

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2020년 1월 9일 (09.01.2020)



(10) 국제공개번호  
**WO 2020/009444 A1**

(51) 국제특허분류:

*A61K 35/545* (2014.01) *A61P 25/28* (2006.01)  
*A61K 35/28* (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/008081

(22) 국제출원일:

2019년 7월 2일 (02.07.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0076719 2018년 7월 2일 (02.07.2018) KR  
10-2018-0089538 2018년 7월 31일 (31.07.2018) KR  
10-2019-0079666 2019년 7월 2일 (02.07.2019) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826

서울시 관악구 관악로 1 (신림동), Seoul (KR). 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 종로구 대학로 101 (연건동), Seoul (KR).

(72) 발명자: 성경준 (SUNG, Jung-Joon); 03080 서울시 종로구 대학로 101 서울대학교병원 의생명연구원, Seoul (KR). 김기윤 (KIM, Ki Yoon); 03080 서울시 종로구 대학로 101 서울대학교병원 의생명연구원, Seoul (KR). 전계선 (JEON, Gye Sun); 06299 서울시 강남구 언주로 117 9동 305호, Seoul (KR).

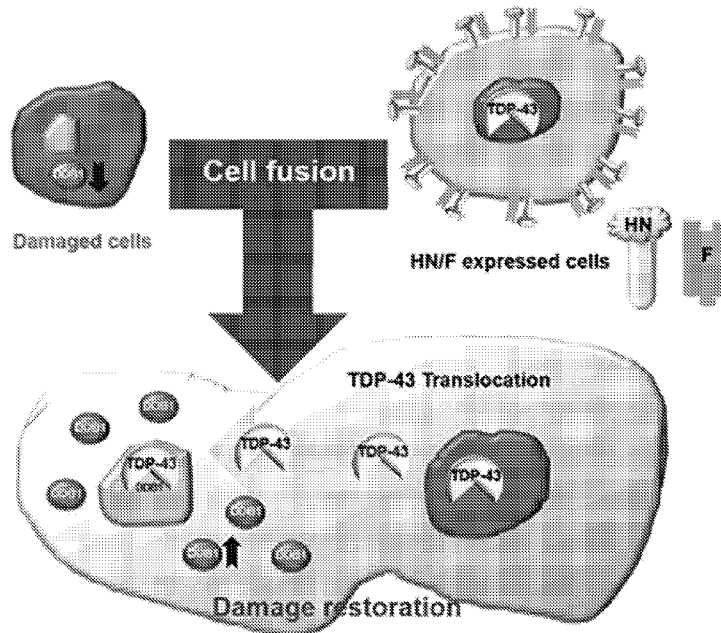
(74) 대리인: 김보민 (KIM, Bo-min); 06736 서울시 서초구 강남대로 212 8층, Seoul (KR).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

(54) Title: GENE AND CELL THERAPY PRODUCT USING CELL FUSION TECHNOLOGY AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 세포융합 기술을 이용한 유전자 및 세포 치료제 및 이의 용도

[도21]



(57) Abstract: The present invention relates to a gene and cell therapy product using a cell fusion technology and a use thereof. More particularly, cells which overexpress hemagglutinin neuraminidase (HN) and F (fusion) protein were found to have an improved cell fusion potential with other cells thanks to the HN and F proteins and restore cells that have been damaged or are undergoing death, or genetically aberrant cells to normal cells through cell fusion therewith. Thus, a vector carrying a gene coding for the HN/F protein or cells transformed therewith can be advantageously used as an effective ingredient of a composition for prevention or treatment of cell damage-related diseases, such as neurodegenerative diseases or neuropathy, or muscular degenerative diseases or myopathy.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/009444 A1

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.

- (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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(57) 요약서: 본 발명은 세포융합 기술을 이용한 유전자 및 세포 치료제 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 과발현하는 세포가 HN 및 F 단백질에 의해 다른 세포와의 세포융합력이 증진되고, 손상 또는 사멸 중인 세포, 또는 유전자 이상이 있는 세포와의 세포융합을 통해 정상 세포로의 회복이 이루어지는 것을 확인하였으므로, 상기 HN/F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터 또는 이로 형질전환된 세포를 세포 손상과 관련된 질환, 예컨대 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 세포융합 기술을 이용한 유전자 및 세포 치료제 및 이의 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 세포융합 기술을 이용한 유전자 및 세포 치료제, 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 유전자를 세포에 형질도입시켜 과발현함으로써 다른 세포와의 세포융합력을 증진시키고, 손상 또는 사멸 중인 세포, 또는 유전자 이상이 있는 세포와의 세포융합을 통해 세포 손상을 회복하고 정상 유전자를 전달할 수 있는, 세포융합 기술을 이용한 유전자 및 세포 치료제, 및 세포 손상과 관련된 질환에서의 용도에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 일반적으로 질병 및 노화는 세포 손상 및 세포 사멸에 의해 진행된다. 세포 손상 및 사멸이 유발되는 대표적인 질환으로는 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease), 근육퇴행위축(muscular dystrophy) 등이 있다.
- [4] 급속한 노령 인구의 증가에 따라, 뇌, 척추, 말초신경의 손상을 포함한 신경퇴행성 질환이 계속해서 증가하고 있는 추세이다. 신경퇴행성질환의 원인은 아직 명확하지 않다. 그리고 각각의 신경퇴행성질환의 병리기전은 조금씩 다른 기전이 작용하는 것으로 알려져 있다.
- [5] 예컨대 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 척수성 근위축(Spinal muscular atrophy), 케네디병(spinal bulbar muscular atrophy) 등은 운동신경세포만 선택적으로 사멸하여 운동기능만 퇴행되는 것이다. 그 결과 사지마비의 증상을 나타낼 수 있으며, 운동신경원 질환으로도 불린다.
- [6] 한편, 상기 운동신경원 질환과 달리 알츠하이머병, 파킨슨병 등은 뇌의 신경세포가 소실되는 대표적인 신경퇴행성 질환으로 알려져 있다. 알츠하이머병의 경우 신경세포 소실로 인해 전반적 뇌 위축 소견이 보이게 된다. 이러한 뇌 병리 소견은 질병 초기에는 주로 기억력을 담당하는 주요 뇌 부위인 해마와 내후각뇌피질 부위에 국한되어 나타나지만 점차 두정엽, 전두엽 등을 거쳐 뇌 전체로 퍼져 나간다. 이러한 뇌 병리 침범 부위의 진행에 따라 초기에는 기억력 저하가 주로 나타나다가 진행됨에 따라 점진적인 경과를 보이면서 임상 증상이 다양해지고 점점 더 심해지게 된다. 파킨슨병의 경우 중뇌에 위치한 흑질(substantia nigra, SN)의 도파민 신경(dopaminergic neuron)의 소실로 인해 유발된다. 도파민 신경의 소실은 선조체(striatum) 내의 심각한 도파민 감소를 유발하여 기저핵(basal ganglia), 시상(thalamus) 및 운동 피질(motor cortex)을 포함하는 추체외로(extrapyrmidal system)에 의한 운동 조절기능의 장애가

나타난다.

- [7] 이렇게 여러 가지 병리 기전이 작용하다 보니 어느 한 기전에 작용하는 치료제로는 병을 치료하는 것이 어려우며, 이러한 이유로 지금까지 거의 모든 임상시험이 실패하고 있고, 근본적 치료제가 전무한 상태이다. 구체적으로 ALS와 관련한 치료제로 미국 FDA 승인을 받은 치료제로는 운동신경세포를 파괴하는 과도한 글루타민산을 억제하는 리루졸(riruzole), 자유라디칼에 의한 산화 스트레스 손상을 억제하는 에다라본(edaravone) 외에는 거의 전무한 실정이며 그나마 약 3개월간의 생존연장 또는 신체기능의 악화를 미미하게 둔화시키는 효과밖에 없다. 알츠하이머병의 경우 미국 FDA 승인을 받은 치료제로 뇌신경세포의 활동을 돕는 신경전달물질 아세틸콜린을 활성화키는 아리셉트(Aricept), 엑셀론(Exelon), 나멘다(Namenda), 라자딘(Razadyne) 등이 있으나, 이들 역시 뇌세포 손상을 최소화시켜 증세를 완화하거나 진행 속도를 늦출 뿐 치료제로서는 역부족이다. 파킨슨병의 경우에도 도파민 작용제로 레보도파(levodopa)가 치료의 근간으로 사용되고 있으나 장기적 효과가 제한적이다. 다른 신경퇴행성 질환의 경우에도 완치를 위한 치료제가 없는 실정이다. 그렇기 때문에 좀 더 광범위한 기전에 작용하며 강력한 효과를 가지는 치료제가 시급하며, 이에 줄기세포치료를 포함한 새로운 치료방법이 절실히 요구되는 질환이라 할 수 있다.
- [8] 현재, 신경퇴행성 질환을 치료하기 위해서 세포 이식, 증상을 개선하는 약물의 투여 등 다양한 치료법이 제시되고 특히 최근에는 세포치료에 관심을 두고 있다. 하지만 기존의 세포치료기술은 건강한 세포(또는 줄기세포)를 질병부위에 삽입해 사멸된 세포를 대신하거나 사멸 중인 세포의 주변 환경을 개선시켜 재생시키는 것을 목표로 하나, 이러한 시도는 많은 전임상 또는 임상시험에서 효과가 없거나 효과가 미미한 정도이다. 또한, 신경세포의 경우 다른 기관과 다르게 신경회로를 형성하는 것이 기능에서 매우 중요하기에 외부에서 공급된 세포가 신경세포로 분화되어 기존 신경회로를 그대로 복원시킬 것을 기대하는 것은 매우 어려운 현실이다. 따라서 기존의 방법 이외에 새로운 신경세포 손상 완화 또는 보호를 위한 치료 방법 개발이 절실하다.
- [9]
- [10] 한편, 근육은 우리 몸을 지탱하고 생명현상을 유지하는 필수 조직이다. 근육은 근아세포(myoblast)가 분화하여 다핵의 근관세포(multinucleated myotube)를 형성하고 근육세포(myocyte)를 만들며 근아세포와 근육세포의 사멸은 여러 가지 질병의 원인이 되고 있다. 또한, 유전자 돌연변이나 여러 원인을 통한 근육세포가 소실되는 질환들이 보고되고 있으나, 현재까지 근본적인 치료제가 없는 상황이다. 이러한 근육 질환은 종류에 따라 증상 및 질환의 강도가 다양하고 뉴런이나 척수 등 신경 계통의 문제로 발생하는 복합적인 형태를 보이기도 한다.
- [11] 일례로 근육퇴행위축(muscular dystrophy)은 근육세포가 파괴되는 질환으로

유전자 이상에 의해 발생하며, 증상은 힘이 약해지고 일어나기가 힘든 것으로 시작되어 점차 심해져 호흡근육이 마비되어 사망하기도 한다. 뒤시엔느 근육퇴행위축(Duchenne muscular dystrophy; DMD), 베커 근육퇴행위축(Becker muscular dystrophy; BMD), 사지연결근육퇴행위축(Limb Girdle muscular dystrophy) 등 여러 가지 종류가 있으며 증상도 종류에 따라 다르게 나타난다. 상기 DMD 및 BMD는 X 염색체에 존재하는 Dystrophin 유전자의 이상에 의해 발생하며 1/3 정도는 자연 돌연변이, 나머지는 반성유전에 기인한다. DMD와 BMD 모두 같은 유전자의 이상이 원인이 되나, frame-shift mutation 등으로 인하여 심한 표현형을 보이는 경우를 DMD라 말한다. DMD의 경우 질환의 경과가 불량하여, 9-13세에는 거의 대부분의 환자에서 보행이 불가하며, 근력 약화뿐만 아니라 인지저하도 동반될 수 있으며, 심근병증, 호흡근 장애가 동반되어 사망에 이르게 된다. DMD의 경우 최근 exon skipping으로 치료를 시도하는 방법이 대두되고 있다. Exon skipping은 Dystrophin gene의 exon 51의 splicing enhancer 서열을 표적으로 하는데, reading frame만을 회복시켜 덜 위중한 유전자 변이로 전환시켜 주는 원리이므로, 근본적 치료 대안이 될 수 없고 모든 DMD를 대상으로 하는 치료방법이 아니다.

[12] 이처럼 근육 질환 환자들은 병이 진행됨에 따라 혼자서는 일상적인 생활을 할 수 없고 근본적인 치료제들 또한 전무한 상황이어서, 근육세포 손상 또는 사멸에 기인한 근육 질환을 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 치료법에 관한 필요성이 절실하다.

[13]

[14] 이에 본 발명자들은 신경퇴행성 질환, 근육퇴행성 질환 등 세포 손상과 관련된 질환 치료제를 개발하기 위해 노력한 결과,

헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 과발현하는 세포가 HN 및 F 단백질에 의해 다른 세포와의 세포융합력이 증진되고, 손상 또는 사멸중인 세포, 또는 유전자 이상이 있는 세포에서 세포 손상을 회복하고 정상 유전자를 전달하는 능력이 높음을 확인하였다. 이에 HN 및 F 단백질에 의한 세포융합 기술을 세포 손상을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

[15]

[16] [선행기술문헌]

[17] [특허문헌]

[18] 대한민국 공개특허 제10-2008-0026786호

[19] 대한민국 공개특허 제10-2006-0119064호

[20]

[21] [비특허문헌]

[22] Annemieke Aartsma-Rus et al., Development of Exon Skipping Therapies for

Duchenne Muscular Dystrophy: A Critical Review and a Perspective on the Outstanding Issues, Nucleic Acid Ther. 2017 Oct 1; 27(5): 251-259

[23]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

[24] 본 발명의 목적은 세포융합 기술을 이용한 유전자 및 세포 치료제 및 이의 세포 손상과 관련된 질환, 보다 구체적으로 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환에서의 용도를 제공하기 위한 것이다.

[25]

### 과제 해결 수단

[26] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[27] 또한, 본 발명은 HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[28] 또한, 본 발명은 HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 치료학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은 HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 치료학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[30] 또한, 본 발명은 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한, HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.

[31] 아울러, 본 발명은 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한, HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포의 용도를 제공한다.

[32]

### 발명의 효과

[33] 본 발명은 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 과발현하는 세포가 HN 및 F 단백질에 의해 다른 세포와의

세포융합력이 증진되고, 손상된 세포와의 융합을 통해 HN 및 F 단백질 과발현 세포 내 정상 유전자 및 전사조절인자를 손상된 세포의 핵 내로 전달하여, 손상된 세포 내 세포 회복에 관여하는 유전자의 발현을 조절하거나 정상 유전자 전달을 통한 정상 단백질을 회복함으로써, 손상된 세포를 회복하는 것을 확인하였다. 또한, 세포 손상과 관련된 다양한 질환 모델에서 HN 및 F 단백질 과발현 세포가 손상된 세포 또는 유전자 이상이 유발된 세포와 세포융합되어 정상 세포로의 회복이 이루어짐을 확인하였다.

- [34] 따라서, HN 및 F 단백질에 의한 세포융합 기술을 이용하여 세포 손상을 회복시키고 정상 유전자를 도입할 수 있으며, 이에 HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터 또는 이로 형질전환된 세포를 세포 손상과 관련된 질환, 구체적으로 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환을 치료하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[35]

### 도면의 간단한 설명

- [36] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 hATMSCs와 세포융합에 의한 사멸중인 NSC34 운동신경세포주의 세포사멸 억제효과를 나타낸 것이다.
- [37] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 hATMSCs와 세포융합이 일어난 NSC34 cell group에서 Bax 및 Bcl-xL의 발현분석을 한 것이다.
- [38] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 HN 및 F가 각각 삽입된 pcDNA3.1 발현벡터를 제작하기 위한 도식도이다.
- [39] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-hATMSCs에서 HN 및 F mRNA 발현을 분석한 것이다.
- [40] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-hATMSCs에서 HN 및 F 단백질 발현의 이미징 분석이다.
- [41] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-hATMSCs의 면역표현형(immunophenotyping)을 분석한 것이다.
- [42] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-hATMSCs에서 NSC34 운동신경세포주와의 세포융합 능력을 분석한 것이다.
- [43] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-hATMSCs와 NSC34 운동신경세포주가 융합된 세포에서 ChAT 및 CD105 발현을 분석한 것이다.
- [44] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 NSC34 운동신경세포주, 사멸중인 NSC34 운동신경세포주 및 HN/F-hATMSCs 간 프로테오믹스(proteomics) 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [45] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 NSC34 운동신경세포주, 사멸중인 NSC34 운동신경세포주 및 HN/F-hATMSCs 간 히트맵(heatmap) 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [46] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 NSC34 운동신경세포주, 사멸중인 NSC34

운동신경세포주 및 HN/F-hATMSCs에서 세포 회복과 관련된 유전자 DDB1, HMGB1 및 MSH2 mRNA 발현을 분석한 것이다.

- [47] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-NSCs와 세포융합에 의한 사멸중인 C2C12 근육근아세포주의 세포사멸 억제효과를 나타낸 것이다.
- [48] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-HeLa에서 HN 및 F mRNA 발현을 분석한 것이다.
- [49] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-HeLa에서 N2A 신경아세포종세포주와의 세포융합 능력을 분석한 것이다.
- [50] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 HN 및 F가 삽입된 pcDNA3.1-P2A 발현벡터를 제작하기 위한 도식도이다.
- [51] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-HeLa 또는 F-P2A-HN-HeLa에서 C2C12 근육근아세포주와의 세포융합 능력을 분석한 것이다.
- [52] 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따라 선별한 세포 회복과 관련된 유전자 DDB1의 프로모터 부위(promoter region)에서 전사조절인자(transcriptional factor, TF)인 TDP-43 결합모티프(binding motif)를 확인한 것이다.
- [53] 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따라 마우스 DBB1(mDDB1)에 특이적으로 결합하는 프로모터를 제작하기 위한 도식도이다.
- [54] 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 N2A 신경아세포종세포주와 GFP-TDP-43이 형질도입된 HeLa 세포주가 융합된 세포에서 TDP-43에 의한 mDDB1 발현을 분석한 것이다.
- [55] 도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 N2A 신경아세포종세포주와 GFP-TDP-43이 형질도입된 HeLa 세포주가 융합된 세포에서 N2A 신경아세포종세포주의 핵 내로 TDP-43이 translocation됨을 이미징 분석한 것이다.
- [56] 도 21은 손상된 세포에서 HN/F 단백질 과발현 세포에 의한 세포 손상 회복 기전을 모식화한 것이다.
- [57] 도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-hATMSCs와 세포융합에 의한 사멸중인 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD) 세포모델의 세포사멸 억제효과를 나타낸 것이다.
- [58] 도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-hATMSCs와 세포융합에 의한 사멸중인 헌팅턴병(Huntington's disease; HD) 질환 세포모델의 세포사멸 억제효과를 나타낸 것이다.
- [59] 도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 HN/F-hATMSCs와 세포융합에 의한 사멸중인 심부전 질환 세포모델의 세포사멸 억제효과를 나타낸 것이다.
- [60] 도 25는 본 발명의 일 실시예에 따라 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 또는 뒤시엔느 근육퇴행위축(Duchenne muscular dystrophy, DMD) 질환 마우스 모델에 HN/F-hATMSCs를 주입하기 위한 intra-spinal cord injection 방법을 나타낸 것이다.

- [61] 도 26은 본 발명의 일 실시예에 따라 HN/F-hATMSCs를 주입한 G93A SOD Tg 마우스에서 운동성능을 분석한 것이다.
- [62] 도 27은 본 발명의 실시예에 따라 제작한 DMD 질환 세포모델의 Dystrophin 및 CTGF 발현을 분석한 것이다.
- [63] 도 28은 본 발명의 실시예에 따라 HN/F-hATMSCs 처리한 DMD 질환 세포모델의 Dystrophin 및 CTGF 발현을 분석한 것이다.
- [64] 도 29는 DMD 질환 동물모델인 mdx 마우스의 골격근에서 Dystrophin 발현을 분석한 것이다.
- [65] 도 30은 본 발명의 일 실시예에 따라 HN/F-hATMSCs를 주입한 mdx 마우스의 골격근 조직에서 HN/F-hATMSCs의 생착능을 분석한 것이다.
- [66] 도 31은 본 발명의 일 실시예에 따라 HN/F-hATMSCs를 주입한 mdx 마우스의 골격근 조직에서 주입 3주 후 및 주입 15주 후 dystrophin 발현을 분석한 것이다.
- [67] 도 32는 본 발명의 일 실시예에 따라 HN/F-hATMSCs를 주입한 mdx 마우스의 골격근 조직에서 CTGF 발현을 분석한 것이다.

[68]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [69] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[70]

- [71] 본 발명은 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

- [72] 본 발명에서, 상기 헤마글루티닌-뉴라미니다아제 및 F 단백질은 산다이바이러스(sendai virus), 인간면역결핍바이러스 1(human immunodeficiency virus 1), 인간파라인플루엔자 바이러스(Human parainfluenza virus), 인간호흡기세포융합바이러스(Human respiratory syncytial virus, HRSV), 인플루엔자 바이러스(influenza virus) 또는 베시쿨라 스토포마티티스 바이러스(vesicular stomatitis virus) 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이들 단백질과 동일 또는 유사한 기전을 통해 세포의 융합을 촉진시키고, 사멸을 억제하며, 손상된 세포의 손상을 회복할 수 있는 한, 다양한 유래 및/또는 전장 및/또는 단편의 다양한 형태의 헤마글루티닌 뉴라미니다아제 및 F 단백질이 사용될 수 있다(Eckert DM, Kim PS. Annu Rev Biochem. 2001;70:777-810.; Sapir A, Avinoam O, Podbilewicz B, Chernomordik LV. Dev Cell. 2008 Jan;14(1):11-21.; Kouris NA, Schaefer JA, Hatta M, Freeman BT, Kamp TJ, Kawaoka Y, Ogle BM. Stem Cells Int. 2012;2012:414038).

- [73] 본 발명에 따른 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN)는 바이러스에서 발현되는 당 단백질로, 헤마글루티닌 및 뉴라미니다아제의 활성을 모두 갖고 있는 단일 바이러스 단백질이거나, 또는 각각이 별개의 단백질로 존재하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 본 발명에 따른

효과를 달성하는 한 모두 본 발명에 포함될 수 있다. 전자의 예로는 볼거리 바이러스(mump virus), 산다이바이러스(sendai virus), 인간 파라인플루엔자 바이러스(human parainfluenza virus), 에컨대 인간 파라인플루엔자 바이러스 1형(HPIV-1), 2형(HPIV-2) 또는 3형(HPIV-3), 또는 조류 뉴캐슬병 바이러스(avian newcastle disease virus) 등과 같은 파라믹소 바이러스(paramyxovirus) 유래의 것들을 들 수 있으며, 후자의 예로는 인플루엔자 바이러스 유래의 것들을 들 수 있다.

이러한 단백질 및 핵산 서열은 공지되어 있으며 예를 들면

헤마글루티닌-뉴라미니다아제는 Enzyme entry(<http://enzyme.expasy.org>)

EC:3.2.1.18의 정보를 참조할 수 있으며, 단백질 서열은 예를 들면

산다이바이러스 유래의 것으로 GenBank accession no. AAB06288.1로 공개되어 있다. 본 발명에 따른 일 구현예에서는 본 발명에 따른 실시예 2의 방법에 따라 제조될 수 있는 산다이바이러스 유래 HN 단일단백질이 사용된다.

- [74] 또한, 융합 단백질(Fusion protein, F protein)은 세포간 융합 또는 바이러스의 세포에의 융합/엔트리, 엔도사이토시스(endocytosis), 멤브레인 트래피킹(membrane trafficking)에 사용되는 당 단백질을 일컫는 것이다. 본 발명에 따른 일 구현예에서는 바이러스 유래의 F 단백질이 사용되며, 이는 구조적 특징에 따라 클래스 I, II 및 III로 나뉜다. 클래스 I의 예로는 에볼라 바이러스의 GP2, MoMuLv(Moloney murine leukemia virus)의 Mo-55, 면역결핍바이러스 HIV의 gp41, Simian Virus(SIV) gp41 등을 포함한다. 클래스 II의 예로는 SFV E1, TBEV E 등을 포함한다. 클래스 III의 예로는 HSV(Herpes Simplex virus)의 gB(glycoprotein B), EBV(Epstein-Barr virus)의 gB, VSV(Vesicular Stomatitis virus)의 단백질 G 및 베컬로바이러스의 당단백질인 gp64 등을 포함한다. 이러한 융합 당 단백질 및 핵산 서열은 공개되어 있으며, 예를 들면 GenBank Accession no. AAC82300.1로 공개되어 있다.

- [75] 본 발명에서, 상기 헤마글루티닌 뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자는 전장 및/또는 단편의 형태로 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 개시된 단백질을 코딩하는 야생형 유전자 서열 및 그 단편은 물론 세포 내에서의 발현 또는 단백질의 안정성 등과 같은 특징이 유리하도록 염기서열의 일부가 인위적으로 변형된 유전자, 및 자연적으로 발견되는 염기서열 일부가 변형된 유전자 또는 이들의 모두의 단편을 포함하는 것이다.

- [76] 본 발명에서, 상기 벡터는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 상기 벡터는 목적 유전자 발현을 위한 요소(elements)를 포함하는 것으로, 복제원점(replication origin), 프로모터, 작동 유전자(operator), 전사 종결 서열(terminator) 등을 포함할 수 있고, 숙주 세포의 게놈 내로의 도입을 위한 적절한 효소 부위(예컨대, 제한 효소 부위) 및/또는 숙주 세포 내로의 성공적인 도입을 확인하기 위한 선별 마커 및/또는 단백질로의 번역을 위한 리보솜 결합 부위(ribosome binding site; RBS), IRES(Internal Ribosome Entry Site)

등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 벡터는 상기 프로모터 이외의 전사 조절 서열(예를 들어, 인핸서 등)을 추가로 포함할 수 있다.

[77] 또한, 상기 벡터는 당업계에 공지된 플라스미드 DNA, 재조합 벡터 또는 기타 매개체일 수 있고, 구체적으로 선형 DNA 플라스미드 DNA, 재조합 비바이러스성 벡터, 재조합 바이러스성 벡터 또는 유전자 발현 유도 벡터 시스템(inducible gene expression vector system)일 수 있으며, 상기 재조합 바이러스성 벡터는 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노 부속 바이러스(adeno associated virus), 헬퍼-의존형 아데노바이러스(helper-dependent adenovirus), 헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus), 렌티바이러스(lentivirus) 또는 백신시아바이러스(vaccinia virus) 벡터일 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다.

[78] 또한, 상기 벡터는 유전자 치료용 발현벡터를 의미한다. 상기 용어 "유전자 치료(gene therapy)"는 유전자 이상에 의하여 유발되는 각종 유전병을 치료하기 위하여, 유전자 이상이 있는 세포에 정상 유전자를 삽입하거나 새로운 기능을 제공하여 그의 기능을 정상화시키는 방법을 일컫는다. 따라서 본 발명에서 유전자 치료용 발현벡터는 헤마글루티닌 뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 유전자를 체내 정상세포로 전달하여 발현시킴으로써 유전자 이상이 있는 세포와 정상세포와의 세포융합을 통해 새로운 기능을 제공하여 그의 기능을 정상화할 수 있는 발현벡터를 의미한다.

[79] 본 발명에 따른 일 구현예에서, 헤마글루티닌 뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 유전자는 전술한 바와 같이 공지된 서열로부터 이를 특이적으로 인식할 수 있는 프라이머를 제작하고, 이를 이용하여 중합효소연쇄증폭반응(Polymerase Chain Reaction)을 통해 상기 유전자를 증폭하고 이를 상술한 바와 같은 발현 벡터에 도입한 후 이를 후술하는 바와 같이 본 발명에 따른 세포에 도입할 수 있다. 도입 방법은 공지되어 있으며 예를 들면 리포솜 매개 전달이입, 칼슘포스페이트법, DEAE-덱스트란 매개 전달이입, 양하전 지질 매개 전달이입법, 전기천공, 파아지 시스템을 이용한 형질도입(transduction) 또는 바이러스를 이용한 감염 방법 등을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.

[80]

[81] 또한, 본 발명은 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[82] 본 발명에서, 상기 용어 "형질전환"은 외부로부터 주어진 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것으로, 즉 생물의 어떤 계통의 세포에서 추출된 핵산의 일종인 DNA를 다른 계통의 살아있는 세포에 도입했을 때 DNA가 그 세포에 들어가서 유전형질이 변화하는 현상을 의미한다.

[83] 본 발명에서, 상기 형질전환된 세포는 줄기세포, 전구세포 또는 동물세포일 수

있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 또한, 상기 줄기세포는 구체적으로 배아줄기세포, 성체줄기세포 또는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPS)일 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니며, 상기 줄기세포에서 분화된 줄기세포, 예컨대 배아줄기세포 유래의 중간엽줄기세포, 유도만능줄기세포 유래의 중간엽줄기세포, 유도만능줄기세포 유래의 신경줄기세포 등을 모두 포함한다. 또한, 상기 세포는 자가(autologous) 또는 타가, 또는 동종이계(allogenic) 또는 이종(Xenogenic) 세포일 수 있다. 가장 바람직하게는 자가유래의 것으로 수용자로부터 유래한 것이기 때문에 약제학적 조성물의 투여 시 면역 반응의 문제가 없고 안전하다는 이점이 있다.

- [84] 상기 배아줄기세포는 배아 발생 초기인 포배기(blastocyte)의 세포내괴(inner cell mass)로부터 형성되고, 모든 세포로 분화가 가능한 잠재력(totipotent)을 가지고 있어 어떠한 조직 세포로도 분화될 수 있다는 장점이 있어, 세포 치료 연구에 이용되고 있다.
- [85] 상기 성체줄기세포는 배아 발달 단계 이후에도 성체 전반에서 발견되는 미분화된 줄기세포를 의미한다. 이러한 성체줄기세포는 주변조직의 특성에 세포 자신을 맞추어 분화하는 조직특이적 분화능력(site-specific differentiation)을 가지고 있다. 성체줄기세포는, 골수, 혈액, 뇌, 피부, 지방, 골격근, 태줄, 제대혈 등의 다양한 성체 세포로부터 유래할 수 있다. 구체예로, 중간엽줄기세포(Mesenchymal Stem Cell; MSC), 골격근줄기세포(skeletal muscle stem cell), 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell), 신경줄기세포(neural stem cell; NSC), 지방유래줄기세포(adipose-derived stem cell), 지방유래전구세포(adipose-derived progenitor cell), 혈관내피전구세포(vascular endothelial progenitor cell) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [86] 또한, 상기 중간엽줄기세포는 이미 성인이 된 몸의 각 부위에서 얻어지는 성체조직으로부터 유래된 줄기세포로, 제대, 제대혈, 골수, 혈액, 뇌, 피부, 지방, 골격, 근육, 신경, 골막, 양막 또는 태반에서 분리될 수 있고, 다양한 세포 예컨대 지방세포 및 운동신경세포 등으로 분화할 수 있는 전능성(pluripotent) 또는 다능성(multipotent) 세포를 의미한다. 또한, 중간엽줄기세포는 면역억제제의 사용 없이도 동종 또는 이종 수혜자에서 효과적으로 생착될 수 있는 특징이 있다. 상기 중간엽줄기세포는 동물, 구체적으로 포유동물, 보다 구체적으로 인간의 중간엽줄기세포일 수 있다.
- [87] 본 발명에 따른 일 구현예에서 중간엽줄기세포는 지방조직 유래의 중간엽줄기세포이다. 지방조직 유래의 중간엽줄기세포는 골수, 양수, 제대혈 줄기세포와 달리 다량을 제공받을 수 있는 실용적인 장점을 가지고 있고, 지방 세포의 1% 정도가 줄기 세포로 추정되고 있으며, 최근 선진국에서 광범위하게 이루어지고 있는 성형수술이 지방흡입술(liposuction)임을 고려한다면 지방유래 줄기세포는 무한적인 공급성으로 인해 유용성이 특히 높다.
- [88] 상기 중간엽줄기세포를 얻는 과정을 설명하면 다음과 같다: 인간 또는

마우스를 포함하는 포유동물, 바람직하게는 인간의 중간엽줄기세포 소스, 예컨대 지방조직, 혈액 또는 골수로부터 중간엽줄기세포를 분리한다. 이어 상기 세포를 적합한 배지에서 배양한다. 배양과정에서 부유 세포를 제거하고 배양 플레이트에 부착된 세포들을 계대 배양하여, 최종적으로 구축된(established) 중간엽줄기세포를 수득한다.

- [89] 또한, 골수 등에 매우 적은 양으로 존재하는 중간엽줄기세포는 이를 분리 및 배양하는 과정은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예컨대, 미국특허 제5,486,359호에 개시되어 있다.
- [90] 상기 과정에서 이용되는 배지로는, 줄기세포의 배양에 이용되는 일반적인 어떠한 배지도 이용할 수 있다. 보다 구체적으로 혈청(예컨대 우태아 혈청, 말 혈청 및 인간 혈청) 또는 혈청 대체제(serum replacement)가 함유된 배지를 이용할 수 있다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는, 예를 들어 RPMI 시리즈, Eagles's MEM(Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)),  $\alpha$ -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 Modified Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., VirProcy 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물(Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980)), Way-mo, h's MB752/1(Waymo, h, 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))를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배지에는, 다른 성분, 예를 들어, 항생제 또는 항진균제(예컨대, 페니실린, 스트렙토마이신) 및 글루타민 등이 포함될 수 있다. 배지 및 배양에 대한 일반적인 설명은 R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells, Alan R. Liss, Inc., New York (1984)에 기재되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [91] 중간엽줄기세포의 확인은, 예컨대, 유세포 분석을 통하여 할 수 있다. 이러한 유세포 분석은, 중간엽줄기세포의 특이한 표면 마커를 이용하여 실시된다. 본 발명에 따른 일 구현예에서 본 발명에 따른 중간엽줄기세포는 마커로서 CD29, CD44 및 CD90와 음성 표지마커인 CD34, CD45 및 HLA-DR의 표현형을 가진다.
- [92] 또한, 상기 유도만능줄기세포는 다능성이 없는 성인의 피부세포와 같은 체세포에 역분화를 일으키는 4가지 특정 유전자를 도입한 후 발현시키거나 역분화를 일으키는 4가지 유전자가 도입된 세포에서 만들어진 역분화 유도 단백질을 추출하여 이를 다시 체세포에 주입함으로써 배아 줄기세포와 같은 다능성을 갖는 줄기세포를 만들 수 있는데 이를 유도 다능성 줄기세포 또는 역분화 줄기세포라고 한다. 유도만능줄기세포를 이용한 줄기세포치료, 환자들에게서 체세포를 얻어 유도만능줄기세포를 만들어서 생체외에서

분화시킴으로써 여러 가지 질병의 경과를 연구하여 질병 모델, 신약 개발에서의 세포 기반 연구 등에 이용된다. 상기 유도만능줄기세포는 공지의 방법, 예를 들어 Yu J et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 318, 1917-1920 또는 Takahashi K et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861-872 등에 개시된 방법에 따라 얻을 수 있다. 또한, 유도만능줄기세포 유래의 줄기세포, 예컨대 유도만능줄기세포 유래의 중간엽줄기세포(induced Pluripotent Stem Cells-derived mesenchymal stem cells, iPSCs-MSCs) 또는 유도만능줄기세포 유래의 신경줄기세포(induced Pluripotent Stem Cells-derived neural stem cells, iPSCs-NSCs) 등이 모두 포함된다. 본 발명의 일 구현예에서 상기 유도만능줄기세포 유래의 줄기세포는 유도만능줄기세포 유래의 신경줄기세포이다.

- [93] 상기 유도만능줄기세포 유래의 중간엽줄기세포 또는 유도만능줄기세포 유래의 신경줄기세포는 공지의 방법, 예를 들어 L.G. VILLA-DIAZ et al. (2012) Derivation of Mesenchymal Stem Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells Cultured on Synthetic Substrates. STEM CELLS. 30, 1174-1181 또는 Hyun Soo Choi et al. (2014) Neural Stem Cells Differentiated From iPS Cells Spontaneously Regain Pluripotency. STEMCELLS. 32, 2596-2604 등에 개시된 방법에 따라 얻을 수 있다.
- [94] 또한, 상기 전구세포는 특정 세포의 형태 및 기능을 갖추기 전 단계의 세포이며, 특정 세포 계통의 세포로 분화되거나 특정 유형의 조직으로 형성될 수 있는 세포로서, 자가재생산능(self-renewal)은 지나치게 제한된 분화능을 갖는 세포를 의미한다. 내배엽 전구세포, 중배엽 전구세포, 및 외배엽 전구세포가 모두 이에 포함된다.
- [95] 또한, 상기 동물세포는 인간을 포함한 동물로부터 기원한 기능적 및 구조적 기본 단위이며, 인간을 포함한 동물(예컨대 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 주 등의 포유동물)로부터 기원한 세포이면 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 따라서 본 발명의 동물세포는 이로 제한되는 것은 아니나, 상피세포, 내피세포, 근육세포, 생식세포, 피부 세포(예로, 섬유아세포, 각질세포), 면역세포, 암세포 등을 포함한다. 구체예로, CHO(Chinese hamster ovary) 세포, NS0(mouse myeloma) 세포, BHK(baby hamster kidney) 세포, Sp2/0(mouse myeloma) 세포, 인간 망막세포(human retinal cell), HUVEC 세포, HMVEC 세포, COS-1 세포, COS-7 세포, HeLa 세포, HEK-293 세포, HepG-2 세포, HL-60 세포, IM-9 세포, Jurkat 세포, MCF-7 세포 또는 T98G 세포 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다.
- [96]
- [97] 또한, 본 발명은 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육

질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [98] 본 발명에서, 상기 벡터에 대해서는 상기 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터에 대한 설명과 동일한 바, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용하고, 이하에서는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.
- [99] 한편, 본 발명은 HN 및 F 단백질을 과발현하는 세포가 HN 및 F 단백질에 의해 다른 세포와의 세포융합능력이 증진되고, 손상된 세포와의 융합을 통해 정상 유전자가 전달되어 발현되며, 세포 손상을 회복하는 유전자의 발현이 조절됨을 확인하였다. 또한, 세포 손상과 관련된 다양한 질환 모델에서 HN 및 F 단백질 과발현 세포가 손상된 세포 또는 유전자 이상이 유발된 세포와 세포융합되어 정상 세포로의 회복이 이루어짐을 확인하였다. 이에, 상기 HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있다.
- [100]
- [101] 본 발명에서, 상기 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환은 세포 손상과 관련된 질환이다.
- [102] 상기 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환은 신경세포 손상, 척수신경 손상, 말초신경 손상 또는 신경세포 사멸을 유발할 수 있다.
- [103] 또한, 상기 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환은 운동신경세포 손상 또는 사멸을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환과 뇌의 신경세포 손상 또는 사멸, 척수신경 손상 또는 말초신경 손상을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환으로 나눌 수 있다.
- [104] 상기 운동신경세포 손상 또는 사멸을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환의 개선 또는 치료를 위해서는 운동신경세포의 보존 및 회복이 필수적으로 이루어져야 한다. 이러한 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환의 예로는 척수근위축증(spinal muscular atrophy), 케네디병(spinal bulbar muscular atrophy), 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 원발성측삭경화증(primary lateral sclerosis) 또는 진행성 구음장애(progressive bulbar palsy)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [105] 상기 뇌의 신경세포 손상 또는 사멸, 척수신경 손상 또는 말초신경 손상을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환은 손상된 뇌 또는 척수의 신경세포, 말초신경의 회복을 통해 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. 이러한 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환의 예로는 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 치매(dementia), 다발-경색성 치매(multi-infarct dementia; mid), 전두측두치매(frontotemporal dementia), 루이소체 치매(dementia with Lewy

bodies), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 피질기저퇴행증(corticobasal degeneration), 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 우울증(depression), 대사성 뇌질환(metabolic brain disease), 다계통위축병(multiple system atrophy; MSA), 헌팅턴병(Huntington's disease), 진행성핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP), 간질(epilepsy), 치상핵적핵담창구시상하핵 위축증(dentatorubropallidolusian atrophy; DRPLA), 척수소뇌실조병(spino cerebellar ataxia), 녹내장(glaucoma), 뇌졸중(stroke), 뇌허혈(brain ischemia), 뇌염후 파킨슨증(post-encephalitic parkinsonism), 투렛 증후군(Tourette's syndrome), 하지불안증후군(restless legs syndrome) 또는 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit disorders with hyperactivity)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [106] 상기 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환은 근육세포 손상 또는 근육세포 사멸을 유발할 수 있다. 이러한 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환의 예로는 근육병(myopathy), 선천성 근육병(congenital myopathy), 선천성 근육퇴행위축(congenital muscular dystrophy), 뒤시엔느 근육퇴행위축(Duchenne muscular dystrophy), 베커 근육퇴행위축(Becker muscular dystrophy), 사지연결근육퇴행위축(Limb Girdle muscular dystrophy), 얼굴어깨위팔근육퇴행위축(Facioscapulohumeral muscular dystrophy), 안구인두근위축증(oculopharyngeal muscular atrophy), 말단근위축증(distal muscular dystrophy), 에머리드레이푸스 근위축증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 근육긴장퇴행위축(Myotonic dystrophy), 바쓰증후군(Barth syndrome), 심부전(heart failure), 근감소증(sarcopenia) 또는 X-연관 확장성 심근병증(X-linked dilated cardiomyopathy)을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[107]

- [108] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 또한 본 발명에 따른 세포치료용 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 최신판]에 상세히 기재되어 있다.

- [109] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체

및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

- [110] 또한 상기 약학적 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양으로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어 "치료"란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 본 용어가 적용되는 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 또한 상기 용어 "치료학적으로 유효한 양"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적인 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 유효 성분은 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.
- [111] 그러므로 최적의 약학적 조성물 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [112] 본 발명에 따른 일 구현예에서 약학적 조성물은 정맥 투여 또는 척수내 투여된다.
- [113] 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다. 예컨대, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분인 헤마글루티닌-뉴라미니다아제 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포  $0.1 \times 10^5$  내지  $1.0 \times 10^8$  세포수/kg(체중), 보다 바람직하게는  $0.5 \times 10^6$  내지  $1.0 \times 10^7$  세포수/kg(체중)일 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개 부위 또는 2개 부위 이상에 투여할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 허혈기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 치료의 대상동물로서는, 인간 및 그 밖의 목적으로 하는 포유동물을 예로 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 개, 염소, 말, 돼지 등이 포함된다.
- [114]
- [115] 또한, 본 발명은 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase,

HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[116] 본 발명에서, 상기 세포에 대해서는 상기

헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포에 대한 설명과 동일한 바, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용한다. 또한, 상기 질환, 세포의 투여방법, 투여량 등에 대해서는 상기 벡터를 포함하는 약학적 조성물의 투여 방법, 투여량 등에 대한 설명과 동일한 바, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용한다.

[117] 한편, 본 발명은 HN 및 F 단백질을 과발현하는 세포가 HN 및 F 단백질에 의해 다른 세포와의 세포융합능력이 증진되고, 손상된 세포와의 융합을 통해 정상 유전자가 전달되어 발현되며, 세포 손상을 회복하는 유전자의 발현이 조절됨을 확인하였다. 또한, 세포 손상과 관련된 다양한 질환 모델에서 HN 및 F 단백질 과발현 세포가 손상된 세포 또는 유전자 이상이 유발된 세포와 세포융합되어 정상 세포로의 회복이 이루어짐을 확인하였다. 이에, 상기 HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있다.

[118]

[119] 또한, 본 발명은 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 치료학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[120] 또한, 본 발명은 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 치료학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[121] 본 발명에서, 상기 벡터 또는 상기 벡터로 형질전환된 세포 및 이의 투여 방법, 투여량 등에 대해서는 상기 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 세포 및 이를 포함하는 약학적 조성물의 투여 방법, 투여량 등에 대한 설명과 동일한 바, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용한다.

[122] 본 발명에서, 상기 개체는 신경퇴행성 질환, 신경 질환, 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환으로 고통받는 개체로서, 보다 구체적으로 상술한 헤마글루티닌-뉴라미니다아제 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터 또는 상기 벡터로 형질전환된 세포를 투여하여 상기 질환에 의한 세포 손상,

예컨대 신경세포 손상 또는 근육세포 손상이 완화 및/또는 회복될 수 있는 포유동물, 예를 들어 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 개, 염소, 말, 돼지 등이 포함된다.

- [123] 상기 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환은 신경세포 손상, 척수 손상, 말초신경 손상 또는 신경세포 사멸을 유발할 수 있다.
- [124] 또한, 상기 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환은 운동신경세포 손상 또는 사멸을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환과 뇌의 신경세포 손상 또는 사멸, 척수 손상 또는 말초신경 손상을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환으로 나눌 수 있다.
- [125] 상기 운동신경세포 손상 또는 사멸을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환의 개선 또는 치료를 위해서는 운동신경세포의 보존 및 회복이 필수적으로 이루어져야 한다. 이러한 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환의 예로는 척수근위축증(spinal muscular atrophy), 케네디병(spinal bulbar muscular atrophy), 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 원발성측삭경화증(primary lateral sclerosis) 또는 진행성 구음장애(progressive bulbar palsy)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [126] 상기 뇌의 신경세포 손상 또는 사멸, 척수 손상 또는 말초신경 손상을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환은 손상된 뇌 또는 척수의 신경세포, 말초신경의 회복을 통해 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. 이러한 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환의 예로는 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 치매(dementia), 다발-경색성 치매(multi-infarct dementia; mid), 전두측두치매(frontotemporal dementia), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 피질기저퇴행증(corticobasal degeneration), 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 우울증(depression), 대사성 뇌질환(metabolic brain disease), 다계통위축병(multiple system atrophy; MSA), 헌팅턴병(Huntington's disease), 진행성핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP), 간질(epilepsy), 치상핵적핵담창구시상하핵 위축증(dentatorubropallidolusian atrophy; DRPLA), 척수소뇌실조병(spino cerebellar ataxia), 녹내장(glaucoma), 뇌졸중(stroke), 뇌허혈(brain ischemia), 뇌염후 파킨슨증(post-encephalitic parkinsonism), 투렛 증후군(Tourette's syndrome), 하지불안증후군(restless legs syndrome) 또는 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit disorders with hyperactivity)를 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [127] 상기 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환은 근육세포 손상 또는 근육세포 사멸을 유발할 수 있다. 이러한 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환의 예로는 근육병(myopathy), 선천성 근육병(congenital myopathy), 선천성 근육퇴행위축(congenital muscular dystrophy), 뒤시엔느 근육퇴행위축(Duchenne muscular dystrophy), 베커 근육퇴행위축(Becker muscular dystrophy),

사지연결근육퇴행위축(Limb Girdle muscular dystrophy),  
 얼굴어깨위팔근육퇴행위축(Facioscapulohumeral muscular dystrophy),  
 안구인두근위축증(oculopharyngeal muscular atrophy), 말단근위축증(distal muscular dystrophy), 애머리드레이푸스 근위축증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 근육긴장퇴행위축(Myotonic dystrophy), 바쓰증후군(Barth syndrome), 심부전(heart failure), 근감소증(sarcopenia) 또는 X-연관 확장성 심근병증(X-linked dilated cardiomyopathy)을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[128] 본 발명은 HN 및 F 단백질을 과발현하는 세포가 HN 및 F 단백질에 의해 다른 세포와의 세포융합능력이 증진되고, 손상된 세포와의 융합을 통해 정상 유전자가 전달되어 발현되며, 세포 손상을 회복하는 유전자의 발현이 조절됨을 확인하였다. 또한, 세포 손상과 관련된 다양한 질환 모델에서 HN 및 F 단백질 과발현 세포가 손상된 세포 또는 유전자 이상이 유발된 세포와 세포융합되어 정상 세포로의 회복이 이루어짐을 확인하였다. 이에, 상기 HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터 또는 이로 형질전환된 세포를 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 이용할 수 있다.

[129]

[130] 또한, 본 발명은 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 조성물로 사용하기 위한, 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.

[131] 아울러, 본 발명은 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 조성물로 사용하기 위한, 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포의 용도를 제공한다.

[132] 본 발명에서, 상기 벡터 또는 상기 벡터로 형질전환된 세포 및 이의 투여 방법, 투여량 등에 대해서는 상기 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 세포 및 이를 포함하는 약학적 조성물의 투여 방법, 투여량 등에 대한 설명과 동일한 바, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용한다. 또한, 상기 질환에 대해서는 상기 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 설명과 동일한 바, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용한다.

[133] 본 발명은 HN 및 F 단백질을 과발현하는 세포가 HN 및 F 단백질에 의해 다른 세포와의 세포융합능력이 증진되고, 손상된 세포와의 융합을 통해 정상 유전자가 전달되어 발현되며, 세포 손상을 회복하는 유전자의 발현이 조절됨을 확인하였다. 또한, 세포 손상과 관련된 다양한 질환 모델에서 HN 및 F 단백질

과발현 세포가 손상된 세포 또는 유전자 이상이 유발된 세포와 세포융합되어 정상 세포로의 회복이 이루어짐을 확인하였다. 이에, 상기 HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터 또는 이로 형질전환된 세포를 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 이용할 수 있다.

[134]

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

[136]

[137] 실시예

[138] 세포배양

[139] K-STMECELL IRB(Institutional review board)의 동의 및 양해하에 얻은 사람 지방유래 중간엽줄기세포(human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, hATMSCs)는 항생제가 첨가된 RKCM 배양배지(10% FBS 첨가, K-STEMCELL에서 제공)에 배양되었다. 생쥐 운동신경세포주 (NSC34 Motor Neuron-Like Hybrid Cell line, CEDARLANE, USA)는 항생제가 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium ) 배양배지(10% FBS 첨가)에 배양되었다. 마우스 신경아세포종세포주 (N2A cell line, ATCC)는 항생제가 첨가된 EMEM(Eagle's Minimum Essential Medium) 배양배지(10% FBS 첨가)에 배양되었다. 사람 자궁경부암세포주 (HeLa cell line, ATCC)는 항생제가 첨가된 EMEM(Eagle's Minimum Essential Medium) 배양배지(10% FBS 첨가)에 배양되었다. 마우스 근육근아세포주 (C2C12 muscle myoblast cell line, ATCC)는 항생제가 첨가된 DMEM 배양배지(10% FBS 첨가)에 배양되었다. 래트 심장근아세포주(H9c2 heart myoblast cell line, ATCC)는 항생제가 첨가된 DMEM 배양배지(10% FBS 첨가)에 배양되었다.

[140]

또한, 정상인으로부터 동의하에 혈액을 제공 받아 제작한 사람 유도만능줄기세포(induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)를 bFGF가 포함되지 않은 hES cell 배양배지(ThermoFisher)가 들어있는 배양플레이트에 4일간 부유상태로 배양하였다. 그 다음, Retinoic acid(RA,  $5 \times 10^{-7}$  M)가 들어있는 hES cell 배양배지에 4일간 배양하고, 7일간 neurobasal medium [EGF(20ng/ml), bFGF(10ng/ml), B27(2%), LIF(10ng/ml)와 heparin sodium(2 $\mu$ g/ml)이 포함된 무혈청 DMEM/F12(1:1) 배양배지]에 배양하였다. 응집상태의 colonies로부터 떨어져 나간 부유상태의 세포를 neurobasal medium이 들어있는, poly-1-ornithine(10 mg/ml)/laminin(5  $\mu$ g/ml) 코팅 배양 플레이트에서 7일간 배양하고, 매 5-7일 간격으로 accutase를 처리하여 세포를 계대배양하여 사람 유도만능줄기세포 유래 신경줄기세포(induced Pluripotent Stem Cells-derived neural stem cells, iPSCs-NSCs)를 획득하였다.

- [141] 상기 세포들 모두 5% CO<sub>2</sub> 공급하에 37°C 조건하에서 배양되었다.
- [142]
- [143] 실시예 1. 사멸중인 운동신경세포주와 지방유래 중간엽줄기세포의 세포융합에 의한 운동신경세포주 세포사멸 억제효과 분석
- [144] 세포 트래커(tracker) CM-Dil(Thermofisher)으로 표지한 운동신경세포주 NSC34 세포에 세포사멸 유도인자인 탭시가긴(thapsigargin) 2.5  $\mu$ M을 처리 후 24시간 배양하였다. 아넥신(Annexin) V 염색 후 아넥신 V 항체를 이용하여 유세포 분석기(flow cytometry)를 통해 아넥신 V-positive NSC34 세포를 분리하였다. 녹색 염료(cell-stalker™, Biterials)로 표지한 hATMSCs와 아넥신 V-positive NSC34 세포를 Sandai virus (HVJ) Envelope Cell fusion Kit (GenomONETM-CF EX Sendai virus (HVJ) Envelope Cell Fusion Kit, COSMO BIO, Japan)을 제조자의 방법대로 이용하여 세포융합을 실시한 후 유세포 분석기를 통해 V-positive 세포를 분석하였다. 도 1에서와 같이 hATMSCs와 세포융합이 일어나지 않은 NSC34 세포 그룹에서는 99.5%의 아넥신 V-positive 세포를 확인하였고, hATMSCs와 세포융합이 일어난 NSC34 세포 그룹에서는 32.9%의 아넥신 V-positive 세포를 확인하였다. 이러한 결과는 hATMSCs와의 세포융합에 의해 NSC34 운동신경세포주 사멸을 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [145] 또한 사멸억제 효과를 분자수준에서 확인하였다. 요약하면, hATMSCs와 세포융합이 일어난 NSC34 세포 그룹을 유세포 분석기를 통해 분리한 후 역전사-중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 및 정량적 역전사-중합효소 연쇄반응(quantitative RT-PCR)을 통해 pro-apoptotic 유전자인 Bax와 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-xL의 발현을 분석하였다. 도 2에서와 같이 hATMSCs와 세포융합이 일어나지 않은 NSC34 세포 그룹에 비해 hATMSCs와 세포융합이 일어난 NSC34 세포 그룹에서 Bax mRNA의 발현이 현저하게 감소하였고, Bcl-xL mRNA의 발현은 현저하게 증가하였다.
- [146] 이러한 결과는 사멸중인 NSC34 운동신경세포주가 hATMSCs와 세포융합을 하였을 때 pro-apoptotic 유전자인 Bax의 발현 감소 및 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-xL의 발현 증가를 통해 세포사멸이 억제되는 것을 의미한다.
- [147]
- [148] 실시예 2. 헤마글루티닌 뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) / F(fusion) 단백질을 과발현하는 사람 지방유래 중간엽줄기세포(HN/F-hATMSCs) 제작
- [149] 센다이 바이러스 게놈을 주형으로 표 1과 같은 프라이머를 이용하여 헤마글루티닌 뉴라미니다아제 (HN)와 F 단백질 유전자 (F) 유전자를 PCR로 증폭하였다. 증폭된 DNA는 pcDNA3.1 발현벡터에 각각 삽입시켜 E. coli strain DH5 $\alpha$ 에 클로닝하였으며, 서열을 확인하였다 (결과는 나타나지 않음). 클로닝된 HN 및 F 단백질은 각각 공개된 서열 GenBank Accession No.AAB06288.1 및

AAC82300.1과 동일하다.

[150]

[151] [표 1] 본 발명에 사용된 HN 및 F 유전자의 클로닝에 사용된 프라이머 서열

[152]

| Target gene | Primer sequences                                                                    | Product size (bp) |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| HN          | FP: 5'-AAGCTTATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGATGGTGATAGGGCAACGTGACTCGTACTG<br>G-3' | 1731              |
|             | RP: 5'-GAATTCTCATCTTTTCTCAGCCATTGCATCAACCCACC-3'                                    |                   |
| F           | FP: 5'-AAGCTTATGCATCATCATCATCATCATACAGCATATATCCAGAGATCAGTGCATCTC-3'                 | 1704              |
|             | RP: 5'-GAATTCTCATCTTTTCTCAGCCATTGCATCAACCCACC-3'                                    |                   |
| partial HN  | FP: 5'-CGATCTCTGGATGTGTTAG-3'                                                       | 411               |
|             | RP: 5'-CCACACTAGGGTATAATGC-3'                                                       |                   |
| partial F   | FP: 5'-CTCATGATAACTGTGGACTC-3'                                                      | 402               |
|             | RP: 5'-GGTTCAGTAGGCTCTTATAC-3'                                                      |                   |
| Human GAPDH | FP: 5'-AGAAGGCTGGGCTCATTG-3'                                                        | 198               |
|             | RP: 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'                                                      |                   |

[153]

[154] 클로닝 후 획득된 클론(clone)은 LB 액체배지에서 24시간 증폭, 배양하여, 플라스미드(plasmid) 추출 키트 (Midiprep kit) (Invitrogen, USA)를 이용하여 플라스미드를 추출한 다음 리포솜 (liposome) (lipofectamine 3000, Invitrogen)을 제조사의 방법대로 이용하여 hATMSCs에 형질도입시켜 HN/F 유전자가 도입된 hATMSCs(HN/F-hATMSCs)를 획득하였다. 형질도입된 세포주로부터 총 RNA를 추출하여 RT-PCR 및 실시간 정량 RT-PCR을 통해 HN 및 F 유전자의 발현을 분석하였다. 대조군으로 hATMSCs를 이용하였다. 부분 (partial) HN 및 F 프라이머는 RT-PCR 및 실시간 정량 PCR을 이용한 HN 또는 F mRNA에 대한 발현 확인용으로 사용하였다.

[155] 발현분석 결과 도 4에서와 같이 HN 및 F 유전자의 과발현을 확인하였다. 이러한 결과는 리포솜을 이용한 형질주입(liposomal transfection)을 통하여 성공적으로 HN 및 F 유전자를 동시에 과발현시켰음을 의미한다.

[156] 또한 표 1에 제시된 바와 같이 HN 유전자 증폭을 위한 정방향 프라이머에 myc 단백질을 코딩하는 염기서열을 부착하였고 F 유전자 증폭을 위한 정방향 프라이머에 히스티딘을 코딩하는 염기서열을 부착하였기 때문에 myc 단백질과 히스티딘에 대한 항체 (Santacruz Biotechnology, USA)를 이용하여 HN/F-hATMSCs에서 공초점레이저 현미경(Nicon, Japan)을 통해 HN과 F 단백질의 발현을 분석하였다.

[157] 이미지 분석결과, 도 5에서와 같이 HN/F-hATMSCs의 세포표면에 HN과 F 단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 HN과 F 단백질을 과발현하는 사람 지방유래 중간엽줄기세포가 성공적으로 제작되었음을 의미한다.

[158]

[159] 실시예 3. HN/F-hATMSCs의 줄기세포 마커에 대한 발현 평가

[160] 지방유래 중간엽줄기세포의 양성 표지마커 CD29, CD44 및 CD90와 음성

표지마커인 CD34, CD45 및 HLA-DR에 대한 항체(Sanacruz Biotechnology, USA)를 이용하여 유세포 분석기를 통해 HN/F-hATMSCs에서 지방유래 중간엽줄기세포 표지마커들에 대한 발현을 분석하였다. 대조군으로 hATMSCs를 이용하였다. 발현분석 결과, 도 6에서와 같이 대조군과 비교해서 양성 표지마커인 CD29, CD44 및 CD90와 음성 표지마커인 CD34, CD45 및 HLA-DR에 대한 발현차이가 없음을 확인하였다. 이러한 면역표현형분석법(Immunophenotyping)을 실시한 결과는 HN과 F 유전가 도입된 hATMSCs가 줄기세포로의 특성을 유지하고 있음을 의미하는 것이다.

[161]

[162] 실시예 4. HN/F-hATMSCs와 NSC34 운동신경세포주의 세포융합 능력에 대한 평가

[163] 실시예 2에서와 같이 제조된 HN/F-hATMSCs의 세포융합 능력을 평가하기 위해서 녹색 염료로 표지한 HN/F-hATMSCs와 세포 트랙커 CM-DiI으로 표지한 NSC34 운동신경세포주와 융합분석법(fusion assay)을 실시하였다. 두 종류의 세포를 세포수 1:1의 비로 1.5 ml 시험관에 혼합하고 5분간 4°C 조건하에서 반응시킨 후 37°C 세포배양기에 15분간 반응시켰다. 항생제가 첨가된 DMEM 배양배지(10% FBS 첨가)가 들어있는 6 웰 플레이트에 옮긴 후 5% CO<sub>2</sub> 공급하에 37°C 조건하에서 16시간 배양하였다. 세포를 회수하여 유세포 분석기를 통해 HN/F-hATMSCs와 NSC34 운동신경세포주의 세포융합율을 분석하였다. 대조군으로는 hATMSCs를 이용하였다. 분석결과, 도 7에서와 같이 대조군에 비해 HN/F-hATMSCs와 NSC34 운동신경세포주의 세포융합율이 3.5배 이상 증가한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 HN/F-hATMSCs가 NSC34 운동신경세포주에 대한 세포융합율이 증진되었음을 의미한다.

[164] 또한 도 7에 제시된 바가 같이 공초점레이저 현미경을 통한 이미지 분석을 통해 녹색 형광을 나타내는 HN/F-hATMSCs와 적색 형광을 띠는 NSC34 운동신경세포주가 융합된 세포의 이미지를 확인할 수 있었다.

[165]

[166] 실시예 5. HN/F-hATMSCs와 NSC34 운동신경세포주가 융합된 세포에서 hATMSCs의 표지마커 및 운동신경세포 표지마커의 발현 분석

[167] 실시예 4의 융합세포에 대하여 운동신경세포 표지마커인 콜린 아세틸트랜스퍼라아제(choline acetyltransferase, ChAT)와 지방유래 중간엽줄기세포 표지마커인 CD105에 대한 항체 (Sanacruz Biotechnology, USA)를 이용하여 공초점레이저 현미경을 통해 지방유래 중간엽줄기세포 표지마커인 ChAT와 CD105의 발현을 분석하였다. 분석 결과, 도 8에서와 같이 HN/F-hATMSCs와 NSC34 운동신경세포주가 융합된 세포에서 운동신경세포 표지마커인 ChAT 지방유래 중간엽줄기세포 표지마커인 CD105의 발현을 확인하였다.

[168] 이러한 결과는 HN/F-hATMSCs와 NSC34 운동신경세포주가 융합되었음을

확인시켜주며, 융합된 세포는 지방유래 중간엽줄기세포와 운동신경세포주에서 발현되는 표지마커 단백질을 모두 발현하고 있다는 것을 의미한다.

[169]

[170] 실시예 6. 사멸중인 NSC34 운동신경세포주와 HN/F-hATMSCs와 NSC34 운동신경세포주가 융합된 세포의 프로테오믹스 분석

[171] 사멸중인 운동신경세포와 HN/F-hATMSCs의 세포융합을 통한 세포 손상 복구 기전을 알아보기 위해, 실시예 2의 annexin V-positive NSC34 운동신경세포주 및 실시예 4의 융합세포에 대한 프로테오믹스 분석(proteomics analysis)을 ESI-LTQ-Orbitrap(Termo Fiher) 및 nanoHPLC(RSLC, Dionex)를 이용하여 실시하고, 히트맵 분석(heatmap analysis)을 MeV software를 이용하여 실시하였다. 대조군으로 NSC34 운동신경세포주를 이용하였다. 분석 결과 도 9 및 도 10에서와 같이 세포 회복(cell repair)과 관련된 5 유전자(DDB1, HMGB1, MSH2, NONO 및 PCNA)가 사멸중인 NSC34 운동신경세포에서 감소하는 반면, HN/F-hATMSCs와 NSC34 운동신경세포주가 융합된 세포에서 증가하는 것을 확인하여, 상기 5 유전자를 세포 손상 복구 표적 유전자로 선별하였다.

[172]

[173] 또한, 실시예 2의 annexin V-positive NSC34 운동신경세포주 및 실시예 4의 융합세포에서 상기 세포 회복과 관련된 5 유전자(DDB1, HMGB1, MSH2, NONO 및 PCNA) 중 DDB1, HMGB1 및 MSH2의 발현변화를 확인하였다. 요약하면, 실시예 2의 annexin V-positive NSC34 운동신경세포주 및 실시예 4의 융합세포를 RT-PCR 및 정량 RT-PCR을 통해 DDB1, HMGB1 및 MSH2의 발현을 분석하였다. 대조군으로 NSC34 운동신경세포주를 이용하였다. 도 11에서와 같이 사멸중인 NSC34 운동신경세포에서는 DDB1, HMGB1 및 MSH2 mRNA의 발현이 감소하는 반면, HN/F-hATMSCs와 NSC34 운동신경세포주가 융합된 세포에서 현저히 증가하였다.

[174] 이러한 결과는 HN과 F 단백질을 과발현하는 hATMSCs가 사멸중인 NSC34 운동신경세포주와 융합하여 세포 손상을 회복하는 과정에서 DDB1, HMGB1 및 MSH2가 관여함을 의미한다.

[175]

[176] 실시예 7. 사멸중인 C2C12 근육근아세포주와 헤마글루티닌 뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) / F(fusion) 단백질을 과발현하는 유도만능줄기세포 유래 신경줄기세포(HN/F-NSCs)의 세포융합에 의한 C2C12 근육근아세포주 세포사멸 억제효과 분석

[177] HN과 F 단백질을 과발현하는 세포에서 세포융합 능력이 나타나는지 알아보기 위해서 HN과 F 단백질을 과발현하는 유도만능줄기세포 유래 신경줄기세포(HN/F-NSCs)를 제작하였다. 요약하면, 실시예 2에서 클로닝한 HN 및 F 단백질이 각각 삽입된 pcDNA3.1 발현벡터를 리포솜(lipofectamine 3000, Invitrogen)을 제조사의 방법대로 이용하여 유도만능줄기세포 유래

신경줄기세포(iPSCs-NSCs)에 형질도입시켜 HN/F 유전자가 도입된 iPSCs-NSCs(HN/F-NSCs)를 획득하였다. 형질도입된 세포주로부터 총 RNA를 추출하여 RT-PCR 및 실시간 정량 RT-PCR을 통해 HN 및 F 유전자의 발현을 분석하였다(결과는 나타내지 않음).

- [178] 그 다음, 세포 트랙커 CM-DiI으로 표지한 C2C12 근육근아세포주에 세포사멸 유도인자인 탭시가진  $2.5 \mu\text{g/ml}$ 를 처리 후 24시간 배양하였다. 아넥신 V 염색 후 아넥신 V 항체를 이용하여 유세포 분석기를 통해 아넥신 V-C2C12 근육근아세포주를 분리하였다. 상기 HN/F-NSCs를 녹색 염료로 표지하고, 실시예 1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 아넥신 V-C2C12 근육근아세포주와 세포융합한 후, 세포를 회수하고 유세포 분석을 통해 V-positive 세포를 분석하였다. 분석결과, 도 12에서와 같이 HN/F-NSCs와 세포융합이 일어나지 않은 C2C12 세포 그룹에서는 72.3%의 아넥신 V-positive 세포를 확인하였고, HN/F-NSCs와 세포융합이 일어난 C2C12 세포 그룹에서는 21.6%의 아넥신 V-positive 세포를 확인하였다.

- [179] 이러한 결과는 HN과 F 단백질을 과발현하는 iPSCs-NSCs가 사멸중인 C2C12 근육근아세포주와 융합하여 세포 손상을 회복함을 의미한다.

[180]

- [181] 실시예 8. N2A 신경아세포종세포주와 헤마글루티닌

뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) / F(fusion) 단백질을 과발현하는 HeLa 세포주(HN/F-HeLa)의 세포융합 능력에 대한 평가

- [182] HN과 F 단백질을 과발현하는 일반세포주에서도 세포융합 능력이 나타나는지 알아보기 위해서 HN과 F 단백질을 과발현하는 HeLa 세포주(HN/F-HeLa)를 제작하였다. 요약하면, GFP-pcDNA3.1 발현벡터 및 실시예 2에서 획득한 HN 단백질 유전자 클론을 이용하여 GFP-HN이 삽입된 pcDNA3.1 발현 벡터를 클로닝하였다. 또한, RFP-pcDNA3.1 발현벡터 및 실시예 2에서 획득한 F 단백질 유전자 클론을 이용하여 RFP-F 단백질이 삽입된 pcDNA3.1 발현 벡터를 클로닝하였다. 그 다음, 리포솜 (lipofectamine 3000, Invitrogen)을 제조사의 방법대로 이용하여 HeLa 세포에 형질도입시켜 HN/F 유전자가 도입된 heLa(HN/F-HeLa)를 획득하였다. 형질도입된 세포주로부터 총 RNA를 추출하여 RT-PCR 및 실시간 정량 RT-PCR을 통해 HN 및 F 유전자의 발현을 분석하였다. 대조군으로 heLa 세포주를 이용하였다. 발현분석 결과 도 13에서와 같이 HN 및 F 유전자의 과발현을 확인하였다.

- [183] 상기에서 제조된 HN/F-HeLa의 세포융합 능력을 평가하기 위해서 HN/F-HeLa와 DAPI로 표지한 N2A 신경아세포종세포주를 실시예 4에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포융합한 후, 세포를 회수하고 유세포 분석기 및 공초점레이저 현미경을 통해 HN/F-HeLa와 N2A 신경아세포종세포주의 세포융합율을 분석하였다. 대조군으로 GFP가 형질도입된 N2A 신경아세포종세포주와 mCherry가 형질도입된 HeLa 세포주를 실시예 4에

기재된 방법과 동일한 방법으로 세포융합한 후, 세포를 회수하고 공초점레이저 현미경을 통해 세포융합율을 비교분석하였다. 분석결과, 도 14에서와 같이 HN/F-HeLa와 N2A 신경아세포종세포주에서 세포융합이 일어나고, 대조군에 비해 HN/F-HeLa와 N2A 신경아세포종세포주의 세포융합율이 7배 이상 증가한 것을 확인하였다.

[184] 이러한 결과는 세포에 상관없이 HN과 F 단백질에 의해 세포융합이 일어남을 의미한다.

[185]

[186] 실시예 9. C2C12 근육근아세포주와 헤마글루티닌 뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) / F(fusion) 단백질을 과발현하는 HeLa 세포주의 세포융합 능력에 대한 평가

[187] 다양한 벡터를 통해 HN과 F 단백질을 과발현하는 HeLa 세포주의 세포융합 능력을 평가하기 위해서 pcDNA3.1 발현벡터 또는 pcDNA3.1-P2A 발현벡터를 이용하여 헤마글루티닌 뉴라미니다아제(HN)과 F(fusion) 단백질 유전자를 HeLa 세포주에 도입하였다. 요약하면, 도 15와 같이 pcDNA3.1-P2A 발현벡터와 실시예 2에서 획득한 HN 단백질 유전자 및 F 단백질 유전자 클론을 이용하여 HN 및 F 단백질이 삽입된 pcDNA3.1-P2A 발현벡터를 클로닝하였다. 그 다음, 리포솜(lipofectamine 3000, Invitrogen)을 제조사의 방법대로 이용하여 HeLa 세포주에 형질도입시켜 HN/F 유전자가 도입된 HeLa 세포주(F-P2A-HN-HeLa)를 획득하였다. 또한, 실시예 2에서 클로닝한 HN 및 F 단백질이 각각 삽입된 pcDNA3.1 발현벡터를 상기와 같이 HeLa 세포주에 형질도입시켜 HN/F 유전자가 도입된 HeLa 세포주(HN/F-HeLa)를 획득하였다. 형질도입된 세포주로부터 총 RNA를 추출하여 RT-PCR 및 실시간 정량 RT-PCR을 통해 HN 및 F 유전자의 발현을 분석하였다 (결과는 나타내지 않음).

[188] 그 다음 세포융합 능력을 평가하기 위해서 상기에서 획득한 HeLa 세포주 각각을 GFP로 표지하고, 실시예 4에 기재된 방법과 동일한 방법으로 RFP로 표지한 C2C12 근육근아세포주와 세포융합한 후, 세포를 회수하고 유세포 분석기를 통해 HeLa 세포주와 C2C12 근육근아세포주의 세포융합율을 분석하였다. 대조군으로 GFP로 표지한 HeLa 세포주와 RFP로 표지한 C2C12 근육근아세포주를 실시예 4에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포융합한 후, 세포를 회수하고 유세포 분석기를 통해 세포융합율을 비교분석하였다. 분석결과, 도 16에서와 같이 F-P2A-HN-HeLa의 세포융합율은 26.9%, HN/F-HeLa의 세포융합율은 50.1%로 대조군에 비해 각각 약 4배, 7배씩 세포융합이 증가한 것을 확인하였다.

[189] 이러한 결과는 다양한 벡터를 통해 세포에 HN과 F 단백질이 과발현되고, HN 및 F 단백질을 과발현하는 세포가 다른 세포와의 세포융합력이 증진됨을 의미한다.

[190]

- [191] 실시예 10. N2A 신경아세포종세포주와 HeLa 세포주가 융합된 세포에서 세포 회복과 관련된 유전자 발현 분석
- [192] HN과 F 단백질에 의한 세포융합 시 세포 손상 복구 기전을 확인하기 위해서 실시예 6에서 선별한 세포 회복과 관련된 유전자 DDB1의 프로모터 부위(promoter region)를 스크리닝하여 도 17에서와 같이 전사조절인자(transcriptional factor, RF)인 TDP-43(TAR DNA-binding protein 43)의 결합모티프(binding motif)가 DDB1의 프로모터 부위에 존재함을 확인하였다.
- [193] 이에 HN과 F 단백질에 의한 세포융합 시 TDP-43 증가에 따라 DDB1의 발현이 증가하는지 확인하기 위해서 도 18에서와 같이 마우스 DDB1(mDDB1)에 특이적으로 결합하는 프라이머를 제작하고 이를 이용하여 N2A 신경아세포종세포주와 HeLa 세포주로부터 총 DNA를 추출하여 PCR을 통해 마우스 특이적 DDB1 유전자를 확인하였다. DDB1의 발현이 TDP-43에 의해 조절됨을 확인하기 위해 N2A 신경아세포종세포주에 TDP-43을 과발현시킨 후 RNA를 추출하여 정량 RT-PCR을 이용해 분석하였다. 그 다음, N2A 신경아세포종세포주와 GFP가 형질도입된 HeLa 세포주, 그리고 N2A 신경아세포종세포주와 GFP-TDP-43이 형질도입된 HeLa 세포주 각각을 Sendai virus (HVJ) Envelope Cell fusion Kit (GenomONETM-CF EX Sendai virus (HVJ) Envelope Cell Fusion Kit, COSMO BIO, Japan)을 제조자의 방법대로 이용하여 세포융합을 실시한 후 fusion GFP 항체(Rockland)를 이용하여 ChIP(Chromatin immunoprecipitation) assay (Millipore)를 수행하였다. 그 결과 도 19에서와 같이 N2A 신경아세포종세포주와 GFP-TDP-43이 형질도입된 HeLa 세포주가 융합된 세포주에서 융합 시간에 따라 mDDB1이 증가하고, mDDB1 프로모터 부위에서 TDP-43의 occupancy가 4배 이상 증가하는 것으로 나타나, TDP-43의 증가에 따라서 DDB1의 발현이 조절됨을 확인하였다.
- [194]
- [195] 또한, HN과 F 단백질에 의한 세포융합 시 TDP-43이 수용체 세포(recipient cell)의 핵 내로 translocation 되는지 확인하기 위해서 CM-DiI으로 표지한 N2A 신경아세포종세포주와 GFP-TDP-43이 형질도입된 HeLa 세포주를 상기에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포융합을 실시하고 DAPI 염색 후 공초점레이저 현미경을 통해 TDP-43의 translocation을 분석하였고, N2A 신경아세포종세포주에 NucBlue (ThermoFisher)를 이용하여 염색하고 GFP-TDP-43이 형질도입된 HeLa 세포주와 상기에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포융합을 실시후 human nuclei 항체(abcam)를 이용하여 면역염색실시 후 공초점레이저 현미경을 통해 분석하였다. 분석결과, 도 20에서와 같이 GFP-TDP-43이 형질도입된 HeLa 세포주의 TDP-43이 N2A 신경아세포종세포주의 핵으로 translocation됨을 확인하였다.
- [196] 이러한 결과는 HN과 F 단백질에 의한 세포융합 시 세포 회복과 관련된 유전자

DDB1의 발현 증가는 공여체 세포(donor cell)의 TDP-43이 수용체 세포(recipient cell)의 핵 내로 translocation 후 mDDB1의 프로모터 부위에 결합하여 발현을 조절함에 의한 것임을 의미한다. 또한, 도 21에서와 같이 세포 손상과 관련된 질환에서 HN/F 단백질 과발현 세포가 손상된 세포와의 융합을 통해 HN/F 단백질 과발현 세포 내 전사조절인자를 손상된 세포의 핵 내로 전달하고, 전달된 전사조절인자에 의해 손상된 세포 내 세포 회복에 관여하는 유전자의 발현을 조절함으로써, 손상된 세포를 회복하고, 이를 통해 세포 손상과 관련된 질환을 치료할 수 있음을 의미한다.

[197]

[198] 실시예 11. 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD) 세포모델에서 HN/F-hATMSCs의 세포융합을 이용한 치료효과 분석

[199] 세포 손상과 관련된 질환으로 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)에서 HN/F 단백질을 과발현하는 세포에 의한 세포융합을 이용한 치료 효과를 확인하기 위하여, AD 세포모델을 제작하였다. 요약하면, AD 동물모델인 TG2576 마우스(생후 80일)를 Jackson laboratory로부터 제공받았다. 그 다음, TG2576 마우스의 뇌실하영역(subventricular zone)을 분리하고, 분리한 조직에서 트립신을 이용해 줄기세포를 분리 및 여과하였다. 그 다음, B27 supplement가 함유된 DMEM 배양배지에 EGF 및 FGF를 각각 20 ng/ml 첨가하여 구 형태로 4일 동안 배양하였다. 4일 후 웰-플레이트로 옮기고 5% FBS 및 B27 supplement가 함유된 DMEM 배양배지에서 7일 동안 배양하여 AD 마우스 유래 신경줄기세포의 분화를 유도하였다.

[200] 그 다음, 상기 실시예 2에서 획득한 HN/F-hATMSCs와 상기에서 획득한 AD 마우스 유래 신경줄기세포를 실시예 4에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포융합하였다. 세포융합 24시간 후 아넥신 V 항체를 5  $\mu$ l 첨가하고 15분 동안 상온에서 반응한 후 유세포 분석기를 통해 V-positive 세포를 분석하였다. 분석 결과, 도 22에서와 같이 AD 마우스 유래 신경줄기세포에서는 50.7%의 아넥신 V-positive 세포를 확인하였고, HN/F-hATMSCs와 세포융합이 일어난 AD 마우스 유래 신경줄기세포에서는 15.9%의 아넥신 V-positive 세포를 확인하였다.

[201] 이러한 결과는 HN과 F 단백질을 과발현하는 hATMSCs가 HN 및 F 단백질에 의해 AD 신경세포와 융합하여 헌팅턴병 신경세포에서 나타나는 세포 손상을 회복함을 의미한다.

[202]

[203] 실시예 12. 헌팅턴병(Huntington's disease) 질환 세포모델에서 HN/F-hATMSCs의 세포융합을 이용한 치료효과 분석

[204] 세포 손상과 관련된 질환으로 헌팅턴병(Huntington's disease)에서 HN/F 단백질을 과발현하는 세포에 의한 세포융합을 이용한 치료 효과를 확인하기 위하여, 헌팅턴병 세포모델을 제작하였다. 요약하면, 헌팅턴병 동물모델인 R6/2 Tg 마우스(생후 80일)를 Jackson laboratory로부터 제공받았다. 그 다음, R6/2

마우스의 뇌실하영역(subventricular zone)을 분리하고, 분리한 조직에서 트립신을 이용해 줄기세포를 분리 및 여과하였다. 그 다음, B27 supplement가 함유된 DMEM 배양배지에 EGF 및 FGF를 각각 20 ng/ml 첨가하여 구 형태로 4일 동안 배양한 뒤, 웰-플레이트로 옮기고 5% FBS 및 B27 supplement가 함유된 DMEM 배양배지에서 7일 동안 배양하여 헌팅턴병 마우스 유래 신경줄기세포의 분화를 유도하였다.

- [205] 그 다음, 상기 실시예 2에서 획득한 HN/F-hATMSCs와 상기에서 획득한 헌팅턴병 마우스 유래 신경줄기세포를 실시예 4에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포융합하였다. 세포융합 24시간 후 아넥신 V 항체를 5  $\mu$ l 첨가하고 15분 동안 상온에서 반응한 후 유세포 분석기를 통해 V-positive 세포를 분석하였다. 분석 결과, 도 23에서와 같이 헌팅턴병 마우스 유래 신경줄기세포에서는 37.5%의 아넥신 V-positive 세포를 확인하였고, HN/F-hATMSCs와와 세포융합이 일어난 헌팅턴병 마우스 유래 신경줄기세포에서는 11.1%의 아넥신 V-positive 세포를 확인하였다.
- [206] 이러한 결과는 HN과 F 단백질을 과발현하는 hATMSCs가 HN 및 F 단백질에 의해 헌팅턴병 신경세포와 융합하여 헌팅턴병 신경세포에서 나타나는 세포 손상을 회복함을 의미한다.
- [207]
- [208] 실시예 13. 심부전(heart failure) 질환 세포모델에서 HN/F-hATMSCs의 세포융합을 이용한 치료효과 분석
- [209] 세포 손상과 관련된 질환으로 심부전(heart failure) 질환에서 HN/F 단백질을 과발현하는 세포에 의한 세포융합을 이용한 치료 효과를 확인하기 위하여, 심부전 질환 세포모델을 제작하였다. 요약하면, 세포 트랙커 CMDFA(Invitrogen)로 표지한 H9c2 심장근아세포주에 과산화수소( $H_2O_2$ ) 200  $\mu$ M을 처리한 후 3시간 동안 배양하여 산화 스트레스를 유도함으로써, 심부전 질환 세포모델을 획득하였다.
- [210] 그 다음, 상기 실시예 2에서 획득한 HN/F-hATMSCs를 CM-DiI으로 표지하고, 상기에서 획득한 심부전 질환 세포모델을 실시예 4에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포융합한 후, 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 아넥신 V로 염색하고 유세포 분석기를 통해 아넥신 V-positive 세포를 분리한 후 분리된 세포 중에서 녹색 형광 positive 세포를 분석하였다. 분석 결과, 도 24에서와 같이 심부전 질환 세포모델에서는 29%의 아넥신 V-positive 세포를 확인하였고, HN/F-hATMSCs와와 세포융합이 일어난 심부전 질환 세포모델에서는 13.4%의 아넥신 V-positive 세포를 확인하였다.
- [211] 이러한 결과는 HN과 F 단백질을 과발현하는 hATMSCs가 HN 및 F 단백질에 의해 심부전이 유도된 세포와 융합하여 세포 손상을 회복함을 의미한다.
- [212]
- [213] 실시예 14. 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 질환

동물모델에서 HN/F-hATMSCs의 세포융합을 이용한 치료효과 분석

- [214] 세포 손상과 관련된 질환으로 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 질환에서 HN/F 단백질을 과발현하는 세포에 의한 세포융합을 이용한 치료 효과를 확인하기 위하여, ALS 질환 동물모델인 G93A SOD1 Tg 마우스(생후 80일)를 Jackson laboratory로부터 제공받았다. 그 다음, G93A SOD1 Tg 마우스를 대조군(Tg-saline), Tg-MSC 및 Tg-fusogenic MSC 그룹으로 나누고, 도 25에서와 같이 intra-spinal cord injection 방법을 이용하여 대조군에는 염류용액(saline)을, Tg-MSC 그룹에는 hATMSCs를, Tg-fusogenic MSC 그룹에는 실시예 2에서 제조한 HN/F-hATMSCs를  $0.5-2 \times 10^6$  세포수로 주입하고 rota rod test를 수행하였다. 그 결과, 도 26에서와 같이 HN/F-hATMSCs를 주입한 Tg-fusogenic MSC 그룹에서 HN/F 단백질에 의한 HN/F-hATMSCs과 신경세포의 융합 및 신경세포 손상 회복으로 인해 운동성이 향상됨을 확인하였다.

[215]

- [216] 실시예 15. 뒤시엔느 근육퇴행위축(Duchenne muscular dystrophy, DMD) 질환 세포모델에서 HN/F-hATMSCs의 세포융합을 이용한 치료효과 분석

- [217] 세포 손상과 관련된 질환으로 뒤시엔느 근육퇴행위축(DMD) 질환에서 HN/F 단백질을 과발현하는 세포에 의한 세포융합을 이용한 치료 효과를 확인하기 위하여, DMD 질환 세포모델을 제작하였다. 요약하면, DMD 질환은 근육섬유의 Dystrophin 결핍으로 인해 발병하는 근육질환인바, Dystrophin에 특이적인 siRNA(siDystrophin, GenePharma)를 입수하고, 이를 제조사의 방법대로 이용해 C2C12 근육근아세포에 도입하여 Dystrophin 발현이 억제된 C2C12 근육근아세포주를 제작하였다. DMD 질환의 병리 증상으로 Dystrophin 및 CTGF 발현을 확인하기 위하여, Dystrophin 및 CTGF에 특이적으로 결합하는 프라이머를 제작하고 상기 siDystrophin을 도입한 C2C12 근육근아세포주로부터 총 RNA를 추출하여 정량 RT-PCR을 이용해 Dystrophin 및 CTGF 유전자 발현을 분석하였다. 또한, CTGF 항체(Abcam)를 이용하여 웨스턴 블롯(western blot)을 이용해 CTGF 단백질 발현을 분석하였다. 대조군으로 C2C12 세포주를 이용하였다. 발현분석 결과 도 27에서와 같이 siDystrophin을 도입한 C2C12 근육근아세포주가 DMD 질환 세포모델로서 Dystrophin의 유전자 발현이 감소하고, CTGF의 유전자 및 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

- [218] 상기에서 제작한 DMD 질환 세포모델에서 HN/F 단백질을 과발현하는 세포에 의한 세포융합을 이용한 치료 효과를 확인하기 위하여, 실시예 2에서와 같이 제조된 HN/F-hATMSCs와 상기에서 제작한 DMD 질환 세포모델을 실시예 4에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포융합한 후, 세포를 회수하고 정량 RT-PCR 및 웨스턴 블롯을 이용해 Dystrophin 및 CTGF의 발현을 분석하였다. 분석결과, 도 28에서와 같이 DMD 질환 세포모델에서 Dystrophin 발현이 감소하고 CTGF 발현이 증가하는 반면, HN/F-hATMSCs와 DMD 질환 세포모델이 융합된 세포에서 Dystrophin 발현이 현저히 증가하고 CTGF 발현이 현저히 감소하는

것을 확인하였다.

- [219] 이러한 결과는 HN과 F 단백질을 과발현하는 세포가 DMD 질환 세포모델과 세포융합하고, 세포융합된 DMD 질환 세포모델에서 정상 세포로의 회복이 이루어짐을 의미한다. 또한, 세포융합된 DMD 질환 세포모델로 정상 Dystrophin 유전자가 전달되어 Dystrophin의 발현이 회복됨을 의미한다.

[220]

- [221] 실시예 16. DMD 질환 동물모델에서 HN/F-hATMSCs의 세포융합을 이용한 치료효과 분석

- [222] DMD 질환에서 HN/F 단백질을 과발현하는 세포에 의한 세포융합을 이용한 치료 효과를 확인하기 위하여, DMD 질환 동물모델인 mdx 마우스(생후 2~4주)를 Jackson laboratory로부터 제공받았다. mdx 마우스에서 골격근을 분리하고, Dystrophin 항체(abcam)을 이용하여 면역조직화학을 실시하여, 도 29에서와 같이 Dystrophin이 감소해 있음을 확인하였다. 그 다음, mdx 마우스를 대조군(saline), MSC 및 fMSC 그룹으로 나누고 도 25에서와 같이 intra-spinal cord injection 방법을 이용하여 대조군에는 염류용액(saline)을, MSC 그룹에는 녹색 염료로 표지한 hATMSCs를, fMSC 그룹에는 녹색 염료로 표지한 실시예 2의 HN/F-hATMSCs를  $0.5-2 \times 10^6$  세포수로 주입하고 1주일 후 골격근(skeletal muscle)을 분리하였다. 그 다음, hNuclei 항체(abcam)로 염색하고, 적출한 골격근에서 공초점레이저 현미경을 통해 생착능을 분석하였다. 또한, 주입하고 3주 후 또는 15주 후 골격근을 분리하고, Dystrophin 항체(abcam)을 이용하여 면역조직화학을 실시하였다. 또한, 주입하고 1주 후 골격근을 분리하고, 분리한 골격근로부터 총 RNA를 추출하여 정량 RT-PCR을 이용해 CTGF 유전자 발현을 분석하였다.

- [223] 그 결과, 도 30에서와 같이 MSC 그룹 및 fMSC 그룹 각각에서 hATMSCs 및 HN/F-hATMSCs의 생착능을 녹색 염료로 확인하였다. 또한, 도 31에서와 같이 fMSC 그룹에서 주입 3주 후 및 주입 15주 후 사람 정상 Dystrophin 단백질 발현이 현저히 증가하여, Dystrophin 단백질 발현이 지속되는 것을 확인하였다. 또한, 도 32에서와 같이 fMSC 그룹에서 주입 1주 후 CTGF 유전자 발현이 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

- [224] 이러한 결과는 mdx 마우스의 근육에서 Dystrophin을 정상적으로 발현하는 세포가 HN 및 F 단백질에 의해 Dystrophin이 결핍된 근육 세포와의 세포융합이 증진되고, 세포융합된 근육 세포에서 정상 근육 세포로의 회복이 이루어짐을 의미한다.

[225]

- [226] 상기 결과들은 HN 및 F 단백질 과발현 세포가 HN 및 F 단백질에 의해 손상된 세포와 융합되고, 손상된 세포와의 융합을 통해 HN 및 F 단백질 과발현 세포 내 전사조절인자를 손상된 세포의 핵 내로 전달하여, 손상된 세포 내 세포 회복에 관여하는 유전자의 발현을 조절함으로써 손상된 세포를 회복하므로, HN 및 F

단백질을 이용한 세포융합 기술을 세포 손상과 관련된 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환을 치료할 수 있음을 의미한다. 또한, HN/F 단백질 과발현 세포가 HN/F 단백질에 의해 유전자 이상이 나타나는 세포와 융합되고, 세포융합에 의해 정상 유전자가 전달되어 발현될 수 있으므로, HN 및 F 단백질을 이용한 세포융합 기술을 유전자치료(gene therapy)의 delivery tool로 사용될 수 있음을 의미한다.

[227]

### 산업상 이용가능성

[228] 본 발명은 세포융합 기술을 이용한 유전자 및 세포 치료제 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 HN 및 F 단백질에 의한 세포융합 기술을 이용하여 세포 손상을 회복시키고 정상 유전자를 도입할 수 있으며, 이에 HN 및 F 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터 또는 이로 형질전환된 세포를 세포 손상과 관련된 질환, 보다 구체적으로 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

[229]

## 청구범위

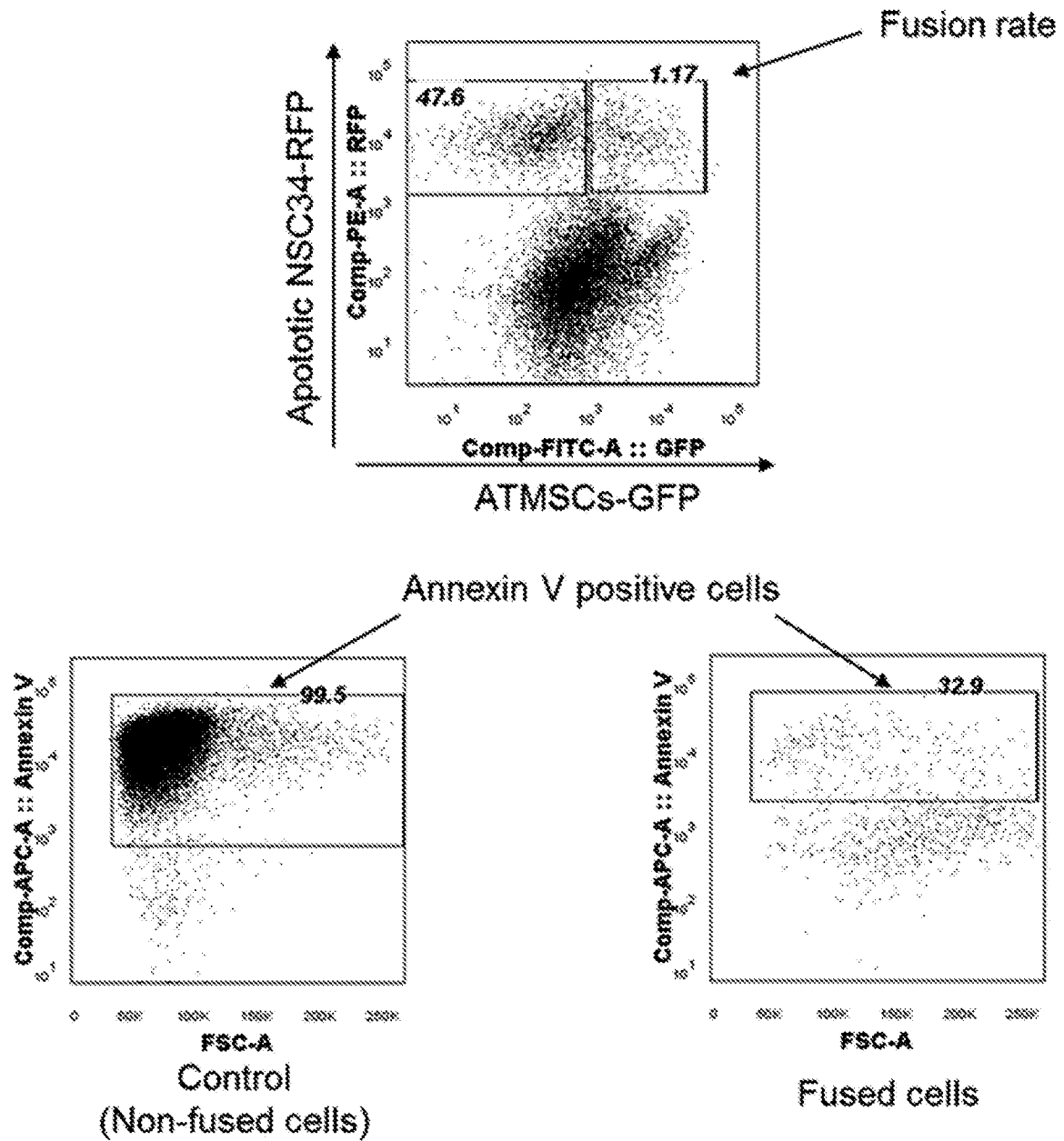
- [청구항 1] 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 헤마글루티닌-뉴라미니다아제 및 F 단백질은 산다이바이러스(sendai virus), 인간면역결핍바이러스 1(human immunodeficiency virus 1), 인간파라인플루엔자 바이러스(Human parainfluenza virus), 인간호흡기세포융합바이러스(Human respiratory syncytial virus, HRSV), 인플루엔자 바이러스(influenza virus) 또는 베시쿨라 스토타티스 바이러스(vesicular stomatitis virus) 유래인 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 벡터는 선형 DNA 플라스미드 DNA, 재조합 비바이러스성 벡터, 재조합 바이러스성 벡터 및 유전자 발현 유도 벡터 시스템(inducible gene expression vector system)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 재조합 바이러스성 벡터는 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노 부속 바이러스(adenovirus associated virus), 헬퍼-의존형 아데노바이러스(helper-dependent adenovirus), 헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus), 렌티바이러스(lentivirus) 및 백신시아바이러스(vaccinia virus) 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환은 운동신경세포 손상 또는 사멸, 뇌의 신경세포 손상 또는 사멸, 척수신경 손상 또는 말초신경 손상을 유발하는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 운동신경세포 손상 또는 사멸을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환은 척수근위축증(spinal muscular atrophy), 케네디병(spinal bulbar muscular atrophy), 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 원발성측삭경화증(primary lateral sclerosis) 및 진행성 구음장애(progressive bulbar palsy)로 이루어진 군으로부터

- 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제 5항에 있어서, 상기 뇌의 신경세포 손상 또는 사멸, 척수신경 손상 또는 말초신경 손상을 유발하는 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 치매(dementia), 다발-경색성 치매(multi-infarct dementia; mid), 전두측두치매(frontotemporal dementia), 루이소체 치매(dementia with Lewy bodies), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 피질기저퇴행증(corticobasal degeneration), 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 우울증(depression), 대사성 뇌질환(metabolic brain disease), 다계통위축병(multiple system atrophy; MSA), 헌팅턴병(Huntington's disease), 진행성핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP), 간질(epilepsy), 치상핵적핵담창구시상하핵 위축증(dentatorubropallidolusian atrophy; DRPLA), 척수소뇌실조병(spino cerebellar ataxia), 녹내장(glaucoma), 뇌졸중(stroke), 뇌허혈(brain ischemia), 뇌염후 파킨슨증(post-encephalitic parkinsonism), 투렛 증후군(Tourette's syndrome), 하지불안증후군(restless legs syndrome) 및 주의력결핍 과잉 행동장애(attention deficit disorders with hyperactivity)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환은 근육병(myopathy), 선천성 근육병(congenital myopathy), 선천성 근육퇴행위축(congenital muscular dystrophy), 뒤시엔느 근육퇴행위축(Duchenne muscular dystrophy), 베커 근육퇴행위축(Becker muscular dystrophy), 사지연결근육퇴행위축(Limb Girdle muscular dystrophy), 얼굴어깨위팔근육퇴행위축(Facioscapulohumeral muscular dystrophy), 안구인두근위축증(oculopharyngeal muscular atrophy), 말단근위축증(distal muscular dystrophy), 에머리드레이푸스 근위축증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 근육긴장퇴행위축(Myotonic dystrophy), 바쓰증후군(Barth syndrome), 심부전(heart failure), 근감소증(sarcopenia) 및 X-연관 확장성 심근병증(X-linked dilated cardiomyopathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase, HN) 및 F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

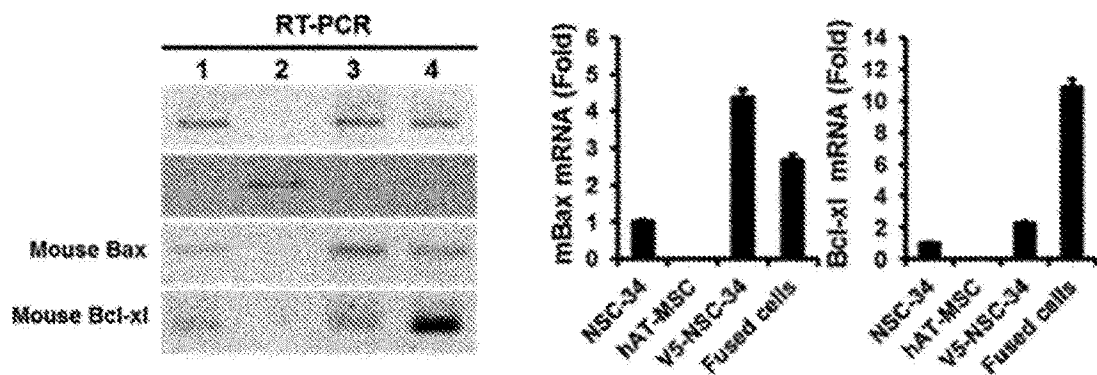
- [청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포, 전구세포 및 동물세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 세포는 자가(*autologous*) 세포, 동종(*allogenic*) 세포 및 이종(*xenogenic*) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제 10항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 성체줄기세포 및 유도만능줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 조혈줄기세포(*hematopoietic stem cell*), 신경줄기세포(*neural stem cell*) 및 중간엽줄기세포(*mesenchymal stem cell*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 혈액, 뇌, 피부, 지방, 골격, 근육, 신경, 골막, 양막 및 태반으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 15] 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(*hemagglutinin neuraminidase, HN*) 및 F(*fusion*) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 치료학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 16] 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(*hemagglutinin neuraminidase, HN*) 및 F(*fusion*) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 치료학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 17] 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한, 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(*hemagglutinin neuraminidase, HN*) 및 F(*fusion*) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터의 용도.
- [청구항 18] 신경퇴행성 질환 또는 신경 질환, 또는 근육퇴행성 질환 또는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한, 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(*hemagglutinin neuraminidase, HN*) 및

F(fusion) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포의 용도.

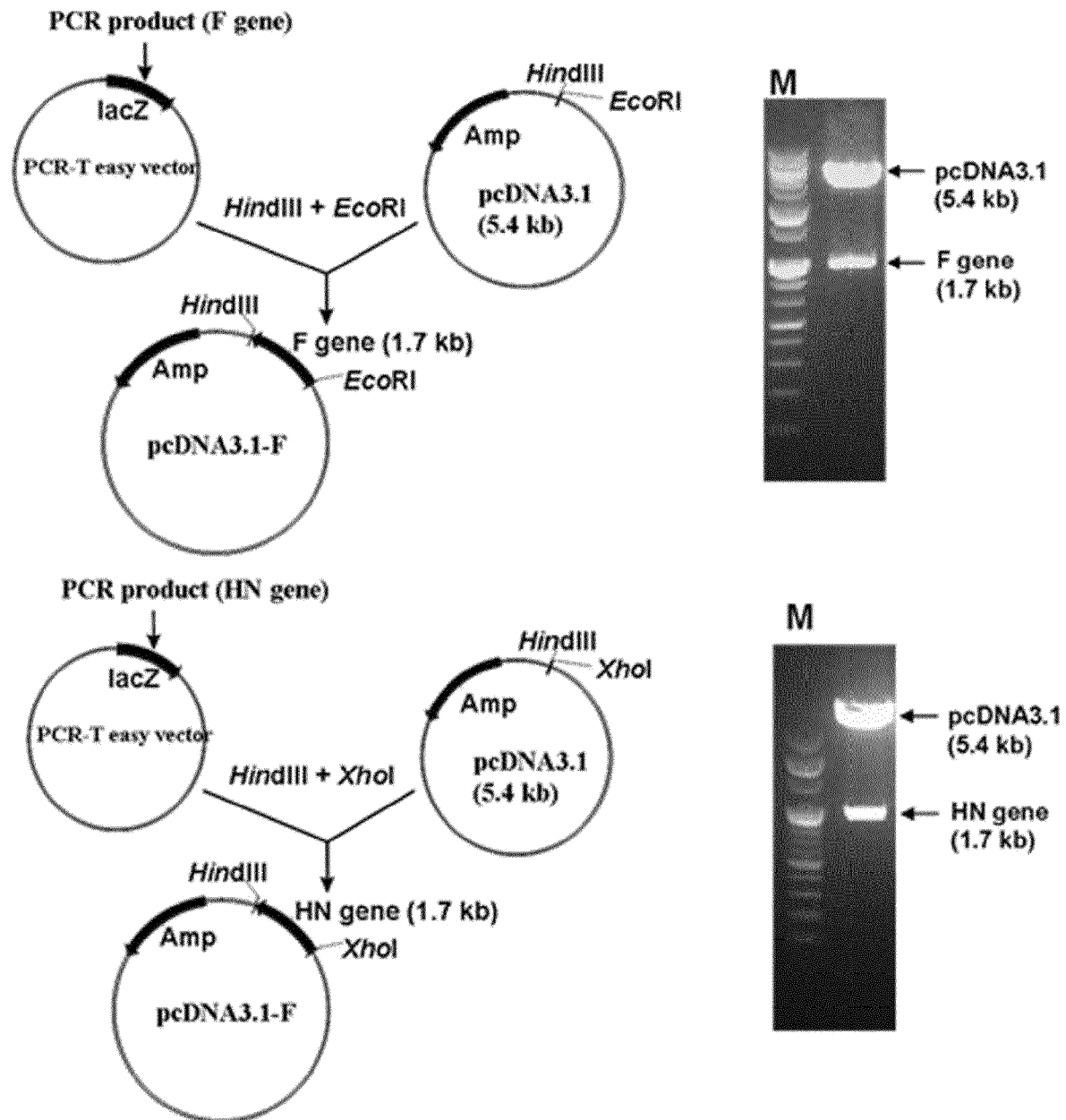
[도1]



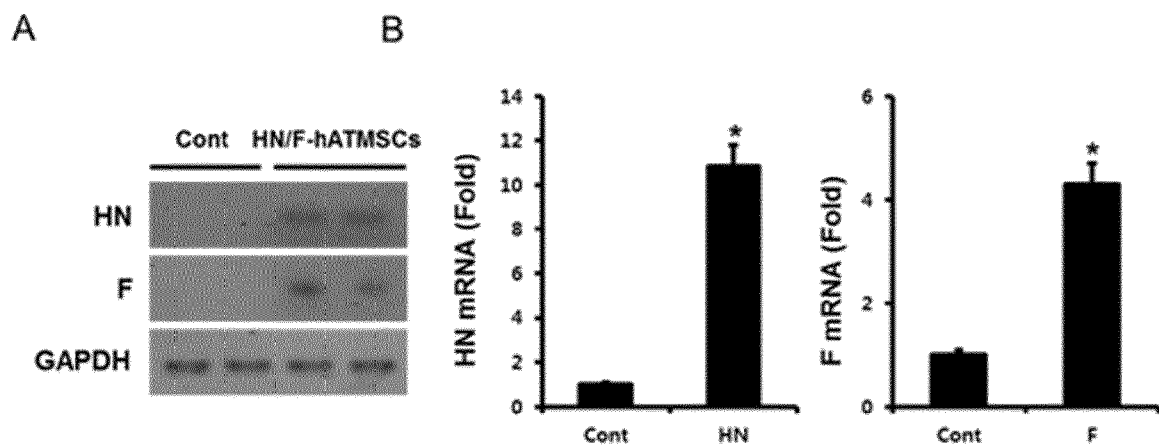
[도2]



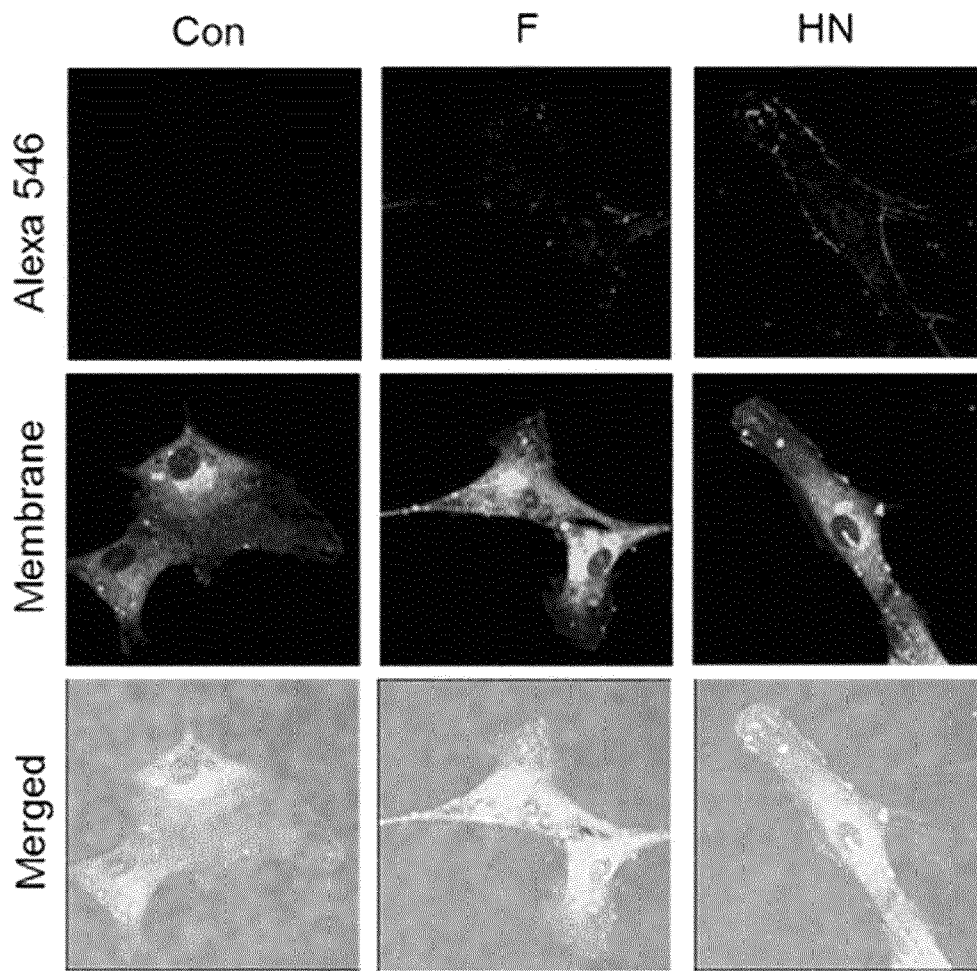
[도3]



[도4]



[도5]

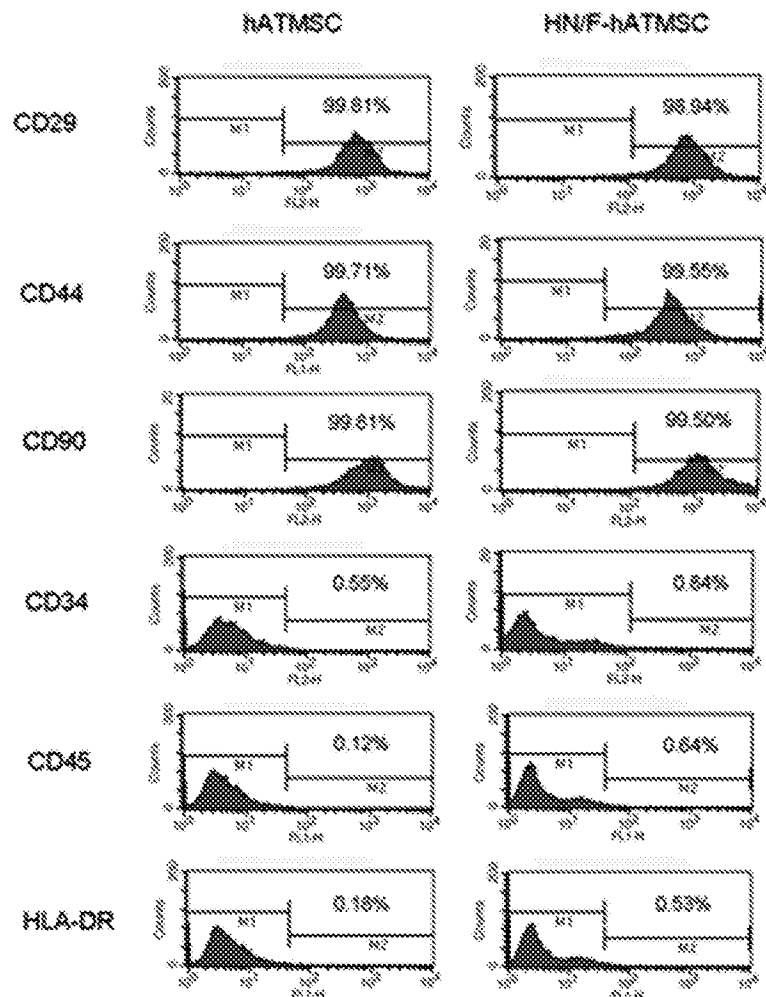


[도6]

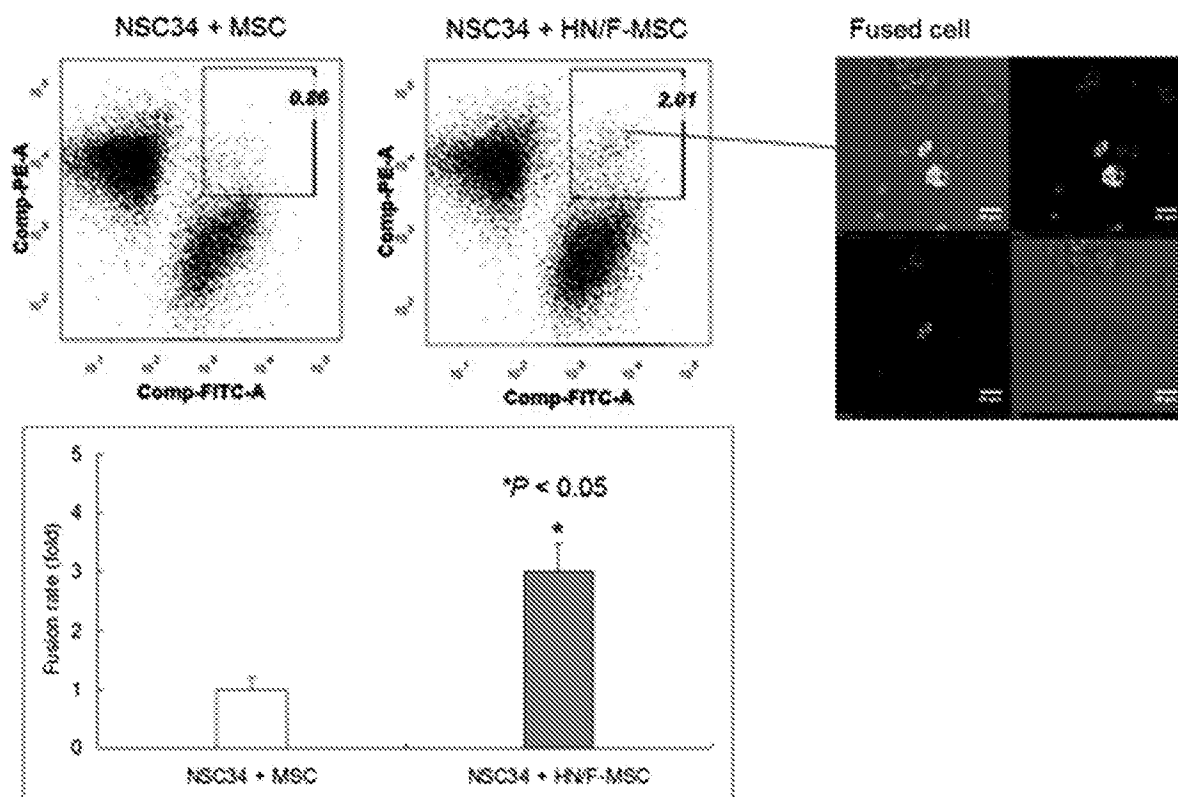
## MSC surface markers

Positive marker

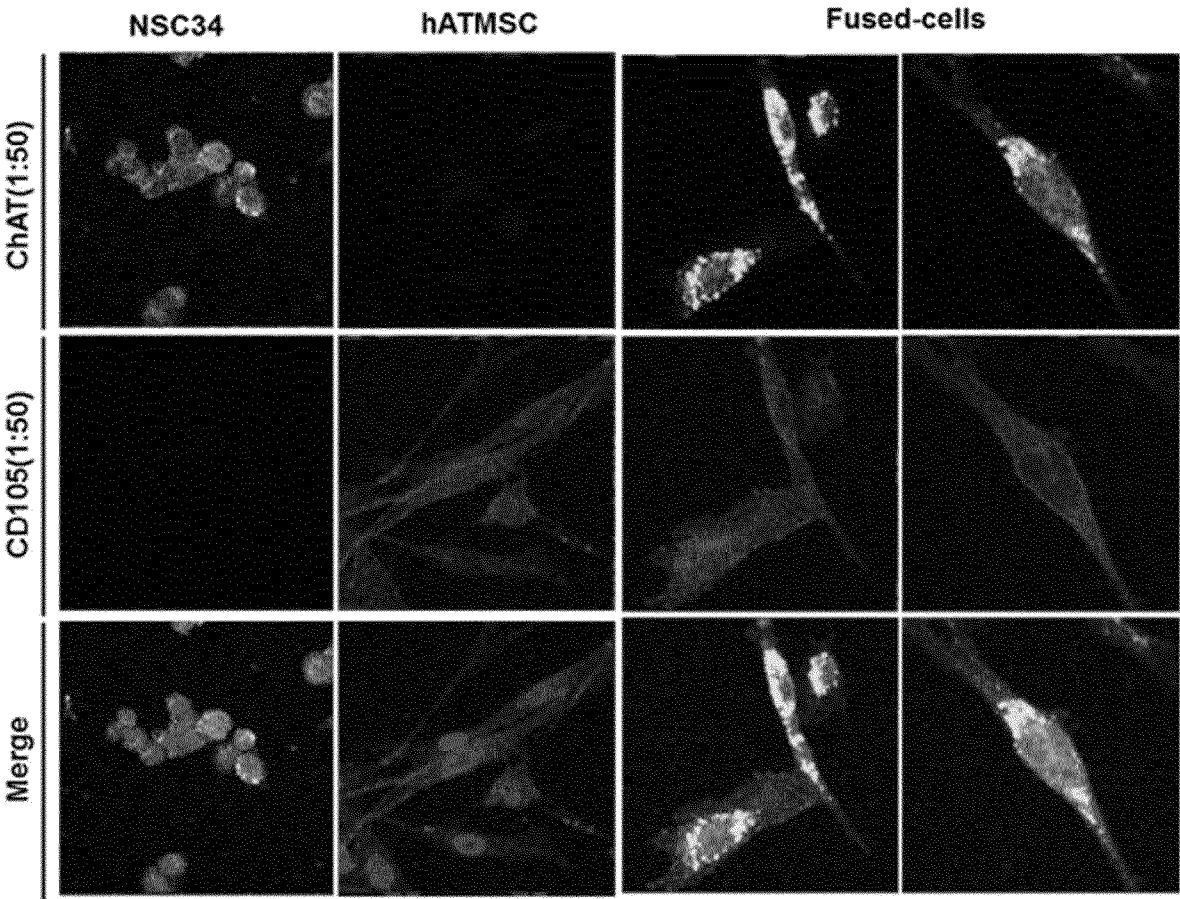
Negative marker



[도7]

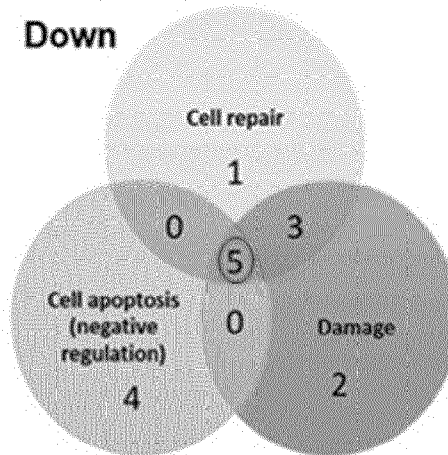
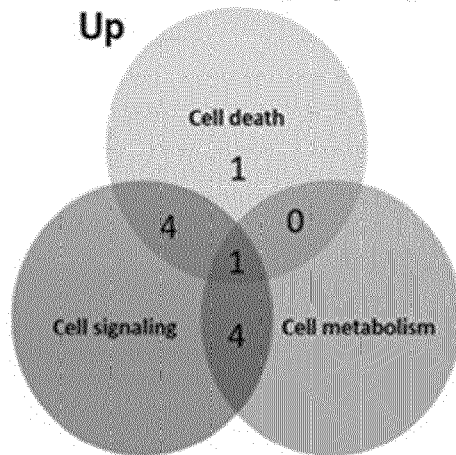


[도8]



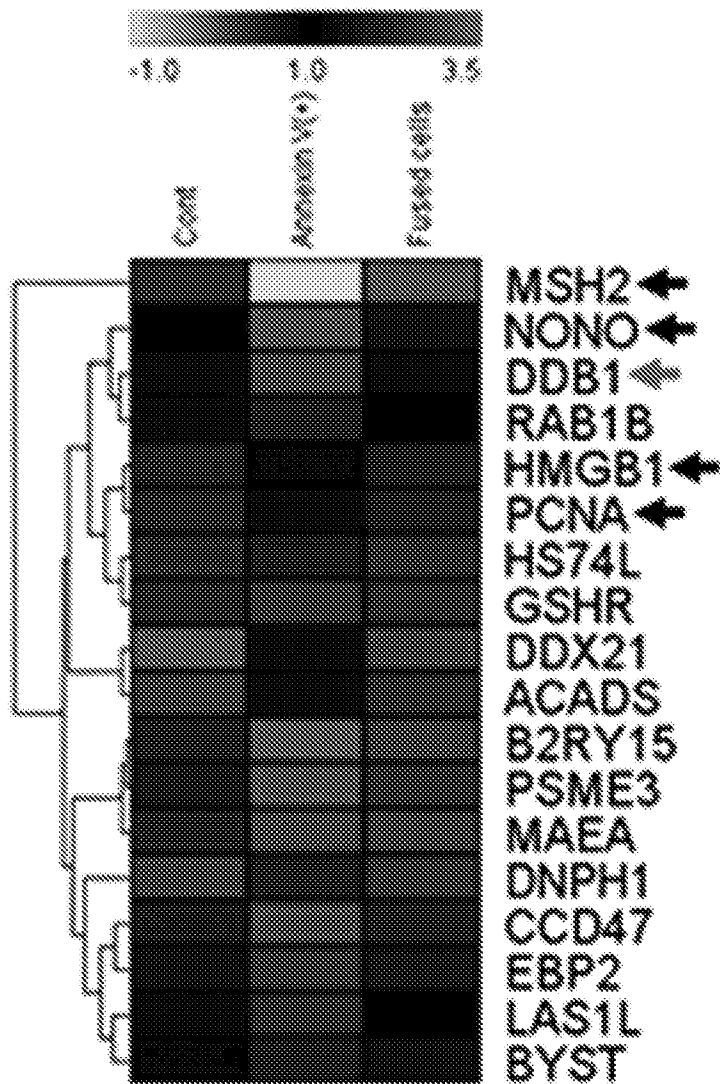
[도9]

- A**
- Cell death (6 genes)
  - Cell signaling (16 genes)
  - Cell metabolism (17 genes)
  - Cell repair: 8 genes
  - Cell apoptosis (negative regulation): 8 genes
  - Cell damage: 10 genes

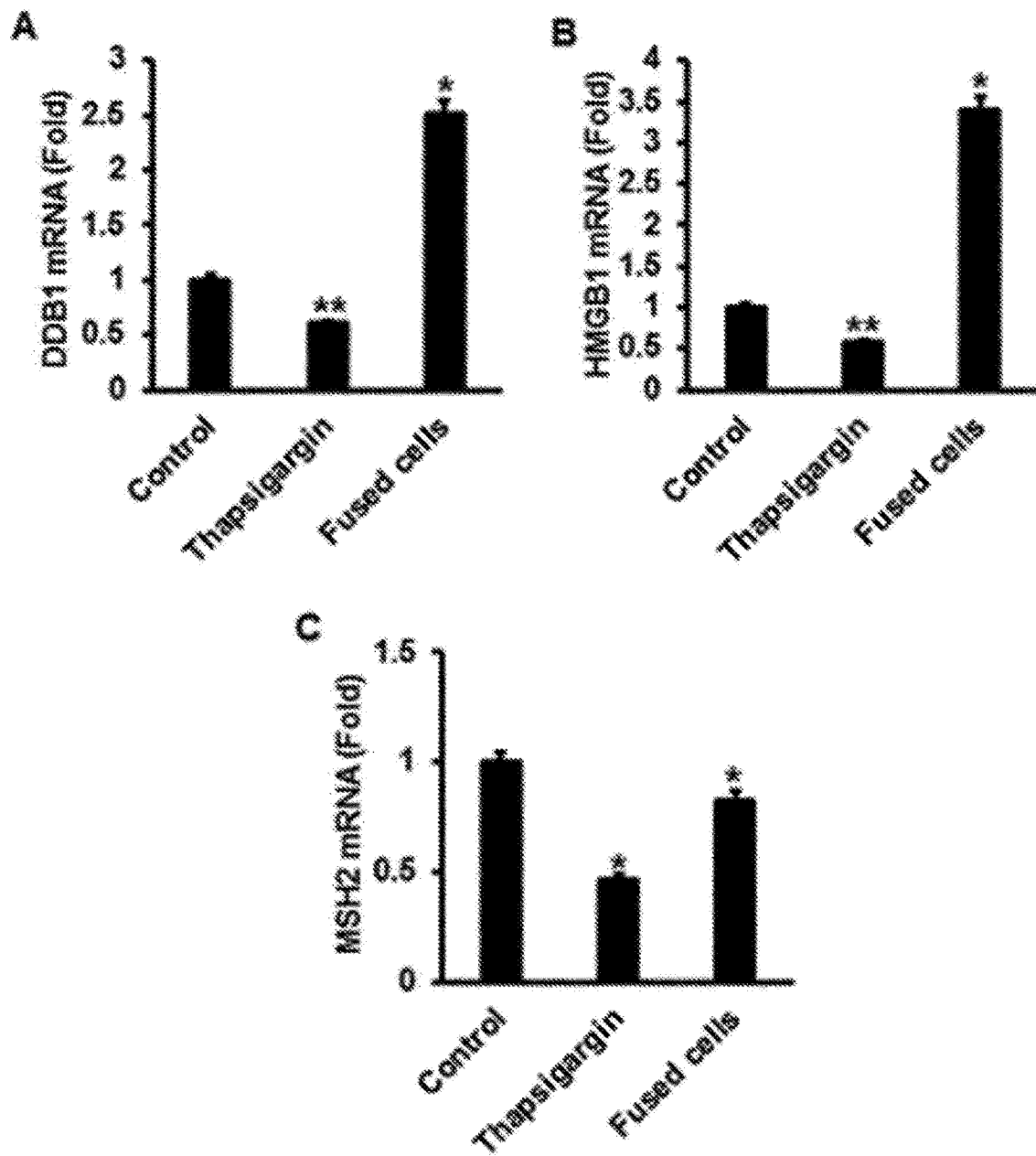
**B**

| Gene  | Full Name                                                 | Function                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CDK1  | Cyclin-dependent kinase 1                                 | cdc25 and chk1 Regulatory Pathway in response to DNA damage, RB Tumor Suppressor/Checkpoint Signaling in response to DNA damage, mitotic G2 DNA damage checkpoint                                                                                                |
| CDK4  | Cyclin-dependent kinase 4                                 | RB Tumor Suppressor/Checkpoint Signaling in response to DNA damage                                                                                                                                                                                               |
| DDB1  | Damage specific DNA binding protein 1                     | Cellular response to DNA damage stimulus, UV-damage excision repair, damaged DNA binding, DNA damage                                                                                                                                                             |
| HMGB1 | High mobility group box 1                                 | DNA damage                                                                                                                                                                                                                                                       |
| MSH2  | MutS homolog 2                                            | Cellular response to DNA damage stimulus, intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage, intra-S DNA damage checkpoint, intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator, damaged DNA binding, DNA damage |
| NONO  | Non-POU-domain-containing, octamer binding protein        | DNA damage, cellular response to DNA damage stimulus                                                                                                                                                                                                             |
| PCNA  | Proliferating cell nuclear antigen                        | DNA damage, cellular response to DNA damage stimulus, damaged DNA binding                                                                                                                                                                                        |
| SMC3  | Structural maintenance of chromosomes 3                   | DNA damage, cellular response to DNA damage stimulus                                                                                                                                                                                                             |
| UHRF1 | Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1 | DNA damage, cellular response to DNA damage stimulus                                                                                                                                                                                                             |

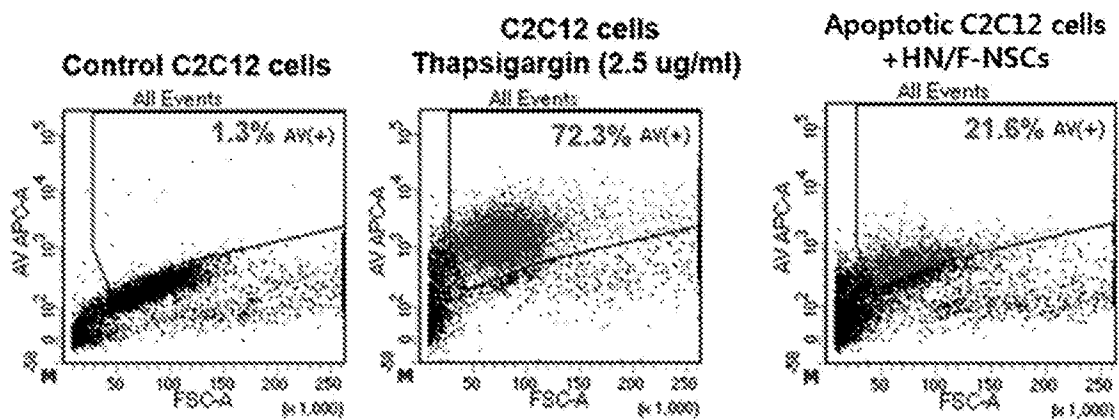
[도10]



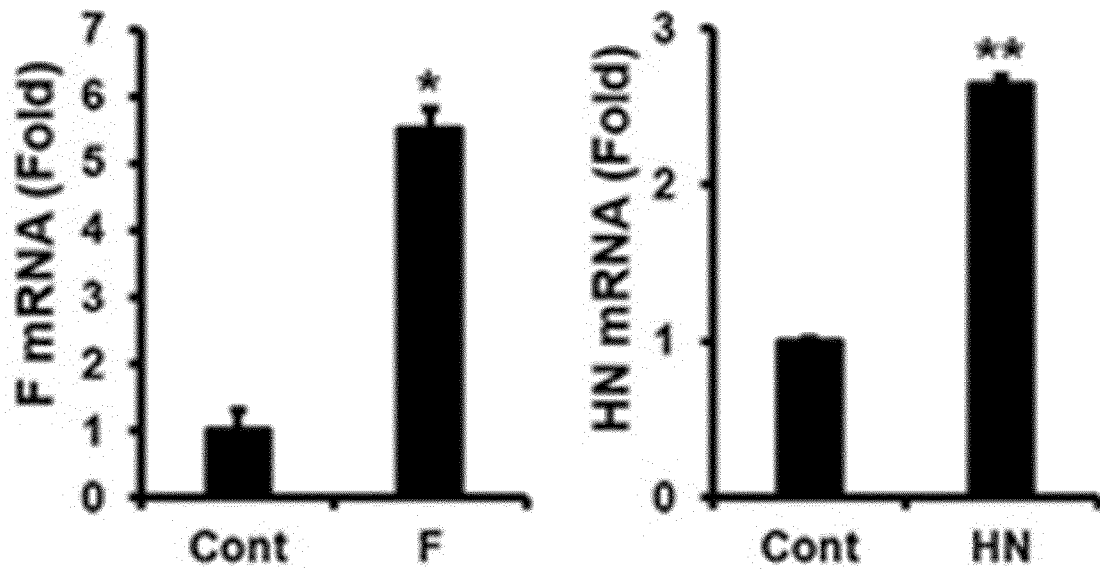
[도11]



[도12]

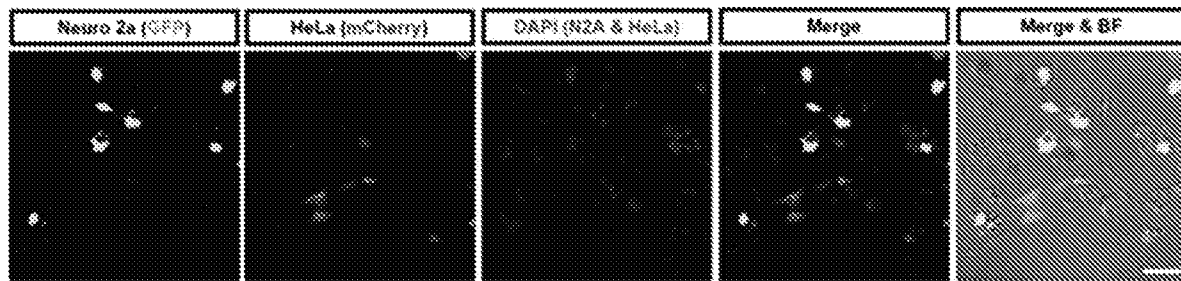


[도13]

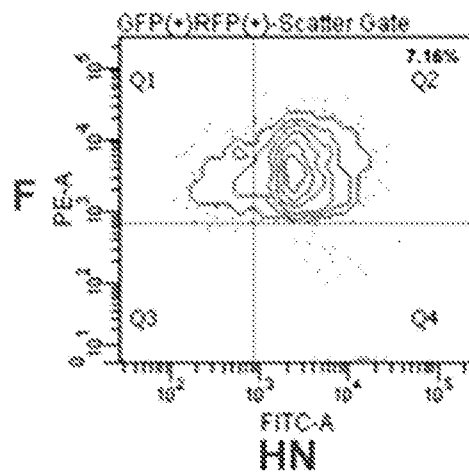
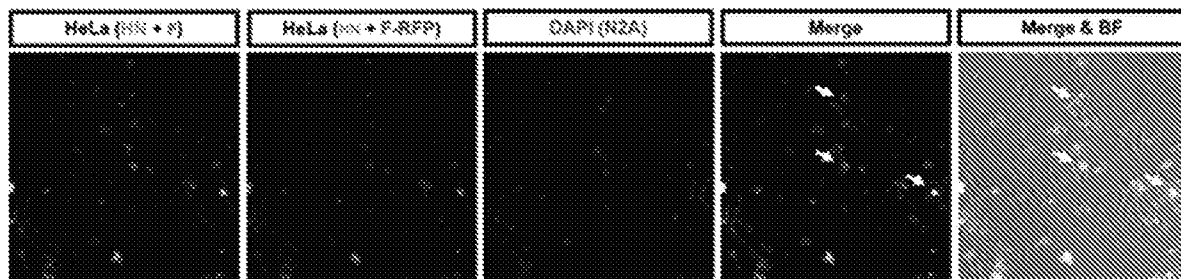


[도14]

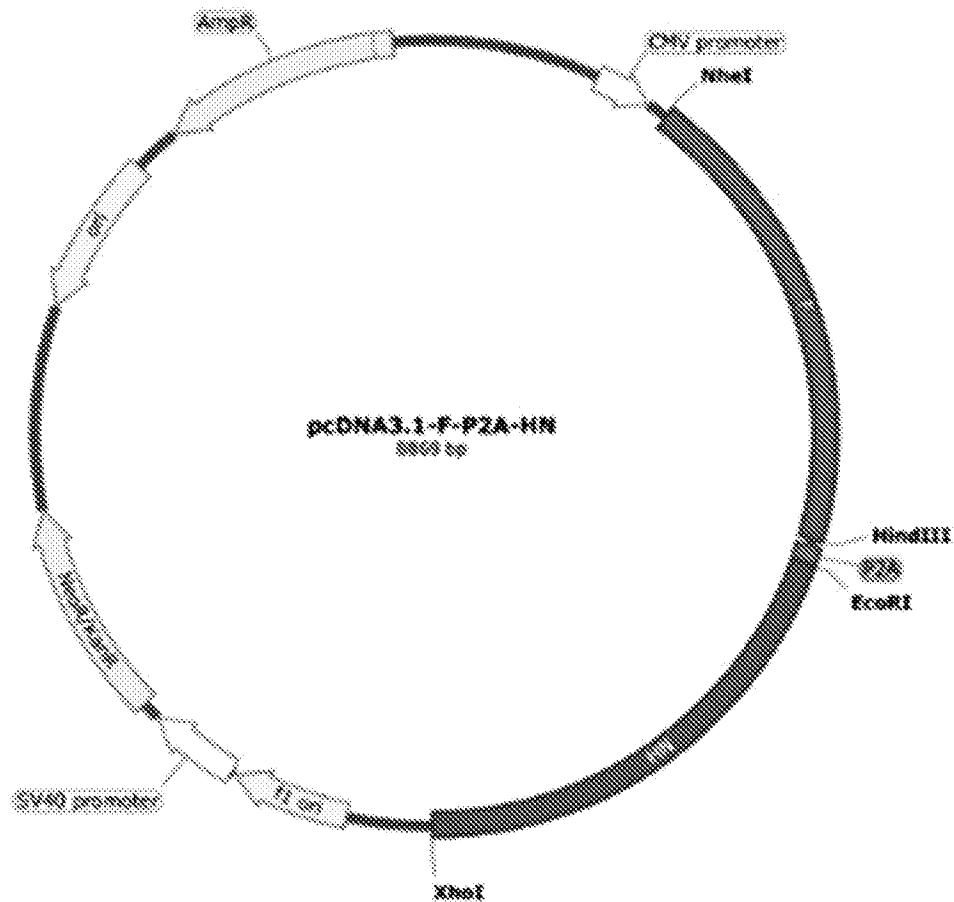
- > Cell fusion between Neuro2A and HeLa
- > Stained with DAPI after cell fusion



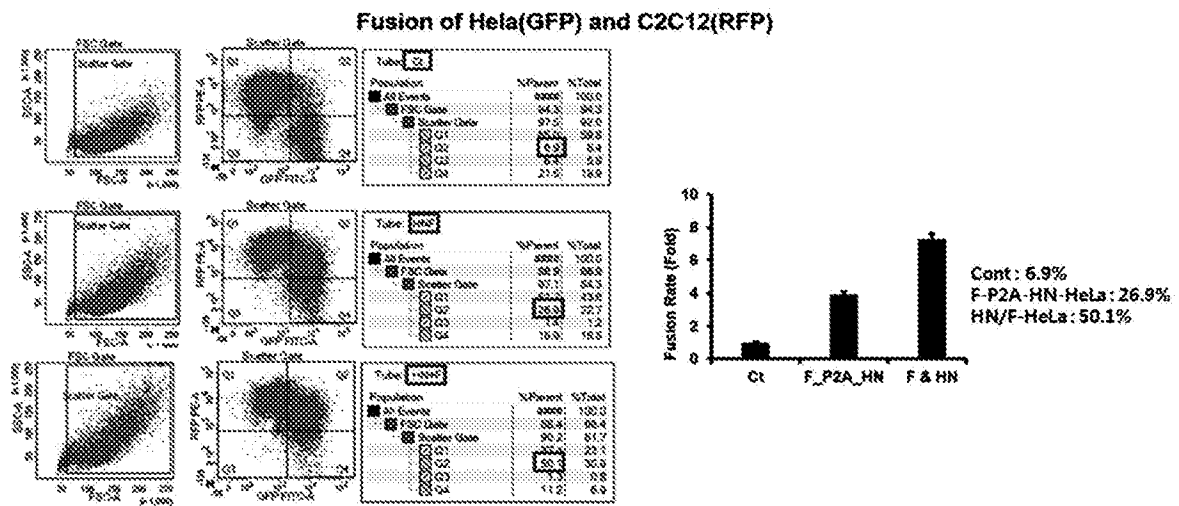
Cell fusion between HN-F co-transfected HeLa and DAPI-stained Neuro2A



[도15]



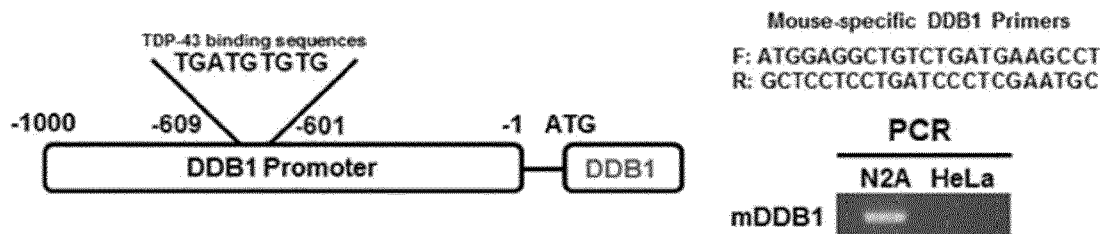
[도16]



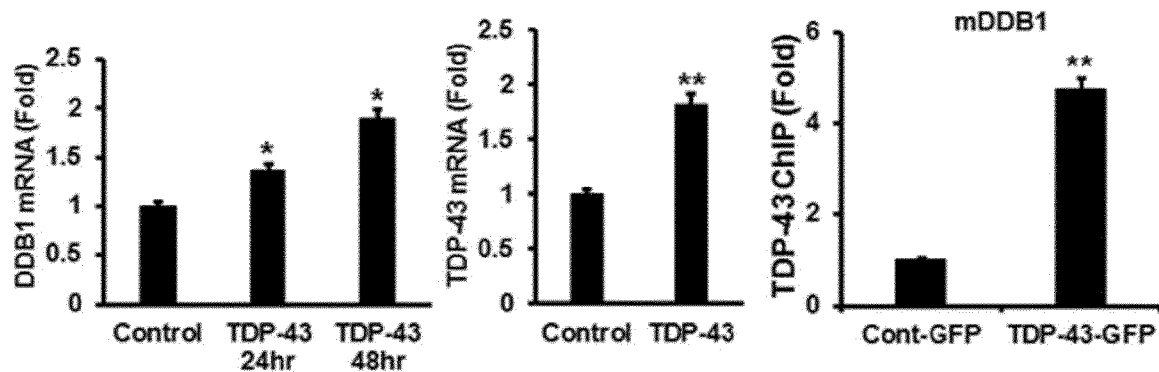
[도17]

-1000  
|  
GAGTCAAGTCGAGTGCCAGCTGGGGAGGTACAAATCATCTTCAGTTCACCTGGTTCAAACCTAGCTACACT  
GATCTCTGCCTCATTTGTAATAAGGGAGTTAGCTCTCCTCCTCCGGCATTCTGGAGATGCTTCAGGACTAGG  
CTTCTGCTGCTCCTCTTTGGGGTTGGGGACATGGAGGCTGTCTGATGAAGCCTGGGACCTGCATCTGCGGG  
GCTGATTGCACTAGTCACCTGGGTGTTTAGGCTCTCCTGTGAAATTCCTGCGTTGTATTTGAGCTTAGAATTT  
GTATCGCAGTAGAGGCACTAATAGTGCTATCAAGTAATTTAGTGGAGAGTCCTTTCGTTTCTGGAGAAATTAA  
AAGAGGTGAGCAAACACACCCCAAGGTGATGTGTGAGGCTGGGATGATTGTTCTAAAGTCAGTTGAGGGCAT  
TCGAGGGATCAGGAGGAGCTCGAAGAATTAAGCAAAGGAAAGCACGATTCTACTCTGGGATGTGCACAGAT  
GGTCACCTCTTATCCCCAGTCTAGTCTCCGCAGCCCTTCTGTTTTAAAAGAGGGAAAACCCCGAGGACGC  
CTGGAGCTATGGAGGAAGGAAGGAGGCAGAATCTGAGGAAGGGGCGCGGATCTGGGCTGGGAAGCCAGCA  
GGCGGCCACTTAGGGCGTAGCAGACCAAAGAGGAGGCCAGTTCTGCCTGCGTACCGGTACTCTCGCTCTCA  
TCCGGGTACTGCGACCTCTGCGGTTAGGAGAAGGCGGGACCTCAGGGGGCGGGGCCCTCGCTTGTTGGCC  
GCCTCGGGCTCCGTAAGTCTCCAAGAGGCCAGGTGAGGCCGTCCCGTGATCCTCTGCGCCTGGCCTCTCTG  
GCTGCAACGTGTCTCAGGGGCGGAGGCAGCAGCCACGGAGTTGGCTGCGTGAGGGTGGGGTTCTCAGTC  
TCTTCGCTCGCGCCGCTCTCTATCTGCTGCTAGGCGCCCCACGGGCCAACCCAAGGCCTCAATATG(Met)

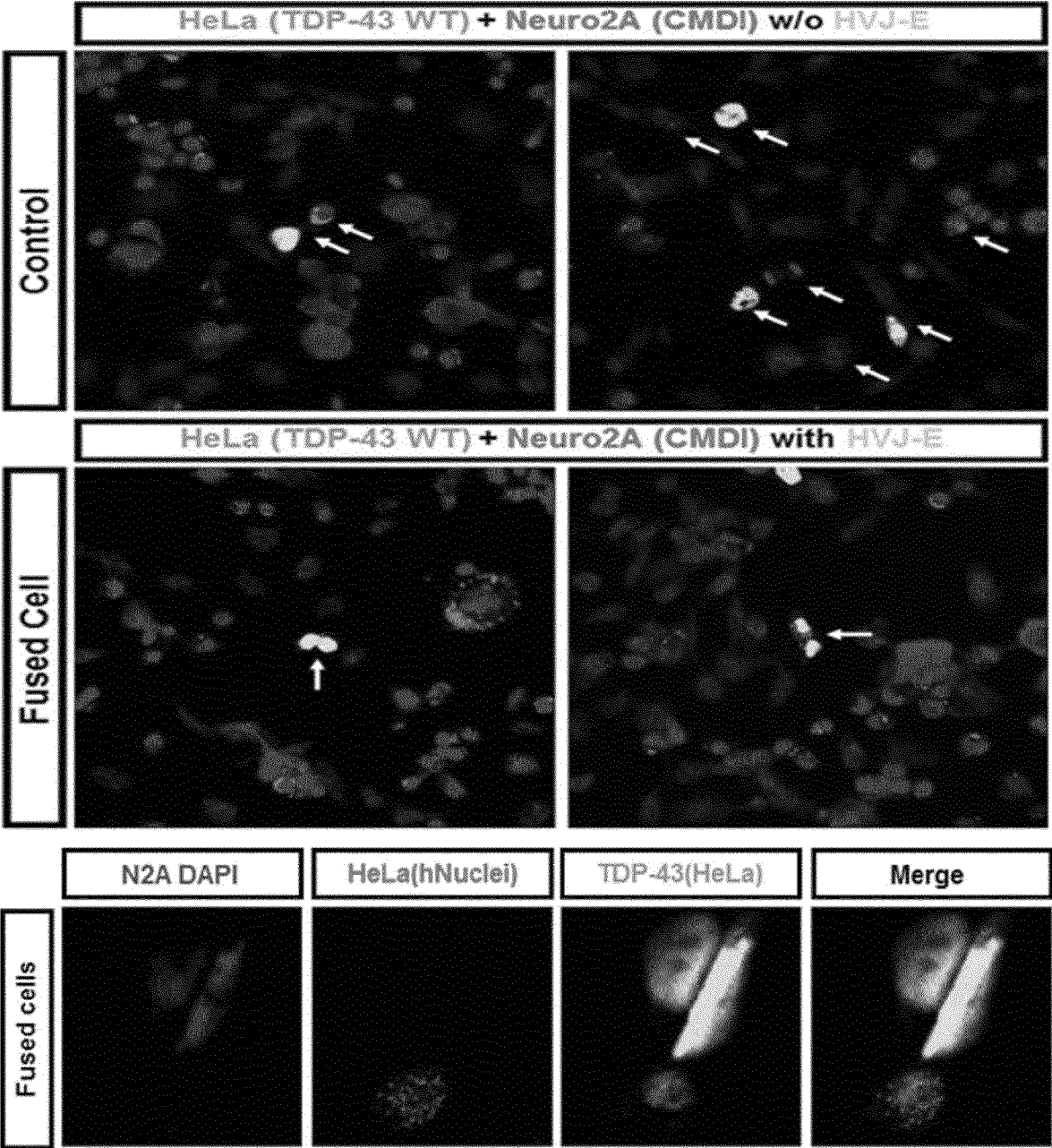
[도18]



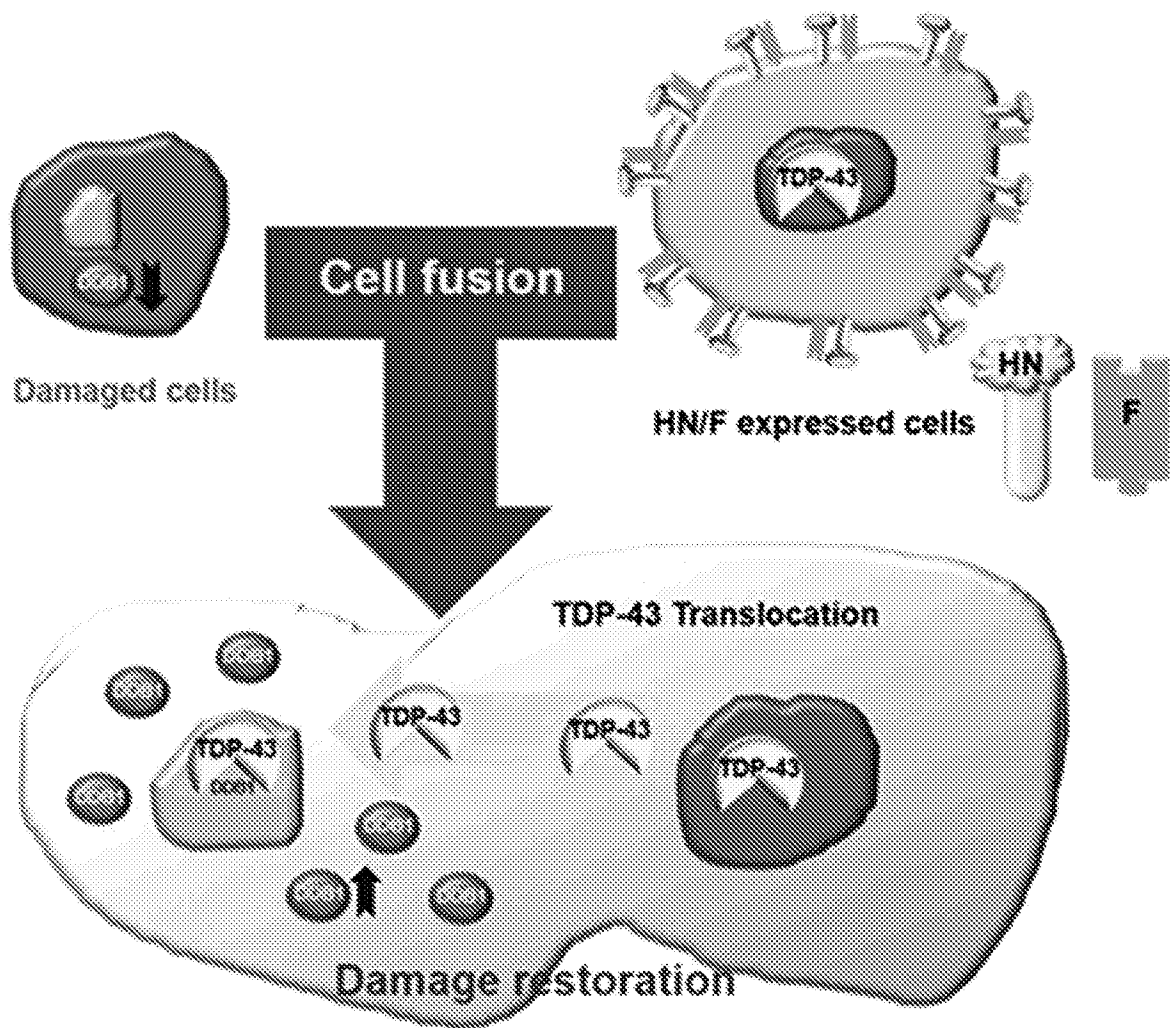
[도19]



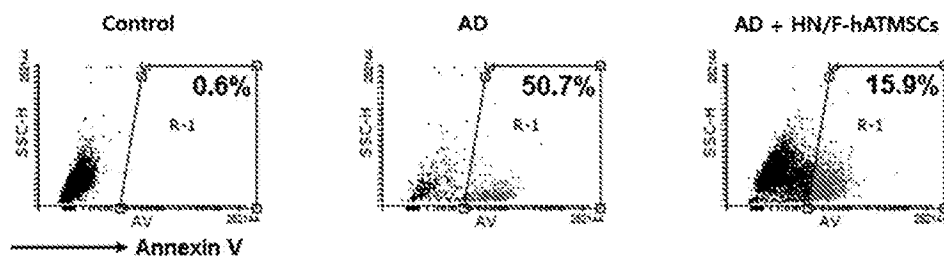
[도20]



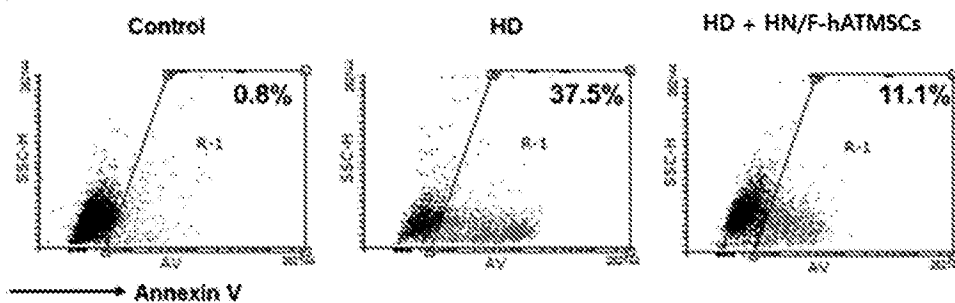
[도21]



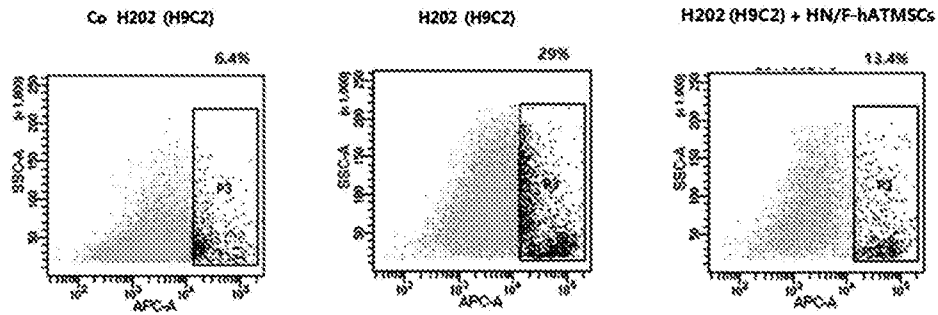
[도22]



[도23]



[도24]



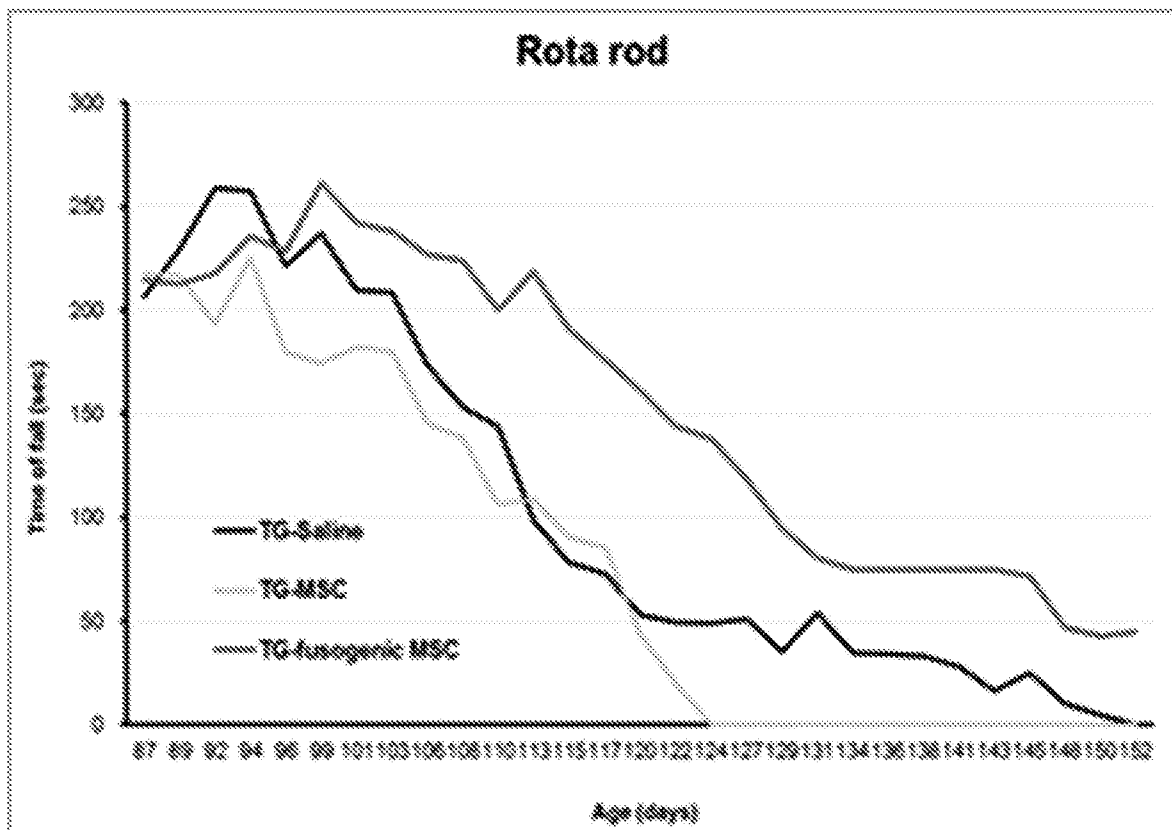
[도25]

- Intra-spinal cord injection

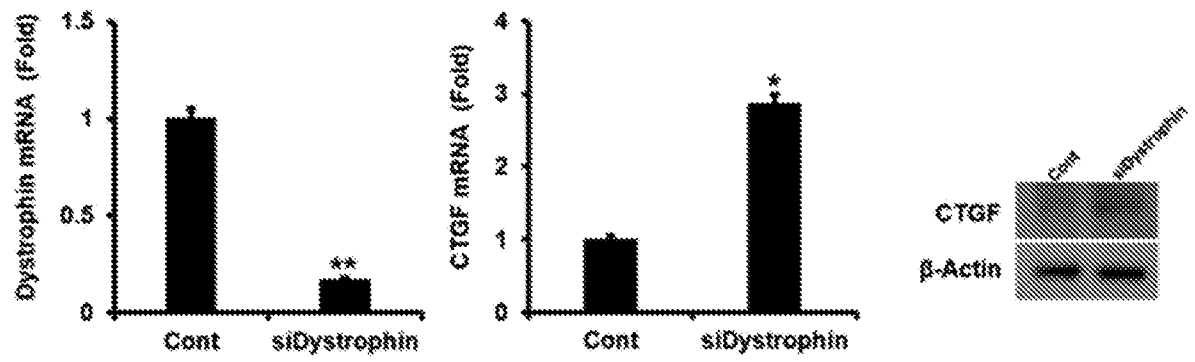


[도26]

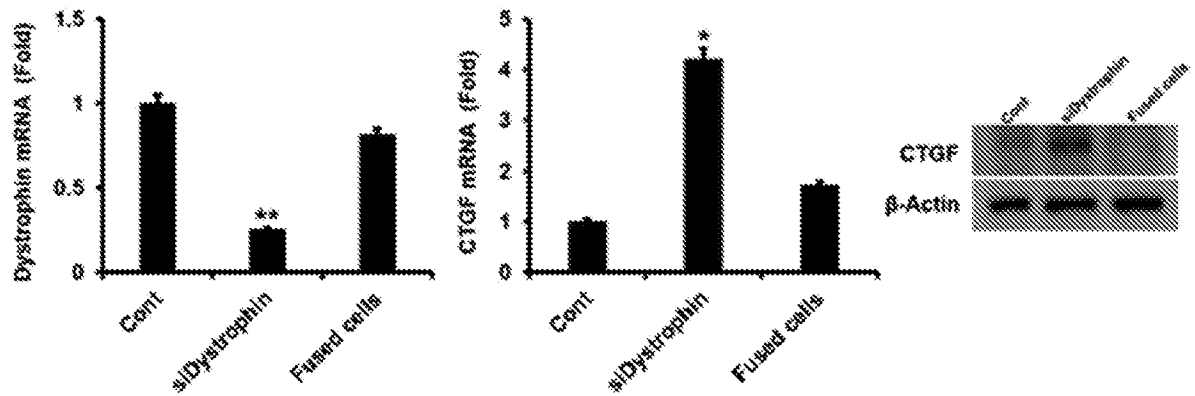
- SOD1 (G93A) Tg mice



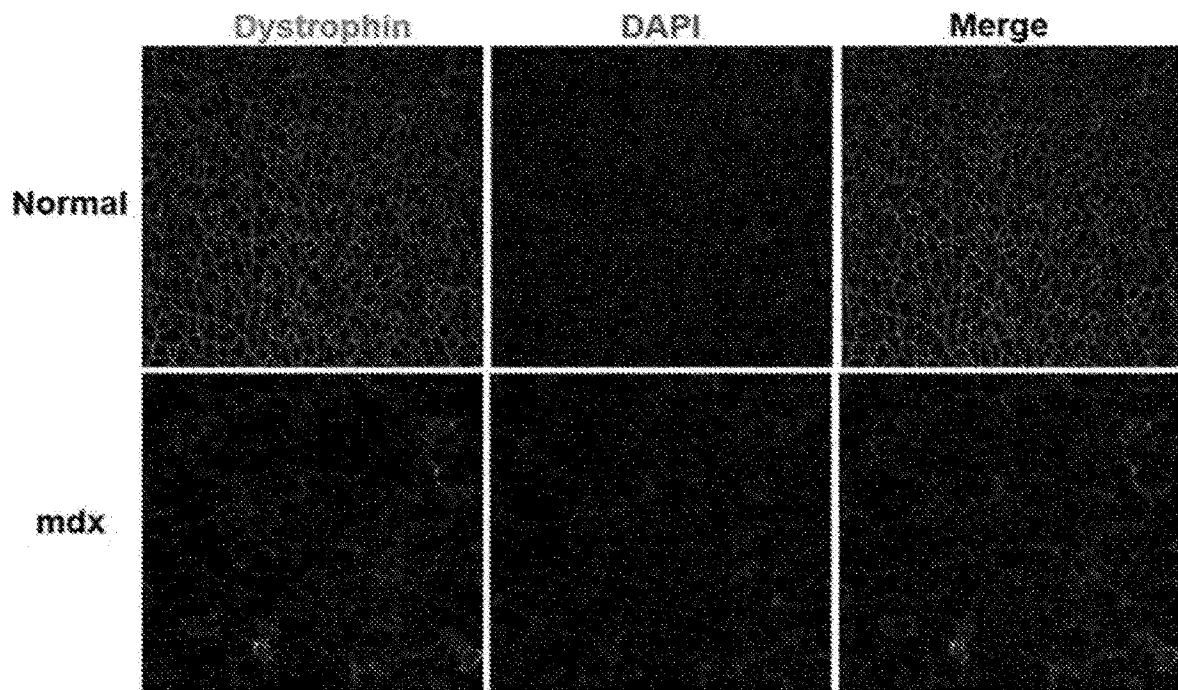
[도27]



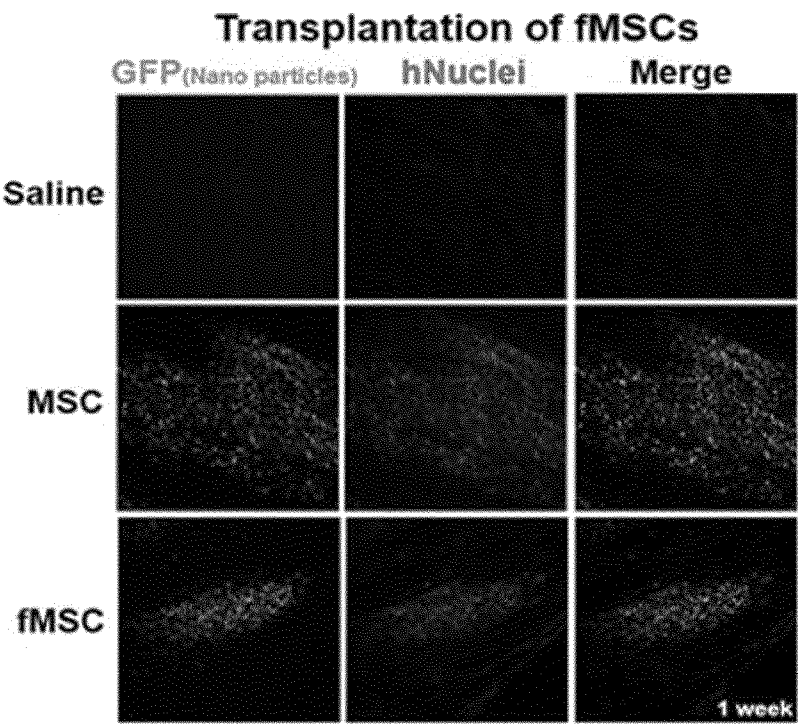
[도28]



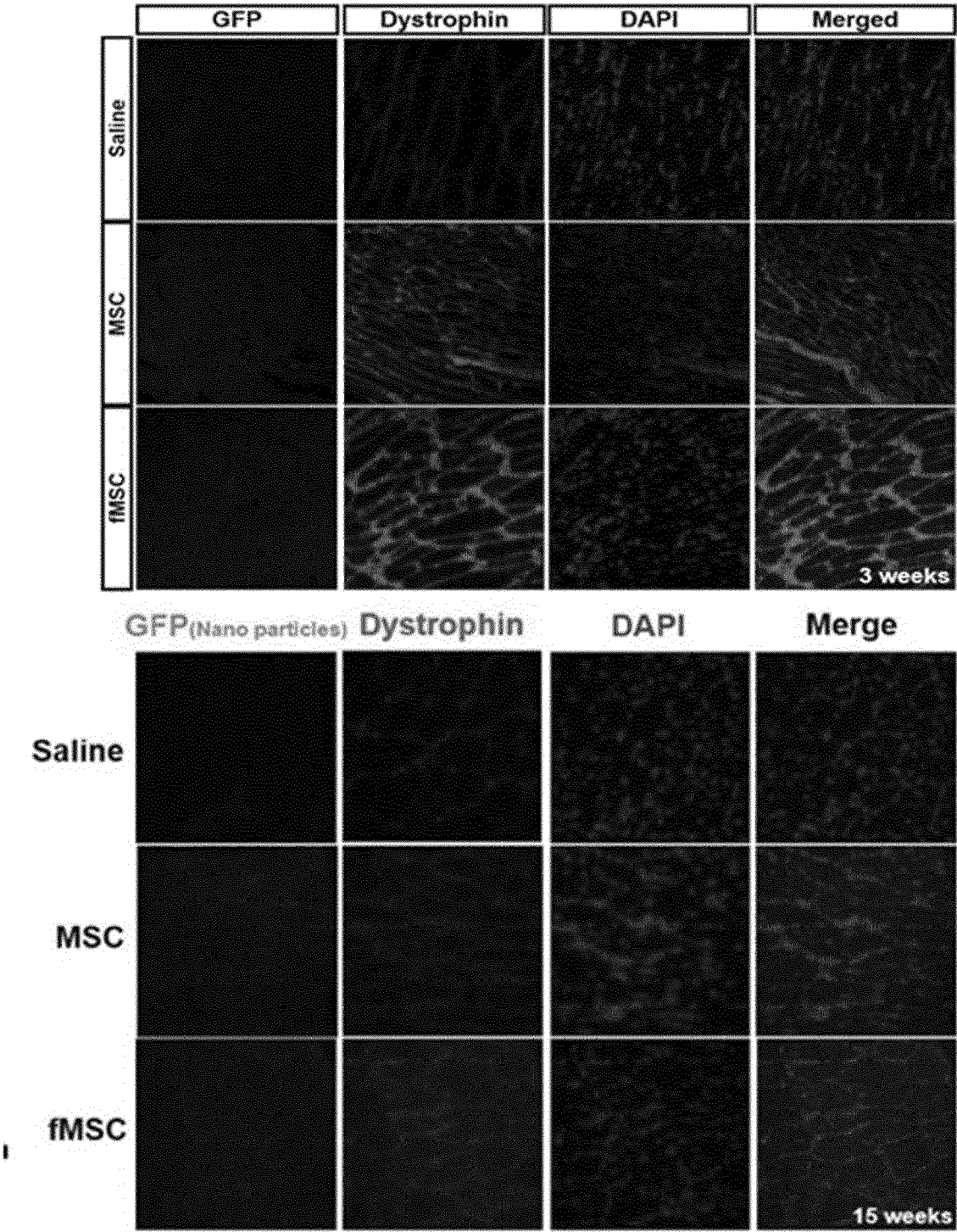
[도29]



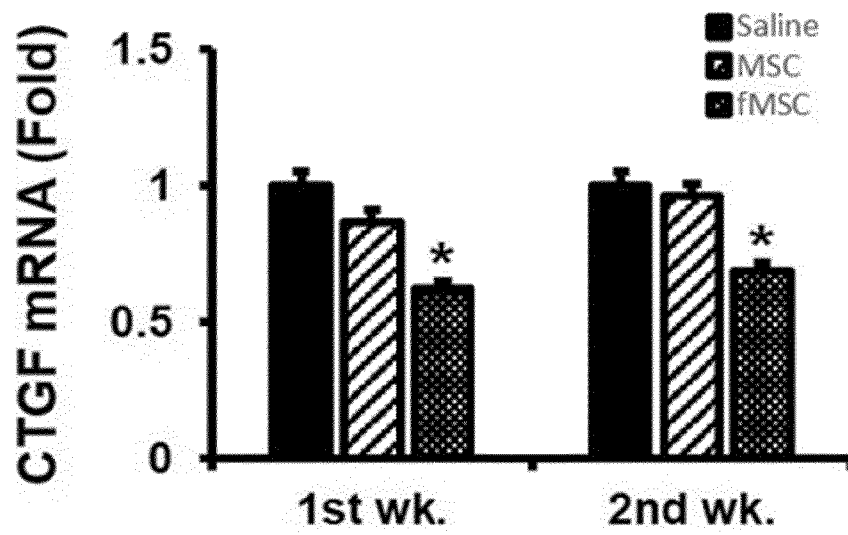
[도30]



[도31]



[도32]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/008081

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K 35/545(2014.01)i, A61K 35/28(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 21/00(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)

A61K 35/545; A61K 35/28; C07K 14/47; C12N 15/86; A61K 48/00; A61P 25/28; A61P 21/00

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) &amp; Keywords: hemagglutinin-neuraminidase, F protein(fusion protein), vector, neurodegenerative disease, muscle dystrophy

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | KR 10-2017-0009464 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL)<br>25 January 2017<br>See claims 1-5, 7; paragraphs [0016], [0018], [0028], [0031], [0033], [0034], [0042], [0062].                                                                                                                                                                                                             | 1-14,17,18            |
| X         | 서울대학교병원. 세포융합기술을 이용한 운동신경원질환 환자의 병리기전 연구 및 새로운 세포치료제 개발. 최종보고서. 보건의료기술연구개발사업. 20 September 2017, pages 1-165 (Seoul National University Hospital. Novel Cell Based Therapy and Pathophysiology Research for Motor Neuron Disease Using Cell Fusion Method. Final Report. Health Technology R&D Project.)<br>See II. Comprehensive Research Results, IV. Second Detailed Research Results. | 1-14,17,18            |
| X         | LEE, Hee-woo et al. G-75: Enhanced fusion ability of hemagglutinin neuraminidase/fusion-expressing human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with motor neurons. In: KSBMB International Conference 2015. 12-14 May 2015, COEX. KOREA<br>See abstract.                                                                                                                          | 1-14,17,18            |
| A         | TSURUDOME, M. et al. The hemagglutinin-neuraminidase (HN) head domain and the fusion (F) protein stalk domain of the parainfluenza viruses affect the specificity of the HN-F interaction. Frontiers in Microbiology. 13 March 2018, vol. 9, thesis no. 391, pages 1-16<br>See the entire document.                                                                                       | 1-14,17,18            |



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

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 OCTOBER 2019 (25.10.2019)

Date of mailing of the international search report

25 OCTOBER 2019 (25.10.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/KR2019/008081**

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                      |                       |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                   | Relevant to claim No. |
| A                                                     | WO 2015-177501 A1 (IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED et al.) 26 November 2015<br>See the entire document. | 1-14,17,18            |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/008081

## 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.: **15, 16**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 15 and 16 pertain to a method for treatment of the human body by 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/KR2019/008081**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| KR 10-2017-0009464 A                      | 25/01/2017          | KR 10-1753069 B1        | 04/07/2017          |
|                                           |                     | US 2018-0193487 A1      | 12/07/2018          |
|                                           |                     | WO 2017-014485 A1       | 26/01/2017          |
| WO 2015-177501 A1                         | 26/11/2015          | AU 2015-263150 A1       | 10/11/2016          |
|                                           |                     | CA 2947125 A1           | 26/11/2015          |
|                                           |                     | EA 201692361 A1         | 31/05/2017          |
|                                           |                     | EP 3145949 A1           | 29/03/2017          |
|                                           |                     | GB 2526339 A            | 25/11/2015          |
|                                           |                     | JP 2017-521049 A        | 03/08/2017          |
|                                           |                     | US 2017-0096684 A1      | 06/04/2017          |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

A61K 35/545(2014.01)i, A61K 35/28(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 21/00(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/545; A61K 35/28; C07K 14/47; C12N 15/86; A61K 48/00; A61P 25/28; A61P 21/00

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: 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin neuraminidase), F 단백질(fusion protein), 벡터(vector), 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease), 근육퇴행위축(muscular dystrophy)

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                                                            | 관련 청구항       |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| X     | KR 10-2017-0009464 A (서울대학교병원) 2017.01.25<br>청구항 1-5, 7; 단락 [0016], [0018], [0028], [0031], [0033], [0034], [0042], [0062] 참조.                                                                                                                                        | 1-14, 17, 18 |
| X     | 서울대학교병원, '세포융합기술을 이용한 운동신경원질환 환자의 병리기전 연구 및 새로운 세포치료제 개발', 최종보고서, 보건 의료기술연구개발사업, 2017.09.20, 1-165 페이지<br>II. 총괄연구과제 연구결과, IV. 제2세부연구과제 연구결과 참조.                                                                                                                      | 1-14, 17, 18 |
| X     | LEE, HEE-WOO 등, G-75: 'Enhanced fusion ability of hemagglutinin neuraminidase/fusion-expressing human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with motor neurons', In: KSBMB International Conference 2015, 2015.05.12-14, COEX, KOREA<br>초록 참조.                | 1-14, 17, 18 |
| A     | TSURUDOME, M. 등, 'The hemagglutinin-neuraminidase (HN) head domain and the fusion (f) protein stalk domain of the parainfluenza viruses affect the specificity of the HN-F interaction', Frontiers in Microbiology, 2018.03.13, 제9권, 논문 번호 391, 1-16 페이지<br>전체 문헌 참조. | 1-14, 17, 18 |

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X"에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 10월 25일 (25.10.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 10월 25일 (25.10.2019)

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



| C (계속). 관련 문헌 |                                                                            |              |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 카테고리*         | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                 | 관련 청구항       |
| A             | WO 2015-177501 A1 (IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED 등) 2015.11.26<br>전체 문헌 참조. | 1-14, 17, 18 |

## 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: 15, 16  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 15 및 16은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 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<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌             | 공개일        |
|-----------------------|------------|--------------------|------------|
| KR 10-2017-0009464 A  | 2017/01/25 | KR 10-1753069 B1   | 2017/07/04 |
|                       |            | US 2018-0193487 A1 | 2018/07/12 |
|                       |            | WO 2017-014485 A1  | 2017/01/26 |
| WO 2015-177501 A1     | 2015/11/26 | AU 2015-263150 A1  | 2016/11/10 |
|                       |            | CA 2947125 A1      | 2015/11/26 |
|                       |            | EA 201692361 A1    | 2017/05/31 |
|                       |            | EP 3145949 A1      | 2017/03/29 |
|                       |            | GB 2526339 A       | 2015/11/25 |
|                       |            | JP 2017-521049 A   | 2017/08/03 |
|                       |            | US 2017-0096684 A1 | 2017/04/06 |