

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2015년 12월 17일 (17.12.2015)



(10) 국제공개번호  
**WO 2015/190710 A1**

- (51) 국제특허분류:  
C12N 5/071 (2010.01) A61K 35/12 (2015.01)  
C12N 5/074 (2010.01) A61P 3/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004741
- (22) 국제출원일: 2015년 5월 12일 (12.05.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2014-0071583 2014년 6월 12일 (12.06.2014) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-015 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이학모 (LEE, Hak Mo); 139-853 서울시 노원구 노원로 62, 309 동 603 호, Seoul (KR). 박경수 (PARK, Kyong Soo); 135-789 서울시 강남구 압구정로 29길 71, 12 동 702 호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601 호, Seoul (KR).

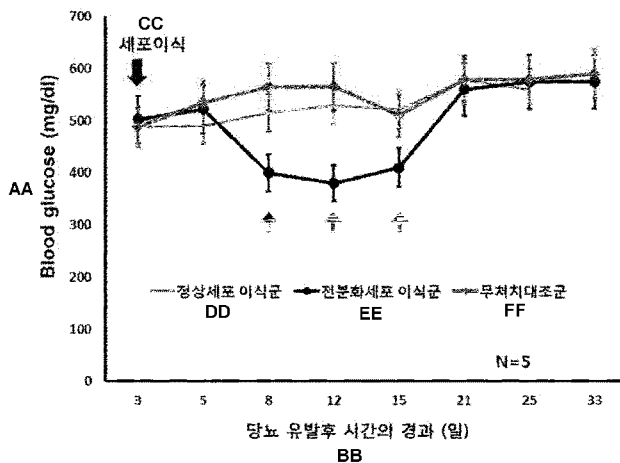
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: DIFFERENTIATION INTO INSULIN-PRODUCING CELLS AND USE METHOD THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 인슐린 생산세포로의 분화 및 이용방법



AA ... Blood glucose (mg/dl)  
BB ... Time elapsed after diabetic induction (days)  
CC ... Cell transplantation  
DD ... Normal cell transplantation group  
EE ... Pluripotent cell transplantation group  
FF ... Non-treated group

(57) Abstract: The present invention relates to a medium composition for inducing the differentiation into insulin-producing cells, the composition containing glucosamine; a method for inducing the differentiation into insulin-producing cells by using the medium composition, and a cell therapeutic agent for treating diabetes, containing insulin-producing cells prepared by the method. The glucosamine according to the present invention can effectively induce the differentiation into insulin-producing cells through the regulation of sugar metabolism. The induction of the differentiation into insulin-producing cells using glucosamine as described above has advantages of being safe due to the exclusion of genetic manipulation; being performed at low cost since high-priced compounds or growth factors with unidentified mechanisms are not required; and minimizing cell contamination and deformation, which are caused at the time of *ex vivo* manipulation, due to the induction in a short period of time.

(57) 요약서: 본 발명은 글루코사민을 포함하는 인슐린 생산세포로의 분화 유도용 배지 조성물, 상기 배지 조성물을 이용한 인슐린 생산세포로의 분화 유도 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 인슐린 생산세포를 포함하는 당뇨병 치료용 세포 치료제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 글루코사민은 당대사 조절을 통하여 인슐린 생산세포로의 분화를 효과적으로 유도할 수 있다. 상기와 같이 글루코사민을 이용하여 인슐린 생산 세포로의 분화를 유도할 경우, 유전자 조작을 배제하기 때문에 안전하며, 기전

이 명확하지 않은 고가의 화합물 또는 성장인자를 필요로 하지 않아 비용이 저렴하고, 단기간 내에 이루어질 수 있어 생체 외 조작 시에 문제되는 세포의 오염, 변성 등을 최소화할 수 있는 장점을 가지고 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 인슐린 생산세포로의 분화 및 이용방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 글루코사민을 포함하는 인슐린 생산세포로의 분화 유도용 배지 조성물, 상기 배지 조성물을 이용한 인슐린 생산세포로의 분화 유도 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 인슐린 생산세포를 포함하는 당뇨병 치료용 세포 치료제에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 당뇨병은 만성적인 고혈당을 가장 중요한 특징으로 하는 질환으로 장기화되면 미세혈관 손상에 기인한 창상치유 지연, 신경질환, 신부전증, 심장질환 망막질환 등의 합병증을 유발하여 사회적 경제적 부담을 가중시키는 질환이다. 현재까지 당뇨병을 완치시킬 수 있는 치료법은 없으며 당뇨 환자에서 부족한 인슐린을 반복적으로 투여하는 인슐린 강화요법이 오랜 기간 임상에서 활용되어 왔다. 그러나 상기 치료법은 하루에도 수 차례 반복해서 인슐린을 투여해야 하는 불편함이 있으며, 당뇨의 합병증을 막을 수 없는 것이 현실이다.
- [3] 당뇨병은 그 원인에 따라 크게 두 가지 형태(제1형, 제2형)로 구분된다. 제 1형 당뇨병은 자신의 면역세포가 인슐린 생산세포를 파괴하여 발생하는 당뇨병으로, 인슐린 생산세포가 부족하여 혈당을 조절하지 못하기 때문에 발생한다. 제 2형 당뇨병은 다양한 원인에 의하여 신체 내 장기/조직/세포 등이 인슐린에 대한 저항성을 갖는 것에 기인하는 것으로 결국에는 고혈당에 의한 인슐린 생산세포의 기능저하 및 소실로 혈당의 조절이 원활하지 않게 되고 결과적으로 고혈당을 보이는 당뇨병 증상과 함께 그에 따른 합병증이 유발되게 된다.
- [4] 이렇듯 인슐린을 생산하는 세포의 소실에 따른 당뇨병의 치료수단으로 동종 혹은 이종 유래의 췌도 세포 이식연구가 진행되고 있으나 췌도 이식을 받은 환자의 경우 평생 동안 면역조절제를 복용해야 하는 불편함이 있으며 그 성공률이 1년 이내 62.5%에서 시간이 경과함에 따라 감소할 뿐만 아니라, 췌도 이식이 요구되는 환자 수에 비하여 공여자의 수가 턱없이 부족한 상황이다.
- [5] 부족한 췌도 공여자에 대한 또 다른 대안으로 줄기세포로부터 인슐린을 생산하는 세포를 분화/증식시켜 환자에 이식함으로써 당뇨병을 치료하고자 하는 연구가 진행되고 있으나 성과가 미미한 상황이다. 실제 부족한 췌도를 대체할 목적으로 생체 외에서 배아줄기세포, 역분화 줄기세포 등 다양한 세포를 이용하여 인슐린을 생산하는 세포로 분화시킨 후 이식함으로써 당뇨병을 치료하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있으나 분화기전이 여전히 모호하고, 분화된 세포의 경우 증식이 일어나지 않는 현상을 고려할 때 당뇨병 치료에 필요한 양의 세포를 얻기 위해서는 천문학적 비용이 소요될 것으로

예상됨에도 불구하고 효율이 매우 낮고 안전성에 대한 우려로 인하여 임상적용이 불가능한 상황이다 (Zhang D et al. 2009).

- [6] 한편, 안전성에 대한 우려를 불식시킬 수 있는 수단으로 성체줄기세포가 제시되고 있다. 특히 골수세포는 골수천자 방법 이외에도 G-CSF, AMD3100 등의 골수세포 동원인자를 투여하여 혈중으로 유리시킨 뒤 말초혈액으로부터 용이하게 획득할 수 있을 뿐만 아니라 (Yeoh JS et al. 2007), 다양한 손상조직의 재생에 기여할 수 있다는 연구결과들이 발표되고 있다 (Badiavas EV et al. 2003, Secco M et al. 2008).

- [7] 이에 본 발명자들은 새로운 당뇨병 치료용 세포치료제를 개발하기 위해 노력한 결과, 글루코사민을 이용한 당대사 조절을 통해 인슐린 생산세포로의 분화를 효과적으로 유도할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

### **발명의 상세한 설명**

#### **기술적 과제**

- [8] 본 발명의 목적은 글루코사민을 포함하는 인슐린 생산세포로의 분화 유도용 배지 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 배지 조성물을 이용한 인슐린 생산세포로의 분화 유도 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 인슐린 생산세포를 포함하는 당뇨병 치료용 세포 치료제, 또는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

#### **과제 해결 수단**

- [11] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 글루코사민을 포함하는 인슐린 생산세포로의 분화 유도용 배지 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 배지 조성물에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 인슐린 생산세포로의 분화를 유도하는 방법을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 인슐린 생산세포를 포함하는 당뇨병 치료용 세포 치료제, 또는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

#### **발명의 효과**

- [14] 본 발명에 따른 글루코사민은 당대사 조절을 통하여 인슐린 생산세포로의 분화를 효과적으로 유도할 수 있다. 상기와 같이 글루코사민을 이용하여 인슐린 생산 세포로의 분화를 유도할 경우, 유전자 조작을 배제하기 때문에 안전하며, 기전이 명확하지 않은 고가의 화합물 또는 성장인자를 필요로 하지 않아 비용이 저렴하고, 단기간 내에 이루어질 수 있어 생체 외 조작 시에 문제되는 세포의 오염, 변성 등을 최소화할 수 있는 장점을 가지고 있다.

#### **도면의 간단한 설명**

- [15] 도 1은 골수세포의 인슐린 생산세포로의 분화를 면역염색법을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

- [16] 도 2는 생체 외에서 글루코사민에 의한 골수세포의 인슐린 생산세포로의 전분화를 real-time PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [17] 도 3은 글루코사민이 감작된 골수세포의 인슐린 생산세포로의 분화를 면역형광염색법을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [18] 도 4는 글루코사민에 의한 말초혈액 유래 골수세포의 인슐린 생산세포로의 분화를 면역형광염색법을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [19] 도 5는 당뇨병 동물모델에서 글루코사민에 의해 전분화된 골수세포 이식 시 혈당 조절 효과를 나타낸 도이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [20] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [21] 본 발명은 글루코사민을 포함하는 인슐린 생산세포로의 분화 유도용 배지 조성물을 제공한다.
- [22] 본 발명에서 있어서, “배지(culture media)”는 생체 외에서 인슐린 생산세포로의 분화 유도 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium: CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 최소 배지에는 예들 들어, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12,  $\alpha$ MEM( $\alpha$  Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한 상기 배지는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신 (streptomycin), 겐타마이신(gentamicin) 등의 항생제를 포함할 수 있다.
- [23] 상기 배지에는 글루코사민 외에 기존에 알려진 하나 이상의 인슐린 생산세포로의 분화 유도 물질이 더 포함될 수 있다.
- [24] 본 발명에 따른 글루코사민은 당대사 조절을 통하여 인슐린 생산세포로의 분화를 효과적으로 유도할 수 있다. 상기와 같이 글루코사민을 이용하여 인슐린 생산 세포로의 분화를 유도할 경우, 유전자 조작을 배제하기 때문에 안전하며, 기전이 명확하지 않은 고가의 화합물 또는 성장인자를 필요로 하지 않아 비용이 저렴하고, 단기간 내에 이루어질 수 있어 생체 외 조작 시에 문제되는 세포의 오염, 변성 등을 최소화할 수 있는 장점을 가지고 있다.
- [25]
- [26] 또한, 본 발명은 상기 배지 조성물에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 인슐린 생산세포로의 분화를 유도하는 방법을 제공한다.
- [27] 상기 세포는 골수세포 또는 성체줄기세포를 포함하며, 이에 제한되지 않는다.
- [28] 상기 성체줄기세포는 골수, 제대혈, 혈액, 피부, 지방 및 태반으로 이루어진

군으로부터 선택된 1종 이상으로부터 유래된 것을 포함하며, 바람직하게는 골수 또는 제대혈로부터 유래될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[29]

[30] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 인슐린 생산세포를 포함하는 당뇨병 치료용 세포 치료제를 제공한다.

[31] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 인슐린 생산세포를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[32] 상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병을 포함한다.

[33] 본 발명에 있어서, "세포치료제"는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다.

[34] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[35] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글라이콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글라이콜, 올리브 오일과 같은

식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[36] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[37] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 상기 투여량은 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[38]

[39] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[40]

[41] 실시예 1. 골수세포 유래의 인슐린 생산세포의 확인

[42] 골수세포가 인슐린 생산세포로 분화될 수 있는지를 확인하기 위하여, 카이메라 마우스를 제조하였다. 보다 구체적으로, 공여 골수세포는 인슐린 프로모터의 조절 하에 다양한 유전자(EGFP, Luciferase 등)를 발현하는 형질전환 마우스(B6-tg(Ins2-luc/EGFP/TK) 300kauf/J)로부터 수득하였으며, 수혜 마우스로는 정상 C57BL/6 마우스를 이용하였다. 먼저, 8~12주령 형질전환 마우스(B6-tg(Ins2-luc/EGFP/TK) 300kauf/J)의 대퇴골과 경골을 분리하고 PBS로 플러싱하여 골수세포를 확보한 뒤, 용혈 용액(BD Pharmingen)을 이용하여 적혈구를 제거하고,  $5 \times 10^7/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 PBS에 희석하였다. 이식 18시간 전에 1,000 cGy의 방사선을 조사받은 C57BL/6 마우스의 미정맥을 통해 상기 과정을 통해 준비된 골수세포를 0.1 ml 주입하였다. 이식 4주 뒤 상기 형질전환 마우스 유래의 골수 세포가 이식된 키메라 마우스에 150 mg/kg의 스트렙토조토신(streptozotocin, STZ, Sigma)을 복강 내로 투여하여 당뇨를 유발하였다. STZ 투여 7일 후에 혈당을 측정하여 450 mg/dl 이상의 혈당 수치를 보이는 개체를 당뇨가 유발된 마우스로 분류하고, 그로부터 3일 후 부검하여 췌장 및 지방 조직을 확보하였다. 상기 조직에서 EGFP를 발현하는 세포의 출현 여부를 공지된 방법인 면역염색법을 통해 확인하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[43] 도 1에 나타낸 바와 같이, STZ를 투여받지 않은 정상 키메라 마우스의 췌장 및 지방조직에서는 EGFP를 발현하는 세포를 관찰할 수 없었으나, STZ 투여를 통해 당뇨가 유발된 마우스의 췌장 및 지방조직에서 EGFP를 발현하는 세포가

관찰되었다.

- [44] 한편, 추가 4주 동안의 관찰 결과 혈당의 감소는 확인할 수 없었으며, 이를 통해 골수세포가 인슐린 생산세포로 분화될 수 있으며 그 원인이 고혈당에 기인한 것임을 확인하였다.

[45]

- [46] 실시예 2. 생체 외에서 골수세포의 당대사 조절을 이용한 인슐린 생산세포로의 전분화

- [47] 실시예 1에서와 동일한 방법으로 정상 C57BL/6 마우스 혹은 형질전환 마우스로부터 골수세포를 준비하였다. 5.5 mM 글루코오스, 2% FBS 및 1% 항생제가 포함된 DMEM 배지(표준배지)를 이용하여 상기 골수세포를  $5 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 부유하였으며, 이를 세포의 부착이 저해된 6 웰 플레이트에 분주하고, 각각의 웰에 다양한 농도의 글루코오스(0, 5, 10, 15 mM), 프럭토오스(5, 10, 15 mM), 피루베이트(5, 10, 15 mM), 자일로오스(5, 10, 20 mM), 자일리톨(5, 10, 15 mM) 또는 글루코사민(5, 10, 15 mM)을 처리한 후, 부유배양용 세포 배양 인큐베이터에서 3, 6 및 9일간 배양하면서 인슐린 생산세포가 출현하는지 여부를 평가하였다. 배양 시에는 부유배양용 세포배양 인큐베이터에 장착된 셰이커가 30~60 rpm으로 계속하여 흔들여 줄 수 있도록 하였다. 인슐린 생산세포의 출현 여부는 상기 세포로부터 RNA를 분리한 후, 종래 공지된 방법에 따라 real-time PCR을 수행하여 인슐린을 생산하는 베타세포 분화를 촉진하는 인자들(neurogenin 3, PDX-1, MafA, Ptf1a)의 발현 정도를 분석함으로써 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

- [48] 다양한 농도의 글루코오스, 프럭토오스, 피루베이트, 자일로오스 또는 자일리톨을 첨가한 실험군에서는 인슐린 생산세포로의 분화를 촉진하는 인자의 발현 변화를 확인할 수 없었을 뿐만 아니라 인슐린 생산세포의 출현을 확인할 수 없었다. 반면 도 2에 나타낸 바와 같이, 글루코사민을 첨가한 실험군의 경우 글루코사민의 농도 및 배양시간의 경과에 따라 인슐린 생산세포 분화를 촉진하는 neurogenin 3, PDX-1, MafA, Ptf1a의 발현이 증가함을 확인하였다.

[49]

- [50] 실시예 3. 글루코사민이 감작된 골수세포의 인슐린 생산세포 분화

- [51] 상기 실시예 2의 결과를 바탕으로 글루코사민을 첨가하여 부유배양한 골수세포가 인슐린 생산세포로 분화될 수 있는지를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 정상 C57BL/6 마우스 혹은 형질전환 마우스로부터 골수세포를 준비하였다. 10 mM 글루코사민이 첨가된 표준배지를 이용하여, 상기 골수세포를  $5 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 부유하고, 상기 실시예 2에서 제시된 부유배양 방법과 동일하게 9일간 배양하였다. 대조군의 경우 글루코사민이 포함되지 않은 표준배지를 이용하여 동일한 조건으로 배양하였다. 배양 후 세포를 수득하고, 인슐린 생산세포의 출현여부를 확인하기 위하여 면역형광염색법을 통해 EGFP, insulin, PDX-1 발현을 확인하였다(도 3의

좌).

[52] 다음으로 부유배양 3, 6, 9일에 세포를 회수하고 PBS로 세척하여 남아있는 글루코사민을 제거한 후, 이를 11 mM 글루코오스, 10% FBS, 1% 항생제가 함유되어있는 RPMI1640 배지로 재부유 한 뒤, 부착배양용 6 웰 플레이트에 옮겨 3일간 추가배양 하였다. 부착배양된 세포가 인슐린을 분비하는지를 확인하기 위해, 배양 상층액 중에 존재하는 인슐린을 ELISA 방법을 통해 정량하였다(도 3의 우).

[53] 이상의 실험 결과를 도 3에 나타내었다.

[54] 도 3에 나타낸 바와 같이, 형질전환 마우스 유래의 골수세포를 글루코사민에 노출시킬 경우 EGFP가 발현되고(도 3의 좌측상단), 정상 C57BL/6 마우스 유래의 골수세포를 글루코사민에 노출시킬 경우 insulin 및 PDX-1의 발현이 나타남(도 2의 좌측하단)을 확인하였다. 또한, 글루코사민에 노출되어 3일 이상 부유된 골수세포를 부착배양 하였을 때 골수세포가 인슐린을 생산하는 세포로 완전분화되어 인슐린 분비량이 시간에 따라 증가함(도 3의 우)을 확인하였다.

[55] 상기 결과를 통하여, 글루코사민이 골수세포의 당대사를 조절하며 인슐린을 생산할 수 있는 세포로 전분화될 수 있도록 분화스위칭을 조절하는 역할을 하며, 글루코사민에 3일 이상 노출된 후 글루코사민을 제거하더라도 인슐린 생산세포로의 분화가 완전하게 이루어짐을 확인하였다.

[56]

[57] 실시예 4. 말초혈액 유래 골수유래세포의 인슐린 생산세포로의 분화

[58] 말초혈액에서 분리한 골수유래 세포가 글루코사민에 의해 인슐린 생산세포로 분화될 수 있는지를 확인하기 위하여, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 인슐린 생산세포로의 분화여부를 평가하였다. 먼저, 말초혈액으로 동원된 골수세포를 얻기 위하여 정상 C57BL/6 마우스에 250 µg/kg의 G-CSF를 1일 1회 4일간 피하 주사하고, 마지막 G-CSF를 주사한 후 복대정맥을 통하여 말초혈액을 확보하였다. 확보된 말초혈액은 적혈구 제거과정을 거친 후, 10 mM 글루코사민이 첨가된 표준배지로 3일간 부유배양하였으며, 이를 회수하고 PBS로 남아있는 글루코사민을 제거하였다. 대조군의 경우 글루코사민이 포함되지 않은 표준배지를 이용하여 동일한 조건으로 배양하였다. 상기 세포를 11 mM 글루코오스, 10% FBS, 1% 항생제가 함유된 RPMI1640 배지로 재부유 한 뒤, 부착배양용 6 웰 플레이트에 옮겨 3일간 추가배양 하였다. 인슐린 생산세포의 출현여부는 상기 실시예 3에서와 동일한 방법으로 면역형광염색법을 통하여 확인하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다

[59] 도 4에 나타낸 바와 같이, insulin 및 PDX-1의 발현을 통해 상기 실시예 3의 결과와 마찬가지로 말초혈액으로부터 분리한 골수유래 세포 역시 글루코사민에 의해 인슐린을 생산하는 세포로 완전분화됨을 확인하였다.

[60]

[61] 실시예 5. 전분화된 골수세포의 이식을 통한 인슐린 생산세포로의 완전분화

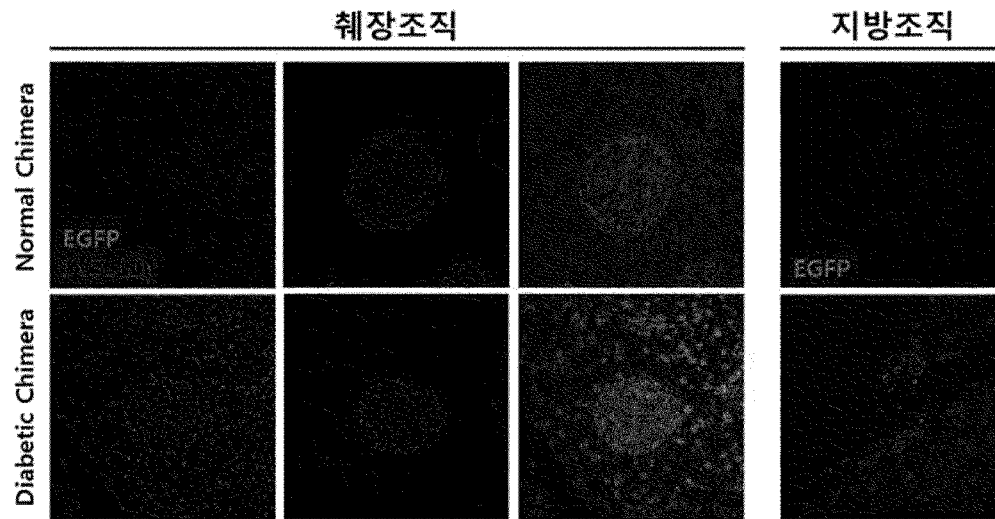
**유도 및 혈당 조절 효과 검증**

- [62] 상기 실시예 3과 4의 결과를 바탕으로 글루코사민을 이용하여 전분화된 골수세포가 생체 내에서 완전분화될 수 있는지를 확인하고자 당뇨병 모델 마우스에 상기 전분화된 골수세포를 이식하였다. 보다 구체적으로, 전분화된 골수 세포는 10 mM 글루코사민을 함유하는 표준배지를 이용하여 3일간 배양한 뒤 PBS로 세척하여 준비하고, 실시예 1에서와 동일한 방법으로 마우스에 당뇨를 유발시키고, 3일 후 마우스의 미정맥을 통하여 개체당  $2 \times 10^6$ 개의 전분화된 골수 세포를 이식하였다. 대조군의 경우 글루코사민이 포함되지 않은 표준배지를 이용하여 동일한 조건으로 배양한 세포를 이식하였다. 이식 후 30일간 혈당을 모니터링 하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [63] 도 5에 나타낸 바와 같이, 글루코사민이 첨가되지 않은 배지에서 배양된 세포를 이식한 대조군에서는 실험 전 기간에 걸쳐 세포의 이식에 의한 혈당 변화를 확인할 수 없었으나, 글루코사민에 의해 전분화된 세포를 이식 받은 실험군에서는 이식 후 5일을 기점으로 12일까지 혈당이 저하됨을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 글루코사민을 이용하여 전분화된 골수 세포가 생체 내에서 인슐린 분리세포로 완전 분화되어 혈당을 조절할 수 있음을 확인하였다.

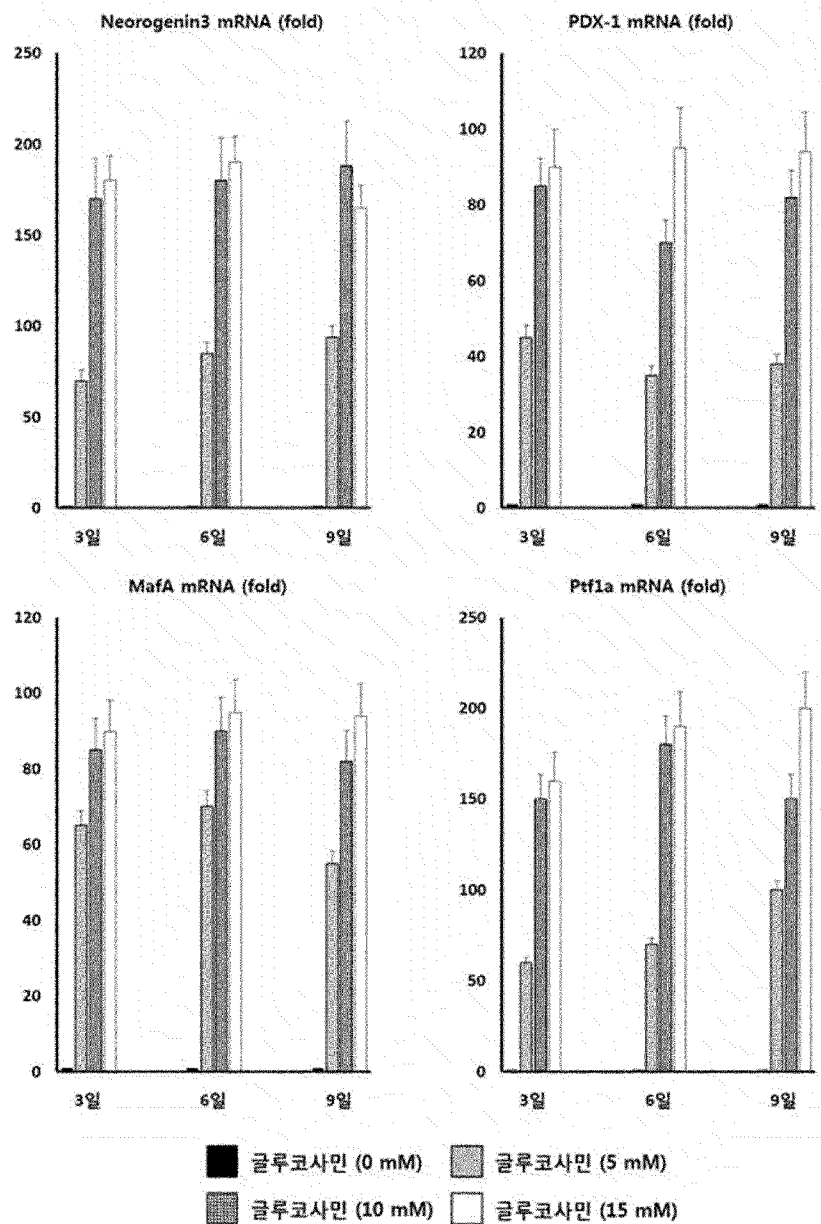
## 청구범위

- [청구항 1]           글루코사민을 포함하는 인슐린 생산세포로의 분화 유도용 배지 조성물.
- [청구항 2]           제1항의 배지 조성물에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 인슐린 생산세포로의 분화를 유도하는 방법.
- [청구항 3]           제2항에 있어서, 상기 세포는 골수세포 또는 성체줄기세포인 것을 특징으로 하는, 인슐린 생산세포로의 분화를 유도하는 방법.
- [청구항 4]           제3항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 골수, 제대혈, 혈액, 피부, 지방 및 태반으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상으로부터 유래된 것을 특징으로 하는, 인슐린 생산세포로의 분화를 유도하는 방법.
- [청구항 5]           제2항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 인슐린 생산세포.
- [청구항 6]           제5항의 인슐린 생산세포를 포함하는 당뇨병 치료용 세포 치료제.
- [청구항 7]           제6항에 있어서, 상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는, 세포 치료제.

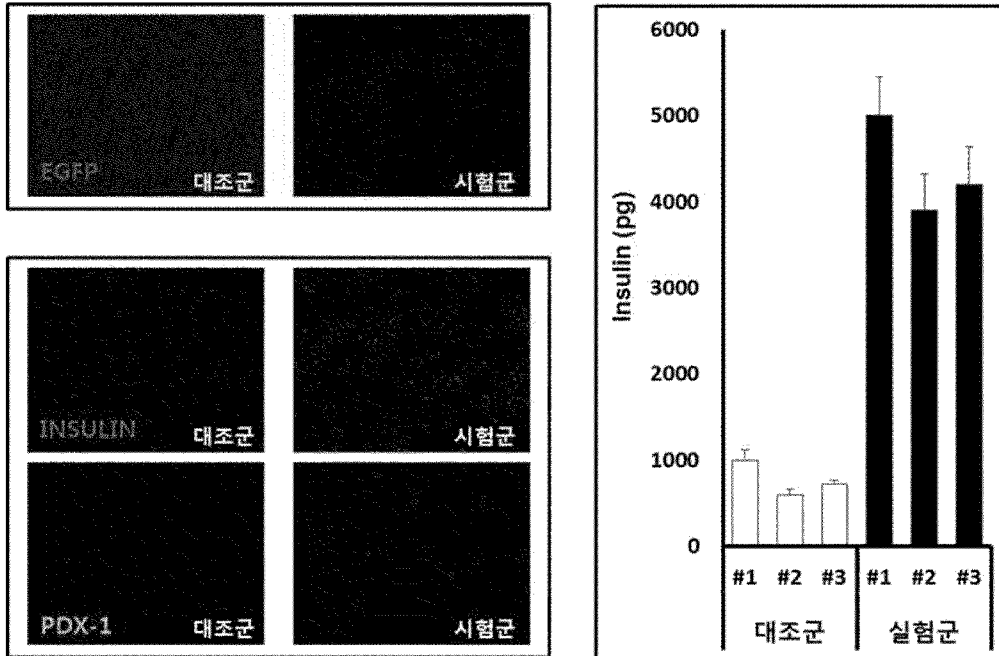
[Fig. 1]



[Fig. 2]



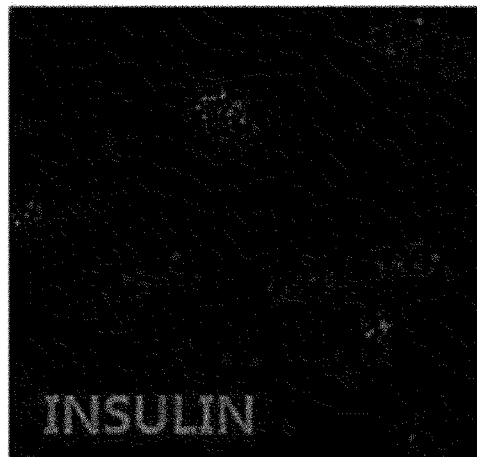
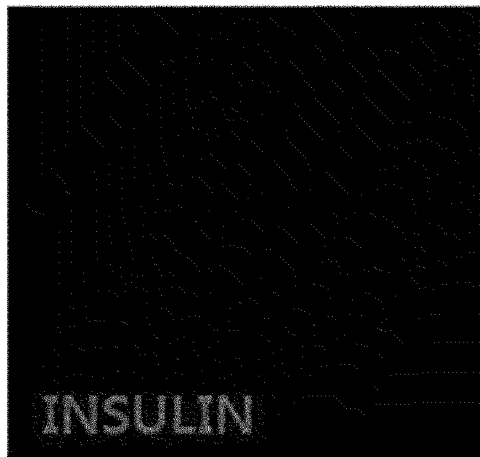
[Fig. 3]



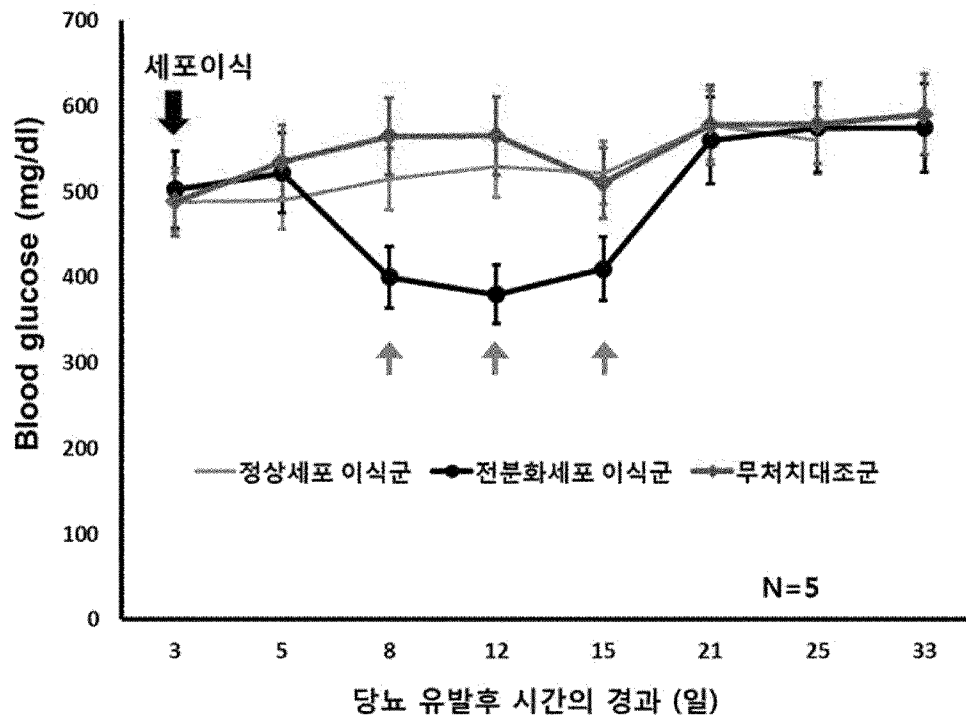
[Fig. 4]

대조군

전분화세포군



[Fig. 5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2015/004741****A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/071(2010.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 3/10(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; C12N 5/0775; C12N 5/074; A61K 35/12; A61P 3/10**

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: insulin-producing cells, diabetes, glucosamine, islet differentiation****C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | OH, SH. et al., "Adult bone marrow-derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes", Laboratory Investigation, 2004, vol. 84, pp. 607-617.<br>See the entire document, especially abstract; pages 607-610, 613; fig. 1, 7 etc.. | 5-7                   |
| A         |                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-4                   |
| X         | TANG, DQ. et al., "In vivo and In vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow", Diabetes, July 2004, vol. 53, pp. 1721-1732.<br>See the entire document, especially abstract.                                                                 | 5-7                   |
| A         |                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-4                   |
| X         | KR 10-0679642 B1 (RNL BIO CO., LTD.) 06 February 2007<br>See abstract; claims 16, 17; example 10.                                                                                                                                                                                    | 5-7                   |
| A         |                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-4                   |
| A         | NELSON, BA. et al., "High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes", Diabetes, June 2000, vol. 49, pp. 981-991.<br>See the entire document, especially abstract.                                                              | 1-7                   |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\*

Special categories of cited documents:

"A"

document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"

earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L"

document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O"

document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"

document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I"

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

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**15 JULY 2015 (15.07.2015)**

Date of mailing of the international search report

**15 JULY 2015 (15.07.2015)**

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2015/004741**

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                          |                       |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                       | Relevant to claim No. |
| A                                                     | BALKAN, B. et al., "Glucosamine inhibits glucokinase in vitro and produces a glucose-specific impairment of in vivo insulin secretion in rats", Diabetes, October 1994, vol. 43, no. 10, pp. 1173-1179.<br>See abstract. | 1-7                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2015/004741**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| KR 10-0679642 B1                          | 06/02/2007          | AU 2005-338370 A1       | 24/05/2007          |
|                                           |                     | AU 2005-338370 B2       | 09/06/2011          |
|                                           |                     | CN 101300343 A          | 05/11/2008          |
|                                           |                     | CN 101300343 B          | 22/06/2011          |
|                                           |                     | CN 101300343 C          | 05/11/2008          |
|                                           |                     | EP 1948786 A1           | 30/07/2008          |
|                                           |                     | EP 1948786 B1           | 18/05/2011          |
|                                           |                     | JP 04-862046 B2         | 25/01/2012          |
|                                           |                     | JP 2009-527221 A        | 30/07/2009          |
|                                           |                     | US 2007-0110729 A1      | 17/05/2007          |
|                                           |                     | US 2011-0171726 A1      | 14/07/2011          |
|                                           |                     | US 7807461 B2           | 05/10/2010          |
|                                           |                     | WO 2007-058404 A1       | 24/05/2007          |
|                                           |                     |                         |                     |

| <b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b><br><b>C12N 5/071(2010.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                             |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----------------------------|--------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---|--|-----|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---|--|-----|---|------------------------------------------------------------------------|-----|---|--|-----|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>B. 조사된 분야</b><br>조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)<br>C12N 5/071; C12N 5/0775; C12N 5/074; A61K 35/12; A61P 3/10<br>조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌<br>한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))<br>eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:insulin-producing cells, diabetes, glucosamine, islet differentiation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                             |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| <b>C. 관련 문헌</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>OH, SH. et al., 'Adult bone marrow-derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes', Laboratory Investigation, 2004, vol.84, pp.607-617.<br/>전문, 특히 초록; 607-610, 613면; Fig.1, 7 등 참조.</td> <td>5-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>TANG, DQ. et al., 'In vivo and In vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow', Diabetes, 2004.7, vol.53, pp.1721-1732.<br/>전문, 특히 초록 참조.</td> <td>5-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-0679642 B1 (주식회사 알앤엘바이오) 2007.2.6.<br/>요약; 청구항 16, 17; 실시예 10 참조.</td> <td>5-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NELSON, BA. et al., 'High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes', Diabetes, 2000.6, vol.49, pp.981-991.<br/>전문, 특히 초록 참조.</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table> |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                             | 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 | X | OH, SH. et al., 'Adult bone marrow-derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes', Laboratory Investigation, 2004, vol.84, pp.607-617.<br>전문, 특히 초록; 607-610, 613면; Fig.1, 7 등 참조. | 5-7 | A |  | 1-4 | X | TANG, DQ. et al., 'In vivo and In vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow', Diabetes, 2004.7, vol.53, pp.1721-1732.<br>전문, 특히 초록 참조. | 5-7 | A |  | 1-4 | X | KR 10-0679642 B1 (주식회사 알앤엘바이오) 2007.2.6.<br>요약; 청구항 16, 17; 실시예 10 참조. | 5-7 | A |  | 1-4 | A | NELSON, BA. et al., 'High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes', Diabetes, 2000.6, vol.49, pp.981-991.<br>전문, 특히 초록 참조. | 1-7 |
| 카테고리*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                                | 관련 청구항                                                                                                                      |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | OH, SH. et al., 'Adult bone marrow-derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes', Laboratory Investigation, 2004, vol.84, pp.607-617.<br>전문, 특히 초록; 607-610, 613면; Fig.1, 7 등 참조. | 5-7                                                                                                                         |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                           | 1-4                                                                                                                         |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | TANG, DQ. et al., 'In vivo and In vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow', Diabetes, 2004.7, vol.53, pp.1721-1732.<br>전문, 특히 초록 참조.                                                           | 5-7                                                                                                                         |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                           | 1-4                                                                                                                         |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | KR 10-0679642 B1 (주식회사 알앤엘바이오) 2007.2.6.<br>요약; 청구항 16, 17; 실시예 10 참조.                                                                                                                                                                    | 5-7                                                                                                                         |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                           | 1-4                                                                                                                         |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | NELSON, BA. et al., 'High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes', Diabetes, 2000.6, vol.49, pp.981-991.<br>전문, 특히 초록 참조.                                                        | 1-7                                                                                                                         |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| <input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                             |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| * 인용된 문헌의 특별 카테고리:<br>"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌<br>"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌<br>"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌<br>"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌<br>"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌<br>"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌<br>"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.<br>"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.<br>"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                             |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| 국제조사의 실제 완료일<br>2015년 07월 15일 (15.07.2015)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                           | 국제조사보고서 발송일<br>2015년 07월 15일 (15.07.2015)                                                                                   |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소<br> 대한민국 특허청<br>(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,<br>4동 (둔산동, 정부대전청사)<br>팩스 번호 +82-42-472-7140                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                           | 심사관<br>이효진<br>전화번호 +82-42-481-8743<br> |       |                            |        |   |                                                                                                                                                                                                                                           |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                 |     |   |  |     |   |                                                                        |     |   |  |     |   |                                                                                                                                                                                    |     |

| C (계속). 관련 문헌 |                                                                                                                                                                                                                      |        |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 카테고리*         | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                           | 관련 청구항 |
| A             | <p>BALKAN, B. et al., 'Glucosamine inhibits glucokinase in vitro and produces a glucose-specific impairment of in vivo insulin secretion in rats', Diabetes, 1994.10, vol.43, no.10, pp.1173-1179.</p> <p>초록 참조.</p> | 1-7    |

국제조사보고서  
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

**PCT/KR2015/004741**

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌             | 공개일        |
|-----------------------|------------|--------------------|------------|
| KR 10-0679642 B1      | 2007/02/06 | AU 2005-338370 A1  | 2007/05/24 |
|                       |            | AU 2005-338370 B2  | 2011/06/09 |
|                       |            | CN 101300343 A     | 2008/11/05 |
|                       |            | CN 101300343 B     | 2011/06/22 |
|                       |            | CN 101300343 C     | 2008/11/05 |
|                       |            | EP 1948786 A1      | 2008/07/30 |
|                       |            | EP 1948786 B1      | 2011/05/18 |
|                       |            | JP 04-862046 B2    | 2012/01/25 |
|                       |            | JP 2009-527221 A   | 2009/07/30 |
|                       |            | US 2007-0110729 A1 | 2007/05/17 |
|                       |            | US 2011-0171726 A1 | 2011/07/14 |
|                       |            | US 7807461 B2      | 2010/10/05 |
|                       |            | WO 2007-058404 A1  | 2007/05/24 |