

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-546382
(P2024-546382A)

(43)公表日 令和6年12月20日(2024.12.20)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/074(2010.01)	C 1 2 N	5/074	4 B 0 6 5
A 6 1 K	35/36 (2015.01)	A 6 1 K	35/36	4 C 0 8 3
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02	4 C 0 8 7
A 6 1 K	8/02 (2006.01)	A 6 1 K	8/02	
A 6 1 K	8/98 (2006.01)	A 6 1 K	8/98	
		審査請求 有	予備審査請求 未請求	(全22頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-538424(P2024-538424)			(71)出願人 518357128
(86)(22)出願日	令和4年12月23日(2022.12.23)			イファ ユニバーシティ・インダストリー
(85)翻訳文提出日	令和6年7月19日(2024.7.19)			コラボレーション ファウンデーション
(86)国際出願番号	PCT/KR2022/021212			EWHA UNIVERSITY – I
(87)国際公開番号	WO2023/121399			NDUSTRY COLLABORAT
(87)国際公開日	令和5年6月29日(2023.6.29)			ION FOUNDATION
(31)優先権主張番号	10-2021-0187681			大韓民国 ソウル 03760、ソデムン
(32)優先日	令和3年12月24日(2021.12.24)			ーグ、イファヨデーギル 52
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)			52, Ewhayeodaegil
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			Seodaemun-gu Seoul
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(			03760, Republic of
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			Korea
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			(71)出願人 521129141
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			ヒエラバイオ インコーポレイテッド
	最終頁に続く			大韓民国 03760 ソウル ソデムン
				最終頁に続く

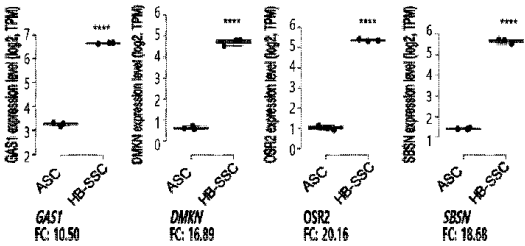
(54)【発明の名称】 皮膚由来幹細胞の培養方法及びその用途

(57)【要約】

本発明は、皮膚由来幹細胞の培養方法及びその用途に関し、皮膚由来幹細胞の培養方法；前記方法で製造された皮膚由来幹細胞；前記製造された皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷治療用薬学組成物；医薬部外品組成物；及び化粧料組成物に関する。

本発明の培養方法によると、皮膚組織から効果的に幹細胞を分離及び得ることができ、前記得られた皮膚由来幹細胞は、多分化能と自己複製能に優れ、皮膚再生効果及び創傷治療効果に優れるため、皮膚再生及び創傷治療または改善用途として有用に活用できるものである。

【選択図】なし



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 皮膚組織をハイドロゲル内に取り込んで培養して培養物を得る段階；及び

(b) 前記で得られた培養物においてハイドロゲルを分解して前記皮膚組織からハイドロゲル内に移動及び増殖した幹細胞を回収する段階を含む、皮膚由来幹細胞の培養方法。

【請求項 2】

前記 (a) 段階で皮膚組織の培養は、皮膚切片をハイドロゲル内に 3 日～20 日間取り込み培養するものである、請求項 1 に記載の皮膚由来幹細胞の培養方法。

【請求項 3】

前記 (a) 段階の以前に皮膚組織の前処理段階として、皮膚組織の試料を 50～70℃の温度で 30 秒～90 秒間皮膚組織を処理する段階；アルコール (alcohol) または界面活性剤に 1 分～10 分間浸漬する段階；及び洗浄段階を含む皮膚組織の前処理段階を含むものである、請求項 1 に記載の皮膚由来幹細胞の培養方法。

【請求項 4】

前記皮膚由来幹細胞は、GAS1、OSR2、DMKN 及び SBSN から選択されるいずれか一つ以上の遺伝子発現が増加したものである、請求項 1 に記載の皮膚由来幹細胞の培養方法。

【請求項 5】

前記皮膚由来幹細胞は、CD29、CD44、CD73、CD90 及び CD105 は発現し、

CD14、CD34 及び CD45 は発現しない免疫学的特性を有するものである、請求項 1 に記載の皮膚由来幹細胞の培養方法。

【請求項 6】

前記皮膚由来幹細胞は、組織培養及び細胞分離後、継代培養 9 回目まで細胞の形態及び大きさが維持されるものである、請求項 1 に記載の皮膚由来幹細胞の培養方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法で製造された皮膚由来幹細胞。

【請求項 8】

前記皮膚由来幹細胞は、GAS1、OSR2、DMKN 及び SBSN から選択されるいずれか一つ以上の遺伝子発現が増加したものである、請求項 7 に記載の皮膚由来幹細胞。

【請求項 9】

前記皮膚由来幹細胞は、CD29、CD44、CD73、CD90 及び CD105 は発現し、

CD14、CD34 及び CD45 は発現しない免疫学的特性を有するものである、請求項 7 に記載の皮膚由来幹細胞。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の方法で製造された皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷治療用薬学組成物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の方法で製造された皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷改善用医薬部外品組成物。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法で製造された皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷改善用化粧品組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、皮膚由来幹細胞の培養方法及びその用途に関し、皮膚由来幹細胞の培養方法；前記方法で製造された皮膚由来幹細胞；前記製造された皮膚由来幹細胞、その培養物ま

10

20

30

40

50

たは前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷治療用薬学組成物；医薬部外品組成物；及び化粧品組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

幹細胞 (stem cell) とは、組織を構成する各細胞に分化する前段階の細胞であり、未分化状態で無限増殖が可能であり、特定分化刺激により多様な組織の細胞に分化し得る潜在的可能性を有する細胞をいう。

【0003】

幹細胞は、分化の可能性に応じて大きく胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES cell) と成体幹細胞 (adult stem cell (組織特異的幹細胞 (tissue specific stem cell))) に分けられる。胚性幹細胞は、受精卵が形成された後、子宮内膜に着床する前の初期段階である胚盤胞 (blastocyst) 胚中の胎児になる細胞塊 (inner cell mass: ICM) から分離した幹細胞であり、全ての組織の細胞に分化し得る潜在力を有している細胞である。

【0004】

一方、組織特異的幹細胞は、胚発生過程が進行されて胚の各臓器が形成される段階で現れる各臓器に特異的な幹細胞であり、その分化能が一般にその組織を構成する細胞のみに限定 (multipotent) される。代表的な組織特異的幹細胞は、骨髄 (bone marrow) に存在する造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) と血球細胞以外の結合組織 (connective tissue) 細胞に分化する間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) がある。造血幹細胞は赤血球、白血球などの各種血球細胞に分化され、間葉系幹細胞は骨芽細胞 (osteoblast)、軟骨芽細胞 (chondroblast)、脂肪細胞 (adipocyte) 及び筋芽細胞 (myoblast) などに分化する。

【0005】

近来、ヒトから胚性幹細胞の分離が成功した後、その臨床的適用に関心が高まっている。幹細胞の適用分野として最も注目されているのは細胞代替療法のための細胞供給源としての利用である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】 韓国公開特許公報 10-2014-0075469 A

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

既存の皮膚幹細胞の分離方法は、コラゲナーゼ (collagenase) などを利用した酵素的分離方法 (韓国公開特許公報 10-2014-0075469 A) であり、細胞表面のタンパク質損傷が避けられないため、細胞性能に影響を及ぼす短所があり、皮膚幹細胞の分離及び培養方法に関する研究が必要なのが現状である。

【0008】

このような背景下で、本発明者らは、新たな幹細胞を開発するために多様な研究を行った結果、本発明の培養方法により製造された皮膚由来幹細胞が体外増殖力、細胞性能、分化能に優れ、皮膚再生及び創傷治療用途として使用できることを確認し、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一つの目的は、皮膚組織及びハイドロゲルを用いて皮膚由来幹細胞を培養する方法を提供することにある。

【0010】

10

20

30

40

50

本発明のもう一つの目的は、前記方法で製造された皮膚由来幹細胞を提供することにある。

【0011】

本発明の他の一つの目的は、前記皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷治療用薬学組成物を提供することにある。

【0012】

本発明の他の一つの目的は、前記皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷改善用医薬部外品組成物を提供することにある。

【0013】

本発明の他の一つの目的は、前記皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷改善用化粧品組成物を提供することにある。

【0014】

本発明の他の一つの目的は、皮膚組織及びハイドロゲルを含む皮膚由来幹細胞培養用組成物を提供することにある。

【0015】

本発明の他の一つの目的は、前記幹細胞培養用組成物を含む皮膚由来幹細胞培養用キットを提供することにある。

【発明の効果】

【0016】

本発明の培養方法によると、皮膚組織から効果的に幹細胞を分離及び得ることができ、前記得られた皮膚由来幹細胞は、多分化能と自己複製能に優れ、皮膚再生効果及び創傷治療効果に優れるため、皮膚再生及び創傷治療または改善用途として有用に活用できる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明のHB-皮膚由来幹細胞の組織培養結果（図1a）、細胞分離及び培養した結果（図1b）である。

【図2】本発明のHB-皮膚由来幹細胞の免疫表現型を確認した結果である。

【図3】本発明のHB-皮膚由来幹細胞の継代培養による増殖能を確認した結果である。

【図4】本発明のHB-皮膚由来幹細胞（HB-SSC）のコロニー形成能を確認した結果である。

【図5a】本発明のHB-皮膚由来幹細胞の脂肪細胞への分化能を確認した結果である。

【図5b】本発明のHB-皮膚由来幹細胞の骨細胞への分化能を確認した結果である。

【図6a】DB基盤皮膚再生機能に関連する遺伝子String Network分析結果及びHB-皮膚由来幹細胞（HB-SSC）の特異皮膚再生機能性遺伝子を確認した結果である。

【図6b】本発明のHB-皮膚由来幹細胞（HB-SSC）の特異的発現皮膚再生機能性遺伝子を脂肪由来幹細胞（ASC）に比した発現量を比較分析した結果である。

【図6c】本発明の皮膚由来幹細胞（HB-SSC）の特異的発現皮膚再生機能性遺伝子を脂肪由来幹細胞（ASC）に比した発現量を比較分析した結果である。

【図7a】マウスモデルにおいて本発明のHB-皮膚由来幹細胞（HB-SSC）の創傷治癒効果を確認した結果である。

【図7b】マウスモデルにおいて本発明のHB-皮膚由来幹細胞（HB-SSC）の創傷治癒効果を確認した結果である。

【図8】マウス創傷モデルにおいて本発明のHB-皮膚由来幹細胞（HB-SSC）の皮膚及び皮膚構造物の再生能を確認した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

10

20

30

40

50

これを具体的に説明すると、次の通りである。一方、本発明で開示されたそれぞれの説明及び実施形態は、それぞれの異なる説明及び実施形態にも適用することができる。即ち、本発明で開示された多様な要素の全ての組合せが本発明の範疇に属する。また、下記の具体的な記述により本発明の範疇が制限されるとは見られない。

【0019】

前記目的を達成するための本発明の一態様は、皮膚組織及びハイドロゲルを用いた皮膚由来幹細胞の培養方法及び前記方法で培養された皮膚由来幹細胞を提供する。

【0020】

本発明の用語、皮膚由来幹細胞は、皮膚組織に由来する全ての幹細胞を含むことができ、一例として、脂肪幹細胞 (adipose stem cells)、表皮幹細胞 (epidermal stem cells)、真皮幹細胞 (dermal stem cells) などを含めてもよいが、これに制限されるものではない。

10

【0021】

具体的には、皮膚組織由来幹細胞の培養方法は、(a) 皮膚組織をハイドロゲル内に取り込んで培養して培養物を得る段階；及び (b) 前記で得られた培養物においてハイドロゲルを分解して前記皮膚組織からハイドロゲル内に移動及び増殖した幹細胞を回収する段階を含む。

【0022】

本発明において、前記ハイドロゲルは、親水性高分子が共有または非共有結合で架橋されて作られた3次元網状構造物を意味するものであり、皮膚組織をハイドロゲル内に3次元的に取り込むことにより、ハイドロゲルは皮膚組織の物理的支持を提供すると共に皮膚組織内に存在する皮膚由来幹細胞をハイドロゲル内に移動し、増殖できる細胞外基質機能を同時に提供することができる。

20

【0023】

また、本発明のハイドロゲルは、ハイドロゲル支持3次元培養のために溶液状態で存在し、ゾルとゲルに変換できる相転移 (phase transitional) 性ハイドロゲルが好ましく、具体的には、コラーゲン (collagen)、ゼラチン (gelatin)、コンドロイチン (chondroitin)、ヒアルロン酸 (hyaluronic acid)、アルギニン (arginic acid)、マトリゲル (Matrigel™)、キトサン (chitosan)、ペプチド (peptide)、フィブリン (fibrin)、PGA (polyglycolic acid)、PLA (polylactic acid) 及びPEG (polyethylene glycol)、ポリアクリルアミド (polyacrylamide) からなる群から選択されたいずれか一つ以上であってもよいが、これに制限されるものではない。また、前記 (a) 段階は、毛包組織をハイドロゲル多重層の間に取り込んで培養することであってもよい。具体的には、ハイドロゲル二重層の間に毛包組織を取り込んで培養することであってもよいが、これに制限されるものではない。

30

【0024】

前記 (a) 段階において、皮膚組織が取り込んだハイドロゲルの培養は、当業界において幹細胞培養に適することが知られている通常の培地に皮膚組織が取り込んだハイドロゲルを浸漬した後に行われてもよい。

40

【0025】

また、前記 (a) 段階で皮膚組織の培養は、皮膚切片をハイドロゲル内に3日～20日、3日～18日、3日～16日間取り込み培養することであってもよい。具体的には、3日～14日間培養してもよいが、これに制限されるものではない。

【0026】

本発明の一具体例では、健康な成人の皮膚を採取して皮膚の切片を形成し、ハイドロゲルに9日間取り込み培養した。

【0027】

また、前記 (a) 段階の以前に皮膚組織の前処理段階として、皮膚組織の試料を50～

50

70℃の温度で30秒～90秒間皮膚組織を処理する段階；アルコール（alcohol）または界面活性剤に1分～10分間浸漬する段階；及び洗浄段階を含むことができる。

【0028】

その時、前記皮膚組織処理段階の温度は、50～70℃、52～68℃、54～66℃、56～64℃、58～62℃、または60℃であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0029】

また、前記皮膚組織処理段階は、30秒～90秒、40秒～80秒、50秒～70秒、55秒～65秒、58～62秒、59、60、または61秒であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0030】

また、前記前処理段階中、アルコールまたは界面活性剤に浸漬する段階で使用されるアルコールは、炭素数1～4のアルコールを含んでもよく、具体的には、エタノール、メタノール、プロパノール、イソプロピルアルコールなどであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0031】

また、前記界面活性剤は、両性界面活性剤または非イオン性界面活性剤を含むことができる。

【0032】

前記両性界面活性剤は、phosphatidylserine、phosphatidylethanolamine、phosphatidylcholineなどを含んでもよいが、これに制限されるものではない。

【0033】

前記非イオン性界面活性剤は、Fatty acid esters of glycerol、Fatty acid esters of sorbitol SpansまたはTweensなどを含んでもよく、具体的には、Glycerol monostearate、Glycerol monolaurate、Sorbitan monolaurate、Sorbitan monostearate、Sorbitan tristearate、Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80などであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0034】

また、前記アルコールまたは界面活性剤に浸漬する段階は、皮膚組織の脂肪層の除去のためのものであるため、浸漬、噴霧、コーティングなどの本技術分野において使用される方法でアルコールまたは界面活性剤に組織を接触させる方法であれば、全部含まれることであり、特に制限されるものではない。

【0035】

また、前記アルコールまたは界面活性剤に浸漬する段階は、1分～10分、2分～9分、3分～8分、4分～7分、4分30秒～6分30秒、5分～5分30秒、または5分であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0036】

また、前記前処理段階の洗浄段階は、本技術分野において洗浄剤として用いられることであれば十分であり、特別な制限があるものではない。

【0037】

一具体例においてPBSであってもよく、洗浄回数は1回～10回、2回～8回、3回、4回、5回、6回、または7回であってもよく、これに制限されるものではない。

【0038】

また、前記皮膚組織の試料は、動物から摘出またはヒトから供与された皮膚組織を試料とすることができるが、これに制限されるものではない。

【0039】

本発明の一実施例では、皮膚組織を試料として約60℃、約1分間皮膚組織を処理して

10

20

30

40

50

角質層を分離し、イソプロピルアルコールに5分間浸漬して皮膚の脂肪層を除去した後、洗浄段階の前処理段階を経た。

【0040】

前記(b)段階は、(a)段階のハイドロゲル支持3次元培養段階後、ハイドロゲル内に移動／増殖した皮膚由来幹細胞を回収するために、ハイドロゲルのみを選択的に分解させることができる。

【0041】

前記ハイドロゲルの分解は、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、TPA (tissue plasminogen activator)、プラスミン(plasmin)及びヒアルロニダーゼからなる群から選択された一つ以上の酵素を通じて分解することができる。

10

【0042】

本発明の皮膚幹細胞の分離／培養技術は、ハイドロゲル基盤のニッチ保存自己複製誘導分離技術として幹細胞を分離する技術であり、皮膚組織が体外生存／培養され、酵素処理なしに組織から直接純度の高い細胞を分離できる新技術に該当する。

【0043】

既存の方法とは異なり、本分離方法は、現存する方式と差別化された方式で体外増殖力及び細胞性能の側面で優れるという長所がある。

【0044】

既存の方法で分離した細胞は、2－3継代(最大5継代)までのみ体外増幅が可能であるが、本発明の方法で分離した細胞は、8継代以上継代培養しても細胞老化が起きないなど性能に優れ、長期間継代培養が可能であるため、大量生産が可能である。

20

【0045】

また、前記方法により製造された皮膚由来幹細胞は、組織培養及び細胞分離後の継代培養9回目まで細胞の形態及び大きさが維持されることを確認した。

【0046】

一方、本発明で提供する皮膚由来幹細胞を製造する方法により製造された皮膚由来幹細胞は、その細胞表面にCD29、CD44、CD73、CD90またはCD105が発現し、CD14、CD34またはCD45は発現しない免疫学的特性を示し、脂肪細胞または骨細胞などに分化し得る多分化特性を示すが、これに制限されるものではない。

30

【0047】

前記皮膚由来幹細胞は、本発明で提供する皮膚由来幹細胞を製造する方法により製造された皮膚由来幹細胞、本発明の皮膚由来幹細胞、皮膚由来幹細胞、HB－皮膚由来幹細胞、本発明のHB－皮膚由来幹細胞、HB－SSCと混用され得る。

【0048】

本発明の一実施例では、本発明の皮膚由来幹細胞製造方法により製造した皮膚由来幹細胞の増殖能、分化能、コロニー形成能を確認することができた。

【0049】

本発明のまた他の実施例では、本発明の皮膚由来幹細胞製造方法により製造した皮膚由来幹細胞の皮膚創傷治療効果を確認することができた。

40

【0050】

本発明のまた他の実施例では、さらに、継代培養による細胞成長能／細胞老化(体外増殖力)及び初代細胞の純度評価の遂行を通じて体外で生存期間が長く、生存能が優れていることを確認することができた。

【0051】

本発明で提供する皮膚由来幹細胞を製造する方法により製造された皮膚由来幹細胞は、特異的皮膚再生機能性遺伝子を発現することができる。

【0052】

その時、前記皮膚再生機能性遺伝子は、具体的には、OSR2(oddskippered-related 2)、DMKN(Dermokine)、SBSN(Suprab

50

asin) 及び GAS1 (Growth Arrest Specific 1) から選択されるいずれか一つ以上の遺伝子であってもよいが、これに制限されるものではなく、皮膚再生機能性遺伝子として知られた遺伝子であれば、これに含まれ得る。

【0053】

本発明の一実施例では、前記皮膚由来幹細胞製造方法により製造された皮膚由来幹細胞において脂肪由来幹細胞に比べて前記4個の皮膚再生機能性遺伝子が10倍以上の顕著な発現量を示すことを確認し、本願方法により製造された皮膚由来幹細胞が特異的皮膚再生機能性遺伝子を発揮することを確認することができた。

【0054】

本発明の他の一態様は、前記皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷治療用薬学組成物を提供する。

10

【0055】

本発明の用語、「皮膚再生」とは、皮膚の外部及び内部の原因による損傷に対し、皮膚組織の回復過程を意味し、外部の原因による損傷は、紫外線、汚染物質、創傷、外傷などであり、内部の原因としては、遺伝的、心理的原因などを全部含むことができるが、これに制限されるものではない。

【0056】

また、前記皮膚再生は、毛包再生または毛包細胞の増殖を含むことができる概念であり、前記毛包細胞の増殖は、毛包細胞が休止期から増殖期への変換が促進されることを含めてもよいが、これに制限されるものではない。

20

【0057】

本発明の用語、「培養物」または「培養液」は、皮膚由来幹細胞を培地で培養する過程中または培養した後に得られた培養物またはその上澄液、その濃縮物またはその凍結乾燥物であってもよい。

【0058】

本発明の用語、「薬学組成物」とは、疾病の予防または治療を目的として製造されたものを意味し、実際の臨床投与時に経口及び非経口の種々の剤形で投与されてもよいが、製剤化する場合には、通常使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤または賦形剤を用いて調剤することができる。

30

【0059】

また、それぞれの剤形により薬学的に許容可能な添加剤をさらに含むことができ、その時、薬学的に許容可能な添加剤としては、デンプン、ゼラチン化デンプン、微結晶セルロース、乳糖、ポビドン、コロイダルシリコンジオキシド、リン酸水素カルシウム、ラクトース、マンニトール、飴、アラビアゴム、前糊化デンプン、コーンスターチ、粉末セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、オパドライ、デンプングリコール酸ナトリウム、カルナウバロウ、合成ケイ酸アルミニウム、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸アルミニウム、ステアリン酸カルシウム、白糖、デキストロース、ソルビトール及びタルクなどが用いられる。本発明による薬学的に許容可能な添加剤は、前記組成物に対して0.1~90重量部が含まれ得る。

40

【0060】

前記薬学組成物には、前記皮膚由来間葉系幹細胞以外にも一つまたはそれ以上の薬学的に許容可能な通常の不活性担体、例えば、注射剤の場合には、保存剤、無痛化剤、可溶化剤または安定化剤などを、局所投与用製剤の場合には、基剤 (base)、賦形剤、潤滑剤または保存剤などをさらに含むことができる。

【0061】

本発明の薬学組成物は、個別治療剤で投与しても、他の治療剤と併用して投与してもよく、従来の治療剤とは順次または同時に投与することができる。そして、単一または多重投与することができる。前記要素を全て考慮し、副作用を誘発せず最小限の量で最大の効果を得る量を投与することが重要であり、当業者により容易に決定することができる。

50

【0062】

それだけでなく、本発明で提供する薬学組成物は、前記皮膚由来幹細胞以外にも皮膚再生または創傷の治療を補助したり、前記皮膚由来幹細胞の活性を維持したり、前記皮膚由来幹細胞の分化を促進する多様な成分をさらに含むことができるが、一例として、抗炎症剤、幹細胞動員因子、成長誘導因子などをさらに含むことができる。

【0063】

本発明で使用される用語、「改善」とは、本発明による組成物を個体に投与して皮膚損傷の進行を遅延させたり症状を軽減させるあらゆる行為を意味する。

【0064】

本発明で使用される用語、「予防」とは、本発明による組成物を個体に投与して皮膚損傷の発生を抑制したり遅延させるあらゆる行為を意味する。

【0065】

本発明で使用される用語、「治療」とは、本発明の前記組成物を皮膚損傷発生の疑いのある個体に投与して皮膚損傷症状が好転又は有益にするあらゆる行為を意味する。

【0066】

本発明の他の一つの目的は、前記皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む組成物を個体に投与する段階を含む、皮膚再生または創傷改善または治療方法を提供する。

【0067】

前記皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞、皮膚再生、創傷改善、治療は、前述した通りである。

【0068】

本発明で使用される用語、「投与」とは、適切な方法で個体に前記組成物を導入することを意味する。具体的には、本発明の前記皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む組成物、またはそれを含む前記薬学的組成物を局所部位、例えば、皮膚損傷または創傷部位に塗布または注射剤として投与することができるが、これに制限されるものではない。

【0069】

また、前記組成物は、皮膚損傷または創傷治療に用いられる他の薬学的組成物と併用されてもよい。

【0070】

本発明の用語、「個体」とは、皮膚損傷または創傷が発症又は発症し得るヒトを含むマウス、ラット、家畜などのあらゆる動物を意味する。前記動物は、ヒトだけでなくこれと類似の症状の予防または治療を必要とするウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ラクダ、カモシカ、イヌ、ネコなどの哺乳動物であってもよいが、これに制限されない。

【0071】

本発明の組成物は、薬学的に有効な量で投与することができる。

【0072】

前記用語、「薬学的に有効な量」とは、医学的治療に適用可能な合理的な受患／リスクの比率で疾患を治療するのに十分な量を意味し、有効用量の水準は、個体の種類及び重症度、年齢、性別、薬物の活性、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路及び排出比率、治療期間、同時に使用される薬物を含む要素及びその他の医学分野によく知られている要素により決定することができる。

【0073】

前記組成物は、個別治療剤として投与したり他の治療剤と併用して投与することができる、従来の治療剤とは順次または同時に投与することができる。また、単一または多重投与することができる。前記要素を全て考慮して副作用なしに最小限の量で最大効果を得ることができる量を投与することが重要であり、これは、当業者により容易に決定することができる。

【0074】

10

20

30

40

50

また、前記組成物は、目的とする方法により経口投与しても非経口投与（例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所に適用）してもよく、投与量は、患者の状態及び体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路及び時間に応じて異なるが、当業者により適切に選択されることができる。具体的な例として、前記組成物は、一般に、1日1回～数回に分けて投与することができるが、好ましい投与量は、個体の状態及び体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路及び期間に応じて当業者により適切に選択することができる。

【0075】

本発明の他の一つの目的は、前記皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷改善用医薬部外品組成物を提供することにある。

【0076】

本発明の用語、「医薬部外品組成物」とは、ヒトや動物の疾病を治療、軽減、処置または予防する目的として使用される繊維、ゴム製品またはそれと類似したもの、人体に対する作用が弱かったり人体に直接作用せず、器具または機械ではないものとそれと類似したもの、感染予防のために、殺菌、殺虫及びそれと類似した用途で使用される製剤の一つに該当する物品であり、ヒトや動物の疾病を診断、治療、軽減、処置または予防する目的で使用する物品中、器具、機械または装置ではないもの及びヒトや動物の構造と機能に薬理学的影響を与える目的として使用する物品中、器具、機械または装置ではないものを除いた物品を意味し、具体的には、皮膚外用剤または個人衛生用品であってもよい。

【0077】

本発明の他の一つの目的は、前記皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、皮膚再生または創傷改善用化粧料組成物を提供することにある。

【0078】

本発明の用語、「化粧料組成物」は、通常製造される如何なる剤形にも製造することができ、例えば、溶液、乳濁液、懸濁液、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、パウダー、スプレー、界面活性剤含有クレンジング、オイル、石鹸、液体洗淨料、入浴剤、ファンデーション、メイクアップベース、エッセンス、化粧水、フォーム、パック、柔軟水、サンスクリーンクリームまたはサンオイルなどに剤形化することができる。

【0079】

本発明の他の一つの目的は、皮膚組織及びハイドロゲルを含む皮膚由来幹細胞培養用組成物及び前記組成物を含む皮膚由来幹細胞培養用キットを提供することにある。

【0080】

併せて、皮膚由来幹細胞培養用キットは、前記幹細胞培養用組成物と前記幹細胞の培養に必要な溶液、装置などの多様な構成要素を含むことができる。

【0081】

本発明の他の一つの目的は、前記皮膚由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む組成物の皮膚再生または創傷改善用途を提供する。

【0082】

以下、本発明を実施例を通じてより詳細に説明する。しかし、これら実施例は、本発明を例示的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれら実施例に限定されるものではない。

【0083】

実施例1．フィブリンハイドロゲル支持皮膚組織の3次元培養

動物から摘出またはヒトから供与された皮膚組織を試料にして60℃、1分間皮膚組織を処理して角質層を分離し、isopropyl alcoholに5分間浸漬して皮膚の脂肪層を除去した後、PBS (Gibco)で三回洗淨して皮膚組織を前処理した。Forcepを用いて処理された組織を固定した後、razor bladeを用いて1-3mm²の大きさで切断し、PBSで三回洗淨した。DMEM (low glucose

10

20

30

40

50

、Gibco)で1回洗浄した後、上澄液を除去し、fibrinogen solution (0.25% w/v fibrinogen (緑十字)、200 µg/mL tranexamic acid (シンブン製薬) in DMEM) 5 mLを入れた。Thrombin solution (0.5 IU/mL thrombin (緑十字) in DMEM)を同量添加し、直ちに100 mmの培養容器に移して穏やかに転がして組織切片及びハイドロゲルが均一に広がるようにした。必要に応じてforcepを用いて組織切片の間隔を確保した。常温で5分間、37℃で2時間培養して十分にゲル化させた。Tranexamic acid 100 µg/mLが添加された成長培地10 mL (90% low DMEM:F12=1:1, 10% Fetal bovine serum、20 ng/mL epidermal growth factor、5 ng/mL basic fibroblast growth factor、10 ng/mL insulin-like growth factor, and 10 mg/mL gentamicin)を入れて3時間の間、1時間ごとに培養液を交換した。その後、2~3日に一回ずつ成長培地を交換した。

10

【0084】

実施例2. フィブリンハイドロゲル内に移動成長したHB-皮膚由来幹細胞の回収及び増幅培養

実施例1で記述した方法で約10日間毛包組織を培養した。ハイドロゲルをwarm PBSで3分間三回洗浄した後、30% FBS/DMEMを入れてorbital shakerで攪拌した(30 rpm)。1時間後に上澄液を除去した後、3,000 units urokinase (緑十字)が添加された10 mL 30% FBS/low DMEMを入れてgelを分解させた。Gelが十分に分解されると、static conditionでovernight培養した後、上澄液を除去し、成長培地を添加して常法で培養した。2~3日ごとに成長培地を交換し、4~6日ごとに継代培養した。

20

【0085】

前記方法により培養した組織培養結果及び細胞分離及び培養結果は、図1に示した。

具体的には、組織培養後、細胞を分離して継代培養した時、継代培養の9回目まで細胞の形態及び大きさが維持されることを確認することができた。

【0086】

実施例3. 分離及び培養されたHB-皮膚由来幹細胞の免疫表現型の確認

30

実施例2の方法により分離及び培養されたHB-皮膚由来幹細胞の免疫表現型を確認するために、T75フラスコで培養中であった細胞をPBSで1回洗浄した後、TrypLE Express (Gibco) 3 mLを3分間処理して細胞を剥離した。剥離した細胞は10% calf serum/PBS 6 mLを入れてタンパク質分解反応を抑制させた。遠心分離(300 g、5 min)した後、上澄液を除去し、3% bovine serum albumin (sigma)/PBSに懸濁した。

【0087】

細胞懸濁液は9等分して次の抗体と4℃で1時間反応させた：FITC-conjugated CD29 (Bio-rad、1:10)、CD44 (Invitrogen、1:100)、CD90 (Invitrogen、1:20)、CD14 (Invitrogen、1:20) antibody, AlexaFluor488-conjugated CD105 (abcam、1:25)、PE-conjugated CD73 (Invitrogen、1:20) antibody, PerCP-conjugated CD34 (Santacruz、1:5) 抗体、またはAlexaFluor594-conjugated CD45 (Novus、1:20) antibody。反応後300 g、5 minで遠心分離して洗浄後、3% BSA/PBSに懸濁した後、フローサイトメトリー(BD)で測定した(図2)。

40

【0088】

その結果、図2で見られるように、分離及び培養されたHB-皮膚由来幹細胞の表面にはCD29、CD44、CD73、CD90及びCD105が発現し、CD14、CD3

50

4 及び C D 4 5 は発現しないことを確認することができた。

【0089】

具体的には、間葉系幹細胞のマーカーである C D 2 9、C D 4 4、C D 9 0、C D 7 3 及び C D 1 0 5 を陽性発現（95%以上）しており、造血系細胞のマーカーである C D 3 4、C D 4 5 及び H L A - D R は陰性発現（5%未満）を示すことを確認した。

【0090】

実施例 4．分離及び培養された H B - 皮膚由来幹細胞の増殖能及びコロニー形成能の確認

実施例 2 で得られた分離及び培養された H B - 皮膚由来幹細胞の増殖能を確認するために、最初培養時に 4 0 0 0 個 / c m 2 の密度で細胞を播種し、4 日ごとに継代し、得られた細胞数を通じて継代培養回数による群集の倍加時間を測定した。

10

【0091】

また、細胞数は t r y p a n b l u e 染色法で染色されていない細胞の個数をカウントし、群集の倍加時間（P D T s, p o p u l a t i o n d o u b l i n g t i m e）は、次の式から計算して図 3 に示した： $P D T = [days / (\log N 2 - \log N 1)] / \log 2$, (N 1 = 4, 0 0 0 c e l l s, N 2 = 4 日後の細胞数)。

【0092】

また、実施例 2 で得られた分離及び培養された H B - 皮膚由来幹細胞のコロニー形成能を確認するために、ヒト皮膚由来幹細胞（4 p a s s a g e s）を 6 - w e l l p l a t e に 2 0 個 / w e l l で播種した。3 日ごとに成長培地で交換しながら 1 4 日間培養した。P B S で洗浄した後、4 % p a r a f o r m a l d e h y d e（4 % P F A, s i g m a）で 1 5 分間常温で放置して固定した。固定された細胞は P B S で三回洗浄した後、0.5 % c r y s t a l v i o l e t / M e t h a n o l で 1 5 分間常温で放置して染色させた。残余溶液を全部除去した後、蒸留水で三回洗浄し、染色されたコロニーを観察した結果を図 4 に示した。

20

【0093】

前記図 3 及び 4 の結果のように、本実施例 2 の方法により得られた H B - 皮膚由来幹細胞は H B - 皮膚由来幹細胞を継代培養 7 回目まで培養して p o p u l a t i o n d o u b l i n g t i m e（P D T）を求めた結果、P D T は平均 3 5 時間 ± 6 時間で観察され、継代培養による増殖能が維持されることが認められ、コロニー形成能も、一定レベル以上であることを確認することができた。

30

【0094】

実施例 5．H B - 皮膚由来幹細胞の分化能の確認

得られた H B - 皮膚由来幹細胞の脂肪細胞への分化能力を評価するために、細胞を 1 × 1 0 4 個 / c m 2 の濃度で播種し、80 % c o n f l u e n c y に到達するまで成長培地で培養した後、S t e m P r o T M A d i p o g e n e s i s d i f f e r e n t i a t i o n k i t（G i b c o, c a t. A 1 0 0 7 0 0 1）で培地を交換し、3 日ごとに培地を交換しながら 1 4 日間培養した。4 % P F A で 1 5 分間固定し、60 % i s o p r o p a n o l で 1 5 分間反応させた後、全ての溶液を除去して十分に乾燥させた。60 % O i l R e d O（s i g m a）/ e t h a n o l を常温で 1 5 分間染色して細胞質内における脂肪蓄積の有無を確認した（図 5 a）。

40

【0095】

また、前記 H B - 皮膚由来幹細胞の骨細胞への分化能力を評価するために、細胞を 1 × 1 0 4 個 / c m 2 の濃度で播種して 80 % c o n f l u e n c y に到達するまで成長培地で培養した後、S t e m P r o T M O s t e o g e n e s i s d i f f e r e n t i a t i o n k i t（G i b c o, c a t. A 1 0 0 7 2 0 1）で培地を交換し、3 日ごとに培地を交換しながら 1 4 日間培養した。4 % P F A で 6 0 秒間固定し、B C I P / N B T s u b s t r a t e s o l u t i o n（S i g m a）処理した後、遮光条件で 1 0 分間染色して塩基性リン酸分解酵素（A l k a l i n e p h o s p h a t a s e, A L P）の活性を確認した（図 5 b）。

50

【0096】

即ち、前記のような結果として本願培養方法により得られたHB-皮膚由来幹細胞は、多分化能を有していることを確認することができた。

【0097】

実施例6. HB-皮膚由来幹細胞の差異発現遺伝子の確認

脂肪幹細胞(ASC-1, ASC-2, ASC-3)、HB-皮膚由来幹細胞(HB-SSC-1, HB-SSC-2, HB-SSC-3)サンプルのために、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kitを用いてメーカーのプロトコルによりペアエンドRNAライブラリーを構築し、マクロジェン社(ソウル、大韓民国)でシーケンシングを行った。前処理過程後、HISAT2プログラム(バージョン2.1.0, <https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>)でリファレンスゲノム(バージョンGRCh38)にマッピングし、StringTieプログラム(バージョン2.1.3b, <https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/>)で転写体別の発現量プロファイルを得た。遺伝子発現量は、TPM(Transcripts Per Kiobase Million)値にログを取って扱った。対照群と比較群間の差異発現遺伝子は、Rプログラム(バージョン4.0)のedgeRパッケージ[1]を用いて得た(1. ROBINSON, Mark D.; MCCARTHY, Davis J.; SMYTH, Gordon K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. bioinformatics, 2010, 26. 1:139-140.) (図6b及び6c)。マーカー遺伝子が参加する生物学的ネットワーク構築は、String Database(バージョン11.5)[2]を用いてタンパク質-タンパク質相互作用(PPI)ネットワークを構築した(2. SZKLARCZYK, Damian, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic acids research, 2019, 47. D1:D607-D613)。PPIネットワーク構築に使用した有機体レファレンスはHomo sapiensとした。ネットワーク構築のための設定でタンパク質を示すノード(node)を互いに連結するエッジ(edge)は、実験の結果、生物学的データベース及び文献、遺伝子フュージョンなどの根拠基盤で連結するようにし、エッジ点数は0.4以上であることを有意なこととした。ネットワーク構築後、他のノード間の連結性がない孤児ノードは除去した。ノードグループが属する生物学的機能は、KEGGデータベース[3]を基準として統計的に有意なことだけ抽出した(3. KANEHISA, Minoru; GOTO, Susumu. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic acids research, 2000, 28. 1:27-30) (False Discovery Rate < 0.05) (図6a)。両グループ間の有意な差の検定はT-Testを行って得、P value<0.05未満を有意なことと見なした。分析プログラムにより自動的に提供する統計的検定結果はそのまま使用し、有意の水準は0.05未満を有意なことと見なした。P valueが0.05を超過した結果を表記する場合、P valueを別途に表記した。

【0098】

String DBを用いてHB-皮膚由来幹細胞で発現した遺伝子を皮膚再生関連遺伝子networkと分析して関連性のある信号伝達経路を確認し、4個の皮膚再生機能性遺伝子(GAS1, OSR2, DMKN, SBSN)を高い水準で発現することを確認した(図6a)。HB-皮膚由来幹細胞においてFold change>10で脂肪由来幹細胞に比べて発現した遺伝子73個を確認し、このうち、図6aで導出した皮膚再生

10

20

30

40

50

機能性遺伝子4個（GAS1，OSR2，DMKN，SBSN）が脂肪由来幹細胞に比べて10倍以上の差異発現を確認した（図6b及び6c）。

【0099】

前記皮膚再生機能性遺伝子4種は、皮膚再生、創傷治癒と関連して免疫調節及び細胞増殖に関連した遺伝子として知られているところ、これに基づいて本発明の皮膚由来幹細胞製造方法により製造された皮膚由来幹細胞の皮膚再生、創傷治癒効果を類推することができる。

【0100】

実施例7．全層皮膚欠損傷（Full-thickness skin wound）マウスモデル及び創傷治癒効果の確認

実験動物である12週齢のBALB/c nude mouse（中央実験動物）を3% Isoflurane（ハナ製薬）を通じて吸入麻酔させ、手術部位をAlcohol swab（メディトップ）で消毒した。目盛り付きステッカーを背中に貼付した後、皮膚を正方形（5mm×5mm、25mm²）状に滅菌された手術用はさみで皮下層まで切開した後、皮下組織を分離して全層皮膚欠損傷を誘発した。創傷収縮を防止するために、創傷周辺部位をSuture（ProleneTM，EHICON，cat. W8566）で固定した。創傷周辺部位に5×10⁵個の細胞をNormal saline（NS）100μlに懸濁して25μl/site（4site）で皮下注射（Insulin syringe、31gauge）した。創傷誘発後、感染防止のために、周囲をAlcohol swabで消毒し、実験群は全部分離して観察した。創傷誘発後、0、1、3、5、7、12、14日目に同時間にデジタルカメラを用いて各群の創傷部位を撮影し、Image J Software（US National Institute of Health Program，USA）で創傷面積を測定した。Wound areaは、創傷誘導直後の創傷面積を基準として測定日別の創傷面積を百分率で計算した（図7a及び図7b）。

【0101】

前記結果として本発明の製造方法により製造されたHB-皮膚由来幹細胞の創傷治癒効果を確認することができた。

【0102】

実施例8．全層皮膚欠損傷（Full-thickness skin wound）マウスモデルにおける皮膚及び皮膚構造物の再生能の確認

組織学的分析のために、皮膚組織を固定液（4% formaldehyde，sigma，USA）に24時間固定した。その後、組織をパラフィン包埋（Paraffin embedding）してブロックを6μmで薄切りした後、H&E（Hematoxylin & Eosin）染色を行った。光学顕微鏡を通じて実験群別に組織を観察及び比較した（図8）。

【0103】

前記結果として本発明の製造方法により製造されたHB-皮膚由来幹細胞の皮膚及び皮膚構造物の再生効果を確認することができた。

【0104】

以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施されることが理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本発明の範囲は前記詳細な説明よりは、後述する請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導かれるあらゆる変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈すべきである。

10

20

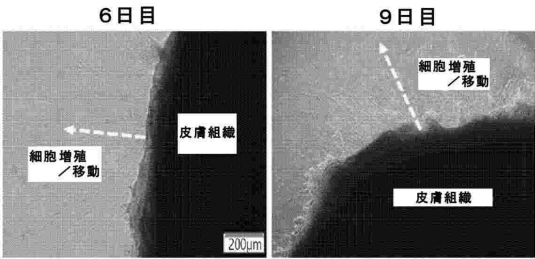
30

40

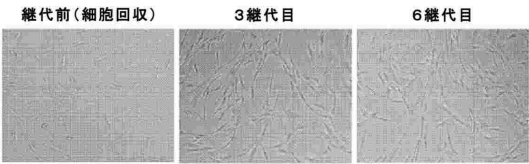
50

【図面】

【図 1 a】

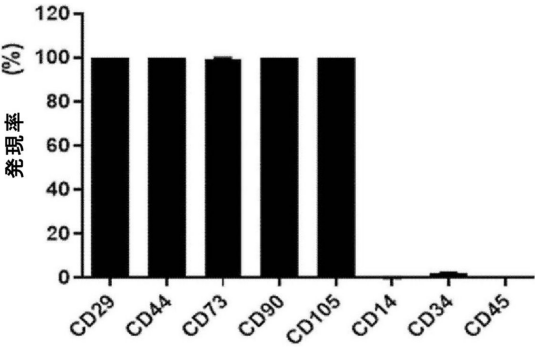


【図 1 b】

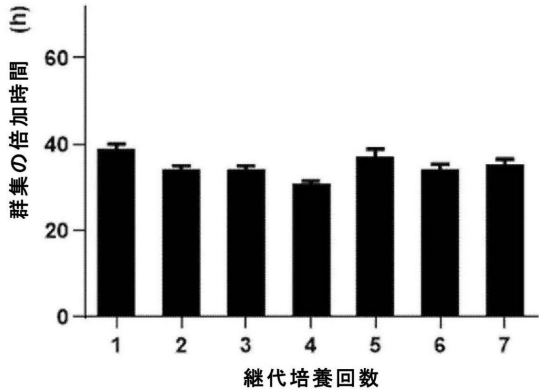


10

【図 2】

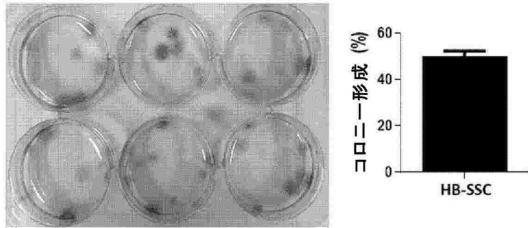


【図 3】

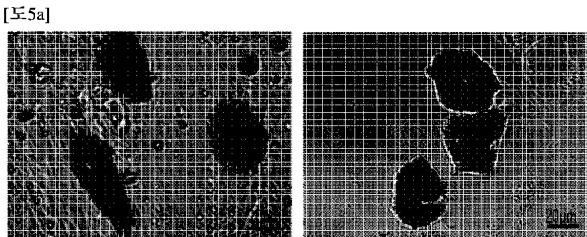


20

【図 4】



【図 5 a】

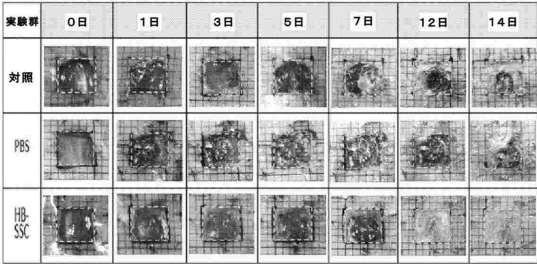


30

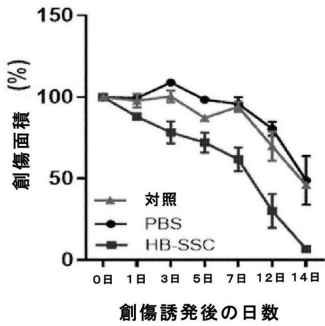
40

50

【図 7 a】

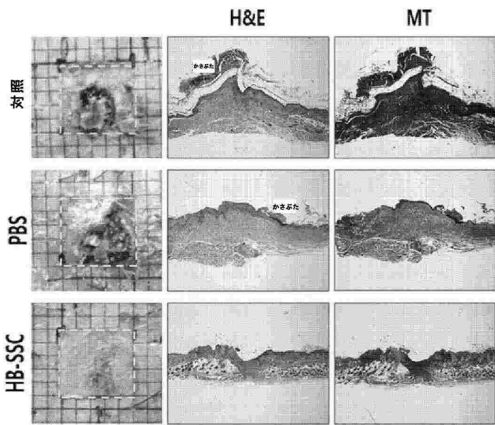


【図 7 b】



10

【図 8】



20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/021212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 5/071(2010.01)i; A61K 35/36(2006.01)i; A61P 17/02(2006.01)i; A61K 8/98(2006.01)i; A61Q 19/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/071(2010.01); B05D 1/38(2006.01); C12N 11/00(2006.01); C12N 5/074(2010.01); C12N 5/0775(2010.01); C12N 5/095(2010.01)		
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: 피부 유래 줄기세포(skin-derived stem cell), 하이드로겔(hydrogel), 세포외기질(extracellular matrix, ECM), 상처(wound), 재생(regeneration)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018-0282690 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 04 October 2018 (2018-10-04) See paragraphs [0001]-[0109], [0415] and [0416].	1-12
A	KR 10-2013-0124074 A (INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 13 November 2013 (2013-11-13) See claim 1.	1-12
A	US 2016-0122723 A1 (ORGANOVO, INC.) 05 May 2016 (2016-05-05) See entire document.	1-12
A	US 2011-0212501 A1 (YOO, Seung-Schik) 01 September 2011 (2011-09-01) See entire document.	1-12
A	KR 10-2013-0061950 A (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION OF SEOKYEONG UNIVERSITY) 12 June 2013 (2013-06-12) See entire document.	1-12
☐ 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 05 April 2023		Date of mailing of the international search report 06 April 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/021212

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2018-0282690	A1	04 October 2018	EP	3359645	A1	15 August 2018
				WO	2017-060240	A1	13 April 2017
KR	10-2013-0124074	A	13 November 2013	KR	10-1389849	B1	29 April 2014
US	2016-0122723	A1	05 May 2016	EP	3215603	A1	13 September 2017
				EP	3215603	B1	22 September 2021
				JP	2017-537654	A	21 December 2017
				JP	2021-045159	A	25 March 2021
				JP	7227211	B2	21 February 2023
				MA	40598	A	13 September 2017
				US	11529436	B2	20 December 2022
				US	2018-0272035	A1	27 September 2018
				WO	2016-073782	A1	12 May 2016
US	2011-0212501	A1	01 September 2011	WO	2010-030964	A2	18 March 2010
				WO	2010-030964	A3	10 June 2010
				WO	2010-030964	A9	18 March 2010
KR	10-2013-0061950	A	12 June 2013	KR	10-1413686	B1	02 July 2014

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2022/021212

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/071(2010.01)i; A61K 35/36(2006.01)i; A61P 17/02(2006.01)i; A61K 8/98(2006.01)i; A61Q 19/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류 기재) C12N 5/071(2010.01); B05D 1/38(2006.01); C12N 11/00(2006.01); C12N 5/074(2010.01); C12N 5/0775(2010.01); C12N 5/095(2010.01)		
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: 피부 유래 줄기세포(skin-derived stem cell), 하이드로겔(hydrogel), 세포 외기질(extracellular matrix, ECM), 상처(wound), 재생(regeneration)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2018-0282690 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 2018.10.04 단락 [0001]-[0109], [0415], [0416]	1-12
A	KR 10-2013-0124074 A (인제대학교 산학협력단 등) 2013.11.13 청구항 1	1-12
A	US 2016-0122723 A1 (ORGANOVO, INC.) 2016.05.05 전체 문헌	1-12
A	US 2011-0212501 A1 (YOO, SEUNG-SCHIK) 2011.09.01 전체 문헌	1-12
A	KR 10-2013-0061950 A (서경대학교 산학협력단) 2013.06.12 전체 문헌	1-12
☐ 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 2023년04월05일(05.04.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년04월06일(06.04.2023)
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) (2022년 7월)

10

20

30

40

50

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/021212

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2018-0282690 A1	2018/10/04	EP 3359645 A1	2018/08/15
		WO 2017-060240 A1	2017/04/13
KR 10-2013-0124074 A	2013/11/13	KR 10-1389849 B1	2014/04/29
US 2016-0122723 A1	2016/05/05	EP 3215603 A1	2017/09/13
		EP 3215603 B1	2021/09/22
		JP 2017-537654 A	2017/12/21
		JP 2021-045159 A	2021/03/25
		JP 7227211 B2	2023/02/21
		MA 40598 A	2017/09/13
		US 11529436 B2	2022/12/20
		US 2018-0272035 A1	2018/09/27
		WO 2016-073782 A1	2016/05/12
US 2011-0212501 A1	2011/09/01	WO 2010-030964 A2	2010/03/18
		WO 2010-030964 A3	2010/06/10
		WO 2010-030964 A9	2010/03/18
KR 10-2013-0061950 A	2013/06/12	KR 10-1413686 B1	2014/07/02

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2022년 7월)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 Q 90/00 (2009.01)

F I

A 6 1 Q 90/00

テーマコード (参考)

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,N
E,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,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,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,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. S P A N

ーグ イファヨデーギル 5 2 ビー ドン 3 0 5 ホ

(74)代理人 110000176

弁理士法人一色国際特許事務所

(72)発明者 リ, ソン チン

大韓民国 0 7 3 3 3 ソウル ヨンドウンポーグ ククチェグムユンーロ 8 6 1 0 1-3 3 0 3

(72)発明者 シン, チーヨン

大韓民国 3 2 8 0 0 チョンチュンナムード キエリョンーシ シンドアンーミョン キエリョンデ
ーロ 6 6 3 2 0 1-3 0 1

(72)発明者 チョン, チョン ファ

大韓民国 0 3 9 3 8 ソウル マポーグ ウォルド コプーロ 3 4-ギル 1 4 1 1 1 0 ホ

(72)発明者 キム, ヒチョン

大韓民国 1 3 5 0 3 キョンギード ソンナムーシ プンダンーグ ポルマルーロ 3 0 ボンーギル
3 2 9 1 6-4 0 6

F ターム (参考) 4B065 AA90X BC46 BD50 CA44

4C083 AA071 AA072 CC02 DD39 EE13 FF01

4C087 AA01 AA02 BB48 BB64 CA04 MA23 MA66 NA14 ZA89