(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 12 월 28 일 (28.12.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/222111 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 35/50 (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)
A61K 31/66 (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/010328

(22) 국제출원일: 2016 년 9 월 13 일 (13.09.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0077485 2016 년 6 월 21 일 (21.06.2016) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 송재준 (SONG, Jae-Jun); 06501 서울시 서초구 신반포로 9, 73동 504호, Seoul (KR). 고윤영 (GO, Yoon Young); 07982 서울시 양천구 목동서로 100, 322동 308호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베델회관 8층, Seoul (KR).

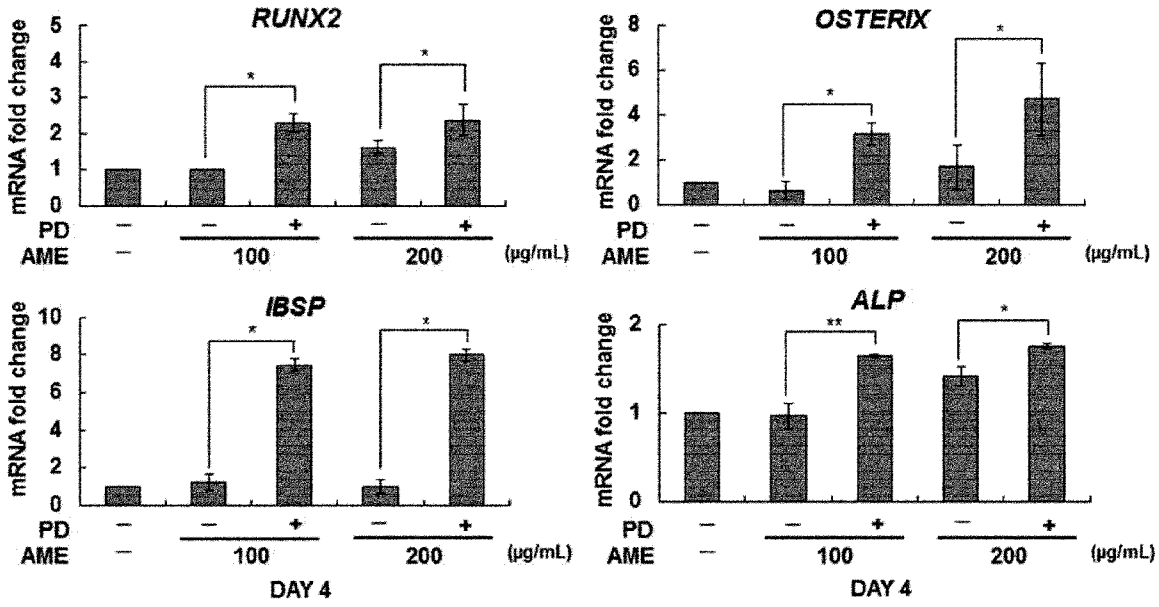
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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,

WO 2017/222111 A1

(54) **Title:** PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF BONE DISEASES COMPRISING, AS ACTIVE INGREDIENTS, EXTRACT FROM POSTPARTUM TISSUE AND EPITHELIAL GROWTH FACTOR INHIBITOR

(54) **발명의 명칭:** 분만 후 조직 유래 추출물 및 상피세포 성장인자 저해제를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물



(57) **Abstract:** The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating bone diseases comprising, as active ingredients, an extract from postpartum tissues selected from an amniotic membrane extract, a chorionic membrane extract, and a complex extract of an amniotic membrane and a chorion membrane, and an epidermal growth factor (EGF) inhibitor.

(57) **요약서:** 본 발명은 양막추출물, 융모막추출물 및 양막과 융모막의 복합추출물 중에서 선택되는 분만 후 조직 유래 추출물 및 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factors; EGF) 저해제를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 분만 후 조직 유래 추출물 및 상피세포 성장인자 저해제를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 분만 후 조직 유래 추출물 및 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factors, EGF) 저해제를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 뼈는 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호해주며 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉, 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다. 성장이 끝난 성인의 뼈는 오래된 뼈를 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수 과정을 지속적으로 반복 재생하면서 균형을 유지하게 되는데, 이를 골 재형성(bone remodeling)이라고 한다(Yamaguchi A. et al., Tanpakushitsu Kakusan Koso., 50(6Suppl);664-669, 2005). 이러한 뼈의 순환은 성장과 스트레스에 의해 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고, 그 기능을 유지하는데 필수적이다. 성인에서는 매년 골격의 약 10-30%가 골흡수-골형성의 리모델링을 통하여 재형성된다.

[3] 골 재형성은 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast) 및 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)가 관여하며 서로 밀접한 연관성으로 골의 항상성이 유지된다. 예를 들어, 조골세포는 RANKL(receptor activator of nuclear factor-κB ligand) 및 그의 유도 수용체인 OPG(osteoprotegerin)과 같은 물질의 분비를 통해 골흡수를 담당하는 파골세포의 분화를 조절함으로써 체내의 골 항상성을 유지한다. 이러한 골의 항상성이 물리적 영향, 호르몬 체계 등에 의해 유지되지 않은 경우 및 골조직 손상시 동반되는 골질환의 치료와 관련하여 과거에는 주로 골 무기질, 즉 칼슘과 인의 대사 이상만을 중심으로 연구가 진행되어 왔으며, 그 기전 규명에 있어서 진전을 보지 못하였다. 일반적으로, 골다공의 치료 및 예방을 위하여 칼슘이 함유된 식이요법이 추천되며, 폐경기의 여성들에게는 에스트로겐 또는 비타민 D 투여가 추천되고 있다. 그 외에, 포사맥스(Fosamax, 성분명: alendronate)와 악토넬(Actonel, 성분명: risedronate)과 같은 비스포스포네이트(bisphosphonate) 계열이 파골세포를 억제하고 사멸을 유도하는 골흡수 억제제로서 새로운 대체 치료제로 주목받고 있다. 그러나, 골질환 치료제로 널리 사용되는 칼슘보강제는 부갑상선 호르몬의 분비를 억제하며 골흡수에 의한 골량 감소를 방지하나, 골량 유지의 개인 차이가 심한 것으로 알려져 있다(Heandy R.P. principles of bone biology, Academic press,

1007-1017, 1996). 또한, 에스트로겐이나 칼시토닌을 이용한 호르몬 요법의 경우 골밀도를 증가시키고 직장암의 발생을 감소시킨다는 보고도 있으나, 유방암, 심근경색, 정맥 혈전증 등의 부작용이 보고된바 있다(Nelson, H.D et al., JAMA, 288:872-881, 2002; Lemay, A., J.Obstet. Bynaecol. Can., 24:711-7152-3). 또한, 비스포스포네이트 제제의 경우, 최근 복용하는 환자에서 턱뼈의 괴사, 중증 심방세동, 뼈나 관절의 무력화 또는 근골격의 통증이 발생하는 사례가 해마다 증가되고 있다(Coleman RE., Br J Cancer, 98:1736-1740(2008). 따라서 부작용 발현이 적으면서도 효과적으로 골흡수를 억제할 수 있는 새로운 골질환 치료제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[4] 한편, 양막(amnion membrane)과 융모막(amnion/chorion membrane)은 태반을 구성하고 있는 여러 층 중 가장 안쪽에 있는 막으로, 양수와 태아를 둘러싸 태아를 외부의 병원균으로부터 보호하고 양수와 태아의 생체항상성을 유지하여 태아가 정상적으로 성장/발달할 수 있는 환경을 조성하는 역할을 한다. 양막/융모막은 콜라겐으로 구성된 세포외 기질과 상피세포로 구성되어 있으며, 표피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 전환 성장인자(transforming growth factor, TGF-b), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF) 및 간장 성장인자(hepatic growth factor, HGF) 등의 다양한 성장인자들과 항염증(anti-inflammation), 항균(anti-bacterial) 성분을 포함하고 있으며 혈관생성 조절 성분(angiogenic modulatory properties) 등을 포함하고 있다(Hao Y et al., Cornea, 19(3):348-352, 2000).

[5] 1910년 Davis가 처음 양막을 생체 재료로 사용한 후(Davis JW et al., Johns Hopkins Hosp Rep, 15; 307, 1910) 화상, 창상 및 안과 수술 후 상처 치유의 목적으로 널리 사용되고 있다(Faulk WP et al., The Lancet, 315(8179):1156-1158, 1980, Mohammadi AA et al., Burns, 39(2):349-353, 2013, Dua HS et, al., Survey of Ophthalmology, 49(1):51-77, 2004). 그 이외에도, 대한민국 등록특허 제10-0756974호에는 히스타민, 면역글로불린 및 태반 추출물을 함유하는 알레르기 질환 및 만성 염증성 질환 치료용 약학적 조성물을 개시한바 있고, 대한민국 등록특허 제10-0725133호에는 자가혈청과 태반추출물을 이용하여 콜라겐을 생성하는 세포인 섬유아세포(fibroblast)를 배양하는 방법 및 이를 이용한 피부 재생용 조성물을 개시한 바 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는 골질환의 예방 또는 치료의 효과를 나타내는 분만 후 조직 유래 추출물 및 상피세포 성장인자 저해제를 유효성분으로 포함하는 약학조성물을 제공하는 것이다.

[7] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 약학조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[8] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 양막추출물, 융모막추출물 및 양막과 융모막의 복합추출물 중에서 선택되는 분만 후 조직 유래 추출물과 상피세포 성장인자(EGF) 저해제를 혼합하되, 상피세포 성장인자 저해제의 첨가량을 조절하여 골형성의 촉진, 상기 골형성 촉진의 속도조절 및 상기 골형성의 촉진량을 조절하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

[9] 상술한 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 분만 후 조직 유래 추출물과 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factors; EGF) 저해제를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[10] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 상기 분만 후 조직 유래 추출물은 양막추출물, 융모막추출물 및 양막(Amnion membrane)과 융모막(Chorion membrane)의 복합추출물 중에서 선택되는 어느 하나의 추출물일 수 있다.

[11] 본 발명에 다른 일 구현예에 의하면, 상기 분만 후 조직 유래 추출물은 양막, 융모막 및 양막과 융모막의 복합물 중에서 선택되는 분만 후 조직의 물 추출물 상청액 또는 2-30부피%의 C_{1-4}알콜 수용액 추출물 상청액일 수 있다.

[12] 본 발명에 따른 상기 골질환은 골소실 또는 골조직의 손상에 의해 유발된 질환이며, 구체적으로 골결손, 골다공증, 골절, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증, 골연화증성 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환 및 부정교합 중에서 선택되는 질환을 의미하는 것일 수 있다.

[13] 또한, 본 발명은

[14] (1) 태반으로부터 양막과 융모막을 각각 박리 또는 양막과 용모막의 복합체를 박리하고 세척하는 단계;

[15] (2) 세척된 양막, 융모막 또는 양막과 융모막의 복합체를 분쇄하여 분쇄물을 얻는 단계;

[16] (3) 상기 분쇄물을 물 또는 2-30부피%의 C_{1-4}알콜 수용액에 투입하여 단백질을 용출시켜 추출물을 얻는 단계;

[17] (4) 상기 추출물을 원심분리하여 상청액을 수집하는 단계; 및

[18] (5) 상기 상청액에 상피세포 성장인자 저해제를 첨가하는 단계;를 포함하는 분만 후 조직 유래 추출물과 상피세포 성장인자 저해제를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학조성물의 제조방법을 제공한다.

[19] 또한, 본 발명은 상기 조성물은 골형성 촉진 또는 칼슘 침착(석화)을 증가시킴으로써 골질환 치료 또는 예방의 효과를 나타낸다.

[20] 또한, 본 발명은 융모막추출물 및 양막과 융모막의 복합추출물 중에서 선택되는 분만 후 조직 유래 추출물과 상피세포 성장인자(EGF) 저해제를 혼합하되, 상피세포 성장인자 저해제의 첨가량을 조절함으로써 골형성 촉진속도 또는 촉진률을 조절하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[21] 본 발명에 따른 분만 후 조직 유래 추출물; 및 상피세포 성장인자 저해제를 유효성분으로 포함하는 약학조성물은 골형성을 촉진시키고, 칼슘의 침착을 유도하는 효과가 우수하다. 따라서 골소실 또는 골조직이 손상되어 유발되는 골관련 질환들, 구체적으로 골결손, 골다공증, 골절, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증, 골연화증성 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환 및 부정교합과 같은 골질환의 예방 또는 치료에 유용하게 적용할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학조성물은 βTCP(β-Tritricalcium phosphate), 히드록시아파타이트(Hydroxyapatite) 및 이들의 혼합물 중에서 선택되는 골재생용 지지체와 같이 사용하는 경우 약학조성물과 골재생용 지지체를 각각 단독으로 사용하는 경우에 비하여 현저히 향상된 골재생 효과를 나타내었다.

도면의 간단한 설명

[22] 도 1A는 태반에서 분리한 양막(Amnion membrane), 융모막(Chorion membrane), 양막/융모막(Amnion/Chorion membran) 복합체의 이미지이며, 도 1B는 양막추출물(AME) 및 융모막추출물(CME)이다.

[23] 도 2는 양막추출물(Amnion membrane extract, AME) 및 융모막추출물(Chorion membrane extract, CME)에 함유된 골재생 관련 성장인자를 분석한 결과이다.

[24] 도 3은 양막 추출물의 ALP(Alkaline Phosphatase)활성도를 검증한 결과이다.

[25] 도 4는 양막 추출물의 칼슘 침착도를 측정한 결과이다.

[26] 도 5는 EGF 저해제 처리된 양막추출물의 칼슘 침착도를 측정한 결과이다.

[27] 도 6은 EGF 저해제 처리된 양막추출물의 골분화 촉진 유전자 발현 증가를 검증한 결과이다.

[28] 도 7은 EGF 처리된 융모막추출물의 칼슘 침착도를 측정한 결과이다.

[29] 도 8은 융모막추출물과 BMP-2의 골분화형성 효과를 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[30] 본 발명의 발명자들은 골질환을 예방 또는 치료할 수 있는 생체재료를 찾기 위해 예의 노력한 끝에 출산 후 대부분 버려지는 생체폐기물이 골생성을 촉진하고, 칼슘의 침착도를 높이는 것을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[31]

[32] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[33] 본 발명은 양막추출물, 융모막추출물 및 양막(Amnion membrane)과 융모막(Chorion membrane)의 복합추출물 중에서 선택되는 분만 후 조직 유래 추출물; 및 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factors; EGF) 저해제;를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[34] 본 발명에 의하면, 상기 골질환은 골결손, 골소실 또는 골조직의 손상에 의해 유발된 질환일 수 있다. 골 재형성은 뼈를 생성하는 조골세포와 뼈를 파괴하는 파골세포가 관여한다. 골결손 또는 골소실은 생성되는 골에 비해 소실되는 골의 양이 더 많아 골조직이 부족하여 발생되는 질환이다. 골조직을 증가시키기는

방법으로서 조골세포의 활성을 도와 골 생성량을 늘리는 방법과 파골세포의 활성을 억제하여 골의 소실을 줄이는 방법이 대표적이다.

[35] 본 발명에 따른 상기 분만 후 조직 유래 추출물; 및 상피세포 성장인자 저해제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 조골세포의 분화와 골형성을 촉진하고, 칼슘의 침착(석화)을 증가시키는 효과를 통해 골생성량을 증가시킨다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물은 골질환의 예방 또는 치료를 위한 약학조성물로 적용이 가능하다.

[36] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 양막과 융모막에는 골재생 촉진과 관련된 여러 종류의 성장인자들이 함유되어 있는데, 구체적으로 섬유아세포 성장인자(Fibroblast Growth Factor, FGF), 형질전환 성장인자 베타-1(Transforming Growth Factor beta-1, TGF beta-1) 및 상피세포 성장인자(epidermal growth factor; EGF) 등이 포함되어 있다. 특히, 상피세포 성장인자(EGF)는 태반 및 탯줄과 같은 분만 후 조직 중에서 양막에만 유의적인 함량으로 함유된 성장인자이다. 본 발명의 발명자들은 양막추출물, 융모막 추출물 및 양막과 융모막의 복합추출물 중에서 선택되는 분만 후 조직 유래 추출물에 상피세포 성장인자 저해제를 처리하였더니 상피세포 성장인자 저해제 처리 전보다 골형성 촉진 효과가 현저히 향상되는 것을 발견하였다.

[37] 본 발명에 따르면, 상기 융모막에는 상피세포 성장인자의 함량이 낮으므로, 상피세포 성장인자 저해제를 첨가하지 않은 융모막추출물을 포함하는 약학조성물도 골형성을 촉진을 기대할 수 있으나, 상피세포 성장인자 저해제를 첨가하면 골형성이 더욱 촉진되는 것을 확인하였다.

[38] 본 발명에 따르면, 상기 분만 후 조직 유래 추출물은 분만 후 조직(양막, 융모막 또는 양막과 융모막의 복합체)의 물 추출물 상청액 또는 2-30부피%의 C_{1-4}알콜 수용액 추출물 상청액일 수 있다.

[39] 상기 C_{1-4}알콜은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 및 이소프로판올 중에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 에탄올인 것이 다른 알콜류로 추출한 추출물에 비하여 골형성 촉진이 우수하다.

[40] 본 발명에 따른 상기 추출물은 2 내지 15 ℃, 바람직하게는 2 내지 10 ℃에서 추출된 추출물일 수 있으며, 물 추출물인 것이 알콜 추출물에 비해 골형성 촉진 효과가 더욱 우수하다.

[41] 본 발명에 따른 상기 상피세포 성장인자 저해제는 상피세포 성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR)의 티로신 키나제 저해제(tyrosin kinase inhibitor; tki), 단일클론성 항체 저해제(Monoclonal antibody inhibitor), 미토겐 활성화 단백질 키나아제 효소 저해제(mitogen-activated protein kinase kinase enzymes inhibitor; MEK inhibitor) 및 포스포이노시타이드-3-키나제 저해제(phosophoinositide-3-kinase inhibitor; PI3K inhibitor) 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 상피세포 성장인자 수용체를 저해할 수 있는 것이면 상기 예시된 것에 제한되지 않는다.

[42] 상업적으로 판매되는 상피세포 성장인자 수용체의 티로신 키나제 저해제의 예로 PD 153035, Gefitinib, Erlotinib, AG494 및 AG1478 등이 있으며, 단일클론성 항체 저해제의 예로는 Matuzumab, Nimotuzumab, Zalutumumab, Cetuximab 및 panitumumab 등이 있고, 미토겐 활성화 단백질 키나아제 효소 저해제의 예로 U0126이 있으며, PI3K 저해제의 예로 Wortmannin이 있다.

[43] 본 발명에 따른 약학조성물은 약학조성물을 단독으로 사용하여 골형성 촉진의 효과를 나타낼 수 있다. 뿐만 아니라, βTCP(β-Tritricalcium phosphate), 히드록시아파타이트(Hydroxyapatite) 및 이들의 혼합물 중에서 선택되는 골재생용 지지체와 병용 또는 혼합하여 사용이 가능하다. 상기 약학조성물과 골재생용 지지체를 혼합하여 사용하는 방법은 특별히 제한은 없으며, 예를 들어, 골재생용 지지체의 표면에 본 발명에 따른 약학조성물을 코팅하여 사용하거나 골재생용 지지체와 본 발명에 따른 약학조성물을 화학적으로 결합시킨 형태로 사용될 수 있다.

[44] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 골재생용 지지체의 표면에 본 발명에 따른 약학조성물을 코팅 또는 화학적으로 결합시키면 골재생을 목적으로 하는 특정 위치에 정량적으로 골재생 효율을 증가시킬 수 있으므로 보다 바람직하다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 약학조성물과 골재생용 지지체를 각각 단독으로 사용하는 경우에 비해 골재생 효과가 현저하게 향상된 것을 확인하였다.

[45] 본 발명에 따른 약학조성물은 분만 후 조직 유래 추출물과 상피세포 성장인자 저해제 이외에 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[46] 본 발명에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체는 투여용 약제학적 활성 화합물을 제형화할 경우에 유용하고 사용 조건하에 사실상 비독성 및 비민감성인 공지된 약제학적 부형제를 의미한다. 이러한 부형제의 정확한 비율은 활성 화합물의 용해도와 화학적 특성, 선택된 투여경로뿐만 아니라, 표준 약제학적 관행에 의해 결정된다.

[47] 본 발명의 약제학적 조성물은 적합하고 생리학적으로 허용되는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제 등과 같은 보조제를 사용하여 원하는 투여 방법에 적합한 형태로 제제화될 수 있다.

[48] 본 발명에 따른 약학조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제, 액제 또는 주사제의 형태로 제형화될 수 있다.

[49] 경구 투여에 적합한 제형은 고체 제제, 예를 들어 정제, 미립자, 액체 또는 분말을 함유한 캡슐제, 환제, 과립제, 산제, 로젠지제(lozenge)(액체-충전된 것 포함), 츄제(chew), 멀티- 및 나노-미립제, 겔제, 고용제(solid solution), 리포솜, 필름제(점막-점착성 포함), 난형제(ovule), 분무제(spray) 및 액제를 포함한다. 액제는 예를 들어 현탁액제, 용액제, 시럽제 및 엘릭시르(elixir)제를 포함한다.

[50] 정제는 약물 이외에도 일반적으로 붕해제를 함유한다. 붕해제로서 나트륨 전분

글리콜레이트, 옥수수 전분, 감자 전분 또는 예비 젤라틴화 전분 등의 전분 또는 변성전분과, 벤토나이트, 몬모릴로나이트, 비검(veegum) 등의 클레이와, 미세결정성 셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 또는 카르복시메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류와, 알긴산 나트륨 또는 알긴산 등의 알긴류와, 크로스카멜로스(croscarmellose) 나트륨 등의 가교 셀룰로오스류와, 구아검, 잔탄검 등의 검류와, 크로스포비돈(crospovidone) 등의 가교 중합체와, 중탄산 나트륨, 시트르산 등의 비등성 제제 등을 혼합 사용할 수 있다. 일반적으로, 붕해제는 투여 형태의 약 1 중량% 내지 약 25 중량%, 바람직하게는 투여 형태의 약 2 중량% 내지 약 10 중량%를 포함할 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[51] 결합제는 일반적으로 정제 제제에 점착성을 부여하기 위해 사용된다. 적합한 결합제는 미세결정성 셀룰로오스, 젤라틴, 당(sugar), 폴리에틸렌 글리콜, 천연 및 합성 검(gum), 폴리비닐피롤리돈, 예비젤라틴화된 전분, 전분, 코포비돈, 고분산성 실리카, 만니톨, 락토스, 하이드록시프로필 셀룰로스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로스를 포함한다. 일반적으로, 결합제는 투여 형태의 약 1 중량% 내지 약 40 중량%, 바람직하게는 투여 형태의 약 2중량% 내지 약 25 중량%를 포함할 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 정제는 희석제로서, 예를 들어 전분, 미세결정성 셀룰로오스, 유당, 포도당, 만니톨, 알기네이트, 알칼리토류금속염, 클레이, 폴리에틸렌글리콜 및 디칼슘 포스페이트 등을 사용할 수 있다. 일반적으로, 희석제는 투여 형태의 약 1 중량% 내지 약 70 중량%, 바람직하게는 투여 형태의 약 2 중량% 내지 약 50 중량%를 포함할 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[52] 정제는 또한 계면활성제, 예컨대 나트륨 라우릴 설페이트 및 폴리솔베이트 80, 및 활택제(glidant), 예컨대 이산화규소 및 활석을 선택적으로 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 계면활성제는 정제의 약 0.2 중량% 내지 약 5 중량%를 포함할 수 있고, 활택제는 정제의 약 0.2 중량% 내지 약 1 중량%를 포함할 수 있다.

[53] 또한 윤활제로서, 예컨대 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 아연 스테아레이트, 나트륨 스테아릴 푸마레이트, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트, 라우릴 설페이트, 수소화 식물성 오일, 나트륨 벤조에이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 폴리에틸렌글리콜 4000 등을 사용할 수 있다. 윤활제는 일반적으로 정제의 약 0.25 중량% 내지 약 5 중량%, 바람직하게는 약 0.5 중량% 내지 약 3 중량%를 포함한다.

[54] 그 밖의 다른 가능한 성분은 산화방지제, 착색제, 향미제, 보존제 및 맛-차단제를 포함한다.

[55] 정제 배합물은 직접적으로 압착되거나 롤러로 압착되어 정제를 형성할 수 있다. 다른 방법으로 정제 배합물 또는 그 배합물의 일부는 정제화되기 전에 습식, 건식, 용융-과립화(granulated), 용융 응고(melt congealed) 또는 압출될 수 있다. 최종 제제는 하나 이상의 층을 포함할 수 있고, 코팅되거나 코팅되지 않을

수 있으며, 캡슐화될 수 있다.

[56] 경구 투여용 고체 제제는 즉시(immediate) 방출형 및/또는 변형(modified) 방출형으로 제제화될 수 있다. 변형 방출형 제제는 지연(delayed), 지속(sustained), 펄스(pulsed), 제어(controlled), 표적(targeted) 및 프로그램(programmed) 방출형을 포함한다.

[57] 일 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 정제일 수 있다. 정제는 임의적으로 필름 코팅될 수 있다. 복용 단위당 약의 총량은 환자에게 편리한 크기의 복용 형태를 제공하는 양일 수 있다.

[58] 본 발명에 따르면, 상기 약학조성물은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 유효량이 조절될 수 있다. 예컨대, 성인의 경우, 의사 또는 약사의 판단에 따라 10 내지 4000 mg/day의 용량을 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수 있다.

[59] 본 발명에 따른 상기 골질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 하기 단계를 포함하여 수행함으로써 제조될 수 있다.

[60] (1) 태반으로부터 양막과 융모막을 각각 박리 또는 양막과 융모막의 복합체를 박리하고 세척하는 단계;

[61] (2) 세척된 양막, 융모막 또는 양막과 융모막의 복합체를 분쇄하여 분쇄물을 얻는 단계;

[62] (3) 상기 분쇄물을 물 또는 2-30부피%의 C_{1-3}알콜 수용액에 투입하여 단백질을 용출시켜 추출물을 얻는 단계;

[63] (4) 상기 추출물을 원심분리하여 상청액을 수집하는 단계; 및

[64] (5) 상기 상청액에 상피세포 성장인자 저해제를 첨가하는 단계.

[65] 상기 제조방법에 있어서, 양막의 박리, 세척, 분쇄 및 양막 내 단백질 용출은 양막추출물, 융모막추출물 또는 양막과 융모막의 복합추출물을 제조하기 위한 통상의 방법을 이용하여 준비될 수 있으며, 특별히 제한되는 것은 아니다.

[66] 본 발명에 의하면, 상기 (4) 단계의 원심분리 전에 단백질 용출이 용이하도록 초음파 분쇄기로 처리하는 단계를 더 포함하여 수행할 수 있다. 또한 수집된 상청액은 필터한 뒤, 냉동 또는 초저온에서 보관하여 실험에 이용하는 것이 바람직하다. 제조된 추출물은 단백질의 농도를 정량한 뒤 실험에 이용하였다.

[67] 또한, 본 발명은 양막추출물, 융모막추출물 및 양막과 융모막의 복합추출물 중에서 선택되는 분만 후 조직 유래 추출물; 및 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factors; EGF) 저해제;를 혼합하여 처리하는 단계를 포함하는 골형성 촉진방법을 제공한다.

[68] 또한, 본 발명은 양막추출물, 융모막추출물 및 양막과 융모막의 복합추출물 중에서 선택되는 분만 후 조직 유래 추출물과 상피세포 성장인자(EGF) 저해제를 혼합하되, 상피세포 성장인자 저해제의 첨가량을 조절함으로써 골형성

촉진속도 또는 촉진률을 조절하는 방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

[69] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 성명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[70]

[71] **실시예**

[72] **제조예**

[73] 내과, 산과 또는 외과 합병증의 증상을 보이지 않고 혈액 검사를 통해 HBV, HCV 그리고 HIV 바이러스가 감염되지 않은 정상 인간 태반(=37 주 임신)을 제왕절개술 이후 수득하였고, 공여자 모두로부터 동의를 받았다. 샘플의 수집 및 실험 목적으로의 사용은 고려대학교 의과대학으로부터 IRB 승인을 받았다.

[74]

[75] 제조예 1: 양막추출물 제조

[76] 태반의 탯줄을 중심으로 칼집을 내어 양막을 태반으로부터 조심스럽게 박리하여 채취하고 채취한 양막은 1% 페니실린/스트렙토마이신 항생제가 첨가된 PBS 또는 생리식염수에 세척하였다. 양막의 점액질과 혈액을 제거한 후 호모지나이저를 이용하여 분쇄시킨 후 1:1=양막의 질량(g):PBS(mL)의 비율로 완충용액을 넣고 하룻밤 동안 4 ℃에서 보관하여 단백질이 방출되도록 하였다. 다음으로 초음파 분쇄기를 이용하여 단백질 방출을 도운 후 원심분리하였다. 상청액을 수집하고 실린지 필터로 여과하여 -80 ℃에서 보관하였다. 제조된 양막추출물은 단백질의 농도를 측정하여 필요량을 실험에 사용하였다.

[77]

[78] 제조예 2 : 양막/융모막 복합추출물 제조

[79] 태반으로부터 양막과 융모막의 복합체를 박리한 뒤 세척하고 분쇄하여 양막추출물의 제조방법과 동일한 방법으로 양막/융모막 복합추출물을 제조하였다.

[80]

[81] 제조예 3: 융모막추출물 제조

[82] 양막 대신 융모막을 박리하여 양막추출물의 제조방법과 동일한 방법으로 융모막추출물을 제조하였다.

[83]

[84] **시험예**

[85] **성장인자 분석**

[86] 제조예 1, 3에서 제조한 양막추출물(Amnion membrane extract, AME) 및 융모막추출물(Chorion membrane extract, CME)에 함유된 골재생 관련

성장인자들을 확인하기 위하여 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 분석법을 실시하였다. 실험에 사용된 농도는 pg of growth factor/mg of protein in extraxt이다.

[87] 하기 표 1및 도 2에 나타낸 바와 같이, 섬유아세포 성장인자(Fibroblast Growth Factor, FGF) 및 형질전환 성장인자 베타-1(Transforming Growth Factor β-1, TGFβ-1)는 양막추출물 및 융모막추출물에서 모두 검출되었으며, 특히, 양막추출물에 함유된 TGFβ-1은 융모막추출물보다 40%가량 더 많이 함유하는 것으로 확인되었다.

[88] 한편, 제2형 골형성 단백질(Bone Morphogenic Protein 2, BMP-2)은 양막추출물과 융모막추출물에서 모두 검출되지 않았으며, 상피세포 성장인자(epidermal growth factor; EGF)는 양막추출물에만 유의적으로 검출되었으며, 융모막추출물에는 극소량 존재하는 것으로 확인되었다.

[89]

[90] 표 1

[표1]

구분	AME	CME
FGF	3.310	3.024
BMP-2	-1.846	-1.604
TGFβ-1	33.070	23.820
EGF	8.229	0.008

[91]

[92] **양막추출물의 ALP(Alkaline Phosphatase)활성도와 칼슘량 측정**

[93] 조골세포와 비슷한 세포로 알려진 인간 골육종 세포주인 MG-63(한국세포주은행, KCLB)을 in vitro 골형성 실험에 사용하였으며, 10%(v/v) FBS(Fetal bonine serum) 및 1%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 및 37 ℃, 5% CO_2 습한 환경 하에서 세포를 배양하였다.

[94] ① ALP(Alkaline Phosphatase)활성도

[95] 골형성시 초기 단계에 나타나는 골 형성 지표인 ALP 효소를 측정하는 실험을 실시하였다. 양막추출물의 ALP 활성도를 측정하기 위해서 이미 골형성을 촉진하여 ALP의 활성화를 촉진하는 융모막추출물과 양막/융모막 복합추출물과 비교하여 ALP 측정을 확인하고자 하였으며, 골형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 MG-63 세포에 100 μg/mL추출물들(AME:양막추출물, ACME:양막/융모막 복합추출물, CME:융모막추출물)를 처리한 후, 추출물을 처리하지 않은 대조군(OIM)과 함께 ALP 활성도를 측정하였다.

[96] 3일, 7일째의 시료를 취하여, 차가운 PBS buffer로 2회 세척한 다음, 0.1% Triton X-10이 첨가된 세포막 분해 용액(cell lysis buffer)로 용해(lysis) 시켰다. 용해된 세포를 4 ℃, 13000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상청액을 회수하여 브래드포드법으로 정량하고, 동량의 단백질을 ALP kit(아나스펙, Inc, Fermont, Canada)로 제조사의 지침에 따라 405 ㎚에서 ALP 활성도를 측정하여 도 3에 나타내었다.

[97] 분화 7일 차에 융모막추출물의 ALP 활성도가 가장 높았으며, 양막/융모막 복합추출물 및 양막추출물 순으로 나타났다.

[98]

[99] ② 칼슘 침착도 측정

[100] 칼슘 침착 평가(석화작용)는 조골세포의 분화 중 중후반 지표로 널리 사용된다. 양막추출물의 칼슘 침착도를 측정하기 위해서 이미 골형성을 촉진하여 칼슘 침착을 촉진하는 융모막추출물과 양막/융모막 복합추출물과 비교하여 본 실험을 실시하였다. 동일하게 골형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 MG-63 세포를 분화시킨 후 추출물을 100, 200, 400, 800 ㎍/mL의 농도로 처리한 후, 추출물을 처리하지 않은 대조군과 함께 칼슘의 함량을 분화 후 7일 후에 측정하였다. 칼슘의 함량은 QuantiChromTM 칼슘 분석 키트(DICA-500)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였으며, 그 결과를 하기 도 4에 나타내었다.

[101] 분화 7일차에 측정한 칼슘 함량결과에서 확인할 수 있듯이, 양막추출물이 융모막추출물 또는 양막/융모막 복합추출물을 처리한 군에 비하여 칼슘 침착 유도 효과가 낮은 것으로 나타났다(*P<0.05). 본 발명의 발명자들은 상기 차이가 융모막에는 포함되지 않고, 양막에만 포함되어 있는 성장인자인 EGF가 골형성 방해 인자로 작용하여 저해효과를 나타내는 것이라는 가설을 세웠으며, 상기 가설을 입증하기 위한 실험으로 양막추출물을 EGF 저해제로 처리하여 비교실험을 실시하였다.

[102]

[103] **EGF 저해제 처리된 양막추출물의 칼슘 침착도 및 골분화 촉진 유전자 발현 증가 검증**

[104] ① 칼슘 침착도 측정

[105] 양막추출물에 EGF 저해제를 처리 후 칼슘 침착도를 측정하기 위해서, 동일하게 골형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 MG-63 세포를 분화시킨 후 PD153035(Calbiochem사, EGF의 세포내 수용체의 전달체인 tyrosin kinase를 저해하는 물질)를 5, 10, 20 μM의 농도로 처리한 후, 1시간 후 양막추출물 200 ㎍/mL을 처리하여 7일 동안 분화를 유도하여 칼슘의 함량을 측정하였다(A).

[106] 동일한 분화 조건에서 PD153035 10μM를 처리한 후, 1시간 후 양막추출물을 100, 200, 400 ㎍/mL의 농도로 처리한 후 처리하여 7일 동안 칼슘의 함량을

측정하였다(B). 칼슘의 함량은 QuantiChromTM 칼슘 분석 키트(DICA-500)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[107] 두 결과 모두 EGF 저해제를 처리한 그룹에서 칼슘의 함량이 현저히 높게 측정되었을 뿐만 아니라 칼슘함량이 EGF 저해제의 농도의존적 증가되는 것을 확인하였다.

[108]

[109] ② 골분화 촉진 유전자 발현 증가 검증

[110] 분화 과정 중 유전자 변화를 확인해보기 위해 분화 단계별 세포로부터 전체 RNA를 트리졸 시약(인비트로젠, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분리하였다. ALP와 IBSP(integrin-binding sialoprotein)는 골형성시 초기 단계에 나타나는 골 형성의 지표 단백질로서, RUNX2와 OSTERIX는 골분화에 중요한 유전자 전사인자로 모두 4일째에 세포로부터 전체 RNA를 얻어 실험을 수행하였다. 배양된 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 다음 트리졸 시약 1 ml을 넣어 용해시켰다. 200 ㎕ 클로로포름을 넣어 섞어준 다음 섭씨 4도, 12000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상청액을 분리하였다. 분리된 상청액에 500 ㎕의 이소프로판올을 넣어 섞어준 다음 섭씨 4도, 12000 rpm으로 다시 원심 분리하였다. 상청액은 버리고 남은 펠렛을 70% 에탄올로 3회 세척한 다음 RNA를 분리하였다. RT-PCR을 위해 동량의 전체 RNA(5 ㎕)에 RT-PCR 증폭 키트를 넣어 섭씨 45도에서 60분간 반응시켜 cDNA를 제조하였다. cDNA는 각각 ALP, IBSP, RUNX2, OSTERIX에 특이적인 프라이머를 이용하여 실시간 PCR 방법으로 증폭하였다. 실시간 PCR은 cDNA에 SYBR 그린 시약(로슈, Basel, Switzerland)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 실시하였다. 구체적으로 동량의 cDNA에 2X SYBR 그린을 10 ㎕와 각각의 0.5 pmol/㎕ 프라이머를 1 ㎕ 넣은 후 95도에서 30초, 섭씨 60도에서 1 분씩, 40 회 반응을 시켜 증폭하였다.

[111] 도 6에 나타낸 바와 같이, RT-PCR 결과, 골분화 마커 유전자들이 EGF 저해제에 농도의존적으로 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

[112]

[113] **EGF 처리된 융모막추출물의 칼슘 침착도 검증**

[114] EGF에 의해 골형성이 저해되는 것을 입증하기 위하여, EGF가 함유되지 않은 융모막추출물에 EGF를 첨가하여 실험을 실시하였다.

[115] 동일한 골형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 MG-63 세포를 분화시킨 후 다양한 농도(100, 200, 400, 800 μg/mL)의 융모막추출물에 EGF(100 ng/mL, PeproTECH, recombinant human EGF)를 처리 또는 미처리하여 9일 동안 분화를 유도한 후 칼슘 침착도를 측정하였다(A). 도 7A에 나타낸 바와 같이, 400 μg/mL이상 농도에서 칼슘 침착도가 유의적으로 증가하였다.

[116] 이에, 융모막추출물의 농도를 400 ㎍/mL으로 동일하게 고정한 다음, EGF를 농도별(50, 100, 500 ng/mL)로 처리하여 9일 동안 분화를 유도한 후 EGF 농도 변화에 따른 칼슘침착도 변화를 측정하였다(B). 도 7B에 나타낸 바와 같이,

EGF가 처리되지 않은 군(0 ng/mL)에서는 칼슘 침착도가 유의적으로 증가하였으나, EGF의 첨가로 칼슘 침착이 저해되는 것을 확인하였다.

[117]

[118] **융모막추출물 및 BMP-2의 골형성 비교 실험**

[119] 제2형 골형성 단백질인 BMP-2와 비교하여 본 발명에 따른 추출물의 효과를 확인하기 위하여 동일한 골형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 MG-63 세포를 분화시킨 후 BMP-2와 융모막추출물(CME)를 농도별로 처리하여 18일 동안 분화를 유도하였다.

[120] 하기 도 8에 나타낸 바와 같이, 융모막추출물 400 ㎍/mL의 농도에서 BMP-2 500 ng/mL로 처리한 것보다 우수한 결과를 얻었다. 상기 표 2의 결과로부터 융모막추출물 400 ㎍/mL에는 FGF가 1.209 pg, TGF-β1이 9.258 pg 함유되는 것으로 계산되었다.

[121]

[122] 막/융모막 조직은 태반 당 50-80g을 얻을 수 있었다. 양막/융모막 1g의 조직당 총단백질량과 추출물별 총단백질량을 확인하여 하기 표 2 나타내었다.

[123] 표 2

[표2]

구분	총단백질량mg/조직g
양막추출물	1.46±0.44
융모막추출물	2.50±0.56

[124]

[125] 상기와 같은 결과를 통해, 태반 당 양막추출물의 단백질량은 36.5-58.4 mg, 융모막추출물의 단백질량은 63-100 mg이며, 양막/융모막 복합추출물은 99-158 mg을 얻을 수 있는 것을 확인하였다. 따라서, 태반 당 BMP-2 500 ng/mL로 처리로 얻을 수 있는 효과의 추출물 250-400회분을 얻을 수 있었다.

산업상 이용가능성

[126] 본 발명은 출산 후 대부분 버려지는 생체폐기물이 골생성을 촉진하고, 칼슘의 침착도를 높이는 것을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다. 본 발명에 따른 양막추출물 또는 양막/융모막 복합추출물; 및 상피세포 성장인자(EGF) 저해제를 포함하는 약학조성물은 골형성을 촉진하고, 칼슘침착을 향상시킴으로 골소실 또는 골조직의 손상에 의한 골질환의 치료 또는 예방에 유용하게 적용할 수 있다. 또한, 폐기물로 버려지는 양막/융모막을 이용하여 높은 부가가치의 창출이 가능하다.

청구범위

[청구항 1] 양막추출물, 융모막추출물 및 양막(Amnion membrane)과 융모막(Chorion membrane)의 복합추출물 중에서 선택되는 분만 후 조직 유래 추출물; 및 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factors; EGF) 저해제;를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 분만 후 조직 유래 추출물은 양막, 융모막 및 양막과 융모막 복합물 중에서 선택되는 분만 후 조직의 물 추출물 상청액 또는 2-30부피%의 C_{1-4} 알콜 수용액 추출물 상청액인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 상피세포 성장인자 저해제는 상피세포 성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR)의 티로신 키나제 저해제(tyrosin kinase inhibitor; tki), 단일클론성 항체 저해제(Monoclonal antibody inhibitor), 미토겐 활성화 단백질 키나아제 효소 저해제(mitogen-activated protein kinase kinase enzymes inhibitor; MEK inhibitor) 및 포스포이노시타이드-3-키나제 저해제(phosophoinositide-3-kinase inhibitor; PI3K inhibitor)로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 골질환은 골소실증, 골결손, 골다공증, 골절, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증, 골연화증성 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환 및 부정교합으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 약학조성물은 βTCP(β-Tritricalcium phosphate), 히드록시아파타이트(Hydroxyapatite) 및 이들의 혼합물 중에서 선택되는 골재생용 지지체와 병용하여 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 약학조성물은 βTCP(β-Tritricalcium phosphate), 히드록시아파타이트(Hydroxyapatite) 및 이들의 혼합물 중에서 선택되는 골재생용 지지체의 표면에 물리적으로 코팅시키거나 또는 화학적으로 결합시켜 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제, 액제 또는 주사제의 형태로 제형화된 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
골형성 촉진 또는 칼슘 침착(석화)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[청구항 9] (1) 태반으로부터 양막과 융모막을 각각 박리 또는 양막과 용모막의 복합체를 박리하고 세척하는 단계;
(2) 세척된 양막, 융모막 또는 양막과 융모막의 복합체를 분쇄하여 분쇄물을 얻는 단계;
(3) 상기 분쇄물을 물 또는 2-30부피%의 C_{1-4}알콜 수용액에 투입하여 단백질을 용출시켜 추출물을 얻는 단계;
(4) 상기 추출물을 원심분리하여 상청액을 수집하는 단계; 및
(5) 상기 상청액에 상피세포 성장인자 저해제를 첨가하는 단계;를 포함하는 분만 후 조직 유래 추출물과 상피세포 성장인자 저해제를 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학조성물의 제조방법.

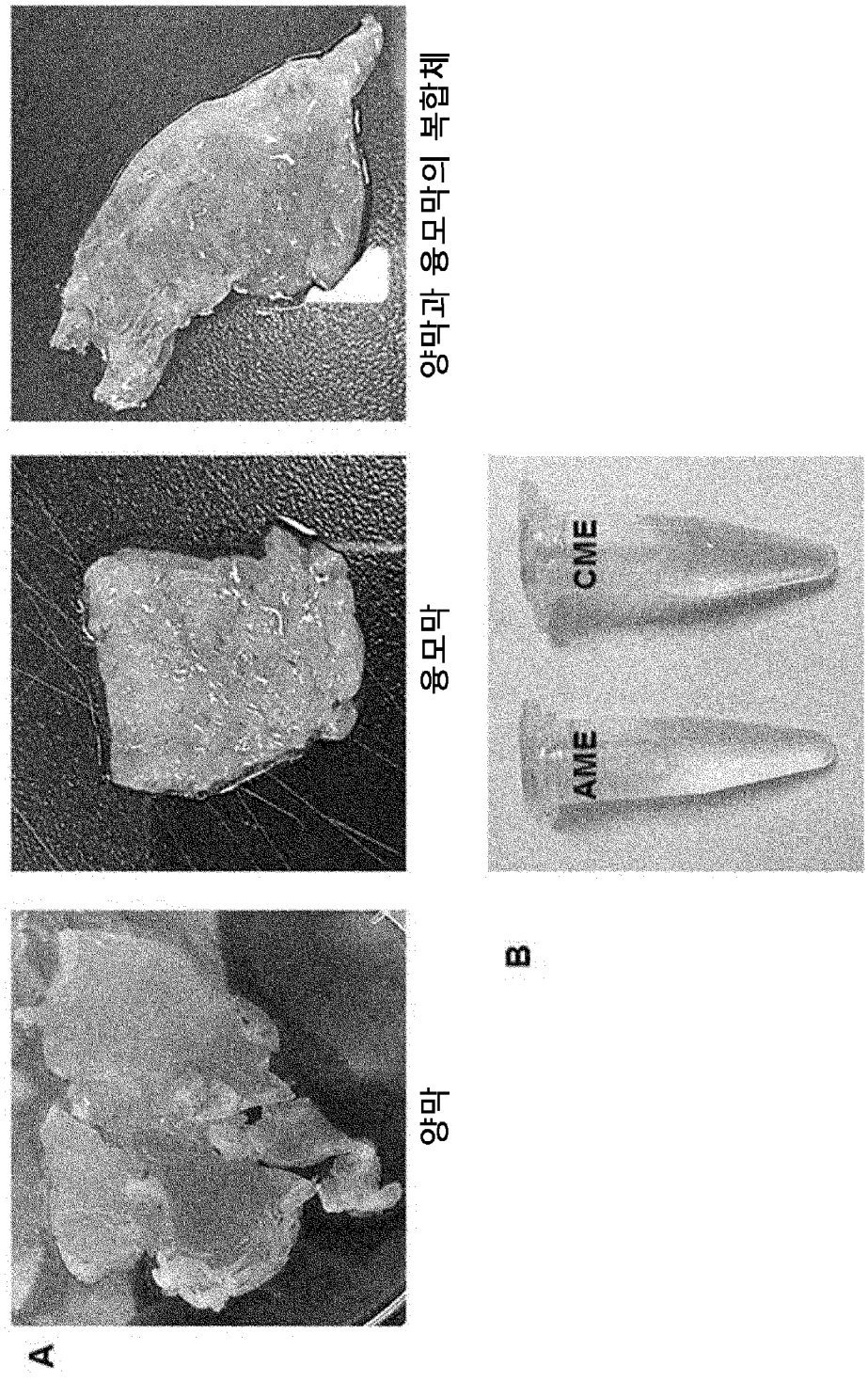
[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 골질환은 골소실증, 골결손, 골다공증, 골절, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증, 골연화증성 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환 및 부정교합 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학조성물의 제조방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 상피세포 성장인자 저해제는 상피세포 성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR)의 티로신 키나제 저해제(tyrosin kinase inhibitor; tki), 단일클론성 항체 저해제(Monoclonal antibody inhibitor), 미토겐 활성화 단백질 키나아제 효소 저해제(mitogen-activated protein kinase kinase enzymes inhibitor; MEK inhibitor) 및 포스포이노시타이드-3-키나제 저해제(phosophoinositide-3-kinase inhibitor; PI3K inhibitor) 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학조성물의 제조방법.

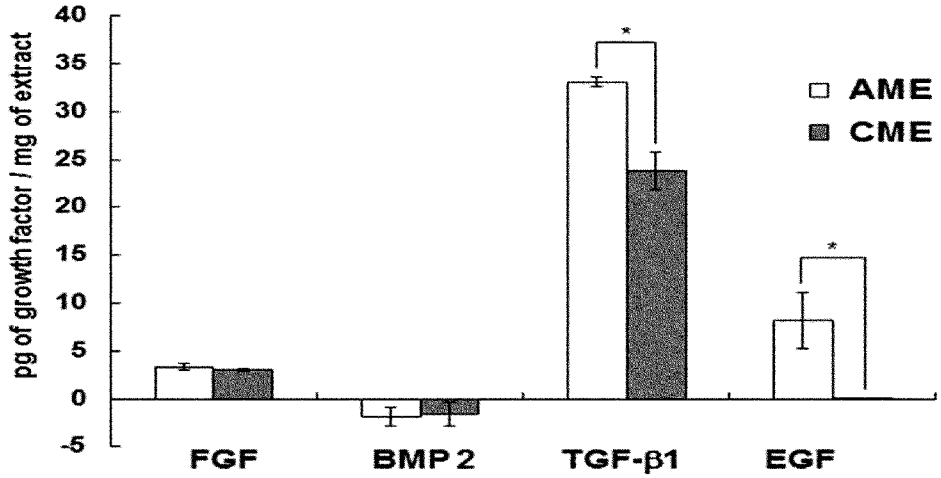
[청구항 12] 양막추출물, 융모막추출물 및 양막과 융모막의 복합추출물 중에서 선택되는 분만 후 조직 유래 추출물; 및 상피세포 성장인자(Epidermal Growth Factors; EGF) 저해제;를 혼합하여 처리하는 단계를 포함하는 골형성 촉진방법.

[청구항 13] 양막추출물, 융모막추출물 및 양막과 융모막의 복합추출물 중에서 선택되는 분만 후 조직 유래 추출물과 상피세포 성장인자(EGF) 저해제를 혼합하되, 상피세포 성장인자 저해제의 첨가량을 조절함으로써 골형성 촉진속도 또는 촉진률을 조절하는 방법.

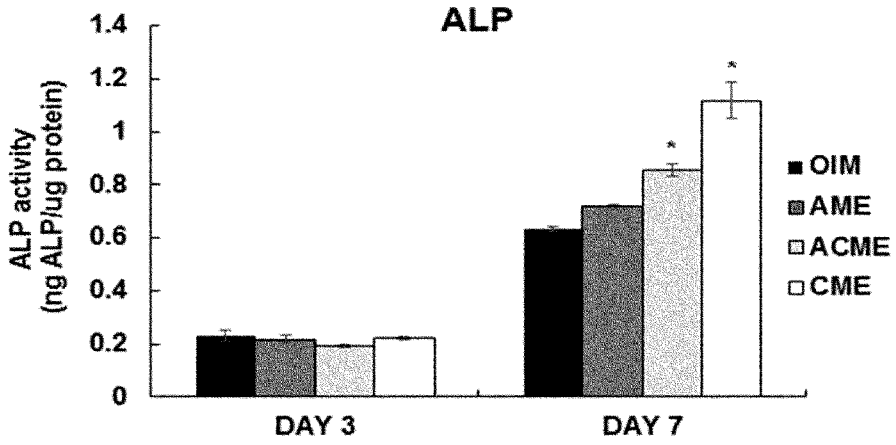
[도1]



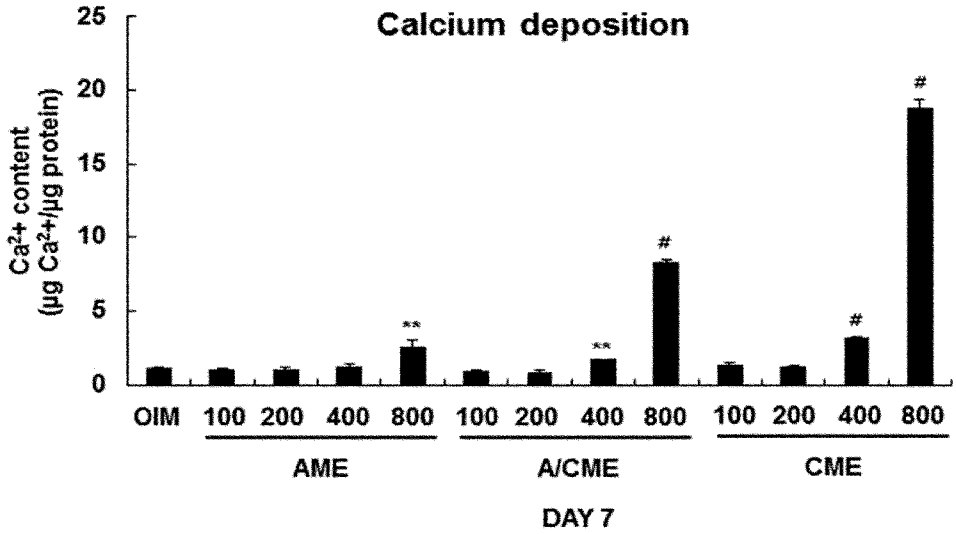
[도2]


pg of growth factor / mg of extract
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
FGF
BMP 2
TGF-β1
EGF
AME
CME
*
*

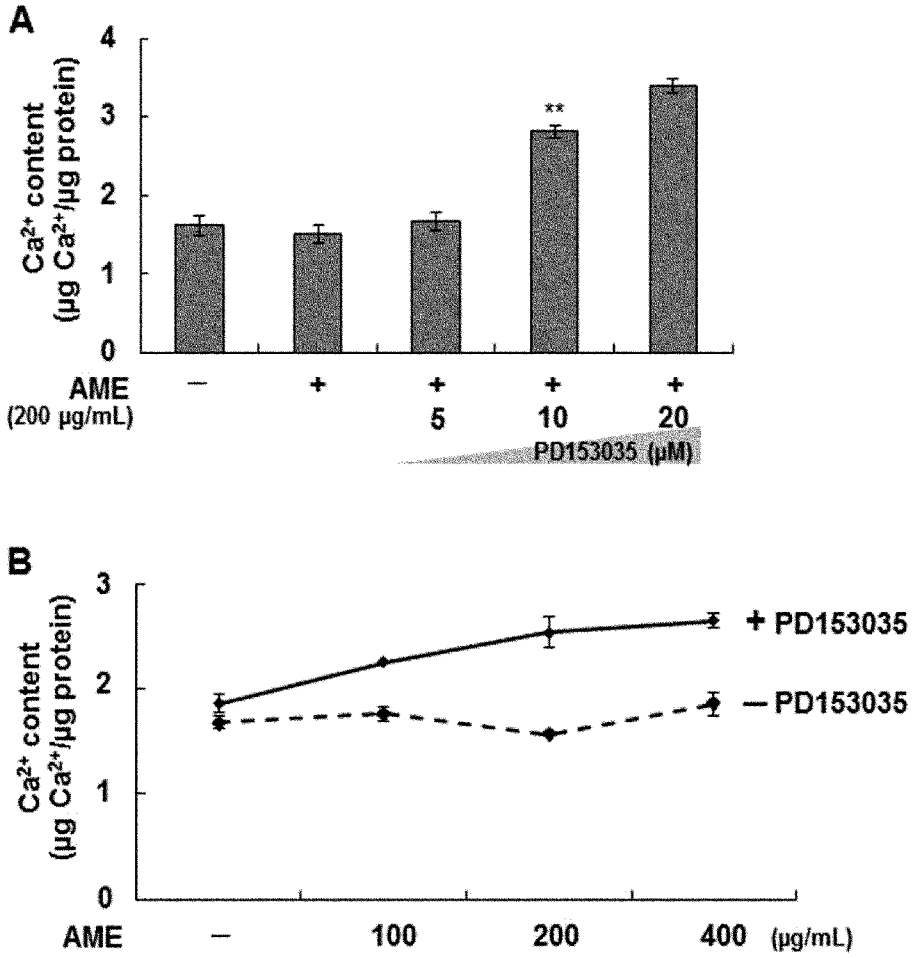
[도3]


ALP
ALP activity
(ng ALP/ug protein)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
DAY 3
DAY 7
OIM
AME
ACME
CME
*
*
*

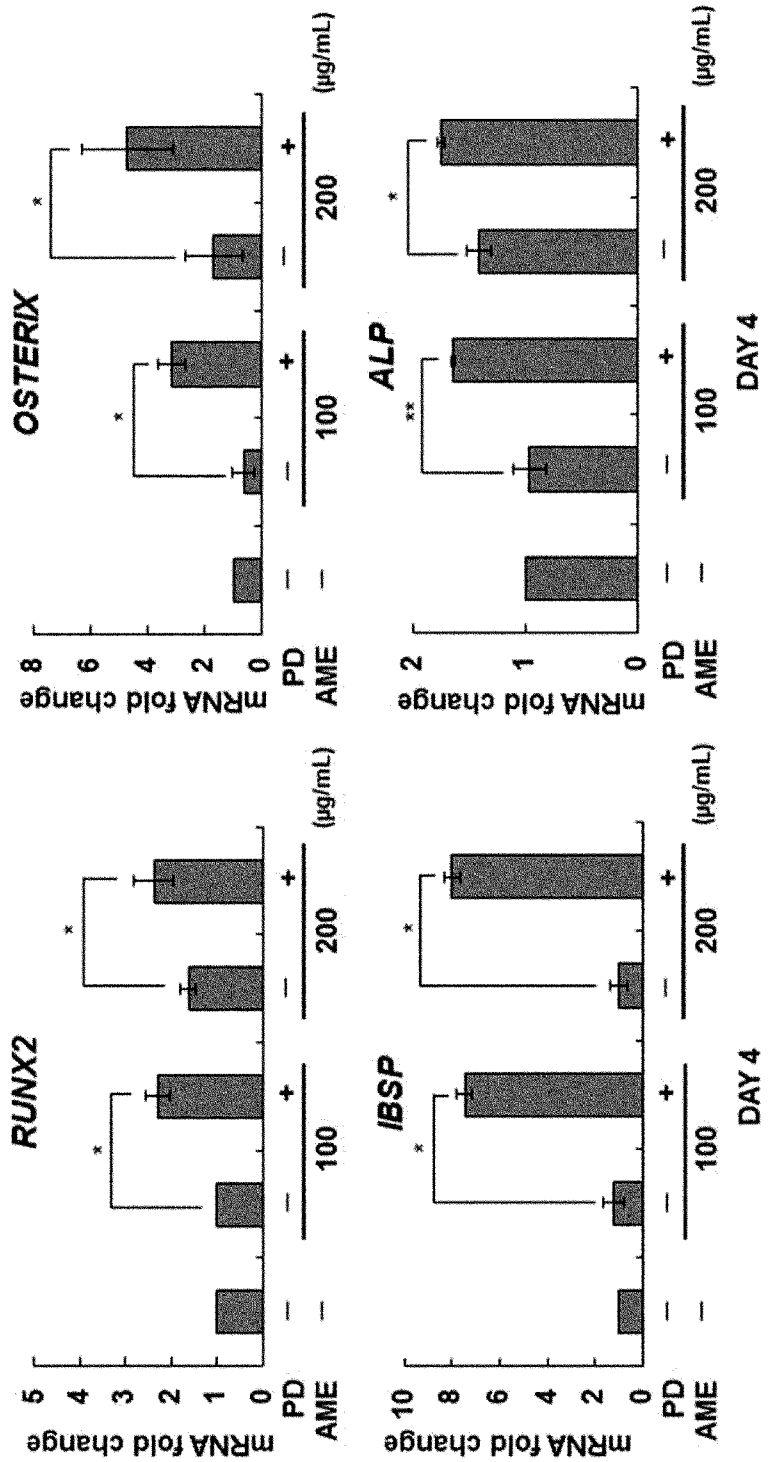
[도4]


Calcium deposition
Ca2+ content
(μg Ca2+/μg protein)
25
20
15
10
5
0
OIM
100 200 400 800
100 200 400 800
100 200 400 800
AME
A/CME
CME
DAY 7
**
**
#
#
#

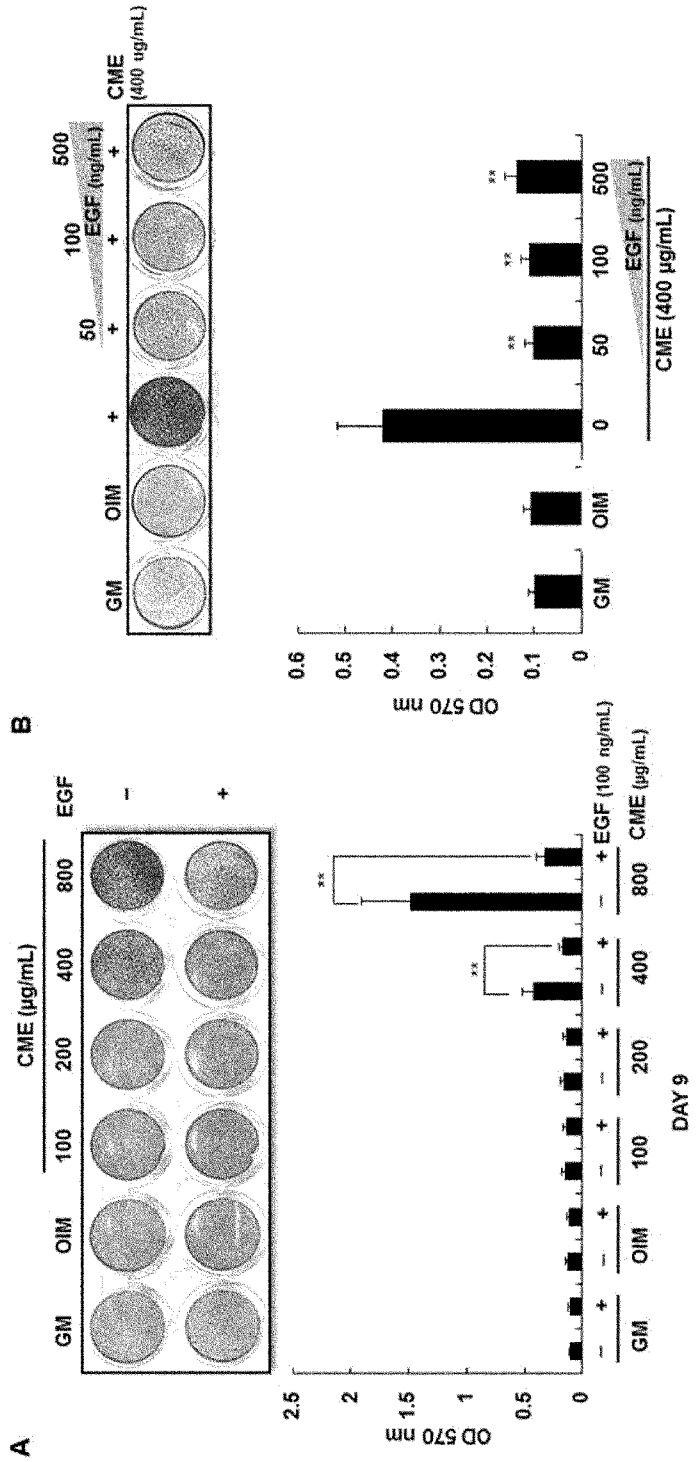
[도5]


A
Ca2+ content
(μg Ca2+/μg protein)
4
3
2
1
0
**
AME
(200 μg/mL)
–
+
+
+
+
5
10
20
PD153035 (μM)
B
Ca2+ content
(μg Ca2+/μg protein)
3
2
1
0
+ PD153035
– PD153035
AME
–
100
200
400
(μg/mL)

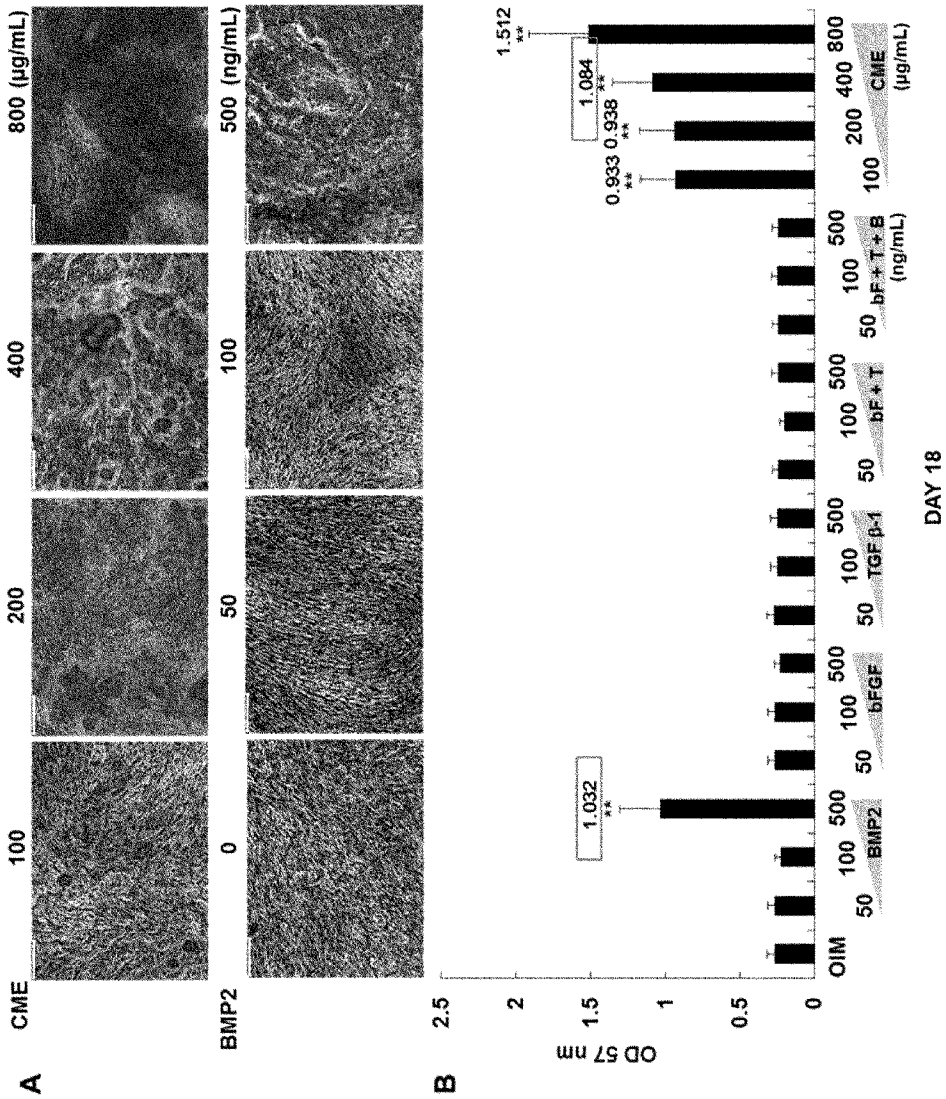
[도6]


OSTERIX
ALP
RUNX2
IBSP
mRNA fold change
PD
AME
(μg/mL)
100
200
DAY 4

[도7]


A
CME (μg/mL)
GM
OIM
100
200
400
800
EGF
DAY 9
OD 570 nm
B
CME (400 ug/mL)
EGF (ng/mL)
50
100
500
GM
OIM
CME (400 μg/mL)
EGF (ng/mL)
OD 570 nm

[도8]


A
CME
100
200
400
800 (μg/mL)
BMP2
0
50
100
500 (ng/mL)
B
OD 57 nm
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1.032
**
0.933
**
0.938
**
1.084
**
1.512
**
OIM
50
BMP2
100
500
50
bFGF
100
500
50
TGF β-1
100
500
50
bF + T
100
500
50
bF + T + B
100
500
100
200
400
800
CME
(μg/mL)
(ng/mL)
DAY 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/010328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/50(2006.01)i, A61K 31/66(2006.01)i, A61K 9/14(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61K 9/48(2006.01)i, A61K 45/06(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 35/50; A61K 38/57; A61K 31/66; A61K 9/14; A61K 9/20; A61K 9/48; A61K 45/06

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: amnion membrane, amnion/chorion membrane, extraction, EGF inhibitor, bone disease, osteanagenesis, osteoporosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014-0112998 A1 (TSENG, S. et al.) 24 April 2014 See abstract; claims 90, 95, 96; paragraphs [0095]-[0134], [0158]-[0161].	1-11
Y	DE LA CROIX NDONG, J. et al., "Combined MEK Inhibition and BMP2 Treatment Promotes Osteoblast Differentiation and Bone Healing in Nf1osx-/- Mice", Journal of Bone and Mineral Research, 2015, vol. 30, no. 1, pp. 55-63 See abstract; figure 3.	1-11
Y	COATHUP, M. J. et al., "A Comparison of Bone Remodelling Around Hydroxyapatite-coated, Porous-coated and Grit-blasted Hip Replacements Retrieved at Post-mortem", The Journal of Bone & Joint Surgery (Br), 2000, vol. 82-B, pages 118-123 See abstract.	5,6
X	GO, Yoon-Young et al., "The Effects of Human Amnion/chorion Membrane Extracts on Osteogenic Differentiation", Proceedings of 2015 Fall Conference of KSBM, 2015, vol. 19, no. 3, abstract no. PO-63 See abstract. ※ The above document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-11

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

* Special categories of cited documents:

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

"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
17 MARCH 2017 (17.03.2017)	**17 MARCH 2017 (17.03.2017)**

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/010328

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.: **12, 13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 12 and 13 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain 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

International application No.
PCT/KR2016/010328

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GO, Yoon-Young et al., "Promotion of Osteogenic Differentiation by Amnion/chorion Membrane Extracts" Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials, 05 April 2016, vol. 14, no. 2, pages e171-e180 See abstract; and page e178. ※ The above document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-11
X	GO, Yoon-Young et al., "Differential Effects of Human Amnion and Chorion Membrane Extracts on Osteogenic Differentiation", The 17th International Annual Meeting of Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society, 10 June 2016, abstract no. P1-3 See abstract. ※ The above document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/010328

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2014-0112998 A1	24/04/2014	US 9526770 B2	27/12/2016
		WO 2012-149486 A1	01/11/2012

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/010328

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/50(2006.01)i, A61K 31/66(2006.01)i, A61K 9/14(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61K 9/48(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/50; A61K 38/57; A61K 31/66; A61K 9/14; A61K 9/20; A61K 9/48; A61K 45/06

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: 양막, 융모막, 추출, EGF 저해제, 골질환, 골재생, 골다공증

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2014-0112998 A1 (TSENG, S. 등) 2014.04.24 요약; 청구항 90, 95, 96; 단락 [0095]-[0134], [0158]-[0161] 참조.	1-11
Y	DE LA CROIX NDONG, J. 등, 'Combined MEK inhibition and BMP2 treatment promotes osteoblast differentiation and bone healing in Nf1osx-/- mice' Journal of Bone and Mineral Research, 2015, 30권, 1호, pp. 55-63 초록; 도면 3 참조.	1-11
Y	COATHUP, M. J. 등, 'A comparison of bone remodelling around hydroxyapatite-coated, porous-coated and grit-blasted hip replacements retrieved at post-mortem' The Journal of Bone & Joint Surgery (Br), 2000, 82-B권, 페이지 118-123 초록 참조.	5,6
X	고윤영 등, 'The effects of human amnion/chorion membrane extracts on osteogenic differentiation' 2015년 한국생체재료학회 추계 학술대회 발표논문집, 2015년, 19권, 3호, 초록 번호 PO-63 초록 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-11

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"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
2017년 03월 17일 (17.03.2017)	2017년 03월 17일 (17.03.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
박정민
전화번호 +82-42-481-3516

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/010328

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	고윤영 등, 'Promotion of osteogenic differentiation by amnion/chorion membrane extracts' Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials, 2016.04.05., 14권, 2호, 페이지 e171-e180 초록; 및 페이지 e178 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-11
X	고윤영 등, 'Differential effects of human amnion and chorion membrane extracts on osteogenic differentiation' 제17차 한국조직공학 재생의학회 학술 대회, 2016.06.10., 초록 번호 P1-3 초록 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-11

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/010328

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: 12,13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제12항 및 제13항은 치료에 의한 인체의 처치방법에 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.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/010328

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2014-0112998 A1	2014/04/24	US 9526770 B2	2016/12/27
		WO 2012-149486 A1	2012/11/01