



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0030917
(43) 공개일자 2017년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
C07K 14/51 (2006.01) *C07K 14/78* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C07K 19/00 (2013.01)
A61K 38/1875 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0128441
 (22) 출원일자 2015년09월10일
 심사청구일자 2015년09월10일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
 (72) 발명자
장준혁
 인천광역시 연수구 컨벤시아대로130번길 80, 107동 503호 (송도동, 송도 푸르지오 하버뷰)
 (74) 대리인
김순용

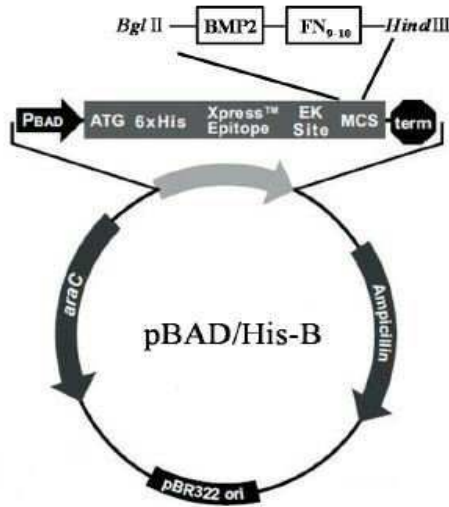
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **피브로넥틴 단백질 및 골 형성 단백질-2가 결합된 융합 단백질**

(57) 요약

본 발명은 피브로넥틴 단백질 및 골 형성 단백질-2가 결합된 융합 단백질, 이를 포함하는 골 재생용 조성물 및 골 재생용 스캐폴드에 관한 것이다. 본 발명에 따른 피브로넥틴 단백질 및 골 형성 단백질-2가 결합된 융합 단백질은 골 세포의 부착 및 분화를 유도하여 골 생성 촉진에 효과적이므로, 본 발명의 융합 단백질은 치아 및 골 조직의 회복 및 재생과 관련된 조직 공학적 재료, 골 재생 치료제 및 의약품 치료제 개발 분야 등에서 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/39 (2013.01)

C07K 14/51 (2013.01)

C07K 14/78 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 49782-1

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구(교육부)

연구과제명 장기 서방출형 골형성 유도 단백질 전달 시스템 연구

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

피브로넥틴(Fibronectin, FN) 단백질 및 골 형성 단백질-2(Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)가 결합된 융합(fusion) 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 피브로넥틴 단백질은 제9타입 III 도메인(FNIII9) 및 제10타입 III 도메인(FNIII10)인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 피브로넥틴 단백질의 제9타입 III 도메인(FNIII9)은 서열번호 1로 표시되는 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 피브로넥틴 단백질의 제10타입 III 도메인(FNIII10)은 서열번호 2로 표시되는 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 골 형성 단백질-2은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질은 서열번호 4로 표시되는 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 7

제1항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

제7항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 도 1의 개열 지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 11

제1항 내지 6항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 골 재생용 조성물.

청구항 12

제1항 내지 6항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 골 재생용 스캐폴드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피브로넥틴 단백질 및 골 형성 단백질-2가 결합된 융합 단백질, 이를 포함하는 골 재생용 조성물 및 골 재생용 스캐폴드에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피브로넥틴(Fibronectin, FN)은 세포의 매트릭스(matrix)의 구성요소이고 인테그린과의 상호작용은 조골세포 분화의 초기단계에 필수적이다(Moursi, A.M. et al., Annu. Rev. Biochem. 1988, 57, 374-413). 피브로넥틴은 세포 표면 수용체의 인테그린 패밀리와 결합하고, 많은 생물학적 과정을 조절한다(Ruoslahti, Annu. Rev. Biochem. 1988, 57, 375-413). 피브로넥틴은 타입 I, II 및 III 반복 (FNI, FNII 및 FNIII)으로 분류하고, 40 내지 90개의 아미노산으로 이루어진 구조적 상동 반복 모듈로 구성된다(Oldberg, A. et al., J. Biol. Chem. 1983, 258, 10193-10196). 피브로넥틴 중 An Arg-Gly-Asp(RGD) 서열은 피브로넥틴의 열번째 타입-III 도메인(FN III10)에 위치하였고, Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) 서열은 아홉번째 타입-III 도메인(FNIII9)을 포함하며, 이는 가장 일반적인 피브로넥틴 수용체인 $\alpha 5\beta 1$ 인테그린 수용체를 통하여 세포 부착을 하기 위한 주요 모티프를 나타낸다(Assoian, R.K. et al., Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11, 48-53). FNIII9 및 FNIII10 모듈은 셀 부착 및 증식뿐만 아니라 조골세포의 분화를 촉진한다(Kim, H.W. et al., Biotechnol. Lett. 2010, 32, 29-33).

[0003] 골 형성 단백질-2(Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)는 가장 강력한 골유도 단백질 중 하나로 조골세포 분화를 촉진할 수 있고, 콜라겐, 오스테오폰틴(osteopontin) 및 피브로넥틴과 같은 세포 매트릭스 단백질의 발현을 자극할 수 있다(Lecanda, F. et al., J. Cell. Biochem. 1997, 67, 386-396)(Wozney, J.M. Clin. Orthop. Relat. Res. 1998, 346, 26-37). BMP-2는 뼈 형성에 필요한 특정 전사 프로그램을 촉발하는 신호를 조절하여 전구-조골세포(pre-osteoblasts)에서 성숙한 조골세포로 분화를 자극한다(Govender, S. et al., J. Bone. Jt. Surg. Am. 2002, 84, 2123-2134)(Sakou, T. Bone 1998, 22, 591-603).

[0004] 이에 본 발명자는 골 생성을 유도할 수 있는 신규한 재조합 단백질을 연구한 결과, 피브로넥틴 단백질 제9타입 III 도메인(FNIII9), 제10타입 III 도메인(FNIII10) 및 골 형성 단백질-2(BMP-2)가 결합된 융합 단백질이 골 세포의 부착 및 분화를 유도하여 골 생성 촉진에 효과적임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 피브로넥틴(Fibronectin, FN) 단백질 및 골 형성 단백질-2(Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)가 결합된 융합(fusion) 단백질을 제공하는 것이다.

[0006] 또한 본 발명의 목적은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0007] 또한 본 발명의 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0008] 또한 본 발명의 목적은 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 골 재생용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 목적은 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 골 재생용 스캐폴드를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 피브로넥틴 단백질 및 골 형성 단백질-2가 결합된 융합 단백질을

제공한다.

- [0011] 또한 본 발명은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 골 재생용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 골 재생용 스캐폴드를 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 피브로넥틴 단백질 및 골 형성 단백질-2가 결합된 융합 단백질은 골 세포의 부착 및 분화를 유도하여 골 생성 촉진에 효과적이므로, 본 발명의 융합 단백질은 치아 및 골 조직의 회복 및 재생과 관련된 조직 공학적 재료, 골 재생 치료제 및 의약품 치료제 개발 분야 등에서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명의 융합 단백질을 발현하는 재조합 벡터의 개열 지도를 나타낸 도이다.
- 도 2는 분리된 본 발명의 융합 단백질(oFN) 및 피브로넥틴 단백질 제9 및 10 타입 III 도메인(iFN)을 쿠마시 블루 염색(A) 및 웨스턴 블랏(B)을 수행하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명의 융합 단백질(oFN), 피브로넥틴 단백질 제9 및 10 타입 III 도메인(iFN) 및 골형성 단백질-2(BMP-2)을 농도별로 조골세포에 처리한 후 세포 부착 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명의 융합 단백질(oFN) 및 피브로넥틴 단백질 제9 및 10 타입 III 도메인(iFN)을 조골세포에 처리하고 3 또는 10일 후 ALP 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 무처리군, oFN 융합 단백질이 봉입된 콜라겐 매트릭스에서 자란 MC3T3-E1 세포 또는 iFN 단백질이 봉입된 콜라겐 매트릭스에서 자란 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 무처리군, oFN 융합 단백질이 봉입된 콜라겐 매트릭스에서 자란 MC3T3-E1 세포 또는 iFN 단백질이 봉입된 콜라겐 매트릭스에서 자란 MC3T3-E1 세포에서 골 형성 마커인 OPN, RUNX2 및 Col I의 mRNA 발현 수준을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 피브로넥틴 단백질 및 골 형성 단백질-2가 결합된 융합 단백질을 제공한다.
- [0018] 상기 피브로넥틴 단백질은 제9타입 III 도메인(FNIII9) 및 제10타입 III 도메인(FNIII10)으로 구성되며, 상기 피브로넥틴 단백질의 제9타입 III 도메인(FNIII9)은, 바람직하게는, 서열번호 1로 표시되는 아미노산으로 이루어져 있고, 상기 피브로넥틴 단백질의 제10타입 III 도메인(FNIII10)은, 바람직하게는, 서열번호 2로 표시되는 아미노산으로 이루어져 있다. 또한, 상기 골 형성 단백질-2는, 바람직하게는, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산으로 이루어져 있다.
- [0019] 본 발명에 따른 융합 단백질은, 바람직하게는, 서열번호 4로 표시되는 아미노산으로 이루어져 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에 있어서, "피브로넥틴 단백질"은 대부분의 동물세포 표면에 있는 큰 주변 단백질이다. 동물 혈액 내, 배양세포 표면 및 조직의 세포 외 기질에 존재한다. 단위체 분자량이 22~25만이고, 세포가 암화되면 현저하게 소실되는 세포막 표면 단백질이다. 간에서 합성하여 혈액에 분비하는 이중합체의 혈장피브로넥틴과 섬유아세포에서 합성, 분비하는 다량체의 세포성 피브로넥틴으로 크게 나눌 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, "골 형성 단백질"은 뼈형성에 직접적으로 관여하는 단백질이다. 상기 단백질의 cDNA는 현재까지 9종류의 BMP(BMP-1~BMP-9)를 복제한다. BMP-3은 오스테오제닌, BMP-7은 OP-1, BMP-6은 Vgr-1이라고도 한다. 이 중 BMP-1을 제외하면 다른 것은 형질전환증식인자 β (TGF- β) 슈퍼패밀리에 속한다. BMP-2 내지 BMP-9는 C말단의 110 내지 140개의 아미노산이 호모 또는 헤테로2 합체를 형성하며 발현한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, "융합 단백질(fusion protein)"은 2개 이상의 이종(異種)단백질의 일부 또는 전부가 결합된 단백질을 일컫는다. 대부분의 경우 유전자의 코드배열을 다른 유전자의 코드배열과 융합한 잡종유전자를 발현시

켜서 얻는다.

- [0023] 본 발명에 따른 융합 단백질의 범위는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 4로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.
- [0024] 본 발명의 융합 단백질은 이의 천연형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체가 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 융합 단백질의 변이체란 각 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979).
- [0025] 상기 융합 단백질 또는 이의 변이체는 천연에서 추출하거나 합성 (Merrifield, J. Amer. chem. Soc. 85:2149-2156, 1963) 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 유전자 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다 (Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2판, 1989).
- [0026] 또한 본 발명은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0027] 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5로 표시되는 염기 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 유전자로서 사용될 수 있는 핵산분자는 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실 (deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 5의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다
- [0028] 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0029] 상기 재조합 벡터는 도 1의 개열 지도로 표시될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에 있어서, "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는 유전자 작제물을 의미하는 것으로, 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 상기 "작동가능하게 연결된 (operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0032] 본 발명에서 상기 "목적 유전자의 발현"은 상기 목적 유전자를 발현시켜 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 생산하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서 목적 유전자를 발현하는 방법은 상기 목적 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체(숙주세포)를 배양하여 상기 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 발현시키는 방법일 수 있으며, 이를 통해 상기 단백질이 관여되는 생합성 경로의 최종산물을 제조할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 벡터는 세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않고 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있으며, 예컨대 플라스미드, 코즈미드, 파지 입자, 바이러스 벡터일 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 pUC19, pSTV28, pBBR1MCS, pBluscriptII, pBAD, pTrc99A, pET, pACYC184 및 pBR322 계열 등의 당업계에 상용화

된 박터를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 pBAD-HisB를 사용하나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 실시예에서는, 피브로넥틴 단백질 제9타입 III 도메인(FNIII9), 제10타입 III 도메인(FNIII10) 및 골 형성 단백질-2가 융합된 단백질(oFN)을 제조하기 위하여, 도 1의 개별 지도를 갖는 재조합 박터를 제작하였다. 그 후, 상기 박터로 형질전환된 대장균을 이용하여 융합 단백질을 수득하였다. 본 발명의 융합 단백질은 조골 세포의 부착 및 분화를 촉진하고, 골 형성 마커인 OPN, RUNX2 및 Col I의 mRNA 발현을 현저하게 증가시키는 효과가 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 융합 단백질은 골 세포의 부착 및 분화를 유도하여 골 생성에 효과적이므로, 본 발명의 융합 단백질은 치아 및 골 조직의 회복 및 재생과 관련된 조직 공학적 재료, 골 재생 치료제 및 의약품 치료제 개발 분야 등에 이용될 수 있다.

[0035] 이에, 본 발명은 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 골 재생용 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명에서 "골 재생"은 소멸되어가거나 손상된 골조직을 재생하는 것을 뜻한다.

[0037] 본 발명의 골 재생용 조성물은 골 조직 재생이 필요한 질환, 예를 들어, 디스크, 퇴행성 척추 질환, 노화에 따른 골 소실, 또는 골다공증 등 각종 질환의 "예방 또는 치료용 약학 조성물"의 형태일 수 있다. 또한, 원하는 골 조직을 체외에서 배양하여 인체에 삽입할 수 있는 조직공학재료를 생산하는데 처리할 수 있는 조성물의 형태일 수 있다.

[0038] 또한 본 발명은 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 골 재생용 스캐폴드(Scaffold)를 제공한다.

[0039] 본 발명에서 "스캐폴드(Scaffold)"는 조직구축, 세포기능 제어를 위해 인공적으로 만든 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)를 뜻한다. 세포 외 물질 중에는 단백질과 다당류와 같은 유기 고분자를 주성분으로 하고 있는 세포 외 기질이라고 불리는 유기고형물질이 존재하고 조직의 구조적 지지체로서 세포의 접촉유도 물질 역할을 한다. 세포가 세포 외 기질에 접촉하면 세포내 정보전달이 활성화되고, 세포형태, 증식 및 세포사(cell death) 등의 기본적인 세포기능이 제어된다. 세포 외 기질은 생체 조직 내에서 가교된 젤 상태 또는 다공성 네트워크로 존재한다.

[0040] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 자세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0041] **실시예 1. oFN(osteoinductive fibronectin) 융합 단백질을 발현하는 재조합 발현 박터 제작**

[0042] 피브로넥틴 단백질의 제9타입 III 도메인(FNIII9), 제10타입 III 도메인(FNIII10) 및 골 형성 단백질-2(BMP-2)가 융합된 재조합 단백질(oFN)을 제조하기 위하여, PCR을 수행하여 BMP-2의 골 유도 도메인의 서열(Gln₂₈₃-Arg₃₉₆)을 증폭시켰다. 구체적으로, 서열번호 6으로 표시되는 프라이머(5'-CCAGATCTCAGGCGAACATAAACAG-3' (BMP-2의 NH₂-말단 앞에 BglII 제한부위(밑줄)가 도입됨) 및 서열번호 7로 표시되는 프라이머(5'-AAGGTACCACGGCAGCCGAGCCTTC-3' (BMP-2의 COOH-말단에 KpnI 제한 부위(밑줄)에 포함됨)를 이용하였다. 또한, PCR을 수행하여 iFN(피브로넥틴 단백질의 제9타입 III 도메인(FNIII9) 및 제10타입 III 도메인(FNIII10))을 증폭시키기 위하여, 서열번호 8로 표시되는 프라이머(5'-aggtaccagagctggagcgaattcggctct-3') 및 서열번호 9로 표시되는 프라이머(5'-aggtacctgttcggtaattaatggaaat-3')를 이용하였다.

[0043] PCR 수행을 위해, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 100 μg · mL⁻¹ 젤라틴, 0.2mM dNTPs(deoxynucleotide triphosphates), 1.25 U Taq polymerase(iNtRON, Seoul, Korea) 및 50 pmol의 각 프라이머를 혼합하여 30 μL 혼합 용액을 제조하였다. PCR은 1분 동안 55°C(어닐링), 1분 동안 72 °C (연장) 및 1분 동안 94 °C(변성)조건으로 30회 수행하였다. 상기 PCR 산물 및 pBAD/HisB박터를 BglII 및 KpnI로 다이제스트(digest)한 후, 이를 라이게이션하여 oFN 융합 단백질을 발현하는 재조합 박터를 제작하였다. 상기 재조합 박터의 개별 지도를 도 1에 나타내었다.

[0044] **실시예 2. oFN 융합 단백질의 발현 및 정제**

[0045] oFN 융합 단백질을 발현 및 정제하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0046] 구체적으로, 상기 실시예 1의 oFN 융합 단백질을 발현시키기 위하여, 상기 실시예 2에서 제조한 제조합 발현 벡터로 형질전환된 제조합 E. coli TOP10을 암피실린(LB-Amp)이 포함된 Luria-Bertani 배지 및 37°C의 조건에서 밤새도록 배양하였다. 대조군으로는 골 형성 단백질-2가 융합되지 않고 피브로넥틴 단백질로만 구성된 iFN 단백질(피브로넥틴 FNIII9 및 FNIII10에서 유래된 인테그린-유래 셀 부착 모듈)을 발현하는 제조합 벡터로 형질전환된 제조합 E. coli TOP10을 동일한 조건에서 배양하였다. 600 nm (A600)에서 흡광도가 0.6로 도달할 때까지 미생물을 배양한 후, 여기에 0.25% (w/v) L-아라비노스(arabinose)를 첨가하였다. 3시간 후에, 6000×g, 10분 조건으로 원심분리한 뒤, 용해시키고 초음파 처리하였다. 이 후, 수용성 추출물을 냉각 원심분리기를 이용하여 14,000×g, 30분의 조건으로 원심 분리를 수행하고, 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 초음파 처리된 상층액으로부터 수득한 조 단백질(crude protein)을 제조사(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 프로토콜에 따라, 니켈-니트릴로트리아세트 산(nickel-nitrilotriacetic acid) 수지 컬럼에 헥사히스티딘 태그(hexahistidine tag) (iFN의 아미노-말단 끝에 위치함)를 결합하여 정제하였다. 제조합 단백질의 정제 정도는 쿠마시 블루로 염색하여 12% (v/v) SDS-PAGE 겔로 변성 조건하에 측정하였다. 그 결과를 도 2의 (A)에 나타내었다.

[0047] 또한, 제조합 단백질의 발현 정도를 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 구체적으로, 일차 항체로 모노클로날 항-폴리히스티딘 항체(sc-8036, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)의 퍼옥시다제 컨쥬게이트를 이용하여 당업계에 공지된 방법에 따라 웨스턴 블랏을 수행하였다. 면역검출된(immunodetected) 단백질의 분자 크기는 전-염색된 단백질 마커의 이동성을 비교하여 확인하였다. 그 결과를 도 2의 (B)에 나타내었다.

[0048] 도 2에 나타난 바와 같이, 쿠마시 블루 염색 결과(A), 본 발명의 oFN 융합 단백질의 크기는 50 kDa이고, iFN 단백질의 크기는 37 kDa임을 확인하였다. 또한, 웨스턴 블랏을 수행한 결과(B), oFN 융합 단백질의 크기는 50 kDa이고, iFN 단백질은 37 kDa임을 확인하였다. 본 발명의 oFN 융합 단백질의 순도는 95%임을 확인하였다.

[0049] 추가적으로, 정제한 본 발명의 oFN 융합 단백질의 서열을 분석한 결과, 상기 oFN 융합 단백질은 서열번호 4로 구성되어 있으며, 서열번호 5로 표시되는 염기서열로 구성되어 있음을 확인하였다.

[0050] **실시예 3. MC3T3-E1 세포 배양**

[0051] MC3T3-E1 세포는 신생 마우스의 두개관(calvaria)에서 유래한 전-조골세포주(pre-osteoblastic cell line)이다. MC3T3-E1 세포는 10% 비동화 소태아혈청(heat-inactivated fetal bovine serum)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U·mL⁻¹ 페니실린 G 나트륨(penicillin G sodium), 100 µg·mL⁻¹ 황산 스트렙토마이신(streptomycin sulfate) 및 0.25 µg·mL⁻¹ 암포테리신 B(amphotericin B)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 포함하는 α-MEM(minimum essential medium)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지에서 5% CO₂ 및 37°C의 조건하에 배양하였다. 충분히 자란 세포(Confluent cells)를 5분동안 0.25%의 트립신-EDTA 처리를 통해 분리하고 분취량(aliquot)을 계대 배양하였다. 3 계대한 MC3T3-E1 세포를 이후 세포의 증식 및 분화 실험에 이용하였다.

[0052] **실시예 4. oFN 융합 단백질이 처리된 세포의 부착 시험(Cell Adhesion Assay)**

[0053] 본 발명의 oFN 융합 단백질이 조골 세포의 부착에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 본 발명의 oFN 융합 단백질, iFN 단백질 또는 BMP-2 단백질 각각을 코팅시킨 플레이트에 상기 실시예 3의 MC3T3-E1 세포를 접종하여 배양한 후 크리스탈 바이올렛 시험을 통해 세포 부착 활성을 확인하였다.

[0054] 구체적으로, 24-웰 플레이트에 본 발명의 oFN 융합 단백질, iFN 단백질 또는 BMP-2 단백질을 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 및 10 µg·mL⁻¹의 각각의 농도로 처리한 후, 4°C에서 밤새도록 흡착시켰다. 모든 샘플은 3회 반복하여 실험하였다. 배양 후, 각 웰을 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)으로 세척한 후, 30분 동안 1% (w/v) BSA 용액으로 블로킹하였다. 5×10³ cells/well의 농도로 α-MEM 무혈청 배지에 준비된 MC3T3-E1 세포를 각 플레이트에 접종하였다. 단백질의 흡착량을 계산하기 위하여, 상층액의 단백질량을 BCA 단백질 분석(Pierce)으로

측정하였다. 30분동안 37℃로 배양 후, 부착 세포를 DPBS로 두 번 세척한 후, 3.7% (w/v) 포르말린 용액으로 15 분 동안 실내온도에서 고정시켰다. 상기 고정된 세포를 1시간 동안 37℃에서 2% (v/v) 에탄올/증류수가 포함된 0.25% (w/v) 크리스탈 바이올렛(Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 염색한 후, DPBS로 3회 세척하였다. 세포 용해는 2% SDS(sodium dodecyl sulfate) 용액을 첨가하여 수행한 후 96-웰 플레이트에 옮겼다. 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0055] 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 oFN 융합 단백질 및 iFN 단백질은 농도 의존적으로 조골 세포 부착 활성이 우수하게 나타남을 확인하였다. 특히, BMP-2 단백질 처리군은 뚜렷하게 세포 부착 활성을 보이지 않았으나, 본 발명의 oFN 융합 단백질 처리군은 기존에 높은 조골 세포 부착 활성을 보인다고 알려진 iFN 단백질 처리군보다 세포 부착 활성이 현저하게 높음을 확인하였다.

[0056] 따라서, 본 발명의 oFN 융합 단백질은 조골 세포 부착 활성에 효과적으로 작용함을 확인하였다.

[0057] **실시예 5. oFN 융합 단백질이 처리된 세포의 분화 정도 분석**

[0058] 본 발명의 oFN 융합 단백질이 조골 세포의 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 골 형성 분화(osteogenic differentiation) 확인을 위한 초기 마커 중 하나인 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase, ALP) 활성을 측정하였다.

[0059] 구체적으로, 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 농도의 oFN 융합 단백질 또는 iFN 단백질이 포함된 MC3T3-E1 세포를 1×10^3 cells/well 의 농도로 플레이트한 후, 3 또는 10일 동안 배양한 뒤, 각 웰을 DPBS로 세척하고 200 μL 1% Triton X-100으로 용해시켰다. 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase, ALP)와 반응 시 노란색을 띠는 100 μL 의 p-NPP(p-nitrophenyl phosphate)와 각 세포 배양액을 혼합하여 현탁한 뒤, 마이크로플레이트 리더(BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 MC3T3-E1 세포 배양액을 이용하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0060] 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 oFN 융합 단백질이 처리된 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성은 기존에 조골 세포 분화 촉진 활성을 보인다고 알려진 iFN 단백질이 처리된 MC3T3-E1 세포보다 유의하게 높게 ALP 활성이 나타남을 확인하였다.

[0061] 또한, 콜라겐 매트릭스(matrix)에 본 발명의 oFN 융합 단백질 또는 iFN 융합 단백질을 봉입한 후, 상기 매트릭스에서 배양한 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성변화를 분석하였다. 구체적으로, 콜라겐을 막자사발에 분쇄하고, 증류수에 용해한 뒤, EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)와 가교-결합하였다. 그 후, 500 μL 콜라겐 용액을 각 24-웰 플레이트에 분주하고 동결 건조 하였다. 동결 건조된 콜라겐 매트릭스를 PBS 용액으로 여러 번 세척한 뒤, 본 발명의 oFN 융합 단백질 또는 iFN 융합 단백질을 4℃로 밤새 처리하여 99%로 흡착시켰다. 그 후, 각 플레이트에 MC3T3-E1 세포를 분주한 후, 상기와 동일한 과정을 통해 ALP 활성을 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0062] 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 oFN 융합 단백질이 봉입된 콜라겐 매트릭스에서 자란 MC3T3-E1 세포가, 무처리 또는 iFN 단백질이 봉입된 콜라겐 매트릭스에서 자란 MC3T3-E1 세포보다 유의적으로 ALP 활성이 높음을 확인하였다.

[0063] 따라서, 본 발명의 oFN 융합 단백질은 골 형성 분화 활성을 촉진시키는데 효과적으로 작용함을 확인하였다.

[0064] **실시예 6. Quantitative Real-Time PCR을 이용한 골 형성 분화 활성 확인(osteogenic differentiation activity)**

[0065] **6-1. RNA 분리 및 cDNA 합성**

[0066] 상기 실시예 5에서 대조한 본 발명의 oFN 융합 단백질이 봉입된 콜라겐 매트릭스에서 배양한 각 MC3T3-E1 세포의 RNA를 분리하고 cDNA를 합성하였다.

[0067] 구체적으로, MC3T3-E1 세포로부터 Easy-spin RNA extraction kit (iNtRON, Seoul, Korea)를 이용하여 총 RNA를

분리하였다. RNA의 순도는 18S 및 28S RNA을 에티디움브로마이드(ethidium bromide)를 이용하여 젤 전기영동하여 260 및 280 nm(1.9-2.1의 A260/A280 비율값이 허용 가능함)로 흡광도를 측정하여 확인하였다. RNA 농도는 A260 값으로 측정하였다. 또한, cDNA를 수득하기 위해, 50 U의 SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 5 μM DTT, 40 U의 RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor, 0.5 μM random hexanucleotide primers 및 500 μM dNTP mixture를 포함하는 20 μM의 반응 용액에 2 μg의 총 RNA를 넣어 60분간 50°C 조건으로 역전사 반응을 수행하였다. 반응액은 마지막 단계에서 15분간 70°C 조건으로 열을 가하고, 생성된 cDNA는 -20°C에서 보관하였다.

[0068] 6-2. Quantitative Real-Time PCR을 이용한 골 형성 분화 활성(osteogenic differentiation activity) 확인

[0069] 상기 실시예 5에서 제조한 본 발명의 oFN 융합 단백질 또는 iFN 융합 단백질이 봉입된 콜라겐 매트릭스에서 배양한 각 MC3T3-E1 세포에서 골 형성 마커인 OPN(osteopontin), RUNX2(Runt-related transcription factor 2) 및 Col I(collagen type I)의 mRNA 발현 수준을 확인하였다.

[0070] 구체적으로, ABI Step One real-time PCR system을 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. real-time PCR 반응액은 10 μL의 2×SYBR Green PCR master mix(Applied Biosystems, AmpliTaq Gold DNA polymerase, a dNTP mix, SYBR Green I dye, ROX dye, 및 10 mM MgCl₂을 포함함), 1 μL의 실시예 6-1의 각 주형 cDNA 및 0.1 μM의 표 1의 각 프라이머(서열번호 10 내지 17)를 혼합하였다. real-time PCR 조건은 94°C에서 15초(변성), 60°C에서 1분(어닐링), 60°C에서 1분(연장)조건으로 40회 수행하고 94°C에서 10분 동안 효소 활성화하였다. ABI 기기에서 자동 임계값이 분석되는 C_t(cycle threshold)값은 C_t(GAPDH)를 표준화하여, "dC_t = C_t(GAPDH) - C_t(특정 유전자)" 식으로 계산하였다. 두 C_t 또는 dC_t 값 간의 n의 차이는 비교되는 두 cDNA 샘플 사이의 표적 서열에 대한 2ⁿ-폴드 차이(2ⁿ-fold difference)를 나타낸다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

표 1

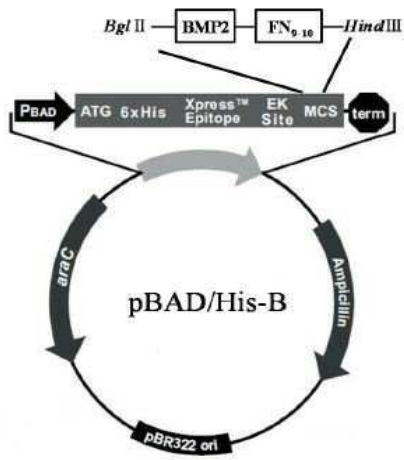
Genes	Forward Primer	Reverse Primer
Runx2	GGCCGGGAATGATGAGAACTA(서열번호 10)	GGCCACAAATCTCAGATCGT(서열번호 11)
OPN	CCAATGAAAGCCATGACCAC(서열번호 12)	CGACTGTAGGGACGATTGGA(서열번호 13)
Col I	GAAAGGATCTCCTGGTGCTG(서열번호 14)	ACCTTGTTTGCCAGGTTTAC(서열번호 15)
GAPDH	TCCACTCACGGCAAATTC AAC(서열번호 16)	AGCCAAGATGCCCTTCAGT(서열번호 17)

[0072] 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 oFN 융합 단백질이 봉입된 콜라겐 매트릭스에서 자란 MC3T3-E1 세포에서 골 형성 마커인 OPN, RUNX2 및 Col I의 mRNA 발현 수준이 무처리 또는 iFN 단백질이 처리된 세포보다 유의적으로 높음을 확인하였다.

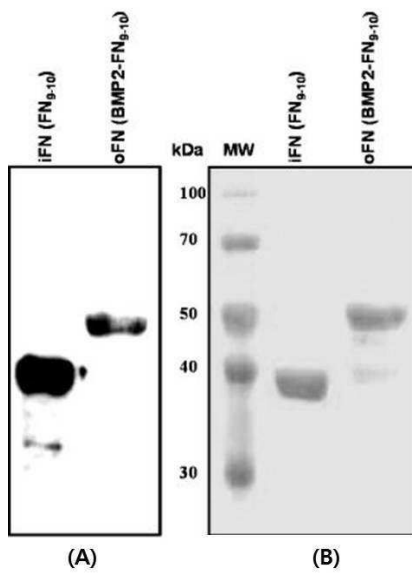
[0073] 이상의 실험 결과를 통하여, 본 발명의 oFN 융합 단백질은 골 세포 부착 활성 및 골 형성 분화활성에 효과적임을 확인하여 골 재생 용도로 사용할 수 있음을 확인하였다.

도면

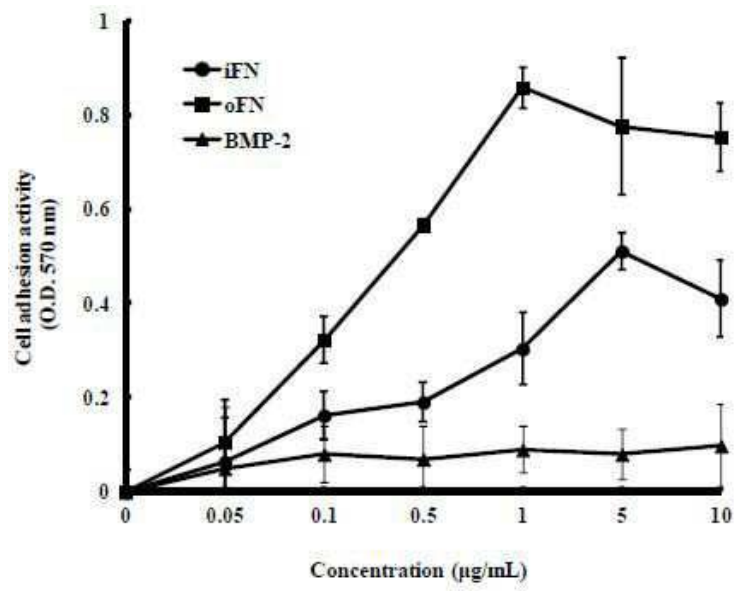
도면1



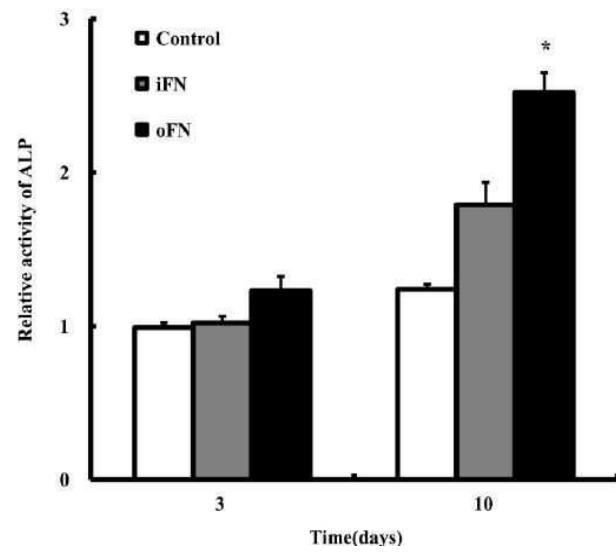
도면2



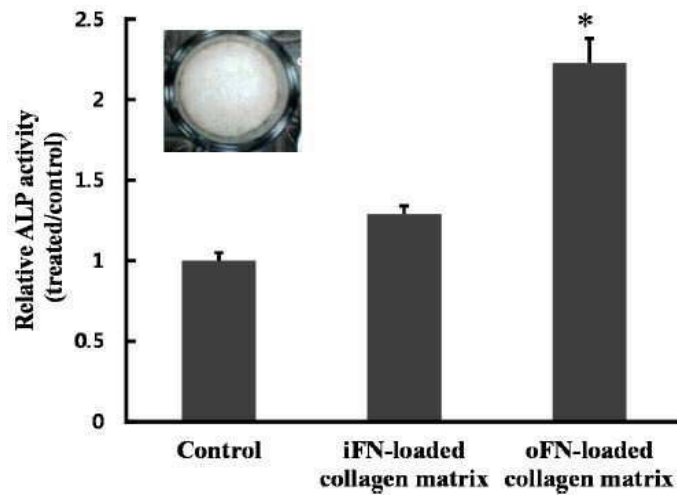
도면3



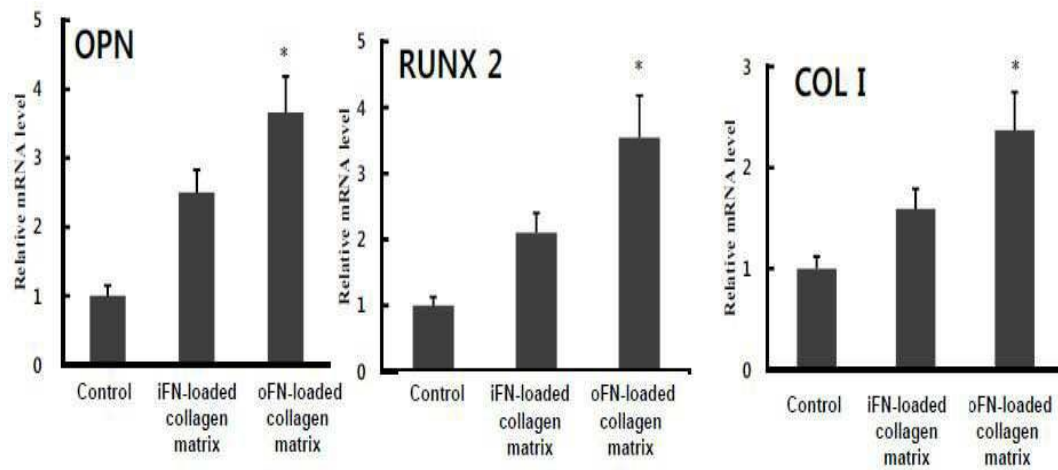
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
 - <120> A fusion protein of fibronectin protein and Bone morphogenetic protein-2
 - <130> 1-165
 - <160> 17
 - <170> KopatentIn 2.0
 - <210> 1
 - <211> 90
 - <212> PRT
 - <213> amino acid of Fibronectin ninth type-3 domain
 - <400> 1
- Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn

1 5 10 15
 Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr
 20 25 30

 Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
 35 40 45
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro
 50 55 60
 Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu
 65 70 75 80
 Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr
 85 90

<210> 2
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> amino acid of Fibronectin tenth type-3 domain

<400> 2
 Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
 20 25 30
 Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 35 40 45
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp

 65 70 75 80
 Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90

<210> 3
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> amino acid of Bone morphogenetic protein-2(BMP-2)

<400> 3

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
 1 5 10 15

His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile
 20 25 30

Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro
 35 40 45

Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln
 50 55 60

Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val
 65 70 75 80

Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu
 85 90 95

Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly
 100 105 110

Cys Arg

<210> 4

<211> 300

<212> PRT

<213> amino acid of fusion oFN protein

<400> 4

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
 1 5 10 15

His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile
 20 25 30

Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro
 35 40 45

Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln
 50 55 60

Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val
 65 70 75 80

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

- <210> 5
- <211> 900
- <212> DNA
- <213> nucleic acid of fusion oFN protein

<400> 5
 caggcgaaac ataacacgcg taaacgtctg aaaagcagct gcaaactca tccgctgtat 60
 gtggatttta gcgatgtggg ctggaacgat tggattgtgg cgccgccggg ctatcatgcg 120

 ttttattgcc atggcgaatg cccgtttccg ctggcggatc atctgaacag caccaacat 180
 gcgattgtgc agaccctggt gaacagcgtg aacagcaaaa ttccgaaaagc gtgctgcgtg 240
 ccgaccgaac tgagcgcgat tagcatgctg tatctggatg aaaacgaaaa agtgggtgctg 300
 aaaaactatc aggatatggt ggtggaaggc tgcggctgcc gtggtaccgg tcttgattcc 360
 ccaactggca ttgacttttc tgatattact gccaactctt ttactgtgca ctggattgct 420
 cctcgagcca ccatcactgg ctacaggatc cgccatcatc ccgagcactt cagtgggaga 480
 cctcgagaag atcgggtgcc ccaactctcg aattccatca ccctcaccaa cctcactcca 540

 ggcacagagt atgtggtcag catcgttctt cttaatggca gagaggaaag tcccttattg 600
 attggccaac aatcaacagt ttctgatgtt ccgagggacc tggaagtgtg tgctgcgacc 660
 cccaccagcc tactgatcag ctgggatgct cctgctgtca cagtgagata ttacaggatc 720
 acttacggag agacaggagg aaatagccct gtccaggagt tcaactgtgcc tgggagcaag 780
 tctacagcta ccatcagcgg ccttaaacct ggagttgatt ataccatcac tgtgtatgct 840
 gtcaactggc gtggagacag ccccgaagc agcaagccaa tttcattaa ttaccgaaca 900
 900

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for BMP-2

<400> 6

ccagatctca ggcgaaacat aaacag 26

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for BMP-2

<400> 7

aaggtaccac ggcagccgca gccttc 26

<210> 8

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for iFN

 <400> 8
 aggtaccag agctggagcg aattcggctct 30
 <210> 9
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for iFN
 <400> 9
 aggtacctgt tcgtaatta atggaat 28
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for Runx2
 <400> 10
 ggccgggaat gatgagaact a 21
 <210> 11

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for Runx2
 <400> 11
 ggcccacaaa ttcagatcg t 21
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for OPN
 <400> 12

ccaatgaaag ccatgaccac 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for OPN

<400> 13

cgactgtagg gacgattgga 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Col I

<400> 14

gaaaggatct cctggtgctg 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Col I

<400> 15

accttgtttg ccaggttcac 20

<210

> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for GAPDH

<400> 16

tccactcacg gcaaattcaa c 21

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for GAPDH

<400> 17

agccaagat gcccttcagt

20