



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년02월18일

(11) 등록번호 10-1595063

(24) 등록일자 2016년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0049601

(22) 출원일자 2014년04월24일

심사청구일자 2014년04월24일

(65) 공개번호 10-2015-0123428

(43) 공개일자 2015년11월04일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120057429 A*

EP02860194 A1

KR1020060005595 A

agnella, S. et al., Tissue Eng.

11(1-2):pp.226-236 (2005. 9.29.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교천안캠퍼스내(안서동)

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

김해원

충남 천안시 서북구 광장로 260, 106동 101호 (불당동, 불당한화꿈에그린아파트)

장준혁

인천광역시 연수구 컨벤시아대로130번길 80 (송도동, 송도 푸르지오 하버뷰) 107동 503호

윤예량

인천 남구 토금북로11번길 8, 501호 (용현동, 금강주택)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 박정웅

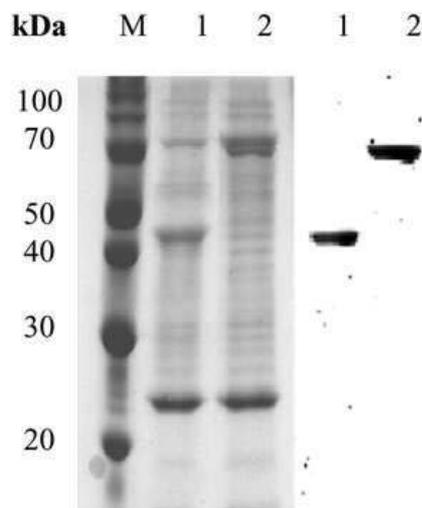
(54) 발명의 명칭 세포결합 서열, 헤파린 결합 도메인 및 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합단백질 및 이를 포함하는 약학 조성물

(57) 요약

피브로넥틴 유래 세포결합에 관여하는 RGD(Arg-Gly-Asp) 서열 및 헤파린 결합 도메인(heparin-binding domain, HBD)과 오스테오칼신 도메인을 포함하여, 세포결합, 세포증식 및 골형성 분화를 현저하게 촉진시킬 수 있는 효과를 나타내는 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



융합단백질 발현용 벡터, 상기 벡터가 도입되어, 상기 융합단백질을 생산할 수 있는 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 융합단백질을 생산하는 방법, 상기 융합 단백질에 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 상기 융합 단백질을 포함하는 골 또는 치아 재생용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 융합단백질은 RGD 서열 뿐만 아니라 헤파린 결합 도메인을 포함하여, RGD 서열만을 포함하는 종래의 융합단백질에 비하여, 세포결합, 세포증식 및 골형성 분화와 같은 다양한 세포활성을 더욱 활성화시킬 수 있음을 확인하였으므로, 골질환의 예방 또는 치료 뿐만 아니라, 손상된 골 또는 치아를 재생하는데에도 널리 활용될 수 있을 것이다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093829
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 대학중점연구소지원사업
 연구과제명 조직재생공학을 위한 소재-세포-인자 융합연구
 기여율 1/2
 주관기관 단국대학교
 연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345205122
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 일반연구자지원(교육부)
 연구과제명 장기 서방출형 골형성 유도 단백질 전달 시스템 연구
 기여율 1/2
 주관기관 인하대학교
 연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

피브로넥틴 유래 RGD(Arg-Gly-Asp) 서열과 헤파린 결합 도메인(heparin-binding domain, HBD), 및 오스테오칼신 도메인을 포함하는, 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 융합단백질

청구항 5

삭제

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 융합단백질은 세포결합 활성, 세포증식 활성 및 골형성 분화활성을 나타내는 것인 융합단백질.

청구항 7

제4항의 융합단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

제7항에 있어서,

서열번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

제7항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 10

제9항의 발현벡터가 도입되어 형질전환된 형질전환체.

청구항 11

(a) 제10항의 형질전환체를 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및,

(b) 상기 배양물로부터 제4항의 융합단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 제4항의 융합단백질의 생산방법.

청구항 12

제4항 또는 제6항 중 어느 한 항의 융합단백질을 유효성분으로 포함하는, 성장기 발육부진, 골절, 구루병(rickets), 골연화증(osteomalacia), 척추측만증(scoliosis), 골반변형(pelvic deformity), 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 갑상선기능항진증(hyperparathyroidism), 파제트병(Paget disease), 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제4항 또는 제6항 중 어느 한 항의 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 골 또는 치아 재생용 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 세포결합 서열, 헤파린 결합 도메인 및 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합단백질 및 그의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 피브로넥틴 유래 세포결합에 관여하는 RGD(Arg-Gly-Asp) 서열 및 헤파린 결합 도메인(heparin-binding domain, HBD)과 오스테오칼신 도메인을 포함하여, 세포결합, 세포증식 및 골형성 분화를 현저하게 촉진시킬 수 있는 효과를 나타내는 융합 단백질, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 융합단백질 발현용 벡터, 상기 벡터가 도입되어, 상기 융합단백질을 생산할 수 있는 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 융합단백질을 생산하는 방법, 상기 융합 단백질을 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 상기 융합 단백질을 포함하는 골 또는 치아 재생용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

대량 골 결손의 치료는 현대 의학에서 중요한 과제이다. 재생 의학 및 조직공학에 대한 연구가 계속되고 있으며, 줄기세포 기반의 치료가 임상에서의 골 재생을 위해 고려되고 있다. 이는 부분적 골 결손이 이미 상당히 진행되었거나 조직이 노화된 환자에게서 초기 조골세포 획득이 어렵다는 문제를 극복하였다. 중간엽 줄기세포(MSCs)는 뼈 형성 단백질과 같은 적절한 영양분이 공급되는 경우 조골세포의 표현형으로 바로 분화한다.

[0003]

골 조직 공학에 적용하기 위한 스캐폴드는, 숙주 조직의 최적화된 조직 형성을 위해 핵심적인 몇 가지 조건을 만족해야 한다. 이 조건은 세포 친화력, 영양분과 산소가 투과하기 위한 적절한 공극률, 세포 부착 및 분화를 촉진시키기 위한 계면 활성 등을 포함한다. 또한, 이상적으로 스캐폴드는 연속적으로 분해되어 숙주세포에 의해 대체되어야 한다. 콜라겐과 같은 세포외 기질(ECM)분자가 적절한 스캐폴드 재료이다. 그러나, 폴리유산(PLA), 폴리카프로락톤(PCL) 및 이의 공중합체와 같은 합성 분해성 플라스틱은 자연발생 물질에 비하여 정확한 가공이 가능하고, 보다 경제적이어서 임상적으로 널리 사용할 수 있다는 장점이 있다.

[0004]

그러나, 합성 생체 고분자는 낮은 골 생체활성, 높은 소수성, 생체 단백질 및 세포에 대한 낮은 친화력을 가지기 때문에, 합성 생체고분자 스캐폴드는 골 조직 공학에 적합하도록 최적화 될 필요가 있다. 따라서, 생체활성을 증가시키기 위해 친수성 물질을 이용한 표면 개질과 같은 여러 시도가 있어왔다. 접착 단백질은 합성 고분자의 표면에 공유결합 하여 초기 세포 부착을 증가시킨다. 이러한 접착 단백질은 콜라겐이나 피브로넥틴을 포함한다. 그러나, 접착 단백질을 스캐폴드에 연결하는 것은 줄기세포가 조골세포로 분화하여 기능적인 골 조직을 형성하기 위해 적절한 표면 조건을 충분히 제공하지 못한다. 하이드록시아파타이트(HA) 또는 트리칼슘 포스페이트(TCP)와 같은 생체활성 세라믹과 PCL로 이루어진 복합 스캐폴드가 골 재생에 있어서 증가된 생물학적 수용력, 즉 개선된 세포 접착력, 조골세포의 기능 분화, 골 형성을 보여준다. 따라서, 생체활성 세라믹과 PCL의 복합 스캐폴드가 골 조직 공학에 있어 바람직하지만, 이는 초기 세포 반응 및 미분화된 줄기세포에 대해서는 선호되지 않을 수 있다. 이상적으로, 생체모방 환경은 초기 줄기 세포 접착 및 성장, 및 조골세포의 표현형으로 성숙하기

위한 연속적 분화 모두에 적합한 것이 바람직하다.

[0005] 이에 초기 중간엽 줄기 세포의 부착 및 연속적인 골형성 모두에 적합한 스캐폴드를 개발하기 위하여, 다양한 연구가 수행되어 왔다. 예를 들어, 한국특허공개 제2012-0036217호에는 합성 생체고분자에 젤라틴-아파타이트를 혼합하여 얻은 혼합물을 전기방사함으로써 젤라틴-아파타이트-생체고분자로 구성된 복합체 골 조직 재생용 나노섬유를 제조하는 방법이 개시되어 있고, 한국특허공개 제2012-0036218호에는 반대 상으로서 캄핀을 사용하는 상분리법을 이용하여 나노섬유상 구조의 생체 고분자를 제조하는 방법과, 반대 상으로서 캄핀을 사용하는 상분리법을 이용하고 일반적인 스캐폴딩 방법을 적용함으로써 나노섬유상 구조를 가지는 3D 스캐폴드를 제조하는 방법이 개시되어 있으며, 한국특허공개 제2012-0057429호에는 피브로넥틴 도메인 및 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합 단백질, 및 상기 단백질을 포함하는 뼈 또는 치아 재생용 조성물 및 뼈 질환 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있고, 한국특허등록 제1317515호에는 고분자 스캐폴드 표면에 코팅된 하이드록시아파타이트 및 하이드록시아파타이트와 결합된 피브로넥틴-오스테오칼신 융합단백질을 포함하는 뼈 재생용 스캐폴드 및 이의 제조 방법이 개시되어 있다.

[0006] 특히, RGD 서열을 포함하는 피브로넥틴 도메인과 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합 단백질의 경우, 이에 포함된 오스테오칼신으로 인하여, 피브로넥틴 자체가 갖는 세포결합 활성이 현저하게 증진되었음을 확인하였다.

[0007] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 피브로넥틴 도메인과 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합 단백질이 나타내는 세포결합 활성 등의 세포활성이 보다 향상된 융합단백질을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 종래의 RGD 서열 이외의 헤파린 결합 도메인(heparin-binding domain, HBD)을 포함하는 피브로넥틴 도메인과 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합 단백질이, RGD 서열만을 포함하는 피브로넥틴 도메인과 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합 단백질 보다도 향상된 세포활성을 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 피브로넥틴 유래 RGD(Arg-Gly-Asp) 서열과 헤파린 결합 도메인(heparin-binding domain, HBD), 및 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 융합단백질 발현용 벡터를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터가 도입되어, 상기 융합단백질을 생산할 수 있는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 상기 융합단백질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합 단백질을 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합 단백질을 포함하는 골 또는 치아 재생용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은 조골세포에 대한 결합 및 유지를 촉진시키고, 조골세포의 분화를 향상시킬 수 있는 효과를 나타내는, RGD 서열을 포함하는 피브로넥틴 도메인과 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합 단백질을 개발한 바 있다(한국특허공개 제2012-0057429호). 상기 개발된 융합 단백질이 나타내는 세포결합 활성 등의 세포활성이 보다 향상된 융합단백질을 개발하고자, 상기 융합단백질에 부가하기 위한 다양한 융합파트너에 대한 연구를 수행하던 중, 헤파린 결합 도메인(heparin-binding domain, HBD)에 주목하게 되었다. 상기 HBD는 제3형 피브로넥틴 12 내지 14번 도메인에 의해 구성되는 도메인으로서, 헤파린에 대한 결합활성을 나타낸다고 알려져 있다. 본 발명자들은 앞서 개발한 융합 단백질과 유사한 형태를 갖도록 RGD 서열을 포함하는 제3형 피브로넥틴 9번 및 10번 도메인과 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합단백질(rhOC-FNIII9-10); 및 RGD 서열을 포함하는 제3형 피브로

넥틴 9번 내지 11번 도메인, HBD를 포함하는 제3형 피브로넥틴 12 내지 14번 도메인 및 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합단백질(rhOC-FNIII9-14)을 각각 제조하고, 전조골세포(preosteoblastic cell)의 일종인 MC3T3-E1 세포의 다양한 세포활성(세포결합 활성, 세포증식 활성 및 골형성 분화활성)에 미치는 이들 각 융합단백질의 효과를 비교하였다. 그 결과, HBD를 포함하는 융합단백질(rhOC-FNIII9-14)이 HBD를 포함하지 않는 융합단백질(rhOC-FNIII9-10) 보다, 다양한 세포활성(세포결합 활성, 세포증식 활성 및 골형성 분화활성)을 높은 수준으로 향상시킬 수 있는 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0016] 따라서, 본 발명에서 제공하는 HBD를 포함하는 융합단백질(rhOC-FNIII9-14)은 세포결합, 세포증식 및 골형성 분화를 현저하게 촉진시킬 수 있는 효과를 나타내어, 골질환의 예방 또는 치료용 약학조성물 또는 골 또는 치아 재생용 약학 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0017] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 피브로넥틴 유래 RGD(Arg-Gly-Asp) 서열과 헤파린 결합 도메인(heparin-binding domain, HBD), 및 오스테오칼신 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0018] 본 발명의 용어 "피브로넥틴(fibronectin, FN)"이란, 고등 동물의 세포 표면, 혈액, 세포외기질 등에 존재하고, 220 내지 250kDa의 분자량을 갖는 당단백질을 의미하는데, 이황화결합으로 인하여 이량체 또는 사량체의 형태로 존재한다. 상기 FN은 주로 간에서 합성되어 혈액으로 분비되는 이중합체 형태의 혈장 피브로넥틴과 섬유아세포에서 합성되어 세포외기질 또는 세포막으로 분비되는 사중합체 형태의 세포성 피브로넥틴으로 구별된다. 상기 FN을 코딩하는 유전자는 한 종류이지만, 상기 유전자는 RNA 스플라이싱이 발생하는 지역이 3개 부위에서 발생할 수 있어, 가능한 조합으로는 약 20종류의 단백질을 합성할 수 있다(도 1). 도 1에서 보듯이, 피브로넥틴을 코딩하는 유전자는 구조적으로 6개의 제1형 피브로넥틴 도메인, 3개의 제2형 피브로넥틴 도메인, 제3형 피브로넥틴 1 내지 14번 도메인, IIICS 도메인, 제3형 피브로넥틴 15번 도메인 및 3개의 제1형 피브로넥틴 도메인으로 구성된다. 상기 구성요소 중에서 제3형 피브로넥틴 7 내지 11번 도메인은 중앙 세포결합 도메인(central cell-binding domain, CCB)를 구성하고, 제3형 피브로넥틴 10번 도메인은 세포 결합에 관여하는 RGD 서열을 포함하며, 제3형 피브로넥틴 12 내지 14번 도메인은 헤파린 결합 도메인(heparin-binding domain, HBD)를 구성한다고 알려져 있어, 이러한 구조로 인하여, 콜라겐, 젤라틴, 헤파린, 피브린, 인테그린 등의 물질과 결합할 수 있다고 알려져 있다. 기능적인 측면에서 FN은 세포결합, 세포증식, 세포형태 조절, 세포이동, 손상회복 등의 다양한 생리적 작용에 관여한다고 알려져 있다. 상기 피브로넥틴의 구체적인 아미노산 서열 또는 그를 코딩하는 유전자의 염기서열 정보는 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스(GenBank Accession No. NP_002017, NP_001263337, NM_002026, NM_001276408 등)에서 얻을 수 있는데, 예를 들어, 피브로넥틴은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 피브로넥틴으로부터 유래된 RGD(Arg-Gly-Asp) 서열과 헤파린 결합 도메인(heparin-binding domain, HBD)를 사용하여 융합단백질을 구성할 수 있다.

[0020] 본 발명의 용어 "피브로넥틴 유래 RGD 서열"이란, 상기 피브로넥틴을 구성하는 제3형 피브로넥틴 10번 도메인에 포함된 서열로서 세포결합 활성을 나타내는 도메인을 의미한다. 예를 들어, RGD 서열은 피브로넥틴을 구성하는 서열번호 1의 아미노산 서열 중에서 1,497 내지 1,499번 아미노산으로 구성된 서열이 될 수 있다.

[0021] 본 발명의 용어 "피브로넥틴 유래 헤파린 결합 도메인(heparin-binding domain, HBD)"이란, 상기 피브로넥틴을 구성하는 제3형 피브로넥틴 12 내지 14번 도메인에 의해 형성되는 영역으로서, 헤파린에 대한 결합활성을 나타내는 도메인을 의미한다. 예를 들어, HBD 서열은 피브로넥틴을 구성하는 서열번호 1의 아미노산 서열 중에서 1,693 내지 1,964번 아미노산으로 구성된 서열이 될 수 있다.

[0022] 본 발명의 용어 "오스테오칼신(osteocalcin, OC)"이란, 감마-카르복실글루타민산(γ -carboxylglutamate: Gla) 잔기를 2-3 개 포함하고, 95개의 아미노산 서열로 구성된, 분자량 약 5.9kDa의 비타민 K 의존성 칼슘 결합 비콜라겐성 단백질을 의미한다. 생리적으로, 상기 오스테오칼신은 골조직의 석회화를 국소적으로 조절하거나 또는 골에 침적되는 칼슘이온의 흡수와 방출을 조절하는 역할을 수행한다. 상기 오스테오칼신의 구체적인 아미노산

서열 또는 그를 코딩하는 유전자의 염기서열 정보는 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스(GenBank Accession No. NM_199173, NM_031368.4, NP_954642, NP_112736.3 등)에서 얻을 수 있는데, 예를 들어, 오스테오칼신은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 OC의 전체 아미노산 서열 또는 부분 아미노산 서열을 사용하여, 융합단백질을 구성할 수 있다. 이때, OC의 부분 아미노산 서열은 이를 포함하는 융합단백질이 다양한 세포활성을 높은 수준으로 향상시킬 수 있는 효과를 나타내게 하는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열 중에서, 19 내지 95번 아미노산으로 구성된 서열이 될 수 있다.

[0024] 본 발명의 용어 "융합단백질"이란, RGD 서열, HBD, 및 OC 도메인을 포함하도록 인위적으로 합성된 단백질을 의미한다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 융합단백질에 포함된 RGD 서열, HBD, 및 OC 도메인의 배열 순서는 상기 융합단백질이 다양한 세포활성을 높은 수준으로 향상시킬 수 있는 효과를 나타내게 하는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 OC 도메인, RGD 서열 및 HBD의 순서로 구성될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

[0026] 또한, 상기 각 도메인은 상호 직접적으로 연결될 수도 있고, 링커를 통해 연결될 수도 있다. 상기 링커는 상기 융합단백질이 다양한 세포활성을 높은 수준으로 향상시킬 수 있는 효과를 나타내게 하는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 아미노산으로 구성된 펩타이드 링커를 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 잘구부러지는(flexible) 펩타이드 링커를 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 당업계에서 통상적으로 사용되는 GGGGGT 아미노산 서열(서열번호 4), GGGGS 아미노산 서열(서열번호 5), GGGSGGGGS 아미노산(서열번호 6) 등의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 링커를 사용할 수 있다. 상기 펩타이드 링커는 상기 링커를 코딩하는 핵산을 각 도메인을 코딩하는 핵산 사이에 인프레임(in frame)으로 연결하여 발현벡터 내에 작동 가능하게 연결하여 발현시킬 수 있다.

[0027] 아울러, 상기 융합단백질은 이에 포함되는 각 도메인의 야생형의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 폴리펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 단백질의 열, pH등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 단백질 활성이 증가한 단백질을 포함할 수 있다.

[0028] 끝으로, 상기 융합단백질 또는 상기 융합단백질을 구성하는 각 도메인의 폴리펩티드는 당해 분야에 공지된 화학적 펩티드 합성방법으로 제조하거나, 상기 도메인을 코딩하는 유전자를 PCR (polymerase chain reaction) 에 의해 증폭하거나 공지된 방법으로 합성한 후 발현벡터에 클로닝하여 발현시켜서 제조할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명의 융합단백질(rhOC-FNIII9-14)이 전조골세포(preosteoblastic cell)의 일종인 MC3T3-E1 세포가 나타내는 다양한 세포활성에 미치는 효과를 종래의 융합단백질(rhOC-FNIII9-10)의 효과와 비교하였다. 먼저, 상기 각 융합단백질이 코팅된 배양용기에 MC3T3-E1 세포를 배양하고, 상기 배양된 세포에 대한 결합활성을 비교한 결과, 1 μ g/ml의 농도로 코팅된 웰에서 rhOCFNIII9-14가 rhOCFNIII9-10 보다 유의하게 증가된 수준의 세포결합 활성을 나타냄을 확인하였다(도 3). 또한, 상기 각 융합단백질이 1 μ g/ml의 농도로 코팅된 배양용기에 MC3T3-E1 세포를 5일 동안 배양하고, 상기 배양된 세포의 증식활성을 비교한 결과, rhOCFNIII9-14가 rhOCFNIII9-10 보다 유의하게 증가된 수준의 세포증식 활성을 나타냄을 확인하였다(도 4). 아울러, 골형성 분화활성에 대한 효과를 비교하고자, 상기 각 융합단백질이 1 μ g/ml의 농도로 코팅된 배양용기에 MC3T3-E1 세포를 7일 동안 배양하고, 상기 배양된 세포의 석회화 활성을 비교한 결과, rhOCFNIII9-14가 rhOCFNIII9-10 보다 유의하게 증가된 수준의 석회화 활성을 나타내었고(도 5), 상기 세포에서 발현되는 골형성 분화 관련 유전자인 제1형 콜라겐(Col I), 오스테오칼신(OC), 오스테오폰틴(osteopontin, OPN) 및 Runx2의 발현수준 측면에서도, rhOCFNIII9-14가 rhOCFNIII9-10 보다 유의하게 상기 유전자의 발현수준을 증가시킴을 확인하였다(도 6a 내지 6d).

- [0030] 따라서, 본 발명에서 제공하는 융합단백질은 세포결합 활성, 세포증식 활성 및 골형성 분화활성의 측면에서 종래의 융합단백질보다도 우수한 활성을 나타내는 신규한 단백질임을 알 수 있었다.
- [0031] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 융합단백질 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 상기 융합단백질을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 본 발명에서 제공하는 융합단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 바람직하게는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열이 될 수 있다.
- [0033] 상기 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에서 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.
- [0034] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 발현벡터는 세포 배양액으로부터 단백질의 분리를 촉진하기 위하여 융합 폴리펩타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시 코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널들 및 개시 코돈들은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.
- [0037] 아울러, 상기 발현벡터는 융합단백질의 검출을 용이하게 하기 위하여, 임의로 엔도펩타이아제를 사용하여 제거할 수 있는 단백질 태그를 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 용어 "태그(tag)"란, 정량가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를 의미하며, 플로오레세인과 같은 화학적 형광물질(fluoracer), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩타이드 형광물질을 포함한 형광 분자일 수도 있고; Myc 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘 태그, 루신 태그, IgG 태그, 스트렙타비딘 태그 등의 에피토프 태그일 수도 있다. 특히, 에피토프 태그를 사용할 경우, 바람직하게는 6개 이상의 아미노산 잔기로 구성되고, 보다 바람직하게는 8개 내지 50개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드 태그를 사용할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 상술한 본 발명에서 제공하는 융합단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있는데, 이때 사용되는 벡터는 본 발명의 융합단백질을 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 플라스미드 DNA, 파자지 DNA 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 상업적으로 개발된 플라

스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물 바이러스 벡터(레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백신시아 바이러스(vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(baculovirus) 등) 이 될 수 있다. 상기 발현벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 실시예에서는 상기 폴리뉴클레오티드를 6개의 히스티딘 태그가 포함된 pBAD 벡터에 도입하여 발현벡터 pBAD-HisB-hOC-FNII19-14를 제작하였다.

[0040]

본 발명에서 제공하는 형질전환체는 상기 본 발명에서 제공하는 발현벡터를 숙주에 도입하여 형질전환시켜서 제작되고, 상기 발현벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서, 본 발명의 융합단백질을 생산하는데 사용될 수 있다. 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 다양한 세포활성을 높은 수준으로 향상시킬 수 있는 효과를 나타내는 본 발명의 융합단백질을 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, CaCl₂ 침전법, CaCl₂ 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다. 또한, 상기 형질전환체의 제작에 사용되는 숙주역시 본 발명의 융합단백질을 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균(E. coli), 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 세레비지에, 스킴조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서는 대장균 TOP10 균주를 숙주로서 사용하였다.

[0041]

상기 형질전환체는 본 발명에서 제공하는 융합단백질을 생산하는 방법에 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 융합단백질을 생산하는 방법은 (a) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및, (b) 상기 배양물로부터 본 발명의 융합단백질을 회수하는 단계를 포함한다.

[0042]

본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다.

[0043]

본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 본 발명의 융합단백질을 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속적으로 배양할 수 있다.

[0044]

배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 옥류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

- [0045] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [0046] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27°C 내지 37°C, 바람직하게는 30°C 내지 35°C이다. 배양은 D형 젖산의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 100 시간에서 달성된다. 대체로 D형 젖산은 배양 배지 중으로 배출되지만, 경우에 따라서는 세포 중에 포함되어 있을 수 있다.
- [0047] 아울러, 배양물로부터 상기 융합단백질을 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 생산된 본 발명의 융합단백질을 회수할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증방, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 실시예에 의하면, PCR을 수행하여 인간의 오스테오칼신을 코딩하는 유전자인 hOC의 뉴클레오티드 서열을 증폭시키고, 상기 증폭된 hOC의 뉴클레오티드 서열에 제한효소 절단부위(KpnI/HindIII)를 삽입시켰으며, FNIII9-14 서열을 증폭시켰다. 상기 제한효소 절단부위가 삽입된 hOC의 뉴클레오티드 서열과 상기 증폭된 FNIII9-14 서열을 결합시켜서, rhOC-FNIII9-14를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제작하였다. 상기 제작된 폴리뉴클레오티드 서열을 6개의 히스티딘 태그를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 포함된 pBAD 벡터에 도입하여 발현벡터 pBAD-HisB-hOC-FNIII9-14를 제작하였다(실시예 1-2). 상기 제작된 발현벡터 pBAD-HisB-hOC-FNIII9-14를 대장균 TOP10에 도입하여 형질전환시킴으로써, HisB-hOC-FNIII9-14를 발현시켜서 생산할 수 있는 형질전환체를 제작하고, 상기 제작된 형질전환체를 배양하였으며, 이로부터 융합단백질인 HisB-hOC-FNIII9-14를 생산하고, 상기 생산된 융합단백질을 Ni-NTA 컬럼 크로마토 그래피에 적용하여 정제함으로써, 목적하는 융합단백질 hOC-FNIII9-14를 수득하였다(실시예 1-3). 상기 수득한 융합단백질을 대상으로, 전기영동 분석 및 웨스턴 블롯 분석을 수행한 결과, 상기 융합단백질은 약 70 kDa의 크기를 갖는 단백질임을 확인하였다(도 2).
- [0049] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 골 또는 치아 재생용 약학 조성물을 제공한다.
- [0050] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 융합단백질은 세포결합 활성, 세포증식 활성 및 골형성 분화활성의 측면에서 종래의 융합단백질보다도 우수한 활성을 나타내는 신규한 단백질임을 확인하였으므로, 상기 융합단백질을 골조직의 퇴화, 손실, 붕괴 등의 증상이 수반되는 다양한 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 손상된 골 또는 치아를 재생시키기 위한 약학 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0051] 본 발명의 용어 "골질환"이란, 조골세포 및 파골세포의 불균형으로 인해 유발되어 골조직의 장애를 초래하거나 또는 골조직을 파괴하는 질환을 의미하는데, 상기 골 관련 질환은 본 발명에서 제공하는 융합단백질에 의하여 증상이 예방, 개선, 경감 또는 치료될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 성장기 발육부진, 골절, 구루병(rickets), 골연화증(osteomalacia), 척추측만증(scoliosis), 골반변형(pelvic deformity), 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 갑상선기능항진증(hyperparathyroidism), 파제트병(Paget disease), 전이성 골암(metastatic bone cancers) 등이 될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 용어 "골질환의 예방 또는 치료"란 상기 골 관련 질환의 발병을 예방하거나 또는 상기 질환의 발병에 의한 증세를 호전하거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미하는데, 골질환 증상의 예방, 감소, 개선, 그 증상의

고통 경감, 골질환 발생을 감소 또는 치료결과를 증가시키는 환자의 어떠한 다른 변화를 모두 포함한다.

[0053]

한편, 본 발명의 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 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, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 융합단백질에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0054]

본 발명의 약학 조성물에 포함된 상기 융합단백질의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 5 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.

[0055]

상기 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[0056]

본 발명의 약학조성물의 투여량은 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 0.01 내지 1 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 0.1 mg/kg으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.

[0057]

상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 약학 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 골질환이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0058]

상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 융합단백질은 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있으므로, 상기 조성물은 골질환을 예방 또는 치료하거나, 또는 손상된 골 또는 치아를 재생하는데 사용될 수 있다.

[0059] 본 발명에서 용어 "개체"란 골질환이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유 동물을 제한 없이 포함한다.

[0060] 본 발명의 골질환을 치료하는 방법에 있어서, 상기 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있다. 다만, 경구 투여시에는 위산에 의하여 상기 융합단백질이 변성될 수 있기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0061] 본 발명의 융합단백질은 RGD 서열 뿐만 아니라 헤파린 결합 도메인을 포함하여, RGD 서열만을 포함하는 종래의 융합단백질에 비하여, 세포결합, 세포증식 및 골형성 분화와 같은 다양한 세포활성을 더욱 활성화시킬 수 있음을 확인하였으므로, 골질환의 예방 또는 치료 뿐만 아니라, 손상된 골 또는 치아를 재생하는데도 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 피브로넥틴을 코딩하는 유전자의 구조를 도식화하여 나타내는 개략도이다.

도 2는 본 발명에서 제공하는 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14를 전기영동 분석 및 웨스턴 블롯분석을 수행한 결과를 나타내는 사진으로서, M은 크기 마커를 나타내고, 1번 레인은 rhOC-FNIII9-10을 나타내며, 2번 레인은 rhOC-FNIII9-14을 나타낸다.

도 3은 본 발명에서 제공하는 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14의 농도에 따른, 세포 결합수준의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명에서 제공하는 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14가 세포증식에 미치는 효과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명에서 제공하는 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14가 골형성 분화에 미치는 효과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

도 6a는 본 발명에서 제공하는 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14가 골형성 분화 관련 유전자인 Col 1의 발현에 미치는 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6b는 본 발명에서 제공하는 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14가 골형성 분화 관련 유전자인 OC의 발현에 미치는 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6c는 본 발명에서 제공하는 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14가 골형성 분화 관련 유전자인 OPN의 발현에 미치는 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6d는 본 발명에서 제공하는 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14가 골형성 분화 관련 유전자인 Runx2의 발현에 미치는 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] **실시예 1: 재조합 융합단백질(rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14)의 제조**

[0065] **실시예 1-1: rhOC-FNIII9-10 생산용 발현벡터의 제작**

[0066] rhOC-FNIII9-10을 제작하기 위하여, 먼저 하기 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여 인간의 오스테오칼신을 코딩하는 유전자인 hOC의 뉴클레오티드 서열을 증폭시켰다. 이때, PCR 조건은 55℃ 1분, 72℃ 1분 및 94℃ 1분의 주기를 30회 반복하도록 설정하였다.

[0067] hOC forward primer, 5'-TAGGAGCCCTCACACTCCTC-3'(서열번호 8)

[0068] hOC reverse primer, 5'-CTGGAGAGGAGCAGAAGTGG-3'(서열번호 9)

[0069] 이어, 상기 증폭된 hOC의 뉴클레오티드 서열을 주형으로 하고, 하기의 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 상기 hOC 뉴클레오티드 서열에 제한효소 절단부위(BglIII/KpnI)를 삽입하여, hOC의 변형된 폴리뉴클레오티드를 수득하였다. 이때, PCR 조건은 상술한 바와 동일하게 설정하였다.

[0070] forward primer(for the BglIII site)

[0071] 5'-AACAGATCTTACCTGTATCAATGGCTGGGA-3'(서열번호 10)

[0072] reverse primer(for the KpnI site)

[0073] 5'-AATGGTACCGACCGGCCGTAGAAGCGCCG-3'(서열번호 11)

[0074] 한편, rhOC-FNIII9-10을 제작하기 위하여, 인간의 피브로넥틴 유전자를 주형으로 하고, 하기의 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 인간의 피브로넥틴의 III 도메인의 9-10(FNIII9-10)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 수득하였다. 이때, PCR 조건은 상술한 바와 동일하게 설정하였다.

[0075] forward primer(for the SacI site)

[0076] 5'-CTCGAGCAACAATCAACAGTTTC-3'(서열번호 12)

[0077] reverse primer(for the SacI site)

[0078] 5'-CTCGAGTGGTTTGTCAATTTC-3'(서열번호 13)

[0079] 상기 수득한 FNIII9-10을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제한효소 SacI으로 절단하고, pBAD/His-OC 벡터의 멀티클로닝 부위에 도입하여 pBAD/His-FNIII9-10/OC를 제작하였다.

[0080] 상기 제작된 pBAD/His-FNRGD/OC에 상기 수득한 hOC의 변형된 폴리뉴클레오티드를 도입하여 rhOC-FNIII9-10를 발현시키는 발현벡터를 수득하고, 이로부터 rhOC-FNIII9-10를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 수득하였다. 상기 수득한 rhOC-FNIII9-10를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 BglIII/KpnI으로 절단하고, 이를 pBAD 벡터에 도입하여, rhOC-FNIII9-10 생산용 발현벡터(pBAD-HisB-hOC-FNIII9-10)를 제작하였다.

[0081] **실시예 1-2: rhOC-FNIII9-14 생산용 발현벡터의 제작**

[0082] 먼저, 상기 실시예 1-1의 방법으로 hOC 서열을 수득하고, 상기 hOC 서열에 제한효소 절단부위(KpnI/HindIII)를 삽입하여, hOC의 변형된 폴리뉴클레오티드를 수득하였다. 이때, PCR 조건은 상기 실시예 1-1과 동일하게 설정하였다.

[0083] 한편, rhOC-FNIII9-14를 제작하기 위하여, 인간의 피브로넥틴 유전자를 주형으로 하고, 하기의 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 인간의 피브로넥틴의 III 도메인의 9-14(FNIII9-14)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 획득하였다. 이때, PCR 조건은 상기 실시예 1-1과 동일하게 설정하였다.

[0084] forward primer, 5'-ATTGATTATTTGCACGGCGT-3'(서열번호 14)

[0085] reverse primer, 5'-ACGGCGTTTCACTTCTGAGT-3'(서열번호 15)

[0086] 상기 획득한 FNIII9-14를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 pBAD/His-OC 벡터의 멀티클로닝 부위에 도입하여 pBAD/His-FNIII9-14/OC를 제작하였다.

[0087] 상기 제작된 pBAD/His-FNIII9-14/OC에 상기 획득한 hOC의 변형된 폴리뉴클레오티드를 도입하여 rhOC-FNIII9-14를 발현시키는 발현벡터를 획득하고, 이로부터 rhOC-FNIII9-14를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 획득하였다. 상기 획득한 rhOC-FNIII9-14를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 KpnI/HindIII으로 절단하고, 이를 pBAD 벡터에 도입하여, rhOC-FNIII9-14 생산용 발현벡터(pBAD-HisB-hOC-FNIII9-14)를 제작하였다.

[0088] **실시예 1-3: 재조합 융합단백질의 제조**

[0089] 상기 실시예 1-1 및 1-2에서 제작한 각각의 발현벡터를 대장균 TOP10에 도입하여 각각의 형질전환체를 제조하였다.

[0090] 상기 제조된 각 형질전환체를 앵피실린을 포함하는 LB 배지에 접종하고, 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양물의 OD600 값이 0.6이 될 때, 0.1% (w/v) L-아라비노스를 가하고 20°C에서 6시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 상기 배양물을 6,000Xg 에서 10분동안 원심분리하여 균체를 획득하고, 상기 획득한 균체를 용해시킨 후, 초음파를 처리하여 각각의 세포파쇄물을 획득하였다. 상기 획득한 각 세포파쇄물을 14,000Xg 에서 30분동안 원심분리하여 액상성분을 획득하고, 이를 Ni-NTA(nickel-nitrilotriacetic acid) 친화성 컬럼 크로마토그래피에 적용하여 재조합 융합단백질인 rhOC-FNIII9-10과 rhOC-FNIII9-14를 각각 정제하였다.

[0091] 상기 정제된 rhOC-FNIII9-10과 rhOC-FNIII9-14를 12%(v/v) SDS-PAGE에 적용하고, 그 결과물을 코마지 브릴리언트 블루 염색제로 염색하여 확인하였다. 아울러, 상기 전기영동된 각 단백질을 대상으로 페록시다제가 결합된 항-폴리히스티딘 단클론 항체(sc-8036 HRP, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용한 웨스턴 블롯분석을 수행하여, 상기 정제된 각 재조합 융합 단백질의 크기를 확인하였다(도 2). 도 2에서 보듯이, rhOC-FNIII9-10의 분자량은 약 45kDa이고, rhOC-FNIII9-14의 분자량은 약 70 kDa임을 확인하였다.

[0092] **실시예 2: 재조합 융합단백질(rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14)을 이용한 세포활성 분석**

[0093] **실시예 2-1: MC3T3-E1 세포 배양**

[0094] MC3T3-E1 세포는 신생 마우스의 골로부터 획득한 전조골세포(preosteoblastic cell)이다. 상기 MC3T3-E1 세포를 10%(v/v) FBS, 100U/ml의 페니실린 G, 100µg/ml의 스트렙토마이신 설페이트 및 0.25µg/ml의 암포테리신 B를 포함하는 최소배지(a-MEM, Invitrogen)에 접종하고, 37°C 및 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 배양용기에 0.25% 트립신/EDTA을 5분간 처리하여 포화배양된 세포를 획득하고, 일부를 계대배양하였다. 3회 계대배양된 MC3T3-E1 세포를 이후의 세포활성 분석에 사용하였다.

[0095] **실시예 2-2: 세포결합활성 분석**

[0096] 상기 실시예 1에서 제조한 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14를 24웰 플레이트의 각 웰에 0, 0.5, 및 1 μ g/ml의 농도로 코팅하고 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 이어, 각 웰을 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 세척하였다. 그런 다음, 각 웰에 1%(w/v) BSA를 30분동안 처리하여 블로킹 시켰다.

[0097] 한편, 상기 각 웰에 상기 실시예 2-1에서 배양한 MC3T3-E1 세포를 웰당 10⁵ 세포수가 되도록 접종하여 30분 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 상기 세포를 DPBS로 2회 세척하고, 3.7%(w/v) 포르말린 용액을 상온에서 15분 동안 처리하여 고정시켰다. 상기 고정된 세포에 0.25%(w/v) Crystal Violet을 포함하는 2%(v/v) 에탄올을 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 염색하였다. 염색이 종료된 후, 상기 세포를 DPBS로 조심스럽게 3회 세척하고, 상기 세척된 세포에 2% SDS 용액을 가하여 세포를 파쇄하였으며, 상기 세포파쇄물을 96웰 플레이트로 옮기고, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(도 3). 도 3에서 보듯이, 각 웰에 코팅된 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14의 처리량이 증가할 수록 세포 결합수준이 증가하였고, 특히 1 μ g/ml의 농도로 코팅된 웰에서는 rhOCFNIII9-14가 rhOCFNIII9-10 보다 유의하게 증가된 수준의 세포결합 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0098] 따라서, 이하의 실시예에서는 상기 각 용합단백질을 1 μ g/ml의 농도로 사용하였다.

[0099] **실시예 2-3: 세포증식활성 분석**

[0100] 상기 실시예 1에서 제조한 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14를 1 μ g/ml의 농도로 코팅하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 2-2의 방법과 동일한 방법을 수행하여 단백질이 코팅된 24웰 플레이트를 준비하였다. 상기 준비된 24웰 플레이트의 각 웰에 상기 실시예 2-1에서 배양한 MC3T3-E1 세포를 웰당 10³ 세포수가 되도록 접종하고, 37 $^{\circ}$ C에서 3일 또는 5일 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 배양된 세포를 DPBS로 3회 세척하고, 각 웰에 500 μ l MTT 용액(5 mg/ml in PBS)을 가하여 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 각 웰로부터 배지를 제거하고, formazan crystal이 용해된 DMSO 200 μ l를 상기 세포에 가한 다음, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(도 4). 도 4에서 보듯이, 3일 동안 배양한 경우에는 코팅된 단백질에 따른 증식수준의 변화가 검출되지 않았으나, 5일 동안 배양한 후에는 rhOC-FNIII9-14 단백질이 코팅된 조건에서 배양된 MC3T3-E1 세포가 rhOC-FNIII9-10 단백질이 코팅된 조건에서 배양된 MC3T3-E1 세포보다도 증식수준이 유의하게 증가함을 확인하였다.

[0101] 따라서, rhOC-FNIII9-14는 세포증식을 촉진하는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0102] **실시예 2-4: 골형성 분화에 미치는 효과분석**

[0103] 생체내에서 골형성 분화가 진행된다면, 골조직이 석회화 되는 과정이 수반되므로, 본 발명에서 제공하는 단백질이 골형성 분화에 미치는 효과를 분석하기 위하여, Alizarin Red S 염색을 수행하여 석회화 활성을 측정하고, 이를 비교하였다.

[0104] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제조한 rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14를 1 μ g/ml의 농도로 코팅하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 2-2의 방법과 동일한 방법을 수행하여 단백질이 코팅된 24웰 플레이트를 준비하였다. 상기 준비된 24웰 플레이트의 각 웰에 상기 실시예 2-1에서 배양한 MC3T3-E1 세포를 웰당 10³ 세포수가 되도록 접종하고, 37 $^{\circ}$ C에서 7일 동안 배양하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척하고, 95%(v/v) 메탄올을 30분 동안 가하여 고정시킨 다음, 알리자린 레드 S(Alizarin Red S) 용액을 가하여 하룻밤 동안 염색하고, 상기 염색약을 제거하였으며, 이를 PBS로 세척한 후, 상기 염색된 세포를 촬영하였다. 다음으로, 상기 염색된 세포에 10%(w/v) CPC(cetylpyridinium chloride)를 포함하는 10 mmol 인산나트륨 완충액(pH 7.0)을 처리하고 상온에서 30분 동안 반응시켜서, 세포를 탈색시켜서, 세포에 흡착되었던 알리자린 레드 S를 완충액으로 방출시켰다. 이어, 상기 시료를 450 nm에서 흡광도를 측정하여, 완충액으로 방출된 알리자린 레드 S의 수준을 측정하여, 이를 이용하여 알리자린 레드 S의 농도를 산출하였다(도 5). 도 5에서 보듯이, rhOC-FNIII9-14 단백질이 코팅된 조건에서 배양된 MC3T3-E1 세포는 rhOC-FNIII9-10 단백질이 코팅된 조건에서 배양된 MC3T3-E1 세포보다도 알리자린 레드 S의

염색수준이 유의하게 증가함을 확인하였다.

[0105] 따라서, rhOC-FNIII9-14는 rhOC-FNIII9-10 보다도 석회화를 촉진시키므로, 골형성 분화를 상대적으로 높은 수준으로 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0106] **실시예 2-5: 골형성 분화 관련 유전자 발현에 미치는 효과분석**

[0107] 상기 실시예 2-4와 동일한 방법으로 각각의 배양된 세포를 수득하였다. 상기 수득한 세포를 대상으로, RNA 추출 키트(Easy-spin RNA extraction kit, iNtRON, Seoul, Korea)를 이용하여 총 RNA를 추출하고, 이로부터 cDNA를 합성하였다. 상기 합성된 cDNA를 주형으로 사용하고, 하기의 프라이머를 사용한 정량적 실시간 PCR 분석(Quantitative real-time PCR analysis)을 수행하여, rhOC-FNIII9-10 또는 rhOC-FNIII9-14이 골형성 분화 관련 유전자인 제1형 콜라겐(Col I), 오스테오칼신(OC), 오스테오폰틴(osteopontin, OPN) 및 Runx2의 발현수준에 미치는 효과를 분석하였다(도 6a 내지 6d). 이때, 상기 PCR 분석반응은 각 프라이머 0.1 μ M, 2 X SYBR Green PCR master mix(Applied Biosystems, AmpliTaq Gold DNA polymerase, a dNTP mix, SYBR Green I dye, Rox dye, 및 10 mM MgCl₂) 10 μ l 및 주형 cDNA 1 μ l를 포함하는 반응액 20 μ l에서 수행하였고, 각 유전자의 CT(cycle threshold) 값은 ABI 장치의 자동화 역치 분석기능을 사용하여 결정하고, CT(GAPDH) 값을 정상화하여, dCT(=CT(GAPDH)-CT(specific gene)) 값을 수득하였다.

[0108] GAPDH F: 5'-TCCACTCACGGCAAATTC AAC-3'(서열번호 16)

[0109] GAPDH R: 5'-AGCCCAAGATGCCCTTCAGT-3'(서열번호 17)

[0110] ColI F: 5'-GCATGGCCAAGAAGACATCC-3'(서열번호 18)

[0111] ColI R: 5'-CCTCGGGTTTCCACGTCTC-3'(서열번호 19)

[0112] OC F: 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'(서열번호 20)

[0113] OC R: 5'-CAGTGGATGCAGGGATGATGT-3'(서열번호 21)

[0114] OPN F: 5'-CCAATGAAAGCCATGACCAC-3'(서열번호 22)

[0115] OPN R: 5'-CGACTGTAGGGACGATTGGA-3'(서열번호 23)

[0116] Runx 2 F: 5'-GGCCGGGAATGATGAGAACTA-3'(서열번호 24)

[0117] Runx 2 R: 5'-GGCCCACAAATCTCAGATCGT-3'(서열번호 25)

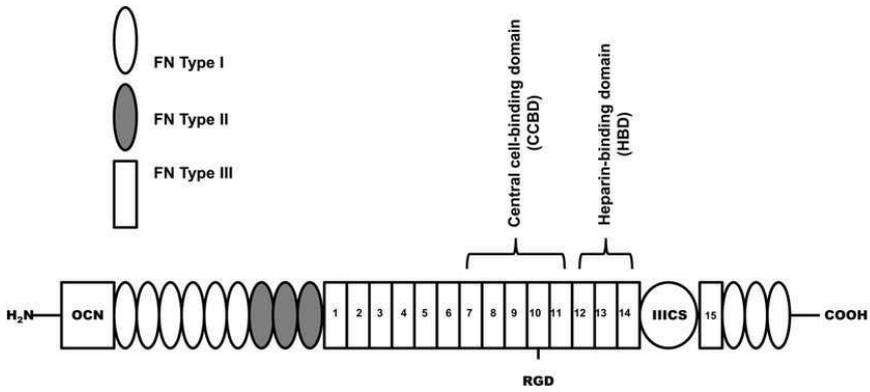
[0118] 도 6a 내지 6d에서 보듯이, rhOC-FNIII9-14 단백질이 코팅된 조건에서 배양된 MC3T3-E1 세포는 rhOC-FNIII9-10 단백질이 코팅된 조건에서 배양된 MC3T3-E1 세포보다도 골형성 분화 관련 유전자인 Col I, OC, OPN 및 Runx2이 모두 상대적으로 유의하게 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다.

[0119] 따라서, rhOC-FNIII9-14 단백질의 골형성 분화를 촉진하는 효과는 골형성 분화 관련 유전자의 발현수준을 증가시켜서 유도하는 것임을 알 수 있었다.

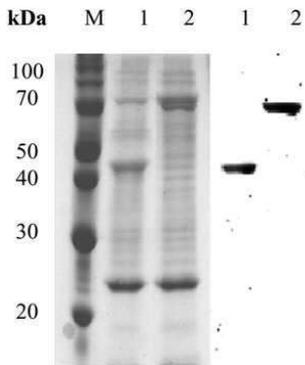
[0120] 상술한 바를 종합하면, 본 발명에서 제공하는 RGD 서열 및 HBD를 포함하는 rhOC-FNIII9-14 단백질은 이에 포함된 HBD로 인하여, RGD 서열만을 포함하는 rhOC-FNIII9-10 단백질에 비하여 세포 결합수준, 세포증식 및 골형성 분화를 상대적으로 높은 수준으로 촉진하는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

도면

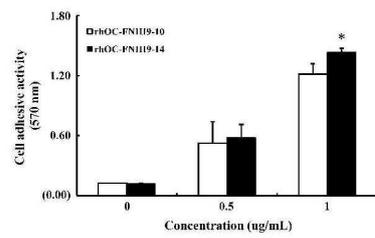
도면1



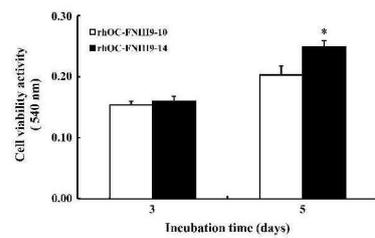
도면2



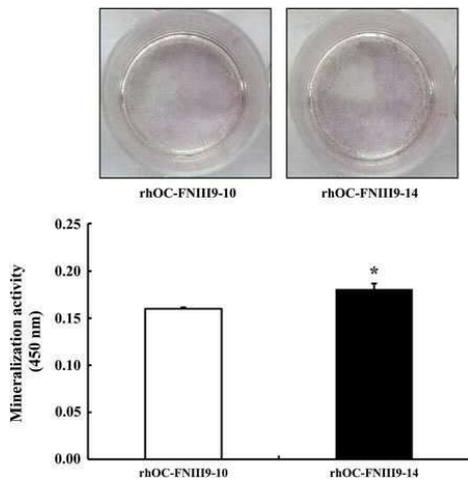
도면3



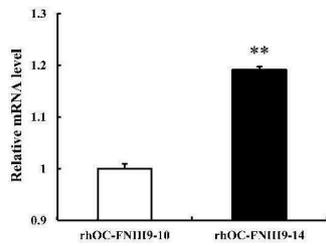
도면4



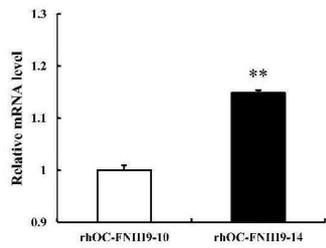
도면5



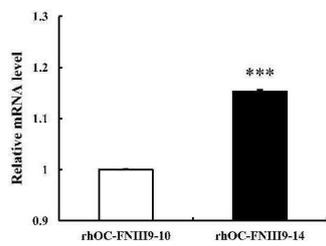
도면6a



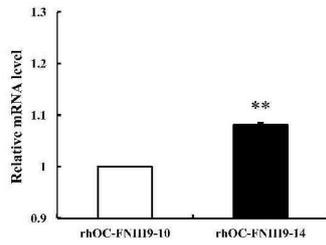
도면6b



도면6c



도면6d



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Dankook University
INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Fusion protein comprising cell-binding sequence, heparin-binding domain and osteocalcin domain, and pharmaceutical composition comprising the same
- <130> PA131391/KR
- <160> 25
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 2328
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Lys Ser Lys Arg Gln Ala Gln Gln Met Val Gln Pro Gln Ser Pro Val
 1 5 10 15

Ala Val Ser Gln Ser Lys Pro Gly Cys Tyr Asp Asn Gly Lys His Tyr
 20 25 30

Gln Ile Asn Gln Gln Trp Glu Arg Thr Tyr Leu Gly Asn Val Leu Val
 35 40 45

Cys Thr Cys Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro
 50 55 60

Glu Ala Glu Glu Thr Cys Phe Asp Lys Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Arg
 65 70 75 80

Val Gly Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys
 85 90 95

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

 Asp His Ala Ala Gly Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys
 165 170 175
 Pro Tyr Gln Gly Trp Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly
 180 185 190
 Ser Gly Arg Ile Thr Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp
 195 200 205
 Thr Arg Thr Ser Tyr Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn
 210 215 220
 Arg Gly Asn Leu Leu Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu

 225 230 235 240
 Trp Lys Cys Glu Arg His Thr Ser Val Gln Thr Thr Ser Ser Gly Ser
 245 250 255
 Gly Pro Phe Thr Asp Val Arg Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His
 260 265 270
 Pro Gln Pro Pro Pro Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val
 275 280 285
 Tyr Ser Val Gly Met Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met
 290 295 300

 Leu Cys Thr Cys Leu Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val
 305 310 315 320
 Thr Gln Thr Tyr Gly Gly Asn Leu Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro
 325 330 335
 Phe Thr Tyr Asn Gly Arg Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg
 340 345 350

Gln Asp Gly His Leu Trp Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp
 355 360 365

Gln Lys Tyr Ser Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Gln
 370 375 380

Gly Gly Asn Ser Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn
 385 390 395 400

Asn His Asn Tyr Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met
 405 410 415

Lys Trp Cys Gly Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly
 420 425 430

Phe Cys Pro Met Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly
 435 440 445

Val Met Tyr Arg Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly
 450 455 460

His Met Met Arg Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr
 465 470 475 480

Cys Ile Ala Tyr Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile
 485 490 495

Thr Tyr Asn Val Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His
 500 505 510

Met Leu Asn Cys Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys
 515 520 525

Asp Pro Val Asp Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln
 530 535 540

Ile Gly Asp Ser Trp Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys
 545 550 555 560

Tyr Cys Tyr Gly Arg Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln
 565 570 575

Thr Tyr Pro Ser Ser Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr
 580 585 590

Pro Ser Gln Pro Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro

850 855 860
 Val Val Ile Gln Gln Glu Thr Thr Gly Thr Pro Arg Ser Asp Thr Val
 865 870 875 880

 Pro Ser Pro Arg Asp Leu Gln Phe Val Glu Val Thr Asp Val Lys Val
 885 890 895
 Thr Ile Met Trp Thr Pro Pro Glu Ser Ala Val Thr Gly Tyr Arg Val
 900 905 910
 Asp Val Ile Pro Val Asn Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg Leu Pro
 915 920 925
 Ile Ser Arg Asn Thr Phe Ala Glu Val Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val
 930 935 940
 Thr Tyr Tyr Phe Lys Val Phe Ala Val Ser His Gly Arg Glu Ser Lys

 945 950 955 960
 Pro Leu Thr Ala Gln Gln Thr Thr Lys Leu Asp Ala Pro Thr Asn Leu
 965 970 975
 Gln Phe Val Asn Glu Thr Asp Ser Thr Val Leu Val Arg Trp Thr Pro
 980 985 990
 Pro Arg Ala Gln Ile Thr Gly Tyr Arg Leu Thr Val Gly Leu Thr Arg
 995 1000 1005
 Arg Gly Gln Pro Arg Gln Tyr Asn Val Gly Pro Ser Val Ser Lys Tyr
 1010 1015 1020

 Pro Leu Arg Asn Leu Gln Pro Ala Ser Glu Tyr Thr Val Ser Leu Val
 1025 1030 1035 1040
 Ala Ile Lys Gly Asn Gln Glu Ser Pro Lys Ala Thr Gly Val Phe Thr
 1045 1050 1055
 Thr Leu Gln Pro Gly Ser Ser Ile Pro Pro Tyr Asn Thr Glu Val Thr
 1060 1065 1070
 Glu Thr Thr Ile Val Ile Thr Trp Thr Pro Ala Pro Arg Ile Gly Phe
 1075 1080 1085
 Lys Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro Arg Glu Val

 1090 1095 1100

Thr Ser Asp Ser Gly Ser Ile Val Val Ser Gly Leu Thr Pro Gly Val
 1105 1110 1115 1120
 Glu Tyr Val Tyr Thr Ile Gln Val Leu Arg Asp Gly Gln Glu Arg Asp
 1125 1130 1135
 Ala Pro Ile Val Asn Lys Val Val Thr Pro Leu Ser Pro Pro Thr Asn
 1140 1145 1150
 Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr Gly Val Leu Thr Val Ser Trp
 1155 1160 1165

 Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Thr Thr Thr
 1170 1175 1180
 Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly Asn Ser Leu Glu Glu Val Val His Ala
 1185 1190 1195 1200
 Asp Gln Ser Ser Cys Thr Phe Asp Asn Leu Ser Pro Gly Leu Glu Tyr
 1205 1210 1215
 Asn Val Ser Val Tyr Thr Val Lys Asp Asp Lys Glu Ser Val Pro Ile
 1220 1225 1230
 Ser Asp Thr Ile Ile Pro Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe

 1235 1240 1245
 Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro
 1250 1255 1260
 Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn
 1265 1270 1275 1280
 Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val
 1285 1290 1295
 Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser
 1300 1305 1310

 Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys
 1315 1320 1325
 Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala
 1330 1335 1340
 Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly
 1345 1350 1355 1360

Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu
 1365 1370 1375

Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 1380 1385 1390

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu
 1395 1400 1405

Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp Val Pro
 1410 1415 1420

Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser
 1425 1430 1435 1440

Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly
 1445 1450 1455

Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser
 1460 1465 1470

Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr
 1475 1480 1485

Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser
 1490 1495 1500

Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln
 1505 1510 1515 1520

Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys Trp Leu
 1525 1530 1535

Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Thr Pro Lys
 1540 1545 1550

Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly Pro Asp Gln Thr
 1555 1560 1565

Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val Val Ser
 1570 1575 1580

Val Tyr Ala Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr
 1585 1590 1595 1600

Ala Val Thr Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val

1605 1610 1615
 Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val
 1620 1625 1630
 Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu
 1635 1640 1645
 Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly
 1650 1655 1660
 Leu Arg Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp

 1665 1670 1675 1680
 Asp Met Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr Ala Ile Pro
 1685 1690 1695
 Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser
 1700 1705 1710
 Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg
 1715 1720 1725
 Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala
 1730 1735 1740

 Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys
 1745 1750 1755 1760
 Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro
 1765 1770 1775
 Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg
 1780 1785 1790
 Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg
 1795 1800 1805
 Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala

 1810 1815 1820
 Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser
 1825 1830 1835 1840
 Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu
 1845 1850 1855
 Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala

1860 1865 1870
 Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr
 1875 1880 1885

 Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr
 1890 1895 1900
 Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val
 1905 1910 1915 1920
 Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu
 1925 1930 1935
 Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn
 1940 1945 1950
 Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro

 1955 1960 1965
 Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu
 1970 1975 1980
 Asp Val Pro Ser Thr Val Gln Lys Thr Pro Phe Val Thr His Pro Gly
 1985 1990 1995 2000
 Tyr Asp Thr Gly Asn Gly Ile Gln Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln
 2005 2010 2015
 Pro Ser Val Gly Gln Gln Met Ile Phe Glu Glu His Gly Phe Arg Arg
 2020 2025 2030

 Thr Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Pro Ile Arg His Arg Pro Arg Pro
 2035 2040 2045
 Tyr Pro Pro Asn Val Gly Gln Glu Ala Leu Ser Gln Thr Thr Ile Ser
 2050 2055 2060
 Trp Ala Pro Phe Gln Asp Thr Ser Glu Tyr Ile Ile Ser Cys His Pro
 2065 2070 2075 2080
 Val Gly Thr Asp Glu Glu Pro Leu Gln Phe Arg Val Pro Gly Thr Ser
 2085 2090 2095
 Thr Ser Ala Thr Leu Thr Gly Leu Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Asn Ile

 2100 2105 2110

<400> 2

Met Arg Thr Leu Ser Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys

1 5 10 15

Leu Ser Asp Leu Thr Asp Ala Lys Pro Ser Gly Pro Glu Ser Asp Lys

20 25 30

Ala Phe Met Ser Lys Gln Glu Gly Asn Lys Val Val Asn Arg Leu Arg

35 40 45

Arg Tyr Leu Gly Ala Ser Val Pro Ser Pro Asp Pro Leu Glu Pro Thr

50 55 60

Arg Glu Gln Cys Glu Leu Asn Pro Ala Cys Asp Glu Leu Ser Asp Gln

65 70 75 80

Tyr Gly Leu Lys Thr Ala Tyr Lys Arg Ile Tyr Gly Ile Thr Ile

85 90 95

<210> 3

<211> 685

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhOC-FNIII9-14

<400> 3

Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu

1 5 10 15

Glu Pro Arg Arg Glu Val Cys Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu

20 25 30

Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro

35 40 45

Val Gly Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile

50 55 60

Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile

65 70 75 80

Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro

85 90 95

Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn

100 105 110
 Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly
 115 120 125
 Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 130 135 140
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu

 145 150 155 160
 Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr
 165 170 175
 Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro
 180 185 190
 Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp
 195 200 205
 Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala
 210 215 220

 Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro
 225 230 235 240
 Ser Gln Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys
 245 250 255
 Trp Leu Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Thr
 260 265 270
 Pro Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly Pro Asp
 275 280 285
 Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val

 290 295 300
 Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val
 305 310 315 320
 Gln Thr Ala Val Thr Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr
 325 330 335
 Asp Val Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly
 340 345 350
 Gln Val Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile

355	360	365
His Glu Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu		
370	375	380
Gln Gly Leu Arg Pro Gly Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His		
385	390	395
Asp Asp Met Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr Ala Ile		
405	410	415
Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu		
420	425	430
Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val		
435	440	445
Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu		
450	455	460
Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr		
465	470	475
Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
485	490	495
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg		
500	505	510
Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
515	520	525
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro		
530	535	540
Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg		
545	550	555
Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr		
565	570	575
Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp		
580	585	590
Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr		
595	600	605

Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
 610 615 620

Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu
 625 630 635 640

Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly
 645 650 655

Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn
 660 665 670

Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 675 680 685

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker

<400> 4

Gly Gly Ser Gly Gly Thr

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 7

<211> 2058

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhOC-FNIII9-14

<400> 7

tacctgtatc aatggctggg agccccagtc ccctaccegg atcccctgga gcccaggagg 60

gaggtgtgtg agctcaatcc ggactgtgac gaggttggctg accacatcgg ctttcaggag 120

gcctatcggc gcttctacgg cccggtcgga tccggtcttg attcccacac tggcattgac 180

ttttctgata ttactgcaa ctcttttact gtgcactgga ttgctcctcg agccaccatc 240

actggctaca ggatccgcca tcatcccag cacttcagtg ggagacctcg agaagatcgg 300

gtgccccact ctcggaatc catcacctc accaacctca ctccaggcac agagtatgtg 360

gtcagcatcg ttgctcttaa tggcagagag gaaagtcct tattgattgg ccaacaatca 420

acagtttctg atgttccgag ggacctggaa gttgttctg cgacccccac cagcctactg 480

atcagctggg atgctcctgc tgtcacagtg agatattaca ggatcactta cggagaaaca 540

ggaggaaata gccctgtcca ggagttcact gtgcctggga gcaagtctac agctaccatc 600

agcggcctta aacctggagt tgattatacc atcactgtgt atgctgtcac tggccgtgga 660

gacagccccg caagcagcaa gccaatttcc attaattacc gaacagaaat tgacaaacca 720

tcccagatgc aagtgaccga tgttcaggac aacagcatta gtgtcaagtg gctgccttca 780

agttccccctg ttactggtta cagagtaacc accactcca aaaatggacc aggaccaaca 840

aaaactaaaa ctgcaggctc agatcaaaca gaaatgacta ttgaaggctt gcagcccaca 900

gtggagtatg tggttagtgt ctatgctcag aatccaagcg gagagagtca gcctctggtt 960

cagactgcag taaccaacat tgatcgccct aaaggactgg cattcactga tgtggatgtc 1020

gattccatca aaattgcttg ggaaagccca caggggcaag tttccaggta cagggtgacc 1080

tactcgagcc ctgaggatgg aatccatgag ctattccctg cacctgatgg tgaagaagac 1140

actgcagagc tgcaaggcct cagaccgggt tctgagtaca cagtcagtgt ggttgccttg 1200

cacgatgata tggagagcca gccctgatt ggaaccctg ccacagctat tcctgcacca 1260

actgacctga agttcactca ggtcacacc acaagcctga gcgccagtg gacaccacc 1320

aatgttcagc tactggata tcgagtgcgg gtgacccca aggagaagac cggaccaatg 1380

aaagaaatca accttctcc tgacagctca tccgtggttg tatcaggact tatggtggcc 1440

accaatatg aagtgagtgt ctatgctctt aaggacactt tgacaagcag accagctcag 1500
 ggtgtttgca ccaactctgga gaatgtcagc ccaccaagaa gggtctcgtgt gacagatgct 1560
 actgagacca ccatcacat tagctggaga accaagactg agacgatcac tggtttccaa 1620
 gttgatgceg ttccagccaa tggccagact ccaatccaga gaaccatcaa gccagatgct 1680
 agaagctaca ccatcacagg tttaacca ggcaactgact acaagatcta cctgtacacc 1740
 ttgaatgaca atgctcggag ctcccctgtg gtcacgacg cctccactgc cattgatgca 1800

 ccatccaacc tgcgtttcct ggccaccaca cccaattcct tgctggtatc atggcagccg 1860
 ccacgtgcca ggattaccgg ctacatcadc aagtatgaga agcctgggtc tcctccaga 1920
 gaagtggicc ctccgccccg ccctgggtgc acagaggcta ctattactgg cctggaaccg 1980
 ggaaccgaat atacaattta tgtcattgcc ctgaagaata atcagaagag cgagcccctg 2040
 attggaagga aaaagaca 2058

 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hOC forward primer
 <400> 8

 taggagccct cacactcctc 20

 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hOC reverse primer
 <400> 9

 ctggagagga gcagaactgg 20

 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for the BglII site
 <400> 10

 aacagatett acctgtatca atggctggga 30

 <210> 11

<211
 > 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for the KpnI site
 <400> 11
 aatggtaccg accgggccgt agaagcgccg 30
 <210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for the SacI site
 <400> 12
 ctcgagcaac aatcaacagt ttc 23
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for the SacI site
 <400> 13
 ctcgagtggg ttgtcaattt c 21
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 14
 attgattatt tgcacggcgt 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 15

acggcgtttc acttctgagt	20
<210> 16	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH F primer	
<400> 16	
tccactcacg gcaaattcaa c	21
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH R primer	
<400> 17	
agcccaagat gcccttcagt	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ColI F primer	
<400> 18	
gcatggccaa gaagacatcc	20
<210> 19	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ColI R primer	
<400> 19	
cctcgggttt ccacgtctc	19
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> OC F primer
 <400> 20
 catcactgcc acccagaaga c 21
 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OC R primer
 <400> 21
 cagtggatgc agggatgatg t 21

 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OPN F primer
 <400> 22
 ccaatgaaag ccatgaccac 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OPN R primer
 <400> 23
 cgactgtagg gacgattgga 20
 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Runx 2 F primer
 <400> 24
 ggccgggaat gatgagaact a 21

 <210> 25
 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Runx 2 R primer

<400> 25

ggcccacaaa tctcagatcg t

21