



- (51) 국제특허분류:
A61K 38/10 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002502
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 14일 (14.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0034227 2015년 3월 12일 (12.03.2015) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로 55길 48, Seoul (KR). 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김상준 (KIM, Sang Jun); 13613 경기도 성남시 분당구 정자일로 55, 107동 504호, Gyeonggi-do (KR). 정영미 (JUNG, Young Mee); 01122 서울시 강북구 삼양로 256, 104동 702호, Seoul (KR). 김수현 (KIM, Soo Hyun); 06519 서울시 서초구 잠원로 136, 345동 706호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, 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, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

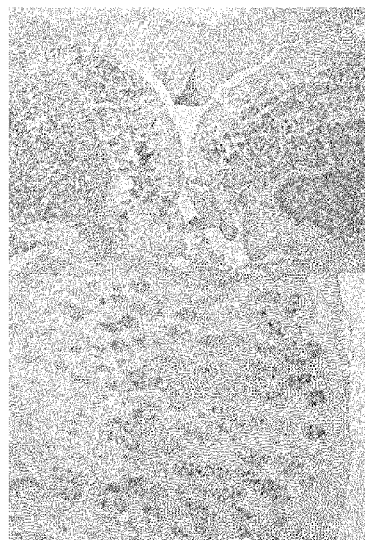
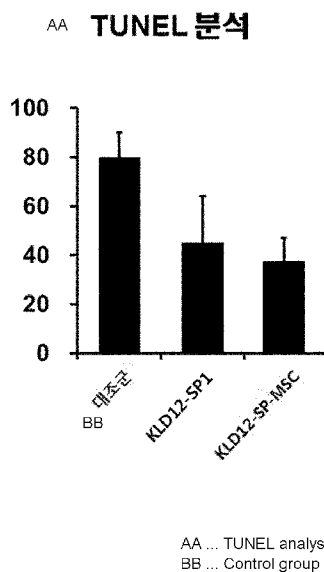
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING ARTHRITIS

(54) 발명의 명칭: 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to: a pharmaceutical composition for preventing or treating arthritis, which comprises synthetic polypeptides; injections for preventing or treating arthritis; and a pharmaceutical composition for inducing differentiation of cartilage cells. Synthetic polypeptides of the present invention consisting of a polypeptide represented by SEQ ID NO: 1 and a polypeptide represented by SEQ ID NO: 2 have activity for recruiting stem cells to an arthritis region, inhibit apoptosis of cartilage cells, and exhibit anti-inflammatory activity and activity for promoting regeneration of cartilage cells. Thus, unlike a conventional arthritis treatment agent, the synthetic polypeptides can improve cartilage damage, can inhibit degenerative changes *per se* and can, at the same time, exhibit an effect as a stem cell treatment agent, and thereby can be usefully utilized as an arthritis prevention or treatment agent.

(57) 요약서: 본 발명은 합성 폴리펩타이드를 포함하는, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 관절염 예방 또는 치료용 주사제 및 연골세포 분화 유도용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를

구성으로 하는 합성 폴리펩타이드는 관절염 부위로 줄기세포의 동원 활성을 가지며, 연골 세포의 세포자멸사를 억제하고, 항-염증 활성 및 연골세포 재생 촉진활성을 나타내므로 기존 관절염 치료제와 달리 연골 손상을 개선할 뿐만 아니라 퇴행성 변화 자체를 억제하고 줄기세포 치료제로서의 효과를 동시에 나타낼 수 있어 관절염 예방 또는 치료제로서 유용하게 활용될 수 있다.



— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 합성 폴리펩타이드를 포함하는, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 관절염 예방 또는 치료용 주사제 및 연골세포 분화 유도용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 뼈(bone)는 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호한다. 또한 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질, 즉 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다.
- [3] 인체를 구성하는 뼈 사이에는 관절이 존재한다. 관절은 두개골이나 이의 치근처럼 서로 접하는 두 개의 뼈나 연골 사이에 가동성이 거의 또는 전혀 없는 부동성관절과, 동물의 팔·다리의 뼈나 턱뼈처럼 양쪽 뼈 사이에 결합조직이 많고 가동성이 큰 가동관절, 연합관절 및 반관절로 나뉜다. 일반적으로 관절이라 하는 것은 가동관절을 말하며, 이 가동관절은 양쪽의 뼈가 인대만으로 결합되어 있는 인대결합과 활액막성 결합으로 나뉜다. 활액막성 결합은 관절이 결합조직성의 주머니(관절낭)로 쌓여 있는 것으로, 관절낭의 안쪽은 윤활유의 성격을 하는 활액을 분비하고 외부에는 많은 인대가 부착되어 있어 관절을 보강한다.
- [4] 연골조직은 관절을 구성하고 있으며, 관절 운동의 전달력을 흡수한다. 이와 같은 연골조직이 손상되면, 붓기, 열감, 통증을 동반한 관절염 (arthritis)이 유발되는데, 관절염은 인종에 무관하게 발병하며 그 원인에 따라 100여종 이상으로 나누어진다. 그 중 가장 흔한 형태가 주로 노화에 의해 발병하는 퇴행성 관절 질환 (degenerative joint disease)인 골관절염 (osteoarthritis)이며, 그 외 자가 면역질환인 류마티스성 관절염 (rheumatoid arthritis)과 건선성 관절염 (psoriatic arthritis), 감염에 의한 패혈성 관절염 (septic arthritis) 등이 있다. 특히 퇴행성 관절염은 노년층의 대표적인 질환으로 주로 관절의 노화에 의해 발병하지만, 그 외에도 유전적 요인, 영양 불균형, 운동 부족, 과격한 운동이나 부상, 과도한 노동과 같이 관절에 무리를 주는 행동이나 잘못된 자세, 비만으로 인한 과부하 등 여러 가지 요인이 복합적으로 작용하여 발병하기 때문에 젊은층에서도 빈번히 발병하는 질환이다. 이처럼 관절염은 폭넓은 연령대에서 발병빈도가 높은 질환이지만, 한번 손상된 조직은 자연적으로 재생이나 복구가 잘되지 않아 장기간 환자의 사회적 활동을 제한하고 삶의 질을 저하시키는 원인이 된다.
- [5] 이와 같은 관절염을 치료하기 위하여, 전통적으로 자가골 이식(autografting)과 동종골 이식(allografting) 그리고 인조골 이식(artificial bone grafting) 등의 연구가

수행되었으나, 골 채취 부위의 감염, 혈종 등과 같은 합병증 유발(자가골이식), 공여자로부터의 질병 전염 가능성(동종골 이식), 근본적인 골 생성이 되지 않는(인조골 이식) 문제점을 가지고 있는 것으로 알려졌다.

- [6] 또한 체중 조절을 포함한 운동요법, 식이요법, 주사 요법, 약물요법과 같은 보존적인 치료법 및 조직 재생술(tissue regeneration), 손상 정도가 심할 경우에 사용하는 인공관절 교체술과 같은 수술요법 역시 관절염 치료를 위하여 사용되고 있다.
- [7] 그러나 운동 요법은 관절 주변 조직을 강화시켜 추가적인 증상 악화를 지연시키는 효과는 있지만, 손상된 조직을 근본적으로 재생시키지는 않으며 증상이 심한 경우 통증으로 인해 시행하기 어렵다는 한계점이 있다.
- [8] 또한 손상된 부위의 마찰을 줄여 통증을 경감시키고 증상의 악화를 막기 위해 관절의 윤활액 성분인 히알루론산(hyaluronic acid; HA)을 주사하는 방법도 사용되고 있으며, 염증이나 통증을 경감시킬 목적으로 아스피린(aspirin), 아세트아미노펜 (acetaminophen), 또는 여러 종류의 비스테로이드성 소염제(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)와 코티손 (cortisone)과 같은 스테로이드성 약물이 사용되고 있다. 하지만 이러한 약물요법도 손상된 조직을 복구시킬 수 있는 근본적인 치료법은 아니며, 장기간 사용시 부작용으로 위장이나 조직, 뼈를 손상시키는 것으로 보고되고 있는 등 치료요법으로 사용되기 위해서는 추가적인 검증이 필요한 것으로 알려져 있다.
- [9] 앞서 언급한 보존적인 치료법으로 효과가 없거나 극심한 통증이 지속되는 경우, 인공 관절로 교체하는 수술적 요법이 사용되는데, 인공 관절은 수명이 약 10년 정도로 한정되어 있어 필요에 따라 재수술이 필요하다. 이 경우 뼈에 협착된 인공 관절 제거의 어려움, 보다 큰 인공관절 이식의 필요성, 보다 광범위한 주변 뼈조직이 필요하게 되어 재수술에 제한이 따른다. 이러한 문제점으로 인공 관절 교체술을 젊은층에 적용할 때는 보다 신중을 기해야 한다.
- [10] 최근에는 인공세포배양기술이 발달함에 따라 다기능 줄기세포(multipotent stem cell)나 자가 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell)로부터 연골세포(chondrocyte)를 인공적으로 배양하여 이식(implantation)하는 방법이 보고되었다. 하지만 충분한 자가 세포를 얻기가 쉽지 않고, 이식한 세포의 부착, 재생 효율, 안전성 측면에서 많은 환자들에게 적용하기에는 기술적으로나 비용적인 측면에서 아직까지 해결해야 할 문제점들이 많다.
- [11] 고령화 사회로 접어들면서 관절염으로 고통 받는 노년층 인구가 꾸준히 증가하고 있고, 과도한 운동, 영양 불균형, 비만 등으로 인한 관절 질환이 젊은 연령층에서도 증가 추세에 있다. 이에 따라 다양한 관절염 질환에 적용 가능한 새로운 치료제에 대한 요구가 지속적으로 있으나, 아직까지 관절염으로 손상된 연골 조직을 재생 복구 시킬 뿐만 아니라, 연골 세포의 자체의 사멸을 막고 줄기세포 치료제의 효과까지 가져올 수 있는 새로운 개념의 치료제에 대해서는 보고된바 없으며 이와 같은 치료제 개발에 대한 필요성이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명자들은 줄기세포 동원 활성을 갖는 합성 폴리펩타이드에 대하여 연구하던 중, 합성 폴리펩타이드가 골밀도를 증가시키고, 연골세포의 세포자멸사를 억제하는 등 관절염을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- [13] 따라서 본 발명의 목적은 합성 폴리펩타이드를 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 관절염 예방 또는 치료용 주사제 및 연골세포 분화 유도용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[14]

과제 해결 수단

- [15] 상기의 목적을 제공하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드를 포함하는, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [16] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드의 혼합물을 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [17] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드를 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 주사제를 제공한다.
- [18] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드를 포함하는, 연골세포 분화 유도용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [19] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드는 관절염 부위로 줄기세포 동원 활성을 가지며, 연골 세포의 세포자멸사를 억제하고, 항-염증 활성 및 연골세포 재생 촉진활성을 나타내므로 기존 관절염 치료제와 달리 연골 손상을 개선할 뿐만 아니라 퇴행성 변화 자체를 억제하고 줄기세포 치료제로서의 효과를 동시에 나타낼 수 있어 관절염 예방 또는 치료제로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 관절염 모델에서 KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5, KLD12-SP-MSC의 처리가 랫트의 행동학적 특성에 미치는 영향을 처리 전, 2주, 4주 후에 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [21] 도 2는 KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5, KLD12-SP-MSC 처리에 따른 골밀도 개선 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

- [22] 도 3은 KLD12-SP1, KLD12-SP-MSD 처리에 따른 연골 세포의 세포자멸사 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [23] 도 4는 KLD12-SP1 또는 KLD12-SP-MSD 처리에 따른 염증성 인자 IL-1 β 및 카스파아제-3의 발현 감소 및 연골 세포 분화 인자인 콜라겐 II형 및 SOX-9의 발현 증가를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [24] 도 5는 KLD12-SP 처리 후, 조직학적 분석을 통해 KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5 및 KLD12-SP-MSD를 주입한 관절염 모델 랫트의 조직 세포에서 연골조직의 손상을 나타내는 정도인 만킨점수를 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- [25] 도 6 및 도 7은 면역형광분석을 통해, 카스파아제-8 및 TIMP-1의 발현 감소, 콜라겐 II형의 발현 증가 및 물질 P(SP)가 랫트의 무릎 관절에 유지되고 있는 것을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [26] 도 8은 중간엽 줄기세포 마커 CD 90, CD 105의 발현이 KLD12-SP 처리에 의하여 증가함을 확인하고, 이의 줄기세포 동원 능력을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드를 포함하는, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [28] 상기 서열번호 1은 자가조립 폴리펩타이드(self-assembly polypeptide)이며, 상기 서열번호 2는 물질 P(Substance P)이다.
- [29] 본 발명에 따른 합성 폴리펩타이드는 줄기세포 동원 활성화에 의하여 관절염 부위로 중간엽 줄기세포를 효과적으로 동원할 수 있을 뿐만 아니라, 연골 세포의 세포자멸사를 억제하고, 항-염증 활성화 및 연골세포 재생 촉진활성을 나타내므로 기존 관절염 치료제와 달리 연골 손상을 개선함과 동시에 퇴행성 변화 자체를 억제하고 줄기세포 치료제로서의 효과까지 동시에 나타낼 수 있다.
- [30] 상기 "서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드" 및 "서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합하여 형성된 선형의 분자를 의미하며, 당업계에서 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis technique)에 따라 제조될 수 있다(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).
- [31] 본 발명의 "물질 p"는 RPKPQQFFGLM의 11개의 아미노산 서열로 이루어진 포유류의 타키키닌의 하나로서, 조직 내 상처가 발생했을 때 과량 분비되고, 이는 상처 회복을 위해 다분화능이 있는 줄기세포의 동원을 유도할 수 있는 능력을 지닌 물질이다. 상기 물질 P의 N 말단에는 글리신(G) 또는 글루탐산(E)이 2 내지 10 개 반복되는 서열의 스페이서가 결합될 수 있고, 물질 P와 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 자가조립 펩타이드와의 사이에 위치하여 합성

폴리펩타이드가 제조될 수 있다.

- [32] 상기 합성 폴리펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 것으로, 이는 줄기세포 동원활성, 연골 세포의 세포자멸사 억제활성, 항-염증 활성 및 연골세포 재생 촉진 활성을 갖고 기존 관절염 치료제와 달리 연골 손상을 개선할 뿐만 아니라 퇴행성 변화 자체를 억제하여 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 폴리펩타이드를 제한없이 포함할 수 있으며, 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드인 것이 특히 바람직하다.
- [33] 상기 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드는 자가조립 펩타이드인 서열번호 1 폴리펩타이드 KLD12와 물질 P가 결합한 것으로, 본 발명의 명세서 전반에서는 “KLD12-SP”로 명명하여 사용하였다.
- [34] 상기 “KLD12-SP”는 자가조립 펩타이드인 KLD12와 혼합하여 사용할 수 있다.
- [35] 따라서 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드의 혼합물을 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [36] 서열번호 1로 표시되는 KLD12와 서열번호 3으로 표시되는 KLD12-SP의 혼합비율은 이에 제한되지 않으나, 200: 1 내지 200: 200 중량비일 수 있고, 바람직하게는 200: 1 내지 200: 30 중량비일 수 있으며, 더 바람직하게는 200:3 내지 200: 20 중량비, 더욱 바람직하게는 200: 3.5 내지 200: 15 중량비 일 수 있다. 본 명세서에서는 바람직한 구현예로 200:7, 200:14, 200:3.5 중량비로 혼합된 폴리펩타이드를 개시하고 있으며, 이는 각각 KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5로 언급된다. 만약 혼합비율이 200:200, 즉 1:1의 중량비를 초과하는 경우 하이드로겔의 강도에 있어서 액체상에 가까워지므로 젤의 형상을 유지하기 어려워지는 문제점이 있다.
- [37] 본 발명에 있어서, “관절염”은 힘줄, 인대 및 근육 등과 같은 관절 주변의 조직 뿐 아니라 신체의 기타 기관 내에서의 관절의 만성 염증을 의미할 수 있고, 바람직하게는 골관절염, 퇴행성 관절염, 박리성 골연골염, 관절 인대 손상, 반월상 연골판 손상, 감염으로 인한 관절염, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 류마티스 관절염 및 소아기 류마티스 관절염으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [38] 특히 본 발명에 있어서, 상기 퇴행성 관절염은 특발성 퇴행성 관절염 또는 속발성 퇴행성 관절염일 수 있다. “퇴행성 관절염”이란 관절을 보호하고 있는 연골의 점진적인 손상이나 퇴행성 변화로 인해 관절을 이루는 뼈와 인대 등에 손상이 일어나 염증과 통증이 생기는 질환으로 관절염 질환 중 가장 높은 빈도를 보이는 질환이다. 이 중 “특발성 퇴행성 관절염”이란 특별한 기질적 원인 없이, 노화 등에 의하여 발생하는 것이고 이를 일차성 퇴행성 관절염이라고도 한다. “속발성 퇴행성 관절염”이란 관절 연골에 손상을 줄 수 있는 외상, 질병 및 기형이 원인이 되는 것으로 세균성 관절염이나 결핵성 관절염 후 관절 연골이

파괴된 경우 등을 말하며 이차성 퇴행성 관절염이라고도 한다. 본 발명의 폴리펩타이드는 특발성 퇴행성 관절염 또는 속발성 퇴행성 관절염에 모두 적용가능하나, 보다 바람직하게는 노화로 인한 퇴행성 변화가 수반되는 특발성 관절염에 적용할 수 있다.

[39] 본 발명의 합성 폴리펩타이드 투여로 인하여 치료될 수 있는 관절염, 보다 바람직하게는 퇴행성 관절염은 연골손상 등에 의하여 관절염이 발생할 수 있는 모든 신체의 관절부위에 발생하는 관절염을 의미하나, 바람직하게는 무릎, 손가락, 턱, 엉덩이 및 허리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 부위에서 발생하는 퇴행성 관절염일 수 있고, 이에 제한되지 않는다.

[40] 또한 본 발명의 합성 폴리펩타이드는 특히 연골 세포의 세포자멸사(apoptosis)를 억제하는 것이다.

[41] 상기 연골세포의 “세포자멸사”가 억제됨으로써, 관절염, 특히 퇴행성 관절염과 같이 노화에 의하여 발생할 수 있는 관절염에서 국소부위에서의 연골 재생과 같은 재생효과 뿐만이 아니라 퇴행성 변화 자체를 저지할 수 있다는 점에서 매우 의미가 있다.

[42] 또한 본 발명의 합성 폴리펩타이드는 항-염증 활성을 갖고, 연골세포의 재생을 촉진하는 것이다. 보다 구체적으로 본 발명의 폴리펩타이드는 연골세포에서 염증성 인자인 IL-1 β 및 카스파아제-3의 유전자 발현량을 감소시키고, 연골세포 재생과 관련된 콜라겐 II 형 및 SOX-9 유전자의 발현을 증가시킨다.

[43] 또한 본 발명은 중간엽 줄기세포를 추가적으로 더 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[44] 본 발명의 합성 폴리펩타이드는 줄기세포를 동원하는 능력이 우수하므로, 주입된 부위로 줄기세포가 동원되어 분화가 활발하게 이루어질 수 있도록 한다. 따라서 폴리펩타이드 주입 부위에 별도의 줄기세포를 도입하지 않아도 해당 부위에서 중간엽 줄기세포의 수가 증가하므로 줄기세포의 분화를 통한 연골세포 재생 촉진 효과를 나타낼 수 있는 장점이 있다. 이와 같은 효과를 극대화하기 위하여 중간엽 줄기세포를 폴리펩타이드와 함께 혼합하여 관절염 부위로 투여할 수 있다. 이와 같이 투여하는 경우 줄기세포 치료제로 사용되는 중간엽 줄기세포가 관절염 부위에 더욱 잘 위치, 분포할 수 있게 되므로 연골 재생 효과를 증가시킬 수 있다.

[45] 본 발명은 또한 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드 외에 당 분야에 관절염 치료 또는 예방에 유용한 것으로 알려져 있는 공지의 치료제 등을 함께, 병용하여 또는 연속적으로 사용하는 것을 포함할 수 있으며, 이외 운동요법 등과 같은 공지의 치료방법과 병행하여 이용할 수 있다.

[46] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 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, 미네랄 오일, 식염수, PBS(phosphate buffered saline) 또는 배지 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [47] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [48] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구 투여 방식, 가장 바람직하게는 관절낭 내(intraarticular)로 투여할 수 있다.
- [49] 따라서 본 발명의 또 다른 양상은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드를 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 주사제 또는 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드와 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드의 혼합물을 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 주사제에 관한 것이다. 상기 주사제는 관절강 내(intraarticular) 투여용인 것이 가장 바람직하다.
- [50] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 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.
- [51] 또한 본 발명은 서열번호 1으로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2으로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드를 포함하는, 연골세포 분화 유도용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [52] 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 포함하는 합성 폴리펩타이드; 및 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드와 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드의 혼합물은 관절염 부위에서 SOX-9 및 콜라겐 타입 II형 등의 발현을 증가시키고 연골세포로 분화될 수 있는 중간엽 줄기세포의 동원을 유도함으로써 연골세포의 분화를 촉진할 수 있다.
- [53] 또한 본 발명의 또 다른 양상은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드를 포함하는 조성물; 또는 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드와 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드의 혼합물을 대상에 투여하는 단계; 를 포함하는 관절염 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.
- [54] 상기 대상은 인간을 포함한 포유류인 것이 바람직하며, 관절염을 앓고 있거나, 앓았거나, 앓을 가능성이 있는 잠재적인 관절염 환자군도 모두 제한없이 포함할 수 있다. 상기 폴리펩타이드는 대상의 관절염 부위에 약학적으로 유효한 양으로 전달될 수 있으며, 전달은 이에 제한되는 것은 아니나 주사액 형태에 의한 것이

바람직하다. 특히 상기 주사액은 포유류 대상, 바람직하게는 인간 환자의 관절강 투여용인 것이 더욱 바람직하다.

[55] 또한 본 발명의 또 다른 양상은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드를 포함하는 관절염 예방 또는 치료제 또는 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드와 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드의 혼합물을 포함하는 관절염 예방 또는 치료제의 제조를 위한 용도에 관한 것이다.

[56]

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

[58]

[59] **제조예 1. 폴리펩타이드 (KLD12-SP) 의 제조**

[60] 퇴행성 관절염 치료 효과를 갖는 폴리펩타이드의 제조를 위하여, 서열번호 1로 표시되는 자가조립 펩타이드 KLD12와 서열번호 2로 표시되는 물질 (Substance P) 가 결합된 폴리펩타이드를 제조하였으며, KLD12-SP로 명명하였다. 보다 구체적으로 KLD12-SP를 고체상 방법으로 합성하는 방법은 다음과 같다.

[61] 0.06 mmol의 글루탐산-Wang 레진을 표준 반응용기 (Standard reaction vessel)에 넣고, 레진의 Fmoc을 염기(20% 피페리딘)로 제거하였다. 합성하려는 펩타이드의 카르복시 말단에 Fmoc-아미노산을 넣고 1-히드록시-벤조트리아졸(HOBT), 디아이소프로필 카보다이이미드(DIC)를 혼합하여 활성화 시킨 후 합성을 시작하였다. 계속하여 동일한 방법을 이용하여, 원하는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 합성하고, 커플링이 끝난 후 N-메틸피롤리돈과 디클로로메탄으로 여러 번 세척한 다음 건조시켰다. 여기에 트리플루오로아세트산 : 페놀 : 티오아니솔 : 물 : 에탄디티올(Trifluoroacetic acid : Phenol : Thioanisole : H₂O : Ethandithiol)의 82.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5 (v/v)용액으로 2 내지 3시간 반응시켜 펩타이드의 보호기를 제거하고, 레진으로부터 펩타이드를 분리하였으며, 용액에 차가운 에틸에테르를 첨가하여 흰색 침전된 펩타이드를 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 펩타이드를 C4 semi-prep 컬럼 (Phenomenex)을 사용하는 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)로 정제하였다. 완충용액 A는 물 및 0.1 % TFA를 사용하여 평형화시키고, 완충용액 B는 아세트나이트릴 및 0.1 % TFA를 사용하여 펩타이드를 용출시켜, 각각 KLD12 및 KLD12에 물질 P가 연결된 KLD12-SP를 제조하였다. 본 제조예에 사용되고 합성된 서열정보를 하기 표 1에 나타내었다.

[62] [Table 1]

	서열	비고
서열번호 1	KLDLKLDLKLDL	KLD12 자가조립 펩타이드
서열번호 2	RPKPQQFFGLM	물질 P (SP)
서열번호 3	KLDLKLDLKLDLRPKPQQFF GLM	KLD12-SP

[63] 제조된 KLD12 와 KLD12-SP를 혼합하여 펩타이드젤을 제조하였다. KLD12와 KLD12-SP를 각각 295mM 수크로오스 용액에 녹여 1%의 펩타이드 용액을 만들고, 제조된 펩타이드 용액을 PBS와 혼합하여 0.5%의 펩타이드젤을 만들었다. 다양한 KLD12-SP의 치료 효과를 확인하기 위하여, KLD12와 KLD12-SP 펩타이드 용액의 혼합 비율을 각각 200:7, 200:14, 200:3.5 중량비로 혼합하여 다양한 함량 농도의 KLD12-SP를 제조하였다. 상기 중량비로 혼합된 KLD12-SP를 각각 KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5로 각각 명명하였다. 또한 KLD12와 KLD12-SP를 200:7로 혼합한 펩타이드 용액에 중간엽줄기세포 (Mesenchymal stem cell; MSC)를 넣은 실험군은 KLD12-SP-MSC로 하였으며, 생리식염수만을 넣은 대조군도 추가하였다.

[64]

[65] 상기와 같이 제조된 KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5, KLD12-SP-MSC의 퇴행성 관절염 치료 효과를 하기 실시예를 통해 확인하였다.

[66] 이하 퇴행성 관절염 치료 효과 확인에 사용된 퇴행성 관절염 모델 랫트는 9주령 랫트를 “오리엔트 바이오”에서 구입하여 삼성생명과학 연구소로 반입하여 1주간 검역을 거치고 5주 간 사육 후 15주령 때 퇴행성 관절염 모델로 제작한 것을 사용하였다. 퇴행성 관절염 모델은 슬개골 내측 부위 피부 및 근막을 절개 후, 슬개골을 외측으로 젖혀 관절강을 노출시킨 후, 전방십자인대, 내측측부인대와 내측 반월상 연골을 scissor로 제거하였다. 이 후, 슬개골을 원위치 시킨 뒤 피부 봉합을 시행하는 단계를 수행하여 제조하였다.

[67]

[68] 실시예 1. 행동 실험

[69] 랫트(오리엔트 바이오)의 무릎관절 기능 측정을 통한 행동실험을 수행하였다. 행동 실험은 흰색 종이가 사면에 부착된 30 cm x 30 cm x 30 cm 아크릴 박스 바닥 전체에 잉크패드를 설치하고, 랫트를 30분간 자유롭게 움직이도록 놔둔 후, 흰색 종이를 수거하는 방식으로 수행하였다. 무릎 관절 기능은 4장의 흰색 종이에 바닥으로부터 5 cm 부위에 줄을 긋고, 5 cm 이상 부위에 앞 발이 찍힌 횟수를 측정하여 확인하였다. 주입 전 앞발이 찍힌 횟수를 측정하였으며, 제조에 1에서 제조된 KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5, KLD12-SP-MSC 및 대조군을 퇴행성 관절염 모델 랫트에 관절강 내에 1ml 주사기를 이용하여 각각 200

마이크로리터를 주입하고 주입 2주 후, 4주 후 앞발이 찍힌 횡수를 측정하였다. 결과를 도 1에 나타내었다.

- [70] 도 1에 나타낸 바와 같이, 각각의 KLD12-SP를 처리하기 전에는 약 20회 정도였던 횡수가 KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5, KLD12-SP-MSD 처리군에서 모두 증가하여 대조군과 비교하여 랫트의 무릎 관절 기능이 개선되었음이 확인되었다. 특히, 줄기세포와 KLD12-SP가 혼합 처리된 KLD12-SP-MSD는 가장 우수한 개선 효과를 나타내었다.

[71]

[72] 실시예 2. Micro-CT를 이용한 골밀도 개선효과 확인

- [73] 퇴행성 관절염 환자는 골밀도 저하로 인한 골다공증 및 골절의 위험성을 갖는다. 따라서 무릎 관절 기능을 개선할 수 있는 KLD12-SP가 골밀도 개선효과를 동시에 가질 수 있는 지 여부를 확인하였다. 보다 구체적으로 관절염 모델 랫트에 KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5, KLD12-SP-MSD 및 대조군을 퇴행성 관절염 모델 랫트 관절강 내에 1ml 주사기를 이용하여 각각 200 마이크로리터를 주입하고 주입 4주 후 무릎관절을 적출하여 근육 및 지방 조직을 제거한 후, Siemens Inveon Micro-PET/CT 스캐너를 이용하여 골밀도를 측정하였다. 모든 조직들은 1.5 mm 간격으로 스캔 되었고, 70 kV, 400 μ A 로 스텝 당 0.5도 씩 전체 360도 회전을 하여 스캔 이미지를 얻어냈다. 각 픽셀은 20.26 μ m 크기의 해상도를 지녔다. 각 스캔된 이미지는 IAW(the Inveon Acquisition Workplace) software package (IAW, Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA)를 이용하여 재구성 되었고, IRW(Inveon Research Workplace)를 이용하여 2D와 3D 이미지 분석 소프트웨어로 분석되었다. 적출된 슬관절 부위는 내측 대퇴골(medial femur; MFC), 외측 대퇴골(lateral femur; LFC), 중앙 경골(medial tibia; MTP) 및 외측 경골(lateral tibia; LTP) 4군데로 나누어져 분석하였으며, 각 부분들은 전방, 중심, 후방의 실린더 모양의 ROI(region of interest)로 계산하였다. 각 ROI들은 0.8 mm의 직경과 0.8 mm 길이였으며, ROI 부피는 대략 0.45 mm³이 되었다. 각 부위별 골밀도는 기존에 밀도 값(g/cm³)이 알려진 막대를 이용하여 측정된 houndsfield를 비교하여 계산하였다. 결과를 도 2에 나타내었다.

- [74] 도 2에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 모든 KLD12-SP 처리군에서 골밀도가 증가한 것이 확인되었다. KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5 및 KLD12-SP-MSD 은 골밀도가 500 내지 600mg/cm³ 정도로 나타났으며, 이는 대조군의 골밀도가 약 400mg/cm³ 인 것과 비교하여 증가된 것으로 KLD12-SP가 퇴행성 관절염 부위에서 골밀도의 개선 효과를 함께 갖는다는 것을 보여주었다.

[75]

[76] 실시예 3. KLD12-SP의 세포자멸사(apoptosis) 억제 효과

- [77] 관절염의 발병 기전 중 하나로 관절 연골세포에서의 세포자멸사가 보고되고 있으며 관절염 환자의 연골세포에서 세포자멸사가 증가되어 있다는 관련성이 보고된 바 있다. 따라서 KLD12-SP가 노화에 의한 퇴행성 관절염의

세포자멸사를 억제하여, 단순히 국소 부위에서의 연골 세포 재생을 촉진하는 것이 아니라 연골 세포 자체가 감소되는 것을 억제하여 노화로 인한 퇴행성 변화를 억제할 수 있는지 여부를 확인하였다.

- [78] KLD12-SP1 및 KLD12-SP-MSK를 주입한 관절염 모델 랫트의 단일 세포 수준에서의 세포자멸사를 관찰하기 위해서 상용화된 ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (cat # S7100, Millipore)를 사용하여 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) 염색을 실시하였다. 양성 대조군으로는 기존에 TUNEL 발현이 확인된 종양조직을 이용하였으며, 음성 대조군은 말단 트랜스퍼라아제(terminal transferase)가 생략된 TUNEL 반응 혼합물에 반응시켰다.
- [79] KLD12-SP1, KLD12-SP-MSK 주입 4주 후 관절염 랫트 모델에서 수득한 4 μ m로 절편된 조직 슬라이드를 60°C 건조 오븐에 5분간 방치 후, 자일렌(xylene)에서 5분간 3회 반응시켜서 탈파라핀화(deparaffinization)를 실시하고 100%, 95%, 90%, 70% 알코올에 담가서 처리하고 증류수에서 수세하였다. 20 μ g/mL 단백질 분해효소 K(Proteinase K)에 15분간 전처리 한 후 트윈 20이 함유된 PBS 완충액을 이용하여 세척하고 내인성 퍼옥시다아제의 활성을 억제하기 위하여 3% H₂O₂ 용액에서 10분간 반응 시킨 후 PBS로 수세하였다. 조직 슬라이드를 TdT 반응 완충액에서 10분간 전-배양한 후 TdT 반응 혼합물을 분주하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 정지/세척 완충액에 담가서 15초간 교반한 후 10분간 실온에서 두어서 TdT 반응 혼합물의 반응을 중지시켰다. 이때 조직의 건조를 방지하고자 습윤화된 챔버를 사용하였다. PBS로 수세 후 조직 슬라이드를 HRP가 접합된 항-디곡시게닌(anti-digoxigenin)으로 실온에서 30 분간 처리 후 수세하였다. 발색제로 DAB를 이용하여 실온에서 3분간 반응시켰으며 Mayer's 헤마톡실린을 이용하여 대조염색을 실시 후 현미경에서 검경하여 갈색으로 염색된 세포자멸사를 관찰하였다. 결과를 도 3에 나타내었다.
- [80] 도 3에 나타낸 바와 같이, 갈색으로 확인되는 세포자멸사가 대조군과 비교하여 KLD12-SP1, KLD12-SP-MSK 처리군에서 매우 현저하게 감소하였음을 확인하였다. 이를 통해, KLD12-SP는 퇴행성 관절염에서 재생 효과뿐만 아니라 관절염으로 인한 세포 사멸 자체를 억제하는 예방 및 치료 효과를 가짐으로, 노화로 인한 퇴행성 관절염을 더욱 효과적으로 치료할 수 있음을 확인하였다.

[81]

[82] 실시예 4. 정량적 실시간 PCR을 이용한 RNA 발현 확인

- [83] KLD12-SP1 또는 KLD12-SP-MSK 를 주입한 랫트의 무릎관절에서 연골만을 수득한 후, 가위로 잘게 다졌다. 작게 조각난 연골은 0.1% 콜라게네이즈(collagenase) 용액에 분산시킨 후 37°C에서 하룻밤동안 진탕시킨 후, 효소반응으로 용액에 부유된 관절연골을 원심 분리하였으며, 이 후 상층액은 버리고, 하부의 침전물을 분리하였다. 하층 침전물을 PBS로 수세하고, 100 μ m 필터로 걸러내는 과정을 세 번 반복하여 연골세포를 얻었다. 정량적 RT-PCR을

위하여, 얻어진 연골세포를 RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Omniscript System Kit (QIAGEN), SYBR[®]GreenMasterMix(AppliedBiosystems,USA)를 이용하여 cDNA로 합성하고, 증합효소 연쇄반응을 통하여 증폭시켰다. 7500 RT-PCR 시스템 (Applied Biosystems)을 이용하여 콜라겐 II형 (Collagen type II), SOX-9, IL-1 β , 카스파아제-3(Caspase-3)의 유전자 발현양의 변화를 확인하였다. 정량적 RT-PCR에 사용된 프라이머는 각각 다음과 같다. GAPDH는 항존 유전자(housekeeping gene)로 사용하였다.

[84] [Table 2]

	정방향	역방향
콜라겐 II 형	CCCCTGCAGTACATGCGG	CTCGACGTCATGCTGTCTCAAG
SOX-9	CTGAAGGGCTACGACTGGAC	TACTGGTCTGCCAGCTTCT
IL-1	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG;	GGGTTCATGGTGAAGTCAAC
카스파아제-3	AATTCAAGGGACGGGTCATG	GCTTGTGCGCGTACAGTTTC
GAPDH	GACATGCCGCCTGGAGAAAC	AGCCCAGGATGCCCTTTAGT

[85] 결과를 도 4에 나타내었다.

[86] 도 4에 나타낸 바와 같이, KLD12-SP1 를 주입한 랫트에서는 대조군과 비교하여 유리질 연골의 세포외 매트릭스(ECM)의 주요 구성원인 콜라겐 II 형의 발현이 2배 이상 증가하였으며, 연골세포의 증식 및 분화조절에 관여하는 유전자인 SOX-9 역시 KLD12-SP1 및 KLD12-SP-MSC 주입 랫트 모두에서 발현이 크게 증가하였다. 반면 염증성 인자인 IL-1 β 및 카스파아제-3는 KLD12-SP1 및 KLD12-SP-MSC 주입 랫트 모두에서 대조군의 절반 이하로 감소하였다. 이와 같은 결과를 통해 KLD12-SP는 퇴행성 관절염에서 연골 분화와 관련된 인자의 발현은 효과적으로 증가시키는 동시에, 염증 인자는 감소시켜 염증 반응의 활성화를 억제하는 우수한 효과가 있음을 확인하였다.

[87]

[88] 실시예 5. 조직학적 분석 및 면역형광 분석

[89] 관절염을 유도시킨 랫트의 무릎관절을 적출하여 조직학적 분석을 시행하였다. 수집한 샘플은 10% (v/v) 포르말린용액에 고정시키고, 염화수소 에틸렌다이아민테트라아세트산 용액 (hydrogen chloride

ethylene-diaminetetraacetic acid solution)에서 탈회하였다. 탈회된 시료는 파라핀으로 포매하고 박절기를 이용하여 조직을 시상면 방향으로 6 μ m 두께로 자른 후, 세포의 형태학적인 분석을 위한 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 실시하였고, 연골조직형성 평가를 위해 MT(Masson Trichrome)염색과 알시안 블루(Alcian blue)염색을 진행하였다. 또한 콜라겐 II (Chemicon, Darmstadt, Germany), 카스파아제-8 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), TIMP-1 (Santa Cruz Biotechnology) 항체를 사용하여 면역형광염색을 시행하였으며, 이 때 Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG (Invitrogen, Eugene, Oregon), Alexa Fluor 594 donkey anti rabbit IgG (Invitrogen), Alexa Fluor 594 rabbit anti mouse IgG (Invitrogen)를 이차 항체로 사용하였다. 세포의 핵 관찰을 위하여 DAPI (4',6-amidino-2-phenylindole, Molecular Probes)를 사용하여 대비염색 하였고, 염색된 조직시편은 200배의 배율에서 형광현미경 (Eclipse TE2000U, Nikon, Tokyo, Japan) 으로 관찰하여 무작위 4군데 사진 촬영 후, 이미지 J 프로그램을 이용하여 정량화 된 수치로 나타내었다.

[90] 또한 자가조립 폴리펩타이드에 결합된 물질 P (Substance P; SP)가 랫트의 무릎 관절에 유지되고 있는지를 확인하기 위하여 물질 P의 항체 (Substance P antibody, Santa Cruz Biotechnology) 를 이용하여 염색하였고, Alexa Fluor 488 chicken anti goat IgG (Invitrogen)은 2차 항체로 사용하였다. 염색이 끝난 시편은 형광현미경 (Eclipse TE2000U) 을 이용하여 200배 배율로 관찰하였고, 무작위로 4군데의 사진을 찍은 후 특이적으로 발현이 나타난 부분을 Image J 프로그램을 이용하여 이미지 처리 후 정량적 수치로 나타내었다.

[91] 결과를 도 5 내지 도 7에 나타내었다.

[92] 도 5에 나타낸 바와 같이, 조직학적 분석 결과 KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5 및 KLD12-SP-MSD를 주입한 관절염 모델 랫트의 조직 세포에서는 대조군과 비교하여 연골조직의 손상을 나타내는 정도인 만킨점수가 낮게 나타났다. 만킨 점수는 0에 가까울수록 정상 조직을 나타내는 지표로, 특히 KLD12-SP1 군에서 가장 낮은 점수가 확인되었다. 이와 같은 결과에 따라 KLD12-SP 모두 관절염 모델 랫트에서 연골조직의 손상을 효과적으로 개선함을 확인하였다.

[93] 도 6 및 도 7에 나타낸 바와 같이, KLD12-SP1, KLD12-SP2, KLD12-SP0.5 및 KLD12-SP-MSD를 주입한 관절염 모델 랫트의 조직 세포에서는 대조군과 비교하여 카스파아제-8 및 TIMP-1 의 발현이 감소되고, 콜라겐 II 형의 발현이 뚜렷하게 모든 군에서 증가하는 것으로 나타났다. 또한 KLD12에 결합된 물질 P(SP)가 랫트의 무릎 관절에 유지되고 있는 것 역시 확인되었다. 보다 구체적으로 콜라겐 II형의 발현은 대조군에 비하여 모든 실험군에서 약 2배 이상 증가하였으며, 카스파아제-8 및 TIMP-1 은 KLD12-SP 처리군의 SP 함량에 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

[94]

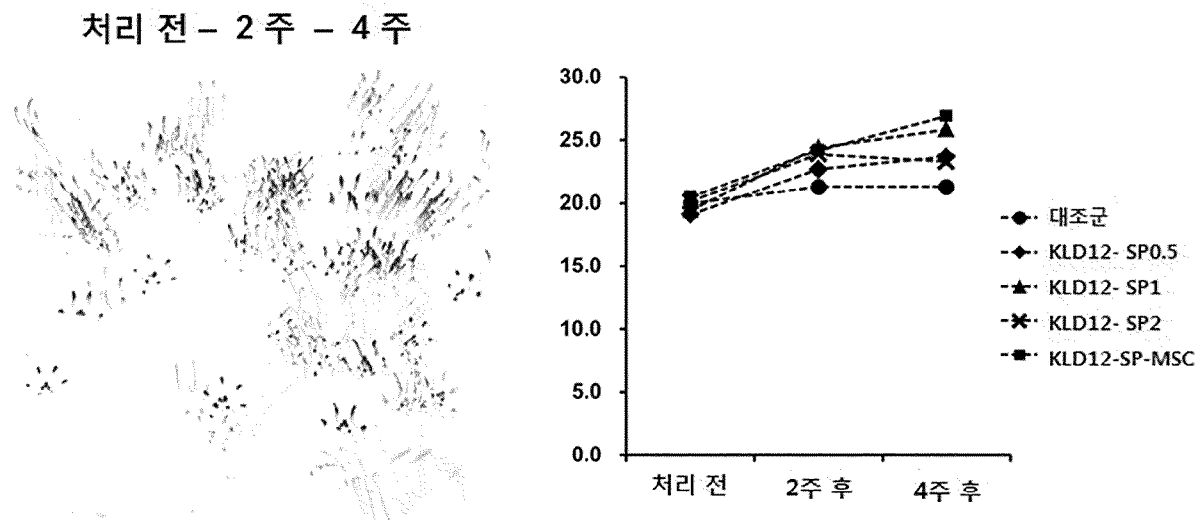
- [95] 실시예 6. KLD12-SP 의 줄기세포 동원활성
- [96] KLD12-SP 의 물질 P는 중간엽 줄기세포의 동원 활성이 있을 것으로 기대되므로, KLD12-SP-MSC 처리군과 MSC 결합없이 KLD12-SP을 처리한 처리군에서 중간엽 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 마커인 CD90 (Thy-1 antibody, Santa Cruz Biotechnology), CD105 (Anti-Endoglin monoclonal antibody, Millipore, Temecula, CA) 항체를 사용하여 면역형광염색을 시행하였다. Alexa Fluor 594 donkey anti rabbit IgG (Invitrogen) 및 Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG (Invitrogen)를 2차 항체로 사용하였으며, 세포의 핵을 확인하기 위하여 DAPI 대비염색을 하였다. 결과를 도 8에 나타내었다.
- [97] 도 8에 나타낸 바와 같이, 중간엽 줄기세포 마커인 CD 90, CD 105의 발현은 MSC 결합없이 KLD12-SP을 처리한 처리군에서도 대조군의 최소 2배 이상으로 나타났다. 이와 같은 결과에 따라, KLD12-SP 는 중간엽 줄기세포를 관절염 부위로 동원하는 효과가 있음이 확인되었으며, 관절염 부위로 중간엽 줄기세포가 이동함에 따라 중간엽 줄기세포에 의한 연골세포의 재생이 더욱 활발하게 이루어질 수 있다는 것을 확인하였다.

청구범위

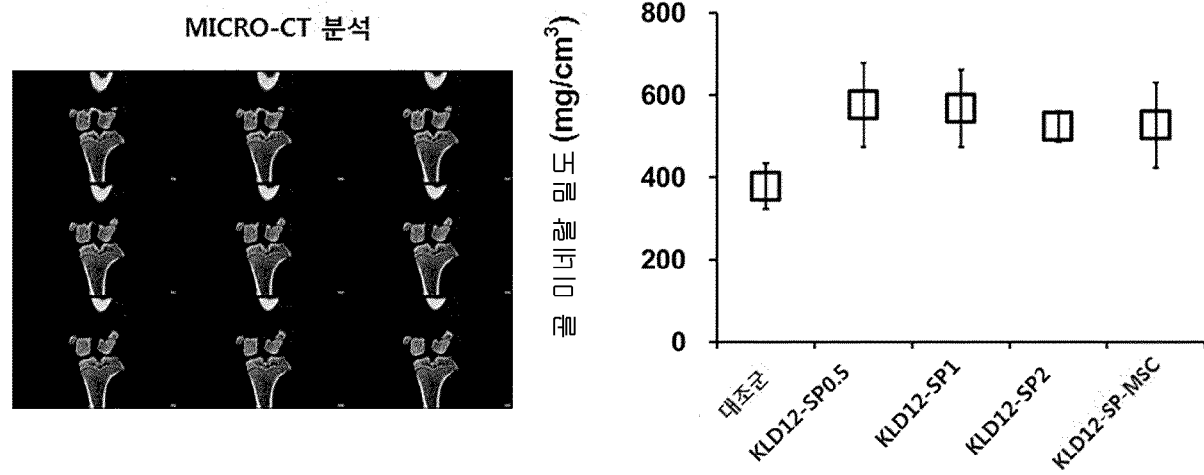
- [청구항 1] 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드로 구성된 합성 폴리펩타이드를 포함하는, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드는 자가조립 폴리펩타이드(self-assembly polypeptide)인, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드는 물질 P(Substance P)인, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 합성 폴리펩타이드는 서열번호 3의 폴리펩타이드인, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드의 혼합물을 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 혼합물은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드와 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드가 200: 1 내지 200: 200 중량비로 혼합된 것인, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 관절염은 골관절염, 퇴행성 관절염, 박리성 골연골염, 관절 인대 손상, 반월상 연골판 손상, 감염으로 인한 관절염, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 류마티스 관절염 및 소아기 류마티스 관절염로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 퇴행성 관절염은 특발성 퇴행성 관절염 또는 속발성 퇴행성 관절염인, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 퇴행성 관절염은 무릎, 손가락, 턱, 엉덩이 및 허리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 부위에서 발생하는 것인, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 합성 폴리펩타이드는 연골 세포의 세포자멸사를 억제하는 것인, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 합성 폴리펩타이드는 항-염증 활성을 갖고, 연골세포의 재생을 촉진하는 것인, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 중간엽 줄기세포를 더 포함하는, 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는

- 폴리펩타이드로 구성된 합성 폴리펩타이드를 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 주사제.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 주사제는 관절강 내(intraarticular) 투여용인, 관절염 예방 또는 치료용 주사제.
- [청구항 15] 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드로 구성된 합성 폴리펩타이드를 포함하는, 연골세포 분화 유도용 약학적 조성물.
- [청구항 16] 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드 및 서열번호 2로 표시되는 폴리펩타이드를 구성으로 하는 합성 폴리펩타이드; 또는 서열번호 1로 표시되는 폴리펩타이드와 서열번호 3으로 표시되는 폴리펩타이드의 혼합물을 대상에 투여하는 단계; 를 포함하는 관절염 예방 또는 치료 방법.

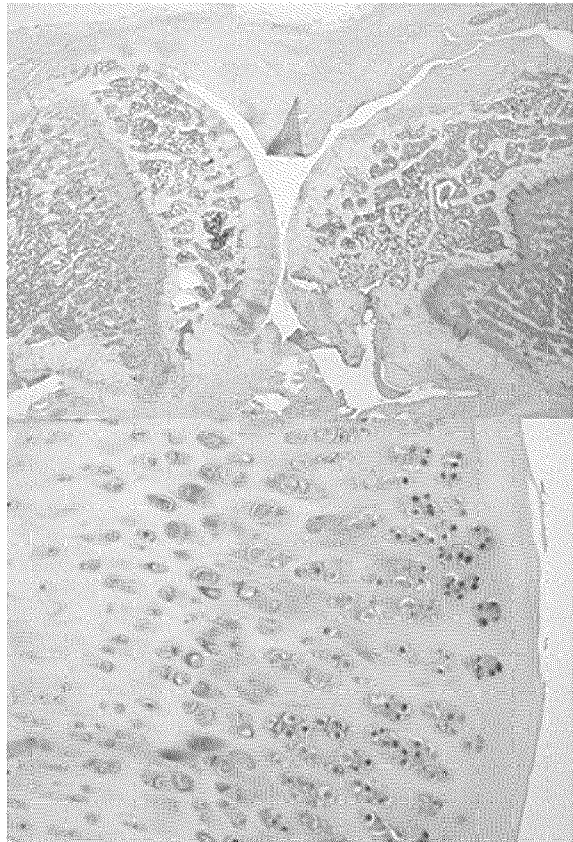
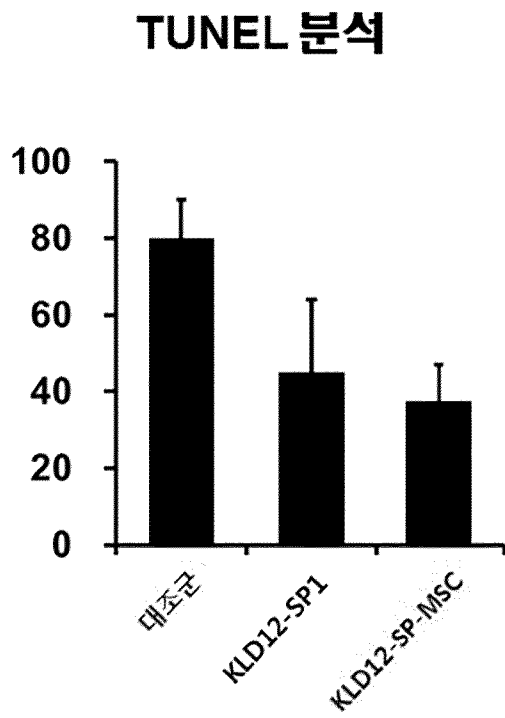
[Fig. 1]



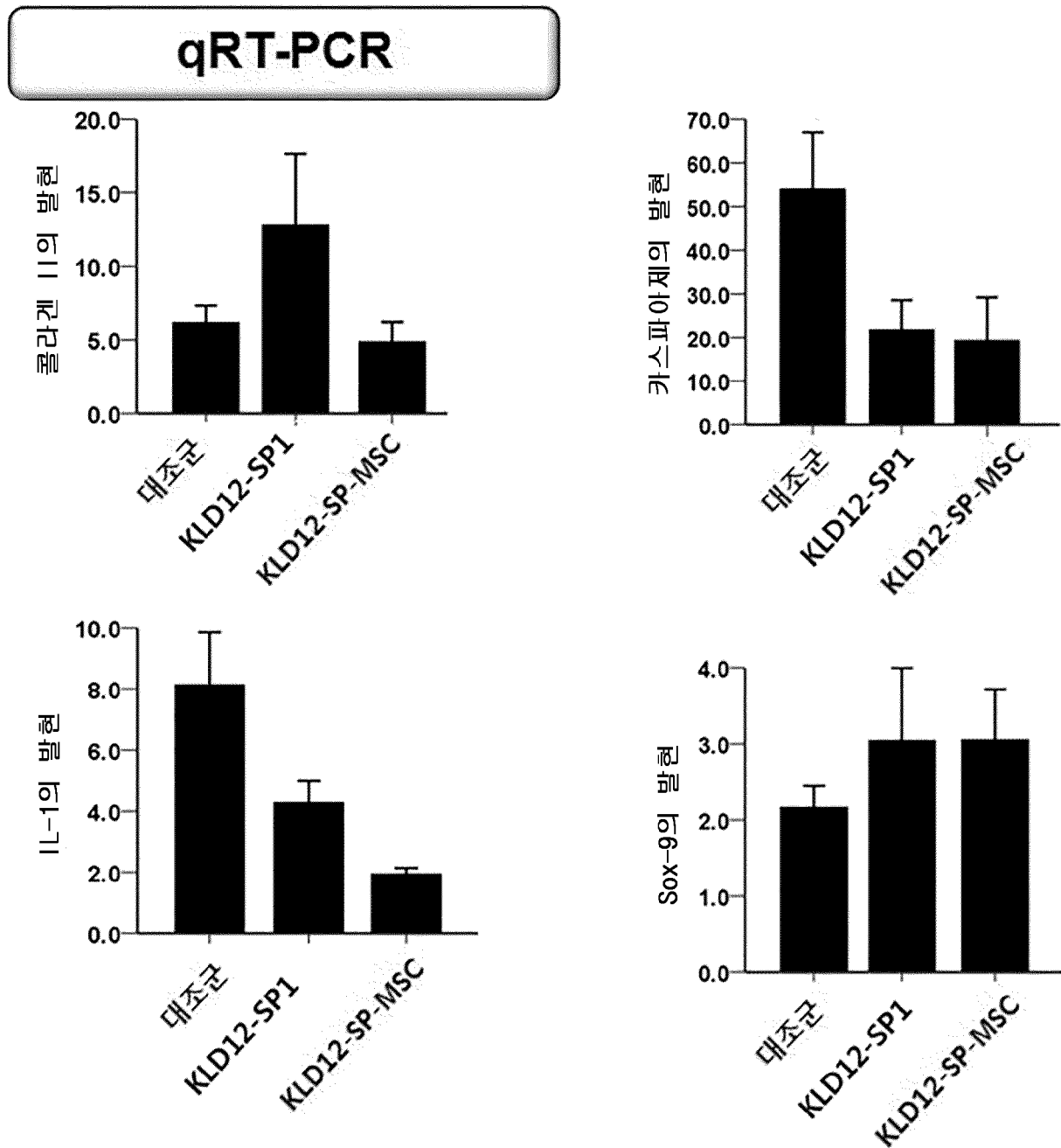
[Fig. 2]



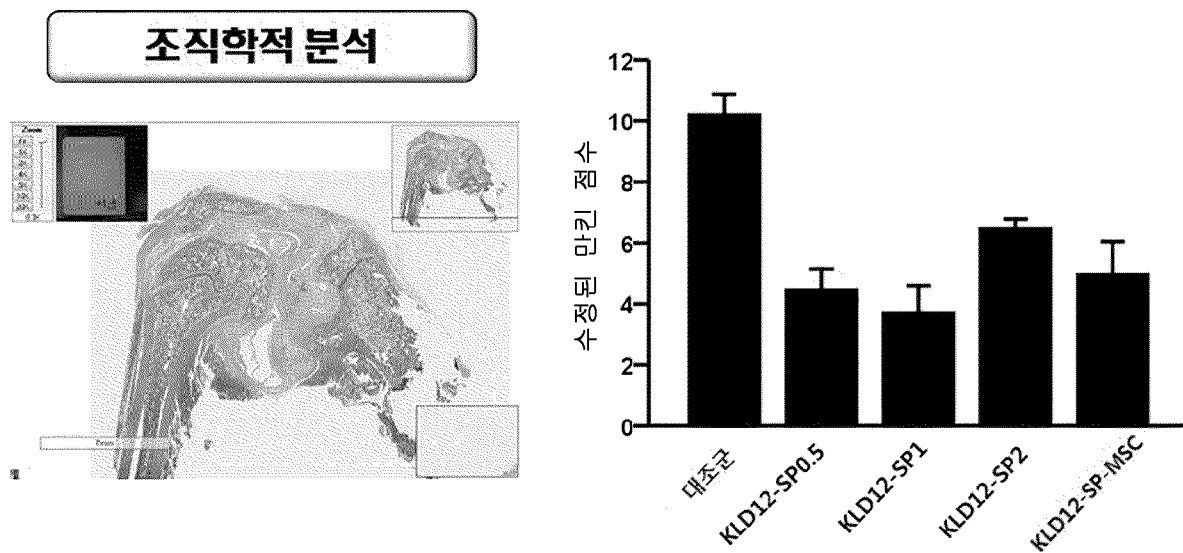
[Fig. 3]



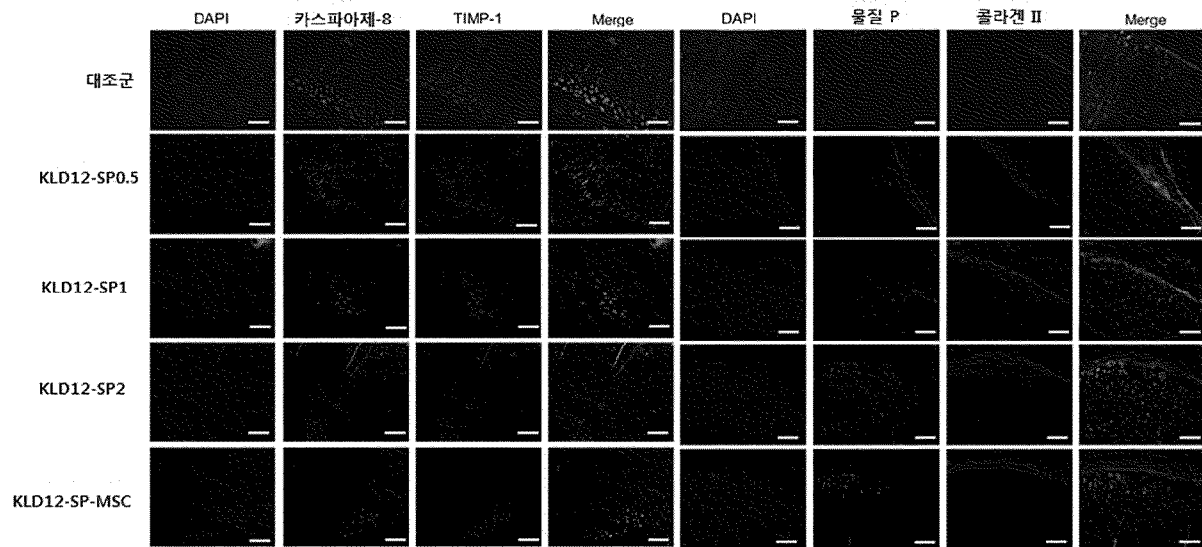
[Fig. 4]



[Fig. 5]

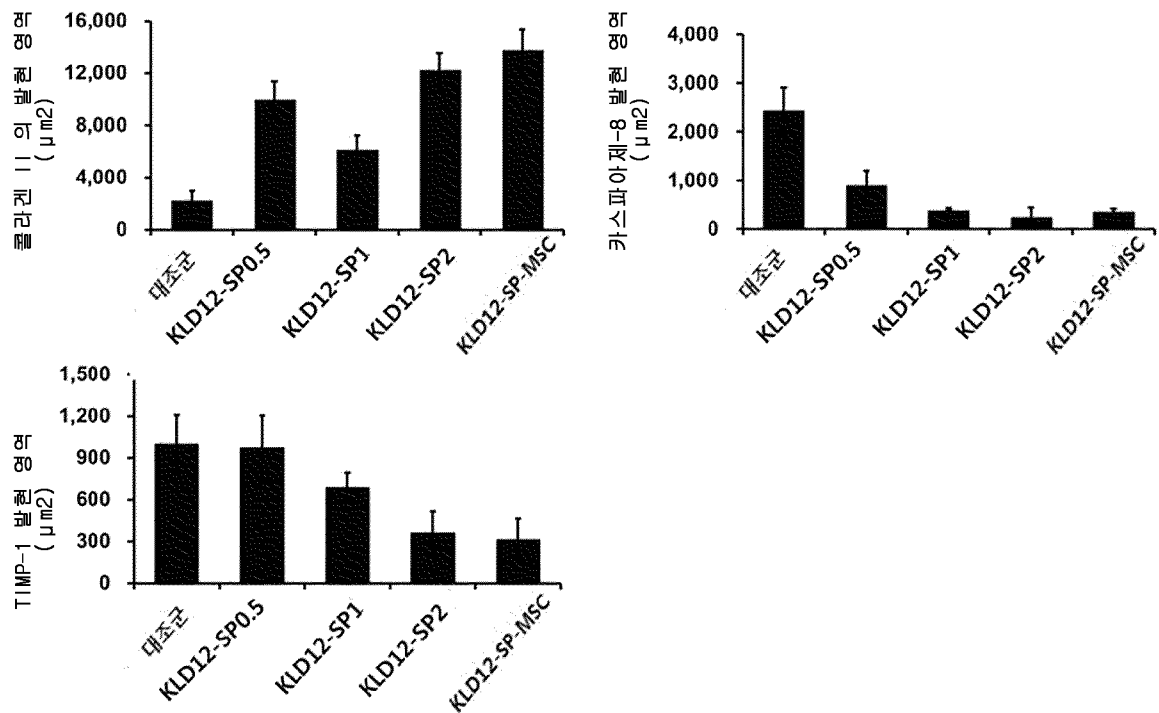


[Fig. 6]

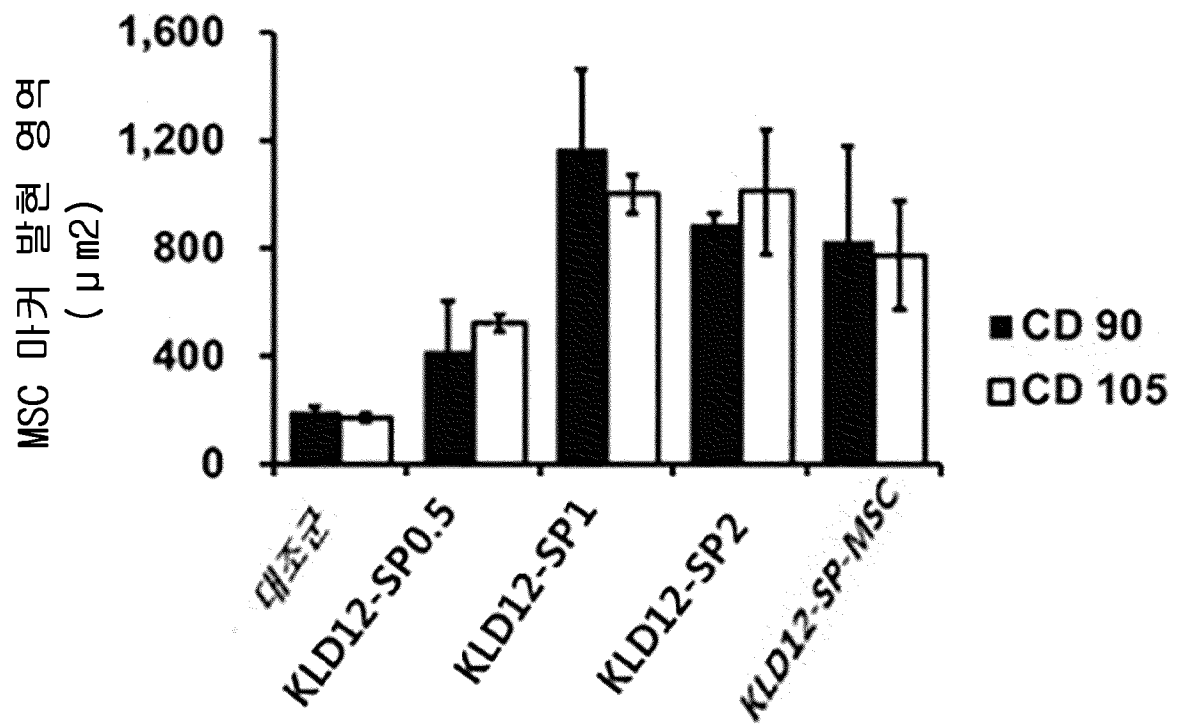


[Fig. 7]

IF 분석



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/002502**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 38/10(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i, A61K 9/00(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 38/10; C12N 5/073; C07K 7/08; C07K 7/06; A61K 38/08; A61K 9/00

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: synthetic polypeptide, arthritis, self-assembly polypeptide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM et al., "Self-assembling Peptide Nanofibers Coupled with Neuropeptide Substance P for Bone Tissue Engineering" Tissue Engineering: Part A, Vol. 21, Nos. 7-8, pp. 1237-1246 (January 2015) See pages 1237-1239 and 1245.	1-9,12-14
Y		10-11,15
Y	KISIDAY et al., "Self-assembling Peptide Hydrogel Fosters Chondrocyte Extracellular Matrix Production and Cell Division: Implications for Cartilage Tissue Repair" PNAS, Vol. 99, No. 15, pp. 9996-10001 (2002) See abstract; pages 9996-9997.	10-11,15
A	HONG et al., "Substance P Ameliorates Collagen II-induced Arthritis in Mice via Suppression of the Inflammatory Response" Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 453, pp. 179-184 (2014) See entire document.	1-15
A	KR 10-1348096 B1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 09 January 2014 See entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 JUNE 2016 (07.06.2016)

Date of mailing of the international search report

16 JUNE 2016 (16.06.2016)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/002502

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1382484 B1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 10 April 2014 See entire document.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/002502

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 16 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/002502

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1348096 B1	09/01/2014	KR 10-2013-0110606 A	30/12/2013
KR 10-1382484 B1	10/04/2014	KR 10-2013-0114968 A	21/10/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/10(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/10; C12N 5/073; C07K 7/08; C07K 7/06; A61K 38/08; A61K 9/00

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: 합성 폴리펩타이드, 관절염, 자가조립 폴리펩타이드

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM 등, `Self-assembling peptide nanofibers coupled with neuropeptide substance P for bone tissue engineering` Tissue Engineering: Part A, Vol.21, No.7-8, pp.1237-1246 (2015.01) 페이지 1237-1239 및 1245 참조.	1-9, 12-14
Y		10-11, 15
Y	KISIDAY 등, `Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair` PNAS, Vol.99, No.15, pp.9996-10001 (2002) 요약; 페이지 9996-9997 참조.	10-11, 15
A	HONG 등, `Substance P ameliorates collagen II-induced arthritis in mice via suppression of the inflammatory response` Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.453, pp.179-184 (2014) 전체 문헌 참조.	1-15
A	KR 10-1348096 B1 (한국과학기술연구원) 2014.01.09 전체 문헌 참조.	1-15

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 06월 07일 (07.06.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 06월 16일 (16.06.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1382484 B1 (한국과학기술연구원) 2014.04.10 전체 문헌 참조.	1-15

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

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

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

1. ☒ 청구항: 16
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제16항은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-1348096 B1

2014/01/09

KR 10-2013-0110606 A

2013/12/30

KR 10-1382484 B1

2014/04/10

KR 10-2013-0114968 A

2013/10/21