

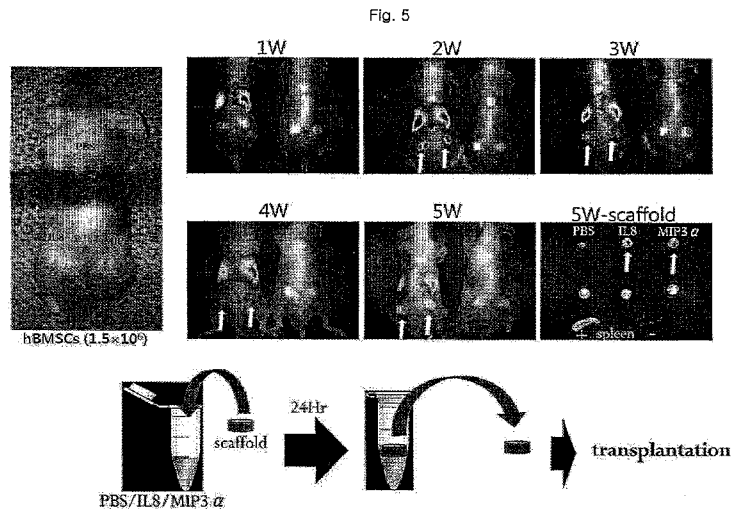


- (51) 국제특허분류:
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 11/08 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01) A61F 2/30 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/003732
- (22) 국제출원일: 2011년 5월 20일 (20.05.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0020221 2011년 3월 8일 (08.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교, 120-749 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 이진우 (LEE, Jin Woo) [KR/KR]; 경기도 고양시 일산동구 마두동 백마마을 삼성아파트 114-1302, 410-350 Gyeonggi-do (KR). 박민성 (PARK, Min Sung) [KR/KR]; 서울특별시 광진구 자양 4동 202-20 호, 143-301 Seoul (KR). 김윤희 (KIM, Yun Hee) [KR/KR]; 서울특별시 동작구 사당 4동 249-35, 156-094 Seoul (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301 호, 151-832 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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR INDUCING IN VIVO MIGRATION OF STEM CELL

(54) 발명의 명칭: 줄기세포의 인 비보 이동 유도방법



(57) Abstract: The present invention provides a method for inducing in vivo migration of a stem cell to a damaged joint region, the method comprising the steps of: (a) submerging a biodegradable scaffold in a solution having chemotactic factors; and (b) implanting the biodegradable scaffold to the damaged joint region. In addition, the present invention provides a method for treating a damaged joint including the step of implanting a biodegradable scaffold having interleukin (IL)-8, Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-3α, or derivatives thereof to a damaged joint cartilage, and provides an implantable composition for treating a damaged joint cartilage having the biodegradable scaffold including IL-8, MIP-3α, or derivatives thereof as an active ingredient. The present invention enables treatment of a damaged joint cartilage by implanting the biodegradable scaffold reacted with the chemotactic factors (for example, IL-8 or MIP-3α) to the damaged area (for example, joint cartilage), and inducing/promoting homing of a stem cell (desirably, a mesenchyme stem cell). Thus, the biodegradable scaffold of the present invention are applied to the treatment of a damaged joint cartilage more conveniently and effectively compared to the conventional technology.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 다음의 단계를 포함하는 손상된 관절 부위로 줄기세포의 인 비보 (in vivo) 이동 유도방법을 제공한다: (a) 화학주성인자(chemotactic factors)를 포함하는 용액에 생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)를 담그는 단계; 및 (b) 상기 생분해성 지지체를 손상된 관절 부위에 이식시키는 단계. 또한, 본 발명은 IL(interleukin)-8, MIP(Macrophage Inflammatory Protein)-3 α 또는 이의 유도체를 가진 생분해성 지지체를 손상된 관절(damaged joint or cartilage)에 이식하는 단계를 포함하는 손상된 관절 치료방법을 제공하고, IL-8, MIP-3 α 또는 이의 유도체를 가진 생분해성 지지체를 유효성분으로 포함하는 손상된 관절 치료용 이식 조성물(implantable compositions)을 제공한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 화학주성 인자(예컨대, IL-8 또는 MIP-3 α)와 반응시킨 생분해성 지지체를 손상된 위치(예컨대, 관절연골)에 이식하여 줄기세포(바람직하게는, 중간엽 줄기세포)의 호밍을 유도/촉진함으로써 손상된 관절연골을 치료할 수 있다. 따라서, 본 발명의 생분해성 지지체는 종래 기술과 비교하여 보다 간편하고 효율적으로 손상된 관절연골의 치료에 적용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

줄기세포의 인 비보 이동 유도방법

5 【기술 분야】

본 발명은 손상된 관절연골(damaged joint or cartilage)로 줄기세포의 인 비보(*in vivo*) 이동 유도방법 및 이를 이용한 치료용 이식 조성물에 관한 것이다.

10 【배경 기술】

관절연골은 단백다당과 제 2 형 교원질로 주로 구성된 무혈성 조직이며, 조직부피의 약 5%의 연골세포를 포함하고 있다[1]. 관절연골 손상시, 결손 부위로의 연골세포의 이동이 거의 일어나지 않으며 손상된 관절연골은 자발적인 치유가 일어나지 않는 단점이 있다[2]. 손상된
15 관절연골을 치료하기 위한 대표적인 생물학적 방법으로 자가연골세포이식법과 골수천공술 등이 있다. 자가연골세포 이식법은 자가연골세포를 배양하여 결손부위로 이식하는 방법으로써 비교적 좋은 결과를 보이나, 반복된 수술과 공여부의 제한성이 단점이다. 골수천공술은 연골결손부의 연골하골을 천공하여 골수와 함께 결손부위로
20 유입된 골수유래 중간엽 줄기세포(bone marrow-derived mesenchymal stem cell)를 이용하여 손상된 연골을 치료하는 방법이다. 이 방법은 비교적 간단하고 경제적이거나 결과가 일정하지 못하며 유입되는 중간엽 줄기세포의 수가 충분치 못할 경우 조직재생이 원활하지 못하다는 단점이 있다[3-7].

중간엽 줄기세포는 뼈, 연골, 지방세포로 분화할 수 있으며
25 연골세포에 비해 빠르게 증식하기 때문에 관절연골재생을 위해 중요한 세포원이며, 또한 기존 관절연골 치료법의 단점을 극복하기 위하여 중간엽 줄기세포를 주목하고 있다. 손상된 관절연골이 중간엽 줄기세포에 의해 재생되기 위해서는 충분한 수의 중간엽 줄기세포가 연골결손부위로 유입되고, 모여든 중간엽줄기세포가 관절연골기질에 부착하여 증식 및
30 연골세포로 분화하여 연골기질을 생성해야 한다. 자연치유과정에서 중간엽 줄기세포는 관절연골손상부위로 이동하여 연골세포로의 분화과정을

거치게 된다. 중간엽 줄기세포의 연골분화를 위해서는 모여든 중간엽 줄기세포의 응집과 세포-세포 및 세포-연골기질 간의 상호작용이 필수적이다[8].

중간엽 줄기세포의 연골분화에 있어서 세포주위 미세환경은 중요한 역할을 한다. 중간엽 줄기세포와 세포와 인접한 교원질의 상호작용이 간엽 줄기세포의 연골분화를 촉진시킨다[9, 10].

연골을 포함한 여러가지 손상된 조직의 치료를 위해서는 조직손상부 내로의 골수-유래 중간엽 줄기세포의 충분한 유입이 매우 중요하다[11-13]. 혈액 또는 골수내 순환하던 중간엽 줄기세포가 조직손상부로 모여드는 현상을 호밍(homing)이라고 하며, 간엽 줄기세포의 호밍은 여러 단계에 걸쳐 세포부착단백과 케모카인(chemokine)에 의해 이루어진다[14-17]. 케모카인(chemokine)은 약 8-10 kDa 의 작은 사이토카인이다. 현재까지, 약 50 여 가지의 케모카인이 알려졌으며, 다양한 세포들의 주화성을 유도하는 기능을 한다[18-20]. 케모카인은 G-단백 수용체의 일종인 케모카인 수용체(chemokine receptor)에 부착하여 세포주화성을 유도한다. 현재, 약 19 가지의 케모카인 수용체가 보고되었으며, 중간엽 줄기세포에서도 케모카인을 이용한 피부 등의 조직재생이 보고된 바 있다[21-23].

현재 사용되고 있는 관절 손상에 대한 치료법(예를 들어, 약물 치료법, 수술, 유전자 치료법, 등)은 관절연골 손상 부위에서 정상 관절연골로의 회복을 가져오지 못하고 있다. 이 외에도, 이식물의 물리적 특성을 고려하여 자가 또는 동종 간 골-연골조직을 이식하거나 재생에 필요한 충분한 수의 연골세포를 보충해주기 위하여 자가연골세포 이식술이 시행되고 있으며 다른 치료법에 비해 좋은 치료효과를 보이나 공여부 또는 공여자의 제한으로 실제 시행에 어려움이 많으며 환자에게는 치료비용이 많이 들고 2 회 이상의 수술을 받아야 하며 이식되는 세포의 기능이 현저히 떨어지는 단점들이 극복되지 못하는 실정이다.

최근에는 이러한 단점을 극복하고자 생분해성 합성 고분자에 세포를 도포한 복합체로 구성된 인공대체물이 활발히 연구되어 임상적용에 시도되는 단계이나 이 방법 또한 기존의 문제점을 극복하지 못하고 있다. 이처럼 손상된 관절연골조직의 재생을 위해 세포와 생체 재료의 접목

기술등의 다양한 치료방법이 개발되었으나, 세포와 생체재료 복합유도체는 임상적으로 적용하기에 제한적이고 아직 미흡하다.

따라서, 세포를 이용하되 그 성질을 최대한 유지하며 기존의 단점을 극복할 수 있는 치료방법의 개발이 절실한 상황이다.

5

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

10

【발명의 상세한 설명】

본 발명자들은 관절연골 치료를 위해 중간엽 줄기세포를 손상된 골 또는 연골부위로 효과적으로 유도할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 케모카인인 IL(interleukin)-8 및 MIP(Macrophage Inflammatory Protein)-3 α 가 손상된 관절 부위로 중간엽 줄기세포(바람직하게는, 골수-유래 중간엽 줄기세포)의 유입을 높은 효율로 촉진시키고 상기 케모카인을 포함하는 생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)를 손상된 부위에 이식시켜 간편하고 효과적으로 치료할 수 있다는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

15

따라서, 본 발명의 목적은 손상된 관절 부위로 줄기세포의 *인 비보*(*in vivo*) 이동 유도방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적은 손상된 관절 치료방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 손상된 관절(damaged joint or cartilage) 치료용 이식 조성물(implantable compositions)을 제공하는 데 있다.

20

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 손상된 관절 부위로 줄기세포의 *인 비보*(*in vivo*) 이동 유도방법을 제공한다: (a) 화학주성인자(chemotactic factors)를 포함하는 용액에

25

생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)를 담그는 단계; 및 (b) 상기 생분해성 지지체를 손상된 관절 부위에 이식시키는 단계.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 IL(interleukin)-8, MIP(Macrophage Inflammatory Protein)-3 α 또는 이의 유도체를 가진
 5 생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)를 손상된 관절(damaged joint or cartilage)에 이식하는 단계를 포함하는 손상된 관절 치료방법을 제공한다.

본 발명자들은 관절연골 치료를 위해 중간엽 줄기세포를 손상된 골
 10 또는 연골부위로 효과적으로 유도할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 케모카인인 IL-8 및 MIP-3 α 가 손상된 관절 부위로 중간엽 줄기세포(바람직하게는, 골수-유래 중간엽 줄기세포)의 유입을 높은 효율로 촉진시키고 상기 케모카인을 포함하는 생분해성 지지체를 손상된 부위에 이식시켜 간편하고 효과적으로 치료할 수 있다는 것을 발견하였다.

15 관절연골 손상(joint or cartilage injury)은 손상 부위로 연골세포의 이동이 거의 일어나지 않아 자발적으로 치유되지 않는다. 관절연골 손상의 치료법으로는 자가연골세포이식법 및 골수천공술 등이 있으나, 다음과 같은 단점이 있다: (a) 반복된 수술; (b) 공여부의 제한성; 및 (c) 충분한 중간엽 줄기세포의 유입의 어려움.

20 최근에는, 종래의 관절연골 손상 치료법의 단점을 극복하기 위해 중간엽 줄기세포를 연골 손상 치료원으로 주목하고 있다.

중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 골, 연골, 근육, 인대, 힘줄 및 지방 같은 중간엽 조직(mesenchymal tissues)으로 분화 및 재생할 수 있는 비조혈 기질세포(nonhematopoietic stromal cells)로, 여러
 25 조직에 존재한다. 예를 들어, MSCs 는 골수에 적은 수(예컨대, 10,000 개의 단핵세포 당 약 1 개)로 존재하는 것으로 알려져 있다. 또한, 비록 불멸화될 수 없을 지라도 MSCs 는 성장 및 다계통 분화능을 유지하면서 수십배로 배양되어 증식하는 능력을 가질 수 있다. 또한, 비록 MSC 가 손상된 조직으로 이동하는 것처럼 보일 지라도, 이들의 이동(trafficking)
 30 및 조직 호밍은 정확하게 이해되지 않는 과정이다. 예를 들어, 케모카인 및 이의 수용체들 중 CXCR4 는 조혈모 줄기세포 및 암세포 전이에 중요한

것으로 알려져 있지만(Zou YR, *et al.*, Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development, *Nature*, 393: 595-599(1998)), MSC *인 비트로* 이동 및 MSC *인 비보* 호밍에서 CXCR4 발현의 필요성은 평가되지 않았다. 또한, 여러 보고에서 손상된 조직으로

5 운반된 MSCs 가 회복을 유도할 수 있다는 것이 알려져 있지만, 제한된 MSCs 만이 복구된 조직으로 분화된다는 것이 증명되었다. 이러한 불일치는 다음과 같은 이유로 설명될 수 있다: (a) 복구된 조직에서 MSCs 의 분리의 기술적 어려움; (b) 치유 단계에서 에 주안점을 포함된 세포로의 MSC 분화 정도의 동정; (c) MSC 활성화 기작으로, 분화가 아닌 MSC 의 재생 유도 가능성.

10 상술한 바와 같이, 임상적으로 MSCs 를 적용하기 위한 수많은 연구들이 있었지만, MSCs 이 연골 손상 부위로 회귀(recruit)하여 생존함으로써 *인 비보* 치료 효능을 발휘하기 위한 효과적인 방법의 개발은 아직까지 불충분한 상태이다.

본 발명은 사람의 골수-유래 중간엽 줄기세포에서 발현하고 연골손상

15 *인 비트로* 조건(*in vitro* injury) 하에서 발현이 증가하는 케모카인 수용체를 선별하고, 이의 리간드를 포함하는 생분해성 지지체를 손상된 관절에 이식함으로써 중간엽 줄기세포의 호밍을 유도하여 관절 손상을 효과적으로 치료할 수 있다는 것을 보여준다(참고: 도 5).

본 발명은 손상된 관절 부위로 줄기세포의 *인 비보(in vivo)* 이동

20 유도방법을 제공한다.

(a) 화학주성인자(chemotactic factors)를 포함하는 용액에 생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)를 담그는 단계.

상기 화학주성인자는 조직으로부터 확산되는 세포의 매트릭스 분자들 및 분비된 단백질로, 예를 들어 TGF(transforming growth factor) 패밀리,

25 BMP(bone morphogenetic protein) 패밀리, CDMP(cartilage-derived morphogenetic proteins), FGF(fibroblast growth factor) 패밀리, CTGF(connective tissue growth factors), PDGF(platelet-derived growth factor) 패밀리, VEGF(vascular endothelial growth factor) 패밀리, 세포의 매트릭스 분자(예컨대, 오스테오펀틴, 파이브로넥틴, 히알루론산,

30 헤파린, 트롬보스폰딘, 콜라겐, 비트로넥틴, 등) 및 케모카인을 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 화학주성인자는 케모카인을 포함한다.

케모카인은 혈액 줄기세포의 조혈기능 및 백혈구의 화학주성(chemotaxis) 같은 다양한 과정들에서 중요한 생리학적 기능을 하는 단백질(5-20 kDa)이다. 본 명세서의 용어 “화학주성(chemotaxis)”은 화학적 자극들에 의해 유도되는 이동성 세포의 양성(즉, 자극을 향하는 방향) 또는 음성(즉, 자극으로부터 멀어지는 방향) 이동을 의미하며, 세포막이 상응하는 화학주성인자(chemotactic substances; 케모카인)에 의해 활성화되고, 이는 상응하는 세포 표면 수용체(케모카인 수용체)에 의해 매개된다.

모든 케모카인의 아미노산 서열은 유사하고 4 개의 시스테인의 연속적인 배열에 의해 특징화될 수 있다. 케모카인 패밀리는 4 개의 서브패밀리로 구분된다: (a) CCL; (b) CXCL; (c) CX3CL; 및 (d) XCL(Murphy, *et al.*, International union of pharmacology, XXII, Nomenclature of chemokine receptors, *Pharmacol Rev*, 52: 145-176(2000)).

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용될 수 있는 케모카인은 CCL20(MIP-3 α), CCL19, CCL21, CCL27, CCL28, CXCL8(IL-8), CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12(SDF-1), CXCL16, CXCL13, CXCL5, CXCL6, CCL2(MCP-1), CCL8, CCL13, CCL25, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23, CX3CL1, XCL1, XCL2, CCL1, CCL17, CCL22, CCL11, CCL24, CCL26, CXCL1, CXCL2, CXCL3 및 CXCL7 을 포함하고, 보다 바람직하게는 CCL20, CCL19, CCL21, CCL27, CCL28, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL16, CXCL13, CXCL5, CXCL6, CCL2, CCL8, CCL13 및 CCL25 를 포함하며, 보다 더 바람직하게는 CCL20, CXCL8, CCL2 및 CXCL12 를 포함하고, 가장 바람직하게는 CCL20 및 CXCL8 을 포함한다.

상기 CCL20 및 CXCL8 의 아미노산 서열은 각각 서열목록 제 1 서열 및 서열목록 제 2 서열에 기재되어 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 케모카인의 농도는 생분해성 지지체(1 g) 당 10-1,000 ng/ml 이며, 보다 바람직하게는 생분해성 지지체(1 g) 당 20-800 ng/ml 이고, 보다 더

바람직하게는 생분해성 지지체(1 g) 당 35-700 ng/ml 이며, 가장 바람직하게는 생분해성 지지체(1 g) 당 50-500 ng/ml 이다.

본 명세서의 용어 “생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)” 는 상기 화학주성인자를 함유한 생분해성 폴리머로 이루어진 3 차원 구조체를 의미하고, 이식을 통해 타겟 위치(예컨대, 손상된 관절연골)로 줄기세포, 바람직하게는 중간엽 줄기세포의 이동을 유도하는 지지체로서 기능한다. 바람직하게는, 본 발명의 생분해성 지지체는 생체적합성 물질로, 일반적으로 다공성 미세 지지체를 형성하여 이동하는 세포를 위한 물리적 지지체를 제공하며, 보다 바람직하게는 이식된 위치로 줄기세포(바람직하게는, 중간엽 줄기세포)의 유입을 위해 제공된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용될 수 있는 생분해성 지지체는 생체 내에서 분해될 수 있는 조건 하에서 어떠한 크기, 형태 또는 조성물로도 이용될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용될 수 있는 생분해성 지지체는 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), PLA(poly(lactic acid)), PGA(polyglycolic acid), PCL(poly-ε-caprolactone), PAA(poly(amino acid)), 폴리안하이드라이드, 폴리오소에스테르, 이의 유도체, 공중합체 및 혼합물, 콜라겐 젤, 폴리비닐 알코올 스폰지, 폴리스카라이드(예를 들어, 알기네이트), 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트 및 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌 글라콜 블랏 공중합체를 포함하고, 보다 바람직하게는 PLGA, PLA, PGA, PCL, PAA, 폴리안하이드라이드, 폴리오소에스테르 및 이의 유도체, 공중합체 및 혼합물을 포함하며, 가장 바람직하게는 PLGA 이다.

25 (b) 상기 생분해성 지지체를 손상된 관절 부위로 이식시키는 단계.

본 발명의 생분해성 지지체는 화학주성을 가지며, 이로 인해 줄기세포(바람직하게는, 중간엽 줄기세포)의 호밍을 촉진시킨다. 유입된 줄기세포는 손상된 타겟 부위에서 재생 효능을 발휘한다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 생분해성 지지체의 이식은 이동된 세포수를 현저하게 증가시켰으며(참고: 도 2b), 이동 거리 및 이동 속도(도 2c)도 뚜렷하게 증가시켰다. 또한, 상기 이식은 세포이동 만을

증가시켰을 뿐 세포분화 상에 어떠한 영향도 주지 않았다(도 3). 이는 본 발명의 생분해성 지지체가 손상된 관절연골 재생을 위해 필요한 자가 중간엽 줄기세포의 유입만을 촉진시킨다는 것을 의미한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 생분해성 지지체가 이식될 수 있는 관절 부위는 무릎, 엉덩이, 어깨, 발목, 손목, 팔꿈치, 족근골, 척골, 척추골, 손목뼈, 장골 및 턱관절을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 생분해성 지지체의 이식은 손상된 관절 부위로 줄기세포의 세포 이동능을 증대시킨다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 유입이 유도된 줄기세포는 자가(autologous) 줄기세포 또는 비자가(non-autologous) 줄기세포를 포함하고, 보다 바람직하게는 자가 줄기세포이고, 보다 바람직하게는 자가 중간엽 줄기세포이며, 가장 바람직하게는 골수-유래 중간엽 줄기세포이다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 IL(interleukin)-8, MIP(Macrophage Inflammatory Protein)-3 α 또는 이의 유도체를 가진 생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)를 유효성분으로 포함하는 손상된 관절(damaged joint or cartilage) 치료용 이식 조성물(implantable compositions)을 제공한다.

본 발명의 조성물은 유효성분으로써 상술한 본 발명의 생분해성 지지체를 포함하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 생분해성 지지체는 살아있는 포유동물에 이식될 수 있으며, 보다 바람직하게는 손상된 관절 부위(예컨대, 관절연골)에 이식될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 포유동물은 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 포유동물이고, 보다 바람직하게는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 및 고양이를 포함하며, 보다 더 바람직하게는 인간 및 마우스를 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 손상된 관절연골 부위는 유리질연골(hyaline cartilage; 예를 들어, 관절, 코, 후두 또는 흉골에 있는 유리질 연골), 탄성연골(elastic cartilage; 예를 들어 귀에 있는 탄성연골) 및 섬유연골(fibrocartilage; 예를 들어, 추간판)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 의해 치료될 수 있는 관절연골 질환은 골관절염 및 류마티스 관절염을 포함하는 관절염, 골다공증, 골연골증, 골연골염, 불완전 골형성증, 골수염, 골증식체, 연골형성부전증, 연골염, 연골종, 연골육종, 추간판 탈출증, 클리펠-파일 증후군, 변형성 골염, 낭성 섬유뼈염, 및 사고, 골절, 상처, 관절 손상, 자가면역질환, 당뇨병 및 암으로 인한 조직 손상과 연관된 관절연골 질환을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 조성물은 (a) 상술한 생분해성 지지체의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물로도 제공될 수 있다.

본 명세서에서 용어 “약제학적 유효량”은 상술한 생분해성 지지체의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 손상된 부위에 직접적으로 투여하며, 예를 들어 피하 주입, 근육 주입, 경피 투여, 관절강내 주사, 등으로 투여할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 손상된 관절연골(damaged joint or cartilage)로 줄기세포의 *인 비보(in vivo)* 이동 유도방법 및 이를 이용한 치료용 이식 조성물에 관한 것이다.

(b) 본 발명에 따르면, 본 발명의 화학주성인자(예컨대, IL-8 또는 MIP-3 α)와 반응시킨 생분해성 지지체를 손상된 위치(예컨대, 관절연골)에 이식하여 줄기세포(바람직하게는, 중간엽 줄기세포)의 호밍을 유도/촉진함으로써 손상된 관절연골을 치료할 수 있다.

(c) 따라서, 본 발명의 생분해성 지지체는 종래 기술과 비교하여 보다 간편하고 효율적으로 손상된 관절연골의 치료에 적용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 친염증성 사이토카인에 의해 자극된 인간 골수-유래 중간엽줄기세포에서 케모카인 수용체들의 변화된 유전자 발현을 나타내는 결과이다. A: RT-PCR; B: 역반점-탁본(reverse dot-blot). 대조군, 정상 중간엽 줄기세포군; IL-4h, 4 시간 동안 IL-1 β -자극된 군; IL-24h, 24 시간 동안 IL-1 β -자극된 군; IL-48h, 48 시간 동안 IL-1 β -자극된 군; TNF-4h,

4 시간 동안 TNF- α -자극된 군; TNF-24h, 24 시간 동안 TNF- α -자극된 군; 및 TNF-48h, 48 시간 동안 TNF- α -자극된 군.

도 2 는 세포 증식 및 이동에서 케모카인(chemokines)의 효과를 나타내는 결과이다. 도 2a 는 세포 증식(cell proliferation)을 보여주는 결과이며, 도 2b 는 상처 치유 효과를 나타내는 결과이고, 도 2c 는 이동능(migratory capacity)을 나타내는 결과이다.

도 3 는 세포 분화 상에 케모카인의 효과를 나타내는 결과이다. 도 3a 의 위쪽 패널은 마스 트라이콤(Masson trichrome) 염색 결과를 보여주며, 아래쪽 패널은 연골 표지 유전자의 발현을 조사한 결과이다. 도 3b 는 폰 코사(Von kossa) 염색 결과를 보여주는 결과이다. 약어: N.C, 음성대조군; 및 P.C., 양성대조군.

도 4 은 bMSCs 의 인 비트로 화학주성을 보여주는 결과이다.

도 5 는 bMSCs 의 인 비보 화학주성을 보여주는 결과이다. 위쪽 패널은 동물실험 결과를 나타내며(W, 주), 아래쪽 패널은 케모카인을 함유한 PLGA 지지체 이식 모식도를 나타낸다.

도 6 는 bMSCs 의 인 비보 화학주성관찰 후 육안관찰(A) 및 병리학적 소견(B)을 보여주는 결과이다.

【실시예】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

25

실시예

대상 및 방법

세포배양

사람의 골수유래 중간엽 줄기세포는 자가장골 이식술이 필요한 환자의 동의 하에 IRB 심의를 거쳐 후 장골능(posterior iliac crest)에서 골수를 흡인하고 원심 분리를 하여 골수 내 세포를 침전시켜 펠렛을 만들고,

30

상층액을 제거한 후 DMEM-LG(Dulbecco's modified eagle's medium-low glucose; GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) 배양액에 10%(v/v) 우태아혈청(FBS, fetal bovine serum; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), 100 units/ml 의 페니실린 G(GIBCO) 및 0.1 mg/ml 스트렙토마이신(GIBCO)이

5 첨가된 기본 배양액으로 세척한 후 T-75 cm² 세포 배양 플라스크(Falcon, Germany)에 분주시켰으며, 4 일 동안 배양하였다. 이후, 플라스크 바닥에 부착되지 않은 세포들은 제거하였고, 바닥에 부착된 중간엽 줄기세포는 3 일 간격으로 배양액을 교환하여 플라스크에 약 90% 정도 차게 되면 계대 배양을 시행하였다. 분리된 골수 유래 중간엽 줄기세포는 2 또는 3 계대

10 배양까지 세포를 증식시켰으며, 모든 실험은 2 또는 3 계대의 세포를 사용하였다.

체외 연골손상 조건 형성

체외 연골손상 조건은 전염증성사이토카인인 IL-1 β (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) 또는 TNF- α (R&D Systems Inc.)를

15 처리함으로써 조성하였다. 중간엽 줄기세포를 12 시간 동안 우태아혈청이 포함되지 않은 DMEM-LG 배양액에서 배양한 후, 10 ng/ml 의 농도로 IL-1 β 또는 TNF- α 를 배양액에 첨가하여 4, 24, 48 시간동안 세포를 배양한 후 실험에 사용하였다.

20

역전사-중합효소 연쇄반응기법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

정상 중간엽 줄기세포에서 발현하는 케모카인 수용체를 선별하기 위해 RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 중간엽

25 줄기세포의 총 RNA 를 추출하여, 역전사-중합효소 연쇄반응기법을 통해 케모카인 수용체의 유전자 발현을 분석하였다. 분석한 케모카인 수용체는 CCR1-10, CXCR1-7, CX3CR, XCR1 로써 총 19 개이다(표 1). 증폭된 케모카인 수용체의 DNA 는 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)를 이용한 DNA 염기서열분석법기법을 이용하여 서로

30 중복된 서열이 없음을 확인하였다.

【표 1】

RT-PCR 에 이용된 프라이머 서열

유전자	크기(BPs)	서열(5' → 3')	
CCR1	560	정방향	AGGTTCTGACTCTTGGCACA
		역방향	TCTCGTTAGGTCTCAACTCT
CCR2	580	정방향	CCAAACTACCTTCCAGTTCC
		역방향	AGCTTCTCCACCTTCCATTC
CCR3	699	정방향	CCTAGTGAGAAGCTGGAAG
		역방향	CCTCTGCAATGTCAGATTGG
CCR4	501	정방향	CTTGCACCAAAGAAGGCATC
		역방향	GGAGTTGAGAGAGTACTTGG
CCR5	550	정방향	TTCTATGAGGCAACCACAGG
		역방향	TTCCCTCACCTTACCTGTAC
CCR6	540	정방향	CTCCGATCCAGAACACTACC
		역방향	CCACAGGTCCTTCAAGATCT
CCR7	548	정방향	CAAGAGGCTCAAGACCATGA
		역방향	ACCACAGCGATGATCACCTT
CCR8	560	정방향	AGTTCAGCATGAAGGATGCC
		역방향	TGAGGCATTGTGTTTGATGG
CCR9	580	정방향	TGACATCTGCTTCCAGGTCA
		역방향	CTGAAGCCACAGAAGTTCAC
CCR10	489	정방향	TCTTCCTGGCCTGTATCAGC
		역방향	AGTGCGACATCCTTGCGTTT
CXCR1	520	정방향	GACCAACATCGCAGACACAT
		역방향	GTGAGCTCACATAGCTTGAG
CXCR2	520	정방향	GTTCCCTCCCTTCTCTTCACA
		역방향	CTGAGACAGAGTCTCACTGT
CXCR3	528	정방향	CCAGACTTCATCTTCCTGTC
		역방향	AGGTCTCAGACCAGGATGAA
CXCR4	517	정방향	ACACAGTCAACCTCTACAGC

		역방향	CTCGGTGATGGAAATCCACT
CXCR5	490	정방향	GAAACGCATGCCTGGTTCAC
		역방향	ACCTAGAACGTGGTGAGAGA
CXCR6	518	정방향	TTCTTCTTGCCACTGCTCAC
		역방향	AAACAAAGCCTGCCTCACCA
CXCR7	516	정방향	AACTTCTCGGACATCAGCTG
		역방향	GGTCTTCAGGTAGTAGGTGT
CX3CR	539	정방향	GATCTGCTGTTTGTAGCCAC
		역방향	CATAGAGCTTAAGCGTCTCC
XCR	550	정방향	GAGTCCCTCACCAACATCTT
		역방향	ACAGGGTGAAGTTGTAGGGA
GAPDH	444	정방향	ATCACTGCCACCCAGAAGAC
		역방향	ATGAGTCCACCACCCTGTT

역반점-탁본 부합법(Reverse Dot-Blot Hybridization)

IL-1 β 또는 TNF- α 에 의해 발현이 증가하는 케모카인 수용체를 선별하기 위해 역전사-중합효소 연쇄반응기법을 이용하여 19 개의 케모카인

5 수용체의 DNA 를 합성하여 시료 DNA 로 사용하였고, 4, 24 또는 48 시간 동안 IL-1 β 또는 TNF- α 의 자극을 받은 중간엽 줄기세포의 cDNA 를 Omniscript RT Kit(Qiagen)를 이용하여 합성하여 프로브 cDNA 로 사용하였다. 케모카인 수용체의 DNA 를 나일론 막(Amersham, GE healthcare, UK)에

10 뚫팅(dotting)하여 자외선(1200 $\times$ 100 μ jules)을 조사하여 고정하였고, 전염증성사이토카인의 자극을 받은 중간엽 줄기세포의 cDNA 를 Rediprime II random prime labeling system(GE Healthcare UK Limited, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)과 γ ³²P-dCTP(NEN Life Sciences, Boston, USA)를 이용하여 표지하였다. 막에 고정된 케모카인 수용체의

15 DNA 와 표지된 중간엽 줄기세포의 cDNA 는 42 $^{\circ}$ C에서 15 시간 동안 혼성화하였다. 막을 세척한 후, 형광 이미지 분석기(FLA-7000, Fujifilm, Japan)로 시그널을 검출하여 밀도계측기(TINA pixel analyzer version 2.10, Raytest Isotopen megerate GmbH, Straubenhardt, Germany)를 이용하여

정량화하였다. 정량화된 결과값은 쌍 t-검정(paired t-tests)을 이용하여 통계학적 유의성을 검증하였다(P 값 < 0.05).

세포증식에 대한 영향

- 5 세포증식에 대한 영향을 확인하기 위해 MSC 에 50-500 ng/ml 의 케모카인이 처리되어 1 일부터 4 일 동안 배양하였다. 케모카인 자극 후 각 날짜별로 MTT 법을 이용하여 세포증식률을 측정하였다.

세포분화에 대한 영향

- 10 연골아세포로의 분화 유도를 위해 10 ng/ml TGF- β 3(R & D system Inc, Minneapolis, MN, USA) 및 30 μ g/ml 아스코르빈산(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)이 첨가된 기본 배양액[10% 우태아 혈청(GIBCO), 1% 항생제(antibiotic-antimycotic) 용액(GIBCO)이 함유된 DMEM-LG(GIBCO)]에서 14 일 동안 연골 분화를 유도하였으며, TGF- β 3 를 처리
- 15 하지 않은 중간엽 줄기 세포와 비교하여 연골 분화 상태를 검사하였다. 골아세포로의 분화 유도를 위해 골아세포 분화 배양액[10 mM β -glycerophosphate(Sigma), 100 μ M dexamethasone(Sigma), 50 μ g/ml ascorbic acid-2-phosphate(Sigma)가 첨가된 기본배양액]에서 14 일 동안 분화유도 후 기본배양액에서 배양한 중간엽줄기세포와 비교하였다.

20

상처 치유 및 실시간 세포이동 속도의 측정

- 상처 형성을 위해 실리콘 배양 삽입(silicon culture insert; IBIDI, Germany)를 이용하여 MSC 를 배양한 후, 세포에 500 ng/mL 의 케모카인 자극을 가하여 상처 치유 정도를 이동한 세포수를 세어 분석하였고,
- 25 이동하는 세포를 실시간 추적하여 이동거리 및 속도를 측정하였다.

세포 화학주성 확인

- 인 비트로 세포 화학주성은 8 μ m-구멍 크기의 트랜스웰 인서트(Falcon, Germany)를 이용하여 세포를 배양한 후, 마이크로포어를
- 30 통과하여 케모카인을 향해 이동한 세포를 카운팅하여 평가하였다. 인 비트로 세포 화학주성은 형광표지된 1.5×10^6 개의 MSC 가 꼬리 혈관에

주입되어 누드마우스 피하에 이식된 케모카인 (IL-8, MIP-3a)을 함유한 PLGA 지지체(한국과학기술연구원 바이오소재센터 김수현 박사로부터 제공받음)를 향해 이동함을 실시간 촬영장비(Optix, ART 사, USA)로 관찰하였다.

5

실험결과

중간엽 줄기세포에서 발현하는 케모카인 수용체

역전사-중합효소 연쇄반응기법을 수행하기 위해 제작한 사람의 케모카인 수용체에 대한 프라이머 서열은 다음과 같다(표 1). 표 1의
10 프라이머에 의해 증폭된 유전자의 염기서열은 DNA 염기서열분석법을 통해 다른 케모카인 수용체의 서열과 서로 중복되지 않음을 확인하였다(결과를 보이지 않음). RT-PCR 을 통해 사람의 골수 유래 정상 중간엽 줄기세포에서 19 개의 케모카인 수용체의 발현을 분석하였다(도 1). 세 명 이상의 공여자(donor)로부터 얻은 중간엽 줄기세포에서 케모카인 수용체의
15 발현을 분석한 결과, CCR2, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR5 및 CXCR7 이 세 명 이상의 중간엽 줄기세포에서 공통적으로 발현하였다.

관절연골 손상시 골수 유래 중간엽 줄기세포에서 발현이 증가하는 케모카인 수용체

관절연골이 손상되면 전염증성사이토카인들(IL-1 β 또는 TNF- α)이
20 분비되고 이에 자극받은 연골세포 등에 의해 다양한 화학주성인자의 분비가 증가한다[23]. 따라서, 관절연골 손상모델에서 중간엽 줄기세포에서 발현하는 케모카인 수용체 중에서 어떤 수용체가 증가하는지 알아보기 위하여 역반점-탁본 부합법을 이용하여 세 명의 공여자로부터 얻은 중간엽
25 줄기세포에서 4, 24 및 48 시간째에 IL-1 β 또는 TNF- α 의 자극에 의해 증가하는 케모카인 수용체를 분석하였다. 본 논문에서는 대표 공여자 1 인에 대한 결과만을 보였으나 반복실험을 통해 세 명의 공여자로부터 유래한 중간엽 줄기세포에서 케모카인 수용체의 발현 양상이 모두 유사함을 확인하였다(도 2). 역반점-탁본 부합법의 결과를 각 공여자의 중간엽
30 줄기세포에 대한 결과를 밀도계측기(densitometry)(TINA Pixel Analyzer version 2.10 (Raytest Isotopenmegeerate GmbH, Straubenhardt, Germany)를

이용하여 정량하여 2 배 이상(fold change ≥ 2) 증가한 수용체를 자극시간에 따라 정리한 결과, 각 공여자의 중간엽 줄기세포에서 세 명의 공여자의 중간엽 줄기세포에서 공통으로 전염증성사이토카인에 의해 2 배 이상 증가하는 케모카인 수용체를 정리하면, CCR2, CCR4, CCR6, CXCR1, CXCR2, CXCR3 등이 세 명의 공여자의 중간엽 줄기세포에서 공통으로 발현이 증가하였으며 이 외의 수용체들은 발현 증가율이 통계적으로 유의하지 않았다.

상술한 결과들을 종합하면, CCR2, CCR4, CCR6, CXCR1 등의 수용체들이 정상 중간엽 줄기세포에서 유의하게 발현하고, 전염증성사이토카인에 의해 그 발현이 세 공여자의 중간엽 줄기세포에서 유의하게 증가하였다(2 배 이상).

세포이동에 대한 영향

선별된 후보물질들의 세포이동에 대한 영향을 평가하기 위해 상처 치유 기법을 실시하였다. 기존 보고된 바에 의하면, SDF1 은 CXCR4 와 CXCR7 을 통하여 중간엽 줄기세포의 화학주성을 유도하는 것으로 알려져 있다[17]. 따라서, 본 연구에서 선별된 후보인자와 SDF1 을 함께 비교하였다. 먼저, 상처 치유 효과가 세포증식이 아님을 확인하기 위해 세포증식에 대한 영향을 살펴본 결과, 50, 100 또는 500 ng/ml 의 농도에서 세포 독성 및 세포증식에 대해 아무런 영향을 주지 않았다(도 2a). 네 가지 후보물질들 중 IL-8 과 MIP-3a 가 가장 빠른 상처 치유 결과를 보였으며 다양한 농도 중에서 500 ng/ml 의 농도에서 가장 좋은 결과를 확인하였다(도 2b). 다음으로, 움직이는 세포를 실시간으로 추적하여 세포의 이동거리 및 속도를 측정하였다. MIP-3a 가 가장 빠른 속도로 가장 많은 거리를 세포를 움직이는 것으로 확인되었다(도 2c).

세포분화에 대한 영향

14 일 동안의 중간엽 줄기세포의 골, 연골 분화유도 동안 후보인자에 의한 영향을 살펴본 결과 분화에 대해 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다(도 3). 따라서, 본 연구에서 발굴된 케모카인은 손상된

관절연골 재생을 위해 필요한 자가 중간엽 줄기세포의 유입을 촉진하는 것으로 사료된다.

화학주성 평가

5 인 비트로 및 인 비보에서 선별된 후보물질들의 중간엽 줄기세포에 대한 화학주성을 평가하였다. 먼저, 트랜스웰 인서트를 이용한 인 비트로 실험에서 TNF α 를 향한 세포화학주성이 관찰되었다(도 4a). 한편, 선별된 네 가지 후보물질들 중 IL-8 과 MIP-3 α 가 인 비트로에서 세포화학주성을 가장 많이 유도하였다(도 4b). 따라서, IL-8 과 MIP-3 α 에 의해 유도된
10 세포화학주성을 인 비보에서도 확인하고자 하였다. PLGA 지지체를 PBS 또는 IL-8 및 MIP-3 α 에 각각 24 시간 동안 담근 후 누드마우스 등의 피하에 이식한 후, 꼬리 혈관을 통해 주입된 중간엽 줄기세포의 이동을 세포에 표지된 형광을 이용하여 확인하였다. 약 2 주째 주입된 중간엽 줄기세포가 IL-8 및 MIP-3 α 에서 확인되었으며 6 주째까지 세포의 이동이 증가하여
15 관찰되었다(도 5).

육안 관찰 및 병리학적 소견

지지체와 함께 이식된 화학주성인자에 의한 염증세포의 유입 정도를 살피고 염증반응을 확인하기 위해 6 주 짜에 이식된 지지체를 회수하여 육안
20 관찰 및 H&E 염색법을 실시하였다. 육안 관찰 결과, PBS 군에 비해 IL8 및 MIP3 α 군의 지지체는 이식된 부위의 주변조직과 융합이 잘 되어있고 혈관형성이 많았다(도 6a). H&E 염색결과, PBS 군은 이식된 지지체의 가장자리 부위에만 일부 혈관형성이 되었고 그 주변에 동공(pore)를 따라 다양한 세포들이 침투하였으나, IL8 또는 MIP3 α 군에서 혈관이 지지체의
25 중앙 부위까지 많이 형성되어 있었고 주입된 사람의 중간엽 줄기세포가 지지체 중앙부위까지 침투하여 세포외 기질을 형성하였다. PBS, IL8, MIP3 α 군 모두 대식세포 등을 비롯한 염증성 세포가 혈관주변에서 일부 관찰은 되었으나 군간의 차이가 없었으며 세 군 모두 염증반응소견을 확인할 수 없었다(도 6b).

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의
5 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참고문헌

1. Hunter W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. Philos Trans R Soc Lond 1995;42b:514-21.
- 10 2. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. Arthritis Rheum 1998;41:1331-42.
3. Pridie K. A method of resurfacing osteoarthritis knee joints. J Bone Joint Surg Br 1959; 41: 618-9.
4. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. The microfracture
15 technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. Orthopade 1999;28:26-32
5. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 1994;331:889-95.
- 20 6. Pelttari K, Lorenz H, Boeuf S, Templin MF, Bischoff O, Goetzke K, et al. Secretion of matrix metalloproteinase 3 by expanded articular chondrocytes as a predictor of ectopic cartilage formation capacity in vivo. Arthritis Rheum 2008;58:467-74.
7. Kessler MW, Ackerman G, Dines JS, Grande D. Emerging technologies
25 and fourth generation issues in cartilage repair. Sports Med Arthrosc 2008;16:246-54.
8. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. Osteoarthritis Cartilage 2000;8:309-34.
9. Dickhut A, Gottwald E, Steck E, Heisel C, Richter W. Chondrogenesis
30 of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials in vitro and in vivo. Front Biosci 2008;13:4517-28.

10. Steck E, Fischer J, Lorenz H, Gotterbarm T, Jung M, Richter W. Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage. *Stem Cells Dev* 2009;18:969-78.
- 5 11. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *ExpNeurol* 2002;174:11-20.
12. Jin HK, Carter JE, Huntley GW, Schuchman EH. Intracerebral
10 transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J Clin Invest* 2002;109:1183-91.
13. Turgeman G, Pittman DD, Muller R, Kurkalli BG, Zhou S, Pelled G, et al. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for
15 skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med* 2001;3:240-51.
14. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005;106:1901-10.
15. Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, vonAndrian UH, Wagner DD. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote
20 hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *ProcNatlAcadSci USA* 1998;95:14423-8.
16. Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B, Zafiropoulos V, Scott LM. Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of a(4)b(1) over b(2)-integrins and selectins. *Blood* 2001;98:2403-11.
- 25 17. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m (null) mice. *Leukemia* 2002;16:1992-2003.
18. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*
30 2001;250:91-104.

19. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-45.
20. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90:909-28.
21. Richard H. Chemokine receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*
5 2001;12:313-35.
22. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Hérault O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 2007;25:1737-45.
- 10 23. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 2008;15:2581-7.

【청구의 범위】

【청구항 1】

다음의 단계를 포함하는 손상된 관절 부위로 줄기세포의 *인 비보*(*in vivo*) 이동 유도방법:

- 5 (a) 화학주성인자(chemotactic factors)를 포함하는 용액에 생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)를 담그는 단계; 및
- (b) 상기 생분해성 지지체를 손상된 관절 부위에 이식시키는 단계.

【청구항 2】

- 10 제 1 항에 있어서, 상기 화학주성인자는 IL(interleukin)-8, MIP(Macrophage Inflammatory Protein)-3 α 또는 이의 유도체인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

- 15 제 1 항에 있어서, 상기 생분해성 지지체는 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), PLA(polylactic acid), PGA(polyglycolic acid), PCL(poly- ϵ -caprolactone), PAA(poly(amino acid)), 폴리안하이드라이드, 폴리오소에스테르 또는 이의 유도체, 공중합체 및 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

20

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 손상된 관절은 무릎, 엉덩이, 어깨, 발목, 손목, 팔꿈치, 족근골, 척골, 척추골, 손목뼈, 장골 또는 턱관절인 것을 특징으로 하는 방법.

25

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 이식은 손상된 관절 부위로 줄기세포의 세포 이동능을 증대시키는 것을 특징으로 하는 방법.

30

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 자가(autologous) 줄기세포 또는 비자가(non-autologous) 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

5 제 6 항에 있어서, 상기 줄기세포는 자가 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

10 제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

15 제 1 항에 있어서, 상기 방법은 포유동물에 적용될 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

20 제 9 항에 있어서, 상기 포유동물은 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

25 IL(interleukin)-8, MIP(Macrophage Inflammatory Protein)-3 α 또는 이의 유도체를 가진 생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)를 손상된 관절(damaged joint or cartilage)에 이식하는 단계를 포함하는 손상된 관절 치료방법.

【청구항 12】

30 제 11 항에 있어서, 상기 생분해성 지지체는 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), PLA(polylactic acid), PGA(polyglycolic acid), PCL(poly- ϵ -caprolactone), PAA(poly(amino acid)), 폴리안하이드라이드,

폴리오소에스테르 또는 이의 유도체, 공중합체 및 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 치료방법.

【청구항 13】

5 제 11 항에 있어서, 상기 손상된 관절은 무릎, 엉덩이, 어깨, 발목, 손목, 팔꿈치, 족근골, 척골, 척추골, 손목뼈, 장골 또는 턱관절인 것을 특징으로 하는 치료방법.

【청구항 14】

10 제 11 항에 있어서, 상기 방법은 이식 부위로 줄기세포의 세포 이동능을 증대시키는 것을 특징으로 하는 치료방법.

【청구항 15】

15 제 14 항에 있어서, 상기 줄기세포는 자가(autologous) 줄기세포 또는 비자가(non-autologous) 줄기세포인 것을 특징으로 하는 치료방법.

【청구항 16】

20 제 15 항에 있어서, 상기 줄기세포는 자가 줄기세포인 것을 특징으로 하는 치료방법.

【청구항 17】

제 14 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 치료방법.

【청구항 18】

25 제 11 항에 있어서, 상기 방법은 포유동물에 적용될 수 있는 것을 특징으로 하는 치료방법.

【청구항 19】

제 18 항에 있어서, 상기 포유동물은 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이를 포함하는 것을 특징으로 하는 치료방법.

5 【청구항 20】

IL(interleukin)-8, MIP(Macrophage Inflammatory Protein)-3 α 또는 이의 유도체를 가진 생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)를 유효성분으로 포함하는 손상된 관절(damaged joint or cartilage) 치료용 이식 조성물(implantable composition).

10

【청구항 21】

제 20 항에 있어서, 상기 생분해성 지지체는 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), PLA(polylactic acid), PGA(polyglycolic acid), PCL(poly- ϵ -caprolactone), PAA(poly(amino acid)), 폴리안하이드라이드, 폴리오소에스테르 또는 이의 유도체, 공중합체 및 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

15

【청구항 22】

제 20 항에 있어서, 상기 손상된 관절은 무릎, 엉덩이, 어깨, 발목, 손목, 팔꿈치, 족근골, 척골, 척추골, 손목뼈, 장골 또는 척관절인 것을 특징으로 하는 조성물.

20

【청구항 23】

제 20 항에 있어서, 상기 조성물은 이식 부위로 줄기세포의 세포 이동능을 증대시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

25

【청구항 24】

제 23 항에 있어서, 상기 줄기세포는 자가(autologous) 줄기세포 또는 비자가(non-autologous) 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

30

【청구항 25】

제 24 항에 있어서, 상기 줄기세포는 자가 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 26】

5 제 23 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 27】

10 제 20 항에 있어서, 상기 조성물은 포유동물에 적용될 수 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 28】

15 제 27 항에 있어서, 상기 포유동물은 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

1/11

Fig. 1

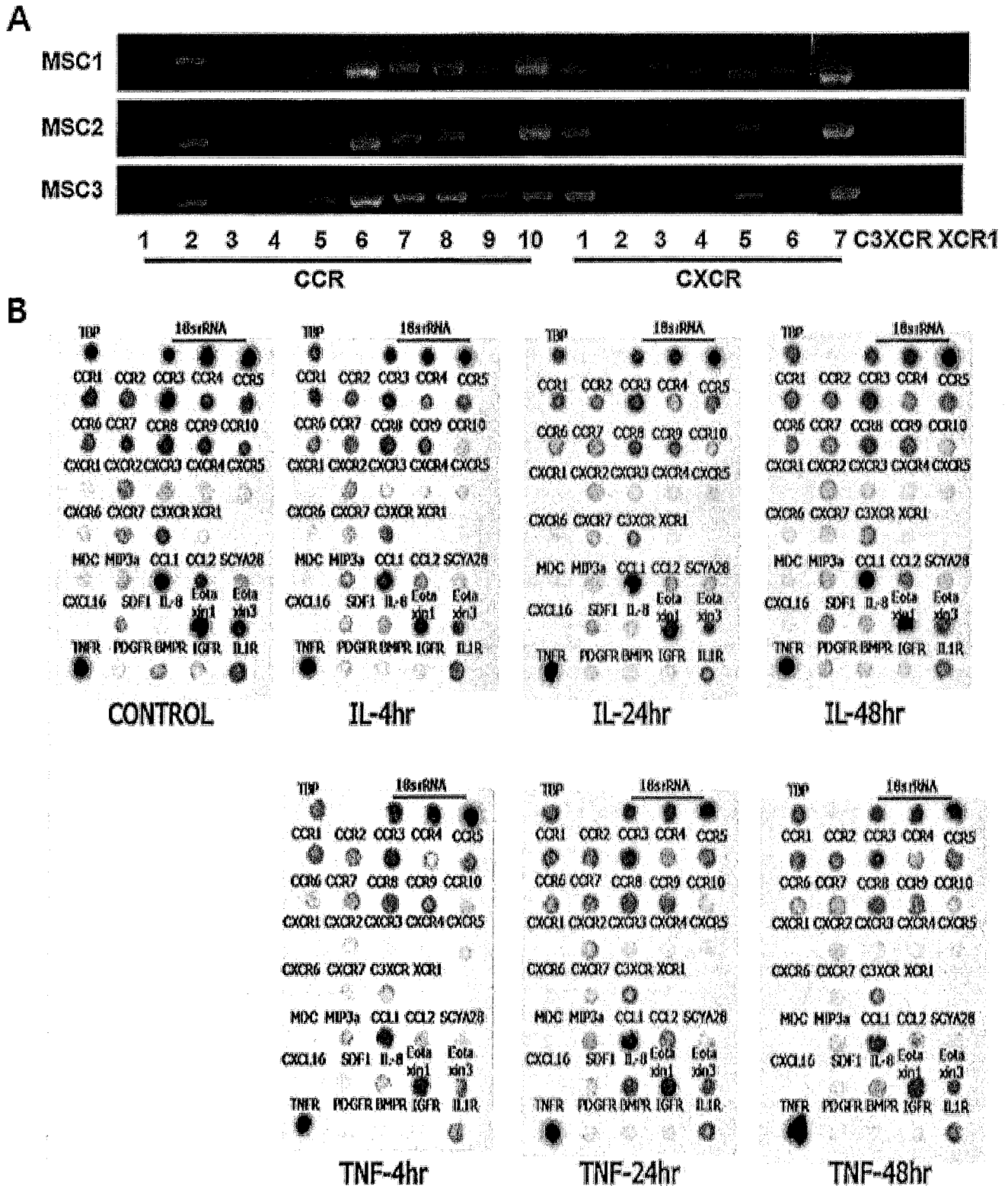
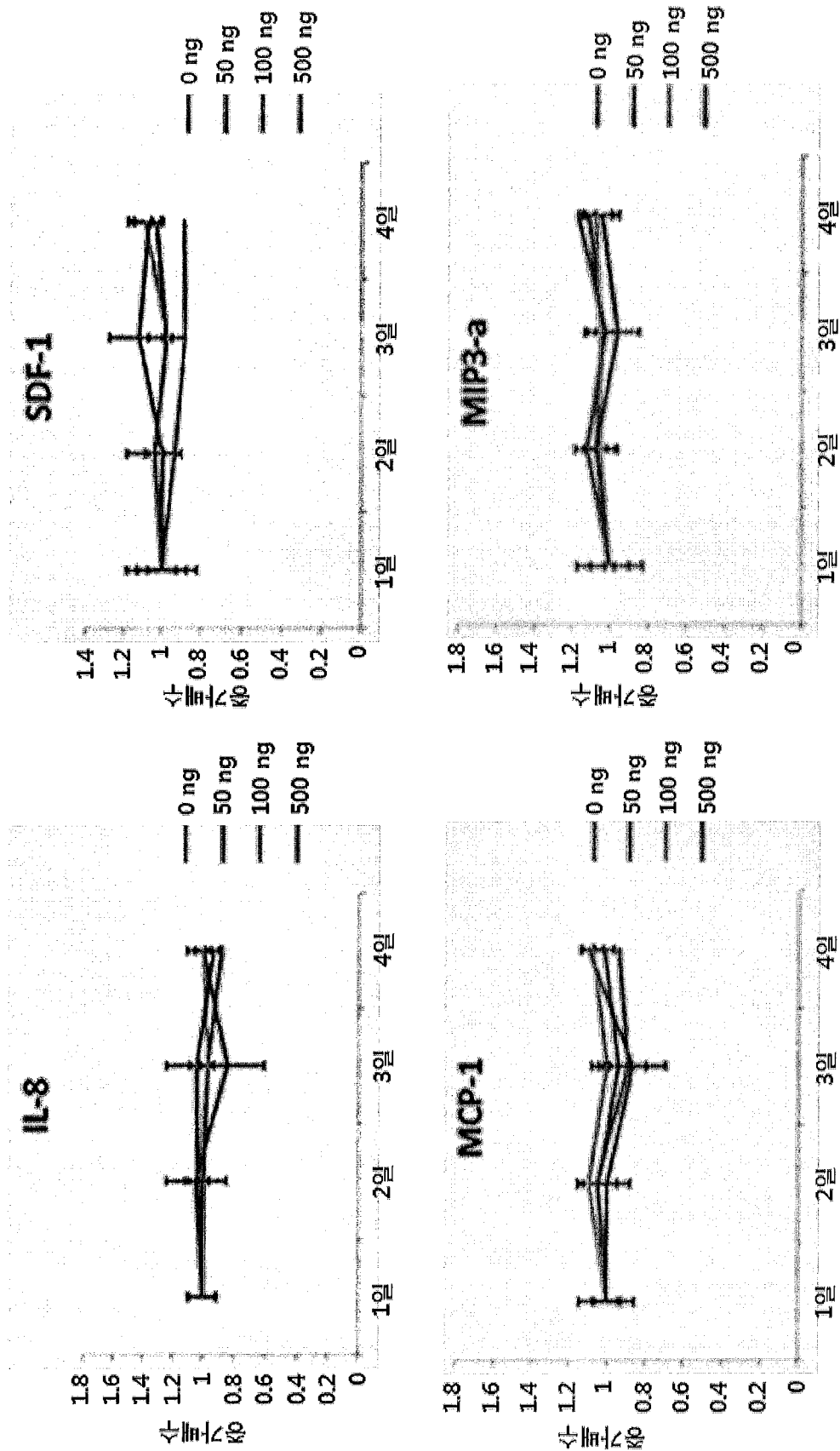
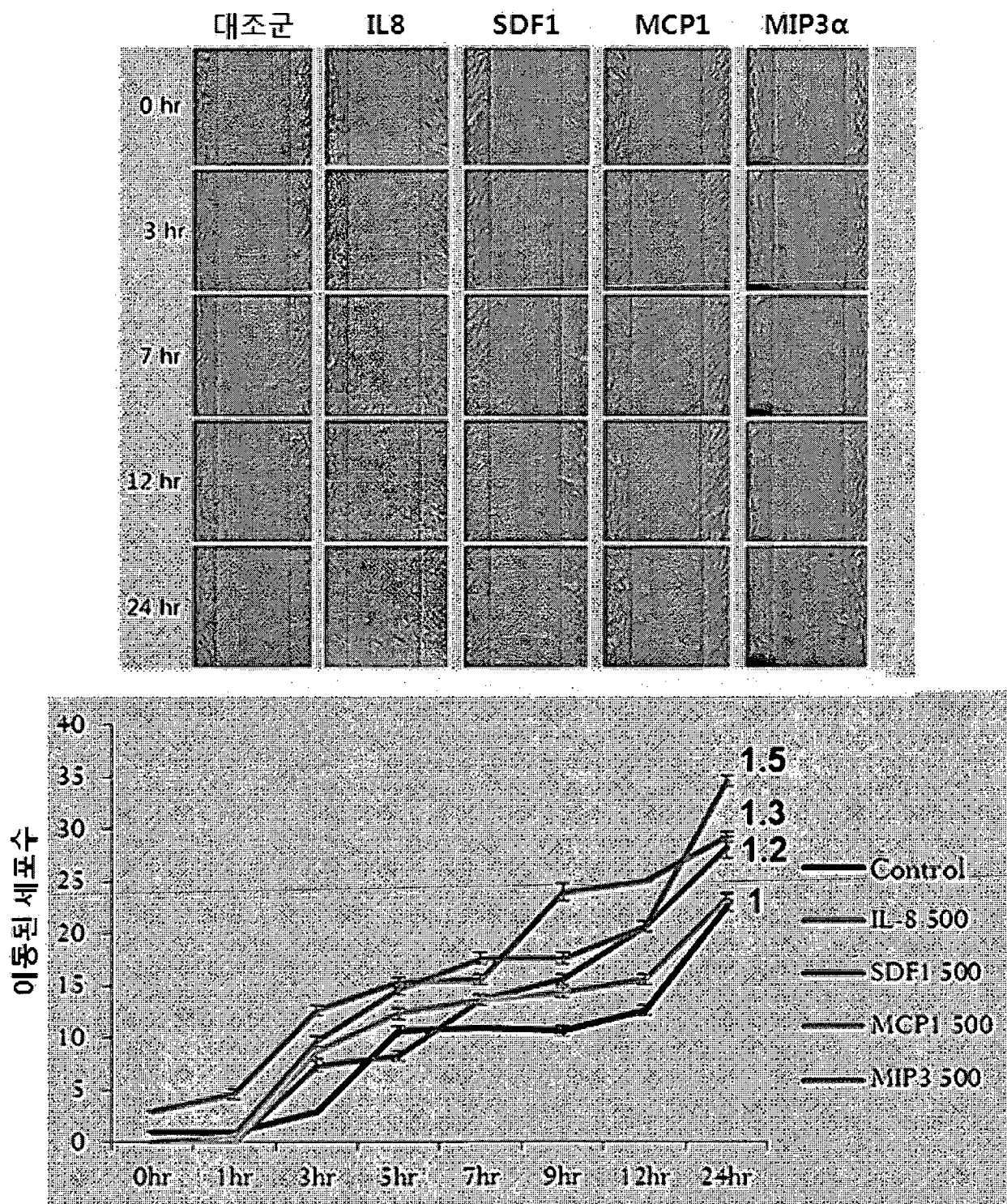


Fig. 2a



3/11

Fig. 2b



4/11

Fig. 2c

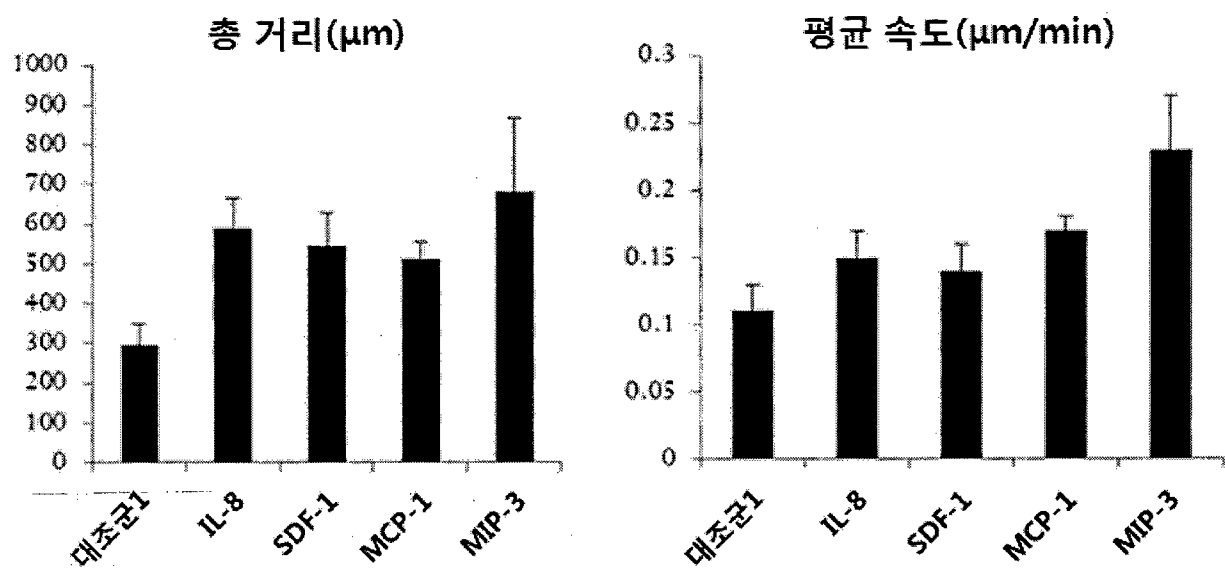
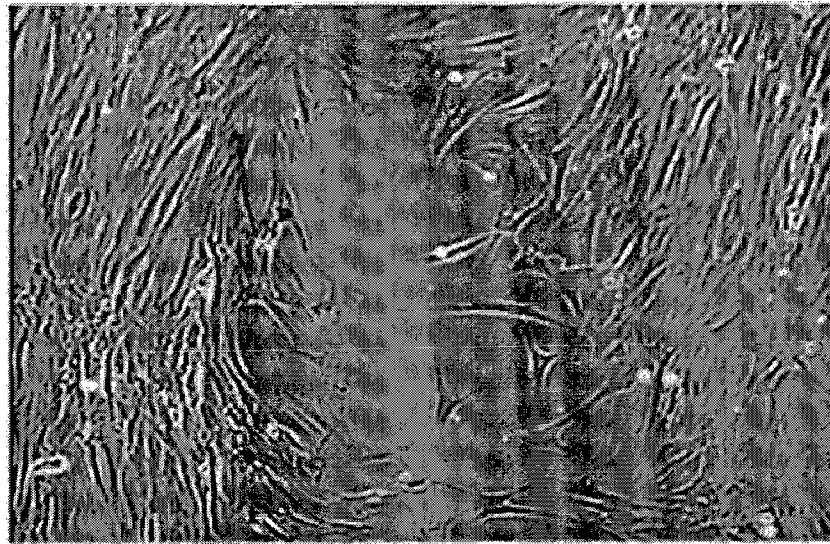


Fig. 3a

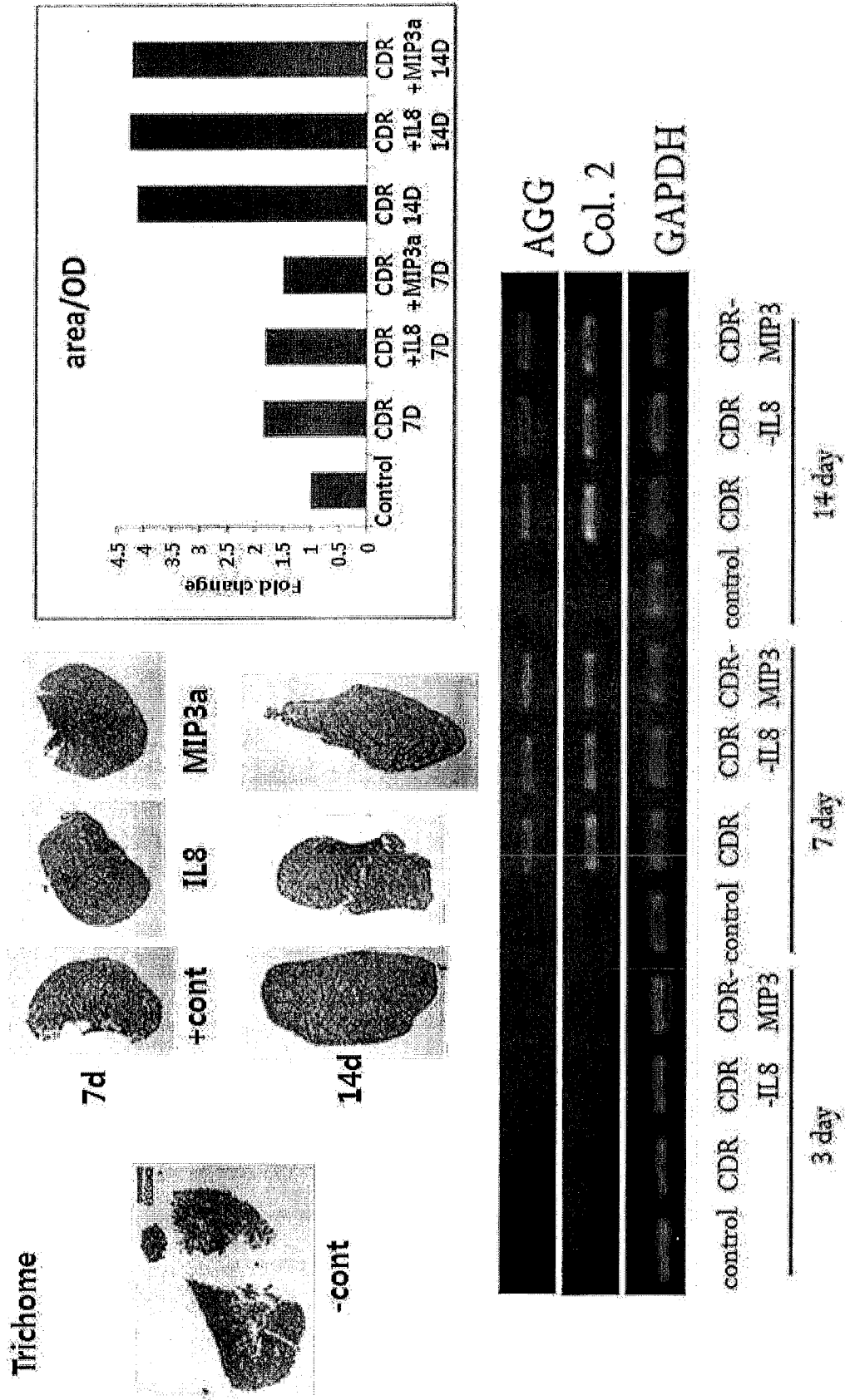
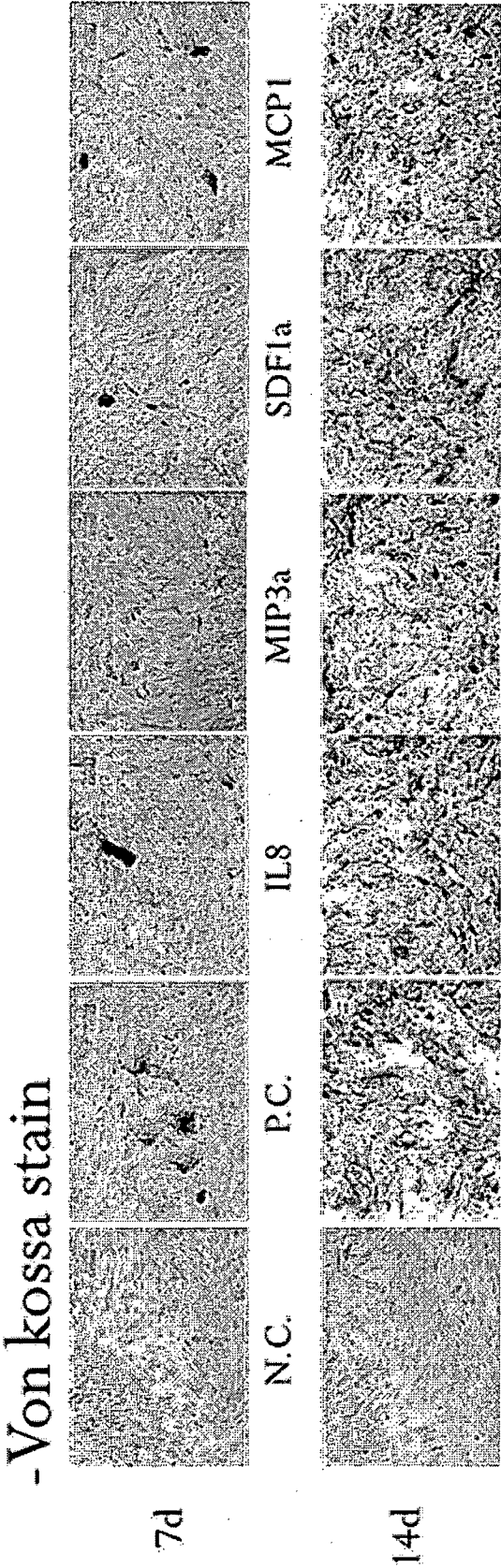
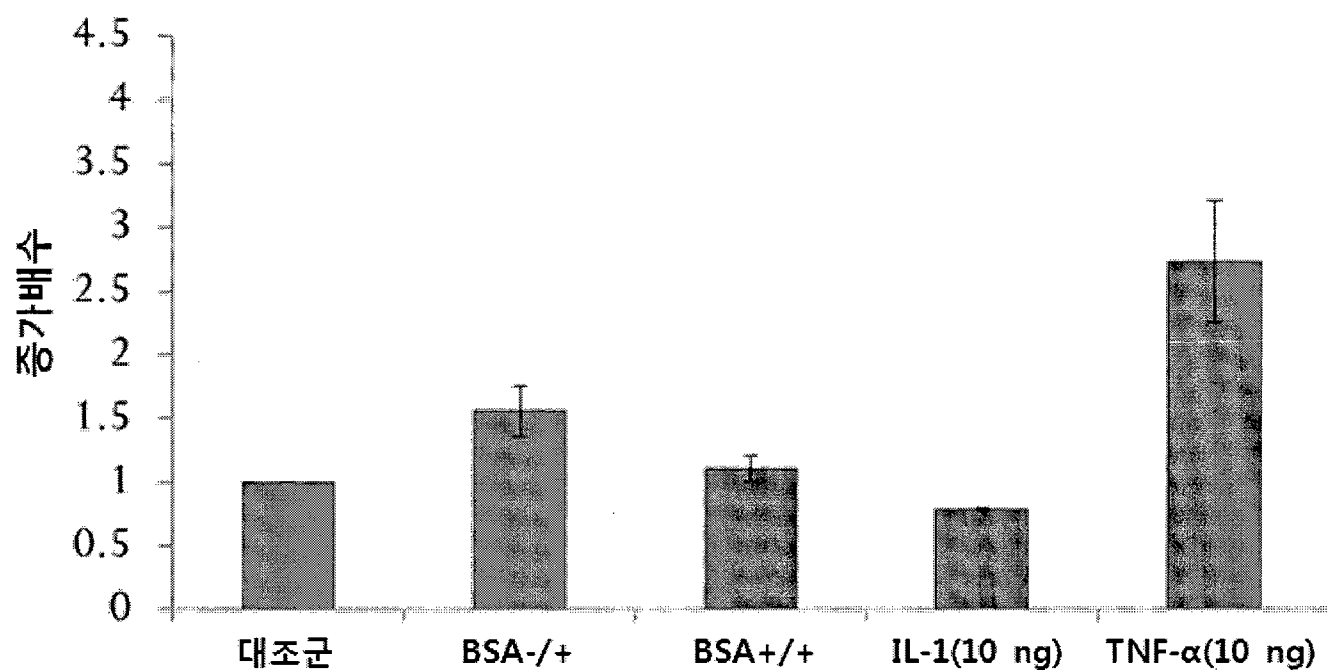


Fig. 3b



7/11

Fig. 4a



8/11

Fig. 4b

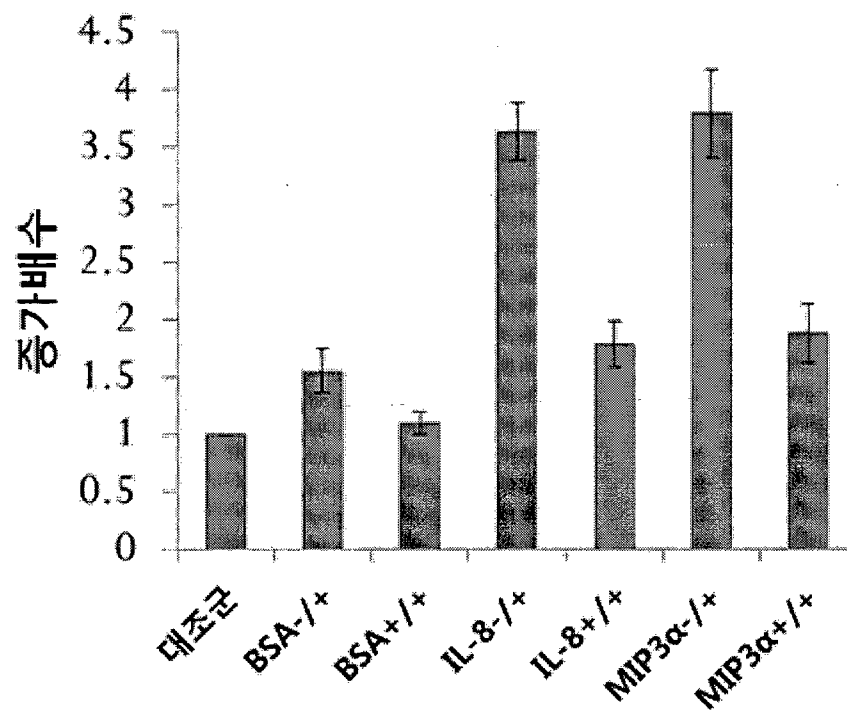
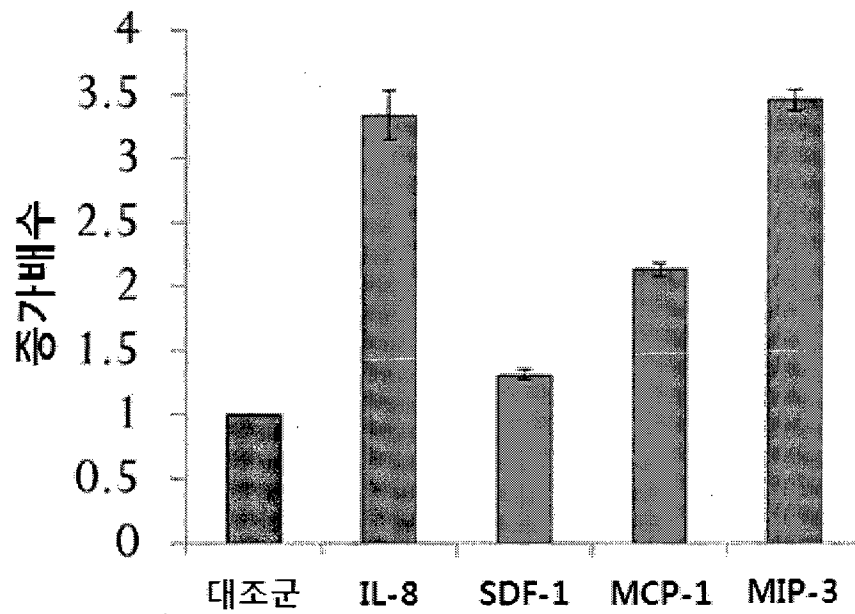
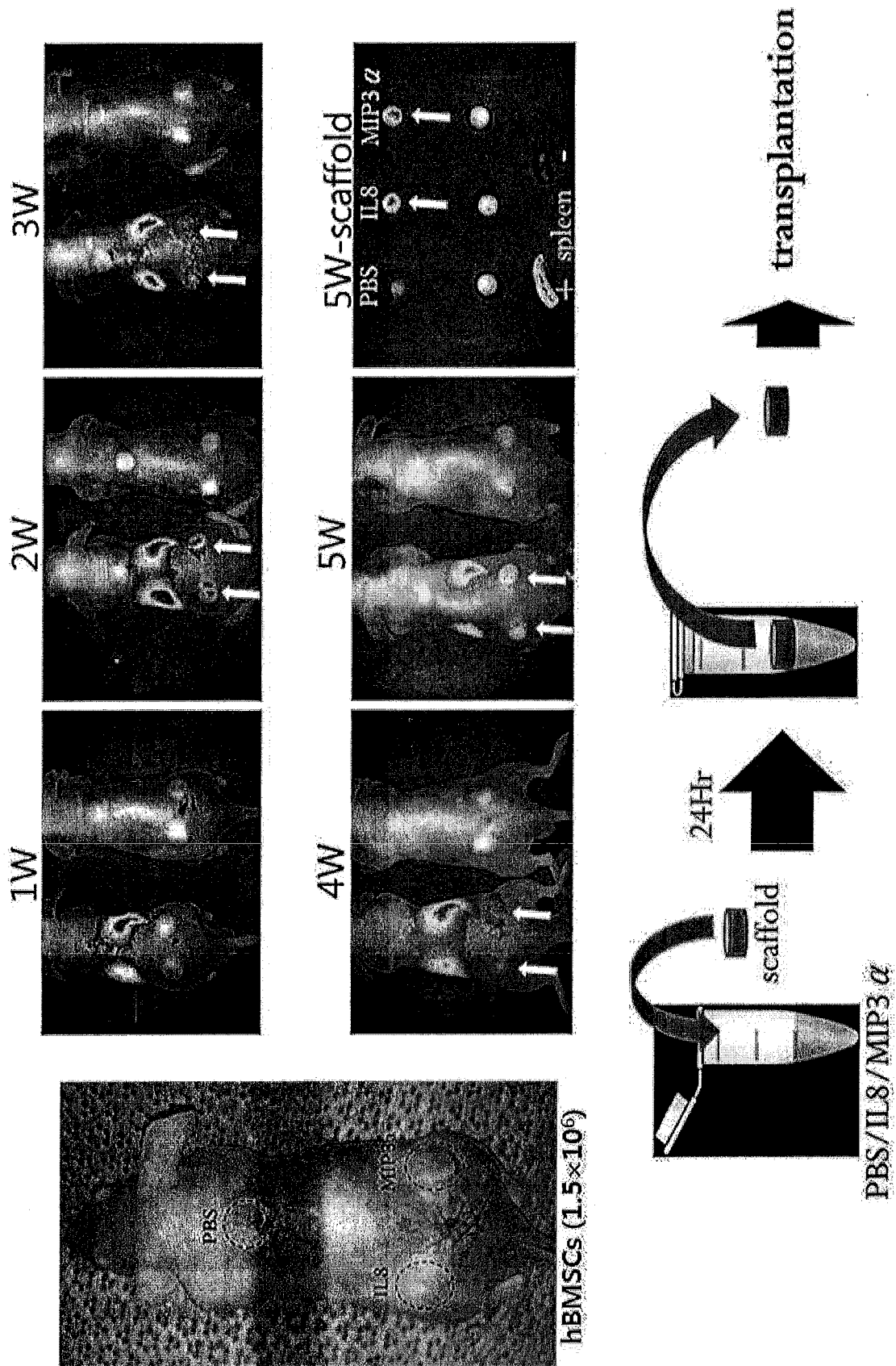


Fig. 5



10/11

Fig. 6a

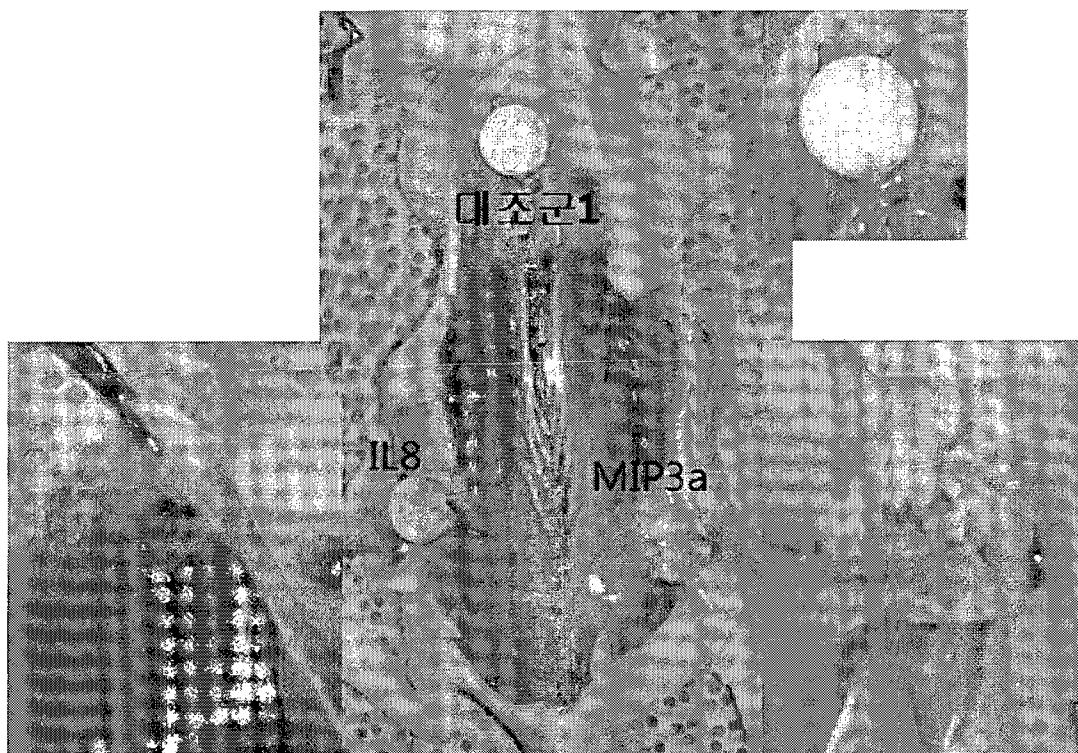
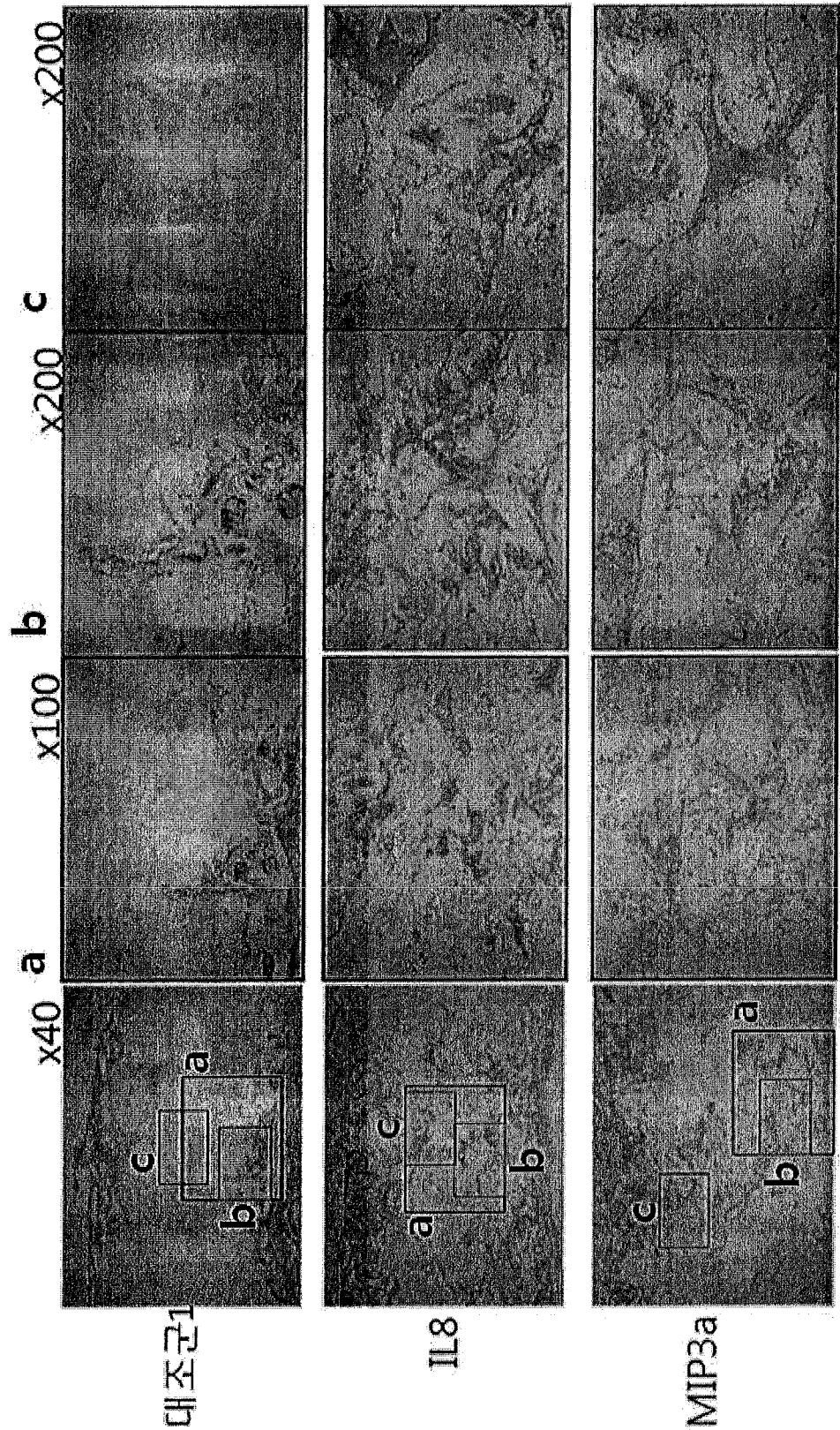


Fig. 6b



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/003732**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/0775(2010.01)i, C07K 14/54(2006.01)i, C12N 11/08(2006.01)i, A61F 2/30(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)

C12N 5/0775; A61L 27/00; A61L 27/58; A61L 27/40

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: mesenchymal stem cell, migration, chemokine, IL-8, MIP-3, biodegradable, PGA, PLGA, PLA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RINGE et al., "Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2" Journal of Cellular Biochemistry, Vol.101, pp.135-146 (2007) See the entire document, especially abstract, p.136, left column - p.138, left column, and figure 4	20-28
Y	US 2009-0017096 A1 (LOWMAN et al.) 15 January 2009 See the entire document, especially abstract, paragraphs [0007], [0037], and claims 1-11	20-28
A	KR 10-2010-0059367 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 04 June 2010 See the entire document	20-28
A	INOKUMA et al., "CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes" Stem Cells, Vol.24, pp.2810-2816 (2006) See the entire document	20-28
A	KR 10-0520944 B1 (COLETICA) 17 October 2005 See the entire document	20-28



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

07 MARCH 2012 (07.03.2012)

Date of mailing of the international search report

08 MARCH 2012 (08.03.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

International application No.

PCT/KR2011/003732

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **1-19**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-19 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/003732

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0017096 A1	15.01.2009	WO 2007-022188 A2 WO 2007-022188 A3	22.02.2007 22.02.2007
KR 10-2010-0059367 A	04.06.2010	US 2010-0129422 A1	27.05.2010
KR 10-0520944 B1	17.10.2005	JP 03-747412 B2 JP 03-865635 B2 JP 2003-534102 A JP 2003-534858 A KR 10-0646046 B1 US 2004-0002055 A1 US 2005-0208478 A1 US 6541023 B1 US 6790454 B1 US 6974679 B2 WO 01-91821 A1 WO 01-92322 A1	22.02.2006 10.01.2007 18.11.2003 25.11.2003 13.11.2006 01.01.2004 22.09.2005 01.04.2003 14.09.2004 13.12.2005 06.12.2001 06.12.2001

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>C12N 5/0775(2010.01)i, C07K 14/54(2006.01)i, C12N 11/08(2006.01)i, A61F 2/30(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/0775; A61L 27/00; A61L 27/58; A61L 27/40 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: mesenchymal stem cell, migration, chemokine, IL-8, MIP-3, biodegradable, PGA, PLGA, PLA		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	RINGE et al., `Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2` Journal of Cellular Biochemistry, Vol.101, pp.135-146 (2007) 전체문헌, 특히 요약, p.136, 왼쪽 컬럼 - p.138, 왼쪽 컬럼, 및 그림 4 참조	20-28
Y	US 2009-0017096 A1 (LOWMAN 외) 2009.01.15 전체문헌, 특히 요약, 문단 [0007], [0037], 및 청구항 1-11 참조	20-28
A	KR 10-2010-0059367 A (한국과학기술연구원) 2010.06.04 전체문헌 참조	20-28
A	INOKUMA et al., 'CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes' Stem Cells, Vol.24, pp.2810-2816 (2006) 전체문헌 참조	20-28
A	KR 10-0520944 B1 (폴레띠까) 2005.10.17 전체문헌 참조	20-28
☐ 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 2012년 03월 07일 (07.03.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 03월 08일 (08.03.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 김승범 전화번호 82-42-481-8746

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 1-19
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 1-19는 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(IV)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2009-0017096 A1	2009.01.15	WO 2007-022188 A2 WO 2007-022188 A3	2007.02.22 2007.02.22
KR 10-2010-0059367 A	2010.06.04	US 2010-0129422 A1	2010.05.27
KR 10-0520944 B1	2005.10.17	JP 03-747412 B2 JP 03-865635 B2 JP 2003-534102 A JP 2003-534858 A KR 10-0646046 B1 US 2004-0002055 A1 US 2005-0208478 A1 US 6541023 B1 US 6790454 B1 US 6974679 B2 WO 01-91821 A1 WO 01-92322 A1	2006.02.22 2007.01.10 2003.11.18 2003.11.25 2006.11.13 2004.01.01 2005.09.22 2003.04.01 2004.09.14 2005.12.13 2001.12.06 2001.12.06