



2018년 7월 5일 (05.07.2018)

WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

C07K 7/06 (2006.01)

A61L 27/14 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/015588

(22) 국제출원일:

2017년 12월 27일 (27.12.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0180121 2016년 12월 27일 (27.12.2016) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 주식회사 나이백 (NANO INTELLIGENT BIOMEDICAL ENGINEERING CORPORATION. CO. LTD) [KR/KR]; 27816 충청북도 진천군 이월면 밤디길 116, Chungcheongbuk-do (KR).

(72) 발명자: 박윤정 (PARK, Yoon Jeong); 08291 서울시 구로구 새말로 31 110-402, Seoul (KR). 정종평 (CHUNG, Chong-Pyoung); 05618 서울시 송파구 석촌호수로 298 2701호, Seoul (KR). 이주연 (LEE, Jue-Yeon); 13831 경

기도 과천시 부림로 2 812-1201, Gyeonggi-do (KR). 박주철 (PARK, Joocheol); 06083 서울시 강남구 봉은사로 109길 14-8 103-1302, Seoul (KR).

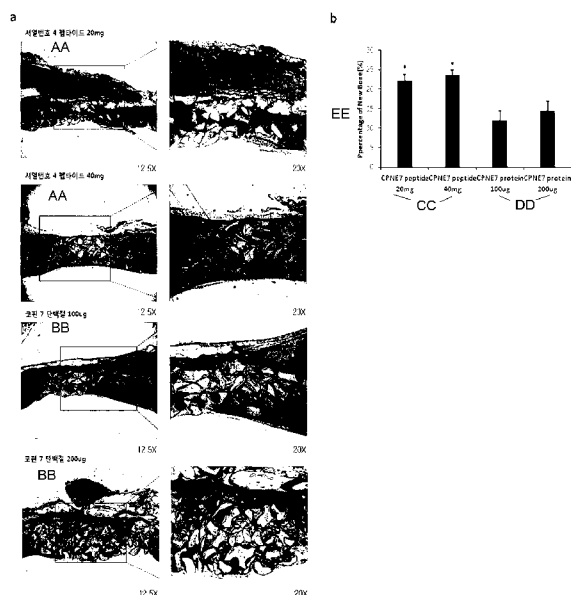
(74) 대리인: 이치영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: DUAL FUNCTIONAL NOVEL PEPTIDE HAVING CELL PERMEABILITY AND BONE TISSUE REGENERATION ABILITY, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 세포 투과능 및 골조직 재생능을 가지고 있는 이중 기능성 신규 펩타이드 및 이의 용도



AA ... Peptide having SEQ ID NO: 4
BB ... Copine 7 protein
CC ... CPNE7 peptide
DD ... CPNE7 protein
EE ... Percentage of New Bone (%)

(57) Abstract: The present invention relates to a novel peptide derived from the copine 7 protein and having both cell permeability and bone tissue regeneration ability, and to a use of the peptide. The peptide according to the present invention has excellent bone tissue regeneration ability and is therefore useful for treating a disease, such as osteoporosis, requiring bone regeneration. Particularly, by also having cell permeability, the peptide does not require the attachment of a separate peptide or addition of another preparation for the cell permeation thereof and thus can be conveniently applied in orthopedics and the like requiring various surgical regeneration treatments.

(57) 요약서: 본 발명은 세포 투과능을 가지는 동시에 골조직의 재생능을 가지고 있는 코핀 7 단백질에서 유래한 신규한 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 펩타이드는 골조직 재생능이 뛰어나 골다공증과 같은 골재생이 필요한 질환의 치료에 유용하고, 특히 세포 투과능도 함께 가지고 있으므로 펩타이드의 세포 투과를 위해 별도의 펩타이드를 부착하거나 기타 제제를 첨가할 필요가 없어 다양한 외과적 재생치료를 요하는 정형외과 등에서 간편하게 적용이 가능한 장점이 있다.

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 세포 투과능 및 골조직 재생능을 가지고 있는 이중 기능성 신규 펩타이드 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 세포 투과능 및 골조직 재생능을 가지고 있는 이중 기능성 신규 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 세포 투과능을 가지는 동시에 골조직의 재생능을 가지고 있는 코핀 7 단백질에서 유래한 신규한 펩타이드 및 이를 이용한 골이식제 등의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 인체조직은 크게 뼈와 같이 단단한 조직인 경조직(hard tissue)과 피부, 점막, 치수와 같이 부드러운 조직인 연조직으로 분류된다. 교원질 섬유(type I collagen fibril)는 이 중 경조직의 구조를 결정하는데 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 뼈가 소실되는 대표적인 질환으로는 골다공증(osteoporosis)이 있으며, 종양 등에 의해서도 경조직의 손상을 가져올 수 있다.
- [4] 정형외과 및 성형외과 영역에서는 상실된 골조직 및 종양 치료 후 골결손 회복을 위하여 다양한 형태의 골이식제 및 차폐막 등을 이용한 골조직 재생 유도술, 자가골 및 타가골 이식술 등을 실시하고 있으나, 이들 시술이 아직 충분한 재생효과를 유도하지는 못하고 있는 실정이다. 이에 최근에는 다양한 종류의 성장인자 및 단백질을 활용한 골재생 방법들이 연구되고 있다. 그러나 정형외과에서 골재생을 위하여 대표적으로 사용하고 있는 단백질인 골형성 단백질(bone morphogenetic protein-2)의 경우 골재생 효과는 뛰어나나, 골 이외의 조직에서도 뼈가 생성되는 부작용으로 환자가 사망한 사례가 있으며, 암을 발생시키는 부작용도 보고된 바 있다. 그 밖에 골재생을 위해 사용되는 약물은 주로 골흡수 억제 기전에 기초하여 작용하는 약물이 대부분이며, 골재생 기전에 기초한 약물로 유일하게 사용되는 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone, PTH)의 경우 생체 내 반감기가 수 분 이내로 매우 짧은 단백질에 해당하기 때문에 이를 약물로 사용하는 경우 매일 주사해야 하는 번거로움이 있다.
- [5] 한편, 최근 코핀 7 단백질이 치수줄기세포(dental pulp stem cell, DPSC)를 상아모세포로 분화시키는 역할을 담당하고 있음이 증명되었다(Oh, Hyun-jung, et al. Biomaterials 37 (2015):208-217, Lee, Ji-Hyun, et al. Biomaterials 32.36(2011): 9696-9706). 그러나, 상기 단백질도 다른 단백질과 마찬가지로 생체 내 반감기가 매우 짧고, 상기 단백질은 총 633개의 아미노산으로 구성되어 있어 상기 단백질을 생산하기 위해서는 유전자 재조합의 번거로운 과정이 요구되며, 따라서 상기 단백질을 치료제로 사용하기 위한 대량 합성에 한계점이 있다.
- [6] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자 예의

노력한 결과, 코핀 7 단백질 중 특정 펩타이드 서열이 세포 투과능을 가지는 동시에 골재생을 증가시키는 기능을 가지는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[7]

[8] **발명의 요약**

[9] 본 발명의 목적은 세포 투과능과 골조직 재생능의 이중 기능성을 가지는 신규한 펩타이드를 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 신규한 골조직 재생 치료용 의약 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 바이오소재를 제공하는 것이다.

[12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 제공한다.

[13] 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골조직 재생 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[14] 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 함유하는 바이오소재를 제공한다.

[15] 본 발명은 또한 상기 펩타이드, 상기 의약 조성물 또는 상기 바이오소재의 골조직 재생 치료 용도를 제공한다.

[16] 본 발명은 또한 상기 펩타이드, 상기 의약 조성물 또는 상기 바이오소재를 골조직 재생 치료가 필요한 환자에게 투여 또는 이식하는 단계를 포함하는 골조직 재생 치료방법을 제공한다.

[17]

도면의 간단한 설명

[18] 도 1은 서열번호 1 내지 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드의 코핀 7 단백질 상의 위치를 표시한 것이다.

[19] 도 2는 서열번호 1 내지 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 각각 고체상 화학합성 후 합성 결과를 HPLC와 mass로 분석한 것이다.

[20] 도 3은 서열번호 1 내지 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드의 세포독성을 평가하기 위한 MTT assay 결과이다.

[21] 도 4은 서열번호 1 내지 서열번호 6의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드의 세포투과능을 평가하기 위한 공초점 현미경 관찰 결과이다.

[22] 도 5은 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드와 코핀 7 단백질의 세포투과능을 평가하기 위한 공초점 현미경 관찰 결과(a) 및 이를 정량화한 결과(b)이다.

[23] 도 6는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드와 코핀 7 단백질의 골분화능을 비교하기 위하여 오스테오칼신(osteocalcin)의 발현량을 공초점 현미경으로 관찰한 결과(a) 및 이를 정량화한 결과(b)이다.

[24] 도 7(a)는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드 또는 코핀 7

단백질이 함유된 골이식재를 토끼의 두개골에 이식하여 골조직 재생 효과를 확인한 결과이고, 도 7(b)는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드 또는 코핀 7 단백질이 함유된 골이식재를 토끼의 두개골에 이식하고 골조직의 재생 면적을 측정한 조직계측 결과이다.

[25]

[26] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[27] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[28] 코핀 7 단백질은 두 개의 C2 도메인과 한 개의 vWMA 도메인으로 구성되어 있는데, 그 중 C2 domain은 세포외 기질막을 이용한 엔도사이토시스에 의한 세포내 유입에 관여하고, 단백질의 인산화에 기여하며, 2~3개의 Ca^{2+} 와 결합하여 단백질의 구조적 안정성에도 기여하는 것으로 알려져 있다(Nalefski, Eric A., and Joseph J. Falke. *Protein Science* 5.12 (1996): 2375-239; Perestenko, Pavel, et al. *FEBS journal* 282.19 (2015): 3722-3736). 한편, vWMA 도메인은 세포외 기질 단백질과 인테그린 수용체에서의 세포 부착에 관여한다고 알려져 있으며, 세포내 단백질간의 신호전달 및 상호작용을 조절하는 것으로 알려져 있다(Springer, Timothy A. *Structure* 14.11 (2006): 1611-1616). 또한, 최근에는 코핀 7 단백질이 세포내 마커인 Dentin sialophosphoprotein(DSP)의 발현을 촉진시킨다는 보고가 있고(Oh, Hyun-Jung, et al. *Biomaterials* 37 (2015): 208-217; Lee, Ji-Hyun, et al. *Biomaterials* 32.36 (2011): 9696-9706)), 이와 더불어 본 발명자들은 사전연구를 통해 코핀 7 단백질에 의해 세포내 골분화 마커인 TAZ와 Smad의 발현이 증가된다는 것도 확인하였다.

[29] 본 발명자들은 상기와 같은 연구 결과를 종합하여, 코핀 7 단백질이 세포내 단백질간의 상호작용을 통해 골분화를 유도할 수 있을 것이라는 가설을 세우고, 코핀 7 단백질에서 세포내 투과능이 있는 도메인을 찾아, 그 도메인을 기준으로 서열번호 1 내지 6의 아미노산 서열로 표시되는 6개의 펩타이드를 설계하였으며, 상기 펩타이드들의 독성, 세포 투과능 및 골조직 재생능을 비교하여 최상의 효과를 갖는 펩타이드를 도출하게 되었다.

[30] 따라서, 본 발명은 일관점에서 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드에 관한 것이다.

[31] 본 발명에서 상기 펩타이드는 세포 투과능과 골조직 재생능의 이중 기능성을 가질 수 있다.

[32] 본 발명에서 상기 펩타이드는 유전자 재조합 기법에 의해 생산되는 코핀 7 단백질에 비해 대량으로 제조할 수 있다는 점에서 펩타이드 합성장치를 이용하여 화학적 합성 방법으로 제조되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다. 한편, 상기 펩타이드는 체내 안정성을 증가시키거나 활성구조를

유지시키기 위하여 D-형 아미노산 및 다른 화학적 수식이 가능하다.

[33]

[34] 한편, 본 발명자들은 상기 펩타이드가 세포 독성없이 골결손부에 존재하는 줄기세포로부터 골조직으로의 분화를 촉진시키고 조직재생력을 극대화시킬 있음을 *in vitro* 실험을 통하여 확인할 수 있었다.

[35] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골조직 재생 치료용 의약적 조성물에 관한 것이다.

[36] 본 발명에서 사용된 용어인 "치료"란 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 의약적 조성물을 골재생이 필요한 개체(예컨대, 골다공증 환자 등)에 투여하여 골재생을 촉진시킴으로써, 골지환의 치료가 수행되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[37] 본 발명에서 상기 조성물은 경구투여용 제제, 주사용 제제 및 국소이식용 겔제로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 공지 기술을 이용하여 적합한 제형으로 제제화할 수 있다 (Joseph Price Remington, Remington's Pharmaceutical Science; 17th edition, Mack Publishing Company, EastonPA).

[38] 본 발명에서 상기 국소이식용 겔제는 i) 폴리락틱글리콜산, 폴록사머 및 프로필렌 글리콜로 이루어진 군에서 선택되는 합성고분자; 또는 ii) 콜라겐, 알긴산, 프로필렌글리콜 알긴산, 황산 콘드로이틴 및 키토산으로 이루어진 군에서 선택되는 천연고분자를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 이 중 알긴산은 생체적합성이 높고, 독성이 없는 천연 폴리사카라이드로서 약물전달시스템, 세포이식담체, 창상 치료제 등 다양한 용도의 생체재료로서 이미 안전성이 검증된 소재로 알려져 있다.

[39] 본 발명에서 펩타이드를 겔 기체에 함유시키는 일 양태로 펩타이드와 알긴산 용액을 혼합하여 제조할 수 있는데, 가교제(cross linker)를 사용하여 펩타이드와 알긴산 간의 에스터 결합을 형성시켜 생성된 펩타이드-알긴산 결합체 용액에 펩타이드를 추가로 첨가하여 제조할 수 있다.

[40] 본 발명의 일 양태에서 상기 국소이식용 겔제를 제조하기 위한 알긴산의 농도는 5-10% (w/v)가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 6-8%의 농도를 사용할 수 있다. 골재생에 필요한 무기이온인 칼슘과 포스페이트를 제공하기 위해 알긴산은 트리폴리포스페이트(tripolyphosphate) 용액에 용해시키고, 후에 황산칼슘(calcium sulfate)를 첨가할 수 있다. 트리폴리포스페이트의 농도는 1-10%(w/v)이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 4-6%의 농도를 사용할 수 있다. 황산 칼슘은 1~20mg/mL 농도로 첨가하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 2~10mg/mL 농도로 첨가하는 것이 바람직하다.

[41] 본 발명에서 상기 조성물은 치료 대상의 체중 1kg 당 1~60mg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않으며, 이는 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라

그 범위가 다양하고, 상기 사항을 고려하여 본 기술분야의 통상의 전문가가 결정할 수 있다.

- [42] 본 발명에서 상기 조성물은 펩타이드로 mg 단위를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 펩타이드의 유래 단백질인 코핀 7 단백질의 경우 그 크기가 수십 kDa인 관계로 세포 내 효소에 의해 분해될 가능성이 높아 체내 안정성이 적고, 재조합 단백질로 합성되는 것이 일반적이므로 합성으로 대량 생산이 불가능하며, 체내에서 면역반응을 유발하는 부작용이 있어 주로 ug 단위로 사용한다. 그러나, 본 발명에서 상기 펩타이드는 mg 단위를 사용하여도 세포 독성이 없는 것으로 나타났고, 화학적 합성 방법 등 세포 외 합성이 가능하므로 대량 생산이 가능하여 펩타이드 수급에 어려움이 없다는 장점이 있다. 특히 상기 펩타이드의 경우, 20mg과 40mg을 비교하였을 때, 20mg의 용량에서 골재생능이 최대로 도달하는 것을 알 수 있었다.
- [43] 또한, 본 발명에서 상기 조성물에는 부형제, 완충제, 항균성 보존제, 계면활성제, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도개질제로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 보조제를 추가로 함유할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 각각의 성분은 업계에서 통상적으로 사용되는 원료를 당업계에서 통용되는 범위 내에서 적절히 변형하여 사용할 수 있다.
- [44] 본 발명에서 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나, 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 그 자체만을 사용할 수도 있으나, 기타 골이식제와 병용하여 사용할 수도 있으며, 상기 골이식제는 생물 유래 골미네랄 분말 및 그 다공성 블록, 합성 수산화아파타이트 분말 및 그 다공성 블록, 트리칼슘인산의 분말 및 그 다공성 블록, 모노칼슘인산의 분말 및 그 다공성 블록 등을 포함할 수 있다.
- [45] 마지막으로, 본 발명자들은 상기 펩타이드가 함유된 골이식제를 토끼의 두개골 결손부에 이식한 결과 토끼의 두개골 결손부를 중심으로 신생골이 재생되는데 매우 뛰어난 효과를 발휘됨을 확인하였다.
- [46] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 펩타이드가 함유된 바이오소제에 관한 것이다.
- [47] 본 발명에서 상기 바이오소제는 당업계에서 사용되는 모든 종류 및 형태의 골이식제 및 고분자 지지체로 사용될 수 있다. 이때, 바람직하게는 자가골, 소뼈 및 돼지뼈에서 기인한 생물유래 골미네랄 분말 및 그 다공성 블록, 합성 수산화아파타이트 분말 및 그 다공성 블록, 트리칼슘인산 분말 및 그 다공성 블록, 모노칼슘인산 분말 및 그 다공성 블록, 이산화 규소(실리카)를 주성분으로 하는 골이식용 바이오소제, 실리카와 고분자의 혼합체를 주성분으로 하는 골충진 이식제, 키토산, 생체적합성 고분자를 주성분으로 하는 이루어진 미립자, 티타늄 등으로 사용될 수 있다. 또한, 고분자 지지체는 바람직하게는 키토산, 생체적합성 고분자를 주성분으로 하는 이루어진 다공성 지지체, 티타늄의

3차원적 다공성 지지체 등으로 사용될 수 있다. 이때, 상기 골이식용 바이오소재 및 지지체의 표면은 활성 펩타이드의 부착이 용이하도록 표면을 개질하는 것이 바람직하다.

[48] 본 발명에서 상기 바이오소재는 바람직하게는 천연고분자, 골미네랄 및 합성고분자로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[49] 본 발명에서 상기 천연고분자는 바람직하게는 콜라겐, 알긴산, 프로필렌글리콜, 황산 콘드로이틴 및 키토산으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[50] 본 발명에서 상기 골미네랄은 바람직하게는 i) 동물에서 유래되거나, ii) 화학적으로 합성될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[51] 본 발명에서 상기 화학적으로 합성된 골미네랄은 바람직하게는 하이드록시아파타이트류일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[52] 본 발명에서 상기 합성고분자는 바람직하게는 폴리락틱글리콜산, 폴록사머 및 프로필렌 글리콜로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[53] 본 발명에서 상기 바이오소재는 바람직하게는 골이식용일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[54] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 펩타이드, 상기 의약 조성물 또는 상기 바이오소재의 골조직 재생 치료 용도에 관한 것이다.

[55] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 펩타이드, 상기 의약 조성물 또는 상기 바이오소재를 골조직 재생 치료가 필요한 환자에게 투여 또는 이식하는 단계를 포함하는 골조직 재생 치료방법에 관한 것이다.

[56] 상기 골재생 치료방법에 사용되는 의약 조성물 및 투여 방법은 상기에서 설명하였으므로, 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략하였으며, 골재생 치료방법에 사용되는 일반적인 방법을 당업자가 적절히 반영하거나 변형하여 실시할 수 있을 것이다.

[57] 한편, 상기 의약 조성물을 투여하거나 바이오소재를 이식할 수 있는 개체는 인간을 포함한 모든 동물일 수 있으며, 예를 들어, 개, 고양이, 마우스 같은 동물일 수 있다.

[58]

[59] 실시예

[60] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[61]

[62] 실시예 1: 세포 투과능 및 골조직 재생능을 가지고 있는 이중 기능성 신규 펩타이드의 설계

[63] 코핀 7 단백질의 아미노산 서열 중 세포 투과능 및 골조직 재생능의 이중

기능성을 가질 것으로 예상되는 6개의 펩타이드 후보군을 선발하였다. 상기 6개의 펩타이드에 대한 아미노산 서열은 하기 표 1에 서열번호 1 ~ 서열번호 6으로 표시하였으며, 코핀 7 단백질 상의 위치는 도 1에 도시하였다. 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 서열번호 1, 2, 4, 5로 표시되는 펩타이드는 각각 10개의 아미노산으로 구성되어 있고, 서열번호 3으로 표시되는 펩타이드는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드와 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드가 연결되어 20개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 서열번호 6으로 표시되는 펩타이드는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드와 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드가 연결되어 20개의 아미노산으로 구성되어 있다.

[64]

[65] [표1]

서열번호 1 ~ 서열번호 6으로 표시되는 펩타이드의 아미노산 서열

	코핀 7 단백질에서 위치	아미노산 서열 (N 말단 → C 말단)	분자량
서열번호 1 (CDP1)	321-330	STTFEEMQKA	1170.5
서열번호 2 (CDP2)	331-340	FEEGQAQWDC	1211.4
서열번호 3 (CDP3)	331-350	FEEGQAQWDCVNP KYKQKRR	2509.2
서열번호 4 (CDP4)	341-350	VNP KYKQKRR	1315.7
서열번호 5 (CDP5)	351-360	SYKNSGVVWL	1064.5
서열번호 6 (CDP6)	341-360	VNP KYKQKRRSYKNSGVVWL	2362.3

[66]

[67] 실시예 2: 펩타이드의 합성

[68] 서열번호 1 내지 서열번호 6으로 표시되는 펩타이드를 합성장치를 이용하여 C 말단으로부터 Fmoc 고체상 화학합성방법으로 합성하였다. 즉, 블로킹 그룹(Blocking group)으로 Fmoc-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)이 결합된 Rink 레진 (0.075 mmol/g, 100 ~ 200 mesh, 1% DVB crosslinking)을 사용하여 합성하였으며, 합성기에 50 mg의 Rink Amide MBHA 레진을 넣은 뒤 DMF로 레진을 스웰링(swelling) 시키고, Fmoc-group의 제거를 위해 20% piperidine/DMF 용액을 사용하였다. C 말단부터 서열대로 0.5M amino acid 용액(용매: DMF), 1.0M DIPEA(용매: DMF&NMP), 0.5M HBTU (용매: DMF)를 각각 5, 10, 15 당량씩 넣어 질소 기류하에서 1~2시간 동안 반응시켰다. 상기 디프로텍션(deprotection)과 커플링(coupling) 단계가 끝날 때마다 DMF와 메탄올로 두 번씩 세척하는 과정을 거쳤다. 마지막 아미노산을 커플링(coupling) 시킨 후에도 디프로텍션(deprotection)을 해주어 Fmoc-group을 제거하였다.

[69]

[70] 합성의 확인은 닐하이드린 테스트(ninhydrin test) 방법을 이용하였고, 테스트를

거치고 합성이 완료된 레진은 건조시킨 후 Reagent K cleavage 각테일을 레진 1g 당 20ml의 비율로 넣어 3시간 동안 shaking 시킨 후 필터링을 통해 레진과 펩타이드가 녹아 있는 각테일을 분리하였다. 필터로 걸러진 용액에 콜드에테르(cold ether)를 넣어 펩타이드를 고체상으로 결정화시키고 이를 원심분리하여 분리하였다. 이때 에테르로 여러 번 세척하고 원심분리하는 과정을 거쳐 Reagent K cleavage 각테일을 완전히 제거하였다. 이와 같이 얻어진 crude를 증류수에 녹여 액체크로마토 그래피를 이용하여 분리 정제하였으며, 정제된 펩타이드는 동결건조 하였다. 정제된 펩타이드의 분자량을 Mass spectrometry를 통해 확인하였다. 도 2는 상기와 같은 방법으로 합성된 서열번호 1 내지 서열번호 6으로 표시되는 펩타이드의 HPLC와 mass의 결과를 나타낸 것이다.

[71]

[72] 실시예 3: 합성 펩타이드의 *in vitro* 세포 독성 평가

[73] 상기 실시예 2에서 합성된 서열번호 1 내지 서열번호 6으로 표시되는

펩타이드의 세포 독성을 평가하기 위해 세포 생존률 테스트(cell viability test)를 진행하였다. 이를 위하여 96-웰 (well) 폴리스티렌 플레이트 (polystyrene plate)의 각 well에 치수줄기세포를 10% FBS (Fetal Bovine Serum)와 1%

antibiotic-antimycotic solution (Thermo Fisher Scientific, USA)이 첨가된 배지

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA) 배지에 9×10^3 cell/ well 단위로 분주한 후 24시간 배양한다. 상기의 서열번호 1 내지 서열번호 6으로 표시되는

펩타이드를 다양한 농도(50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 800 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M)로 각 웰에 처리하고 24시간(1일), 48시간(2일), 72시간(3일) 후에 MTT

assay를 진행하여 펩타이드의 세포 독성 여부를 확인하였다. MTT assay를 위하여 펩타이드를 처리한 지 24시간, 48시간, 72시간 후 배지를 제거하고, 각각 DMEM

배지 180 μ l과 MTT 용액 20 μ l를 섞은 혼합액을 처리하여 1시간 동안 추가 배양하였다. 1시간 후 혼합액을 제거하고 Dimethyl sulfoxide(DMSO) 200 μ l를 각

웰마다 처리하였으며, 이를 새로운 96 웰에 옮겨 담은 후에 측정하였다. 모든

수치는 3번 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었고, 측정된 값을 정리하여 도 3에 나타내었다.

[74]

[75] 그 결과, 서열번호 5로 표시되는 펩타이드와 서열번호 6으로 표시되는

펩타이드는 세포내 독성이 있는 것으로 확인되었고, 서열번호 1 내지 서열번호 4로 표시되는 펩타이드는 모두 3일간 함께 배양하여도 세포에 전혀 독성을

나타내지 않음을 확인하였다.

[76]

[77] 실시예 4: 합성 펩타이드의 세포투과능 확인

[78] 실시예 2에서 합성된 서열번호 1 내지 서열번호 6으로 표시되는 펩타이드들의 세포 투과능을 확인하기 위하여, 각각 펩타이드의 N 말단에 Fluorescein

isothiocyanate(FITC)를 부착하였다. 치수줄기세포를 4-웰 챔버(chamber)에 3X10⁴ 개씩 분주하고, 세포 안정화를 위해 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 상기의 FITC가 표지된 펩타이드를 다양한 농도 (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M, 1000 μ M)로 30분간 처리하였다. 코핀 7 단백질도 펩타이드와 함께 세포투과능을 비교하기 위하여 100ng/ml 농도로 30분간 동일하게 처리하였다. 이후, 이들 펩타이드 또는 단백질의 세포내 투과양상을 비교하기 위하여, 각 웰에 4% 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde)를 처리하여 실온에서 10분 동안 고정시킨 후, 0.5% Triton-X 100을 처리하고 15분 동안 실온에서 배양하였다. 그 후 3% 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)가 녹아있는 완충용액(PBS)으로 30분 동안 블로킹을 하였다. 코핀 7 단백질의 경우, CPNE7 1차 항체(antibody)를 1% 소혈청알부민이 녹아있는 완충용액(PBS)에 1:100의 비율로 희석하여 4°C에서 16시간 동안 반응시키고, 형광염료(Fluorescein isothiocyanate, FITC)가 결합된 2차 항체를 1:200 비율로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 마지막으로, 핵을 염색하는 염료(Hoechst 33342, blue)를 상온에서 10분 동안 처리하고, 완충용액(PBS)으로 세척하여 공초점 주사전자현미경(confocal scanning microscope, IX 70, Olympus Co, Tokyo, Japan)으로 형광강도를 측정하여 발현 정도를 확인 하였다. 모든 수치는 서로 다른 세 영역에서 형광강도를 측정하여 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었으며, 그 결과를 대조군 (no treatment, NT)과 비교하였다(*P <0.05).

[79]

[80] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이, 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 가장 높은 1000 μ M에서도 형광 발현이 관찰되지 않아 세포 투과능이 없음을 알 수 있었다. 한편, 서열번호 2로 표시되는 펩타이드는 1000 μ M에서 약한 형광이 발현되는 것을 확인할 수 있었지만 강한 형광발현은 확인되지 않았다. 그러나, 서열번호 4로 표시되는 펩타이드는 100 μ M을 처리하여도 형광이 발현되는 것으로 확인되어, 세포투과 효율이 가장 좋은 펩타이드임을 확인할 수 있었다. 그 다음으로 서열번호 3으로 표시되는 펩타이드, 서열번호 6으로 표시되는 펩타이드가 상대적으로 세포투과 효율이 좋은 것을 확인할 수 있었다.

[81]

[82] 한편, 서열번호 4로 표시되는 펩타이드와 코핀 7 단백질의 세포 투과능을 공초점 현미경으로 비교해 본 결과, 서열번호 4로 표시되는 펩타이드가 코핀 7 단백질에 비해 세포투과 효율이 우수한 것으로 나타났고, 세포내 형광 강도를 정량한 결과에서도 서열번호 4로 표시되는 펩타이드가 코핀 7 단백질에 비해 형광 강도가 강하게 나타나, 서열번호 4로 표시되는 펩타이드는 그 펩타이드가 유래한 단백질인 코핀 7 단백질에 비해서도 세포 투과성이 향상된 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[83]

[84] 실시예 5: 서열번호 4로 표시되는 펩타이드와 코핀 7 단백질의 골분화능 비교

- [85] 상기 실시예 4에서 세포투과 기능이 가장 우수한 것으로 확인된 서열번호 4로 표시되는 펩타이드와 코핀 7 단백질의 골분화능을 확인하기 위하여, 치수줄기세포 (dental pulp stem cell, DPSC)에서 오스테오칼신(osteocalcin)의 발현 차이를 평가하였다.
- [86]
- [87] 이를 위하여 24웰 플레이트에 1×10^5 개의 DPSC를 10% FBS (Fetal Bovine Serum)과 1% antibiotic-antimycotic solution (Thermo Fisher Scientific, USA)가 첨가된 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA) $50 \mu\text{l}$ 에 부유하도록 분주하였다. 24시간 동안 세포를 배양한 뒤, 보충제(hMSC Osteogenic SingleQuots[®], Lonza, USA)가 추가된 골분화 유도 배지 (Differentiation Basal Medium-Osteogenic, Lonza, USA)로 교체하며 18일간 서열번호 4로 표시되는 펩타이드는 농도 $200 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ 씩 처리하고, 코핀 7 단백질은 농도 100ng/ml 씩 처리였다. 이후, 면역형광(immunofluorescence, IF) 기법을 이용하여 오스테오칼신(osteocalcin)의 발현 정도를 비교하였다. 이를 위하여 4% 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde)를 처리하여 실온에서 10분 동안 고정시키고, 0.5% Triton-X 100을 처리하고 15분 동안 실온에서 배양하였다. 그 후 3% 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)가 녹아있는 완충용액(PBS)으로 30분 동안 블로킹을 하였다. osteocalcin의 1차 항체(antibody)를 1% 소혈청알부민이 녹아있는 완충용액(PBS)에 1:100의 비율로 희석하여 4°C 에서 16시간 동안 반응시키고, 형광염료(Fluorescein isothiocyanate, FITC)가 결합된 2차 항체를 1:200 비율로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 마지막으로, 핵을 염색하는 염료(Hoechst 33342, blue)를 상온에서 10분 동안 처리하고, 완충용액(PBS)으로 세척하여 공초점 주사전자현미경(confocal scanning microscope, IX 70, Olympus Co, Tokyo, Japan)으로 오스테오칼신(osteocalcin)의 발현 정도를 확인하였다. 모든 수치는 서로 다른 세 영역에서 형광강도를 측정하여 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었으며, 이를 대조군 (no treatment, NT) 과 비교하였다(* $P < 0.05$).
- [88]
- [89] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 오스테오칼신(osteocalcin)의 발현정도를 공초점 현미경과 형광 강도를 정량하였을 때, 서열번호 4로 표시되는 펩타이드를 $200 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ 씩 처리한 군에서 모두 코핀 7 단백질을 100ng/ml 로 처리한 군보다 상대적으로 강한 형광이 발현되었으며, 이를 통해 서열번호 4로 표시되는 펩타이드가 코핀 7 단백질보다 골분화능이 더 우수한 것을 확인할 수 있었다.
- [90]
- [91] 실시예 6: 서열번호 4로 표시되는 펩타이드와 코핀 7 단백질의 토끼에서의 골재생능 평가
- [92] 서열번호 4로 표시되는 펩타이드를 각각 20mg, 40mg 취하여 정제수 $100 \mu\text{L}$ 에

용해하여 골이식재 0.1g에 가하고 4°C에서 24시간 동안 방치한 후, 동결건조하였다. 대조군으로 코핀 7 단백질질을 위와 동일한 방법으로 골이식재 0.1g에 100 μ g, 200 μ g을 함유시켰다. 뉴질랜드 흰토끼 (종명: cuniculus)의 두개골에 직경 8mm의 결손부를 형성시키고, 결손부당 0.1g 골이식재를 이식하고, 골막과 피부를 이중봉합하였다. 이식 3주 후 동물을 희생시키고, 채취한 표본은 포르말린 용액에 넣어 고정시킨 후 조직을 포매하여 두께 20 μ m의 시편으로 제작하였다. 제작된 시편은 염기성 푸신과 톨루이딘 블루로 염색하여 비탈회 표본을 제작하였다. 제작된 표본은 광학현미경으로 관찰하여 사진 촬영을 하고 조직계측학적 분석을 실시하였다. 모든 수치는 서로 다른 세 개의 샘플에서 면적을 측정하여 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었으며, 코핀 7 단백질과 비교하였다(*P < 0.05).

[93]

[94] 그 결과, 도 7(A)에 나타나 바와 같이, 서열번호 4로 표시되는 펩타이드를 함유하는 골이식재가 코핀 7 단백질을 함유하는 골이식재에 비해, 두개골 결손부 중심으로 신생골이 재생되는 효과가 우수함을 확인하였다. 또한, 도 7(B)에 나타난 바와 같이, 조직계측학적이 분석을 하였을 때에도, 서열번호 4로 표시되는 펩타이드가 코핀 7 단백질에 비해 골재생 면적이 유의하게 높은 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과를 통하여 서열번호 4로 표시되는 펩타이드의 골재생 효과가 코핀 7 단백질에 비해 우수하다는 것을 알 수 있었다.

[95]

[96] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[97]

산업상 이용가능성

[98] 본 발명에 따른 펩타이드는 골조직 재생능이 뛰어나 골다공증과 같은 골재생이 필요한 질환의 치료에 유용하고, 특히 세포 투과능도 함께 가지고 있으므로 펩타이드의 세포 투과를 위해 별도의 펩타이드를 부착하거나 기타 제제를 첨가할 필요가 없고, 펩타이드 자체의 세포 투과능으로 단시간 내에 세포의 이행, 증식 및 분화를 촉진하여 최종적으로 효율적인 골조직 재생 효과를 발휘하는바, 정형외과를 포함하는 다양한 외과적 재생치료에 간편하게 적용이 가능하고 치료기간도 단축시킬 수 있는 장점이 있다.

[99]

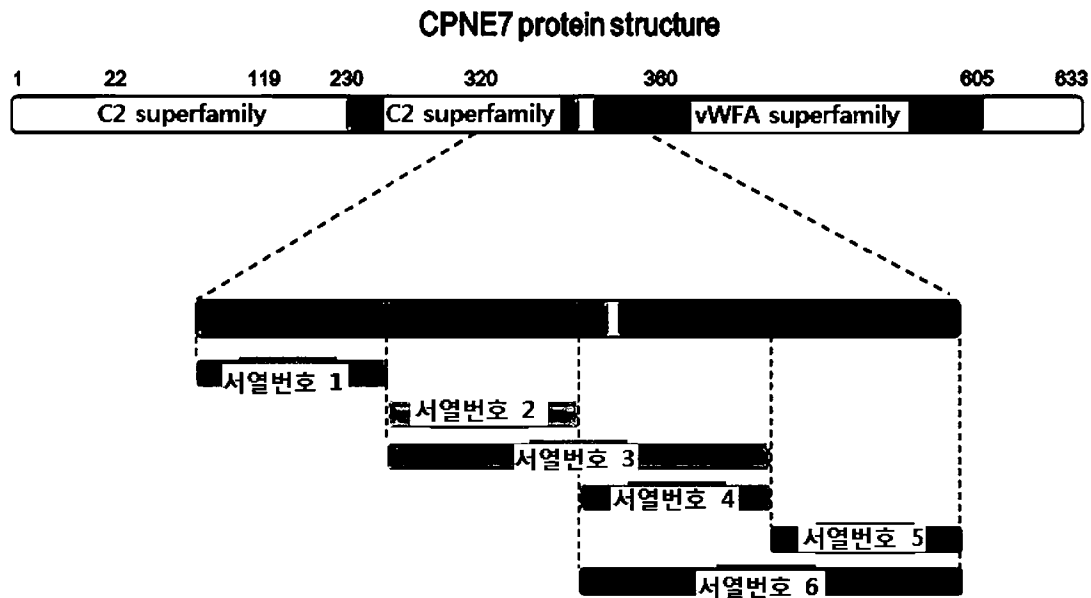
서열목록 Free Text

[100] 전자파일 첨부하였음.

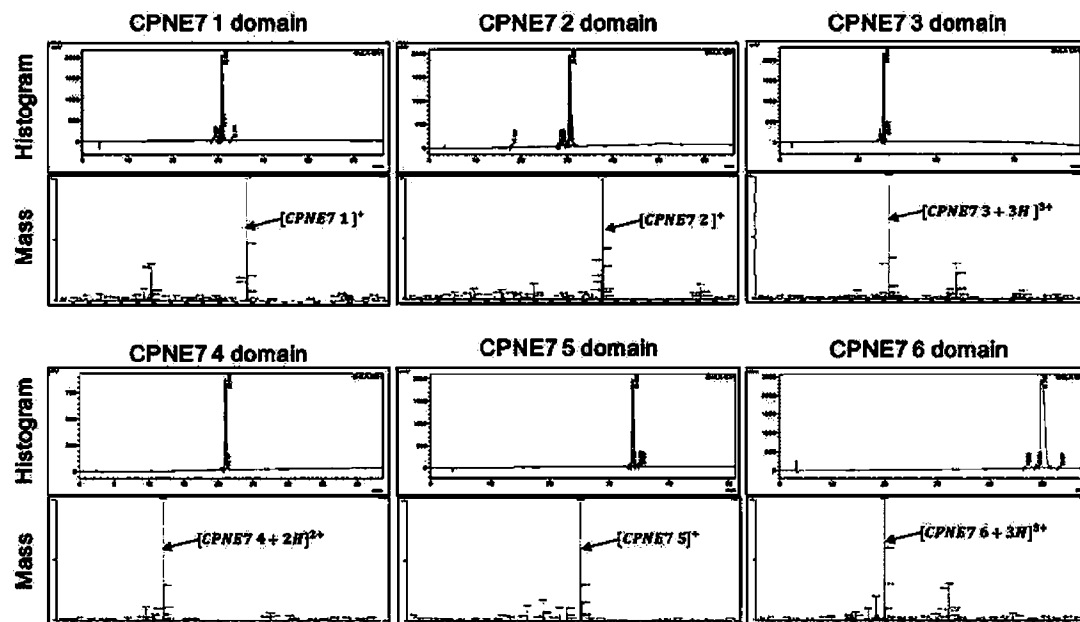
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 세포 투과능과 골조직 재생능의 이중 기능성을 가지는 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 3] 제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골조직 재생 치료용 의약 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 조성물은 경구투여용 제제, 주사용 제제 및 국소이식용 겔제로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 국소이식용 겔제는
 - i) 폴리락틱글리콜산, 폴록사머 및 프로필렌 글리콜로 이루어진 군에서 선택되는 합성고분자; 또는
 - ii) 콜라겐, 알긴산, 프로필렌글리콜 알긴산, 황산 콘드로이틴 및 키토산으로 이루어진 군에서 선택되는 천연고분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 조성물은 치료 대상의 체중 1kg 당 1~60mg의 용량으로 투여하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제1항의 펩타이드가 함유된 바이오소재.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 바이오소재는 천연고분자, 골미네랄 및 합성고분자로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오소재.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 천연고분자는 콜라겐, 알긴산, 프로필렌글리콜, 황산 콘드로이틴 및 키토산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오소재.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 골미네랄은 i) 동물에서 유래되거나, ii) 화학적으로 합성된 것을 특징으로 하는 바이오소재.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 화학적으로 합성된 골미네랄은 하이드록시아파타이트류인 것을 특징으로 하는 바이오소재.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 합성고분자는 폴리락틱글리콜산, 폴록사머 및 프로필렌 글리콜로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오소재.
- [청구항 13] 제7항에 있어서, 상기 바이오소재는 골이식용인 것을 특징으로 하는 바이오소재.

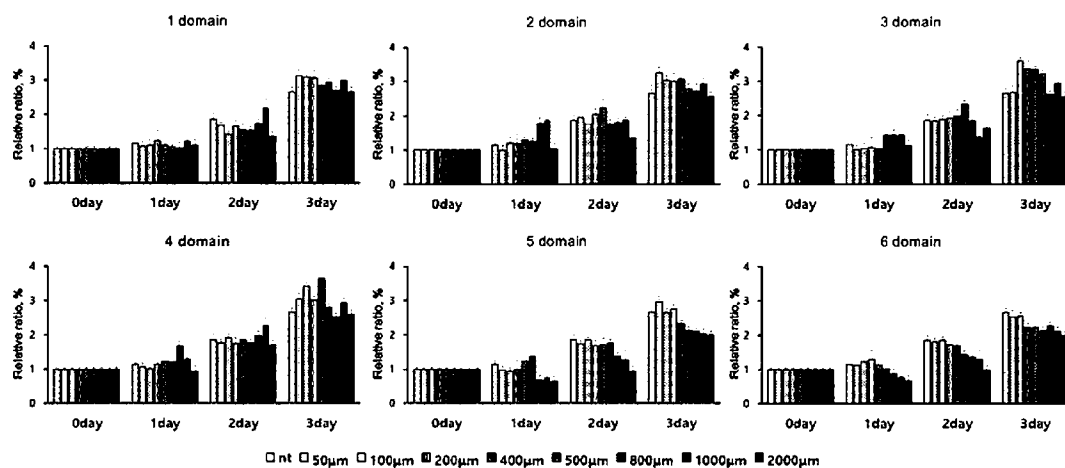
[도1]



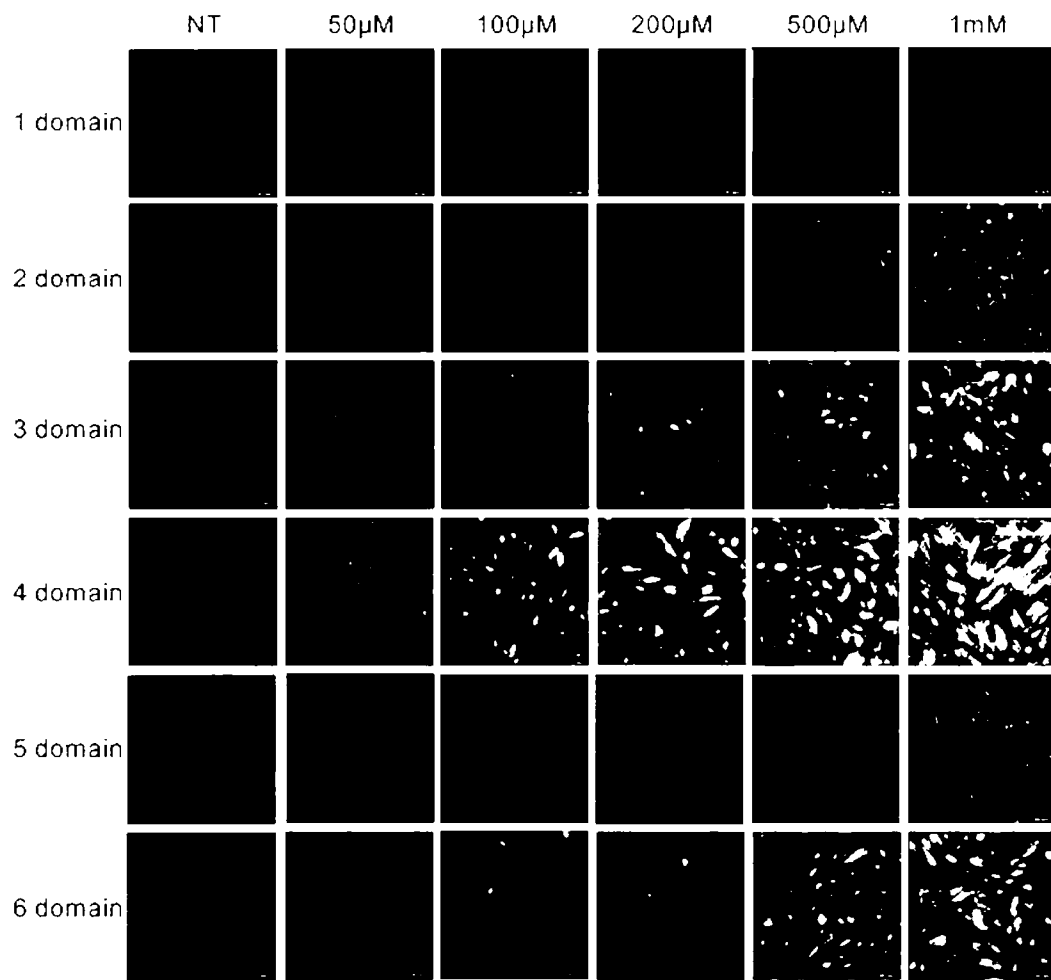
[도2]



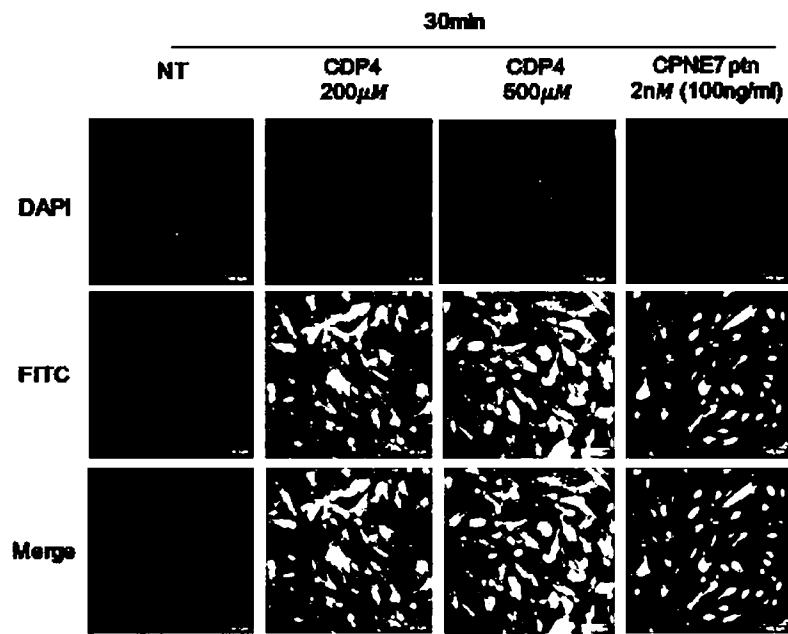
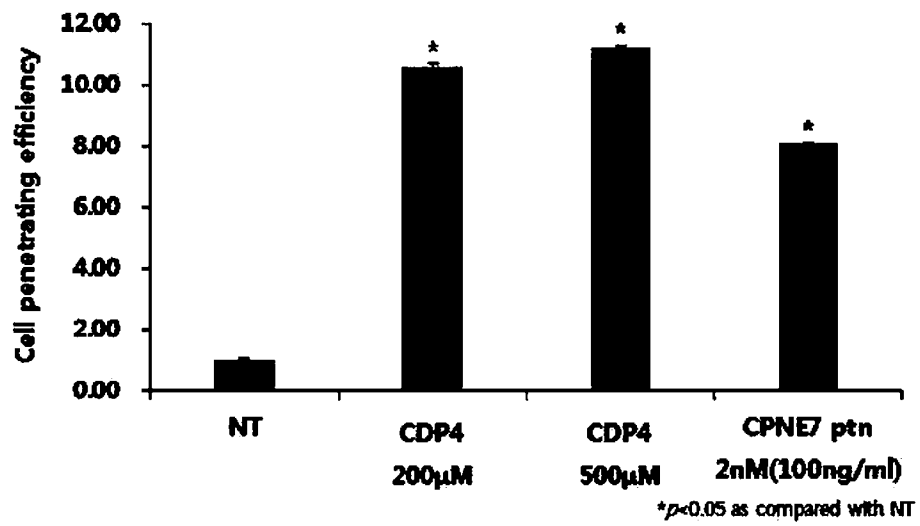
[도3]



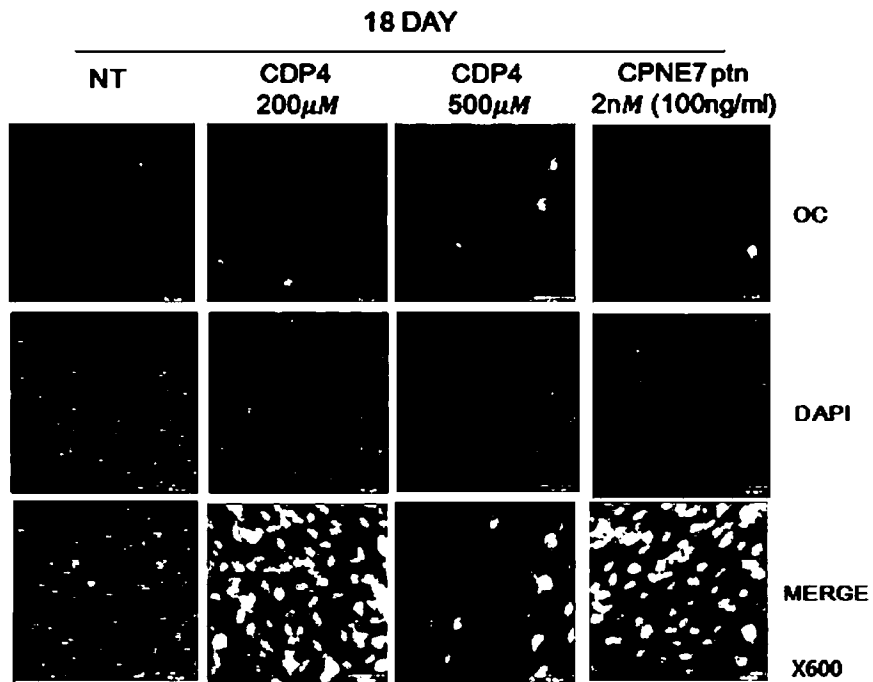
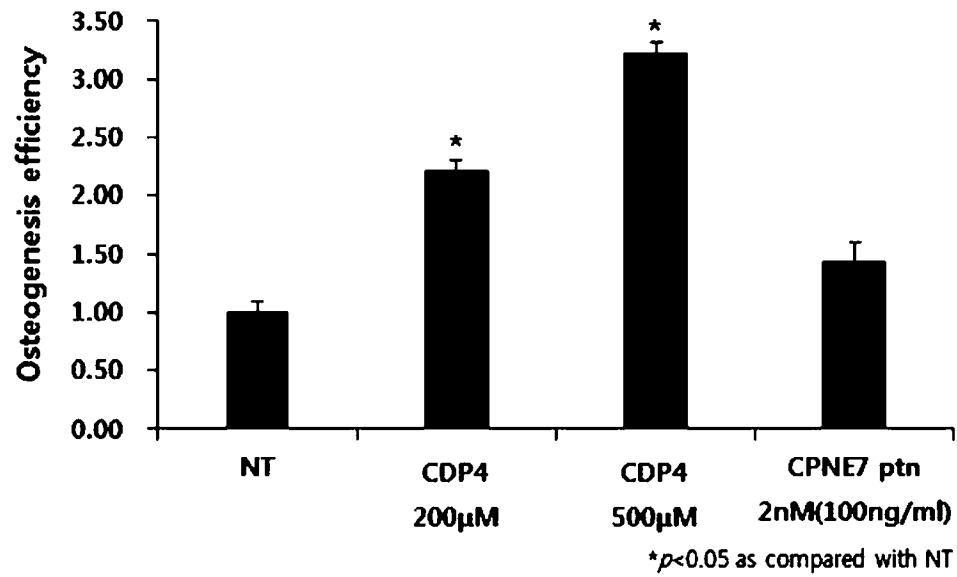
[도4]



[도5]

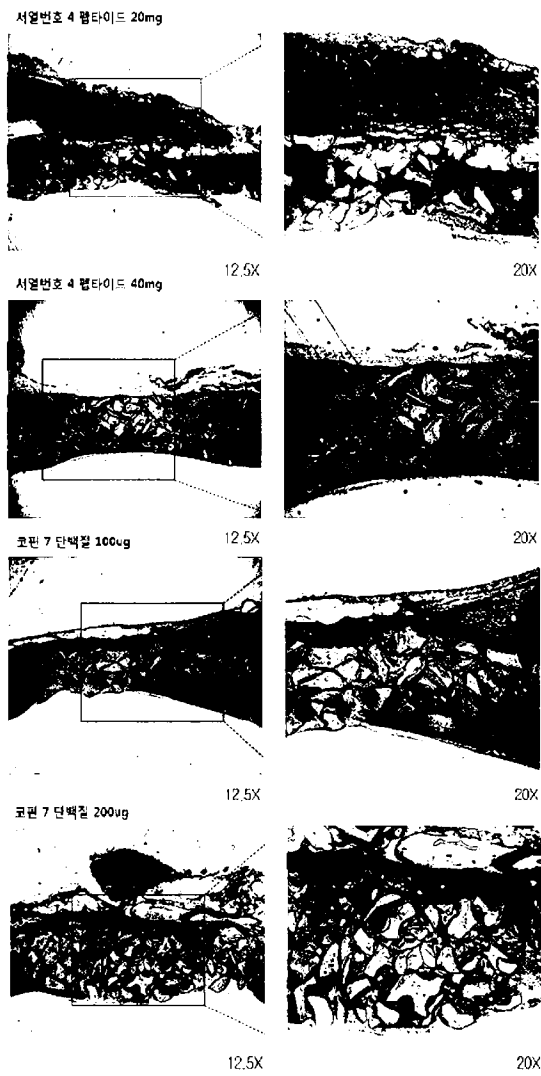
a**b**

[도6]

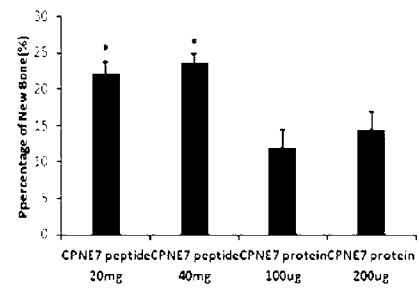
a**b**

[도7]

a



b



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/015588**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C07K 7/06(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i, A61L 27/12(2006.01)i, A61L 27/14(2006.01)i, A61L 27/22(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 7/06; C07K 7/08; C07K 14/51; A61K 35/12; A61K 38/08; A61L 27/12; A61L 27/14; A61L 27/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cell permeability, ability to regenerate bone tissue, peptide, copine 7, CPNE 7, copine 7

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI, GenBank accession no. XP_011751707.1 (30 March 2015) See the sequences.	1-13
A	KR 10-2012-0026408 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 19 March 2012 See paragraph [0025]; claims 1-6.	1-13
A	KR 10-2015-0145470 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 30 December 2015 See claims 1-9.	1-13
A	OH, H.-J. et al., "CPNE7, a Preameloblast-derived Factor, Regulates Odontoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells", Biomaterials, 2015, vol. 37, 208-217 See abstract.	1-13
A	US 2016-0060319 A1 (JO, D. et al.) 03 March 2016 See claims 1-5.	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 MARCH 2018 (30.03.2018)

Date of mailing of the international search report

30 MARCH 2018 (30.03.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/015588

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0026408 A	19/03/2012	EP 2615105 A1	17/07/2013
		EP 2615105 B1	22/02/2017
		KR 10-1348284 B1	03/01/2014
		US 2013-0237484 A1	12/09/2013
		US 9023987 B2	05/05/2015
		WO 2012-033272 A1	15/03/2012
KR 10-2015-0145470 A	30/12/2015	JP 2017-519505 A	20/07/2017
		KR 10-1627917 B1	07/06/2016
		US 2017-0100458 A1	13/04/2017
		WO 2015-194753 A1	23/12/2015
US 2016-0060319 A1	03/03/2016	US 2016-0060310 A1	03/03/2016
		US 2016-0060311 A1	03/03/2016
		US 2016-0060312 A1	03/03/2016
		US 2016-0060313 A1	03/03/2016
		US 2016-0060314 A1	03/03/2016
		WO 2017-034330 A1	02/03/2017
		WO 2017-034333 A1	02/03/2017
		WO 2017-034335 A1	02/03/2017
		WO 2017-034344 A1	02/03/2017
		WO 2017-034347 A1	02/03/2017
		WO 2017-034349 A1	02/03/2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/06(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i, A61L 27/12(2006.01)i, A61L 27/14(2006.01)i, A61L 27/22(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/06; C07K 7/08; C07K 14/51; A61K 35/12; A61K 38/08; A61L 27/12; A61L 27/14; A61L 27/22

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 세포 투과능, 골조직 재생능, 펩타이드, 코핀 7, CPNE 7, copine 7

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, GenBank accession no. XP_011751707.1 (2015.03.30) 서열 참조.	1-13
A	KR 10-2012-0026408 A (서울대학교산학협력단 등) 2012.03.19 단락 [0025]; 청구항 1-6 참조.	1-13
A	KR 10-2015-0145470 A (서울대학교산학협력단) 2015.12.30 청구항 1-9 참조.	1-13
A	OH, H.-J. 등, 'CPNE7, a preameloblast-derived factor, regulates odontoblastic differentiation of mesenchymal stem cells', Biomaterials, 2015, 37권, 208-217 초록 참조.	1-13
A	US 2016-0060319 A1 (JO, D. 등) 2016.03.03 청구항 1-5 참조.	1-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 03월 30일 (30.03.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 03월 30일 (30.03.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

장기정

전화번호 +82-42-481-8364



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0026408 A	2012/03/19	EP 2615105 A1 EP 2615105 B1 KR 10-1348284 B1 US 2013-0237484 A1 US 9023987 B2 WO 2012-033272 A1	2013/07/17 2017/02/22 2014/01/03 2013/09/12 2015/05/05 2012/03/15
KR 10-2015-0145470 A	2015/12/30	JP 2017-519505 A KR 10-1627917 B1 US 2017-0100458 A1 WO 2015-194753 A1	2017/07/20 2016/06/07 2017/04/13 2015/12/23
US 2016-0060319 A1	2016/03/03	US 2016-0060310 A1 US 2016-0060311 A1 US 2016-0060312 A1 US 2016-0060313 A1 US 2016-0060314 A1 WO 2017-034330 A1 WO 2017-034333 A1 WO 2017-034335 A1 WO 2017-034344 A1 WO 2017-034347 A1 WO 2017-034349 A1	2016/03/03 2016/03/03 2016/03/03 2016/03/03 2016/03/03 2017/03/02 2017/03/02 2017/03/02 2017/03/02 2017/03/02 2017/03/02