

# 골재생 효능이 우수한 골질환 예방 또는 치료용 조성물 (기술분류-첨단바이오-유전자·세포 치료)

## 기술성 분석

### 기술 개요

- BMP-2 암호화 유전자 및 HSV-tk 암호화 유전자를 포함하고, HGPRT 암호화 유전자가 녹아웃(knock out)된 이중 킬 스위치(dual kill switch) 발현벡터가 도입된 줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것임
- BMP-2 성장인자를 통해 골재생 효과를 구현함과 동시에 이중 킬 스위치를 통해 세포 사멸을 이중으로 제어할 수 있음

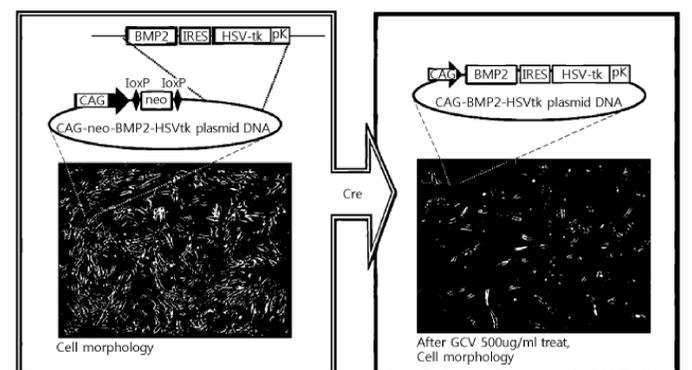
### 미해결 과제(Unmet needs)

- 줄기세포/ 성장인자를 이용한 골재생 치료법의 어려움
  - 골절 이후에는 다양한 성장인자에 의해 손상부위와 원거리의 중간엽 줄기세포들이 모집/ 분화를 통하여 성숙한 골세포가 되며 신생혈관과 골조직의 생성을 통하여 골재생이 일어나는데, 이때 줄기세포의 모집과 분화에 핵심적 기능을 하는 단백질인 BMP-2는 골재생에 있어 가장 결정적 역할을 하는 성장인자로 알려져 있음
  - 현재 줄기세포/성장인자를 이용한 골재생 치료법은 발전이 미미한 수준으로 줄기세포와 성장인자의 결합을 통하여 골재생 능력을 개선시킬 수 있는 기능성 세포치료제의 개발이 필요함
  - 한편, 세포치료제는 생체내에서 원치 않는 세포로 분화하여 조직의 기능을 저해하거나 악성 종양으로 발전할 가능성이 있기 때문에 이의 안전성 문제 또한 해결해야 할 필요가 있음

### 기술적 해결수단(발명의 구성)

- 1) BMP-2 암호화 유전자
  - BMP-2는 내연골성 막성 골절 치유에 관여하고 골 성장을 촉진할 뿐만 아니라 자연적인 재생 반응에 필수적인 골형성 단백질의 일종으로, BMP-2를 세포 내에서 직접 생산할 수 있도록 도입함으로써 외부로부터 BMP-2를 주입하는 경우에 비해 골질환 치료 효능을 향상시킬 수 있음
- 2) HSV-tk 암호화 유전자
  - 발현벡터의 내부에 HSV-tk 암호화 유전자를 삽입함으로써 단일 킬 스위치를 구현할 뿐만 아니라, 세포사멸을 저해하는 HGPRT 암호화 유전자를 녹아웃시켜 이중 킬 스위치를 구현할 수 있음
  - 구체적으로, 이중 킬 스위치 발현벡터를 세포주에 도입 시, 아미노프테린과 같은 약물을 처리하여 세포 사멸을 효과적으로 제어하여 이상증식, 악성 종양 발생 등 줄기세포 치료제의 부작용을 예방할 수 있음

세포주 내 벡터의 도입

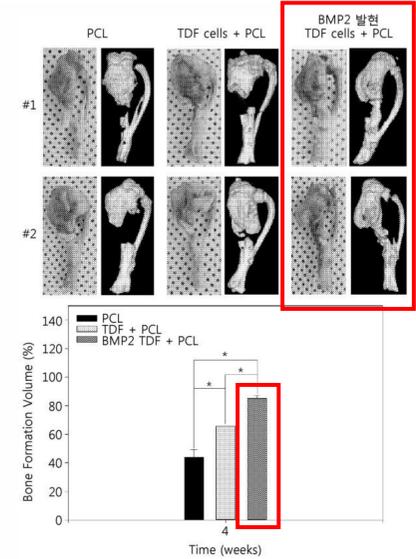


# 본 기술의 우수성 및 파급 효과

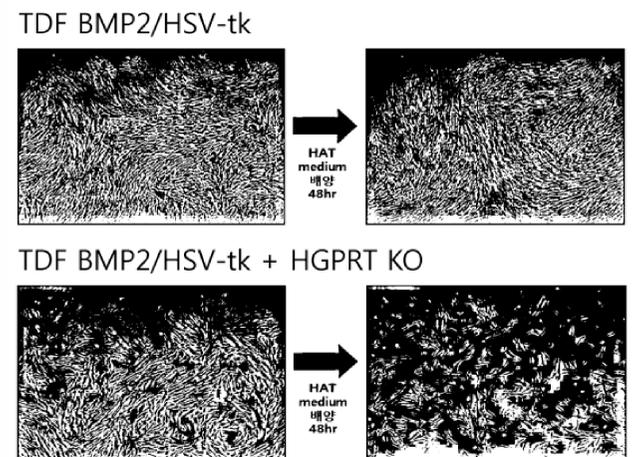
## 본 기술의 우수성(효과)

- 우수한 골형성능
  - 대퇴골 골결손 동물 모델에서 골결손 4주 경과 시점에서 BMP-2 및 HSV-tk 유전자가 발현되도록 한 TDF(Teratoma-derived fibroblast) 세포(이하 '(A) TDF 세포주')를 주입한 군이 대조군 TDF 세포 도입 군에 비해 골결손 부위의 유합이 보다 효과적으로 나타났으며, PCL 지지체만 도입한 군과 대조군 TDF 세포 도입 군 대비 월등히 향상된 골형성능을 나타냄
- 이중 킬 스위치 구현
  - HGPRT 암호화 유전자 exon8 위치의 PAM 사이트(site)와 상보적인 sgRNA(가이드 RNA)를 클로닝한 후, Neon® Transfection 방법을 이용해 Cas9 플라스미드DNA와 sgRNA를 1:1의 비율로 (A) TDF 세포주에 도입하여 HGPRT 암호화 유전자가 제거된 이중 킬 스위치 발현벡터를 제작함
  - HGPRT 암호화 유전자를 녹아웃시킨 TDF 세포주와 (A) TDF 세포주에 6-TG(Tioguanine)을 처리하여 세포 수 경과를 관찰한 결과, 6-TG 처리 9일 후 (A) TDF 세포주에 비해 HGPRT 세포주에서 더 많은 세포가 생존하였으며, 아미노프테린을 처리하는 경우 (A) TDF 세포주는 세포 수의 변화가 거의 없으나, 분리된 HGPRT 녹아웃 세포주에서는 세포 사멸이 나타남

### 커패시턴스 증가율 비교 결과



### 본 발명에 따른 세포주에 대한 아미노프테린 약물의 세포 사멸 효과



## 적용 제품 및 파급 효과

- 골질환 치료제
- 줄기세포에 BMP-2암호화 유전자 및 HSV-sa 암호화 유전자를 포함하고, HGPRT암호화 유전자가 녹아웃된 이중 킬 스위치 발현벡터가 도입함으로써 줄기세포와 성장인자의 결합을 통해 골재생 능력을 개선시킬 수 있는 기능성 세포치료제를 개발할 수 있음

## 지식재산권 현황

발명의 명칭	출원/등록번호	출원/등록일자
골재생 효능이 우수한 골질환 예방 또는 치료용 조성물	10-2106895	2020.04.27.
패밀리 특허 현황	패밀리 국가	
PCT/KR2018/001910, US16486757	PCT, US	

문의 | 고려대학교 산학협력단 기술사업화센터 권성진 02-3290-5832, giannie77@korea.ac.kr