

특 허 법 원

제 3 부

판 결

사 건	2022허5416	거절결정(특)
원 고	A	
	일본국	
	대표이사	일본국인 B
	소송대리인	변리사 이원희, 배재광
피 고	특허청장	
	소송수행자	김병숙
변 론 종 결	2023. 8. 24.	
판 결 선 고	2023. 10. 19.	

주 문

1. 원고의 청구를 기각한다.
2. 소송비용은 원고가 부담한다.

청 구 취 지

특허심판원이 2022. 8. 19. 2022원774호 사건에 관하여 한 심결을 취소한다.

이 유

1. 기초사실

가. 원고의 이 사건 출원발명(갑 제2호증)

1) 발명의 명칭: 섬유화 조직¹⁾으로부터 정상 조직을 재생하기 위한 조성물

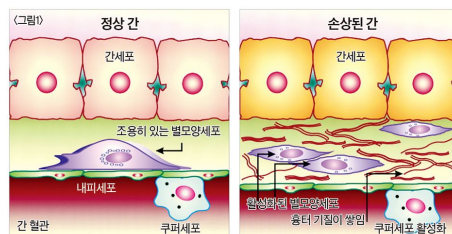
2) 국제출원일/ 분할출원일/ 번역문제출일/ 우선권주장일/ 분할출원번호/ 원출원번호:

2011. 8. 5./ 2021. 8. 4./ 2013. 2. 25./ 2010. 8. 5. 및 2010. 10. 12./ 제10-2021-7024745 호/ 제10-2013-7004671호

3) 청구범위(2021. 10. 21.자 보정 반영)

【청구항 1】 콜라겐²⁾의 생산 또는 분비를 저해하는 HSP³⁾47에 대한 siRNA⁴⁾가 담지된 레티노이드 결합 리포솜 구성 담체를 포함하고, 상기 레티노이드는 콜라겐 생산 세포에 siRNA를 특이적으로 전달하며, 섬유화 간이 섬유화 자극을 계속 받고 있는 동안 섬유화 간에 축적된 콜라겐의 감소로 형성된 공간에서 줄기세포의 성장 및 분화에 의해

1) 조직의 섬유화는 콜라겐을 중심으로 하는 세포 외 매트릭스가 조직에 과도하게 생산·축적되는 것에서 생긴다(갑 제2호증의 식별번호 [0003] 참조).



<출처 : 2023. 6. 20. 더메디컬 기획기사 간경변>

2) 콜라겐은 동물의 뼈와 피부에 주로 존재하며 연골, 장기 막, 머리카락 등에도 분포되어 있는 경단백질로 교원질이라고도 하며, 섬유상 고체로 존재하고, 세 개의 폴리펩티드 사슬이 꼬여 있는 삼중나선형 구조로 특히 하이드로프로린의 함량이 많은 단백질이다(네이버 지식백과 두산백과 참조).

3) Heat Shock Protein

4) RNAi(RNA interference, RNA 간섭) 현상은 표적 유전자의 침묵을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하는 방법이고, siRNA(small interference RNA)는 19-21 염기쌍 길이의 dsRNA(이중나선 RNA)로서 화학적 합성 방법으로 제조된 외부 유래 물질이며, 인위적으로 세포 내로 도입되어 특정 유전자 발현을 제어하여 다양한 세포의 기능, 분화, 증식 및 사멸에 관여한다 (한국분자·세포생물학회 웹진 2018년 2월호 침묵 유전자 치료제 참조).

인간 개체 내 섬유화 간으로부터 정상 간을 재생시키기 위한 약학적 조성물로서, 상기 조성물은 섬유화 자극을 계속 받고 있는 섬유화 간을 갖고 있는 인간 개체(1), 섬유화 간으로부터 정상 간의 재생이 필요한 인간 개체(2) 및 섬유화 간으로 인한 알부민 발현 레벨 감소를 겪는 인간 개체(3)에 투여하기 위한 것이고, 상기 인간 개체는 장기 이식만이 치료법인 중증 간 섬유화 환자이고; 및 상기 조성물은 줄기세포를 섬유화 간의 정상 조직세포로 분화시키기 위한 것이고, 간의 알부민 발현 레벨을 증가시키기 위한 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물(이하 '이 사건 제1항 발명'이라 하고 나머지 청구항도 같은 방식으로 부른다).

【청구항 2】 제1항에 있어서, 상기 레티노이드는 섬유화 간에서 콜라겐 생산 세포에 대한 표적화제인, 약학적 조성물.

4) 발명의 주요 내용

별지 1과 같다.

나. 선행발명⁵⁾(을 제1호증)

2008. 3. 30. 전기통신회선으로 공개된 Nature Biotechnology, Vol. 26, No. 4, pp. 431-442에 게재된 '콜라겐-특이적 샤페론에 대한 siRNA를 비타민 A가 결합된 리포솜을 사용하여 전달하는 간경변증 회복(Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone)'에 관한 것으로, 주요 내용은 별지 2와 같다.

다. 이 사건 심결의 경위

1) 특허청 심사관은 2021. 9. 1. 원고에게 '이 사건 제1, 2항 발명은 그 발명이 속한

5) 특허청 심사단계에서 언급된 비교대상발명 2에 해당한다.

기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람(이하 '통상의 기술자'라 한다)이 비교대상발명 16) 또는 2의 결합에 의해 쉽게 발명할 수 있어 진보성이 부정되므로 특허법 제29조 제2항에 따라 특허를 받을 수 없다.'는 거절이유가 담긴 의견제출통지를 하였다.

2) 원고는 2021. 10. 21. 이 사건 출원발명의 청구항 일부를 보정하였으나, 특허청 심사관은 2022. 1. 5. 해당 보정에도 불구하고 이 사건 출원발명은 2021. 9. 1.자 의견제출 통지서에 기재된 거절이유를 해소하지 못하였다는 이유로 이 사건 출원발명에 대하여 특허거절결정을 하였다.

3) 원고는 2022. 4. 5. 특허심판원에 해당 거절결정의 취소를 구하는 거절결정불복심판을 청구하였다. 이에 특허심판원은 해당 심판청구를 2022원774호로 심리한 다음, 2022. 8. 19. '이 사건 출원발명은 통상의 기술자가 선행발명에 의하여 쉽게 발명할 수 있어 진보성이 부정되므로 특허법 제29조 제2항에 따라 특허를 받을 수 없다.'는 이유로 원고의 심판청구를 기각하는 심결(이하 '이 사건 심결'이라 한다)을 하였다.

2. 당사자의 주장

가. 원고

다음과 같은 이유로 이 사건 출원발명은 선행발명에 의해 진보성이 부정되지 않는다. 따라서 이와 결론이 다른 이 사건 심결은 위법하다.

1) 이 사건 출원발명은 투여대상이 장기 이식만이 치료법인 중증 간 섬유화 환자의 콜라겐 분비 억제에 의한 간 섬유화 억제뿐만 아니라 정상조직으로의 재생 효과에 관한 것으로서 선행발명과 상이한 질병에 대한 의약용도를 제공하는 것이다.

2) 이 사건 출원발명은 지속적인 섬유화 자극을 받고 있는 섬유화 조직에서 섬유화

6) 비교대상발명 1은 2007. 7. 4. 공개된 공개특허공보 제10-2007-97495호에 기재된 "섬유화 억제를 위한 약물 담체 및 약물 담체 키트"에 관한 것인데, 해당 발명은 심사 단계에서만 인용되고 이 사건 소송에는 제출되지 않았다.

조직 분해 및 콜라겐 제거 효과를 나타내므로 선행발명에 비해 현저한 효과가 있는 것이고, 줄기세포를 통한 정상 조직 세포로의 분화 및 정상 조직 재생은 선행발명의 간 섬유화 조직의 회복과 대비하여 이질적인 효과를 나타내는 것이다.

나. 피고

다음과 같은 이유로 이 사건 출원발명은 선행발명에 의해 진보성이 부정된다. 따라서 이와 결론이 같은 이 사건 심결은 적법하다.

1) 선행발명은 담관 결찰 유도 모델과 DMN 유도 모델 등을 대상으로 시행된 연구이고, 이는 이 사건 제1항 발명이 대상으로 한 섬유화 자극을 계속 받고 있는 섬유화 간과 실질적으로 다를 바 없다.

2) 선행발명과 이 사건 출원발명은 적용 대상이 간 섬유화 환자라는 점에서 실질적으로 동일하다. 이 사건 출원발명의 '섬유화 자극을 계속 받고 있는 섬유화 간'이 선행발명과 달리 특별한 의미가 있다거나, 이 사건 출원발명의 유효성분이 장기 이식만으로 치료될 수 있는 중증 간 섬유화 환자에게 특별한 작용 효과가 있다고 보기 어렵다.

3) 선행발명과 이 사건 출원발명은 실질적으로 같은 약물 조성물을 투여함으로써 섬유화 영역을 감소시키고 정상 간 구조로 복원시키는 동일한 작용효과를 나타낸다. 이 사건 제1항 발명이 선행발명에 비해 통상의 기술자가 예측할 수 없는 이질적이거나 양적으로 현저한 효과가 있다고 볼 수 없다.

3. 이 사건 심결의 위법 여부

가. 이 사건 제1항 발명의 진보성 부정 여부

1) 기술분야 및 목적의 대비

이 사건 제1항 발명은 "섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생"하기 위한 약물

조성물에 관한 것이다(식별번호 [0001], [0007]). 이 사건 출원발명은 "섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생"하는 것의 기술적 의의를 다음과 같이 정의하고 있다.

이 사건 출원발명(갑 제2호증)
<p>[0050] 본 발명에 있어 「<u>섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생한다</u>」는 <u>섬유화에 의해서 변질한 조직을, 적어도 섬유화가 보다 경도인 상태로 회복시키는 것을 의미한다.</u> 즉, 섬유화가 진행되는 것에 따라, 조직은 세포 외 매트릭스를 중심으로 한 섬유 조직으로 치환되어 가지만, <u>이 흐름을 역전시켜, 증식한 섬유 조직을 본래의 정상 조직으로 치환해 가는 것이 본 발명에서 섬유화 조직으로부터의 정상 조직의 재생이다.</u> 따라서, 본 발명에서 <u>섬유화 조직으로부터의 정상 조직의 재생은 섬유화 조직을 완전하게 원 상태로 회복시키는 것뿐만 아니라, 섬유화 조직을 부분적으로 원래 상태에 회복시키는 것도 포함한다.</u> (후략)</p>
<p>[0051] 본 발명의 <u>한 형태에 있어서 정상 조직의 재생은 섬유화 조직에 축적된 콜라겐의 감소에 의해 생성된 스페이스에 있어, 줄기세포가 증식·분화하는 것으로 생기는 것이어도 좋다.</u> 따라서, 본 발명의 한 형태는 섬유화 조직에 축적된 콜라겐이 감소되어 생성되는, 줄기세포의 증식·분화용의 스페이스에 있어, 섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생하기 위한 상기 의약 조성물에 관한 것이다. (후략)</p>

해당 기재에 의하면, 이 사건 제1항 발명에서 '섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생'하는 것의 기술적 범위는 ① 섬유화가 보다 경도인 상태로 회복시키는 것, ② 섬유화의 흐름을 역전시킴으로써 증식한 섬유 조직을 본래의 정상 조직으로 치환해 가는 것, ③ 섬유화 조직에 축적된 콜라겐의 감소에 의해 생성된 공간에서 줄기세포가 증식·분화하여 정상 조직을 재생하는 것을 포함하는 것으로 해석된다.

이에 대응하여 선행발명은 간 섬유화 조직의 생성 억제 및 분해 촉진을 통해 정상적인 간 구조로 회복할 수 있다는 것으로서(초록, 436면 제2단락), 이 사건 출원발명에 정의된 '정상 조직의 재생' 중 ①과 ②에 직접 대응되고, 뒤에서 살펴볼 바와 같이 ③ 역시 선행발명에 암묵적으로 내재되어 있다.

따라서 양 발명은 간 섬유화 치료제에 관한 것이라는 점에서 기술분야가 동일하고, 섬유화 조직의 재생을 통해 섬유화가 존재하는 조직을 치료하여 정상적인 간 기능을 할 수 있는 조성물을 제공한다는 점에서 발명의 목적이 공통된다.

2) 이 사건 제1항 발명과 선행발명의 구성요소 대비

이 사건 제1항 발명의 구성요소를 대비하기 쉽게 재구성하여 선행발명의 대응 구성요소와 대비하면 다음과 같다.

구성 요소	이 사건 제1항 발명	선행발명
1 (유효 성분)	콜라겐의 생산 또는 분비를 저해하는 HSP47에 대한 siRNA가 담지된 레티노이드 결합 리포솜 구성 담체를 포함하고, 상기 레티노이드 ⁷⁾ 는 콜라겐 생산 세포에 siRNA를 특이적으로 전달하며,	<ul style="list-style-type: none"> ○ 콜라겐의 생산 또는 분비를 저해하는 gp46(인간 HSP47의 래트 상동체)에 대한 siRNA가 담지된 레티노이드 결합 리포솜 구성 담체(VA⁸⁾-lip-siRNA_{gp46}) [초록, 431면 우측 칼럼 등] ○ Vitamin A는 콜라겐 생산세포(간 성상 세포; HS 세포, Hepatic Stellate Cell)에 siRNA를 특이적으로 전달함[433면 좌측 칼럼]
2 (투여 대상)	상기 조성물은 섬유화 자극을 계속 받고 있는 섬유화 간을 갖고 있는 인간 개체(1), 섬유화 간으로부터 정상 간의 재생이 필요한 인간 개체(2) 및 섬유화 간으로 인한 알부민 발현 레벨 감소를 겪는 인간 개체(3)에 투여하기 위한 것이고, <u>상기 인간 개체는 장기 이식만이 치료법인 중증 간 섬유화 환자</u> 이고;	<ul style="list-style-type: none"> ○ 간경변증 동물 모델(DMN⁹⁾ 유도, CCl₄ 유도, 담관 결찰(BDL¹⁰⁾) 유도]에서 콜라겐 합성 억제에 의해 간 경변을 역전할 수 있고, 재생능이 시사됨[439면 우측 칼럼] - DMN 유도 모델은 진행성 및 치명적 섬유증 유발하므로 주 연구 모델로 선택하였다고 기재 - CCl₄ 유도 모델은 치명적이지 않고 DMN 모델보다 경미한 특징의 섬유증 모델로 기재

		<ul style="list-style-type: none"> - 담관 결찰 유도 모델은 담즙 역류로 인한 만성적인 연속 자극에 의해 간경변증을 유도하는 동물 모델로 기재 ○ DMN 래트에서 VA-lip-siRNAg46 치료 70일에 알부민 수준이 거의 또는 완전히 정상적인 수준임이 확인됨[437면 좌측 칼럼 도입부 및 439면 우측 칼럼 하단] ○ 간경변증 또는 섬유증은 모든 형태의 만성 간 손상에서 최종적인 병리학적 특징으로, 전 세계적으로 이환율과 사망률에 많은 영향을 미침[431면 좌측 칼럼 도입부]
3 (의학 용도)	<p>섬유화 간이 섬유화 자극을 계속 받고 있는 동안 섬유화 간에 축적된 콜라겐의 감소로 형성된 공간에서 <u>줄기세포의 성장 및 분화에 의해 인간 개체 내 섬유화 간으로부터 정상 간을 재생시키기 위한 약</u></p> <p><u>학적 조성물로서, 상기 조성물은 줄기세포를 섬유화 간의 정상 조직세포로 분화</u></p> <p><u>시키기 위한 것이고, 간의 알부민 발현</u></p> <p><u>레벨을 증가시키기 위한 것을 특징으로</u></p> <p><u>하는, 약학적 조성물</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 간경변증 동물 모델(DMN 유도, CCl₄ 유도, 담관 결찰(BDL) 유도)에서 축적된 콜라겐의 감소 효과 확인 - HS 세포의 콜라겐 합성 억제와 동시에 콜라게나제에 의한 축적된 콜라겐 분해 - HS 세포자멸사에 의해 콜라겐 생성 세포 감소 - 프로콜라겐 I mRNA 생성 억제 ○ 간경변증 치료 후 간이 거의 완전히 정상적인 간 구조로 복원되어 간 조직의 재생능이 시사됨[439면 우측 칼럼 하단] ○ 알부민 수준이 정상 수준으로 회복됨

7) 레티노이드(retinoid)는 4개의 이소프레노이드(isoprenoid) 단위가 헤드-투-테일(head-to-tail)식으로 연결한 골격을 가지는 화합물 군의 일원이며, 비타민 A는 레티놀(retinol)의 생물학적 활성을 정상적으로 보이는 레티노이드의 일반적인 기술자(記述子)이다(식별번호 [0054]).

8) 비타민 A(Vitamin A)의 약어이다.

9) Dimethylnitrosamine

10) Bile Duct Ligation (담관 결찰) : 담관을 묶어 폐쇄성 황달을 유발하여 담즙정체성 간경변증을 유발하는 모델이다(을 제4호증).

3) 공통점 및 차이점 분석

가) 구성요소 1

(1) 구성요소 1은 약학 조성물의 유효성분을 '콜라겐의 생산 또는 분비를 저해하는 HSP47에 대한 siRNA가 담지된 레티노이드 결합 리포솜 구성 담체를 포함하고, 상기 레티노이드는 콜라겐 생산세포에 siRNA를 특이적으로 전달'하기 위한 것으로 한정된 것이다. 이에 대응하여 선행발명에는 인간 HSP47의 래트 상동체인 gp46에 대한 siRNA를 비타민 A가 결합된 리포솜 구성 담체에 넣어 캡슐화하는 방법이 개시되어 있고, 콜라겐 생산 세포인 간 성상 세포(HS 세포)가 콜라겐 생성에 의해 섬유화에 주요 역할을 하면서도 비타민 A를 흡수 및 저장하는 기능을 하는 점을 이용하여 siRNA와 비타민 A를 결합할 경우 siRNA의 HS 세포에 대한 표적화가 가능한 것을 확인하는 실험데이터도 기재되어 있다(초록, VA-lip-siRNAgp46과 RBP의 결합 확증 섹션 참조).

(2) 양 발명의 대응 구성은 HS 세포에 siRNA를 전달하려는 목적으로 레티노이드 [비타민 A]를 이용하고, 레티노이드[비타민 A]가 결합된 리포솜 형태의 담체에 siRNA를 넣는 점에서도 기술 구성이 동일하다. 다만, 구성요소 1이 인간 HSP47에 대한 siRNA를 이용하는 구성인 반면, 선행발명은 래트 gp46에 대한 siRNA를 이용한 연구이기는 하나, 선행발명에는 인간 HSP47에 대한 래트 상동체인 gp46을 이용하였다는 사실이 기재되어 있고[439면 참조], 이 사건 출원발명은 구체적인 실시예에서 선행발명과 마찬가지로 인간 HSP47의 래트 상동체인 gp46에 대한 siRNA를 이용하고 있다(식별번호 [0090] 참조). 따라서 양 발명의 대응 구성은 HSP47에 관한 문언상 차이만 있을 뿐 실질적으로 동일하다(이에 대하여 당사자 사이에 다툼이 없다).

나) 구성요소 2

구성요소 2는 투여 대상을 '섬유화 자극을 계속 받고 있는 섬유화 간을 갖고 있는 인간 개체(1), 섬유화 간으로부터 정상 간의 재생이 필요한 인간 개체(2) 및 섬유화 간으로 인한 알부민 발현 레벨 감소를 겪는 인간 개체(3)', '상기 인간 개체는 장기 이식만이 치료법인 중증 간 섬유화 환자' 등 여러 특성의 조합으로 한정하는 것이다. 구성요소 2가 한정하는 투여 대상을 선행발명의 대응 구성과 순차 대비하면 다음과 같다.

(1) 인간개체(1)의 대비

다음과 같은 이유로 인간개체(1)은 선행발명의 대응구성과 실질적으로 동일하다.

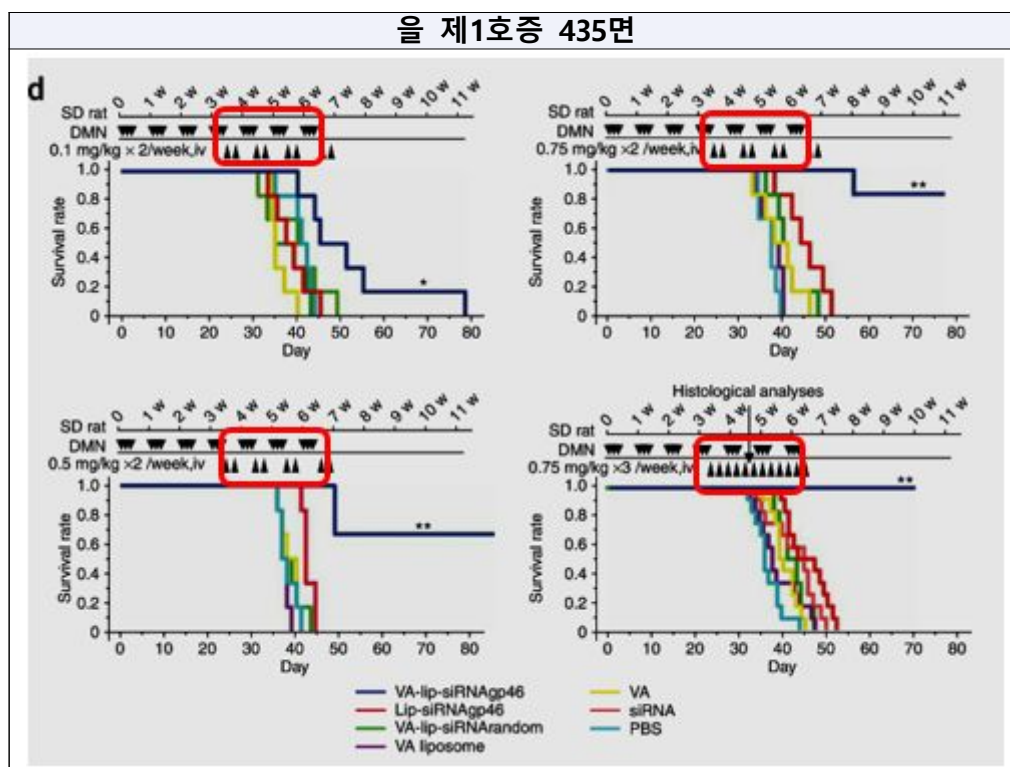
(가) 선행발명에는 "본 연구의 양상이 담즙 역류로 인한 만성적인 연속 자극에 의해 유발된 간경변증에도 효과적인지 확인하기 위하여 담관결찰술(bile duct ligation, BDL)을 받은 래트"를 대상으로 VA-lip-siRNA_{Agp46}을 투여한 결과 유의미한 효과가 있었다는 내용이 기재되어 있다(을 제1호증 437면). 선행발명은 담관결찰술을 받은 래트를 간 섬유화 자극이 계속되는 모델로서 VA-lip-siRNA_{Agp46}의 투여 대상으로 하였다.

(나) 나아가 이 사건 출원발명은 '섬유화 자극을 계속 받고 있는 간 조직'으로서 "담관 질환 등에 의해 담즙의 울체가 일어나고 있는 간 조직"을 예로 들고 있고(식별번호 [0049]), 실시예 2에서는 "담관 결찰 래트 모델"을 대상으로 VA-lip-siRNA_{Agp46}을 투여하는 실험을 시행하면서 해당 모델에 관하여 "담관 결찰에 의해 담즙의 울체가 생겨 간 조직이 섬유화 자극에 계속적으로 노출된 상태가 된다."라고 설명하고 있다(식별번호 [0103]). 이 사건 출원발명의 '간 섬유화 자극을 계속 받고 있는 간 조직'에 대한 구체적인 실시예에서 이용한 모델은 선행발명의 실험 모델 중 하나와 실질적으로 동일한 것이다.

(다) 선행발명은 DMN 유도 모델을 VA-lip-siRNA_{Agp46}을 투여하는 주요 연구

모델로 삼고 해당 모델에서 확인한 효과를 사염화탄소(CCl_4) 유도 모델이나 담관 결찰 유도 모델에 대한 투여 결과와 비교하는 방식으로 연구를 수행하였다. 이에 대하여 원고는 선행발명의 DMN 유도 모델에 대한 실험은 DMN 처리를 중단한 이후 VA-lip-siRNAg46을 투여한 실험이므로, 해당 실험은 섬유화 자극을 계속 받고 있는 섬유화 간에 대한 연구에 해당하지 않는다고 주장한다. 그러나 다음과 같은 이유로 선행발명의 DMN 유도 모델에 대한 실험 역시 '섬유화 자극을 계속 받고 있는 섬유화 간'을 투여대상으로 한 연구에 해당한다고 보는 것이 타당하다.

① 선행발명에서 DMN 유도 모델에 VA-lip-siRNAg46과 대조군 약물을 투여하여 생존율을 비교한 결과를 나타내는 아래 그림을 보면, 선행발명에서 DMN 처리 기간과 VA-lip-siRNAg46이 투여된 기간은 상당 기간 중복되는 것으로 보인다.



② 또한, 선행발명에는 "The reversibility of liver cirrhosis was examined

in liver specimens from day 47 and day 70 rats that stopped receiving DMN and VA-lip-siRNAg46 treatments at day 44 and day 46, respectively. Near-specimens from day 47 and day 70 rats, indicating the regeneration capacity of liver tissue."(436면)라고 기재되어 있다. 해당 기재에 의하면, 선행발명은 DMN과 VA-lip-siRNAg46의 투여를 각각 44일째와 46일째 중단한 래트의 검체를 확인하여 간조직의 가역성을 확인하였다는 것이므로, DMN 처리와 VA-lip-siRNAg46 투여는 상당기간 함께 이루어진 것으로 보인다.

③ 더욱이 이 사건 출원발명은 '섬유화 자극'을 "섬유화를 유도하는 임의의 자극"이라 정의하면서 "산화 스트레스, 저산소 상태, 염증, 세포사멸 등을 포함"한다고 할 뿐 '섬유화 자극'을 특정 자극으로 한정하고 있지 않다(식별번호 [0049]). 또한, 이 사건 출원발명이 들고 있는 섬유화 자극의 예시에 비추어 볼 때, 섬유화 자극의 '지속' 여부는 특정 물질의 투여가 계속되는 것뿐만 아니라 그러한 투여에 의한 결과가 계속되는 것 등을 포함하여 '임의의 섬유화 자극이 지속'되는 것으로 해석하는 것이 합리적이다.

④ 그런데 DMN은 간세포 괴사, 간 섬유증 및 간경변증 등을 유발하는 물질로서 DMN을 끊어도 조직 소견이 불변하거나 오히려 더 진행한다는 것은 이 사건 출원발명이 속한 기술분야에서 우선일 당시 널리 알려진 사실이다(을 제3, 4호증). 이는 간 섬유증 및 간경변증을 유도하기 위해 이전에 투여된 DMN으로 인해 개시된 생체 내 '염증', '산화 스트레스', '세포 사멸' 등 '임의의 섬유화 자극'이 DMN의 투여가 중단되어 DMN이 해당 조직에 존재하지 않더라도 지속되기 때문이다.

(2) 인간개체(2)의 대비

인간개체(2)는 '섬유화 간으로부터 정상 간의 재생이 필요한' 개체로 투여 대

상을 한정한 것인데, 이 사건 제1항 발명의 목적 대비에서 살핀 바와 같이 선행발명도 섬유화 간을 치료하기 위해 정상 간을 재생하는 것을 개시하고 있다. 양 발명의 대응 구성은 실질적으로 동일하다.

(3) 인간개체(3)의 대비

인간개체(3)은 '섬유화 간으로 인한 알부민 발현 레벨 감소를 겪는' 개체로 한정하고 있다. 그런데 간세포가 손상되어 섬유화될 경우 간 실질세포가 정상 간에 비해 감소되면서 단백질 합성 기능이 저하되고, 그 결과 알부민 단백질의 합성 역시 감소하게 된다. 알부민의 감소는 대부분의 중증 간 섬유증 및 간경변증에서 흔히 보이는 병태 생리적 특성이고, 이 때문에 알부민은 간 실질세포의 마커로서(식별번호 [0122]) 역할을 하게 된다. 이는 이 사건 출원발명이 속한 기술분야에 널리 알려진 사실이므로, 통상의 기술자는 간 섬유화와 알부민 발현 레벨 감소의 관계를 쉽게 파악할 수 있다. 나아가 선행발명에도 '알부민-양성 세포(간세포)'라는 기재가 있고(433면), DMN에 의해 간경변증을 유도한 래트 모델에서 VA-lip-siRNA_gp46 치료 70일 경과 시점에서 알부민 수준을 VA-lip-siRNA_gp46의 효과를 확인하는 지표로 삼은 실험 데이터도 기재되어 있다(참고자료 그림 6 참조). 따라서 양 발명의 대응 구성은 실질적으로 동일하다.

(4) '장기 이식만이 치료법인 중증 간 섬유화 환자'의 대비

구성요소 2는 VA-lip-siRNA_gp46을 투여할 수 있는 환자군으로 '장기 이식만이 치료법인 중증 간 섬유화 환자'로 추가 한정하고 있는 반면, 선행발명에는 VA-lip-siRNA_gp46의 투여 대상으로 간 섬유증 또는 간경변증 환자만 기재되어 있는 점에서 차이가 있다(이하 '차이점 1'이라 한다).

다) 구성요소 3

(1) 구성요소 3은 의약용도를 '섬유화 간'이 섬유화 자극을 계속 받고 있는 동안 섬유화 간에 축적된 콜라겐의 감소로 형성된 공간에서 줄기세포의 성장 및 분화에 의해 인 간 개체 내 섬유화 간으로부터 정상 간을 재생시키기 위한 약학적 조성물로서, 상기 조성물은 줄기세포를 섬유화 간의 정상 조직세포로 분화시키기 위한 것이고, 간의 알부민 발현 레벨을 증가시키기 위한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물'로 한정된 것이다.

이에 대응하여 선행발명에는 다양한 간 섬유증 모델에 VA-lip-siRNAg46을 투여한 결과 콜라겐 합성의 억제 및 분해, 콜라겐 생성 세포의 감소 등으로 간 조직 내 콜라겐 감소와 함께 간 섬유증 회복 효과가 나타났고, 간경변증을 겪던 간이 치료 후 거의 완전히 정상적인 간 구조로 복원되는 것을 보였으며, 위와 같은 실험 결과는 간 조직의 재생능을 시사한다는 내용이 기재되어 있다.

(2) 또한, 앞서 구성요소 2에서 살펴본 바와 같이 이 사건 제1항 발명의 섬유화 자극을 계속 받는 섬유화 간과 선행발명에 개시된 간 섬유증 모델은 실질적으로 동일하고, 간 섬유증과 간경변증을 겪는 간이 정상 간으로 회복되면 알부민 발현 레벨이 증가한다는 것은 주지관용기술에 해당할 뿐만 아니라 선행발명에도 개시되어 있다. 따라서 양 발명의 대응 구성은 섬유화 자극을 계속 받는 섬유화 간 내 콜라겐을 감소시켜 섬유화 간을 정상 간으로 재생시키는 약학 조성물이라는 점에서는 실질적으로 동일하다.

(3) 다만 선행발명은 VA-lip-siRNAg46을 투여한 결과 정상적인 간 구조가 회복되어 간의 재생능이 시사된다고 기재되어 있을 뿐, 그와 같은 간의 재생이 '줄기세포의 성장 및 분화'에 의한 것으로 기재하고 있지 않은 점에서 차이가 있다(이하 '차이점 2'라 한다).

4) 차이점 검토

가) 차이점 1 - '장기 이식만이 치료법인 중증 간 섬유화 환자'

다음과 같은 이유로 통상의 기술자는 선행발명으로부터 차이점 1을 쉽게 극복할 수 있다고 보는 것이 타당하다.

(1) 선행발명은, 간경변증 또는 섬유증은 모든 형태의 만성 간 손상에서 최종적인 병리학적 특징으로, 전 세계적으로 이환율과 사망률에 많은 영향을 미치고, 현재 간경변증에 대해 승인된 항 섬유화 요법은 없다고 명시하고 있다. 이 사건 출원발명이 속한 기술분야에서 간 섬유증 및 간경변증 치료제가 없는 실정이었고, 선행발명의 공개일 즈음에 이르러서야 비로소 간 섬유화가 가역적 병리라고 인식되기 시작하였을 뿐이다. 그 때까지 진행성 만성 간질환(비대상성 간경변증)으로 인한 간 부전 치료법으로 확립된 방법은 간 이식뿐이었고 장기 이식의 여러 문제점으로 인해 이를 대체할 수 있는 치료법을 찾는 것이 이 사건 출원발명이 속한 기술분야의 오랜 해결 과제였다(을 제2, 7호증). 선행발명의 공개일 시점에서 간경변증과 같은 중증 간 섬유화로 진단받은 환자에 대해 통상의 기술자라면 치료법으로 당연히 간이식을 고려하였을 것으로 보인다. 따라서 이 사건 제1항 발명이 한정하고 있는 '장기 이식만이 치료법인 중증 간 섬유화 환자'가 선행발명의 간경변증과 같은 중증 간 섬유화 환자와 대비하여 구별되는 새로운 환자군으로 보기 어렵다.

(2) 대상 환자군이 한정된 발명은 그 의약물질이 가지는 미지 속성의 발견에 기초하여 기존 치료제로 치료가 어려웠던 환자에게도 치료효과를 나타내는 새로운 쓰임새를 제공하는 데 발명으로서 의의가 있다(특허법원 2017. 2. 17. 선고 2016허5026 판결 등 참조). 따라서 이 사건 출원발명에서 한정된 환자군이 발명의 구성요소 한정으로서 의미가 있기 위해서는, 명세서에 약학 조성물의 해당 환자군에 대한 종전 약물과 다른 쓰임새를

확인할 수 있는 내용이 기재되어 있어야 한다. 그러나 이 사건 출원발명의 명세서에는 약학 조성물을 해당 환자군에 적용한다는 아래 문언 이외에는 해당 환자군에 대한 치료효과를 확인할 수 있거나, 통상의 기술자가 그와 같은 효과가 있는 것과 마찬가지로 이해할 만한 내용이 기재되어 있지 않다.

이 사건 출원발명(갑 제2호증)

[0024] 또한, 본 발명에 의해 섬유화 자극에 계속적으로 노출되어 있는 섬유화 조직의 치료가 가능해지며 종래 유효한 치료법이 존재하지 않았던 섬유화 질환이나, 장기 이식밖에 치료법이 없었던 섬유화 질환을 포함한 모든 섬유화 질환의 내과적 치료가 실현되기 때문에 의료 및 수의학에 대한 지대한 공헌을 기대할 수 있다.

(3) 이에 대하여 원고는, '장기 이식만이 치료법인 중증 간 섬유화 환자'란 간이 더는 기능하지 않는 사람을 의미하고, 이러한 환자는 정상조직의 간이 필요한 환자이므로, 이 사건 제1항 발명은 섬유화가 많이 진행되어 간이 더는 기능하지 않는 환자군에 대한 약학 조성물의 쓰임새를 제공한 것인 반면, 선행발명에서 간 조직의 재생능은 간이 기능하는 간경변증 환자에서 일어나는 것을 의미하는 것으로 그 용도가 상이하고 이 사건 출원발명의 명세서에는 정상 간의 재생 효과를 기재하고 있으므로(식별번호 [0116], [0128]) 선행발명의 환자군과는 차별화되는 새로운 대상군에 대한 의약용도를 제공하는 것이라고 주장한다. 그러나 다음과 같은 이유로 원고의 주장은 받아들이지 않는다.

(가) 이 사건 출원발명에 기재된 피험 래트는 실시예 2에서 제작한 간 섬유화 모델 래트로서(식별번호 [0116], [0128]), 담관 결찰 유도 모델이고(식별번호 [0103]), 해당 간 섬유화 모델은 선행발명에 시험된 3가지 동물 모델 중 하나와 같다. 그런데도 선행발명의 실험 데이터는 간이 정상적으로 기능하는 간경변증 환자에 대한 것인 반면, 이 사건 제1항 발명은 간이 더는 기능하지 않는 개체에 대한 것으로서 서로 다르다고 보기

는 어렵다.

(나) 동물 모델은 인간을 대상으로 약효를 검증하기 전에 안전성 측면에서 우선적으로 효과를 확인하기 위해 주로 사용된다. 동물 모델이 인간의 질병 상태를 완벽하게 구현하는 경우는 거의 없고, 상황에 따라 적절한 동물 모델을 선택하여 실험하고 이를 토대로 인간에 대한 적용 가능성을 평가하는 것이다. 이 사건 출원발명에서 구체적으로 효과를 살펴본 담관 결찰 유도 모델이 '장기 이식만이 치료법인 중증의 간 섬유화 환자'를 대표하는 동물 모델로 이 사건 출원발명이 속한 기술분야에 널리 인식되고 있었다는 사정은 이 사건 출원발명의 명세서 어디에도 기재되어 있지 않고, 달리 이를 인정할 증거도 없다. 나아가 이 사건 출원발명의 명세서에 간 섬유화 모델 동물로 사염화탄소(CCl₄), 돼지 혈청, 디메틸니트로사민(DMN), 메티오닌-코린 결핍식(methionin-and cholinedeficient diet; MCDD), 콘카나바린 A(concanavalin A; ConA), 담관 결찰 등이 이용될 수 있다고 기재된 점에 비추어 보더라도(식별번호 [0076]), 시험에 사용된 동물 모델이 한정된 유형의 간 섬유증 모델을 대표하는 모델이라고 볼 수 없다.

(다) 또한, 원칙적으로 이 사건 출원발명과 선행발명에서 효과를 본 동물 모델 중 하나가 담관 결찰 유도 모델로서 같은 이상, 담즙의 울체로 인한 섬유화 자극에 계속적으로 노출된 상태의 모델이라는 점에서도 차이가 있다고 볼 수도 없다. 게다가 원고가 주장하는 바와 같이 담관 결찰 유도 모델을 '섬유화 자극의 지속'에 의한 만성 간 섬유화 모델로 간주할 수 있다 하더라도, 해당 모델의 간 섬유화 병리가 비알콜성 지방간염 유래 간 섬유증, 고지방 식이로 인한 간 섬유증, DMN 유도 간 섬유증의 병리를 적절하게 반영하여 그러한 간 섬유증에서의 치료 효과를 예측할 수 있는 모델로 볼 근거도 없다.

이 사건 출원발명(갑 제2호증)

[0005] 또한, 조직의 섬유화에는 바이러스 감염, 음주, 약물 등에 유래하는 섬유증 등 병인이 명확하고 그 제거가 가능한 것뿐만이 아니라, 직접적인 병인이 불명한 섬유증, 예를 들면, 특발성 간경변, 특발성 폐 섬유증, 특발성 골수 섬유증 등, 또는, 직접적인 병인은 알고 있지만, 그 병인의 원인이 불명한 것이나, 제거 곤란한 것, 예를 들면, 방사성 발전성 담즙성 간경변, 비알코올성 지방간염(NASH) 유래의 간 섬유증, 원발성 경화성 담관염 등도 포함된다. 이러한 병인의 제거가 곤란한 섬유화가 존재하는 조직은 끊임없이 섬유화 자극에 노출되어 있는 상태에 있지만, 해당 섬유화 조직에 대해 병적인 세포 외 매트릭스의 축적을 감소시킬 수 있는 것도, 더욱이 조직을 재생할 수 있는 것도 지금까지 전혀 알려지지 않았었다.

[0049] (전략) 또한, 해당 조직에는 직접적인 병인이 불명한 섬유증, 예를 들면, 특발성 간경변, 특발성 폐 섬유증, 특발성 골수 섬유증 등, 또는, 직접적인 병인은 알고 있지만, 그 병인의 원인이 불명한 것이나, 제거 곤란한 것, 예를 들면, 원발성 담즙성 간경변, 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis;NASH) 유래의 간 섬유증, 원발성 경화성 담관염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 간질성 폐렴 유래의 폐 섬유증, 원발성 골수 섬유증, 특발성 간질성 신장염 유래의 신장 섬유증, 염증성 장질환(예를 들면 만성 크론병, 궤양성 대장염 등), 전신성 강피증 등으로 이환한 조직 등도 포함된다.

(라) 더욱이 선행발명은 3가지 간 섬유증 동물 모델 중 주된 효과를 살펴본 DMN 유도 모델이 '진행성 및 치명적인 섬유증이 유발'되는 것으로 기재하고 있고, 이 사건 출원발명과 선행발명의 발명자가 동일한 점을 고려하면, 원고도 DMN 유도 모델이 담관 결찰 유도 모델보다 더 치명적인 간 섬유증을 유발한다는 것을 인식하였을 것으로 보인다. 이 사건 출원발명의 실험 모델인 담관 결찰 유도 모델이 정상적인 간 기능을 하지 않는 간 섬유화 모델이라거나, 선행발명의 간 섬유화 모델은 정상적인 간 기능이 잔존하고 있는 모델이라고 볼 수 없다.

(마) 이 사건 출원발명과 선행발명이 담관 결찰 유도 모델에 실시한 약리효과 평가 방법이 서로 다른 점¹¹⁾은 인정되나, 이 사건 출원발명에 선행발명이 구체적으로 개

11) 선행발명은 담관 결찰 유도 모델에서 VA-lip-siRNAg46 처치에 의한 간 섬유화 개선을 콜라겐 염색인 아잔 염색 등을 하여 대조군 대비 콜라겐 감소를 조직학적으로 평가하고 있는 것에 비해(그림 6 참조), 이 사건 출원발명은 담관 결찰 유도 모델

시하지 않은 시험 데이터가 기재되었다는 사정만으로 동물 모델의 병리가 변경되어 해당 모델을 '정상적인 간세포가 기능하지 않는 간 섬유화 모델'로 보기는 어렵다.

(바) 위와 같은 사정을 종합하면, 이 사건 제1항 발명에서 '장기 이식만이 치료법인 중증의 간 섬유화 환자'로 한정된 환자군은 선행발명과 차별화되는 새로운 환자군으로 볼 수 없으므로, 구성요소 2는 의약용도발명에 있어서 새로운 쓰임새를 제공하는 정도의 특별한 기술적 의의를 가진다고 볼 수 없다.

나) 차이점 2

다음과 같은 이유로 통상의 기술자가 선행발명으로부터 차이점 2를 쉽게 극복할 수 있다고 보는 것이 타당하다.

(1) 이 사건 출원발명에 기재된 '줄기세포에 성장 및 분화에 의한 간의 재생'은 이 사건 제1항 발명의 유효성분인 VA-lip-siRNAg46만의 효과가 아니라 치료를 위해 별도로 이식한 간 줄기세포가 조합되어 나타나는 효과이다.

이 사건 출원발명(갑 제2호증)

[0105] (2) GFP 표지 래트 간 줄기세포의 제조

[0106] GFP 표지 래트 간 줄기세포는 4주령의 GFP 유전자 도입 래트(Slc Japan)의 간에서 채취했다. (중략) 세포수를 센 후, FITC 결합 마우스 항CD45 항체(BD Pharmingen), 래빗-폴리클로날(rabbit-polyclonal) 항CD133 항체(Abcam) 및 마우스 모노클로날(monoclonal) 항EpCAM 항체(Santa Cruz)를 이용해 MACS(R)(을)를 실시해, CD133 양성, EpCAM 양성, CD45 음성 세포를 채취하여, 래트 간 줄기세포로서 본 실험에 이용했다.

[0108] (3) 간섬유화 모델 래트의 처리

[0109] 상기 (1)로 제작한 간섬유화 모델 래트에게, 상기 (2)로 제조한 GFP 표지 간 줄기세포

에서 **VA-lip-siRNAg46 처치 이전에 GFP 표지 래트 간 줄기세포를 먼저 이식한 후** 간 섬유증 개선 효과를 확인하고 있어서(실시예 2 참조), 구체적인 실시 태양이 상이하다. 즉 이 사건 출원발명에 기재된 효과는 **VA-lip-siRNAg46 단독의 효과**가 아니라 외부에서 치료학적으로 별도로 공급된 줄기세포가 조합된 효과인데, 이러한 실시 태양의 차이로 동물 모델의 병리학적 특성이 변경되는 것은 아니다.

를, 200 μl 의 DME/F12 배지 속에 2×10^6 개의 농도로 국소 이식했다.

[0128] GFP를 발현하는 세포는 이식한 간 줄기세포 유래의 세포이므로, VA-lip-siRNAg46의 투여에 의해, 세포 이식 부위에 있어서, 섬유화 영역의 축소와 함께 간 줄기세포가 간실질 세포, 담관 상피 세포 및 혈관 상피 세포로 분화하는 것으로서, 정상적인 간 조직이 재생되는 것이 나타났다. 즉, VA-lip-siRNAg46 투여에 의한 치료는, 간 섬유증의 치유뿐만 아니라, 간 재생도 유발하는 것이 분명해졌다. 또한, VA-lip-siRNA scramble 투여군에서 간 줄기세포를 검출할 수 없었던 것(도 3)은, VA-lip-siRNAg46에 의한 섬유화 영역의 축소가 간 줄기세포의 증식 및 분화에 깊게 관여하고 있는 것을 시사하고 있다.

(2) 그런데 이 사건 제1항 발명은 '이식된 줄기세포'로 한정하고 있지 않고 '줄기세포'로 기재하고 있으므로 발명의 설명을 참작하여 해당 문언의 기술적 의의를 객관적이고 합리적으로 고찰할 필요가 있다. 이 사건 출원발명의 관련 기재는 다음과 같다.

이 사건 출원발명(갑 제2호증)

[0051] 본 발명의 한 형태에 있어서 정상 조직의 재생은 섬유화 조직에 축적된 콜라겐의 감소에 의해 생성된 스페이스에 있어, 줄기세포가 증식·분화하는 것으로 생기는 것이어도 좋다. 따라서, 본 발명의 한 형태는 섬유화 조직에 축적된 콜라겐이 감소되어 생성되는, 줄기세포의 증식·분화용의 스페이스에 있어, 섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생하기 위한 상기 위약 조성물에 관한 것이다. 여기서, 줄기세포에는, 한정하지 않고, 예를 들면, 섬유화한 조직에 본래 존재하는 것(간 줄기세포, 췌장 줄기세포, 폐 줄기세포, 신장 줄기세포, 골수 줄기세포, 심장 줄기세포, 비장 줄기세포, 자궁 줄기세포, 피부 줄기세포, 유선 줄기세포, 장관 줄기세포, 간엽계 줄기세포 등)나, 체내의 다른 장소로부터 이동해 온 것, 또한, 치료적으로 투여한 것 등이 포함된다. 또한, 「스페이스」는 조직 내의 공극뿐만 아니라, 세포가 확대·증식할 수 있는 여지가 있는 공간, 예를 들면, 세포 간의 압력이 감소된 공간이나, 유연성을 가지는 공간 등을 포함한다.

해당 기재에 의하면, 줄기세포는 치료를 위해 별도로 투여한 줄기세포만을 의미하는 것이 아니므로, 이 사건 제1항 발명의 '줄기세포'는 ① 섬유화한 간에 본래 존재하거나 ② 다른 조직에서 이동해 온 줄기세포와 ③ 치료적으로 이식한 줄기세포까지

포함하는 것으로 해석된다.

(3) 외부 독소의 해독을 담당하는 간은 수많은 독성 물질에 노출되므로, 간세포의 손상은 생존 기간 필연적으로 수반된다. 만약 간이 다른 장기처럼 재생되지 않는다면 생명 유지가 곤란해지므로, 간은 인체에서 재생이 가장 잘되는 특성을 가지고 있다. 간세포의 재생에 관여하는 세포 중 간 전구세포(난원세포)는 심한 간 손상으로 간세포 자체의 증식이 한계점에 도달한 경우, 즉 성숙한 간세포의 탁월한 재생 능력이 더는 작동하지 않는 경우에 활성화되는 세포로서(을 제2, 5, 6호증), 본래부터 간에 상주하고 있는 간 줄기세포의 일종이다. 그리고 선행발명은 '간경변증 또는 섬유증이 모든 형태의 간 손상에서의 궁극적인 병리학적 특징'으로 기재하고 있으므로, 선행발명에서 치료하고자 하는 '간경변증 또는 섬유증'도 정상적인 간세포의 재생 능력이 고갈되어 간 전구세포 활성화가 수반된 상태를 포함하고 있다고 할 것이다.

을 제2호증

1. 간 내 줄기세포

간은 이미 성숙한 간세포(hepatocyte)와 난원세포(hepatic oval cell, hepatic progenitor cell)라는 두 개의 대표적인 줄기세포를 내포하고 있으며, 이 중 성숙한 간세포는 탁월한 재생력으로 자기재개를 하여 간 재생에 중요한 역할을 하므로 과거부터 줄기세포로 정의되어 왔다. 간 내 두 번째 줄기세포인 난원세포는 2-acetylaminofluorene(2-AAF) 투여로 성숙한 간세포 증식을 억제하면서 간절제술 또는 사염화탄소(CCl_4)로 간손상을 유도하게 되면, 간내 줄기세포가 활성화되어 간세포와 담도세포로 분화하여 간의 손실된 양을 회복시켜 손상된 간을 구하게 된다.^{5,6} 간내 줄기세포는 문맥역 주변의 담관과 간세포줄 경계에 존재하는 Hering canal에 위치하는 세포로 핵이 크고 세포질이 작아 난원세포로 불리며, 심한 간 손상으로 간세포 자체 증식의 한계점에 도달할 경우, 간 내 줄기세포가 활성화된다.

을 제5호증

[초록]

간은 고유한 재생 특성의 진화적 발달에 의해 섭취된 독소의 유입에 적응하고 성숙한 세

포의 급속한 분열에 의해 손상이나 조직 손실에 반응한다. 간 실질 세포, 즉 담관의 간세포 및 상피 세포의 증식은 수많은 사이토카인/성장 인자 매개 경로에 의해 조절되며, 세포외기질 분해 및 맥관 구조의 복원과 동시에 발생한다. 또한 상주하는 간 줄기/전구세포는 정상 간에서 적은 수로 확인되었으며 간 조직 복구와 관련이 있다. 그러나 간의 생리학, 병태생리학 및 치료에서의 추정적 역할은 아직 정확하게 알려져 있지 않다. 설치류에서 “난원세포”라고도 알려진 간 줄기/전구세포는 간세포 및 담관 복제 능력이 소진되거나 실험적으로 억제되는 시점(기능성 줄기/전구세포 풀)에서 간 조직 복구와 관련¹²⁾이 있다. 간의 생리학 및 병태생리학에서 줄기/전구 세포의 역할에 대해 훨씬 더 많은 것을 배워야 하지만 이러한 세포의 치료적 가치에 대한 실험적 분석이 시작되었다. 간 줄기/전구세포의 이식¹³⁾ 또는 간 줄기세포 풀(pool)의 생체 내 약리학적 활성화¹⁴⁾는 간 질환 치료를 위한 새로운 양식을 제공할 수 있다. 또한, 간 외 줄기세포(예, 골수세포)가 간 재생에 기여¹⁵⁾하는 것으로 조사되고 있다. 배아줄기세포에서 파생된 간 전구세포가 이 종설에 포함되어 있으며 간 질환에 대한 줄기세포 기반 치료법의 미래 전망도 논의한다.

[272면 좌측 칼럼 2단락] 상주 간 줄기/전구세포

상주하는 간 줄기/전구세포(rHSPC) 구획의 존재 및 활성화 증거는 “난원세포” 증식의 다양한 설치류 동물 모델에서 제공되었다(Alison et al. 1997; Fausto 2004; Thorgeirsson 1996). 난원세포 활성화의 기본 원리는 간 손상과 손상 반응에 의한 간세포 증식 불능의 조합에 기초한다. 예를 들어, DNA 손상 물질을 투여한 후 부분 간 절제술을 시행하면 간세포의 분열이 차단되고, 그리고 난원세포가 문맥역으로부터 출현한다. 이러한 난원세포는 간 재생에서 기능적 역할을 하며, 즉 난원세포는 성숙한 간세포 증식이 억제되거나 또는 고갈된 경우에만 조직 재생에 기여한다(Fausto 및 Campbell 2003).

[273면 좌측 칼럼 3단락]

상주하는 간 줄기/전구세포의 분리, 배양 및 증식을 위한 프로토콜은 수십 년 동안 확립되었다. 생성된 세포주는 치료 잠재력과 간 발달 및 재생을 둘러싼 분자 현상을 탐색하는 데 유용하다는 점에서 주목받았다. 난원세포주는 대부분 화학물질과 발암 물질에 노출된 설치류의 간에서 유래되었다.

[273면 우측 칼럼 3단락]

인간 간에서 전구세포 활성화는 다양한 간 질환과 관련이 있으며 전구세포의 수는 질병의

중증도와 관련이 있다(Roskams 등 2003). 이러한 설치류 모델에 대한 우리의 지식과 병행하여 성숙한 간세포의 복제 억제는 인간 간 질환에서도 억제된다. 최근 간세포는 텔로미어 단축에 따라 다양한 만성 인간 간 질환의 간경변 단계에서 노화되는 것으로 나타났다(Marshall 등 2005; Wiemann 등 2002). 아마도 이 간세포 복제 노화는 부분적으로 만성 간 질환이 20-30년 동안 계속된 증식의 결과일 것이다. 만성 염증과 성장 인자 및 반응성 산소 종 및 질소 종과 같은 DNA 손상 인자의 존재도 중요한 역할을 한다. 몇몇 만성 인간 간 질환, 특히 원발성 담즙성 간경변증은 난원세포 증식을 나타낸다(Bisgaard 등 2002; Tan 등 2002). "전구 세포" 증식이 간암종 및 담관암종의 진행과 연관되어 있다는 증거가 증가하고 있다 (Alison and Lovell 2005; Petersen 2001). 그러나 난원세포가 단순히 발암성 질병 상태의 표지자인지 또는 난원세포가 변형의 특별한 위험에 처해 있는지 여부는 여전히 불분명하다.

을 제6호증

[초록]

간 전구세포는 간세포 및 담관세포 계통으로 분화할 수 있는 인간 및 동물의 간에 존재하는 이중 잠재성 줄기세포이다. 성인 간에서 간 전구세포는 증식률이 낮은 휴지 줄기세포이고, 간의 성숙한 상피세포가 지속적으로 손상되거나 복제가 억제되거나 심각한 세포 손실이 있는 경우에만 활성화되는 예비 구획을 나타낸다.

간 전구세포 활성화는 다양한 급성 및 만성 간질환에서 기술되었다. (후략)

[455면 우측 칼럼] 2. 간 전구세포

간 전구세포(또는 HPC)는 간세포 및 담관세포 계통으로 분화할 수 있는 인간 및 동물에 존재하는 이중 잠재력 줄기세포이다[2,3]. 이 구획은 전구세포(인간에서) 또는 난원세포(설치류에서) 구획으로 불리며, Hering 관에 위치한다(그림 1).

[456면 우측 칼럼] 3. 간 전구세포의 활성화

성인 간에서 간 전구세포는 증식률이 낮은 휴지 줄기세포이다(그림 3). 간 손상에 반응하더라도 세포 손실과 중량은 일반적으로 간세포와 담관세포의 복제를 통해 회복된다. 왜냐하면 부분 간 절제술이나 담관 결찰과 같은 여러 실험 모델에서 입증된 것처럼 이들은 거의 무한한 자기 재생능력을 갖고 있기 때문이다. 이러한 조건에서 소엽간 담관의 간세포 또는 담관 세포는 높은 증식률을 보이며 각각 간의 복구 또는 담관 중량의 증가를 책임진다. 따라서 간 전구세포는 간의 성숙한 상피세포가 지속적으로 손상되거나 복제가 억제되거나 심각한 세포 손실이 있는 경우에만 활성화된다. 이러한 조건에서 상주하는 간 전구세포는 활성화되고 문

맥주위 영역으로부터 중심주위 영역의 간세포 및/또는 담관 세포로 확장된다[9, 13-15].

[458면 좌측 칼럼 4단락]

간세포의 급성 대량 괴사 후 간 재생에는 전구 구획의 눈에 띄는 증식이 존재한다. 유사하게, 현저한 간 전구세포 활성화는 대부분의 만성 간 질환에서도 기술되었다[2, 17, 18].

[458면 좌측 칼럼 6단락]

(전략) 간세포 복제의 억제는 장기간의 만성 간 질환에서도 발생하며 간 전구세포 활성화와 관련이 있다. 여러 만성 간 병리학에서 간 전구세포의 증식 정도는 섬유증 정도와 상관관계가 있다[19].

[458면 우측 칼럼 1단락]

간 전구세포 활성화가 일어나지 않는 인간 간 질환은 소수에 불과하다. (중략) 대조적으로, 이 질병의 임상적 및 병리학적 진행 동안 그 역할에 관한 정보가 적음에도 불구하고 원발성 담즙성 간경변증(PBC)과 같은 만성 담즙성 질환에서 두드러진 간 전구세포의 관여가 기술되었다[20].

(4) 따라서 선행발명이 줄기세포의 증식·분화에 의한 재생을 직접적으로 언급하지 않을지라도, 병리학적 특성상 간경변증은 적어도 '간 전구세포'와 같은 줄기세포가 활성화되어 세포의 증식·분화가 수반되고 있는 상태로 보는 것이 합리적이고, 달리 구성요소 3에서 '줄기세포의 증식·분화에 의한 정상 조직의 재생'이 '이식된 줄기세포가 증식·분화되는 것에 의한 정상 조직의 재생'인 것으로 제한 해석하여야 할 이유가 없다.

5) 효과의 대비

이 사건 출원발명에는 섬유화 조직에 축적된 콜라겐의 감소에 의해 생성된 공간에 GFP 표지된 줄기세포가 이식된 위치에서 증식·분화하여 정상 조직을 재생하는 것과, 줄기세포의 분화에 물리적 공간 및 활성화 성상세포의 작용이 중요하다는 것을 확

12) 이 사건 출원발명의 명세서의 식별번호 [0051]에 기재된 3가지 줄기세포 중 첫 번째 유형에 대응된다.

13) 이 사건 출원발명의 명세서의 식별번호 [0051]에 기재된 3가지 줄기세포 중 세 번째 유형에 대응된다.

14) 이 사건 출원발명의 명세서의 식별번호 [0051]에 기재된 3가지 줄기세포 중 첫 번째 유형에 대응된다.

15) 이 사건 출원발명의 명세서의 식별번호 [0051]에 기재된 3가지 줄기세포 중 두 번째 유형에 대응된다.

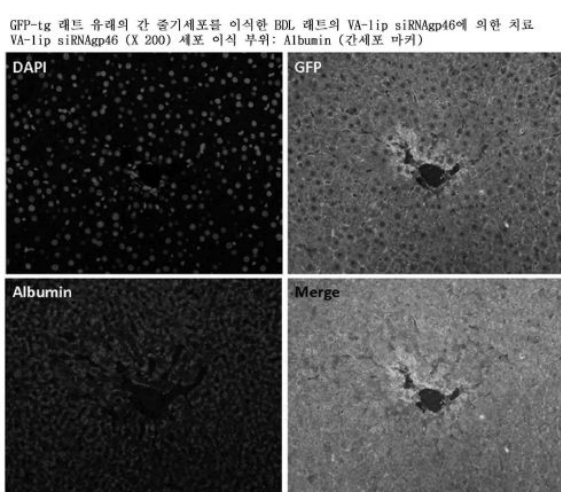
인한 효과가 기재되어 있는 반면, 선행발명에는 위와 같은 내용이 구체적으로 기재되어 있지는 않다. 그러나 다음과 같은 이유로 이식된 줄기세포의 증식·분화와 관련된 공간의 중요성 및 활성화 성상세포의 간 내 줄기세포의 활성화 역할을 확인한 것은 통상의 기술자가 선행발명으로부터 예측할 수 있는 효과의 범주 내에 있다고 보는 것이 타당하다.

가) 심한 간 손상으로 간세포 자체 증식이 한계점에 도달할 경우에 간에 본래부터 존재하는 줄기세포의 일종인 난원세포(간 전구세포)가 활성화된다는 것은 이 사건 출원 발명이 속한 기술분야에 주지된 사실이다(을 제2, 5, 6호증). 간이 손상되면 성상 세포가 활성화되어 콜라겐을 생성하여 섬유화를 유발하는 병리 기전을 고려하면, 심한 간 손상 일 때에도 성상 세포는 활성화된 상태일 것은 자명하고, 그에 따라 휴지기의 난원세포가 활성화되는 것으로 미루어 짐작할 수 있다. 이와 같은 간 손상 과정에서 성상 세포와 난원세포의 상호작용은 통상의 기술자가 예측할 수 있는 범주 내에 있고, 성상 세포에 의한 난원세포 활성화는 생체 내에서 순차적으로 진행되는 일련의 생리 기능에 해당하므로 이를 규명한 것이 새로운 의약용도를 제공하는 정도라 할 수도 없다.

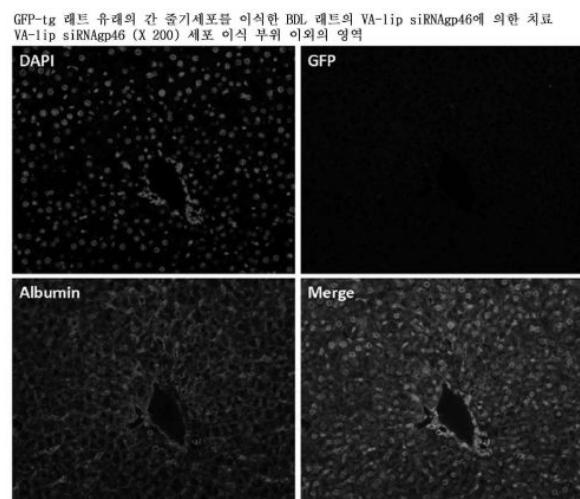
나) 생물학 분야에서 세포의 증식·분화 시 접촉 억제(contact inhibition) 기전이 작용하므로, 세포 등을 배양할 때에는 컨플루언스(confluence) 상태¹⁶⁾에 도달하기 전에 다른 배양 시스템으로 분주하는 것이 기술 상식이다. 줄기세포를 저밀도 조건(즉, 콜라겐의 감소로 물리적 공간에 여유가 생긴 상태)에서 배양한 경우 고밀도 조건인 컨플루언스 상태에서 배양한 것보다 더 잘 증식·분화된 것을 확인한 정도는 통상의 기술자가 쉽게 예측할 수 있는 효과이다.

16) 세포배양 시 세포의 자란 상태가 일정 기간 공간 내에서 가득 찬 상태를 말한다.

다) 또한, 앞서 살핀 바와 같이 이 사건 제1항 발명의 '줄기세포'가 '이식된 줄기세포'만을 의미하는 것도 아니고, 이 사건 출원발명은 이식 줄기세포를 GFP로 표지하여 추적 관찰한 결과 GFP 표지된 줄기세포 대부분이 알부민을 발현하고 있어서 이식된 줄기세포가 간 실질세포로 분화된 것을 확인하고 있기는 하나(도 7), 간에 본래 존재하던 줄기세포에 의해서도 축소된 섬유화 영역에서 간은 재생될 수 있다. 이 사건 출원발명의 도 10을 보면, 이식 부위 이외에는 이식된 줄기세포가 존재하지 않음에도, 해당 영역에서 간세포 실질 마커인 알부민이 검출되고 있는 것이 확인되고, 이 때 알부민은 이식된 줄기세포가 없던 영역에도 간 실질세포가 존재한다는 것을 의미한다. 이는 간에 본래 존재하던 난원세포(간 전구세포)와 같은 줄기세포가 축소된 섬유화 영역에서 간 실질세포로 재생되어 검출된 것으로 볼 수 있다. 나아가 이는 본래 간에 상주하던 간 전구세포가 중증 간 섬유증에 의해 활성화된 상태에서, 간 섬유증의 진행이 VA-lip-siRNA_g46 투여에 의해 반전되어 섬유화가 축소될 경우, 축소된 영역은 당연히 간조직의 유연성이 증가된 상태가 되고, 해당 위치에서 활성화된 난원세포와 같은 줄기세포에 의해 간이 재생되는 것을 실험적으로 확인한 것이라 할 수 있다.



도 7



도 10

라) 더욱이 선행발명은 VA-lip-siRNAgp46 투여에 의해 간 섬유화 영역이 축소되고 거의 완전히 정상적인 간 구조로 복원되므로 VA-lip-siRNAgp46이 간 섬유증을 회복할 수 있다고 기재하고 있다(선행발명의 명칭). 그런데 회복(resolution)¹⁷⁾이라는 문언의 보편적인 의미에 비추어 볼 때, 선행발명에 있어 '회복'이란 간 섬유화 영역이 VA-lip-siRNAgp46 투여에 의해 축소된 후 그 영역이 비어있는 상태로 유지되는 것이 아니라, 정상적인 간 구조의 형태가 갖추어진 상태인 정상 상태로 되돌아온 것을 의미하는 것으로 보아야 한다. 따라서 선행발명에 직접적으로 섬유화 축소 영역에서 줄기세포가 증식·분화된 것이 기재되어 있지 않을지라도, 이 사건 출원발명은 선행발명에서 암시된 효과를 단순히 확인하여 기재한 것에 불과하다.

6) 검토결과의 정리

이 사건 제1항 발명은 통상의 기술자가 선행발명으로부터 쉽게 발명할 수 있으므로 진보성이 부정된다.

나. 소결론

특허출원에서 청구범위가 둘 이상의 청구항으로 이루어진 경우에 어느 하나의 청구항이라도 거절이유가 있는 때에는 그 특허출원 전부가 거절되어야 한다(대법원 2009. 12. 10. 선고 2007후3820 판결 참조). 이 사건 제1항 발명이 그 진보성이 부정되어 특허를 받을 수 없는 이상 나머지 청구항에 관하여 더 나아가 살펴볼 필요 없이 이 사건 출원발명은 특허를 받을 수 없다. 이와 결론이 같은 이 사건 심결은 적법하다.

4. 결론

이 사건 심결의 취소를 구하는 원고의 청구는 이유 없어 기각한다.

17) resolve(회복하다) : 병적 과정에서 정상 상태로 돌아오는 것(제2판 의학대사전, 1999년 1월 20일 발행, 편저자 이우주, 발행처 도서출판 아카데미서적)

재판장 판사 이형근

판사 임경옥

판사 윤재필

별지 1

이 사건 출원발명의 주요 내용 및 도면

① 기술분야

[0001] 본 발명은 섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

② 배경기술

[0003] 조직의 섬유화는 콜라겐을 중심으로 하는 세포 외 매트릭스가 조직에 과도하게 생산·축적되는 것으로 생긴다. 조직은 산화 스트레스, 저산소 상태, 염증, 세포사멸(apoptosis) 등의 자극에 의해 손상을 받았을 경우, 손상 조직을 세포 외 매트릭스로 대체하여 회복을 도모하지만, 손상이 중증의 경우나 해당 자극이 만성화됐을 경우 등에는 세포 외 매트릭스의 축적이 과도하게 되어 조직이 그 기능을 충분히 완수할 수 없게 된다. 섬유화는 간, 췌장, 폐, 신장, 골수, 심장 등의 각종 장기에서 보여지며 근섬유모세포(myofibroblastic cell) 등의 콜라겐 생산 세포가 병태(病態)에 관여하고 있다고 생각되고 있다. 종래 섬유화는 불가역적인 현상이며, 일단 섬유화한 조직이 원래대로 돌아갈 수 없다고 생각되어 왔지만, 최근에는, 섬유화가 가역적인 것이며 상기 설명과 같은 섬유화 자극이 소실하면 조직에 축적한 세포 외 매트릭스가 감소하는 것을 시사하는 몇 개의 보고가 있다(비특허문헌 1 내지 3¹⁸⁾ 참조).

[0004] 그렇지만, 병적인 세포 외 매트릭스의 축적이 감소한 후의 조직에서 구체적으로 무엇이 발생하는 지에 대한 상세한 보고는 없고, 해당 섬유화 조직으로 정상 조직의 재생이 일어나는 것도, 정상 조직의 재생을 일으킬 수 있는 것도 지금까지 전혀 알려지지 않았다.

[0005] 또한, 조직의 섬유화에는 바이러스 감염, 음주, 약물 등에 유래하는 섬유증 등 병인이 명확하고 그 제거가 가능한 것뿐만이 아니라, 직접적인 병인이 불명한 섬유증, 예를 들면, 특발성 간경변, 특발성 폐 섬유증, 특발성 골수 섬유증 등, 또는, 직접적인 병인은 알고 있지만, 그 병인의 원인이 불명한 것이나, 제거 곤란한 것, 예를 들면, 방사성 발전성 담즙성 간경변, 비알코올성 지방간염(NASH) 유래의 간 섬유증, 원발성 경화성 담관염 등도 포함된다. 이러한 병인의 제거가 곤란한 섬유화가 존재하는 조직은 끊임없이 섬유화 자극에 노출되어 있는 상태에 있지만, 해당 섬유화 조직에 대해 병적인 세포 외 매트릭스의 축적을 감소시킬

수 있는 것도, 더욱이 조직을 재생할 수 있는 것도 지금까지 전혀 알려지지 않았었다.

[3] 발명의 내용

[해결하고자 하는 과제]

[0007] 본 발명은 섬유화가 존재하는 조직에 대해 치료적으로 정상 조직을 재생하기 위한 조성물 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[과제의 해결 수단]

[0009] 본 발명자들은 상기 과제를 해결할 수 있도록 열심히 연구를 계속하는 가운데, 섬유화 자극을 계속 받고 있는 섬유화 조직에서도 조직에 축적한 콜라겐을 감소시킬 수 있는 것과, 또한, 조직에 축적한 콜라겐을 제거하여 줄기세포가 증식·분화할 수 있는 공간을 확보하는 것으로 섬유화 조직으로부터 정상적인 조직을 재생할 수 있는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성시켰다.

[0010] 상기와 같이, 섬유화 자극이 소실하면 조직에 축적한 세포 외 매트릭스가 감소할 수 있는 것은 알려져 있었지만, 섬유화 자극을 계속 받고 있는 섬유화 조직에 대해 조직에 축적한 콜라겐을 감소시킬 수 있는 것도, 조직에 축적한 콜라겐을 적극적으로 제거하는 것으로, 섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생할 수 있는 것도 지금까지 완전히 알려져 있지 않았고, 이것은 놀라운 결과이다.

[발명의 효과]

[0023] 본 발명에 의해 지금까지 정상 조직의 재생이 일어나지 않는다고 생각되고 있던 섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생할 수 있는 것을 확인하였다. 이것에 의해 섬유화 조직으로부터 정상 조직을 치료적으로 재생할 수 있게 되어 섬유화 질환의 새로운 재생 치료가 가능해진다.

[0024] 또한, 본 발명에 의해 섬유화 자극에 계속적으로 노출되어 있는 섬유화 조직의 치료가 가능해지며 종래 유효한 치료법이 존재하지 않았던 섬유화 질환이나, 장기 이식밖에 치료법이 없었던 섬유화 질환을 포함한 모든 섬유화 질환의 내과적 치료가 실현되기 때문에 의료 및 수의학에 대한 지대한 공헌을 기대할 수 있다.

[4] 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 콜라겐(collagen) 감소 물질을 포함하는 섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생하기 위한 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에 있어서 콜라겐 생산 세포는 섬유화 조직에 있어서 콜라겐을 생산하는 임의의 세포를 의미하며, 한정되지 않고, 예를 들면, 활성화별세포, 근섬유모세포(myofibroblastic cell) 등을 포함한다. 활성화별세포 및 근섬유모세포(myofibroblastic cell)는 섬유화 조직에서 주요한 콜라겐 생산원이라고 생각되고 있고 있어 α -SMA(α -평활근 액틴(alpha smooth muscle Actin))의 발현을 특징으로 하고 있다. 따라서, 본 발명에서 활성화별세포 및 근섬유모세포(myofibroblastic cell)는 검출 가능하게 표지된 항 α -SMA 항체를 이용한 면역 염색 등에 의해서 동정(同定)되는 것이다.

[0030] 콜라겐 생산 세포에 의한 콜라겐 생산을 억제하는 물질은 섬유화 조직에서 콜라겐 축적에 관계하는 동일 세포의 물리적, 화학적 및/또는 생리적인 작용 등을 직접 또는 간접에 억제하는 임의의 약물을 포함하며, 한정되지 않고, 예를 들면, TGF- β (Transforming growth factor-beta) 저해 물질, HGF(Hepatocyte growth factor) 또는 이의 생산 촉진 물질, PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 리간드, 안지오텐신(Angiotensin) 저해 물질, PDGF(Platelet-derived growth factor) 저해 물질, 릴렉신(Relaxin) 또는 이의 생산 촉진 물질, 세포 외 매트릭스 성분의 생산·분비를 저해하는 물질, 세포 활성 억제 물질, 세포 증식 억제 물질, 세포사멸(apoptosis) 유도 물질 등을 포함한다.

[0036] 세포 외 매트릭스 성분의 생산·분비를 저해하는 물질은 한정하지 않고, 예를 들면, 콜라겐(Collagen), (중략) 등의 세포 외 매트릭스 성분의 발현을 억제하는, RNAi 분자, 리보자임, 안티센스 핵산 등의 물질, 혹은 도미넌트 네가티브(Dominant negative) 변이체 등의 도미넌트 네가티브 효과를 가지는 물질, 이들을 발현하는 벡터, 및 이들로 형질 전환된 세포 등을 들 수 있다. 콜라겐의 생산·분비를 저해하는 약물은, 한정되지 않고, 예를 들면, 여러 가지 타입의 콜라겐의 합성 과정에서 공통되는 세포 내 수송 및 분자 성숙화에 필수인 콜라겐 특이적 분자 샤페론(chaperone)인 HSP(Heat shock protein) 47의 저해물질, 예를 들면, HSP47에 대한 RNAi 분자, 리보자임, 안티센스 핵산 등의 HSP47 발현 저해 물질, 혹은 HSP47의 도미넌트 네가티브 변이체 등의 도미넌트 네가티브 효과를 가지는 물질, 이들을 발현하는 벡터, 및 이들로 형질 전환된 세포 등을 들 수 있다.

[0042] 본 발명에서 RNAi 분자에는 siRNA(small interfering RNA), (중략) 포함된다. 또한, 본 발명에서 핵산은 RNA, DNA, PNA, 또는 이들의 복합물을 포함한다.

[0049] 본 발명의 한 형태에 있어서 섬유화 조직은 섬유화 자극을 계속적으로 받고 있는 것

이다. 본 발명에 대해 섬유화 자극은 섬유화를 유도하는 임의의 자극을 의미하여, 한정하지 않으며, 예를 들면, 산화 스트레스, 저산소 상태, 염증, 세포사멸(apoptosis)등을 포함한다 (Ghiassi-Nejad et al., Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2008;2(6):803-16참조). 해당 조직으로는, 예를 들면, 만성 염증을 일으키고 있는 섬유화 조직이나, 세포 장해성 물질에 끊임 없이 노출되어 있는 조직(예를 들면, 담관 질환등에 의해 담즙의 울체가 일어나고 있는 간 조직)등을 들 수 있다. 또한, 해당 조직에는 직접적인 병인이 불명한 섬유증, 예를 들면, 특발성 간경변, 특발성 폐 섬유증, 특발성 골수 섬유증 등, 또는, 직접적인 병인은 알고 있지만, 그 병인의 원인이 불명한 것이나, 제거 곤란한 것, 예를 들면, 원발성 담즙성 간경변, 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis;NASH) 유래의 간 섬유증, 원발성 경화성 담관염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 간질성 폐렴 유래의 폐 섬유증, 원발성 골수 섬유증, 특발성 간질성 신장염 유래의 신장 섬유증, 염증성 장질환(예를 들면 만성 크론병, 궤양성 대장염 등), 전신성 강피증 등으로 이환한 조직 등도 포함된다.

[0050] 본 발명에 있어 「**섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생한다**」는 섬유화에 의해서 변질한 조직을, 적어도 섬유화가 보다 경도인 상태로 회복시키는 것을 의미한다. 즉, 섬유화가 진행되는 것에 따라, 조직은 세포 외 매트릭스를 중심으로 한 섬유 조직으로 치환되어 가지만, 이 흐름을 역전시켜, 증식한 섬유 조직을 본래의 정상 조직으로 치환해 가는 것이 본 발명에서 섬유화 조직으로부터의 정상 조직의 재생이다. 따라서, 본 발명에서 섬유화 조직으로부터의 정상 조직의 재생은 섬유화 조직을 완전하게 원 상태로 회복시키는 것뿐만 아니라, 섬유화 조직을 부분적으로 원래 상태에 회복시키는 것도 포함한다. 정상 조직의 재생 정도는, 생검 시료 등의 조직학적 검사에 의해, 조직 구조의 정상화, 섬유 조직이 차지하는 영역의 축소, 정상 조직이 차지하는 영역의 확대 등에 기초를 두어 평가해도 좋고, 본 발명의 조성물에 의한 처리 전에 섬유화에 기인하는 생화학적 지표의 이상이 인정되고 있는 경우에는, 해당 지표의 개선 등에 의해서 평가해도 좋다.

[0051] 본 발명의 한 형태에 있어서 정상 조직의 재생은 섬유화 조직에 축적된 콜라겐의 감소에 의해 생성된 스페이스에 있어, 줄기세포가 증식·분화하는 것으로 생기는 것이어도 좋다. 따라서, 본 발명의 한 형태는 섬유화 조직에 축적된 콜라겐이 감소되어 생성되는, 줄기세포의 증식·분화용의 스페이스에 있어, 섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생하기 위한 상기 의약 조성물에 관한 것이다. 여기서, 줄기세포에는, 한정하지 않고, 예를 들면, 섬유화

한 조직에 본래 존재하는 것(간 줄기세포, 췌장 줄기세포, 폐 줄기세포, 신장 줄기세포, 골수 줄기세포, 심장 줄기세포, 비장 줄기세포, 자궁 줄기세포, 피부 줄기세포, 유선 줄기세포, 장관 줄기세포, 간엽계 줄기세포 등)나, 체내의 다른 장소로부터 이동해 온 것, 또한, 치료적으로 투여한 것 등이 포함된다. 또한, 「스페이스」는 조직 내의 공극뿐만 아니라, 세포가 확대·증식 할 수 있는 여지가 있는 공간, 예를 들면, 세포 간의 압력이 감소된 공간이나, 유연성을 가지는 공간 등을 포함한다.

[0052] 본 발명의 조성물은, 그 한 형태에 있어서, 섬유화 조직에서 콜라겐 생산 세포에 대한 표적화제를 한층 더 포함한다. 표적화제를 포함하는 것으로, 콜라겐 생산 세포를 표적으로 하는 콜라겐 감소 물질, (중략) 등을, 표적 세포인 콜라겐 생산 세포에 특이적으로 전달하는 것이 가능해져, 사용하는 콜라겐 감소 물질의 효과를 높일 수 있다.

[0053] 본 발명의 한 형태에 있어서, 콜라겐 생산 세포에 대한 표적화제는 레티노이드이다. 레티노이드에 의한 표적화 기구는 아직 완전하게 해명되어 있지 않지만, 예를 들면, RBP(Retinol binding protein)와 특이적으로 결합한 레티노이드가, 섬유화 조직에서 콜라겐 생산 세포의 세포 표면에 위치하는 어떤 종류의 리셉터를 통하여 상기 세포에 편입되는 것을 생각할 수 있다. 레티노이드가 콜라겐 생산 세포의 표적화제로서 기능 할 수 있는 것은, WO 2006/068232, 특개 2009-221164, 특개 2010-59124등에 기재되어 있다.

[0075] (전략) 또한, 정상 조직의 재생은, 조직학적 소견이나, 표지한 줄기세포를 섬유화 조직에 투여하여 이것을 추적 조사하는 것 등에 의해 평가할 수 있다.

[0076] (전략) 섬유화의 모델 동물로는, 사염화탄소(CCl₄), 돼지 혈청, 디메틸니트로사민(dimethylnitrosamine; DMN), 메티오닌-코린 결핍식(methionin-and choline- deficient(MCD) diet; MCDD), 콘카나바린 A(concanavalin A; Con A), 담관 결찰 등에 의한 간경변 모델, 블레오마이신(bleomycin; BLM) 등에 의한 폐 섬유증 모델, 이 염화 디부틸 주석(dibutyltin (DBT) dichloride) 등에 의한 췌장 섬유증모델, 트롬보포이에틴(Thrombopoietin; TPO) 트랜스제닉(transgenic) 마우스(Leukemia Research 29: 761-769, 2005)등의 골수 섬유증 모델 등의 여러 가지를 이용할 수 있다.

[0080] 본 발명의 방법에 있어서, 용어 「대상」은 임의의 생물 개체를 의미하며 바람직하게는 동물, 더 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 사람이다. 본 발명에 있어서 대상은 건강하거나 어떠한 질환에 이환되어 있지만, 전형적으로는 섬유화 조직을 가지거나 조직이

섬유화하는 리스크(risk)를 가지는 대상을 의미한다. 해당 대상으로서 예를 들면, 한정하지 않고, 상기의 장기 섬유증에 이환되어 있거나 이환한 리스크를 가지는 대상, 조직이 섬유화 자극을 받고 있거나 받는 리스크가 있는 대상 등을 들 수 있다.

[0081] 더욱이, 본 발명은 섬유화 조직에서 콜라겐을 감소하는 단계 및/또는 섬유화 조직에 대해 세포 증식·분화용의 스페이스를 생성하는 단계를 포함하는 섬유화 조직으로부터 정상 조직을 재생하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0083] 본 방법에 있어서 섬유화 조직에서 콜라겐의 감소 및 세포 증식·분화용의 스페이스의 생성은 본 발명의 조성물 또는 상기에서 서술한 콜라겐 감소 물질을 섬유화 조직에 투여하는 것으로 실시할 수 있다.

[0088] <실시예 1> VA-lip siRNA의 제조

[0089] (1) siRNA의 제조

[0090] 콜라겐(I~IV형)의 공통 분자 샤페론인 사람 **HSP47의 래트 호모 로그, gp46**(GenBank Accession No. M69246)의 **염기 배열을 표적으로 하는 siRNA**(훗카이도 시스템·사이언스, Sapporo, Japan)의 센스 사슬 및 안티센스 사슬은 이하의 것을 이용했다.

[0098] (2) VA-lip siRNA의 제조

[0099] 양이온성 지질로서 O,O'-디테트라데카노일-N-(-트리메틸암모니오아세틸) 디에탄올아민클로라이드(ditetradecanoyl-N-(trimethylammonioacetyl)diethanolaminechloride)(DC-6-14), 콜레스테롤(cholesterol) 및 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올라민(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)(DOPE)을 4 : 3 : 3의 물비로 포함하는 양이온성 리포솜(LipoTrust)을 훗카이도 시스템·사이언스(Sapporo, 일본)로부터 구입했다. 리포솜은, 사용 전에, 동결건조 한 지질 혼합물에 교반 조건하에서 재증류수(DDW)를 첨가하는 것에 의해서, 1 mM(DC-6-14)의 농도로 제조했다. VA결합 리포솜을 조제하기 위해서, DMSO에 용해한 200 nmol의 비타민 A(레티놀, Sigma, USA)를 리포솜 현탁액(DC-6-14로 100 nmol)과 1.5 mL 튜브에서 교반하면서 25°C로 혼합했다. siRNAgp46를 담지하는 VA결합 리포솜(**VA-lip-siRNAgp46**)을 조제하기 위해(때문에), siRNAgp46 용액(DDW중에 580 pmol/mL)을 레티놀 결합 리포솜 용액에 교반하면서 실온하에서 첨가했다. siRNA와 DC-6-14와의 물비는 1 : 11이었다. in vitro에서의 사용에 바람직한 용량을 얻기 위해서 VA-lip siRNA를 인산완충 생리 식염수(PBS)로 재구성했다.

[0101] <실시에 2> 간섬유화 모델 래트로 재생 치료 실험

[0102] (1) 간섬유화 모델 래트의 제작

[0103] 간섬유화 모델 래트는 수컷 SD래트(체중 150~200 g)(Slc Japan, Shizuoka, 일본)에 대해서 담관 결찰을 수행하여 제작하고 결찰 후 28일째의 개체를 본 실험에 제공했다. 본 모델 래트에 있어서, 담관 결찰에 의해 담즙의 울체가 생겨 간조직이 섬유화 자극에 계속적으로 노출된 상태가 된다.

[0105] (2) GFP 표지 래트 간 줄기세포의 제조

[0106] GFP 표지 래트 간 줄기세포는 4주령의 GFP 유전자 도입 래트(Slc Japan)의 간에서 채취했다. (중략) 세포수를 센 후, FITC 결합 마우스 항CD45 항체(BD Pharmingen), 래빗-폴리클로날(rabbit-polyclonal) 항CD133 항체(Abcam) 및 마우스 모노클로날(monoclonal) 항EpCAM 항체(Santa Cruz)를 이용해 MACS(R)(을)를 실시해, CD133 양성, EpCAM 양성, CD45 음성 세포를 채취하여, 래트 간 줄기세포로서 본 실험에 이용했다.

[0108] (3) 간섬유화 모델 래트의 처리

[0109] 상기 (1)로 제작한 간섬유화 모델 래트에게, 상기 (2)로 제조한 GFP 표지 간 줄기세포를, 200 μ l의 DME/F12 배지 속에 2×10^6 개의 농도로 국소 이식했다.

[0110] 간 줄기세포의 이식 후 24시간째부터, 비타민 A결합 리포솜 내포 siRNA_{Agp46}(VA-lip siRNA_{Agp46}) 또는 mock으로서 VA-lip siRNA scramble를 1일 간격¹⁹⁾으로, 합계 12회 미정맥 투여했다. 투여한 siRNA의 농도는, 래트 체중에 대해서 0.75 mg/kg로 사용했다. 비타민 A 및 리포솜(LipoTrust, 홋카이도 시스템·사이언스, Sapporo, 일본) 및 siRNA의 물비는 11.5 : 11.5 : 1으로 했다.

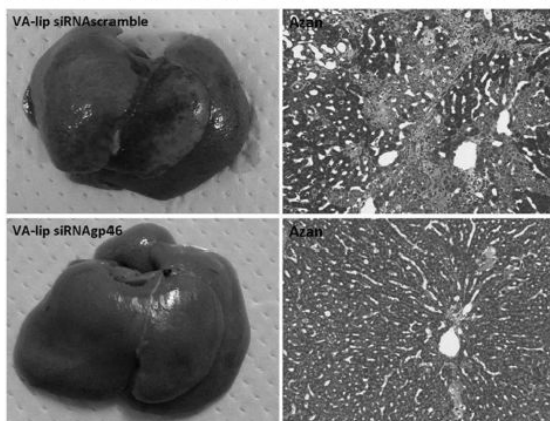
[0113] 상기 (3)으로 12번째의 VA-lip siRNA_{Agp46} 투여가 종료한 24시간 후(즉 담관 결찰 후 52일째)에, GFP 발현 간 줄기세포를 이식한 담관 결찰 래트의 간을 채취했다. (후략)

[0116] 도 1은 피험 래트로부터 채취한 간의 외관과 그 그²⁰⁾ 대표적 절편의 아잔 염색상을 나타낸다. VA-lip siRNA scramble를 투여한 군에서는, 간은 위축하고, 표면이 불규칙하며, 조직 중에 아잔 염색상에 있어서 청색으로 염색된 세포외 매트릭스의 축적이 광범위하게 보여지고, 소엽 구조도 흐트러지고 있었다. 이것에 대해, VA-lip siRNA_{Agp46}를 투여한 군에 대해서는, 외관적인 위축이 인정되지 않고, 표면은 매끈하고, 조직 중에 세포 외 매트릭스의 축적은 거의 보이지 않고, VA-lip siRNA scramble 투여군에 비해 섬유화 영역의 축소가 보

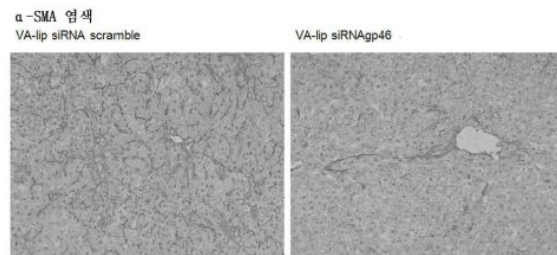
였다. 또한, 중심 정맥으로부터 방사상으로 유동(sinusoid²¹⁾)이 주행하는 정상적인 소엽 구조가 회복하고 있는 것이 명확하게 보였다.

[0117] 도 2는 α -SMA 항체의 DAB 염색상이다. 청색의 부분은 헤마토실린(hematoxylin)으로 염색된 핵을 나타내고 진한 갈색 부분이 α -SMA 양성 영역이다. α -SMA는 활성화 별세포의 마커로서 알려져 있어 α -SMA 양성 영역에는 활성화 별세포가 존재한다고 생각된다. VA-lip siRNA_{Agp46} 투여군에 있어서, VA-lip siRNA scramble과 비교해 현저한 활성화 별세포의 감소를 보였다.

담관결찰 래트(rat)에게 간 줄기세포의 이식 및 VA-lip siRNA_{Agp46}를 이용한 치료



도 1



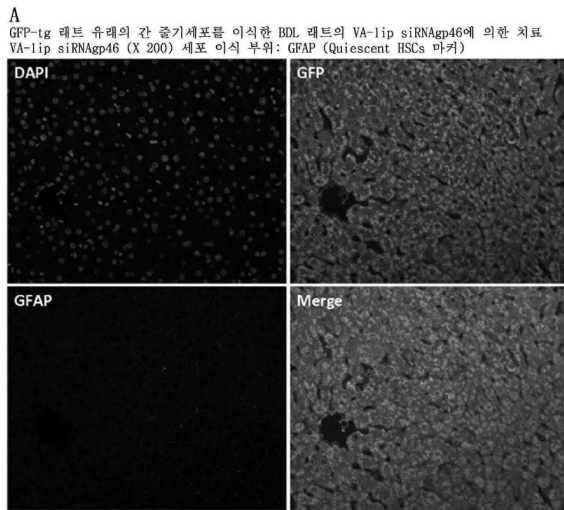
도 2

[0118] 도 3은 GFP 표지 간 줄기세포 이식 부위에 있어서 DAPI 및 GFP의 형광상이다. VA-lip siRNA_{Agp46} 투여군에 있어서 약 80%의 영역에서 GFP의 발색을 보였던 것에 비해, VA-lip siRNA scramble 투여군에 있어서 거의 관찰되지 않았다.

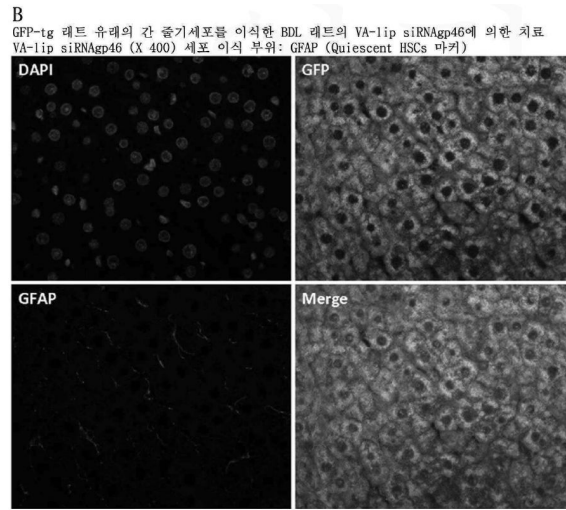
[0119] 도 4는 GFP 표지 간 줄기세포 이식 부위의 명시야상과 GFP 형광상이다. VA-lip siRNA scramble 투여군에서는 특히 혈관 주위 등에 있어 세포 외 매트릭스의 침착을 위해서 세포의 형상이 희미해져 유동(sinusoid)도 불규칙하게 주행하고 있는 것에 반해, VA-lip siRNA_{Agp46} 투여군에서는, 뚜렷한 세포 형상과 중심 정맥으로부터 방사상으로 주행하는 유동구조가 보였다. 또한, VA-lip siRNA scramble 투여군에서는 GFP의 발색을 볼 수 없었는데, VA-lip siRNA_{Agp46} 투여군에서는, 조직 전체에 걸쳐 GFP의 발색을 볼 수 있었다.

[0120] 도 5는 VA-lip siRNA_{Agp46} 투여군에서 DAPI, GFP의 형광상과 GFAP 항체에 의한 형광 염색상을 비교한 것이다(도 5A는 배율 200배, 도 5B는 배율 400배). GFAP는 휴지 상태의 간성세포²²⁾의 마커로서 알려져 있는 단백질이다. GFAP를 발현하고 있는 세포는, GFP를

발현하지 않았다.



도 5A



도 5B

[0121] 도 6은 VA-lip siRNA_{Agp46} 투여군에서 DAPI, GFP의 형광상과 α -SMA 항체에 의한 형광 염색상을 배율 200배로 비교한 것이다. α -SMA를 발현하고 있는 세포는, GFP를 발현하지 않았다. 도 5 및 6의 결과는 간성 세포가 간 줄기세포에 유래하는 것은 아닌 것을 시사하는 것이다.

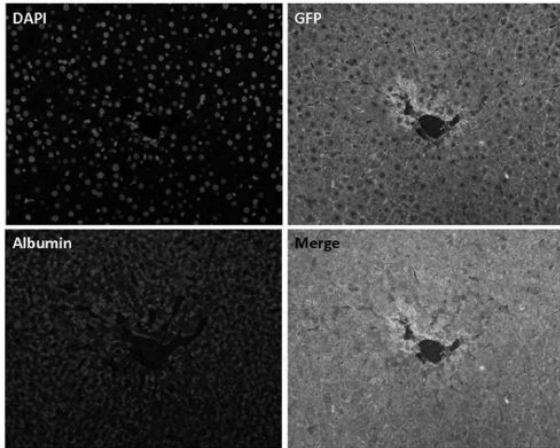
[0122] 도 7은 VA-lip siRNA_{Agp46} 투여군에서 DAPI, GFP의 형광상과 알부민 항체에 의한 형광 염색상을 배율 200배로 비교한 것이다. 알부민은 간 실질 세포의 마커이지만, GFP를 발현하고 있는 세포의 대부분이 알부민을 발현하고 있었다.

[0123] 도 8은 VA-lip siRNA_{Agp46} 투여군에서 DAPI, GFP의 형광상과 CK19 항체에 의한 형광 염색상을 배율 200배로 비교한 것이다. CK19는 담관 상피 세포의 마커이지만, 담관을 구성하는 CK19 양성 세포는, GFP를 발현하고 있었다.

[0124] 도 9는 VA-lip siRNA_{Agp46} 투여군에서 DAPI, GFP의 형광상과 CK19 항체에 의한 형광 염색상을 배율 200배로 비교한 것이다(도 9A는 배율 200배, 도 9B는 배율 400배). ve-CAD는 혈관 상피 마커로서 알려져 있어 GFP를 발현하고 있는 세포의 일부에 있어, ve-CAD를 발현하는 세포가 관찰되었다.

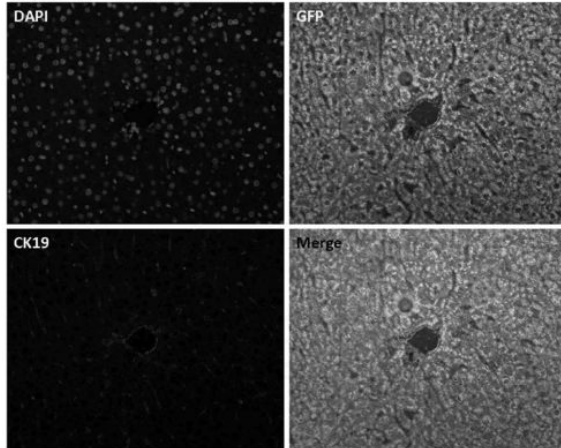
[0125] 도 10은 VA-lip siRNA_{Agp46} 투여군의 세포 이식하지 않았던 부위에서 DAPI, GFP의 형광상과 알부민 항체에 의한 형광 염색상을 배율 200배로 비교한 것이다. 세포 이식하지 않았던 부위에 있어서는, GFP 발현 세포는 관찰되지 않았다.

GFP-tg 레트 유래의 간 줄기세포를 이식한 BDL 레트의 VA-lip siRNA_{Agp46}에 의한 치료
VA-lip siRNA_{Agp46} (X 200) 세포 이식 부위: Albumin (간세포 마커)



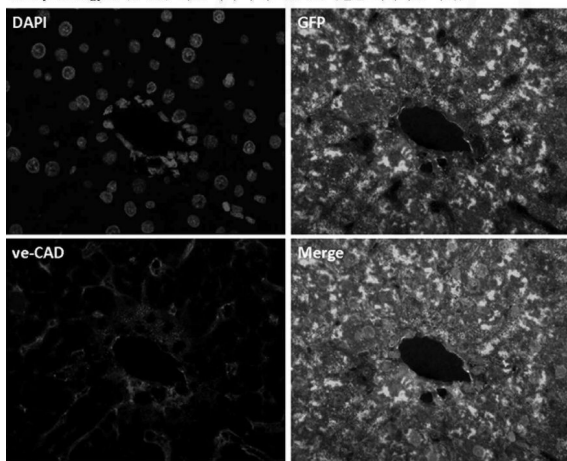
도 7

GFP-tg 레트 유래의 간 줄기세포를 이식한 BDL 레트의 VA-lip siRNA_{Agp46}에 의한 치료
VA-lip siRNA_{Agp46} (X 200) 세포 이식 부위: CK19 (담관 상피 세포 마커)



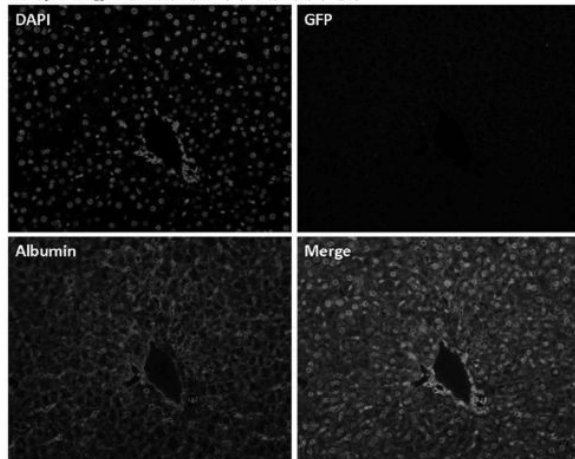
도 8

B
GFP-tg 레트 유래의 간 줄기세포를 이식한 BDL 레트의 VA-lip siRNA_{Agp46}에 의한 치료
VA-lip siRNA_{Agp46} (X 400) 세포 이식 부위: ve-CAD (혈관 내피세포 마커)



도 9B

GFP-tg 레트 유래의 간 줄기세포를 이식한 BDL 레트의 VA-lip siRNA_{Agp46}에 의한 치료
VA-lip siRNA_{Agp46} (X 200) 세포 이식 부위 이외의 영역



도 10

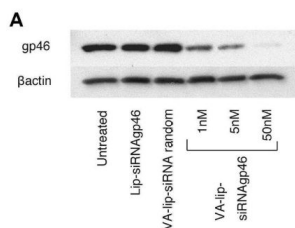
[0127] 고찰

[0128] GFP를 발현하는 세포는 이식한 간 줄기세포 유래의 세포이므로, VA-lip siRNA_{Agp46}의 투여에 의해, 세포 이식 부위에 있어서, 섬유화 영역의 축소와 함께 간 줄기세포가 간 실질 세포, 담관 상피 세포 및 혈관 상피 세포로 분화하는 것으로써, 정상적인 간 조직이 재생되는 것이 나타났다. 즉, VA-lip-siRNA_{Agp46} 투여에 의한 치료는, 간섬유증의 치유뿐만 아니라, 간재생도 유발하는 것이 분명해졌다. 또한, VA-lip-siRNA_{scramble} 투여군에서 간 줄기세포를 검출할 수 없었던 것(도 3)은, VA-lip-siRNA_{Agp46}에 의한 섬유화 영역의 축소가 간 줄기세포의 증식 및 분화에 깊게 관여하고 있는 것을 시사하고 있다.

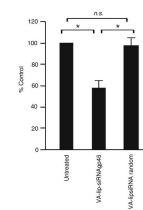
[0150] 도 13A는 억제 효과의 농도에 의한 차이를 나타내는 웨스턴 블로팅의 결과를 나타

낸다. VA-lip-siRNAgp46 처리된 세포에서는 VA-lip-siRNAgp46의 농도 의존적으로 gp46의 발현 억제가 관찰되어 50 nM에 있어서는 거의 완전하게 발현이 억제된 것에 비하여, VA-lip siRNA random 및 Lip siRNAgp46에서는 발현 억제는 관찰되지 않았다.

[0152] 도 14는 미처리 세포, 및 VA-lip siRNAgp46 및 VA-lip siRNArandom 각각으로 처리한 세포의, 72시간 후의 콜라겐 생산량을 정량한 그래프이다. VA-lip siRNAgp46으로 처리했을 경우에, 미처리 세포 및 VA-lip siRNArandom으로 처리한 세포와 비교해서 현저한 콜라겐 생산 억제를 확인할 수 있었다.



도 13A



도 14

[0193] <실시예 5> 줄기세포의 증식·분화용 스페이스의 중요성

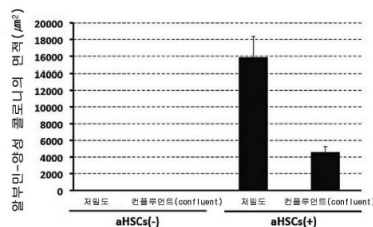
[0194] 활성화간별세포(aHSC)를, 여러 가지의 밀도의 간전구 세포와 공동 배양하여 간전구 세포의 분화에 세포 주위의 스페이스의 유무가 주는 영향을 검토했다. 간전구 세포로는 상기 <실시예 2>로 얻은 GFP 표지 래트 간 줄기세포를, aHSC로는 SD 래트로부터 채취한 HSC를 배양하여 1회 계대 한 것을 각각 이용했다. aHSC는 이하와 같이 채취·배양했다. (중략) 배양 5일째에 계대를 실시해, 상기 세포를 본 실험에 이용했다.

[0195] 세포 배양 인서트(구멍 지름 0.4μm, BD Falcon, Franklin Lakes, 미국) 위에 aHSC를 5×10⁴개/웰(well)의 밀도로 파종하여 인큐베이터내에서 37℃, 5% CO₂에서, DMEM + 10% FBS를 이용해 48시간 배양했다. aHSC 파종의 2일 후에, 간전구 세포를 I형 콜라겐으로 코팅된 커버 유리(IWAKI, Tokyo, Japan)를 넣은 24 웰(well) 플레이트(BD Falcon)에 1×10⁴개/웰(well)(저밀도) 또는 5×10⁵개/웰(well)(컨플루언트(confluent))의 밀도로 파종했다. 그 다음에, aHSC를 포함한 상기 세포 배양 인서트를 24 웰(well) 플레이트의 웰(well)에 삽입하여 인큐베이터 내에서 37℃, 5% CO₂에서 10일간 모두 배양했다(후략).

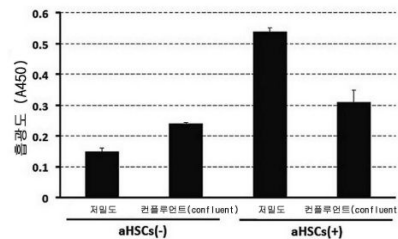
[0196] 공동 배양 10일째, 항알부민 항체(래빗-폴리클로날, MP Biomedicals)로 면역 염색을 실시하여 역상 현미경(Nikon)을 이용해 100배의 배율로 알부민 양성 콜로니를 촬영해서 수

특한 이미지(image)를 기초로 알부민 양성 콜로니의 면적을 NIS-Elements software(Nikon, 일본)를 이용해 산출했다. 그 결과를 도 20에 나타낸다.

[0197] 별도 실험에서는, 공동 배양 10일째에, Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System(Takara, Tokyo, 일본)을 사용하고, 마이크로 플레이트 리더(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, 미국)를 이용해 세포 증식의 측정을 실시했다. 그 결과를 도 21에 나타냈다.



도 20



도 21

[0198] 도 20에 나타내는 결과와 같이, aHSC를, 저밀도로 파종 한 간전구 세포와 공동 배양 하면, 간전구 세포는 다수의 알부민 양성의 간실질 세포로 분화하지만, 간전구 세포가 컨플루언트(confluent)라면, 극히 소수 밖에 간실질 세포로 분화하지 않는 것이 분명해졌다. 또한, 간전구 세포를 단독 배양했을 경우에는, 알부민 양성의 간실질 세포로 분화하지 않았다.

[0199] 또한, 도 21에 나타낸 바와 같이, 간전구 세포를 상기와 동일한 밀도로 파종했을 경우, 그 증식능은 저밀도 조건보다 컨플루언트(confluent) 조건이 낮아지는 것도 분명해졌다.

[0201] 이상의 결과로부터, 활성화별세포가 줄기세포의 증식·분화를 유도하는 것, 및, 줄기세포의 증식·분화에 줄기세포 주위의 물리적 스페이스의 유무가 중요한 영향을 있음이 판명되었다. 이것은, 상기 각 예의 결과를 종합하여 생각하면, 콜라겐 감소 물질에 의해서 섬유화 조직에서 섬유 조직이 축소하여 줄기세포의 주위에 스페이스가 생긴 결과, 줄기세포가 증식·분화하여 정상 조직이 재생하는 것을 나타내는 것이다.

22) 비특허문헌 3이 선행발명이다.

19) 담관 결찰 후 28일째 개체에 대해 줄기세포 이식 후 24시간 후에 투여를 시작하여 12번째의 투여가 종료한 24시간 후가 52 일째인 점(식별번호 [0103], [0110], [0113])을 보면 '2일 간격', 즉 '하루 걸러' 투여한 것을 의미하는 것으로 보이고, 이 사건 출원발명의 대응 미국특허공보에도 'every other day'로 기재되어 있다.

20) '그 그'는 '그'의 오기로 보인다.

21) 'sinusoid'의 오기로 보인다.

22) 간 성상세포(HS 세포, 별세포)의 다른 이름이다.

별지 2

선행발명의 주요 내용

[초록]

현재 간경변증에 대해 승인된 항섬유화 요법은 없다. 본 연구진은 비타민 A가 결합된 리포솜을 사용하여 인간 열충격단백질(heat shock protein, HSP)47의 래트 상동체인 gp46에 대한 소간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA)를 간 성상세포(stellate cell)에 전달했다. 이 접근법은 이들 세포의 섬유화에 대한 주요 역할뿐만 아니라 비타민 A를 흡수 및 저장하는 세포의 기능을 이용한 것이다. siRNA를 함유한 비타민 A-접합 리포솜을 사용한 5가지 치료는 간 섬유화를 거의 완전히 회복시켰고, 디메틸니트로사민(dimethylnitrosamine, DMN)으로 유도된 간경변 래트에서 그렇지 않은 경우 치명적이었을 생존율 용량 및 기간 의존적으로 연장시켰다. 이러한 회복은 비표적(off-target) 효과나 선천성 면역반응과는 관련이 없었다. 수용체-특이 siRNA 전달은 콜라겐 분비, 그리고 CCl₄ 또는 담관 결찰로 유도된 섬유증의 치료에서 비슷하게 효과적이었다. 급성 및 만성 간섬유증 모델을 사용하여 이 접근법의 유효성을 확인한 결과에서는 인간 간경변증을 역전시킬 수 있는 치료 가능성을 시사했다.

[431면]

간경변증 또는 섬유증은 모든 형태의 만성 간 손상에서의 최종적인 병리학적 특징으로, 전 세계적으로 이환율과 사망률에 많은 영향을 미친다. 간 섬유화를 유발하는 주요 세포 유형은 성상(hepatic stellate, HS) 세포로서, 순환하는 비타민 A를 흡수하여 저장하는 간에 상주하는 동주위(perisinusoidal)세포이다. 활성산소 중간체 또는 시토카인에 의해 자극받으면, HS 세포는 활성화되며, 그러면 증식성, 섬유화성 및 수축성 근섬유모세포(myofibroblast)로 전환되어 프로콜라겐을 합성하고 분비하게 되고, 이 프로콜라겐은 프로콜라겐 펩티드에 의해 말단 도메인이 절단된 후 불용성 콜라겐으로 축적되어 섬유증을 유발한다. 콜라겐-특이 샤페론(chaperone)인 열충격단백질 47(HSP47)은 소포체에서 프로콜라겐이 적절한 삼중나선구조를 형성하도록 하여 콜라겐 분비를 촉진하고, 프로콜라겐 합성의 단백질 번역 조절(translational regulation)에도 관여한다.

콜라겐 합성이 억제될 때 동물 및 인간의 간 섬유증이 퇴행될 수 있다는 실증은 섬유증이 역전될 수 있다는 것을 시사하고, 그것은 아마도 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase, MMP)의 활성화에 의한 것일 가능성이 매우 높다. 동물 모델에서 콜라겐 합

성을 억제하거나 MMP를 활성화하기 위한 다양한 치료적 접근법이 연구되었다. 그러나 아직 임상적으로 적용된 치료법은 없으며, 그 원인은 주로 특정 분자 및/또는 세포를 특이적으로 표적화할 수 없어서 발생하는 부작용 때문이다.

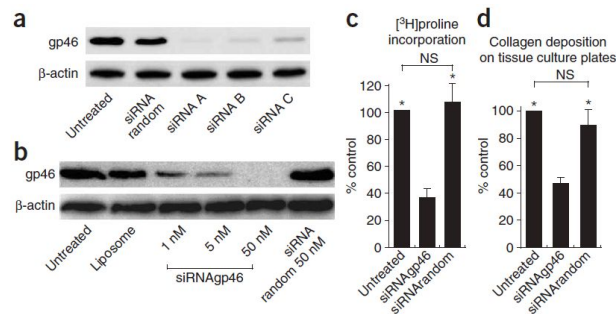
HSP47은 다양한 콜라겐 유형과 특이적으로 연관되어 있어서 siRNA를 사용한 HS 세포 매개의 콜라겐 분비를 표적화하기 위한 탁월한 후보물질이다. 이러한 전략의 특이성을 강화하기 위한 방법으로, 본 연구진은 비타민 A가 결합된 리포솜에 siRNA를 넣어 캡슐화하면, 비타민 A 흡수 용량이 현저하게 큰 HS 세포가 레티놀 결합 단백질(retinol binding protein, RBP)에 대한 수용체를 통해 우선적인 표적이 될 것이라고 추론했다.

DMN, CCl₄ 또는 담관 결찰로 유도한 3가지 간경변 동물 모델을 사용한 조직학적 분석에 따르면, 래트 gp46(HSP47의 상동체)를 암호화하는 mRNA에 대한 siRNA를 포함한 비타민 A-접합 리포솜(VA-lip-siRNA_{gp46})을 정맥내(i.v.) 주입하면 간 섬유증이 빠르게 회복되는 것이 확인되었다. HS 세포와 상응하는 세포는 만성 췌장염 및 후두 섬유증과 관련된 섬유증 유발에 필수적인 역할을 하기 때문에 이러한 접근은 간 이외의 기관에서 섬유증 상태를 치료하는 데 가치가 있을 수 있다.

[결과]

siRNA_{gp46} 은 gp46 발현 및 콜라겐 분비를 억제한다

(전략) 다양한 투여량의 siRNA_{gp46A}로 NRK 세포를 형질전환한 결과, 명백하게 투여량 의존적으로 gp46 발현이 억제되었으며 50nM에서는 발현이 거의 완전히 억제되었다(도1b). 다음으로, 프롤린결합분석법(proline incorporation assay)을 사용하여 siRNA_{gp46A}가 콜라겐 분비를 억제할 수 있는지 조사했다. siRNA_{gp46A}로 형질전환된 NRK 세포의 배양배지 내 새로 합성된 콜라겐의 농도는 부모세포 및 무작위로 선택한 siRNA(siRNA_{random})로 형질전환된 세포의 경우에 비해 유의미하게 감소되었다($P < 0.01$)(도 1c). 배양된 NRK 세포로부터의 콜라겐 분비는 시리우스 레드(Sirius red) 염료 결합 및 분광광도법으로 측정했다. siRNA_{gp46A}로 처리된 NRK 세포의 콜라겐 분비는 처리하지 않은 NRK 세포 또는 siRNA_{random}으로 처리된

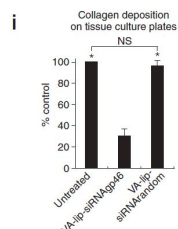


NRK 세포보다 유의미하게 더 적었다($P < 0.01$)(도 1d).

[433면]

VA-lip-siRNA_{Agp46}은 pHS 세포의 콜라겐 분비를 억제한다

랫 pHS 세포에서 콜라겐 분비에 대한 VA-lip-siRNA_{Agp46}의 효과를 확인하기 위해, 조직 배양 플레이트에 침착된 콜라겐의 양을 시리우스 레드 염료결합 및 분광광도법으로 평가했으며, 그 결과 비처리 및 VA-lip-siRNA_{random}을 처리한 경우보다 유의미하게 더 낮았다($P < 0.01$)(그림 1i).



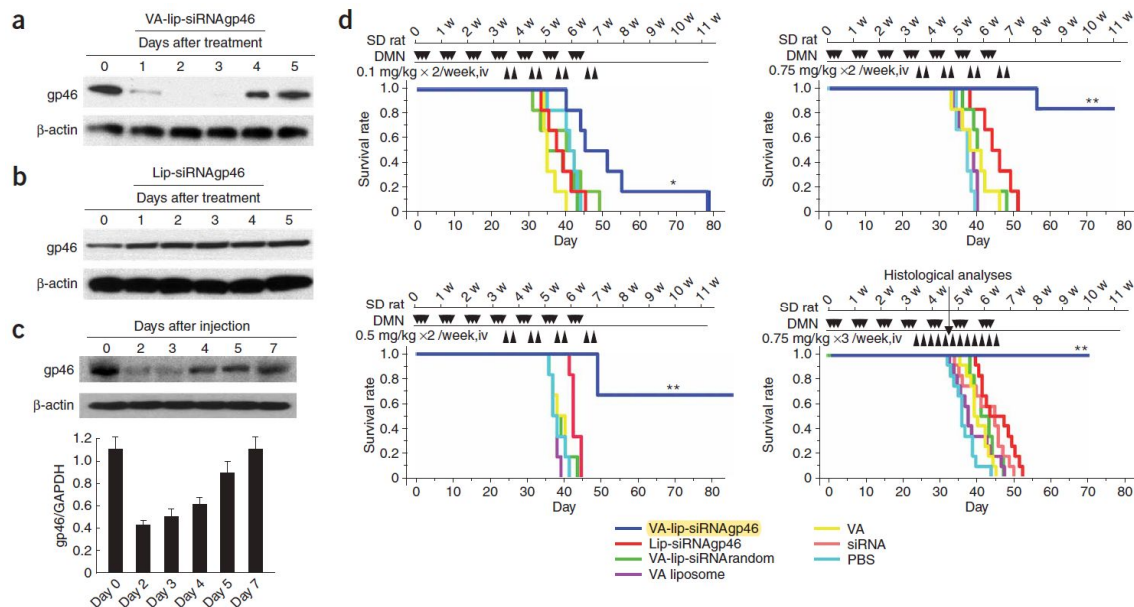
(중략) 생체 내에서 HS 세포에 대한 siRNA_{Agp46}의 특이적 전달을 확인하기 위해, 우리는 VA-lip-siRNA_{Agp46}-Cy5를 주입한 DMN-5 처리 쥐의 간에서 분리한 간세포, HS 세포 및 Kupffer 세포에서 사이닌 5(Cy5) 형광 강도에 대한 FACS 분석을 수행하였다. 우리는 CD163-양성 세포(Kupffer 세포) 또는 알부민-양성 세포(간세포)보다 α-SMA-양성 세포(HS 세포)에서 siRNA_{Agp46}-Cy5가 현저하게 많이 축적된 것이 관찰되었다. (후략)

[435면]

VA-lip-siRNA_{Agp46}의 gp46 억제 지속 시간

siRNA_{Agp46}이 gp46 발현에 미치는 효과 지속 시간을 조사하기 위하여, 시험관 내에서 래트 pHS 세포를 VA-lip-siRNA_{Agp46} 및 lip-siRNA_{Agp46}으로 30분 동안 처리하고(도 3a, b), DMN 래트에게 제24일에 VA-lip-siRNA_{Agp46}을 정맥내 주입했다(도 3c). 래트 pHS 세포 및

DMN 래트의 간 모두에서 적어도 3일 동안 gp46 발현이 억제된 반면(도 3a, c), lip-siRNAgp46으로 처리한 pHs 세포에서는 gp46 발현이 억제되지 않았다(도 3b).



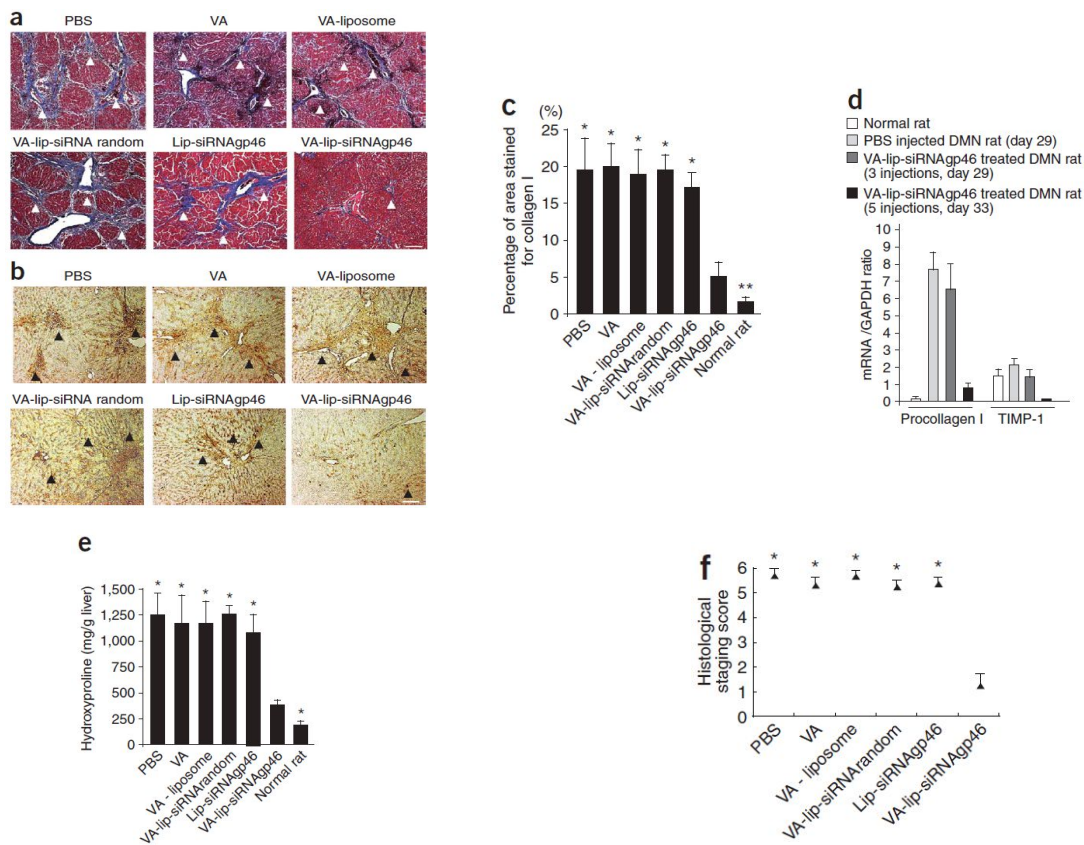
VA-lip-siRNAgp46 i.v. 주입한 DMN 래트의 생존

일반적으로는 치명적인 DMN 처리⁶에 노출된 래트에서 siRNAgp46가 생존에 미치는 효과를 조사했다(그림 3d). 이 일련의 실험에서는 래트에게 DMN을 12회 투여하여 간경변을 유도(제24일)한 후 처치를 시작했다(보충 도 4). 대조군은 PBS, 비타민 A, 비타민 A-결합 리포솜, VA-lip-siRNArandom 또는 lip-siRNAgp46을 1주에 2회 주입했으며, 모두 DMN 처리 후 52 일 이내에 사망했다. DMN 처리 래트는 복수, 위장출혈 및 흑색변이 발생한 것으로 보아 간부전으로 사망한 것으로 보였다(데이터는 표시되지 않음). 대조적으로, VA-lip-siRNAgp46을 1주에 2회 처리한 래트에서는 생존 시간이 용량(0.1, 0.5, 0.75 mg/kg) 의존적으로 연장되었고, 0.75 mg/kg을 처리한 경우의 생존율은 훨씬 더 높았다(83.3%, 5/6 마리의 래트). 0.75 mg/kg 용량을 1주에 3회 투여했을 때 생존율은 100%(12/12 마리)였다(도 3d). 이 결과는 gp46 발현이 siRNAgp46 처리 후 72시간 동안 억제되었지만 4일 이내에 회복되었다는 결과와 일치한다(도 3a, c).

DMN 처리 래트에서 siRNAgp46에 의한 간섬유증 회복

DMN 처리 래트에서 VA-lip-siRNAgp46(0.75 mg/kg)을 5회 투여한 후(제33일) Azan-Mallory(그림 4a) 및 콜라겐 I 염색(그림 4b)으로 간 섬유증을 조사했다. 콜라겐 염색에

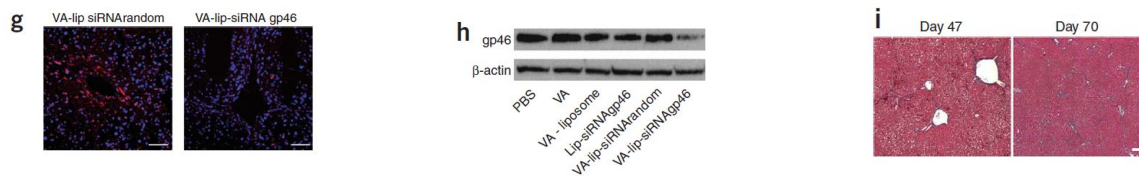
대해 점수화하는 전산화된 이미지 분석을 통해 검출된 섬유화 영역은 대조군 검체에 비해 VA-lip-siRNAgp46 처치 래트의 검체에서 유의하게 더 작았다($P < 0.001$)(그림 4c). 이러한 결과는 VA-lip-siRNAgp46 처치에 의해 제1형 프로콜라겐 및 TIMP-1의 mRNA 발현이 실질적으로 억제된다는 것을 보여준 정량적 RT-PCR 데이터와 일치했다(도 4d). 유사하게, VA-lip-siRNAgp46 처리 래트에서 하이드록시프롤린 수치는 대조군 래트에 비해 유의하게 더 낮았다($P < 0.001$)(도 4e). VA-lip-siRNAgp46 처리 래트에서 병리학적 병기, 즉 섬유증 및 구조적 변화도 명확하게 억제되었다(도 4f).



VA-lip-siRNAgp46 및 VA-lip-siRNArandom을 5회 주입한 래트(제33일)의 간 검체를 gp46에 대해 염색하여 siRNAgp46가 간의 gp46 발현에 미치는 효과도 조사했다. 양성으로 염색된 영역(적색)은 전자에서 실질적으로 더 작았다(그림 4g). 웨스턴 블롯 분석 결과는 면역조직학적 관찰과 일치하여, 대조군에 비해 VA-lip-siRNAgp46 처리 래트에서 gp46 밴드의 강도가 더 약했다(도 4h).[436면]

각각 제44일 및 제46일에 DMN 및 VA-lip-siRNAgp46 처리를 중단한 래트의 제47일 및

제70일 간 검체에서 간경변의 가역성을 조사했다. 제47일 및 제70일 래트의 검체에서 거의 완전히 정상적인 간 구조로 복원된 것이 관찰되어(그림 4i), 간 조직의 재생능을 시사했다.



siRNA_{gp46}에 의한 래트 HS 세포의 세포자멸사(apoptosis) 유도

이 결과로부터 siRNA_{gp46} 처리가 HS 세포의 세포자멸사를 유도할 수 있다고 추측했다. VA-lip-siRNA_{gp46}(0.75 mg/kg 격일로 5 회), PBS, 비타민 A 단독, 비타민 A 결합 리포솜, VA-lip-siRNA random 또는 lip-siRNA_{gp46}을 주입한 DMN 처리 래트로부터, 제33일에 간 검체를 TUNEL 염색하여 세포자멸사를 측정했다(군당 n=3). VA-lip-siRNA random 처리 래트 대비 VA-lip-siRNA_{gp46} 처리 래트에서 HS 세포(α -SMA 양성)와 겹치는 영역 내의 TUNEL 양성 세포가 명백하게 증가되었다(보충 도 5a 온라인). α -SMA 양성 영역 내 TUNEL 양성 세포(보충 도 5b)는 대조군에 비해 VA-lip-siRNA_{gp46} 처리 래트에서 유의하게 증가되었다($P < 0.01$).

HS 세포 배양 실험에서, 세포배양 3일 후, siRNA_{gp46}으로 형질전환된 래트 pHs 세포에서 세포자멸사로 TUNEL 염색된 핵은 대조 HS 세포에 비해 더 많았다(보충 도 5c). siRNA_{gp46}으로 형질전환된 모든 HS 세포핵의 대략 절반(48 ± 12 %)은 세포자멸사한 것으로 보여, 대조 세포에 비해 세포자멸사가 상당히 증가되었다($P < 0.01$)(보충 도 5d). 이러한 결과는 siRNA_{gp46}이 HS 세포의 콜라겐 분비를 억제할 뿐만 아니라 세포자멸사를 통해 섬유화 조직에서 HS 세포를 제거하여, 더 이상 콜라겐이 조직에 축적되지 않도록 차단함을 시사하는 것이다.

[437면]

간 기능에 대한 siRNA_{gp46} 처리의 효과

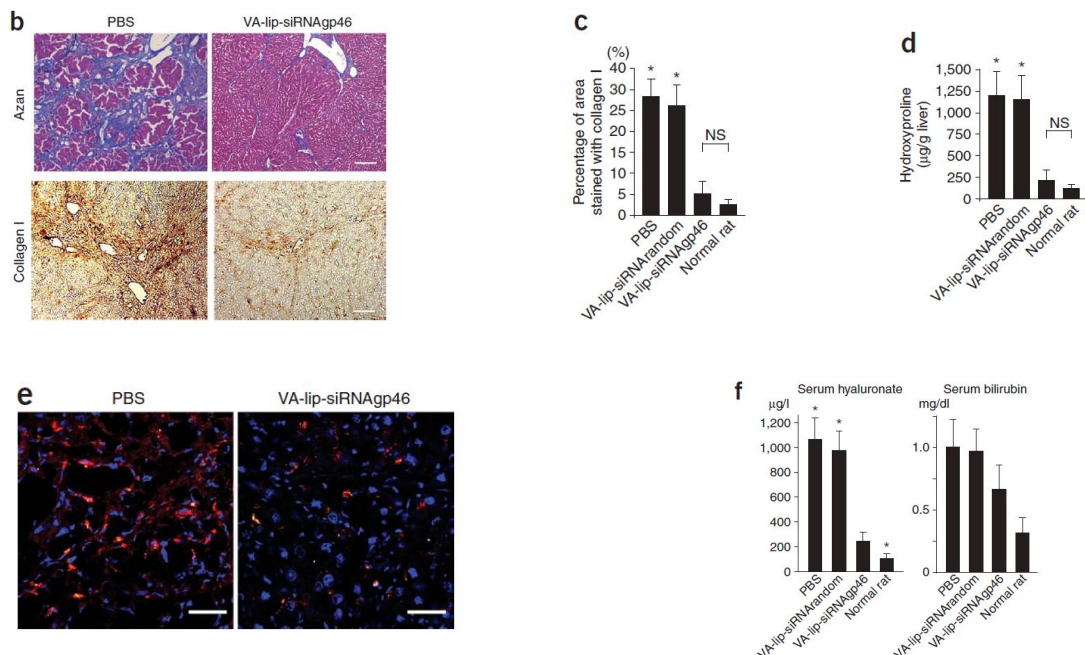
VA-lip-siRNA_{gp46}를 처리한 간경변 래트(제33일)에서 VA-lip-siRNA_{gp46}(0.75 mg/kg, 격일로 5회)는, DMN 노출 동안 상승되었던 혈청 빌리루빈 및 히알루로네이트(hyaluronate)가 대조군의 간경변 래트에 비해 유의하게 감소되었다($P < 0.01$). 제70일에 DMN 처리 래트의 빌리루빈, 히알루로네이트, 알라닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase, ALT) 및 알부민 수준은 VA-lip-siRNA_{gp46} 처리에 의해 거의 또는 완전히 정상화되었다(보충 도 6 온라인).

siRNAgp46 처리한 간경변 래트의 간 콜라게나제 활성

경화된 간에서 콜라겐 용해 활성을 평가하기 위하여 DMN 래트의 간 균질액에서 콜라게나제 활성을 측정했다. PBS 또는 VA-lip-siRNAgp46을 3회 주입한(제29일) DMN 처리 래트의 간 콜라게나제 활성은 정상 간의 경우만큼 높았으며 VA-lip-siRNAgp46으로 5회 처리한(제33일) 후에도 높게 유지되었다(보충 표 3 및 보충 방법).

CCl₄ 유도 간경변에 대한 VA-lip-siRNAgp46의 효과

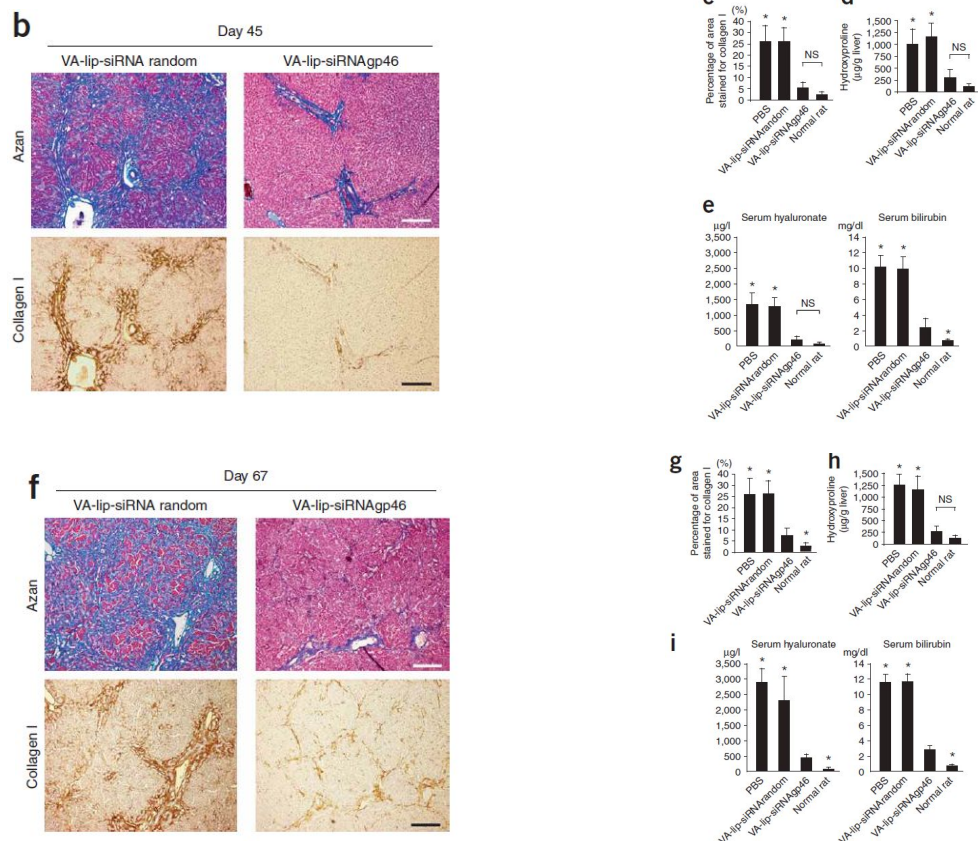
래트에게 CCl₄를 연속적으로 복강 내 투여하면(8주 동안 16회) 치명적이지 않은 간경변이 발생한다. 본 연구진은 이러한 화학적으로 유발된 추가 간경변 모델을 사용하여 siRNAgp46 및 VA-lip-siRNAgp46의 항섬유화 가능성에 대해 평가하기 위하여, 이 간경변 모델에 siRNAgp46 및 VA-lip-siRNAgp46을 1주에 2회, 3주 동안 투여했다(도 5a). 섬유화 부위의 수축(도 5b,c), 히드록시프롤린 수준의 억제(도 5d) 및 gp46 발현 억제(도 5e)와 관련된 siRNAgp46의 효과는 DMN 처리 래트의 경우와 본질적으로 동일했다. CCl₄ 처리된 간경변 래트에서도 VA-lip-siRNAgp46을 처리한 후 빌리루빈과 히알루로네이트 수준이 개선되었다(도 5f).



담관결찰 유도 간경변에 대한 VA-lip-siRNAgp46의 효과

본 연구의 양상이 담즙 역류로 인한 만성적인 연속 자극에 의해 유발된 간경변에도 효과

적인지 확인하기 위하여 담관 결찰술(bile duct ligation, BDL; 도 6a)을 받은 래트¹⁶에게 VA-lip-siRNAgp46을 투여했다. VA-lip-siRNAgp46을 5회 주입한(0.75 mg/kg, 격일) 후 제45일에 관찰한 결과에서 조직학적인 섬유증 개선(도 6b,c) 및 히드록시프롤린(도 6d), 혈청 빌리루빈 및 히알루로네이트의 수준 억제(도 6e)가 명확했다. 이러한 효과는 동일 제제를 1주에 2회 연속 주입한 경우 제67일까지 유지되었지만(도 6f-i), PBS 또는 VA-lip-siRNArandom 처리군에서는 섬유증을 동반한 현저한 담관 증식의 증거가 있어 BDL 자극이 지속되었음을 보여준다.



[438면]

[고찰]

간 섬유증을 치료하기 위한 접근법은 대부분 표적 특이성이 적절하지 못하여 임상적 사용에 대한 적합성이 제한되어 있었다. 본 연구에서 특이성을 보장하기 위해 사용한 2가지 방법의 전략은 다음과 같다: 첫째, 콜라겐에 대해 특이적인 샤페론 분자(gp46)를 siRNA로 표적화하고, 둘째, siRNA를 콜라겐을 생성하는 간 세포에 특이적으로 전달하도록 비타민 A-결합 리

포숨을 사용한다. 이를 통해 DMN 또는 CCl₄ 처리로 유도된 래트 간경변 모델 또는 담관결찰로 유도된 래트 간경변 모델에서 간의 콜라겐 침착을 해소할 수 있었다. DMN 처리 래트에서 siRNAg46 처리에 의해 생존이 용량 및 기간 의존적 방식으로 연장되었으며, 이는 생물학적으로 특이적 효과임을 시사한다. (중략)

다양한 간섬유증 동물모델이 연구된 바 있다. DMN 모델에서 진행성 및 치명적인 섬유증이 유발되기 때문에 본 연구진은 주로 DMN 모델에 초점을 맞추기로 결정했으며, 이를 통해 섬유증 해소에 인한 생존 연장을 입증할 수 있었다. 이러한 결과는 두 가지 모델 즉, 치명적이지 않고 DMN 모델보다 경미한 특징의 CCl₄ 모델과 지속적인 담즙역류 자극으로 만성 간경변을 유발하는 담관 결찰 유도 모델을 사용하여서도 확인했다. **세 가지 모델에 걸친 결과의 일관성은 다양한 유형의 간경변에 대한 본 연구의 접근법의 적용 가능성을 시사한다.**

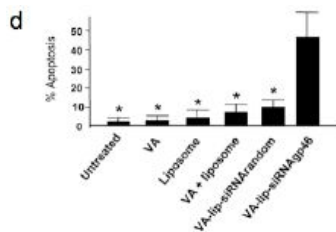
이러한 모델들에서 동물들은 여전히 DMN, CCl₄ 또는 BDL 자극에 노출되었지만, siRNAg46를 5회 주입한 후 섬유증은 퇴행했다. 치료 효과에 대해 기초적인 일차 기전으로 추측되는 것은 siRNAg46에 의해 콜라겐 분비가 억제되고(그림 1c, d, i), 콜라게나제 활성화에 의해 이미 축적된 콜라겐이 동시에 분해되는 것이다. 이 콜라게나제 활성화는 VA-lip-siRNAg46를 5회 처리하여 섬유화가 거의 완전히 사라질 때까지 정상 간에서와 같은 정도로 높게 유지되었다(보충 표 3). 이 결과는 일단 세포에서 매트릭스 메탈로프로테이나제가 분비되면 제1형 콜라겐에 결합하여 지속적으로 세포외 매트릭스 관련 풀을 이룬다는 개념과 일치한다. 또한 고정 부위(콜라겐) 손실로 인한 HS 세포의 세포자멸사가 치료 효과의 이차적 기전으로 간주된다(보조 그림 5). 부수적으로, 엄밀히는 siRNAg46로 인해 것이어서는 안 되는, siRNAg46를 처리한 간에서의 프로콜라겐 I mRNA의 명백한 억제도(그림 4d) 콜라겐을 생산하는 HS 세포가 세포자멸사했기 때문일 수 있다.

세 가지 간경변 모델 모두에서 혈청 빌리루빈 및 히알루로네이트의 수준이 개선되어, 간 문맥 영역에서 섬유증이 해소된 것을 추가로 입증했다. 그러나 DMN 처리 래트에서 혈청 알부민과 ALT의 수준은 VA-lip-siRNAg46 처리에 의해 크게 개선되지 않았다. 제70일에 DMN 처리 래트가 정상적인 간 구조로 회복되었고(그림 4i) 혈청 빌리루빈 및 히알루로네이트뿐 아니라 혈청 알부민 및 ALT의 수준도 거의 완전히 정상화된 것으로 보아, 이는 진행 중인 DMN 처리로 인한 독성효과에 의한 것일 수 있다(보충 그림 6). 따라서 **본 연구에서 사용된 방법은 실제로 간경변을 조직학적 및 기능적으로 역전시킨다.**

이것은 간경변증 치료에 대한 임상 중재 유망성을 강조하는 것이다.

[선행발명의 참고자료]

도 5d. VA-lip-siRNAgp46 처치 유도 간 정상세포의 세포자멸사



도 6. 간경화증 래트의 정맥 주사된 VA-lip-siRNAgp46의 간 기능에 대한 효과

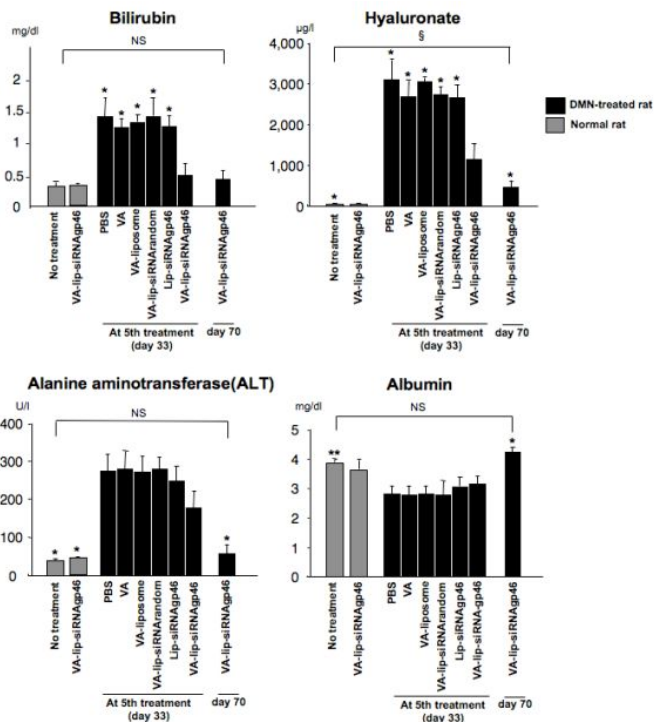


표 3. 래트 간 균질화물의 콜라게나아제 활성

	Collagenase activity (Arbitrary units of fluorescence / mg protein)
Normal rat	21,151 ± 1,408
PBS injected DMN rat (3 injections, day 29)	23,786 ± 3,310
VA-lip-siRNAgp46 treated DMN rat (3 injections, day 29)	23,399 ± 2,673
VA-lip-siRNAgp46 treated DMN rat (5 injections, day 33)	20,100 ± 2,230

Values are mean ± SD (n = 5 per group).