

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 3월 13일 (13.03.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/038866 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 35/32 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/008018
- (22) 국제출원일: 2013년 9월 5일 (05.09.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0097973 2012년 9월 5일 (05.09.2012) KR
10-2013-0106092 2013년 9월 4일 (04.09.2013) KR
- (71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 443-749 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동), Gyeonggi-do (KR). 리젠프라임 주식회사 (REGENPRIME CO., LTD.) [KR/KR]; 442-819 경기도 수원시 팔달구 월드컵로 311, 서영프라자 5층 (우만동), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 민병현 (MIN, Byoung Hyun); 151-871 서울시 서초구 서초동 현대아이파크아파트 101-201, Seoul

(KR). 박소라 (PARK, So Ra); 151-871 서울시 서초구 서초동 현대아이파크아파트 101-201, Seoul (KR). 최병현 (CHOI, Byung Hyune); 463-977 경기도 성남시 분당구 운중동 산운마을 13단지아파트 1305-2401, Gyeonggi-do (KR). 양재욱 (YANG, Jae Wook); 607-786 부산시 동래구 사직 2동 사직쌍용 예가아파트 118-2502, Busan (KR). 윤정호 (YOON, Jeong Ho); 137-867 서울시 서초구 서초동 1458-6 서초지웰아파트 101-902, Seoul (KR).

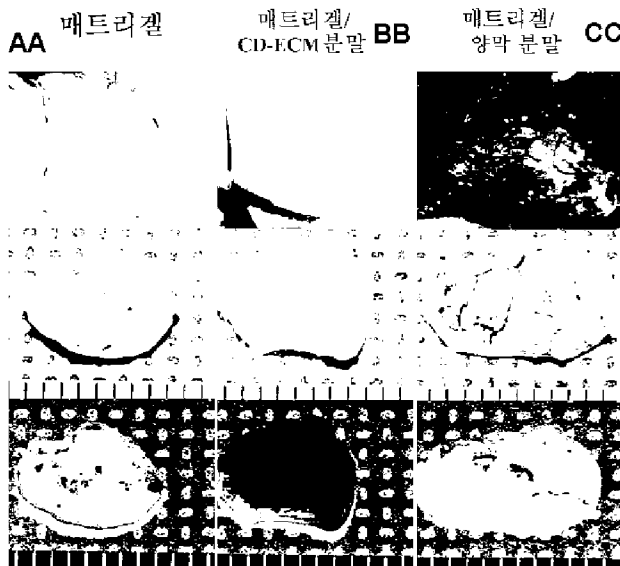
(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 153-803 서울시 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1차 601호, Seoul (KR).

(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, SA, SC, SD,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING ANGIOGENIC DISEASES USING EXTRACELLULAR MATRIX MEMBRANE OF CARTILAGE-DERIVED CELL, AND TRANSPLANT MATERIAL FOR CORNEA OR CONJUNCTIVA

(54) 발명의 명칭: 연골세포 유래 세포외 기질막을 이용한 신생혈관질환 치료용 조성물 및 각막 또는 결막 이식재



AA ... Matrigel
BB ... Matrigel/CD-EDM powder
CC ... Matrigel/amnion powder

(57) Abstract: The present invention provides a novel composition for treating angiogenic diseases using an extracellular matrix membrane of a cartilage-derived cell having a membrane or film form, which is excreted from cartilage cells that are cultured when the cartilage cells isolated from the cartilage of an animal is monolayer-cultured, and a transplant material for the cornea or the conjunctiva. The composition for treating the angiogenic diseases and the transplant material for the cornea or the conjunctiva, according to the present invention, suppresses endothelial cells from attaching or proliferating and impedes the movement of endothelial cells, thereby suppressing vascular endothelial growth and vascular penetration and thus ultimately suppressing angiogenesis.

(57) 요약서: 본 발명은 동물의 연골에서 분리된 연골세포를 단층으로 배양할 때 배양된 연골세포에서 분비되어 막 또는 필름 형태로 형성된 연골세포 유래 세포외 기질막을 이용한 신규한 신생혈관질환 치료용 조성물 및 각막 또는 결막 이식재를 제공한다. 본 발명의 신생혈관질환 치료용 조성물 및 각막 또는 결막 이식재는 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하고 혈관내피세포 이동을 저해함으로써 혈관 생성 및 혈관 침투를 억제하여 궁극적으로 신생혈관생성을 억제할 수 있다.



SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

- (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,

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))

명세서

발명의 명칭: 연골세포 유래 세포외 기질막을 이용한 신생혈관질환 치료용 조성물 및 각막 또는 결막 이식재

기술분야

- [1] 본 발명은 연골세포 유래 세포외 기질막을 이용한 신생혈관질환 치료용 조성물 및 각막 또는 결막 이식재에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 연골세포 유래 세포외 기질막의 신생혈관생성 억제 효능을 이용하여 익상편과 같은 각막 신생혈관질환을 치료하는 조성물 및 각막 또는 결막 이식재에 관한 것이다.
- [2] 구체적으로, 본 발명은 동물의 연골조직 및/또는 연골유래 연골세포에서 분비되어 형성된 연골세포 유래 세포외 기질을 이용하여 막 형태로 제작한 지지체의 신생혈관생성 억제 효능을 이용하여 익상편과 같은 각막 신생혈관질환을 치료하는 조성물 및 각막 또는 결막 이식재에 관한 것이다.
- [3] 또한, 본 발명은 동물의 연골조직 및/또는 연골세포 유래 세포외 기질막이 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하고 혈관내피세포 이동을 저해함으로써 혈관 생성 및 혈관 침투를 억제하여 궁극적으로 신생혈관생성을 억제하는 효능과 관련한 신규한 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [4] 신생혈관생성(Angiogenesis 또는 Neovascularization이라고 함)은 새로운 혈관이 생성되는 것을 의미한다. 발생과정이나 상처치료와 관련하여 정상적인 신생혈관의 생성은 유도되거나 조절하여야 하지만, 신생혈관생성이 조직의 퇴화를 유도하는 경우에는 바람직한 현상이 아니다. 특히, 신생혈관생성은 암, 연골 신생혈관형성증, 각막 신생혈관증, 당뇨병성 망막증, 맥락막 신생혈관 질환, 황반변성과 같은 질환과 밀접한 관련이 있어 이러한 경우에는 신생혈관을 억제해야만 해당 질환의 치료효과를 높일 수 있다.
- [5] 신생혈관의 형성 기전과 관련하여서는 암세포나 조직으로부터 신생혈관 유도인자인 VEGF(vascular endothelial growth factor), FGF, PIGF 등이 발현되어 주변의 혈관으로부터 미세 혈관이 형성되는 것이 알려져 있고, 상기 신생혈관 생성 유도인자의 발현은 허혈성 손상과 염증반응이 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [6] 각막은 무혈관 조직으로 시력보존을 위해 항상 투명성을 유지해야 한다. 그런데, 신생혈관 생성은 눈에서도 나타나 안구의 신생혈관 관련 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 즉, 각막에서의 신생혈관 생성은 안구의 투명성을 저해하여 시력의 손실을 가져오게 하며, 망막에서의 신생혈관 생성은 비정상적인 혈관이 생성됨으로써 혈액의 삼출현상이 일어나 망막세포의 변성을 통한 실명을 유도한다. 이와 관련된 질환으로는 각막신생혈관 생성증, 당뇨병성 망막증, 맥락막 신생혈관 질환, 황반변성 등이 있다. 따라서, 눈에서의 신생혈관

생성은 바람직한 현상이 아니고 최대한 억제되는 것이 바람직하다.

- [7] 이와 관련하여 최근에는 평균 기대수명의 증가, 야외활동 및 스포츠 인구의 증가로 인해 외상성 안과질환의 발병률이 증가하고 있으며, 이에 따라 눈에서의 신생혈관생성 관련 질환에 대해 효과적이고 기존 시술의 단점들을 보완한 새로운 치료법 개발의 요구도 급속히 증가하고 있다.
- [8] 예를 들어, 각막의 신생혈관질환인 익상편(pterygium)의 초기단계에는 약물 치료를 하지만, 중증의 경우에는 제거술과 자가 결막이식술 등의 외과적 수술을 시행하고 있다. 그러나, 신생혈관질환의 경우 높은 재발률(10-45%)과 합병증이 문제가 되고 있으며, 특히 광범위한 익상편에 대한 수술이나 재수술의 경우에는 전술한 외과적 수술을 적용하기 어려운 한계가 있다.
- [9] 즉, 각막 신생혈관질환의 경우 약물 부작용 문제, 합병증, 외과적 수술의 한계로 인해 새로운 치료제, 의료 소재 및 치료방법의 개발이 필요한 실정이다. 이러한 요구에 부응하여 최근에는 새로운 각막 치료용 의료소재가 각광을 받고 있다.
- [10] 현재까지 출시된 각막 치료용 의료소재로는 주로 녹내장 수술에 쓰이는 콜라겐 다공성 스폰지, 그리고 화상, 각막손상 및 익상편 치료 등에 쓰이는 생체조직 유래의 의료 소재인 양막이 있다.
- [11] 전술한 바와 같은 양막을 사용한 의료소재 중 국내제품으로는 바이오랜드사의 AmniSite-Cornea가 있으며 그 외 대부분은 모두 미국 제품으로 국내에는 IOP사의 Ambio-dry2™가 수입되어 익상편 시술 및 각막 손상치료에 사용되고 있다. 그러나, 이들 제품 모두 의료보험 비급여 품목으로 수술비용에 대한 환자의 부담이 매우 큰 문제가 있다.
- [12] 따라서, 대부분 고가의 수입 의료 제품에 의존하고 있는 현실에서 신생혈관 질환 치료용 의료소재 시장을 선점하고 새로운 수요를 창출할 수 있는 신기술 및 신소재 개발이 절실히 필요한 상황이라고 하겠다.
- [13] 이와 관련하여, 대한민국 등록특허공보 제10-0947553호에서는 동물 또는 인체로부터 분리된 양막을 알콜, 트립신, 알칼리 용액 및 산 용액으로 처리하여 양막 조직 이식재를 제조하는 방법을 개시하고 있고, 각막 표피 결손이 유도된 개의 안구에 양막조직 이식재를 처리하면 각막 상피재생 효과가 있음을 개시하고 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제100996846호에서는 양막과 비점막 상피세포를 포함하는 각막 또는 결막 이식재로서 풍부한 뮤신분비 세포를 포함하여 안구표면 안정화에 기여하고 이식 후 생착률과 지속성이 높은 각막 또는 결막 이식재를 개시하고 있다.
- [14] 그러나, 이들 종래기술은 각막 또는 결막 이식재의 기초 소재로서 양막을 이용하고 있기 때문에 양막 확보 어려움에 따른 제조단가의 상승 문제점을 여전히 갖고 있으며 대량 생산에 한계가 있다. 따라서, 본 발명이 속하는 기술분야에서는 양막을 대체하는 치료용 의료소재로서 값싸게 대량 생산이 가능하고 생체 적합성과 효능이 우수한 새로운 치료용 의료소재의 개발이 시급한 실정이라고 하겠다.

- [15] 이에 본 발명자들은 전술한 바와 같이 신생혈관생성으로 인하여 각막 혼탁, 시력저하 및 실명의 합병증이 발생하는 점에 주목하여 신생혈관생성을 방지할 수 있는 새로운 의료소재에 대해 예의 연구를 거듭한 결과, 연골세포 유래 세포외 기질막이 신생혈관생성 억제에 있어 우수한 효능을 갖는다는 것을 확인하고 이를 이용하여 신생혈관질환 치료용 조성물 및 각막 또는 결막 이식재를 개발하기에 이르렀다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [16] 본 발명의 목적은 연골세포 유래 세포외 기질막의 신생혈관생성 억제 효능을 이용하여 익상편과 같은 각막 신생혈관질환을 치료하는 조성물 및 각막 또는 결막 이식재를 제공하는데 있다.
- [17] 구체적으로, 본 발명의 목적은 배양된 동물의 연골유래 연골세포에서 분비되어 막 형태의 지지체로 형성된 연골세포 유래 세포외 기질막의 신생혈관생성 억제 효능을 이용하여 익상편과 같은 각막 신생혈관질환을 치료하는 조성물 및 각막 또는 결막 이식재를 제공하는데 있다.
- [18] 또한, 본 발명의 목적은 동물의 연골조직 및/또는 연골유래 연골세포에서 분비되어 형성된 연골세포 유래 세포외 기질막이 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하고 혈관내피세포 이동을 저해함으로써 혈관 생성 및 혈관 침투를 억제하여 궁극적으로 신생혈관생성을 억제하는 효능을 이용한 신규한 용도 발명을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [19] 본 발명은 신규한 신생혈관질환 치료용 조성물 및 각막 또는 결막 이식재를 제공한다.
- [20] 본 발명의 신생혈관질환 치료용 조성물은 동물의 연골에서 분비되어 형성된 연골세포 유래 세포외 기질을 유효성분으로 포함한다.
- [21]
- [22] 바람직하게는, 상기 연골세포 유래 세포외 기질은 콜라겐 및 단백당(glycosaminoglycan)으로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [23]
- [24] 상세하게는, 상기 연골세포 유래 세포외 기질은 연골조직을 탈세포하고 단백질을 분해효소로 처리 후 중화하여 수득하거나, 또는 연골조직에서 분리된 연골세포를 단층배양하는 과정에서 연골세포가 분비하여 형성된 세포외 기질막을 탈세포하여 제작한 것을 특징으로 한다.
- [25]
- [26] 발명의 일실시예의 신생혈관질환 치료용 조성물은 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명의 일실시예의 신생혈관질환 치료용 조성물은 혈관 생성 및 혈관 침투를 억제하여 신생혈관생성을 억제하는

것을 특징으로 한다.

- [27] 예를 들어, 본 발명의 일실시예의 신생혈관질환 치료용 조성물은 각막 신생혈관질환을 치료하는데 사용될 수 있고, 특히 익상편 또는 외상성 각막 궤양을 치료하는데 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 일실시예의 신생혈관질환 치료용 조성물은 당뇨병성 망막증, 맥락막 신생혈관 질환 또는 황반변성을 치료하는데 사용될 수도 있다.
- [28] 이러한 본 발명의 일실시예의 신생혈관질환 치료용 조성물은 상기 연골세포 유래 세포외 기질막이 분말화된 후 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합되어 점안제 형태의 안약 또는 주사제로 제공될 수 있다.
- [29] 즉, 본 발명의 일실시예의 신생혈관질환 치료용 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 약제학적으로 허용가능한 담체로서 혼합하여 사용할 수 있다. 주사제의 경우는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있다. 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수화 투약 형태로 제조할 수 있다. 또한, 국소 투여 시에는 기제, 부형제, 유효제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니며, 본 발명의 기술분야에 속하는 당업자라면 다양한 형태로 본 발명의 신생혈관질환 치료용 조성물이 제제화될 수 있으며, 다양한 담체나 첨가제들을 포함할 수 있음을 이해할 것이다.
- [30] 한편, 본 발명의 신생혈관질환 치료용 조성물의 투여 경로는 상기 연골세포 유래 세포외 기질막 성분이 안구에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통해서도 투여될 수 있고, 안구에 대한 국소적, 유리체내, 눈주변, 각막, 결막, 눈주변부, 전방내, 망막하, 또는 결막하 투여 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [31] 본 발명의 신생혈관질환 치료용 조성물의 치료상 유효량은 신생혈관질환 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 환자의 질환 종류, 질환의 경중, 투여되는 연골세포 유래 세포외 기질막 제형의 종류, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강 상태, 식이, 치료용 조성물의 투여 시간 및 투여 방법, 투여 경로 및 배출 속도에 따라 조절될 수 있다. 예를 들어, 성인에게 본 발명의 신생혈관질환 치료용 조성물을 투여하는 경우, 1일 1회 투여시 0.1 $\mu\text{g/kg}$ ~ 100 mg/kg 의 용량으로 투여할 수 있다.
- [32] 또한, 본 발명의 각막 또는 결막 이식제는 1) 연골조직을 탈세포하고 단백질을 분해효소로 처리 후 중화하여 수득한 연골세포 유래 세포외 기질; 또는 2) 연골조직에서 분리된 연골세포를 단층배양하는 과정에서 연골세포가 분비하여 형성된 세포외 기질막을 탈세포하여 제작한 연골세포 유래 세포외 기질로 구성된다.
- [33] 본 발명의 일실시예의 각막 또는 결막 이식제는 안구세포가 상기 연골세포 유래 세포외 기질막 상에 이식되어 배양될 수 있다. 상기 안구세포는 각막을

둘러싸고 있는 눈 표면의 가장자리에서 세포분열을 해서 조직을 자라게 하는 세포인 각막 줄기세포인 것을 특징으로 한다. 예를 들어, 각막 윤부의 상피 줄기세포, 구강 점막세포, 또는 비점막세포가 상피 연골세포 유래 세포외 기질막 상에 이식되어 배양될 수 있다.

- [34] 본 발명의 일실시예의 각막 또는 결막 이식재는 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명의 일실시예의 각막 또는 결막 이식재는 혈관 생성 및 혈관 침투를 억제하여 신생혈관생성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [35] 본 발명은 연골세포 유래 세포외 기질막의 신생혈관생성 억제 효능을 이용하여 익상편과 같은 각막 신생혈관질환을 치료하는 신규한 조성물 및 각막 또는 결막 이식재를 제공할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따르면 배양된 동물의 연골유래 연골세포에서 분비되어 막 형태의 지지체로 형성된 연골세포 유래 세포외 기질막의 신생혈관생성 억제 효능을 이용하여 익상편과 같은 각막 신생혈관질환을 치료하는 신규한 조성물 및 각막 또는 결막 이식재를 제공할 수 있다.
- [36] 또한, 본 발명의 신생혈관질환을 치료하는 신규한 조성물 및 각막 또는 결막 이식재는 배양된 동물의 연골유래 연골세포에서 분비되어 막 형태의 지지체로 형성된 연골세포 유래 세포외 기질막이 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하고 혈관내피세포 이동을 저해함으로써 혈관 생성 및 혈관 침투를 억제하여 궁극적으로 신생혈관생성을 억제할 수 있다.
- [37] 따라서, 본 발명의 신생혈관질환을 치료하는 신규한 조성물 및 각막 또는 결막 이식재를 이용하면, 각막의 신생혈관생성을 방지함으로써 각막의 궤양이나 병변 후 신생혈관생성으로 인하여 발생하는 각막 혼탁, 이로 인한 시력저하 및 실명의 합병증을 방지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [38] 이하, 도면의 간단한 설명 및 실시예에서 "연골세포 유래 세포외 기질막"은 편의상 "CD-ECM"으로 약칭한다.
- [39] 도 1의 (a)는 연골세포를 각각 이식한 배양 플레이트, CD-ECM 실험군 및 양막 실험군에 대한 연골세포 부착율(%) 및 혈관내피세포 부착율(%)을 나타내는 그래프이고, 도 1의 (b)는 연골세포를 각각 이식한 배양 플레이트, CD-ECM 실험군 및 양막 실험군의 부착세포수를 나타내는 형광강도를 측정하여 나타낸 그래프이다.
- [40] 도 2는 연골세포를 각각 이식한 배양 플레이트, CD-ECM 실험군 및 양막 실험군에 대한 연골세포 증식율(%) 및 혈관내피세포 증식율(%)을 나타내는 그래프이다.
- [41] 도 3은 젤트렉스만 코팅된 대조군, 젤트렉스/CD-ECM 분말 실험군 및

젤트렉스/양막 분말 실험군에 대해 각각 혈관내피세포의 이식과 배양을 수행한 후 혈관생성 정도를 나타내는 사진이다.

[42] 도 4는 젤트렉스만 코팅된 대조군, 젤트렉스/CD-ECM 분말 실험군 및 젤트렉스/양막 분말 실험군에 대해 각각 혈관내피세포의 이식과 배양을 수행한 후 시야당 형성된 혈관의 개수와 혈관의 길이를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[43] 도 5는 매트릭젤 단독, 매트릭젤/CD-ECM 분말 및 매트릭젤/양막 분말을 각각 누드마우스 척추에 주사하여 이식한 후 1주일이 경과한 시점에서 척추로부터 수거한 각각의 샘플을 카메라로 촬영한 3차원 이미지 사진이다.

[44] 도 6은 매트릭젤 단독, 매트릭젤/CD-ECM 분말 및 매트릭젤/양막 분말을 각각 누드마우스 척추에 주사하여 이식한 후 1주일이 경과한 시점에서 척추로부터 수거한 각각의 샘플 조직 절편에 대한 화학적 염색(H&E) 및 면역화학적 염색(a-SMA, CD31)을 하여 혈관 형성 및 면역 염색 상태를 현미경으로 촬영한 사진이다.

[45] 도 7은 도 6에서 염색된 현미경 사진 이미지에서 면적당 혈관의 개수와 혈관의 지름을 IMAGE J 프로그램을 사용하여 측정하고 정량화한 그래프이다.

[46] 도 8은 매트릭젤 단독, 매트릭젤/CD-ECM 분말 및 매트릭젤/양막 분말을 각각 누드마우스 척추에 주사하여 이식한 후 1주일이 경과한 시점에서 척추로부터 수거한 각각의 샘플 조직 절편에 대한 면역화학적 염색(VEGF, HIF-1a, 엔도스타틴)을 한 후 면역 염색 상태를 현미경으로 촬영한 사진이다.

[47] 도 9는 토끼 양안에 각막 신생혈관을 실험적으로 발생시킨 후 좌안(실험군)에는 CD-ECM을 이식하고 우안(대조군)에는 아무 것도 이식하지 않은 경우, CD-ECM을 시술하지 않은 우안 대조군에 비해 CD-ECM을 시술한 좌안 실험군에서 혈관의 형성이 많이 억제된 것을 나타내는 사진이다.

[48] 도 10은 각막 신생혈관을 실험적으로 발생시키고 좌안(실험군)에는 CD-ECM을 이식하고 우안(대조군)에는 아무 것도 이식하지 않은 토끼의 안구를 적출한 후 면역화학적 염색(CD31)을 하여 혈관 형성 및 면역 염색 상태를 현미경으로 촬영한 사진이다.

[49] 도 11은 각막 신생혈관을 실험적으로 발생시키고 좌안(실험군)에는 CD-ECM을 이식하고 우안(대조군)에는 아무 것도 이식하지 않은 토끼의 안구를 적출한 후 안구조직에서 VEGF 단백질의 발현량을 분석하는 웨스턴 블롯 결과 사진이다.

[50] 도 12는 본 발명의 CD-ECM 위에 이식된 후 잘 생착되어 있는 세포 시트를 현미경으로 촬영한 사진이다.

[51] 도 13은 본 발명의 CD-ECM 위에 상피세포가 이식되어 배양된 상피세포시트를 토끼의 각막 조직의 상피부위에 이식하고 이를 마우스의 등쪽 피하조직에 이식 후 3주간 배양한 뒤 이식 조직의 생착여부를 조직학적으로 분석한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.

[52] 도 14는 본 발명의 CD-ECM 위에 상피세포가 이식되어 배양된 상피세포시트를

토끼의 각막 조직의 상피부위에 이식하고 이를 마우스의 등쪽 피하조직에 이식 후 3주간 배양한 뒤 이식 조직의 생착여부를 면역화학적으로 분석한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.

- [53] 도 15는 본 발명의 CD-ECM 위에 상피세포가 이식되어 배양된 상피세포시트를 토끼의 각막 조직의 상피부위에 이식하고 이를 마우스의 등쪽 피하조직에 이식 후 3주간 배양한 뒤 관찰한 전자현미경 사진으로서, 상피세포가 하부 각막 기질층에 밀착 접합(tight junction)을 잘 형성하고 있음을 보여준다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [54] 본 발명은 신규한 신생혈관질환 치료용 조성물 및 각막 또는 결막 이식재를 제공한다.
- [55] 본 발명의 신생혈관질환 치료용 조성물은 동물의 연골에서 분비되어 형성된 연골세포 유래 세포외 기질을 유효성분으로 포함한다.
- [56] 바람직하게는, 상기 연골세포 유래 세포외 기질은 콜라겐 및 단백당(glycosaminoglycan)으로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [57] 상세하게는, 상기 연골세포 유래 세포외 기질은 연골조직을 탈세포하고 단백질 분해효소로 처리 후 중화하여 수득하거나, 또는 연골조직에서 분리된 연골세포를 단층배양하는 과정에서 연골세포가 분비하여 형성된 세포외 기질막을 탈세포하여 제작한 것을 특징으로 한다.
- [58] 발명의 일실시예의 신생혈관질환 치료용 조성물은 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명의 일실시예의 신생혈관질환 치료용 조성물은 혈관 생성 및 혈관 침투를 억제하여 신생혈관생성을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [59] 본 발명의 각막 또는 결막 이식재는 1) 연골조직을 탈세포하고 단백질 분해효소로 처리 후 중화하여 수득한 연골세포 유래 세포외 기질; 또는 2) 연골조직에서 분리된 연골세포를 단층배양하는 과정에서 연골세포가 분비하여 형성된 세포외 기질막을 탈세포하여 제작한 연골세포 유래 세포외 기질로 구성된다.
- [60] 본 발명의 일실시예의 각막 또는 결막 이식재는 안구세포가 상기 연골세포 유래 세포외 기질막 상에 이식되어 배양될 수 있다. 상기 안구세포는 각막을 둘러싸고 있는 눈 표면의 가장자리에서 세포분열을 해서 조직을 자라게 하는 세포인 각막 줄기세포인 것을 특징으로 한다. 예를 들어, 각막 윤부의 상피 줄기세포, 구강 점막세포, 또는 비점막세포가 상기 연골세포 유래 세포외 기질막 상에 이식되어 배양될 수 있다.
- [61] 본 발명의 일실시예의 각막 또는 결막 이식재는 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명의 일실시예의 각막 또는 결막 이식재는 혈관 생성 및 혈관 침투를 억제하여 신생혈관생성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [62] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다. 본 발명에 인용된 참고문헌들은 본 발명에 참고로서 통합된다.
- [63]
- [64] **<실시예 1> 연골세포 유래 세포외 기질막 및 양막 준비**
- [65] 본 발명의 각막 신생혈관질환을 치료하는 조성물 및 각막 또는 결막 이식재의 기초소재로서 사용되는 연골세포 유래 세포외 기질막(chondrocyte-derived extracellular matrix membrane)(이하, 'CD-ECM'이라고 약칭함)은 다음과 같이 제조된 막형태의 지지체이다.
- [66] 무균돼지 무릎연골조직의 연골세포를 채집하고 배양하여 형성된 막 형태의 세포외 기질막이다. 이러한 연골세포 유래 세포외 기질막은 현재 정형외과에서 연골을 재생하는 목적만으로 임상적으로 사용되고 있는 소재로서 무균돼지 무릎연골에서 분리된 연골세포를 단층으로 배양하면서 분비된 세포외 기질막 또는 필름형태로 건조한 후 DNase I과 같은 효소로 탈세포하고 PBS 버퍼로 세척하여 수득한다. 상기 세포외 기질막은 두께가 10~20 μ m 정도의 생체막으로, 콜라겐과 단백당을 주 구성 성분으로 갖고 있으며, 약 25 N/mm²의 인장강도와 10%의 신장율을 가진다(대한민국 등록특허공보 제10-0816395호 참조).
- [67] 또한, 무균돼지의 무릎연골조직에서 연골세포를 제거하고 연골세포가 분비한 세포외 기질 성분을 수득하여 제작한 막 형태의 세포외 기질막이다. 무균돼지 무릎연골조직을 분말 형태로 분쇄한 후 hypotonic lysis buffer와 DNase I과 같은 효소로 탈세포하고 증류수 혹은 PBS로 세척하여 수득한 동물 연골 유래 세포외 기질 분말을(대한민국 등록특허공보 제10-1056069호 참조) 단백질 분해효소를 첨가한 산성 수용액으로 처리한 후 이를 중화시켜 개질하여 막 형태의 지지체로 제조한다.
- [68] 본 발명의 연골세포 유래 세포외 기질막을 이용한 신생혈관질환 치료용 조성물 및 각막 또는 결막 이식재의 대조군으로 사용되는 양막은 주식회사 바이오랜드(충청남도 천안, 대한민국 소재)에서 판매하는 제품을 사용한다.
- [69] 또한, 후술하는 실시예에서 사용되는 CD-ECM과 양막의 분말은 이들 각각의 필름을 -70°C에서 동결 건조시킨 후 극저온 샘플 분쇄기(cryogenic sample crusher)(JFC-300, JAI, Japan)를 사용하여 준비하고, 사용 전 27°C에서 24시간 동안 이온가스로 멸균시킨다.
- [70]
- [71] **<실시예 2> 세포 배양**

- [72] 실시예 1에서 준비한 본 발명의 연골세포 유래 세포외 기질막(CD-ECM) 및 대조군인 양막에 각각 부착되어 후술하는 시험관내 시험 및 생체내 시험에서 사용되는 혈관내피세포와 연골세포를 다음과 같이 사전에 배양하여 준비하였다.
- [73] 우선, 혈관내피세포인 HUVEC는 내피세포 성장인자들(Promega, Wisconsin, USA), $10\mu\text{g/ml}$ bFGF 및 2% FBS 등이 보충된 내피세포 배양액에서 배양한 후 배양 플레이트에 플레이트 당 1×10^6 개 세포를 파종하였고 5% CO_2 인큐베이터 내에서 37°C 에서 배양하였다. 혈관내피세포(HUVEC) 파종 후 2일이 경과한 후, 미부착 세포들은 제거하였고 플레이트에 부착된 세포들을 추가로 배양하였다. 파종 후 14일째에 부착된 혈관내피세포(HUVEC)를 트립신 처리로 떼어내었고 7분간 180g 에서 원심분리를 하였다. 원심분리 후 얻은 세포 펠릿을 세포 배양액에 재현탁하였고 세포 증식을 위해 플레이트 당 1×10^6 개 세포를 다시 파종하여 70-80% 밀집도까지 배양하였다.
- [74] 다음으로, 2주령된 암컷 뉴질랜드 백색 가토(New Zealand white rabbit)의 무릎 연골에서 연골 조각을 채취한 후 이를 DMEM 내의 1mg/ml 콜라게나아제(Worthington, NJ, USA)로 처리하여 연골세포를 분리하였다. 콜라게나아제 처리후 수득한 연골세포 현탁액을 나이론 메쉬 세포여과기(nylon mesh cell strainer)(BD, MA, USA)로 연골세포만을 거르고, 원심분리(1700rpm , 10분)하여 연골세포만을 분리하였다. 분리된 연골세포 펠릿을 10% FBS와 1% 항생-항진균제(antibiotic-antimycotic)가 첨가된 DMEM에서 재현탁하고 배양 플레이트에 플레이트 당 1.5×10^6 개 파종한 후 5% CO_2 인큐베이터 내에서 37°C 에서 배양하였다. 그리고 배양배지는 3일마다 교환해 주었다.
- [75]
- [76] < 실시예 3 > 연골세포와 혈관내피세포(HUVEC)에 대한 세포 부착 어세이
- [77] 본 실시예에서는 실시예 1에서 준비한 본 발명의 연골세포 유래 세포외 기질막(CD-ECM)과 대조군인 양막의 소재 차이에 따른 연골세포(chondrocyte)와 혈관내피세포(HUVEC)의 부착율 차이를 다음과 같이 확인하였다.
- [78] 우선, 직경 5mm의 CD-ECM과 양막을 각각 별개의 24웰 디쉬(24 well dish)에 부착시키고 건조한 후, 이온가스 멸균을 실시하였다. 그리고 CD-ECM과 양막이 각각 코팅된 디쉬에 1×10^3 개의 연골세포와 혈관내피세포를 별도로 이식하고 세포의 형광염색을 위해 $40\mu\text{l}$ 칼세인(Calcein) AM($2\mu\text{g}/1\text{ml}$)(Invitrogen, Wisconsin, USA)을 첨가한 후, 24시간 동안 5% CO_2 인큐베이터 내에서 37°C 에서 배양하였다. 이때 연골세포의 배양에는 DMEM과 10% FBS가 첨가된 배지를 사용하였고, 혈관내피세포의 배양에는 내피세포 성장 배지(endothelial cell growth media), $10\mu\text{g/ml}$ bFGF 및 2% FBS가 첨가된 배지를 사용하였다. 한편, 대조군으로는 상기 펠름들이 부착되지 않은 통상의 세포 배양 플레이트(cell culture plate)를 사용하여 전술한 바와 같은 동일한 조건으로 연골세포와 혈관내피세포의 이식과 배양을 수행하였다.

- [79] 24시간이 경과한 후, 배양액을 제거하여 부착되지 않은 세포수를 확인하였고, 이에 기초하여 부착율을 계산하여 정량하였다. 또한, 부착된 세포에 대해서는 형광염색을 통하여 염색된 형광 강도를 마이크로 플레이트 리더를 이용하여 측정함으로써 부착된 세포의 양을 정량하였다. 정량 결과 데이터 분석은 그래프패드 소프트웨어(GraphPad software)를 이용하여 스튜던트 t 테스트(student t-test)에 의해 수행되었고 각 실험은 5회 반복되어 평균값과 표준편차로서 표시되었다(통계학적 유의성: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).
- [80] 그 결과, 도 1의 (a)에 도시된 바와 같이, 연골세포를 이식한 CD-ECM 실험군과 양막 실험군을 비교하였을 때, 연골세포의 부착율에 있어서 CD-ECM 실험군에서 상대적으로 연골세포 부착율(%)이 높은 것을 확인할 수 있었다. 반면에, 혈관내피세포를 이식한 CD-ECM 실험군과 양막 실험군을 비교하였을 때에는, 혈관내피세포의 부착율에 있어서 양막 실험군에서 상대적으로 혈관내피세포 부착율(%)이 높은 것을 확인할 수 있었다.
- [81] 이러한 결과는 도 1의 (b)에 도시된 바와 같은 형광강도 측정결과와도 일치하였는데, 이러한 결과들로부터 부착세포수와 형광강도 측정에서 CD-ECM 실험군과 양막 실험군 간에 유의적 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 즉, 본 발명의 CD-ECM 소재를 이용한 경우에는 연골세포의 부착율은 높지만 신생혈관생성과 관련된 혈관내피세포에 대해서는 부착을 유의적으로 억제하는 것을 알 수 있었고, 반면에 종래의 양막 소재를 이용한 경우에는 CD-ECM 소재에 비해 신생혈관생성과 관련된 혈관내피세포 부착율이 높고 혈관내피세포에 대한 부착을 억제하지 않는다는 것을 알 수 있었다.
- [82]
- [83] < 실시예 4 > 연골세포와 혈관내피세포(HUVEC)에 대한 세포 증식 어세이
- [84] 본 실시예에서는 실시예 1에서 준비한 본 발명의 연골세포 유래 세포외 기질막(CD-ECM)과 대조군인 양막의 소재 차이에 따른 연골세포(chondrocyte)와 혈관내피세포(HUVEC)의 증식율 차이를 다음과 같이 확인하였다.
- [85] 우선, 직경 5mm의 CD-ECM과 양막을 각각 별개의 24웰 디쉬(24 well dish)에 부착시키고 건조한 후, 이온가스 멸균을 실시하였다. 그리고 CD-ECM과 양막이 각각 코팅된 디쉬에 1×10^3 개의 연골세포와 혈관내피세포를 별도로 이식하고 총 7일 동안 5% CO_2 인큐베이터 내에서 37°C에서 배양하였다. 이때 연골세포의 배양에는 DMEM과 10% FBS가 첨가된 배지를 사용하였고, 혈관내피세포의 배양에는 내피세포 생장배지(endothelial cell growth media), 10 $\mu\text{g/ml}$ bFGF 및 2% FBS가 첨가된 배지를 사용하였다. 3일마다 신선한 배지로 교체해 주었으며 배양 후 1일째, 4일째 및 7일째에 MTT 어세이를 수행하여 CD-ECM과 양막이 각각 코팅된 디쉬에서의 각 세포의 증식율을 확인하였다(마이크로 플레이트 리더를 이용하여 460nm에서 측정된 광학밀도값 비교 계산). 한편, 대조군으로는 상기 펠름들이 부착되지 않은 통상의 세포배양 플레이트(cell culture plate)를 사용하여 전술한 바와 같은 동일한 조건으로 연골세포와 혈관내피세포의 이식과 배양을

수행하였다.

- [86] 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, 연골세포를 이식한 CD-ECM 실험군과 양막 실험군을 비교하였을 때, 배양 후 4일째 및 7일째 연골세포의 증식율에 있어서 CD-ECM 실험군에서 상대적으로 연골세포 증식율(%)이 높은 것을 확인할 수 있었다.
- [87] 반면에, 혈관내피세포를 이식한 CD-ECM 실험군과 양막 실험군을 비교하였을 때에는, 배양 후 4일째 및 7일째 혈관내피세포의 증식율에 있어서 양막 실험군에서 상대적으로 혈관내피세포 증식율(%)이 높은 것을 확인할 수 있었다.
- [88] 이러한 결과들로부터 배양 후 4일째 및 7일째 연골세포 증식율과 혈관내피세포의 증식율에 있어서 CD-ECM 실험군과 양막 실험군 간에 유의적 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 즉, 본 발명의 CD-ECM 소재를 이용한 경우에는 연골세포의 증식율은 높지만 신생혈관생성과 관련된 혈관내피세포 증식을 유의적으로 억제하는 것을 알 수 있었고, 반면에 종래의 양막 소재를 이용한 경우에는 CD-ECM 소재에 비해 신생혈관생성과 관련된 혈관내피세포 증식율이 높고 혈관내피세포 증식을 억제하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

[89]

[90] **< 실시예 5 > 혈관 생성 어세이 (Tube formation assay)**

- [91] 본 실시예에서는 실시예 1에서 준비한 본 발명의 연골세포 유래 세포외 기질막(CD-ECM) 소재가 혈관내피세포의 혈관생성을 억제할 수 있는지 여부를 다음과 같이 평가하였다.

- [92] 100 μ l 젤트렉스(Geltrex)(기저막 base membrane)(Gibco BRL, Cat.12760-021)를 24웰 디쉬에 코팅하고 37°C에서 30분간 인큐베이션하여 각 웰에서 젤트렉스가 중합되도록 하였다. 그런 다음, 실시예 1에서 준비한 CD-ECM 분말 및 양막 분말을 젤트렉스가 중합되어 코팅된 각각의 웰에 넣어준 후, 1.9×10^4 개의 혈관내피세포를 이식하여 24시간 동안 배양하였다. 또한, 배양 후 혈관형성 유무를 확인하기 위한 염색을 위해 칼세인(Calcein) AM(2 μ g/1ml)(Invitrogen, Wisconsin, USA)을 첨가하여 염색을 시행하였다. 이때 혈관내피세포의 배양에는 내피세포 성장 배지(endothelial cell growth media), 100 ng/ml bFGF 및 10% FBS가 첨가된 배지를 사용하였다. 한편, 대조군은 CD-ECM 분말 및 양막 분말이 웰에 첨가되지 않고 젤트렉스만 코팅된 24웰 디쉬를 사용하여 전술한 바와 같은 동일한 조건으로 혈관내피세포의 이식과 배양을 수행하였다.

- [93] 염색 후 각 실험군에 대해 배양 후 24시간 경과 시점에 관찰이 수행되었는데, 디지털 카메라를 이용하여 촬영된 각 웰당 10개의 시야(field)에서 혈관 개수를 계수하였고 이미지 J 프로그램(Image J program)을 이용하여 혈관의 길이 및 면적을 측정 계산하였다. 시야 당 혈관 개수 및 혈관 길이에 대한 정량 결과 데이터분석은 그래프패드 소프트웨어(GraphPad software)를 이용하여 스튜던트 t 테스트(student t-test)에 의해 수행되었고 각 실험은 5회 반복되어 평균값과 표준편차로서 표시되었다(통계학적 유의성: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

- [94] 그 결과, 도 3에 도시된 바와 같이, CD-ECM 분말이 섞인 실험군에서 혈관 생성이 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 4에 도시된 바와 같이, 시야(field) 당 형성된 혈관의 개수와 길이를 측정하여 정량하였을 때, CD-ECM 분말이 섞인 실험군에서 형성된 혈관 개수가 양막 분말이 섞인 실험군에서 형성된 혈관개수 보다 적은 것이 확인되었으며(도 4의 (a) 참조), 형성된 혈관의 길이 또한 CD-ECM 분말이 섞인 실험군에서 짧게 형성되어 있음을 확인할 수 있었다(도 4의 (b) 참조).
- [95] 따라서, 본 발명의 CD-ECM 분말은 혈관내피세포의 혈관 생성을 강력하게 저해하는 것을 알 수 있었고, 반면에 종래의 양막 분말은 혈관내피세포의 혈관 생성을 유의적으로 방해하지 않는다는 것을 알 수 있었다.
- [96] 이상과 같은 실시예 3 내지 실시예 5의 시험관내 실험을 통해 본 발명의 CDECM 소재는 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하고 혈관내피세포의 혈관생성을 저해함으로써 혈관내피세포의 혈관 침투를 억제할 수 있고 궁극적으로 신생혈관생성을 억제할 수 있음을 알 수 있다.
- [97]
- [98] <실시예 6> 매트릭셀 혈관 침투의 육안 관찰
- [99] 본 실시예에서는 실시예 1에서 준비한 본 발명의 연골세포 유래 세포외 기질막(CD-ECM) 소재가 혈관침투를 억제할 수 있는지 여부를 매트릭셀(matrigel)(BDBioscience, Cat. 354234 and 356234) 침투 어세이를 수행한 후 육안으로 평가하였다.
- [100] 우선, 매트릭셀에 실시예 1에서 준비한 CD-ECM 분말 또는 양막 분말을 섞은 후 누드마우스 등쪽 피하에 주사하였고, 대조군은 매트릭셀만을 누드마우스 등쪽 피하에 주사하였다. "매트릭셀", "매트릭셀CD-ECM 분말" 및 "매트릭셀+양막 분말"을 각각 10마리의 누드마우스 척추 양쪽을 따라 주사하여 길이방향으로 이식되도록 한 후 이식 후 1주일 이 경과한 시점에서 척추로부터 샘플을 수거하였고, 육안관찰을 통하여 샘플의 형상, 크기 및 혈관침투의 유무를 확인하였다.
- [101] 그 결과, 도 5에 도시된 CCD 카메라로 촬영한 3차원 이미지에서 확인되는 바와 같이, 매트릭셀 단독 사용의 대조군과 양막 분말이 섞인 매트릭셀 실험군에서는 혈관침투가 증가되어 있음을 관찰할 수 있었지만, CD-ECM 분말이 섞인 매트릭셀 실험군에서는 혈관 침투가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.
- [102] 따라서, 본 발명의 CD-ECM 소재는 종래의 양막 소재에 비해 혈관침투도 효과적으로 저해하는 것을 알 수 있었다.

[103]

[104] <실시예 7> 매트릭셀 혈관 침투의 면역조직화학적 관찰 및 분석

- [105] 본 실시예에서는 실시예 1에서 준비한 본 발명의 연골세포 유래 세포외 기질막(CD-ECM) 소재가 혈관 형성 및 침투를 억제할 수 있는지 여부를 매트릭셀(matrigel) 침투 어세이를 수행한 후 면역조직화화학적으로 분석 및

평가하였다.

- [106] 우선, 매트릭젤에 실시예 1에서 준비한 CD-ECM 분말 또는 양막 분말을 섞은 후 누드마우스 등쪽 피하에 주사하였고, 대조군은 매트릭젤만을 누드마우스 등쪽 피하에 주사하였다. "매트릭젤", "매트릭젤+CD-ECM 분말" 및 "매트릭젤+양막 분말"을 각각 10마리의 누드마우스 척추 양쪽을 따라 주사하여 길이방향으로 이식되도록 한 후 이식 후 1주일의 경과한 시점에서 척추로부터 샘플을 수거하였다.
- [107] 수거된 샘플을 4% 포르말린으로 24시간 고정하고 탈수시킨 후 파라핀 포매(包埋) 후 4 μ m 두께의 절편을 만들었고 혈관의 분포와 형태를 보기 위해 H&E 염색(헤마톡실린/에오신 염색)을 당업계에 널리 알려진 통상의 방법에 따라 수행하였다.
- [108] 또한, 각 샘플 내에 신생혈관이 생성된 것을 나타내는 α -SMA(alpha smooth muscle actin)과 CD31(혈관내피세포의 마커)의 발현을 확인하기 위해 각각의 수거된 샘플에 대해 당업계에 널리 알려진 통상의 방법에 따라 면역화학적 염색을 수행하였다.
- [109] 그리고, 각각의 샘플에 대한 화학적 염색(H&E)과 면역화학적 염색(α -SMA 및 CD31에 대한 염색)을 통하여 혈관 형성의 유무를 현미경(Nikon E600, Japan)으로 확인하였고(도 6 참조), 염색된 현미경 사진 이미지에서 면적당 혈관의 개수와 혈관의 지름을 IMAGE J 프로그램(Image J program) (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)을 사용하여 측정하고 정량화하였다(도 7 참조).
- [110] 그 결과는 도 6 및 도 7에 도시된 바와 같다. 도 6은 각 샘플 조직 절편에 대해 화학적 염색(H&E)과 면역화학적 염색(α -SMA 및 CD31에 대한 염색)을 한 후 400배 배율로 현미경(Nikon E600, Japan)으로 촬영한 사진이다. 혈관형성 유무를 화학적 염색(H&E)을 통하여 확인한 결과, 매트릭젤 단독 사용의 대조군과 양막 분말이 섞인 매트릭젤 실험군에서는 혈관이 침투해 있음을 관찰할 수 있었지만, CD-ECM 분말이 섞인 매트릭젤 실험군에서는 혈관형성 및 혈관 침투가 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [111] 또한, 각 실험군에서 혈관형성 유무를 α -SMA 및 CD31에 대한 면역화학적 염색을 통하여 확인한 결과, 매트릭젤 단독 사용의 대조군과 양막 분말이 섞인 매트릭젤 실험군에서는 α -SMA 및 CD31이 발현되어 면역화학적 염색이 된 것을 확인할 수 있었지만, CD-ECM 분말이 섞인 매트릭젤 실험군에서는 α -SMA 및 CD31이 발현되지 않아 염색이 되지 않았으며 혈관구조를 관찰할 수 없었다.
- [112] 그리고, 도 7에 도시된 바와 같이, 염색된 조직의 슬라이드를 통해 면적당 형성된 혈관의 개수(number of capillary structure/mm²)와 지름(diameter of capillary structure μ m)을 측정하여 정량화하였을 때, CD-ECM 분말이 섞인 매트릭젤 실험군에서는 측정된 혈관이 없었다. 반면에, 양막 분말이 섞인 매트릭젤 실험군의 경우에는 CD-ECM 분말이 섞인 매트릭젤 실험군 뿐만아니라 매트릭젤 단독 사용의 실험군과 비교하였을 때에도 형성된 혈관의 길이가 길며,

혈관의 개수 또한 많은 것이 관찰되었다.

- [113] 따라서, 본 발명의 CD-ECM 소재는 종래의 양막 소재에 비해 혈관형성 및 혈관침투를 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

[114]

- [115] <실시예 8> 신생혈관생성인자 및 신생혈관생성 억제인자에 대한 면역조직화학적 관찰 및 분석

- [116] 본 실시예에서는 실시예 7과 동일 또는 유사한 방법으로 실험을 수행하여 각 샘플을 수거한 후 각 실험군에서 신생혈관생성인자(angiogenic factor)와 신생혈관 생성 억제인자(anti-angiogenic factor)의 발현 여부를 확인하기 위한 목적으로 면역화학적 분석 및 평가를 수행하였다.

- [117] 본 실시예에서는 실시예 7과 동일 또는 유사한 방식으로 신생혈관생성인자(VEGF, HIF-1a)와 신생혈관생성 억제인자(Endostatin)의 발현을 확인하기 위해 각각의 수거된 샘플에 대해 당업계에서 널리 알려진 통상의 방법에 따라 면역화학적 염색을 수행하였다. 그리고, 각각의 샘플에 대한 면역화학적 염색(VEGF, HIF-1a 및 Endostatin에 대한 염색)을 통하여 혈관 형성의 유무를 현미경(Nikon E600, Japan)으로 확인하였다(도 8 참조).

- [118] 도 8은 각 샘플 조직 절편에 대해 면역화학적 염색(VEGF, HIF-1a 및 Endostatin에 대한 염색)을 한 후 400배 배율로 현미경(Nikon E600, Japan)으로 촬영한 사진이다. 각 실험군에서 혈관형성 유무를 신생혈관생성인자인 VEGF 및 HIF-1a에 대한 면역화학적 염색을 통하여 확인한 결과, 매트릭셀 단독 사용의 대조군과 양막 분말이 섞인 매트릭셀 실험군에서는 VEGF 및 HIF-1a이 발현되어 면역화학적 염색이 된 것을 확인할 수 있었지만, CD-ECM 분말이 섞인 매트릭셀 실험군에서는 VEGF 및 HIF-1a이 발현되지 않아 염색이 되지 않았으며 혈관구조를 관찰할 수 없었다.

- [119] 한편, 각 실험군에서 신생혈관생성 억제인자의 발현 유무를 신생혈관생성 억제인자인 엔도스타틴(Endostatin)에 대한 면역화학적 염색을 통하여 확인한 결과, 혈관 형성 및 침투가 있는 영역에서 엔도스타틴이 발현되어 엔도스타틴에 대한 양성 염색을 확인할 수 있었다.

- [120] 따라서, 본 발명의 CD-ECM 소재는 종래의 양막 소재에 비해 혈관형성 및 혈관침투를 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 혈관이 형성된 조직에서 신생혈관생성 억제인자의 발현을 관찰할 수 있었다.

- [121] 결국, 전술한 바와 같은 실시예 3 내지 실시예 8의 실험을 통해 본 발명의 CD-ECM 소재는 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제할 수 있고 혈관내피세포 이동을 저해할 뿐만 아니라 혈관형성 및 혈관침투를 효과적으로 억제하여 궁극적으로 신생혈관생성을 억제할 수 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 CD-ECM 소재는 신생혈관질환을 치료하는 조성물 및 각막 또는 결막 이식재로서 유용하게 활용될 수 있다.

[122]

[123] <실시예 9> 각막 신생혈관생성 억제 동물실험

[124] 본 실시예에서는 본 발명의 CD-ECM 소재가 신생혈관질환을 치료하는 조성물 및 각막 또는 결막 이식재로서 활용될 수 있는지를 확인하기 위해 동물실험을 수행하였다. 즉, 8주령 뉴질랜드 백색 가토를 대상으로 하여 양안에 각막 신생혈관을 실험적으로 발생시킨 후, 한쪽 눈(좌안: 실험군)에는 CD-ECM을 이식하고 다른 쪽 눈(우안: 대조군)에는 아무 것도 이식하지 않고 본 발명의 CD-ECM의 각막 신생혈관화 억제효과를 비교하였다. 실험과정 및 실험결과를 설명하면 다음과 같다.

[125]

[126] A. 각막 신생혈관 발생 모델의 준비

[127] 각막에 신생혈관의 발생을 일으키기 위하여 뉴질랜드 백색 가토의 각막 윤부에 7-0 머실크(mersilk)를 이용하여 중간 간질 레벨(mid stromal level)에 4 포인트 봉합(4 point suture)를 해 준다.

[128]

[129] B. CD-ECM 및 양막 준비

[130] CD-ECM은 실시예 1에서 준비한 것을 사용하였다. 그리고, 양막은 B형 간염, C형 간염, HIV, 매독 등의 혈청 검사상 음성인 산모의 제왕 절개 직후 태반으로부터 분리한 것을 사용하였다. 분리된 양막은 PBS(phosphphate buffered saline)를 이용하여 세척한 다음, 양막의 상피쪽이 반대로 향하도록 니트로셀룰로오스 페이퍼(Nitrocellulose paper) 위에 얇게 펼친 후 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)과 100% 글리세린을 1:1로 섞은 배지에 넣어 -70°C 냉장고에 보관하였다.

[131]

[132] C. CD-ECM 및 양막의 이식

[133] 안구에 대한 신생혈관 생성 모델 제작 4일 후 뉴질랜드 백색 가토의 대퇴근에 졸레틸(zoletil) (15mg/mg)과 자일라진(xylazine) (5mg/mg) (atropine 2A /마리)을 근육주사하여 전신 마취를 한 후 뉴질랜드 백색 가토의 눈에 0.5% 프로파라카인 하이드록시클로라이드(proparacaine hydroxychloride)(Alcaine®, Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, Texas, USA)를 2회 점안하여 국소 마취하였다.

[134] 사용하는 CD-ECM 및 양막을 신생혈관 주위에 고정하기 위하여 10-0 나일론으로 봉합하였다. 1주일 동안 레보플록사신(levofloxacin)(Cravit®, Santen Pharmaceutical Company, Osaka, Japan) 안약을 하루 3회 점안하였다.

[135]

[136] D. 항 혈관화(신생혈관 생성 억제) 효능의 평가

[137] 최종적으로는 신생혈관 유도 4일째 봉합사 제거 후 CD-ECM을 시술하였으며, 7일 후에 마취한 상태에서 안구의 상태를 육안으로 관찰하여 혈관 형성 정도를 조사하였다. 도 9에 도시된 바와 같은 육안 관찰 결과에서 CD-ECM을 시술하지 않은 우안 대조군에 비해 CD-ECM을 시술한 좌안 실험군에서 혈관의 형성이

많이 억제되어 있음을 확인할 수 있었다.

[138] 또한, 마취한 토끼를 CO₂ 챔버에서 희생시키고 안구를 적출하여 조직학적 분석을 수행하였다. 먼저, 수술부위의 혈관화 억제 정도를 보기 위해서 혈관내피세포의 마커(marker)인 CD31에 대해 면역화학적 염색을 당업계에 널리 알려진 통상의 방법에 따라 수행하여 혈관 수의 변화를 관찰하였다. 도 10에 도시된 바와 같이, 혈관내피세포의 마커인 CD31에 대한 면역화학적 염색을 수행한 후 안구조직 절편에 대해 분석한 결과, CD-ECM을 이식하지 않은 우안 대조군에 비해 CD-ECM을 이식한 좌안 실험군에서 혈관 형성 및 CD31 발현이 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[139] 그리고, 신생혈관형성에 중요한 역할을 하는 VEGF 단백질의 발현량을 당업계에 널리 알려진 통상의 방법에 따라 웨스턴 블롯(Western blot)을 통해 분석하였다. 도 11에 도시된 바와 같이, 안구조직에서 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯으로 VEGF 단백질의 발현량을 조사한 결과, CD-ECM을 이식하지 않은 우안 대조군에 비해 CD-ECM을 이식한 좌안 실험군에서 VEGF의 발현량이 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[140] 따라서, 본 발명의 CD-ECM 소재를 신생혈관질환을 치료하는 조성물 및 각막 또는 결막 이식재로서 이용하면, 각막의 신생혈관생성을 방지하여 각막의 궤양이나 병변 후 신생혈관생성으로 인하여 발생하는 각막 혼탁, 이로 인한 시력저하 및 실명의 합병증을 방지할 수 있다.

[141]

[142] < 실시예 10 > 각막윤부에 위치하는 각막상피줄기세포의 이식을 위한 매개체로서의 이용 가능성

[143] 각막의 투명도는 눈의 적절한 기능에 있어 가장 기본이면서도 중요한 요소이다. 이러한 각막의 상피세포는 각막 윤부에 위치한 줄기세포에 의해 지속적으로 건강하게 유지되고 있으나, 열 또는 화학 손상, 스티븐스존슨증후군, 여러 차례의 수술, 감염성 질환 등의 질병에 의해 손상되면 치명적이고 회복 불가능한 시력소실을 유발하게 되며, 더욱이 콘택트렌즈의 장기착용 같은 정상적인 환자 군에서도 각막 윤부세포손상이 나타날 수 있기에 안구 표면 질환의 치료에 대한 필요성이 높은 현실이다.

[144] 본 실시예는 심각한 시력 소실을 야기하는 안구 표면 질환에서 각막상피줄기세포의 이식의 기본 재료로서 본 발명의 CD-ECM 소재의 이용 가능성을 알아보고자 하였다. 2.5kg 가량의 백색가토를 대상으로 각막의 윤부 상피 줄기세포를 채취하였으며, 이를 본 발명의 CD-ECM 소재 위에서 증식시켜 상피를 제거한 각막조직에 다시 이식하여 이식재료로서의 조직의 적합성 및 가능성을 알아보았다.

[145] 우선, 백색 가토에서 채취한 각막윤부조직을 12 조각으로 나누어 조직배양용기에 나누어 담고 디스파아제 버퍼(Dispase buffer)를 처리하여 상피 세포를 분리한 이후 계대배양하였다. 이후 배양된 상피세포를 지름 6mm 크기의

- 원형으로 재단된 CD-ECM 위에 이식하기 위해, 조직배양용기 바닥에 재단된 CD-ECM을 깔아놓고 배양된 세포를 분주한 후 배양하여 세포 시트를 만들었다.
- [146] 도 12에 도시된 바와 같이, PKH26으로 미리 표지한 상피세포가 붉은 색으로 잘 확인되며 모여서 밀집된 상태를 이루고 있음을 확인할 수 있었으며(도 12의 A 참조), 단면조직에서도 붉은색으로 표시되는 상피세포가 한 두 층을 이루며 잘 생착되어 있음을 확인할 수 있었다(도 12의 B 참조).
- [147] 그리고 나서, 백색 가토의 각막을 6mm의 같은 크기로 관상톱으로 절취(trephine)하여 각막 조직을 얻었다. 이후 20% 에탄올 및 찰과의 방법을 통해 상피세포를 모두 제거하였으며, 앞서 준비한 상피세포시트를 각막 조직의 상피부위에 이식하고 비흉선 Balb/C 마우스(athymic Balb/C mouse)의 등쪽 피하조직에 이식 후 3주간 배양한 뒤 이식 조직의 생착여부를 관찰하였다.
- [148] 3주간의 피하조직에서 배양된 조직을 분석한 결과, 도 13에 도시된 바와 같이, 본 발명의 CD-ECM 상피세포시트를 부착하지 않은 대조군(A-B) 및 CD-ECM 만을 부착한 대조군(C-D)에 비해 CD-ECM 상피세포시트(E-F)를 부착한 경우 상피세포의 형성이 잘 되어 있고 아래 각막기질층에 단단한 결합을 하고 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [149] 또한, 면역 화학적 염색을 수행하여 분석한 결과, 도 14에 도시된 바와 같이, 본 발명의 CD-ECM 상피세포시트를 부착하지 않은 대조군(A-B) 및 CD-ECM 만을 부착한 대조군(C-D)에 비해 CD-ECM 상피세포시트(E-F)를 부착한 경우 상피세포에 특징적인 CK 3+ / MUC 5A- 인 표현형을 잘 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.
- [150] 그리고, 도 15의 전자현미경 사진에서도 상피세포가 하부 각막 기질층에 밀착 접합(tight junction)을 잘 형성하고 있음을 보여주었다.
- [151] 이상의 결과들에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 CD-ECM 소재는 각막맹(Corneal blindness)을 유발하는 난치성 안구표면질환의 치료에 있어 자가 또는 타인의 각막 윤부의 상피 줄기세포, 구강점막세포, 또는 비점막세포의 배양 및 세포시트의 이식술을 통한 치료에 이용될 수 있는 유용한 재료라고 할 수 있다.
- [152] 이상 본 발명을 상기 실시예를 들어 설명하였으나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니다. 당업자라면 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수정, 변경을 할 수 있으며 이러한 수정과 변경 또한 본 발명에 속하는 것임을 알 수 있을 것이다.

산업상 이용가능성

- [153] 본 발명에 따르면 배양된 동물의 연골유래 연골세포에서 분비되어 막 형태의 지지체로 형성된 연골세포 유래 세포외 기질막의 신생혈관생성 억제 효능을 이용하여 익상편과 같은 각막 신생혈관질환을 치료하는 신규한 조성물 및 각막 또는 결막 이식제를 제공할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 동물의 연골세포에서 분비되어 형성된 연골세포 유래 세포외 기질을 유효성분으로 포함하는 신생혈관질환 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 연골세포 유래 세포외 기질은 콜라겐 및 단백질(glycosaminoglycan)으로 이루어진 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 치료용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 연골세포 유래 세포외 기질은 연골조직을 탈세포하고 단백질을 분해효소로 처리 후 중화하여 수득한 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 치료용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 연골세포 유래 세포외 기질은 연골조직에서 분리된 연골세포를 단층배양하는 과정에서 연골세포가 분비하여 형성된 세포외 기질막을 탈세포하여 제작한 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 치료용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 연골세포 유래 세포외 기질은 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 치료용 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 연골세포 유래 세포외 기질은 혈관 생성 및 혈관 침투를 억제하여 신생혈관생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 치료용 조성물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 신생혈관질환은 각막 신생혈관질환, 당뇨병성 망막증, 맥락막 신생혈관 질환 또는 황반변성인 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 치료용 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 각막 신생혈관질환은 익상편 또는 외상성 각막 궤양인 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 치료용 조성물.
- [청구항 9] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조성물은 상기 연골세포 유래 세포외 기질을 약제학적으로 허용 가능한 담체와 혼합하여 점안제 형태의 안약이나 주사제, 또는 젤 형태의 안연고나 주사제로서 제공되는 것을 특징으로 하는 신생혈관질환 치료용 조성물.
- [청구항 10] 1) 연골조직을 탈세포하고 단백질을 분해효소로 처리 후 중화하여 수득한 연골세포 유래 세포외 기질; 또는 2) 연골조직에서 분리된

연골세포를 단층배양하는 과정에서 연골세포가 분비하여 형성된 세포외 기질막을 탈세포하여 제작한 연골세포 유래 세포외 기질로 구성된 각막 또는 결막 이식재.

[청구항 11]

제10항에 있어서,

상기 이식재는 각막 윤부의 상피 줄기세포, 구강점막세포, 또는 비점막세포가 상기 연골세포 유래 세포외 기질막 상에 이식되어 배양된 것을 특징으로 하는 각막 또는 결막 이식재.

[청구항 12]

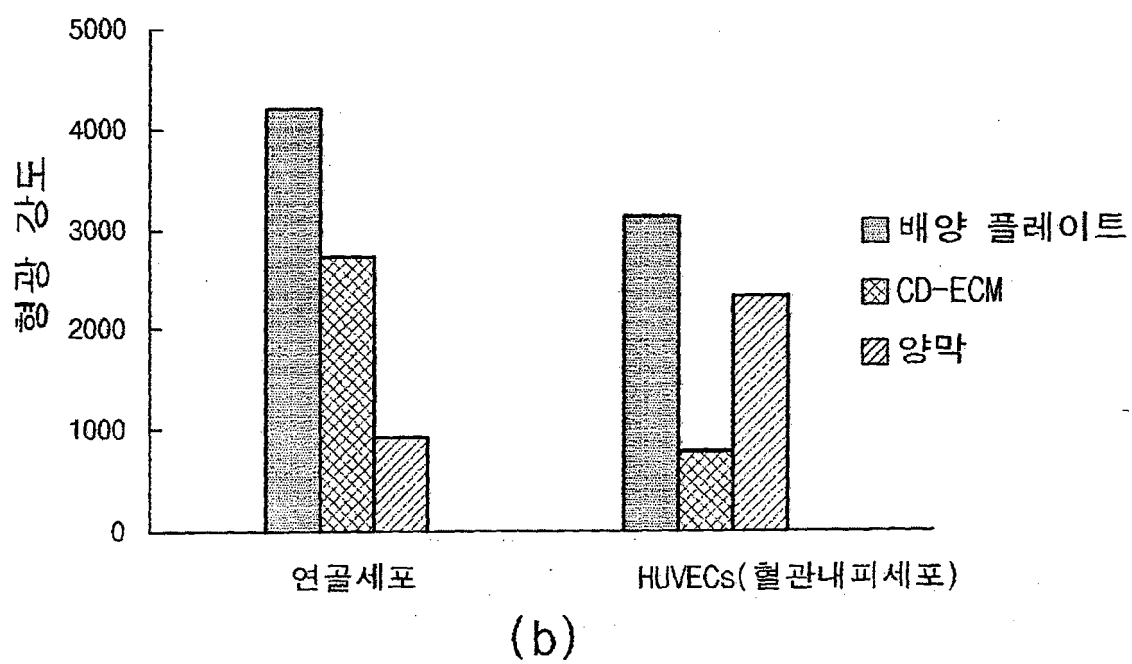
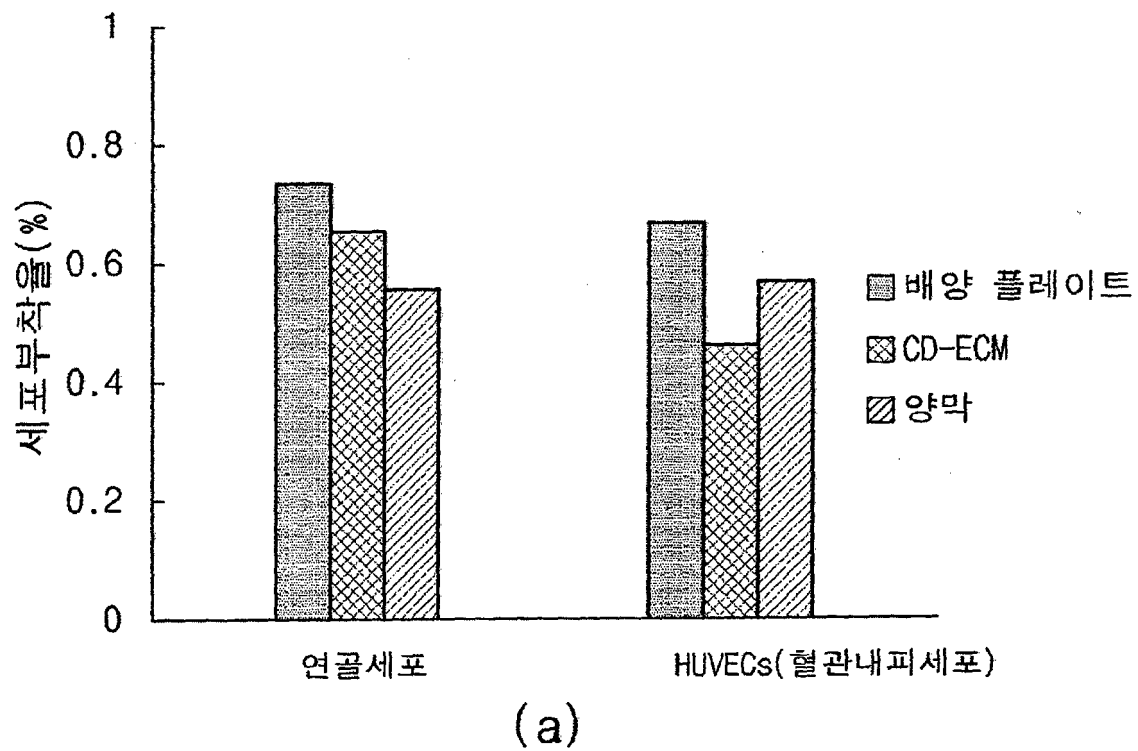
제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 이식재는 혈관내피세포 부착 및 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 각막 또는 결막 이식재.

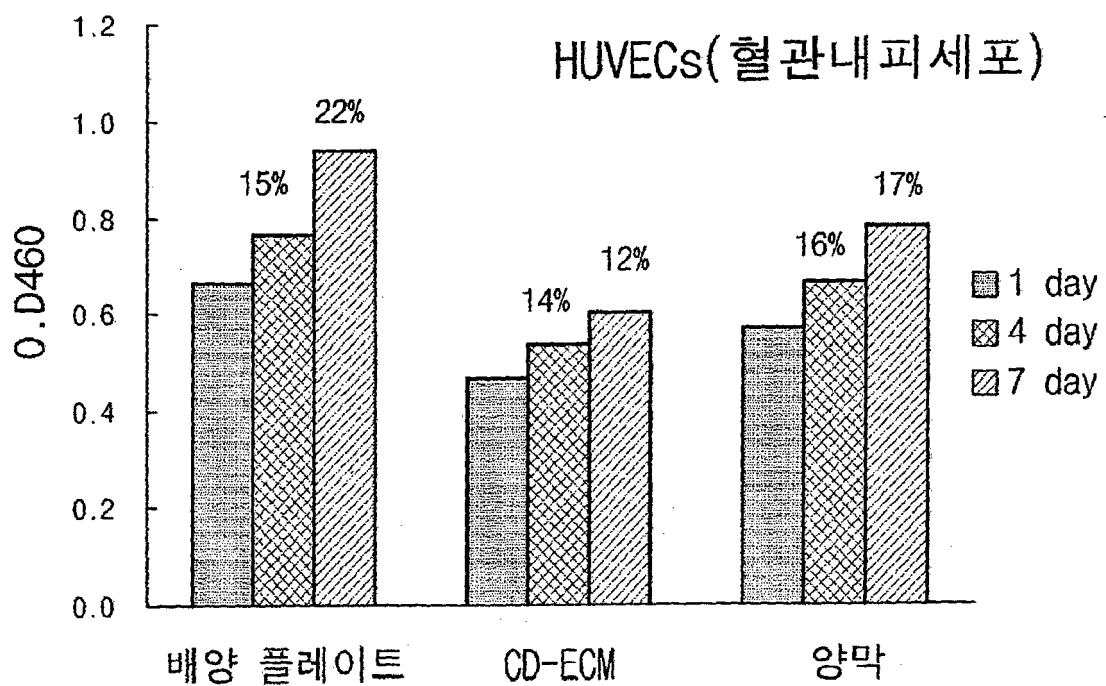
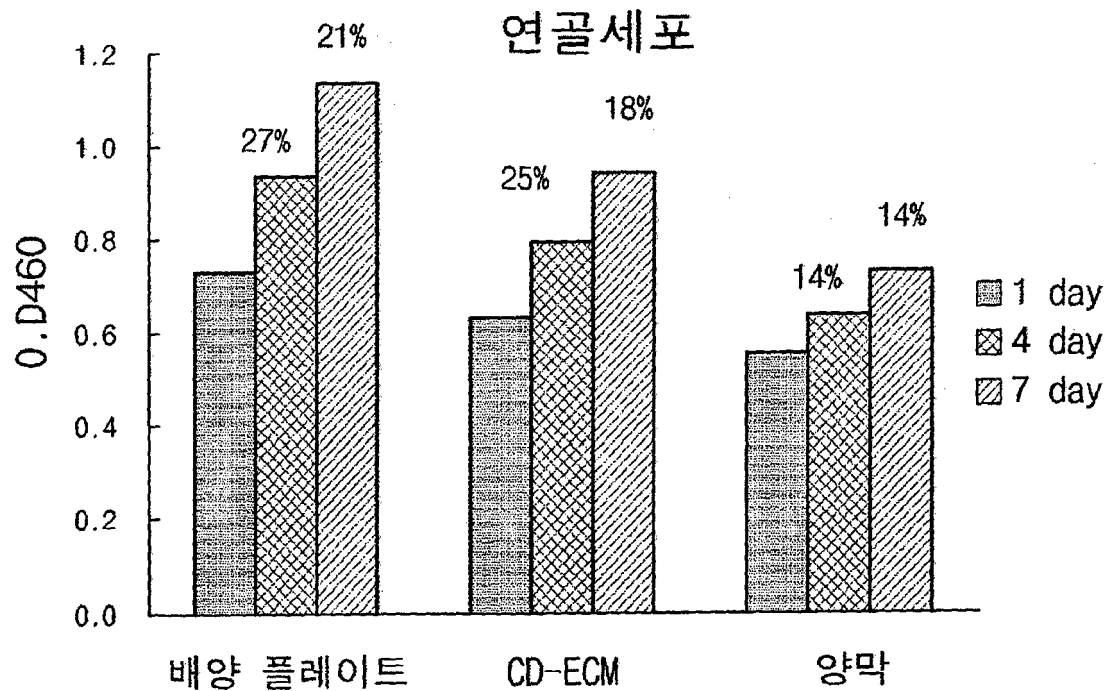
[청구항 13]

제10항 또는 제11항에 있어서,

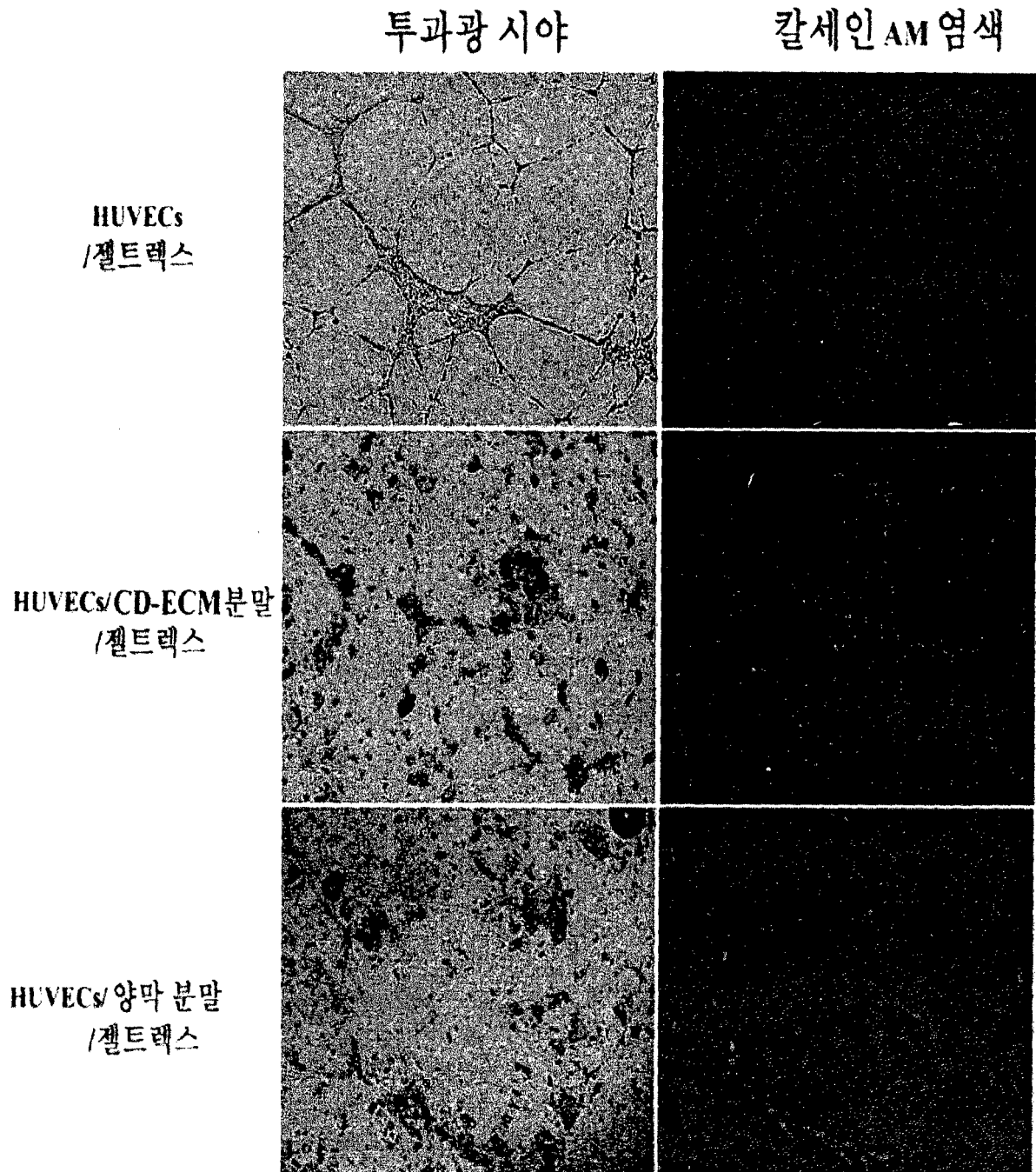
상기 이식재는 혈관 생성 및 혈관 침투를 억제하여 신생혈관생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 각막 또는 결막 이식재.

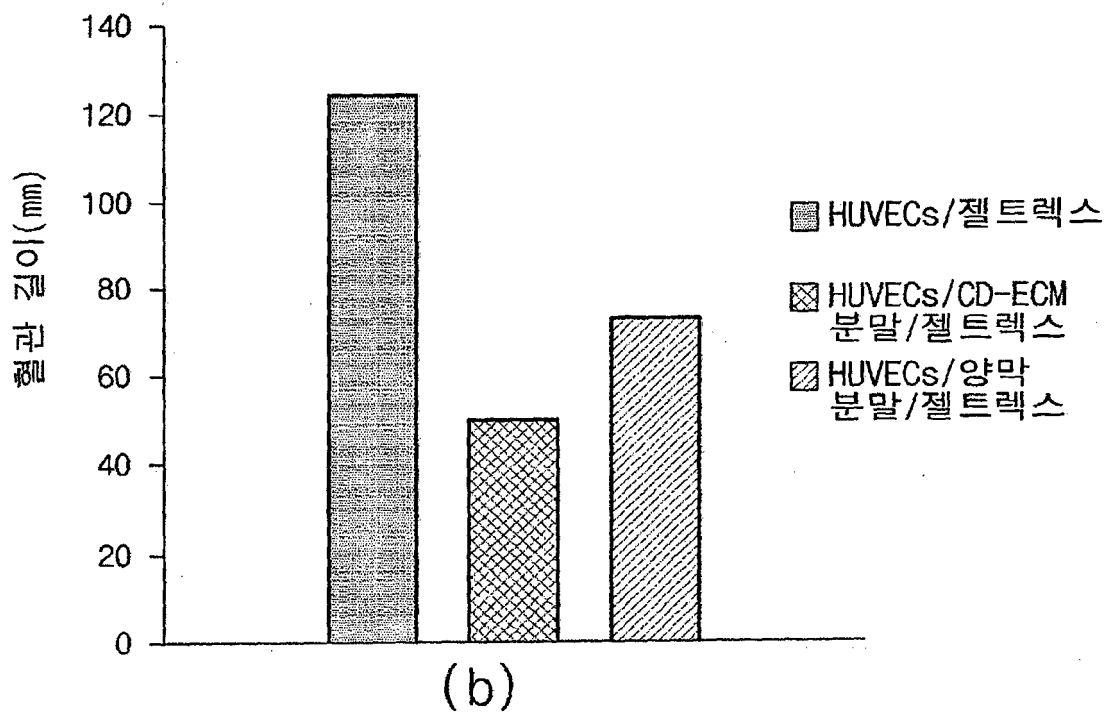
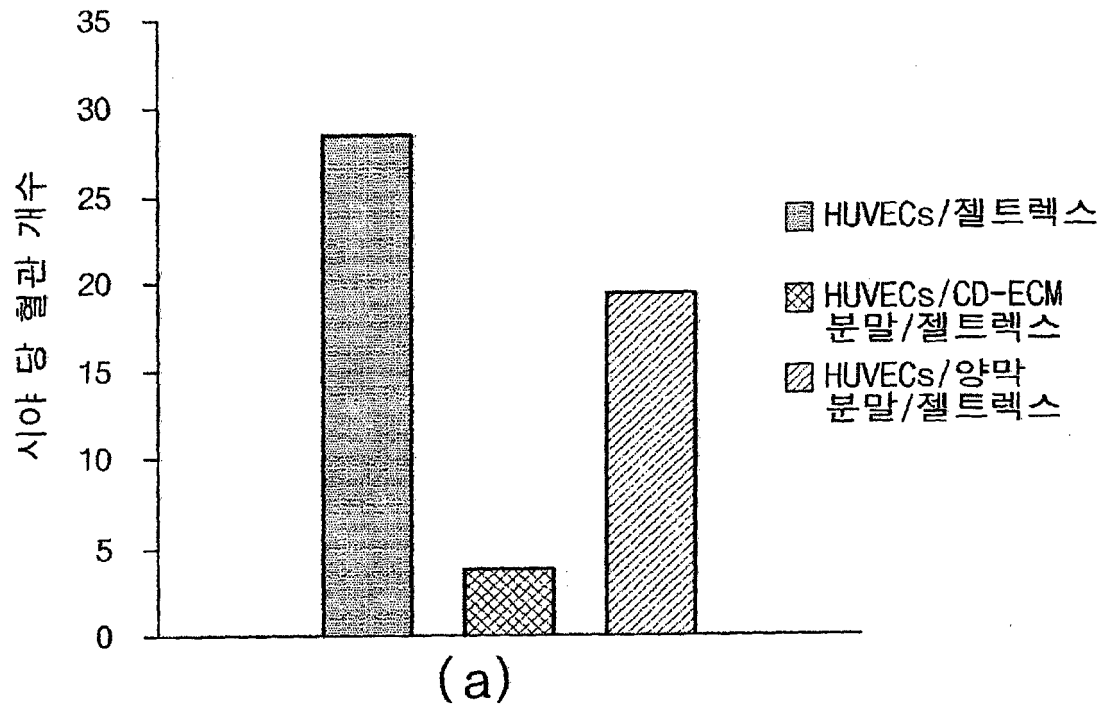
[Fig. 1]

[Fig. 2]

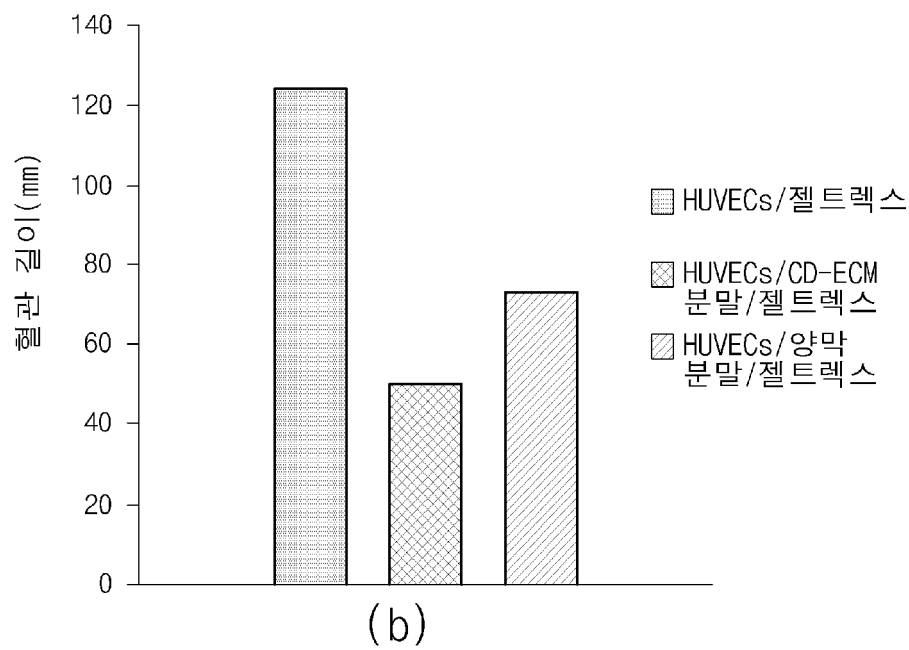
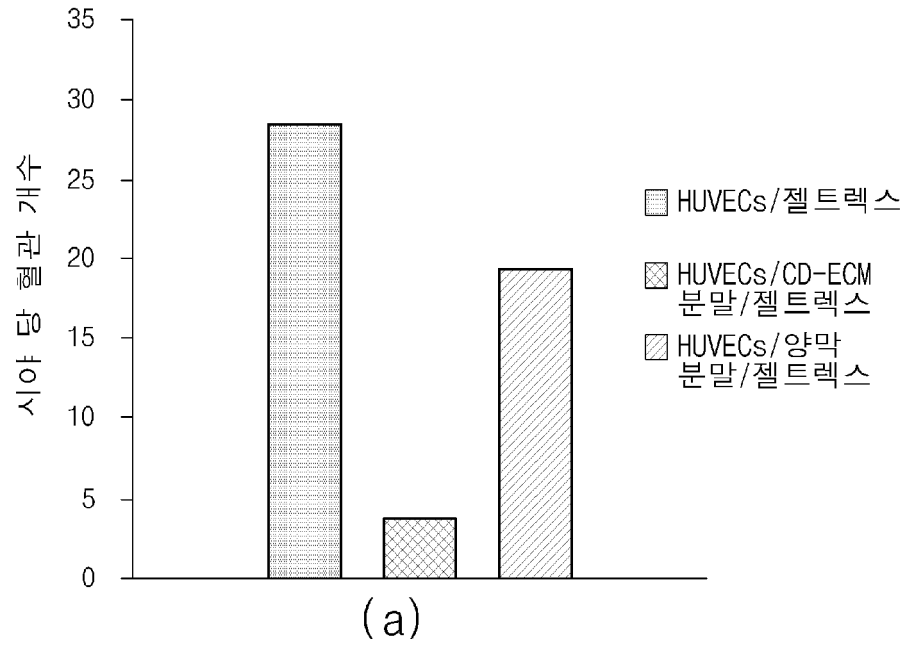


[Fig. 3]

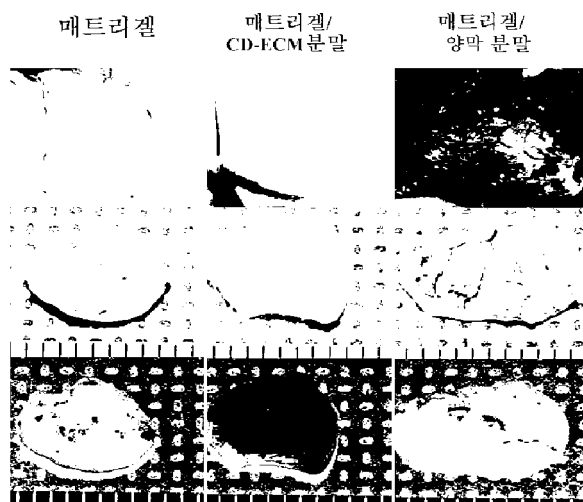


[Fig. 4]

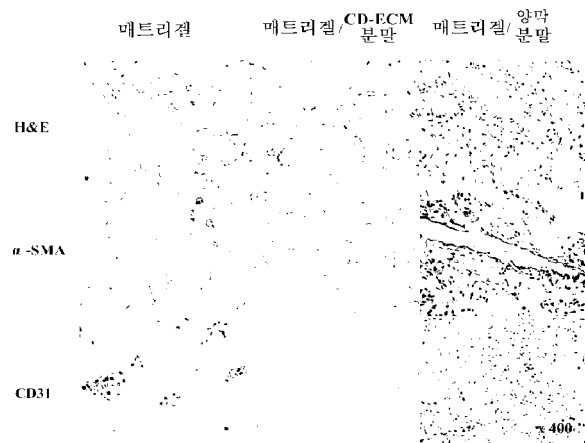
[Fig. 4]



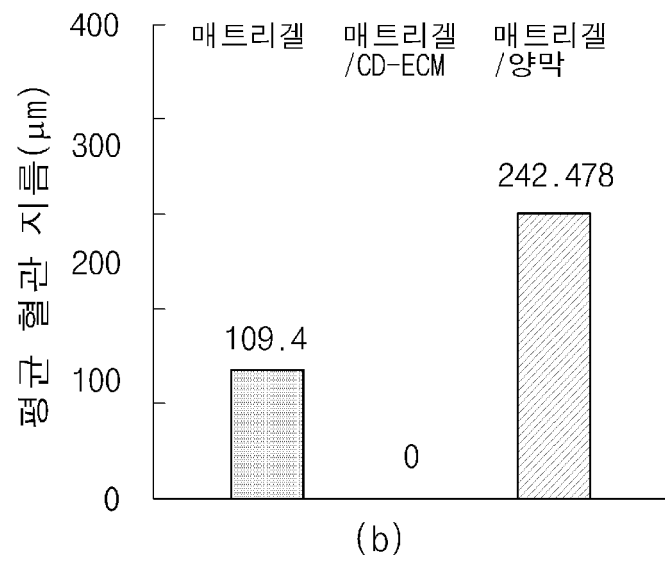
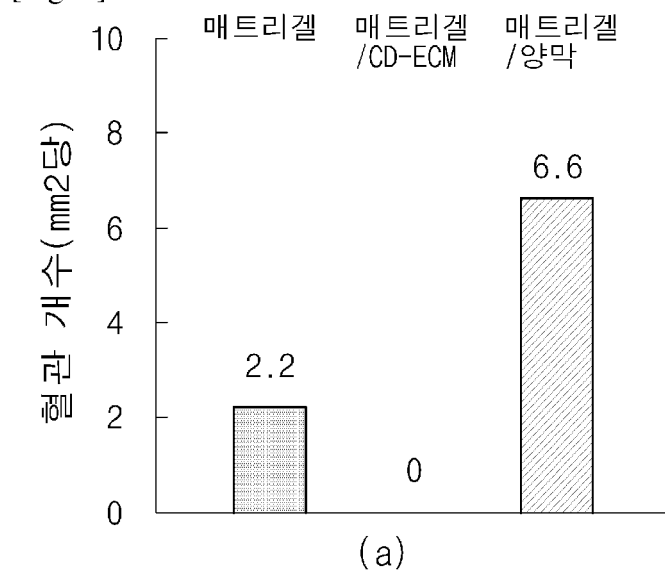
[Fig. 5]

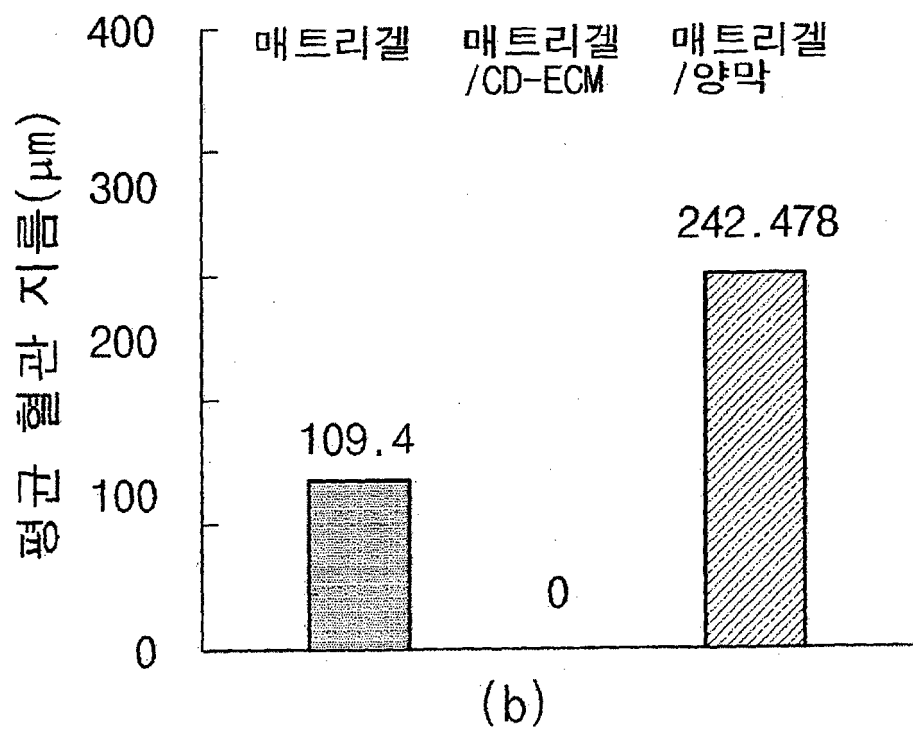
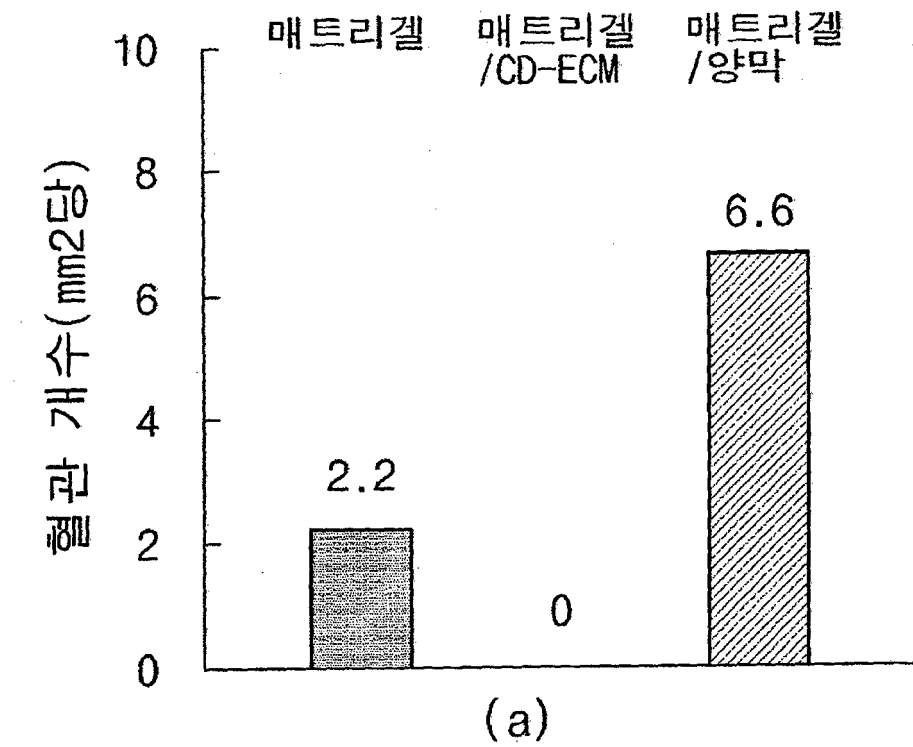


[Fig. 6]

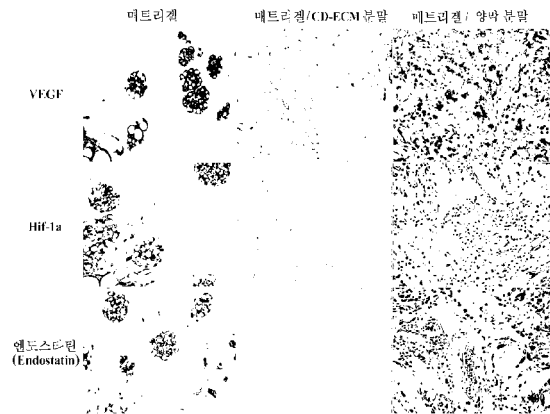


[Fig. 7]

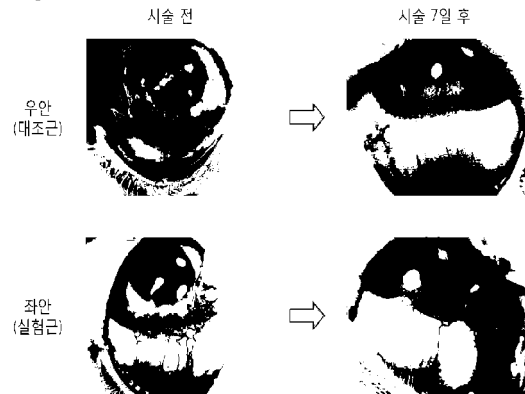


[Fig. 7]

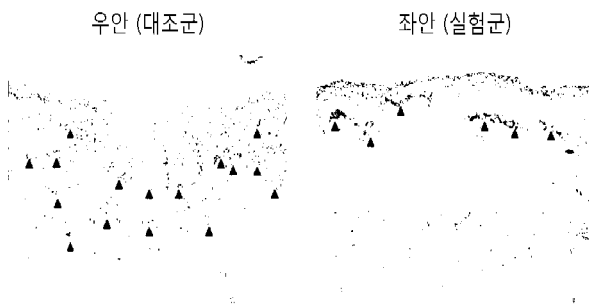
[Fig. 8]



[Fig. 9]



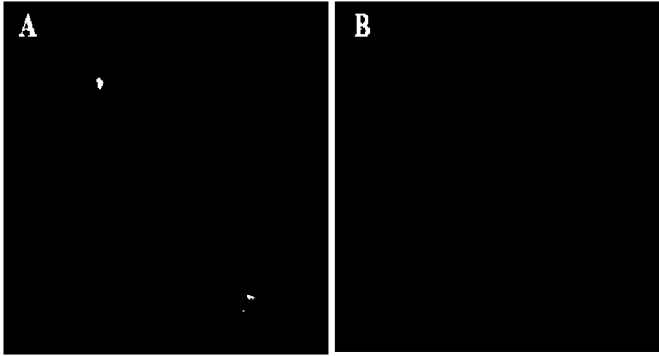
[Fig. 10]



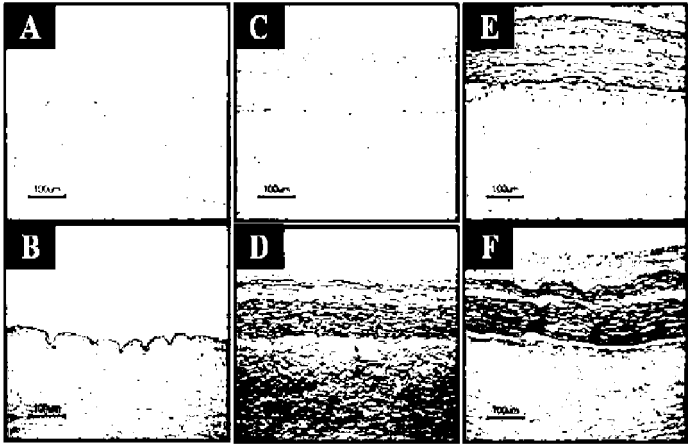
[Fig. 11]



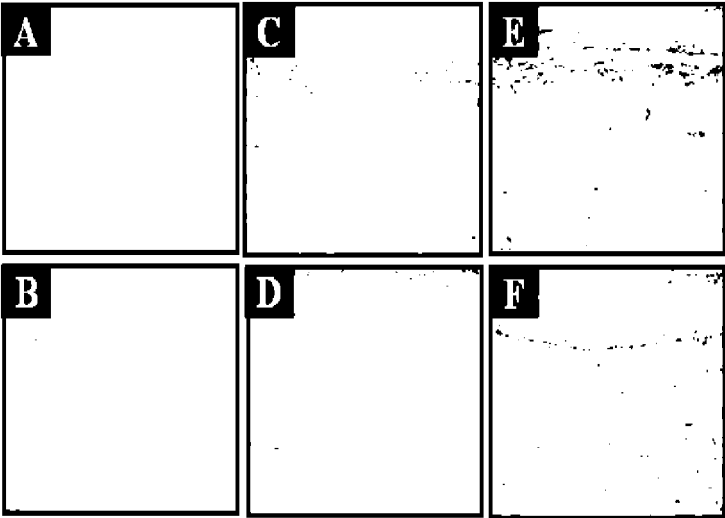
[Fig. 12]



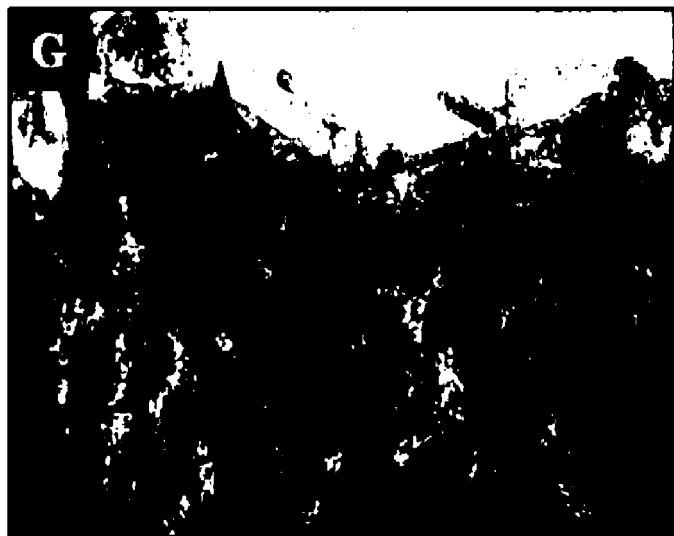
[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/008018**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 35/32(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 27/02(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)

A61K 35/32; C12N 5/071; C12N 5/077; C12N 5/02; A61K 37/00; C12N 5/07; A61K 39/00; A61K 35/50; A61K 35/12; A61P 35/00; A61P 27/02

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: extracellular matrix, chondrocyte, vascularization, cornea graft material, acellular, monolayer culture

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2010-0005105 A (MIN, Byoung Hyun) 13 January 2010 See abstract, paragraph [0037] and claims 1-3, 15.	1-13
A	GROGAN, S. P. et al., "A static, closed and scaffold-free bioreactor system that permits chondrogenesis in vitro", Osteoarthritis and Cartilage, 2003, vol. 11, pages 403-411 See abstract and pages 408-409.	1-13
A	KR 10-0816395 B1 (REGENPRIME. CO., LTD.) 27 March 2008 See abstract and claims 1, 10.	1-13
A	WO 91-11193 A1 (CHILDREN' S HOSPITAL) 08 August 1991 See abstract, page 5, lines 7-8, 12-13 and claims 1, 5, 6 and 9.	1-13
A	KR 10-2004-0064004 A (BIOLAND LTD.) 16 July 2004 See abstract and claims 2, 3 and 5.	1-13
A	KR 10-2007-0053152 A (CELLULAR BIOENGINEERING, INC. et al.) 23 May 2007 See abstract and claims 1, 2, 4, 5 and 8-10	1-13



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

26 DECEMBER 2013 (26.12.2013)

Date of mailing of the international search report

26 DECEMBER 2013 (26.12.2013)

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/008018

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0005105 A	13/01/2010	US 2010-0119577 A1 WO 2008-146956 A1	13/05/2010 04/12/2008
KR 10-0816395 B1	27/03/2008	CN 101563450 A CN 101563450 B EP 2078072 A1 JP 2010-504093 A JP 4798405 B2 US 2010-0137203 A1 WO 2008-035843 A1	21/10/2009 14/12/2011 15/07/2009 12/02/2010 19/10/2011 03/06/2010 27/03/2008
WO 91-11193 A1	08/08/1991	AT 144710 T AU 652744 B2 AU 7335191 A CA 2074725 A1 DE 69122956 D1 DE 69122956 T2 DK 0512071 T3 EP 0512071 A1 EP 0512071 A4 EP 0512071 B1 ES 2093699 T3 GR 3021925 T3	15/11/1996 08/09/1994 21/08/1991 26/07/1991 05/12/1996 22/05/1997 25/11/1996 11/11/1992 05/05/1993 30/10/1996 01/01/1997 31/03/1997
KR 10-2004-0064004 A	16/07/2004	KR 10-0834731 B1	13/06/2008
KR 10-2007-0053152 A	23/05/2007	AU 2004-282525 A1 AU 2004-282525 B2 CA 2542133 A1 CN 1898377 A EP 1675944 A1 EP 1675944 B1 JP 2007-508015 A US 2007-0275365 A1 WO 2005-038015 A1	28/04/2005 23/09/2010 28/04/2005 17/01/2007 05/07/2006 24/11/2010 05/04/2007 29/11/2007 28/04/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 35/32(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 27/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 35/32; C12N 5/071; C12N 5/077; C12N 5/02; A61K 37/00; C12N 5/07; A61K 39/00; A61K 35/50; A61K 35/12; A61P 35/00; A61P 27/02 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: 세포외 기질, 연골세포, 신생혈관, 각막 이식재, 탈세포, 단층배양		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2010-0005105 A (민병현) 2010.01.13 요약, 단락 [0037] 및 청구항 1-3, 15 참조.	1-13
A	GROGAN, S. P. 외 4명, 'A static, closed and scaffold-free bioreactor system that permits chondrogenesis in vitro', Osteoarthritis and Cartilage, 2003, 11권, 페이지 403-411 요약 및 페이지 408-409 참조.	1-13
A	KR 10-0816395 B1 (㈜필리아젠) 2008.03.27 요약 및 청구항 1, 10 참조.	1-13
A	WO 91-11193 A1 (CHILDREN'S HOSPITAL) 1991.08.08 요약, 페이지 5, 라인 7-8, 12-13 및 청구항 1, 5, 6, 9 참조.	1-13
A	KR 10-2004-0064004 A (주식회사 바이오랜드) 2004.07.16 요약 및 청구항 2, 3, 5 참조.	1-13
A	KR 10-2007-0053152 A (셀룰라 바이오엔지니어링 인코포레이티드 외 1명) 2007.05.23 요약 및 청구항 1, 2, 4, 5, 8-10 참조	1-13
☐ 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 2013년 12월 26일 (26.12.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 12월 26일 (26.12.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 최승희 전화번호 +82-42-481-8740 

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2013/008018

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0005105 A	2010/01/13	US 2010-0119577 A1 WO 2008-146956 A1	2010/05/13 2008/12/04
KR 10-0816395 B1	2008/03/27	CN 101563450 A CN 101563450 B EP 2078072 A1 JP 2010-504093 A JP 4798405 B2 US 2010-0137203 A1 WO 2008-035843 A1	2009/10/21 2011/12/14 2009/07/15 2010/02/12 2011/10/19 2010/06/03 2008/03/27
WO 91-11193 A1	1991/08/08	AT 144710 T AU 652744 B2 AU 7335191 A CA 2074725 A1 DE 69122956 D1 DE 69122956 T2 DK 0512071 T3 EP 0512071 A1 EP 0512071 A4 EP 0512071 B1 ES 2093699 T3 GR 3021925 T3	1996/11/15 1994/09/08 1991/08/21 1991/07/26 1996/12/05 1997/05/22 1996/11/25 1992/11/11 1993/05/05 1996/10/30 1997/01/01 1997/03/31
KR 10-2004-0064004 A	2004/07/16	KR 10-0834731 B1	2008/06/13
KR 10-2007-0053152 A	2007/05/23	AU 2004-282525 A1 AU 2004-282525 B2 CA 2542133 A1 CN 1898377 A EP 1675944 A1 EP 1675944 B1 JP 2007-508015 A US 2007-0275365 A1 WO 2005-038015 A1	2005/04/28 2010/09/23 2005/04/28 2007/01/17 2006/07/05 2010/11/24 2007/04/05 2007/11/29 2005/04/28