

## 명세서

### 발명의 명칭: 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 치료용 약학 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 및 치주조직 재생용 조성물에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 치주조직(periodontium)이란 치아를 둘러싸고 있는 조직들을 총칭한다. 치주조직은 치아를 악골(턱뼈) 내에 지지하는 치조골, 치조골과 치아를 악골 내에 연결하는 치주인대, 치주인대의 섬유를 함유하는 백악질, 치조골을 덮고 있는 연조직인 치은(잇몸) 등으로 구성되어 있다. 치은 섬유모세포(gingival fibroblast)와 치주인대 섬유모세포 (periodontal ligament fibroblast)는 치은 연조직성 결합조직의 주요 세포 구성 성분이며, 세포 외 기질(extracellular matrix)을 형성하고 이를 유지하는 역할을 한다. 이 중 치은 섬유모세포는 주로 치은 결합조직을 유지하는 데 관여하는 반면, 치주인대 섬유모세포는 그 특유 기능으로 치주인대를 형성할 뿐만 아니라 생체 내에서의 인접 치조골 및 백악질의 수복과 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [4] 치주인대는 치아뿌리(치근부)의 백악질과 치조골 사이를 연결시켜주는 섬유성 결합조직을 말한다. 치주인대의 양끝은 치근부의 백악질과 치조골에 매입되어 있으며 이렇게 치조골이나 백악질 내로 매입되어 있는 치주인대 섬유다발을 샤피섬유(Sharpey's fiber)라 한다. 치주인대의 기능은 치아를 유지시켜주고 경조직의 구조적 특성을 유지시키는데 중요한 기능을 할 뿐만 아니라 교합압의 충격에 저항하며 손상으로부터 혈관과 신경 같은 연조직을 보호한다. 또 다른 중요한 기능은 영양공급과 감각 수용기로서의 기능으로, 치주인대의 신경지배는 삼차신경경로를 통해 고유수용 감각과 촉각 및 통각을 전달하고, 개개의 치아들에 가해지는 외부 압력을 감지하여 조절하고 저작근육계를 조절하는 신경근육 기전에 중요한 역할을 한다. 이러한 치주인대는 많은 섬유모세포를 함유하고 있으며, 이들 세포들은 그 특유 기능으로 치주인대를 형성할 뿐만 아니라 백악질과 치조골의 형성과 흡수에 관여하여 생리적인 치아이동을 유발하고 치주조직이 교합압에 적응되도록 하며 손상을 회복시키는 기능을 갖고 있다.
- [5] 치주질환은 잇몸에 국한되는 치은염과 치아뿌리를 둘러싸고 있는 치조골에도 염증이 확산된 치주염으로 분류되며, 치아 자체가 손상되는 질환이 아니라 치아를 지지하고 있는 치주조직에 염증이 발생하는 질환이다. 치주질환이 발생하면 임상적으로 치은 출혈과 종창, 치주낭의 형성 및 치조골의 파괴 등으로

치아의 상실을 가져오게 되며, 이러한 치주질환의 원인으로서는 국소적 요인과 전신적 요인이 있다. 국소 원인인자로 알려진 두가지는 치태(dental plaque), 치석 및 기타 국소 원인들과 교합성 외상(trauma from occlusion)이라 할 수 있다. 발병 기전으로 치태가 치주낭 내에 기계적으로 축적되면 주변에 존재하는 세균들의 서식처가 되며 이러한 서식은 점차 호기성, 통기성, 그람 양성 세균에서 혐기성 그람음성 세균으로 점차 이행되며, 치주낭의 심부로 증식되고, 이러한 혐기성 그람음성 세균은 증식하여 치주낭의 심부로 이행하게 된다. 이때 증식된 혐기성 그람음성 세균의 독소 및 모든 산물은 직접 조직을 파괴하거나 면역계를 자극하여 자극된 면역계에서부터 여러 가지 작용에 의하여 치주조직파괴와 더불어 염증을 유발하게 된다. 이에 대한 방어기전으로서 다형핵 백혈구의 기능과 면역반응이 전신적인 요인으로서 작용하게 된다. 그러나, 근원적인 인자인 혐기성 그람음성 세균에 대한 항균작용 및 정균작용과 이들 세균의 독성산물을 제거하고 파괴, 소실된 치주조직을 원상 회복시키는 것이 치주질환의 예방 및 치료에 중요한 관건이 되는 것으로 알려져 있다.

- [6] 기본적인 치주질환의 치료는 치주질환의 원인이 되는 치태와 치석을 제거하는 치석제거 (스케일링) 술식과 이와 유사하게 치태와 치석을 제거하는 술식으로 치아 뿌리 표면 백악질에 박혀 있는 염증을 일으키는 요인을 제거하는 치근활택술이 있다. 치주질환으로 인해 염증이 심해지면 치조골 손상을 동반하게 되며, 치조골이 심하게 흡수된 경우에 재생형 치주수술을 통한 골이식을 수행할 수 있다. 이식하는 골의 종류는 환자자신의 골(자가골)을 사용하거나 이종골이나 합성골을 사용할 수 있다.
- [7] 따라서 치주질환을 치료하기 위하여는 치주질환의 원인균을 제거해야 할 뿐만 아니라 치주조직을 재생하는 과정이 함께 수행되어야 할 것으로 사료된다.
- [8] 현재 파괴된 치주조직을 재생하기 위한 치료방법으로 골 이식술, 조직유도재생술, 그리고 다양한 성장인자를 이용한 치료법 등이 시행되고 있으며, 또한 치주인대세포의 재생과 신생 백악질의 형성에 초점이 맞춰져 있는 치아 재식술 방법도 시행되고 있다.
- [9] 이와 관련하여 치주조직을 효과적으로 재생하는 방법을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 대한민국 등록특허 제1179476호에는 인간 치주인대 (hPDL) 세포의 광물화 과정에서 높게 발현되는 전골수구성 백혈병 아연 손가락(PLZF) 유전자, Fk506 결합 단백질 5(FKBP5) 유전자, 혈청 아밀로이드 A1(SAA1) 유전자, 지방산 결합 단백질 4(FABP4) 유전자, 서열 유사성을 갖는 계열 A(FAM107A) 유전자, 코린(CORIN) 유전자, ras-관련 C3 부톨리눔 독소 기질 3(RAC3) 유전자 또는 프로락틴-유도된 단백질(PIP) 유전자 및 인간 치주인대 (hPDL) 세포의 광물화 과정에서 낮게 발현되는 FNDC1, PTGS2, RSAD2, NPTX1, VCAM1, MX1, IFIT1, CLDN1 또는 WISP2 유전자가 개시되어 있다. 또한 대한민국 등록특허 101788916호에는 법랑모세포 배양액을 포함하는 치주질환 치료용 약학 조성물에 관해 개시되어 있다.

- [10] 한편, 치아 혹은 치주조직에 외상력이 가해지면, 그 방향과 크기의 차이 등에 따라 여러 가지 파괴가 치아와 치주조직에 발생한다. 치아의 외상은 크게 파절성 외상과 탈구성 외상으로 나눌 수 있다. 탈구성 외상은 치주인대의 손상을 가리키며 진탕·아탈구, 정출성 탈구, 측방성 탈구, 완전 탈구, 함입으로 세분화할 수 있으며, 모든 연령층에서 가능하나 8~12세의 어린이에서 많이 일어날 수 있다. 이러한 완전 탈구 치아의 재식 성공여부는 완전 탈구된 치아에 부착되어 있는 치주인대 또는 치아가 빠진 치조窝에 남아있는 치주인대의 재생에 달려있다. 치주인대의 재생이 일어나지 않으면, 치아 뿌리의 백악질과 상아질의 흡수가 일어나며, 이 부위가 치조골로 대체되는 골유착(Ankylosis)이 발생하게 된다. 따라서 치주치료의 궁극적인 목적은 치주질환의 진행을 막고 치은, 치주인대, 치조골, 그리고 백악질을 포함하는 파괴된 치주조직을 재생시켜 원래대로 회복하는 것이지만, 아직까지는 치주인대를 직접적으로 재생하거나 분화시킬 수 있는 방법은 보고되어 있지 않다.
- [11] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 치주질환으로 인해 손상된 치주조직(치주인대, 백악질, 치조골)을 재생시킬 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 치주인대 세포의 분화를 유도하여 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 손상된 치주인대를 치료할 수 있을 뿐만 아니라 손상된 백악질 및 치조골을 재생할 수 있는 펩타이드의 새로운 용도를 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [12] **발명의 상세한 설명**  
**기술적 과제**
- [13] 본 발명은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [14] 본 발명은 치주조직 재생용 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [15] 본 발명은 BSP, DMP1, CAP, COL3 및 페리오스틴 중 어느 하나 이상의 유전자 발현 촉진용 조성물을 제공하는 것을 또다른 목적으로 한다.
- [16] 본 발명은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 펩타이드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 치주질환 또는 탈구성 외상 치아를 치료하는 방법을 제공하는 것을 또다른 목적으로 한다.
- [17] 본 발명은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 치료용 약제를 제조하는데 있어서, 상기 펩타이드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공하는 것을 또다른 목적으로 한다.
- [18]
- [19] 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.

[20]

### 기술적 해결방법

[21] 상기 기술적 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 양상은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다:

[22] K-Y-K-Q-X5-X6-X7-X8-Y-K (일반식 1)

[23] 상기 일반식 1에서,

[24] X5 내지 X7는 각각 독립적으로 아르기닌 (R) 또는 리신 (K)이고;

[25] X8은 아스파라긴 (N) 또는 세린 (S)이다.

[26]

[27] 상기 펩타이드는, 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있는 한, 이를 구성하는 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 변이체 펩타이드도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함된다.

[28] 본 명세서 전반에서, 펩타이드를 구성하는 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[29] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

[30] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

[31] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

[32] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

[33] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

[34] 류신 Leu, L 리신 Lys, K

[35] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

[36] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

[37] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

[38] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

[39]

[40] 본 발명자들은 상기 펩타이드가 치주인대의 재생 또는 뼈모세포 및 백악모세포로의 분화, 치조골 및 백악질의 재생을 촉진시킴으로써 치주질환 또는 탈구성 외상 치아를 치료할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[41] 상기 펩타이드는 인간 치주인대세포에서 뼈모세포 및 백악모세포 분화마커 유전자인 BSP, DMP1, CAP의 발현을 증가시키고, 치주인대 분화마커 유전자인 페리오스틴과 COL3의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 또한, 상기 펩타이드는 인간 중간엽줄기세포에서 뼈모세포 및 백악모세포 분화마커 유전자인 BSP 및

DMP1의 발현을 증가시킴을 확인하였다.

- [42] 뿐만 아니라, 치주조직 손상 동물 모델 실험 결과, 상기 펩타이드가 치조골, 백악질 및 치주인대를 재생하였음을 확인하였다. 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 치조골을 재생하고, 신생 백악질 유사조직 및 신생 치주인대 유사조직을 형성하는 효과가 있으며, 본 발명의 펩타이드에 의해 형성된 신생 치주인대는 새로 형성된 치조골과 백악질에 함입되어 있음을 확인하였다.
- [43] 일 구체예에서, 상기 펩타이드는 1개 이상의 아미노산에서 보존적 치환이 일어난 것일 수 있다.
- [44] “보존적 치환(conservative substitution)”은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 상기 펩타이드는 동일 또는 유사한 생물학적 활성을 여전히 보유하면서, 예를 들어 하나 이상의 보존적 치환을 가질 수 있다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 예를 들면, 양으로 하전 된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신, 및 히스티딘을 포함하고; 음으로 하전 된 (산성) 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산을 포함하고; 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함하고, 소수성 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판을 포함한다. 또한, 아미노산은 전하를 띠는(electrically charged) 결사슬을 갖는 아미노산과 전하를 띠지 않는(uncharged) 결사슬을 갖는 아미노산으로 분류할 수 있으며, 전하를 띠는 결사슬을 갖는 아미노산은 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 히스티딘을 포함하고, 전하를 띠지 않는 결사슬을 갖는 아미노산은 다시 비극성(nonpolar) 아미노산 또는 극성 아미노산(polar)으로 분류할 수 있으며, 비극성 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 프롤린, 극성 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민을 포함하는 것으로 분류할 수 있다. 상기와 같은 유사한 성질을 갖는 아미노산으로의 보존적 치환은 동일 또는 유사한 활성을 나타낼 것으로 기대할 수 있다.
- [45] 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 포함됨은 자명하다.
- [46] 또한, 본 발명의 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.

- [47] 일 구체예에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [48] 다른 구체예에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열로 필수적으로 구성된 것이거나, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.
- [49] 본원에서 '특정 서열번호로 구성되는 펩타이드'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 침묵 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본 발명의 범위 내에 속하는 것이 자명하다. 즉, 일부 서열의 차이가 있더라도 일정 수준 이상의 상동성을 나타내며 동일 또는 유사한 활성을 나타낸다면 본 발명의 범위에 속할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1 내지 16의 아미노산 서열과 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [50] “상동성(homology)” 또는 “동일성(identity)”은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어, “상동성” 및 “동일성”은 종종 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [51] 임의의 두 펩타이드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA(Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.(1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [52] 펩타이드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al.(1970), J Mol Biol.48: 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL (NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들 간의 관련성(relevance)를 나타낸다.
- [53] 일 구체예에서, 상기 펩타이드는 펩타이드 단독의 형태로 사용될 수도 있고, 상기 펩타이드가 2회 이상 반복되어 연결된 폴리펩타이드의 형태로 사용될 수도 있다.
- [54] 따라서, 상기 약학 조성물은 상기 펩타이드가 반복되어 연결된 폴리펩타이드를 포함하는 것일 수 있다.
- [55] 일 구체예에서, 다양한 펩타이드 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제조할 수 있다.
- [56] 본 발명의 펩타이드는 그 길이에 따라 이 분야에서 잘 알려진 방법, 예를 들어 자동 펩타이드 합성기에 의해 합성할 수 있으며, 유전자 조작 기술에 의하여 생산할 수도 있다. 구체적으로, 본 발명의 펩타이드는 표준 합성 방법, 제조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 펩타이드는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:
- [57] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [58] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [59] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [60] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.
- [61] 또한, 상기 펩타이드의 제조는 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형

- 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 예컨대, 측쇄 간 고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노핵산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다. 또한, 상기 변형은 비 천연형 화합물로 치환을 모두 포함한다.
- [62] 상기 변형에 이용되는 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [63] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.
- [64] 또한, 본 발명에 따른 펩타이드는 N-말단 및/또는 C-말단이 변형되지 않은 것일 수 있으나, 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 펩타이드 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태 역시 본 발명에 따른 펩타이드의 범주에 포함된다. C-말단이 변형되지 않은 경우, 본 발명에 따른 펩타이드의 말단은 자유 카르복실기를 가지나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [65] 특히, 화학적으로 합성한 펩타이드의 경우, N- 및 C-말단이 전하를 띠고 있기 때문에, 이러한 전하를 제거하기 위하여 N-말단을 아세틸화 (acetylation) 및/또는 C-말단을 아미드화 (amidation)할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [66] 상기 펩타이드는 아미노산 서열 상의 변이 또는 수식에 의해서 펩타이드의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 치료 효과가 증가하거나 치주인대조직 재생능이 증가한 펩타이드를 포함할 수 있다.
- [67] 상기 펩타이드는 펩타이드 그 자체, 그의 염(예컨대, 상기 펩타이드의 약학적으로 허용가능한 염), 또는 그의 용매화물의 형태를 모두 포함한다.
- [68] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [69] 또한, 상기 펩타이드는 약학적으로 허용되는 임의의 형태일 수 있다.
- [70] "약학적으로 허용가능한"이란 치료효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여 횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [71] 일 구체예에서, 상기 펩타이드는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 형태일 수

있다. 상기 염은 약학 분야, 예를 들면 치주질환 분야에서 사용되는 통상의 산 부가염, 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 술폰산, 인산 또는 질산과 같은 무기산으로부터 유도된 염 및 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 시트르산, 말레산, 말론산, 메탄술폰산, 타르타르산, 말산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔술폰산, 옥살산 또는 트리플루오로아세트산과 같은 유기산으로부터 유도된 염을 포함한다. 또한, 상기 염은, 암모늄, 디메틸아민, 모노메틸아민, 모노에틸아민, 디에틸아민과 같은 염기 부가 염일 수 있다. 또한, 상기 염은 통상의 금속 염 형태, 예를 들면 리튬, 소듐, 칼륨, 마그네슘, 또는 칼슘과 같은 금속으로부터 유도된 염을 포함한다. 상기 산 부가염, 염기 부가염 또는 금속염은 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염 및 그를 제조하는 일반 방법론은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [P. Stahl, et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011)]; [S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977]을 참조할 수 있다.

- [72] 보호된 아미노산 또는 펩타이드의 축합을 위하여, 펩타이드 합성에 유용한 각종 활성화 시약, 특히 바람직하게는 트리스포스포늄염, 테트라메틸우로늄염, 카보다이이미드 등이 사용될 수 있다. 트리스포스포늄염의 예는 벤조트라이아졸-1-일옥시트리스(피롤라지노)포스포늄헥사플루오로포스페이트(PyBOP), 브로모트리스(피롤라지노)포스포늄헥사플루오로포스페이트(PyBroP), 7-아자벤조트라이아졸-1-일옥시트리스(피롤라지노)포스포늄헥사플루오로포스페이트(PyAOP)를 포함하고, 테트라메틸우로늄염의 예는 2-(1H-벤조트라이아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트(HBTU), 2-(7-아자벤조트라이아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트(HATU), 2-(1H-벤조트라이아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄테트라플루오로보레이트(TBTU), 2-(5-노보난-2,3-다이카복시이미드)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄테트라플루오로보레이트(TNTU), O-(N-석시미딜)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄테트라플루오로보레이트(TSTU)를 포함하고, 카보다이이미드의 예는 N,N'-다이사이클로헥실카보다이이미드(DCC), N,N'-다이아이소프로필카보다이이미드(DIPCDI), N-에틸-N'-(3-다이메틸아미노프로필)카보다이이미드 염산염(EDCI-HCl) 등을 포함한다. 이들을 이용하는 축합을 위하여, 라세미화 저해제[예컨대, N-하이드록시-5-노보넨-2,3-다이카복실산 이미드(HONB), 1-하이드록시벤조트라이아졸(HOBt),

1-하이드록시-7-아자벤조트라이아졸(HOAt),  
 3,4-다이하이드로-3-하이드록시-4-옥소-1,2,3-벤조트라이아진(HOObt), 에틸  
 2-사이아노-2-(하이드록시이미노)아세테이트(Oxyma 등]의 첨가가 바람직하다.  
 축합에 사용되는 용매는 펩타이드 축합 반응에 유용한 것으로 공지된  
 것들로부터 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 무수 또는 물-함유  
 N,N-다이메틸폼아마이드, N,N-다이메틸아세트아마이드, N-메틸피롤리돈 등과  
 같은 산 아마이드, 염화메틸렌, 클로로폼 등과 같은 할로젠화된 탄화수소,  
 트라이플루오로에탄올, 페놀 등과 같은 알코올, 다이메틸설폭사이드 등과 같은  
 설폭사이드, 피리딘 등과 같은 3급 아민, 다이옥산, 테트라하이드로퓨란 등과  
 같은 에터, 아세토나이트릴, 프로피오나이트릴 등과 같은 나이트릴, 메틸  
 아세테이트, 에틸 아세테이트 등과 같은 에스터, 이들의 적절한 혼합물 등이  
 사용될 수 있다. 반응 온도는 펩타이드 결합 반응에 사용 가능한 것으로 공지된  
 범위로부터 적절하게 선택되고, 통상 약 -20°C 내지 90°C의 범위로부터  
 선택된다. 활성화된 아미노산 유도체는 통상 1.5 내지 6배 과잉으로 사용된다.  
 고상 합성에서, 다프트린 반응을 이용하는 시험이 축합이 불충분한 것을  
 나타낼 경우, 충분한 축합은 보호기의 제거 없이 축합 반응을 반복함으로써  
 수행될 수 있다. 반응을 반복한 후에도 축합이 여전히 불충분할 경우, 미반응  
 아미노산은 산 무수물, 아세틸이미다졸 등으로 아세틸화될 수 있으므로 후속  
 반응에 대한 영향이 회피될 수 있게 된다.

- [73] 출발 아미노산의 아미노기에 대한 보호기의 예는 벤질옥시카보닐(Z),  
 tert-부톡시카보닐(Boc), tert-펜틸옥시카보닐, 아이소보닐옥시카보닐,  
 4-메톡시벤질옥시카보닐, 2-클로로벤질옥시카보닐(Cl-Z),  
 2-브로모벤질옥시카보닐(Br-Z), 아다만틸옥시카보닐, 트라이플루오로아세틸,  
 프탈로일, 폼일, 2-나이트로페닐설폰, 다이페닐포스포노티오일,  
 9-플루오레닐메틸옥시카보닐(Fmoc), 트라이틸 등을 포함한다.
- [74] 출발 아미노산에 대한 카복실-보호기의 예는, 위에서 언급된 C<sub>1-6</sub> 알킬기, C<sub>3-10</sub>  
 사이클로알킬기, C<sub>7-14</sub> 아르알킬기 이외에, 아릴, 2-아다만틸, 4-나이트로벤질,  
 4-메톡시벤질, 4-클로로벤질, 페나실 및 벤질옥시카보닐하이드라자이드,  
 tert-부톡시카보닐하이드라자이드, 트라이틸하이드라자이드 등을 포함한다.
- [75] 세린 또는 트레오닌의 하이드록실기는, 예를 들어, 에스터화 또는 에터화에  
 의해 보호될 수 있다. 에스터화에 적합한 기의 예는, 아세틸기 등과 같은 저급(C<sub>2-4</sub>)  
 알카노일기, 벤조일기 등과 같은 아로일기, 및 유기산 등으로부터 유래된  
 기를 포함한다. 또한, 에터화에 적합한 기의 예는 벤질, 테트라하이드로피란일,  
 tert-부틸(Bu<sup>t</sup>), 트라이틸(Trt) 등을 포함한다.
- [76] 티로신의 페놀성 하이드록실기에 대한 보호기의 예는 Bzl, 2,6-다이클로로벤질,  
 2-나이트로벤질, Br-Z, tert-부틸 등을 포함한다.
- [77] 히스티딘의 이미다졸에 대한 보호기의 예는 p-톨루엔설폰(Tos),  
 4-메톡시-2,3,6-트라이메틸벤젠설폰(Mtr), 다이나이트로페닐(DNP),

- 벤질옥시메틸 (Bom), tert-부톡시메틸 (Bum), Boc, Trt, Fmoc 등을 포함한다.
- [78] 아르기닌의 구아니디노기에 대한 보호기의 예는 Tos, Z, 4-메톡시-2,3,6-트라이메틸벤젠설포닐(Mtr), p-메톡시벤젠설포닐(MBS), 2,2,5,7,8-펜타메틸크로만-6-설포닐(Pmc), 메시틸렌-2-설포닐(Mts), 2,2,4,6,7-펜타메틸다이하이드로벤조퓨란-5-설포닐(Pbf), Boc, Z, NO<sub>2</sub> 등을 포함한다.
- [79] 라이신의 겔사슬 아미노기에 대한 보호기의 예는 Z, Cl-Z, 트라이플루오로아세틸, Boc, Fmoc, Trt, Mtr, 4,4-다이메틸-2,6-다이옥소사이클로헥실리텐일(Dde) 등을 포함한다.
- [80] 트립토판의 인돌릴에 대한 보호기의 예는 폼일(For), Z, Boc, Mts, Mtr 등을 포함한다.
- [81] 아스파라긴 및 글루타민에 대한 보호기의 예는 Trt, 잔틸(Xan), 4,4'-다이메톡시벤즈하이드릴(Mbh), 2,4,6-트라이메톡시벤질(Tmob) 등을 포함한다.
- [82] 출발 물질 중의 활성화된 카복실기의 예는 대응하는 산 무수물, 아자이드, 활성 에스터[알코올과의 에스터(예컨대, 펜타클로로페놀, 2,4,5-트라이클로로페놀, 2,4-다이나이트로페놀, 사이아노메틸알코올, 파라나이트로페놀, HONB, N-하이드록시석시미드, 1-하이드록시벤조트라이아졸(HOBT), 1-하이드록시-7-아자벤조트라이아졸(HOAt))] 등을 포함한다. 출발 재료 내 활성화된 아미노기의 예는 대응하는 인 아마이드를 포함한다.
- [83] 보호기를 제거(removing)(제거(eliminating))하는 방법의 예는, Pd-블랙 또는 Pd-탄소와 같은 촉매의 존재 하에서의 수소 스트림 중의 촉매 환원; 무수 플루오린화수소, 메탄설포산, 트라이플루오로메탄설포산, 트라이플루오로아세트산(TFA), 트라이메틸실릴 브로마이드(TMSBr), 트라이메틸실릴 트라이플루오로메탄설포네이트, 테트라플루오로붕산, 트리소(트라이플루오로)붕산, 삼브로민화붕소, 또는 이의 혼합물 용액을 이용한 산 처리; 다이아이소프로필에틸아민, 트라이에틸아민, 피페리딘, 피페라진 등을 이용한 염기 처리; 및 액체 암모니아 중에서 나트륨에 의한 환원 등을 포함한다. 위에서 기재된 산 처리에 의한 제거 반응은 일반적으로 -20°C 내지 40°C의 온도에서 수행되고; 산 처리는 아니솔, 페놀, 티오아니솔, 메타크레졸 및 파라크레졸; 다이메틸설파이드, 1,4-부탄다이티올, 1,2-에탄다이티올, 트라이아이소프로필실란 등과 같은 양이온 포착제(cation scavenger)를 첨가함으로써 효율적으로 수행된다. 또한, 히스티딘의 이미다졸의 보호기로서 사용되는 2,4-다이나이트로페닐기는 티오펜 처리에 의해 제거되고; 트립토판의 인돌의 보호기로서 사용되는 폼일기는 1,2-에탄다이티올, 1,4-부탄다이티올 등의 존재 중에서 산처리에 의한 것뿐만 아니라, 희석 수산화나트륨, 희석 암모니아 등에 의한 알칼리 처리에 의한 탈보호에 의해 제거된다.

- [84] 출발 물질과 보호기의 반응에 관여되지 않아야 하는 작용기의 보호, 보호기의 제거, 반응에 관여하는 작용기의 활성화 등은 공지된 보호기 및 공지된 수단으로부터 적절하게 선택될 수 있다.
- [85] 펩타이드의 아마이드를 제조하는 방법에서, 이것은 아마이드 합성을 위하여 수지를 이용하는 고상 합성에 의해 형성되거나, 또는 카복시 말단 아미노산의  $\alpha$ -카복실기가 아마이드화되고, 펩타이드 사슬이 아미노기 측을 향하여 목적하는 사슬 길이로 연장되고, 그 후, 펩타이드 사슬만의 N-말단  $\alpha$ -아미노기에 대한 보호기가 제거된 펩타이드 및 C-말단 카복실기에 대한 보호기만이 펩타이드 사슬에서 제거된 펩타이드가 제조되고, 이들 두 펩타이드는 위에서 기재된 혼합된 용매 중에서 축합된다. 축합 반응에 대한 상세에 대해서, 위에서의 것과 같은 것이 적용된다. 축합에 의해 얻어진 보호된 펩타이드가 정제된 후에, 모든 보호기가 위에서 기재된 방법에 의해 제거되어 목적하는 조절의 펩타이드를 수득할 수 있다. 이 조절의 펩타이드를 주된 분획의 정제 및 동결-건조의 각종 공개적으로 공지된 수단을 이용해서 정제함으로써, 펩타이드의 목적하는 아마이드가 제조될 수 있다.
- [86] 일 구체예에서, 상기 펩타이드는 그의 용매화물의 형태일 수 있다. “용매화물”은 상기 펩타이드 또는 그의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 의미한다.
- [87] “치주질환”은 치아를 유지하는 치아 주위 조직인 치은, 치주인대, 치조골에서 일어나는 염증 질환을 일컫는 것이다. 치은(잇몸)과 치아 사이의 틈에 박테리아가 감염되어 치주인대와 인접조직을 손상시키는 질환을 의미하는데, 병증의 정도에 따라 치은염과 치주염으로 구분된다. 염증이 진행되어 더 많은 조직이 손상되면서 치주낭(periodontal pocket)이 형성되고, 치주염이 심할수록 치주낭의 깊이가 깊어지게 되는데, 치주낭이 깊어지면서 치주인대에 염증이 생기게 되고 최종적으로는 골소실이 유발된다고 알려져 있다. 이러한 치주질환의 근본적 치료는 손상된 치주인대 결합조직, 백악질 및 치조골을 복원하는 것이므로, 이를 위하여는 치조골을 지지하는 치주인대를 재생시켜야 할 뿐만 아니라, 치주인대가 부착할 수 있는 치조골과 백악질의 재생이 필요하다.
- [88] 상기 약학 조성물에서, 상기 치주질환은 치주조직 염증성 질환일 수 있다.
- [89] 상기 약학 조성물에서, 상기 치주질환은 치은염 또는 치주염일 수 있다.
- [90] 일 구체예에서, 상기 약학 조성물은 치주질환 치료용 약물을 더 포함할 수 있다.
- [91] 상기 치주질환 치료용 약물은 상기 펩타이드와 분리되어 있는 것일 수도 있고, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 결합되어 펩타이드와 복합체를 형성한 형태일 수도 있다.
- [92] “탈구성 외상”은 치아 혹은 치주조직에 외상력이 가해져서, 그 방향과 크기의 차이 등에 따라 치아와 치주조직이 파괴되어, 치주인대가 손상된 외상을 포함하며, 진탕·아탈구, 정출성 탈구, 측방성 탈구, 완전 탈구, 함입으로 세분화된

것을 포함한다. 따라서, 탈구성 외상의 근본적 치료 또한 손상된 치주인대의 재생을 필요로 한다. 특히 완전 탈구 치아의 재식 성공여부는 완전 탈구된 치아에 부착되어 있는 치주인대 또는 치아가 빠진 치조와에 남아있는 치주인대의 재생에 달려있다. 치주인대의 재생이 일어나지 않으면, 치아 뿌리의 백악질과 상아질의 흡수가 일어나며, 이 부위가 치조골로 대체되는 골유착(Ankylosis)이 발생하게 된다.

- [93] “치아 재식술(tooth replantation)”은 치아를 의도적으로 발치한 후 적절한 근관치료를 시행하였거나 시행하기 전에 발치와에 재식립하는 방법이다. 의도적 재식술은 근관치료가 실패하였거나, 해부학적인 한계가 있거나, 접근성의 어려움이 있거나, 사고로 인해 치아가 탈구되었거나, 의도적으로 빠른 교정 맹출을 해야 하는 상황에서 시행할 수 있다.
- [94] “예방”은 상기 조성물의 투여로 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [95] “치료”는 상기 조성물의 투여로 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [96] 상기 약학 조성물은, 상기 펩타이드에 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체 (자연적 또는 비자연적 담체), 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 치주질환 치료용 약학 조성물의 형태로 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 치주질환이 유발된 부위에 투여할 수 있는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [97] 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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. 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 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [98] 상기 약학 조성물에 포함된 상기 펩타이드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 또는 0.01 내지 20 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.
- [99] 상기 본 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 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 치주질환 치료용 약학 조성물과 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

- [100] 상기 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.
- [101]
- [102] 상기 기술적 과제를 해결하기 위한 본 발명의 다른 양상은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는 치주조직 재생용 조성물을 제공한다:
- [103] K-Y-K-Q-X5-X6-X7-X8-Y-K (일반식 1)
- [104] 상기 일반식 1에서,
- [105] X5 내지 X7는 각각 독립적으로 아르기닌 (R) 또는 리신 (K)이고;
- [106] X8은 아스파라긴 (N) 또는 세린 (S)이다.
- [107] 일 구체예에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [108] 다른 구체예에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열로 필수적으로 구성된 것이거나, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.
- [109] 상기 펩타이드에 관한 설명은 상술한 바와 같다.
- [110] “치주조직(periodontium)”은 상피조직, 연조직성 결합조직(connective tissue) 및 석회화 된 결합조직으로 이루어진 복합기관으로, 구조적으로 잇몸(gingiva, 치은), 치주인대(PDL: periodontal ligament), 백악질(cementum) 및 치조골(alveolar bone)로 구성되어 있다.
- [111] “치주인대(periodontal ligament, PDL)”란, 치근막이라고도 호칭되며, 포유류에서 치근의 백악질과 치조골벽을 결합하는 결합조직성 섬유막을 의미한다. 상기 치주인대는 치아의 장축에 대해 평행 또는 비스듬히 뻗은 교원섬유인 주섬유와 이것에 연속하여 양끝이 경조직에 묻혀있는 샤페(Sharpey)

섬유의 다발로 구성되며, 치주인대를 통하여 치아가 탄성적으로 턱뼈(치조골)에 고정된다. 상기 치주인대는 음식을 씹을 때 생기는 압력을 완충할 뿐만 아니라 혈관이나 신경이 풍부하며 영양공급이나 감각에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 치주 인대에는 섬유모세포, 미분화 중간엽세포, 상피세포 등 다양한 세포가 포함되어 있으며, 이중 치주인대 섬유모세포는 적절한 자극에 의해 뼈모세포 또는 백악모세포로 분화할 수 있으나, 치주인대 섬유모세포의 백악모세포로의 분화 기작 및 분화 촉진 단백질에 대해서는 알려져 있지 않다. 백악모세포 분화 마커로는 BSP(bone sialoprotein), OC(osteocalcin), CAP(cementum attachment protein)등이 알려져 있으며, 특히 CAP는 백악질에 치주인대 섬유가 부착하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

- [112] "백악질(cementum)"이란, 포유동물의 치아 뿌리(치근)를 덮고 있는 석회화 된 조직이다. 백악질은 치주인대를 고정시킴으로써 치아를 치조골에 고정시킨다. 따라서 세균이 잇몸에 감염되면 치아를 둘러싼 백악질의 변성이 일어나고, 변성된 백악질에는 치아와 치조골을 연결해주는 치주인대 섬유 다발이 달라붙지 못해서 치아가 흔들리게 된다. 이러한 변성된 백악질의 치료를 위해서는 새로운 백악질의 형성이 필요하다.
- [113] "치조골(alveolar bone)"은 치아뿌리(치근)을 둘러싸고 치아를 지지하는 역할을 하는 상악 및 하악골의 일부로서 치아의 형성이나 맹출에 따라 발달하고, 치아가 상실되면 서서히 흡수된다. 이러한 치조골은 치근백악질과 함께 치주인대를 고정시킴으로써 저작 등 교합압, 발음, 연하시 일어나는 치아에 대한 압력의 분산, 흡수에 중요한 역할을 한다.
- [114] "치주인대 섬유모세포(periodontal ligament fibroblast)"는 치은 섬유모세포(gingival fibroblast)와 함께 치주조직의 연조직성 결합조직의 주요 세포 구성이다. 치주인대 섬유모세포는 그 특유 기능으로 치주인대를 형성할 뿐만 아니라 생체 내에서의 인접 치조골 및 백악질의 수복과 재생에 관여하나, 이를 촉진할 수 있는 물질에 대해서는 알려진 바가 없으며, 치은 결합조직을 유지하는 데 관여하는 치은 섬유모세포와는 구분된다. 치주인대 섬유모세포는 적절한 자극에 의해 뼈모세포 또는 백악모세포로 분화할 수 있으나, 치주인대 섬유모세포의 백악모세포로의 분화 기작은 명확히 알려져 있지 않다. 뼈모세포와 백악모세포 분화 마커로는 BSP(bone sialoprotein), OC(osteocalcin)등이 알려져 있으며, CAP(cementum attachment protein)는 백악질에 치주인대 섬유가 부착하는데 중요한 역할을 하는 유전자로 알려져 있다. 또한 치주인대 마커로는 페리오스틴(Periostin) 유전자가 알려져 있다. 최근 여러 연구에 따르면 페리오스틴은 치주조직 형성의 중요한 조절 인자로 콜라겐 섬유질 생성 및 섬유모세포 및 뼈모세포의 이동을 촉진함으로써, 치주 수술 후 치주인대 및 치조골의 재생에 중요한 역할을 한다는 것이 보고되고 있다.
- [115] "재생"은 상실 또는 손상된 세포 또는 조직이 복구 또는 보충되는 모든 작용을

- 의미할 수 있다. 상기 재생은 세포의 분화에 의한 것일 수 있다.
- [116] 상기 펩타이드는 치주인대 섬유모세포의 백악모세포로의 분화를 촉진하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [117] 상기 치주조직 재생용 조성물은 치은, 치주인대, 백악질, 및 치조골 중 어느 하나 이상의 재생을 촉진하는 것일 수 있다.
- [118] 상기 치주조직 재생용 조성물은 약학 조성물일 수 있다.
- [119] 상기 약학 조성물에 대하여는 상술한 바와 같다.
- [120] 상기 치주조직 재생용 조성물은 의약외품 조성물일 수 있다. 상기 의약외품 조성물은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물일 수 있다.
- [121] "개선"이란, 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [122] 상기 개선은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 치주질환의 치료가 요구되는 개체에 투여하여 치주조직의 재생을 촉진함으로써, 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 증상이 호전되거나 또는 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [123] "의약외품"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 의약외품이란 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.
- [124] 상기 펩타이드를 포함하는 의약외품 조성물의 종류나 제형은 특별히 제한되지 않으나, 일 예로서, 구강용 소독 청결제, 구강청정용품, 치약, 치실, 구강용 연고제 등일 수 있다.
- [125] 상기 치주조직 재생용 조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있다. 상기 건강기능식품 조성물은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [126] "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.
- [127] 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.

- [128] 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 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 장기복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [129] 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, 건강 식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.
- [130] 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.
- [131] 상기 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있으므로, 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [132] 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.
- [133] 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(panthothenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [134] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시톨루엔(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.

- [135] 상기 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 50 중량부 이하, 20 중량부 이하, 10 중량부 이하, 5 중량부 이하, 1 중량부 이하, 0.1 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.
- [136] 상기 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.
- [137] 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.
- [138] 상기 식품 조성물은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있고, 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.
- [139]
- [140] 상기 기술적 과제를 해결하기 위한 본 발명의 또다른 양상은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는, BSP (Bone sialoprotein), DMP1 (Dentin matrix protein 1), CAP (Cementum attachment protein), COL3 (collagen type III) 및 페리오스틴 (Periostin) 중 어느 하나 이상의 유전자 발현 촉진용 조성물을 제공한다:
- [141] K-Y-K-Q-X5-X6-X7-X8-Y-K (일반식 1)
- [142] 상기 일반식 1에서,
- [143] X5 내지 X7는 각각 독립적으로 아르기닌 (R) 또는 리신 (K)이고;

- [144] X8은 아스파라긴 (N) 또는 세린 (S)이다.
- [145] 일 구체예에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [146] 다른 구체예에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열로 필수적으로 구성된 것이거나, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.
- [147] 상기 펩타이드에 관한 설명은 상술한 바와 같다.
- [148] 상기 펩타이드는 인간 치주인대세포에서 뼈모세포 및 백악모세포 분화마커 유전자인 **BSP**, **DMP1**, **CAP**의 발현을 증가시키고, 치주인대 분화마커 유전자인 페리오스틴과 **COL3**의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 또한, 상기 펩타이드는 인간 중간엽줄기세포에서 뼈모세포 및 백악모세포 분화마커 유전자인 **BSP** 및 **DMP1**의 발현을 증가시킴을 확인하였다.
- [149]
- [150] 본 발명의 기술적 과제를 해결하기 위한 또다른 양상은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 상기 펩타이드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 치주질환 또는 탈구성 외상 치아를 치료하는 방법을 제공한다.
- [151] “개체”란 질환의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [152] “유효량”은 환자에게 단일 또는 다회 용량으로 투여되었을 때, 진단 또는 치료 하에 환자에서 원하는 효과를 제공하는, 상기 펩타이드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 양 또는 용량을 지칭한다. 유효량은 공지 기술을 사용함으로써 또는 유사 환경 하에서 수득한 결과를 관찰함으로써 관련 기술분야의 통상의 기술자로서 주치의 진단의에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 환자에 대한 유효량을 결정할 때, 포유동물종; 그의 크기, 연령 및 일반적인 건강 상태; 연루된 구체적인 질환 또는 장애; 질환 또는 장애의 연루 정도 또는 중증도; 개별 환자의 반응; 투여되는 특정 화합물; 투여 모드; 투여되는 제제의 생체이용성 특징; 선택된 투약 요법; 동시 약물처리 사용; 및 다른 관련된 환경을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다수의 인자가 주치의 진단의에 의해 고려된다.
- [153] “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미한다. 투여 경로는 환자의 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로일 수 있다. 상기 투여는, 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 직장 내 투여일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [154] 상기 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 치료는 치주조직의 재생에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [155] 상기 방법에서, 유효량의 상기 펩타이드 또는 그의 약학적으로 허용가능한

염은 유효량의 하나 이상의 다른 활성 성분과 동시에, 개별적으로, 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 상기 하나 이상의 다른 활성 성분은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아를 치료하기 위한 하나 이상의 다른 제제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[156]

[157] 상기 기술적 과제를 해결하기 위한 본 발명의 또다른 양상은 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 치료용 약제를 제조하는데 있어서, 상기 펩타이드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

[158] 본원에서 개시된 모든 수치는 “약”의 의미를 포함할 수 있다. “약”은  $\pm 0.5$ ,  $\pm 0.4$ ,  $\pm 0.3$ ,  $\pm 0.2$ ,  $\pm 0.1$  등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[159] 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[160]

### 발명의 효과

[161] 본 발명에 따른 치주질환 또는 탈구성 외상 치아의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 치주인대, 치조골 및 백악질을 포함하는 치주조직의 재생과 치주인대의 부착을 촉진하므로, 치주질환 및 탈구성 외상 치아와 같은 손상된 결합조직의 복원용으로 사용될 수 있다. 따라서, 상기 펩타이드는 약학 조성물, 의약품 조성물, 건강기능식품 조성물 등으로 다양하게 이용될 수 있다.

[162] 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.

[163]

### 도면의 간단한 설명

[164] 도 1은 실시예 1에서 제조한 그룹 1 및 그룹 2의 펩타이드가 인간 치주인대세포(hPDL)에서 뼈모세포 및 백악모세포 분화 마커 유전자인 BSP (Bone sialoprotein), DMP1 (Dentin Matrix protein 1) 와 CAP(Cementum attachment protein)의 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[165] 도 2는 실시예 1에서 제조한 그룹 1 및 그룹 2의 펩타이드가 인간 중간엽줄기세포(hBMSCs)에서 뼈모세포 분화 마커 유전자인 BSP (Bone sialoprotein)와 DMP1 (Dentin Matrix protein 1)의 발현에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

[166] 도 3은 실시예 1에서 제조한 그룹 1 및 그룹 2의 펩타이드가 인간 치주인대세포에서 치주인대 마커 유전자인 제3형 콜라겐 섬유 유전자(COL3)와

페리오스틴 유전자의 발현에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

- [167] 도 4는 치주조직 손상 부위에 실시예 1의 펩타이드(서열번호 16)를 처리하고 3개월 후 헤마톡실린/에오신으로 염색한 조직 사진으로서, 펩타이드가 치조골 재생에 미치는 영향을 확인한 결과이다. A는 양성대조군(Positive Control: PC)을 나타내고; B는 치주조직 손상 후 아무것도 처리하지 않은 음성대조군(NC)을 나타내며; C는 치주조직 손상 후 콜라겐 스펀지만 식립한 음성대조군(NC+Plug)을 나타내며; D는 그룹 2(서열번호 16번)의 펩타이드를 처리한 실험군을 나타내고; AB는 치조골을 의미하고; De는 상아질을 의미한다.
- [168] 도 5는 치주조직 손상 부위에 실시예 1의 펩타이드(서열번호 16)를 처리하고 3개월 후 펩타이드가 치주인대 조직 재생에 미치는 영향을 헤마톡실린/에오신으로 염색을 통하여 확인한 결과이다. A-D는 아무것도 처리하지 않은 음성대조군(NC)을 나타내며; E-H는 콜라겐 스펀지만 식립한 음성대조군(NC+Plug)을 나타내며; I-L은 그룹 2(서열번호 16번)의 펩타이드를 처리한 실험군을 나타낸다. AB는 치조골을 의미하고; De는 상아질을 의미하고; CE는 백악질을 의미하고; CT는 결합조직을 의미하고; NPD는 새롭게 형성된 치주인대 유사조직을 의미하며; NCE는 새롭게 형성된 백악질 유사조직을 의미한다. 크기바, A, E, I, M 500  $\mu\text{m}$ . B, F, J, N, 200  $\mu\text{m}$ . C, G, K, O, 100  $\mu\text{m}$ . D, H, L, P, 50  $\mu\text{m}$ .
- [169] 도 6는 치주조직 손상 부위에 실시예 1의 펩타이드(서열번호 16)를 처리하고 3개월 후 펩타이드가 치주인대 조직 재생에 미치는 영향을 콜라겐 염색 (Masson's trichrome stain)방법으로 확인한 결과이다. A-B는 아무것도 처리하지 않은 음성대조군(NC)을 나타내며; C-D는 콜라겐 스펀지만 식립한 음성대조군(NC+Plug)을 나타내며; E-F는 그룹 2(서열번호 16번)의 펩타이드를 처리한 실험군을 나타낸다. AB는 치조골을 의미하고; De는 상아질을 의미하고; CE는 백악질을 의미하고; CT는 결합조직을 의미하고; NPD는 새롭게 형성된 치주인대 유사조직을 의미하며; NCE는 새롭게 형성된 백악질 유사조직을 의미한다. 크기바, A, C, E, G 100  $\mu\text{m}$ . B, D, F, H, 50  $\mu\text{m}$ .

[170]

### 발명의 실시를 위한 형태

- [171] 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.

[172]

[173] 실시예 1: 펩타이드의 합성

- [174] 하기 표 1에 기재된 아미노산 서열로 구성된 16개의 펩타이드를 각각 합성하였다. 여기에서, 8번 아미노산이 아스파라긴(N)인 펩타이드를 그룹 1로 하고, 8번 아미노산이 세린(S)인 펩타이드를 그룹 2로 하였다.

[175]

[176] [표1]

| 그룹   | 서열번호 | 아미노산 서열(N-C) |
|------|------|--------------|
| 그룹 1 | 1    | KYKQRKKNYK   |
|      | 2    | KYKQRKRNYK   |
|      | 3    | KYKQRRKNYK   |
|      | 4    | KYKQRRRNYK   |
|      | 5    | KYKQKKKNYK   |
|      | 6    | KYKQKRKNYK   |
|      | 7    | KYKQKKRNYK   |
|      | 8    | KYKQKRRNYK   |
| 그룹 2 | 9    | KYKQRKKSYK   |
|      | 10   | KYKQRKRSYK   |
|      | 11   | KYKQRRKSYK   |
|      | 12   | KYKQRRRSYK   |
|      | 13   | KYKQKKKSYK   |
|      | 14   | KYKQKRKSYK   |
|      | 15   | KYKQKKRSYK   |
|      | 16   | KYKQKRRSYK   |

[177] **실험 재료 및 방법1. 세포 배양**

[178] hBMSCs세포는 5%의 CO<sub>2</sub>를 포함하는 습윤된 공기 37°C 조건에서 배양되어 실험에 사용되었다. 사람유래 중간엽 줄기세포(hBMSCs)는 론자 (LONZA, 스위스)에서 구입하여 사용하였다. hBMSCs는 10% 열 불활성화된 소의 혈청이 첨가된 알파-엠이엠( $\alpha$ -MEM, Invitrogen) 배양액에서 배양하였다.

[179]

[180] **2. 인간 치주인대세포 분리 및 배양**

[181] 인간 치주인대세포(hPDL cells)는 서울대학교 치과병원에서 성인 10명(18-22세)의 사랑니에서 치주인대조직으로부터 세포를 분리하였다. 구체적으로, 모든 실험은 임상연구심의위원회(hospital's Institutional Review Board)에서 승인을 받은 후 환자의 동의를 받아 수행하였으며, 사랑니의 치아뿌리에 붙어있는 치주인대 조직을 분리하여 양면도로 잘게 자르고, 60 mm 접시에 넣고, 커버 슬립으로 덮은 후 들베코의 수정 이글 배지에서 배양하였다.

[182]

[183]     **3. 실시간 PCR 분석**

[184]     TRIzol 시약을 이용하여 인간 치주인대세포의 전체(total) RNA를 분리하였다. 2  $\mu$ g의 전체 RNA와 역전사효소 1  $\mu$ l와 0.5  $\mu$ g의 올리고(oligo; dT)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 인간 치주인대세포의 cDNA를 하기 표 2의 프라이머를 사용한 실시간 중합효소 연쇄반응에 이용하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응은 SYBR GREEN PCR Master Mix(Takara, 일본)를 이용하여 ABI PRISM 7500 시퀀스 검출 시스템(sequence detection system)(Applied Biosystems)에서 진행되었다. 실시간 중합효소 연쇄반응은 94°C, 1 분; 95°C, 15 초 - 60°C, 34 초를 40 사이클(cycles) 반복하는 조건으로 진행하였다. 결과의 분석은 CT (comparative cycle threshold) 방법을 이용하였다.

[185]

[186]     [표2]

| 유전자                       | 서열번호 | 방향  | 서열(5'-3')                |
|---------------------------|------|-----|--------------------------|
| <i>hBSP</i>               | 17   | 정방향 | GAATGGCCTGTGCTTTCTCAA    |
|                           | 18   | 역방향 | TCGGATGAGTCACTACTGCCC    |
| <i>hDMP1</i>              | 19   | 정방향 | ACAGGCAAATGAAGACCC       |
|                           | 20   | 역방향 | TTCACTGGCTTGTATGG        |
| <i>hCAP</i>               | 21   | 정방향 | GACGAGGACGGCACCAACGG     |
|                           | 22   | 역방향 | CGCGGTCATGGCGATGTCGT     |
| <i>hPERIOSTIN</i>         | 23   | 정방향 | GAGACAAAGTGGCTTCCG       |
|                           | 24   | 역방향 | CTGTCACCGTCACATCCT       |
| <i>hCollagen Type III</i> | 25   | 정방향 | CGGATGCTTCCAGACATCTCTATC |
|                           | 26   | 역방향 | ACAGGAAGCTGTTGAAGGAGGA   |
| <i>hGAPDH</i>             | 27   | 정방향 | CCATGGAGAAGGCTGGGG       |
|                           | 28   | 역방향 | CAAAGTTCTCATGGATGACC     |

[187]     **4. 치주조직 손상 모델에서 펩타이드가 치주조직 재생에 미치는 영향 평가**

[188]     4 마리의 비글견(12 내지 16kg; 6 내지 8주령)에 겔로란을 흡입시켜서 마취시키고, 졸레틸(Zoletil, 5mg/kg)과 자일라진(xylazine, 0.2~0.5mg/kg)을 정맥주사한 다음, 리도카인을 처리하였다(Lidocaine 2% with 1:80,000 epinephrine). 상기 비글견의 하악골에서 4번 소구치와 2번 대구치를 발치한 다음 3개월 동안 치유되기를 기다렸다.

[189]     치유 3개월 후 1번 큰어금니 원심면과 근심면에 3벽성 치주결손을 유도하였다. 그런 다음, 치근 주위로 헤파혈측 및 원심측 골이 남아있는 상태로 4x4x4 mm

크기의 치주 손상을 형성하고, 치근부 치조골을 확실하게 삭제한 후 큐렛을 이용하여 치근면 활택술 시행한 후 1/2 라운드 버를 이용하여 앞니골패임을 형성하였다.

- [190] 이어, 실험군은 결손 부위에 50  $\mu\text{g}$ 의 실시예 1에서 제조한 펩타이드(그룹 2의 서열번호 16)를 포함하는 콜라겐 스펀지(펩타이드를 생리식염수에 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  농도로 용해한 펩타이드 용액을 제조한 다음 EP tube에 펩타이드 용액 50  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{g}$ )를 첨가한 후 콜라겐 스펀지를 5분간 담가 두어 제조하였음)를 이식하였고, 결손 후 아무 처리도 하지 않은 음성 대조군(NC)과 콜라겐 스펀지(콜라겐 스펀지를 생리식염수 50  $\mu\text{l}$ 에 5분간 담가 두어 제조하였음) 만 골 결손 부 내부 골 벽에 위치시켜 이식한 음성 대조군(NC+Plug)을 3개월 후에 희생하여 조직학적 평가를 시행하였다.
- [191] 3개월 후, 상기 비글견에 과량(90-120 mg/kg)의 펜토바비탈을 투여하여 희생시켰다. 상기 비글견의 치아 부위를 적출하고, 10% 포르말린으로 고정시킨 후, 5% 포름산을 가하여 칼슘을 제거하며, 성형하고, 파라핀에 포매한 다음, 5 $\mu\text{m}$  두께의 조직 절편을 수득하였다.
- [192] 상기 수득한 조직 절편을 헤마톡실린과 에오신으로 염색하거나 치주인대 재생을 확인하기 위하여 콜라겐 염색(Masson's Trichrome Staining) 한 다음, 디지털 카메라(LEICA ICC50 camera, Germany)가 장착된 광학현미경(LEICA DM750, Germany)을 사용하여 분석하였다.
- [193]
- [194] **실험 결과**
- [195] **실험예 1: 펩타이드가 인간 치주인대세포에서 뼈모세포 및 백악모세포 분화마커 유전자 발현에 미치는 영향**
- [196] BSP (Bone sialoprotein)와 DMP1 (Dentin matrix protein 1) 유전자는 뼈모세포와 백악모세포 분화 마커로 사용되며, 뼈와 백악질의 석회화에 중요한 유전자로 알려져 있다. 또한, CAP (cementum attachment protein) 유전자는 분화된 백악모세포에서 발현되며, 치주인대 섬유다발의 백악질 부착에 관여하는 유전자로 알려져 있다.
- [197] 도 1은 실시예 1에서 제조한 그룹 1 및 그룹 2의 펩타이드가 인간 치주인대세포(hPDL)에서 뼈모세포 및 백악모세포 분화 마커 유전자 BSP, DMP1 및 CAP의 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [198] 도 1에 나타낸 바와 같이, 그룹 1과 그룹 2의 펩타이드를 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 BSP, DMP1, 및 CAP 유전자 발현이 약 2배 이상 증가된 것을 확인하였다.
- [199] 표 3은 그룹 1과 그룹 2의 펩타이드 군이 BSP mRNA 발현에 미치는 영향을 실시간 PCR로 확인한 결과이며, 대조군 대비 상대적 mRNA 발현 정도를 나타낸 것이다.
- [200] 표 4는 그룹 1과 그룹 2의 펩타이드 군이 CAP mRNA 발현에 미치는 영향을

실시간 PCR로 확인한 결과이며, 대조군 대비 상대적 mRNA 발현 정도를 나타낸 것이다. 표 3 및 표 4에 나타낸 결과는 실험을 3회 반복 실시하여 얻은 평균값과 표준 편차(SD)이다.

[201]

[202] [표3]

| BSP 유전자 발현 |      |       |       |
|------------|------|-------|-------|
|            | 서열번호 | 평균    | SD    |
| 그룹 1       | 1    | 2.092 | 0.152 |
|            | 2    | 2.361 | 0.098 |
|            | 3    | 2.572 | 0.209 |
|            | 4    | 2.702 | 0.301 |
|            | 5    | 2.67  | 0.088 |
|            | 6    | 2.705 | 0.137 |
|            | 7    | 2.215 | 0.072 |
|            | 8    | 2.021 | 0.301 |
| 그룹 2       | 9    | 2.211 | 0.413 |
|            | 10   | 2.811 | 0.302 |
|            | 11   | 2.362 | 0.182 |
|            | 12   | 2.211 | 0.287 |
|            | 13   | 2.525 | 0.25  |
|            | 14   | 2.836 | 0.099 |
|            | 15   | 2.620 | 0.401 |
|            | 16   | 2.606 | 0.371 |

[203] [표4]

| CAP 유전자 발현 |      |       |       |
|------------|------|-------|-------|
|            | 서열번호 | 평균    | SD    |
| 그룹 1       | 1    | 2.092 | 0.152 |
|            | 2    | 2.361 | 0.098 |
|            | 3    | 2.572 | 0.209 |
|            | 4    | 2.702 | 0.301 |
|            | 5    | 2.67  | 0.088 |
|            | 6    | 2.705 | 0.137 |
|            | 7    | 2.451 | 0.072 |
|            | 8    | 2.021 | 0.301 |
| 그룹 2       | 9    | 2.211 | 0.413 |
|            | 10   | 2.811 | 0.302 |
|            | 11   | 2.362 | 0.182 |
|            | 12   | 2.211 | 0.287 |
|            | 13   | 2.525 | 0.25  |
|            | 14   | 2.836 | 0.099 |
|            | 15   | 2.620 | 0.401 |
|            | 16   | 2.467 | 0.371 |

[204]

[205] 실험예 2: 펩타이드가 인간 중간엽줄기세포에서 뼈모세포 및 백악모세포 분화마커 유전자 발현에 미치는 영향

[206] 도 2는 실시예 1에서 제조한 그룹 1 및 그룹 2의 펩타이드가 인간 중간엽줄기세포에서 뼈모세포와 백악모세포 분화 마커 유전자의 발현에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

[207] 도 2에 나타난 바와 같이, 펩타이드 그룹 1과 그룹 2를 인간 중간엽줄기세포에 처리하였을 때, 대조군과 비교하여 뼈모세포와 백악모세포 분화 마커 유전자인 BSP와 DMP1의 발현을 약 2배에서 4배까지 증가시키는 것을 확인하였다.

[208]

[209] 실험예 3: 펩타이드가 인간 치주인대세포에서 치주인대 분화마커 유전자 발현에 미치는 영향

[210] 페리오스틴(Periostin)은 치주인대와 뼈의 페리오스티움에서 처음 발견된 단백질로, 발생 중인 치아의 치주인대와 간엽에서 발현하며, 세포의 부착에

관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 여러 연구에 따르면 페리오스틴은 치주조직 형성의 중요한 조절자로서, 콜라겐 섬유질 생성 및 섬유모세포와 뼈모세포의 이동을 촉진하고, 치주질환을 치료하기 위한 치주 수술 후 치주인대 및 치조골의 재생에 중추적인 역할을 수행한다고 알려져 있다. 따라서, 실시예 1의 펩타이드가 치주인대 분화 마커 유전자인 페리오스틴과 제3형 콜라겐 섬유 유전자(COL3)의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

- [211] 도 3은 실시예 1에서 제조한 그룹 1 및 그룹 2의 펩타이드가 인간 치주인대세포에서 치주인대 마커 유전자인 제3형 콜라겐 섬유 유전자(COL3)와 페리오스틴 유전자의 발현에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- [212] 도 3에서 볼 수 있듯이, 인간 치주인대세포에 펩타이드 그룹 1 및 그룹 2를 처리하였을 때 제3형 콜라겐 섬유 유전자(COL 3)와 페리오스틴 유전자의 발현이 2배 이상 증가되는 것을 확인하였다.
- [213] 표 5는 그룹 1과 그룹 2의 펩타이드 군이 페리오스틴 mRNA 발현에 미치는 영향을 실시간 PCR로 확인한 결과이며, 대조군 대비 상대적 mRNA 발현 정도를 나타내었다. 표 5에 나타낸 결과는 실험을 3회 반복 실시하여 얻은 평균값과 표준 편차(SD)이다.
- [214]

[215] [표5]

| PERIOSTIN 유전자 발현 |      |         |       |
|------------------|------|---------|-------|
|                  | 서열번호 | average | SD    |
| 그룹 1             | 1    | 2.092   | 0.152 |
|                  | 2    | 2.361   | 0.098 |
|                  | 3    | 2.572   | 0.209 |
|                  | 4    | 2.702   | 0.301 |
|                  | 5    | 2.67    | 0.088 |
|                  | 6    | 2.705   | 0.137 |
|                  | 7    | 2.329   | 0.072 |
|                  | 8    | 2.021   | 0.301 |
| 그룹 2             | 9    | 2.211   | 0.413 |
|                  | 10   | 2.811   | 0.302 |
|                  | 11   | 2.362   | 0.182 |
|                  | 12   | 2.211   | 0.287 |
|                  | 13   | 2.525   | 0.25  |
|                  | 14   | 2.836   | 0.099 |
|                  | 15   | 2.620   | 0.401 |
|                  | 16   | 2.403   | 0.371 |

[216]

[217] 실험예 4: 치주조직 손상 동물 모델에서 펩타이드의 치주조직 재생 효과 검증

[218] 4 마리의 비글견 하악골에서 4번 소구치와 2번 대구치를 발치한 다음, 3개월 동안 치유되기를 기다린 후, 치유 3개월 후에 1번 큰어금니 원심면과 근심면에 3벽성 치주 결손을 유도하였다. 그런 다음, 치근 주위로 협설측 및 원심측 골이 남아있는 상태로 4X4x4 mm 크기의 치주조직 손상을 형성한 다음 치근부 치조골을 확실하게 삭제하고, 큐렛을 이용하여 치근면 활택술 시행하여 앞니 골패임을 형성하였다. 이어, 실험군은 결손 부위에 50  $\mu$ g의 실시예 1의 펩타이드(서열번호 16)를 포함하는 콜라겐 스펀지를 이식하였고, 결손 후 아무 처리도 하지 않은 음성 대조군(Negative Control: NC)과 콜라겐 스펀지만 골 결손 부 내부 골 벽에 위치시켜 이식한 대조군(NC+Plug)을 3개월 후에 희생하여 조직학적 평가를 시행하였다.

[219] 도 4는 치주조직 손상 부위에 실시예 1의 펩타이드(서열번호 16)를 처리하고 3개월 후 헤마톡실린/에오신으로 염색한 조직 사진으로서, 펩타이드가 치조골

재생에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

- [220] 도 4에 나타낸 바와 같이, 상기 실험군은 음성대조군과 비교하여 손상된 치주조직 대부분에서 치조골이 재생된 것이 확인되었다.
- [221] 도 5는 치주조직 손상 부위에 실시예 1의 펩타이드(서열번호 16)를 처리하고 3개월 후 펩타이드가 치주인대 조직 재생에 미치는 영향을 헤마톡실린/에오신으로 염색을 통하여 확인한 결과이다.
- [222] 도 5에 나타낸 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 음성대조군(도 5A-D) 또는 콜라겐 스펀지만 식립한 음성대조군(도 5E-H)은 치근면을 따라 신생치주인대 유사조직(NPD)이 관찰되지 않았으며, 결합조직(CT)이 형성된 것이 관찰되었다. 또한, 치조정 부위의 상아질은 흡수가 일어난 것이 관찰되었다. 그러나, 그룹 2의 펩타이드(서열번호 16)(도 5I-L)를 처리한 실험군은 치근면을 따라 신생 백악질 유사조직이 관찰되었을 뿐만 아니라, 신생 치주인대 유사조직 형성 또한 관찰되었다. 신생 치주인대는 새로 형성된 치조골과 백악질에 함입되어 있었다.
- [223] 도 6는 치주조직 손상 부위에 실시예 1의 펩타이드(서열번호 16)를 처리하고 3개월 후 펩타이드가 치주인대 조직 재생에 미치는 영향을 콜라겐 염색 (Masson's trichrome stain)방법으로 확인한 결과이다.
- [224] 도 6에 나타낸 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 음성대조군(도 6A-B) 또는 콜라겐 스펀지만 식립한 음성대조군(도 6C-D)은 치근면을 따라 대부분 결합조직(CT)이 형성된 것이 관찰되었으며, 일부에서는 신생치주인대 유사조직(NPD)이 관찰되었으나, 치주인대 섬유 다발은 불규칙하게 배열되어 있었다. 또한, 음성대조군은 치근을 따라 일부에서 신생 백악질이 형성된 것이 관찰되었다. 그러나, 그룹 2의 펩타이드(서열번호 16)(도 6E-F)를 처리한 실험군은 치근면을 따라 신생 백악질 유사조직이 관찰되었을 뿐만 아니라 신생 치주인대 유사조직 형성 또한 관찰되었다. 신생 치주인대 섬유다발은 새로 형성된 치조골과 백악질에 수직으로 함입되어 있었다.
- [225] 이와 같이, 본 발명의 펩타이드는 치조골을 재생하고, 신생 백악질 유사조직 및 신생 치주인대 유사조직을 형성하는 효과가 있으며, 본 발명의 펩타이드에 의해 형성된 신생 치주인대는 새로 형성된 치조골과 백악질에 함입되어 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 펩타이드는 치주조직 재생용, 치주질환 예방 또는 치료용, 탈구성 외상 치아의 예방 또는 치료용으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [226]
- [227] 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.