

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 9월 14일 (14.09.2023)



(10) 국제공개번호

WO 2023/172004 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

A61K 6/54 (2020.01)

A61K 6/69 (2020.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/003027

(22) 국제출원일:

2023년 3월 6일 (06.03.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0031002 2022년 3월 11일 (11.03.2022) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826

서울특별시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: 민병무 (MIN, Byung-Moo); 04425 서울특별시 용산구 이촌로 310, 101동 4503호, Seoul (KR). 김

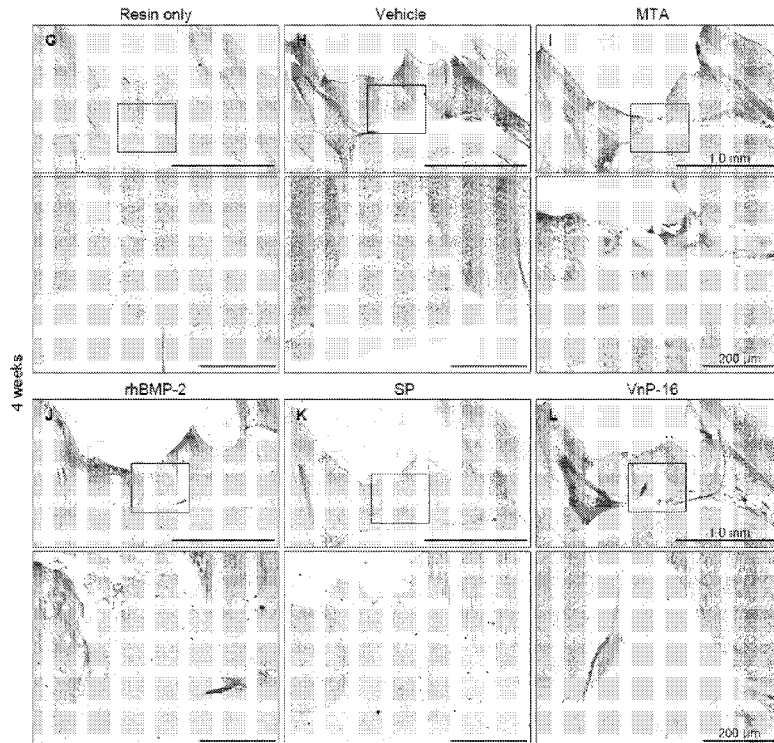
선영 (KIM, Sun-Young); 05507 서울특별시 송파구 올림픽로 435, 213동 601호, Seoul (KR). 박초연 (PARK, Choyeon); 18114 경기도 오산시 내삼미로 65, 101동 1601호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태평양 (BAE, KIM & LEE IP); 04521 서울특별시 중구 청계천로 30, 5층, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: PEPTIDE HAVING RESTORATIVE DENTIN REGENERATION ACTIVITY AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 수복 상아질 재생 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a peptide having dentin regeneration activity and a use thereof. The peptide according to the present invention promotes dental pulp cell behavior, including the attachment, spreading, and migration of dental pulp cells, and promotes the differentiation of dental pulp cells into odontoblasts. The peptide according to the present invention can be used as an active ingredient in dental materials, such as root canal filling materials or pulp restoration materials, associated with tooth restoration and dentin regeneration, and can also be used for treating and preventing dental pulp diseases.

[다음 쪽 계속]

WO 2023/172004 A1

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (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))
-

(57) 요약서: 본 발명은 상아질 재생 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 펩타이드는 치수세포의 부착, 퍼짐 및 이동을 포함하는 치수세포의 행동을 촉진하고, 치수세포의 상아질모세포(odontoblast)로의 분화를 촉진한다. 본 발명의 펩타이드는 치아의 회복 및 상아질 재생과 관련된 치과용 재료, 예를 들어 근관충전재 또는 치수복조제의 활성성분으로 사용될 수 있으며, 치수질환의 치료 및 예방 용도로도 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 수복 상아질 재생 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도 기술분야

- [1] [관련출원과의 상호인용]
- [2] 본 출원은 2022년 03월 11일에 출원된 한국특허출원 제10-2022-0031002호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국특허출원 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [3] [기술분야]
- [4] 본 발명은 비트로넥틴(vitronectin) 유래 기능성 펩타이드의 상아질 재생, 치수질환의 예방 또는 치료, 치수복조제 및 근관충전재 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [5] 치아는 최외층에 법랑질, 그 내층에는 상아질이라는 경조직을 가지고 있으며, 상아질 안쪽에 상아질을 생산하는 상아질모세포, 더 중심부에는 치수세포를 가진 기관이다. 치수는 치아의 내부에 있는 치수강을 채우고 있는 부드러운 결합조직으로 신경과 혈관이 풍부하게 분포되어 있으며 상아질의 표층에까지 이르는 곳을 말한다. 치수-상아질 복합체는 매우 역동적인 기능을 하는 구조물로 유해한 자극에 대하여 면역학적으로 방어하고 외상이나 감염에 대하여는 치유와 재생으로 반응하는 등 치아를 보호하는데 매우 중요한 역할을 하는 조직이다. 상아질은 발생 순서에 따라 일차 상아질(primary dentin), 이차 상아질(secondary dentin), 삼차 상아질(tertiary dentin)로 구분한다. 삼차 상아질은 치아에 치아우식, 교모, 마모, 치과보존시술 같은 유해자극이 가해지는 경우 이에 대한 반응으로 치수 쪽에서 추가로 형성된 상아질이다. 이 상아질은 기존의 상아질이 유해자극을 받은 부위에서만 형성된다. 삼차 상아질에는 반응 상아질(reactionary dentin)과 수복 상아질(reparative dentin)의 2종류가 있다. 반응 상아질은 유해자극이 약한 경우에 기존의 상아질모세포에 의해 형성되는 상아질이며, 수복 상아질은 유해자극이 심하여 일차 상아질 및 이차 상아질을 만들었던 기존의 상아질모세포가 죽고 상아질모세포유사세포(odontoblast-like cell)가 새로 분화되어 만든 상아질이다. 상아질이 손상되어 치수가 및 이로 인한 세균 감염으로 발생한 치수질환은 치근단질환과 치주질환까지 확대될 수 있다.
- [6] 치아는 태아기의 발생 과정의 유도에 의해 형성되며, 여러 개의 세포종에 의해 구축된 기능 단위로서, 기관이나 장기와 같다. 따라서, 치아는 성체 내의 조혈 줄기세포나 간엽계 줄기세포와 같은 줄기세포에서 각종 세포종으로 발생하는 줄기세포 시스템에 의해 발생하지는 않는다. 이와 같이, 치아는 성체에서는 자발적으로 재생되지 않는 특성을 가지는데 비하여, 인간의 음식 섭취나 언어 생활 등 일상생활에서 지속적으로 외부에 노출되고 사용되는 조직으로, 치아우식증이나 치주병 또는 외부적 충격 등에 의해 쉽게 소실될 수 있는 기관이다. 이에, 자발적

으로 재생되지 않는 조직의 특징에 따라 최근에는 의치나 임플란트와 같은 방법으로 보충하는 경우가 많다. 그러나, 치아의 유무는 외관이나 음식물의 미각에 크게 영향을 주는바, 건강 유지나 질 높은 생활을 위해 치아 조직의 재생 기술의 개발에 대한 관심이 높아지고 있다.

- [7] 치아우식치료에 사용되는 기존의 근관 충전재인 가타 퍼차(Gutta Percha)는 가소성(plasticity) 및 조작성이 좋고, 세포 독성이 낮으며, 방사선 불투과성이고, 열과 용해제에 의해 쉽게 제거할 수 있는 장점이 있으나, 상아질과 접촉하지 않아 미세 누출의 위험성이 있다. 또한 가열된 경우 식으면서 수축하게 되어 미세 누출이 발생하고, 물리적으로 근관을 폐쇄하는 능력만 있을 뿐 상아질(dentin) 유도 능력이 없어 넓은 근관 또는 미완성 치근에서의 사용이 매우 어렵고, 수복 상아질이 형성되기 전 괴사가 발생하면 치아우식증 치료의 실패가 불가피하다. 또한 과충전된 경우 제거가 어려우며 오히려 치근단 질환의 원인이 될 수 있어 이에 대한 개선이 요구되어 왔다.
- [8] 대한민국 등록특허 제10-1943978호에는 경조직 및 치수조직의 재생촉진 활성을 갖는 펩타이드가 제안되어 있고, 일본 등록특허 제5519121호에는 경조직 유도 활성이 있는 상아질 포스포포린의 RGD 배열을 포함한 합성 펩타이드가 제안되어 있는 등 펩타이드와 같은 활성물질을 치수 조직 재생용으로 개발하기 위한 노력이 계속되고 있으나, 생체적합성을 가진 상아질 재생 용도의 활성물질의 개발은 아직까지 만족할 만한 성과를 거두고 있지 못하였다.
- [9] 이러한 배경하에 본 발명자들은 상아질 재생용 물질을 개발하기 위해 연구 노력한 결과, 비트로넥틴(vitronectin) 유래 생리 활성 펩타이드가 치수 노출 동물 모델에서 치수세포의 상아질모세포로 분화, 세포의 행동 및 상아질의 석회화를 촉진하는 활성이 있음을 실험적으로 증명하여 본 발명을 완성하였다.
- [10] [선행기술문헌]
- [11] [특허문헌]
- [12] 대한민국 등록특허 제10-1943978호
- [13] 일본 등록특허 제5519121호
- [14]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [15] 본 발명의 일 목적은, 비트로넥틴(vitronectin) 유래 생리 활성 펩타이드를 유효 성분으로 포함하는 상아질 재생용 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [16] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 치수질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [17] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 근관 충전제용 조성물을 제공하는 것에 있다.

- [18] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 치수 복조재용 조성물을 제공하는 것에 있다.

과제 해결 수단

- [19] 본 발명의 일 측면은 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 상아질 재생용 조성물을 제공한다.
- [20] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 치수 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [21] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 근관 충전재용 조성물을 제공한다.
- [22] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 치수 복조재용 조성물을 제공한다.
- [23] 이하에서 본 발명을 상세히 설명한다.
- [24] 상아질 재생용 조성물
- [25] 본 발명의 일 측면은 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 상아질 재생용 조성물을 제공한다.
- [26] 본 발명에서 용어 “펩타이드”는 2개 이상의 아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 중합체 화합물을 의미한다.
- [27] 본 발명에서 상아질 재생 용도로 사용되는 펩타이드는 비트로넥틴(vitronectin) 유래 생리활성 펩타이드로서, 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드이다.

- [28] 다르게 표현하면, 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열 (RVYFFKGKQYWE)을 포함하는 펩타이드로서, 서열번호 2의 아미노산 서열내의 연속되는 12 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [29] 본 발명의 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열 내의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개, 연속하는 12개 내지 80개, 또는 연속하는 12개 내지 40개, 또는 12개 내지 30개, 12개 내지 25개, 12개 내지 20개, 연속하는 12개 내지 14개, 또는 연속하는 12개 내지 13개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드로서, 상아질 재생 활성을 나타내는 펩타이드일 수 있다.
- [30] 본 발명의 펩타이드는 본 발명의 펩타이드를 이루는 아미노산 서열에서 다른 아미노산이 추가되거나, 아미노산이 결실되거나, 다른 펩타이드가 융합되더라도 상아질 재생 활성을 나타내는 한, 본 발명의 펩타이드 범위에 포함된다.
- [31] 상기 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드는 비트로넥틴 유래의 활성 펩타이드로서, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 생물학적 활성 펩타이드 모티프(motif)가 유래된 펩타이드이다.
- [32] 상기 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 상기 생물학적 활성 펩타이드 모티프를 포함하므로, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열 (RVYFFKGKQYWE)로 이루어지는 펩타이드 또는 이 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드가 갖는 활성을 동등하게 보유한다.
- [33] 본 발명에서 상아질 재생 용도로 사용되는 펩타이드는 비트로넥틴 (vitronectin) 유래 생리활성 펩타이드로서, 서열번호 1의 아미노산 서열 "RVYFFKGKQYWE"을 포함하는 펩타이드이다.
- [34] 상기 펩타이드는 상기 펩타이드의 활성에 영향을 미치지 않는 범위 내에서, 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합에 의해 상이한 서열을 가지는 변이체 펩타이드를 포함할 수 있으며, 또는 동일한 기능을 가지는 단백질 단편의 형태일 수 있다.
- [35] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하면서 이의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는, 단백질 및 펩타이드 수준에서의 아미노산 변형은 본 발명의 기술분야에 공지되어 있으며, 경우에 따라서는 인산화 (phosphorylation), 황화 (sulfation), 아크릴화 (acrylation), 당화 (glycosylation), 메틸화 (methylation), 파네실화 (farnesylation) 등으로 변형될 수 있다. 따라서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열뿐만 아니라 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 또는 이의 변이체를 포함한다. 상기 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드는, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 99.5% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 아

미노산 서열의 상동성을 가지는 서열을 포함하면서 동일한 활성을 가지는 펩타이드라면 본 발명의 범위에 포함된다.

- [36] 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하면서, 상아질 재생 활성을 나타내는 20개 이하의 아미노산으로 이루어지는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 펩타이드는 20개 이하, 18개 이하, 15개 이하 또는 12개의 아미노산으로 이루어지는 것일 수 있다.
- [37] 일 구현예에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드일 수 있다. 본 명세서에서 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드는 “VnP-16 펩타이드”로도 지칭되면서 설명된다.
- [38] 본 발명의 상기 펩타이드는 당해 분야에서 널리 공지된 다양한 방법으로 획득할 수 있다. 일례로서, 폴리뉴클레오타이드 재조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 제조하거나 펩타이드 합성과 같은 화학적 합성을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법, 및 무세포 단백질 합성법 등으로 제조될 수 있으나, 이의 제조방법에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [39] 또한, 본 발명의 펩타이드는 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 예컨대, 상기 보호기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 펩타이드의 개질, 특히 펩타이드의 안정성 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다. 상기 '안정성'은 생체 내 단백질 절단 효소의 공격으로부터 본 발명의 펩타이드를 보호하는 인 비보에서의 안정성뿐만 아니라, 저장안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미한다.
- [40] 본 발명의 펩타이드는 상아질모세포 또는 치수세포에 의한 상아질 재생을 촉진하는 활성을 가지므로, 상아질 재생 용도 또는 상아질 재생 촉진 용도로 사용될 수 있다.
- [41] 본 발명의 용어 "상아질(dentin)"은 치아의 대부분을 구성하고 있는 흰색의 단단한 조직으로, 외중간엽 기원으로 교원질을 함유하고 있는 석회화 조직이다. 상아질은 치유두(dental papilla)의 외배엽성중간엽세포(ectomesenchymal cell)에서 기원하는 상아질모세포(odontoblast)에 의해 만들어진다. 치관부에서는 법랑질, 치근부에서는 백악질로 덮여있어 치아의 표면으로는 드러나지 않으나, 노화에 따라 법랑질이 마멸되면 치관의 선단부나 교합면에 상아질이 노출된다. 상아질은 보통의 뼈와 다르게, 상아질을 만들고 있는 세포의 본체는 치수 속에 존재하고 그 돌기만 상아질 속으로 뻗어나와 있다. 상아질을 형성하는 상아질모세포가 치수에 존재하기 때문에 치수와 상아질이 하나의 기능적 단위인 상아질-치수복합체(dentin-pulp complex)로 간주된다.
- [42] 본 발명에서 용어 “치수(dental pulp)”는 치아의 내부에 있는 치수강(pulp chamber)을 채우고 있는 부드러운 결합조직과 상아질모세포(odontoblast)로 이루

어져 있는 부분이고, 신경과 혈관이 풍부하게 분포해 있으며, 상아질(dentin)을 형성하는 기능을 담당한다.

- [43] 본 발명에서 상아질은 수복 상아질(reparative dentin) 또는 반응 상아질(reactionary dentin)일 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 상아질, 구체적으로 수복 상아질 또는 반응 상아질의 재생 또는 형성을 촉진한다. 수복 상아질과 반응 상아질은 삼차상아질의 일종으로, 삼차상아질은 치아에 치아우식증, 교모, 마모, 치과보존시술 같은 유해자극이 가해지는 경우 이에 대한 반응으로 치수 쪽에서 추가로 형성된 상아질이다. 상기 수복 상아질은 기존의 상아질이 유해자극을 받은 부위에서만 형성되며, 일차상아질 및 이차상아질을 만들었던 기존의 상아질모세포가 죽고 치수세포로부터 새로 분화된 상아질모세포-유사세포(odontoblast-like cell)에 의해 형성되는 형성한 상아질이다. 상기 반응 상아질은 유해자극이 약한 경우에, 유해자극에서 살아남은 기존의 유사분열된 상아질모세포(postmitotic odontoblasts)에 의해 형성되는 상아질이다. 본 발명에서 상아질은 치수가 노출된 상아질일 수 있다. 구체적으로, 상기 상아질은 치아가 손상되어 치아 내의 치수가 외부로 노출된 것일 수 있다. 본 명세서의 실시예에서, 본 발명의 펩타이드는 쥐(rat)의 치수노출 동물 모델에서 균일하고 두꺼운 경조직 형성을 촉진함을 확인하였다. 본 발명의 상아질 재생용 조성물은 치수복조(pulp-capping)에 사용될 수 있다. 본 발명에서 용어 "상아질모세포(odontoblast)"는 상아질의 내나멜세포에 접해있는 치유두의 표면에 존재하며, 상아질모세포가 전상아질을 만들고, 이에 석회질이 침착되어 상아질이 만들어진다. 본 발명에서 상아질모세포는 유사분열된 상아질모세포뿐 아니라 상아질모세포-유사세포(odontoblast-like cell)를 포함할 수 있다. 상기 상아질모세포-유사세포란 원래 줄기세포나, 전구세포, 치수세포 등에서 상아질모세포로 분화하도록 유도한 세포로 상아질모세포와 유사한 형질을 가지는 세포를 의미한다.
- [44] 본 발명의 펩타이드는 치수세포(dental pulp cell)의 행동을 촉진하는 활성을 갖는다. 구체적으로 상기 치수세포의 행동을 촉진하는 활성은 치수세포의 부착, 퍼짐 또는 이동을 촉진하는 활성일 수 있다.
- [45] 본 발명의 펩타이드는 치수세포의 부착, 퍼짐 또는 이동을 촉진하는 활성을 통해 상아질 재생 촉진 활성을 발휘한다.
- [46] 본 발명의 용어 "부착(attachment)"은 세포의 부착을 의미하며, 세포끼리의 부착뿐 아니라 세포가 기질에 부착하는 현상을 포함한다. 세포의 부착능이 향상되면, 해당 부위에 세포가 용이하게 부착된다.
- [47] 본 발명의 용어 "퍼짐(spreading)"은 동물세포가 기질에 접촉한 후, 세포질을 기질면에 얇게 퍼서 넓히는 과정 또는 세포가 기질에의 세포 부착을 완료한 상태를 의미한다. 정상적인 세포는 기반의존성이 있어, 기질에 접촉하여 신전하지 않으면 증식할 수 없다. 세포 퍼짐은 세포표면 상의 세포부착수용체인 인테그린이 기질 상의 세포부착성단백질 등을 인식하여 접촉함으로써 일어나고, 접촉 신호가 세포내로 전달됨으로써 세포골격이 배향하여 세포질이 기질면에 얇게 넓혀진

다. 세포 퍼짐은 세포 부착과는 구별되는 것으로서, 세포의 증식과 이동과 관련 된 것이다.

- [48] 본 발명의 용어 “이동(migration)”은 세포가 외부의 신호에 반응하여 이동하는 것을 의미한다. 세포 이동이 향상되는 경우 세포 손상 억제에 도움이 될 수 있고, 유해자극이나 상처가 있을 때 상처 회복 능력이 우수할 수 있다.
- [49] 본 발명의 일 실시예에서 증명되는 바와 같이, 본 발명의 펩타이드는 인간치수 세포의 부착, 퍼짐 및 이동을 강력하게 촉진하였다.
- [50] 본 발명의 펩타이드는 치수세포가 상아질모세포(odontoblast) 또는 상아질모세포-유사세포(odontoblast-like cell)로의 분화되는 것을 촉진하는 활성 또는 석회화를 촉진하는 활성을 갖는다.
- [51] 상기 치수세포가 상아질모세포(odontoblast) 또는 상아질모세포-유사세포(odontoblast-like cell)로 분화되는 것을 촉진하는 활성은 치성(odontogenic) 분화 마커 유전자의 mRNA 발현이나 단백질 발현을 증가시키는 활성일 수 있다. 상기 분화 마커 유전자는 ALP, DMP-1 및 DSPP으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [52] 상기 석회화(mineralization)는 광화 또는 무기화라고도 하며, 치아의 상아질 또는 법랑질에서 주요성분인 칼슘과 인이 인회석으로 침착되어 치아를 형성하는 것을 의미한다. 석회화 과정은 치아 발달과 줄기세포에 기초한 치아 재생에 있어, 상아질모세포 분화 메커니즘에 중요한 역할을 한다. 치아의 석회화는 주로 삼차 상아질(tertiary dentin)이 침착되어 나타나는 현상으로, 삼차 상아질은 상아세관이 매우 불규칙적이어서 일반적으로 이차 상아질과 연속되지 않는 특징이 있다. 이러한 특징은 외부로부터 유해한 물질이 상아세관을 통해 치수조직으로 전달되지 않도록 보호하는 작용을 한다. 상기 석회화는 Alizarin S red(ARS) 염색 및 이의 정량분석, 알칼린인산분해효소(ALP: alkaline phosphatase) 염색, 활성 및 RT-PCR (real time-PCR)로 측정될 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않고 더 다양한 방법으로 석회화를 측정할 수 있다. 따라서 석회화를 촉진하는 활성은 치아에서 칼슘 또는 인의 침착을 증가시켜 치아 내지 상아질의 재생을 촉진하는 활성일 수 있다.
- [53] 일 구현예에서, 본 발명의 펩타이드는 본 명세서 구체적인 실시예의 실험결과로 증명되는 바와 같이, 음성대조군에 비해 ALP 또는 ARS 염색되는 정도가 확연히 증가하여 VnP-16 펩타이드가 치수세포에서 상아질모세포 또는 상아질모세포-유사세포로의 분화를 유도하고, 석회화를 촉진하는 활성이 있음을 확인하였다(도 2a 내지 도 2d).
- [54] 일 구현예에서, 본 발명의 펩타이드는 본 명세서 구체적인 실시예의 실험결과로 증명되는 바와 같이 치수세포에서 ALP, DMP-1 및 DSPP 군에서 선택되는 하나 이상의 치성 분화 마커 유전자의 발현을 촉진할 수 있다.
- [55] 본 발명의 조성물은 유효성분으로서 상술한 펩타이드 외에 일반적으로 상아질 재생 효과를 갖는 성분을 더 포함할 수 있다.

- [56] 본 발명의 조성물은 상기 펩타이드 뿐만 아니라, 상기 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터를 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [57] 본 발명에서 용어 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유 결합에 의해 사슬모양으로 길게 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)이며, 일정한 길이 이상의 DNA 핵산 분자 또는 RNA 핵산 분자로서, 본 발명의 펩타이드를 암호화(코딩)하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.
- [58] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 펩타이드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 펩타이드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있다.
- [59] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 펩타이드를 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다.
- [60] 본 발명의 제조합 벡터는 세포 내에 도입하여 본 발명의 펩타이드를 안정적으로 발현시키기 위한 수단의 발현 컨스트럭트를 의미하며, 예를 들어 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터, 바이러스 벡터 등 공지의 발현 벡터를 포함하며, 이러한 제조합 벡터는 DNA 제조합 기술을 이용한 임의의 공지된 방법에 따라 당업자가 용이하게 제조할 수 있다.
- [61] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터를 치수 또는 치수세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 상아질 재생 방법을 제공한다. 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터를 치수 또는 치수세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 상아질 재생 방법을 제공한다.
- [62] 한편, 본 발명의 상아질 재생용 조성물은 후술하는 약학적 조성물의 형태로도 제공될 수 있다.
- [63] 치수질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물
- [64] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 치수 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [65] 상기 약학적 조성물에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다.
- [66] 본 발명의 펩타이드는 상아질 재생용 조성물에서 설명된 내용을 원용하며, 중복하여 설명되지 않는다. 본 발명의 펩타이드는 상술한 바와 같이, 치수세포에서 상아질의 재생을 촉진하는 활성이 있으므로, 치수질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.
- [67] 상기 치수질환은 치아의 내부에 있는 치수강을 채우고 있는 부드러운 결합조직으로 신경과 혈관이 풍부하게 분포되어 있는 치수 조직에 생기는 병변을 일컫는 것이다. 상아질의 손상으로 치수가 노출되어, 치수에 물리적 화학적 또는 세균성의 자극이 가해지면 처음에는 치수의 혈관이 확장되어 충혈을 볼 수 있고(치수충혈), 이 자극이 계속되면 치수에 염증이 생긴다(치수염). 자극의 세기, 세균감염의 유무에 따라서 염증에 정도의 차이가 있는데, 단단한 상아질에 의해서 쌓여있는 치수의 해부학적 특징 때문에 염증이 일어나면 순환장애가 일어나기 쉽고, 그대로 내버려두면 치수가 괴사하기 쉽다. 치수질환의 원인은 매우 다양하나, 대부분의 경우는 충치에 의한 세균감염과 치아의 천공, 파절, 균열, 치주낭을 통해서 치수 내부로의 감염에 의해 발생한다. 또한 외상, 마모, 치아 균열, 치료 시 치과용 기구에서 나오는 열과 마찰 등도 유발할 수 있다. 치수질환이 악화되어 치아의 뿌리와 치은까지 염증이 확산하면, 치근단 질환과 치주질환으로 확대될 수 있다. 본 발명에서 치료대상인 치수질환은 예컨대 상아질 지각과민증, 치수충혈, 치수염, 치수변성, 치수의 괴사 또는 치수의 괴저를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [68] 본 발명의 용어 "예방"이란, 본 발명의 펩타이드를 포함하는 치수질환 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여로 치수질환의 발생을 저해 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [69] 본 발명의 용어 "치료"란, 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 치수질환의 치료가 요구되는 개체에 투여하여 상아질 또는 치수조직의 재생을 촉진함으로써, 치수질환의 치료가 수행되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [70] 본 발명의 약학적 조성물은 (i) 상술한 본 발명의 펩타이드, 상기 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터의 치료학적 유효량(therapeutically effective amount); 및 (ii) 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [71] 상기 용어 "치료학적 유효량"은 본 발명의 조성물이 치수질환의 치료 또는 예방 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [72] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에

- 이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [73] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (21th ed., 2006, Williams & Wilkins)에 상세히 기재되어 있다.
- [74] 본 발명의 약학적 조성물은 치수질환을 치료하기 위한 적합한 모든 경로로 투여될 수 있으며, 예를 들어, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 치수질환이 발생한 부위에 직접 도포하거나 국소투여로 행할 수 있으며, 이외에도 정맥내 주입, 피하 주입, 근육내 주입, 복강내 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [75] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [76] 본 발명의 약학적 조성물의 1일 투여량은 0.00001-10,000 mg/kg이나, 이에 한정되지 않고, 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양한 투여량으로 투여될 수 있다.
- [77] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이 때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [78] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 치수질환의 치료 방법은 직접 치수복조법(direct pulp-capping)일 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 치수에 대한 다양한 치료방법, 예를 들어 치근단형성술(apexification), 치수보호술식(barrier technique), 간접 치수복조법(indirect pulp capping), 치수절단술(pulpotomy), 치근단절제술(pulpectomy), 치근단 주변의 경조직형성(hard tissue formation)유도, 골유도 재생술(guided bony regeneration, GBR) 및 치근천공 수복(perforation repair) 등에 이용될 수 있다. 구체적으로, 상아질이 손상되어 치수의 치아 신경이 노출됐을 때 본 발명의 조성물을 노출된 신경부위에 도포하여 치유를 돕고 이차적인 감염을 막아주는 치료법인 직접 치수복조법에 이용할 때, 효과적으로 치수질환을 치료할 수 있다.
- [79] 본 발명의 약제학적 조성물은 치수조직 또는 상아질의 재생 및 염증 반응을 조절할 수 있는 약물을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 약물은 히스톤 디아세틸라아

제(histone deacetylases) 저해제, 항산화제, 포스포리파아제(phospholipases) 및 사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase) 저해를 주요 작용으로 하는 소염제, Wnt 신호전달조절제 및 항생제를 포함할 수 있다. 구체적으로, 추가 가능한 약물은 트리코스타틴 A (trichostatin A), 부틸레이트(butyrate), 발프로익산(valproic acid), 아피시딘 (apicidin); N-아세틸 시스테인(N-acetyl cysteine); 아스피린(Aspirin), 타이레놀(Tylenol, acetaminophen), 이부프로펜(ibuprofen), 디클로페낙 (Diclofenac), 인도메타신(indomethacin), 케토프로펜(Ketoprofen), 볼타렌(Voltaren), 펠덴(feldene), 모빅(Mobic); 페니실린(penicillin), 세팔로스포린(cephalosporin), 카나마이신(kanamycin), 겐타마이신(gentamicin), 시소마이신(sisomicin), 에리트로마이신(erythromycin), 반코마이신(vancomycin), 타이코플라닌(teicoplanin), 퀴놀론(quinoline), 이소옥사졸(isoxazole) 유도체 및 리튬클로라이드(lithium chloride)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 약물일 수 있다.

- [80] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터의 치료학적 유효량을 치수질환 치료가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 치수질환의 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 상기 대상체는 인간 또는 인간을 제외한 포유동물을 포함할 수 있다.

[81] 근관충전재용 및 치수복조재용 조성물

- [82] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 근관충전재용 조성물을 제공한다.

- [83] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 치수복조재용 조성물을 제공한다.

- [84] 상기 조성물에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다. 본 발명에서 용어 “근관 충전(root canal capping)”은 치아의 우식치료에서 근관의 세척 후 형태 부여, 약제 처리 후 근관을 영구적으로 밀폐하는 것을 의미한다. 상기 근관 충전에 사용되는 근관 충전제는 근관 중심(core)을 채우는 거터퍼차(gutta-percha)와 전색을 담당하는 근관 충전 실러(root canal sealer)로 구분된다. 근관충전제는 치아의 치아우식증 치료과정에서 손상되거나 감염된 치수조직을 제거하고 절단된 치수조직의 상방에 넣어 신경과 세포가 풍부한 치관부 치수조직을 밀폐하기 위해 빈 공간을 직접 메우는 재료이다. 또한

상기 근관 충전 실러는 치아의 치아우식증 치료과정에서 빈 공간을 메운 뒤 근관을 밀폐하기 위해 사용되는 것으로, 치수나 치근단 조직에 미생물이 침입할 수 없게 하거나 근관 내에 잔존한 미생물을 가두어 차단하는 역할을 한다. 또한 근관 내에 존재하는 미세 치아 근관을 폐쇄하여 동통을 방지하는 역할을 한다. 바람직한 근관충전재는 생체 적합성, 우수한 밀봉 특성, 손상된 치수 조직의 재생을 촉진하는 활성이 있어야 한다.

- [85] 본 발명의 펩타이드는 상술한 바와 같이 치수세포의 행동 및 상아질모세포의 분화를 촉진하여 상아질, 특히 삼차 상아질의 재생을 촉진하는 활성을 가지므로, 근관충전재 또는 치수복조제에 포함되어 활성성분으로 사용될 수 있다.
- [86] 본 발명의 펩타이드는 상아질 재생용 조성물에서 설명된 내용을 원용하며, 중복하여 설명하지 않는다.
- [87] 본 발명의 근관충전재용 조성물은 치과용 근관충전재로 사용되는 재료를 더 포함할 수 있다.
- [88] 상기 근관충전재용 조성물은 예를 들어, 산화아연유지놀계 실러(zinc-oxide eugenol based sealer), 레진계 실러, 수산화칼슘계 실러, 글라스아이오노머계 실러(glass ionomer based sealer), 포르말데하이드 함유 실러, 거타퍼차(gutta-percha), 클로르퍼차(chloroperchar), 실리콘계 실러, MTA(mineral trioxide aggregate)계 실러, 칼슘-실리케이트-포스페이트계 바이오세라믹 실러, 또는 칼슘포스페이트 실러를 포함할 수 있다.
- [89] 상기 산화아연유지놀계 실러는 산화아연, 및 유지놀(eugenol)을 포함하거나, 산화아연, 레진, 및 유지놀을 포함할 수 있다. 상기 레진계 실러는 에폭시 레진계 실러, 또는 메타크릴레이트 레진계 실러를 포함할 수 있다. 상기 수산화칼슘계 실러는 산화아연 유지놀 및 수산화칼슘을 포함하거나, 레진 및 수산화칼슘을 포함할 수 있다.
- [90] 상기 근관충전재용 조성물은 예컨대, MTA(mineral trioxide aggregate), 거타퍼차, 산화 칼슘, 산화 아연, 레진, 에폭시 레진, 메타크릴레이트 레진, 유지놀, 산화 알루미늄, 규산 알루미늄, 이산화 규소, 실리콘, 살리실산염, 지방산, 글라스아이오노머, 탄산칼슘, 규산 칼슘, 규산 삼칼슘, 수산화 칼슘, 인산 제3칼슘, 인산 제4칼슘, 인산 제8칼슘, 수산화인회석, 콜라겐, 탈회냉동건조골, 인듐박 (indium foil), 황산칼슘, 상아질 또는 백아질삭편, 골삭편, 티타늄, 키토산, 테프론 (Teflon) 및 탄탈 중 적어도 하나를 더 포함할 수 있다.
- [91] 또한, 상기 근관충전재용 조성물은 산화바륨, 황산바륨, 산화지르코늄, 산화탄탈륨, 산화이트륨 및 텅스텐산 칼슘 중 선택된 적어도 하나의 조영제를 더 포함할 수 있다. 이때, 조영제는, 방사선 불투과성을 부여하여 방사선 사진에서 상기 근관 충전재용 조성물의 관찰이 가능하도록 할 수 있다. 그러나, 전술한 것에 제한되지 않고 본 발명의 근관충전재용 조성물은 보다 다양한 첨가물을 더 포함할 수 있다.

- [92] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 근관에 위치시키는 단계를 포함하는 근관충전(root canal capping) 방법을 제공한다.
- [93] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 근관에 위치시키는 단계를 포함하는 근관충전 방법을 제공한다.
- [94] 본 발명은 치수복조제(pulp-capping agent)용 조성물을 제공한다.
- [95] 본 발명에서 치수복조제는 치아의 보존적 치료인 부분치수절단법에서 치수노출치아의 생활력을 유지하기 위해 노출된 치수조직을 제거하고 절단된 치수조직의 상방에 적용하는 재료를 의미한다.
- [96] 상기 치수복조제용 조성물은 상술한 근관충전제용 조성물에 첨가되는 재료와 동일한 재료를 더 포함할 수 있으며, 상기 치수복조제용 조성물에서 더 포함되는 재료는 근관충전제용 조성물에서 설명된 첨가되는 재료에 관한 내용을 원용하며 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복하여 설명하지 않는다.
- [97] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 치수에 위치시키는 단계를 포함하는 치수복조(pulp-capping) 방법을 제공한다.
- [98] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 1의 아미노산 서열(RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 치수에 위치시키는 단계를 포함하는 치수복조 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [99] 본 발명의 비트로벡틴 유래 기능성 펩타이드를 이용하여 치수세포의 세포부착, 세포퍼짐, 세포이동을 증가시키고, 치수세포에서 상아질모세포로의 분화를 촉진할 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 펩타이드는 상아질 재생을 촉진하는 활성을 가지므로, 상아질의 재생과 관련된 치과용 재료, 예를 들어 근관충전제, 치수복조제의 활성성분으로 유용하게 사용될 수 있고, 치수질환 치료제로도 사용될 수 있다.
- [100] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [101] 도 1a는 무혈청 배지에서 펩타이드 처리된 플레이트에 1시간동안 부착시킨 hDPC 인간치수세포(상단 패널)와 3시간 후 인간치수세포의 퍼짐(하단 패널)을 보여주는 것이다.
- [102] 도 1b는 고정된 펩타이드에 대해 인간치수세포의 세포 부착 및 확산 정도를 정량화한 것이다.
- [103] 도 1c는 수평 이동을 유도하기 위해 80% 컨플루언스(confluence)된 인간치수세포에 스크래치 자극을 가한 뒤, 스크래치 상처 이동을 보여주는 것이다.
- [104] 도 1d는 스 인간치수세포에 스크래치 자극을 가하고 0, 24 및 48시간 후, 세포의 이동 영역을 측정한 결과이다.
- [105] 도 1e는 인간치수세포에 VnP-16 펩타이드를 처리하여 24 및 48시간이 지난 후 세포의 생존능을 보여주는 결과이다.
- [106] 도 2a 내지 도 2e는 VnP-16 펩타이드가 인간치수세포의 상아질모세포-유사 세포로 분화 및 석회화를 촉진시키는 활성을 보여주는 실험결과를 나타낸 것이다.
- [107] 도 2a는 인간치수세포에 VnP-16 펩타이드를 처리하여 7일 동안 치성 분화를 유도한 후 알칼리인산분해효소(ALP) 염색을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- [108] 도 2b는 인간치수세포에 VnP-16 펩타이드를 처리하여 21일 동안 치성 분화를 유도한 후 Alizarin Red S(ARS) 염색을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- [109] 도 2c는 치성 분화가 유도된 인간치성세포의 알칼리포스파타제(ALP) 염색 결과를 정량화한 것이다.
- [110] 도 2d는 치성 분화가 유도된 인간치성세포의 Alizarin Red S(ARS) 염색 결과를 정량화 한 것이다.
- [111] 도 2e는 치성 분화를 유도한 후 3, 7, 14일차에 세포를 수확하여 ALP, DMP1 및 DSPP 유전자에 대하여 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- [112] 도 3a는 쥐의 치수 노출 수술 2주 후, 노출된 치수부위에서 염증반응을 조직학적으로 정량 분석한 결과이다.
- [113] 도 3b는 쥐의 치수 노출 수술 2주 후, 노출된 치수부위에서 수복 상아질 형성 정도를 조직학적으로 정량 분석한 결과이다.
- [114] 도 3c는 쥐의 치수 노출 수술 2주 후, 노출된 치수 부위를 H&E 염색한 후의 단면을 나타낸 것으로, 모든 그룹에서 경미한 정도의 염증 반응을 확인할 수 있었으며, MTA 그룹과 VnP-16 그룹을 제외한 모든 그룹에서 경조직이 형성되지 않음을 확인할 수 있었다.
- [115] 도 4a는 쥐의 치수 노출 수술 4주 후, 노출된 치수 부위에서 염증반응을 조직학적으로 정량 분석한 결과이다.
- [116] 도 4b는 쥐의 치수 노출 수술 4주 후, 노출된 치수부위에서 수복 상아질 형성 정도를 조직학적으로 정량 분석한 결과이다.
- [117] 도 4c는 쥐의 치수 노출 수술 4주 후, 노출된 치수 부위를 H&E 염색한 후의 단면을 나타낸 것으로, 모든 그룹에서 경조직이 형성되었으나 특히 VnP-16 그룹에

서 양성 대조군인 MTA 그룹이나 rhBMP-2 그룹에 비해 더 두껍고 균일하게 수복 상아질이 형성되었다.

[118] 도 5는 쥐의 치수 노출 수술 2주 후, 항-DSP 항체를 이용하여 면역조직화학염색 한 결과를 나타내 것으로, 레진 단독 그룹을 제외한 모든 그룹에서 DSP가 세포를 따라 흩어져 검출되었다. MTA 그룹과 VnP-16 그룹은 석회화된 조직 내부에서 높은 강도를 나타내었다

[119] 도 6은 쥐의 치수 노출 수술 4주 후, 항-DSP 항체를 이용하여 면역조직화학염색 한 결과를 나타내 것이다. 4주차에 레진 단독 그룹은 염색이 되지 않았다. 경조직이 형성됨에 따라, 노출된 치수의 중심에서 염색 정도가 감소하였으며 오히려 대부분의 그룹에서 경조직을 둘러싼 세포가 염색된 것이 관찰되었다.

[120]

발명의 실시를 위한 형태

[121] 이하, 본 출원을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 출원을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 출원의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[122] **[실시예 1]**

[123] **펩타이드(peptide) 및 시약의 준비**

[124] 본 발명의 모든 펩타이드(peptide)는 Pioneer 펩타이드 합성기(Applied Biosystems)에서 C-말단에 아마이드(amide)와 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-기반 고체상 방법을 이용하여 합성하였다. 펩트론(Peptron)사(대전, 한국)에서 펩타이드를 정제하고, 특징을 분석하였다. 본 발명에 사용된 모든 펩타이드의 순도는 97% 이상이였다. 실험에서는 본 발명의 VnP-16 펩타이드(RVYFFKKGKQYWE: 서열번호 1)를 실험군으로 사용하였고, Millipore(Bedford, MA, USA)에서 구입한 인간 혈장 비트로넥틴을 양성 대조군으로, 망가진 펩타이드(scrambled peptide; SP)(FVWRQFYKYEKG: 서열번호 3)를 음성 대조군으로 사용하였다.

[125] **[실시예 2]**

[126] **세포 배양**

[127] hDPC(human dental pulp cell, 인간치수세포)는 서울대학교 치과병원(IRB No. CRI19007)의 IRB(Institutional Review Board)의 환자 동의 및 승인을 받아 환자의 제3대구치에서 수집하였다. hDPC는 10% 소태아혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(10,000U/ml 페니실린, 10,000 μ g/ml 스트렙토마이신; Gibco, Paisley, Scotland)이 첨가된 DMEM 배지(Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)에서 3회 계대 배양하였다. 이후, hDPC는 치성(odontogenic) 분화를 유도하기 위해 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 10mM 글리세롤-2-인산(β -glycerophosphate), 200 μ M 아스코르브산, 0.1 μ M 덱사메타손(dexamethasone)이 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다.

[128] **[실시예 3]**

[129] 세포 생존능 분석

[130] hDPC의 생존능을 Cyttox Cell Viability Assay Kit (DoGenBio, Seoul, Korea)를 사용하여 VnP-16 존재하에서 조사하였다. 96웰 배양 플레이트에 VnP-16을 50, 100 및 200 μ g/ml의 농도로 처리한 다음, 각 웰에 1.5×10^4 세포를 플레이트팅하고 37°C에서 24시간 또는 48시간동안 배양하였다. 수용성 테트라졸륨염 시약(10 μ l)을 각 웰에 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 마지막으로 마이크로플레이트 리더(Epoch2, Bio- Tek, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[131] [실시예 4][132] hDPC 세포 부착 및 퍼짐 분석

[133] 먼저, 세포 부착 분석을 위해 48-웰 배양 플레이트를 4°C에서 24시간 동안 인간 혈장 비트로넥틴 (0.26 μ g /cm²)으로 코팅하였다. SP 및 VnP-16(10.5 μ g/cm²)도 실온에서 24시간 동안 건조하여 플레이트에 코팅하였다. 세포 부착 분석은 용량-반응 곡선으로부터 결정하였고, 최대 부착을 나타내는 최저 농도를 사용하였다. 펩타이드로 코팅된 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 1% 열불활성화 소혈청 알부민(BSA)이 첨가된 PBS로 차단한 후, 다시 PBS로 세척하였다. hDPC 세포(5×10^4 cell/250 μ L)를 각 플레이트에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 배양한 후, 플레이트를 PBS로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포를 10% 포르말린으로 15분 동안 고정하고 0.5% 크리스탈 바이올렛으로 1시간 동안 염색하였다. 이후 플레이트를 2차 증류수로 부드럽게 3회 세척하였고, 이후 각 well의 내용물을 2% 도데실 황산 나트륨(sodium dodecyl sulfate)에 5분간 용해시킨 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[134] 또한, 세포 퍼짐 분석을 위해, 상기와 같은 방법으로 펩타이드가 코팅된 각 플레이트에 hDPC 세포(3×10^4 cell/250 μ L)를 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 부착된 세포를 10% 포르말린으로 고정하고 0.5% 크리스탈 바이올렛으로 1시간 동안 염색하였다. 그런 다음, 플레이트를 PBS로 부드럽게 3회 세척한 후 Image Pro Plus 소프트웨어(버전 4.5; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)를 사용하여 세포의 표면적을 측정하여 세포 퍼짐 정도를 평가하였다.

[135] [실시예 5][136] 스크래치 상처 이동 분석

[137] hDPC의 이동 능력 및 상처 회복능력을 평가하기 위해 스크래치 분석을 수행하였다. 24웰 플레이트에서 hDPC를 플레이트팅하여 완전 배지에서 80% 컨플루언스(confluence)시기까지 배양하였다. 그 후, 무혈청배지에서 24시간 계대배양한 후에 200 μ l 피펫 팁으로 스크래치 자극을 가하였다. PBS로 배지를 세척하여 세포 파편을 제거한 후, 세포 배양물에 비히클(10% DMSO), 비트로넥틴(1.25 μ g/ml), SP(50 μ g/ml) 또는 VnP-16(50 μ g/ml)를 처리하였다. 처리 후 0, 24 및 48시간이 지났을 때 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 사진을 찍었다. Image Pro Plus 소프트웨어(버전 4.5; Media Cybernetics, MD, USA)를 사용하여 데이터를 분석하여

0시간부터 48시간까지 시점까지의 스크래치 폐쇄율을 비교하였다. 스크래치 폐쇄율(%) = $[A(0) - A(t)/A(0)] \times 100$ 의 식으로 계산하였다. 여기서 초기 스크래치 면적은 "A(0)"이고 배양 시간(t) 후의 면적은 "A(t)"으로 하였다. 스크래치 상처 이동 분석은 3번 수행하였다.

[138] **[실시예 6]**

[139] **알칼리인산분해효소(Alkaline phosphatase, ALP) 및 Alizarin red S(ARS) 염색**

[140] ALP 염색은 Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)/ALP 이중 염색 키트 (Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 치성(odontogenic) 유도 후 7일차에 수행하였다. ARS 염색은 치성 유도 후 3주차에 수행하였다. ARS 염색을 위해 세포를 -20°C에서 30분 동안 ice-cold 95% 에탄올로 고정한 후, 40 mM Alizarin red S 용액(pH 4.2)으로 1시간 동안 염색하였다. 염색된 세포를 2차 증류수로 5회 세척한 후 PBS로 15분 동안 세척하였다. 광상을 시각화하기 위해 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 플레이트를 촬영하였다.

[141] **[실시예 7]**

[142] **정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)**

[143] 인간 치수세포(hDPCs)의 전체(total) RNA의 분리는, RNeasy® MiniKit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지시서에 따라 수행하였다. cDNA는 SuperScript® IV 역전사 효소(Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 준비하고, 특정 마커 유전들에 대한 PCR 증폭을 수행하였다. cDNA를 SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara)를 사용하고, 아래 [표 1]의 각각의 프라이머를 200 nM의 농도로 사용하여 증폭하였다. CT(cycle threshold) 값을 Sequenced Detection Software (version 1.3; Applied Biosystems)을 사용하는 자동화 역치 분석에 의해 결정하고, Microsoft Excel를 사용하여 추가 분석하였다. 각 표적 mRNA의 상대 발현 수준은 comparative cycle threshold 방법을 사용하여 제조사(Applied Biosystems)의 프로토콜에 따라 분석하였다.

[144] **[표 1]**

서열번호	유전자	프라이머	염기서열(5'→3')
4	GAPDH	Forward	GTATCCGTTGTGGATCTGAC
5		Reverse	TGTTGAAGTCACAGGAGACA
6	ALP	Forward	ACTGGTACTCGGACAATGAG
7		Reverse	AGACATAGTGGGAGTGCTTG
8	DMP-1	Forward	CACACAGTCCAGTGAAGACA
9		Reverse	ACCCGATATTCCTCACTCTC
10	DSPP	Forward	CAGAGGTCAGGGTTCAGTTA
11		Reverse	GAGATTCTGGTTGTCCTGTG

12	OC	Forward	CTCTCTCTGCTCACTCTGCT
13		Reverse	CGGAGTCTATTACACCT
14	RUNX2	Forward	TACTTCGTCAGCGTCCTATC
15		Reverse	CCAGACAGACTCATCCATTC

[145] [표 1에서, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ALP: alkaline phosphatase; DMP-1: dentin matrix protein-1; DSPP: dentin sialophosphoprotein; OC: osteocalcin; RUNX2: runt-related transcription factor 2]

[146] [실시예 8]

[147] 쥐(Rat) 치아 치수 노출

[148] 7주령 수컷 Sprague-Dawley 쥐(rat)는 서울대학교 동물관리위원회(No. SNU-180109-2)의 승인을 받고 OrientBio에서 구입하였다. 쥐를 표준 동물 사육 조건(음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있는 12시간 명암 주기)에서 1주일 동안 순응시킨 후 치수 복조(pulp-capping) 시술을 위해 무작위로, 자가 접착성 레진 시멘트(Resin) 그룹, ProRoot MTA(MTA) 그룹, 비히클(Veh) 그룹, rhBMP-2 그룹, SP 그룹, 및 VnP-16 그룹의 6개 그룹으로 나누었다. 레진(Resin) 그룹과 비히클(Veh) 그룹은 음성 대조군으로, MTA 그룹과 rhBMP-2 그룹은 양성 대조군으로 사용하였다. 모든 실험군에서 레진 시멘트(Rely X U-200, 3M ESPE, MN, USA)를 최종 수복물로 사용하였다.

[149] 구체적으로, 쥐에 31.25 mg/kg tiletamine/zolazepam 및 8.75 mg/kg 자일라진(xylazine)을 복강내 주사하여 마취시켰다. 전신마취를 확인한 후 맞춤형 와이어로 구강을 개방하여 하악 제1대구치를 노출시켰다. 3% H₂O₂와 10% 포비돈 요오드를 적신 면으로 세척 및 소독한 후에, 고속 핸드피스에 장착된 #1/4 원형 버(bur)(직경 0.5mm)를 사용하여 교합면 중앙을 조심스럽게 천공하였다. MTA(ProRoot MTA, Dentsply Sirona, York, PA, USA)는 제조업체의 지침에 따라 혼합하여 노출된 치수에 도포하였다. 흡수성 콜라겐 스폰지(BiolandKorea, 천안, 한국)에 비히클(DMSO 10μL 및 DDW 5μL)(비히클(Veh) 그룹), rhBMP-2(스캐폴드당 2μg, 15μL 부피; Pepro-Tech, Rocky Hill, NJ, USA)(rhBMP-2 그룹), 또는 합성 펩타이드인 SP 또는 VnP-16 (스캐폴드당 2mg, 15μL 부피)(SP 및 VnP-16 그룹)를 각각 흡수시킨 다음 노출된 치수에 도포하였다. 천공된 부위는 MTA 또는 콜라겐 스폰지를 도포한 후 레진 시멘트로 덮었다. 레진 그룹에는 레진 시멘트를 천공 부위에 직접 도포하였다. 저작에 의한 치아 파절을 방지하기 위해 상악 대구치와 하악 제1대구치의 날카로운 교두 끝을 축구공 모양의 다이아몬드 버(bur)를 사용하여 연마하였다.

[150] [실시예 9]

[151] 조직학적 분석

[152] 치수 노출 수술 후 2주와 4주 후에 쥐를 조직학적으로 분석하였다. 전체 하악골을 4°C에서 24시간 동안 4% 파라포름알데히드에 고정하였다. 조직학적 염색을

위해 표본을 12% EDTA로 4주간 석회질을 제거하고 파라핀에 포매(embedding)하였다. 파라핀 포매된 샘플을 5 μm 두께로 박편한 다음, 제조사 프로토콜에 따라 이 박편에 항-DSP(MABT37; Millipore, Billerica, MA, USA)을 처리한 뒤 샘플을 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 용액으로 대조염색하고 현미경으로 관찰하였다. 하기 [표 2]에 제시된 기준에 따라 각 샘플을 평가하고 염증 반응 및 경조직 형성에 대해 점수를 매겼다. 본 실험에서는 기존 상아질 하부의 재생된 상아질과는 구분되는, 치수가 노출된 부위의 하부에 형성된 수복 상아질을 평가하였다.

[153] [표2]

점수	염증세포 침투	경조직 형성
1	없음(none): 염증성 세포가 없거나 매우 적음	다량(heavy): 연속적인 상아질 다리가 노출된 치수부위를 완전히 수복함.
2	경증(mild): 상아질 다리 또는 치수 노출 부위 옆에만 염증성 세포/근관 치수 조직의 1/3까지 도달	보통(moderate): 불연속적인 상아질 다리가 형성되어 노출된 치수부위의 절반 이상이 수복됨. 그러나 완전히 수복되지는 않음.
3	중등증(moderate): 관부치수 조직에서 근관 치수 조직의 최대 3분의 2까지 염증성 세포가 관찰됨	약간(slight): 노출된 치수 부위에서 50% 미만의 분산된 상아질 다리 형성.
4	중증(severe): 모든 관부치수/근관 치수 조직의 3분의 2 이상이 침투하거나 괴사함	없음(none): 경조직 형성 없음.

[154] [실시예 10]

[155] 통계 분석

[156] 본 발명의 실시예에서 실험한 모든 데이터는 평균 $\pm$ S.D.로 나타내었고, 결과의 통계학적 분석은 STATISTICA 6.0 소프트웨어 패키지(StatSoft)를 이용하여 수행하였다. 분산 테스트의 분석을 이용하여 결과를 비교하였다. 중요한 차이점이 발견되었을 때, Scheffe's 조정을 이용하여 쌍으로 비교를 수행하였다. Two-tailed Student's t-테스트를 이용하여 통계학적 유의성을 계산하였다. 0.05 미만의 P 값의 차이는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[157] [실시예 11]

[158] 시험관 내에서 hDPC의 부착, 퍼짐 및 상처 이동을 촉진하는 VnP-16.

[159] VnP-16이 hDPC 행동을 유도할 수 있는지 여부를 조사하기 위해, 상술한 실시예에 따라, hDPC 세포 부착, 세포 퍼짐 및 스크래치 상처 이동 분석을 수행하였다. 그 결과, 인간 혈장 비트로넥틴은 세포 부착 및 퍼짐을 강력하게 촉진하였다. 또한, VnP-16은 BSA 대조군 및 SP 대조군보다 더 높은 수준으로 세포 부착 및 퍼짐을 유도했으며, 이는 비트로넥틴과 유사한 수준으로 확인되었다(도 1a 및 도

1b). 또한, 스크래치 분석 결과 비트로넥틴과 VnP-16이 hDPC의 상처 이동을 강력하게 촉진한다는 것을 확인하였다(도 1c 및 도 1d). 또한, VnP-16은 hDPC에 대한 세포독성이 없어 세포적합성이 있는 것으로 확인되었다(도 1e). 이러한 실험결과 는 VnP-16이 hDPC의 세포 부착 및 퍼짐을 촉진하는 데 중요한 역할을 하는 활성을 갖는 펩타이드임을 입증한다.

[160] [실시예 12]

[161] **hDPC의 상아질모세포-유사 세포로의 분화 및 석회화를 촉진하는 VnP-16**

[162] VnP-16이 상아질모세포 분화에 미치는 영향을 평가하기 위해 hDPC를 조골 세포 분화 배지(Cell Applications, San Diego, CA, USA)에서 7일(ALP) 또는 21일(ARS) 동안 배양하였다. VnP-16은 비트로넥틴과 유사한 수준으로 ALP 염색 및 ARS 염색이 증가하여 치성(odontogenic) 분화 및 석회화가 진행됨을 확인할 수 있었다(도 2a 내지 도 2d). 또한, qRT-PCR 결과, VnP-16이 *ALP*, *DMP-1* 및 *DSPP*를 포함한 치성 마커를 상향 조절하는 것으로 확인되었다(도 2e). 이러한 실험결과는 VnP-16 펩타이드가 비트로넥틴과 유사한 정도로 hDPC의 분화 및 석회화를 촉진한다는 것을 의미한다.

[163] [실시예 13]

[164] **생체 내 수복 상아질 형성을 촉진하는 VnP-16**

[165] 쥐의 치수 노출 모델에서 수복 상아질 형성을 유도하는 VnP-16의 생체 내 잠재력을 조사하고 염증성 치수 반응을 평가하였다(도 3 및 도 4).

[166] 치수 노출 수술 후 2주차에는 레진 단독 그룹을 제외하고는 심한 치수 염증성 반응을 보이는 표본은 없었다. rhBMP-2 그룹은 50%(표본 6개 중 3개 표본)에서 중등증(moderate)의 염증 반응이 나타났고, 수지 단독 그룹(표본 3개), 비히클 그룹(표본 6개) 및 MTA 그룹(표본 4개) 들은 1개 표본에서 중등증의 염증 반응이 나타났다(도 3a). 레진 단독 그룹, 비히클 그룹, rhBMP-2 그룹, SP 그룹에서는 치수 노출 부위에서 새로 형성된 석회화된 조직이 거의 검출되지 않은 반면(도 3b), MTA 그룹에서는 표본 4개 중 3개, VnP-16 그룹은 표본 6개 중 1개에서 치수 노출 부위를 완전히 덮는 수복 상아질이 형성되었다(도 3c, 하단 패널). MTA 그룹과 VnP-16 그룹에서 치수를 따라 배열된 세포는 치수 쪽으로 치우쳐진 핵을 가지는 구조를 가지고, 형성된 경조직 다리와 치수 사이의 경계에 정렬되어 있어 상아질 모세포(odontoblast)와 유사함을 알 수 있었다.

[167] 치수 노출 수술 후 4주차에, 레진 단독 그룹의 75%(4개 중 3개)는 중등증(moderate)에서 중증(severe)의 염증 반응을 보였고, 나머지 그룹은 67%에서 100%까지 염증 반응이 경증(mild)하거나 전혀 나타나지 않았다(도 4a). 모든 그룹에서 약간(slight) 또는 다량(heavy)의 수복상아질 형성 경향을 보였으나, 레진 단독 그룹의 1개, 비히클 그룹의 1개 표본에서는 상아질 형성이 관찰되지 않았다. rhBMP-2 그룹과 VnP-16 그룹의 표본 모두 보통(moderate) 및 다량(heavy) 정도의 수복 상아질 형성을 보여주었다(도 4B). 또한, MTA, rhBMP-2, SP 및 VnP-16 그룹은 4주차에 비슷한 수복 상아질 형성 수준을 보였지만, 수복 상아질의 품질은 그

룹마다 차이가 있었다(도 4c). SP 그룹의 모든 표본은 경조직이 형성되었지만 관이 없고(non-tubular), 큰 세포-포함 구조를 포함하였다. VnP-16 그룹은 양성대조군인 MTA 그룹과 rhBMP-2 그룹에 비해 더 두껍고 균일한 수복 상아질이 형성된 것이 관찰되었다.

- [168] 또한, 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, DSP에 대한 면역조직화학 염색은 상기 H&E 염색 결과와 일치하는 결과를 확인할 수 있었는데, 모든 그룹에서 상아질과 새로 형성된 경조직 주변에서 중요한 염색 패턴을 보였다. 이러한 실험결과들은 VnP-16 펩타이드가 염증 반응 없이 수복 상아질 형성을 촉진하는 활성이 비트로넥틴보다 우수하고, MTA 및 rhBMP2에 필적하는 정도임을 의미한다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열 (RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 상아질 재생용 조성물.
- [청구항 2] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 상기 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 상아질 재생용 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 상아질은 수복 상아질 또는 반응 상아질인 것인 상아질 재생용 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 상아질은 치수가 노출된 것인 상아질 재생용 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 치수세포의 상아질모세포 (odontoblast) 또는 상아질모세포-유사 세포(odontoblast-like cell)로의 분화를 촉진하는 것인, 상아질 재생용 조성물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 치수세포의 행동을 촉진하는 것인, 상아질 재생용 조성물.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 치수세포의 행동은 치수세포의 부착, 퍼짐 또는 이동인 것인, 상아질 재생용 조성물.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 치수세포 또는 상아질의 석회화를 촉진하는 것인 상아질 재생용 조성물.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 ALP, DMP-1 및 DSPP로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현을 증가시키는 것인, 상아질 재생용 조성물.
- [청구항 10] 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열 (RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 치수질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 치수질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 청구항 10에 있어서, 상기 치수질환은 상아질 지각과민증, 치수충혈, 치수염, 치수변성, 치수의 괴사 또는 치수의 괴저인 것인, 치수질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열 (RVYFFKKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산

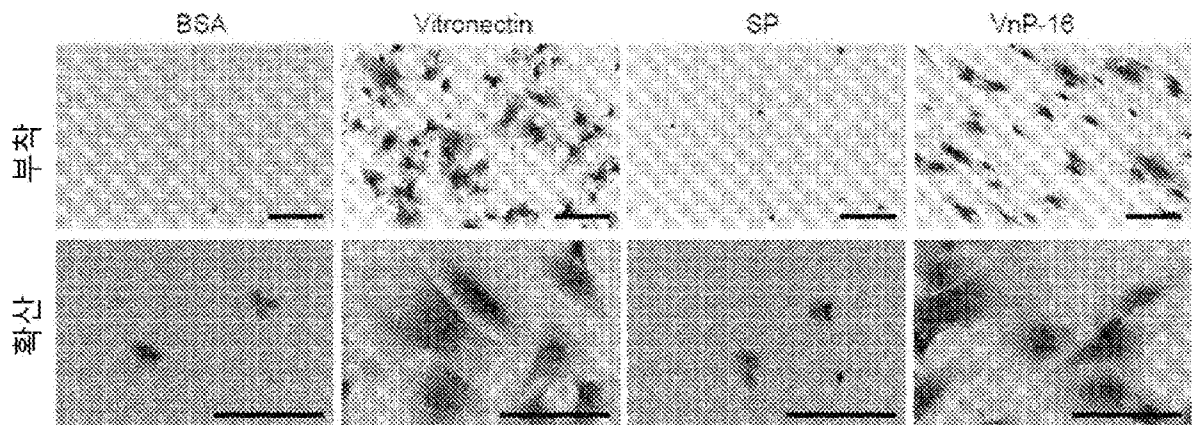
서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 근관충전재용 조성물.

[청구항 14] 청구항 13에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것인, 근관충전재용 조성물.

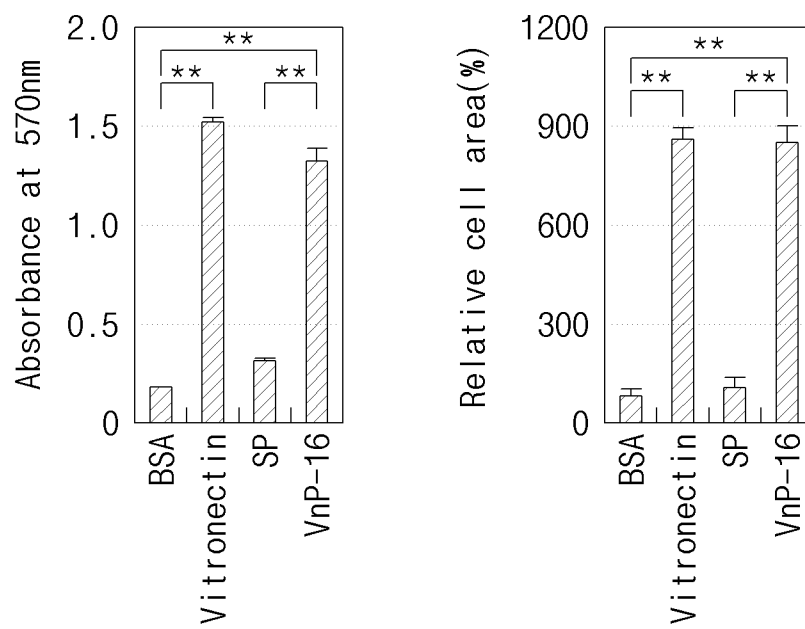
[청구항 15] 서열번호 2의 아미노산 서열내의 서열번호 1의 아미노산 서열 (RVYFFKGKQYWE)을 포함하는 연속하는 12개 내지 173개의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 치수복조재용 조성물.

[청구항 16] 청구항 15에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드인 것인, 치수복조재용 조성물.

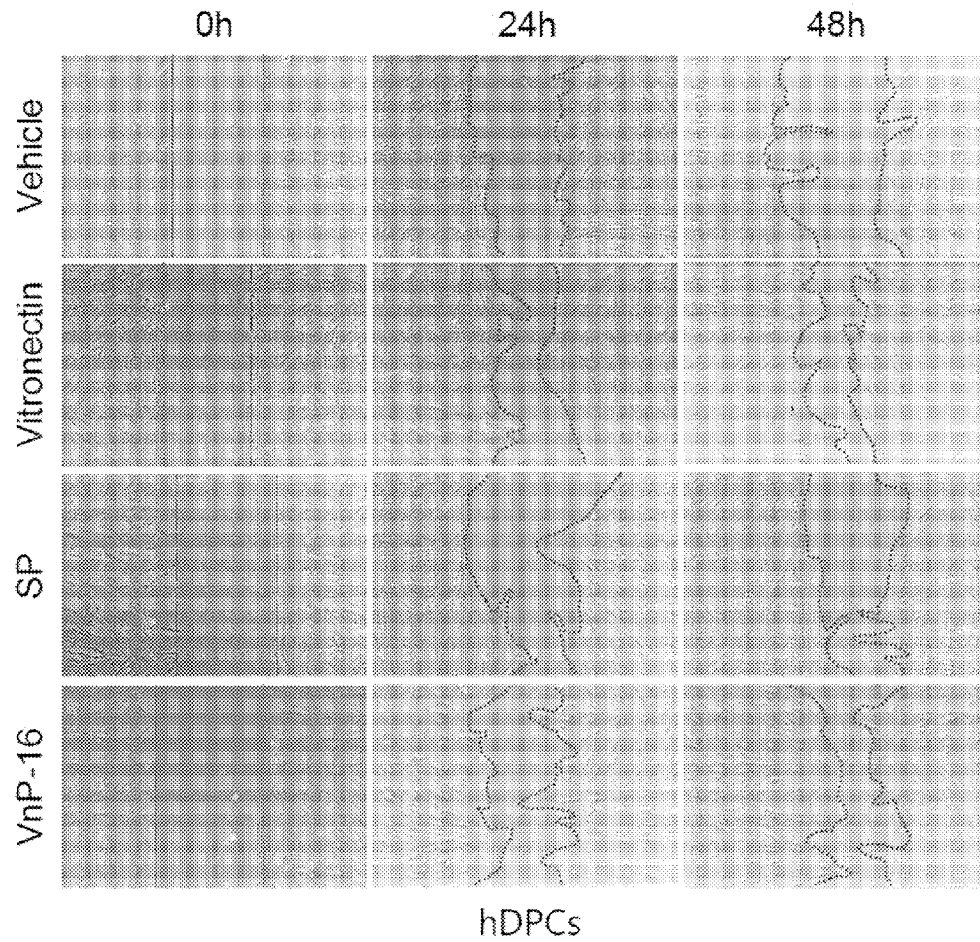
[도1a]



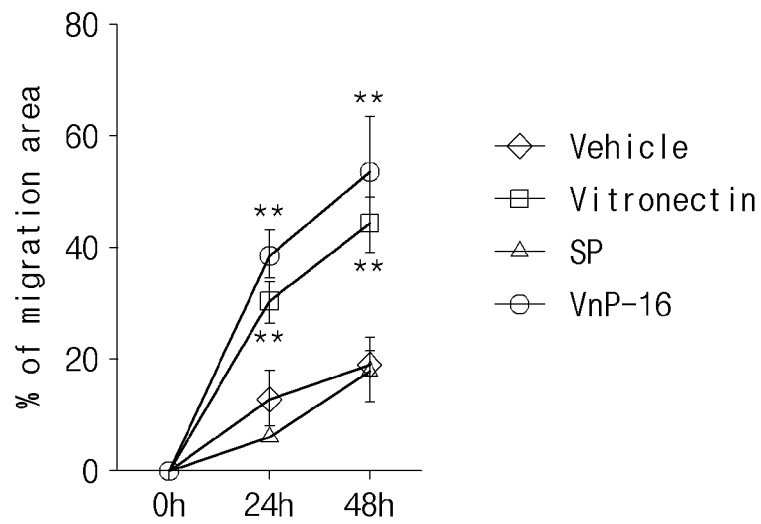
[도1b]



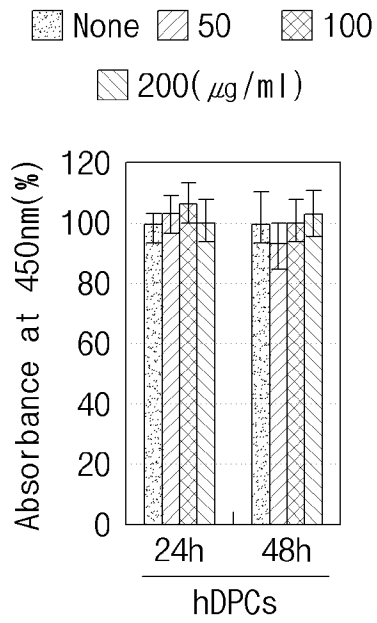
[도1c]



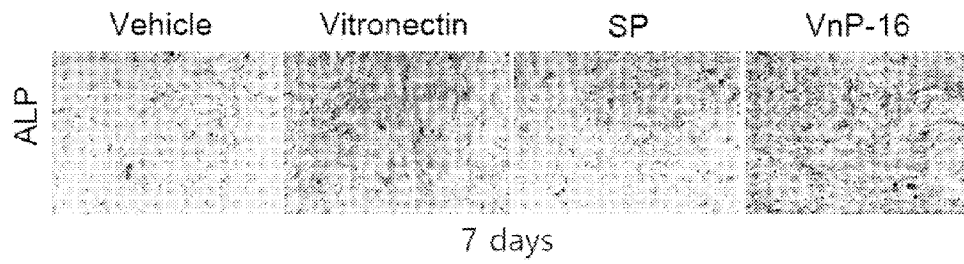
[도1d]



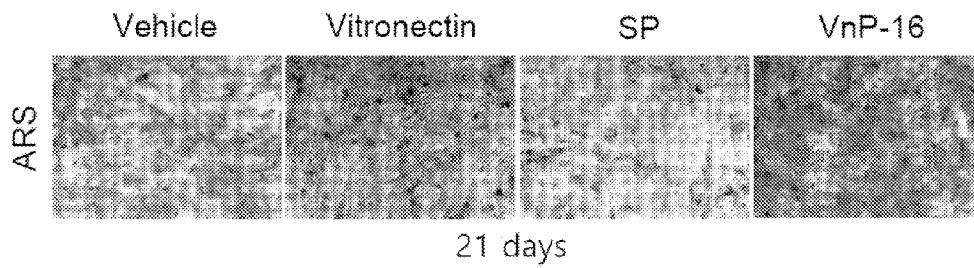
[도1e]



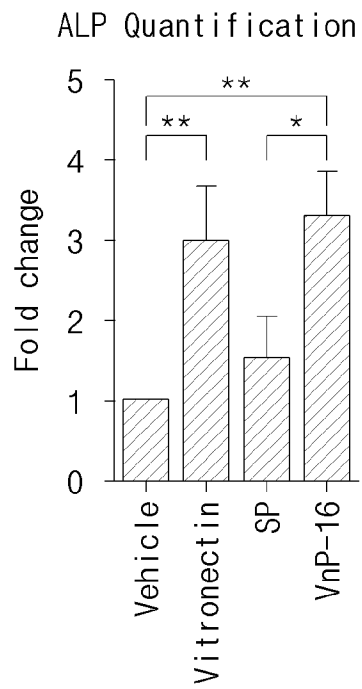
[도2a]



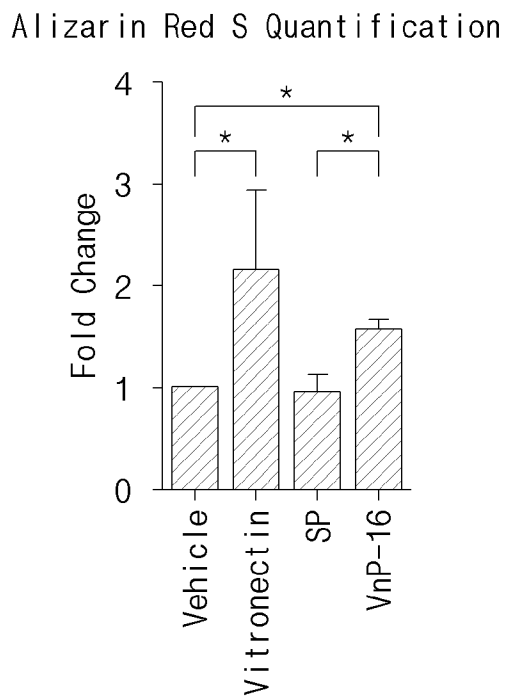
[도2b]



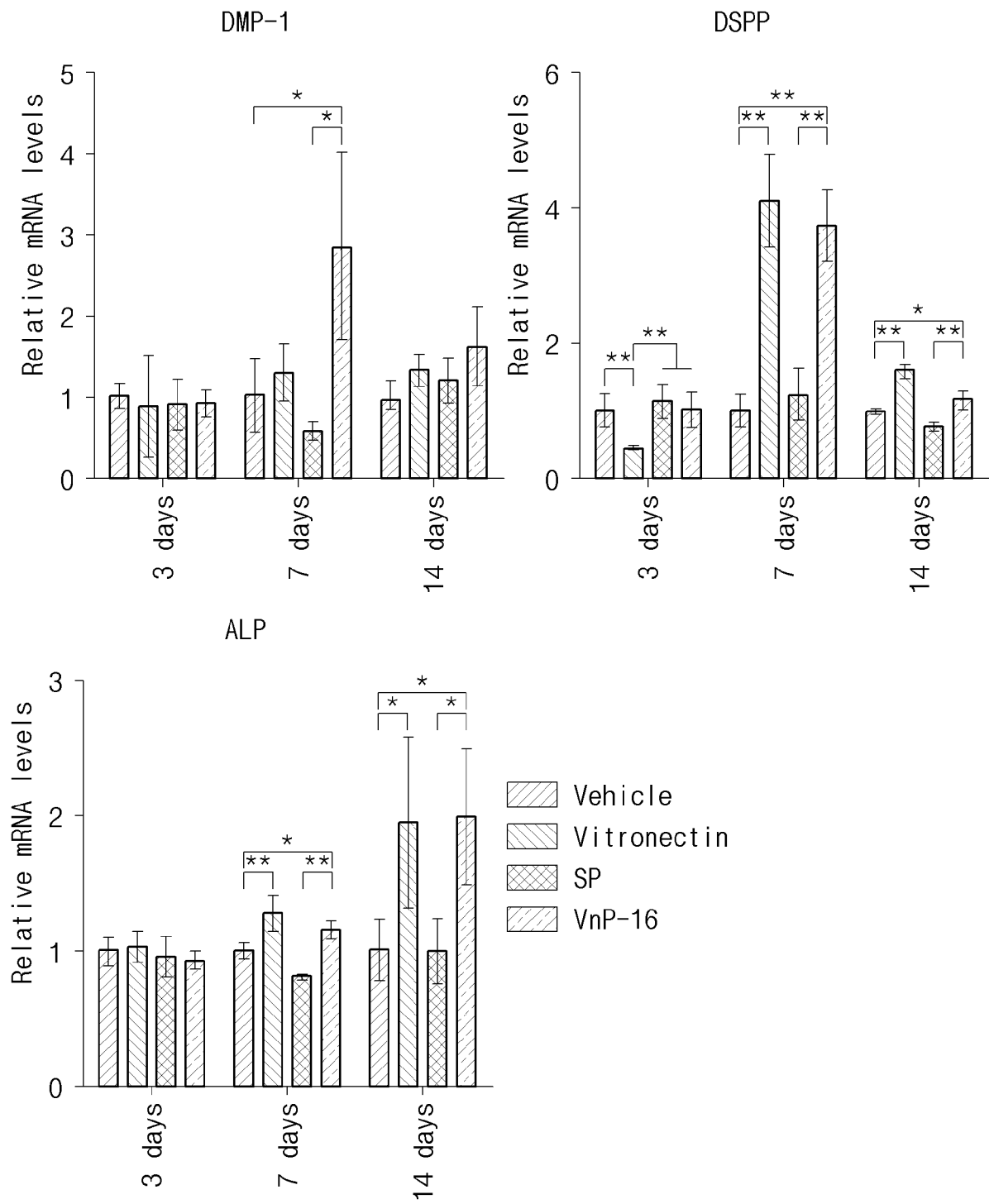
[도2c]



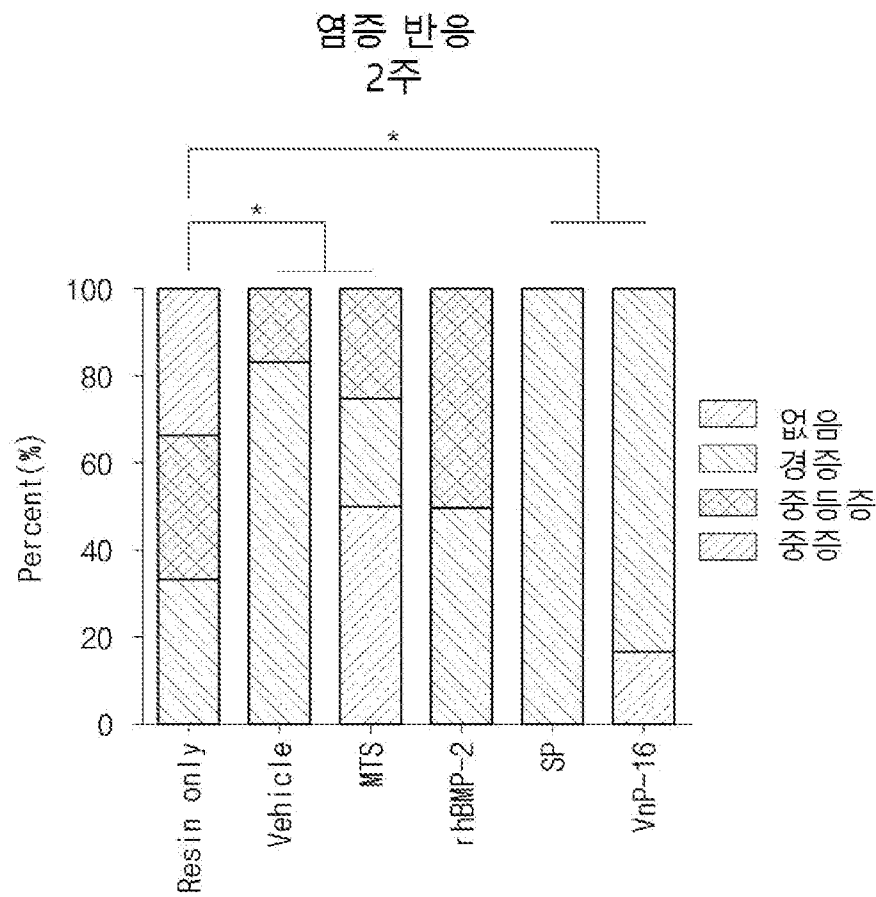
[도2d]



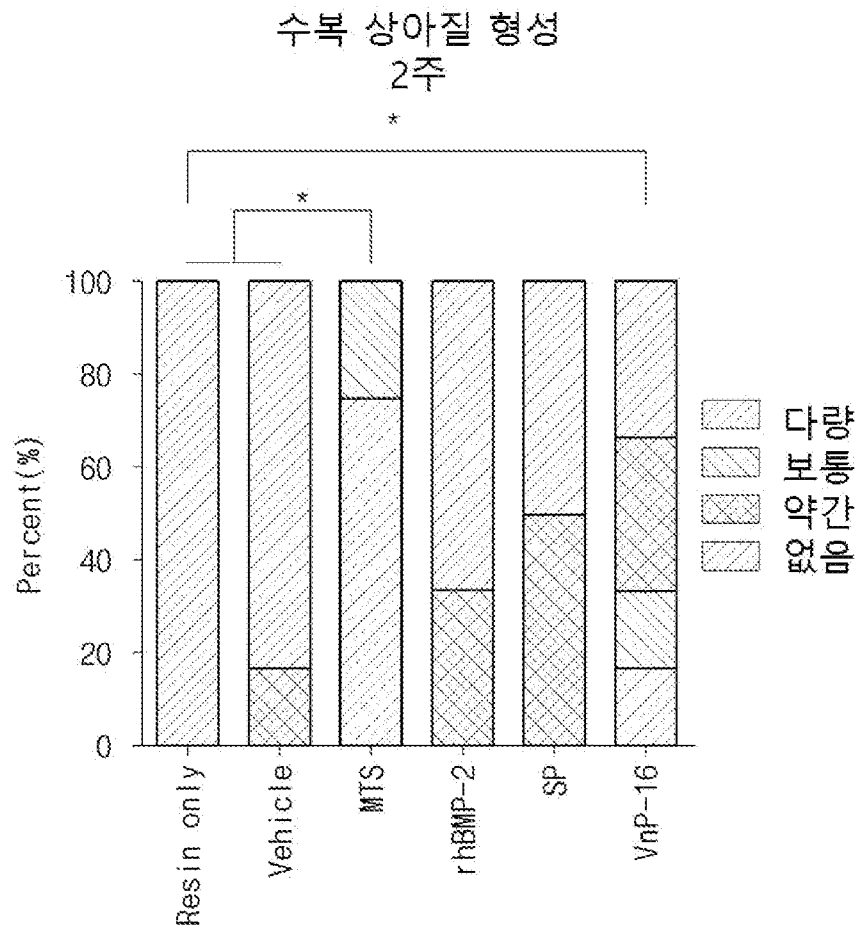
[도2e]



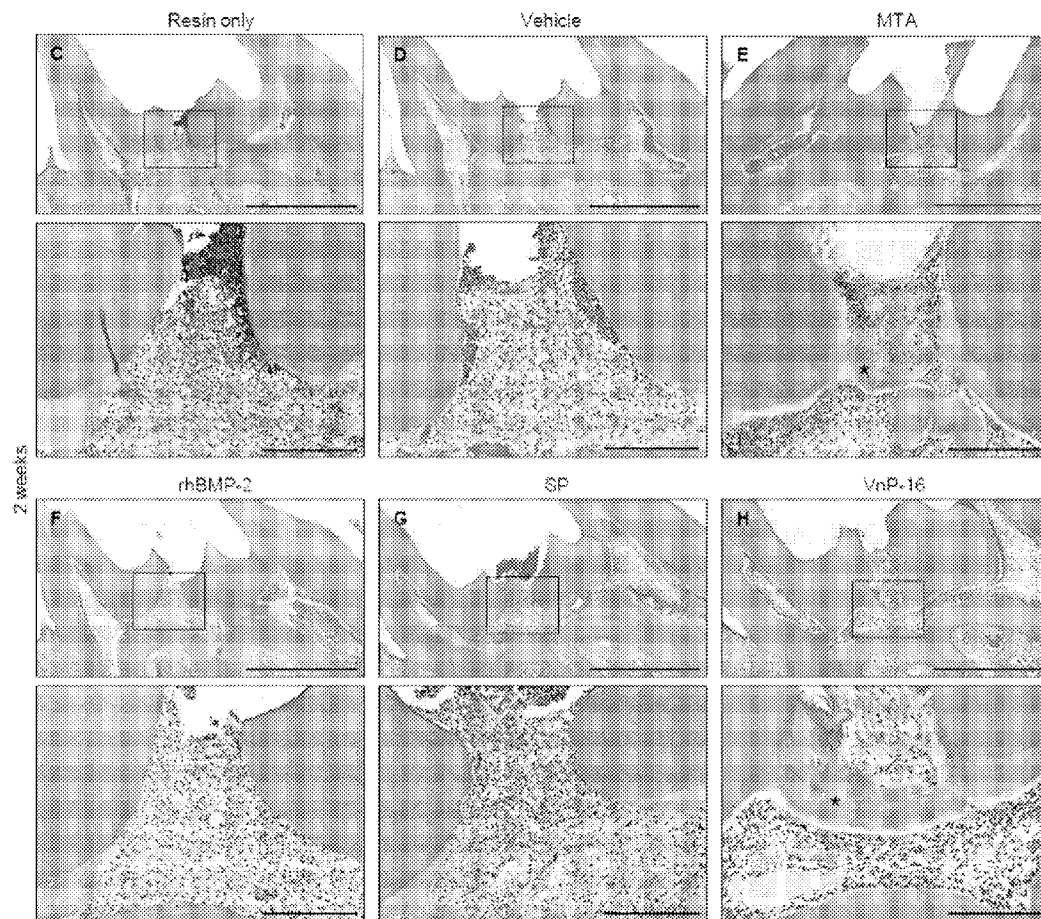
[도3a]



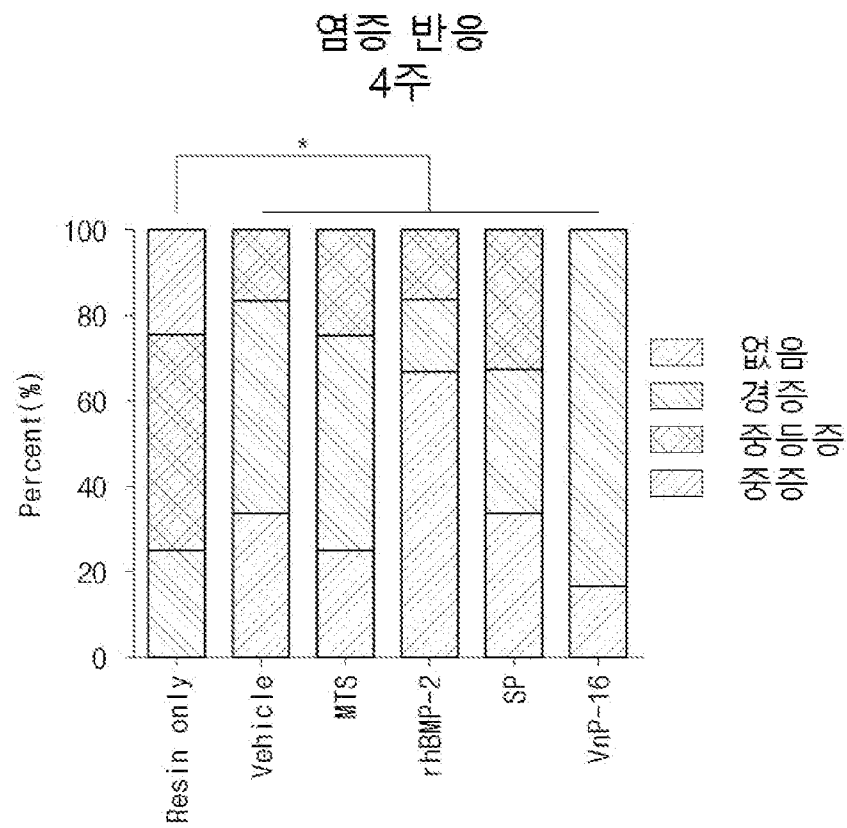
[도3b]



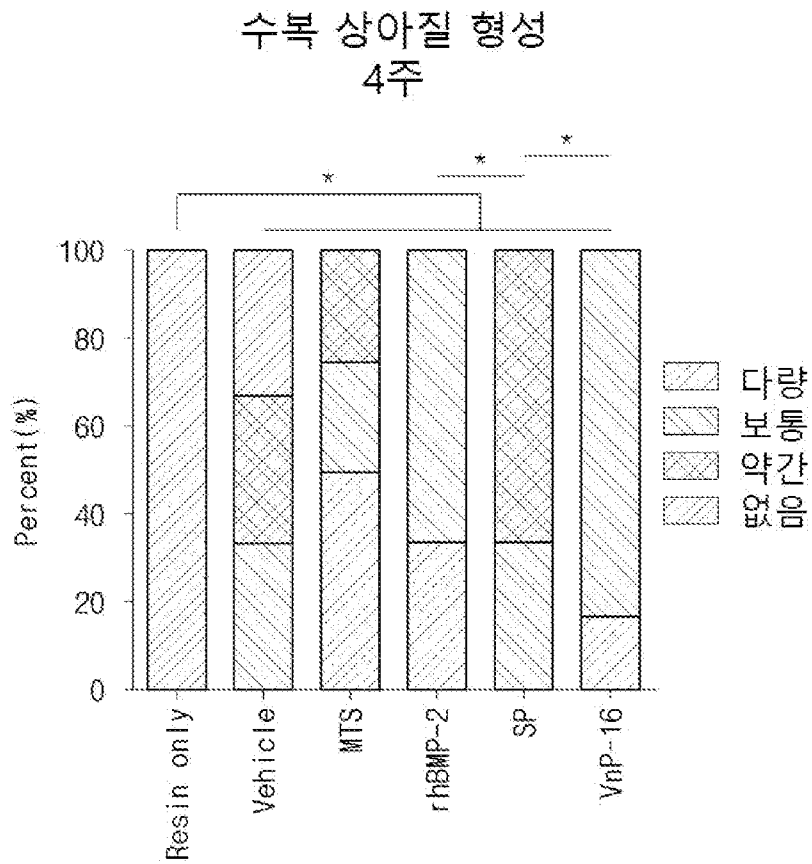
[도3c]



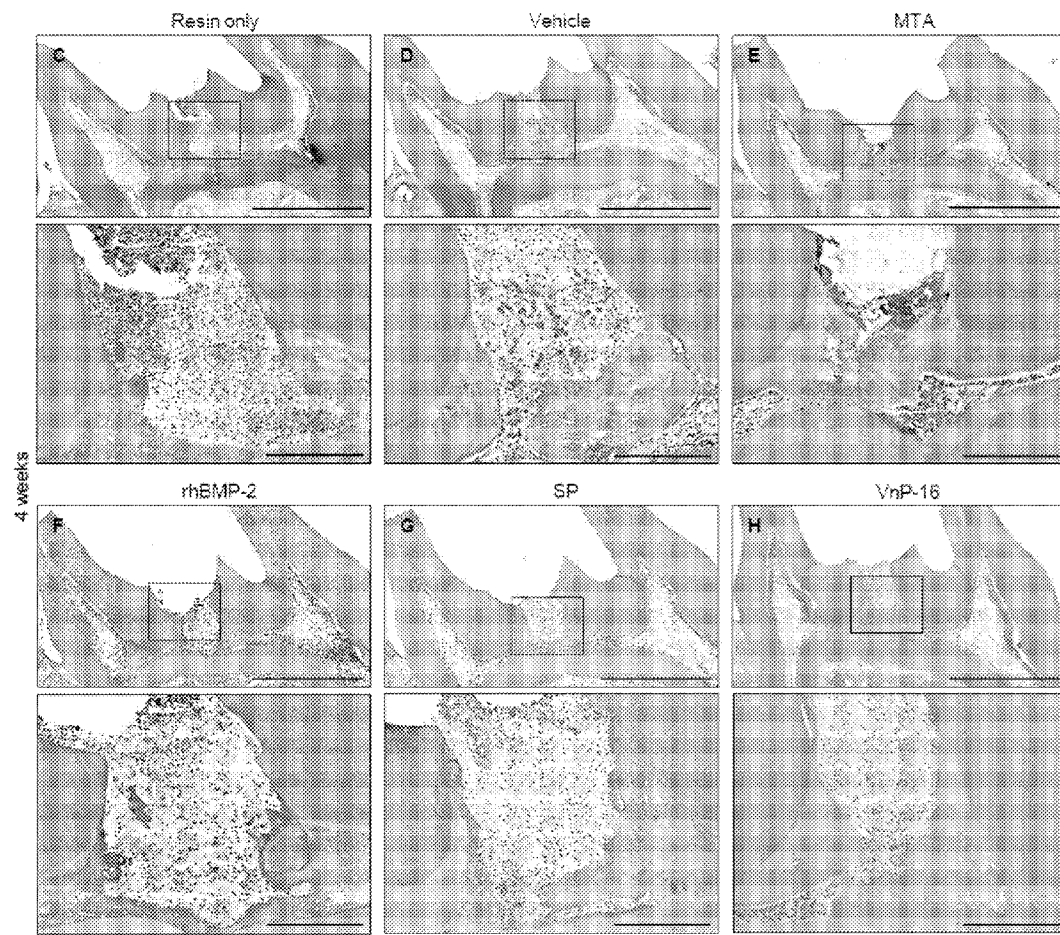
[도4a]



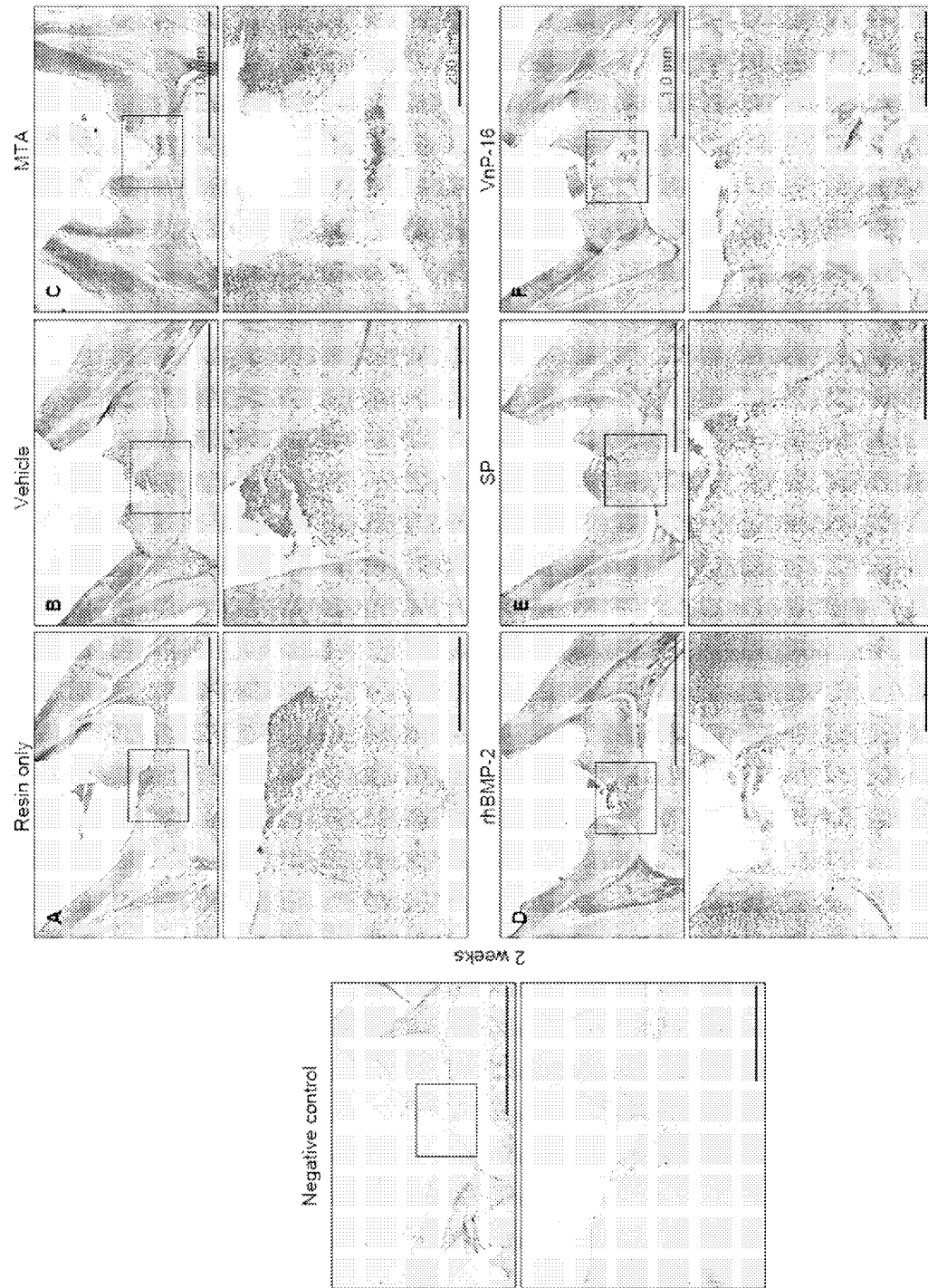
[도4b]



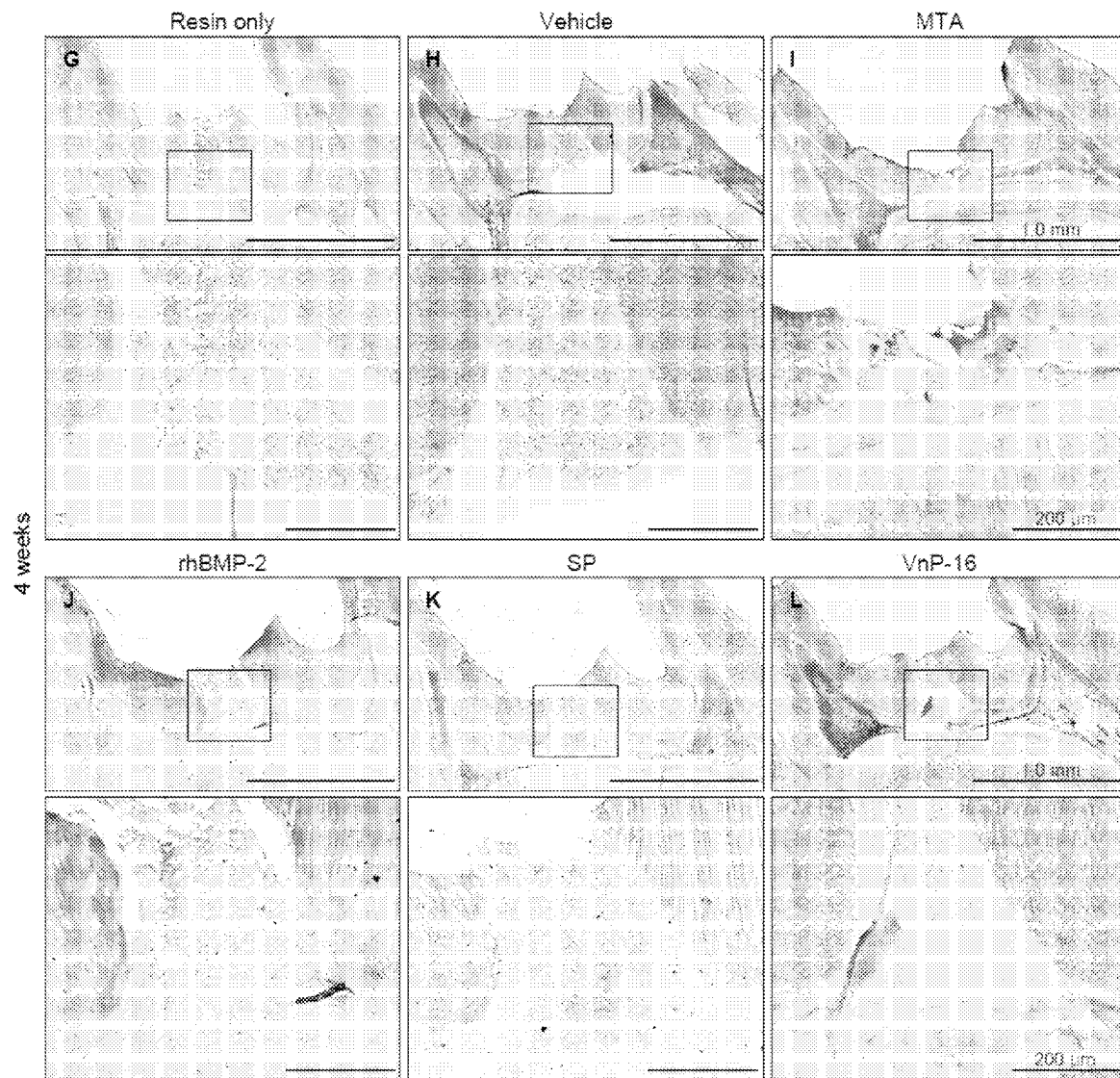
[도4c]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/003027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/10(2006.01)i; **A61K 38/16**(2006.01)i; **A61P 1/02**(2006.01)i; **A61K 6/54**(2020.01)i; **A61K 6/69**(2020.01)i;
C07K 7/08(2006.01)i; **C07K 14/00**(2006.01)i; **C12N 5/077**(2010.01)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)

A61K 38/10(2006.01); A61K 38/01(2006.01); A61K 38/39(2006.01); A61K 6/17(2020.01); A61K 6/54(2020.01);
A61L 27/16(2006.01); A61L 27/38(2006.01); A61L 27/56(2006.01); A61L 27/58(2006.01)

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: 펩타이드(peptide), 비트로 벡틴(vitronectin), RVYFFKKGQYWE, 상아질(dentin),
재생(regeneration), 근관 충전(root canal capping), 치수복조제(pulp-capping agent)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARK, Cho-Yeon. Effects of vitronectin-derived bioactive peptide on reparative dentinogenesis in rats. [※] 울대학교 대학원 치의과학박사 학위논문 (Ph.D. thesis, Graduate School of Dentistry, Seoul National University). February 2021, inner pp. 1-63. See abstract; inner pages 1 and 19-53; and figures 3A, 3B, 9A, 9B, 10F, 12 and 13.	1-16
X	US 2021-0077359 A1 (MARQUETTE UNIVERSITY) 18 March 2021 (2021-03-18) See paragraphs [0039], [0091], [0143] and [0156].	1-16
A	US 2017-0203009 A1 (TEMPLE UNIVERSITY-OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 20 July 2017 (2017-07-20) See entire document.	1-16
A	US 2021-0196802 A1 (TANG, Jia et al.) 01 July 2021 (2021-07-01) See entire document.	1-16



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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

24 May 2023

Date of mailing of the international search report

24 May 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

**Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208**

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/003027**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019-0091373 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS AND HARVARD COLLEGE) 28 March 2019 (2019-03-28) See entire document.	1-16
PX	PARK, C. et al. Vitronectin-derived peptide promotes reparative dentin formation. 16 June 2022 (online publication date), vol. 101, no. 12, pp. 1481-1489. See abstract; pages 1481-1489; and figures 1-5.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/003027

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/003027

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2021-0077359	A1	18 March 2021	AU	2018-266193	A1	28 November 2019
				CA	3062632	A1	15 November 2018
				EP	3621663	A1	18 March 2020
				EP	3621663	A4	27 January 2021
				WO	2018-209101	A1	15 November 2018
US	2017-0203009	A1	20 July 2017	WO	2016-011039	A1	21 January 2016
US	2021-0196802	A1	01 July 2021	None			
US	2019-0091373	A1	28 March 2019	EP	3426182	A1	16 January 2019
				US	11224679	B2	18 January 2022
				US	2022-249741	A1	11 August 2022
				WO	2017-156102	A1	14 September 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/10(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61P 1/02(2006.01)i; A61K 6/54(2020.01)i; A61K 6/69(2020.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; C07K 14/00(2006.01)i; C12N 5/077(2010.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/10(2006.01); A61K 38/01(2006.01); A61K 38/39(2006.01); A61K 6/17(2020.01); A61K 6/54(2020.01); A61L 27/16(2006.01); A61L 27/38(2006.01); A61L 27/56(2006.01); A61L 27/58(2006.01) 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: 펩타이드(peptide), 비트로넥틴(vitronectin), RYVFFKKGQYWE, 상아질(dentin), 재생(regeneration), 근관 충전(root canal capping), 치수복조제(pulp-capping agent)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	박초연, "Effects of vitronectin-derived bioactive peptide on reparative dentinogenesis in rats" 서울대학교 대학원 치의과학박사 학위논문, 2021년 2월, 내부페이지 1-63 요약; 내부페이지 1, 19-53; 및 그림 3A, 3B, 9A, 9B, 10F, 12, 13	1-16
X	US 2021-0077359 A1 (MARQUETTE UNIVERSITY) 2021.03.18 단락 [0039], [0091], [0143], [0156]	1-16
A	US 2017-0203009 A1 (TEMPLE UNIVERSITY-OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 2017.07.20 전체 문헌	1-16
A	US 2021-0196802 A1 (TANG, JIA 등) 2021.07.01 전체 문헌	1-16
A	US 2019-0091373 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS AND HARVARD COLLEGE) 2019.03.28 전체 문헌	1-16
☒ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년05월24일 (24.05.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년05월24일 (24.05.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	PARK, C. 등, "Vitronectin-derived peptide promotes reparative dentin formation", 2022년 6월 16일(온라인 공개일), 101권, 12호, 페이지 1481-1489 요약; 페이지 1481-1489; 및 그림 1-5	1-16

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2021-0077359 A1	2021/03/18	AU 2018-266193 A1	2019/11/28
		CA 3062632 A1	2018/11/15
		EP 3621663 A1	2020/03/18
		EP 3621663 A4	2021/01/27
		WO 2018-209101 A1	2018/11/15
US 2017-0203009 A1	2017/07/20	WO 2016-011039 A1	2016/01/21
US 2021-0196802 A1	2021/07/01	없음	
US 2019-0091373 A1	2019/03/28	EP 3426182 A1	2019/01/16
		US 11224679 B2	2022/01/18
		US 2022-249741 A1	2022/08/11
		WO 2017-156102 A1	2017/09/14