



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월07일
(11) 등록번호 10-2106895
(24) 등록일자 2020년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/545 (2014.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/32 (2015.01) A61K 35/33 (2014.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/545 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0017137
(22) 출원일자 2018년02월12일
심사청구일자 2018년02월12일
(65) 공개번호 10-2018-0094800
(43) 공개일자 2018년08월24일
(30) 우선권주장
1020170020967 2017년02월16일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110132579 A*
Immunology Letters, 77권, 페이지 127-131,
(2001)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
송재준
서울특별시 서초구 신반포로 9, 73동 504호 (반포
본동, 주공아파트)
송호석
경기도 과천시 관문로 166, 1016동 304호 (중
앙동, 주공아파트)
고윤영
서울특별시 구로구 구로동로 148, 이빈인후과 (구
로동, 고려대부속구로병원)
(74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 5 항

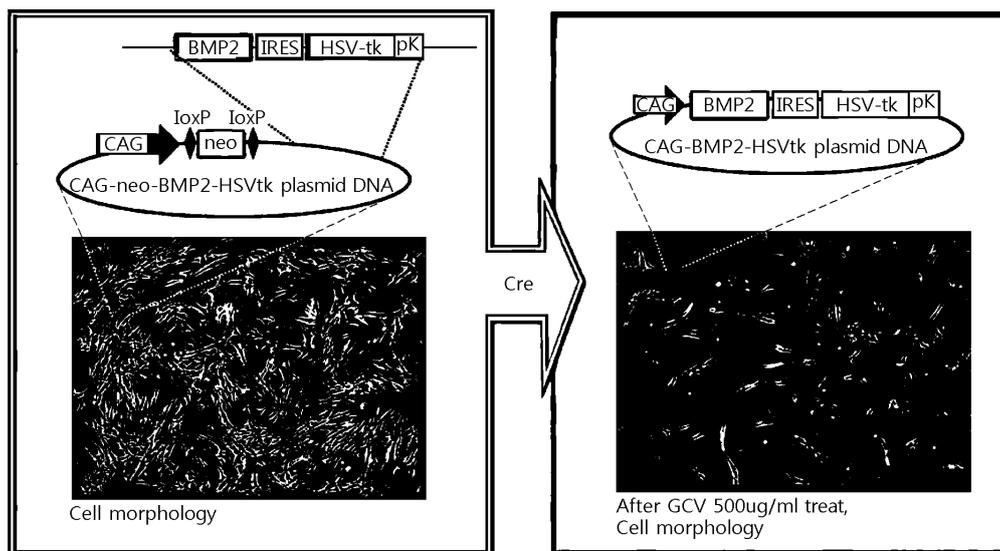
심사관 : 홍성제

(54) 발명의 명칭 골재생 효능이 우수한 골질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 BMP-2암호화 유전자 및 HSV-tk 암호화 유전자를 포함하고, HGPRT암호화 유전자가 녹아웃(knock out)된 이중 킬 스위치(dual kill switch) 발현백터가 도입된 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, BMP-2 성장인자를 통해 골재생 효과를 구현함과 동시에 이중 킬 스위치를 통해 세포 사멸을 이중으로 제어할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/32 (2013.01)

A61K 35/33 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

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 테라토마로부터 생성되는 섬유아세포(TDF, Teratoma-derived fibroblast)를 유효성분으로 포함하는, 골결손 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

ALP(Alkaline phosphatase), IBSP(Integrin binding sialoprotein), RUNX2(Runt-related transcription factor 2), OSX(Osterix), SPP1(Secreted phosphoprotein 1) 및 OCN(Osteocalcin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커 발현을 증가시키는, 골결손 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 지지체(scaffold)를 더 포함하는, 골결손 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 지지체는 폴리카프로락톤(PCL, Polycaprolactone) 또는 이상인산칼슘(BCP, Biphasic calcium phosphate)으로 이루어진, 골결손 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

BMP-2 암호화 유전자 및 HSV-tk 암호화 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;

상기 벡터 내 HGPRT 암호화 유전자를 녹아웃시키는 단계; 및

상기 벡터를 테라토마로부터 생성되는 섬유아세포(TDF, Teratoma-derived fibroblast)에 도입하는 단계;를 포함하는, 골결손 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 골재생 효능이 우수한 골질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, BMP-2 성장인자를 통해 골재생 효과를 구현함과 동시에 이중 길 스위치를 통해 세포사멸 제어의 이중 안전장치를 마련한 줄기세포를 유효성분으로 포함한다.

배경 기술

[0003] 인체의 연조직과 체중을 지탱하고 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호하는 뼈는 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라, 체내의 칼슘이나 인, 마그네슘과 같은 필수 무기질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다.

[0004] 성장이 완료된 성인의 뼈는 오래된 뼈를 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수 과정을 지속적으로 반복하면서 균형을 유지하게 되는데, 이를 골재형성(bone remodeling)이라고 한다(Yamaguchi A. et al., Tanpakushitsu Kakusan Koso., 50(6Suppl):664-669, 2005). 이러한 뼈의 순환은 성장과 스트레스에 의해 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 그 기능을 유지하는데 필수적이다. 성인에서는 매년 약 10% 내지 30%의 골격이 골흡수-골형성의 리모델링을 통하여 재형성된다.

[0005] 골재형성에는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)와 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)가 관여하며, 이들 간 밀접한 상호작용을 통해 골의 항상성이 유지된다. 예를 들어, 조골세포는 RANKL(receptor activator of nuclearfactor- κ B ligand), 및 그의 유도 수용체인 OPG(osteoprotegerin)과 같은 물질의 분비를 통해 골흡수를 담당하는 파골세포의 분화를 조절함으로써 체내의 골 항상성을 유지한다.

[0006] 물리적 영향, 호르몬 체계 등에 의해 골의 항상성이 유지되지 않는 경우나 골조직 손상 시 동반되는 골질환의 치료와 관련하여, 과거에는 주로 골 무기질, 즉 칼슘과 인의 대사 이상만을 중심으로 연구가 진행되어 왔으며, 그 기전 규명에 있어서 진전을 보지 못하였다.

[0007] 일반적으로, 골다공증의 치료 및 예방을 위하여 칼슘이 함유된 식이요법이 추천되며, 폐경기의 여성들에게는 에스트로겐 또는 비타민 D 투여가 추천된다. 그 외, 포사맥스(Fosamax, 성분명: alendronate)와 악토넬(Actonel, 성분명: risedronate)과 같은 비스포스포네이트(bisphosphonate) 계열의 약물이 파골세포를 억제하고 사멸을 유도하는 골흡수 억제제로서 새로운 대체 치료제로 주목받고 있다.

[0008] 그러나, 골질환 치료제로 널리 사용되는 칼슘보강제는 부갑상선 호르몬의 분비를 억제하며 골흡수에 의한 골량 감소를 방지하나, 골량 유지의 개인 차가 심한 것으로 알려져 있다(Heandy R.P. principles of bone biology, Academic press, 1007-1017, 1996). 또한, 에스트로겐이나 칼시토닌을 이용한 호르몬 요법의 경우 골밀도를 증가시키고 직장암의 발생을 감소시킨다는 보고도 있으나, 유방암, 심근경색, 정맥 혈전증 등의 부작용이 보고된 바 있다(Nelson, H.D et al., JAMA, 288:872-881, 2002; Lemay, A., J.Obstet. Bynaecol. Can., 24:711-7152-3).

[0009] 비스포스포네이트 제제의 경우, 최근 복용하는 환자에서 턱뼈의 괴사, 중증 심방세동, 뼈나 관절의 무력화 또는 근골격의 통증이 발생하는 사례가 해마다 증가하고 있다(Coleman RE., Br J Cancer, 98:1736-1740(2008). 따라서, 부작용 발현이 적으면서도 효과적으로 골흡수를 억제할 수 있는 새로운 골질환 치료제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0010] 골절 이후에는 다양한 성장인자에 의해 손상부위와 원거리의 중간엽 줄기세포들이 모집/분화를 통하여 성숙한 골세포(mature osteocyte)가 되며 신생혈관과 골조직의 생성을 통하여 골재생이 일어난다.

[0011] 이 때, 줄기세포의 모집과 분화에 핵심적 기능을 하는 단백질인 BMP-2는 골재생에 있어 가장 결정적 역할을 하는 성장인자로 알려져 있다. 성장인자로는 골재생 효과를 인정 받아 재조합 단백질의 형태인 BMP-2 성장인자를 임상에서도 주사제 형태로 사용하고 있으나, 초기 주입시 80% 이상이 방출되어 효율적으로 사용되지 못하고 있는 실정이다.

[0012] 골재생 치료를 위한 기존의 치료방법은 수술적 치료법, 생체재료/조직공학을 이용한 치료법, 줄기세포/성장인자

를 이용한 치료법이 있다. 골 이식술의 자가골 이식술은 공여부 손상 및 반복적인 수술이 필요하며 동종골/이종골 이식술의 경우는 골재생이 부족하거나 감염 등의 합병증이 발생할 가능성이 있다.

[0013] 생체 재료 지지체는 골유도성(osteinduction)의 부족으로 골결손이 큰 경우에는 골재생 효과가 미약하여 줄기세포나 성장인자가 필요한 단점이 있다. 현재 줄기세포/성장인자를 이용한 골재생 치료법은 발전이 미미한 수준으로 줄기세포와 성장인자의 결합을 통하여 골재생 능력을 개선시킬 수 있는 기능성 세포치료제의 개발이 필요하다.

[0014] 한편, 세포치료제는 생체내에서 원치 않는 세포로 분화하여 조직의 기능을 저해하거나 악성 종양으로 발전할 가능성이 있기 때문에 이의 안전성 문제 또한 해결해야 할 과제로 남아있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 골재생 효능을 향상시키고 동시에 우수한 생체 안전성을 지니는 골질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, BMP-2암호화 유전자 및 HSV-tk 암호화 유전자를 포함하고, HGPRT암호화 유전자가 녹아웃(knock out)된 이중 킬 스위치(dual kill switch) 발현벡터가 도입된 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 줄기세포는 배아줄기세포(ESC, Embryonic stem cell) 또는 간엽줄기세포(MSC, Mesenchymal stem cell)일 수 있다.

[0021] 일 측에 따르면, 상기 줄기세포로부터 분화된 세포는 섬유아세포(fibroblast) 또는 조골세포(osteoblast)일 수 있다.

[0022] 일 측에 따르면, 상기 섬유아세포는 테라토마 유래 섬유아세포(TDF, Teratoma-derived fibroblast)일 수 있다.

[0023] 일 측에 따르면, 상기 골질환은 골결손, 골다공증, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합 골절, 골형성 부전증 및 골연화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0024] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 ALP(Alkaline phosphatase), IBSP(Integrin binding sialoprotein), RUNX2(Runt-relatedtranscription factor 2), OSX(Osterix), SPPI(Secreted phosphoprotein 1) 및 OCN(Osteocalcin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커 발현을 증가시킬 수 있다.

[0025] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 지지체(scaffold)를 더 포함할 수 있다.

[0026] 일 측에 따르면, 상기 지지체는 폴리카프로락톤(PCL, Polycaprolactone) 또는 이상인산칼슘(BCP, Biphasic calcium phosphate)으로 이루어질 수 있다.

[0027] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, BMP-2 암호화 유전자 및 HSV-tk 암호화 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 상기 벡터 내 HGPRT 암호화 유전자를 녹아웃시키는 단계; 및 상기 벡터를 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 분화된 세포에 도입하는 단계;를 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법이 제공된다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 골질환 예방 또는 치료용 조성물은 BMP-2 유전자가 도입된 줄기세포를 포함하므로 그 자체로 BMP-2 성장인자를 생성할 수 있고, 이에 따라 우수한 골재생 효과를 구현할 수 있다.

[0030] 또한, 상기 줄기세포는 HSV-tk 유전자를 포함하고, HGPRT 암호화 유전자를 녹아웃시켜 이중 킬 스위치를 구현함으로써 자가증식 등에 의해 암 세포화 되는 것을 이중으로 방지하며, 인체 안전성을 향상시킬 수 있다.

[0031] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포의 Cre 처리 전, 후의 형태 및 BMP-2와 HSV-tk 유전자 발현 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 BMP-2 방출 거동을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 ALP 활성도를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 외부로부터 BMP-2를 주입한 TDF 세포주의 ALP 활성도를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 골분화 중 BMP-2 방출 거동을 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 골분화 관련 유전자 발현 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 칼슘 침착도를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 미네랄 침착도를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 대퇴부 골결손 동물 모델에 대한 골형성 효능을 나타낸 X-ray 이미지이다.
- 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 골형성 효능을 나타낸 micro-CT 결과이다.
- 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 두개골 골결손 동물 모델에 대한 골형성 효능을 나타낸 H&E 조직 염색 결과 및 결손부위 크기 감소 정도를 비교하는 그래프이다.
- 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 간시클로비르(gancyclovir) 처리 농도 및 시간에 따른 세포 형태를 나타낸 이미지이다.
- 도 13은 간시클로비르(gancyclovir) 처리 농도 및 시간에 따른 세포 수를 나타낸 그래프이다.
- 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 형태를 촬영한 이미지이다.
- 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 BMP-2 방출 거동을 나타낸 그래프이다.
- 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 골분화 관련 유전자 발현 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 칼슘 침착도를 나타낸 그래프이다.
- 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 미네랄 침착도를 나타낸 그래프이다.
- 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 두개골 골결손 동물 모델에 대한 골형성 효능을 나타낸 H&E 조직 염색 결과이다.
- 도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 6-TG 약물에 대한 저항성 테스트 결과를 나타낸 이미지이다.
- 도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주에 대한 아미노프테린 약물의 세포 사멸 효과를 나타낸 이미지이다.
- 도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포주의 골재생 마커 발현 정도를 나타낸 이미지이다.
- 도 23은 IgK 부착 여부에 따른 BMP-2 방출 거동을 비교하는 그래프이다.
- 도 24는 HGPRT 유전자 편집 후, 대조군과 이중 킬 스위치 군의 HGPRT 발현량을 비교하는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.
- [0035] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0036] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을

조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

- [0037] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 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 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0038] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 따르면, BMP-2암호화 유전자 및 HSV-tk 암호화 유전자를 포함하고, HGPRT암호화 유전자가 녹아웃(knock out)된 이중 킬 스위치(dual kill switch) 발현백터가 도입된 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 분화된 세포를 유효성분으로 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.
- [0041] 상기 BMP-2는 내연골성 막성 골질 치유에 관여하고 골 성장을 촉진할 뿐만 아니라 자연적인 재생 반응에 필수적인 골형성 단백질의 일종으로, 상기 BMP-2를 세포 내에서 직접 생산할 수 있도록 도입함으로써, 외부로부터 BMP-2를 주입하는 경우에 비해 골질환 치료 효능을 향상시킬 수 있다.
- [0042] HGPRT(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)는 세포 사멸을 저해하는 단백질로서, HGPRT 암호화 유전자를 제거하는 것은 HSV-tk 의 소실에 따른 세포사멸 제어 실패를 막는 이중 안전장치가 될 수 있다. 즉, 발현백터의 내부에 HSV-tk 암호화 유전자를 삽입함으로써 단일 킬 스위치(single kill switch)를 구현할 뿐만 아니라, 이에 더하여 상기 HGPRT 암호화 유전자를 녹아웃시켜 이중 킬 스위치(dual kill switch)를 구현할 수 있다. 구체적으로, 상기 이중 킬 스위치 발현백터가 세포주에 도입된 경우 아미노프테린(aminopterin)과 같은 약물을 처리하여 세포 사멸을 유도할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 조성물은 세포 사멸을 효과적으로 제어하여 이상증식, 악성 종양 발생 등 줄기세포 치료제의 부작용을 예방할 수 있다.
- [0043] 상기 BMP-2가 도입된 세포주는 줄기세포일 수 있고, 구체적으로 상기 줄기세포는 배아줄기세포(ESC, Embryonic stem cell) 또는 간엽줄기세포(MSC, Mesenchymal stem cell)일 수 있다. 상기 줄기세포는 BMP-2에 의한 골형성과는 별도로 자체 골발생 기능을 수행할 수 있으나, BMP-2와 함께 적용되는 경우 보다 효과적인 골형성 효능을 구현할 수 있다.
- [0044] 또한, 상기 줄기세포로부터 분화된 세포는 섬유아세포(fibroblast) 또는 조골세포(osteoblast)일 수 있다. 이 때, 상기 섬유아세포는 테라토마 유래 섬유아세포(TDF, Teratoma-derived fibroblast)일 수 있다.
- [0045] 즉, 상기 BMP-2 암호화 유전자가 도입된 세포주는 배아줄기세포로부터 형성된 테라토마 유래의 섬유아세포일 수 있고, 배아줄기세포로부터 분화된 조골세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 본 명세서에서 사용된 용어 "테라토마(teratoma)"는 일반적인 종양이 단일 세포로 이루어진 것과 달리 피부세포, 근육세포, 신경세포 등 다양한 세포와 조직들로 이루어진 종양의 일종으로, 상기 배아줄기세포를 마우스에 주입하는 것에 의해 형성될 수 있다. 상기 테라토마로부터 생성되는 섬유아세포(fibroblast)를 분리하여 세포주로 사용함으로써, BMP-2의 발현 효율을 향상시킬 수 있다. 또한, 상기 섬유아세포는 조골세포로 분화할 수 있어 골발생 기능을 구현할 수도 있다.
- [0047] 한편, 상기 줄기세포 또는 줄기세포로부터 분화된 세포는 그 자체로 우수한 분화능을 지니기 때문에 치료제로서의 기능뿐만 아니라 암 세포로의 발전 위험성도 동시에 내포할 수 있다.
- [0048] 이에 따라, 상기 세포주 내에 BMP-2 유전자뿐만 아니라 HSV-tk와 같은 자살 유전자를 함께 도입함으로써 상기 세포주가 암 세포로 발전하는 것을 억제할 수 있다.
- [0049] 이 때, 상기 BMP-2 유전자와 HSV-tk 유전자 사이에 IRES(Internal ribosome entry site) 유전자를 삽입할 수 있다. 상기 IRES 유전자를 이용하여 하나의 프로모터로 BMP-2 유전자와 HSV-tk 유전자를 모두 발현시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 BMP-2 유전자, IRES 유전자 및 HSV-tk 유전자는 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0050] 또한, 상기 BMP-2 유전자는 5' 말단에 Lgk 펩타이드를 암호화하는 유전자가 도입된 것일 수 있다. 상기 Lgk 펩

타이드는 세포 내에서 생성된 BMP-2 단백질의 세포 외 방출을 유도하는 선도펩타이드(leader peptide)로, 상기 BMP-2 단백질에 의한 골형성 효능을 향상시킬 수 있다. 상기 Lgk 펩타이드 암호화 유전자가 도입된 BMP-2 유전자는 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.

[0051] 상기 HSV-tk 유전자는 아시클로비르(acyclovir), 간시클로비르(gancyclovir)와 같은 약물을 인산화시키고, 이러한 약물의 인산화는 DNA 중합효소에 의한 DNA 합성을 억제함으로써 세포 사멸을 유도할 수 있다. 이에 따라, 상기 세포주에서 BMP-2에 의한 골형성 유도가 충분히 이루어진 시점에 아시클로비르, 간시클로비르와 같은 약물을 투여함으로써 상기 세포주의 암세포화를 방지할 수 있다. 즉, 이러한 HSV-tk 유전자는 세포주에 대한 킬 스위치(kill switch)로 작용할 수 있다.

[0052] 한편, 상기 BMP-2 암호화 유전자 및 상기 HSV-tk 암호화 유전자는 하나의 발현벡터에 삽입될 수 있고, 이러한 발현벡터가 숙주 세포 내로 형질감염(transfection) 됨으로써 상기 유전자들이 발현될 수 있다. 예를 들어, 상기 발현벡터는 아데노바이러스 발현벡터, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 레트로바이러스 벡터 또는 플라스미드(plasmid)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 상기 조성물의 예방 또는 치료 대상인 상기 골질환은 골량 내지 골밀도 저하와 관련된 질환일 수 있으며, 구체적으로 골결손, 골다공증, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합 골절, 골형성 부전증 및 골연화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 이에 따라, 상기 조성물은 골량 내지 골밀도를 향상시키는 데 관련된 유전자 내지 단백질의 발현을 증가시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물은 ALP(Alkaline phosphatase), IBSP(Integrin binding sialoprotein), RUNX2(Runt-related transcription factor 2), OSX(Osterix), SPP1(Secreted phosphoprotein 1) 및 OCN(Osteocalcin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커 발현을 증가시킬 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 상기 조성물은 그 자체로도 우수한 골형성 유도능을 나타낼 수 있으나, 그 효능을 더욱 향상시키기 위해 지지체(scaffold)를 더 포함할 수 있다. 이 때, 상기 지지체는 폴리카프로락톤(PCL, Polycaprolactone) 또는 이상인산칼슘(BCP, Biphasic calcium phosphate)으로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 지지체는 상기 조성물에 포함된 세포주를 이식된 위치에 고정시키는 기능을 수행할 수 있다.

[0056] 한편 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, BMP-2 암호화 유전자 및 HSV-tk 암호화 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 벡터를 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 분화된 세포에 도입하는 단계;를 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법이 제공된다.

[0057] 상기 BMP-2 암호화 유전자와 HSV-tk 암호화 유전자의 기능, 이들을 세포주에 도입하는 방법 및 상기 골질환의 종류에 관해서는 전술한 것과 같다. 한편, 상기 HGPRT 암호화 유전자를 녹아웃 시키는 방법은 공지된 유전자 제거 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어, TAL-뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 또는 RNA-유도 엔도뉴클레아제를 이용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, Cas9/CRISPR 방법을 이용할 수 있다.

[0059] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 실시예 1: TDF 세포주 확립

[0062] 배아줄기세포(WA01 male embryonic stem cell, WiCell research institute) 10⁶개를 30% matrigel(BD biosciences)에 혼합한 후, SCID(severe combined Immunodeficiency) 마우스에 피하주사하였다. 6주 경과 후, 형성된 테라토마(teratoma)를 분리하여 1mm³ 크기로 분쇄한 뒤 10% FBS, 1% 비필수아미노산, 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin), 2mM 글루탐산(glutamax) 및 55 μM β-메르캅토에탄올(β-mercaptoethanol)을 포함하는 DMEM 배양액에서 배양하였다. 배양 중 테라토마 조직으로부터 자라 나온 섬유아세포(TDF, Teratoma-derived fibroblast)를 트립신(trypsin)으로 분리하고 이를 계대 배양하여 세포주를 확립하였다.

[0064] 실시예 2: BMP-2 암호화 유전자 및 HSV-tk 암호화 유전자 삽입 벡터 제작

[0065] CAG promoter-loxP-neo-loxP가 포함된 pL453 벡터를 Not I 제한효소로 절단하고 T4 DNA 중합효소를 이용하여 평활 말단(blunt end)을 형성시켰다. HSV-tk 유전자가 포함된 플라스미드 DNA를 Bgl II/Nco I 제한효소로 절단

하고 T4 DNA 중합효소를 이용하여 평활 말단을 형성시킨 뒤, 상기 벡터 내부로 삽입하였다.

[0066] 이후, 상기 벡터를 BamHI 제한효소로 절단하고 T4 DNA 중합효소를 이용하여 평활 말단을 형성시킨 뒤, BMP-IRES 부분을 PCR로 증폭시켜 상기 벡터 내에 삽입함으로써 BMP-2 유전자 및 HSV-tk 유전자가 삽입된 벡터를 제작하였다.

[0068] 실시예 3: 세포주 내 벡터의 도입

[0069] 상기 실시예 1의 TDF 세포주를 60phi 디쉬에 2×10^6 개의 세포가 되도록 분주한 뒤, 상기 실시예 2의 벡터를 형질감염(transfection)하였다. 형질감염 48시간 경과 후, 네오마이신(neomycin)을 5일 동안 처리함으로써 neoR 유전자가 없는 세포는 사멸시키고 BMP-2 유전자가 도입된 세포를 선별하였다.

[0070] 이후, pCAG-Cre를 포함하는 플라스미드 DNA를 상기 세포에 형질감염하여 loxP 유전자와 Cre 단백질을 반응시킴으로써 BMP-2 및 HSV-tk 유전자가 발현되도록 하였다(도 1). ELISA 분석을 통해 BMP-2의 발현을 확인하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2를 참고하면, Cre를 2회 처리한 경우 약 2ng/ml의 세포 외 BMP-2 방출을 확인할 수 있었다.

[0072] 실시예 4: 초기 골형성 유도능 평가

[0073] 상기 실시예 3에 따른 세포주의 in vitro 초기 골형성 유도능을 평가하기 위해, 골형성 초기 단계의 지표인 ALP(Alkaline phosphatase)의 활성 수준을 측정하였다.

[0074] 상기 실시예 3의 TDF 세포주와 BMP-2를 발현하지 않는 정상 TDF 세포주의 ALP 활성도를 측정하기 위해, 골형성 유도 배지(OIM, Osteogenesis induction medium)에서 세포들을 배양한 군과 일반 성장 배양액(GM, Growth medium)에서 배양한 군으로 나누어 3일, 7일 동안 배양한 뒤 각각의 ALP 활성도를 측정하였다.

[0075] 구체적으로, 배양 3일과 7일 경과 후의 시료를 PBS 완충액으로 2회 세척한 뒤 0.1% Triton X-10이 첨가된 세포막 분해 용액(cell lysis buffer)으로 용해시켰다. 용해된 세포를 4°C, 13000rpm 조건에서 30분 동안 원심분리한 후 상층액을 회수하여 브래드포드법(Bradford assay)으로 정량하고, 동량의 단백질에 대해 405nm에서 ALP kit(AnaSpec)을 이용하여 ALP 활성도를 측정하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0076] 도 3을 참고하면, 골형성 유도 7일 경과 시점에서 상기 실시예 3의 세포주의 ALP 활성도가 대조군의 그것에 비해 2배 가량 높게 관찰되었으며, 일반 성장 배양액에서도 상기 실시예 3의 세포주는 ALP 활성도를 나타내었다. 이를 통해, BMP-2가 도입된 TDF 세포주는 우수한 초기 골형성 유도능을 구현할 수 있음을 알 수 있다.

[0077] 한편, 상기 실시예3의 TDF 세포주와 비교하여 외부로부터 BMP-2 단백질을 주입하는 경우의 골형성 유도능을 평가하기 위해, 시판되는 재조합 BMP-2 단백질을 정상 TDF 세포주에 주입하고 위와 동일한 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0078] 도 4를 참고하면, 골형성 유도 7일 경과 시점에 BMP-2를 1ng/ml, 2ng/ml 및 5ng/ml로 처리한 모든 실험군에서 BMP-2를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 ALP 활성도를 관찰할 수 없었다. 진술한 것과 같이 상기 실시예 3의 TDF 세포에서 방출되는 BMP-2의 농도가 2ng/ml 임을 감안하면, 내부에서 직접 BMP-2 단백질을 발현하는 TDF 세포주가 외부로부터 BMP-2를 주입하는 경우에 비해 월등히 우수한 골형성 유도능을 구현할 수 있음을 알 수 있다.

[0080] 실시예 5: 골형성 과정 중 BMP-2 방출 거동 평가

[0081] 상기 실시예 3의 TDF 세포주가 골형성 과정 중에도 BMP-2 방출을 지속적으로 유지하는지 확인하기 위해, 상기 실시예 3의 TDF 세포주를 골형성 유도 배양액(OIM)에서 배양 후 3일 및 7일 경과 시점에 ELISA 분석을 통해 BMP-2 방출 거동을 분석하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0082] 도 5를 참고하면, 배양 3일 및 7일 경과 시점 모두 어떠한 처리도 하지 않은 TDF 세포주에 비해 상기 실시예 3의 TDF 세포주에서 향상된 BMP-2 방출을 확인할 수 있다. 따라서, 상기 실시예 3의 TDF 세포주는 골형성 과정에서 지속적으로 BMP-2 방출을 유지할 수 있음을 알 수 있다.

[0084] 실시예 6: 골형성 관련 마커 발현 수준 측정

[0085] 상기 실시예 3의 TDF 세포주가 골형성 초기 단계에 나타나는 ALP(Alkaline phosphatase), IBSP(Integrin binding sialoprotein) 및 골분화 관련 전사인자인 RUNX2(Runt-related transcription factor 2), OSX(Osterix)의 발현을 증가시키는지 확인하기 위해, 상기 TDF 세포주와 BMP-2가 도입되지 않은 TDF 세포의 골

분화를 유도하고 3일 경과 후 Trizol 시약(Invitrogen)을 이용하여 이들의 전체 RNA를 추출한 뒤 상기 마커들의 유전자 발현 수준을 측정하였다.

- [0086] 구체적으로, 배양된 각각의 세포를 PBS로 2회 세척하고 Trizol 시약 1ml로 용해시킨 뒤, 200 μ l 클로로포름을 투입하여 교반하고 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm 조건으로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액에 500 μ l의 이소프로판올을 투입하여 교반한 뒤 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm 조건으로 다시 원심분리하였다. 상층액을 제외한 펠렛을 70% 에탄올로 3회 세척한 뒤 RNA를 분리하였다.
- [0087] 각각의 RNA를 5 μ l씩 준비하여 RT-PCR 증폭 키트에 투입하고, 45 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 제작하였다. 제작된 cDNA는 각각 ALP, OCN(Osteocalcin) 및 OPN(Osteopontin)에 특이적인 프라이머를 이용하여 실시간 PCR로 증폭하였다.
- [0088] 구체적으로, 동량의 cDNA에 2X SYBR 그린 시약(Roche) 10 μ l와 각각의 프라이머(0.5pmol/ μ l)를 1 투입한 후 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분씩 40회 반응시켜 증폭하였으며, RT-PCR 결과는 도 6에 나타내었다.
- [0089] 도 6을 참고하면, 상기 실시예 3의 TDF 세포주는 골형성 마커인 ALP, IBSP, RUXN2 및 OSX의 유전자 발현 수준을 증가시키는 것을 알 수 있고, 이는 BMP-2가 도입된 TDF 세포주가 효과적으로 골형성을 유도할 수 있음을 암시한다.
- [0091] 실시예 7: 후기 골형성 유도능 평가
- [0092] 상기 실시예 3의 TDF 세포주의 후기 골형성 유도능을 평가하기 위해, 상기 실시예 3의 TDF 세포주와 BMP-2를 발현하지 않는 정상 TDF 세포주를 각각 골형성 유도 배지(OIM) 또는 일반 성장 배양액(GM)에서 10일 내지 12일 동안 배양 후 칼슘과 미네랄 침착도를 측정하였다.
- [0093] 칼슘의 침착도는 QuantiChromTM 칼슘 분석 키트(DICA-500)로 측정하였다. 구체적으로, 골분화 유도 10일 경과 시점의 시료를 채취하여 PBS 완충액으로 2회 세척한 후, 0.6N HCl을 처리하고 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 보관하였다. 상기 칼슘 분석 키트를 이용하여 세포에 침착된 칼슘을 612nm에서 측정하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0094] 한편, 미네랄 침착도는 Arizarin red S staining solution(Millipore)을 이용하여 측정하였다. 구체적으로, 골분화 유도 10일 경과 시점의 시료를 PBS 완충액으로 2회 세척한 후, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 15분 동안 세포를 고정시켰다. 고정 용액을 제거하고 증류수로 세척한 뒤 Arizarin red S 염색액을 넣고 20분 동안 실온에 보관하였다. 염색이 완료된 후 증류수로 3회 세척하며 색 변화를 확인함과 동시에 570nm에서의 광학밀도(OD)를 측정하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0095] 도 7 및 도 8을 참고하면, 상기 실시예 3의 TDF 세포주는 대조군과 비교하여 4배 이상의 칼슘 침착도와 2배 이상의 미네랄 침착도를 나타내어, 후기 골형성 유도능이 우수함을 알 수 있다.
- [0097] 실시예 8: 동물 모델 내 골형성 평가
- [0098] 대퇴골 골결손 동물 모델에서 상기 실시예 3의 TDF 세포주의 골재생 효과를 확인하기 위해, 7주령의 랫트(rat)의 대퇴부를 수술로 노출시킨 후 장골의 부분 절제(segmental resection)를 통해 골결손 모델을 제작하였다. 이 때, 부분 절제 4주와 8주 후에 유합이 일어나지 않도록 골결손의 크기를 7mm로 제작하였다.
- [0099] 상기 실시예 3의 TDF 세포와 BMP-2가 도입되지 않은 대조군 TDF 세포를 각각 5 \times 10⁵개씩 폴리카프로락톤(PCL, Polycaprolactone) 지지체(scaffold)와 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양한 후 상기 랫트의 골결손 부위에 도입하였다. 이후, 수술 부위를 봉합하고 외고정 장치로 고정하여 마무리한 뒤, 1주일 간격으로 X-ray를 이용하여 골형성을 관찰하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0100] 도 9를 참고하면, 골결손 2주 후부터 PCL 지지체만 주입한 군과 비교하여 대조군 TDF 세포를 주입한 군과 상기 실시예 3의 TDF 세포를 주입한 군 모두 골형성이 증가하였음을 육안으로 확인할 수 있다. 특히, 골결손 4주 경과 시점에서는 대조군 TDF 세포에 비해 실시예 3의 TDF 세포가 골결손 부위의 유합이 보다 효과적으로 나타났다.
- [0101] 또한, 골결손 4주 후 랫트의 장골 골결손 부위를 micro-CT로 촬영하고 골형성 부위를 측정 및 비교하여 그 결과를 도 10에 나타내었다. 도 10을 참고하면, 상기 실시예 3의 TDF 세포주를 도입한 군은 PCL 지지체만 도입한 군과 대조군 TDF 세포주 도입 군 대비 월등히 향상된 골형성능을 나타내는 것을 확인할 수 있다.
- [0102] 한편, 두개골 골결손 동물 모델에서 상기 실시예 3의 TDF 세포주의 골재생 효과를 확인하기 위해, 8주령의 누드

마우스의 두개골을 수술로 노출시킨 후 부분 절제(segmental resection)를 통해 골결손 모델을 제작하였다. 이 때, 부분 절제 4주와 8주 후에 유합이 일어나지 않도록 골결손의 크기를 4mm로 제작하였다.

[0103] 상기 실시예 3의 TDF 세포와 BMP-2가 도입되지 않은 대조군 TDF 세포를 각각 5×10^5 개씩 이상인산칼슘(BCP, Biphasic calcium phosphate) 지지체(scaffold)와 혼합하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 상기 랫트의 골결손 부위에 도입하였다. 3주 경과 후, 두개골 결손 부위를 채취하여 H&E 조직염색 시험법을 이용하여 골형성을 평가하였으며, 그 결과를 도 11에 나타내고, 오스테오칼신(osteocalcin) 및 라민(Lamin) A/C 마커를 형광염색하여 확인한 결과를 도 12에 나타내었다. . 도 11을 참고하면, 상기 실시예 3의 TDF 세포주 도입 군은 대조군 TDF 세포주 도입군에 비해 우수한 골형성 효과를 나타내며, , 결손 부위 크기를 가장 많이 감소시킨 것을 확인할 수 있다. . 도 22를 참고하면, 실시예 3의 TDF 세포주 도입 군은 대조군 TDF 세포주 도입군에 비해 골재생 마커인 오스테오칼신과 라민 A/C의 발현이 두드러지는 것을 확인할 수 있으며, 이는 실시예 3의 TDF 세포주 도입 군에서 골재생 효과가 더 우수하다는 것을 시사한다.

[0105] 실시예 9: 세포 사멸 평가

[0106] 상기 실시예 3에 따른 TDF 세포주의 HSV-tk 유전자 발현에 따른 세포 사멸 여부를 평가하기 위해, 상기 실시예 3의 세포주에 간시클로비르(gancyclovir)를 0 μ g/ml, 50 μ g/ml 및 500 μ g/ml 농도로 각각 처리하고 72시간 내지 124시간 동안 세포 수를 관찰 및 분석하여 각각 도 12 및 도 13에 나타내었다.

[0107] 도 12 및 도 13을 참고하면, 간시클로비르 처리 농도와 시간에 의존적으로 세포 성장이 억제되는 것을 확인하였고, 이는 HSV-tk 유전자 발현에 따라 세포의 킬 스위치(kill switch)가 작동하였음을 나타낸다. 이를 통해, 상기 실시예 3의 TDF 세포주는 골형성 기능을 완료한 뒤, 자가증식에 따른 암 세포화를 효과적으로 방지함을 알 수 있다.

[0109] 실시예 10: OB 세포주 확립

[0110] 배아줄기세포(WA01 male embryonic stem cell, WiCell research institute)를 60phi 디쉬에 10^6 개의 세포가 되도록 분주한 뒤, 상기 실시예 2의 벡터를 형질감염(transfection)하였다. 형질감염 48시간 경과 후, 네오마이신(neomycin)을 5일 동안 처리함으로써 neoR 유전자가 없는 세포는 사멸시키고 BMP-2 유전자가 도입된 세포를 선별하였다.

[0111] 선별한 세포를 배상체(EB, Embryoid body)로 분화시킨 뒤, 아데노신(adenosine)을 포함하는 골분화 배양액으로 3주 동안 배양하여 조골세포(OB, Osteoblast)로 이루어진 세포주를 확립하였다.

[0112] 이후, pCAG-Cre를 포함하는 플라스미드 DNA를 상기 세포주에 형질감염하여 loxP 유전자와 Cre 단백질을 반응시킴으로써 BMP-2 및 HSV-tk 유전자가 발현되도록 하였다. 도 14는 상기 배아줄기세포, 이에 공벡터 또는 실시예 2의 벡터를 삽입하여 분화시킨 조골세포(OB)를 촬영한 이미지이다.

[0113] ELISA 분석을 통해 상기 세포주의 BMP-2 발현을 확인하였으며, 그 결과를 도 15에 나타내었다. 도 15를 참고하면, 공벡터가 도입된 대조군 OB 세포주에 비해 BMP-2가 도입된 OB 세포주가 향상된 세포 외 BMP-2 방출을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0115] 실시예 11: 골형성 관련 마커 발현 수준 측정

[0116] 상기 실시예 10의 OB 세포주가 골형성 관련 마커인 ALP, RUNX2, OSX, IBSP, SPP1 및 OCN의 발현을 증가시키는 지 확인하기 위해, 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 각 마커의 유전자 발현 수준을 측정하였다. 이 때, 대조군으로는 공벡터가 도입된 OB 세포주를 사용하였으며, 측정 결과는 도 16에 나타내었다.

[0117] 도 16을 참고하면, 상기 실시예 10의 OB 세포주는 골형성 마커인 ALP, RUNX2, OSX, IBSP, SPP1 및 OCN의 발현을 모두 증가시키는 것을 알 수 있고, 이는 BMP-2가 도입된 OB 세포주가 효과적으로 골형성을 유도할 수 있음을 암시한다.

[0119] 실시예 12: 후기 골형성 유도능 평가

[0120] 상기 실시예 10의 OB 세포주의 후기 골형성 유도능을 평가하기 위해, 상기 실시예 7과 동일한 방법으로 칼슘과 미네랄 침착도를 측정하였고, 각각의 결과를 도 17 및 도 18에 나타내었다.

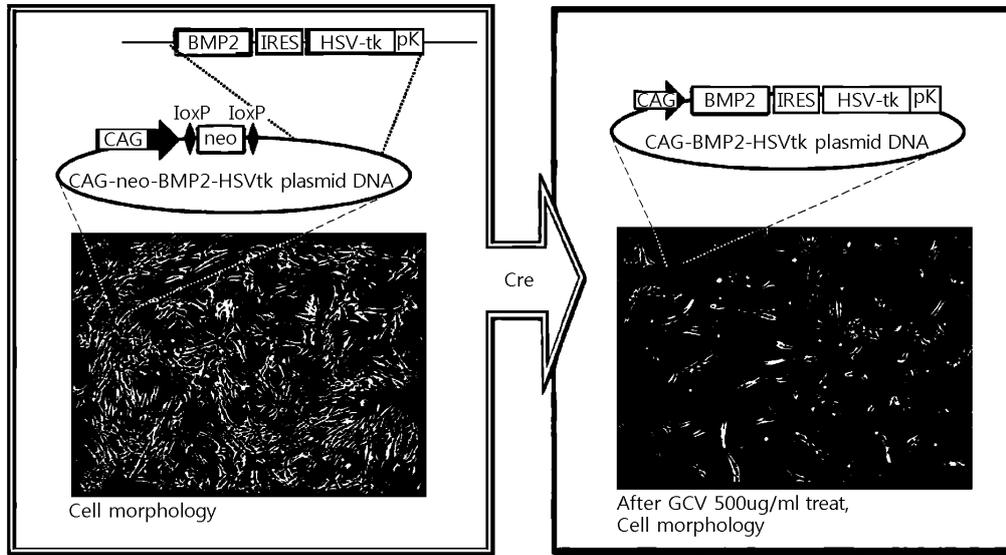
[0121] 도 17 및 도 18을 참고하면, 상기 실시예 10의 OB 세포주는 공벡터가 도입된 대조군과 비교하여 2배 가량 향상

된 칼슘 침착도와 미네랄 침착도를 나타내어, 후기 골형성 유도능이 우수함을 알 수 있다.

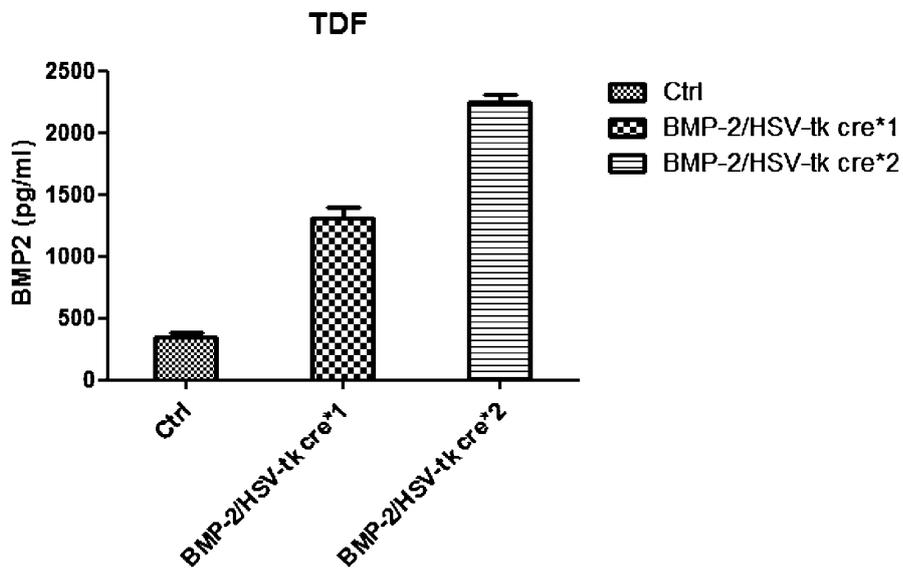
- [0123] 실시예 13: 동물 모델 내 골형성 평가
- [0124] 두개골 결손 동물 모델에서 상기 실시예 10의 OB 세포주의 골재생 효과를 확인하기 위해, 상기 실시예 8과 동일한 H&E 조직염색 시험법을 통해 골형성을 평가하였으며, 그 결과를 도 19에 나타내었다.
- [0125] 이 때, 어떠한 처리도 하지 않은 경우(Defect only), BCP 지지체만을 적용한 경우(Scaffold), 외부로부터 주입한 BMP-2를 지지체와 함께 적용한 경우(50ng/ml 및 5 μ g/ml) 및 공백터가 도입된 OB 세포주를 지지체와 함께 적용한 경우를 대조군으로 설정하였다.
- [0126] 도 19를 참고하면, 상기 대조군들에 비해 실시예 10의 OB 세포주를 적용한 경우 보다 우수한 골형성 효과를 구현할 수 있음을 알 수 있다.
- [0128] 실시예 14: HGPRT 유전자의 게놈 편집 - 이중 킬 스위치 구현
- [0129] X 염색체 상에 존재하는 HGPRT 암호화 유전자를 제거하여 이중 킬 스위치 시스템을 도입하기 위해, Cas9/CRISPR 방법을 수행하였다. HGPRT 암호화 유전자 exon8 위치의 PAM 사이트(site)와 상보적인 sgRNA(가이드 RNA)를 클로닝하였다. Neon® Transfection 방법을 이용해 Cas9 플라스미드DNA와 sgRNA를 1:1의 비율로 상기 실시예 3의 TDF 세포주에 도입하여 HGPRT 암호화 유전자가 제거된 이중 킬 스위치 발현백터를 제작하였다.
- [0130] HGPRT 암호화 유전자가 제거되었는지 여부를 확인하기 위해, HGPRT 암호화 유전자를 제거한 TDF 세포주(이중 킬 스위치 군) 및 상기 실시예 3의 TDF 세포주(대조군)로부터 RNA를 추출하고, 추출한 RNA를 cDNA로 합성한 후 GAPDH, HGPRT real time Primer를 이용하여 그 양을 측정하였다. 어닐링(Annealing) 온도는 60°C이었으며, 사용된 프라이머는 다음과 같다.
- [0131] Forward primer: TGACACTGGCAAAACAATGCA
- [0132] Reverse primer: GGCCTTTTCACCAGCAAGCT
- [0133] 도 24를 참고하면, 이중 킬 스위치 군의 HGPRT 발현량은 대조군의 약 0.328배로 측정되었으며, 이러한 결과를 통해 HGPRT 암호화 유전자가 대부분 제거되었음을 확인할 수 있다.
- [0135] 실시예 15: 약물 테스트를 이용한 이중 킬 스위치 세포주의 확보
- [0136] 상기 실시예 14에서 HGPRT 암호화 유전자를 녹아웃(knock out) 시킨 TDF 세포주와 상기 실시예 3의 TDF 세포주에 6-TG(Tioguanine)을 처리하여 처리 5일, 9일 후의 세포 수를 관찰하여 도 20에 나타내었으며, 생존한 HGPRT 유전자 녹아웃 세포를 분리하였다.
- [0137] 분리한 HGPRT 유전자 녹아웃 세포주와 상기 실시예 3의 TDF 세포주를 6-well에 1 \times 10⁴로 배양하였다. 배양액에 50 \times 의 아미노프테린(aminopterin, HAT) 스톡(stock)을 1 \times (히포크산틴 100 μ M, 아미노프테린 0.4 μ M, 티미딘 16 μ M)로 희석하여 처리하였다. 아미노프테린(HAT)를 처리한 배양액에서 배양 48시간 후의 세포 사멸을 관찰하여 도 21에 나타내었다.
- [0138] 도 20을 참고하면, 6-TG 처리 9일 후 상기 실시예 3의 TDF 세포주에 비해 상기 실시예 14의 HGPRT 녹아웃 세포주에서 더 많은 세포가 생존한 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 21을 참고하면, 아미노프테린을 처리하는 경우 상기 실시예 3의 TDF 세포주는 세포 수의 변화가 거의 없으나, 분리된 HGPRT 녹아웃 세포주에서는 세포 사멸이 나타난 것을 확인할 수 있다.
- [0140] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [0141] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

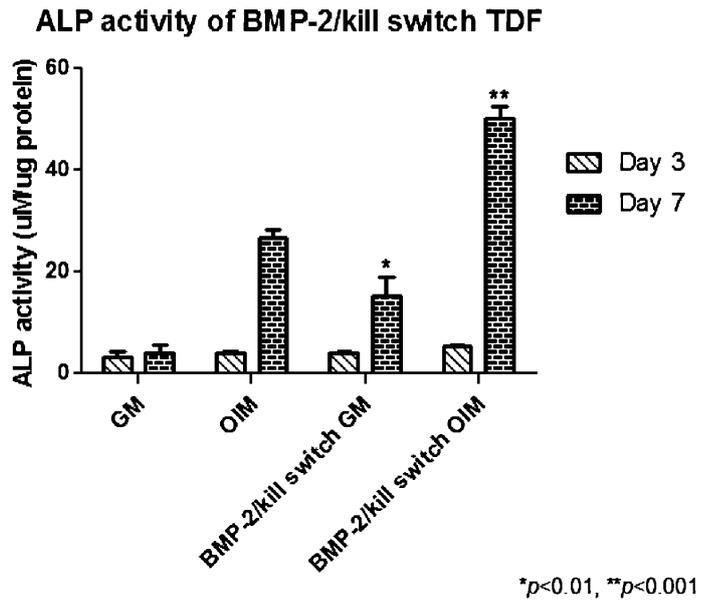
도면1



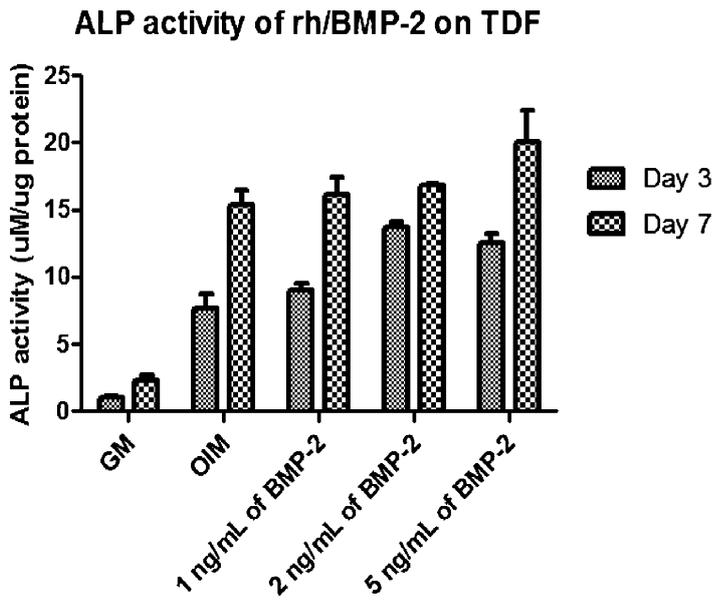
도면2



도면3

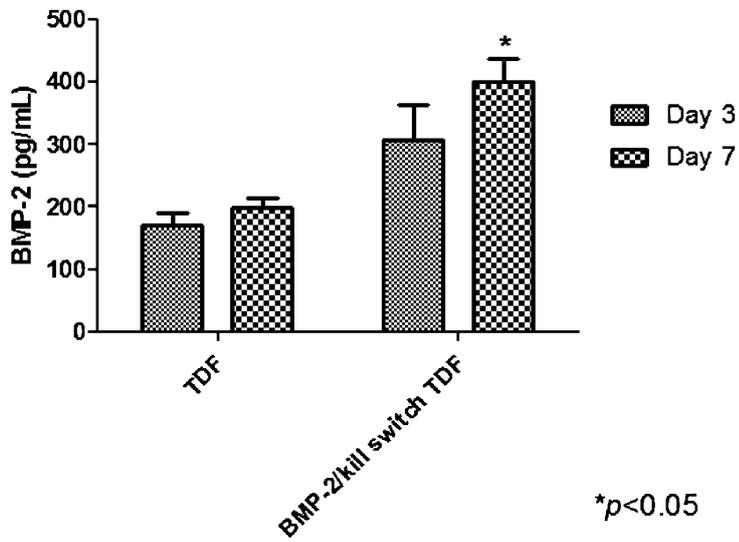


도면4



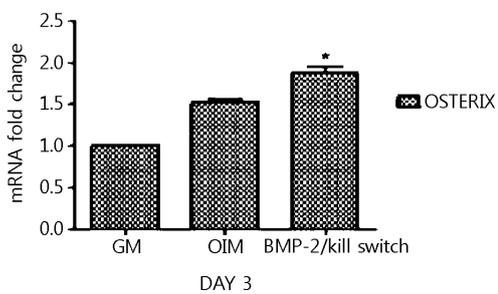
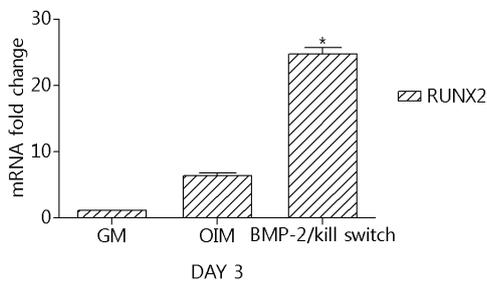
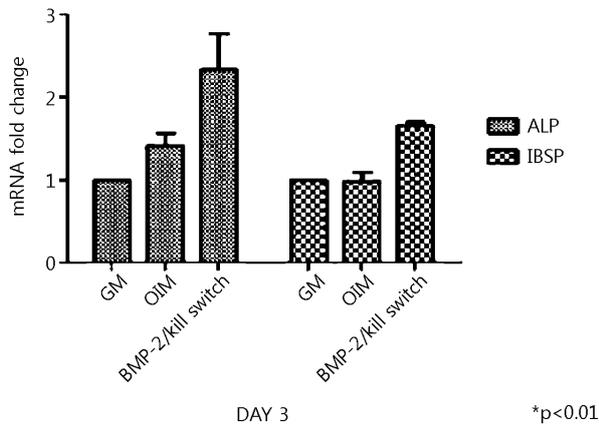
도면5

BMP-2 ELISA during in vitro osteogenesis



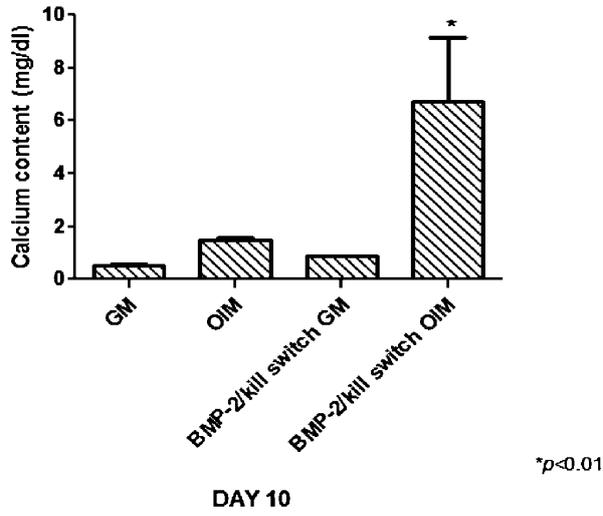
도면6

OS marker gene expression on BMP-2/kill switch TDF



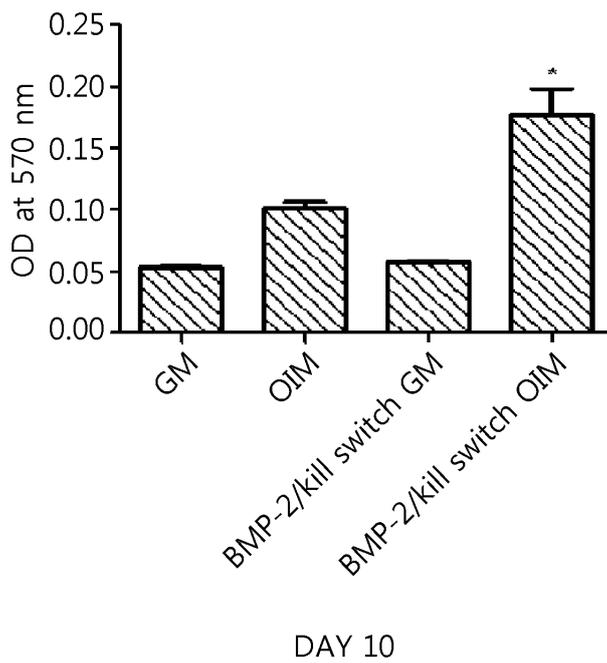
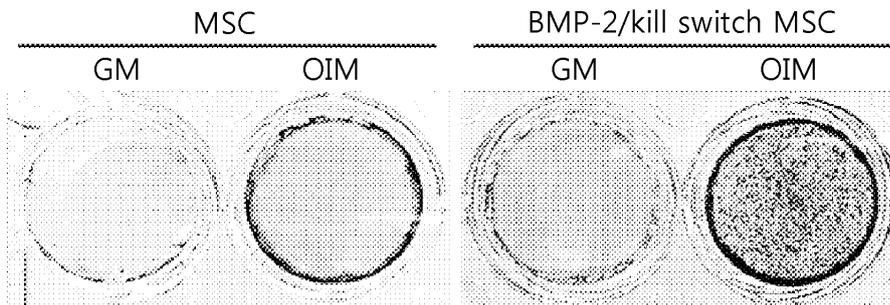
도면7

Calcium deposition of BMP-2/kill switch TDF

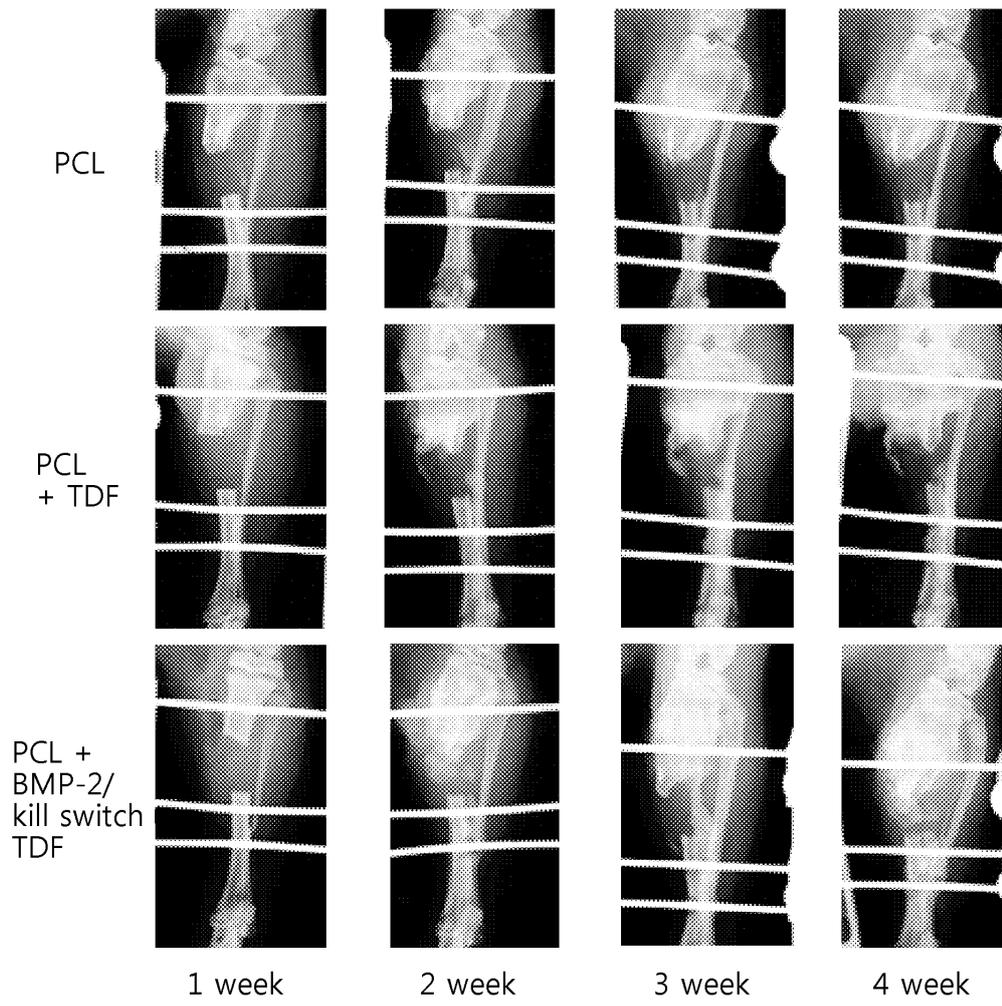


도면8

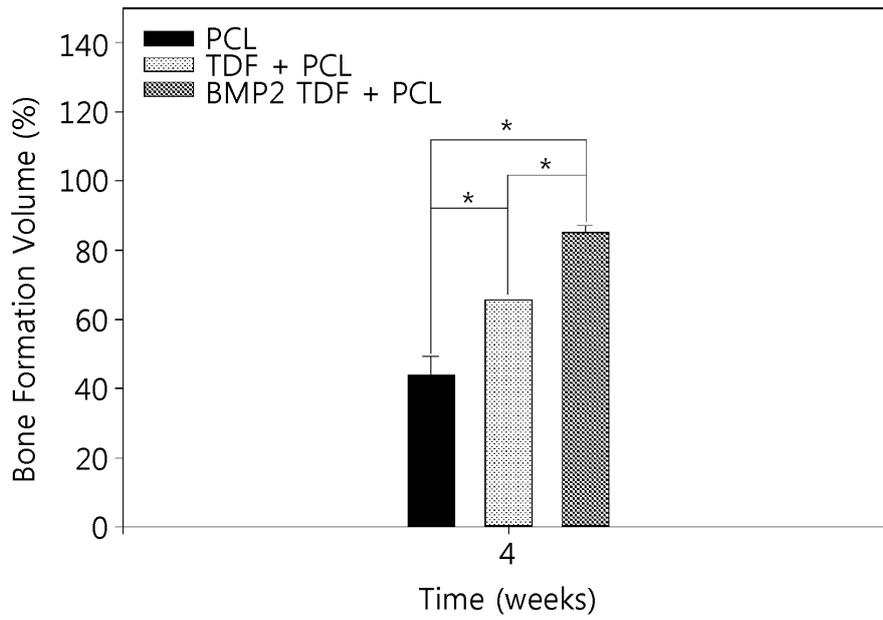
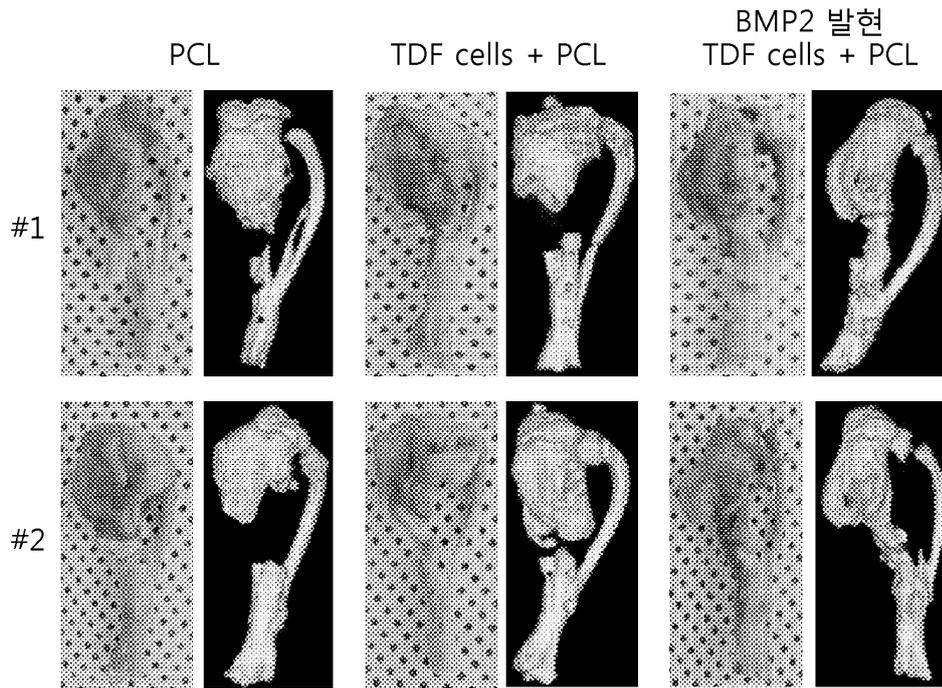
Arizarin red S staining BMP-2/kill switch TDF



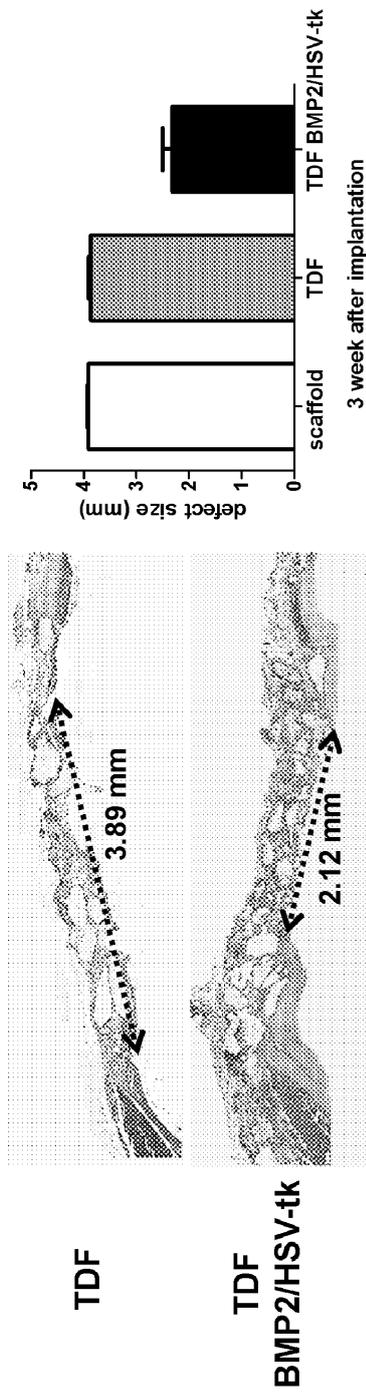
도면9



도면10

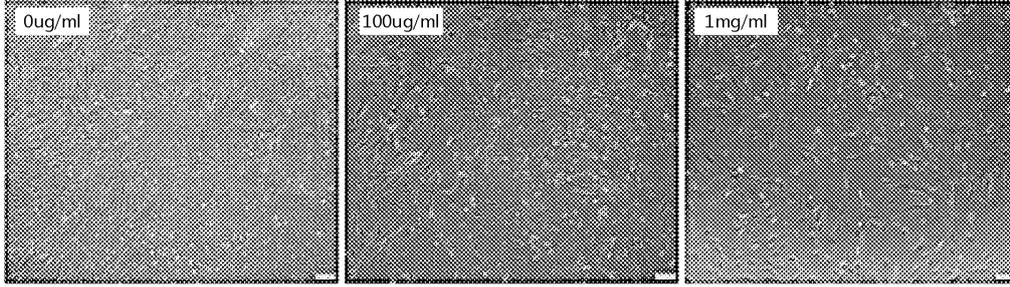


도면11

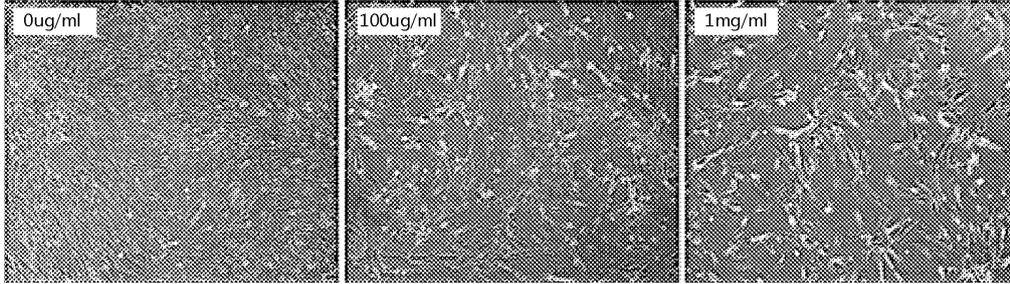


도면12

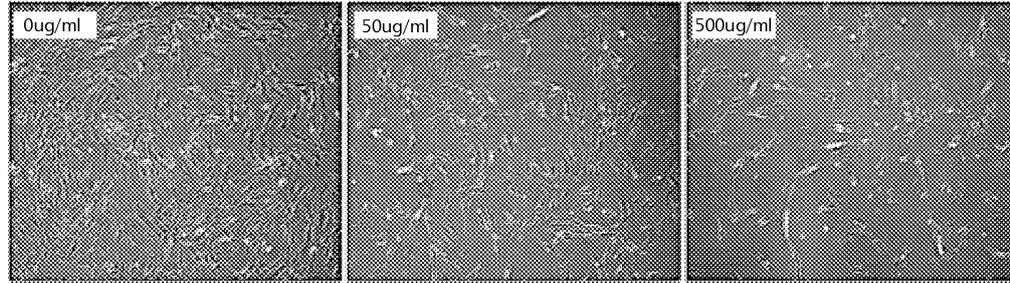
Gancyclovir 처리 72hr



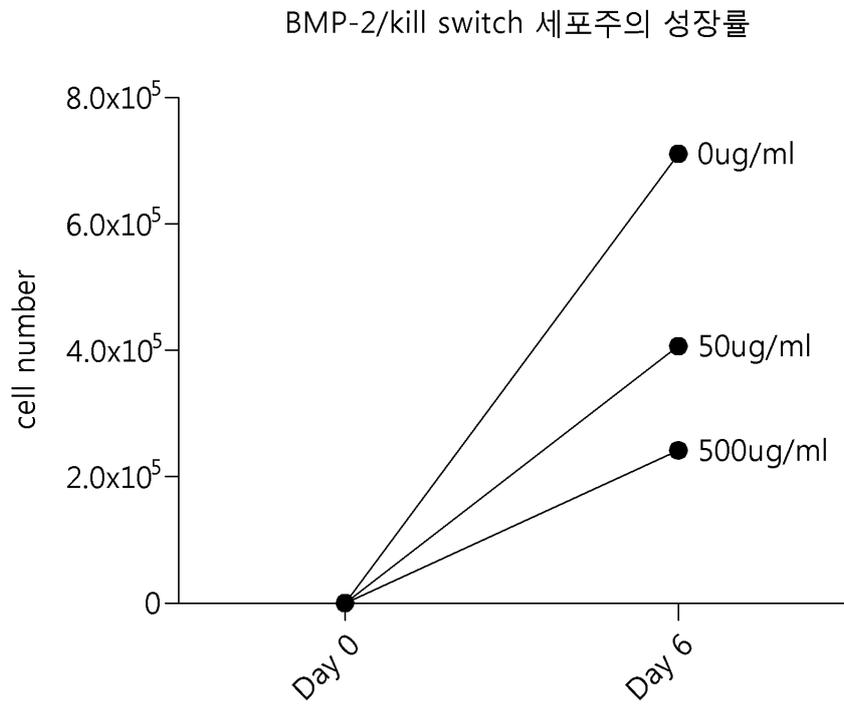
Gancyclovir 처리 120hr



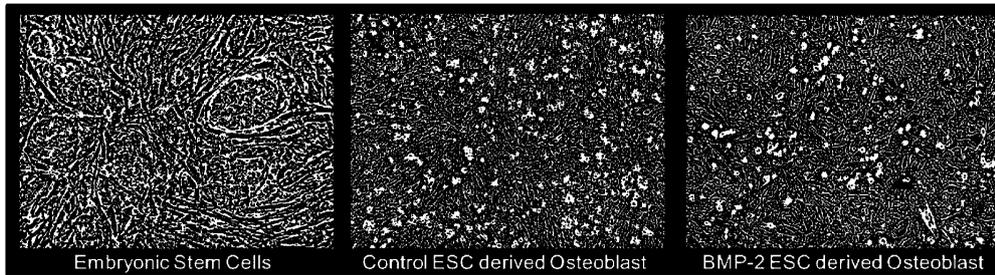
Gancyclovir 처리 124hr



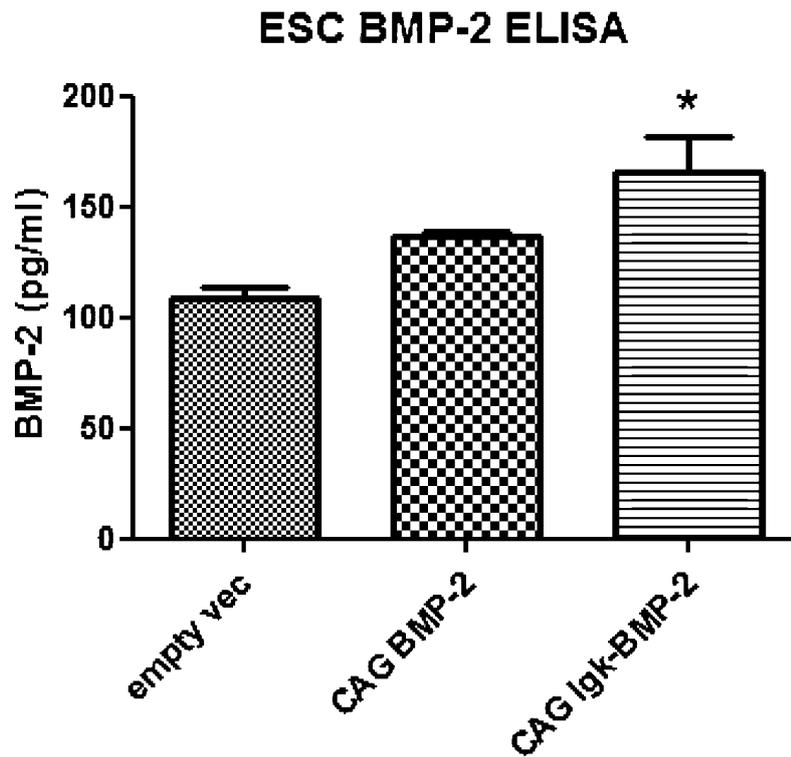
도면13



도면14

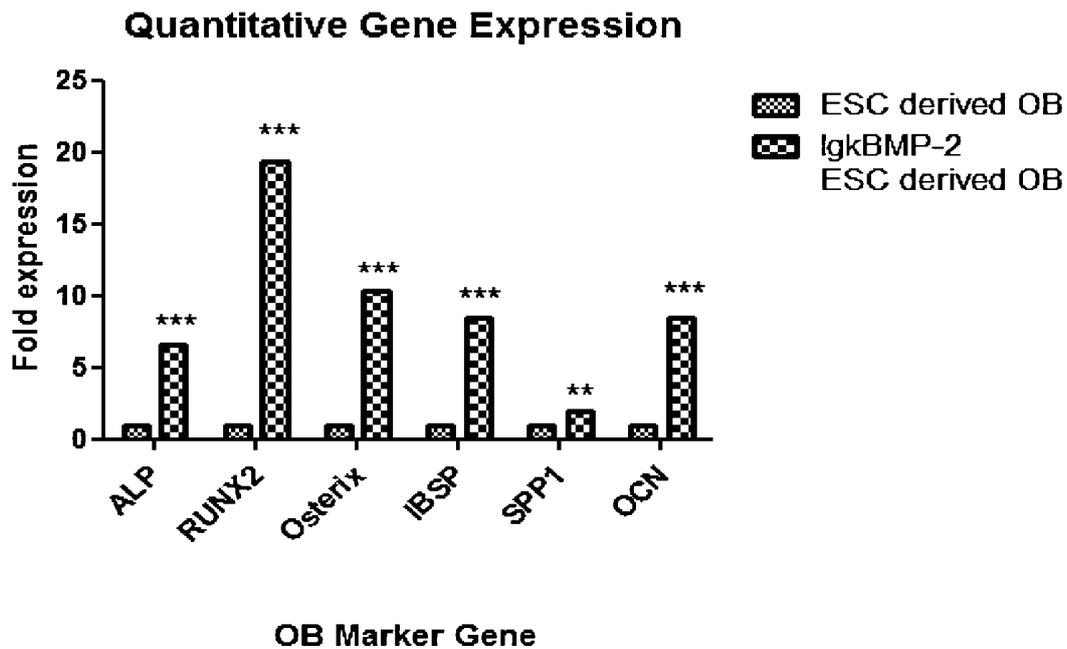


도면15



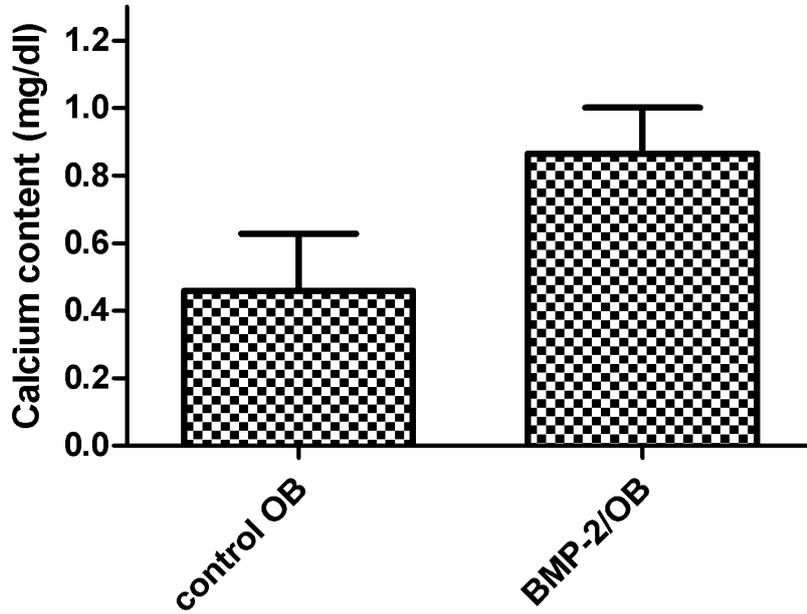
<ESC 세포 내 BMP-2 방출 확인>

도면16



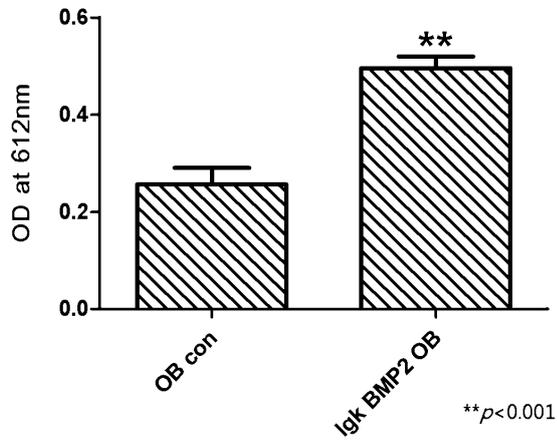
도면17

Calcium assay

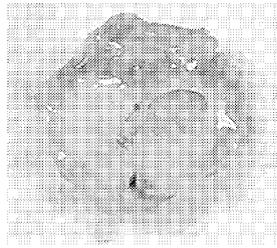


도면18

Arizarin Red staining



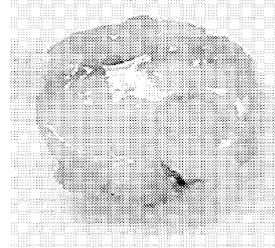
도면19



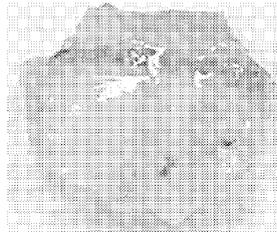
Defect only



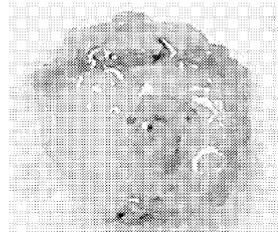
Scaffold(gelform)



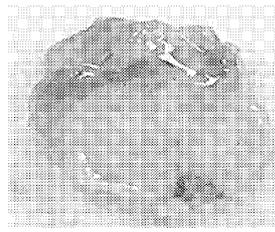
rh/BMP2 (50ng/ml)+scaffold



rh/BMP2 (5ug/ml)+scaffold

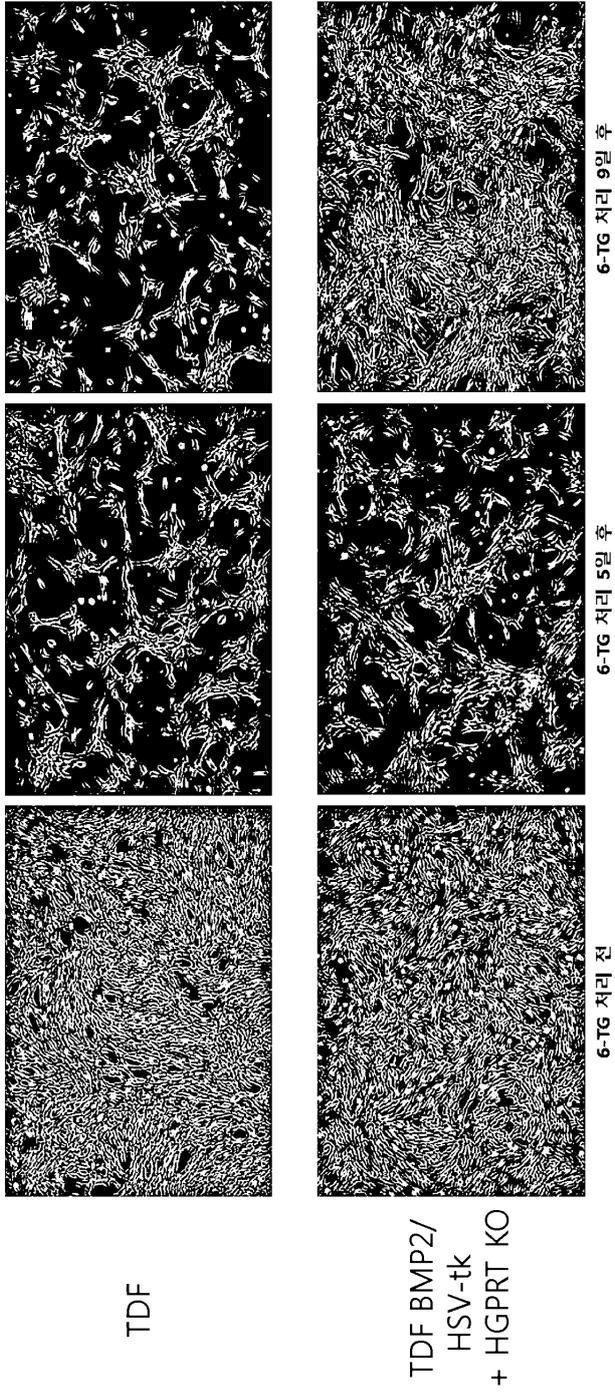


Control OB+scaffold



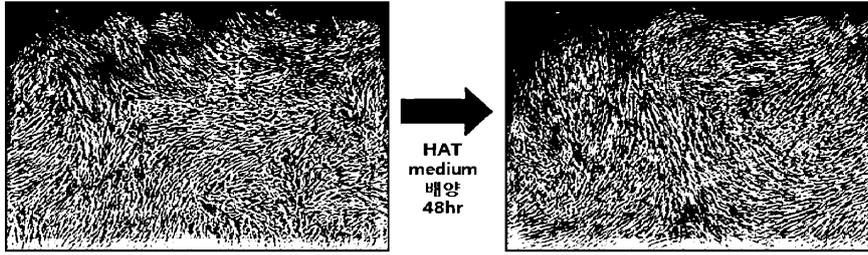
Lgk BMP2/OB+scaffold

도면20

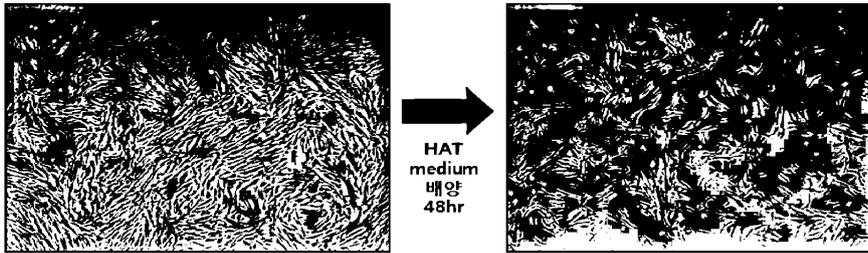


도면21

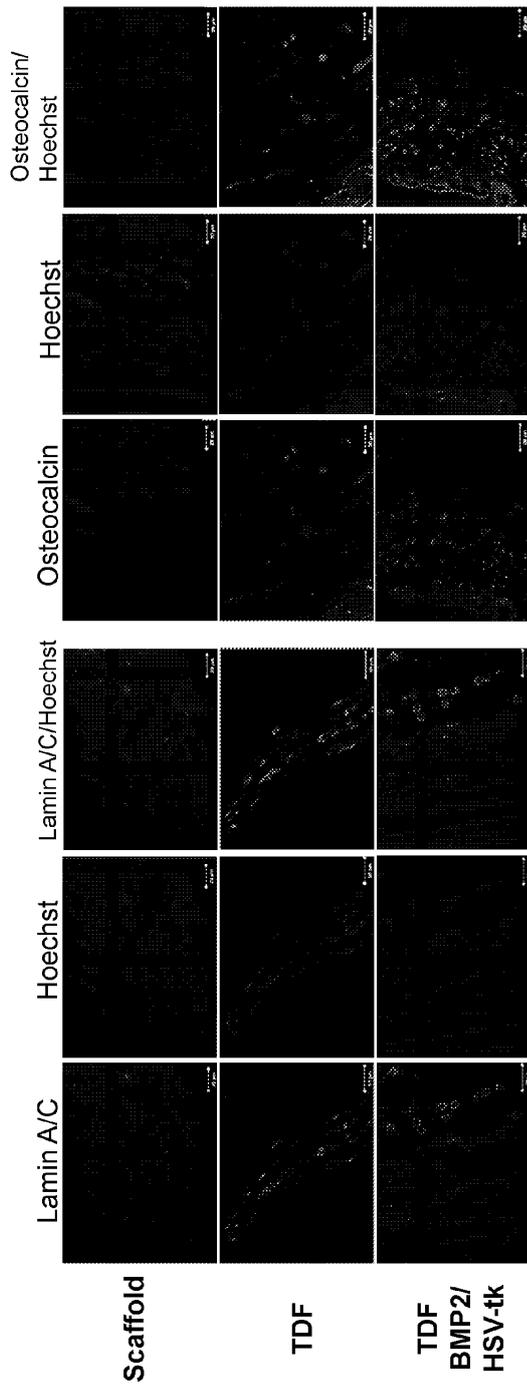
TDF BMP2/HSV-tk



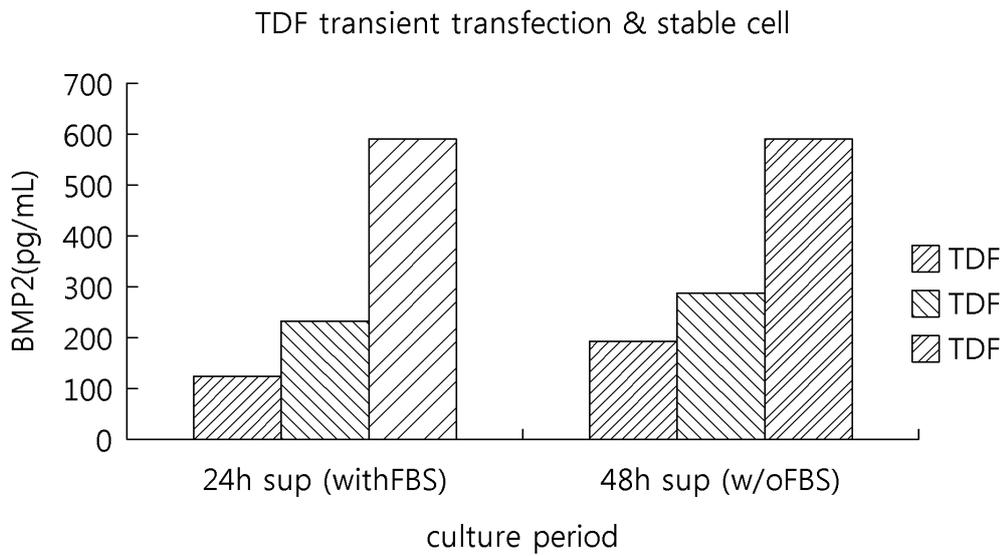
TDF BMP2/HSV-tk + HGPRT KO



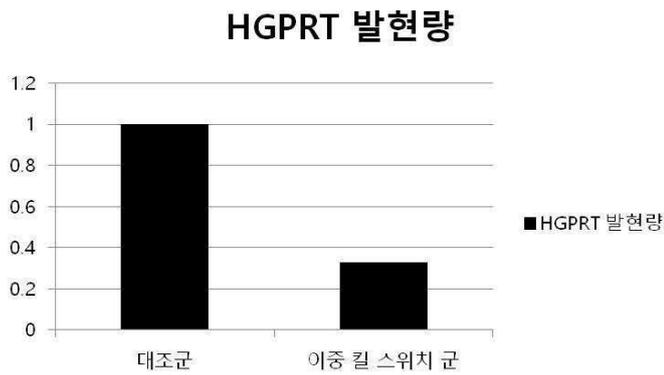
도면22



도면23



도면24



| 구분 | 발현량 |
|----------------|-------------|
| 대조군 | 1 |
| HGPRT 유전자 편집 군 | 0.328042739 |

서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY
- <120> COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING BONE DISEASE HAVING EXCELLENT BONE REGENERATION ABILITY
- <130> APC-2016-0432
- <150> KR 10-2017-0020967
- <151> 2017-02-16
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 caagccaaac acaaacagcg gaaacgcctt aagtccagct gtaagagaca ccctttgtac 60
 gtggacttca gtgacgtggg gtggaatgac tggattgtgg ctccccggg gtatcacgcc 120
 ttttactgcc acggagaatg cccttttctt ctggctgac atctgaactc cactaatcat 180

 gccattgttc agacgttggc caactctgtt aactctaaga ttcctaagc atgctgtgtc 240
 ccgacagaac tcagtgtcat ctcatgctg taccttgacg agaatgaaaa gttgtatta 300
 aagaactatc aggacatggt tgtggagggt tgtgggtgtc gctag 345

 <210> 2
 <211> 593
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 aattccgccc ctctccctcc ccccccccta acgttactgg ccgaagccgc ttggaataag 60
 gccggtgtgc gtttgtctat atgttatttt ccacatatt gccgtctttt ggcaatgtga 120
 gggcccggaa acctggcctt gtcttcttga cgagcattcc taggggtctt tcccctctcg 180

 ccaaaggaat gcaaggctcg ttgaatgtcg tgaaggaagc agttcctctg gaagcttctt 240
 gaagacaaac aacgtctgta gcgacccttt gcaggcagcg gaacccccca cctggcgaca 300
 ggtgcctctg cggccaaaag ccacgtgtat aagatacacc tgcaaaggcg gcacaacccc 360
 agtgccacgt tgtgagttgg atagtgtgg aaagagtcaa atggctctcc tcaagcgtat 420
 tcaacaaggg gctgaaggat gcccagaagg tacccattg tatgggatct gatctggggc 480
 ctcggtgcac atgctttaca tgtgtttagt cgaggttaaa aaactctag gcccccgaa 540
 ccacggggac gtggttttcc tttgaaaaac acgatgataa tatggccaca acc 593

 <210> 3
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 atggcttcgt accccggcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc 60

ggccatagca accgacgtac ggcgttgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
 cgccccgagc agaaaatgcc cagcctactg cgggtttata tagacgtcc ccacgggatg 180
 gggaaaacca ccaccacgca actgctgggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240
 gtacccgagc cgatgactta ctggcgggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcaaacatc 300
 tacaccacac aacaccgctt cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtgta 360

atgacaagcg ccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggtc 420
 cctcatatcg ggggggagcg tgggagctca catgccccgc cccccgcct caccctcatc 480
 ttcgaccgcc atcccatcgc gcacctctg tctaccgg ccgcgcggtta ccttatgggc 540
 agcatgacce ccaggcctg gctggcgttc gtggccctca tcccgcgac cttgcccggc 600
 accaacatcg tgcttggggc ctttccggag gacagacaca tcgaccgctt ggccaaacgc 660
 cagcgccccg gcgagcggtt ggacctggct atgctggctg cgattcgcgg cgtttacggg 720
 ctacttgcca atacggtcgc gtatctgcag tgcggcgggt cgtggcggga ggactgggga 780

cagctttcgg ggacggcctt gccgccccag ggtgccgagc ccagagcaa cgcgggcccc 840
 cgaccccata tgggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt getggcccc 900
 aacggcgacc tglataacgt gtttgcttgg gccttggacg tcttggccaa acgcctcctg 960
 tccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcgg ccggtgccg ggacgcctg 1020
 ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cagctacca cccccggctc cataaccgacg 1080
 atatgcgacc tggcgcgcac gtttccccgg gagatggggg aggctaactg a 1131

<210> 4

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lgk leading peptide binding BMP-2 gene

<400> 4

gttccagggt ccaactggtga ccaagccaaa cacaacacgc ggaaacgcct taagtccagc 60
 tgtaagagac accctttgta cgtggacttc agtgacgtgg ggtggaatga ctggattgtg 120
 gctcccccg ggtatcacgc cttttactgc cagggagaat gcccttttcc tctggtgat 180
 catctgaact ccaactaatca tgccattggt cagacgttgg tcaactctgt taactetaag 240
 attcctaagg catgctgtgt cccgacagaa ctcagtgcta tctcgtgct gtacctgac 300
 gagaatgaaa aggttgattt aaagaactat caggacatgg ttgtggaggg ttgtgggtgt 360

cgctag 366