



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0102780
(43) 공개일자 2018년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/077 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)

A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0654 (2013.01)

A61K 35/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0029350

(22) 출원일자 2017년03월08일

심사청구일자 2017년03월08일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

조인호

충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동 2001호 (두정동, 이안더센터)

정성철

서울특별시 서초구 명달로4길 68, A동 502호 (서초동, 서초네스피아)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

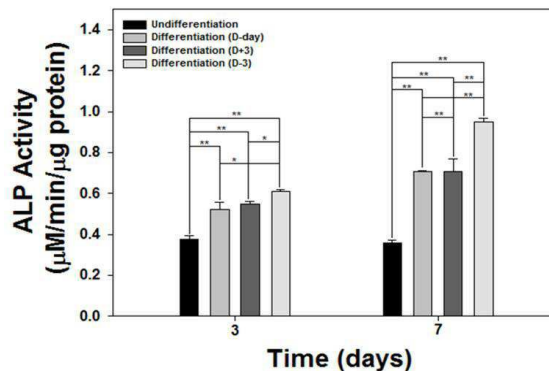
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 생분해성 고분자 지지체에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골 형성을 위한 최적의 전처리 조건 방법

(57) 요약

본 발명은 생분해성 고분자 지지체에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골 형성을 위한 최적의 전처리 조건 방법에 관한 것으로, 구체적으로 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골 분화 방법, 골 재생용 지지체의 제조 방법, 및 골 손상 또는 대사성 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61L 27/3608 (2013.01)
A61L 27/3834 (2013.01)
A61L 27/3847 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)
C12N 2506/1346 (2013.01)
C12N 2533/40 (2013.01)

(72) 발명자

유연실

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 257동 1002호 (잠실동, 리센츠)

박세영

서울특별시 도봉구 시루봉로 71, 110동 201호 (방학동, 청구아파트)

윤영필

서울특별시 강서구 초록마을로32길 29-17, 401호 (화곡동)

송해용

서울특별시 구로구 경인로65길 16-15, 1102동 101호 (신도림동, 신도림4차e-편한세상)

김성은

서울특별시 양천구 목동서로 397, 2001호 (신정동, 대림아크로빌)

이재용

경기도 광주시 행정타운로 143-38, 105동 302호 (회덕동, 상록파크타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C2207

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-첨단의료기술개발

연구과제명 부갑상선기능 저하증에 대한 편도 유래 줄기세포 치료제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.08 ~ 2021.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 2 차원 배양 조건에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 (tonsil-derived mesenchymal stem cell)에 골 분화를 유도하는 단계; 및
- (b) 상기 골 분화가 유도된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 생분해성 고분자 지지체에 혼입시키고 골 분화 조건에서 추가적으로 배양하는 단계를 포함하는, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골 분화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는 3 일 내지 7 일 동안 수행되는 것인, 골 분화 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 생분해성 고분자 지지체는 3 차원 쾌속 조형 기법 (Rapid Prototyping)을 이용하여 제조되는 것인, 골 분화 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 생분해성 고분자는 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락트산-글리콜산 공중합체 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 골 분화 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계는 7 일 내지 21 일 동안 수행되는 것인, 골 분화 방법.

청구항 6

- (a) 2 차원 배양 조건에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 (tonsil-derived mesenchymal stem cell)에 골 분화를 유도하는 단계; 및
- (b) 상기 골 분화가 유도된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 생분해성 고분자 지지체에 혼입시키고 골 분화 조건에서 추가적으로 배양하는 단계를 포함하는, 골 재생용 지지체의 제조 방법.

청구항 7

- (a) 2 차원 배양 조건에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 (tonsil-derived mesenchymal stem cell)에 골 분화를 유도하는 단계; 및
- (b) 상기 골 분화가 유도된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 생분해성 고분자 지지체에 혼입시키고 골 분화 조건에서 추가적으로 배양하는 단계를 포함하는, 골 손상 또는 대사성 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 골 손상은 골절, 골 관절염, 골 괴사 및 외상으로 인한 골 결손으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이고, 상기 대사성 골질환은 골위축, 골다공증 및 구루병으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것인, 골 손상 또는 대사성 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생분해성 고분자 지지체에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골 형성을 위한 최적의 전처리 조건 방법에 관한 것으로, 구체적으로 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골 분화 방법, 골 재생용 지지체의 제조 방법, 및 골 손상 또는 대사성 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 손상된 골 조직의 치료방법으로 자가 골 이식이 일차적으로 많이 사용되고 있다. 그러나 상기 방법은 이식된 부위와 원래 조직 사이에 틈이 남는 문제 등이 있어 완전한 치료 방법이라 보기 어려우며, 자가이식이 가능한 환자만을 대상으로 시행할 수 있어 보편적인 방법이 될 수 없다. 또한, 정상 골 부위를 희생하므로, 희생 부위에 새로운 통증이 생길 수 있는 등의 취약점이 있으며, 수술 후 통증, 골절, 출혈, 반흔을 비롯하여 재활이 더디게 이루어지는 등의 합병증이 발생할 수 있다. 한편, 타인의 골 이식도 사용되어 왔으나 공급에 제한이 있으며 전염병이 전달될 수 있는 단점이 있다.

[0005] 최근 골재생을 위하여 중간엽 줄기세포에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 여러 다른 인체 조직으로부터 유래한 중간엽 줄기세포가 임상 및 연구에 지속적으로 사용되고 있다. 특히, 골수 유래 및 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포가 많은 연구 비중을 차지해 오고 있다 (Ding DC, et al., Cell Transplant., 20:5-14, 2011; Lee OK, et al., Blood, 103:1669-1675, 2004). 그러나 상기 중간엽 줄기세포들은 인체에서 조직을 채취하는 과정이 침습적 (invasive)이며, 채취한 조직으로부터 분리 가능한 세포의 양이 충분하지 않고, 분리된 세포의 성장속도가 느리거나 계대 배양에 따른 노화의 속도가 빨라 건강하고 충분한 세포를 얻는 데에 한계를 가지고 있다. 따라서 이러한 장애를 극복하기 위한 새로운 줄기세포의 공급원에 대한 연구, 개발이 필요한 실정이다.

[0007] 편도 유래 중간엽 줄기세포는 편도선 조직에서 유래된 중간엽 줄기세포로서, 편도선 조직이 성체 중간엽 줄기세포의 새로운 공급원으로 대두되고 있다. 편도선은 림프상피 면역조직으로 인체의 구인두 및 비인두에 존재한다. 사춘기까지 면역기관으로써 기능을 수행하다가 성인이 되면서 서서히 퇴화하게 되는데, 일부 편도선이 비정상적으로 비대하거나 (hyperplasia), 편도염 (tonsillitis)이 발생한 경우에 편도선을 제거하기 위하여 절제술 (tonsillectomy)을 실시하게 된다.

[0008] 편도선 조직으로부터 분리된 편도 유래 중간엽 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포와 동일하게 지방세포, 골세포 및 연골세포와 같은 중배엽성 조직으로의 분화능을 가지고 있으며 (Janjanin SF, et al., Arthritis Res. Ther., 10:R83, 2008), 줄기세포성을 나타내는 표면항원 표지자의 표현형이 골수 유래 중간엽 줄기세포와 일치 (조혈모세포 마커인 CD14, CD34, CD45는 음성, 중배엽성 줄기세포 마커인 CD74, CD90, CD105는 양성)하며, 15 계대까지 배양이 진행되어도 배아줄기세포 마커인 NANOG, OCT4-A, SOX-2의 표현 수준이 3 계대의 것과 같이 유지되는 것으로 보고된바 있다.

[0009] 골수 유래 중간엽 줄기세포는 계대배양에 의하여 계대 수가 증가함에 따라 골 분화능이 감소하는 것으로 보고되고 있다. 그에 반해 편도 유래 중간엽 줄기세포는 10 계대까지 계대배양시 골 분화능이 증가하다가 15 계대에 이르러 골 분화능이 감소하며, 이는 CCN1의 발현과 일치함을 보여주고 있다. 이와 같이 편도 유래 중간엽 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포보다 우수한 골 분화능의 유지, 지속성을 가지고 있으며, 골 분화능이 향상된 다수의 세포를 확보할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

[0011] 줄기세포를 골세포로 분화시켜 세포치료제로 사용하려는 연구는 이미 많이 진행되어 왔으며, 최근 골 손실 환자를 위한 줄기세포 치료 (stem cell therapy)의 한계성을 극복하기 위하여, 생체적합성 지지체와의 복합사용이 주목받고 있다. 그러나 현재까지 보고된 연구 결과는 대부분 골수 유래 중간엽 줄기세포와 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 결과들이며, 편도 유래 중간엽 줄기세포에 생분해성 고분자 지지체를 적용한 결과는 거의 보고되지 않았다. 나아가, 기존 결과들은 세포 생존성 및 지지체에 대한 부착성 등의 요인에 의해 기존 배양 조건 (즉, 2 차원 배양 조건)에서 미분화 상태로 유지되던 세포를 생분해성 고분자에 혼입시킨 뒤, 분화를 유도하는 방식으로 수행되었을 뿐이다.

[0013] 이러한 배경하에 본 발명자들은 편도 유래 중간엽 줄기세포에서 골지지 복합체의 효능을 최대화시키기 위한 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 생분해성 고분자에 중간엽 줄기세포를 접종한 후 골 분화를 유도하는 것보다, 전 처리로 접종 전 분화를 유도하는 것이 더 우수한 분화능을 보이는 것을 확인하였고, 접종 전 분화 기간 및 혼입기간이 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골 분화능에 미치는 영향을 밝힘으로써, 골 손상 및 대사성 골 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은, (a) 2 차원 배양 조건에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 (tonsil-derived mesenchymal stem cell)에 골 분화를 유도하는 단계; 및 (b) 상기 골 분화가 유도된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 생분해성 고분자 지지체에 혼입시키고 골 분화 조건에서 추가적으로 배양하는 단계를 포함하는, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골 분화 방법, 골 재생용 지지체의 제조 방법, 및 골 손상 또는 대사성 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0019] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, (a) 2 차원 배양 조건에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 (tonsil-derived mesenchymal stem cell)에 골 분화를 유도하는 단계; 및 (b) 상기 골 분화가 유도된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 생분해성 고분자 지지체에 혼입시키고 골 분화 조건에서 추가적으로 배양하는 단계를 포함하는, 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골 분화 방법이다.

[0020] 본 발명에서 용어 “중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell, MSC)”는, 골수, 재대혈, 말초혈액, 기타 조직 등에 존재하는 줄기세포의 하나로 기본적으로 골, 연골, 지방 등 중배엽성 세포로 분화될 수 있는 성체 줄기세포를 의미한다. 특히 본 발명에서 사용되는 중간엽 줄기세포는 편도 조직으로부터 유래된 것으로, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 골세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포등의 중배엽성 조직세포로 분화될 뿐만 아니라 부갑상선 조직세포로도 분화될 수 있어, 세포 치료제 자원으로서 활용가치가 매우 높다. 본 발명에서 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포는 편도에서 유래된 것이라면 그 종류에 특별히 제한되지 않으며, 최소한의 중간엽 줄기세포의 정의를 만족하면 모두 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 본다. 예컨대, 본 발명의 편도 유래 줄기세포는 편도 절제술을 통해 수득된 편도로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 한편, 중간엽 줄기세포의 정의는 학계에서도 분명하지 않은 상황이지만, 당업자들은 적어도 중배엽성 (mesodermal lineage) 분화능을 가지는 성체줄기세포를 중간엽 줄기세포로 인식할 수 있다. 이 보다 다소 넓은 개념으로, 본 발명에서 중간엽 줄기세포는 중간엽 기질 세포 (mesenchymal stromal cell), 골 전구세포 등을 모두 포함할 수 있다. 일차적인 본 발명의 목적은 편도로부터 유래된 골 분화능을 가지는 세포를 생분해성 고분자에 적용하여 높은 수준의 골 분화를 유도하는데 있으므로 상기 기준을 만족하는 경우라면 (즉, 편도 조직으로부터

터 유래된 골 분화가 가능한 세포라면) 본 발명의 범주 내에 모두 포함되는 것으로 볼 수 있다. 따라서, 본 발명에서 편도 유래 중간엽 줄기세포라 함은 편도조직으로부터 분리되고, 특히 골 조직으로 분화가 가능한 세포를 의미하며, 추가적으로 연골, 지방 및 근육 조직 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 조직으로 분화가 가능한 세포를 모두 포함할 수 있다. 편도 유래 중간엽 줄기세포를 분리하기 위한 방법의 일 예시로서 대한민국 등록특허 제10-1520531호, 제10-1520536호, 대한민국 공개특허 제10-2015-0098227호 등에 개시된 내용이 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있다.

[0022] 본 발명에서 용어, “편도 조직”은, 흔히 구개편도를 일컫는 것으로 입안에 양쪽 좌우에 붙어있는 신체기관이다. 코 안쪽, 혀 뿌리 등에도 편도는 존재하여 인두편도, 귀인두관편도, 혀편도 등도 포함된다. 편도조직은 외부에서 침입하는 세균등의 물질로부터 일차적으로 신체를 방어하는 면역 조직으로서, 본 발명에서 상기 편도조직은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 제공하는 공급원으로 사용된다.

[0023] 본 발명에서는 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포를 이용하여 골 세포를 제조하는 골 분화 방법을 제공한다. 본 발명의 용어, “골 세포 (osteocyte)”란, 결합조직의 섬유아세포에서 형성되는 것을 말하며, 분화 과정에서 골아세포 단계 (osteoblast)를 거쳐, 이것이 기질을 만들고 그 기질 속에 자신이 들어가 골세포로 형성된다. 다수의 가는 원형질 돌기를 가지고 있으며, 기질 내의 골 세포관을 통하여 인접한 골세포의 돌기와 합쳐진다. 본 발명의 분화 방법은 분화를 유도하는 기간에 따라 분화 수준이 달라질 수 있으므로, 본 발명에서 골 세포는 다소 넓은 의미로, 골아세포까지 모두 포함하는 것으로 본다.

[0024] 본 발명의 용어, “미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포”는, 편도조직으로부터 분리된 편도 유래 중간엽 줄기세포가 특정한 조직의 세포로의 분화단계를 거치지 않은 것을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포는 편도 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포로 배양 배지에서 유지된 세포를 의미한다. 본 발명에서 배양 배지는 중간엽 줄기세포의 미분화 상태를 유지할 수 있는 배지를 의미하고, 분화 배지는 미분화 중간엽 줄기세포의 분화를 유도할 수 있는 배지를 의미한다.

[0026] 이하, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골 분화 방법의 각 단계를 상세히 설명한다.

[0028] (a) 단계는, 2 차원 배양 조건에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 (tonsil-derived mesenchymal stem cell)에 골 분화를 유도하는 단계로서, 편도 유래 중간엽 줄기세포를 생분해성 고분자 지지체에 혼입하기 전 선분화시키는 단계이다.

[0029] 본 발명에서 용어, “선분화 (pre-differentiation)”는, 상기 미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포를 편도 조직으로부터 분리하여 배양배지에서 2 차원 배양한 후, 골조직 재생용 생체활성 지지체와 혼입을 하기 전에 조성된 골 분화 배지에서 일정기간 분화과정을 거치는 것을 의미한다. 본 발명에서 미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포는 당업계에서 통상적으로 사용되는 배양 조건에 의해 미분화 상태를 유지하며 배양될 수 있다. 즉, 본 발명에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양 배지 (미분화 배지)와 2 차원 배양 조건은 특별히 제한되지 않으며, 중간엽 줄기세포의 미분화 상태가 유지되는 경우라면 당업자는 적절한 배양 배지 및 배양 조건을 선택하여 사용할 수 있다. 이에, 본 발명에서 사용되는 편도 유래 중간엽 줄기세포는 초대 배양 (primary culture), 계대 배양 (subculture), 또는 동결보존된 중간엽 줄기세포를 접종하여 배양하는 경우에 있어서, 2 차원 배양 조건에서 적절한 배양 배지 및 배양 조건을 통해 미분화 상태로 배양될 수 있다.

[0030] 본 발명에서 상기 미분화 상태의 편도 유래 중간엽 줄기세포는 생분해성 고분자 지지체에 혼입되기 전, 필수적으로 선분화 단계를 거친다. 본 발명에서, “골 분화 배지”는 줄기세포 또는 전구세포의 골 분화를 유도하는 조성의 배지를 의미하는데, 상기 배양 배지와 마찬가지로 이 역시 당업계에 공지된 분화 배지가 사용될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상기 골 분화 배지는 미분화 배지에 100 μ M/ml 아스코빅산, 2 mM β -글리세로포스페이트, 10 mM 텍사메타손을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명에서 미분화 편도 유래 중간엽 줄기세포를 분화 배지에서 2 차원 배양하여 골 분화를 유도하는 단계는, 상술한 바와 같이 생분해성 고분자 지지체에 혼입되기 전 수행되는 것으로, 구체적으로 3 일 내지 7 일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 구체적 일 실시예에서는, 편도 유래 중간엽 줄기세포를 생분해성 고분자 지지체에 적용하는데

있어서, 다양한 분화 조건을 설정하여 이들이 골 분화에 미치는 영향을 평가하였다 (도 1). 그 결과, 생분해성 고분자 지지체에 혼입하자마자, 또는 혼입 3 일 후부터 골 분화를 유도한 그룹 (그룹 2 및 그룹 3)에 비하여, 먼저 2 차원 배양 조건에서 3 일간 골 분화를 유도한 뒤, 생분해성 고분자 지지체에 혼입하여 분화 조건을 유지한 경우 (그룹 4)에 ALP (alkaline phosphatase) 활성 (도 2), 칼슘 함량 (도 3) 및 골 분화 관련 유전자 발현 (도 4)에서 현저한 효과를 확인할 수 있었다. 더 나아가, 상기와 같은 효과가 선분화 기간에 따라질 수 있는지 확인하기 위해 선분화 유도 기간을 달리하여 실험을 설계한 결과 (도 5), 3 일간 선분화 한 경우 가장 높은 ALP 활성을 보였지만, 나머지 조건, 즉 5 일 또는 7 일간 선분화한 경우에도 대조군 대비 높은 ALP 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명은 생분해성 고분자 지지체에 혼입 전 편도 유래 중간엽 줄기세포에 먼저 선분화 조건으로 골 분화를 유도하는 것에 기술적 특징이 있다.

- [0035] (b) 단계는, 상기 골 분화가 유도된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 생분해성 고분자 지지체에 혼입시키고 골 분화 조건에서 추가적으로 배양하는 단계로서, 선분화 단계를 통해 이미 분화된 세포를 생분해성 고분자 지지체에 서 추가적으로 분화시키는 단계이다.
- [0036] 본 발명에서 용어 “생분해성 고분자 (biodegradable polymer)”는 생체 내에서 분해되는 고분자로서 생체 흡수성 고분자 재료를 의미한다. 본 발명의 용어 “생분해성 고분자 지지체 (scaffold)”란, 손상되거나 결손된 부위에 이식하거나 충진을 통하여 손실된 부위를 지지해줄 뿐만 아니라 주변의 자가 조직이 상기 부위에 새로운 조직을 형성시키도록 유도시키는 기능을 가진 생체재료를 의미한다. 특히 상기 지지체는 생분해성 고분자 소재를 포함하므로, 이로 인해 지지체가 기능과 역할을 충분히 수행할 때까지 유지된 후 생체 내에서 완전히 분해되어 없어질 수 있다. 상기 지지체로 사용될 수 있는 생분해성 고분자는 예를 들어, 폴리카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락트산-글리콜산 공중합체 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 생분해성 고분자 지지체에 줄기세포를 혼입시켜 골 분화를 유도하는 경우 분화 유도 시기 및 세포의 종류, 상태 등에 따라 세포의 분화 수준이 달라질 수 있으며, 특히 본 발명에서는 상술한 바와 같이 지지체 혼입 전 선분화시키는 것을 특징으로 한다.
- [0037] 상기 생분해성 고분자 지지체의 제조 방법은 특별히 제한되지 않으며, 본 발명의 편도 유래 줄기세포 또는 이로부터 분화된 세포가 부착되어 배양 및 분화 유도될 수 있는 것이라면, 당업계에 공지된 방법을 통해 제조될 수 있다. 예를 들어 상기 생분해성 고분자 지지체는 3 차원 쾌속 조형 기법 (Rapid Prototyping)을 이용하여 제조된 것일 수 있다. 3 차원 쾌속 조형 기법은 3D 프린팅과 같은 의미로 통용되며, 3 차원 영상 자료의 2 차원 단면화를 통해서 재료를 체계적으로 한 층씩 적층함으로써 실제 3 차원 모델을 빠른 시간 안에 제작할 수 있는 기술을 일컫는다.
- [0038] 상기 (a) 단계를 통해 골 분화가 유도된 세포를 생분해성 고분자 지지체에 혼입시킨 뒤, 지지체에 세포가 부착됨으로써 생분해성 고분자 지지체, 및 골 분화된 편도 유래 줄기세포, 즉 골 세포의 복합체를 형성하게 되는데, 본 발명에서는 상기 복합체 상태로 추가적으로 분화 배지에서 배양하는 단계 (후분화 단계)를 포함한다.
- [0039] 상기 후분화 단계는 상기 (a) 단계에서 사용된 것과 동일한 분화 배지, 혹은 다른 조성을 가지는 골 분화 배지를 사용할 수 있으며, 사용되는 세포의 종류 및 사용하고자 하는 목적에 따라 분화 기간을 조절할 수 있다. 예컨대, 상기 후분화 단계는 7 일 내지 21 일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 다른 하나의 양태는, (a) 2 차원 배양 조건에서 편도 유래 중간엽 줄기세포 (tongue-derived mesenchymal stem cell)에 골 분화를 유도하는 단계; 및 (b) 상기 골 분화가 유도된 편도 유래 중간엽 줄기세포를 생분해성 고분자 지지체에 혼입시키고 골 분화 조건에서 추가적으로 배양하는 단계를 포함하는, 골 재생용 지지체 제조 방법이다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 양태는, 상기 (a) 및 (b) 단계를 포함하는, 골 손상 또는 대사성 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조 방법이다.
- [0043] (a) 및 (b)의 각 단계는 상기 설명한 바와 같다.
- [0044] 상술한 본 발명의 골 분화 방법을 통해 제조된 생분해성 고분자 지지체 및 골 세포의 복합체는 생체 내 이식될 경우 조직에 생착되어 골 재생을 유도 혹은 촉진시킬 수 있어, 골 재생용 지지체로 이용될 수 있다. 본 발명에서 용어, “골 재생”은 손상된 골 조직을 골 세포가 증식하거나 또는 골아세포가 골 세포로 분화하는 등의 과

정을 거쳐 골 손상을 치료, 완화, 개선시키는 모든 현상을 의미할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 특히 상기 골 재생은 본원발명의 제조 방법에 의해 제조된 골 재생용 지지체를 체내에 이식함에 의한 것일 수 있다.

[0045] 본 발명에서 “골 재생용 지지체”는 그 형태와 상관없이 이식의 대상이 되는 골 손상 부위의 형태와 반드시 일치할 필요는 없고, 유사한 형태로 성형이 가공한 정도의 상태이면 족하다. 그러나, 필요에 따라서는 이식 대상의 골 손상 부위의 형태를 미리 파악하여 이에 맞는 모양을 제조할 수도 있으며, 다양한 상황에 일반적으로 적용될 수 있도록 막의 구조 또는 띠의 구조 등으로 미리 형상화 시킨 것일 수도 있다. 이를 위해서는 상기의 골 재생용 지지체의 성형성을 증가시키기 위한 다양한 재료가 더 첨가될 수 있다. 즉, 생체적합성이 뛰어난 선형의 소재, 튜브형의 소재, 입자형의 소재 및 부정형의 소재 등이 더 첨가되어 상기 골 재생용 지지체의 물리적 특성을 향상시킬 수 있다. 이러한 형태의 소재들은 콜라겐, 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose, CMC) 또는 동물 유래 젤라틴 등의 소재로부터 선택될 수 있으며, 이식 대상에 면역반응을 유발하지 않는다면 특별히 제한되지 않는다.

[0046] 더 나아가, 이러한 골 재생 효과에 따라, 상기 골 재생용 지지체를 포함하는 조성물은 골 손상 또는 대사성 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 활용될 수 있다. 상기 골 손상 질환으로는 골절, 골 관절염, 골 괴사, 외상으로 인한 골 결손 등을 포함하고, 대사성 골 질환으로 골위축, 골다공증 또는 구루병 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 본 발명에 따른 조성물은 공지의 방법에 따라 환자의 환부 내 또는 그 주변에 이식될 수 있으며, 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자를 고려하여 투여하는 세포의 수를 조절할 수 있다. 투여되는 골 세포의 수는 바람직하게는 1×10^3 내지 1×10^9 세포/cm³, 보다 바람직하게는 1×10^4 내지 1×10^8 세포/cm³, 가장 바람직하게는 5×10^6 내지 5×10^7 세포/cm³일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0049] 본 발명에서는 골 손상 질환을 치료하기 위한 가장 효과적인 골 재생용 지지체를 생산하기 위한 골 분화 방법을 제공한다. 이에 본 발명은 선천적으로 혹은 유전적으로 뼈의 손상을 가지고 있거나, 외상, 종양제거 등으로 조직이 손실되었을 시, 편도 유래 줄기세포로부터 분화된 골 세포를 적정 시기에 생체재료에 주입하여 3 차원 배양 방식을 적용한 조직 공학적 세포치료제 등의 바이오신약 생산에 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 편도 유래 줄기세포가 선분화 또는 후분화 조건에 따른 혼입된 지지체 (편도 줄기세포-지지체)의 배양 조건을 모식도로 나타낸 것이다.

도 2는 분화된 편도 유래 줄기세포-지지체의 ALP의 활성도를 조사한 결과로서 가장 효과적인 골지지체 배양방법을 확인한 것이다.

도 3은 분화된 편도 유래 줄기세포-지지체에서 조골세포 후기 분화 마커인 칼슘 침착 농도를 조사한 결과로서 가장 효과적인 골 지지체 배양방법을 확인한 것이다.

도 4는 분화된 편도 유래 줄기세포-지지체에서 조골세포 분화인자의 발현을 조사한 결과로서 가장 효과적인 골 지지체 배양방법을 확인한 것이다.

도 5는 선분화의 조건에 따른 편도 유래 줄기세포가 혼입된 지지체 (편도 줄기세포-지지체)의 배양 조건을 모식도로 나타낸 것이다.

도 6은 편도 유래 줄기세포를 3 일, 5 일 또는 7 일 동안 골 세포로 선분화시켜 지지체에 혼입 후, 다시 골 분화 배양액으로 분화시켜 골 지지체로 유도하고, ALP 활성도를 조사한 결과로서, 지지체에 주입 전 줄기세포의 최적 분화기간을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1: 재료 및 방법**

[0056] **실시예 1-1: 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양**

[0057] 편도 유래 줄기세포 (tonsil-derived mesenchymal stem cells, T-MSCs)는 10 % FBS (Hyclone), 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (GIBCO)이 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)에서 배양하였다 (미분화 배지).

[0059] **실시예 1-2: 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골세포로의 분화**

[0060] 본 발명자들은 편도 유래 줄기세포를 생분해성 고분자에 혼입하여 분화시킴에 있어서, 분화를 유도하는 시기에 따라 분화능력이 달라질 것으로 보았다. 이에, 먼저 지지체에 세포를 주입하기 전 분화유도 시기에 따른 분화능력을 평가하기 위해, 전처리 조건을 확립하고자 하였다.

[0062] 분화를 유도하기 위하여 배양중인 줄기세포를 상기 언급된 미분화 배지에 100 μ M/ml 아스코빅산 (ascrobic acid, Sigma-Aldrich), 2 mM β -글리세로포스페이트 (β -glycerophosphate, Sigma-Aldrich), 10 mM 덱사메타손 (dexamethasone, Thermo Fisher)을 첨가하였다 (분화 배지). 이어서 최적의 골 지지체 형성조건을 확립하기 위해 제조방법 (그룹)별로 분화 수준을 확인하였다. 도 1에서 보는 바와 같이 그룹 1은 미분화 줄기세포를 지지체에 혼입 (mixing 혹은 embedding) 후 계속 미분화 배지에서 배양한 것이다 (대조군). 그룹 2는 기존에 알려진 방법인 미분화 줄기세포를 지지체에 혼입 후 곧 바로 분화배지에서 배양한 것이다 (양성 대조군). 그룹 3은 미분화 줄기세포를 지지체에 혼입 후 미분화 배지에서 3 일 동안 배양한 다음, 분화배지로 바꾸어 배양한 것이다 (실험군 1). 그룹 4는 미분화 줄기세포를 지지체에 혼입하기 전, 3 일간 분화 배양액으로 선분화시킨 줄기세포를 지지체에 주입한 다음, 계속 분화배지에서 배양한 것이다 (실험군 2).

[0063] 또한, 3 일 동안 선분화시키는 조건이 최적의 조건인지를 알기 위해서 편도 유래 줄기세포를 지지체에 혼입 전 3 일 (D-3) 이외에 5 일 (D-5), 또는 7 일 (D-7) 동안 선분화 (pre-differentiation)시켜 골 형성을 비교한 실험 역시 수행하였다 (도 5).

[0065] **실시예 1-3: 지지체 제작**

[0066] 3 차원 쾌속 조형 기법 (Rapid Prototyping, RP)을 이용하여 생분해성 고분자인 폴리카프로락톤 (Polycaprolactone; PCL, MW: 70,000 - 90,000, Sigma-Aldrich, USA) 지지체를 제작하였다. PCL 4 g을 첨가하고, 아세톤 (Junsei, Tokyo, Japan) 10 ml을 더하여 60 $^{\circ}$ C에서 500 RPM으로 교반하며 용해시켰다. 용해된 혼합액을 50 $^{\circ}$ C로 설정된 히팅블록 (Wisestir, Germany) 위에서 예열한 뒤 RP 장비 (EZ-ROBO5, Iwashita, Japan)용 주사기에 PCL 용액을 주입하고, 상기 주사기에 플런저를 넣고 주사기 안의 공기를 빼준 뒤 25 G 니들을 주사기에 장착하였다. 상기 주사기를 어답터 어셈블리 주사기에 연결시키고, 오토메틱 디펜서 (Model : AD 3000C, IWASHITA, Japan)에 있는 에어 프레셔를 작동시켜서 PCL 용액이 잘 분사되는지 확인하고 PCL 용액이 들어있는 주사기를 히팅블록에 고정시켜 준 뒤 본체 부분에 100 % 알코올 200 ml이 들어있는 15 x 4 cm 디쉬를 장착하였다. RP 장비의 공기압을 55 Kpa로 설정하고, 속도는 5 mm/sec 로 설정하고 분사하여 PCL 지지체를 제작하였다.

[0068] **실시예 1-4: 편도 유래 중간엽 줄기세포의 골세포로의 분화 후 지지체 혼입**

[0069] 24-웰 플레이트 (Falcon, USA)에 지지체를 넣고 완충용액 (PBS, GIBCO)으로 3 회 세척한 뒤 미분화 배지에 100 μ M/ml 아스코빅산 (Sigma-Aldrich), 2 mM β -글리세로포스페이트 (Sigma-Aldrich), 10 mM 덱사메타손 (Thermo Fisher)이 첨가된 분화배지에서 3, 5 또는 7 일 동안 분화시킨 편도유래중간엽 줄기세포를 회수한 후 1×10^6

개의 세포를 분주, 혼입하고, 각 그룹별 상기 배양조건에 따라 실시하고 3 또는 7 일 동안 배양하였다.

[0071] 실시예 1-5: 지지 복합체의 골재생능 확인

[0072] 실시예 1-5-1: 알칼리성 포스파타제 활성도 평가 (Alkaline Phosphatase activity)

[0073] 24-웰 플레이트 (Falcon, USA)에 지지체를 넣고 완충용액 (PBS, GIBCO)으로 3 회 세척한 뒤 1×10^6 개의 편도 유래 줄기세포를 분주하고, 상기 배양조건에 따라 실시한 다음 3 또는 7 일 동안 배양하였다. 세포를 완충용액으로 세척한 뒤, $1 \times$ RIPA 용액 (RIPA Lysis Buffer, Darmstadt, Germany)을 주입하고 0 °C에서 110 W로 1 분 동안 초음파 처리하여 세포를 용해시켰다. 그 다음 4 °C에서 3 분 동안 13,500 rpm으로 원심분리한 뒤, 상층액에 p-니트로페닐포스파테이트 용액 (Sigma-Aldrich)을 첨가하여 37 °C에서 30 분 동안 배양한 후, 0.5 ml의 1 N NaOH로 반응을 정지하였다. 405 nm에서 흡광도를 측정 (Varioskan Flash, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA)하여 활성도를 확인하였다.

[0075] 실시예 1-5-2: 칼슘 침착 평가

[0076] 24-웰 플레이트에 지지체를 넣고 완충용액으로 3 회 세척한 뒤 1×10^6 개의 편도 유래 줄기세포를 분주하고, 각 배양조건에 따라 7 또는 21 일 동안 세포를 배양하였다. 세포를 완충용액으로 세척한 뒤, Tris-EDTA 용액으로 각각의 세포를 분리한 후 13,500 rpm으로 1 분간 원심분리하였다. 그 다음, 0.1 % 트리톤 X-100 용액을 세포에 넣고, 4 °C에서 1 분간 초음파를 가하여 세포막을 분쇄하고, 원심분리를 하였다. 상층액을 분리한 뒤, QuantiChromTM Calcium Assay 키트를 이용하여 612 nm에서 흡광도를 측정 비교하여 칼슘 침착을 확인하였다.

[0078] 실시예 1-5-3: 유전자 발현 분석

[0079] 24-웰 플레이트에 지지체를 넣고 완충용액으로 3 회 세척한 뒤 1×10^6 개의 편도 유래 줄기세포를 분주하고 7 또는 21 일 동안 배양하였다. 세포를 완충용액으로 세척한 뒤, Tris-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA) 용액으로 각각의 세포를 분리하고 13,500 rpm으로 1 분간 원심분리하였다. 그 다음, 세포에 Trizol 시약 (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA)과 클로로포름 (Junsei, Tokyo, Japan)을 넣어주고, 4 °C에서 1 분간 초음파를 가하여 세포를 파쇄한 뒤, 원심분리를 하였다. RNeasy Mini kit (RNeasy mini kit; Qiagen, Doncaster, VIC, Australia)를 이용하여 상층액으로부터 RNA를 분리하고, NanoDrop (Nanodrop 2000, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA) 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. AccuPower RT-PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용하여 분리된 RNA로부터 cDNA를 합성한 뒤, 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real-time PCR; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 을 수행하였다.

표 1

[0081] RT-PCR에 사용된 프라이머의 염기서열

명칭	염기서열 (5'-3')	산물의 크기 (bp)	서열번호
ALP forward	CCGTGGCAACTCTATCTTTGG	70	1
ALP reverse	GATGGCAGTGAAGGGCTTCTT	70	2
RUNX-2 forward	GCCTTCAAGGTGGTAGCCC	67	3
RUNX-2 reverse	CGTTACCCGCCATGACAGTA	67	4
OPN forward	CGGGACCAGACTCGTCTC	59	5
OPN reverse	TTCCTTGGTCGGCGTTTG	59	6
OCN forward	GTGCAGCCTTTGTGTCCAA	129	7
OCN reverse	GCTCACACACCTCCCTCCT	129	8

[0083] 실시예 1-6: 통계 분석

[0084] 데이터를 평균 $\pm$ 표준편차(S.E.)로 표시하고, 통계적으로 유의한 값은 GRAPHPAD PRISM 소프트웨어(GraphPadSoftware Inc., San Diego, CA)를 이용하여 One-way ANOVA로 분석하였다. $P < 0.05$ 로 통계적 유의수준을 결정하였으며, 모든 실험은 적어도 3 회 반복 수행하였다.

[0086] 실시예 2: 편도 유래 줄기세포의 최적의 골 분화 조건 확립

[0088] 편도 유래 줄기세포로부터 골 분화가 유도된 세포를 세포 치료에 적용함에 있어서, 이식된 세포의 생착률, 생존성, 기능성 등을 고려할 때, 이식하고자 하는 세포를 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)과 같은 생분해성 고분자 지지체에 혼입시켜 이용하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 기존에 2D 배양 방식에서 확립된 골 분화 또는 골 형성 조건과는 별개로, 상기 생분해성 지지체에서 편도 유래 중간엽 줄기세포의 효과적인 분화방법이 확립될 필요가 있다.

[0090] 이에, 본 발명자들은 지지체에 혼입하는 편도 유래 줄기세포의 골 형성과 관련하여 최적의 분화조건을 확인하기 위하여, 편도 유래 줄기세포를 지지체에 혼입하기 전 조건 및 후 조건으로 나누고 이들을 배양 및 분화시켜 골 분화 수준을 평가하였다(도 1).

[0092] 먼저, 조골세포 초기분화 인자인 알칼리성 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP) 활성도를 측정한 결과, 혼입 후 3 일 및 7 일째에, 분화배지를 사용한 배양한 그룹 2, 3 및 4 모두 미분화 배지를 사용한 그룹 1보다 ALP 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 2). 특히, 그 중에서도 혼입 전 3 일 동안 분화 배양액으로 선분화한 그룹 4가, 지지체에 미분화세포를 주입한 후 골 분화 배지에서 배양하거나(그룹 2), 지지체에 미분화세포를 주입 후 3 일간 미분화 배지에서 배양한 뒤 골 분화 배지에서 배양한 경우(그룹 3)에 비해, ALP의 활성이 현저히 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 2).

[0094] 다음으로, 상기 각각의 골 분화 조건에 대하여 조골세포 후기 분화 마커인 칼슘의 침착 정도를 측정한 결과, 배양 3 일째와 7 일째 모두 분화배지에서 배양한 그룹 2, 3, 4에서 대조군인 그룹 1 보다 유효성 있는 증가를 보였고, 더 나아가 상기 ALP 활성과 마찬가지로 그룹 4가 가장 우수한 활성도를 나타내었다(도 3).

[0096] 또한, 골 조직으로의 분화능을 평가하기 위하여, 초기(ALP, RUNX-2)와 후기(Osteocalcin, Osteopontin) 골 분화 인자의 발현을 real-time PCR을 통해 확인하였다. 그 결과, 모든 인자의 발현이 배양 7 일째와 21 일째에 그룹 2, 3, 4(분화배지사용)에서 그룹 1(미분화배지 사용)보다 유의적인 증가를 보였고, 상기 ALP 활성 및 칼슘 침착의 결과와 마찬가지로 그룹 4가 가장 높은 발현율을 나타내었다. 특히, 초기 분화 인자는 7 일째에, 후기 분화 인자는 21 일째에 급격히 증가하는 것을 확인하였다(도 4).

[0098] 실시예 3: 골 지지체에 혼입하기 전 편도 줄기세포의 선 배양 조건에 따른 골 형성 조사

[0100] 상기 결과는 일관적으로 지지체에 혼입하기 3 일 전, 먼저 분화를 유도하는 것이 더 나은 수준의 골 분화를 유도할 수 있음을 의미하는 것이다.

[0101] 이에, 지지체에 혼입하는 편도 유래 줄기세포의 골 형성과 관련하여 최적의 선분화 조건을 얻기 위해, 먼저 편도 유래 줄기세포를 지지체에 혼입하기 전 3 일(D-3), 5 일(D-5) 또는 7 일(D-7) 동안 분화시켰다. 대조군으로는 미분화 줄기세포를 사용하였다(도 5). 상기 다양한 조건의 줄기세포를 혼입한 지지체(즉, 줄기세포-지지체)를 다시 골 분화 배지에서 배양하고 7 일째에 ALP의 활성도를 조사하였다.

[0102] 그 결과, 7 일까지 배양시킨 줄기세포-지지체(골 지지체)를 보면, D-3의 ALP 활성이 가장 높은 것을 확인할 수

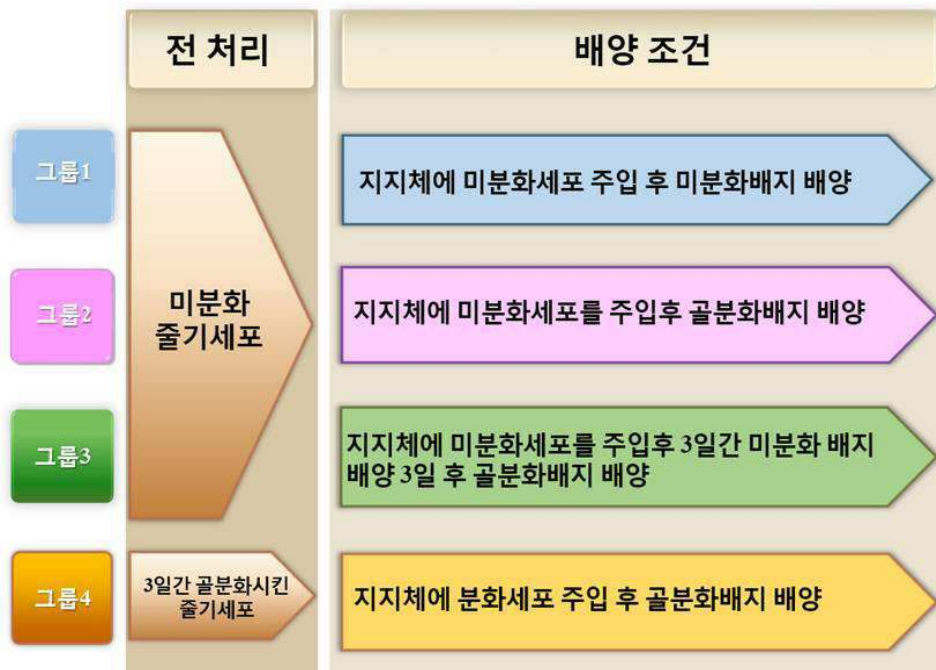
있었으며, 5 일 또는 7 일간 선분화를 유도한 경우에도, 미분화 줄기세포를 지지체에 혼입한 뒤 곧 바로 분화시킨 대조군에 비해 ALP 활성이 현저히 높은 것으로 나타났다. 기존에 보고된 통상적인 *in vivo* 조건에서의 골 형성 기간이 21일 보다 긴 것을 생각한다면, 본 발명에 따른 최적의 골 지지체 형성을 위한 편도유래줄기세포의 선분화 조건은 3 일 내지 7 일이 최적 기간임을 알 수 있다 (도 6).

[0104] 3 차원 지지체를 이용한 세포 치료에 있어서, 통상적으로 미분화 세포를 지지체에 혼입한 뒤 분화 조건을 수행하는 것을 고려할 때, 상기 결과들은 지지체 혼입 전 먼저 분화를 유도하는 것이 더 유리할 수 있음을 확인하였다는 점에서 의미가 있다. 본 발명은 생적합성 고분자를 이용하여 편도 유래 줄기세포로부터 골 분화가 유도된 세포를 제조함에 있어서, 기존에 알려진 것 보다 우수한 수준의 골 세포 (혹은 이를 포함하는 골 지지체)를 제조할 수 있고, 상기 제조 방법은 매우 단기간에 분화를 유도할 수 있는바, 본 발명을 통해 제조된 골 지지체는 골 결손의 예방 또는 치료를 위한 조성물로도 매우 유용하게 사용될 수 있다.

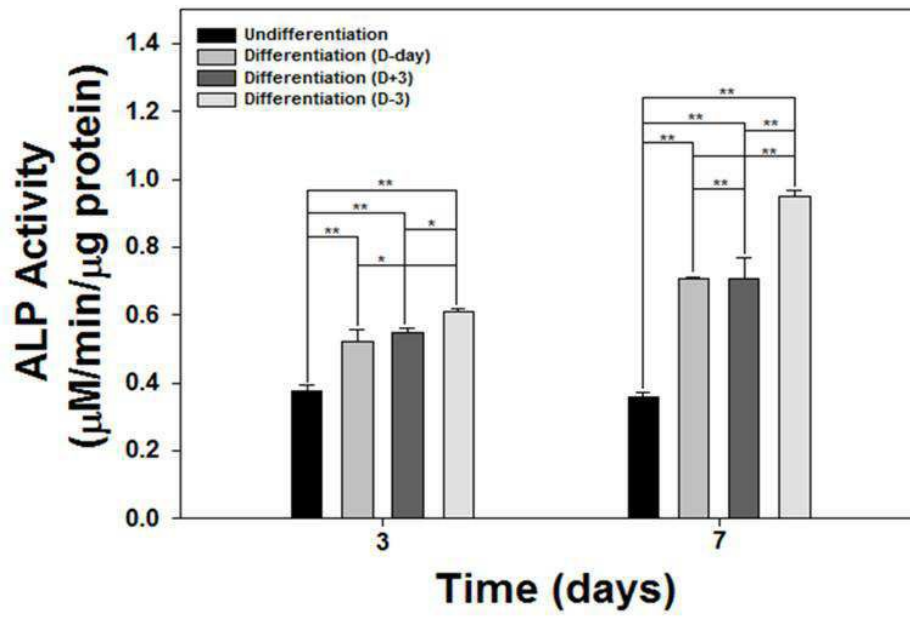
[0106] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

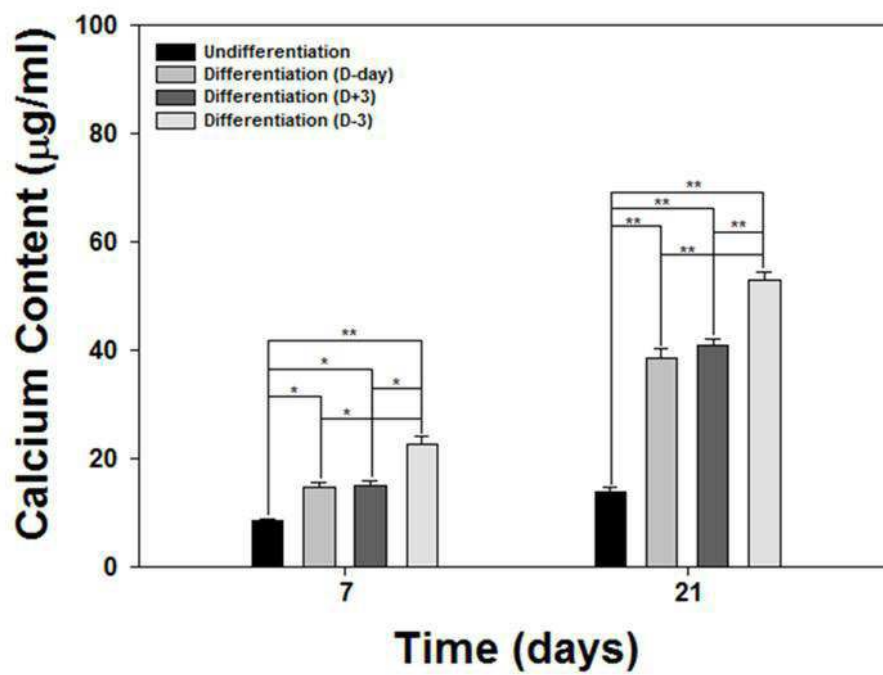
도면1



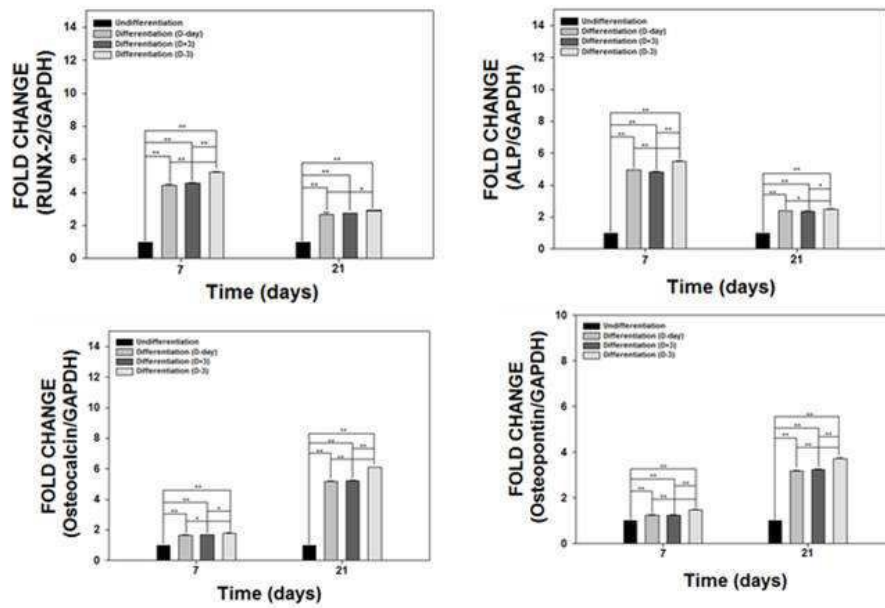
도면2



도면3



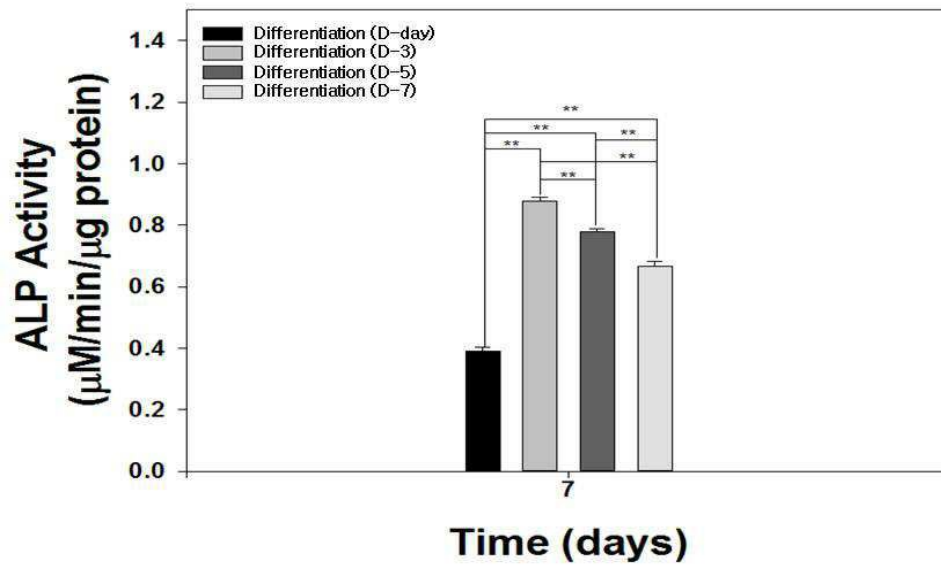
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION
KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Preconditioning method for optimal bone formation of
tonsil-derived mesenchymal stem cells on a biodegradable polymer
scaffold
- <130> P17-020-EWHA
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> ALP forward
- <400> 1
- ccgtggcaac tctatctttg g

21

- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> ALP reverse

<400>	2	
gatggcagtg aagggttct t		21
<210>	3	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	RUNX-2 forward	
<400>	3	
gccttcaagg tggtagccc		19
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	RUNX-2 reverse	
<400>	4	
cgttaccgc catgacagta		20
<210>	5	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OPN forward	
<400>	5	
cgggaccaga ctggtctc		18
<210>	6	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OPN reverse	
<400>	6	
ttccttggtc ggcgtttg		18
<210>	7	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> OCN forward

<400> 7

gtgcagcctt tgtgtccaa

19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OCN reverse

<400> 8

gctcacacac ctcctcct

19