(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-546856
(P2022-546856A)
(43)公表日　令和4年11月9日(2022.11.9)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/28 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/28	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*3/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/04	
Ａ６１Ｐ	*1/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16	

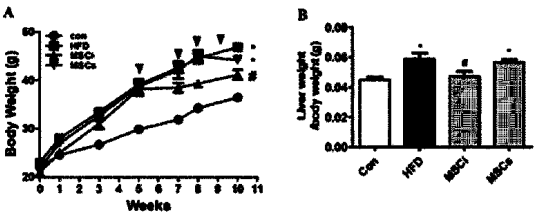
審査請求　有　予備審査請求　未請求　（全19頁）

(21)出願番号　特願2022-515589(P2022-515589)
(86)(22)出願日　令和2年9月7日(2020.9.7)
(85)翻訳文提出日　令和4年3月7日(2022.3.7)
(86)国際出願番号　PCT/KR2020/012045
(87)国際公開番号　WO2021/045595
(87)国際公開日　令和3年3月11日(2021.3.11)
(31)優先権主張番号　10-2019-0110968
(32)優先日　令和1年9月6日(2019.9.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　516172857
インダストリー－アカデミック コーオペレイション ファウンデーション キョンサン ナショナル ユニバーシティ
大韓民国 ６６０－７０１ キョンサンナムード チンジュ－シ チンジュ－デロ ５０１
(71)出願人　521483054
ステムセントリック カンパニー リミテッド
大韓民国、１４０６７、キョンギ－ド、アニャンシ、トンアンク、シミンデロ２３０、Ｄ－２４４９
(74)代理人　100107582
弁理士　関根 毅
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　歯周組織由来の多分化能幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物

(57)【要約】
本発明は、ガラス化凍結保存された歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物に関する。本発明の肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物は、体重減少、血清アジポカイン濃度の減少、肝臓の組織学的提示の回復、および肝臓内脂質代謝酵素を改善し、肥満または非アルコール性脂肪肝に対する著しい予防及び治療効果を示す。また、本発明の有効成分である歯周組織由来の間葉系幹細胞は、安全性が検証された中胚葉性幹細胞であり、且つ最も非侵襲的な方法で細胞を得ることができ、肥満または非アルコール性脂肪肝に対する細胞治療剤として有用に使用されることが期待される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物。
【請求項２】
前記歯周組織は、幼歯または永久歯の歯髄組織、歯周靭帯組織、歯小嚢組織、歯胚幹組織、および根尖乳頭組織からなる群から選択される少なくとも１つであることを特徴とする、請求項１に記載の肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物。
【請求項３】
前記歯周組織は、親知らず（ｗｉｓｄｏｍ　ｔｅｅｔｈ）の周囲組織であることを特徴とする、請求項１に記載の肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物。
【請求項４】
前記歯周組織は、ガラス化凍結保存されていることを特徴とする、請求項１に記載の肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物。
【請求項５】
歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む、肥満または非アルコール性脂肪肝治療用幹細胞治療剤。
【請求項６】
前記歯周組織は、幼歯または永久歯の歯髄組織、歯周靭帯組織、歯小嚢組織、歯胚幹組織、および根尖乳頭組織からなる群から選択される少なくとも１つであることを特徴とする、請求項５に記載の肥満または非アルコール性脂肪肝の治療用幹細胞治療剤。
【請求項７】
歯周組織由来の間葉系幹細胞を個体に処理する工程を含む、肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療方法。
【請求項８】
歯周組織由来の間葉幹細胞の肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬としての使用。
【請求項９】
肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬製剤を生産するための、歯周組織由来の間葉系幹細胞の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ガラス化凍結保存された歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
肥満（Ｏｂｅｓｉｔｙ）は、体内に過剰エネルギーが脂肪として蓄積され、体脂肪が異常に多くなり、代謝異常が誘発され、現れる現象である。これは、神経内分泌、薬物、活動量の減少、遺伝的疾患が原因と推定される。肥満は、糖尿病、心臓病、高血圧、脳卒中などの合併症を引き起こす原因として認識される慢性疾患であり、主に食欲抑制剤と脂肪吸収阻害剤を通じた治療が行われる。一方、このような肥満症の薬物療法を施す際には、肥満症薬物の副作用の側面で、依存性、心血管疾患のリスク及び気分障害等が発生するおそれがあることを念頭に置かなければならない。例えば、食欲抑制剤であるシブトラミン（ｓｉｂｕｔｒａｍｉｎｅ）は、国内抗肥満薬市場の代表的な治療剤であったが、心血管疾患のリスクを高める可能性があり、販売中止されている。したがって、副作用が少なく、かつ肥満を誘発する病態生理の工程を効果的に調節できる治療剤の開発が切実である。
【０００３】

非アルコール性脂肪肝疾患（ｎｏｎ－ａｌｃｏｈｏｌｉｃ ｆａｔｔｙ ｌｉｖｅｒ ｄｉｓｅａｓｅ，ＮＡＦＬＤ）は、慢性肝疾患の中で最も一般的な疾患であり、２型糖尿病、肥満および代謝症候群と密接な関係があることが知られている。欧米化した食習慣及び肥満、糖尿病人口の増加に伴い韓国でも非アルコール性脂肪肝疾患の患者が急増しており、グローバルデータ（Ｇｌｏｂａｌ ＤＡＴＡ）社によれば、非アルコール性脂肪肝治療剤市場は、来る２０２６年までに約２５３億ドルの規模に達すると見込まれている。これは年平均４５％ずつの成長数値である。しかし、非アルコール性脂肪肝疾患は、正確な病理機転が究明されておらず、今日まで報告された薬物治療の効果においても、研究対象数が十分になく、まだ公式的な承認治療薬もないのが実情である。したがって、長期間使用しても安定性が確保され、ＮＡＦＬＤに対する明確な治療効果を発揮することができる新しい治療法が必要とされる。

【０００４】

一方、歯周組織由来の間葉系幹細胞（ｄｅｎｔａｌ ｔｉｓｓｕｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ）は、間葉系幹細胞の一種であって、近来の研究によれば、間葉系幹細胞は中胚葉だけでなく外胚葉（主に神経細胞）あるいは内胚葉（肝細胞、膵臓細胞など）にも分化し得ることが明らかになり、多分化能（Ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｃｙ）を有するものと認められている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

そこで、本発明者らは、肥満または非アルコール性脂肪肝の新規な治療剤の開発を試みたところ、ガラス化凍結保存された歯周組織由来の間葉系幹細胞を高脂肪食動物モデルに投与した後、体重減少、血清アジポカイン濃度の減少および肝臓の組織学的提示が回復されており、肥満または非アルコール性脂肪肝の改善に効果的であることが確認され、本発明を完成するに至った。

【０００６】

したがって、本発明の目的は、歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物を提供するものである。

【０００７】

本発明のもう一つの目的は、歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝治療用幹細胞治療剤を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

前記目的を達成するために、本発明は、歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物を提供する。

【０００９】

また、本発明は、歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝を治療するための幹細胞治療剤を提供する。

【００１０】

また、本発明は、歯周組織由来の間葉系幹細胞を個体に処理する工程を含む、肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療方法を提供する。

【００１１】

また、本発明は、歯周組織由来の間葉系幹細胞の肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬としての使用を提供する。

【００１２】

また、本発明は、肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用の医薬製剤を生産するための、歯周組織由来の間葉系幹細胞の使用を提供する。

【発明の効果】

【００１３】

本発明の肥満、非アルコール性脂肪肝の予防、または治療用薬学的組成物は、体重減少

、血清アジポカイン濃度の減少、肝臓の組織学的提示の回復、および肝内脂質代謝酵素を改善させ、肥満または非アルコール性脂肪肝に対する著しい予防及び治療効果を示す。また、本発明の有効成分である歯周組織由来の間葉系幹細胞は、安全性が検証された中胚葉性幹細胞であり、且つ最も非侵襲的な方法で細胞が得られるので、肥満または非アルコール性脂肪肝に対する細胞治療剤として有用に使用されることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【００１４】

【図１】対照群と高脂肪食で肥満およびＮＡＦＬＤが誘導された各実験群マウスの体重（Ａ）、肝組織（Ｂ）の重さを測定した結果を示すものである（＊ｐ＜０．０５、対照群と比較；＃ｐ＜０．０５、ＨＦＤ群と比較）。

【図２】対照群と各実験群マウスの肝組織の組織学的分析結果を示すものであり、各欄に該当するＨ＆Ｅ染色の結果は、それぞれ互いに異なるマウスの組織学的提示を示す（スケールバー＝５０μｍ、倍率＝ｘ４００）。

【図３】肝組織に対するウエスタンブロット結果を示したものであり、肝組織におけるアンドロゲン受容体（ａｎｄｒｏｇｅｎ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ，ＡＲ）発現程度を確認した結果（Ａ）及び前記発現量を定量化した結果（Ｂ）に該当する（＊ｐ＜０．０５、対照群と比較；＃ｐ＜０．０５、ＨＦＤ群と比較）。

【図４】肥満指標である血清アジポカイン（ａｄｉｐｏｋｉｎｅ）の水準に対するＥＬＩＳＡ分析の結果を示す図である（＊ｐ＜０．０５、対照群と比較；＃ｐ＜０．０５、ＨＦＤ群と比較）。

【発明を実施するための形態】

【００１５】

本発明は、歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物を提供する。

【００１６】

以下、本発明を詳細に説明する。

【００１７】

本明細書にて他に定義されていない用語は、本発明が属する技術分野における通常使用される意味を有するものである。

【００１８】

本発明において、用語「幹細胞（ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ）」とは、組織を構成する各細胞に分化（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ）される前工程の未分化細胞を総称するもので、特定分化刺激（環境）により特定細胞に分化が進む細胞を意味する。

【００１９】

本発明において、用語「間葉系幹細胞（ＭＳＣｓ）」は、間葉系幹細胞または成体幹細胞とも呼ばれ、胚以外の組織から単離および培養された幹細胞を称するものである。間葉系幹細胞は、すでに分化が完了したほとんどの組織に少量存在するものであって、今まで臍帯血、臍帯、歯、目、胎盤、毛包、肺、肝臓など研究されたほぼすべての組織からその存在が確認されている。

【００２０】

本発明において、用語「歯周組織由来の間葉系幹細胞」とは、歯および歯周組織由来の成体幹細胞、間葉系幹細胞と形態が類似する細胞（ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ）－ｌｉｋｅ　ｃｅｌｌｓ）を全て含む概念であり、骨髄や臍帯などに存在する他の成体幹細胞に比べて組織の損傷を最小化し（非侵襲的）、容易に得ることができる利点があり、本発明の有効成分として使用した。前記歯周組織は、これに制限されるものではないが、幼歯または永久歯の歯髄組織、歯周靭帯組織、萌出中の歯小嚢組織、歯胚幹組織、未成熟永久歯の歯間乳頭組織であってもよく、好ましくは親知らず（ｗｉｓｄｏｍ　ｔｅｅｔｈ）周囲の組織であってもよい。

【００２１】

また、前記組織は、間葉系幹細胞を含むことを特徴とすることができ、前記間葉系幹細

胞は、歯髄幹細胞（ｄｅｎｔａｌ ｐｕｌｐ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ、ＤＰＳＣｓ）、脱落乳歯幹細胞（ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ｈｕｍａｎ ｅｘｆｏｌｉａｔｅｄ ｄｅｃｉｄｕｏｕｓ ｔｅｅｔｈ、ＳＨＥＤｓ）、歯周靭帯幹細胞（ｐｅｒｉｏｄｏｎｔａｌ ｌｉｇａｍｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ、ＰＤＬＳＣｓ）、歯小嚢幹細胞（ｄｅｎｔａｌ ｆｏｌｌｉｃｌｅ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ、ＤＦＳＣｓ）および根尖乳頭組織（ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ａｐｉｃａｌ ｐａｐｉｌｌａ，ＳＣＡＰ）からなる群から選択される少なくとも１つであることができるが、これに限定されるものではない。

【００２２】

なお、このような歯周組織由来の間葉幹細胞は、インプラント周囲炎、神経損傷、歯槽骨消失などを治療または改善させるために、再生医療的に臨床に適用されたことがあるが、現在まで肥満または非アルコール性肝疾患に対する医学的効果については報告されたことがない。

【００２３】

本発明において、前記人体から分離した歯周組織は、ガラス化凍結保存されたことを特徴とし、前記ガラス化凍結保存方法は、本発明者らの先行特許である韓国登録特許第１０－１５５１９００号に開示された方法を用いることができる。

【００２４】

本発明において、間葉系幹細胞の単離方法は、当業界に公知された方法を制限なく使用することができ、例えば、歯周組織から単離され、精製することができ、単離された間葉系幹細胞は、必要に応じて培養することができる。

【００２５】

本発明において、前記肥満は、韓国肥満学会で提示した肥満基準である体脂肪指数２５ｋｇ／ｍ^{2}以上であることを意味し、これに伴う動脈硬化、２型糖尿、心筋梗塞を含む、各種代謝症候群及び心血管疾患を意味するが、これに限定されるものではない。

【００２６】

また、前記非アルコール性脂肪肝疾患（ｎｏｎ－ａｌｃｏｈｏｌｉｃ ｆａｔｔｙ ｌｉｖｅｒ ｄｉｓｅａｓｅ，ＮＡＦＬＤ）は、アルコールに起因しない肝細胞内の脂肪含有量が肝臓の重さの５％以上である場合であり、肝組織内の脂肪（トリグリセリド、脂肪酸など）の単純な蓄積が起こった状態、肝脂肪症（ｈｅｐａｔｉｃ ｓｔｅａｔｏｓｉｓ）状態、肝組織内の脂肪蓄積が激しくなった結果、肝組織内に炎症反応が起こった疾患状態を意味するが、これに限定されるものではない。

【００２７】

本発明において、「歯周組織由来の間葉幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物」は、歯周組織由来の間葉幹細胞自体であってもよく、歯周組織由来の中間葉幹細胞以外に培養液、幹細胞培養時、当業界で一般に用いられる物質を含む組成物を含むものである。また、歯周組織由来の間葉幹細胞が分泌する物質または歯周組織由来の間葉幹細胞から抽出した物質を、歯周組織由来の間葉幹細胞を代替して用いることも含むという意味である。

【００２８】

本発明において、前記薬学的組成物は、歯周組織由来の間葉系幹細胞以外に薬学的に許容可能な通常の担体を含むことができ、注射剤の場合、保存剤、無痛化剤、可溶化剤または安定化剤、局所投与用製剤の場合には、基剤、賦形剤、潤滑剤または保存剤などを含むことができる。

【００２９】

本発明の薬学的組成物に含まれる薬学的に許容される担体は、製剤時に通常用いられるものであり、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギネート、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、

ステアリン酸マグネシウムおよびミネラルオイルなどを含むが、これらに限定されるものではない。本発明の薬学的組成物は、前記成分以外に、潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤などをさらに含むことができる。

【００３０】

本発明の薬学的組成物は、当該発明が属する技術分野における通常の知識を有する者が容易に実施することができる方法により、薬学的に許容される担体及び／又は賦形剤を用いて製剤化することにより単位用量形態で製造する、又は多容量容器内に内入させて製造することができる。このとき、剤形は油または水性媒体中の溶液、懸濁液または乳化剤の形態であってもよく、分散剤または安定化剤をさらに含むことができる。

【００３１】

本発明の薬学的組成物は、非経口で投与することができ、静脈内、皮下、腹腔内投与または局所適用が可能であり、本発明による組成物の非経口投与用組成物（例えば、注射剤）は、薬学的に許容可能な担体、例えば、滅菌精製水、約ｐＨ７の緩衝液、または生理食塩水中に分散および／または溶解して生体内に注入することができ、必要であれば保存剤、安定性化剤などの通常の添加剤を含むことができる。

【００３２】

また、本発明において間葉系幹細胞の量は、10^{4}～10^{10}ｃｅｌｌｓ／回投与することができ、好ましくは10^{5}～10^{9}ｃｅｌｌｓ／回投与することができ、より好ましくは10^{6}～10^{8}ｃｅｌｌｓ／回、最も好ましくは５×10^{7}～10^{8}ｃｅｌｌｓ／回投与することができるが、これらに限定されるものではない。前記用量は、製剤化方法、投与方法、患者の年齢、体重、健康状態、食品、投与時間、投与経路、排泄速度および反応感受性などの要因によって様々に処方することができる。

【００３３】

本発明において、前記薬学的組成物は、体重減少、血中アジポカイン濃度を減少させ、肝臓の組織学的回復を誘導し、高脂肪食摂取又は代謝症候群によって発生した肥満又はそれに伴う非アルコール性脂肪肝を改善させることができることを特徴とするとする。

【００３４】

本発明の一実施形態では、歯周組織由来の間葉幹細胞を投与する場合、高脂肪食動物モデルの体重が減少し、肝組織の脂肪沈着所見が著しく改善され、血清アジポカインであるＴＮＦ－αとＩＬ－１βが減少し、肥満および非アルコール性脂肪肝を改善させることができることを確認した。なお、血清アジポカインは、肥満状態で活性化された脂肪細胞（ａｄｉｐｏｃｙｔｅｓ）から分泌され、ＴＮＦ－αとＩＬ－１βを含む炎症性サイトカイン（ｐｒｏｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　ｃｙｔｏｋｉｎｅｓ）からなる。非アルコール性脂肪肝の場合、肝臓にて局所的に肥満と類似する病理学的症状が現れると報告されているが、前記の結果により、本発明による歯周組織由来の間葉幹細胞は、脂肪代謝活性化を通じてアジポカイン濃度を減少させ、これにより肥満または非アルコール性脂肪肝を予防または治療することができる。

【００３５】

本発明の薬学的組成物は、肥満または非アルコール性脂肪肝の予防および治療のために単独で、または当業界で公知の肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療方法と併用して用いることができる。

【００３６】

また、本発明は、歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝を治療するための幹細胞治療剤を提供する。

【００３７】

本発明において、前記歯周組織はこれに限定されるものではないが、幼歯または永久歯の歯髄組織、歯周靭帯組織、萌出中の歯小嚢組織、歯胚幹組織、未成熟永久歯の根尖乳頭組織であってもよく、好ましくは、親知らず（ｗｉｓｄｏｍ　ｔｅｅｔｈ）の周囲の組織であってもよい。

【００３８】

本発明において、用語「細胞治療剤」とは、ヒトから単離、培養及び特殊な操作により作製された細胞及び組織で治療、診断及び予防の目的で使用される医薬品（米国ＦＤＡ規定）であり、細胞又は組織の機能を回復させるために生きている自己、同種または異種細胞をインビトロで増殖、選別、または他の方法で細胞の生物学的特性を変化させるなどの一連の行為を通じて、治療、診断および予防の目的で使用される医薬品をいう。

【００３９】

本発明にて使用される用語「予防」とは、本発明による薬学的組成物又は幹細胞治療剤の投与により肥満または非アルコール性脂肪肝を抑制する、または進行を遅延させる全ての行為を意味する。

【００４０】

本発明にて使用される用語「治療」とは、本発明による薬学的組成物または幹細胞治療剤の投与によって肥満または非アルコール性脂肪肝が好転または有利に変更されるすべての行為を意味する。

【００４１】

また、本発明は、歯周組織由来の間葉系幹細胞を個体に処理する工程を含む、肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療方法を提供する。

【００４２】

また、本発明は、歯周組織由来の間葉系幹細胞の肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬としての使用を提供する。

【００４３】

また、本発明は、肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用の医薬製剤を製造するための歯周組織由来の間葉系幹細胞の使用を提供する。

【実施例】

【００４４】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の要旨によって本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されないことは当業界で通常の知識を有する者にとって自明である。統計分析は、ＳＰＳＳ（ＳＰＳＳ Ｉｎｃ．，Ｃｈｉｃａｇｏ，ＩＬ，ＵＳＡ）を用いてｏｎｅ－ｗａｙ ＡＮＯＶＡ ｆｏｌｌｏｗｅｄ ｂｙ Ｔｕｋｅｙ’ｓ ｔｅｓｔに従って行われた。結果は平均±標準誤差で表した。Ｐ＜０．０５である場合、有意であると判断した。

【００４５】

実施例１．歯周組織由来の間葉系幹細胞の準備

すべての化学物質は、ＳｉｇｍａＡｌｄｒｉｃｈ(R)（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）から購入し、培地は、Ｇｉｂｃｏ Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ，ＵＳＡ）から購入して使用した。歯周組織由来の間葉系幹細胞を得るために、本発明者らは、新しい凍結プロトコルを確立し、これをガラス化凍結保存方法と命名した。この方法は、エチレングリコール（Ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）、スクロース（Ｓｕｃｒｏｓｅ）およびグルコースを含有する組織のガラス化凍結保存用組成物を用いて組織内の細胞を効果的に保存するためのものであって、本発明者らの先行特許である韓国登録特許第１０－１５５１９００号に開示されており、これは全体として本明細書の参照として引用される。

【００４６】

より具体的には、２０歳前後の埋伏歯の患者から抜歯後、廃棄される歯周組織を慶尚大学病院の口腔顎顔面外科から提供を受けて用いており、滅菌メスを用いて抽出された親知らずから歯組織を単離し、ガラス化凍結させ、少なくとも３ヶ月間保管した後、解凍した。組織解凍時、液体窒素に貯蔵された凍結用チューブを３７℃の水で１～２分間解凍した後、凍結保存剤を完全に除去するために１００Ｕ／ｍｌペニシリン／ストレプトマイシン、０．２５μｇ／ｍｌアムホテリシンＢ（ａｍｐｈｏｔｅｒｉｃｉｎ Ｂ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含むＤＰＢＳを用いて、１５００ｒｐｍで５分間遠心分離し、数回洗浄した

。前記歯周囲組織から間葉系幹細胞（ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ）を単離するために、Ｃｏｌｌａｇｅｎａｓｅ　ｔｙｐｅ　ＩＶ（Ｓｉｇｍａ、ＵＳＡ）を３０分間酵素処理した。処理した組織を１００μｍ　ｃｅｌｌ　ｓｔｒａｉｎｅｒ（ＢＤ　ＦａｌｃｏｎＴＭ、ＵＳＡ）、４０μｍ　ｃｅｌｌ　ｓｔｒａｉｎｅｒ（ＢＤ　ＦａｌｃｏｎＴＭ、ＵＳＡ）にそれぞれ１回ろ過した後、１５ｍｌコニカルチューブ（１５ｍｌ　ｐｏｌｙｐｒｏｐｉｌｅｎｃｏｎｉｃａｌ　ｔｕｂｅ；ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ　ＴＭ，ＵＳＡ）に移した後、ペニシリン／ストレプトマイシン、アムホテリシンＢ（ａｍｐｈｏｔｅｒｉｃｉｎ　Ｂ，Ｇｉｂｃｏ，ＵＳＡ）を含むＤＰＢＳを用いて、１５００ｒｐｍで５分間遠心分離して２回洗浄した。

【００４７】

１０％ＦＢＳ（ｆｅｔａｌ　ｂｏｖｉｎｅ　ｓｅｒｕｍ）、１％Ｌ－グルタミン（Ｇｌｕｔａｍａｘ^{TM}および１％ペニシリン／ストレプトマイシンを含む４ｍＬ　ＤＭＥＭ（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ’ｓ　Ｍｅｄｉｕｍ）を用いて２５Ｔ－フラスコ（ｕｎｃＴＭ，Ｒｏｓｋｉｌｄｅ，Ｄｅｎｍａｒｋ）内で５％ CO_2、３７℃と湿った（ｈｕｍｉｄｉｔｙ）条件で前記ガラス化凍結保存された歯周組織に由来する間葉系幹細胞を培養した。培地は３日に１回ずつ交換した。

【００４８】

動物に投与する直前に、継代培養４～５回の細胞を０．２５％トリプシン／ＥＤＴＡで培養容器の底部から剥離してから、ＤＰＢＳで洗浄した。血球計数器（ｈｅｍｏｃｙｔｏｍｅｔｅｒ）を用いて分離した細胞を計数し、細胞1×10^6個を冷ＤＰＢＳ２００μｌに希釈し、その後の実験に使用した（以下、ＭＳＣｓという）。

【００４９】

実施例２．高脂肪食摂取による動物モデルの作製

２０～２２ｇの８週齢オスＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス４０匹をＣｅｎｔｒａｌ　Ｌａｂ　Ａｎｉｍａｌ　Ｉｎｃ．（Ｓｅｏｕｌ、Ｋｏｒｅａ）から購入して使用した。すべてのマウスは１２時間の明暗サイクルを維持し、部屋の温度は２５±２℃、湿度３０～４０％で飼育し、水と食物に自由にアクセス可能にした。マウスはランダムに以下の４つのグループに分けられた：１．対照群（Ｃｏｎ）（ｎ＝１０）：１０週間正常食

２．ＨＦＤ群（ｎ＝１０）：１０週間６０ｋｃａｌ％の脂肪を含む高脂肪食が＋１０週後に２００μｌ　ＰＢＳ腹腔内投与

３．ＭＳＣｉ群（ｎ＝１０）：１０週間６０ｋｃａｌ％の脂肪を含む高脂肪食＋高脂肪食が５週、７週、及び９週後、1×10^6／２００μｌ　ＭＳＣｓをそれぞれ腹腔内投与

４．ＭＳＣｓ群（ｎ＝１０）：１０週間６０ｋｃａｌ％の脂肪を含む高脂肪食＋高脂肪食が８週後に1×10^6／２００μｌ　ＭＳＣｓを５日連続腹腔内投与。

【００５０】

毎週、全てのマウスの体重を測定し、１０週間後、０．５μＬ／ｇ　ｔｈｉｂｅｔａｎｕｓ－ｊａｐｏｎｉｃｕｓ（Ｚｏｌｅｔｉｌ$^{(R)}$および０．５μＬ／ｇ　ｘｙｌａｚｉｎｅ（Ｒｏｍｐｕｎ，Ｂａｙｅｒ　Ｋｏｒｅａ　Ｌｔｄ．，Ｓｅｏｕｌ，Ｋｏｒｅａ）を注入して犠牲にした。心臓穿刺（ｃａｒｄｉａｃ　ｐｕｎｃｔｕｒｅ）によりマウスの血液を採取し、ヘパリンを含むＰＢＳで灌流して残留血液を除去した。肝組織を収得し、組織重さ／体重を計算するために重さを測定した。すべての動物実験は、慶尚大学の実験動物処置と使用に向けたガイドラインに従って実行した。その結果を図１に示す。

【００５１】

図１のＡに示すように、ＨＤＦ群の体重は、高脂肪食が３週間から対照群より有意に高かった（ｐ＜０．０５）。ＭＳＣｉ群の体重は、ＭＳＣの初回投与時、ＨＦＤ群と比較して体重が著しく低かった（ｐ＜０．０５）。肝臓重さの場合、図１のＢに示すように、ＨＦＤ群の肝臓重さは対照群と比較して有意に増加し（ｐ＜０．０５）、ＭＳＣｉ群はＨＦＤ群と比較して有意に減少した肝臓重さを示しており（ｐ＜０．０５）、一方、ＭＳＣ群は、ＨＦＤ群と比較して有意な差異を示さなかった。

【００５２】

実施例３．ＭＳＣ投与前後の組織学的分析

肝臓に対する歯周組織由来の間葉系幹細胞の治療効果を確認するために、組織学的分析を行った。肝臓組織を４％ホルムアルデヒドに固定し、脱水した後、パラフィンに入れ、５μm厚の切片に切断した。キシレン（ｘｙｌｅｎｅ）を用いて組織切片からパラフィン成分を除去した後、エタノールで再水和（ｒｅｈｙｄｒａｔｉｏｎ）した後、Ｈ＆Ｅ（ｈｅｍａｔｏｘｙｌｉｎ ａｎｄ ｅｏｓｉｎ）で染色した。染色された全ての組織は、脱水、洗浄過程を経て、ｐｅｒｍｏｕｎｔ（Ｆｉｓｈｅｒ ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，ＮＨ，ＵＳＡ）でマウントした後、光学顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ Ｅｃｌｉｐｓｅ ８０ｉ）およびＰｈｏｔｏ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｃａｎｏｎ ６００Ｄ）で染色度合いを確認した。その結果を図２に示す。

【００５３】

図２に示すように、肝組織の組織学的分析の結果、対照群は、正常肝組織の特性を示すのに対し、ＨＦＤ群は、大滴性脂肪変性（ｍａｃｒｏｖｅｓｉｃｕｌａｒ ｓｔｅａｔｏｓｉｓ）および深刻な症状である微小空胞変性（ｍｉｃｒｏｖｅｓｉｃｕｌａｒ ｓｔｅａｔｏｓｉｓ）がすべて現れることを確認した。微小空胞変性は、ＮＡＦＬＤの組織学的特徴に該当する。一方、ＭＳＣｓおよびＭＳＣｉ群の両方で深刻な脂肪沈着所見を示した肝組織が幹細胞投与後、正常モデルと同様の水準に回復して肝脂肪症が改善されることを確認し、特にＭＳＣｉ群がＭＳＣｓ群より著しく改善されることを確認した。

【００５４】

実施例４．ＭＳＣ投与による脂質恒常性の評価

４－１．ウェスタンブロット

脂質恒常性（ｌｉｐｉｄ ｈｏｍｅｏｓｔａｓｉｓ）に対する歯周組織由来の間葉系幹細胞投与の効果を確認するために肝組織に対してウェスタンブロットを行い、肝臓と脂肪組織において脂質酸化を介して脂肪分解を誘導するアンドロゲン受容体（ａｎｄｒｏｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ、ＡＲ）の発現程度を分析した。各実験群の肝臓組織を収集し、使用前まで－８０℃に保存した。各組織をＲＩＰＡ緩衝液（ＰＩＥＲＣＥ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ，ＵＳＡ）を用いて溶解（ｌｙｓｅｄ）し、抽出したタンパク質をＢＣＡタンパク質分析キット（ＰＩＥＲＣＥ）を用いて定量した。タンパク質５０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥにロードし、ニトロセルロース膜（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ，ＵＳＡ）に移した。前記膜を１：１０００に希釈した一次モノクローナル抗アンドロゲン受容体（ａｂ１３３２７３、Ａｂｃａｍ）、１：５０００で希釈したベーター－アクチン（ａ５４４１、ｓｉｇｍａ）で４℃で一晩反応させた。その後、０．１％ＴＢＳＴで３回洗浄した後、１：１００００で希釈したＨＲＰ－結合ヤギ抗－マウス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ヤギ抗－ラビット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）二次抗体を加えて１時間室温で反応させた。膜は、ＥＣＬ ｋｉｔ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ，ＵＳＡ）を用いて現像し、ＩｍａｇｅＪ ｓｏｆｔｗａｒｅ（ＮＩＨ、ＵＳＡ）を用いてベーター－アクチンに対する標的タンパク質の光学密度（ｏｐｔｉｃａｌ ｄｅｎｓｉｔｙ）を測定した。その結果を図３に示す。

【００５５】

図３に示すように、肝臓におけるＡＲの濃度は有意に減少したが（ｐ＜０．０５）、ＭＳＣ投与後に有意に増加することが確認された。以上の結果から、脂質酸化を含む脂質代謝は、ＡＲ回復を介して肝臓組織で増加することが確認された。

【００５６】

４－２．ＥＬＩＳＡ

体重減少及びＡＲ発現回復との間の関連性を確認するために、肥満指標である血清アジポカイン（ａｄｉｐｏｋｉｎｅ）の水準をＥＬＩＳＡ法で測定した。実施例２に記載の方法で心臓穿刺（ｃａｒｄｉａｃ ｐｕｎｃｔｕｒｅ）してマウスの血液を収集し、４００×Ｇで１０分間遠心分離して血清を収集し、使用前まで－８０℃に保存した。歯周組織由来の間葉系幹細胞が高脂肪食によって誘発される肥満および非アルコール性脂肪肝を改善

することができることを確認するために、ＥＬＩＳＡによりマウス血清中のＴＮＦ－α（ＡＤＩ－９００－０４７、ＥＮＺＯ）、ＩＬ－１βを分析した。その結果を図４に示す。

【００５７】

図４に示すように、血清アジポカインであるＴＮＦ－αとＩＬ－１βの両方がＨＦＤ群で有意に増加したが（ｐ＜０．０５）ＭＳＣ投与後に減少することが確認された。前記の結果を通じて、歯周組織由来の間葉系幹細胞の投与が、肥満における炎症状態を減少させ、それによって肥満を改善させることができることを確認した。

【００５８】

ＮＡＦＬＤを誘導する様々な動物モデルのうち、高脂肪食動物モデルは、ヒトＮＡＦＬＤと最も類似した病理学的特徴を有し、体重増加、血糖増加、および代謝性疾患増加などの同様の生理学的変化を示すと報告されている。

【００５９】

本発明者らは、肥満およびＮＡＦＬＤの新しい治療薬を開発するために高脂肪食で誘導した動物モデルを製造し、前記動物モデルに歯周組織由来の間葉系幹細胞の投与後、体重減少、血中アジポカインレベルの正常化、肝臓内脂質代謝酵素の改善を通じて肥満およびＮＡＦＬＤを改善できることを確認した。

【００６０】

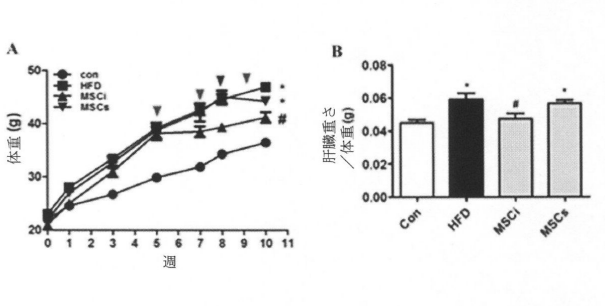
さらに、本発明の有効成分である歯周組織由来の間葉系幹細胞は、最も非侵襲的な方法で細胞を得ることができ、本発明は肥満または非アルコール性脂肪肝に対する細胞治療剤として有用に使用されるものと期待される。

【００６１】

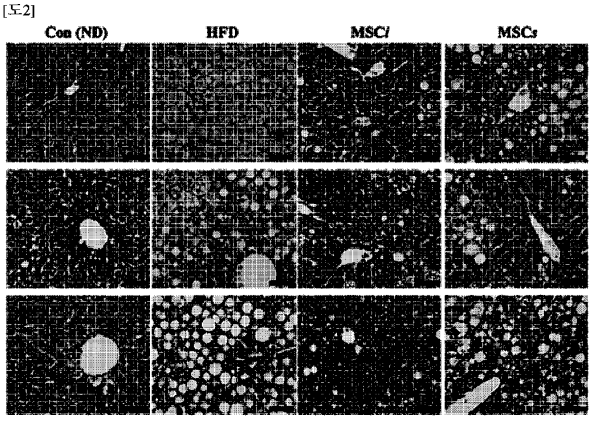
以上、本発明の特定の部分を詳細に述べた。当業界の通常の知識を有する者にとって、このような具体的な技術は単に好ましい一実施形態に過ぎないものではなく、これに本発明の範囲が限定されるものではないことは明らかである。したがって、本発明の実質的な範囲は、添付の特許請求の範囲とその等価物によって定義されるといえる。

【図面】

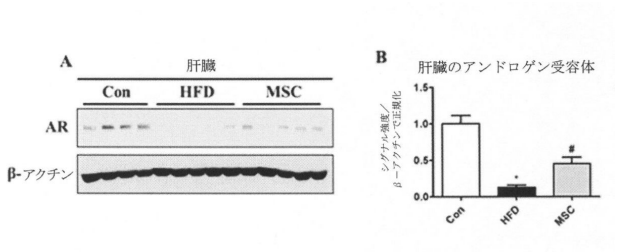
【図１】



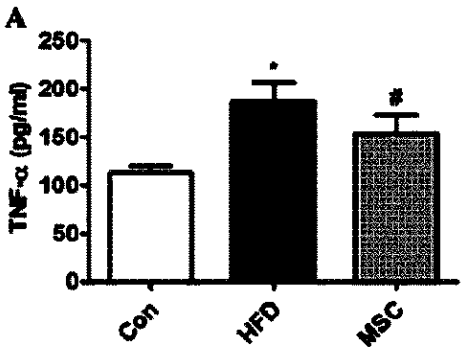
【図２】



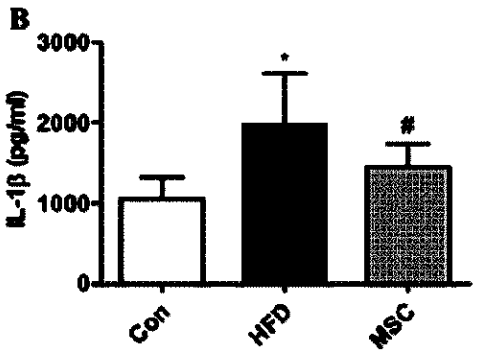
【図３】


A
肝臓
Con
HFD
MSC
AR
β-アクチン
B
肝臓のアンドロゲン受容体
シグナル強度／β－アクチンで正規化
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
Con
HFD
MSC

【図４Ａ】


A
TNF-α (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
*
#
Con
HFD
MSC

【図４Ｂ】


B
IL-1β (pg/ml)
3000
2000
1000
0
*
#
Con
HFD
MSC

【手続補正書】
【提出日】令和4年3月8日(2022.3.8)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用薬学的組成物。
【請求項２】
前記歯周組織は、幼歯または永久歯の歯髄組織、歯周靭帯組織、歯小嚢組織、歯胚幹組織、および根尖乳頭組織からなる群から選択される少なくとも１つである、請求項１に記載の薬学的組成物。
【請求項３】
前記歯周組織は、親知らず（ｗｉｓｄｏｍ　ｔｅｅｔｈ）の周囲組織である、請求項１に記載の薬学的組成物。
【請求項４】
前記歯周組織は、ガラス化凍結保存されている、請求項１に記載の薬学的組成物。
【請求項５】
歯周組織由来の間葉系幹細胞を含む、肥満または非アルコール性脂肪肝治療用幹細胞治療剤。
【請求項６】
前記歯周組織は、幼歯または永久歯の歯髄組織、歯周靭帯組織、歯小嚢組織、歯胚幹組織、および根尖乳頭組織からなる群から選択される少なくとも１つである、請求項５に記載の治療用幹細胞治療剤。
【請求項７】
肥満または非アルコール性脂肪肝の予防または治療用医薬製剤を生産するための、歯周組織由来の間葉系幹細胞の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/012045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/32(2006.01)i; ***A61K 35/28***(2006.01)i; ***A61P 3/04***(2006.01)i; ***A61P 1/16***(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; A61K 35/12; A61P 1/16; A61P 25/00; A61P 3/02; A61P 3/06; A61K 35/28; A61P 3/04

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: 비알코올성 지방간 치료제(medicine for non-alcoholic fatty liver), 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell), 치아 주변조직(teeth surrounding tissue), 사랑니(wisdom teeth), 초자화 동결보존(hyalinizing cryopreservation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018-116732 A1 (ROHTO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 28 June 2018. See abstract; and paragraphs [0002], [0015], [0017] and [0048].	1-6,8-9
A	LIAO, Naishun et al. Adipose tissue-derived stem cells promote the reversion of non-alcoholic fatty liver disease: an in vivo study. International Journal of Molecular Medicine. 2016, vol. 37, pp. 1389-1396. See entire document.	1-6,8-9
A	KR 10-2016-0054336 A (DANKOOK UNIVERSITY CHEONAN CAMPUS INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 16 May 2016. See entire document.	1-6,8-9
A	JP 2016-517405 A (AVITA INTERNATIONAL LTD) 16 June 2016. See entire document.	1-6,8-9
A	MATSUSHITA, Kenichi et al. Mesenchymal stem cells in obesity: insights for translational applications. Laboratory Investigation. 2017, vol. 97, pp. 1158-1166. See entire document.	1-6,8-9

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 December 2020	**09 December 2020**
Name and mailing address of the ISA/KR **Korean Intellectual Property Office** **Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea** **35208** Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/012045

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **7**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 7 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/012045

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2018-116732 A1	28 June 2018	CN 109996550 A	09 July 2019
KR 10-2016-0054336 A	16 May 2016	KR 10-1895648 B1	05 September 2018
JP 2016-517405 A	16 June 2016	BR 102014006335 A2	07 June 2016
		CA 2904804 A1	18 September 2014
		CN 109219441 A	15 January 2019
		CN 109312303 A	05 February 2019
		EP 3426267 A1	16 January 2019
		EP 3426770 A1	16 January 2019
		HK 1219506 A1	07 April 2017
		JP 2019-116490 A	18 July 2019
		JP 2019-507772 A	22 March 2019
		JP 6491606 B2	27 March 2019
		KR 10-2018-0137488 A	27 December 2018
		KR 10-2019-0003489 A	09 January 2019
		RU 2018134615 A	10 April 2020
		US 2015-0050248 A1	19 February 2015
		US 2019-0000887 A1	03 January 2019
		US 9790468 B2	17 October 2017
		WO 2014-141210 A2	18 September 2014
		WO 2014-141210 A3	30 April 2015
		WO 2017-153956 A1	14 September 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2019)

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/012045

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/32(2006.01)i, A61K 35/28(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 1/16(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 35/32; A61K 35/12; A61P 1/16; A61P 25/00; A61P 3/02; A61P 3/06; A61K 35/28; A61P 3/04

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: 비알코올성 지방간 치료제(medicine for non-alcoholic fatty liver), 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell), 치아 주변조직(teeth surrounding tissue), 사랑니(wisdom teeth), 초자화 동결보존(hyalinizing cryopreservation)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2018-116732 A1 (ROHTO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2018.06.28 요약; 및 단락 [0002], [0015], [0017], [0048] 참조.	1-6,8-9
A	LIAO, NAISHUN 등, "Adipose tissue-derived stem cells promote the reversion of non-alcoholic fatty liver disease: an in vivo study", International Journal of Molecular Medicine, 2016, 37권, 페이지 1389-1396 전체 문헌 참조.	1-6,8-9
A	KR 10-2016-0054336 A (단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단) 2016.05.16 전체 문헌 참조.	1-6,8-9
A	JP 2016-517405 A (AVITA INTERNATIONAL LTD) 2016.06.16 전체 문헌 참조.	1-6,8-9
A	MATSUSHITA, KENICHI 등, "Mesenchymal stem cells in obesity: insights for translational applications", Laboratory Investigation, 2017, 97권, 페이지 1158-1166 전체 문헌 참조.	1-6,8-9

☐ 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

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

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

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 12월 09일 (09.12.2020)	2020년 12월 09일 (09.12.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-5373

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2020/012045

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

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

1. ☒ 청구항: 7
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 7은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다 (PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

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

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/012045

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2018-116732 A1	2018/06/28	CN 109996550 A	2019/07/09
KR 10-2016-0054336 A	2016/05/16	KR 10-1895648 B1	2018/09/05
JP 2016-517405 A	2016/06/16	BR 102014006335 A2	2016/06/07
		CA 2904804 A1	2014/09/18
		CN 109219441 A	2019/01/15
		CN 109312303 A	2019/02/05
		EP 3426267 A1	2019/01/16
		EP 3426770 A1	2019/01/16
		HK 1219506 A1	2017/04/07
		JP 2019-116490 A	2019/07/18
		JP 2019-507772 A	2019/03/22
		JP 6491606 B2	2019/03/27
		KR 10-2018-0137488 A	2018/12/27
		KR 10-2019-0003489 A	2019/01/09
		RU 2018134615 A	2020/04/10
		US 2015-0050248 A1	2015/02/19
		US 2019-0000887 A1	2019/01/03
		US 9790468 B2	2017/10/17
		WO 2014-141210 A2	2014/09/18
		WO 2014-141210 A3	2015/04/30
		WO 2017-153956 A1	2017/09/14

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人　100187159
弁理士　前川 英明
(72)発明者　ノ、ギュジン
大韓民国キョンサンナムード、チンジューシ、チンジュヨクーロ、７３ボンーギル、３３、１０２－２９０３
(72)発明者　キム、キョンミン
大韓民国ソウル特別市、ソチョーグ、トンガンーロ、１－ギル、１１２、１０１－１１０３
(72)発明者　チャン、シジョン
大韓民国キョンサンナムード、チンジューシ、トンブーロ、４３ボンーギル、１０－１３、１０２－３０５
(72)発明者　リー、ソンリム
大韓民国キョンサンナムード、チンジューシ、セピョンゴーロ、２５、１０２－１６０２
(72)発明者　パク、ボンウク
大韓民国キョンサンナムード、チンジューシ、セピョンゴーロ、１１２、１０２－１２０４
(72)発明者　リー、ヒョンジュン
大韓民国キョンサンナムード、チンジューシ、チンジューデロ、４０４ボンーギル、２５、２０２

Ｆターム（参考）　4C087　AA01 AA02 BB44 BB63 CA04 NA14 ZA70 ZA75