



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0060131
(43) 공개일자 2023년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/077 (2010.01) A61K 38/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01) C07K 14/50 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0655 (2013.01)

A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0144465

(22) 출원일자 2021년10월27일

심사청구일자 2021년10월27일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

최한석

서울특별시 송파구 송파대로 567, 501동 706호(잠실동, 잠실주공아파트)

최진

서울특별시 송파구 송파대로32길 15, 108동 802호(가락동, 가락금호아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

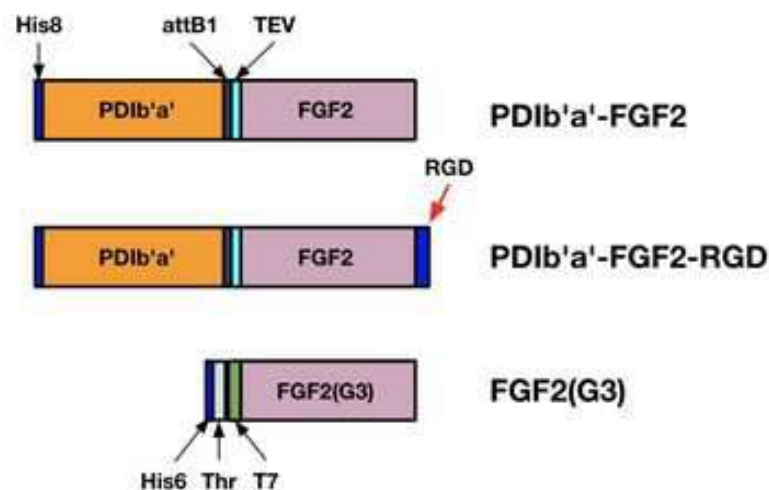
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 FGF2-RGD 융합 단백질을 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화용 조성물

(57) 요약

본 발명은 FGF2-RGD 융합 단백질을 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, FGF2(fibroblast growth factor-2)의 C 말단에 RGD(Arg-Gly-Asp)가 결합된 FGF2-RGD 융합 단백질이 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell)의 세포 증식을 증가시키며, 연골세포 분화와 관련된 유전자인 col2a1(collagen type II alpha 1 chain), 아그레칸(aggrecan), sox9(SRY-box 9 protein)의 발현을 증가시키고, 글리코사미노글리칸의 생성을 증가시켜 기존에 FGF2 보다 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell)를 연골세포로 분화를 우수하게 유도하는 것을 확인함으로써, FGF2-RGD 융합 단백질을 포함하는 조성물을 줄기세포의 연골세포로의 분화용 조성물로 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 19/00 (2018.01)

C07K 14/503 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C12N 2501/115 (2013.01)

C12N 2501/998 (2013.01)

C12N 2506/1369 (2013.01)

(72) 발명자

웬민관

서울특별시 송파구 강동대로 13, A동 501호(
풍납동, 패밀리타운)

송지영

서울특별시 송파구 송이로21길 33-17, 301호(가락
동, 은경아트빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711081751

과제번호 2017M3A9F8031039

부처명 미래창조과학부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)

연구과제명 효율적인 전분화능 줄기세포의 배양 기술개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 울산대학교 산학협력단

연구기간 2019.01.01 ~ 2020.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

FGF2(fibroblast growth factor-2)의 C 말단에 RGD(Arg-Gly-Asp)가 결합된 FGF2-RGD 융합 단백질을 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 FGF2-RGD 융합 단백질은 줄기세포의 세포 증식을 증가시키는 것을 특징으로 하는 분화용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 FGF2-RGD 융합 단백질은 줄기세포의 연골세포로의 분화 과정에서 col2a1(collagen type II alpha 1 chain), 아그레칸(aggrekan), 및 sox9(SRY-box 9 protein)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 분화용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 FGF2-RGD 융합 단백질은 글리코사미노글리칸의 생성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 분화용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 분화용 조성물은 FGF2-RGD 융합 단백질을 0.1 ng/mL 내지 10 ng/mL의 함량으로 포함하는 것을 특징으로 하는 분화용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell)인 것을 특징으로 하는 분화용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 분화용 조성물을 포함하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 연골세포 분화 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 분화용 조성물을 포함하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 기간이 3일 내지 7일인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 연골세포로의 연골세포 분화 방법.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 분화용 조성물을 포함하는 골질환의 치료를 위한 세포 치료제의 병용 투여용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 FGF2-RGD 융합 단백질을 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

[0002] 기존 손상관절 치료법으로 약물치료, 자가골 연골 이식술, 골수 천공술 및 인공관절치환술 등이 있으며 이들 중 약물 치료 등의 보존적 치료는 증상 완화를 시켜 제한적인 기능 회복에 한정되고 관절연골의 외상성 결손에 이용하는 자가 골 연골 이식술은 골-연골편 채취로 인한 공여부 손상을 초래하며, 채취양이 제한된 단점이 있다. 또한, 중등도로 진행된 골관절염에 시행하는 골수 천공술은 원래의 연골조직인 초자연골대신 섬유연골을 재생시켜 임상 결과가 불량한 단점이 있으며 현재 진행된 골관절염에 있어서는 인공관절 치환술을 시행하는 것이 표준적인 치료이나 젊은 환자에 시술하는 경우는 인공관절의 수명이 또한 문제가 된다.

[0003] 위와 같은 문제점을 해결하기 위해, 최근 자기 복제능력이 있고 여러 조직으로 분화할 수 있으며 많은 양을 공여부의 기능 장애 없이 쉽게 채취할 수 있는 장점이 있는 줄기세포가 세포 치료에 이상적인 세포원으로 인식되어 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으나, 아직까지 연골형성을 위한 인자, 환경 등에 대한 명확한 지식이 부족한 상태이다.

[0004] 줄기세포는 여러 종류의 신체 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포, 즉 '미분화'세포이다. 분화란 발생 초기 단계의 세포가 각 조직으로서의 특성을 갖게 되는 과정을 말하는데, 하나의 세포가 뼈, 심장, 피부 등의 다양한 조직 세포로 만들어지기 위해서는 '분화'가 일어나야 하는 것이다. 이러한 미분화 상태에서 적절한 조건을 맞춰주면 줄기세포는 다양한 조직의 세포로 분화할 수 있다. 따라서 줄기세포의 이러한 분화능력을 이용하여, 손상된 관절 조직을 재생 및 항염증 등의 치료에 응용하기 위하여 중간엽 줄기세포 연구에 대하여 보고되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2010-0084142호 (2010. 07. 23. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 줄기세포의 연골세포로의 분화를 촉진할 수 있는 분화용 조성물을 제공하고, 이를 이용하여 줄기세포의 연골세포로의 분화 방법 및 이를 포함하는 골질환의 치료를 위한 세포 치료제의 병용 투여용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 FGF2(fibroblast growth factor-2)의 C 말단에 RGD(Arg-Gly-Asp)가 결합된 FGF2-RGD 융합 단백질을 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 분화용 조성물을 포함하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 연골세포 분화 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 분화용 조성물을 포함하는 골질환의 치료를 위한 세포 치료제의 병용 투여용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, FGF2(fibroblast growth factor-2)의 C 말단에 RGD(Arg-Gly-Asp)가 결합된 FGF2-RGD 융합 단백질이 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell)의 세포 증식을 증가시키며, 연골세포 분화와 관련된 유전자인 col2a1(collagen type II alpha 1 chain), 아그레칸(aggrecan), sox9(SRY-box 9 protein)의 발현을 증가시키고, 글리코사미노글리칸의 생성을 증가시켜 기존에 FGF2 보다 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell)를 연골세포로 분화를 우수하게 유도하는 것을 확인함으로써, FGF2-RGD 융합 단백질을 포함하는 조성물을 줄기세포의 연골세포로의 분화용 조성물로 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 설계된 PD1b'a'-FGF2-RGD 및 PD1b'a'-FGF2의 구조와 비교군인 FGF2(G3) 구조를 나타내는 그림이다.

도 2는 설계된 PD1b'a'-FGF2-RGD 및 PD1b'a'-FGF2 구조물이 온도에 따라 발현되는 수준 및 불용성 여부를 평가한 결과이다.

도 3은 융합 단백질 FGF2-RGD를 정제하기 위해, 양이온 교환 크로마토그래프로 정제(도 3B)한 후, TEV 프로테아제에 의해 태그를 제거(도 3C)하여 음이온 교환 크로마토그래피로 정제(도 3D)하고, 최종적으로 수득되는 단백질(도 3E)을 확인한 결과 및 정제 과정(도 3F)이다.

도 4는 FGF2(점선이 있는 열린 원) 및 융합 단백질 FGF2-RGD(실선이 있는 닫힌 원)의 처리 용량에 따른 세포 증식을 평가한 용량-반응 곡선이다.

도 5는 FGF2 및 그 유도체의 시간 의존적 세포 증식 자극 효과를 평가한 결과이다.

도 6은 FGF2 및 융합 단백질 FGF2-RGD가 UCMSC(Umbilical cord mesenchymal stem cell) 세포의 연골 세포 분화에 미치는 영향을 평가하기 위한 실험 설계를 나타내는 그림이다.

도 7은 FGF2 및 융합 단백질 FGF2-RGD가 UCMSC(Umbilical cord mesenchymal stem cell) 세포의 연골 세포 분화와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 8은 FGF2 및 융합 단백질 FGF2-RGD가 UCMSC(Umbilical cord mesenchymal stem cell) 세포의 연골 세포 분화에 미치는 영향을 평가하기 위해 연골 세포의 주요 마커인 글리코사미노글리칸의 존재를 측정된 결과이다.

도 9는 FGF2 및 융합 단백질 FGF2-RGD가 UCMSC(Umbilical cord mesenchymal stem cell) 세포의 연골 세포 분화에 미치는 영향을 평가하기 위해 ECM 생성 및 글리코사미노글리칸을 검출한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0013] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0014] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.
- [0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0016] 본 발명은 FGF2(fibroblast growth factor-2)의 C 말단에 RGD(Arg-Gly-Asp)가 결합된 FGF2-RGD 융합 단백질을 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화용 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 FGF2-RGD 융합 단백질은 줄기세포의 세포 증식을 증가시키고, 줄기세포의 연골세포로의 분화 과정에서 col2a1(collagen type II alpha 1 chain), 아그레칸(aggrecan), 및 sox9(SRY-box 9 protein)의 발현을 증가시키며, 글리코사미노글리칸의 생성을 증가시킬 수 있으므로, 줄기세포를 연골세포로 분화를 유도하는 효과가 우수하다.
- [0018] 상기 분화용 조성물은 FGF2-RGD 융합 단백질을 0.1 ng/mL 내지 10 ng/mL의 함량으로 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell)일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 분화용 조성물을 포함하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 연골세포 분화 방법을 제공한다.

- [0021] 상기 분화용 조성물을 포함하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 기간이 3일 내지 7일일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 분화용 조성물을 포함하는 골질환의 치료를 위한 세포 치료제의 병용 투여용 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 병용 투여용 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0024] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 병용 투여용 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 병용 투여용 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 병용 투여용 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율, 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0028] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실험예 및 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실험예 및 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실험예 및 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0029] **<실험예> 실험 재료 및 방법**
- [0030] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0031] **1. 재료**
- [0032] 모든 시약은 분석 등급 및 세포 배양 등급으로 사용하였다. BCA (bicinchoninic acid) 분석 키트는 Abkine (Wuhan, China)에서 구입하였다. Coomassie bright blue R-250 및 Tris-HCl은 Amresco(Solon, OH, USA)에서 구입하였다. DTT(Dithiothreitol) 및 IPTG는 Anaspec(Fremont, CA)에서 구입하였다. Power SYBR Green PCR 마스터 믹스 및 7900HT Fast Real-Time PCR 시스템은 Applied Biosystems (Waltham, MA)에서 구입하였다. Mesh는 BD Falcon(San Jose, CA)에서 구입하였다. 암피실린(Ampicillin) 및 겐타마이신(gentamicin)은 Duchefa biochemie(Haarlem, Netherlands)에서 구입하였다. Lambda integrase 및 excisionase는 Elpis biotech(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. DH5 α E.coli는 Enzynomics(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. FavorPrep total RNA mini kit는 Favorgen(Ping-Tung, Taiwan)에서 구입하였다. AKTA Prime 및 AKTA Start를 포함한 모든 크로마토그래피 컬럼 및 정제 시스템은 GE Healthcare(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였다. 멤브레인 필터는 현대 마이크론(Seoul, Korea)에서 구입하였다. Agarose는 LPS 솔루션(Daejeon, Korea) 또는 Cosmogenetech (Seoul, Korea)에서 구입하였다. Amicon Ultra 농축기는 Merck Millipore(Billerica, MA, USA)의 제품을 사용하였다. BL21(DE3) E.coli는 New England Biolabs(Ipswich, MA)에서 구입하였다. Ultrasonic cell disruptor JY99-IIDN은 Ningbo Scientz Biotechnology (Guangdong, China) 제품을 사용하였다. Acrodisc 주사기 필터는 Pall(Ann Arbor, MI)에서 구입하였다. 콜라게나아제 A는 Roche(Basel, Switzerland)에서 구입하

였다. 염화나트륨 및 글리세롤은 삼천화학(Pyeongtaek, Korea)에서 구입하였다. Alcian blue는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다. SuperScript II 역전사효소, MEM, 트립판 블루 및 StemPro 연골형성 분화 키트 배지는 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA)에서 구입하였다. 투석막은 Viskase(Darien, IL, USA)에서 구입하였다. FGF2, FGF2-RGD, PD1b'a'-FGF2, FGF2(G3) 및 TEV 프로테아제는 자체 제작하였다. TEV 프로테아제용 플라스미드는 David Waugh(Addgene 플라스미드 #92414 및 #8827)로부터 얻었다. Pfu-sso7d 및 Taq DNA 중합효소용 플라스미드는 자체 제작하였다.

2. 윤리 선언

본 실험은 분당서울대학교병원 기관심사위원회(허가번호 B-1606/349-303)의 승인을 받았다. 본 실험은 헬싱키 선언에 따라 수행되었으며, 모든 지원자는 서면 동의서를 제공받았다.

3. FGF2-RGD 플라스미드 제작

E. coli 발현 시스템용 His-PD1b'a'-TEV-FGF2-RGD를 구축하기 위해, 말단에 attB1과 attB2가 있는 TEVsite-FGF2 유전자는 바이오니아(Daejeon, Korea)에서 합성하였다. BP 반응을 수행하여 TEV-FGF2 유전자를 pDONR207-PIP2에 통합하여 엔트리 클론(entry clone)을 제작하였다. 엔트리 클론을 DH5 α 균주로 형질전환하고 50 μ g/mL 겐타마이신 항생제와 대장균 독소(ccdB 유전자)로 스크리닝하였다. pEntry-TEV-FGF2 클론의 성공 여부는 PCR 및 DNA 시퀀싱으로 평가하였다. pEntry-TEV-FGF2 클론은 특정 프라이머를 사용하여 PCR을 이용하여 FGF2의 C 말단에 3개의 아미노산 RGD를 삽입하였다. 프라이머 종류는 하기 표 1과 같다.

표 1

유전자		염기서열 (5'-3')	서열번호
FGF2-RGD	F	GAGCCGTGGCGACTAAACCCAGCTTCTTGACAAAGTGGG	1
	R	GTTTAGTCGCCACGGCTCTTTCGCGTCATCGGCAG	2
GAPDH	F	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	3
	R	GAAGATGGTGATGGGATTTC	4
Col2a1	F	TCTACCCCAATCCAGCAA	5
	R	GCGTAGGAAGGTCATCTGG	6
Aggrecan	F	CCAGGAGGTATGTGAGGA	7
	R	CGATCCACTGGTAGTCTTG	8
Sox9	F	AGGAAGCTCGCGGACCACTAC	9
	R	GGTGGTCCTTCTGTGCTGCAC	10
Runx2	F	CCCAGTATGAGAGTAGGTGTCC	11
	R	GGGTAAGACTGGTCATAGGACC	12

PCR 산물은 Dpn I 제한 효소에 의해 분해되었다. PCR 산물을 DH5 α 균주로 형질전환시킨 후 50 μ g/mL 겐타마이신 항생제로 스크리닝하였다. 돌연변이된 pEntry-TEV-FGF2-RGD 클론을 DNA 시퀀싱으로 평가하였다. 돌연변이된 pEntry-TEV-FGF2-RGD 클론에서 TEV-FGF2-RGD를 절제하고 N-말단에 His-PD1b'a'가 있는 pDest-HMGWA로 통합하기 위해 LR 반응이 수행되었다. DH5 α 균주에서 LR 반응이 수행되고, 50 μ g/mL 암피실린 항생제 및 E.coli 독소(ccdB 유전자)를 스크리닝 하였다. 발현 벡터는 PCR 및 DNA 시퀀싱으로 확인하였다.

4. 인테그린에 대한 FGF2-RGD 결합의 상동성 모델링

Modeller 9.16(39)은 인테그린에 결합하는 FGF2-RGD의 상동성 모델링에 사용되었다. 구조적 pdb 템플릿은 FGF2의 경우 1bfg이고 RGD 펩티드와 복합된 인테그린 알파IIB 베타3의 경우 3zdz로 설정하였다. 3D 그래픽 모델은 Molsoft ICM Browser 3.9-2a를 사용하였다.

5. FGF2-RGD의 발현 및 정제

소규모의 3 ml 세포 배양액에 BL21 (DE3) 균주를 발현 플라스미드로 형질전환시킨 후, 항생제(100 μ g/mL의 암피실린)를 함유한 LB 한천 배지에 배양하였다. 선별된 콜로니를 100 μ g/mL의 암피실린을 함유하는 LB 배지에 접종하였다. 세포를 37°C에서 200 rpm으로 밤새 배양하였다. 배양액을 1 : 100 비율로 적절한 항생제를 포함하는 10 ml의 LB 배지에 옮기고, 37°C에서 200 rpm으로 배양하였다. OD₆₀₀이 0.5 내지 0.6에 도달하면, 3 ml의 세포 배양액을 등근 바닥 튜브에 옮겼다. 최종 0.5 mM 농도의 IPTG를 첨가하여 융합 단백질을 제조하고, 18°C 및 37°C에서 18 시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양된 세포를 4°C에서 5분 동안 4,000 xg로 원심분리하

였다. 초음파 세포 분열기를 사용하여 세포 펠렛을 용해하였다. 초음파 처리는 초음파 처리 완충 용액(50 mM 트리스-HCl, 5% 글리세롤(v/v), pH 8.0)에서 5초 on : 5초 off 주기로 반복처리 되었다. 용해된 세포를 4℃에서 10분 동안 17,000 xg로 원심분리하여 가용성 및 불용성 분획물로 분리하였다. 단백질 발현 및 용해도 수준은 10% 트립신 SDS-PAGE 겔로 분석하고, Gel Analyzer 19.1을 사용하여 계산하였다.

[0043] 대용량 정제 과정에서 1 L 세포 배양물, 세포 펠렛을 초음파 처리 완충액(50mM Tris-HCl, 5% 글리세롤, pH 8.0, 0.5mM EDTA)에 현탁시키고, 30분 동안 3초 on : 27초 off 주기로 초음파 세포 분열기를 사용하여 용해하였다. 용해물을 17,000 xg에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 HiTrap SP HP 컬럼에 적용한 후, 초음파 처리 완충용액으로 세척하였다. 500 mM NaCl에서 용해 단백질을 수득하였다. 용해 단백질을 초음파 처리 완충 용액으로 투석한 후, 18℃에서 밤새 TEV 프로테아제(1:30(w/w) = TEV:용해 단백질의 비율)로 절단하였다. TEV 절단 분획을 HiTrap Q HP 컬럼에 로딩하여 약 250mM에서 FGF2-RGD의 표적 단백질을 얻은 후, 탈염 컬럼으로 표적 단백질을 1X PBS로 교환하였다.

[0044] 6. FGF2, PD1b'a'-FGF2 및 FGF2(G3)의 제조

[0045] hFGF-2의 경우, PD1b'a'-TEV-FGF2의 용해 단백질을 최종 0.5 mM 농도의 IPTG 18℃ 조건에서 18시간 동안 50 μg/mL 암피실린을 포함하는 Clearcoli BL21(DE3) 균주에서 완성되었다. 세포 펠렛을 초음파 처리 완충액(20 mM Tris-HCl, 5% 글리세롤, pH 8.0)에 재현탁하고, ultrasonic cell disruptor를 사용하여 세포를 용해하였다. 용해물을 17,000 xg에서 원심분리하여 상등액을 수집하고, SP 세파로스 컬럼에 적용하여 600 mM NaCl에서 용해 단백질을 수집하였다. 용해 단백질을 초음파 처리 완충액에 투석한 후, TEV 프로테아제(1:30(w/w) = TEV:용해 단백질의 비율)로 절단하여 FGF2의 표적 단백질을 얻었다. TEV 절단 분획을 Q 세파로스 컬럼에 로딩하여 50mM NaCl에서 FGF2를 얻은 후, 탈염 컬럼에서 표적 단백질을 1X PBS로 교환하였다. PD1b'a'-FGF2의 경우, SP 세파로스 컬럼에 적용한 후, 용해 단백질을 GPC superdex 75 prep 등급에 적용하여 1x PBS로 교환하였다.

[0046] His-FGF2(G3)는 50 μg/mL Kanamycin 및 최종 0.5 mM 농도의 IPTG를 포함하는 Clearcoli BL21(DE3) 균주에서 37℃ 또는 18℃에서 밤새 발현되었다. 세포 펠렛을 완충액 A(20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 5% 글리세롤, pH 8.0)에 재현탁하고 ultrasonic cell disruptor를 사용하여 용해하였다. 용해물을 17,000 xg에서 원심분리하여 상등액을 수득하고, Ni NTA 컬럼에 적용하여 약 300mM 이미다졸에서 His-FGF2(G3)를 수득하였다. 표적 단백질은 탈염 컬럼에서 1X PBS로 교환되었다.

[0047] 7. UCMSC의 분리 및 확장

[0048] 태줄 샘플은 건강한 임산부로부터 제왕절개 분만시 얻었다. 혈관과 양막을 제거하기 전에 제대를 멸균 식염수로 여러 번 세척하였다. Wharton의 젤리 조직을 3mm 두께의 조각으로 절편한 후, 0.1% 콜라게나제 A가 포함된 MEM에서 37℃에서 3시간 동안 진탕배양하였다. 70 μM 메쉬를 통해 여과하고 10분 동안 200 xg에서 원심분리하여 펠렛을 수득하였다. 분리된 세포를 CO₂ 5% 가습 인큐베이터에서 37℃에서 10% FBS를 함유하는 DMEM에 배양하였다. 72 시간 후 플라스틱 배양 플레이트에 부착하여 MSC를 선택하였다.

[0049] 8. 세포 증식 분석

[0050] 2×10^4 농도의 계대 3 세대 UCMSC(Umbilical cord mesenchymal stem cell) 세포를 10% FBS, 10 IU/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신을 포함하는 MEM 배지에 배양하였다. 24 시간 배양 후, 배양 배지에 다양한 농도의 FGF2(0.1, 1, 5 및 10 ng/mL) 또는 FGF2-RGD(0.1, 1, 5 및 10 ng/mL)를 포함하는 배지로 매일 1회, 2일에 1회, 또는 4일에 1회 교체하였다. 세포 생존율을 평가하기 위해, 0.25% 트립신을 이용하여 세포를 분리한 후, 0.4% 트립판 블루와 혼합하여 혈구 계산기로 세포를 계수하였다. 데이터는 하기 수식으로 계산되었다.

$$Re = BI + (Max - BI) / (1 + (EC_{50}/conc)^{Hs}) - (Max - Bh) / (1 + (IC_{50}/conc)^{Hi})$$

[0052] Re는 세포의 반응, BI는 고농도에서 기준선, Max는 최대 반응, conc는 단백질 농도, Hs는 Hill 자극 계수, Bh는 고농도에서 기준선, Hi는 Hill 억제 계수이다.

[0053] 9. 연골 세포로의 분화

[0054] 2×10^4 농도의 계대 3 세대 UCMSC 세포를 6웰 배양 플레이트에 접종하였다. UCMSC의 각 그룹은 FGF2(5 ng/mL), FGF2-RGD(1 ng/mL), 또는 이를 포함하지 않은 10% FBS 함유 MEM 배지에서 5일 동안 배양되었다. 5일 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 상업용 StemPro 연골형성 분화 키트 배지로 교체하였다. Chondrogenic 배지는 7~21일

동안 3일마다 교체되었다.

10. qRT-PCR

총 RNA는 FavorPrep Total RNA Mini Kit를 사용하여 분리하였다. cDNA는 SuperScript II 역전사효소를 사용하여 총 RNA의 1 µg로 합성되었다. qRT-PCR은 상기 표 1의 프라이머 및 Power SYBR Green PCR 마스터 믹스를 사용하여 Fast Real-Time PCR 시스템에서 수행되었다. 증폭 조건은 95℃에서 5분 동안 초기 변성 단계; 15초 동안 94℃, 15초 동안 60℃, 15초 동안 72℃로 구성되는 35 사이클; 및 72℃에서 10분 동안 최종 확장 단계로 구성하였다. 유전자의 발현 수준은 GAPDH의 발현 수준으로 정규화하였다.

11. 알시안 블루 염색

배양 용기에서 분화 배지를 제거하고 세포를 PBS로 1회 세척하고, 4% 포름알데하이드 용액으로 30분 동안 고정하였다. 고정 후, 세포를 PBS로 세척하고, 0.1N HCl에 녹인 1% 알시안 블루(Alcian blue) 용액으로 30분 동안 염색하였다. 세포를 0.1 N HCl로 3회 세척하고, 산도를 중화하기 위해 증류수를 추가하고, 광학 현미경으로 관찰하며 이미지를 분석하였다. 조직학적 분석을 위해, 세포를 4% 파라포름알데하이드에 밤새 고정하고, 파라핀에 포매한 후, 4 µm 두께로 절편화하였다. 그 후, 알시안 블루(Alcian blue) 용액으로 염색하였다.

실시예 1. FGF2-RGD 융합 단백질 제작

도 1에 나타난 바와 같이, C-말단에 RGD 펩타이드를 포함하는 PD1b'a'-FGF2-RGD를 제작하였으며, PD1b'a' 태그는 TEV 프로테아제 처리로 제거하였다. 인테그린에 대한 FGF2-RGD의 가상 결합은 상동성 모델링 기술을 사용하여 모델링되었으며, 인테그린에 대한 FGF2-RGD 결합의 가능성을 확인하였다. 설계된 유전자는 게이트웨이 클로닝 기술을 사용하여 구성되었다.

실시예 2. BL21(DE3)에서 FGF2-RGD의 발현 및 정제

실시예 1에 제조된 PD1b'a'-FGF2-RGD 및 PD1b'a'-FGF2 구조물을 E. coli BL21(DE3) 균주에 형질전환하고, 18℃ 및 37℃에서 IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. 도 2 및 표 2에 나타난 바와 같이 두 온도에서 단백질 발현 수준은 비슷하게 나타났으나, 융합 단백질은 37℃에서는 불용성이었으나, 18℃에서는 완전히 용해되었다.

표 2

Expression level (%)	18℃	36.5 ± 1.5
	37℃	37.8 ± 1.1
Solubility level (%)	18℃	98.1 ± 0.6
	37℃	0.3 ± 0.1

도 3에 나타난 바와 같이, 단백질을 양이온 교환 크로마토그래프로 정제(도 3B)한 후, TEV 프로테아제에 의해 태그를 제거(도 3C)하였다. 이어서 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 FGF2-RGD 단백질을 정제(도 3D)하고, 최종적으로 순도 97.6%, 수율 2.7%의 단백질을 수득하였다(도 3E).

실시예 3. FGF2-RGD가 MSC 증식에 미치는 영향 평가

FGF2 및 융합 단백질 FGF2-RGD가 MSC(Mesenchymal Stem Cell) 증식에 미치는 영향을 평가하기 위해, UCMSC(Umbilical cord mesenchymal stem cell) 세포에 FGF2 및 융합 단백질 FGF2-RGD를 처리하고 세포 증식 정도를 측정하였다. FGF2 및 융합 단백질 FGF2-RGD를 0.1 ng/mL 내지 10 ng/mL의 다른 농도로 UCMSC 세포에 6일 동안 처리하고, 세포 증식 정도를 평가하였다. 도 4에 나타난 바와 같이, FGF2 및 융합 단백질 FGF2-RGD를 처리한 경우 모두 UCMSC 세포의 증식을 2상 향상시켰다. FGF2를 5 ng/mL로 처리한 경우 UCMSC 세포의 수를 거의 1.8 배 증가시켰고, FGF2-RGD를 1 ng/mL로 처리한 경우, UCMSC 세포의 수를 거의 2배 증가시켰다. EC50 및 FGF2의 최대 반응은 각각 1.1±1.1 ng/mL 및 234±13%이고, EC50 및 FGF2-RGD의 최대 반응은 각각 0.27±0.02 ng/mL 및 294±20%이다.

FGF2, 이의 유도체인 FGF2(G3), 융합 단백질 FGF2-RGD 및 PD1b'a'-RGD의 열안정성을 평가하기 위해, FGF2(G3), FGF2-RGD 및 PD1b'a'-RGD를 포함하는 배지는 매일, 격일 및 3일마다 교체하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, FGF2의 자극 효과는 매일 교체하는 경우에 비해 이틀에 한번 또는 3일에 한번 배지를 교체하는 경우 감소하는 것으로 나타났다. FGF2의 열안정성 변이체로 알려진 FGF2(G3)도 FGF2와 유사한 패턴을 나타냈다. FGF2-RGD 및

PD1b'a'-FGF2는 배지를 격일 또는 3일마다 교체한 경우 자극 효과가 유지되지 못하는 것으로 나타났다.

[0068] **실시예 4. FGF2-RGD가 UCMSC의 연골 세포 분화에 미치는 영향**

[0069] FGF2 및 융합 단백질 FGF2-RGD가 UCMSC(Umbilical cord mesenchymal stem cell) 세포의 연골 세포 분화에 미치는 영향을 평가하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, UCMSC 세포에 FGF2(5 ng/mL) 또는 FGF2-RGD(1 ng/mL)로 5일 동안 처리한 후, StemPro 배지에서 21일 동안 연골세포로 분화시켰다.

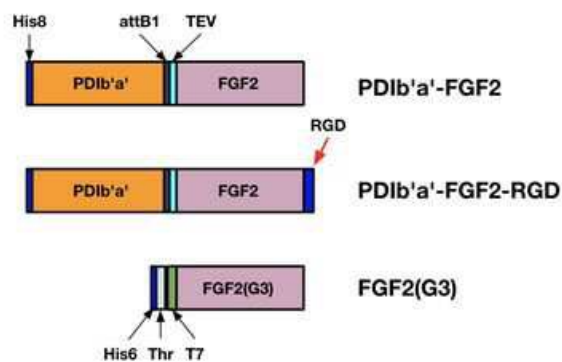
[0070] 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)을 사용하여 col2a1(collagen type II alpha 1 chain), 아그레칸(aggrecan), sox9(SRY-box 9 protein), runx2(RUNX Family Transcription Factor 2)의 발현을 측정하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, FGF2-RGD를 처리한 경우 col2a1(collagen type II alpha 1 chain), 아그레칸(aggrecan), sox9(SRY-box 9 protein)의 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 특히, col2a1 유전자의 발현은 FGF2-RGD로 처리한 경우 vehicle에 비해 3배 증가하고, FGF2로 처리한 경우 vehicle에 비해 2배 증가하였다. sox9 유전자의 발현도 FGF2로 처리한 경우에 비해 FGF2-RGD로 처리한 경우 더 증가하는 것으로 나타났다.

[0071] 또한, 연골 세포의 주요 마커인 글리코사미노글리칸의 존재를 확인하기 위해 알시안블루 염색을 수행하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, FGF2 또는 FGF2-RGD로 처리된 세포에서는 강한 염색이 나타났다. 연골 형성은 Eppendorf 튜브에서 수행되었으며, 연골을 파라핀으로 고정하고 절편을 헤마톡실린과 에오신(H&E)으로 염색하고, 알시안블루로 염색하여 각각 ECM 생성 및 글리코사미노글리칸을 검출하였다. 도 9에 나타난 바와 같이, FGF2 또는 FGF2-RGD를 처리한 세포는 vehicle에 비해 더 조밀한 구조를 가지며 H&E 및 알시안 블루 염색이 강하게 나타났다. 또한, FGF2-RGD를 처리한 연골세포의 연골 크기가 FGF2를 처리한 연골세포보다 크게 나타났다.

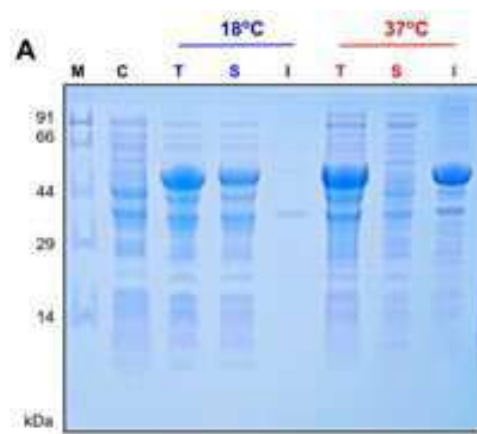
[0072] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

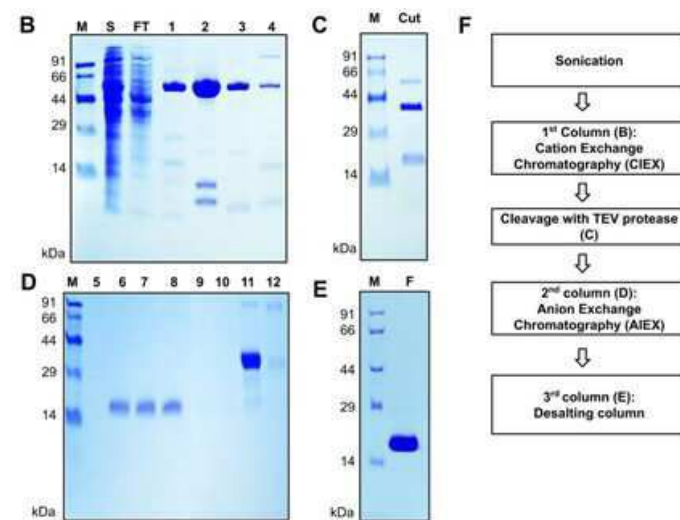
도면1



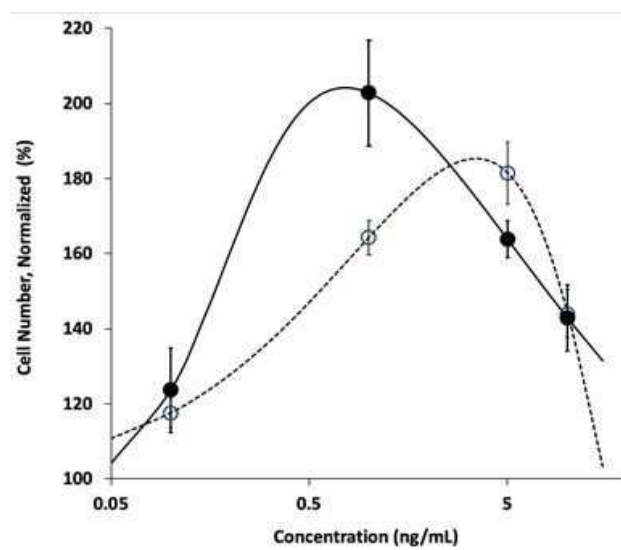
도면2



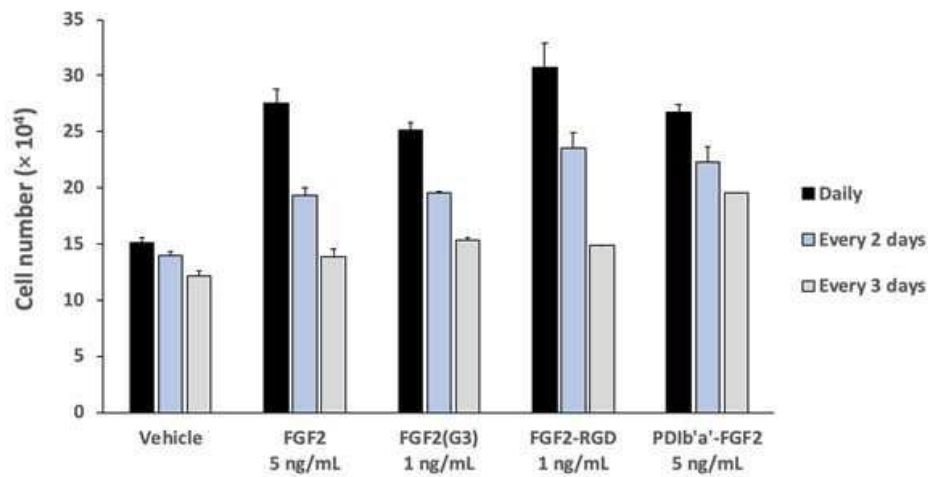
도면3



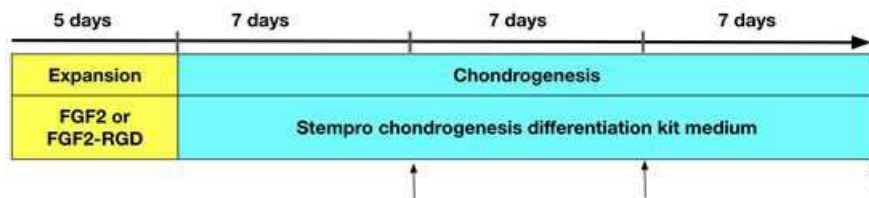
도면4



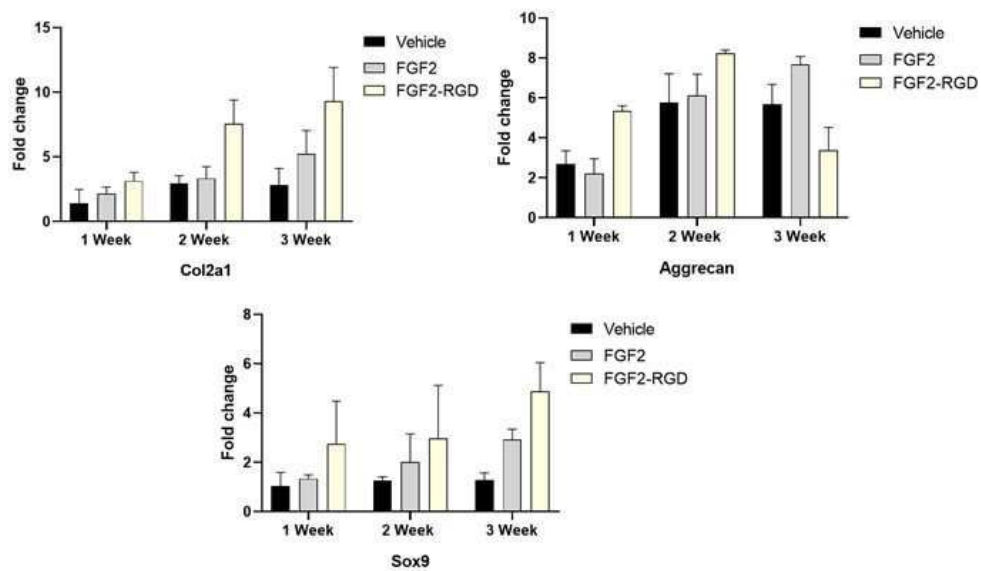
도면5



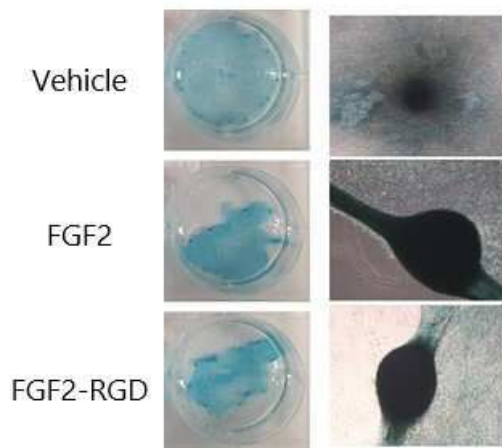
도면6



도면7



도면8



도면9

