



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월12일  
(11) 등록번호 10-1957230  
(24) 등록일자 2019년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 38/20 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 38/2053 (2013.01)  
A61K 48/00 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-0138238  
(22) 출원일자 2017년10월24일  
심사청구일자 2017년10월24일  
(56) 선행기술조사문헌  
Annals of the New York Academy of Science.  
1383 (2016) 80-87  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
이진우  
서울특별시 서초구 방배로26길 50, 402호(방배동, 엘리빌)  
이경미  
경기도 고양시 일산동구 백석로 26, 302동 1504호 (백석동, 흰돌마을3단지아파트)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이재영

전체 청구항 수 : 총 9 항

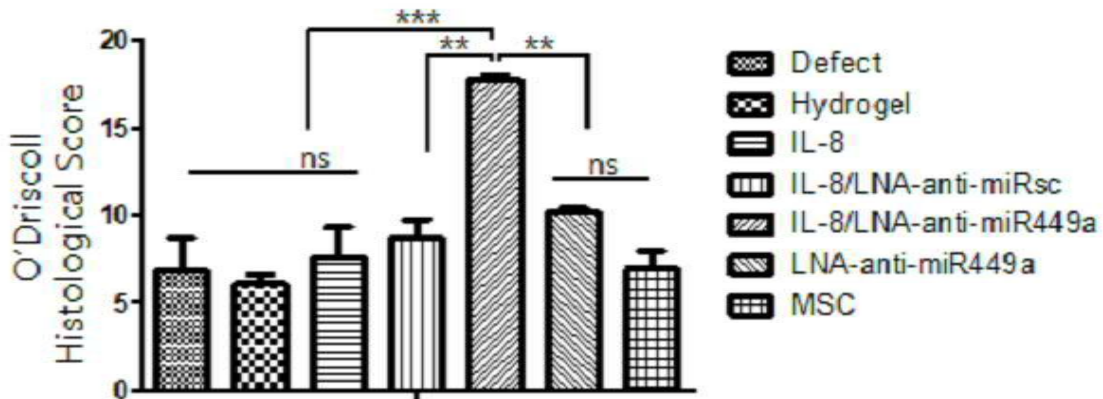
심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 IL-8 및 LNA-anti-miR449a를 포함하는 연골 재생용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 케모카인(chemokine) 및 miR449a 억제제를 유효 성분으로 포함하는 조성물로, 본 발명의 조성물은 조직 중에서도 예를 들어, 골 조직 또는 연골 조직을 재생시켜 골 또는 연골 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있도록 한다.

대표도 - 도7



(72) 발명자  
**김성환**  
서울특별시 강남구 언주로 332, 110동 2002호(역삼동, 역삼푸르지오아파트)  
**최성미**  
서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 에비슨연구센터 201호 (신촌동)

(56) 선행기술조사문헌  
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE  
35: 238-246, 2015  
Osteoarthritis and Cartilage 24 (2016)  
2153e2161  
KR1020180012072 A  
Stem Cells Dev. 2012, 21(18) 3298-308

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI14C2000
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발사업
연구과제명	손상연골 재생을 위한 차세대 무배양 줄기세포 치료제 개발
기여율	1/1
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2016.11.01 ~ 2017.10.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

케모카인(chemokine) 및 miR449a 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 조직 재생용 약학적 조성물로,  
상기 miR449a 억제제는 서열번호 4로 표시되는 것이고,  
상기 조직은 골 조직 또는 연골 조직인, 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 케모카인은 CXCL8(인터루킨-8), CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12(SDF-1), CXCL16, CXCL13, CXCL5, CXCL6, CXCL1, CXCL2, CXCL3 및 CXCL7으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 케모카인은 인터루킨-8(interleukin-8)인, 약학적 조성물.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 골 조직은 늑골, 두개골, 장골, 상완골, 척추뼈, 골반뼈 또는 어깨뼈의 골 조직인, 약학적 조성물.

#### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 연골 조직은 유리질 연골(hyaline cartilage), 탄성 연골(elastic cartilage) 또는 섬유 연골(fibrocartilage)인, 약학적 조성물.

#### 청구항 10

케모카인(chemokine) 및 miR449a 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 골 또는 연골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로,

상기 miR449a 억제제는 서열번호 4로 표시되는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 케모카인은 CXCL8(인터루킨-8), CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12(SDF-1), CXCL16, CXCL13, CXCL5, CXCL6, CXCL1, CXCL2, CXCL3 및 CXCL7으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 약학적 조성물.

**청구항 12**

제10항에 있어서,

상기 케모카인은 인터루킨-8(interleukin-8)인, 약학적 조성물.

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

제10항에 있어서,

상기 골 또는 연골 질환은 관절염; 골다공증; 골연골증; 골연골염; 불완전 골형성증; 골수염; 골증식체; 연골형성부전증; 연골염; 연골종; 연골육종; 추간판 탈출증; 클리펠-파일 증후군; 변형성 골염; 낭성 섬유뼈염; 및 사고, 골절, 상처, 관절 손상, 자가면역질환, 당뇨병 또는 암으로 인한 골 또는 연골 질환으로 이루어진 군에서 선택되는, 약학적 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 조직 중에서도 예를 들어, 골 조직 또는 연골 조직을 재생할 수 있는 조성물과, 더 나아가 골 또는 연골 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 연골은 탄력성 있는 조직으로서 두 개의 뼈를 서로 연결하며, 관절 부위에 운동성을 부여하고 충격 완화의 역할을 한다. 특히, 관절 연골은 결합조직으로서 프로테오글리칸(proteoglycan)과 타입 콜라겐의 매트릭스에 임베딩되어 있는 연골세포를 포함한다. 상기한 타입의 연골 조직이 손상됨으로써, 뼈끼리의 직접적인 마찰, 관절의 뻣뻣함, 관절 연골 운동의 점진적 저하 및 연골 부위의 빈발성 통증이 유발된다. 골관절염의 초기 병인이 아직 불분명하지만, 일반적으로 관절 연골 매트릭스 내의 동화 및 이화 대사 기전의 변화나 불균형에 의하여 연골 파괴가 초래되는 것으로 알려져 있다.

[0003] 일반적으로 척추동물의 관절을 이루는 연골 조직에는 혈관, 신경 및 임파조직이 없어서 한번 손상되게 되면 정상적으로 생체 내에서 재생이 되지 않는다. 이러한 관절의 연골 조직이 손상될 경우 심한 통증과 함께 일상 활동에 제한을 받게 되며, 만성화될 경우 치명적인 퇴행성 관절염을 유발하게 되어 정상적인 생활이나 직업적인 활동을 방해하게 된다. 그러므로 손상된 관절 연골은 스스로 회복 및 재생이 매우 제한될 수 밖에 없다. 의학적으로 여러 가지 방법이 도모되지만 아직 관절 연골인 초자 연골을 자연과 같은 상태로 회복하기에는 부족한 실정이다.

[0004] 임상적으로 연골을 재생시키는 수술 방법으로는 ① 줄기세포의 연골세포로의 분화를 유도하는 방법, ② 골 연골 이식술(osteochondral transplantation)로 자가 혹은 동종의 연골조직을 연골 결손 부위에 이식하는 방법, ③ 미세 골절술(microfracture)로 손상된 연골을 잘 긁어내어 제거하고 연골하골이 노출되면 여기에 일정한 간격으로 구멍을 뚫고 이를 통해서 흘러나온 골수세포가 연골 조직으로 재생되는 것을 도모하는 방법, ④ 연골세포 이식술(chondrocyte transplantation)로 연골 결손부위에 연골세포를 이식함으로써 연골 재생을 유도하는 방법 등

이 사용되고 있다.

- [0005] 미세 골절술(microfracture)은 가장 일반적으로 사용되는 방법이며, 그 대표적 방법인 관절경적 시술은 소형카메라가 장착된 관절경(arthroscopy)을 1cm 미만의 작은 구멍을 통해 관절강 내에 삽입하여, TV 모니터를 통해 관절 속을 확대 관찰하면서 진단 및 수술을 동시에 수행하는 방법이다. 그러나 미세 골절술(microfracture)은 실제의 관절에 필요한 초자연골(hyaline cartilage)이 아니라 섬유연골(fibro-cartilage)이 주로 생성되기 때문에, 기능적인 측면에서 볼 때는 만족할 만한 효과를 거두지 못하고 있다.
- [0006] 골 연골 이식술은 환자의 정상부위에서 이미 생성되어 있는 연골과 연골하골 부분을 함께 채취하여, 손상된 연골 부위에 적당한 구멍을 파고 이식하여 초자연골을 생성하는 방법이다. 그러나 상기 방법은 이식된 부위와 원래 조직 사이에 틈이 남는 문제 등이 있어 완전한 치료 방법이라 하기 어려우며, 그나마 자가이식(autologous transplantation)이 가능한 환자만을 대상으로 시행할 수 있어 보편적인 방법이 될 수 없다.
- [0007] 최근, 손상된 관절 연골의 치료를 위해 조직 공학에 기초를 둔 새로운 치료법으로서 자기유래 연골세포 이식술이 각광받고 있다. 이는 무릎 관절 연골이 손상된 환자의 연골 부위 중 사용이 많지 않은 연골을 채취한 후 연골 세포를 분리하고, 상기 연골 세포를 배양하여 연골 결손 부위를 치료할 만큼의 연골 세포수를 획득하며, 배양된 연골세포를 환자의 연골 결손 부위에 이식하여 환자의 관절 연골을 복원시키는 방법이다.
- [0008] 상기 방법은 이미 생성된 연골조직을 손상부위에 주입하는 골 연골 이식술에 비해, 이식된 연골세포가 손상된 부위 내에서 직접 증식하면서 손상부위를 채우게 되므로, 이식된 부위와 정상 부위가 비교적 잘 융합되며, 초자연골을 재생할 가능성 또한 많다. 그러나 연골세포를 채취할 때, 그리고 체외에서 배양된 연골세포를 다시 관절 연골손상 부위에 이식할 때 각각 수술이 필요하므로, 결국 2차례에 걸친 수술에 의해 환자의 고통, 후유증 및 경제적 부담이 크며, 시술 과정 또한 복잡하다. 또한, 채취된 연골세포는 대부분은 이미 성장이 다 이루어진 성인으로부터 얻은 것이므로, 채취된 세포의 증식 및 성장이 왕성하지 않아 세포의 체외 배양 시 이식에 필요한 만큼의 세포 수를 얻기까지 상당한 기간이 걸리며, 세포가 분화능력을 잃어 아예 증식하지 않는 경우에는 치료 자체가 이루어질 수 없고, 연골세포를 체외에서 배양하기 때문에 세포의 표현형이 변화되곤 하는 문제점이 있을 수 있다.
- [0009] 상기 방법을 응용하여 자가 유래 골수(bone marrow), 근육, 피부 등의 간엽 조직으로부터 연골세포(chondrocyte)의 전구모세포(precursor cell)인 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)를 얻고, 체외에서 증식시켜 고분자와 함께 관절연골손상 부위에 주입하는 방법이 보고된 바 있다. 상기와 같이 성숙한 개체에서 얻은 간엽줄기세포를 이용하여 연골손상을 치료하는 방법은 자기유래연골세포 이식술에 비해, 보다 미분화된 세포를 얻어 체외 배양하므로 세포증식력이 다소 높아지는 것으로 나타났다. 그러나 상기 방법 역시 다양한 연골손상을 충분히 치료하기에는 여전히 미약한 수준의 세포증식력을 나타내고 있다.
- [0010] 따라서 최근에는 보다 효과적으로 연골 조직을 재생할 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0011] 본 발명의 일 목적은 골 조직 또는 연골 조직을 포함하여 다양한 조직을 효과적으로 재생할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 골 조직 또는 연골 조직을 효과적으로 재생하여 골 또는 연골 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.
- [0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0014] 본 발명의 발명자들은 인터루킨-8(interleukin-8)과 miR449a 억제제를 유효 성분으로 포함하는 경우 연골 조직의 재생 효과가 예측할 수 있는 수준을 넘어서서 현저히 향상됨을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.
- [0015] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 케모카인(chemokine) 및 miR449a 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 조직 재생용 약학적 조성물에 관한 것이다.

- [0016] 본 발명에서 상기 "케모카인(chemokine)"은 작은 사이토카인 패밀리어거나 세포에서 분비되는 신호 관련 단백질에 해당한다. 케모카인은 근접하는 반응성 세포에 의하여 화학주성(chemotaxis)을 유도하는 능력을 가진다. 상기한 케모카인은 CXC, CC, CX3C 및 XC의 총 4가지 군으로 분류할 수 있다. 이들 단백질은 케모카인 수용체(chemokine receptors)로 알려진 G 단백질 연결 막 관통 수용체(G protein-linked transmembrane receptors)과의 상호 작용을 통하여 생물학적 영향을 가한다.
- [0017] 본 발명에서 상기 케모카인으로는 CXC 케모카인인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 CXCL8(인터루킨-8), CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12(SDF-1), CXCL16, CXCL13, CXCL5, CXCL6, CXCL1, CXCL2, CXCL3 및 CXCL7으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 CXCL8, 즉 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 "인터루킨-8(interleukin-8)"은 대식세포(macrophages)와, 상피 세포(epithelial cells), 맥관성 평활근 세포(airway smooth muscle cells) 및 내피 세포(endothelial cells) 등과 같은 세포로부터 분비되는 케모카인에 해당한다. 내피 세포는 인터루킨-8을 소낭(vesicles)에 저장한다. 인간에 있어서, 인터루킨-8은 서열번호 1로 표시되는 CXCL8 유전자에 의해 코딩된다. 인터루킨-8은 초기에는 99개의 아미노산으로 이루어지는 전구체 폴리펩티드로 생성되었다가, 절단(cleavage)되어 활성화된 인터루킨-8 아이소폼(isoform)의 형태가 얻어진다. 배양 시 대식 세포에 의해 분비되는 주된 형태는 72개의 아미노산으로 구성된다.
- [0019] 본 발명에서 상기 인터루킨-8의 구체적인 서열 정보는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 서열번호 2로 표시되는 아미노산으로 이루어질 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 케모카인은 1 내지 100  $\mu\text{g}/\text{site}$ 의 양으로 포함되는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 또한, 본 발명에서 상기 miR449a 억제제는 서열번호 3으로 표시되는 miR449a의 발현을 억제하는 발현 억제제, 또는 miR449a에 결합하여 miR449a가 기능하지 못하게 하는 작용 억제제일 수 있다. 이러한 억제제로는 miR449a에 대한 안타고미르(antagomir), 안티센스 올리고뉴클레오티드(anti-sense oligonucleotide), miR449a에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 발현하는 벡터, RNA 억제 분자(inhibitory RNA molecule) 등이 포함될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 안타고미르 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 miR449a의 서열에 상보적인 서열을 포함하여 이루어짐으로써 miR449a에 상보적으로 결합하여 miR449a의 작용을 억제할 수 있다. 예를 들어, 서열번호 3으로 표시되는 miR449a에 상보적인 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 안타고미르 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), DNA, 2'-O-변형 올리고뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트-백본 DNA, PNA(peptide nucleic acid) 및 LNA(locked nucleic acid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 LNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에서 상기 "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는, 유전자 치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.
- [0024] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음)등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 타겟 유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 짝을 이루는 데 지장이 없는 길이이면 특별히 한정되지 않는다.
- [0025] 본 발명에서 상기 "shRNA"는 단일 가닥으로 50~70개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, in vivo 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 5~10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19~29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.

- [0026] 본 발명에서 상기 "miRNA(microRNA)"는 유전자 발현을 조절하며, 전장 20~50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20~45개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 20~40개 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 20~30개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21~23개의 뉴클레오타이드로 구성된 단일 가닥 RNA분자를 의미한다. miRNA는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드이며, 짧은 스텝-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2 이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.
- [0027] 본 발명에서 상기 "리보자임(ribozyme)"은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.
- [0028] 본 발명에서 상기 "PNA(Peptide nucleic acid)"는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다. PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.
- [0029] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.
- [0030] 본 발명에서 상기 "LNA(Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall Gene Therapy (2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오사이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 상기 miR449a 억제제는 서열번호 4로 표시되는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 상기 서열번호 4로 표시되는 상기 miR449a 억제제를 구성하는 핵산은 LNA를 적어도 하나 포함하거나, 전체 핵산이 LNA일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 miR449a 억제제는 10 내지 1000 nM의 양으로 포함되는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에서 상기 조직은 골 조직 또는 연골 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에서 상기 "골 조직(osseous tissue)"은 뼈를 형성하는 조직을 일컫는 용어이다. 뼈는 표면이 치밀골질로 이루어지며, 중심부나 장골의 양 끝은 그물눈 같이 연합된 해면골질로 되어 있다. 대부분의 뼈는 처음에 결합조직 중의 연골로서 발생하여 나중에 골조직으로 바뀌는데 일부는 결합조직 중에서 직접 생성된다. 말단에는 이웃 뼈와 접하는 부분에 관절면이 있고, 그 표면은 초자연골인 관절연골로 덮여있다. 해면질 가운데의 해면소주는 일정한 배열로 되어 있는 것이 특징이다. 골세포는 골충관 사이에 배열되어 있으며, 불규칙한 별모양으로 가는 원형질 돌기로 인접한 다른 골세포와 연결되어 있다. 뼈의 표면에는 질긴 결합조직성 골막이 있으며, 신경

과 혈관이 분포되어 뼈의 보호와 영양을 맡고 있다. 골막이 결손되면 뼈의 생존, 신생, 재생 등의 곤란해진다. 골질의 성분은 수분 20%, 세포를 포함한 유기질 35%, 무기질 45%인데, 뼈가 일정한 탄력성을 유지하는 것은 유기질이 있기 때문이다. 연령이 증가함에 따라 무기질(주로 인산칼슘)이 증가하여 뼈의 경도도 증가한다.

- [0035] 본 발명에서 상기 재생의 대상이 되는 골 조직의 부위를 특별히 제한하지는 않으며, 체내의 모든 골결 부위를 포함할 수 있지만, 예를 들면, 늑골, 두개골, 장골, 상완골, 척추뼈, 골반뼈 또는 어깨뼈의 골 조직일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 상기 "연골 조직(cartilage tissue)"은 인간 및 동물의 체내 여러 부분에서 발견되는 유연한 결합 조직으로, 뼈, 흉곽, 귀, 코, 기관지 및 추간관 사이의 접합부를 포함한다. 뼈와 달리 딱딱하고 경직되지 않으나, 근육보다는 뻣뻣하고 덜 유연하다. 연골은 콜라겐 섬유(collagen fiber), 단백당(proteoglycan)이 풍부한 기반물질(ground substance) 및 탄력소 섬유(elastin fiber)로 구성된 다량의 세포외기질(extracellular matrix)을 생산하는 연골모세포(chondroblast)라 불리는 특화된 세포로 구성된다. 연골은 상기 세 가지 주요 요소들의 상대적인 함유량에 따라 탄성연골(elastic cartilage), 유리연골(hyaline cartilage) 및 섬유연골(fibrocartilage)의 세 가지 타입으로 분류된다. 기질 내에 포획된 연골모세포를 연골세포(chondrocyte)라 하며, 이는 소강이라 불리는 공간에 위치한다. 하나의 공간은 8개의 연골세포까지 수용할 수 있다. 연골은 다른 결합조직과는 달리 혈관을 포함하지 않으며, 연골세포는 관절연골의 압박 또는 탄성연골의 굽힘에 의해 생성되는 펌핑작용에 의한 확산에 의해 제공된다. 따라서, 다른 결합조직에 비해 연골은 성장 및 회복이 매우 느리다.
- [0037] 본 발명에서 재생의 대상이 되는 연골 부위는 특별히 제한하지는 않으며, 체내의 모든 연골 부위를 포함할 수 있지만, 예를 들면, 유리질 연골(hyaline cartilage; 예를 들어, 관절, 코, 후두 또는 흉골에 있는 유리질 연골), 탄성 연골(elastic cartilage; 예를 들어 귀에 있는 탄성 연골) 및 섬유 연골(fibrocartilage; 예를 들어, 추간관)일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 "재생"은 일반적으로 생물체에는 몸의 일부 또는 그 기능을 상실하였을 때, 그 부분의 조직이나 기관을 다시 만들어 원래 상태로 복구시키거나 그 기능을 회복하려는 작용을 일컫는다. 이러한 재생 능력은 체계가 간단하고 계통적으로 진화의 정도가 낮은 것일수록 강하다.
- [0039] 본 발명의 조성물을 재생이 필요한 손상된 조직으로, 특히 골 조직 또는 연골 조직에 처리하는 경우 손상된 부위로 주변 세포로 특히 중간엽 줄기세포의 유입을 유도하고, 이러한 세포에 있어서 골 세포 또는 연골 세포로의 분화를 촉진하여 골 재생 또는 연골 재생을 극대화시킬 수 있다.
- [0041] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 케모카인(chemokine) 및 miR449a 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 골 또는 연골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명에서 상기 케모카인 및 miR449a 억제제에 관한 내용은 상기 조직 재생용 약학적 조성물에 기재된 바와 중복되어 과도한 기재를 피하기 위하여 이하에서는 그 기재를 생략한다.
- [0043] 본 발명의 조성물에 의해 치료될 수 있는 골 질환 또는 연골 질환은 골관절염 및 류마티스 관절염을 포함하는 관절염, 골다공증, 골연골증, 골연골염, 불완전 골형성증, 골수염, 골증식체, 연골형성부전증, 연골염, 연골종, 연골육종, 추간관 탈출증, 클리펠-파일 증후군, 변형성 골염, 낭성 섬유뼈염, 및 사고, 골절, 상처, 관절 손상, 자가면역질환, 당뇨병 또는 암으로 인한 조직 손상과 연관된 골 또는 연골 질환을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 골 또는 연골 질환을 차단하거나, 골 또는 연골 질환의 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 조사하여 골 또는 연골 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성

물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[0049] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[0051] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0052] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약무형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

**발명의 효과**

[0053] 본 발명의 조성물은 손상된 조직, 특히는 골 조직 또는 연골 조직으로 주변의 중간엽 줄기세포의 유입을 유도하고, 유입된 세포에서 골 세포 또는 연골 세포로의 분화를 현저히 촉진시켜, 골 조직 또는 연골 조직을 효과적으로 재생시킴에 따라 골 또는 연골 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0054] 도 1은 실시예 1에서 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포에 각 처리 후 miR449a 및 LEF-1의 발현 수준의 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 실시예 1에서 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포에 각 처리 후 SOX9, COL2A1 및 어그리칸의 mRNA의 발현 수준의 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 실시예 1에서 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포에 각 처리 후 SOX9, 및 COL2A1 단백질의 발현 수준의 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 1에서 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포에 각 처리 후 알시안블루 염색 및 사프라닌-오 염색을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 실시예 2에서 골연골 손상 토끼 모델의 손상된 무릎뼈 연골 부위에 각 처리 후 손상된 부위의 형상을 사진으로 나타낸 것이다.

도 6은 실시예 2에서 골연골 손상 토끼 모델의 손상된 무릎뼈 연골 부위에 각 처리 후 재생된 손상 연골 부위를 메이슨 트리콤 염색과, 사프라닌-오 염색 후 패스트 그린 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 실시예 2에서 골연골 손상 토끼 모델의 손상된 무릎뼈 부위에 각 처리 후 손상 연골 부위의 O'Driscoll 조직 점수를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적

으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0057] 실시예

[0059] [실시예 1] 인간 골수 유래 줄기세포의 연골 세포로의 분화 확인

[0060] 1.1 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(hBMSCs)의 배양

[0061] 골수 천자액(BM aspirates)은 IRB(Institutional Review Board)의 승인 하에 19~63세의 12명의 성인 기증자의 후장골릉(posterior iliac crest)에서 수득하였다. 인간 골수유래 중간엽 줄기세포(hMSC)는 플라스틱 세포배양 플라스크에 흡착하는 능력을 기준으로 선별하였다. 골수 천자액(BM aspirates)은 10% FBS(Gibco, Grand Island, NY, USA) 및 1% 항생제-항진균제 용액(Gibco)이 보충된 DMEM-LG(low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium; Welgene, Daegu, Korea)에서 7일 간 배양하였다.

[0062] 1.2 마이크로매스 배양방법을 이용한 hBMSC의 인 비트로 연골 분화

[0063] 인 비트로에서 hBMSC를 연골로 분화시키기 위하여 마이크로매스 배양 방법을 이용하였다. 트립신화된 hBMSC를 10% FBS가 함유된 DMEM-LG에서  $1 \times 10^8$  cells/mL 농도로 재부유시키고, 이 중 10  $\mu$ L 만을 24-웰 플레이트(웰 당  $1 \times 10^6$  cells)의 각각의 웰에 찍어(dotting)주었다. 세포들을 37°C에서 두 시간 동안 흡착하도록 한 뒤, 1% 항생제-항진균제 용액, 1% 인슐린 트랜스페린 셀레늄-A(ITS; Invitrogen), 50  $\mu$ g/mL 아스코르빈산(Invitrogen) 및 10 ng/mL TGF- $\beta$ 3(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)가 보충된 DMEM-HG에 하기 표 1에 나타난 조건의 연골 분화 배양액을 첨가하였다. 인 비트로 분화 시기 동안에 10 ng/mL TGF- $\beta$ 3을 포함하는 연골 분화 배양액은 2일 마다 교체하였다.

표 1

구분	처리군
비교예 1	무처리
비교예 2	100ng/mL 인터루킨-8(IL-8)
비교예 3	100ng/mL 인터루킨-8(IL-8)+ 100nM 항-miRSC LNA 프로브(LNA-anti-miRSC)
실시예 1	100ng/mL 인터루킨-8(IL-8)+ 100nM 항-miR449a LNA 프로브(LNA-anti-miR449a)
LNA-anti-miR449a(Qiagen (Exiqon, CA,USA))의 서열 정보: 5' - CTAACAATACACTGCC - 3'(서열번호 4)	
LNA-anti-miRSC(Qiagen (Exiqon, CA,USA))의 서열 정보: 5' - ACGTCTATACGCCCA - 3'(서열번호 5)	

[0066] 1.3 miR449a 및 LEF-1 발현 수준 평가

[0067] 상기 1.2에서 hBMSC에 표 1에 나타난 조건으로 처리하며 TGF- $\beta$ 3를 이용하여 5일 간 연골 분화를 유도한 뒤 세포에서 miR449a와 LEF-1의 발현 수준을 분석하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0068] 도 1에서 보는 바와 같이, 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포에 본 발명에 따라 인터루킨-8(IL-8)과 miR449a 억제제(LNA-anti-miR449a)를 처리한 경우, 인터루킨-8(IL-8)을 단독으로 처리하거나 혹은 인터루킨-8(IL-8)과 항-miRSC LNA 프로브(LNA-anti-miRSC)를 처리한 경우에 비하여 miR449a의 발현 수준이 감소하였고, LEF-1의 발현 수준은 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0069] 1.4 연골 분화 마커의 발현 수준 평가

[0070] 상기 1.2에서 hBMSC에 상기 표 1에 나타난 조건으로 처리하며 TGF- $\beta$ 3를 이용하여 5일 간 연골 분화를 유도한 뒤 연골 분화 주요 마커인 SOX9, 2형 콜라겐 알파 1 체인(collagen type 2 alpha 1 chain, COL2A1) 및 어그리칸(aggrecan)의 mRNA 발현 수준을 실시간 PCR로 관찰하여 그 결과를 도 2에 나타내었고, 상기 SOX9 및 COL2A1 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 분석하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0071] 도 2 및 도 3에서 보는 바와 같이, 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포에 본 발명에 따라 인터루킨-8(IL-8)과 miR449a 억제제(LNA-anti-miR449a)를 처리한 경우, 인터루킨-8(IL-8)을 단독으로 처리하거나 혹은 인터루킨-8(IL-8)과 항-miRSC LNA 프로브(LNA-anti-miRSC)를 처리한 경우에 비하여 연골 분화에 중요한 마커인 SOX9, COL2A1 및 어그리칸의 발현 수준이 현저히 증가한 것을 볼 수 있었다.

[0072] 1.5 연골 세포로의 분화 여부 평가 평가

[0073] 상기 1.2에서 hBMSC에 상기 표 1에 나타난 조건으로 처리하며 TGF-β3를 이용하여 5일 간 연골 분화를 유도한 뒤 알시안블루 염색(alcian blue staining), 사프라닌-오 염색(safranin-o staining)을 이용하여 세포의 분화 여부를 분석하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0074] 단, 알시안블루 염색은 연골 특이적 기질 중 산성 점액다당류(acid mucosubstance and acid mucin)를 파란색으로 염색시키며, 사프라닌-오 염색은 연골 특이적 기질 중 프로테오글리칸(proteoglycan)에 붉게 염색이 된다.

[0075] 도 4에서 보는 바와 같이 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포에 본 발명에 따라 인터루킨-8(IL-8)과 miR449a 억제제(LNA-anti-miR449a)를 처리한 경우, 인터루킨-8(IL-8)을 단독으로 처리하거나 혹은 인터루킨-8(IL-8)과 항-miRSC LNA 프로브(LNA-anti-miRSC)를 처리한 경우에 비하여 연골 특이적 기질의 형성 정도가 현저히 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0076] 이를 통하여 본 발명에 따른 인터루킨-8(IL-8) 및 miR449a 억제제(LNA-anti-miR449a)의 혼합 조성물은 중간엽 줄기세포를 연골 세포로 효과적으로 분화를 유도하는 것을 알 수 있다.

[0078] [실시예 2] 골연골 손상 모델에서 연골 재생 효과

[0079] 2.1 골연골 손상 모델의 준비 및 본 발명의 조성물의 투여

[0080] 본 발명에 따른 인터루킨-8과 miR449a 억제제가 골연골 손상 모델 (Osteochondral defect model) 내에서 연골 조직 재생에 미치는 영향을 평가하였다. 뉴질랜드 화이트 래빗(수컷, 2.5 kg, 오리엔트 바이오, 한국)에 케타민(KETAMIN, 유한, 한국) 45 mg/kg 및 자일라진(xylazine, 상풍명 립폰, 바이엘, 한국) 2 mg/kg을 근육 주사하여 마취시켰다. 마취된 토끼의 오른쪽 다리에 제모제를 이용하여 무릎부위의 털을 제거한 후 포비돈과 70% 알코올을 이용하여 소독하였다. 15호 수술용 칼을 이용하여 무릎부위의 외피를 2 cm 가량 절개한 후 무릎뼈 인대를 확인한 후 인대의 안쪽을 따라 1.5 cm 가량 내피를 절개하였다. 절개된 부위의 무릎뼈를 포셉을 이용하여 대퇴골 홈의 바깥쪽으로 탈골시켰다. 탈골로 인해 노출된 대퇴골 홈의 중간 부위를 드릴날을 이용하여, 지름 6 mm, 깊이 3 mm 크기의 손상을 유도하였다. 손상된 부위의 골 부속물을 식염수를 이용하여 제거하였다. 용출되는 골수를 거즈로 지혈한 후 2% HA (hyaluronic acid)에 거즈를 제거하는 동시에 하기 표 2에 나타난 조건으로 손상 부위에 주입하였다. 인터루킨-8(IL-8)과 miR449a 억제제는 각각 2.5 ug/site, 100 nM/site의 농도로 사용하였으며, 지지체를 포함한 최종 볼륨은 120 ul를 초과하지 않았다. 주입 후 무릎뼈를 원상 복귀한 후 내피를 나일론 4호 수술실을 이용하여 봉합하고 외피를 나일론 3호를 이용하여 봉합하였다. 봉합된 부위는 포비돈을 이용하여 재소독하였으며, 빠른 회복을 위하여 37°C warm-plate에서 30분간 회복기간을 주었다. 8주간 연골조직 재생을 유도하였다.

표 2

[0082]

구분	처리군
비교예 1	무처리
비교예 2	하이드로겔(hydrogel)
비교예 3	2.5ug/site 인터루킨--8(IL-8)
비교예 4	2.5ug/site 인터루킨-8(IL-8)+ 100nM/site 항-miRSC LNA 프로브(LNA-anti-miRSC)
비교예 5	100nM/site 항-miR449a LNA 프로브(LNA-anti-miR449a)
비교예 6	중간엽 줄기세포(MSC)
실시에 1	2.5ug/site 인터루킨-8(IL-8)+ 100nM/site 항-miR449a LNA 프로브(LNA-anti-miR449a)
LNA-anti-miR449a(Qiagen (Exiqon, CA,USA))의 서열 정보: 5' - CTAACAATACACTGCC - 3'(서열번호 4)	
LNA-anti-miRSC(Qiagen (Exiqon, CA,USA))의 서열 정보: 5' - ACGTCTATACGCCCA - 3'(서열번호 5)	

[0084] 2.2. 연골조직 재생 효율 분석

[0085] 본 발명에 따른 인터루킨-8과 miR449a 억제제의 처리가 연골조직 재생에 미치는 영향을 확인하기 위하여 골연골 손상 모델의 무릎뼈 부분을 회수하여 그 사진을 도 5에 나타내었다. 또한, 회수한 무릎뼈 부분을 파라핀으로 포매하고, 미세절단한 다음 콜라겐 합성 정도를 평가하기 위하여 메이슨 트리콤 염색(Masson's trichrome staining)을 수행하고, 글루코사미노글리칸(glucosaminoglycan, GAG)의 합성 정도를 평가하기 위하여 사프라닌-0로 염색한 후, 대조 염색으로는 패스트 그린(Fast green)을 사용하였다. 각 염색 후 사진은 도 6에 나타내었다. 또한, 조직학적 분석을 위하여, 3명의 전문가가 O'Driscoll scoring system을 통해서 연골의 조직

재생, 형태 및 두께를 평가한 뒤 그 평균값을 도 7에 그래프로 나타내었다.

[0086] 도 5에서 보는 바와 같이 본 발명에 따라 인터루킨-8(IL-8)과 miR449a 억제제(LNA-anti-miR449a)를 함께 골연골 손상 부위에 주입한 경우는, 이들을 단독으로 주입한 경우에 비하여 연골 재생 정도가 현저히 뛰어난 것을 육안으로 관찰할 수 있었다. 뿐만 아니라 상기와 같이 인터루킨-8(IL-8)과 miR449a 억제제(LNA-anti-miR449a)를 동시에 주입한 경우는, 하이드로겔(hydrogel) 또는 중간엽 줄기세포(MSC)를 주입한 경우나, miR449a 억제제(LNA-anti-miR449a) 대신에 항-miRSC LNA 프로브(LNA-anti-miRSC)를 인터루킨-8(IL-8)과 함께 주입한 경우에 비하여도 연골 재생 효과가 현저히 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

[0087] 또한, 도 6에서 보는 바와 같이 재생된 손상연골 부위를 조직학적 염색을 이용하여 분석한 결과, 본 발명에 따라 인터루킨-8(IL-8)과 miR449a 억제제(LNA-anti-miR449a)를 함께 골연골 손상 부위에 주입한 경우는 이들을 각각 단독으로 주입한 경우나, 하이드로겔(hydrogel), 중간엽 줄기세포(MSC) 또는 인터루킨-8(IL-8)과 항-miRSC LNA 프로브(LNA-anti-miRSC)를 주입한 경우에 비하여 재생된 부위가 정상 조직에서와 가장 유사하게 표면이 매끄럽고, 연골 세포가 규칙적으로 분포하는 것을 확인할 수 있었으며, 글루코사미노글리칸(GAG) 또한 높은 수준으로 발현된 것을 볼 수 있었다.

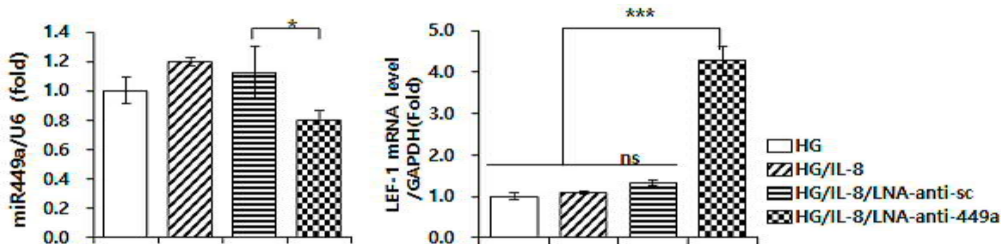
[0088] 도 7에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따라 인터루킨-8(IL-8)과 miR449a 억제제(LNA-anti-miR449a)를 함께 골연골 손상 부위에 주입한 경우가 이들을 각각 단독으로 주입한 경우나, 하이드로겔(hydrogel), 중간엽 줄기세포(MSC) 또는 인터루킨-8(IL-8)과 항-miRSC LNA 프로브(LNA-anti-miRSC)를 주입한 경우에 비하여 O'Driscoll 조직학적 점수가 3배 이상으로 현저히 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0089] 이를 통하여 본 발명에 따른 인터루킨-8(IL-8) 및 miR449a 억제제(LNA-anti-miR449a)의 혼합 조성물은 인 비보(in vivo)에서도 골 조직 또는 연골 조직의 재생 효과가 매우 뛰어난 것을 알 수 있다.

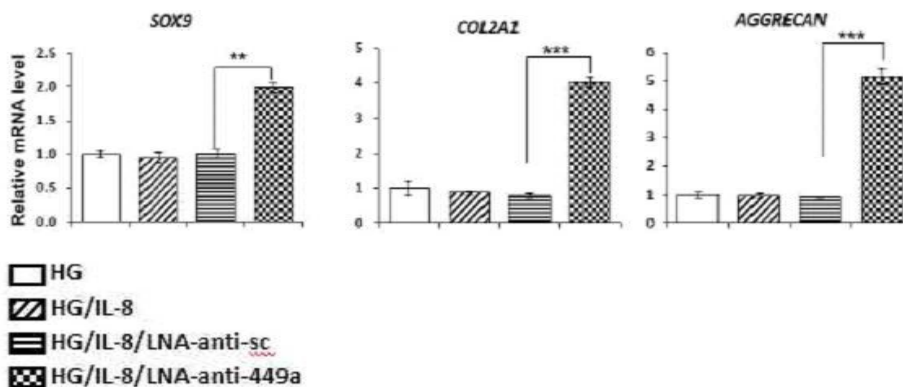
[0090] 이상에서 본 발명의 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

도면

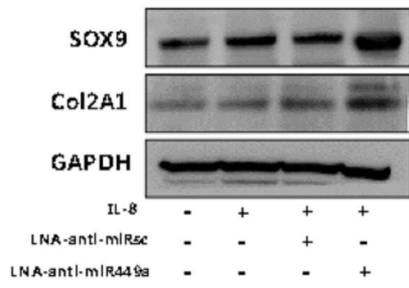
도면1



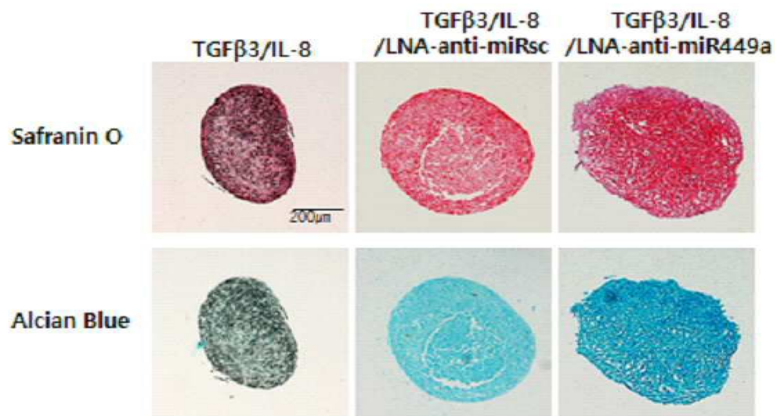
도면2



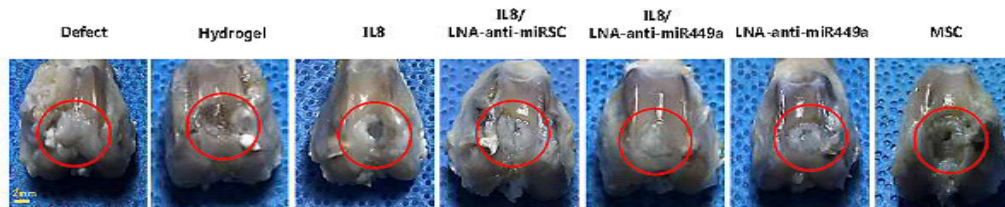
도면3



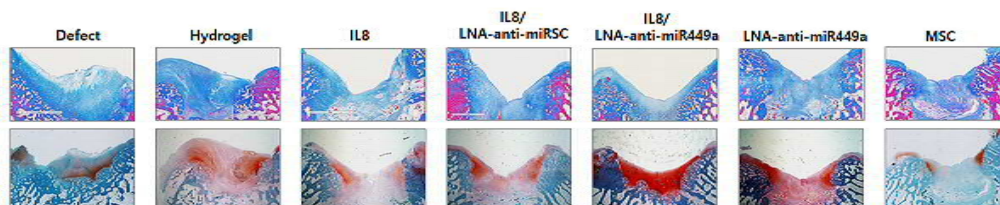
도면4



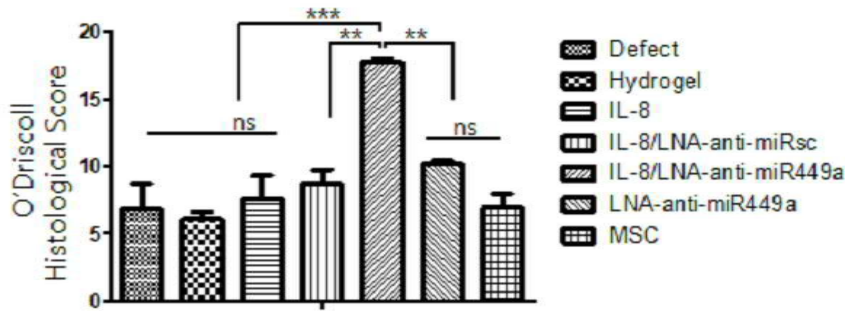
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Pharmaceutical composition for regenerating cartilage comprising interleukin-8 and LNA-anti-miR449a
- <130> DPB173564
- <160> 5
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 3211
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

gagggtgcat aagtctctta gtagggatgat gatataaaaa gccaccggag cactccataa      60
ggcacaaaact ttcagagaca gcagagcaca caagcttcta ggacaagagc caggaagaaa      120
ccaccggaag gaaccatctc actgtgtgta aacatgactt ccaagctggc cgtggctctc      180

ttggcagcct tctgatttc tgcagctctg tgtgaaggta agcacatctt tctgacctac      240
agcgttttcc tatgtctaaa tgtgatcctt agatagcaaa gctattcttg atgctttggt      300
aacaacatc cttttattc agaaacagaa tataatctta gcagtcaatt aatgttaaat      360
tgaagattta gaaaaaacta tatataaacac ttaggaaagt ataaagttg atcaatatag      420
atattctgct tttataattt ataccatgta gcattgatat atttaacgta aataagtaat      480
ttatagtatg tctattgag aaccacgggt acctatatta tgtattaata ttgagttgag      540
caaggtaact cagacaattc cactccttgt agtatttcat tgacaagcct cagatttgtc      600

attaattcct gtctggttta aagataccct gattatagac caggcatgta taacttattt      660
atatatttct gtttaattctt tctgaaggca atttctatgc tggagagtct tagcttgccct      720
    
```

actataaata acactgtggt atcacagagg attatgcaat attgaccaga taaaaatacc 780  
atgaagatgt tgatattgta caaaaagaac tctaactctt tataataggaa gtcgttcaat 840  
gttgtcagtt atgactgttt tttaaaacaa agaactaact gaggtcaagg gctaggagaa 900  
tattcaggaa tgagttcact agaaacatga tgccttccat agtctccaaa taatcatatt 960  
ggaattagaa aggaagtagc tggcagagct gtgcctgttg ataaaatcaa tccttaatca 1020

ctttttcccc caacagggtgc agttttgcca aggagtgcta aagaacttag atgtcagtgc 1080  
ataaagacat actccaaacc tttccacccc aaatttatca aagaactgag agtgattgag 1140  
agtggaccac actgcgcca cacagaaatt atgtaagtac tttaaaaaag attagatatt 1200  
ttgttttagc aaacttaaaa ttaaggaagg tggaaatatt taggaaagt ccagggttta 1260  
ggattacagt agtaaatgaa acaaaacaaa ataaaaatatt ttgtctacat gacatttaaa 1320  
tatggtagct tccacaacta ctataaatgt tttttggac ttagacttta tgctgactt 1380  
aaggaatcat gatttgaatg caaaaactaa atattaatct gaaccatttc tttcttattt 1440

cagtgtaaag ctttctgatg gaagagagct ctgtctggac cccaaggaaa actgggtgca 1500  
gagggttgtg gagaagtttt tgaagaggta agttatatat ttttaattt aaatttttca 1560  
tttatcctga gacatataat ccaaagtcag cctataaatt tcttctgtt gctaaaaatc 1620  
gtcattaggt atctgccttt ttggttaaaa aaaaaaggaa tagcatcaat agtgagtttg 1680  
ttgtactcat gaccagaaag accatacata gtttggccag gaaattctgg gtttaagctt 1740  
gtgtcctata ctcttagtaa agttctttgt cactcccagt agtgcctat ttagatgat 1800  
aatttctttg atctccctat ttatagtga gaatatagag catttctaac acatgaatgt 1860

caaagactat attgactttt caagaaccct actttccttc ttattaaca tagctcatct 1920  
ttatatTTTT aattttattt taggctgag aattcataaa aaaattcatt ctctgtgta 1980  
tccaagaate agtgaagatg ccagtgaac ttcaagcaaa tctacttcaa cacttcatgt 2040  
attgtgtggg tctgtttag ggttgccaga tgcaatacaa gattcctggt taaattttaa 2100  
tttcagtaaa caatgaatag ttttctattg taccatgaaa tatccagaac atacttatat 2160  
gtaaagtatt atttatttga atctacaaaa aacaacaat aatttttaa tataaggatt 2220  
ttcctagata ttgcacggga gaatatacaa atagcaaat tgaggccaag ggccaagaga 2280

atatccgaac ttaatttca ggaattgaat gggtttgcta gaatgtgata ttgaagcat 2340  
cacataaaaa tgatgggaca ataaattttg ccataaagtc aaatttagct ggaaatcctg 2400  
gatttttttc tgttaaatct ggcaacccta gtctgctagc caggatccac aagtccttgt 2460  
tccactgtgc ctgggtttct cctttatttc taagtggaaa aagtattagc caccatctta 2520  
cctcacagtg atgttgtgag gacatgtgga agcacttta gtttttcat cataacataa 2580

attattttca agigtaactt attaacctat ttattattta tgtattttatt taagcatcaa 2640  
 atattttgtgc aagaatttgg aaaaatagaa gatgaatcat tgattgaata gttataaaga 2700

tgttatagta aattttatfff attttagata ttaaattgatg ttttattaga taaatttcaa 2760  
 tcagggtttt tagattaaac aaacaacaa ttgggtaccc agttaaatff tcatttcaga 2820  
 taaacaacaa ataatttttt agtataagta cattattggtt tatctgaaat ttttaattgaa 2880  
 ctaacaatcc tagtttgata ctcccagtct tgcattgcc agctgtgttg gtagtgctgt 2940  
 gttgaattac ggaataatga gttagaacta ttaaacacgc caaaactcca cagtcaatat 3000  
 tagtaatttc ttgctggttg aaacttgttt attatgtaca aatagattct tataatatta 3060  
 tttaaatgac tgcattttta aatacaaggc tttatatttt taactttaag atgtttttat 3120

gigctctcca aatttttttt actgtttctg attgtatgga aatataaaag taaatatgaa 3180  
 acatttaaaa tataatttgt tgtcaaagta a 3211

<210> 2  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial sequence  
 <400> 2

Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro  
 1 5 10 15  
 Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro  
 20 25 30

His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu  
 35 40 45  
 Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys  
 50 55 60  
 Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser  
 65 70

<210> 3  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

uggcagugua uuguuagcug gu	22
<210> 4	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial sequence	
<400> 4	
ctaacaatac actgcc	16
<210> 5	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial sequence	
<400> 5	
acgtctatac gccca	15