

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2017/217803 A1

2017 년 12 월 21 일 (21.12.2017) WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

A61K 9/70 (2006.01)

A61L 15/14 (2006.01)

A61L 17/00 (2006.01)

A61K 35/36 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/006312

(22) 국제출원일:

2017 년 6 월 16 일 (16.06.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0076005 2016 년 6 월 17 일 (17.06.2016) KR

(71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR).

(72) 발명자: 노종렬 (ROH, Jong-Lyel); 06288 서울시 강남구 삼성로 150, 103동 1204호, Seoul (KR).

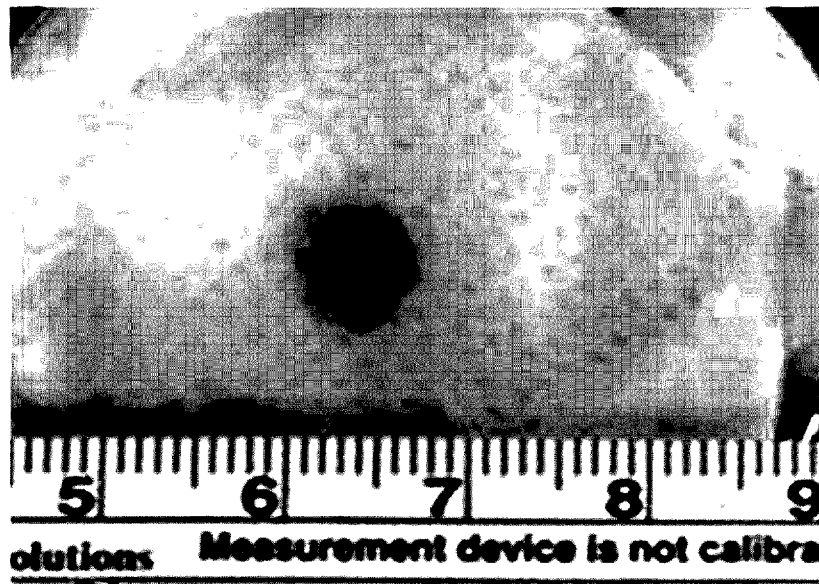
(74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

(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: 3-DIMENSIONAL CELL SHEET FOR WOUND OR ULCER TREATMENT AND METHOD OF PRODUCING SAME

(54) 발명의 명칭: 상처 또는 궤양치료를 위한 3차원 세포시트 및 이의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a 3-dimensional cell sheet for wound or ulcer treatment, and to a method of producing same. The cell sheet of the present invention can be produced without mouse-derived nutritional cells, special equipment, and special scaffolds. The cell sheet can be very easily detached from a culture medium through a simple physical method even without using a cell separator, and transplantation can be performed irrespective of the shape and size of a defective part. Accordingly, the cell sheet of the present invention can be usefully used for treating a mucosal defect, an ulcer, and the like after an operation of the oral cavity, the pharynx, the esophagus, or the like requiring re-epithelialization.

[다음 쪽 계속]



WO 2017/217803 A1

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 상처 또는 궤양치료를 위한 3 차원 세포시트 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 세포시트는 마우스 유래 영양세포, 특별한 장비 및 특별한 골격체(scaffolds) 없이 제조가 가능하고, 세포 분리제 사용 없이도 간단한 물리적 방법으로 배지로부터 세포시트의 탈착이 매우 용이하고, 결손부의 모양과 크기에 상관없이 이식이 가능하다. 따라서, 본 발명의 세포시트는 재생피화(re-epithelialization)가 요구되는 구강, 인두, 식도 등 수술 후 점막 결손과 궤양 등의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 상처 또는 궤양치료를 위한 3차원 세포시트 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 상처 또는 궤양치료를 위한 3차원 세포시트 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인체 점막과 피부는 내부 장기와 연부조직을 보호하는 일차 방어벽으로서 생명유지에 가장 중요한 생체 구성물 중 하나이다. 기도와 소화관을 덮고 있는 점막상피의 결손은 초기 감염, 통증 등을 일으킬 수 있으며 원활한 창상 치유가 이루어지지 않을 경우 반흔(scar) 및 협착(adhesion)으로 인한 심각한 기능 장애와 삶의 질 저하로 이어질 수 있다. 혀, 볼 점막, 구개 및 잇몸 등 구강 내 발생한 종양을 수술로 절제한 후, 점막결손부가 발생하고 결손부를 덮기 위해 환자의 다리나 팔에서 얻은 자가 피부 이식을 사용해왔다. 이 경우 피부 공여부의 또 다른 상처를 남길 수 있고 구강 내 결손부에 이식한 피부가 점막과 다르게 치유되는 과정에서 또 다른 문제를 만들 수도 있다. 또한, 항암치료제, 면역억제제나 방사선치료의 독성으로 심한 점막염이 발생하거나 정상 일반인에서도 크고 작은 구강 및 위궤양이 흔히 발생할 수 있다. 궤양의 크기가 크고 반복되거나 쉽게 낫지 않을 경우 심한 통증과 함께 반흔으로 인한 후유증이 발생할 수 있다. 구강 또는 인두 궤양의 치료를 위해 다양한 약물과 치료제가 개발되었으나 효과적인 궤양 치료법이 아직 부족한 실정이다.
- [3] 따라서, 본 발명의 연구자들은, 환자 유래의 구강점막의 일부를 채취해 약 2주 이내 빠른 시간에 체외에서 점막상피세포와 점막하조직을 포함한 3차원 구강점막 세포시트를 제조할 수 있었으며, 이의 구강 점막결손과 궤양 치료에서의, 흉터가 없는 치유(rapid scarless healing)가 가능함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명의 목적은 상처 또는 궤양치료를 위한 3차원 세포시트 및 이의 제조방법을 제공하기 위함이다.

과제 해결 수단

- [5] 섬유아세포(fibroblast)를 포함하는 제 1 세포층; 및
- [6] 상피세포가 포함된 제 2 세포층을 포함하는 세포시트를 제공한다.
- [7] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상피세포 및 섬유아세포는 자가유래의 세포일 수 있다.
- [8] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제 1 세포층은 상기 섬유아세포에 피브린

및 혈청을 가하여 응고시켜 형성된 것일 수 있다.

- [9] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제1 세포층은 피브린, MEM(minimum essential medium), 혈청, 염 및 혈액 응고제를 가하여 응고시켜 형성된 것임을 특징으로 할 수 있다.
- [10] 상기 염은 NaNO_3 , NaCl , Na_2S , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 , KNO_3 , KCl , K_2S , K_2SO_4 , K_2CO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{S}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, MgCl_2 , MgS , MgSO_4 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, BaCl_2 , BaS , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , CaS , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 및 AgNO_3 일 수 있고, 바람직하게는 염화칼슘(CaCl_2)일 수 있다.
- [11] 상기 "혈액 응고제"는 혈액 응고를 개시 또는 증강시키거나 피브린용해 또는 혈전증을 저해하는 능력이 있는 약제를 지칭한다. 상기 혈액응고제는 트레넥사민산(tranexamic acid), 호모코아굴라제(homocoagulase), 트롬빈 파우더(thrombin powder), 혈장 유래 인자 VII/VIIa, IX/IXa, X/Xa, II/IIa, VIII/VIIIa, V/Va, 제조합 인자 VII/VIIa(제조합 인간 인자 VIIa (NovoSeven, eptacog alfa (활성화된), ATC code B02BD08)), IX/IXa, X/Xa, II/IIa, VIII/VIIIa, V/Va 및 그의 조합이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 혈액 응고제의 예에는 흡착성 화학물질, 지혈제, 트롬빈, 피브린 글루, 데스모프레신 (상표명: DDAVP, Stimite, Minirin) 및 동결 혈장, 응고 인자 농축물, 활성화된 또는 비활성화된 프로트롬빈 복합체 농축물, 웨이바 Vh, 혈소판 농축물 및 그의 조합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 혈액 응고제의 부가적인 예에는 트롬빈-활성화 가능 피브린용해 저해제(TAFI), 단백질 C 저해제(PCI), 단백질 S 저해제(PSI), 아미노카프론산, 아프로티닌 및 그의 조합이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 이용가능한 혈액 응고 인자의 더 많은 예는 인용문헌 Brooker M, Registry of Clotting Factor Concentrates, Eighth Edition, World Federation of Hemophilia, 2008 에서 찾을 수 있다.
- [12] 본원 발명에서 혈액 응고제는 트레넥사민산(tranexamic acid), 호모코아굴라제(homocoagulase) 또는 트롬빈 파우더(thrombin powder)일 수 있고, 바람직하게는 트레넥사민산일 수 있다.
- [13] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제2세포층은 형성된 제 1 세포층에 상피세포를 분주하여 배양함으로써 형성된 것임을 특징으로 할 수 있다.
- [14] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 상피세포는 각질세포(keratinocyte)일 수 있다.
- [15] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 상피세포는 구강, 인두, 식도 및 피부 중 선택된 어느 1 종 이상의 조직으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [16] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 섬유아세포는 구강, 인두, 식도 및 피부 중 선택된 어느 1 종 이상의 조직으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 상피세포는 상피층에서 단일세포화되어 배양된 세포일 수 있다.
- [18] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 섬유아세포는 점막하조직 또는

- 상피하조직층으로부터 분리되어, 단일세포화되어 배양된 세포일 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 섬유아세포는 점막하 섬유아세포(submucosal fibroblase)일 수 있다.
- [20] 본 발명은 상기 세포시트의 제조방법을 제공한다.
- [21] 본 발명의 제조방법은 (a) 단일세포화(single cell suspension)한 섬유아세포와 상피세포를 수득하여 각각 배양하는 단계;
- [22] (b) 상기 배양된 섬유아세포를 세포 지지체에 분주하여 제 1 세포층을 형성하는 단계; 및
- [23] (c) 상기 제1세포층에 상기 배양된 상피세포를 분주하고 배양하여 제 2 세포층을 형성함으로써 세포시트를 제작하는 단계를 포함할 수 있다.
- [24] 상기 (a)단계는,
- [25] 개체로부터 분리된 피부 또는 점막 조직으로부터 상피층과 상피하조직층을 각각 분리하는 단계; 및
- [26] 상기 상피층으로부터 단일세포화한 상피세포를 수득하고, 상기 상피하조직층으로부터 단일세포화한 섬유아세포를 수득하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [27] 상기 세포 지지체는 체내 환경과 유사하여 다양한 세포의 부착, 증식, 분화 및 배양을 할 수 있는 환경을 제공할 수 있다. 상기 세포 지지체는 배양접시, 샤알레, 8 내지 96웰 배양접시, 셀테스크 LF(SUMILON), 인서트(insert well), 멀티플레이트 및 플라스크 등을 포함할 수 있지만 이에 제한 되지 않는다. 또한, 세포 지지체의 재질로는 유리, 개질유리, 폴리스티렌, 폴리메틸메타크릴레이트 또는 세라믹류일 수 있다.
- [28] 바람직하게는, 세포 지지체는 인서트(insert well)일 수 있고, 상기 인서트를 이용하는 경우, 세포시트의 탈부착이 용이하다. 또한, 인서트 사용시 공기부양(air lifting)을 위한 특별한 장비와 조건 없이도 배양이 가능하고, 자가유래 혈장과 섬유아세포를 지지체로 사용해 상피세포의 성장을 촉진하고 특이한 온도반응접시(Okano 등), 무세포진피(acellular dermis), 콜라겐 아교(collagen glue), 양막(amniotic membrane) 등의 특별한 골격체(scaffolds) 없이 쉽고 편리하고 저렴하게 세포시트 제조가 가능하다.
- [29] 먼저, 상기 분리된 점막조직 또는 피부조직은 피부, 식도, 인두 및 구강 중 선택된 1종 이상으로부터 분리될 수 있고, 크기가 1×1mm 내지 10×10mm, 바람직하게 5×5mm, 더욱 바람직하게 2×2mm일 수 있다. 점막조직 또는 피부조직이 분리된 개체는 상처 또는 궤양이 있는 환자일 수 있다. 상기 상피층과 상피하조직의 분리를 위하여, 어떠한 방법으로도 가능하나, 핀셋 또는 나이프 등을 이용한 물리적 방법을 이용할 수 있다. 상기 상피층과 상피하조직층을 분리하기 전에 인산완충액(PBS; phosphate buffered solution)으로, 바람직하게는 10회 이상을 세정할 수 있고, 이 후, 트립신 EDTA를 처리하여, 30 내지 40°C, 10분 내지 1시간 동안 방치할 수 있다.

- [30] 상기 단일세포화는, 상기 (a)단계에서 분리된 상피층 및 상피하조직을 각각 따로 MEM(minimum essential medium)에서 배양한 후, 인산완충액으로 세정 후, 0.1 내지 1%, 바람직하게는 0.25%의 트립신 EDTA를 이용하여, 30°C 내지 40°C에서 5분 내지 30분간 단일세포화할 수 있다.
- [31] 상기 (a)단계의 배양은, 영양세포 없이, 혈청을 포함한 MEM 배지를 이용할 수 있고, 바람직하게는 5 내지 9일 동안 배양할 수 있다. 상기 혈청은 조직을 분리한 환자의 자가혈청을 열불활성화시킨 혈청일 수 있으며, 혈청의 농도는 1 내지 20%, 바람직하게는 10% 일 수 있다. 또한, 이 후에, 이차배양을 추가적으로 수행할 수 있다.
- [32] 상기 (b)단계는 배양된 섬유아세포를 세포지지체에 분주하여 제 1 세포층을 형성하는 단계이고, 이 후, 제 1 세포층에 상피세포를 분주하여 제 2 세포층을 형성할 수 있다. 상기 섬유아세포는 피브린 및 혈청을 가하여 응고시킬 수 있으며, 피브린, MEM(minimum essential medium), 혈청, 염 및 혈액 응고제와 혼합되어 세포지지체가 포함된 배양접시 위에서 굳을 수 있다. 상기 분주되는 섬유아세포의 개수는 6웰-플레이트의 한 웰당 2.5×10^3 내지 2.5×10^5 , 바람직하게는 2.5×10^4 개일 수 있다. 상기 분주되는 상피세포의 개수는 6웰-플레이트의 한 웰당 1×10^5 내지 1×10^7 , 바람직하게는 1×10^6 개일 수 있다. 상기 (c)단계의 배양 과정은 공기부양법을 통하여 수행될 수 있다. 또한, 상기 상피세포는 각질세포일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한(c) 단계는 상피세포의 밀도가 90 내지 100%가 되도록 배양한 다음 세포지지체로부터 세포시트를 분리함으로써 제작하는 것일 수 있다.
- [33] 또한, 본 발명은 본 발명의 세포시트를 유효성분으로 포함하는, 상처 또는 궤양 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [34] 본 발명의 용어 "세포치료제(cellular therapeutic agent)"란, 인간으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 이러한 세포가 질병의 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [35] 바람직하게는 본 발명의 세포치료제는 상처 또는 궤양 등에 대한 치료용으로 이용될 수 있다. 본 발명의 세포시트를 상처가 난 부위, 또는 궤양이 발생한 부위에 투여함으로써, 상처 또는 궤양을 치료할 수 있다. 본 발명의 세포치료제의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있으며, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [36] 또한, 본 발명은 본 발명의 세포시트의 점막 결손 또는 궤양의 치료 용도를

제공한다.

- [37] 아울러, 본 발명은 본 발명의 세포시트를 이용한 점막 결손 또는 궤양의 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [38] 본 발명은 마우스 유래 영양세포(feeder cell)과, 소, 마우스 등 이종유래 배양촉진제를 사용하지 않고, 환자 유래 혈청을 사용해 2주 이내 인체 구강점막과 흡사한 3차원적 구강점막 세포시트를 제조할 수 있다.
- [39] 또한, 인서트(insert well) 사용시 공기부양(air lifting)을 위한 특별한 장비와 조건 없이도 세포의 배양이 가능하고, 자가유래 혈장과 섬유아세포를 지지체로 사용해 상피세포의 성장을 촉진하고 특이한 온도반응접시(Okano 등), 무세포진피(acellular dermis), 콜라겐 아교(collagen glue), 양막(amniotic membrane) 등의 특별한 골격체(scaffolds) 없이도 쉽고 편리하고 저렴하게 세포시트의 제조가 가능하다.
- [40] 또한, 본 발명의 방법으로 제조한 구강점막 세포시트는 트립신과 같은 세포 분리제를 사용하지 않고도 물리적 방법으로 간단하게 배지로부터 탈착이 매우 용이한 효과가 있다.
- [41] 또한, 본 발명의 세포시트는 잘 찢어지지 않으면서도 신축성이 뛰어나며 점막결손부 변연 4 내지 5군데 정상 점막에 세포시트 끝을 봉합해 결손부의 모양과 크기에 상관없이 사용이 용이하다.
- [42] 또한, 본 발명의 세포시트는 연령, 나이, 환자의 지병의 상태에 관계없이, 대부분의 환자 구강점막 일부를 채취하여, 2주 이내 10cm² 이상의 크기로 배양이 가능하고, 신축성이 매우 뛰어나 약 30cm² 크기로 점막결손부에 늘려서 이식이 가능하다.
- [43] 따라서, 본 발명의 세포시트는 재생피화(re-epithelialization)가 요구되는 구강, 인두, 식도 등 수술 후 점막 결손과 궤양 등의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [44] 도 1은 구강 점막조직을 채취한 사진을 나타낸 도이다.
- [45] 도 2는 일차배양된 구강점막 상피각질세포(A)와 섬유아세포(B)의 도립현미경 사진(200배)을 나타낸 도이다.
- [46] 도 3은 인서트 안에 배양된 구강점막 세포시트(A)와 물리적으로 떼어낸 세포시트(B)의 사진을 나타낸 도이다.
- [47] 도 4는 체외 배양된 3차원 구조의 구강점막 세포시트를 헤마톡실린에오신(hematoxylin and eosin, H&E) 염색한 사진(A), 싸이토케라틴 AE1/AE3(Dako, Tokyo, Japan)을 이용해 면역조직화학염색한 사진(B) 및 인간 줄기세포마커인 p63에 염색한 사진(C)을 나타낸 도이다.
- [48] 도 5는 구강점막조직으로부터 제작된 3차원 세포시트와 구강점막조직에서 면역형광염색을 비교한 결과를 나타낸 도이다.

- [49] 도 6은 본 발명의 3차원 세포시트의 제조과정을 나타낸 도이다.
- [50] 도 7은 일차배양된 구강점막(oral mucosa)와 피부 상피각질세포(skin epithelium)에서 날짜별 도립현미경 사진(x100배)을 나타낸 도이다(화살표는 세포성장 변연을 나타냄).
- [51] 도 8은 구강점막(oral mucosa)과 피부(skin) 조직을 채취해 체외에서 일차배양 후 증식된 세포수(cell number, A)와 세포 생존율(cell viability, B)을 나타낸 도이다(조직 채취 후, 각 일자별로 트리판블루 세포 염색을 이용하여 세포수와 생존율의 평균과 표준편차를 나타냄).
- [52] 도 9는 구강점막(oral mucosa), 피부(skin), 식도점막(esophageal mucosa)과 인두점막(pharyngeal mucosa)에서 조직을 채취해 체외에서 일차배양 9일 후 도립현미경 사진(x100배)을 나타낸 도이다.
- [53] 도 10은 본 발명의 세포시트의 조직학적 소견과 정상조직의 조직학적 소견을 비교한 도이다.
- [54] 도 11은 구강, 피부, 식도 및 인두에서 채취한 조직의 일차 배양 후, 클론형성능을 비교한 도이다(각각의 조직을 채취한 후, 1차 배양하고, 피브린이 덮인 배지에 각각 같은 수의 세포를 뿌린 후, 약 14일 후 형성된 클론의 개수를 비교하였음; 피부린을 이용하지 않은 점막세포를 대조군으로 함).
- [55] 도 12는 본 발명의 3차원 세포시트의 처리와 탈착의 용이성을 나타낸 도이다(A: 인서트를 포함한 세포 배양접시에 담겨있는 3차원 세포시트의 육안 사진; B:인서트를 꺼내 핀셋등을 이용하여 세포시트를 배지 접촉면으로부터 가볍게 떼고 생리식염수가 담긴 배양접시에 옮기는 과정을 나타낸 사진; 좌로부터 우로 탈착과 이동과정을 나타냄).
- [56] 도 13은 동물실험을 위한 3차원 세포시트의 준비 과정을 나타낸 도이다(3차원 세포시트와 실라스틱 시트를 알맞은 크기로 자르고 덮어(화살표) 창상에 이동하기 전 준비과정을 찍은 사진(좌로부터 우로 과정을 설명)).
- [57] 도 14는 마우스 구강 창상모델에 3차원 점막세포시트를 적용하는 방법을 나타낸 도이다(A: 마우스 구강 불점막에 전층 창상(full-thickness wound)를 만들; B: 3차원 세포시트와 실라스틱 시트를 창상에 덮음).
- [58] 도 15는 마우스 구강 창상모델에 점막세포시트 이식의 창상치유 효과를 나타내는 조직학적 소견 결과이다(A:대조군; B:정상 구강점막 조직; C:세포시트를 덮은 실험군).
- [59] 도 16은 구강 창상모델에 점막세포시트 이식의 창상치유 효과를 나타낸 도이다(A:image J 프로그램; B:점막상피 두께; C: 점막하조직의 두께; D:콜라겐 밀도).
- [60] 도 17은 랫트 구강 창상모델에서 점막세포시트의 창상치유 효과에 대한 실험 개요를 나타낸 도이다(A:제작된 3차원 세포시트를 떼어 적당한 크기로 잘라 실라스틱 시트 위에 얻는 단계; B:흰쥐 불점막에 전층 창상을 만든 후, 세포시트를 창상(화살표)에 부착하는 단계; C:창상을 만들지 않은 정상

불점막(좌측)과 구강점막 창상 후, 4주째 창상군의 불점막(중간)과 창상에 세포시트를 덮었던 실험군의 불점막(우측)의 사진).

[61] 도 18은 마우스 피부 창상모델에서 3차원 세포시트의 창상치유 효과를 나타낸 도이다.

[62] 도 19는 마우스 피부 창상모델에서 3차원 세포시트의 창상치유 효과에 대한 조직학적 분석 결과를 나타낸 도이다(A:정상 피부조직; B:창상 피부 조직 C:세포시트를 덮은 피부조직; D, E: 상피와 상피하 조직의 두께를 나타냄(Image J)).

[63] 도 20은 3차원 세포시트의 종양형성 등 부작용을 관찰한 결과이다(A:3차원 세포시트를 누드마우스 피하에 이식; B: 4주 후, 이식한 부위를 열어 육안적 및 현미경적 관찰).

[64] 도 21는 누드마우스(athymic nude mice)의 정상 불점막 조직(A), 점막상피와 상피하 조직을 제거하고 체외 배양된 3차원 구강점막 세포시트를 이식한 군(실험군, C)및 이식하지 않은 대조군(B)의 헤마톡실린에오신 염색한 사진을 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[65] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[66]

[67] **[실시예 1] 구강 점막세포를 이용한 세포시트의 제조**

[68] **1.구강 점막세포의 채취와 체외배양**

[69] **1.1 구강 점막조직 및 혈액 채취**

[70] 의사의 충분한 설명에 동의서(informed consent)에 서명을 받은 뒤, 외래 또는 수술실에서 환자의 구강 내에서 점막 상피세포(mucosal epithelial cells) 및 점막하조직(submucosa)이 포함된 5×5mm 이내 (약 0.2 cm²) 크기의 구강점막을 채취하였다. 이와 함께 환자로부터 혈액 10mL을 채혈하여 구연산나트륨(sodium citrate)이 들어있는 진공채혈기(vacutainer tube, 혈장으로 사용)와 구연산나트륨이 없는 채혈기(혈청으로 사용)에 각각 담았다. 채취한 혈액은 3700rpm에서 8분간 원심분리한 후, 상층액인 혈장(plasma)만 따로 분리해서 -80°C의 초저온냉동고(deep freezer)에 보관하였다. 구강점막 채취를 위한 과정 모두 청결하게 수행하였으며, 포비돈 요오드액을 이용하여 소독을 하였고, 생리식염수로 반복 세척하여 오염을 방지한 후, 실험실로 채취한 조직을 운반하였다.

[71] 상기 채취한, 구강점막의 사진을 도 1에 나타내었다.

[72]

[73] **1.2 구강 점막조직의 처리 및 일차배양**

[74] 실험실로 구강점막조직을 운반한 후, 1) 세정, 2) 점막상피층 및 점막하조직층의 분리, 3) 단일세포화의 순서로 진행하여 일차배양하였다. 보다 구체적으로, 채취한 구강점막조직을 인산완충액(Dubecco's phosphate buffered solution, PBS; Life Technology™, Carlsbad, CA, USA)으로 10회 이상 세정한 뒤 트립신(trypsin) EDTA (Life Technology™)을 처리하여 37°C에서 20 내지 30분 동안 방치하였다. 그 후, 구강점막조직을 핀셋과 10번 나이프를 사용하여 점막상피층과 점막하조직으로 분리하였다. 점막상피층은 상피세포 배양을 위해, 점막하조직은 섬유아세포의 배양을 위해, 각각 MEM(minimum essential medium; Life Technologies™)에 이어 인산완충액으로 세정하였다. 그 후, 37°C에서 10분간 0.25% 트립신 EDTA (Life Technologies™)을 점막상피층과 점막하조직층에 각각 따로 처리하여 단일세포화(single cell suspension)하였다.

[75]

[76] **1.3 구강점막세포의 이차 배양을 통한 확장(expansion)**

[77] 영양세포(feeder cells)가 포함되지 않은 MEM 배지에 50°C 수조에서 약 30분간 열불활성화시킨 10%의 환자유래 혈청(patient-derived heat inactivated serum)을 첨가한 뒤, 상기 실시예 1.2에서 단일세포화한 점막상피세포와 점막하조직세포(submucosal fibroblast)를 각각 따로 뿌려 37°C에서 배양하였다. 배양액을 3일에 한 번씩 교체하였고, 세포밀도(cell confluence)가 약 70 내지 80% 정도가 되는 시점에 트립신을 이용해 다른 디쉬에서 이차 배양하였다. 상기 세포의 성장(증식)형태를 도립현미경으로 관찰한 결과를 도 2에 나타내었다.

[78] 도 2에 나타난 바와 같이, 채취한 점막상피층으로부터 점막상피세포(keratinocyte)를 약 1주일 동안 약 백 만개(1×10^6) 이상, 점막하조직으로부터 점막하조직세포(점막하 섬유아세포, submucosal fibroblast)를 2.5×10^4 개 이상이 되도록 세포 배양(확장, expansion)이 가능함을 확인하였다.

[79]

[80] **2. 구강점막 3차원적 체외배양을 통한 점막세포시트의 제작**

[81] 6-웰 플레이트(6-well plate)에 코닝 트랜스웰 24mm 폴리에스테르 멤브레인 인서트(BD Bioscience, Franklin Lake, NJ, USA)를 끼워 세포 배양 플레이트를 준비하였다. 상기에서 1주일 동안 배양한 구강점막 상피각질세포(keratinocyte) 1×10^6 개 및 점막하 섬유아세포(submucosal fibroblast) 2.5×10^4 개를 트립신 및 트립신 EDTA (Life Technologies™)를 사용해 분리하였다. 분리한 섬유아세포 2.5×10^4 개를 환자의 혈장에서 분리한 피브린(fibrin) 1mL, Eagle's MEM (Life Technologies™) 및 10% 환자 유래 혈청과 섞었다. 여기에 0.167 mL 1% 칼슘 클로라이드(Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA) 및 20L 트레넥사민산(tranexamic acid, Sigma-Aldrich)을 섞어 상기에서 준비한 인서트가 끼워진 6-웰 플레이트에 뿌리고, 37°C, 5% CO₂ 조건으로 유지되는 인큐베이터에서 배양하였다. 10분 후, 인서트에 넣은 섬유아세포와 혈장 혼합액이 굳으면, 그 위에 1×10^6 개의 구강점막

상피각질세포(keratinocyte)를 뿌리고, 위에서 설명한 세포배양 배지를 구강점막 상피각질세포층이 약간 잠길 정도로 인서트 밖 플레이트 부분에 넣어 공기부양법(air-lifting)으로 1주일 동안 배양하여 세포시트를 제작하였다.

- [82] 이의 결과를 도 3에 나타내었다. 또한, 체외 배양된 3차원 구조의 구강점막 세포시트를 헤마토실린에오신(hematoxylin and eosin, H&E)로 염색한 사진(A), 싸이토케라틴 AE1/AE3 (Dako, Tokyo, Japan)을 이용해 면역조직화학염색한 사진(B) 및 인간 상피세포마커인 AE1/AE3와 줄기세포마커인 p63로 염색한 사진(C)을 도 4에 나타내었다.

- [83] 또한, 구강점막조직으로부터 제작된 3차원 점막세포시트와 정상 구강점막조직의 면역형광염색을 비교한 결과를 도 5에 나타내었다 (미분화각질세포(cytokeratin 5/6), 분화각질세포(cytokeratin AE1/AE3), 세포증식(ki67), 상피줄기세포(p64) 및 중엽세포(vimentin)마커들에 대한 면역형광염색, 세포 염색은 DAPI 사용)

- [84] 도 3 내지 5에 나타난 바와 같이, 구강점막 유래 각질세포의 분화가 유도되었고 약 1주일 후 점막상피세포의 밀도가 90 내지 100%인 구강점막 세포시트를 얻을 수 있었다. 즉, 채취한 구강점막 조직을 체외에서 약 2주 이내에 인체 구강점막과 흡사한 3차원의 구강점막 세포시트 제작이 가능하였고, 이의 특성이 정상 구강점막 조직과 유사함을 확인하였다.

[85]

- [86] **[실시예 2] 피부, 식도 점막 및 인두 점막을 이용한 세포시트 제작**

- [87] **1. 피부, 식도 점막 및 인두 점막을 이용한 3차원 세포시트 제작**

- [88] 실시에 1과 동일한 방식으로, 피부, 식도 및 인두 조직을 채취하여 3차원 세포시트를 제조하였다.

- [89] **2. 피부, 식도 점막 및 인두 점막을 이용한 3차원 세포시트의 특성 분석**

- [90] (1) 구강점막 조직과 피부 조직을 실시예 1의 방법으로 일차배양한 뒤, 날짜별 구강 점막 (oral muscosa)과 피부 상피각질세포(skin epithelium)의 세포 성장을 도립현미경 사진(x100배)으로 도 7에 나타내었고, 각각의 증식된 세포수(A)와 세포 생존률(B)을 도 8에 나타내었다.

- [91] (2) 또한, 구강점막, 피부, 식도점막 및 인두점막에서 조직을 채취하여, 실시예 1의 방법으로 체외에서 일차배양 9일 후, 각각의 각질세포 및 섬유아세포를 도립현미경 사진(x100배)으로 도 9에 나타내었다.

- [92] (3) 또한, 각 조직을 이용해 실시예 1과 동일한 방식으로 제조한 세포시트와 정상조직의 조직학적 특성을 비교한 결과를 도 10 (헤마토실린-에오신 염색 사진)에 나타내었다.

- [93] (4) 또한, 구강점막, 피부, 식도 및 인두에서 채취한 조직의 일차배양 후 클론형성능을 비교하기 위하여, 각각의 조직을 채취한 후, 실시예 1의 방법으로 일차배양하고 각각 같은 수의 세포를 뿌려 약 14일 동안 배양한 후 형성된 클론의 개수를 비교하였다 (피브린 처리). 이의 대조군으로는, 피브린을

처리하지 않은 점막세포를 사용했다. 그 결과는 도 11에 나타내었다.

- [94] (5) 아울러, 제작된 3차원 세포시트의 처리와 탈착의 용이성을 확인한 결과를 도 12 (A: 인서트를 포함한 세포 배양접시에 담겨있는 3차원 세포시트 육안 사진; B: 인서트를 꺼내 핀셋 등을 이용하여 세포시트를 배지 접촉면으로부터 가볍게 떼고 생리식염수가 담긴 배양 접시에 옮기는 과정을 찍은 사진; 좌로부터 우로 탈착과 이동과정을 나타냄)에 나타내었다. 상기의 결과, 채취 후 약 2주 내 완성된 구강점막 세포시트를 핀셋을 이용해 인서트의 변연(marginal)으로부터 가볍게 물리적으로 탈착할 수 있었다.

[95]

- [96] [실시예 3] 본 발명에서 제조한 세포시트의 이식

- [97] 1. 마우스 구강 창상 모델에서 세포시트의 이식 효과 확인.

- [98] 동물실험을 위한 3차원 세포시트 (구강점막을 이용한 세포시트)와 이의 대조군으로 실라스틱 시트를 알맞게 잘라 준비하고 (도 13 참조), 이를 마우스 구강 창상 모델 (마우스 구강 볼점막(buccal mucosa)에 전층 창상(full-thickness wound)을 만듦)에 세포시트를 적용하여 (도 14 참조), 이의 치료효과를 확인하였다(도 17 참조).

- [99] 창상 후, 4주째 되는 실험동물을 희생하고, 창상부를 수거해 헤마토실린-에오신 염색 후, 관찰한 결과를 도 15에 나타내었다. 또한, 창상 후, 4주째 수거한 구강점막 조직에서 Image J 프로그램(A)을 이용하여, 점막상피 두께(B), 점막하조직의 두께(C)와 콜라겐 밀도 (콜라겐 밀도는 마손-트릭론(masson-trichrome) 염색 후 상대적인 콜라겐 밀도 조사함)를 창상을 주지 않는 정상 점막조직, 창상 점막, 창상에 세포시트를 적용한 군을 비교하였고, 이의 결과를 도 16에 나타내었다.

- [100] 도 15에 나타난 바와 같이, 세포시트를 사용하지 않은 대조군(A)에 비하여, 세포시트를 사용한 실험군(B)에서 구강점막 상피층의 두께가 구강점막조직(C)과 유사하게 회복됨을 확인하였다.

- [101] 도 16에 나타난 바와 같이, 점막하조직 및 점막상피의 두께는 창상 점막에 비하여 증가하였고, 콜라겐 밀도는 감소함을 확인하였다.

- [102] 상기의 결과를 종합하면, 창상군에서는 정상 볼점막과 같은 재상피화가 이루어졌으나, 점막이 얇게 형성되고 반흔(scar)이 남았다. 이에 반해, 세포시트를 사용한 실험군의 경우, 정상 볼점막과 비슷한 재상피화가 형성됨을 확인하였다.

[103]

- [104] 2. 마우스 피부 창상모델에서 세포시트 이식 효과 확인

- [105] 실시예 3-1과 같은 방식으로 (피부조직을 이용하여 제조된 세포시트 이용), 마우스 피부 창상모델에 본 발명의 세포시트를 이식하였다. 구체적으로, 누드마우스와 랫트 모델에서 각각 약 2cm 크기의 피부 전층(full thickness) 창상 모델을 만들고, 3차원 세포시트를 덮은 후, 3차원 세포시트를 덮지 않은

대조군과 창상 치유 효과를 비교하였다.

[106] 이의 결과를 도 18에 나타내었다. 또한, 마우스 피부 창상모델에서 3차원 세포시트의 창상치유 효과를 조직학적으로 분석한 결과를 도 19에 나타내었다.

[107] 도 18 및 도 19에 나타난 바와 같이, 생쥐 정상 피부조직 (도 19의 A)에 비하여 창상부 피부 상피 (도 19의 B)가 얇고, 세포시트를 덮은 군에서 정상조직과 비슷한 창상 치유가 관찰됨을 확인하였다. 또한, 상피와 상피하 조직의 두께 (도 19의 D, E)를 image J 프로그램을 이용하여 분석한 결과, 정상 피부조직과 세포시트를 덮은 군에서 비슷한 창상 치유효과를 확인하였다.

[108]

[109] **3. 세포시트 이식의 부작용 확인**

[110] 3차원 세포시트의 이식이 종양형성 등 부작용을 확인하기 위하여, 본 발명의 3차원 세포시트를 누드마우스의 피하에 이식하고, 4주 후 이식한 부위를 열어 육안적 및 현미경적 관찰하여, 종양형성등의 부작용을 확인하였다.

[111] 이의 결과를 도 20에 나타내었다.

[112] 도 20에 나타난 바와 같이, 종양형성등의 부작용이 없음을 확인하였다.

[113]

[114] **4. 결손부 창상에 대한 구강점막을 이용하여 제조된 세포시트의 이식 효과**

[115] 실시에 1 또는 2에서 제조된 구강점막 이용 세포시트를 2mL 배양액이 포함된 배양 접시에 옮기고 이식이 필요한 수술실로 이동하였다. 세포시트의 끝을 두 개의 핀셋을 이용하여 가볍게 잡아 누드마우스의 점막결손부에 덮었다. 이의 결과를 도 21에 나타내었다.

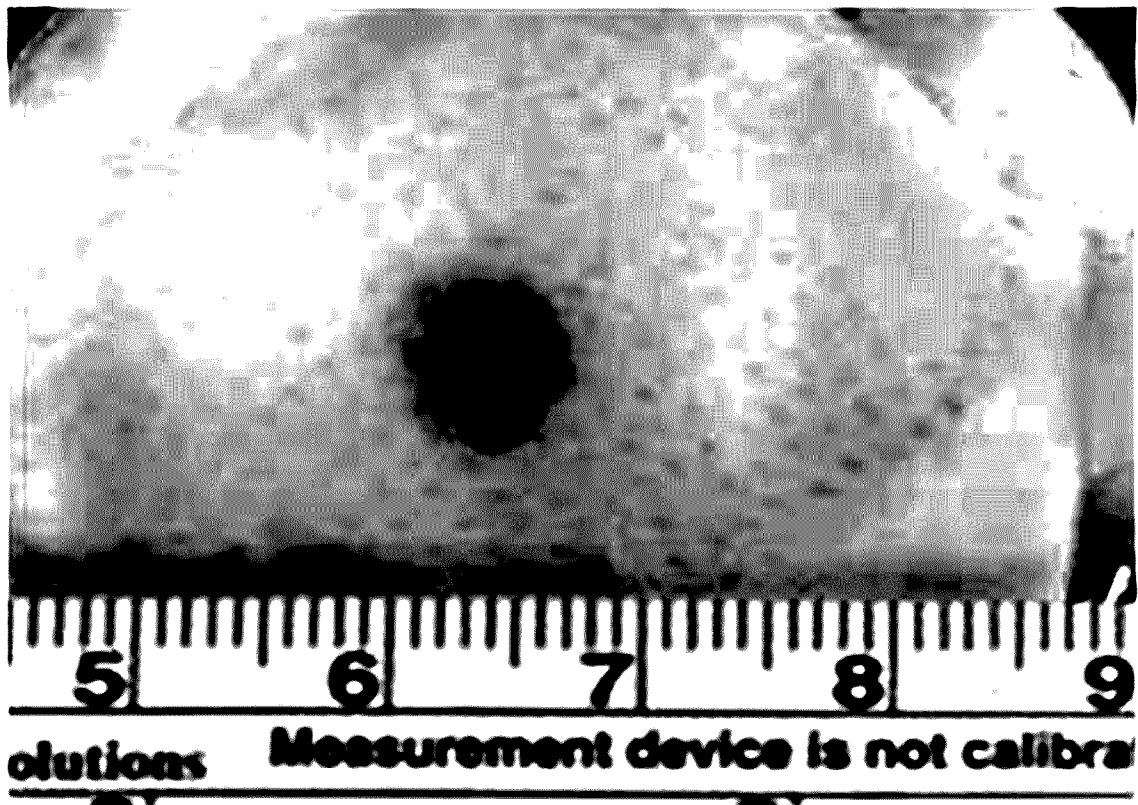
[116] 도 21에 나타난 바와 같이, 제작된 점막 세포시트가 잘 찢어지지 않으면서도 신축성이 뛰어나고, 실제로 점막결손부의 크기가 30cm² 까지 모양과 크기에 상관없이 점막결손부 변연부 정상 점막 4 내지 5군데에 세포시트 끝을 봉합해 사용이 용이함을 확인하였고, 창상 회복을 매일 관찰한 결과, 생체 결손부에 이식한 자가이식 구강점막 세포시트가 감염, 분리됨 없이 잘 안착되어 결손부 창상의 원활한 재상피화가 관찰됨을 확인하였다.

청구범위

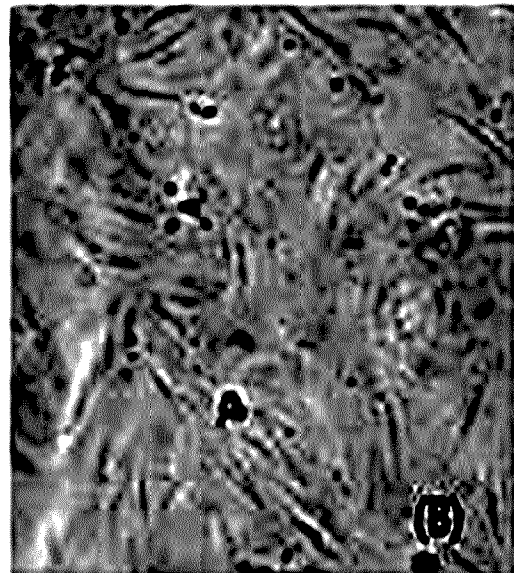
- [청구항 1] 섬유아세포(fibroblast)를 포함하는 제 1 세포층; 및 상피세포가 포함된 제 2 세포층을 포함하는 세포시트.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 제 1 세포층은 상기 섬유아세포에 피브린 및 혈청을 가하여 응고시켜 형성된 것임을 특징으로 하는, 세포시트.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 제1세포층은 상기 섬유아세포에 피브린, MEM(minimum essential medium), 혈청, 염 및 혈액 응고제를 가하여 응고시켜 형성된 것임을 특징으로 하는 세포시트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 제2세포층은 형성된 제1세포층에 상피세포를 분주하여 배양함으로써 형성된 것임을 특징으로 하는 세포시트.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 상피세포는 각질세포(keratinocyte)인, 세포시트.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 상피세포는 구강, 식도, 인두 및 피부 중 선택된 어느 1 종 이상으로부터 유래된 것인, 세포시트.
- [청구항 7] 다음 단계를 포함하는 세포시트의 제작방법:
 (a) 단일세포화(single cell suspension)한 섬유아세포와 상피세포를 수득하여 각각 배양하는 단계;
 (b) 상기 배양된 섬유아세포를 세포 지지체에 분주하여 제 1 세포층을 형성하는 단계; 및
 (c) 상기 제1세포층에 상기 배양된 상피세포를 분주하고 배양하여 제 2 세포층을 형성함으로써 세포시트를 제작하는 단계.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 (a)단계는,
 개체로부터 분리된 피부 또는 점막 조직으로부터 상피층과 상피하조직층을 각각 분리하는 단계; 및
 상기 상피층으로부터 단일세포화한 상피세포를 수득하고, 상기 상피하조직층으로부터 단일세포화한 섬유아세포를 수득하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
 상기 분리된 피부 또는 점막 조직은 피부, 식도, 인두 및 구강 중 선택된 1종 이상으로부터 분리된 것임을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제7항에 있어서,
 상기 (a)단계의 상피세포의 배양은 영양세포(Feeder)가 포함되지 않은 배지에서 5 내지 9일간 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 (b)단계는, 섬유아세포에 피브린 및 혈청을 가하여 응고시켜 제1세포층을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제7항에 있어서, 상기 (b)단계는, 섬유아세포에 피브린, MEM(minimum essential medium), 혈청, 염 및 혈액 응고제를 가하여 응고시켜 제1세포층을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 13] 제7항에 있어서, 상기 상피세포는 각질세포(keratinocyte)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제7항에 있어서, 상기 (c)단계는 상피세포의 밀도가 90~100%가 되도록 배양한 다음 세포시트를 분리함으로써 제작하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 세포시트를 유효성분으로 포함하는, 세포치료제.

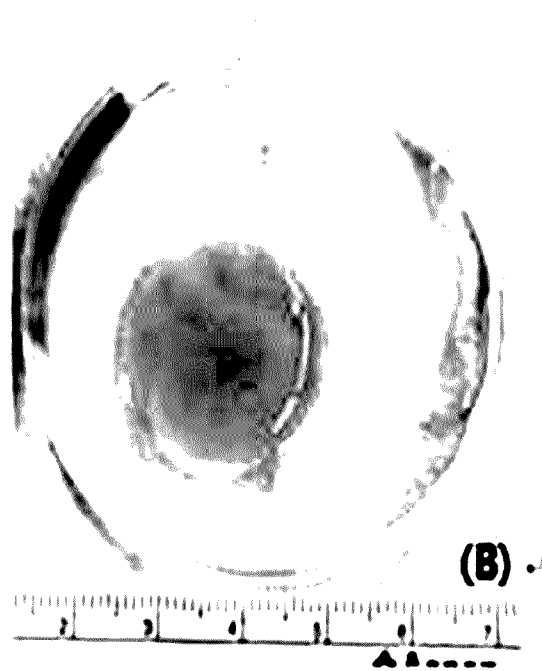
[도1]



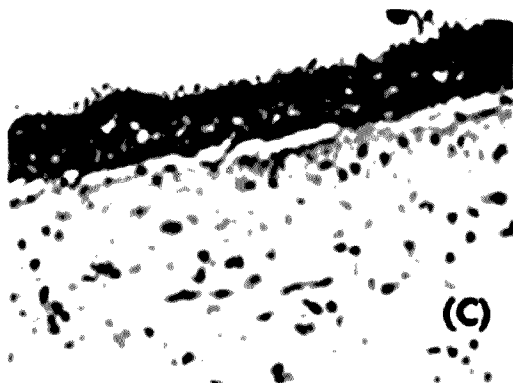
[도2]



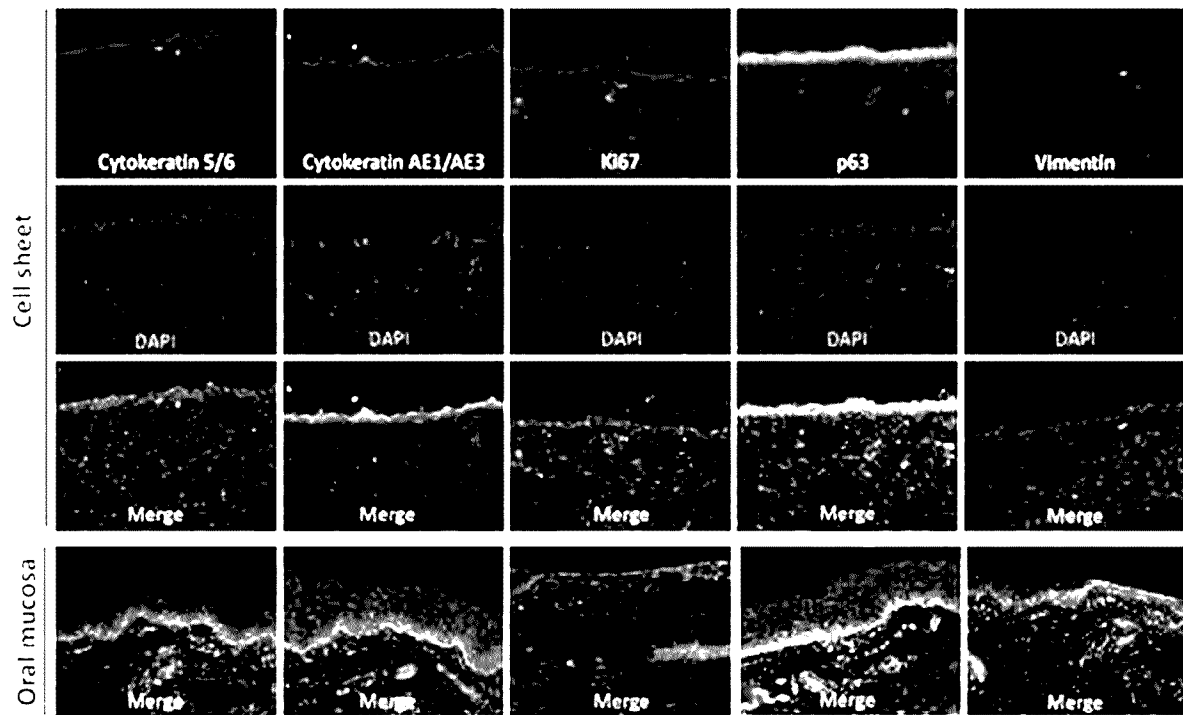
[도3]



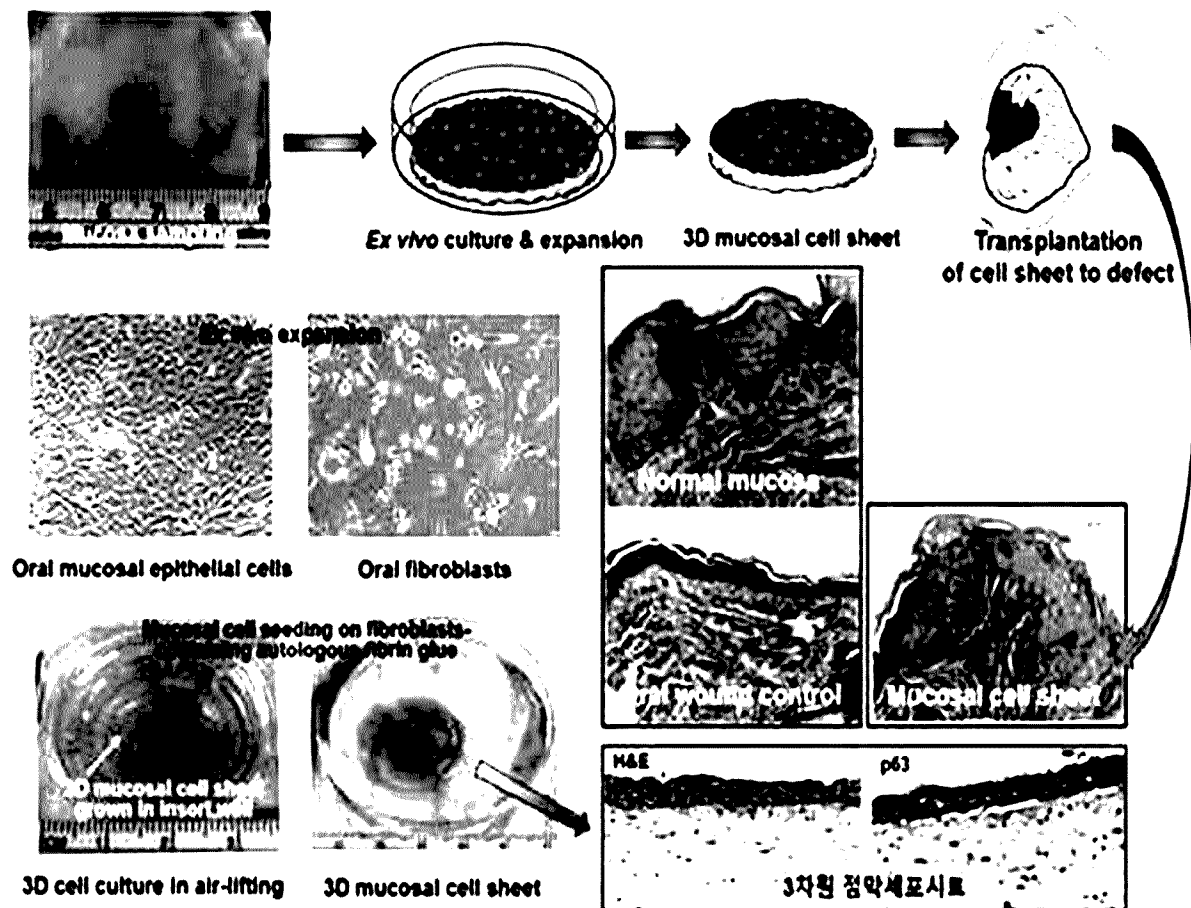
[도4]



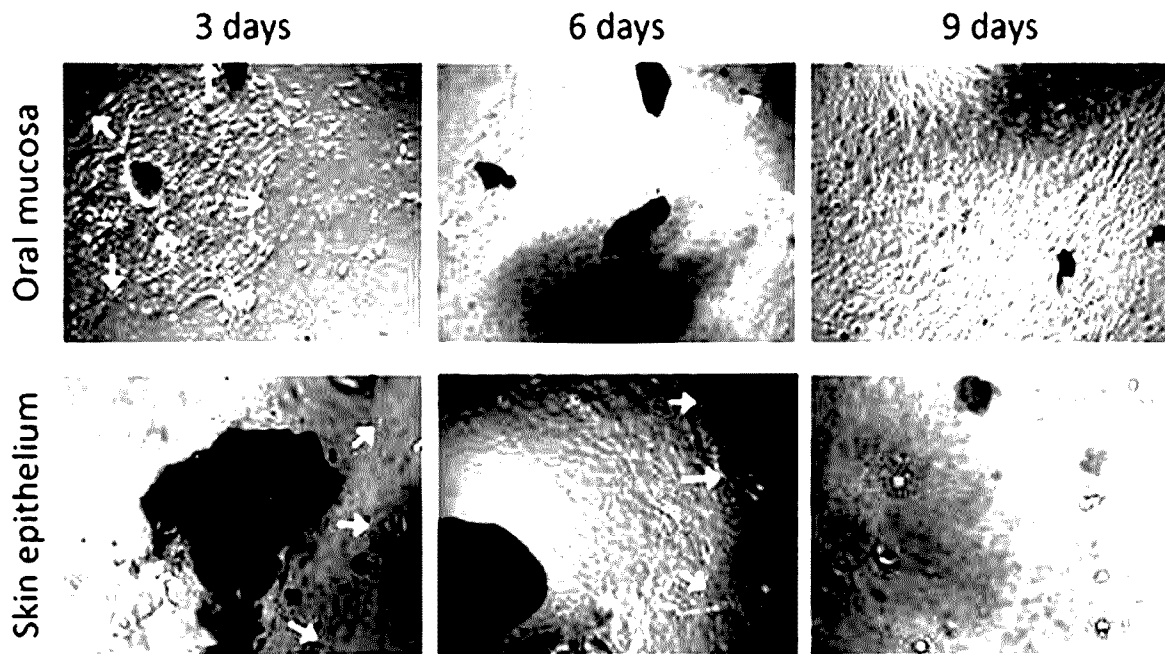
[도5]



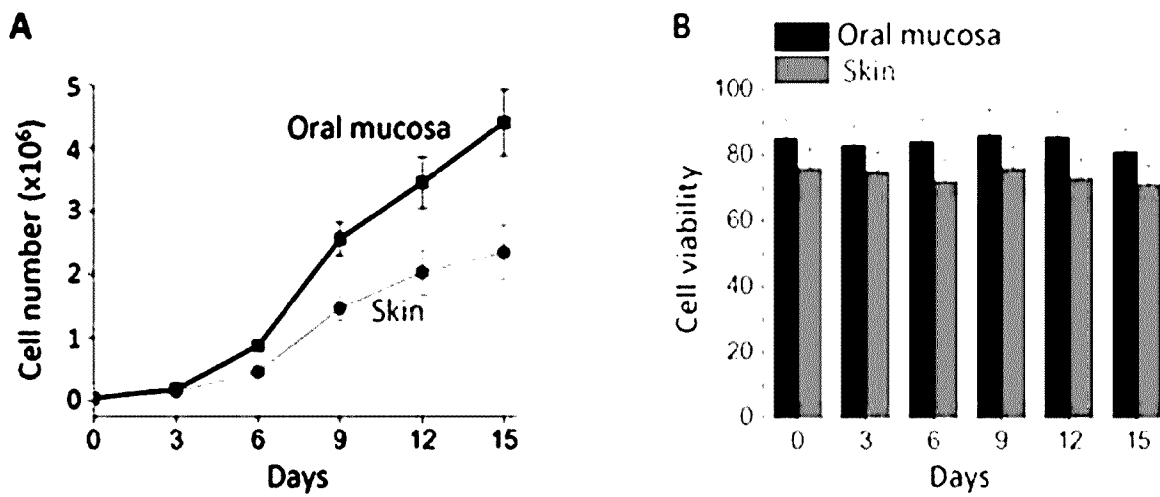
[도6]



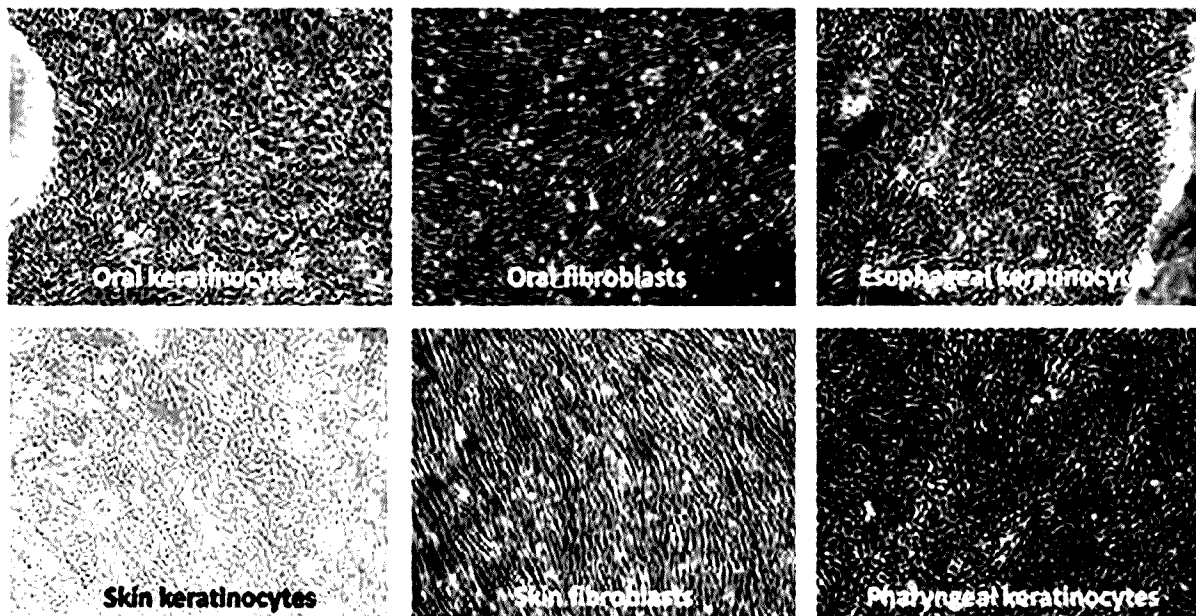
[도7]



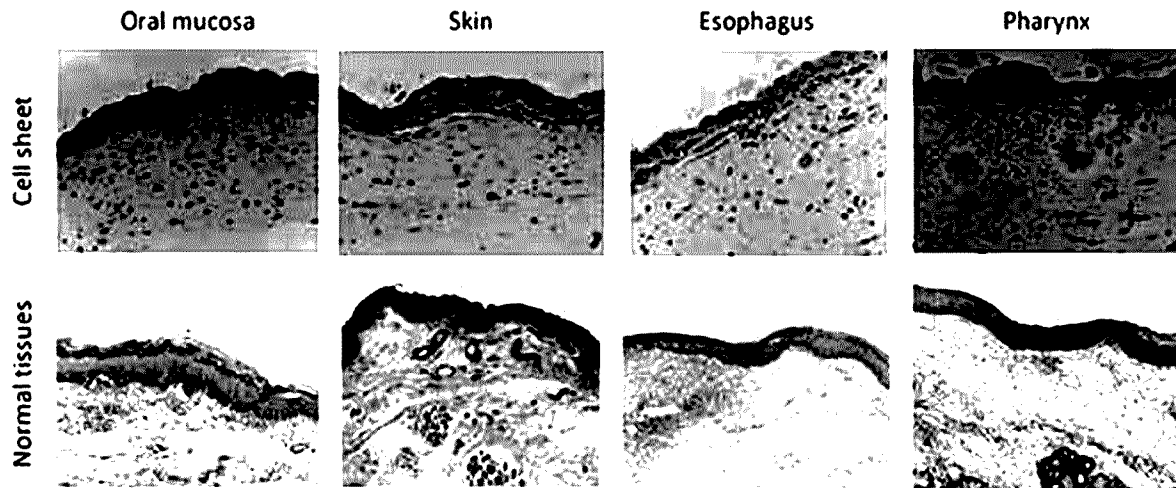
[도8]



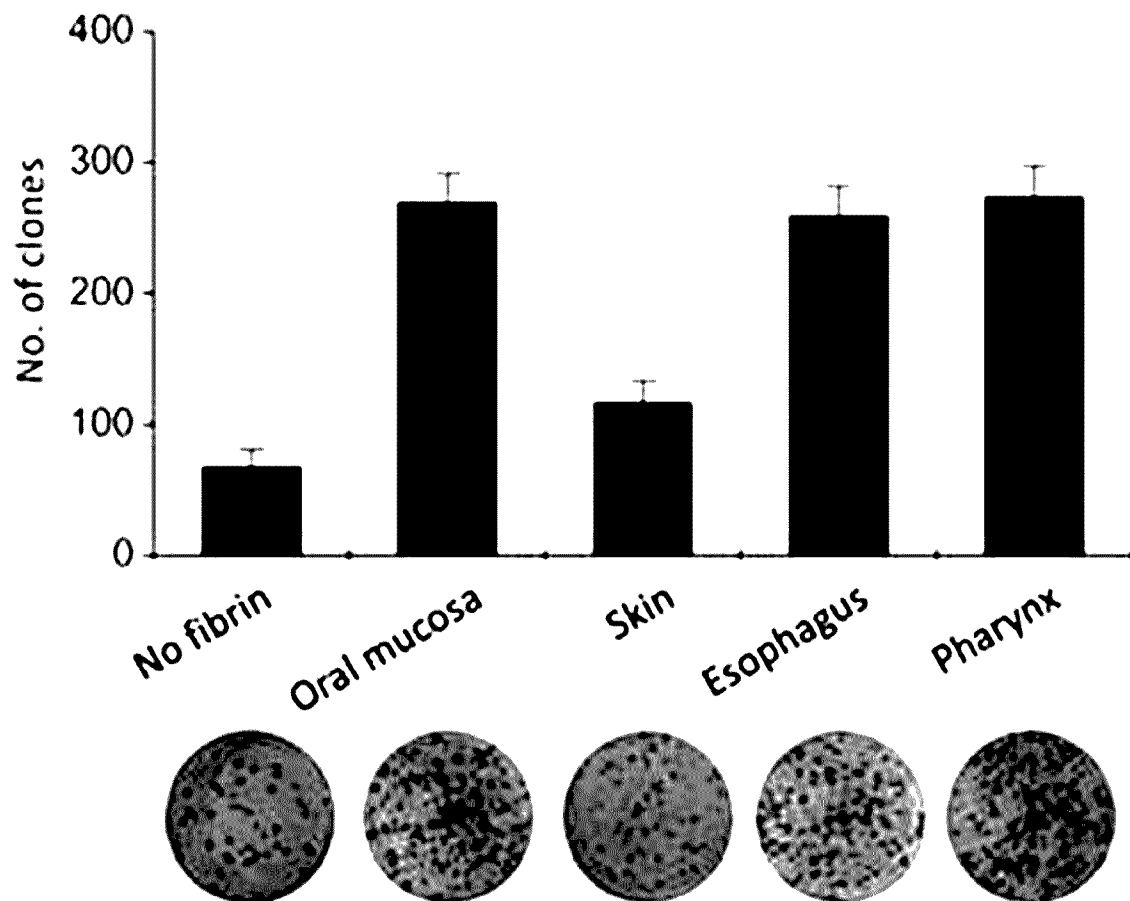
[도9]



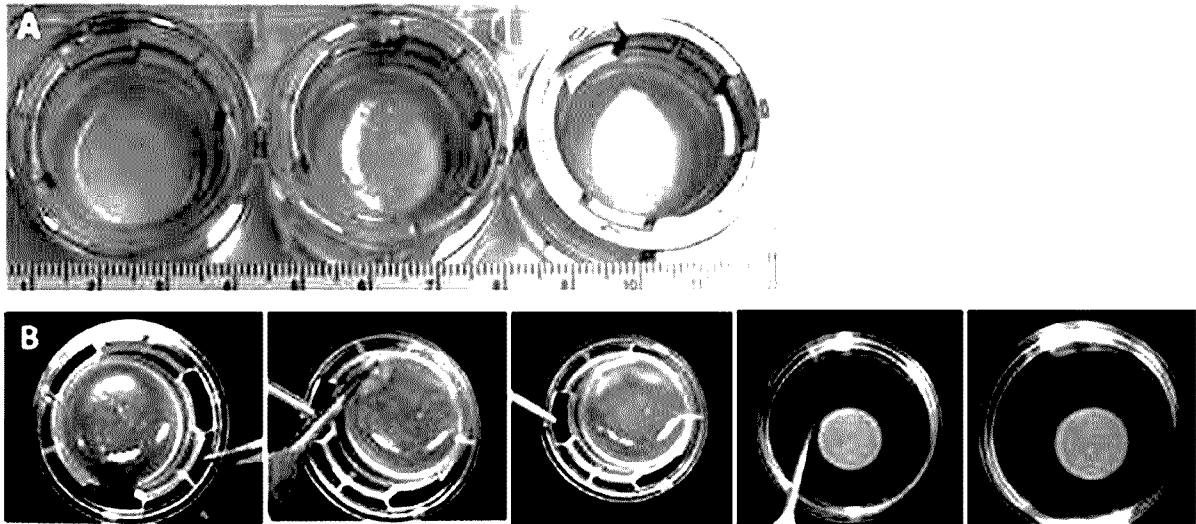
[도10]



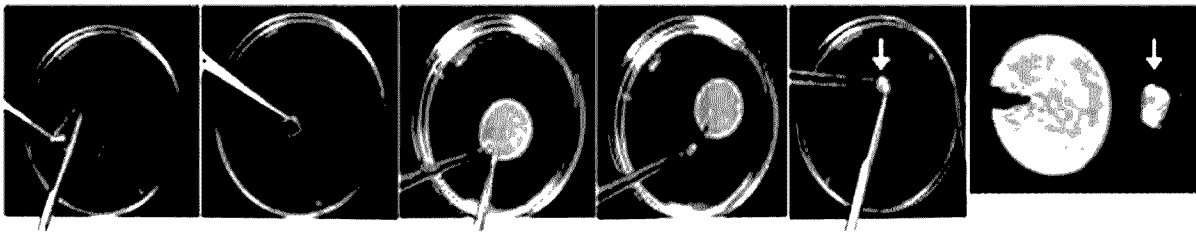
[도11]



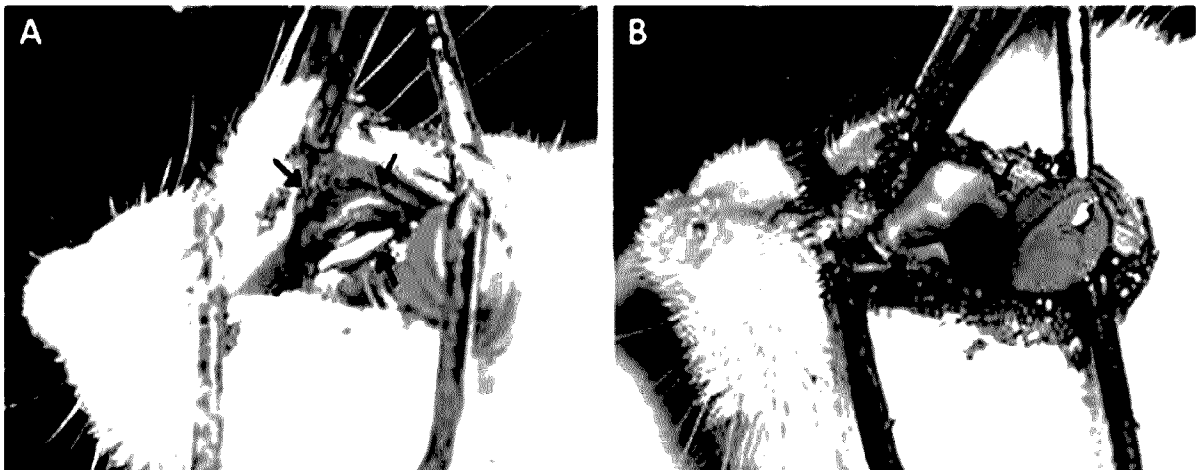
[도12]



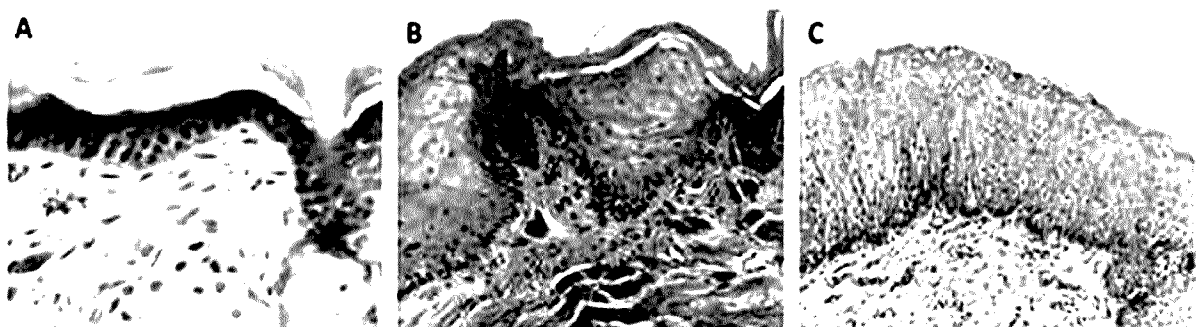
[도13]



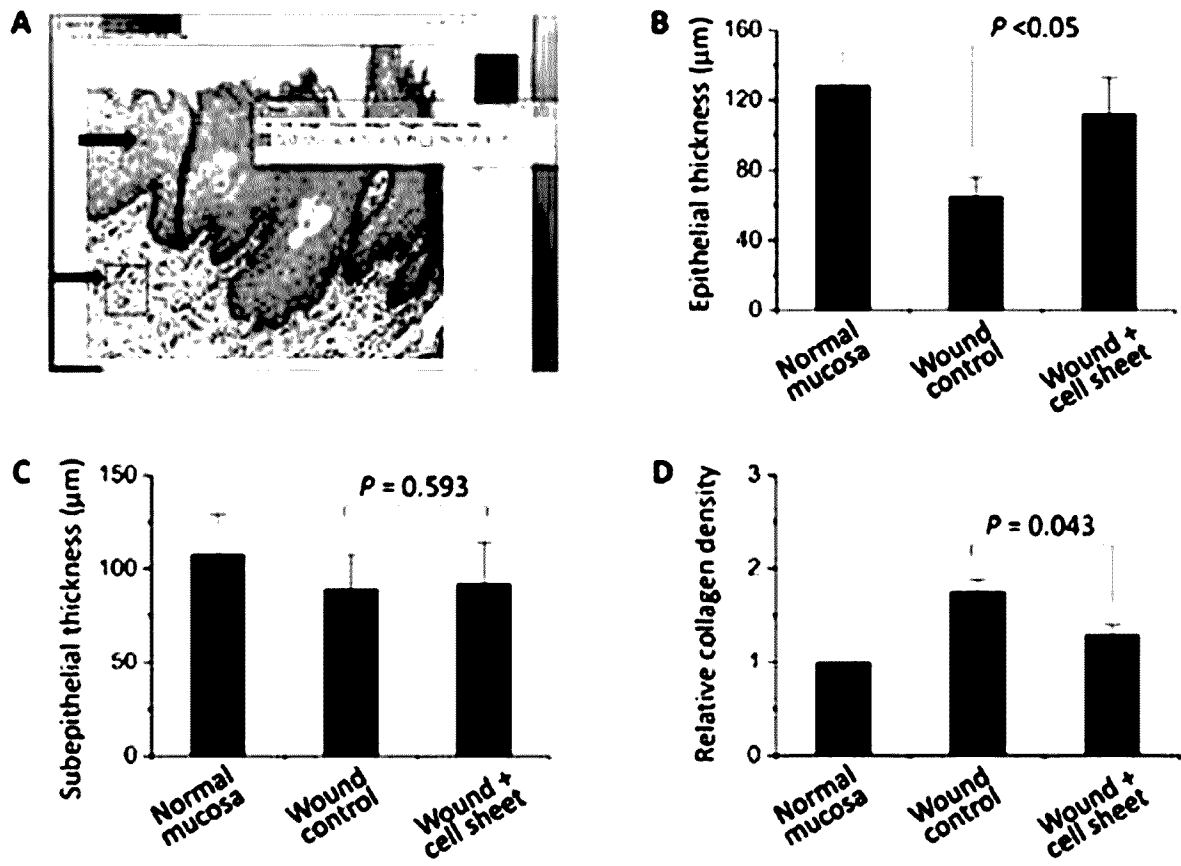
[도14]



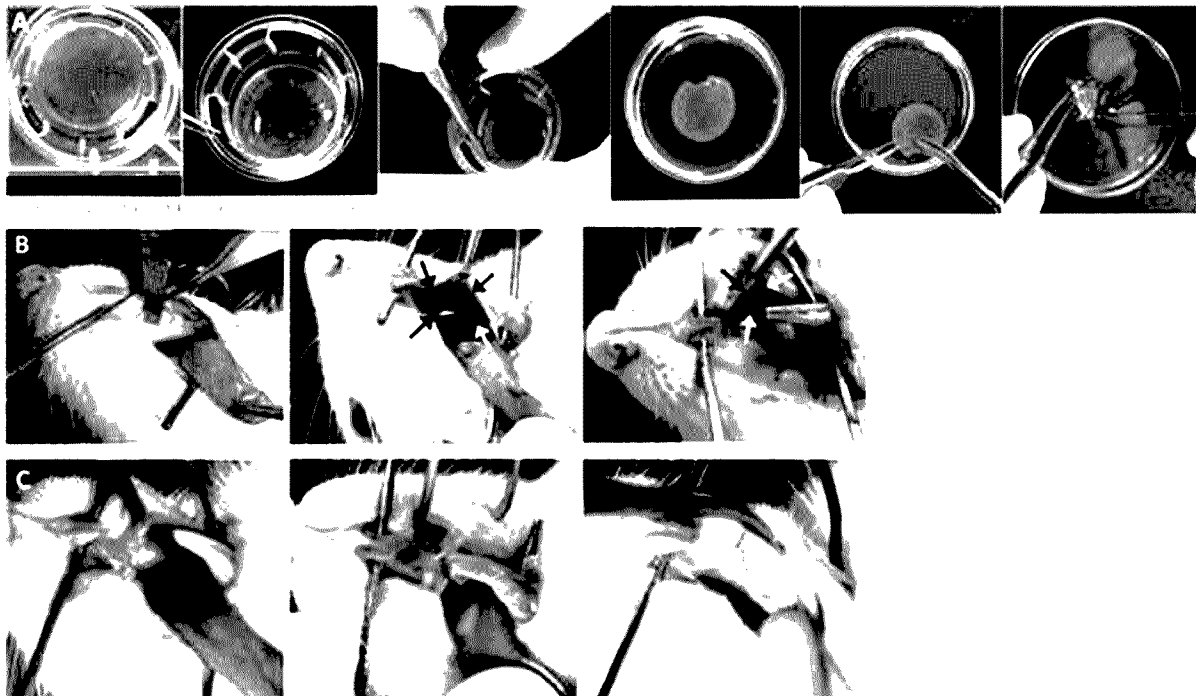
[도15]



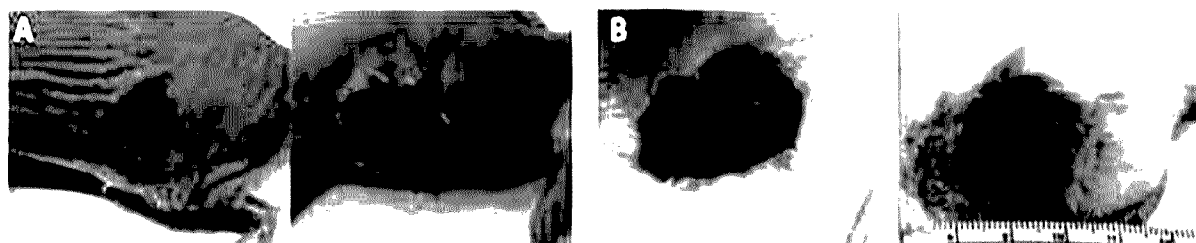
[도16]



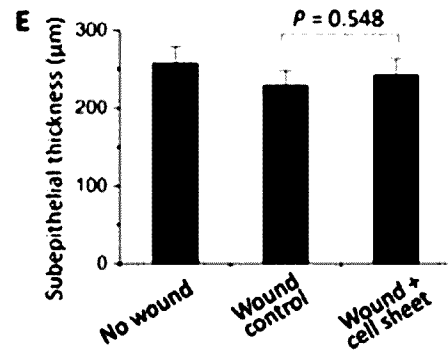
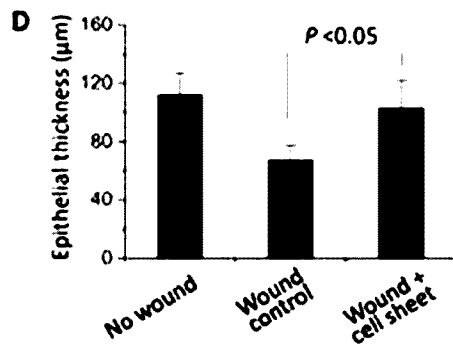
[도17]



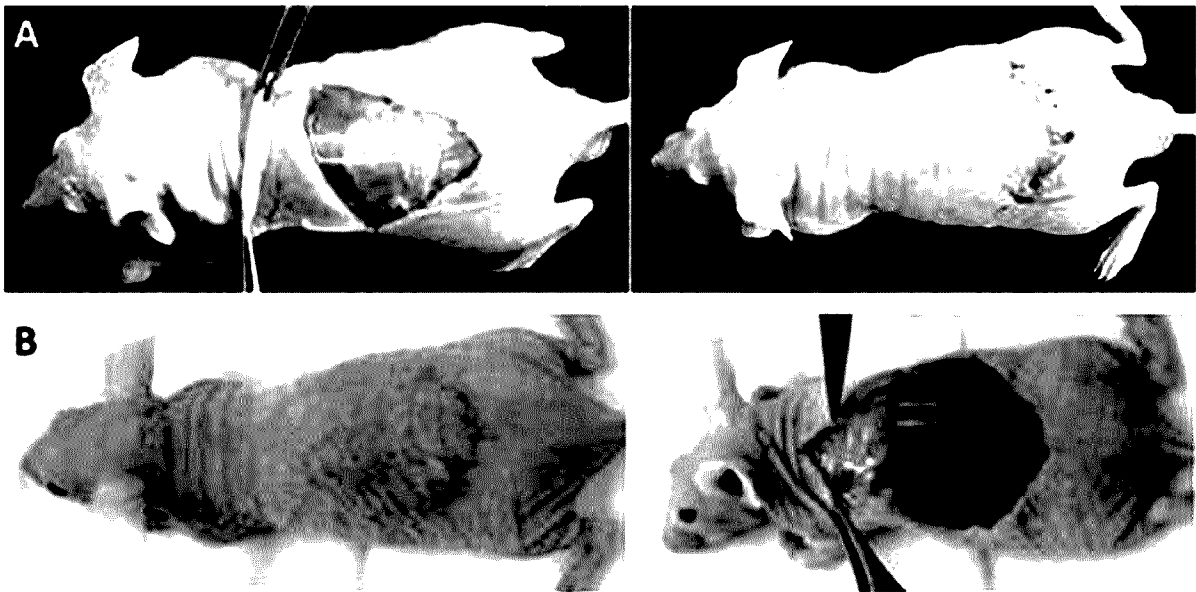
[도18]



[도19]



[도20]



[도21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/006312**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 9/70(2006.01)i, A61L 15/14(2006.01)i, A61L 17/00(2006.01)i, A61K 35/36(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)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)

A61K 9/70; A61L 27/60; C12N 5/071; C12N 1/00; A61L 27/00; A61L 27/24; C12N 5/08; A61L 27/54; C12Q 1/68; A61L 15/14; A61L 17/00; A61K 35/36

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: fibroblast, epithelial cell, cell sheet, keratinocyte, cultivation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PENA, I. et al., "In Vitro Engineering of Complete Autologous Oral Mucosa Equivalents: Characterization of a Novel Scaffold", Journal of Periodontal Research, 2010, vol. 45, no. 3, pages 375-380 See abstract; and pages 376, 377, 379.	1-15
X	US 2013-0195958 A1 (BURGL, Zambrano J. C. et al.) 01 August 2013 See paragraphs [0060]-[0111]; and claims 1-12.	1,4-10,13-15
X	JP 2004-147585 A (KJOJIN BIO KK et al.) 27 May 2004 See abstract; and claims 1-9.	1, 4- 10,13-15
X	KR 10-2016-0007901 A (JEON, Sae Hwa) 21 January 2016 See example 2; and claims 1-17.	1, 4- 10,13-15
X	US 2003-0170892 A1 (BOYCE, S. T.) 11 September 2003 See claims 1-33.	1, 4- 10,13-15
X	KR 10-2011-0032381 A (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) 30 March 2011 See paragraph [0053]; and claims 1-15.	1, 4-6



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

31 AUGUST 2017 (31.08.2017)

Date of mailing of the international search report

31 AUGUST 2017 (31.08.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/006312

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	ROH, J. L. et al., "Promotion of Oral Surgical Wound Healing Using Autologous Mucosal Cell Sheets", Oral Oncology, [Electronic publishing] 25 April 2017, vol. 69, pages 84-91 See abstract; and pages 85-87.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/006312

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0195958 A1	01/08/2013	BR 112012029546 A2	13/10/2015
		CL 2012003244 A1	18/10/2013
		CN 103003415 A	27/03/2013
		CN 103003415 B	08/02/2017
		EP 2573167 A1	27/03/2013
		MX 2012013500 A	05/06/2013
		MX 339001 B	09/05/2016
		US 9222076 B2	29/12/2015
		WO 2011-144956 A1	24/11/2011
JP 2004-147585 A	27/05/2004	JP 4313021 B2	12/08/2009
KR 10-2016-0007901 A	21/01/2016	KR 10-1613618 B1	20/04/2016
		WO 2016-006944 A1	14/01/2016
US 2003-0170892 A1	11/09/2003	AT 431400 T	15/05/2009
		AU 2003-217907 A1	22/09/2003
		CA 2478107 A1	18/09/2003
		CA 2478107 C	13/05/2014
		DK 1483373 T3	07/09/2009
		EP 1483373 A2	08/12/2004
		EP 1483373 B1	13/05/2009
		EP 2075330 A1	01/07/2009
		EP 2075330 B1	11/05/2016
		EP 2302035 A2	30/03/2011
		EP 2302035 A3	01/06/2011
		EP 2302035 B1	11/05/2016
		ES 2326873 T3	21/10/2009
		JP 2005-518910 A	30/06/2005
		JP 2008-200520 A	04/09/2008
		JP 2011-172592 A	08/09/2011
		JP 4555576 B2	06/10/2010
		JP 5535446 B2	02/07/2014
		JP 5689023 B2	25/03/2015
		US 2010-0254955 A1	07/10/2010
		US 2013-0259919 A1	03/10/2013
		US 2014-0287020 A1	25/09/2014
		US 7741116 B2	22/06/2010
		US 8450108 B2	28/05/2013
		US 8765468 B2	01/07/2014
		US 9089417 B2	28/07/2015
		WO 03-076604 A2	18/09/2003
		WO 2003-0 76604	04/03/2004
KR 10-2011-0032381 A	30/03/2011	KR 10-1103571 B1	09/01/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 9/70(2006.01)i, A61L 15/14(2006.01)i, A61L 17/00(2006.01)i, A61K 35/36(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 9/70; A61L 27/60; C12N 5/071; C12N 1/00; A61L 27/00; A61L 27/24; C12N 5/08; A61L 27/54; C12Q 1/68; A61L 15/14; A61L 17/00; A61K 35/36

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: 섬유아세포, 상피세포, 세포시트, 각질세포, 배양

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	PENA, I. 등, "In vitro engineering of complete autologous oral mucosa equivalents: characterization of a novel scaffold", Journal of Periodontal Research, 2010, 45권, 3호, 페이지 375-380 초록; 및 페이지 376, 377, 379 참조.	1-15
X	US 2013-0195958 A1 (ZAMBRANO BURGL, J. C. 등) 2013.08.01 단락 [0060]-[0111]; 및 청구항 1-12 참조.	1,4-10,13-15
X	JP 2004-147585 A (KOOJIN BIO KK 등) 2004.05.27 요약; 및 청구항 1-9 참조.	1,4-10,13-15
X	KR 10-2016-0007901 A (전세화) 2016.01.21 실시예 2; 및 청구항 1-17 참조.	1,4-10,13-15
X	US 2003-0170892 A1 (BOYCE, S. T.) 2003.09.11 청구항 1-33 참조.	1,4-10,13-15
X	KR 10-2011-0032381 A (한림대학교 산학협력단) 2011.03.30 단락 [0053]; 및 청구항 1-15 참조.	1,4-6

☒ 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

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

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

"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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 08월 31일 (31.08.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 08월 31일 (31.08.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



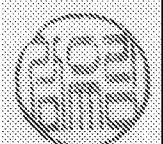
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	ROH, J. -L. 등, “Promotion of oral surgical wound healing using autologous mucosal cell sheets”, Oral Oncology, [전자공개]2017.04.25, 69권, 페이지 84-91 초록; 및 페이지 85-87 참조.	1-15

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2013-0195958 A1	2013/08/01	BR 112012029546 A2 CL 2012003244 A1 CN 103003415 A CN 103003415 B EP 2573167 A1 MX 2012013500 A MX 339001 B US 9222076 B2 WO 2011-144956 A1	2015/10/13 2013/10/18 2013/03/27 2017/02/08 2013/03/27 2013/06/05 2016/05/09 2015/12/29 2011/11/24
JP 2004-147585 A	2004/05/27	JP 4313021 B2	2009/08/12
KR 10-2016-0007901 A	2016/01/21	KR 10-1613618 B1 WO 2016-006944 A1	2016/04/20 2016/01/14
US 2003-0170892 A1	2003/09/11	AT 431400 T AU 2003-217907 A1 CA 2478107 A1 CA 2478107 C DK 1483373 T3 EP 1483373 A2 EP 1483373 B1 EP 2075330 A1 EP 2075330 B1 EP 2302035 A2 EP 2302035 A3 EP 2302035 B1 ES 2326873 T3 JP 2005-518910 A JP 2008-200520 A JP 2011-172592 A JP 4555576 B2 JP 5535446 B2 JP 5689023 B2 US 2010-0254955 A1 US 2013-0259919 A1 US 2014-0287020 A1 US 7741116 B2 US 8450108 B2 US 8765468 B2 US 9089417 B2 WO 03-076604 A2 WO 2003-0 76604	2009/05/15 2003/09/22 2003/09/18 2014/05/13 2009/09/07 2004/12/08 2009/05/13 2009/07/01 2016/05/11 2011/03/30 2011/06/01 2016/05/11 2009/10/21 2005/06/30 2008/09/04 2011/09/08 2010/10/06 2014/07/02 2015/03/25 2010/10/07 2013/10/03 2014/09/25 2010/06/22 2013/05/28 2014/07/01 2015/07/28 2003/09/18 2004/03/04
KR 10-2011-0032381 A	2011/03/30	KR 10-1103571 B1	2012/01/09