

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0134141

(43) 공개일자 2019년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)*A61K 48/00* (2006.01) *A61P 19/08* (2006.01)*A61P 19/10* (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)*G01N 33/573* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)*A61K 48/00* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0059400

(22) 출원일자 2018년05월25일

심사청구일자 2018년05월25일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

윤형문

서울특별시 성북구 월곡로14길 26, 109동 1603호 (하월곡동, 월곡래미안루나밸리아파트)

홍진태

충청북도 청주시 서원구 예체로 68, 112동 306호 (사직동, 청주푸르지오캐슬아파트)

박경란

서울특별시 성북구 월곡로14길 26 (하월곡동, 월곡래미안루나밸리아파트)

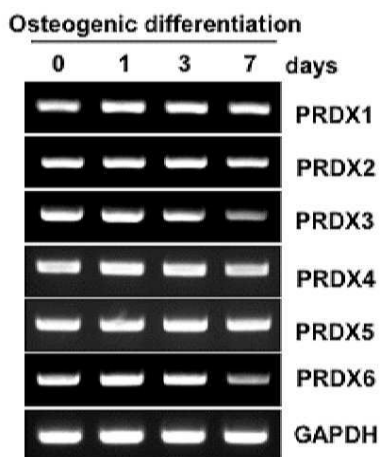
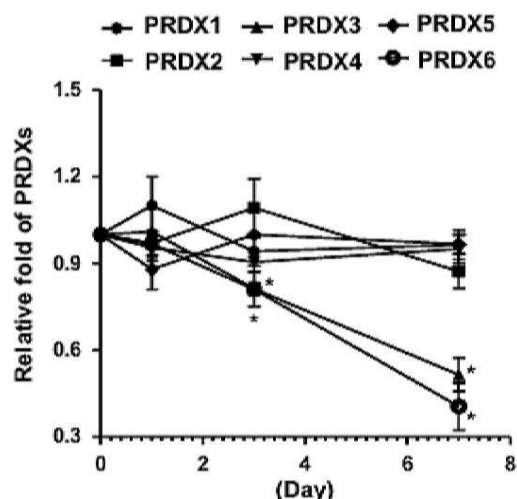
(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **퍼옥시레독신6 활성 저해제를 함유하는 골 형성 촉진용 조성물****(57) 요약**

본 발명은 골 형성 촉진 효과를 가지는 조성물에 관한 것으로, PRDX6(peroxiredoxin-6) 유전자 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1**A****B**

(52) CPC특허분류

A61P 19/08 (2018.01)

A61P 19/10 (2018.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

G01N 33/573 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

PRDX6(peroxiredoxin-6) 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PRDX6 활성 저해제는 GPx(glutathione peroxidase) 또는 iPLA2(calcium-independent phospholipase A2)의 활성을 저해하는 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 PRDX6 활성 저해제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA, 줄기세포 치료제, 저해 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 줄기세포 치료제는 변이 PRDX6 유전자가 도입된 줄기세포인 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 줄기세포는 치수, 골수, 혈액, 제대혈, 지방조직, 간장, 피부, 위장관, 태반 및 자궁으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 조직으로부터 유래한 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

골 질환 예방 또는 치료용인 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 골 질환은 대사성 골 질환 또는 정형외과적 골 질환인 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 골 형성 촉진용 조성물.

청구항 9

(a) PRDX6를 발현하는 세포 및 시험 체제를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 시험 체제의 PRDX6에 대한 억제 효과를 결정하는 단계; 및

(c) 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 시험물질과 접촉된 세포에서 PRDX6의 활성 억제 정도를 비교하는

단계를 포함하는 골 질환 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 시험 제제는 폴리펩티드, 소 유기 물질(Small organic molecule), 다당류(Polysaccharide), 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 골 질환 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 퍼옥시레독신6(PRDX6) 활성 저해제를 함유하는 골 형성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뼈는 일생동안 지속적으로 변화하는 활동적인 조직이다. 뼈는 육안으로 외부의 피질골(치밀골)과 내부의 소주골(해면골, 스폰지뼈)로 구분하는데, 피질골은 물리적인 강도가 강하여 신체를 보호하고 지지하는 역할을 하고, 소주골은 충격을 흡수하거나 칼슘의 변화를 일정하게 유지하는 역할을 한다.

[0003] 뼈의 성장이 중단된 후에도 오래된 뼈는 파괴되어 없어지고(골 흡수), 새로운 뼈가 없어진 곳을 메우는 고정(골 형성)이 일생동안 반복되는, 이러한 현상을 뼈의 재형성(remodeling)이라 한다.

[0004] 조골세포와 파골세포 사이의 상호작용이 균형을 이루어 골 흡수와 골 형성이 균형을 이루어야 뼈의 항상성이 유지되고 혈액 속의 칼슘 농도가 일정하게 유지되는데, 혈액에 칼슘이 부족하게 되면 이를 보충하기 위하여 골 흡수가 증가되어 뼈의 칼슘을 혈액으로 방출하게 되며, 골 흡수가 지속되면 뼈가 약해져 골다공증과 같은 질환이 발생할 수 있다.

[0005] 골다공증은 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포(osteoclast)의 활성화에 따른 골흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증과, 노화가 되면서 조골 세포(osteoblast)의 기능이 감소하여 골 형성이 감소하는 노인성 골다공증으로 분류할 수 있다.

[0006] 골다공증으로 인한 골절은 심각한 활동 제한에 이르게 되고, 고관절 골절의 경우 약 15-35%의 높은 사망률과 관련되어 있기 때문에, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 진단과 치료가 중요하다.

[0007] 그럼에도 불구하고, 현재까지 개발된 골다공증 치료제들은 부갑상선 호르몬제를 제외하고는 골 형성 작용이 미미하여 치료효과보다는 증상의 진행을 예방하는 효과에 그치고 있다.

[0008] 또한, 골 형성 효과를 갖는 부갑상선 호르몬제의 경우는 골 형성을 촉진하여 치료효과를 얻을 수 있지만 장기 사용에 대한 안전성이 확립되지 않아 그 사용이 제한되고 있다. 따라서 골다공증의 효과적인 치료를 위해서는 골 형성의 기작에 대한 명확한 이해와 이를 기반으로 한 근본적인 치료 대책이 요구된다.

[0009] 한편, 퍼옥시레독신(peroxiredoxin, PRDX)은 산화 환원 균형을 조절하는 항산화 효소로서 자가재생 및 줄기세포의 잠재력을 유지하는데 중요한 역할을 한다는 연구 결과가 보고된 바 있으나(Cancer Research 77(13 Supplement):4272-4272 · July 2017), 골 관련 질환과의 연관성은 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 골 형성과 관련된 PRDX6의 역할을 명확하게 규명하고, 골 질환의 근본적인 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 측면에 따르면, PRDX6(peroxiredoxin-6) 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물이 제공된다.

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 PRDX6 활성 저해제는 GPx(glutathione peroxidase) 또는 iPLA2(calcium-independent

phospholipase A2)의 활성을 저해할 수 있다.

- [0013] 일 실시예에 있어서, 상기 PRDX6 활성 저해제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA, 줄기세포 치료제, 저해 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.
- [0014] 일 실시예에 있어서, 상기 줄기세포 치료제는 변이된 PRDX6 유전자가 도입된 줄기세포일 수 있다.
- [0015] 일 실시예에 있어서, 상기 줄기세포는 치수, 골수, 혈액, 제대혈, 지방조직, 간장, 피부, 위장관, 태반 및 자궁으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 조직으로부터 유래한 것일 수 있고, 구체적으로는 치수줄기세포일 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 있어서, 상기 골 형성 촉진용 조성물은 골 질환 예방 또는 치료용일 수 있다
- [0017] 일 실시예에 있어서, 상기 골 질환은 대사성 골 질환 또는 정형외과적 골 질환일 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 있어서, 상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) PRDX6를 발현하는 세포 및 시험 제제를 접촉시키는 단계; (b) 상기 시험 제제의 PRDX6 발현에 대한 조절 효과를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 시험 제제와 접촉된 세포 및 상기 시험 제제와 접촉되지 않은 대조군에서 상기 PRDX6의 발현 수준을 비교하는 단계;를 포함하는 골 질환 예방 또는 치료제 스크리닝 방법이 제공된다.
- [0020] 일 실시예에 있어서, 상기 시험 제제는 폴리펩티드, 소 유기 물질(Small organic molecule), 다당류(Polysaccharide), 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명은 PRDX6 유전자의 분자적 기작에 대한 명확한 이해를 바탕으로 효과적으로 골 형성을 촉진하는 방법을 제공하며, 다양한 골 관련 질환에 대한 치료, 예방, 진단 또는 그 연구 등에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1A 및 도 1B는 조골 세포 분화에 따른 PRDX6의 발현 정도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 변이 PRDX6 유전자가 도입된 줄기세포의 iPLA2 활성 정도(A) 및 GPx 활성 정도(B)를 나타낸 것이다.
- 도 3은 골 형성 분화 및 골형성 mRNA 발현에 있어 PRDX6의 영향을 분석한 것이다.
- 도 4는 PRDX6의 iPLA2 및 GPx 효소 활성 변이체의 발현, 세포의 국소화, 및기능성을 분석한 것이다.
- 도 5는 골 형성 분화에서 PRDX6의 iPLA2 및 GPx 효소적 활성이 미치는 영향을 분석한 것이다.
- 도 6은 hDPSC-기반 골 재생에서 PRDX6가 미치는 영향을 분석한 것이다.
- 도 7은 미발달 뼈 발생에서 PRDX6가 미치는 영향을 분석한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0025] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미

를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

- [0026] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0027] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 일 측면에 따르면, 퍼옥시레독신-6(peroxiredoxin-6, PRDX6) 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물이 제공된다.
- [0030] 상기 “퍼옥시레독신(Peroxyredoxin)”은 사이토카인에 의해 유발된 과산화물의 수준을 조절하고 이를 통해 신호전달을 매개하는 항산화 효소 패밀리 단백질을 의미한다.
- [0031] TGF β (Transforming growth factor β)는 receptor-mediated Smad2 및 p38 mitogen-activated protein kinase를 인산화시켜 TGF β 에 의해 유도된 골 분화를 조절하는 전사인자인 RUNX2의 발현을 유도할 수 있다.
- [0032] 상기 PRDX6의 활성을 억제시키는 경우 Smad2 및 p38가 인산화되어 RUNX2 유전자의 발현이 회복될 수 있고(도 4), 이로 인하여 골 형성이 촉진될 수 있다.
- [0033] 즉, 상기 PRDX6의 활성을 억제시킴으로써 TGF β 신호 전달 경로를 활성화할 수 있으며, 골 형성을 촉진시킬 수 있다.
- [0034] 골 형성 기작에 있어서 상기 퍼옥시레독신의 관련성은 아직까지 밝혀진 바 없으나, 본 발명자들은 골 형성 과정에서 상기 퍼옥시레독신-6이 직접적으로 관여하며 골 대사를 매개하는 유력한 요인임을 확인하였다.
- [0035] 상기 “유효성분으로 포함하는”은 골 형성 효과를 나타낼 수 있는 것으로, PRDX6 유전자의 활성을 억제하는 정도의 유효량을 함유하는 것을 의미할 수 있다.
- [0036] 상기 “골 형성”은 뼈가 발생하는 과정을 의미하는 것으로, 조골 세포에 의한 골기질 형성 및 그것의 석회화 현상을 포함할 수 있으며, 상기 “골 형성의 촉진”은 빠른 시간 내 골 형성이 일어나도록 하는 것은 물론, 골 형성을 유도하는 것을 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 PRDX6 활성 저해제는 GPx(glutathione peroxidase) 또는 iPLA2(calcium-independent phospholipase A2)의 활성을 저해할 수 있다.
- [0038] 상기 “GPx”는 세포에서 주된 항산화 작용기에 해당하고, 상기 “iPLA2”는 글리세로포스포리피드(glycerophospholipid)의 sn-2 지방 아실 에스테르 결합(fatty acyl ester bond)에 대한 가수분해를 촉매하여 유리 지방산(free fatty acid)과 리소포스포리피드(lysophospholipid)를 생산한다.
- [0039] 세포외 스트레스 요인에 의한 산화 환원 반응의 불균형(redox imbalance)은 SOD(superoxide dismutases), GPx(glutathione peroxidase), PRDXs(peroxiredoxins)를 포함하는 다양한 항산화 방어 수단에 의해 제어된다.
- [0040] 상기 PRDX는 과산화물(peroxide)의 수준을 제어하는 흔히 존재하는 효소로서 보존된 시스테인 잔기를 포함하며, 인지질 하이드로과산화물을 제거하여, ROS-매개 세포 손상이나 세포 사멸을 억제할 수 있다.
- [0041] 또한, PLA2에 의해 발생하는 인지질 막의 대사체는 골 형성에 있어서 중요한 음성 매개체(negative mediator)로서 조골세포의 분화 및 골 형성을 억제할 수 있다.
- [0042] 본 발명자들은 PRDX6가 GPx 또는 iPLA2에 미치는 영향을 분석하고, iPLA2 및 GPX 활성을 통해 TGF β 경로에 영향을 미칠 수 있음을 규명하였다.
- [0043] 상기 PRDX6 활성 저해제를 투여하여 골 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0044] 상기 PRDX6 유전자는 골 형성 관련 신호 경로의 상위에 위치하거나 TGF β 경로에 직접적으로 영향을 미치므로, 상기 PRDX6 유전자의 활성을 조절하여 궁극적으로 골 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

- [0045] 상기 "예방"은 본 발명의 골 형성 촉진용 조성물의 투여에 의해 골 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 포함하고, 상기 "치료"는 골 질환에 의한 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 다른 측면에 따르면, PRDX6 활성 저해제를 유효성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물이 제공된다.
- [0047] 상기 PRDX6 활성 저해제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA, 줄기세포 치료제, 저해 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.
- [0048] 상기 "항체"는 단일클론항체 및 이에 대한 카이메릭 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 모두 포함하는 것이고, 신규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함될 수 있다. 상기 항체는 PRDX6 유전자를 특이적으로 인식하는 결합의 특성을 갖는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0049] 상기 "압타머(aptamer)"는 단일 사슬 DNA 또는 RNA 분자로서, SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득할 수 있다. 압타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조절할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적이 기능하는 능력을 차단할 수 있다.
- [0050] 상기 "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 상기 siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법 또는 유전자 치료 방법으로 제공될 수 있다. 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 상기 siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 상기 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다.
- [0051] 상기 siRNA는 표적 유전자의 발현 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA (예컨대, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다. 상기 siRNA 말단 구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중 사슬 RNA 일반의 말단 부위가 링커 RNA 에 의하여 접속된 스텝 루프형 구조일 수도 있다.
- [0052] 상기 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관 내에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예컨대 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트를 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태일 수 있다.
- [0053] 상기 siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 상이해질 수 있다.
- [0054] 상기 "shRNA"는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 아데노바이러스, 렌티바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 상기 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase III)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져 있다.
- [0055] 상기 줄기세포 치료제는 변이 PRDX6 유전자가 줄기세포에 형질전환 방법을 이용하여 도입될 수 있다. 상기 변이 PRDX6 유전자를 도입하기 위한 형질전환 방법은 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행될 수 있다.
- [0056] 상기 "형질전환"은 외부DNA 또는 외부DNA를 함유하는 바이러스벡터가 숙주에 도입되어 DNA가 염색 체의 인자로

서 또는 염색체 통합 완성에 의해, 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.

- [0057] 일반적으로 형질전환방법에는 레트로바이러스와 아데노바이러스를 이용한 감염방법, DNA의 CaCl_2 침전법, CaCl_2 방법에 환원물질인 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로 박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민을 포함한 리포솜 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다.
- [0058] 본 발명의 실시예에서는 pcDNA3.1 벡터와 변이 PRDX6 유전자를 줄기세포에 감염시켜 형질전환시켰다.
- [0059] 상기 “변이 PRDX6 유전자”는 유전자 서열의 변이에 의해 PRDX6의 발현이 억제, 중단되거나 본래의 기능이 상실된 것으로, PRDX6 유전자의 염기 배열이나 아미노산 배열 중 일부 또는 전부가 결실, 치환, 부가, 삽입 등으로 변이된 것일 수 있다.
- [0060] 상기 변이 PRDX6 유전자는 특정 서열의 변이 유전자에 한정되지 않으며, 일부 서열의 변이에 의해 본래 단백질 기능이 상실된 것이면 족하며, 유전자의 변이 방법은 당해 기술 분야에 널리 알려진 다양한 방법을 사용할 수 있다.
- [0061] 상기 “줄기세포(stem cell)”는 자기 복제 능력뿐만 아니라, 세포가 위치하는 환경의 영향을 받아 적절한 신호가 주어질 경우, 다중분화능(multi potency)의 특성에 의해 여러 가지 세포로 분화할 수 있는 세포로서, 예컨대, 줄기세포(germline stem cell), 배아 줄기세포(embryonic stem cell), 또는 역분화 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)일 수 있다.
- [0062] 상기 줄기세포는 지방, 골수, 제대혈 및 태반 등에 포함되어 있으며, 척수손상, 심근경색, 뇌경색, 퇴행성 관절염 및 골절 등 다양한 세포손상질환을 치료하는데 활용될 수 있다. 상기 줄기세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있으며, 인간 및 비인간 포유류를 포함한 임의 유형의 동물 유래일 수 있다.
- [0063] 상기 줄기세포는 치수, 골수, 혈액, 제대혈, 지방조직, 간장, 피부, 위장관, 태반 및 자궁으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 조직으로부터 유래한 것일 수 있고, 바람직하게는 치수줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 상기 “치수줄기세포(dental pulp stem cell)”는 치수조직에 존재하는 줄기세포를 의미한다. 치수줄기세포는 빠른 증식능력과 세포집락 형성능력이 높아서 밀도가 높은 석회화 결절을 형성하며, 상아질모세포, 지방세포, 연골세포, 및 조골세포로 분화할 수 있다.
- [0065] 상기 골 형성 촉진용 조성물은 골 질환 예방 또는 치료용일 수 있다. 상기 골 질환은 대사성 골 질환 또는 정형외과적 골 질환일 수 있다.
- [0066] 상기 “대사성 골 질환”은 파골 세포의 과다한 생성 또는 활성으로 인해 나타나는 상태 또는 질병을 의미하는 것으로, 골량 저하 질환을 포함할 수 있다. 상기 골량 저하 질환이란 골밀도의 저하, 골조직의 연화 등의 증상을 수반하는 골량의 저하가 나타나는 상태 또는 질환을 의미한다.
- [0067] 상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0068] 상기 조성물은 치주질환 예방 및 치료용으로 사용될 수 있다. 상기 Runx2 유전자의 활성은 골 형성의 촉진뿐만 아니라, 치주질환과도 밀접한 관련이 있다고 알려진바 있으며, Runx2 유전자가 치조골의 리모델링을 조절하고 치주인대 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(Camilleri, S. et al., Eur J Oral Sci. 114(5):361-373, 2006).
- [0069] 따라서, 상기 PRDX6 유전자의 활성을 조절하여 Runx2를 활성화함으로써 골 질환 치료뿐만 아니라, 치주 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0070] 상기 “치주질환”은 상기 치조골 또는 치조골 주변조직에 감염된 치주균에 의하여 분비되는 병독성 대사산물에 의하여 치아의 구조와 치은의 세포조직이 손상되고, 치은조직의 면역력을 약화시키는 병변이 발생되며, 치주균이 증식하여 병변 부위가 반복적으로 확장되는 질환을 의미할 수 있다.
- [0071] 상기 치주질환은 치조골 또는 상기 치조골을 치은에 지지 및 결합시키는 치조골 주변조직에 영향을 미치는 질환을 포괄적으로 포함할 수 있다.

- [0072] 상기 치주질환은 상기 병변부위의 영역에 따라 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)으로 구분될 수 있으며, 예컨대, 상기 치은염은 상기 병변부위가 연조직에 발생하는 증상을 나타내는 질환을 의미하고, 치주염은 상기 병변부위가 잇몸과 잇몸뼈 주변까지 확장된 부위에서 나타나는 질환을 의미할 수 있다.
- [0073] 상기 골 형성 촉진용 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 상기 골 형성 촉진용 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0074] 예컨대, 상기 골 형성 촉진용 조성물은 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0075] 상기 골 형성 촉진용 조성물의 유효 투여량은 성별, 체표면적, 질환의 종류 및 중증도, 연령, 약물에 대한 민감도, 투여경로 및 배출비율, 투여시간, 치료기간, 표적세포, 발현 수준 등 기타 의학 분야에 잘 알려진 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0076] 상기 골 형성 촉진용 조성물은 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화될 수 있으며, 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0077] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0078] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.
- [0079] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다.
- [0080] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0081] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.
- [0082] 본 발명의 다른 측면은 (a) PRDX6를 발현하는 세포 및 시험 제제를 접촉시키는 단계; (b) 상기 시험 제제의 PRDX6 발현에 대한 조절 효과를 결정하는 단계; 및 (c) 상기 시험 제제와 접촉된 세포 및 상기 시험 제제와 접촉되지 않은 대조군에서 상기 PRDX6의 발현 수준을 비교하는 단계;를 포함하는 골 질환 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0083] 상기 “접촉”은 통상적인 의미로서, 2개 이상의 제제(예: 2개의 폴리펩티드)를 결합(combine)시키거나, 제제와 세포(예; 단백질과 세포)를 결합시키는 것을 의미할 수 있다.
- [0084] 예컨대, 시험관(test tube) 또는 다른 컨테이너(container)에서 2개 이상의 제제를 결합시키거나 시험 제제와 세포 또는 세포 용해물과 시험 제제를 결합시킬 수 있으며, 2개의 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 세포 내에서 공동발현(coexpresion)시킴으로써 세포 또는 세포 용해물에서 2개의 폴리펩티드를 접촉시킬 수 있다.
- [0085] 상기 “제제(agent)” 또는 “시험 제제(test agent)”는 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실체물(entity) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예컨대, 단백질, 폴리펩티드, 소 유기 물질(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함할 수 있으며, 자연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 화학 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 상기 제제, 물질 및 화합물은 상호 교환적(interchangeably)으로 사용할 수 있다.
- [0086] 상기 스크리닝 방법은 당업계에 공지된 다양한 생화학적 및 분자생물학적 기술을 이용할 수 있으며[Sambrook et

al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Editions; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York(1987-1999)], 예컨대, 시험관 내 단백질-단백질 결합 어세이(시험관 내 폴-다운 어세이), EMSA, 단백질 결합을 위한 면역 어세이, 기능적 어세이(인산화 어세이 등), 효모-2 하이브리드 어세이, 비면역 침전 어세이, 면역침전 웨스턴 블랏 어세이, 면역-공동-위치화 어세이 등 당업계에 공지된 다양한 방법으로 수행될 수 있다.

[0087] 상기 스크리닝에 사용되는 화합물은 치료효과를 보유한 저분자량의 화합물일 수 있다. 예컨대, 상기 저분자량의 화합물은 중량이 400Da, 600Da 또는 800Da과 같이 약 1000Da 내외일 수 있다. 목적에 따라 상기 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 개수도 수십개부터 수백만개까지 상이할 수 있다. 상기 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보 사이클 및 폴리사이클 화합물(예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클(예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0088] 상기 스크리닝 방법에는 바이올로지스가 사용될 수 있다. 상기 바이올로지스는 세포 또는 바이오 분자를 일컫는 것으로, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 생체 내 및 생체 외에서 세포 시스템 등을 이용하여 생산된 물질을 의미한다. 상기 바이오분자는 단독으로 또는 다른 바이오분자 또는 세포와 조합되어 사용될 수 있다. 상기 바이오분자는 예컨대, 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 항체, 또는 기타 혈장에서 발견되는 단백질 또는 생물학적 유 기물질을 포함할 수 있다.

[0089] 상기 스크리닝 방법에 사용되는 세포의 종류 및 농도와 시험물질의 양 및 종류 등은 사용하는 구체적인 실험 방법 및 시험 제제의 종류에 따라 상이해질 수 있으며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있을 것이다. 실험결과 시험 제제와 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재하에서 PRDX6의 활성을 증가 또는 억제시키는 물질을 후보 물질로 선별할 수 있다. 상기 대조군과 비교하여 약 99% 이하 감소, 약 95% 이하 감소, 약 90% 감소, 약 85% 감소, 약 80%감소, 약 75% 감소, 약 70% 감소, 약 65% 이하 감소, 약 60% 이하 감소, 약 55% 감소, 약 50% 이하 감소, 45% 이하 감소를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

[0090] 일 실시예에 따르면, 1차적으로 상기 시험 제제가 PRDX6의 생물학적 활성을 조절하는 능력이 있는지 어세이할 수 있다. 구체적으로, 상기 1차 어세이는 시험 제제의 존재 하에서 분리된 PRDX6의 생물학적 활성을 분석하여 상기 폴리펩티드의 생물학적 활성을 조절하는 조절 제제(modulating agent)를 규명할 수 있다.

[0091] 상기 1차 어세이는 PRDX6의 여러 생물학적 활성에 대한 조절이 어세이될 수 있다. 예컨대, 시험 제제는 PRDX6의 발현 수준, 예컨대, 전사 또는 번역을 조절하는 활성이 있는지 어세이될 수 있다. 또한 상기 시험 제제는 PRDX6의 세포 내 수준 또는 안정성, 예컨대 번역 후 수식(post-translational modification) 또는 가수분해를 조절하는 활성이 있는지 어세이될 수 있다.

[0092] 상기 1차 어세이를 통해 PRDX6의 생물학적 활성과 관련된 조절 제제를 규명한 후, 상기 시험 제제가 신경병증성 통증을 완화할 수 있는지 2차적으로 시험할 수 있다 예컨대, 상기 시험 제제는 신경병증성 통증의 예방 또는 치료 활성이 있는지 더욱 시험될 수 있다.

[0093] 상기 1차 및 2차 어세이는 변하지 않은(intact) PRDX6 및 이의 단편, 아날로그, 또는 기능적 동등물을 사용할 수 있다. 이들 어세이에 사용될 수 있는 단편은 일반적으로 PRDX6의 생물학적 활성을 하나 이상 보유할 수 있다. 또한, 상기 단편 또는 아날로그를 포함하는 융합 단백질이 시험 제제를 위한 스크리닝에 사용될 수 있다. 상기 PRDX6의 기능적 동등물은 아미노산 결실, 삽입, 또는 치환을 포함하나 PRDX6와 동일한 생체활성을 보유하는 것이므로 본 발명의 스크리닝 방법을 실시하는데 사용될 수 있다.

[0094] 당업계에 통상적으로 실시되고 있는 다양한 어세이들이 PRDX6를 조절하는 제제를 확인하는데 사용될 수 있다. 바람직하게, 상기 제제는 세포 기반 어세이 시스템(cell based assay system)으로 스크리닝될 수 있다. 예컨대, 스크리닝하기 위한 전형적인 세포 기반 어세이(즉, 2차 어세이)에서, 시험 제제의 존재 하에서 리포터 유전자 활성(예: 효소 활성)을 측정하고, 이를 시험 제제의 부재 하에서의 리포터 유전자의 활성과 비교할 수 있다.

[0095] 상기 리포터 유전자는 당업계에 공지된 임의의 검출 가능한 폴리펩티드(반응 또는 리포터 폴리펩티드), 예컨대, 형광 또는 인광(phosphorescence)에 의해 검출가능한 폴리펩티드나 그것이 보유하고 있는 효소 활성에 의해 검출 가능한 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 검출 가능한 반응 폴리펩티드(detectable reponse polypeptide)는,

예컨대, 루시퍼라제, 알파-글루쿠로니다제(glucuronidase), 알파-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 전이효소, 녹색 형광 단백질, 강화된 녹색 형광 단백질 및 인간 분비된 알칼린 인산화 효소일 수 있다.

[0096] 상기 세포 기반 어세이에서, 시험 제제(예: 펩티드 또는 폴리펩티드)는 숙주세포 내에 존재하는 다른 벡터에 의해 발현될 수 있다. 어떤 방법에서는, 시험 제제의 라이브러리가 상기 벡터의 라이브러리(예: cDNA 라이브러리)에 의해 암호화될 수 있다. 상기 라이브러리는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제조할 수 있으며(Sambrook et al. and Ausubel et al., supra), 또는 다양한 상업적인 출처로부터 얻어질 수 있다.

[0097] 상기 세포-기반 어세이 이외에, 비-세포 기반 방법에 의해서도 스크리닝될 수 있다. 상기 방법은, 예컨대, 모빌리티 쉬프트 DNA 결합 어세이(mobility shift DNA-binding assays), 메틸화 및 우라실 간섭 어세이(methylation and uracil interference assays), DNase 및 히드록시 라디칼 풋프린팅 분석(DNase and hydroxyl radical footprinting analysis), 형광 편광(fluorescence polarization) 및 UV 교차결합(crosslinking) 또는 화학적 가교제(cross-linkers)를 포함할 수 있다.

[0098] 일반적인 개요는 Ausubel 등의 문헌에 개시되어 있다(Ausubel et al., supra, chapter 12, DNA-Protein Interaction). 핵산 및 DNA/RNA 결합 단백질을 포함하는 공동-결합된 단백질(co-associating protein)을 분리하는 기술은 절단가능한 가교제 디티오비스(dithiobis; succinimidylpropionate) 및 3,3'-디티오비스(sulfosuccinimidyl-propionate)를 포함하는 UV 교차 결합 또는 화학적 가교제를 포함할 수 있다(McLaughlin, Am. J. Hum. Genet., 1996; Tang, 1996; Lingner, 1996; Chodosh, 1986).

[0099] 이하에서는 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 실시예는 발명의 이해를 쉽게 하기 위해 제공되는 것 일뿐 발명의 보호범위가 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0100] **실시예 : 변이 PRDX6 유전자를 도입한 줄기세포의 제조**

[0101] PRDX6 유전자의 활성이 억제된 줄기세포를 처리하는 경우 조골세포의 분화 및 기능에 미치는 영향을 확인하기 위하여 변이 PRDX6 유전자를 도입한 줄기세포를 제조하였다.

[0102] 구체적으로, 변이 PRDX6 유전자를 EcoR I 과 Xho I 으로 잘라낸 후 pcDNA3.1 벡터 (Invitrogen 사)에 서브클로닝하여 변이 PRDX6 유전자가 도입된 pcDNA3.1 벡터를 제작하였다. 상기 제작된 벡터를 치수줄기세포에 도입하여 변이 PRDX6 유전자를 도입한 줄기세포를 제조하였다.

[0103] PRDX6 유전자는 GPx 및 iPLA2 유전자의 이작용성 효소로 알려져 있으므로, 웨스턴 블롯을 통해 GPx 및 iPLA2 유전자의 발현을 확인하였다.

[0104] 한편, 치수줄기세포에 PRDX6 유전자를 도입하지 않은 줄기세포를 음성대조군으로, 치수줄기세포에 PRDX6 유전자를 도입한 줄기세포를 양성대조군으로 하였다.

[0105] 도 2를 참조하면, 양성대조군과 비교하여 GPx 및 iPLA2 유전자의 활성이 유의적으로 감소된 실험군을 hDPSC/myc-PRDX6(C47S)로, GPx 유전자의 활성에 유의적인 변화는 없으나 iPLA2 유전자의 활성이 유의적으로 감소된 실험군을 hDPSC/myc-PRDX6(S32A)로 하였다(P<0.05).

[0106] **실험예 1 : PRDX6 유전자의 발현 측정**

[0107] 폐옥시레독신 유전자가 골 형성에 미치는 역할을 확인하기 위하여 6종의 폐옥시레독신 PRDX1 내지 PRDX6의 단백질이 인간 치수줄기세포(human dental pulp stem cell, hDPSC)에서 발현되는지 실시간 PCR(real-time PCR)을 통해 분석하였다.

[0108] 도 1을 참조하면, 폐옥시레독신의 발현 양상은 PRDX3 및 PRDX6 외에 변화가 없었으며, PRDX3은 미토콘드리아 기능에 필요한 미토콘드리아 단백질로 알려져 있는 바, 상기 결과는 PRDX6이 치수줄기세포의 골 대사를 매개하는 가장 유력한 요인임을 시사한다.

[0109] **실험예 2 : 조골세포 분화 능력 측정**

[0110] 조골세포의 분화에 실시예 1 및 2의 줄기세포가 영향을 미치는지 조사하기 위해, 골 형성 보충 배지(OS)에서 실시예 1 및 2의 줄기세포 처리에 따른 효과를 관찰하였다.

[0111] 초기 조골세포 분화 마커로서 알칼리 포스파타아제 효소 활성(ALP enzymatic activity)을 측정하였다.

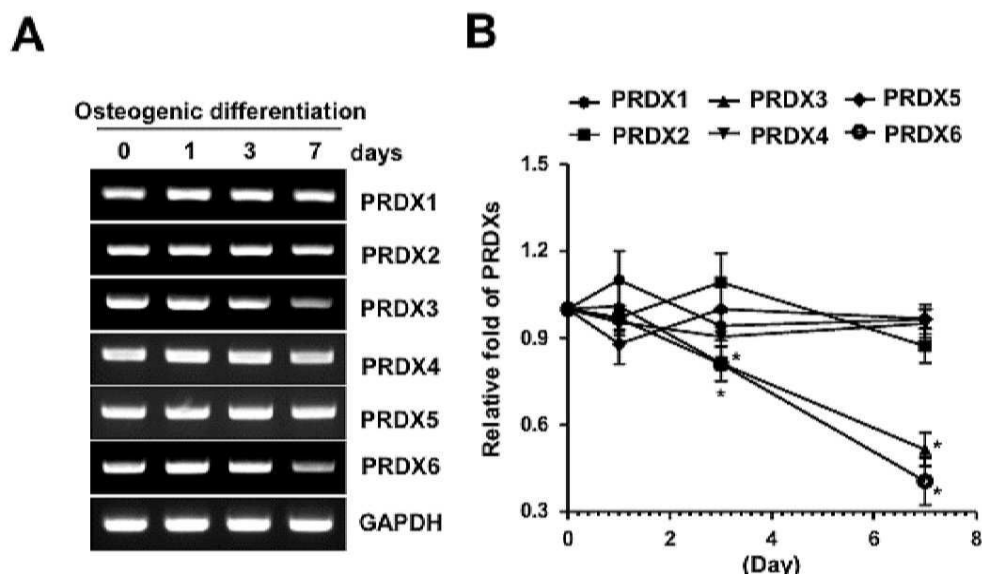
[0112] 알칼리 포스파타아제는 골아세포에서 분비되는 바이오마커로 골 형성 지표로 가장 보편적으로 사용된다.

- [0113] 도 3을 참조하면, 음성대조군과 비교하여 양성대조군은 ALP 활성이 유의적으로 감소하는 반면, 실시예 1 및 2는 ALP의 활성이 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$).
- [0114] alizarin red staining을 통해 말기 조골 세포 마커로서 광화 정도를 측정하였다. hDPSC/myc-PRDX6는 7, 14, 21 일째 광화 결정 형성을 감소시켰다(도 3C 및 3D).
- [0115] PRDX6를 과발현하는 세포는 초기 및 말기 마커를 감소시켰으므로, 골형성 특이적 유전자의 mRNA 발현에 대한 효과를 분석하였다.
- [0116] 도 3E 및 3F를 참조하면, PRDX6는 ALP 및 OCN(osteocalcin)의 mRNA 수준을 21일 넘게 하향 조절하였으며, 상기 결과는 PRDX6가 골형성 분화에 있어서 중대한 역할을 수행함을 시사한다.
- [0117] **실험예 3 : PRDX6 및 TGF β 신호 경로의 연관성 시험**
- [0118] PRDX6의 골형성 억제 효과가 iPLA2 및 GPx에 대한 이원축대활성과 관련 있는지 분석하고자, GPx 활성이 결여된 변이체(C47A) 또는 iPLA2 활성이 결여된 변이체를 구축하였다(S32A).
- [0119] 상기 변이체를 통해 hDPSC/myc-PRDX6(S32A) 및 hDPSC/myc-PRDX6(C47S)를 각각 제조하였다.
- [0120] 유전적으로 조작된 hDPSC는 웨스턴블랏 및 면역형광법을 통해 검증하였으며, 모든 변이체는 유사한 세포기질(cytosolic) 발현을 나타내었다(도 4A 및 4B).
- [0121] 또한, 변이 hDPSC/myc-PRDX6(S32A)는 GPx 활성에 영향을 미치지 않았으며, iPLA2 활성을 감소시킨 반면, 변이 hDPSC/myc-PRDX6(C47S)는 hDPSC/myc-PRDX6와 비교하여 GPx 및 iPLA2 활성을 효과적으로 감소시켰다(도 4C 및 4D).
- [0122] PRDX6의 활성과 함께, PRDX6(WT)는 ROS 수준을 감소시킨 반면, PRDX6(C47S) 및 PRDX6(S32A) 변이체는 ROS 감소를 차단하였다(도 4E 및 4F).
- [0123] 동일 조건의 hDPSCs에서, PRDX6(WT)는 hDPSCs의 ALP 활성을 감소시킨 반면, PRDX6(S32A) 및 PRDX6(C47S) 변이체는 골형성 분화 동안 ALP 활성을 증대시켰다(도 5A).
- [0124] PRDX6 및 골 형성 분화에 있어서 연관된 유전자 간 네트워크 연결을 분석하고자, GeneMANIA(<https://genemania.org/>)를 이용하여 관련 유전자를 예측하였다. GeneMANIA는 인간의 경우 TGF β , RUNX2, MAP3K4 및 PRDX6가 연관성이 높은 것으로 평가하였다(도 5B).
- [0125] 상기 예측을 기반으로, PRDX6 및 TGF β 경로의 기능적인 연관성을 규명하였다.
- [0126] PRDX6(WT)는 Smad2 및 p38의 인산화를 감소시켰으며, RUNX2의 발현과 연관되었다.
- [0127] 상기 결과는 PRDX6(WT)가 골 형성 분화에서 핵심적인 조절자인 반면, PRDX6(S32A) 및 PRDX6(C47S) 변이체는 TGF β 경로를 억제 또는 차단시킬 수 있음을 시사한다(도 5C 내지 5E).
- [0128] 도 5F를 참조하면, BMP2 발현은 PRDX6(WT), PRDX6(S32A), 및 PRDX6(C47S)에 영향을 받지 않았으며, 상기 결과는 PRDX6의 iPLA2 및 GPx 활성이 TGF β 경로(smad2, p38 및 RUNX2)를 통해 골 형성에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.
- [0129] **실험예 4 : 동물실험에서 골 재생 및 골 발달 측정**
- [0130] 12 주령 생쥐를 대상으로 실시예의 줄기세포 처리가 두개골 결손의 회복에 영향을 미치는지 분석하였다.
- [0131] DPSC/myc-PRDX6(WT), hDPSC/myc-PRDX6(S32A), 및 hDPSC/myc-PRDX6(C47S)를 포함하는 콜라겐 스폰지를 6주간 결손 부위에 위치시켰다(도 6A).
- [0132] 6주 후 3D 마이크로-CT 이미지를 통해 신규 형성된 골을 분석하였다(도 6C).
- [0133] hDPSC/myc-PRDX6(WT)는 hDPSC 대비 두개골 결손의 회복 비율을 현저히 감소시켰으며(도 6B), H&E 염색을 통해 상기 결과를 검증하였다(도 6D 및 6E).
- [0134] 반면, hDPSC/myc-PRDX6(S32A) 및 hDPSC/myc-PRDX6(C47S)은 hDPSC/myc-PRDX6(WT)와 달리 지연된 골 재생을 효과적으로 회복시켰으며, 상기 결과는 PRDX6의 iPLA2 및 GPx 활성이 hDPSC-매개 골 형성과 연관되어 있음을 시사한다.

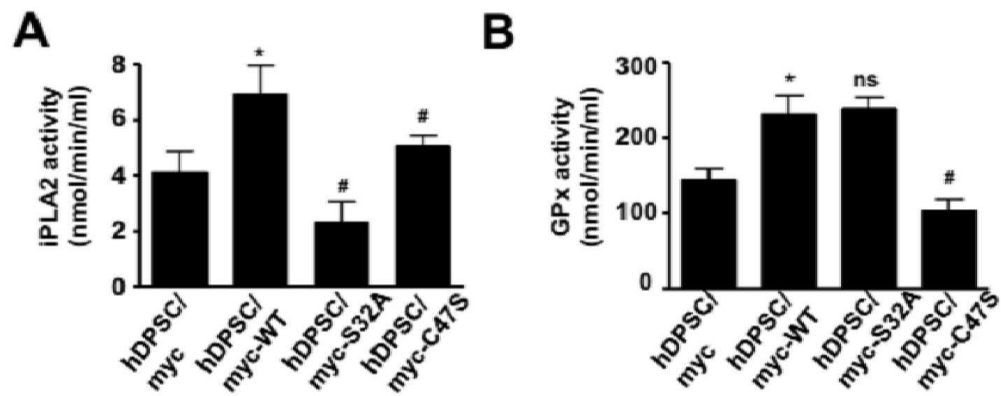
- [0135] PRDX6 유전자 이식 마우스(Tg)를 이용하여 출생일 postnatal day P1(P1)에 PRDX6의 연관성을 시험하였다(도 7A 및 7B).
- [0136] PRDX6 Tg 마우스에서 골 형성의 분자적 결정 요인인 RUNX2의 발현이 현저히 감소하였다(도 7C).
- [0137] 또한, Alizarin Red 및 Alcian Blue staining을 이용하여 PRDX6 Tg 마우스와 야생형 마우스의 골 형성을 비교하였다(도 7D).
- [0138] PRDX6 Tg 마우스의 골격에서 주요 성장 부위인 두개골 및 안면과 같은 골격 요소는 짧고 얇은 것으로 확인되었다.
- [0139] 즉, PRDX6는 골 형성 분화, 골 재생, 골 발달에서 기능적으로 밀접히 연관되었으며, 상기 결과는 PRDX6는 골 형성과 관련된 질환의 치료에 있어 중요한 타겟임을 시사한다(도 7E).
- [0140] **실험예 5 : PRDX6 활성 저해제의 골 형성 촉진 효과 시험**
- [0141] 변이된 PRDX6가 도입된 줄기세포 외에도 PRDX6 활성 저해제가 동등한 골 형성 촉진 효과를 가지는지 시험하고자, 항-PRDX6 항체, siRNA, 및 MJ33(1-Hexadecyl-3-trifluoroethylglycero-sn-2-phosphomethanol)을 이용하여 상기 실험을 반복 수행하였다.
- [0142] 실험 결과, 상기 각 저해제들은 상기 실험예와 미차가 있으나, 유사하거나 동등한 골 형성 관련성을 나타내었다.
- [0143] 상기 결과는 PRDX6가 직접적으로 골 형성과 연관되며, PRDX6 활성 또는 발현을 억제시킬 수 있는 수단이라면 골 형성과 관련된 질환의 치료에 활용될 수 있음을 시사한다.
- [0144] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0145] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

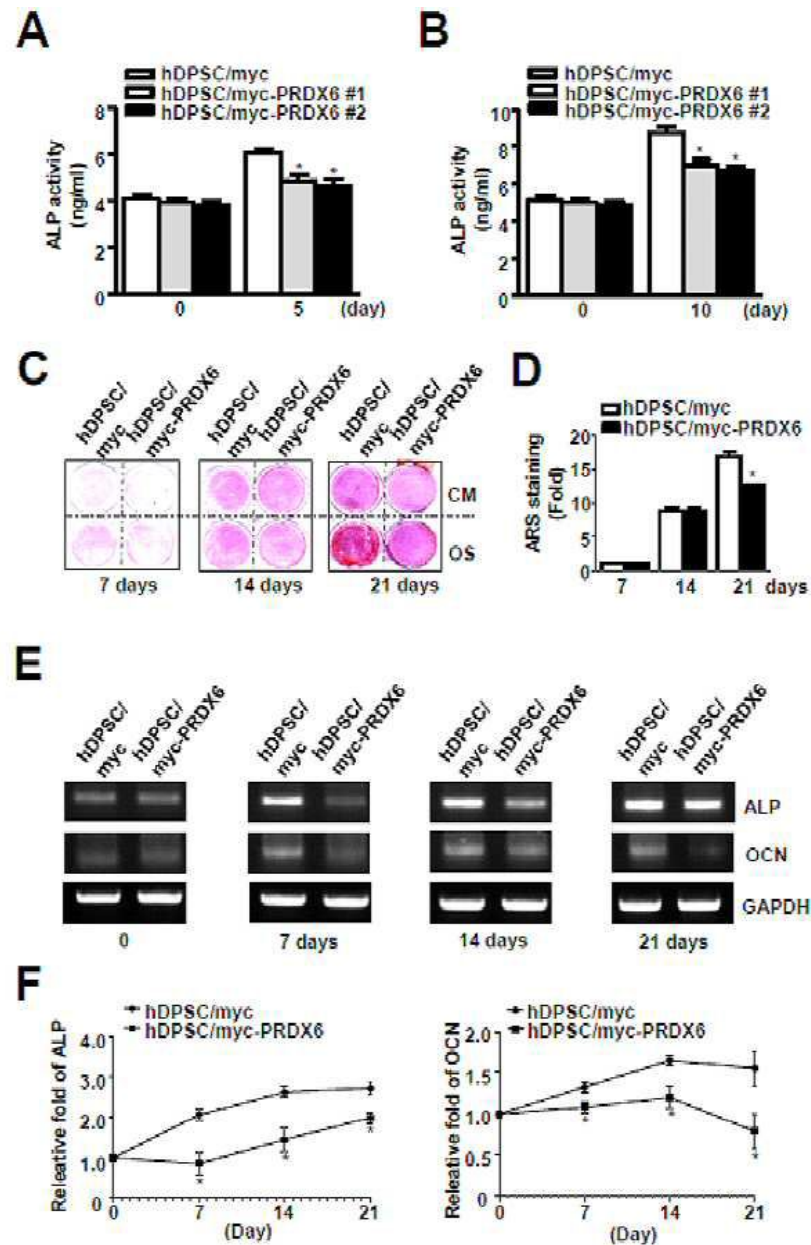
도면1



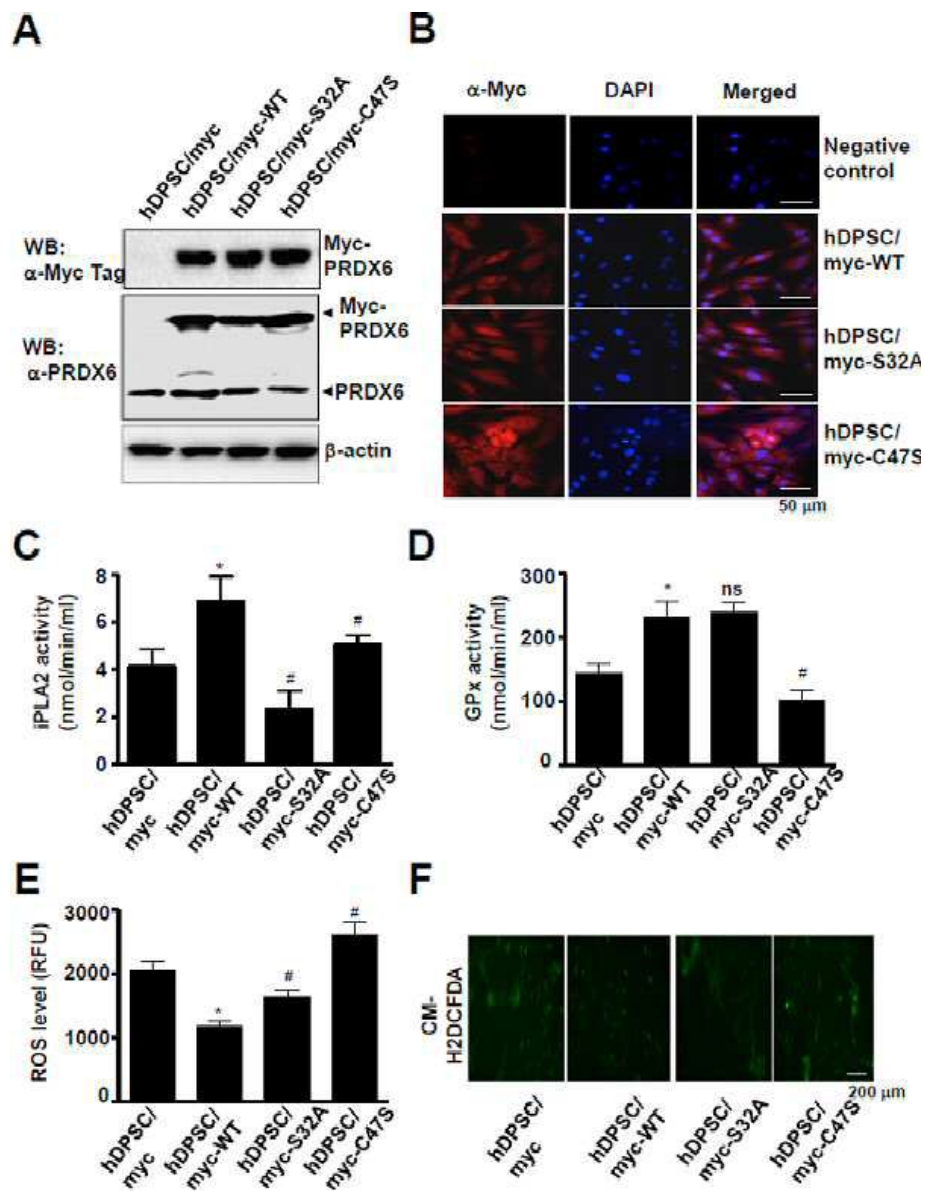
도면2



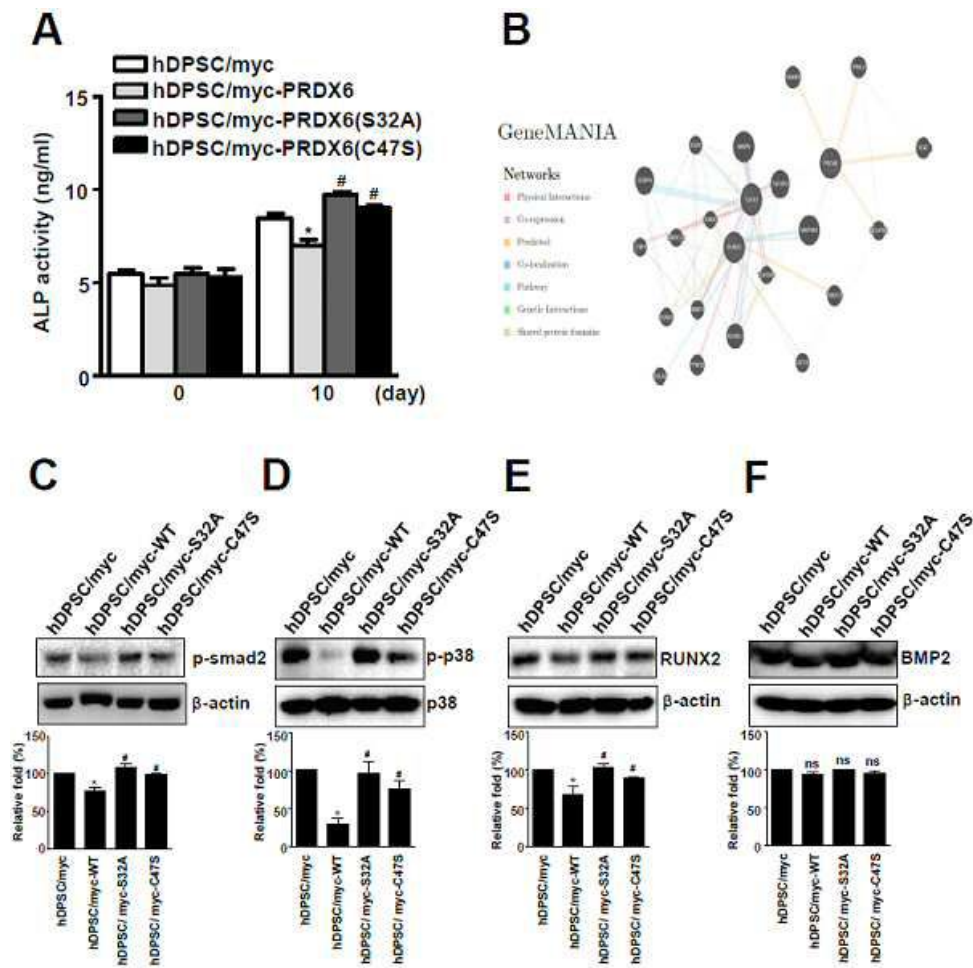
도면3



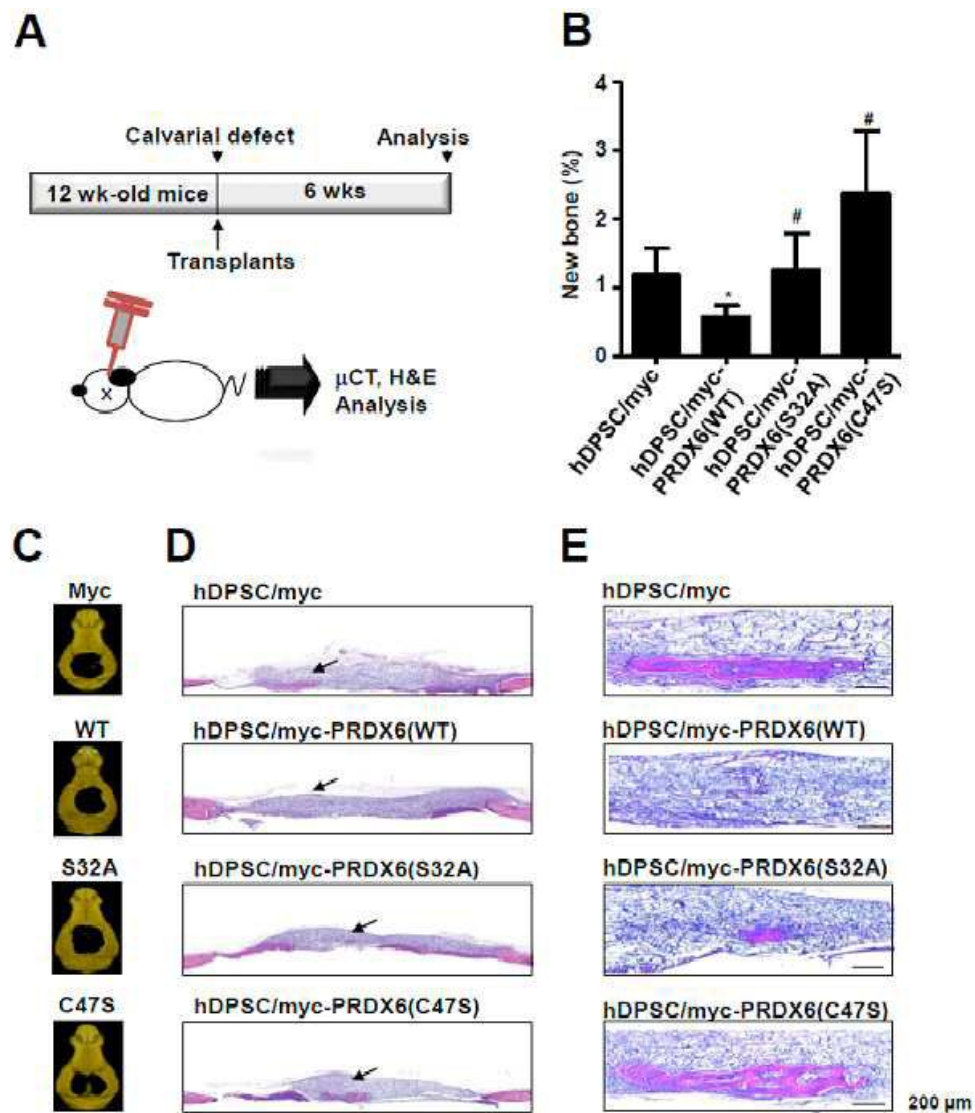
도면4



도면5



도면6



도면7

