



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0085398
(43) 공개일자 2025년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2015.01) A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)
A61P 19/02 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-0174628

(22) 출원일자 2023년12월05일

심사청구일자 2023년12월05일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

이부규

서울특별시 강남구 언주로30길 57, 타워팰리스 E
동 2004호

김현정

경기도 의정부시 평화로290번길 11, 한주1차아파트 102동 705호

(74) 대리인

특허법인태평양

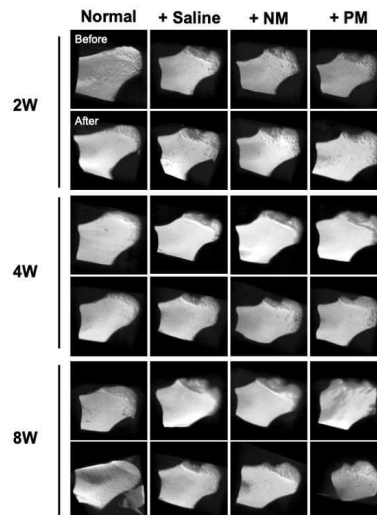
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **턱관절 질환의 예방 또는 치료용 줄기세포 치료제 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 줄기세포 치료제 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 구체적으로는, IDO, TSG-6 및 FGF2로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하며, 이를 이용하는 경우, 턱관절의 연골 소실을 예방하고 뼈의 재생을 촉진하여 턱관절염의 근본적인 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)

C12N 5/0647 (2013.01)

C12N 5/0663 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465038769
과제번호	HI21C0168010023
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질병중심중개연구사업
연구과제명	고효능 제대 줄기세포의 턱관절염 치료 유효성 평가 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase), TSG-6(tumor necrosis factor stimulated gene-6) 및 FGF2(fibroblast growth factor 2)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는, 퇴관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 줄기세포는 IDO, TSG-6 및 FGF2를 과발현하는 것인, 퇴관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 IDO의 농도는 0.6 ng/ml 이상, TSG-6의 농도는 8 pg/ml 이상, FGF2의 농도는 6 pg/ml 이상인, 퇴관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 줄기세포는 유도된 다능력 줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS cells), 배아유래 줄기세포 및 성체 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 퇴관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 성체 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 지방유래 줄기세포, 내피 줄기세포 및 조혈 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 퇴관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포는 뼈, 연골, 지방, 힘줄, 신경조직, 섬유아세포, 골수, 제대혈, 배낭(embryonic yolk sac), 제대조직, 피부, 말초혈액, 근육, 간, 태아막(fetal membrane), 활액막(synovium), 전십자인대(anterior cruciate ligament), 관절연골세포(articular chondrocytes) 및 섬유연골(fibrocartilage)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나로부터 유래한 것인, 퇴관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 턱관절 질환은 측두하악관절장애 또는 저작근장애인 것인, 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 측두하악관절장애는 염증성 장애, 관절원판 장애, 탈구, 강직 및 골절로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나로부터 유래하는 것인, 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 염증성 장애는 관절낭염, 원관후조직염 및 골관절염로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고,

상기 관절원판 장애는 선천성 및 발육 관절원판 장애(congenital and developmental disc derangement disorders) 및 관절원판변위(disc displacement) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 7에 있어서,

상기 저작근장애는 근막통증(myofascial pain), 근염(myositis), 근경련(myospasm), 국소근통증(local muscle soreness), 보호성근긴장(protective muscle splinting), 근경축(muscle contracture) 및 신생물(neoplasia)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 줄기세포는 하기 i) 내지 iii) 중 적어도 하나의 특징을 갖는 것인, 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

- i) 대식세포를 M2 면역 대식세포로 분화시키고, M1 대식세포를 저해;
- ii) NO(nitric oxide), TNF- α 및 IL-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 염증 유발 인자의 발현을 억제; 및
- iii) 연골세포와 연골 내 존재하는 섬유연골 줄기세포의 사멸을 감소.

청구항 12

줄기세포에 염증성 사이토카인을 처리하는 단계; 및

IDO, TSG-6 및 FGF2로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자가 과발현된 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하는 턱관절 예방 또는 치료용 줄기세포의 제조방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 IDO, TSG-6 및 FGF2로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자가 과발현된 줄기세포는 염증성 사이토카인을 처리하여 수득한 것인, 제조방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 염증성 사이토카인은 IFN- γ (interferon-gamma), TNF- α (tumor necrosis factor- α) 및 IL-1 β (interleukin-1 β)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 것인, 제조방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서,

상기 염증성 사이토카인은 농도 2 내지 1000IU/mL 인 것인, 제조방법.

청구항 16

청구항 12에 있어서,

상기 IDO의 농도는 0.6 ng/ml 이상, TSG-6의 농도는 8 pg/ml 이상, FGF2의 농도는 6 pg/ml 이상인, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 줄기세포 치료제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 턱관절(temporomandibular joint; TMJ)은 아래턱과 두개골의 관절 사이의 연결로 이루어진 특이한 관절로, 상악골과 하악골 사이의 관절인데, 이 관절은 말하기, 저작, 호흡 등과 같은 일상적인 기능을 수행하는데 중요한 역할을 한다. 턱관절 장애(TMJ disorder: TMD)는 아래턱과 두개골 사이 근육과 관절에 통증과 기능장애를 유발하는 다양한 상태를 포괄하는데, 이는 신체적, 사회적 및 심리적 요인과 연관된 복합적이고 복잡한 질환이다.

[0004] 턱관절 장애의 하위 유형 중 하나인 턱관절염(TMJ osteoarthritis; TMJ OA)은 주로 연골과 관절하부뼈에 영향을 미치는 진행성 퇴행성 질환이다. 턱관절염의 특징으로는 연골세포의 사멸, 세포외 기질(extracellular matrix; ECM)의 분해 및 관절하부뼈의 신생에 의한 변화가 있다. 이 질환은 연골의 점진적인 붕괴로 나타나며, 이는 비정상적인 연골세포 기능과 조직의 분해 및 재생 기작의 불균형으로 설명된다. 오랫동안 관절염은 저염증성 및 무균적 질환으로 여겨져 왔지만, 최근에는 턱관절염 환자의 관절액에서 염증 인자 및 기타 염증 매개체가 높게 검출된다는 것이 보고되고 있으며, 이는 염증이 턱관절염의 발병 및 진행에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 이러한 염증성 사이토카인은 관절 내에 존재하는 연골 세포, 관절주위 세포 및 거대세포에 의해 방출되어 관절연골의 염증을 유발시킨다. 또한, 관절염의 병태생리학에서는 염증, 세포외 기질의 분해 및 합성 감소, 세포 사멸 및 증식의 저하 등이 병증의 진행과 관절 손상을 악화시키는 요인으로 알려져 있으며, 여러 TNF- α 와 IL-1 β 와 같은 전염증 매개체 및 활성 산소와 질소종(nitrogen species) 등의 대사산물이 관절염의 시작과 진행에 기여한다고 보고되어 있다. 이러한 신호 분자들은 MMP13 및 ADAMTS5와 같은 단백질 분해 효소의 분비를 촉진하여 연골세포의 이화작용을 유발한다. 전염증 사이토카인에 자극된 연골세포는 상당량의 iNOS와 NO(nitric oxide)를 생성하며, 이는 IL-1의 파괴적 효과를 증폭시키는 강력한 매개체로 작용한다. 더 나아가 NO는 조직 파괴 효소의 합성을 유발하고 기질의 합성을 억제한다.

[0005] 골관절염의 발병은 활막세포(synovocyte) 기능의 이상, 연골세포의 세포사멸(apoptosis) 및 과증식, 면역세포

의 활성화 등 다양한 병리적 변화를 포함한다. 이러한 변화들은 연골 재생에 중요한 관절 미세환경에 큰 영향을 미친다. 따라서, 턱관절염의 치료는 염증 반응을 억제하고 연골 형성을 촉진하는 미세환경을 제공하는 다면적인 접근이 필요하다.

[0006] 턱관절의 표면은 유리연골(hyaline cartilage)이 아닌 섬유연골(fibrous cartilage)로 덮여 있으며, 턱관절염의 병리 과정은 다른 관절염과는 구별된다. 유리 연골은 주로 2형 콜라겐으로 이루어져 있는 반면, 이 섬유 연골은 주로 1형 콜라겐으로 이루어져 있다. 이 턱관절 표면의 섬유 방향은 1형 콜라겐 섬유가 파도처럼 교차하면서 서로 겹치게 되어 대부분의 섬유가 표면과 접촉하도록 배치되어 있다. 이 특성으로 인해 전단력(shear force)을 더 잘 견디게 해주는 반면, 유리 연골은 압축 하중에 대한 저항성을 지니고 있다. 또한, 무릎의 관절 연골과 달리, 턱관절 연골은 뇌신경능선(cranial neural crest) 세포에서 유래하므로, 생태학적으로 출발점이 다르다. 더욱이, 다른 연골과는 다른 가장 흥미로운 생물학적 측면 중 하나는, 턱관절의 위치, 관절 기능 및 기계적 하중 변화에 대응하여 재구성할 수 있는 능력에 있다. 아마도 이러한 중요한 구조적 차이로 인해 턱관절의 병적 변화의 임상적 표현이 크게 변경된다(Zhao et al., 2022, Front Physiol. 13:859517).

[0007] 턱관절에 류머티스 관절염 또는 이로 인해 디스크가 천공이 되면, 연골 표재층의 섬유연골은 염증성 손상의 위험성을 가지며, 손상되면, 하악의 기능 및 성장 제한을 포함한 영구적인 조직 손실과 기능 장애를 초래할 수도 있다. 따라서, 섬유 연골 내 섬유연골 줄기세포의 재생 능력을 보존하는 것 또한 턱관절염의 연골 재생을 위한 효과적인 치료 전략 중 하나로 제시되고 있다. 그러나 이러한 턱관절염의 복잡한 특성으로 인해, 현재 사용가능한 치료법은 주로 증상 관리를 목적으로 한다.

[0008] 따라서, 만성염증을 조절할 수 있는 효과적인 항염 인자를 투여함으로써 병증이 개선될 것으로 기대했지만, 텍사메타존과 같은 기존의 항염 약물제제는 일시적인 항염작용은 있으나, 반감기가 매우 짧고, 손상된 세포재생에 효과가 없을 뿐 아니라 전신에 부작용등으로 장기적인 관점에서 임상적용에 한계가 있다.

[0009] 한편, 지난 수십년간, 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)는 전임상 및 임상 시험에서 재생 요법으로 연구되어왔다. 그러나, 같은 조직에서 분리된 다양한 기증자의 중간엽 줄기세포는 이질적이며 서로 다른 치료 효과를 가지고 있으므로, 현재는 이 문제를 해결하기 위해 더 표준화된 치료 효능 표현형을 유도하는 데 많은 연구가 이루어지고 있다. 이러한 방편으로, 최근에는 중간엽 줄기세포를 활성화시키고 항염증 및 면역조절 인자의 분비를 증가시키기 위한 목적으로 다양한 프라이밍(priming) 방법이 제안되었다. 이 중, 효과적인 프라이밍 방법 중 하나는 세포를 염증성 사이토카인이나 성장인자에 노출시키는 것인데, 이러한 노출 과정에 의해 중간엽 줄기세포는 세포의 항상성 상태를 유지하기 위한 중요한 인자들을 상향 조절한다. 그러나 턱관절의 위치나 구조상, 턱관절염 동물 모델의 생성과 치료제 주사에 있어 고도의 기술이 필요하기 때문에 타관절에 비하여 치료제의 발굴과 연구의 진행이 활발히 이루어지지 않고 있다.

[0010] 이에, 턱관절의 퇴화된 연골을 재생하고, 염증을 감소시켜 턱관절염으로의 진행을 예방하고 개선하는 기술의 연구 및 개발이 필요한 실정이다

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 일 목적은 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 턱관절 예방 또는 치료용 줄기세포의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 IDO, TSG-6 및 FGF2로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는, 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명의 다른 측면은 줄기세포에 염증성 사이토카인을 처리하는 단계; 및 IDO, TSG-6 및 FGF2로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자가 과발현된 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하는 퇴관절 예방 또는 치료용 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 줄기세포를 이용하는 경우, 대식세포를 M2 대식세포로 분화를 촉진하고, M1 대식세포를 저해하며, 연골 세포의 염증 인자와 세포의 기질 분해 인자의 발현을 감소시킬 수 있다. 또한, 섬유연골 줄기세포의 증식을 활성화시킴으로써 궁극적으로 퇴관절의 연골 소실을 예방하고, 연골 및 연골하부 뼈의 재생을 촉진하여 연골세포의 생존성을 향상시킬 수 있어 퇴관절 질환의 근본적인 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0020] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 제대유래 중간엽 줄기세포의 면역학적 특성을 나타내는 도면이다.

도 2는 hUCM-MSC(human Umbilical cord matrix mesenchymal cells, hUCM-MSC)의 세포 타입, #A, #B 및 #C에서 염증성 사이토카인으로 프라이밍하기 전(Naive MSC, NM)과 후(Primed MSC, PM)의 IDO1(도 2A), TSG-6(도 2B) 및 FGF(도 2C)의 유전자와 배양 상등액에서의 mRNA 발현량 또는 단백질 발현량의 변화를 나타낸 결과이다.

도 3은 IDO1의 단백질 양에 따른 세포주 선별 기준을 확인한 결과이다.

도 4은 NM 및 PM과 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7을 공배양 한 후의 M2 마커인 Arg-1과 IL-10 유전자 발현량의 변화를 나타낸 결과이다.

도 5는 NM 및 PM과 M1 대식세포로 활성화시킨 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7을 공배양 한 후의 M1 마커인 iNOS와 IL-1 β 유전자 발현량의 변화를 나타낸 결과이다.

도6은 IL-1 β 로 자극시켜 관절염을 유발한 랫드 연골세포와 PM을 공배양 한 후의 IDO1, TSG-6 및 FGF2 유전자 발현량의 변화를 나타낸 결과이다.

도 7은 NM 및 PM과 IL-1 β 로 자극시켜 관절염을 유발한 랫드 연골세포를 공배양 한 후, 세 세포주에 의한 염증성 사이토카인, 세포의 기질 분해인자, 세포의 기질 분해 억제인자 및 세포자멸 인자의 유전자 발현량의 비교 결과이다.

도 8은 NM 및 PM #B 와 IL-1 β 로 자극된 섬유연골 줄기세포(fibrocartilage stem cell, FCSC)를 공배양 한 후, FCSC의 세포증식력의 차이를 나타낸 결과이다.

도 9는 MIA(Monosodium iodoacetate)로 퇴관절염을 유발한 랫드의 하악관절 내강에 NM 및 PM을 주입한 지 2주 후, 관절연골의 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 iNOS의 mRNA의 발현량의 변화를 나타낸 결과이다.

도 10은 MIA로 퇴관절염을 유발한 랫드의 하악관절 내강에 NM 및 PM을 주입한 지 2주 후, 관절연골의 세포의 기질 분해 인자인 Mmp13과 Adamts5의 mRNA의 발현량의 변화를 나타낸 결과이다.

도 11은 MIA로 퇴관절염을 유발한 랫드의 하악관절 내강에 NM 및 PM을 주입한 후, 연골하부뼈의 in-vivo CT 사진을 보여주는 도면이다.

도12는 NM 및 PM을 주입한 지 2주, 4주 및 8주 후의 H&E 및 Safranin O stain 염색을 통해 관절연골의 변화를 보여주는 도면이다.

도13은 NM 및 PM을 주입한 지 2주, 4주 및 8주 후의 관절연골의 세포내의 염증성 매개체인 iNOS 발현의 차이를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 1. **턱관절 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있는 줄기세포와 이의 제조방법**
- [0026] 본 발명의 일 측면은 턱관절 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있는 줄기세포를 제공한다.
- [0027] 상기 줄기세포는 미분화 세포로서, 자기 재생을 통해 오랫동안 분열할 수 있으며, 특정 환경 하에서는 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 세포를 의미한다.
- [0028] 본 발명의 일 측면에 있어서, 상기 줄기세포는 유도된 다능력 줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS cells), 배아유래 줄기세포 또는 성체 줄기세포일 수 있다. 바람직하게는 성체 줄기세포일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 측면에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 지방유래 줄기세포, 내피 줄기세포 또는 조혈 줄기세포일 수 있으며, 바람직하게는 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 용어, "중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)"는 뼈(bone), 연골(cartilage), 지방(fat), 힘줄, 신경 조직(nerve tissue), 섬유아세포(fibroblast) 및 근육 세포(muscle cell) 등 구체적인 장기의 세포로 분화되기 전의 다분화 전구 세포(multipotent progenitor)를 의미한다.
- [0031] 본 발명의 일 측면에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 포유동물, 예를 들면, 인간으로부터 분리된 것일 수 있다. 상기 중간엽 줄기세포는 뼈, 연골, 지방, 힘줄, 신경조직, 섬유아세포, 골수, 체대혈, 배낭(embryonic yolk sac), 체대조직, 피부, 말초혈액, 근육, 간, 태아막(fetal membrane), 활액막(synovium), 전십자인대(anterior cruciate ligament), 관절연골세포(articular chondrocytes) 및 섬유연골(fibrocartilage)로부터 유래한 것일 수 있다. 바람직하게는, 체대조직 또는 골수로부터 유래한 것일 수 있다.
- [0032] 분리된 중간엽 줄기세포는 필요에 따라 배양할 수도 있다. 중간엽 줄기세포를 배양하기 위한 배지로는, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), ISDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 및 MSCGM 등의 세포 기본 배지를 사용할 수 있고, 추가로 이 기본 배지에 인슐린, 하이드로코르티손, EGF, FGF, NGF, LIF 등의 성장인자 또는 우태아혈청, 말혈청, 염소혈청, 인간혈청, 체대혈청 등의 성장에 필수적인 혈청 등이 포함된 배지를 사용할 수도 있다. 또한, 본 발명에서 세포 배양 배지에는 필요에 따라 한 가지 이상의 보조 성분을 첨가할 수 있는데, 우태아혈청, 말 또는 인간 등의 혈청을 비롯하여, 미생물의 오염을 막기 위한 항생제 및 항진균제 등을 사용할 수 있다.
- [0033] 분리 또는 배양된 줄기세포는 사용 전까지 당업계에 공지된 방법에 의해 보관될 수 있다. 일반적으로 줄기세포는 동결보호(cryoprotection) 처리한 후 냉동 보관할 수 있다. 상기 동결보호 처리는 당업계에 공지된 DMSO, 글리세롤, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 글리콜, 알부민, 텍스트란, 수크로스, 에틸렌 글리콜, i-에리스리톨, D-리비톨, D-만니톨, D-솔비톨, i-이노시톨, D-락토스 또는 콜린 클로라이드와 같은 동결보호제를 이용하여 수행할 수 있다.
- [0034] 특히, 상기 줄기세포는 IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase), TSG-6(tumor necrosis factor stimulated gene-6) 및 FGF2(fibroblast growth factor 2)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자를 과발현하는 것일 수 있다.
- [0035] 구체적으로, 상기 줄기세포는 IDO, TSG-6 및 FGF2 중 어느 하나, 또는 두 유전자를 과발현하는 것일 수 있고, 가장 바람직하게는 IDO, TSG-6 및 FGF2 모두를 과발현하는 것일 수 있다.
- [0036] 상기 IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase)는 많은 종류의 세포들, 특히 수지상세포, 골수세포, 인체 내 중간엽 줄기세포 및 대부분의 종양세포들에 의해 생성되는 단백질이다. 종래의 연구들에서 IDO가 인간 중간엽세포의 면역 조절 능력에 중요한 역할을 하는 것이 입증되었는데, 이 효소는 트립토판을 분해하여 이펙터 T 세포(effector T cell)의 증식을 억제하고, 조절 T 세포(regulatory T cell, Treg)으로의 분화도 유도함으로써, 면역 반응을 조절한다. 인간의 경우 IDO1 유전자에 의해 암호화된다. 본 명세서에 있어서, IDO는 IDO1, IDO-1과 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0037] 상기 TSG-6(tumor necrosis factor stimulated gene-6)는 항염증 및 조직 보호 기능을 한다. 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 TNF- α 와 IL-1에 의해 자극되어 관절염에서 발현된다고 보고되고 있다(Chou et al., 2018, Osteoarthr. Cartil, 26:245-254). 관절의 염증 상태에서, 중간엽 줄기세포는 활성화된 M1 대식

세포가 생성한 TNF- α 에 반응하여 TSG-6을 분비한다. 중간엽 줄기세포는 대식세포의 CD44와 상호 작용하여 TLR/NF- κ B 신호 전달을 감소시키고, 결과적으로 염증 매개체(nitroxide, TNF- α , 및 IL-1)의 분비를 완하시킨다 (Shen et al., 2015, Sci Rep, 4:16244).

- [0038] 상기 FGF2(fibroblast growth factor 2)는 인체 내의 혈관, 근육, 뼈나 신경세포 등의 여러 세포에 작용하여 세포의 증식이나 분화를 촉진하며, 줄기세포의 자가 갱신(self-renewal)에 중요한 역할을 할 수 있다. 본 명세서에 있어서, FGF2는 bFGF, FGF basic과 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 "발현(expression)"은 세포에서 암호화된 유전자로부터 핵산이나 단백질이 생합성되는 것을 의미하며, "과발현(overexpression)"은 별도의 처리를 하지 않은 상태의 무자극 세포보다 특정 유전자의 발현의 수준이 과도하게 증가한 것을 의미한다. 여기서, 별도의 처리를 하지 않은 상태의 무자극 세포는 일반적으로 발현되는 인자의 조절을 위해 별도의 처리를 하지 않은 상태이거나, 변형되지 않은 상태, "Naive cell", "무자극 세포" 와 동일한 의미로 사용될 수 있다. 줄기세포의 경우 특정 인자나 환경에 의해 분화하기 전의 상태를 의미하며, "Naive stem cell", "무자극 줄기세포"과 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [0040] 따라서 본 발명의 상기 줄기세포는 IDO, TSG-6 및 FGF2로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 수준이 별도의 처리를 하지 않은 상태의 세포에서의 수준보다 증가되어 있는 것을 의미한다. 따라서 상기 줄기세포의 파쇄물이나 배양액에 상기 IDO, TSG-6 및 FGF2로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 수준이 별도의 처리를 하지 않은 상태의 줄기세포에서의 수준보다 증가되어 있을 수 있다.
- [0041] 한편, 상기 발현 수준의 "증가"는 별도의 처리하지 않은 동종 줄기세포(예, 동종의 비변형 줄기세포) 대비, 1% 이상, 3% 이상, 5% 이상, 7% 이상, 9% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 300% 이상, 500% 이상, 700% 이상, 1000% 이상, 2000% 이상, 5000% 이상, 7000% 이상, 10000% 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 일 측면에 있어서, 상기 IDO의 농도는 0.6 ng/ml 이상, TSG-6의 농도는 8 pg/ml 이상, FGF2의 농도는 6 pg/ml 이상일 수 있다. 바람직하게는 상기 IDO의 농도는 0.6 내지 30 ng/ml, TSG-6의 농도는 8 내지 50 pg/ml, FGF2의 농도는 6 내지 500 pg/ml일 수 있다. 상기 단백질의 농도는 10^5 cells/ml 조건의 배양 상등액에서 측정된 것일 수 있다. 따라서, 배양 상등액에서 10^5 cells/ml 기준으로 IDO의 농도는 0.6 내지 30 ng/ml, 상기 TSG-6의 농도는 8 내지 50 pg/ml, 상기 FGF2의 농도는 6 내지 500 pg/ml 일 수 있다. 각각의 단백질의 농도가 상기 범위를 벗어나는 경우, 항염증 효과가 충분히 나타나지 않을 수 있다.
- [0043] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 예시적으로 IDO, TSG-6 및 FGF2 중 하나의 유전자인 IDO의 발현 수준이 0.6ng/ml 미만인 줄기세포를 이용하였을 때, 별도의 처리를 하지 않은 무자극 hUCM-MSC와 염증 매개 인자인 iNOS의 발현 수준에서 효과 차이가 없는 것을 확인하였다(실시예 4 및 도 3 참조). 따라서, 효과적인 항염 강화 줄기세포를 선별하기 위해서는 hUCM-MSC 중 IDO, TSG-6 및 FGF2 유전자가 역가를 넘어야 충분한 항염 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명의 다른 측면은, 상기와 같이 턱관절 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있는 줄기세포를 제조방법을 제공한다.
- [0045] 본 발명은 줄기세포에 염증성 사이토카인을 처리하는 단계; 및 IDO, TSG-6 및 FGF2로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자가 과발현된 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하는 턱관절 예방 또는 치료용 줄기세포의 제조방법을 제공한다.
- [0046] 상기 제조방법으로 제조된 줄기세포는 턱관절 예방 또는 치료에 효과가 있다.
- [0047] 상기 "IDO, TSG-6 및 FGF2로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자가 과발현된 줄기세포"는 IDO, TSG-6 또는 FGF2를 과발현하도록 유도된 줄기세포일 수 있다. 구체적으로, 상기 유전자들을 삽입한 벡터를 재조합한 줄기세포이거나, 염증성 사이토카인을 처리한 줄기세포일 수 있다. 바람직하게는 염증성 사이토카인을 처리하여 수득한 것일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 측면에 있어서, 상기 염증성 사이토카인은 체내에서 발생하는 염증 반응을 유발시키는 사이토카인을 의미하며, 바람직하게는 IFN- γ (interferon-gamma), TNF- α (tumor necrosis factor- α) 또는 IL-1 β

(interleukin-1 β) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 조성물은 상기와 같은 염증성 사이토카인을 처리함으로써 줄기세포에서 유전자의 생성능을 강화시킬 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 측면에 있어서, 상기 염증성 사이토카인은 2 내지 1000IU/mL를 처리할 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 500IU/mL를 처리할 수 있다. 상기 범위보다 낮은 농도의 사이토카인을 처리하는 경우 목적하는 유전자의 발현이 충분하지 않아, 퇴관절 질환의 치료 효과가 나타나지 않을 수 있고, 높은 농도의 사이토카인을 처리하는 경우, 중간엽 줄기세포의 세포사멸을 유발할 수 있다.

[0050] 상기 줄기세포는 항염증 기능을 강화하기 위하여 치료제로 사용 전, 염증성 사이토카인을 첨가한 상기 배양액에서 일정 시간 배양한 것일 수도 있다.

[0051] 상기 줄기세포를 배양하는 방법으로는 줄기세포를 2차원적으로 배양하거나 또는 3차원적으로 응집된 상태에서 배양하는 것일 수도 있다. 펠렛 배양은 예를 들면, 세포를 포함하는 현탁액을 원심분리 혹은 펠렛 배양용 플레이트를 사용하여 세포 펠렛을 형성시키고, 이 펠렛을 그대로 배양하는 것일 수 있다. 이 때 배양에 사용되는 초기 세포 농도는 10^0 cells/ml 내지 5×10^7 cells 일 수 있다.

[0052] 분리된 줄기세포는 필요에 따라 배양할 수도 있다. 중간엽 줄기세포를 배양하기 위한 배지로는, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), ISDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 및 MSCGM 등의 세포 기본 배지를 사용할 수 있고, 추가로 이 기본 배지에 인슐린, 하이드로코르티손, EGF, FGF, NGF, LIF 등의 성장인자 또는 우태아혈청, 말혈청, 염소혈청, 인간혈청, 제대혈청 등의 성장에 필수적인 혈청 등이 포함된 배지를 사용할 수도 있다.

[0053] 구체적으로, 본 발명의 제조방법은 복수의 줄기세포를 2 내지 1000 IU/mL의 용량으로 염증성 사이토카인에 노출하는 단계를 포함한다. 염증성 사이토카인에 노출된 후 상기 유전자들의 단백질 발현이 배양 상등액에서 10^5 cells/ml 기준으로 IDO는 양이 0.6 ng/ml 이상, TSG-6는 8 pg/ml 이상 및 FGF2의 양이 6 pg/ml 이상을 발현하는 세포를 선별할 수 있다. 바람직하게는 배양 상등액에서 10^5 cells/ml 기준으로 상기 IDO의 농도는 0.6 내지 30 ng/ml, TSG-6의 농도는 8 내지 50 pg/ml, FGF2의 농도는 6 내지 500 pg/ml일 수 있다.

[0054] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 제대유래 중간엽 줄기세포를 200 IU/mL의 IFN- γ 로 감염하여 세 유전자 모두의 과발현을 유도한 경우에, M0 대식세포를 M2 대식세포로 분화를 촉진하고, M1 대식세포를 저해하며, 관절염이 유발된 연골세포에서 염증이 감소하고 세포의 기질이 분해되는 것을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다(실시예 4, 5 및 7 참조). 또한, 퇴관절염 모델에서 연골하부뼈의 재생 효능이 우수한 것을 확인하였다(실시예 10 참조).

[0056] 2. 퇴관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

[0057] 본 발명의 또 다른 측면은 퇴관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0058] 본 발명의 상기 퇴관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 "1. 퇴관절 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있는 줄기세포와 이의 제조방법"에서 설명한 줄기세포를 유효성분으로 포함할 수 있고, 이에 대해서는 상기 항목에서 설명한 바를 인용하여 그 설명을 생략한다.

[0059] 본 발명의 일 측면은 IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase), TSG-6(tumor necrosis factor stimulated gene-6) 및 FGF2(fibroblast growth factor 2)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자를 과발현하는 줄기세포를 유효성분으로 포함하는, 퇴관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0060] 상술한 활성을 갖는 본 발명의 줄기세포는 퇴관절 질환의 예방 또는 치료에 우수한 효능을 발휘할 수 있다.

[0061] 본원에 있어서, '퇴관절 질환'은 퇴관절의 염증, 연골 손상, 변성, 상실 또는 결함을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명의 일 측면에 있어서, 상기 퇴관절 질환은 측두하악관절장애 또는 저작근장애 일 수 있다.

[0063] 퇴관절의 표면은 다른 관절과는 다르게 유리 연골(hyaline cartilage)이 아니라, 섬유 연골(fibrous cartilage)로 덮여 있다. 유리 연골은 주로 2형 콜라겐으로 이루어져 있는 반면, 이 섬유 연골은 주로 1형 콜라

겐으로 이루어져 있다. 이 턱관절 표면의 섬유 방향은 1형 콜라겐 섬유가 과도처럼 교차하면서 서로 겹치게 되어 대부분의 섬유가 표면과 접촉하도록 배치되어 있다. 이 특성으로 인해 전단력(shear force)을 더 잘 견디게 해주는 반면, 유리 연골은 압축 하중에 대한 저항성을 지니고 있다. 본 발명의 줄기세포는 턱관절 질환의 예방 또는 치료에 특히 우수하다.

- [0064] 본 발명의 일 측면에 있어서, 상기 측두하악관절장애는 염증성 장애, 관절원판 장애, 탈구, 강직 및 골절로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나로부터 유래한 것일 수 있다.
- [0065] 상기 염증성 장애는 구체적으로 관절낭염, 원판후조직염 또는 골관절염일 수 있으며, 상기 관절원판 장애는 선천성 및 발육 관절원판 장애(congenital and developmental disc derangement disorders) 또는 관절원판변위(disc displacement) 일 수 있다.
- [0066] 상기 저작근장애는 구체적으로 근막통증(myofascial pain), 근염(myositis), 근경련(myospasm), 국소근통증(local muscle soreness), 보호성근긴장(protective muscle splinting), 근경축(muscle contracture) 또는 신생물(neoplasia)일 수 있다.
- [0067] 본 명세서에서 용어 "예방"은 턱관절 질환에 걸릴 위험을 감소시키는 것을 의미하며, 상기 턱관절 질환 또는 이의 하나 이상의 임상적 증후가 진행되지 않도록 하여 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0068] 본 명세서에서 용어 "치료"는 턱관절 질환을 경감시키는 것을 의미하며, 상기 턱관절 질환의 하나 이상의 임상적 증후의 진행을 저지 또는 감소시켜 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 포함한다.
- [0069] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 줄기세포의 치료학적 유효량을 포함할 수 있다.
- [0070] 상기 용어 "치료학적 유효량"은 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분인 줄기세포가 그 활성 또는 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미하고, 예컨대, 턱관절 질환의 치료 또는 예방의 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0071] 상기 조성물은 1×10^3 cells/ml 내지 1×10^7 cells/ml, 5×10^3 cells/ml 내지 1×10^7 cells/ml, 2.5×10^4 cells/ml 내지 1×10^7 cells/ml, 5×10^4 cells/ml 내지 1×10^7 cells/ml의 IDO, TSG-6 또는 FGF2를 생산하는 줄기세포를 포함할 수 있다.
- [0072] 상기 조성물의 줄기세포가 생산하는 유전자들의 단백질 발현 수준은 10^5 cells/ml 기준으로 IDO는 양이 0.6 ng/ml 이상, TSG-6는 8 pg/ml 이상, 및 FGF2의 양이 6 pg/ml 이상을 발현하는 줄기세포를 포함할 수 있다. 단백질 발현 수준의 상한선은 통상적인 줄기세포에서 과발현되는 수준이라면 제한 없으며, 통상의 기술자가 적절히 변형한 범위도 본 발명에 포함될 수 있다. 바람직하게는 상기 IDO의 농도는 0.6 내지 30 ng/ml, TSG-6의 농도는 8 내지 50 pg/ml, FGF2의 농도는 6 내지 500 pg/ml일 수 있다. 상기 단백질의 농도는 10^5 cells/ml 조건의 배양 상등액에서 측정된 것일 수 있다. 따라서, 배양 상등액에서 10^5 cells/ml 기준으로 IDO의 농도는 0.6 내지 30 ng/ml, 상기 TSG-6의 농도는 8 내지 50 pg/ml, 상기 FGF2의 농도는 6 내지 500 pg/ml 일 수 있다. 각각의 단백질의 농도가 상기 범위를 벗어나는 경우, 항염증 효과가 충분히 나타나지 않을 수 있다.
- [0073] 상기 줄기세포는, 상기 IDO, TSG-6 또는 FGF2를 생산하고 세포 외부로 분비하는 줄기세포일 수 있다. 즉, 상기 줄기세포는 자신이 IDO를 분비하고, 자신이 상기 IDO, TSG-6 또는 FGF2와 상호작용하여 항염작용을 하는 것일 수 있다. 또한, 줄기세포가 분비하는 IDO, TSG-6 또는 FGF2가 접촉하는 세포는, 예를 들면, 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결합이 있는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 본 명세서에 있어서, "연골 손상, 변성, 상실, 또는 결합이 있는 조직에 존재하는 세포"란 상기 조직 자체뿐만 아니라 연골 손상, 변성, 상실, 또는 결합에 의하여 노출되는 조직에 존재하는 세포일 수 있다. 예를 들면, 활액, 골막, 뼈, 및 골수로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0074] 본 발명의 일 측면에 있어서, 상기 줄기세포는 대식세포를 M2 면역 대식세포로 분화시키고, M1 대식세포를 저해하는 것일 수 있다.
- [0075] 최근의 많은 연구 결과들은 M2 대식세포가 관절염 치료의 유망한 대상임을 시사하며, M1 대식세포의 저해 및 M2 대식세포의 분화 촉진이 골관절염 증상을 효과적으로 완화시킬 수 있다는 것을 보고하고 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명의 줄기세포가 M2 대식세포로 분화를 촉진하고, M1 대식세포를 저해할 수 있음을 확

인하였다(실시예 4, 실시예 5, 도 3 및 도 4 참조).

- [0076] 또한, 상기 줄기세포는 NO(Nitric oxide), TNF- α 또는 IL-1의 염증 유발 인자의 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- [0077] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명의 줄기세포를 처리한 랫드 턱관절염 모델에서 염증을 유발하는 인자인 TNF- α , IL-1 β 및 iNOS의 발현을 감소시키고(실시예 9 및 도 8 참조), 하악 과두 내 연골의 염증인자인 iNOS 단백질의 발현이 유의하게 감소되는 것을 확인하였다(실시예 11 및 도 12 참조).
- [0078] 상기 줄기세포는 연골세포와 연골 내 존재하는 섬유연골 줄기세포의 사멸을 감소시킬 수 있다. 턱관절염 유사 환경에서는 세포 자멸이 유도될 수 있으나, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명의 줄기세포를 처리하는 경우 섬유연골 줄기세포의 증식 및 생존 능력이 증가하는 것을 확인하였다(실시예 8 및 도 7 참조). 또한, 랫드 턱관절염 모델에서 본 발명의 줄기세포를 처리하는 경우, 연골 및 연골하부뼈의 재생 효과가 있음을 확인하였다(실시예 10 및 도 10 참조).
- [0079] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.
- [0080] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0081] 또한, 줄기세포는 통상적인 방법에 따라 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 사용할 수 있다. 상기 담체는 배지, 버퍼, 및 생체 적합성 중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 생체 적합성 중합체는 2차원적 또는 3차원적 구조 내에서 세포를 지지 및/또는 세포활성을 유지할 수 있는 통상적으로 알려진 중합체 중에서 선택되는 것일 수 있다. 상기 생체 적합성 중합체의 예는, 히알루론산, 히드록시아파타이트, 키토산, 콜라겐 및 피브린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상이 포함된다.
- [0082] 본 발명의 조성물은 개체에 투여된 후 유효 성분의 신속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 정제, 분말, 용액, 멸균 주사용액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있다. 상기 제형은 1회용 투약 형태가 편리할 것이다.
- [0083] 상기 약학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때, 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캡셀제 또는 젤(에켄대, 하이드로젤) 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0085] 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 레밍턴의 약학적 과학(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0086] 본 발명의 약학적 조성물은 턱관절 질환을 치료하기 위한 적합한 모든 경로로 투여될 수 있으며, 예를 들어, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육내 주입, 복강내 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0087] 상기 약학적 조성물의 투여량은 1일당 0.0001 μg 내지 100 mg, 0.001 μg 내지 100 mg, 0.01 μg 내지 100 mg, 0.1 μg 내지 100 mg, 또는 1.0 μg 내지 1000 mg 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0088] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이 때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0089] 상기 줄기세포는 적합한 희석제에 약 1×10^3 내지 약 1×10^7 세포/ml 농도로 현탁시켜 조성물의 형태로 개체에 투여할 수 있는데, 이 희석제는 세포를 보호 및 유지하고, 목적하는 턱관절 내강에 주입시 사용에 용이하도록 하는 용도로서 사용된다. 상기 희석제는 생리식염수, PBS, HBSS 등의 완충용액, 혈장 또는 혈액성분 등이 있을 수 있다.
- [0090] 본 발명의 약학적 조성물은 턱관절 질환의 치료 또는 예방을 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0091] 본 발명의 다른 측면에서, IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase), TSG-6(tumor necrosis factor stimulated gene-6) 및 FGF2(fibroblast growth factor 2)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자를 과발현하는 줄기세포를 턱관절 질환의 치료 또는 예방하는데 사용하는 용도를 제공한다.
- [0092] 본 발명의 다른 측면에서, 상술한 IDO(indoleamine 2,3-dioxygenase), TSG-6 TSG-6(tumor necrosis factor stimulated gene-6) 및 FGF2(fibroblast growth factor 2)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 유전자를 과발현하는 줄기세포를 턱관절 질환의 예방 또는 개선이 필요한 대상체(subject)에 투여하는 것을 포함하는 턱관절 질환의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0093] 상기 대상체는 인간 또는 인간을 제외한 동물일 수 있다. 또한, 상기 대상체는 턱관절 질환을 가진 인간 또는 인간을 제외한 동물일 수 있다.
- [0094] 상기 턱관절 질환의 치료, 예방, 또는 개선 방법에는 상술한 본 발명의 "1. 턱관절 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있는 줄기세포와 이의 제조방법", "2. 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물"에 관해 설명된 내용이 모두 동일하게 적용될 수 있으며, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복하여 기재하지 않는다.
- [0095] 본 발명의 턱관절 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하는 경우, 대식세포를 M2 대식세포로 분화를 촉진하고, M1 대식세포를 저해하며, 연골 세포의 염증 인자와 세포외 기질 분해 인자의 발현을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 또한, 섬유연골 줄기세포의 증식을 활성화시킴으로써 궁극적으로 턱관절의 연골 소실을 예방하고, 연골 및 연골하부 뼈의 재생을 촉진하여 연골세포의 생존성을 향상시킬 수 있어 턱관절 질환의 예방 및 치료에 효과가 있다.
- [0097] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0098] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.
- [0100] **실시예 1: 제대유래 중간엽 줄기세포의 추출 및 배양**
- [0101] 인간 제대유래 중간엽 줄기세포(human Umbilical cord matrix mesenchymal cells, hUCM-MSC)(CELLnLIFE Inc. Seoul, Republic of Korea)는 일차적으로 혈액 성분을 제거하기 위해 PBS로세척되었으며, 그 후 작은 조각(0.5 - 1 cm)으로 잘라, 혈관을 제거하였다. 제대의 Wharton's(WJ)의 젤리 부위는 $0.5 - 11 \text{ cm}^3$ 크기로 자른 후, LG-DMEM(Gibco, Thermo Fisher Scientific, NY, USA)에 10% FBS(Hyclone, Cytiva, USA) 및 100 U/ml PS가 포함된 배양 용기에 직접 넣어 배양 확장했다. 세포집단이 생겨 70% 밀도에 도달하면, 0.05% 트립신-EDTA(Gibco, Thermo Fisher Scientific, NY, USA)로 떼어내어 밀도가 10^3 cells/cm^2 가 되도록 계대 배양하였다. 세포 생산의 최종 단계에서 200 IU/mL의 IFN- γ (Intermax-gamma; LG Life Sciences)로 24시간 동안 프라임링 했다.
- [0103] **실시예 2: 제대유래 중간엽 줄기세포의 면역학적 특성**
- [0104] 세포 막 단백질 발현 분석은 유세포분석(Flow cytometry)을 사용하여 수행하였다. hUC-MSC는 얼음 위의 찬 용액에서 항체와 함께 1시간 동안 배양되었다. CD73-PE, CD45-PE, CD90-PE, CD105-PE, CD11b-PE, CD19-PE 및 HLA-DR-PE 항체(BD Biosciences, Franklin Lake, NJ, USA)가 사용되었다.
- [0105] 분석 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 세 명의 기부자로부터 획득한 hUC-MSC 세포주(각각 #A, #B, #C라고 함)는 CD73, CD90 및 CD105에 대해 양성이며, CD11b, CD19, CD45 및 HLA-DR에 대해 음성을 나타냈다.

- [0107] **실시예 3: 염증성 사이토카인에 의해 자극된 hUCM-MSC에서 관절염 유사 환경에 의해 특이적으로 유도되는 단백질의 동정**
- [0108] 턱관절염 유사 환경에 있는 인간 제대유래 중간엽 줄기세포에서 특이적으로 유도되는 단백질을 동정하였다. 우선, hUCM-MSC의 세 타입 #A, #B 및 #C를 염증성 사이토카인인 IFN- γ 를 200 IU/mL로 프라이밍하기 전(Naive MSC, 이하 'NM')과 후(Primed MSC, 이하 'PM')의 단백질 발현량을 측정하였다. hUCM-MSC를 24시간 동안 배양한 후, IL-1 β 에 의해 자극된 랫드 턱관절 연골세포와 24 시간동안 공배양한 뒤, 각각의 단백질 발현량을 측정하였다.
- [0109] 분석 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 염증성 사이토카인에 의해 자극된 hUCM-MSC에서 관절염 유사 환경에 반응하여 IDO1(도 2A), TSG-6(도 2B) 및 FGF2(도 2C)의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0111] **실시예 4: IDO1 역가에 따른 세포주 선별 기준 확인**
- [0112] 실시예 3에서 TSG-6의 경우, 세 세포주의 배양 상등액의 단백질 양의 차이가 적기 때문에, 세포주간 편차가 컸던 IDO의 단백질 양에 따른 항염 효과를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.
- [0113] 마우스 유래의 대식세포주 RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하여 M1 대식세포로 활성화시킨 후, 염증성 사이토카인으로 자극된 세 개의 hUCM-MSC 세포주(#A, #B 및 #C) 또는 무자극 hUCM-MSC(도 3의 'NM')와 공배양하여 염증 매개 인자로 알려져 있는 iNOS의 mRNA 발현량을 비교 분석하였다.
- [0114] 분석 결과, hUCM-MSCs와 공배양 된 M1으로 활성화된 RAW 264.7 모두 iNOS의 발현량이 현저히 감소하였으나, 배양 상등액의 IDO1의 양이 0.6 ng/ml 미만인 세포주(도 3의 PM C)는 무자극 hUCM-MSC와 그 효과에 차이가 없었다(도 3). 따라서, 무자극 hUCM-MSC도 항염 능력을 나타내지만, 보다 충분한 항염 강화 줄기세포의 선별을 하기 위해서는 사이토카인으로 자극된 hUCM-MSC중 배양 상등액의 IDO의 양이 0.6 ng/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) 세포주를 사용해야 하는 것을 확인하였다.
- [0116] **실시예 5: M2 대식세포로의 분화 촉진여부 확인**
- [0117] 대식세포는 M2 면역억제 대식세포로 분화할 수 있으며, M2 대식세포가 관절염 치료의 유망한 대상이라고 알려져 있으므로, 본 발명의 염증성 사이토카인으로 자극한 줄기세포가 M2 대식세포로의 분화를 촉진하는지 여부를 확인하였다.
- [0118] 우선, 마우스 유래의 대식세포주 RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하여 M2 대식세포로 활성화시켰다. 이를 염증성 사이토카인으로 자극된 hUCM-MSC(Primed MSC, 이하 'PM')와 자극되지 않은 hUCM-MSC(Naive MSC, 이하 'NM')와 공배양하여, M2의 마커인 Arg-1과 IL-10 유전자의 발현량을 비교하였다. 여기서, PM은 배양 상등액의 IDO1의 양이 0.6 ng/ml 이상, TSG-6의 양이 8 pg/ml 이상 및 FGF2 6 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) 것을 이용하였으며, NM은 배양 상등액의 IDO1의 양이 1 ng/ml 미만, TSG-6의 양이 8 pg/ml 미만 및 FGF2 6 pg/ml 미만인(10^5 cells/ml 기준) 것을 이용하였다.
- [0119] mRNA의 발현량을 분석한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 염증성 사이토카인으로 자극하여 IDO 및 TSG-6의 발현량이 기준치 이상인 경우, M2 대식세포의 마커인 Arg-1 및 IL-10의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 염증성 사이토카인으로 자극된 본 발명의 줄기세포는 M0 대식세포를 M2 대식세포로 분화를 촉진하는 것을 확인하였다.
- [0121] **실시예 6: M1 대식세포의 저해 확인**
- [0122] M1 대식세포를 저해하는 것이 골관절염의 증상을 효과적으로 완화할 수 있음이 알려져 있으므로, 본 발명의 염증성 사이토카인으로 자극된 줄기세포가 M1 대식세포를 저해하는지 여부를 확인하였다.
- [0123] 구체적으로, 마우스 유래의 대식세포주 RAW 264.7 M0(도 5의 'M0'), 이를 M1 대식세포로 활성화시킨 것(도 5의

'M1')을 및 염증성 사이토카인으로 자극된 hUCM-MSC(Primed MSC, 이하 'PM')와 자극되지 않은 hUCM-MSC(Naive MSC, 이하 'NM')와 공배양하여, M1 마커로 알려져 있는 iNOS와 IL-1 β 의 mRNA 발현량을 비교 분석하였다. 여기서, PM은 배양 상등액의 IDO1의 양이 0.6 ng/ml 이상, TSG-6의 양이 8 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준)인 것을 이용하였으며, NM 배양 상등액의 IDO1의 양이 1 ng/ml 미만, TSG-6의 양이 8 pg/ml 미만인(10^5 cells/ml 기준) 것을 이용하였다.

[0124] mRNA의 발현량을 분석한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 염증성 사이토카인으로 자극하여 배양 상등액의 IDO1의 양이 1 ng/ml 이상, TSG-6의 양이 8 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) hUCM-MSC가 효과적으로 iNOS 및 IL-1 β 의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명의 염증성 사이토카인으로 자극된 줄기세포가 M1 대식세포를 저해하여, M1의 마커인 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다.

[0126] **실시예 7: 턱관절염을 유발한 랫드 연골 세포와 공배양시 줄기세포에서의 IDO1, TSG-6 및 FGF2의 유전자 발현량 확인**

[0127] IL-1 β 로 자극시켜 턱관절염을 유발한 랫드 연골세포와 염증성 사이토카인으로 자극된 hUCM-MSC세포주 #A, #B, #C를 공배양 한 후의 IDO1, TSG-6 및 FGF2의 유전자 발현량을 확인하였다.

[0128] 도 6에 나타난 바와 같이, 세 유전자 모두 턱관절염을 유발한 랫드 연골 세포와 공배양시 IDO1, TSG-6 및 FGF2의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

[0130] **실시예 8: 염증성 사이토카인과 세포의 기질 분해와 합성 조절 인자 및 세포 자멸 유전자의 발현량 확인**

[0131] IL-1 β 로 자극시켜 관절염을 유발한 랫드 연골세포(IL-1 β chondrocytes, 이하 'IC')와 염증성 사이토카인으로 자극된 hUCM-MSC(Primed MSC, 이하 'PM')와 자극되지 않은 hUCM-MSC(Naive MSC, 이하 'NM')를 공배양하여, 세 세포주에 의한 염증성 사이토카인, 세포의 기질 분해인자, 세포의 기질 분해 억제인자 및 세포자멸 인자의 유전자 발현의 비교를 분석하였다. 여기서, PM은 배양 상등액의 IDO1의 양이 0.6 ng/ml 이상, TSG-6의 양이 8 pg/ml 및 FGF2의 양이 6 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) 것을 이용하였으며, NM은 배양 상등액의 IDO1의 양이 0.6 ng/ml 미만, TSG-6의 양이 8 pg/ml 미만 및 FGF2의 양이 6 pg/ml 미만인(10^5 cells/ml 기준) 것을 이용하였다.

[0132] 그 결과, 도 7A에 나타난 바와 같이, 염증성 사이토카인(iNOS, TNF- α 및 IL-1 β)과 세포의 기질 분해인자(MMP3, MMP9, MMP13 및 ADAMTS5)의 유전자 발현량이 유의하게 가장 큰 폭으로 감소한 것을 확인할 수 있다. 또한, 세포의 기질 분해 억제인자(TIMPS) 역시 유일하게 위의 세포와의 공배양에 의해 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

[0133] 이러한 결과를 통해, 관절염이 유발된 연골세포에 염증성 사이토카인으로 자극된 MSC를 처리하는 경우, 염증이 감소하고, 세포의 기질이 분해되는 것을 억제할 것임을 알 수 있다.

[0134] 나아가, 연골세포의 세포 자멸 인자인 Bax의 발현 수준을 확인한 결과, IDO1의 양이 0.6 ng/ml 이상, TSG-6의 양이 8 pg/ml 이상, FGF2의 양이 6 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) 세포주 #B에서 더욱 유의적으로 Bax의 발현수준이 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 치료 효능의 편차가 다양한 세포주들 중에서 턱관절염에 확실한 치료 효능을 지닌 세포주를 선별하기 위해서는 IDO1, TSG-6, FGF2의 발현량이 각각 기준치 이상이어야 함을 재확인하였다.

[0136] **실시예 9: 섬유연골 줄기세포의 증식 및 생존 능력 증가 여부 확인**

[0137] 섬유연골 줄기세포가 턱관절염 유사 환경에서 본 발명의 줄기세포를 처리하였을 때 증식 및 생존 능력이 증가되는지 여부를 평가하였다.

[0138] 랫드 턱관절 연골 표층층(superficial zone)에 분포하는 섬유연골 줄기세포(fibrocartilage stem cell, FCSC)를 추출하여 분리 배양한 후, IL-1 β 로 자극하여 유사 턱관절염 환경을 조성한 후, 세포자멸을 유도하였다. 이후, 염증성 사이토카인으로 자극된 hUCM-MSC(Primed MSC, 이하 'PM')와 자극되지 않은 hUCM-MSC(Naive MSC, 이

하 'NM')와 공배양한 후 CCK8을 통하여 FCSC의 증식 및 생존 능력을 비교 분석하였다.

[0139] 실험은 CCK8 kit(Dojindo, Kumamoto, Japan) 제조사의 안내에 따라 수행되었다. 100 uL /ml의 농도로 CCK8 용액을 플레이트에 첨가하고 빛이 차단된 상태로 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 상등액은 96 웰 마이크로플레이트로 옮겨, 마이크로플레이트 리더(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0140] 분석 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 48시간 이후, 배양 상등액의 FGF2의 양이 8 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) hUCM-MSC에 의해 FCSC의 증식 및 생존 능력이 증가된 것을 확인하였다. 기존에 FGF2는 중간엽 줄기세포의 증식 및 연골 분화 잠재력을 증가시키는 데 기여하는 것으로 알려져 있었다. 본 실시예를 통해 FGF2의 발현이 6pg/ml 이상인 경우 하악관절 연골 표재층(superficial zone)에 있는 섬유연골 줄기세포(FCSC)의 유지에 기여할 수 있음을 재확인하였다.

[0142] 실시예 10: 랫드 턱관절염 모델에서 염증 인자 및 연골 기질 분해 효소의 발현량 변화 확인

[0143] 랫드 턱관절염 모델에서의 본 발명의 줄기세포의 염증 완화 및 치료 효능을 평가하였다.

[0144] 우선, 모든 동물 실험 절차는 아산의료원 생명과학연구소의 IACUC의 검토를 거쳐 승인되었으며, 관련 지침과 규정에 따라 진행되었다(허가 번호 2021-12-208). 평균 8주령의 SD 랫드의 양쪽 턱관절 내강에 MIA(monosodium iodoacetate)를 주사하여 2주 동안 턱관절염을 유발시켰다. 턱관절염이 유발된 모델에 염증성 사이토카인으로 자극된 hUCM-MSC(Primed MSC, 이하 'PM')와 자극되지 않은 hUCM-MSC(Naive MSC, 이하 'NM')를 각각 10^5 cell/50 uL씩 관절 내강에 주사하였다. 여기서, PM은 배양 상등액의 IDO1의 양이 1 ng/ml 이상, TSG-6의 양이 8 pg/ml 이상 및 FGF2의 양이 8 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) 것을 이용하였으며, NM은 배양 상등액의 IDO1의 양이 1 ng/ml 미만, TSG-6의 양이 8 pg/ml 미만 및 FGF2의 양이 8 pg/ml 미만인(10^5 cells/ml 기준) 것을 이용하였다. 비치료 대조(도 9, 도 10의 'Induced')에는 생리식염수를 주사하였고, 정상대조군(도 9, 도 10의 'Normal')은 같은 주령의 랫드로 분석하였다. 세포 또는 생리식염수를 주사하고 2주 후, 턱관절에서 mRNA를 추출하여 염증 인자 및 연골 기질 분해 효소의 발현 변화를 비교 분석하였다.

[0145] 분석 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 배양 상등액의 IDO1의 양이 1 ng/ml 이상, TSG-6의 양이 8 pg/ml 이상 및 FGF2의 양이 8 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) PM에 의해 염증 인자인 TNF- α , IL-1 β 및 iNOS의 발현이 크게 감소하였다. 또한, 도 10에 나타난 바와 같이, 연골 기질 분해 효소인 MMP13과 ADAMTS5의 발현 역시 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0147] 실시예 11: 랫드 턱관절염 모델에서 하악 파두 내 연골과 연골하부뼈의 재생에 미치는 영향 확인

[0148] 랫드 턱관절염 모델에서의 본 발명의 줄기세포의 연골 및 연골하부뼈의 재생에 대한 효능을 평가하였다.

[0149] 실시예 10에서와 동일하게, 평균 8주령의 SD 랫드의 양쪽 턱관절 내강에 MIA(monosodium iodoacetate)를 주사하여 2주 동안 턱관절염을 유발시켰다. 턱관절염이 유발된 모델에 염증성 사이토카인으로 자극된 hUCM-MSC(Primed MSC, 이하 'PM')와 자극되지 않은 hUCM-MSC(Naive MSC, 이하 'NM')를 각각 10^5 cell/50 uL씩 관절 내강에 주사하였다. 여기서, PM은 배양 상등액의 IDO1의 양이 1 ng/ml 이상, TSG-6의 양이 8 pg/ml 이상 및 FGF2의 양이 8 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) 것을 이용하였으며, NM은 배양 상등액의 IDO1의 양이 1 ng/ml 미만, TSG-6의 양이 8 pg/ml 미만 및 FGF2의 양이 8 pg/ml 미만인(10^5 cells/ml 기준) 것을 이용하였다. 비치료 대조(도 11의 'Induced')에는 생리식염수를 주사하였고, 정상대조군(도 11의 'Normal')은 같은 주령의 랫드로 분석하였다.

[0150] In-vivo CT는 턱관절염 유발 후 치료전과 세포 또는 생리식염수를 주사한 뒤 2주, 4주, 8주차 시점에 촬영하여 분석하였다. 조직 병리 분석은 각 치료 후 2주, 4주, 8주 후에 동물 모델을 희생시켜 턱관절을 추출하고 슬라이드 제작 후, 조직 염색을 통해 비교 분석하였다.

[0151] 분석 결과, 도 11 및 도 12에 나타난 바와 같이, 배양 상등액의 IDO1의 양이 1 ng/ml 이상, TSG-6의 양이 8

pg/ml 이상 및 FGF2의 양이 8 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) PM 치료군의 연골하부뼈가 더 빠른 속도로 관절 외곽 측면에서부터 점차 회복되는 것을 확인할 수 있으며, 연골에서도 더 완화된 모습을 확인할 수 있다.

[0153] 실시예 12: 랫드 턱관절염 모델에서 하악 과두 내 연골의 염증 인자 조절에 미치는 영향 확인

[0154] 랫드 턱관절염 모델에서의 본 발명의 줄기세포의 염증 인자 조절에 미치는 영향을 평가하였다. 면역조직화학분석(immunohistochemistry)을 통해 랫드 턱관절염 관절 연골 세포 내의 iNOS 단백질의 발현을 비교 분석하였다.

[0155] 분석 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, 배양 상등액의 IDO1의 양이 1 ng/ml 이상, TSG-6의 양이 8 pg/ml 이상 및 FGF2의 양이 8 pg/ml 이상인(10^5 cells/ml 기준) PM 치료군에서 4주차부터 iNOS의 발현이 유의하게 감소되는 것을 확인하였다.

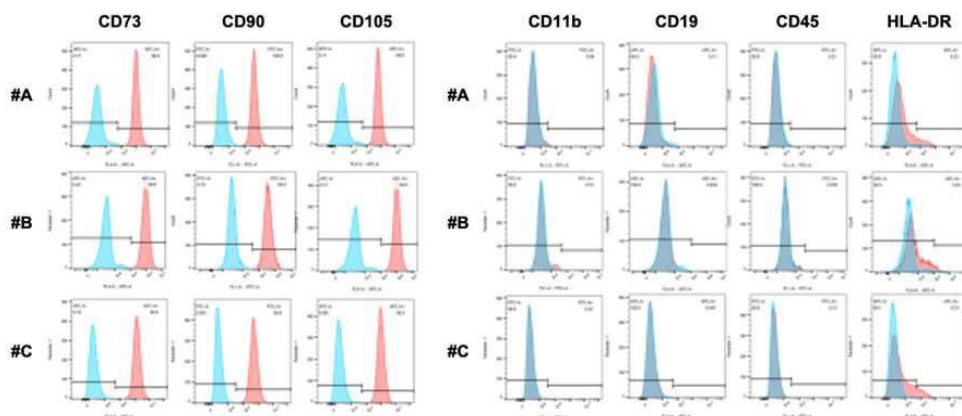
[0157] 통계 분석은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)을 사용하여 수행하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현되었다. 데이터가 정규분포를 따르는 것으로 확인된 후, 다중 그룹 비교는 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 진행했다. P값이 0.05 미만이면 통계적으로 유의미하다고 간주하였다.

[0159] 종합하면, 본 발명의 줄기세포는 대식세포를 M2 대식세포로 분화를 촉진하고, M1 대식세포를 저해하며, 연골 세포의 염증 인자와 세포외 기질 분해 인자의 발현을 감소시킬 수 있다. 또한, 섬유연골 줄기세포의 증식을 활성화 시킴으로써 궁극적으로 턱관절의 연골 소실을 예방하고, 연골 및 연골하부 뼈의 재생을 촉진하여 연골세포의 생존성 향상을 통해 턱관절 질환에 효과가 있다.

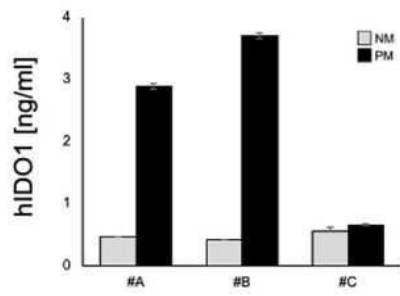
[0161] 상기에서는 본 발명의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

도면

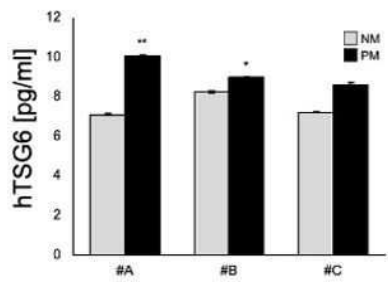
도면1



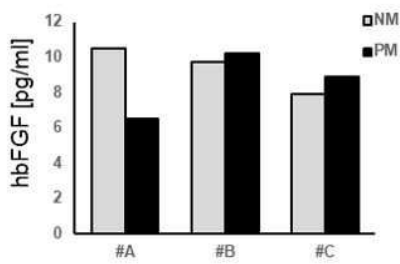
도면2a



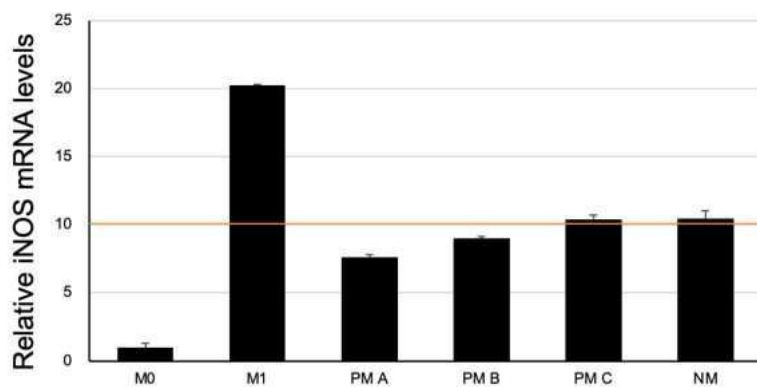
도면2b



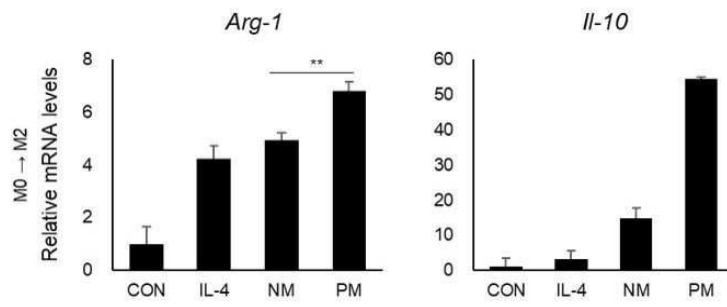
도면2c



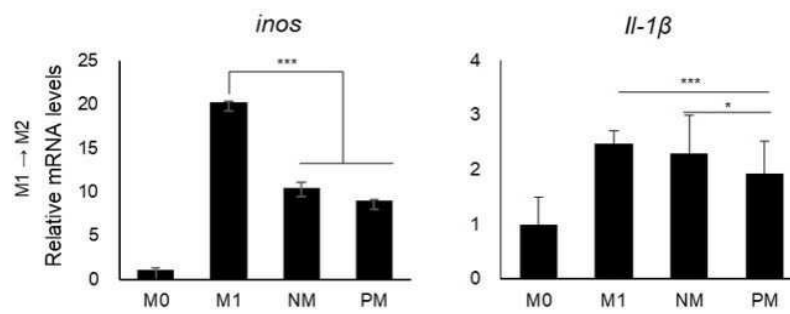
도면3



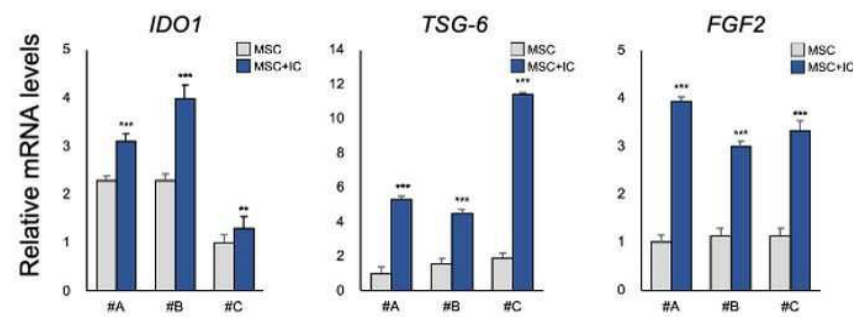
도면4



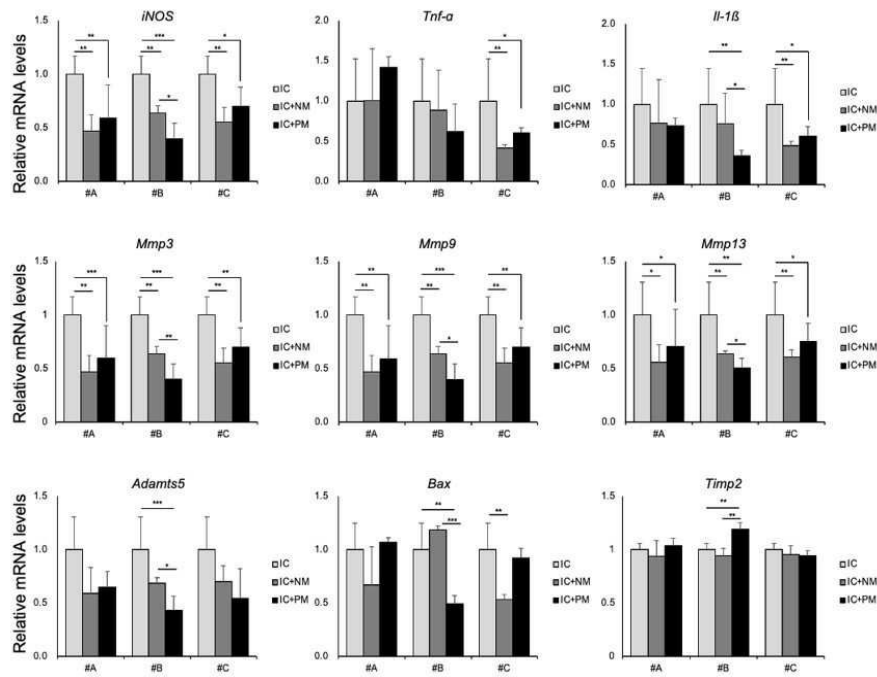
도면5



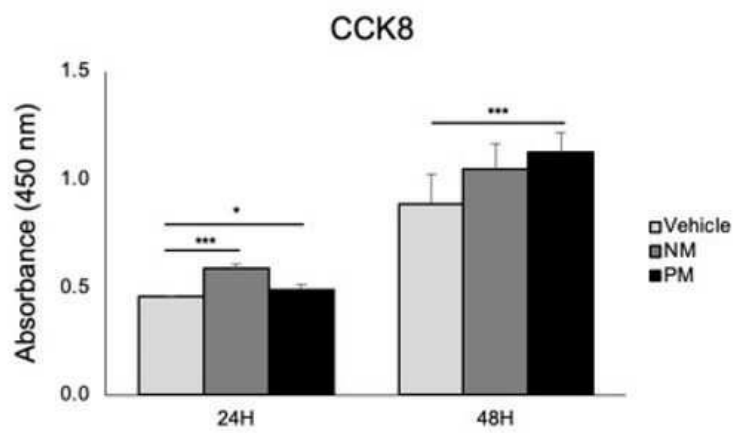
도면6



도면7

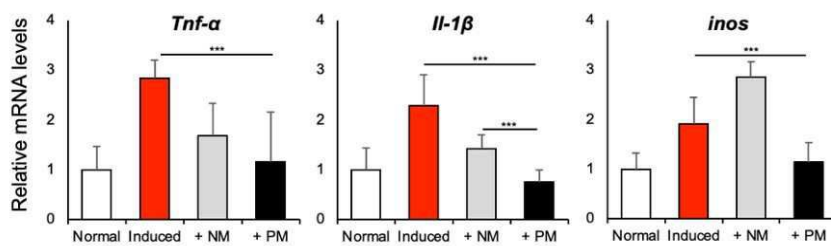


도면8



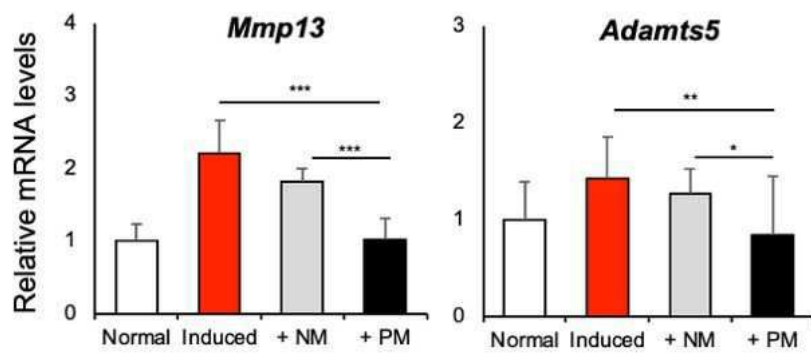
도면9

Proinflammation markers

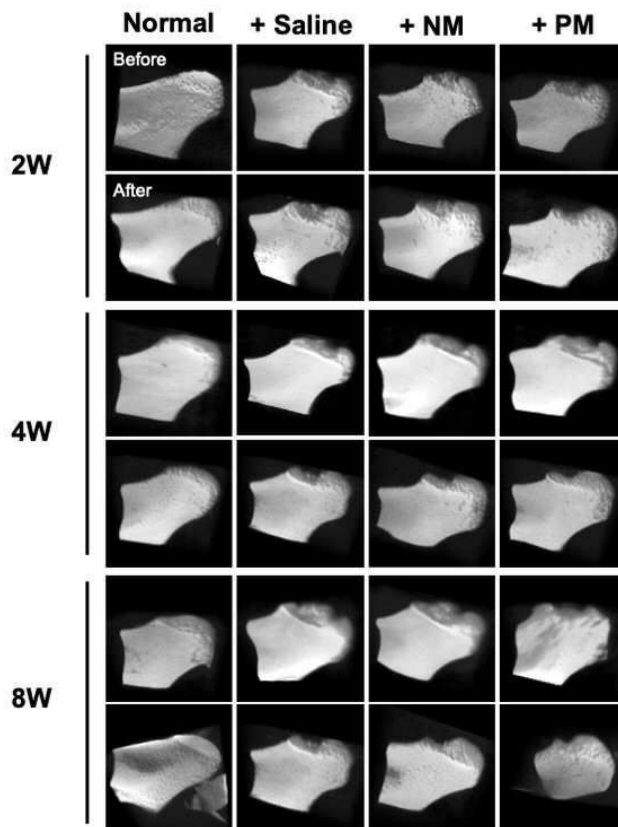


도면10

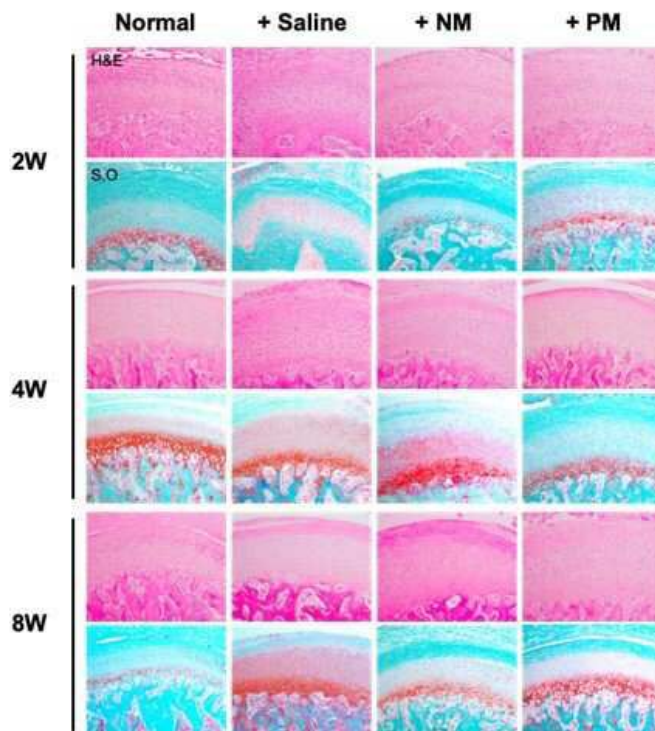
Matrix regulation markers



도면11



도면12



도면13

