(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 12 월 5 일 (05.12.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/180431 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/078 (2010.01) *A61L 27/38* (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/004642

(22) 국제출원일: 2013 년 5 월 28 일 (28.05.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0057008 2012 년 5 월 29 일 (29.05.2012) KR

(71) 출원인: **서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 151-742 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: **조현철 (JO, Hyun Chul)**; 138-913 서울시 송파구 잠실 2 동 리센츠아파트 259-2801, Seoul (KR). **김향 (KIM, Hyang)**; 423-736 경기도 광명시 철산 3 동 주공아파트 1204-303, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **박원미 (PARK, Weonmee)**; 138-715 서울시 강남구 논현로 412, 601 호, 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, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, SD, SL, 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 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

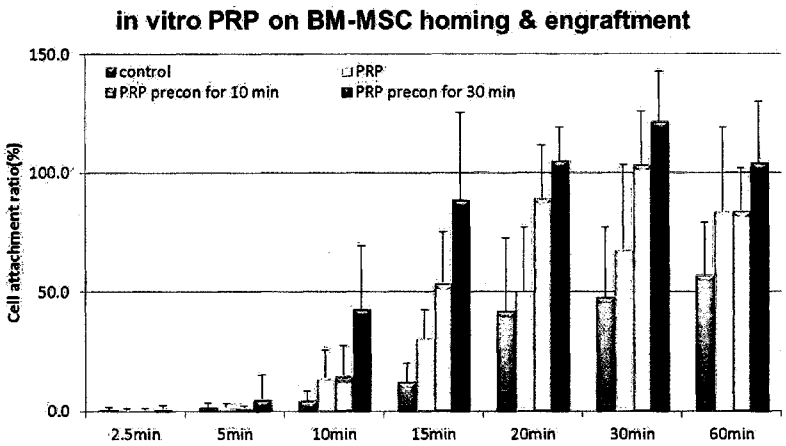
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) **Title**: COMPOSITION FOR ENHANCING CELL ENGRAFTMENT AND HOMING PROPERTIES, CONTAINING PRP AS ACTIVE INGREDIENT

(54) **발명의 명칭** : 피알피를 유효성분으로 포함하는 세포 부착능 및 귀소능 증진용 조성물



(57) **Abstract**: The present invention provides a composition for enhancing cell engraftment and homing properties, containing platelet-rich plasma (PRP) as an active ingredient. The present invention provides a method for improving cell engraftment and homing properties, comprising the step of treating *in vitro* isolated cells with a composition containing PRP as an active ingredient. According to the present invention, when a cell to be transplanted or a region to which cells are transplanted is treated with PRP, or a cell to be transplanted is mixed with PRP, transplantation to an in vivo region is carried out, thereby increasing cell engraftment in a transplanted region and increasing cell homing from a transplanted region to a damaged region.

(57) **요약서**: 본 발명은

[다음 쪽 계속]

WO 2013/180431 A1

PRP(Platelet-Rich Plasma)를 유효성분으로 포함하는 세포 부착능 및 귀소능 증진용 조성물을 제공한다. 본 발명은 PRP를 유효성분으로 포함하는 조성물을 생체외 분리된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 세포의 부착능 및 귀소 능을 개선하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 이식하고자 하는 세포 또는 세포를 이식하고자 하는 부위에 PRP를 전처리하거나, PRP를 이식하고자 하는 세포와 혼합하여 생체내 부위에 이식하면 이식 부위에서 세포의 부착능이 증가하며, 이식 부위에서 손상부위로 세포의 귀소능이 증가한다.

【명세서】

【발명의 명칭】

피알피를 유효성분으로 포함하는 세포 부착능 및 귀소능 증진용 조성물

【기술분야】

본 발명은 PRP를 유효성분으로 포함하는 세포 부착능 및 귀소능 증진용 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

최근 들어 세포를 상처 및 질병 치료에 이용하는 세포 치료가 의약의 새로운 패러다임이 되었다. 예를 들면 연골세포, 근아세포, 골아세포, 심장세포, 섬유아세포, 지방세포, 뉴런, 간세포 등과 같은 분화된 조직 특이적 세포 및 조혈줄기세포, 간엽줄기세포, 조직특이적 전구세포, 배아줄기세포, 유도만능줄기세포 등과 같은 미분화 줄기세포 또는 전구세포는 다양한 의약 분야에서 이용되고 있다.

그러나, 세포 치료의 임상 적용에 있어서 가장 중요하면서도 일반적인 문제는 세포의 귀소(homing, 신체 내 손상된 조직이나 부위를 찾아가는 것을 의미함) 및 생착(engrafting) 능력이 부족하다는 것과 손상되거나 질병을 가진 조직 또는 기관의 아노이키스(anoikis) 및 가혹한 미세환경 등 다양한 원인에 의해 이식된 세포의 생존능력이 떨어진다는 것이다(13). 특히 SDF-1의 수용체인 CXCR4와 같은 귀소 수용체가 배양된 간엽세포에서는 사라지기 때문에 백혈구 및 조혈모세표와 비교하였을 때, 귀소에 있어서 비효율적이다 (14).

그러므로, 관심 조직으로 세포를 표적화하고 생착시키는 것은 성공적인 세포 치료에서 중요하다. 특히 특정 조직으로의 귀소 능력이 증가된 세포는 치료 효과를 달성하는데 요구되는 세포의 숫자를 현저하게 줄일 수 있으며, 귀소 능력의 증가로 인해 세포 배양에 필요한 시간, 비용 및 노력을 줄일 수 있으며 환자에게서도 보다 좋은 예후를 기대할 수 있다.

종래 세포의 귀소 및 생착 능력을 증가시키는 다음과 같은 몇 가지

방법이 알려져 있다: 1) CXCR4와 같은 귀소 수용체의 유전적 암호화(15, 16), 2) 세포 표면 글리칸의 화학적 엔지니어링(17), 3) 2중 특이성 항체 또는 팔미트산화 단백질 G 또는 A를 통해 세포 표면에 항체 접합(18) 및 4) 특정 귀소 수용체의 발현을 자극시키는 배양 조건 이용(19).

세포 치료의 활성화를 위해 생착능 및 귀소능을 증대시킬 수 있는 물질의 개발이 요구된다.

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.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 PRP를 유효성분으로 포함하는 세포 부착 능 및 귀소능 증진용 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 PRP를 유효성분으로 포함하는 조성물을 생체외 분리된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 세포의 부착능 및 귀소능을 개선하는 방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

한 양태에서 본원은 PRP(Platelet-Rich Plasma)를 유효성분으로 포함하는 세포 부착능 및 귀소 (homing)능 증진용 조성물을 제공한다. 본원에 따른 조성물에 포함되는 PRP는 본원에 따른 조성물이 처리되는 세포의 종류, 생화학적 특징, 이식되는 부위 등에 따라 달라질 수 있으며, 본원에 따른 효과를 달성할 수 있도록 포함된다. 일 구현예에서는 혈장 1 마이크로리터당 약 $2 \times 10^5 - 3 \times 10^8$ 개의 혈소판을 포함한다.

본원에 따른 조성물은 이식을 통해, 근골격계의 손상(injury), 병변,

또는 질환의 재건 복구 및/또는 치료에 사용될 수 있다.

일 구현예에서는 줄기세포, 특히 다능성 줄기세포 (multipotent stem cells), 를 들면 다능성 중간엽줄기세포, 다능성 조혈모줄기세포, 다능성 신경줄기세포, 다능성 내피줄기세포, 다능성 상피줄기세포, 다능성 표피줄기세포, 역분화 줄기세포, 다능성 근육줄기세포, 다능성 성체 줄기세포, 다능성 췌장줄기세포, 다능성 심근줄기세포, 다능성 혈관줄기세포, 다능성 모낭줄기세포, 다능성 각막줄기세포, 다능성 지방줄기세포, 다능성 제대/제대혈 줄기세포, 다능성 치아줄기세포, 다능성 간줄기세포 및 다능성 암줄기세포를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

본원에 따른 일 구현예에서 본원에 따른 조성물은 세포의 부착능 및 귀소능을 향상 또는 개선을 위하여 생체외(in vitro) 분리된 세포의 전처리에 사용될 수 있으며, 전처리된 세포는 세포가 이식될 생체내 부위에 이식된다.

본원에 따른 조성물은 상기 세포를 이식하고자 하는 생체내 부위에 또는 상기 세포와 혼합하여 생체내 부위에 적용될 수 있다.

다른 양태에서 본원은 본원에 따른 조성물을 분리된 세포 및/또는 상기 세포가 이식될 생체내 부위에 처리하는 단계를 포함하는 세포의 부착능 및 귀소능을 증진하는 방법을 제공한다.

다른 양태에서 본원은 또한 세포 부착능 및 귀소 (homing)능 증진용으로 사용되는 PRP (Platelet-Rich Plasma)를 제공한다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 PRP를 유효성분으로 포함하는 세포 부착능 및 귀소능 증진용 조성물을 제공한다.

(b) 본 발명에 따르면, 이식하고자 하는 세포 또는 세포를 이식하고자 하는 부위에 PRP를 전처리하거나, PRP를 이식하고자 하는 세포와 혼합하여 생체내 부위에 이식하면 이식 부위에서 세포의 부착능이 증가하며, 이식 부위에서 손상 부위로 세포의 귀소능이 증가한다.

(c) 본 발명은 본 발명의 조성물을 생체외 분리된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 세포의 부착능 및 귀소능을 개선하는 방법을 제공한다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 손상 정도에 따른 골연골 조각(osteochondral plugs)의 조직학적 차이를 H&E 염색을 수행하여 확인한 그림이다. 손상 정도에 따른 등급은 다음과 같다: 등급 0, 정상 연골 등급 1, 연골두께의 50% 미만으로 손상 또는 병변 진행 등급 2, 연골두께의 50%를 초과하여 손상 또는 병변 진행 등급 3, 손상 또는 병변이 연골하골까지 진행되어 연골하골이 노출된 병변.

도 2는 2% 아가로스 겔에 골연골 조각의 준비 및 배치를 도식적으로 나타낸 그림이다.

도 3은 엑스 비보 귀소(homing) 및 생착(engraftment) 분석법에 대한 실험디자인을 나타낸 모식도이다.

도 4는 플라스틱 배양 접시에 부착된 골수 간엽줄기세포를 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 5는 골수 간엽줄기세포 부착에 대한 PRP의 효과를 확인한 그림이다.

도 6은 플라스틱 배양 접시에 부착된 연골세포를 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 7은 연골세포 부착에 대한 PRP의 효과를 확인한 그림이다.

도 8은 엑스 비보에서 골수 간엽줄기세포의 귀소 및 생착 효과에 대한 PRP의 효과를 확인한 그림이다.

도 9는 엑스 비보에서 골수 간엽줄기세포의 귀소 및 생착 효과에 대한 PRP의 효과를 확인한 공초점 현미경 사진이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

본 발명자들은 세포의 부착능 및 귀소능을 효과적으로 향상시킬 수 있는 물질을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 PRP를 세포에 처리하면 궁극적으로 세포의 부착 및 귀소능력이 매우 효과적으로 향상되는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 PRP를 유효성분으로

포함하는 세포 부착능 및 귀소능 증진용 조성물에 관한 것이다.

본원에 따른 조성물은 특히 세포의 부착능 및 귀소능을 향상시키기 위해 PRP를 이용하는 것이다.

혈소판은 그들의 과립 내부에 세가지 중복 단계(염증단계(inflammatory phase), 영양단계(trophic phase) 및 리모델링(remodeling))를 포함하는 조직 치료 또는 재생과 관련된 염증, 성장인자, 사이토카인, 케모카인, 접착 단백질, 단백질 분해효소 및 항-단백질 분해효소 등 다양한 생활성 물질을 포함한다(1-3). 염증단계는 상처를 입은 후 2-3일까지 지속되며, 이 단계에서는 상처부위의 백혈구 혈관외 유출 및 축적, 단핵구/대식세포 활성화가 특징적으로 나타난다. 신혈관형성은 새로운 조직에 혈류를 촉진하여 대사 활성을 증진시키기 위해 진행되며, 내피세포는 혈관형성을 시작하기 위해 영양(trophic) 또는 동화(anabolic) 단계에서 활성화된다. 세포는 지지체로써 피브린 기질을 이용하여 이동 및 분열하며 콜라겐, 프로테오글리칸 및 세포외 기질의 다른 요소들을 생산하도록 분화한다. 리모델링 단계에서는 세포 밀도가 감소하며, 손상된 조직의 전체 대사 활성이 감소한다. 각 단계에서, 특이적인 신호전달 활성은 단계의 지속 기간을 제한하고 다음 단계로의 진행을 촉진하는 다른 내생적 신호(endogenous signals)에 의해 침묵되거나 균형이 맞춰진다.

PRP(Platelet-Rich Plasma)는 혈소판 농축물로 마이크로리터 당 1,000 x 10^3 개이상의 혈소판을 포함하며, 전혈(whole blood)과 비교하여 혈소판을 3-5배 더 포함하고 있다(4). PRP는 생리학적 레벨보다 높은 농도에서 혈소판 과립내 다양한 생활성 물질을 분비할 수 있다(5). 또한, PRP는 혈관 내 손상된 부분을 재건 및 재생하는 기능을 가지고 있기 때문에 성장인자를 고농축하여 피부재생을 촉진시키거나 증식치료(prolotherapy)와 같이 조직의 재생을 촉진시키는 촉진제(stimulants)로 사용하여 피부나 조직(인대, 건)을 재건 및 재생하므로 관절염, 만성허리통증, 골반통, 어깨나 무릎인대 손상 등에 효과가 있다고 알려져 있다. PRP는 처음에 악안면 및 성형수술 분야로 대중화되었으나(4), 현재는 뼈(6), 연골(7), 건(tendon)(8), 인대(9) 및 근육(10, 11)과 같은 다양한 조직의 치료 및 재생을 촉진하고 증진시키는 것으로 알려져 있다. 그러나, PRP의 조직 치료에 대한 효과 및 메카니즘에 대한 연구는 거의 없는 실정이다(12).

본 명세서에서 사용된 용어, "PRP(Platelet-Rich Plasma)"는 혈소판 농축물을 말하며, 정상적으로 혈액에서 발견되는 혈소판 농도보다 높은 수준을 의미한다. 예컨대, 혈소판 농도가 정상 혈액에서의 농도보다 2배, 5배, 10배, 100배 또는 그 이상일 수 있다.

PRP는 혈소판 이외에 다른 혈액 성분들을 포함할 수 있다. PRP에서 혈소판은 50% 또는 그 이상, 75% 또는 그 이상, 80% 또는 그 이상, 95% 또는 그 이상, 99% 또는 그 이상일 수 있다. 혈소판 이외 요소는 혈장, 성장인자, 백혈구 세포 및/또는 어떠한 혈액 요소일 수 있다. PRP는 자가조직(autologous), 동종 이계(allogeneic) 또는 혈소판 및/또는 혈장의 원천으로부터 수득할 수 있다. 바람직하게는 자가 혈장으로부터 수득한다. PRP는 다양한 동물로부터 수득할 수 있으며, 바람직하게는 인간이다.

본 발명에서, PRP는 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 수득할 수 있다. 사용 시 또는 사용에 앞서 PRP를 활성화시키거나 젤화 등 물리적 특성을 변화시키는 단계 (예컨대, 트롬빈 및 칼슘 처리, 콜라겐 처리, 피브리노겐을 피브린으로 전환시키는 특정 물질 예를 들어 바트록소빈 등의 뱀독 등의 처리)를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 한 구현예에 따르면, 본 발명의 PRP는 혈장 약 1 마이크로리터 당 바람직하게는 약 2×10^5 - 3×10^8 혈소판을 포함하고, 보다 바람직하게는 약 1×10^6 - 1×10^7의 혈소판을 포함하며, 보다 더 바람직하게는 약 1×10^6 - 5×10^6 개의 혈소판을 포함한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "부착능"은 세포가 이식부위에 효율적으로 부착(adhesion) 또는 생착하는 능력을 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 용어 "세포 부착능 증진"은 세포 이식 효율이 개선되어 목표 조직으로의 향상된 세포 점착 및 이식거부의 감소 등의 결과가 나타나는 것을 의미한다.

본 명세서에서 용어"귀소능"은 세포가 이식부위로부터 손상부위로 효율적으로 이동하는 귀소 능력(homing ability)을 말한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물을 배양 접시에 이식한 세포에 처리하거나, 세포에 전처리 한 후 배양 접시에 이식하면 세포의 부착능이 현저히 증가한다. 또한, 본 발명의 조성물을 전처리한 세포를 손상

된 조직에 처리하면 손상된 부위로의 세포 이동이 증가한다.

본 발명의 조성물을 세포 이식에 사용될 수 있는 다양한 세포에 적용될 수 있으며, 본원의 조성물이 적용될 수 있는 세포는 줄기세포, 간세포, 췌장 세포/췌장모세포, 신장세포, 갑상선세포, 폐세포, 심근세포,근육세포/근육모세포/근위성세포, 골세포/조골세포/골모세포/파골세포, 연골세포/연골모세포, 건세포, 인대세포, 활액막세포, 섬유아세포, 피부세포, 내피세포, 모세포, 조혈세포, 생식세포, 지방세포, 상피세포, 피부세포, 진피세포, 모낭세포/모모세포/모기질세포,신경세포/신경모세포, 면역세포, 각막세포 또는 망막세포를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 한 구현예에서는 줄기세포 또는 연골세포이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물이 적용되는 줄기세포는 다능성 줄기세포이고, 보다 바람직하게는 다능성 중간엽줄기세포, 다능성 조혈모줄기세포, 다능성 신경줄기세포, 다능성 내피줄기세포, 다능성 상피줄기세포, 다능성 표피줄기세포, 역분화 줄기세포, 다능성 근육줄기세포, 다능성 성체 줄기세포, 배아 줄기 세포, 다능성 췌장줄기세포, 다능성 심근줄기세포, 다능성 혈관줄기세포, 다능성 모낭줄기세포, 다능성 각막줄기세포, 다능성 지방줄기세포, 다능성 제대/제대혈 줄기세포, 다능성 치아줄기세포, 다능성 간줄기세포 또는 다능성 암줄기세포이며, 보다 더 바람직하게는 다능성 중간엽줄기세포이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 손상된 세포의 재생을 개선시킨다. 본 발명의 조성물을 처리하면 세포의 귀소능이 증가하여 치료용 세포의 손상된 세포 또는 조직으로의 이동이 증가하고, 치료용 세포의 이동으로 인해 손상된 세포 또는 조직의 재생이 개선된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 세포의 부착능 및 귀소능을 개선하기 위하여 생체외(in vitro) 분리된 세포를 생체외에서 전처리하는데 이용될 수 있다. 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 생체외 분리된 세포에 PRP를 전처리한 후, 이러한 세포를 이식하면 세포의 부착능이 현저하게 증가한다.

본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 생체외 분리된 세포는 줄기세포, 간세포, 췌장세포/췌장모세포, 신장세포, 갑상선세포, 폐세포, 심근세포, 근육세포/근육모세포/근위성세포, 골세포/조골세포/골모세포/파골세포, 연골

세포/연골 모세포, 건세포, 인대세포, 활액막세포, 섬유아세포, 피부세포, 내피세포, 모세포, 조혈세포, 생식세포, 지방세포, 상피세포, 피부세포, 진피세포, 모낭세포/모모세포/모기질세포, 줄기세포 또는 연골세포이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 전처리는 5분-3시간, 보다 바람직하게는 10분-2시간, 보다 더 바람직하게는 10분-30분 동안 실시한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "생체외"는 세포를 살아있는 유기체로부터 제거하고 그 유기체의 외부(예컨대, 시험관내)에서 조작하는 과정을 지칭한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 세포를 이식하고자 하는 생체내 부위에 적용될 수 있다. 본 발명의 조성물을 세포를 이식하고자 하는 생체내 부위에 먼저 적용시킨 다음, 세포를 이식하면 해당 부위의 세포 부착능 및 귀소능이 증가된 상태이므로 이식한 세포의 생착률이 증가하고, 이식 부위로세포의 이동이 효과적으로 유도된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 이식하고자 하는 세포와 혼합하여 생체내 부위에 적용될 수 있다. 본 발명의 조성물을 이식하고자 하는 세포에 전처리한 후, 적용하고자 하는 생체내 부위에 이식하면 이식한 세포의 증가된 부착능으로 인해 생착률이 증가한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 이식에 이용되는 세포는 줄기세포, 간세포, 췌장세포/췌장모세포, 신장세포, 갑상선세포, 폐세포, 심근세포, 근육세포/근육모세포/근위성세포, 골세포/조골세포/골모세포/파골세포, 연골세포/연골모세포, 건세포, 인대세포, 활액막세포, 섬유아세포, 피부세포, 내피세포, 모세포, 조혈세포, 생식세포, 지방세포, 상피세포, 피부세포, 진피세포, 모낭세포/모모세포/모기질세포, 신경세포/신경모세포, 면역세포, 각막세포 또는 망막세포이고, 보다 바람직하게는 줄기세포 또는 연골세포이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물이 적용된 세포는 손상된 조직으로의 증가된 귀소능을 갖는다. 본 발명에 따르면, 손상된 골연골 조각에 본 발명의 조성물을 전처리한 세포를 처리하면 세포가 골연골 조각의 손상 및 퇴행성 변화가 진행된 연골 표면으로 효과적으로 이동하며, 특히 손상 정도가 심한 조직으로 세포의 이동이 증가한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 생체외 분리된 세포 및/또는 세포를 이식하고자 하는 생체내 부위에 처리하는 단계를

포함하는 세포의 부착능 및 귀소능을 개선하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 처리된 세포를 세포 치료가 필요한 부위에 이식하는 단계를 추가로 포함한다. 본 방법에서 상기 생체외 분리된 세포는 앞서 언급한 바와 같다.

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

[실시예]

[실험재료 및 방법]

간엽줄기세포(Mesenchymal stem cells)

인간 간엽줄기세포는 표준 절차를 준수하여 골수로부터 추출하였다. Ficoll-PaqueTM PREMIUM를 이용하여 원심분리를 통해 단핵 세포를 분리하고, 2회 세척한 후 10% 우태아혈청(HyClone, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 100 U/ml 페니실린/100 μg/ml 스트렙토마이신(HyClone, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, 미국)을 추가적으로 포함하는 DMEM-LG(HyClone, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, 미국)에 부유시키고 1×10^6 세포/cm^2 로 분주한 다음, 37°C, 5% CO_2 가습 조건에서 배양하였다. 배지는 세포 분주 후 1일 또는 2일에 교체하고 그 다음부터는 3일마다 교체하였다. 약 80%의 세포군집 (confluence)을 나타내면 1:3의 비율로 계대배양하였다.

연골세포(Chondrocytes)

연골은 칼슘 및 마그네슘이 첨가되지 않은 PBS(phosphate buffered saline, DPBS)로 세척하여 잘게 간 후, 항생제-항진균제 용액(100 U/mL 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신 및 0.25 mg/ml 암포테리신 B; Life Technologies)을 포함하는 DMEM(high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life Technologies, Rockville, MD)에 0.6% 콜라겐분해효

소(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 37℃에서 6시간 동안 연골세포가 방출되도록 하였다. 100 mm 나일론 체(BD, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 갈리지 않은 연골을 제거한 후, 원심분리하여 연골세포를 수득하고 2회 세척한 후, 10% 우태아혈청(FBS, Life Technologies), 25 mg/ml L-아스코르브산(Sigma) 및 100 U/ml 페니실린/100 μg/ml 스트렙토마이신(HyClone; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA,USA)를 추가적으로 포함하는 DMEM으로 부유시킨 다음, 100 mm 조직 배양접시에 분주하고 37°C, 5% CO_2 가습 조건에서 7일간 배양하였다. 배지는 세포 분주 후 1일 또는 2일에 교체하고 그 다음부터는 3일마다 교체하였다. 약 80%의 세포군집(confluence)을 나타내면 1:3의 비율로 계대배양하였다. 세포는 부착 실험에 이용하기 전에 트립신- EDTA(0.25% 트립신, 0.53 mM EDTA; Life Technologies)를 5분간 처리하여 분리시키고, 배양배지로 2회 세척한 후 배지, PBS 또는 PRP로 부유시켰다. 2-5회 계대 배양된 세포를 실험에 사용하였다.

PRP 준비

PRP는 표준 수집 프로그램에 따라 백혈구제거 세트(COBE spectra LRS Turbo; Caridian BCT, Lakewood, CO, USA)를 갖는 혈소판분리반출 시스템을 이용하여 환자들로부터 수득하였다(20). 최종산물에서 혈소판의 농도는 마이크로리터 당 1,400 x 103 이었다. 제조사의 지시에 따라 항응혈제로써 식염수 및 ACDA(anti-coagulant acid citrate dextrose)를 준비하였다. 전혈구 수(complete blood counts)를 측정하기 위해 분주하였다. 실험 수행을 위해 PRP 내 혈소판 수는 마이크로리터 당 1,000 x 10^3 으로 조정하였고(20), 필요에 따라 희석하거나 농축하여 사용하였다. PRP를 활성화시키기 위해 166.7 IU/ml 트롬빈(Reyon Pharmaceutical, 한국)을 포함하는 10% 칼슘 글루콘산염을 1:10 부피/부피로 PRP에 첨가하였다. 대조군 세포에는 식염수만을 처리하였다.

인 비트로 귀소(homing) 및 생착(engraftment) 분석법

세포는 식염수(대조군)로 부유시키거나, PRP를 세포에 처리하거나 또는 플레이트로 이식하기 전에 세포에 전처리하였다: 대조군, 식염수로 부유

시킴 PRP, PRP로 부유시킴 10분간 PRP를 전처리(전처리는 세포 이식 전에 세포를 PRP로 부유시는 것을 의미함), 이식 전 세포에 10분간 PRP를 전처리함 30분간 PRP 전처리, 이식 전 세포에 30분간 PRP를 전처리함. 48-웰 플레이트에 세포를 분주하고 2.5, 5, 10, 15, 20, 30 및 60분 동안 37°C, 5% CO_2 가습 조건에서 배양하였다. 각 시간별로 비-부착세포를 제거하기 위해 2회 세척하였다. 부착세포의 수는 이미지 프로세싱 프로그램을 이용하여 측정하였다.

엑스 비보 귀소 및 생착 분석법

실험 디자인은 도 3에 나타낸 바와 같다.

골연골 디스크 준비

골연골 조직편(Osteochondral block)은 공지된 방법에서 조금 수정된 방법에 따라 무릎관절 치환수술을 받는 환자의 근위 경골(proximal tibia)로부터 절단하였다. 근위 경골의 관절연골 표면을 관찰하고, 관찰 부위를 수정된 국제연골재생학회(International Cartilage Repair Society, ICRS) 등급에 따라 손상 정도를 평가하였다: 등급 0, 정상 연골 등급 1, 연골두께의 50% 미만으로 손상 또는 병변 진행 등급 2, 연골두께의 50%를 초과하여 손상 또는 병변 진행 등급 3, 손상 또는 병변이 연골하골까지 진행되어 연골하골이 노출된 병변.

골연골 조각(osteochondral plug)은 관상톱바(Trephine burr)를 이용하여 원통형(지름 4.0 mm 및 높이 4.0 mm)이 되도록 절단하였다. 등급에 따른 관절연골 표면의 대표적인 조직학적 특징은 도 1과 같다. 골연골 조각은 -80℃에 보관하였으며, 사용하기 1시간 전에 DPBS에 담가 상온에서 녹였다. 시각적 등급 평가에 따른 가변성은 수차례 등급 평가(샘플 수령시 2차례 등급 평가 실시, 디스크로 절단하고 실험에 이용할 때 모든 샘플을 확인함)를 수행하여 극복하였다. 골연골 조각은 2% 아가로스를 이용하여 35 mm 배양 접시에 이식하였다(도 2).500 ml 병에 2 g의 아가로스를 넣은 후 100 ml의 0.5 x TBE 버퍼를 넣고 잘 혼합하고, 전자렌지에서 2분간 가열하여 아가로스를 용해시킨 후 식히고 35 mm 배양 접시 바닥이 잠기도록 조심히 부었다. 골연골 조각은 배양 접시 벽면의 위쪽을 향하도록 배치하였다: 등급 0

의 조각은 4분면에서 우측 상단, 등급 1의 조각은 우측 하단, 등급 2의 조각은 좌측 하단, 등급 3의 좌측 상단.

골연골 조각에서 세포의 귀소 및 생착

골수 유래 간엽 줄기세세포를 배양접시로부터 떼어낸 후, DPBS로 2회 세척하고 5 x 10^6 세포/ml 농도가 되도록 DMEM-LG로 부유시켰다. 1 mM 칼세인 AM 스톡을 첨가하고 조심스럽게 혼합한 후, 30분간 37℃에서 배양하였다. 세포는 DPBS로 2회 세척한 후, 식염수(대조군)로 부유시키거나, PRP를 처리하였다: 대조군, 식염수로 부유시킴 PRP, PRP로 부유시킴 10분간 PRP 전처리, 이식 전 10 분간 세포에 PRP를 전처리함 30분간 PRP 전처리, 이식 전 30분간 세포에 PRP를 전 처리함. 세포를 골연골 조각이 담긴 배양 접시에 1.0 x 10^4 세포/mm^2 로 분주하고, 15분 동안 37°C, 5% CO_2 가습 조건에서 배양하였다. 배양 후 배양 접시를 4회 세척한 다음, 형광을 확인하기 위해 스캐너(typhoon 9410 scanner, GE Healthcare)로 이미지를 촬영하였다. 이미지는 ImageQuant로 정량화하였다. 골연골 조각은 1x PBS(4% 파라포름알데히드 포함)를 포함하는 96 웰 플레이트에 관절연골 표면이 플레이트의 아래쪽에 오도록 이동시켰다. 세포는 공초점 레이저현미경(Carl Zeiss, 독일)를 이용하여 촬영하였다. 이미지는 이미지 분석시스템(Carl Zeiss, 독일)을 이용하여 캡쳐하였다.

통계학적 분석

모든 데이터값은 평균 및 표준편차로 표현하였다. 차이유의성은 독립 t-검정 및 일원변량분성을 이용하여 판단하였다. 사후 분석에서 던넷 검정(Dunnett test)은 대조군 비교를 위해 사용되었으며, 터키 검정(Tukey's test)는 PRP 및 10분 및 30분간 PRP 전처리에 대한 비교를 위해 사용되었다. $P < 0.05$는 통계적 유의성을 갖는 것으로 판단하였다.

실험결과

인 비트로 귀소 및 생착 분석법

세포 종류에 상관없이 PRP의 사용은 시간-의존적 방식으로 세포 부착을 증가시켰다(도 4-7). 30분간 PRP를 전처리 하였을 경우, 세포 부착이

가장 증가하였고 그 다음으로 10분간 PRP 전처리, PRP 처리 및 대조군 순으로 세포 부착이 증가하였다.

골수 간엽줄기세포 부착은 배양 시간에 의존적으로 증가하였으며, PRP 사용에 의해 보다 증가되었다. 60분간 배양한 대조군의 세포수는 20분간 배양한 PRP 처리군과 비슷한 수준을 나타냈으며, 10분 및 30분간 PRP를 전처리한 군을 10분간 배양하였을 때보다 조금 많았다. 대조군에서 60분 동안 배양 접시에 부착된 세포는 57.11%였다. 반면, PRP를 10분 또는 30분간 전처리한 군에서 부착 세포의 수는 큰 차이를 나타내지 않았으며 배양 15분 및 20분 후에 각각 정체기(plateau)에 도달하였다(도 4).

연골세포 부착은 배양 시간에 의존적으로 증가하였으며, PRP 사용에 의해 보다 증가되었다. 60분간 배양한 대조군의 세포수는 30분간 배양한 PRP 처리군과 비슷한 수준을 나타냈으며, 10분 및 30분간 PRP를 전처리한 군을 각각 10분 및 20분간 배양하였을 때와 비슷한 수준을 나타냈다. 대조군에서 60분 동안 배양 접시에 부착된 세포는 76.56%였다. 반면, PRP 처리군 및 10분간 PRP를 전처리한 군은 배양 60분 후에 정체기에 도달했으며, PRP를 30분간 전처리한 군을 배양 30분 만에 정체기에 도달하였다(도 5).

골수 유래 간엽줄기세포

각 시간 포인트에서 처리군 사이의 세포 부착 정도를 비교한 결과는 표 1, 도 4 및 5와 같다. 2.5분 및 5분에서는 처리군 사이에 유의한 차이는 없었으나 10, 15, 20, 30 및 60분에서는 처리군 사이에 유의한 차이가 있었다.

[표 1]

골수 유래 간엽줄기세포의 배양조건별 부착 비율 비교

	대조군	PRP	10분간 PRP 전처리	30분간 PRP 전처리	p-값
2.5분	0.94± 0.63	0.77±0.35	0.74±0.38	1.17±1.45	0.57
5분	1.72± 1.75	1.98±1.23	1.62±0.58	5.60±9.74	0.17
10분	4.65± 3.79	14.37±11.31	15.26±12.35	43.24±26.01	0.00
15분	12.37± 7.86	31.05±11.71	53.88±21.29	88.68±36.79	0.00
20분	42.16± 30.46	50.48±26.79	89.84±21.93	105.02±14.11	0.00
30분	47.83± 29.19	68.00±35.57	103.91±22.18	121.50±21.19	0.00
60분	57.11± 22.08	83.88±35.40	84.22±17.52	104.21±25.74	0.00

10분 배양 시, 30분간 PRP 전처리한 군이 다른 3군에 비해 유의하게 세포 부착이 증가되었다(모든 P < 0.001). 대조군, PRP 처리 및 10분간 PRP 전처리군 사이에는 유의한 차이가 없었다. 15분 배양 시, 10분 및 30분간 PRP를 전처리한 군은 대조군과 유의한 차이를 보였다(P = 0.001 및 < 0.001, 각각). PRP 및 대조군 사이에는 유의한 차이가 없었으며(P = 0.204), 30분간 PRP를 전처리한 군은 PRP 및 10분간 PRP를 전처리한 군과 유의한 차이를 보였다(P < 0.001 및 0.012, 각각). 20분 배양 시, 10분 및 30분간 PRP를 전처리한 군은 대조군과 유의한 차이를 보였으나(모든 P < 0.001), PRP 및 대조군 사이에는 유의한 차이가 없었다(P =0.734). 30분간 PRP를 전처리한 군은 PRP와 유의한 차이를 보였다(P < 0.001). 30분 배양 시, 10분 및 30분간 PRP를 전처리한 군은 대조군과 유의한 차이를 보였으나(모든 P < 0.001), PRP 및 대조군 사이에는 유의한 차이가 없었다(P = 0.193).

30분간 PRP를 전처리한 군은 PRP와 유의한 차이를 보였다(P < 0.001). 60분 배양 시, PRP 처리, 10분 및 30분간 PRP를 전처리한 군이 대조군과 유의한 차이를 보였으나 (P = 0.041, = 0.381, 및 < 0.001, 각각), 서로간에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

연골세포

각 시간 포인트에서 처리군 사이의 세포 부착 정도를 비교한 결과는 표 2, 도 6 및 7과 같다. 2.5분 및 5분에서는 처리군 사이에 유의한 차이는 없었다. 10, 15, 20, 30 및 60분에서는 처리군 사이에 유의한 차이가 있었다.

[표 2]

연골세포의 배양 조건별 부착 비율 비교

	대조군	PRP	10분간 PRP 전처리	30분간 PRP 전처리	p-값
2.5분	0.10± 0.12	0.30± 0.10	0.30± 0.54	0.41± 0.34	0.45
5분	0.46± 0.40	0.71± 0.25	0.89± 0.69	1.50± 1.44	0.20
10분	1.01± 0.73	4.31± 4.04	3.02± 1.14	14.65± 12.47	0.01
15분	3.30± 4.02	7.48± 5.03	19.62± 13.89	36.89± 18.18	0.00
20분	8.16± 5.08	12.40± 8.08	23.22± 6.69	41.05± 4.28	0.00
30분	29.03± 12.24	47.13± 18.32	57.20± 21.91	92.31± 3.84	0.00
60분	76.56± 12.24	102.15± 7.06	82.42± 10.40	130.95± 10.72	0.00

10분 배양 시, 30분간 PRP를 전처리한 군이 대조군 및 10분간 PRP

를 전처리한 군에 비해 유의하게 세포 부착이 증가되었다(P = 0.005 및 0.029, 각각). PRP 처리군 및 10분간 PRP를 전처리한 군 사이에는 유의한 차이가 없었다. 15분 배양 시, 30분간 PRP를 전처리한 군은 대조군 및 PRP 처리군과 유의한 차이를 보였으나(P < 0.001 및 = 0.002), 10분간 PRP를 전처리한 군과는 유의한 차이가 없었다 (P = 0.088). 20분 배양 시, 10분 및 30분간 PRP를 전처리한 군은 대조군과 유의한 차이를 보였으나(P < 0.001 & = 0.001), PRP 및 대조군 사이에는 유의한 차이가없었다(P = 0.513). 10분 및 30분간 PRP를 전처리한 군은 PRP와 유의한 차이를 보였다(P = 0.032 및 < 0.001, 각각). 30분 배양 시, 10분 및 30분간 PRP를 전처리한 군은 대조군과 유의한 차이를 보였으나(P < 0.001 및 = 0.015), PRP 및 대조군 사이에는 유의한 차이가 없었다(P = 0.142). 30분간 PRP를 전처리한 군은 PRP처리군 및 10분간 PRP를 전처리한 군과 유의한 차이를 보였다(P < 0.001 및 =0.005, 각각). 60분 배양 시, PRP 처리군 및 30분간 PRP를 전처리한 군이 대조군과 유의한 차이를 보였다(P = 0.001 및 < 0.001, 각각). 30분간 PRP를 전처리한 군은 PRP 처리군 및 10분간 PRP를 전처리한 군과 유의한 차이를 보였다(P = 0.001 및 < 0.001, 각각).

엑스 비보 귀소 및 생착 분석법

이식된 골수 유래 간엽줄기세포는 골연골 조각으로 이동 및 부착되었다(도 8-9). 세포 귀소 및 생착은 골연골 조각의 병변 정도 및 PRP의 치료에 따라 증가하였다. 인 비트로 결과와 일관되게 30분간 PRP를 전처리 한 경우, 세포 부착이 가장 증가하였고 그 다음으로 10분간 PRP를 전처리한 군, PRP를 처리한 군 및 대조군 순으로 세포 부착이 증가하였다. 세포 귀소 및 생착은 연골의 손상 정도에 의존적으로 증가하였으며, PRP를 사용한 경우 더욱 증가하였다. 등급 G1-G3의 손상된 연골은 PRP를 처리하였을 때 (PRP 전처리 여부와 상관없이), 세포 귀소 및 생착능이 증가하였다(도 9).

참고문헌

1. Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., and Nurden, A.T. 2004. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue

regeneration. Thromb Haemost 91:4-15

2. Alsousou, J., Thompson, M., Hulley, P., Noble, A., and Willett, K. 2009. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. J Bone Joint Surg Br 91:987-996.

3. Eppley, B.L., Pietrzak, W.S., and Blanton, M. 2006. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. Plasticand Reconstructive Surgery 118:147e-159e. 38-25 2012-05-29

4. Marx, R.E. 2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP Implant Dent 10:225-228.

5. Everts, P.A., Knape, J.T., Weibrich, G., Schonberger, J.P., Hoffmann, J., Overdevest, E.P., Box, H.A., and van Zundert, A. 2006. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. J Extra Corpor Technol 38:174-187.

6. Kasten, P., Vogel, J., Geiger, F., Niemeyer, P., Luginbuhl, R., and Szalay, K. 2008. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. Biomaterials 29:3983-3992.

7. Akeda, K., An, H., Okuma, M., Attawia, M., Miyamoto, K., Thonar, E., Lenz, M., Sah, R., and Masuda, K. 2006. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. Osteoarthritisand Cartilage 14:1272-1280.

8. de Mos, M., van der Windt, A.E., Jahr, H., van Schie, H.T.M., Weinans, H., Verhaar, J.A.N., and van Osch, G.J.V.M. 2008. Can Platelet-Rich Plasma Enhance Tendon Repair: A Cell Culture Study. The American Journal of Sports Medicine 36:1171-1178.

9. Murray, M.M., Spindler, K.P., Ballard, P., Welch, T.P., Zurakowski, D., and Nanney, L.B. 2007. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagenplatelet-rich plasma scaffold. Journal of Orthopaedic Research 25:1007-1017.

10. Harmon, K.G. 2010. Muscle injuries and PRP: what does the science say, British Journal of Sports Medicine 44:616-617.

11. Mei-Dan, O., Mann, G., and Maffulli, N. 2010. Platelet-rich plasma: any substance into it, British Journal of Sports Medicine 44:618-619.

12. Randelli, P.S., Arrigoni, P., Cabitza, P., Volpi, P., and Maffulli, N. 2008. Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. Disability & Rehabilitation 30:1584-1589.

13. Song, H., Song, B.W., Cha, M.J., Choi, I.G., and Hwang, K.C. 2010. Modification of mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. Expert Opin Biol Ther 10:309-319.

14. Karp, J.M., and Leng Teo, G.S. 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. Cell Stem Cell 4:206-216.

15. Brenner, S., Whiting-Theobald, N., Kawai, T., Linton, G.F., Rudikoff, A.G., Choi, U., Ryser, M.F., Murphy, P.M., Sechler, J.M., and Malech, H.L. 2004. CXCR4-transgene expression significantly improves marrow engraftment of cultured hematopoietic stem cells. Stem Cells 22:1128-1133.

16. Cheng, Z., Ou, L., Zhou, X., Li, F., Jia, X., Zhang, Y., Liu, X., Li, Y., Ward, C.A., Melo, L.G., et al. 2008. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. Mol Ther 16:571-579.

17. Sackstein, R., Merzaban, J.S., Cain, D.W., Dagia, N.M., Spencer, J.A., Lin, C.P., and Wohlgemuth, R. 2008. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. Nat Med 14:181-187.

18. Lee, R.J., Fang, Q., Davol, P.A., Gu, Y., Sievers, R.E., Grabert, R.C., Gall, J.M., Tsang, E., Yee, M.S., Fok, H., et al. 2007. Antibody targeting of stem cells to infarcted myocardium. Stem Cells 25:712-717.

19. Chavakis, E., Urbich, C., and Dimmeler, S. 2008. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. J Mol Cell Cardiol 45:514-522.

20. Jo, C.H., Kim, J.E., Yoon, K.S., Lee, J.H., Kang, S.B., Han, H.S.,

Rhee, S.H., and Shin, S. 2011. Does platelet-rich plasma accelerate recovery after rotator cuff repair. A prospective cohort study. Am J Sports Med 39:2082-2090.

21. Jo, C.H., Kim, E.M., Ahn, H.J., Kim, H.J., Seong, S.C., and Lee, M.C. 2006. Degree of degeneration and chondroitinase ABC treatment of human articular cartilage affect adhesion of chondrocytes. Tissue Eng 12:167-176.

22. Brittberg, M., and Peterson, L. 1998. Introduction of an articular cartilage classifiction. ICRS News letter 1:5-8.

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

【청구범위】

【청구항 1】

PRP(Platelet-Rich Plasma)를 유효성분으로 포함하는 세포 부착능 및 귀소 (homing)능 증진용 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 PRP는 혈장 1 마이크로리터 당 2×10^5 - 3×10^8 개의 혈소판을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 줄기세포는 다능성 줄기세포 (multipotent stem cells)인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 다능성 줄기세포는 다능성 중간엽줄기세포, 다능성 조혈모줄기세포, 다능성 신경줄기세포, 다능성 내피줄기세포, 다능성 상피줄기세포, 다능성 표피줄기세포, 역분화 줄기세포, 다능성 근육줄기세포, 다능성 성체 줄기세포, 다능성 췌장줄기세포, 다능성 심근줄기세포, 다능성 혈관줄기세포, 다능성 모낭줄기세포, 다능성 각막줄기세포, 다능성 지방줄기세포, 다능성 제대/제대혈 줄기세포, 다능성 치아줄기세포, 다능성 간줄기세포 및 다능성 암줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 세포의 부착능 및 귀소능을 개선하기 위하여 생체외(in vitro) 분리된 세포를 전처리하는 데 이용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 세포를 이식하고자 하는 생체 내 부위에 적용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 이식하고자 하는 상기 세포와 혼합하여 생체내 부위에 적용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 9】

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 손상된 조직으로의 증가된 귀소능을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

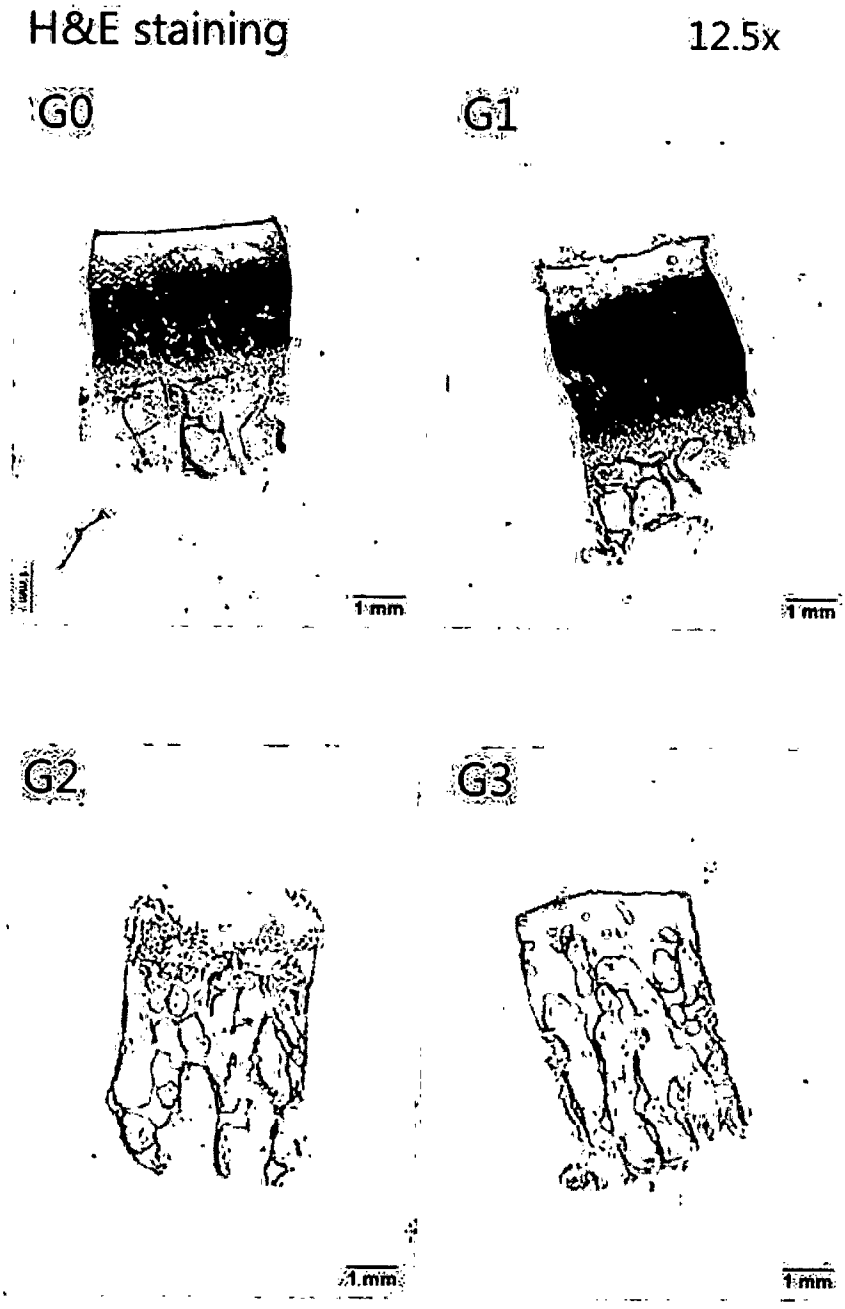
제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 조성물을 분리된 세포 및/또는 상기 세포가 이식될 생체내 부위에 처리하는 단계를 포함하는 세포의 부착능 및 귀소능을 증진하는 방법.

【청구항 11】

세포 부착능 및 귀소 (homing)능 증진용의 PRP (Platelet-Rich Plasma).

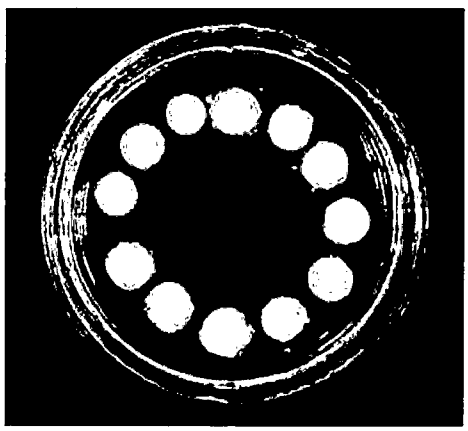
【도면】

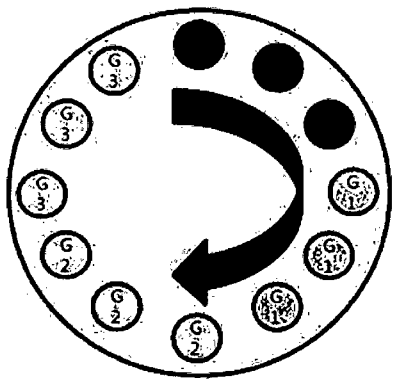
【도 1】



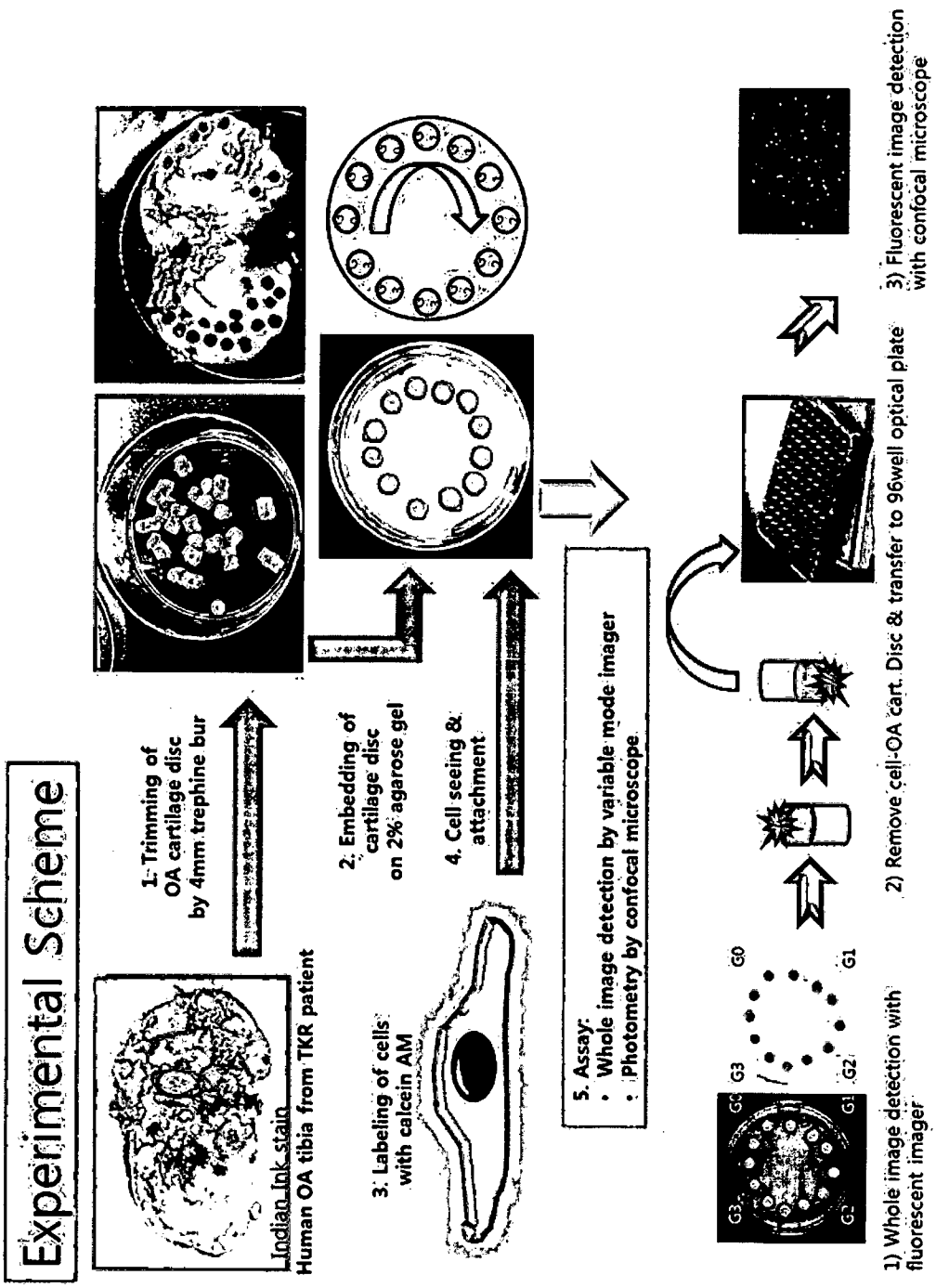
【도 2】



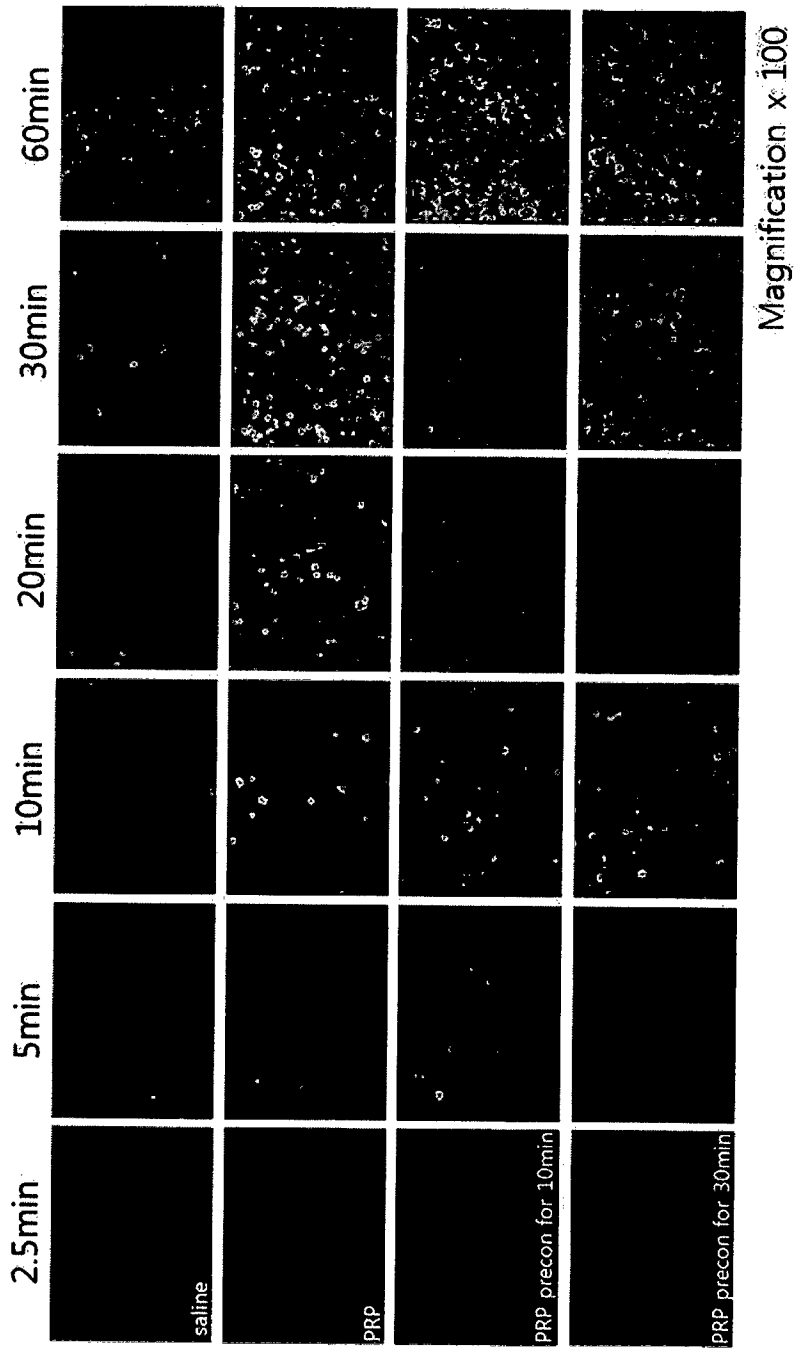




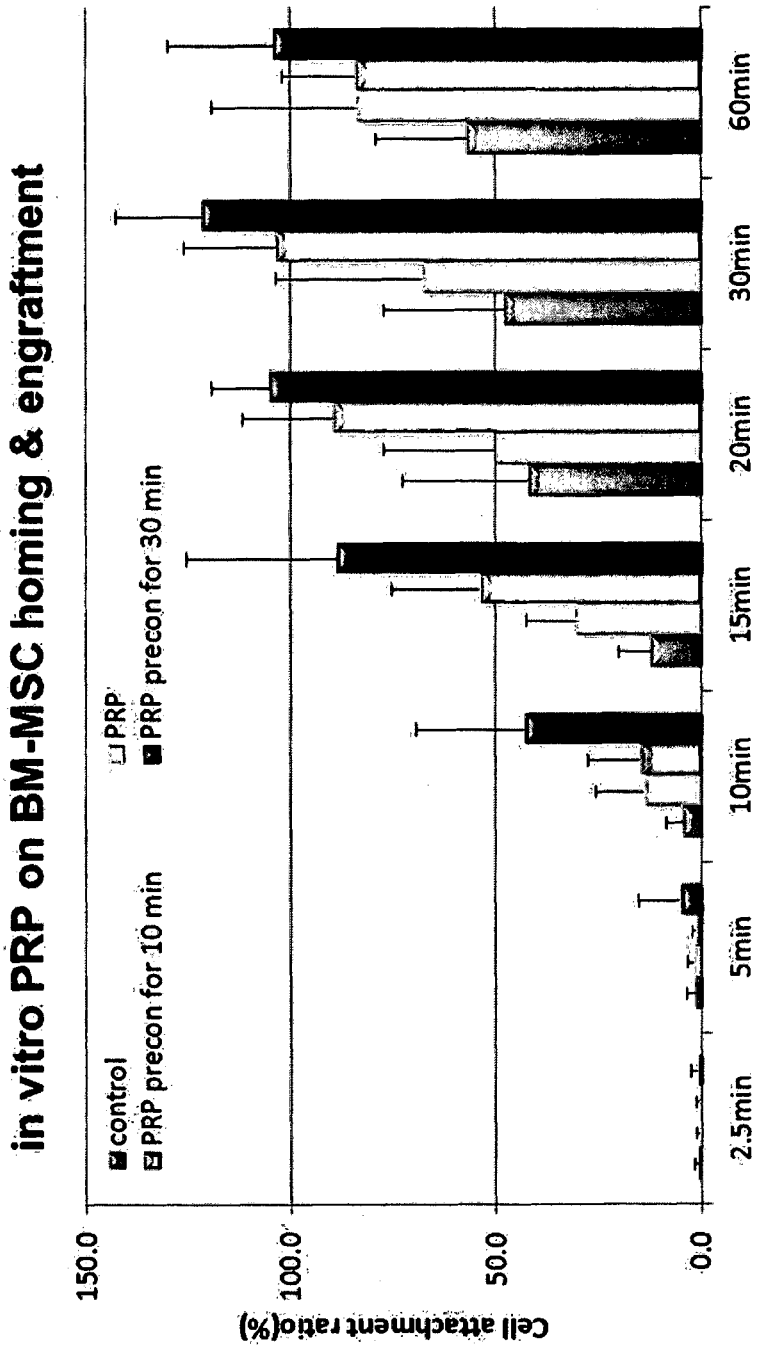
【도 3】


Experimental Scheme
Indian Ink stain
Human OA tibia from TKR patient
1. Trimming of OA cartilage disc by 4mm trephine bur
2. Embedding of cartilage disc on 2% agarose gel
3. Labeling of cells with calcein AM
4. Cell seeing & attachment
5. Assay:
• Whole image detection by variable mode imager
: Photometry by confocal microscope
G0
G1
G2
G3
1) Whole image detection with fluorescent imager
2) Remove cell-OA cart. Disc & transfer to 96well optical plate
3) Fluorescent image detection with confocal microscope

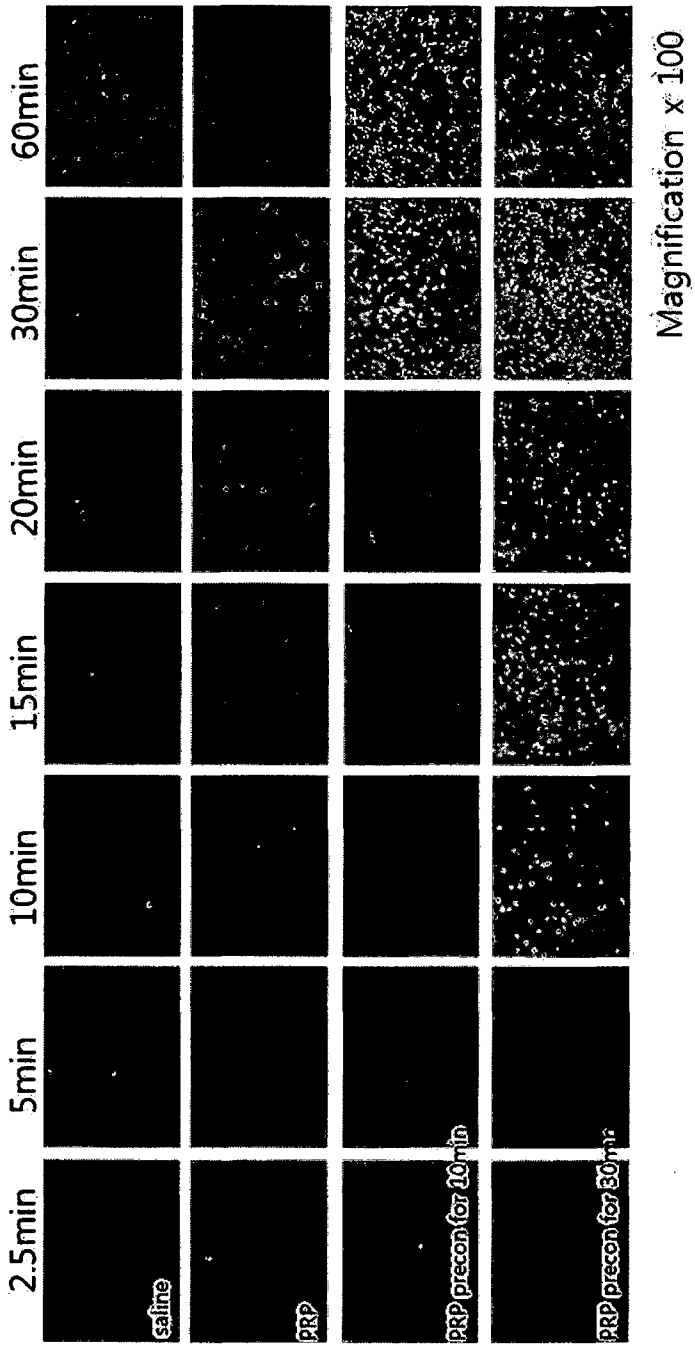
【도 4】


2.5min
5min
10min
20min
30min
60min
saline
PRP
PRP precon for 10min
PRP precon for 30min
Magnification x 100

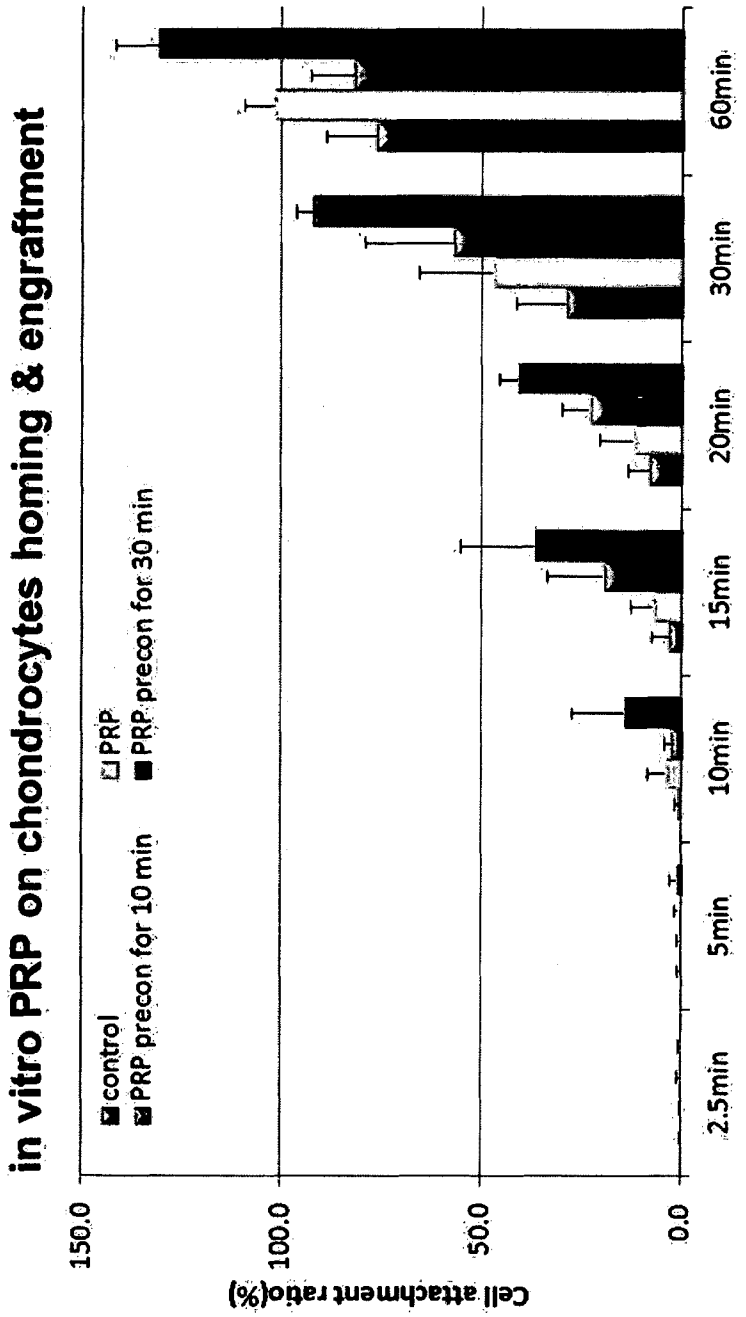
【도 5】


in vitro PRP on BM-MSC homing & engraftment
control
PRP precon for 10 min
PRP
PRP precon for 30 min
Cell attachment ratio(%)
150.0
100.0
50.0
0.0
2.5min
5min
10min
15min
20min
30min
60min

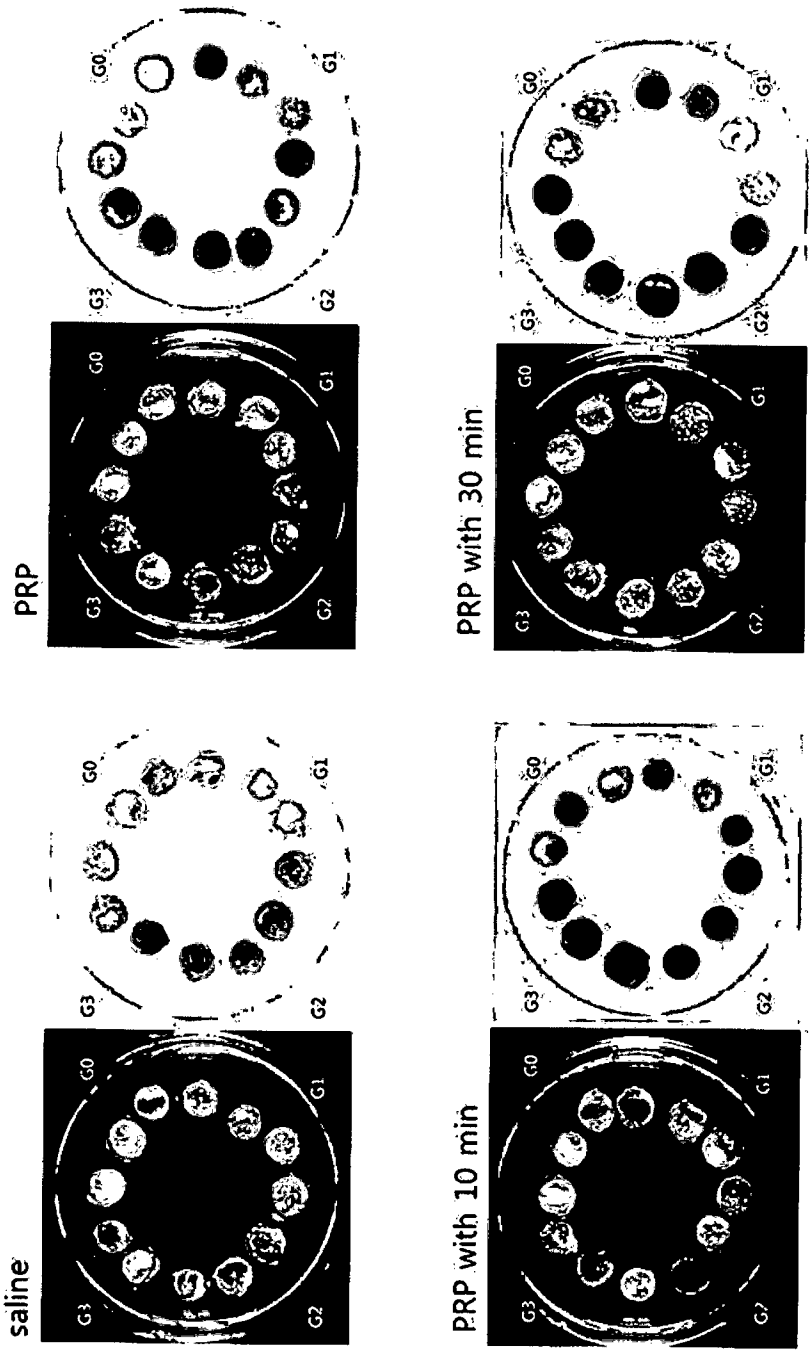
【도 6】


2.5min
5min
10min
15min
20min
30min
60min
saline
PRP
PRP precon for 10min
PRP precon for 30min
Magnification x 100

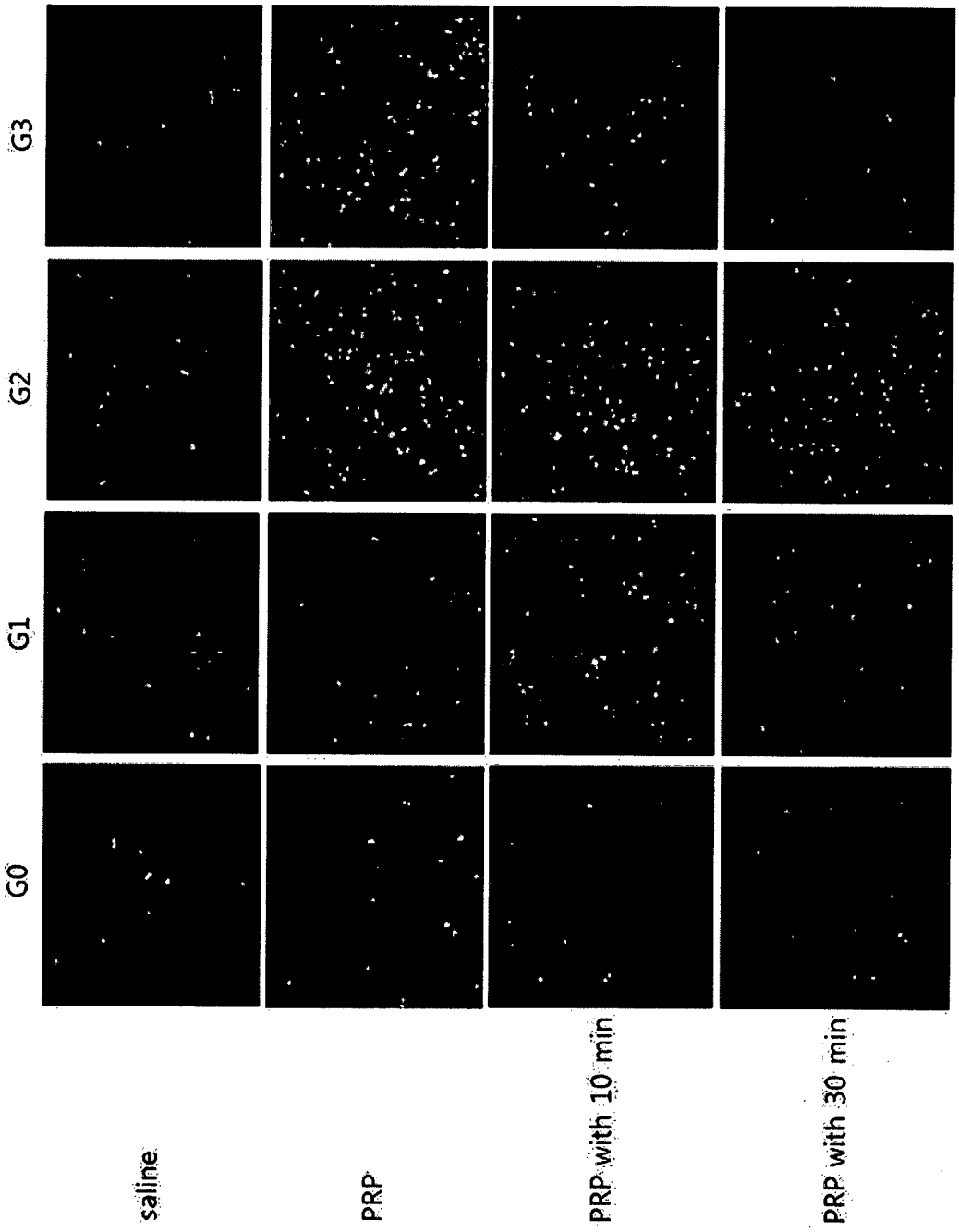
【도 7】


in vitro PRP on chondrocytes homing & engraftment
control
PRP precon for 10 min
PRP
PRP precon for 30 min
Cell attachment ratio(%)
150.0
100.0
50.0
0.0
2.5min
5min
10min
15min
20min
30min
60min

【도 8】



【도 9】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/004642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/078(2010.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, A61L 27/38(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 5/078; A61K 35/12; A61K 35/16; C12N 5/074; A61L 27/38

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: , ,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANGER, H. et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. Circulation Research. 03 February 2006, vol. 98, no. 2, pages e2-10. See abstract; materials and methods.	1-9
A		11
X	MEHTA, V. Platelet-rich plasma: a review of the science and possible clinical applications. Orthopedics. February 2010, vol. 33, no. 2, pages 111-114. See page 112.	11
A		1-9
A	KR 10-1038616 B1 (PAK, Jae Woo) 03 June 2011 See claims 1 and 3.	1-9,11
A	ROOKMAAKER, M. B. et al. Met-RANTES reduces endothelial progenitor cell homing to activated (glomerular) endothelium in vitro and in vivo. American Journal of Physiology-Renal Physiology. August 2007, vol. 293, no. 2, pages F624-30. See pages F626-628.	1-9,11

☒ 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	Date of mailing of the international search report
27 SEPTEMBER 2013 (27.09.2013)	**27 SEPTEMBER 2013 (27.09.2013)**

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/004642

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.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 10 pertains to a method for treatment of diseases of the human body, and thus pertains 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.: **10**
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.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? Implant Dentistry. 2001, vol. 10, no. 4, pages 225-8. See page 225.	1-9,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2013/004642

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1038616 B1	03/06/2011	WO 2012-124873 A1	20/09/2012
		WO 2012-125007 A2	20/09/2012
		WO 2012-125007 A3	27/12/2012

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/004642

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/078(2010.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, A61L 27/38(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/078; A61K 35/12; A61K 35/16; C12N 5/074; A61L 27/38

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: , ,

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LANGER, H. et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. Circulation Research. 3 February 2006, Vol. 98, No. 2, pages e2-10. abstract; materials and methods 참조.	1-9
A		11
X	MEHTA, V. Platelet-rich plasma: a review of the science and possible clinical applications. Orthopedics. February 2010, Vol. 33, No. 2, pages 111-114. 페이지 112 참조.	11
A		1-9
A	KR 10-1038616 B1 (박재우) 2011.06.03 청구항 1 및 3 참조.	1-9,11
A	ROOKMAAKER, M. B. et al. Met-RANTES reduces endothelial progenitor cell homing to activated (glomerular) endothelium in vitro and in vivo. American Journal of Physiology-Renal Physiology. August 2007, Vol. 293, No. 2, pages F624-30. 페이지 F626-628 참조.	1-9,11

☒ 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	국제조사보고서 발송일
2013년 09월 27일 (27.09.2013)	2013년 09월 27일 (27.09.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
이현지
전화번호 +82-42-481-8745

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/004642

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? Implant Dentistry. 2001, Vol. 10, No. 4, pages 225-8. 페이지 225 참조.	1-9,11

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/004642

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: 10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
제10항은 사람의 질병을 치료하는 방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(IV)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☒ 청구항: 10
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.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/004642

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1038616 B1	2011/06/03	WO 2012-124873 A1	2012/09/20
		WO 2012-125007 A2	2012/09/20
		WO 2012-125007 A3	2012/12/27