(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 5 월 7 일 (07.05.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/091463 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 35/12 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/014605

(22) 국제출원일: 2019 년 10 월 31 일 (31.10.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0132211 2018 년 10 월 31 일 (31.10.2018) KR

(71) 출원인: 차의과학대학교 산학협력단 (**CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 11160 경기도 포천시 해룡로 120, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **최용수 (CHOI, Yong-Soo)**; 11160 경기도 포천시 해룡로 120, Gyeonggi-do (KR). **이지민 (LEE, Ji Min)**; 11160 경기도 포천시 해룡로 120, Gyeonggi-do (KR). **김미진 (KIM, Mi Jin)**; 11160 경기도 포천시 해룡로 120, Gyeonggi-do (KR). **민경훈 (MIN, Kyunghoon)**; 11160 경기도 포천시 해룡로 120, Gyeonggi-do (KR).

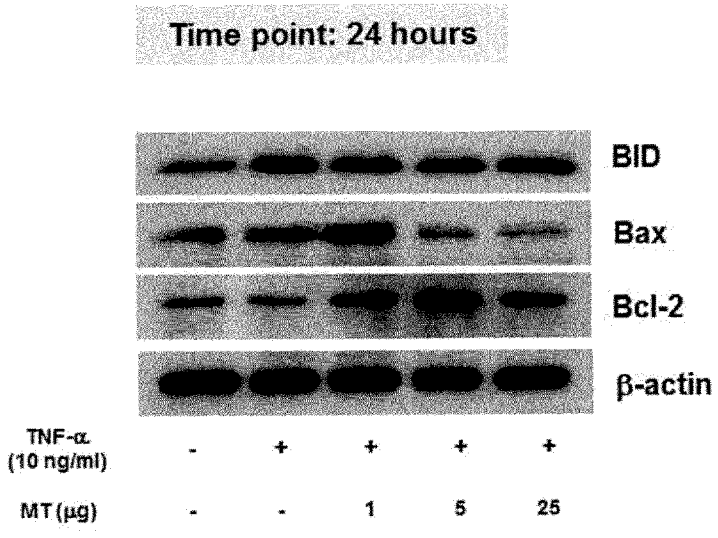
(74) 대리인: **제일특허법인(유) (FIRSTLAW P.C.)**; 06775 서울시 서초구 마방로 60, Seoul (KR).

(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,

(54) **Title:** PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING ISOLATED MITOCHONDRIA FOR PREVENTING OR TREATING TENDINOPATHY

(54) **발명의 명칭:** 분리된 미토콘드리아를 포함하는 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물

[도 19]



(57) **Abstract:** The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating tendinopathy, comprising isolated mitochondria as an effective component. The pharmaceutical composition of the present invention, comprising isolated mitochondria as an effective component, can restore the ATP synthesis capacity and antioxidant capacity of tenocytes damaged by inflammations to a normal tenocyte level. In addition, the pharmaceutical composition of the present invention, when administered to damaged tenocytes, inhibits the expression of an apoptosis promoter, Bax, and increases the expression of an apoptosis inhibitor, Blc-2. In addition, the pharmaceutical composition of the present invention, when administered to damaged tenocytes, can restore the expression of MMP1 to a normal tenocyte level. Accordingly, the pharmaceutical composition of the present invention may be beneficially used in the prevention or treatment of tendinopathy.

WO 2020/091463 A1

[다음 쪽 계속]

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 분리된 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 염증반응에 의해 손상된 건세포의 ATP 합성능 및 항산화능을 정상 건세포 수준으로 회복시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물을 손상된 건세포에 투여할 경우, 세포사멸 인자인 Bax 의 발현을 억제하며, 세포사멸 억제 인자인 Blc-2 의 발현을 증가시킨다. 또한, 본 발명의 약학 조성물을 손상된 건세포에 투여할 경우, MMP1 의 발현을 정상 건세포 수준으로 회복시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물은 건병증을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭

분리된 미토콘드리아를 포함하는 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물

기술분야

본 발명은 분리된 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

건병증은 발목 관절과 근육을 연결시켜주는 건(tendon) 조직 내 콜라겐의 퇴행성 변화에 의해 발생하는 질환이다. 건병증은 건 조직이 손상되었을 때 휴식을 취하여 건 조직이 회복될 시간을 주지 않고 반복적인 염좌 또는 과도한 사용으로 인해 건 조직의 회복이 이루어지지 않는다. 또한, 건병증은 건 조직 내에 콜라겐 섬유의 비정상적인 정렬, 콜라겐의 섬유소(fibrinoid) 또는 점액양(myxoid) 변성, 섬유화 등이 진행되며 약해진 건 조직은 파열되기도 한다.

건병증의 병인으로 염증반응이 주요원인으로 대두되고 있다. 염증반응에 관여하는 사이토카인은 근육, 힘줄, 혈관과 같은 연조직의 손상과 상처 치유과정에서 중요하게 작용한다. 구체적으로, 건세포(tenocyte)에서 TNF-α, IL-1β, IL-6, VEGF, TGF-β와 같은 염증성 사이토카인의 발현은 생체 내 조직의 기능과 밀접하게 연관되어 있다. 이와 관련하여, IL-6 결핍 마우스의 건 조직은 다른 마우스의 건 조직보다 조직의 강도나 배열 등의 물리적 특성이 우수하다는 연구결과가 보고된 바 있으며, TNF-α와 IL-1β가 미토콘드리아의 DNA 손상을 야기하며, 연골세포에서 세포사멸을 유도한다는 연구결과가 보고된 바 있다(Neal L. Millar *et al.*, *Scientific Reports* volume 6, Article number: 27149, 2016).

한편, 기질 금속 단백질 분해효소(matrix metalloprotease, MMP)는 정상적인 건 조직에서 세포외 기질의 균형을 유지하는 역할을 하는데, 건병증 환자에서 기질 금속 단백질 분해효소의 불균형이 관찰되었다는 연구결과가 보고된 바 있다(Graham

Riley, *Nature Clinical Practice Rheumatology* volume 4, p82-89, 2008).

건병증은 임상적으로 매우 흔하게 발생하지만 아직까지 확실한 치료 방법이 없다. 현재 건병증의 치료법으로는 스트레칭, 물리치료, 소염제 복용, 스테로이드 주사, 체외 충격파 치료(extracorporeal shock wave therapy), 자가 혈소판 풍부 혈장(platelet-rich plasma) 주사 등의 보존적 치료가 있으나, 대부분 과학적 근거가 거의 없다. 주로 스테로이드 주사를 이용한 치료가 이루어지고 있으나, 스테로이드 주사가 연부 조직을 파괴하거나 근력을 감소시킨다는 연구결과가 보고된 바 있다. 뿐만 아니라, 염증을 동반하지 않는 경우 스테로이드 주사의 소염효과를 볼 수 없다는 점에서 스테로이드 치료범위의 한계가 있다. 보존적 치료에 실패할 경우에는 수술적 치료를 할 수 있지만, 수술은 변성된 부분을 제거하고 남은 부분을 봉합하거나 주변의 다른 건을 이식하는 수준의 증상 경감을 위한 치료이며 근본적인 해결방법은 아니다.

최근, 건병증의 치료와 관련하여 단백질 또는 줄기세포를 이용한 재생치료가 활발히 연구되고 있다. 대한민국 특허출원 제2016-0091029호에서는 건 또는 인대 손상 치유를 위해 자가 및 동종의 지방유래 중간엽줄기세포를 포함하는 조성물 및 이의 제조방법에 대해 개시하고 있다. 상기 문헌에는 자가 및 동종의 지방유래 중간엽줄기세포를 포함하는 조성물을 투여하는 경우, 콜라겐, 세포외기질(ECM) 단백질, 및 각종 성장인자를 분비한다는 내용이 개시되어 있으나, 상기 조성물을 단회투여 하였을 경우, 그 효과가 지속적이 않다는 점에서 기술적 한계가 있다. 따라서, 효과적으로 건 조직을 재생시킬 수 있는 새로운 치료법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

건병증을 치료하기 위한 연구가 진행된 바 있으나, 증상만을 일시적으로 완화시키는 치료이거나, 치료 효과의 지속성이 짧다는 한계가 있는 등 아직은 획기적인 치료법이 개발되지 않은 실정이다. 효과적인 건병증 치료제에 대한 지속적인 연구개발이 필요한 상황이다.

따라서, 본 발명은 건병증을 치료하기 위한 약학 조성물 및 이를 이용한 건병증을 치료하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 건병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 측면은, 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 건병증의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 건병증을 치료하기 위한 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 건병증 치료용 약제를 제조하기 위한 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물의 용도를 제공한다.

발명의 효과

본 발명의 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 염증반응으로 인해 손상된 건세포의 ATP 합성능 및 항산화능을 정상 건세포 수준으로 회복시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물을 손상된 건세포에 투여할 경우, 세포사멸 인자인 Bax의 발현을 억제하며, 세포사멸 억제 인자인 Blc-2의 발현을 증가시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물을 손상된 건세포에 투여할 경우, MMP1의 발현을 정상 건세포 수준으로 회복시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물은 건병증을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 건세포에 TNF-α를 농도별로 처리한 후, 건세포의 세포사멸 관련 인자의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 2는 건세포에 TNF-α를 농도별로 처리한 후, 건세포의 BID 단백질 발현량을 나타낸 도면이다.

도 3은 건세포에 TNF-α를 농도별로 처리한 후, 건세포의 Bax/Bcl-2 수치를

나타낸 도면이다.

도 4는 건세포에 TNF-α를 농도별로 처리한 후, 건세포의 Bcl-2/Bax 수치로 나타낸 도면이다.

도 5는 건세포에 TNF-α를 처리한 후, 시간의 경과에 따른 건세포의 세포사멸 관련 인자의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 6은 건세포에 TNF-α를 처리한 후, 시간의 경과에 따른 건세포의 BID 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 7은 건세포에 TNF-α를 처리한 후, 시간의 경과에 따른 건세포의 Bax/Bcl-2 수치를 나타낸 도면이다.

도 8은 건세포에 TNF-α를 처리한 후, 시간의 경과에 따른 건세포의 Bcl-2/Bax 수치로 나타낸 도면이다.

도 9는 TNF-α를 처리한 건세포에 DCFH-DA를 처리한 후, 건세포 내 DCF의 형광세기를 나타낸 도면이다.

도 10은 TNF-α를 처리한 건세포 내의 ATP량을 나타낸 도면이다.

도 11은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리한 후, Mitotracker green, Mitotracker CMXRos Red 및 DAPI로 건세포를 형광염색한 도면이다.

도 12는 TNF-α, 과산화수소, 비타민C 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에 DCFH-DA를 처리한 후, 건세포 내 DCF의 형광세기 변화량을 나타낸 도면이다.

도 13은 TNF-α, 과산화수소, 비타민C, TNF-α와 건강한 미토콘드리아 또는 TNF-α와 손상된 미토콘드리아를 처리한 건세포에 DCFH-DA를 처리한 후, 건세포의 DCF 형광세기를 나타낸 도면이다.

도 14는 TNF-α, 과산화수소, TNF-α와 건강한 미토콘드리아 또는 TNF-α와 손상된 미토콘드리아를 처리한 건세포 내의 ATP 변화량을 나타낸 도면이다.

도 15는 TNF-α, 과산화수소 또는 TNF-α와 미토콘드리아를 처리한 건세포 내의 ATP량을 나타낸 도면이다.

도 16은 TNF-α, CCCP 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포

내의 미토콘드리아 막전위를 나타낸 도면이다.

도 17은 TNF-α, 비타민C, TNF-α와 건강한 미토콘드리아 또는 TNF-α와 손상된 미토콘드리아를 처리한 건세포 내의 미토콘드리아 탈수소효소 활성을 나타낸 도면이다.

도 18은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 12시간 후, 건세포의 세포사멸 관련 인자의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 19는 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 세포사멸 관련 인자의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 20은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 12시간 또는 24시간 후, 건세포의 BID 단백질 발현량을 나타낸 도면이다.

도 21은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 12시간 또는 24시간 후, 건세포의 Bax/Bcl-2 수치를 나타낸 도면이다.

도 22는 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 12시간 또는 24시간 후, 건세포의 Bcl-2/Bax 수치를 나타낸 도면이다.

도 23은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 12시간 후, 건세포의 MMP1 단백질의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 24는 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 MMP1 단백질의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 25는 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 12시간 또는 24시간 후, 건세포의 MMP1 단백질 발현량을 나타낸 도면이다.

도 26은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 Collagen 1 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 27은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 Collagen 1 단백질의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 28은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 Collagen 1 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 29는 TNF-α 또는 TNF-α와 손상된 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 Collagen 1 단백질의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 30은 TNF-α 또는 TNF-α와 손상된 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 Collagen 1 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 31은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 Scleraxis 단백질의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 32는 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 Tenomodulin 단백질의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 33은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 Fis1, Drp1 및 MFN2 단백질의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 34는 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 Fis1 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 35는 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 Drp1 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 36은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 MFN2 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 37은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 IL-1β의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 38은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 IL-6의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 39는 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 p-NF-kB 단백질의 발현량을 비교한 도면이다.

도 40은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 p-NF-kB 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 41은 TNF-α 또는 TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포 내 신호전달 관련 유전자의 발현량을 비교한 도면이다.

도 42는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 주입한 후, Mitotracker green, Mitotracker CMXRos Red 및 DAPI로 건 조직을 형광염색한 도면이다.

도 43은 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건

조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 Fis1, Drp1 및 MFN2 단백질의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 44는 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 Fis1 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 45는 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 Drp1 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 46은 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 MFN2 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 47은 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 TNC 및 MMP1 단백질의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 48은 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 TNC 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 49는 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 MMP1 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 50은 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 콜라겐 함량을 하이드록시프롤린 분석(hydroxyproline assay)을 통해 확인한 도면이다.

도 51은 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 TNF-α의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 52는 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 IL-1β의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 53은 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 IL-6의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 54는 Collagenase 1 또는 Collagenase 1과 건강한 미토콘드리아를 건 조직에 처리하고 2주 후, 건 조직의 p-NF-kB 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 55는 외래의 건강한 미토콘드리아를 농도별로 건병증 환자 유래의 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포 증식율을 비교한 도면이다.

도 56은 외래의 건강한 미토콘드리아를 농도별로 건병증 환자 유래의 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 TNC, TNMD 및 COL1 단백질의 발현정도를 비교한 도면이다.

도 57은 외래의 건강한 미토콘드리아를 농도별로 건병증 환자 유래의 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 TNC 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 58은 외래의 건강한 미토콘드리아를 농도별로 건병증 환자 유래의 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 TNMD 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

도 59는 외래의 건강한 미토콘드리아를 농도별로 건병증 환자 유래의 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포의 COL1 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하도록 한다.

본 발명의 일 측면은 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 건병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, "유효성분"은 단독으로 활성을 나타내거나 또는 그 자체로는 활성이 없는 보조제(담체)와 함께 활성을 나타내는 성분을 지칭한다.

상기 미토콘드리아는 포유동물로부터 수득된 것일 수 있으며, 인간으로부터 수득된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 미토콘드리아는 세포 또는 조직으로부터 분리된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 미토콘드리아는 체세포, 생식세포 또는 줄기세포로부터 수득된 것일 수 있다. 또한, 상기 미토콘드리아는 미토콘드리아의 생물학적 활성이 정상인 세포로부터 수득된 정상적인 건강한 미토콘드리아일 수 있다. 또한, 상기 미토콘드리아는 체외에서 배양된 것일 수 있다.

또한, 상기 미토콘드리아는 자가(autologous), 동종(allogenic) 또는 이종(xenogenic)으로부터 수득된 것일 수 있다. 구체적으로, 자가 미토콘드리아는 동일 개체의 조직 또는 세포로부터 수득된 미토콘드리아를 의미한다. 또한, 동종 미토콘드리아는 개체와 같은 종에 속하면서 대립유전자에 대해서는 다른 유전자형을 가지는 개체로부터 수득된 미토콘드리아를 의미한다. 또한, 이종

미토콘드리아는 개체와 다른 종에 속하는 개체로부터 수득된 미토콘드리아를 의미한다.

구체적으로, 상기 체세포는 근육세포, 간세포, 신경세포, 섬유아세포, 상피세포, 지방세포, 골세포, 백혈구, 림프구, 혈소판 또는 점막세포일 수 있다.

또한, 상기 생식세포는 감수분열과 체세포 분열을 하는 세포로서 정자 또는 난자일 수 있다. 또한, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포, 성체줄기세포, 역분화줄기세포, 배아줄기세포, 골수줄기세포, 신경줄기세포, 윤부줄기세포 및 조직 유래 줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 이때, 상기 중간엽줄기세포는 탯줄, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

본 발명에서 사용하는 용어 "건강한 미토콘드리아"란, 정상적인 세포로부터 추출한 미토콘드리아를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용하는 용어 "손상된 미토콘드리아"란, ATP 합성 기능이 억제된 미토콘드리아를 의미한다. 구체적으로, 상기 손상된 미토콘드리아는 세포에 올리고마이신과 같은 ATP 합성 억제제를 처리하여 세포 내 미토콘드리아 ATP 합성 기능을 억제한 수준의 미토콘드리아를 의미한다. 한편, 상기 미토콘드리아를 특정 세포로부터 분리하는 경우에는, 예를 들어, 특정 버퍼 용액을 사용하거나 전위차 및 자기장을 이용하는 등 공지된 다양한 방법을 통해 미토콘드리아를 분리할 수 있다.

상기 미토콘드리아 분리는 미토콘드리아 활성 유지 측면에서, 세포를 파쇄하고 원심분리하여 수득할 수 있다. 일 구체예로, 세포를 배양하고, 이러한 세포를 포함하는 약학 조성물을 제1차 원심분리하여 펠렛을 생성하는 단계, 상기 펠렛을 버퍼 용액에 재현탁시키고, 균질화하는 단계, 상기 균질화된 용액을 제2차 원심분리하여 상청액을 제조하는 단계 및 상기 상청액을 제3차 원심분리하여 미토콘드리아를 정제하는 단계로 수행될 수 있다. 이때, 제2차 원심분리가 수행되는 시간은 제1차 및 제3차 원심분리가 수행되는 시간보다 짧도록 조절되는 것이 세포 활성 유지 면에서 바람직하며, 제1차 원심분리에서 제3차 원심분리로 갈수록 속도를 높일 수 있다.

구체적으로, 상기 제1차 내지 제3차 원심분리는 0℃ 내지 10℃의 온도,

바람직하게는 3℃ 내지 5℃의 온도에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 원심분리가 수행되는 시간은 1분 내지 50분 동안 수행될 수 있으며, 원심분리 횟수 및 샘플의 함량 등에 따라 적절히 조정될 수 있다.

아울러, 상기 제1차 원심분리는 100 ×g 내지 1,000 ×g, 또는 200 ×g 내지 700 ×g, 또는 300 ×g 내지 450 ×g의 속도로 수행될 수 있다. 또한, 상기 제2차 원심분리는 1 ×g 내지 2,000 ×g, 또는 25 ×g 내지 1,800 ×g, 또는 500 ×g 내지 1,600 ×g의 속도로 수행될 수 있다. 또한, 상기 제3차 원심분리는 100 ×g 내지 20,000 ×g, 또는 500 ×g 내지 18,000 ×g, 또는 800 ×g 내지 15,000 ×g의 속도로 수행될 수 있다.

또한, 상기 약학 조성물에 대하여, 미토콘드리아는 0.1 ㎍/㎖ 내지 500 ㎍/㎖, 0.2 ㎍/㎖ 내지 450 ㎍/㎖ 또는 0.5 ㎍/㎖ 내지 400 ㎍/㎖의 농도로 포함될 수 있다. 상기 범위로 미토콘드리아를 포함함으로써, 투여 시 미토콘드리아 용량 조절이 용이하고, 환자의 건병증 병증 개선 정도가 보다 향상될 수 있다.

특히, 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은, 투여할 개체의 체중을 기준으로 1회 0.01 ㎎/㎏ 내지 5 ㎎/㎏, 0.1 ㎎/㎏ 내지 4 ㎎/㎏ 또는 0.25 ㎎/㎏ 내지 2.5 ㎎/㎏ 양의 미토콘드리아를 투여할 수 있다. 즉, 상기 약학 조성물이 건병증이 유발된 개체의 체중을 기준으로 상기 범위의 함량으로 미토콘드리아가 투여되는 것이 세포 활성 측면에서 가장 바람직하다. 또한, 상기 약학 조성물은 1회 내지 10회, 3회 내지 8회 또는 5회 내지 6회 투여할 수 있으며, 바람직하게는 5회 투여할 수 있다. 이때, 투여 간격은 1일 내지 7일 또는 2일 내지 5일 간격으로 할 수 있으며, 바람직하게는 3일 간격으로 투여할 수 있다.

또한, 상기 약학 조성물은 건병증에 걸릴 수 있거나, 그러한 질환 또는 질병을 앓고 있는 인간 또는 다른 포유동물에 대하여 투여될 수 있다. 상기 약학 조성물은 건 조직의 염증을 억제하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 상기 약학 조성물은 건 조직의 콜라겐의 손상을 입은 환자 또는 건 조직이 만성 퇴행(chronic degenerative)인 환자에게 적용되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

구체적으로, 상기 약학 조성물은 건병증 환자의 collagen I, TNMD(tenomodulin), Scleraxis 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는

어느 하나의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물은 건병증 환자의 BID(BH3 interacting-domain death agonist), Bax(Bcl-2-associated X protein), MMP1, Fis1(Mitochondrial fission 1 protein), Drp1(Dynamin-1-like protein), MFN2(Mitofusin-2), IL-1β, IL-6, p-NF-kB, TNC(tenascin C), TNF-α 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

본 발명에서 사용하는 용어 "TNMD(tenomodulin)"이란, TNMD (Tnmd) 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 의미하며, 건(tendon) 성숙의 중요한 마커이다. 또한, 상기 TNMD는 자기 재생을 촉진시키고 노화를 억제함으로써, 건 유래 줄기세포 또는 전구세포의 발달에 영향을 미친다.

본 발명에서 사용하는 용어 "Scleraxis"란, bHLH(basic helix-loop-helix) 수퍼 패밀리에 속하는 구성원 중 하나인 전사조절 인자이다. 초기 Scleraxis를 발현하는 전구 세포는 건 조직 및 다른 근육 부착을 형성에 기여한다.

본 발명에서 사용하는 용어 "BID(BH3 interacting-domain death agonist)"란, Bcl-2 단백질 패밀리의 전-세포사멸적 멤버(pro-apoptotic member)로서, BH3 도메인만을 함유하는 전-세포사멸적 Bcl-2 단백질이다. 상기 BID는 세포사멸 신호 전달에 반응하여, 다른 Bcl-2 패밀리 단백질인 Bax와 상호작용하여, Bax가 소기관 막, 주로 외부 미토콘드리아 막으로 삽입되게 한다. 상기 Bax(Bcl-2-associated X protein)는 미토콘드리아 전압-의존성 음이온 채널인 VDAC(voltage-dependent anion channel)와 상호작용하고 개방을 유도한다.

또한, 상기 약학 조성물은 정맥 투여될 수 있는 주사제일 수 있고, 바람직하게는 주사용 제제일 수 있다.

따라서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 주사제 처방의 유통에 따른 제품 안정성을 확보하기 위하여, 주사제로 사용 가능한 산수용액 또는 인산염 등의 완충용액을 사용하여 pH를 조절함으로써, 물리적으로나 화학적으로 매우 안정한 주사제로 제조될 수 있다.

구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 주사용수를 포함할 수 있다. 상기 주사용수는 고형주사제의 용해나 수용성 주사제를 희석하기 위하여 만들어진

증류수로서, 글루코스 주사, 자일리톨 주사, D-만니톨 주사, 프룩토스 주사, 생리식염수, 덱스트란 40 주사, 덱스트란 70 주사, 아미노산 주사, 링거액, 락트산-링거액 또는 pH 3.5 내지 7.5 범위의 인산염 완충용액 또는 인산이수소나트륨-구연산 완충용액 등 일 수 있다.

또한, 본 발명의 약학 조성물은 안정화제 또는 용해보조제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 안정화제는 나트륨 피로설파이트(sodium pyrosulfite) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid)일 수 있고, 용해보조제는 염산, 아세트산, 수산화나트륨, 탄산수소나트륨, 탄산나트륨 또는 수산화칼륨일 수 있다.

본 발명의 다른 측면은, 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 건병증의 예방 또는 치료방법을 제공할 수 있다. 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 또한, 상기 개체는 손상된 건 조직을 가지고 있는 것일 수 있다.

상기 약학 조성물은 비경구적으로 투여될 수 있는데, 근육 내(intra-muscular), 정맥 내(intra-venous), 건 내(intra-tendinous) 등에 적당한 방법에 의해서 투여될 수 있다. 바람직하게는, 상기 투여는 정맥 내 투여 또는 건 내 투여일 수 있다.

이를 통해, 본 발명에 따른 약학 조성물은 건병증을 앓고 있는 개체의 정맥에 정상적인 활성을 갖는 외래 미토콘드리아를 공급할 수 있어, 미토콘드리아 기능이 저하된 세포의 활성을 증가시키거나 미토콘드리아 기능 이상 세포 재생에 유용하며, 건병증의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은, 건병증을 치료하기 위한 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물의 용도를 제공한다. 상기 약학 조성물은 상술한 바와 동일하다.

본 발명의 또 다른 측면은, 건병증 치료용 약제를 제조하기 위한 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물의 용도를 제공한다. 상기 약학 조성물은 상술한 바와 동일하다.

발명의 실시를 위한 형태

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. TNF-α 처리 농도별 건세포 내 세포사멸 인자 발현량 변화 확인

인간 유래의 건 세포인 Tenocyte(ZenBio Inc., #TNE-F)를 이용하여 건병증 유발 세포 모델을 확립하였다. 10% 우태아혈청과 1% 페니실린/스트렙토마이신 항생제가 포함되어 있는 Dulbecco's modified eagle's medium high glucose 배지와 Collagen type 1(Sigma; code: C8919)이 코팅된 플라스크/플레이트에서 배양하였다. 배양 조건은 세포의 패시지(passage) 넘버가 4를 넘지 않도록 유지하였다.

재조합 인간 TNF-α(tumor necrosis factor-α)는 페프로텍(Peprotech, No. 300-01A)으로부터 구매하였다. 구매한 재조합 인간 TNF-α는 정제된 에탄올에 녹인 후, 저장용액(Stock solution)의 농도가 20 ㎎/㎖이 되도록 맞추고 사용 전까지 -4℃ 온도에서 보관하였다. 최종 농도는 배지에 희석하여 10 ng/㎖, 50 ng/㎖, 100 ng/㎖ 또는 500 ng/㎖ 농도로 사용하였다. 10 ng/㎖, 50 ng/㎖, 100 ng/㎖ 또는 500 ng/㎖ 농도의 TNF-α를 건세포에 처리한 후 37℃ 온도, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다.

TNF-α처리에 따른 농도별 건세포 내 세포사멸 변화를 관찰하였다. 건세포 내 세포사멸 신호 단백질인 BID 및 Bax 발현량을 웨스턴 블롯 방법을 이용해 분석하였다. 구체적으로, 단백질 추출을 위해 프로테아제 억제제(Protease inhibitor)가 첨가된 RIPA buffer 100 ㎖를 각 웰(well)에 분주한 후 건세포를 분리하였다. 그 후, 분리한 건세포를 4℃ 온도, 12,000 rpm 조건에서 15분간 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 상층액 내 단백질의 농도를 측정하기 위해 BCA(bicinchoninic acid) 정량법을 이용하였으며, ELISA microplate reader 장비를 이용하여 562 ㎚ 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 샘플은 SDS-PAGE sample buffer(62.5 mM tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol 및 5% 2-mercaptoethanol)와 함께 100℃ 온도에서 3분 동안 가열시켰다.

가열한 샘플을 10% SDS PAGE gel에 로딩하고 전기영동한 후, 전기영동으로 분리된 단백질을 PVDF 막으로 0.35 mA 조건으로 3시간 동안 이동시켰다. PVDF 막은 사용 전에 순수한 메탄올에 담근 후 사용하였다. 3% BSA(bovine serum albumin; Bio Basic Inc., Ontario, Canada)를 0.1% Tween-20가 첨가된 1X TBS에 처리하여 블락킹(Blocking) 버퍼를 제조하였다. 그 후, 비특이적인 결합 반응을 방지하기 위해, PVDF 막에 블락킹 버퍼를 처리하여 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체를 1:1000 희석하여 PVDF 막에 처리한 후 4℃ 온도에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 1차 항체는 항-BID 항체(Santa Cruz; FL-195), 항-Bax 항체(Santa Cruz; sc-7480), 항-Bcl2 항체(Santa Cruz; sc-7480), 항-β-actin 항체(Santa Cruz; sc-4778)를 사용하였다.

다음날, PVDF 막을 TBST 버퍼로 10분간 3번 세척한 후, HRP(horseradish peroxidase)가 표지된 goat anti-mouse(Santa Cruz Biotechnology Inc.; sc-2005) 1:5000 희석하여 PVDF 막에 처리한 후, 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, TBST 버퍼로 PVDF 막을 10분간 3번 세척한 후, chemiluminescence detection(ECL component from Pierce ClarityTM and Western ECL Substrate from Bio-Rad)을 이용하여 발색 반응을 유도 하고 LAS-4000(Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)을 사용하여 BID, Bax, Bc12의 발현량을 확인하였다.

그 결과, TNF-α를 처리한 건세포에서 세포사멸 신호 단백질인 BID 및 Bax 단백질 발현량이 증가하였다. 반면, 세포사멸 억제 인자인 Bcl-2 단백질 발현량은 감소하였다(도 1 내지 도 4).

실시예 2. TNF-α 처리 시간별 건세포 내 세포사멸 인자 발현량 변화 확인

TNF-α를 건세포에 처리한 후, 어느 시점에서 세포사멸이 가장 활성화되는지 확인하기 위해, TNF-α 10 ng을 건세포에 처리한 후 6, 12 또는 24시간 후 세포사멸 인자 단백질인 BID 및 Bax 단백질의 발현량를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다. 웨스턴 블랏은 실시예 1과 동일한 방법으로 진행하였다.

그 결과, TNF-α를 건세포에 처리한 후 시간이 지남에 따라 세포사멸 인자의 발현량이 증가하였다. 특히, TNF-α를 건세포에 처리한 후 24시간이 지났을 때, 건세포 내 세포사멸이 가장 활성화되는 것을 확인하였다(도 5 내지 도 8).

실시예 3. TNF-α 처리에 따른 건세포 내 미토콘드리아 기능이상 확인

TNF-α를 건세포에 처리함에 따라 미토콘드리아 기능이상이 일어나는 지 확인하였다. 재조합 인간 TNF-α를 건세포에 처리한 후 세포 내 ATP 및 ROS(reactive oxygen species) 수치를 확인하였다.

구체적으로, DCFH-DA probe(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 이용하여 건세포 내에 생성되는 ROS 수치를 측정하였다. 건세포는 96-웰-플레이트에 각 웰당 5×10^3 개의 세포수가 되도록 분주한 후, 37℃ 온도, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 중인 건세포의 세포밀도(cell density)가 약 80% 내지 90% 정도가 되었을 때, 10 ng, 50 ng, 100 ng 또는 500 ng 양의 재조합 인간 TNF-α를 건세포에 처리한 후, 37℃ 온도, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 양성 대조군으로 과산화수소(H_2O_2) 500 μM를 건세포에 처리하였다. 배양된 건세포를 PBS로 1번 세척한 후, 10 mM 농도의 DCFH-DA를 처리하여 30분간 배양하였다. 그 후, Synergy Mix Multi-Mode Reader(BioTek Inc.)를 이용하여 517 nm 내지 522 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 데이터는 개별적으로 측정하였으며, 평균(mean)과 표준편차(standard deviation)를 계산하였다.

그 결과, TNF-α를 처리한 건세포에서는 정상 건세포에 비해 DCF의 형광세기가 높게 측정되었으며, 이는 세포 내 DCFH와 반응한 ROS가 많다는 것으로 건세포 내 ROS 수치가 높다는 것으로 해석된다(도 9).

또한, 건세포 내 ATP량은 CellTiter-Glo luminescence kit(Promega,madison,WI)를 이용하여 측정하였다. 10 ng, 50 ng, 100 ng 또는 500 ng 양의 TNF-α를 건세포에 처리한 후, 37℃ 온도, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 양성 대조군으로 500 μM 농도의 과산화수소(H_2O_2)를 건세포에 처리하였다. 그 후, 성장배지 100 ㎖와 CellTiter-Glo luminescence test solution 100 ㎖를 각 웰에 처리하고, 2분 동안 플레이트 쉐이커(plate shaker)에서 반응시킨 후, 실온에서 10분 동안 추가 반응시켰다. 그 후, Luminescene microplate reader를 이용해 발광신호를 측정하였다.

그 결과, TNF-α를 처리한 건세포 내 ATP량이 정상 건세포의 ATP량보다 낮게

측정되었다(도 10). 이를 통해, TNF-α를 건세포에 처리할 경우, 건세포 내 미토콘드리아가 정상적으로 작동하지 않음을 확인하였다.

실시예 4. 미토콘드리아를 포함하는 조성물 제조

분당 차병원으로부터 제공받은 탯줄 유래 중간엽 줄기세포를 10%(v/v) 우태혈청(Fetal bovine serum, FBS, Gibco), 100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신 및 100 U/㎖ 암피실린을 함유하는 Alpha-MEM(Alpha-Minimum Essential Medium) 배지에 접종하고 72시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco)를 이용하여 2회 세척하였다. 세척된 세포는 0.25%(v/v) Trypsin-EDTA(TE, Gibco)를 처리하여 세포를 수득하였다.

또한, 손상된 미토콘드리아 수득을 위해서는, 탯줄 유래 중간엽 줄기세포에 미토콘드리아 ATP합성 억제제 (올리고마이신, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 미토콘드리아 기능을 인위적으로 억제시켰다. 24시간 뒤, DPBS를 이용하여 2회 세척하였다. 세척된 세포는 0.25% TE를 처리하여 세포를 수득하였다.

이와 같이, 각각 수득한 세포는 미토콘드리아를 추출하기 위하여, 혈구계산기를 이용하여 1×10^7 cells/㎖ 농도의 세포를 회수하였다. 상기 세포주를 약 4℃의 온도에서 10분 동안 350 ×g의 속도로 제1차 원심분리를 수행하였다. 이때 얻어진 펠렛을 회수하여 버퍼 용액에 재현탁 시킨 후, 10분 내지 15분 동안 균질화시켰다. 그 후, 상기 펠렛을 포함하는 조성물을 약 4℃의 온도에서 3분 동안 1,100 ×g의 속도로 제2차 원심분리시켜 상청액을 수득하였다. 상기 상청액을 약 4℃의 온도에서 15분 동안 12,000 ×g의 속도로 제3차 원심분리시켜 세포주로부터 미토콘드리아를 분리하였다. 이렇게 얻어진 미토콘드리아를 5 ㎍ 또는 50 ㎍의 양으로 각각 100 ㎕의 주사용수와 혼합한 뒤 인슐린 주사기에 충진하였다.

실시예 5. 건세포 내 미토콘드리아 전달 확인

실시예 4의 방법을 통해, 정상 탯줄 유래 줄기세포로부터 추출한 건강한 미토콘드리아(Intact MT)를 타깃 건세포 내로 전달하였다.

미토콘드리아 전달 방법은 아래와 같이 원심분리기를 통하여 전달하였다. 먼저, 실험 24시간 전에 건세포에 TNF-α의 농도가 10 ng/㎖가 되도록 처리하였다. 미토콘드리아 전달 전, 1×10^5 개의 건세포를 PBS 100 ㎖에 섞어 준비한 후,

아이스에 보관하였다. 실시예 4에서 분리한 미토콘드리아 1 ㎍, 5 ㎍ 또는 25 ㎍을 건세포에 처리하고 천천히 섞어 주었다. 그 후, 원심 분리 튜브에 담아 1,500 ×g에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후, PBS로 2번 세척하여 불순물을 제거해주었다. 펠릿(Pellet)만 남긴 후, 100 ㎖의 PBS 넣어 섞어준 뒤 플레이트에 배양하였다.

전달된 미토콘드리아를 확인하기 위하여, Mitotracker Green, Mitotracker CMXRos Red, DAPI를 이용하여 건세포를 염색하였다. 이때, Mitotracker Green은 미토콘드리아의 막 전위에 상관없이 건세포 내 미토콘드리아를 염색하는 시료이다. Mitotracker CMXRos Red는 미토콘드리아의 막 전위에 의존적으로 축적되는 시료로서, 전달된 미토콘드리아의 생존력을 나타낸다.

구체적으로, 6-웰-플레이트에 1×10^5 개의 미토콘드리아를 전달시킨 건세포를 분주한 후, 세포밀도가 80% 내지 90% 되었을 때 DPBS로 세척하였다. 300 nM 농도의 Mitotracker Green, CMXRos Red, DAPI 염료를 배지에 처리하고 37℃ 온도, 5% CO_2 조건에서 20분 동안 배양하였다. 그 후, TCP SP5 II confocal microscope(Leica, Heidelberg, Germany) 형광현미경 및 Leica LASAF software, ver 2.6(Leica Microsystems, Mannheim, Germany)를 이용하여 이미지를 촬영하였다.

그 결과, 정상 건세포(control)과 TNF-α를 처리한 건세포의 형광이미지에서는 빨간색 형광(Mitotracker CMXRos Red)을 제외한 녹색형광(Mitotracker Green)과 파란색 형광(DAPI)만 발색되는 것을 확인하였다. 반면, 건강한 미토콘드리아 처리한 건세포의 형광이미지에서는 미토콘드리아 처리 농도에 따라 빨간색 형광 세기가 증가하였다. 이를 통해 건세포 내 건강한 미토콘드리아가 전달된 것을 확인하였다(도 11).

실시예 6. 미토콘드리아 전달에 따른 건세포 내 기능 변화 확인

TNF-α에 의해 손상된 건세포에 미토콘드리아 전달을 통해 건세포 내 기능이 회복되는지 확인하였다. 먼저, TNF-α 10 ng을 건세포에 처리한 후, 37℃ 온도, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아 또는 손상된 미토콘드리아 1 ㎍, 5 ㎍ 또는 25 ㎍을 건세포에 처리하고 24시간 후, 건세포 내 ATP량 및 ROS 수치를 확인하였다. ATP, ROS

분석법은 실시예 3과 동일하게 수행하였다.

그 결과, TNF-α를 처리한 건세포에서는 DCF 수치가 증가하는 반면, TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 DCF 수치가 정상 건세포(control)의 DCF 수치만큼 감소하였다. 이는 DCFH와 반응한 ROS가 적다는 것으로 건세포 내 ROS 수치가 감소하였다는 것으로 해석된다. 한편, TNF-α와 손상된 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 DCF 수치가 증가하였다(도 12 및 도 13).

또한, TNF-α를 처리한 건세포에서 ATP량이 감소하는 반면, TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 ATP량이 증가하였다. 특히, TNF-α와 25 ㎍의 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 TNF-α를 처리한 건세포보다 ATP량이 현저하게 증가하였다. 반면, TNF-α와 손상된 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 ATP량이 증가하지 않았다(도 14 및 도 15).

또한, 건강한 미토콘드리아 1 ㎍, 5 ㎍ 또는 25 ㎍을 건세포에 처리하고 24시간 후, 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial Membrane potential)를 측정하였다. 또한, 양성 대조군으로 50 μM 농도의 CCCP를 처리하고 30분 후에 미토콘드리아 막전위를 측정하였다. 그 결과, TNF-α를 처리한 건세포에서 미토콘드리아 막전위 수치가 감소하는 반면, TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 미토콘드리아 막전위 수치가 증가하였다(도 16).

또한, 건강한 미토콘드리아 또는 손상된 미토콘드리아 1 ㎍, 5 ㎍ 또는 25 ㎍을 건세포에 처리한 후, 미토콘드리아 탈수소효소 활성(Mitochondrial dehydrogenase activity)을 측정하였다. 그 결과, TNF-α를 처리한 건세포에서 미토콘드리아 탈수소효소 활성이 감소하는 반면, TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 미토콘드리아 탈수소효소 활성이 증가하였다. 반면, TNF-α와 손상된 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 미토콘드리아 탈수소효소 활성이 증가하지 않았다(도 17).

이를 통해, 건강한 미토콘드리아를 손상된 건세포에 전달함에 따라 건세포 내 기능이 회복되었음을 확인하였다.

실시예 7. 미토콘드리아 전달에 따른 건세포의 사멸 억제 확인

미토콘드리아 전달에 따른 건세포의 세포사멸이 억제되는지 확인하기 위해, TNF-α 10 ng을 건세포에 처리한 후, 37℃ 온도, 5% CO_2 조건에서 12시간 또는 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아 1 ㎍, 5 ㎍ 또는 25 ㎍을 건세포에 처리하였다. 그 후, 건세포의 세포사멸 인자 발현량을 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 웨스턴 블롯은 실시예 1과 동일하게 수행하였다.

그 결과, TNF-α를 처리한 건세포에서 세포사멸 신호 인자인 BID 단백질 발현량이 증가하였다. TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포의 BID 단백질 발현량은 TNF-α를 처리한 건세포의 BID 단백질 발현량과 유의미한 차이가 나타나지 않았다(도 18 내지 도 20).

또한, TNF-α를 처리한 세포에서 세포사멸 신호 인자인 Bax 단백질 발현량이 증가한 반면, TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 Bax 단백질 발현량이 감소하였다(도 18, 도 19 및 도 21).

한편, TNF-α를 처리한 건세포에서 세포사멸 억제 인자인 Bcl-2 단백질 발현량은 감소하였다. 반면, TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 Bcl-2 단백질 발현량이 증가하였다(도 18, 도 19 및 도 22). 이를 통해, 미토콘드리아를 손상된 건세포에 전달함에 따라 세포사멸 인자가 억제됨을 확인하였다.

실시예 8. 미토콘드리아 전달에 따른 기질 회복 확인

손상된 건세포에 건강한 미토콘드리아를 전달함에 따라 건세포의 세포외기질이 회복되는지 확인하였다. 먼저, TNF-α 10 ng을 건세포에 처리한 후, 37℃ 온도, 5% CO_2 조건에서 12시간 또는 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아 또는 손상된 미토콘드리아 1 ㎍, 5 ㎍ 또는 25 ㎍을 건세포에 처리한 후, 웨스턴 블롯으로 건세포의 MMP1 단백질 발현량을 측정하였다. 웨스턴 블롯은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 사용된 1차 항체는 항-MMP1 항체(Santa Cruz; sc-21731), 항-Collagen type 1 항체(Abcam; ab6308)를 사용하였다.

그 결과, TNF-α를 처리한 건세포에서 MMP1 단백질 발현량이 현저하게 증가하였다. 이는 건세포의 금속 단백질 분해효소 불균형을 나타낸다. 반면, TNF-

α 및 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포의 MMP1 단백질 발현량은 TNF-α를 처리한 건세포의 MMP1 단백질 발현량에 비해 현저하게 감소하였으며, 정상 건세포의 MMP1 단백질 발현량과 유의미한 차이가 나타나지 않았다(도 23 내지 도 25).

또한, TNF-α를 처리한 건세포에서 Collagen 1 단백질 발현량이 현저하게 감소하였다. 이는 건세포의 기질 단백질 분해를 나타낸다. 반면, TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포의 Collagen 1 단백질 발현량은 TNF-α를 처리한 건세포의 Collagen 1 단백질 발현량에 비해 현저하게 증가하였다. 반면, TNF-α와 손상된 미토콘드리아를 처리한 건세포의 Collagen 1 단백질 발현량은 TNF-α를 처리한 건세포의 Collagen 1 단백질 발현량과 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 이를 통해, 건강한 미토콘드리아 전달받은 건세포에서 기질 금속 분해 단백질의 균형이 유지됨을 확인하였다(도 26 내지 도 30).

또한, 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아 1 ㎍, 5 ㎍ 또는 25 ㎍을 건세포에 처리한 후, 웨스턴 블롯으로 건세포의 Scleraxis 및 Tenomodulin 단백질 발현량을 측정하였다. 웨스턴 블롯은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 사용된 1차 항체는 항-Scleraxis 항체(Abcam; ab58655), 항-Tenomodulin 항체 (Abcam; ab203676)를 사용하였다.

그 결과, TNF-α를 처리한 건세포에서 Scleraxis 단백질 발현량이 현저하게 감소하였다. 반면, TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포의 Scleraxis 단백질 발현량은 TNF-α를 처리한 건세포의 Scleraxis 단백질 발현량에 비해 현저하게 증가하였다. 특히, 25 ㎍의 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포의 Scleraxis 단백질 발현량은 정상군의 Scleraxis 단백질 발현량과 유의미한 차이를 나타내지 않았다(도 31).

또한, TNF-α를 처리한 건세포에서 Tenomodulin 단백질 발현량이 현저하게 감소하였다. 반면, TNF-α와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포의 Tenomodulin 단백질 발현량은 TNF-α를 처리한 건세포의 Tenomodulin 단백질 발현량에 비해 현저하게 증가하였다. 특히, 25 ㎍의 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포의 Tenomodulin 단백질 발현량은 정상군의 Tenomodulin 단백질 발현량과 유의미한

차이를 나타내지 않았다(도 32).

실시예 9. 미토콘드리아 전달에 따른 건세포 내 미토콘드리아의 활성 개선 확인

미토콘드리아 전달에 따른 건세포의 미토콘드리아 활성(dynamics)이 개선되는지 확인하기 위해, TNF-a 10 ng을 건세포에 처리한 후, 37℃, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아 1 ㎍, 5 ㎍ 또는 25 ㎍을 건세포에 처리한 후, 다시 37℃, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 미토콘드리아 분열 인자 및 미토콘드리아 융합 인자의 단백질 발현량을 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 웨스턴 블롯은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 사용된 1차 항체는 항-Fis1 항체(Cell signaling; D6C7) 및 항-Drp1 항체(Santa cruz; sc98900)를 사용하였다(도 33).

그 결과, TNF-a를 처리한 건세포에서 미토콘드리아 분열 인자인 Fis1 및 Drp1 단백질의 발현량이 증가하였다. 반면, TNF-a와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포의 Fis1 및 Drp1 단백질의 발현량은 감소하였다(도 34 및 도 35).

또한, TNF-a를 처리한 건세포에서 미토콘드리아 융합 인자인 MFN2 단백질의 발현량은 감소하였다. 반면, TNF-a와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 MFN2 단백질 발현량이 증가하였다(도 36). 이를 통해, 외래 건강한 미토콘드리아를 손상된 건세포에 전달함에 따라 미토콘드리아 활성이 개선되는 것을 확인하였다.

실시예 10. 미토콘드리아 전달에 따른 건세포의 염증 억제 효과 확인

외래의 건강한 미토콘드리아를 전달함에 따라 건세포의 염증반응이 억제되는지 확인하기 위해, TNF-a 10 ng을 건세포에 처리한 후, 37℃, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아 1 ㎍, 5 ㎍ 또는 25 ㎍을 건세포에 처리한 후, 다시 37℃, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 건세포의 IL-1β, IL-6 및 p-NF-kB의 발현량을 ELISA와 웨스턴 블롯으로 확인하였다. ELISA는 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 또한, 웨스턴 블롯은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 사용된 1차 항체는 항-p-NF-kB 항체(Cell signaling; 9936S)를 사용하였다. ELISA의 경우 L-1β(R&D; RLB00), IL-6R&D; R6000B)를 사용하였다.

그 결과, TNF-a를 처리한 건세포에서 염증 사이토카인인 IL-1β와 IL-6의 발현량이 증가하였다. 반면, TNF-a와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서 염증 사이토카인 IL-1β와 IL-6의 발현량이 감소하였다(도 37 및 도 38).

또한, TNF-a를 처리한 건세포에서 염증 신호인 p-NF-kB 단백질의 발현량은 증가하였다. 반면, TNF-a와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 p-NF-kB 단백질 발현량이 감소하였다(도 39 및 도 40). 이를 통해, 외래 건강한 미토콘드리아를 손상된 건세포에 전달함에 따라 건세포 내 염증이 억제되는 것을 확인하였다.

실시예 11. 마이크로어레이 분석

건세포를 6-웰-플레이트에 1×10^5 세포수로 접종한 후, 2일 뒤에 TNF-a 10 ng/㎖을 처리하고 37℃, 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아를 건세포 내 전달하고, 24시간 후에 건세포로부터 RNA를 추출하였다. 상기 건세포로부터 추출한 RNA는 Easy-spin Total RNA Extraction Kit(iNtRON Bio, Seoul, South Korea)를 이용하여 추출하였으며, Nanodrop spectrophotometer(Thermo Fisher, Waltham, USA) (260:280 > 1.9 와 260:230 > 1.9)를 이용하여 농도와 순도를 측정하였다.

상기 마이크로어레이 분석은 Affymetrix HuGene 2.0ST chips(Affymetrix, California, USA)를 이용하여 수행하였다. 히트 맵(heat map) 형성은 모르페우스(Morpheus) 프로그램을 이용하여 클러스터링 하였다(도 41).

그 결과, 전반적으로, TNF-a를 처리한 건세포에서 TNF 신호전달(TNF signaling), 세포 사멸(apoptosis), 칼슘 신호전달(calcium signaling), 염증 매개자 조절(inflammation mediator regulation), NF-kB 신호전달(NF-kB signaling) 및 ECM-수용체 상호작용(ECM-receptor interacrion)와 관련된 인자의 발현율이 높고, 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)와 관련된 인자의 발현율이 낮았다. 반면, TNF-a와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 TNF 신호전달, 세포 사멸, 칼슘 신호전달, 염증 매개자 조절, NF-kB 신호전달 및 ECM-수용체 상호작용와 관련된 인자의 발현율이 낮고, 산화적 인산화와 관련된 인자의 발현율이 높았다(도 41).

이를 통해, TNF-a를 처리한 건세포에서 염증 유도, 세포 사멸, 미토콘드리아 기능 이상 및 건조직이 파괴되는 것을 확인하였으며, TNF-a와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서 염증 유도, 세포 사멸, 미토콘드리아 기능 이상 및 건조직의 파괴가 개선되는 것을 확인하였다.

실시예 12. 건 조직 내 미토콘드리아 전달 확인

건 조직내로 외래의 미토콘드리아가 전달 되는지 확인하기 위해, 먼저, 외래의 건강한 미토콘드리아를 분리하기 전에 L6 세포(ATCC, CRL-1458)에 Mitotracker CMXRos red 시약을 이용하여 염색하였다. 염색된 L6 세포로부터 실시예 4와 동일한 방법으로 건강한 미토콘드리아를 분리하였으며, 염색된 건강한 미토콘드리아를 25 ㎍을 건 조직에 주입하였다. 건 조직은 동결 절단(cryosection)을 하였다. 그 후, 건 조직을 슬라이드에 부착하고 300 nM mitotracker green 염색약을 처리한 후 37℃, 5% CO_2 조건에서 30분간 배양하였다. 추가적으로, DAPI 염색을 진행하였다. 그 후, 공 초점 레이저 스캐닝 ZEISS LSM 880(Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)을 이용하여 400배율로 형광 이미지를 분석하였다(도 42).

그 결과, 도 42에 나타난 바와 같이, 전달된 건강한 미토콘드리아(빨간색)와 기존의 건 조직 내 미토콘드리아(녹색)가 관찰되었으며, 이를 통해, 건 조직 내로 외래의 건강한 미토콘드리아가 전달되었음을 확인하였다.

실시예 13. 건 조직 내 미토콘드리아 전달에 따른 미토콘드리아 활성 개선 확인

외래의 건강한 미토콘드리아를 전달함에 따라 건 조직 내 미토콘드리아의 활성이 개선되는지 확인하기 위해, 0.6 ㎎의 collagenase I(Sigma-Aldrich, Dorset, England)을 건 조직에 주입한 후 2주간 건 조직의 염증을 유도하였다. 그 후, 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아 10 ㎍ 또는 50 ㎍을 건 조직에 주입하였다. 2주 후, 미토콘드리아 분열 인자 및 미토콘드리아 융합 인자의 단백질 발현량을 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 웨스턴 블롯은 실시예 9 동일하게 수행하였다(도 43).

그 결과, collagenase I를 처리한 건 조직에서 미토콘드리아 분열 인자인

Fis1 및 Drp1 단백질 발현량이 증가하였다. 반면, collagenase I과 건강한 미토콘드리아를 처리한 건 조직에서는 Fis1 및 Drp1 단백질의 발현량이 감소하였다(도 44 및 도 45).

또한, collagenase I을 처리한 건 조직에서 미토콘드리아 융합 인자인 MFN2 단백질의 발현량은 감소하였다. 반면, collagenase I와 건강한 미토콘드리아를 처리한 건세포에서는 MFN2 단백질 발현량이 증가하였다(도 46). 이를 통해, 미토콘드리아를 손상된 건조직에 전달함에 따라 미토콘드리아 활성이 개선되는 것을 확인하였다.

실시예 14. 미토콘드리아 전달에 따른 건 조직의 기질 회복

외래의 건강한 미토콘드리아를 전달함에 따라 건 조직이 회복되는 확인하기 위해, 0.6 mg collagenase I을 건 조직에 주입한 후 2주간 건 조직의 염증 유도하였다. 그 후, 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아 10 ㎍ 또는 50 ㎍을 건 조직에 주입하였다. 2주 후, TNC 및 MMP1 단백질의 발현량을 웨스턴 블롯과 ELISA로 확인하였다. 웨스턴 블롯은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 사용된 1차 항체는 항-TNC 항체(Abcam, ab203676) 및 항-MMP1 항체(Santa Cruz; sc-21731)를 사용하였다. ELISA는 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다(도 47).

그 결과, collagenase I을 처리한 건 조직에서 TNC(tenascin-C) 및 MMP1 단백질의 발현량이 증가하였다. 이는 건 조직의 금속 단백질 분해효소 불균형을 나타낸다. 반면, collagenase I과 건강한 미토콘드리아를 처리한 건 조직에서는 TNC 및 MMP1 단백질의 발현량이 감소하였으며, 정상 건 조직의 TNC 및 MMP1 단백질 발현량과 유의미한 차이가 나타나지 않았다(도 48 및 도 49).

또한, 건 조직 내 콜라겐의 함량을 정략적으로 확인하기 위해, 하이드록시프롤린 분석(hydroxyproline assay)을 진행하였다. 건 조직은 빠르게 액체 질소에서 동결시킨 후 -80℃ 온도에서 보관하였다. 조직 파쇄 방법과 실험법은 hydroxyproline Assay Kit(Abcam, ab222941)에서 제공한 매뉴얼에 따라 수행하였다. 조직을 파쇄한 후 10 N NaOH와 HCl을 처리한 후 10,000×g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 회수한 후, oxidation mix를 넣고 20분간 상온에서 반응시켰다. developer와 DMAB concentrate solution을 각 웰당 50 ㎖씩 넣고

45분간 65℃ 온도에서 반응시켰다. Synergy Mix Multi-Mode Reader(BioTek, Vermont, USA)를 이용하여 560 nm 파장에서 측정하였다.

그 결과, collagenase I를 처리한 건 조직에서 콜라겐 함량이 정상 건 조직 대비 32±0.4 % 감소하였다. 반면, collagenase I와 건강한 미토콘드리아(10 mg 또는 50 mg)를 처리한 건 조직에서는 콜라겐 함량이 각각 25.4, 24 ±0.7% 증가하였다(도 50). 이를 통해, 미토콘드리아 전달이 손상된 건 조직의 재생을 촉진하는 것을 확인하였다.

실시예 15. 미토콘드리아 전달에 따른 건 조직의 염증 억제 효과 확인

외래의 건강한 미토콘드리아를 전달함에 따라 건 조직 내 염증반응이 억제되는지 확인하기 위해, 0.6 mg collagenase I을 건 조직에 주입한 후 2주간 건 조직의 염증 유도하였다. 그 후, 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아 10 ㎍ 또는 50 ㎍을 건 조직에 주입하였다. 2주 후, 건세포의 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 p-NF-kB의 발현량을 ELISA와 웨스턴 블롯으로 확인하였다. ELISA는 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였으며, 웨스턴 블롯은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 사용된 1차 항체는 항-p-NF-kB 항체(Cell signaling; 9936S)를 사용하였다. ELISA의 경우 TNF-α(R&D; 210-TA-005), L-1β(R&D; RLB00), IL-6R&D; R6000B)를 사용하였다.

그 결과, collagenase I을 처리한 건 조직에서 염증 사이토카인인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 발현량이 증가하였다. 반면, collagenase I과 건강한 미토콘드리아를 처리한 건 조직에서 염증 사이토카인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 발현량이 감소하였다(도 51 내지 도 53).

또한, collagenase I을 처리한 건 조직에서 염증 신호인 p-NF-kB 단백질의 발현량은 증가하였다. 반면, collagenase I과 건강한 미토콘드리아를 처리한 건 조직에서는 p-NF-kB 단백질 발현량이 감소하였다(도 54). 이를 통해, 외래 건강한 미토콘드리아를 손상된 건 조직에 전달함에 따라 건 조직 내 염증이 억제되는 것을 확인하였다.

실시예 16. 미토콘드리아 전달에 따른 건병증 환자 유래 건세포의 세포 증식 및 관련 인자 변화 확인

외래의 건강한 미토콘드리아를 전달함에 따라 건병증 환자 유래의 건세포가 회복되는지 확인하기 위해, 실시예 4에서 분리한 건강한 미토콘드리아 1 ㎍, 5 ㎍ 또는 25 ㎍을 건병증 환자에서 분리한 건세포(Zenbio,TEN-F)에 처리하였다. 2주 후, 건세포의 증식율 및 건 관련 인자를 WST-1 분석 및 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 웨스턴 블롯은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 사용된 1차 항체는 항-TNC 항체(Abcam,ab203676), 항-TNMD 항체(Abcam, ab203676) 및 항-Collagen type 1 항체(Abcam; ab6308)를 사용하였다. 또한, WST-1(EZ-cyto x, EZ-3000, Dozen) 분석은 배지와 1:9로 배합하여 450 nm 파장에서 측정하였다.

그 결과, 외래의 건강한 미토콘드리아를 전달함에 따라 건세포의 증식이 증가하였다(도 55). 또한, 건 관련 인자인 TNC 단백질의 발현이 미토콘드리아 전달 농도 의존적으로 감소하였고, TNMD 단백질의 발현 역시 농도 의존적으로 증가하였다. 이외에도, Collagen 단백질의 발현이 미토콘드리아가 전달되지 않은 군 대비 증가하였다(도 56 내지 도 59). 이를 통해, 외래의 건강한 미토콘드리아 전달이 손상된 건변증 환자의 건세포를 회복시키는 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1]

미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 2]

제 1항에 있어서,

상기 미토콘드리아는 세포 또는 조직으로부터 분리된 것인, 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 3]

제 2항에 있어서,

상기 세포는 체세포, 생식세포, 줄기세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 4]

제 3항에 있어서,

상기 줄기세포가 중간엽줄기세포, 성체줄기세포, 역분화줄기세포, 배아줄기세포, 골수줄기세포, 신경줄기세포, 윤부줄기세포, 조직 유래 줄기세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 5]

제 4항에 있어서,

상기 중간엽줄기세포가 탯줄, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막, 태반, 활액, 정소, 골막 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로부터 수득된 것인, 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 6]

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물에 대하여, 상기 미토콘드리아는 0.1 ㎍/㎖ 내지 500 ㎍/㎖의 농도로 포함되는, 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 7]

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물이 건 조직의 염증을 억제하는 것을 특징으로 하는 것인, 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 8]

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물이 건 조직의 콜라겐의 손상을 입은 환자 또는 건 조직이 만성 퇴행(chronic degenerative)인 환자에게 적용되는 것을 특징으로 하는 것인, 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 9]

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물이 건병증 환자의 collagen I, TNMD(tenomodulin), Scleraxis, hydroxyproline 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 것인, 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 10]

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물이 건병증 환자의 BID(BH3 interacting-domain death agonist), Bax(Bcl-2-associated X protein), MMP1, Fis1(Mitochondrial fission 1 protein), Drp1(Dynamin-1-like protein), MFN2(Mitofusin-2), IL-1β, IL-6, p-

NF-kB, TNC(tenascin C), TNF-α 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 것인, 건병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 11]

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 건병증 예방 또는 치료방법.

[청구항 12]

제 11항에 있어서,

상기 개체는 손상된 건 조직을 가지고 있는 것인, 건병증 예방 또는 치료방법.

[청구항 13]

제 11항에 있어서,

상기 투여는 근육 내(intra- muscular), 정맥 내(intra-venous) 또는 건 내(intra-tendinous) 투여인 것인, 건병증 예방 또는 치료방법.

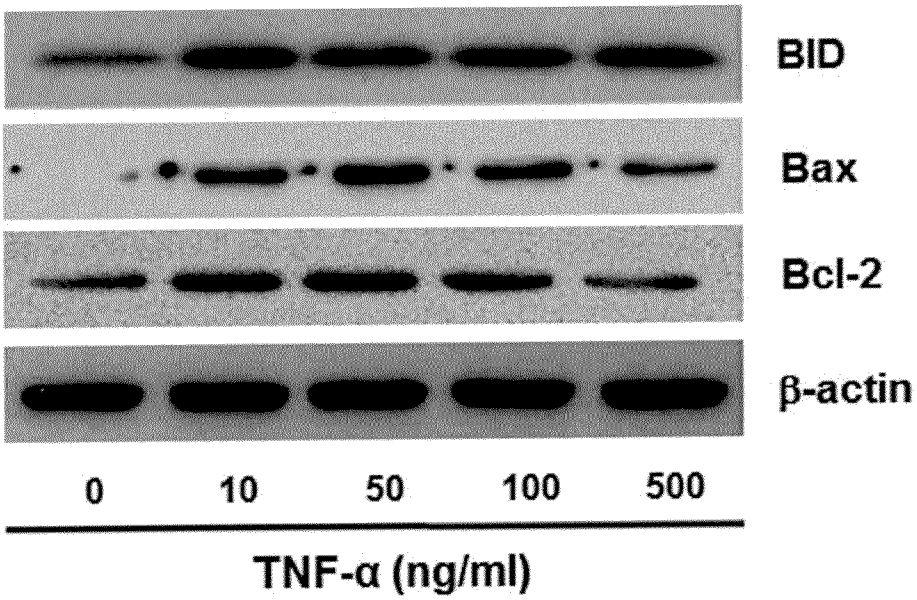
[청구항 14]

건병증을 치료하기 위한 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물의 용도.

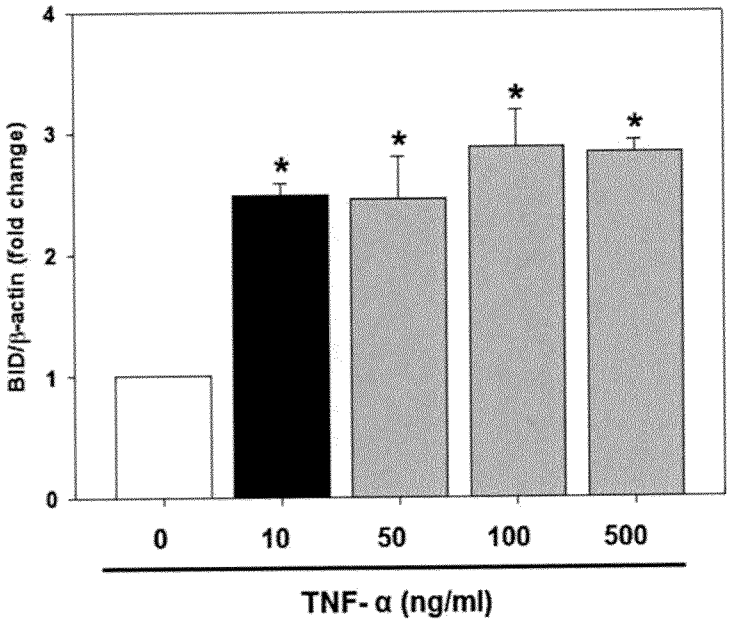
[청구항 15]

건병증 치료용 약제를 제조하기 위한 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물의 용도.

[도 1]

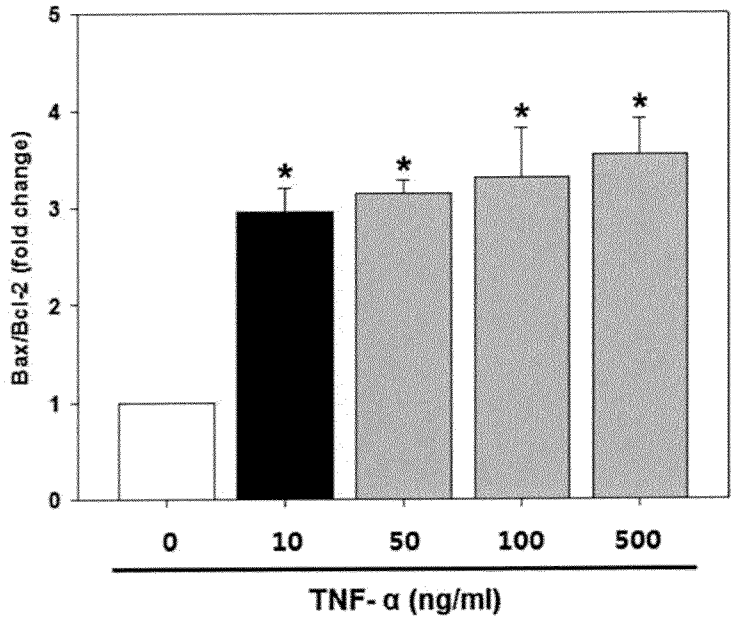


[도 2]



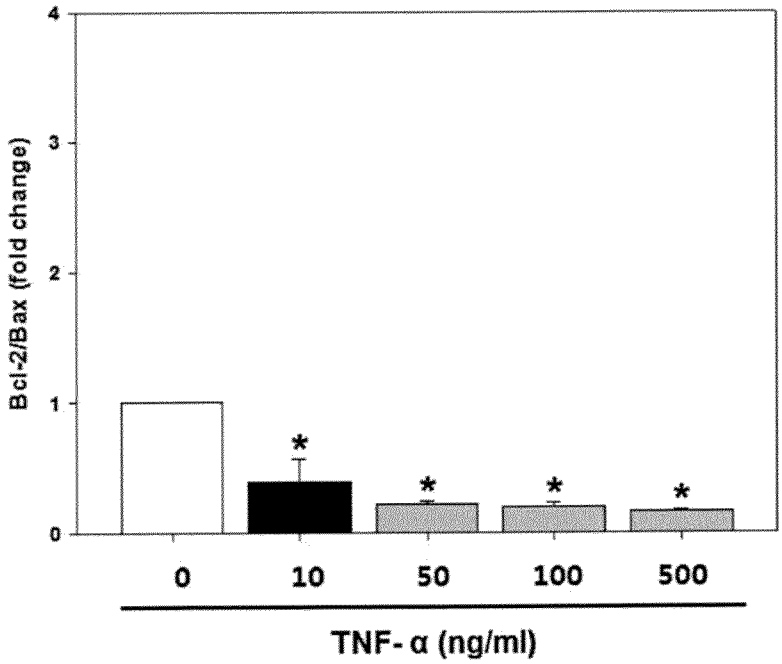
*p<0.05 vs control

[도 3]



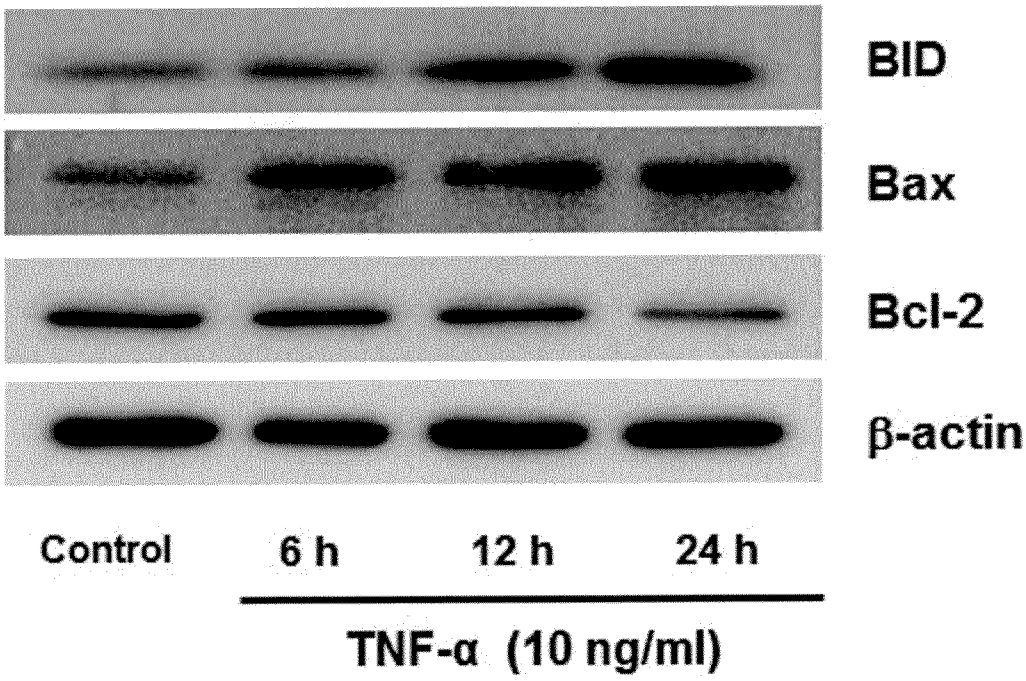
*p<0.05 vs control

[도 4]

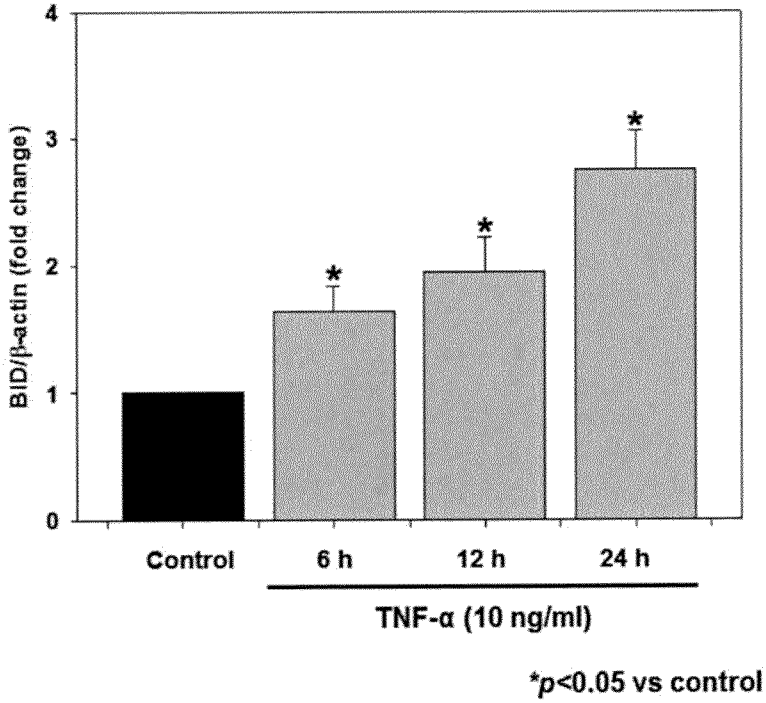


*p<0.05 vs control

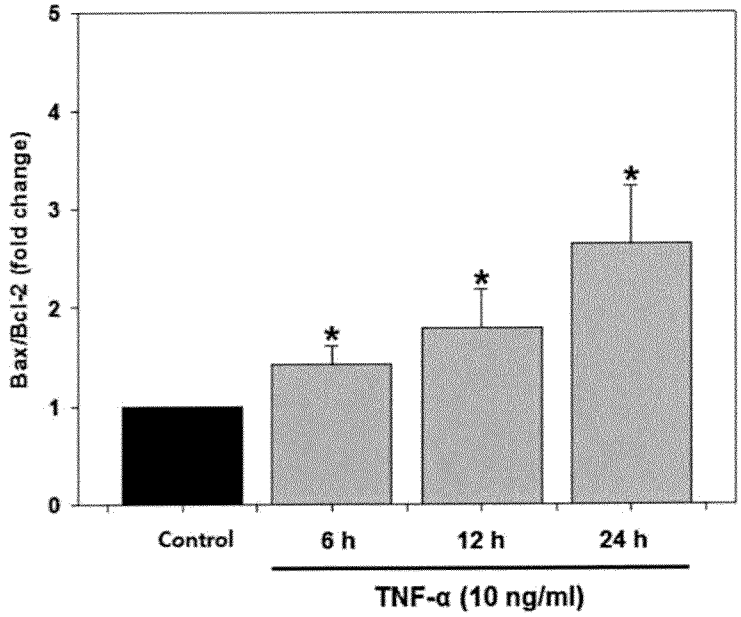
[도 5]


BID
Bax
Bcl-2
β-actin
Control
6 h
12 h
24 h
TNF-α (10 ng/ml)

[도 6]

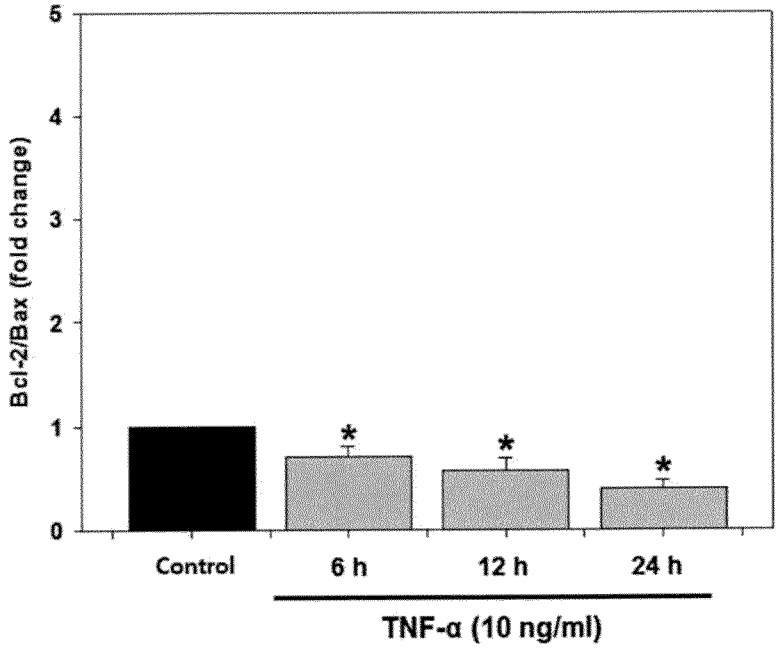

BID/β-actin (fold change)
0
1
2
3
4
*
*
*
Control
6 h
12 h
24 h
TNF-α (10 ng/ml)
*p<0.05 vs control

[도 7]



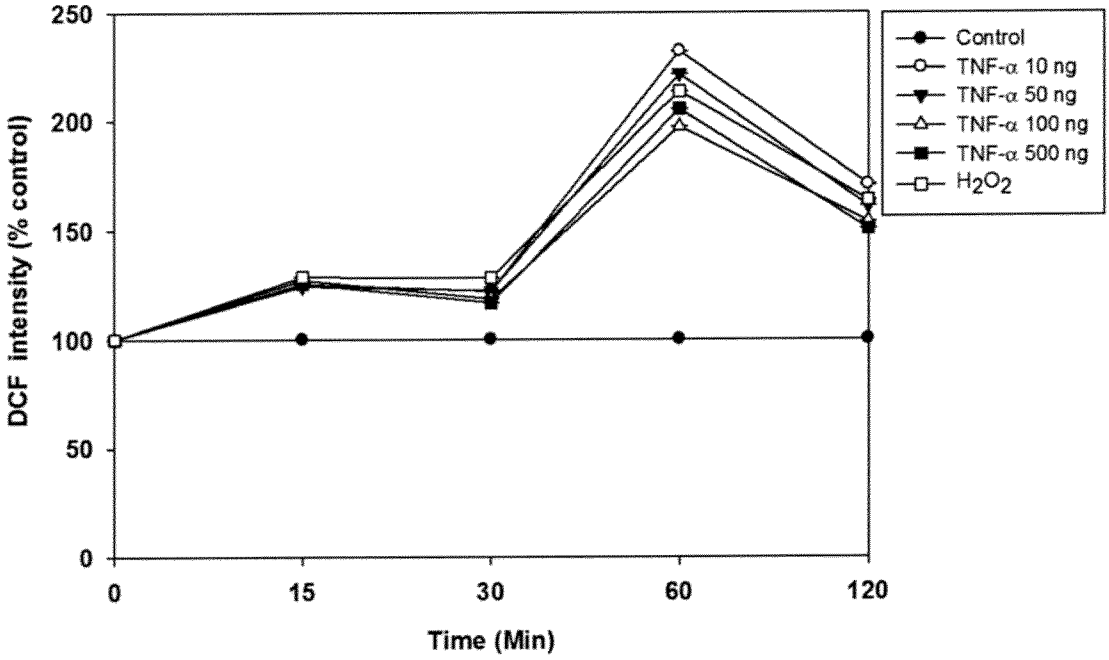
*p<0.05 vs control

[도 8]

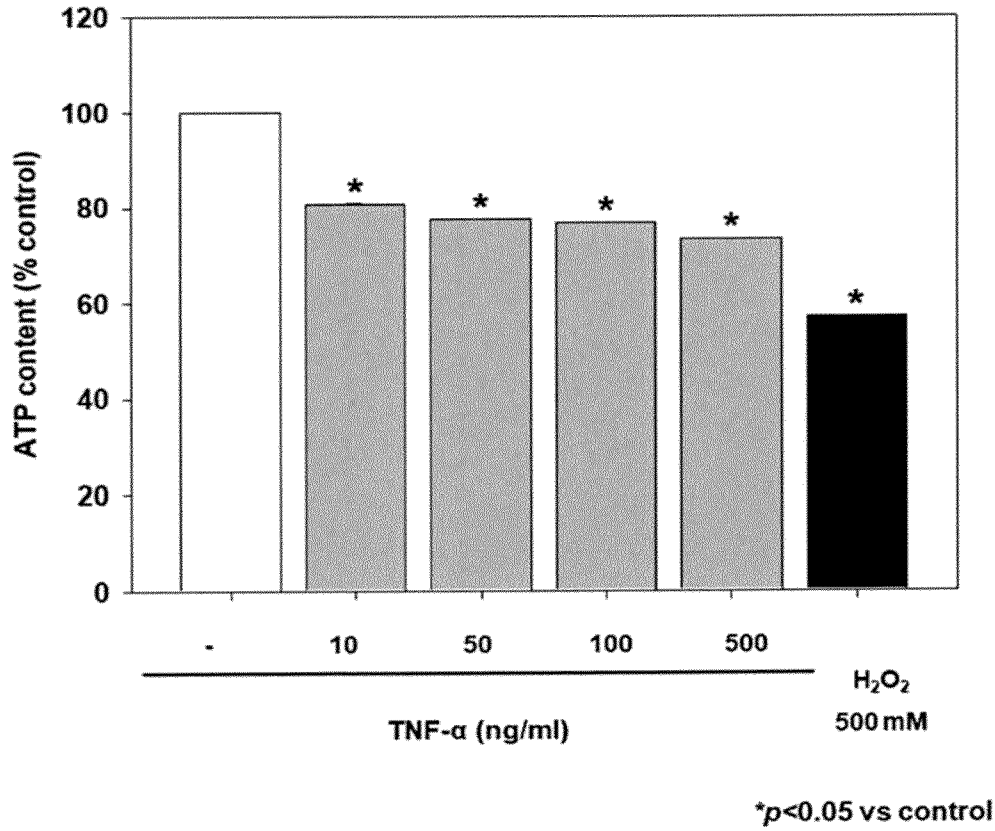


*p<0.05 vs control

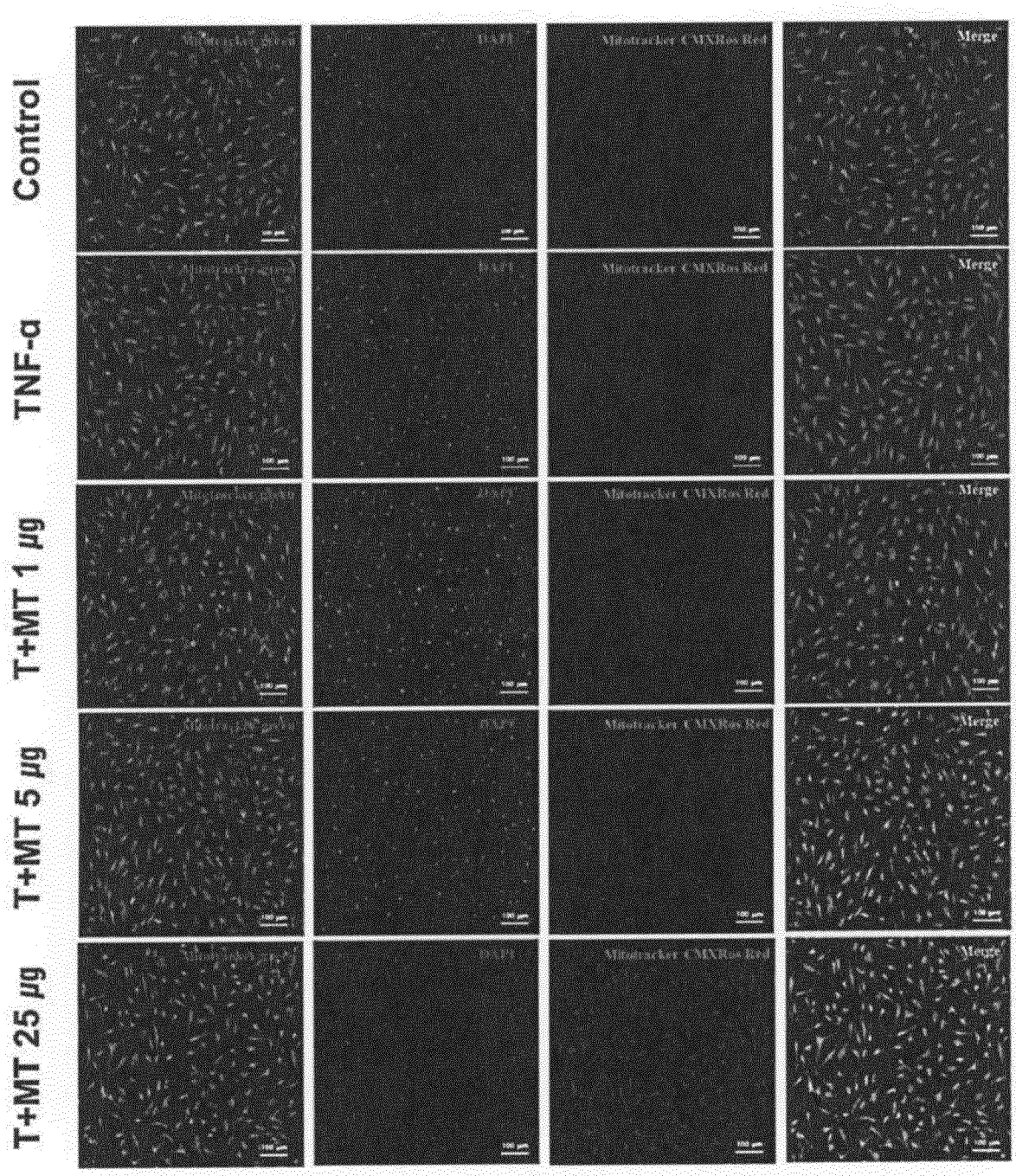
[도 9]


250
200
150
100
50
0
DCF intensity (% control)
0
15
30
60
120
Time (Min)
Control
TNF-α 10 ng
TNF-α 50 ng
TNF-α 100 ng
TNF-α 500 ng
H2O2

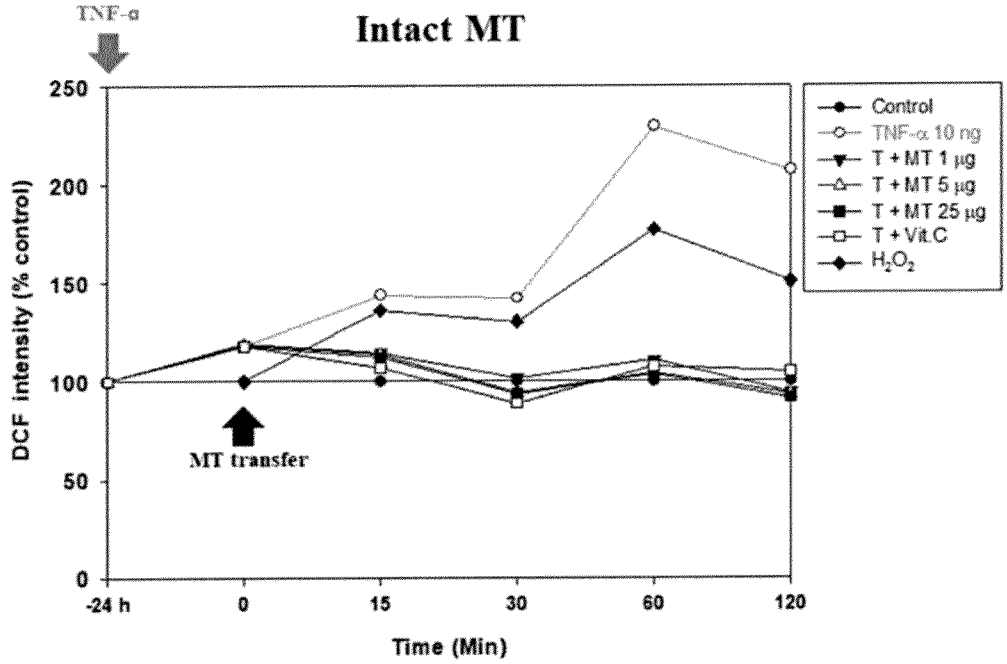
[도 10]


120
100
80
60
40
20
0
ATP content (% control)
*
*
*
*
*
-
10
50
100
500
H2O2
500 mM
TNF-α (ng/ml)
*p<0.05 vs control

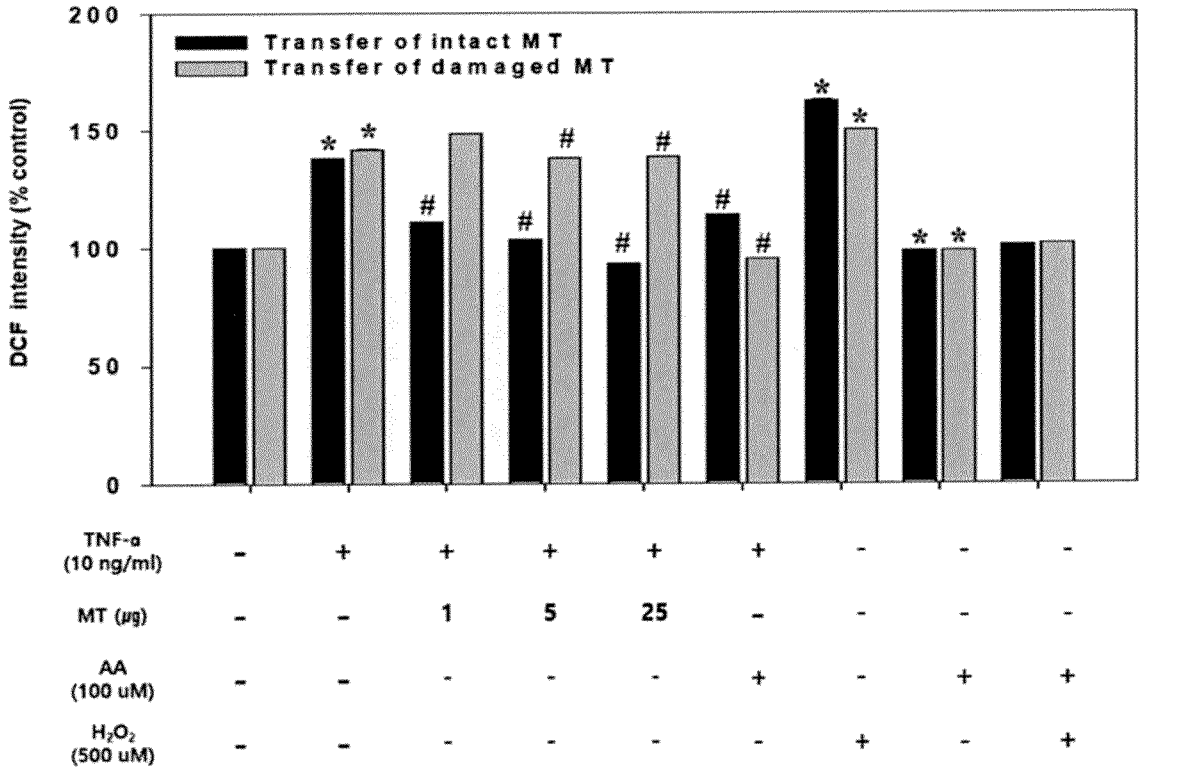
[도 11]


Control
TNF-α
T+MT 1 μg
T+MT 5 μg
T+MT 25 μg
Mitotracker Green
DAPI
Mitotracker CMXRos Red
Merge

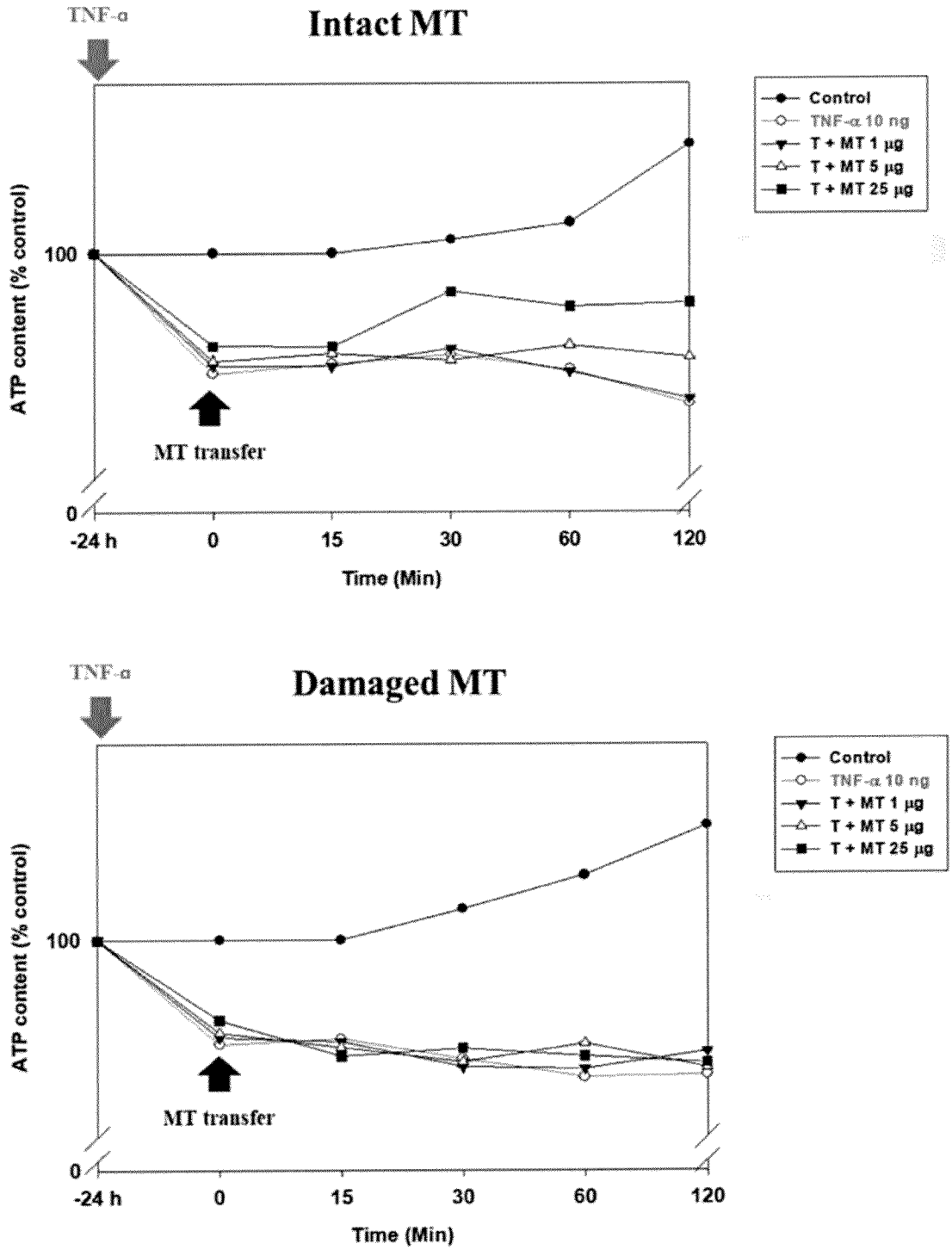
[도 12]


TNF-α
Intact MT
DCF intensity (% control)
250
200
150
100
50
0
MT transfer
-24 h
0
15
30
60
120
Time (Min)
Control
TNF-α 10 ng
T + MT 1 μg
T + MT 5 μg
T + MT 25 μg
T + Vit.C
H2O2

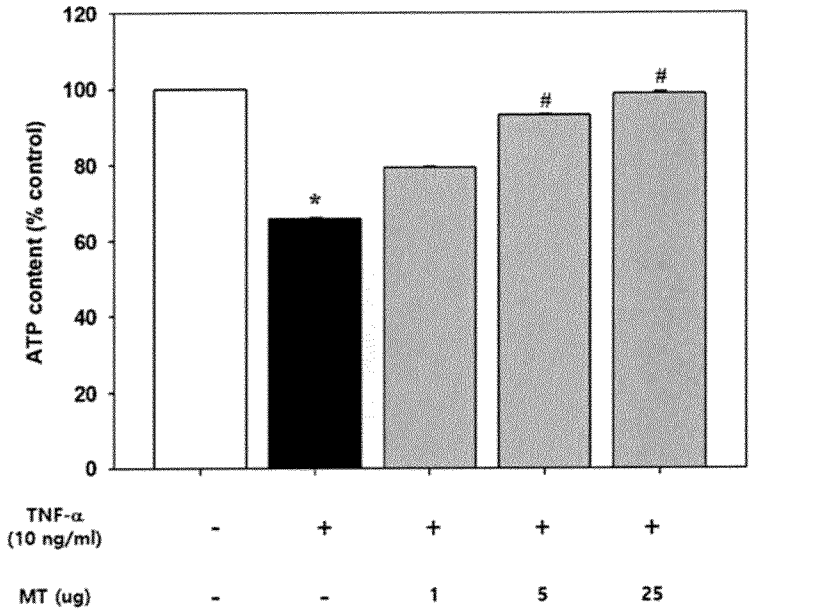
[도 13]


Transfer of intact MT
Transfer of damaged MT
DCF intensity (% control)
200
150
100
50
0
TNF-α (10 ng/ml) - + + + + + - - -
MT (μg) - - 1 5 25 - - - -
AA (100 uM) - - - - - + - + +
H2O2 (500 uM) - - - - - - + - +
* p<0.05 vs control
# p<0.05 vs TNF-α

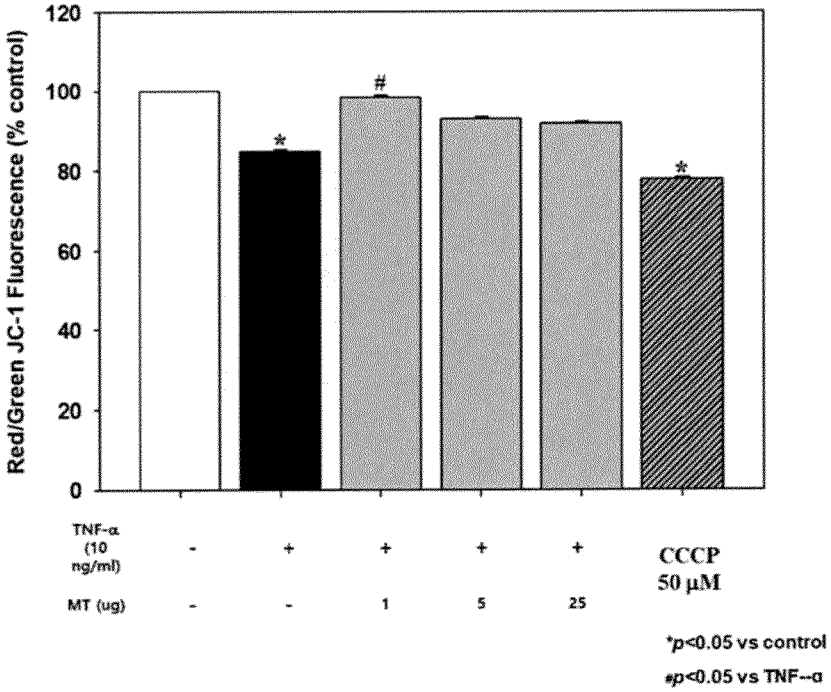
[도 14]


TNF-α
Intact MT
Control
TNF-α 10 ng
T + MT 1 μg
T + MT 5 μg
T + MT 25 μg
ATP content (% control)
100
0
MT transfer
-24 h
0
15
30
60
120
Time (Min)
TNF-α
Damaged MT
Control
TNF-α 10 ng
T + MT 1 μg
T + MT 5 μg
T + MT 25 μg
ATP content (% control)
100
0
MT transfer
-24 h
0
15
30
60
120
Time (Min)

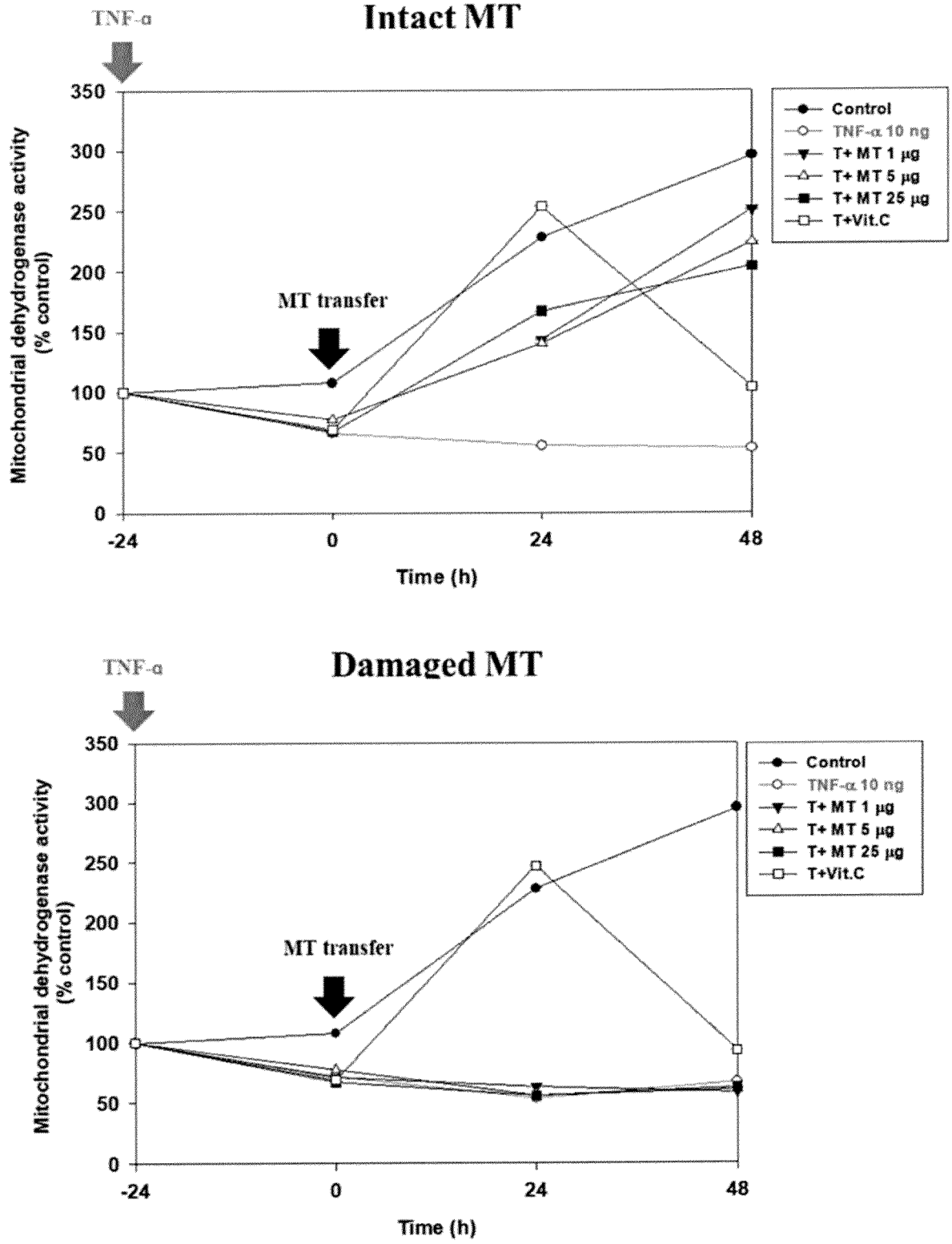
[도 15]


ATP content (% control)
120
100
80
60
40
20
0
*
#
#
TNF-α (10 ng/ml)
- + + + +
MT (ug)
- - 1 5 25
*p<0.05 vs control
#p<0.05 vs TNF--α

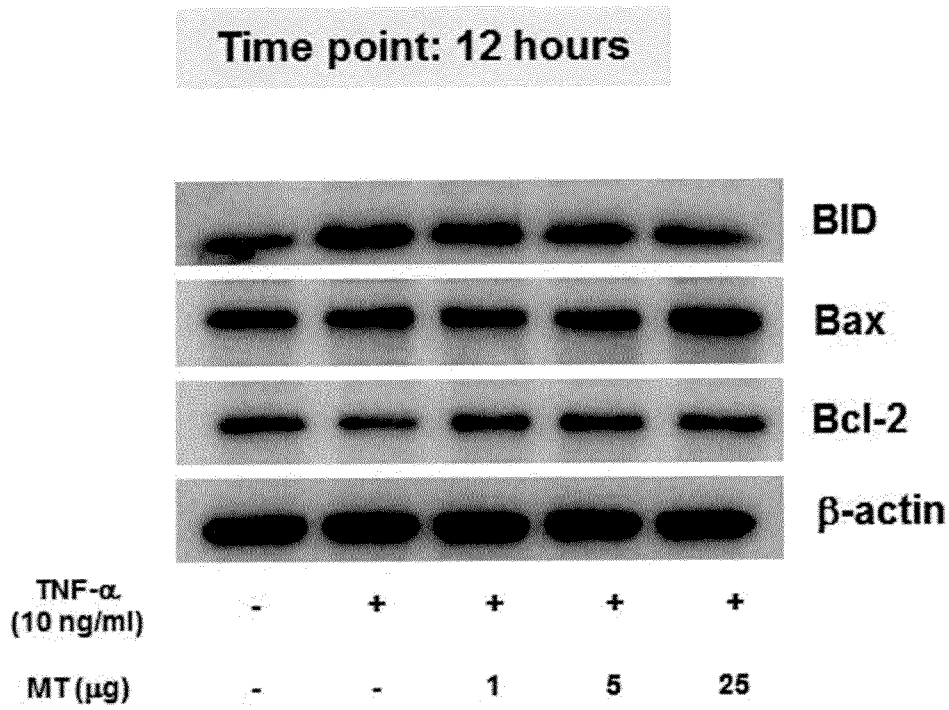
[도 16]


Red/Green JC-1 Fluorescence (% control)
120
100
80
60
40
20
0
*
#
*
TNF-α (10 ng/ml)
- + + + +
CCCP 50 μM
MT (ug)
- - 1 5 25
*p<0.05 vs control
#p<0.05 vs TNF--α

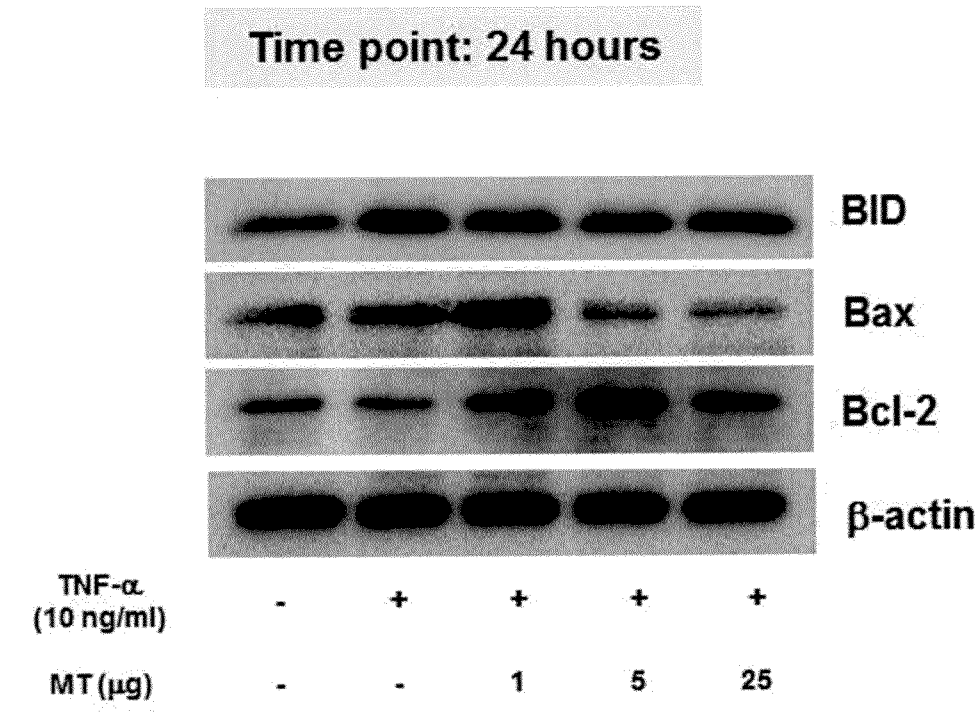
[도 17]


Intact MT
TNF-α
MT transfer
Mitochondrial dehydrogenase activity (% control)
Time (h)
Control
TNF-α 10 ng
T+ MT 1 μg
T+ MT 5 μg
T+ MT 25 μg
T+Vit.C
Damaged MT
TNF-α
MT transfer
Mitochondrial dehydrogenase activity (% control)
Time (h)
Control
TNF-α 10 ng
T+ MT 1 μg
T+ MT 5 μg
T+ MT 25 μg
T+Vit.C

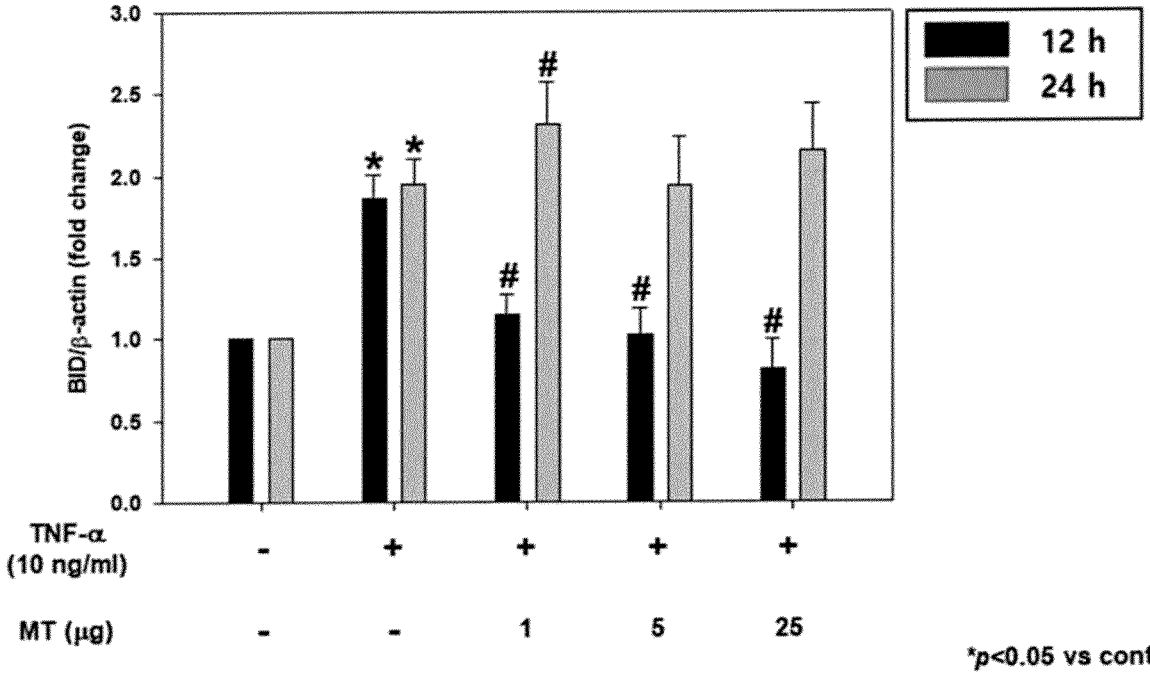
[도 18]


Time point: 12 hours
BID
Bax
Bcl-2
β-actin
TNF-α (10 ng/ml) - + + + +
MT (μg) - - 1 5 25

[도 19]


Time point: 24 hours
BID
Bax
Bcl-2
β-actin
TNF-α (10 ng/ml) - + + + +
MT (μg) - - 1 5 25

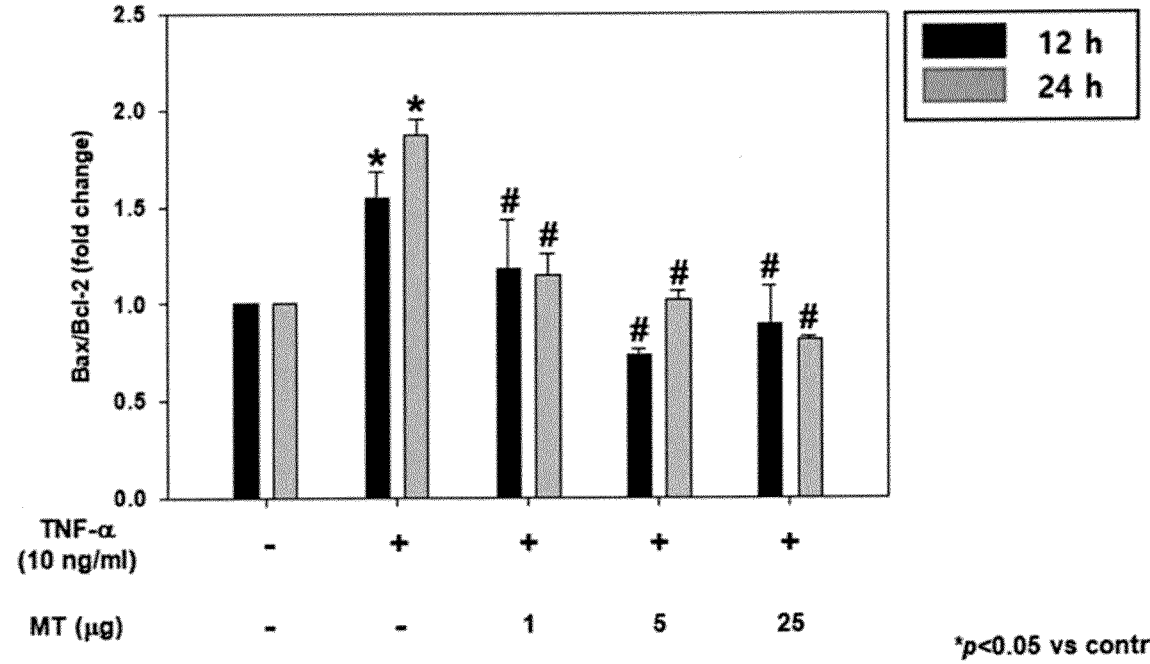
[도 20]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs TNF-α

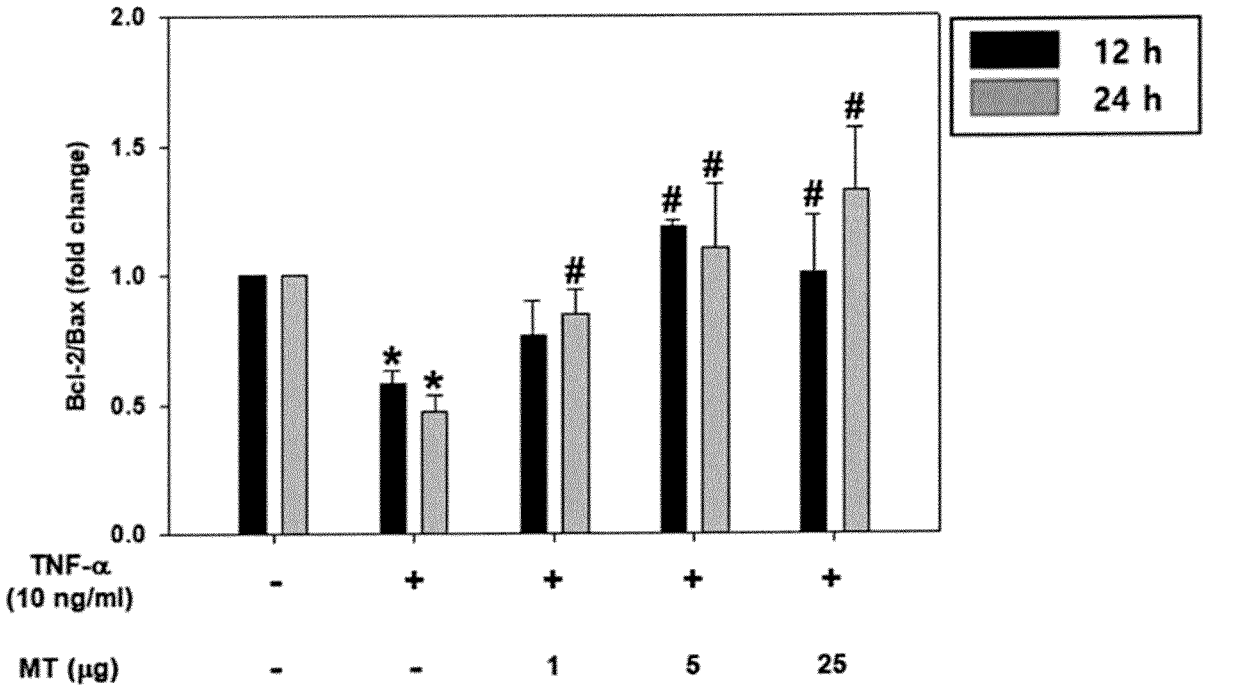
[도 21]



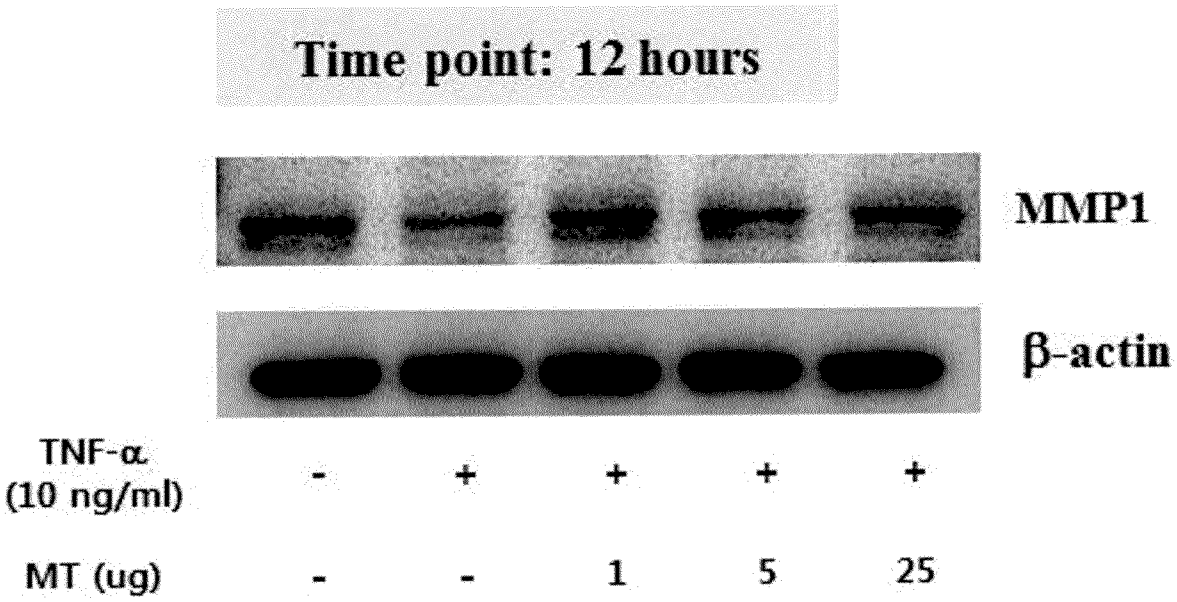
*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs TNF-α

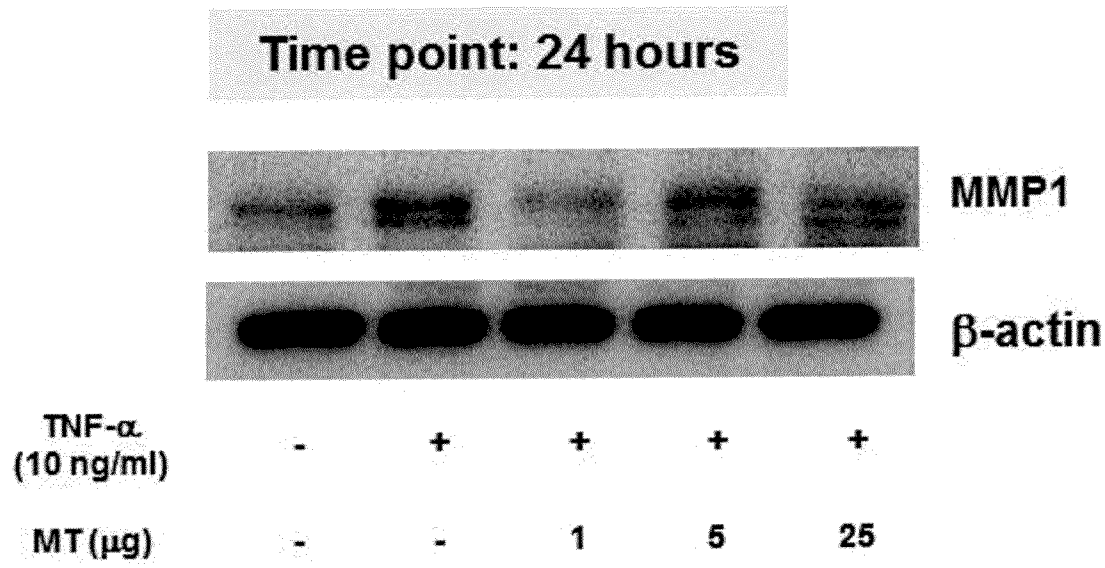
[도 22]


2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Bcl-2/Bax (fold change)
12 h
24 h
TNF-α
(10 ng/ml)
- + + + +
MT (μg)
- - 1 5 25
*p<0.05 vs control
#p<0.05 vs TNF-α

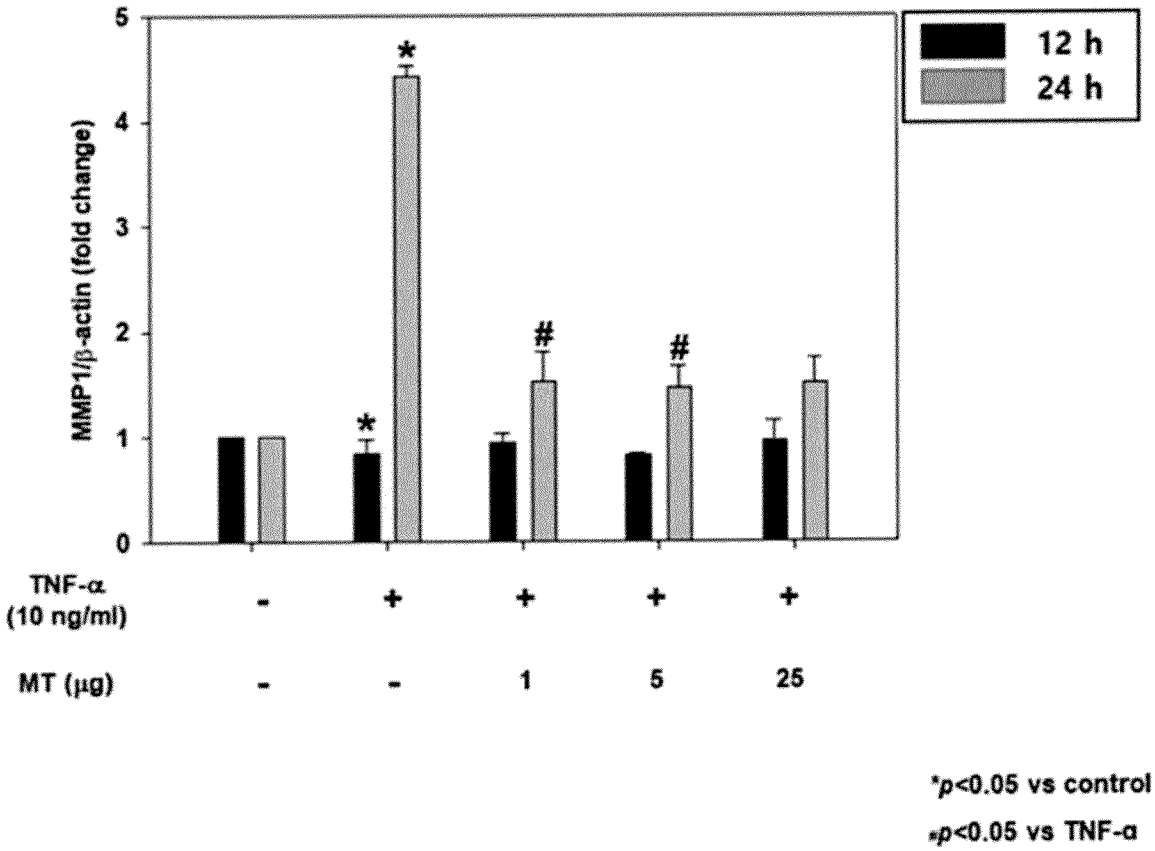
[도 23]


Time point: 12 hours
MMP1
β-actin
TNF-α
(10 ng/ml)
- + + + +
MT (ug)
- - 1 5 25

[도 24]



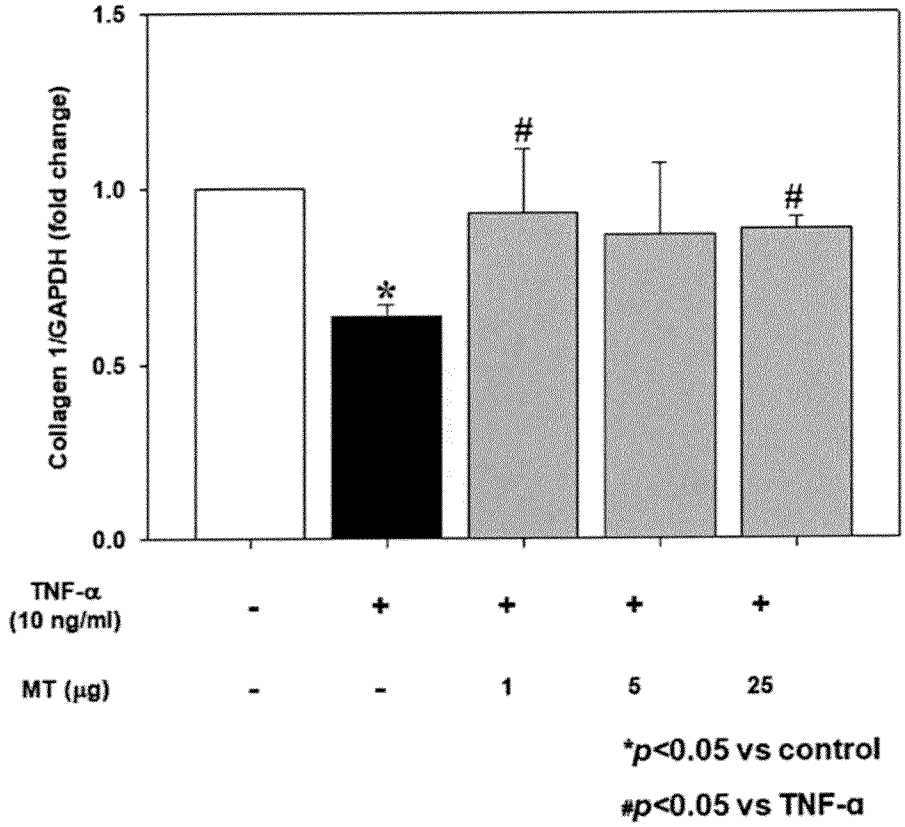
[도 25]



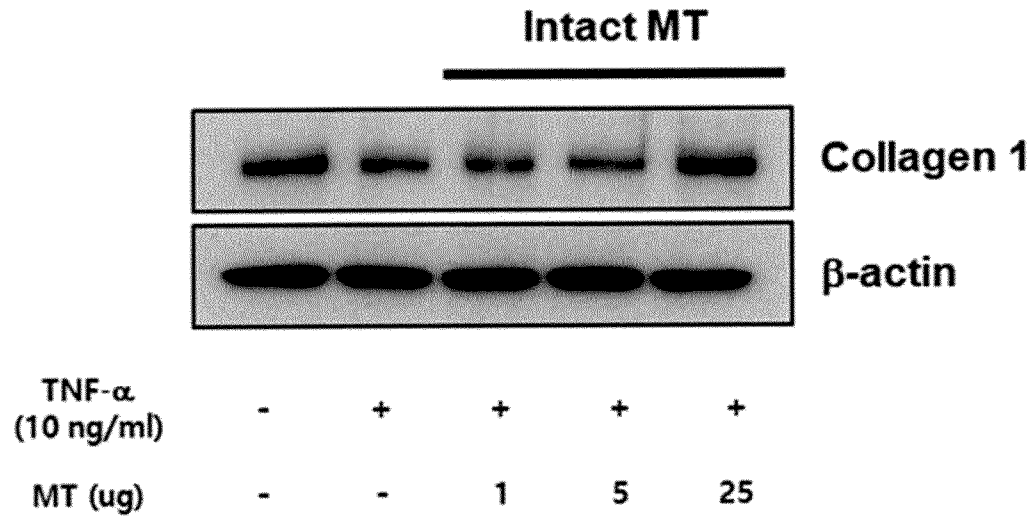
*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs TNF-α

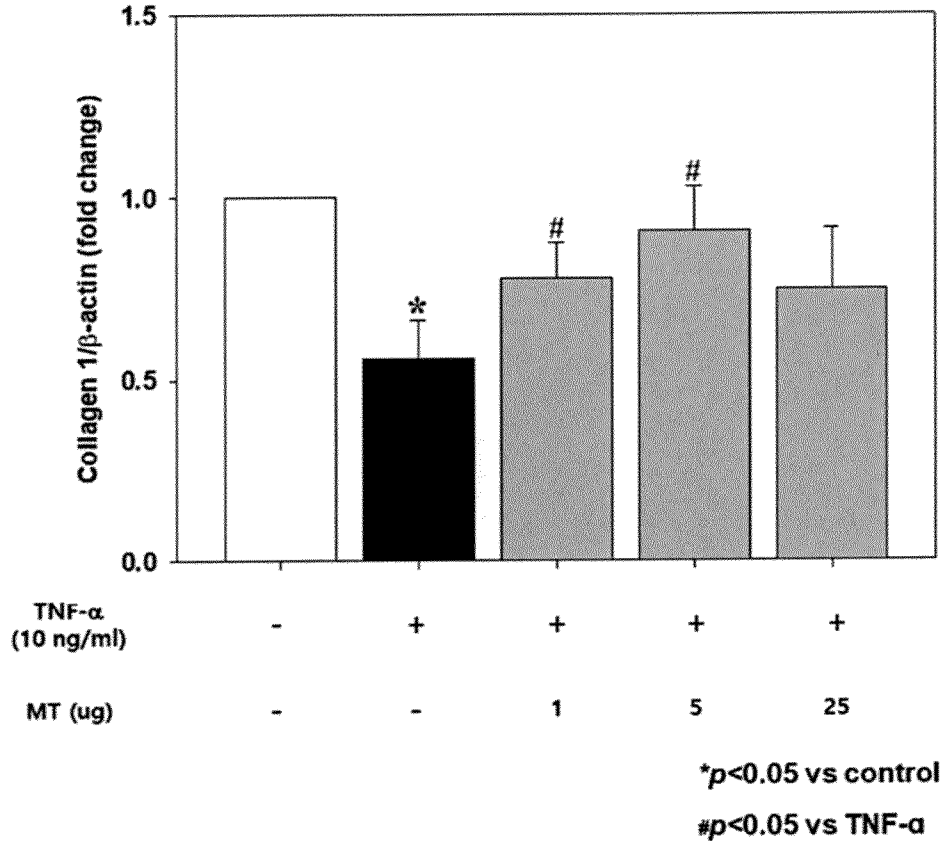
[도 26]


Collagen 1/GAPDH (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
#
TNF-α (10 ng/ml)
- + + + +
MT (μg)
- - 1 5 25
*p<0.05 vs control
#p<0.05 vs TNF-α

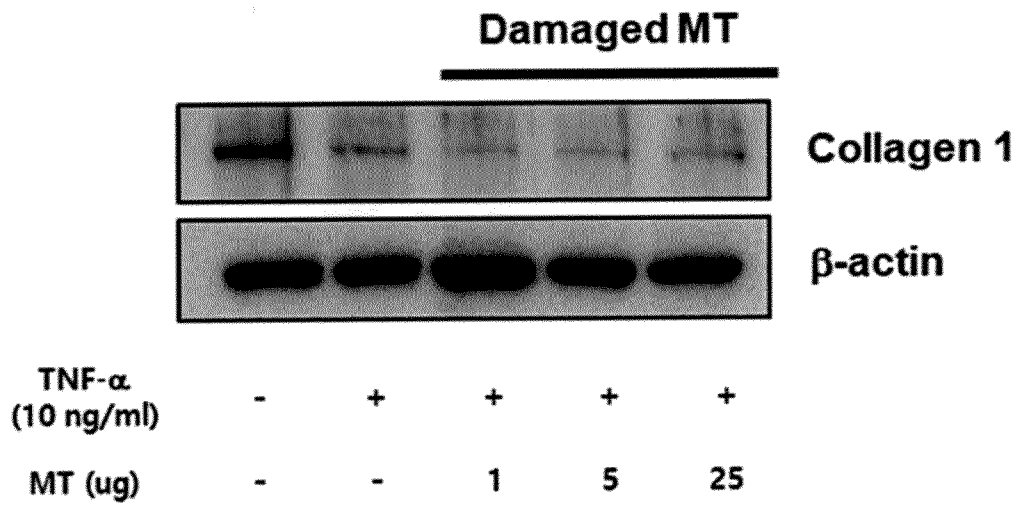
[도 27]


Intact MT
Collagen 1
β-actin
TNF-α (10 ng/ml)
- + + + +
MT (ug)
- - 1 5 25

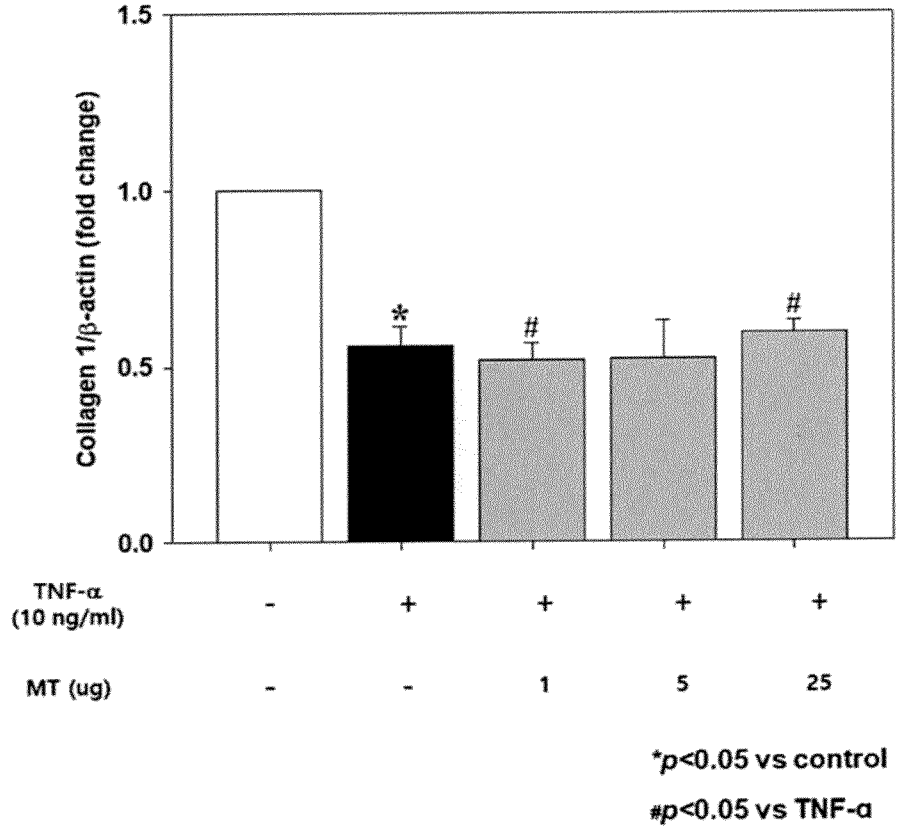
[도 28]


1.5
1.0
0.5
0.0
Collagen 1/β-actin (fold change)
*
#
#
TNF-α (10 ng/ml) - + + + +
MT (ug) - - 1 5 25
*p<0.05 vs control
#p<0.05 vs TNF-α

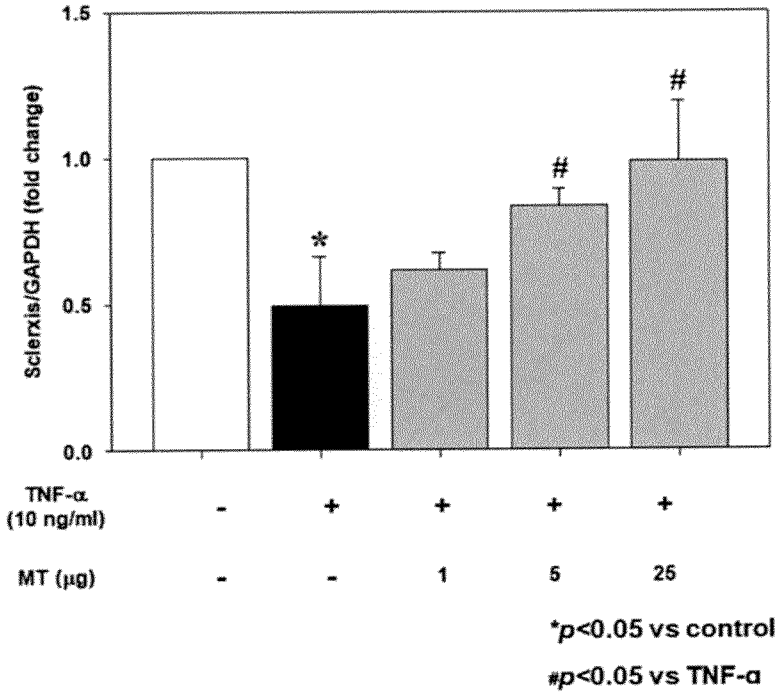
[도 29]


Damaged MT
Collagen 1
β-actin
TNF-α (10 ng/ml) - + + + +
MT (ug) - - 1 5 25

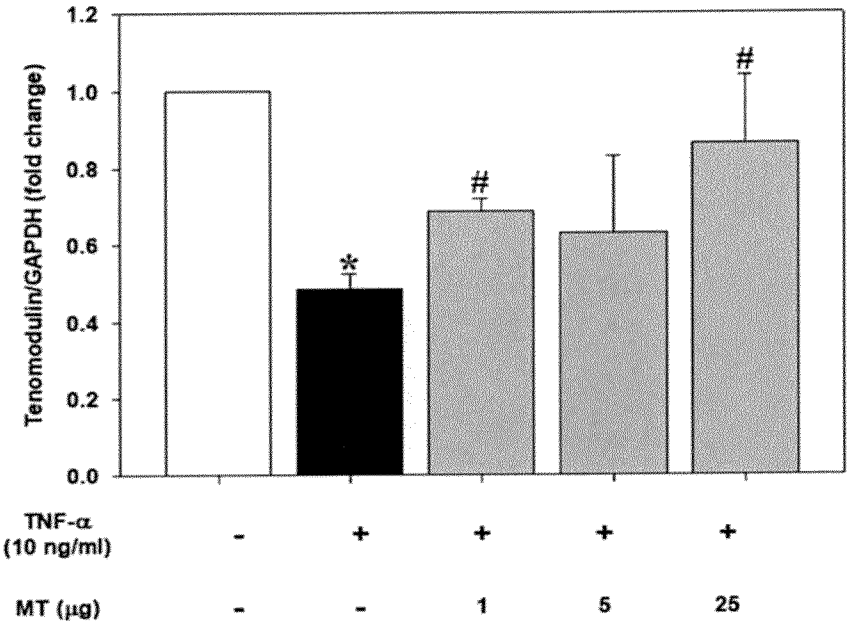
[도 30]


Collagen 1/β-actin (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
#
TNF-α
(10 ng/ml)
- + + + +
MT (ug)
- - 1 5 25
*p<0.05 vs control
#p<0.05 vs TNF-α

[도 31]


Sclerxis/GAPDH (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
#
TNF-α
(10 ng/ml)
- + + + +
MT (μg)
- - 1 5 25
*p<0.05 vs control
#p<0.05 vs TNF-α

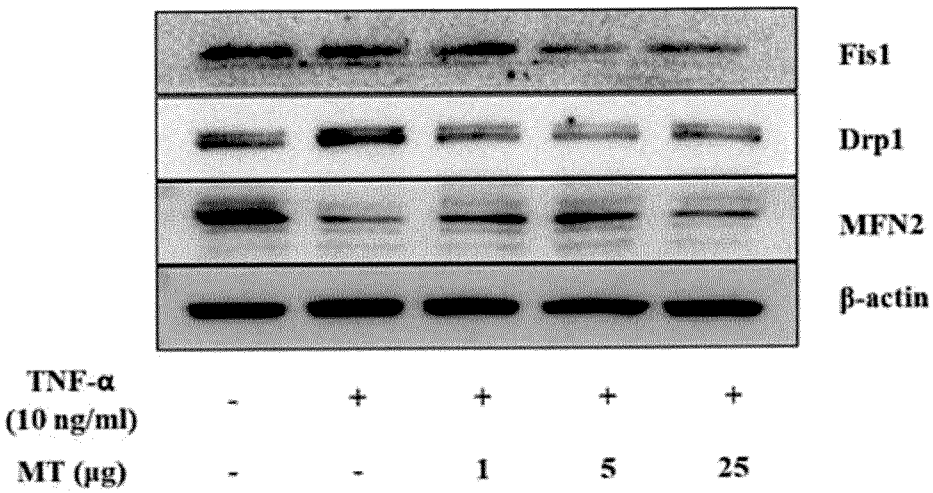
[도 32]



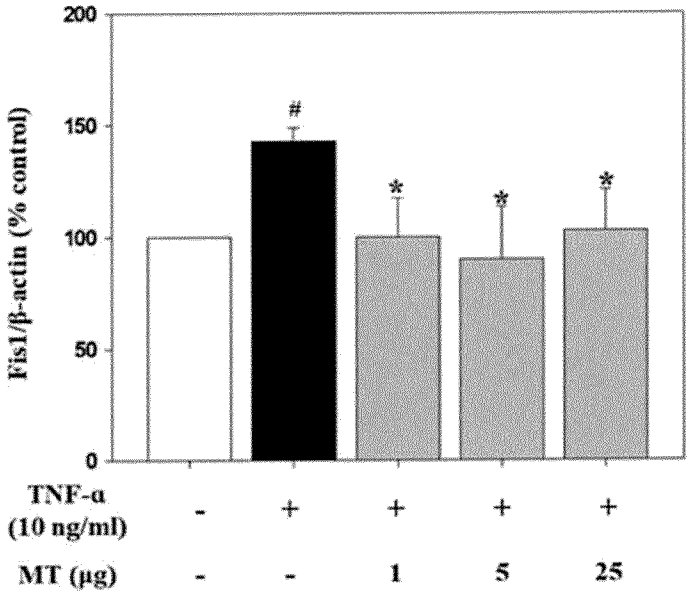
*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs TNF-α

[도 33]



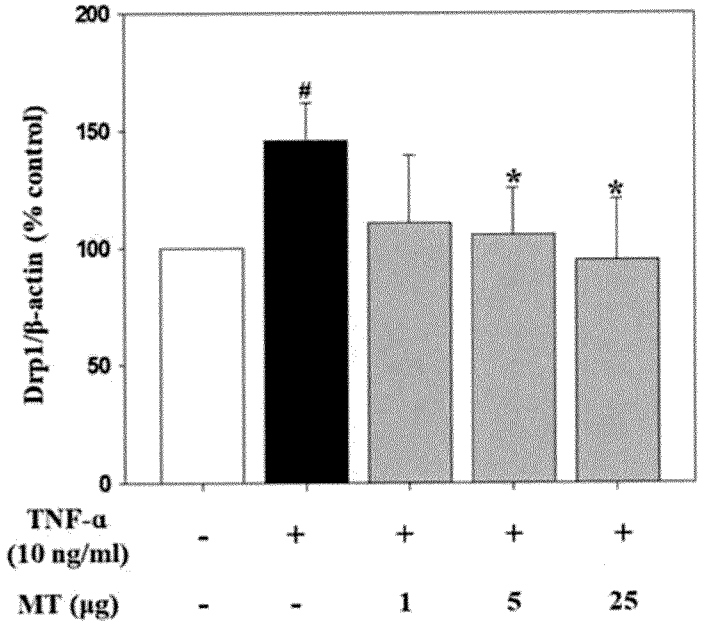
[도 34]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs TNF-α

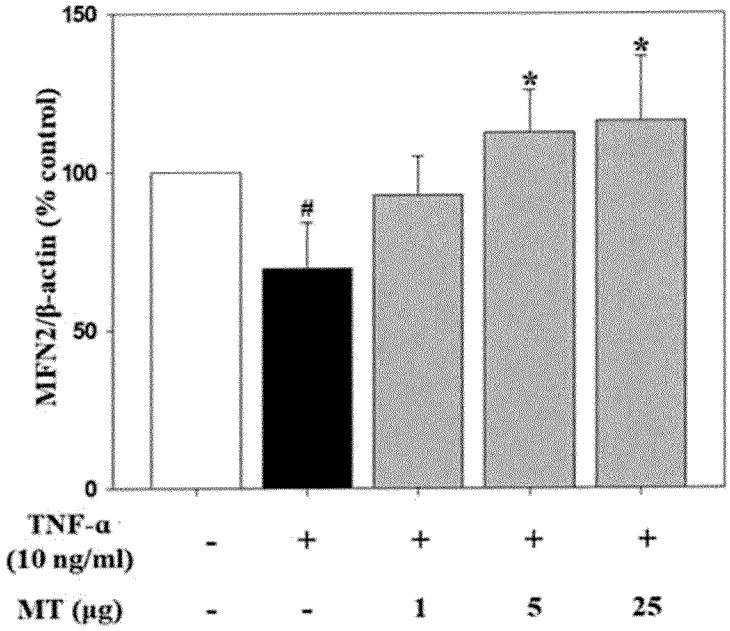
[도 35]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs TNF-α

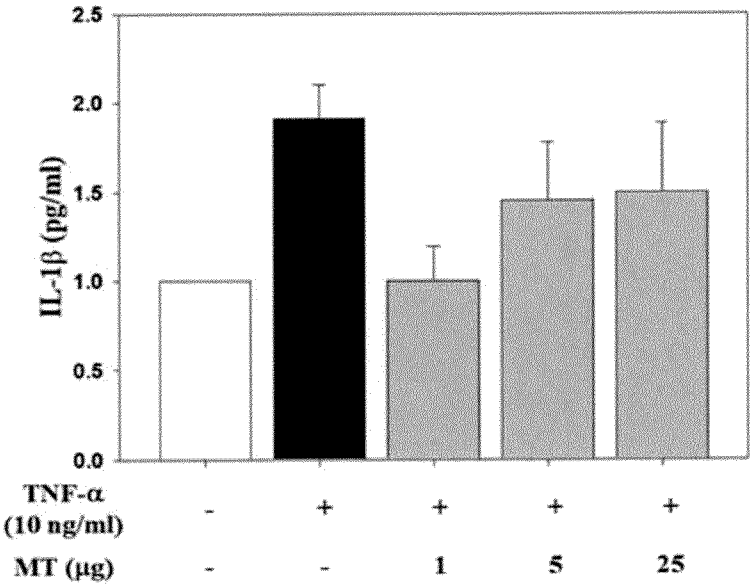
[도 36]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs TNF-α

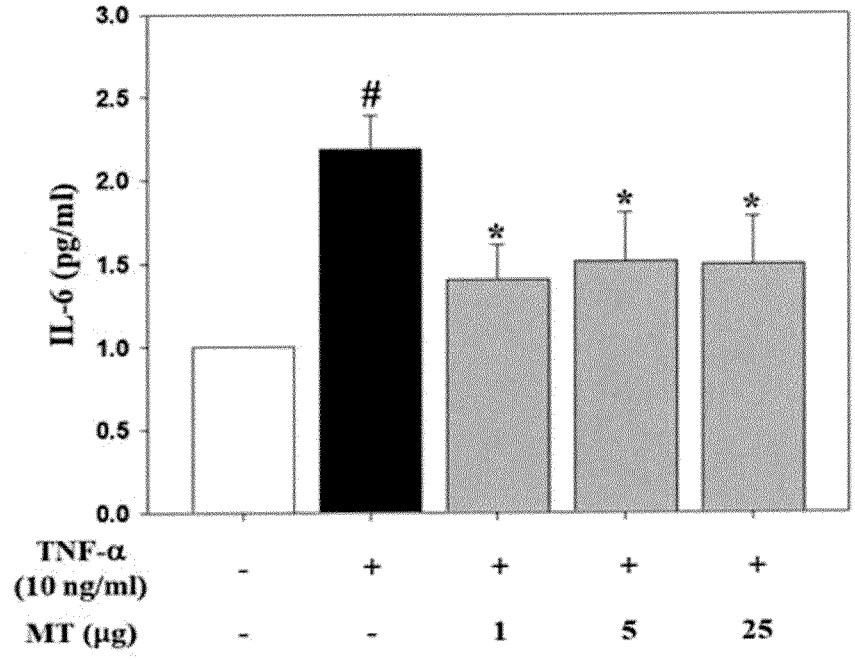
[도 37]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs TNF-α

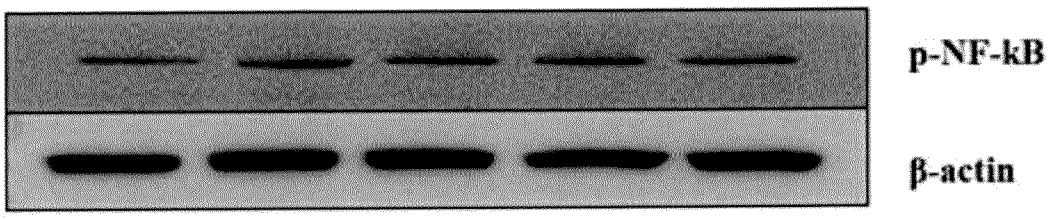
[도 38]



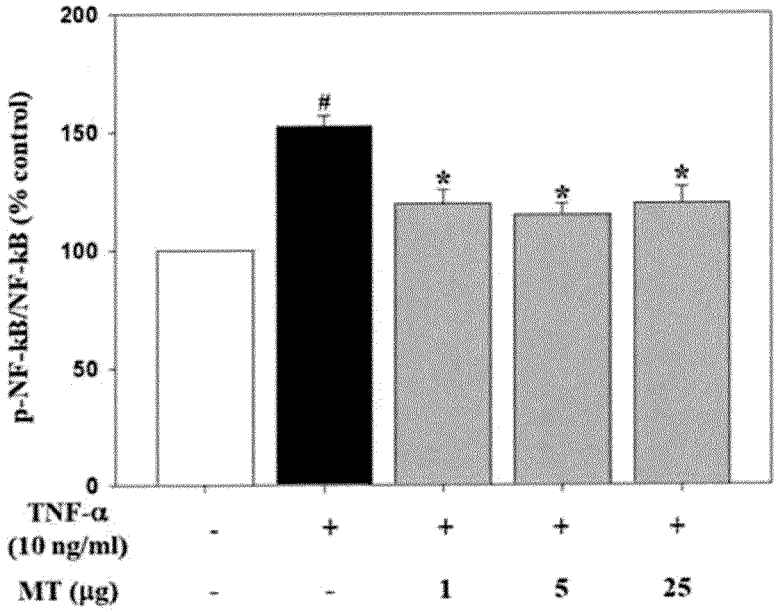
*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs TNF-α

[도 39]



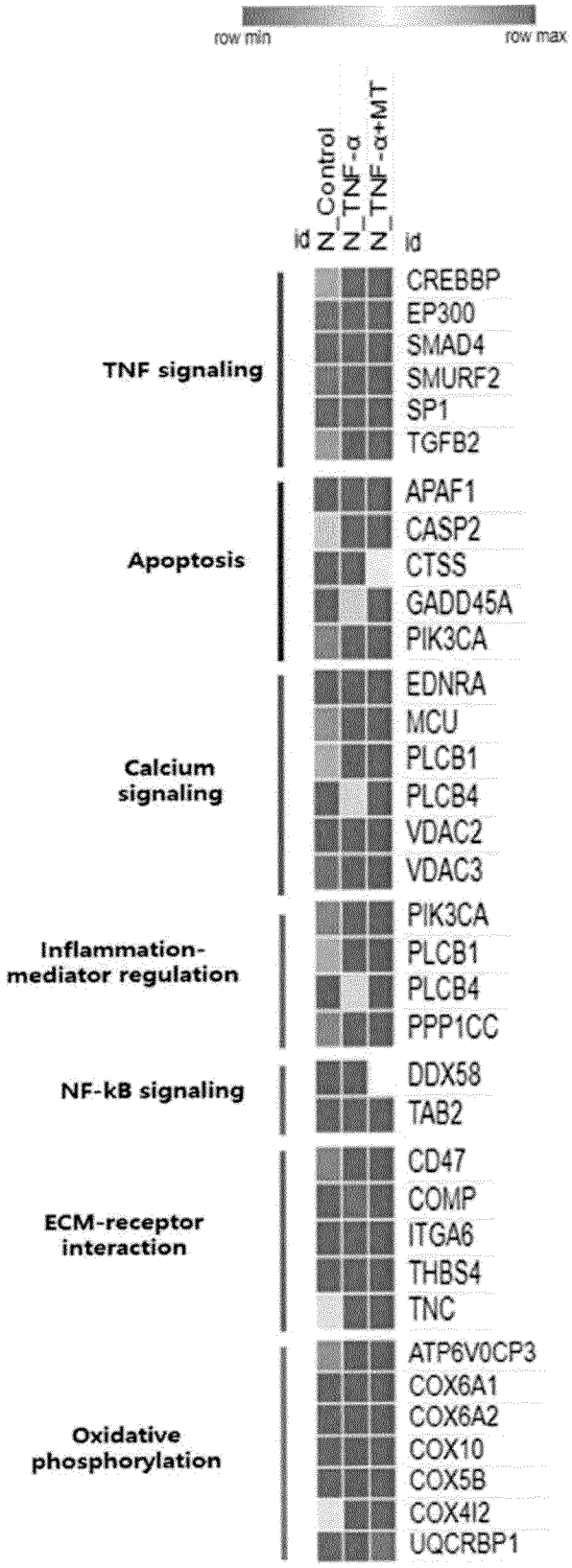
[도 40]



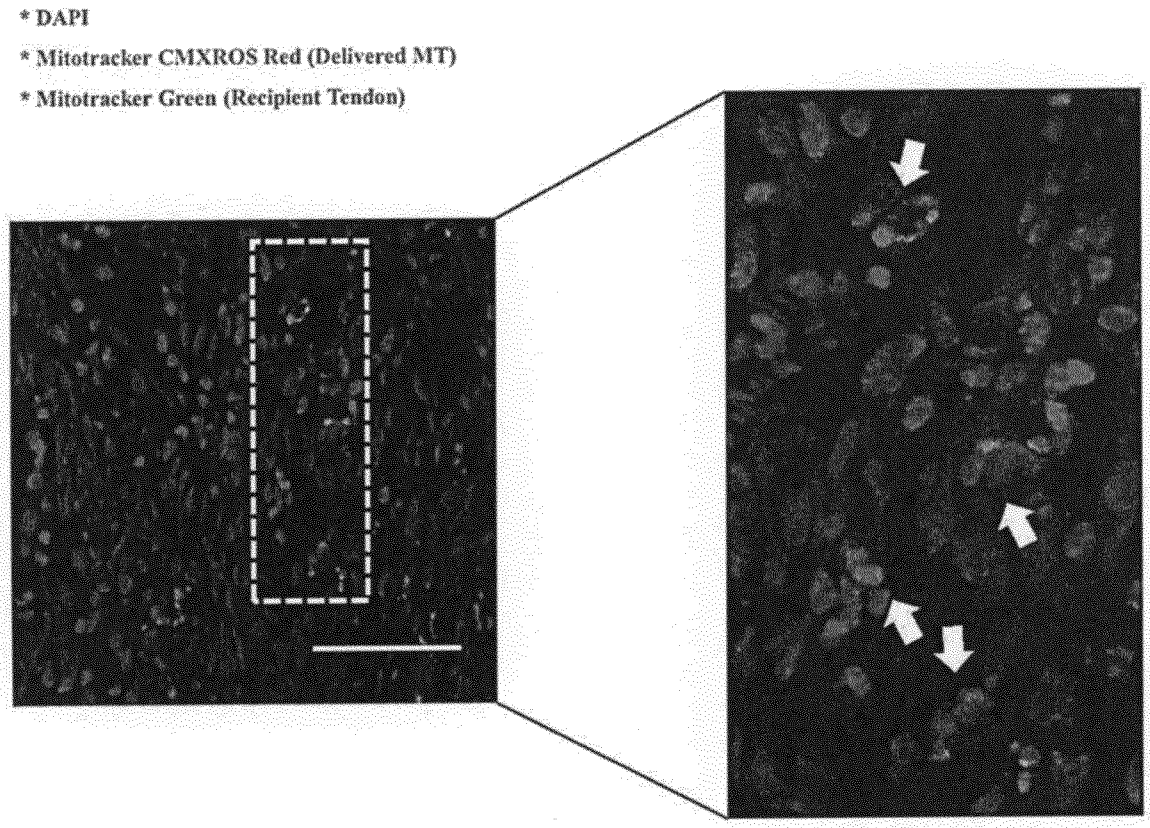
*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs TNF-α

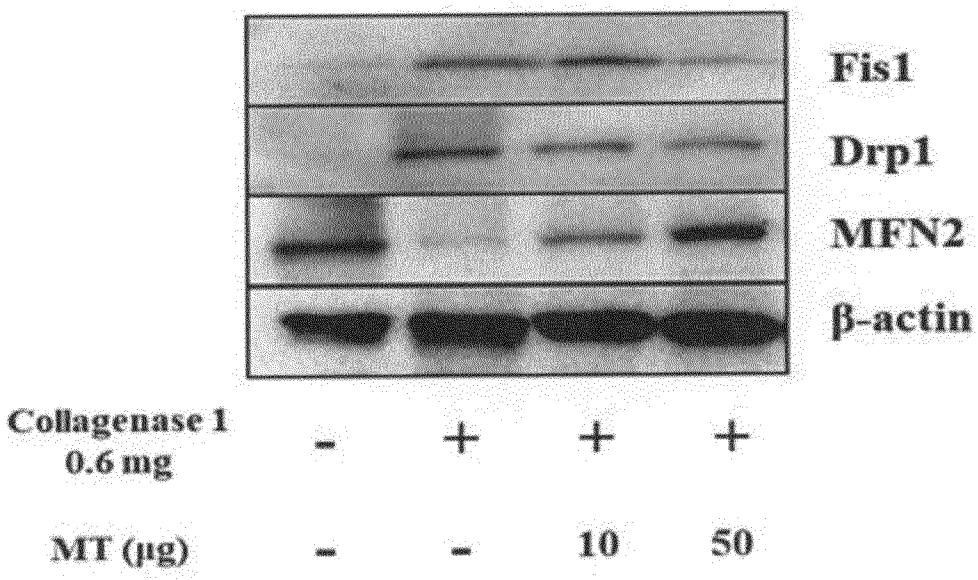
[도 41]


row min
row max
id
N_Control
N_TNF-α
N_TNF-α+MT
id
TNF signaling
CREBBP
EP300
SMAD4
SMURF2
SP1
TGFB2
Apoptosis
APAF1
CASP2
CTSS
GADD45A
PIK3CA
Calcium signaling
EDNRA
MCU
PLCB1
PLCB4
VDAC2
VDAC3
Inflammation-mediator regulation
PIK3CA
PLCB1
PLCB4
PPP1CC
NF-kB signaling
DDX58
TAB2
ECM-receptor interaction
CD47
COMP
ITGA6
THBS4
TNC
Oxidative phosphorylation
ATP6V0CP3
COX6A1
COX6A2
COX10
COX5B
COX4I2
UQCRBP1

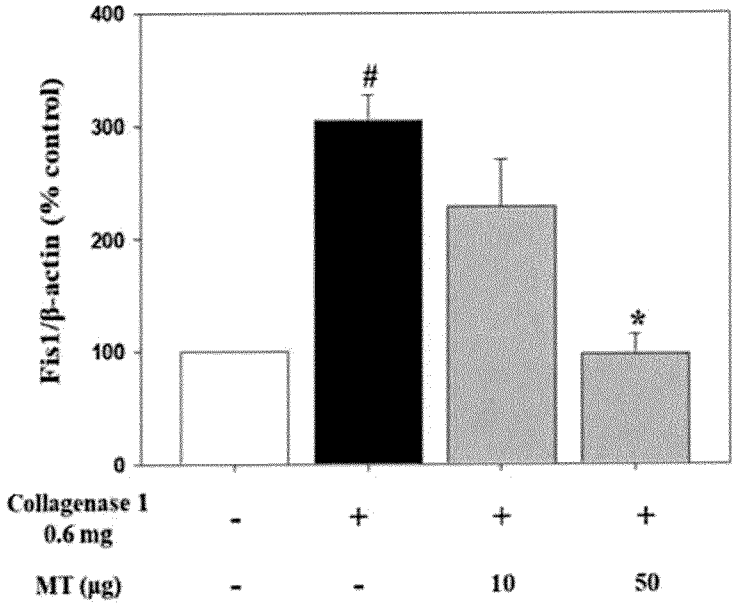
[도 42]


* DAPI
* Mitotracker CMXROS Red (Delivered MT)
* Mitotracker Green (Recipient Tendon)

[도 43]


Fis1
Drp1
MFN2
β-actin
Collagenase 1 0.6 mg - + + +
MT (μg) - - 10 50

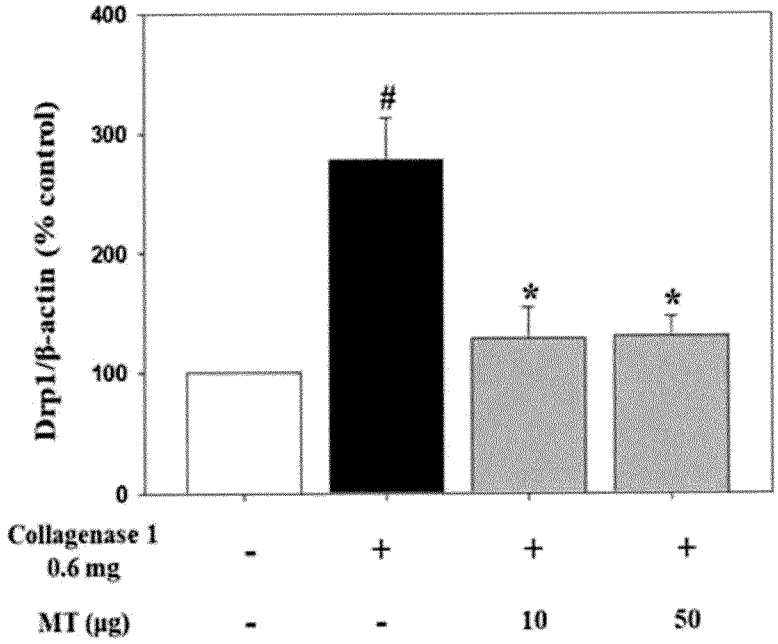
[도 44]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs collagenase

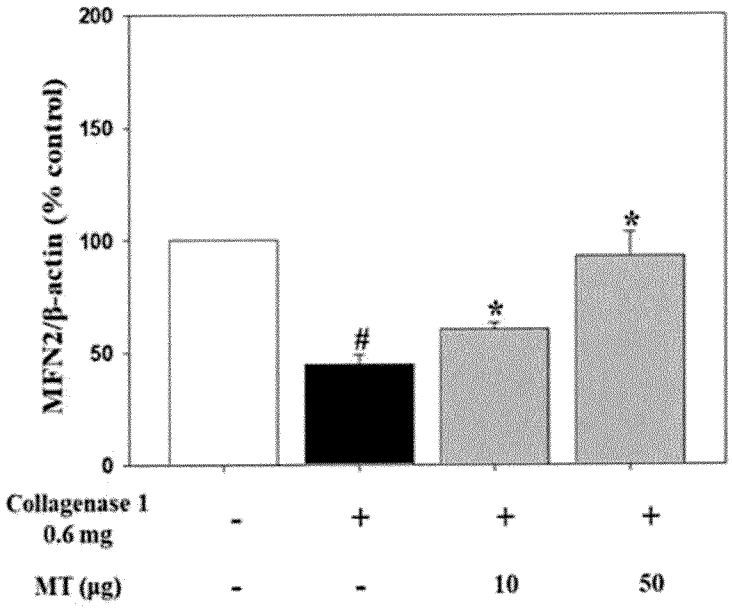
[도 45]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs collagenase

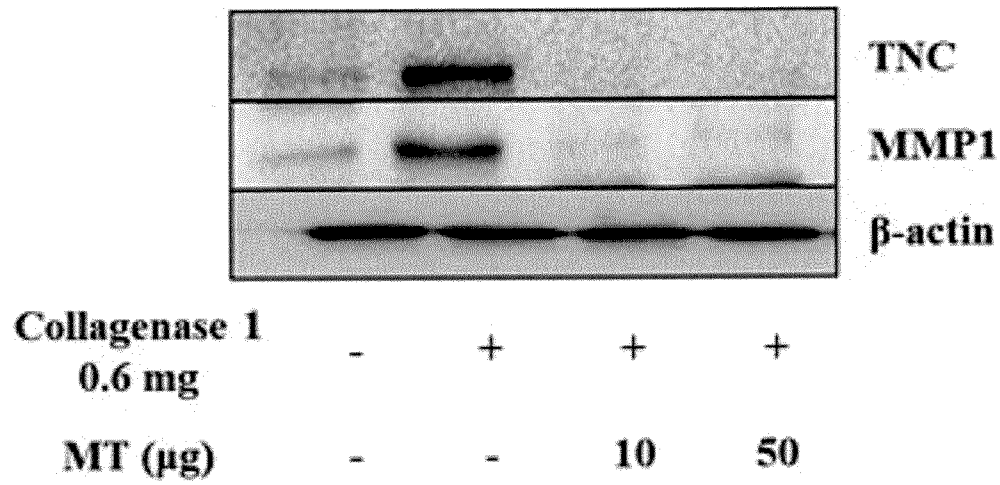
[도 46]



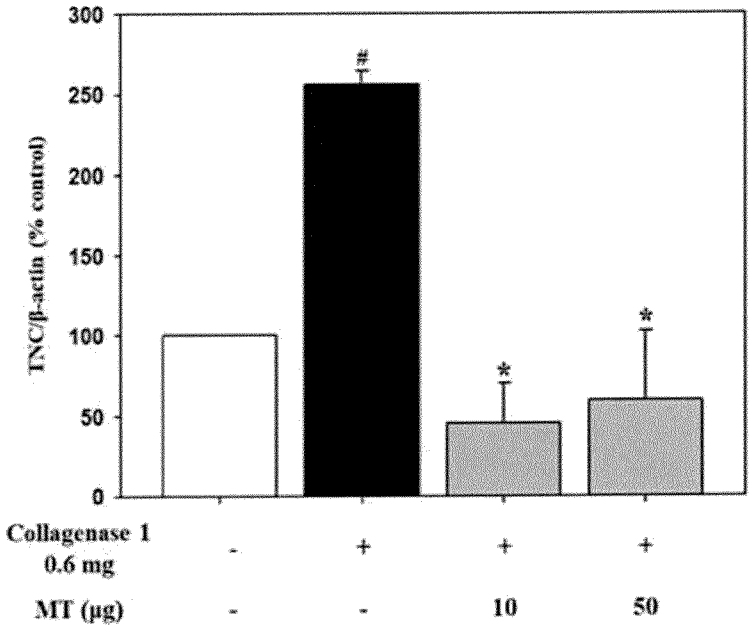
*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs collagenase

[도 47]



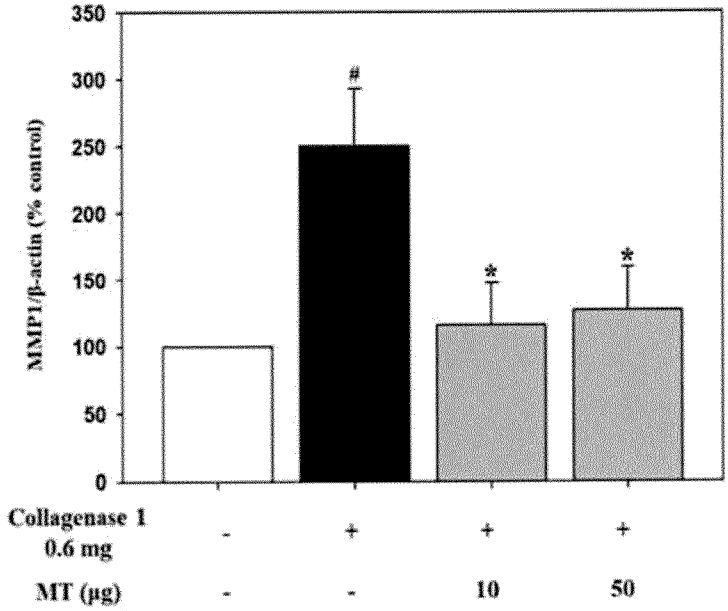
[도 48]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs collagenase

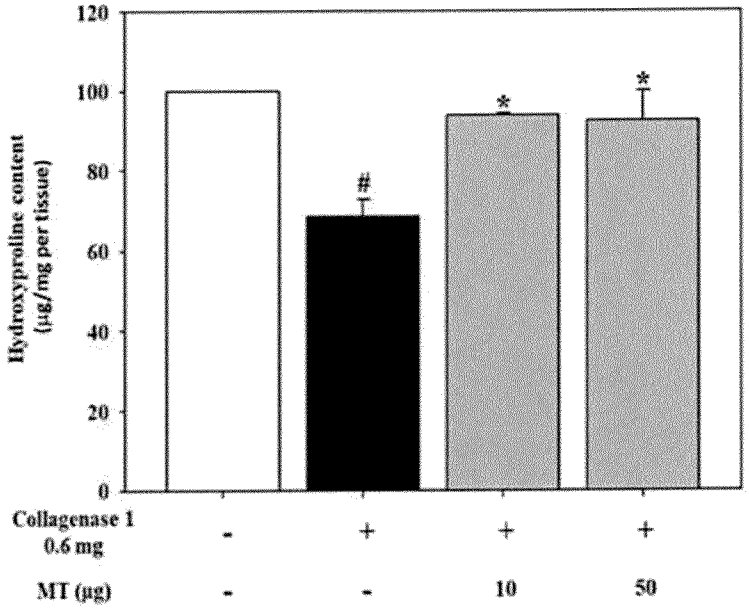
[도 49]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs collagenase

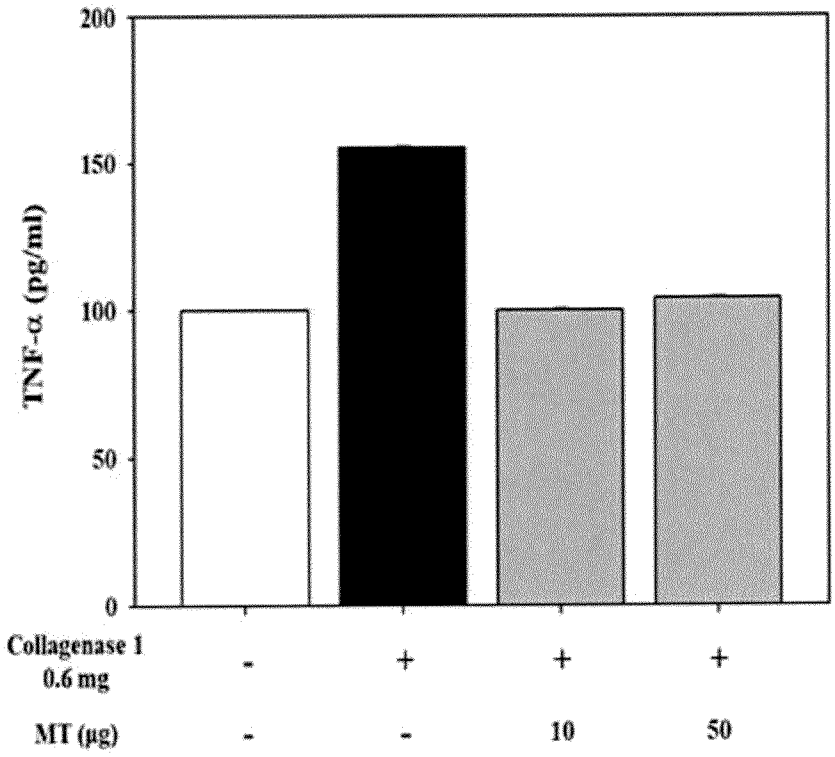
[도 50]



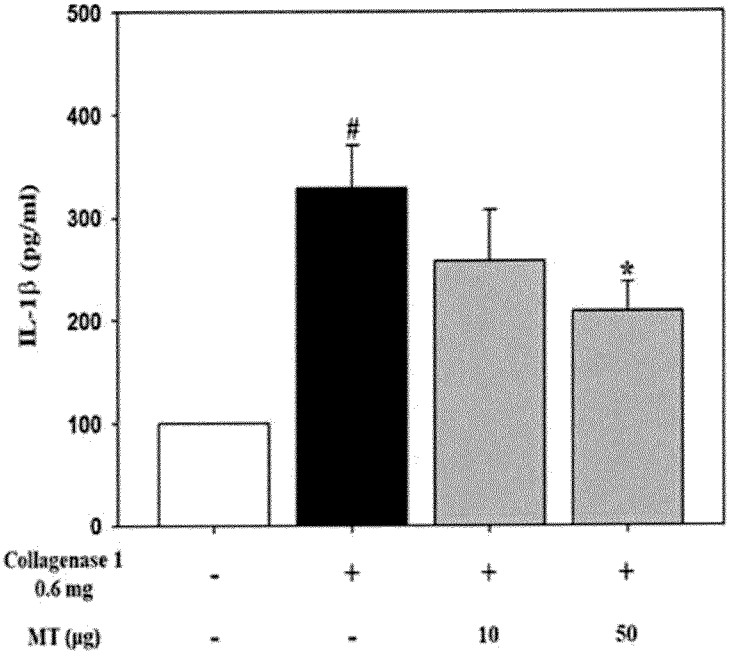
*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs collagenase

[도 51]



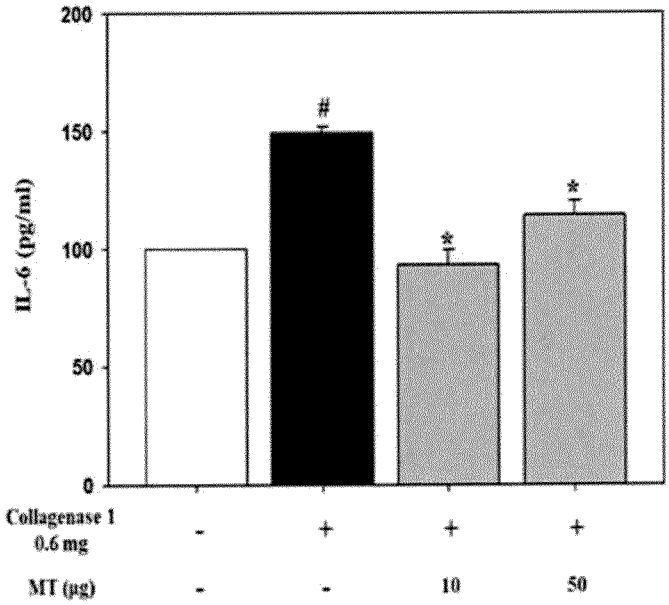
[도 52]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs collagenase

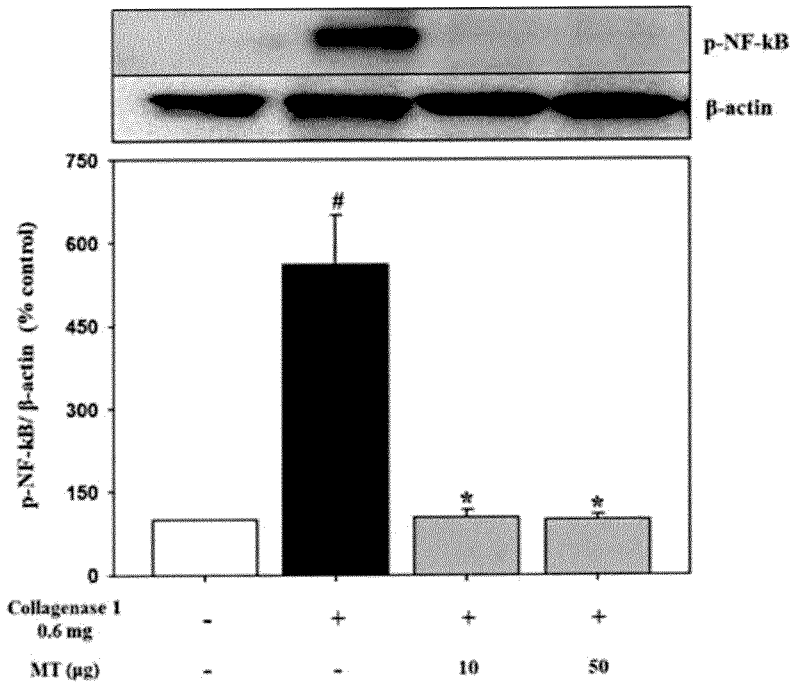
[도 53]



*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs collagenase

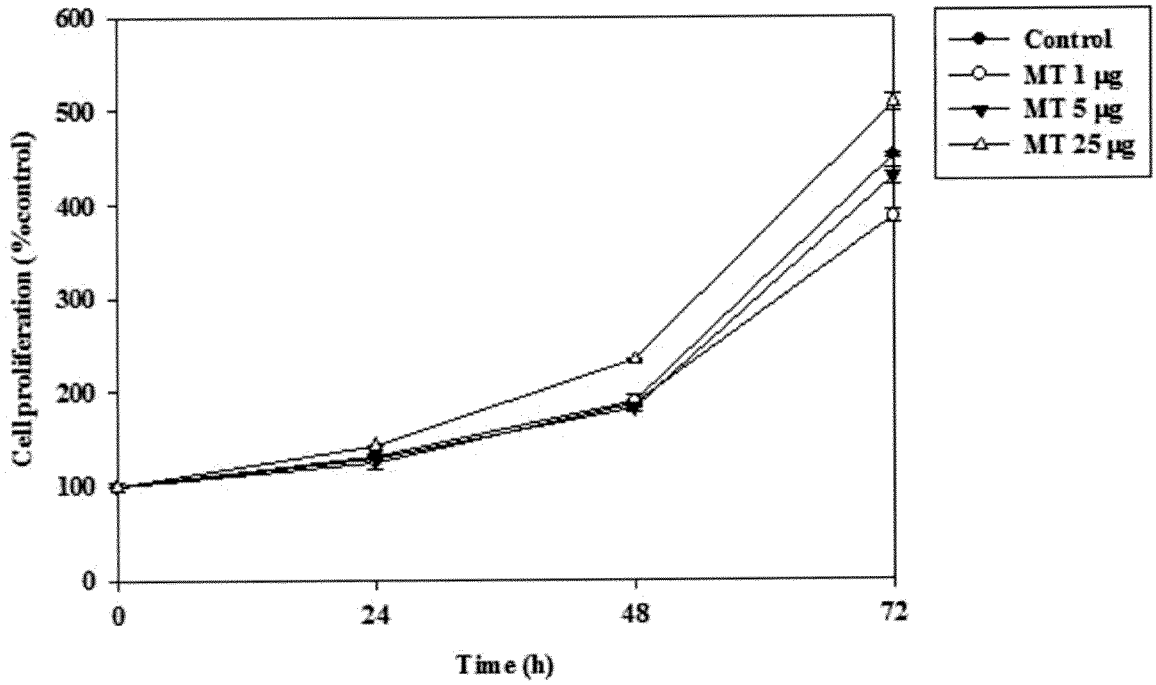
[도 54]



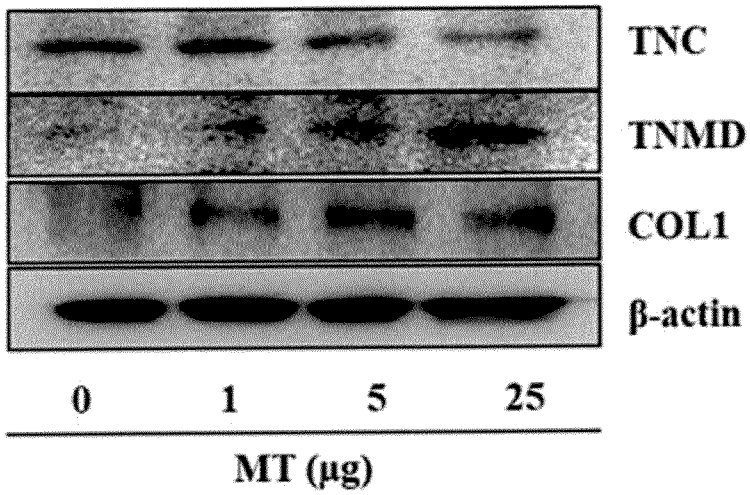
*p<0.05 vs control

#p<0.05 vs collagenase

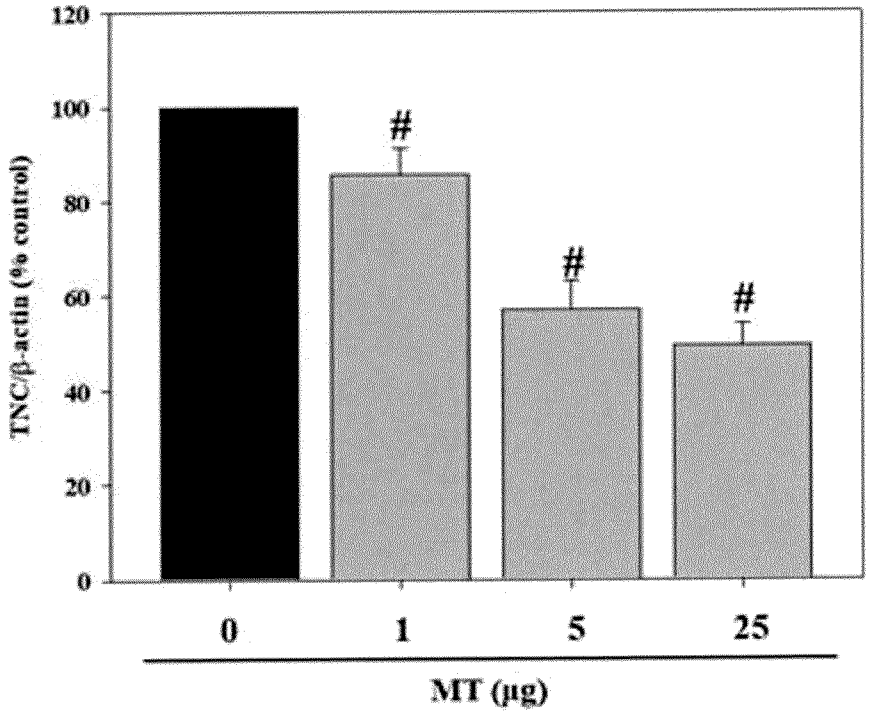
[도 55]



[도 56]

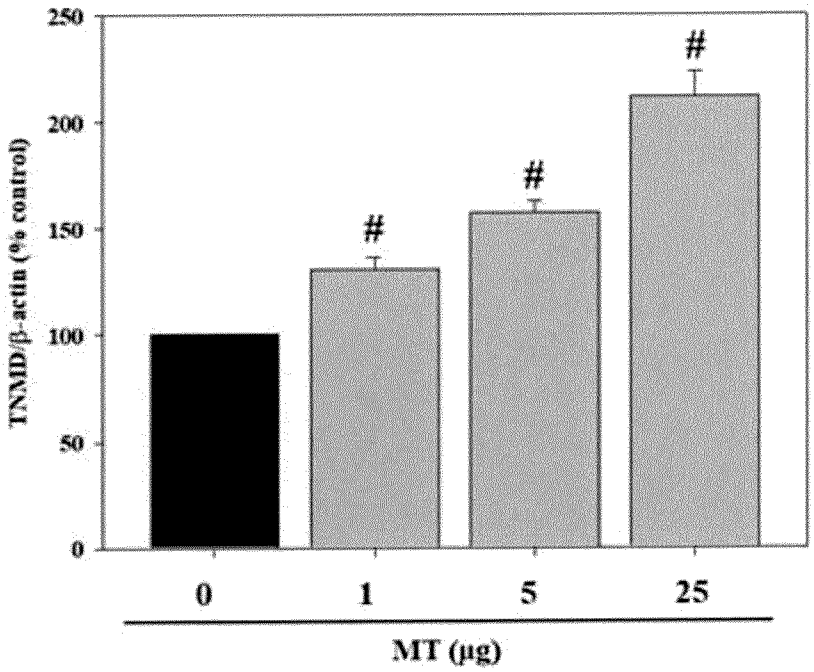


[도 57]



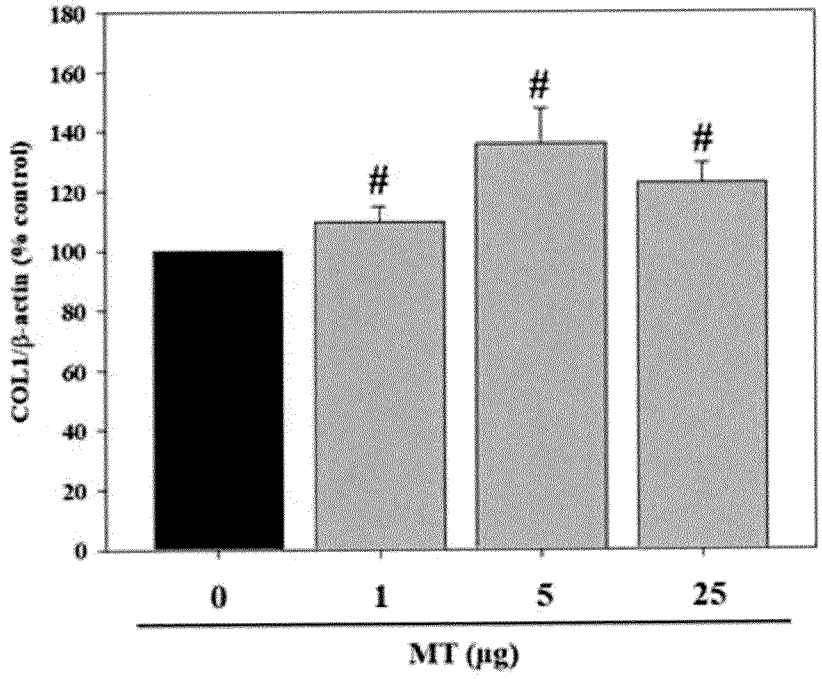
#$p<0.05$ vs collagenase

[도 58]



#p<0.05 vs collagenase

[도 59]



#p<0.05 vs collagenase

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/014605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/12(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i, A61P 21/00(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)

A61K 35/12; A01N 63/00; A61K 35/00; A61K 35/28; A61K 38/43; A61K 9/00; A61P 19/02; A61P 21/00

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: mitochondria, tendon, tendinopathy

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008-137035 A1 (THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION) 13 November 2008 See abstract; page 26; claim 1.	1-10,14-15
Y	LOWES, D. A, et al. The mitochondria targeted antioxidant MitoQ protects against fluoroquinolone-induced oxidative stress and mitochondrial membrane damage in human Achilles tendon cells. Free radical research. 2009, vol. 43, no. 4, pages 323-328 See abstract; page 323, left column, page 324, left column.	1-10,14-15
Y	KR 10-2018-0062387 A (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 08 June 2018 See abstract; page 5; claims 1-17.	1-10,14-15
Y	KR 10-2018-0071030 A (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 27 June 2018 See abstract; paragraph [0004]; claims 1-11.	1-10,14-15
Y	WO 2017-124037 A1 (THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION et al.) 20 July 2017 See abstract; claim 1.	1-10,14-15

☐ 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	Date of mailing of the international search report
21 FEBRUARY 2020 (21.02.2020)	**21 FEBRUARY 2020 (21.02.2020)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/014605

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **11-13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 11-13 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/014605

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2008-137035 A1	13/11/2008	CA 2688125 A1	13/11/2008
		EP 2150117 A1	10/02/2010
		EP 2150117 A4	05/10/2011
		EP 2641617 A1	25/09/2013
		US 2011-0008310 A1	13/01/2011
		US 2017-0065635 A1	09/03/2017
		US 2018-0071337 A1	15/03/2018
		US 9603872 B2	28/03/2017
		US 9855296 B2	02/01/2018
KR 10-2018-0062387 A	08/06/2018	CN 110022884 A	16/07/2019
		EP 3549589 A1	09/10/2019
		KR 10-2018-0071030 A	27/06/2018
		KR 10-2019-0090754 A	02/08/2019
		KR 10-2019-0092348 A	07/08/2019
		KR 10-2019277 B1	06/09/2019
		US 2020-0009198 A1	09/01/2020
		WO 2018-101708 A1	07/06/2018
KR 10-2018-0071030 A	27/06/2018	CN 110022884 A	16/07/2019
		EP 3549589 A1	09/10/2019
		KR 10-2018-0062387 A	08/06/2018
		KR 10-2019-0090754 A	02/08/2019
		KR 10-2019-0092348 A	07/08/2019
		US 2020-0009198 A1	09/01/2020
		WO 2018-101708 A1	07/06/2018
WO 2017-124037 A1	20/07/2017	AU 2017-208013 A1	09/08/2018
		CA 3011472 A1	20/07/2017
		CN 109152795 A	04/01/2019
		EP 3402490 A1	21/11/2018
		JP 2019-507729 A	22/03/2019
		US 10370458 B2	06/08/2019
		US 2018-057610 A1	01/03/2018

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/014605

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/12(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i, A61P 21/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 35/12; A01N 63/00; A61K 35/00; A61K 35/28; A61K 38/43; A61K 9/00; A61P 19/02; A61P 21/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords:미토콘드리아(mitochondria), 인대(tendon), 건병증(tendinopathy)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	WO 2008-137035 A1 (THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION) 2008.11.13 요약; 페이지 26; 청구항 1	1-10,14-15
Y	LOWES, D. A, 등, `The mitochondria targeted antioxidant MitoQ protects against fluoroquinolone-induced oxidative stress and mitochondrial membrane damage in human Achilles tendon cells`, Free radical research, 2009, 43권, 4호, 페이지 323-328 초록; 페이지 323 왼쪽 컬럼, 324 왼쪽 컬럼	1-10,14-15
Y	KR 10-2018-0062387 A (차의과학대학교 산학협력단) 2018.06.08 요약; 페이지 5; 청구항 1-17	1-10,14-15
Y	KR 10-2018-0071030 A (차의과학대학교 산학협력단) 2018.06.27 요약; 단락 [0004]; 청구항 1-11	1-10,14-15
Y	WO 2017-124037 A1 (THE CHILDREN`S MEDICAL CENTER CORPORATION 등) 2017.07.20 요약; 청구항 1	1-10,14-15

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2020년 02월 21일 (21.02.2020)	2020년 02월 21일 (21.02.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/014605

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 11-13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 11-13은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/014605

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2008-137035 A1	2008/11/13	CA 2688125 A1	2008/11/13
		EP 2150117 A1	2010/02/10
		EP 2150117 A4	2011/10/05
		EP 2641617 A1	2013/09/25
		US 2011-0008310 A1	2011/01/13
		US 2017-0065635 A1	2017/03/09
		US 2018-0071337 A1	2018/03/15
		US 9603872 B2	2017/03/28
		US 9855296 B2	2018/01/02
KR 10-2018-0062387 A	2018/06/08	CN 110022884 A	2019/07/16
		EP 3549589 A1	2019/10/09
		KR 10-2018-0071030 A	2018/06/27
		KR 10-2019-0090754 A	2019/08/02
		KR 10-2019-0092348 A	2019/08/07
		KR 10-2019277 B1	2019/09/06
		US 2020-0009198 A1	2020/01/09
		WO 2018-101708 A1	2018/06/07
KR 10-2018-0071030 A	2018/06/27	CN 110022884 A	2019/07/16
		EP 3549589 A1	2019/10/09
		KR 10-2018-0062387 A	2018/06/08
		KR 10-2019-0090754 A	2019/08/02
		KR 10-2019-0092348 A	2019/08/07
		US 2020-0009198 A1	2020/01/09
		WO 2018-101708 A1	2018/06/07
WO 2017-124037 A1	2017/07/20	AU 2017-208013 A1	2018/08/09
		CA 3011472 A1	2017/07/20
		CN 109152795 A	2019/01/04
		EP 3402490 A1	2018/11/21
		JP 2019-507729 A	2019/03/22
		US 10370458 B2	2019/08/06
		US 2018-057610 A1	2018/03/01