;

15 도 12b는 투바스타틴 A의 처리 유무에 따른 CMT 2F-MN에서 미토콘드리아 이동 속도를 비교한 도이고; 및

도 12c는 투바스타틴 A의 처리 유무에 따른 CMT 2F-MN에서 이동하는 미토콘드리아의 백분율을 나타낸 도이다.

20 도 13은 미토콘드리아 운송량을 분석하여 CMT 2F-MN의 운동 뉴런의 축삭 운송 효율을 확인하기 위한 미소유체 배양(Microfluidic culture)을 나타낸 도이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

25

본 발명은 하기 단계를 포함하는 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT) 환자 유래의 체세포에서 운동신경세포의 제조방법을 제공한다.

1) 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT) 환자로부터 인간 체세포를 수득하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 CMT 환자 유래 인간 체세포에 OCT4, SOX2, KLF4 및 c-MYC의 트랜스유전자가 삽입된 벡터를 형질전환시키고 배양하여 역분화 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)를 유도하는 단계; 및

3) 상기 단계 3)의 역분화 유도만능 줄기세포에 레티논산(retinoic acid) 및 소닉 헤지호그(sonic hedgehog)의 존재하에 배양하여 운동신경세포를 유도하는 단계.

상기 단계 1)의 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT)은 CMT 1형, CMT 2형, CMT 4형 또는 CMTX형이며, 바람직하게 CMT 2F형이다. 상기 CMT 2F형은 열활성단백질(heat-shock protein; HSPs)27의 유전자 404 번째 및 545 번째 사이토신(cytosine)이 티민(thymine)으로 치환된 돌연변이된 것을 특징으로 포함한다. 상기 돌연변이로 인해 합성된 단백질은 야생형 HSP27 단백질로부터 135 번째 아미노산이 세린(serine)에서 페닐알라닌(Phenylalanine)으로 치환되거나, 182 번째 아미노산이 프롤린(Proline)에서 류신(Leucine)으로 치환된 변이체 단백질인 것을 특징으로 포함한다.

상기 단계 1)의 인간 체세포는 섬유아세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

또한, 상기 단계 2)에서 이용되는 벡터는 센다이 바이러스, 레트로바이러스 및 렌티바이러스를 이용한 바이러스-매개 또는 비바이러스성 벡터를 이용할 수 있고, 구체적으로 센다이바이러스를 이용하는 것이 보다 바람직하다.

또한, 형질전환 후 상기 역분화 유도만능 줄기세포를 얻기 위해 인간 체세포를 배양하기 위해 이용되는 배지는 통상적인 배지를 사용할 수 있다. 예를 들어, Eagle's MEM(Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α -MEM(Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM(Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지(Morgan

et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640(Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12(Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10(Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), DMEM(Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물(Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980)), Way-mouth's MB752/1(Waymouth, C. J. Natl. Cancer Inst. 22:1003(1959)), McCoy's 5A(McCoy, T.A., et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈(Ham, R.G. et al., In Vitro 14:11(1978)) 등이 이용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)는 이미 분화된 세포들로부터 인위적인 역분화 과정을 통해 다능성 분화능을 가지도록 유도된 세포를 지칭하는 것으로, 역분화 줄기세포 또는 유도만능 줄기세포라고도 한다. 상기 역분화 유도만능 줄기세포는 배아줄기세포와 거의 같은 특성을 가지며, 구체적으로는 비슷한 세포 모양을 보여주며, 유전자, 단백질 발현 패턴이 유사하다. 또한, 다능성 분화능을 가지는 iPSC는 시험관 내(in vitro)에서 전분화능 마커 단백질의 발현을 확인할 수 있으며, 생체 내(in vivo)에서 기형종 형성을 나타낸다. 특히, 생쥐의 배반포(blastocyst)에 상기 iPSC를 삽입시켰을 때, 키메라(chimera) 생쥐를 형성하고, 유전자의 생식선 전이(germline transmission)이 가능하다. 본 발명의 iPSC로는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등의 모든 유래의 iPSC를 포함하나, 바람직하게는 인간 유래의 iPSC이며, 가장 바람직하게는 CMT 환자로부터 유래한 iPSC이다.

본 발명의 트랜스유전자(transgene)는 한 생물체에서 다른 생물체로 자연적인 이동에 의하거나 유전공학 기술에 의해 옮겨지는 유전자 또는 유전 물질을 의미한다. 구체적으로, 한 생물체에서 분리하여 다른 생물체에 도입하는 유전자 서열을 포함하는 DNA 세그먼트이다. 상기 트랜스 유전자로서 사용되는 유전자 서열은 벡터에 트랜스유전자로서 OCT4, SOX2, KLF4 및 c-MYC을 사용하며 이는 본래 분화된 세포에서 역분화 유도만능 줄기세포로

역분화시키기 위해 필요하다. 본 발명에서 '역분화'란 존재하는 분화된 세포들을 미분화 상태로 되돌려 새로운 분화 조직 형성이 가능하도록 하는 후성학적인 역행과정을 의미하는 것으로 리프로그래밍(reprogramming) 과정이라고도 말하며, 세포 유전체의 후성학적인 변형(epigenetic changes)의 가역성에 기초한 것이다. 본 발명에서의 목적에 따라, 상기 역분화란 0% 이상 내지 100% 미만의 분화능을 가지는 분화된 세포들을 미분화 상태로 되돌리는 과정이라면 모두 이에 포함되고 예를 들어 0%의 분화능을 가지는 분화된 세포를 1%의 분화능을 가지는 분화된 세포로 미분화시키는 과정도 이에 포함될 수 있다.

10 상기 단계 3) 이후에 상기 제조된 역분화 유도만능 줄기세포를 운동신경세포(motor neurons)로 분화시키는 하기 (3-1) 내지 (3-2)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다;

(3-1) 상기 제조된 역분화 유도만능 줄기세포를 배양하여 배상체(Embryoid Body;EB)를 얻고 이를 신경구(Neuroshpere)로 분화하는 단계;

15 및

(3-2) 상기 신경구를 운동신경세포로 분화시키는 단계.

또한, 상기 단계 4)의 뉴트로핀(neurotrophin)은 신경성자인자(nerve growth factor;NGF), 뇌-유래 신경인자(brain-derived neurotrophic factor;BDNF), 뉴트로핀(neurotrophin-3;NT-3) 및 글리아세포-유래 신경영양인자(Glial cell-derived neurotrophic factor;GDNF)으로 구성된 군에서 선택하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

20

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 HSP27 유전자의 S135F 또는 P182L의 변이를 포함하는 CMT 2F 환자의 피부 생검으로부터 수득한 섬유아세포(fibroblast)로부터 4종류의 전사인자(Klf4, Oct3/4, Sox2 및 c-Myc)를 사용하여 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSC) 및 배상체(embryoid body)의 제조하였으며(도 4 참조), 상기 iPSC는 S135F 또는 P182L의 변이를 포함하는 CMT 2F 환자에서 나타나는 변이를 포함하면서(도 3

25

참조) 다분화능 마커 유전자 및 단백질을 발현하므로, CMT 질병의 만능 줄기세포 모델로 사용할 수 있음을 확인하였다(도 5 및 도 6 참조). 또한, CMT 2F 환자 유래의 iPSC(CMT 2F-iPSC)로부터 분화된 배상체는 시험관 내에서 내배엽, 중배엽 및 외배엽으로의 분화능을 나타내는 것을 확인하였고(도 7 5 참조), 생체 내에서 기형종을 형성하는 것을 확인하였다(도 8 참조).

또한, 본 발명자들은 CMT 2F-iPSC를 말초신경병증(peripheral neuropathy)의 모델로 사용하기 위하여, 공지된 방법에 기초하여 CMT 2F-iPSC로부터 운동 뉴런으로 분화하였으며(Amoroso MW, et al, J Neurosci 2013; 33: 574-586)(도 2 참조), 상기 분화된 운동 뉴런의 마커 단백질 발현 및 10 신경근육 이음부(neuromuscular junction) 형성을 확인함으로써 운동 뉴런으로 분화된 효율을 확인하였다(도 9 및 도 10 참조).

본 발명의 CMT 유래의 iPSCs 모델은 CMT 환자의 유전자 변이와 동일한 변이를 나타내면서 다분화능을 나타낼 뿐만 아니라, 효과적으로 15 신경구(Neuroesphere)를 거쳐 자가(autologous) 운동신경세포(moter neurons)로 분화되므로, 상기 iPSCs 모델의 제조 방법은 CMT를 위한 분석 연구에 이용하는 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 샤르코-마리-투스 질환 예방 및 20 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

1) 본 발명의 제조방법으로 제조된 운동신경세포에 시험관 내(in vitro)에서 CMT 치료제 후보 물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 치료제 후보 물질이 처리된 세포에서 CMT 지표의 수준을 측정하는 단계; 및

25 3) 상기 단계 2)의 CMT의 지표의 수준을 대조군과 비교하여 증가 또는 감소시킨 후보물질을 선별하는 단계.

또한, 본 발명은 CMT 유형별 환자 치료를 위한 맞춤형 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 CMT 환자의 세포로부터 역분화시켜 제조된 역분화 유도만능 줄기세포로부터 분화된 세포는 상기 단계 1) 내지 단계 2) 및 (3-1) 내지 (3-2)의 방법으로 제작할 수 있다.

본 발명의 CMT 유래 iPSC로부터 분화된 운동신경세포는 CMT 질환에 대한 후보 약물을 스크리닝하기 위해, 사용될 수 있다. 상기 후보 약물은 히스톤 디아세틸라제 6(Histon deacetylase 6, HDAC6) 억제제인 트리코스타틴(Trichostatin), 투바신(Tubacin) 및 투바스타틴 A(tubastatin A)를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 후보 약물의 세포독성(cytotoxicity) 수준을 측정하기 위해 정상 대조군과 CMT 유래 신경세포에 후보 약물을 농도-의존(dose-dependent)하게 처리하여 세포의 생존을 저해하지 않는 수준의 약물 농도를 결정할 수 있다. 세포의 생존력을 평가하기 위한 방법으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test를 이용할 수 있다.

상기 방법으로 제작된 세포에 CMT 치료제 후보 물질을 처리하였을 때, 상기 CMT 지표를 측정하여 후보 물질이 CMT에 대하여 나타내는 약물 효용성을 확인할 수 있다. 상기 CMT 지표는 축삭 이동(axonal transport)의 표지자인 것이 바람직하며, 구체적으로는 아세틸화된 알파-튜블린(acetylated α -tubulin), 미토콘드리아 운송량(moving mitochondria) 또는 전기 생리학적 지표인 활동전위 진폭(action potential amplitude)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하며, 더욱 구체적으로 알파-튜블린(acetylated α -tubulin) 또는 미토콘드리아 운송량(moving mitochondria) 중 어느 하나 또는 둘 다인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 CMT 치료제 후보 물질이 처리된 세포에서 아세틸화된 알파-튜블린(acetylated α -tubulin)의 양이 증가되는 것을 확인하여 상기 치료제 후보물질이 CMT 치료에 효과적이라고 확인할 수 있다. 이때, 아세틸화된 알파-튜블린의 양은 치료제 후보물질을 처리하지 않았을 때 보다

20% 이상 증가하였을 때, 바람직하게는 30% 이상, 보다 바람직하게 35% 이상 증가하였을 때 치료효과가 있다고 확인할 수 있다.

상기 CMT 치료제 후보 물질이 처리된 세포에서 미토콘드리아 운송량(moving mitochondria) 및 활동전위 진폭(action potential amplitude)이
5 정상 대조군으로부터 유래한 신경세포 수준으로 회복되었을 때 치료제 후보 물질이 CMT 치료에 효과적이라고 말할 수 있다.

이때, 상기 단백질 발현량 변화의 측정은 당업계에서 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블롯(western blot) 및 면역세포화학(ICC)을 이용하여 실시할 수 있다. 또한,
10 유전자의 발현량 변화의 측정은 RT-PCR(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufman et al., Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor
15 Press(2001)) 등을 이용하여 실시할 수 있다.

상기 단계 1)의 샤르코-마리-투스 질환은 CMT 1형, CMT 2형, CMT 4형 또는 CMTX형이며, 바람직하게 CMT 2F형이다. 상기 CMT 2F형은 열활성단백질27의 유전자 404 번째 및 545 번째 사이토신이 티민으로 치환된 돌연변이 된 것을 특징으로 포함한다. 상기 돌연변이로 인해 합성된 단백질은 야생형 HSP27
20 단백질로부터 135 번째 아미노산이 세린에서 페닐알라닌으로 치환되거나, 182 번째 아미노산이 프롤린에서 류신으로 치환된 변이체 단백질인 것을 특징으로 포함한다.

본 발명의 또다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 CMT 2F에서
25 나타나는 주된 증상인 축삭 운송(axonal transport) 시스템의 기능 장애에 연관된 마이크로 튜블린 트랙의 기능 확인을 통해 CMT 환자 유래의 iPSC로부터 분화된 신경세포를 CMT에 대한 약물의 효용성 평가 모델로 사용하기 위하여, α -튜블린의 아세틸화 수준 및 미토콘드리아 운송량(moving mitochondria)을

통해 CMT 2F-MN의 운동 뉴런의 축삭 운송 효율을 확인한 결과, CMT 2F-MN는 정상 대조군인 WA09_MN에 비해 α -튜블린의 아세틸화 수준이 감소하는 것을 확인하였고(도 11 참조), 미토콘드리아 운송량(moving mitochondria) 역시 정상 대조군에 비해 감소된 수준을 나타내는 것을 확인하였다(도 12 참조). 그러나, 5 히스톤 디아세틸라제 6(Histon deacetylase 6, HDAC6) 억제제인 투바스타틴 A(tubastatin A)을 CMT 2F-MN에 처리하였을 때, α -튜블린의 아세틸화 수준 및 미토콘드리아 운송량이 유의적으로 상승하여, 정상 대조군의 수준으로 회복되는 것을 확인하였다(도 11b, 도 11c, 도 12b 및 도 12c 참조).

따라서, 본 발명의 CMT 환자 유래의 iPSC는 CMT 원인 유전자의 변이를 10 유지하면서 신경구를 거쳐 자가 운동신경세포를 제작할 수 있으며, 상기 제작된 자가 운동신경세포는 CMT 치료제 후보물질을 직접 환자에게 투여하지 않고 약물을 처리하여 나타나는 CMT 지표의 수준의 증가 또는 감소를 확인할 수 있어서, 개개인마다 상이할 수 있는 의약 물질의 효능에 관계없이 가장 15 우수한 효과를 보이는 약물인 환자 맞춤형 의약을 선택할 수 있고, 여러 약물 중에서 어느 약물이 가장 세포 독성이 없는지 사전에 확인할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

20

<실시예 1> 피부 생검(Skin biopsy)을 통한 환자 유래 세포 분리

피부생검(Skin biopsy)은 피부 병변의 병리학적 진단을 위해 시행되는 안전하고 저침습적이며 경제적인 방법이다. 기관생명윤리위원회(institutional review board)의 승인을 받아, HSP27 25 유전자의 S135F 또는 P182L의 변이를 포함하는 CMT 2F 환자 및 정상군이 연결되었다(이화여자대학교, 목동 병원, 한국). 피부생검은 정상군 및 CMT 환자에 대해 국소마취 후 직경 4 mm의 원형 날이 달린 펀치를 이용해 시행되었다. 상기 방법으로 얻어진 피부조직을 10 mg/ml collagenase type

IV(Invitrogen, 미국), 50 U/ml dispase(Roche), 0.05% trypsin/EDTA가 포함된 DMEM 배지에 넣고 37°C에서 40분간 반응하였다. 이렇게 얻어진 세포부유액을 70 µm 크기를 통과시키는 나일론 체(cell strainer)로 걸러 세포를 수득하였다. 상기 수득된 섬유아세포(fibroblast)를 20% 우태아혈청(FBS)과 100 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 각각의 검체는 하기 [표 1]과 같이 분류하였다.

【표 1】

정상군 및 CMT 2F 환자군의 검체

식별번호	분류	세포주	HSP27 돌연변이	
			핵산 변이	단백질 변이
WA09_hESC	정상 대조군	WA09 인간배아줄기세포주	-	-
Normal iPSC	정상 대조군	정상군 유래 세포	-	-
HSP27 S135F	CMT 2F 환자군	CMT 2F 환자 유래세포	405 C>t	S135F
HSP27 P182L	CMT 2F 환자군	CMT 2F 환자 유래세포	545 C>T	P182L

그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 정상군 및 CMT 환자에서 분리된 섬유아세포(fibroblast)는 형태학적으로 동일한 것을 확인하였다(도 1).

<실시예 2> CMT 환자 유래 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSC) 및 배상체(embryoid body)의 제조

<2-1> CMT 환자 유래의 iPSC 발생의 유도

상기 <실시예 1>에서 수득한 CMT 환자 피부 생검의 섬유아세포(fibroblast)로부터 신경세포분화를 위한 유도만능줄기세포(iPSCs)를 제조하기 위해 정상군 및 환자군의 섬유아세포에 4종류의 전사인자(Klf4, Oct3/4, Sox2, c-Myc)가 포함된 센다이 바이러스 시스템(Cell Biolabs 사, 미국)을 사용하여 형질도입(transduction)하였다. 특히 사용한 센다이 바이러스의 벡터는 호스트 게놈에 삽입되지 않고 수차례의 계대배양 후에 사라지므로 보다 안정한 iPSC를 생성할 수 있다. 센다이바이러스의 양은 MOI(multiplicity of infection) 3 으로 하였고, 하룻밤 동안(overnight) 센다이바이러스에 감염한 다음, 상기 CMT 환자 피부 생검의

섬유아세포 배양 배지를 10% 우태아혈청이 포함된 DMEM 배지로 교체하고 6 일 동안 배양하여 안정화하였다. 이후 세포를 mitomycin C(Invitrogen)를 처리한 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblast, MEF)인 SNL 지지세포(feeder cells; Cell Biolabs 사, 미국)으로 옮기고, 4 ng/ml의 bFGF를 5 첨가한 ESC/iPSC 배지(KnockOut™ 사, 미국)와 혼합하여, 매일 새로운 배지로 교체하면서 배양하였다. 센다이바이러스 감염 후 약 30일이 지나, iPSC의 형태에 맞는 세포집락을 선택하여 분리하였다. 상기 분리한 iPSC는 염기서열을 분석하여, CMT의 원인 유전자 변이를 유지하고 있는지 확인하였다.

그 결과, 상기 [표 1], 도 3 및 도 4에서 나타난 바와 같이, CMT 10 환자로부터 유래된 iPSC(CMT 2F-iPSC)는 *HSP27* 유전자에서 404C>T 또는 545C>T 변이가 나타나, 이로부터 합성된 HSP27 단백질에서 S135F 또는 P182L로 치환된 변이체를 형성하는 것을 확인하였다(표 1 및 도 3). 또한, 정상 대조군 및 CMT 환자에서 분리된 섬유아세포(fibroblast)를 줄기세포로 유도한 15 유도만능줄기세포(iPSCs)는 개별적 세포가 평평한 조약돌 형상 및 선명한 가장자리를 나타내는 일반적인 인간 만능줄기세포(pluripotent cell)의 형태를 나타내는 것을 확인하였다(도 4).

<2-2> CMT 2F-iPSC의 내인성(endogenous) 다분화능 유전자의 발현 확인

CMT 2F-iPSC가 다분화능을 나타내는지 확인하기 위해, 발생 유도된 CMT 20 2F-iPSC에서 내인성 *KLF4*, *OCT4*, *SOX2* 및 *c-Myc* 유전자의 발현을 확인하였다.

구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 발생 유도한 CMT 2F-iPSC 또는 정상 대조군 WA09_hESC를 10 번의 세포 계대(cellular passage)를 반복하여 배양한 다음, 이를 수득하여 트리졸(TRIZOL; Gibco 사, 미국)에 현탁하고 제조사의 프로토콜에 따라 CMT 2F-iPSC 또는 WA09_hESC의 전체 RNA를 추출하였다. 그런 25 다음, 상기 추출한 RNA 1 µg 및 AMV 역전사 합성효소(AMV reverse transcriptase; Promega 사, 미국)를 올리고뉴클레오티드(oligo-dT), 하기 [표 2]에 기재된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 혼합하여 사용하여 *KLF4*, *OCT4*, *SOX2* 및 *c-Myc* 유전자의 cDNA를 각각 합성하고, 이를 증폭하여

전기영동(electrophoresis)로 상기 유전자의 발현을 mRNA 수준에서 확인하였다.

【표 2】

다분화능 마커 유전자의 발현 확인을 위한 프라이머의 서열

목적 유전자	프라이머			
	명칭	서열	방향	서열번호
KLF	KLF CDR_F	CTG CGG CAA AAC CTA CAC AAA	정방향	서열번호: 1
	KLF CDR_R	GCG AAT TTC CAT CCA CAG CC	역방향	서열번호: 2
	KLF4 UTR_F	CAT GGT CAA GTT CCC AAC TGA	정방향	서열번호: 3
	KLF4 UTR_R	CAC AGA CCC CAT CTG TTC TTT G	역방향	서열번호: 4
Oct3/4	Oct3/4 CDR_F	CAG TGC CCG AAA CCC ACA C	정방향	서열번호: 5
	Oct3/4 CDR_R	GGA GAC CCA GCA GCC TCA AA	역방향	서열번호: 6
	Oct3/4 UTR_F	GAA AAC CTG GAG TTT GTG CCA	정방향	서열번호: 7
	Oct3/4 UTR_R	TCA CCT TCC CTC CAA CCA GTT	역방향	서열번호: 8
Sox2	Sox2 CDR_F	TAC CTC TTC CTC CCA CTC C	정방향	서열번호: 9
	Sox2 CDR_R	GGT AGT GCT GGG ACA TGT GA	역방향	서열번호: 10
	Sox2UTR_F	CCC GGT ACG CTC AAA AAG AA	정방향	서열번호: 11
	Sox2UTR_R	GGT TTT TGC GTG AGT GTG GAT	역방향	서열번호: 12
c-Myc	c-Myc CDR_F	CGT CCT CGG ATT CTC TGC TC	정방향	서열번호: 13
	c-Myc CDR_R	GCT GGT GCA TTT TCG GTT GT	역방향	서열번호: 14
	c-MycUTR_F	GCG TCC TGG GAA GGG AGA TCC GGA GC	정방향	서열번호: 15
	c-MycUTR_R	TTG AGG GGC ATC GTC GCG GGA GGC TG	역방향	서열번호: 16

5 그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이 내인성 *KLF4*, *OCT4*, *SOX2* 및 *c-Myc* 유전자가 발현되는 것을 확인하였다(도 5).

<2-3> CMT 2F-iPSC의 다분화능 마커 단백질의 발현 확인

CMT 환자 유래의 iPSCs에서 줄기세포 마커를 확인하기 위하여,
 10 줄기세포성 마커(stemness marker) 단백질인 SSEA4 및 NANOG 단백질 발현을 추가로 확인하였다.

구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 발생 유도한 CMT 2F-iPSC 또는 정상 대조군 WA09_hESC를 젤라틴이 코팅된 슬라이드 배양용기(chamber slide, Lab-Tek II)에 SNL세포와 혼합 배양 1주 후, 4% paraformaldehyde으로 고정 후,

10% normal goat serum(NGS; Gibco 사 미국) 및 0.2% triton X-100 처리하여
면역세포염색법으로 확인하였다. 사용한 일차 항체는 항-SSEA4 항체(마우스
IgG3, 1:100 희석; MC-813-70, DSHB 사, 미국), 항-NANOG 항체(마우스 IgG1,
1:500 희석; NNG-811, Abcam 사, 미국)이며, 적절한 Cy3-결합된 염소 유래
5 항-마우스 IgG 이차항체 및 DAPI 대비 염색체를 시각화에 이용하였다.

그 결과, 도 6에서 나타난 바와 같이, CMT 2F-iPSC는 핵에서 발현되는
NANOG 단백질 및 세포막(plasma membrane)에서 발현되는 SSEA4 단백질 모두를
유의적으로 발현하는 것을 확인하였다(도 6).

10 <2-4> CMT 2F-iPSC로부터 배상체 및 세포조직 분화 유도 확인

시험관 내(in vitro)에서 CMT 2F-iPSC의 전분화능(pluripotency)를
확인하기 위하여, CMT 2F-iPSC로부터 배상체(EB)를 형성하도록 분화를 유도한
후, 외배엽(ectoderm), 중배엽(mesoderm) 및 내배엽(endoderm) 기원의
세포조직으로 분화를 유도하였다.

15 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 발생 유도한 CMT 2F-iPSC 또는 정상
대조군 WA09_hESC의 세포집락을 바닥에 세포가 잘 붙지 않는
배양용기(uncoated Petri dish)로 옮겨 ESC/iPSC 배지(KnockOut™, Gibco 사,
미국)를 이틀에 한 번씩 교체하면서 8 일 동안 배양하여 떠서 자라는 세포를
배상체(embryoid body; EB)로서 수득하였다. 수득한 배상체를 젤라틴이 코팅된
20 슬라이드 배양용기(chamber slide, Lab-Tek)로 옮겨, 10% FBS/DMEM 배지에서
추가로 8 일 동안 배양하여 외배엽, 중배엽 및 내배엽 기원의 세포조직으로
분화를 유도하였다.

또한, 상기 분화된 세포는 상기 실시예 <2-3>과 동일한 방법으로
면역세포염색법을 수행하였다. 일차 항체로는 항-알파 페토프로틴
25 항체(anti-alpha fetoprotein Ab, anti-AFP Ab, 마우스 IgG2b, 1:100 희석; 2A9,
Abcam 사, 미국), 항-알파 평활근 액틴 항체(anti-alpha smooth muscle actin Ab,
마우스 IgG2a, 1:100 희석; 1A4, Abcam 사, 미국) 및 항-네스틴
항체(anti-Nestin Ab, 마우스 IgG1, 1:1000 희석; 10C2, Abcam 사, 미국)을

사용하였으며, 이차 항체로는 FITC가 결합된 염소 유래 항-마우스 IgG 항체를 사용하여 반응시킨 후 DAPI 대비 염색체가 포함된 용액으로 마운트 하여 공초점 현미경으로 분석하였다.

5 그 결과, 도 7에서 나타난 바와 같이, CMT 환자 유래의 iPSC로부터 분화된 배상체를 획득하였으며, 상기 배상체는 알파-페토프로테인(α -fetoprotein; AFP)(내배엽(endoderm)), 평활근액틴(smooth muscle actin; SMA)(중배엽(mesoderm)) 및 네스틴(Nestin)(외배엽(Ectoderm))이 정상군 및 CMT 환자군 세포 모두 이상 없이 분화되었음을 확인하였다(도 7).

10

<2-5> 생체 내(In vivo)에서 CMT 2F-iPSC의 분화능 확인

생체 내에서 CMT 2F-iPSC의 분화능을 확인하기 위하여, 면역 손상된 마우스 내에서 CMT 2F-iPSC의 기형종(teratoma) 형성을 확인하였다.

구체적으로, 상기 <실시에 2>과 동일한 방법을 수행하여 발생을 유도한
15 CMT 2F-iPSC(S135F 및 P182L) 또는 정상 대조군 WA09_hESC를 작은 세포집합군으로 분리(detach)한 후, 1.0×10^6 세포로 계수(counting)하여 매트릭셀(matrigel)과 1:1(v:v)의 비율로 혼합하였다. 상기 혼합한 매트릭셀-세포 혼합물을, 5 주령의 암컷 면역결핍 마우스(NOD/SCID mouse)의 등쪽에 피하로 주입한 후, 이종이식(xenograft)한 마우스를 8 주 동안
20 사육하였다. 그런 다음, 사육한 마우스를 희생하여, 형성된 기형종을 외식(explante)하여 10% Natural buffered formaldehyde(10% NBF)에 하룻밤 고정된 뒤 파라핀 블록을 만들었으며, 0.4 μ m 두께로 잘라 헤마톡실린 & 에오신(Hematoxylin and Eosin, H&E)염색을 하여 관찰하였다.

그 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이 마우스의 생체 내에 주입된 CMT
25 2F-iPSC는 유의적으로 기형종을 형성하였으며 조직학적으로도 내배엽, 중배엽, 외배엽 기원 조직으로 분화한 것을 확인하여, CMT 환자 유래의 iPSC가 생체 내에서도 다분화능을 나타내는 것을 확인하였다(도 8).

<실시에 3> CMT 환자 유래 운동 뉴런(motor neurons)의 분화 유도 및 효율 확인

<3-1> CMT 2F-iPSC로부터 운동 뉴런으로 분화 유도

CMT 2F-iPSC를 말초신경병증(peripheral neuropathy)의 모델로 사용하기 위하여, 도 2에 기재된 바와 같이 공지된 방법에 따라 CMT 2F-iPSC로부터 운동 뉴런으로 분화하였다(Amoroso MW, et al, J Neurosci 2013; 33: 574-586)(도 2).

구체적으로, 상기 <실시에 2>과 동일한 방법을 수행하여 발생을 유도한 CMT 2F-iPSC(S135F 및 P182L) 또는 정상 대조군 WA09_hESC를 작은 무리(clump)로 분리하여, 기본 배지(basal medium)를 ESC/iPSCs 배지로 사용하고, Rho-연관 키나아제(Rho-associated kinase) 억제제인 10 μ M Y27632(Tocris Bioscience 사, 영국), 20 ng/ml bFGF (Invitrogen 사, 미국), 10 μ M SB435142 (Stemgent 사, 미국), 0.2 μ M LDN193189 (Stemgent 사, 미국) 및 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)을 첨가한 페트리 디쉬에서 2 일 동안 부유 배양하여 배상체 (embryoid body)를 형성하였다.

배양 개시 3일 후에 기본 배지를 Neural stem cell media (Stemline; Sigma사, 미국)로 바꾸어 준 뒤 2 μ g/ml heparin (Sigma 사, 미국)과 N2 supplement (Gibco사, 미국)을 첨가하여 신경화 (neuralization)을 유도하였으며, 1 μ M 레티노산(retinoic acid; Sigma 사, 미국), 0.4 μ g/ml 아스코르브산(ascorbic acid; Sigma 사, 미국) 및 10 ng/ml BDNF(R&D 사, 미국)을 상기 ESC/iPSCs 배지에 첨가하여 꼬리쪽화(caudalization)를 통해 신경구(Neurosphere)를 획득하였다.

그런 다음, 배양 개시 7 일 후에, 10 μ M SB435142 및 0.2 μ M LDN193189의 첨가를 중지하였고, 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, shh)의 작용제(agonist)인 퍼모프아민(purmorphamine; Stemgent 사, 미국)을 첨가하여 배양하면서 등쪽화(ventralization)를 수행하였다.

배양 개시 17 일 후에, 기본 배지를 뉴로바잘(Neurobasal; Invitrogen 사, 미국)으로 변경하고, 상기 첨가한 모든 인자를 유지하면서 10 ng/ml IGF-1, 10 ng/ml GDNF, 10 ng/ml CNTF (R&D사, 미국) 및 B27 supplement(Gibco사, 미국)을

추가로 첨가하여 신경구를 운동 뉴런 세포로 분화되도록 배양하였다. 세포는 부유 배양상태로 유지하여 배양하였으며, 배양 개시 20 또는 30일 후에 배양된 세포를 어큐테이즈(acutase, PAA Laboratories)로 처리하여 세포를 흩어지게 한 후, 폴리-L-라이신/라미닌(poly-L-lysine/laminin)이 코팅된 배양용기 또는
5 슬라이드 챔버(slide chamber; Nalgene Nunc 사, 미국)에 두어, CMT-2F iPSC 또는 WA09_hESC로부터 분화된 운동뉴런(CMT-2F-MN 또는 WA09_MN)을 수득하였다.

<3-2> CMT 2F-MN의 운동 마커 단백질 발현 확인

CMT 2F 환자로부터 분화된 운동 뉴런이 분화된 효율을 확인하기 위해,
10 운동 뉴런의 마커 단백질 발현 및 신경근육 이음부(neuromuscular junction) 형성을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <3-1>에서 수득한 CMT-2F-MN 또는 WA09_MN은 상기 실시예 <2-3>과 동일한 방법으로 면역세포염색법을 수행하여 운동 뉴런 마커 단백질의 발현을 확인하였다. 사용한 일차 항체는 항-HB9 항체 (마우스
15 IgG1, 1:100 희석; 81.5C10, DSHB 사, USA), 항-Islet-1/2 항체(마우스 IgG2b, 1:50 희석; 39.4DS, DSHB 사, USA), 항-H-비 인산화된 신경섬유(neurofilament H non-phosphorylated)인 항-SMI32 항체(마우스 IgG1, 1:500 희석; Covance 사, 미국), 항-뉴런 특이적 베타III 튜블린(Tuj1)항체(토끼 IgG, 1:1000 희석; Abcam 사, 미국), 항-미세튜브-연관 단백질 2(anti-microtubule-associated protein 2,
20 anti-MAP2) 항체 (토끼 IgG, 1:200 희석; Millipore 사, 미국), 항-시냅신(synapsin) 항체(토끼 IgG, 1:100; Abcam 사, 미국), 항-콜린 아세틸트랜스퍼라제(anti-choline acetyltransferase, anti-ChAT) 항체 (토끼 IgG, 1:1000 희석; Abcam 사, 미국)를 사용하였고, 이차 항체로는 FITC-결합된 거위 항-마우스 IgG 및 Cy3-결합된 염소 항-토끼 IgG 및 Cy3-결합된 염소
25 항-마우스 IgG 항체를 사용하였으며, DAPI 대비 염색체를 시각화에 이용하였다. 운동 뉴런의 발달정도는 면역세포염색된 SMI32/DAPI 또는 MAP2/DAPI 양성 세포의 백분율을 구하고, 축삭 돌기의 길이를 측정하여 비교하였다.

그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군 및 CMT 2F-iPSC로부터

분화된 운동 뉴런 세포는 운동 뉴런 마커 단백질인 HB9, ISL1, SMI32, Tuj1, MAP2 Synapsin 및 ChAT를 유의적으로 발현하는 것으로 확인하였으며(도 9a), 분화된 CMT 2F-MN는 정상 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않아, 발달적인 결함을 나타내지 않는 것을 확인하였다(도 9b 및 도 9c).

5

<3-3> CMT 2F-MN의 신경근육 이음부(neuromuscular junction) 형성 확인

CMT 2F 환자로부터 분화된 운동 뉴런이 분화된 효율을 확인하기 위해, 운동 뉴런의 신경근육 이음부(neuromuscular junction) 형성을 확인하였다.

구체적으로, C2C12 마우스 근원세포(myoblast)(CRL-1772, ATCC 구입)를
 10 10% FBS, 1 mM 글루타민(glutamin) 및 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 DMEM
 배지에서 배양하였다. 배양한 세포가 70%의 컨플루언스(confluence)가 되면,
 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium, ITS)
 첨가제(Sigma 사, 미국)을 배지에 첨가하여 근관세포(myotube)로 분화를
 유도하였다. 2 일간 배양한 후, 분열된 세포(dividing cell)를 제거하기 위해
 15 10 μ M 시토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside)를 첨가하여, 2 내지 4 일간
 배양하였다. 그런 다음, 분화된 근관세포는 트립신으로 수득하여
 매트릭셀-코팅된 8 웰 슬라이드 챔버에 1.0×10^4 세포/웰의 낮은 밀도로 세포를
 접종하였다. 1 또는 2 일 후에, 상기 실시예 <3-1>에서 수득한 CMT-2F-MN 또는
 WA09_MN를 상기 접종한 근관세포와 10:1의 비율로 공동-배양(co-culture)하고,
 20 MN 분화 배지를 첨가하였다. 1 주일 후, 상기 공동-배양한 운동 뉴런 및
 근관세포를 알렉사 488-결합된 α -벵가로독소(α -bungarotoxin, α -BTX;
 Invitrogen 사, 미국)로 염색하여 형성된 신경근육 이음부의 형성을
 확인하였다.

그 결과, 도 10에서 나타난 바와 같이 근관세포와 함께 공동-배양된
 25 CMT-2F-MN는 신경근육 이음부를 정상적으로 형성하는 것을 확인하였다(도 10).

<실시예 4> CMT 유래의 운동 뉴런에 대한 히스톤 디아세틸라제 6(Histon
 deacetylase 6, HDAC6) 억제제의 축삭 운송(axonal transport) 회복 효과 확인

<4-1> CMT 2F-MN α -튜블린(α -tubulin)의 아세틸화(acetylation) 확인

CMT 환자 유래의 iPSC로부터 분화된 신경세포를 CMT에 대한 약물의 효용성 평가 모델로 사용하기 위하여, 히스톤 디아세틸라제 6(Histon deacetylase 6, HDAC6) 억제제인 투바스타틴 A(tubastatin A)의 처리 유무에
 5 따른 축삭 운송(axonal transport) 회복 효과를 확인하고자 하였다. CMT 2 아형(subtype)은 원인 유전자에 있어서 이질성(heterogeneity)을 가짐에도 불구하고 많은 환자에서 축삭 운송 시스템 기능의 장애를 나타내며(Gentil BJ and Cooper L, Brain Res Bull 2012; 88: 444-453), 운송체와 운동 단백질의 상호작용에 관련이 있는 것으로 보고되어 있는(Westermann S and Weber K. Nat
 10 Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 938-947) α -튜블린의 아세틸화 수준을 통해 CMT 2F-MN의 운동 뉴런의 축삭 운송 효율을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <3-1>의 방법으로 분화 유도한 CMT-2F-MN 또는 WA09_MN를 수득한 후, 5 μ M 투바스타틴 A을 배지에 처리하여 12 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <2-3>과 동일한 방법으로 α -튜블린 및
 15 아세틸화된 α -튜블린을 면역세포염색하였다. 1차 항체로는 항- α -튜블린 항체(토끼 IgG, 1:500 희석; Abcam 사, 미국) 및 항-아세틸화된 α -튜블린 항체(마우스 IgG, 1:200 희석; Abcam 사, 미국)를 사용하였고, 2차 항체로 Alexa 488-결합된 염소 항-토끼 IgG 및 Cy3-결합된 염소 항-마우스 IgG 항체를 사용하였다.

20 또한, 5 μ M 투바스타틴 A을 처리한 CMT-2F-MN 또는 WA09_MN는 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% 소듐 디옥시콜레이트(sodium deoxycholate), 0.1% 소듐 도데실설페이트(sodium dodecylsulfate) 및 50 mM 트리스(Tris)를 포함하는 RIPA 용해 완충용액(RIPA lysis buffer, pH 8.0)에 현탁하여 세포의 단백질을 포함하는 상층액을 수득하고, 12% SDS-PAGE gel에서 분리한 다음, PVDF 막으로
 25 이동하였다. 그런 다음, 상기 막에 항체로 항-아세틸화된 α -튜블린 항체(마우스 IgG2b, 1:1000 희석; 6-11B-1, Abcam 사) 및 항- α -튜블린 항체(토끼, 마우스 IgG1, 1:1000 희석; DM1A, Sigma 사, 미국)를 사용하여 면역블롯(immunoblotting)을 수행한 다음, UN-SCAN-IT 겔 소프트웨어(Silk

Scientific 사, 미국)을 사용하여 밴드 밀도를 분석하여 α -튜블린의 아세틸화 수준을 확인하였다. 음성 대조군으로, 5 μ M 투바스타틴 A을 처리하지 않은 CMT-2F-MN 또는 WA09_MN을 사용하여 상기와 동일한 방법으로 면역세포염색 및 면역블롯을 수행하였다.

- 5 그 결과, 도 11에서 나타난 바와 같이 투바스타틴 A을 처리하지 않았을 때 CMT 2F-MN는 정상 대조군인 WA09_MN에 비해 α -튜블린의 아세틸화 수준이 감소하는 것을 확인한 반면, 5 μ M 투바스타틴 A를 처리하였을 때에는 CMT 2F-MN α -튜블린의 아세틸화 수준이 증가하여 정상 대조군과 유사한 수준으로 회복되는 것을 확인하였다(도 11a, 도 11b 및 도 11c).

10

<4-2> CMT 2F-MN α -튜블린의 미토콘드리아 운송량(moving mitochondria)

확인

- CMT 환자 유래의 iPSC로부터 분화된 신경세포를 CMT에 대한 약물의 효용성 평가 모델로 사용하기 위하여, 도 13에서 나타난 미소유체 배양(Microfluidic culture)을 통해 마이크로HDAC6 억제제인 투바스타틴 A의 처리 유무에 따른 미토콘드리아 운송량(moving mitochondria)을 분석하여 CMT 2F-MN의 운동 뉴런의 축삭 운송 효율을 확인하였다(도 13)

- 구체적으로, 상기 실시예 <3-1>에서 수득한 CMT-2F-MN 또는 WA09_MN를 어큐테이즈를 사용하여 단일 세포로 분리한 후, 미세채널 플레이트(microchannel plates; 목 교수 제공, 서울대학교, 한국; Park JW et al., Nat Protoc 2006; 1: 2128-2136)에 1.0×10^5 세포/플레이트의 밀도로 접종하여, 10 일 동안 뉴로바잘 및 B27 배지에서 배양하였다. 축삭 돌기(axons)가 마이크로-크기의 홈(micrometer-sized groove)을 통해 완벽하게 자라고 반대편 칸(opposite compartment)으로 뻗은 후, 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000; Invitrogen 사, 미국)을 사용하여 미토-dsRED2(mito-dsRED2)를 상기 가공된 운동 뉴런에 형질전환하였다. 형질전환 2 일 내에, 5 또는 10 μ M 투바스타틴 A을 배지에 처리하여 6 시간 동안 배양한 다음, 121 스냅/ 2 분의 속도로 형광현미경을 사용해 미토콘드리아 영상을 촬영하고, ImageJ 및

카이머그래프(Kymograph)를 사용하여 상기 운동 뉴런의 운동 속도(moving velocity)를 측정하였다.

그 결과, 도 12, 하기 [표 3] 및 하기 [표 4]에서 나타난 바와 같이 CMT-2F-MN 또는 WA09_MN에 형질전환된 mito-RED2를 통해 운동 뉴런의 축삭 미토콘드리아를 관찰하였으며, 투바스타틴 A을 처리하지 않았을 때 CMT 2F-MN의 미토콘드리아 이동 속도는 S135F 변이를 나타내는 CMT 2F-MN의 축삭에서 유의적으로 감소하고, P182L 변이를 나타내는 CMT 2F-MN에서는 미토콘드리아 이동의 백분율이 감소하는 것을 확인하였다(도 12a, 도 12b 및 도 12c). 이에 반해, 투바스타틴 A를 처리하였을 때에는 S135F-MNs 및 P182L-MNs 모두에서 미토콘드리아의 이동 속도 및 이동 횟수가 현저히 증가하여, 정상 수준으로 회복되는 것을 확인하였다(도 12b 및 도 12c).

【표 3】

투바스타틴 A의 처리 유무에 따른 미토콘드리아의 이동 속도 비교

식별번호	미토콘드리아 이동 속도($\mu\text{m}/\text{초}$)	
	투바스타틴 A 무처리	5 μM 투바스타틴 A
WA09_hESC-MN	0.2389 \pm 0.013310	0.2446 \pm 0.038590
HSP27 S135F-MN	0.1427 \pm 0.009589	0.2498 \pm 0.023570
HSP27 P182L-MN	0.2244 \pm 0.009310	0.2599 \pm 0.051860

【표 4】

투바스타틴 A의 처리 유무에 따른 미토콘드리아의 이동 정도 비교

식별번호	이동 정도(%) ^a	
	투바스타틴 A 무처리	10 μM 투바스타틴 A
WA09_hESC-MN	31.39 \pm 3.741	39.31 \pm 3.831
HSP27 S135F-MN	22.14 \pm 6.410	-
HSP27 P182L-MN	14.64 \pm 2.136	44.61 \pm 10.450

^a 이동 정도는 전체 미토콘드리아 수에 대한 이동하는 미토콘드리아 수의 백분율로 나타낸다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

1) 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT) 환자로부터 인간 체세포를 수득하는 단계;

5 2) 상기 단계 1)의 CMT 환자 유래 인간 체세포에 OCT4, SOX2, KLF4 및 c-MYC의 트랜스유전자가 삽입된 벡터를 형질전환시키고 배양하여 역분화 유도만능 줄기세포를 유도하는 단계; 및

 3) 상기 단계 3)의 역분화 유도만능 줄기세포에 레티논산(retinoic acid) 및 소닉 헤지호그(sonic hedgehog)의 존재하에 배양하여 운동신경세포를
10 유도하는 단계를 포함하는 CMT 환자 유래 체세포에서 운동신경세포의 제조방법.

【청구항 2】

15 1) 샤르코-마리-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT) 환자로부터 인간 체세포를 수득하는 단계;

 2) 상기 단계 1)의 CMT 환자 유래 인간 체세포에 OCT4, SOX2, KLF4 및 c-MYC의 트랜스유전자가 삽입된 벡터를 형질전환시키고 배양하여 역분화 유도만능 줄기세포를 유도하는 단계;

 3) 상기 단계 3)의 역분화 유도만능 줄기세포에 레티논산(retinoic acid)
20 및 소닉 헤지호그(sonic hedgehog)의 존재하에 배양하여 운동신경세포를 유도하는 단계; 및

 4) 상기 단계 3)의 운동신경세포를 뉴트로핀(neurotrophin)의 존재하에 연장 배양하는 단계를 포함하는 CMT 환자 유래 체세포에서 운동신경세포의 제조방법.

25

【청구항 3】

 제 2항에 있어서, 상기 단계 4)의 뉴트로핀(neurotrophin)은 신경성장인자(nerve growth factor; NGF), 뇌-유래 신경인자(brain-derived

neurotrophic factor; BDNF), 뉴트로핀-3(neurotrophin-3; NT-3) 및 글리아세포-유래 신경인자(Glial cell-derived neurotrophic factor; GDNF)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

5 **【청구항 4】**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 샤르코-마리-투스 질환은 CMT 1형, CMT 2형, CMT 4형 또는 CMTX형인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

10 제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 단계 1)의 인간 체세포는 섬유아세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

15 제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 단계 2)의 벡터는 센다이바이러스, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

20 제 4항에 있어서, 상기 CMT 2F형은 열활성단백질(heat-shock protein; HSPs)27 단백질의 135번째 또는 182번째 아미노산이 돌연변이 된 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 단계 3)은

25 (3-1) 상기 제조된 역분화 유도만능 줄기세포를 배양하여 배상체(Embryoid Body; EB)를 얻고 이를 신경구(Neurosphere)로 분화하는 단계; 및

(3-2) 상기 신경구를 운동신경세포로 분화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

1) 제 1항 또는 제 2항의 방법으로 제조된 운동신경세포에 시험관 내(in vitro)에서 CMT 치료제 후보 물질을 처리하는 단계;

5 2) 상기 단계 1)의 CMT 치료제 후보 물질이 처리된 세포에서 CMT 지표의 수준을 측정하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 CMT 지표의 수준을 대조군과 비교하여 증가 또는 감소시킨 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 CMT 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

10

【청구항 10】

제 9항에 있어서, 상기 샤르코-마리-투스 질환은 CMT 1형, CMT 2형, CMT 4형 및 CMTX형인 것을 특징으로 하는 CMT 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

15

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 상기 CMT 2F형은 열활성단백질(heat-shock protein; HSPs)27 단백질의 135번째 또는 182번째 아미노산이 돌연변이 된 것을 특징으로 하는 CMT 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

20

【청구항 12】

제 9항에 있어서, 상기 CMT 지표는 축삭 운송(axonal transport) 지표인 아세틸화된 알파-튜불린(acetylated α -tubulin) 또는 미토콘드리아 운송량(moving mitochondria) 중 어느 하나 또는 둘 다인 것을 특징으로 하는
25 CMT 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 13】

제 9항에 있어서, 상기 단계 3)의 축삭 운송 지표인 아세틸화된

알파-튜블린 및 미토콘드리아 운송량의 CMT 지표의 수준을 증가시키는 후보물질을 선별하는 단계인 것을 특징으로 하는 CMT 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

5 【청구항 14】

제 9항에 있어서, 상기 단계 2)의 CMT 지표의 수준 측정은 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학(IHC), 웨스턴 블롯(western blot), 유세포분석법(FACS) 또는 전세포패치클램프분석법(whole cell patch clamp assay)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는
10 것을 특징으로 하는 CMT 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 15】

1) 제 1항 또는 제 2항의 방법으로 제조된 운동신경세포에 시험관 내(in vitro)에서 CMT 치료제를 처리하는 단계;

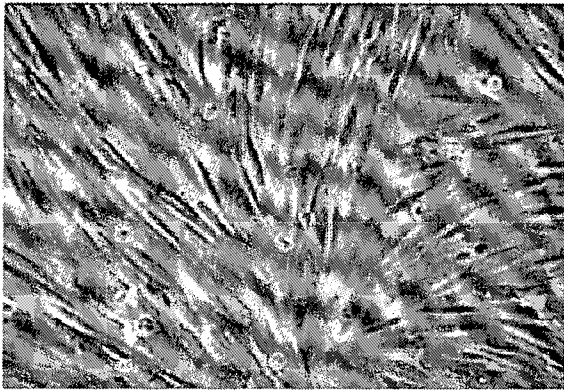
15 2) 상기 단계 1)의 CMT 치료제가 처리된 세포에서 CMT 지표의 수준을 측정하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 CMT 지표의 수준을 대조군과 비교하여 증가 또는 감소시킨 CMT 치료제를 선별하는 단계를 포함하는 CMT 환자 치료를 위한 맞춤형 치료제 스크리닝 방법.

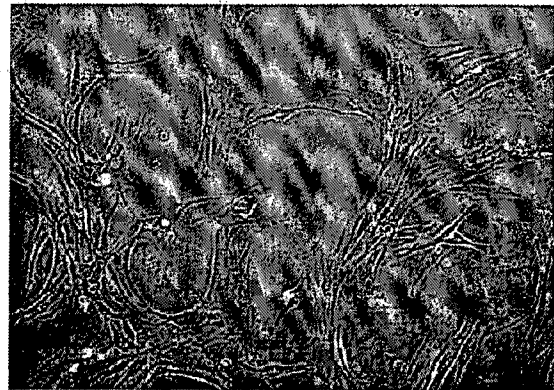
1/12

[도 1]

대조군 인간 섬유아세포

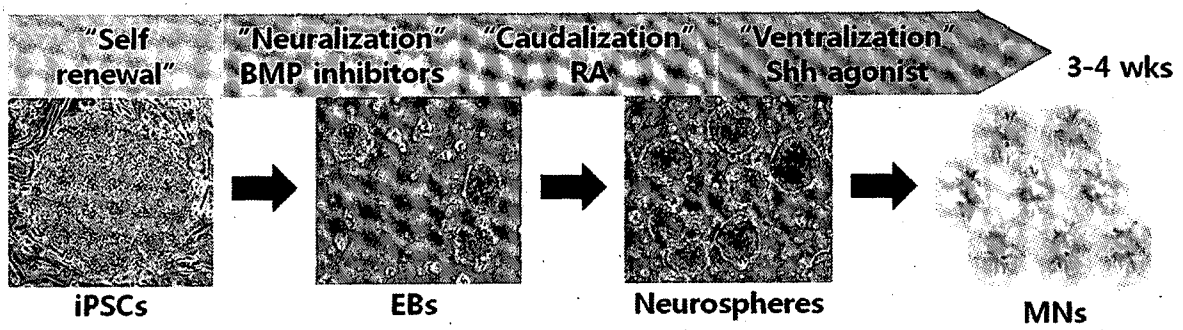


CMT 환자 유래 섬유아세포



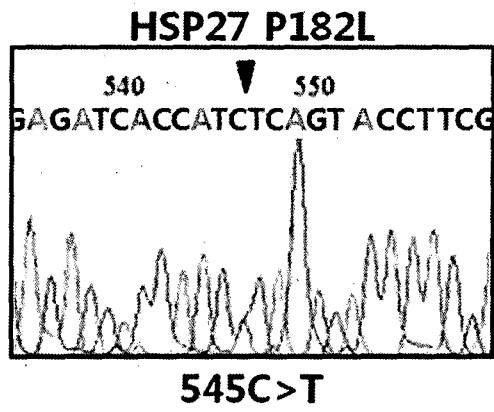
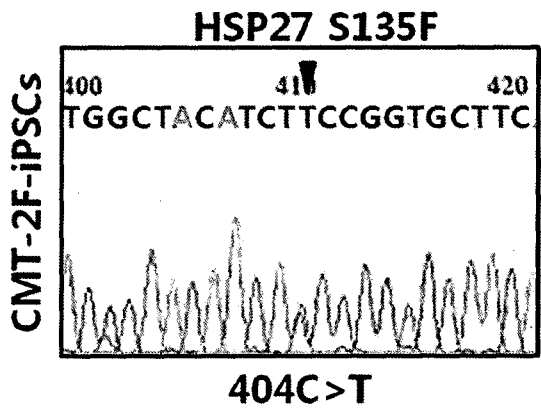
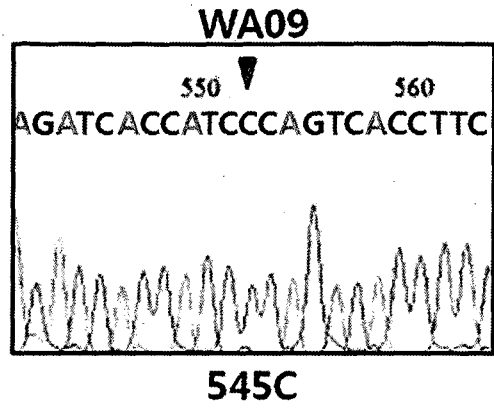
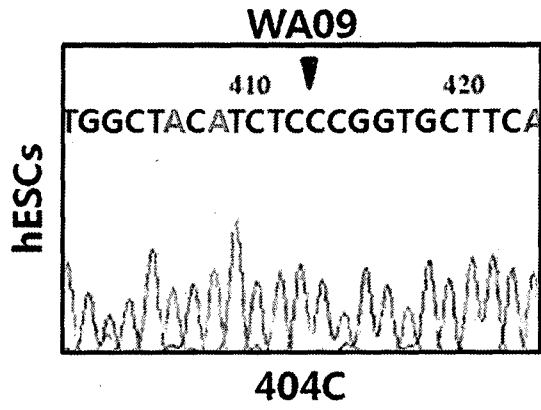
2/12

[도 2]



3/12

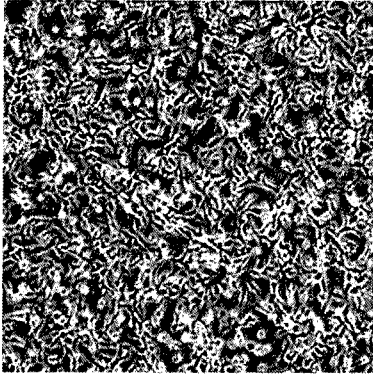
[도 3]



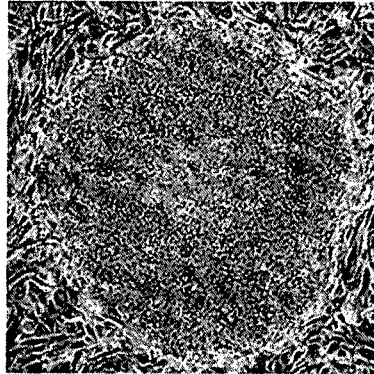
4/12

[도 4]

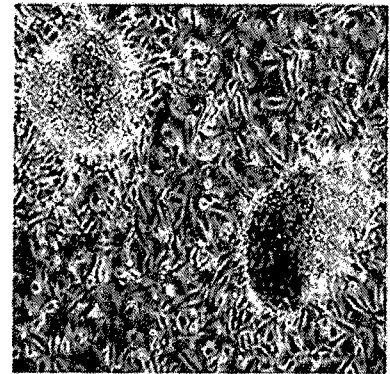
SNL feeder



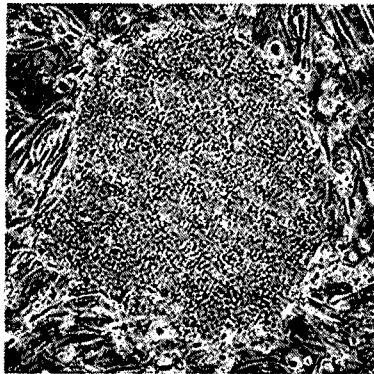
WA09_hESC



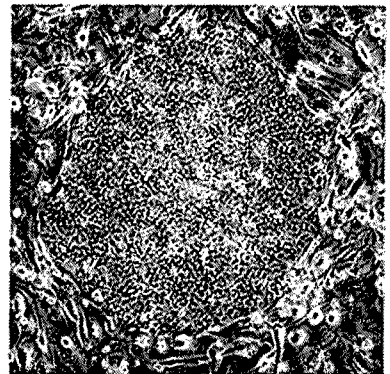
Normal iPSCs



HSP27 S135F

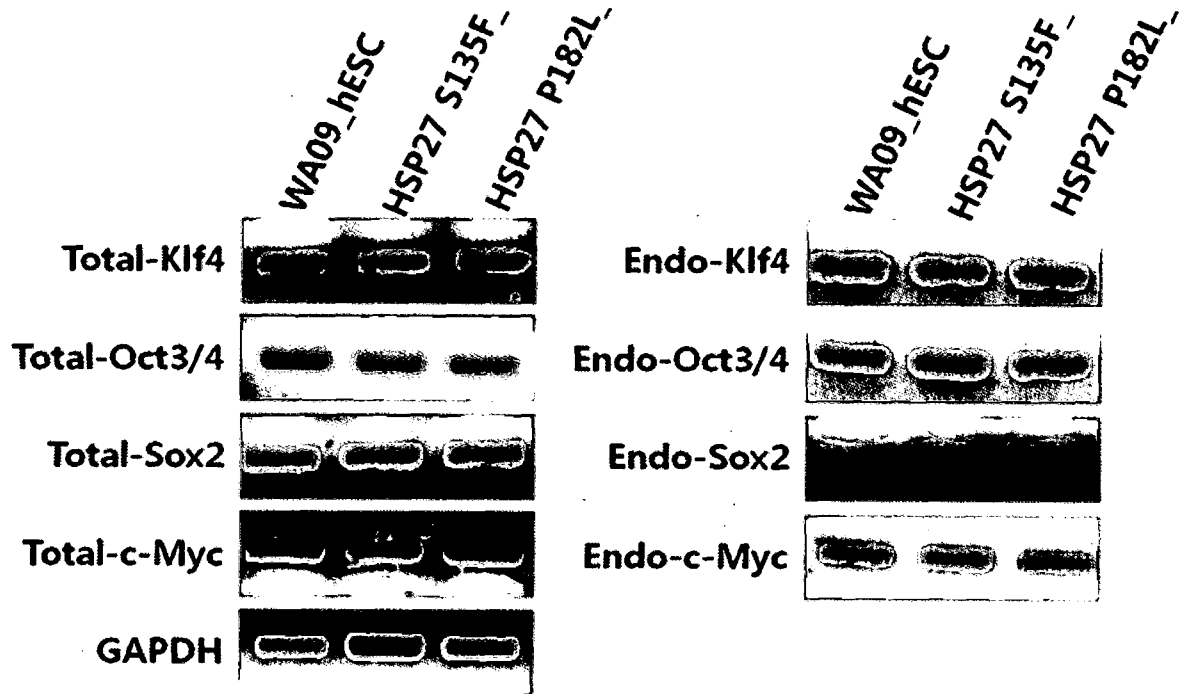


HSP27 P182L



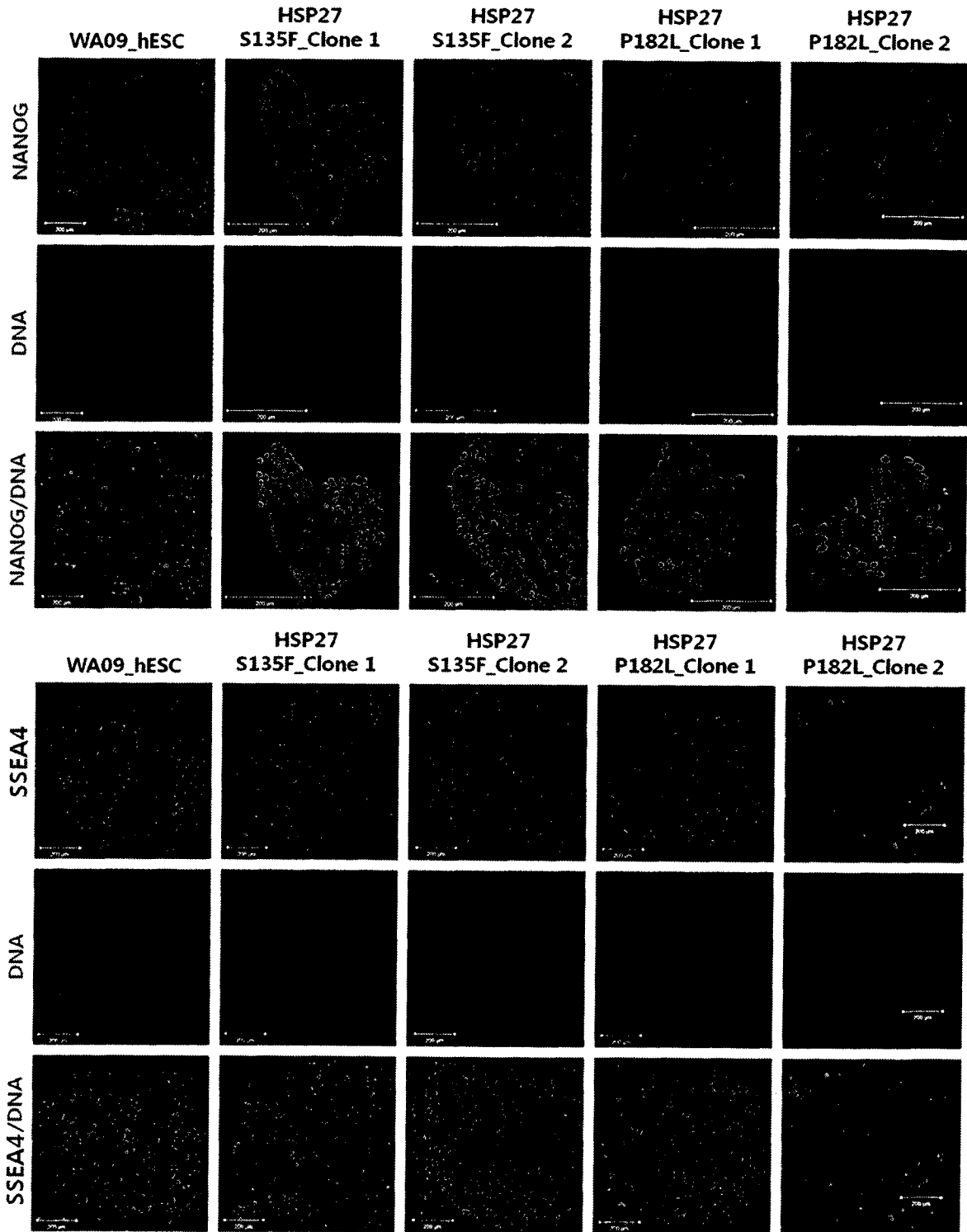
5/12

[표 5]



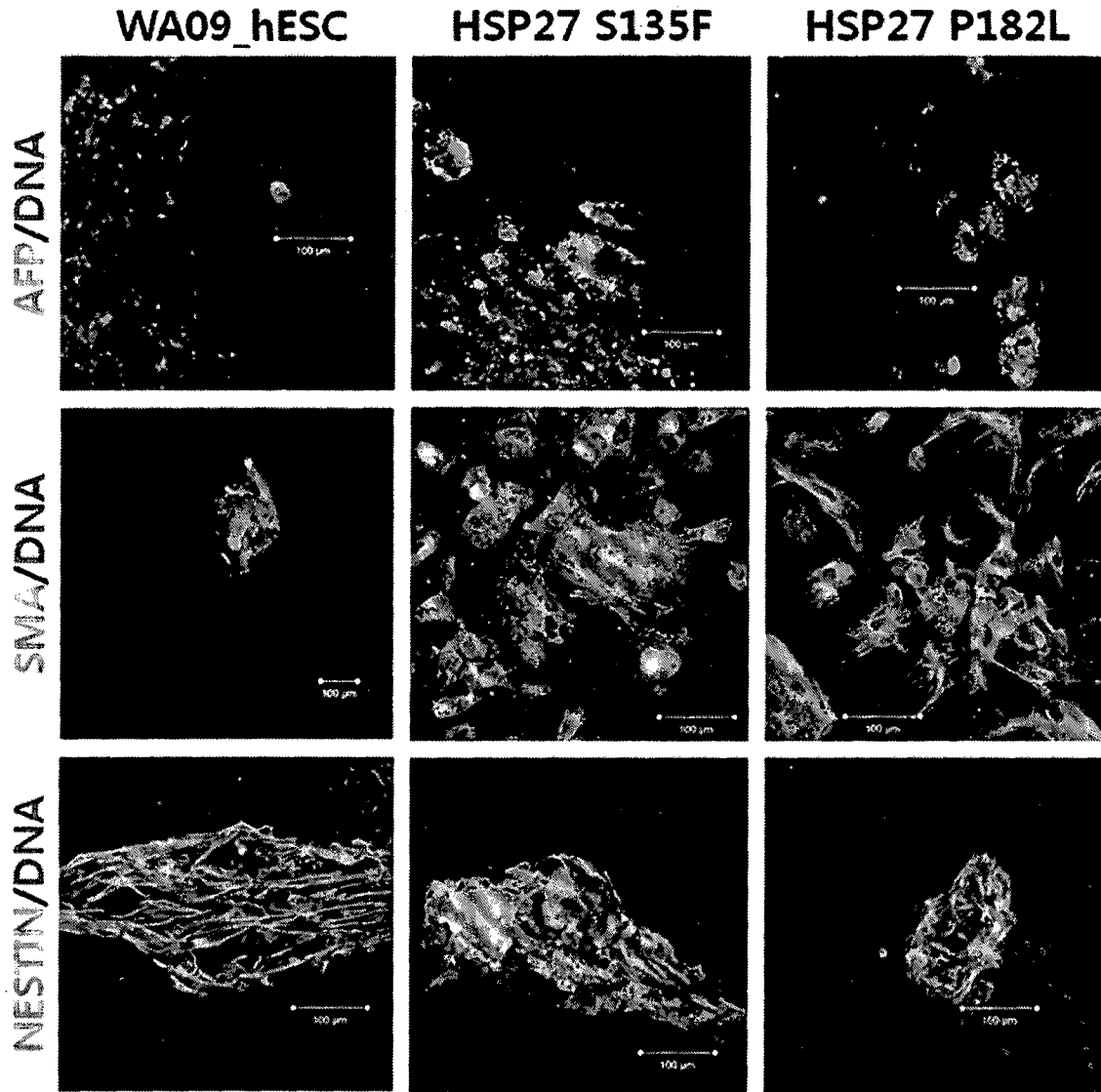
6/12

[도 6]



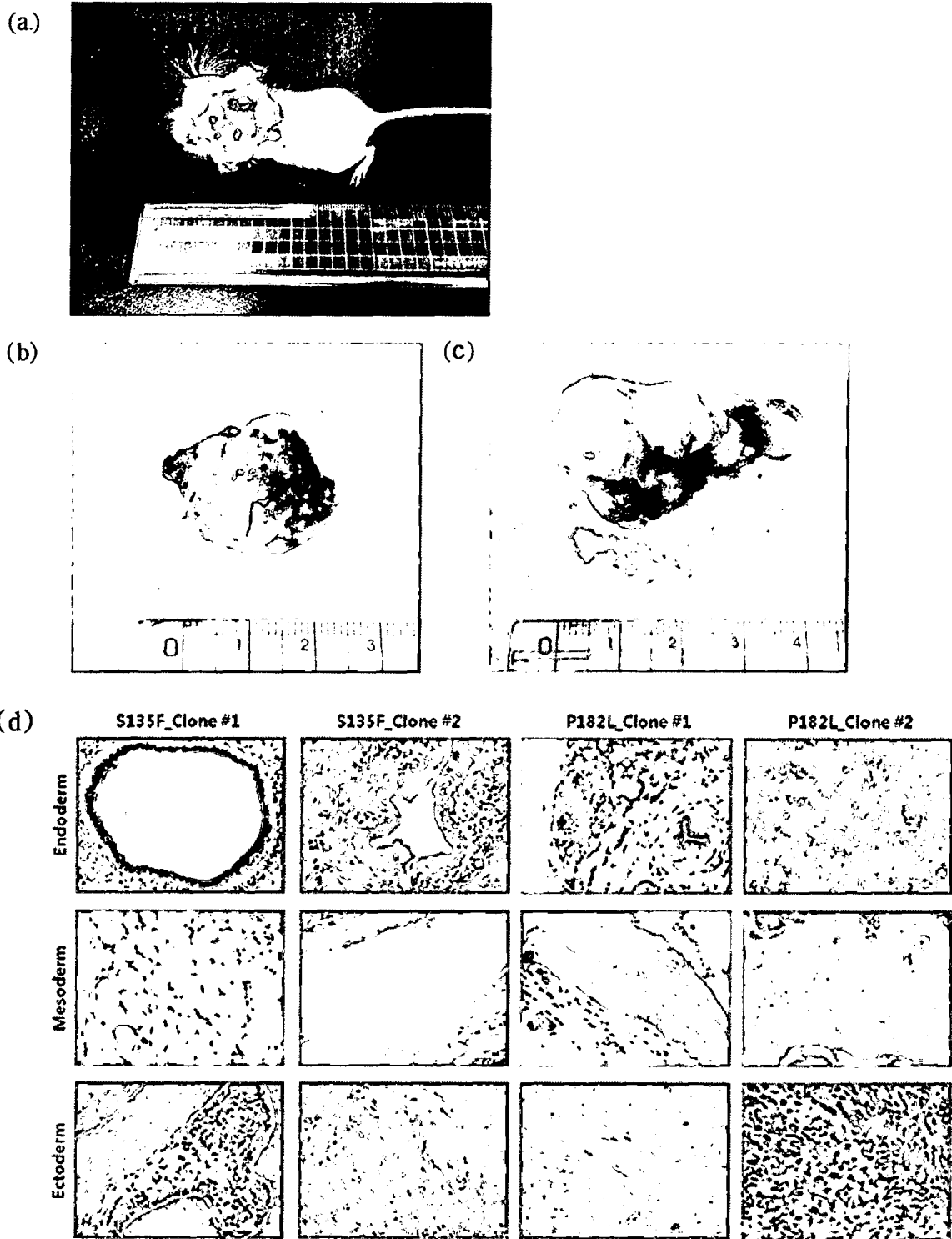
7/12

[도 7]



8/12

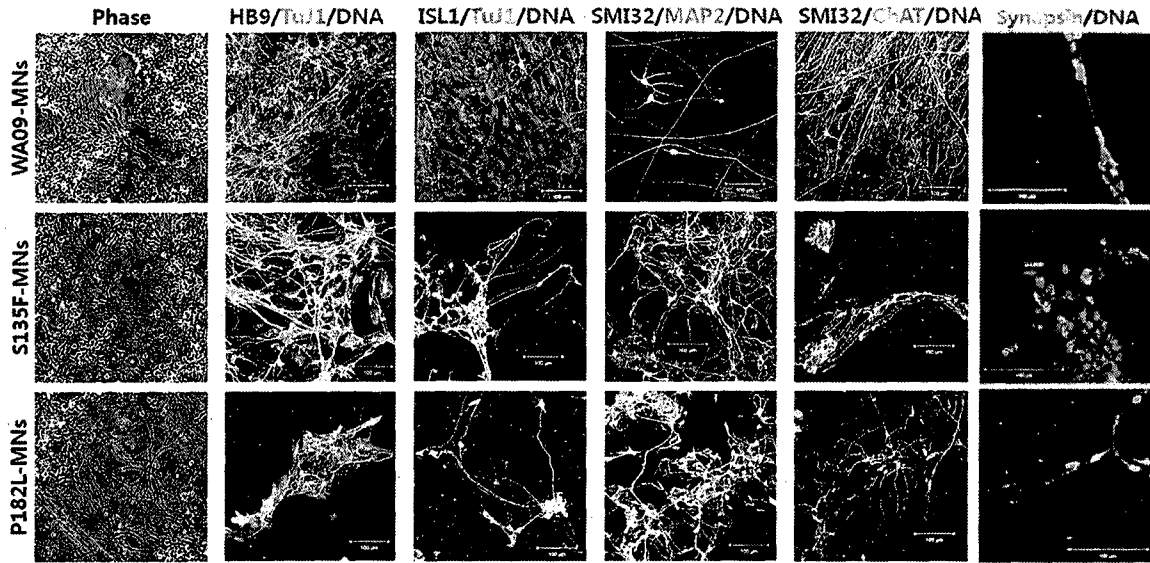
[도 8]



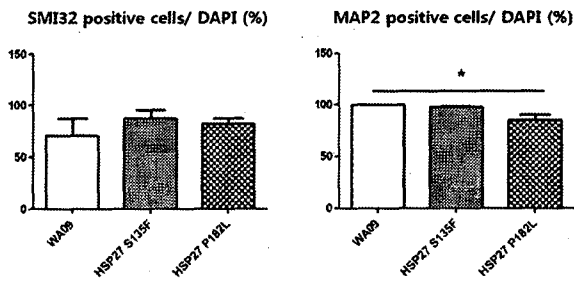
9/12

[도 9]

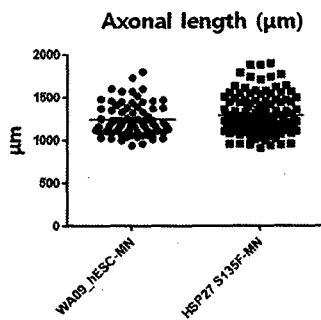
(A)



(B)



(C)



10/12

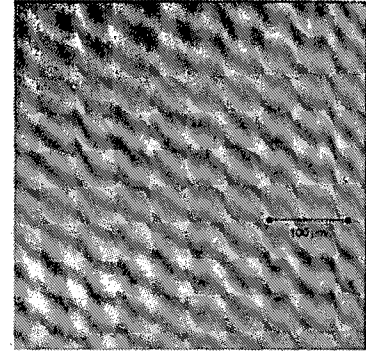
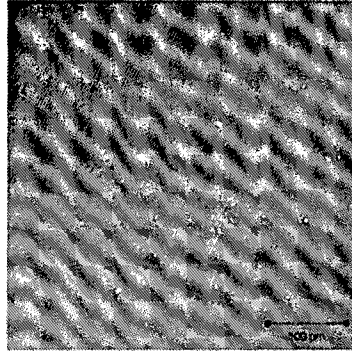
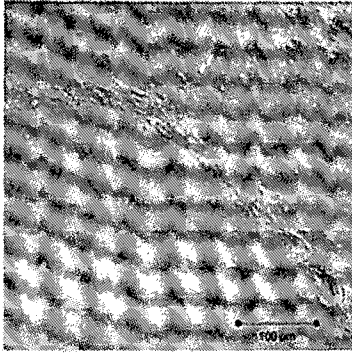
[$\bar{1}0$ 10]

WA09-MNs

S135F-MNs

P182L-MNs

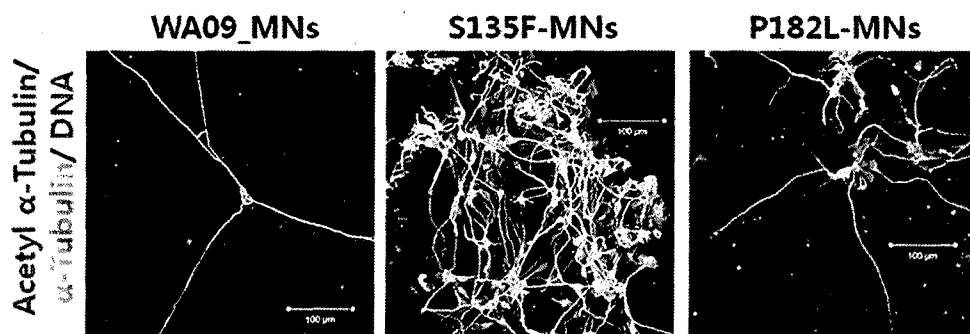
α -BTX/DIC



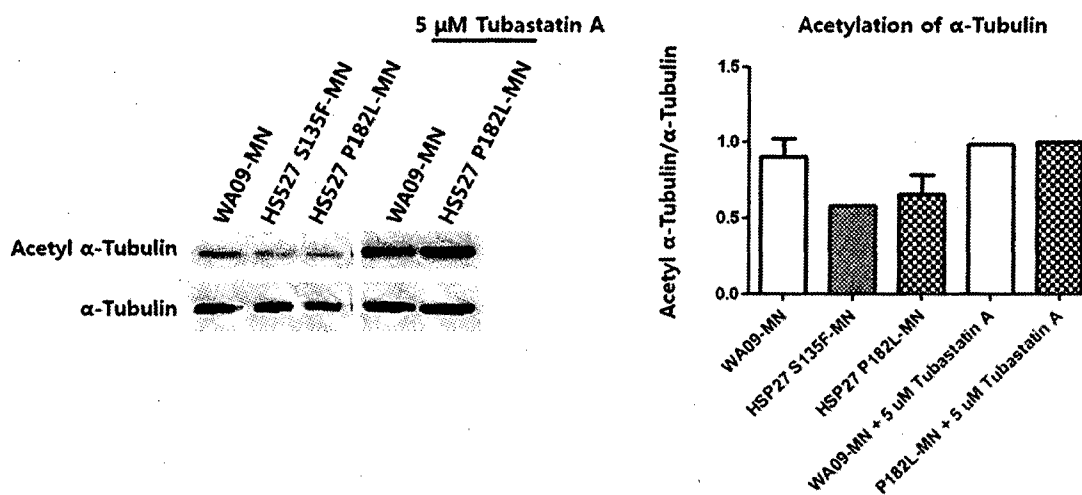
11/12

[도 11]

(a)



(b)



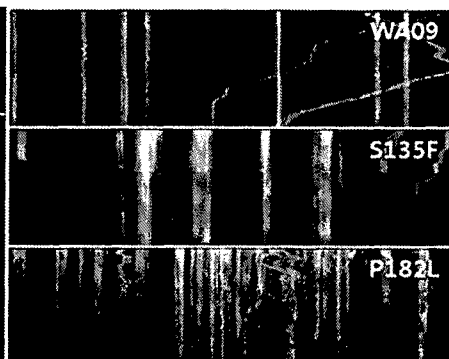
12/12

[도 12]

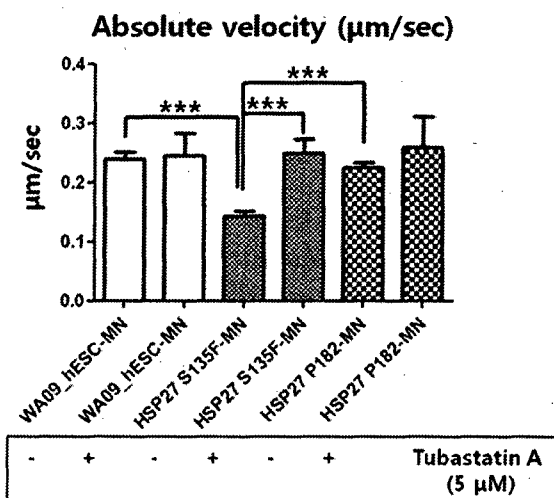
(a)



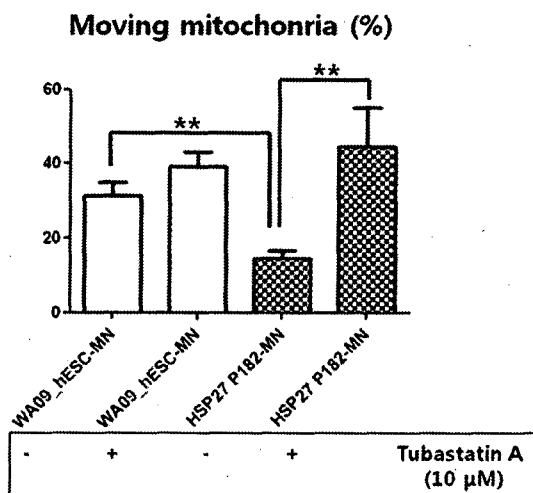
(b)



(c)



(d)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/002794

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i, C12N 5/079(2010.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/15(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 5/10; A61K 31/422; A61K 31/192; A61K 31/437; A61K 31/197; C12N 5/079; C12Q 1/68; G01N 33/15

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: Charcot-Marie-Tooth, induced pluripotent stem cell, retinoic acid, sonic hedgehog, neurotrophin, CMT 2F, 135, 182, mutation, axonal transport, acetylated α -tubulin, moving mitochondria

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAPORTA, MARIO et al., "Establishing a Charcot-Marie-Tooth (CMT) induced pluripotent stem cell bank: Towards a human disease model for CMT", In: 2012 American Academy of Neurology Meeting, 25 April 2012, abstract number S27.001 See the entire document.	1-15
Y	SAPORTA, MARIO A et al., "Induced pluripotent stem cells in the study of neurological diseases", Stem Cell Research & Therapy, 2011, vol. 2, no. 5, document number 37, pp. 1-9 See abstract; pages 1-3.	1-15
Y	WO 2012-045804 A1 (VIB VZW et al.) 12 April 2012 See abstract; claims 1-14; pages 1-7, 10-11, 16-21; figures 6-9.	7,11-13
A	OKADA, Y. et al., "Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells", Developmental Biology, 2004, vol. 275, no. 1, pp. 124-142 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2012-0027353 A (PHARNEXT) 21 March 2012 See abstract; claims 1-13.	1-15

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
 See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search

16 JULY 2014 (16.07.2014)

Date of mailing of the international search report

17 JULY 2014 (17.07.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/002794

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2012-045804 A1	12/04/2012	AU 2011-311531 A1	11/04/2013
		CA 2812855 A1	12/04/2012
		EP 2624832 A1	14/08/2013
		US 2013-0227717 A1	29/08/2013
KR 10-2012-0027353 A	21/03/2012	AU 2010-255802 A1	09/12/2010
		CA 2763495 A1	09/12/2010
		EP 2263665 A1	22/12/2010
		EP 2437742 A1	11/04/2012
		JP 2012-528818 A	15/11/2012
		US 2012-0088744 A1	12/04/2012
		WO 2010-139627 A1	09/12/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 5/10(2006.01)i, C12N 5/079(2010.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 5/10; A61K 31/422; A61K 31/192; A61K 31/437; A61K 31/197; C12N 5/079; C12Q 1/68; G01N 33/15

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: 샤르코-마리-투스, 역분화 유도만능 줄기세포, 레티논산, 소닉 헤지호그, 뉴트로핀, CMT 2F, 135, 182, 돌연변이, 축삭 운송, 아세틸화 알파-튜블린, 미토콘드리아 운송량

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	SAPORTA, MARIO 외 2명, `Establishing a Charcot-Marie-Tooth (CMT) induced pluripotent stem cell bank: Towards a human disease model for CMT`, In: 2012 American Academy of Neurology Meeting, 2012.04.25., 초록번호 S27.001 전체 문헌 참조.	1-15
Y	SAPORTA, MARIO A 외 2명, `Induced pluripotent stem cells in the study of neurological diseases`, Stem Cell Research & Therapy, 2011, 2권, 5호, 문헌번호 37, 페이지 1-9 요약; 페이지 1-3 참조.	1-15
Y	WO 2012-045804 A1 (VIB VZW 외 1명) 2012.04.12. 요약; 청구항 1-14; 페이지 1-7, 10-11, 16-21; 도면 6-9 참조.	7, 11-13
A	OKADA, Y. 외 3명, `Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells`, Developmental Biology, 2004, 275권, 1호, 페이지 124-142 전체 문헌 참조.	1-15
A	KR 10-2012-0027353 A (파넥스트) 2012.03.21. 요약; 청구항 1-13 참조.	1-15

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
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌
 “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 2014년 07월 16일 (16.07.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 07월 17일 (17.07.2014)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150
---	------------------------------------

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

서면

전자적 형태

b. 제출시기

출원시 국제출원에 포함

전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2012-045804 A1	2012/04/12	AU 2011-311531 A1 CA 2812855 A1 EP 2624832 A1 US 2013-0227717 A1	2013/04/11 2012/04/12 2013/08/14 2013/08/29
KR 10-2012-0027353 A	2012/03/21	AU 2010-255802 A1 CA 2763495 A1 EP 2263665 A1 EP 2437742 A1 JP 2012-528818 A US 2012-0088744 A1 WO 2010-139627 A1	2010/12/09 2010/12/09 2010/12/22 2012/04/11 2012/11/15 2012/04/12 2010/12/09