

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 3월 23일 (23.03.2023)



(10) 국제공개번호

WO 2023/043262 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/145 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/013880

(22) 국제출원일:

2022년 9월 16일 (16.09.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0124425 2021년 9월 17일 (17.09.2021) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWH
UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION
FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구
이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: 정병문 (JEONG, Byeong Moon); 03306 서울특
별시 은평구 진관2로 57-37, 241동 601호, Seoul (KR). 우
예진 (WOO, Ye Jin); 16918 경기도 용인시 기흥구 연남
로 5, 107동 603호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 원대규 (WON, Dae Gyu); 08505 서울특별시 금
천구 디지털로 121, 509호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 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,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 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), 유
럽 (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).

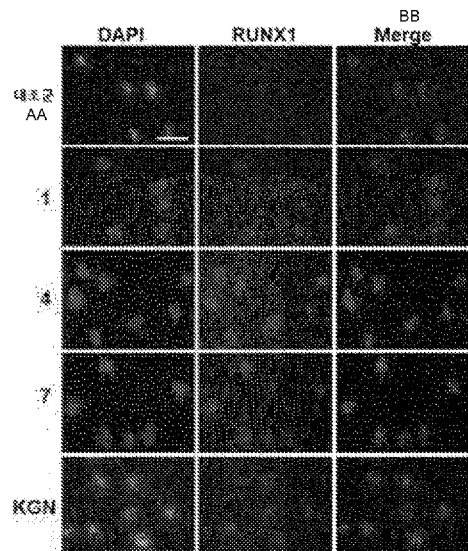
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING ANTI-FOLIC ACID AGENT FOR DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELL INTO CARTILAGE

(54) 발명의 명칭: 항엽산제를 포함하는 중간엽줄기세포의 연골분화용 조성물

[도 9]



AA ... Control
BB ... Merge

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for inducing dif-
ferentiation of stem cells into chondrocytes, a pharmaceutical composition for
treatment of cartilage injury diseases, and a sustained release dosage form for in-
ducing differentiation of stem cells into chondrocytes, wherein the compositions
and dosage form each comprise an anti-folic acid agent.

(57) 요약서: 본 발명은 항엽산제를 포함하는 줄기세포의 연골세포로의
분화 유도용 조성물, 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물 및 줄기세포의
연골세포로의 분화 유도용 서방출제형에 관한 것이다.

WO 2023/043262 A1

명세서

발명의 명칭: 항염산제를 포함하는 중간엽줄기세포의 연골분화용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 항염산제를 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물과 이를 이용한 연골 손상 질환의 치료 방법에 관한 것으로서, 답손, 프랄라트렉세이트, 트리메토프림 또는 이들의 조합과 같은 임상적으로 허가된 항염산제를 이용하여 경제적이고, 안정적이고 효율적으로 줄기세포를 연골세포로 분화시킬 수 있다.

배경기술

- [2] 골관절염(Osteoarthritis)은 퇴행성관절질환으로, 결국 관절연골(articular cartilage)이 파괴되는 질환이다. 연골에는 혈관이 형성되어 있지 않기 때문에 정상적인 조직 복구 기전이 적용되지 않는다. 또한 연골 조직은 세포 밀도가 낮기 때문에 국소 세포에 의한 자가 재생이 제대로 수행되기 어렵다. 현재는 골관절염에 대한 세포 기반 치료법으로서 성숙한 자가 연골세포를 이식하는 방법이 사용되고 있다. 그러나 분화된 연골세포는 제한된 증식 능력을 가지므로 이식에 필요한 적절한 수의 세포를 얻는 것이 주요한 문제가 될 수 있다. 또한, 골관절염 환자는 대개 고령자인데, 자가 연골 세포의 증식 수준은 환자의 나이가 들수록 감소하는 것이 문제가 된다. 따라서, 줄기세포치료는 이러한 한계를 극복할 수 있는 골관절염 치료법으로서 재생의학 분야에서 활발히 연구되고 있다. 줄기세포는 연골세포를 포함한 성숙한 체세포에 비해 훨씬 우수한 증식 및 재생력을 갖는다. 재생의학에서는, 줄기세포의 운명과 행동을 조절하고, 특정 세포로의 분화를 유도하는 것이 치료 응용에서 중요한 전제 조건이다. 줄기세포의 분화 및 기능적 활성화는 일반적으로 성인자와 신호분자와의 혼합물로 조절된다. 자연적으로 또는 화학적으로 합성된 화합물은 단백질과 같은 고분자 성장인자와 비교하여 줄기세포를 분화하기 위한 수단으로서 정확하고, 효율적이고, 가역적이고, 경제적이란 이점을 갖는다. 그러나 줄기세포를 연골세포로 유도할 수 있는 화합물은 티에노인다졸(thienoindazol) 유도체인 TD-198946, 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2), 텍사메타손, 카르토제닌(kartogenin, KGN), 및 옥소피페라진 (oxopiperazine) 유도체인 5{i,2}와 같이 매우 제한적으로 알려져 있다.
- [3] 한편 항염산제는 염산의 작용을 길항하는 항대사 약물 계열이다. 항염산제는 세포분열, 유전물질의 합성 및 복구, 및 단백질 합성을 억제한다. 따라서 항염산제는 암, 자가면역질환, 건선, 및 세균 감염을 치료하는데 항생제 및 세포독성물질로 사용된다. 미국 FDA (U.S. Food and Drug Administration, FDA)에서 임상적으로 승인된 항염산제로는 답손(dapsone),

메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉시드(pemetrexed),
프랄라트렉세이트(pralatrexate), 프로구아닐(proguanil),
피리메타민(pyrimethamine), 및 트리메토프림(trimethoprim) 등이 있다.

- [4] 엽산은 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell typo)의 연골 분화를 유의하게 개선하는 것으로 알려져 있다. 대한민국 등록특허 10-2197871은 엽산을 이용하여 줄기세포를 연골세포로 분화하는 방법에 대해서 개시한다. 여기서 엽산과 유사한 용도로 엽산 저해제를 이용할 수 있음은 언급하지만, 실제로 엽산과는 달리, 항암제 등으로 사용되는 엽산 저해제를 이용하여 줄기세포를 연골세포로 분화시킬 수 있음은 보여주지 않는다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 항엽산제를 포함하는, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [6] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 항엽산제 및 줄기세포를 포함하는, 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [7] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 일 구체예에 따른 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물을 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 서방출제형을 제공한다.

과제 해결 수단

- [8] 본 명세서에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [9] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.
- [10] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [11] 본 명세서에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [12] 본 명세서에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [13] 본 명세서에서, “분화(differentiation)”는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉, 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 의미할 수 있다.

- [14] 본 명세서에서, "연골세포"는 줄기세포로부터 분화 유도된 연골세포, 또는 연골세포로의 분화 과정에 있는 세포를 모두 포함하는 것일 수 있다.
- [15] 본 명세서에서, "배지"는 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식 등에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외 (in vitro)에서 줄기세포 등의 세포의 배양 또는 분화를 위한 혼합물을 의미하는 것일 수 있다.
- [16] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.
- [17]
- [18] 본 발명의 일 실시예에 따른 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물은 항염산제를 포함한다.
- [19] 상기 조성물은 상기 줄기세포로부터 분화된 상기 연골세포에 포함된 유전자 또는 단백질의 발현이 증폭되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자 또는 단백질은 예를 들어 2형 콜라겐 (type II collagen, COL II), SRY-box 9 (SRY box transcription factor 9, SOX9), 아그레칸 (aggrecan, ACAN), 코어결합인자 β (core-binding factor β subunit, CBF β), RUNX1 (runt-related transcription factor 1) 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [20] 상기 항염산제의 농도는 0.01 μ M 내지 100 μ M, 또는 0.01 내지 10 μ M, 또는 0.05 μ M 내지 0.5 μ M, 0.05 μ M 내지 0.2 μ M, 또는 0.05 μ M 내지 0.15 μ M일 수 있다. 상기 항염산제의 농도가 상기 범위 값보다 낮을 경우 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도가 일어나지 않을 수 있고, 상기 범위 값 보다 높을 경우 세포 독성으로 오히려 유도 효율이 떨어질 수 있다.
- [21] 상기 항염산제는 임상적으로 사용되는 약물이 모두 사용될 수 있고, 예를 들어 답손(dapsone), 메토틱렉세이트(methotrexate), 페메트렉시드(pemetrexed), 프랄라트렉세이트(pralatrexate), 프로구아닐(proguanil), 피리메타민(pyrimethamine), 트리메토프림(trimethoprim) 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 항염산제는 바람직하게는 답손, 프랄라트렉세이트, 트리메토프림 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 항염산제는 보다 바람직하게는 프랄라트렉세이트일 수 있다.
- [22] 상기 줄기세포는 상기 줄기세포는 지방유래 중간엽 줄기세포, 골수유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래줄기세포, 배아줄기세포, 편도유래 중간엽 줄기세포 및 활막 중간엽 줄기세포(synival mesenchymal stem cell)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [23] 상기 중간엽 줄기세포는 골수-유래 줄기세포, 지방-유래 줄기세포, 편도-유래 줄기세포, 활막 줄기세포, 또는 이들의 조합일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 중간엽 줄기세포는 골수, 조직, 배아, 제대혈, 혈액 또는 체액으로부터 수득된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [24] 일 구체예에서 상기 중간엽 줄기세포는, 편도선 유래(tonsil-derived) 중간엽 줄기세포로서, 구체적으로 편도유래 중간엽 줄기세포(tonsil-derived mesenchymal

stem cell, TMSC)일 수 있다. TMSC의 경우 다른 MSC와 유사하게 TMSC는 다중 계통 및 면역 억제에 대한 분화 가능성이 있으면서, 편도선 절제술 후 폐기되는 편도선 조직에서 쉽게 얻을 수 있고, 골수 유래 MSC(BMSC) 및 지방 유래 MSC(AMSC)에 비해 연령 관련 합병증이 덜 심각하며 증식 속도가 빠른 등 몇 가지 장점을 갖는다.

[25] 상기 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물은 줄기세포의 배양용 배지에 처리하여 사용될 수 있다. 상기 배지는 줄기세포의 배양 시 일반적으로 사용되는 배지를 모두 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 상기 배지는 DMEM, MEM, BME, RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM-F12, α -MEM, G-MEM, MSCGM, IMDM, MacCoy's 5A, AmnioMax, AminoMaxII complete Medium, 또는 Chang's Medium MesemCult-XFMedium 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[26]

[27] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른, 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물은 항염산제 및 줄기세포를 포함한다.

[28] 상기 연골 손상 질환은 관절염, 연골 손상, 연골 결손, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골절, 족저근막염, 상완골외과염, 골연화증, 또는 이들의 조합일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[29] 상기 약학 조성물은 내재성 줄기세포 또는 체외에서 이식된 줄기세포의 연골세포로의 특이적 분화를 유도함으로써 관절 내 연골조직의 재생을 촉진시킬 수 있다.

[30] 상기 약학 조성물은 공지의 방법에 따라 환자의 관절 내로 직접 주입되거나, 3차원 배양 후 스캐폴드(scaffold)와 함께 이식될 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 약학 조성물이 환자에게 주입될 경우, 주입량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여 경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자를 고려하여 조절될 수 있다.

[31] 상기 약학 조성물은 환자에 주입 또는 이식 시 약학적으로 허용된 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 투여 방법에 따라 달라질 수 있다.

[32] 또한 상기 약학 조성물은 연골조직의 재생을 촉진시키기 위한 다른 약학적으로 허용된 성분을 더 포함할 수 있고, 이는 예를 들어, 글루코사민, 콘드로이틴, 콜라겐, 히알루론산, 칼슘, 마그네슘 등과 같은 미네랄, 비타민D, 비타민C 등과 같은 비타민류 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

[33]

[34] 본 발명의 다른 일 구체예에 따른 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물을 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 서방출제형을 제공한다.

[35] 상기 서방출제형은 열활성 겔(thermogel) 형태를 갖는 것일 수 있다. 상기 열활성 겔은 용액 상태로 대상 부위에 주입한 후 열에 반응하여 졸-겔 전이 반응(sol-to-gel transition)이 일어나 겔 형태가 되는 재료를 의미한다.

- [36] 상기 서방출제형이 겔 형태를 갖게 되면, 3차원 배양 방법에 적용하기 적합할 수 있다. 3 차원 배양이란 세포 성장에 의해 세포단층(monolayer)이 형성되도록 배양하는 통상적인 단층배양이 아닌 세포들이 뭉쳐서 성장하여 3 차원적인 입체형태, 예를 들어, 구체 또는 타원체를 형성하도록 배양하는 것을 말하며, 바람직하게는 펠렛(pellet) 배양을 적용할 수 있다. 펠렛 배양은 연골세포의 표현형을 유지시키는데 효과적이며, 원심분리를 통해 쉽게 세포를 응집하여 세포와 세포간의 접합 효과를 유도하여 초기 연골 조직 생성과 비슷한 세포외 환경을 제공할 수 있다.
- [37] 상기 서방출제형은 열활성 겔과 줄기세포를 포함할 수 있는데, 줄겔 전이 온도 이하의 온도에서 수성 폴리머 용액에 줄기세포를 현탁하여 주입하는 경우, 열-유도된 줄겔 전이 동안 인 시투(in situ)로 형성된 히드로겔에 줄기세포가 포함되고, 상기 히드로겔의 기공에 영양분 및 분화인자를 포함하여 줄기세포를 보다 효율적이고 안정적으로 연골세포로 분화시키면서, 연골조직에 분화된 연골세포를 서방출하거나 히드로겔로부터 영양분 및 분화인자가 서방출되어 내재적 줄기세포 또한 연골세포로 분화하도록 유도할 수 있다.
- [38] 상기 서방출제형은 폴리(에틸렌글리콜)-폴리(L-알라닌) 공중합체를 포함하는 것일 수 있다. 상기 공중합체는 1,000 Da 내지 10,000Da, 1,000 Da 내지 5,000Da, 또는 1,000 Da 내지 2,000Da의 분자량을 갖는 것일 수 있다. 상기 공중합체의 다분산지수(polydispersity index)는 0.5 내지 1.5, 0.8 내지 1.5, 또는 1.0 내지 1.2일 수 있다. 상기 공중합체의 임계미셀농도(CMC)는 0.01 wt% 내지 1.0wt%, 0.01 wt% 내지 0.1, 또는 0.01wt% 내지 0.05wt%일 수 있다.
- [39] 상기 서방출제형은, 폴리(에틸렌글리콜)-폴리(L-알라닌) 수용액에 항염산제 및 줄기세포를 졸 상태 온도에서 혼합하고, 겔 상태 온도까지 열을 가하여 겔로 전이시켜 제조할 수 있다. 상기 폴리(에틸렌글리콜)-폴리(L-알라닌)수용액은 배지에 혼합하여 사용할 수 있고, 배지에 대하여 5w/w% 내지 20 w/w%, 5 w/w% 내지 15 w/w%, 또는 8 w/w% 내지 12 w/w%일 수 있다. 상기 서방출제형에서 사용되는 줄기세포의 세대 정도는 passage 3 내지 passage 10, passage 5 내지 passage 8, 또는 passage 7인 것일 수 있고, 0.01×10^6 개 내지 1×10^6 개, 0.1×10^6 개 내지 10×10^6 개, 또는 0.3×10^6 개 내지 0.8×10^6 개로 사용될 수 있다.
- [40] 상기 졸 상태 온도는 10°C 내지 25°C, 15°C 내지 25°C 또는 18°C 내지 22°C일 수 있고, 겔 상태 온도는 5°C 내지 40°C, 또는 35°C 내지 38°C일 수 있다.

발명의 효과

- [41] 본 발명의 일 실시예에 따른 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물을 이용하여 줄기세포 이외의 다른 세포로의 분화에는 영향을 미치지 않으면서 연골세포로 선택적으로 유도할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 항염산제는 임상적으로 허가된 약물로서 인체에 노출되어도 안전하여 체내외에서 적용할 수 있고, 재현성, 생산성 및 경제성이 우수한 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [42] 도 1A는 PEG-PA 및 PEG (CF₃COOD)의 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타내고, 도 1B는 PEG-PA (D₂O에서 10.0 wt.%)의 FTIR 스펙트럼을 나타내고, 도 1C는 PEG-PA 수용액에서 폴리머 농도의 함수로서 CD 스펙트럼을 나타내고, 도 1D는 폴리머 함수로서 CD 밴드의 이동을 나타낸다.
- [43] 도 2A는 PEG-PA 블록 공중합체 수용액의 상평형그림을 나타내고, 도 2B는 PEG-PA 블록 공중합체 수용액(10.0 wt.%)의 계수를 온도 함수로서 나타내고, 도 2C는 37 °C에서 PEG-PA 블록 공중합체 수용액(10.0 wt.%)으로부터 제조된 열활성젤의 전계 방출-주사 전자현미경 이미지를 나타낸다 (scale bar: 10 μm).
- [44] 도 3은 PEG-PA 수용액으로부터 제조된 열활성젤에서 각 후보 화합물의 방출 프로파일을 나타낸 것이다.
- [45] 도 4A는 항염산제를 함유한 PEG-PA 열활성젤을 이용하여 TMSC의 연골형성 분화를 위한 후보 물질의 세포 독성을 평가한 결과를 보여주는 그래프이고, 도 4B는 3D 배양 조건 하에 후보 물질에 의한 연골형성 바이오마커인 COL II의 mRNA 발현 수준을 보여주는 그래프이다.
- [46] 도 5는 항염산제를 함유하는 PEG-PA 3D 매트릭스에서 죽은 세포와 살아있는 세포를 보여주는 이미지이다. 1, 4, 7, 및 KGN은 각각 답손, 프랄라트렉세이트, 트리메토프림, 및 KGN을 나타내고, 스케일 바는 50 μm이다.
- [47] 도 6A는 각 항염산제를 함유하는 PEG-PA 3D 매트릭스에서 COL II의 mRNA 발현량을, 도 6B는 SOX 9의 mRNA 발현량을, 도 6C는 ACAN의 mRNA 발현량을, 및 도 6D는 COL I의 mRNA 발현량을 나타낸다. 여기서 1, 4, 7, 및 KGN은 각각 답손, 프랄라트렉세이트, 트리메토프림, 및 KGN을 의미한다.
- [48] 도 7A는 각 항염산제를 함유하는 PEG-PA 3D 매트릭스에서 COL II의 단백질 발현량을, 도 7B는 SOX 9의 단백질 발현량을, 도 7C는 ACAN의 단백질 발현량을, 및 도 7D는 COL I의 단백질 발현량을 나타낸다. DAPI 및 PHD는 각각 핵은 청색, 세포질은 녹색으로 염색한다. 스케일 바는 25 μm이다. 여기서 1, 4, 7, 및 KGN은 각각 답손, 프랄라트렉세이트, 트리메토프림, 및 KGN을 의미한다.
- [49] 도 8A는 TMSC에서 CBFβ의 핵 전위를 보여주는 웨스턴 블롯 이미지이고, 도 8B는 웨스턴 블롯에서 세포질에 대한 핵에서의 밴드 세기를 그래프로 나타낸 것이고, 도 8C는 CBFβ의 면역형광 이미지이다. 스케일 바는 25 μm이다. 여기서 1, 4, 7, 및 KGN은 각각 답손, 프랄라트렉세이트, 트리메토프림, 및 KGN을 의미한다.
- [50] 도 9는 TMSC에서 RUNX1의 발현을 보여주는 면역형광 이미지이고, 스케일 바는 25 μm이다. 여기서 1, 4, 7, 및 KGN은 각각 답손, 프랄라트렉세이트, 트리메토프림, 및 KGN을 의미한다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [51] 본 발명은 항염산제를 포함하는, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용

조성물에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[52] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 보다 자세하게 설명하나, 이들은 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 이들에 의하여 본 발명의 범위가 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[53]

[54] 실시예 1. 열활성겔의 제조 및 특성 확인

[55] 1-1. 열활성겔의 제조

[56] 열활성겔로 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리(L-알라닌) (PEG-PA) 블록 공중합체를 준비하였다. PEG-PA 단량체에 α -아미노- ω -메톡시 폴리(에틸렌 글리콜) (α -Amino- ω -methoxy poly(ethylene glycol)) (Mn = 2,000 Daltons) (Creative PEGWorks, USA)을 개시제로 사용하여 N-카르복시 무수 L-알라닌 (N-carboxy anhydrides of L-alanine, NCA-A, (Onsolution, Korea))의 고리-열림 중합 반응을 이용하여 이전에 알려진 방식으로 합성하였다 (Kim, H. et al. Biomacromolecules 2020, 21, 3176-3185). 합성된 폴리머를 디에틸에테르로 분획 침전하여 정제하고, 잔류 용매를 진공 하에 증발시켰다. 그런 다음, 정제된 폴리머를 1,000 Da의 컷오프 분자량을 갖는 막을 이용하여 탈이온수에서 투석한 후 동결건조하였다.

[57] 1-2. 열활성겔의 구조 및 다분산 지수 확인

[58] PEG-PA의 분자량을 확인하기 위해 트리플루오로아세트산-D(CF₃COOD)(300 MHz NMR spectrometer, Bruker, USA) 및 N,N-디메틸 포름아미드를 용출 용매로 이용한 겔투과 크로마토그래피(SP930D; Younglin, Korea)에서 ¹H-NMR 분광 분석 방법을 이용하였다. 그리고 25 °C의 물에 PEG-PA 공중합체를 현탁하고 2차 구조를 FT-IR 분광법 (Nicolet iS10, Thermo Scientific, USA) 및 원형 이색성 (circular dichroism, CD) 분광법 (J-1500, JASCO, Japan)으로 결정하였다. PEG-PA의 임계 미셀 농도는 0.01-1.0 wt.%의 폴리머 농도 범위에서 CD 분광법으로 조사하였다.

[59] PEG-PA 블록 공중합체의 중량은 ¹H-NMR 스펙트럼에서 3.8-4.1 ppm의 에틸렌 글리콜 피크(-CH₂CH₂O-)의 면적과 1.4-1.7 ppm의 알라닌(-NHCH(CH₃)CO-)의 메틸 피크 면적을 비교하여 2,000-1,000 Da로 계산되었다. (도 1A). 겔 투과 크로마토그래피로 측정한 PEG-PA 블록 공중합체의 다분산 지수(polydispersity index)는 1.1이었다.

[60] D₂O에서 10.0wt.% 농도의 PEG-PA 자가-조립체의 2차 구조는 25°C에서 FT-IR 스펙트럼으로 확인하였다 (그림 1B). FTIR 스펙트럼에서 1625 cm⁻¹ 및 1652 cm⁻¹의 피크는 각각 β -시트 및 α -나선 구조로 지정되었다. PEG-PA 수용액의 원형 이색성 스펙트럼은 농도의 함수로 수득하였다. 0.01 wt.% 농도에서 220 nm에서 최소값을 갖는 음의 밴드는 β -시트 구조를 나타내는 반면 208 nm에서 음의 밴드는 α -나선 구조를 나타낸다. CD 스펙트럼은 208 및 220 nm에서 음의 밴드를

보였고, 0.001 wt.%에서 1.0 wt.%로 폴리머의 농도가 증가함에 따라 밴드가 230-240 nm로 적색 이동하여 소수성 PA 블록과 친수성 PEG 블록으로 이루어진 폴리머의 양친매성 특성으로 인해 PEG-PA의 자가-조립이 발생하였음을 확인하였다(그림 1C). CD 스펙트럼에서 외삽된 두 선의 교차점은 블록 공중합체의 자가-조립(미셀)을 나타낸다(그림 1D). PEG-PA 블록 공중합체의 임계 미셀 농도(CMC)는 0.04wt%였다.

[61] **1-3. 열활성겔의 졸-겔 전이 특성 확인**

[62] 폴리머 농도의 함수로서 PEG-PA 블록 공중합체 수용액의 졸-겔 전이를 연구하기 위해 시험관반전법(test-tube inverting method)을 사용하여 상평형그림(Phase Diagram)을 도출하였다. 구체적으로, 용액(1.0mL)을 내경이 11mm인 시험관에 넣고, 온도를 1.0 °C/step씩 증가시키면서, 유동(졸)에서 비유동(겔) 기준으로 전이점(transition point)을 결정하였다. 각 데이터 지점은 3회 측정한 평균으로 결정하였다. 온도가 증가함에 따라, PEG-PA 블록 공중합체 수용액은 4.0-12.0wt%의 중합체 농도 범위에서 졸에서 겔로 전환되었다. 폴리머 농도가 4.0에서 12.0 wt.%로 증가함에 따라 전이 온도는 45°C에서 16°C로 감소했다(그림 2A). 폴리머 수용액은 4.0 wt.% 미만의 농도에서 유동성 졸 상태인 반면, 10°C 내지 60°C의 실험 온도 범위에서 12.0 wt.% 이상의 농도에서는 겔 상태였다.

[63] 수성 폴리머 용액(10.0 wt.%)의 계수를 온도의 함수로 조사하였다(그림 2B). 폴리머 수용액(10.0 wt.%)의 모듈러스 변화는 Rotational Rheometer(Bohlin Gemini 150, Malvern, England)를 사용하여 온도(5-50°C)의 함수로 조사하였다. 용액을 직경이 20mm, 간격이 0.5mm인 두 평행판 사이에 놓고, 1.0 rad/s의 주파수와 1.0 °C/분의 가열 속도로 제어된 응력(0.4 Pa) 하에서 용액의 모듈러스를 기록함으로써 취득하였다. 저장탄성계수(Storage modulus, G')은 25°C에서 손실탄성계수(loss modulus, G'')와 교차하고, G' 및 G'' 는 각각 복합 계수의 탄성 및 점성 정도를 나타낸다. G' 가 G'' 보다 크면 탄성이 점성을 압도하여 졸에서 겔로의 전이를 나타낸다.

[64] TMSC의 3D 배양 연구에 사용된 PEG-PA 블록 공중합체 수용액은 10.0 wt.%로, 37 °C에서 600 Pa의 G' 값을 갖는 겔 상태를 보여 세포를 유지하기에 충분히 강한 특성을 확인하였고, 15 °C에서 G' 값이 0.03 Pa 미만이 되어 저점도의 졸 상태가 되었다. 폴리머 수용액의 졸 및 겔 상태 이미지는 도 2B에 나타내었다.

[65] **1-4. 열활성겔의 다공성 확인**

[66] 겔의 다공성 형성 상태를 관찰하기 위해, 전계 방출-주사 전자현미경 (Field Emission-Scanning Electron Microscopy, FE-SEM) 이미지를 획득하였다. 구체적으로, 37°C의 PEG-PA 블록 공중합체 열경화겔(10.0 중량%)을 액체 질소(-196°C)에서 급냉시킨 후, 동결 건조하고, 전계 방출-주사형 전자현미경(JSM-6700F, JEOL, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 폴리머 겔은 다공성 구조를 가지므로, 3D 세포 배양 중에 줄기세포를 고정하고 서방출할 수

있고, 영양소 및 대사 산물을 수송할 수 있다(도 2C).

[67]

[68] 실시예 2. 열활성 겔의 약물 방출 프로파일 확인

[69] 열활성 겔의 약물 방출 프로파일을 인 비트로로 확인하였다. 구체적으로, 답손, 프랄라트렉세이트, 트리메토프림, 또는 KGN(0.02 mg)을 PEG-PA 블록 공중합체 수용액(10.0 wt.%, 0.2 mL)에 용해시켰다. 약물을 함유하는 폴리머 용액의 온도를 37 °C로 증가시켜서 졸에서 겔로 전이시켰다. 30분 후, 인산완충식염수(PBS)(1.2mL, 37°C)를 첨가하고, 37°C에서 40스트로크/분으로 진탕 항온조에 넣었다. PBS는 특정 샘플링 간격으로 교체하였다. 매질인 PBS로 방출된 약물은 포토다이오드 검출기(Waters 2998, USA)와 Jupiter® 5 μ m C18 300A LC 컬럼(Phenomenex, USA)을 갖춘 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(HPLC; Waters 1525B, USA)으로 분석하였다. 이동상으로서 트리플루오로아세트산(0.1%)(40/60 v/v)을 함유한 메탄올/물의 공용매를 답손, 프랄라트렉세이트 및 트리메토프림에 사용하였고, 아세토니트릴/물 함유 포름산(0.1%)의 공용매(35/65 v/v)를 KGN에 사용하였고, 분석속도는 1.0 mL/분의 유속으로 설정하였다. 약물 방출량은 답손의 경우 260 nm, 프랄라트렉세이트는 307 nm, 트리메토프림은 287 nm, 및 KGN은 274 nm에서 분석하여 3회 반복한 후 평균 값으로 결정하였다.

[70] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 답손(1)의 경우 24시간 동안 70%가 방출된 반면 프랄라트렉세이트(4)와 트리메토프림(7)은 79%가 방출되었다. 항염산제(화합물 1, 4, 및 7)의 95% 이상이 3일 동안 방출되었다. 방출 프로파일에 의하면 후보 항염산제가 초기 며칠 동안 PEG-PA 열활성 겔에서 방출되므로 각 시스템이 TMSC에 대해 항염산제의 전처리 효과를 제공할 수 있음을 의미한다.

[71]

[72] 실시예 3. 항염산제의 연골 생성 효과 확인

[73] 3-1. 항염산제의 줄기세포에 대한 세포 독성 확인

[74] 항염산제의 세포 증식, 생존력 및 연골 형성 가능성을 평가하기 위해 다양한 항염산제에 대해 스크리닝 하였다. 사용한 항염산제는 답손(dapsone (1)), 메토틱렉세이트(methotrexate (2)), 페메트렉시드(pemetrexed (3)), 프랄라트렉세이트(pralatrexate (4)), 프로구아닐(proguanil (5)), 피리메타민(pyrimethamine (6)), 및 트리메토프림(trimethoprim (7))이었다. 항염산제 또는 KGN을 함유하는 PEG-PA 열활성 겔 스캐폴드에 내장된 줄기세포를 FBS(10.0% v/v)를 함유하는 DMEM 성장 배지에서 21일 동안 배양하였다. 대조 실험은 항염산제를 첨가한 것을 제외하고는 동일한 조건에서 수행하였다.

[75] 세포 증식은 세포계수키트-8(CCK-8)을 사용하여 열활성 겔에서 항염산제 농도의 함수로 조사하였다(도 4A). 배양 21일째 세포를 0일째와 비교한 결과 항염산제가 세포 증식을 크게 방해하는지 여부를 확인하였다. 구체적으로,

CCK-8 용액(1.0% v/v PS를 함유하는 DMEM 중 10.0% v/v)을 플레이트의 각 웰(1.5ml/웰)에 첨가하고, 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 3시간 동안 세포를 배양한 후 마이크로플레이트 리더(iMARK™, Bio-Rad, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 655 nm에서의 흡광도를 기준선으로 사용하였다. 세포 생존율은 Live/Dead Kit(Molecular Probes, USA)로 분석하였다. 세포 배양액을 에티디움 호모다이머-1(ethidium homodimer-1)(2.0μM)과 칼세인 아세톡시메틸에스터(calcein acetoxymethyl ester)(2.0μM)가 포함된 PBS로 교체하고 30분 간 배양하였다. 0일, 14일 및 21일 간 3D 배양 후, 세포를 Olympus IX71 형광 현미경으로 관찰하고 Olympus DP2-BSW 소프트웨어를 사용하여 이미지를 얻었다.

[76] 그 결과, 모든 항염산제가 0.1 μM 농도에서 세포 독성이 없음을 확인하였다.

[77] **3-2. 항염산제의 연골 형성 효과 확인**

[78] 항염산제 존재 하에서 연골형성 바이오마커 발현을 조사하였다. 줄기세포의 연골 분화에 가장 널리 사용되는 바이오마커인 COL II의 발현을 mRNA 수준으로 확인하였다 (도 4B). 0.1 μM의 농도에서 COL II 발현은 답손(1), 프랄라트렉세이트(4), 트리메토프림(7) 및 KGN(양성 대조군 화합물)에서 유의하게 증가했고 (p<0.05), COL II mRNA 발현 수준은 대조군과 비교하여 각각 1.8배, 2.1배, 1.5배 및 1.5배 증가하였고, 프랄라트렉세이트가 그 중에서도 COL II 발현 효과가 현저히 우수한 것으로 확인 되었다.

[79]

[80] **실시예 4. 열활성젤에서의 줄기세포 배양 및 연골형성 촉진 효과 확인**

[81] **4-1. 열활성젤에서 3D 줄기세포 배양**

[82] 실시예 3의 스크리닝 결과를 토대로 답손(1), 프랄라트렉세이트(4), 트리메토프림(7)을 항염산제 후보로 선정하였다. 그런 다음 선별된 항염산제를 줄기세포가 유의한 독성을 나타내지 않는 0.1μM 농도에서 세부 연구를 수행하였고, 0.1 μM의 KGN-포함 시스템을 양성 대조군으로 사용하였다.

[83] 줄기세포로 사용된 인간TMSC는 편도절제술(tonsillectomy)을 통해 6세 남성에서 분리하여 대학의 윤리 지침에 따라 이화여자대학교 목동병원(서울, 한국)에서 기증된 것이다. 10.0%(v/v) 태아소혈청(FBS, Corning, USA), 1.0%(v/v) 페니실린/스트렙토마이신(PS, Corning, USA) 및 1.0%(v/v) 항생제-항유사분열제(AA, Corning, USA)를 함유하는 DMEM (Corning, USA)을 성장 배지로 사용하여 분리된 인간TMSC를 37°C에서 5% CO₂ 대기하에 전통적인 폴리스티렌 배양 접시에서 배양하였다. 그런 다음, 줄기 세포(passage 7, 0.5x10⁶ 세포/웰)를 항염산제 또는 KGN을 함유하는 PEG-PA 수용액(성장 배지 중 10.0중량%)과 20°C에서 혼합하였다. 항염산제나 KGN을 포함하지 않는 시스템을 대조군으로 사용하였다. TMSC-현탁 용액을 37°C에서 24웰 배양 플레이트(0.2ml/well)에 주입하여 히드로겔 매트릭스를 형성하였다. 배지를 3D배양기간인 21일 동안 3일마다 교체하였고, 각 실험은 삼중으로 수행하였다.

- [84] 먼저 PEG-PA 열활성 겔을 이용하여 3D 세포 배양한 14일 및 21일 후, 살아있는 세포와 죽은 세포의 이미지를 각각 녹색과 빨간색으로 염색된 Live/Dead 분석 키트를 사용하여 얻었다(도 5). 모든 이미지에서 대부분의 세포가 살아있는 것을 확인되었고, 세포 밀도가 증가하였다.
- [85] **4-2. 연골형성 분화 유도 효과의 mRAN 수준에서의 확인**
- [86] TMSC의 연골 분화는 COL II, SOX 9 및 ACAN과 같은 연골형성 바이오마커의 mRNA 및 단백질 수준으로 확인하였다. 동일한 양의 cDNA를 사용하여 항염산제가 없는 대조군 시스템과 비교하여 유전자 발현 수준을 결정하였다. 골형성 바이오마커인 COL I을 이용하여 항염산제를 사용하는 경우 골형성 분화 여부도 확인하였다.
- [87] 구체적으로, 0일, 14일 및 21일의 3D 배양 후 제조사의 프로토콜에 따라 TRIZOLTM 시약(Invitrogen, USA)을 사용하여 열경화겔의 세포로부터 mRNA를 추출하고 mRNA 농도는 Nano Drop 2000 분광광도계(Thermo Scientific, USA)로 분석하였다. 동일한 양의 cDNA를 qPCR에 사용하여 항염산제가 없는 대조군과 비교하여 유전자 발현 수준을 결정하였다. 그런 다음 ReverTra Ace® qPCR RT 키트(Toyobo, Japan)를 사용하여 전체 cDNA를 합성하고, mRNA 발현량을 CFX96TM real-time RT-PCR system(Bio-Rad, USA)과 iQTM SYBR® Green Supermix solution(Bio-Rad, USA)을 이용하여 분석하였다. 표적 유전자의 상대적 발현 값은 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 로 계산하였으며, 여기서 계산식은 $\Delta\Delta C_t = (\text{Gene A} - \text{GAPDH})_t - (\text{Gene A} - \text{GAPDH})_0$ 이다. 첨자 0은 0일(3시간)의 데이터를 의미한다. 증폭에 사용된 프라이머 서열은 표 1과 같고, 각 시험 값은 모두 3회 반복하여 평균 값으로 결정하였다.

[88]

[89] [표1]

Genes	Primer sequences	Annealing Temp. (°C)
COL II	F: 5'-AGG AGG CTG GCA GCT GTG TGC-3' 5'-CAC TGG CAG TGG CGA GGT CAG-3'	65.0 62.8
SOX 9	F: 5'-GCA GCG AAA TCA ACG AGA AAC-3' 5'-TCC AAA CAG GCA GAG AGA TTT AG-3'	55.0 54.5
ACAN	F: 5'-CAG AGC AAG ACT CTG TCT CAA A-3' 5'-GGG ACA AGA GCC TCA TCA AA-3'	54.5 54.8
COL I	F: 5'-CTC CTC AAG GGC TCC AAC G-3' 5'-CAT CGA CAG TGA CGC TGT AGG-3'	58.0 57.5
GAPDH	F: 5'-CTC CTC ACA GTT GCC ATG TA-3' 5'-GTT GAG CAC AGG GTA CTT TAT TG-3'	54.5 53.9

- [90] COL II, SOX 9, ACAN, COL I, 및 GAPDH는 각각 type II collagen, SRY box transcription factor 9, aggrecan, type I collagen, 및 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase를 의미한다. F 및 R은 각각 정방향 및 역방향 프라이머를 의미한다. 그 결과, COL II 발현은 프랄라트렉세이트(4)를 포함하는 시스템에서 가장 우수하였고, 0일(배양 후 3시간)과 비교하여 14일에 10배 증가하였고, KGN의 경우와 비교하여 2배 이상이었다. 14일 째를 기준으로, COL II mRNA 수준은 프랄라트렉세이트, 트리메토프림 및 KGN을 포함하는 시스템에서 각각 항염산제를 포함하지 않는 대조군 시스템에 비해 3.9배, 2.1배 및 1.7배 증가했다(도 6A). COL II 발현 수준은 각각 답손, 프랄라트렉세이트, 트리메토프림 및 KGN을 포함하는 시스템에서 대조군과 비교하여 각각 2.6배, 3.5배, 2.1배 및 2.1배 증가했다. 유사하게, SOX 9 발현은 4일 및 21일 째에 프랄라트렉세이트 및 트리메토프림을 포함하는 시스템에서 유의하게($p < 0.01$) 증가했다(도 6B). 특히, 프랄라트렉세이트를 함유하는 시스템은 가장 높은 SOX 9 mRNA 수준을 나타냈다.
- [91] 14일 째에, 프랄라트렉세이트 및 트리메토프림 함유 시스템은 SOX 9 mRNA 발현 수준을 대조군 시스템과 비교하여 각각 4.2배 및 2.9배 증가시켰다. ACAN mRNA 발현 수준 또한 SOX 9 mRNA와 유사한 경향을 보였다. 14일 째에 ACAN mRNA 수준은 0일(배양 후 3시간)과 비교하여 프랄라트렉세이트, 트리메토프림 및 KGN 함유 시스템에 대해 각각 12배, 6배 및 5배 증가했다(도 6C). 항염산제를 함유하지 않은 대조 시스템과 비교하여, ACAN 발현 수준은 프랄라트렉세이트, 트리메토프림 및 KGN 함유 시스템에서 14일에 각각 4.3배, 2.2배 및 1.7배 증가했다. 20일 째에 KGN 함유 시스템은 대조군 시스템의 약 3.7배로 가장 높은 ACAN mRNA 수준을 나타냈다. 반면, 골형성 분화 바이오마커 COL I은 모든 조건에서 0일보다 현저히 낮은 발현을 보였다(도 6D). 이러한 결과는 항염산제가 줄기세포가 연골세포로 분화하도록 유도하고 골세포로의 분화를 억제한다는 것을 나타낸다.
- [92] **4-2. 연골형성 분화 유도 효과의 단백질 수준에서의 확인**
- [93] COL II, SOX 9, ACAN 및 COL I에 대한 단백질 발현은 14일 동안 배양된 줄기세포에 대해 면역형광 분석을 사용하여 확인하였다. 구체적으로, 항염산제 또는 KGN으로 14일 간 3D 세포를 배양한 후, 열활성 겔 지지체에 캡슐화 된 TMS를 4.0% 파라포름알데히드(PFA)로 12시간 동안 고정하고 -70°C 에서 신속하게 동결시켰다. 그런 다음, CM1850(Leica, Germany)을 사용하여 열활성 겔을 $10\ \mu\text{m}$ 두께로 동결 절편하였다. 모든 샘플에는 트리톤(PBS 중 0.25% v/v)으로 처리 후, 소 혈청 알부민(PBS 중 1.0% w/v)으로 블로킹하고, 항-COL II, 항-SOX 9, 항-ACAN 및 항-COL I인 1차 항체를 처리하였다. 그런 다음, 샘플을 PBS로 세척하고 2차 항체로서 COL II 및 ACAN의 경우 염소 항-마우스 IgG H&L Alexa Fluor® 594, SOX 9 및 COL I의 경우 염소 항-토끼 IgG H&L Alexa Fluor® 594로 처리하였다. 모든 항체는 미국 Abcam에서 구입했으며 제조업체의

프로토콜을 따라 시험하였다. 또한 각 샘플을 DAPI(Molecular probes, 미국) 및 팔로이딘(phalloidin, PHD)(Abcam, 미국)으로 각각 핵과 F-액틴을 염색하였다. 이미지는 Olympus IX71 형광 현미경과 Olympus DP2-BSW 소프트웨어를 사용하여 얻었다.

- [94] 그 결과는 도 7에 나타내었다. 면역형광 분석은 세포의 핵과 액틴을 각각 DAPI 및 PHD의 청색과 녹색으로 염색하고, 각 단백질의 항체를 적색으로 염색하였다. COL II, SOX 9 및 ACAN의 경우 프랄라트렉세이트 함유 시스템에서 형광 강도(적색)가 가장 높았고, 모든 조건에서 COL I의 형광 강도는 현저히 낮았으며 이는 mRNA 발현 결과와 일치하였다.

[95]

[96] 실시예 5. 항염산제의 연골형성 분화 관련 인자 조절 효과 확인

- [97] 필라민 A(Filamin A)는 연골 분화에 관여하는 세포골격 네트워크를 조절하는 액틴 결합 단백질이다. KGN이 세포질에서 필라민 A에 결합하면 필라민 A와 CBF β 간의 상호작용이 끊어지고 해리된 CBF β 가 핵으로 들어가게 되면 CBF β 가 RUNX1을 조절하여 MSC의 연골세포로의 분화를 촉진시킨다. 항염산제가 이러한 메커니즘에 관여하여 연골형성 분화 관련 인자를 조절할 수 있는지 웨스턴 블롯 및 면역형광 분석으로 확인하였다.

- [98] 구체적으로, 웨스턴 블롯을 하기 위해 줄기세포를 밤새 기아 상태로 둔 후, 무혈청 성장 배지에서 항염산제 또는 KGN을 처리하였다. 그런 다음, 핵/세포질 분획 키트(Cell Biolabs INC., USA)를 이용해 TMSC의 세포질 및 핵 단백질을 얻고, 프로테아제 억제제 및 페닐 메탄 설폰일 플루오라이드(1.0mM)가 함유된 세포 추출 완충액(미국, Invitrogen)을 이용하여 전체 단백질을 얻었다. 각 세포질 및 핵 단백질을 로딩하고 항-CBF β 1차 항체(Cell Signaling Technology, USA)로 검출한 후, 항-토끼 IgG HRP 연결 2차 항체(Cell Signaling Technology, USA)를 처리하고 배양하고, Amersham Imager 600(GE, UK)을 사용하여 향상된 화학발광 기질(Bio-rad, USA)로 이미지화 하였다.

- [99] 면역형광분석은 줄기세포를 밤새 기아 상태로 둔 후, 무혈청 성장 배지에서 항염산제 또는 KGN으로 처리하였다. 각 세포에 소 혈청 알부민(PBS 중 1.0% w/v) 처리 후, 항-CBF β 1차 항체(Abcam, USA) 및 항-RUNX1 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 처리하고 인큐베이션하고, 세포를 각각 CBF β 및 RUNX1에 대한 항-토끼 IgG H&L 이차 항체(Abcam, USA) 및 항-마우스 IgG H&L 2차 항체(Abcam, 미국)를 처리하였다. 세포 핵은 DAPI(Molecular probes, USA)로 염색하고, 각 이미지를 Olympus IX71 형광 현미경과 Olympus DP2-BSW 소프트웨어를 사용하여 얻었다.

- [100] 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다. 웨스턴 블롯에서 핵 내 CBF β 증가와 함께 세포질에서 CBF β 가 감소하여 줄기세포에 항염산제를 처리하면 CBF β 의 핵 전위가 증가함을 확인하였다 (도 8A). 세포질 밴드 강도에 대한 핵 밴드 강도를 비교한 결과, 프랄라트렉세이트를 처리한 경우 CBF β 의 핵 전위를 증가시키는

것이 확인되었다(도 8B). 면역형광 이미지 또한 항염산제 처리에 의해 핵 내 CBF β 의 발현이 증가함을 보여준다(도 8C).

- [101] RUNX1 발현은 면역형광으로 확인하였다(도 9). 프랄라트렉세이트를 처리한 경우 대조군에 비해 핵에서 RUNX1의 형광 강도를 증가시켰다. 항염산제가 줄기세포의 RUNX1 매개 연골 형성을 상향 조절하는 CBF β 의 핵 전위를 증가시켜 줄기 세포의 연골 형성 분화를 촉진하는 것을 확인되었다.

[102]

- [103] 모든 결과 값 간의 통계적 유의성은 Tukey 테스트를 사용한 일원 분산 분석(one-way ANOVA)으로 분석하였다. * 및 **는 각각 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 을 나타낸다.

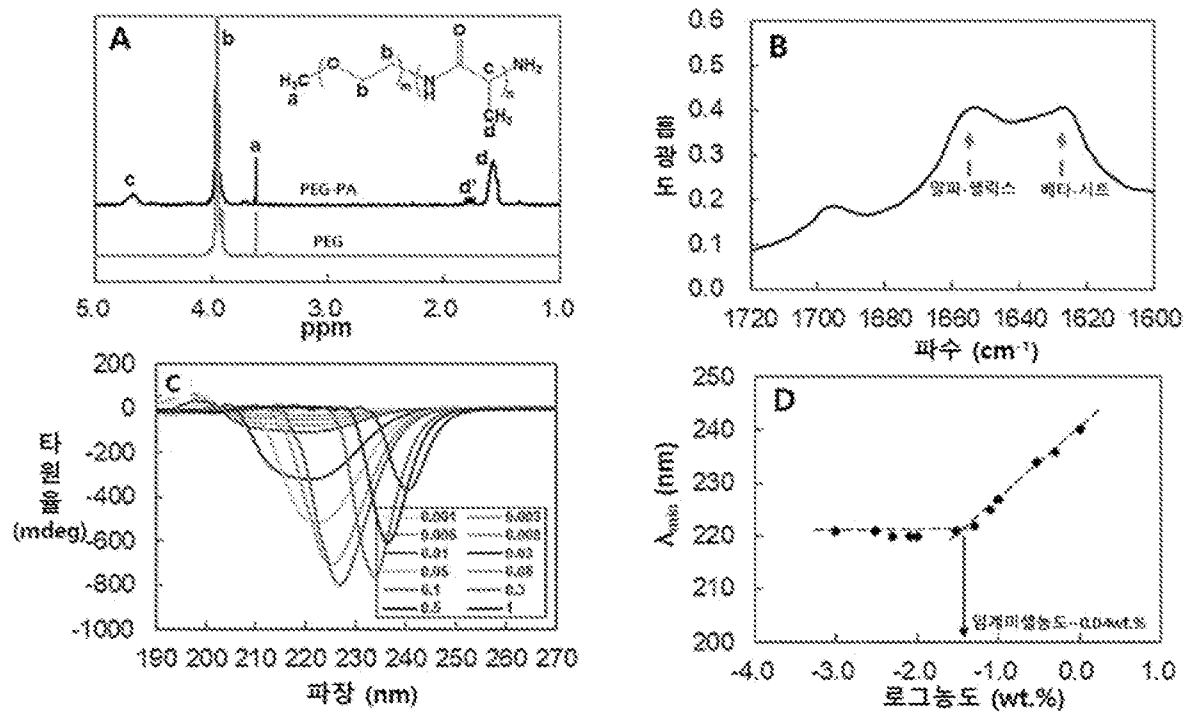
산업상 이용가능성

- [104] 본 발명은 항염산제를 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물과 이를 이용한 연골 손상 질환의 치료 방법에 관한 것으로서, 답손, 프랄라트렉세이트, 트리메토프림 또는 이들의 조합과 같은 임상적으로 허가된 항염산제를 이용하여 경제적이고, 안정적이고 효율적으로 줄기세포를 연골세포로 분화시킬 수 있다.

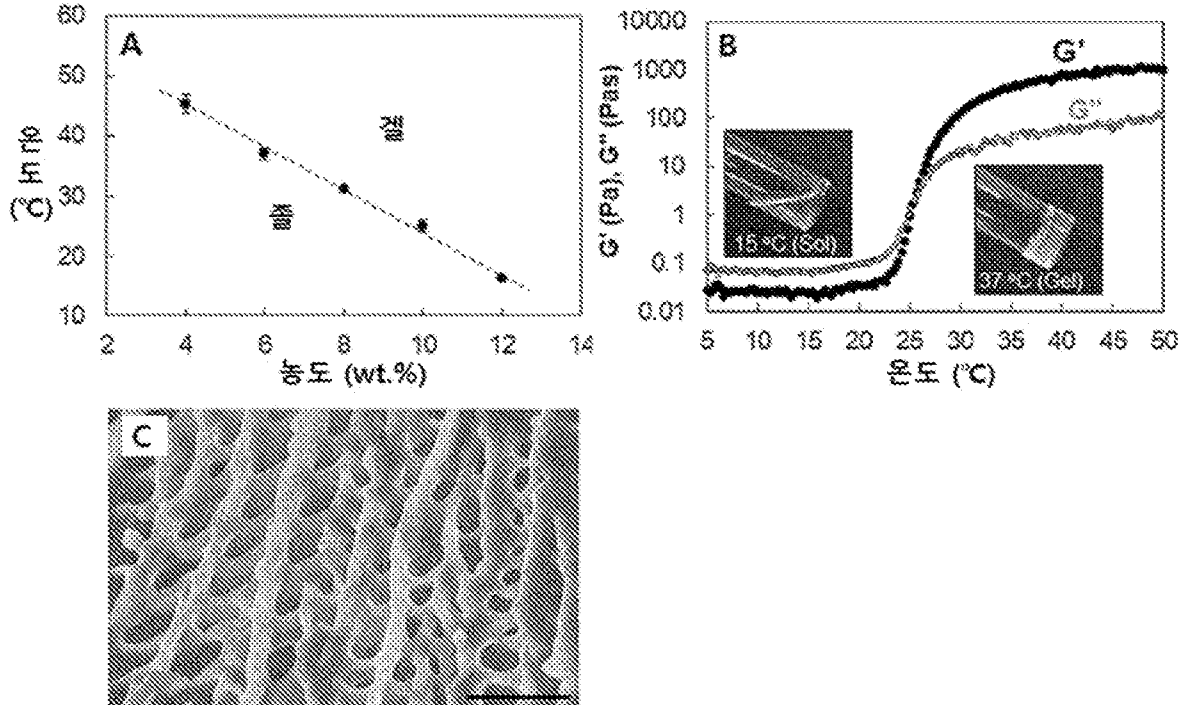
청구범위

- [청구항 1] 항염산제를 포함하는, 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 지방유래 중간엽 줄기세포, 골수유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래줄기세포, 배아줄기세포, 편도유래 중간엽 줄기세포 및 활막 중간엽 줄기세포(synival mesenchymal stem cell)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 항염산제는 답손(dapsone), 프랄라트렉세이트(pralatrexate), 트리메토프림(trimethoprim) 또는 이들의 조합인 것인 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 항염산제는 프랄라트렉세이트인 것인 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 항염산제의 농도는 0.05 μ M 내지 100 μ M인 것인 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물.
- [청구항 6] 항염산제 및 줄기세포를 포함하는, 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 연골 손상 질환은 관절염, 연골 손상, 연골 결손, 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염, 골절, 족저근막염, 상완골외과염, 골연화증, 또는 이들의 조합인 것인 연골 손상 질환 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 청구항 1에 따른 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 조성물을 포함하는 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 서방출제형.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 서방출제형은 열활성 겔(thermogel)인 것인 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 서방출제형.
- [청구항 10] 청구항 8에 있어서, 상기 서방출제형은 폴리(에틸렌글리콜)-폴리(L-알라닌) 공중합체를 포함하는 것인 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 서방출제형.
- [청구항 11] 청구항 8에 있어서, 상기 서방출제형은 줄기세포를 더 포함하는 것인 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도용 서방출제형.

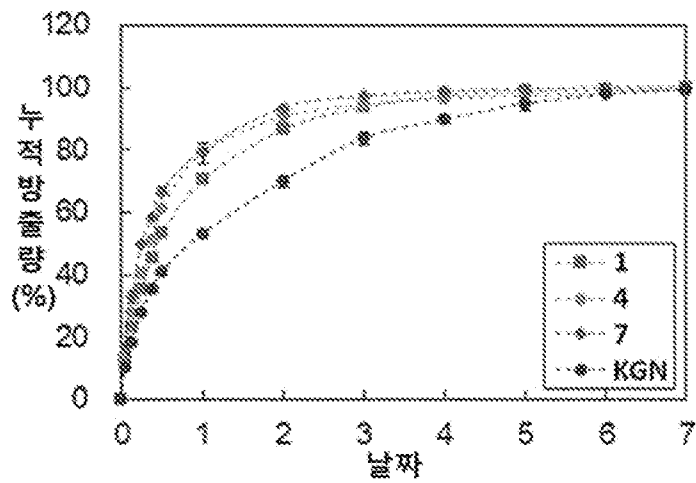
[도 1]



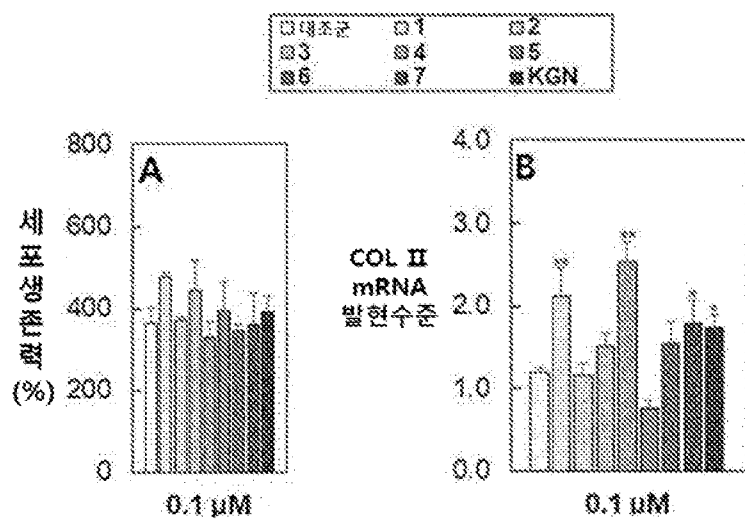
[도 2]



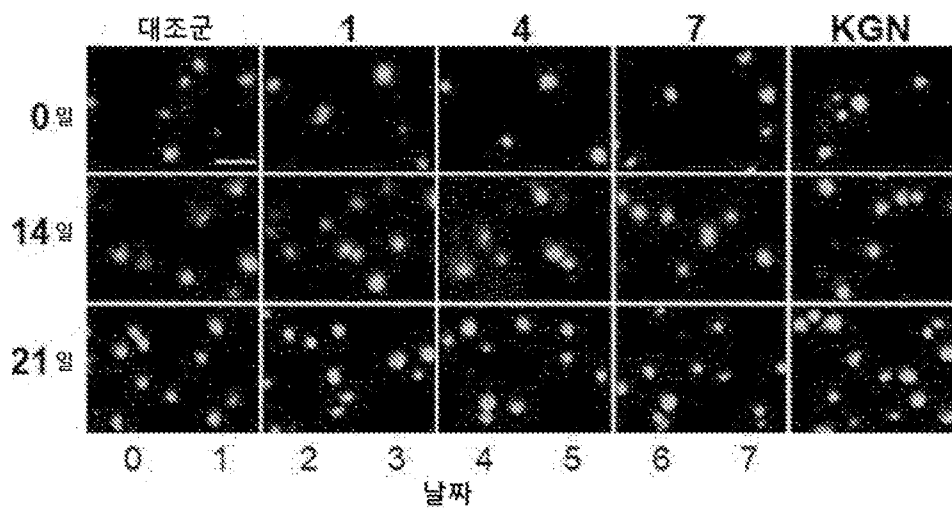
[도 3]



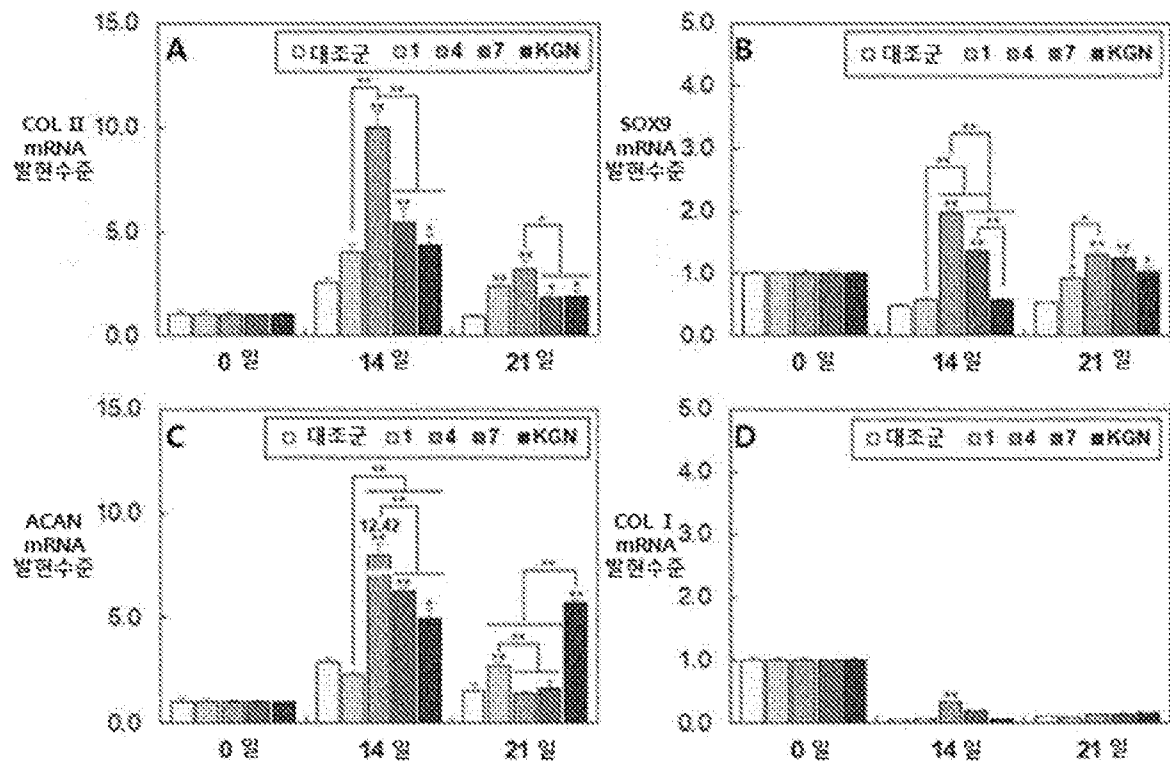
[도 4]



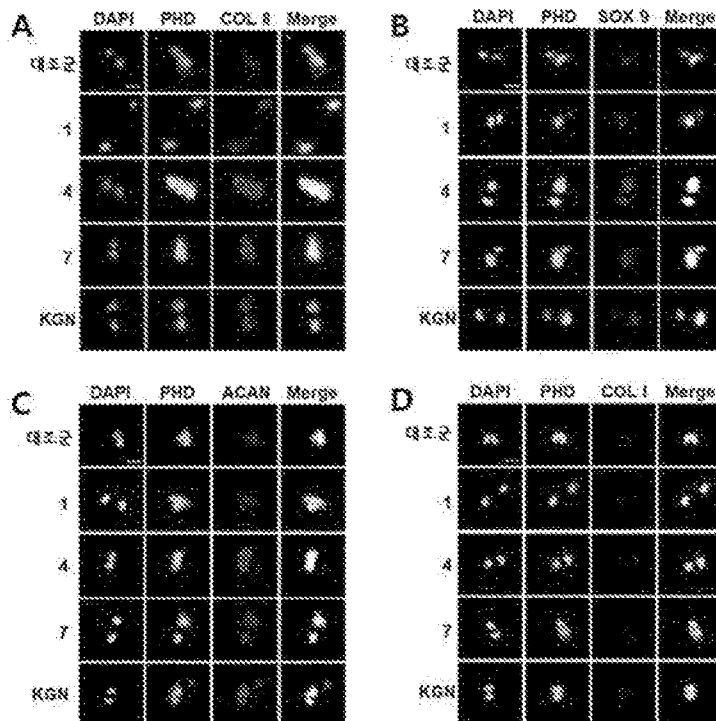
[도 5]



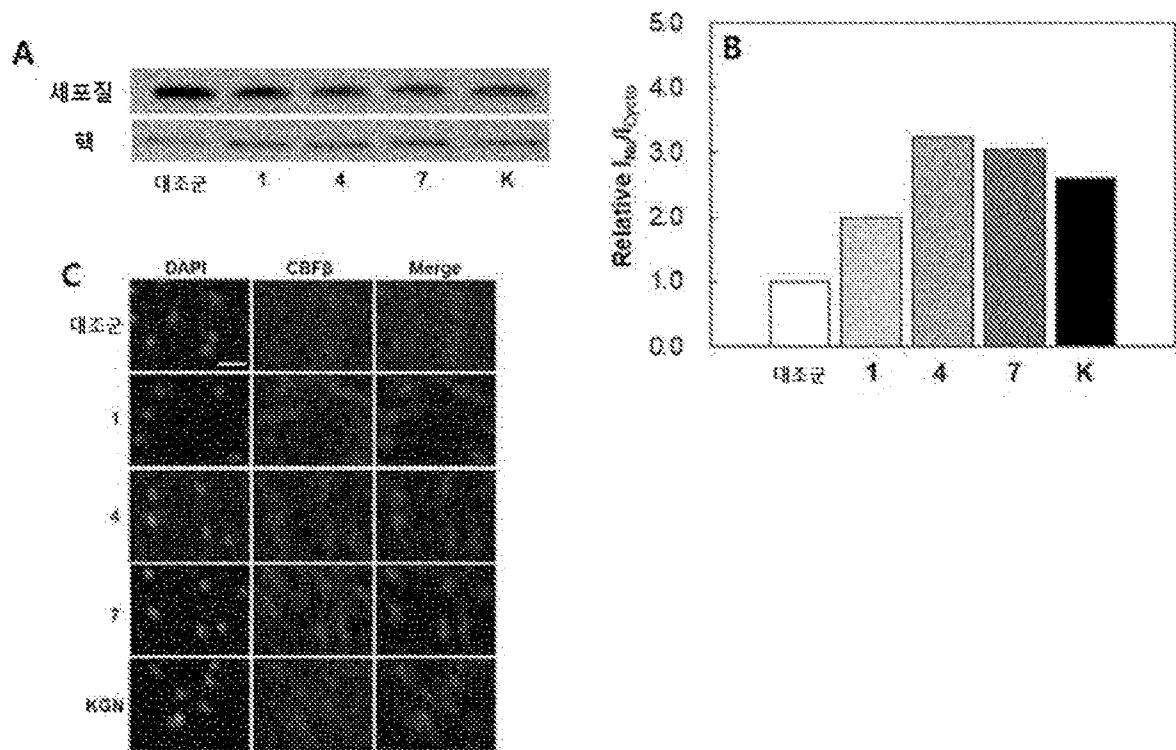
[도 6]



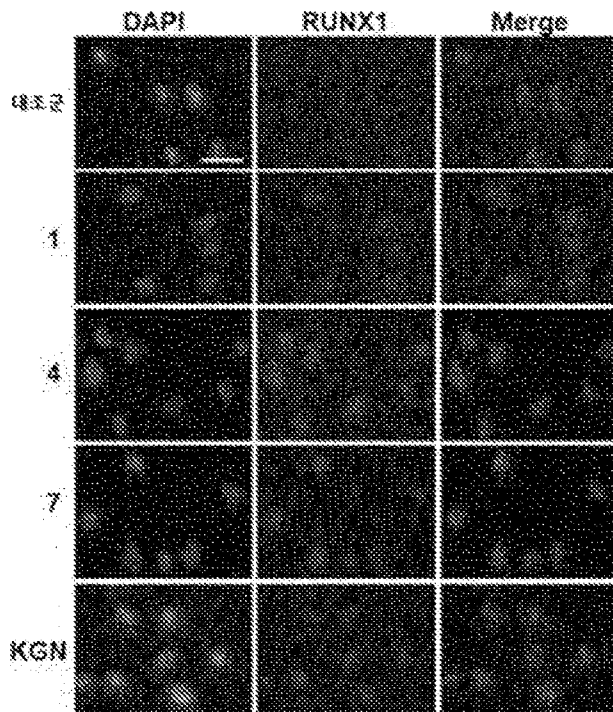
[도 7]



[도 8]



[도 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013880

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/145(2006.01)i; **A61K 31/519**(2006.01)i; **A61K 31/505**(2006.01)i; **A61K 9/06**(2006.01)i; **A61K 9/00**(2006.01)i;
A61K 47/34(2006.01)i; **A61P 19/02**(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 31/145(2006.01); A61K 35/32(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: 항엽산제(anti-folate), 줄기세포(stem cell), 연골세포(chondrocyte), 분화(differentiation), 열활성 겔(thermogel), 폴리(에틸렌글리콜)-폴리(L-알라닌) 공중합체(poly(ethylene glycol)-poly(L-alanine) copolymer)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
DX	KR 10-2020-0114226 A (EWAH UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 07 October 2020 (2020-10-07) See paragraphs [0033], [0041]-[0042] and [0075]; and claims 1, 4 and 13.	1-5,8-9
DY		10-11
X	ZHAI, Qiming et al. Mesenchymal stem cells enhance therapeutic effect and prevent adverse gastrointestinal reaction of methotrexate treatment in collagen-induced arthritis. Stem Cells International. 11 January 2021, vol. 2021, 8850820, pp. 1-12. See abstract.	6-7
Y	PARK, Min Hee et al. PEG-poly(L-alanine) thermogel as a 3D scaffold of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. Macromolecular Bioscience. 2015, vol. 15, pp. 464-472. See abstract.	10-11
A	BEANE, Olivia S. et al. Adipose-derived stem cells retain their regenerative potential after methotrexate treatment. Exp Cell Res. 2014, vol. 327, no. 2, pp. 222-233. See entire document.	1-11



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

27 December 2022

Date of mailing of the international search report

27 December 2022

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/KR2022/013880**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIU, Shuang et al. Assessment and comparison of the efficacy of methotrexate, prednisolone, adalimumab, and tocilizumab on multipotency of mesenchymal stem cells. <i>Frontiers in Pharmacology</i> . 2020, vol. 11, no. 1004, pp. 1-11. See entire document.	1-11
A	LI, Hui et al. Effects of various antimicrobial agents on multi-directional differentiation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. <i>World Journal of Stem Cells</i> . 2019, vol. 11, no. 6, pp. 322-336. See entire document.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/013880

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2020-0114226 A	07 October 2020	KR 10-2197871 B1	04 January 2021
		WO 2020-197059 A2	01 October 2020
		WO 2020-197059 A3	29 April 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/145(2006.01)i; A61K 31/519(2006.01)i; A61K 31/505(2006.01)i; A61K 9/06(2006.01)i; A61K 9/00(2006.01)i; A61K 47/34(2006.01)i; A61P 19/02(2006.01)i; C12N 5/077(2010.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/145(2006.01); A61K 35/32(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: 항엽산제(anti-folate), 줄기세포(stem cell), 연골세포(chondrocyte), 분화(differentiation), 열활성 겔(thermogel), 폴리(에틸렌글리콜)-폴리(L-알라닌) 공중합체(poly(ethylene glycol)-poly(L-alanine) copolymer)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
DX	KR 10-2020-0114226 A (이화여자대학교 산학협력단) 2020.10.07 단락 [0033], [0041]-[0042], [0075]; 및 청구항 1, 4, 13 참조.	1-5,8-9
DY		10-11
X	ZHAI, QIMING 등, "Mesenchymal stem cells enhance therapeutic effect and prevent adverse gastrointestinal reaction of methotrexate treatment in collagen-induced arthritis", Stem Cells International, 2021.01.11, 2021권, 8850820, 페이지 1-12 요약 참조.	6-7
Y	PARK, MIN HEE 등, "PEG-poly(L-alanine) thermogel as a 3D scaffold of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells", Macromolecular Bioscience, 2015, 15권, 페이지 464-472 요약 참조.	10-11
A	BEANE, OLIVIA S. 등, "Adipose-derived stem cells retain their regenerative potential after methotrexate treatment", Exp Cell Res., 2014, 327권, 2호, 페이지 222-233 전체 문헌 참조.	1-11
☒ 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 2022년12월27일 (27.12.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년12월27일 (27.12.2022)
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
A	LIU, SHUANG 등, "Assessment and comparison of the efficacy of methotrexate, prednisolone, adalimumab, and tocilizumab on multipotency of mesenchymal stem cells", Frontiers in Pharmacology, 2020, 11권, 1004호, 페이지 1-11 전체 문헌 참조.	1-11
A	LI, HUI 등, "Effects of various antimicrobial agents on multi-directional differentiation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells", World Journal of Stem Cells, 2019, 11권, 6호, 페이지 322-336 전체 문헌 참조.	1-11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2020-0114226 A	2020/10/07	KR 10-2197871 B1	2021/01/04
		WO 2020-197059 A2	2020/10/01
		WO 2020-197059 A3	2021/04/29