



(51) 국제특허분류:

A61K 35/30 (2006.01) C12N 5/0797 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/861 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/000504

(22) 국제출원일: 2017년 1월 13일 (13.01.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0004877 2016년 1월 14일 (14.01.2016) KR

(71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HAN-YANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 04763 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이상훈 (LEE, Sang-Hun); 05118 서울시 광진구 광나루로 56길 32, 205동 402호 (구의동, 현대아파트), Seoul (KR). 이용희 (RHEE, Yong Hee); 04753 서울시 성동구 마장로 35길 76, 102동 2704호 (마장동, 현대아파트), Seoul (KR). 박장환 (PARK, Chang-Hwan); 04746 서울시 성동구 고산자로 164, 116동 603호 (행당동, 행당한신아파트), Seoul (KR). 장미윤 (CHANG, Mi-Yoon); 13626 경기도 성남시 분당구 미금로 22번길 10, 1209동 1304호 (구미동, 무지개마을주공 12단지아

파트), Gyeonggi-do (KR). 야누아르알란술리스트티오 (YANUAR, Alan Sulistio); 04762 서울시 성동구 사근동 2길 7-82 (사근동), Seoul (KR). 고지윤 (KO, Ji Yun); 10307 경기도 고양시 일산동구 숲속마을 1로 55, 207동 206호 (풍동, 숲속마을 2단지아파트), Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

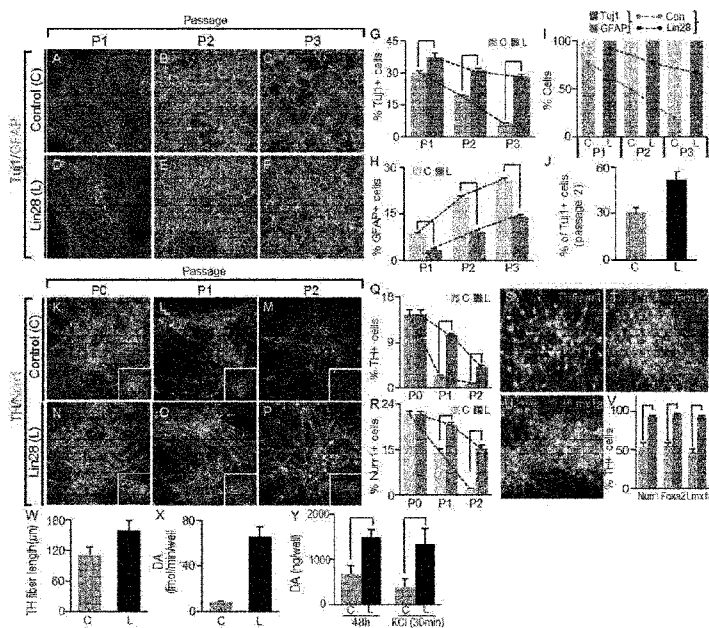
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD USING EXPRESSION OF LIN28 FOR PREPARING STEM CELL HAVING EXCELLENT RENEWAL ABILITY AND DIFFERENTIATION POTENCY

(54) 발명의 명칭 : LIN28의 발현을 이용한 재생능 및 분화능이 우수한 줄기세포의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a cell therapeutic agent comprising a stem cell expressing Lin28, a pharmaceutical composition comprising a neural stem cell expressing Lin28 for the prevention or treatment of a neurological disorder, and a method for treating a neurological disorder using the composition. A stem cell superior in terms of differentiation potency to various tissue cells and renewal ability can be prepared by introducing Lin28, which regulates an embryonic development procedure, or a vector expressing Lin28 during stem cell culturing, and by culturing the cell.

(57) 요약서: 본 발명은 Lin28을 발현하는 줄기세포를 포함하는 세포치료제, Lin28을 발현하는 신경줄기세포를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 신경계 질환의 치료 방법에 관한 것으로, 줄기세포 배양 시 발생발달과정을 조절하는 Lin28 또는 이를 발현하는 벡터를 도입하여 배양함으로써, 각종 조직세포로의 분화능 및 재생능이 우수한 줄기세포를 제조할 수 있다.



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

명세서

발명의 명칭: LIN28의 발현을 이용한 재생능 및 분화능이 우수한 줄기세포의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 Lin28을 도입시킨 줄기세포를 계대배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 재생능과 분화능의 손실을 차단한 줄기세포의 제조방법과 Lin28을 발현하는 줄기세포를 포함하는 세포치료제, Lin28을 발현하는 신경줄기세포를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 신경줄기세포란 주로 신경계에 존재하는 미성숙(immature) 세포로서 미분화(undifferentiated) 된 상태로 계속 증식하는 자가 재생산(self-renewal)을 보이고, 신경세포(neuron) 및 신경교세포(glia)로 분화하는 분화의 다능성(multipotency)을 보이는 세포로 정의된다. 신경줄기세포는 인간을 포함한 포유동물의 태아 신경계 전반에 걸쳐 다양한 해부학적 부위에서 존재하고, 최근에는 태아뿐만 아니라 성체 신경계의 특정 부위에서도 신경줄기세포가 존재하며, 일생을 통하여 신경줄기세포는 뇌의 특정 부위에서 계속 증식하면서 새로운 신경세포를 생성한다. 이외에도 신경줄기세포는 보다 미성숙한 세포인 배아줄기세포에서 분화될 수도 있고, 신경계가 아닌 몸의 다른 부위 즉, 골수, 피부, 양막(amniotic membrane), 제대혈(umbilical cord blood) 세포 등에서도 분화될 수 있다고 보고되고 있으나 이러한 조직에서 나오는 신경줄기세포 및 신경세포는 극히 드물며 진정한 기능성 신경세포로 분화되는지는 아직 확실하지 않다. 그러나 신경계에 존재하는 신경줄기세포는 확실히 기능성 신경세포로 분화하므로 최근에 이러한 신경줄기세포를 이용한 줄기세포의 증식과 분화기전 및 신경계 발달에 관한 기초연구뿐만 아니라, 한번 손상되면 재생되지 않는다고 알려져 있는 선천성 및 후천성 난치성 신경계질환에서 신경줄기세포의 생물학적 특성을 이용하여 새로운 세포 및 유전자 치료의 가능성에 대한 관심이 증대하고 있다.
- [3] 알츠하이머 질환을 비롯한 난치성 신경계 질환은 신경세포가 퇴화하여 사멸하는 질병으로 대부분의 난치성 신경계 질환은 현재까지 근본적인 치료제가 없다. 따라서, 난치성 신경계 질환의 근본적 치료는 질병의 원인을 제거하여 환자의 기능을 정상적으로 회복시키거나, 초기에 진단하고 치료하여 더 이상의 진행을 억제하는 것을 들 수 있다. 다른 치료 방법으로는 손상된 신경세포의 기능을 일부라도 회복시킬 수 있는 것으로, 근본적 치료제가 부재한 상황에서 신경줄기세포를 이용한 세포치료는 다양한 난치성 신경계 질환 치료에 대안을 제시할 수 있다.

- [4] 한편, Lin28은 줄기세포의 자기재생(self-renewal)과 전분화능(pluripotency) 그리고 분화(differentiation)와 발달과정(development)을 조절하는 중요한 요소이다. 또한, 강력한 let-7 마이크로 알엔에이(micro RNA, miRNA)의 조절자로서, Lin28 단백질이 높게 발현하고 있는 배아줄기세포에서는 let-7 miRNA가 거의 발현하지 않고, 분화된 후 Lin28의 발현이 감소되면 let-7 miRNA의 발현이 증가한다고 알려져 있다. 또한, 종래에는 Lin28이 배아줄기세포 전사인자뿐만 아니라, 리프로그래밍 유도 인자로 이용되어 왔다.
- [5] 후술되는 참고문헌 1 및 2에서는 Lin28이 신경전구세포(NSC)의 증식, 신경생성 또는 뇌의 발달을 향상시키는 효과가 있음을 개시하고 있으나, 이는 개체 내에 존재하는 Lin28의 발현을 조절하여 신경전구세포의 수적 증식을 유도하고, 신경생성 및 뇌 발달 향상 효과를 보인 것으로, 본 발명에서 제시하는 Lin28 유전자의 도입이 도파민성 신경세포에 미치는 영향과 Lin28 유전자를 도입한 줄기세포의 줄기세포성 유지, 분화능 향상, 세포사멸 인자의 억제에 의한 생존력 등의 효과는 개시하고 있지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 Lin28을 발현하는 줄기세포의 세포치료제로서의 용도 및 신경계 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Lin28을 발현하는 줄기세포를 포함하는 세포치료제를 제공한다.
- [8] 본 발명은 또한, Lin28을 도입시킨 줄기세포를 계대배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 재생능 및 분화능의 손실을 차단한 줄기세포의 제조방법을 제공한다.
- [9] 본 발명은 또한, Lin28을 발현하는 신경줄기세포를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료에서의 사용을 위한 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [10] 본 발명은 줄기세포 배양 시 발생발달과정을 조절하는 Lin28 또는 이를 발현하는 벡터를 도입하여 배양함으로써, 줄기세포 증식 계대배양시 발생하는 재생능 및 분화능의 손실을 차단하여 세포 이식 치료시 보다 치료 효과가 우수한 줄기세포를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 신경줄기세포에서 내재성 Lin28의 발현이 감소함에 따라 도파민성 신경세포로의 분화능이 감소함을 Real-time PCR로 분석하여 신경세포의 분화능과 Lin28의 상관관계를 나타낸 결과이다.
- [12] 도 2는 Lin28 발현 벡터를 도입하여 배양된 세포를 수거하여 각종 유전자의 변화 양상을 Real-time PCR 과 면역형광염색법을 통하여 관찰한 결과를 나타낸

것이다.

- [13] 도 3은 Lin28이 과발현된 신경줄기세포가 대조군에 비하여 신경세포로의 분화능이 더 우수함을 관찰한 결과이다.
- [14] 도 4는 Lin28 발현 유도된 신경줄기세포 유래 도파민성 신경세포의 세포사멸 억제 및 독성에 의한 세포사멸 억제 효과를 면역형광염색법과 유속세포분석기법(Flow cytometry)을 통해 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [15] 도 5는 파킨슨 모델 실험 동물에 Lin28 발현 유도된 신경줄기세포를 이식한 후 2개월 간 동물 행동 변화를 나타낸 결과이다.
- [16] 도 6은 RNA 레플리콘을 이용하여 신경줄기세포에 Lin28을 도입시킨 후 신경줄기세포의 신경세포로의 분화능을 면역형광염색법으로 관찰한 결과이다.
- [17] 도 7은 인간 배아줄기세포 유래 신경줄기세포의 5 계대에 렌티바이러스 벡터를 이용하여 Lin28을 도입시킨 후 계대배양하여 6 계대 내지 8 계대에서의 세포 증식 효과를 관찰한 결과이다.
- [18] 도 8은 인간 장골로부터 분리한 중간엽 줄기세포에 RNA 레플리콘을 이용하여 Lin28을 도입시킨 후 중간엽 줄기세포의 골 분화능을 ALP 및 Alizarin-red로 염색하여 확인한 결과와, real-time PCR을 통해 골 분화 인자의 발현 정도를 확인한 결과이다.
- [19] 도 9는 인간 장골로부터 분리한 중간엽 줄기세포의 2 계대에서 렌티바이러스 벡터를 이용하여 Lin28을 도입시킨 후 중간엽 줄기세포의 줄기세포성 인자와 분화 유전자의 발현 정도를 real-time PCR을 통해 확인한 결과이다.
- [20] 도 10은 인간 장골로부터 분리한 중간엽 줄기세포의 2 계대에서 렌티바이러스 벡터를 이용하여 Lin28을 도입시킨 후 중간엽 줄기세포의 줄기세포성 유지 관련 인자, 세포사멸 인자의 발현 정도와, 1 계대와 4 계대에서의 중간엽 줄기세포의 골 분화 후 골 분화 인자의 발현 정도를 real-time PCR을 통해 확인한 결과이다.
- [21] 도 11 내지 도 13은 각각 인간 장골로부터 분리한 중간엽 줄기세포의 2 계대, 3 계대, 4 계대에서 골 분화 14일 후에 Lin28의 발현이 유도된 중간엽 줄기세포의 골 분화능을 ALP, Alizarin-red 및 Safranin-O로 염색하여 관찰하고, 골 분화 인자 및 연골 분화 인자의 발현 정도를 real-time PCR을 통해 확인한 결과이다.
- [22] 도 14는 마우스로부터 분리한 근육 줄기세포성 전구세포에 렌티바이러스 벡터를 이용하여 Lin28을 도입시킨 후 Lin28 도입 후 2 계대 및 4 계대에서의 근육세포성 인자의 발현 정도(b)와 근육 줄기세포성 전구세포의 수를 확인한 결과이다(c).
- [23] 도 15는 마우스로부터 분리한 상피 전구세포에 렌티바이러스 벡터를 이용하여 Lin28을 도입시킨 후 Lin28이 도입된 후 3, 5, 7 계대에서의 상피 전구세포의 수와 세포사멸 인자(a), 상피 전구세포 분화 인자의 발현 정도를 확인한 결과이다(b).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 본 발명은 Lin28을 발현하는 줄기세포를 포함하는 세포치료제를 제공한다.

- [25] Lin28은 줄기세포의 자기재생(self-renewal)과 전분화능(pluripotency) 그리고 분화(differentiation)와 발달 과정(development)을 조절하는 중요한 요소이다. 또한, 강력한 let-7 마이크로 알엔에이(micro RNA, miRNA)의 조절자(regulator)로써, Lin28 단백질이 높게 발현하고 있는 배아줄기세포(embryonic stem cell)에서는 let-7 miRNA가 거의 발현하지 않고, 분화(differentiation)되면서 Lin28의 발현이 감소되면 let-7 miRNA의 발현이 증가한다고 알려져 있다. 이러한 Lin28과 let-7 miRNA의 발현 변화는 배아줄기세포뿐만 아니라 대부분의 세포 및 조직에서도 동일하다. 또한, 종래에는 Lin28이 배아줄기세포 전사인자뿐만 아니라 리프로그래밍 유도 인자로 이용되어 왔으나, 본 발명자들은 줄기세포 배양 시 분화능 및 재생능이 우수한 줄기세포의 제조를 위해 Lin28 또는 Lin28을 발현하는 벡터를 도입할 수 있음을 밝혔다.
- [26] 구체적으로, 하기 실시예에서, 본 발명자들은 신경줄기세포(neural stem cell)를 분리하고 배양하는 동안 계대가 진행됨에 따라 도파민성 신경세포(dopaminergic neuron)로의 분화능, 발생발달을 조절하는 Lin28 유전자, 및 세포신호 하위 물질인 Hmga2가 현저히 감소하는 것을 관찰하였다(도 1). 이에, 신경줄기세포에 Lin28을 발현하는 벡터를 도입하여 Lin28을 발현하는 신경줄기세포를 제조하였다(도 2). 신경줄기세포 배양시 발생발달을 조절하는 Lin28 유전자가 신경줄기세포의 분화에 영향을 줄 수 있으므로 배양 초기 Lin28의 발현을 유도하는 독시사이클린(doxycycline)을 첨가하여 증식기 기간에만 Lin28 발현을 유도하여 계대 배양한 결과, Lin28 발현 벡터가 도입되는 것만으로도 신경세포로의 분화능 손실이 차단됨을 확인하였다. 또한, Lin28의 발현 유도로 유지된 도파민성 신경세포는 형태적으로나 기능적으로 성숙한 것을 관찰하였다(도 3).
- [27] 신경줄기세포의 배양 시 계대가 진행됨에 따라 세포사멸(apoptotic cell death)이 증가하는데 이는 줄기세포 이식 치료 시 재생능의 감소를 유발한다. Lin28의 발현이 유도되지 않은 신경줄기세포 유래 도파민성 신경세포는 대다수가 H_2O_2 독소에 의해 파괴되는 반면, Lin28의 발현이 유도된 신경줄기세포 유래 도파민성 신경세포에서는 H_2O_2 독소로부터의 보호 효과를 나타내었다(도 4).
- [28] 마지막으로, 파킨슨 모델 래트에 Lin28을 발현하는 신경줄기세포의 재생능을 실험한 결과, 파킨슨 병에 대해 뛰어난 치료 효과를 보이고, Lin28 발현이 유도된 신경줄기세포를 이식받은 군에서 더 많은 양의 도파민성 신경세포의 생존을 확인하였다(도 5).
- [29] 따라서, 본 발명은 이러한 결과를 바탕으로 Lin28을 발현하는 줄기세포를 포함하는 세포치료제, Lin28을 도입시킨 줄기세포를 계대배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 재생능 및 분화능의 손실을 차단한 줄기세포의 제조방법, Lin28을 발현하는 신경줄기세포를 포함하는 신경계 질환의 치료용 약학 조성물, 상기 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 신경계 질환의 치료 방법,

줄기세포 증식 계대배양시 재생능 및 분화능의 손실이 차단된 줄기세포의 제조를 위한 Lin28의 신규 용도를 제공한다.

- [30] 상기 Lin28은 쥐와 인간과 같은 포유류에서는 Lin28 homolog A(Lin28a), B(Lin28b) 두 가지 형태로 존재한다. 본 발명에 있어서, 상기 Lin28은 Lin28a의 공지된 서열을 가지는 것이다. 본 발명에 있어서, 인간의 Lin28a의 핵산 서열은 서열번호 1에 따르며, 래트의 Lin28a의 핵산 서열은 서열번호 2에 따른다.
- [31] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포 또는 성체줄기세포를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 상기 성체줄기세포는 신경줄기세포 또는 중간엽 줄기세포일 수 있다. 다른 한 구체예에서, 줄기세포는 위에서 나열한 줄기세포 외에 자극에 따라 분화가 가능한 전구세포까지도 범위로 포함할 수 있으며, 예컨대 근육 줄기세포성 전구세포, 상피 전구세포를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [32] 신경줄기세포(neural stem cell, NSC)는 자기 재생산(self-renewal)이 가능하고, 신경계통 세포로의 분화능을 가진 세포이다. 신경줄기세포는 신경세포(neuron), 성상교세포(astrocyte), 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)로 분화된다고 보고되고 있다. 또한, 중간엽 줄기세포는 지방, 골세포, 연골 세포와 같은 세포로 분화할 수 있는 세포이다.
- [33] 본 발명에서, 신경줄기세포는 중뇌 또는 골수 등에서 분리할 수 있고, 자가유래 또는 동종이계 신경줄기세포를 이용할 수 있다. 예를 들어, 환자 자신으로부터 채취하거나, 혈액 은행의 데이터베이스를 이용하여 조직적합항원(human leukocyte antigen, HLA) 타입이 일치되는 골수로부터 분리하여 사용함으로써 개체간의 면역거부반응을 최소화시킬 수 있다. 또한, 신경줄기세포와 마찬가지로 중간엽 줄기세포는 자가유래 또는 동종이계 중간엽 줄기세포를 이용할 수 있으며, 골수, 조직, 배아, 제대혈, 혈액 또는 체액으로부터 얻을 수 있다. 중간엽 줄기세포 공급원으로부터 중간엽 줄기세포를 수득하는 방법 또한 당업계에 공지된 방법을 사용하여 중간엽 줄기세포를 수득할 수 있다.
- [34] 따라서, 본 발명은 발생발달과정을 조절하는 Lin28을 유전자 형태로 줄기세포에 도입하여 배양 시 발현시킴으로써, 줄기세포 증식 계대배양 시 발생하는 각종 조직세포로의 분화능 및 재생능의 손실을 차단하여 질환의 치료를 위한 줄기세포 이식 시 보다 우수한 치료 효과를 제공할 수 있다.
- [35] 본 발명에서 Lin28을 발현하는 줄기세포의 배양 시 Lin28 유전자의 도입 시점은 정해진 것은 아니며 Lin28을 발현하는 줄기세포는, 예를 들어 분리한 줄기세포에 Lin28 유전자를 도입한 후 시험관 내에서 적절한 조건으로 증식 및 분화시켜 얻거나, 줄기세포를 충분히 증식시킨 다음 여기에 Lin28 유전자를 도입하여 얻을 수 있다.
- [36] 본 발명에 있어서, 상기 Lin28을 발현하는 줄기세포는 Lin28을 발현하는 벡터가 도입된 줄기세포일 수 있다.
- [37] 본 발명에 있어서, 상기 “벡터”는 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 내로

삽입된 외부 DNA를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 상기 벡터는 Lin28의 핵산 서열이 게놈 내로 삽입된 벡터로서, 이들 벡터는 예를 들어, DNA 벡터, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터, 효모 벡터, 바이러스 벡터, 또는 RNA 레플리콘일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [38] 예컨대, 상기 벡터는 바이러스, 플라스미드 벡터 또는 RNA 레플리콘일 수 있다. 상기 바이러스 벡터의 예로, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, SV 40, 폴리오마 바이러스, 파필로마 바이러스, 피카르노바이러스, 벡시니아 바이러스 또는 헬퍼 의존성 아데노바이러스 등이 Lin28을 발현하는 매개체로 사용될 수 있다. 상기 바이러스들은 재조합 바이러스일 수 있다.
- [39] 본 발명에서, '레플리콘'은 하나의 복제 기점으로부터 복제되는 DNA 또는 RNA 영역을 말한다.
- [40] 본 발명의 실시예에서는 Lin28을 발현하는 바이러스 벡터로 렌티바이러스 벡터를 줄기세포에 도입하여 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [41] 본 발명의 다른 실시예에서는 Lin28을 발현하는 RNA 레플리콘을 줄기세포에 도입하여 사용하였다. RNA 레플리콘을 이용하여 세포에 Lin28을 도입하게 되면, 도입 후 약 2주 이내에 Lin28 유전자는 자동 소멸되므로, Lin28의 발현을 조절하는 단계를 필요로 하지 않는다는 점에서 바람직할 수 있다.
- [42] 본 발명의 한 구체예에서, Lin28 발현 벡터는 아데노바이러스일 수 있다. 상기 아데노바이러스는 생체 내의 도입 후 약 8일 정도면 사라지게 되어 추가적으로 Lin28 유전자의 발현을 조절하는 단계를 필요로 하지 않는다는 점에서 바람직할 수 있다.
- [43] 본 발명에 있어서, 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현 벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [44] 한 구체예에서, 상기 바이러스 또는 플라스미드 벡터를 통해 Lin28 유전자를 발현시킬 경우, Lin28 유전자의 발현을 조절시킬 수 있는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [45] 상기 벡터에 도입되는 Lin28 유전자는 Lin28 단백질 또는 이들과 기능적으로 동등한 특성을 갖는 유사체를 코딩하는 핵산 서열일 수 있다. 상기 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 본 명세서에서 기능적으로 동등한 특성을 갖는 유사체란 상기 Lin28과 기능적으로 동등한 특성을 갖는 것으로, 구체적으로, 펩타이드 중의 일부의 아미노산 잔기를 치환, 결실 또는 부가한 펩타이드를 의미한다.
- [46] 한편, Lin28의 발현이 계속해서 유도되면 각종 조직세포로의 분화를 방해하여 분화능을 감소시키고, oncogene의 발생 위험이 있어 Lin28 유전자의 발현을

조절할 수 있는 단계가 필요할 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, Lin28 발현 벡터로써 아테노바이러스의 경우 생체 내의 도입 후 약 8일 정도면 사라지게 되고, RNA 레플리콘을 이용하는 경우 유전자 도입 후 약 2주 이내 유전자는 자동 소멸되어 추가적으로 Lin28 유전자의 발현을 조절하는 단계를 필요로 하지 않는다는 점에서 바람직할 수 있다.

[47] 한 구체예에서, 상기 Lin28의 발현은 특정 물질의 처리에 의해 on-off 될 수 있고, 상기 특정 물질은 on-off 시킬 수 있는 것이라면 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 예를 들어, 독시사이클린(doxycycline)에 의해 렌티바이러스에 도입된 Lin28의 발현을 조절할 수 있다.

[48] 또한, 본 발명에서 Lin28을 발현하는 벡터를 줄기세포에 도입하는 방법은, 공지된 형질도입(transduction) 또는 형질전환(transfection) 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어 원심분리법, 미세주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[49] 본 발명의 조성물은 신경계 질환, 근육계 질환, 뼈 질환 또는 상피 관련 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낸다. 본 발명의 신경계 질환은 퇴행성 신경계 질환을 포함할 수 있으며, 예를 들어 파킨슨씨 질환, 치매, 알츠하이머 질환, 헌팅턴 질환, 근위축성 측색 경화증, 기억력 저하, 중증근무력증, 진행성 핵상마비, 다계통 위축증, 본태성 진전증, 피질-기저핵 퇴행증, 미만성 루이소체 질환 및 픽병을 포함하는 다양한 신경계 질환이 포함된다. 상기 근육계 질환은 근위축증, 뇌성마비, 진행성골화성섬유이형성증, 피부근염, 구획증후군, 중증근무력증, 루게릭병, 미토콘드리아 근병증, 횡문근융해증, 다발성근염, 섬유근통, 근긴장증 및 근막동통증후군과 같은 근육계 질환이 포함된다. 상기 뼈 질환은 골연화증, 골다공증 및 구루병과 같은 뼈 질환이 포함되며, 상피 관련 질환은 난치성 각막 질환 등과 같은 질환이 포함된다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기 질환 외에도 줄기세포의 이식을 통해 치료가 가능한 질환이라면 모두 적용될 수 있다.

[50] 따라서, 본 발명은 Lin28을 발현하는 줄기세포를 포함하는 세포치료제, Lin28을 발현하는 신경줄기세포를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료에서의 사용을 위한 약학 조성물 및 이를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 신경계 질환의 치료 방법을 제공한다.

[51] 본 발명에서 “치료”란 질환과 관련된 임상적 상황을 억제하거나 완화하거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 또한 치료는 치료를 받지 않은 경우 예상되는 생존율과 비교하여 증가된 생존을 의미할 수 있다. 치료는 치료적 수단 이외에 예방적 수단을 동시에 포함한다.

[52] 본 명세서에 있어서, “대상체”는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 예를 들어, 개, 고양이, 생쥐, 인간 등일 수 있다.

[53] 본 발명의 조성물은 세포 치료제로써 적용될 수 있으며, 약학적으로

허용가능한 담체를 추가로 포함하여 제제화될 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 성분의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 본 발명에 있어서, 세포 치료제로써 적용될 수 있는 본 발명의 조성물에 대해 약학적으로 허용 가능한 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 운할제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명의 조성물인 세포치료제는 질병부위로 이동을 유도할 수 있다면 어떠한 경로를 통해서든지 투여 가능하다. 경우에 따라서는 줄기세포를 병변으로 향하게 하는 수단을 구비한 비히클에 로딩하는 방안을 고려할 수도 있다. 따라서 본 발명의 조성물은 국소 (협측, 설하, 피부 및 안내 투여를 포함), 비경구 (피하, 피내, 근육내, 점적, 정맥 내, 동맥 내, 관절 내 및 뇌척수액 내를 포함) 또는 경피성 투여를 포함한 여러 경로를 통해 투여할 수 있으며, 바람직하게는 발병부위에 직접 투여한다. 일 양태로서 줄기세포는 적합한 희석제에 약 현탁시켜 개체에 투여할 수 있는데, 이 희석제는 세포를 보호 및 유지하고, 목적하는 조직에 주입 시 사용에 용이하도록 하는 용도로 사용된다. 상기 희석제로는 생리식염수, 인산완충용액, HBSS 등의 완충용액, 뇌척수액 등이 있을 수 있다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있도록 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 주사제이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액, Hank 용액 또는 멸균된 수용액 등의 수성용제, 올리브 오일 등의 식물유, 에틸올레인산 등의 고급 지방산 에스테르 및 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 또는 글리세린 등의 비수성용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 점막 투과를 위해, 통과할 배리어에 적합한 당업계에 공지된 비침투성제가 사용될 수 있으며, 변질방지를 위한 안정화제로 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등과, 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등의 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 등의 약학적 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [54] 본 발명에서 용어, "세포 치료제"는 질병 치료 등을 목적으로 유전물질 또는 유전물질을 이입한 세포를 인체에 투여하는 의약품을 의미한다.
- [55] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [56] 본 명세서에서, "유효량"은 목적하는 치료되어야 할 특정 질환의 발병 또는 진행을 지연하거나 전적으로 중지시키는 데 필요한 양을 의미한다. 본 발명에서 조성물은 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른

의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다.

- [57] 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[58]

- [59] 또한, 본 발명은 Lin28을 도입시킨 줄기세포를 계대배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 재생능 및 분화능의 손실을 차단한 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

- [60] 본 발명에 따른 줄기세포의 제조방법에 있어서, Lin28을 도입시킨 줄기세포는 Lin28을 발현하는 벡터가 도입된 줄기세포일 수 있다.

- [61] 상기 줄기세포의 제조방법에 있어서, 줄기세포, Lin28 발현 벡터 및 Lin28을 발현하는(도입시킨) 줄기세포는 위에서 기술한 모든 내용을 그대로 적용 또는 준용할 수 있다.

- [62] 일반적으로 줄기세포는 증식 계대배양시 증식능 및 분화능이 감소되고 이식시에는 조직 손상을 복구해주는 재생능(regenerative potential)이 현저하게 감소되나, 본 발명에 따른 줄기세포의 제조방법으로 제조된 줄기세포는 계대가 증가함에도 증식능, 재생능 및 분화능의 손실을 차단하는 효과가 있으므로, 줄기세포 이식 치료시 보다 우수한 치료 효과를 나타낼 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [63] 이하, 본 출원을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 출원을 예시하는 것일 뿐 본 출원의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[64]

- [65] [실시예 1] 바이러스 벡터를 이용한 Lin28을 발현하는 신경줄기세포의 제조

- [66] Hsd:ICR(CD-1) 태아(embryonic day 10) 중뇌(ventral midbrain; VM)에서 신경줄기세포(VM-NSC)를 분리하고 배양하였다. 배양 초기(2~3일)에 서열번호 2의 Lin28을 이용하여 Lin28의 발현을 유도(Dox-on system)하는 doxycycline-inducible lentiviral vector(Buganim et al Cell. 2012 Sep 14;150(6):1209-22. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.023.)를 세포에 도입하여 증식 배양하였다. 증식 배양 중에 doxycycline을 첨가하여 VM-NSC에서 Lin28 유전자의 발현을 유도함으로써 Lin28을 발현하는 신경줄기세포를 제조하였다.

[67]

- [68] [실험예 1] 도파민성 신경세포(dopaminergic neuron)으로의 분화능 확인 실험

- [69] Hsd:ICR(CD-1) 태아(mouse embryonic day 10)의 중뇌(ventral midbrain, VM)에서

신경줄기세포(VM-NSC)를 분리하고 배양하는 동안의 신경줄기세포의 분화능을 real-time PCR 분석을 통해 관찰하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[70] 도 1에서 보는 바와 같이, 신경줄기세포를 분리하고 배양하는 동안 계대가 진행됨에 따라 도파민성 신경세포로의 분화능이 현저히 감소됨을 관찰할 수 있었다. 또한, 배양 과정 중 발생발달을 조절하는 Lin28 유전자의 감소와 세포 신호(cell signal) 하위 물질인 Hmga2의 감소 및 let-7b micro RNA의 증가를 확인할 수 있었다.

[71]

[72] [실험예 2] Lin28 유전자를 도입하여 증식 배양한 도파민성 신경세포의 유전자 변화 양상 확인 실험

[73] Lin28 유전자를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 신경줄기세포에 도입한 후 증식 배양하여 상기 바이러스 벡터의 도입 3일 후 계대마다 배양된 세포를 수거하여 각종 유전자의 변화 양상을 real-time PCR과 면역형광염색법을 통해 분석 및 관찰하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[74] 도 2에서 보는 바와 같이, 배양 기간 동안 신경줄기세포 특이적 유전자인 Nestin, Sox2 및 도파민성 신경세포 특이적 유전자인 Otx2, En-1, Foxa2, Lmx1a의 합성이 대조군에서 크게 감소하는 반면, Lin28 유전자가 도입된 군에서는 상기 유전자들의 합성 감소 현상이 방지됨을 확인하였다.

[75]

[76] [실험예 3] Lin28 발현 유도 후 신경줄기세포의 분화능 확인 실험

[77] 신경줄기세포의 배양 초기에 독시사이클린(doxycycline)을 첨가하여 증식시킨 중뇌 신경줄기세포(VM-NSC)를 Lin28 발현이 유도된 후 독시사이클린을 첨가하지 않고 Lin28의 발현이 차단된 상태에서 신경줄기세포의 분화능을 면역형광염색법으로 관찰하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[78] 도 3의 A 내지 J에서 보는 바와 같이, 증식 기간 동안 Lin28 발현 벡터가 도입되는 것만으로도 신경세포로의 분화능 손실이 차단됨을 확인할 수 있었다. 또한, K 내지 V에서 보는 바와 같이, Lin28의 발현 유도는 도파민성 신경세포로의 분화능 손실을 억제하였으며, 도파민성 신경세포는 모두 중뇌 특이적 마커와 co-label 되는 것을 확인하였다. Lin28의 발현 유도로 유지된 도파민성 신경세포는 형태적, 기능적으로도 성숙함을 확인하였다.

[79]

[80] [실험예 4] 도파민성 신경세포의 세포사멸 억제 효과 확인 실험

[81] 신경줄기세포 배양 중 계대가 진행됨에 따라 증가하는 세포사멸(apoptotic cell death)은 줄기세포 이식 치료 시 재생능 감소를 유발시키는 원인으로 알려져 있다. 이에, 신경줄기세포에서의 Lin28의 발현이 세포사멸을 억제하는 효과를 면역형광염색법 및 유속세포분석기법(flow cytometry)을 통해 관찰하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[82] 도 4에서 보는 바와 같이, Lin28의 발현이 유도되지 않은 신경줄기세포 유래

도파민성 신경세포가 대다수의 H_2O_2 독소에 의해 파괴되는 반면, Lin28의 발현이 유도된 신경줄기세포 유래 도파민성 신경세포에서는 보호 효과를 나타내고 있음을 확인하였다. 따라서, 세포 이식 치료시 발생할 수 있는 재생능 감소 현상을 Lin28의 발현이 방지할 수 있음을 예측할 수 있다.

[83]

[84] **[실험예 5] Lin28 발현 신경줄기세포의 치료 효과 확인 실험**

[85] 6-hydroxydopamine(6-OHDA)을 이용하여 헤미 파킨슨(hemi-parkinson) 모델 쥐의 선조체에 Lin28 발현이 유도된 신경줄기세포를 이식한 후 2개월 동안 동물 행동 변화를 측정하였다. 상기 6-OHDA는 파킨슨 질환 동물 모델의 제조에 널리 사용되는 신경 독소로, 도파민성 신경세포에 대해 특이적인 독성을 나타내는 것이다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[86] 도 5에서 보는 바와 같이, Lin28의 발현이 유도된 신경줄기세포를 이식받은 파킨슨 모델 쥐가 대조군과 비교했을 때 뛰어난 치료 효과를 보였다. 신경줄기세포 이식한 2개월 후의 이식 병변을 분석한 데이터를 확인해보면, Lin28의 발현이 유도된 신경줄기세포를 이식받은 군의 이식편에서 더 많은 양의 도파민성 신경세포의 생존을 확인하였고, 생존한 도파민성 신경세포는 중뇌 특이적 마커와 co-label 됨을 확인할 수 있었다.

[87]

[88] **[실시예 2] RNA 레플리콘 시스템을 이용한 Lin28을 발현하는 신경줄기세포의 제조**

[89] Hsd:ICR(CD-1) 태아 중뇌에서 신경줄기세포를 분리하고 배양하였다. 배양 초기에 서열번호 2의 Lin28을 이용하여 Lin28의 발현을 유도하는 Lin28 레플리콘(replicon)을 세포에 도입하여 증식 배양하였다. 증식 배양 중에 리포펙타민(lipofectamine)을 첨가하여 Lin28을 발현하는 신경줄기세포를 제조하였다.

[90]

[91] **[실험예 6] Lin28 RNA 유전자가 도입된 신경줄기세포의 분화 및 증식능 확인**

[92] 상기 실시예 2에서 제조한 신경줄기세포는 유전자 도입 14일 이내 Lin28 유전자가 자동 소멸되므로, Lin28이 발현이 유도된 후 Lin28이 자동 소멸되어 발현이 차단된 상태에서의 신경줄기세포의 분화능을 면역형광염색법으로 관찰하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[93] 도 6에서 볼 수 있듯이, 유전자 도입 4일 후에 RNA 유래 Lin28이 발현되는 것을 확인할 수 있었으며(A), 도입 14일 후에는 Lin28의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(B). 또한, Lin28은 3번 계대배양하는 동안 발현이 유지되며, Lin28 발현 세포군이 보다 다량의 세포로 증식됨을 확인하였다(C).

[94] 면역형광염색법을 통해 Tuj1, GFAP, Foxa2, TH, Lmx1a 및 Nurr1의 발현 정도를 확인한 결과(D 내지 Q), 신경줄기세포에 RNA 레플리콘 시스템으로 Lin28을 도입하여 분화를 유도한 경우, 신경세포가 증대되고(Tuj1) 정상세포로의 분화가

억제되었으며(GFAP), 중뇌 도파민성 인자인 Foxa2, TH, Lmx1a 및 Nurr1의 발현이 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

[95]

[96] [실시예 3] 바이러스 벡터를 이용한 Lin28을 발현하는 인간 배아줄기세포 유래 신경줄기세포의 제조

[97] 인간 배아줄기세포에서 신경줄기세포를 분리하여 배양하였다. 배양 초기에 서열번호 1의 Lin28을 이용하여 Lin28의 발현을 유도하는 doxycycline-inducible lentiviral vector를 세포에 도입하여 증식 배양하였다. 증식 배양 중에 독시사이클린을 첨가하여 신경줄기세포에서 Lin28 유전자의 발현을 유도함으로써 Lin28을 발현하는 인간 배아줄기세포 유래 신경줄기세포를 배양하였다.

[98]

[99] [실험예 7] Lin28의 발현이 유도된 인간 배아줄기세포 유래 신경줄기세포의 도파민성 신경세포로의 분화능 확인

[100] 상기 실시예 3에서 제조한 신경줄기세포는 5 계대에 Lin28을 발현하는 렌티 바이러스를 도입하여 6일 간격으로 계대 배양한 후, 6 계대 내지 8 계대에서의 그 다량 증식 효과를 관찰하여 도 7에 나타내었다.

[101] 도 7의 T에 나타난 바와 같이, 6 계대 내지 8 계대까지 세포가 증식되는 것을 알 수 있으며, U 내지 W를 통해 세포사멸이 감소되고, X 내지 Z를 통해 도파민성 신경세포로의 분화능이 향상되는 것을 확인할 수 있다.

[102]

[103] [실시예 4] RNA 레플리콘 시스템을 이용한 Lin28을 발현하는 중간엽 줄기세포의 제조

[104] 인간 장골로부터 중간엽 줄기세포를 분리하고 배양하였다. 배양 초기에 서열번호 1의 Lin28을 이용하여 Lin28의 발현을 유도하는 Lin28 레플리콘을 세포에 도입하여 증식 배양하였다. 증식 배양 중에 리포펙타민을 첨가하여 Lin28을 발현하는 중간엽 줄기세포를 제조하였다.

[105]

[106] [실험예 8] Lin28 RNA 유전자가 도입된 중간엽 줄기세포의 분화능 확인

[107] 상기 실시예 4에서 제조한 중간엽 줄기세포는 유전자 도입 14일 이내 Lin28 유전자가 자동 소멸되므로, Lin28의 발현이 유도된 후 Lin28이 소멸되어 발현이 차단된 상태에서 중간엽 줄기세포의 골 분화능을 ALP 및 Alizarin-red로 염색하여 관찰하였다. 또한, real-time PCR을 이용해 골 분화 인자인 Runx2, COL1A1, BSP, OCN 및 Osterix의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[108] 도 8에서는 Lin28 도입 4일 후에 RNA 유래 Lin28이 발현되는 것을 확인하였으며(도 8의 Expansion), 골 분화 14일 후에 Lin28의 발현 유도 실험군에서 골 분화 인자인 Runx2, COL1A1, BSP, OCN 및 Osterix의 발현이

증진되는 것을 통해 골 분화능이 향상된 것을 확인하였다(도 8의 Osteogenic differentiation).

[109]

[110] [실시예 5] 바이러스 벡터를 이용한 Lin28을 발현하는 중간엽 줄기세포의 제조
[111] 인간 장골로부터 중간엽 줄기세포를 분리하고 배양하였다. 1 계대에 서열번호 1의 Lin28을 이용하여 Lin28의 발현을 유도하는 doxycycline-inducible lentiviral vector를 세포에 도입하여 증식 배양하였다. 증식 배양 중에 독시사이클린을 첨가하여 중간엽 줄기세포에서 Lin28 유전자의 발현을 유도함으로써 Lin28을 발현하는 중간엽 줄기세포를 제조하였다.

[112]

[113] [실험예 9] Lin28의 발현이 유도된 중간엽 줄기세포의 줄기세포성 확인

[114] 상기 실시예 5에서 제조한 중간엽 줄기세포의 2 계대에서 Lin28의 발현이 유도된 중간엽 줄기세포의 줄기세포성 인자와 분화 유전자의 발현 정도를 real-time PCR을 통해 확인하여 도 9에 나타내었다.

[115] 도 9에서 볼 수 있듯이, Lin28 발현이 유도된 중간엽 줄기세포에서 줄기세포성 인자인 Nanog 및 Oct4의 발현이 증진됨과 동시에 분화 인자인 Cox2, SMA 및 Stella의 발현이 억제되는 것을 통해 중간엽 줄기세포의 줄기세포성이 유지되는 것을 확인하였다.

[116]

[117] [실험예 10] Lin28의 발현이 유도된 중간엽 줄기세포의 줄기세포성 유지 유전자 및 골 분화 인자의 발현 정도 확인

[118] 상기 실시예 5에서 제조한 중간엽 줄기세포의 2 계대에서 Lin28의 발현이 유도된 중간엽 줄기세포의 줄기세포성 유지 관련 유전자 및 세포사멸 인자의 발현 정도와, Lin28 발현 후, 1 계대와 4 계대에서의 중간엽 줄기세포의 골 분화 후 골 분화 인자의 발현 정도를 real-time PCR을 통해 확인하여 도 10에 나타내었다.

[119] 도 10의 a에서는 중간엽 줄기세포 증식 단계에서 Lin28이 발현된 중간엽 줄기세포가 줄기세포성 인자(Oct4 및 Nanog)의 발현 수준을 유지하고, 세포사멸 인자(P16)의 발현은 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, b에서는 분화 이후에 1 계대와 4 계대의 중간엽 줄기세포에서 골 분화 인자인 OCN, Runx2의 발현되는 것을 확인할 수 있다.

[120]

[121] [실험예 11] Lin28을 발현하는 중간엽 줄기세포의 골 분화능 확인

[122] 1) 2, 3 계대에서의 중간엽 줄기세포의 골 분화능 확인

[123] 상기 실시예 5에서 제조한 중간엽 줄기세포의 2 계대, 3 계대에서 골 분화 14일 후에 Lin28의 발현이 유도된 중간엽 줄기세포의 골 분화능을 ALP 및 Alizarin-red로 염색하여 관찰하였으며, 골 분화 인자의 발현 정도를 real-time PCR을 통해 확인하여 도 11(2 계대) 및 12(3 계대)에 나타내었다.

- [124] 도 11 및 12에서 볼 수 있듯이, 2 계대 및 3 계대 모두 골 분화 14일 후에 ALP와 Alizarin-red로 염색한 결과, 골 분화능이 향상된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 골 분화 인자인 Runx2, COL1A1, BSP, OCN 및 Osterix의 발현이 대조군과 비교하여 현저하게 상승된 것을 확인하였다.
- [125]
- [126] 2) 4 계대에서의 중간엽 줄기세포의 골 분화능 확인
- [127] 상기 실시예 5에서 제조한 중간엽 줄기세포의 4 계대에서 골 분화 14일 후에 Lin28의 발현이 유도된 중간엽 줄기세포의 골 분화능을 Safranin-O로 염색하여 관찰하였으며, 연골 분화 인자의 발현 정도를 real-time PCR을 통해 확인하여 도 13에 나타내었다.
- [128] 도 13에서 볼 수 있듯이, 4 계대에서 중간엽 줄기세포의 골 분화 14일 후에 Safranin-O로 염색한 결과, 연골 분화능이 향상된 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 연골 분화 인자인 Aggrecan, COL2, SOX9의 발현이 대조군과 비교하여 현저하게 상승된 것을 확인하였다.
- [129]
- [130] [실시예 6] 바이러스 벡터를 이용한 Lin28을 발현하는 근육 줄기세포의 제조
- [131] Hsd:ICR(CD-1)로부터 근육 줄기세포성 전구세포를 분리하고 배양하였다. 배양 초기에 서열번호 2의 Lin28을 이용하여 Lin28의 발현을 유도하는 doxycycline-inducible lentiviral vector를 세포에 도입하여 증식 배양하였다. 증식 배양 중에 독시사이클린을 첨가하여 근육 줄기세포성 전구세포에서 Lin28 유전자의 발현을 유도함으로써 Lin28을 발현하는 근육 줄기세포성 전구세포를 제조하였다.
- [132]
- [133] [실험예 12] Lin28을 발현하는 근육 줄기세포성 전구세포의 근육세포성 확인
- [134] 상기 실시예 6에 따라 제조된 근육 줄기세포성 전구세포는 real-time PCR을 통해 Lin28 도입 후 2 계대 및 4 계대에서의 근육세포성 인자인 MyoD의 발현 정도를 확인하고, 근육 줄기세포성 전구세포의 수를 측정하였다.
- [135] 도 14에서는 2 계대에서 Lin28을 세포에 도입한 후, 2 계대와 4 계대에서 근육세포성 인자인 FHL1, MyoD, Myogenin와 PAX7의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있다(b). 또한, c에서는 Lin28의 발현이 유도된 후 근육 줄기세포성 전구세포의 수적 증대가 유발되는 것을 확인할 수 있다.
- [136]
- [137] [실시예 7] 바이러스 벡터를 이용한 Lin28을 발현하는 상피 전구세포의 제조
- [138] Hsd:ICR(CD-1)로부터 상피 전구세포를 분리하고 배양하였다. 배양 초기에 서열번호 2의 Lin28을 이용하여 Lin28의 발현을 유도하는 doxycycline-inducible lentiviral vector를 세포에 도입하여 증식 배양하였다. 증식 배양 중에 독시사이클린을 첨가하여 상피 전구세포에서 Lin28 유전자의 발현을 유도함으로써 Lin28을 발현하는 상피 전구세포를 제조하였다.

[139]

[140] **[실험예 13] Lin28을 발현하는 상피 전구세포의 상피 전구세포성 확인**

[141] 2 계대 상피 전구세포에 Lin28이 도입된 후 계대의 증식에 따른 상피 전구세포성을 확인하였다.

[142] 도 15에서는 Lin28이 도입된 후 3, 5, 7 계대로 증식됨에 따라 Lin28이 발현된 실험군(L3, L5, L7)에서 상피 전구세포의 수적 증대가 유발되는 것을 관찰하였다(a). 또한, 3, 5, 7 계대배양시 세포사멸 인자인 P16, P21, P53과 상피 전구세포 분화 인자인 Vimentin, Desmin, SMA의 발현이 감소되는 것을 통해 상피 전구세포성이 유지되는 것을 확인할 수 있었다(b).

[143]

[144] 참고문헌

[145] 1. Cimadamore F, et al. "SOX2-LIN28/let7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors." Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 6;110(32):E3017-26. (2013.08.06. 공개)

[146] 2. Mei Yang, et al. "Lin28 promotes the proliferative capacity of neural progenitor cells in brain development." Development 2015 142:1616-1627. (2015 공개)

청구범위

- [청구항 1] Lin28을 발현하는 줄기세포를 포함하는 세포치료제.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 줄기세포는 Lin28을 발현하는 벡터가 도입된 줄기세포인 세포치료제.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
줄기세포는 배아줄기세포 또는 성체줄기세포인 세포치료제.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 성체줄기세포는 Lin28을 발현하는 신경줄기세포 또는 중간엽 줄기세포인 세포치료제.
- [청구항 5] 제2항에 있어서,
상기 벡터는 바이러스, 플라스미드 벡터 또는 RNA 레플리콘인 세포치료제.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
벡터는 RNA 레플리콘인 세포치료제.
- [청구항 7] Lin28을 도입시킨 줄기세포를 계대배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 재생능 및 분화능의 손실을 차단한 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
Lin28을 도입시킨 줄기세포는 Lin28을 발현하는 벡터가 도입된 줄기세포인 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
벡터는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터 또는 RNA 레플리콘인 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
벡터는 RNA 레플리콘인 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 11] 제7항에 있어서,
줄기세포는 배아줄기세포 또는 성체줄기세포인 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
줄기세포는 Lin28을 발현하는 신경줄기세포 또는 중간엽 줄기세포인 줄기세포의 제조방법.
- [청구항 13] Lin28을 발현하는 신경줄기세포를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료에서의 사용을 위한 약학 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
신경줄기세포는 Lin28을 발현하는 벡터가 도입된 신경줄기세포인 약학 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
벡터는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터 또는 RNA 레플리콘인 약학

조성물.

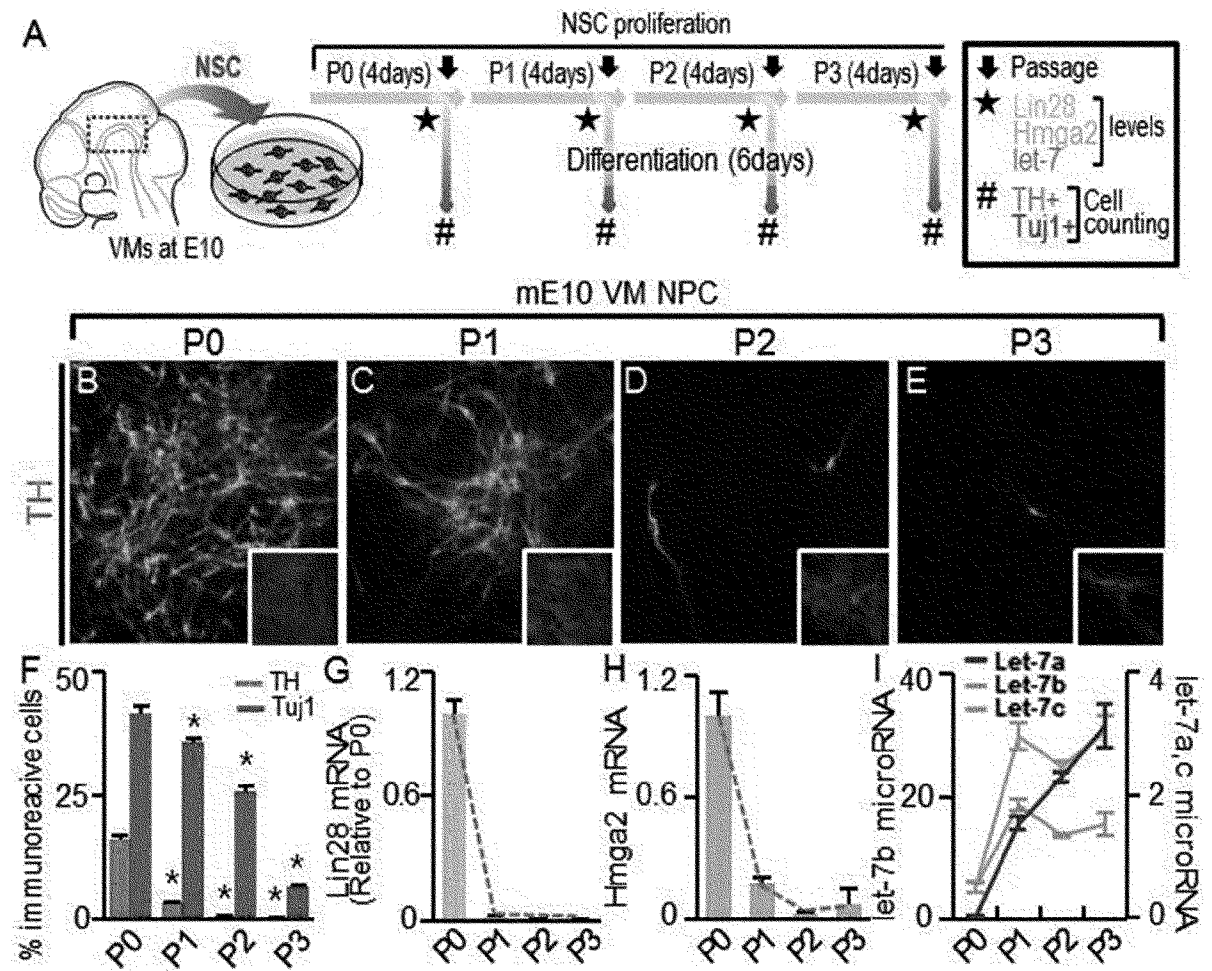
[청구항 16] 제15항에 있어서,
벡터는 RNA 레플리콘인 약학 조성물.

[청구항 17] 제13항에 있어서,
신경계 질환은 파킨슨씨 질환, 치매, 알츠하이머 질환, 헌팅턴 질환,
근위축성 측색 경화증, 기억력 저하, 중증근무력증, 진행성 핵상마비,
다계통 위축증, 본태성 진전증, 피질-기저핵 퇴행증, 미만성 루이소체
질환 및 픽병으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 약학 조성물.

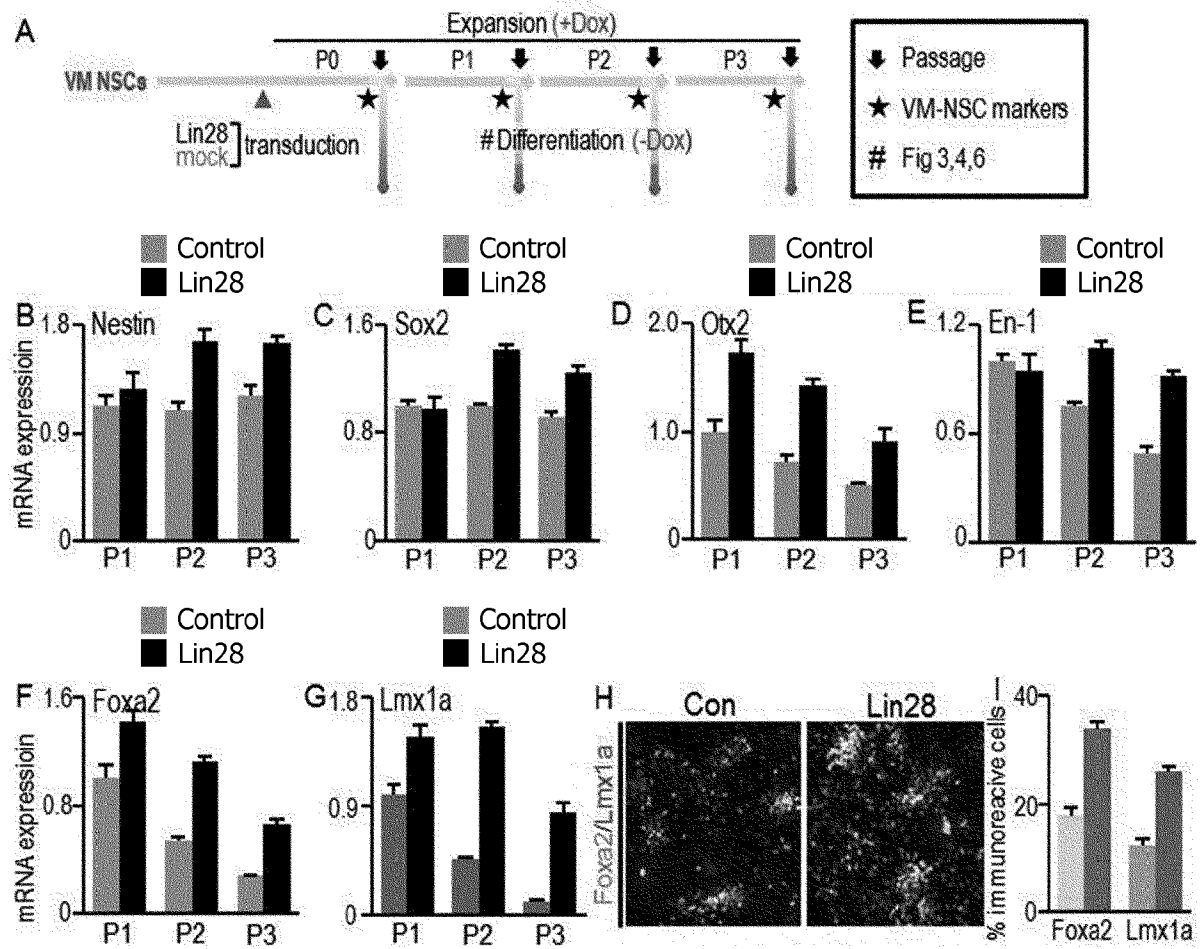
[청구항 18] 제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물을 이를 필요로
하는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 신경계 질환의 치료 방법.

[청구항 19] 제18항에 있어서,
신경계 질환은 파킨슨씨 질환, 치매, 알츠하이머 질환, 헌팅턴 질환,
근위축성 측색 경화증, 기억력 저하, 중증근무력증, 진행성 핵상마비,
다계통 위축증, 본태성 진전증, 피질-기저핵 퇴행증, 미만성 루이소체
질환 및 픽병으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 치료 방법.

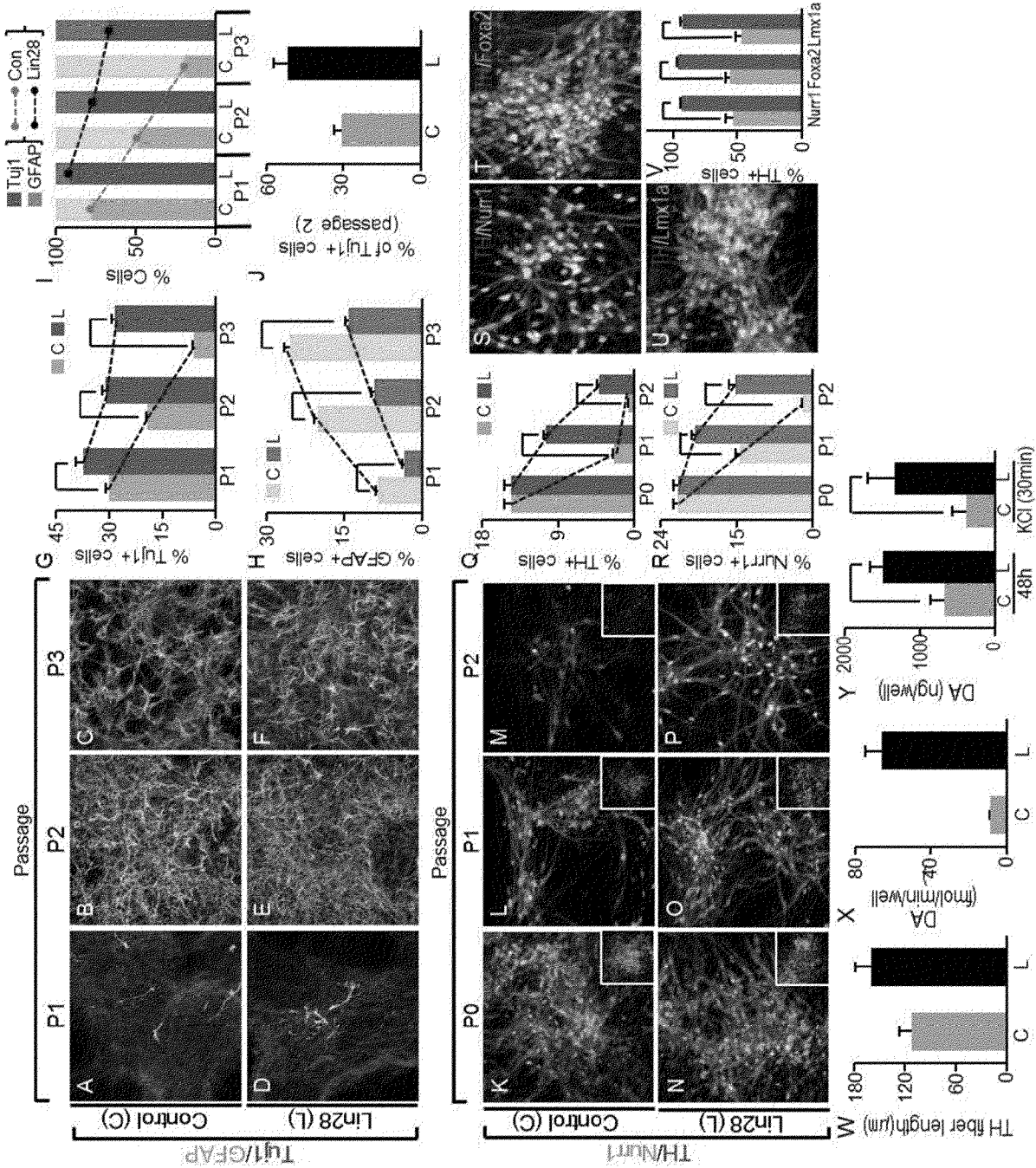
[도1]



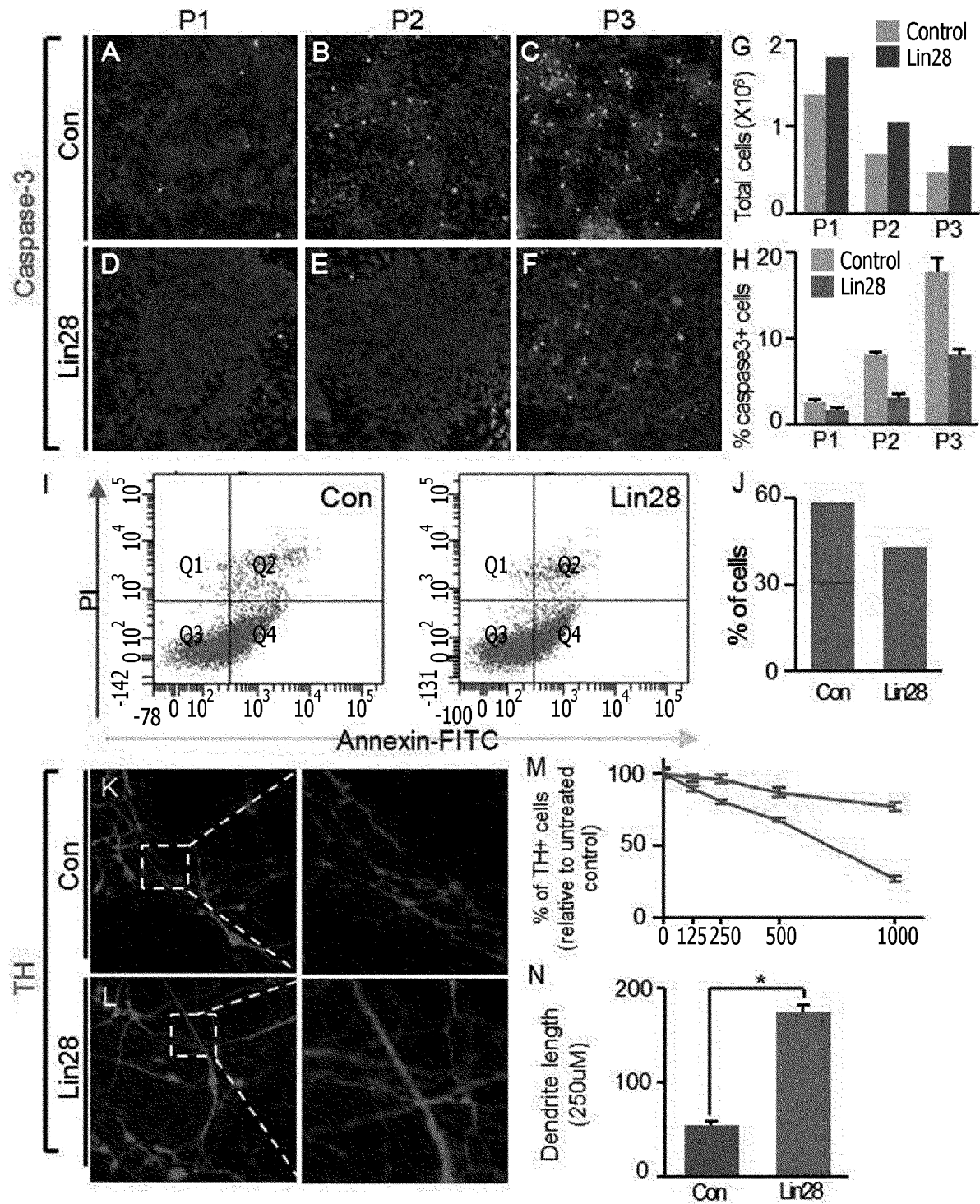
[도2]



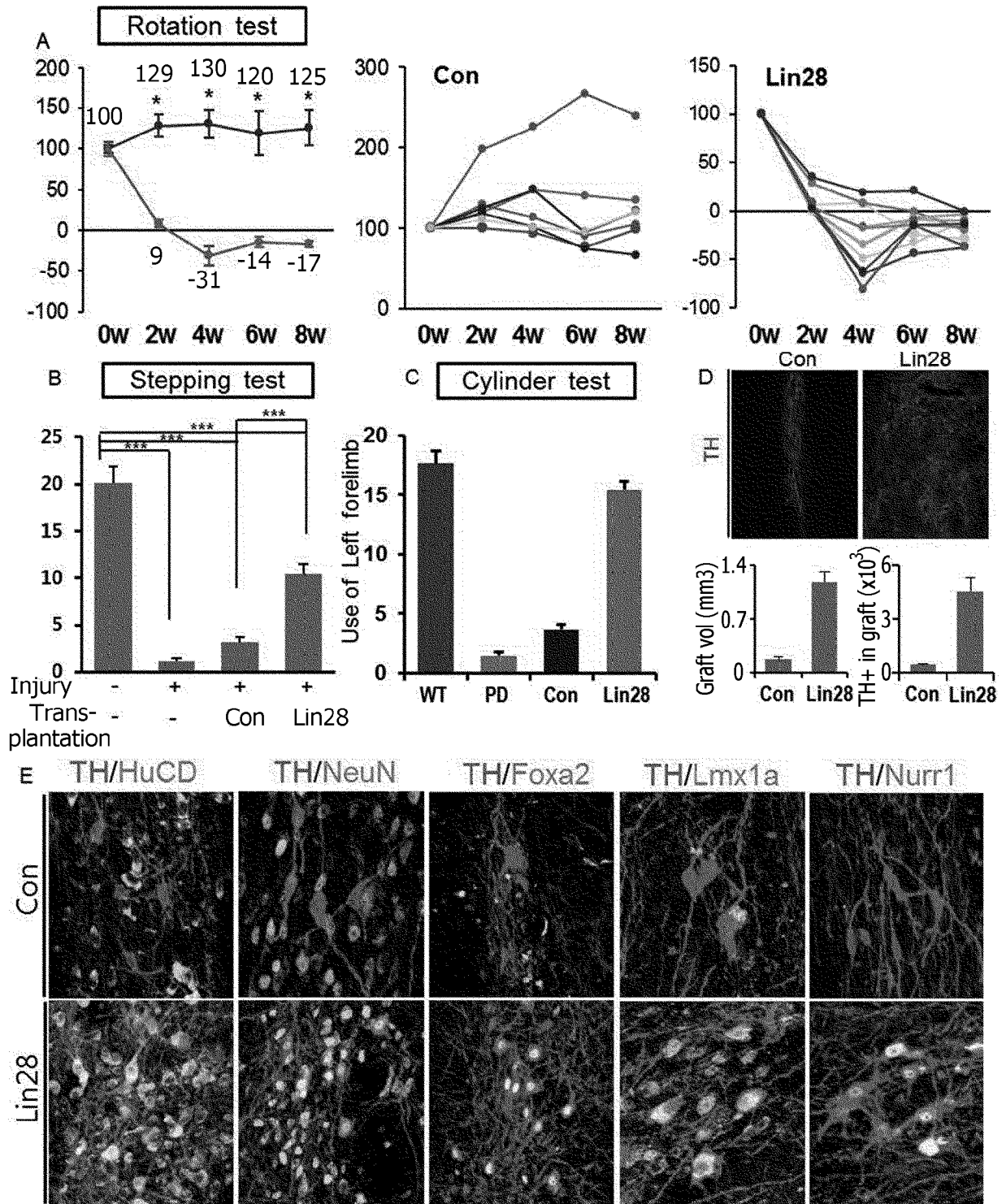
[도3]



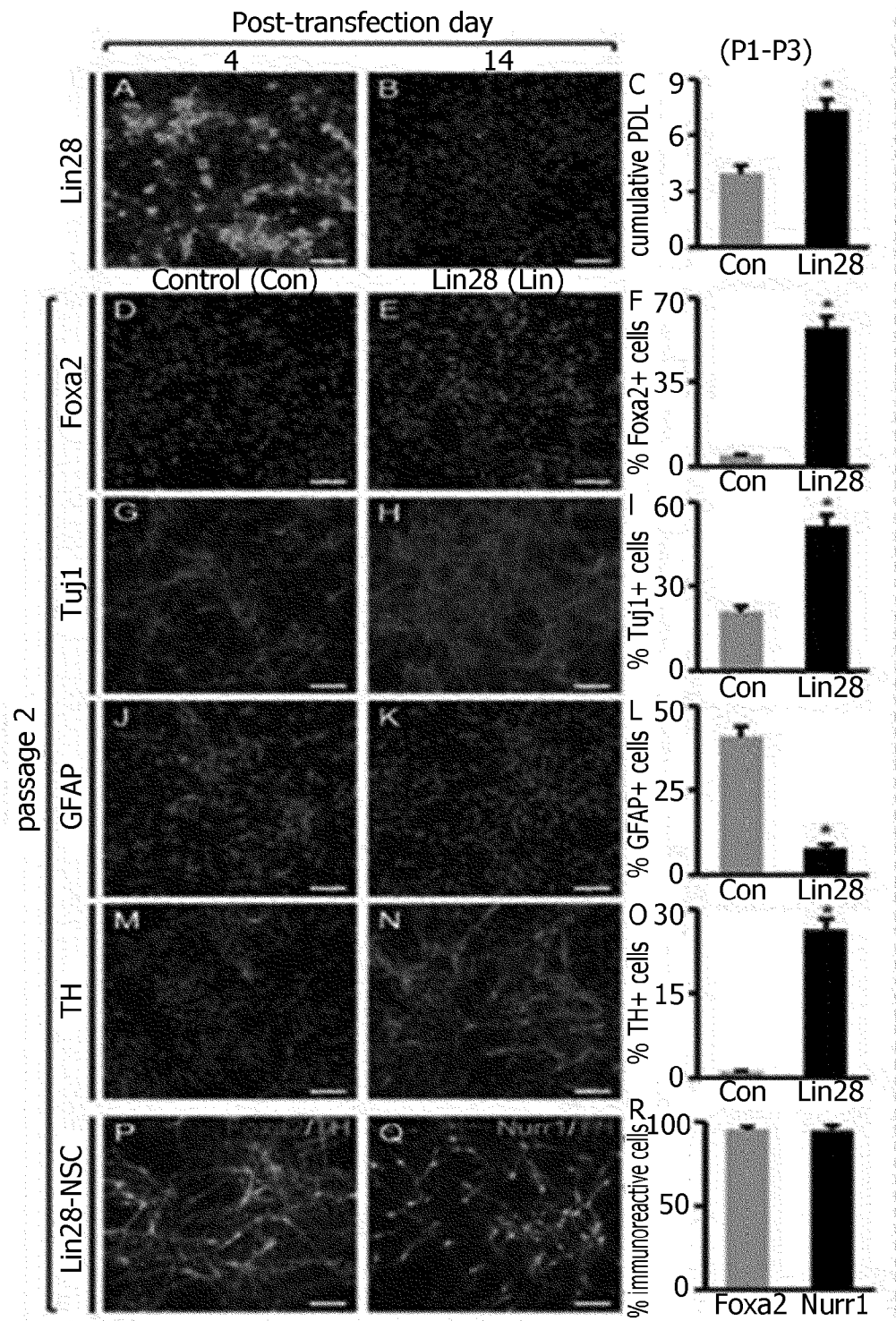
[도4]



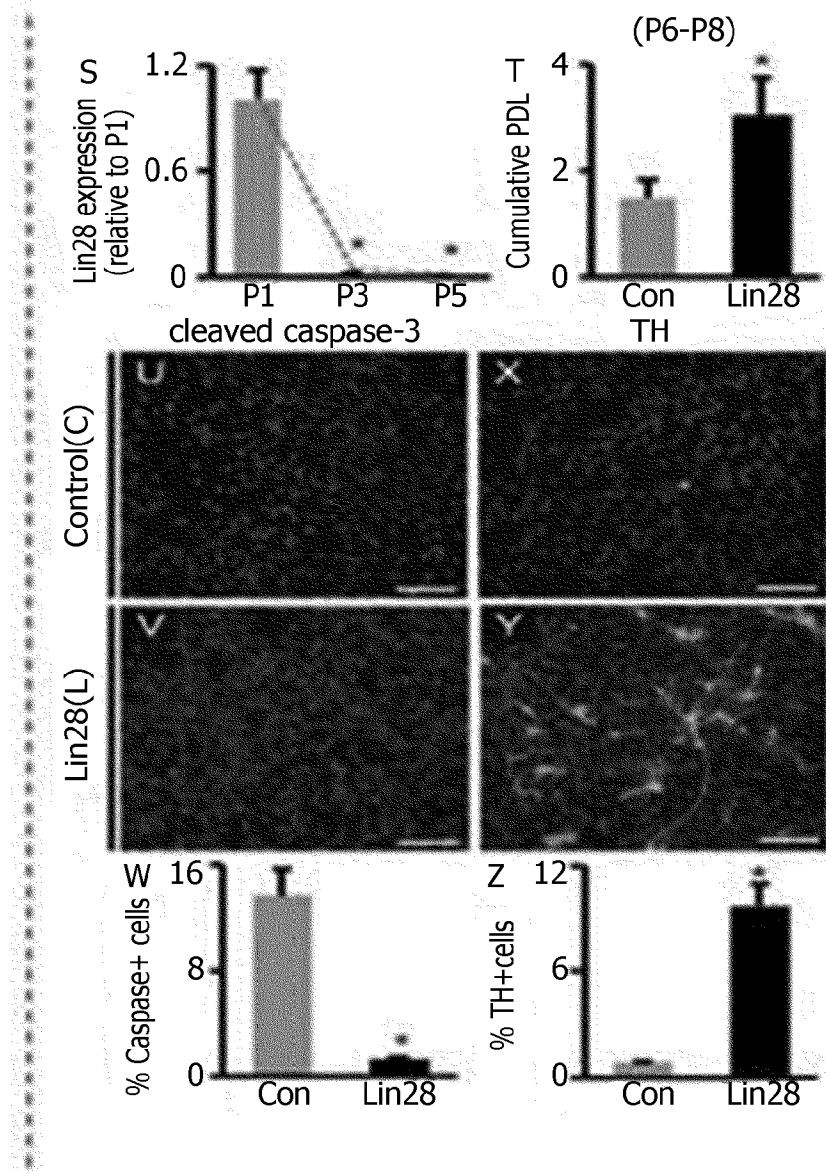
[도5]



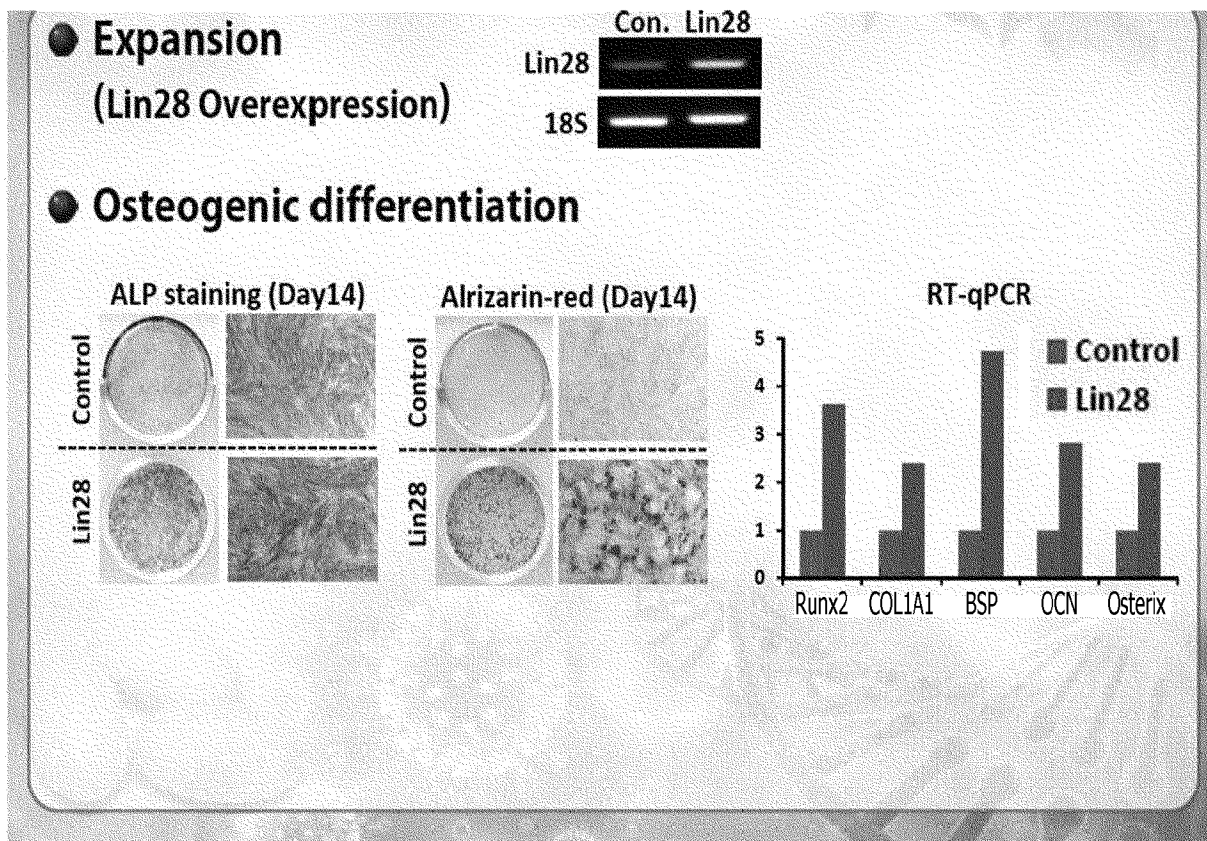
[도6]



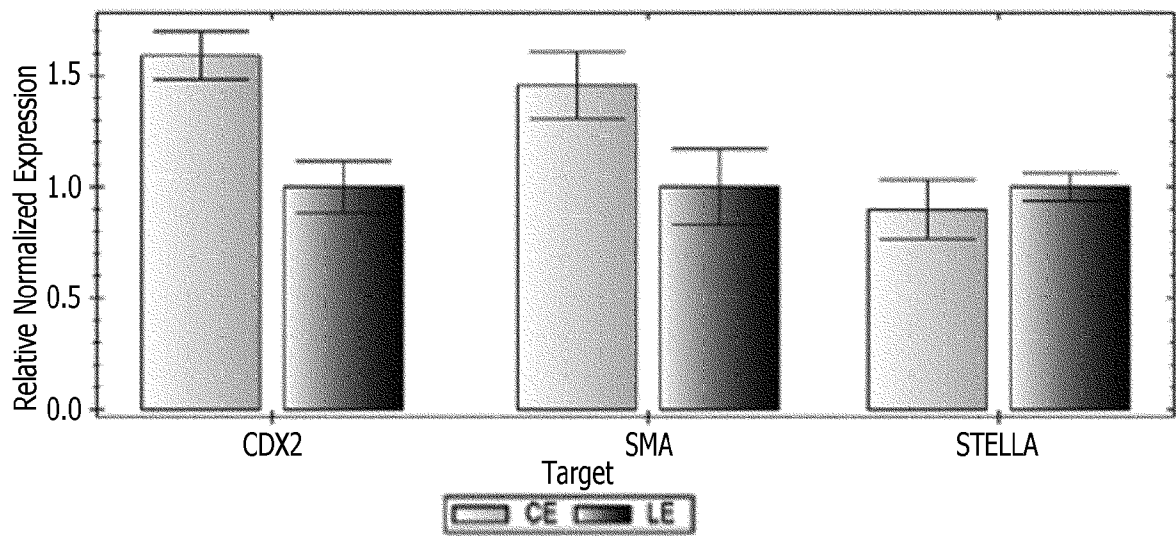
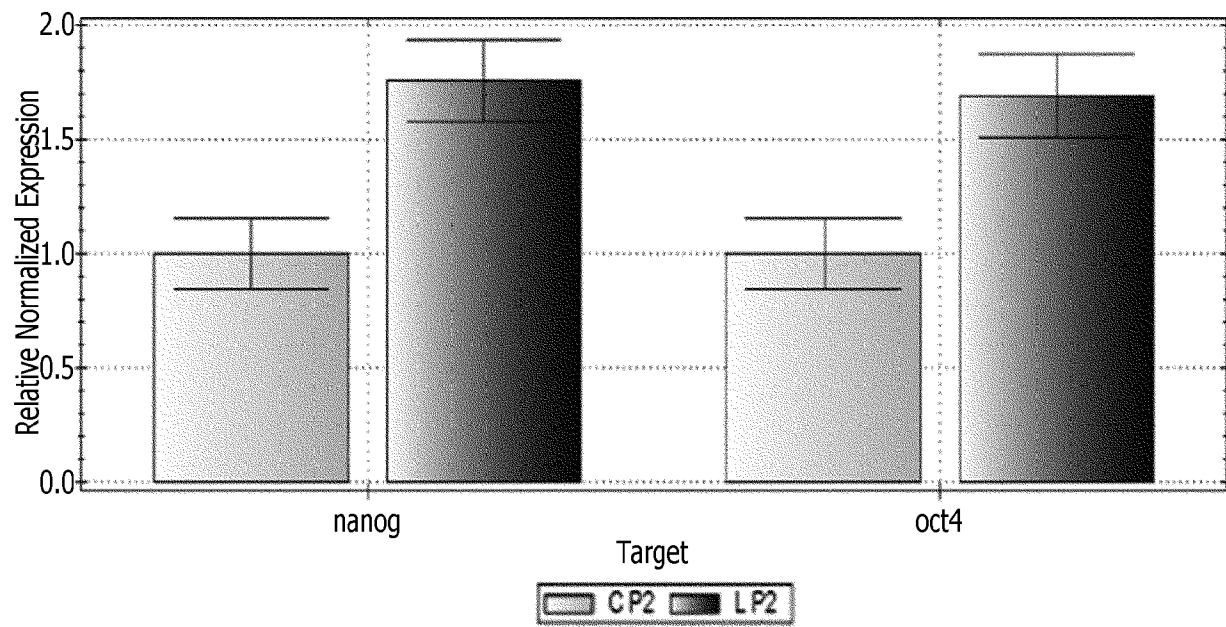
[도7]



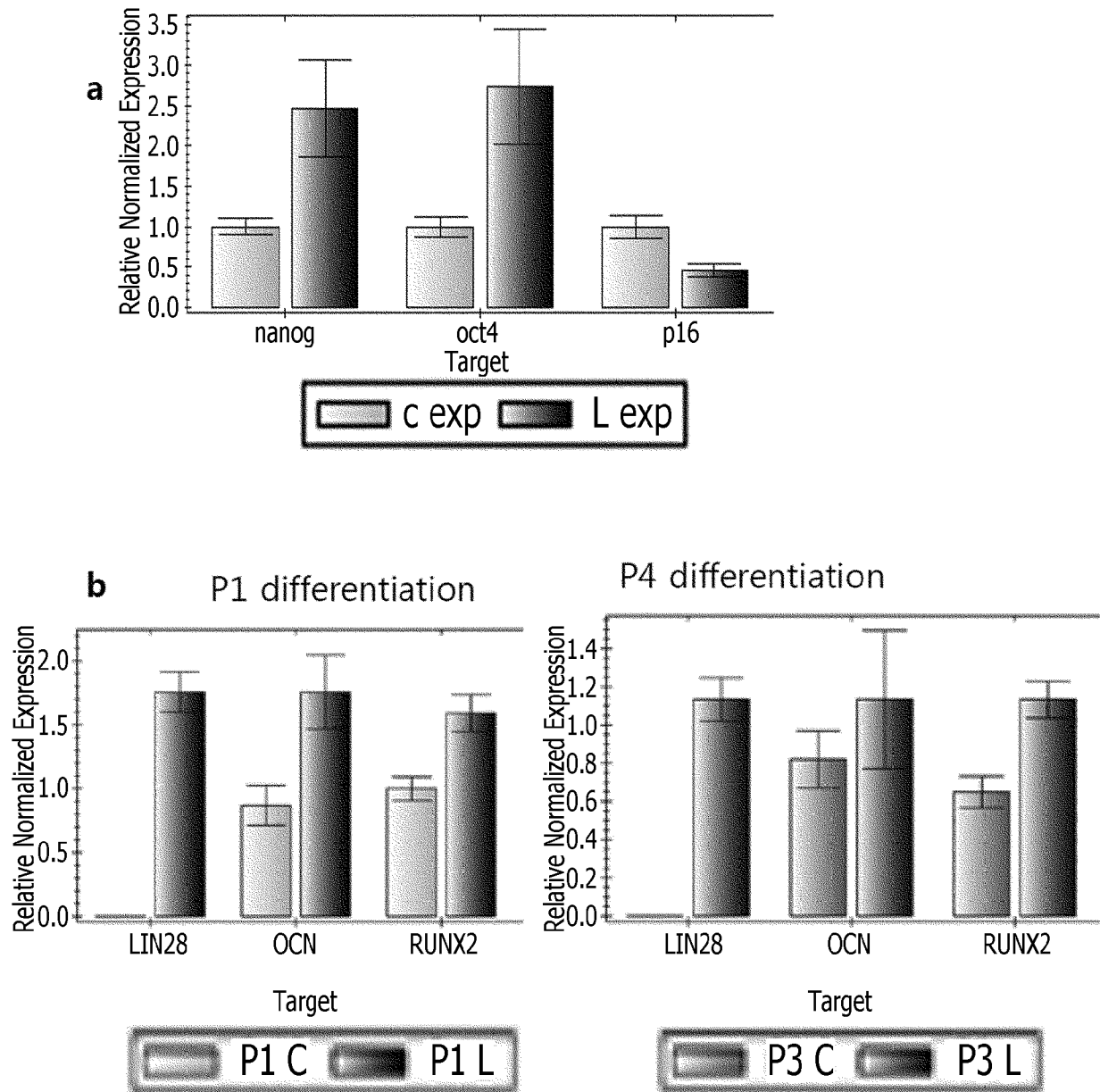
[도8]



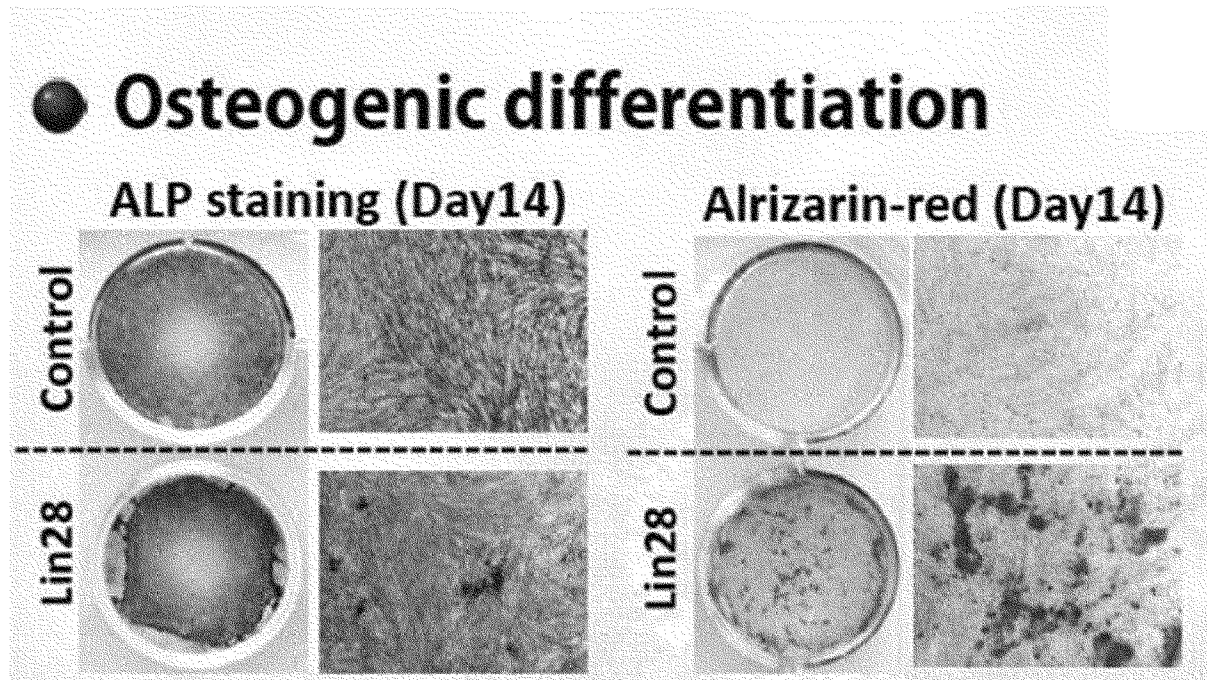
[도9]



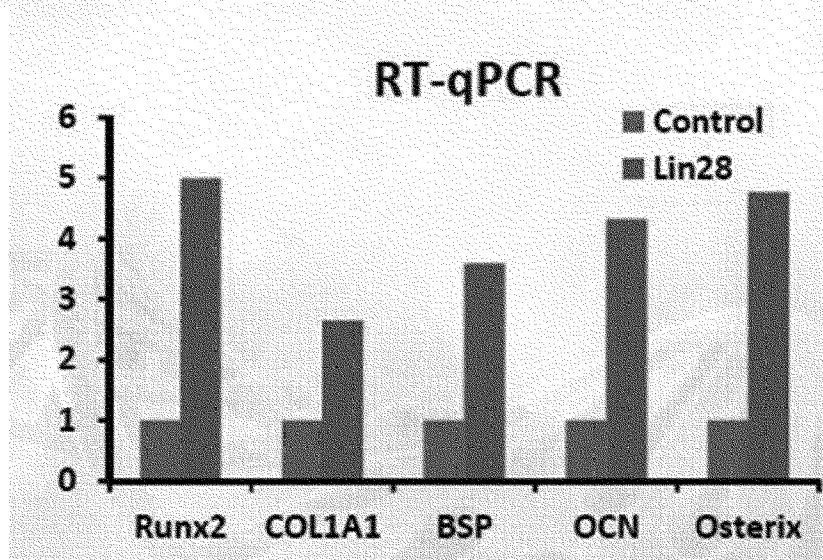
[도10]



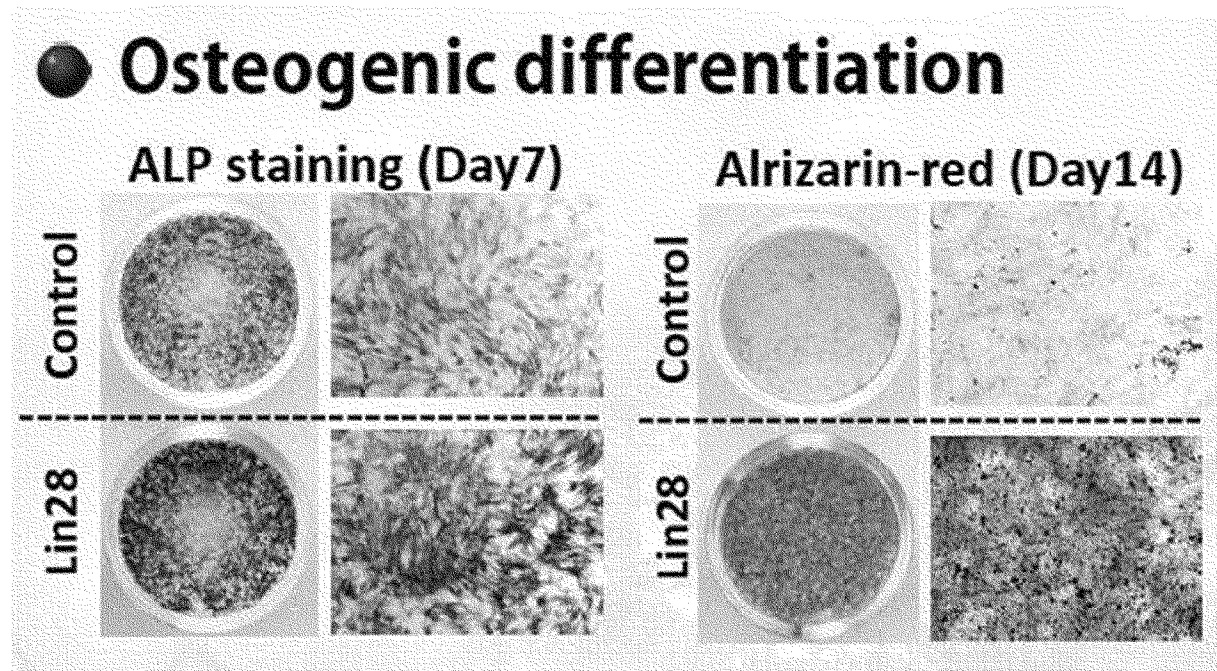
[도11]



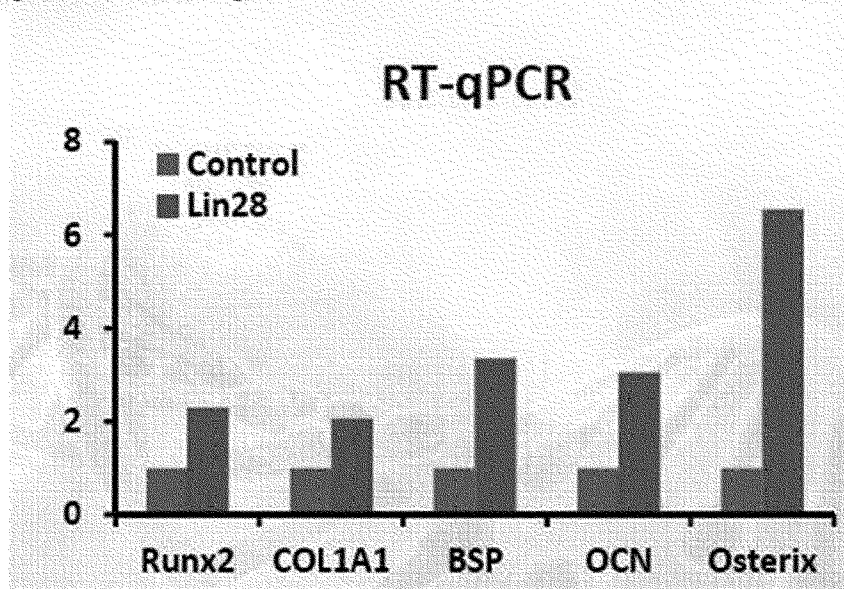
**● Osteogenic differentiation
(160605)**



[도12]



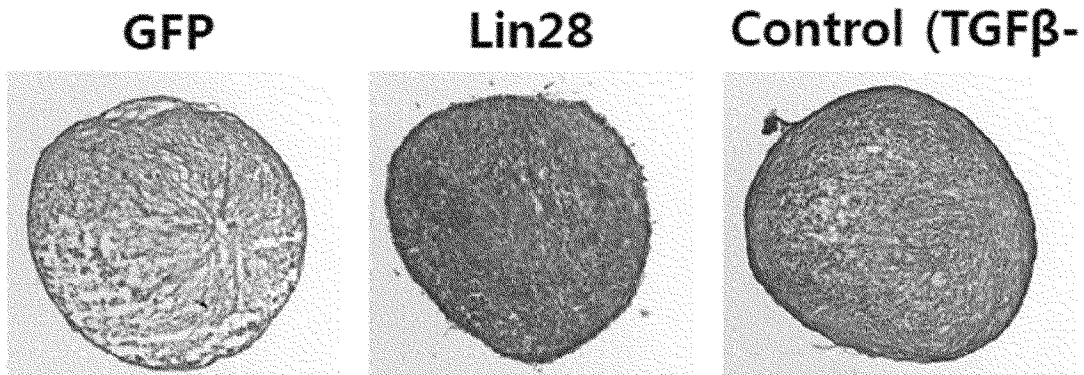
● Osteogenic differentiation (160613)



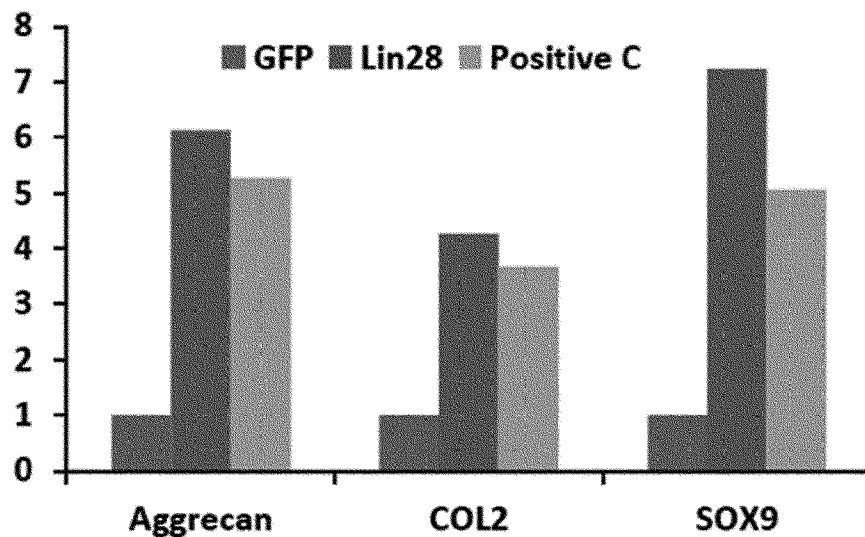
[도13]

● chondrogenic differentiation

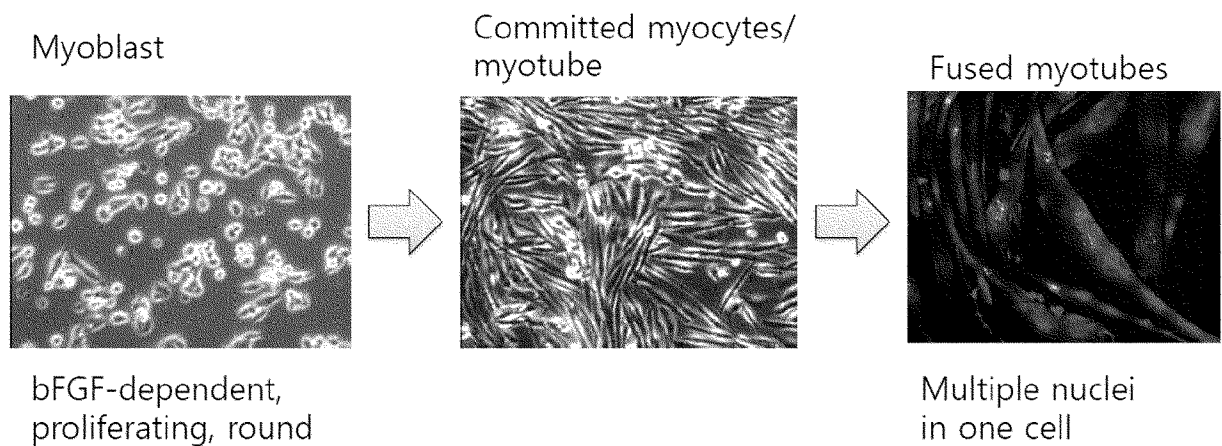
Safranin-O staining (Day21)



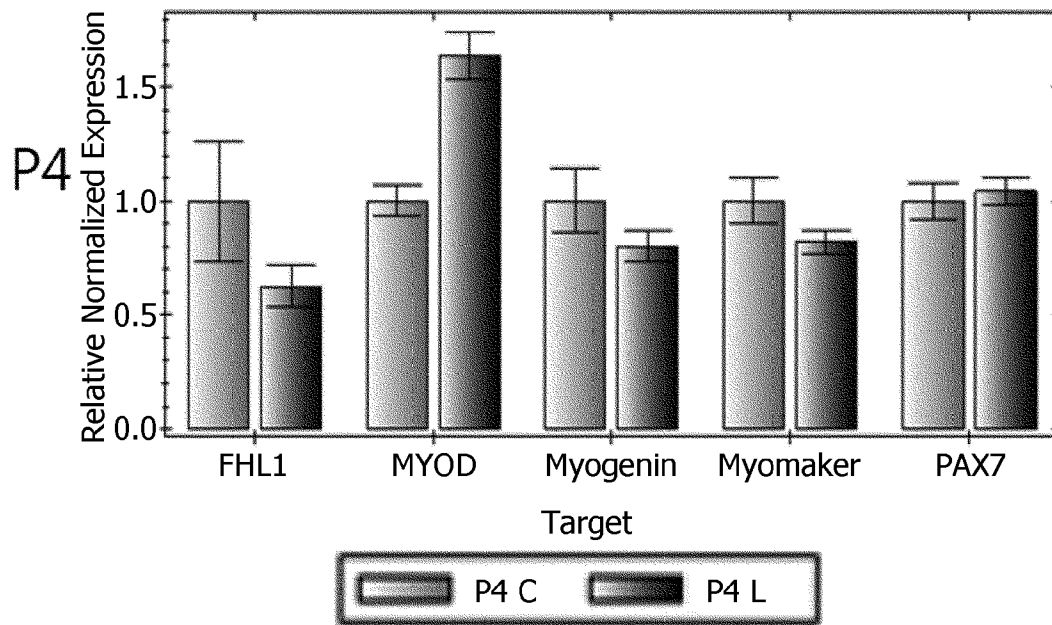
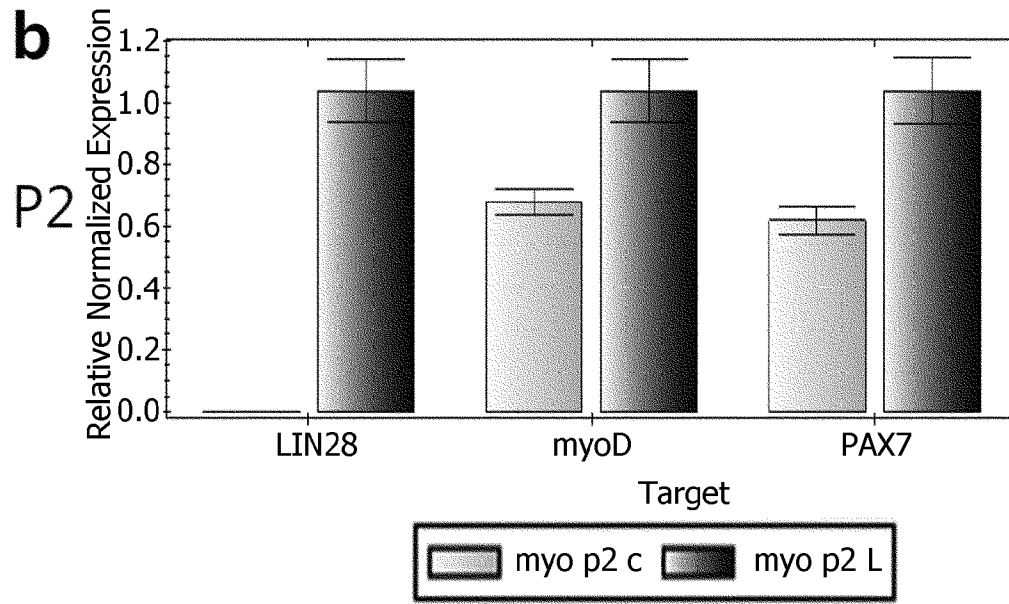
RT-qPCR



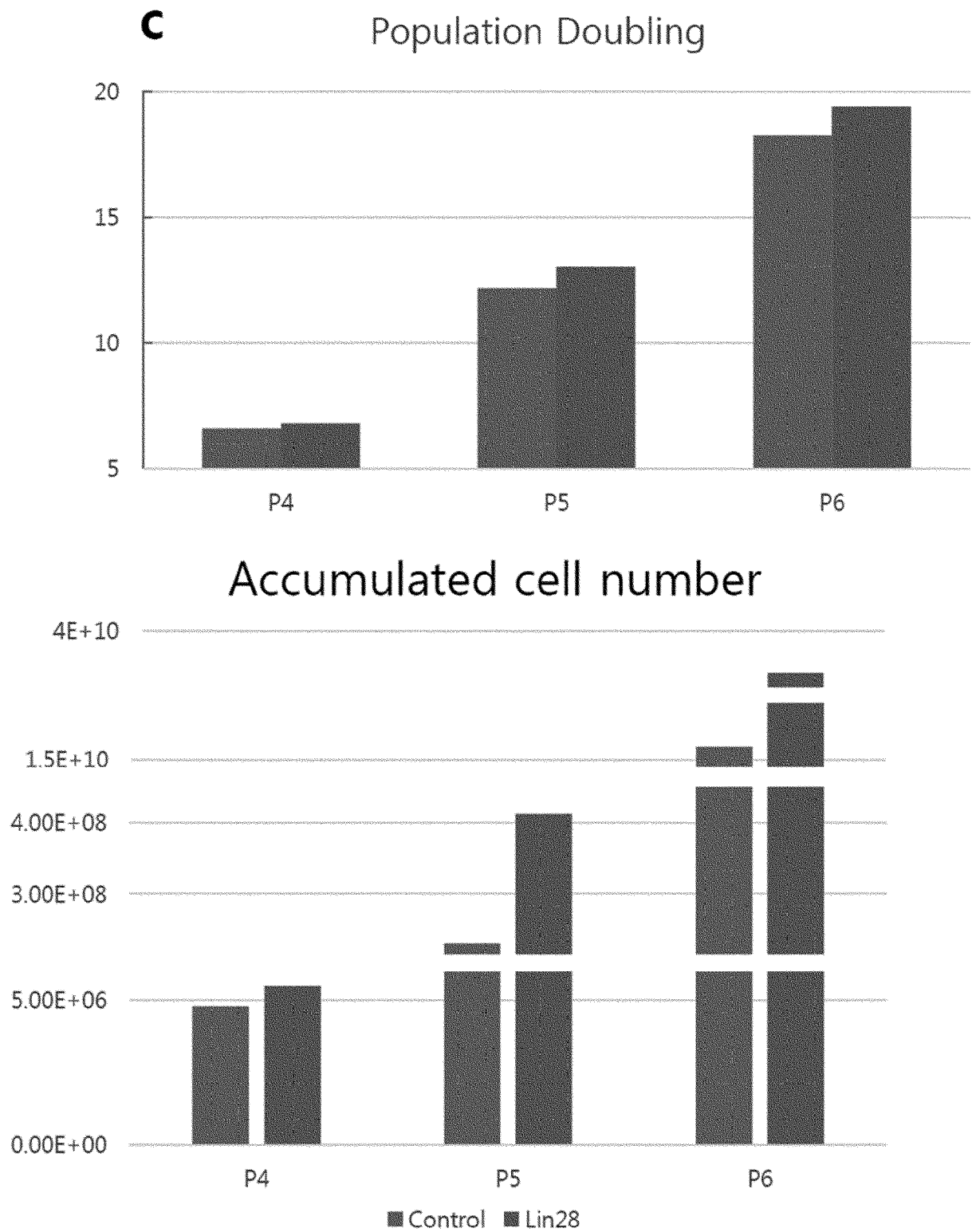
[도14a]



[도 14b]



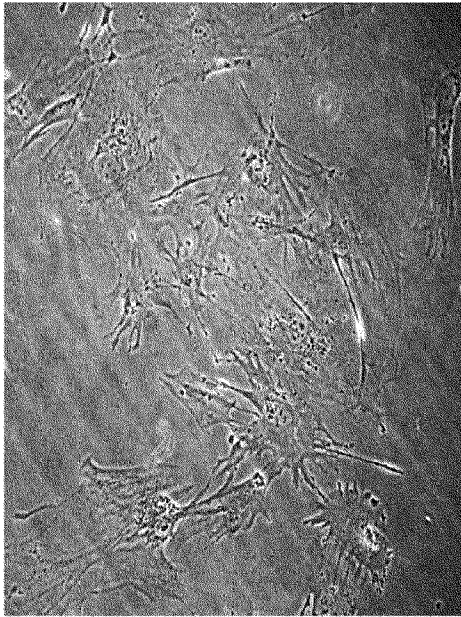
[도14c]



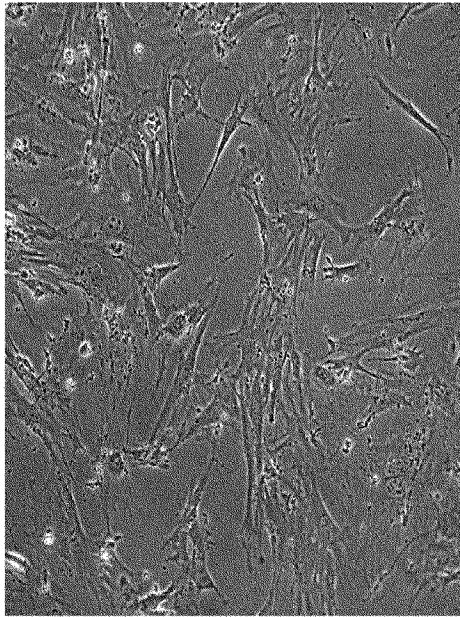
[도15a]

a

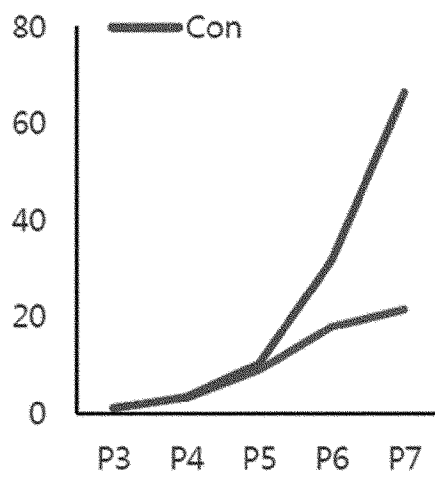
P7 Con



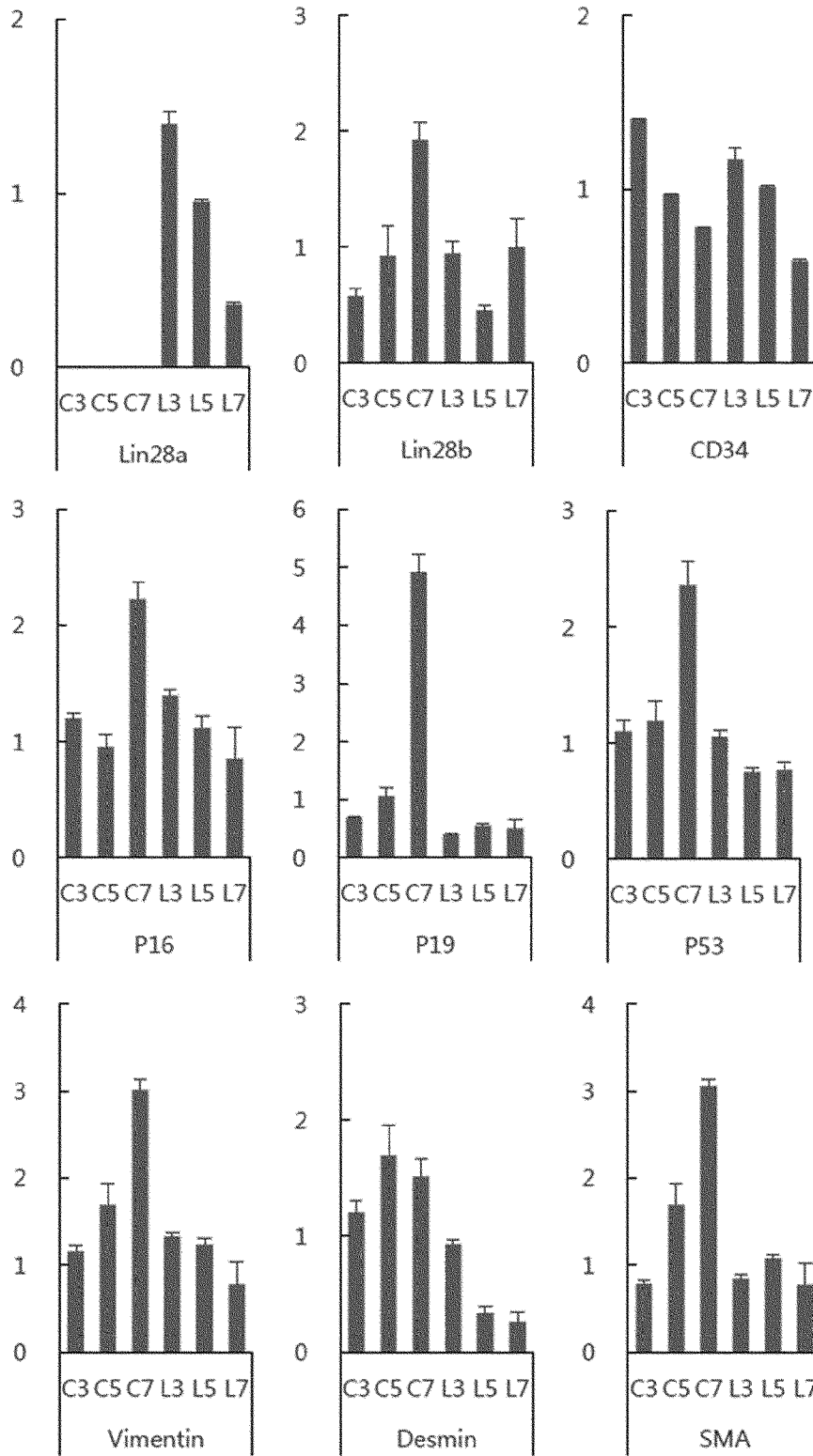
P7 Lin



Total cell number
($\times 10^6$)



[도15b]

b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000504**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 35/30(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 35/761(2014.01)i, C12N 5/0797(2010.01)i, C12N 15/861(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 35/30; C12N 5/10; A61K 31/7105; C12N 15/86; A61K 48/00; C12N 15/11; A61K 31/7088; A61K 35/761; C12N 5/0797; C12N 15/861

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: Lin28, neural stem cell, stem cell, vector, nervous disorder

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YANG, M. et al., "Lin28 Promotes the Proliferative Capacity of Neural Progenitor Cells in Brain Development", Development, 2015, vol. 142, pages 1616-1627 See abstract; pages 1616, 1620; and figures 3, 4.	1-17
X	CIMADAMORE, F. et al., "SOX2-LIN28/let-7 Pathway Regulates Proliferation and Neurogenesis in Neural Precursors", Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, vol. 110, no. 32, pages E3017-E3026 See abstract; pages E3017, E3020; and figures 3, 4.	1,3-4,7,11-13,17
A	WO 2013-126605 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 29 August 2013 See the entire document.	1-17
A	WO 2012-135081 A2 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION et al.) 04 October 2012 See the entire document.	1-17
A	WO 2009-048932 A2 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 16 April 2009 See the entire document.	1-17



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

19 APRIL 2017 (19.04.2017)

Date of mailing of the international search report

19 APRIL 2017 (19.04.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000504

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.: **18, 19**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 18 and 19 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain to 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/KR2017/000504

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2013-126605 A1	29/08/2013	US 2015-0148405 A1	28/05/2015
WO 2012-135081 A2	04/10/2012	EP 2688595 A2	29/01/2014
		EP 2688595 A4	10/12/2014
		US 2014-328858 A1	06/11/2014
		WO 2012-135081 A3	27/12/2012
WO 2009-048932 A2	16/04/2009	US 2010-0221266 A1	02/09/2010
		US 8283331 B2	09/10/2012
		WO 2009-048932 A3	16/07/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/30(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 35/761(2014.01)i, C12N 5/0797(2010.01)i, C12N 15/861(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/30; C12N 5/10; A61K 31/7105; C12N 15/86; A61K 48/00; C12N 15/11; A61K 31/7088; A61K 35/761; C12N 5/0797; C12N 15/861

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: Lin28, 신경줄기세포, 줄기세포, 벡터, 신경질환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	YANG, M. 등, 'Lin28 promotes the proliferative capacity of neural progenitor cells in brain development' Development, 2015, 142권, 페이지 1616-1627 초록; 페이지 1616, 1620; 및 도면 3, 4 참조.	1-17
X	CIMADAMORE, F. 등, 'SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors' Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110권, 32호, 페이지 E3017-E3026 초록; 페이지 E3017, E3020; 및 도면 3, 4 참조.	1,3-4,7,11-13,17
A	WO 2013-126605 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2013.08.29 전체 문헌 참조.	1-17
A	WO 2012-135081 A2 (CHILDREN' S MEDICAL CENTER CORPORATION 등) 2012.10.04 전체 문헌 참조.	1-17
A	WO 2009-048932 A2 (CHILDREN' S MEDICAL CENTER CORPORATION) 2009.04.16 전체 문헌 참조.	1-17

☐ 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

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

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 04월 19일 (19.04.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 04월 19일 (19.04.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



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: 18, 19
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제18항 및 제19항은 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 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
WO 2013-126605 A1	2013/08/29	US 2015-0148405 A1	2015/05/28
WO 2012-135081 A2	2012/10/04	EP 2688595 A2	2014/01/29
		EP 2688595 A4	2014/12/10
		US 2014-328858 A1	2014/11/06
		WO 2012-135081 A3	2012/12/27
WO 2009-048932 A2	2009/04/16	US 2010-0221266 A1	2010/09/02
		US 8283331 B2	2012/10/09
		WO 2009-048932 A3	2009/07/16