



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0129709
(43) 공개일자 2020년11월18일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 15/85</i> (2006.01) <i>A61K 35/30</i> (2015.01)
 <i>A61L 27/36</i> (2006.01) <i>A61P 25/00</i> (2006.01)
 <i>C12N 5/079</i> (2010.01) <i>G01N 33/50</i> (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 15/85</i> (2013.01)
 <i>A61K 35/30</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0054514
 (22) 출원일자 2019년05월09일
 심사청구일자 2019년05월09일</p> | <p>(71) 출원인
 울산과학기술원
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(72) 발명자
 김정범
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 이현아
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(74) 대리인
 리엔목특허법인</p> |
|---|---|

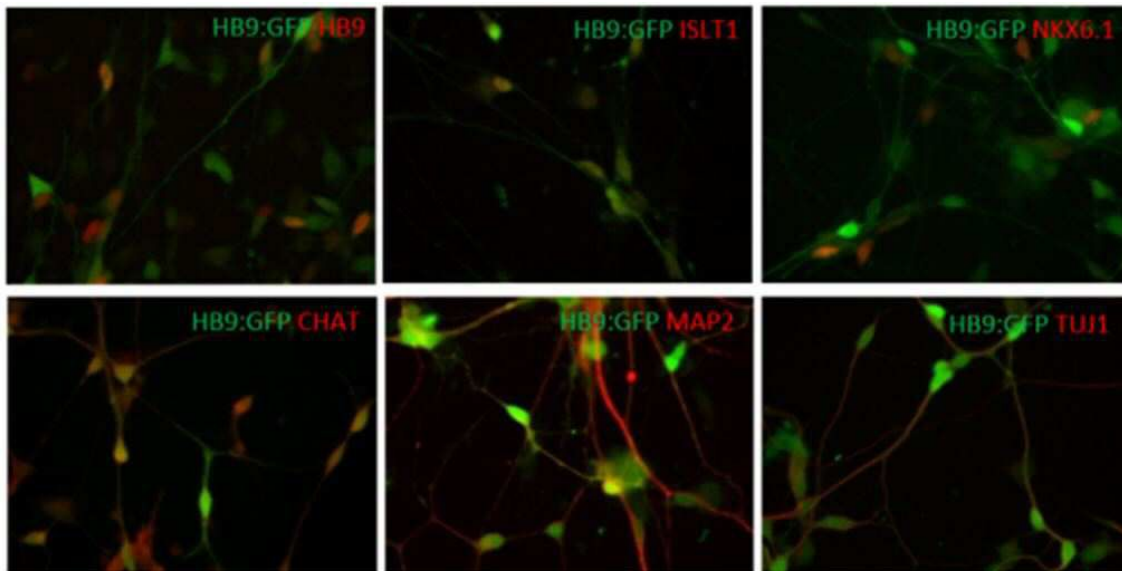
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **체세포로부터 운동뉴런으로의 직접교차분화 유도용 조성물 및 이의 이용방법**

(57) 요약

체세포로부터 운동뉴런(motor neuron)로의 직접교차분화 유도용 조성물, 상기 조성물을 체세포에 도입하여 직접 교차분화 유도된 운동뉴런, 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 세포치료제 및 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료 약물의 스크리닝용 조성물 및 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체소재 조성물에 관한 것이다. 일 양상의 조성물을 이용하면 직접교차분화 유도인자 발현을 통해 역분화줄기세포의 전분화능(Pluripotency) 단계를 거치지 않고 체세포로부터 운동뉴런으로 효율적으로 분화를 유도할 수 있어, 이를 이용하면 신경계 질환 및 손상에 대한 효과적인 예방 및 치료가 가능하다. 또한 일 양상의 유도된 운동뉴런을 이용하면 종래 난치성 질환으로 알려진 신경계 질환 및 손상을 치료할 수 있는 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체소재 조성물로 사용될 수 있어 재생치료분야에서 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61L 27/3675 (2013.01)

A61P 25/00 (2018.01)

C12N 5/0618 (2013.01)

G01N 33/5058 (2013.01)

C12N 2503/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질;

(2) 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및

(3) 상기 핵산분자가 도입된 벡터;

로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는, 체세포로부터 운동 뉴런(motor neuron)으로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 2

청구항1에 있어서, 상기 조성물은

OCT4 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 및 상기 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이상; 및

LHX3, ISL1, NKX6.1, NGN2 및 SOX11로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 및 상기 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상;

을 포함하는 체세포로부터 운동 뉴런(motor neuron)으로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 체세포는 섬유아세포 (fibroblast), 상피세포, 근육세포, 신경세포, 모발세포, 모근세포, 모낭세포, 구강상피세포, 소변에서 추출한 체세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, B세포, 주피세포, 성상교세포(astrocyte) 혈액세포, 신경 줄기세포, 조혈모 줄기세포, 제대혈 줄기세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 체세포로부터 운동 뉴런(motor neuron)으로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스(Retrovirus) 벡터, HIV(Human immunodeficiency virus) 벡터, MLV(Murineleukemia virus)벡터, ASLV(Avian sarcoma/leukosis) 벡터, SNV(Spleen necrosis virus)벡터, RSV(Rous sarcoma virus)벡터, MMTV(Mouse mammary tumor virus) 벡터, 아데노바이러스(Adenovirus) 벡터, 아데노 관련 바이러스(Adenoassociatedvirus) 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 벡터 및 에피조말(episomal) 벡터로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 벡터인 것을 특징으로 하는, 체세포로부터 운동 뉴런(motor neuron)으로의 직접교차분화 유도용 조성물.

청구항 5

(1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질;

(2) 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및

(3) 상기 핵산분자가 도입된 벡터;

로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물을 체세포에 접촉 또는 삽입시키는 단계를 포함하는, 체세포를 운동뉴런으로 직접교차분화하는 방법.

청구항 6

(1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및

(2) 상기 핵산분자가 도입된 벡터;

로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 체세포에 도입시켜 직접교차분화 유도된 운동뉴런.

청구항 7

청구항 1의 조성물 또는 청구항 6의 상기 직접교차분화 유도된 운동뉴런을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 신경계 질환 및 손상은 척수 손상, 파킨슨병, 뇌졸중, 근위축성 척수측색경화증, 운동 신경손상, 외상에 의한 말초신경손상, 허혈성 뇌손상, 신생아 저산소성 허혈성 뇌손상, 뇌성마비, 간질, 난치성 간질, 알츠하이머병, 선천성 대사성 신경계질환 및 외상성 뇌손상(traumatic brain injury)으로 이루어진 군에서 선택된 질환 및 손상인 것인 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

청구항 6의 상기 직접교차분화 유도된 운동뉴런을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료용 세포 치료제.

청구항 10

청구항 7에 있어서, HB9 단백질을 더 포함하는 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

청구항 6의 상기 직접교차분화 유도된 운동뉴런을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료 약물 스크리닝용 조성물.

청구항 12

청구항 6의 직접교차분화 유도된 운동뉴런을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 및 손상 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체소재 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

체세포로부터 운동뉴런(motor neuron)로의 직접교차분화 유도용 조성물, 상기 조성물을 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 운동뉴런, 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 세포치료제, 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료 약물 스크리닝용 조성물 및 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체소재 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

기존의 배아줄기세포 및 역분화줄기세포를 이용한 운동뉴런 분화방법은 배아를 파괴하여 배아줄기세포를 확립하거나 체세포에서 역분화줄기세포의 단계로 역분화 과정(Reprogramming)하고 다시 운동뉴런으로 분화단계(Differentiation)를 거쳐야 세포를 제작할 수 있었다. 아울러 종래의 방법은 배아줄기세포를 이용한다는 점에서 윤리적 문제가 발생할 수 있으며, 또한 역분화줄기세포를 이용할 경우 분화를 수행하는 단계에 있어서 시간적, 금전적 비용과 노력이 소요되나 수율(efficiency)이 낮고, 인위적인 분화능의 조절이 용이하지 않아 비효율

적인 방법인 문제가 있었다. 또한 시험관수준에서 약물대사와 독성 검증에 요구되는 충분한 수의 세포를 확보하기 어렵고, 운동뉴런 기능 재생을 위한 세포치료를 적용단계에서 미분화세포로부터 유래한 기형종(teratoma)이 형성될 가능성이 높아 상기 세포를 사용하는데 안전성의 문제가 있었다.

[0003] 상기와 같은 기형종 형성 위험성을 없애기 위하여, 만능줄기세포 상태를 통하지 않고 체세포를 다른 계통의 체세포로 또는 다분화능 줄기세포로 직접교차분화하기 위한 연구가 진행되고 있으나, 이러한 세포 리프로그래밍과 정의 기작은 유도를 위해 사용된 유전자의 수가 너무 많아 자세한 기작을 규명하기 어렵기 때문에 현재까지 밝혀진 수준이 미미한 상태이다. 또한, 역분화기술이 확립이 되었음에도 실제 치료적용을 위해서는 기술적으로 간편하고 효율이 높은 방법을 계속해서 개발해야만 하고 이렇게 개발된 기술들은 모두 효율과 안전성 측면에서 평가되어야 하므로 제한적이다. 아울러, 아직까지 체세포로부터 수개의 유전자만을 발현시켜 운동뉴런을 제조하는 방법은 알려진 바가 없다.

[0004] 이에 본 발명자들은 체세포에서 운동뉴런으로 직접교차분화 방법에 관한 연구를 수행하던 중 특정 유전자의 전사인자를 체세포에 이소성 발현을 유도하면 효과적으로 체세포를 뉴런세포로 유도할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 (1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질; (2) 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 (3) 상기 핵산분자가 도입된 벡터; 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는, 체세포로부터 운동 뉴런(motor neuron)으로의 직접교차분화 유도용 조성물에 관한 것이다.

[0006] 다른 양상은 (1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질; (2) 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 (3) 상기 핵산분자가 도입된 벡터; 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물을 체세포에 접촉 또는 삽입시키는 단계를 포함하는, 체세포를 운동뉴런으로 직접교차분화하는 방법에 관한 것이다.

[0007] 다른 양상은 (1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 (2) 상기 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 체세포에 도입시켜 직접교차분화 유도된 운동뉴런에 관한 것이다.

[0008] 다른 양상은 직접교차분화 시켜 유도된 운동뉴런을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 세포치료제에 관한 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 직접교차분화 유도된 운동뉴런을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료 약물 스크리닝용 조성물에 관한 것이다.

[0010] 또 다른 양상은 신경계 질환 및 손상 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체소재 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일 양상은 (1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질; (2) 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 (3) 상기 핵산분자가 도입된 벡터; 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는, 체세포로부터 운동 뉴런(motor neuron)으로의 직접교차분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0012] 다른 양상은 (1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질; (2) 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자;

및 (3) 상기 핵산분자가 도입된 벡터; 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물을 체세포에 접착 또는 삽입시키는 단계를 포함하는, 체세포를 운동뉴런으로 직접교차분화하는 방법을 제공한다.

- [0013] 다른 양상은 (1) OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 (2) 상기 핵산분자가 도입된 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 체세포에 도입시켜 직접교차분화 유도된 운동뉴런을 제공한다.
- [0014] 다른 양상은 직접교차분화 시켜 유도된 운동뉴런을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 세포치료제를 제공하는 것이다.
- [0015] 또 다른 양상은 직접교차분화 유도된 운동뉴런을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료 약물 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [0016] 또 다른 양상은 신경계 질환 및 손상 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체소재 조성물을 제공한다.
- [0017] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0018] 용어 '직접교차 분화(Direct Conversion)'는 고등생물에서 전혀 다른 세포타입을 가지는 성숙한(분화가 끝난) 세포간의 전환을 유도하는 과정을 말한다(Kim, J. et al, Neurobiol. 22, 778-784, 2012). 이는 유도만능줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)로 리프로그래밍 하고 이를 재분화하여 목적하는 세포로 만들어야 하는 종래 기술과 달리, 유도만능줄기세포단계를 거치지 않고 바로 목적하는 세포로의 전환을 유도한다는 점에서 차이를 가지며, 현재 직접교차분화는 질병모델링과 신약 개발 등에 이용될 가능성을 인정받고 있어 유전자 치료 및 재생의학 등에도 응용될 수 있는 기술로 알려져 있다.
- [0019] 일 양상에서 제공되는 직접교차분화 유도용 조성물은 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질; (2) 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 (3) 상기 핵산분자가 도입된 벡터; 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0020] 일 양상의 상기 조성물은 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함할 수 있다. 예를 들면 상기 조성물은 OCT4, LHX3, ISL1, NKX6.1, NGN2 또는 SOX11를 포함할 수 있고, OCT4 및 LHX3; OCT4 및 ISL1; OCT4 및 NKX6.1; OCT4 및 NGN2; OCT4 및 SOX11; OCT4, LHX3 및 ISL1; OCT4, LHX3 및 NKX6.1; OCT4, LHX3, 및 NGN2; OCT4, LHX3, 및 SOX11의 조합을 포함할 수 있다.
- [0021] 일 양상의 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 발현하는 벡터에 삽입된 상태로 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 전달체를 의미할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.
- [0024] 구체적인 일실시예로 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질,

ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하여 운동뉴런으로의 직접교차분화를 확인하였다.

[0025] 또한 본 발명의 조성물은 운동뉴런을 직접교차 분화 유도할 수 있는 전사인자를 벡터를 통하여 도입할 수 있는데, 본 발명에서 사용할 수 있는 벡터는 예컨대 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스(Retrovirus) 벡터, HIV(Human immunodeficiency virus) 벡터, MLV(Murineleukemia virus)벡터, ASLV(Avian sarcoma/leukosis) 벡터, SNV(Spleen necrosis virus)벡터, RSV(Rous sarcoma virus)벡터, MMTV(Mouse mammary tumor virus) 벡터, 아데노바이러스(Adenovirus) 벡터, 아데노 관련 바이러스(Adenoassociatedvirus) 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 벡터 및 에피조말(episomal) 벡터로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 벡터일 수 있다.

[0026] 일 양상의 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질은 이의 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터의 형태로 제공될 수 있다. 상기 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 인간, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 포유 동물 유래의 모든 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 사용 가능한 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 이들의 야생형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질의 변이체 (예컨대, 각 단백질의 아형(subtype)들)를 포함할 수 있다.

[0027] OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질의 변이체란 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백

질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질의 천연 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 천연 아미노산 서열과 상이한 서열을 가지면서 천연(wild-type) 단백질의 고유의 생물학적 기능을 유지하는 단백질을 의미한다. 상기 변이체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이거나 필요에 의해서 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체일 수 있고, 물리, 화학적 환경에 대한 구조적 안정성이 증대되거나 생리학적 활성이 증대된 변이체일 수 있다.

[0028] 상기 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질 또는 이의 변이체는 천연에서 분리되거나, 제조합적 또는 합성적으로 제조된(non-naturally occurring) 것 일 수 있다.

[0029] 또한, 상기 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 상기 단백질을 코딩하는 염기서열로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 상기 단백질을 코딩하는 염기서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA) 또는 RNA (mRNA) 분자일 수 있다.

[0030] 구체적인 일 실시예에서는 렌티바이러스를 통한 OCT4 또는 OCT4 및 LHX3의 직접교차분화인자를 체세포의 대표예로서 선택된 섬유아세포에 도입하고 상기 인자를 이소성 발현시켜 섬유아세포를 운동뉴런으로 직접교차분화시켰다. 또한 상기 유도된 운동뉴런에 Reverse transcription PCR을 수행하여 직접교차분화 인자를 도입하기 전의 섬유아세포와는 다른 운동뉴런 마커가 유도된 운동뉴런에 나타내는 것을 확인하였다.

[0031] 용어 "체세포"는, 생식세포를 제외한 모든 세포를 의미하는 것일 수 있으며, 예컨대, 인간, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 포유 동물 유래의 것 또는 분리된 것일 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 체세포를 운동뉴런으로 직접교차 분화 유도할 수 있는데, 상기 체세포는 섬유아세포 (fibroblast), 상피세포, 근육세포, 신경세포, 모발세포, 모근세포, 모낭세포, 구강상피세포, 소변에서 추출한 체세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, B세포, 주피세포, 성상교세포(astrocyte) 혈액세포, 신경 줄기세포, 조혈모 줄기세포, 체대혈 줄기세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 다만, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 체세포를 섬유아세포로 사용하였다.

[0032] 용어 "운동뉴런 (motor neuron)"은 신경계를 구성하는 뉴런의 한 종류로, 척수와 같은 중추신경계에서 오는 신호를 근육이나 샘과 같은 반응기(effector)에 전달해서 작동하게 하는 뉴런을 말한다. 또한, "유도된 운동뉴런"은 예를 들어, 일 양상에 따른 직접교차분화를 통하여 체세포로부터 유도된 운동뉴런을 의미할 수 있다.

[0033] 일 구체예에서는 상기 직접교차분화 방법은 체세포를 배지에서 배양하는 단계, 상기 배양한 체세포에 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자를 삽입한 벡터를 형질감염(transfection) 시키는 단계, 및 상기 감염된 체세포를 직접교차분화를 유도할 수 있는 배양조건에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 또한 상기 직접교차분화 방법에서는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질,

NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질 유전자를 체세포에 형질감염시키는 단계를 추가적으로 더 포함할 수 있다.

[0034] 상기 체세포의 배양에 사용되는 배지는 당해 분야에서 체세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함한다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 프로타민 설페이트(protamine sulphate)를 함유하는 배지를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 또한, 상기 체세포를 직접교차분화를 유도할 수 있는 배양조건은 당해 분야에서 체세포에 대하여 직접교차분화를 유도하는 데 통상적으로 사용되는 배지 및/또는 통상적인 배양 조건을 포함할 수 있다.

[0036] 상기 직접교차분화 유도용 조성물을 체세포에 도입하는 단계를 통하여, OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4), LHX3 (LIM homeobox 3), ISL1 (ISL LIM homeobox 1), NKX6.1 (NK6 homeobox 1), NGN2 (neurogenin 2) 및 SOX11 (SRV-box 11) 등의 직접교차분화인자들의 이소성 발현 (Ectopic expression)을 유도할 수 있다. 이소성 발현이란, 어떤 유전자가 원래 발현하는 조직이나 세포 외에서 발현하는 것, 또는 원래 발현하는 시기와 다른 시기에 발현하는 것을 의미한다. 본 발명의 방법에 따르면 체세포로부터 운동뉴런이 효과적으로 제조될 수 있다.

[0037] 일 양상에서 개시된 방법 및 조성물에 의하여 유도된 운동뉴런은 본래 세포 유래의 마커를 발현하지 않으면서 오로지 운동뉴런에서 발견되는 마커가 나타나는 것을 특징으로 한다. 일 양상에서는 직접교차분화 유도된 운동뉴런을 수득하기 위하여 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 포함하는 조성물을 활용하여 직접교차분화를 유도할 수 있다. OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 포함한 조성물로 운동뉴런으로의 직접교차분화를 확인하였다. 또한 구체적인 일실시예로 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 더 포함시키고, 상기 조성물에 의한 체세포로부터 운동뉴런으로의 직접교차분화를 확인하였다. 또한 상기 직접교차분화 유도된 운동뉴런은 상기 조성물에 포함된 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질을 코딩하는 핵산분자는 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) 단백질, LHX3 (LIM homeobox 3) 단백질, ISL1 (ISL LIM homeobox 1) 단백질, NKX6.1 (NK6 homeobox 1) 단백질, NGN2 (neurogenin 2) 단백질 및 SOX11 (SRY-box 11) 단백질에 의하여 제공될 수 있다.

[0038] 용어 "예방"은 신경계 질환 및 손상의 병인을 제거하거나 조기 발견하여 해당 질환을 막는 모든 행위를 의미한다.

[0039] 용어 "치료"는 본 발명의 구성물에 의해 신경계 질환 및 손상에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0040] 예방 또는 치료가 가능한 상기 신경계 질환 및 손상은 예컨대 척수 손상, 파킨슨병, 뇌졸중, 근위축성 척수측색경화증, 운동신경손상, 외상에 의한 말초신경손상, 허혈성 뇌손상, 신생아 저산소성 허혈성 뇌손상, 뇌성마비, 간질, 난치성 간질, 알츠하이머병, 선천성 대사성 신경계질환 및 외상성 뇌손상(traumatic brain injury)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 신경계의 기능 저하, 소실, 및/또는 비정상적 기능에 의하여 야기되는 모든 질병 및/또는 병적 증상을 포함할 수 있다.

- [0041] 상기 조성물은 유도된 운동뉴런과 함께 신경계 질환 및 손상 예방 또는 치료 효과를 가지는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 예컨대 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 조성물은 실제 임상투여시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 예컨대 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다.
- [0044] 상기 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위하여 본 발명의 직접교차분화 유도된 운동뉴런은 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때 예를 들어 약 1,000~10,000 세포/회, 1,000~100,000세포/회, 1,000~1000,000 세포/회, 1,000~10,000,000, 1,000~100,000,000 세포/회, 1,000~1,000,000,000세포/회, 1,000~10,000,000,000 세포/회로, 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회에 분할 투여할 수도 있고, 일정 시간 간격으로 여러 번 투여할 수 있다.
- [0045] 상기 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육 또는 피하 내 주사에 의해 투여될 수 있으며, 피부에 도포되는 방식이라는 어떤 경로로든지 투여될 수 있다.
- [0046] '개체'란 신경계 질환 및 손상의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0047] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 신경계 질환 및 손상의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다. 상기 직접교차분화 유도된 운동뉴런을 포함하는 약학적 조성물에 HB9 단백질을 더 포함할 수 있다.
- [0048] 용어 “세포치료제”는 조직의 기능을 복원하기 위하여 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 이용한 치료제로, 암의 억제를 위해 사용되는 치료제를 의미한다. 상기 직접교차분화 유도된 운동뉴런을 유효성분으로 포함하면 신경계 질환 및 손상의 치료 및 예방을 위한 세포 치료제로 활용할 수 있다.
- [0049] 상기 세포치료제는 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 예컨대 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, HSA(Human serum albumin) 및 이들 성분 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 및 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- [0050] 상기 세포치료제는 예컨대 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가할 수 있으며, 예컨대 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형으로 제제화 할 수 있다.
- [0051] 상기 신경계 질환 및 손상의 예방 또는 치료 약물 스크리닝용 조성물은 신경계 질환 및 손상의 치료 후보 물질의 존재 및 부재하에서 본 발명의 분화 유도된 운동뉴런의 반응성을 확인하는 방법으로 신경계 질환 및 손상의 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다. 예를 들어, 일 양상의 분화 유도된 운동뉴런은 신경계 질환 및 손상 질환의 회복 또는 치료에 중요한 세포로서 후보 물질에 대한 독성 또는 약효를 평가하는데 사용할 수 있다.
- [0052] 상기 독성의 평가는 일 양상의 치료 후보 물질의 존재 및 부재하에서 또는 본 발명의 분화 유도된 운동뉴런의 IC₅₀ 등 당업계에서 통상적으로 독성을 판단하는 방법에 따라 평가할 수 있다. 또한, 상기 약효의 평가는 일 양

상의 치료 후보 물질의 존재 및 부재하에서 본 발명의 분화 유도된 운동뉴런이 손상된 신경의 재생을 촉진하는 등 당업계에서 신경계 질환 및 손상질환의 치료에 효과가 있음을 확인할 수 있는 방법에 따라 평가할 수 있다.

[0053] 상기 3D 프린팅 기술은 3차원(3D)의 입체적 고체 물질을 프린트하는 출력 기술에 대한 것으로, 상기 3D 프린팅 생체소재 조성물은 생체모방, 소형조직 및 자율성 자가조립의 특징을 가지는 생체적합성 고분자, 천연고분자, 바이오분자, 생체활성물질, 세포를 의미한다.

[0054] 일 양상에 의하면 직접교차분화 시켜 유도된 운동뉴런을 원하는 형상 또는 패턴으로 적층 조형함으로써 신경계 질환 및 손상 치료용 인공조직 제작이 가능하여 재생치료분야에서 널리 활용될 수 있다.

[0055] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

발명의 효과

[0056] 일 양상의 조성물을 이용하면 직접교차분화 유도인자 발현을 통해 역분화줄기세포의 전분화능 (Pluripotency) 단계를 거치지 않고 체세포로부터 운동뉴런으로 효율적으로 분화를 유도할 수 있어, 이를 이용하면 신경계 질환 및 손상에 대한 효과적인 예방 및 치료가 가능하다. 또한 일 양상의 유도된 운동뉴런을 이용하면 종래 난치성 질환으로 알려진 신경계 질환 및 손상을 치료할 수 있는 치료용 약학 조성물 및 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체소재 조성물로 사용될 수 있어 재생치료분야에서 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1a는 섬유아세포로부터 운동뉴런을 직접교차분화하여 유도하는 과정을 모식화한 도이다.
 도 1b는 3차원 배양하여 제조한 유도된 운동뉴런의 조직학적 형태를 확인한 결과에 관한 것이다.
 도 2는 단일 또는 조합 직접교차분화인자 유전자로 유도된 운동뉴런에서 HB9 유전자 발현을 확인한 결과(도 2A) 및 상기 인자로 유도된 운동뉴런의 직접교차분화의 효율을 확인한 결과(도 2B)를 나타낸 도이다.
 도 3는 유도된 운동뉴런에 대한 면역 형광 염색을 수행한 결과를 나타낸 도이다.
 도 4는 유도된 운동뉴런(유도운동뉴런 중층세포, OCT4 감염으로 제조한 유도운동뉴런세포, OCT4 감염 후 LHX3를 처리한 유도운동뉴런세포)에서 발현되는 운동뉴런 마커를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 5는 유래세포인 섬유아세포 대비 유도된 운동뉴런에서 나타나는 상대적 유전자 발현양 차이를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 6는 마우스 척수 손상 모델의 신경 손상 치료효과를 대조군 마우스와 대비한 결과를 운동회복기능 회복정도를 확인할 수 있는 지수인 BBB 스코어(BBB score)를 확인한 결과(도 6A)에, 척수 부분에 H&E 염색을 수행하여 나타낸 결과(도 6B)를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실험예 및 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실험예 및 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실험예 및 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0059] [실험예 및 실시예]

[0060] <실험예 1> 클로닝 및 렌티바이러스 플라스미드의 패키징

[0061] 전사 인자(OCT4 및 LHX3)를 HepG2의 cDNA를 이용하여 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)으로 증폭시켰다. 이후, 상기 전사인자를 렌티 바이러스 벡터로 이동시키고 염기 서열 분석으로 이를 확인하였다. 렌티바이러스의 패키징을 X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche, 06365787001)를 사용하여 렌티바이러스 트랜스퍼 플라스미드 (lentiviral transfer plasmid), 패키징 플라스미드(packaging plasmid, psPAX2) 및 엔벨로프 플라스미드 (envelope plasmid, VSV-G)를 각각 3 대 2 대 1비율로 첨가하여 수행하였다. DMEM을 첨가하여 총 부피를 200 μ l로 한 혼합물을 50 % 컨플루언시(confluent) 상태의 293T 세포에 처리하여 48시간 동안 형질전환시켰다. 세포 배지를 초원심분리기에서 1시간 30분 동안 80,000g에서 원심 분리하였으며, 이후 원심 분리된 렌티 바이러스 펠

렛을 1ml의 DMEM (Gibco, 10313-021)에 희석하고 형질전환에 사용하였다.

[0062] <실험예 2> 세포 배양 배지 및 유도운동뉴런(induced motor neurons, iMN)의 제조

[0063] 피부 섬유아세포를 10% FBS 배양 배지 내 젤라틴 코팅된 6well 플레이트 위에 3×10^4 cells로 분주하였다. 하루 후에, 섬유아세포를 $6 \mu\text{g/ml}$ 의 프로타민 설페이트를 함유하는 배지에서 OCT4, LHX3, ISL1, NKX6.1, NGN2, SOX11을 각각 발현하는 pMX 레트로바이러스 벡터와 OCT4 및 LHX3; OCT4 및 ISL1; OCT4 및 NKX6.1; OCT4 및 NGN2; OCT4 및 SOX11; OCT4, LHX3 및 ISL1; OCT4, LHX3 및 NKX6.1; OCT4, LHX3 및 NGN2; OCT4, LHX3 및 SOX11 조합을 발현하는 pMX 레트로바이러스 벡터로 감염시켜 유도운동뉴런을 제조하였다. 이후, 바이러스 상층액을 제거하고 새로운 배지로 대체하였다. 벡터로 섬유아세포를 감염시킨 이후, 제조한 iMN을 운동뉴런 분화 배지인 PDL/laminin-coated 4-well 플레이트에 플레이팅하였다. 플레이팅 이후 세포를 배양시키고 뉴런세포 군집을 기계적으로 분리하고 젤라틴 코팅된 플레이트에서 성숙한 iMN를 선별(picking)하거나 트립신처리하여 계대배양(subculture) 하였다.

[0064] <실험예 3> RNA 추출 및 cDNA 합성

[0065] 세포 용해물의 total RNA를 RiboEX (Geneall, 301-001)에서 추출하였다. RNA 추출은 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. 총 $20 \mu\text{l}$ 의 반응 혼합물에 500ng의 RNA 및 oligo-dT 프라이머를 첨가하여 M-MuLV-역전사효소(NEB, M0253L)로 cDNA를 합성하였다.

[0066] <실험예 4> RT-PCR 분석

[0067] 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)은 Taq polymerase (Invitrogen, 10342-020)와 프라이머 쌍을 사용하여 58℃에서 35사이클로 수행하였다. PCR 생성물을 1% 아가로스 겔에서 100V로 겔 전기 영동을 25 분 동안 수행하고, 이를 운동뉴런 마커 유전자와 운동뉴런 전구 및 신경외배엽 마커에 대하여 실험은 3회 반복하여 실시하였고 항존유전자(housekeeping gene) Gapdh로 정상화하였다. 유전자 발현은 Ct 값 계산 방법으로 측정하여 분석하였으며, 모든 실험은 제조업체의 설명에 따라서 수행하였다.

[0068] <실험예 5> 면역 형광 염색

[0069] 세포를 실온에서 10분간 4% 파라 포르말데히드(Tech & Innovation, BPP-9004)로 고정시켰다. 고정된 세포를 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Corning, 21-031-CV)로 3번 세척하였다. 이후 실온에서 10분 동안 0.1% Triton X-100 (Sigma, T9284)을 포함한 DPBS로 세포를 침투시켰다. DPBS로 3회 세척한 후, 4% FBS를 포함한 DPBS로 실온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 결합을 차단하였다. 이어서, 세포를 실온에서 1 차 항체와 함께 1 시간 동안 배양시킨 후, 0.05% Tween-20(Sigma, P7949)을 포함하는 DPBS로 3 회 세척하는 단계를 수행하였다. 이후 2차 형광 항체를 샘플에서 처리하고, 암소에서 1 시간 동안 배양하였다. 이중 염색이 필요한 상기의 절차에 따른 1차 항체를 처리하기 전 30 분 동안 추가적인 차단 단계를 수행하였다.

[0070] <실험예 6> 마이크로어레이 분석

[0071] 마이크로어레이 분석을 이용하여 섬유아세포, OCT4 감염 후의 섬유아세포로 유도운동뉴런 중층세포 (iMN intermediate cell), OCT4 감염만으로 제조한 유도운동뉴런(Mock_iMN) 및 OCT4 감염 후 LHX3를 처리하여 제조한 유도운동뉴런세포 (LHX3_iMN)의 전체적인 유전자 발현을 프로파일 분석하고 이를 각각 비교하였다. 전체 RNA는 제조업체의 지시에 따라 RNeasy mini kit (Qiagen)을 이용하여 분리하였다. 샘플은 Affymetrix array와 혼성화 하였다. RMA (Robust Multi-array Analysis) 알고리즘으로 계산하여 정상화하였다. 데이터 처리 및 그래픽은 내부에 개발된 Matlab으로 수행하였다. 유전자 및 샘플의 계층 클러스터링은 one minus correlation metric and the unweighted average distance (UPGMA) linkage 방법으로 수행하였다.

[0072] <실험예 7> 척수 손상 모델의 제조 및 유도 운동뉴런의 이식

[0073] 척수 손상 모델은 6주령의 남성 쥐에 척수의 가슴등뼈 level 9(T9)에 손상을 주기 위한 공기 펀치 장치를 이용하여 제작하였다. 손상 1주 후에, 수확한 iMNs를 DiI으로 표지하고 1×10^5 iMNs/rat 농도로 정위 고정방법(stereotaxic)으로 척수의 가슴등뼈 level 8(T8) 및 가슴등뼈 level 10(T10)에 각각 주입하였다. 쥐에게 규칙적으로 물과 음식을 제공하고 배뇨 작용을 위해 방광을 마사지 해주었다. 동물 실험 과정은 동물 시설(animal facility) 및 울산과학기술대학교의 IBR 위원회에서 승인받았다. 동물 실험 과정은 동물연구에 대한 미국국립보건원의 지침을 기반으로 하였다.

[0074] 실시예 1. 직접교차분화인자에 의한 유도운동뉴런(induced motor neurons, iMN)로의 유도

[0075] 운동뉴런으로 유도하기 위해서, 피부 섬유아세포를 배양 배지에 심고 24시간 동안 렌티바이러스 발현 시스템으로 운동뉴런으로의 유도를 야기하는 전사인자인 OCT4을 섬유아세포에 형질전환시켜 유도운동뉴런 중층세포(iMN intermediate cell)를 제조하였다. 이후, 렌티바이러스 발현 시스템으로 LHX3를 추가적으로 상기 세포에 도입하여 유도운동뉴런을 제조하거나 LHX3를 도입하지 않은 유도운동뉴런을 제조하였다. 이후, 이를 젤라틴으로 코팅한 배양접시에 피부 조직을 부착시키고 이를 배양하여 사용하였다. 상기 실험의 과정을 도식화하여 도 1a에 나타내었으며, 상기 유도된 운동뉴런을 3차원 배양한 세포의 조직학적 형태를 도 1b에 나타내었다.

[0076] 도 1b에 나타난 바와 같이, 렌티바이러스로 형질전환 이후 20일 정도에 집합체가 형성되며, 이를 3차원 배양시킨 후 5일째가 되면 전형적인 운동뉴런의 형태가 나타나는 것을 확인하였다. 상기와 같은 결과를 통하여 OCT4 및 LHX3을 체세포인 섬유아세포에 처리하여 상기 인자들의 이소성 발현(ectopic expression)을 유도하면 효과적으로 운동뉴런을 제조할 수 있음을 확인하였다. 특히 상기와 같은 과정에 의하여 유도된 운동뉴런은 실제 운동뉴런에서 나타나는 특징적인 형태가 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] 실시예 2. 직접교차분화인자에 의한 유도운동뉴런(induced motor neurons, iMN)로의 유도

[0078] 직접교차분화인자 단일 유전자 및 2개 이상의 유전자 조합을 체세포에 도입하여 운동뉴런으로 직접교차분화 유도를 시키는 경우에 직접교차 효율이 효과적으로 나타나는지 여부와 상기 직접교차 분화인자 조합 간 직접교차 효율 확인하는 실험을 수행하였다. 실험에 2와 동일한 조건으로 직접교차분화인자 단일 유전자와 이의 조합을 사용하여 유도운동뉴런을 제조하고, 제조한 운동뉴런에서 직접교차분화의 운동뉴런 마커인 HB9의 발현을 확인한 결과를 도 2A에 나타내고, 단일 유전자와 이의 조합 간 직접교차분화 효율을 측정한 결과를 도 2B에 나타내었다.

[0079] 도 2A에서 확인한 바와 같이, 운동뉴런 마커인 HB9는 단일 직접교차분화인자에서는 OCT4, LHX3, ISL1, NKX6.1, NGN2 및 SOX11순으로 HB9 마커의 발현이 낮아지는 것을 확인하였으며, 조합 인자에서는 OCT4 및 LHX3; OCT4, LHX3 및 ISL1; OCT4, LHX3 및 NKX6.1; OCT4 LHX3 및 NGN2; OCT4 LHX3 및 SOX11 조합에서 섬유아세포 대비 500 배 이상 운동뉴런 마커인 HB9의 발현량이 높아지는 것을 확인하였다. 또한, 도 2B에서 확인한 바와 같이, 단일 직접교차분화인자 유전자에서는 OCT4가 운동뉴런 마커인 HB9 단백질을 발현하는 세포가 가장 직접교차분화 효율이 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 조합 직접교차분화인자에 있어서는 모든 조합들이 효율이 60%이상을 나타내는 것을 확인하여, 단일인자보다는 직접교차분화의 효율이 높아지는 것을 확인하였다.

[0080] 실시예 3. 직접교차분화 유도된 운동뉴런의 특징 확인

[0081] 상기 실시예 1 및 2에서 유도된 운동뉴런(iMN)이 형태뿐 아니라 실제적인 운동뉴런의 특징을 나타내는지 여부를 확인하기 위하여, 웨스턴 블랏팅, RT-PCR 분석을 수행하고 동시에 면역 형광 염색을 수행하였다. 실험에 4 내지 6에 개시된 방법에 의하여 실험을 수행하였으며, 면역 형광 염색을 수행한 결과를 도 3에, 웨스턴블랏팅을 통하여 발현되는 유전자 마커를 확인한 결과를 도 4에, 유래세포인 섬유아세포 대비 유도된 운동뉴런에서 나타나는 상대적 유전자 발현량 차이를 확인한 결과를 도 5에 나타내었다.

[0082] 도 3에서 확인한 바와 같이, 제조된 iMN은 섬유아세포에서는 발현하지 않았던 운동뉴런 마커인 HB9, ISLT1, NKX6.1, MAP2, TUJ1 마커의 발현이 강하게 나타나는 것을 확인하였다. 또한 도 4에서 확인한 바와 같이, 유도운동뉴런 중층세포(iMN intermediate cell)은 ISLT1 및 MAP2 마커의 발현이 나타나는 것을 확인하였으며, OCT4만으로 운동뉴런을 유도한 군(+Mock_iMN)은 ISLT1 및 MAP2를 발현하면서 LIM1을 더 추가적으로 발현하는 것을 확인하였다. LHX3를 추가적으로 도입하여 유도한 운동뉴런군(+LHX3_iMN)은 LIM1, HB9, ISLT1, NKX6.1 및 MAP2를 모두 발현하는 것을 확인하였다.

[0083] 아울러 도 5에서 확인한 바와 같이, 유도운동뉴런 중층세포는 ISLT1의 발현이 현저하게 증가된 것이 확인되었으며, 또한 OCT4만으로 운동뉴런을 유도한 군인 Mock_iMN에서는 ISLT1, MAP2 및 LIM1의 발현이 10배 이상 상승한 것을 확인할 수 있었다. LHX3를 추가적으로 도입하여 유도한 운동뉴런군인 LHX3_iMN은 LIM1, HB9, ISLT1, NKX6.1, SCSL1 및 MAP2의 발현량이 모두 약 10배 이상 상승하는 것을 확인하였다.

[0084] 상기와 같은 결과에 따라서, 제조된 iMN은 형태뿐 아니라 운동뉴런 마커가 확연하게 나타나는 실제의 운동뉴런과 동일한 것을 확인하였다. 다만 도 3 및 도 4에서 확인한 바와 같이, 사용한 직접교차분화 전사 인자의 조합에 따라 확인할 수 있는 운동뉴런 마커의 발현 양상은 다소 상이할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0085] 따라서, 상기와 같은 결과들을 종합해 보면, 섬유아세포로부터 유도된 운동뉴런은 실제 운동뉴런과 동일한 것을

확인하여, 상기 실시예에 개시된 방법을 통하면 효율적으로 운동뉴런을 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0086] 실시예 4. 척수 손상 동물 모델에 iMN 투여를 통한 신경 손상 치료 효과의 확인

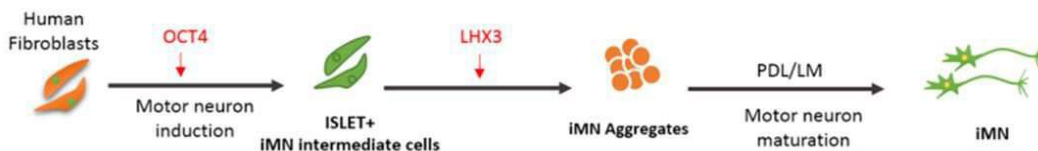
[0087] 상기 실시예를 통하여 제조된 운동뉴런이 척수손상 동물 모델에 투여된 경우에 치료효과가 나타나는지를 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 실험방법은 실험예 7과 같이 하였으며, iMN을 투여한 군과 추가적으로 유도된 iMN에 HB9를 더 병용하여 투여한 마우스 척수 손상 모델의 신경 손상 치료효과를 대조군 마우스와 대비한 결과를 운동회복기능 회복정도를 확인할 수 있는 지수인 BBB 스코어(BBB score)로 확인한 결과를 도 6A에, 척수 부분에 H&E 염색을 수행하여 확인한 결과를 도 6B에 나타내었다.

[0088] 상기 도 6A에서 나타난 바와 같이, iMN이 주입된 군은 대조군과 비교하여 시간이 지날수록 운동기능회복정도가 주입 이후 5주부터 현저하게 상승하는 것을 확인하였다. 또한 HB9를 병용하여 같이 투여한 군은 주입 이후 1주부터 꾸준히 운동기능회복이 증가하였으며, 특히 3주 이후부터는 현저하게 운동기능이 회복하는 것을 확인하였다. 또한 도 6B에 확인한 바와 같이, 유도된 iMN에 HB9를 더 병용하여 투여한 경우에는 대조군 대비 척수의 손상된 부분의 손상된 조직이 현저히 감소한 것을 확인하였다.

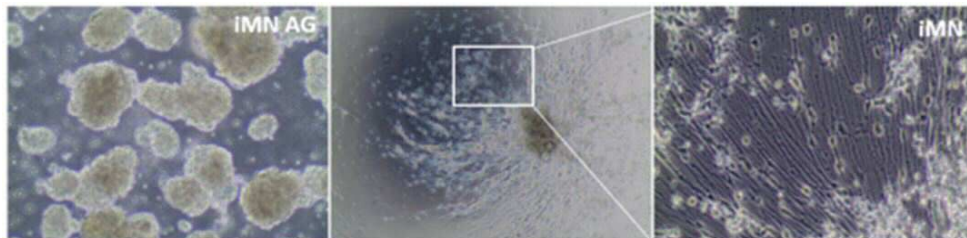
[0089] 상기와 같은 결과를 통하여 유도된 운동뉴런을 투여하면 신경계 질환 및 손상을 을 효과적으로 치료할 수 있어, 상기 질환 등을 예방 또는 치료할 수 있는 치료제 조성물로 활용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

도면

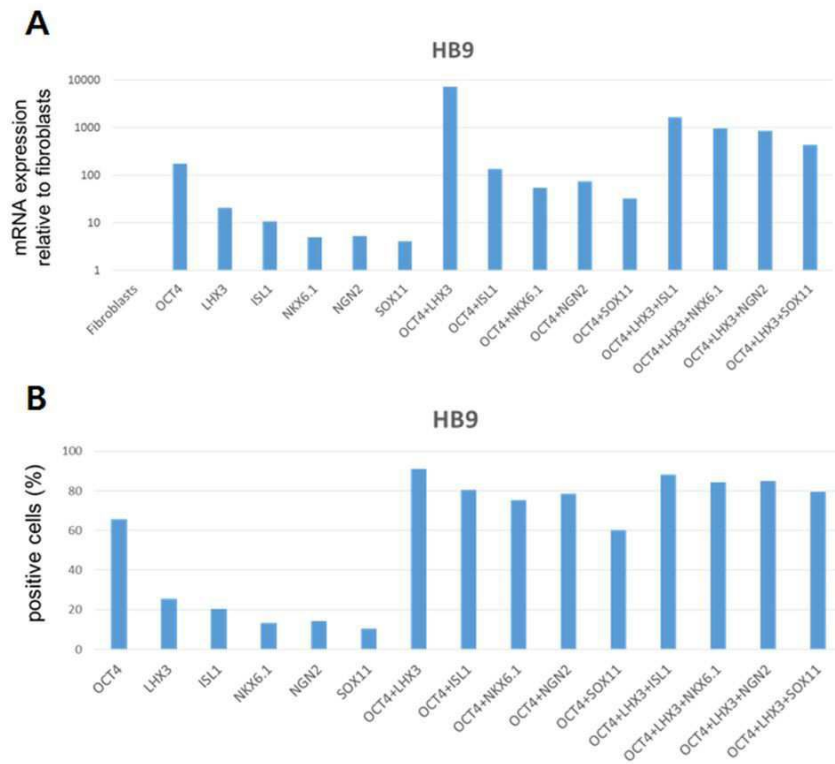
도면1a



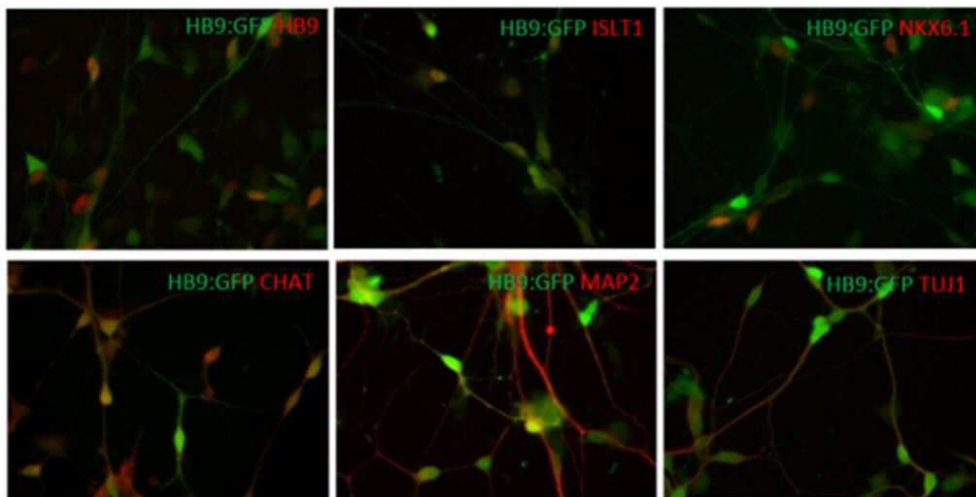
도면1b



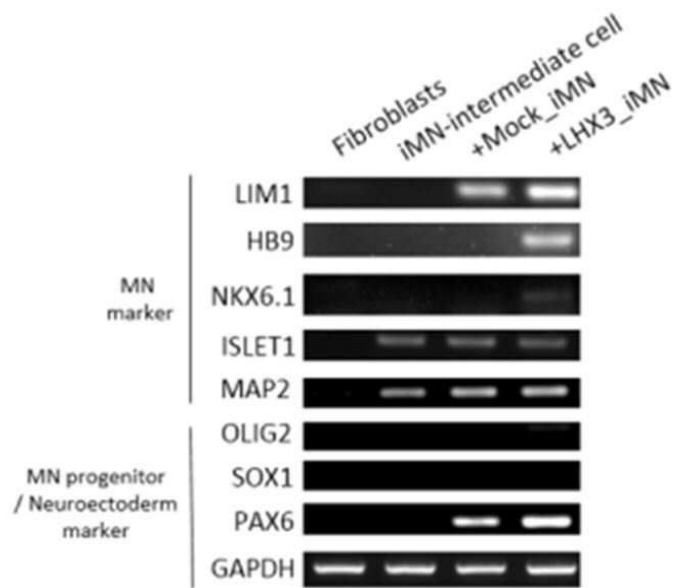
도면2



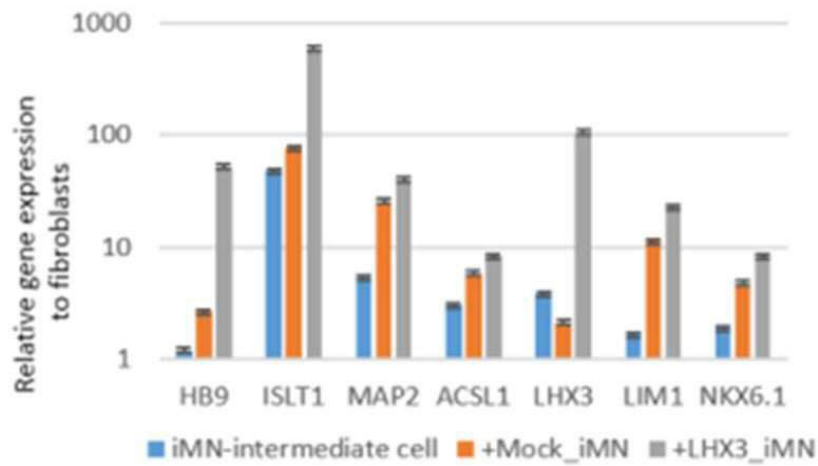
도면3



도면4



도면5



도면6

