

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 9일 (09.01.2020)

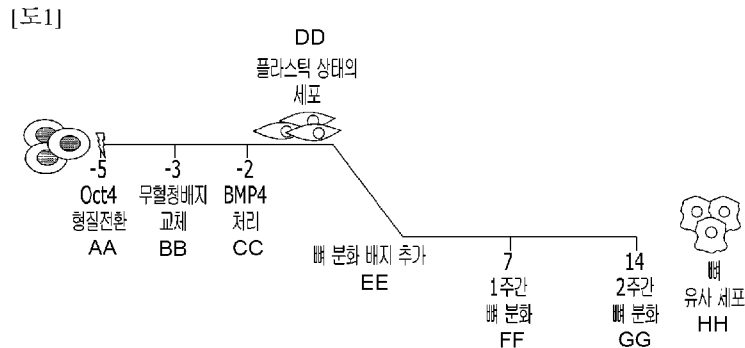


(10) 국제공개번호
WO 2020/009320 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 5/077 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/005103
- (22) 국제출원일: 2019년 4월 26일 (26.04.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0077739 2018년 7월 4일 (04.07.2018) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 황석연 (HWANG, Suk-yeon); 08826 서울시 관악구 관악로 1, 122G동 201호, Seoul (KR). 김승현 (KIM, Seung Hyun); 06262 서울시 강남구 논현로 213, 110동
- 1401호, Seoul (KR). 이화진 (LEE, Hwa Jin); 22009 인천시 연수구 컨벤시아대로274번길 55, 2101동 702호, Incheon (KR).
- (74) 대리인: 안소영 (AHN, So Young); 06224 서울시 강남구 논현로 416, 3층, 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, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING OCT4 FOR INDUCING DIRECT TRANSDIFFERENTIATION INTO BONE-RELATED CELL

(54) 발명의 명칭: OCT4를 포함하는 골 관련 세포 직접교차분화 유도용 조성물



- AA ... Oct4 transformation
- BB ... Change to serum-free medium
- CC ... BMP4 treatment
- DD ... Cells in plastic state
- EE ... Bone differentiation medium added
- FF ... Bone differentiation for 1 week
- GG ... Bone differentiation for 2 weeks
- HH ... Bone-like cells

(57) Abstract: The present invention provides: a method for direct transdifferentiation of somatic cells into bone-related cells, the method comprising a step of treating the somatic cells with at least one OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) expression promoting factor of OCT4 protein or a fusion thereof, a nucleic acid molecule coding for the protein, and a vector carrying the nucleic acid molecule, and a musculoskeletal growth factor; the bone-related cells obtained thereby; a cell therapy product using same; a therapeutic material screening method using same; and a diagnostic composition using same. The present invention also provides: a composition comprising at least one OCT4 expression promoting factor of OCT4 protein or a fusion thereof, a nucleic acid molecule coding for the protein, and a vector carrying the nucleic acid molecule as an effective ingredient for preventing or treating a bone-related disease; and a preventive or therapeutic method using same. Furthermore, the present invention provides a cell-penetrating carrier-fused

WO 2020/009320 A1

(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))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

OCT4 protein fusion or a cell-penetrating carrier-fused OCT4 protein fusion having a bone tissue-specific carrier conjugated thereto.

(57) 요약서: 본 발명은 OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) 단백질 또는 그의 융합체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및 상기 핵산 분자가 도입된 벡터 중 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자 및 근골격계 성장인자를 체세포에 처리하는 단계를 포함하는, 체세포에서 골 관련 세포로의 직접교차분화 방법, 이를 통해 수득한 골 관련 세포, 이를 이용한 세포치료제, 치료물질 스크리닝 방법, 진단 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한, OCT4 단백질 또는 그의 융합체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및 상기 핵산 분자가 도입된 벡터 중 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자를 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물 또는 이를 이용한 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 세포투과용 전달물질이 융합된 OCT4 단백질 융합체 또는 골 조직 특이적 전달 물질이 결합된, 세포투과용 전달물질이 융합된 OCT4 단백질 융합체를 제공한다.

명세서

발명의 명칭: OCT4를 포함하는 골 관련 세포 직접교차분화 유도용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 OCT4를 포함하는 골 관련 세포 직접교차분화 유도용 조성물 또는 이를 이용한 직접교차분화 방법 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 재생의학에서는 인간의 세포와 조직, 장기를 대체하거나 재생시켜 원래의 기능을 할 수 있도록 복원시키려는 연구가 계속되고 있다. 연구 소재로는 세포, 약물, 소재, 의료기기 등이 포함되며, 특히 면역 거부 현상을 해결하기 위한 관점에서 자가세포에 대한 연구가 집중되고 있다.
- [3] 종래에는 목적으로 하는 세포를 수득하기 위하여 유도 만능 줄기세포를 이용한 연구가 주를 이루고 있다. 유도 만능 줄기세포는 비 만능 세포인 성체 체세포로부터 특정한 유전자를 인위적으로 발현 및 유도하여 인공적으로 만들어진 것이다.
- [4] 체세포를 사용하기 때문에 배아의 사용을 필요로 하지 않고 만능줄기세포를 얻을 수 있으므로 유도만능줄기세포는 줄기세포 연구에 주로 인용되어 왔다. 그러나, 성체 체세포의 형질을 변형시키기 위하여 바이러스와 같은 매개체를 사용하면서 기형종(teratoma)의 생성 가능성이 높아지기 때문에 in vivo 시험에 사용하기 어렵고, 유도 만능 줄기세포를 생성하기 위해서는 리프로그래밍 및 재분화 단계를 반드시 거쳐야 한다.
- [5] 이에, 점차 가속화되고 있는 고령화 사회에서 골, 연골, 골격근, 인대, 건 등과 같은 근골격계 관련 질환들에 대한 세포 치료로 유용하게 사용할 수 있는 제제에 대한 연구 및 시도가 이루어지고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적 중 하나는 체세포 내 OCT4 발현을 촉진하기 위한 수단을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 목적 중 하나는 체세포에서 골 관련 세포로의 직접교차분화 방법을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 목적 중 하나는 직접교차분화를 통해 수득한 골 관련 세포 및 그의 용도를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 목적 중 하나는 직접교차분화를 통한 OCT4 단백질의 골 관련 질환 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명은 체세포 내 OCT4 발현을 촉진하기 위한 수단, 체세포에서 골 관련

세포로의 직접교차분화 방법, 직접교차분화를 통해 수득한 골 관련 세포 및 그의 용도; 및 직접교차분화를 통한 OCT4 단백질의 골 관련 질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[11]

[12] **1. 체세포 내 OCT4 발현을 촉진하기 위한 수단**

[13]

[14] 본 발명의 일 실시양태는 체세포 내 OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) 발현 촉진 인자이다.

[15] 본 발명의 OCT4 발현 촉진 인자는 체세포 내에서 OCT4 단백질의 발현을 상승시킬 수 있는 모든 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단을 의미한다. 본 발명의 일 실시양태에 따르면, OCT4 발현 촉진 인자는 OCT4 단백질, 그의 융합체 또는 운반체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및 상기 핵산 분자가 도입된 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[16] 본 발명에서, “OCT4 (octamer-binding transcription factor 4) 단백질”은 POU5F1 단백질로도 알려져 있으며, POU5F1 유전자에 의하여 코딩된다. OCT4는 POU 패밀리의 호메오도메인 (homeodomain) 전사 인자 중 하나이다. OCT4 단백질은 분화되지 않은 배아줄기세포의 자가분열과 관계되어 있음이 알려져 있으나, 체세포로부터 골 관련 세포로의 직접교차분화와 관련된 내용은 전혀 알려진 바가 없다.

[17] 일 실시양태에서, 인간 OCT4의 유전자 서열은 서열번호 1로 구성되고(NM_002701.5), 인간 OCT4 단백질은 서열번호 2로 구성되고(NP_002692.2), 마우스 OCT4의 유전자 서열은 서열번호 3으로 구성되고(NM_013633.3), 마우스 OCT4 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 4로 구성되며(NP_038661.2), 본 발명의 OCT4 단백질은 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지된 OCT4 단백질과 서열 상동성 또는 기능적 유사성을 갖는 단백질을 포함할 수 있다.

[18] 본 발명에서, OCT4 단백질은 OCT4 단백질의 하나 이상의 아미노산이 유전학적 및/또는 화학적으로 변형되고 모 단백질의 생물학적 활성을 보유한 OCT4 단백질 유사체를 포함할 수 있다.

[19] 본 발명에서 “OCT4 단백질 융합체”란 OCT4 단백질의 생물학적 활성을 보유하면서 OCT4 단백질의 1종 이상의 아미노산에 펩타이드 등이 화학적으로 결합 또는 융합된 복합체를 의미한다.

[20] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, OCT4 단백질 융합체는 세포투과용 전달물질이 융합된 OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) 단백질이다. 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 세포투과용 전달물질은 세포 투과성 펩타이드(cell-penetrating peptide: CPP)이다.

[21] 본 발명에서, 세포 투과성 펩타이드(CPP)는 OCT4 단백질에 융합되어 목적하는 세포 내부로 OCT4 단백질의 세포 통과를 가능하도록 기능하는 펩타이드로서,

그 의미는 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지되어 있다. CPP는 아르기닌 또는 리신과 같은 염기성 서열을 다량 포함하고, 높은 양전하를 띄는 8 내지 16개의 아미노산으로 이루어진 PTD(protein transduction domain)라는 특정 서열을 가진 펩타이드일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 CPP는 30K 단백질, Antp(Penetratin), HSV-1, VP22, pep-1, PTD4, TAT PTD, Hph-1, Vectocell, Lactoferrin, Sim-2, LPIN3, 2IL-1a, dNP2, nona-arginine(R9)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [22] 예컨대, 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 세포 투과성 펩타이드는 30K 단백질이다. 30K 단백질은 누에 체액 내에 30KDa의 단백질 군을 지칭하며, 본 발명이 속하는 기술 분야(예컨대, 대한민국 공개특허 제10-2011-0003889호, 제10-2014-0111178호 또는 대한민국 등록특허 제10-1626343호)에 공지되어 있다. 상기 30K 단백질은 누에 체액으로부터 얻거나, 유전자 재조합 방법에 의하여 대장균을 포함하는 박테리아, 식물 또는 식물 유래 세포, 효모, 균류, 곤충 세포 또는 척추동물 세포로부터 생산된 재조합 단백질일 수 있으며, OCT4의 N-말단 또는 C-말단에 결합될 수 있다. 본 발명에서, 상기 30K 단백질은 당업계에 공지된 30K 단백질 외에도 세포투과성 특성을 갖는 30K 단백질의 유사체, 변형체, 단편, 또는 아형 등을 모두 포함할 수 있으며, 예컨대 30KC19, 30KC α , PeP-C일 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에서, 30K 단백질은 30Kc19이다. 본 발명에서 세포 투과성 펩타이드의 일례로서 30K 단백질이 제시되었으나, OCT4 단백질에 컨쥬게이션 또는 융합되어 목적하는 세포 내부로 OCT4 단백질의 세포 통과를 가능하는 펩타이드라면 본 발명의 직접교차분화를 위한 CPP로 사용될 수 있다.
- [23] 본 발명의 실시예에서, 30K 단백질을 CPP의 예시로 사용한 CPP-OCT4 단백질 복합체를 제조하여 체세포에 투여한 결과, 상기 체세포 내 OCT4 단백질 농도가 증가하고, 골 관련 세포로의 직접교차분화가 효과적으로 일어남을 확인하였다(실시예 2).
- [24] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, OCT4 단백질의 융합체는 골 조직 또는 골수 조직 특이적 전달 물질이 결합된 OCT4 단백질 융합체이다. 일 실시양태에서, OCT4 단백질의 융합체는 골 조직 또는 골수 조직 특이적 전달 물질이 결합된, 세포투과용 전달물질이 컨쥬게이션 또는 융합된 OCT4 단백질 융합체이다.
- [25] 본 발명에서 “OCT4 단백질 운반체”는 OCT4 단백질을 목적하는 세포 내로 효율적으로 전달할 수 있는, OCT4 단백질 또는 그의 융합체를 포함하는 전달물질을 의미한다. 일 실시양태에서, 상기 OCT4 단백질 운반체는 OCT4 단백질을 포함하는 나노입자, 리포솜, 마이셀, 또는 나노 에멀전을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [26] 본 발명에서, OCT4 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지된 방법, 예컨대 벡터 형태의 네이키드 DNA로 세포내로 전달되거나, 리포솜 (Liposome), 양이온성 고분자 (Cationic polymer)등을 이용하거나 다른

세포 특이적인 타겟팅을 가능하게 하는 화학 물질 또는 펩타이드와 같은 생물학적 물질의 결합 등을 활용하여 세포 내로 전달될 수 있다. 리포솜은 유전자 전달을 위하여 예컨대 DOTMA 또는 DOTAP 등의 양이온성 인지질을 혼합하여 제조한 인지질 막으로, 양이온성의 리포솜과 음이온성의 핵산이 일정 비율로 혼합하면 핵산-리포솜 복합체가 형성될 수 있다.

- [27] 본 발명에서 "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 전달체를 의미한다. 본 발명의 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.
- [28] 본 발명에서 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 본 발명에서 벡터는 비-바이러스성 벡터일 수 있으며, 구체적으로 플라스미드일 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에서, 벡터는 직접교차분화를 유도하는 OCT4 유전자 포함 플라스미드 벡터일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[29]

[30] **2. 체세포에서 골 관련 세포로의 직접교차분화 방법**

[31]

[32] 본 발명의 일 실시양태는 OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) 단백질, 그의 용합체 또는 운반체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및 상기 핵산 분자가 도입된 벡터 중 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자; 및 근골격계 성장인자를 체세포에 처리하는 단계를 포함하는, 체세포에서 골 관련 세포로의 직접교차분화 방법이다.

[33] 본 발명에서, 용어 "직접교차분화(Direct reprogramming, Direct conversion, Transdifferentiation)"는 전혀 다른 세포 타입을 가지는 성숙한(분화가 끝난) 세포간의 전환을 유도하는 과정이다. 직접교차분화 과정은 유도만능줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)로 리프로그래밍하고 이를 재분화하여 목적하는 세포로 만들어야하는 과정과 달리, 유도만능줄기세포 단계를 거치지 않고 바로 목적하는 세포로의 전환을 유도한다는 점에서 명확히 구별된다.

[34] 본 발명에서 용어 "체세포"는, 생식세포를 제외한 모든 세포를 의미하는 것일 수 있으며, 예컨대, 인간, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 포유 동물 유래의 것 또는 분리된 것일 수 있다. 일 실시양태에서 상기 체세포는 생체에서 분리된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 체세포는 섬유아세포, 상피세포, 근육세포,

신경세포, 모발세포, 모근세포, 모낭세포, 구강상피세포, 소변에서 추출한 체세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, B세포, 주피세포, 혈관내피세포, 혈액세포, 성상교세포 혈액세포, 신경 줄기세포, 조혈모 줄기세포, 지방세포, 또는 중간엽 줄기세포일 수 있으며 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 체세포는 혈관내피세포, 중간엽 줄기세포, 지방세포, 및 섬유아세포로 중 1종 이상의 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [35] 본 발명자들은 최초로, 인간 혈관내피세포인 HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) 세포 내에 OCT4 단백질의 발현을 골 관련 세포가 직접교차분화 유도됨을 확인하였고, 상기 체세포로부터 직접교차분화 유도된 골 관련세포의 특성 분석을 수행하여 정상적인 골 관련 세포 특성을 가지고 있음을 확인하였다 (실시예 1 내지 3).
- [36] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 골 관련 세포는 골아세포(osteoblast), 골형성계 세포(osteogenic cell), 조골아세포(pre osteoblast), 골세포(Osteocyte), 골연골전구세포(osteochondroprogenitor cell), 연골 세포(chondrocyte), 파골세포(osteoclast)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [37] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 OCT4 단백질 발현 촉진 인자를 체세포에 처리하는 단계 이전에, 체세포를 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [38] 상기 체세포를 배양하는 단계는 당업계에서 공지된 방법에 따라 수행될 수 있다. 체세포 배양에 사용되는 배지는 동물 세포 성장에 적절한 임의의 기본 배지이며, EGM-2 배지, MEM(Minimal Essential Medium), DMEM(Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM(Keratinocyte Serum Free Medium), F12(Ham's F-12 medium) 배지, 혹은 DMEM과 F12를 혼합한 DMEM/F12 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 기본 배지에, 탄소, 질소 및 미량 영양소의 동화성 공급원, 비제한적인 예로서, 혈청 공급원, 성장 인자, 아미노산, 항생제, 비타민, 환원제, 및/또는 당 공급원이 첨가될 수 있다.
- [39] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 방법은 OCT4 발현 촉진 인자를 체세포에 처리하는 단계 이후에, 체세포를 무혈청 배지에서 안정화하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [40] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 근골격계 성장인자는 IGF-1, TGF, BMP, 오스테오제닌(osteogenin), Osx(Osterix), 및 RUNX2(Runt-related transcription factor 2) 중 1종 이상의 인자이다. 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 근골격계 성장인자는 BMP이며, 더욱 구체적으로 BMP4이다.
- [41] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 직접교차분화 방법에서 근골격계 성장인자는 0.1 내지 500 ng/mL의 농도, 구체적으로 0.5 내지 100 ng/ml의 농도, 보다 구체적으로 2 내지 20 ng/mL로 첨가될 수 있다.
- [42] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 직접교차분화 방법에서 상기 체세포에 근골격계 성장인자를 첨가하는 단계를 수행한 이후, 체세포를 뼈 분화 배지에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 뼈 분화

배지는 본 발명이 속한 기술 분야에 공지되어 있다.

- [43] 본 발명의 일 실시양태는 OCT4 단백질, 그의 융합체 또는 운반체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및 상기 핵산 분자가 도입된 벡터 중 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자; 및 근골격계 성장인자를 포함하는, 체세포로에서 골 관련 세포로의 직접교차분화 유도용 조성물이다. 여기서, OCT4 발현 촉진 인자는 상기에서 정의된 바와 같다.

[44]

[45] **3. 직접교차분화를 통해 수득한 골 관련 세포 및 그의 용도**

[46]

- [47] 본 발명의 일 실시양태는 본 발명의 직접교차분화 방법에 의해 제조된 골 관련 세포의 직접교차분화 방법을 수행하여 제조되는 골 관련 세포이다. 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 골 관련 세포는 골아세포(osteoblast), 골형성계 세포(osteogenic cell), 조골아세포(pre osteoblast), 골세포(Osteocyte), 골연골전구세포(osteochondroprogenitor cell), 연골 세포(chondrocyte) 또는 파골세포(osteoclast)일 수 있으며, 예컨대 골아세포일 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에서, cbfa1, ALP 및 cal1와 같은 골아세포 특이적 마커의 발현량을 확인하여 직접교차분화 방법에 따른 골아세포로의 분화를 확인하였다(실시예 1-4, 실시예 2-6 등).

- [48] 본 발명의 일 실시양태는 본 발명의 직접교차분화 방법에 의해 제조된 골 관련 세포를 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 세포 치료제이다.

- [49] 본 발명에서, “세포 치료제”는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로, 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 통칭한다.

- [50] 본 발명의 교차분화방법에 따라 제조된 골 관련 세포는 골 관련 질환의 치료, 진단 또는 예방에 사용될 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 골 관련 질환은 골다공증(osteoporosis), 골연화증(osteomalacia), 골감소증(osteopenia), 골위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 페이젯병(Paget's disease), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 암(cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절(fracture), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 및 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 골염(Osteitis), 골형성부전증(Osteogenesis Imperfecta)으로부터 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [51] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 세포치료제는 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 운환제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 및 완충액 등 중 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

- [52] 본 발명의 일 실시양태는 본 발명의 직접교차분화 방법에 의해 제조된 골 관련 세포를 포함하는 골 관련 세포를 이용한 골 관련 질환 치료 물질 스크리닝 방법이다.
- [53] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 골 관련 질환의 치료 후보 물질의 존재 및 부재하에서 본 발명의 체세포에서 직접교차분화되어 제조된 골 관련 세포의 반응성을 확인하는 방법으로 골 관련 질환 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [54] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 골 관련 세포를 이용한 골 관련 질환 치료 물질 스크리닝 방법은
- [55] 직접교차분화 방법을 수행하여 제1 골 관련 세포 및 제2 골 관련 세포를 준비하는 단계;
- [56] 상기 제1 골 관련 세포에 후보 물질을 접촉시키는 단계;
- [57] 상기 제1 골 관련 세포에 골 관련 질환 치료 효과 또는 부작용 감소 효과를 측정하는 단계;
- [58] 상기 후보 물질을 접촉시키지 않은 제2 골 관련 세포에서의 골 관련 질환 치료 효과 또는 부작용 감소 효과와 비교하는 단계; 및
- [59] 상기 후보 물질을 접촉시킨 제1 골 관련 세포에서의 골 관련 질환 치료 효과가 후보 물질을 접촉시키지 않은 제2 골 관련 세포 시료에서 골 관련 질환 치료 효과보다 높은 경우, 상기 후보 물질을 골 관련 질환 치료 후보 약물로 결정하는 단계를 포함한다.
- [60] 상기 후보 물질은 각종 소분자 화학 약물, 펩타이드, 단백질, 핵산분자, 천연물, 천연물의 추출물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [61] 본 발명의 일 실시양태는 본 발명의 직접교차분화 방법에 의해 제조된 골 관련 세포를 포함하는 골 관련 질환 진단용 조성물이다. 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 직접교차분화 방법에 의해 제조된 골 관련 세포를 포함하는 골 관련 질환 진단용 조성물을 개체로부터 수집한 시료와 접촉하여 정상 대조군과 비교함으로써 골 관련 질환의 진단에 이용할 수 있다.

[62]

[63] **4. 직접교차분화를 통한 OCT4 단백질의 골 관련 질환 예방 또는 치료 용도**

[64]

[65] 본 발명의 일 실시양태는 OCT4 단백질, 그의 융합체 또는 운반체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및 상기 핵산 분자가 도입된 벡터 중 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자를 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물이다.

[66] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 골 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물은 OCT4 발현 촉진 인자를 체세포로 전달할 수 있는 물질을 더 포함할 수 있다.

[67] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 OCT4 단백질 융합체는 세포투과성 펩티드가 융합된 OCT4 단백질이다. 세포 투과성 펩티드는 상기에서 정의한

바와 같다. 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 세포투과성 펩티드는 30K 단백질, Antp(Penetratin), HSV-1, VP22, pep-1, PTD4, TAT PTD, Hph-1, Vectocell, Lactoferrin, Sim-2, LPIN3, 2IL-1a, dNP2, nona-arginine(R9)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일 실시양태에서, 30K 단백질은 30Kc19이다.

- [68] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 OCT4 단백질 융합체는 체세포, 예컨대 혈관내피세포 내로 전달될 수 있다.
- [69] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 골 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물은 상기 OCT4 발현 촉진 인자를 뼈 부위 또는 골수 부위로 전달할 수 있는 물질을 더 포함할 수 있다.
- [70] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 OCT4 단백질 융합체는 골 조직 특이적 전달 물질이 컨쥬게이션 또는 융합된 세포투과성 펩티드에 융합된 OCT4 단백질이다.
- [71] 본 발명의 일 실시양태에서, 골 조직 또는 골수 조직 특이적 전달 물질은 개체 내에 정맥 주사된 후 골 조직 또는 골수 조직으로 전달하고자 하는 물질을 표적화할 수 있는 물질을 의미한다. 골 조직 또는 골수 조직 특이적 전달물질은 예를 들어 비스포스포네이트 계열 화합물등을 포함하는 화학물질, BMHP1 (bone marrow homing peptide 1), PFS (PFSSTKT) 등을 포함하는 Bone 혹은 Bone marrow homing peptide 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에 공지된 골 조직 또는 골수 조직 특이적 전달물질일 수 있다.
- [72] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 골 조직 특이적 전달 물질은 상기 OCT4 단백질 융합체에 결합된 비스포스포네이트(Bisphosphonate) 계열 화합물이다. 상기 비스포스포네이트 계열 화합물은 예컨대, OCT4 단백질 융합체의 카르복시기에 결합될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [73] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 골 관련 질환은 골다공증(osteoporosis), 골연화증(osteomalacia), 골감소증(osteopenia), 골위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 페이지젯병(Paget's disease), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 암(cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절(fracture), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 및 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)으로부터 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상이다.
- [74] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 골 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물은 투여되는 체세포 내에서 Sox2, Klf4, C-Myc 또는 Lin28 단백질의 발현을 증가시키지 않는다. 상기 조성물은 예컨대 Sox2, Klf4, C-Myc 또는 Lin28 단백질 또는 그의 융합체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산이 도입된 벡터를 포함하지 않는다.
- [75] 본 발명의 일 실시양태는 OCT4 단백질 또는 그의 융합체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및 상기 핵산 분자가 도입된 벡터 중 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자를 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 골 관련 질환을 예방

또는 치료하기 위한 방법이다.

[76] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 예방 또는 치료 방법에서 OCT4 발현 촉진 인자는 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥 주사, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 비장내 (intrasplenically), 또는 직장내 투여 등으로 투여될 수 있다.

[77] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 투여방법은 정맥 주사 또는 뼈 관련 질환 부위에의 국소 투여이다.

발명의 효과

[78] 본 발명에 따른 OCT4 발현 촉진 인자를 포함하는 체세포에서 골 관련 세포로의 직접교차분화 유도용 조성물을 이용하여 제조된 골 관련 세포는 세포 치료제, 골 관련 질환 치료 물질 스크리닝, 골 관련질환 진단에 유용하게 사용될 수 있으며, 상기 조성물은 개체에 투여되어 골 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[79] 도 1은 혈관내피세포에 Oct4 유전자의 발현을 통한 직접교차분화의 과정을 나타낸 도이다.

[80] 도 2의 (A)는혈관내피세포에 도입된 Oct4 유전자의 발현을 PCR로 확인한 결과를 나타내고, 도 2의 (B)는 세포내 발현되는 OCT4 단백질의 유무를 면역세포화학법으로 확인한 결과를 나타낸다.

[81] 도 3은 BMP4 수용체와 관련된 MBPRIA 및 BMPRII 유전자 및 내피-중간엽 전환(endothelial-mesenchmal transition)과 관련된 SLUG 및 SNAIL 유전자의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸다.

[82] 도 4는 골아세포 특이적 마커의 발현 정도를 확인한 그래프이다.

[83] 도 5는 오스테오칼신의 존재여부를 면역화학염색법(immunocytochemistry)으로 확인한 사진이다.

[84] 도 6은 세포의 석회화 정도를 확인한 사진이다.

[85] 도 7은 두개골 결합 마우스 모델에서 골 재생을 확인하기 위한 micro-CT 사진 및 BV/TV %를 측정된 그래프이다.

[86] 도 8은 두개골 결합 마우스 모델에서 골 재생을 확인하기 위한 Masson's trichrome 염색을 확인한 사진이다.

[87] 도 9는 CPP-OCT4 복합체 단백질을 제조하기 위한 벡터를 나타낸다.

[88] 도 10 내지 도 12는 CPP-OCT4 복합체 단백질의 농도를 확인한 체 크로마토그래피(Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC) 및 SDS-PAGE의 결과이다.

[89] 도 13은 혈관내피세포의 LIVE/DEAD 분석 결과를 나타내는 도이다.

[90] 도 14는 CPP-OCT4 복합체 단백질의 세포 투과 여부를 확인한 도이다.

[91] 도 15는혈관내피세포 특이적 유전자(CD31, VECAD, VEGFR-2) 및

중간엽줄기세포 특이적 유전자 (VIMENTIN, TWIST, SLUG)의 발현 정도를 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸다.

[92] 도 16은 혈관내피세포 특이적 단백질(CD31)과 중간엽내피세포 특이적 단백질(α SMA)에 대한 면역화학염색 결과를 나타낸다.

[93] 도 17은 팔로이딘으로 세포를 형광 염색하여 혈관 형성을 관찰한 결과를 나타낸다.

[94] 도 18은 골아세포 특이적 마커의 발현 정도를 확인한 그래프이다.

[95] 도 19은 세포의 석회화 정도를 알린자린 염색으로 확인한 사진이다.

[96] 도 20은 두개골 결합 마우스 모델에서 골 재생을 확인하기 위한 micro-CT 사진 및 BV/TV %를 측정된 그래프이다.

[97] 도 21은 CPP-OCT4 복합체 단백질 또는 BP-CPP-OCT4 복합체 단백질 투여에 따른 골다공증 개선 효과를 확인하기 위한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[98] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[99]

[100] <실시예 1> OCT4 유전자 포함 재조합 벡터를 혈관내피세포에 도입한 골아세포의 직접교차분화

[101]

[102] 실시예 1-1. 골아세포직접교차분화 방법

[103]

[104] 혈관내피세포인 HUVEC(human umbilical vein endothelial cells) 세포를 배양하기 위해, 젤라틴 0.1% 용액을 20분 동안 코팅한 100 mm 세포 배양 접시에 HUVEC 세포(Lonza사, USA)를 4×10^3 세포/cm² 밀도로 접종하였다. 1% FBS 및 각종 성장인자(IGF, VEGF, FGF)를 포함하는 EGM-2 배지(Lonza사, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 배양 조건으로 배양 접시를 90% 가량 채울 때까지 세포를 배양하였다. 그 다음, 배양 접시의 세포를 0.25% 농도의 트립신을 이용하여 분리하였다.

[105]

[106] OCT4 유전자를 포함하는 플라스미드 수득을 위해, DH5alpha 박테리아 스톡(Invitro사)에 OCT4(Addgene #13366) 유전자가 포함된 재조합 플라스미드를 45초 동안 42°C에서 heat shock을 주어 도입하였다. 그 다음, 상기 OCT4 유전자 도입 박테리아를 100 μ g/ml의 암피실린 항생제가 포함된 4 mL LB 배지(Sigma사, USA)에 접종하고, 8시간 동안 37 °C 진탕 배양기(shaking incubator)에서 160 rpm으로 종균배양하였다. 4 mL의 박테리아 배지는 글리세롤 15%와 함께 동결 튜브에 스톡으로 보관하고, 나머지 1mL의 박테리아 배지를 준비된 100 mL의 LB 배지에 넣어준 후 15 내지 16시간 동안 37 °C 진탕배양기에 200 rpm으로 배양하였다. 다음날, Midi-Prep(Qiagen사, USA)를 사용하여

플라스미드를 박테리아로부터 분리시켜 수득하였다.

[107]

[108] 상기 재조합 플라스미드를 Neon transfection system(Thermo Fisher사)의 R 완충용액 및 혈관내피세포의 존재 하에 전기천공법(electroporation)을 통해 형질전환시켰다. 전기천공은 15 μ g의 재조합 플라스미드가 2×10^6 세포에 전달될 수 있도록 전기장 세기 13.5 kV/cm, 충격 시간 30 ms로 실시하였다. 그 후, 형질전환된 세포를 선별하기 위하여, OCT4 전사인자를 표적화하는 OCT4 항체(Abcam, USA)를 사용하여 면역세포화학법(immunocytochemistry)를 수행하였다.

[109]

[110] 전기천공 이후, 세포의 안정화를 위하여 37°C, 5%의 CO₂ 조건으로 무혈청 EGM-2 배지에서 24 시간 동안 배양하였다. 그 후, 10 ng/mL 농도의 BMP4(RnD systems, USA)를 무혈청 배지에 첨가하고 48 시간 동안 배양하였다.

[111]

[112] 그 다음, 뼈 분화 배지인 StemPro Osteogenesis medium(Thermo, USA)에서 세포를 14 일 동안 배양하였다.

[113]

[114] **실시예 1-2. 혈관내피세포 내 OCT4 유전자 발현 확인**

[115]

[116] 실시예 1-1에 따라 OCT4 유전자를 발현하는 혈관내피세포가 확립되었는지 확인하였다. 전기천공법을 실시한 혈관내피세포에 대해 RT-PCR 및 면역세포화학법(immunocytochemistry)를 수행하였다.

[117]

[118] RT-PCR의 경우, 혈관내피세포를PBS로 워시한 후 Trizol(Thermo, USA)을 처리하여 얼음에 20분 동안 세포를 용출하여 RNA를 분리하였다. 그 후, 클로로포름(chloroform, Sigma, USA)을 넣어주고 15초간 흔들어주고, 10분 동안 실온에서 방치시킨 후, 15,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리 하였다. 이후, 분리된 두 개의 층(투명한 층과 분홍색 층) 중에 투명한 층을 따로 추출하여 새로운 튜브로 옮겨주었다. 이소프로판올(isopropanol, Sigma, USA)을 첨가하여 5분 동안 상온에서 RNA 침전물이 생성될 때까지 대기하고, 생성된 침전물은 원심분리기를 통하여 15,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 분리하였다. 세척 단계로 75% 에탄올을 원심분리된 RNA 펠렛(pellet)에 넣어 다시 한 번 10,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리하였다. 세척된 침전물은 molecular graded water(Sigma, USA)에 60°C에서 10분간 변성 시켰다.

[119]

[120] 이렇게 수득된 각 세포의 RNA는 reverse-transcriptional PCR kit(Enzynomics사)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 cDNA로 제작되었다. 제조된 cDNA는 분석하고자 하는 각 유전자의 프라이머들과 SYBR green PCR

Mastermix(Enzynomics사)를 사용하여 quantitative real-time PCR을 수행하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 1과 같다.

[121]

[122] [표1]

유전자	프라이머 서열 (정방향)	프라이머 서열 (역방향)
OCT4	CGTGAAGCTGGAGGAGA (서열번호 5)	CATCGGCCTGTGTATATCCC (서열번호 6)
18s	CCCTGTAATTGGAATGAGTCCACTT (서열번호 7)	ACGCTATTGGAGCTGGAATTAC (서열번호 8)

[123] 면역세포화학법의 경우, OCT4 항체(Abcam, USA)를 사용하여 염색을 진행하였다. 이를 위해 세포를 4% 파라포름알데히드(Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 20 분간 상온에서 고정한 후, 5분간 phosphate buffer saline(PBS; Gibco,USA)으로 두 번 워시해주었다. 그후, 염색약 투과화(permeabilization)를 위해 0.2% triton-X100(sigma-aldrich)를 1% bovine serum albumin/PBS (BSA/PBS; MP Biomedicals,USA)에 섞어 15 분간 처리해주었다. Blocking을 위해 10% normal goad serum(Vector laboratories)를 1% BSA/PBS에 섞어 한 시간 동안 상온에 보관하였다. 첫 번째 항체인 OCT4를 붙이기 위해 0.1% triton-X100, 5% NGS, 1% BSA/PBS에 항체와 용해를 1:500 비율로 섞어 하룻밤 동안 4°C에서 보관하였다. 다음날, 10분씩 세 번 워시하여 남아있는 첫 번째 항체를 없애주고 두 번째 항체를 같은 용해에 1:200 비율로 1.5 시간 동안 상온에서 처리해주었다. 세포핵 염색을 위해 DAPI(D9541, Sigma-aldrich) 용액을 1:200 비율로 PBS에 섞은 후, 15분간 상온에서 처리해주었다.

[124]

[125] 그 결과, 실시예 1-1에 따라 OCT4 유전자가 혈관내피세포 내에 성공적으로 발현된 것을 확인하였다(도 2).

[126]

[127] 실시예 1-3. 형질전환된 세포에 BMP4 처리에 따른 특정 유전자 발현

[128]

[129] 실시예 1-1에 따라 수득한 세포에서, BMP4 수용체와 관련된 MBPRIA 및 BMPRII 유전자와 내피-중간엽 전환(endothelial-mesenchmal transition)과 관련된 SLUG 및 SNAIL 유전자의 발현 수준을 실시예 1-2에 기재된 RT-PCR을 통해 측정하였다. RT-PCR에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[130]

[131] [표2]

유전자	프라이머 서열 (정방향)	프라이머 서열 (역방향)
BMPRIA	CAGGTTCTGGACTCAGCTC (서열번호 9)	CTTTCCTTGGGTGCCATAAA (서열번호 10)
BMPRII	GCTAAAATTTGGCAGCAAGC (서열번호 11)	CTTGGGCCCTATGTGTCCT (서열번호 12)
SLUG	GCACTGCGATGCCAGTCTA (서열번호 13)	TGGCGCAGATCTTGCAAACA (서열번호 14)
SNAIL	GGCAATTTAACAATGTCTGAAAAGG (서열번호 15)	GAATAGTTCTGGGAGACACATCG (서열번호 16)

[132] 그 결과, OCT4 유전자를 형질전환시키고 BMP4 처리까지 해준 세포에서 BMPRIA, BMPRII, SLUG 및 SNAIL 발현량이 가장 높은 것을 확인하였다(도 3).

[133]

[134] 실시에 1-4. 골아세포 특이적 마커 유전자의 발현

[135]

[136] 실시예 1-1의 직접교차분화방법에 따라 혈관내피세포가골아세포로 분화되었는지 확인하기 위해, 실시예 및 비교예(비교예 1: 혈관내피세포를 그대로 사용, 비교예 2: 혈관내피세포에 BMP4만 처리, 비교예 3: 혈관내피세포에 OCT4로 유전자로 형질전환만 수행)의 세포에서 골아세포 특이적인 마커인 cbfa1, ALP 및 cal1 유전자의 발현 정도를 확인하였다.

[137]

[138] 상기 cbfa1(core-binding factor subunit alpha-1)의 다른 이름은 RUNX2(Runt-related transcription factor 2)로 조골세포의 분화, 연골세포의 성숙 및 골 형성에 관여한다. 골아세포가 분화하는 과정에서 cbfa1는 항상 높은 레벨로 발현된다.

[139]

[140] 염기성 인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP)는 거의 모든 조직에 존재하며, 특히 골조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이

증가한다. 또한, ALP는 유골(osteoid) 형성과 무기질화(mineralization)에 중요한 역할을 하는 효소이며, 골아세포 활성도의 마커로서 잘 알려져 있다. col1(Type 1 Collagen)은 골아세포가 성숙되는 초기에 발현이 증가되는 인자이다. cbfa1, ALP 및 cal1 유전자들은 골아세포에서 높게 발현되는 유전자들로 혈관내피세포가 골아세포로 분화되었는지는 cbfa1, ALP 및 cal1의 발현 정도가 높을수록 골아세포로 분화되었다고 판단하였다.

[141]

[142] cbfa1, ALP 및 cal1 유전자의 발현 정도는 실시예 및 비교예의 세포를 배양 1 주 또는 2 주차때 실시예 1-2에 기재된 것과 같은 RT-PCR을 이용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 3과 같다.

[143] [표3]

유전자	프라이머 서열 (정방향)	프라이머 서열 (역방향)
cbfa1	TGAGCTCCGGAATGCCTCTG (서열번호 17)	TGTCTGTGCCTTCTGGGTTCC (서열번호 18)
ALPL	GCTGGTGGGAAGGAGGCAGAA (서열번호 19)	GTGGGAATGGTCCGCAGTGA (서열번호 20)
Col I	GTCACCCACCGACCAAGAAACC (서열번호21)	AAGTCCAGGCTGTCCAGGGATG (서열번호 22)

[144] 뼈 분화 배지 배양 7일 또는 14일째 실시예 1 및 비교예 세포(비교예 1: 혈관내피세포를 그대로 사용, 비교예 2: 혈관내피세포에 BMP4만 처리, 비교예 3: 혈관내피세포에 OCT4로 유전자로 형질전환만 수행)들의 cbfa1, ALP 및 cal1 유전자의 발현 정도를 확인하였다(도 4).

[145]

[146] 실시예 1-5. 오스테오칼신의 존재 확인

[147]

[148] 실시예 1-1의 직접교차분화방법에 따라 혈관내피세포가 골아세포로 분화되었는지 확인하기 위해, 면역화학염색법(immunocytochemistry)을 이용하여 실시예 및 비교예(비교예 1: 혈관내피세포를 그대로 사용, 비교예 2: 혈관내피세포에 BMP4만 처리, 비교예 3: 혈관내피세포에 OCT4로 유전자로 형질전환만 수행)의 세포에서 조골세포 마커인 오스테오칼신(Osteocalcin) 존재를 확인하였다.

[149]

[150] 각 실시예 및 비교예 세포들을 PBS 버퍼(buffer)로 세척한 후, 세포를 고정하기 위해 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 이용하여 실온에서 20분 동안 처리하였다. PBS 버퍼로 세척한 후, 1% BSA(MP Biomedicals, USA)/PBS(Gibco, USA)에 0.2% Triton X-100(Sigma-Aldrich, USA)를 섞어 15분 동안 투과화(permeabilization)하여 항체(antibody)가 세포 안으로 들어갈 수 있게 처리하였다. 비특이적 항체 결합(Non-specific antibody binding)을 방지하기 위하여 차단(blocking) 단계에서 10% 정상염소혈청(Normal Goat Serum, Vector Laboratories, USA)을 1% BSA/PBS에 희석하여 1시간 동안 처리하였다.

[151]

[152] 0.1% Triton X-100, 5% 정상염소혈청(Normal Goat Serum), 1% BSA/PBS 용액(solution)에 각각 1차 항체를 만나질 동안 처리하였다. 사용된 1차 항체는 1:500으로 희석한 항-오스테오칼신(1:500; Abcam, USA; ab13420) 또는 1:200으로 희석한 OCT4 단백질을 사용하였다. 그 다음, 각 세포들을 1% BSA/PBS로 5분간 3씩 세척하고, 1:200으로 희석한 2차 항체(Jackson Immuno Research)를 1시간 반 동안 처리하였다. 핵 염색을 위하여 1:200으로 희석한 BAPI(Sigma-Aldrich, USA)을 PBS에 용해하여 15분간 처리하였다. 염색 결과는 EVOS(Thermo, USA)으로 관찰하였다.

[153]

[154] 실시예 및 비교예(비교예 1: 혈관내피세포를 그대로 사용, 비교예 2: 혈관내피세포에 BMP4만 처리, 비교예 3: 혈관내피세포에 OCT4로 유전자로 형질전환만 수행) 세포에서 조골세포 마커인 오스테오칼신(Osteocalcin) 존재를 확인한 결과, A:T 쌍이 주로 분포하고 있는 세포의 핵이 DAPI에 의해 푸른 형광으로 염색됨으로써, 세포의 존재를 확인할 수 있고, 붉은 색으로 염색된 오스테오칼신이 핵 주변에 분포되어 있음을 확인하였다(도 5).

[155]

[156] 실시예 1-6. 석회화 정도 확인

[157]

[158] 실시예 1-1의 직접교차분화방법에 따라 혈관내피세포가골아세포로 분화되었는지 확인하기 위해, 칼슘염을 염색하는 알리자린(alizarin) 염색을 이용하여 실시예 및 비교예에서 세포의 석회화 정도를 확인하였다.

[159]

[160] 각각의 세포들을 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 이용하여 상위 면역 화학 염색법에 쓰인 것과 같이 고정하였다. 이후, 증류수로 한차례 세척하고 40mM 알리자린 레드(alizarin red, Sigma Aldrich) pH 4.2 용액을 처리하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 증류수로 2차례 세척한 후 PBS 용액으로 10분간 세척하고 염색 결과를 관찰하였다(도 6).

[161]

- [162] 실시예 1-7. 직접교차분화에 따른 골 조직의 재생 효과 확인
- [163]
- [164] 실시예 1-1에 따라 직접교차분화된골아세포가 골 조직을 재생하는지 확인하기 위해 두개골 결함 마우스 모델에 실시예 및 비교예 세포들을 적용하였다.
- [165]
- [166] 해당 실험을 위해서 8주령 마우스 모델에서 두개골을 외과적으로 4mm 크기의구멍을 내는 형태로 두개골 결함 모델을 제작하였다. 실험군은 세포가 없는 스캐폴드(scaffold) 물질을 구멍에 채운 수술대조군(sham)과 실시예 1 및 비교예(비교예 1: 혈관내피세포를 그대로 사용, 비교예 2: 혈관내피세포에 BMP4만 처리, 비교예 3: 혈관내피세포에 OCT4로 유전자로 형질전환만 수행) 세포들을 넣은 스캐폴드를사용한 마우스로 분류하였다.
- [167] 8주후, 각 실험군에서 골 재생을 확인하기 위해 뼈가 채워진 형태를 SkyScan1172 (SkyScan) micro-CT 장비로 촬영하고, ReCon Micro-CT이미지 분석 프로그램을 통해 BV/TV %를 측정하여 골 재생 정도를 확인하였다(도 7)
- [168]
- [169] 골 재생의 정도를 확인한 결과, 비교예 세포들을 투여하거나 수술대조군(sham) 대비 OCT4 유전자로 형질전환된혈관내피세포에 BMP4를 처리한 실시예 1 세포를 투여한 마우스에서 현저히 높은 골 재생이 나타났다.
- [170]
- [171] 각 실험군에서 골 재생의 정도를 조직학적으로 확인하기 위해 Masson's trichrome 염색으로 골 재생 정도를 확인하였다. 두개골을 뜨거운 파라핀에 고정한 후, -20도씨 정도 되는 차가운 plate에 굳혀블락을 만들어 준 뒤, 절편기(sectioning)를 이용하여 얇게 잘라 유리슬라이드에 붙였다.붙은 유리슬라이드에 있는 파라핀을 100%, 95%, 70% 알코올로 옮겨가며 없애주었다.그 뒤,물에5-10분간 담가 남아있는 알코올을 없애주었다.먼저 hematoxylin solution으로 10분간 염색해 주고,다시 10분간 물에 씻어 주었다.그 뒤,Biebrich scarlet-acid fuchsin solution에 10-15분간 염색 후 물에 씻어 주었다.마지막으로 phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution에 10-15분간 염색하여 콜라젠을 destaining 한 후, aniline blue solution으로 5-10분간 염색하고 물에 잠시 씻은 뒤 1% acetic acid solution에 2-5분간 담가 주었다. Dehydration을 위해 물에 씻어 준 뒤, 95% ethyl alcohol, 100% ethyl alcohol, xylene에 옮겨 주었다.그 뒤,mounting solution에 mount 해 주었다.
- [172]
- [173] 그 결과, OCT4 유전자로 형질전환된혈관내피세포에 BMP4를 처리한 실시예 1 세포를 투여받은 마우스의 골 조직이 원래의 골 조직과 유사한 형태로 재생되는 것을 확인하였다(도 8).
- [174]
- [175] <실시예 2>세포투과성 펩티드 및 OCT4 융합 단백질 복합체를

혈관내피세포에 도입한 골아세포의 직접교차분화

[176]

[177] 실시예 2-1. CPP-OCT4 융합 단백질 복합체의 제조방법

[178]

[179] 세포 투과 단백질(Cell Penetrating Peptide, CPP)에 OCT4 단백질이 융합된 CPP-OCT4 복합체 단백질을 제조하였다. 먼저, OCT4와 결합되는 세포 투과성 단백질은 세포 투과성을 지닌 것으로 보고된 바 있는 30kc19을 사용하였다. 본 실험에 사용된 30Kc19의 아미노산 서열은 다음과 같다(서열번호 23).

[180] [표4]

30Kc19 (1-239 AA) 아미노산 서열
ADSDVPNDILEEQLYNSVWVADYDSAVEKSKHLYEEKKSEVITNVVNLIRNNKMNCMEY
AYQLWLQGSKDIVRDCFPVEFRLIFAENAIKLMYKRDGLALTLSDVQGGDGRPRYGDGK
DKTSPRVSWKLIALWENNKVYFKILNTERNQYLVLGVGTNWNGDHMAFGVNSVDSFRAQW
YLQPAKYDNDVLFYIYNREYSKALTLRSRTVEPSGHRMAWGYNGRVIGSPEHYAWGIKAF

[181] 30kc19 유전자와 OCT4 유전자를 pET-23a 벡터에 클로닝한 후, BL21 박테리아에 해당 OCT4 유전자가 담긴 벡터를 삽입하였다. 이후 37°C에서 박테리아 배양 이후 His Tag를 활용하여 CPP-OCT4 복합체 단백질을 정제하였다.

[182]

[183] CPP-OCT4 융합 복합체 단백질은 고속 단백질 액체 크로마토그래피(Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC)를 통해 정제하였고, 이를 SDS-PAGE 젤에 Coomassie Blue로 염색하여 확인하였다. CPP-OCT4 복합체 단백질의 농도는 표준 BSA 농도를 비교 대조하여 측정하였다(도 10 내지 도 12).

[184]

[185] 실시예 1-1에 기재된 방법에 따라 배양한 혈관내피세포를 골아세포로 분화하기 위해 무혈청 EGM-2 배지에서 40 µg의 CPP-OCT4 복합체 단백질과 10 ng/mL 농도의 BMP4(RnD systems, USA)로 24시간 처리하였다. BMP4를 같은 조건을 24시간 처리하고, 뼈 분화 배지인 StemPro Osteogenesis medium(Thermo, USA)에 14일 동안 배양하여 골아세포로 분화시켰다.

[186]

[187] 실시예 2-2. CPP-OCT4 복합체의 세포 안전성 및 투과

[188]

[189] 수득한 CPP-OCT4 복합체 단백질을 혈관내피세포에 0, 20, 40, 60, 80 μg 으로 처리한 후, 염색을 통한 LIVE/DEAD 분석을 통해 세포 독성을 확인하였다. 초록색은 Calcein 성분으로 염색된 살아있는 세포이고, 붉은색은 EtBr 성분으로 염색된 죽은/죽어가는 세포이다(도 13).

[190] 또한, CPP-OCT4 복합체 단백질의 세포 투과 여부를 확인하기 위해, CPP-OCT4 복합체 단백질의 일부인 T7에 결합하는 형광 항체를 이용하여 CPP-OCT4 복합체 단백질을 혈관내피세포에 0, 4, 8, 12, 24 시간째 처리하여 세포 투과 여부를 확인하였다(도 14).

[191]

[192] 실시예 2-3. 세포 유전자 유형 변화

[193]

[194] 실시예 2-1의 직접교차분화방법에 따른 혈관내피세포의 변화를 확인하기 위해, 실시예 및 비교예의 세포에서 혈관내피세포 특이적 유전자(CD31, VECAD, VEGFR-2) 및 중간엽줄기세포 특이적 유전자 (VIMENTIN, TWIST, SLUG)의 발현 정도를 실험예 3-1과 동일한 RT-PCR로 확인하였다(도 15).

[195]

[196] 실시예 2-4. 단백질 발현 유형 변화

[197]

[198] 실시예 2-1의 직접교차분화방법에 따라 혈관내피세포의 변화를 확인하기 위해, 실시예 및 비교예의 세포에서 혈관내피세포 특이적 단백질(CD31) 및 중간엽내피세포 특이적 단백질(αSMA)의 발현 정도를 면역화학염색법(immunocytochemistry)을 통해 확인하였다.

[199] 그 결과, 비교예들에 비해 CPP-OCT4 복합체 단백질과 BMP4를 처리한 실시예 2에서 혈관내피세포 특이적 단백질(CD31)과 중간엽내피세포 특이적 단백질(αSMA)의 발현 정도가 높게 나타났다(도 16).

[200]

[201] 실시예 2-5. 혈관 형성 확인

[202]

[203] 실시예 2-1의 직접교차분화방법에 따른 혈관내피세포의 변화를 확인하기 위해, 형광 분석을 통해 혈관 형성을 확인하였다.

[204]

[205] Matrigel (BD #354234)을 세포배양디쉬에 도포한 후 37도에서 30분 기다린 이후, 실시예 및 비교예의 세포를 matrigel 위에 VEGF(10ng/ml)과 FBS가 함유된 배지에서 12시간동안 배양하였다. 이후, 팔로이딘으로 세포를 형광 염색하여 혈관 형성을 관찰하였다(도 17).

[206]

[207] 실시예 2-6. 골아세포 특이적 마커 유전자의 발현

[208]

[209] 실시예 2-1의 직접교차분화방법에 따라 혈관내피세포가골아세포로 분화되었는지 확인하기 위해, 실시예 및 비교예의 세포에서 골아세포 특이적인 마커인 Col1(colagen type-1), OPN(Psteopontin) 및 BSP 유전자의 발현 정도를 RT-PCR로 확인하였다. 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[210] [표5]

유전자	프라이머 서열 (정방향)	프라이머 서열 (역방향)
Col1	GTCACCCACCGACCAAGAAACC (서열번호 24)	AAGTCCAGGCTGTCCAGGGATG (서열번호 25)

[211] 실시예 및 비교예세포들에서골아세포 특정 유전자인 Cal1, OPN 및 BSP의 발현 정도를 확인한 결과, CPP-OCT4 복합체 단백질과 BMP4를 처리한 실시예 2에서 골아세포 특이적 유전자의 발현이 높게 유지되는 것을 확인하였다(도 18).

[212]

[213] 실시예 2-7. 석회화 정도 확인

[214]

[215] 실시예 2-1의 직접교차분화방법에 따라 혈관내피세포가골아세포로 분화되었는지 확인하기 위해, 칼슘염을 염색하는 알리자린(alizarin) 염색을 이용하여 실시예 및 비교예에서 세포의 석회화 정도를 확인하였다.

[216]

[217] 실시예 및 비교예 세포에서 석회화 정도를 확인한 결과, 비교예들에 비해 CPP-OCT4 복합체 단백질과 BMP4를 처리한 실시예 2에서 붉은색의 염색 부분이 많이 나타나므로 석회화가 가장 많이 진행된 것을 확인하였다(도 19).

[218] 실시예 2-8. 골 조직의 재생 효과 확인

[219]

[220] 실시예 2-1의 직접교차분화방법에 따라 혈관내피세포가골아세포로 분화되었는지 확인하기 위해, 두개골 결함 마우스 모델에 실시예 및 비교예 세포들을 적용하였다.

[221]

[222] 골 재생의 정도를 확인한 결과, 비교예 세포들을 투여하거나 수술대조군(sham) 대비 CPP-OCT4 복합체 단백질과 BMP4를 처리한 실시예 2 세포를 투여한 마우스에서 현저히 높은 골 재생 효과를 확인하였다(도 20).

[223]

[224] <실시예 3> 비스포스포네이트가 결합된 세포투과성 펩티드 및 OCT4 융합 단백질 복합체를 혈관내피세포에 도입한 골아세포의 직접교차분화

[225]

[226] 실시예 3-1. BP-CPP-OCT4 융합 단백질 복합체의 제조방법

[227]

[228] 골아세포의 직접교차분화를 in vivo로 실행하기 위해서 CPP-OCT4 복합체 단백질에 비스포스포네이트(bisphosphonate, BP)를 결합한 BP-CPP-OCT4 복합체 단백질을 제조하였다.

[229]

[230] 비스포스포네이트 계열의 알렌드로네이트(alendronate)를 사용하여, CPP와 결합하였다. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) 와 Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide)를 이용하여 CPP 단백질의 카르복실기와 알렌드로네이트의 아민기를 결합하여 BP-CPP-OCT4 복합체 단백질을 제조하였다.

[231]

[232] 이후, 제조된 BP-CPP-OCT4 복합체 단백질은 5 mg/ml 농도로 deuterium oxide(D₂O)에 녹여 핵자기 공명을 통해 결합된 여부와 질량을 확인하였다.

[233]

[234] 실시예 3-2. 골다공증 유발 동물 모델 제조

[235]

[236] 본 발명에 따른 직접교차분화 방법에 따라 골다공증이 개선되는 지 확인하기 위해, C3H 암컷 마우스에서 난소를 절제하여 골다공증 동물모델을 제작하였다. 치사 후 대퇴골을 micor-CT로 촬영하여 골다공증 발병 여부를 확인하였다.

[237]

[238] 실시예 3-3. BP-CPP-OCT4 복합체를 이용한 골다공증 치료 효과 확인

[239]

[240] BP-CPP-OCT4 복합체 단백질의 골다공증 개선 효과를 확인하기 위해, 골다공증 유발 동물모델에 BP-CPP-OCT4 복합체 단백질을 투여하였다.

[241]

[242] 골다공증 유발 동물모델은 외과 시술에 의해 난소가 절제된 마우스로, 난소 절제 2주 후에 2.5 mg의 BP-CPP-OCT4 복합체 단백질 투여군, 0.125 mg의 알렌드로네이트 투여군으로 나누어 6주간 단백질/kg/wk의 투여량으로 정맥 투여한 후 골다공증이 개선되었는지 확인하였다(도 21).

[243]

[244] 그 결과, BP-CPP-OCT4 복합체 단백질을 정맥 투여한 골다공증 질환 마우스에서 치료 효과를 확인하였다.

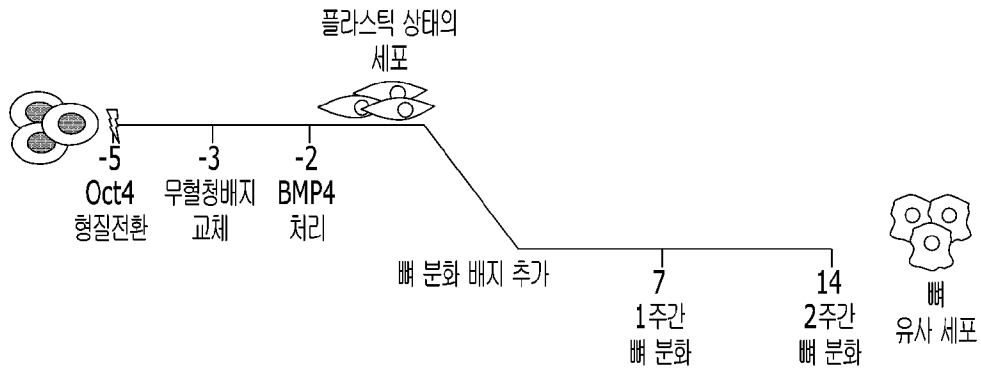
청구범위

- [청구항 1] OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) 단백질, 그의 융합체 또는 운반체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 및 상기 핵산분자가 도입된 벡터 중 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자; 및 근골격계 성장인자를 체세포에 처리하는 단계를 포함하는, 체세포에서 골 관련 세포로의 직접교차분화 방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 체세포는 혈관내피세포, 중간엽 줄기세포, 지방세포, 및 섬유아세포 중 1종 이상의 세포인 방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 골 관련 세포는 골아세포인 방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 OCT4 발현 촉진 인자를 체세포에 처리하는 단계 이전에, 체세포를 배양하는 단계를 더 포함하는 방법.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 OCT4 발현 촉진 인자를 체세포에 처리하는 단계 이후에, 체세포를 무혈청 배지에서 안정화하는 단계를 더 포함하는 방법.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 근골격계 성장인자는 IGF-1, TGF, BMP, 오스테오제닌(osteogenin), Osx(Osterix), 및 RUNX2(Runt-related transcription factor 2) 중 선택되는 1종 이상의 인자인 방법.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 근골격계 성장인자는 BMP4인 방법.
- [청구항 8] 제 6 항에 있어서, 상기 근골격계 성장인자는 0.1 내지 500 ng/mL의 농도로 첨가되는 것인 방법.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 체세포에 근골격계 성장인자를 첨가하는 단계를 수행한 이후, 체세포를 뼈 분화 배지에서 배양하는 단계를 더 포함하는 방법.
- [청구항 10] 제 1 항의 직접교차분화 방법을 수행하여 제조되는 골 관련 세포.
- [청구항 11] 제 10 항의 골 관련 세포를 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서, 상기 골 관련 질환은 골다공증(osteoporosis), 골연화증(osteomalacia), 골감소증(osteopenia), 골위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 페이지켓병(Paget's disease), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 암(cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절(fracture), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 골염(Osteitis) 및 골형성부전증(Osteogenesis Imperfecta)으로부터 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 세포 치료제.
- [청구항 13] 제 10 항의 골 관련 세포를 이용한 골 관련 질환 치료 물질 스크리닝 방법.
- [청구항 14] 제 10 항의 골 관련 세포를 포함하는 골 관련 질환 진단용 조성물.
- [청구항 15] OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) 단백질 또는 그의 융합체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및 상기 핵산 분자가 도입된 벡터 중

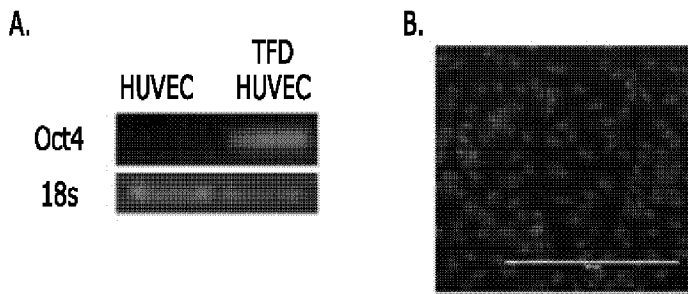
- 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자; 및
근골격계 성장인자
를 포함하는, 체세포에서 골 관련 세포로의 직접교차분화 유도용 조성물.
- [청구항 16] 제 15 항에 있어서, 상기 OCT4 발현 촉진 인자는 OCT4 단백질을 코딩하는 핵산 분자가 도입된 벡터인 조성물.
- [청구항 17] 제 16 항에 있어서, 상기 OCT4 발현 촉진 인자는 비바이러스성 벡터인 조성물.
- [청구항 18] 제 15 항에 있어서, 상기 OCT4 발현 촉진 인자는 세포투과성 펩티드가 융합된 OCT4 단백질인 조성물.
- [청구항 19] 제 15 항에 있어서, Sox2, Klf4, C-Myc 또는 Lin28 단백질을 포함하지 않는 조성물.
- [청구항 20] OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) 단백질, 그의 융합체 또는 운반체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 및 상기 핵산 분자가 도입된 벡터 중 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자를 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 21] 제 20 항에 있어서, 상기 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자를 혈관내피세포 내로 전달할 수 있는 물질을 더 포함하는 조성물.
- [청구항 22] 제 20 항에 있어서, 상기 OCT4 단백질 융합체는 세포투과성 펩티드가 융합된 OCT4 단백질인 조성물.
- [청구항 23] 제 22 항에 있어서, 상기 세포투과성 펩티드는 30K 단백질인 조성물.
- [청구항 24] 제 20 항에 있어서, 상기 OCT4 단백질 융합체는 혈관내피세포 내로 전달될 수 있는 것인 조성물.
- [청구항 25] 제 20 항에 있어서, 상기 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자를 뼈 부위로 전달할 수 있는 물질을 더 포함하는 조성물.
- [청구항 26] 제 20 항에 있어서, 상기 OCT4 단백질 융합체는 골 조직 혹은 골수 조직특이적 전달 물질이 컨쥬게이션 또는 융합된 세포투과성 펩티드에 융합된 OCT4 단백질인 조성물.
- [청구항 27] 제 26 항에 있어서, 상기 골 조직 특이적 전달 물질은 상기 OCT4 단백질 융합체에 결합된 비스포스포네이트 계열 화합물인 조성물.
- [청구항 28] 제 20 항에 있어서, 상기 골 관련 질환은 골다공증(osteoporosis), 골연화증(osteomalacia), 골감소증(osteopenia), 골위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 페이지젯병(Paget's disease), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 암(cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절(fracture), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 및 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)으로부터 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 조성물.
- [청구항 29] OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) 단백질, 그의 융합체 또는 운반체, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 및 상기 핵산분자가 도입된

- 벡터 중 1종 이상의 OCT4 발현 촉진 인자를 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 골 관련 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법.
- [청구항 30] 제 29 항에 있어서, 정맥 주사로 투여되는, 골 관련 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법.
- [청구항 31] 제 29 항에 있어서, 뼈 관련 질환 부위에 국소 투여되는, 골 관련 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법.
- [청구항 32] 세포투과용 전달물질이 융합된 OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) 단백질 융합체.
- [청구항 33] 제 32 항에 있어서, 세포투과용 전달물질은 세포투과성 펩티드인 단백질 융합체.
- [청구항 34] 골 조직 특이적 전달 물질이 결합된, 세포투과용 전달물질이 융합된 OCT4 (OCTamer-binding transcription factor 4) 단백질 융합체.

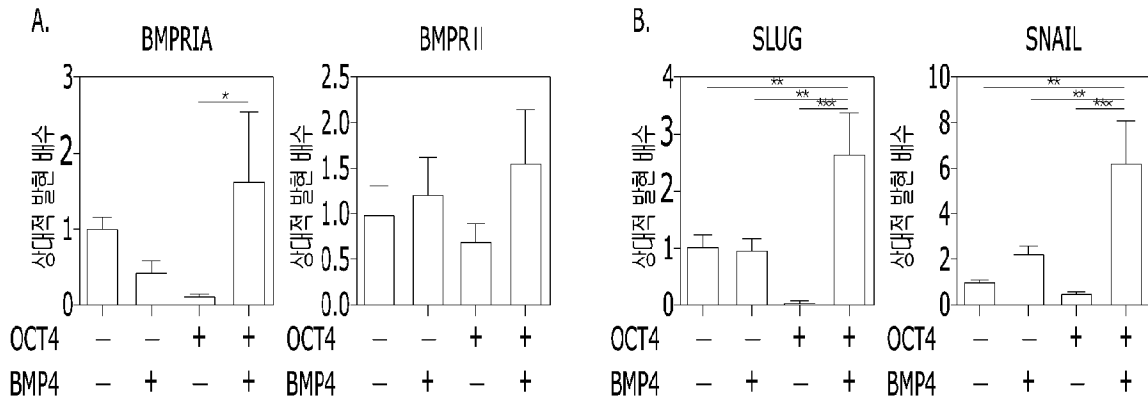
[도1]



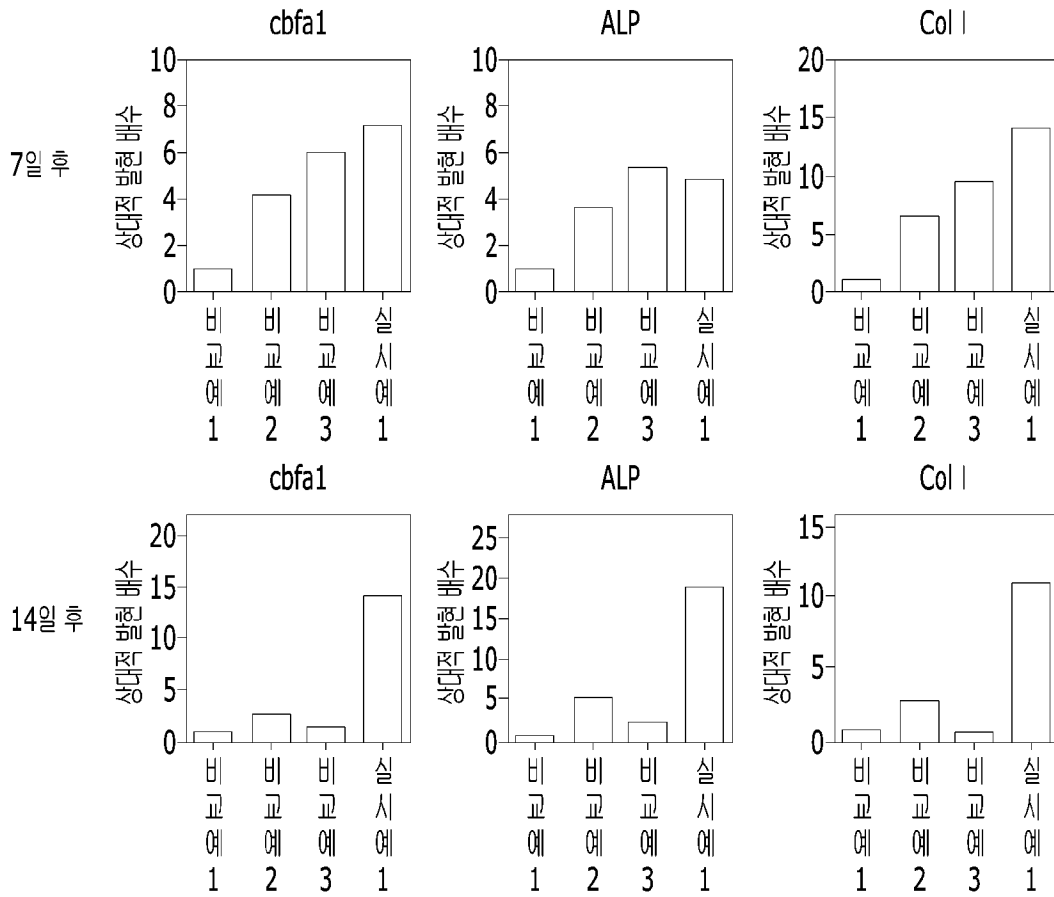
[도2]



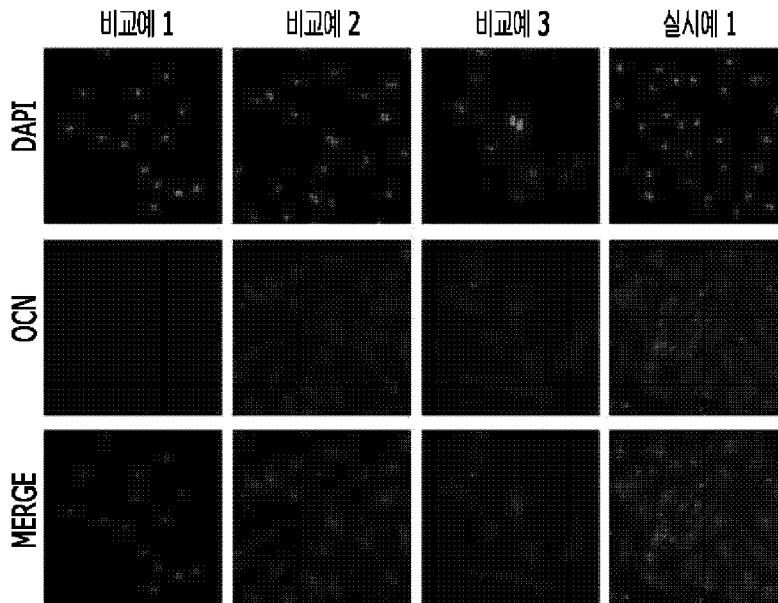
[도3]



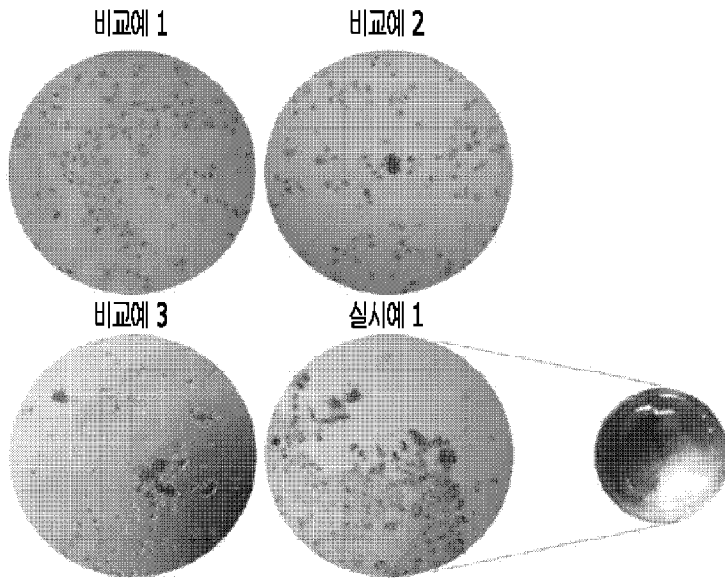
[도4]



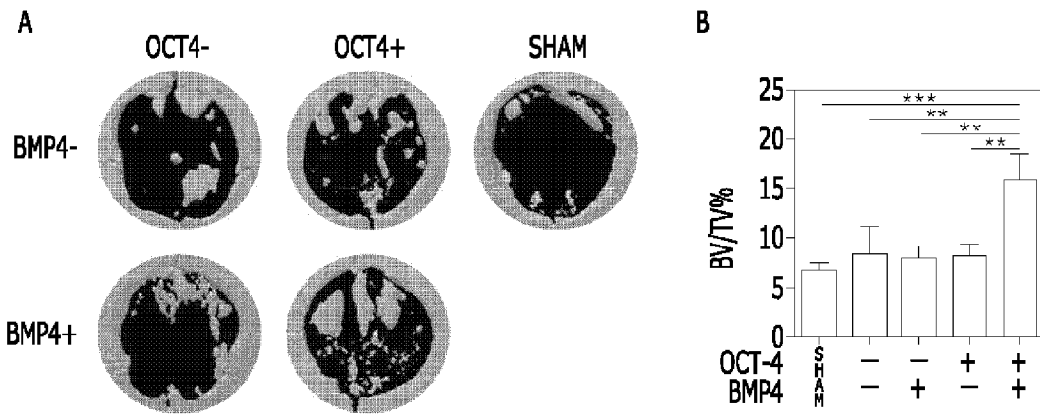
[도5]



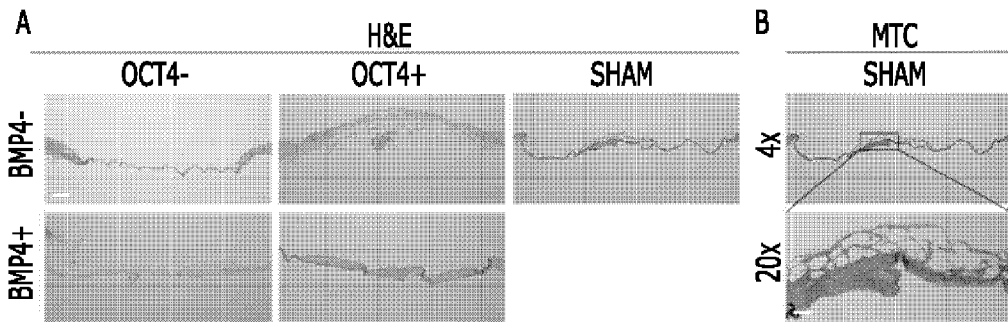
[도6]



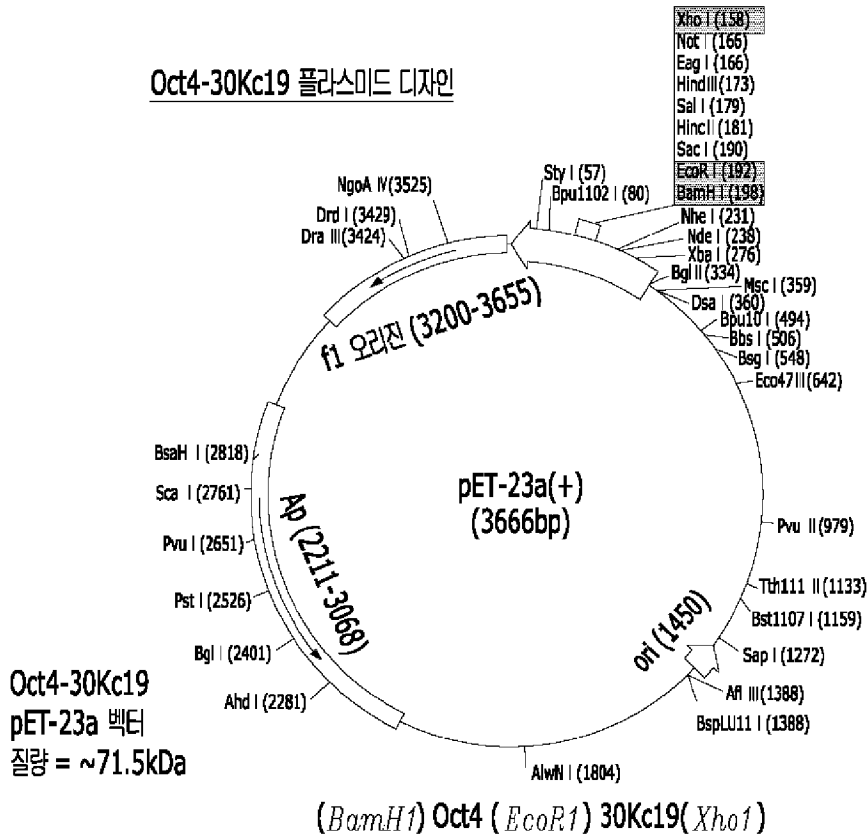
[도7]



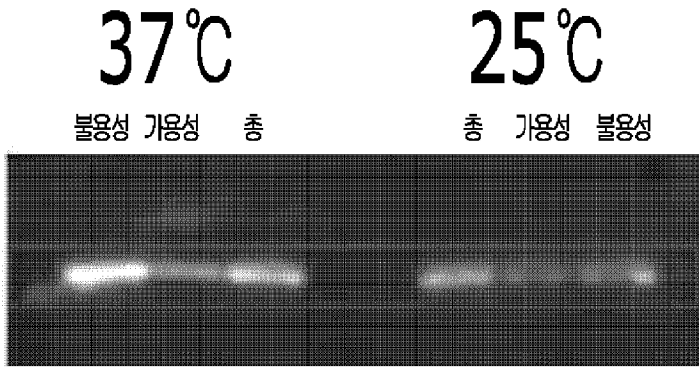
[도8]



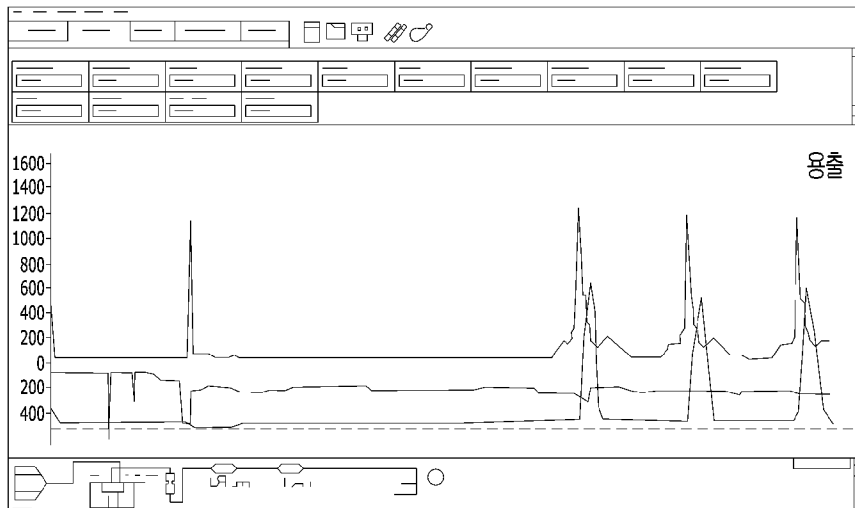
[도9]



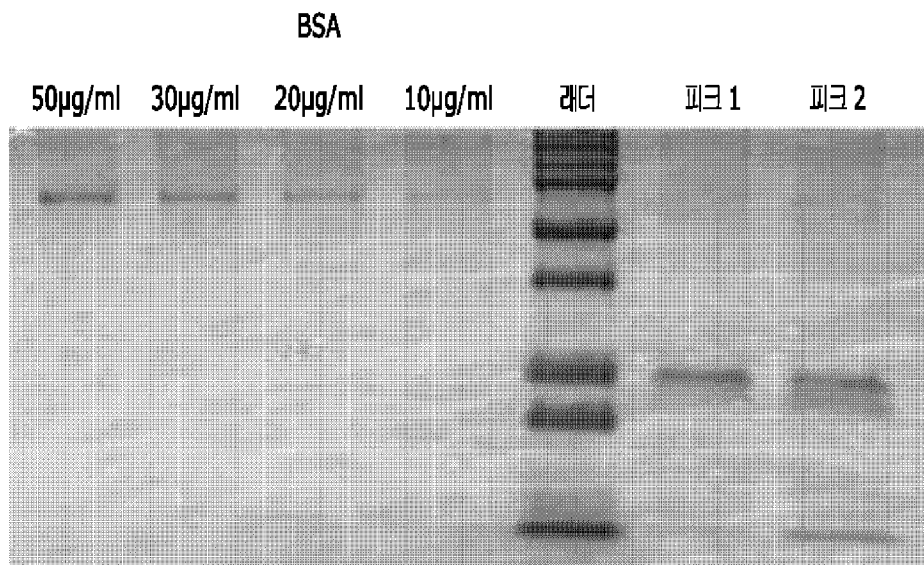
[도10]



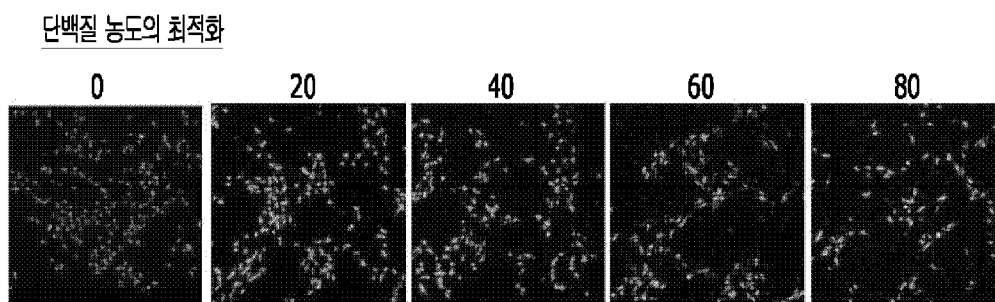
[도11]



[도 12]

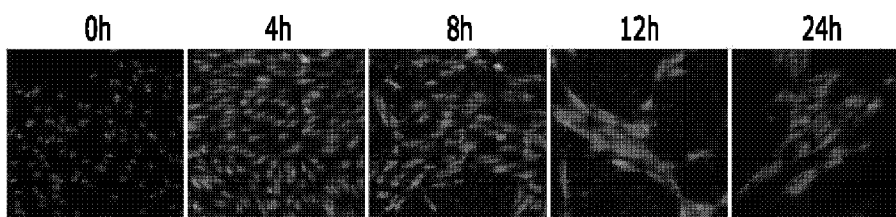


[도 13]

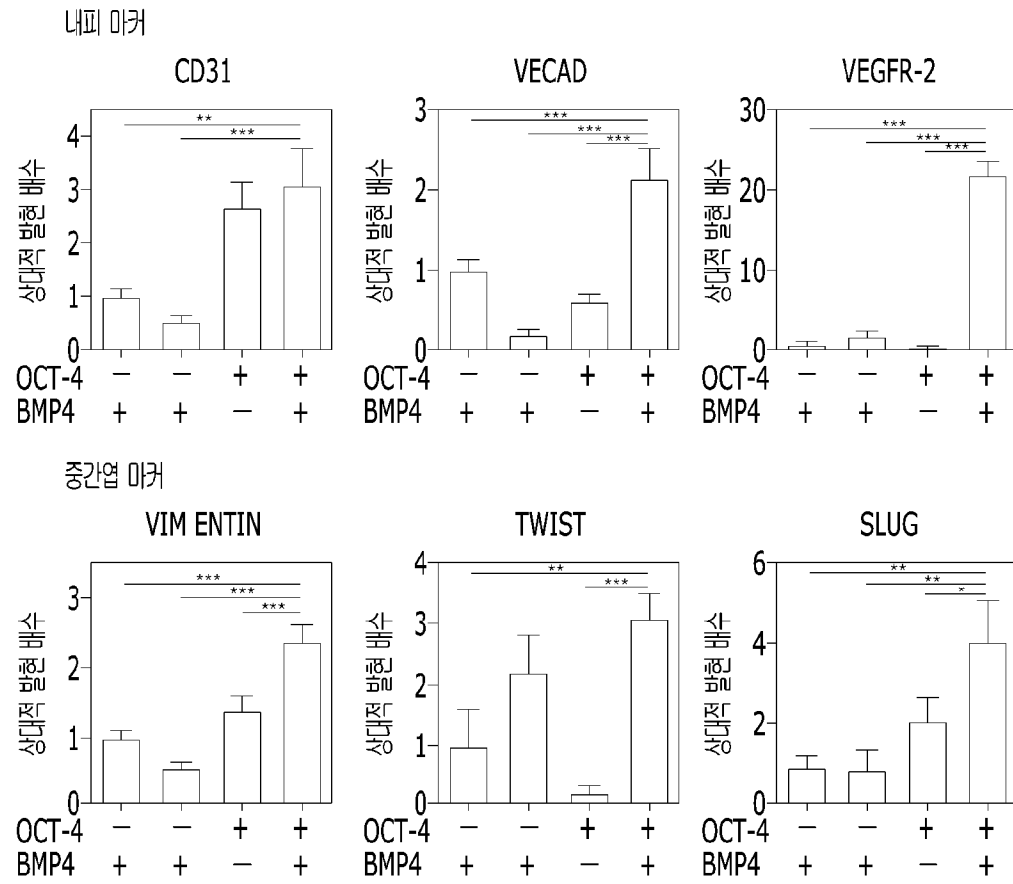


[도 14]

Oct4-30Kc19 세포 침입도 → T7의 ICC

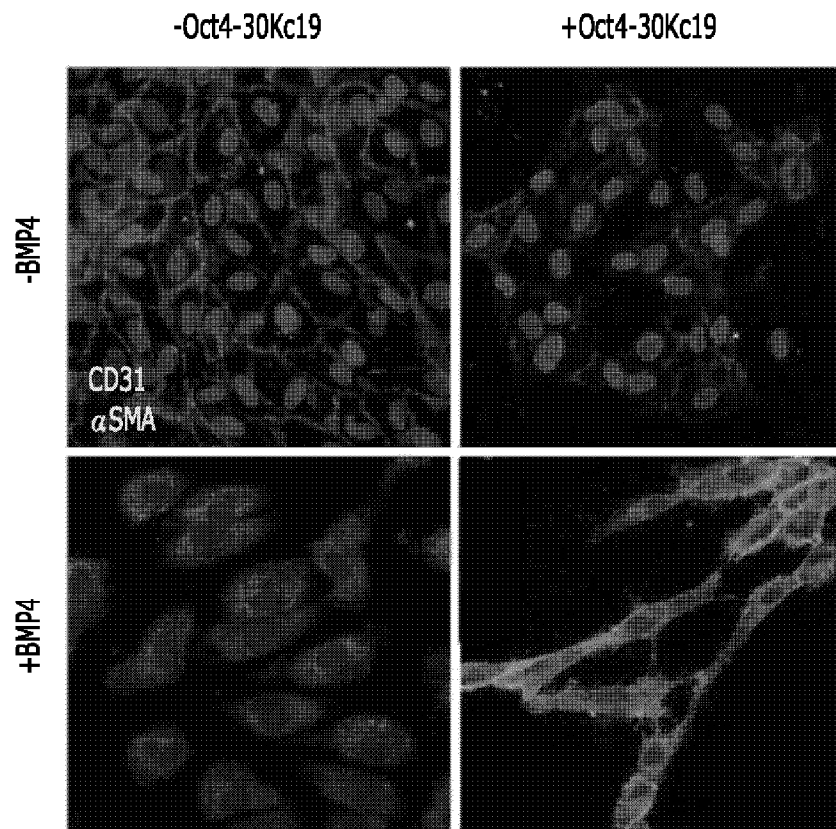


[도 15]



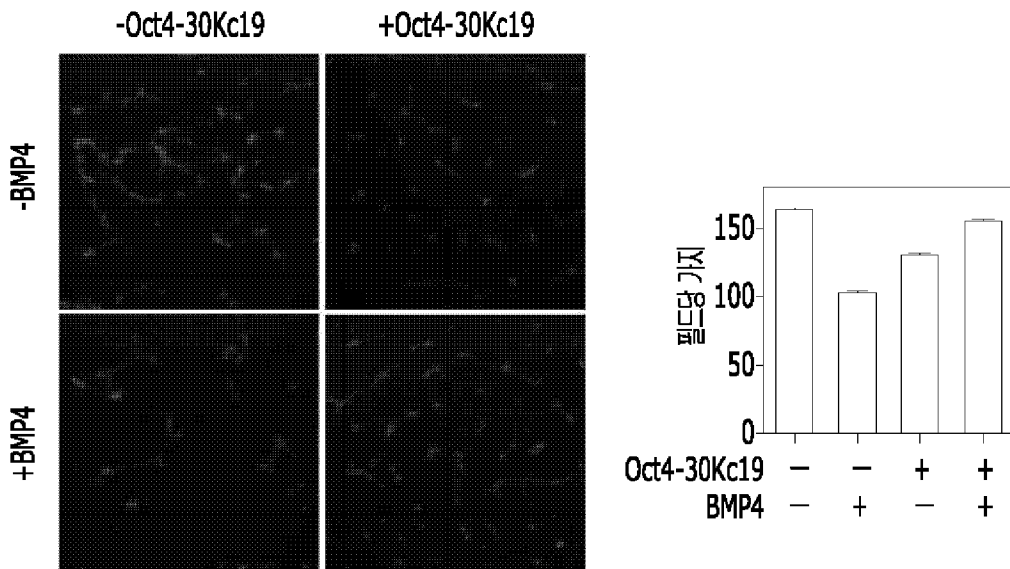
[도 16]

내피 & 중간엽 단백질 발현:

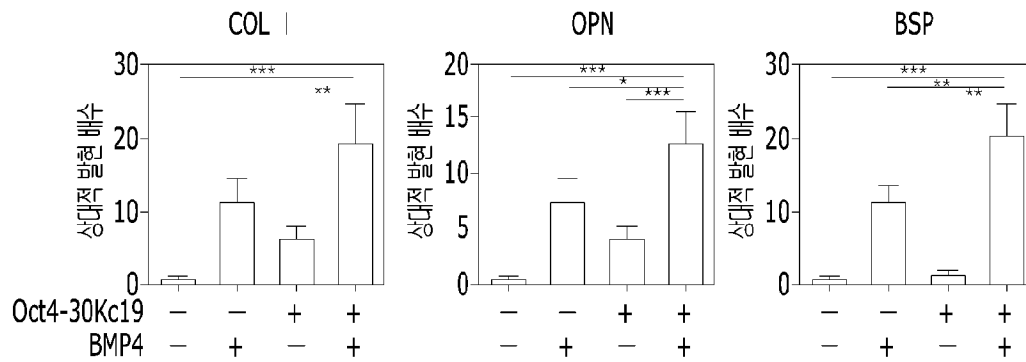


[도17]

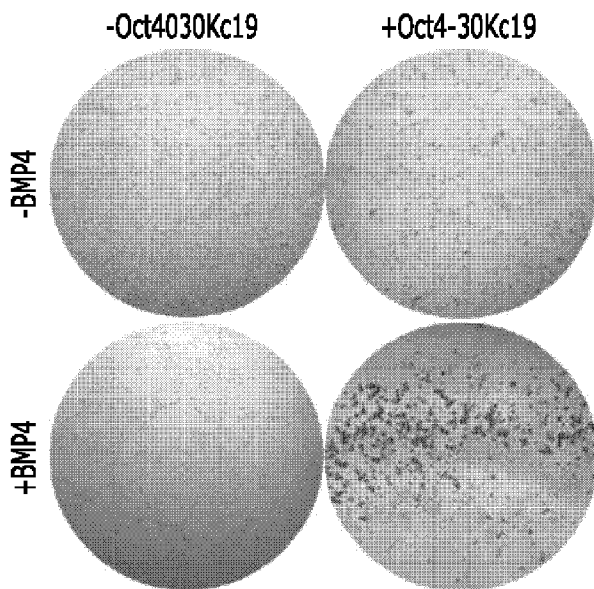
골관 형성 분석:



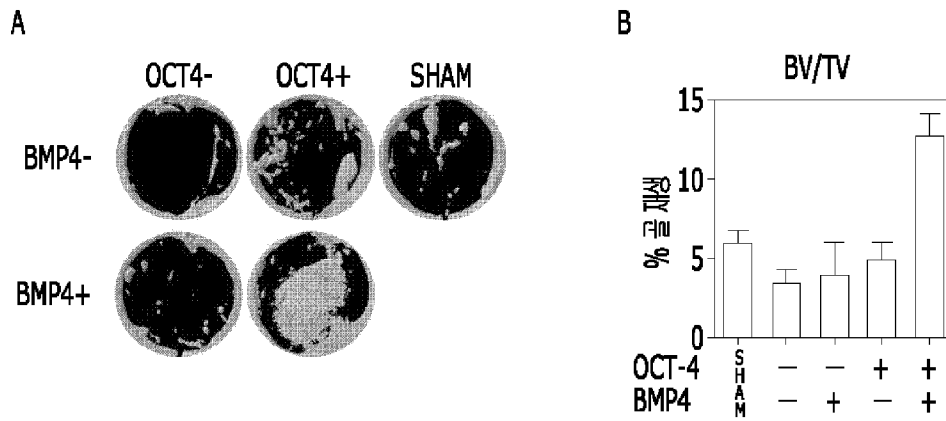
[도18]



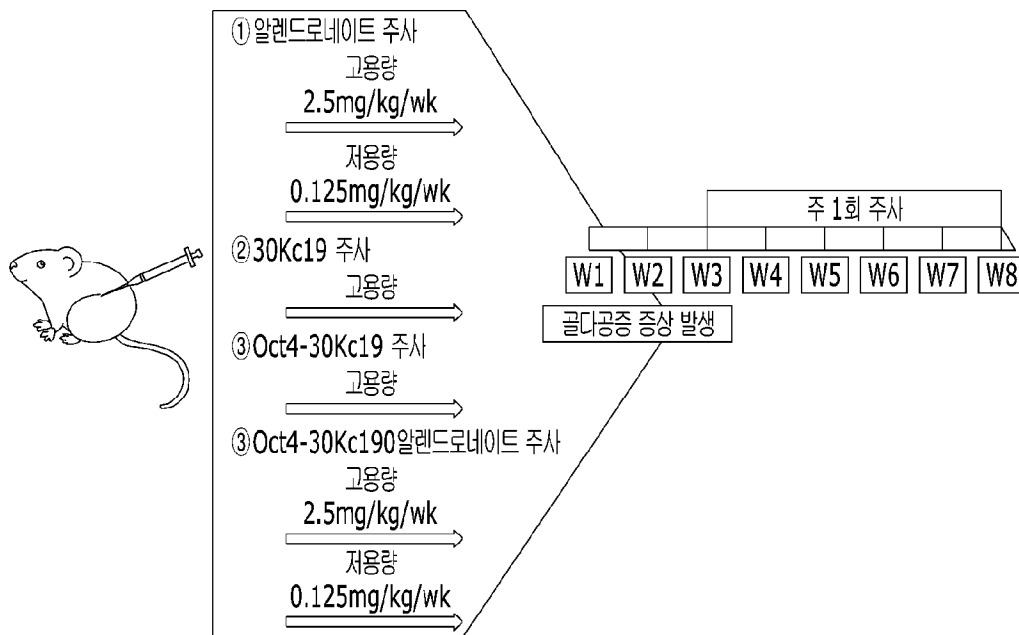
[도19]



[도20]



[도21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/005103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/077(2010.01)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 5/077; C07K 14/495; C12N 15/85; C12N 5/02

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: OCT4(OCTamer-binding transcription factor 4), musculoskeletal growth factor, osteoblast, vascular endothelial cell, direct conversion

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016-0160180 A1 (KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION) 09 June 2016 See claims 1-13; paragraphs [0041], [0099], [0112], [0123].	1-17,19,20,28
Y		18,21-27,32-34
Y	SVENSEN, N. et al. Peptides for cell-selective drug delivery. Trends in Pharmacological Sciences. 2012, vol. 33, no. 4, pages 186-192 See abstract; pages 186, 188; tables 1, 2; figure 1.	18,21-27,32-34
Y	KWON, J. et al. Direct conversion of human umbilical vein endothelial cells in to osteoblasts using cell penetrating peptide, 30Kc19. 5th International Mammalian Synthetic Biology Workshop. 05 May 2018, poster presentation See abstract.	18,22,23,32,33
X	YAMAMOTO, K. et al. Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors. PNAS. 12 May 2015, vol. 112, no. 19, pages 6152-6157 See abstract; pages 6152-6154; figures 1-5.	1-17,19,20,28
Y		18,21-27,32-34
A	WO 2011-112671 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE et al.) 15 September 2011 See the entire document.	1-28,32-34



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

12 AUGUST 2019 (12.08.2019)

Date of mailing of the international search report

12 AUGUST 2019 (12.08.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/005103

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **29-31**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 29-31 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/005103

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2016-0160180 A1	09/06/2016	CN 105555955 A EP 3026112 A1 JP 6516672 B2 KR 10-2016-0034416 A WO 2015-012377 A1	04/05/2016 01/06/2016 22/05/2019 29/03/2016 29/01/2015
WO 2011-112671 A2	15/09/2011	US 2013-0078718 A1 WO 2011-112671 A3	28/03/2013 29/12/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/077(2010.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/077; C07K 14/495; C12N 15/85; C12N 5/02 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: OCT4(OCTamer-binding transcription factor 4), 근골격계 성장인자(musculoskeletal growth factor), 골아세포(osteoblast), 혈관내피세포(vascular endothelial cell), 직접교차분화(direct reprogramming, direct conversion)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2016-0160180 A1 (KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION) 2016.06.09 청구항 1-13; 단락 [0041], [0099], [0112], [0123] 참조.	1-17, 19, 20, 28
Y		18, 21-27, 32-34
Y	SVENSEN, N. 등, `Peptides for cell-selective drug delivery`, Trends in Pharmacological Sciences, 2012, 33권, 4호, 페이지 186-192 초록; 페이지 186, 188; 표 1, 2; 도면 1 참조.	18, 21-27, 32-34
Y	KWON, J. 등, `Direct conversion of human umbilical vein endothelial cells in to osteoblasts using cell penetrating peptide, 30Kc19`, 5th International Mammalian Synthetic Biology Workshop, 2018.05.05, poster 발표 초록 참조.	18, 22, 23, 32, 33
X	YAMAMOTO, K. 등, `Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors`, PNAS, 2015.05.12, 112권, 19호, 페이지 6152-6157 초록; 페이지 6152-6154; 도면 1-5 참조.	1-17, 19, 20, 28
Y		18, 21-27, 32-34
A	WO 2011-112671 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE 등) 2011.09.15 전체 문헌 참조.	1-28, 32-34
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 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 08월 12일 (12.08.2019)		국제조사보고서 발송일 2019년 08월 12일 (12.08.2019)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 이기철 전화번호 +82-42-481-3353 

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: 29-31
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 29-31은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2016-0160180 A1	2016/06/09	CN 105555955 A EP 3026112 A1 JP 6516672 B2 KR 10-2016-0034416 A WO 2015-012377 A1	2016/05/04 2016/06/01 2019/05/22 2016/03/29 2015/01/29
WO 2011-112671 A2	2011/09/15	US 2013-0078718 A1 WO 2011-112671 A3	2013/03/28 2011/12/29