

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 9월 10일 (10.09.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/101326 A1

(51) 국제특허분류:
A61F 2/14 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2009/001770

(22) 국제출원일: 2009년 4월 6일 (06.04.2009)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2009-0018294 2009년 3월 4일 (04.03.2009) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 서울대학교 산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1, 151-015 Seoul (KR).

(72) 발명자: 김

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 위원량 (WEE, Won-Ryang) [KR/KR]; 서울특별시 강남구 압구정 1동 현대아파트 81-1301, 135-905 Seoul (KR). 김미금 (KIM, Mee-Kum) [KR/KR]; 경기도 고양시 일산동구 장항 2동 호수마을 3단지 유원아파트 301-102, 410-744 Gyeonggi-do (KR). 오주연 (OH, Joo-Youn) [KR/KR];

서울특별시 송파구 송파 2동 삼성래미안아파트 102-202, 138-778 Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태동 (TAEDONG INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM); 서울특별시 구로구 구로동 97-3 대림오피스텔리 302호, 152-841 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

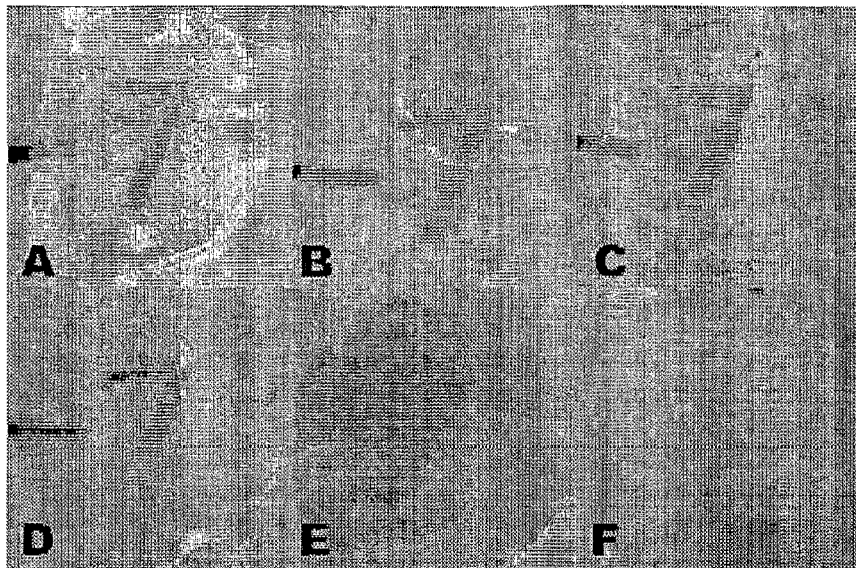
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PROCESSING PORCINE CORNEA FOR DECELLULARIZATION

(54) 발명의 명칭 : 탈세포화를 위한 돼지 각막의 가공방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for processing porcine cornea using a NaCl solution and an trypsin/EDTA solution to decellularize the extracted porcine cornea. The processed porcine cornea by the method does not cause inflammation or an immune reaction after transplantation. A substrate of decellularized porcine cornea by the method recellularizes together with host corneal stromal cells after transplantation.

(57) 요약서: 본 발명은 적출된 돼지 각막의 탈세포화를 위해 NaCl 수용액 및 트립신/EDTA 수용액을 이용한 돼지 각막의 가공방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법으로 가공된 돼지 각막은 이식 후 염증이나 면역반응을 일으키지 않았고, 본 발명의 방법에 의해 탈세포화된 돼지 각막 기질은 이식 후, 숙주 각막 기질세포와 더불어 재세포화시키는 특징을 보였다.

WO 2010/101326 A1



GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

탈세포화를 위한 돼지 각막의 가공방법

기술분야

- [1] 본 발명은 돼지 각막의 가공방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 탈세포화를 위한 돼지 각막의 가공방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 각막(角膜, cornea)은 눈알 외막의 1/6을 차지하며, 빛을 굴절시켜 주는 주된 기관 중 하나이다. 각막은 각막상피, 보우만층, 각막기질(각막실질), 데스메츠막, 각막내피의 총 5개 층으로 이루어져 있다. 각막상피는 5~6의 세포층으로 이루어져 있으며, 주변부의 줄기세포로부터 기초 세포가(base cell)가 생성되어 중심부로 이동하며 7일 후 탈락하게 된다. 보우만층은 세포가 없는 아교질 섬유로 되어 있으며, 무색 투명하다. 그러나, 재생이 불가하여 수술이나 외상 시 흉터를 남기게 된다. 각막기질은 각막의 두께의 90%를 차지하며, 세포의 진행방향 및 크기가 일정하다. 데스메츠막은 3~4층의 세포로 이루어져 있으며, 내피의 기저 막으로 추정되는 곳이다. 각막내피는 1층의 세포로 이루어져 있으며, 내피의 세포는 정해져 있고, 재생은 극히 제한적이며, 나이가 들면 세포의 수가 감소한다. 세포의 수가 감소할 경우, 주변의 세포가 커져 자리를 메우게 된다.
- [3] 한편, 각막의 투명성 상실에 기인하는 실명은 백내장 다음으로 실명의 가장 큰 원인인데, 눈의 외상과 각막의 궤양으로 인한 실명이 연간 백오십만에서 이백만 가량 발생하고 있다. 이 경우 인간 기증 각막을 통한 이식수술만이 유효한 치료법인데, 기증 각막의 수적 부족으로 인해 동종 이식 외의 새로운 대안이 요구되고 있다.
- [4] 각막 대체품에 대해서는 기존부터 널리 연구가 진행되어 왔는데, 합성 대체 재료로 인공각막, 천연물질로 조직공학을 통한 세포배양 및 세포 외 기질로 이루어진 각막 대체 물질 등이 있다.
- [5] 그런데, 현재는 생체호환성과 광학적 기계적 성질에 대한 문제 때문에 유용하게 사용되지 않고 있는 실정이고, 다른 동물의 각막을 이용한 이종 이식이 인간 대체제로서 급부상되고 있다.
- [6] 돼지의 각막은 인간 각막의 대체물로서 가장 기대되고 있는데, 돼지의 각막이 인간의 각막과 비슷한 굴절률 및 크기일 뿐만 아니라, 장기이식을 위한 돼지의 사용은 윤리적으로 용인되고 있고, 최근 유전자 조작 돼지(예: α -1,3-galactosyltransferase 유전자 억제 돼지와 hDAF 유전자 치환 돼지) 등이 개발되어 임상적으로도 사용 가능한 상태에 도달하였기 때문이다.
- [7] 그런데, 기존의 연구 결과에 따르면 이종각막전층이식은 심한 면역거부반응을 보이는 것으로 알려져 있다. 게다가 본 발명자들이 최근 발표한 연구에 따르면

각막의 내피 세포가 없는 층판이종각막이식술도 역시 거부반응을 나타냈다.

[Oh, J.Y., Kim, M.K., Wee, W.R. Lamellar corneal pig-to-rabbit xenotransplantation. Xenotransplantation 15, 198, 2008; Oh, J.Y., Kim, M.K., Ko, J.H., Lee, H.J., Park, C.G., Kim, S.J., Wee, W.R., Lee, J.H. Histological differences in full-thickness versus lamellar corneal pig-to-rabbit xenotransplantation. Vet Ophthalmol in press]. 이것은 각막기질세포(keratocyte)도 이종각막이식에서 면역 거부반응을 나타낼 수 있다는 것을 의미한다.

- [8] 따라서, 본 발명자는 돼지 각막의 실질을 탈세포화하여 세포가 없는 각막실질절편을 만들면, 내피세포가 정상이면서 각막 기질에 혼탁만 있는 환자에게 층판각막이식의 기증 조직으로 활용할 수 있을 것이라고 생각하였다. 더욱이 최근에는 각막이식술의 패러다임이 전체 각막을 교체하는 것이 아니라, 병든 부위의 각막만을 이식하는 것으로 바뀌어 가고 있기 때문에 이러한 접근은 임상적으로도 더욱 유용하기도 하다.
- [9] 세포가 없는 수많은 생물학적인 재료가 다양한 장기의 손상을 복구하는 데 이용되고 있고, 다양한 방법의 탈세포화과정이 연구되고 있다.
- [10] 그런데, 각막 실질을 탈세포화시키는 방법은 종래에 충분히 연구된 바 없고, 특히 이식 후 면역반응 및 병원성을 최소화하며, 투명성을 계속 유지하면서도, 효율적으로 각막을 가공하는 방법에 대해서는 더욱더 연구된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 이에 본 발명은 이식 후 면역반응 및 병원성을 최소화하며, 투명성을 계속 유지할 수 있는 각막 조직의 효과적인 가공방법을 개발하여 제공하는 데 그 목적이 있다.

기술적 해결방법

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 적출된 돼지 각막을 NaCl을 함유하는 수용액에 담가 보관하는 단계(a); 상기 단계(a) 후, 돼지 각막을 트립신 및 EDTA를 함유하는 수용액에 옮겨 보관하는 단계(b); 상기 단계(b) 후, 돼지 각막을 세척하는 단계(c);를 포함하는 것을 특징으로 하는 돼지 각막의 가공방법을 제공한다.
- [13] 본 발명에서는 NaCl 수용액과 트립신/EDTA 수용액을 사용함으로써, 면역반응이 줄어들고, 염증 반응이 줄어들며, 탈세포화가 용이하게 된다.
- [14] 한편, 본 발명의 각막 가공방법에 있어서, 바람직하게 NaCl을 함유하는 수용액은 NaCl의 농도가 1.0~2.0 M인 것이 좋다. 더욱 바람직하게 단계(a)는 35~39°C의 온도 조건에서 12~36 시간 동안 수행하는 것이 좋다.
- [15] 또한, 본 발명 각막의 가공방법에 있어서, 바람직하게 트립신 및 EDTA를 함유하는 수용액은 0.01~0.10%(w/v) 트립신 및 0.01~0.05%(w/v)의 EDTA를 함유하는 수용액인 것이 좋다. 이때, 더욱 바람직하게 단계(b)는 35~39°C의 온도

조건에서 36~60시간 동안 수행하는 것이 좋다.

[16] 한편, 본 발명 각막의 가공방법에 있어서, 세척은 세척액으로 PBS(phosphate buffered solution)를 사용하는 것이 좋다.

[17] 이하, 본 발명의 내용을 하기에서 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[18] 층판 이식이나 덮개 각막 부분이식을 위한 이상적인 각막 대체물은 인간 각막과 유사한 기계적이고, 광학적인 특성을 보여야 하고, 면역반응을 일으키지 않으며, 주위 안구 조직들에 비독성이고, 기능적으로 활성이 있는 세포 외 기질을 가져야 한다.

[19] 각막 세포 외 기질은 다음의 두 가지 이유에서 중요하다.

[20] 첫 번째로, 세포 외 기질은 창상 치유 동안 각막의 복구와 재생에 필요한 적절한 미세환경을 제공하는 생물학적 골격으로 작용한다.

[21] 두 번째로, 각막 건조 무게의 70% 이상을 차지하는 콜라겐으로 구성된 세포 외 기질은 일정하게 얇은 콜라겐 섬유들이 층판 구조를 이루고 있어 각막의 투명성에 필수적이다.

[22] 그러므로 비록 지금까지 임상적으로 유용한 것은 없었으나, 유효한 각막 대체물의 개발에 많은 노력이 있어 왔다.

[23] 한편, 본 발명자들은 물리적, 굴절학적 특징이 인간의 각막과 유사한 돼지 각막 기질이 혼탁한 인간 각막의 좋은 세포 외 기질 대체물이 될 수 있다고 판단하였는데, 본 발명자의 이전 연구에서 밝혀진 바에 의하면, 돼지 각막은 심지어 앞층판만 이식하여도 수술 후 4주 뒤에 거부반응이 일어났다. [Oh, J.Y., Kim, M.K., Wee, W.R. Lamellar corneal pig-to-rabbit xenotransplantation. Xenotransplantation 15, 198, 2008; Oh, J.Y., Kim, M.K., Ko, J.H., Lee, H.J., Park, C.G., Kim, S.J., Wee, W.R., Lee, J.H. Histological differences in full-thickness versus lamellar corneal pig-to-rabbit xenotransplantation. Vet Ophthalmol in press.].

[24] 이에 본 발명자들은 물리적(얼림, 반복적 얼림-녹임), 화학적(고장성, 고삼투압), 또는 효소적 처리를 통해 세포를 파괴시켜 돼지 각막의 면역유발성을 감소시키기로 결정하였다. 왜냐하면, 콜라겐이 약한 항원성인 반면 세포들은 높은 항원성을 가지고 있기 때문이다. [Dufrane, D., Cornu, O., Delloye, C., Schneider, Y.J. Physical and chemical processing for a human dura mater substitute. Biomaterials 23, 2979, 2002; Minami, A., Usui, M., Ishii, S., Kobayashi, H. The in vivo effects of various immunoreactive treatments on allogeneic tendon grafts. J Hand Surg [Am] 8, 888, 19, 1983.].

[25] 하기 본 발명에서의 실험 결과, 본 발명의 구성 중, 일 실시예인 "1.5 mol NaCl 과 '0.05% 트립신 및 0.02% EDTA'"의 실험군이 면역유발성을 줄이고, 콜라겐 구조를 보존하는 면에서 최선의 결과를 보였으며, 숙주 각막에 잘 통합되었고, 토끼에 부분 이식 후 6개월 동안 염증이나 거부반응 없이 투명하게 유지되었다.

[26] 한편, 비교 실험군인 '냉동 그룹'은 돼지 각막에서 세포들을 제거하는데 충분하지 않았고, 대조군인 신선한 돼지 각막에서와 같은 시점에서 거부 반응이

일어났다.

- [27] 또한, 비교 실험군인 '3회 냉동-해빙 그룹'에서는 처리 후에도 일부 세포들이 남아, 이식 2 개월 뒤 거부반응을 유발하였다.
- [28] 또한, 비교 실험군인 '고삼투압성 글리세롤 그룹'이나 '트립신/Dispase/SDS 그룹'은 심한 세포자멸사를 유발하였고, 많은 자멸사된 세포 파편을 만들어 토끼 안구의 면역반응을 촉발하였으며, 조기 거부반응으로 나타났다.
- [29] 또한, 비교 실험군인 '트립신/Dispase/SDS 그룹'과 'Dnase/Rnase 그룹'은 콜라겐 구조를 심하게 파괴하여, 돼지 각막의 모든 콜라겐 섬유들이 없어지고 분절화되었다. 또한, 처리된 돼지 각막은 이식 직후 투명성을 잃고 융해되어 사라졌다.
- [30] 한편, 본 발명에서 주목할만한 점은 본 발명의 실험군인 고장성 식염수 그룹의 탈세포화된 돼지 각막 기질이 이식 후 숙주 각막 기질세포와 더불어 재세포화된 것이다. 전체 각막 두께와 함께 이식물의 두께는 반대편의 비이식안과 같이 증가하였다. 이는 돼지 각막 기질에서 재증식하는 각막기질세포들이 기능적으로 활성이며, 세포 외 기질을 생산함을 시사하는 것이다. 탈세포화된 이식물의 재세포화는 중요한데, 각막기질세포들이 각막 기질의 유지와 대사에 중요한 역할을 하기 때문이다. [McLaughlin, C.R., Fagerholm, P., Muzakare, L., Lagali, N., Forrester, J.V., Kuffova, L., Rafat, M.A., Liu, Y., Shinozaki, N., Vascotto, S.G., Munger, R., Griffith, M. Regeneration of corneal cells and nerves in an implanted collagen corneal substitute. *Cornea* 27, 580, 2008; Salvalaio, G., Fasolo, A., Bruni, A., Frigo, A.C., Favaro, E., Ponzin, D. Improved preparation and preservation of human keratoplasty lenticules. *Ophthalmic Res* 35, 313, 2003; Muller, L.J., Pels, E., Vrensen, G.F.J.M. The effects of organ-culture on the density of keratocytes and collagen fibers in human corneas. *Cornea* 20, 80, 2004].

유리한 효과

- [31] 본 발명에서 제공하는 돼지 각막의 가공방법은 어떠한 염증이나 면역반응을 일으키지 않았고, 본 발명의 방법에 의해 탈세포화된 돼지 각막 기질은 이식 후 숙주 각막 기질세포와 더불어 재세포화시키는 특징을 보였는데, 본 발명의 탈세포화된 돼지 각막 기질은 인간 각막 세포의 생체 외 배양과 조직공학적으로 제조하는 대체 각막에서 기질로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 무처리 대조군(A)과 3회 냉동-해빙 그룹(B), 고장성 식염수 그룹(C), 고삼투압성 글리세롤 그룹(D), 트립신/Dispase/SDS 그룹(E) 및 DNase/RNase 그룹(F)의 돼지 각막 사진이다. 3회 냉동-해빙 그룹, 고장성 식염수 그룹, 고삼투압성 글리세롤 그룹의 각막은 광학적 투명성이 유지되었으나, 트립신/Dispase/SDS 그룹, 그리고 DNase/RNase 그룹에서는 투명성을 잃었다.
- [33] 도 2는 대조군(A)과 3회 냉동-해빙 녹인 그룹(B), 고장성 식염수 그룹(C),

- 고삼투압성 글리세롤 그룹(D), 트립신/Dispase/SDS 그룹(E), 그리고 DNase/RNase 그룹(F)의 돼지 각막 Hematoxylin-eosin 염색 결과를 보여준다. 3회 냉동-해빙 그룹과 고농도 식염수 그룹, 고삼투압성 글리세롤 그룹, 트립신/Dispase/SDS 그룹에서는 거의 세포가 관찰되지 않은 반면, DNase/RNase 그룹에서는 세포 구조가 전혀 없었고, 심하게 왜곡된 콜라겐 구조들이 관찰되었다.
- [34] 도 3은 대조군(A), 냉동 그룹(B), 3회 냉동-해빙 그룹(C), 고장성 식염수 그룹(D), 고삼투압성 글리세롤 그룹(E), 트립신/Dispase/SDS 그룹(F) 및 DNase/RNase 그룹(G)의 돼지 각막 TUNEL 분석 결과를 보여준다. 대조군이나 냉동 그룹 내에는 자멸사한 세포들이 없었다. 많은 자멸사한 세포들이 고삼투압성 글리세롤 그룹과 트립신/Dispase/SDS 그룹에서 발견되었다.
- [35] 도 4는 대조군(A, B)과 3회 냉동-해빙 그룹(C, D), 고장성 식염수 그룹(E, F), 고삼투압성 글리세롤 그룹(G, H), 트립신/Dispase/SDS 그룹(I, J), DNase/RNase 그룹(K, L)의 돼지 각막 투과전자현미경 사진 결과이다. 대조군에서는 정상으로 보이는 각막기질세포들이 잘 조직화된 콜라겐 다발들 사이에 존재하였다. 반면에 다른 각막들에서는 현저하게 손상된 세포들이 관찰되었다. 트립신/Dispase/SDS 그룹과 DNase/RNase 그룹의 각막들에서는 세포 구조가 보이지 않는 심하게 분절화된 콜라겐 섬유들을 가지고 있었다.
- [36] 도 5는 정상 각막으로부터 배양된 돼지 각막 기질세포들(A, B, C)과 세 번 얼렸다 녹인 각막으로부터 배양된 돼지 각막 기질세포들(D, E, F)의 형태를 보여준다. 정상 각막에 비해 세 번 얼렸다 녹인 돼지 각막으로부터 소수의 세포들이 1주 후 (A, D), 2주 후 (B, E)와 3주 후 (C, F)의 배양에서 자랐다.
- [37] 도 6은 토끼에 돼지 각막을 증편이식한 후의 각막 사진이다. 대조군인 신선한 돼지 각막은 시술 후 2주 뒤까지 투명하게 유지되었으나(A), 4주 후에는 거부반응이 일어났다(B). 냉동 그룹의 얼린 돼지 각막은 한 달 후 역시 거부반응이 일어났고(C), 고삼투압성 글리세롤 그룹으로 처치한 각막은 더 초기에 염증반응이 일어나 혼탁해졌다(D). 트립신/Dispase/SDS 그룹과 DNase/RNase 그룹은 이식 후, 용해되었다(각각 E, F). (G)와 (H)는 3회 냉동-해빙 그룹의 돼지 각막 이식 후, 한 달 뒤 (G)와 두 달 뒤 (H)의 모습이다. 한편, 고농도 식염수 그룹의 각막은 두 달 뒤 (L)와 6개월 뒤 (I)에도 투명성이 유지되었다.
- [38] 도 7은 돼지에서 토끼로 증편각막이식한 1달 뒤의 hematoxylin-eosin 염색 결과를 보여준다. 대조군의 경우, 토끼에 이식한 이식편-숙주 연결부에서 많은 염증세포들의 침윤이 나타났다(A). 많은 염증세포들이 냉동 그룹(B)과 3회 냉동-해빙 그룹(C), 고삼투압성 글리세롤 그룹(D)에서 역시 관찰되었다. 반면에 고장성 식염수 그룹의 이식편에는 염증세포가 없었고, 기질세포들이 시술 후, 한 달째 (E)와 6달째 (F)에 재증식되었다.
- [39] 도 8은 CD3⁺와 Hoechst 33342 면역조직화학염색 결과를 보여준다. 많은 CD3⁺ 세포들이 시술 후, 한 달째에 거부반응이 온 대조군의 이식물에서 관찰(A)된 반면, 고장성 식염수 그룹의 돼지 각막 이식물에서는 CD3⁺ 세포들이 관찰되지

않았다(B). Hoest 33342 염색에서 각막 기질 세포들이 시술 후, 한 달째에 고장성 식염수 그룹으로 처리한 이식물 전체에 관찰되었는데(D), 이는 정상 토끼 각막 기질에서 보이는 세포들의 수와 유사하였다.

- [40] 도 9는 고장성 식염수 그룹으로 처리한 돼지 각막을 이식한 토끼 각막의 시술 후, 한 달째 (A), 세 달째 (B), 그리고 여섯 달째 (C)의 생체 내 절편 사진이다. 이식편-숙주 연접부가 관찰되었는데(화살표), 이는 돼지 이식물이 이식편 각막에 잘 생착되는 것을 의미했다. 이식 6개월 뒤에 이식편 바탕 각막에 이식 각막이 완전히 생착되어 연접부가 쉽게 인식되지 않았다.

- [41] 도 10에서 (A)는 이식된 안구의 전체 각막 두께와 이식물의 두께를 비교한 것이고, (B)는 이식된 안구의 전체 각막 두께와 반대 측 비이식 안구의 전체 각막 두께를 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [42] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

- [43] 실시예 및 비교예: 본 발명에 따른 실시예(실험군) 및 비교예(비교 실험군)의 샘플 제조

- [44] 돼지의 각막을 근교배된 미니어처 성인(12개월이 넘는) 돼지의 사망 직후 얻었다. 상피는 100% 에탄올 처리 후 벗겨내었고, 이후 각막은 포스페이트 버퍼 용액(phosphate buffered solution, PBS)에서 30분씩 3번 항생물질과 함께 흔들어서 처리되었다. 250 μ m 두께의 앞층판은 8.0 mm 지름의 트레파인(Kai industries Cp. Ltd, Seki city, Tokyo)을 사용하여 돼지 각막으로부터 얻어내었다.

- [45] 각막은 실험을 위해 하기 표 1에 기재된 7그룹으로 나뉘었고, 다음의 처리방법이 적용되었다. 각 그룹당 5안이 사용되었다.

- [46] (1) 아무 처리 하지 않은 신선한 각막(대조군), (2) 1주 동안 -20°C의 냉동 상태로 유지한 각막. 1주 후, 각막을 냉동상태에서 꺼내어, 상온에서 해빙함(냉동 그룹), (3) 50ml 튜브에 액화질소에 15분간 얼린 후, 급속도로 37°C에서 해동한 각막. 이러한 냉동-해빙과정을 3차례 반복함(3회 냉동-해빙 그룹), (4) 각막을 1.5M의 NaCl 용액에 담가 37°C에서 24시간 동안 유지하였고, 0.05% 트립신/0.02% EDTA 수용액(ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma Aldrich)에 37°C에서 48시간 보관한 후, PBS로 3회 세척함 (고장성 식염수 그룹), (5) 98%의 글리세롤 용액에서 4°C에서 21일간 보관한 후 PBS로 세척하고, 다시 0.05% 트립신/0.02% EDTA 용액에 37°C에서 48시간 유지한 후, PBS에서 3회 세척함 (고삼투압성 글리세롤 그룹), (6) 0.25% 트립신 용액에서 4°C에서 24시간 담근 후, 0.1% SDS(sodium dodecyl sulfate) 용액에서 실온에서 6시간 보관 후, 560unit/l의 Dispase 용액에 4도에서 12시간 처리하고, 다시 0.1%의 SDS용액을 상온에서 6시간 처리하고, PBS로 다시 3회 세척함 (트립신/Dispase/SDS 그룹), (7) 0.1M의 NaOH 용액에

25°C에서 2시간 담근 후, 40 U/mL의 Dnase 와 RNase 처리를 흔들면서 37°C에서 1시간하고, PBS로 철저히 씻어냄 (Dnase/RNase 그룹).

[47] 상기의 각 각막은 각 그룹에서 사용 전까지 4°C에서 보관되었다.

[48] 표 1

그룹		처리방법
대조군	무처리군	아무 처리하지 않은 신선한 각막
냉동 그룹	비교예(비교 실험군)	1주 동안 -20 °c 의 냉동 상태로 유지한 각막. 1주 후, 각막을 냉동상태에서 꺼내어, 상온에서 해빙
3회 냉동-해빙 그룹	비교예(비교 실험군)	50 ml 튜브에 액화질소에 15분간 얼린 후, 급속도로 37 °c 에서 해동한 각막. 이러한 냉동-해빙과정을 3차례 반복
고장성 식염수 그룹	실시예(실험군)	막을 1.5 M의 NaCl 수용액에 담가 37 °c 에서 24 시간 동안 유지하였고, 0.05% 트립신(trypsin)/0.02% EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA Sigma Aldrich) 수용액에 37 °c 에서 48시간 보관한 후 PBS로 3회 세척
고삼투압성 글리세롤 그룹	비교예(비교 실험군)	98%의 글리세롤 용액에서 4 °c 에서 21일간 보관한 후 PBS로 세척하고, 다시 0.05% 트립신/0.02% EDTA 용액에 37 °c 에서 48시간 유지한 후, PBS에서 3회 세척
트립신/Dispase/SDS 그룹	비교예(비교 실험군)	0.25% 트립신 용액에서 4 °c 에서 24시간 담근 후, 0.1% SDS(sodium dodecyl sulfate) 용액에서 상온에서 6시간 보관 후, 560unit/l의 Dispase 용액에 4 °c 에서 12시간 처리하고, 다시 0.1%의 SDS용액을 상온에서 6시간 처리하고, PBS로 다시 3회 세척
Dnase/RNase 그룹	비교예(비교 실험군)	0.1 M의 NaOH 용액에 25 °c 에서 2시간 담근 후, 40 U/mL의 Dnase 와 RNase 처리를 흔들면서 37 °c 에서 1시간 보관하고, PBS로 철저히 씻어냄

[49]

[50] 실험예 1: 상기 표 1의 방법에 의해 탈세포화된 각막 실질의 Ex vivo 평가

[51] 1. 거시 분석

[52] 거시적 검사상, 대조군, 냉동 그룹, 3회 냉동-해빙 그룹, 고장성 식염수 처리 그룹, 고삼투압성 글리세롤 처리 그룹의 각막은 투명성을 유지하였으나,

트립신/Dispase/SDS 처리 그룹과 DNase/RNase 처리를 한 그룹의 각막은 혼탁을 보였다(도 1).

[53] **2. 현미경 분석**

[54] 먼저, 각 그룹의 돼지 각막은 섹션을 만들어서 H&E 방법으로 염색되었다. 그 후, H&E 염색된 슬라이드를 광학현미경(Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

[55] H&E 염색상 3회 냉동-해빙 그룹, 고장성 식염수 그룹, 고삼투압성 글리세롤 그룹, 트립신/Dispase/SDS 그룹의 경우 세포가 거의 관찰되지 않았다. 다만, 대조군과 냉동 그룹에서는 각막 실질 전체에 걸쳐 많은 핵이 관찰되었다(도 2). 세포는 Dnase/Rnase 그룹에서는 관찰되지 않았으나, 콜라겐 구조가 심하게 왜곡되어 있었고, 이러한 현상은 거시 검사에서 혼탁함을 나타낸 양상과 일치하였다.

[56] 한편, 돼지 각막의 탈세포화 과정의 기전을 분석하기 위해 ApopTag® Plus Fluorescein *in situ* apoptosis detection kit (Chemicon international, Billerica, MA, USA)를 사용하여, TUNEL 분석을 시행하였다. 세포자멸사된 세포를 형광현미경(BX 61, Olympus, Shinjuku, 동경, 일본)을 통해 관찰하였다.

[57] TUNEL 검사 결과, 양성으로 염색된 많은 핵이 고삼투압성 글리세롤 그룹과 트립신/Dispase/SDS 그룹에서 관찰되었으며, 3회 냉동-해빙 그룹의 일부에서 양성으로 염색된 핵이 관찰되었고, 고장성 식염수 그룹에서는 핵이 거의 관찰되지 않았다(도 3).

[58] TUNEL 검사상 대조군과 냉동 그룹에서는 핵이 양성 염색되지 않았는데, 이것은 해당 그룹에서는 세포자멸사가 일어나지 않았기 때문이다.

[59] 한편, Dnase/Rnase 그룹에서 H&E 염색 및 TUNEL 염색에서 핵이 전혀 염색되지 않은 것은 Dnase와 Rnase로 처리된 경우 세포나 핵의 부스러기가 존재하지 않았기 때문이다.

[60] 한편, 각막의 세포와 콜라겐에 미친 미세한 손상을 평가하기 위해 각막을 2.5% 글루타르알데하이드 PBS(glutaraldehyde PBS, pH 7.2)에 고정시켜 4°C에서 하룻밤 동안 유지한 다음 1%의 오스미움 테드록사이드(osmium tetroxide)에 1시간 동안 고정하였다. 샘플은 다시 세척하고 에탄올의 연속 희석방법을 통해 탈수되었다. 샘플은 스터브에 마운트하여, 'sputter-coated with gold' 처리를 하여 TEM(JEM-1400 JEOL, Tokyo, Japan)을 통해 관찰하였다.

[61] 대조군인 신선한 각막의 TEM 소견은 잘 조직화된 콜라겐 층판들 사이에 정상적으로 보이는 각막기질세포가 관찰되었다. 그러나, 3회 냉동-해빙 그룹과 고삼투압 글리세롤 그룹에서는 각막기질세포에 자멸사한 찌꺼기들을 가진 저명한 세포 손상이 관찰되었다(도 4). 특히 고장성 식염수 그룹의 각막에는 인지할 만한 세포나 세포 찌꺼기들이 관찰되지 않았으나, 콜라겐 다발들은 잘 보존되고 배열되어 있었다. 이와는 반대로 트립신/Dispase/SDA 그룹과 Dnase/RNase 그룹들의 각막은 세포질의 파괴가 심하여 세포 구조가 보이지 않고

오직 빈 공동들만 관찰되었다. 또한 두 군 모두에서 콜라겐 섬유들이 사라지거나 심하게 분절화되어 심한 콜라겐 층판 구조의 파괴를 보였다.

[62] **3. 각막 실질세포의 생존 정도 평가**

[63] 각막 실질세포의 생존 정도를 평가하기 위하여, 각막을 조각내어 각막실질세포 배양용 매체(DMEM/F-12, 10 % FBS, and 1 % penicillin-streptomycin(Lonza, Basel, Switzerland)에 넣어 배양하였다.

[64] 3회 냉동-해빙 그룹의 각막기질세포는 대조군의 각막에 비해 매우 서서히 자랐다(도 5). 하지만 고장성 식염수 그룹이나 고삼투압 글리세롤 그룹, 트립신/Dispase/SDA 그룹, Dnase/Rnase 그룹의 각막에서는 21일 동안 배양하였어도 세포는 자라지 않았다.

[65] **실험예 2: 이종이식모델에서 탈세포화된 각막기질의 생체 내 효율 검증**

[66] **1. 각막 이종이식의 임상 경과 조사**

[67] 다 자란 2-3kg 정도 무게의 New Zealand 흰토끼(Orient Bio Inc., Seoungnam, 한국)가 본 실험예 2에서 각막이식의 수여동물로 사용되었다. 토끼는 10 mg/kg의 zolazepam(Zoletil®, Yuhan Corp., 서울, 한국)과 6.8 mg/kg의 xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer, Frankfurt, 독일)를 근육 내 투여함으로써 마취되었다.

[68] 돼지 각막의 이식을 위하여 250 µm 두께의 돼지 각막 앞부분 층판 이식편을 8.0 mm 지름의 트레파인으로 표를 하고, crescent knife(Alcon Surgical, Fort Worth, TX, USA)를 사용하여 수동으로 박리하였다. 돼지 각막의 앞부분 층판부 이식편(그룹 당 7안)은 토끼의 수여각막에 10-0 나일론 봉합사(Ethicon, Somerville, NJ, USA)를 사용하여 단속 봉합함으로써 총 8회 봉합하였다. 1주일 후, 모든 봉합사를 제거하였다. 완전 눈꺼풀 봉합술을 시행하였고, 1주일간 유지하였다. 수술받은 토끼들에 levofloxacin 항생제(Cravit®, Santen Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) 점안약을 1일 2회 투여하였고, 전신 항생제(Gentamicin®, 40 mg/kg body weight; Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA)를 근육주사하였다.

[69] 이식한 각막은 세극등 현미경으로 1주일에 3회 관찰하였다. 거부반응은 이식편의 투명성이 완전히 소실된 경우(즉, 동공 주변부와 홍채 구조가 이식편을 통해 전혀 보이지 않을 경우)로 정의하였다.

[70] 관찰 결과, 대조군, 냉동 그룹, 3회 냉동-해빙 그룹, 고장성 식염수 그룹, 그리고 고삼투압 글리세롤 그룹들의 돼지 각막은 모두 이식받은 토끼 각막에 잘 통합되었고, 일주일 뒤 숙주 상피에 의해 완전히 재상피화되었다. 대조군과 냉동 그룹의 돼지 각막 기질은 토끼에 이식된 지 2주 후까지 투명하였다.

[71] 하지만 이후 혼탁화가 시작되었고 모든 이식된 각막들은 이식된 지 4주 후까지 완전히 혼탁화되었다. 3회 냉동-해빙 그룹의 이식편은 한 달 동안 투명하였으나, 시술 2달 뒤에 거부반응이 일어났다. 고장성 식염수 그룹의 모든 돼지 각막들은 이식 후 6개월 동안 거부반응이나 염증 없이 광학적으로 투명하게 유지되었다.

[72] 한편, 고삼투압 글리세롤 그룹의 돼지 각막이 이식된 토끼의 안구들은 시술 후

3주 뒤에 염증반응과 신생혈관이 발생하여 완전히 혼탁화되었다.

[73] 한편, 트립신/Dispase/SDA 그룹과 Dnase/Rnase 그룹들의 돼지 각막 층판들은 토끼에 이식되자마자 용해가 시작되어 이식편의 투명성은 얻지 못하였다.

[74] 각 그룹의 이식편들의 생존시간과 각막 사진들은 표 2와 도 6에 각각 표시하였다.

[75] 표 2

그룹	No	생존기간 (날)
대조군	7	20, 20, 28, 28, 30, 30, 34
냉동 그룹	7	20, 20, 20, 24, 24, 28, 28
3회 냉동-해빙 그룹	7	43, 43, 47, 47, 60, 60, 60
고장성 식염수(NaCl) 그룹	7	>30, >60, >180, >180, >180, >180, >180
고삼투압성 글리세롤 그룹	7	16, 18, 18, 18, 20, 20, 20
트립신/Dispase/SDS 그룹	7	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0
Dnase/RNase 그룹	7	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0

[76]

[77] 2. 각막 이종이식의 조직학적 관찰

[78] 시술 후 각각 1, 2, 6개월째 각 그룹의 토끼들을 희생하여 각막을 적출하였다. 각막의 절편을 만들어, H&E 염색을 하거나, 면역 형광 염색법에 사용하였는데, 각막 내 CD3⁺ 세포의 존재에 대해 면역 형광 염색을 하였다. 얻어진 각막은 10%의 중성 버퍼 포르말린에 고정하여 하룻밤 동안 4°C에서 배양하였다. 그리고 5 µm 두께로 잘라서, 60°C에서 2 시간 동안 건조시키고, 자일렌을 사용하여 디파라핀화하였다. 이후, Proteinase K (20µg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 5% H₂O₂, and 0.3% triton X-100을 연속적으로 처리하고, 그 후에 1% 시럼(serum)을 첨가하였다. 토끼 CD3⁺에 대한 단세포성 생쥐의 항체를 1차 항체로 사용하고, PBS를 음성 컨트롤로 사용하였다. FITC-conjugated goat anti-rabbit IgGs(1:1000, Southernbiotech, Birmingham, AL, USA)를 2차 항체로 사용하였고, Hoechst 33342(Sigma)를 사용하여 대조염색을 시행하였다. 이후, 염색된 CD3⁺ 세포는 형광 현미경을 통해 관찰되었다.

[79] 관찰 결과, 임상적 검사와 유사하게 H&E 염색 소견은 거부반응 후 심한 염증세포들의 침윤을 보였다. 고장성 식염수 그룹을 제외한 모든 군들에서 신생혈관 내생이 공여-이식편 연결부에 발생하였고, 이식편으로 자라 들어갔다(도 7). 하지만 고장성 식염수 그룹의 돼지 각막은 시술 후 6개월간

염증세포와 신생혈관이 발생하지 않았다.

- [80] 한편, 면역조직화학염색에서는 고장성 식염수 그룹의 돼지 각막 이식편에서는 CD3+ 양성 세포들이 발견되지 않았으나, 대조군에서는 많은 CD3+ 양성 림프구들이 발견되었다(도 8). 더구나 Hoechst 33342 염색에서 토끼에 이식된 지 한 달 후에 고장성 식염수 그룹의 탈세포화된 돼지 각막이식편에서 세포들이 재증식하는 소견이 보였다. 이는 숙주 각막기질세포들에 의한 이식편의 재증식을 시사하는 것이다(도 8).

[81]

- [82] 3. 생체 내 절편 이미지 연구, 각막 두께 측정 및 각막 이종이식의 조직학적 소견

- [83] 전층 두께의 각막 횡단면 전후 이미지를 전안부 OCT(anterior optical coherence tomography) (OCT; Visante™ OCT Model 1000, Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, CA, USA)를 사용하여 매달 촬영하였다.

- [84] 촬영 결과, 토끼 각막에 돼지 각막을 이식한 조직 절편 소견은 고장성 식염수 그룹의 이식물에서 완전히 이식편으로 통합되어 성공적으로 토끼 각막에 재구성되었다(도 9).

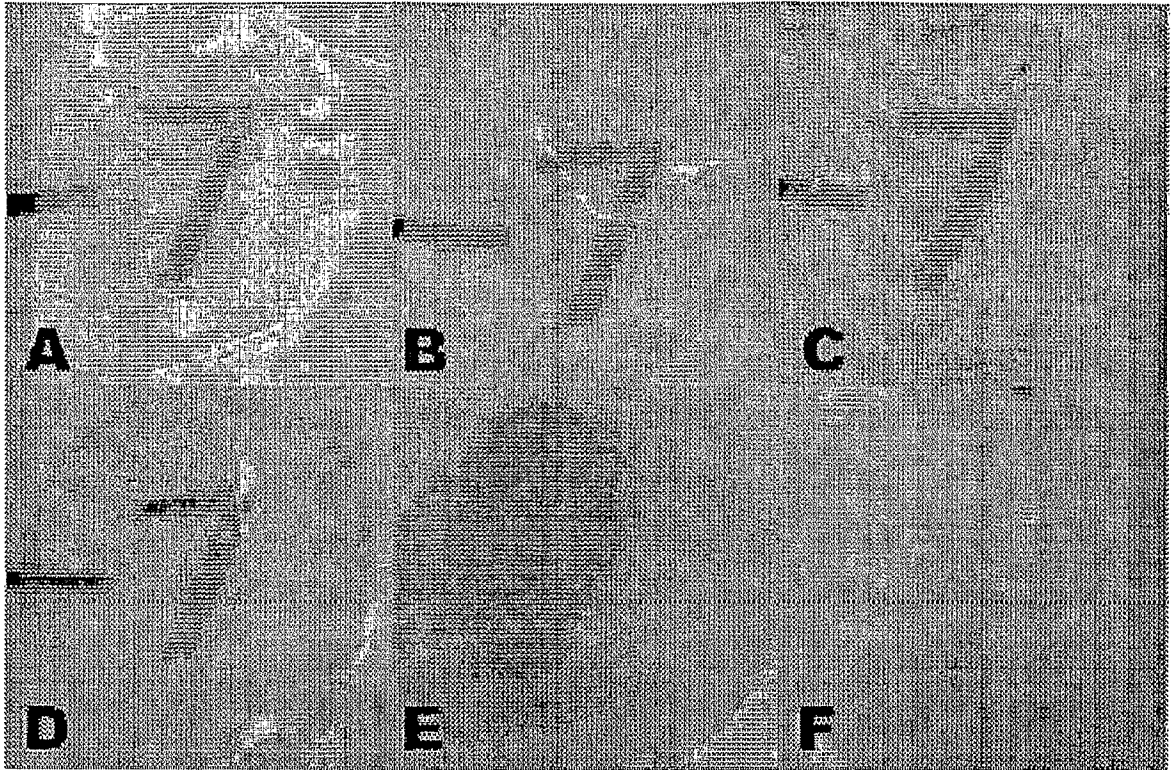
- [85] 한편, 각막 두께를 평가하였는데, 전안부 OCT를 사용하여 전체 각막 두께와 이식된 각막실질부위의 두께를 살아있는 상태에서 측정하였고, 각각 각막 상피와 내피 사이의 거리 및 각막 상피 및 이식편 부위 간의 거리를 측정하여 계산하였다. 전체 각막의 두께는 초음파 두께 측정기(Pachymeter, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France)를 사용하여 측정하였다.

- [86] 측정 결과, 순차적인 각막 두께 측정에서는 이식된 돼지 각막 층판의 두께가 전체 각막 두께가 증가함에 따라 증가하였다(도 10에서 A). 또한, 이식된 토끼 각막은 반대쪽 비이식안처럼 정상적으로 자랐다.

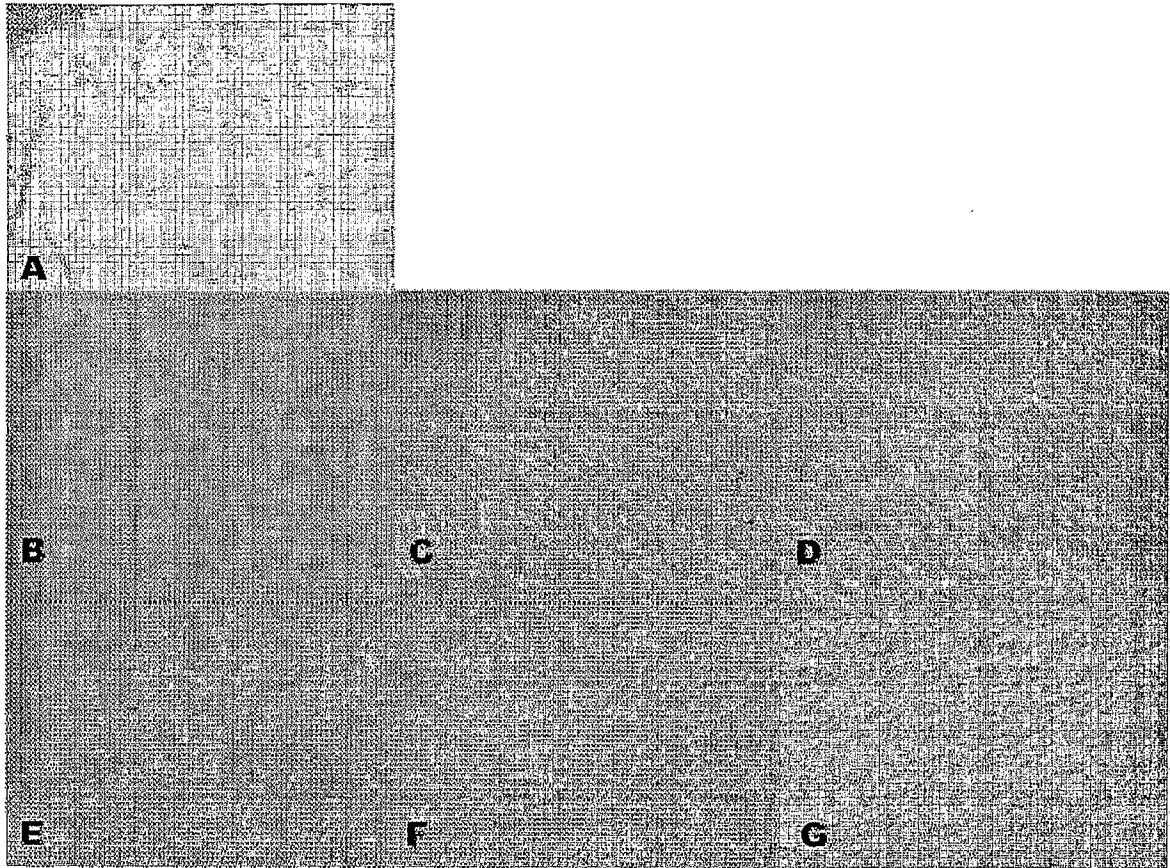
청구범위

- [1] 적출된 돼지 각막을 NaCl을 함유하는 수용액에 담가 보관하는 단계(a);
상기 단계(a) 후, 돼지 각막을 트립신 및 EDTA를 함유하는 수용액에 옮겨
보관하는 단계(b);
상기 단계(b) 후, 돼지 각막을 세척하는 단계(c);를 포함하는 것을 특징으로
하는 돼지 각막의 가공방법.
- [2] 제1항에 있어서,
상기 NaCl을 함유하는 수용액은,
NaCl의 농도가 1.0~2.0 M인 것을 특징으로 하는 돼지 각막의 가공방법.
- [3] 제2항에 있어서,
상기 단계(a)는,
35~39°C의 온도 조건에서 12~36 시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는
돼지 각막의 가공방법
- [4] 제1항에 있어서,
상기 트립신 및 EDTA를 함유하는 수용액은,
0.01~0.10%(w/v) 트립신 및 0.01~0.05%(w/v)의 EDTA를 함유하는 수용액인
것을 특징으로 하는 돼지 각막의 가공방법.
- [5] 제4항에 있어서,
상기 단계(b)는,
35~39°C의 온도 조건에서 36~60시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는
돼지 각막의 가공방법.
- [6] 제1항에 있어서,
상기 세척은,
세척액으로 PBS(phosphate buffered solution)를 사용하는 것을 특징으로
하는 돼지 각막의 가공방법.

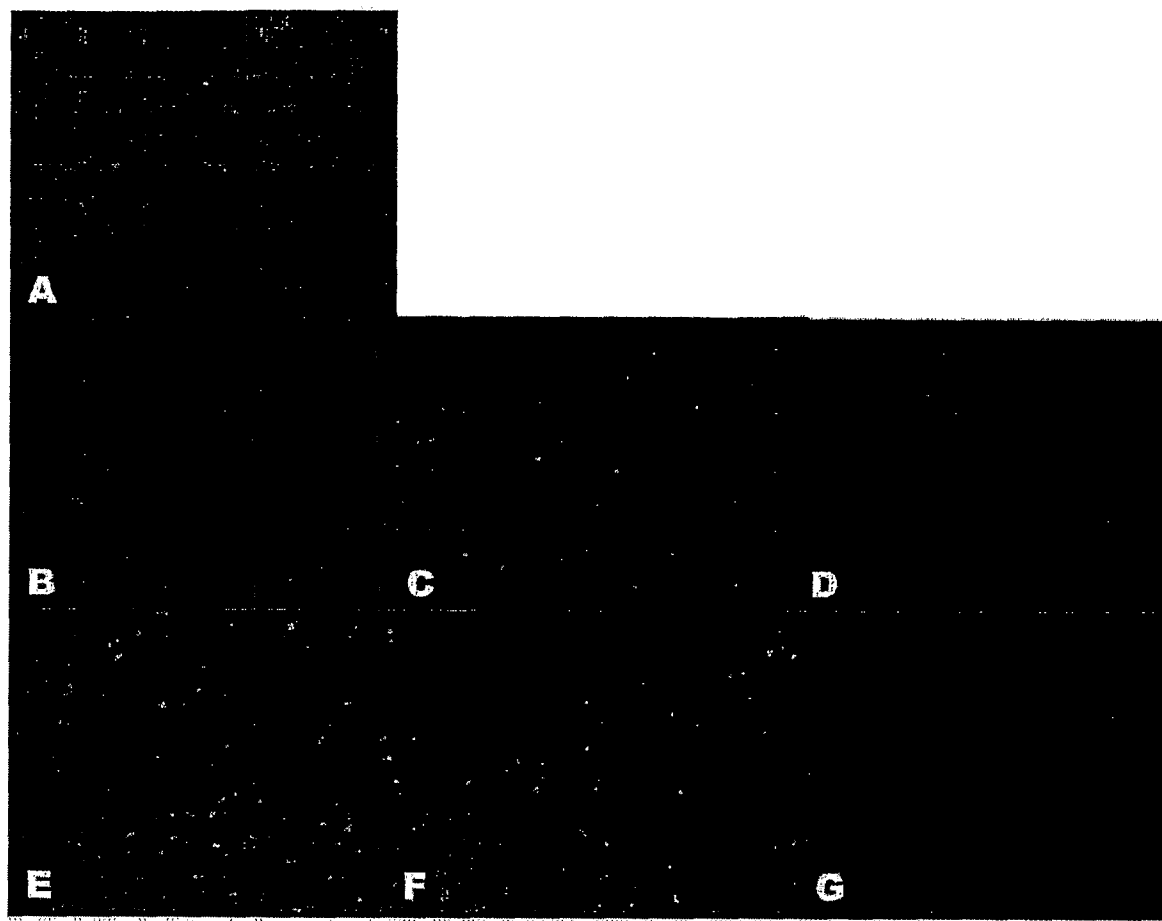
[Fig. 1]



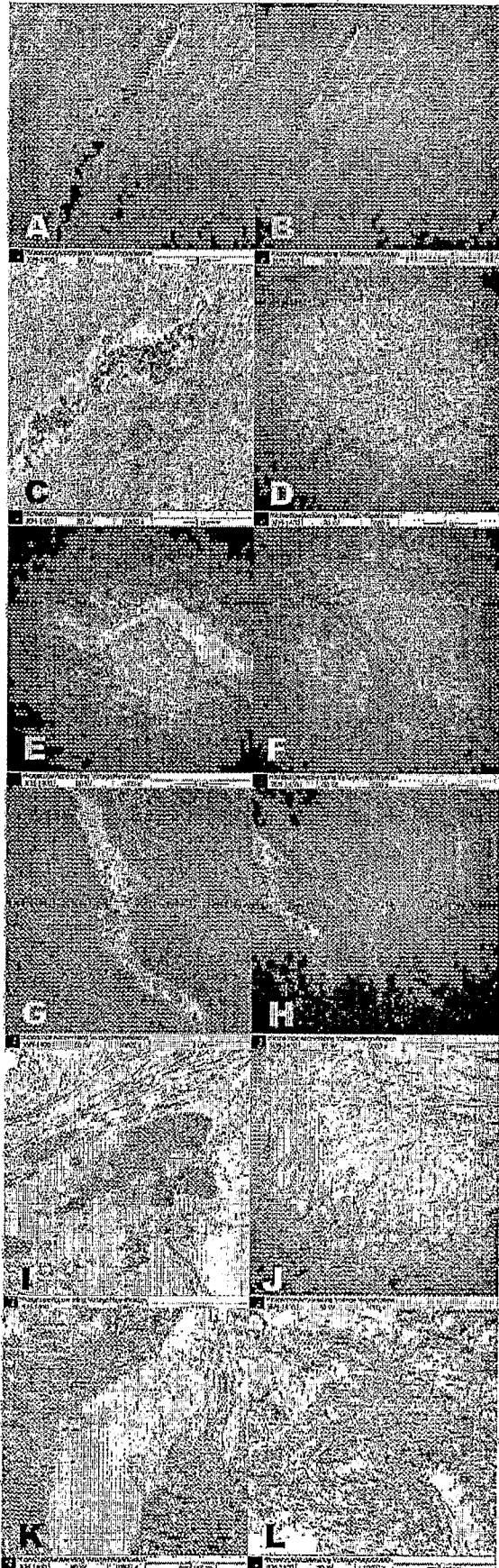
[Fig. 2]



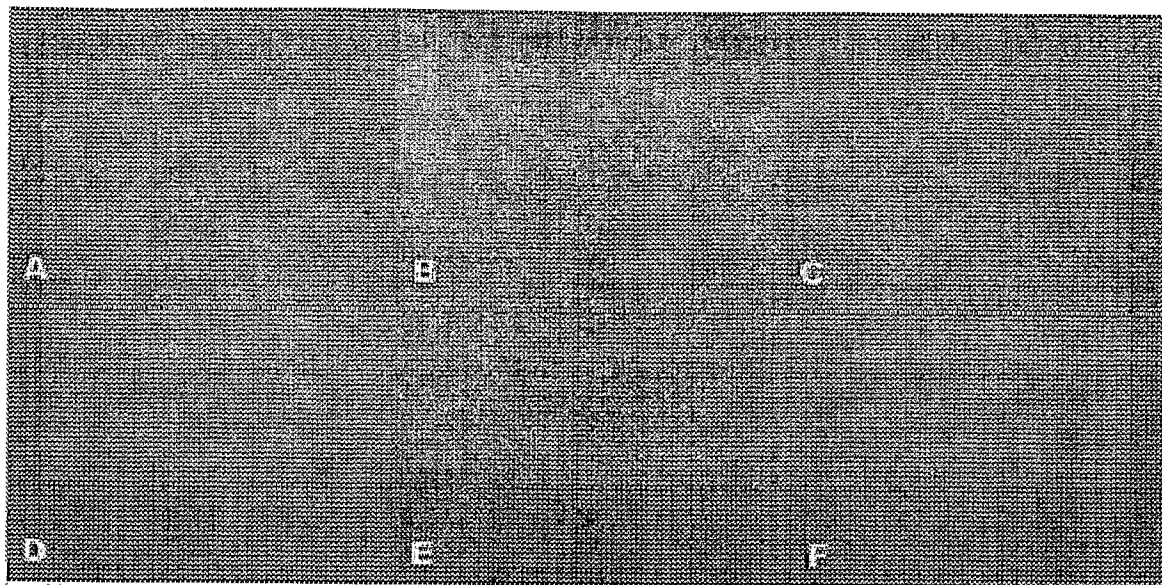
[Fig. 3]



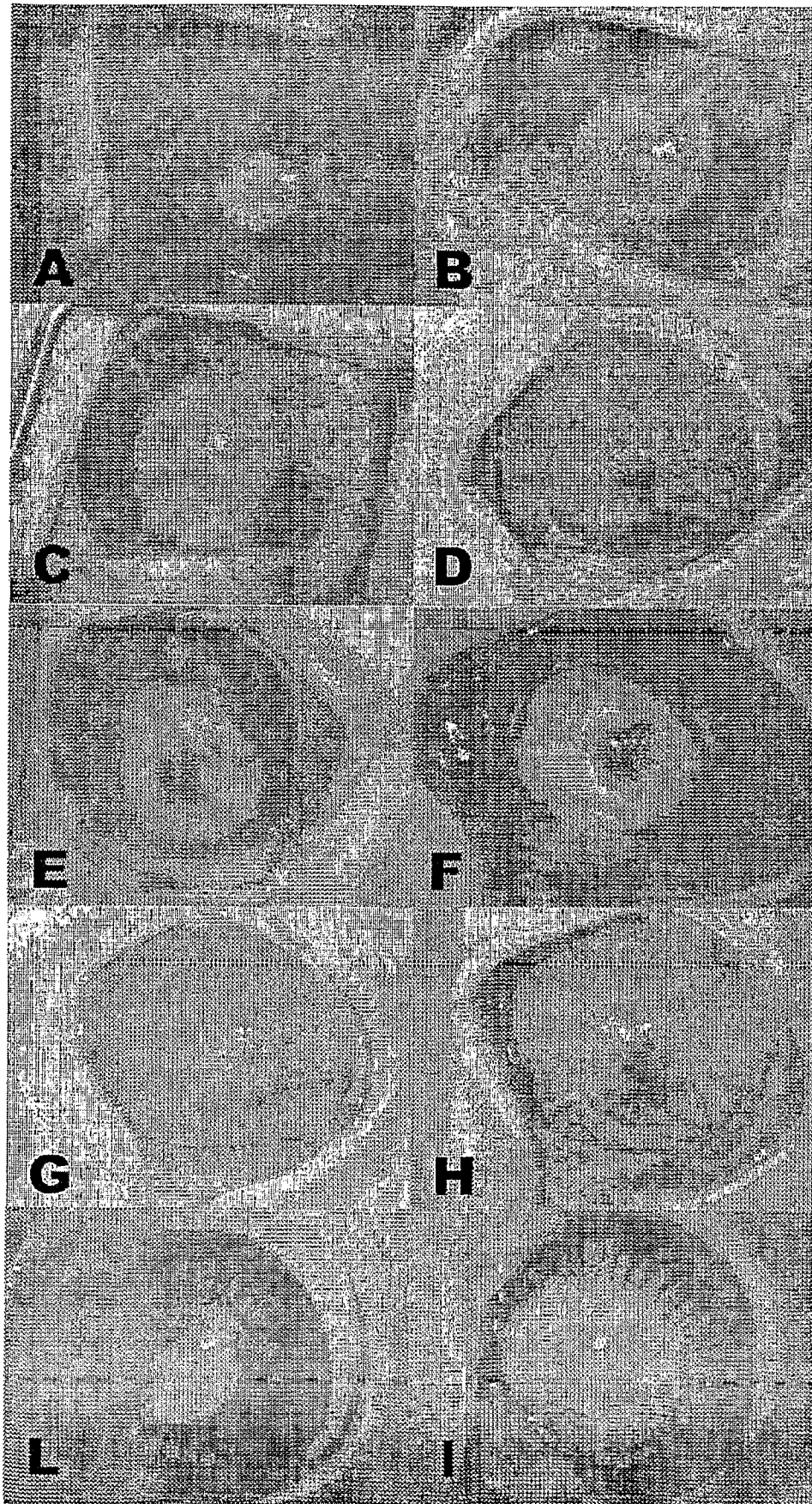
[Fig. 4]



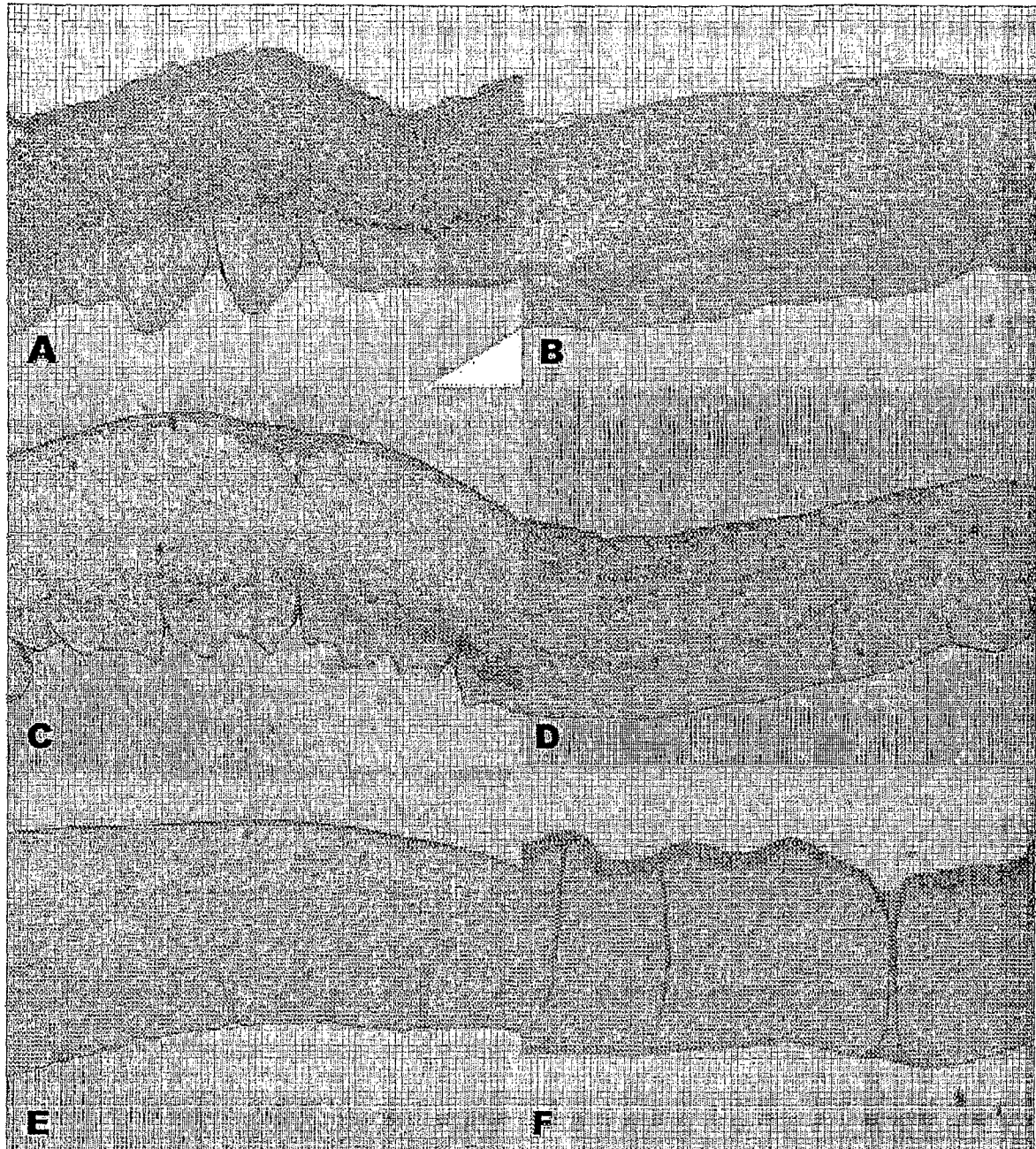
[Fig. 5]



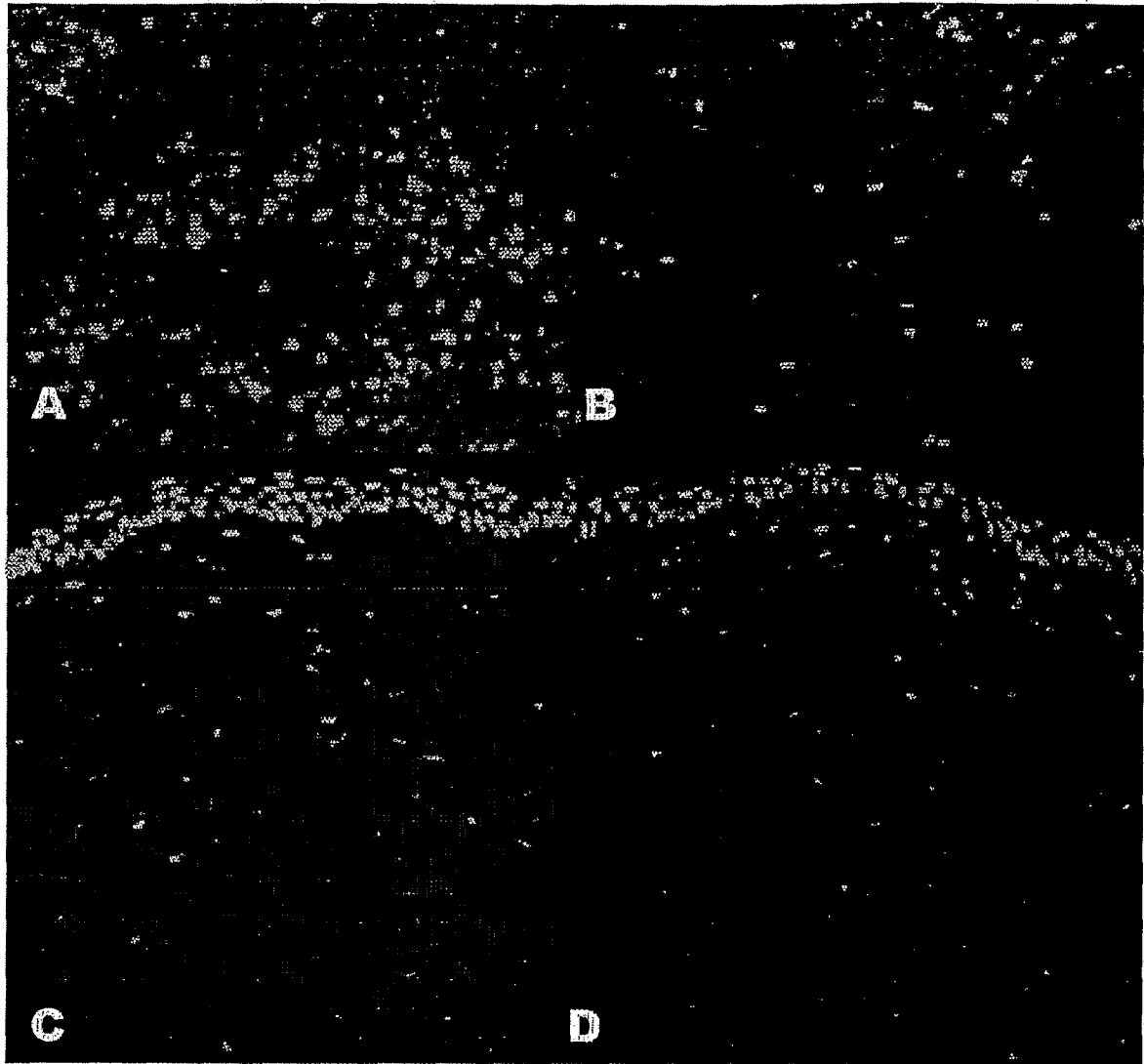
[Fig. 6]



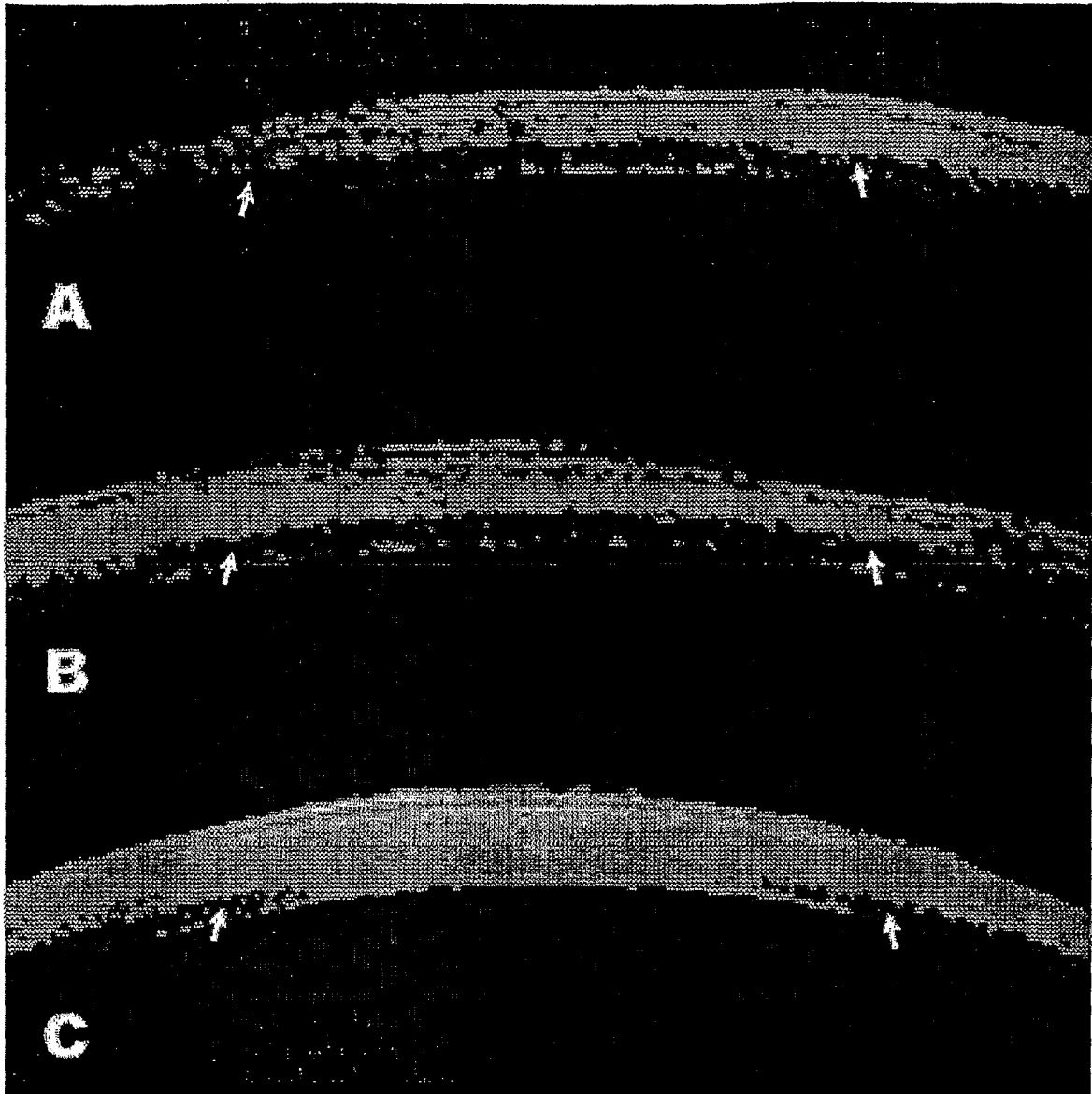
[Fig. 7]



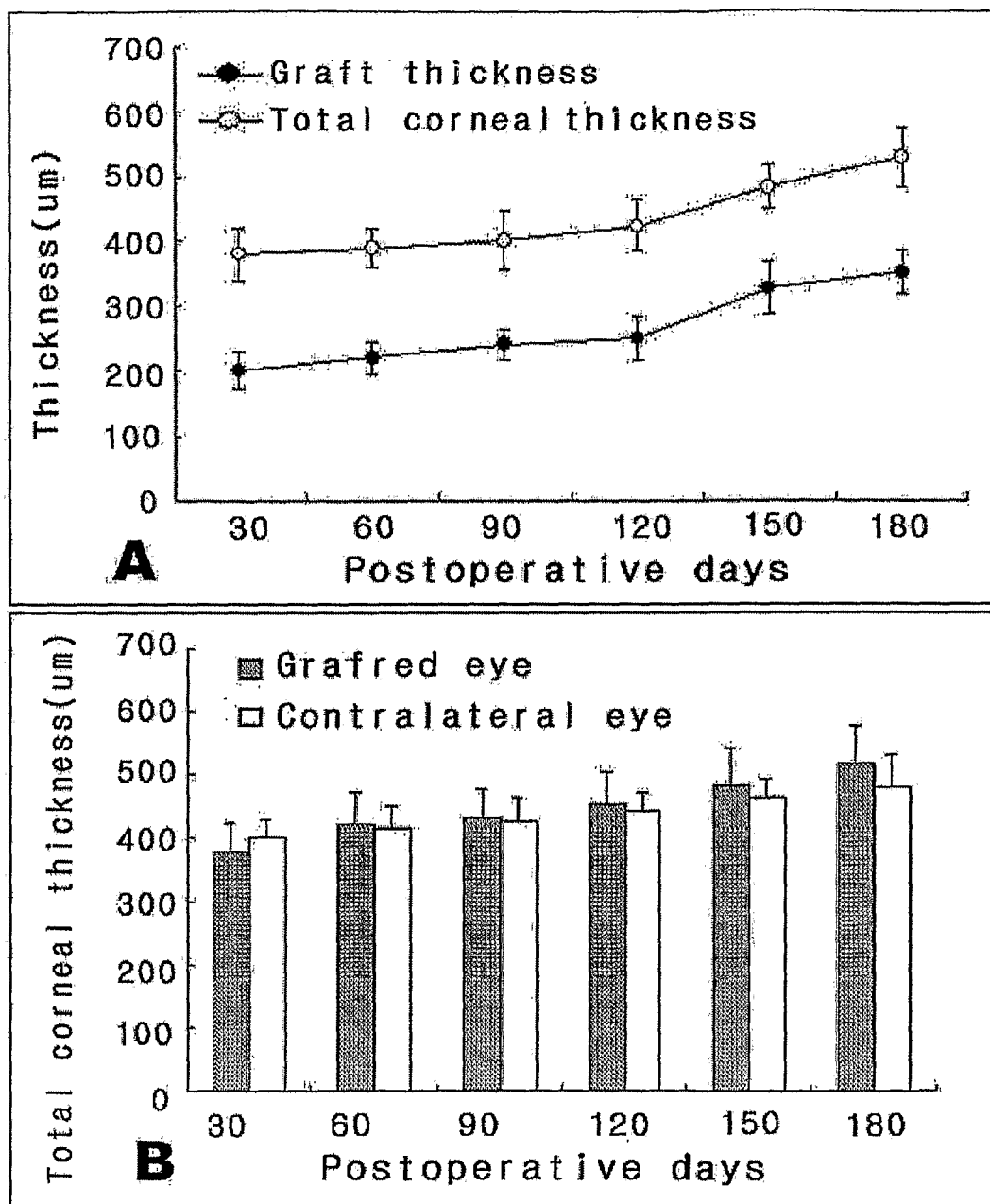
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/001770**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61F 2/14(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)

A61F 2/14; A01N 1/02; A61L 27/00; A61L 27/36; C12N 15/09; C12N 5/071; C12Q 1/24

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-507907 A (BADER, AUGUSTINUS et al.) 12 March 2002	1-6
A	KR 10-0648405 B1 (KOREA ATOMIC ENERGY RESEARCH INSTITUTE) 24 November 2006	1-6
A	KR 10-2003-0045779 A (PEREZ EDWARD) 11 June 2003	1-6
A	US 6645715 B1 (GRIFFITH, MAY et al.) 11 November 2003	1-6



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

18 MARCH 2010 (18.03.2010)

Date of mailing of the international search report

18 MARCH 2010 (18.03.2010)

Name and mailing address of the ISA/

 Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2009/001770

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2002-507907 A	12.03.2002	EP 0989867 A2 EP 0989867 B1 WO 99-00152 A2	05.04.2000 24.04.2002 07.01.1999
KR 10-0648405 B1	24.11.2006	JP 2004-522446 A JP 2006-136326 A JP 2008-283981 A KR 10-0432584 B1 US 2005-0164388 A1 US 2006-0105454 A1 WO 02-062971 A1	29.07.2004 01.06.2006 27.11.2008 24.05.2004 28.07.2005 18.05.2006 15.08.2002
KR 10-2003-0045779 A	11.06.2003	AU 2001-278947 B2 AU 2001-78947 A1 CA 2418306-A1 CN 1458849 A CN 1458849 C0 EP 1301223 A2 JP 2004-504627 A US 2003-0083743 A1 US 2003-0105521 A1 US 2003-0220653 A1 US 2005-0070942 A1 US 2005-0124982 A1 US 6544286 B1 US 6880558 B2 US 7338507W D US 7497866 B2 WO 02-06883 A2 WO 02-06883 A3	30.03.2006 30.01.2002 24.01.2002 26.11.2003 01.03.2006 16.04.2003 12.02.2004 01.05.2003 05.06.2003 27.11.2003 31.03.2005 09.06.2005 08.04.2003 19.04.2005 04.03.2008 03.03.2009 24.01.2002 24.01.2002
US 6645715 B1	11.11.2003	AU 1999-21462 A1 CA 2227827-A1 CA 2318641-A1 EP 1049768 A1 WO 99-37752 A1	09.08.1999 23.07.1999 29.07.1999 08.11.2000 29.07.1999

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61F 2/14(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61F 2/14; A01N 1/02; A61L 27/00; A61L 27/36; C12N 15/09; C12N 5/071; C12Q 1/24

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

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2002-507907 A (BADER, AUGUSTINUS 외 2명) 2002.03.12	1-6
A	KR 10-0648405 B1 (한국원자력연구소) 2006.11.24	1-6
A	KR 10-2003-0045779 A (페레즈 에드워드) 2003.06.11	1-6
A	US 6645715 B1 (GRIFFITH, MAY 외 3명) 2003.11.11	1-6

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2010년 03월 18일 (18.03.2010)

국제조사보고서 발송일

2010년 03월 18일 (18.03.2010)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 선사로 139,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

김종규

전화번호 82-42-481-5593



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2002-507907 A	2002.03.12	EP 0989867 A2 EP 0989867 B1 WO 99-00152 A2	2000.04.05 2002.04.24 1999.01.07
KR 10-0648405 B1	2006.11.24	JP 2004-522446 A JP 2006-136326 A JP 2008-283981 A KR 10-0432584 B1 US 2005-0164388 A1 US 2006-0105454 A1 WO 02-062971 A1	2004.07.29 2006.06.01 2008.11.27 2004.05.24 2005.07.28 2006.05.18 2002.08.15
KR 10-2003-0045779 A	2003.06.11	AU 2001-278947 B2 AU 2001-78947 A1 CA 2418306-A1 CN 1458849 A CN 1458849 C0 EP 1301223 A2 JP 2004-504627 A US 2003-0083743 A1 US 2003-0105521 A1 US 2003-0220653 A1 US 2005-0070942 A1 US 2005-0124982 A1 US 6544286 B1 US 6880558 B2 US 7338507W D US 7497866 B2 WO 02-06883 A2 WO 02-06883 A3	2006.03.30 2002.01.30 2002.01.24 2003.11.26 2006.03.01 2003.04.16 2004.02.12 2003.05.01 2003.06.05 2003.11.27 2005.03.31 2005.06.09 2003.04.08 2005.04.19 2008.03.04 2009.03.03 2002.01.24 2002.01.24
US 6645715 B1	2003.11.11	AU 1999-21462 A1 CA 2227827-A1 CA 2318641-A1 EP 1049768 A1 WO 99-37752 A1	1999.08.09 1999.07.23 1999.07.29 2000.11.08 1999.07.29