



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년02월15일
(11) 등록번호 10-1233072
(24) 등록일자 2013년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0020866
(22) 출원일자 2011년03월09일
심사청구일자 2011년03월09일
(65) 공개번호 10-2012-0104458
(43) 공개일자 2012년09월21일
(56) 선행기술조사문헌
논문1:TISSUE ENGINEERING PART A
논문2:BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS

(73) 특허권자
차의과학대학교 산학협력단
경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)
(72) 발명자
박근홍
서울특별시 송파구 올림픽로4길 42, 우성아파트 1,2,3차 3동 1207호 (잠실동)
박지선
서울특별시 송파구 신천로 45, 장미아파트 1차 6동 1303호 (신천동)
(74) 대리인
오국진

전체 청구항 수 : 총 12 항

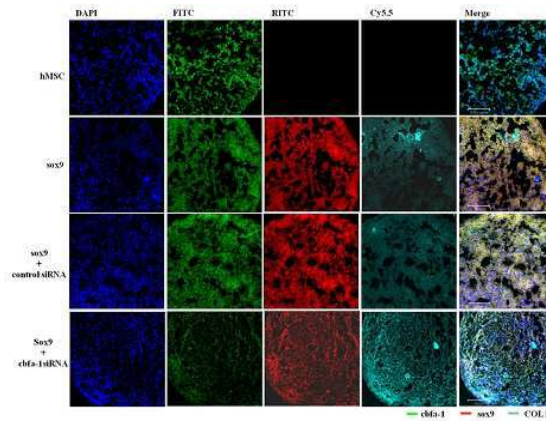
심사관 : 신동환

(54) 발명의 명칭 **연골조직 재건 또는 재생을 위한 나노 복합체 및 이를 이용한 연골세포로의 분화방법**

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 생분해성 고분자의 나노입자 상에, hSOX9 유전자 및 특정 siRNA를 결합시켜 얻어진 연골조직 재건 또는 재생을 위한 나노 복합체 및 이를 이용한 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포를 포함하는 연골조직 재건 또는 재생을 위한 약학 조성물, 즉 세포 치료제를 제공한다.

대표도 - 도4b



(72) 발명자

전수연

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수촌아파트 206동 904호 (방이동)

양한나

서울특별시 동작구 성대로12길 83, 영진하이츠빌라 202호 (상도동)

우대균

서울특별시 강동구 고덕로20길 23-3 (암사동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0008638

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중간연구자지원사업

연구과제명 나노입자와 결합된 특정 유전인자전달을 통한 줄기세포 분화유도기술 확립

주관기관 차의과학대학교

연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

생분해성 고분자의 나노입자 상에, hSOX9 유전자; 및 서열번호 1 내지 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드로부터 1종 이상 선택된 siRNA를 결합시켜 얻어진, 연골조직 재건 또는 재생을 위한 나노 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 hSOX9 유전자 및 siRNA의 결합이, 카르복실기를 갖는 생분해성 고분자의 나노입자를 폴리에틸렌이민과 반응시킨 후, hSOX9 유전자 및 siRNA를 반응시킴으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 나노 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 생분해성 고분자가 폴리락트산, 락트산과 글리콜산의 공-중합체, 폴리카프로락톤, 락타이드와 1,4-디옥산-2-온의 공-중합체, 카프로락톤과 글리콜산의 공-중합체, 카프로락톤과 락트산의 공-중합체, 폴리오르토에스테르, 폴리안하이드라이드, 폴리포스포아미드(phosphoramides), 폴리아미노산, 및 폴리우레탄과 폴리에틸렌글리콜의 블록 공-중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 나노 복합체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 생분해성 고분자가 락트산과 글리콜산의 공-중합체[poly(lactic-co-glycolic acid)]인 것을 특징으로 하는 나노 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 hSOX9 유전자가 나노 복합체 중 0.5~2 μg 의 범위로 결합되는 것을 특징으로 하는 나노 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 siRNA가 나노 복합체 중 50~200 p mol의 범위로 결합되는 것을 특징으로 하는 나노 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 hSOX9 유전자와 상기 생분해성 고분자의 나노입자의 중량비가 1 : 40~100 의 범위인 것을 특징으로 하는 나노 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 siRNA가 서열번호 1 내지 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 나노 복합체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 나노 복합체 존재하에서 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)를 배양하는 것을 포함하는, 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 배양이 상기 나노 복합체를 포함하는 무혈청 배지 중에서 중간엽 줄기 세포를 처리한 후, 혈청을 함유하는 배지 중에서 펠렛 배양을 수행함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 분화방법.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포를 포함하고, 약학적으로 허용

가능한 담체를 포함하는, 연골조직 재건 또는 재생용 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 나노 복합체가 0.5~2 μg 의 hSOX9 유전자 및 50~200 p mol의 siRNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 연골조직 재건 또는 재생을 위한 나노 복합체 및 이를 이용한 연골세포로의 분화방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 생분해성 고분자의 나노입자 상에, hSOX9 유전자 및 특정 siRNA를 결합시켜 얻어진 연골조직 재건 또는 재생을 위한 나노 복합체 및 이를 이용한 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포를 포함하는 연골조직 재건 또는 재생을 위한 약학 조성물, 즉 세포 치료제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유전자 치료는 유전자를 도입하여 부족한 점을 고치고 질병의 악화를 늦추어 삶의 질을 높이고자 하는 것이다. 최근 휴먼 게놈 프로젝트의 성공으로 수 만개의 유전자가 공개되었으나, 특정 유전자를 사람을 포함한 고등 생물로 전달하는 것은 다양한 연구를 필요로 한다. 체세포로 유전자를 전달하기 위한 방법은 바이러스성 유전자 전달체와 비-바이러스성 유전자 전달체를 사용하는 방법으로 나누어 진다. 바이러스성 유전자 전달체는 숙주 세포를 감염시켜 유전 물질을 핵으로 전달하는 방법이며, 비-바이러스성 유전자 전달체는 리포솜, 생분해성 고분자 등을 사용하여 유전 물질을 전달하는 방법이다.

[0003] 비-바이러스성 유전자 전달체로서 양이온성 콜레스테롤 유도체(cationic cholesterol derivatives), 그라미시딘(gramicidin) 등이 주로 연구되고 있으며, 이들은 DNA와 결합하여 효율적으로 세포막과 융합후 세포내로 온전하게 유입되는(uptake)되는 것으로 보고되고 있다. 비-바이러스성 유전자 전달체는 바이러스성 유전자 전달체에 비하여 면역거부반응과 세포독성이 낮은 편이지만, 상대적으로 유전자 발현률이 매우 낮기 때문에, 독성은 낮추면서 발현률을 높이기 위하여 많은 연구가 진행중에 있다.

[0004] 한편, 중간엽 줄기 세포 등을 포함한 성체 줄기 세포로부터 연골세포로의 분화를 조절하는 마스터 유전자(master gene)는 아직 명백히 밝혀져 있지 않다. 골수 줄기세포를 포함하여 성체 조직에 존재하고 있는 줄기세포는 그 분화양상의 다양성을 확인가능하며, 이에 따라 매우 다양한 조직으로의 분화능력을 지닌 세포들의 복합체라고 할 수 있다. 중간엽 줄기세포의 경우 그 다양한 분화능 중 연골, 골 조직으로의 분화가 특이적으로 높은 것으로 보고되어 있으며, 많은 연구에 광범위하게 사용되고 있다. 하지만 단일화된 줄기 세포들의 증식 능력 및 분화유지 능력에 있어서 많은 한계가 있는 것이 사실이다. 즉, 중간엽 줄기 세포 등의 성체 줄기 세포를 얻기 위해서는 배가계대수(population doubling)가 많이 필요하나, 인간의 중간엽 줄기 세포는 증식 능력에 한계가 있으며, 평균적으로 38의 배가계대수가 지나면 노년기에 이르는 것으로 알려져 있으며, 또한 중간엽 줄기 세포의 수율은 공여체의 나이가 증가할수록 증식능력이 떨어지는 것으로 알려져 있다.

[0005] 따라서, 중간엽 줄기 세포를 연골조직 재건(reconstruction) 또는 재생(regeneration)을 위한 세포치료제로서 사용하기 위해서는, 중간엽 줄기 세포를 높은 분화효율로 연골세포로 분화시키는 방법을 개발하는 것이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 중간엽 줄기 세포를 연골조직 재건 및 재생을 위한 세포치료제로서 사용하기 위한 방법을 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행하였다. 본 발명자들은 분화된 연골 조직의 중요한 마커인 COL II 발현을 유도하고 유지시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 hSOX9 유전자를, 특정 siRNA와 함께, 비-바이러스성 유전자 전달체로서 나노 복합체를 제작하였으며, 상기 나노 복합체가 효과적으로 중간엽 줄기 세포 내부로 유입(uptake)될 뿐만 아니라, 상기 나노 복합체가 유입된 중간엽 줄기 세포가 높은 분화효율로 연골세포로 분화될 수 있다는 것을 발견하였다.

- [0007] 따라서, 본 발명은 hSOX9 유전자 및 특정 siRNA가 결합된 나노 복합체를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 나노 복합체를 사용한 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포를 포함하는, 연골조직 재건 또는 재생용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 태양에 따라, 생분해성 고분자의 나노입자 상에, hSOX9 유전자; 및 서열번호 1 내지 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드로부터 1종 이상 선택된 siRNA를 결합시켜 얻어진, 연골조직 재건 또는 재생을 위한 나노 복합체가 제공된다.
- [0011] 본 발명에 따른 연골조직 재건 또는 재생을 위한 나노 복합체에 있어서, 상기 hSOX9 유전자 및 siRNA의 결합은, 카르복실기를 갖는 생분해성 고분자의 나노입자를 폴리에틸렌이민과 반응시킨 후, hSOX9 유전자 및 siRNA를 반응시킴으로써 수행될 수 있다. 또한, 상기 생분해성 고분자는 폴리락트산, 락트산과 글리콜산의 공-중합체, 폴리카프로락톤, 락타이드와 1,4-디옥산-2-온의 공-중합체, 카프로락톤과 글리콜산의 공-중합체, 카프로락톤과 락트산의 공-중합체, 폴리오르토에스테르, 폴리안하이드라이드, 폴리포스포아미드, 폴리아미노산, 및 폴리우레탄과 폴리에틸렌글리콜의 블록 공-중합체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 락트산과 글리콜산의 공-중합체일 수 있다. 상기 hSOX9 유전자는 나노 복합체 중 0.5~2 μg 의 범위로 결합될 수 있으며, 상기 siRNA는 나노 복합체 중 50~200 p mol의 범위로 결합될 수 있다. 상기 hSOX9 유전자와 상기 생분해성 고분자의 나노입자의 중량비는 1 : 40~100의 범위일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 siRNA는 서열번호 1 내지 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드들의 혼합물일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 태양에 따라, 상기 나노 복합체 존재하에서 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)를 배양하는 것을 포함하는, 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화방법이 제공된다. 상기 배양은 상기 나노 복합체를 포함하는 무혈청 배지 중에서 중간엽 줄기 세포를 처리한 후, 혈청을 함유하는 배지 중에서 켈렛 배양을 수행함으로써, 바람직하게 수행될 수 있다.
- [0013] 본 발명의 또다른 태양에 따라, 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포를 포함하고, 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 연골조직 재건 또는 재생용 약학 조성물이 제공된다. 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 나노 복합체는 0.5~2 μg 의 hSOX9 유전자 및 50~200 p mol의 siRNA를 포함하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0014] hSOX9 유전자 및 특정 siRNA(즉, 서열번호 1 ~ 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드로부터 1종 이상 선택된 siRNA)가 결합된 상기 나노 복합체는 hSOX9 유전자 및 siRNA를 중간엽 줄기 세포에 실효성 있게 전달함으로써, 연골조직 재건 및 재생을 위한 유전자 전달 수송체로 유용하게 사용할 수 있다는 것이 본 발명에 의해 밝혀졌으며, 특히, 상기 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포는 높은 분화효율로 연골세포로 분화될 수 있음이 본 발명에 의해 증명되었다. 따라서, 상기 나노 복합체는 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화에 유용하게 사용될 수 있으며, 나아가 상기 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포는 연골조직 재건 또는 재생을 위한 약학 조성물, 즉 세포 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 폴리에틸렌이민, hSOX9 유전자, 및 siRNA의 사용량을 변화시켜 제조한 나노 복합체에 대한 겔 지연 분석(gel retardation assay) 결과 및 동적광산란(Dynamic light scattering, DLS)에 의한 입자크기 측정 결과를 나타낸다.
- 도 2는 중간엽 줄기 세포에 의한 나노 복합체의 세포 내 유입(cellular uptake)을 평가한 결과로서, 도 2a는 유세포 분석 결과이고, 도 2b는 면역형광염색법 실시에 따른 공초점 레이저 현미경 분석결과이며, 도 2c는 RT-PCR 및 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 결과를 나타낸다.
- 도 3은 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화를 평가한 결과로서, 도 3a는 역전사효소-중합효소연쇄반응(Reverse Transcriptase-Polymer Chain Reaction : RT-PCR) 분석 결과이고, 도 3b는 실시간-중합효소연쇄반응(Real time Polymer Chain Reaction : Real time PCR) 분석결과이며, 도 3c는 면역조직염색

분석 결과를 나타낸다.

도 4는 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화를 평가한 결과로서, 도 4a는 웨스턴 블롯 분석 결과이고, 도 4b는 면역형광염색법에 따른 공초점 레이저 현미경 분석 이미지이고, 도 4c는 도 4b의 이미지로부터 확인가능한 형광발현의 정도를 정량한 결과를 나타낸다. 이미지의 정량은 공초점 레이저 현미경 운용 프로그램내의 면적정량기능을 이용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 생분해성 고분자의 나노입자 상에, hSOX9 유전자; 및 서열번호 1 내지 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드로부터 1종 이상 선택된 siRNA를 결합시켜 얻어진, 연골조직 재건 또는 재생을 위한 나노 복합체를 제공한다.
- [0017] 본 발명에 따른 나노 복합체는 생분해성 고분자의 나노입자를 유전자 전달체로 사용하며, 분화를 유도하는 hSOX9 유전자; 및 특정 siRNA가 나노입자 표면에 결합되어 형성된다.
- [0018] 상기 "나노입자" 또는 "나노 복합체"에 있어서, 그 형태는 통상 구형 즉, 나노스피어(nanosphere)이나, 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 나노입자 또는 나노 복합체의 크기는 예를 들어, 10~300 nm, 바람직하게는 150~250 nm의 범위일 수 있다.
- [0019] 또한, 상기 생분해성 고분자는 폴리락트산, 락트산과 글리콜산의 공-중합체, 폴리카프로락톤, 락타이드와 1,4-디옥산-2-온의 공-중합체, 카프로락톤과 글리콜산의 공-중합체, 카프로락톤과 락트산의 공-중합체, 폴리ortho 에스테르[poly(ortho esters)], 폴리안하이드라이드(polyanhydrides), 폴리포스포아미드(phosphoramides), 폴리아미노산[poly(amino acids)], 및 폴리우레탄과 폴리에틸렌글리콜의 블록 공-중합체(polyurethane-PEG block copolymer)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 락트산과 글리콜산의 공-중합체 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]일 수 있다.
- [0020] 상기 hSOX9 유전자는 진뱅크(Gene Bank) 등에 공지되어 있으며, 분화된 연골 조직의 중요한 마커인 콜라겐 타입 II 발현을 유도하고 유지시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. hSOX9는 HMG(high mobility group) box 단백질의 SRY-형 계에 속하는 전사인자이다. SOX9 발현은 전구-연골(prechondrogenic) 중간엽에서 시작되며, 완전히 분화된 연골세포에서 높은 수준으로 유지된다.
- [0021] 상기 siRNA는 골세포(osteocytes) 및 지방세포(adipocytes)로 분화를 유도하는 cbfa-1의 유전자의 발현을 억제(silencing)하도록 설계된 뉴클레오티드로서, 구체적으로는 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 서열번호 1 ~ 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드로부터 1종 이상 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 siRNA는 서열번호 1 내지 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드들의 혼합물일 수 있다.

표 1

[0022]

서열번호	서열	
1	센스	CUG UUC AUA UGC CAA UUC A
2	안티센스	UGA AUU GGC AUA UGA ACA G
3	센스	CUG AAC UGU UGG GUU CGU U
4	안티센스	AAC GAA CCC AAC AGU UCA G
5	센스	GGA GAG CAA AAU UGC ACC A
6	안티센스	UGG UGC AAU UUU GCU CUC C

[0023] 본 발명에 따른 나노 복합체에 있어서, 생분해성 고분자의 나노입자 상에 hSOX9 유전자 및 siRNA의 결합은, 카르복실기를 갖는 생분해성 고분자의 나노입자를 폴리에틸렌이민과 반응시킨 후, hSOX9 유전자 및 siRNA를 반응 시킴으로써 수행될 수 있다.

[0024] 상기 카르복실기를 갖는 생분해성 고분자의 나노입자는 본 발명자들의 선행 특허 즉, 대한민국 특허등록 제10-0710052호에 개시된 제조방법에 의해 제조될 수 있으며, 다양하게 변형된 제조방법에 의해 제조가 가능하다. 예를 들어, PLGA 등의 생분해성 고분자를 디클로로메탄 등의 유기용매에 용해시킨 후, 초음파 처리한 다음, 폴리비닐 알코올 수용액에 첨가하여 유화시키고, 아이소프로판올을 함유한 폴리비닐 알코올수용액 50 ml을 첨가한 후, 건조 예를 들어 동결건조시킴으로써, 카르복실기를 갖는 나노입자를 얻을 수 있다.

- [0025] 상기와 같이 얻어진 카르복실기를 갖는 생분해성 고분자의 나노입자를 폴리에틸렌이민과 반응시키면, 나노입자의 표면 전하가 바뀌어 양이온(cation)으로 전환되게 되며, hSOX9 유전자 및 siRNA와 정전기적 결합을 형성할 수 있게 된다. 상기 폴리에틸렌이민의 사용량은 크게 제한되는 것은 아니나, 카르복실기를 갖는 생분해성 고분자의 나노입자 250 μg 에 대하여 4~10 μg 의 비율로 사용될 수 있다.
- [0026] 상기 폴리에틸렌이민과의 반응에 의해 얻어진 생분해성 고분자의 나노입자와 hSOX9 유전자 및 siRNA와의 반응은 수성 매질(예를 들어, 증류수 등) 내에서 수행될 수 있으며, hSOX9 유전자 및 siRNA 각각의 사용량은 나노 복합체에 의한 연골세포로의 선택적인 분화효율을 감안하여 정해질 수 있다. 바람직하게는, 상기 hSOX9 유전자는 나노 복합체 중 0.5~2 μg 의 범위로 함유되도록 결합될 수 있으며, 상기 siRNA는 나노 복합체 중 50~200 p mol의 범위로 결합될 수 있다. 상기 hSOX9 유전자와 상기 생분해성 고분자의 나노입자(즉, 폴리에틸렌이민과의 반응에 의하여 얻어진 생분해성 고분자의 나노입자)의 중량비는 1 : 40~100의 범위, 바람직하게는 약 1 : 50일 수 있다.
- [0027] 상기와 같이 얻어진 본 발명에 따른 나노 복합체는 효과적으로 hSOX9 유전자 및 siRNA를 중간엽 줄기 세포내로 유입(uptake)시킴으로써, 연골조직 재건 및 재생을 위한 유전자 전달 수송체로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0028] 또한, 상기와 같이 얻어진 본 발명에 따른 나노 복합체는 중간엽 줄기 세포를 연골세포로 선택적으로 분화시키는데 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 상기 나노 복합체 존재하에서 중간엽 줄기 세포를 배양하는 것을 포함하는, 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화방법을 제공한다.
- [0029] 상기 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)는 윤활막, 제대혈, 골수, 태반, 치조골, 지방(지방조직) 등 다양한 조직을 기원으로 하여 획득할 수 있으며, 다양한 기원 중 타 조직들 보다 상대적으로 손쉽게 분리할 수 있는 골수 유래의 중간엽 줄기 세포의 사용이 유리할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 분화방법에 있어서, 상기 배양은 상기 나노 복합체를 포함하는 무혈청 배지 중에서 중간엽 줄기 세포를 처리한 후[예를 들어, 나노 복합체를 포함하는 무혈청 배지 중에서 중간엽 줄기 세포를 약 6시간 동안 인큐베이션하여 나노 복합체의 세포 내 유입을 유도한 후], 우태아혈청(FBS) 등의 혈청을 함유하는 배지 중에서 펠렛 배양을 수행함으로써 수행될 수 있다. 상기 무혈청 배지 중에서의 처리는 통상의 세포배양용 배지 예를 들어, α -MEM 배지(Hyclone, USA) 등의 배지를 사용하여, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양 조건하에서 수행될 수 있다. 상기 무혈청 배지 중에서의 배양은 통상의 세포배양용 배지 예를 들어, α -MEM 배지(Hyclone, USA) 등의 배지를 사용하여, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양 조건 하에서 수행 가능하다. 또한, 무혈청 배지 중에서의 배양으로부터 얻어진 세포 즉, 나노복합체가 유입된 세포는 통상의 방법, 예를 들어 트립신-EDTA(GIBCO, USA)로 처리하여 단일세포로 만든 후, 펠렛 배양을 수행할 수 있다. 상기 펠렛 배양은 혈청을 함유하는 배지(예를 들어, FBS와 항생제가 포함된 α -MEM 배지) 중에 상기 단일세포를 접종하여 배양액 내에 부유시키고 원심분리하여 배양용 시험관 바닥에 펠렛을 형성시킨 후, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 배양 조건에서 배양함으로써 수행될 수 있다. 상기 펠렛 배양은 3일 내지 4일마다 배지를 교환하면서, 약 3주간 동안 수행될 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 나노 복합체는 또한 중간엽 줄기 세포와 함께 연골조직 재건 또는 재생을 위한 세포 치료제로서 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포를 포함하고, 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 연골조직 재건 또는 재생용 약학 조성물, 즉 세포 치료제를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 나노 복합체는 0.5~2 μg 의 hSOX9 유전자 및 50~200 p mol의 siRNA를 포함할 수 있다. 또한, 상기 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포는 상기한 바와 같이 얻을 수 있다. 즉, 상기 나노 복합체를 포함하는 무혈청 배지 중에서 중간엽 줄기 세포를 처리한 후[예를 들어, 나노 복합체를 포함하는 무혈청 배지 중에서 중간엽 줄기 세포를 약 6시간 동안 인큐베이션하여 나노 복합체의 세포 내 유입을 유도한 후], 우태아혈청(FBS) 등의 혈청을 함유하는 배지 중에서 펠렛 배양을 수행함으로써 얻어질 수 있다. 상기 무혈청 배지 중에서의 배양 및 펠렛 배양은 상기한 바와 같이 수행될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약학 조성물은 상기한 바와 같이 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포를 포함하고, 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 액체, 현탁액, 에멀전, 동결건조제 등의 비경구용 제형(예를 들어, 주사제 등)으로 제제화될 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline), 정제수, 멸균수 등의 수성 희석제 혹은 용제를 포함할 수 있다. 필요에 따라 용해제, 등장화제(isotonic agents), 현탁화제, 유화제, 안정화제 및 방부제와 같은 종래의 첨가제를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 BD MatrigelTM Matrix (BD biosciences 사) 등과 같은 통상의 지지

체를 사용하여 연결조직 재건 또는 재생을 위한 구조체(construct) 형태로 제조될 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 투여형태, 투여경로 및 기간에 따라 상이하지만, 예를 들면, 상기 중간엽 줄기 세포는 단위 투여시 약 1×10^6 cells의 용량으로, 예를 들어 주사제 형태로, 투여될 수 있다. 상기 투여는 필요에 따라 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여될 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물의 단위 제제는 약 1×10^6 cells의 나노 복합체가 도입된 중간엽 줄기 세포를 함유할 수 있다.

[0035] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다.

[0036] **실시예 1. 카르복실기를 갖는 나노입자의 제조**

[0037] 락트산과 글리콜산의 공-중합체[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA](중량평균분자량 33 kDa) 100 mg을 디클로로메탄 1 ml에 용해시킨 후, 약 30초 동안 초음파 처리(sonication)하였다. 얻어진 용액을 폴리비닐 알코올(Mw 13,000~23,000)(Sigma사) 7% 수용액 3 ml에 첨가한 다음, 7,500 rpm으로 교반하면서 20초간 초음파 처리하여 유화시켰다. 얻어진 용액을 2% 아이소프로판올을 함유한 폴리비닐 알코올(Mw 13,000~23,000)(Sigma사) 1% 수용액 50 ml에 첨가한 후, 동결건조기 중에서 동결건조시켜 나노입자 분말을 제조하였다.

[0038] **실시예 2. 나노 복합체의 제조 및 평가**

[0039] (1) 나노 복합체의 제조

[0040] 실시예 1에서 얻어진 카르복실기를 갖는 나노입자 50 mg을 증류수 10 ml에 용해하고, 0.22 μ m 시린지 필터로 여과하여 0.22 μ m 이상의 크기를 지니는 입자를 제거하였다. 얻어진 나노입자가 포함된 용액 0.2ml에 폴리에틸렌이민을 5 μ g을 가하여 폴리에틸렌이민을 반응시켜 폴리에틸렌이민을 코팅한 다음, hSOX9 유전자 및 서열번호 1 ~ 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드들의 혼합물을 가하고, 실온에서 20분 동안 교반하여, 나노 복합체-함유 용액을 제조한 다음, 냉장보관하였다. 또한 대조군으로서, 무작위 서열(scrambled sequence)을 갖는, 즉 CCU ACG CCA CCA AUU UCG U(서열번호 7) 및 ACG AAA UUG GUG GCG UAG G(서열번호 8)의 염기서열을 지니는 siRNA 혼합물을 제조하여 사용하였다. 각각의 서열들은 바이오니어(Bioneer)사에 합성을 의뢰하여 그 합성 결과물을 획득하였다.

[0041] (2) 나노 복합체의 평가

[0042] 폴리에틸렌이민의 사용량에 따른 영향을 평가하기 위하여, hSOX9 유전자 0.5 μ g을 사용하고, HEPES 완충액에 5 μ g/ μ l의 농도로 용해시켜 얻어진 폴리에틸렌이민 용액의 사용량을 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 및 2 μ l로 변화시켜 나노 복합체(siRNA 비사용)를 제조하였다. 또한, hSOX9 유전자의 사용량에 따른 영향을 평가하기 위하여, 상기 폴리에틸렌이민 용액 1 μ l를 사용하고, hSOX9 유전자의 사용량을 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 및 2 μ g으로 변화시켜 나노 복합체(siRNA 비사용)를 제조하였다. 또한, siRNA의 사용량에 따른 영향을 평가하기 위하여, 상기 폴리에틸렌이민 용액 및 hSOX9 유전자를 각각 1 μ l 및 0.5 μ g을 사용하고, siRNA의 사용량을 1, 5, 10, 50, 100, 및 200 p mol로 변화시켜 나노 복합체를 제조하였다.

[0043] 얻어진 생성물이 나노 복합체를 형성하였는지 확인하기 위하여, 각각의 나노 복합체 용액 100 μ l에 증류수 900 μ l에 넣고, 60초 동안 볼텍싱한 다음, 전기 영동 장치를 이용하여 겔 지연 분석(gel retardation assay)을 수행하였다. 상기 겔 지연 분석에서 겔로서 1% 아가로오즈(Agarose)를 사용하였으며, 30분 동안 100v 전압으로 측정하였다. 또한, 각각의 입자 크기를 동적광산란(Dynamic light scattering, DLS)를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 도 1과 같다.

[0044] 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 폴리에틸렌이민 용액을 1 μ l로 사용하였을 때 적어도 1 μ g 이상의 hSOX9 유전자가 PLGA에 결합되었으며, 폴리에틸렌이민 용액 및 hSOX9 유전자를 각각 1 μ l 및 0.5 μ g으로 사용하였을 때, 적어도 50 p mol 이상의 siRNA가 PLGA에 결합되었다. PLGA 나노입자에 폴리에틸렌이민을 결합시킴으로써 나노입

자의 크기가 증가하였으며, 또한 hSOX9 유전자 및 siRNA가 결합됨에 따라 이에 비례하여 입자 크기가 증가하였다. 따라서, 상기에서 얻어진 생성물은 PLGA 나노입자 표면에 hSOX9 유전자 및 siRNA가 결합된 나노 복합체임을 확인할 수 있다.

[0045] 실시예 3. 중간엽 줄기 세포의 나노복합체 세포내유입(cellular uptake) 평가

[0046] (1) 중간엽 줄기 세포의 배양

[0047] 리보뉴클레오사이드, 데옥시리보뉴클레오사이드, 및 L-글루타민을 함유하고 있는 α -MEM(Hyclone, USA) 배지에 10% 열-불활성화시킨 우태아혈청(heat-inactivated fetal bovine serum, FBS) 및 1% 항생제(페니실린, 스트렙토마이신)를 가하여 기본 배지로 사용하였다. 기본 배지에 골수 유래의 인간 중간엽 기질 줄기세포(Cambrex, Walkersville, PT-2501, U.S.A)를 접종하여 세포배양용 디쉬(지름: 150 π)에서, 37 °C에서 5% CO₂를 포함하는 가습조건(humidified atmosphere)의 세포 배양기에서 배양하였다. 5일 후, 비-부착 세포를 제거하고, 부착된 세포를 3일에 한 번씩 배지를 갈아주며 계대배양하였다.

[0048] (2) 중간엽 줄기 세포의 나노복합체 세포내 유입(cellular uptake)

[0049] 상기 (1)에서 배양된 중간엽 줄기 세포를 6-웰 플레이트에 웰 당 1X10⁵ cells를 기본 배지와 함께 접종하고, 37°C에서 24시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양한 다음, 배지를 제거하고 FBS와 항생제가 없는 α -MEM 배지(Hyclone, USA)로 바꾸어 주었다. 나노 복합체를 각각의 웰에 가하고, 6 시간 동안 인큐베이션한 다음, 배지를 FBS와 항생제가 포함된 기본 배지로 교환한 후, 37°C에서 48시간 동안 추가로 배양하였다. 상기 나노 복합체는 HEPES 완충액에 5 μ g/ μ l의 농도로 용해시켜 얻어진 폴리에틸렌이민 용액 1 μ l, 형광물질 FITC(fluorescein isothiocyanate)으로 표지된 hSOX9 유전자 1 μ g, 형광물질 RITC(rhodamine isothiocyanate)으로 표지된 siRNA (즉, RITC로 표지된 서열번호 1 에서 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드들의 혼합물) 100 p mol을 사용하여, 실시예 2의 (1)과 동일한 방법으로 PLGA-hSOX9 복합체, PLGA-hSOX9-siRNA 복합체, 및 PLGA-hSOX9-컨트롤 siRNA 복합체를 각각 제조하였다.

[0050] (3) 나노복합체의 세포내 유입(cellular uptake) 평가 - 유세포분석 및 형광염색 분석

[0051] 상기와 같이 6-웰 플레이트에서 배양된 각각의 세포를 트립신-EDTA(GIBCO, USA)로 처리하여 단일세포로 만든 후, 2% FBS가 들어있는 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 세포내 유입(cellular uptake)양상을 측정하였으며, 그 결과는 도 2a와 같다. 또한, 얻어진 세포를 FACSCaliber flow cytometer (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 세포 내로의 이입정도를 측정하였다. 또한 형광이 표지된 나노복합체가 유입되어 배양된 중간엽 줄기세포의 세포내 유입양상과 배양 간 유지의 확인을 위하여, 세포가 배양된 6-웰에 각각 4% 파라포름알데히드를 가하여 5분간 세포를 고정시킨 후 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)(Hyclone)으로 2회 세척 후, DAPI(디아미디노-2-페닐인돌)(Sigma)로 1분간 핵을 염색하였으며, 공초점 레이저 현미경(Confocal Laser Scanning microscopy)(Zwiss, 독일)을 사용하여 (2)에서 기술한 바와 같이 형광표지인자의 형광 발현 정도를 측정하였으며, 그 결과는 도 2b와 같다. 도 2a 및 도 2b에서 보여주는 바와 같이 나노 복합체가 중간엽 줄기 세포내부로 온전히 효과적으로 유입(uptake)되었음을 알 수 있다.

[0052] (4) 세포내 유입(cellular uptake)의 평가 - 역전사효소-중합효소연쇄반응(RT-PCR) 및 웨스턴 블롯 분석

[0053] 배양된 세포로부터 총 RNA는 TRIzol(Invitrogen Technology, USA)을 이용하여 추출하였다. 제조사 지침에 따라, 추출한 RNA 1 μ g과 50mM oligo dT, 10mM dNTP mix, DW를 이용하여 65°C에서 5분간 반응시키고, 5X first-strand buffer, 0.1M DTT 및 MML-V (Clontech, USA)을 첨가한 후, 37°C에서 1시간, 70°C에서 15분간 반응하여 cDNA를 얻었다. 합성된 cDNA는 hSOX9 및 cbfa-1 에 특이적인 프라이머를 이용하여 Taq polymerase (Clontech, USA)로 증폭시켰다. 컨트롤 마커로서 GAPDH 유전자를 사용하였다. 사용된 각각의 프라이머는 다음 표 2와 같다.

PCR 산물은 1% 아가로스 겔(Intron, Korea)를 사용하여 전기영동하였으며, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하였다. 그 결과는 도 2c와 같다.

표 2

[0054]

유전자	서열번호	서열	
hSOX9	9	센스	TCCGCGAGGTCCATCTTG TG
	10	안티센스	ACGCTGCGCATCGTCTGG
cbfa-1	11	센스	ACTGGACGCTTGCAGACCAG
	12	안티센스	ATGCTCGGAAACAGTATCA
GAPDH	13	센스	CGGTGAGAACGTGCTGGAGT
	14	안티센스	ATGATGTTCTCCAGACGCC

[0055]

배양된 세포를 DPBS(Hyclone)로 2회 세척하고, RIPA 완충액(ELPIS, 한국)으로 처리하여 단백질을 추출한 다음, BSA assay (Pierce) 방법에 따라 정량하여 단백질 양을 확인하였다. 얻어진 세포 추출액을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔을 사용하여 웨스턴 블롯(Western blot) 분석을 수행하였다. 즉, SDS-폴리아크릴아마이드 겔을 사용하여 단백질을 분리한 후, PVDF 막(Bio-Rad, USA)으로 이동시켰다. 상기 PVDF 막은 5%의 무지방 우유(BD Biosciences, USA)가 함유된 1X TBST(0.5% 트윈-20) 용액으로 1시간 동안 블로킹(Blocking : 비특이적 항원-항체반응의 저지)하고, 1X TBST로 세척한 후 1차 항체를 5% 무지방 우유를 포함한 용액을 이용하여 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응 후 1X TBST를 이용하여 세척하고 퍼옥시다아제가 표지된 2차 항체를 반응시킨 후 1X TBST를 이용하여 세척하고 ECL 웨스턴 블롯(Western blot) 검출 시스템(Amersham, USA)을 사용하여 발광을 유도하여 검출된 단백질을 확인하였다. 웨스턴 블롯 분석에 사용된 각각의 1차 항체 즉, 항-hSOX9 항체 및 항-cbfa-1 항체는 Millipore사(미국)로부터 구입하였으며, 마커 단백질로서 사용된 β-액틴에 대한 1차 항체는 Santa Cruz사(미국)로부터 구입하였다. 그 결과는 도 2c와 같다.

[0056]

도 2c의 결과로부터, 본 발명에 따라 제조된 나노 복합체 즉, PLGA-hSOX9-siRNA 복합체로 처리된 중간엽 줄기 세포는 세포 내에서 hSOX9 유전자가 효과적으로 발현되는 반면, cbfa-1 유전자는 발현이 되지 않아, siRNA에 의해 cbfa-1 유전자의 발현이 억제됨을 알 수 있다.

[0057]

실시에 4. 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화 평가

[0058]

(1) 중간엽 줄기 세포의 연골세포로의 분화

[0059]

실시에 3의 (1)에서 배양된 중간엽 줄기 세포를 6-웰 플레이트에 웰 당 1×10^5 cells를 기본 배지와 함께 접종하고, 37℃에서 24시간 동안 5% CO₂를 포함하는 가습조건(humidified atmosphere)의 세포 배양기에서 배양한 다음, 배지를 제거하고 FBS와 항생제가 없는 α-MEM 배지(Hyclone, USA)로 바꾸어 주었다. 나노 복합체를 각각의 웰에 가하고, 6 시간 동안 배양하여 나노 복합체의 세포내 유입을 유도한 다음, 배지를 FBS와 항생제가 포함된 기본 배지로 교환한 후, 37℃에서 48시간 동안 5% CO₂를 포함하는 가습조건(humidified atmosphere)의 세포 배양기에서 추가로 배양하였다. 배양된 각각의 세포를 트립신-EDTA(GIBCO, USA)로 처리하여 단일세포로 만든 후, 얻어진 세포를 1×10^6 cells/ml의 밀도로 FBS와 항생제가 포함된 기본 배지에 접종하여 부유시킨 후, 15ml 폴리프로필렌 튜브에 넣고 1300rpm에서 3분간 원심분리하여 튜브 내부 바닥에 펠렛을 형성시켰다. 펠렛이 형성된 튜브를 37℃, 5% CO₂를 포함하는 가습조건(humidified atmosphere)의 세포 배양기에서 3주간 배양하였으며, 배양 기간 중 3일 내지 4일마다 새로운 배지로 교체해 주었다. 상기 나노 복합체는 HEPES 완충액에 5μg/μl의 농도로 용해시켜 얻어진 폴리에틸렌이민 용액 1 μl, hSOX9 유전자 1 μg, siRNA(즉, 서열번호 1 내지 6의 염기서열을 갖는 뉴클레오티드들의 혼합물) 100 p mol을 사용하여, 실시에 2의 (1)과 동일한 방법으로 PLGA-hSOX9 복합체, PLGA-hSOX9-siRNA 복합체, 및 PLGA-hSOX9-콘트롤 siRNA 복합체를 각각 제조하였다.

[0060]

(2) 연골세포로의 분화 평가 - RT-PCR 분석, 실시간-PCR 분석 및 면역조직염색

[0061]

실시에 3의 (4)와 동일한 방법으로 RT-PCR 분석을 수행하였으며, hSOX9, cbfa-1, 및 GAPDH 에 대하여 사용된 프

라이머는 상기 표 2와 동일하고, Comp(Cartilage oligomeric matrix protein), 아그레칸(aggrecan), 콜라겐 타입 II에 대하여 사용된 프라이머는 하기 표 3과 같다.

표 3

[0062]

유전자	서열번호	서열	
Comp	15	센스	AACGCTGAAGTCACGCTCAC
	16	안티센스	GGTAGCCAAAGATGAAGCCC
아그레칸	17	센스	ACAGACTTGAGGGGAGGTG
	18	안티센스	GGGGTCCTCTCCAGACAAA
Col II	19	센스	CAGGTTACGTACTACTGCC
	20	안티센스	TGGGATGAATGGACATCAGG

[0063]

또한, 중간엽 줄기세포 단독 및 PLGA-hSOX9 복합체, PLGA-hSOX9-siRNA 복합체, 또는 PLGA-hSOX9-콘트롤 siRNA 복합체 존재하에서 배양된 중간엽 줄기세포에서의 hSOX9, cbfa-1, Comp, 아그레칸(aggrecan), 및 콜라겐 타입 II의 발현량을 실시간-PCR(Real time-PCR)을 통하여 측정하였다. 상기 실시간-PCR은 ExiCycler (Bioneer, 한국)으로 수행하였으며, 증폭을 확인하기 위해 SYBR[®] Premix Ex Taq TM (Takara, Japan)을 사용하였다. PCR 조건은 95℃에서 30초 동안 (pre-denaturation) 1 cycle, 95℃에서 5초(denaturation), 50℃에서 30초 동안 (annealing), 72℃에서 10초 (annealing)로 총 40 cycle을 실행하였다.

[0064]

콘트롤 마커로서 β-액틴 유전자를 사용하였다. 사용된 각각의 프라이머는 다음 표 4와 같다.

표 4

[0065]

유전자	서열번호	서열	
hSOX9	21	센스	ACGCTGGGCAAGCTCTGG
	22	안티센스	TCCGGGTGGTCCTTCTTGTC
cbfa-1	23	센스	CAGTCACCTCAGGCATGTCC
	24	안티센스	GTGCTGCTGGTCTGGAAGG
Comp	25	센스	AGGAGGACTCAGACCACGATG
	26	안티센스	CTCCTGGCCGGGGTTAGG
Aggrecan	27	센스	GCTACGGAGACAAGGATGAGTTC
	28	안티센스	CGTAAAAGACCTCACCCCCAT
Col II	29	센스	AACACTGCCAACGTCCAGAT
	30	안티센스	CTGCAGCACGGTATAGGTGA
β-actin	31	센스	CACAGAGCCTCGCCTTTGC
	32	안티센스	CATGCCGGAGCCGTGTC

[0066]

또한, 각각의 배양된 세포를 알시안 블루(Alcian blue), 사프란인 O(Safranin O), 트리크롬(Trichrome), 알리자린 레드 O(Alizarin Red O), 및 헤마톡신&에오신(H&E) 염색을 통하여, 면역조직염색 분석을 수행하였다.

[0067]

상기 RT-PCR 분석 결과, 실시간-PCR 분석결과, 및 면역조직염색 분석 결과는 각각 도 3a, 도 3b, 및 도 3c와 같다. 도 3a 와 도 3b의 결과는 각각의 조건에 따라 분화 정도의 상이성에 의거하여 발현되는 단백질을 만들어 내는 세포내 RNA수준을 나타낸다. 본 발명에 따라 제조된 나노 복합체 즉, PLGA-hSOX9-siRNA 복합체를 세포 내로 유입시켜 분화를 유도한 시험군은 연골세포의 분화 확인 마커인 콜라겐 타입 II 및 아그레칸(aggrecan)이 효과적으로 발현됨을 알 수 있으며, 분화 유도 작용에 관여하는 SOX9의 발현 또한 효과적이다. 그러나, 골세포 분화 과정에서 생성되는 cbfa-1의 발현은 대조군 및 다른 시험군에 비하여 현저하게 저하됨으로써 중간엽 줄기세포로부터 연골세포로의 분화가 효율적으로 일어났음을 나타낸다. 반면 PLGA-hSOX9 복합체 및 PLGA-hSOX9-콘트롤 siRNA 복합체로 처리한 경우에는 콜라겐 타입 II 및 아그레칸(aggrecan) 발현의 수준이 PLGA-hSOX9-siRNA 복합체에 비하여 낮으며 골세포 분화과정에서 발현되는 cbfa-1의 발현수준이 높은 양상을 보여줌으로써, PLGA-hSOX9-siRNA 복합체를 이용한 연골세포 분화가 다른 나노복합체에 비하여 그 효율성이 현저하게 증가하는 것으로 분석할 수 있다.

[0068]

도 3c는 면역조직염색의 결과를 나타낸다. 알시안 블루 염색과 사프란인 O를 통한 조직염색은 연골세포 분화에 있어서 연골세포가 분비하여 만들어내는 연골조직 구성의 주요성분인 다당류의 조직 내 존재량을 나타낸다. 트

리크롬 염색을 통하여 생성되는 조직에 존재하는 콜라겐성분의 존재량을 확인할 수 있고, 알리자린 레드 O 염색을 통하여 조직 내 존재하는 칼슘성분의 침착 정도를 확인할 수 있다. 또한 헤마토크신&에오신 염색은 조직학분석의 가장 기본이 되는 형태학적 분석을 위한 염색법이다. 면역염색결과 또한, 도 3a와 도3b에서 나타난 결과와 유사한 양상을 나타내었다. 따라서, 본 발명에 따른 나노 복합체를 이용한 분화유도를 통해 연골세포로의 분화가 다른 복합체들에 비하여 현저하게 우수함을 확인할 수 있다.

[0069] (3) 연골세포로의 분화 평가 - 웨스턴 블롯 및 면역형광 분석

[0070] 상기 (2)에서 확인된 RNA수준에서의 결과를, 단백질 수준의 발현양상을 통하여 검증하였다. 즉, 실시예 3의 (4)와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하였으며, 웨스턴 블롯 분석에 사용된 각각의 1차 항체 즉, 항-hSOX9 항체, 항-cbfa-1 항체, 및 항-콜라겐 타입 II 항체는 Millipore사(미국)로부터 구입하였으며, 항-아그레칸 항체는 Abcam사(영국)으로부터 구입하였다. 마커 단백질로서 사용된 β -액틴에 대한 1차 항체는 Santa Cruz 사(미국)로부터 구입하였다. 그 결과는 도 4a와 같다.

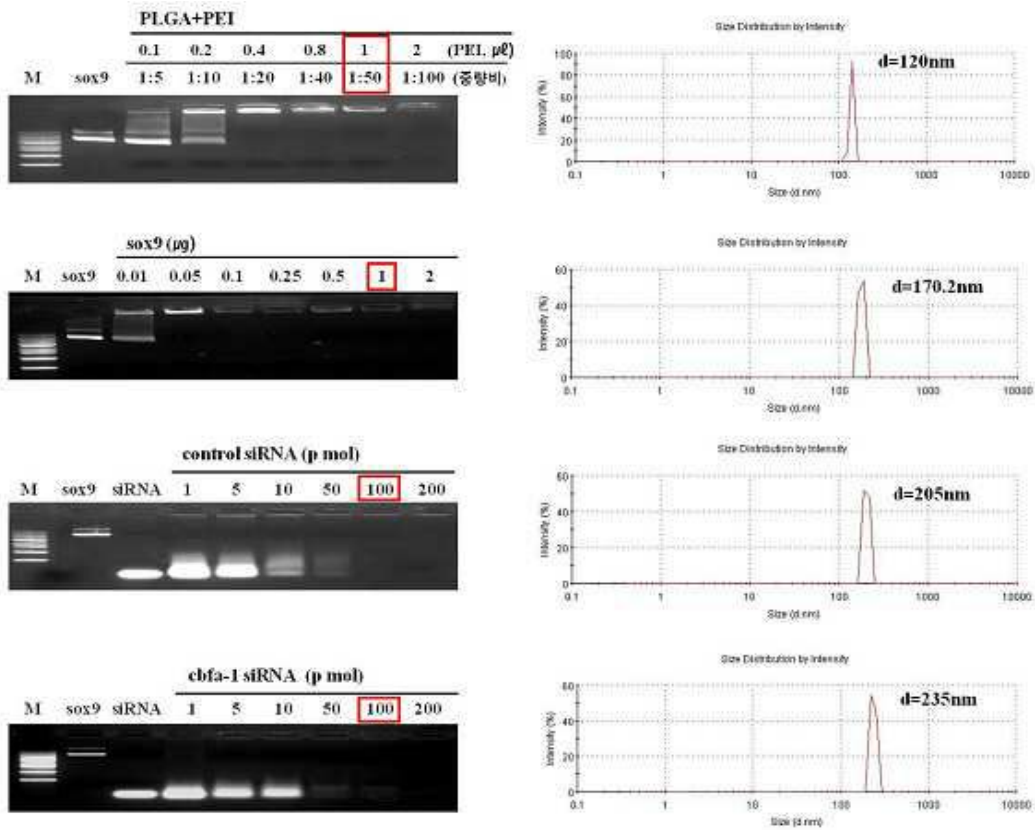
[0071] 또한, 펠렛 배양된 세포의 면역형광 분석의 수행을 위하여, 배양된 세포를 동결용 포매제(Optical cutting temperature compound)로 포매(embedding)한 후 냉동시켜 동결조직박편기(Cryo Cut)를 사용하여 10 μ m 두께의 박편을 만들어 슬라이드글라스에 부착시켰다. 부착된 조직은 4% 포르말데히드를 가한 뒤 10분간 방치하여 고정시켰으며 블록킹(비특이 면역반응 저지법)을 위하여 블록킹 용액 (Dako, 덴마크)을 분주하여 30분간 실온에 방치한 다음, 항-hSOX9 항체, 항-cbfa-1 항체, 및 항-콜라겐 타입 II 항체를 PBS에 1:100배로 희석하여 4°C에서 16시간 동안 처리한 후, PBS로 2회 세척하였다. 위의 과정을 통하여 반응이 완료된 시료에 hSOX9 유전자에는 형광물질 FITC(fluorescein isothiocyanate)로 표지된 형광 2차 항체를 반응시키고 siRNA 유전자에는 형광물질 RITC(rhodamine isothiocyanate)으로 표지된 형광 2차 항체를, 콜라겐 타입 II 항체에는 Cyanine dye 5.5 (Cy 5.5)가 표지된 형광 2차 항체를 반응시켰다. 이때 사용한 형광 2차 항체는 PBS를 이용하여 1:200배로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS를 이용하여 2회 세척하였다. 세포 또는 조직의 핵과 반응하여 UV상에서 관찰 가능한 형광빛을 발현하는 DAPI(디아미디노-2-페닐인돌)를 1:500배로 희석하여 1분간 염색하여 대조염색을 실시하였다.

[0072] 모든 과정이 완료된 시료를 캐나다 발삼(Canada balsam)(JUNSEI, 일본)을 이용하여 커버글라스로 마운팅후 건조시켜, 검체 표본을 제작하였다. 검체 표본들을 공초점 레이저 현미경(Confocal Laser Scanning Microscopy)을 사용하여, 상기한 각기 다른 파장의 형광을 그 파장에 반응하는 레이저를 조사하여 연골세포로의 분화과정에서 발현되는 항원-항체반응의 형광 발현 결과를 이미지화하여 분석하였다. 또한 이러한 형광 면역 반응에 따른 결과의 유의성을 증명하기 위하여 이미지화 된 결과를 공초점 레이저 현미경 운용 프로그램 내의 면적 정량 기능을 이용하여 분석 하였으며, 그 방법은 각각의 항원-항체반응과 레이저 조사에 따라 분석된 특이형광의 양을 이미지 픽셀단위로 환산하여 전체면적대비 유효형광발현면적의 비율(%) (계산식: 유효형광발현면적/전체이미지의 면적)X100)을 통해 정량 및 수치화하여 그래프로 나타내었다. 면역형광 분석 이미지 및 이로부터 형광을 정량한 결과는 각각 도 4b 및 도 4c에서 확인 할 수 있다.

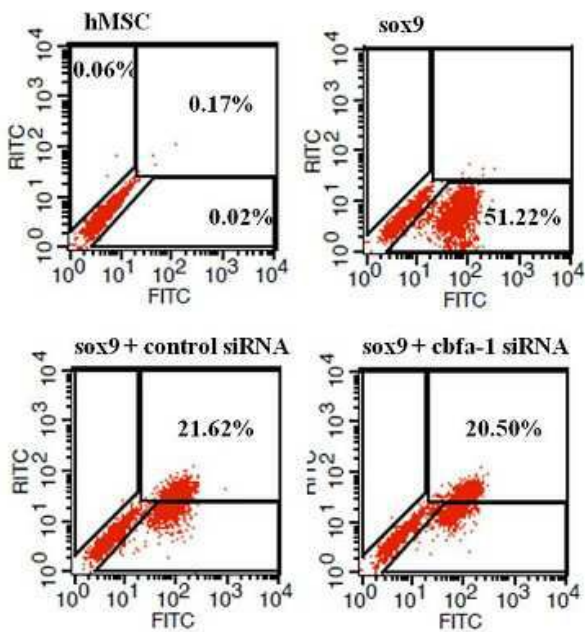
[0073] 도 4a 내지 도 4c에서 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따라 제조된 나노 복합체 즉 PLGA-hSOX9-siRNA 복합체로 처리하여 분화시킨 세포는 연골세포의 분화마커인 콜라겐 타입 II, SOX9 및 아그레칸(aggrecan)이 효과적으로 발현됨을 확인할 수 있으며, 반면 cbfa-1의 발현은 오히려 저하되고 억제됨으로써, 상기 도 3a 내지 도 3c와 상응하는 결과를 나타내었다. 즉, hSOX9를 포함한 나노복합체 및 hSOX9-콘트롤 siRNA를 포함한 나노복합체로 처리한 경우, 콜라겐 타입 II 및 아그레칸(aggrecan)의 발현은 확인되었으나 cbfa-1의 발현양상은 특이적으로 억제되는 양상이 적은 것을 보여주고 있다. 따라서 본 발명에 따라 제조된 나노 복합체 즉, PLGA-hSOX9-siRNA 복합체를 이용한 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화유도 및 연골세포분화 양상은 hSOX9를 포함한 나노복합체 및 hSOX9-콘트롤 siRNA를 포함한 나노복합체에 비하여 중간엽 줄기세포가 가지는 선택적 분화능력을 촉진하며 그 분화의 효율성을 높여주는 것을 확인할 수 있다.

도면

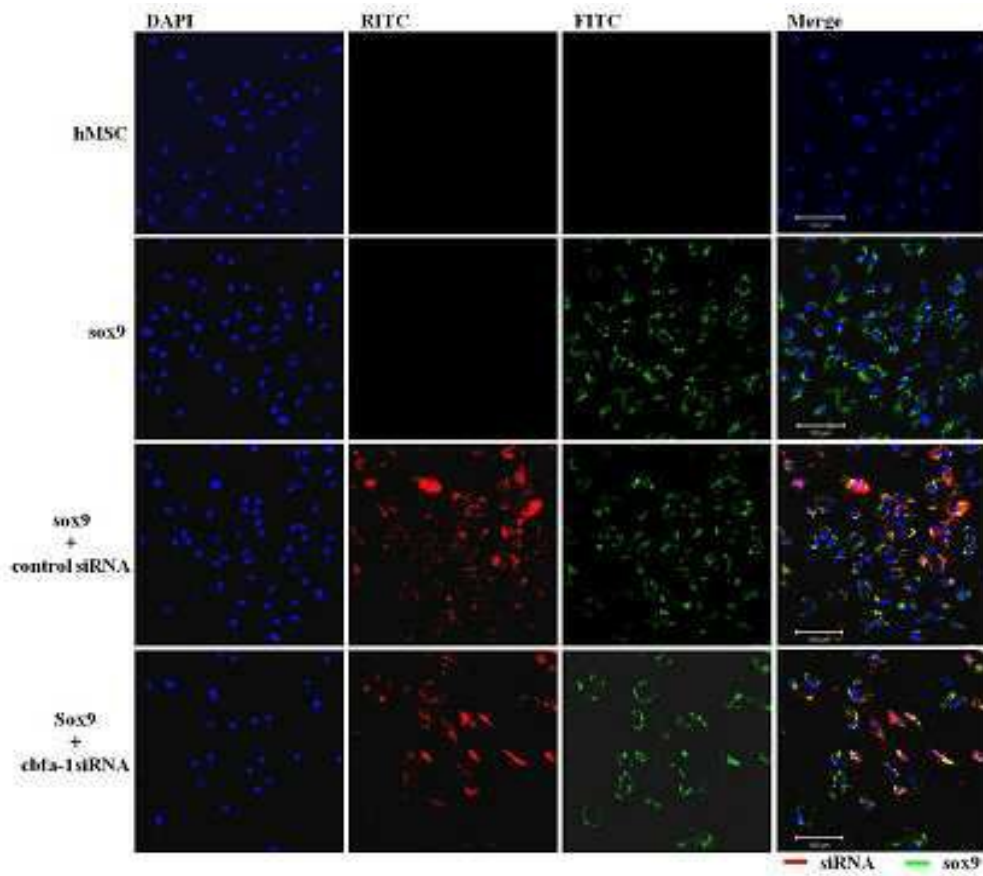
도면1



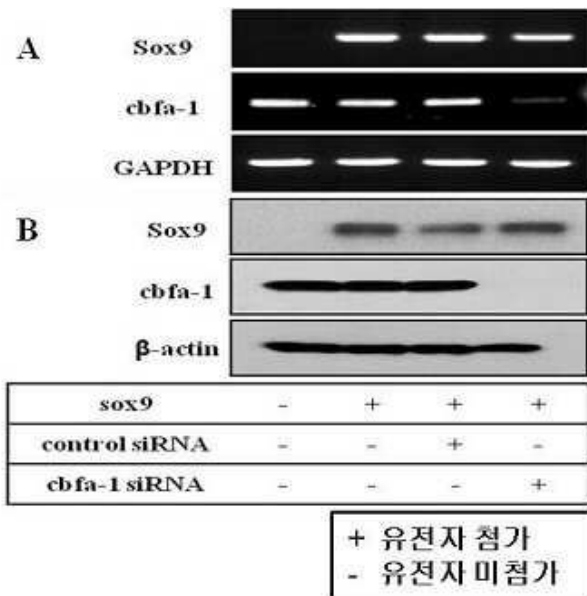
도면2a



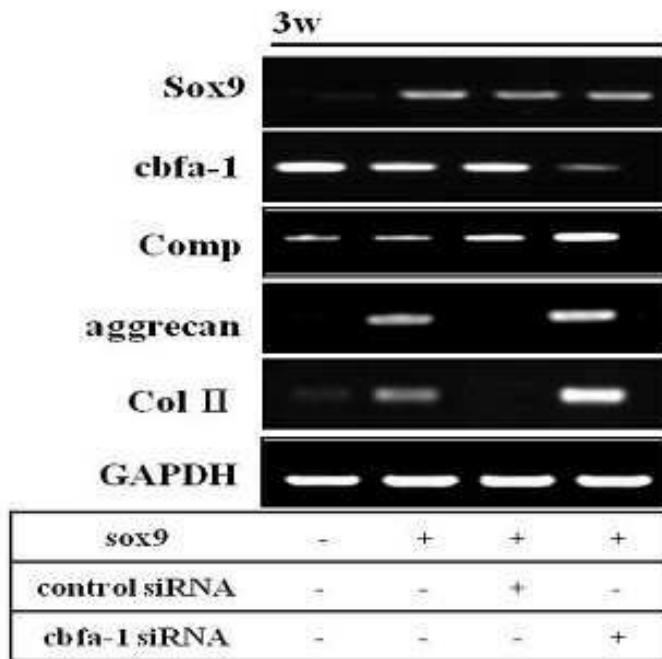
도면2b



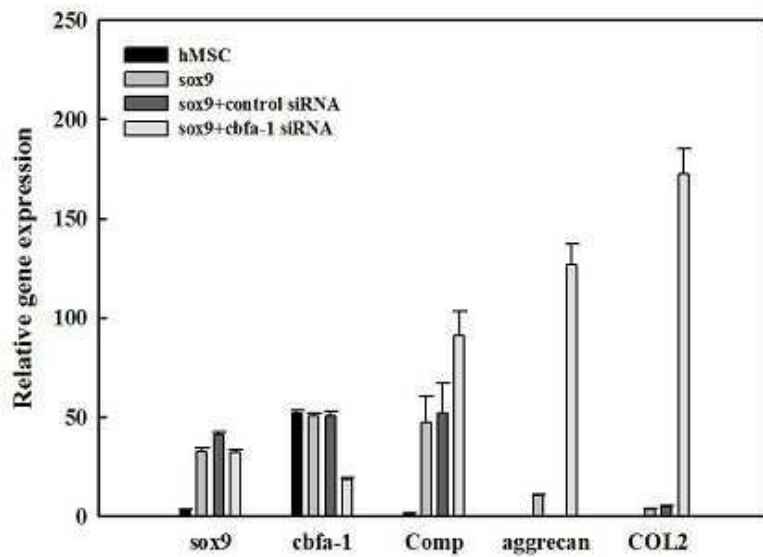
도면2c



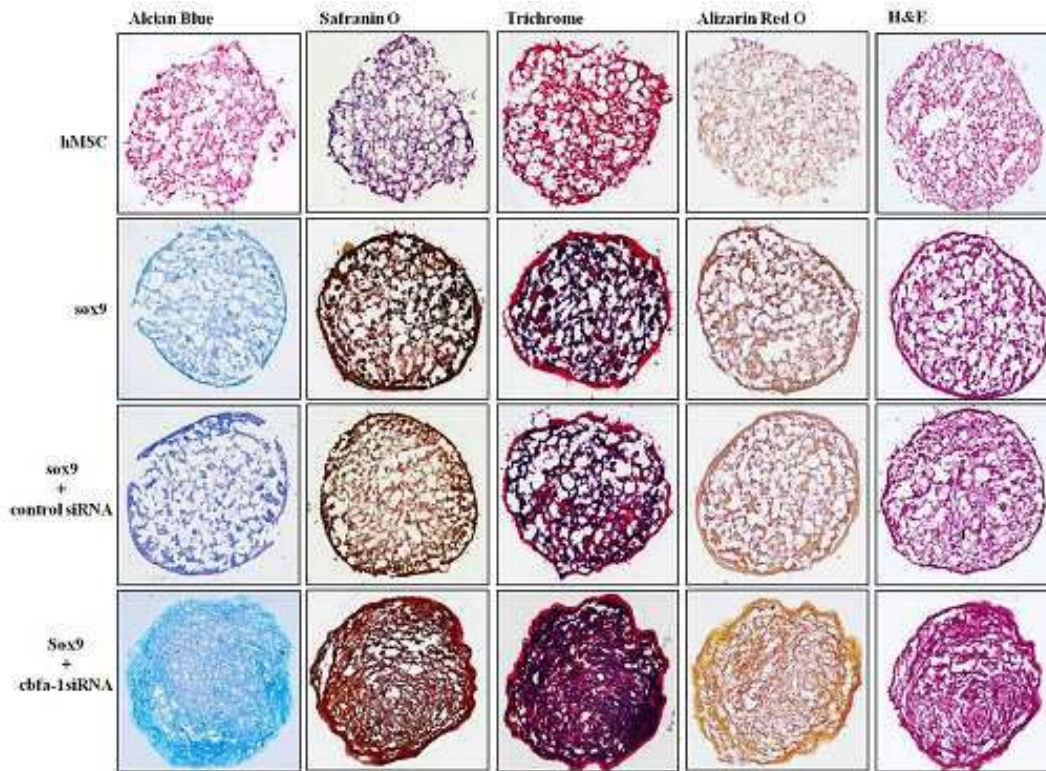
도면3a



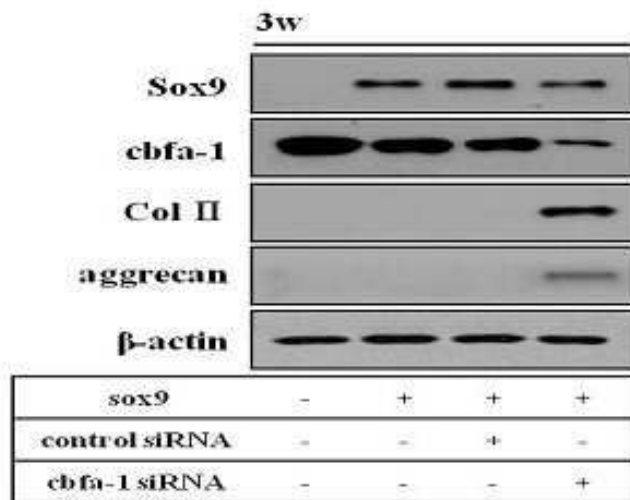
도면3b



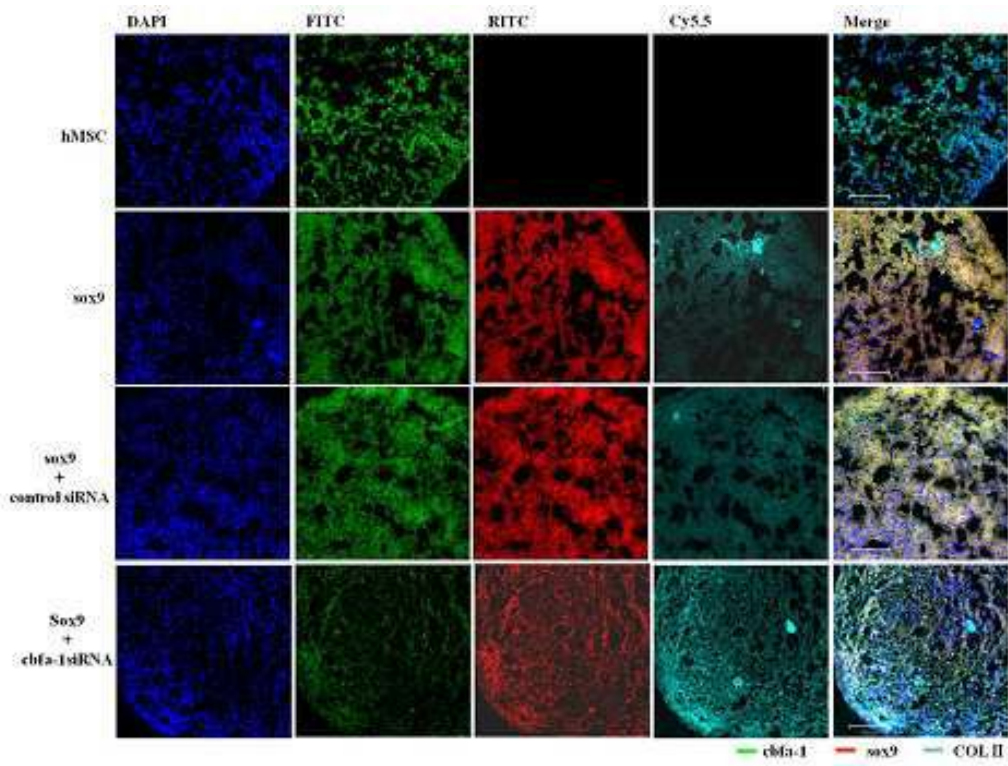
도면3c



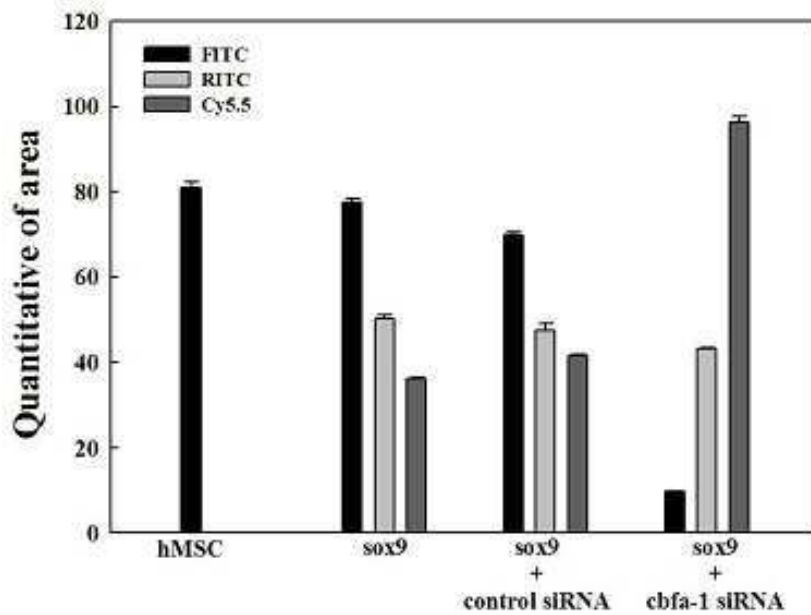
도면4a



도면4b



도면4c



서열 목록

<110> College of Medicine Pochon CHA University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Nano complex for reconstruction or regeneration of chondrocytic

tissue and method for differentiation to chondrocytes using the
same

<130> PN0466

<160> 32

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 1

cuguucauau gccaaauca 19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 2

ugaauuggca uaugaacag 19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 3

cugaacuguu gguucguu 19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 4

aacgaacca acaguucag 19

<210> 5
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA
 <400> 5
 ggagagcaaa auugcacca 19
 <210> 6
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siRNA
 <400> 6
 uggugcaauu uugcucucc 19
 <210> 7
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Scrambled siRNA
 <400> 7
 ccuacgccac caauuucgu 19

 <210> 8
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Scrambled siRNA
 <400> 8
 acgaaaugg uggcguagg 19
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 9

tccgcgaggt ccatttttg	20
<210> 10	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 10	
acgctgcgca tcgtctgg	18
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 11	
actggacgct tgcagaccag	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 12	
atgctcgcga aacagtatca	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 13	
cggtgagaac gtgctggagt	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Primer
 <400> 14
 atgatgttct ccagacgccc 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 15
 aacgctgaag tcacgctcac 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 16
 ggtagccaaa gatgaagccc 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 17
 acagacttga gggggaggtg 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 18
 ggggtcctct ccagacaaaa 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 19
 caggttcacg tacactgcc 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 20
 tgggatgaat ggacatcagg 20

<210> 21
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 21
 acgctgggca agctctgg 18

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 22
 tccgggtggt ccttctgtg 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 23
 cagtcacctc aggcatgtcc 20

<210> 24

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 24
 gtgctgctgg tctggaagg 19
 <210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Priemr
 <400> 25
 aggaggactc agaccacgat g 21

 <210> 26
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 26
 ctctggccg gggtagg 18
 <210> 27
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 27
 gctacggaga caaggatgag ttc 23
 <210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 28

cgtaaaagac ctcaccctcc at	22
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 29	
aacctgccca acgtccagat	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 30	
ctgcagcacg gtataggtga	20
<210> 31	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 31	
cacagacct cgcctttgc	19
<210> 32	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 32	
catgccggag ccgttgtc	18