

## (19) 대한민국특허청(KR)

## (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
A61K 38/18

(11) 공개번호 특2000-0072904

(43) 공개일자 2000년12월05일

(21) 출원번호	10-1999-0015854
(22) 출원일자	1999년05월03일
(71) 출원인	주식회사 코오롱      구광시 경기도 과천시 별양동 1-23
(72) 발명자	노문중 경기도수원시팔달구영통동현대아파트730-1204 강경애 경기도용인시구성면마북리석진빌라A-301 이관희 서울특별시강남구일원동우성7차아파트115-603
(74) 대리인	서종완

**심사청구 : 있음****(54) TGF- $\beta$  분비세포를 포함하는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제****요약**

본 발명은 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) 분비세포 및 억제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제에 관한 것이다.

**대표도****도1****색인어**

인대, 연골재생

**영세서****도면의 간단한 설명**

도 1은 메탈로치오네인 프로모터 및 TGF- $\beta$  cDNA가 삽입된 pUC19 벡터의 모식도이다.

도 2는 네오마이신을 저항유전자로 하여 TGF- $\beta$ 의 cDNA가 삽입된 세포를 분리하는 방법의 모식도이다.

도 3은 본 발명에 따른 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제의 유전자 요법(Ex vivo gene therapy)과 종래의 유전자 치료법의 비교를 나타내는 모식도이다.

도 4는 실시예 1에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포에서 발현된 TGF- $\beta$ 의 mRNA의 노던 블랏(Northern blot)을 나타낸다.

도 5는 실시예 1에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포 투여에 따른 인대의 변화를 나타낸다. a 및 b는 측면도이며, c 및 d는 인대를 자른 후 관찰한 사진이다.

도 6은 실시예 1에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포 투여에 따른 인대 내부에서의 세포들의 수를 나타낸다.

도 7은 실시예 1에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포의 투여 전 및 후의 콜라겐 형성변화를 나타낸다.

도 8은 실시예 1에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포의 투여 전 및 후의 슬관절 내부의 유리질 연골의 변화를 나타낸다.

도 9는 생성된 연골조직을 헤마톡실린-에오진 염색후 관찰한 결과를 나타낸다.

도 10은 생성된 연골조직이 주위조직과 붙어있는 것을 나타내는 사진이다.

도 11은 생성된 연골의 사프라닌-O 염색 결과를 나타낸다. 관절연골은 사프라닌-O 염색에서 붉게 나타나고, 섬유연골은 회색으로 나타난다.

도 12는 손상시킨 연골의 치유촉진도중 TGF- $\beta$  분비여부를 나타내는 사진이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor - $\beta$ ) 분비세포를 포함하는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제에 관한 것이다.

세계적으로 시장의 크기를 가능하기 어려울 정도로 인대의 손상은 자주 일어난다. 또한 퇴행성 관절염의 원인으로 알려진 관절의 연골파열로 인한 관절경 검사 및 관절 치환술의 숫자도 해마다 증가하고 있으나, 이러한 치료로는 손상된 연골의 복원이 불가능하므로 단순히 제거 및 치환하는데 머물고 있는 실정이다.

이런 문제점을 해결하기 위하여 자가 연골세포를 퇴행성 관절에 이식하여 치료하는 생물학적 요법(biotherapy)에 관한 연구가 활발히 진행되었고, 젠자임(Genzyme)사에 의해 상업화되기도 했다. 그러나, 이 방법은 상당히 고가일 뿐 아니라 수술 후에 정상 연골과 재생연골 사이에 틈이 생겨 장기 사용할 때 이 부위에 파열을 가져오는 것이 문제점으로 지적되고 있다. 이러한 생물학적 요법의 단점을 해소하고자 생체 접합제인 트랜스글루타미나제(transglutaminase)를 사용하려는 노력이 있었으나 접합제로 사용가능성이 높은 조직 글루타미나제(tissue glutaminase)는 인체 투여시 분해되어 버리는 단점이 있어 사용가능성이 확실하지 않은 실정이다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에 본 발명자들은 상기한 종래의 치료방법과 전혀 상이한 기전을 가지면서, 종래기술에서 지적되는 문제점이 없는 새로운 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제를 개발하고자 연구한 결과, TGF- $\beta$  분비세포를 인대 및 연골부위의 손상된 부위에 직접 투여하였을 때[즉, TGF- $\beta$  분비세포의 체외유전자 요법(ex-vivo gene therapy)], 효과적으로 인대손상을 치료할 수 있고 연골을 재생시킬 수 있다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명은 TGF- $\beta$  분비세포를 포함하는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 발명의 구성 및 작용

본 발명은 TGF- $\beta$  분비세포 및 억제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제에 관한 것이다.

TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor - $\beta$ )는 다기능의 성장촉진 인자로 세포의 성장, 분화 및 세포간질 단백질의 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.

본 발명에 따른 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제에 특징적으로 함유되는 TGF- $\beta$  분비세포는 TGF- $\beta$ 의 cDNA를 공지의 방법에 따라 세포에 주입하여 제조할 수 있다. 예를들면, 메탈로치오네인(methallothionein) 등의 프로모터(promotor) 및 TGF- $\beta$ 의 cDNA를 암피실린, 네오마이신 등의 저항유전자를 갖는 공지의 벡터[예를들어, Gibco-BRL사의 pUC19(암피실린 저항유전자 함유)]에 포함시켜 TGF- $\beta$ 의 cDNA를 포함하는 벡터를 제조한 후, 공지의 섬유아세포[예를들어, NIH 3T3 (ATCC로부터 구입가능)]에 인산칼슘(Calcium Phosphate) 방법 또는 리포펙틴(Lipofectin) 방법 등의 공지의 방법에 따라 주입함으로써 제조할 수 있다 (Ashley DM et al, Endogenous expression of TGF- $\beta$ 1 inhibits growth and tumorigenicity and enhances Fas-mediated apoptosis in a murine high-grade glioma model, Cancer Res., 58(2), pp 302-309, Jan 1998; Hoffman BB et al, Transcriptional activation of TGF- $\beta$  in mesangial cell culture by high glucose concentration, Kidney Int., 54(4), pp 1107-1116, Oct 1998; Itoh S et al, Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces nuclear export of inhibitory Smad7., J. Biol. Chem. 273(44), pp 29195-29201, Oct 1998; MacKay SL et al, Transfection of type II TGF- $\beta$  receptor into colon cancer cell increases receptor expression, inhibits cell growth and reduces the malignant phenotype, Ann Surg., 227(6), pp 781-789, Jun 1998; Riddick CA et al, TGF- $\beta$  increases leukotriene C4 synthase expression in the monocyte like cell line, THP-1, J. Immunol., 162(2), pp 1101-1107, Jan 1999; Wagner M et al, Transfection of the type I TGF- $\beta$  receptor restores TGF- $\beta$  responsiveness in pancreatic cancer, Int. J. Cancer., 78(2), pp 256-260, Oct 1998). 메탈로치오네인 프로모터 및 TGF- $\beta$ 의 cDNA를 벡터(pUC19)에 주입시킨 재조합 벡터의 모식도는 도 1과 같으며, 네오마이신을 저항유전자로 하여 TGF- $\beta$ 의 cDNA가 주입된 세포의 분리방법에 관한 모식도는 도 2와 같다.

또한, 본 발명에 따른 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제에 함유되는 TGF- $\beta$  분비세포는 일정량의 방사선을 조사함으로써 그 자체의 세포분화를 억제하는 것이 안전성 측면에서 바람직하다. 즉, 상기 TGF- $\beta$  분비세포에 방사선을 조사하게 되면 세포의 분화에 따른 발암성의 발현을 효과적으로 차단할 수 있다. 상기 방사선 조사량은 세포분화를 효과적으로 억제할 수 있는 방사량, 예를들어 4000 내지 10000 rad 가 바람직하다.

하기의 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 TGF- $\beta$  분비세포를 손상된 인대에 이식하였을 때, 손상된 인대가 비후해짐으로써 효과적으로 인대의 손상치료를 촉진할 것으로 기대되며; 또한 관절연골을 인위적으로 손상시켜 퇴행성 관절염의 모델을 만든 후 투여하였을 때에도 연골의 재생효과도 매우 뛰어나므로 효과적인 연골재생 촉진제로서의 사용이 기대된다. 따라서 본 발명에 따른 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제에 의한 치료방법은 체외 유전자 치료법(ex vivo gene therapy)에 해당하는 것으로 종래의 다른 유전

자 치료법과 상이한 것이며, 이를 모식도로 나타내면 도3과 같다.

본 발명에 따른 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 필요에 따라 주사제 등의 형태로 제제화할 수 있다. 예를들어 본 발명에 따른 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제는 0.95% 생리식염수 또는 상업적으로 구입 가능한 배양액 [예를들어, DMEM 완충액(buffered Dulbecco's Modified Eagle's Medium)]에 부유시켜 인대 및 관절강 내에 투여할 수 있으며, 필요에 따라 통상의 현탁화제, 무동화제 등을 포함하여, 피하주사 등의 비경구 제형의 형태로 제제화될 수 있다.

또한, TGF- $\beta$  분비세포를 육안 또는 기계적인 방법으로 갯수를 측정하여 상기 배양액에 부유시켜 0.1ml, 0.5ml, 1.0ml 등의 다양한 형태로 제제화할 수 있다. 예를들어, 100만개의 세포를 DMEM 완충액(buffered Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 부유시켜 1.0ml의 비경구형 제제로 제조할 수 있으며, 2ml의 용기에 저장한 후 투여직전에 37°C의 온도에서 녹여 생체에 투여할 수 있다. 또한, 필요에 따라 세포의 개수를 변화시켜 각각 다른 크기의 용기에 저장하여 규격화시킬 수도 있다.

상기와 같은 조성을 갖는 본 발명에 따른 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제는 인대 및 연골손상의 질병, 예를들어 슬부 전후방 십자인대의 급성손상 및 재건술, 퇴행성 관절염을 갖는 인간 및 동물에게 비경구로 투여될 수 있으며, 그 투여량은 치료하고자 하는 대상의 나이, 개인적 차이 등의 환자의 상태 및 목적에 따라 좌우되지만, 통상 체중 Kg 당  $0.5 \times 10^5$  내지  $2 \times 10^6$  개의 용량으로 인대와 관절강 내에 투여될 수 있고, 바람직하게는 체중 Kg 당  $1-2 \times 10^5$  개의 용량으로 인대 조직 및 관절강내에 투여될 수 있다.

본 발명은 인대 손상의 새로운 치료법 개발, 예를들어 슬관절 내부 전후방 십자인대의 급성 인대손상 치료의 촉진 및 현재까지 불가능하였던 손상된 관절연골의 재생을 가능케 하여, 인대의 손상 및 퇴행성 관절염의 치료제 개발을 목표로 한다.

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

#### 실시예 1

TGF- $\beta$ 의 cDNA (Roberts A. B. et al : Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney, Biochemistry 22, 5692-5698)를 메탈로치오네인(methallothionein) 프로모터와 연결하여, 암피실린 저항유전자를 갖는 pUC19(Gibco-BRL 사) 벡터에 첨가하였다. 이를 퓨젠-6-트랜스펙션(Fugene-6 Transfection) 시약 (보링거-만하임 사)를 사용하여, NIH 3T3 세포(ATCC HB11602)에 주입하였다. 배양액에 암피실린을 첨가하여 암피실린 저항유전자가 삽입된 세포 즉 TGF- $\beta$ 의 cDNA가 삽입된 세포를 분리배양 하였으며, TGF- $\beta$  분비여부를 노던블랏으로 확인하였다. 제조된 TGF- $\beta$ 의 cDNA가 삽입된 세포를 10% 소 태아 혈청을 함유한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양한 다음 -70°C에서 보관하였다.

발현된 TGF- $\beta$  mRNA의 노던 블랏(Northern blot)은 도4와 같다. 노던 방법은 RNA를 구아니디움 이소티오시아네이트/페놀/클로로포름 방법을 사용하여 추출하고, 추출된 10 $\mu$ g의 RNA를 1.0% 아가로스 겔에 전기영동하고, 이를 Duralon-UV 막에 옮겨 자외선 stratalinker로 가교시킨 후, 이를 1% 소혈청알부민, 7% 소듐도데실설페이트(SDS), 0.5M 소듐 포스페이트, 1mM EDTA와 65°C에서 혼성화(hybridization)시킨 후, <sup>32</sup>P-표지 TGF- $\beta$  cDNA에 반응시키는 방법을 사용하였다.

도4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포가 효과적으로 TGF- $\beta$ 를 분비하였으며, 효소면역법(Enzyme linked Immunosolvent Assay)을 사용하여 측정된 TGF- $\beta$ 의 유리 농도는 약 30ng/10<sup>6</sup> cell/24시간이었다.

#### 실시예2

실시예 1에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포에 6000 rad의 방사선을 1012초 동안 조사(CIS Biointernational사, IBL437C)하여 방사선이 조사된 TGF- $\beta$  분비세포를 제조하였다.

#### 시험예 1

가토(NewZealand White Rabbit)의 아킬레스건을 수술적으로 절개하여 분리한 후, 실시예 1에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포를 10<sup>6</sup>개/ml 농도로 0.3ml 를 인대에 투여하였다. 또한, TGF- $\beta$ 가 포함되지 않은 섬유아세포를 반대쪽 아킬레스건에 투여하였다. TGF- $\beta$ 의 발현을 위하여 토끼의 식수에 황산 아연(zinc sulfate)을 첨가하였다. 투여후 2, 4, 6주 경과한 후 육안적 및 조직학적인 관찰을 시행하였다.

도5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 TGF- $\beta$  분비세포를 투여한 결과 투여 6주후 인대가 효과적으로 비후해짐을 확인할 수 있고, 주입한 세포는 인대 내에서 마치 섬같은 모양을 보였으며(도6), 대조군에서와 달리 6주가 경과되었을 때 콜라겐이 형성되었음을 확인할 수 있다(도7).

#### 시험예 2

퇴행성 관절염 모델을 얻기 위하여, 가토를 마취한 후 슬관절을 절개하여 연골면의 손상을 수술적으로 만들었다. 이후 수술부위를 봉합하고 실시예 1에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포를 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 포함시켜 슬관절 내부에 투여하였다.

부분적으로 손상시킨 연골에 실시예 1에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포를 투여한 후 6주가 경과하였을 때, 육안

적으로도 유리질 연골(hyline cartilage)이 효과적으로 생성됨을 확인할 수 있으며(도 8B), 이런 변화는 TGF- $\beta$ 를 포함하지 않은 섬유아세포를 주입한 정상 대조군에서는 나타나지 않았다(도 8A). 새로 생성된 연골조직은 조직학적으로 유리질 연골과 동일하였으며(도9B), 새로 생성된 유리질 연골은 주위조직과 연결된 것을 확인할 수 있었다(도10). 새로 생성된 연골은 사프란인-0 (safranin-0) 염색에 의해 붉은 색을 띠었으며, 섬유연골은 흰색으로 나타났으므로(도 11), 이를 통하여 생성된 연골이 유리질 연골이라는 사실을 다시 한번 확인할 수 있었다.

### 시험예 3

실시에 2에서 제조한 TGF- $\beta$  분비세포를 투여한 결과, 관절연골이 효과적으로 생성됨을 확인하였다. 한편, 본 발명의 작용기전을 규명하기 위하여 실시한 이유노히스토케미칼(Immunohistochemical) 염색의 결과를 보면, 투여된 세포들이 손상부위의 위쪽에 존재하여 TGF- $\beta$ 를 분비하고 있고, 그 하부에 유리질 연골들이 재생되고 있음을 확인할 수 있다 (도 12). 즉, 투여 4주후에 TGF- $\beta$  항체를 이용한 이유노히스토케미칼 염색상 재생되고 있는 관절연골의 상층에서 투여된 세포들이 갈색으로 TGF- $\beta$ 를 분비하고 있다.

따라서, 투여된 세포에서 분비된 TGF- $\beta$  단백질이 그 하부의 연골세포를 분화하도록 유도하기 때문에 새로운 연골이 생성되는 것으로 판단된다. 이는 방사선 조사후의 결과와 더불어 세포가 변환되어 이루어지는 것이 아니고 투여한 세포들이 연골세포들의 성장을 촉진하여 효과가 나타남을 증명하는 것이다.

### 발명의 효과

본 발명에 따른 TGF- $\beta$  분비세포를 포함하는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제는 인대 및 연골손상의 질병, 예를들어 슬관절 측부 및 내부 전후방 십자인대의 파열 및 퇴행성 관절염을 갖는 인간 및 동물의 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1

TGF- $\beta$  분비세포 및 억제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 TGF- $\beta$  분비세포가 바이러스 또는 플라스미드 유래의 벡터에 재조합된 발현 벡터에 의해 형질전환된 세포인 것을 특징으로 하는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 형질전환된 세포가 사람에서 유래된 세포인 것을 특징으로 하는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제.

#### 청구항 4

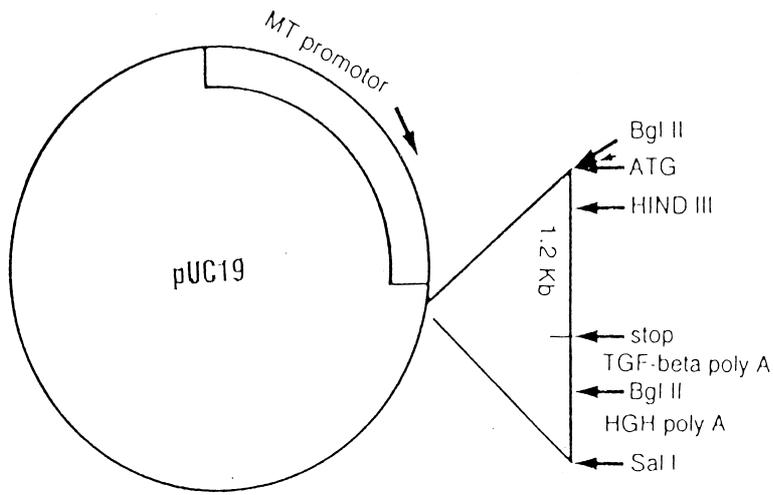
제1항에 있어서, 주사제의 제형을 갖는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제

#### 청구항 5

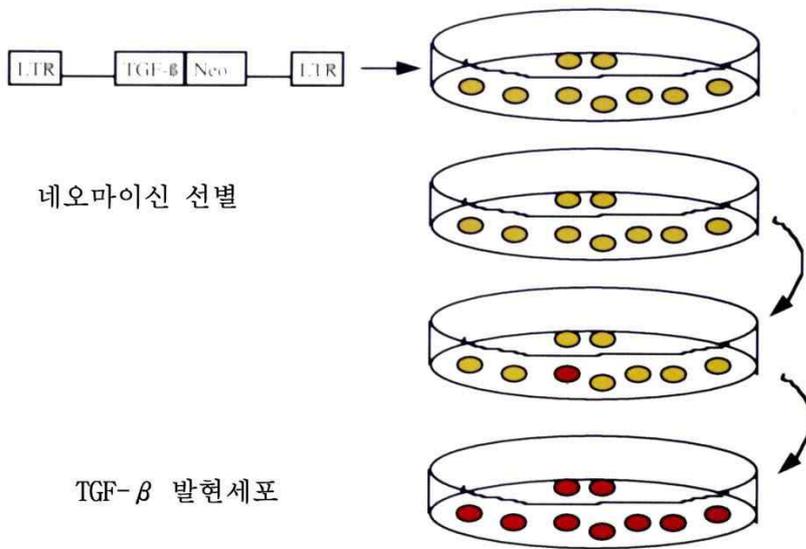
제1항에 있어서, 상기 TGF- $\beta$  분비세포가 4000 내지 10000 rad로 방사선 조사된 TGF- $\beta$  분비세포임을 특징으로 하는 인대손상 치료 및 연골재생 촉진제.

도면

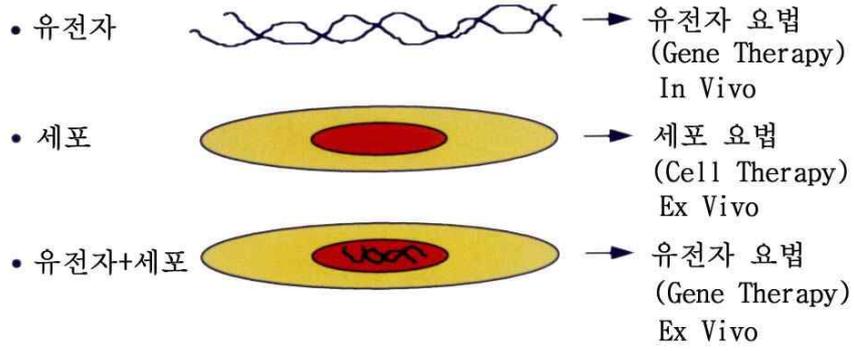
도면1



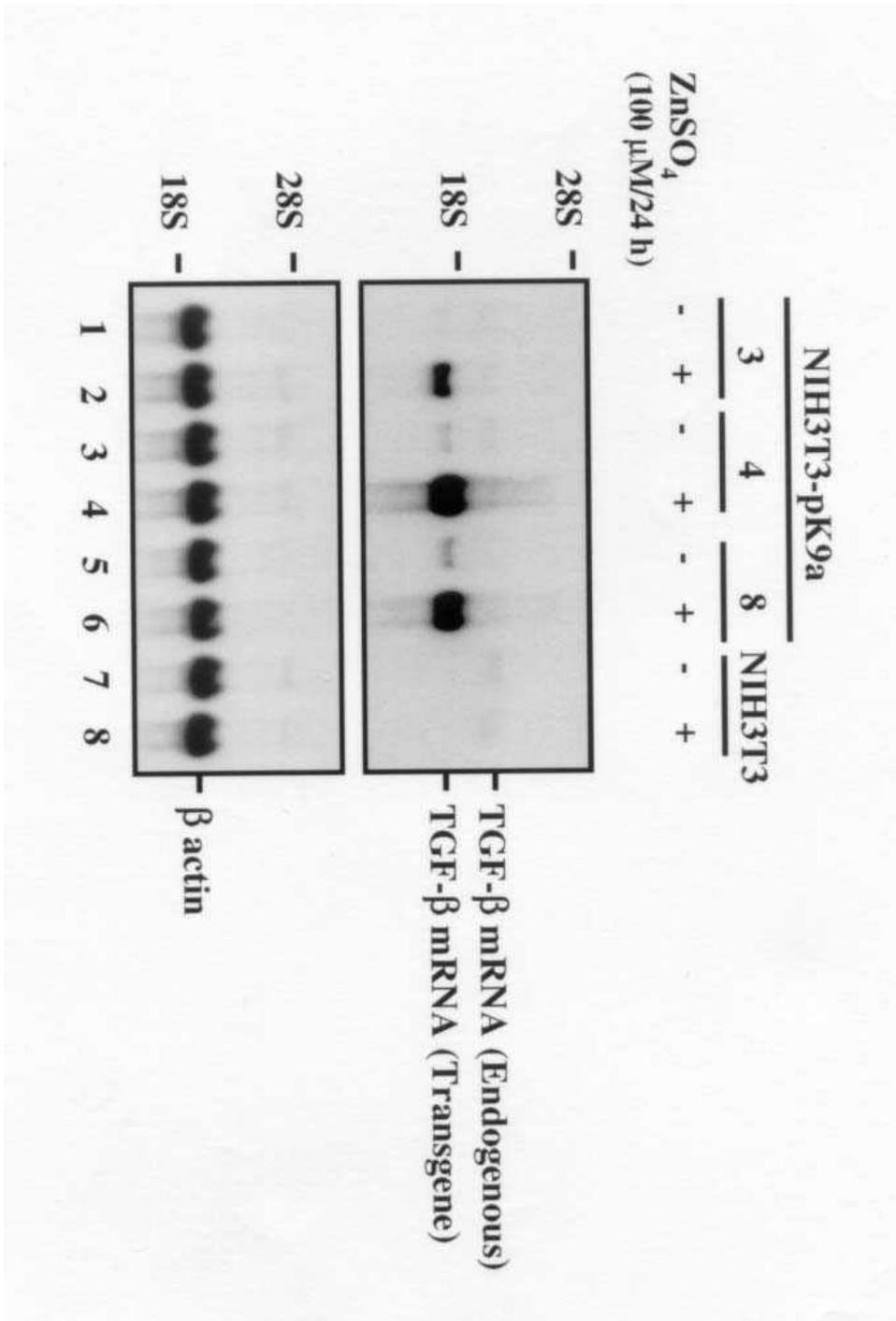
도면2



### 세포 및 유전자 요법



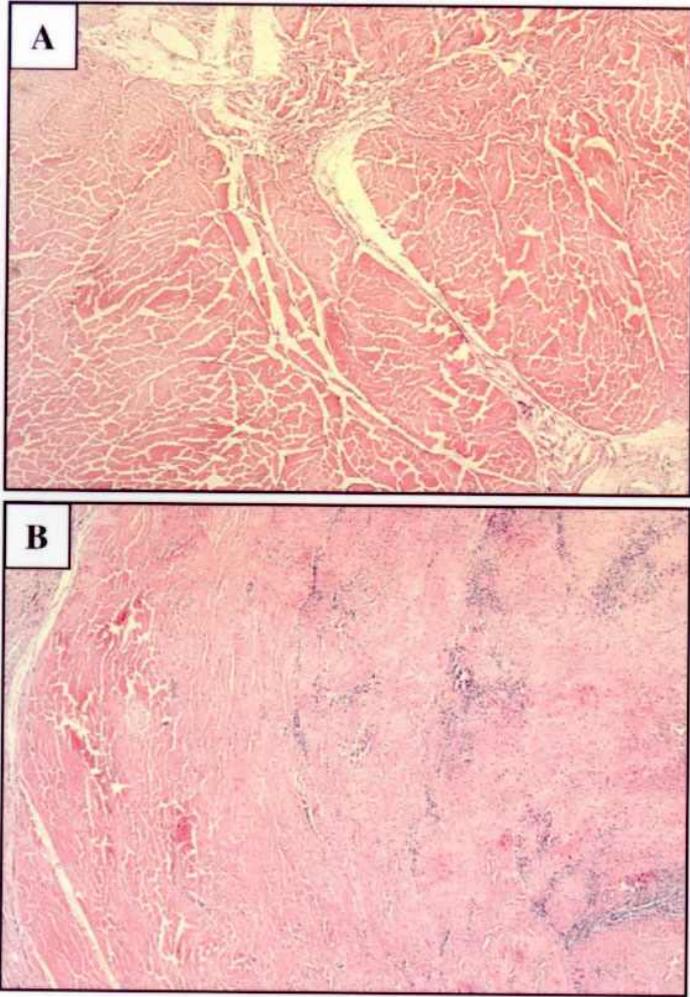
도면4



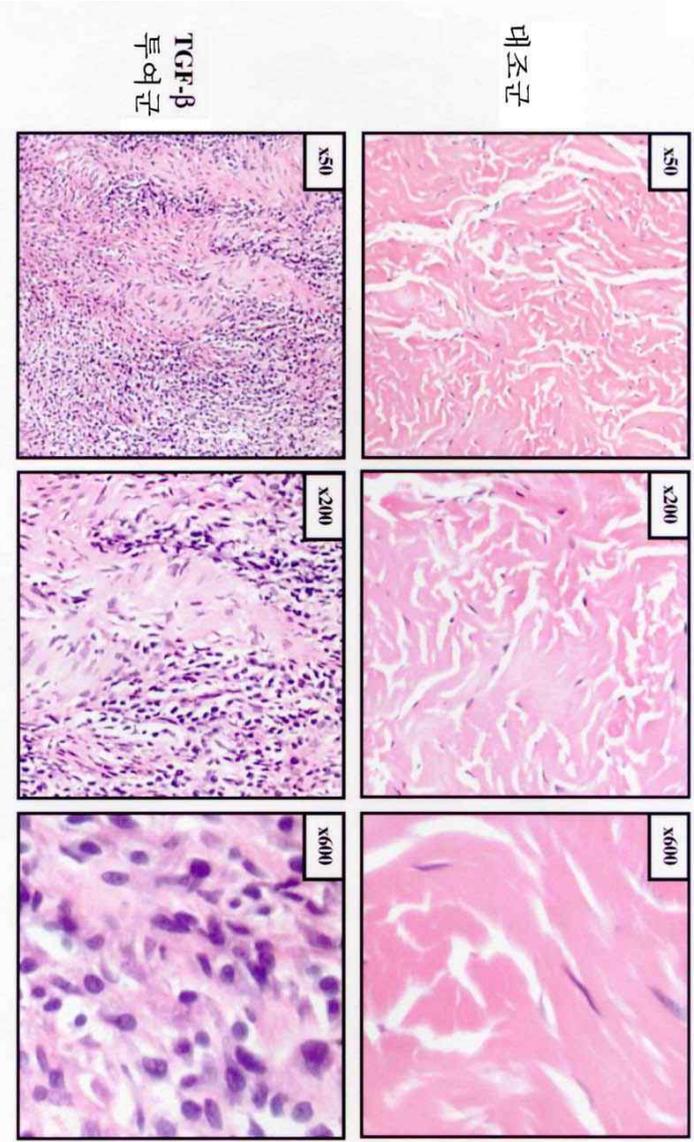
도면5



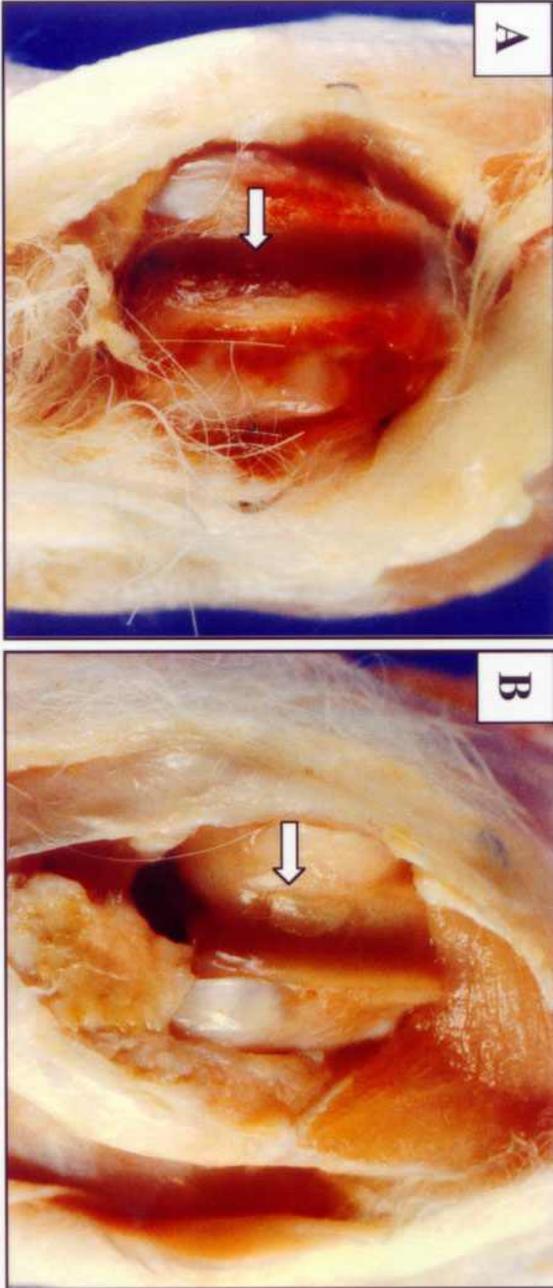
도면6



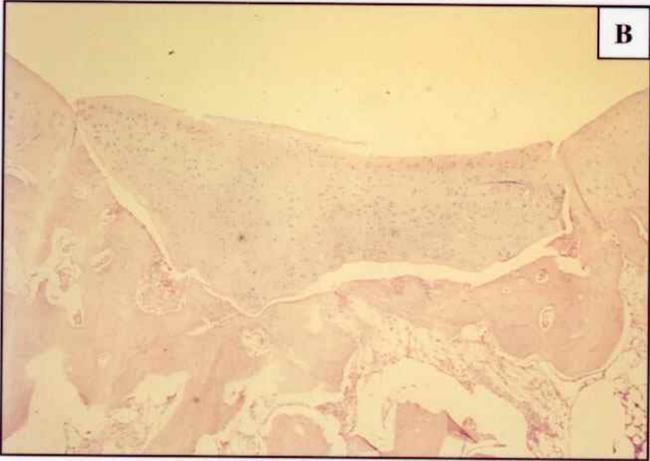
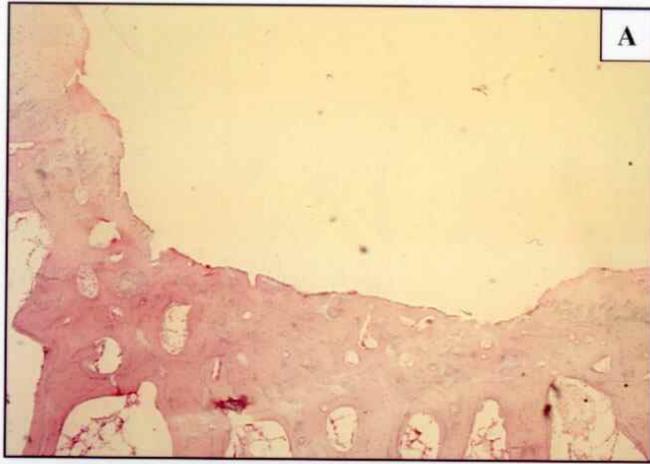
도면7



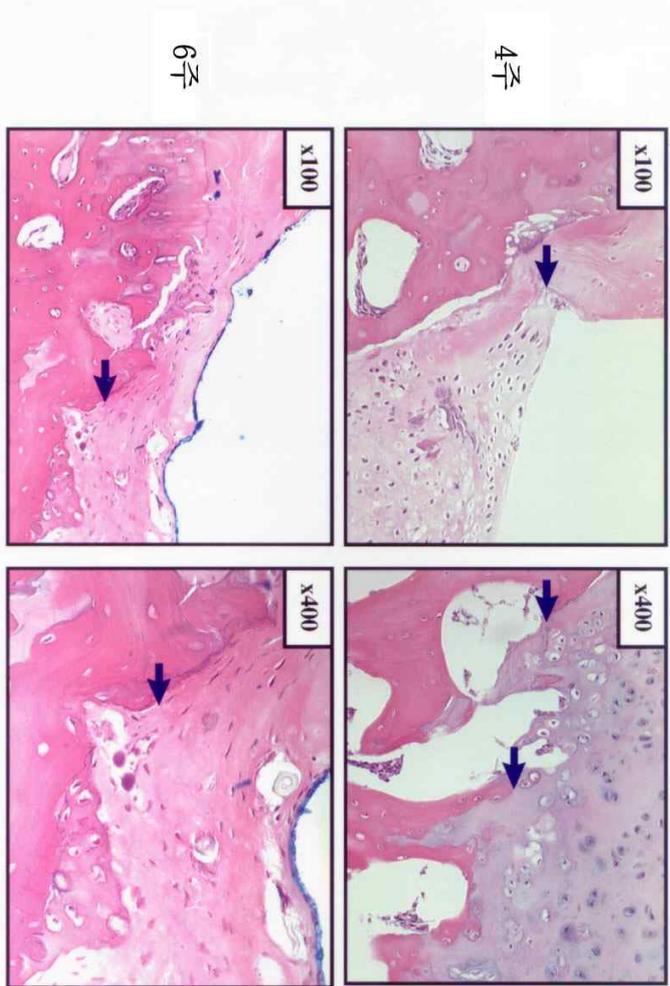
도면8



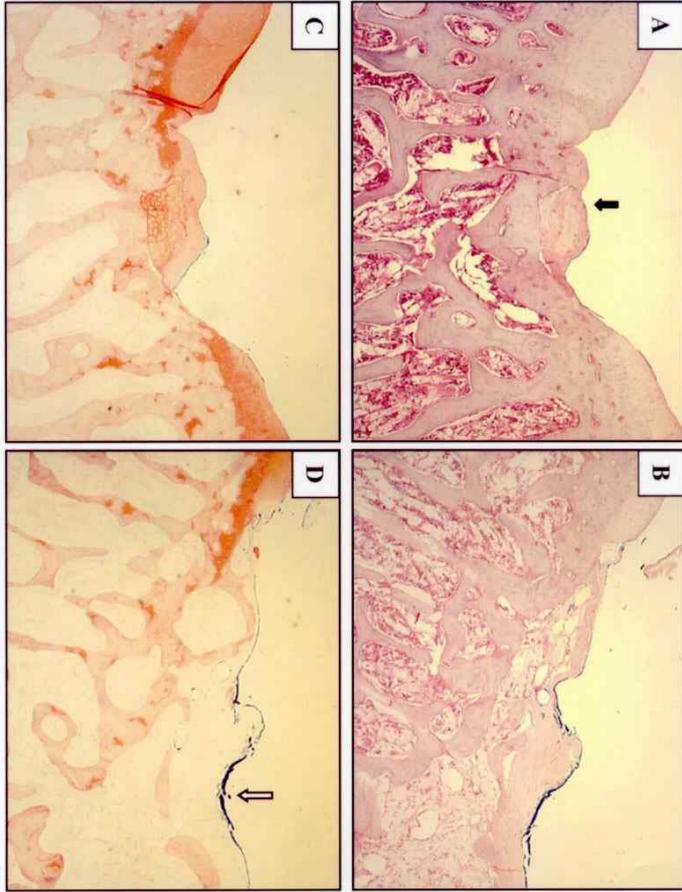
도면9



도면 10



도면11



도면 12

