

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 9일 (09.01.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/009429 A1

(51) 국제특허분류:
A01K 67/027 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/008054

(22) 국제출원일: 2019년 7월 3일 (03.07.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0078043 2018년 7월 5일 (05.07.2018) KR
10-2018-0121798 2018년 10월 12일 (12.10.2018) KR
10-2019-0078584 2019년 7월 1일 (01.07.2019) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)
[KR/KR]: 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR).

(72) 발명자: 김성우 (KIM, Seong Woo); 06544 서울시 서초구 신반포로270, 123동 401호, Seoul (KR).

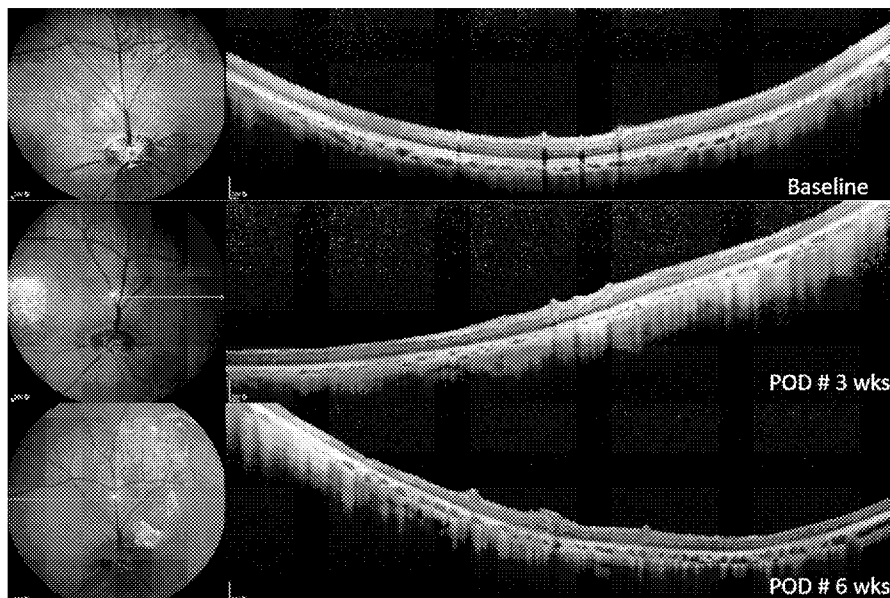
(74) 대리인: 특허법인 무한 (MUHANN PATENT & LAW FIRM); 06144 서울시 강남구 언주로 560, 8층 (역삼동, 화물재단빌딩), Seoul (KR).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING RETINAL DEGENERATION ANIMAL MODEL USING VITRECTOMY AND INTRAPERITONEAL MNU INJECTION AND REMOVAL, AND RETINAL DEGENERATION ANIMAL MODEL USING SAME

(54) 발명의 명칭: 유리체 절제술 및 안구 내 MNU 주입과 제거를 이용한 망막 변성 동물 모델의 제조방법 및 이를 이용한 망막 변성 동물 모델



(57) Abstract: According to one embodiment of the present invention, a method for producing a retinal degeneration animal model comprises: a) removing the vitreous body from an eye of a non-human mammal by performing vitrectomy; b) replacing, with air, an empty space inside the eye from which the vitreous body has been removed; c) injecting an N-methyl-N-nitrosourea (MNU) solution into the empty space inside the eye; and d) removing the MNU solution.

(57) 요약서: 본 발명의 일 실시예에 따르면, a) 인간을 제외하는 포유동물의 안구에서 유리체 절제술을 수행하여 유리체를 제거하는 단계; b) 유리체가 제거된 안구 내 빈 공간을 공기로 치환하는 단계; c) 상기 안구 내 빈 공간으로 MNU(N-methyl-N-nitrosourea) 용액을 주입하는 단계; 및 d) MNU 용액을 제거하는 단계; 를 포함하는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법이 제공된다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/009429 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 유리체 절제술 및 안구 내 MNU 주입과 제거를 이용한 망막 변성 동물 모델의 제조방법 및 이를 이용한 망막 변성 동물 모델

기술분야

- [1] 본 발명은 유리체 절제술을 통해 유리체 조직이 제거된 동물의 안구 내로 MNU(N-methyl-N-nitrosourea)의 주입 및 제거를 수행하는 방법을 이용한 망막 변성 동물 모델의 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 망막 변성 동물 모델에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 망막 변성은 시세포의 변성으로 시력이 저하되어 결국 실명되는 질환으로, 아직 효과적인 치료법이 없다. 유전성 망막 변성, 망막색소변성증(retinitis pigmentosa, RP) 등 망막의 시세포가 손상되어 실명에 이르는 질환들의 치료를 위하여 개발되는 유전자 치료, 줄기세포 치료, 나아가 인공망막 등 여러 치료방법을 적용하기 위해서는 망막 변성 질환을 가진 실험동물의 개발이 필수적이다.
- [3] 이와 같이 여러 치료방법을 적용하기 위해 유전자 변성 동물 모델이나 약물로 변성을 유발하는 모델 등이 개발되고 있다. 약물로 망막 변성을 유발한 동물 모델의 경우, 일단 약물 변성 프로토콜이 확립되면 유전자 변성 동물 모델보다 가격이 저렴하며, 변성 유발기간이 짧아 대량으로 변성을 유발할 수 있고, 연구자가 각종 규제로부터 자유로울 수 있는 장점이 있다.
- [4] 현재 망막 변성 동물 모델을 만들기 위해 사용되는 약제 중 하나인 N-methyl-N-nitrosourea (MNU)는 일상 환경에 널리 퍼져있는 질소화합물로, 다양한 동물 에서 망막 변성을 유발할 수 있는 알킬 화합물이다. MNU는 p-450 system의 대사 활성화 없이 직접적으로 알킬화(alkylating)를 일으키는 화학물질로 강력한 돌연변이원이며, 기형발생원 및 발암물질이다. MNU를 이용한 동물 모델의 제조방법으로는 마우스나 래트에 MNU를 전신 주사하여 망막 변성을 유발하는 방법이 대중적이다. 한편, 망막 변성 모델에서 MNU는 망막광수용체 세포에 특이적으로 독성을 나타내어 망막광수용체 세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유발하며, 그 손상의 정도는 MNU의 용량과 시간에 비례하는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, MNU 주입 후 24시간이 지난 시점에서 망막두께의 감소가 관찰되고, TUNEL 염색을 이용한 세포 괴사에 대한 형태학적인 연구에서는 약물주입 후 12시간에 세포자멸사가 관찰되기 시작하여 24시간 후에 최고조를 이루는 것으로 확인되었다.
- [5] 한편, 종래의 MNU를 이용한 망막 변성 동물 모델의 제조는 전신 주사를 시행하여 실험체의 양안을 실명하게 만들어 장기간 실험체를 사육하여

치료효과를 보아야 하는 연구에 어려움이 있었다. 게다가, 전신 주사의 경우 약물의 독성으로 인해 실험체의 체중이 감소하고 암이 발생하며 사망에 이르는 경우까지도 발생하는 문제가 있다. 대안적으로, Rosch, S., Werner, C., Muller, F. et al. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (2017) 255: 317. 에서는 토끼의 안구에 직접 MNU를 주입하여 망막 변성을 유발하는 연구를 기술하고 있으나, MNU의 주입량을 토끼의 몸무게를 기준으로 하여 실제 임상에 적용하기 어렵고, 안구에 주사한 약물이 안구 내에서 어떻게 분포하는지 명확히 제시하지 못한 한계가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 유리체 절제술을 통해 유리체 조직이 제거된 안구 내로 특정 농도의 MNU를 주입하고 일정 시간 동안 방치한 후 약물을 제거하는 방법을 이용하면 안구의 크기에 관계없이 안구 전체의 변성이 유발된 동물 모델을 제조할 수 있다는 사실을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [7] 본 발명은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 한쪽 눈에 국한되며, 안구 내 전체 범위의 망막 시세포가 소실된 망막 변성 동물 모델의 제조방법 및 이를 이용한 동물 모델을 제공하는 것이다.
- [8] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명의 일 실시예에 따르면, a) 인간을 제외하는 포유동물의 안구에서 유리체 절제술을 수행하여 유리체를 제거하는 단계; b) 유리체가 제거된 안구 내 빈 공간을 공기로 치환하는 단계; c) 상기 안구 내 빈 공간으로 MNU(N-methyl-N-nitrosourea) 용액을 주입하는 단계; 및 d) MNU 용액을 제거하는 단계; 를 포함하는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법이 제공된다.
- [10] 일 측에 따르면, 상기 a) 단계 내지 d) 단계는 동시 수술로 수행될 수 있다.
- [11] 일 측에 따르면, 상기 d) 단계는, 상기 c) 단계로부터 2분 내지 20분 경과 후 수행될 수 있다.
- [12] 일 측에 따르면, 상기 b) 단계 내지 d) 단계는, 상기 a) 단계와 별개의 수술로 수행될 수 있다.
- [13] 일 측에 따르면, 상기 b) 단계 내지 d) 단계는, 상기 a) 단계로부터 적어도 3일 이후에 수행될 수 있다.
- [14] 일 측에 따르면, 상기 d) 단계 이후에, e) 안구를 세척하고, 안구 내 빈 공간을 충전하는 단계; 를 더 포함할 수 있다.
- [15] 일 측에 따르면, 상기 c) 단계에서 MNU 용액은 안구의 망막 앞, 유리체강 부위로 주입될 수 있다.

- [16] 일 측에 따르면, 상기 MNU용액은 2mg/ml 내지 10mg/ml의 농도일 수 있다.
- [17] 일 측에 따르면, 상기 포유동물은 토끼, 개, 고양이, 돼지 또는 원숭이 일 수 있다.
- [18] 일 측에 따르면, 안구의 망막 전체가 변성될 수 있다.

발명의 효과

- [19] 본 발명의 망막 변성 동물 모델의 제조방법은 MNU의 주입 전 유리체 절제술을 통해 유리체 조직을 제거하므로, 유리체 절제술을 수행하지 않는 경우와 달리 약물 용량에 비례한 변성을 유발할 수 있고, 망막 변성의 정도를 예측할 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명의 망막 변성 동물 모델의 제조방법은 개체 간 종의 차이에 따른 안구 크기, 수정체 유무에 관계없이 일정 농도의 MNU를 이용하여 같은 정도의 망막 변성 유발이 가능하다.
- [21] 특히, 본 발명의 제조방법을 이용하면 안구 내 잔여 MNU를 최소화함으로써 전신적인 약물의 흡수에 의해 전신적인 합병증이 나타나는 것을 방지할 수 있다.
- [22] 본 발명의 제조방법에 따르면 한쪽 눈에만 국한된 균일하고 안구 전체 넓이의 망막을 모두 포함하는 망막 변성이 유발된 동물 모델을 제조할 수 있으므로, 제조된 동물 모델은 인공 망막의 개발, 줄기세포 치료 연구 등에 유리하게 이용될 수 있으며, 사육의 편리함도 제공할 수 있다.
- [23] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 수술 전과 유리체 절제술 및 MNU(2mg/ml) 약물 주사 수술 3주 경과 후 OCT 검사 결과이다.
- [25] 도 2는 은 수술 전과 유리체 절제술 및 MNU(2mg/ml) 약물 주사 수술 3주 경과 후 ERG검사 결과이다.
- [26] 도 3은 수술 전과 유리체 절제술 및 MNU(4mg/ml) 약물 주사 수술 3주 경과 후, 12주 후 OCT 검사 결과이다.
- [27] 도 4는 수술 전과 유리체 절제술 및 MNU(4mg/ml) 약물 주사 수술 3주 경과 후, 12주 후 ERG 검사 결과이다.
- [28] 도 5는 수술 전과 유리체 절제술 및 MNU(5mg/ml) 약물 주사 수술 3주 경과 후, 6주 후 OCT검사 결과이다.
- [29] 도 6은 수술 전과 유리체 절제술 및 MNU(5mg/ml) 약물 주사 수술 3주 경과 후, 6주 후 ERG 검사 결과이다.
- [30] 도 7은 수술 전과 유리체 절제술 및 MNU(6mg/ml) 약물 주사 수술 2주 경과 후, 12주 후 OCT검사 결과이다.
- [31] 도 8은 수술 전과 유리체 절제술 및 MNU(6mg/ml) 약물 주사 수술 2주 경과 후, 12주 후 ERG 검사 결과이다.

- [32] 도 9는 수술 전과 유리체 절제술 및 MNU(8mg/ml) 약물 주사 수술 3주 경과 후 OCT 검사 결과이다.
- [33] 도 10은 유리체 절제술의 유무 및 MNU 농도에 따른 토끼 안구의 광시야 안저영상 및 자가 형광 영상 사진이다.
- [34] 도 11은 토끼 안구 내로 MNU 주사 1달 후 근적외선(IR) 사진, 빛 간섭 단층촬영(OCT) 사진 및 H&E 조직염색사진이다.
- [35] 도 12는 유리체 절제술을 수행하지 않고 MNU를 안구 내 주사한 토끼 안구의 광시야 안저영상 및 자가 형광 영상 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [36] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [37] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [38] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [39] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [40] MNU(N-methyl-N-nitrosourea)는 현재 망막 변성 동물 모델을 만들기 위해 사용되는 약제 중 하나로, 안구 내로 주사 후 망막에 얼마나 국소적으로 존재하는지 혹은 분산되는지 여부에 따라 망막의 국소적 변성을 유발하는 정도에 차이가 발생하게 된다. 따라서, 망막에 전체적인 변성을 유발하기 위해서는 안구 내로 주사된 MNU가 망막에 전체적으로 골고루 존재하도록 제어될 필요가 있다.

- [41] 본 발명은 유리체 절제술을 수행하는 동안 유리체가 제거된 유리체강 부위를 공기로 치환한 후 특정 농도의 MNU를 주입하고 일정시간 동안 방치한 후 약물을 제거하는 방법을 통해 망막 전체에 균일한 변성을 유발할 수 있음을 발견하여 완성하게 된 것이다.
- [42] 본 발명에서 용어 "유리체 절제술(Pars Plana Vitrectomy, PPV)"은 유리체 절제침(vitrector)라 불리는 외과장치를 통해 유리체 체액을 기계적으로 절단 및 흡입함으로써 유리체 조직을 제거하는 외과 기술이다. 유리체 절제술은 유리체 절제침의 굵기(gauge)에 따라서 분류될 수 있는데, 현재 사용되고 있는 유리체 절제침의 종류는 27 게이지, 25 게이지, 23 게이지, 20 게이지가 있으며, 23 게이지 유리체 절제술(23G vitrectomy)과 25 게이지 유리체 절제술(25G vitrectomy)이 가장 많이 사용된다.
- [43] 본 발명의 동물 모델 제조방법에서 유리체 절제술은 유리체 조직을 제거하여 약물이 안구 내로 균일하게 퍼지도록 하기 위한 목적으로 수행되는 것으로, 공막 절개(trocar insertion), 주입관 삽입(insertion of infusion cannula), 평형염액(balanced salt solution)을 이용한 관류 압력의 조절, 수정체제거술, PVD(Posterior vitreous detachment, 후유리체박리) induction, 망막전인막 처치 단계를 포함할 수 있으며, 필요에 따라 일부 단계가 생략될 수 있다.
- [44] 본 발명의 일 실시예에 따르면, a) 인간을 제외하는 포유동물의 안구에서 유리체 절제술을 수행하여 유리체를 제거하는 단계; b) 유리체가 제거된 안구 내 빈 공간을 공기로 치환하는 단계; c) 상기 안구 내 빈 공간으로 MNU(N-methyl-N-nitrosourea) 용액을 주입하는 단계; 및 d) MNU 용액을 제거하는 단계;를 포함하는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법이 제공된다.
- [45] 본 발명에서, 상기 a) 단계 내지 d) 단계는 동시 수술로 수행될 수 있고, 여기서 "동시 수술"은 각 단계를 포함하는 1회의 수술을 의미한다. 본 발명의 망막 변성 동물 모델의 제조방법을 동시 수술로 진행하는 경우 상기 d) 단계는, 상기 c) 단계로부터 2분 내지 20분 경과 후 수행될 수 있다.
- [46] 상기 d) 단계에서, MNU 용액을 2분이 경과하기 전에 제거하는 경우 망막 변성이 충분히 발생하지 않을 수 있고, MNU 용액을 20분이 경과한 후에 제거하는 경우 너무 심한 망막 변성이 발생할 수 있으므로, 2분 내지 20분 내에 제거하는 것이 바람직하다. 이와 같이, 본 발명의 방법은 안구 내에 MNU 용액을 주입하여 변성을 유발한 후 약물을 제거하므로, 약물이 안구에 남아 발생할 수 있는 부작용을 최소화할 수 있고, 망막 변성 정도를 제어하기에도 용이하다.
- [47] 또한, MNU 용액을 유리체가 제거된 안구 내 빈 공간으로 주입하는 방식은 망막 박리를 유발하여 망막 아래로 MNU를 주사하는 방법과는 달리 망막의 전체 넓이를 포함하는 광범위하고 균일한 망막 변성을 유발할 수 있다.
- [48] 주입된 MNU 용액에 의해 유발되는 변성은 주사 용량기반의 변성이 아닌 주사액의 농도기반의 변성이기 때문에 종간 혹은 개체 차이에 따른 안구의 크기의 차이나 안구 내 수정체의 유무에 다른 유리체강 내 용적의 차이에도

영향을 받지 않는다. 더욱이, 본 발명의 방법은 복강 내 투여와 같은 전신 주사로 발생하는 양안 실명, 약물 독성 등의 문제를 해결할 수 있으며, MNU를 직접 안구에 주입하므로 한쪽 눈에만 망막 변성을 유발하는 데 유용하게 이용될 수 있다.

- [49] 한편, 상기 b) 단계 내지 d) 단계는, 상기 a) 단계와 별개의 수술로 수행될 수 있으며, 이 경우 유리체 제거 후 충분한 회복 기간을 확보하기 위해 상기 b) 단계 내지 d) 단계는, 상기 a) 단계로부터 적어도 3일 이후에 수행되는 것이 바람직하다.
- [50] 상기 c) 단계에서 MNU 용액은 안구의 망막 앞, 유리체 강 부위로 주입되는 것으로, 망막 아래 주사와는 구별된다. 주입되는 MNU 용액은 2mg/ml 내지 10mg/ml의 농도로 주입되는 것이 바람직하며, 4mg/ml 내지 8mg/ml의 농도로 주입되는 것이 보다 바람직하다. MNU를 2mg/ml 미만으로 주입하는 경우 망막 변성이 충분히 유발되지 않으며, 10mg/ml를 초과하여 주입하는 경우 독성이 커서 망막의 전층이 위축되고, 시세포층이 소실되는 등의 문제로 망막 변성 동물 모델로서 사용하기 어려우므로 바람직하지 않다(실시예 3-1, 3-2 및 도 1 ~ 4 참조).
- [51] 본 발명의 동물 모델 제조방법은 상기 단계 d) 이후에, e) 안구를 세척하고, 안구내 빈 공간을 충전하는 단계;를 더 포함할 수 있다. 여기서, 안구 내 빈 공간에는 눈의 상태에 따라 평형 염기용액, 공기, 충전가스, 실리콘 오일 등을 충전할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [52] 본 발명의 동물 모델 제조방법에 사용되는 포유동물은 토끼, 개, 고양이, 돼지 또는 원숭이를 이용할 수 있으며, 안구가 큰 개, 고양이, 돼지 또는 원숭이가 더욱 바람직하다. 그 중에서도, 돼지는 안구의 크기가 사람에 유사하고, 개나 고양이보다 유리체 절제술을 수행하기 용이하므로 가장 바람직하다.
- [53] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 동물 모델 제조방법으로 제조된 망막 변성 동물 모델이 제공된다.
- [54] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 망막 변성 동물 모델은 안구의 망막 전체 범위에 균일하게 변성이 유발되므로 연구자가 동물 모델에게 실제 치료를 적용하기 용이하다. 또한, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 망막 변성 동물 모델은 MNU 주사 이후 나타나는 망막 변성의 패턴을 광학 안저 카메라나 OCT, 망막 전위도, 다초점 망막 전위도 등으로 확인하여 연구 목적에 부합하는 경우 실험에 이용될 수 있다.
- [55] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [56] 이하의 실시 예는 Ophthalmic and Vision Research를 위한 동물의 사용법에 대하여 규제하고 있는 ARVO 선언의 규제에 따라 실시한 것이다.
- [57] 실시예 1: 유리체 절제술의 시행

- [58] 나이 1~2년 정도의 의료 실험용 미니돼지(메디키네틱스, MICROPIG®)를 준비하고, 전신마취를 시행했다. 돼지의 동공은 tropicamide 0.5%와 phenylephrine HCl 2.5% eye drops (Mydrin-P®)에 의해 확장되었고, proparacaine HCl 0.5% (Alcaine®) 국부 안약 마취제를 처리하였다.
- [59] 먼저, 돼지 안구에 23 게이지 크기의 MVR knife를 이용하여 돼지 각막 윤부로부터 약 3~4mm 지점에 세개의 트로카를 삽입한 후 트로카 한 곳으로는 평형 염기용액을 주입하여 부피를 유지하면서 나머지 두개의 트로카를 이용하여 유리체 절제술을 시행했다. 이 때, 수술현미경의 조명을 이용하고, 수술 시야의 확보를 위해 Biom system을 이용하여 안구내 구조물을 확인하면서 수술을 진행하였다.
- [60] 실시에 2: MNU 약물의 준비
- [61] 분자량 103g/mol의 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) (Oakwood Products Inc., West Columbia, SC, USA)를 105mg/ml의 농도가 되도록 DMSO 용액에 녹이고, MNU가 각각 2mg/ml, 4mg/ml, 5mg/ml, 6mg/ml, 8mg/ml의 농도가 되도록 평형 염기용액 (balanced salt solution) (BSS)에 희석하여 준비한다.
- [62] 실시에 3: MNU 농도에 따른 망막 변성 패턴의 비교
- [63] 상기 실시예 1의 방법으로 유리체를 제거한 후 망막 앞 유리체강 부위의 평형 염기용액을 공기로 치환하고, 상기 실시예 2에서 준비한 약물들을 공기로 치환된 부위에 주입하고 2~10분이 지난 후 약물을 제거하였다. 그 다음, 평형 염기용액을 유리체강으로 관류시켜 유리체강 내부를 세척하고 유리체강을 가득 채운다. 주입된 MNU의 농도에 따라 실험예 3-1(2mg/ml), 실험예 3-2(4mg/ml), 실험예 3-3(5mg/ml), 실험예 3-4(6mg/ml), 실험예 3-5(8mg/ml)로 하였다.
- [64] MNU 주사 2주 이후, 망막 변성의 패턴을 빛 간섭 단층촬영(OCT), 망막 전위도(ERG), 다초점 망막 전위도(mfERG)로 측정하고, 그 결과를 도 1 내지 도 9에 나타냈다.
- [65] 실험예 3-1의 경우, 도 1에 나타낸 바와 같이, 수술 전에 비해 유리체 절제술 및 MNU 약물 주사 후에 망막의 시세포를 나타내는 외층이 소실된 것을 알 수 있다. 그러나 도 2의 ERG 결과에서는 MNU 주사 3주 이후에도 여전히 음순응과 명순응 후 빛자극에 대한 반응이 살아 있어 망막 변성이 완전히 이루어지지 않은 것을 알 수 있다.
- [66] 실험예 3-2의 경우, 도 3에 나타낸 바와 같이, 수술 전에 비해 유리체 절제술 및 MNU 약물 주사 후에 망막의 시세포를 나타내는 외층이 소실된 것을 알 수 있다. 그러나 도 4의 ERG 결과에서는 MNU 주사 12주 이후에도 여전히 음순응과 명순응 후 빛자극에 대한 반응이 살아 있어 망막 변성이 완전히 이루어지지 않은 것을 알 수 있다.
- [67] 실험예 3-3의 경우, 도 5에 나타낸 바와 같이, 수술 전에 비해 유리체 절제술 및 MNU 약물 주사 3주 후, 6주 후에 망막의 시세포를 나타내는 외층이 소실된 것을 알 수 있다. 그리고 도 6의 ERG 결과에서는 MNU 주사 3주 이후부터 ERG 전

- 반응이 소실되고 6주 이후에도 소실되는 것을 확인할 수 있으며, 망막변성의 균질성을 확인하기 위하여 시행한 mfERG에서도 망막의 전기반응을 측정한 103영역 모두에서 MNU 주사 3주, 6주 후에 빛자극에 대한 반응이 소실되었다.
- [68] 실험에 3-4의 경우, 도 7에 나타낸 바와 같이, 수술 전에 비해 유리체 절제술 및 MNU 약물 주사 2주 후, 12주 후에 망막의 시세포를 나타내는 망막 외층뿐만 아니라 망막 내층도 심하게 소실되고 얇아진 것을 알 수 있다. 그리고 도 8의 ERG 결과에서는 주사 2주 이후부터 ERG 전 반응이 소실되고, 12주 이후에도 소실되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 망막 변성의 균질성을 확인하기 위하여 시행한 mfERG에서도 망막의 전기반응을 측정한 103 영역 모두에서 주사 2주 이후, 12주 이후에 빛자극에 대한 반응이 소실된 것으로 확인되었으며, 망막의 전기자극반응은 모두 소실되었으나 OCT 상에서 손상이 되어서는 안되는 망막 내층까지도 손상되어 MNU 농도가 적합 농도를 벗어났다.
- [69] 실험에 3-5의 경우, 도 9에 나타낸 바와 같이, 수술 전에 비해 유리체 절제술 및 MNU 약물 주사 3주 이후 망막 외층의 손상이 심하여 망막이 모두 망막 상피세포에서 분리되는 망막 박리가 발생하였다. 이는 주입한 약의 농도가 매우 높아서 망막 전층의 손상이 심함을 보여주는 소견이다.
- [70] 결론적으로, 실시예 3의 결과는 본 발명의 방법을 이용하는 경우 망막 전체 범위에 균일하고 효과적인 망막 변성을 유발하는 것이 가능함을 시사한다.
- [71] 실시예 4: 유리체 절제술 유무에 따른 망막 변성 비교
- [72] 실시예 4-1. 유리체 절제술의 시행
- [73] 2.5 내지 3.5 kg 범위의 뉴질랜드 흰토끼를 준비한다. A-scan을 이용하여 측정된 토끼의 안구 길이는 평균 15.75 mm (범위: 15.0~16.5 mm)이었다.
- [74] 준비한 토끼를 alfaxalone (5 mg/kg; Alfaxan®Vetoquinol, West Sussex, UK) 과 xylazine (4 mg/kg; Rompun®Bayer Corp., Shawnee Mission, KA, USA)을 이용하여 마취를 시행했다. 두 가지 약을 각각 1 CC 근육 주사하였다. 마취가 부족한 경우 0.5 cc씩 추가로 근육 주사하였다. 토끼의 동공은 tropicamide 0.5%와 phenylephrine HCl 2.5% eye drops (Mydrin-P®)에 의해 확장되었고, proparacaine HCl 0.5% (Alcaine®) 국부 안약 마취제를 처리하였다.
- [75] 먼저 토끼 안구에 23게이지 크기의 유리체 절제침을 이용하여 토끼 각막 윤부에서 약 4mm 지점에 두개의 트로카를 삽입한 후 트로카 한 곳으로는 평형 염기용액을 주입하여 부피를 유지하면서 나머지 하나의 트로카를 이용하여 유리체 절제술을 시행했다. 이 때, 수술현미경의 조명을 이용하고, 수술 시야의 확보를 위해 direct concave lens를 이용하여 안구내 구조물을 확인하면서 수술을 진행하였다.
- [76] 실시예 4-2. MNU 약물의 준비
- [77] 분자량 103g/mol의 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) (Oakwood Products Inc., West Columbia, SC, USA)를 105mg/ml의 농도가 되도록 DMSO 용액에 녹이고, 0.05 ml에 MNU가 각각 0.05mg, 0.1mg, 0.3mg, 0.5mg의 양이 되도록 phosphate buffered

saline (PBS)에 희석하여 준비한다.

[78] 실시에 4-3. MNU 농도에 따른 망막 변성 패턴의 평가

[79] 상기 실시예 4-1에서 시행한 유리체 절제술로부터 1주일 이후, 상기 실시예 2에서 준비된 약물들을 30 게이지 바늘을 이용하여 토끼 각막 윤부로부터 약 4mm 지점에 주사하였다. 주입된 MNU의 농도에 따라 실험예 4-1(0.05mg/0.05ml), 실험예 4-2(0.1mg/0.05ml), 실험예 4-3(0.3mg/0.05ml), 실험예 4-4(0.5mg/0.05ml)로 하고, 유리체 절제술 없이 MNU 0.5mg/0.05ml를 주사한 군을 비교예 4-1, 유리체 절제술만 시행한 군을 비교예 4-2로 하였다.

[80] MNU 주사 1달 이후, 망막 변성의 패턴을 광시야 안저 촬영 및 자가 형광 안저 촬영하여 도 10에 나타내고, 자가 형광 빛 간섭 단층촬영(OCT), 근적외선(IR), H&E 조직염색 사진은 도 11에 나타냈다.

[81] 도 10에서 좌측 두 열은 주사 전 사진, 우측 두 열은 주사 1달 이후 사진이다. a ~ d는 유리체 절제술 없이 MNU 0.5mg/0.05ml를 주사한 군(비교예 4-1)으로, 안저의 등 쪽(귀쪽) 하얗게 밝아져 국소적으로 형성된 병변을 관찰할 수 있다.

[82] e ~ h는 유리체 절제술만 시행한 군(비교예 4-2)으로, 변화가 없음을 확인할 수 있다.

[83] i ~ l은 유리체 절제술 후 MNU 0.05mg/0.05ml를 주사한 군(실험예 4-1)으로, 안저사진과 자가 형광 사진 모두 큰 변화가 관찰되지 않았다.

[84] m ~ p는 유리체 절제술 후 MNU 0.1mg/0.05ml를 주사한 군(실험예 4-2)으로 안저사진과 자가 형광 사진 모두 큰 변화가 관찰되지 않았다.

[85] q ~ t는 유리체 절제술 후 MNU 0.3mg/0.05ml를 주사한 군(실험예 4-3)으로 안저사진과 자가 형광 사진에서 visual streak에 해당하는 시력을 담당하는 부위를 중심으로 전반적으로 자가 형광이 증가된 것을 확인할 수 있다.

[86] u ~ x는 유리체 절제술 후 MNU 0.5mg/0.05ml를 주사한 군(실험예 4-4)으로 안저사진과 자가 형광 사진에서 안저의 등쪽(귀쪽) 끝에 부메랑 형태의 경계가 줄처럼 하얗게 증가된 자가 형광을 나타내고, 내부는 어두운 지도모양인 국소적 병변을 관찰할 수 있다.

[87] 도 11에서는 좌측부터 순서대로 근적외선(IR) 사진, 빛 간섭 단층촬영(OCT) 사진, H&E 조직염색 사진을 나타낸다.

[88] a, b는 유리체 절제술 없이 MNU 0.5mg/0.05ml를 주사한 군(비교예 4-1)으로, 근적외선 (IR) 사진에서 상부에 밝게 나타난 부위의 OCT 사진에서는 망막의 시세포층에 해당하는 외층 뿐만 아니라 망막의 내층까지, 망막 전층이 심하게 위축된 것을 확인할 수 있다. 조직 검사에서는 시세포층이 소실된 것으로 확인되었다.

[89] c, d는 유리체 절제술만 시행한 군(비교예 4-2)으로 IR 사진, OCT 사진 및 조직 소견 모두 정상으로 나타났다.

[90] e, f는 유리체 절제술 후 MNU 0.05mg/0.05ml를 주사한 군(실험예 4-1)으로 IR 사진, OCT 사진 및 조직 소견 모두 정상으로 나타났다.

- [91] g, h는 유리체 절제술 후 MNU 0.1mg/0.05ml를 주사한 군(실험예 4-2)으로 IR 사진, OCT 사진 및 조직 소견 모두 정상으로 나타났다.
- [92] i, j는 유리체 절제술 후 MNU 0.3mg/0.05ml를 주사한 군(실험예 4-3)으로 근적외선 (IR) 사진에서 시신경 아래 밝게 찍힌 부위의 OCT 사진에서 망막 내층은 비교적 잘 보존 되어있는 반면 망막의 시세포층에 해당하는 망막 외층이 소실된 것을 확인할 수 있었다. 조직 검사에서는 시세포층이 소실되었다.
- [93] k, l은 유리체 절제술 후 MNU 0.5mg/0.05ml를 주사한 군(실험예 4-4)으로 근적외선 (IR) 사진에서 시신경에 연접한 아래 밝은 부위의 OCT 사진에서 망막의 시세포층에 해당하는 외층뿐만 아니라 망막의 내층까지, 망막 전층이 심하게 위축된 것을 확인할 수 있다. 조직 검사에서도 망막 전층이 소실된 것으로 확인되었다.
- [94] m은 MNU의 농도에 따른 살아있는 세포와 죽은 세포의 패턴을 도식화한 것이다. 0.05mg/0.05ml, 0.1mg/0.05ml를 주사한 군에서는 MNU를 주사하지 않은 군과 유사한 패턴을 나타내어 망막 변성이 유발되지 않은 것을 확인할 수 있고, 0.5mg/0.05ml를 주사한 군에서는 대부분의 시세포가 소실된 것을 확인할 수 있다. 한편, 0.3mg/0.05ml를 주사한 군에서는 약 60%의 시세포가 소실되어 1/3 내지 2/3 범위에 해당하는 망막 변성이 유발된 것을 확인할 수 있다.
- [95] 이상의 결과를 통해 MNU를 너무 많이 투여하는 경우(비교예 4-1, 실험예 4-4) 망막 전층이 소실되고, MNU를 너무 적게 투여하는 경우(실험예 4-1, 4-2) 망막 변성이 유발되지 않아 망막 변성 동물 모델에 적합하지 않다는 것을 알 수 있다.
- [96] 실시예 4-4. 유리체 절제술을 수행하지 않는 경우의 망막 변성
- [97] 세 마리의 토끼를 준비하고, 유리체 절제술 없이 0.2mg/0.05ml, 0.3mg/0.05ml, 0.4mg/0.05ml 농도의 MNU를 각각 30 게이지 바늘을 이용하여 토끼 각막 윤부로부터 약 4mm 지점에 주사하였다. MNU 주입으로부터 4주 후, 망막 변성 발생여부를 확인하여 도 12에 나타냈다.
- [98] 도 12에 나타낸 바와 같이, 0.2mg/0.05ml, 0.3mg/0.05ml, 0.4mg/0.05ml 농도 모두에서 망막 변성이 유발되었으며, 특히 0.2mg/0.05ml의 농도로 주사한 경우 0.3mg/0.05ml나 0.4mg/0.05ml 농도로 주사한 경우에 비해 망막 변성의 정도가 심한 것으로 확인되었다.
- [99] 상기의 실험결과를 통해 MNU 주사 전 유리체 절제술을 수행하지 않는 경우 MNU 농도에 관계없는 망막 변성이 유발되며, 약물이 안구 내로 주사된 이후 약물의 망막에서의 거동을 예측하거나 제어할 수 없는 문제점이 발생하게 된다는 것을 알 수 있다.
- [100] 결론적으로, 상기 실시예 4-3 및 실시예 4-4에서 나타난 결과는 약물 주입 용량에 비례하여 국소적인 망막 변성이 유발되도록 하기 위해서는 MNU를 주사하기 전 유리체 절제술이 필수적임을 시사한다.
- [101] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및

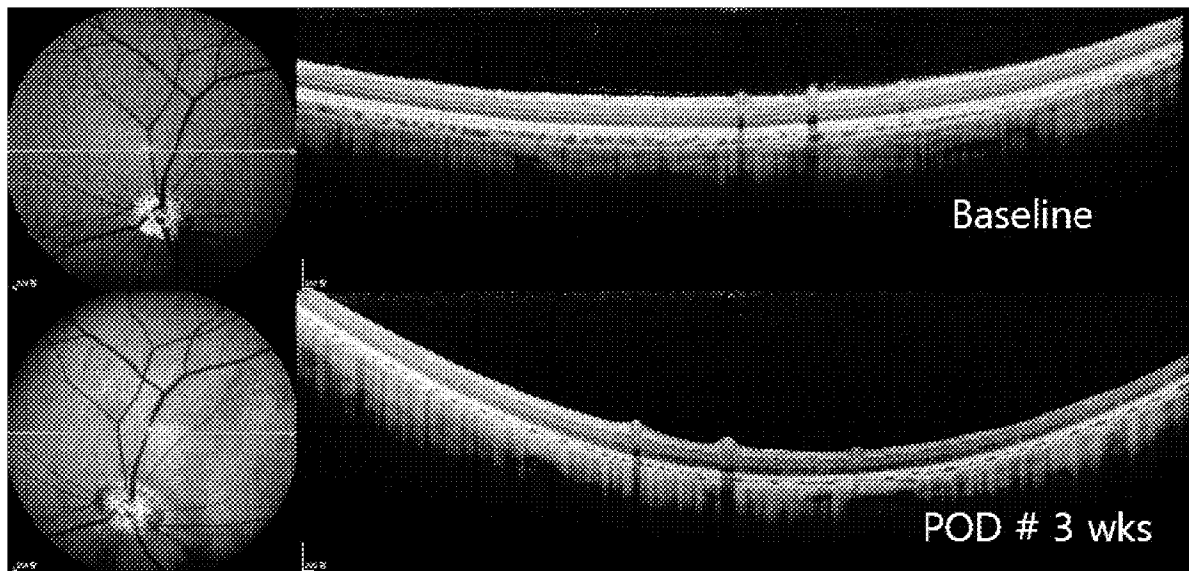
변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

- [102] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

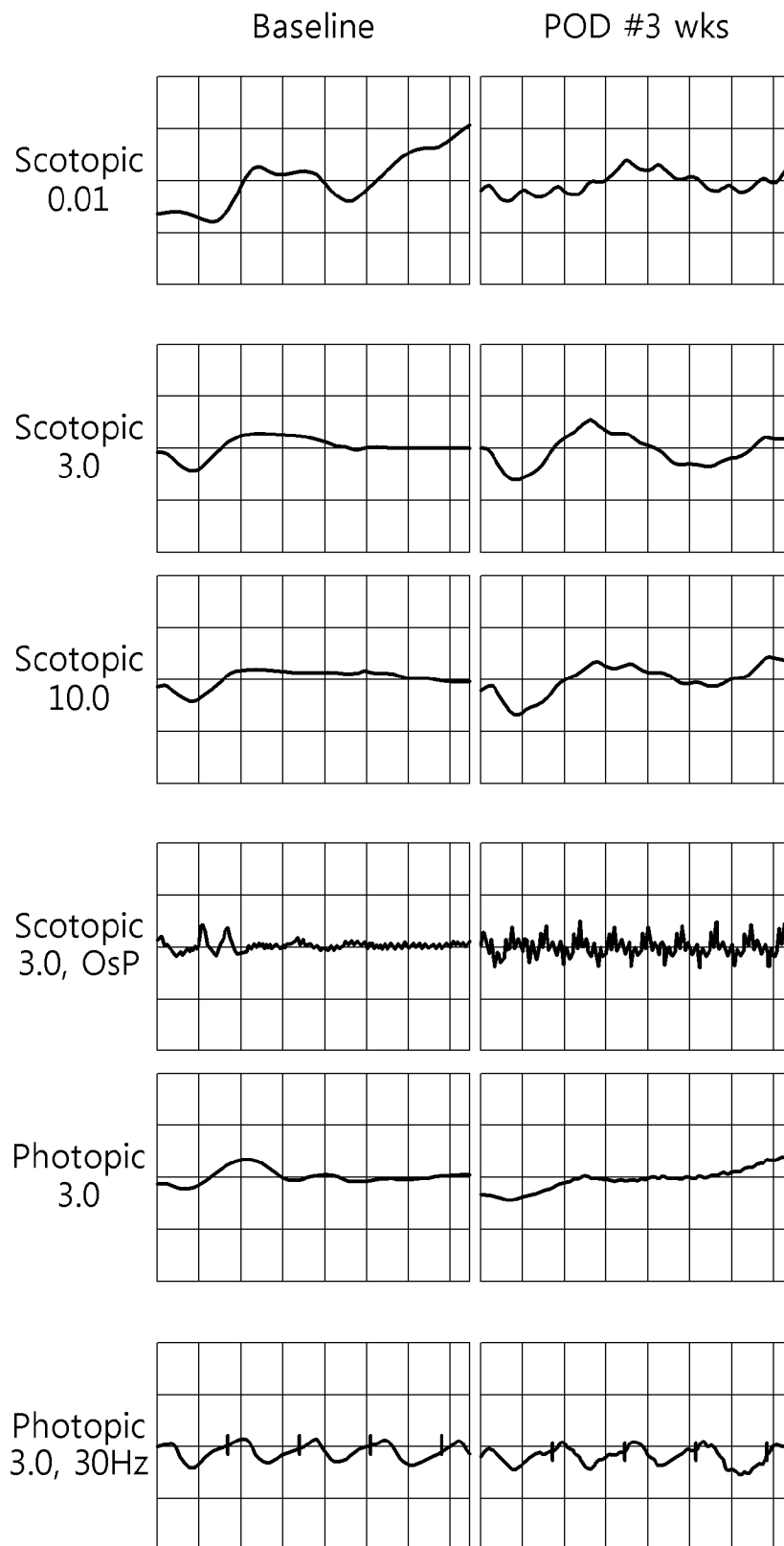
청구범위

- [청구항 1] a) 인간을 제외하는 포유동물의 안구에서 유리체 절제술을 수행하여 유리체를 제거하는 단계;
b) 유리체가 제거된 안구 내 빈 공간을 공기로 치환하는 단계;
c) 상기 안구 내 빈 공간으로 MNU(N-methyl-N-nitrosourea) 용액을 주입하는 단계; 및
d) MNU 용액을 제거하는 단계; 를 포함하는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 a) 단계 내지 d) 단계는 동시 수술로 수행되는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 d) 단계는, 상기 c) 단계로부터 2분 내지 20분 경과 후 수행되는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 b) 단계 내지 d) 단계는, 상기 a) 단계와 별개의 수술로 수행되는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 b) 단계 내지 d) 단계는, 상기 a) 단계로부터 적어도 3일 이후에 수행되는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 d) 단계 이후에, e) 안구를 세척하고, 안구 내 빈 공간을 충전하는 단계; 를 더 포함하는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 c) 단계에서 MNU 용액은 안구의 망막 앞, 유리체강 부위로 주입되는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 MNU는 2mg/ml 내지 10mg/ml의 농도인, 망막 변성 동물 모델의 제조방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 포유동물은 토끼, 개, 고양이, 돼지 또는 원숭이인, 망막 변성 동물 모델의 제조방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 동물 모델은 안구의 망막 전체 면적이 변성되는, 망막 변성 동물 모델의 제조방법.

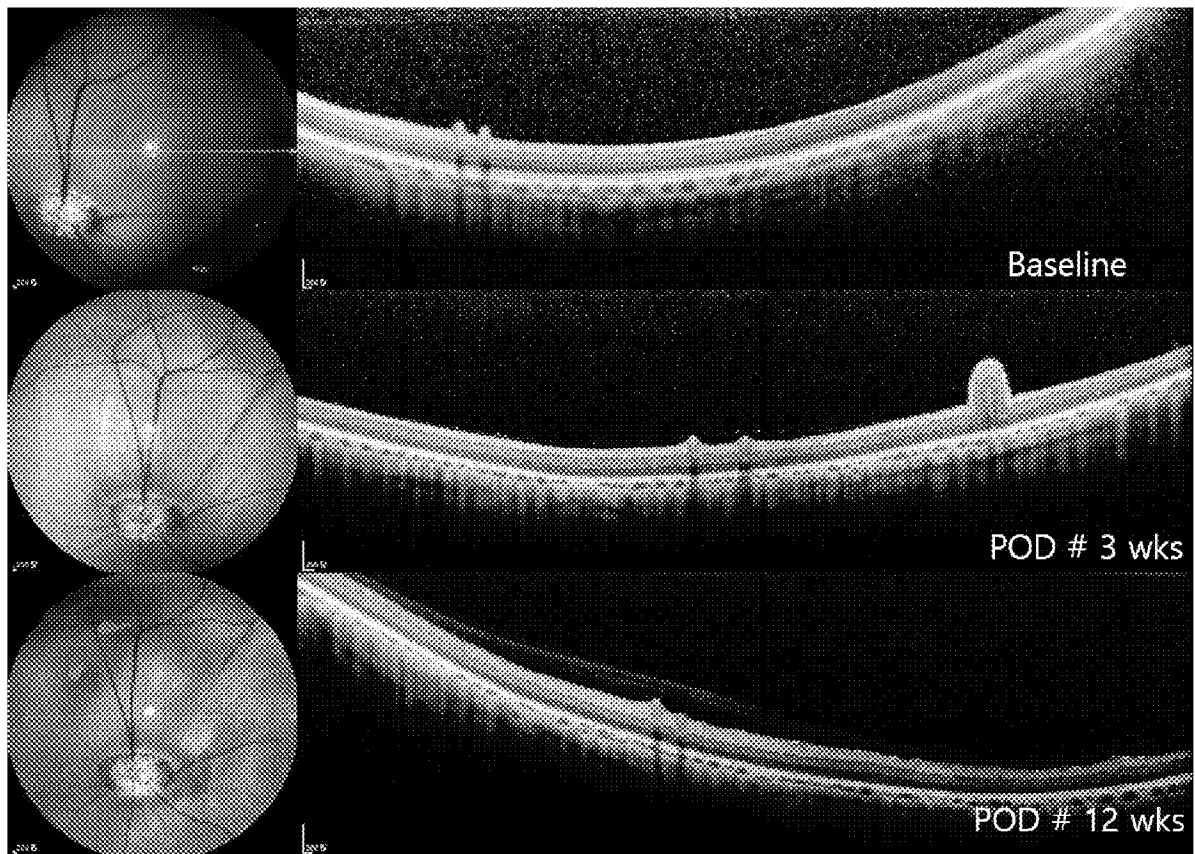
[도1]



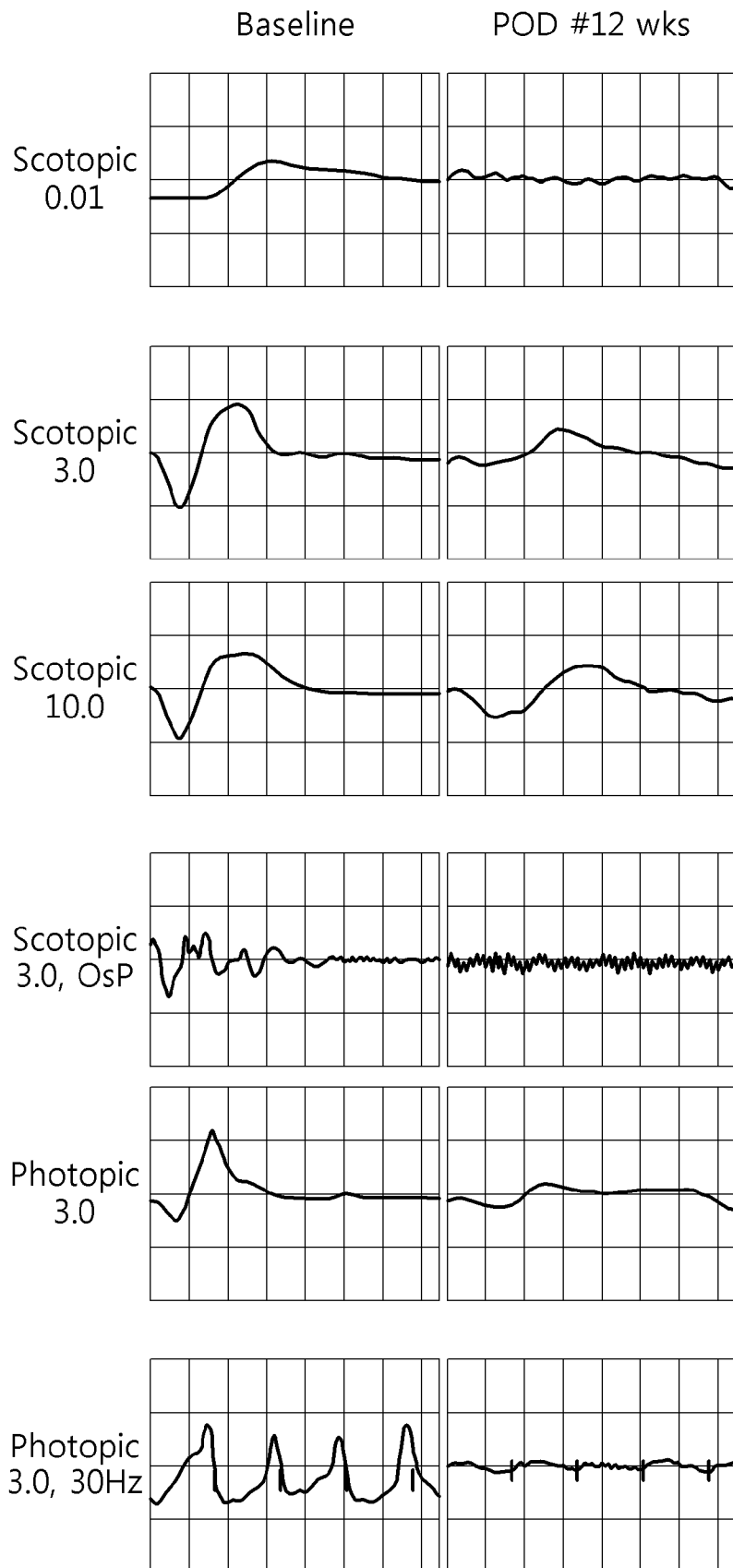
[도2]



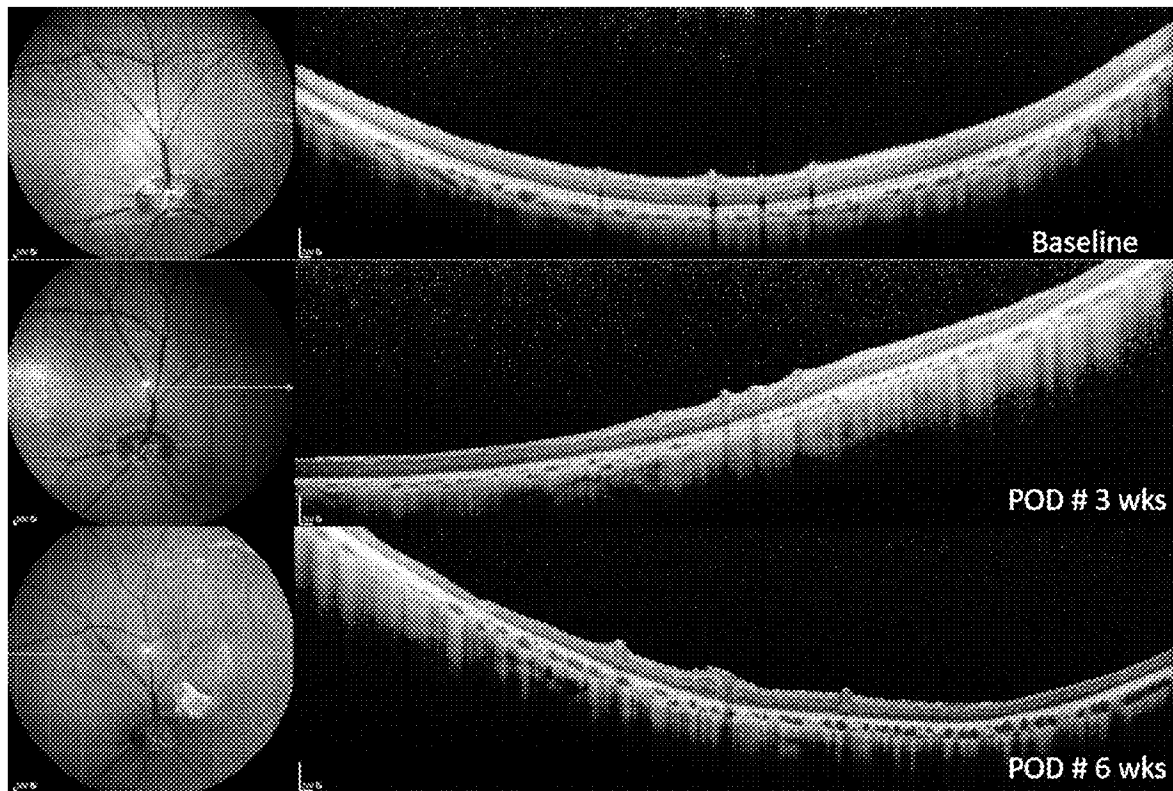
[도3]



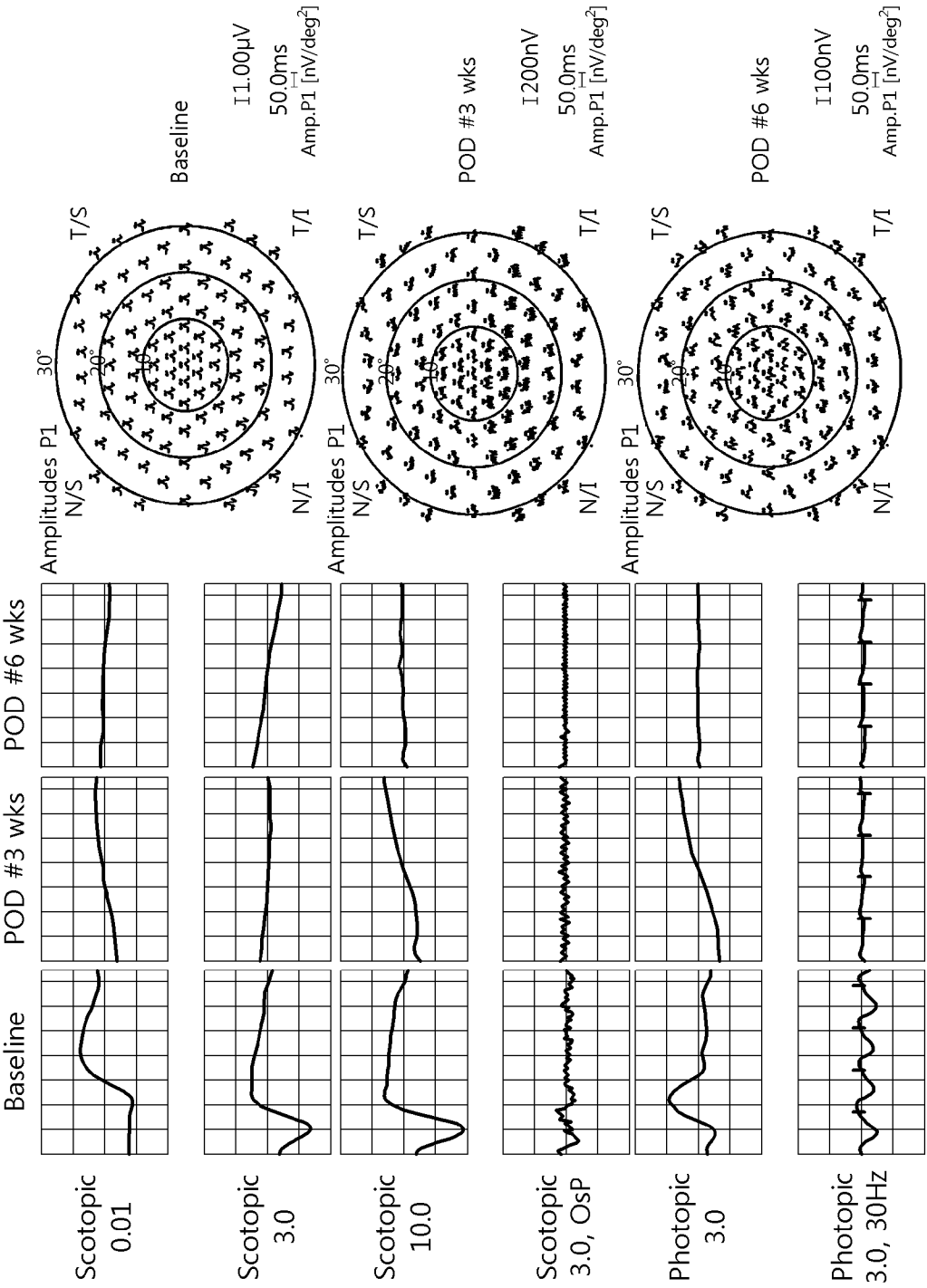
[도4]



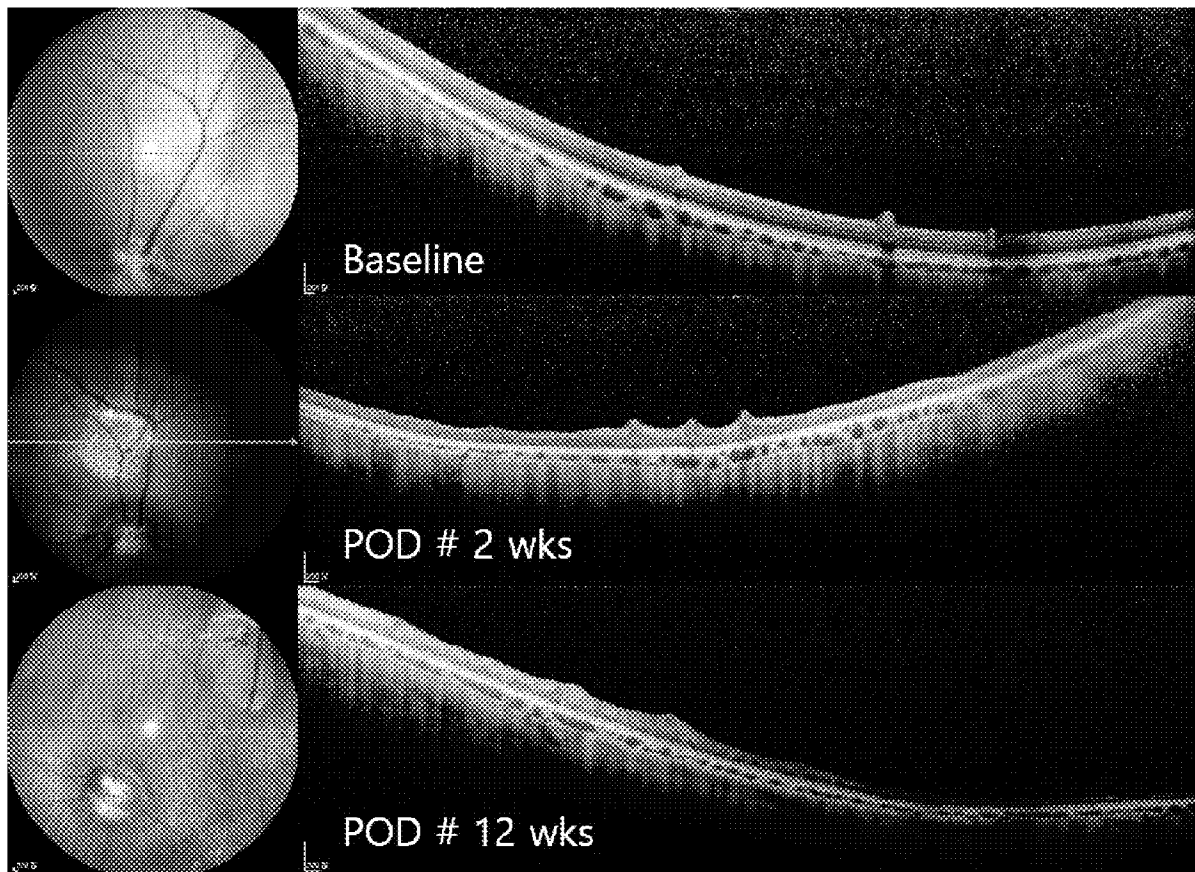
[도5]



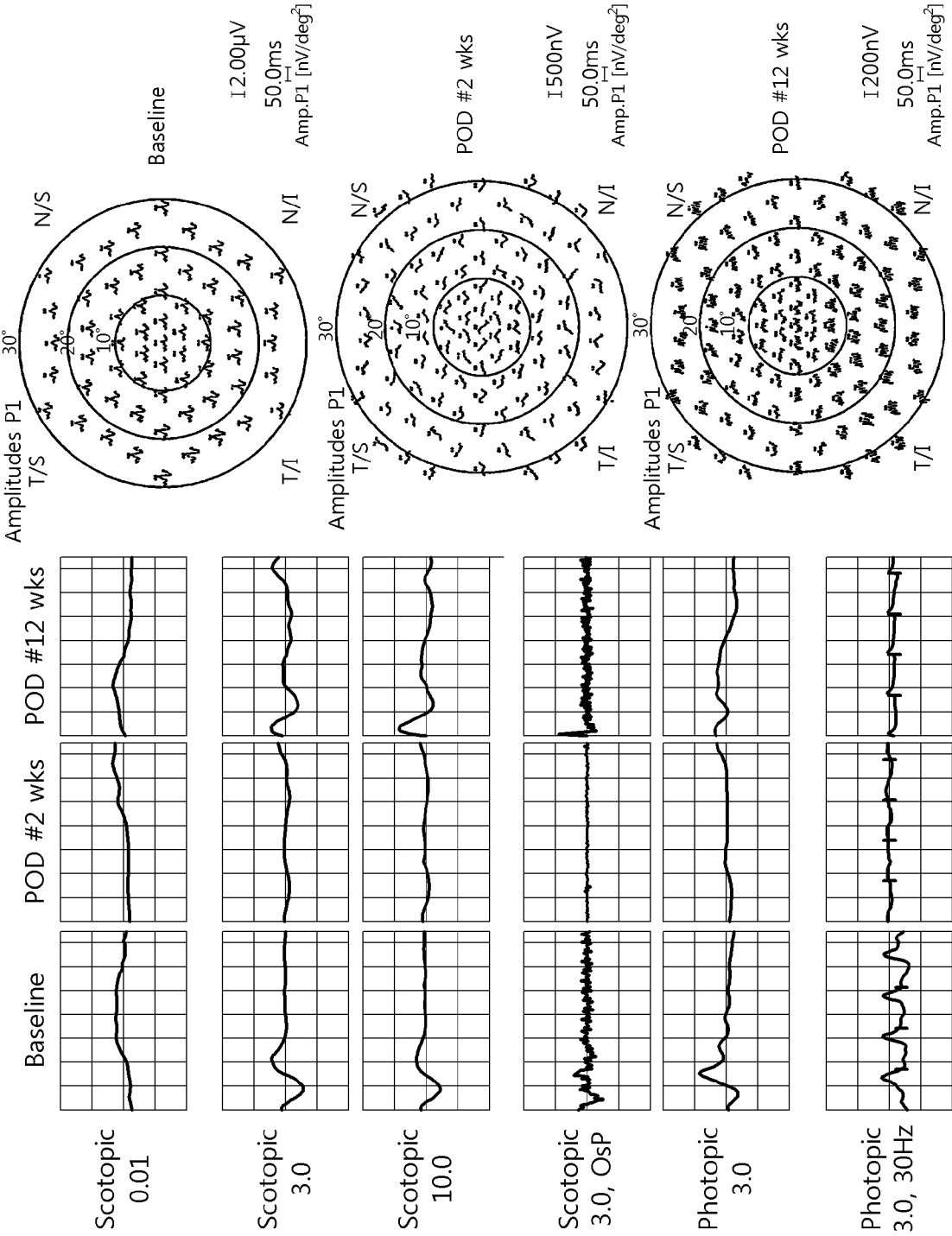
[도6]



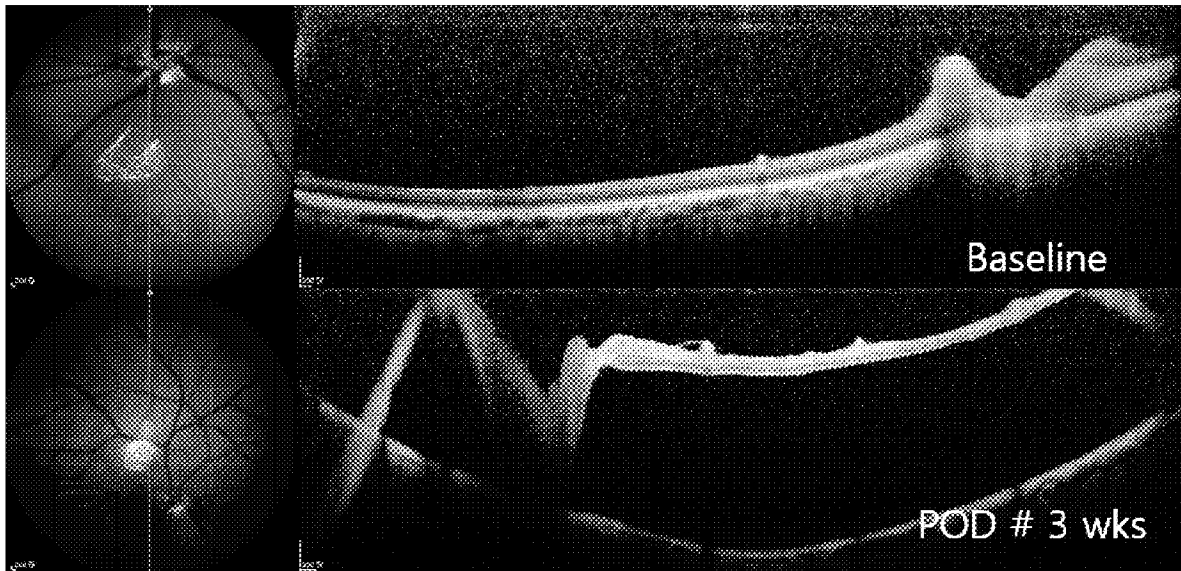
[도7]



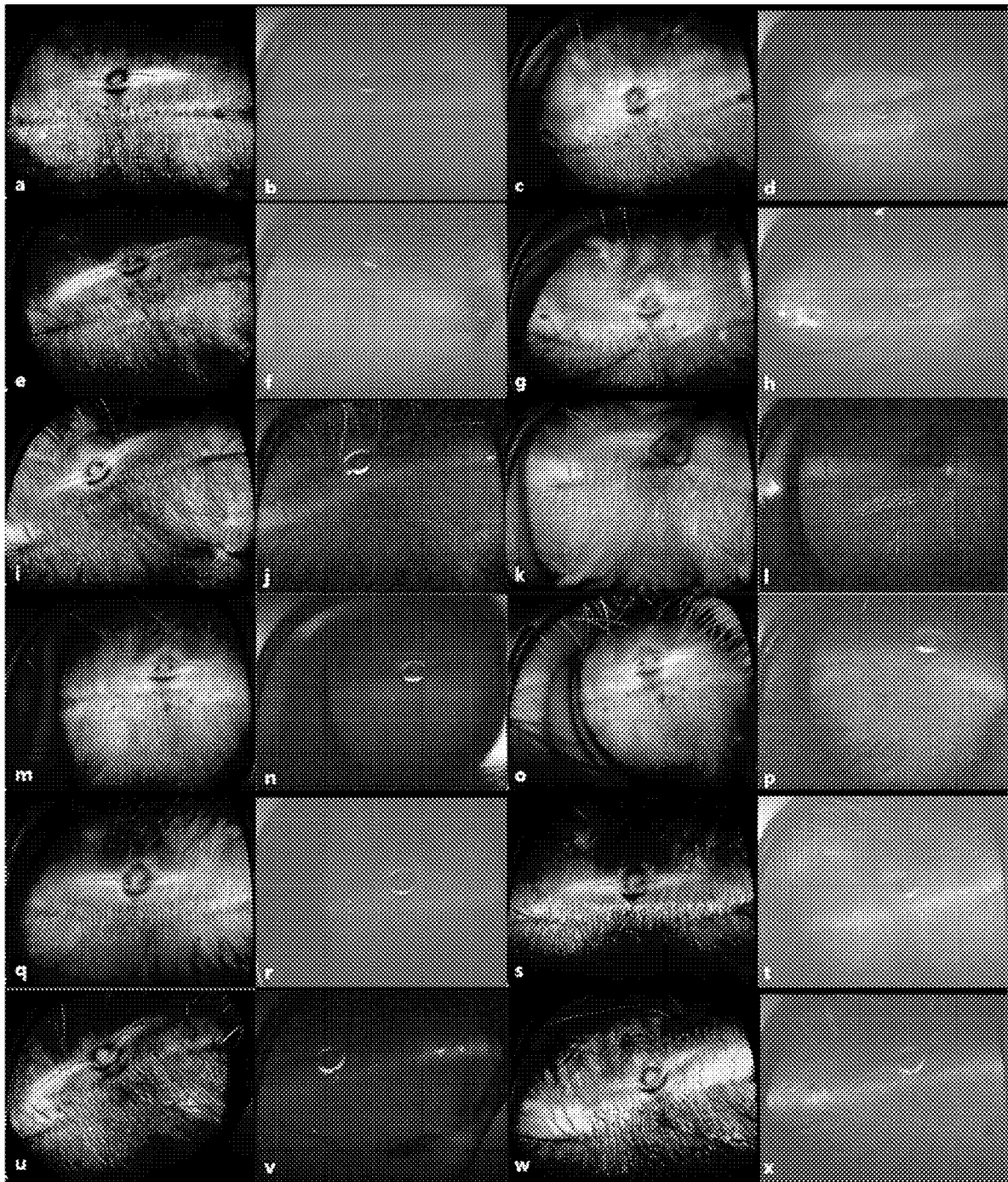
[도8]



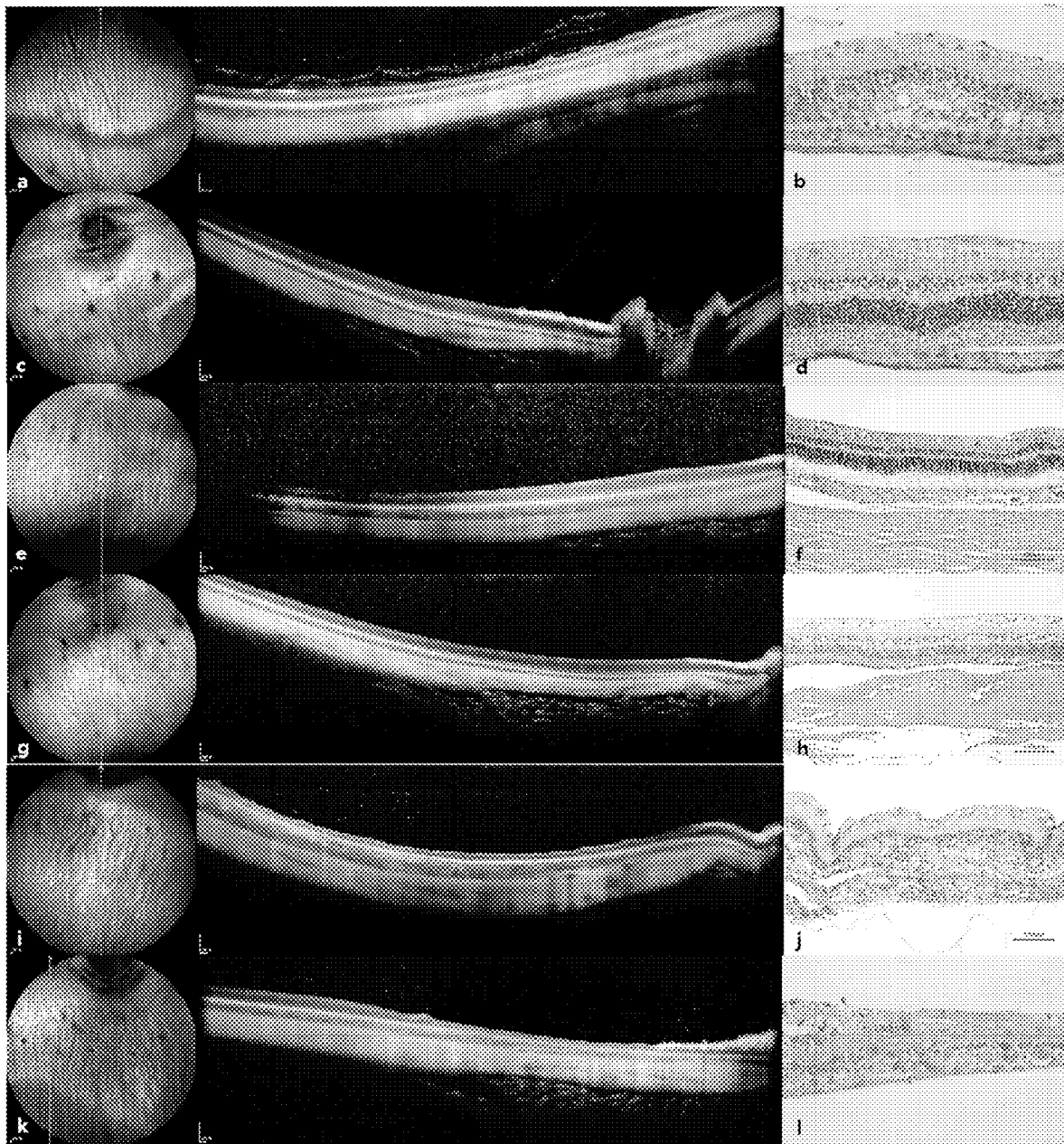
[도9]



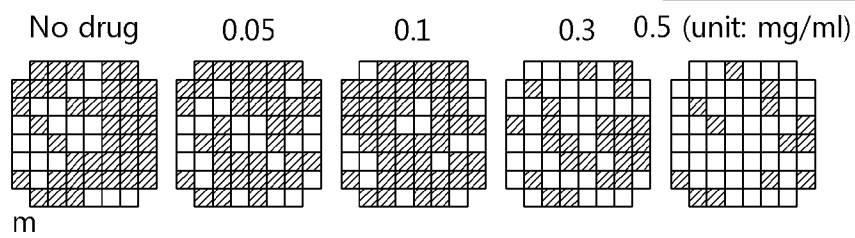
[도10]



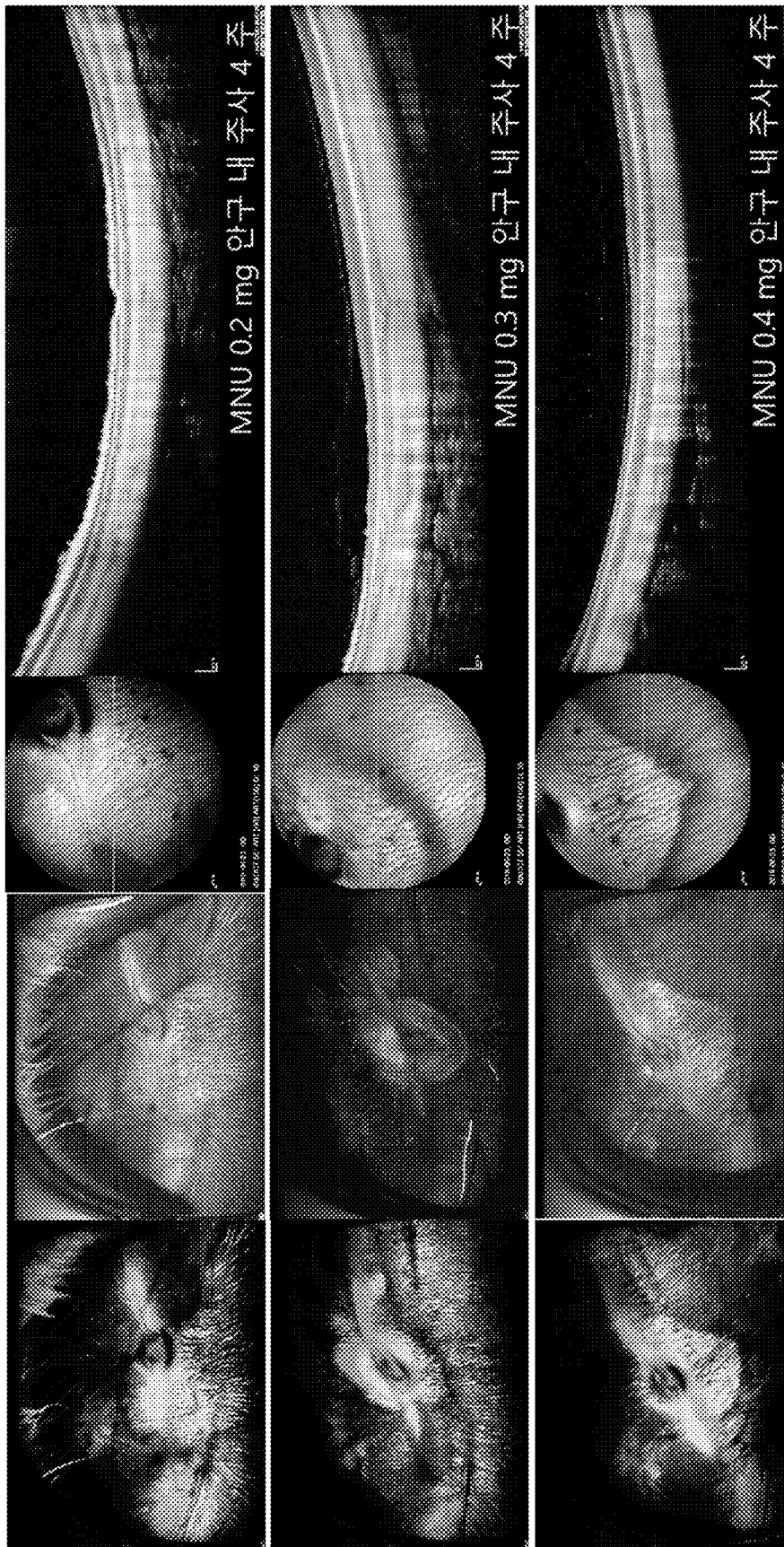
[도11]



☒ Spike firing channel
☐ Non-spike firing channel



[도12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/008054

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K 67/027(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)

A01K 67/027

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: Vitrectomy, MNU(N-methyl-N-nitrosourea), Retina, Animal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROSCH, S. et al. Photoreceptor degeneration by intravitreal injection of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in rabbits: a pilot study. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2017, vol. 255, pages 317-331 See page 319, left column, first paragraph.	1-10
A	ROSCH, S. et al. Selective Photoreceptor Degeneration by Intravitreal Injection of N-Methyl-N-Nitrosourea. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014, vol. 55, pages 1711-1723 See the entire document.	1-10
A	OKA, T. et al. Contribution of calpains to photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated rats. Exp Neurol. 2007, vol. 204, pages 39-48 See the entire document.	1-10
A	TSURUMA, K. et al. Role of oxidative stress in retinal photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated mice. J Pharmacol Sci. 2012, vol. 118, pages 351-362 See the entire document.	1-10
A	안상일 등. 약물 유도 망막변성 생쥐 모델에서 안구내 면역세포에서의 F4/80와 nestin 발현 양상. 대한안과학회지. 2013, vol. 54, no. 6, pages 945-953 (AHN, Sang Il et al. Expression Profiles of F4/80 and Nestin in Ocular Immune Cells Following Pharmaceutically Induced Retinal Degeneration in Adult Mice. J Korean Ophthalmol Soc.) See the entire document.	1-10



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

15 OCTOBER 2019 (15.10.2019)

Date of mailing of the international search report

15 OCTOBER 2019 (15.10.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/008054

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A01K 67/027(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A01K 67/027 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: 유리체 절제술 (Vitrectomy), MNU(N-methyl-N-nitrosourea), 망막(retina), 동물(animal)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	ROSCH, S. 등, "Photoreceptor degeneration by intravitreal injection of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in rabbits: a pilot study", Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2017, 255권, 페이지 317-331 페이지 319, 왼쪽 칼럼, 첫 번째 단락 참조.	1-10
A	ROSCH, S. 등, "Selective Photoreceptor Degeneration by Intravitreal Injection of N-Methyl-N-Nitrosourea", Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55권, 페이지 1711-1723 전체 문헌 참조.	1-10
A	OKA, T. 등, "Contribution of calpains to photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated rats", Exp Neurol, 2007, 204권, 페이지 39-48 전체 문헌 참조.	1-10
A	TSURUMA, K. 등, "Role of oxidative stress in retinal photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated mice", J Pharmacol Sci, 2012, 118권, 페이지 351-362 전체 문헌 참조.	1-10
A	안상일 등, "약물 유도 망막변성 생쥐 모델에서 안구내 면역세포에서의 F4/80와 nestin 발현 양상", 대한안과학회지, 2013, 54권, 6호, 페이지 945-953 전체 문헌 참조.	1-10
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2019년 10월 15일 (15.10.2019)		국제조사보고서 발송일 2019년 10월 15일 (15.10.2019)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 방승훈 전화번호 +82-42-481-5659 

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음