

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-504473
(P2025-504473A)

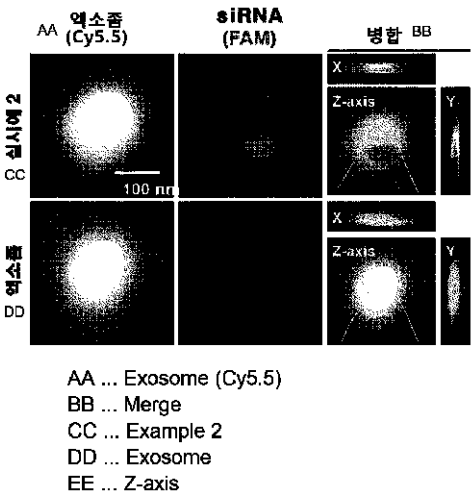
(43)公表日 令和7年2月12日(2025.2.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/20 (2006.01)	A 6 1 K	35/20		4 B 0 6 5
A 6 1 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711	Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105		4 C 0 8 4
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00		4 C 0 8 6
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00		4 C 0 8 7
		審査請求 有	予備審査請求 未請求	(全32頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-543099(P2024-543099)	(71)出願人	304039548		
(86)(22)出願日	令和5年1月20日(2023.1.20)		コリア・インスティテュート・オブ・サイエンス・アンド・テクノロジー		
(85)翻訳文提出日	令和6年7月19日(2024.7.19)		大韓民国, ソウル 1 3 6-7 9 1, ソンブクーク, ファランノ 1 4-ギル 5		
(86)国際出願番号	PCT/KR2023/001034	(74)代理人	110001508		
(87)国際公開番号	WO2023/140695		弁理士法人 津国		
(87)国際公開日	令和5年7月27日(2023.7.27)	(72)発明者	ヤン, ユス		
(31)優先権主張番号	10-2022-0009019		大韓民国, ソウル 0 2 7 9 2, ソンブクーク, ファランノ 1 4-ギル 5		
(32)優先日	令和4年1月21日(2022.1.21)	(72)発明者	キム, ソンファ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		大韓民国, ソウル 0 2 7 9 2, ソンブクーク, ファランノ 1 4-ギル 5		
(31)優先権主張番号	10-2022-0099821	(72)発明者	ハン, ゴンヒ		
(32)優先日	令和4年8月10日(2022.8.10)		大韓民国, ソウル 0 2 7 9 2, ソンブクーク, ファランノ 1 4-ギル 5		
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)	(72)発明者	大韓民国, ソウル 0 2 7 9 2, ソンブ		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 乳由来のエキソソームを有効成分として含む腸の健康機能改善用組成物及びその製造方法

(57)【要約】

本発明は、乳由来のエキソソーム；及び治療剤を含み、前記治療剤は、DNA、RNA又は小分子（small molecule）であり、前記治療剤は、エキソソームの内部空間に位置して封入されることを特徴とする、腸の健康機能改善用組成物を提供する。また（a）乳からエキソソームを分離する段階；（b）分離されたエキソソームを電気穿孔してエキソソームの表面に微細空隙を形成させる段階；（c）前記（b）段階の電気穿孔されたエキソソームと治療剤とを混合する段階；及び（d）エキソソームの内部に封入されていない治療剤を除去する段階を含む腸の健康機能改善用組成物の製造方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

乳由来のエキソソーム；及び治療剤を含み、
前記治療剤は、DNA、RNA又は小分子（small molecule）であり、
前記治療剤は、エキソソームの内部空間に位置して封入されることを特徴とする、腸の健康機能改善用組成物。

【請求項 2】

当該組成物は、60～90%の細胞内送達率を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【請求項 3】

前記乳は、ヒト、牛、羊、山羊、ヤギ、ラクダ、バッファロー又はヤク由来の乳であるか、又は初乳（colostrum）である、請求項 1 に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【請求項 4】

前記 RNA は、siRNA、miRNA、mRNA、shRNA、ncRNA、及び antisense RNA からなる群より選ばれた一つ以上の RNA である、請求項 1 に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【請求項 5】

前記 siRNA は、TNF- α siRNA、TGF- β siRNA、JAK3 siRNA、及び IL-6 siRNA からなる群より選ばれた一つ以上の siRNA である、請求項 4 に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【請求項 6】

前記 miRNA は、Let-7b-5p、miR-320a-3p、及び miR-21 からなる群より選ばれた一つ以上の miRNA である、請求項 4 に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【請求項 7】

当該組成物は液状剤形であり、

前記治療剤が封入された乳由来のエキソソームを 100～1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含む、請求項 1 に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【請求項 8】

当該組成物は凍結乾燥剤形であり、

前記治療剤が封入された乳由来のエキソソームを、組成物の総重量を基準として 0.001～100 重量%の範囲で含む、請求項 1 に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【請求項 9】

当該組成物は経口投与するものである、請求項 1 に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載の組成物を製造する方法であって、

（a）乳からエキソソームを分離する段階；

（b）分離されたエキソソームを電気穿孔してエキソソームの表面に微細空隙を形成させる段階；

（c）前記（b）段階の電気穿孔されたエキソソームと治療剤とを混合する段階；及び

（d）エキソソームの内部に封入されていない治療剤を除去する段階を含む、方法。

【請求項 11】

前記（b）段階の電気穿孔は、250～350 V の電圧を加えることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記（b）段階の電気穿孔は、3～7 回のパルスを加えることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記（b）段階の電気穿孔は、20～40 ms の時間の間パルスを加えることを特徴と

10

20

30

40

50

する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 (a) 段階の乳は、ヒト、牛、羊、山羊、ヤギ、ラクダ、バッファロー又はヤク由来の乳であるか、又は初乳 (colostrum) であることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 (c) 段階の治療剤は DNA であり、

前記 (d) 段階は、dnase を添加して封入されていない治療剤を除去する段階である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 (c) 段階の治療剤は RNA であり、

前記 (d) 段階は、rnase を添加して封入されていない治療剤を除去する段階である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 RNA は、siRNA、miRNA、mRNA、shRNA、ncRNA、及び antisense RNA からなる群より選ばれた一つ以上の RNA である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 siRNA は、TNF- α siRNA、TGF- β siRNA、JAK3 siRNA、及び IL-6R siRNA からなる群より選ばれた一つ以上の siRNA である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 miRNA は、Let-7b-5p、miR-320a-3p、及び miR-21 からなる群より選ばれた一つ以上の miRNA である、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2022 年 1 月 21 日付で出願された大韓民国特許出願第 10-2022-0009019 号及び 2022 年 8 月 10 日付で出願された大韓民国特許出願第 10-2022-0099821 号に基づいて優先権を主張し、当該出願の全内容が本出願に参照として組み込まれる。

【0002】

国家支援の研究開発に関する説明

本研究は、韓国科学技術研究院の主管の下、科学技術情報通信部・韓国科学技術研究院の研究運営費支援 (R&D) (主要事業費) 事業 (ハイパーコネクテッド医療機器リバース仲介研究事業、課題固有番号: 1711152094)、科学技術情報通信部・韓国科学技術研究院の研究運営費支援 (主要事業費) 事業 (オーダーメイド型診断・治療、再生、リハビリ及び新薬の開発、課題固有番号: 1711173292)、及び科学技術情報通信部・革新新薬基礎基盤技術開発事業 (炎症性腸疾患の治療のための革新型 siRNA 経口治療薬の開発、課題固有番号: 1711160075) の支援によって行われたものである。

【0003】

本開示は、乳由来のエキソソームを有効成分として含む腸の健康機能改善用組成物に関する発明である。

【背景技術】

【0004】

エキソソームは、直径 30~150 nm の細胞外小胞体の一種であって、多様な種類の細胞から分泌される。このようなエキソソームは、細胞間情報を伝達する重要な役割を果たすという事実が知られ、次世代薬物送達技術に用いられ始めた。しかし、細胞が分泌す

10

20

30

40

50

るエキソソームの量が小さすぎて、高い純度を確保することが難しく、且つ比較的不安定な物性を持つため、大量生産に限界がある。最近、食品由来のエキソソームが脚光を浴びている。このような食品由来のエキソソームは容易に入手でき且つ一般的に安全である。中でも、特に乳由来のエキソソームは、抗炎症特性があり、病理学的及び生理学的活性を媒介するのに重要なマイクロRNAをエキソソーム自体に含んでいる。乳由来のエキソソームは、乳からエキソソームを高い収率で分離し、精製することができ、急激な環境変化、例えばpHや温度などにも高い安定性を維持する。また、乳由来のエキソソームは、生体利用率が高いため薬物の経口投与が可能となり、特に炎症性腸疾患のような胃腸管内に病変が存在する場合に活用度が高い。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

一側面において、腸の健康機能改善用組成物を提供することをその目的とする。

【0006】

一側面において、治療剤がエキソソームの内部空間に位置して封入されることを特徴とする、腸の健康機能改善用組成物を提供することを目的とする。

【0007】

一側面において、経口投与が可能であり且つ腸関連疾患又は機能改善のための組成物を提供することを目的とする。

【0008】

一側面において、腸の健康機能改善用組成物の製造方法を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

一側面において、乳由来のエキソソーム；及び治療剤を含み、前記治療剤は、DNA又はRNAであり、前記治療剤は、エキソソームの内部空間に位置して封入されることを特徴とする、腸の健康機能改善用組成物を提供する。

【0010】

他の一側面において、(a) 乳からエキソソームを分離する段階；(b) 分離されたエキソソームを電気穿孔してエキソソームの表面に微細空隙を形成させる段階；(c) 前記(b) 段階の電気穿孔されたエキソソームと治療剤とを混合する段階；及び(d) エキソソームの内部に封入されていない治療剤を除去する段階を含む、腸の健康機能改善用組成物の製造方法を提供する。

30

【発明の効果】

【0011】

細胞から由来の細胞外小胞体の低い収率及び高い維持コストを克服するために、需給が円滑であり且つ容易にアクセス可能な乳からエキソソームを容易に高い収率で分離及び精製することができる。また、比較的不安定な物性を持つ細胞由来の細胞外小胞体に代えて、pH、温度などでの急激な環境変化にも高い安定性を維持する特性を持つ乳エキソソームに、電気穿孔法を用いて治療剤を封入することができる。このような乳由来のエキソソームは、生体利用率が高いため薬物の経口投与が可能となり、特に炎症性腸疾患のように胃腸管内に病変が存在する場合、活用度が高いという長所がある。

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1a】エキソソームタンパク質マーカー(Alix、Tsg-101、and CD9)及び非エキソソームタンパク質マーカー(GM130)の発現水準を示す。

【図1b】乳由来のエキソソームの大きさ分布グラフである。

【図1c】乳由来のエキソソームの代表的なTEM画像を示す。

【図2a】0、1、4、8、12又は24時間の間に0.05又は0.1mg/mlのCy5.5標識されたCollexoとともに培養されたRAW264.7及びNCM460細胞の共焦点顕微鏡画像である。図中、暗い小さな円がDAPIを意味し、明るい円は

50

C o l - e x o を意味する。

【図 2 b】0、0.1、0.2、0.5 又は 1 m g / m l の乳由来のエキソソームと 24 時間培養した N C M 4 6 0 及び R A W 2 6 4 . 7 細胞の細胞増殖速度を示す (n = 6 ; n s = 有意ではない、** p < 0 . 0 1 及び **** p < 0 . 0 0 0 1) 。

【図 2 c】N C M 4 6 0 の細胞生存率を示したグラフである。

【図 3 a】細胞内減少した R O S を確認した画像である。

【図 3 b】M 1 型大食細胞で炎症性サイトカインをコードする m R N A の発現を示したグラフである (n = 4 ; * p < 0 . 0 5 、 ** p < 0 . 0 1 、 **** p < 0 . 0 0 0 1) 。

【図 4 a - 4 b】C y 5 . 5 標識された乳由来のエキソソームの生体分布画像である。図 4 a は臓器の全体画像であり、図 4 b は臓器の断面画像である。

【図 4 c】D S S 大腸炎誘導治療及び乳由来のエキソソームの経口投与の日程を示した模式図である。

【図 4 d】左側から D S S 大腸炎誘導マウスに対する体重減少、D A I 指数変化を示したグラフ (n ≥ 1 0 ; n s = 有意ではない、* p < 0 . 0 5 、 ** p < 0 . 0 1 、 a n d *** * p < 0 . 0 0 0 1) 、 2 7 日目にマウスを犠牲させ結腸の長さを測定したグラフである (n ≥ 1 0 ; n s = 有意ではない、*** p < 0 . 0 0 1 、 a n d **** p < 0 . 0 0 0 1) 。

【図 5 a - 5 c】D S S 誘発大腸炎の重症度を弱める実施例 1 の効果を示す。図 5 a は、2 7 日目にヘマトキシリン及びエオシン (H & E) 染色にて分析した結腸組織の組織病理学的画像である (○ 表面上皮消失、△ 潰瘍、↑ 炎症細胞の浸潤) 。図 5 b は、C O X - 2 に対する代表的な免疫組織化学 (I H C) 画像であり、矢印は C O X - 2 タンパク質が高度に発現される位置を示す。図 5 c は、T U N E L 染色によって検出された結腸壊死の代表的な画像である。

【図 6 a】化学発光分析によって測定された結腸の R O S を示す (n ≥ 7 ; n s > 0 . 0 5 、 *** p < 0 . 0 0 1 及び **** p < 0 . 0 0 0 1) 。

【図 6 b】i N O S に対する免疫蛍光 (I F) 染色の代表的な画像である (青色、図中暗い灰色 : D A P I 、 緑色、図中明るい灰色 : i N O S) 。

【図 6 c】結腸組織で炎症性サイトカインをコードする m R N A の発現を示す (n = 4 ; * p < 0 . 0 5 及び *** p < 0 . 0 0 1) 。

【図 7】電気穿孔法に対する乳エキソソームの安定性を示すグラフである。

【図 8】乳由来のエキソソームに担持された s i R N A をアガロースゲル上で確認した画像である。

【図 9】電気穿孔変数による s i R N A の乳由来のエキソソームの封入効率を比較したグラフである。

【図 1 0 a】及び

【図 1 0 b】T N F - α s i R N A が封入された乳由来のエキソソームの視覚化写真及び相対的な蛍光領域の大きさを示したグラフである。

【図 1 1】T N F - α s i R N A (C y 3 l a b e l e d) が封入された乳エキソソームの細胞内吸収画像である。

【図 1 2】T N F - α s i R N A が封入された乳エキソソームの細胞内送達率を示した共焦点画像及び蛍光強度グラフである。

【図 1 3】T N F - α s i R N A が封入された乳エキソソームの遺伝子沈黙効果 (i n v i t r o) を示すグラフである。

【図 1 4 a】I B D 誘導及び治療日程を示した模式図である。

【図 1 4 b】及び

【図 1 4 c】I B D 誘導マウスの体重減少及び D A I 指数変化を観察したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

用語の定義

本明細書で用いられた用語「細胞内送達率」とは、リポフェクタミン (L i p o f e c

10

20

30

40

50

t a m i n) を用いて T N F - α s i R N A を形質注入して染色された細胞の相対的な蛍光強度を基準 (100%) にして、細胞内の相対的な T N F - α s i R N A の蛍光強度を測定し百分率で表した、封入された T N F - α s i R N A が細胞内でどれだけ送達されるかのことを意味するものである。

【0014】

以下、本発明を詳しく説明する。

【0015】

一側面において、本発明は、乳由来のエキソソーム；及び治療剤を含み、前記治療剤は、DNA、RNA又は小分子 (small molecule) であり、前記治療剤は、エキソソームの内部空間に位置して封入されることを特徴とする、腸の健康機能改善用組成物を提供する。本明細書で「エキソソームの内部空間に位置して封入される」とは、治療剤などの物質がエキソソームの内部空間に完全に入り込んで封入されることを意味し、付着、吸着又は接着などの方式でエキソソームの表面のみに存在するものではないことをいう。

10

【0016】

本発明の他の側面において、対象の腸の健康機能改善のための方法であって、当該方法は、乳由来のエキソソーム；及び治療剤の有効量を、これを必要とする対象に投与する段階を含み、前記治療剤は、DNA、RNA又は小分子 (small molecule) であり、前記治療剤は、エキソソームの内部空間に位置して封入されることを特徴とする方法を提供する。

20

【0017】

本発明の他の側面において、腸の健康機能改善のための組成物を製造するに際する乳由来のエキソソーム；及び治療剤の用途を提供する。

【0018】

本発明の他の側面において、腸の健康機能改善のための乳由来のエキソソーム；及び治療剤を提供する。

【0019】

例示的な一具現例において、前記乳は、ヒト、牛、羊、山羊、ヤギ、ラクダ、バッファロー又はヤク由来の乳であるか、又は初乳 (colostrum) であってよく、これらに制限されない。

30

【0020】

例示的な一具現例において、前記RNAは、siRNA、miRNA、mRNA、shRNA、ncRNA、及びantisense RNAからなる群より選ばれた一つ以上のRNAであってよく、これらに制限されない。

【0021】

例示的な一具現例において、前記siRNAは、TNF- α siRNA、TGF- β siRNA、JAK3 siRNA、及びIL-6R siRNAからなる群より選ばれた一つ以上のsiRNAであってよい。

【0022】

例示的な一具現例において、前記miRNAは、Let-7b-5p、miR-320a-3p、及びmiR-21からなる群より選ばれた一つ以上のmiRNAであってよい。

40

【0023】

例示的な一具現例において、前記組成物は液状剤形であってよく、前記治療剤が封入された乳由来のエキソソームを100~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含んでよい。具体的に、前記乳由来のエキソソームは、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、450 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上又は500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であり、且つ1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、950 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、850 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、650 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下又は550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度であってよい

50

。

【0024】

例示的な一具現例において、前記組成物は凍結乾燥剤形であってよく、前記治療剤が封入された乳由来のエキソソームを、組成物の総重量を基準として0.001～100重量%の範囲で含んでよい。具体的に、前記治療剤が封入された乳由来のエキソソームの濃度又は溶媒の種類に応じて当業者が適宜変更して前記含量を調節してよい。例えば、前記含量は、0.001重量%以上、0.01重量%以上、0.1重量%以上、1重量%以上、5重量%以上、10重量%以上、15重量%以上、20重量%以上、25重量%以上、30重量%以上、35重量%以上、40重量%以上、45重量%以上又は50重量%以上であり、且つ100重量%以下、95重量%以下、90重量%以下、85重量%以下、80重量%以下、75重量%以下、70重量%以下、65重量%以下、60重量%以下又は55重量%以下であってよい。

10

【0025】

例示的な一具現例において、前記組成物は経口投与するものであってよい。

【0026】

他の一側面において、本発明は、(a) 乳からエキソソームを分離する段階；(b) 分離されたエキソソームを電気穿孔してエキソソームの表面に微細空隙を形成させる段階；(c) 前記(b) 段階の電気穿孔されたエキソソームと治療剤とを混合する段階；及び(d) エキソソームの内部に封入されていない治療剤を除去する段階を含む、腸の健康機能改善用組成物の製造方法を提供する。

20

【0027】

例示的な一具現例において、前記(b) 段階の電気穿孔は、250～350vの電圧を加えることであってよい。具体的に、前記電圧は、250v以上、255v以上、260v以上、265v以上、270v以上、275v以上、280v以上、285v以上、290v以上、295v以上又は300v以上であり、且つ350v以下、345v以下、340v以下、335v以下、330v以下、325v以下、320v以下、315v以下、310v以下又は305v以下であってよい。

【0028】

例示的な一具現例において、前記(b) 段階の電気穿孔は、3～7回のパルスを加えることであってよい。具体的に、前記パルスは、3回以上、4回以上、5回以上であり、且つ7回以下又は6回以下であってよい。

30

【0029】

例示的な一具現例において、前記(b) 段階の電気穿孔は、20～40msの時間の間パルスを加えることであってよい。具体的に、前記パルスは、20ms以上、21ms以上、22ms以上、23ms以上、24ms以上、25ms以上、26ms以上、27ms以上、28ms以上、29ms以上又は30ms以上であり、且つ40ms以下、39ms以下、38ms以下、37ms以下、36ms以下、35ms以下、34ms以下、33ms以下、32ms以下又は31ms以下であってよい。

【0030】

例示的な一具現例において、前記(a) 段階の乳は、ヒト、牛、羊、山羊、ヤギ、ラクダ、バッファロー又はヤク由来の乳であるか、又は初乳(colostrum)であってよい。

40

【0031】

例示的な一具現例において、前記(c) 段階の治療剤はDNAであり、前記(d) 段階は、dnaseを添加して封入されていない治療剤を除去することであってよい。

【0032】

例示的な一具現例において、前記(c) 段階の治療剤はRNAであり、前記(d) 段階は、rnaseを添加して封入されていない治療剤を除去することであってよい。

【0033】

例示的な一具現例において、前記(c) 段階のRNAは、siRNA、miRNA、m

50

RNA、iRNA、ncRNA、及びantisense RNAからなる群より選ばれた一つ以上のRNAであってよい。

【0034】

例示的な一具現例において、前記(c)段階のsiRNAは、TNF- α siRNA、TGF- β siRNA、JAK3 siRNA、及びIL-6R siRNAからなる群より選ばれた一つ以上のsiRNAであってよい。

【0035】

例示的な一具現例において、前記(c)段階のmiRNAは、Let-7b-5p、miR-320a-3p、及びmiR-21からなる群より選ばれた一つ以上のmiRNAであってよい。

【0036】

以下、実施例等を通じて本発明をさらに詳しく説明する。なお、これらの実施例はあくまでも本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されるものではない。本発明の請求の範囲に記載された技術思想と実質的に同一の構成を有し且つ同一の作用効果を奏するものは、いずれも本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】

【0037】

1. ウシの初乳由来のエキソソームの炎症性腸疾患の予防及び治療効果の確認

(1) 細胞培養

NCM460細胞及びRAW264.7細胞(40071、韓国細胞株バンク)を、10%ウシ胎児血清(FBS、fetal bovine serum、FP-0500-A、Atlas Biologicals、USA)及び1%抗生剤-抗真菌剤(15240096、ThermoFisher Scientific、USA)が含有された高グルコース(SH30243.01、Hyclone、USA)のダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、Dulbecco's modified eagle medium)で育成した。細胞を5%二酸化炭素(CO₂)とともに37℃インキュベーターでインキュベートした。M1様大食細胞を誘導するために、RAW264.7細胞を、100ng/ml LPS(L4524、sigma、USA)及び20ng/ml IFN- γ (315-05、Peprotech、UK)で24時間刺激させた。

【0038】

(2) 初乳からのエキソソームの分離

エキソソームは4℃で連続遠心分離によって製造された。ウシの初乳(慶尚南道昌寧郡桂城面鳳山官洞1路20所在の李ソンヨンチャンブク牧場入手)を、JA-14ローター(Avanti J-E、Beckman Coulter、USA)付きの高速遠心分離機を用いて、5,000xgで30分間及び12,000xgで1時間遠心分離した。上層液は40 μ mストレーナー(93040、SPL、韓国)に通し、使用するまで-80℃で保管した。ろ過された乳を、45 Tiローター(Optima XE-100、Beckman Coulter、USA)付きの超遠心分離機を用いて、35,000xgで1時間及び最大加速/デカル(accel/decal)にて70,000xgで3時間遠心分離した。溶液を3つの層に分離し、中間層を孔径0.8、0.45、0.2 μ m(16592-K、16555-K、16534-K、Sartorius Stedim Biotech、Germany)のシリンジフィルターにて順次ろ過した。

【0039】

エキソソームとみなされるペレットは、100,000xgで1時間遠心分離して得た。エキソソームをダルベッコのリン酸緩衝食塩水(DPBS、LB001、Wellgene、韓国)に再懸濁し4℃で一晩回転させた。このようにして得たエキソソームを以下のウシ初乳由来のエキソソーム(Col-exo、実施例1)と命名する。

【0040】

エキソソームのない乳(Exo-free milk、比較例1)の製造のために、エキソソームペレットを除いた透明な溶液を200,000xgで3時間遠心分離して残っ

10

20

30

40

50

ているエキソソームを除去し、上層液をエキソソームのない乳とみなした。

【0041】

(3) ウエスタンブロット (Western blot)

エキソソームタンパク質の濃度はBCA assay kit (23225、ThermoFisher Scientific、USA)を用いて定量し、タンパク質はSDS-PAGE loading bufferで変性させた。サンプルをドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。分離されたタンパク質をニトロセルロース膜に移し、5%脱脂乳でブロックした。一次抗体は24時間標的タンパク質に結合された。前記膜をトリス緩衝食塩水 (tris-buffered saline)、0.1% Tween 20洗剤 (TBST)ですすぎ、タンパク質は室温で40分間HRP-標識二次抗体とともにインキュベートして標識された。標識されたタンパク質はClarity Western ECL基質 (1705061、Bio-Rad、USA)で視覚化された。

10

【0042】

抗体としては、Alix (1:500、NB100-65678、Novus、USA)、Tsg-101 (1:1000、ab83、Abcam、USA)、CD9 (1:1000、NB500-494、Novus、USA)、GM130 (1:500、PA1077、ThermoFisher Scientific、USA)、ヤギ抗マウスIgG抗体 (HRP) (1:1000、GTX21311-01、GeneTex、USA)、ヤギ抗ウサギIgG抗体 (HRP) (1:1000、GTX21310-01、GeneTex、USA) が用いられた。

20

【0043】

実施例1及び比較例1に対する結果は、図1aに示すように、エキソソームタンパク質のマーカーであるAlix、Tsg-101及びCD9は実施例1で確認されたのに対し、非エキソソームタンパク質であるGM130は比較例1で発見された。このような結果は、エキソソームの有無によって比較例1 (Exo-free milk) 及び実施例1 (Collexo) が区別されることを示している。

【0044】

(4) 動的光散乱 (Dynamic lighting scattering、DLS) 及び透過電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy、TEM)

30

DLSのためにエキソソームを蒸留水で0.1 µg/µlに希釈し、使い捨てキュベット (art. 01960-00、Kartell LABWARE、Italy)に移した。エキソソームの大きさ分布は173°の固定角でDLS (Zetasizer Nano ZS、Malvern Instruments、UK)にて測定した。各サンプルに対して3つの独立的な測定を行い、ソフトウェアによる分析のために平均をとった。

【0045】

TEM画像の確認のために、10 µgのエキソソームを炭素コートされた銅グリッド (CF200-Cu、Emgrid Australia、Australia)にて室温で30分間蒸着した。エキソソームのネガティブ染色のために、銅グリッドを1分間ウラニルアセテート (uranyl acetate)と対照した。エキソソームの形態はTEM (FEI Tecnai F20 G2、Philips、Netherlands)で視覚化した。

40

【0046】

図1b及び図1cで示したように、実施例1のエキソソームの平均直径が85.2 nmであり、球形であることが確認された。

【0047】

(5) エキソソームの細胞吸収

エキソソームは、4℃で一晩回転させ、650 nMシアニン (Cyanine) 5.5

50

NHSエステル (ester) で標識された。非結合断片を Airfuge を用いて 2 回洗浄した。細胞は、RAW264.7 細胞の場合は 2×10^5 細胞 / ディッシュ (cell / dish)、NCM460 細胞の場合は 3×10^5 細胞 / ディッシュ (cell / dish) の密度で共焦点ディッシュにプレートされた。エキソソームを各濃度 (0.05 及び 0.1 mg / ml) で処理し、各時点で DPBS にて洗浄した。画像をキャプチャするために、細胞をホルムアルデヒドで固定してから 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を加えて核酸を 15 分間染色した。画像は共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP6、Leica、Germany) で撮像した。

【0048】

(6) 細胞増殖及び生存力分析

細胞生存分析は Cell counting Kit-8 (CCK-8) (CK04、Dojindo、Japan) ガイドに従い行われた。NCM460 及び RAW264.7 細胞を 96 ウェルプレートにそれぞれ 6,000 及び 8,000 細胞 / ウェル (cell / well) の密度でシーディング (seeding) し、24 時間付着できるようにした。細胞を 24 時間種々の濃度の比較例 1 (エキソソームのない乳) 又は実施例 1 のエキソソーム (生存性分析で 0.5 mg / ml) で処理した。生存力分析のための追加段階として、細胞を 2.5% DSS (0216011080、MP Biomedicals、USA) 溶液 (w / v) と共に 24 時間インキュベートした。培地を 10% CCK-8 溶液を含有する無血清培地に取り替えた。450 nm 波長での吸光度をマイクロプレートリーダー (SpectraMAX 340、Molecular Devices、USA) で測定した。RAW264.7 細胞は、エキソソームで処理する前に、100 ng / ml LPS 及び 20 ng / ml INF- γ と共に 24 時間培養された。

【0049】

実施例 1 (Col-exo) の細胞内送達効率を調べた。RAW264.7 細胞を 0、1、4、8、12 又は 24 時間の間に 0.05 又は 0.1 mg / ml の濃度にて Cy5.5 で標識された実施例 1 と共に培養した (図 2a)。図 2a 中、暗い小さな円は DAPI を意味し、明るい円は Col-exo を意味する。共焦点画像をみると、実施例 1 (Col-exo) の相当な細胞内吸収が 8 時間以内に現われ、画像は吸収が 24 時間以内に飽和したことを示している。また、NCM460 細胞でも類似したパターンを示した。このようなデータに基づいて、実施例 1 (Col-exo) の吸収時間を以降の in vitro 及び in vivo 実験で 24 時間と設定した。

【0050】

次いで、実施例 1 (Col-exo) と細胞成長との関係を調べるために、NCM460 細胞と RAW264.7 細胞に対して細胞増殖分析を行った (図 2b)。NCM460 細胞に 0.1 mg / ml 濃度の実施例 1 (Col-exo) を処理したとき、細胞増殖が $113.1 \pm 3.4\%$ と有意に増加したことが分かる。このような細胞増殖は、実施例 1 の 1 mg / ml の濃度まで類似に維持された。他の細胞株である RAW264.7 は、0.5 mg / ml の濃度で細胞成長の有意な増加を示し、特に 1 mg / ml の濃度で $121.8 \pm 4.7\%$ に増加した。

【0051】

また、炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease、IBD) を誘発する化学物質である dextran sulfate sodium (DSS、36,000 - 50,000 Da) で結腸上皮細胞を損傷させてから外部損傷を修復する実施例 1 (Col-exo) の能力を観察した (図 2c)。2.5% DSS を 24 時間処理して細胞損傷を発生させ、その結果、細胞成長速度が $82.7 \pm 3.7\%$ に減少した。比較例 1 (Exo-free milk) を処理したグループは DSS 処理と類似した水準の細胞生存率を示したのに対し、実施例 1 (Col-exo) は $91.8 \pm 2.6\%$ まで細胞生存率を回復することができた。結果的に、実施例 1 (Col-exo) は、NCM460 及び RAW264.7 細胞の増殖を増加させることが分かった。

【0052】

(7) 抗炎症効果の確認

次いで、ウシ初乳由来のエキソソームが細胞内活性酸素種（ROS）の濃度を減少させることができるかどうかをDCF-DAアッセイを用いて確認した。RAW264.7細胞を共焦点ディッシュに 2×10^5 細胞の密度でシーディングし、 100 ng/ml LPS及び 20 ng/ml IFN- γ を24時間処理してM1大食細胞に誘導した。NCM460細胞を 3×10^5 個細胞/ウェル（cell/well）の密度で24時間培養した。エキソソームのない乳又はエキソソームを 0.1 mg/ml の濃度で各細胞に24時間処理した。酸化ストレス（oxidative stress）は $100 \mu\text{M}$ の H_2O_2 を30分間提供し、 $50 \mu\text{M}$ の2',7'-dichlorofluorescein diacetate（DCFDA）を30分間細胞と共に培養して誘導した。DPBSで細胞を洗浄した後、共焦点顕微鏡を用いて蛍光画像を得た。

10

【0053】

図3aに示すように、NCM460細胞とRAW264.7細胞のいずれにおいても実施例1（Col-exo）処理群の細胞内ROS数値（明るい円）が過酸化水素処理群又は比較例1（Exo-free milk）処理群に比べて顕著に減少した。

【0054】

(8) 試験管内でのサイトカイン水準の定量化

また、炎症反応に関与する細胞内サイトカインをコードするmRNAの発現水準を分析した。RAW264.7細胞（ 2.5×10^5 細胞/ml）を培養ディッシュにプレートし、 100 ng/ml LPS及び 20 ng/ml IFN- γ で24時間刺激した。M1誘導細胞をエキソソームのない乳又はエキソソームで24時間処理してからDPBSで2回洗浄した。メーカーのガイドラインに従いTrizolTM試薬でtotal RNAを抽出し、逆転写後、oligo（dT）プライマーでcDNAを生成した。サイトカインの定量は、SYBR Green qPCR premix（RT501S、enzymomics、韓国）と各プライマー（表1）を用いた定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）で進行し、PCR周期はpremixプロトコルに従い設定した。

20

【0055】

【表1】

Gene	Primer sequence (F: Forward; R: Reverse)
GAPDH	F: CATGCCGCCTGGAAACCTGCCA R: TGGGCTGGGTGGTCCAGGGGTTTC
TNF- α	F: AGTGGAGGAGCAGCTGGAGT R: TCCCAGCATCTTGTGTTTCTG
IL-6	F: GAGGATAACCACTCCCAACAGACC R: TTCACAGAGGATAACCACTCC
IL-10	F: CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA R: CCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA

30

40

まず、RAW264.7細胞をM1大食細胞に分化させ、それぞれ実施例1（Col-exo）及び比較例1（Exo-free milk）で処理した。図3bに示したように、定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）データでは、腫瘍壊死因子- α （tumor necrosis factor- α 、TNF- α ）及びインターロイキン-6（interleukin-6、IL-6）のmRNA発現水準が、実施例1の方が対照群に比べて0.69倍及び0.61倍減少した結果を示した。対照的に、抗炎症性サイトカインであるインターロイキン-10（IL-10）のmRNA発現水準は、実施例1（Col-

50

e x o) 群の方が対照群に比べて1.7倍増加した結果を示した。したがって、実施例1は細胞水準で抗炎症効果があることが分かった。

【0056】

(9) 初乳由来のエキソソームの生体外 (e x v i v o) 分布 (b i o - d i s t r i b u t i o n)

大腸炎のマウスモデルで実施例1 (C o l - e x o) の効果を確認する前に、C y 5 . 5 標識された実施例1 (C o l - e x o) を経口投与した後、臓器の相対的な生体分布を測定した。B A L B / c マウスにC y 5 . 5 で標識されたエキソソームを経口投与した。マウスを経口胃管栄養法後、5時間と24時間経過後に胃腸管と心臓、肺、脾臓、腎臓、及び肝を含むその他の器官を収集した。分離された臓器の蛍光強度は生体内イメージングシステム (I V I S) (L u m i n a S e r i e s I I I P e r k i n E l m e r , U S A) を用いて推定された。エキソソームの吸収は、ホルマリン固定された、パラフィン包埋胃腸器官から観察された。パラフィンが包埋された組織を5 μ mの厚さに切断した。代表的な画像は共焦点顕微鏡を用いてキャプチャされた。

10

【0057】

その結果、図4aに示すように、C y 5 . 5 - l a b e l e d C o l - e x o を食べさせてから5時間後に蛍光強度を測定したとき、胃腸管、特に結腸で強い信号を示した。また、24時間の時点で胃と結腸で蛍光信号が有意に維持されることを確認した。一方、図4bから確認できるように、胃、小腸、結腸をそれぞれスライスしてC y 5 . 5 で標識された実施例1 (C o l - e x o) が臓器に吸収されることを観察した。C y 5 . 5 で標識された実施例1 (C o l - e x o) の吸収の大部分は胃と結腸で発見された。24時間後に吸収されたエキソソームが顕著に減少することを確認した。このため、実施例1を毎日マウスに経口投与した。

20

【0058】

(10) 大腸炎マウスモデルの炎症反応の推定

8週齢のB A L B / c 雌マウス (O r i e n t B i o、韓国) を潰瘍性大腸炎モデルに使用した。マウスを無作為に3つのグループ、健康対照群 (食塩水)、D S S - 誘導大腸炎 (D S S)、C o l - e x o 前処理 (実施例1) に分け、10日間順応期間を設けた。実施例1 (C o l - e x o) グループは1週間毎日初乳由来のエキソソーム1mgを経口胃管栄養法で前処理し、他のグループには食塩水のみを与えた。2.5% D S S 溶液を飲用水に任意に1週間投与して化学的に炎症性腸疾患 (I B D) を誘導した。27日目に、マウスを犠牲させて結腸の長さを推定した (図4c)。

30

【0059】

1) 疾患活動性指数 (D i s e a s e A c t i v i t y I n d e x、D A I)

疾患活動性指数は、体重減少、糞便の粘度、及び糞便出血の特性について、18日目から27日目まで毎日各マウスに対して3人の独立した観察者が評価した (表2)。総点数の範囲は0から12までであり、点数が高いほど疾患の重症度が高い。

【0060】

【表2】

点数	体重減少 (%)	糞便の粘度	糞便出血
0	< 5 %	通常	通常
1	5 ~ 1 0 %		
2	1 0 ~ 1 5 %	軟便	潜血
3	1 5 ~ 2 0 %		
4	> 2 0 %	下痢	出血

40

50

定められた日程に従い動物実験を進行した結果、DSSグループは急激な体重減少を示したのに対し、実施例1 (Col-exo) グループはDSSで誘発された大腸炎マウスの体重減少が効果的に抑制された。(図4d)。

【0061】

2) 生体外 (ex vivo) ROSイメージング

27日目にL-012 (120-04891、FujiFilm Wako Chemicals、Japan) をDPBSに溶解して製造し常温の暗室に保管した。L-012溶液を20mg/kgの用量で腹腔内注射し、15分後にマウスの結腸を分離した。分離された結腸のROSは生体内イメージングシステム (IVIS) (Lumina Series I II PerkinElmer、USA) によって画像化した。データは5分間測定 (p/s/cm²/sr) に対する平均輻射効率を示す。

10

【0062】

定められた日程に従い動物実験を進行した結果、DSSグループは急激な体重減少を示したのに対し、実施例1 (Col-exo) グループはDSSで誘発された大腸炎マウスの体重減少が効果的に抑制された。また、実施例1 (Col-exo) グループのDAI (disease activity index) 点数はDSSグループよりも有意に低かった。実施例1 (Col-exo) グループの結腸の長さはDSSグループに比べて有意に長く、食塩水グループと類似した水準に回復した(図4d)。以上の実験を通じて実施例1がDSSで誘発された大腸炎を緩和させることを確認した。

20

【0063】

(11) 組織学的分析

分離されたマウス結腸組織はSwiss-roll技法で用意された。結腸サンプルをホルマリンに一晩浸漬固定し脱水しパラフィンに包埋した。すべての組織標本を5μmの厚さに切断した。

【0064】

1) H&E (Hematoxylin and eosin)

セクションをキシレンで脱口ウシヘマトキシリンで染色した。水道水で洗浄後、ブルーイング剤で核染色を完了した。タンパク質はeosin (ab245880、Abcam、USA) によって非特異的に染色された。スライドにトルエンを装着し、光学顕微鏡 (BX51、Olympus Corporation、Japan) を用いて観察した。

30

【0065】

その結果、DSSグループの結腸から深刻な表在性上皮損傷、潰瘍、及び免疫細胞の浸潤が確認された(図5a)。これに対し、実施例1のグループは軽微な上皮増殖を示した。

【0066】

2) 免疫組織化学 (Immunohistochemistry、IHC)

COX-2は炎症の開始を誘導する核心の分子であるため、免疫組織化学 (IHC) を用いて各グループでのCOX-2タンパク質の発現水準を調べた。結腸組織からのCOX-2の発現は、メーカーのプロトコルに従いMouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit (ab64264、Abcam、USA) を用いて検出された。標的タンパク質は1% BSA及び0.5% Triton X-100を含有するPBS中のCOX-2抗体 (1:500、ab15191、Abcam、USA) でタグを指定した。組織セクションをDAB基質で染色しヘマトキシリンで対照染色した。画像は光学顕微鏡でキャプチャされた。

40

【0067】

図5bから確認できるように、実施例1 (Col-exo) グループの大腸では、DSSグループに比べてCOX-2タンパク質の発現が減少した。

【0068】

3) 免疫蛍光 (Immunofluorescent、IF)

組織細胞死の程度を視覚化するために、fluorometric TUNEL Sy

50

stem (G3250、Promega、USA) のメーカ指針に従い TUNEL 分析を行った。すなわち、再水和された組織切片をホルムアルデヒドで固定し、透過性のためにプロテイナーゼ K 溶液を添加した。ホルムアルデヒド固定を繰り返し、平衡緩衝液と共にインキュベートした。アポトーシス (Apoptosis) 領域はターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) 反応によって表示され、DAPI で対照染色された。

【0069】

図 5 c を見ると、結腸細胞の細胞死は TUNEL 染色データから分かるように、DSS グループでひどく発生しており、実施例 1 (Col-exo) グループで優勢に回復した。その結果、実施例 1 は、大腸炎及び細胞死の重症度を軽減するのに有効であった。

10

【0070】

(12) 生体内 (in vivo) サイトカイン水準の定量化

Col-exo が結腸炎症の緩和に及ぼす影響を確認するために、ルミノールベースの化学発光プローブを用いて結腸の ROS 水準を測定した。マウス結腸組織は Trizol TM 試薬と共にホモジナイザー (HG-15D、Wise Tis、Korea) を用いて均質化された。均質化の後、Trizol TM 試薬の手順マニュアルに従い結腸組織の総 RNA を得た。cDNA 合成後、メーカのプロトコルに従い SYBR Green (RT501M、Enzynomics、Korea) を用いて qRT-PCR を行った。すべての qRT-PCR は QuantStudio TM1 Real-Time PCR 機器 (Applied Biosystems、USA) を用いて行われた。各プライマーは (表 1) に要約されている。

20

【0071】

その結果、ROS 水準が DSS グループで有意に増加し、実施例 1 (Col-exo) グループで半分未満に減少した結果を示した (図 6 a)。

【0072】

(13) 腸の炎症改善効果の確認

次いで、Col-exo の腸の炎症改善効果を確認するために、免疫蛍光法 (IF) を用いて伝染性 M1 型大食細胞の標識子である iNOS タンパク質の発現を確認した。iNOS に対する染色でマウス結腸組織の大食細胞の浸潤を検出した。脱パラフィン化された組織を再水和し、抗原レトリバー緩衝液 (Citrate buffer pH 6.0) (ab93678、Abcam、USA) で沸かした。スライドを PBS、0.05 % Tween 20 洗剤 (PBST) で洗浄し、5 % BSA (w/v) を含有する PBST にて室温で 10 分間ブロックした。1 % BSA (w/v) 及び 0.5 % Triton-100 (v/v) を含有する PBS で製造された Alexa fluor 488 接合された iNOS モノクローナル抗体 (53-5920-82、eBioscience、USA) は 4 °C で一晩セクションを染色した。核酸は室温で 15 分間 DAPI で染色された。スライドは共焦点顕微鏡で撮像した水溶性マウンティングソリューション (0100-01、Southern Biotech、USA) でマウントされた。その結果、図 6 b に示すように、iNOS タンパク質が、DSS グループでは過発現したのに対し、実施例 1 (Col-exo) グループではほとんど観察されなかった。

30

40

【0073】

また、qRT-PCR を用いて炎症性サイトカインの mRNA 発現を調べた (図 6 c)。qRT-PCR の結果、TNF- α 及び IL-6 の mRNA 水準は、食塩水グループに比べて DSS グループでそれぞれ 3.8 倍及び 3.6 倍増加した結果を示した。対照的に、これらの mRNA 発現水準は食塩水グループのそれと類似であることが分かった。しかし、抗炎症性サイトカインの qRT-PCR の結果は逆の傾向を示し、DSS グループの IL-10 mRNA 発現量が食塩水グループに比べて約 20 倍減少した。特に、実施例 1 (Col-exo) 処理グループの IL-10 発現水準は、DSS 処理グループの約 5 倍水準に若干回復した。このような結果は、実施例 1 が過度な腸の炎症反応を軽減させることを示す。

50

【0074】

(14) 統計的分析

データの統計的分析は、パラメトリック一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と二元配置分散分析にて Prism 8.0 を用いて実行された。すべての結果は、平均±標準偏差で表された。すべてのグラフは Prism 8.0 (GraphPad Software Inc、USA) で構成された。

【0075】

2. RNA が封入された乳由来のエキソソームの炎症性腸疾患治療の効果

(1) エキソソームの抽出

乳は市販の低温殺菌牛乳を使用し、エキソソームの抽出は、前記実施例 1. (2) に記載の方法と同じ方法を用いて行った。 10

【0076】

(2) 電気穿孔に対するエキソソームの安定性の確認

0.1 mg/ml の細胞由来のエキソソーム (HEK exo) 及び乳由来のエキソソーム (milk exo) に、300 V、30 ms、5 pulses、1 s インターバル (interval) の電気衝撃をそれぞれ加え、4 °C で 3 時間インキュベートした。実施例 1. (4) の動的光散乱 (DLS) 実験方法と同じ方法を用いて、電気衝撃を加える前後のエキソソームの大きさ変化を観察した。

【0077】

その結果、図 7 に示すように、細胞由来のエキソソームは、電気穿孔後にエキソソームの大きさが小さくなるのに対し、乳由来のエキソソームは、電気穿孔前後のエキソソームの大きさ分布に変化がほとんどないことを確認した。 20

【0078】

(3) siRNA の封入

前記電気穿孔でエキソソームに微細な空隙 (pore) を作ってから、TNF- α siRNA をエキソソーム溶液に混ぜてエキソソームの内部に TNF- α siRNA を封入させた後、Rnase を用いてエキソソームの内部に封入されていない siRNA を除去した。電気穿孔を施していないエキソソーム、電気穿孔を施したエキソソーム、電気穿孔を施していないエキソソームに TNF- α siRNA を混ぜた結果物、及び電気穿孔を施したエキソソームに TNF- α siRNA を混ぜて封入したエキソソームを 1 % アガロースゲルにローディングし、電気泳動装置で 100 V、10 分間電気泳動した。次いで、ゲルイメージ分析機で視覚的に確認し、その結果、図 8 に示すように、エキソソームに電気穿孔を施した場合、TNF- α siRNA が効率的にエキソソームの内部に封入されることを確認した。以下、TNF- α siRNA が封入されたエキソソームを実施例 2 と称し、TNF- α siRNA が封入されていないエキソソームを比較例 2 と称する。 30

【0079】

(4) 電気穿孔変数による siRNA の封入効率の比較

0.1 mg/ml の乳由来のエキソソームに電圧条件を確認するために、電気穿孔回数は 5 回、時間は 30 ms と固定し、200、250、300、350、及び 400 V の電圧をそれぞれ加えたときの TNF- α siRNA の封入効率を比較し、電気穿孔回数条件を確認するために、電圧は 300 V、時間は 30 ms と固定し、1、2、3、4、及び 5 回の電気穿孔を施したときの TNF- α siRNA の封入効率を比較し、電気穿孔時間条件を確認するために、電圧は 300 V、電気穿孔回数は 5 回と固定し、10、20、30、40、50、及び 60 ms の時間の間電気衝撃を加えたときの TNF- α siRNA の封入効率を比較した。300 V、5 回、30 ms 間電気穿孔を施した場合、最も効率的に TNF- α siRNA がエキソソームに封入されることを確認することができた (図 9)。 40

【0080】

(5) TNF- α siRNA が封入された乳由来のエキソソームの視覚化 50

乳由来のエキソソームに300V、30ms、5pulses、1sインターバル（interval）の電気衝撃をそれぞれ加えた後、TNF- α siRNA（FAM labeled）を封入して3時間インキュベートし、乳由来のエキソソームをCy5.5でラベリングした。TNF- α siRNAが封入された乳由来のエキソソーム（実施例2）をFluoromount-G溶液と混ぜてスライドガラスに固定した。次いで、TNF- α siRNAが封入された乳由来のエキソソームをSuper resolution microscopy（SRM）でx、y、z方向に測定して視覚化し（図10a）、相対的な蛍光領域を図表化した（図10b）。TNF- α siRNAを封入した後のデータをみると、実施例2の場合、緑色（図中では暗い灰色）FAMでラベリングされたTNF- α siRNAが赤色（図中では白色）Cy5.5でラベリングされたエキソソームの内部中央に位置していることを確認することができた。また、相対的な蛍光領域の場合も、エキソソームのみを有する比較例2の場合に100以上の蛍光領域を示していたCy5.5が、TNF- α siRNAが封入された場合に100以下と減少し、相対的にFAMで標識された蛍光領域が増加したことを確認することができた。これは、TNF- α siRNAがエキソソームの表面に粘着などの方式で担持されるのではなく、電気穿孔によって生じた微細な空隙からTNF- α siRNAがエキソソームの内部領域中央に正確に入り込んで封入されたことを意味する。

10

【0081】

（6）TNF- α siRNAが封入された乳由来のエキソソームの細胞吸収の確認

前記実施例2と同じ電気穿孔法で乳由来のエキソソームに空隙を形成し、Cy3をラベリングしたTNF- α siRNAを封入し、3時間インキュベートした。次いで、NCM460細胞に前記エキソソームを処理し、24時間後に細胞吸収の程度を共焦点顕微鏡で視覚化した。図11に示すように（図中、暗い灰色はDPAI、明るい小さな点はsiRNAを示す）、TNF- α siRNAのみを細胞に処理した場合に比べて、TNF- α siRNAがエキソソームに封入された実施例2の場合は、細胞内への流入が効率的に行われたことを確認することができる。

20

【0082】

（7）電気穿孔法でTNF- α siRNAが封入された乳由来のエキソソームの細胞内送達率の確認

前記実施例2と同じ電気穿孔法で乳由来のエキソソームに空隙を形成し、Cy3をラベリングしたTNF- α siRNAをそれぞれ封入し、3時間、4℃で安定化させた。RAW264.7細胞の場合、 3×10^5 細胞／ディッシュ（cell／dish）の密度で共焦点ディッシュにプレートされた。対照群としてリポフェクタミン（Lipofectamin）を用いてTNF- α siRNAを形質移入した。RAW264.7細胞に対照群及び実施例2をそれぞれ処理し、24時間後に細胞をDPBSで洗浄してからホルムアルデヒドで固定した後、Hoechst33342で10分間核を染色した。染色された細胞を共焦点顕微鏡を用いて相対的な蛍光強度を撮像した（ $n=4$ ）。撮像された画像の蛍光強度はImage Jプログラムによって測定された。

30

【0083】

図12に示したように（図中、暗い灰色はHoechst、明るい灰色はTNF-siRNAを示す）、対照群を処理した細胞内の相対的なTNF- α siRNA蛍光強度を100とし（Lipofectamin： 100 ± 17.19 ）、これを細胞内送達率が100%であると設定した。これに比べ、実施例2を処理した細胞内の相対的なTNF- α siRNA蛍光強度は約75%を示した（実施例2： 75.04 ± 11.25 ）。すなわち、実施例2の細胞内送達率は約75%であることが分かる（t-test：ns）。

40

【0084】

（8）TNF- α siRNAが封入された乳由来のエキソソームの遺伝子沈黙効果の確認（in vitro）

前記電気穿孔法と同じ条件で乳由来のエキソソームに空隙を形成し、乳由来のエキソソ

50

ームとTNF- α siRNAとを1mg:14 μ gの割合で混合後、3時間インキュベートした。LPS (1 μ g/ml、24時間) で予め活性化させたRAW264.7細胞にTNF- α siRNAが封入された乳由来のエキソソーム(実施例2)を濃度別に処理した。24時間後、qRT-PCRでTNF- α mRNAの水準を測定した。その結果、濃度依存的にTNF- α mRNAの発現が減少することを確認することができた(図13)。

【0085】

(9) 抗炎症効果確認 (in vivo)

DSS 2.5%で炎症性腸疾患(IBD)動物モデル(BALB/c、Female、8w)を誘導した。乳由来のエキソソーム(比較例2)及びTNF- α siRNAが封入された乳由来のエキソソーム(実施例2)を3日間隔で腹腔内注射し、体重変化及び疾患活動性指数(Disease Activity Index、DAI)を測定した(図14a)。点数は表2に表したとおりである。また、腸の長さとお腸組織をH&Eで観察し、H&E実験方法は実施例1.(12)の方法と同じ方法を用いた。

10

【0086】

実施例2を3日間隔で腹腔内注射した結果、IBDモデルで典型的に現われる体重減少が緩和されることを確認し(図14b)、DAI点数が減少したことから推し量るに(図14c)、TNF- α siRNAが封入された乳エキソソームがIBD炎症治療効果を奏することが分かる。

【0087】

20

具体例

- 具体例1: 乳由来のエキソソーム; 及び治療剤を含み、前記治療剤は、DNA、RNA又は小分子(small molecule)であり、前記治療剤は、エキソソームの内部空間に位置して封入されることを特徴とする、腸の健康機能改善用組成物。

【0088】

- 具体例2: 当該組成物は、60~90%の細胞内送達率を有することを特徴とする、具体例1に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【0089】

- 具体例3: 前記乳は、ヒト、牛、羊、山羊、ヤギ、ラクダ、バッファロー又はヤク由来の牛乳であるか、又は初乳(colostrum)である、具体例1~2に記載の腸の健康機能改善用組成物。

30

【0090】

- 具体例4: 前記RNAは、siRNA、miRNA、mRNA、shRNA、ncRNA、及びantisense RNAからなる群より選ばれた一つ以上のRNAである、具体例1~3に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【0091】

- 具体例5: 前記siRNAは、TNF- α siRNA、TGF- β siRNA、JAK3 siRNA、及びIL-6R siRNAからなる群より選ばれた一つ以上のsiRNAである、具体例4に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【0092】

40

- 具体例6: 前記miRNAは、Let-7b-5p、miR-320a-3p、及びmiR-21からなる群より選ばれた一つ以上のmiRNAである、具体例4に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【0093】

- 具体例7: 当該組成物は液状剤形であり、前記治療剤が封入された乳由来のエキソソームを100~1000 μ g/mlの濃度で含む、具体例1~6に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【0094】

- 具体例8: 当該組成物は凍結乾燥剤形であり、前記治療剤が封入された乳由来のエキソソームを、組成物の総重量を基準として0.001~100重量%の範囲で含む、具体

50

例 1 ～ 7 に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【0095】

- 具体例 9：当該組成物は経口投与するものである、具体例 1 ～ 8 に記載の腸の健康機能改善用組成物。

【0096】

- 具体例 10：具体例 1 ～ 9 の組成物を製造する方法であって、（a）乳からエキソソームを分離する段階；（b）分離されたエキソソームを電気穿孔してエキソソームの表面に微細空隙を形成させる段階；（c）前記（b）段階の電気穿孔されたエキソソームと治療剤とを混合する段階；及び（d）エキソソームの内部に封入されていない治療剤を除去する段階を含む、方法。

【0097】

- 具体例 11：前記（b）段階の電気穿孔は、250 ～ 350 v の電圧を加えることを特徴とする、具体例 10 に記載の方法。

【0098】

- 具体例 12：前記（b）段階の電気穿孔は、3 ～ 7 回のパルスを加えることを特徴とする、具体例 10 ～ 11 に記載の方法。

【0099】

- 具体例 13：前記（b）段階の電気穿孔は、20 ～ 40 ms の時間の間パルスを加えることを特徴とする、具体例 10 ～ 12 に記載の方法。

【0100】

- 具体例 14：前記（a）段階の乳は、ヒト、牛、羊、山羊、ヤギ、ラクダ、バッファロー又はヤク由来の乳であるか、又は初乳（colostrum）であることを特徴とする、具体例 10 ～ 13 に記載の方法。

【0101】

- 具体例 15：前記（c）段階の治療剤は DNA であり、前記（d）段階は dnase を添加して封入されていない治療剤を除去する段階である、具体例 10 ～ 14 に記載の方法。

【0102】

- 具体例 16：前記（c）段階の治療剤は RNA であり、前記（d）段階は rnase を添加して封入されていない治療剤を除去する段階である、具体例 10 ～ 15 に記載の方法。

【0103】

- 具体例 17：前記 RNA は、siRNA、miRNA、mRNA、shRNA、ncRNA、及び antisense RNA からなる群より選ばれた一つ以上の RNA である、具体例 16 に記載の方法。

【0104】

- 具体例 18：前記 siRNA は、TNF- α siRNA、TGF- β siRNA、JAK3 siRNA、及び IL-6R siRNA からなる群より選ばれた一つ以上の siRNA である、具体例 17 に記載の方法。

【0105】

- 具体例 19：前記 miRNA は、Let-7b-5p、miR-320a-3p、及び miR-21 からなる群より選ばれた一つ以上の miRNA である、具体例 17 に記載の方法。

10

20

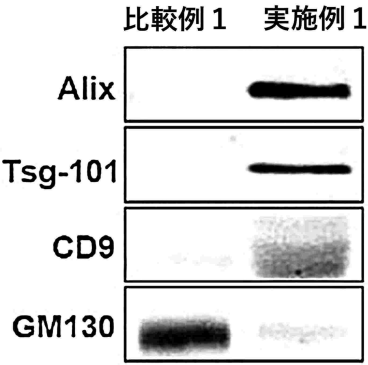
30

40

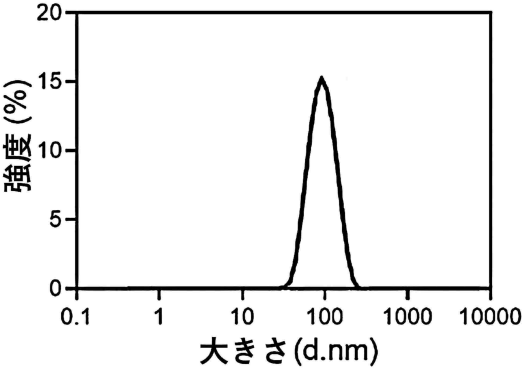
50

【図面】

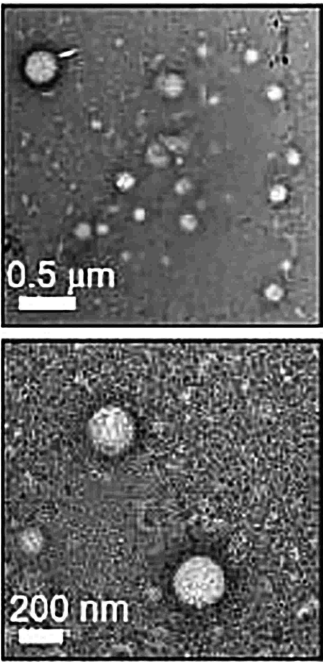
【図 1 a】



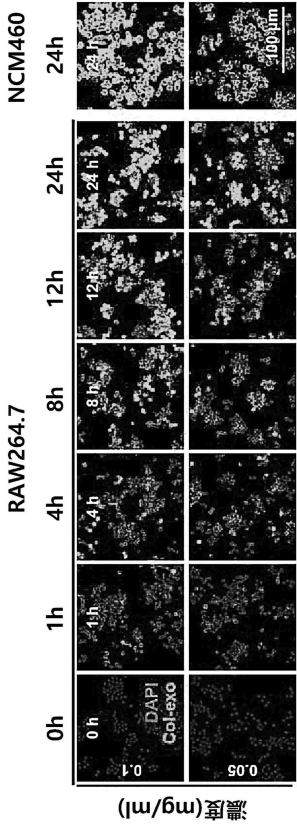
【図 1 b】



【図 1 c】



【図 2 a】



10

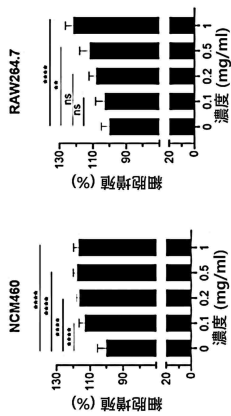
20

30

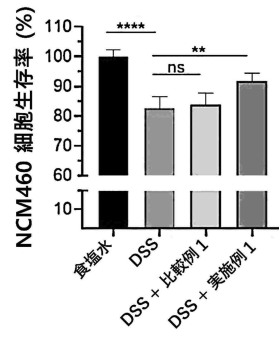
40

50

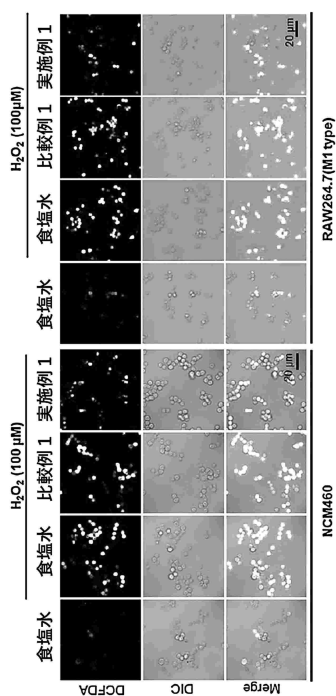
【図 2 b】



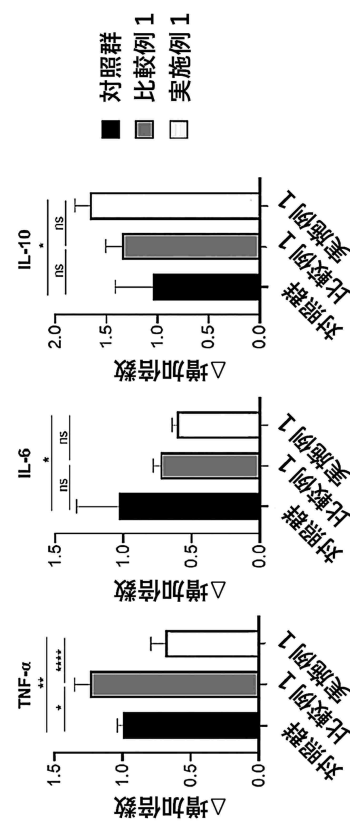
【図 2 c】



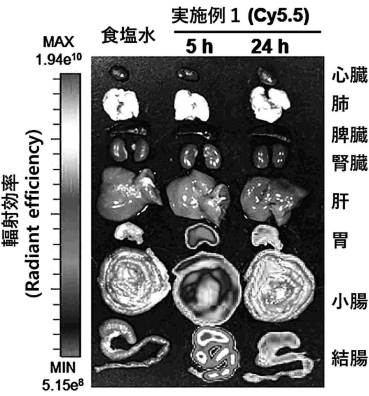
【図 3 a】



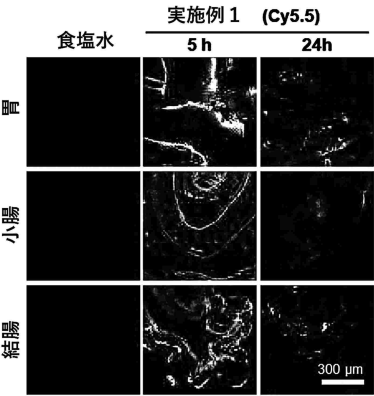
【図 3 b】



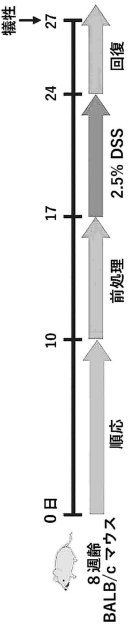
【図 4 a】



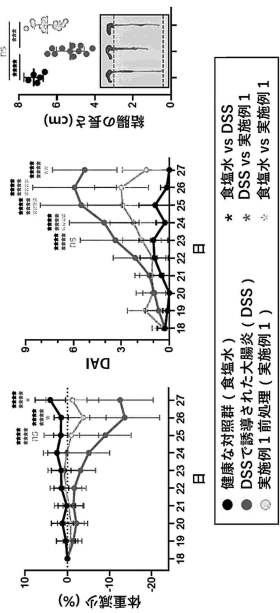
【図 4 b】



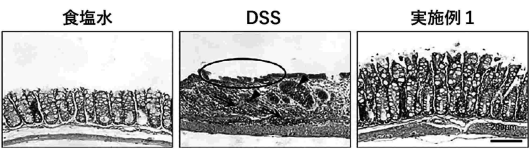
【図 4 c】



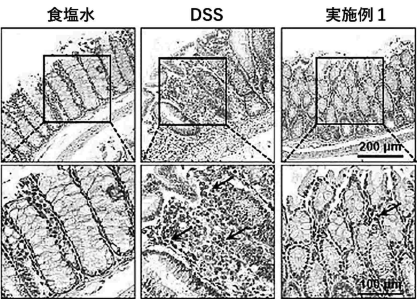
【図 4 d】



【図 5 a】



【図 5 b】



10

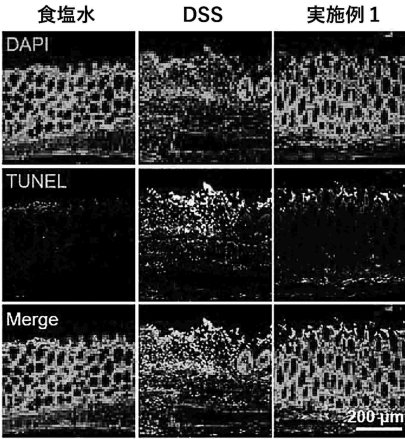
20

30

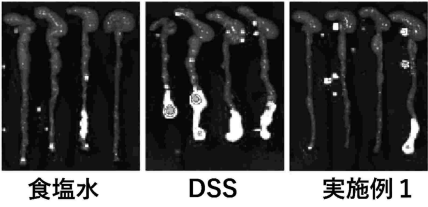
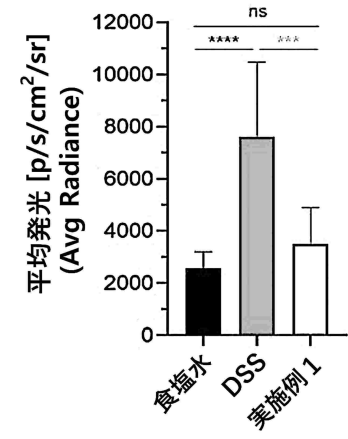
40

50

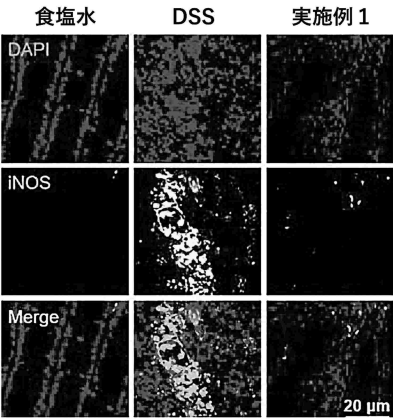
【 図 5 c 】



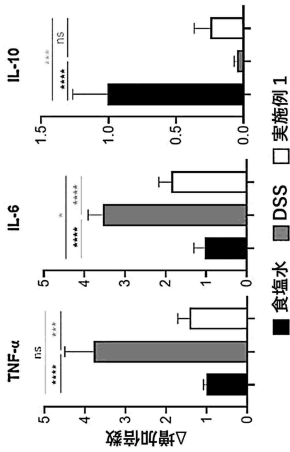
【 図 6 a 】



【 図 6 b 】



【 図 6 c 】



10

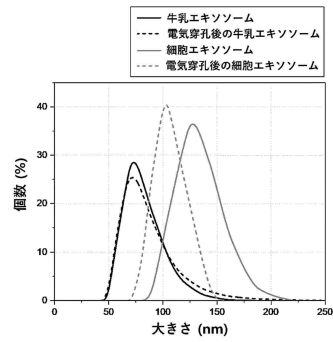
20

30

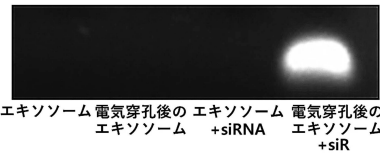
40

50

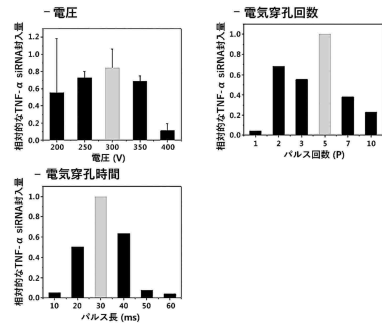
【図 7】



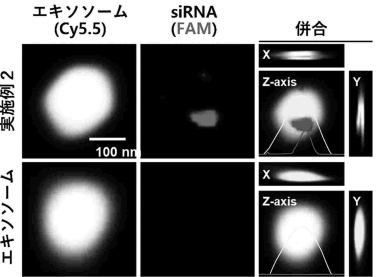
【図 8】



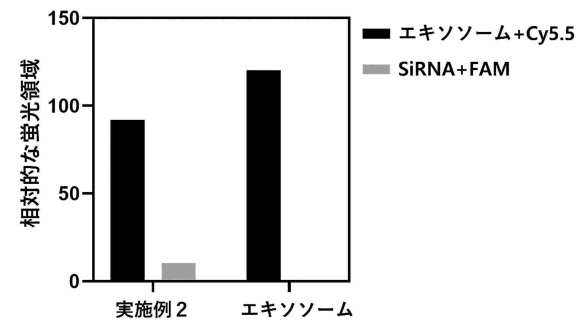
【図 9】



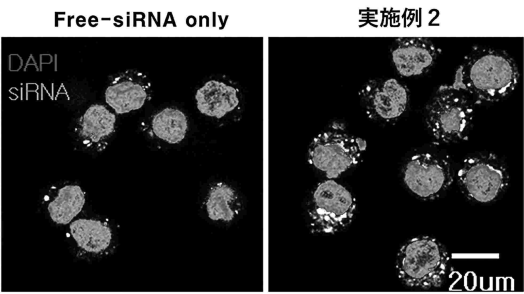
【図 10 a】



【図 10 b】



【図 11】



10

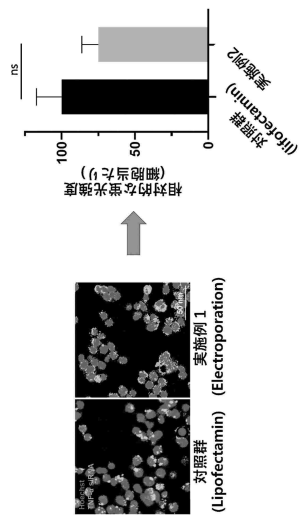
20

30

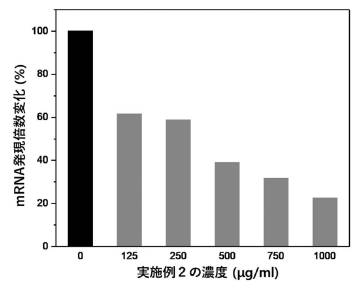
40

50

【図 1 2】

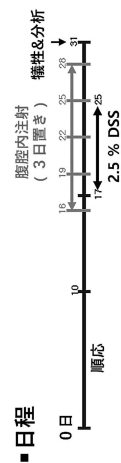


【図 1 3】

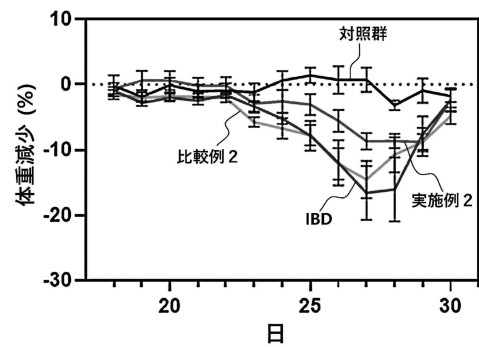


10

【図 1 4 a】



【図 1 4 b】



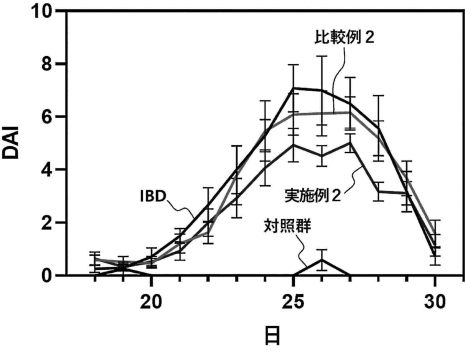
20

30

40

50

【図 1 4 c】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2023/001034
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 9/50(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 31/711(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61K 35/20(2006.01)i; A61P 29/00(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) A61K 9/50(2006.01); A23C 7/04(2006.01); A23C 9/00(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A23L 33/19(2016.01); A61K 31/712(2006.01); A61K 47/54(2017.01); A61K 9/127(2006.01); C12N 15/113(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: 우유(milk), 엑소좀(exosome), 봉입(inclusion), 전기천공(electroporation), 전달(delivery)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019-236873 A1 (BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF NEBRASKA) 12 December 2019 (2019-12-12) See claims 1-13, 17-27 and 73-76; and paragraphs [0020], [00146], [00172], [00209], [00217], [00236] and [00277].	1-19
X	US 2018-0193270 A1 (PURETECH HEALTH LLC) 12 July 2018 (2018-07-12) See abstract; claims 12, 23-29 and 36-43; and paragraphs [0611] and [0753].	1-19
Y	KR 10-2021-0066750 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 07 June 2021 (2021-06-07) See abstract; claims 9-13; and paragraphs [0002]-[0005], [0012] and [0115].	1-19
Y	EP 3620519 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 11 March 2020 (2020-03-11) See claims 1-18; and paragraphs [0025], [0062] and [0146].	1-19
☒ 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 17 April 2023		Date of mailing of the international search report 19 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

International application No.

PCT/KR2023/001034**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2020-0057381 A (INDUSTRIAL COOPERATION FOUNDATION JEONBUK NATIONAL UNIVERSITY) 26 May 2020 (2020-05-26) See claims 1-4.	1-19
PX	HAN, G. et al. Bovine colostrum derived-exosomes prevent dextran sulfate sodium-induced intestinal colitis via suppression of inflammation and oxidative stress. <i>Biomater. Sci.</i> 22 March 2022, vol. 10, pp. 2076-2087. See entire document. ※ This document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/001034

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019-236873	A1	12 December 2019	US	2021-0228634	A1	29 July 2021
US	2018-0193270	A1	12 July 2018	AU	2017-368050	A1	20 June 2019
				AU	2017-368050	A2	27 June 2019
				CA	3043768	A1	07 June 2018
				CN	110177544	A	27 August 2019
				EP	3548005	A1	09 October 2019
				EP	3548005	A4	17 June 2020
				EP	4035659	A1	03 August 2022
				JP	2019-535839	A	12 December 2019
				US	2021-0177757	A1	17 June 2021
				WO	2018-102397	A1	07 June 2018
KR	10-2021-0066750	A	07 June 2021	CN	115427014	A	02 December 2022
				EP	4066816	A1	05 October 2022
				KR	10-2023-0025809	A	23 February 2023
				US	2023-0000920	A1	05 January 2023
				WO	2021-107706	A1	03 June 2021
EP	3620519	A1	11 March 2020	None			
KR	10-2020-0057381	A	26 May 2020	None			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2023/001034

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 9/50(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 31/711(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61K 35/20(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 9/50(2006.01); A23C 7/04(2006.01); A23C 9/00(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A23L 33/19(2016.01); A61K 31/712(2006.01); A61K 47/54(2017.01); A61K 9/127(2006.01); C12N 15/113(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: 우유(milk), 엑소좀(exosome), 봉입(inclusion), 전기천공(electroporation), 전달(delivery)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2019-236873 A1 (BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF NEBRASKA) 2019.12.12 청구항 1-13, 17-27, 73-76; 단락 [0020], [00146], [00172], [00209], [00217], [00236], [00277]	1-19
X	US 2018-0193270 A1 (PURETECH HEALTH LLC) 2018.07.12 요약; 청구항 12, 23-29, 36-43; 단락 [0611], [0753]	1-19
Y	KR 10-2021-0066750 A (한국과학기술연구원 등) 2021.06.07 요약; 청구항 9-13; 단락 [0002]-[0005], [0012], [0115]	1-19
Y	EP 3620519 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2020.03.11 청구항 1-18; 단락 [0025], [0062], [0146]	1-19
A	KR 10-2020-0057381 A (전북대학교산학협력단) 2020.05.26 청구항 1-4	1-19
☒ 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 2023년04월17일(17.04.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년04월19일(19.04.2023)
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/KR2023/001034

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2019-236873 A1	2019/12/12	US 2021-0228634 A1	2021/07/29
US 2018-0193270 A1	2018/07/12	AU 2017-368050 A1	2019/06/20
		AU 2017-368050 A2	2019/06/27
		CA 3043768 A1	2018/06/07
		CN 110177544 A	2019/08/27
		EP 3548005 A1	2019/10/09
		EP 3548005 A4	2020/06/17
		EP 4035659 A1	2022/08/03
		JP 2019-535839 A	2019/12/12
		US 2021-0177757 A1	2021/06/17
		WO 2018-102397 A1	2018/06/07
KR 10-2021-0066750 A	2021/06/07	CN 115427014 A	2022/12/02
		EP 4066816 A1	2022/10/05
		KR 10-2023-0025809 A	2023/02/23
		US 2023-0000920 A1	2023/01/05
		WO 2021-107706 A1	2021/06/03
EP 3620519 A1	2020/03/11	없음	
KR 10-2020-0057381 A	2020/05/26	없음	

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	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 9/19	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z	
C 1 2 N 15/88 (2006.01)	C 1 2 N 15/88 Z	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	

,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,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,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,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,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,L
C,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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

特許法第30条第2項適用申請有り 令和4年(2022年)3月22日 Biomaterials Science、2022、vol. 10、pp. 2076-2087にて公開

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

ックーク、ファランノ 14-ギル 5

(72)発明者 ジャン, ヨンジ

大韓民国、ソウル 02792、ソンブックーク、ファランノ 14-ギル 5

(72)発明者 キム, ヒョソク

大韓民国、ソウル 02792、ソンブックーク、ファランノ 14-ギル 5

(72)発明者 チョ, ハウン

大韓民国、ソウル 02792、ソンブックーク、ファランノ 14-ギル 5

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA01 BA03 CA23 CA44
4C076 AA11 AA29 AA65 AA95 BB01 BB11 CC04 CC16 FF34 FF36
FF67 FF68 GG06 GG42
4C084 AA13 MA02 MA16 MA44 MA52 MA56 MA66 NA03 NA06 NA07
NA10 NA11 NA13 NA14 ZA661 ZA731 ZB111 ZC751
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 MA16 MA44 MA52 MA56 MA66
NA03 NA06 NA07 NA10 NA11 NA13 NA14 ZA66 ZA73 ZB11 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB39 CA07 CA20 MA02 MA16 MA44 MA52 MA66
NA03 NA06 NA07 NA10 NA11 NA13 NA14 ZA66 ZA73 ZB11 ZC75