



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월25일
(11) 등록번호 10-2183208
(24) 등록일자 2020년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01) A61K 35/30 (2015.01)
A61P 25/28 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0619 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0090381
(22) 출원일자 2019년07월25일
심사청구일자 2019년07월25일
(56) 선행기술조사문헌
JP2016146841 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
이창준
대전광역시 유성구 엑스포로 55 기초과학연구원
인지및사회성연구단
안희영
대전광역시 유성구 엑스포로 55 기초과학연구원
인지및사회성연구단
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 16 항

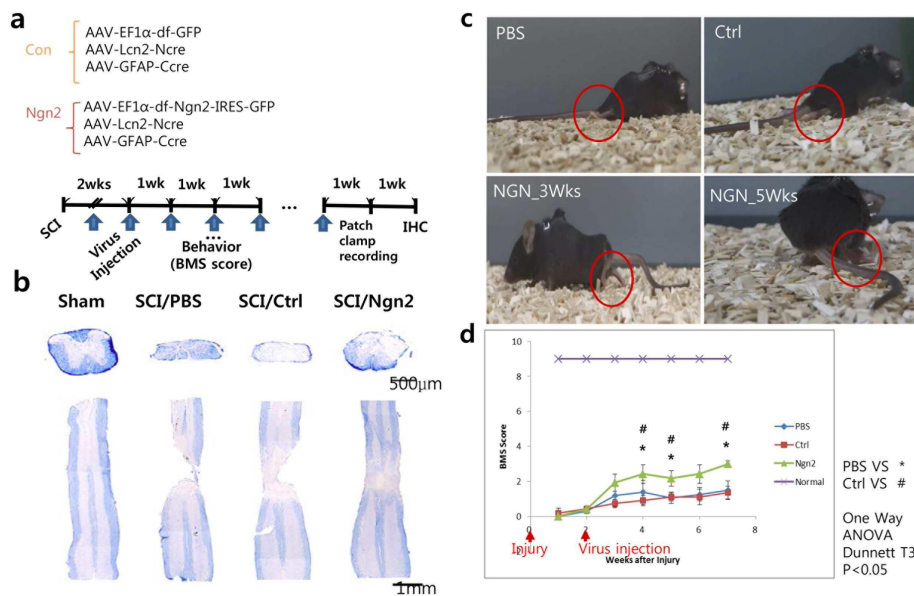
심사관 : 유성진

(54) 발명의 명칭 Ngn2(neurogenin-2)를 이용하여 척수 손상 모델에서 반응성 성상세포를 신경세포로 리프로그래밍하는 방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 반응성 성상세포(astrocyte)에 Ngn2(neurogenin-2) 단백질 또는 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 도입하거나, 또는 성상세포에서 Ngn2 단백질을 발현을 증가시키는 단계 및 (b) 상기 (a) 단계의 성상세포를 배양하는 단계를 포함하는, 반응성 성상세포를 신경세포로 리프로그래밍(reprogramming)하는 방법; Ngn2 단백질 (뒷면에 계속)

대표도



또는 Ng2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는, 정상세포의 신경세포로의 리프로그래밍 유도용 조성물; 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 상기 방법에 의해 제조된 신경세포 및 이를 포함하는 세포치료제에 관한 것이다.

본 발명에 따라 반응성 정상세포에 특이적으로 Ng2(neurogenin-2) 발현을 증가시킬 경우 상기 반응성 정상세포를 신경세포로 직접 리프로그래밍할 수 있다. 또한 본 발명의 방법을 이용하여 척수손상 마우스 모델에서 반응성 정상세포를 신경세포로 리프로그래밍함으로써 행동능력 개선을 확인하였는바, 이러한 신경세포로의 리프로그래밍 방법은 척수 손상을 비롯한 퇴행성 신경질환에 대한 예방 또는 치료 목적의 약학적 조성물 또는 세포치료제 등으로 활용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

C07K 14/4702 (2013.01)

C12N 2506/08 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

오수진

서울시 성북구 화랑로14길 5 한국과학기술연구원
치매DTC센터

하윤

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 의과
대학 신경외과학교실

이혜란

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 의과
대학 신경외과학교실

(56) 선행기술조사문헌

JP2018513686 A

KR1020140116063 A

US20170114324 A1

US20170166903 A1

WO2011091048 A1

Neuron. 2016 Aug 17; 91(4): 728-738.

Nat Commun. 2014; 5: 3338.

Front. Bioeng. Biotechnol., 21 November 2018

PLoS One. 4(1):e4286 (2009.01.27.)

Stem Cell Reports. 12(2):290-304 (2019.02.12.)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018M3C7A1056894

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 반응성 정상세포 기반 치매 독소 분해 기전 규명 및 플랫폼 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한국과학기술연구원

연구기간 2018.06.01 ~ 2022.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 인간을 제외한 동물의 반응성 성상세포(reactive astrocyte)에 Ngn2(neurogenin-2) 단백질을 코딩하는 핵산분자를 도입하거나, 또는 성상세포에서 Ngn2 단백질을 발현을 증가시키는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 성상세포를 배양하는 단계를 포함하는, 성상세포를 신경세포로 리프로그래밍(reprogramming)하는 방법으로,

상기 (a) 단계는,

(i) GFAP 프로모터 및 상기 프로모터의 하단에 작동가능하게 연결된, Cre 재조합효소의 N-말단 또는 C-말단을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 제1 재조합 벡터;

(ii) Lcn2 또는 iNOS 프로모터, 및 상기 프로모터의 하단에 작동가능하게 연결된 Cre 재조합효소의 N-말단 또는 C-말단을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 제2 재조합 벡터; 및

(iii) EF1 α 프로모터 및 상기 프로모터 하단에 2개의 loxP 부위를 포함하고, 상기 2개의 loxP 부위 사이에 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제3 재조합 벡터를 도입하여 Split-cre system을 이용하는 것으로,

상기 제1 및 제2 재조합 벡터에 포함되는 Cre 재조합효소를 코딩하는 핵산서열은 Cre 재조합효소를 절단하여 N-말단 및 C-말단 부위로 나눈 것으로 서로 중복되지 않으며,

상기 제3 재조합 벡터의 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자는 프로모터와 역방향으로 연결된 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자는 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 리프로그래밍은 전환분화(transdifferentiation) 또는 직접분화(direct-reprogramming)인 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자의 도입은 도 1의 a 또는 도 2의 a에 개시된 개열지도를 갖는 재조합 벡터, 또는 상기 재조합 벡터를 포함하는 바이러스를 성상세포에 전달하는 것인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 성상세포는 마우스(mouse) 성상세포이고, Cre 재조합 효소의 일부를 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 벡터 2종의 프로모터는 각각 Lcn2 및 GFAP 프로모터인 것인, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 성상세포는 원숭이(monkey) 성상세포이고, Cre 재조합 효소의 일부를 코딩하는 서열을 포

함하는 제조합 벡터 2종의 프로모터는 각각 iNOS 및 GFAP 프로모터인 것인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 정상세포는 개체의 뇌 또는 척수로부터 유래된 것인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 반응성 정상세포는 척수 손상 개체로부터 유래된 것인, 방법.

청구항 9

Ngn2 단백질 또는 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는, 반응성 정상세포의 신경세포로의 리프로그래밍 유도용 조성물로,

상기 조성물은 Split-cre system을 이용하기 위한 하기 (i) 내지 (iii)의 구성을 포함하는 것인, 반응성 정상세포의 신경세포로의 리프로그래밍 유도용 조성물:

(i) GFAP 프로모터 및 상기 프로모터의 하단에 작동가능하게 연결된, Cre 재조합효소의 N-말단 또는 C-말단을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 제1 재조합 벡터;

(ii) Lcn2 또는 iNOS 프로모터, 및 상기 프로모터의 하단에 작동가능하게 연결된 Cre 재조합효소의 N-말단 또는 C-말단을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 제2 재조합 벡터; 및

(iii) EF1 α 프로모터 및 상기 프로모터 하단에 2개의 loxP 부위를 포함하고, 상기 2개의 loxP 부위 사이에 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제3 재조합 벡터로,

상기 제1 및 제2 재조합 벡터에 포함되는 Cre 재조합효소를 코딩하는 핵산서열은 Cre 재조합효소를 절단하여 N-말단 및 C-말단 부위로 나눈 것으로 서로 중복되지 않으며,

상기 제3 재조합 벡터의 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자는 프로모터와 역방향으로 연결된 것임.

청구항 10

Ngn2 단백질 또는 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는, 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로,

상기 조성물은 Split-cre system을 이용하기 위한 하기 (i) 내지 (iii)의 구성을 포함하는 것인, 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

(i) GFAP 프로모터 및 상기 프로모터의 하단에 작동가능하게 연결된, Cre 재조합효소의 N-말단 또는 C-말단을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 제1 재조합 벡터;

(ii) Lcn2 또는 iNOS 프로모터, 및 상기 프로모터의 하단에 작동가능하게 연결된 Cre 재조합효소의 N-말단 또는 C-말단을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 제2 재조합 벡터; 및

(iii) EF1 α 프로모터 및 상기 프로모터 하단에 2개의 loxP 부위를 포함하고, 상기 2개의 loxP 부위 사이에 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제3 재조합 벡터로,

상기 제1 및 제2 재조합 벡터에 포함되는 Cre 재조합효소를 코딩하는 핵산서열은 Cre 재조합효소를 절단하여 N-말단 및 C-말단 부위로 나눈 것으로 서로 중복되지 않으며,

상기 제3 재조합 벡터의 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자는 프로모터와 역방향으로 연결된 것임.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 파킨슨씨병(Parkinson's disease), 알츠하이머(Alzheimer's disease), 피크병(Pick's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 허혈성 뇌질환(stroke), 탈수초질환(demyelinating disease), 다발성 경화증, 간질, 퇴행성 신경질환 및 척수손상(Spinal Cord Injury, SCI)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 신경세포.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 신경세포를 유효성분으로 포함하는, 세포치료제.

청구항 14

인간을 제외한 동물에서,

(a) 반응성 성상세포(reactive astrocyte)에 Ng2(neurogenin-2) 단백질 또는 Ng2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 도입하거나, 또는 성상세포에서 Ng2 단백질을 발현을 증가시키는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 성상세포를 배양하여, 성상세포를 신경세포로 리프로그래밍(reprogramming)하는 단계를 포함하는, 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료 방법으로,

상기 (a) 단계는,

(i) GFAP 프로모터 및 상기 프로모터의 하단에 작동가능하게 연결된, Cre 재조합효소의 N-말단 또는 C-말단을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 제1 재조합 벡터;

(ii) Lcn2 또는 iNOS 프로모터, 및 상기 프로모터의 하단에 작동가능하게 연결된 Cre 재조합효소의 N-말단 또는 C-말단을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 제2 재조합 벡터; 및

(iii) EF1 α 프로모터 및 상기 프로모터 하단에 2개의 loxP 부위를 포함하고, 상기 2개의 loxP 부위 사이에 Ng2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제3 재조합 벡터를 도입하여 Split-cre system을 이용하는 것으로,

상기 제1 및 제2 재조합 벡터에 포함되는 Cre 재조합효소를 코딩하는 핵산서열은 Cre 재조합효소를 절단하여 N-말단 및 C-말단 부위로 나눈 것으로 서로 중복되지 않으며,

상기 제3 재조합 벡터의 Ng2 단백질을 코딩하는 핵산분자는 프로모터와 역방향으로 연결된 것인, 방법.

청구항 15

(a) 분리된 반응성 성상세포(reactive astrocyte)에 Ng2(neurogenin-2) 단백질 또는 Ng2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 도입하거나, 또는 성상세포에서 Ng2 단백질을 발현을 증가시키는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 성상세포를 배양하는 단계를 포함하는, 성상세포를 신경세포로 리프로그래밍(reprogramming)하는 방법으로,

상기 (a) 단계는,

(i) GFAP 프로모터 및 상기 프로모터의 하단에 작동가능하게 연결된, Cre 재조합효소의 N-말단 또는 C-말단을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 제1 재조합 벡터;

(ii) Lcn2 또는 iNOS 프로모터, 및 상기 프로모터의 하단에 작동가능하게 연결된 Cre 재조합효소의 N-말단 또는

C-말단을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 제2 재조합 벡터; 및

(iii) EF1 α 프로모터 및 상기 프로모터 하단에 2개의 loxP 부위를 포함하고, 상기 2개의 loxP 부위 사이에 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 제3 재조합 벡터를 도입하여 Split-cre system을 이용하는 것으로,

상기 제1 및 제2 재조합 벡터에 포함되는 Cre 재조합효소를 코딩하는 핵산서열은 Cre 재조합효소를 절단하여 N-말단 및 C-말단 부위로 나눈 것으로 서로 중복되지 않으며,

상기 제3 재조합 벡터의 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자는 프로모터와 역방향으로 연결된 것인, 방법.

청구항 16

제15항의 방법으로 제조된 신경세포를 유효성분으로 포함하는, 세포치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 (a) 성상세포(astrocyte)에 Ngn2(neurogenin-2) 단백질 또는 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 도입하거나, 또는 성상세포에서 Ngn2 단백질을 발현을 증가시키는 단계 및 (b) 상기 (a) 단계의 성상세포를 배양하는 단계를 포함하는, 성상세포를 신경세포로 리프로그래밍(reprogramming)하는 방법; Ngn2 단백질 또는 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는, 성상세포의 신경세포로의 리프로그래밍 유도용 조성물; 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 상기 방법에 의해 제조된 신경세포 및 이를 포함하는 세포치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 특정 세포의 전환분화(transdifferentiation) 또는 직접 리프로그래밍(direct-reprogramming)을 통해 목적하는 세포의 제조는 장기이식(transplantation)을 대체할 유망한 치료 방법으로 활용될 수 있는바, 주목을 받고 있다. 즉, 이러한 재생의학 분야에서 전환분화 또는 직접 리프로그래밍을 통한 손상 세포의 대체는 질환을 근본적으로 치료 가능한 대안으로 제시되고 있으며, 구체적인 질환 및 세포에 대한 임상 시험 또한 활발히 진행되고 있는 추세이다.

[0004] 특히, 신경세포는 신경계를 구성하며 감각인지, 학습, 기억 및 운동 능력을 제어하는데 필수적이나, 한번 손상을 입으면 정상 상태로 회복되는데 오랜 시간이 걸릴 뿐만 아니라 다른 세포와 달리 재생되기 어려워 영구적인 손상에 이를 가능성이 높은 점에서 치료 대상으로서 더욱 가치가 높다고 할 수 있다. 이와 관련하여, 동일한 신경세포에서도 어떤 부위에 손상을 입었는지에 따라 손상 반응 및 재생 능력의 차이가 나타나게 되는데, 중추 신경인 척수 손상(Spinal Cord Injury, SCI)과 같은 경우에는 다른 부위보다 재생 실패에 이르는 경우가 많이 나타나며, 현재까지 임상에서도 별다른 치료 방법이 없는 실정이다. 또한, 척수 손상 이외에도 신경세포의 퇴행으로 인한 질환들, 예컨대 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머(Alzheimer's disease), 피크병(Pick's disease) 등과 같은 질환들은 운동장애 및 인지기능 장애 등을 유발하여 지속적인 치료를 요구하나, 근본적인 치료방법이 존재하지 않는 점에서 개인적, 사회적 문제로도 자리잡고 있다.

[0005] 한편, 성상세포(astrocyte)는 중추신경계에서 패킹 조직을 형성하는 신경교세포로, 건강한 신경 조직에서 에너지 공급, 혈류 조절, 세포 외액의 항상성, 이온 및 전송기의 항상성, 시냅스 기능 조절을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 중추신경계의 외상, 감염, 허혈, 뇌졸중, 자가 면역 반응 및 신경 퇴행성 질환 등으로 인해 인근 뉴런의 파괴가 일어날 경우, 성상세포의 수가 비정상적으로 증가하게 되는데 이를 반응성 성상세포(reactive astrocyte, astrogliosis)라고 한다. 이와 관련하여, 현재까지 손상된 척수를 회복시키고자 한 연구들은 전능성을 가진 배아줄기세포(embryonic stem cell)와 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS cell), 다능성을 가진 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC) 및 신경줄기세포(neural stem cell; NSC) 등의 이식에 관한 것이거나, 척수 손상 이후에 발생하는 부작용 증상에 대한 치료방법이 대부분이었으나(한국 등록특허 제10-1892457호), 반응성 성상세포로부터 신경세포를 직접 전환시켜 이식하고자 하는 시도는 이루어지지 않았다.

[0006] 이에, 본 발명의 발명자들은 비신경세포인 성상세포를 리프로그래밍하여 신경세포를 제조하는 방법에 대해 예의

노력한 결과, 성상세포 특이적으로 Ngn2(neurogenin-2) 발현을 증가시킬 경우 성상세포가 신경세포로 직접 리프로그래밍되고, 척수 손상 모델에 적용시 증상이 개선되는 것을 확인하였는바, 종국적으로 이러한 신경세포로의 리프로그래밍 방법이 척수 손상을 비롯한 퇴행성 신경질환에 대한 예방 또는 치료 목적으로 활용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 (a) 성상세포(astrocyte)에 Ngn2(neurogenin-2) 단백질을 코딩하는 핵산분자를 도입하거나, 또는 성상세포에서 Ngn2 단백질을 발현을 증가시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 성상세포를 배양하는 단계를 포함하는, 성상세포를 신경세포로 리프로그래밍(reprogramming)하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는, 성상세포의 신경세포로의 리프로그래밍 유도용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는, 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 방법에 의해 제조된 신경세포를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 방법에 의해 제조된 신경세포를 유효성분으로 포함하는 세포치료제를 제공하는 것이다.
- [0013]

과제의 해결 수단

- [0014] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0016] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 (a) 성상세포(astrocyte)에 Ngn2(neurogenin-2) 단백질을 코딩하는 핵산분자를 도입하거나, 또는 성상세포에서 Ngn2 단백질을 발현을 증가시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 성상세포를 배양하는 단계를 포함하는, 성상세포를 신경세포로 리프로그래밍(reprogramming)하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명에서 용어 "성상세포(astrocyte)"는 중추신경계에서 패킹 조직을 형성하는 신경교세포로, 건강한 신경 조직에서 에너지 공급, 혈류 조절, 세포 외액의 항상성, 이온 및 전송기의 항상성, 시냅스 기능 조절을 하는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, 상기 성상세포는 반응성 성상세포(reactive astrocyte)일 수 있다.
- [0018] 상기 "반응성 성상세포"는 중추신경계의 외상, 감염, 허혈, 뇌졸중, 자가 면역 반응 및 신경 퇴행성 질환 등으로 인해 유입·축적된 독성물질에 대한 반응 또는 병리적 환경에 대한 반응으로 성상세포의 성질이 변화하여 생성되는 세포이다. 본 발명의 목적상, 신경세포로 리프로그래밍되는 세포는 반응성 성상세포 일 수 있다. 구체적으로, 상기 반응성 성상세포는 척수 손상에 의해 생성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또는, 상기 반응성 성상세포는 뉴런의 파괴를 동반하거나, 뉴런의 파괴에 선행하여 생성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 반응성 성상세포를 확인하는 방법의 일 예시로, GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein) 발현 수준이 정상 세포보다 높은 경우, 반응성 성상세포로 판별할 수 있다. 뿐만 아니라, Tnf(Tumor necrosis factor), Il1b(Interleukin 1 beta) 및/또는 C1q를 과발현하는 A1 type의 반응성 성상세포, Chil3(Chitinase-like 3), Fzd1(Frizzled class receptor 1) 및/또는 Arg1(Arginase 1)를 과발현하는 반응성 성상세포 역시 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0020] 상기 성상세포는 개체의 뇌 또는 척수로부터 유래된 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 선조체 또는 피곡(putamen)으로부터 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명에서 용어 "Ngn2(neurogenin-2)"는 *NEUROG2* 유전자에 의해 코딩되는 단백질로, basic helix-loop-helix

(bHLH) 전사인자 유전자의 neurogenin 서브 패밀리의 하나이다. 본 발명에서 상기 Ngn2는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 상기 Ngn2는 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로 Ngn2와 동일하거나 유사한 활성을 나타내는 단백질의 경우, 이에 제한없이 포함될 수 있다. 또한, 상기 *NEUROG2* 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 2의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명에서 용어 "도입"은 세포, 조직 또는 개체에서 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 활성이 자연적 혹은 인위적으로 나타나게 하거나, 이의 발현을 증가시키는 모든 행위를 의미하는 것으로, 상기 단백질은 Ngn2일 수 있으며, 상기 유전자는 *NEUROG2* 유전자일 수 있다.

[0023] 구체적으로, 본 발명에서 반응성 정상세포 특이적으로 Ngn2 단백질 또는 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 도입, 또는 정상세포에서 Ngn2 단백질의 발현을 증가하는 도 1의 a 또는 도 2의 a에 개시된 개열지도를 갖는 재조합 벡터, 또는 상기 재조합 벡터를 포함하는 바이러스를 정상세포에 전달함으로써 수행될 수 있으며, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 보다 구체적으로, 상기 재조합 벡터는 정상세포 특이적으로 Ngn2를 발현시키고 발현 여부를 확인하는 목적으로 사용될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 mouse에 대해 pAAV-GFAP-Ccre; pAAV-Lcn2-Ncre; pAAV-EF1 α -df-Ngn2-IRES-GFP를 사용하고, cynomolgus monkey에 대해 pAAV-iNOS-Ccre; pAAV-GFAP-Ncre; pAAV-EF1 α -df-Ngn2-IRES-GFP를 injection하여 정상세포에 특이적으로 Ngn2를 발현시키고, 그 여부를 면역화학염색(immunohistochemistry)을 통해 확인하였다.

[0025] 상기 재조합 벡터는 프로모터로 mouse와 cynomolgus monkey에 대해 각각 Lcn2 또는 iNOS; 및 GFAP 프로모터를 사용한 것으로, 구체적으로, 상기 재조합 벡터에 있어서, mouse에 대해서는 Gfap 프로모터를 포함하는 벡터; 및 Lcn2 프로모터를 포함하는 벡터를 이용하고, monkey에 대해서는 Gfap 프로모터를 포함하는 벡터; 및 iNOS 프로모터를 포함하는 벡터를 이용할 수 있다. 상기 2종의 재조합 벡터 프로모터 하단에는 각각 N-terminal Cre와 C-terminal Cre 단편을 코딩하는 서열이 포함되어 있을 수 있다. 상기 N-terminal Cre와 C-terminal Cre는, Cre recombinase를 절단하여 N-말단 및 C-말단 부위로 나눈 것을 의미한다.. 상기 프로모터 조합을 사용함으로써, 반응성 정상세포 특이적으로 유전자 발현을 조절할 수 있다. 즉, 상기 프로모터 조합을 이용하여, 특정 세포(반응성 정상세포)에서만 선택적으로 유전자 발현을 조절할 수 있는 것으로, 이를 이용하여 반응성 정상세포만을 신경세포로 전환분화시킬 수 있다.

[0026] 상기 GFAP 프로모터는 서열번호 3의 염기서열로, Lcn2 프로모터는 서열번호 4의 염기서열로, iNOS 프로모터는 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업자는 상기 프로모터 서열을 공지된 데이터베이스(NCBI genbank 등)에서 얻을 수 있다.

[0027] 본 발명에서 용어 "배양"은 세포를 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미하며, 본 발명의 배양 과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 세포에 따라 당업자가 조정하여 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어 "리프로그래밍(reprogramming)"은 특정 세포가 가지는 전체 유전자 발현 패턴(global gene expression pattern)을 조절하여, 목적하는 세포로 전환시키는 방법을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서 리프로그래밍은 특정 세포를 인위적으로 조작하여 전혀 다른 특성을 가지는 세포로 전환시키는 방법을 의미하며, 본 발명의 목적상 상기 리프로그래밍은 비신경세포인 정상세포에 외래 유전자 혹은 핵산분자를 포함하는 재조합벡터를 도입함으로써 수행되는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 리프로그래밍은 전환분화(transdifferentiation) 또는 직접분화(direct-reprogramming)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에서는 mouse 및 cynomolgus monkey에 대해 정상세포 특이적인 Ngn2 발현을 위해 각각 재조합 플라스미드 벡터를 전달하는 바이러스 AAV-GFAP-Ccre; AAV-Lcn2-Ncre; AAV-EF1 α -df-Ngn2-IRES-GFP 및 AAV-iNOS-Ccre; AAV-GFAP-Ncre; AAV-EF1 α -df-Ngn2-IRES-GFP를 반응성 정상세포에 injection하고 이를 배양한 결과, Ngn2 발현 그룹에서 patch clamp recording에서 활동전위를 나타내며, GFP 발현 세포(반응성 정상세포)가 뉴런 유사 세포(neuron-like cell)로 분화되었음을 확인하였다.

[0031] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 Ngn2 단백질 또는 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자

를 포함하는, 정상세포의 신경세포로의 리프로그래밍 유도용 조성물을 제공한다.

- [0032] 상기 Ng2, 정상세포, 신경세포 및 리프로그래밍은 전술한 바와 같다.
- [0034] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 Ng2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는, 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 Ng2, 정상세포, 신경세포 및 리프로그래밍은 전술한 바와 같다.
- [0035] 본 발명에서 용어 "퇴행성 신경질환"은 신경세포의 기능 감소 또는 소실에 의해 운동조절능력, 인지기능, 지각기능, 감각기능 및 자율신경의 기능 이상을 의미하는 것으로, 주요 증상에 따라 진행성 인지기능 장애, 진행성 운동실조, 근력저하 및 근위축 그룹으로 나눌 수 있다. 상기 퇴행성 신경질환은 파킨슨씨병(Parkinson's disease), 알츠하이머(Alzheimer's disease), 피크병(Pick's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 허혈성 뇌질환(stroke), 탈수초질환(demyelinating disease), 다발성 경화증, 간질, 퇴행성 신경질환 및 척수손상(Spinal Cord Injury, SCI)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것 일 수 있으며, 보다 구체적으로 척수손상일 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 않는다.
- [0036] 본 발명에서 용어 "척수손상(Spinal cord injury)"은, 후천적인 사고로 인하여 척수에 손상이 가해져 손상된 자리를 통과하는 감각신호와 운동신호의 수행이 영향을 받게 되어 감각신경(sensory neuron)이나 운동신경(motor neuron)의 전달 장애를 초래하여 인체기능을 부분적 또는 완전 마비 상태에 이르게 하는 질환을 의미한다.
- [0037] 구체적으로, 상기 척수 손상은 교통사고, 추락 등의 외상에 의해 발생하는 것일 수 있다. 상기 척수 손상은 손상 정도에 따라 완전손상과 불완전 손상으로 나눌 수 있다. 척수손상은 주로 손상부위 이하에서 운동 신경의 마비로 기능을 소실하게 되는 증상을 수반할 수 있다. 구체적으로 완전손상은 척수의 완전 횡 절단에 의해 척수의 운동, 감각 기능을 완전 소실하게 될 수 있다. 불완전 손상은 완전손상과 달리 손상 부위 이하의 일부 감각, 운동 기능이 보존된 상태로 나타날 수 있다. 손상부에 따라 증상이 달라질 수 있으며, 일 예로, 경수 손상에 의해 사지마비와 혈압, 맥박, 체온, 호흡수가 모두 떨어지는 증상이 나타날 수 있으며, 흉수 이하 손상에 의한 하지마비, 감각기능의 소실, 대장과 방광 및 성기능의 소실을 보일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 용어 "예방"은 본 발명의 조성물에 의해 척수 손상을 비롯한 신경 퇴행성 질환의 진행을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0039] 본 발명에서 용어 "치료"는 본 발명의 조성물에 의해 척수 손상을 비롯한 신경 퇴행성 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0040] 본 발명의 "약학적 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 실제 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.
- [0041] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 혼합 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose), 락토오스 (Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0042] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로콜, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구투여하거나 비경구투여할 수 있으며, 비경구투여시 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택할 수

있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 또는 암의 예방, 치료, 또는 개선 효과를 나타내는 기타 약학적 활성 화합물과 결합하여 또는 적당한 집합을 이루어 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에서는, 척수손상 모델 mouse에 대해 상기 3종의 재조합백터를 포함하는 바이러스(AAV-EF1 α -df-Ngn2-IRES-GFP, AAV-Lcn2-Ncre 및 AAV-GFAP-Ccre)를 injection한 결과, 대조군 및 PBS 그룹 대비 손상된 척수 조직이 유의한 수준으로 회복되며, 그에 따라 하반신 마비의 증상이 개선되고 BMS 점수 또한 증가된 수치를 나타내는 것을 확인하였다. 이로부터 본 발명의 조성물은 척수 손상을 비롯한 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료 목적으로 활용 될 수 있다.

[0047] 상기 "척수손상 모델"은 척수 손상을 유도한, 인간을 제외한 동물 모델을 의미한다. 상기 "척수 손상"에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0049] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 방법에 의해 제조된 신경세포를 제공한다. 또한, 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 방법에 의해 제조된 신경세포를 유효 성분으로 포함하는 세포치료제를 제공한다.

[0050] 본 발명의 "세포치료제"는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있는 것으로, 정상세포에 Ngn2 단백질 또는 Ngn2 단백질을 코딩하는 핵산분자를 도입하거나, 또는 정상세포에서 Ngn2 단백질을 발현을 증가시키는 단계 및 이를 배양하는 단계를 통해 제조된 신경세포를 포함할 수 있으며, 상기 신경세포 이외에도 본 발명의 목적상 척수 손상을 비롯한 퇴행성 신경질환에서 손상된 신경세포를 대체 가능한 물질은 제한되지 않고 여기에 포함될 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 (a) 반응성 성상세포(reactive astrocyte)에 Ngn2(neurogenin-2) 단백질을 코딩하는 핵산분자를 도입하거나, 또는 정상세포에서 Ngn2 단백질을 발현을 증가시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 정상세포를 배양하여, 성상세포를 신경세포로 리프로그래밍(reprogramming)하는 단계;를 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0054] 본 발명에 따라 반응성 성상세포에 특이적으로 Ngn2(neurogenin-2) 발현을 증가시킬 경우 상기 성상세포를 신경세포로 직접 리프로그래밍할 수 있다. 또한 마우스에서 GFAP-Lcn2 프로모터 조합을, 원숭이에서 GFAP-iNOS 프로모터 조합을 이용하여 반응성 성상세포 특이적으로 Ngn2 발현을 조절할 수 있다. 이러한 신경세포로의 리프로그래밍 방법은 척수 손상을 비롯한 퇴행성 신경질환에 대한 예방 또는 치료 목적의 약학적 조성물 또는 세포치료제 등으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1의 a는 mouse에 대해 성상세포 특이적 Ngn2 발현을 위해 사용된 재조합 플라스미드 벡터 pAAV-GFAP-Ccre, pAAV-Lcn2-Ncre 및 pAAV-EF1 α -df-Ngn2-IRES-GFP를 나타낸 것이다.

도 1의 b는 mouse에 대해 성상세포 특이적 Ngn2 발현의 대조군으로 사용된 플라스미드 벡터 pAAV-EF1 α -df-GFP를 나타낸 것이다.

도 2 a는 cynomolgus monkey에 대해 성상세포 특이적 Ngn2 발현을 위해 사용된 재조합 플라스미드 벡터 pAAV-

iNOS-Ccre, pAAV-GFAP-Ncre 및 pAAV-EF1 α -df-Ngn2-IRES-GFP를 나타낸 것이다.

도 2 b는 cynomolgus monkey에 대해 정상세포 특이적 Ngn2 발현의 대조군으로 사용된 플라스미드 벡터 pAAV-EF1 α -df-GFP를 나타낸 것이다.

도 3의 a는 정상세포 특이적인 Ngn2 발현을 위한 재조합 벡터를 포함하는 바이러스를 mouse 및 cynomolgus monkey에 대해 injection하는 프로토콜을 나타낸 것이다.

도 3의 b 및 c는 각각 mouse 및 cynomolgus monkey의 손상된 선조체 조직에서 GFP, GFAP, DAPI 및 Lcn2/iNOS의 발현 여부를 확인한 면역화학염색(immunohistochemistry) 결과를 나타낸 것이다.

도 4의 a는 각각 mouse 및 cynomolgus monkey에 대해 정상세포 특이적 Ngn2 발현을 위한 double floxed Split-Cre system의 도식을 나타낸 것이다.

도 4의 b는 in vitro 조건에서 반응성 정상세포의 배양 및 Ngn2 발현을 유도하는 프로토콜을 나타낸 것이다.

도 4의 c는 대조군과 Ngn2 발현 그룹에서 정상세포의 morphology 변화를 나타낸 것이다.

도 4의 d는 EGFP 발현 세포와 함께 리프로그래밍된 세포의 전체 세포 patch-clamp recording 결과(in vitro)를 나타낸 것이다. 뉴런 유사 세포(Neuron-like cell)은 자발적이진 않으나 성공적으로 활동전위를 나타내었다.

도 5의 a는 mouse 선조체에서 Ngn2 발현에 따른 정상세포의 신경세포로의 리프로그래밍을 확인하기 위한 프로토콜을 나타낸 것이다.

도 5의 b는 대조군과 Ngn2 발현 그룹에서 GFP, GFAP 및 NeuN 발현 양상을 확인한 면역화학염색 결과(in vivo) 및 GFP 발현 세포 중 GFAP 또는 NeuN 발현 세포의 비율을 나타낸 것이다.

도 5의 c는 대조군과 Ngn2 발현 그룹에서 patch-clamp recording 결과를 나타낸 것이다.

도 6의 a는 cynomolgus monkey 피곡(putamen)에서 Ngn2 발현에 따른 정상세포의 신경세포로의 리프로그래밍을 확인하기 위한 프로토콜을 나타낸 것이다.

도 6의 b는 대조군과 Ngn2 발현 그룹에서 GFP, GFAP 및 NeuN 발현 양상을 확인한 면역화학염색 결과(in vivo)를 나타낸 것이다.

도 6의 c는 GFAP 및 NeuN 강도에 따른 scatter plot 결과를 나타낸 것이다. 대조군의 경우 NeuN 강도가 대부분 1K 미만이었으나, Ngn2 발현 그룹에서는 NeuN 강도가 유의하게 증가하였다.

도 6의 d는 대조군과 Ngn2 발현 그룹에서 GFAP 및 NeuN 강도를 비교한 결과이다.

도 7의 a는 척수 손상(Spinal Cord Injury, SCI) 모델에서 정상세포 특이적인 Ngn2 발현을 위한 재조합 벡터를 포함하는 바이러스 injection에 따른 실험 프로토콜을 나타낸 것이다.

도 7의 b는 척수 손상 모델 중 PBS 그룹, 대조군, Ngn2 그룹 및 모의대조군(sham)에서 수득한 척수 조직의 coronal, longitudinal section의 EC 염색 결과를 나타낸 것이다. PBS 그룹 및 대조군과 달리 Ngn2 그룹에서는 손상된 척수 조직의 회복이 유의한 수준으로 나타났다.

도 7의 c는 척수 손상 모델 중 PBS 그룹, 대조군 및 Ngn2 그룹(injection 후 3주 및 5주)에서 하반신 마비(paraparesis) 증상의 변화를 나타낸 사진이다.

도 7의 d는 척수 손상 모델 중 PBS 그룹, 대조군 및 Ngn2 그룹에서 시간 경과에 따른 BMS 점수 변화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0059] **실시예 1: Electrophysiology test를 위한 brain 시료의 준비**

[0061] Brain 시료를 준비하기 위해 각각의 동물(mouse 및 cynomolgus monkey)을 할로탄(halothane)으로 마취하였다. Decapitation 후, brain을 두개골로부터 빠르게 절제하고, 이를 얼음처럼 차가운 절삭 용액(130 NaCl, 24 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 3.5 KCl, 1.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 및 10 D(+)-glucose, pH 7.4)에 담구었다. 전체 용액은

95 % O₂ / 5 % CO₂로 가스 처리하였다. 이어서 소뇌를 trimming한 후, blade(DORCO, 서울, 한국)와 vibratome(DSK 선형 슬라이서, 교토, 일본)를 사용하여 300 μm의 coronal slice를 절단하였고, 이를 세포 외 ACSF 솔루션(mM, 130 NaCl, 24 NaHCO₃, 1.25, NaH₂PO₄, 3.5 KCl, 1.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 및 10, D(+)-glucose, pH 7.4)로 옮겼다. 피펫은 전류 측정(current measurement)을 위한 internal solution(mM 단위, 135 CsCl, 4 NaCl, 0.5 CaCl₂, 10 HEPES, 5 EGTA, 2 Mg-ATP, 0.5 Na₂-GTP, 10 QX-314, pH adjusted to 7.2 with CsOH (278-285 mOsmol)) 및 전압 측정(voltage measurement)을 위한 internal solution(mM 단위, 140 K-gluconate, 10 HEPES, 7 NaCl, and 2 MgATP adjusted to pH 7.4 with CsOH)로 충전하였다.

[0063] **실시예 2: in vitro 조건에서 신경세포로의 직접분화**

[0065] Split-Cre/df system을 이용하여 반응성 성상세포에서 Ngn2의 특이적 발현을 유도하고자 하였다. Mouse에 대해 pAAV-GFAP-Ccre, pAAV-mLcn2-Ncre, pAAV-EF1a-df-Ngn2-IRES-GFP, pAAV-EF1a-df-GFP를 클로닝하고, cynomolgus monkey에 대해 pAAV-GFAP-Ncre, pAAV-iNOS-Ccre, pAAV-EF1a-df-Ngn2-IRES-GFP, pAAV-EF1a-df-GFP를 클로닝하였다. 반응성 성상세포에 3종의 DNA로 된 발현 mixture를 전기천공법(electroporation)으로 도입하였다. 각각의 발현 mixture는 아래 도 5의 a 및 도 6의 a에 나타내었다. 3일 동안 성상세포 배지(10% Horse serum, 10% FBS, 1% P/S in DMEM)에서 세포를 배양하였고, 전기천공 후 4일째 배지를 신경세포 배양 배지(2% B-27, 1% Glutamax, 1%P/S in F-12 media)로 교체하였다.

[0066] 그 결과, 전기천공 후 10일째 Ngn2 그룹의 세포는 극성 및 신경세포와 같은 형태를 나타냄을 확인하였으며, Ngn2 그룹에서 GFP 발현 세포는 patch clamp recording 결과 활동전위를 나타냄을 확인하였다. 이는 반응성 성상세포에서 Ngn2의 발현이 반응성 성상세포를 신경세포로 전환분화시킬 수 있음을 나타내는 결과이다.

[0068] **실시예 3: in vivo 조건에서 신경세포로의 직접분화 (mouse)**

[0070] Naive mouse(7주령, 수컷)의 선조체에 3종의 바이러스 mixture 2 μl을 micro injection하였다. Injection 후 3주 후에 mouse를 희생시켜 1일내 fixation시키고, 2일 동안 dehydration시켜 면역조직화화학검사(immunohistochemistry)를 수행하였다. 냉동 brain 조직을 크라이오스탯(cryostat) 마이크로톰으로 30 μm 두께로 얇게 슬라이스하고, NeuN (신경세포 핵, 신경세포 마커) 및 GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein, 성상세포 마커)로 염색하였다. DAPI는 대비 염색하였으며, GFP는 항체로 염색되지 않았다. Imaging은 confocal microscope Nikon A1를 이용하여 수행하였다.

[0071] 선조체에서 GFP 발현 세포로부터 NeuN 양성 세포와 GFAP 양성 세포 수를 측정한 결과, 도 5의 b로부터 알 수 있듯이, GFP 발현 세포의 약 70%가 대조군에서 GFAP 양성이며, GFP 발현 세포의 약 70%가 Ngn2 그룹에서 NeuN 양성임을 나타내었다. 이로부터 GFP 발현 세포(반응성 성상세포)가 뉴런 유사 세포(neuron-like cell)로 분화되었음을 알 수 있었으며, 이는 반응성 성상세포에서 Ngn2의 발현이 반응성 성상세포를 신경세포로 전환분화시킬 수 있음을 나타내는 결과이다.

[0072] 또한, mouse brain을 injection 3주 후에 300 μm 두께로 슬라이스하고 GFP 발현 세포에 대해 전체 세포 patch-clamp recording을 수행하였다. 그 결과, 대조군의 GFP 발현 세포는 전압 클램프(voltage clamp)에 대해 수동적 컨덕턴스를 나타내며, Ngn2 그룹의 GFP 발현 세포는 신경세포 특성으로 활동 전위 및 miniature 흥분성 후시냅스 전류(EPSC)를 나타냄을 확인하였다.

[0074] **실시예 4: in vivo 조건에서 신경세포로의 직접분화 (cynomolgus monkey)**

[0076] stereotaxic surgery를 통해 Cynomolgus monkeys(2-4년)의 피곡(putamen)에 3종의 바이러스 mixture 25 μl을 micro injection하였다. Injection 후 3주 후에 monkey를 희생시켜 1일내 fixation시키고, 2일 동안 dehydration시켜 면역조직화화학검사(immunohistochemistry)를 수행하였다. 냉동 brain 조직을 크라이오스탯(cryostat) 마이크로톰으로 50 μm 두께로 얇게 슬라이스하고, NeuN (신경세포 핵, 신경세포 마커) 및 GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein, 성상세포 마커)로 염색하였다. DAPI는 대비 염색하였으며, GFP는 항체로 염색되지 않았다. Imaging은 confocal microscope Nikon A1를 이용하여 수행하였다. 그 결과, 대조군은 GFP와 GFAP(흰색)의 colocalization을 나타내며, Ngn2 그룹은 GFP와 NeuN(황색)의 colocalization을 나타내었다.

[0077] 피곡(putamen)에서 GFP 발현 세포로부터 NeuN 양성 세포와 GFAP 양성 세포 수를 측정한 결과(각 세포의 ROI는 DAPI 영역으로 정의), scatter plot으로부터 대조군의 GFP 발현 세포로부터 GFAP 강도가 높고 NeuN 강도는 1K 미만임을 확인하였으며, Ngn2 그룹에서는 NeuN 강도가 4K까지 증가한 것을 확인하였다. 또한, 도 6의 d로부터 알 수 있듯이, 대조군에서 GFAP 강도가 NeuN 강도보다 유의하게 높고, Ngn2 그룹에서는 별다른 차이가 없음을

확인하였다. 아울러, NeuN의 강도를 보면 Ngn2 군이 대조군보다 높았고, 대조군은 Ngn2 군보다 GFAP 강도가 높음을 확인하였다. 이는 반응성 성상세포에서 Ngn2의 발현이 반응성 성상세포를 신경세포로 전환분화시킬 수 있음을 나타내는 결과이다.

[0079] 실시예 5: 척수 손상(Spinal Cord Injury, SCI) 모델에서 신경세포로의 직접분화

[0081] Naive 마우스(7주령, 수컷)를 이용하여 척수 T10에서 압박 손상에 의한 척수 손상(SCI) 모델을 제작하였다. 손상 후 2주 후에 stereotaxic surgery를 통해 SCI 모델의 손상 부위로부터 1mm 거리의 2개 부위에 3종의 바이러스 mixture 2 μ l을 micro injection하였다. 아울러, 손상 후 매주 SCI 모델의 BMS 점수를 측정하였다. Injection 후 5주 후에 mouse를 희생시켜 1일내 fixation시키고, 2일 동안 dehydration시켜 면역조직화학검사(immunohistochemistry)를 수행하였다. 냉동된 조직을 크라이오스탯(cryostat) 마이크로톰으로 20 μ m 두께로 얇게 슬라이스 하고, 슬라이스된 조직에 대해 EC 염색을 수행하였다.

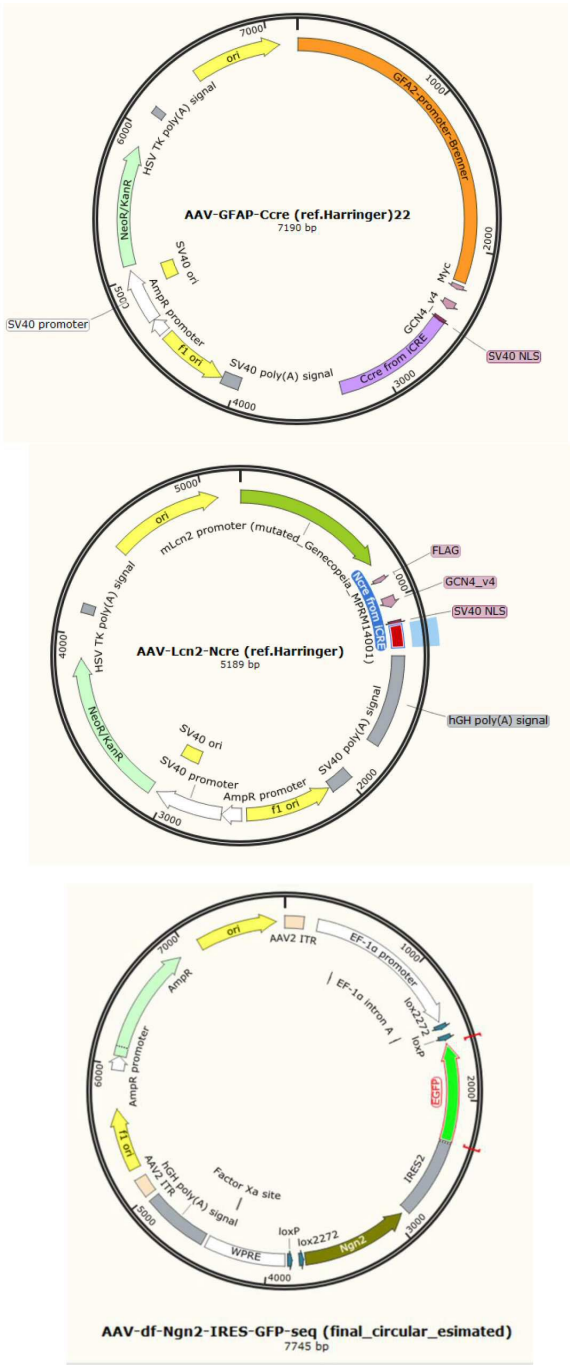
[0082] 그 결과, 대조군 및 PBS 그룹은 척수 손상이 회복되지 않았으나, Ngn2 그룹에서는 회복된 조직을 확인하였다. 또한, 대조군 및 PBS 그룹은 injection 후 5주까지는 하반신을 전혀 사용할 수 없었던 반면, injection 3주 후에 Ngn2 그룹은 뒷다리를 사용할 수 있음을 확인하였으며, injection 5주 후 Ngn2 그룹은 바닥에 발바닥을 딛을 수 있음을 확인하였다. 또한, BMS 점수의 평가 결과는 Ngn2 그룹의 BMS 점수가 injection 후 2주부터 대조군 및 PBS 그룹과는 유의한 차이가 있음을 나타낸다. 이는 반응성 성상세포에서 Ngn2의 발현이 반응성 성상세포를 신경세포로 전환분화시킬 수 있음을 나타내며, 나아가 이를 척수 손상 또는 신경 퇴행성 질환에 대한 치료 목적으로 활용할 수 있음을 나타내는 결과이다.

[0084] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

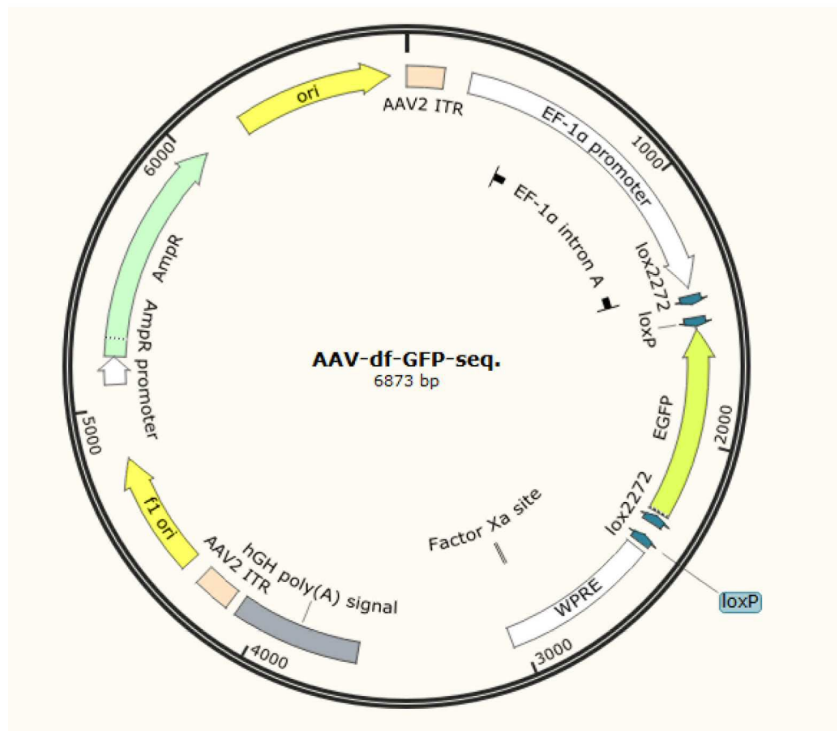
도면1a

a



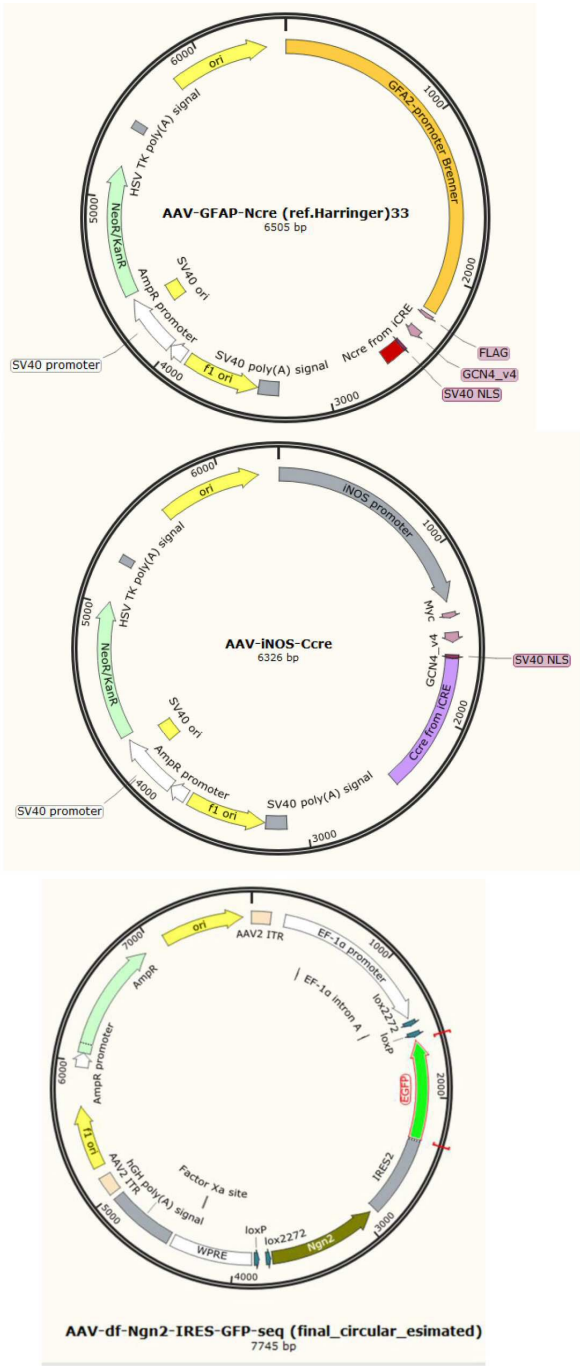
도면1b

b

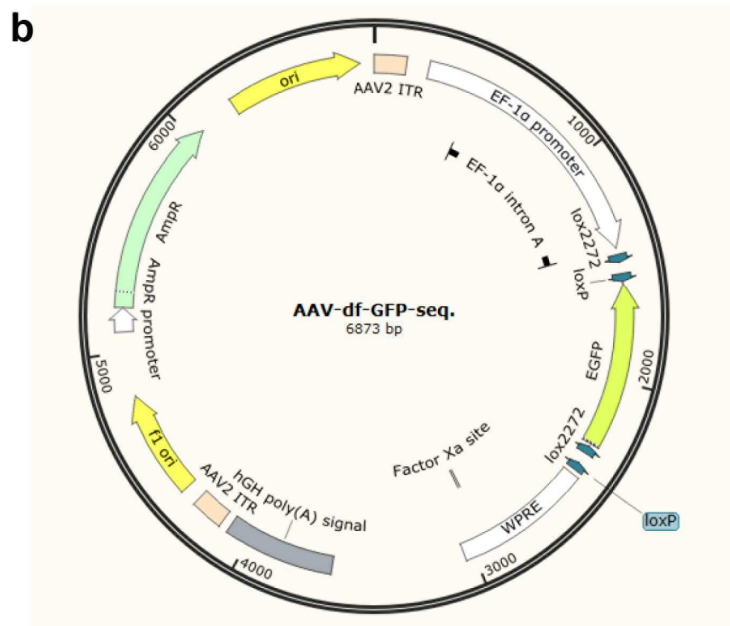


도면2a

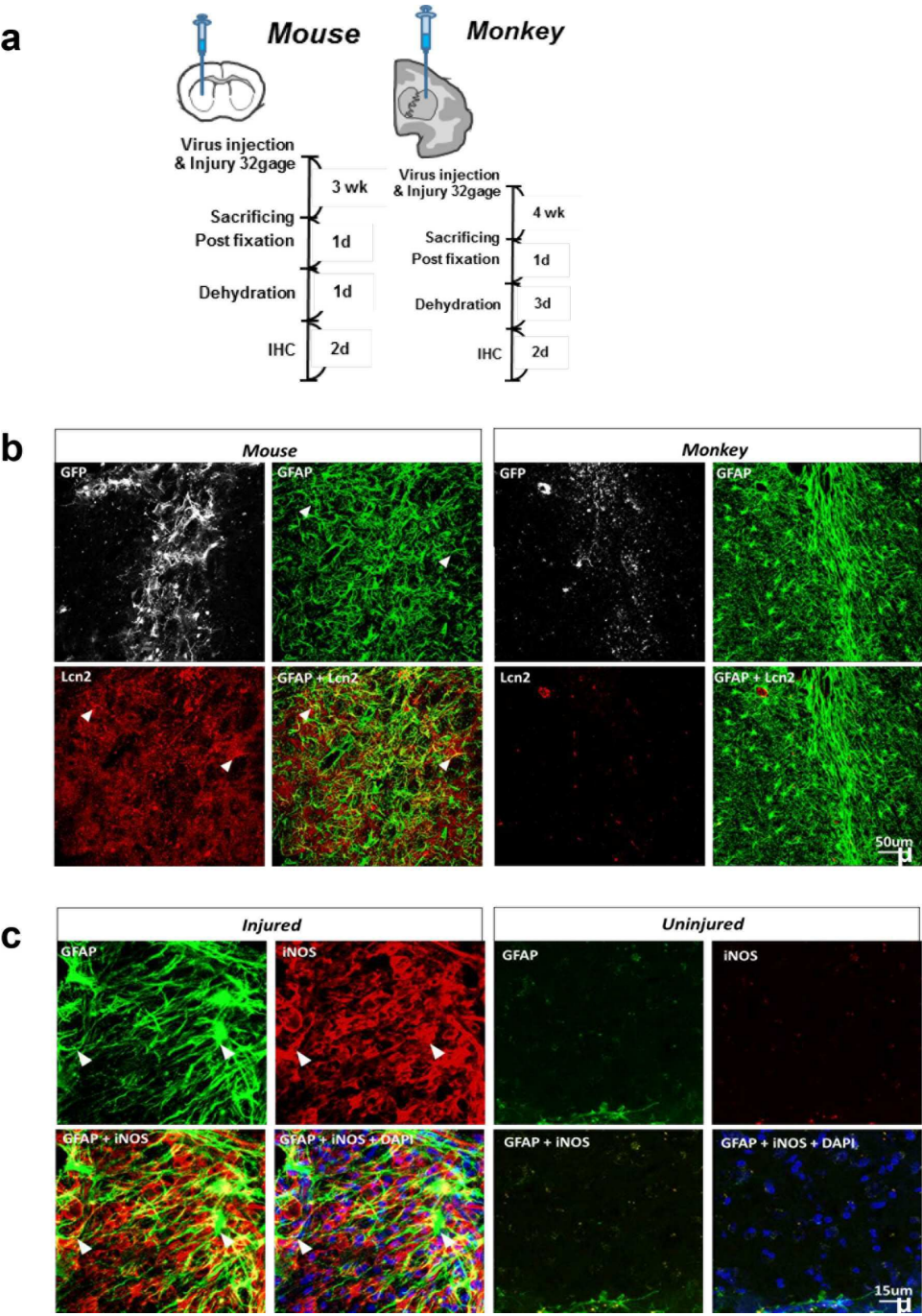
a



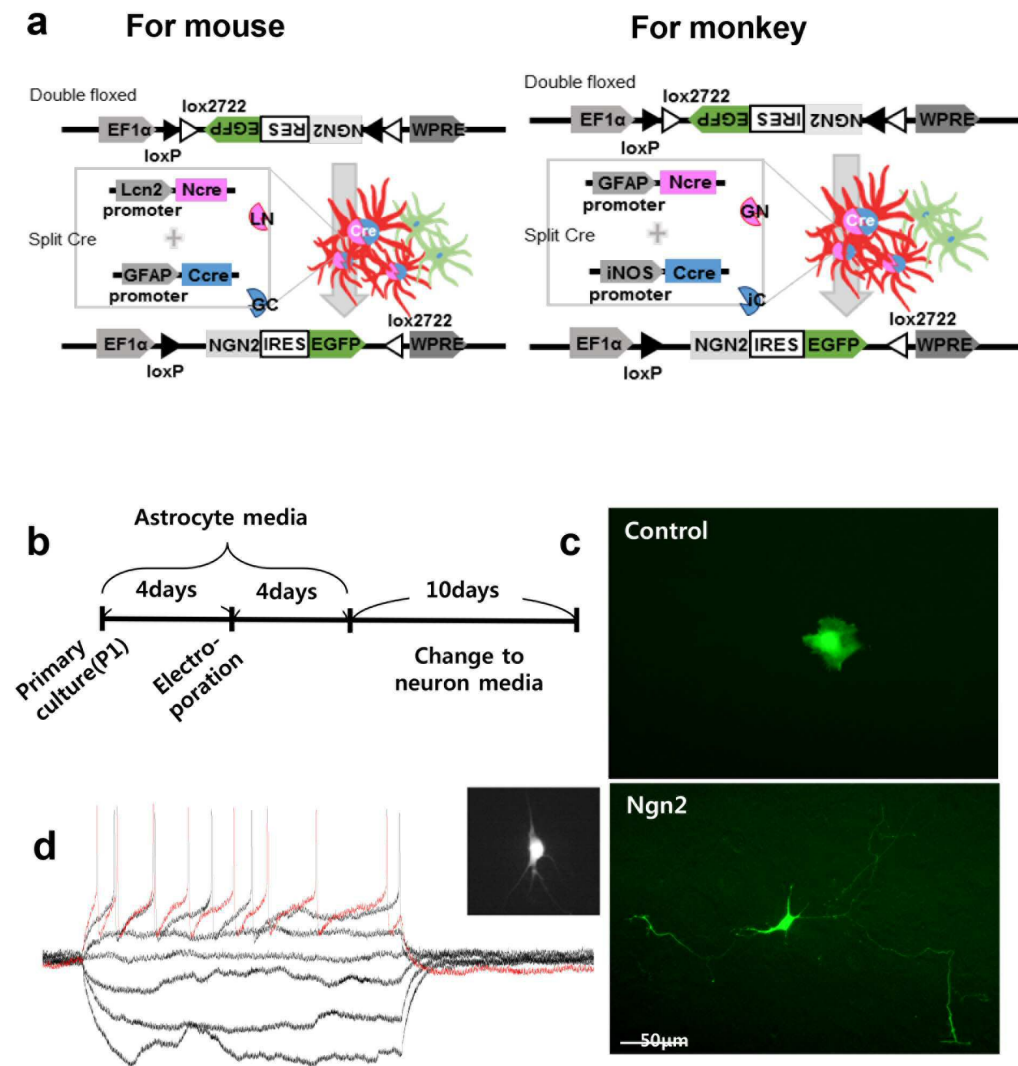
도면2b



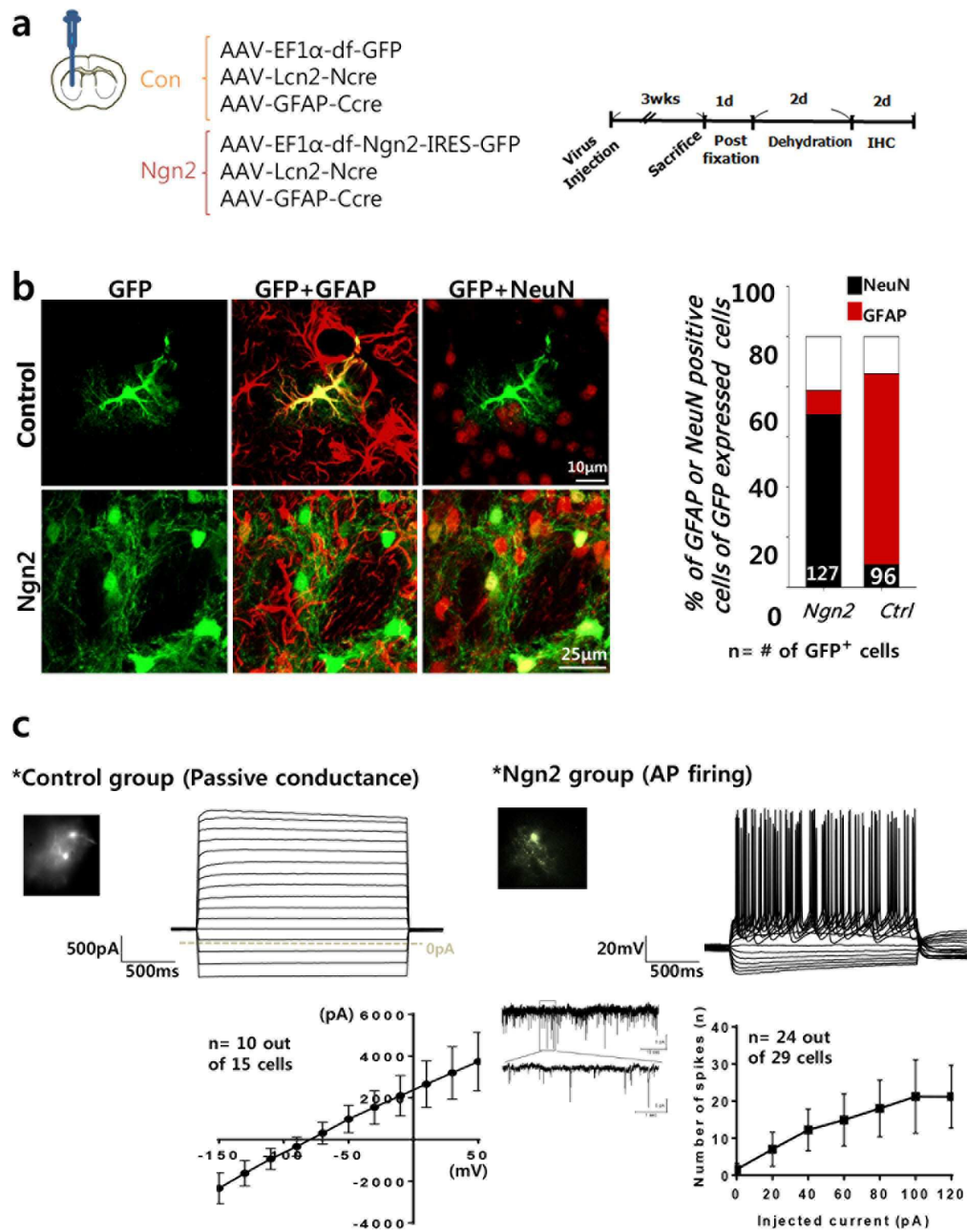
도면3



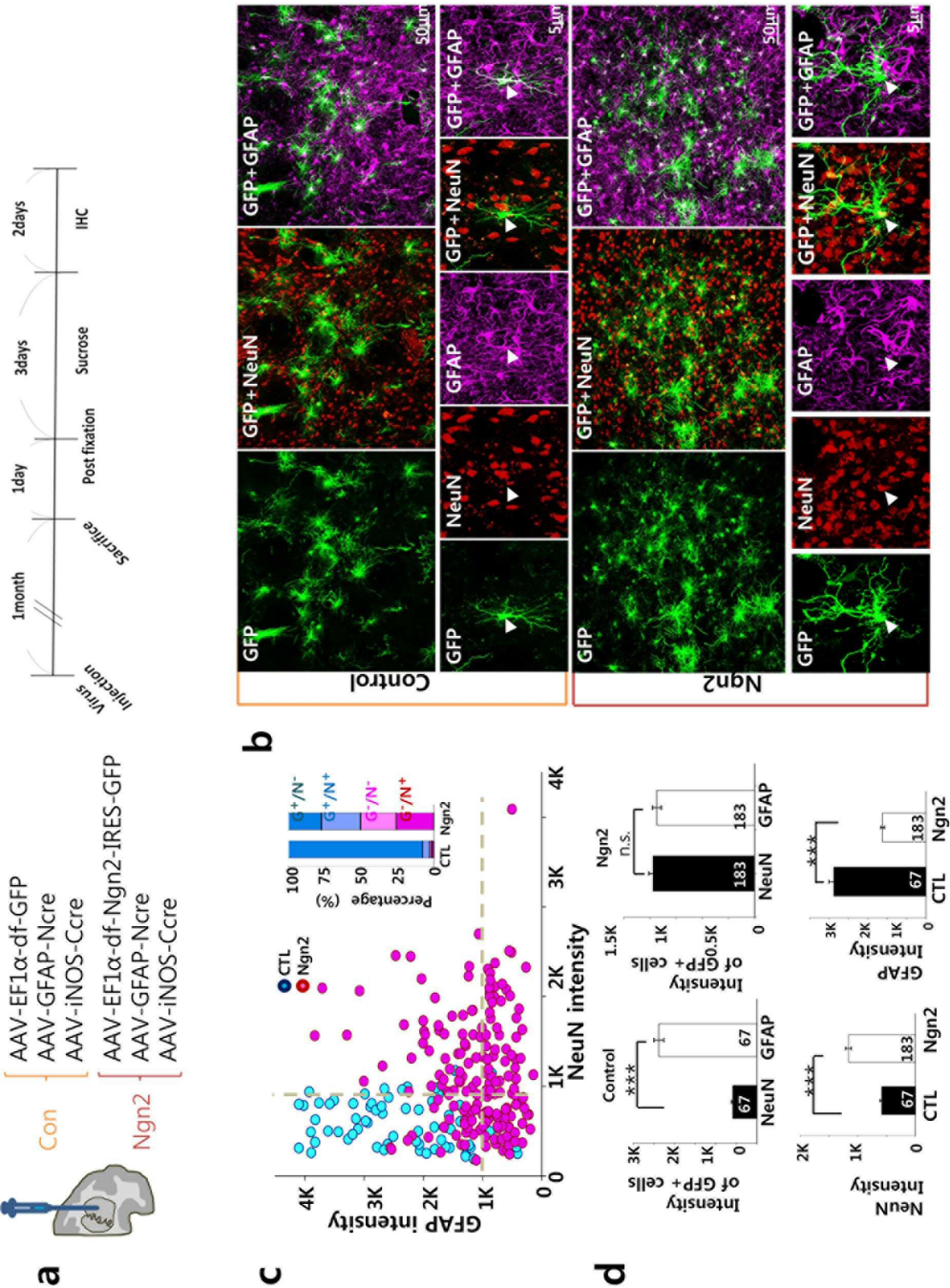
도면4



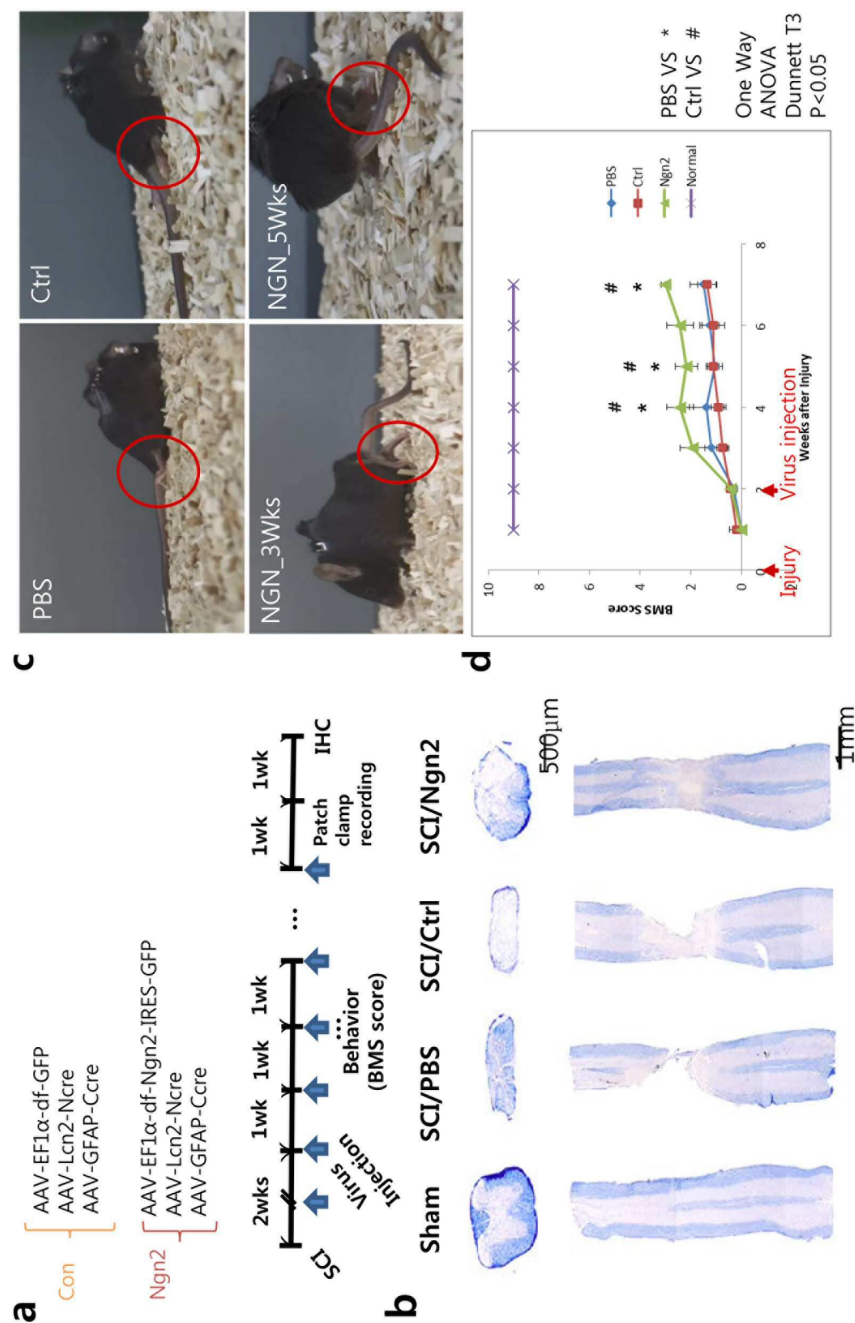
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Methods for reprogramming astrocytes into neurons in spinal cord
injury(SCI) animal model using Ngn2
- <130> KPA181042-KR
- <160> 5
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 263

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ngn2

<400> 1

Met Phe Val Lys Ser Glu Thr Leu Glu Leu Lys Glu Glu Glu Glu Val

1 5 10 15

Leu Met Leu Leu Gly Ser Ala Ser Pro Ala Ser Ala Thr Leu Thr Pro

20 25 30

Met Ser Ser Ser Ala Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Arg Arg Pro

35 40 45

Gly Ser Ala Arg Gly Gln Arg Gly Ala Glu Ala Gly Gln Gly Val Gln

50 55 60

Gly Ser Pro Ala Ser Gly Ala Gly Gly Cys Arg Pro Gly Arg Leu Leu

65 70 75 80

Gly Leu Met His Glu Cys Lys Arg Arg Pro Ser Arg Ser Arg Ala Val

85 90 95

Ser Arg Gly Ala Lys Thr Ala Glu Thr Val Gln Arg Ile Lys Lys Thr

100 105 110

Arg Arg Leu Lys Ala Asn Asn Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asn Leu

115 120 125

Asn Ala Ala Leu Asp Ala Leu Arg Glu Val Leu Pro Thr Phe Pro Glu

130 135 140

Asp Ala Lys Leu Thr Lys Ile Glu Thr Leu Arg Phe Ala His Asn Tyr

145 150 155 160

Ile Trp Ala Leu Thr Glu Thr Leu Arg Leu Ala Asp His Cys Ala Gly

165 170 175

Ala Gly Gly Leu Gln Gly Ala Leu Phe Thr Glu Ala Val Leu Leu Ser

180 185 190

Pro Gly Ala Ala Leu Gly Ala Ser Gly Asp Ser Pro Ser Pro Pro Ser

195 200 205

Ser Trp Ser Cys Thr Asn Ser Pro Ala Ser Ser Ser Asn Ser Thr Ser

210 215 220
Pro Tyr Ser Cys Thr Leu Ser Pro Ala Ser Pro Gly Ser Asp Val Asp

225 230 235 240
Tyr Trp Gln Pro Pro Pro Glu Lys His Arg Tyr Ala Pro His Leu

245 250 255
Pro Leu Ala Arg Asp Cys Ile

260

<210> 2

<211> 792

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NEUROG2

<400> 2

atgttcgtca aatctgagac tctggagttg aaggaggaag aggaggtact gatgctgctg 60

ggctcggctt ccccggcctc ggcgaccctg accccgatgt cctccagcgc ggacgaggag 120

gaggacgagg agctgcgccg gccgggctcc gcgcgtgggc agcgtggagc ggaagccggg 180

caggggggtgc agggcagtcg ggcgtcgggt gccgggggtt gccggccagg gcggctgctg 240

ggcctgatgc acgagtcaa gcgtcgcccg tcgcgtcac gggccgtctc ccgaggtgcc 300

aagacggcgg agacggtgca gcgcatcaag aagaccgca ggctcaaggc caacaaccgc 360

gagcgcaacc gcatgcacaa cctaaacgcc gcgctggacg cgctgcgcga ggtgctgccc 420

accttcccc aggatgccaa gctcacgaag atcgagacgc tgcgttcgc ccacaattac 480

atctgggcgc tcaccgagac tctgcgcctg gcggaccact gcgccggcgc cgggtggcctc 540

cagggggcgc tcttcacgga ggcggtgctc ctgagcccgg gagctgcgct cggcgccagc 600

ggggacagcc cttctcacc ttctcctg agctgcacca acagcccgc gtcacctcc 660

aactccagt ccccatag ctgcacttta tcgccgcta gcccgggtc agacgtggac 720

tactggcagc cccacctcc ggagaagcat cgttatgcgc ctacactgcc cctcgccagg 780

gactgtatct ag 792

<210> 3

<211> 2210

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFAP promoter

<400> 3

tattaatccc acciccctct ctgtgctggg actcacagag ggagacctca ggaggcagtc	60
tgtecatcac atgtccaaat gcagagcata ccttgggctg ggcgagtg ggagagtg	120
taattccagc acittgggag gctgatgtgg aaggatcact tgagcccaga agttctagac	180
cagcctgggc aacatggcaa gaccctatct ctacaaaaaa agttaaaaaa tcagccacgt	240
gtggtgacac acacctgtag tcccagctat tcaggaggct gaggtgaggg gatcacttaa	300
ggctgggagg ttgaggctgc agtgagtcgt ggttgcgcca ctgcactcca gcctgggcaa	360
cagttagacc ctgtctcaaa agacaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaac atatcctggt	420
gtggagtagg ggacgctgct ctgacagagg ctggggggcc tgagctggct ctgtgagctg	480
gggaggaggc agacagccag gccttgtctg caagcagacc tggcagcatt gggtggccg	540
ccccccagg cctcctcttc atgcccagtg aatgactcac cttggcacag acacaatgtt	600
cggggtgggc acagtgcctg ctcccgccg caccagcc cccctcaaat gccttcagag	660
aagccattg agcagggggc ttgcattgca cccagcctg acagcctggc atcttgggat	720
aaaagcagca cagcccccta ggggctgccc ttgctgtgtg gcgccaccgg cggtagagaa	780
caaggctcta ttcagcctgt gccaggaag ggggatcagg ggatgccag gcatggacag	840
tggtggcag ggggggagag gagggctgtc tgcttccag aagtccaagg acacaaatgg	900
gtgaggggac tgggcagggt tctgacctg tgggaccaga gtggaggcg tagatggacc	960
tgaagtctcc agggacaaca gggcccaggt ctgagctcc tagttgggcc cagtggctcc	1020
agcgtttcca aacccatcca tcccagagg ttcttcccat ctctccagc tgatgtgtgg	1080
gaactcgagg aaataaatct ccagtgggag acggagggt ggccaggga acggggcgct	1140
gcaggaataa agacagacca gcacagccag ctcatgtgta acggctttgt ggagctgtca	1200
aggcctggtc tctgggagag aggcacaggg aggcagaca aggaagggt gacctggagg	1260
gacagatcca ggggctaaag tctgataag gcaagagagt gccggcccc tcttgccta	1320
tcaggacctc cactgccaca tagaggccat gattgacct tagacaaagg gctggtgtcc	1380
aatcccagcc cccagccca gaactccagg gaatgaatgg gcagagagca ggaatgtggg	1440
acatctgtgt tcaagggaag gactccagga gtctgctggg aatgaggcct agtaggaaat	1500
gaggtggccc ttgagggtac agaacaggtt cattcttcgc caaatccca gcacctgca	1560
ggcacttaca gctgagttag ataatgctg ggttatgaaa tcaaaaagtt ggaaagcagg	1620
tcagaggtea tctggtacag ccttccctc ctttttttt ttttttttt gtgagacaag	1680

gtctctctct gttgccccagg ctggagtggc gcaaacacag ctactgcag cctcaaccta 1740
ctgggctcaa gcaatcctcc agcctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aagcatgagc 1800
caccctcctc agccctttcc ttctttttta attgatgcat aataattgta agtattcatc 1860
atggtccaac caaccctttc ttgaccacc ttcttagaga gaggtctctc ttgcttcagc 1920
ggtcagggcc ccagacccat ggtctggctc caggtaccac ctgcctcatg caggagtgg 1980
cgtgccccagg aagctctgcc tctgggcaca gtgacctcag tggggtgagg ggagctctcc 2040
ccatagctgg gctgcggccc aacccaccc cctcaggcta tgccaggggg tgttgccagg 2100

ggcaccggg catgccagt ctageccact ccttcataaa gccctcgcat cccaggagcg 2160
agcagagcca gagcaggttg gagaggagac gcatcacctc cgctgctcgc 2210

<210> 4

<211> 797

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lcn2 promoter

<400> 4

agggaagaa aaaggga aaaaaaagga aggcagccac atttaaggat tacgtggcac 60
aggagagggt gattccctga gatttcagct gctgccctgt ctgttctgt aaatggcagt 120
ggggtcatgg gaaagtgaag gggttcaagg tattggacac ttccaggata atcttttga 180
cgctcacc tgtgccagga ccaaggctga gcttggcagg ctgagaacag ggtgtcctgt 240

tcttccctgt ctaaacatt cactctcagc ttgctcacc ttcccagac aaggaagctg 300
cacagggtct ggtgttcaga tggctttggc ttacagcagg tgtgggtgtg gggtaggagg 360
caggggtag ggttgggga agcctgtact atactacta tctgtttct gaccctctag 420
gactcctaca ggttatggg agtggacagg cagtccagat ctgagctgct gaccacaag 480
cagtgcctg tgctgccag aatccaaagc cctgggaatg tccctctggt cccctctgt 540
cccctgcagc cttctctgt gctcaacctt gcacagtcc gacctggggg agagagggac 600
agaaatcttg ccaagtattt caacagaatg tactggcaat tacttcatgg ctctctggac 660

ttggtaaagg atggactacc ccgccaaca gggggctgg cagccaggta ggccataaa 720
aagcccgctg gggagtctc ctactctct gctcttctc ctccagaca catcagacct 780
agtagctgtg gaaacca 797

<210> 5

<211> 1304

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iNOS promoter

<400> 5

ggcattataa ggaatgaaat tataggccgg gcatgggtggc taacccttgt aatcctagca	60
ctttgagagg ctgaagtggg cagatcactt gagcttcaga gttcgagacc agcatggaca	120
acatggtgaa acccagtctc taccaaaaac acaaaaatat tagctgggtg tgggtggtgca	180
tgcctgtagt ccagctact caggaggctg aggtgggagg atcgcttgag cctgggaggc	240
agaagttgca atgagcagag atcggtccac tccgtccag tcttggtgac agaatgagac	300
tccatctcaa aaataaataa ataaataaaa taaatgaaat gaaattataa gaaattacca	360
ctttttcatg taagaagtga tcatttccat tataaggga ggaatttaat cctacctgcc	420
attccaccaa agcttaccta gtgctaagg atgaggtgtt agtaagacca acatctcaga	480
ggcctctctg tgccaatagc ctctcttctt ttcccttcca aaaacctcaa gtgactagtt	540
cagaggcctg tctggaataa tggcatcatc taatatcact ggccttctgg aacctgggca	600
ttttccagtg tgttccatac tgtcaatatt cccccagctt cctggactcc tgtcacaagc	660
tggaaaagtg agaggatgga cagggtataa ccagagagct cctgctgag gaaaaaatct	720
cccagatgct gaaagtgagg ccatgtggct tggccaaata aaacctggct ccgtggtgcc	780
tctatcttag cagccacctt gctgatgaac tgccaccttg gacttgggac cagaaagagg	840
tgggttgggt gaagaggcac cacacagagt gatgtaacag caagatcagg tcaccacag	900
gccctggcag tcacagtcac aaattagcta actgtacaca agctggggac actccctttg	960
gaaacaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaga cctttatgca aaaacaactc tctggatggc	1020
atggggtgag tataaatact tcttggctgc cagtgtgttc ataactttgt agcgagtcca	1080
aaactgaggc tccggccgca gagaactcag cctcattcct gctttaaaat ctctcggcca	1140
cctttgatga ggggactggg cagttctaga cagtccgaa gttctcaagg cacaggtctc	1200
ttcctggttt gactgtcctt accccgggga ggcagtgcag ccagctgcaa ggtgagttgc	1260
cttcatttct ggggaagcgg ctgttttgag agggttttgt ttct	1304