

명세서

발명의 명칭: 치아우식증 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 감염된 치질의 제거를 수반하지 않는 치아우식증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 치아우식증은 가장 흔한 만성 질환 중 하나로 전세계 35억 인구가 이환(affection)되어 있는 것으로 보고된 바 있다 (Dye 2017; Kassebaum et al. 2015; World Health Organization 2017). 2013년 대한민국 보건복지부 자료에 의하면, 성인 남성의 영구치 우식 경험율은 약 87%에 달하며, 여성은 약 90%로 나타나 높은 이환율을 보인 것으로 조사되었다. 전반적인 의료기술 발달로 인해 국민의 평균수명의 연장됨으로써 삶의 질을 높이기 위한 구강건강관리의 중요성이 커지고 있으며 무엇보다 자연치 보존에 대한 중요도가 강조되고 있다. 초기 치아우식증은 증상이 없지만 진행됨에 따라 여러 동통을 유발하고 결과적으로 치아 상실을 유발하며 결과적으로 무치악 상태는 섭식 장애를 유발하여 전반적인 삶의 질을 크게 저해하는 요인이 된다(Bortoluzzi et al. 2012).
- [3] 일반적으로 비감염성 원인으로 인해 상아질의 손상이 일어난 경우에는 단순히 소실된 치질을 수복하는 과정만이 요구되지만 치아우식증에 이환된 경우에는 이환된 치질 및 감염증의 원인이 되는 박테리아의 영향을 최소화하여야 하는 점에서 여타의 비감염성 원인으로 인한 상아질 질환의 치료방식과 구별된다. 치아 우식증은 다른 상아질-치수질환과는 다르게 치아 우식증의 원인균에 의한 치질의 감염으로 시작된다. 치아 우식증은 박테리아에 의한 감염질환이기 때문에 이환된 치질의 제거를 통해 박테리아의 영향을 최소화하는 것이 중요하므로 종래 치아 우식증의 치료는 감염된 치질을 제거하여 박테리아의 감염원을 물리적으로 제거하고 제거된 치질부위를 수복하는 치료방법을 적용하는 것이 일반적이다.
- [4] 현재 이루어지고 있는 일반적인 치아우식증의 치료방법의 경우 치과치료에 대한 공포로 인해 치료시기가 늦춰지는 문제점 그리고, 인공적인 치과재료를 사용하여 발생하는 문제점이 존재한다.
- [5] 치아는 경조직인 법랑질, 상아질, 백악질 그리고 내부의 연조직인 치수로 이루어져 있다. 치수는 신경과 혈관이 발달되어 있으며, 치수와 상아질의 경계부에는 상아질을 형성하는 상아모세포가 위치한다. 치아를 구성하는 구성의 침식여부 등을 고려하여 치아우식증은 진행정도에 따라 5단계로 구분할 수 있다. 구체적으로 치아우식증의 1단계는 법랑질에 한정된 미약한 손상을 수반하나 자각증상이 거의 없는 단계이고, 2단계는 법랑질과 상아질의 경계 부근의 손상을 수반하고 시린이 증상을 동반하며, 3단계는 상아질까지 이환되어

상아질의 손상이 일어나 외부의 자극에 통증을 느낄 수 있는 단계이고, 4단계는 치수까지 이환되어 외부의 자극이 없는 상태에서도 염증을 일으키는 단계이며, 5단계는 치수가 괴사되는 한편 극심한 통증을 수반하는 단계로 구분될 수 있다. 일반적으로 초기단계에 해당하는 2단계 및 3단계에서 비로소 치아우식증을 자각하게 되는 경우가 많다. 2단계 및 3단계는 치아우식증의 원인균의 영향을 최소화하여 치아우식증을 치료하기 위한 적절한 시기가 될 수 있다.

- [6] 자각증상을 통해 빠른 치과치료를 받을 수 있음에도 불구하고 적절한 치료 단계를 놓치는 경우가 빈번한 것으로 알려져 있는데 이는 치아우식증의 전통적 치료방식에 기인한다. 현재의 치아우식증의 치료는 기계적으로 약화된 치질을 제거하고 그 부위를 새로운 재료로 채워 넣는 과정으로 이루어지므로 대부분의 치과환자들은 치과 치료에 대한 불안, 근심, 공포 및 긴장으로 인해 치료시기를 늦추는 경향이 있다. 적절한 치료시기를 놓치게 되고 치료과정에서도 치질의 상당부분을 제거해야 하는 경우가 발생하게 된다. 치아 우식증의 치료에 대한 불안 또는 근심은 어린 아이들에서부터 노인까지 다양한 연령층에 나타난다. 특히 심리적, 신체적으로 아직 성숙되지 못한 상태인 유소년층(0~14세)의 경우 치과 치료에 대한 공포가 큰 것으로 알려져 있다. 1984년 Berggren과 Meynert는 20~40세의 성인을 대상으로 치과치료에 대한 회피원인에 대해 조사하고 이를 보고하였는데 대상자의 약 85%는 어린시절의 충격적인 치과치료 경험으로 인해 치과 치료에 대한 공포를 갖게 된 것으로 조사되었고, 특히 치아에 와동을 형성하거나, 마취 또는 발치시 경험한 통증이 치과치료에 따른 공포의 주요 원인으로 지적되었다. 아동기에 형성된 치과 치료에 대한 공포는 성인기까지 이어질 수 있어 적절한 치료시기를 놓치게 하는 요인이 될 수 있다.
- [7] 종래 치아우식증의 치료에 사용되는 치과재료로는 치아의 손상으로부터 치아의 구조 및 기능을 회복하기 위해 아말감, 글라스아이오노머 시멘트, 복합 레진, 금, 도재 등 다양한 성분으로 구성된 보존, 보철용 수복재료들이 사용되고 있다. 현재까지의 치과 치료에 쓰이는 수복재료는 장기적으로 미세누출이 발생할 가능성이 높아 치아의 보존, 보철 수복용 치과재료의 화학적 자극, 미세누출 등은 치수의 병변을 발생시키거나 악화시킬 수 있다. 이로 인해 염증반응이 진행되면 치수의 괴사로 이어지고, 치수를 제거하는 근관치료 및 추가적인 치아 삭제로 인한 치질 손실을 일으키게 된다. 노년에 많이 발생하는 치근우식증은 수복 시에 방습, 시야확보, 접근 등이 어렵고 와동의 변연부가 백악질과 상아질에 위치하므로 치근 우식은 법랑질에서의 우식과는 달리 산부식에 대한 저항력이 약하고 불완전한 변연으로 우식의 재발이 흔하다고 보고되고 있다. 또한 수복 형태를 유지하기 어려운 부위에 있어 수복물의 탈락이 쉬운 경우 치근은 치수까지의 치질 두께가 두껍지 않아 치료 후의 통증의 발생 빈도가 높으며 치아우식증의 제거 시 치수의 노출이 쉬워 근관치료로 넘어가는 경우가 많기 때문에 자연치아의 보존이 어렵다.
- [8] 치아우식증의 발생초기에는 통증을 조금 느낄 수 있다가거나 또는 전혀 느끼지

못할 수 있다. 치아우식증이 치아 속의 신경과 혈관이 있는 치수까지 진행하지 않았기 때문에 감염된 부분만 삭제하고 치과재료를 이용해 충전한다. 하지만, 치아우식증이 치수까지 침범한 경우에는 보통 신경치료라고 불리는 근관치료가 필요하다. 근관치료는 치수 내의 신경과 혈관 조직을 모두 제거해내고 치과재료로 채워 넣는 치료를 말한다. 근관치료가 끝나면 치아의 삭제 부분을 치과재료로 충전한다. 근관치료를 받은 치아는 충전치료 만으로는 부서지기 쉬워 충전치료후 금속을 주조해 만든 금관으로 씌워주게 된다. 치아우식증이 치수까지 진행된 상태로 오래 지속될 경우에는 뿌리끝 뼈속에 고름 주머니가 생기고 고름이 뼈를 통과해서 잇몸으로 흘러 붓게 된다. 이 때에도 근관치료로 치료하기도 하지만 뼈 속의 고름주머니가 너무 커지게 되면 고름 주머니를 제거하는 수술을 하거나 치아를 뽑아야만 하는 상황에 놓이기도 한다. 치수세포의 보호가 아닌 제거가 이루어지는 근관치료가 이루어지는 경우 자연치아로 인한 저작의 느낌이 들지 않고 이물감으로 불편을 겪을 수밖에 없다. 치아 내에서의 면역반응과 관련하여 상아모세포의 자가포식작용은 새로운 상아모세포의 분화, 세포생존율, 세포사멸로부터의 보호와 연관이 되어 있다고 알려져 있다. 상아모세포의 보호와 적응의 관점에서 보았을 때 상아모세포의 자가포식작용은 치수세포와 새로운 상아모세포의 생존에 유리한 효과를 제공할 수 있을 것으로 기대되나 종래의 근관치료 방법으로는 상아모세포 역시 제거될 수밖에 없으므로 상아모세포에 의한 유리한 효과는 기대하기 어렵다.

- [9] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 보다 효과적으로 치수우식증을 치료할 수 있는 제제를 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 상아질 또는 치수조직의 재생촉진용 펩타이드의 치아우식증 예방, 개선 또는 치료에 대한 신규 용도를 개발하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 치근 우식증, 탈락이 임박한 유치의 치아우식증, 맹출 중인 치아의 치아우식증을 포함한 치아우식증 및 그로 인한 통증을 개선하거나 또는 치료하기 위한 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [11] 본 발명은 치아우식증으로 인해 손상된 치수의 치유능력 증가 및 염증인자의 발현을 감소시켜 비가역적 통증으로 진행하지 않도록 하는 치아우식증의 개선 또는 치료 효과를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [12] 본 발명은 치아우식증으로 인해 치수가 손상된 환경에서 상아모세포의 자가포식작용을 증가시켜 치수의 보호 및 상아모세포를 재활성함으로써 치아우식증을 개선하거나 또는 치료하기 위한 용도를 제공하는 것을 또다른 목적으로 한다.
- [13] 본 발명의 목적은 이상에서 언급한 것으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을

가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 본 발명자들은 다양한 연구를 수행한 결과, 10개의 아미노산으로 구성된 펩타이드를 포함하는 치아우식증의 예방, 개선 및 치료용 제제 및 그 용도를 개발하였다.
- [15] 상기 펩타이드는 상아모세포 분화마커 유전자인 *Dspp*, *Dmp1* 및 *Nestin* 유전자의 발현수준을 증가시킬 수 있어, 상아질 재생을 촉진하는 효과를 나타내면서도, 치수조직의 세포에 대하여는 어떠한 세포독성도 나타내지 않음을 확인하였다.
- [16] 또한, 상기 펩타이드는 생체내 상아질-치수조직과 가장 유사한 형태의 상아질-치수 유사 조직을 형성하고, 콜라겐의 형성수준을 증가시키며, 상아모세포 특이적 분화 마커 유전자인 *DSP*의 발현수준을 증가시키는 것을 확인하였다.
- [17] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 하기 일반식 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는, 치아우식증 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [18] K-Y-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8 (일반식 1)
- [19] 상기 일반식 1에서,
- [20] R1은 아르기닌(R), 리신(K) 또는 글루타민(Q)이고;
- [21] R2는 아르기닌(R) 또는 글루타민(Q)이며;
- [22] R3, R4 및 R5는 각각 아르기닌(R) 또는 리신(K)이고;
- [23] R6는 아스파라긴(N) 또는 세린(S)이며; 및
- [24] R7 및 R8은 리신(K) 또는 타이로신(Y)이다.
- [25]
- [26] 본 발명의 용어, "상아질(dentine)"이란, "치질(齒質)"이라고도 호칭되고, 치아의 대부분을 이루고있는, 노란 빛을 띤 흰색의 단단한 조직을 의미한다. 상기 상아질은 치관부(齒冠部)에서는 에나멜질, 치근부(齒根部)에서는 시멘트질로 덮여 있으므로 치아의 표면으로는 드러나지 않으나, 나이가 많아짐에 따라 에나멜질이 마멸되면 치관의 선단부나 교합면(咬合面)에 상아질이 노출될 수 있다. 상기 상아질은 일종의 골조직이지만 상아질을 만들고 있는 세포의 본체는 치수(齒髓) 속에 있고, 그 돌기만 상아질 속으로 뻗어 나온다는 점에서 일반적인 골조직과 구별된다.
- [27] 본 발명의 용어, "치수조직(dental pulp)"이란, "치수"라고도 하며, 치아의 내부에 있는 치수강을 채우고 있는 부드러운 결합조직을 의미한다. 해부학적으로는, 신경과 혈관이 풍부하게 분포되어 있으며 상아질의 표층에까지 이르는 곳까지의 영역을 의미할 수도 있다.
- [28] 본 발명에서 제공하는 제제에 포함된 펩타이드는 세포독성을 나타내지

않으면서도, 상아모세포 분화마커 유전자인 Dspp, Dmp1 및 Nestin 유전자의 발현수준을 증가시킬 수 있으며, 치수조직 세포와 함께 생체내에 이식할 경우, 상기 치수조직 세포가 상아질/치수조직-유사 조직을 형성하는 특징을 나타낼 수 있다.

- [29] 본 발명에서 제공하는 제제에 포함된 펩타이드는, 치아우식증 치료효과를 나타낼 수 있는 한, 이를 구성하는 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 변이체 펩타이드도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함된다.
- [30] 일반적으로, 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 폴리펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 펩타이드의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 상아질 또는 치수조직의 재생촉진능이 증가한 펩타이드를 포함할 수 있다.
- [31] 예를 들어, 본 발명에서 제공하는 서열번호 1의 펩타이드의 3번에 위치한 산성 아미노산인 글루타민은 염기성 아미노산인 리신 또는 아르기닌으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있고; 서열번호 1의 펩타이드의 4번 또는 5번에 위치한 염기성 아미노산인 아르기닌은 산성 아미노산인 글루타민 또는 염기성 아미노산인 리신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으며; 서열번호 1의 펩타이드의 6번, 7번 또는 9번에 위치한 염기성 아미노산인 리신은 염기성 아미노산인 아르기닌 또는 방향족 아미노산인 타이로신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있고; 서열번호 1의 펩타이드의 8번에 위치한 산성 아미노산인 아스파라긴은 중성 아미노산인 세린으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으며; 서열번호 1의 펩타이드의 10번에 위치한 방향족 아미노산인 타이로신은 염기성 아미노산인 리신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있다.
- [32] 이처럼, 본원발명의 펩타이드를 구성하는 산성 아미노산, 염기성 아미노산 또는 방향족 아미노산은 각각 이와 다른 산성 아미노산, 염기성 아미노산, 중성 아미노산 또는 방향족 아미노산으로 치환되어도, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으므로, 본 발명의 펩타이드를 구성하는 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 변이체 펩타이드도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함될 수 있다.
- [33] 또한, 본 발명의 제제에 포함된 펩타이드는 그의 N-말단 또는 C-말단에 임의의 아미노산이 부가된 형태를 갖더라도, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으므로, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함된다.

일 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 300개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있고, 다른 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 100개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 24개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있다.

- [34] 발명에서 제공하는 일반식 1에 해당하는 96종의 펩타이드는 펩타이드를 처리하지 않은 MDPC-23 세포(대조군)에서 측정된 상아모세포 분화마커인 Dspp 유전자의 mRNA 수준에 비하여, 상기 96종의 펩타이드를 처리한 MDPC-23 세포에서 상기 Dspp 유전자의 mRNA 수준이 현저히 증가된 값을 갖는다.
- [35] 지금까지 보고된 바에 의하면, DSPP의 mRNA 발현 수준이 증가되면, 상아모세포 분화 및 상아질 재생이 촉진된다고 알려져 있으므로, 상기 Dspp 유전자의 mRNA 수준을 증가시키는 효과를 나타내는 상기 96종의 펩타이드는 상아모세포 분화 및 상아질 재생을 촉진하는 효과를 나타낼 수 있다(Taduru Sreenath et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 278, No. 27, Issue of July 4, pp. 24874-24880, 2003; William T. Butler et al, Connective Tissue Research, 44(Suppl. 1): 171-178, 2003).
- [36] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [37] 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에서 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토 프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 이용하여 합성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [38] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터를 포함하는 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 상기 펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [39] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되고, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내어야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.
- [40] 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을

수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

- [41] 또한, 상기 발현벡터는 세포 배양액으로부터 펩타이드의 분리를 촉진하기 위하여 상기 펩타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널 및 개시코돈은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.
- [42] 아울러, 상기 발현벡터는 상기 펩타이드의 검출이 용이하도록 하기 위하여, 임의로 엔도펩티다아제를 사용하여 제거할 수 있는 단백질 태그를 추가로 포함할 수 있다.
- [43] 본 발명의 용어 "태그(tag)"란, 정량가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를 의미하며, 플루오레세인과 같은 화학적 형광물질(fluoracer), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩타이드 형광물질을 포함한 형광분자일 수도 있고; Myc 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘 태그, 루신 태그, IgG 태그, 스트렙타비딘 태그 등의 에피토프 태그일 수도 있다. 특히, 에피토프 태그를 사용할 경우, 바람직하게는 6개 이상의 아미노산 잔기로 구성되고, 보다 바람직하게는 8개 내지 50개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드 태그를 사용할 수 있다.
- [44] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 상술한 본 발명의 상아질 또는 치수조직의 재생촉진 및 상아질 지각과민증 치료용 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있는데, 이때 사용되는 벡터는 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물바이러스 벡터(레트로바이러스(retrovirus), 아테노바이러스(adenovirus), 백시니아 바이러스(vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(baculovirus) 등)가 될 수 있다. 상기 발현벡터는 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에

가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.

- [45] 본 발명에서 제공하는 형질전환체는 상기 본 발명에서 제공하는 발현벡터를 숙주에 도입하여 형질전환시킴으로써 제작될 수 있고, 상기 발현벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서, 상기 펩타이드를 생산하는데 사용될 수 있다. 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, CaCl_2 침전법, CaCl_2 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다. 또한, 상기 형질전환체의 제작에 사용되는 숙주 역시 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균, 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 세레비지에, 스킨조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류세포; 드로소필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.
- [46] 상기 형질전환체는 또한 본 발명의 상아질 또는 치수조직의 재생촉진 및 상아질 지각과민증 치료용 펩타이드를 생산하는 방법에 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 상아질 또는 치수조직의 재생촉진 및 상아질 지각과민증 치료용 펩타이드를 생산하는 방법은 (a) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 배양물로부터 본 발명의 펩타이드를 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [47] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 본 발명의 상아질 또는 치수조직의 재생촉진 및 상아질 지각과민증 치료용 펩타이드를 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.
- [48] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다.

사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산 암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.

- [49] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [50] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27°C 내지 37°C, 바람직하게는 30°C 내지 35°C이다. 배양은 상기 펩타이드의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 100 시간에서 달성된다.
- [51] 아울러, 배양물로부터 상기 펩타이드를 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 생산된 상기 펩타이드의 회수에 사용될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [52] 본 발명의 약학 조성물은 치수조직 세포가 상아질/치수조직-유사 조직을 형성하는 것을 촉진시킬 수 있으므로, 상아질 또는 치수조직을 복구하는 방법에 의하여 치아우식증을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [53] 상기 약학 조성물에 포함되는 펩타이드는 펩타이드 단독의 형태로 사용될 수도 있고, 상기 펩타이드가 2회 이상 반복되어 연결된 폴리펩타이드의 형태로 사용될 수도 있으며, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 치아우식증 원인균에 대한 항생효과를 나타내는 약물이 결합된 복합체 형태로 사용될 수도 있다.
- [54] 본 발명의 용어 "치아우식증"이란, 치아면에 서식하는 세균으로 인한 감염성 질환을 의미할 수 있다.

- [55] 본 발명의 용어 "예방"이란, 본 발명의 펩타이드를 포함하는 치아우식증 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여로 치아우식증의 발생을 저해 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [56] 본 발명의 용어 "치료"란, 본 발명의 펩타이드를 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물을 치아우식증의 치료가 요구되는 개체에 투여하여 상아질 또는 치수조직의 재생을 촉진함으로써, 치아우식증의 치료가 수행되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [57] 본 발명의 약학 조성물은, 상기 펩타이드에 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체(자연적 또는 비자연적 담체), 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 치아우식증 치료용 약학 조성물의 형태로 제조될 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 치아우식증이 유발된 부위에 투여할 수 있는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 콜라겐 등을 들 수 있다. 본 발명의 펩타이드를 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 특히, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제, 연고제(예를 들어, 치수이장제 등) 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [58] 본 발명의 약학 조성물에 포함된 펩타이드의 함량은 특별히 제한되지 않으나, 최종 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 20 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.
- [59] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 치아우식증 치료용 약학 조성물과 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두

고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

- [60] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 약 0.1 ng 내지 약 100 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 10 mg/kg로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [61] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 약학 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 치아우식증이 발병된 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 치아우식증 치료방법을 제공한다.
- [62] 본 발명의 용어 "개체"란 치아우식증의 치료가 요구되는 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물 등을 제한 없이 포함할 수 있으나, 상기 질환이 발병된 개체 중에서 인간을 제외한 것일 수 있다.
- [63] 본 발명의 치아우식증 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 구강내 투여 또는 구강내 주사 등의 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [64] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 치아우식증 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [65]
- [66] *69본 발명의 용어, "개선"이란, 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [67] 본 발명에 있어서, 상기 개선은 본 발명의 펩타이드를 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물을 치아우식증의 치료가 요구되는 개체에 투여하여 상아질 또는 치수조직의 재생을 촉진함으로써, 치아우식증의 증상이 호전되거나 또는 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [68] 본 발명의 용어 "의약품"이란, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 섬유·고무 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염병을 막기 위한 살균·살충제 등이 이에 포함된다.
- [69] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드를 포함하는 의약품 조성물의 종류나 제형은 특별히 제한되지 않으나, 일 예로서, 구강용 소독 청결제, 구강청정용품, 치약, 치실, 구강용 연고제 등일 수 있다.

- [70] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 치아우식증 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [71] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강 식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [72] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 치아우식증의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [73] 상기 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.
- [74] 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 본 발명의 펩타이드를 음료, 차류, 향신료, 껌류, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.
- [75] 본 발명의 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 치아우식증의 예방 또는 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있으므로, 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [76] 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [77] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca),

- 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [78] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [79] 본 발명의 펩타이드는 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [80] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 내지 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 내지 0.03 g이 될 수 있다.
- [81] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강음료 조성물 100 중량부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [82] 본 발명의 식품 조성물은 치아우식증의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 본 발명의 펩타이드를

식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [83] 본 발명은 치근 우식증, 탈락이 임박한 유치의 치아우식증, 맹출 중인 치아의 치아우식증을 포함한 치아우식증 및 그로 인한 통증을 개선하거나 또는 치료하기 위한 용도를 제공할 수 있다.
- [84] 본 발명은 치아우식증으로 인해 손상된 치수의 치유능력 증가 및 염증인자의 발현을 감소시켜 비가역적 통증으로 진행하지 않도록 하는 치아우식증의 개선 또는 치료 효과를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [85] 본 발명은 치아우식증으로 인해 치수가 손상된 환경에서 상아모세포의 자가포식작용을 증가시켜 치수의 보호 및 상아모세포를 재활성함으로써 치아우식증을 개선하거나 또는 치료하기 위한 용도를 제공할 수 있다.
- [86] 본 발명의 효과는 이상에서 언급한 것으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [87] 도 1a 및 도 1b는 각각 치아우식증 환경에서 본 발명의 실시예에 다른 약학 조성물에 포함된 펩타이드(서열번호 96)의 투과성 및 안정성을 관찰한 결과로써, 도 1a는 사람으로부터 발치된 치아로써 상아질 치아우식증(치아우식증 2~3단계)단계의 양상을 보이는 치아에 형광 색소인 로다민이 결합된 펩타이드를 도포한 후 약 1분이 경과한 후에 4% 파라포름알데히드로 고정하고 치아의 슬라이스를 디지털 저속 다이아몬드 절단기를 이용하여 시상면 방향으로 잘라 0.1mm 두께로 제작하고 공초점 현미경에서 관찰한 결과이고, 도 1b는 치아우식증의 원인균인 *S.Mutans*가 존재하는 환경에서의 약학 조성물 내의 펩타이드의 안정성을 MALDI-TOF 분석을 통해 확인한 결과이다.
- [88] 도 2a는 치아우식증 랫드(rat) 모델에서 치아우식증의 단계별로 본 발명의 실시예에 따른 약학 조성물을 처리한 결과이고, 도 2b는 치아우식증 랫드 모델에서 치아우식증이 이환된 치아에 본 발명의 실시예에 따른 약학 조성물을 처리하였을 때 염증 세포의 수를 비교한 결과이다.
- [89] 도 3은 4단계에 해당하는 치아우식증으로 인해 발생한 치수 염증을 모방한 세포 실험으로, 염증환경 하에서 사람치수세포에 대한 본 발명의 실시예에 따른 약학 조성물의 처리가 염증 인자와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [90] 도 4는 4단계에 해당하는 치아우식증으로 인한 치수 염증이 발생하였을 때의 상황을 모방한 세포 실험으로 염증환경 하에서 사람치수세포에 대한 본 발명의 실시예에 따른 약학 조성물의 처리가 치수세포의 생존율에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

- [91] 도 5는 4단계에 해당하는 치아우식증으로 인한 치수 염증이 발생하였을 때의 상황을 모방한 세포 실험으로 염증환경 하에서 손상된 사람치수세포에 대한 본 발명의 실시예에 따른 약학 조성물의 처리가 치수세포의 회복에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- [92] 도 6은 4단계에 해당하는 치아우식증으로 인한 치수 염증이 발생하였을 때의 상황을 모방한 세포 실험으로 사람치수세포의 광화능에 미치는 영향을 살펴본 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [93] 본 발명의 목적 및 효과, 그리고 그것들을 달성하기 위한 기술적 구성들은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 본 발명을 설명함에 있어서 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 것이다. 그리고 후술되는 용어들은 본 발명에서의 기증을 고려하여 정의된 용어들로서 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 관례 등에 따라 달라질 수 있다.
- [94] 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있다. 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. 그러므로 그 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.
- [95] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[96]

[97] 실시예 1: 펩타이드의 합성

- [98] 본 발명자들은 상아질 또는 치수조직의 재생촉진 효과를 나타내는 펩타이드(서열번호 1)를 9-플루오르닐메틸옥시카보닐(9-fluorenylmethyloxycarbonyl, Fmoc) 방법으로 합성하고, 상기 합성된 펩타이드의 아미노산을 치환하여 각 그룹의 펩타이드를 합성하였다(표 1 내지 12).

[99] N-KYQRRKKNKY-C(서열번호 1)

- [100] 먼저, 그룹 1의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드 또는 상기 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 1).

[101]

[102] [표1]

그룹 1의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
1	KYQRRKKNKY
2	KYQRRKRKNKY
3	KYQRRRKKNKY
4	KYQRRRRKNKY
5	KYQRKKKNKY
6	KYQRKRKNKY
7	KYQRKKRNKY
8	KYQRKRKNKY

[103]

[104] 다음으로, 그룹 2의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 2).

[105]

[106] [표2]

그룹 2의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
9	KYQRRKSKY
10	KYQRRKRKY
11	KYQRRRKSKY
12	KYQRRRRSKY
13	KYQRKKSKY
14	KYQRKRKY
15	KYQRKKRKY
16	KYQRKRKY

[107]

[108] 다음으로, 그룹 3의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하여 합성하였다(표 3).

[109]

[110] [표3]

그룹 3의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
17	KYQRRKKNYK
18	KYQRRKRNYK
19	KYQRRRKNYK
20	KYQRRRRNYK
21	KYQRKKKNYK
22	KYQRKRKNYK
23	KYQRKKRNYK
24	KYQRKRKNYK

[111]

[112] 다음으로, 그룹 4의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 4).

[113]

[114] [표4]

그룹 4의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
25	KYQRRKKSYK
26	KYQRRKRSYK
27	KYQRRRKSYSK
28	KYQRRRRSYK
29	KYQRKKKSYK
30	KYQRKRKSYK
31	KYQRKKRSYK
32	KYQRKRRSYK

[115]

[116] 다음으로, 그룹 5의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 5).

[117]

[118] [표5]

그룹 5의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
33	KYRQRKKNKY
34	KYRQRKRNKY
35	KYRQRRKNKY
36	KYRQRRRNKY
37	KYRQKKKNKY
38	KYRQKRKNKY
39	KYRQKKRNKY
40	KYRQKRRNKY

[119]

[120] 다음으로, 그룹 6의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 6).

[121]

[122] [표6]

그룹 6의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
41	KYRQRKKSKY
42	KYRQRKRISKY
43	KYRQRRKISKY
44	KYRQRRRISKY
45	KYRQKKKISKY
46	KYRQKRKISKY
47	KYRQKKRISKY
48	KYRQKRRISKY

[123]

[124] 다음으로, 그룹 7의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하며, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 7).

[125]

[126] [표7]

그룹 7의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
49	KYRQRKKNYK
50	KYRQRKRNYK
51	KYRQRRKNYK
52	KYRQRRRNYK
53	KYRQKKKNYK
54	KYRQKRKNYK
55	KYRQKKRNYK
56	KYRQKRRNYK

[127]

[128] 다음으로, 그룹 8의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 8).

[129]

[130] [표8]

그룹 8의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
57	KYRQRKKSYK
58	KYRQRKRKYK
59	KYRQRRKSYK
60	KYRQRRRSYK
61	KYRQKKKSYK
62	KYRQKRKSYK
63	KYRQKKRSYK
64	KYRQKRRSYK

[131]

[132] 다음으로, 그룹 9의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 9).

[133]

[134] [표9]

그룹 9의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
65	KYKQRKKNKY
66	KYKQRKRNKY
67	KYKQRRKNKY
68	KYKQRRRNKY
69	KYKQKKKNKY
70	KYKQKRKNKY
71	KYKQKKRNKY
72	KYKQKRRNKY

[135]

[136] 다음으로, 그룹 10의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 10).

[137]

[138] [표10]

그룹 10의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
73	KYKQRKKSKY
74	KYKQRKRISKY
75	KYKQRRKISKY
76	KYKQRRRISKY
77	KYKQKKKISKY
78	KYKQKRKISKY
79	KYKQKKRISKY
80	KYKQKRRISKY

[139]

[140] 다음으로, 그룹 11의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하며, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 11).

[141]

[142] [표11]

그룹 11의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
81	KYKQRKKNYK
82	KYKQRKRNYK
83	KYKQRRKNYK
84	KYKQRRRNYK
85	KYKQKKKNYK
86	KYKQKRKNYK
87	KYKQKKRNYK
88	KYKQKRRNYK

[143]

[144] 끝으로, 그룹 12의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 12).

[145]

[146] [표12]

그룹 12의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
89	KYKQRKKSYK
90	KYKQRKRSYK
91	KYKQRRKSYK
92	KYKQRRRSYK
93	KYKQKKKSYK
94	KYKQKRKSYK
95	KYKQKKRSYK
96	KYKQKRRSYK

[147]

[148]

[149] **실시예 2: 약학 조성물의 제조**

[150] 본 발명의 실시예에 따른 약학 조성물(KH002)의 제조방법은 아래와 같다. 약학조성물(KH002)은 약 1.5% 카복실메틸 셀룰로스 (Carboxymethyl cellulose, sigma-aldrich, C5678)에 혼합하여 제조하였다. 카복실메틸 셀룰로스 (Carboxymethyl cellulose, sigma-aldrich, C5678)는 증류수에 약 3% 로 혼합하여

C에서 끝낸 다음 가압조건에서 멸균처리 하였고, 실시예 1에 따라 제조된 펩타이드 중 서열번호 96번의 펩타이드(KH001)와 혼합 시 최종 농도가 약 1.5%가 되도록 제조하였다.

[151]

[152] 실시예 3: 치아우식증 환경에서 약학 조성물의 투과성 및 안정성[153] 실시예 3-1: 치아우식증 환경에서의 약학 조성물의 투과성

[154] 형광 색소인 로다민이 결합된 펩타이드(KH001)가 포함된 약학조성물(KH002)을 발치된 상아질 치아우식증(치아우식증 2~3단계)이 있는 사람 치아에 도포 1분 후에 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 그 후 치아의 슬라이스를 디지털 저속 다이아몬드 절단기를 이용하여 시상면 방향으로 잘라 약 0.1mm 두께로 제작하고 공초점 현미경에서 관찰하였다 (도 1a).

[155] 도 1a를 통해 붉은 색으로 염색된 모습을 관찰할 수 있었으며, 실시예 2에 따른 약학 조성물에 포함된 펩타이드(KH001) 성분이 치아우식증에 이환된 치질을 잘 투과하여 치수까지 도달한 것을 확인할 수 있었다.

[156]

[157] 실시예 3-2: 치아우식증 환경에서의 약학 조성물의 안정성 분석

[158] 가. 실시예 2에 의하여 제공된 약학 조성물 내의 펩타이드의 안정성 분석

[159] 본 실험에 사용한 표준 균주 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, KCOM 1054)는 한국구강미생물자원은행 (Korean Collection of Oral Microbiology; KCOM)에서 분양 받아 사용하였다. 약 20% 자당이 함유된 mitis salivarius bacitracin (MSB; bacitracin 농도는 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 한천 평판 배지에 도말하고, 이를 약 37°C의 양초병(Candle jar)에서 약 48시간 배양하고, 단일 콜로니는 트립틱소이 브로스 (Tryptic Soy Broth (TSB; BD DIFCO, USA)) 배양액에서 약 24시간동안 배양하여 실험에 사용하였다. *S. mutans* 균주는 흡광도 (OD600) 값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 배양한 균주 100 μL 와 1.5% 카복실메틸 셀룰로스에 100 μg 의 약학조성물(KH002)과 혼합하여 균주와 반응한 시간에 따른 약학조성물(KH002) 내에 포함된 펩타이드(KH001)의 안정성을 MALDI-TOF 분석을 실시(UltraflexIII TOF/TOF (Bruker Daltonics))하여 분석하였다.

[160] 나. 가.의 조성물을 각각 1분, 5분, 15분, 30분 간격으로 수득하여 약 15,000 rpm으로 약 10 분간 원심분리를 실시하고 상층액 수거

[161] 다. 나.에서 수거된 각각의 상층액 2 μL 를 기질 용액 (10mg/mL of α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in 0.1% TFA / ACN (1:1, v/v) 2 μL 와 혼합하여 MALDI-TOF 분석을 실시(UltraflexIII TOF/TOF (Bruker Daltonics)) (도 1b)

[162]

[163] 도 1b를 통해 실시예 2에 의하여 제공된 약학 조성물(KH002) 내의 펩타이드(KH001)가 치아우식증의 원인균인 *S. Mutans* 환경 하에서 안정적으로 유지된 것을 확인하였다.

[164]

[165] 실시예 4: 약학조성물의 치아우식증 단계별 처리결과 분석[166] 실시예 4-1: 단계별 치아우식증의 랫드모델을 준비

[167] 도 2a는 치아우식증 랫드모델에서 상아질 치아우식증의 단계를 상아질 두께의 1/3 별로 나눠 각각 초기(Early), 중기(Moderate), 후기(Advanced)로 나누고 치수 상방의 상아질이 완전히 치아우식증에 이환되어 치수까지 침범한 경우를 가장 심각한 중증(Severe)단계로 분류하여 각각 준비하였다 (n=4). 이와 같은 분류는 사람의 치아우식증 단계에서는 초기는 치아우식증 2단계, 중기 및 후기는 치아우식증 3단계, 중증은 치아우식증 4단계와 거의 유사한 양상에 해당한다.

[168]

[169] 실시예 4-2: 랫드모델별 약학조성물의 처리결과 관찰

[170] 대조군은 치아우식증에 이환되었지만 실시예 2에 따라 제조된 약학조성물(KH002)을 도포하지 않은 군이고 아래의 조직 사진들은 초기, 중기, 후기, 중증 단계에 약학조성물(KH002)을 치아당 3ug씩 도포하고 4주 후 랫드를 희생하여 고정, 탈회한 후 조직슬라이드를 제작하여 헤마톡실린과 에오신 염색을 시행하였다.

[171] 실시예 2에 따라 제조된 약학조성물(KH002)을 처리하지 않은 대조군에서는 치수 내부에 액화괴사가 관찰되며 치아우식증이 이환된 부분 하방에 상아모세포의 울타리 양상이 손상되었으며 치수 내부로도 염증 세포들이 침윤되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 약학조성물(KH002)을 처리한 군에서는 모두 치아우식증이 이환된 하방의 상아모세포가 울타리 양상을 보이며 치수 전반적으로도 초기 및 중기 단계에는 건강한 치수의 특징인 성장세포가 관찰되었고, 치수 상방의 상아질이 모두 치아우식증에 이환된 중증상태에서도 치아의 뿌리 부분에서는 건강한 치수가 유지되고 있는 것을 확인하였다.

[172]

[173] 약학조성물(KH002)을 처리시 모든 단계의 치아우식증에서 상아질이 재생된 것을 관찰할 수 있었으며 중증상태의 치아모델에서도 보존된 치수 상방에는 치아우식증에서 방어작용의 하나로 형성되는 상아질다리가 형성된 것을 관찰할 수 있었다.

[174]

[175] 실시예 4-3: 치아우식증에 따른 염증세포 관찰

[176] 전체 치수 세포 수 대비 염증 세포의 수를 백분율로 비교하였다(개체수 기준 n=4, 치아 수 기준 n=6) 치수 내부의 3부위를 무작위로 지정하였고 3명의 연구자가 판독을 진행하였으며 정확한 판독을 위해 눈가림을 시행하였다.

[177] 도 2a는 치아우식증 랫드(rat) 모델에서 치아우식증의 단계별로 본 발명의 실시예에 따른 약학 조성물을 처리한 결과이다. 도 2a를 참고하면, 약학조성물(KH002)을 처리하지 않은 대조군에 비해 약학조성물(KH002)을

처리한 실험군에서는 ED1에 염색된 염증세포의 비율이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 약학조성물(KH002)의 처리가 치아우식증으로 인한 염증의 회복에 효과적임을 예측할 수 있다.

[178] 도 2b는 사람 치아우식증 3단계에 해당하는 깊이의 랫드 치아우식증 모델에 약학조성물(KH002)을 처리한 결과로써 치아우식증에서 염증의 정도를 정량화하기 위해 치수 내부로 침윤한 염증세포의 수를 확인한 것으로, 대표적인 치수의 염증 세포 마커인 ED1을 면역염색화학기법으로 비교한 결과이다.

[179]

[180] 실시예 5: 치아우식증의 염증인자의 발현에 미치는 영향 분석

[181] 치아우식증에 이환된 후 염증이 발생한 4단계 치아우식증에서 약학조성물(KH002)의 예방적, 치료적인 효과를 확인하기 위해 사람치수세포에 LPS(Lipopolysaccharide) 및 약학조성물(KH002)을 처리한 후 염증인자의 발현을 비교하였다.

[182] 사람 치수 세포를 이용한 모든 실험은 서울대학교 치과 병원의 기관생명윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB; S-D20140007)로부터 승인을 받았으며 해당 기관의 가이드라인과 규제에 따라 진행되었다. 서울대학교 치과병원에서 동의서를 작성한 환자들의 제3대구치(사랑니)를 발치하여 치수세포를 분리하였고 분리 방법은 종전에 보고된 방법을 이용하였다(Choung et al., 2016). 치아를 절단하여 내부의 치수를 포셉으로 분리해내고 치수 조직을 60-mm 직경의 세포 배양 접시에 잘게 다진다. 그 후 잘게 다져진 치수 조직을 커버글라스로 덮고 세포배양액에 키워 사람 치수 세포를 분리하였다. 사람치수세포를 6-well dish에 1×10^5 cells/well로 세포를 접종한 후 음성 대조군은 배양 배지만, 양성 대조군은 각각 10 μ g/mL LPS, 10 μ g/mL 약학조성물(KH002)만 처리하였으며 실험군으로는 예방적 효과를 알기 위해 10 μ g/mL LPS와 10 μ g/mL 약학조성물(KH002)을 동시에 처리하였다. 실험군의 경우 치료 효과를 확인하기 위해 LPS를 24시간동안 선처리한 후 약학조성물(KH002)을 처리하였다.

[183] 염증인자의 발현을 비교하기 위해 RT-PCR을 진행하고 각 인자의 발현량을 정량적으로 비교하기 위해 GAPDH의 발현량과의 비율을 확인하였다(도 3).

[184]

[185] 사람치수세포에 LPS만 처리한 경우 염증인자인 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, CXCL10, iNOS, and COX2의 발현이 현저히 증가된 것이 확인되었다. 이와는 대조적으로 LPS 선처리 후 약학조성물(KH002)을 적용하였을 때와 LPS와 약학조성물(KH002)을 같이 처리하였을 때 모두 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군과 비슷한 발현 양상을 보임을 확인하였다. 이러한 결과는 치아우식증에 이환된 후 염증이 발생하였을 때 약학조성물(KH002)이 치아우식증과 관련한 염증을 예방적, 치료적으로 완화시키는 효과를 가짐을 보여준다.

[186]

[187] 각 인자에 대한 RT-PCR의 프라이머 서열은 다음과 같다(표 12).

[188]

[189] [표13]

인자	프라이머 서열	서열번호
CPNE7	F: 5'-CGGGACCCATTGACCAAGTC-3'	97
	R: 5'-CATACACCTCAAACCGTAGCTTC-3'	98
TNF- α	F: 5'-CCTGGTATGAGCCCATCTATCTG-3'	99
	R: 5'-GCAATGATCCCAAAGTAGACCTG-3'	100
IL-1 α	F: 5'-TGTATGTGACTGCCCAAGATGAAG-3'	101
	R: 5'-AGAGGAGGTTGGTCTCACTACC-3'	102
IL-1 β	F: 5'-CCAGGGACAGGATATGGAGCA-3'	103
	R: 5'-TTCAACACGCAGGACAGGTACAG-3'	104
IL-6	F: 5'-CGAAAGTCAACTCCATCTGCC-3'	105
	R: 5'-GGCAACTGGCTGGAAGTCTCT-3'	106
CXCL10	F: 5'-TGCCATTCTGATTTGCTGCC-3'	107
	R: 5'-TGCAGGTACAGCGTACAGTT-3'	108
Inos	F: 5'-CAGCGGGATGACTTTCCAA-3'	109
	R: 5'-AGGCAAGATTTGGACCTGCA-3'	110
COX2	F: 5'-TTCTCCTTGAAAGGACTTATGGGTAA-3'	111
	R: 5'-AGAAGTTCATTGATGGTGACTGTTT-3'	112

[190]

[191] 실시예 6: 치수세포의 생존율에 미치는 영향의 분석

[192] 치아우식증에 이환된 후 염증이 발생한 4단계 치아우식증과 관련하여, 사람치수세포의 염증환경에서의 세포 생존율에 미치는 약학조성물(KH002)의 효과를 확인하였다.

[193] 세포 생존율을 측정하기 위해 사람치수세포를 5×10^3 cells/well 로 96-well plate에 접종한 후 각각 1일, 3일, 5일차에 150 μ L of MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide solution, Medifab)을 약 2시간동안 처리한 후 DMSO에 용해한 용액의 570nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[194] 사람 치수 세포를 이용한 모든 실험은 서울대학교 치과 병원의 기관생명윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB; S-D20140007)로부터 승인을 받았으며 해당 기관의 가이드라인과 규제에 따라 진행되었다.

서울대학교 치과병원에서 동의서를 작성한 환자들의 제3대구치(사랑니)를 발치하여 치수세포를 분리하였고 분리 방법은 종전에 보고된 방법을 따랐다(Choung et al., 2016). 치아를 절단하여 내부의 치수를 포셉으로 분리해내고 치수 조직을 60-mm 직경의 세포 배양 접시에 잘게 다진다. 그 후 잘게 다져진 치수 조직을 커버글라스로 덮고 세포배양액에 키워 사람 치수 세포를 분리하였다. 사람치수세포를 6-well dish에 1×10^5 cells/well로 세포를 접종한 후 음성 대조군은 배양 배지만, 양성 대조군은 각각 10 μ g/mL LPS, 10 μ g/mL 약학조성물(KH002)만 처리하였으며 실험군으로는 예방적 효과를 알기 위해 10 μ g/mL LPS와 10 μ g/mL 약학조성물(KH002)을 동시에 처리하였다. 실험군의 경우 치료 효과를 확인하기 위해 LPS를 24시간동안 선처리한 후 약학조성물(KH002)을 처리하였다.

- [195] 도 4는 4단계에 해당하는 치아우식증으로 인한 치수 염증이 발생하였을 때의 상황을 모방한 세포 실험으로 염증환경 하에서 사람치수세포에 대한 약학조성물(KH002)처리가 치수세포의 생존율에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [196] 약학조성물(KH002)을 10 μ g/mL의 농도로 처리한 실험군은 음성 대조군과 크게 차이를 보이지 않았다. 10 μ g/mL LPS를 처리한 군은 음성대조군에 비해 치수세포의 생존율이 현저히 감소하였으며 10 μ g/mL LPS에 10 μ g/mL 약학조성물(KH002)을 같이 처리한 군은 치수세포의 생존율이 음성 대조군과 유사한 정도로 회복되었다.
- [197] 이와 같은 결과는 치아우식증에 이환된 후 염증이 발생하였을 때 약학조성물(KH002)이 사람치수세포의 생존율을 올려 치수의 보호 및 염증을 완화하는 기능을 제공할 수 있음을 의미한다.

[198]

[199] **실시예 7: 치수세포의 회복에 미치는 영향의 분석**

- [200] 사람치수세포의 상치치유모델에서 염증환경과 약학조성물(KH002)처리시의 상치치유능력에 미치는 영향을 확인하였다.
- [201] 사람치수세포를 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 접종한 후 다음날 200 μ L의 파이펫 끝으로 중앙 부분을 긁은 후 24시간 이후에 세포가 자라 들어오는 속도를 비교하였다.
- [202] 사람 치수 세포를 이용한 모든 실험은 서울대학교 치과 병원의 기관생명윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB; S-D20140007)로부터 승인을 받았으며 해당 기관의 가이드라인과 규제에 따라 진행되었다. 서울대학교 치과병원에서 동의서를 작성한 환자들의 제3대구치(사랑니)를 발치하여 치수세포를 분리하였고 분리 방법은 종전에 보고된 방법을 따랐다(Choung et al., 2016). 치아를 절단하여 내부의 치수를 포셉으로 분리해내고 치수 조직을 60-mm 직경의 세포 배양 접시에 잘게 다진다. 그 후 잘게 다져진 치수 조직을 커버글라스로 덮고 세포배양액에 키워 사람 치수

세포를 분리하였다. 사람치수세포를 6-well dish에 1×10^5 cells/well로 세포를 접종한 후 음성 대조군은 배양 배지만, 양성 대조군은 각각 10 μ g/mL LPS, 10 μ g/mL 약학조성물(KH002)만 처리하였으며 실험군으로는 예방적 효과를 알기 위해 10 μ g/mL LPS와 10 μ g/mL 약학조성물(KH002)을 동시에 처리하였다. 실험군의 경우 치수세포의 회복에 미치는 효과를 확인하기 위해 LPS를 24시간동안 선처리한 후 약학조성물(KH002)을 처리하였다.

- [203] 세포의 사진은 10x의 대물렌즈를 사용하여 광학현미경으로 촬영하였으며 촬영한 사진은 ImageJ 프로그램을 이용하여 분석하였다.
- [204] 도 5는 4단계에 해당하는 치아우식증으로 인한 치수 염증이 발생하였을 때의 상황을 모방한 세포 실험으로 염증환경 하에서 손상된 사람치수세포에 대한 본 발명의 실시예에 따른 약학 조성물의 처리가 치수세포의 회복에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- [205] 실험군의 상처치유능력을 대조군과의 비율로 정량한 결과, 약학조성물(KH002)만을 처리한 군은 대조군과 큰 차이가 없었지만 LPS를 처리한 군은 대조군의 50%정도로 상처치유능력이 현저히 감소하였다. LPS와 약학조성물(KH002)을 같이 처리한 군에서는 상처치유능력이 약 90%까지 회복되어 약학조성물(KH002)이 치아우식증에 의한 염증환경하에서도 사람치수세포의 상처치유능력을 회복시킴을 확인할 수 있었다.
- [206]
- [207] **실시예 8: 치수세포의 광화능에 미치는 영향 분석**
- [208] 치아우식증에 이환된 후 염증이 발생하였을 때 약학조성물(KH002)처리시 사람치수세포의 광화능에 미치는 영향을 확인하였다.
- [209] 이를 위하여 사람치수세포를 각각의 6-well dish에 1×10^5 cells/well로 접종한 후 다음날부터 아스코르브산(50 μ g/mL), 베타글리세로인산(10 mM)를 함유한 분화배지에서 7일, 14일, 21일 동안 배양하였다.
- [210] 사람 치수 세포를 이용한 모든 실험은 서울대학교 치과 병원의 기관생명윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB; S-D20140007)로부터 승인을 받았으며 해당 기관의 가이드라인과 규제에 따라 진행되었다. 서울대학교 치과병원에서 동의서를 작성한 환자들의 제3대구치(사랑니)를 발치하여 치수세포를 분리하였고 분리 방법은 종전에 보고된 방법을 따랐다(Choung et al., 2016). 치아를 절단하여 내부의 치수를 포셉으로 분리해내고 치수 조직을 60-mm 직경의 세포 배양 접시에 잘게 다진다. 그 후 잘게 다져진 치수 조직을 커버글라스로 덮고 세포배양액에 키워 사람 치수 세포를 분리하였다. 사람치수세포를 6-well dish에 1×10^5 cells/well로 세포를 접종한 후 음성 대조군은 배양 배지만, 양성 대조군은 각각 10 μ g/mL LPS, 10 μ g/mL 약학조성물(KH002)만 처리하였으며 실험군으로는 예방적 효과를 알기 위해 10 μ g/mL LPS와 10 μ g/mL 약학조성물(KH002)을 동시에 처리하였다. 실험군의 경우 광화능에 미치는 효과를 확인하기 위해 LPS를 24시간동안

선처리한 후 약학조성물(KH002)을 처리하였다.

[211] 광물화된 매트릭스의 양을 비교하기 위해 4% PFA로 4°C에서 밤새 고정된 후 pH 4.2로 교정된 40mM의 alizarin red S를 25°C에서 30분간 처리하였다. 그 후 0.5N 염산에 용해한 0.5mL의 도데실 황산 나트륨을 적용하고 셰이커에 30분간 처리한 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

[212] 도 6은 4단계에 해당하는 치아우식증으로 인한 치수 염증이 발생하였을 때의 상황을 모방한 세포 실험으로 사람치수세포의 광화능에 미치는 영향을 살펴본 결과이다. 도 6을 참고하면, 대조군에 비해 약학조성물(KH002)를 처리한 군은 21일차에 광물 결절의 크기가 증가하였으며 7일, 14일, 21일차에 광물화된 매트릭스의 양도 현저히 증가하였다. 그에 비해 LPS를 처리한 군에서는 21일차의 광물 결절의 크기와 7일, 14일, 21일차에 광물화된 매트릭스의 양이 대조군에 비해 현저히 감소하였다. LPS와 약학조성물(KH002)를 같이 처리한 군은 LPS를 처리한 군에 비해서 21일차의 광물 결절의 크기가 증가하였고 광물화된 매트릭스 양이 7일, 14일차에 음성 대조군과 거의 유사한 정도로 회복되었다. 실험군의 경우 21일이 경과한 후 대조군과 동일하게 회복되지는 않았지만 LPS만 처리한 군에 비해서는 통계적으로 유의한 증가를 보였다. 이러한 결과들을 통해 약학조성물(KH002)이 치아우식증으로 인한 염증환경 상태의 사람치수세포에서 상아모세포의 상아질 분비능력을 회복 및 향상시켜 손상된 상아질의 두께를 회복하는 효과를 제공할 수 있음을 확인하였다.

[213] 본 발명의 실시예에 따른 약학 조성물은 일반적인 치아우식증의 치료방법을 적용하기 어려운 노년층의 치근우식증을 방지 또는 예방하고, 청소년 환자의 치아우식증이 발생한 유치를 탈락시기까지의 유지하는 등 다양한 치아우식증 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

[214] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 약학 조성물의 경우 심각한 치아우식증 단계로써 일반적인 치아우식증의 치료로는 자연치아상태로 회복할 수 없는 염증이 발생한 경우에도 상아모세포를 보호할 수 있고 새로 형성된 상아모세포의 자가포식작용이 함께 제공될 수 있도록 함으로써 치수세포의 보호를 통해 치아우식증을 치료하는 효과를 제공할 수 있다.

[215]

[216] 본 명세서와 도면에는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 개시하였으며, 비록 특정 용어들이 사용되었으나, 이는 단지 본 발명의 기술 내용을 쉽게 설명하고 발명의 이해를 돕기 위한 일반적인 의미에서 사용된 것이지, 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다. 여기에 개시된 실시예 외에도 본 발명의 기술적 사상에 바탕을 둔 다른 변형예들이 실시 가능하다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 하기 일반식 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 치아우식증 예방 또는 치료용 약학 조성물:
K-Y-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8 (일반식 1)
상기 일반식 1에서,
R1은 아르기닌(R), 리신(K) 또는 글루타민(Q)이고;
R2는 아르기닌(R) 또는 글루타민(Q)이며;
R3, R4 및 R5는 각각 아르기닌(R) 또는 리신(K)이고;
R6는 아스파라긴(N) 또는 세린(S)이며; 및
R7 및 R8은 리신(K) 또는 타이로신(Y)이다.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 96 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 치아우식증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 상기 펩타이드가 반복되어 연결된 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 치아우식증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 상기 펩타이드에 구강세균에 대한 항생효과를 갖는 약물이 결합된 복합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 치아우식증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 치아우식증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항의 펩타이드를 포함하는 치아우식증 예방 또는 개선용 의약품 조성물.
- [청구항 7] 제1항 또는 제2항의 펩타이드를 포함하는 치아우식증 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물.
- [청구항 8] 하기 일반식 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 치아우식증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 처리하는 치아우식증 예방 또는 치료방법:
K-Y-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8 (일반식 1)
상기 일반식 1에서,
R1은 아르기닌(R), 리신(K) 또는 글루타민(Q)이고;
R2는 아르기닌(R) 또는 글루타민(Q)이며;
R3, R4 및 R5는 각각 아르기닌(R) 또는 리신(K)이고;
R6는 아스파라긴(N) 또는 세린(S)이며; 및

R7 및 R8은 리신(K) 또는 타이로신(Y)이다.