



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0126567

(43) 공개일자 2015년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61L 27/36 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/47 (2013.01)
A61L 27/3604 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0062649
(22) 출원일자 2015년05월04일
심사청구일자 2015년05월04일
(30) 우선권주장
1020140053450 2014년05월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
최유성
대전광역시 대덕구 대전로 1020번길 86, 오정동
영진맨션 1108호
송우호
대전광역시 서구 청사로 65, 황실타운아파트 110
동 302호
김혜린
대전광역시 서구 복수서로 50, 105동 1607호(복수
동, 삼익목화아파트)
(74) 대리인
특허법인주원

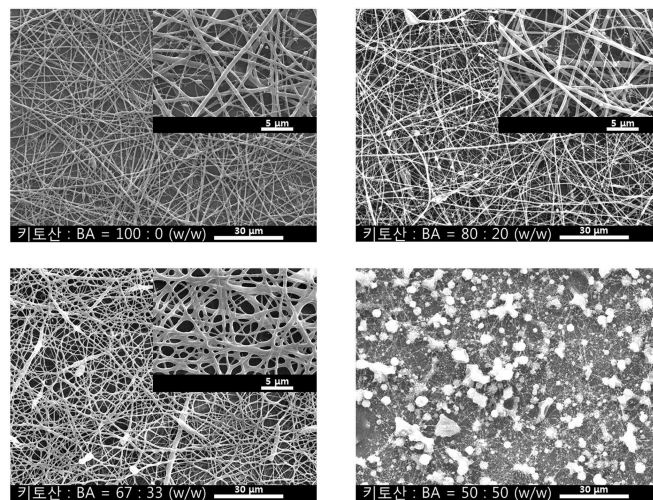
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 칼슘 결합 단백질 및 이를 함유하는 나노섬유 지지체**

(57) 요약

본 발명에서는 고분자에 재조합 칼슘 결합 단백질을 혼합하여, 칼슘 결합 단백질을 함유하는 키토산 나노섬유 지지체를 제조하였다. 칼슘 결합 단백질이 함유된 골조직 재생용 나노섬유 지지체는, 칼슘과 용이하게 결합하여 칼슘을 지지체에 손쉽게 함유할 수 있을 뿐만 아니라 바이오미네랄화 과정에 의해 탄산칼슘으로 코팅될 수 있어, 손상된 골조직에 이식 및 충전되었을 때 조골세포의 성장과 분화를 촉진할 것으로 기대되어 새로운 골조직 재생용 생체활성 지지체로써 활용될 것으로 판단된다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C07K 14/4728 (2013.01)

C07K 19/00 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2011-0029964

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 충남대학교산학협력단

연구사업명 해양극지기초원천기술개발사업

연구과제명 해양 오손/방오 기작 이해를 통한 단백질 기반 방오소재 원천기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국연구재단

연구기간 2011.08.10 ~ 2016.06.22

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 카르복시 말단이나 아미노 말단에 RGD, YIGSR, GEFYFDLRLKGDK, CRPKPQQFFGLM 및 그 조합으로 이루어진 아미노산 서열을 추가로 포함한 것, 또는 이들 서열 중 타이로신의 1 내지 100%가 3,4-디하이드록시페닐-L-알라닌(DOPA)으로 치환된 것을 포함하는 재조합 칼슘 결합 폴리펩티드.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 폴리펩티드는 추가로 당화, 아실화, 메틸화, 인산화, 해실화, 카르바밀화, 황화, 프레닐화, 산화, 구아니딜화, 아미딘화, 카르바밀화, 트리니트로페닐화, 질산화, 또는 폐길화된 것을 특징으로 하는 재조합 칼슘 결합 폴리펩티드.

청구항 3

청구항 1의 폴리펩티드 2 내지 10 개가 공유결합에 의해 연결된 재조합 칼슘 결합 폴리펩티드 복합체.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2의 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열을 포함하는 유전자.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 유전자는 대장균 내 발현에 적합하도록 코돈이 조작된 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 6

청구항 4의 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 7

청구항 6의 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 8

나노섬유 제조용 고분자 100 중량부, 및

청구항 1 또는 청구항 2의 재조합 칼슘 결합 폴리펩티드 0.01 내지 90 중량부를 포함하는 나노섬유.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 나노섬유 제조용 고분자는 키토산, 콜라겐, 실크, CA(cellulose acetate), PCL(polycaprolactone), PDO(polydioxanone), PLA(polylactic acid), PLLA(poly(L-lactide)), PLGA(poly(DL-lactide-co-glycolide)), PEO(polyethylene oxide), PVA(polyvinyl alcohol), PE(polyethylene), PP(polypropylene), PS(polystyrene), PA(polyamide), PU(polyurethane), PANI(polyaniline), PBI(polybenzimidazole), PC(polycarbonate), PVC(polyvinylchloride), PAN(polyacrylonitrile), PMMA(polymethacrylate), PEG(polyethylene glycol), PVDF(poly(vinylidene fluoride)), PFDMS(poly(ferrocenyldimethylsilane)), Polyvinylcarbazole, Poly(2-hydroxyethyl methacrylate), PET(polyethylene Terephthalate), PVP(poly vinyl phenol), PEN(polyethylene naphthalate), Polyvinyl pyrrolidone, Polymetha-phenylene isophthalamide, PEI(polyether imide),

PEVA(polyethylene-co-vinyl acetate), PAA(polyacrylic acid), PM(polypyrrole methanol), 그 공중합물 및 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 나노섬유.

청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 나노섬유는 전기방사로 제조된 것을 특징으로 하는 나노섬유.

청구항 11

청구항 8의 나노섬유를 포함하는 골조직 재생용 지지체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 제조합 칼슘 결합 단백질 및 이를 함유하는 나노섬유 지지체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조직공학(Tissue engineering) 기술이란 세포를 지지체에 배양하여 세포-지지체 복합체를 제조하고 이를 이용하여 생체조직 및 장기를 재생하는 기술을 말한다. 조직공학 기술은 인공뼈, 인공연골, 인공피부, 인공각막, 인공혈관, 인공근육 등 인체의 거의 모든 장기의 재생에 적용되고 있다. 이와 같은 조직공학 기술에서 생체조직 및 장기의 재생을 최적화하기 위해서는 기본적으로 생체조직과 유사한 조직공학용 지지체를 제조하는 것이 중요하다. 조직공학용 지지체의 기본적인 요건으로는 조직 세포가 지지체에 유착하여 증식이 잘 되어야 하고, 분화된 세포의 기능이 보전되어야 하며, 체내에 이식된 후에도 주위 조직과 융화가 잘 되고, 염증 반응이나 혈액 응고가 일어나지 않는 무독성의 생체적합성이 있어야 한다. 또한 이식된 세포가 새로운 체내 조직으로서 기능과 역할을 하게 되면 원하는 시간 안에 생체 내에서 완전히 분해되어 없어질 수 있는 생분해성을 지녀야 한다.

[0003] 현재 통상적으로 사용되는 조직공학용 지지체는 천연 또는 합성 고분자 지지체로서, 자연에서 유래한 키토산(chitosan), 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin), 히아루론산(hyaluronic acid) 등의 천연 고분자와, 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리카프로락산(PCL) 및 이들의 공중합체인 합성 고분자가 그 대표적이다. 이러한 지지체는 세포나 조직의 배양과 이식을 목적으로 하는 지지체와 화장품, 상처피복제, 치과용 매트릭스 등의 의료용 재료로 소개되었다. 그러나, 이들은 제한된 물성을 지니고 있어 다양한 물성이 요구되는 인체 조직 장기의 재생용 재료로서는 많은 한계점이 있다. 또한 지지체의 표면에 세포 등 생리활성물질을 충분하게 부착, 유지 및 증식시키는 것은 예전부터 큰 어려움을 겪어 왔다. 따라서 기존의 재료를 대체할 수 있는 조직공학용 지지체의 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 조직공학용 지지체 중 골조직 재생용 지지체란 손상되거나 결손된 골부위에 이식 및 충진을 통해 골결손 부위를 지지해 줌과 동시에 주변의 자가 골조직으로부터 골 결손 부위로의 새로운 자가 골조직을 형성시키도록 유도하거나 재생시키는 기능을 가진 생체 재료를 말한다. 통상적인 골조직 재생용 지지체는 천연재료인 키토산, 콜라겐, 젤라틴, 히아루론산 등과 합성 고분자인 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리카프로락산 등이 대표적으로 단독 또는 복합적으로 사용되어 다양한 제조공정을 거쳐 지지체로 개발된다. 최근 생체재료기술의 발달과 함께 생체 불활성보다는 생체기능성 및 생체적합성을 갖는 재료를 설계·개발하여 사용부위 및 목적에 따라 다양한 기능성을 갖는 골조직 재생용 생체활성 지지체 개발이 점차 증가하고 있다.

[0005] 뼈는 인체를 지탱하며 동작을 수행하는 기능 이외에도 체내의 칼슘 이온 농도를 조절하기 위한 칼슘의 저장고 역할을 하며, 뼈의 생화학적 구성은 세포 성분을 포함해 유기질 35%, 무기질 45%, 수분 20%로 이루어져 있다. 뼈의 두 가지 중요한 형태는 높은 기계적 강도의 조밀한 구조를 지닌 피질골(cortical bone)과 내부의 다공성 망상구조를 이루는 지주골(trabecular bone)로 나뉜다.

[0006] 나노섬유 지지체는 손상된 다공성 지주골에 이식 및 충진을 통하여 새로운 자가 지주골 조직을 형성시키도록 유도하거나 재생시키기 위해 활용될 수 있다. 그리고 통상의 골조직 재생용 나노섬유 지지체에 추가적인 생체기능성 및 생체적합성을 부여하기 위하여 뼈의 구성물질과 물리적·생화학적 특성에 바탕을 둔 새로운 나노섬유 지지체의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제 2002-0096677 호 (2002.12.31)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 재조합 칼슘 결합 단백질을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 재조합 칼슘 결합 단백질 및 고분자를 포함하는 나노섬유를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 나노섬유를 포함하는 골조직 재생용 지지체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 재조합 칼슘 결합 폴리펩티드는 상술한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여, 서열번호 1의 아미노산 서열, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 카르복시 말단이나 아미노 말단에 RGD, YIGSR, GEFYFDLRKGD, CRPKPQQFFGLM 및 그 조합으로 이루어진 아미노산 서열을 추가로 포함한 것, 또는 이들 서열 중 타이로신의 1 내지 100%가 3,4-디하이드록시페닐-L-알라닌(DOPA)으로 치환된 것을 포함함을 특징으로 한다.

[0012] 또한, 상기 폴리펩티드는 추가로 당화, 아실화, 메틸화, 인산화, 해실화, 카르바미화, 황화, 프레닐화, 산화, 구아니딜화, 아미딘화, 카르바미화, 트리니트로페닐화, 질산화, 또는 폐길화될 수 있다.

[0013] 또한, 상기 폴리펩티드 2 내지 10 개가 공유결합에 의해 연결되어 재조합 칼슘 결합 폴리펩티드 복합체를 형성할 수도 있다.

[0014] 한편, 본 발명의 유전자는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 상기 유전자는 대장균 내 발현에 적합하도록 코돈이 조작될 수 있다.

[0016] 한편, 본 발명의 벡터는 상기 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 한편, 본 발명의 세포는 상기 벡터로 형질전환되는 것을 특징으로 한다.

[0018] 한편, 본 발명의 나노섬유는

[0019] 나노섬유 제조용 고분자 100 중량부, 및

[0020] 상기 재조합 칼슘 결합 폴리펩티드 0.01 내지 90 중량부를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0021] 또한, 상기 나노섬유 제조용 고분자는 키토산, 콜라겐, 실크, CA(cellulose acetate), PCL(polycaprolactone), PDO(polydioxanone), PLA(poly(lactic acid)), PLLA(poly(L-lactide)), PLGA(poly(DL-lactide-co-glycolide)), PEO(poly(ethylene oxide)), PVA(poly(vinyl alcohol)), PE(poly(ethylene)), PP(poly(propylene)), PS(polystyrene), PA(poly(amide)), PU(poly(urethane)), PANI(poly(aniline)), PBI(poly(benzimidazole)), PC(polycarbonate), PVC(poly(vinyl chloride)), PAN(poly(acrylonitrile)), PMMA(poly(methacrylate)), PEG(poly(ethylene glycol)), PVDF(poly(vinylidene fluoride)), PFDMS(poly(ferrocenyldimethylsilane)), Polyvinylcarbazole, Poly(2-hydroxyethyl methacrylate), PET(poly(ethylene Terephthalate)), PVP(poly(vinyl phenol)), PEN(poly(ethylene naphthalate)), Polyvinyl pyrrolidone, Polymetha-phenylene isophthalamide, PEI(poly(ether imide)), PEVA(poly(ethylene-co-vinyl acetate)), PAA(poly(acrylic acid)), PM(polypyrene methanol), 그 공중합물 및 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0022] 또한, 상기 나노섬유는 전기방사로 제조될 수 있다.

[0023] 한편, 본 발명의 골조직 재생용 지지체는 상기 나노섬유를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명은 재조합 칼슘 결합 단백질과 고분자를 이용하여 새로운 조직공학용 나노섬유를 제공하며, 상기 나노섬유는 표면에 바이오미네랄화 과정을 이용하여 탄산칼슘을 코팅할 수 있고, 그 제조과정이 매우 단순하여 산업적 이용 가능성이 매우 높으며, 생체적합성이 우수하기 때문에, 조직공학용 지지체 및 의료용 소재로 적합하다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 아미노산 서열 1의 칼슘 결합 단백질 발현 벡터 pBAA2의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 아미노산 서열 1의 발현을 위한 형질전환체에서 재조합 칼슘 결합 단백질을 발현시켜 정제한 결과를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸다.

도 3은 최종적으로 정제하여 동결건조된 재조합 칼슘 결합 단백질을 나타낸 것이다.

도 4은 키토산과 아미노산 서열 1의 재조합 칼슘 결합 단백질을 블렌딩을 통해 제조한 나노섬유의 전자현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 5는 키토산과 아미노산 서열 1의 재조합 칼슘 결합 단백질을 블렌딩을 통해 제조한 나노섬유의 표면에 바이오미네랄화를 통해 탄산칼슘을 코팅한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 또한, 하기의 설명에서는 구체적인 구성요소 등과 같은 많은 특정사항들이 설명되어 있는데, 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐 이러한 특정 사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 그리고, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0027] 이러한 측면에서 본 발명자들은 고분자에 재조합 칼슘 결합 단백질을 혼합하여, 칼슘 결합 단백질을 함유하는 나노섬유 지지체를 제조하였다. 칼슘 결합 단백질이 함유된 나노섬유 지지체는, 칼슘과 용이하게 결합하여 칼슘을 지지체에 손쉽게 함유할 수 있을 뿐만 아니라 바이오미네랄화 과정에 의해 탄산칼슘으로 코팅될 수 있어, 손상된 골조직에 이식 및 충전되었을 때 조골세포의 성장과 분화를 촉진할 것으로 기대되어 새로운 골조직 재생용 생체활성 지지체로써 활용될 것으로 판단된다.

[0028] 이하, 본 발명을 단계별로 보다 상세히 설명한다.

[0029] 단계 1)은 칼슘 결합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터 및 칼슘 결합 단백질을 생산하기 위한 벡터를 포함하는 형질전환체에 관한 것이다.

[0030] 본 발명에서 칼슘 결합 단백질은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 진주조개 유래 칼슘 결합 단백질로, 바람직하게는 핀타다 푸카타(*Pinctada fucata*), 핀타다 맥시마(*Pinctada maxima*)에서 유래한 칼슘 결합 단백질 또는 이의 변형서열을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 변형서열은 상기 아미노산의 카르복실말단이나 아미노말단에 추가적인 서열을 포함하거나, 서열번호 1의 일부 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 상기 칼슘 결합 단백질의 카르복실 말단 또는 아미노 말단에 세포외기질을 구성하는 단백질의 기능을 발현하는 핵심 아미노산 서열인 RGD, YIGSR, GEFYFDLRLKGDK, CRPKPQQFFGLM 등을 포함하는 3 내지 25개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드가 연결된 것이거나, 칼슘 결합 단백질을 이루는 타이로신 잔기 총수의 1 내지 100%, 바람직하게는 5 내지 100%가 3,4-디하이드록시페닐-L-알라닌(DOPA)로 치환된 것일 수 있다. 또한 서열번호 1의 아미노산을 70% 이상, 바람직하게는 적어도 80% 이상, 더 바람직하게는 적어도 90% 이상, 더 바람직하게는 95% 이상, 더 바람직하게는 97% 이상, 더 바람직하게는 98% 이상, 더더욱 바람직하게는 99% 이상의 서열이 유지된 것을 말한다.

[0032] 나아가, 서열번호 1의 mRNA 서열 중 일부의 코돈 서열을 재배치하여 최적화한 후, 최적화된 칼슘 결합 단백질의 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하고, 상기 발현벡터를 숙주세포에 삽입하여 형질전환체를 제조한 다음, 형질전환체로부터 생산되는 것을 특징으로 한다.

[0033] 상기 생산된 재조합 칼슘 결합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지며, 아미노산 서열의 N-말단 또는

C-말단에 6개의 히스티딘이 태그(6xhis 정제 tag 서열: HHHHHH)되어 있을 수 있다. 서열번호 1의 진주조개 유래 칼슘 결합 단백질의 아미노산 서열은, NCBI Reference Sequence (BAA20465)의 정보를 이용하였고, N-말단에 신호 서열로 판단되는 부분(19개의 아미노산)을 제거하였다.

[0034]

본 발명의 재조합 칼슘 결합 단백질은, 외부 유전자를 발현할 수 있는 용도로 제작된 통상의 벡터에 발현가능하도록 삽입하여 유전공학적인 방법으로 대량생산할 수 있다. 본 발명의 재조합 칼슘 결합 단백질의 생산방법에 대해 상세히 설명하면 다음과 같다. 먼저 칼슘 결합 단백질의 mRNA 서열 중 일부의 코돈 서열을 재배치하여 최적화한다. 칼슘 결합 단백질의 DNA 서열은 숙주세포에서 주로 사용하는 코돈으로 변형되거나, DNA 코돈 서열의 중복 및 반복을 피하기 위한 다른 코돈 서열로 변형되어 사용될 수 있다. 상기 최적화된 진주조개 유래 칼슘 결합 단백질의 DNA를 양 끝에 *NdeI*, *XhoI*의 제한효소 사이트에 첨가하고 발현용 프로모터 T7을 포함하는 발현벡터 pET23b(+)에 클로닝하여 발현벡터를 제조한다. 상기 제조된 발현벡터는 벡터 내 C-말단에 히스티딘 태그(histidine tag)가 포함되도록 한다[6xhis 정제 tag 서열: HHHHHH]. 상기 발현벡터는 단백질을 생산하기 위한 숙주세포의 종류 및 특성에 따라 적절히 선택하거나 새롭게 제조할 수 있다. 발현벡터를 숙주세포에 삽입하여 형질전환체를 제조하거나 형질전환체로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법은 통상의 방법을 이용하여 용이하게 수행할 수 있다. 본 발명에서 사용된 숙주세포로는 대장균, 효모, 동물세포, 식물세포 또는 곤충세포 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 하기에 숙주세포로 대장균을 사용하여 형질전환체의 제조 및 이로부터 재조합 칼슘 결합 단백질의 생산방법에 대해 상세히 설명하도록 한다.

[0035]

상기 제조된 발현벡터를 42℃에서 1분 30초간 방치하는 열충격 방법이나 전기천공법(electroporation)으로 숙주세포에 삽입하여 재조합 칼슘 결합 단백질을 생산하는 형질전환체를 제조한다.

[0036]

상기 형질전환체를 LB 배지, 바람직하게는 앰피실린이 첨가된 LB 배지에 접종하여 진탕배양한다. 재조합 칼슘 결합 단백질의 발현을 유도하기 위하여, 배양액의 흡광도(OD₆₀₀)가 600nm에서 0.4~1.2, 바람직하게는 0.8~0.9가 되었을 때 단백질 발현 유도물질인 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 0.1~10mM로 첨가하고, 추가로 16~37℃에서 3~24시간 동안 진탕배양한다. 배양된 세포를 원심 분리한 다음 상등액을 제거하고 세포를 회수한 후, 회수된 세포를 용해 용액에 부유시키고 초음파 분쇄기 또는 고압분질기를 이용하여 파쇄한다. 파쇄된 세포의 일부를 전체 세포 파쇄액(whole cell lysate), 수용성 분액(soluble fraction) 및 불용성 분액(insoluble fraction)으로 나누고, 서열번호 1의 경우는 불용성 분액을 회수한다. 회수된 분액은 히스-태그 컬럼(His-tag column)을 이용하여 분액에서 발현되는 재조합 칼슘 결합 단백질을 분리 및 정제한다. 각 분액들을 SDS-PAGE 용 완충액(0.5M Tris-HCl (pH 6.8), 10% 글리세롤, 5% SDS, 5% β-머캅토에탄올, 0.25% 브로모페놀블루)에 희석한 후 100℃에서 5분 동안 끓여 변성시킨 후, SDS-폴리 아크릴아미드 겔에 전기영동하여 분자량별로 분리하여 재조합 칼슘 결합 단백질의 발현을 확인한다.

[0037]

그 다음, 숙주세포에서 생산된 재조합 칼슘 결합 단백질은 니켈 레진이 충전된 컬럼을 이용한 통상의 친화도 크로마토그래피를 실시하여, 컬럼에 결합한 단백질을 40mM~5M의 이미다졸에서 정제하거나 pH 5 이하의 용액을 사용하여 정제한다. 바람직하게는, 재조합 칼슘 결합 단백질이 포함된 파쇄된 세포의 수용성 분액을 니켈-NTA(nitrilotriacetic acid) 컬럼에 주입하고 세척용액(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 30mM 이미다졸, pH 8.0)으로 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 세척하고, 용출 완충액(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 300mM 이미다졸, pH 8.0)으로 단백질을 컬럼에서 분리하고 정제한다. 상기의 친화도 크로마토그래피법으로 정제된 재조합 칼슘 결합 단백질은 물을 이용한 투석을 통해 단백질 수용액에 남아있는 물과 단백질 이외의 성분을 제거하고 최종적으로 동결건조를 통해 분말 형태로 정제된 재조합 칼슘 결합 단백질을 얻는다. 상기 생산된 진주조개 유래 재조합 칼슘 결합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는다.

[0038]

단계 2)는 단계 1)에서 얻어진 재조합 칼슘 결합 단백질을 고분자와 혼합하여 방사원액을 제조하고, 이를 전기방사하여 재조합 칼슘 결합 단백질을 함유하는 나노섬유를 제조하는 단계로, 전기방사 공정을 사용하는 것이 바람직하다.

[0039]

전기방사 공정은 고분자 용액이나 용융된 고분자를 소정 전압으로 하전시킬 때 발생하는 전기적 인력 및 척력을 이용하여 섬유를 형성시키는 기술이다. 전기방사 공정은 수 nm~수천 nm 크기의 다양한 직경을 갖는 섬유를 제조할 수 있으며, 장비 구조가 간단하고, 광범위한 재료에 적용이 가능하며, 기존의 섬유에 비하여 공극률이 증가되어 부피 대비 표면적이 큰 섬유 제조가 가능하다.

[0040]

구체적으로, 상기 전기방사공정을 수행하기 위하여, 먼저 재조합 칼슘 결합 단백질을 유기용매 단독 또는 유기용매와 산성용매의 혼합용매에 용해시킬 수 있다. 상기 유기용매는 TFA(trifluoroacetic acid),

HFIP(hexafluoroisopropanol), HFP(hexafluoropropanol) 등을 포함하고, 산성용매는 초산(acetic acid), 염산(hydrochloric acid) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않고, 본 발명에서는 95% TFA와 5% 초산의 혼합용매가 바람직하다. 상기 용매에 용해된 재조합 칼슘 결합 단백질의 농도는 고분자 대비 0.01 내지 90% (w/w), 바람직하게는 10 내지 40% (w/w), 보다 바람직하게는 20 내지 30% (w/w) 일 수 있다. 방사공정은 적절한 전압에서 인가하면서 적절한 방사 장치를 이용하여 수행할 수 있다. 방사공정 시 인가되는 전압은 10 내지 20 kV의 범위 내로 설정하는 것이 안정적인 방사공정을 수행할 수 있어 바람직하다. 10 내지 20 kV의 전압 범위 내에서 전압이 커질 경우 방사속도가 증가된다.

[0041]

바람직하게, 재조합 칼슘 결합 단백질을 고분자와 함께 블렌딩(혼합)하여 합성고분자 용액을 제조한 후 전기방사를 통하여 나노섬유를 제조할 수 있다. 상기 고분자는 일반적으로 조직공학 재료로 사용되는 대부분의 고분자들을 포함하며, 일반적으로 나노섬유를 제작할 수 있는 고분자라면 제한되지 않고 일반 열가소성 및 열경화성 고분자를 모두 포함한다. 예를 들어 유기용매에 용해되면서 전기 방사가 잘 이루어지는 키토산, 콜라겐, 실크, CA(cellulose acetate), PCL(polycaprolactone), PDO(polydioxanone), PLA(polylactic acid), PLLA(poly(L-lactide)), PLGA(poly(DL-lactide-co-glycolide)), PEO(polyethylene oxide), PVA(polyvinyl alcohol), PE(polyethylene), PP(polypropylene), PS(polystyrene), PA(polyamide), PU(polyurethane), PANI(polyaniline), PBI(polybenzimidazole), PC(polycarbonate), PVC(polyvinylchloride), PAN(polyacrylonitrile), PMMA(polymethacrylate), PEG(polyethylene glycol), PVDF(poly(vinylidene fluoride)), PFDMS(poly(ferrocenyldimethylsilane)), Polyvinylcarbazole, Poly(2-hydroxyethyl methacrylate), PET(polyethylene Terephthalate), PVP(poly vinyl phenol), PEN(polyethylene naphthalate), Polyvinyl pyrrolidone, Polymetha-phenylene isophthalamide, PEI(polyether imide), PEVA(polyethylene-co-vinyl acetate), PAA(polyacrylic acid), PM(polypyrene methanol), 그 공중합물 및 그 혼합물 등을 예시할 수 있다. 상기 고분자를 용매에 각각 용해시킨 후, 상기에 언급한 대로 용해된 재조합 칼슘 결합 단백질을 블렌딩하여 전기방사를 수행할 수 있다. 또한 재조합 칼슘 결합 단백질과 고분자를 다양한 비율로 혼합하고 전기방사를 통하여 나노섬유를 제조할 수 있다.

[0042]

상기와 같이 재조합 칼슘 결합 단백질과 고분자의 블렌딩을 통해 제조된 나노섬유의 표면에는 재조합 칼슘 결합 단백질이 자연스럽게 노출될 수 있다. 또한, 상기 재조합 칼슘 결합 단백질과 고분자로 제조한 나노섬유는 우수한 인장강도 및 인장 탄성계수를 보인다. 또한, 상기와 같이 제조된 나노섬유의 표면에 탄산칼슘 바이오미네랄화를 유도하면 표면에 탄산칼슘이 코팅된 나노섬유를 제조할 수 있다. 상기 제조한 나노섬유는 우수한 인장강도 및 인장 탄성계수를 보일 뿐만 아니라, 동물 세포 실험에서 조골세포의 분화를 촉진할 수 있을 것으로 판단된다.

[0043]

따라서, 본 발명의 나노섬유 지지체는 탄산칼슘이 표면에 코팅된 유연성 및 탄성을 갖는 지지체로서 조직의 재생에 우수한 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

[0044]

이하, 본 발명의 실시예에 대하여 설명한다.

[0045]

실시예

[0046]

실시예 1: 재조합 BA 칼슘 결합 단백질 발현 벡터의 제조

[0047]

BA 칼슘 결합 단백질은 Genebank BAA20465의 N-말단에 신호 서열로 판단되는 부분(19개의 아미노산)을 제거하였고, 대장균에서 대량발현하기 위하여 mRNA 서열의 일부를 코돈 최적화하여 DNA 서열을 화학합성하였다. 상기 최적화된 DNA의 양 끝에 *NdeI*, *XhoI*의 제한효소 사이트에 첨가하고 발현용 프로모터 T7을 포함하는 발현벡터 pET23b(+)에 클로닝하여 발현벡터를 제조하였다. 상기 제조된 발현벡터는 벡터 내 C-말단에 히스티딘 태그(histidine tag)가 포함되도록 한다[6×his 정제 tag 서열; HHHHHH]. 상기 제조된 BA 칼슘 결합 단백질 발현 벡터 pBAA2의 모식도는 도 1에 나타내었다.

[0048]

실시예 2: BA 재조합 칼슘 결합 단백질의 발현 및 정제

[0049]

상기 실시예 1에서 제조한 발현벡터를 이용하여 BA 재조합 칼슘 결합 단백질을 발현하는 형질전환체는 42℃에서 1분 30초간 방치하는 열충격 방법에 의하여 대장균 BL21(DE3)에 도입하고 엠펜실린이 첨가되어 있는 LB-한천 배지에서 선별하였다. 그리고 상기 제조한 형질전환체를 50 µg/mL 엠펜실린이 첨가된 통상의 37℃, LB 배지에서 진탕 배양하여 배양액의 흡광도(OD₆₀₀)가 0.8~0.9 정도가 되었을 때 유도물질인 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, 0.2 mM)을 첨가하여 상기 단백질들의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 추가로 5시간 동안 37℃에서 배양한 후, 배양된 세포를 4000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하고 세포를 회수

하였다. 회수된 세포를 세포 파쇄를 위한 용액 (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7, 8M urea, 10 mM imidazole)에 부유시킨 다음 초음파 분쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 수용성 분액과 불용성 분액으로 나누어 각각을 통상의 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 또한, 상기 단백질의 불용성 분액을 니켈 레진이 충전된 컬럼에 적용하여 단백질과 컬럼이 결합하도록 하고, 세척 버퍼(50 mM sodium phosphate buffer, 8M urea, 30 mM imidazole, pH 7.0)로 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 씻어 냈다. 컬럼으로부터 단백질의 용출은 용출 버퍼(50 mM sodium phosphate buffer, 8M urea, 250 mM imidazole, pH 7.0)를 이용하여 진행하였고, 상기 정제된 용액은 물을 이용한 투석을 통해 단백질 수용액에 남아 있는 물과 단백질 성분 이외의 성분을 제거하고 최종적으로 동결건조를 통해 파우더 형태로 정제된 단백질을 생산하였다.

[0050]

도 2는 대조군 대장균 BL21(DE3) 세포 파쇄액과, 재조합 BA 칼슘 결합 단백질의 수용성 분액과 불용성 분액, 그리고 니켈 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제된 BA 칼슘 결합 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 사진이다. 도 2에 의하면, 재조합 BA 칼슘 결합 단백질이 응집체(Inclusion body)로 발현되어 불용성 분액에서 검출됨을 알 수 있고, 단백질 정제가 잘 진행되었음을 확인할 수 있다. 상기 도 2에서 각 부호의 의미는 다음과 같다: L: 대장균 BL21 (DE3) 세포 파쇄액, S: 재조합 BA 칼슘 결합 단백질이 발현된 형질전환체의 수용성 분액, IS: 재조합 BA 칼슘 결합 단백질이 발현된 형질전환체의 불용성 분액, P: 정제된 재조합 BA 칼슘 결합 단백질. 도 3은 최종적으로 동결건조에 의해 얻어진 정제된 재조합 BA 칼슘 결합 단백질의 사진이다.

[0051]

실시예 3: 키토산과 BA 재조합 칼슘 결합 단백질의 블렌딩을 통해 제조한 나노섬유의 제조 (1)

[0052]

키토산 및 재조합 칼슘 결합 단백질 기반의 나노섬유를 제조하기 위하여 전기방사 기술을 이용하였다. 구체적으로 우선 재조합 BA 칼슘 결합 단백질은 95% TFA와 5% 초산 혼합용매에 용해시킨 후, 키토산과 재조합 BA 칼슘 결합 단백질의 비율이 80:20(w/w) 및 67:33(w/w)이 되도록 섞어 준 후, 이 혼합용액을 이용해 전기방사를 수행하였다. 전기방사는 혼합용액을 시린지 펌프를 이용해 15 kV의 고전압을 걸어주면서 나노섬유를 생성시키는 방식으로 진행되었고, 생성된 나노섬유는 알루미늄 호일 위에 받았다. 도 4는 상기 나노섬유가 성공적으로 생성된 주사 전자현미경 이미지를 보여주고 있다.

[0053]

비교예 1: 나노섬유의 제조 (2)

[0054]

상기 실시예 3과 동일한 과정을 거치되, 재조합 BA 칼슘 결합 단백질을 첨가하지 않고 키토산만 상기 혼합용매에 섞어 주었다.

[0055]

비교예 2: 나노섬유의 제조 (3)

[0056]

상기 실시예 3과 동일한 과정을 거치되, 키토산과 재조합 BA 칼슘 결합 단백질의 비율이 50:50(w/w)이었다.

[0057]

도 4로부터 키토산과 재조합 BA 칼슘 결합 단백질의 비율이 80:20(w/w)인 경우와 67:33(w/w)인 경우 나노섬유가 성공적으로 생성됨을 확인할 수 있으나, 상기 비율이 50:50(w/w)인 경우는 나노섬유가 제대로 생성되지 않음을 확인할 수 있었다.

[0058]

실시예 4: 상기 나노섬유 표면에 바이오미네랄화를 통한 탄산칼슘 코팅 (1)

[0059]

상기 실시예 3의 나노섬유 중 키토산과 재조합 BA 칼슘 결합 단백질의 비율이 80:20(w/w)인 나노섬유 표면에 바이오미네랄화를 통해 탄산칼슘을 코팅하였다. 탄산칼슘 바이오미네랄화는 CaCl_2 용액과 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 증기의 반응을 통해 진행하였다. 구체적으로 상기 나노섬유를 CaCl_2 용액에 넣어 나노섬유 표면에 Ca 이온을 결합시킨 후 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 고체가 포함되어 있는 진공 데시케이터에 보관하여 약 20시간 정도 방치하였다. 비슷한 방법으로 탄산칼슘 바이오미네랄화는 CaCl_2 용액과 NH_2CO_3 용액의 반응을 통해서 마찬가지로 진행하였다. 구체적으로 상기 나노섬유를 CaCl_2 용액에 넣어 나노섬유 표면에 Ca 이온을 결합시킨 후 NH_2CO_3 용액을 넣어 약 20시간 정도 방치하였다. 도 5는 주사 전자현미경 실험 결과물의 주사 전자현미경 사진이다.

[0060]

비교예 3: 탄산칼슘 코팅 (2)

[0061]

상기 실시예 4와 동일한 과정을 거치되, 실시예 3의 나노섬유 대신 비교예 1의 나노섬유를 사용하였다.

[0062]

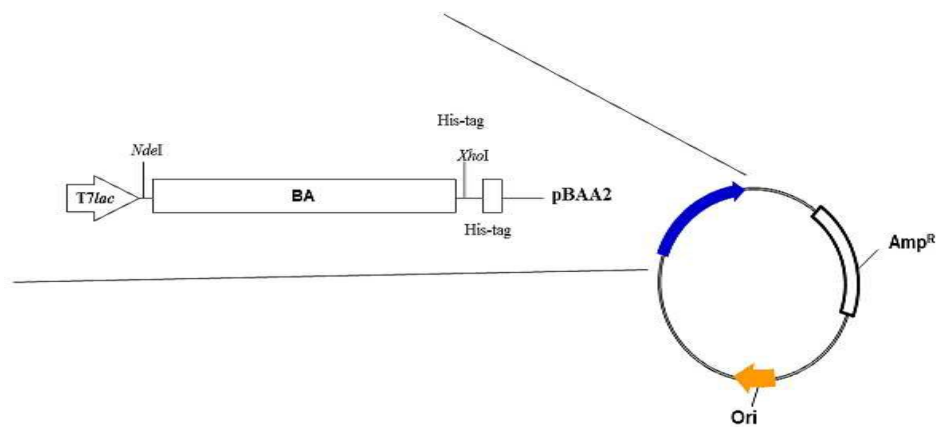
도 5로부터 키토산과 재조합 BA 칼슘 결합 단백질의 비율이 80:20(w/w)인 나노섬유의 경우 탄산칼슘이 안정적으로 코팅됨을 확인할 수 있으나, 키토산만으로 제조된 나노섬유의 경우는 탄산칼슘이 제대로 코팅되지 않음을 확인할 수 있었다.

[0063]

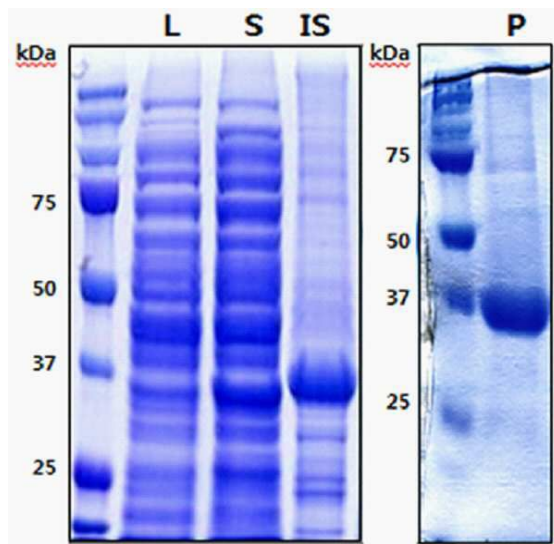
이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대해서 설명하였으나, 본 발명은 상술한 특정의 실시예에 한정되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형 실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 범위는 위의 실시예에 국한해서 해석되어서는 안되며, 후술하는 특허청구범위 뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 할 것이다.

도면

도면1



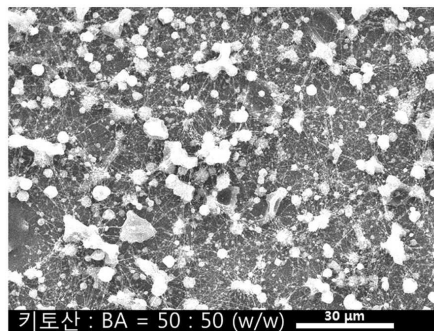
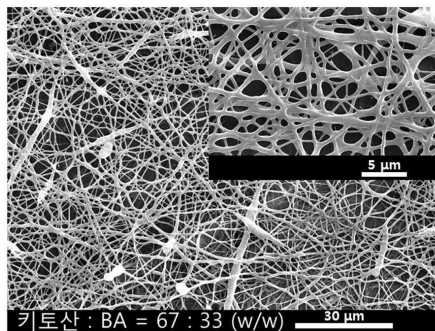
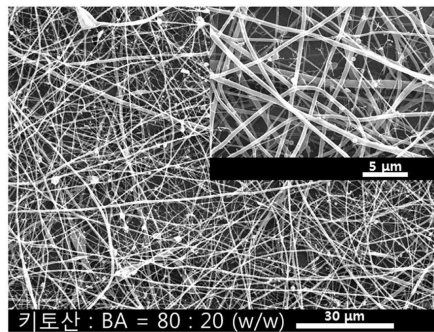
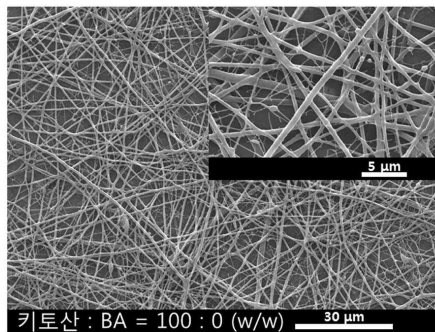
도면2



도면3

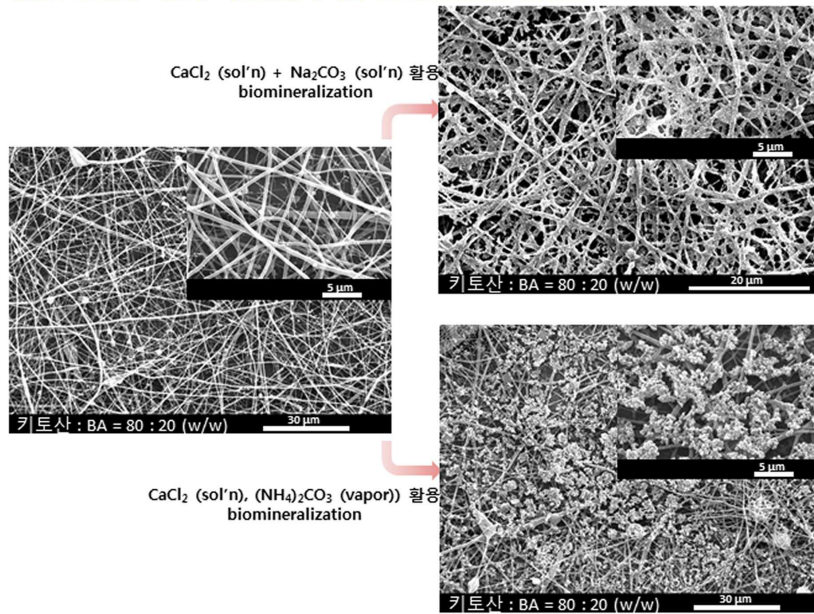


도면4

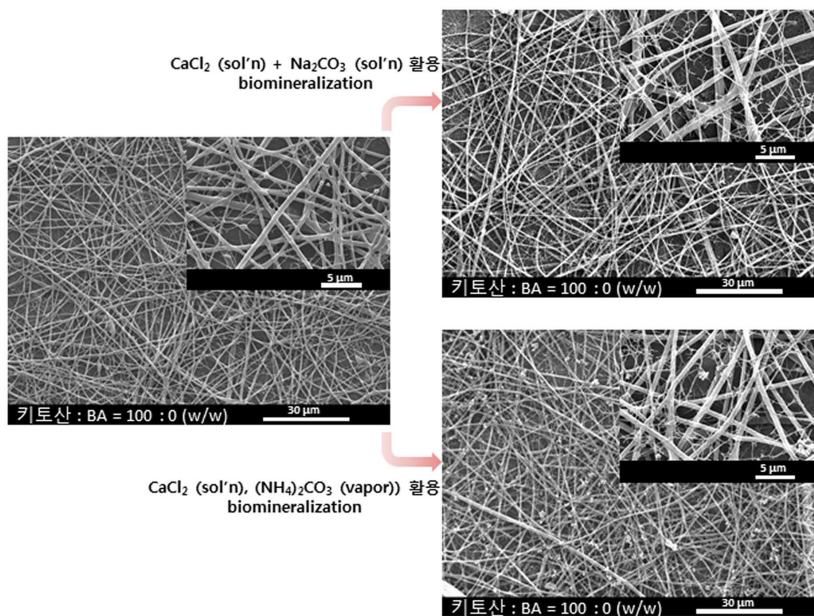


도면5

재조합 BA 함유 키토산 나노섬유에서의 CaCO_3 biomineralization



키토산 나노섬유에서의 CaCO_3 biomineralization



서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Chitosan nanofibrous web containing recombinant calcium binding proteins and the method of preparation thereof
- <130> M14-1227-FD
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 315

<212> PRT

<213> Pinctada fucata

<400> 1

Asp Gly Tyr Asp Asp Tyr Lys Lys Tyr Gly Ser Val Gly Tyr Gly Pro

1 5 10 15

Gly Ile Ser Leu Gly Gly Gly Gly Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ile Ile

20 25 30

Ser Val Gly Gly Gly Gly Gly Leu Gly Gly Gly Leu Gly Gly Gly Leu

35 40 45

Gly Cys Gly Leu Val Gly Val Gly Gly Gly Gly Leu Ile Gly Gly Gly

50 55 60

Phe Gly Pro Gly Arg Val Ser Gly Thr Ile Asn Ala Gly Gly Gly Val

65 70 75 80

Phe Ala Ser Gly Ser Gly Leu Gly Gly Leu Ser Pro Ala Gly Arg Gly

85 90 95

Ala Ala Gln Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Gln Ile Ala Ser Gly

100 105 110

Arg Pro Gly Arg Val Ser Gly Val Ser Val Gly Thr Gly Gly Gly Arg

115 120 125

Ala Val Val Ser Gly Ser Ala Thr Pro Val Gly Gly Phe Gly Val Pro

130 135 140

Tyr Gly Gly Tyr Gly Tyr Asn Tyr Gly Val Pro Ser Tyr Gly Val Gly

145 150 155 160

Leu Pro Ser Tyr Gly Val Ser Leu Pro Ser Tyr Gly Val Gly Leu Gly

165 170 175

Gly Gly Tyr Gly Gly Tyr Gly Tyr Gly Leu Asp Leu Ala Ser Phe Gln

180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Gly Asn Leu Ala Thr Gly Gln Ile Asn Thr Ala Val

195 200 205

Val Ala Phe His Met Ala Val Leu Leu Glu Ser Met Glu Ala Glu Ser

210 215 220

Asp Thr Glu Val Asp Thr Glu Asp Met Asp Ser Glu Glu Asp Met Glu
225 230 235 240

Ser Glu Glu Asp Thr Glu Ser Glu Glu Asp Thr Glu Ser Glu Glu Asp
245 250 255

Thr Glu Ser Glu Glu Asp Met Glu Ser Glu Glu Asp Met Asp Ser Glu
260 265 270

Ser Ser Val Val Asp Gln Val Ser Met Val Tyr Pro Asn His Phe Thr
275 280 285

Gly Asp Val Leu Phe Cys Gln Val Arg Leu Gln Glu Leu Glu Phe Pro
290 295 300

Ala Leu Glu Ala Leu Val Ser Val Val Leu Glu

305 310 315