



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0135689
(43) 공개일자 2018년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
C12N 5/0654 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0074157
(22) 출원일자 2017년06월13일
심사청구일자 2017년06월13일

(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
네이트특허법인

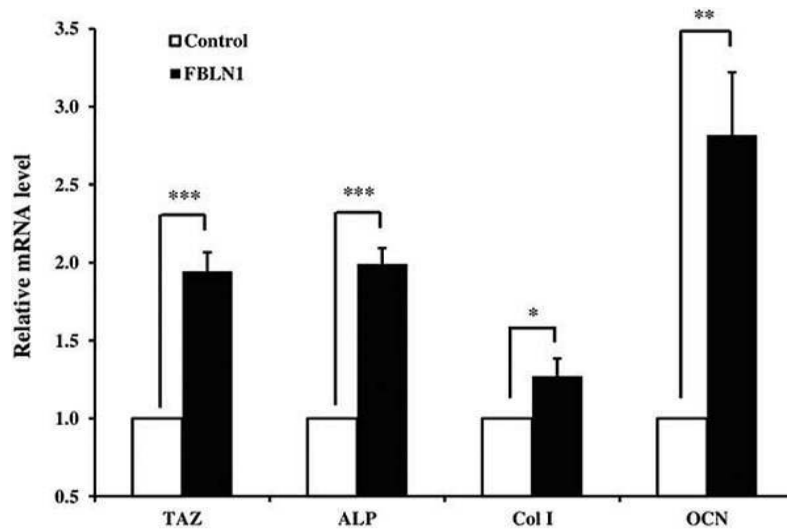
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **피블린-1 단백질을 포함하는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 피블린-1 단백질을 유효 성분으로 포함하는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물, 줄기세포에 피블린-1 단백질을 처리하여 줄기세포의 골분화를 촉진하는 방법 및 그 응용에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 생체에서 유래한 피블린-1 단백질을 예를 들어 유전자 재조합 등의 방법으로 대량으로 합성, 제조할 수 있으며, 본 발명에 따라 분화된 조골세포를 유효 성분으로 사용하여 골결손 질환이나 골다공증과 같은 골 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12N 2501/998 (2013.01)

C12N 2506/1346 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A2B4008811

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심연구

연구과제명 줄기세포 Niche-like 세포외기질 개발

기 여 율 1/2

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C0522

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 의료기기기술개발사업

연구과제명 장기 방출형 신경재생인자 전달시스템 개발

기 여 율 1/2

주관기관 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2019.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

피불린-1(fibulin-1) 단백질을 유효 성분으로 포함하는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 피불린-1 단백질은 서열식별번호:1로 이루어지는 아미노산 서열을 가지는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 피불린-1 단백질은 서열식별번호:2의 염기 서열로 이루어지는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터의 발현 산물인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 줄기세포는 인간 중간엽 유래의 줄기세포를 포함하는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 인간 중간엽 유래의 줄기세포는 인간 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포(human turbinate-derived mesenchymal stem cell, hTMSC)인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 피불린-1 단백질은 상기 인간 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포의 조골세포(osteoblast)로의 분화를 촉진하는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 피불린-1 단백질은 상기 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물 중에 0.001 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함된 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물.

청구항 8

시험관 내(*in vitro*)에서 줄기세포에 피불린-1 단백질을 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포의 골분화를 촉진하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 피불린-1 단백질은 인간 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포의 조골세포(osteoblast)로의 분화를 촉진하는 줄기세포의 골분화를 촉진하는 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 피불린-1 단백질로 처리된 줄기세포를 배양하는 단계를 더욱 포함하는 줄기세포의 골분화를 촉진하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 특허출원은 대한민국 정부 미래창조과학부의 "핵심연구사업"의 일환으로서 "줄기세포 Niche-like 세포외기질

[0001]

개발"(주관기관: 인하대학교 산학협력단; 과제번호: NRF-2016R1A2B4008811) 과제와, 보건복지부의 "의료기기기술개발사업"의 일환으로 "장기 방출형 신경재생인자 전달시스템 개발"(주관기관: 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단; 과제번호: HI14C0522) 과제의 수행 결과물에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 세포의 분화 촉진용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 피불린-1 단백질을 유효 성분으로 포함하는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물 및 그 응용에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 난치병 치료와 관련하여 조직공학을 이용한 재생의학 분야에서 줄기세포가 큰 관심을 얻고 있다. 줄기세포는 미분화 상태에서 다양한 특정 세포로 분화될 수 있는 특성을 가지고 있으며, 그 기원에 따라 배아줄기세포와 성체줄기세포로 구분될 수 있다. 성체줄기세포는 배아줄기세포에 비하여 분화 능력이 제한되고 있으나, 생명윤리적인 논란을 회피할 수 있다는 점에서 주목을 받고 있다. 특히, 체세포에 외래 유전자나 특정 단백질을 가하여 얻어지는 유도만능줄기세포인 역분화 줄기세포의 경우, 배아줄기세포와 같이 모든 세포로 분화될 수 있고, 환자 자신의 세포를 이용할 수 있는 이점이 있다.

[0004] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 섬유아세포 유사 표현형을 가지고 있으며, 근육, 진피, 골수 및 지방 등 다양한 조직에 존재한다. 중간엽 줄기세포는 조골세포(osteoblast), 지방세포(adipocyte), 연골세포(chondrocyte), 근육모세포(myoblast) 등으로 분화한다. 그 중에서도 조골세포로의 분화는 골형성 단백질(bone morphogenic proteins, BMP), 형질전환성장인자-베타(transforming growth factor- β , TGF- β)와 같은 다양한 성장 인자들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 특히, RUNX2(runt-related transcription factor 2)는 조골세포 분화에 필수적인 전사 인자이며, 그 외에도 다양한 호메오박스(homeobox) 단백질이나 전사 인자가 상호작용하여 골 발달에 중요한 역할을 한다. 이들 전사 인자 등의 단백질은 세포의 기질(extracellular matrix, ECM) 단백질 및 알칼리 인산가수분해효소(alkaline phosphatase, ALP)와 같은 무기질화 단백질의 발현을 유도하며, 특히 타입-I 콜라겐(Col I), OCN(osteocalcin)과 같은 조골세포 특이적 유전자의 발현을 조절한다.

[0005] 줄기세포의 분화를 촉진하여 다양한 질병의 치료에 응용될 수 있는데, 일례로 대한민국등록특허 제10-1738087호는 한방에서 널리 사용된 세신(*Asiasari Radix*) 추출물을 유효 성분으로 포함하는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물을 개시하고 있다. 하지만, 식물에서 얻어진 성분을 사용하기 때문에 줄기세포의 골분화 촉진에 한계가 있으며, 상업적으로 대량 생산하는데 어려움이 있다.

[0006] 따라서 상업적 생산이 가능한 줄기세포의 분화를 촉진할 수 있는 소재에 대한 관심이 높아지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해소하기 위하여 제안된 것으로, 본 발명의 목적은 생체 유래 성분을 유효 성분으로 함유하는 줄기세포의 골분화를 촉진할 수 있는 조성물 및 골분화를 촉진하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상업적 제조가 가능한 펩타이드를 유효 성분으로 함유하는 줄기세포의 골분화를 촉진할 수 있는 조성물 및 골분화를 촉진하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 가지는 본 발명의 일 측면에 따르면, 본 발명은 피불린-1(fibulin-1) 단백질을 유효 성분으로 포함하는 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물을 제공한다.

[0010] 일례로, 상기 피불린-1 단백질은 서열식별번호:1로 이루어지는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0011] 하나의 예시적인 실시형태에서, 상기 피불린-1 단백질은 서열식별번호:2의 염기 서열로 이루어지는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터의 발현 산물인 것을 특징으로 한다.

[0012] 예를 들어, 상기 줄기세포는 인간 중간엽 유래의 줄기세포를 포함할 수 있다.

[0013] 예시적인 실시형태에서, 상기 인간 중간엽 유래의 줄기세포는 인간 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포(human turbinate-derived mesenchymal stem cell, hTMSC)인 것을 특징으로 한다.

- [0014] 이때, 상기 피블린-1 단백질은 상기 인간 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포의 조골세포(osteoblast)로의 분화를 촉진할 수 있다.
- [0015] 또한, 상기 피블린-1 단백질은 상기 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물 중에 0.001 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 시험관 내(*in vitro*)에서 줄기세포에 피블린-1 단백질을 처리하는 단계를 포함하는 줄기세포의 골분화를 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0017] 일례로, 상기 피블린-1 단백질은 인간 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포의 조골세포(osteoblast)로의 분화를 촉진할 수 있다.
- [0018] 선택적으로, 상기 피블린-1 단백질로 처리된 줄기세포를 배양하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따르면, 생체에서 유래한 피블린-1 단백질이 줄기세포, 예를 들어 인간 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포(hTMSC)와 같은 인간 중간엽 줄기세포의 증식은 물론이고, 이들 줄기세포의 골분화를 촉진하였다.
- [0020] 본 발명에서 유효 성분으로 사용된 피블린-1은 유전자 재조합 등의 방법을 통하여 대량으로 합성할 수 있기 때문에, 줄기세포의 골분화를 촉진하기 위한 유효 성분으로 사용될 때 경제적인 비용으로 제조할 수 있다.
- [0021] 피블린-1 단백질을 처리하여 줄기세포의 골분화를 촉진할 수 있으므로, 피블린-1 단백질의 처리에 따라 얻어진 조골세포를 유효 성분으로 함유하는 골결손 질환이나 골다공증과 같은 골대사 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 피블린-1 단백질을 발현하기 위해 사용된 재조합 발현 벡터의 개열 지도와, 발현된 피블린-1 단백질을 웨스턴-블롯팅으로 정제한 분석 결과를 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 피블린-1 단백질로 코팅된 폴리스티렌의 표면 영상을 도시한 사진과 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 피블린-1 단백질의 세포 접합 정도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. ***는 검증(student's test)에서 통계적으로 유의미한 차이($P < 0.001$)를 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 hTMSC에 대한 피블린-1 단백질의 세포 증식 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. *는 검증(student's test)에서 통계적으로 유의미한 차이($P < 0.05$)를 나타낸다.
- 도 5는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 hTMSC에 대한 피블린-1 단백질의 ALP(alkaline phosphatase, 알칼리 인산가수분해효소) 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. **는 검증(student's test)에서 통계적으로 유의미한 차이($P < 0.01$)을 나타낸다.
- 도 6은 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 hTSMC에 대한 피블린-1 단백질의 무기질화(mineralization) 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. ***는 검증(student's test)에서 통계적으로 유의미한 차이($P < 0.001$)을 나타낸다.
- 도 7은 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 hTSMC에 대한 피블린-1 단백질의 골형성 분화 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. 별표들은 검증(student's test)에서 통계적으로 유의미한 차이(*는 $P < 0.05$, **는 $P < 0.01$, ***는 $P < 0.001$)를 나타낸다. TAZ는 PDZ-결합 모티프를 가지는 전사 공동활성인자(transcriptional coactivator)이고, ALP는 알칼리 인산가수분해효소, Col I는 콜라겐-I, OCN은 오스테오칼신(osteocalcin)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 필요한 경우에 첨부하는 도면을 참조하면서 본 발명을 설명한다.
- [0024] 본 발명의 일 측면에 따르면, 본 발명은 피블린-1 단백질을 유효 성분으로 포함하는 줄기세포의 골형성 촉진용 조성물에 관한 것이다. 즉, 본 발명에 따라 줄기세포의 골분화를 촉진하는 유효 성분은 피블린-1 단백질이다. 피블린(fibulin)은 배양 세포에 의해 발현되거나 또는 세포 단층(cell monolayer)에 외인적으로 첨가될 때, 원섬유성 세포의 기질(fibrillar extracellular matrix) 내부로 통합되는 분비성 당-단백질이다. 그 중에서도 피

불린-1(fibulin-1, FBLN1)은 세포외 당-단백질의 일종으로서, 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)을 이루는 단백질이다.

[0025] 피불린-1의 구조는 3개의 도메인(도메인 I, 도메인 II, 도메인 III)으로 뭉쳐져 있는 ECM 모듈의 독특한 배열로 이루어져 있다. 아미노기 말단인 도메인 I은 각각 4개 또는 6개의 시스테인을 함유하는 대략 40개의 아미노산 잔기로 이루어진 3개의 아나필라톡신(anaphylatoxin, AT)-유사 모듈로 이루어져 있는데, 각각의 AT-유사 모듈은 시스테인 잔기에 형성된 3개의 이황화 연결(disulfide bridge)에 의해 안정화되는 알파-나선 폴딩 구조를 가지고 있다. 중앙의 도메인 II는 9개의 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF)-유사 구조로 구성되어 있다. 또한, 카르복시기 말단의 도메인 III는 각각 피불린-1A, -1B, -1C, -1D로 명명되는 선택적인 스플라이스 변이체(splice variant)로 발현될 수 있는 신규 단백질 모듈이다. FBLN-1은 fibronectin, nidogen-1, proteoglycan, versican 등과 같은 ECM 성분과 결합하며, 또한 혈액에서는 fibrinogen과 결합한다.

[0026] 본 발명에 따라 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물 중에 유효 성분으로 사용되는 피불린-1 단백질은 예를 들어 서열식별번호:1의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 피불린-1 단백질은 화학적 합성에 의하여 제조될 수도 있으나, 바람직하게는 재조합 발현 벡터를 이용하는 유전공학적 방법을 통하여 제조될 수 있다. 유전공학적 재조합 방법에서, 서열식별번호:1의 피불린-1 폴리펩타이드를 암호화하는 적절한 핵산 서열, 예를 들어 서열식별번호:2의 염기 서열을 가지는 핵산을 적절한 재조합 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0027] 이와 관련해서, 본 명세서에서 '펩타이드(peptide)'라는 용어는 자연적으로 존재하는 것으로부터 분리하였거나, 재조합기술(recombinant techniques)에 의해 또는 화학적으로 합성된 단백질, 단백질의 절편 및 펩타이드를 모두 포함한다. 또한, 본 명세서에서 '핵산(nucleic acid)'이라는 용어는 DNA(예를 들어 cDNA) 및 RNA를 포괄적으로 포함하는 의미로서, 천연의 뉴클레오타이드(아데닌, 티민, 구아닌, 사이토신, 우라실) 외에도 뉴클레오타이드를 구성하는 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)를 포함하는 의미이다(예를 들어, Uhlman and Peyman, Chemical Reviews, 90: 543-584 (1990)).

[0028] 일반적으로, 본 명세서상에 언급되어 있는 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 분리된(isolated) 것이다. "분리된(isolated)" 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드란 원래의 환경으로부터 제거된 것이다. 예를 들어, 자연 상태로 존재하는 단백질은 그 상태에서 함께 존재하는 물질들 전부 혹은 일부를 제거함으로써 분리되는 것이다. 이러한 폴리펩타이드는 적어도 90% 이상의 순도를 지녀야 하며, 바람직하게는 95%, 더욱 바람직하게는 99% 이상의 순도를 가져야 한다. 폴리뉴클레오타이드는 벡터 내에서 클로닝 시킴으로써 분리된다.

[0029] 하지만, 본 발명에 따른 펩타이드나 핵산이 전술한 서열식별번호:1에 기재된 아미노산 서열이나 서열식별번호:2에 기재된 염기 서열만으로 한정되는 것은 아니다. 주지된 것처럼, 핵산 분자의 코돈(codon)은 대부분 2개 이상의 아미노산을 암호화(encoding)하도록 축퇴(degeneracy)되어 있는 관계로, 전술한 핵산의 염기 서열에서의 변이가 일어나더라도 최종적으로 동일한 단백질이 발현되는 경우가 많다. 뿐만 아니라 후술하는 것처럼 펩타이드를 구성하는 아미노산이 다른 아미노산으로 변이되더라도 동일한 기능을 가질 수 있다는 점은 잘 알려져 있다.

[0030] 즉, 본 발명은 서열식별번호:2로 표시되는 염기 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드 이외에도, 서열식별번호:1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드와 동일한 아미노산을 암호화하는 코돈, 서열식별번호:1로 표시되는 아미노산으로 이루어지는 펩타이드와 생물학적으로 균등한 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다. 특히, 본 발명의 펩타이드를 암호화하기 위해서 제공되는 핵산 서열에는 펩타이드의 발현을 위해 필요한 전사 조절 서열 등이 포함되는 재조합 핵산일 수도 있다. 펩타이드를 암호화하는 핵산은 유전자 재조합 기술을 사용하여, 예를 들어 적절한 벡터 사이에 삽입하거나 PCR 기법 등을 통해서 제작, 증폭시킬 수 있으며, 또는 화학적 합성법에 의해서 합성할 수 있다.

[0031] 특히, 단백질을 이루는 아미노산이 변형되더라도 해당 단백질의 생물학적 기능에 전혀 영향을 미치지 않거나 오히려 원래의 단백질의 기능을 강화하기도 한다는 점은 잘 알려져 있다. 이러한 의미에서 본 발명과 관련해서 사용될 수 있는 펩타이드는 서열식별번호:1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드에서 1개 이상의 아미노산이 치환 및/또는 추가된 서열로 이루어질 수 있다. 이와 같은 이른바 '보존적 치환(conservative substitution)'은 특히 아미노산 곁사슬(side chain) 치환기의 소수성/친수성, 크기, 전하 여부와 같은 상대적인 유사성에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 각각의 아미노산 곁사슬에 따른 소수성 인덱스(hydrophobic index)라든가 친수성 값(hydrophilic value) 등을 고려하여 보존적 치환 여부를 고려해 볼 수 있다.

[0032] 예를 들어 소수성 아미노산인 알라닌(A), 발린(V), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 티로신(W), 트립토판(W), 프롤린(P) 사이의 변이; 친수성 아미노산인 라이신(K), 아르기닌(R), 히스티딘(H), 아스파르

트산(D), 아스파라진(N), 시스테인(C), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 세린(S), 트레오닌(T) 사이에서의 변이; 지방족 측쇄를 갖는 아미노산인 글리신(G), 알라닌(A), 발린(V), 류신(L), 이소류신(I), 프롤린(P) 사이에서의 변이; 수산기를 포함하는 측쇄를 가지는 아미노산인 세린(S), 트레오닌(T) 및 티로신(Y) 사이에서의 변이; 염기를 포함하는 측쇄를 갖는 아미노산인 아르기닌(R), 라이신(K) 및 히스티딘(H) 사이에서의 변이, 카르복실산과 아미드를 포함하는 측쇄를 갖는 아미노산인 아스파르트산(D), 아스파라진(N), 글루탐산(E), 글루타민(Q) 사이에서의 변이; 황 원자를 포함하는 측쇄를 갖는 아미노산인 시스테인(C) 및 메티오닌(M) 사이에서의 변이; 방향족 측쇄를 갖는 아미노산인 히스티딘(H), 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W) 사이에서의 변이를 갖는다. 아울러, 알라닌(A), 글리신(G) 및 세린(S)은 유사한 크기를 갖는다는 점에서 단백질의 활성에 큰 변화가 없는 변이체를 이룰 수 있다. 대표적으로는 (1) 알라닌(A)/글리신(G), (2) 아스파르트산(D)/글루탐산(E), (3) 아스파라진(N)/글루타민(Q), (4) 라이신(K)/아르기닌(R), (5) 류신(L)/이소류신(I)/발린(V)/메티오닌(M), (6) 페닐알라닌(F)/티로신(Y)/트립토판(W), (7) 세린(S)/트레오닌(T), (8) 시스테인(C)/메티오닌(M) 사이에서의 변이이다.

[0033] 용어 "대체가능한 변이체(substitutional variant)"는 아미노산 서열 중에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 대체 또는 결실되었으나 번역세포에 의해 특이적으로 인지되는 특성은 유지하는 분자를 의미한다. 대체가능한 변이체의 아미노산 서열은 원래의 아미노산 서열과 적어도 80%의 상동성(identity)을 갖는 것이 바람직하며 적어도 90% 이상의 동일성을 갖는 것은 더욱 바람직하다.

[0034] 결국, 전술한 아미노산 사이의 균등한 생물학적 활성을 갖는 변이를 고려한다면 본 발명과 관련된 펩타이드 또는 이를 암호화하는 핵산이 서열목록에 기재된 것과 실질적으로 균등한 활성을 갖는 펩타이드 또는 핵산도 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0035] 폴리펩타이드는 재조합 방법(recombinant means) 또는 화학적 합성을 통해 재조합으로써 분리될 수 있다. 본 명세서 상에 언급된 핵산의 염기 서열에 의해 암호화(encode)되는 재조합 폴리펩타이드는 알려져 있는 많은 발현 벡터들 중 어느 것을 이용하든지 간에 공지된 방법으로 손쉽게 제조될 수 있다. 발현은 재조합 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질전환 된 적절한 숙주 세포(host cell) 내에서 일어날 수 있다. 적절한 숙주 세포는 원핵세포들(prokaryotes), 효모(yeast) 및 진핵세포들(eukaryotes)이 포함된다. 일례로, 대장균, 효모 또는 포유동물 세포주(Cos 또는 CHO 등의)를 숙주세포로 이용하는 것이 바람직하다. 재조합 단백질의 정제를 위해서는 먼저 수용성의 숙주/벡터 시스템에서 얻은, 배양액으로 분비된 재조합 단백질을 포함하는 상청액을 시판되는 필터를 이용하여 농축시킨다. 다음 단계로 수득된 농축액을 친화 매트릭스(affinity matrix) 또는 이온교환수지(ion exchange resin) 등의 적절한 정제 매트릭스(purification matrix)를 이용하여 정제한다. 마지막으로 한 단계 또는 여러 단계의 역상(reverse phase) HPLC를 수행함으로써 순수한 재조합 단백질을 얻을 수 있다.

[0036] 화학적 합성 방법은 펩타이드 합성용 유기 합성기기를 이용하여 고체상 펩타이드를 합성하는 방법을 들 수 있다. 예를 들어, 이러한 폴리펩타이드들은 상용화되어 있는 고상 기법(solid-phase techniques), 즉 성장하는 아미노산 사슬에 순차적으로 아미노산을 부가시키는 메리필드 고상법(Merrifield solid-phase synthesis method)으로 합성할 수 있다(Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2146-2149). 폴리펩타이드의 자동 합성을 위한 장비는 퍼킨 엘머/어플라이드 바이오시스템(Perkin Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) 등의 공급사로부터 구입이 가능하며 공급자의 매뉴얼에 따라 조작이 가능하다.

[0037] 본 발명과 관련해서 전술한 펩타이드를 직접 숙주 세포 내로 트랜스펙션(transfection)할 수도 있으나, 그 펩타이드를 암호화하는 핵산이 숙주 세포 내로 도입되는 방법을 고려해 볼 수 있다. 예를 들어 본 발명에 따른 펩타이드를 암호화하는 핵산이 적절한 벡터 내에 클로닝(cloning)될 수 있도록 삽입될 수 있다.

[0038] 용어 "벡터(vector)" 는 숙주세포에 전달이 가능하며 바람직하게는 하나 또는 그 이상의 목적하는 유전자 또는 서열의 발현도 가능하도록 만들어진 구조물(construct)을 의미한다. 예를 들면 벡터에는 바이러스 벡터(viral vectors), DNA 또는 RNA 발현 벡터(expression vectors), 플라스미드(plasmid), 코스미드(cosmid) 또는 파지벡터(phage vectors), CCA(cationic condensing agents)와 연결된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜(liposomes)으로 포장된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 프로듀서 세포(producer cells)와 같은 특정 진핵세포(eukaryotic cells) 등이 포함된다.

[0039] 이러한 의미에서 본 발명에 따른 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터로서는 염색체, 에피솜 및 유도된 바이러스와 같은 수많은 발현 시스템이 사용될 수 있다. 보다 구체적으로 사용할 수 있는 재조합 벡터로는 미생물성 플라스미드, 트랜스포존, 효모 에피솜, 삽입 인자, 효모 염색체 인자, 바콜로바이러스와 같은 바이러스, SV40과 같은 유두종바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스, 레트로바이러스

스, 계두 바이러스, 가성광견병 바이러스로부터 유래한 것이 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 이들 재조합 벡터는 또한 코스미드 또는 파지미드 유도체일 수 있다.

[0040] 이때, 예를 들어 펩타이드를 암호화하는 핵산이 DNA인 경우에는 이른바 'naked DNA' 방법을 활용하거나 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터를 활용할 수 있으며, 원핵세포 또는 진핵세포를 대상으로 하는 벡터로서 서열식별번호:1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드를 암호화하는 핵산, 예를 들어 서열식별번호:2의 염기 서열로 이루어지는 핵산이 발현 가능한 형태로 포함될 수 있다. 본 명세서에서 '발현 가능한 형태로'라는 용어는 핵산이 숙주 세포에 도입되면, 엔테로바이러스 70에 대한 면역을 유발하는 펩타이드가 생체내에서 발현되는 것을 의미한다.

[0041] 만약, 벡터를 사용하는 경우에는 전사를 진행할 수 있는 강력한 프로모터(promoter)를 사용할 수 있으며, 원핵세포를 숙주로 하는 경우라면 벡터는 펩타이드로의 번역을 개시하기 위하여 리보솜 결합 부위(RBC) 및 전사/번역 종결 서열을 포함할 수 있다. 원핵세포를 대상으로 제작되는 벡터에 포함될 수 있는 프로모터로는 tac 프로모터, lac 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터 등 일반적으로 공지된 임의의 프로모터를 사용할 수 있다. 이와 같은 플라스미드 벡터로서는 당업계에서 일반적으로 사용되는 플라스미드, 예를 들어 pSC101, pBR322, pUC19, pET-22 등을 사용할 수 있다. 일례로 본 발명의 실시예에서는 *E. coli* 발현 벡터인 pSCherry2 플라스미드 벡터를 사용하였으나, 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터가 이에 한정되지 않는다.

[0042] 반면, 진핵세포를 숙주로 하는 경우라면 포유동물 세포에서 유래된 프로모터(메탈로티아닌 프로모터) 라든가 포유동물 바이러스에서 유래된 프로모터를 사용할 수 있다. 다시 말하면, 본 발명의 벡터로서 바이러스를 사용하고자 하는 경우, 서열식별번호:1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드를 암호화하는 핵산, 예를 들어 서열식별번호:2의 염기 서열로 이루어지는 핵산을 발현시키기 위해서 백신시아(vaccinia) 또는 플로폭스(flowpox)와 같이 약독화된 바이러스는 물론이고 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated virus) 벡터, 레트로바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 무독성 탄저병 독소 벡터 등을 들 수 있고, 이때, 예를 들어 아데노바이러스 후기 프로모터, 백신시아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터와 같은 포유동물 바이러스 유래의 프로모터가 사용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 벡터는 발현되는 펩타이드의 정체를 용이하기 위해서 다른 서열과 융합(fusion)될 수 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질 (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6 x His (hexahistidine) 등이 있고, 가장 바람직하게는 6 x His이다. 상기 정체를 위한 추가적인 서열 때문에, 숙주에서 발현된 펩타이드는 친화성 크로마토그래피를 통하여 신속하고, 용이하게 정제될 수 있다. 예를 들어, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 6x His이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 칼럼 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 발현된 펩타이드를 신속하고 용이하게 얻을 수 있다.

[0044] 즉, 본 발명과 관련하여서 서열식별번호:1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 숙주 세포 내로 전달시키기 위해 사용되는 벡터는 일종의 유전자 전달체로서, 목적하는 핵산 분자는 발현 조절 부위에 작동 가능하게 연결된다. '작동 가능하게 연결된(operably linked)'란, 목적하는 핵산의 발현 조절 부위(프로모터, 시그널 서열, 인핸서, 전사조절인자 결합 위치)와 다른 핵산 사이의 기능적인 결합을 의미한다.

[0045] 따라서 본 발명에 따르면, 펩타이드를 암호화하는 핵산을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 임의의 유전자 전달체를 포함하는데, 이 유전자 전달체는 예를 들어 naked 재조합 DNA, 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터 또는 naked 재조합 핵산 또는 플라스미드를 내포하는 리포솜 또는 니오솜의 형태로 제작될 수 있다.

[0046] 한편, 본 발명에 따른 상술한 벡터를 안정적으로 발현시키기 위해서 당업계에서 통상적으로 사용되는 숙주 세포를 활용할 수 있다. 예를 들어 *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 쉼린겐시스(*Bacillus Thuringiensis*, BT), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다. 진핵 세포로서의 숙주 세포에는 사카로미세 세레비시아(*Saccharomyce cerevisiae*)와 같은 yeast 세포, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주 등이 이용될 수 있다. 이 숙주 세포는 서열식별번호:1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드를 발현시키는 분리된 세포이거나 배양된 세포일 수 있다. 이 숙주 세포는 생식 세포이거나 체세포일 수 있으며, 줄기 세포 또는 분화된 세포일 수 있으며, 일례로 포유동물의 눈에서 유래된 세포일 수 있다.

- [0047] 적절한 재조합 발현 벡터, 예를 들어 히스티딘 태그를 가지는 플라스미드 벡터에 PCR 기법을 활용하여 펩타이드를 암호화하는 염기로 이루어지는 핵산을 클로닝하여 재조합 벡터를 제조한 뒤, 숙주인 대장균 내에서 펩타이드의 형태로 대량 발현한 뒤, 순수 정제하는 단계를 통하여 제조될 수 있다. 이때, 펩타이드를 암호화하는 염기와 별도로 다른 펩타이드를 암호화하는 염기를 동시에 삽입하여 융합 단백질의 형태로 발현시킬 수도 있다.
- [0048] 한편, 하나의 예시적인 실시형태에서, 피볼린-1 단백질에 의해 골분화가 촉진되는 줄기세포는 인간 줄기세포이며, 인간 중간엽 유래의 줄기세포일 수 있다. 일례로, 피볼린-1 단백질의 처리에 의하여 골분화가 촉진되는 줄기세포는 인간 하비갑개 유래 중간엽 줄기세포(human turbinate-derived mesenchymal stem cell, hTMSC)일 수 있다.
- [0049] hTMSC는 CD14, CD19, CD34, HLA-DR에 대하여 음성이며, CD29, CD73, CD90에 양성으로서, 통상적인 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)의 특성을 보여주고 있다. 다른 종류의 MSC와 마찬가지로 hTMSC는 시험관 내(*in vitro*)에서 신속하게 증식하고, TGF- β 또는 IGF-1과 같은 성장인자를 가지는 3차원 스캐폴드에서 시험관 내 배양을 통하여 연골형성 표현형을 향하여 진행될 수 있다. 또한, hTMSC는 골형성 단백질-2(bone morphogenic protein-2, BMP-2)에 의하여 유사-조골세포(osteoblast-like)로 시험관 내에서 분화되거나, 생체 내(*in vivo*)에서는 하이드로겔 시스템에서 유사-골 조직으로 분화될 수 있다. 따라서 hTSMC는 조직 공학 및 재생 의학 분야에서는 잠재적인 세포 원으로 고려되고 있다.
- [0050] 본 발명의 예시적인 실시예에 따르면, 피볼린-1은 폴리스티렌과 같은 플라스틱 표면에 균일하게 코팅되며(도 2 참조), 특히 hTMSC에 대한 세포 흡착 활성을 크게 향상시킨다(도 3 참조). 일례로 재조합 방법을 통하여 합성된 피볼린-1은 hTMSC의 골 분화능과 관련해서, 시험관 내에서의 세포 분화, 매트릭스 무기질화 등의 조골세포 분화의 특징적인 형태를 보여주고 있다(도 4 참조). 특히, 피볼린-1은 조골세포 분화의 초기 마커인 ALP 분석 및 Alizarin Red S(ARS) 염색에서도 특징적인 골 분화 유도 형태를 보여준다(도 5 및 도 6 참조).
- [0051] 골 형성은 조골세포 전구체가 편입됨으로써 개시되는데, 이 전구체는 조골세포로 분화하여 성숙하게 되며, 조골세포는 추후에 무기질로 침착되는 콜라겐을 분비하여 골을 형성한다. 이와 같이 ALP 활성의 증가와 Alizarin Red S 염색 세포의 증가는 피볼린-1으로 처리된 hTMSC에서 조골세포로의 골 분화가 발생하였다는 것을 의미한다. 특히, 도 6에 도시한 것과 같이, Alizarin Red S 염색에 의하여 검출된 무기질화된 세포는 피볼린-1의 처리에 의하여 hTMSC의 골 분화가 유도되었다는 것을 보여준다. 뿐만 아니라, 본 발명에 따르면 피볼린-1으로 처리된 hTMSC에서 골 형성과 관련된 마커 유전자, 일례로, TAZ, ALP, 콜라겐 I (Col I), OCN 유전자의 발현이 크게 증가한다.
- [0052] TAZ(PDZ-결합 모티프를 가지는 전사 공동활성인자; transcriptional co-activator with PDZ-binding motif)는 중배엽 세포에서 지방세포로의 분화를 차단하면서, 조골세포로의 분화를 유도하는 전사 공동활성인자(transcriptional coactivator)이다. 특히, TAZ는 생체 내에서 골 형성을 긍정적으로 제어하는데, Runx2 및 TGF- β 시그널링 촉진시킴으로써 이들 인자의 발현을 매개한다. 따라서 TAZ는 중배엽 줄기세포의 조골세포로의 분화에 필수적이며, 조골세포 마커 유전자일 수 있다.
- [0053] 또한, ALP는 ECM의 무기질화와 관련된 이펙터 단백질(effector protein)로서, ALP 단백질과 mRNA는 모두 골 분화의 진화를 평가하는데 사용될 수 있다. 골 조직에서, ALP는 발생 초기단계에서 발현되며, 세포 표면과 기질 소포(matrix vesicle)에서 발견되며, 발생 프로그램 후기에는, 다른 유전자가 상향 조절되며, ALP 발현은 감소한다. 본 발명에 따르면, 피볼린-1으로 처리한 hTMSC에서 ALP 유전자의 발현이 증가하였는데, 이러한 결과는 9 일 동안 피볼린-1으로 처리한 hTMSC에서 ALP 활성이 증가한 것(도 5 참조)을 뒷받침한다.
- [0054] 타입-I 콜라겐(Col I)은 골 세포의 기질의 주요 구성 성분이며, 골 분화 과정에서 Col I은 무기질화되어 골을 형성한다. Col I의 합성 이후에, 오스테오칼신(osteocalcin, OCN)이 이어서 발현되는데, OCN은 조골세포에서만 분비되며, 조골세포 분화의 최종 단계의 마커로 고려되고 있다. 본 발명에 따르면, 피볼린-1으로 처리한 hTMSC에서 OCN의 발현이 또한 증가하였다(도 7 참조).
- [0055] 하나의 예시적인 실시형태에서, 피볼린-1 단백질은 줄기세포의 골분화 촉진용 조성물 중에 0.001 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도, 바람직하게는 0.1 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함될 수 있지만, 본 발명에 이에 한정되지 않는다. 유효 성분으로서의 피볼린-1 단백질의 함량이 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 미만인 경우에는 줄기세포의 골분화 촉진 효과가 일어나지 않을 수 있으며, 피볼린-1 단백질의 함량이 10 $\mu\text{g/mL}$ 을 초과하는 경우에는 사멸하는 세포가 증가할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 피볼린-1 단백질을 유효 성분으로 포함하는 줄기세포의 골분화 촉진용 배지에 관한 것이다. 줄기세포의 골분화 촉진용 배지는 줄기세포를 배양하기 위해 통상적으로 이용되는 임의

의 배지를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 배지는 최소필수배지(Minimal Essential Medium, MEM), 돌베코 변형 이글 배지(Dulbeco's Modified Eagle's Medium, DMEM)는 물론이고, BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)등과 같은 기본 배지, 또는 골분화를 유도할 수 있는 성분이 함유된 배지일 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되지 않는다.

[0057] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 피블린-1 단백질을 줄기세포에 처리하는 단계와, 필요에 따라 피블린-1 단백질이 처리된 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 골분화를 촉진하는 방법에 관한 것이다. 골분화 촉진의 대상이 되는 줄기세포는 시험관 내(*in vitro*) 상태일 수 있고, 피블린-1 단백질은 줄기세포 배양용 배지의 형태로 줄기세포에 처리될 수 있다. 선택적으로, 골분화를 촉진하기 위하여, 줄기세포는 3차원 지지체에서 배양될 수 있다. 상기 지지체를 구성하는 성분은 생체적합성(biocompatible) 물질을 사용할 수 있고, 지지체에서 배양되어 분화된 조골세포는 지지체로부터 별도로 분리하지 않고 골질환 치료를 위하여 지지체에 부착된 상태로 생체에 이식될 수 있다.

[0058] 일례로, 배양은 시험관 내(*in vitro*) 상태 또는 생체 내(*in vivo*) 상태에서 수행될 수 있으며, 시험관 내 상태에서 배양 절차가 이루어지는 경우, 이산화탄소(CO₂) 배양기에서 수행될 수 있다. CO₂ 배양기 내에서의 배양은 CO₂ 농도가 3 내지 15%인 환경에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 5 내지 10%에서 수행될 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되지 않는다.

[0059] 또한, 배양은 25 내지 45℃의 온도 범위에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 30 내지 40℃에서 수행될 수 있으나 본 발명이 이에 한정되지 않는다. 배양 온도가 전술한 범위를 벗어난 경우에는 줄기세포의 골형성 분화가 원활하게 촉진되지 않고, 사멸되는 줄기세포가 증가할 수 있다.

[0060] 배양은 예를 들어 1 내지 20일, 바람직하게는 1 내지 15일, 더욱 바람직하게는 4 내지 15일 동안 지속적으로 수행될 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되지 않는다. 배양 기간이 20일을 초과할 때, 배양 용기 내의 세포 밀도가 높아지면서 영양 성분이 빠르게 고갈되고, 세포 특성이 변하면서 조골세포로의 분화가 유도되지 않을 수 있다. 필요하다면, 배양 기간 동안 계대배양을 수행하여 세포군을 나누어 배양할 수도 있다.

[0061] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 본 발명의 골분화 촉진용 조성물에 의하여 분화된 조골세포를 유효 성분으로 포함하는 골결손 질환 및/또는 골다공증과 같은 골대사 질환을 치료 또는 예방하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따라 분화된 조골세포는 예를 들어 콜라겐이나 히드록시아파타이트 스캐폴드 등 다양한 생체보조제와 혼합하여 외과수술로 골조직에 이식할 수 있다. 본 발명의 치료용 조성물은 상기 분화된 조골세포 외에 보조성분으로서 콜라겐이나 골지지체 등을 더 함유할 수 있다.

[0062] 이때, 본 발명의 골분화 촉진용 조성물에 의하여 분화된 조골세포를 유효 성분으로 포함하는 골결손 질환 및/또는 골대사 질환을 치료 또는 예방하는 약학 조성물은 유효 성분인 조골세포를 포함한다면, 약학적으로 허용할 수 있는 액상의 무균성 용액, 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용할 수 있다. 예를 들면, 약리학상 허용되는 담체 혹은 매체, 구체적으로는, 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 부형제, 비히클(vehicle), 방부제, 결합제 등과 적당히 조합하여, 일반적으로 인정된 제약 실시예에 요구되는 단위 용량 형태로 혼화하는 것에 의해 제제화하는 것을 고려해 볼 수 있다.

[0063] 예를 들어, 주사를 위한 무균 조성물은 주사용 증류수와 같은 부형액을 이용해 통상의 제제 실시예에 따라 처방할 수가 있다. 주사용의 수용액으로서는, 예를 들면 생리 식염수, 포도당이나 그 외의 보조약을 포함한 등장액, 예를 들면, D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 염화나트륨을 들 수 있으며, 적당한 용해 보조제, 예를 들면 알코올, 구체적으로는 에탄올, 폴리 알코올, 예를 들면 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 예를 들면 폴리소르베이트 80(TM), HCO-50으로 병용할 수 있다. 유성액으로서는 참기름, 콩기름을 들 수 있어 용해 보조제로서 안식향산벤질, 벤질 알코올과 병용할 수 있다.

[0064] 또한, 완충제, 예를 들면 인산염 완충액, 초산나트륨 완충액, 무통화제, 예를 들면, 염산 프로 카인, 안정제, 예를 들면 벤질 알코올, 페놀, 산화 방지제와 배합할 수 있다. 조제된 주사액은 통상, 적당한 앰플에 충전시킨다.

[0065] 환자의 체내에의 투여는 바람직하게는 비경구 투여이며, 구체적으로는 정맥에의 1회 내지 3회의 투여가 기본이지만 그 이상의 투여라도 좋다. 또, 투여 시간은 단시간이라도 장시간 지속 투여라도 좋다. 더욱 구체적으로는, 주사 제형, 경피투여형 등을 들 수 있다. 주사 제형의 예로서는 예를 들면, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 선택적

동맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피하주사, 뇌실내 주사, 뇌내 주사, 골수액강내 주사 등에 의해 투여할 수 있지만, 바람직하게는 정맥내 주사이다.

[0066] 이하, 예시적인 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명하지만, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다. 하기 실험은 모두 3회 수행되었으며, 데이터는 평균±표준편차로 표시된다. 그룹 사이의 통계적 분석은 SAS 프로그램을 사용하여 수행되었다. 2개 그룹 사이의 차이는 학생 t-테스트를 사용하여 분석되었다. 모든 통계 분석에서 P 값 < 0.05는 유의미한 것으로 간주되었다(* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001).

[0067] **실시예 1: 재조합 벡터를 이용한 피볼린-1 발현**

[0068] 서열식별번호:1의 아미노산으로 이루어지는 피볼린-1 단백질을 암호화하는 cDNA를 성인 인간 cDNA 라이브러리로부터 증폭하였다. 서열식별번호:2의 duarlfh 이루어지는 피볼린-1 cDNA를 증폭하기 위하여, 피볼린-1의 아미노기 말단 앞에 *Kpn I* 인식 부위를 가지는 정방향 프라이머(서열식별번호: 3; 5'-TGGTACCGAGTGGACGCGGATGTC-3')와, 피볼린-1의 카르복실기에 *EcoR I* 인식 부위를 가지는 역방향 프라이머(서열식별번호:4, 5'-TGAATTCCTCATTGATGTCTTCACATGAC-3')의 인간 피볼린-1을 인식할 수 있는 프라이머를 설계하였다. PCR 반응 용액은 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 100 µg/mL 젤라틴, 0.2 mM dNTPs, 1.25 unit의 Taq 중합효소로 이루어진 30 µL의 PCR 반응 혼합액(Elpis Biotech, 대전, 대한민국)과 각각의 프라이머 50 pmol로 이루어져 있다. PCR은 55°C에서 1분(annealing), 72°C에서 1분(extension), 94°C에서 1분(denaturation)으로 이루어지는 사이클을 30회 반복하였다.

[0069] 증폭 산물을 *Kpn I*과 *EcoR I*을 이용하여 절단하고, 재조합 피볼린-1을 구축하기 위하여, *E. coli*의 RNA 중합효소에 비하여 유전자의 전사를 5배 향상시키는 T7 박테리오파지 프로모터와, 미생물이 재조합 단백질을 생성할 때 안정화 시스템을 만드는 미생물의 antidote/poison인 *ccdA/ccdB* 유전자와, cherry tag와, 적색 폴리펩타이드를 암호화하는 작은 서열을 함유하고 있는 pSCherry2/His 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 *Kpn I*과 *EcoR I* 사이트로 라이게이션하였다.

[0070] 재조합 피볼린-1 단백질을 발현하기 위하여, *E. coli* SE1 세포를 100 µg/mL의 암피실린을 함유하는 Luria-Bertani 배지(LB-Amp)에서 37°C에서 밤새 성장시켰다. 배양액이 0.6의 A600에 도달하였을 때, 100 mM IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 4시간 후, 10분 동안 6,000 g에서 원심분리하여 미생물을 침전시키고, 세포를 용출하고, 초음파로 파쇄하였다. 용출 추출물을 냉장 원심분리기에서 30분 동안 13,000g에서 원심분리하고, 상청액(supernatant)을 새로운 튜브로 옮겼다.

[0071] 재조합 피볼린-1을 니켈(Ni)-니트릴로아세트산(NTA) 레진을 이용한 친화 정제법으로 정제하였다. 제조사(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 지시에 따라 피볼린-1 단백질의 아미노기 말단에 위치하는 6-His 태그를 니켈-니트릴로아세트산 레진 컬럼에 결합하여 초음파로 파쇄한 미생물 상청액에서 수득한 조 단백질을 정제하였다. 재조합 단백질의 정제 정도를 12%(V/V) SDS-PAGE 겔의 쿠마시 블루 염색을 사용하는 denaturing 조건 하에서 측정하였다. 사전-염색된 단백질의 분자량 마커(Elpis Biotech, 대전, 대한민국)을 평행선으로 전기영동하였다.

[0072] 전기영동 후, 단백질을 Hybond ELC 멤브레인(Amersham, GE Healthcare Life Science)로 옮기고 웨스턴-블롯팅을 수행하였다. 탈지유를 사용하여 비-특이적인 결합을 방지하였다. 단클론 항-폴리히스티딘 항체의 과산화효소 컨쥬게이트(sc-8036, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)가 1:1000으로 사용되었다. 항체에 결합된 재조합 피볼린-1을 제조사의 프로토콜(Amersham)에 따라 화학발광을 통하여 검출하였다. IPTG에 의해 유도되어, *E. coli* SE1은 74 kDa의 분자량을 가지는 단백질을 생성하였는데, 이는 cherry tag, 피볼린-1, 아미노기 말단의 His6-tag를 가지는 융합 단백질에 대하여 예상된 크기를 가지고 있다. 따라서, 재조합 피볼린-1 단백질이 발현되었음을 확인하였다(도 1 참조).

[0073] **실시예 2: hTMSc 분리 및 배양**

[0074] 수술 과정에서 버려진 조직으로부터 수득된 하비갑개 조직에서 hTMSc를 분리하였다. 분리 과정은 대한민국 가톨릭대학교, 서울성모병원의 기관윤리위원회(IRB)의 승인(승인번호: KC08TSS0341)을 받고 진행하였다. 조직을 항생-항진균(antibiotic-antimycotic) 용액(Gibco, Gaithersburg, MD)로 3-5회 세척하고, 인산염완충용액(PBS)로 3회 세척한 뒤에, 1 mm²의 크기로 조직을 절단하였다. 조직을 배양 접시 위에 놓고, 멸균 글라스 커버 슬라이드로 덮었다. 이어서 조직을 37°C에서 5% CO₂를 함유하는 습한 대기에서, 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 배지에서 인큐베이션 하였다. 배양 배지를 2-3일마다 교환하였다. 배양 3주 후, 글라스 커버 슬라이드

이드를 제거하고, 배양 배지에 떠 있는 조직을 세척으로 제거하였다. 흡착된 세포를 1 mM EDTA에 용해된 0.25% 트립신을 이용하여 분리한 뒤에, 1×10^4 cells/cm²의 밀도로 확장을 위해 대체하였다.

[0075] hTMSC를 37℃에서 5% CO₂ 대기 조건의, 10% FBS, 100 units/mL 페니실린 G 나트륨, 100 mg/mL 황산스트렙토마이신, 0.25 mg/mL 암포테리신 B(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 함유하는 알파-변형 최소필수 배지(Minimum Essential Medium Alpha Modification; α -MEM)에서 배양하였다. 융합성(confluent) 세포를 5분 동안 0.25% 트립신-EDTA를 사용하여 분리하고, 분액(aliquot)을 계대배양하였다. 3세대 동안 유지된 hTMSC를 이후의 세포 부착, 증식 및 분화 시험에 사용하였다.

[0076] 실시예 3: 피블린-1 코팅에 따른 표면 형태 분석 및 세포 흡착 분석

[0077] (1) 표면 형태 분석

[0078] 피블린-1 코팅의 형성 및 표면 분포를 알아보기 위하여, 조직 배양액으로 처리된 폴리스티렌 페트리 접시가 기질로 사용되었다. 폴리스티렌 기질을 0.1 μ g/mL 피블린-1 농도의 피블린-1 용액으로 덮고, 증발을 방지하기 위하여 폐쇄하고 상온에서 밤새 방치하여, 피블린-1이 표면에 부착되도록 하였다. 이어서, 각각의 샘플을 인산완충용액(PBS)로 3회 세척하고, 압축 공기를 사용하여 건조시켰다. 코팅되지 않은 폴리스티렌 샘플이 컨트롤로 사용되었다. 표면의 표면 형태를 알아보기 위하여 원자현미경(AFM; MultiMode, Bruker)을 사용하였다. 표면 영상을 실리콘 팁이 구비된 탭핑 모드(tapping mode; RTESPA-150, Bruker AFM probe)를 사용하여 다음과 같은 조건에서 기록하였다. 힘 상수(force constant) 6 N/m, 공명 주파수 150 Hz, 스캔 속도 0.96 Hz. 모든 샘플에 대하여 3개의 영상 크기(5 X 2.5 μ m)를 기록하였다. 표면 형태 분석 결과, 폴리스티렌 표면에 피블린-1이 균일하고 밀도 있게 코팅된 것을 확인할 수 있었다. 프로파일 분석 결과, 나노 크기의 단백질로 특성을 가지는 피블린-1의 균일한 코팅을 보여준다(도 2의 a) 부분 참조). 반면, 대조군 샘플은 매끈한 표면으로서, 조직 배양 접시에 통상적인 무작위 분포된 스크래치 표면을 보여준다(도 2의 b) 참조). 따라서, 피블린-1이 표면에 존재하며 연속적인 코팅 형상으로 형성되었음을 확인하였다.

[0079] (2) 세포 흡착 분석

[0080] 세포 흡착 활성은 크리스탈 바이올렛 분석(crystal violet assay)을 사용하여 측정하였다. 24-웰 플레이트(well plate)를 500 μ L/웰의 부피 내의 피블린-1의 농도 구배를 사용하여 4℃에서 밤새 코팅하였다(0-1 μ g/mL). 24-웰 플레이트 상의 피블린-1의 코팅은 단백질 흡착 분석을 통해 확인하였다(결과 미도시). 인큐베이션 후에, 각각의 웰을 둘베코 인산완충액(DPBS; Welgene, 경산, 대한민국)을 사용하여 3회 세척한 뒤, 30분 동안 1%(w/v) 우혈청 알부민(BSA, bovogen, 오스트레일리아) 용액으로 차단하였다. hTMSC를 1×10^5 cells/well의 밀도로 플레이트에 접종하고, 37℃에서 5분 동안 인큐베이션 하였다. 흡착 세포를 DPBS를 이용하여 2회 세척하고, 상온에서 15분 동안 3.7%(w/v)의 포르말린 용액으로 고정하였다. 이어서, 세포를 37℃에서 1시간 동안 2%(v/v) 에탄올/물에 용해된 0.25%(w/v) 크리스탈 바이올렛(Sigma, St. Louis, USA)으로 염색하고, DPBS로 3회 세척하였다. 이어서, 세포를 2% SDS 용액으로 용출시키고, 96-웰 플레이트로 옮겼다. 570 nm에서 각각의 웰에 대한 흡광도를 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 판독하였다.

[0081] 본 실시예에 따른 분석 결과를 도 3에 나타낸다. 도 3에 도시한 바와 같이, 피블린-1은 농도-의존적인 세포 흡착 활성을 가지고 있다. 모든 경우에 피블린-1은 확장된 세포 형태를 가지면서 세포 흡착 활성이 대조군에 비하여 증가하였다. 이러한 결과는 피블린-1이 hTMSC에 대하여 상당한 흡착 활성을 가지고 있다는 것을 의미한다. 본 실시예의 결과를 토대로, 피블린-1의 최적 농도는 0.1 μ g/mL라는 것을 확인하였으며, 후속 실험에서 0.1 μ g/mL의 피블린-1을 사용하였다.

[0082] 실시예 4: 세포 증식 분석

[0083] hTMSC에 대한 분화 능력을 알아보기 위하여, 시험관 내에서 조골세포 분화 과정에서 특징적인 세포 증식을 분석하였다. 제조사의 지시(Promega, Madison, WI, USA)에 기술된 바와 같이, 생존 세포의 대사 활성을 측정하는 MTT 생존력 분석(MTT viability assay)을 통하여 세포 증식을 측정하였다. 피블린-1 단백질 용액을 24-웰 플레이트에 0.1 μ g/mL의 농도로 코팅하였다. 이어서, hTMSC를 1×10^4 cells/웰의 밀도로 플레이트에 접종하고, 37℃에서 플레이트를 4일 및 8일 동안 인큐베이션 하였다. 각각의 웰을 DPBS로 3회 세척하고, 각각의 웰에 MTT 500 μ L(DPBS에 용해된 5 mg/mL)을 첨가하였다. 4시간 동안 인큐베이션 한 뒤, 배지를 제거하고, 100 μ L DMSO에 포르마잔 크리스탈(formazan crystal)을 용해시켰다. 570 nm에서 각각의 웰에 대한 흡광도를 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 측정하였다. 세포 증식 분석은 음성 대조군(비처리)과 실험군(피블린-1 처리)를 사용하여

수행되었다.

[0084] 본 실시예에 따른 분석 결과를 도 4에 나타낸다. 대조군과 실험군에서 증식 속도는 0일과 4일 사이에는 차이가 없었으나, 8일째가 되면 피볼린-1으로 코팅된 플레이트에서 배양된 세포의 경우, 대조군과 비교하여 세포 증식에서 유의미한 차이를 보여주었다.

[0085] **실시예 5: 골세포로의 분화 분석**

[0086] (1) 알칼리 인산가수분해효소(ALP) 분석

[0087] ALP 활성과, 무기질화(mineralization)을 평가하기 위하여, hTMSC를 분화-유도 배지에서 0일, 3일, 6일, 9일 동안 1×10^4 cells/웰의 밀도에서 인큐베이션 하였다. 이 배지는 10% FBS, 100 units/mL의 페니실린 G 나트륨, 100 mg/mL 황산스트렙토마이신, 0.25 mg/mL 암포테리신 B, 0.1 μ g/mL 피볼린-1을 함유하는 α -MEM으로 구성되어 있다. 10% FBS와 항생제를 함유하는 α -MEM 배지에서 배양된 hTMSC로 이루어진 음성 대조군이 동시에 평가되었다. 이어서 세포를 DPBS로 세척하고, 37°C에서 5분 동안 1 mM $ZnCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1% 트리톤 X-100을 함유하는 1.5 M Tris-HCl (pH 10.2)를 사용하여 용출시켰다. 10분 동안 4°C에서 원심분리 한 뒤, 알칼리 인산가수분해효소 분석 키트(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 ALP 활성을 위하여 세포 용출물이 분석되었다. 알칼리 인산가수분해효소가 존재 하에서 p-니트로페놀이 생성되며, 마이크로플레이트 판독기(BioRad Laboratories, CA, USA)를 사용하여 405 nm에서 분광 광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다. ALP 활성을 대조군의 활성으로 정규화(normalize)하였다.

[0088] 본 실시예에 따라, 골 분화의 중요한 초기 마커 중의 하나인 ALP 활성 분석 결과를 도 5에 나타낸다. 도 5에 나타난 바와 같이, 피볼린-1으로 처리한 경우 대조군에 비하여 ALP 활성이 크게 증가하였다.

[0089] (2) Alizarin Red S(ARS) 염색

[0090] 피볼린-1에 의한 hTMSC의 골 분화(osteogenic differentiation)을 조사하기 위하여, hTMSC를 분화 배지에서 1×10^4 cells/웰의 농도에서 0일, 4일, 8일, 12일 동안 배양하였다. 세포를 DPBS로 세척하고, 30분 동안 95% 메탄올로 고정된 뒤, Alizarin Red S(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 밤새 염색하였다. 이어서 염색된 세포를 0일, 4일, 8일, 12일에 촬영하였다. 상온에서 30분 동안 10 mmol 인산나트륨(pH 7.0)에 용해된 10%(w/v) 세틸피리디늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride)를 사용하여 양적 탈-염색 과정을 수행하였다. 분광 광도계를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 Alizarin Red S의 농도를 측정하였다.

[0091] 또한, 피볼린-1으로 유도하였을 때, hTMSC의 조골세포-분화 능력을 측정하기 위하여 무기질화 정도를 분석한 결과를 도 6에 나타낸다. 도 6에 나타난 바와 같이, 피볼린-1으로 처리하지 않은 대조군과 비교해서, 피볼린-1으로 처리하고 12일이 경과하면 hTMSC의 무기질화 활성이 크게 강화되었다. 결국, ALP 분석 및 ARS 분석 결과, 피볼린-1 단백질은 hTMSC와 같은 줄기세포의 조골세포로의 분화능을 크게 향상시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[0092] **실시예 6: 정량적 실시간 PCR에 따른 골세포로의 분화 분석**

[0093] Easy-spin RNA 추출 키트(iNtRON, 서울, 대한민국)을 사용하여 총 RNA를 추출하였다. RNA 순도를 260 및 280 nm에서 흡광도 값(A_{260}/A_{280} 비율의 값이 1.9-2.1이면 수용 가능한 것으로 간주됨)과, 겔 전기영동을 사용하여 평가된 18S 및 28S RNA의 에티디움 브로마이드 염색으로 평가하였다. A_{260} 값으로부터 RNA 농도를 측정하였다. 2 마이크로그램의 총 RNA를, 50 unit의 SuperScript II 역전사 효소(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 5 μ M DTT, 40 unit의 RNaseOUT 재조합 리보뉴클레아제 억제제, 0.5 μ M의 랜덤 헥사뉴클레오타이드 프라이머, 500 μ M dNTP 혼합물을 함유하는 20 μ L 반응 혼합물에서 역-전사시켰다. 역전사는 50°C에서 60분 동안 수행되었다. 반응 혼합물을 이어서 15분 동안 70°C로 가열하여 반응을 종료하였다. 수득된 cDNA를 -20°C에서 보관하였다.

[0094] 이어서, 정량적 실시간 PCR을 수행하여 수득된 유전자의 과-발현을 확인하였다. 모든 실시간 PCR 반응을 ABI Step One 실시간 PCR 시스템에서 분석하였다. 각각의 프라이머 0.1 μ M, 2 X SYBR Green PCR 마스터 믹스(Applied Biosystem, 버퍼 용액 내의 AmpliTaq Gold DNA 중합효소, dNTP 믹스, SYBR Green I 염료 및 10 mM $MgCl_2$ 포함) 10 μ L, 주형 cDNA 1 μ L를 함유하는 반응 혼합물 20 μ L에서 각각의 반응을 수행하였다. PCR은 10분 동안 94°C에서 효소를 활성화시킨 뒤에, 15초 동안 94°C에서 denaturation, 1분 동안 60°C에서 annealing, 1분 동안 60°C extension의 40 사이클로 진행하였다. ABI 기기의 자동 문턱 분석 함수를 사용하여 각각의 유전자에 대한 C_T (cycle threshold) 값을 측정하였고, $C_{T(GAPDH)}$ 에 대하여 정규화를 수행하여 $dC_T(= C_{T(GAPDH)} - C_{T(특정 유전)}$

자)를 얻었다. 2개의 C_T 또는 dC_T 값에서 n 의 차이는 비교된 2개의 cDNA 샘플 사이에서 표적 서열에서의 2^n -배의 차이를 나타낸다. 실시간 PCR에서 사용된 골-연관 유전자의 프라이머 서열은 표 1에 정리하였다. 여기서 베타-actin은 내부 control로 사용되었다.

표 1

실시간 PCR에 사용된 프라이머 서열

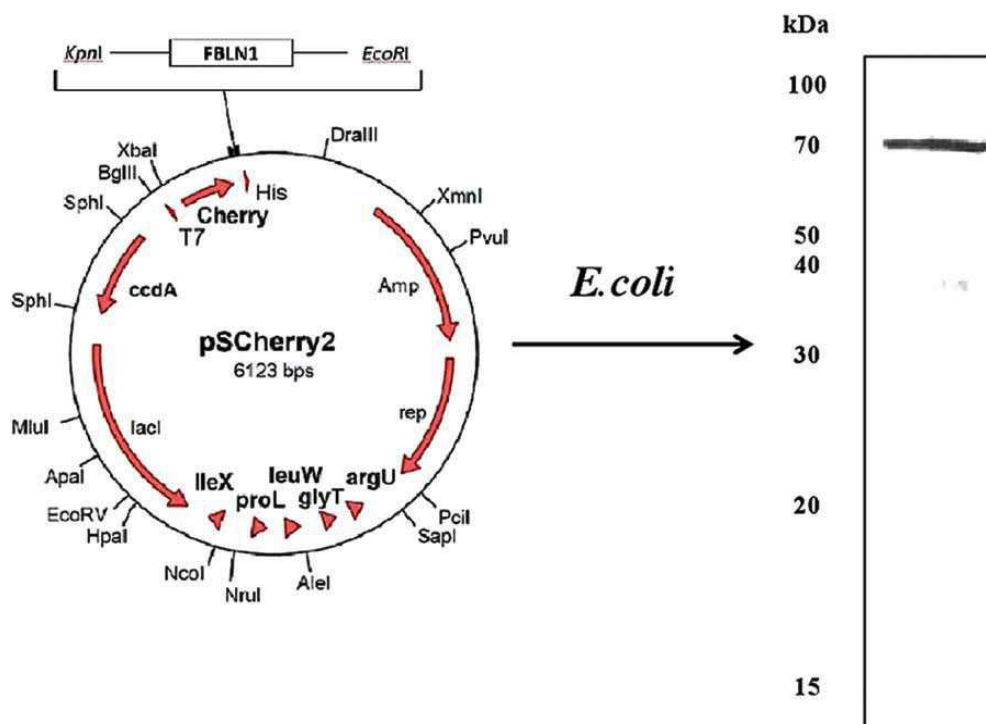
유전자	정방향 프라이머	역방향 프라이머
β -actin	5'-TGGCACCCAGCACAATGAAGAT-3' (서열식별번호:5)	5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3' (서열식별번호:6)
TAZ	5'-ACCGTGTCCAATCACCAGTC-3' (서열식별번호:7)	5'-TGTAGCTCCTTGGTGAAGCA-3' (서열식별번호:8)
ALP	5'-CCAAAGGCTTCTCTTGCTG-3' (서열식별번호:9)	5'-CCACCAAATGTGAAGACGTG-3' (서열식별번호:10)
Col I	5'-GAAAATGGAGCTCCTGGTCA-3' (서열식별번호:11)	5'-ACCCTTAGCACCAACAGCAC-3' (서열식별번호:12)
OCN	5'-GACTGTGAGTTGGCTGA-3' (서열식별번호:13)	5'-AGCAGAGCGACACCTAGAC-3' (서열식별번호:14)

본 실시예에 따른 분석 결과를 도 7에 나타낸다. 4개의 선택된 골 분화 유전자 마커의 mRNA 발현은 피블린-1으로 배양하였을 때 control에 비하여 크게 증가하였다. 특히, 비-처리된 control과 비교해서, TAZ 및 ALP mRNA는 피블린-1으로 처리하면 그 발현이 크게 유도된 것을 알 수 있다.

상기에서는 본 발명의 예시적인 실시형태 및 실시예에 기초하여 본 발명을 설명하였으나, 본 발명이 상기 실시형태 및 실시예에 기재된 기술사상으로 한정되지 않는다. 오히려 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 전술한 실시형태 및 실시예를 토대로 다양한 변형과 변경을 용이하게 추고할 수 있다. 하지만, 이러한 변형과 변경은 모두 본 발명의 권리범위에 속한다는 사실은 첨부하는 청구범위에서 분명하다.

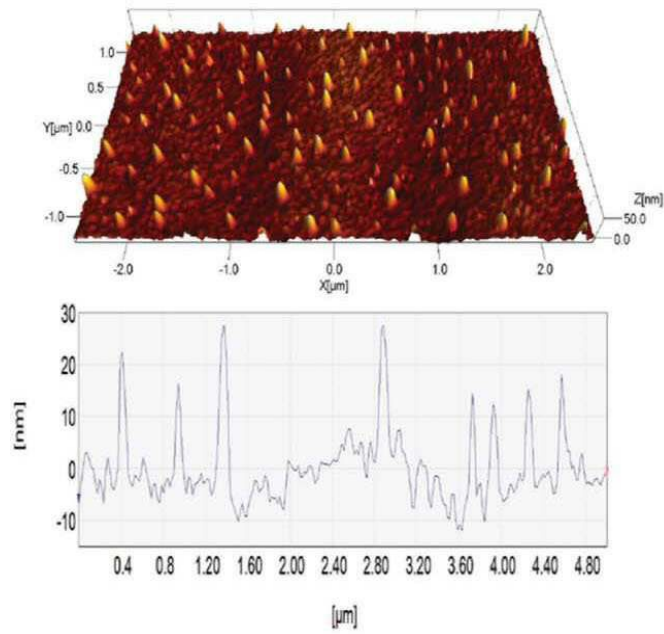
도면

도면1

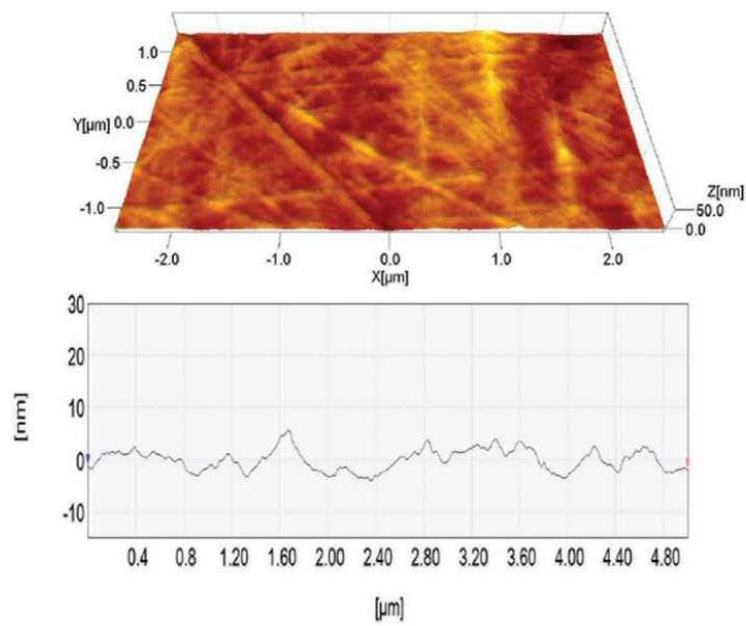


도면2

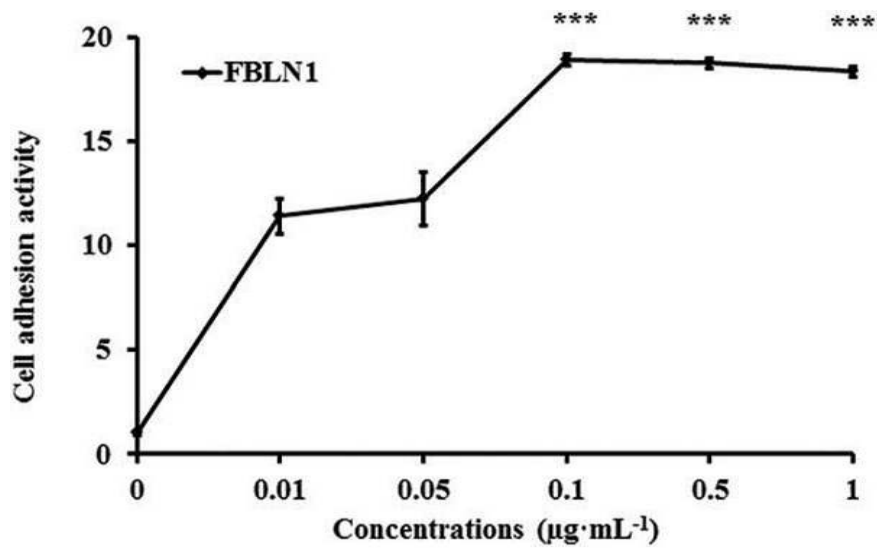
a) FBLN1



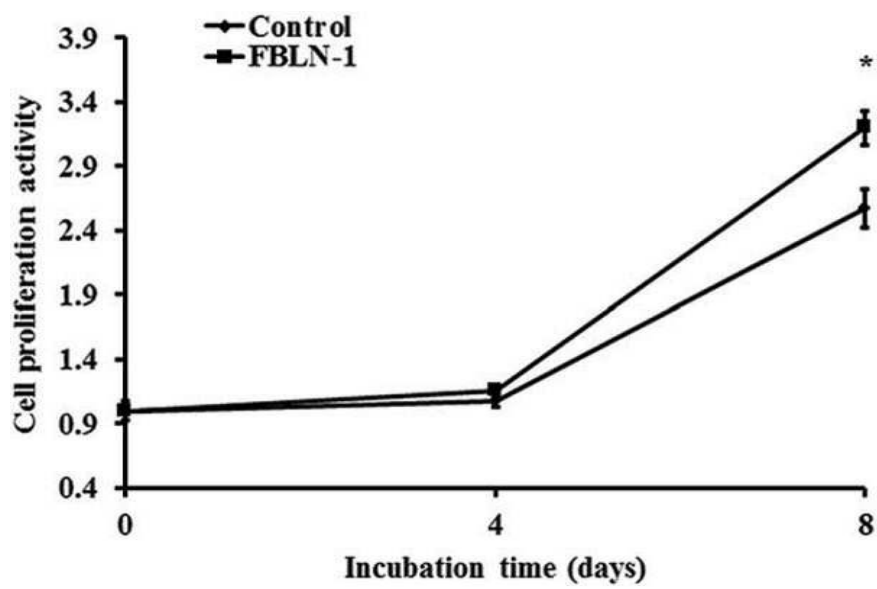
b) control



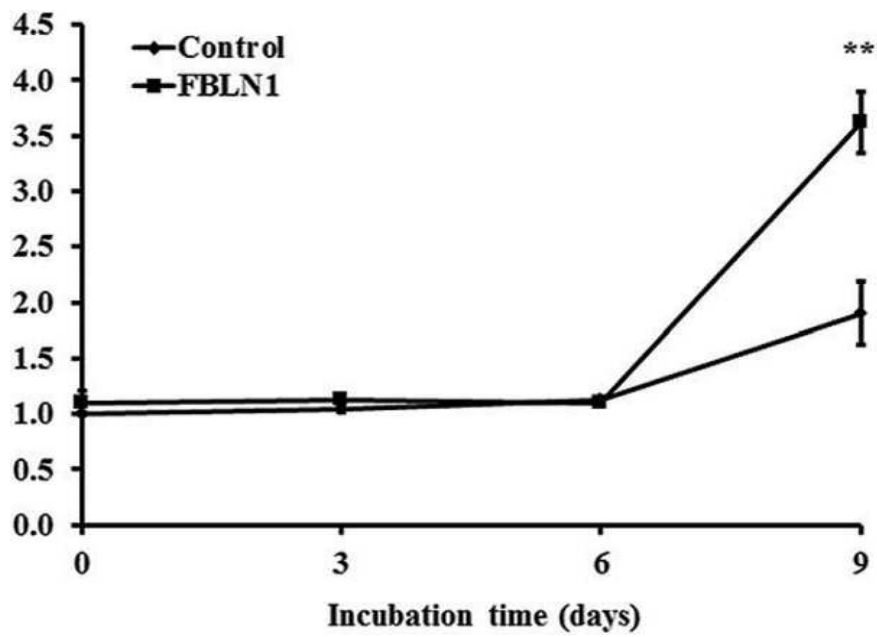
도면3



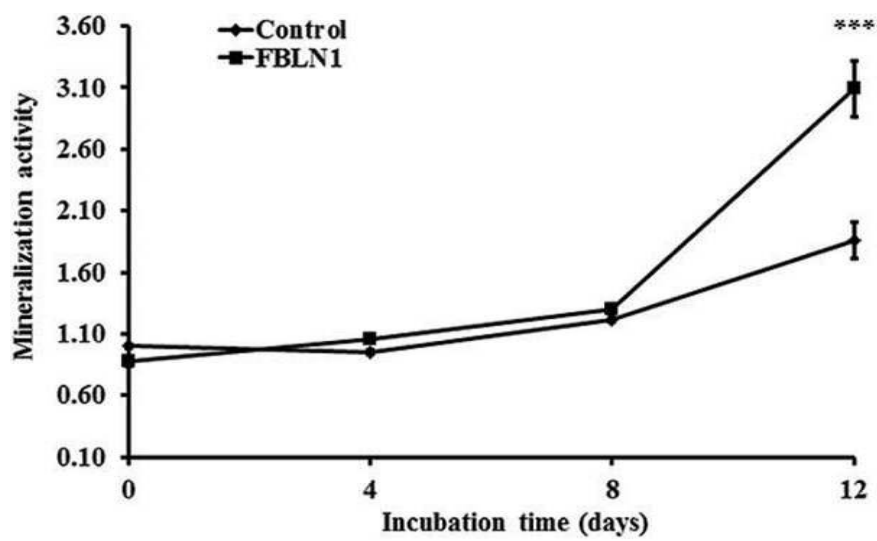
도면4



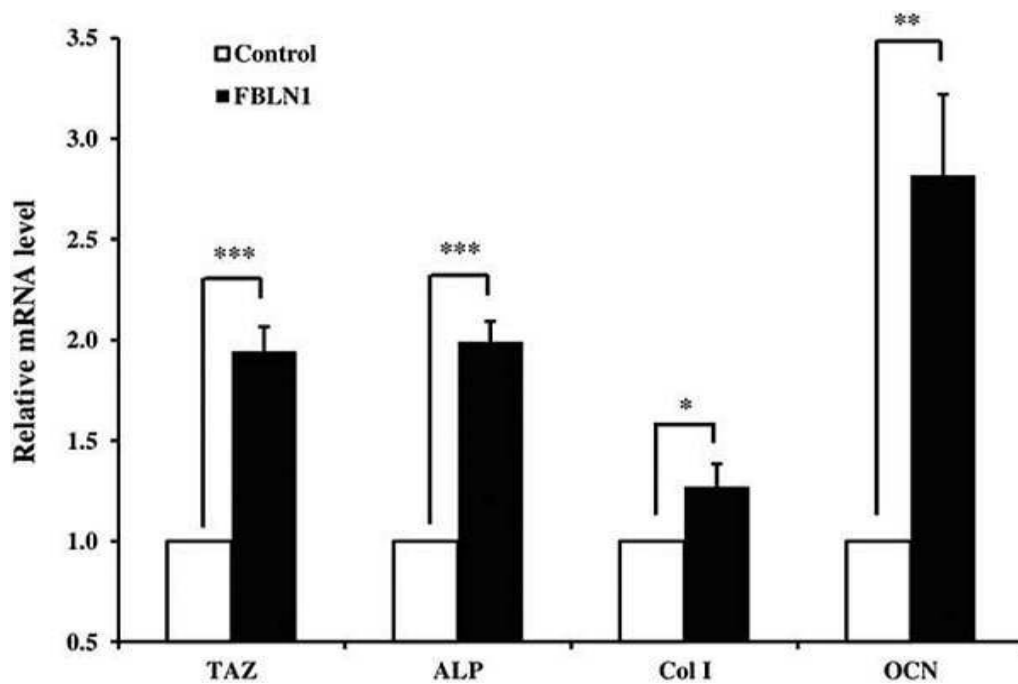
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> Inha University Research and Business Foundation

<120> COMPOSITION FOR PROMOTING DIFFERENTIATION OF STEM CELL INTO
OSTEOBLASTS CONTAINING FIBULIN-1

<160> 14

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 418

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Asp Ala Asp Val Leu Leu Glu Ala Cys Cys Ala Asp Gly His Arg

1 5 10 15

Met Ala Thr His Gln Lys Asp Cys Ser Leu Pro Tyr Ala Thr Glu Ser

20 25 30

Lys Glu Cys Arg Met Val Gln Glu Gln Cys Cys His Ser Gln Leu Glu

35 40 45

Glu Leu His Cys Ala Thr Gly Ile Ser Leu Ala Asn Glu Gln Asp Arg

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

 100 105 110
 Val Phe Arg Ala Cys Cys Val Lys Ser Gln Glu Thr Gly Asp Leu Asp
 115 120 125
 Val Gly Gly Leu Gln Glu Thr Asp Lys Ile Ile Glu Val Glu Glu Glu
 130 135 140
 Gln Glu Asp Pro Tyr Leu Asn Asp Arg Cys Arg Gly Gly Gly Pro Cys
 145 150 155 160
 Lys Gln Gln Cys Arg Asp Thr Gly Asp Glu Val Val Cys Ser Cys Phe
 165 170 175

 Val Gly Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Gly Val Ser Cys Glu Asp Val Asn
 180 185 190
 Glu Cys Ile Thr Gly Ser His Ser Cys Arg Leu Gly Glu Ser Cys Ile
 195 200 205
 Asn Thr Val Gly Ser Phe Arg Cys Gln Arg Asp Ser Ser Cys Gly Thr
 210 215 220
 Gly Tyr Glu Leu Thr Glu Asp Asn Ser Cys Lys Asp Ile Asp Glu Cys
 225 230 235 240
 Glu Ser Gly Ile His Asn Cys Leu Pro Asp Phe Ile Cys Gln Asn Thr

 245 250 255
 Leu Gly Ser Phe Arg Cys Arg Pro Lys Leu Gln Cys Lys Ser Gly Phe
 260 265 270
 Ile Gln Asp Ala Leu Gly Asn Cys Ile Asp Ile Asn Glu Cys Leu Ser
 275 280 285
 Ile Ser Ala Pro Cys Pro Ile Gly His Thr Cys Ile Asn Thr Glu Gly
 290 295 300
 Ser Tyr Thr Cys Gln Lys Asn Val Pro Asn Cys Gly Arg Gly Tyr His

305 310 315 320

Leu Asn Glu Glu Gly Thr Arg Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Pro

325 330 335

Pro Ala Glu Pro Cys Gly Lys Gly His Arg Cys Val Asn Ser Pro Gly

340 345 350

Ser Phe Arg Cys Glu Cys Lys Thr Gly Tyr Tyr Phe Asp Gly Ile Ser

355 360 365

Arg Met Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Gln Arg Tyr Pro Gly Arg Leu

370 375 380

Cys Gly His Lys Cys Glu Asn Thr Leu Gly Ser Tyr Leu Cys Ser Cys

385 390 395 400

Ser Val Gly Phe Arg Leu Ser Val Asp Gly Arg Ser Cys Glu Asp Ile

405 410 415

Asn Glu

<210> 2

<211> 1254

<212> DNA

<213> Homo sapiens

 $\langle 400 \rangle$ 2

gtggacgcgg atgtcctcct ggaggcctgc tgtgcggacg gacaccggat ggccactcat 60

cagaaggact gctcgctgcc atatgctacg gaatccaaag aatgcaggat ggtgcaggag 120

cagtgtgcc acagccagct ggaggagctg cactgtgcca cgggcatcag cctggccaac 180

gagcaggacc gctgtgccac gccccacggt gacaacgcca gcctggaggc cacatttgtg 240

aagaggtgct gccattgctg tctgctgggg agggcgggcc aggcccaggg ccagagctgc 300

gagtacagcc tcatggttgg ctaccagtgt ggacaggtct tccgggcatg ctgtgtcaag 360

agccaggaga ccggagattt ggatgtcggg ggcctccaag aaacggataa gatcattgag 420

gttgaggagg aacaagagga cccatatctg aatgaccgct gccgaggagg cgggccctgc 480

aagcagcagt gccgagacac gggtgacgag gtgggtctgct cctgcttcgt gggctaccag 540

ctgctgtctg atggtgtctc ctgtgaagat gtcaatgaat gcatcacggg cagccacagc 600

tgccgcttg gagaatcctg catcaacaca gtgggctctt tccgctgcca gccggacagc 660

agctgcggga ctggctatga gctcacagag gacaatagct gcaaagatat tgacgagtgt 720
gagagtggta ttcataactg cctccccgat tttatctgtc agaatactct gggatccttc 780
cgctgccgac ccaagctaca gtgcaagagt ggctttatac aagatgctct aggcaactgt 840
attgatatca atgagtgttt gagtatcagt gccccgtgcc ctatcgggca tacatgcatc 900
aacacagagg gctcctacac gtgccagaag aacgtgccca actgtggccg tggtaccat 960
ctcaacgagg agggaacgcg ctgtgttgat gtggacgagt gcgcgccacc tgctgagccc 1020

tgtgggaagg gacatcgctg cgtgaactct cccggcagtt tccgctgcga atgcaagacg 1080
ggttactatt ttgacggcat cagcaggatg tgtgtcgatg tcaacgagtg ccagcgctac 1140
cccgggcgcc tgtgtggcca caagtgcgag aacacgctgg gctcctacct ctgcagctgt 1200
tccgtgggct tccggctctc tgtggatggc aggtcatgtg aagacatcaa tgag 1254

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer for Amplifying Human Fibulin-1

<400> 3

tggtaccgga gtggacgagg atgtc 25

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer for Amplifying Human Fibulin-1

<400> 4

tgaattcctc attgatgtct tcacatgac 29

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer for Amplifying Beta-actin

<400> 5

tggcaccag cacaatgaag at 22

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer for Amplifying Beta-actin

<400> 6

tactcctgct tgctgatcca 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer for Amplifying TAZ

<400> 7

accgtgtcca atcaccagtc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer for Amplifying TAZ

<400> 8

tgtagtcct tgggaagca 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer for Amplifying ALP

<400> 9

ccaaaggctt cttcttgctg 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer for Amplifying ALP

<400> 10

ccaccaaag tgaagacgtg 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Forward Primer for Amplifying collagen 1
 <400> 11
 gaaaatggag ctcttggtca 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer for Amplifying collagen 1
 <400> 12
 acccttagca ccaacagcac 20
 <210> 13
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer for Amplifying OCN
 <400> 13
 gactgtgagt tggctga 17
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer for Amplifying OCN
 <400> 14
 agcagagcga caccctagac 20