



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월26일
(11) 등록번호 10-2169924
(24) 등록일자 2020년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/32 (2015.01) A61P 19/02 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0655 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0034441
(22) 출원일자 2019년03월26일
심사청구일자 2019년03월26일
(65) 공개번호 10-2020-0113769
(43) 공개일자 2020년10월07일
(56) 선행기술조사문헌
Acta Biomater. 3(5):677-85 (2007.09.)*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
홍진기
서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동, 연세대학교)
한의영
서울특별시 서대문구 연희로33길 29-3(연희동)
(74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 13 항

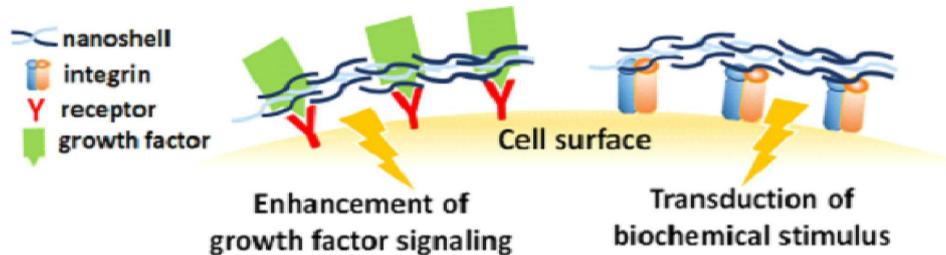
심사관 : 유성진

(54) 발명의 명칭 연골세포 분화 유도용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 연골세포 분화 유도용 조성물, 상기 조성물을 이용한 연골세포 분화 유도 방법 및 상기 조성물을 포함하는 연골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/32 (2013.01)
A61P 19/02 (2018.01)
C12N 5/0006 (2013.01)
C12N 2506/1346 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20140105954 A1*
 KR1020090010607 A*
 KR101653992 B1
 KR1020170100693 A
 KR1020140043398 A
 JP2007528706 A
 EP01661580 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017R1E1A1A01074343
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재)한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	피부세포의 노화억제를 위한 산화질소 나노전달체 개발에 관한 연구
기여율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.11.01 ~ 2022.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711078071
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재)한국연구재단
연구사업명	실험실 특화형 창업선도대학사업
연구과제명	줄기세포 기능 및 분화 증대를 위한 세포표면 다기능성 다층박막 코팅 기술
기여율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2018.05.01 ~ 2021.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

피브로넥틴(fibronectin); 및

헤파린(heparin) 또는 콘드로이틴황산염(chondroitin sulfate)의 물질을 포함하는, 연골세포 분화 유도용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 물질은 줄기세포 표면에 코팅되는 것인, 연골세포 분화 유도용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 물질은 줄기세포 표면에 반복적으로 코팅되어 2 내지 8층의 코팅층을 형성하는 것인, 연골세포 분화 유도용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 코팅층은

피브로넥틴 및 헤파린의 반복 코팅; 및

피브로넥틴 및 콘드로이틴황산염의 반복 코팅으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 연골세포 분화 유도용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 코팅층은 줄기세포 표면에 나노껍질(nano-shell)을 형성하는 것인, 연골세포 분화 유도용 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것인, 연골세포 분화 유도용 조성물.

청구항 7

생체 외에서 피브로넥틴(fibronectin); 및

헤파린(heparin) 또는 콘드로이틴황산염(chondroitin sulfate)의 물질을 줄기세포에 코팅하는 단계를 포함하는, 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 유도 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 물질은 줄기세포 표면에 반복적으로 코팅되어 2 내지 8의 코팅층을 형성하는 것인, 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 유도 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 코팅층은

피브로넥틴 및 헤파린의 반복 코팅; 및

피브로넥틴 및 콘드로이틴황산염의 반복 코팅으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 연골세포 분화 유도 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것인, 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 유도 방법.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 연골세포 분화 유도용 조성물을 포함하는, 연골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 연골 질환은 골관절염, 변형성 관절증, 연골형성이상증, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골연화증, 섬유성 골염 및 무형성 골질환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 연골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 연골세포 분화 유도용 조성물은 줄기세포 표면에 코팅되는 것인, 연골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 연골세포 분화 유도용 조성물, 상기 조성물을 이용한 연골세포 분화 유도 방법 및 상기 조성물을 포함하는 연골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포는 연골세포, 조골세포, 지방세포 또는 근육세포 등으로 분화할 수 있는 다분화능 세포로서, 체외에서도 형질의 변화 없이 무한으로 증식할 수 있기 때문에 재생 의학 분야와 조직 공학 분야에서 꾸준히 연구되고 있다.

[0003] 특히, 부착형 세포(adhesion cell)인 중간엽 줄기세포는 기질의 경도(stiffness) 따라, 분화 방향이 조절된다. 기질의 경도가 높을수록 뼈로 분화가 쉬우며 부드러운 기질일수록 연골이나 근육세포로의 분화가 촉진 된다. 기질의 물리적 특성을 조절하는 기술은 2차원의 기관으로 구현되는 경우가 많고, 이는 체내 환경에서 적용하기 어렵다는 단점을 갖는다.

[0004] 한편, 연골 분화를 촉진하는 성장인자(TGF-β1) 및 그 신호를 강화시키는 각종 물질들이 포함된 하이드로젤 내에서 3차원 배양을 통한 분화를 조절한 연구도 보고되고 있다. 하지만, 겔 구조의 특성상 세포의 활동을 제한하여, 증식의 효율이 낮아질 수 있다.

[0005] 한편, 기존 연골 치료용 줄기세포 치료제는 줄기세포를 이식할 때 통상 히알루론산 하이드로젤이 사용되며, 모든 세포에 동일한 환경을 제공하기 때문에, 골관절염과 같은 염증을 동반한 다발성 연골 손상 질병에서는 치료 효율이 낮아지게 되는 문제가 있어, 이러한 한계를 극복하기 위한 연구가 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1815370호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 연골세포 분화 유도용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 연골세포 분화 유도용 조성물을 이용한 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 유도 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 연골세포 분화 유도용 조성물을 포함하는 연골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 콜라겐(collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 헤파린(heparin), 콘드로이틴황산염(chondroitin sulfate) 및 탄닌산(tannic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 2 이상의 물질을 포함하는, 연골세포 분화 유도용 조성물에 관한 것이다.
- [0011] 구체적으로, 상기 물질은 줄기세포 표면에 코팅될 수 있으며, 더욱 구체적으로는 줄기 세포 표면에 반복적으로 코팅되어 2 내지 6층의 코팅층을 형성하는 것일 수 있다.
- [0012] 또한 구체적으로, 상기 코팅층은 콜라겐 및 헤파린의 반복 코팅; 콜라겐 및 탄닌산의 반복 코팅; 콜라겐 및 콘드로이틴황산염의 반복 코팅; 피브로넥틴 및 헤파린의 반복 코팅; 피브로넥틴 및 헤파린으로 이루어진 코팅층과 콜라겐, 헤파린 및 콜라겐으로 이루어진 코팅층의 교차 반복 코팅; 피브로넥틴 및 헤파린으로 이루어진 코팅층과 콜라겐 및 헤파린으로 이루어진 코팅층의 교차 반복 코팅; 피브로넥틴 및 콘드로이틴황산염의 반복 코팅; 및 피브로넥틴 및 콜라겐의 반복 코팅으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명에서, “코팅”은 자기조립방법에 의해 수행될 수 있다. 자기조립방법이란, 상대 전하를 띠는 고분자 용액을 순차적으로 가하는 과정을 원하는 만큼 반복함으로써 코팅 용액의 박막을 적층시키는 것을 의미한다. 순차적으로 박막을 제조할 수 있기 때문에 'layer by layer(층과층, LBL)' 적층법이라 부르기도 한다. 용액을 서로 혼합하는 것이 아니라 기질을 사용하는 방법이기 때문에 상분리가 일어나지 않는 박막을 제작할 수 있다.
- [0014] 구체적으로, 피브로넥틴 기반의 코팅층 형성에 있어 피브로넥틴/콘드로이틴황산염(FN/CS) 및 피브로넥틴/헤파린의(FN/Hep) 경우, 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan) 결합으로 형성될 수 있으며, 피브로넥틴/콜라겐(FN/Col)의 경우 정전기적 상호작용(electrostatic interaction)에 의해 형성되도록 할 수 있다.
- [0015] 또한, 콜라겐(Col) 기반의 코팅층(Col/Hep, Col/CS 및 Col/TA)의 경우, 양(+)으로 대전된 콜라겐과 음(-)으로 대전된 헤파린, 탄닌산 및 콘드로이틴황산 사이의 반복적인 정전기적 흡착에 의해 형성되도록 할 수 있다.
- [0016] 본 발명 일 실시예에서는 콜라겐 및 헤파린의 반복 코팅(Col/Hep, 실시예 1), 콜라겐 및 탄닌산의 반복 코팅(Col/TA, 실시예 2), 콜라겐 및 콘드로이틴황산염의 반복 코팅(Col/CS, 실시예 3), 피브로넥틴 및 헤파린의 반복 코팅(FN/Hep, 실시예 4), 피브로넥틴 및 헤파린으로 이루어진 코팅층과 콜라겐, 헤파린 및 콜라겐으로 이루어진 코팅층의 교차 반복 코팅((FN/Hep) 및 (Col/Hep/Col), 실시예 5), 피브로넥틴 및 헤파린으로 이루어진 코팅층과 콜라겐 및 헤파린으로 이루어진 코팅층의 교차 반복 코팅((FN/Hep) 및 (Col/Hep), 실시예 6), 피브로넥틴 및 콘드로이틴황산염의 반복 코팅(FN/CS, 실시예 7), 피브로넥틴 및 콜라겐의 반복 코팅(FN/Col, 실시예 8)을 통해 코팅층이 적층되도록 하였으며, 이러한 코팅층의 적층을 통해 나노겍질이 형성됨을 확인하였다. 특히, 형성된 나노겍질이 분해되지 않고 구조적 안정성이 유지됨을 확인하였으며(도 3 및 도 4), 연골세포 표지 유전자 발현이 나타나 연골세포로의 분화를 유도 및/또는 촉진하는 효과를 나타냄을 확인하였다(도 7).
- [0017] 더욱 구체적으로, 상기 코팅층은 피브로넥틴 및 콘드로이틴황산염으로 구성된 것일 수 있으며, 본 발명 일 실시예에서는 피브로넥틴 및 콘드로이틴황산염으로 이루어진 코팅층이 줄기세포에 코팅될 경우 특히 연골 분화 촉진 효과가 높게 나타나는 것을 확인하였다(도 7).
- [0018] 또한 구체적으로, 상기 코팅층은 반복적으로 코팅되어 2 내지 8층의 코팅층을 형성함으로써 줄기세포 표면에 나노겍질(nano-shell)을 형성하는 것일 수 있다. 본 발명 일 실시예에서는 8개의 코팅층이 적층된 (FN/CS)₈의 나

노겹질이 배양시간이 증가함에도 전극의 진동수(frequency)가 거의 변화하지 않아 구조적 안정성이 유지됨을 확인하였다(도 3).

- [0019] 더욱 구체적으로, 상기 코팅층은 반복적으로 코팅되어 2 내지 6층의 코팅층을 형성하는 나노겹질일 수 있으며, 가장 구체적으로 2 내지 4층의 코팅층을 형성하는 나노겹질일 수 있다.
- [0020] 본 발명 일 실시예에서는 나노겹질을 구성하는 2 내지 6의 코팅층 수 전체에서 대조군 대비 연골 분화 효과가 현저히 향상되어 있음을 확인하였으며, 그 중에서도 2 내지 4의 코팅층의 경우 연골 분화 유도 및/또는 촉진 효과가 더욱 증가되어 있음을 확인하였다(도 8).
- [0021] 구체적으로, 코팅층의 조성 및 코팅층 수에 따라 연골분화 유도 및/또는 촉진 효과가 달라질 수 있는 바(도 7 및 도 8), 코팅층의 조성 및 코팅층 수를 조절함으로써 필요에 따라 적절한 분화 정도를 조절하여 적용할 수 있다.
- [0022] 예를 들어, 손상된 정도가 심하여 연골의 분화를 특히 촉진할 필요가 있는 경우에는 피브로넥틴 및 콘드로이틴 황산염의 구성으로 된 코팅층을 2 내지 4층 적층하여 분화 정도를 크게 촉진시킬 수 있고, 상황에 따라 생성되는 연골 조직을 낮출 필요가 있는 경우에는 코팅층을 5층 이상으로 하여 분화 정도를 조절할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서, “줄기세포”는 스스로 세포 분열을 할 수 있고, 매우 다양한 형태의 특이 세포 타입(specific cell type)으로 분화할 수 있는 능력을 갖는 세포를 의미한다. 이러한 줄기세포의 종류는 특별히 제한되지 않으나, 구체적으로 중간엽 줄기세포를 사용할 수 있다.
- [0024] 상기 중간엽 줄기세포의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 상기 중간엽 줄기세포는 그것이 어디로부터 유래한 것인지 관계없이 이용될 수 있다. 구체적으로, 중간엽 줄기세포는 공지의 중간엽 줄기세포 공급원, 예를 들어 지방, 골수, 배아, 체대혈, 혈액 또는 체액으로부터 얻을 수 있다. 상기 줄기세포의 조직 유래에 따라 분화 양상이 달라질 수 있다. 또한, 상기 골수 또는 조직 등의 채취 대상 동물은 포유동물일 수 있으며, 구체적으로 인간일 수 있다. 이러한 공지의 중간엽 줄기세포 공급원으로부터 중간엽 줄기세포를 수득하는 방법에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0025] 본 발명 일 실시예에서는 상기의 연골세포 분화 유도용 조성물로 코팅된 중간엽 줄기세포를 마우스 신장 하부에 이식한 후 실제 조직에서의 연골 세포외기질(ECM), 골소강(lacunae), 연골세포(chondrocytes, cartilage cells) 및 연조직(perichondrium)이 형성된 것을 확인하였는 바(도 15), 본 발명의 상기 조성물이 조직상에서도 실제로 줄기세포가 연골세포로 분화되어 연골을 형성할 수 있음을 확인하였다.
- [0026] 본 발명의 다른 일 측면은 콜라겐(collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 헤파린(heparin), 콘드로이틴황산염(chondroitin sulfate) 및 탄닌산(tannic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 2 이상의 물질을 줄기세포에 코팅하는 단계를 포함하는, 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 유도 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 분화 유도는 생체 외에서 이루어질 수 있다.
- [0027] 또한 구체적으로, 상기 물질은 줄기세포 표면에 반복적으로 코팅되어 2 내지 8의 코팅층을 형성하는 것일 수 있다.
- [0028] 더욱 구체적으로, 상기 코팅층은 콜라겐 및 헤파린의 반복 코팅; 콜라겐 및 탄닌산의 반복 코팅; 콜라겐 및 콘드로이틴황산염의 반복 코팅; 피브로넥틴 및 헤파린의 반복 코팅; 피브로넥틴 및 헤파린으로 이루어진 코팅층과 콜라겐, 헤파린 및 콜라겐으로 이루어진 코팅층의 교차 반복 코팅; 피브로넥틴 및 헤파린으로 이루어진 코팅층과 콜라겐 및 헤파린으로 이루어진 코팅층의 교차 반복 코팅; 피브로넥틴 및 콘드로이틴황산염의 반복 코팅; 및 피브로넥틴 및 콜라겐의 반복 코팅으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0029] 또한 구체적으로, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명 일 실시예에서는 상기의 연골세포 분화 유도용 조성물로 코팅된 중간엽 줄기세포가 분화를 통해 연골 세포외기질(ECM), 골소강(lacunae), 연골세포(chondrocytes, cartilage cells) 및 연조직(perichondrium)을 형성하는 것을 확인하였는 바, 상기 본 발명의 코팅층, 상기 코팅층으로 구성된 나노겹질 및 이를 포함하는 연골 세포 분화 유도용 조성물을 이용하여 줄기세포로부터 연골세포로 분화를 유도할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 일 측면은 상기 연골세포 분화 유도용 조성물을 포함하는, 연골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0032] 구체적으로, 상기 연골 질환은 골관절염, 변형성 관절증, 연골형성이상증, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염,

골연화증, 섬유성 골염 및 무형성 골질환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

- [0033] 본 발명의 조성물은 연골 재생 또는 연골 형성 촉진 효과를 나타내는 것으로서, 연골 재생 또는 연골 형성이 필요한 모든 연골 질환에 적용될 수 있으며, 상기 질환에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 또한 구체적으로, 상기 연골세포 분화 유도용 조성물은 줄기세포 표면에 코팅되는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명 일 실시예에서는 상기의 연골세포 분화 유도용 조성물로 코팅된 중간엽 줄기세포가 분화를 통해 연골 세포외기질(ECM), 골소강(lacunae), 연골세포(chondrocytes, cartilage cells) 및 연조직(perichondrium)을 형성하는 것을 확인하였는 바, 상기 이를 이용하여 손상된 연골을 수복하거나 치료함으로써 연골 질환을 치료할 수 있다, 특히 상기 연골세포로의 분화는 줄기세포에 콜라겐(collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 헤파린(heparin), 콘드로이틴황산염(chondroitin sulfate) 및 탄닌산(tannic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 2 이상의 물질을 포함하는 코팅층의 형성을 통해 이루어질 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여, 상기 본 발명의 골 재생 또는 골 형성 촉진용 조성물 외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 보다 구체적으로 비경구용 제형일 수 있다. 비경구용 제형으로는 주사용, 도포용, 에어로졸 등의 스프레이 형일 수 있다. 더욱 구체적으로는 주사제 형태일 수 있다.
- [0038] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0039] 주사형 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 약학적 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 연골 질환 치료방법을 제공한다. 구체적으로 상기 연골 질환은 골관절염, 변형성 관절증, 연골형성이상증, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골연화증, 섬유성 골염 및 무형성 골질환으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 성별, 연령, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 용어 "개체"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 연골 질환을 가진 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 또는 인간을 포함한다. 본 발명에 따른 치료용 조성물을 개체에게 투여함으로써, 연골 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 인간 또는 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 치료용 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0045] 본 발명의 연골분화 유도용 조성물, 연골 분화 유도 방법 및 약학적 조성물은 독성이 없어 생체 적합성이 우수

하며, 연골세포로의 분화 및 연골 형성 효과가 우수하여 연골 조직의 수복 또는 연골 질환 치료에 널리 활용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 본 발명에 따른 줄기세포 표면에 코팅된 코팅층으로부터 중간엽 줄기세포로 전달되는 생화학적 자극의 전달 효과를 나타낸 모식도이다.

도 2는 코팅층의 수에 따른 나노겍질의 유지 시간 및 연골 분화 촉진 정도를 나타낸 모식도 및 그래프이다.

도 3은 (FN/CS)₈로 코팅된 전극의 주파수 변화를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 공초점 레이저 스캐닝 현미경 이미지를 통해 세포막 내에 존재하는 FN을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 코팅층의 수에 따른 코팅된 중간엽 줄기세포의 전자투과현미경(TEM) 이미지를 나타낸 것이다.

도 6은 (FN/CS)로 구성된 나노겍질로 코팅된 중간엽 줄기세포의 소기관이 없는 영역을 주사투과 전자 현미경 이미지로 나타낸 것이다.

도 7은 실시예 1 내지 8의 나노겍질로 코팅된 중간엽 줄기세포에서의 연골세포의 표지 유전자인 *ACAN*, *COL2A1* 및 *COL5A1*의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 나노겍질을 구성하는 코팅층 수에 따른 분화 촉진 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 나노겍질을 구성하는 코팅층 수에 따른 세포 생존능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 연골세포의 표지 유전자인 *Aggrecan(ACAN)*의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 연골세포의 표지 유전자인 *COL2A1*의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 연골세포의 표지 유전자인 *COL5A1*의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 알시안블루(alcian blue) 염색을 통해 연골세포 형성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 웨스턴블롯(western blot)을 통한 연골세포 형성에 관한 신호전달 단백질의 발현을 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 *in vivo* 나노겍질(FN/CS)로 코팅된 줄기세포의 연골세포로의 분화를 확인한 결과를 나타낸 것이다(a: Hematoxylin 및 Eosin(H&E) 염색 결과, b: Masson's Trichrome(M-T) 염색 결과, c-e: 면역조직화학적 분석(Immunohistochemical analysis) 결과).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0049] **제조예 1. 줄기세포 코팅용액의 제조**

[0050] 피브로넥틴(fibronectin, FN), 콜라겐(collagen, Col), 헤파린(heparin, Hep), 콘드로이틴황산염(chondroitin sulfate, CS) 및 탄닌산(tannic acid, TA)을 각각 0.2mg/mL, 0.2mg/mL, 1mg/mL, 1mg/mL, 1mg/mL로 중간엽 줄기세포 배양액에 분산시켜 나노 코팅 용액을 각각 제조하였다.

[0051] **제조예 2. 나노겍질로 코팅된 중간엽 줄기세포의 제조**

[0052] 상기 제조예 1의 코팅 용액을 인체 골수 유래 중간엽 줄기세포(human bone marrow derived mesenchymal stem cell, hMSC)에 적용하여 코팅시킴으로써 줄기세포 표면에 나노 겍질을 형성시켰다.

[0053] 구체적으로, 상기 제조예 1의 코팅 용액을 각각 중간엽 줄기세포의 성장 배지(10% FBS를 포함하는 DMEM)를 용매로 pH 7.4 조건에서 1 mg/mL의 농도가 되도록 하였으며, 박테리아 제거 등의 소독을 위해 0.2 μm 필터를 이용하여 필터링하였다.

- [0054] 세포 펠렛(pellet)은 241 x g에서 3분 동안 원심분리하여 수득하였다. 상층액을 제거한 세포 펠렛에 첫 번째 코팅 용액(A)을 약하게 파이펫팅(pipetting)하여 넣고 세척 용액인 growth media로 2 회 세척 후 241 x g에서 3분 동안 원심분리하여 결합되지 않은 코팅 분자를 제거하였다.
- [0055] 이후 두 번째 고분자 코팅 용액(B)을 가한 후 상기 첫 번째 코팅 과정과 동일한 과정을 반복하여, 코팅층 A 및 B가 줄기세포 표면에 층층이 코팅되도록 하였다. 이를 A/B로 표시하였으며, 코팅층의 적층 횟수(n)만큼 반복하여 (A/B)_n으로 구성된 코팅층이 줄기세포 표면에 형성되도록 하였다.
- [0056] 하기 표 1에 정리된 바와 같이 코팅층의 구성을 변경하면서 코팅층의 적층을 통해 나노겔질을 형성하였다(실시예 1 내지 8). 구체적으로, 나노겔질은 콜라겐 및 헤파린의 반복 코팅(Col/Hep, 실시예 1), 콜라겐 및 탄닌산의 반복 코팅(Col/TA, 실시예 2), 콜라겐 및 콘드로이틴황산염의 반복 코팅(Col/CS, 실시예 3), 피브로넥틴 및 헤파린의 반복 코팅(FN/Hep, 실시예 4), 피브로넥틴 및 헤파린으로 이루어진 코팅층과 콜라겐, 헤파린 및 콜라겐으로 이루어진 코팅층의 교차 반복 코팅((FN/Hep) 및 (Col/Hep/Col), 실시예 5), 피브로넥틴 및 헤파린으로 이루어진 코팅층과 콜라겐 및 헤파린으로 이루어진 코팅층의 교차 반복 코팅((FN/Hep) 및 (Col/Hep), 실시예 6), 피브로넥틴 및 콘드로이틴황산염의 반복 코팅(FN/CS, 실시예 7), 피브로넥틴 및 콜라겐의 반복 코팅(FN/Col, 실시예 8)로 구성되도록 하였다.
- [0057] 상기 나노겔질 구성 코팅층 구성 중 Col/Hep, Col/TA 및 Col/CS는 콜라겐을 기반으로 하였으며, FN/Hep, FN/CS 및 FN/Col은 피브로넥틴을 기반으로 하였다. 피브로넥틴 기반의 나노겔질에 있어 FN/CS 및 FN/Hep의 경우, 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan) 결합으로 형성되었으며, FN/Col의 경우 정전기적 상호작용(electrostatic interaction)에 의해 형성되었다. 또한, 콜라겐 기반의 나노겔질의 경우, 양(+)으로 대전된 콜라겐과 음(-)으로 대전된 Hep, TA 및 CS 사이의 반복적인 정전기적 흡착에 의해 형성되었다.

표 1

[0058]

구분	나노겔질 구성 코팅층
실시예 1	(Col/Hep)
실시예 2	(Col/TA)
실시예 3	(Col/CS)
실시예 4	(FN/Hep)
실시예 5	(FN/Hep) 및 (Col/Hep/Col)
실시예 6	(FN/Hep) 및 (Col/Hep)
실시예 7	(FN/CS)
실시예 8	(FN/Col)

[0059] **실험예 1. 코팅된 나노겔질의 구조적 안정성 확인**

- [0060] 중간엽 줄기세포 배양조건에서 나노겔질의 구조적 안정성을 확인하기 위하여 37 °C의 PBS에서의 (FN/CS)₈ 로 코팅된 전극의 주파수 변화를 측정하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 초기 배양부터 24시간까지 배양 시간이 증가함에도 전극의 나노겔질로 코팅된 전극의 진동수(frequency)가 거의 변화하지 않아 구조적 안정성이 유지됨을 확인하였다.
- [0061] 상기와 같은 결과는 중간엽 줄기세포 표면에 형성된 나노겔질은 분해되지 않고 안정성이 유지되는 것임을 나타내는 것으로서, 나아가 로다민(rhodamine)-퀴뉴계이트된 FN을 이용하여 중간엽 줄기세포를 코팅하여 2시간 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경 이미지를 통해 세포막 내에 존재하는 FN을 확인하였다(도 4). 이는 나노겔질이 중간엽 줄기세포에 코팅된 후 중간엽 줄기세포 내로 흡수됨을 나타내는 것으로서 구조적 불안정에 기인하여 분리되거나 분해되는 것이 아님을 나타내는 것이다.
- [0062] 또한, 상기 실시예 7의 (FN/CS)로 구성된 나노겔질로 코팅한 중간엽 줄기세포를 전자 현미경(The transmission electron microscope, TEM)을 이용하여 관찰하였다. 피브로넥틴 및 콘드로이틴황산염의 코팅층으로 구성된 각각의 코팅층이 2층((FN/CS)₂) 및 4 층((FN/CS)₄)으로 형성되도록 한 줄기세포를 전자투과현미경(transmission electron microscope, TEM)으로 관찰하였다. 대조군으로는 코팅층이 형성되지 않은 줄기세포를 사용하였다.
- [0063] 구체적으로, 중간엽 줄기세포를 4 °C에서 2 시간 동안 Karnovsky 고정액에 고정시킨 후 각 샘플을 0.05M 카코딜 산나트륨(sodium cacodylate)으로 세척하고 후고정(post-fixation)을 4 °C에서 2 시간 동안 1 % OsO₄ 용액에서

수행하였다. 탈 이온수로 세척 한 후, 샘플을 0.5 % 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 염색하고 이어서 등급이 매겨진 일련의 에탄올을 사용하여 탈수시켰다. 마지막으로 샘플을 70 °C의 오븐에서 24 시간 동안 건조시켜 에폭시 수지에 묻었다. 울트라마이크로톰(ultramicrotome, EM UC7, Leica Camera, Wetzlar, Germany)을 이용하여 얇은 절편으로 절단하였으며, 이후 실온에서 전자투과현미경(TEM, JEM1010, JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

[0064] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 나노겹질이 성공적으로 코팅되었으며, 세포 표면에 코팅층의 적층 횟수가 0, 2 및 4로 증가할수록 적층된 코팅층의 두께 역시 각각 0, 100 및 200 nm로 증가함을 확인하였다.

[0065] 이에 따라, 적용하는 코팅 횟수에 따라 규칙적으로 적층된 코팅 두께가 증가함을 확인하였으며, 이로부터 본 발명의 코팅층의 적층수(n)를 변경함으로써 다양한 두께의 나노겹질을 구축할 수 있음을 확인하였다.

[0066] 또한, 상기 실시예 7의 (FN/CS)로 구성된 나노겹질로 코팅된 중간엽 줄기세포의 소기관이 없는 영역을 주사투과 전자 현미경(The scanning transmission electron microscope, STEM)을 이용하여 관찰하였으며, (FN/CS)로 구성된 나노겹질로 코팅된 경우 나노겹질이 세포 표면에 흡착되어 두껍고 완전히 덮힌 형태를 나타냄을 확인하였다(도 6).

[0067] **실험예 2. 연골세포로의 분화 촉진 효과 확인**

[0068] 상기 표 1에 정리된 바와 같이 코팅층의 구성을 변경하면서 중간엽 줄기세포에 코팅층의 적층을 통해 나노겹질을 형성하였으며(실시예 1 내지 8, n=2(이중층)), 이의 분화 촉진 효과를 확인하였다.

[0069] 구체적으로, 상기 실시예 1 내지 8의 나노겹질로 코팅된 중간엽 줄기세포를 1×10^6 개씩 96 웰 플레이트에 분주한 뒤, 6 내지 8 시간 동안 세포 응집을 유도하였다. 이후 유도 연골 분화용 배지(0.1 mM 아스코르브산염(ascorbate), 1% ITS 혼합물(mixture) 및 10 ng/mL TGF-β1을 포함하는 DMEM)를 첨가하였다. 10일 후 정량적 실시간 PCR(Quantitative real-time PCR)을 진행하여 연골세포의 표지 유전자인 *ACAN*, *COL2A1* 및 *COL5A1*의 발현을 확인하였다.

[0070] 정량적 실시간 PCR은 상기 줄기세포로부터 트리졸(Trizol) 및 클로로포름(chloroform)을 이용하여 총 RNA를 추출한 후, M-MLV 역전사효소(Thermo Scientific)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 진행하였다. 정량적 실시간 PCR에 사용된 프라이머는 하기 표 2에 나타난 바와 같다.

표 2

[0071]

유전자	방향	프라이머 서열	서열번호
<i>ACAN</i>	정방향	AGCCTGCGCTCCAATGACT	1
	역방향	TAATGGAACACGATGCCTTCA	2
<i>COL2A1</i>	정방향	GGCAATAGCAGGTTACGTACA	3
	역방향	CGATAACAGTCTTGCCCCACTTA	4
<i>COL5A1</i>	정방향	CCAAAGAAAACCCGGGCTCC	5
	역방향	GCAGTGGTAGGTGACGTCT	6
<i>GAPDH</i>	정방향	ACATCGCTCAGACCCATG	7
	역방향	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	8

[0072] 상기 정량적 실시간 PCR 수행 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 피브로넥틴(FN) 및 콘드로이틴황산(CS)를 포함하는 실시예 4, 실시예 5, 실시예 7 및 실시예 8의 나노겹질로 코팅된 줄기세포에서 연골세포 표지 유전자의 발현이 유의하게 증가하여 약 1.5 내지 1.8배 높은 발현을 나타냄으로써 연골 분화 촉진 효과가 나타남을 확인하였다. 특히, FN 및 CS로 구성된 실시예 7의 경우 특히 높은 수준의 연골세포 표지 유전자의 발현이 나타내어, 가장 높은 연골 분화 촉진 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0073] **실험예 3. 나노겹질을 구성하는 코팅층 수에 따른 분화 촉진 효과 확인**

[0074] 코팅 횟수를 2 내지 6으로 달리한 중간엽 줄기세포를 1×10^6 개씩 96 웰 플레이트에 분주한 뒤, 6 내지 8 시간 동안 세포 응집을 유도하였다. 이후 유도 연골 분화용 배지(0.1 mM 아스코르브산염(ascorbate), 1% ITS 혼합물(mixture) 및 10 ng/mL TGF-β1을 포함하는 DMEM)를 첨가하였다. 10일 후 정량적 실시간 PCR(Quantitative real-time PCR)을 진행하여 연골세포의 표지 유전자인 *ACAN*, *COL2A1* 및 *COL5A1*의 발현을 확인하였다. 대조군은

코팅되지 않은 줄기세포를 이용하였다.

[0075] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 나노겍질을 구성하는 2 내지 6의 코팅층 수 전체에서 대조군 대비 연골 분화 효과가 현저히 향상되어 있음을 확인하였는 바, 2 내지 6의 코팅층으로 구성된 나노겍질은 모두 연골 분화 촉진 용도로 활용될 수 있음을 확인하였다. 특히, 2 내지 4의 코팅층의 경우 연골 분화 촉진 효과가 더욱 증가되어 있음을 확인하였다(* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005).

[0076] **실험예 4. 나노겍질을 구성하는 코팅층 수에 따른 세포 생존능 확인**

[0077] 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 코팅층을 0, 2 및 4로 달리하여 중간엽 줄기세포를 코팅하였다. 이후, 코팅된 줄기세포를 줄기세포를 2×10^4 세포/cm²의 밀도로 6 웰 플레이트에 분주한 뒤 24 시간 후 EZ-Cytox 검정 키트 (DAEILLAB SERVICE, Guro-Gu, Seoul, South Korea)로 세포 생존능을 분석하였다. 450 nm의 파장에서 마이크로 플레이트 분광 광도계(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 검출하였으며, 코팅을 하지 않은 줄기세포(n=0)을 대조군으로 하였다.

[0078] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 코팅층의 수가 증가하더라도 대조군 대비 세포 생존능은 유의한 차이가 나타나지 않았는 바(ns: not significant), 이로부터 본 발명의 나노겍질이 세포 독성 없이 생체 적합성을 나타냄을 확인하였다.

[0079] **실험예 5. *in vitro* 나노겍질(FN/CS)로 코팅된 줄기세포의 연골세포로의 분화 확인**

[0080] **5-1. 연골세포의 표지 유전자 발현 확인**

[0081] FN/CS로 구성된 실시예 7의 나노겍질을 중간엽 줄기세포에 4회 코팅하여 4중층이 형성되도록 하였으며, 코팅하지 않은 중간엽 줄기세포를 대조군으로 하였다. 이후, 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 연골세포의 표지 유전자인 *ACAN*, *COL2A1* 및 *COL5A1*의 발현을 12일 동안 관찰하였다. 그 결과, 6일째 이후부터 *ACAN*, *COL2A1* 및 *COL5A1*의 유전자 발현이 모두 유의하게 증가되었음을 확인하였다(도 10, 도 11 및 도 12) (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005).

[0082] **5-2. 알시안블루(alcian blue) 염색을 통한 연골세포 형성 확인**

[0083] FN/CS로 구성된 실시예 7의 나노겍질을 중간엽 줄기세포에 2회 코팅하였으며, 코팅하지 않은 중간엽 줄기세포를 대조군으로 하였다. 이후, 상기 줄기세포들을 3주 동안 배양하면서 3, 12 및 18일째에 알시안블루(alcian blue) 염색을 진행하였다.

[0084] 구체적으로, 상기 3, 12 및 18일째의 줄기세포를 실온에서 20 분 동안 3.7 % 포름알데히드로 고정시키고, PBS로 3 회 세척 후, 세포를 2 시간 동안 1 % 알시안블루 용액으로 염색하였다. 그 다음, 세포를 0.1 M HCl로 세정하고 PBS로 3 회 세척하였다. 염색 후, 광학현미경으로 줄기세포에서 연골세포로의 분화 정도를 관찰하였다. 연골 세포의 분화가 진행될수록 세포는 청록색으로 염색된다.

[0085] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 12일째에 코팅되지 않은 대조군과 현저한 색상 차이가 관찰되었으며, 이로부터 FN/CS의 코팅층을 포함하는 나노겍질이 매우 우수한 연골 분화 촉진 효과를 나타냄을 확인하였다. 특히, 이는 초기 단계에서 줄기세포의 연골세포로의 분화 및 연골 형성을 촉진시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

[0086] **5-3. 웨스턴블롯(western blot)을 통한 신호전달 단백질 확인**

[0087] 웨스턴블롯을 이용하여 나노겍질이 코팅된 후 1시간 이내의 신호전달 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

[0088] 구체적으로, FN/CS로 구성된 실시예 7의 나노겍질을 중간엽 줄기세포에 2회 코팅하였으며, 0, 15, 30 및 60분째에 1X SDS 용액을 이용하여 수득하고, 펠렛을 분해하기 위해 가볍게 초음파 분해(sonication)하였다. 이후 95 °C에서 5분 동안 끓인 후, SDS-PAGE 전기 영동하였다. 이후 폴리비닐리덴 플루라이드(polyvinylidene fluoride) 멤브레인으로 transfer한 후, Tween 20을 포함하는 Tris 버퍼(TBS-T)에 희석한 5% 탈지유로 1시간 동안 반응시켰다. 이후 TBST 버퍼로 3회 씻어낸 후 p-FAK Y576, p-FAK Y397, FAK, p-LATS1, LATS1, p-P38, P38, TAZ 및 TAP에 대한 각각의 1차 항체를 결합시킨 후 4 °C에서 밤새 반응시켰다.

[0089] 상기 각 p-FAK Y576(#3281), p-FAK Y397(#3283), FAK(#3285), p-LATS1 (#8654), LATS1(#3477), p-P38(#9211), P38 (#9212), YAP/TAZ(#8418) 및 YAP (#4912) 항체는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구매하였으며, β-Actin(A5441) 항체는 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)에서 구매하였다.

[0090] 이후 TBST 버퍼로 3회 씻어낸 후 2차 항체를 결합시킨 후 1시간 반응시켰으며, 다시 TBST 버퍼로 3회 씻어낸 후

enhanced chemiluminescence system를 이용하여 단백질을 확인하였다.

- [0091] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, YAP 및 TAZ 단백질은 시간이 흐름에 따라 감소되었다. TAZ는 PDZ 결합 모티프를 가지는 전사 활성인자로서, 중간엽 줄기세포의 골 분화 및 세포 증식을 자극시킨다. 또한, 중간엽 줄기세포가 고강성 기질(high-stiffness substrate)에서 배양될 때, TAZ가 핵으로 이동하여 골 분화를 촉진시킨다. YAP/TAZ 전사인자는 히포(Hippo)신호 전달 체계의 작동체로 알려져 있으며, 세포의 분화, 분열, 성장, 이동에 관여하는 것으로 보고된 바 있다.
- [0092] 골 형성 및 연골 형성은 부분적으로 신호 전달 경로 및 신호를 생성하는 특정 자극을 공유하며, 상기 결과는 TAZ 단백질의 발현에 기인한 골 분화 및 세포 증식 기작 외에 다른 기작에 의해 본 발명의 조성물이 연골세포로의 분화 및 연골 성을 촉진시킬 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0093] **실험예 5. *in vivo* 나노겹질(FN/CS)로 코팅된 줄기세포의 연골세포로의 분화 확인**
- [0094] **5-1. 나노겹질(FN/CS)로 코팅된 줄기세포의 신장 캡슐 이식**
- [0095] FN/CS로 구성된 실시예 7의 나노겹질을 중간엽 줄기세포에 4회 코팅하여 4중층이 형성되도록 하였으며, 코팅하지 않은 중간엽 줄기세포를 대조군으로 하였다.
- [0096] 상기 줄기세포를 1×10^6 개씩 96 웰 플레이트에 분주하고, 6 내지 8 시간 동안 세포 응집을 유도한 뒤 nude mouse 신장의 피막 하부에 상기 응집된 줄기세포를 이식하였다(kidney capsule transplantation). 마취 하에서 1mg mL^{-1} Zoletile 및 0.04 % Rompun (1 mL kg^{-1})로 복강 내 주사를 통해 수행하였다. 5 주 후 조직을 분리하여 조직학적 염색(histological staining)을 통해 연골분화를 확인하였다.
- [0097] **5-2. Hematoxylin 및 Eosin(H&E) 염색**
- [0098] 신장캡슐 이식 5주 후 분리한 조직을 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)가 포함된 PBS(phosphate buffered saline)로 고정시키고 파라핀 용액 안에서 고체화한 후 $4\ \mu\text{m}$ 두께로 절편화하였다. 상기 절편화된 조직에 대해 헤마톡실린(Hematoxylin) 및 에오신(Eosin)(H&E) 염색을 수행하였다.
- [0099] 그 결과, 도 15a에 나타난 바와 같이, FN/CS 나노겹질로 코팅된 줄기세포가 이식된 경우 연골 세포외기질(ECM), 골소강(lacunae), 연골세포(chondrocytes, cartilage cells) 및 연조직(perichondrium)이 형성된 것을 확인하였다. 반면, 나노겹질로 코팅되지 않은 줄기세포를 이식한 경우 연골 형성을 위한 석회 조직이 생성되지 않았다.
- [0100] **5-3. Masson's Trichrome(M-T) 염색**
- [0101] 신장캡슐 이식 5주 후 분리한 조직을 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)가 포함된 PBS(phosphate buffered saline)로 고정시키고 파라핀 용액 안에서 고체화한 후 $4\ \mu\text{m}$ 두께로 절편화하였다. 이후 탈파라핀화시킨 후 저농도의 알코올 과정을 거쳐 흡수하였다. 상기 탈파라핀화 및 흡수화한 조직을 Bouin's 용액 실온에서 밤새 매염하였다. 그 후 황색이 제거될 때까지 흐르는 수돗물로 세척하였다.
- [0102] 슬라이드는 Mayer's hematoxylin 으로 2 분 동안 염색하고 흐르는 수돗물로 씻어내었다. 탈이온수로 다시 행구고 Biebrich scarlet-Acid fuschsin 으로 5분 동안 염색하고 다시 탈이온수로 행구었다. 이후 인텟스텐산/인몰리브텐산(Phosphotungstic/Phosphomolybdic acid)으로 5 분 동안 염색하고, 세척없이 아닐린블루(Aniline blue) 용액으로 5 분 동안 염색하였다. 이후 1% 아세트산(acetic acid) 용액에 2 분 동안 둔 후 탈이온수로 행구었다. 및 탈 이온수 5 분 과정으로 염색을 하였다. 후처리 과정으로 수분을 없애기 위해 70 내지 95 %의 알코올을 순차적으로 처리한 후 100 %의 알코올에 5 분 동안 처리하였다. 이 후 자일린(xylene)을 2 회 5 분씩 처리하여 알코올을 제거하였다. Trichrome 염색은 Accustain® Trichrome Stain (Masson) kit(HT-15, Sigma-Aldrich, MO, USA)을 사용하였다.
- [0103] 그 결과, 도 15b에 나타난 바와 같이, 분화된 연골의 세포외 기질은 파란색으로, 연골세포는 빨간색으로 염색되었으며, FN/CS 나노겹질로 코팅된 줄기세포가 이식된 경우 자연 연골과 유사한 형태로 나타남을 확인하였다.
- [0104] **5-4. 면역조직화학적 분석(Immunohistochemical analysis)**
- [0105] 신장캡슐 이식 5주 후 분리한 조직을 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)가 포함된 PBS(phosphate buffered saline)로 고정시키고 파라핀 용액 안에서 고체화한 후 $4\ \mu\text{m}$ 두께로 절편화하였다. 상기 절편화된 조직에 대한 항원 회복(antigen retrieval)은 시트르산 버퍼(citrate buffer), pH 6.0 환경에서 이루어졌다. 조

직 슬라이드는 Col2A1(제2형 콜라겐 α-1 사슬) 항체(1:100, abcam, UK)와 결합시켰으며, 이미지는 CQ1-confocal 레이저 스캐닝 현미경(Yokogawa, Japan)으로 관찰하였다. 각 실험당 최소 10마리의 쥐를 이용하였다.

[0106] 도 15c 내지 15e에 나타난 바와 같이, FN/CS 나노겍질로 코팅된 줄기세포가 이식된 경우 연골의 세포외 기질 및 연골막(perichondrium) 내에서 제2형 콜라겐 α-1 사슬 단백질(Col2A1)이 발현되어 있음을 확인하였다. 반면, 나노겍질로 코팅되지 않은 줄기세포를 이식한 경우에는 상기와 같은 Col2A1의 발현이 나타나지 않았다.

[0107] 이는 FN/CS 나노겍질의 코팅으로 인해 줄기세포가 연골세포로 분화될 수 있음을 나타내는 것이다.

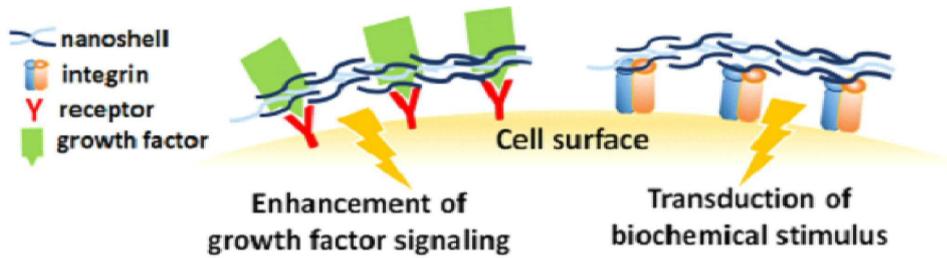
[0108] 모든 실험은 3회 반복되었으며, 실험 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계적 유의성은 Student 's t-test 로 확인하였으며, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005 이며, ns는 유의하지 않음을 나타낸다.

[0109] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

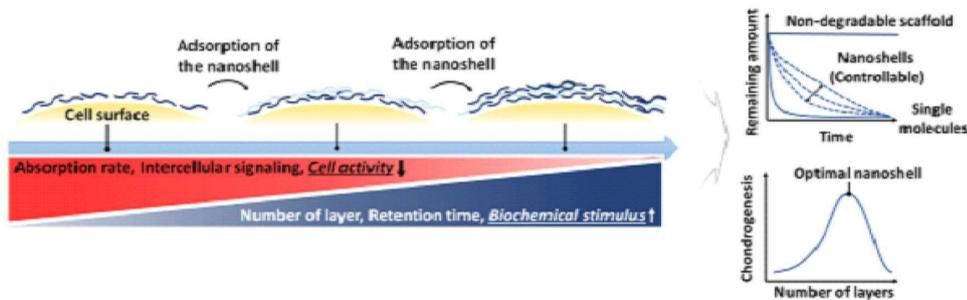
[0110] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

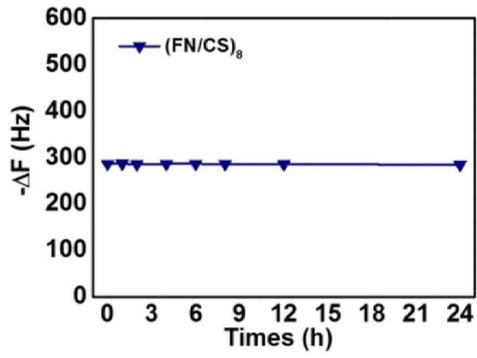
도면1



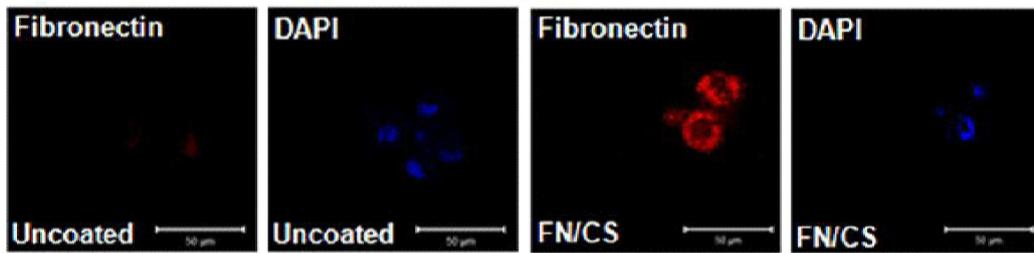
도면2



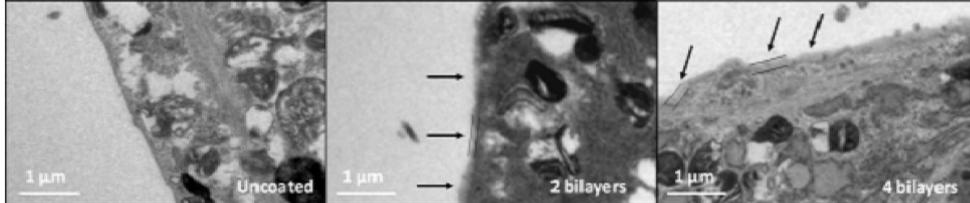
도면3



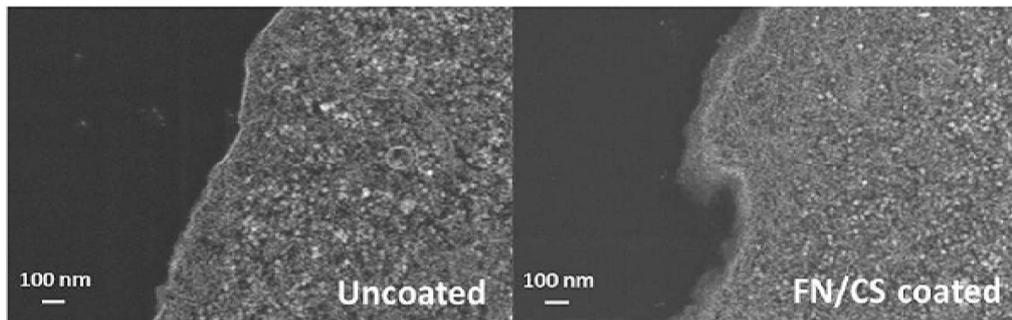
도면4



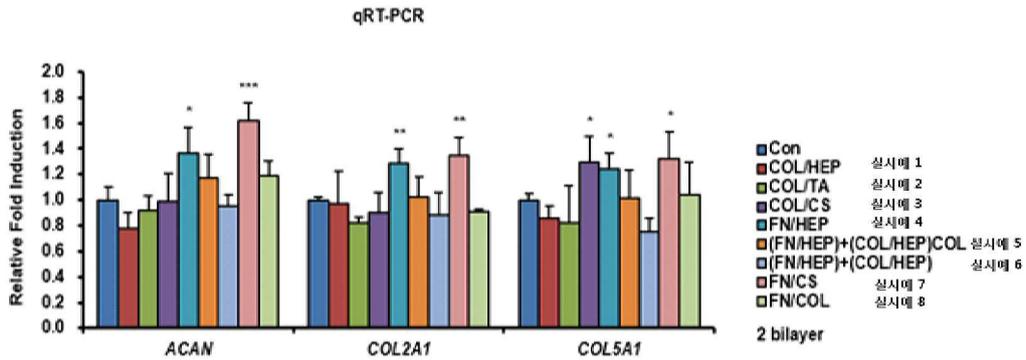
도면5



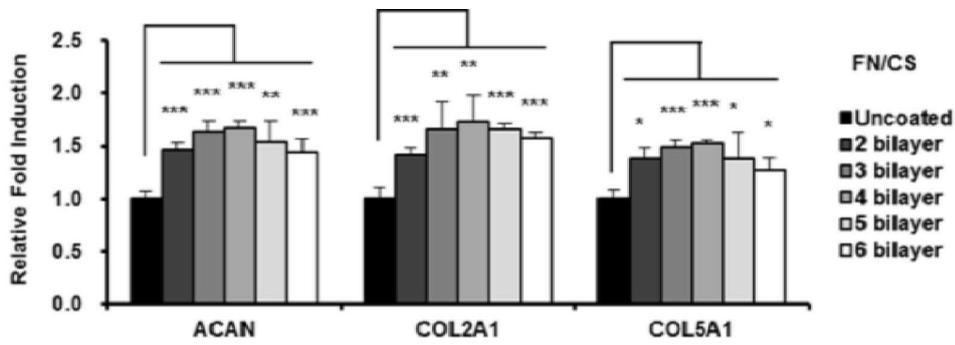
도면6



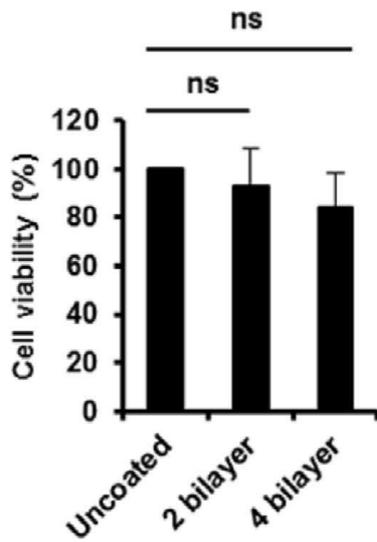
도면7



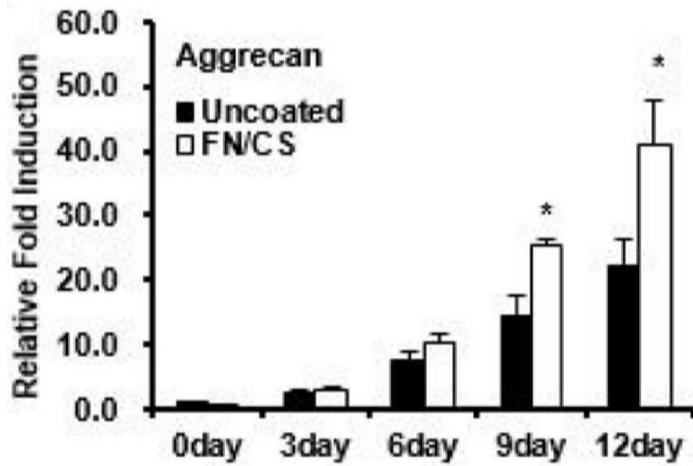
도면8



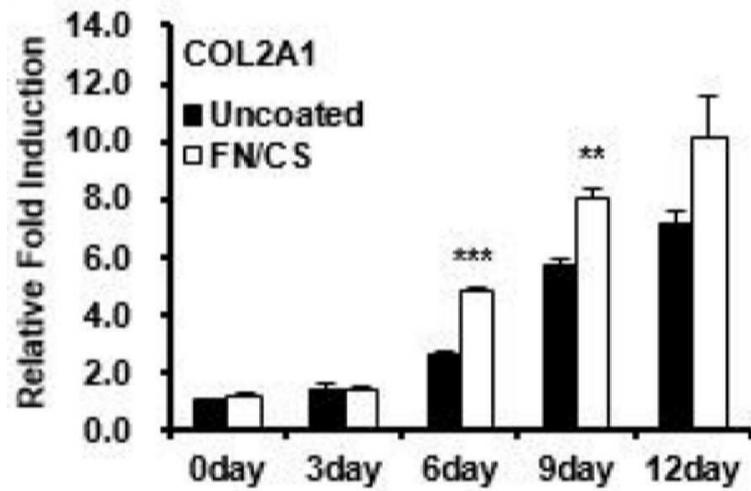
도면9



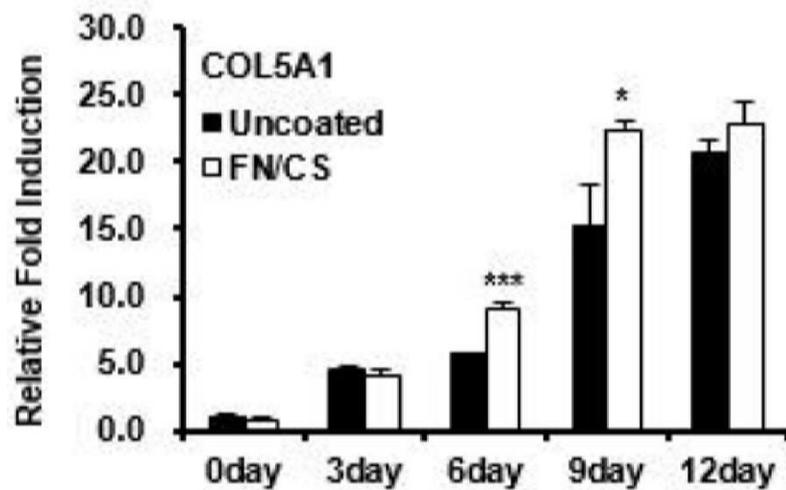
도면10



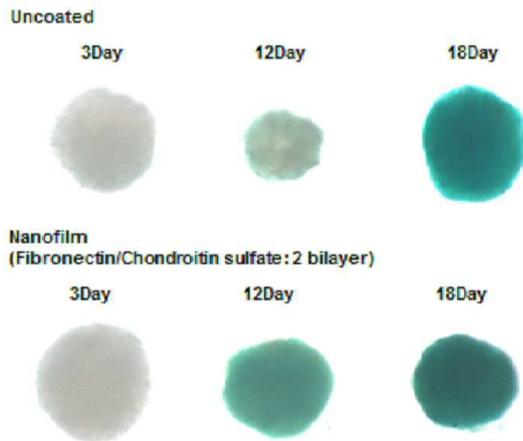
도면11



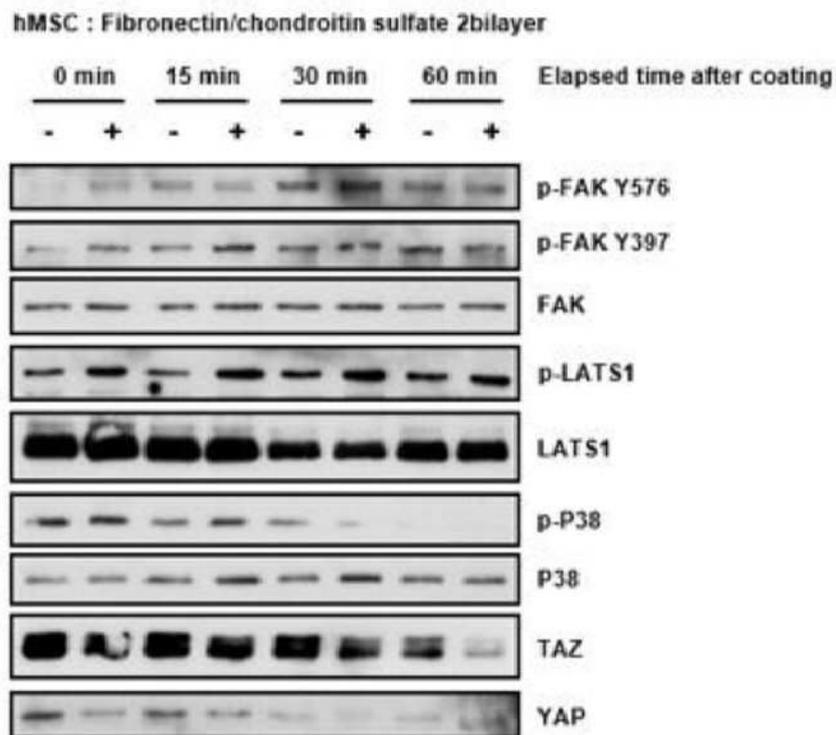
도면12



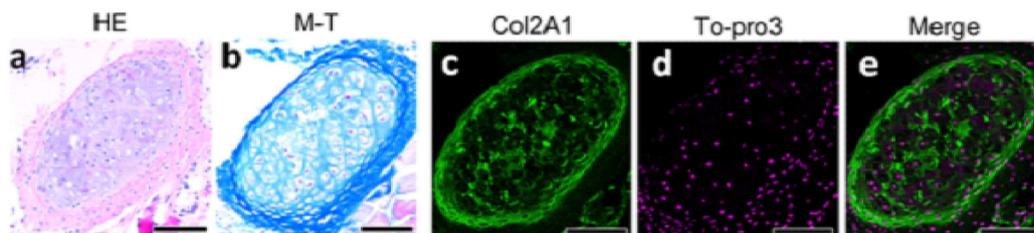
도면13



도면14



도면15



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> COMPOSITION FOR INDUCING CHONDROGENESIS AND USE THEREOF
 <130> 18PP31229
 <160> 8
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ACAN forward primer
 <400> 1
 agcctgcgct ccaatgact 19
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ACAN reverse primer
 <400>
 2
 taatggaaca cgatgccttt ca 22
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> COL2A1 forward primer
 <400> 3
 ggcaatagca ggttcacgta ca 22
 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> COL2A1 reverse primer
 <400> 4
 cgataacagt cttgccccac tta 23
 <210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COL5A1 forward primer

<400> 5

ccaaagaaaa cccgggctcc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COL5A1 reverse primer

<400> 6

gcagtggtag gtgacgttct 20

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH forward primer

<400> 7

acatcgctca gacaccatg 19

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH reverse primer

<400> 8

tgtagttgag gtcaatgaag gg 22