



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0117266
(43) 공개일자 2020년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) A61K 35/32 (2015.01)
A61P 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0655 (2013.01)
A61K 35/32 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0039147
(22) 출원일자 2019년04월03일
심사청구일자 2019년04월03일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
정병문
서울특별시 은평구 진관2로 57-37, 241동 601호(진관동, 은평뉴타운우물골)
김예린
경기도 남양주시 도농로 34, 107동 501호(다산동, 부영그린타운)
엄소연
인천광역시 서구 비지니스로194번길 4-12, 1층 1층호(청라동)
(74) 대리인
특허법인엠에이피에스

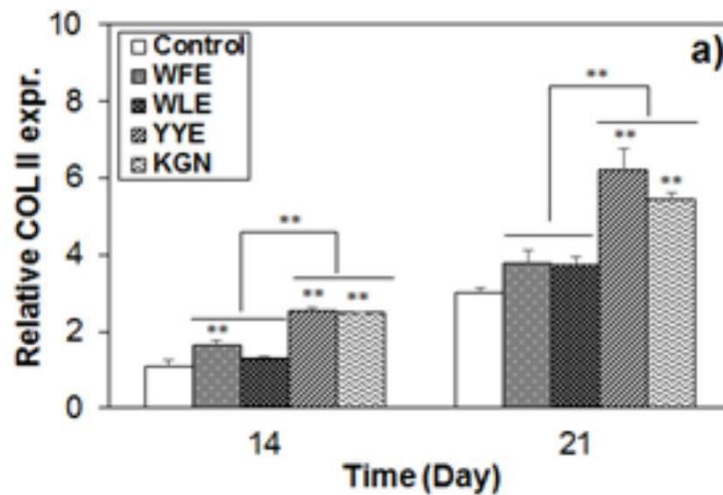
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 올리고펩타이드를 이용한 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법

(57) 요약

올리고펩타이드를 이용한 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법, 및 상기 분화 유도 방법에 의해 분화된 연골세포를 포함하는 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 19/00 (2018.01)

C12N 2501/998 (2013.01)

C12N 2506/1346 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2-2017-1340-000-2
부처명	한국연구재단
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업(학술진흥)(2017)-선도연구센터지원사업-이공학분야(S/ERC)
연구과제명	혼성계면 화학구조 연구센터
기 여 율	20/100
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2017.06.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2-2017-0412-000-2
부처명	한국연구재단
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업(학술진흥)(2017)-중견연구자지원사업-총연구비3억초과~5억이하
연구과제명	연골세포로 분화를 위한 주사형 바이오액티브 스캐폴드
기 여 율	80/100
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.01 ~ 2020.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

2 개 내지 10 개의 아미노산으로 이루어진 올리고펩타이드를 포함하는,
줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 올리고펩타이드는 글리신, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 페닐알라닌, 프로린, 티로신, 트립토판, 시스틴, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스팔산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하는 것인,

줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 올리고펩타이드는 알라닌-알라닌-글루탐산, 페닐알라닌-페닐알라닌-글루탐산, 이소루신-페닐알라닌-글루탐산, 루신-페닐알라닌-글루탐산, 메티오닌-페닐알라닌-글루탐산, 발린-페닐알라닌-글루탐산, 트립토판-페닐알라닌-글루탐산, 티로신-페닐알라닌-글루탐산, 페닐알라닌-아르기닌-아스팔산, 페닐알라닌-루신-글루탐산, 트립토판-루신-글루탐산, 티로신-이소루신-아스팔산, 티로신-티로신-아스팔산, 또는 티로신-티로신-글루탐산의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 올리고펩타이드의 농도는 10 nM 내지 100 μ M 범위인 것인,

줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물.

청구항 5

줄기세포에 2 개 내지 10 개의 아미노산으로 이루어진 올리고펩타이드를 처리하여 연골세포로의 분화를 유도하는 것을 포함하는,

줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 올리고펩타이드는 글리신, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 페닐알라닌, 프로린, 티로신, 트립토판, 시스틴, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스팔산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하는 것인,

줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 올리고펩타이드는 알라닌-알라닌-글루탐산, 페닐알라닌-페닐알라닌-글루탐산, 이소루신-페닐알라닌-글루탐산, 루신-페닐알라닌-글루탐산, 메티오닌-페닐알라닌-글루탐산, 발린-페닐알라닌-글루탐산, 트립토판-페닐알라닌-글루탐산, 티로신-페닐알라닌-글루탐산, 페닐알라닌-아르기닌-아스팔산, 페닐알라닌-루신-글루탐산, 트립토판-루신-글루탐산, 티로신-이소루신-아스팔산, 티로신-티로신-아스팔산, 또는 티로신-티로신-글루탐산의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 줄기세포에 올리고펩타이드를 처리하는 것은, 상기 줄기세포를 올리고펩타이드가 포함된 배지에서 배양하는 것을 포함하는 것인,

줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 배지 중 상기 올리고펩타이드의 농도는 10 nM 내지 100 μ M 범위인 것인, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법.

청구항 10

제 5 항에 있어서,

상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 유도-만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것인,

줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법.

청구항 11

제 5 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 분화된 연골세포를 포함하는, 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 연골 손상 질환은 관절염, 연골 손상, 연골 결손, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골절, 족저근막염, 상완골외과염, 골연화증, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것인,

연골 손상 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제 1 항에 따른 분화 유도용 조성물을 포함하는, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 하이드로젤.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 하이드로젤은 히알루론산, 폴리펩타이드, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 및 이들의 조합들로 이루어진 군 으로부터 선택된 생분해성 고분자를 포함하는 것인, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 하이드로젤.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은, 올리고펩타이드를 이용한 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법, 및 상기 분화 유도 방법에 의해 분화된 연골세포를 포함하는 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포는 자체 재생 능력을 가지고 있으며, 성숙한 세포보다 증식 및 재생 잠재력이 더 크다. 특히, 골 관절염과 같은 연령 관련 퇴행성 질환의 경우, 줄기세포는 연골세포로의 빠른 분화 및 계통 분화로 인해 치료를 위해 성숙한 세포보다 우수한 것으로 기대된다.

[0003] 중간엽 줄기세포(MSCs)를 포함한 줄기세포는 또한 염증 부위에 대한 귀소 특성을 가지며, 면역 세포의 증식과 전염증성 사이토카인의 방출을 억제하여 면역 억제 효과와 소염 효과를 나타낸다. 현재, 손상된 연골을 위한 세포 치료는 병원에서 자가 연골세포와 중간엽 줄기세포를 사용한다. 자가 연골세포 이식은 주로 섬유연골 조직으로 이끄는 데, 상기 조직은 연골 조직으로서의 기계적 물성이 부족하고 2 년 동안 분해된다.

[0004] 줄기세포 치료의 경우에도, 줄기세포가 연골세포로 분화하여 연골 조직이 되기 보다는 줄기세포에서의 분비물이 주로 임상 효능에 기여한다. 중간엽 줄기세포의 연골 분화를 향상시키기 위해 다양한 접근법이 시도되었다. 이들은 1) 단백질 또는 비단백질 성장 인자, 2) 상이한 성분과 전하, 경도 및 다공성을 갖는 스캐폴드 디자인, 3) 연골세포와의 공동 배양, 4) 줄기세포의 유전 조절, 5) 산소 분압과 같은 화학적 자극, 전기 자극 및 기계적 자극을 포함한다. 그 중에서 줄기세포의 연골 분화를 유도하는 명확한 인자를 사용하는 접근법이 가장 유망한 방법으로 간주된다. 중간엽 줄기세포의 연골 분화를 촉진하기 위한 많은 인자들이 개발되었다. 이들은 단백질 [조직증식 인자- β 1-3 (TGF- β 1-3), 섬유아세포성장인자-2 (FGF-2), 상피세포증식인자 (EGF), 인슐린유사성장인자-1 (IGF-1), 골형성 단백질-2,4,7 (BMP-2,4,7) 혈소판유래성장인자 (PDGF), 및 인터루킨-1 β (IL-1 β)]과 작은 분자(에탄올, 프로스타글란딘 E2, 아스코르브산, 스타우로스포린, 텍사메타손, 1,25-디하이드록시 비타민D)를 포함한다. 단백질 기반 성장 인자와 비교하여, 작은 분자 화합물은 화학적으로 명확하며 중간엽 줄기세포의 연골 분화 촉진제로서 생산에 대한 신뢰도가 더 높다. 또한, 중간엽 줄기세포의 연골 분화를 촉진시키는 데 가장 효과적인 단백질인 TGF- β 는 활액 섬유화와 골극 형성, 연골내골화를 유도한다. FGF-2는 또한 조직병리학적인 연골세포 클론의 다발 형성을 유도하고, 프로테오글리칸 합성을 길항하며 매트릭스 금속단백분해효소 (MMP)의 염증 마커를 증가시킴으로써 골관절염 진행을 가속화시킨다. 최근, 오히려 카토제닌(KGN)과 옥소피페라진의 유도체인 5*i*,2는 작은 분자 화합물임에도 불구하고 중간엽 줄기세포의 연골 분화를 촉진시키는데 TGF- β 이상으로 우수하다고 보고되었다.

[0005] 대한민국 공개특허 10-2010-0069376는, 지방-유래 중간엽 줄기세포를 TGF- β 2 또는 TGF- β 2와 IGF-1이 혼합되어 첨가된 연골 형성 배지에서 배양함으로써 연골세포로 분화하는 것을 보여준다.

[0006] 2012년 Medipost에서 개발한 줄기세포 치료제, 카티스탐은 분화된 연골 세포가 아닌 줄기세포의 분비물 효과(paracrine effect)로 인해 임상적으로 효과가 있다고 보고되었다. 중간엽 줄기세포의 특정한 분화를 유도하기 위한 분자를 찾는 과정에서, 거대 분자 단백질 또는 유전적 변조보다 저분자 화합물이 재현성 있는 생산 및 신속하고 가역적인 효능을 위한 우수하고 제어 가능한 생화학적 이점으로 인해 임상적 유망성이 제시되었다.

- [0007] 에탄올, 아스코르브산, 텍사메사손, 프로스타글란딘 E2, 스타우로스포린, 카토제닌, 그리고 옥소피페라진 유도체(5 {i,2})를 포함한 저분자 화합물들이 중간엽 줄기세포의 연골 분화를 효과적으로 유도하는 것으로 보고되었다. 그러나, 더욱 뛰어난 연골분화를 위한 효과적인 단분자 화합물은 지속적으로 연구되고 있다.
- [0008] 미국 특허 US 9,487,754 B2는 CTGF 및 TGFβ3를 함유하는 미세입자로부터 방출을 조절함으로써 중간엽 줄기세포를 연골세포로 분화하는 것을 촉진함을 보여준다.
- [0009] 미국 특허 9,464,065 B2 및 Science, 2012, 336, page 717-721 논문은 Kartogenin 및 그의 유도체를 이용하여 줄기세포를 연골세포로 분화하는 것을 촉진함을 보여준다.
- [0010] 대한민국특허 10-2013-0126018 및 Chemical Science, 2012, 3, page 3071-3075 논문은 옥소피페라진의 유도체인 5{I,2} 및 그의 유도체를 이용하여 줄기세포를 연골세포로 분화하는 것을 촉진함을 보여준다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본원은, 올리고펩타이드를 이용한 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법, 및 상기 분화 유도 방법에 의해 분화된 연골세포를 포함하는 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다.
- [0012] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본원의 제 1 측면은, 2 개 내지 10 개의 아미노산으로 이루어진 올리고펩타이드를 포함하는, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본원의 제 2 측면은, 줄기세포에 2 개 내지 10 개의 아미노산으로 이루어진 올리고펩타이드를 처리하여 연골세포로의 분화를 유도하는 것을 포함하는, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법을 제공한다.
- [0015] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 2 측면에 따른 방법에 의해 분화된 연골세포를 포함하는, 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0016] 본원의 제 4 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 분화 유도용 조성물을 포함하는, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 하이드로젤을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본원의 구현예들에 따르면, 2 개 내지 10 개, 구체적으로는 3 개 내지 5 개의 아미노산으로 이루어진 올리고펩타이드를 이용함으로써, 편도-유래 중간엽 줄기세포의 골 분화를 억제함과 동시에 연골 분화를 향상시켜 줄기세포의 연골세포로의 분화를 선택적으로 유도할 수 있다. 또한, 상기 유도 방법에 의해 분화된 연골세포는 연골 질환 치료용, 또는 조직공학용 물질로 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1의 (a) 내지 (e)는, 본원의 일 실시예에 있어서, 3 차원 펠렛 배양된 줄기세포의 mRNA 수준에서 실시간 RT-PCR로 분석한 COL II (a), COMP (b), ACAN (c), COL X (d), 및 COL I α1 (e)의 발현을 나타낸 그래프이다 (n=3).
- 도 2는, 본원의 일 실시예에 있어서, 상이한 올리고펩타이드에 따라 줄기세포를 21 일 간의 3 차원 배양한 후, 세포 펠렛을 7 μm 두께로 절단한 뒤 절단면에서의 알시안 블루 (alcian blue) 및 사프란인 O 염색처리 후의 사진이다(스케일 바 = 0.5 mm).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분

은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

- [0020] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 “연결”되어 있다고 할 때, 이는 “직접적으로 연결”되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 “전기적으로 연결”되어 있는 경우도 포함한다.
- [0021] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 “상에” 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0022] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [0023] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0024] 본원 명세서 전체에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [0026] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.
- [0027] 본원 명세서 전체에서, “분화(differentiation)”는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉, 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 의미할 수 있다.
- [0028] 본원 명세서 전체에서, “연골세포”는 줄기세포로부터 분화 유도된 연골세포, 또는 연골세포로의 분화 과정에 있는 세포를 모두 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 본원 명세서 전체에서, “배지”는 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식 등에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외 (in vitro)에서 줄기세포 등의 세포의 배양 또는 분화를 위한 혼합물을 의미하는 것일 수 있다.
- [0031] 본원의 제 1 측면은, 2 개 내지 10 개의 아미노산으로 이루어진 올리고펩타이드를 포함하는, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [0032] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드를 포함하는 분화 유도용 조성물에 의해, 상기 줄기세포로부터 분화된 상기 연골세포에 포함된 유전자 또는 단백질의 발현이 증폭되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자 또는 단백질은 바이오마커를 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로는, 콜라겐 타입 II 알파 1(COL II), SRY-박스 9(SOX 9), 연골 올리고머 매트릭스 단백질(COMP), 아그리칸(ACAN), 콜라겐 타입 X 알파 1(COL X), 콜라겐 타입 I 알파 2(COL I α2), 및 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(GAPDH), 황화 글리코사미노글리칸(sGAG), 프로테오글리칸, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0033] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드는 글리신, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 페닐알라닌, 프로린, 티로신, 트립토판, 시스틴, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스팔산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 2 개 내지 10 개의 아미노산을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0034] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드는 2 개 내지 10 개, 2 개 내지 8 개, 2 개 내지 6 개, 또는 3 개 내지 5 개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다.
- [0035] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드는 3 개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있으며, 예를 들어,

알라닌-알라닌-글루탐산, 페닐알라닌-페닐알라닌-글루탐산, 이소루신-페닐알라닌-글루탐산, 루신-페닐알라닌-글루탐산, 메티오닌-페닐알라닌-글루탐산, 발린-페닐알라닌-글루탐산, 트립토판-페닐알라닌-글루탐산, 티로신-페닐알라닌-글루탐산, 페닐알라닌-아르기닌-아스팔산, 페닐알라닌-루신-글루탐산, 트립토판-루신-글루탐산, 티로신-이소루신-아스팔산, 티로신-티로신-아스팔산, 또는 티로신-티로신-글루탐산의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [0036] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드는 트립토판-페닐알라닌-글루탐산, 트립토판-루신-글루탐산, 또는 티로신-티로신-글루탐산의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0037] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드의 아미노산 서열에 따라, 줄기세포의 연골세포로의 분화 정도가 상이할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0038] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드의 농도는 약 10 nM 내지 약 100 μ M 범위일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0039] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드의 농도가 약 0.01 μ M 미만 또는 약 100 μ M 초과일 경우, 연골세포로의 분화 효과가 하락할 수 있다. 따라서, 상기 올리고펩타이드의 농도는 약 0.01 μ M 내지 약 100 μ M, 예를 들어, 약 0.01 μ M 내지 약 100 μ M, 약 0.01 μ M 내지 약 75 μ M, 약 0.01 μ M 내지 약 50 μ M, 약 0.01 μ M 내지 약 10 μ M, 약 0.01 μ M 내지 약 1 μ M, 약 0.01 μ M 내지 약 0.1 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 100 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 75 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 50 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 10 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 1 μ M, 약 1 μ M 내지 약 100 μ M, 약 1 μ M 내지 약 75 μ M, 약 1 μ M 내지 약 50 μ M, 약 1 μ M 내지 약 10 μ M, 약 10 μ M 내지 약 100 μ M, 약 10 μ M 내지 약 75 μ M, 약 10 μ M 내지 약 50 μ M, 약 50 μ M 내지 약 100 μ M, 약 50 μ M 내지 약 75 μ M, 또는 약 75 μ M 내지 약 100 μ M 범위인 것이 바람직하다.
- [0040] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 유도-만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0041] 본원의 일 구현예에 있어서, 중간엽 줄기세포는 골수-유래 줄기세포, 지방-유래 줄기세포, 편도-유래 줄기세포, 활액 줄기세포, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0042] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 골수, 조직, 배아, 체대혈, 혈액 또는 체액으로부터 수득된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0044] 본원의 제 2 측면은, 줄기세포에 2 개 내지 10 개의 아미노산으로 이루어진 올리고펩타이드를 처리하여 연골세포로의 분화를 유도하는 것을 포함하는, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도 방법을 제공한다.
- [0045] 본원의 제 2 측면에 따른 분화 유도 방법에 대하여, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었다더라도 본원의 제 1 측면에 기재된 내용은 본원의 제 2 측면에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0046] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드는 글리신, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 페닐알라닌, 프로린, 티로신, 트립토판, 시스틴, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 아스팔산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0047] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드는 알라닌-알라닌-글루탐산, 페닐알라닌-페닐알라닌-글루탐산, 이소루신-페닐알라닌-글루탐산, 루신-페닐알라닌-글루탐산, 메티오닌-페닐알라닌-글루탐산, 발린-페닐알라닌-글루탐산, 트립토판-페닐알라닌-글루탐산, 티로신-페닐알라닌-글루탐산, 페닐알라닌-아르기닌-아스팔산, 페닐알라닌-루신-글루탐산, 트립토판-루신-글루탐산, 티로신-이소루신-아스팔산, 티로신-티로신-아스팔산, 또는 티로신-티로신-글루탐산의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0048] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드의 농도는 약 10 nM 내지 약 100 μ M 범위일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0049] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 올리고펩타이드의 농도가 약 0.01 μ M 미만 또는 약 100 μ M 초과일 경우, 연골세포로의 분화 효과가 하락할 수 있다. 따라서, 상기 올리고펩타이드의 농도는 약 0.01 μ M 내지 약 100 μ M

M, 예를 들어, 약 0.01 μ M 내지 약 100 μ M, 약 0.01 μ M 내지 약 75 μ M, 약 0.01 μ M 내지 약 50 μ M, 약 0.01 μ M 내지 약 10 μ M, 약 0.01 μ M 내지 약 1 μ M, 약 0.01 μ M 내지 약 0.1 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 100 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 75 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 50 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 10 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 1 μ M, 약 1 μ M 내지 약 100 μ M, 약 1 μ M 내지 약 75 μ M, 약 1 μ M 내지 약 50 μ M, 약 1 μ M 내지 약 10 μ M, 약 10 μ M 내지 약 100 μ M, 약 10 μ M 내지 약 75 μ M, 약 10 μ M 내지 약 50 μ M, 약 50 μ M 내지 약 100 μ M, 약 50 μ M 내지 약 75 μ M, 또는 약 75 μ M 내지 약 100 μ M 범위인 것이 바람직하다.

[0050] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 유도-만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0051] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 줄기세포에 올리고핵타이드를 처리하는 것은, 상기 줄기세포를 올리고핵타이드가 포함된 배지에서 배양하는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 배지는 줄기세포의 배양 시 일반적으로 사용되는 배지를 모두 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 상기 배지는 DMEM, MEM, BME, RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM-F12, α -MEM, G-MEM, MSCGM, IMDM, MacCoy's 5A, AmnioMax, AminoMax II complete Medium, 또는 Chang's Medium MesemCult-XFMedium일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0052] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 줄기세포에 올리고핵타이드를 처리함으로써, 상기 줄기세포로부터 분화된 상기 연골세포에 포함된 유전자 또는 단백질의 발현이 증폭되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자 또는 단백질은 바이오마커를 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로는, 콜라겐 타입 II 알파 1(COL II), SRY-박스 9(SOX 9), 연골 올리고머 매트릭스 단백질(COMP), 아그리칸(ACAN), 콜라겐 타입 X 알파 1(COL X), 콜라겐 타입 I 알파 2(COL I α 2), 및 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(GAPDH), 황화 글리코사미노글리칸 (sGAG), 프로테오글리칸, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0053] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 유도-만능 줄기세포, 배아 줄기세포, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0054] 본원의 일 구현예에 있어서, 중간엽 줄기세포는 골수-유래 줄기세포, 지방-유래 줄기세포, 편도-유래 줄기세포, 활액 줄기세포, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 중간엽 줄기세포를 분리한 후 2 회 내지 10 회 계대 배양한 것을 연골세포의 분화 방법에 사용하는 것일 수 있다.

[0055] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 골수, 조직, 배아, 제대혈, 혈액 또는 체액으로부터 수득된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0056] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 방법은, 당업계에 알려진 3 차원 배양 방법을 적용할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 3 차원 배양이란 세포 성장에 의해 세포단층(mono-layer)이 형성되도록 배양하는 통상적인 단층배양이 아닌 세포들이 뭉쳐서 성장하여 3 차원적인 입체 형태, 예를 들어, 구체 또는 타원체를 형성하도록 배양하는 것을 말하며, 바람직하게는 펠렛(pellet) 배양을 적용할 수 있다. 예를 들어, 상기 펠렛 배양은 연골세포의 표현형을 유지시키는데 효과적이며, 원심분리를 통해 쉽게 세포를 응집하여 세포와 세포간의 접합 효과를 유도하여 초기 연골 조직 생성과 비슷한 세포의 환경을 제공할 수 있다. 또한, 예를 들어, 상기 3 차원 배양은 상기 세포 또는 줄기세포를 히아루론산 등을 포함하는 하이드로젤로 세포 또는 줄기세포를 3 차원 매트릭스를 이용하여 배양하는 것을 포함할 수 있다.

[0058] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 2 측면에 따른 방법에 의해 분화된 연골세포를 포함하는, 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0059] 본원의 제 3 측면에 따른 약학 조성물에 대하여, 본원의 제 1 측면 또는 제 2 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면 또는 제 2 측면에 기재된 내용은 본원의 제 3 측면에 동일하게 적용될 수 있다.

[0060] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 연골 손상 질환은 관절염, 연골 손상, 연골 결손, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골절, 족저근막염, 상완골외과염, 골연화증, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0061] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 내재성 줄기세포 또는 이식된 치료용 줄기세포의 연골세포로의

특이적 분화를 유도함으로써 관절 내 연골조직의 재생을 촉진할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [0062] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 공지의 방법에 따라 환자의 관절 내로 직접 주입되거나, 3 차원 배양 후 스캐폴드(scaffold)와 함께 이식될 수도 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 약학 조성물이 환자에게 주입될 경우, 주입량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여 경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련인자를 고려하여 조절될 수 있다.
- [0063] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 환자에 주입 또는 이식 시 당업계에서 사용되고 있는 공지의 담체를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 유효 성분을 통상의 방법에 따라 약제학적으로 허용 가능한 담체에 현탁시키거나 용해될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0064] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 현탁제, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형물로 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0065] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 이의 제형은 사용 방법에 따라 달라질 수 있다.
- [0067] 본원의 제 4 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 분화 유도용 조성물을 포함하는, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 하이드로젤을 제공한다.
- [0068] 본원의 제 4 측면에 따른 분화 유도용 하이드로젤에 대하여, 본원의 제 1 측면, 제 2 측면, 또는 제 3 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면, 제 2 측면, 또는 제 3 측면에 기재된 내용은 본원의 제 4 측면에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0069] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 분화 유도용 조성물을 포함하는 하이드로젤은, 스캐폴드와 함께 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 분화 유도용 조성물을 포함하는 하이드로젤은 스캐폴드와 함께 조직 공학용 물질로 응용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0070] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 분화 유도용 조성물을 포함하는 하이드로젤은, 화학 반응, 온도, pH, UV 조사, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 것에 의해 졸-젤(sol-gel) 변화를 일으킬 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 분화 유도용 조성물을 포함하는 하이드로젤은 졸 상태에서 상기 화학 반응, 온도, pH 또는 UV 조사 등에 의해 젤 상태로 변화할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0072] 이하, 실시예에 의하여 본원을 좀더 자세히 설명하지만, 본원이 이에 제한되는 것은 아니다.

[실시예]

편도-유래 중간엽 줄기세포의 2 차원 배양

- [0076] 본 실시예에서, 편도선 수술 이후 편도 조직으로부터 회수된 편도-유래 중간엽 줄기세포(TMSCs)가 성체 줄기세포로 사용되었다. 편도 조직의 줄기세포 밀도는 골수에서의 줄기세포 밀도보다 약 10 배 내지 100 배이다. 또한, 편도-유래 중간엽 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포보다 2 배 내지 3 배 빠르게 증식한다. 카토제닌(KGN)과 옥소피페라진 유도체 5{i,2}의 구조가 방향족 고리와 카르복실산을 모두 포함하고 있기 때문에, 올리고펩타이드를 선정하기 위한 첫 번째 시도로서 방향족 그룹(페닐알라닌, 티로신, 트립토판)와 카르복실산(아스파산, 글루탐산)를 갖는 트라이펩타이드가 선택되었다.
- [0077] 연골 바이오마커 발현을 나타내는 다양한 트라이펩타이드를 스크리닝하여 상위 3종의 트라이펩타이드를 먼저 선택한 후, 3D 펠렛을 21 일 동안 배양하여 편도-유래 중간엽 줄기세포의 연골 분화 효과를 상세히 조사하였다. 트라이펩타이드의 존재 또는 트라이펩타이드의 부재(음성 대조군) 하에 혈청이 없는 연골 유도 배양액에서 세포로부터의 연골 생체 지표 발현이 조사되었다. 카토제닌은 양성 대조군으로 사용되었다.
- [0078] 편도-유래 중간엽 줄기세포는 이화여자대학교 목동병원(서울, 한국)에서 기증받았다. 세포는 NIH 가이드라인에 따라 편도선 수술 후 6 세 남성 기증자로부터 분리되었다. 편도-유래 중간엽 줄기세포는 10% (v/v) FBS와 1.0% (v/v) 항생제/항균제 용액 (Gibco, 미국), 1.0% 페니실린/스트렙토마이신 용액이 보충된 고농도의 글루코스 DMEM(Hyclone, 미국)의 성장 배지에서 37℃의 5% 이산화탄소 하에서 계대 5까지 플레이트 상에서 2 차원(2D) 배

양되었다. 편도-유래 중간엽 줄기세포 (계대 6)는 이어서 37℃의 5% 이산화탄소 하에서 2D 배양되었다. 24 시간 후, 10% (v/v) FBS와 1.0% (v/v) 항생제/항균제 용액 (Gibco, 미국), 1.0% 페니실린/스트렙토마이신 용액이 들어간 성장 배지(3.0 mL)를 FBS가 제거된 동일한 성장 배지로 대체되었고, 개별 트라이펩타이드 또는 카토제닌이 용액에 첨가되었다. 대조(음성) 실험은 각각의 트라이펩타이드 또는 카토제닌의 부재 하에 수행되었다. 카토제닌을 포함하는 프로토콜은 양성 대조군 실험으로 사용된다. 배지는 매 3 일마다 교체되었다. 동일한 수의 편도-유래 중간엽 줄기세포 (약 2.5×10^5 cells/well)가 각 시스템에 사용되었고, 각 실험은 3 번 수행되었다 (n=3).

[0080] **편도-유래 중간엽 줄기세포의 증식**

[0081] 1.0% 페니실린/스트렙토마이신 용액이 들어간 고농도의 글루코스 DMEM (Hyclone, 미국)에서 세포 카운팅 키트-8 (CKK-8)이 준비되었다. 상기 용액 (0.5 mL)은 각각의 트라이펩타이드 (10 μ M) 또는 카토제닌과 1.0% (v/v) 항생제/항균제 용액 (Gibco, 미국), 1.0% 페니실린/스트렙토마이신 용액이 들어간 성장 배지를 사용하여 편도-유래 중간엽 줄기세포가 3 일간 배양된 각 세포 배지를 대체하였다. 37℃의 5% 이산화탄소 하에서 3 시간 동안 배양한 후, 마이크로 플레이트 리더 (iMark TM, Bio-Rad, 미국)를 사용하여 655 nm에 대한 450 nm에서의 시료의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 각각의 트라이펩타이드 또는 카토제닌이 없는 대조군에 비해 세포 생존력을 나타낸다.

[0083] **배양된 줄기세포의 Live/Dead 검사**

[0084] 편도-유래 중간엽 줄기세포는 7 일 동안 각각의 트라이펩타이드 (10 μ M) 또는 카토제닌과 1.0% (v/v) 항생제/항균제 용액 (Gibco, 미국), 1.0% 페니실린/스트렙토마이신 용액이 들어간 DMEM에서 배양되었다. 배양액이 에티뉼 호모다아미어-1 (4.0 μ M)과 칼세인 아세톡시 메틸 에스터 (2.0 μ M)를 함유한 인산 완충 생리식염수 (PBS)로 대체되고, 15 분간 세포를 배양하였다. Olympus IX71 형광 현미경과 Olympus DP2-BSW 소프트웨어를 사용하여 라이브/데드 키트 (Molecular Probes, Life Technologies, 미국)를 통해 편도-유래 중간엽 줄기세포의 생존력을 조사하였다.

[0086] **줄기세포의 3 차원 펠렛 배양**

[0087] 편도-유래 중간엽 줄기세포 (계대 6)는 트립신 처리로 효소를 통해 분리되고, 혈구 계산기로 계수하였다. 튜브를 상대 원심력(RCF) 500 g에서 10 분간 원심 분리하고 37℃, 5% 이산화탄소 하에서 24 시간 배양하였다. 원뿔 모양의 폴리프로필렌 튜브 (15 mL)에 약 3.0×10^5 개의 세포로 구성된 세포 펠렛을 만들었다. FBS를 함유하는 성장 배지가 1.0% (v/v) 항생제/항균제 용액과 1.0% 페니실린/스트렙토마이신 용액, 50 μ g/mL의 아스코르베이트-2-인산, 40 μ g/mL의 L-프롤린, 100nM의 텍사메타손, 최종 농도가 10 μ g/mL의 소 혈청, 5.5 μ g/mL의 트랜스페린, 5 μ g/mL의 아셀렌산 나트륨, 4.7 μ g/mL의 리놀레산, 0.5 mg/mL의 BSA인 1% ITS + Premix가 들어간 고농도의 글루코스 DMEM으로 구성된 배지 A로 대체되었다. 펠렛은 21 일간 37℃, 5% 이산화탄소 하에서 다음의 세 가지 다른 조건으로 배양되었다: 1) 배지 A만, 2) 카토제닌이 들어간 배지 A, 또는 3) 각각 상기 트라이펩타이드가 들어간 배지 A. 각 배지는 3 일마다 바꾸어주었다. 실험은 각 시스템에 대해 3회 수행되었다.

[0089] **RNA 추출 및 실시간 RT-PCR**

[0090] 전체 RNA는 TRIZOLTM (Invitrogen, 미국)을 사용하여 세포로부터 추출되었다. mRNA 농도는 Nano Drop 2000 분광계 (Thermo Scientific, 미국)로 분석하였다. cDNA는 ReverTra Ace® qPCR RT kit (Toyobo, 일본)에 의해 합성되었다. mRNA 발현 수준은 IQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, 미국)를 사용하여 실시간 RT-PCR(CFX96TM, Bio-Rad, 미국)을 통해 분석하였다. 표적 유전자의 발현 수준은 다음과 같은 계산 방법에 의해 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로 계산하였으며, 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

[0091] $\Delta\Delta Ct = (\text{유전자 A} - \text{GAPDH}) - (\text{유전자 A} - \text{GAPDH})_{\text{대조군}}$

표 1

Genes	Primer sequences
COL II	F: 5'-CACTGGCAGTGGCGAGGTCAG-3' R: 5'-CACTGGCAGTGGCGAGGTCAG-3'
SOX 9	F: 5'-GCAGCGAAATCAACGAGAAAC-3' R: 5'-TCCAAACAGGCAGAGAGATTAG-3'
COMP	F: 5'-AGCAGATGGAGCAAACGTATTG-3' R: 5'-ACAGCCTTGAGTTGGATGCC-3'
ACAN	F: 5'-CAGAGCAAGACTCTGTCTCAA-3' R: 5'-GGGACAAGAGCCTCATCAA-3'
COL X	F: 5'-CAAGGCACCATCTCCAGGAA-3' R: 5'-AAAGGGTATTTGTGGCAGCATATT-3'
COL I α2	F: 5'-GGACACAATGGATTGCAAGG-3' R: 5'-TAACCACTGCTCCACTCTGG-3'
GAPDH	F: 5'-CTCCTCACAGTTGCCATGTA-3' R: 5'-GTTGAG5CACAGGGTACTTTATTG-3'

[0092]

[0093]

상기 표 1에서, COL II, SOX 9, COMP, ACAN, COL X, COL I α2, GAPDH 는 각각 콜라겐 타입 II 알파 1, SRY-박스 9, 연골 올리고머 매트릭스 단백질, 아그리칸, 콜라겐 타입 X 알파 1, 콜라겐 타입 I 알파 2, 및 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소를 의미한다. F 및 R은 각각 포워드 프라이머, 리버스 프라이머를 의미한다.

[0095]

조직학적 염색

[0096]

줄기세포 펠렛을 포르말린 수용액 (10% v/v)에서 고정시키고 파라핀에 포매하였다. 이어서, 이들 펠렛을 마이크로톰을 사용하여 7 μm의 두께로 절편하였다. 그런 다음, 절편된 세포 펠렛 샘플을 자일렌으로 탈파라핀화하고 각각 COL II와 sGAG, 프로테오글리칸의 시각화를 위해 항체와 알시안 블루 염색, 사프란인 O 염색을 통해 평가하였다.

[0097]

면역 형광 분석을 위해 절편된 펠렛 샘플은 트리톤 (PBS 중 0.1% v/v)에 의해 투과성화시키고 BSA(PBS 중 1% wt./v, Sigma, 미국)로 처리하였다. 염소 항-마우스 H&L Alexa Fluor® 594 (Abcam, 미국)와 염소 항-토끼 IgG H&L Alexa Fluor® 594 (Abcam, 미국)를 사용하여 COL II를 조사했다. 핵과 액틴은 각각 DAPI (Molecular probes, 미국)와 팔로이딘 (Abcam, 미국)으로 염색되었다.

[0098]

알시안 블루 염색을 위해 절편된 샘플을 알시안 블루 용액 [아세트산 수용액 (3.0 % v/v) 중 1% wt./v, Sigma Aldrich, 미국]과 뉴클리어 패스트 레드 용액(0.1% wt./v, Sigma Aldrich, 미국)으로 처리하였다.

[0099]

사프란인 O 염색을 위해 절편된 샘플을 제조자의 프로토콜에 따라 패스트 그린 FCF 수용액 (0.001% wt./v, Sigma Aldrich, 미국)과 사프란인 O 수용액 (0.1% wt./v Acros Organics, 미국)으로 처리하였다.

[0100]

트라이펩타이드의 다양한 조합 중에서, 편도-유래 중간엽 줄기세포의 연골 세포 분화를 위한 후보 프로모터로 알라닌-알라닌-글루탐산(AAE), 페닐알라닌-페닐알라닌-글루탐산(FFE), 이소루신-페닐알라닌-글루탐산(IFE), 루신-페닐알라닌-글루탐산(LFE), 메티오닌-페닐알라닌-글루탐산(MFE), 발린-페닐알라닌-글루탐산(VFE), 트립토판-페닐알라닌-글루탐산(WFE), 티로신-페닐알라닌-글루탐산(YFE), 페닐알라닌-아르기닌-아스파산(FRD), 페닐알라닌-루신-글루탐산(FLE), 트립토판-루신-글루탐산(WLE), 티로신-이소루신-아스파산(YID), 티로신-티로신 아스파산(YYD), 및 티로신-티로신-글루탐산(YYE)이 선정되었다. 옥소피페라진 유도체 5{i,2} 및 카토제닌과 유사한 트

라이캅타이드의 효능을 표적으로 하여, 상기 트라이캅타이드 존재 하에서 (10 μ M) 또는 존재하지 않는 Dulbecco의 변형된 이글 매질 (DMEM)의 무혈청 성장 배지에서 편도-유래 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 세포 밀도는 크게 변하지 않았고 생존/사멸 이미지의 녹색 발현과 세포 카운팅 키트-8 (CCK-8) 분석에서 확인할 수 있듯이, 3 일간의 배양에서 세포는 살아있었다. 첫 번째 검사에서, 7 일간의 배양 후 연골 생체 지표는 2 형 콜라겐 (COL II)과 SRY-box 9 (SOX9), 연골 올리고머 매트릭스 단백질 (COMP)의 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응 (RT-PCR)을 통해 mRNA 수준에서 조사되었다. WFE와 WLE, YFE가 있는 경우에는 생체 지표가 향상되었다. 카토제닌과 비교하여, YFE는 연골 생체 지표에서 똑같이 좋은 프로모터 역할을 했다. 특히, YFE의 구조적 고유성을 FFE 및 YFE와 비교할 수 있다. 첫 번째 및 두 번째 아미노산에서 Y의 수산기는 편도-유래 중간엽 줄기세포의 연골 분화 촉진제가 되기 위해 중요할 것이다.

[0101] 상기 프리스크리닝 정보를 바탕으로, WFE와 WLE, YFE를 연골 형성 배지에서 3D 펠렛 배양을 이용하여 연골 분화 촉진제로서 상세히 연구하였다. 트라이캅타이드(10 μ M)가 배지에 보충되고, 편도-유래 중간엽 줄기세포 펠렛 (크기: ~ 1 mm)가 만들어졌다. 트라이캅타이드가 없는 연골 형성 배지를 대조군 실험으로 사용하였다. 트라이캅타이드 대신에 카토제닌 (표적 분자)가 첨가된 배지를 편도-유래 중간엽 줄기세포의 연골 분화에 대한 비교 목적으로 사용하였다. 0 일제와 비교했을 때, 세포 밀도는 각각 14 일과 21 일의 3D 배양 기간 동안 1.4 배 내지 1.8 배, 및 2.4 배 내지 2.6 배 증가했다.

[0102] COL II와 COMP, 아그리칸(ACAN)의 생체 지표는 RT-PCR을 사용하여 mRNA 수준에서 분석되었다. COMP는 콜라겐, 피브로넥틴, TGF- β 등의 세포 외 단백질과 상호작용하며, 골 관절염이 있는 연골보다 건강한 연골에 더 풍부하다. 2 차 검사에서 선택된 WFE와 WLE, YFE의 트라이캅타이드 존재 하에 COL II 및 COMP, ACAN의 연골 형성 mRNA는 모두 높게 발현되었다. 특히, YFE는 COL II, COMP, ACAN의 발현 수준은 1.7 배 내지 2.8 배 증가시켰으며, 반면 COL X와 COL I α 2의 발현 수준을 대조 시스템의 절반 이하로 감소시켜 YFE가 줄기세포의 연골 분화 유도에 효과가 있음을 시사했다. COL X는 골 형성 분화를 유도하는 중간 상태를 나타내는 세포의 비대과 관련된 생체 지표이며, COL I α 2는 줄기세포의 골 형성 분화와 관련된 생체 지표이다. 줄기세포의 골 분화는 줄기세포의 연골 분화 단계에서 중단되어야 하며, 이러한 분화를 조절하는 것이 골 관절염 치료에 중요한 부분이다. 이와 관련하여, YFE가 특이적으로 연골 분화를 유도하고 편도-유래 중간엽 줄기세포의 골 분화를 억제한다는 사실은 YFE가 편도-유래 중간엽 줄기세포의 골 분화를 하향 조절한다는 것을 시사한다. COL II는 관절 연골에서 콜라겐의 80% 내지 90%를 차지하며 중간엽 줄기세포의 연골 분화의 생체 지표로 가장 널리 사용되고 있다. 또한, COL II는 면역형광법을 통해 단백질 수준에서 분석되었으며, 여기서 COL II의 항체는 적색으로 염색되었다. 세포의 핵과 액틴은 각각 4',6-다이아미디노-2-페닐인돌 (DAPI)과 팔로이딘에 의해 청색과 녹색으로 염색되었다. YFE 또는 카토제닌이 첨가된 시스템은 대조 시스템 및 WFE 또는 WLE가 첨가된 시스템과 대조적으로 COL II에 의해 적색으로 발현되었다.

[0103] 황산화된 글리코사미노글리칸 (sGAG)과 프로테오글리칸은 또한 중간엽 줄기세포의 연골 분화의 대표적인 생체 지표이다. 3 차원 배양된 펠렛을 얇게 조각내어 sGAG와 프로테오글리칸을 각각 청색과 적색으로 염색한 알시안 블루와 사프란인 O로 염색하였다. 티로신-티로신-글루탐산의 존재 하에서 배양된 편도-유래 중간엽 줄기세포는 카토제닌과 유사하게 sGAG와 프로테오글리칸의 연골 생체 표지 물질을 상향 조절하였다.

[0105] 본원에서, 일련의 트라이캅타이드가 편도-유래 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화에 효과가 있음을 확인하였다. 2차원 배양에서는 연골 생체 지표에 기반하여 트립토판-페닐알라닌-글루탐산 (Trp-Phe-Glu, WFE)과 트립토판-루신-글루탐산 (Trp-Leu-Glu, WLE), 티로신-티로신-글루탐산 (Tyr-Tyr-Glu, YFE)가 선택되었다. 편도-유래 중간엽 줄기세포가 3 차원 펠렛으로 만들어지고 연골 형성 배지에서 편도-유래 중간엽 줄기세포의 연골 분화 촉진제로서 상기 트라이캅타이드의 존재 하에 21 일 동안 배양되었다. 세포 펠렛의 알시안 블루 염색과 사프란인 O 염색뿐만 아니라 COL II, COMP, ACAN, COL X, COL I α 2의 생체 지표 발현은, 상기 올리고펩타이드 중 티로신-티로신-글루탐산의 아미노산을 포함하는 올리고펩타이드가 편도-유래 중간엽 줄기세포의 골 분화를 억제하는 동시에 연골 분화를 향상시킴에 매우 뛰어난 화합물임을 입증하였다.

[0107] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된

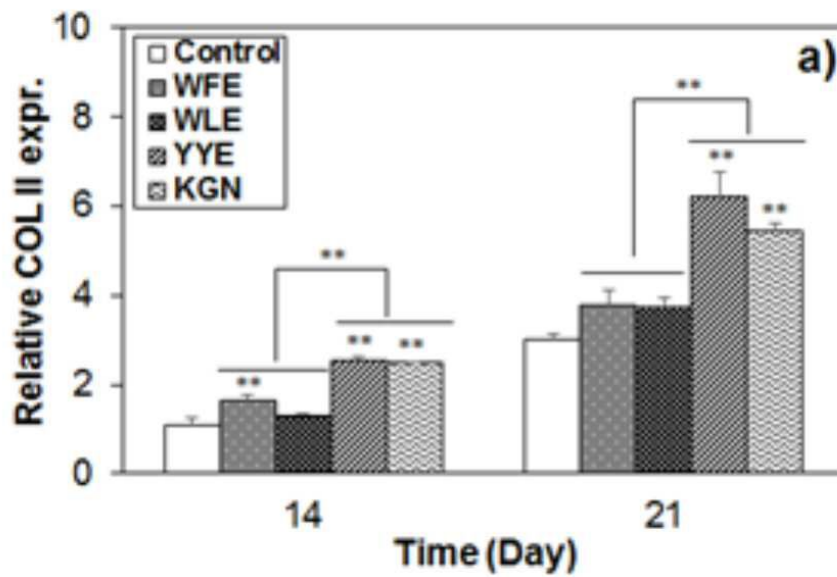
것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0108]

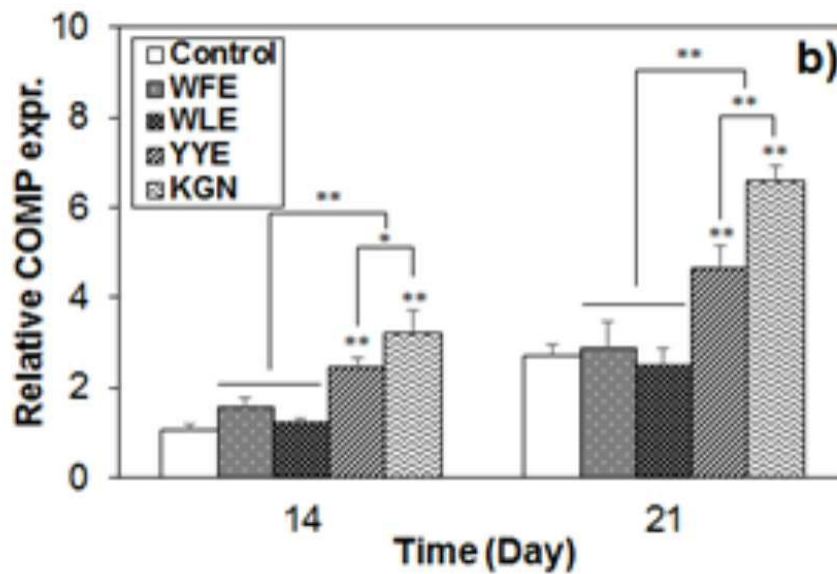
본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

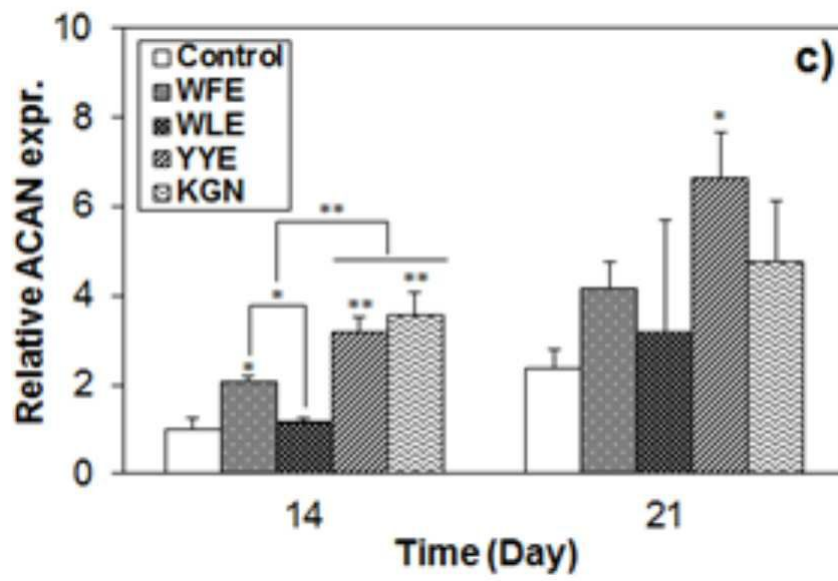
도면1a



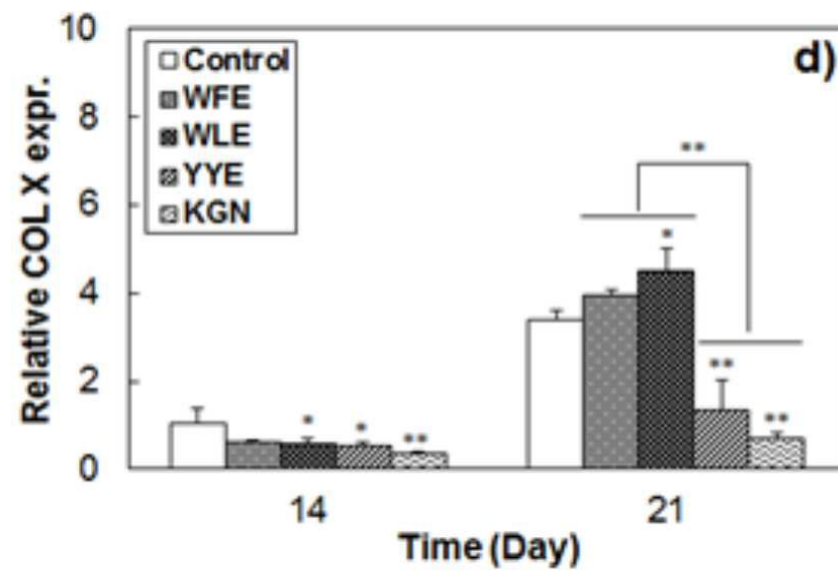
도면1b



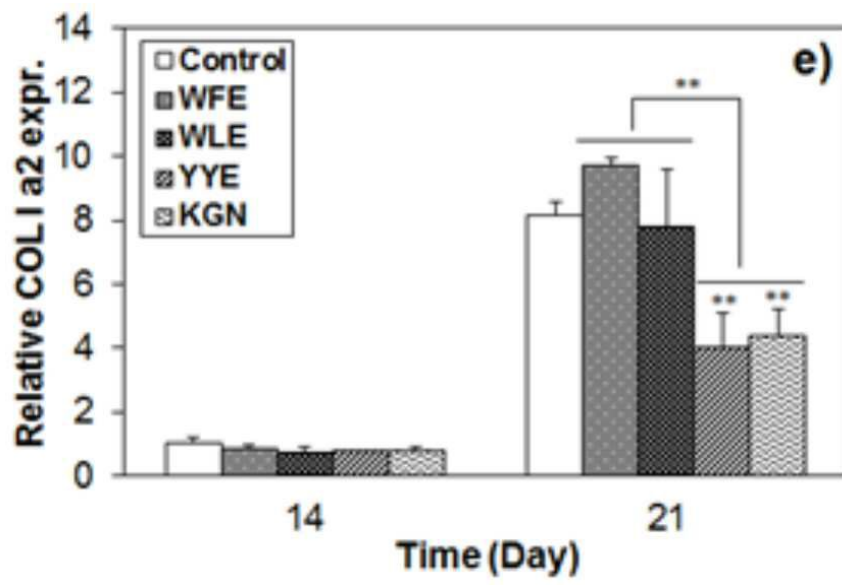
도면1c



도면1d



도면1e



도면2

