(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 12 월 18 일 (18.12.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/200237 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005063

(22) 국제출원일: 2014 년 6 월 10 일 (10.06.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0066575 2013 년 6 월 11 일 (11.06.2013) KR

(71) 출원인: **아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 443-749 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **민병현 (MIN, Byoung Hyun)**; 137-865 서울시 서초구 효령로 68 길 33, 101 동 201 호, Seoul (KR). **박소라 (PARK, So Ra)**; 400-711 인천시 중구 인항로 27 인하대학병원 의과대학 생리학교실, Incheon (KR). **최병현 (CHOI, Byung Hyune)**; 463-977 경기도 성남시 분당구 판교원로 82 번길 30, 1305 동 2401 호, Gyeonggi-do (KR). **트루민융 (TRUONG, Minh Dung)**; 443-749 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동) 아주대학교 의생명과학관 1 층 세포치료센터, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM)**; 153-803 서울시 금천구 가산디지털 1 로 151 이노플렉스 1 차 601 호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

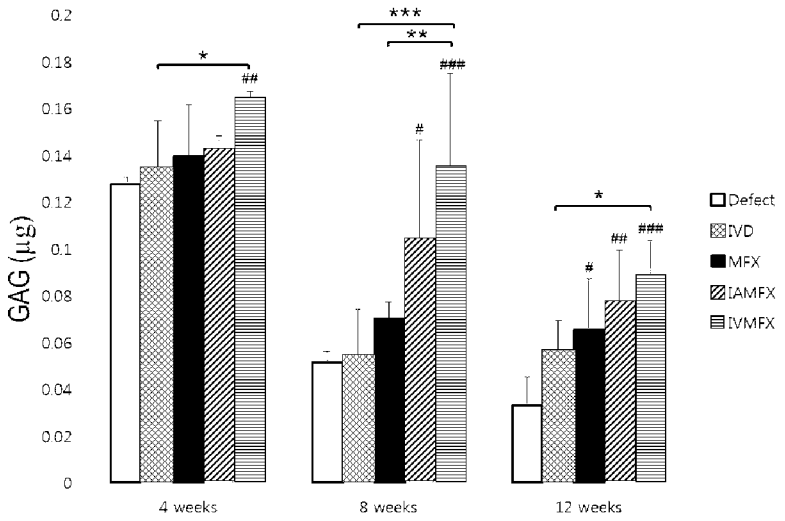
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) **Title**: COMPOSITION FOR REGENERATIVE TREATMENT OF CARTILAGE DAMAGE

(54) **발명의 명칭** : 연골손상 재생 치료용 조성물



(57) **Abstract**: The present invention relates to a composition containing a granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) as an active ingredient for regenerative treatment of cartilage damage. More specifically, the GM-CSF is characterized by being at least one selected from the group consisting of a GM-CSF full-length gene, a GM-CSF gene subdomain, proteins expressed by the genes, and cells transformed to express the genes. In addition, the composition is characterized by being administered by treating the transplant at the time of bone marrow transplantation (BMT) or stem cell transplantation. Therefore, the GM-CSF is expected to be applicable as a regenerative treatment agent of damaged cartilage.

(57) **요약서**: 본 발명은 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)를

[다음 쪽 계속]

WO 2014/200237 A1

유효성분으로 포함하는 연골손상 재생 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 상기 GM-CSF 는 GM-CSF 전장 유전자, GM-CSF 유전자 절편(subdomain), 상기 유전자들로부터 발현되는 단백질 및 상기 유전자들을 발현하도록 형질전환된 세포로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 조성물은 골수이식술 (bone marrow transplantation; BMT) 또는 줄기세포이식술 (stem cell transplantation) 시술 시 이식물에 처리하여 투여되는 것을 특징으로 한다. 따라서 상기 이를 통해 상기 GM-CSF 는 손상된 연골의 재생 치료제로 응용 가능할 것으로 보인다.

명세서

발명의 명칭: 연골손상 재생 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 연골손상 재생 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 관절(articular) 또는 초자(hyaline) 연골은 무혈관으로 이루어졌고, 매우 평평한 표면과 점탄성체(viscoelastic)의 성질을 가진 환상(aneural) 조직이다. 관절연골의 기능은 관절에 있어서 두 뼈 사이의 원활한 상호작용을 하게 한다. 따라서, 손상을 입으면 관절 이동 유동성에 있어서 장애를 일으킨다. 연골 손상이 재생되지 않는 주요 이유 중 하나는 특이적인 무혈관성으로 인해 손상된 부위에서의 충분한 충전 세포(packed cells)의 보충이 부족하기 때문이다. 그러므로, 손상 부위로 세포들을 전달하는데 초점을 맞춰 많은 노력을 기울이고 있다.

[3] 미세골절술(Microfracture technique; MFx)은 가장 잘 알려진 연골 손상의 임상치료법이다. MFx는 골수로부터 다양한 성장 인자/사이토카인 및 여러 종류의 세포를 포함하는 혈병(blood clot)의 배출을 유도함으로써 손상된 연골 조직의 재생을 돕는다. MFx 기술은 환자에게 최소한의 침습을 야기하여 기존에 마땅한 치료법이 없기 때문에 현재 임상적으로 연골 손상에 대한 1차 치료요법으로 고려되고 있다. 하지만, MFx에 의해 재생된 조직은 주로 비구조적이고, 빈약한 물리적 성질을 갖는 섬유연골(fibrocartilages)로 이루어지는 한계가 있다. 또한, MFx 치료에 대한 과학적 기전이 완전히 밝혀지지 않았고, 다른 외과 수술에 비해 치료 효능의 장점을 주장하거나 반박하기 위한 임상적 연구도 많이 이루어지지 않은 형편이다.

[4]

[5] 한편, 한국특허출원 제10-2008-0092917호는 과립성 백혈구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 유효성분으로서 포함하는 손상된 조직의 상흔 형성 억제제에 대해 개시하고 있지만, GM-CSF의 연골손상 재생과 같은 의학적 용도를 전혀 개시하거나 인식하지 못하고 있으므로 본 발명과는 상이하다.

[6]

[7] 따라서, 본 발명자들은 세포분열(mitogenic) 반응뿐만 아니라 세포방어(cytoprotective) 및 면역-향상 활성을 가지는 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)를 사용함으로써 MFx의 치료 효과가 향상될 것이라고 예상하였다. 이전 연구에 의하면, TGF-β와 같은 사이토카인 및 성장 인자들이 MFx에 사용되었는데, 이는 줄기세포의 연골세포로의 분화 및 연골 매트릭스 분자의 생산을 유도할 수 있었다. 하지만, 세포 방어 및 면역 조절 활성을 나타낼 수 있는 사이토카인을

활용한 연구는 본 발명이 최초이다. 본 발명자들은 연골 손상된 토끼 모델에서 미세골절술 후, 연골 재생에 있어서 GM-CSF의 정맥(intravenous; IV) 또는 관절 내(intra-articular; IA) 주사의 효과에 대해 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명은 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)를 유효성분으로 포함하는 연골손상 재생 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)를 유효성분으로 포함하는 연골손상 재생 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[10] 본 발명의 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)를 유효성분으로 포함하는 연골손상 재생 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 연골 손상된 토끼 모델에서 미세골절술 후, 연골 재생에 있어서 GM-CSF의 정맥(intravenous; IV) 또는 관절 내(intra-articular; IA) 주사의 효과에 대해 확인하였다. 이를 통해 상기 GM-CSF는 손상된 연골의 재생 치료제로 응용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[11] 도 1은 수술 후 4, 8, 12 주에 손상 부위에서 재생된 조직의 sulfated GAGs 조사 결과이다. (a, f, k) 손상 그룹; (b, g, l) IVD 그룹; (c, h, m) MFX 그룹; (d, i, n) IAMFX 그룹; (e, j, o) IVMFX 그룹 및 (p) 정상 연골.

[12] 도 2는 수술 후 4, 8, 12 주에 손상 부위에서 재생된 조직의 조직학적 관찰 결과이다(H&E 염색). (a, f, k) 손상 그룹; (b, g, l) IVD 그룹; (c, h, m) MFX 그룹; (d, i, n) IAMFX 그룹; (e, j, o) IVMFX 그룹 및 (p) 정상 연골.

[13] 도 3은 수술 후 4, 8, 12 주에 손상 부위에서 재생된 조직의 콜라겐 구조를 관찰한 이다(picro sirius-red 염색). (a, f, k) 손상 그룹; (b, g, l) IVD 그룹; (c, h, m) MFX 그룹; (d, i, n) IAMFX 그룹; (e, j, o) IVMFX 그룹 및 (p) 정상 연골.

[14] 도 4는 수술 후 4, 8, 12 주에서의 조직학적 결과에 대한 국제 연골 재생학회(International Cartilage Repair Society; ICRS) 점수를 나타내는 정량 그래프이다. ICRS 조직학 점수는 다음 7개의 파라미터로 체계적으로 평가된다. (1) 세포 형태, (2) 매트릭스-염색, (3) 구조적 안정성(structural integrity), (4) 표면 규칙성(surface regularity), (5) 연골의 두께, (6) 재생된 연골하골, 및 (7) 인접 연골과의 통합성. 데이터는 평균±SD(표준편차)로서 표시하였다. (각 비교군에 대해 *$p<0.05$, **$p<0.01$ 및 ***$p<0.001$; ###$p<0.001$ *v.s* 손상 그룹)

[15] 도 5는 수술 후 4, 8, 12 주에 손상 부위에서 재생된 조직의 sulfated GAGs의

함량을 화학적 방법으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다(화학적 분석-GAG 함량). 손상 그룹과의 비교한 IVD, MFX, IAMFX 및 IVMFX 그룹에서 새롭게 재생된 조직에서의 GAG 함량을 나타낸다. 데이터는 평균±SD(표준편차)로서 표시하였다. (각 비교군에 대해 *p<0.05, **p<0.01 및 ***p<0.001; ###p<0.001 *v.s* 손상 그룹)

[16] 도 6은 투여 후 GM-CSF 이동성을 나타낸다. MFX, IAMFX 및 IVMFX 처리 후에 수확된 골수에서 GM-CSF의 농도를 측정하기 위해서 ELISA 방법이 사용되었다. 데이터는 평균±SD(표준편차)로서 표시하였다. (각 비교군에 대해 *p<0.05, **p<0.01 및 ***p<0.001; ###p<0.001 *v.s* 손상 그룹)

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[17] 본 발명은 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)를 유효성분으로 포함하는 연골손상 재생 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상세하게는 상기 GM-CSF는 GM-CSF 전장 유전자, GM-CSF 유전자 절편(subdomain), 상기 유전자들로부터 발현되는 단백질 및 상기 유전자들을 발현하도록 형질전환된 세포로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[18]

[19] 대식세포-콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF) 유전자 및 단백질 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 에 등록되어 있다 (GeneID: 1437 , NM_000758.3).

[20]

[21] 또한, 상기 조성물은 미세골절술(Microfracture technique; MFx), 소파관절성형술 (abrasion arthroplasty), 천공술 (drilling), 골수이식술 (bone marrow transplantation; BMT) 및 줄기세포이식술 (stem cell transplantation)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 시술시 투여되는 것이 바람직하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[22] 상세하게는, 상기 투여는 정맥 (intravenous; IV), 관절강 내 (intra-articular; IA), 손상 연골 (intra-defect) 내, 근육 내 (intramuscular; IM), 피하 (subcutaneous) 또는 복강 (intraperitoneal; IP)에 투여되는 것이 바람직하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[23]

[24] 또한, 상기 조성물은 골수이식술 (bone marrow transplantation; BMT) 또는 줄기세포이식술 (stem cell transplantation) 시술 시 이식물에 처리하여 투여되는 것을 특징으로 한다.

[25]

[26] 본 발명의 약학 조성물인 경우, 상기 약학 조성물은 상기 GM-CSF 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는데, 이러한 약제학적으로

허용되는 담체는 약품 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 약학적 조성물은 첨가제로서 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[27] 상기 약학적 조성물은 연골 손상의 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 본 발명의 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물 중 유효성분의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 환자의 나이, 성별, 체중 등에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[28] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[29]

[30] **< 실시예 >**

[31] 1. 동물실험

[32] 16주령 수컷 뉴질랜드 흰색 토끼(3.5±0.5kg; Joong-Ang Experimental Animal Center, Seoul, Korea)가 본 발명에 사용되었다. 75마리 토끼는 5 그룹으로 나뉘었다. 1 그룹(손상 그룹)은 연골하 골수 공간이 열리지 않은 미처리한 전층(full-thickness) 연골 손상을 가진 음성 대조군이었다. 2 그룹(MFX 그룹)은 MFx 치료한 그룹으로서, 전층 연골 손상 후, 연골하골(subchondral bone)에 MFx를 시술하여 혈괴(blood clot) 형성을 유도하였다. 3 그룹(IVD 그룹)은 전층 연골 손상 후 GM-CSF만 정맥(intravenous; IV) 주사하여 처리하였다. 4 그룹(IVMFX 그룹)은 전층 연골 손상 후 MFx 시술과 함께 GM-CSF를 정맥(IV) 주사하였으며, 5 그룹(IAMFX 그룹)은 전층 연골 손상 후 MFx 시술과 함께 GM-CSF를 관절강 내(intra-articular; IA)로 주사하였다.

[33] 수술 후 4, 8 및 12주에 토끼들은 희생되었다. 희생 후 즉시, 토끼의 오른쪽 및 왼쪽 무릎 관절을 수확하였다. 샘플은 4% 포르말린에서 고정하였고, 자일린으로 세척하기 전에 알코올 농도를 높여가며 연속적으로 탈수시켰다. 탈수된 샘플은 4㎛ 두께로 절단되었으며, 절단된 시료(tissue section)는 글리코스아미노글리칸(glycosaminoglycan; GAG) 분석을 위해 사프라닌-O(Safranin-O)로, 형태학적 분석을 위해 헤마톡실린 및

에오신(hematoxylin and eosin; H&E)으로, 총 콜라겐 분석을 위해 picro sirius-red로 염색되었다.

[34] 수술 과정은 zoletil 50 (50 mg/ml; Virbac laboratories, Carros, France) 및 xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer, Ansan, Korea) (Zoletil: Rompun = 1: 2)의 혼합액(0.2 ml/kg 몸무게)을 이용하여 토끼를 마취시킨 상태에서 수행되었다. 토끼의 무릎 부위의 털을 제거하고 소독(scrubbing) 및 방포(draping)한 후에, 상기 무릎 부위를 전방 중심선 종 절개(anterior midline longitudinal incision)를 통해 오픈하였다. 그 후, 무릎뼈를 측면으로 탈구하여 연골 조직을 완전히 노출하였다.

[35]

[36] 2. 미세골절술(Microfracture technique; MFx)

[37] 대퇴골 무릎연골조직 표면의 중앙에 5 mm 생검 펀치(Miltex, Inc., York, USA) 및 특이 큐렛(curette)을 이용하여, 5 mm 지름 및 0.2 mm 깊이의 전층(full-thickness) 연골을 손상시켰다. MFx 기술은 손상 부위에 미니-마이크로골절 송곳(mini-microfracture awl)을 이용하여 연골하골(subchondral bone)에 각 2.0-2.5 mm의 공간을 두고 3개의 구멍을 만들었다. 강철 합성물로 만들어진 스토퍼(stopper)를 가진 마이크로골절-송곳(microfracture-awls)이 3 mm 길이 및 1 mm 지름을 가진 MFx 구멍의 깊이를 조절하기 위해서 제작되었다.

[38]

[39] 3. GM-CSF 측정

[40] 투여 후에, GM-CSF가 골수 내로 전달되었는지 조사하기 위해 MFx에 의해 골수에서 유출된 혈병(blood clot) 내의 GM-CSF 농도를 효소-결합 면역흡착법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 이용하여 측정하였다. 인간 GM-CSF ELISA kit은 혈청에서 인간 GM-CSF의 정량적 측정을 위한 분석법이다. 이 분석법은 96-웰 플레이트 상에 코팅된 인간 GM-CSF에 대한 특이적 항체가 사용된다. 표준물질 및 샘플은 웰에 분주되었고, 샘플에 존재하는 GM-CSF는 면역화된 항체에 결합된다. 샘플을 씻어낸 후, 비오틴화된 항-GM-CSF 항체가 첨가되었다. 미결합 비오틴화된 항체를 제거하기 위해 세척한 후, HRP-접합 스트렙타비딘을 웰에 첨가하였고, 마지막으로 TMB 기질 용액을 웰에 첨가하였다. 샘플에 존재하는 GM-CSF와 결합하는 항체의 양에 따라 색깔이 노란색으로 변했으며, 색깔의 세기를 450 nm에서 측정하여 정량하였다.

[41]

[42] 4. 재생 조직에 대한 정량 분석

[43] 새로운 재생 조직에 대한 정량분석은 국제 연골재생학회(International Cartilage Repair Society; ICRS)에서 제시하는 방법에 따라 점수로 평가하여 수행하였다. ICRS 시각 조직학 점수는 다음 7개의 파라미터로 체계적으로 평가된다. (1) 세포 형태, (2) 매트릭스-염색, (3) 구조적 안정성(structural integrity), (4) 표면

규칙성(surface regularity), (5) 연골의 두께, (6) 재생된 연골하골, 및 (7) 인접 연골과의 통합성. 최고점은 18이고, 최저점은 0이다.

[44] 각 그룹에 있어서 수술 후 4, 8 및 12 주에, 샘플 및 정상 연골을 추출하였고, 동결건조기(IlShin Lab Co., Ltd, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 습윤 및 건조 중량에 따른 수분 함량을 측정하였다. 각 샘플은 파파인(papain)-절단 용액으로 절단되었다. 전체 DNA 함량은 Hoechst 33258 dye을 이용하여 측정하였다. 총 GAG 함량은 분광광도계를 이용한 1, 9-디메틸메틸렌 블루(1, 9-dimethylmethylene blue; DMB)를 이용한 색도측정법을 통해 측정하였으며, 표준시약으로는 상어 콘드로이틴 설페이트(chondroitin sulfate)을 이용하였다. 또한, 총 콜라겐 함량은 콜라겐 분석 키트를 사용하여 측정하였다(Biocolor, County Antrim, United Kingdom).

[45] 분석에 있어서, 통계적 유의성은 Tukey-Kramer test: 처리군과의 다중 비교(* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 및 *** $p<0.001$)와 함께 일원분산분석(one-way analysis of variance; ANOVA)으로 측정되었다. 데이터는 평균±SD(표준편차)로서 표시하였다.

[46]

[47] 5. 결과

[48] 도 1을 보면, GAG 분석을 위한 사프라닌-O 염색에 있어서, IVMFX 와 IAMFX 그룹에서는 4주째 손상된 연골조직이 초자연골(hyaline cartilage)과 유사한 조직으로 채워져 있었고, 12주째 연골의 구조가 잘 구성되어 있었다. 반면 MFX 그룹에서는 재생된 연골 조직이 가늘고 사프라닌-O 염색이 약하게 되었다. IVD 그룹에서는 재생 조직이 상당히 가늘었으며, 사프라닌-O에 의해 더 약하게 염색되었다. 손상 그룹에서는 오직 손상된 부위 중 극히 일부만 사프라닌-O에 의해 염색되어 가장 나쁜 결과를 보였다.

[49] 도 2에서는 재생된 연골 조직에 있어서의 세포 형태에 대해 H&E 염색을 통해 관찰하였다. 연골세포는 골소강(lacunae)에서 자랐으며, MFX, IAMFX 및 IVMFX 그룹에서 동형(isogenous) 골소강이 잘 형성되었다. 반대로, IVD 및 손상 그룹에서는 낮은 밀도로 나타났다.

[50] 도 3에 의하면, picro sirius-red 염색을 통해 재생 조직의 콜라겐 네트워크가 수술 후 4, 8 및 12주에 나타난다는 것을 확인하였다. IVMFX 및 IAMFX 그룹에 있어서, 재생 조직의 표면층(superficial layer), 중간층(transitional layer) 및 심층(deep layer) 부위에서 콜라겐 네트워크가 균일한 방향으로 잘 형성되었다. MFX 그룹에서는 재생 조직이 약한 구조 콜라겐 섬유 네트워크를 나타냈다. IVD 및 손상 그룹에서는 재생 조직이 구조 콜라겐 섬유 네트워크로 상당히 약하게 염색되었다.

[51] 도 4에서는 ICRS를 이용하여 정량적 조직학 점수를 얻었다. 수술 후 4, 8 및 12주에, 손상 그룹의 ICRS 점수 평균은 각각 (2.9±1.22), (4.2±1.72) 및 (5.0±1.73)으로 다른 그룹들에 비해 점수가 가장 낮았다($p < 0.001$). 수술 4주

후에는, IVD 그룹 (10.8±1.47)은 MFX (15.4±0.80), IAMFX (15.9±0.94) 및 IVMFX (16.3±1.19) 보다 크게 낮은 점수를 보였다($p < 0.001$). 수술 8주 후에는, IVMFX 그룹의 ICRS 점수 (16.4±1.11)가 IAMFX (10.8±1.99, $p < 0.001$), MFX (14.1±1.58, $p < 0.05$) 및 IVD (11.1±1.30, $p < 0.01$) 점수보다 더 높았다. 그러나, 수술 12주 후에는 IVMFX (13.0±2.24), IAMFX (10.5±3.01), MFX (11.8±2.04) 및 IVD (11.6±1.69) 사이에 유의적 차이성은 없었다($p > 0.05$).

[52] 도 5에서, GAG 함량에 대한 정량 분석에서, IVMFX 그룹은 수술 4, 8 및 12주 후에 가장 높은 GAG 함량을 나타냈다. IAMFX 그룹은 MFX, IVD 및 손상 그룹과 비교하여 GAG 함량이 증가되었으며, MFX 그룹은 IVD 및 손상 그룹보다는 GAG 함량이 높았다. IVD 그룹은 손상 그룹보다는 높은 GAG 함량을 보였으나, 다른 그룹에 비해 현저히 낮은 GAG 함량을 보였다.

[53] 도 6에서, MFx 후 유출된 골수 내(100ul)에 존재하는 GM-CSF 농도를 측정한 결과, MFX (585.11±189.91 pg) 그룹과 비교하여 IAMFX (9760.44±298.18 pg) 및 IVMFX (6176.22±1057.93 pg)에서 높게 발현되는 것으로 나타났다.

[54] IVMFX 그룹에서, GM-CSF의 농도가 MFX 보다 높았는데, 이러한 결과는 GM-CSF가 혈액 순환을 통해 이동할 수 있고, 골수에 전달될 수 있다는 것을 보여준다. 또한 GM-CSF 농도는 IAMFX에서도 증가하였는데, 이 역시 GM-CSF가 골수로 전달된다는 것을 나타낸다.

[55] 상기와 같은 결과는 GM-CSF 투여가 MFx 시술의 연골 재생효능을 높인다는 것을 나타낸다. GM-CSF는 정맥 주사한 경우와 관절강으로 주사한 경우 모두 유의한 효과를 보였다. 또한, GM-CSF를 단독으로 처리한 경우도 손상 그룹에 비해 어느 정도의 치료효과를 나타내었다. 따라서 GM-CSF를 함유한 치료용 조성물은 MFx와 함께 또는 단독으로 연골재생 치료제로 사용될 수 있을 것이다.

청구범위

[청구항 1] 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)를 유효성분으로 포함하는 연골손상 재생 치료용 약학 조성물.

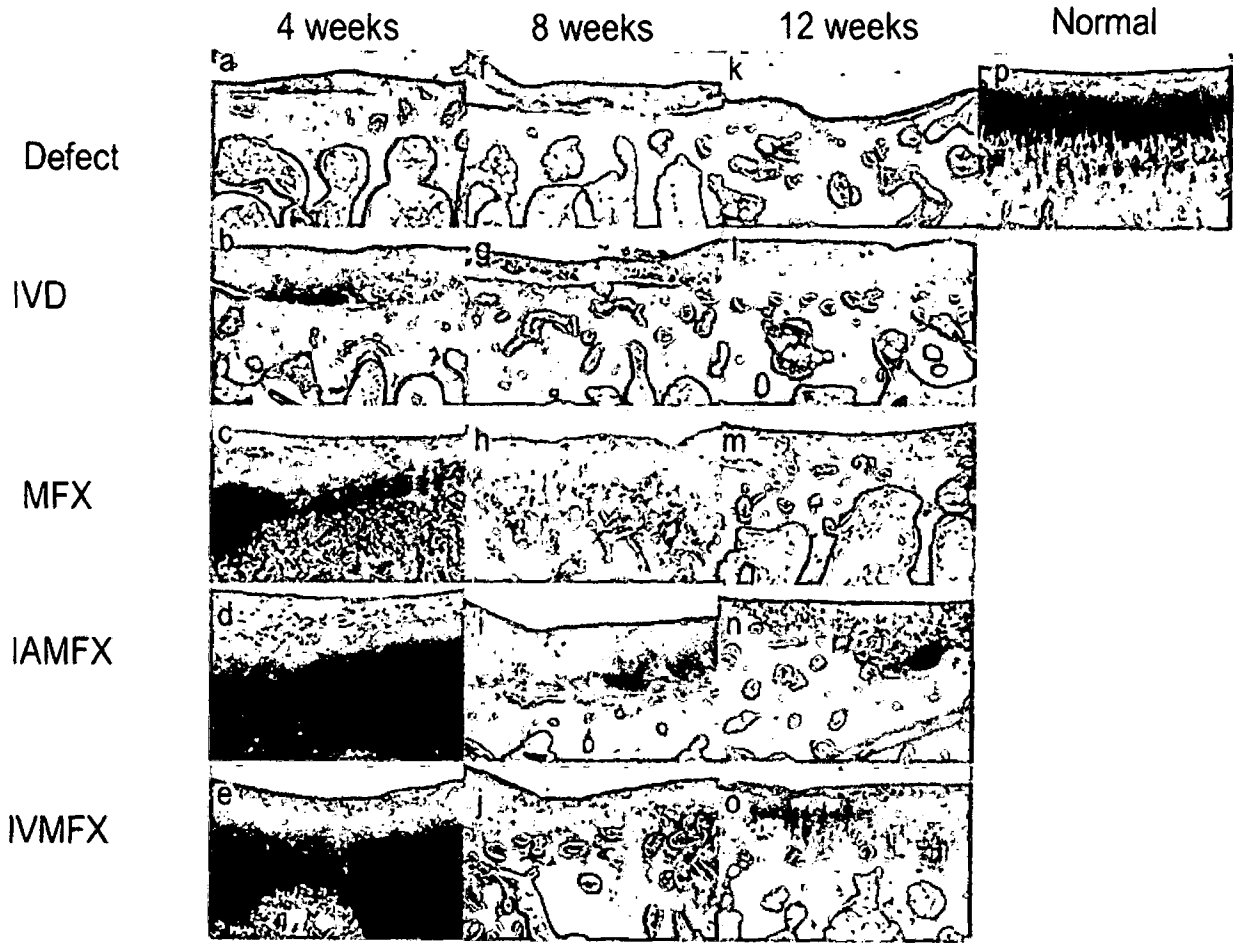
[청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 GM-CSF는 GM-CSF 전장 유전자, GM-CSF 유전자 절편(subdomain), 상기 유전자들로부터 발현되는 단백질 및 상기 유전자들을 발현하도록 형질전환된 세포로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 연골손상 재생 치료용 약학 조성물.

[청구항 3] 제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 조성물은 미세골절술(Microfracture technique; MFx), 소파관절성형술 (abrasion arthroplasty), 천공술 (drilling), 골수이식술 (bone marrow transplantation; BMT) 및 줄기세포이식술 (stem cell transplantation)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 시술시 투여되는 것을 특징으로 하는 연골손상 재생 치료용 약학 조성물.

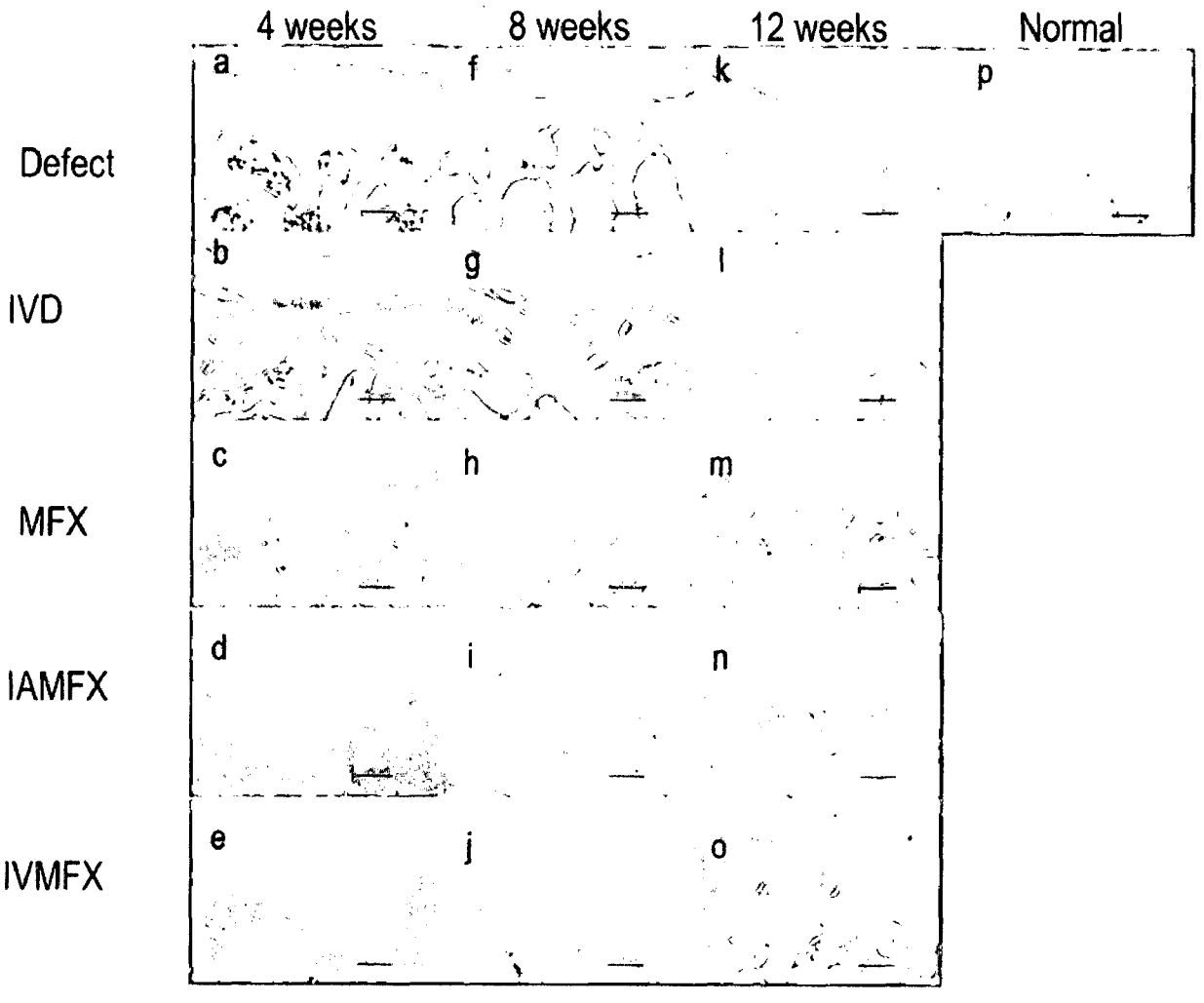
[청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 투여는 정맥 (intravenous; IV), 관절강 내 (intra-articular; IA), 손상 연골 (intra-defect) 내, 근육 내 (intramuscular; IM), 피하 (subcutaneous) 또는 복강 (intraperitoneal; IP)에 투여되는 것을 특징으로 하는 연골손상 재생 치료용 약학 조성물.

[청구항 5] 제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 조성물은 골수이식술 (bone marrow transplantation; BMT) 또는 줄기세포이식술 (stem cell transplantation) 시술 시 이식물에 처리하여 투여되는 것을 특징으로 하는 연골손상 재생 치료용 약학 조성물.

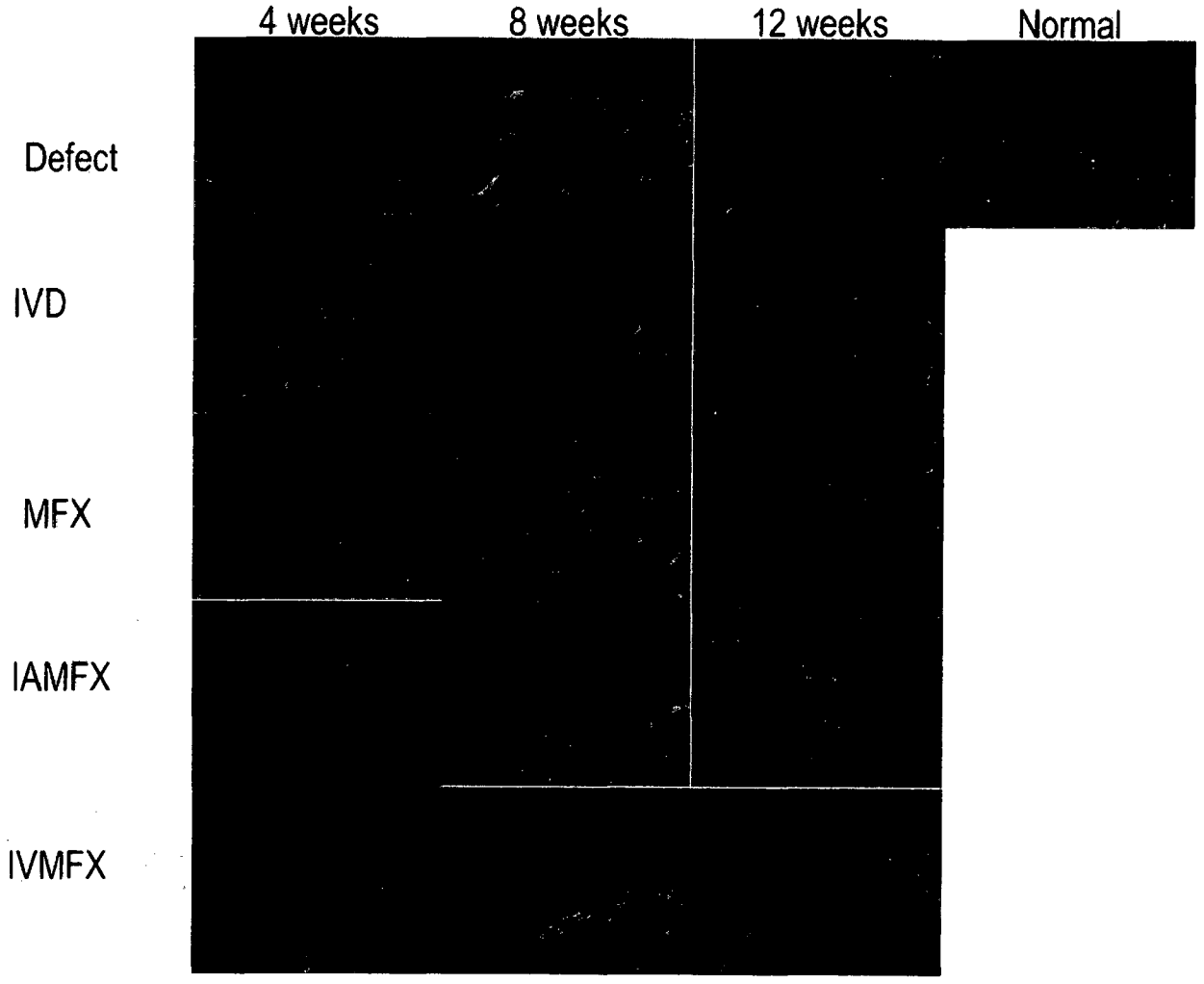
[Fig. 1]


4 weeks
8 weeks
12 weeks
Normal
Defect
IVD
MFX
IAMFX
IVMFX
a
f
k
p
b
g
l
q
c
h
m
r
d
i
n
s
e
j
o
t

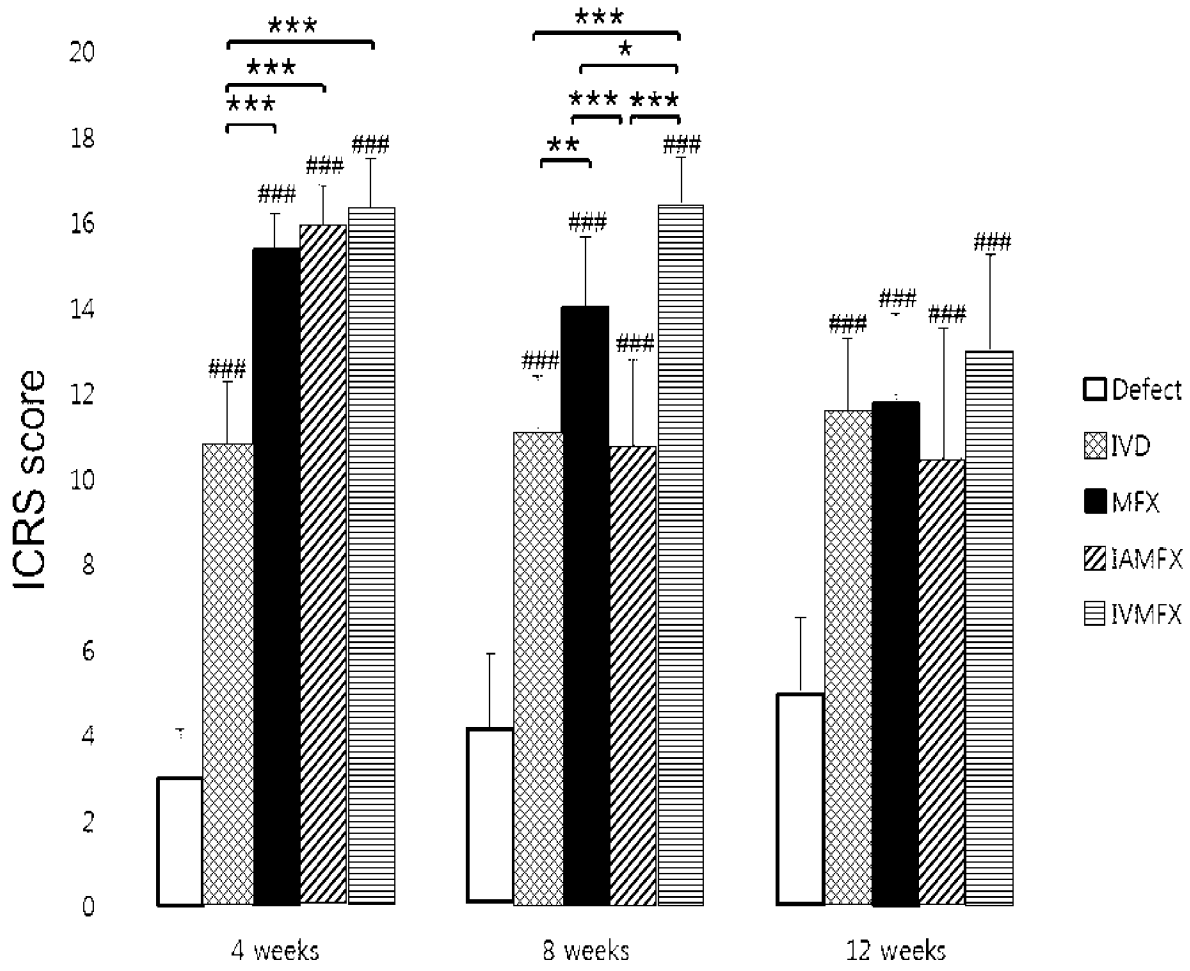
[Fig. 2]


4 weeks
8 weeks
12 weeks
Normal
Defect
IVD
MFX
IAMFX
IVMFX
a
f
k
p
b
g
l
c
h
m
d
i
n
e
j
o

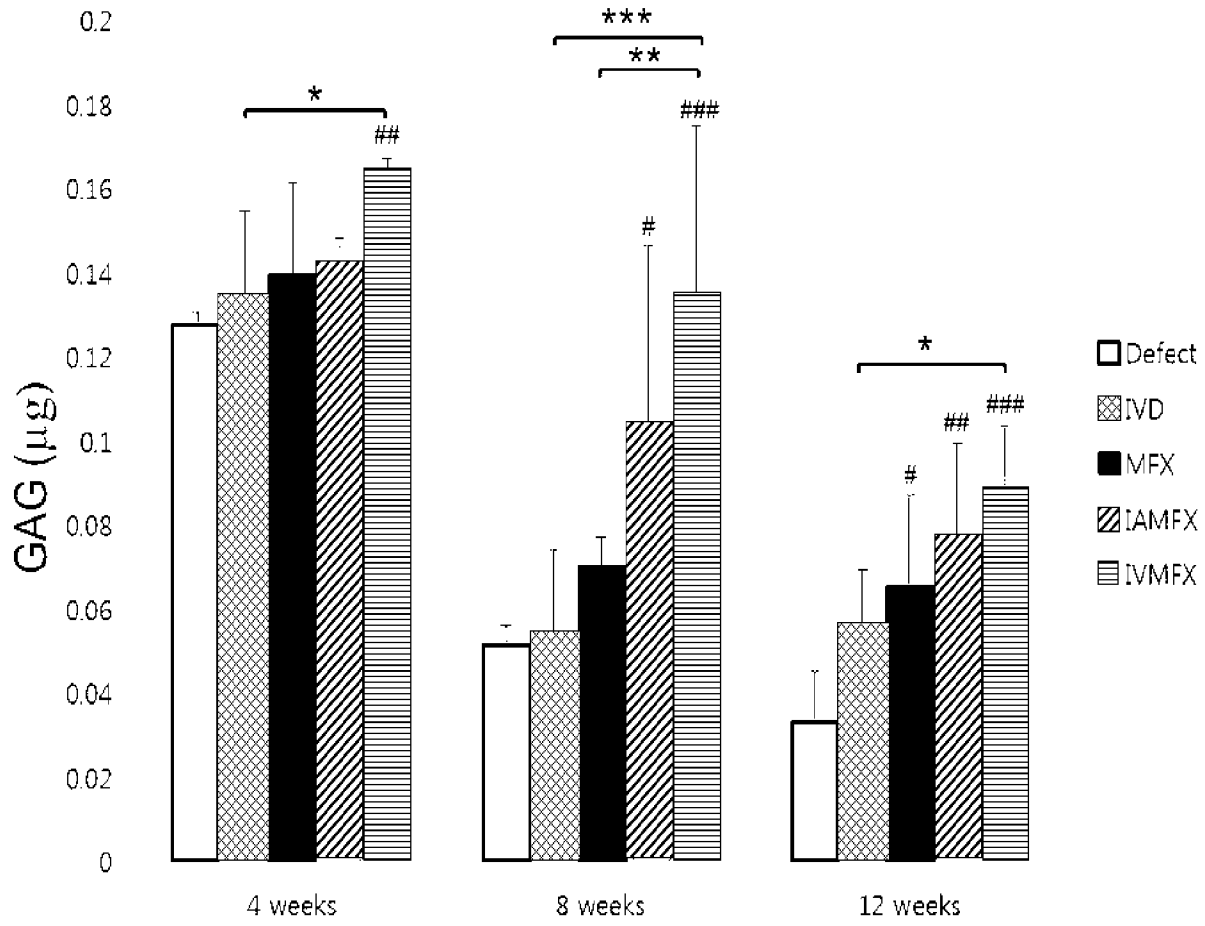
[Fig. 3]



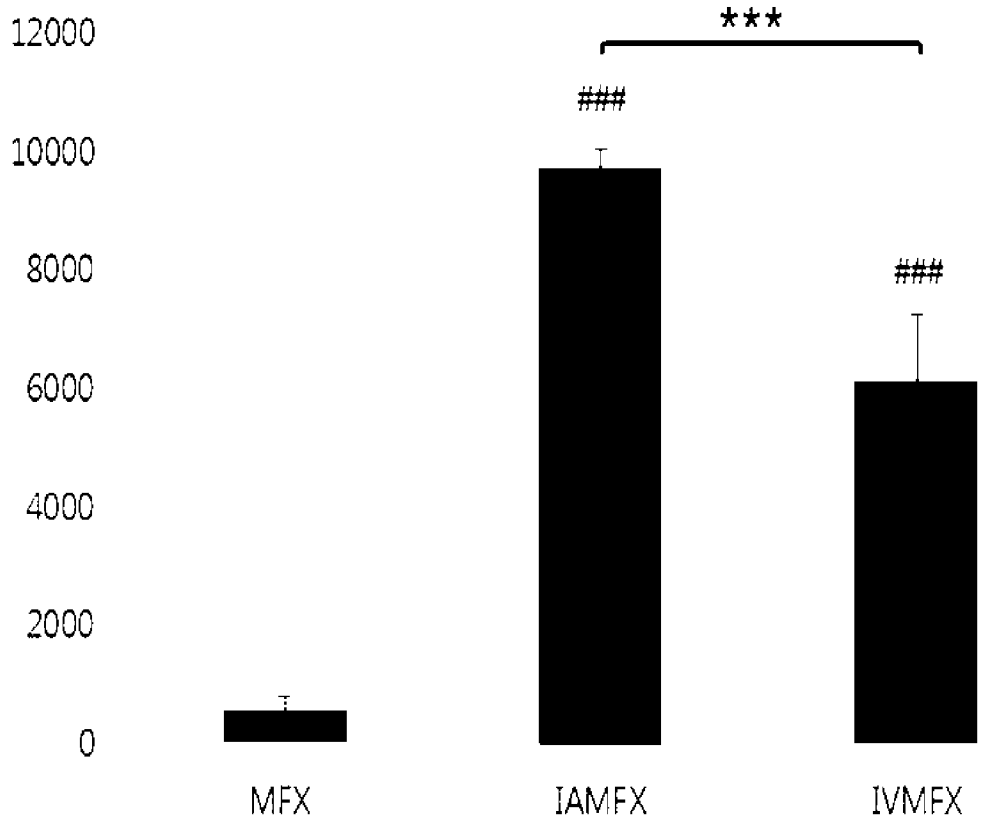
[Fig. 4]


ICRS score
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
4 weeks
8 weeks
12 weeks
Defect
IVD
MFX
IAMFX
IVMFX

[Fig. 5]


0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
GAG (μg)
*
**
***
##
#
###
4 weeks
8 weeks
12 weeks
Defect
IVD
MFX
IAMFX
IVMFX

[Fig. 6]


12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
***
###
###
MFX
IAMFX
IVMFX

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/005063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 38/19(2006.01)i, A61P 19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 48/00; A61L 27/44; A61K 9/50; A61K 9/16; A61L 27/56; A61L 27/20; A61K 38/18; A61K 38/19; A61P 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF, cartilage injury repair, Microfracture technique; MFx, bone marrow transplantation; BMT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Quintero M. et al., "Granulocyte-macrophage colony stimulating factor activates proteoglycan, type II collagen, and cAMP production by rat articular chondrocytes through specific binding sites.", J. Rheumatol., vol. 28(9), pases 2075-2084 (September 2001) See abstract	1-5
A	WO 2011-060554 A1 (CORPORATION DE L'ECOLE POLYTECHNIQUE DE MONTREAL et al.) 26 May 2011 See the entire document	1-5
A	KR 10-1270161 B1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 31 May 2013 See the entire document	1-5
A	A. Marmotti et al., "Human cartilage fragments in a composite scaffold for single-stage cartilage repair: an in vitro study of the chondrocyte migration and the influence of TGF-b1 and G-CSF", Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, vol. 21, pages 1819-1833 (10 November 2012) See the entire document	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 SEPTEMBER 2014 (25.09.2014)	**25 SEPTEMBER 2014 (25.09.2014)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/005063

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2011-060554 A1	26/05/2011	NONE	
KR 10-1270161 B1	31/05/2013	KR 20110118859 A	02/11/2011
		US 2011-0263018 A1	27/10/2011

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/005063

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 38/19(2006.01)i, A61P 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 48/00; A61L 27/44; A61K 9/50; A61K 9/16; A61L 27/56; A61L 27/20; A61K 38/18; A61K 38/19; A61P 19/00

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: GM-CSF, 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자, 연골손상 재생,미세골절술, 골수이식술

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Quintero M. 외 5명, “Granulocyte-macrophage colony stimulating factor activates proteoglycan, type II collagen, and cAMP production by rat articular chondrocytes through specific binding sites.”, J. Rheumatol., Vol. 28(9), pases 2075-2084 (2001.9.) 요약 참고	1-5
A	WO 2011-060554 A1 (CORPORATION DE L`ECOLE POLYTECHNIQUE DE MONTREAL 외 5명) 2011.05.26 전문 참고	1-5
A	KR 10-1270161 B1 (한국과학기술연구원) 2013.05.31 전문 참고	1-5
A	A. Marmotti 외 8명, "Human cartilage fragments in a composite scaffold for singlestage cartilage repair: an in vitro study of the chondrocyte migration and the influence of TGF-b1 and G-CSF", Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, Vol. 21, pages 1819-1833 (2012.11.10.) 전문 참고	1-5

☐ 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

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 09월 25일 (25.09.2014)	2014년 09월 25일 (25.09.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
정의준
전화번호 +82-42-481-8148

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/005063

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2011-060554 A1	2011/05/26	없음	
KR 10-1270161 B1	2013/05/31	KR 20110118859 A	2011/11/02
		US 2011-0263018 A1	2011/10/27