



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월10일

(11) 등록번호 10-2337404

(24) 등록일자 2021년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/6887 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2020-0000919
 (22) 출원일자 2020년01월03일
 심사청구일자 2020년01월03일
 (65) 공개번호 10-2021-0087779
 (43) 공개일자 2021년07월13일
 (56) 선행기술조사문헌
 J Orthop Res (2017) Vol.35, pp876-885. 1부.*
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
 주식회사 아바테라퓨틱스
 서울특별시 강남구 테헤란로52길 6, 806호(역삼동, 테헤란오피스빌딩)
 (72) 발명자
 박광환
 서울특별시 강남구 논현로51길 25, 1동 1804호(도곡동, 현대그린아파트)
 이진우
 서울특별시 서초구 방배로26길 Elle Ville 402호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 5 항

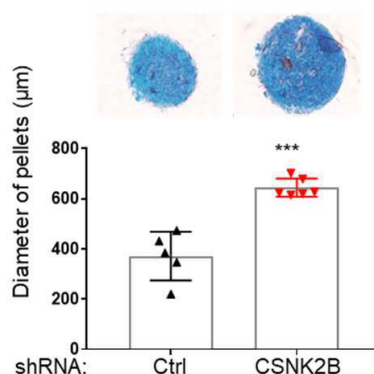
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 조직 재생용 조성물

(57) 요약

본 발명은 CK2(casein kinase 2) 단백질 활성 억제제; 또는 CK2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 조직 재생용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 조성물은 CK2 단백질의 활성을 억제하거나, CK2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 억제함으로써, 줄기세포가 연골로 분화될 수 있도록 유도 및 촉진할 수 있다. 따라서, 연골 분화를 촉진시켜 골 또는 연골과 관련된 질환의 예방, 개선 또는 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/912 (2013.01)

G01N 2800/10 (2013.01)

(72) 발명자

이경미

경기도 고양시 일산동구 노루목로 80, 315동 402호(호수마을3단지아파트)

윤동석

경기도 고양시 덕양구 도래울로 85(21/2), 211동 101호

(56) 선행기술조사문헌

비특허1

KR1020130067486 A

KR1020100017359 A

US20020147163 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

인간 CK2 β (casein kinase 2 β) 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 연골 조직 재생용 약학 조성물로서,

상기 CK2 β 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제는 CK2 β 를 암호화하는 유전자인 CSNK2B(Casein Kinase 2 Beta)의 염기 서열의 일부에 상보적으로 결합하는 서열번호 4로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 연골 조직은 유리질 연골(Hyaline cartilage), 탄성 연골(Elastic cartilage) 및 섬유 연골(Fibrocartilage)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

인간 CK2 β (casein kinase 2 β) 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 연골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 CK2 β 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제는 CK2 β 를 암호화하는 유전자인 CSNK2B(Casein Kinase 2 Beta)의 염기 서열의 일부에 상보적으로 결합하는 서열번호 4로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것이고,

상기 연골 질환은 관절염; 골다공증; 골연골증; 골연골염; 불완전 골형성증; 골수염; 골증식체; 연골형성부전증; 연골염; 연골종; 연골육종; 추간판 탈출증; 클리펠-파일 증후군; 변형성 골염; 낭성 섬유뼈염; 골절; 및 사고로 인한 연골 손상으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인, 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

인간 CK2 β (casein kinase 2 β) 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 연골 조

직 재생용 식품 조성물로서,

상기 CK2 β 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제는 CK2 β 를 암호화하는 유전자인 CSNK2B(Casein Kinase 2 Beta)의 염기 서열의 일부에 상보적으로 결합하는 서열번호 4로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

인간 CK2 β (casein kinase 2 β) 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 연골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

상기 CK2 β 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제는 CK2 β 를 암호화하는 유전자인 CSNK2B(Casein Kinase 2 Beta)의 염기 서열의 일부에 상보적으로 결합하는 서열번호 4로 표시되는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것이고,

상기 연골 질환은 관절염; 골다공증; 골연골증; 골연골염; 불완전 골형성증; 골수염; 골증식체; 연골형성부전증; 연골염; 연골종; 연골육종; 주간관 탈출증; 클리펠-파일 증후군; 변형성 골염; 낭성 섬유뼈염; 골절; 및 사고로 인한 연골 손상으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인, 조성물.

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CK2(casein kinase 2) 단백질 활성 억제제; 또는 CK2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 조직 재생용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탄력성을 갖는 조직인 연골은 두 개의 뼈를 서로 연결하며, 관절 부위에 운동성을 부여하고 충격을 완화하는 역할을 한다. 특히, 관절 연골은 결합조직으로서, 이와 같은 연골에는 프로테오글리칸(Proteoglycan)과 타입 콜라겐의 매트릭스에 임베딩되어 있는 연골 세포가 포함된다. 다양한 원인에 의해 연골 조직이 손상되는 경우에는 뼈와 뼈의 직접적인 마찰, 관절의 뻣뻣함, 관절 연골 운동의 점진적 저하 및 연골 부위의 빈발성 통증이 유발된다. 현재까지 밝혀진 바에 의하면, 골 관절염의 초기 병인은 일반적으로 관절 연골 매트릭스 내의 동화 및 이화 대사 기전의 변화나 불균형에 의하여 연골 파괴가 초래되는 것으로 알려져 있다.

[0003] 일반적으로 척추동물의 관절을 이루는 연골 조직에는 혈관, 신경 및 임파조직이 부재하여, 상기 연골 조직이 한 번 손상되게 되면 정상적으로 생체 내에서 재생될 수 없다. 이렇게 관절의 연골 조직이 손상될 경우 심한 통증으로 인해 일상 활동에 제한을 받게 되며, 연골 조직의 손상이 만성화되는 경우 치명적인 퇴행성 관절염을 유발하게 되어 정상적인 생활이나 직업적인 활동을 거의 할 수 없게 된다. 이에, 손상된 연골 조직을 재생하기 위한 다양한 의학적 방법이 시도되고 있으나, 아직 관절 연골인 초자연골(Hyaline cartilage)을 자연과 같은 상태로 회복하기에는 부족한 실정이다.

[0004] 임상적으로 ① 줄기세포의 연골 세포로의 분화를 유도하는 방법, ② 골 연골 이식술(Osteochondral transplantation)로 자가 혹은 동종의 연골조직을 연골 결손 부위에 이식하는 방법, ③ 미세 골절술(Microfracture)로 손상된 연골을 잘 긁어내어 제거하고 연골 하골이 노출되면 여기에 일정한 간격으로 구멍을 뚫고 이를 통해서 흘러나온 골수 세포가 연골 조직으로 재생되는 것을 도모하는 방법 및 ④ 연골세포 이식술(Chondrocyte transplantation)로 연골 결손부위에 연골세포를 이식함으로써 연골 재생을 유도하는 방법 등이 연골을 재생시키는 수술 방법으로 사용되고 있다.

[0005] 그러나 상기 미세 골절술은 실제 관절에 필요한 초자연골이 아니라 섬유연골(Fibro-cartilage)이 주로 생성되기 때문에, 기능적인 측면에서 만족할 만한 효과를 거두지 못한다는 단점이 존재하고, 상기 골 연골 이식술은 이식

된 부위와 기존의 조직 사이에 틈이 남는 다는 단점이 있으며, 상기 연골세포 이식술의 경우 다수 회에 걸친 수술로 인한 환자의 고통과 경제적 부담이 크다는 단점이 존재한다. 이와 같은 문제점에 따라 연골과 같은 조직을 매우 효과적으로 재생할 수 있는 기술의 개발이 여전히 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 조직 재생용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 연골 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 1. 조직 재생용 조성물

[0010] 본 발명의 일 구현 예에서는 조직 재생용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 상기 조직 재생용 조성물은 CK2(casein kinase 2) 단백질의 활성 억제제; 또는 CK2 단백질을 암호화하는 유전자(예를 들면, *CSNK2A1*, *CSNK2A2* 및 *CSNK2B*)의 발현 억제제를 유효성분으로 포함한다.

[0012] 본 발명의 상기 CK2 단백질의 활성을 억제하거나, CK2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 억제함으로써, 다양한 종류의 줄기세포가 연골로 분화될 수 있도록 유도 및 촉진할 수 있다.

[0013] 본 발명의 상기 "CK2 단백질"은 다양한 진핵세포에 존재하며, 2 분자의 촉매 서브유닛(α 1 및 α 2)과, 2 분자의 조절 서브유닛(β)으로 구성되어 있다. 상기 CK2 α 1의 경우에는 *CSNK2A1*에 의해 암호화되고, 상기 CK2 α 2의 경우에는 *CSNK2A2*에 의해 암호화되며, 상기 CK2 β 의 경우에는 *CSNK2B*에 암호화된다. 상기 CK2 단백질의 α 서브유닛을 암호화하는 유전자를 파괴하였을 때에는 효모가 죽는 현상이 나타나므로, 이와 같은 CK2 단백질은 세포의 생육에 필수적인 것에 해당한다. 본 발명의 목적상 상기 CK2 단백질은 CK2 α 1, CK2 α 2 및 CK2 β 일 수 있고, 예를 들면, CK2 β 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 상기 CK2 α 1 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 CK2 α 2 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 CK2 β 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 상기 아미노산 서열은 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 또는 이들 조합에 따라 통상의 기술자에게 용이하게 변형될 수 있다. 따라서, 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열과 높은 상동성을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드, 예를 들면 상동성이 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상인 경우도 그 활성 또는 유전자의 발현 수준을 억제하였을 때 골 또는 연골의 분화가 유도되거나 촉진되는 기술적 특징을 유지하는 한 본 발명의 상기 단백질에 모두 포함된다.

[0016] 본 발명의 상기 상동성이란, 야생형(Wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열과 상기과 같은 서열 상동성 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시될 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package(Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용가능 하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화될 수 있다.

[0017] 본 발명의 상기 "단백질의 활성 억제제"는 CK2 단백질의 카이네이즈 활성을 억제할 수 있는 물질이라면 제한없이 사용될 수 있고, 상기 CK2 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편 또는 펩타이드 중 어느 하나 이상일 수 있다.

- [0018] 본 발명의 상기 "항체"란, 폴리클로날 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 본 발명에서 상기 CK2 단백질에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler et al., European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 제조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 문헌(Harlow, E. et al., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991)에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 포함된다. 예를 들어, 모클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 CK2 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.
- [0019] 본 발명의 상기 "단편"이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 상기 "유전자의 발현 억제제"는 CK2 단백질을 암호화하는 유전자, 즉 CK2 유전자(*CSNK2A1*, *CSNK2A2* 및 *CSNK2B*)의 전사 또는 번역 과정을 억제하여 상기 유전자의 발현을 억제할 수 있는 물질이라면 모두 사용될 수 있고, 예를 들면, 상기 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 압타머 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 상기 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란, 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스 서열은 상기 서열번호 1로 표시되는 AmpG 유전자의 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하며, 상기 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 예를 들면, siRNA, shRNA 등일 수 있고, 서열번호 4로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5, 3, 343-55, 1995). 골격은 포스포포티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아로믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6(6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오펜, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제 5,138,045호, 제 5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 표적으로하는 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.
- [0023] 본 발명의 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 일례는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.
- [0024] 본 발명의 상기 "압타머"란, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 올리고뉴클레오타이드 분자를

말한다. 앵타머는, 소정의 표적 분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다.

- [0025] 본 발명의 상기 앵타머는 RNA, DNA, 수식(modified) 올리고뉴클레오타이드 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 본 발명의 앵타머는 또한, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 본 발명의 앵타머의 길이는 특별히 한정되지 않고, 통상 15 내지 200 뉴클레오타이드일 수 있지만, 예컨대 15 ~ 100 뉴클레오타이드이고, 바람직하게는 18 ~ 80 뉴클레오타이드이며, 보다 바람직하게는 20 ~ 60 뉴클레오타이드이고, 가장 바람직하게는 22 ~ 45 뉴클레오타이드일 수 있다. 총 뉴클레오타이드 개수가 적으면 화학합성, 화학수식 및 대량 생산이 보다 용이하고, 경제적이며, 생체내 안정성은 높으면서 독성은 낮아 유리하다는 장점이 존재한다.
- [0026] 본 발명의 상기 조직은 연골 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 상기 연골 조직(Cartilage tissue)은 인간을 포함하는 동물의 체내 다양한 부분에서 발견되는 유연한 결합조직으로, 뼈, 흉곽, 귀, 코, 기관지 및 추간판 사이의 접합부를 포함하는 개념이다. 뼈와 달리, 단단하고 경직되어 있지 않으나, 근육과 비교하였을 때에는 덜 유연하고 비교적 뻣뻣하다는 특징을 갖고 있다. 상기 연골 조직은 콜라겐 섬유(Collagen fiber), 프로테오글리칸(Proteoglycan)이 풍부한 기반물질(Ground substance) 및 탄력소 섬유(Elastin fiber)로 구성된 다량의 세포외기질(Extracellular matrix)을 생산하는 연골세포(Chondroblast)라 불리는 특화된 세포로 구성된다. 상기 연골 조직 내에 포획되어 있는 연골 세포에는 관절연골의 압박 또는 탄성연골의 굽힘에 의해 생성되는 펌핑 작용에 의한 확산을 통해 영양분이 제공된다. 이와 같은 이유에 의해 상기 연골 조직은 다른 결합조직과는 달리 혈관을 포함하지 않기 때문에 성장 및 회복이 매우 느릴 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 연골 조직은 상기 세 가지 주요 요소의 상대적인 함유량에 따라 분류될 수 있는 탄성 연골(Elastic cartilage), 유리질 연골(Hyaline cartilage) 및 섬유 연골(Fibrocartilage)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 상기 연골 조직이 위치하는 부위는 유리질 연골(Hyaline cartilage; 예를 들어, 관절, 코, 후두 또는 흉골에 위치하는 유리질 연골), 탄성 연골(Elastic cartilage; 예를 들어 귀에 위치하는 탄성 연골) 및 섬유 연골(Fibrocartilage; 예를 들어, 추간판)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 상기 재생은 일반적으로 생물체에는 몸의 일부 또는 그 기능을 상실하였을 때, 그 부분의 조직이나 기관을 다시 원래의 상태로 복구시키거나 그 기능을 회복하려는 작용을 일컫는다. 본 발명의 목적상 상기 재생은 CK2 단백질의 활성 억제; 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 억제함으로써, 줄기세포가 연골 조직으로 분화될 수 있도록 유도함으로써, 원래의 상태로 복구될 수 있는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 상기 조직 재생용 조성물은 식품 조성물 또는 약학 조성물로 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(Elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0035] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0036] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0037] 본 발명의 상기 비경구는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 상기 유효성분 포함하는 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 상기 유효성분이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 포함하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 구체적으로, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 상기 성분은 독립적 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] **2. 연골 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**
- [0046] 본 발명의 다른 구현 예에서는 연골 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 상기 연골 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 CK2(casein kinase 2) 단백질의 활성 억제제; 또는 CK2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함한다.
- [0048] 본 발명의 연골 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에서, CK2 단백질, CK2 단백질의 활성 억제제, CK2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제, 조직, 연골, 약학 조성물, 식품 조성물 등과 관련된 내용은 상기 "1. 조직 재생용 조성물"에 기재된 바와 동일하여, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0049] 본 발명의 상기 "연골 질환"이란, 연골이 발생되지 않거나, 퇴화 등과 같은 손상에 의해 발생될 수 있는 모든 질환을 의미하는 것으로서, 예를 들면, 관절염; 골다공증; 골연골증; 골연골염; 불완전 골형성증; 골수염; 골중식체; 연골형성부전증; 연골염; 연골종; 연골육종; 추간판 탈출증; 클리펠-파일 증후군; 변형성 골염; 낭성 섬유증; 및 사고, 골절, 상처, 관절 손상, 자가면역질환, 당뇨병 또는 암으로 인한 연골 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 상기 "예방"이란, 본 발명의 조성물을 이용하여 연골 질환으로 발생된 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 상기 "개선" 및 "치료"란, 본 발명의 조성물을 이용하여 연골 질환으로 발생된 증상이 호전 또는 이

롭게 변경되는 행위라면 제한없이 모두 포함될 수 있다.

[0052]	[서열목록]				
[0053]	서열번호 1: CSNK2A1				
[0054]	10	20	30	40	50
[0055]	MSGPVPSRAR VYTDVNTHRP REYWDYESHV VEWGNQDDYQ LVRKLGRGKY				
[0056]	60	70	80	90	100
[0057]	SEVFEAINIT NNEKVVKIL KPVKKKKIKR EIKILENLRG GPNITLADI				
[0058]	110	120	130	140	150
[0059]	VKDPVSRTPA LVFEHVNNTD FKQLYQTLTD YDIRFYMYEI LKALDYCHSM				
[0060]	160	170	180	190	200
[0061]	GIMHRDVKPH NVMDHEHRK LRLIDWGLAE FYHPGQEYNV RVASRYFKGP				
[0062]	210	220	230	240	250
[0063]	ELLVDYQMYD YSLDMWSLGC MLASMIFRKE PFFHGHNDYD QLVRIAKVLG				
[0064]	260	270	280	290	300
[0065]	TEDLYDYIDK YNIELDPRFN DILGRHSRKR WERFVHSENQ HLVSPALDF				
[0066]	310	320	330	340	350
[0067]	LDKLLRYDHQ SRLTAREAME HPYFYTVVKD QARMGSSSMP GGSTPVSSAN				
[0068]	360	370	380	390	
[0069]	MMSGISSVPT PSPLGPLAGS PVIAAANPLG MPVPAAAGAQ Q				
[0071]	서열번호 2: CSNK2A2				
[0072]	10	20	30	40	50
[0073]	MPGPAAGSRA RVYAEVNSLR SREYWDYEAH VPSWGNQDDY QLVRLGRGK				
[0074]	60	70	80	90	100
[0075]	YSEVFEAINI TNNERVVKI LKPVKKKKIK REVKILENLR GGTNI IKLID				
[0076]	110	120	130	140	150
[0077]	TVKDPVSKTP ALVFEYINNT DFKQLYQILT DFDIRFYMYE LLKALDYCHS				
[0078]	160	170	180	190	200
[0079]	KGIMHRDVKP HNVMDHQK KLRLIDWGLA EHYHPAQEYN VRVASRYFKG				
[0080]	210	220	230	240	250
[0081]	PELLVDYQMY DYSLDMWSLG CMLASMIFRR EPFFHGQDNY DQLVRIAKVL				
[0082]	260	270	280	290	300
[0083]	GTEELYGYLK KYHIDLDPHF NDILGQHSRK RWENFIHSEN RHLVSPEALD				
[0084]	310	320	330	340	350
[0085]	LLDKLLRYDH QQRLTAKEAM EHPYFYPVK EQSQPCADNA VLSSGLTAAR				
[0087]	서열번호 3: CSNK2B				
[0088]	10	20	30	40	50

[0089]	MSSSEEVSWI SWFCGLRGNE FFCEVDEDYI QDKFNLTGLN EQVPHYRQAL
[0090]	60 70 80 90 100
[0091]	DMILDLEPDE ELEDNPQSD LIEQAAEMLY GLIHARYILT NRGIAQMLEK
[0092]	110 120 130 140 150
[0093]	YQQGDFGYCP RVYCENQFML PIGLSDIPGE AMVKLYCPKC MDVYTPKSSR
[0094]	160 170 180 190 200
[0095]	HHHTDGAYFG TGFPMLFMV HPEYRPKRPA NQFVPRLYGF KIHPMAYQLQ
[0096]	210
[0097]	LQAASNFKSP VKTIR
[0099]	서열번호 4: shCSNK2B
[0100]	5'-CCGGCCAACCAGAGTGACCTGATTGCTCGAGCAATCAGGTCACCTCTGGTTGGTTTTTG-3'
[0101]	서열번호 5: forward primer
[0102]	CGACTAATAGACTGGGGTTTG
[0104]	서열번호 6: reverse primer
[0105]	TCATACTGCCAGCATACAACC
[0107]	서열번호 7: forward primer
[0108]	AATGTTCTGTAGCCTCAAGGT
[0110]	서열번호 8: reverse primer
[0111]	CTGGTCATAGTTGCTCCTGTCCA
[0113]	서열번호 9: forward primer
[0114]	GCCTGATGAAGAACTGGAAGAC
[0116]	서열번호 10: reverse primer
[0117]	TAACCAAAGTCTCCTTGCTGGT
[0119]	서열번호 11: forward primer
[0120]	ATCAAGACGGAGCAGCTGAG
[0122]	서열번호 12: reverse primer
[0123]	TGGTGGTCGGTGTAGTCGTA
[0125]	서열번호 13: forward primer
[0126]	GAATCAACTGCTGCAGACCA
[0128]	서열번호 14: reverse primer
[0129]	ATGCTGCTCAGGTGTGACTG
[0131]	서열번호 15: forward primer
[0132]	GTCTACCCCAATCCAGCAAA
[0134]	서열번호 16: reverse primer
[0135]	GTTGGGAGCCAGATTGTCAT
[0137]	서열번호 17: forward primer

- [0138] GCTATAAAATTCTTTGCTGACCTGCTG
- [0140] 서열번호 18: reverse primer
- [0141] AATTACTTTTATGTCCCTGTTGACTGG
- [0143] 서열번호 19: forward primer
- [0144] TCTTCTGTGAGGTGGATGAAGA
- [0146] 서열번호 20: reverse primer
- [0147] CTCTTCATCAGGTTCCAGGTCT
- [0149] 서열번호 21: forward primer
- [0150] CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG
- [0152] 서열번호 22: reverse primer
- [0153] CCAGTTTCTACTAATGACACAAACG

발명의 효과

- [0155] 본 발명의 조성물은 CK2 단백질의 활성을 억제하거나, CK2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 억제함으로써, 줄기세포가 연골로 분화될 수 있도록 유도 및 촉진할 수 있다. 따라서, 연골 분화를 촉진시켜 골 또는 연골과 관련된 질환의 예방, 개선 또는 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0156] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포(hBMSCs)에서 CSNK2B(Casein Kinase 2 Beta) 억제에 의한 연골 세포 분화 촉진 효과를 알시안 블루 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 hBMSCs로부터 분화된 연골 세포에서 CSNK2B 억제에 의한 연골 세포 분화와 관련된 유전자의 발현 수준 변화를 정량적 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스의 발생 17.5일째 배아의 뒷다리(hindlimb)에서 얻어진 mRNA로부터 CSNK2B의 발현 수준을 정량적 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스의 발생 17.5일째 배아에서 조직학적 염색을 통해 골 및 연골 분화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스의 발생 17.5일째 배아의 앞다리(forelimb), 뒷다리(hindlimb) 및 빗장뼈(clavicle)에서 조직학적 염색을 통해 골 및 연골 분화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스 각각의 상완골(humeri) 및 대퇴골(femur)에서 골 및 연골 분화 정도를 사프란인 O 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스의 발생 16.5일째의 배아(E16.5) 및 신생아(P0)의 사진을 나타낸 것이다.
- 도 8의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스의 신생아(P0)의 전신, 앞다리 및 뒷다리에서 골 및 연골 분화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9의 A 내지 C는 본 발명의 일 실시예에 따른 CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스의 신생아(P0)의 두개골, 손가락, 빗장뼈에서 골 및 연골 분화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스 각각의 상완골(humeri) 및 대퇴골(femur)에서 골 및 연골 분화 정도를 H&E 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0157] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0159] 실시예

[0161] [준비예 1] 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포(hBMSCs)의 배양

[0162] 아래의 실험은 모두 IRB(Institutional Review Board)의 승인(승인 번호: IRB no. 4-2018-1223) 하에 진행되었다. 6명의 성인 기증자의 후장골릉(posterior iliac crest)에서 골수 천자액(BM aspirates)을 수득하였다. 상기 골수 천자액으로부터 플라스틱 세포배양 플라스크에 흡착되는 능력을 기준으로 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포(hBMSCs)를 선별하였다. 배양 배지(10% FBS(Gibco, Grand Island, NY, USA) 및 1% 항생제-항진균제 용액(Gibco)이 포함된 DMEM-LG(low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco))에서 상기 선별된 hBMSCs를 배양하였다. 여기서, 통상의 방법에 따른 유세포 분석에 의해 CD90 및 CD105가 양성인 반면, CD34 및 CD45가 음성인 것을 통해 hBMSCs의 특성이 확인된 세포만을 아래의 실험에서 사용하였다.

[0164] [준비예 2] CK2 β (Casein kinase 2 β)를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 억제된 hBMSCs 제작

[0165] 렌티바이러스 벡터(pLKO.1-Puro Lentiviral Vector; 시그마알드리치, 한국)의 CK2 β 를 암호화하는 유전자인 CSNK2B(Casein Kinase 2 Beta)의 염기 서열의 일부에 상보적인 서열번호 4로 표시되는 염기 서열을 삽입하여, pLKO.1-puro-CSNK2B를 제작하였다. 여기서, 대조군의 경우, 상기 서열번호 4로 표시되는 염기 서열을 대신하여, 비-타겟 shRNA 염기 서열이 삽입된 대조군 벡터(shScramble, SHC016, pLKO.1-puro (Yonsei Genome Center))를 사용하였다.

[0166] 바이러스 패키징 믹스(Sigma-Aldrich, 미국) 및 리포펙타민 LTX PLUS (Invitrogen, 미국)을 이용하여 상기 렌티바이러스 벡터를 Lenti-X-293FT(Clontech, 미국) 세포에 제조사에서 제공된 프로토콜에 따라 형질전환한 뒤, 상기 형질전환된 세포를 배양하고 상기 세포의 배양액으로부터 바이러스를 수득하였다. 그런 다음, 상기 제조예의 hBMSCs에 상기 수득된 바이러스를 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 바이러스가 포함된 배양 배지를 제거하고, 10 μ g/mL의 푸로마이신(puromycin) 항생제가 포함된 새로운 배양 배지에서 24시간 이상 배양하는 과정을 통해, 항생제에 저항성이 있는 세포만을 선택함으로써 CSNK2B의 발현이 억제된 hBMSCs와, 대조군 hBMSCs를 제작하였다.

표 1

이름	번호	염기서열
shCSNK2B	서열번호 4	CCGGCCAACCAGAGTGACCTGATTGCTCGAGCAATCAGGTCACCTCTGGTTGGTTTTTG

[0170] [준비예 3] CSNK2B 결손 동물 모델 제작

[0171] CSNK2B^{f1/f1} 마우스는 C57BL/6 마우스를 기초로, Nat Immunol. 2015 Mar;16(3):267-75에 기재된 방식에 따라 제작하였다. 나아가, CSNK2B^{Prx1} 마우스는 Prx1-cre 마우스와 CSNK2B^{f1/f1} 마우스의 브리딩에 의해 출생한 마우스 중 표현형이 CSNK2B^{Prx1}인 수컷 마우스만 선별하였다.

[0173] [실시예 1] CK2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제에 의한 연골 분화능 변화 확인

[0174] 마이크로메스(Micromass) 배양을 위하여, 상기 [준비예 2]에서 제작한 1×10^5 (10 μ l)개의 CSNK2B의 발현이 억제된 hBMSCs 또는 대조군 hBMSCs 펠렛을 24-웰 플레이트에 조심스럽게 배치하고, 37°C에서 2시간 동안 부착될 수 있도록 하였다. 그런 다음, 연골 분화 배지(1 \times 인슐린-트랜스페린-셀레늄-A [Gibco], 1% 항생제-항진균제 용액, 50 μ g/mL 아스코르브산 및 10ng/mL 형질전환성장인자- β 3(TGF- β 3; R&D Systems)이 포함된 DMEM-HG(High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco)에서 21일 동안 배양하고, 상기 세포의 마이크로메스 펠렛을 24시간 동안 10% 포말린에 고정시켰다. 고정 후, 상기 포말린-고정 표본을 파라핀에 임베디드(embedded)시켰다. 상기 파라핀-임베디드 절편을 탈파라핀화(deparaffinized)한 뒤, 재수화(rehydrated)하고 PBS를 이용하여 두 번 세척하였다. 그런 다음, 상기 절편을 4 μ m의 두께로 슬라이스하고, 알시안 블루로 염색을 실시한 뒤, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0175] 도 1에서 보는 바와 같이, 대조군 hBMSCs와 비교하여, CSNK2B의 발현이 억제된 hBMSCs에서 21일 동안 연골 분화가 진행될 때 연골 분화능이 현저하게 증가되는 것을 확인하였다.

[0176] 상기 결과를 통해 CK2 β 단백질 및 이를 암호화하는 유전자에 의해 연골 또는 지방 세포로 분화되는 것이 억제될 수 있고, 이와 같은 단백질 및 유전자의 발현 수준을 억제함으로써 중간엽줄기세포가 연골로 분화를 유도하며, 연골로 분화되는 것을 촉진할 수 있음을 알 수 있다.

[0178] **[실시예 2] CK2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제에 의한 연골 분화와 관련된 유전자 발현 수준 확인**

[0179] 상기 [준비예 2]에서 제작한 각각의 CSNK2B의 발현이 억제된 hBMSCs 및 대조군 hBMSCs로부터 QIAzol(QIAGEN)를 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 그런 다음, 분리된 전체 RNA로부터 High-Capacity cDNA 역전사 키트(Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이렇게 합성된 cDNA를 주형가닥으로 하여, 하기 표 2에 기재된 CSNK2A1(Casein Kinase 2 Alpha 1), CSNK2A2(Casein Kinase 2 Alpha 2), CSNK2B, SOX9(SRY-Box Transcription Factor 9), ACAN(Aggregan), COL2A1(Collagen, type II, alpha 1) 및 HPRT(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)에 특이적인 프라이머 세트를 이용하여 SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 및 QuantStudio 제 6 Flex System (Applied Biosystems)을 통해 정량적 RT-PCR(realtime-Polymerase chain reaction)을 수행하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

표 2

[0181]

유전자	서열번호	특징	서열
CSNK2B	서열번호 5	정방향	CGACTAATAGACTGGGGTTTGG
	서열번호 6	역방향	TCATACTTGCCAGCATACAACC
CSNK2A2	서열번호 7	정방향	AATGTTCTGTAGCCTCAAGGT
	서열번호 8	역방향	CTGGTCATAGTTGCTCTGTCCA
CSNK2B	서열번호 9	정방향	GCCTGATGAAGAACTGGAAGAC
	서열번호 10	역방향	TAACCAAAGTCTCCTTGCTGGT
SOX9	서열번호 11	정방향	ATCAAGACGGAGCAGCTGAG
	서열번호 12	역방향	TGGTGGTCGGTGTAGTCGTA
ACAN	서열번호 13	정방향	GAATCAACTGCTGCAGACCA
	서열번호 14	역방향	ATGCTGCTCAGGTGTGACTG
COL2A1	서열번호 15	정방향	GTCTACCCCAATCCAGCAAA
	서열번호 16	역방향	GTTGGGAGCCAGATTGTCAT
HPRT	서열번호 17	정방향	GCTATAAATCTTTGCTGACCTGCTG
	서열번호 18	역방향	AATTACTTTTATGTCCCTGTTGACTGG

[0182] 도 2에서 보는 바와 같이, 대조군 hBMSCs와 비교하여, CSNK2B의 발현이 억제된 hBMSCs로부터 분화된 연골 세포에서, SOX9, ACAN 및 COL2A1의 발현 수준이 모두 현저하게 증가되었다.

[0183] 상기 결과를 통해 CK2 β 단백질 및 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 억제함으로써 중간엽줄기세포가 연골로 분화를 유도하며, 연골로 분화되는 것을 촉진할 수 있음을 알 수 있다.

[0185] **[실시예 3] 실험 동물에서 CSNK2B 유전자 결손에 따른 연골 형성 확인**

[0186] **[3-1] 유전자 결손 여부 확인**

[0187] 상기 [준비예 3]의 동물 모델인 CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스의 사지(limbs)로부터 전체 RNA를 추출하기 위해, 수정 후 17.5일째 태아 마우스의 뒷다리 조직을 적출하고, 조직을 충분히 균질화 하였다. 이후, 균질화된 샘플을 이용하여 상기 [실시예 2]에 기재된 방법과 동일하게 전체 RNA를 추출하고 하기 표 3에 기재된 프라이머 세트를 이용하여 정량적 RT-PCR을 수행하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

표 3

[0188]

유전자	서열번호	특징	서열
CSNK2B	서열번호 19	정방향	TCTTCTGTGAGGTGGATGAAGA
	서열번호 20	역방향	CTCTTCATCAGGTTCCAGGTCT
HPRT	서열번호 21	정방향	CTGGTGAAGGACCTCTCGAAG
	서열번호 22	역방향	CCAGTTTCACTAATGACACAAACG

- [0189] 도 3에서 보는 바와 같이, 대조군에 해당하는 CSNK2B^{f1/f1} 마우스와 비교하여, CSNK2B^{prx1} 마우스에서 CSNK2B 유전자의 발현이 2배 이상 낮아진 것을 확인하였다.
- [0191] **[3-2] 조직학적 분석**
- [0192] 상기 [준비예 3]의 동물 모델의 제작 과정에서, CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스의 발생 17.5일째의 배아(embryo)를 분리한 뒤, 2 % 중탄산 나트륨 용액에 용해된 25 mg/kg 칼세인(Calcein, Sigma, C0875) 및 50 mg/kg 알리자린-3-메틸이미노디아세트릭 에시드(alizarin-3-methyliminodiacetic acid, Sigma, A3882)을 5 일 간격으로 마우스에 피하에 주사하였다. 이후, 10% 중성 완충 포르말린에서 2일 동안 배양한 뒤, 메틸 메타 크릴레이트에 탈칼슘화되지 않은 대퇴골 샘플을 매립화하였다. 그런 다음, 근위 메타피시스(metaphysis)를 종방향(5 μ m)으로 절단하고, 이를 골 형성률/골 표면 (bone formation rate/bone surface; BFR/BS), 미네랄 동격 비율(mineral apposition rate; MAR), 골 영역 (bone area; B.Ar) 및 파골 세포 수 / 골 매개 변수(osteoclast number/bone parameter; N.Oc / B.Pm)가 측정의 대상으로 정의되는 반자동 분석 시스템(Osteometrics)으로 구현된 Nikon Optiphot 2 현미경을 사용하여 측정하여, 그 결과를 도 4 및 5에 나타내었다. 여기서, 측정 시에는 두 섹션/샘플을 ~ 25 μ m로 분리한 상태로 수행하였으며, 정규화 전에 합산하여 ASBMR 표준에 따라 단일 측정/샘플을 얻었다.
- [0193] 도 4 및 도 5에서 보는 바와 같이, 대조군에 해당하는 CSNK2B^{f1/f1} 마우스와 비교하여, CSNK2B^{prx1} 마우스에서 파란색으로 표시되는 연골이 매우 잘 형성되었으나, 골은 제대로 형성되지 않는 것을 확인하였다.
- [0195] **[실시예 4] 실험 동물에서 CSNK2B 유전자 결손에 따른 연골 분화능 억제 효과 확인(1)**
- [0196] 상기 [준비예 3]의 동물 모델에서 조직학적 분석을 위하여, CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스 각각의 상완골(humeri) 및 대퇴골(femur)을 해부하고, 2일 동안 10% 중성 완충 포르말린에 고정시킨 뒤, 1 내지 2 주 동안 15% 테트라 나트륨 EDTA를 매일 갈아주는 과정을 통해 석회를 충분히 제거하였다. 그런 다음, 에탄올을 이용하여 조직을 탈수시킨 뒤, 자일렌을 사용하여 2회 씻어내고, 파라핀을 이용하여 파라핀화한 뒤, 관상 플레이트를 따라 전방에서 후방으로 7 μ m 두께로 절편화 하였다. 마지막으로 상기 절편을 사프라닌 0를 이용하여 염색하고, 그 결과를 도 6의 A 및 B에 나타내었다.
- [0197] 도 6의 A 및 B에서 보는 바와 같이, CSNK2B 유전자의 결손이 있는 CSNK2B^{prx1} 마우스의 상완골 및 대퇴골 모두에서 정상 대조군인 CSNK2B^{f1/f1} 마우스와 비교하여 연골에서 골로 분화되는 과정을 현저하게 지연시켰다.
- [0198] 상기 결과를 통해 CSNK2B 유전자의 결손에 따라 연골이 골로 분화되는 것을 억제하기 때문에, 이와 같은 현상은 결국 CSNK2B 유전자의 억제가 연골분화능을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0200] **[실시예 5] 실험 동물에서 CSNK2B 유전자 결손에 따른 골격 표현형의 특징 분석**
- [0201] 상기 [준비예 3]의 동물 모델의 제작 과정에서, CSNK2B^{f1/f1} 및 CSNK2B^{prx1} 마우스의 발생 16.5일째의 배아(E16.5) 및 신생아(P0)의 사진을 촬영하여 도 7에 나타내었다. 또한, 상기 실시예 [3-2]에서와 동일한 방법으로 신생아의 골 및 연골을 염색하여, 그 결과를 도 8의 A 및 B와, 도 9의 A 내지 C에 나타내었다.
- [0202] 도 7, 도 8의 A 및 B와, 도 9의 A 내지 C에서 보는 바와 같이, 골과 연골 조직을 관찰하였을 때 대조군에 해당하는 CSNK2B^{f1/f1} 마우스와 비교하여, CSNK2B^{prx1} 마우스의 앞다리(Forelimb), 뒷다리(Hindlimb), 두개골(skull), 손가락(digit) 및 복장뼈(sternum)에서 골에 비하여 연골 조직이 현저하게 높은 수준으로 존재하는 것을 확인하였다.
- [0204] **[실시예 6] 실험 동물에서 CSNK2B 유전자 결손에 따른 연골 분화능 억제 효과 확인(2)**
- [0205] 상기 [준비예 3]의 동물 모델의 신생아에서 조직학적 분석을 위해, 상기 [실시예 4]와 동일한 단계를 수행하여, 절편을 얻은 뒤에 사프라닌 0를 대신하여 헤마톡실린&에오신(hematoxylin and eosin; H&E)을 이용하여 염색하고, 그 결과를 도 10의 A 및 B에 나타내었다.
- [0206] 도 10의 A 및 B에서 보는 바와 같이, CSNK2B 유전자의 결손이 있는 CSNK2B^{prx1} 마우스의 상완골 및 대퇴골 모두에

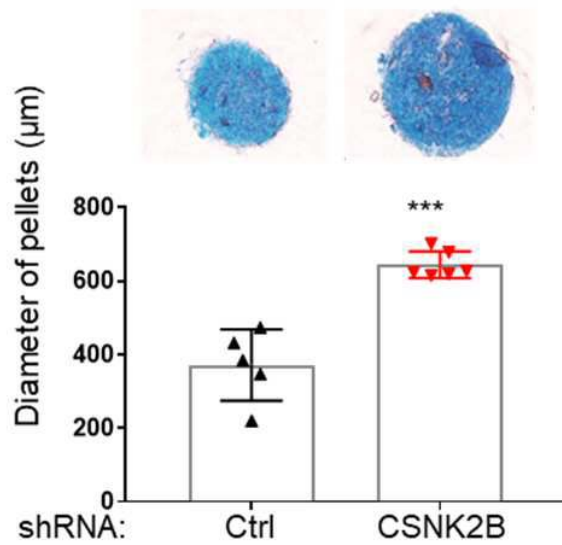
서 정상 대조군인 CSNK2B^{f1/f1} 마우스와 비교하여 연골에서 골로 분화되는 과정을 현저하게 지연시켰다.

[0208]

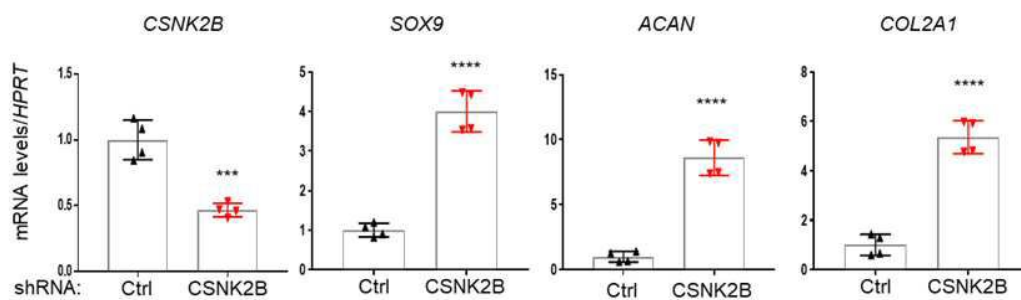
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

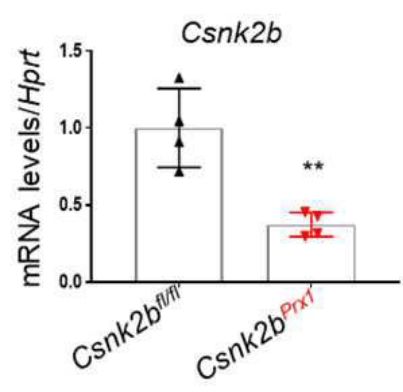
도면1



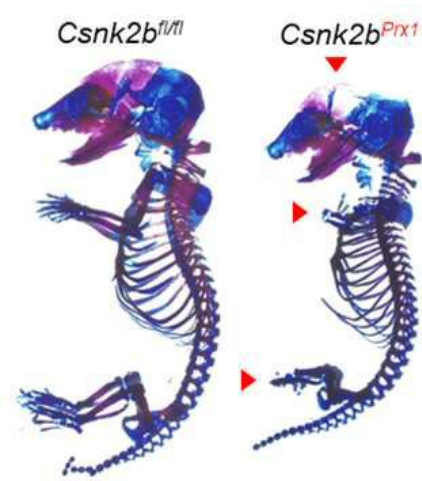
도면2



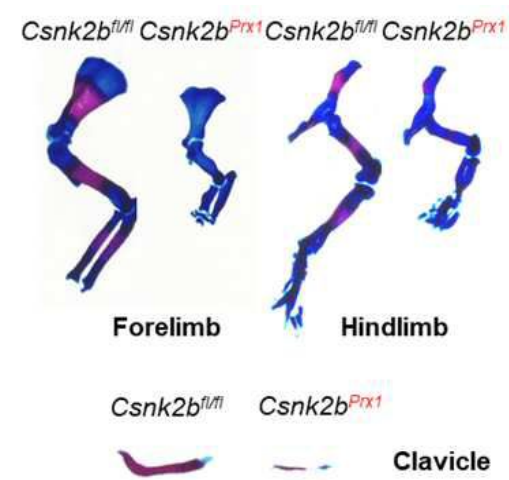
도면3



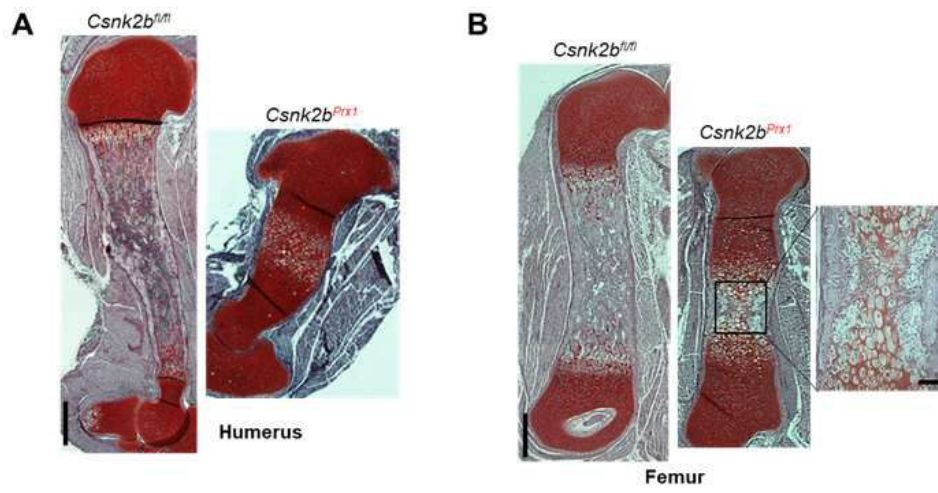
도면4



도면5



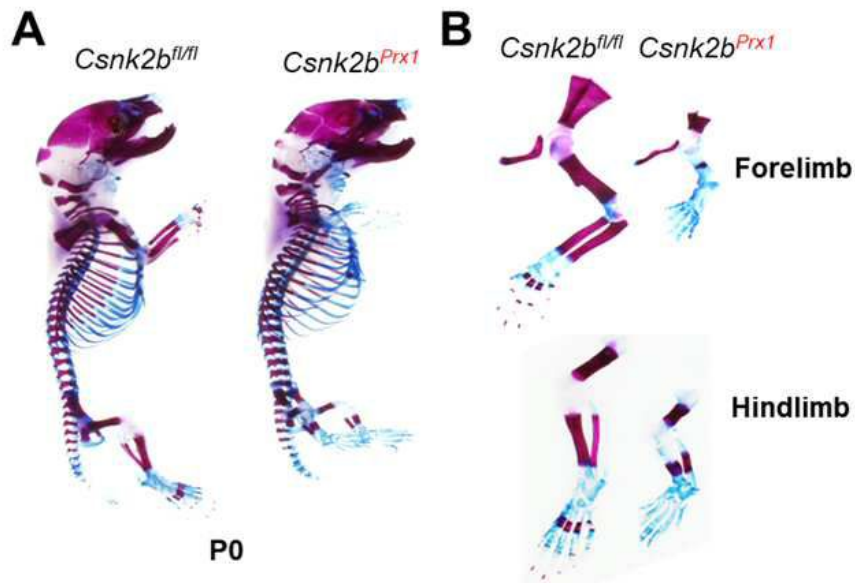
도면6



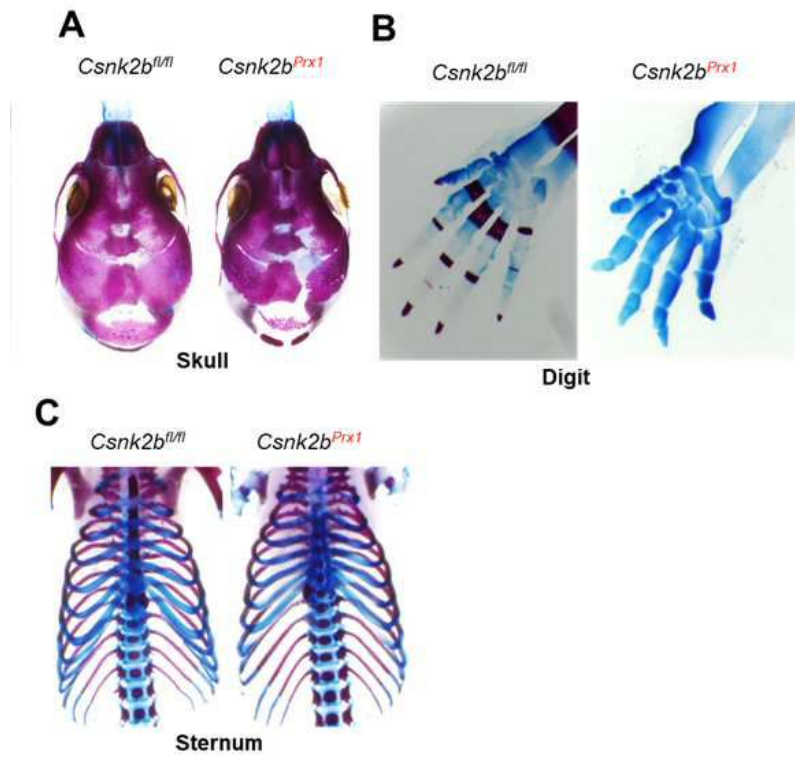
도면7



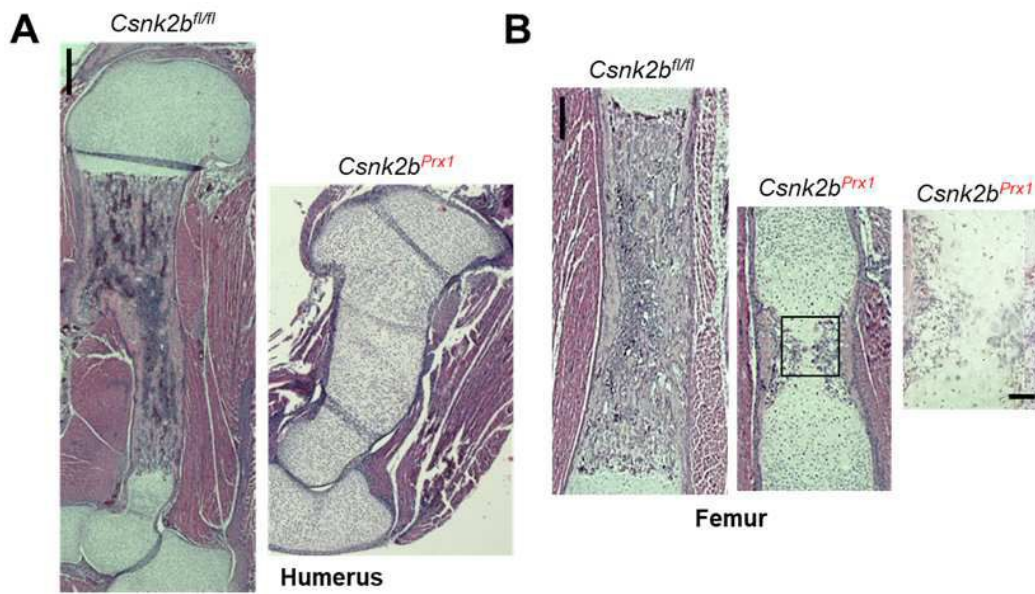
도면8



도면9



도면10



서열목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> A Composition for regeneration of tissue

<130> PDPB194255

<160> 22

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 391

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met Ser Gly Pro Val Pro Ser Arg Ala Arg Val Tyr Thr Asp Val Asn

1 5 10 15

Thr His Arg Pro Arg Glu Tyr Trp Asp Tyr Glu Ser His Val Val Glu

20 25 30

Trp Gly Asn Gln Asp Asp Tyr Gln Leu Val Arg Lys Leu Gly Arg Gly

35 40 45

Lys Tyr Ser Glu Val Phe Glu Ala Ile Asn Ile Thr Asn Asn Glu Lys

50 55 60

Val Val Val Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg

65 70 75 80

Glu Ile Lys Ile Leu Glu Asn Leu Arg Gly Gly Pro Asn Ile Ile Thr
 85 90 95
 Leu Ala Asp Ile Val Lys Asp Pro Val Ser Arg Thr Pro Ala Leu Val
 100 105 110
 Phe Glu His Val Asn Asn Thr Asp Phe Lys Gln Leu Tyr Gln Thr Leu
 115 120 125
 Thr Asp Tyr Asp Ile Arg Phe Tyr Met Tyr Glu Ile Leu Lys Ala Leu
 130 135 140
 Asp Tyr Cys His Ser Met Gly Ile Met His Arg Asp Val Lys Pro His
 145 150 155 160
 Asn Val Met Ile Asp His Glu His Arg Lys Leu Arg Leu Ile Asp Trp
 165 170 175
 Gly Leu Ala Glu Phe Tyr His Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Arg Val
 180 185 190
 Ala Ser Arg Tyr Phe Lys Gly Pro Glu Leu Leu Val Asp Tyr Gln Met
 195 200 205
 Tyr Asp Tyr Ser Leu Asp Met Trp Ser Leu Gly Cys Met Leu Ala Ser
 210 215 220
 Met Ile Phe Arg Lys Glu Pro Phe Phe His Gly His Asp Asn Tyr Asp
 225 230 235 240
 Gln Leu Val Arg Ile Ala Lys Val Leu Gly Thr Glu Asp Leu Tyr Asp
 245 250 255
 Tyr Ile Asp Lys Tyr Asn Ile Glu Leu Asp Pro Arg Phe Asn Asp Ile
 260 265 270
 Leu Gly Arg His Ser Arg Lys Arg Trp Glu Arg Phe Val His Ser Glu
 275 280 285
 Asn Gln His Leu Val Ser Pro Glu Ala Leu Asp Phe Leu Asp Lys Leu
 290 295 300
 Leu Arg Tyr Asp His Gln Ser Arg Leu Thr Ala Arg Glu Ala Met Glu
 305 310 315 320
 His Pro Tyr Phe Tyr Thr Val Val Lys Asp Gln Ala Arg Met Gly Ser

325 330 335
 Ser Ser Met Pro Gly Gly Ser Thr Pro Val Ser Ser Ala Asn Met Met
 340 345 350
 Ser Gly Ile Ser Ser Val Pro Thr Pro Ser Pro Leu Gly Pro Leu Ala
 355 360 365
 Gly Ser Pro Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Leu Gly Met Pro Val Pro
 370 375 380
 Ala Ala Ala Gly Ala Gln Gln

385 390

<210> 2
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 2

Met Pro Gly Pro Ala Ala Gly Ser Arg Ala Arg Val Tyr Ala Glu Val
 1 5 10 15
 Asn Ser Leu Arg Ser Arg Glu Tyr Trp Asp Tyr Glu Ala His Val Pro
 20 25 30
 Ser Trp Gly Asn Gln Asp Asp Tyr Gln Leu Val Arg Lys Leu Gly Arg
 35 40 45
 Gly Lys Tyr Ser Glu Val Phe Glu Ala Ile Asn Ile Thr Asn Asn Glu

50 55 60
 Arg Val Val Val Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Lys Ile Leu Glu Asn Leu Arg Gly Gly Thr Asn Ile Ile
 85 90 95
 Lys Leu Ile Asp Thr Val Lys Asp Pro Val Ser Lys Thr Pro Ala Leu
 100 105 110
 Val Phe Glu Tyr Ile Asn Asn Thr Asp Phe Lys Gln Leu Tyr Gln Ile
 115 120 125

Leu Thr Asp Phe Asp Ile Arg Phe Tyr Met Tyr Glu Leu Leu Lys Ala
 130 135 140

Leu Asp Tyr Cys His Ser Lys Gly Ile Met His Arg Asp Val Lys Pro
 145 150 155 160
 His Asn Val Met Ile Asp His Gln Gln Lys Lys Leu Arg Leu Ile Asp
 165 170 175
 Trp Gly Leu Ala Glu Phe Tyr His Pro Ala Gln Glu Tyr Asn Val Arg
 180 185 190
 Val Ala Ser Arg Tyr Phe Lys Gly Pro Glu Leu Leu Val Asp Tyr Gln

 195 200 205
 Met Tyr Asp Tyr Ser Leu Asp Met Trp Ser Leu Gly Cys Met Leu Ala
 210 215 220
 Ser Met Ile Phe Arg Arg Glu Pro Phe Phe His Gly Gln Asp Asn Tyr
 225 230 235 240
 Asp Gln Leu Val Arg Ile Ala Lys Val Leu Gly Thr Glu Glu Leu Tyr
 245 250 255
 Gly Tyr Leu Lys Lys Tyr His Ile Asp Leu Asp Pro His Phe Asn Asp
 260 265 270

Ile Leu Gly Gln His Ser Arg Lys Arg Trp Glu Asn Phe Ile His Ser
 275 280 285
 Glu Asn Arg His Leu Val Ser Pro Glu Ala Leu Asp Leu Leu Asp Lys
 290 295 300
 Leu Leu Arg Tyr Asp His Gln Gln Arg Leu Thr Ala Lys Glu Ala Met
 305 310 315 320
 Glu His Pro Tyr Phe Tyr Pro Val Val Lys Glu Gln Ser Gln Pro Cys
 325 330 335
 Ala Asp Asn Ala Val Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ala Ala Arg

 340 345 350

<210> 3

<211> 215

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Met Ser Ser Ser Glu Glu Val Ser Trp Ile Ser Trp Phe Cys Gly Leu

1 5 10 15
 Arg Gly Asn Glu Phe Phe Cys Glu Val Asp Glu Asp Tyr Ile Gln Asp
 20 25 30
 Lys Phe Asn Leu Thr Gly Leu Asn Glu Gln Val Pro His Tyr Arg Gln
 35 40 45
 Ala Leu Asp Met Ile Leu Asp Leu Glu Pro Asp Glu Glu Leu Glu Asp

50 55 60
 Asn Pro Asn Gln Ser Asp Leu Ile Glu Gln Ala Ala Glu Met Leu Tyr
 65 70 75 80
 Gly Leu Ile His Ala Arg Tyr Ile Leu Thr Asn Arg Gly Ile Ala Gln
 85 90 95
 Met Leu Glu Lys Tyr Gln Gln Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Pro Arg Val
 100 105 110
 Tyr Cys Glu Asn Gln Pro Met Leu Pro Ile Gly Leu Ser Asp Ile Pro
 115 120 125

Gly Glu Ala Met Val Lys Leu Tyr Cys Pro Lys Cys Met Asp Val Tyr
 130 135 140
 Thr Pro Lys Ser Ser Arg His His His Thr Asp Gly Ala Tyr Phe Gly
 145 150 155 160
 Thr Gly Phe Pro His Met Leu Phe Met Val His Pro Glu Tyr Arg Pro
 165 170 175
 Lys Arg Pro Ala Asn Gln Phe Val Pro Arg Leu Tyr Gly Phe Lys Ile
 180 185 190
 His Pro Met Ala Tyr Gln Leu Gln Leu Gln Ala Ala Ser Asn Phe Lys

195 200 205
 Ser Pro Val Lys Thr Ile Arg

210 215

<210> 4

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shCSNK2B

<400> 4
ccggccaacc agagtgacct gattgctcga gcaatcaggt cactctgggtt ggTTTTTg 58

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> forward primer

<400> 5
cgactaatag actgggggttt gg 22

<210> 6

<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer

<400> 6
tcatacttgc cagcatataca cc 22

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> forward primer

<400> 7
aatgttcgtg tagcctcaag gt 22

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer

<400> 8
ctggcatag ttgtcctgtc ca 22

<210> 9
<211> 22
<212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	9	
gcctgatgaa gaactggaag ac		22
<210>	10	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	10	
taaccaaagt ctccttgctg gt		22
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	11	
atcaagacgg agcagctgag		20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	12	
tggtggtcgg tgtagtcgta		20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	13	
gaatcaactg ctgcagacca		20
<210>	14	
<211>	20	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	14	
	atgctgctca ggtgtgactg	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	15	
	gtctacccca atccagcaaa	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	16	
	gttgggagcc agattgtcat	20
<210>	17	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer	
<400>	17	
	gctataaatt ctttgctgac ctgctg	26
<210>	18	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	18	
	aattactttt atgtcccctg ttgactgg	28

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 19

tcttctgtga ggtggatgaa ga 22

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 20

ctcttcatca ggttccaggt ct 22

<210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 21

ctggtgaaaa ggacctctcg aag 23

<210> 22
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 22

ccagtttcac taatgacaca aacg 24