



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월21일  
(11) 등록번호 10-2502294  
(24) 등록일자 2023년02월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/00 (2006.01) A01N 1/02 (2006.01)  
C12N 5/077 (2010.01) C12N 5/09 (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 5/0018 (2013.01)  
A01N 1/0221 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7009923
- (22) 출원일자(국제) 2017년10월04일  
심사청구일자 2020년08월11일
- (85) 번역문제출일자 2019년04월05일
- (65) 공개번호 10-2019-0090780
- (43) 공개일자 2019년08월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2017/105252
- (87) 국제공개번호 WO 2018/064975  
국제공개일자 2018년04월12일
- (30) 우선권주장  
62/405,447 2016년10월07일 미국(US)  
62/404,170 2016년10월04일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
US20090130756 A1\*  
Lopez-Uruena, E. et al., Reproduction in Domestic Animals (2016) 51(5):700-707\*  
Wang, X. et al. Cryobiology, (2010) 61:345-351\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
트랜스웰 바이오테크 컴퍼니 리미티드  
대만 30076 신주 시티 안파 세컨드 로드 넘버 12
- (72) 발명자  
창 야-휘수안  
중화민국 대만 30076 신주 시티 안파 세컨드 로드 넘버 12  
린 쉹-이  
중화민국 대만 30076 신주 시티 안파 세컨드 로드 넘버 12  
차오 치-유안  
중화민국 대만 30076 신주 시티 안파 세컨드 로드 넘버 12
- (74) 대리인  
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 16 항

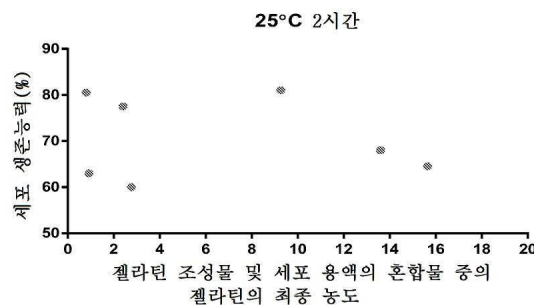
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 세포 생존능력을 유지시키기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지가 제공된다. 세포 안정화 배지는 저온보존 후, 예를 들어, 생물학적 재료의 해동 후 세포 생존능력을 유지시키는 것을 돕는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*C12N 5/0068* (2013.01)

*C12N 5/0607* (2013.01)

*C12N 5/0656* (2013.01)

*C12N 5/0693* (2013.01)

*C12N 2533/54* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

세포 생존능력을 유지시키는 방법으로서,

동결보존 상태에서부터 해동된, 글리세롤을 포함하는 동결보존 조성물 내의 하나 이상의 포유류 세포를 포함하는 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하는 단계를 포함하되,

여기서 상기 세포 안정화 배지는 해동된 상기 세포 현탁액과 혼합될 때 액체 상태의 열가역적 하이드로겔이고 상기 혼합물의 총 중량을 기준으로 0.8 중량% 내지 15.7 중량%의 젤라틴을 포함하고;

상기 세포 안정화 배지 대 상기 세포 현탁액의 부피비는 3.0 내지 12.5 범위이고;

상기 세포는 8시간 이상까지 적어도 70%의 해동 후 생존능력을 갖는, 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 혼합물은 2.4 중량% 내지 7 중량% 또는 9.3 중량% 내지 14.6 중량%의 젤라틴을 포함하는, 세포 생존능력을 유지시키는 방법.

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

제18항에 있어서, 상기 세포 안정화 배지 대 상기 세포 현탁액의 부피비는 5 내지 10 또는 6.25 내지 12.5의 범위인, 세포 생존능력을 유지시키는 방법.

**청구항 22**

제18항에 있어서, 상기 세포는  $7.5 \times 10^5$  개의 세포/ml 내지  $7.5 \times 10^7$  개의 세포/ml의 범위의 농도로 상기 세포 현탁액 중에 있는, 세포 생존능력을 유지시키는 방법.

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

제18항에 있어서, 상기 세포 안정화 배지를 상기 혼합 단계 전에 25°C 내지 37°C의 범위의 온도에 배치하는 단계를 더 포함하는, 세포 생존능력을 유지시키는 방법.

**청구항 27**

제18항에 있어서, 젤라틴은 100 킬로달톤(kD) 내지 200kD의 범위의 중량 평균 분자 질량을 갖는, 세포 생존능력

을 유지시키는 방법.

**청구항 28**

제18항에 있어서, 젤라틴은 변성된 콜라겐을 포함하는, 세포 생존능력을 유지시키는 방법.

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

제18항에 있어서, 상기 세포는 종양 세포, 섬유아세포 또는 줄기세포를 포함하는, 세포 생존능력을 유지시키는 방법.

**청구항 31**

동결보존 상태에서부터 해동된, 글리세롤을 포함하는 동결보존 조성물 내의 하나 이상의 포유류 세포를 포함하는 세포 현탁액 및

세포 안정화 배지가 상기 해동된 세포 현탁액과 배합될 때 액체 상태의 열가역적 하이드로겔인, 세포 안정화 배지를 포함하는 조성물로서,

여기서 상기 조성물은 조성물의 총 중량을 기준으로 0.8 중량% 내지 15.7 중량%의 젤라틴을 포함하고;

상기 세포 안정화 배지 대 상기 세포 현탁액의 부피비는 3.0 내지 12.5 범위이고;

상기 조성물의 세포는 8시간 이상까지 적어도 70%의 해동 후 생존능력을 갖는, 조성물.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 2.4 중량% 내지 7 중량% 또는 9.3 중량% 내지 14.6 중량%의 젤라틴을 포함하는, 조성물.

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

제31항에 있어서, 젤라틴은 100 킬로달톤(kD) 내지 200kD의 범위의 중량 평균 분자 질량을 갖는, 조성물.

**청구항 36**

제31항에 있어서, 젤라틴은 변성된 콜라겐을 포함하는, 조성물.

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

제31항에 있어서, 상기 세포는 종양 세포, 섬유아세포 또는 줄기세포를 포함하는, 조성물.

**청구항 39**

제31항에 있어서, 상기 세포가  $10^5$  개 세포/ml 내지  $10^7$  개 세포/ml 범위의 농도로 존재하는, 조성물.

**청구항 40**

제31항에 있어서, 상기 세포가  $7.5 \times 10^5$  세포/ml 내지  $7.5 \times 10^7$  세포/ml의 농도로 존재하는, 조성물.

**청구항 41**

제31항, 제32항, 제35항, 제36항 및 제38항 내지 제40항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 키트.

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

**청구항 50**

삭제

**청구항 51**

삭제

**청구항 52**

삭제

**청구항 53**

삭제

**청구항 54**

삭제

**청구항 55**

삭제

**청구항 56**

삭제

청구항 57

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001]

**관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002]

본 출원은 미국 가출원 제62/404,170호(2016년 10월 4일자로 출원) 및 제62/405,447호(2016년 10월 7일자로 출원)(본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 대한 우선권을 주장한다. 본 출원은 또한 발명의 명칭이 "Compositions and Methods for Cell Cryopreservation"이고 2017년 10월 4일자로 출원된 국제 출원 제 PCT/CN2017/105253호(본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 관한 것이다.

[0003]

**기술 분야**

[0004]

본 개시내용은 일반적으로 시험관내 생물학적 재료의 생존능력을 유지시키는 것의 분야에 관한 것이다. 특히, 본 개시내용은 생물학적 재료, 예컨대 세포 및 조직이 저온보존 후 해동될 때 이들의 생존능력을 유지시키기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005]

0°C 이하의 온도에서의 저온보존 기법은 생물학적 재료, 예컨대 동물 및 식물의 세포 및 조직(인간 세포 및 조직 포함)의 장기간 보존에 일상적으로 사용된다. Thompson et al., Cryopreservation and Thawing of Mammalian Cells, December 2014, eLS, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002561.pub2. 포유류 세포의 효과적인 장기간 저장은 임상 및 조사 도구로서 이러한 세포의 성공적인 분야에 중요하다. 예를 들어, 줄기세포는 세포 이식, 조직 조작 및 재생 의학에 사용될 수 있다. 저온보존된 난모세포, 정자 및 배아는 보조 재생 기술에서 사용될 수 있다. 이식 의학에서, 살아 있는 조직, 예컨대 피부, 각막, 췌장 소도 및 심장 판막은 저온보존될 필요가 있다.

[0006]

세포는 수개월 또는 수년 동안 영하 온도(예를 들어, -70°C 미만)에서 저장될 수 있다. 그러나, 세포는 이것이 해동될 때 및 해동된 후 안정하다. 주로 생존능력에 의해 표시되는, 세포의 안정성은 해동 공정 동안에 또는 후에 세포가 접촉하는 환경에 따라 변한다. 해동 속도, 삼투 스트레스 및 저온보호제 독성이 해동 후 세포를 손상시킬 것이라고 나타났다. Thompson et al., Cryopreservation and Thawing of Mammalian Cells, December 2014, eLS, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002561.pub2. 세포가 대상체(예를 들어, 세포 치료, 수혈 또는 골수 이식 등을 통해) 대상체로 주사되면, 죽은 또는 손상된 세포를 재주사하는 것이 소용없을 수 있으므로, 해동 후 높은 세포 생존능력을 얻는 것이 매우 중요하다. 마찬가지로, 세포가 재배양되어야 할 때, 세포 생존능력이 높다는 것이 동등하게 중요하다.

[0007]

이것이 저온보존 상태에서부터 대사상 활성인 상태로 이행하면서 세포 생존능력을 어떻게 유지시키는지의 도전적인 업무이다. 따라서, 해동 후 세포 생존능력을 유지시키기 위한 개선된 배지 및 방법에 대한 수요가 있다.

**발명의 내용**

[0008]

본 개시내용은 (세포 안정화 배지의 전체 중량을 기준으로) 약 5중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량% 내지 약 7.5중량%, 약 10중량% 내지 약 15.7중량%, 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%, 약 2.4중량% 내지 약 7중량%, 또는 약 9.3중량% 내지 약 14.6중량%의 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지를 제공한다.

[0009]

생물학적 재료(예를 들어, 하나 이상의 세포, 조직(들), 기관(들), 및/또는 바이러스 입자) 및 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%, 약 2.4중량% 내지 약 7중량%, 또는 약 9.3중량% 내지 약 14.6중량%의 젤라틴을 포함하는 조성물이 본 개시내용에 의해 또한 포함된다.

[0010]

소정의 실시형태에서, 생물학적 재료(예를 들어, 하나 이상의 세포, 조직(들), 기관(들), 및/또는 바이러스 입자)는 저온보존된 상태에서부터 해동된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 적어도 70%, 또는 적어도 80%의 해동 후 생존능력을 갖는다.

- [0011] 본 개시내용은 생물학적 재료의 생존능력(예를 들어, 세포 생존능력)을 유지시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 생물학적 재료(예를 들어, 하나 이상의 세포, 조직(들), 기관(들), 및/또는 바이러스 입자)를 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성(또는 세포 안정화 배지 및 생물학적 재료(예를 들어, 하나 이상의 세포, 조직(들), 기관(들), 및/또는 바이러스 입자)의 조합을 형성)하는 단계를 포함한다.
- [0012] 본 개시내용은 세포 생존능력을 유지시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 하나 이상의 세포를 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물(또는 세포 안정화 배지 및 생물학적 재료(예를 들어, 하나 이상의 세포, 조직(들), 기관(들), 및/또는 바이러스 입자)의 조합)을 형성하는 단계를 포함하고, 혼합물(또는 조합)은 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%, 약 2.4중량% 내지 약 7중량%, 또는 약 9.3중량% 내지 약 14.6중량%의 젤라틴을 포함한다.
- [0013] 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 세포는 혼합 단계 전에 세포 현탁액 중에 있다.
- [0014] 소정의 실시형태에서, 혼합 단계에 대해, 세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비는 약 6.25 내지 약 12.5, 또는 약 5 내지 약 10의 범위이다.
- [0015] 소정의 실시형태에서, 세포는 약  $7.5 \times 10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^7$ 개의 세포/ml의 범위의 농도에서 세포 현탁액 중에 있다.
- [0016] 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 세포 안정화 배지를 혼합 단계 전에 약 25°C 내지 약 37°C의 범위의 온도에서 배치하는 단계를 더 포함한다.
- [0017] 소정의 실시형태에서, 혼합 단계 전에, 하나 이상의 세포는 저온보존된 상태에서부터 해동된 저온보존 조성물 중에 있다. 소정의 실시형태에서, 저온보존된 상태는 약 -70°C 및 -200°C의 범위의 온도에 있다.
- [0018] 소정의 실시형태에서, 세포는 적어도 70%, 또는 적어도 80%의 해동 후 생존능력을 갖는다.
- [0019] 소정의 실시형태에서, 저온보존 조성물은 글라이세롤, 다이메틸 설펍사이드(DMSO), 및/또는 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)을 포함한다.
- [0020] 소정의 실시형태에서, 혼합 단계 후, 세포는 약  $10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^7$ 개의 세포/ml의 범위의 농도로 혼합물 중에 존재한다.
- [0021] 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 약 100킬로달톤(kD) 내지 약 200kD의 범위의 중량 평균 분자 질량(또는 분자량, 또는 평균 분자량)을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 변성된 콜라겐을 포함한다.
- [0022] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 약 190 내지 약 325의 범위의 블룸 값(bloom value)을 갖는 열가역적 하이드로겔이다.
- [0023] 소정의 실시형태에서, 세포는 포유류 세포이다. 소정의 실시형태에서, 세포는 인간, 돼지, 개, 말 또는 소 세포이다. 소정의 실시형태에서, 세포는 종양 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 세포는 섬유아세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 세포는 줄기세포를 포함한다.
- [0024] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 아미노산, 사이토카인, 지질, 성장 인자, 항생제, 항진균제, 스테로이드 호르몬, 단백질 호르몬, 또는 이들의 조합물을 더 포함한다.
- [0025] 본 개시내용은 본 조성물 또는 본 세포 안정화 배지를 포함하는 키트를 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0026] **도 1**은 해동 후 세포 생존능력에 대한 젤라틴 농도 및 항온처리 온도 및 시간의 효과를 보여주는 그래프이다. 실험에서, 세포를 초기에 글라이세롤계 어는 용액 중에 동결시켰다. (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 혼합하였다. 해동 후 세포 생존능력을 평가하기 전에, 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 항온처리하였다.
- 도 2**는 해동 후 세포 생존능력에 대한 젤라틴 농도 및 항온처리 온도 및 시간의 효과를 보여주는 그래프이다. 실험에서, 세포를 초기에 글라이세롤계 어는 용액 중에 동결시켰다. (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 혼합하였다. 해동 후 세포 생존능력을 평가하기 전에, 혼합물을 25°C에서 4시간 동안 항온처리하였다.
- 도 3**은 해동 후 세포 생존능력에 대한 젤라틴 농도 및 항온처리 온도 및 시간의 효과를 보여주는 그래프이다.

실험에서, 세포를 초기에 글라이세올계 어는 용액 중에 동결시켰다. (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 혼합하였다. 대조군 샘플에서, (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 DMEM을 혼합하였다. 해동 후 세포 생존능력을 평가하기 전에, 혼합물을 30℃에서 2시간 항온처리하였다.

**도 4**는 해동 후 세포 생존능력에 대한 젤라틴 농도 및 항온처리 온도 및 시간의 효과를 보여주는 그래프이다. 실험에서, 세포를 초기에 글라이세올계 어는 용액 중에 동결시켰다. (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 혼합하였다. 대조군 샘플에서, (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 DMEM을 혼합하였다. 해동 후 세포 생존능력을 평가하기 전에, 혼합물을 30℃에서 4시간 동안 항온처리하였다.

**도 5**는 해동 후 세포 생존능력에 대한 젤라틴 농도 및 항온처리 온도 및 시간의 효과를 보여주는 그래프이다. 실험에서, 세포를 초기에 글라이세올계 어는 용액 중에 동결시켰다. (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 혼합하였다. 해동 후 세포 생존능력을 평가하기 전에, 혼합물을 27℃에서 2시간 동안 항온처리하였다.

**도 6**은 해동 후 세포 생존능력에 대한 젤라틴 농도 및 항온처리 온도 및 시간의 효과를 보여주는 그래프이다. 실험에서, 세포를 초기에 글라이세올계 어는 용액 중에 동결시켰다. (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 혼합하였다. 대조군 샘플에서, (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 DMEM을 혼합하였다. 해동 후 세포 생존능력을 평가하기 전에, 혼합물을 37℃에서 2시간 동안 항온처리하였다.

**도 7**은 해동 후 세포 생존능력에 대한 젤라틴 농도 및 항온처리 온도 및 시간의 효과를 보여주는 그래프이다. 실험에서, 세포를 초기에 글라이세올계 어는 용액 중에 동결시켰다. (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 혼합하였다. 대조군 샘플에서, (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 DMEM을 혼합하였다. 해동 후 세포 생존능력을 평가하기 전에, 혼합물을 37℃에서 4시간 동안 항온처리하였다.

**도 8**은 해동 후 세포 생존능력에 대한 젤라틴 농도 및 항온처리 시간의 효과를 보여주는 그래프이다. 실험에서, 세포를 초기에 글라이세올계 어는 용액 중에 동결시켰다. (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 혼합하였다. 대조군 샘플에서, (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 DMEM을 혼합하였다. 해동 후 세포 생존능력을 평가하기 전에, 혼합물을 37℃에서 항온처리하였다.

**도 9**는 해동 후 세포 생존능력에 대한 젤라틴 농도 및 항온처리 시간의 효과를 보여주는 그래프이다. 실험에서, 세포를 초기에 DMSO 기반 어는 용액 중에 동결시켰다. (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 혼합하였다. 대조군 샘플에서, (어는 용액 중의) 해동된 세포 현탁액 및 DMEM 또는 10% FBS/DMEM 중 어느 하나를 혼합한다. 해동 후 세포 생존능력을 평가하기 전에, 혼합물을 25℃에서 항온처리하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0027] 본 개시내용은 예를 들어 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지를 제공한다. 세포 안정화 배지는 예를 들어 저온 보존 후 생물학적 재료의 해동 후 세포 생존능력을 유지시키는 것을 돕는다. 본 세포 안정화 배지와 혼합함으로써, 세포의 생존능력은 바람직한 시간 동안 유지될 수 있다.
- [0028] 이후, 생물학적 재료(예를 들어, 세포)는 다양한 조사 및 임상 환경에서, 예를 들어 보조 생식 기술에서 세포 기반 치료제에 대해, 또는 화학치료 또는 방사선 치료를 겪는 환자에 대해 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 생물학적 재료는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0029] 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료(예를 들어, 세포, 조직, 기관 또는 바이러스 입자)는 저온보존으로부터(저온보존된 상태로부터) 해동된다(또는 해동되었다). 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료는 저온보존 하에 있다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지와 혼합되면서, 생물학적 재료는 저온보존으로부터 해동되는 공정에 있거나 해동되었다. 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지와 배합/혼합된 후, 세포는 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 해동 후 생존능력을 갖는다.
- [0030] 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료(예를 들어, 세포, 조직, 기관 또는 바이러스 입자)가 저온보존으로부터 해동될(또는 해동된) 때, 생물학적 재료는 하나 이상의 투과 저온보호제, 및/또는 하나 이상의 비투과 저온보호제를 포함하는 저온보존 조성물 내에 있다. 투과 저온보호제의 비제한적인 예는 글라이세올, DMSO, 폴리에틸렌 글라이콜, 에틸렌 글라이콜 및 프로필렌 글라이콜(1,2-프로판다이올, 프로판-1,2-다이올)을 포함한다. 비투과 저온보호제의 비제한적인 예는 고분자량 분자, 예컨대 사카라이드(예를 들어, 수크로스, 트레할로스, 말토스),

당, 전분(예를 들어, 하이드록시에틸 전분), 단백질(예를 들어, 알부민, 예컨대 혈청 알부민), 피콜, 피콜, 폴리에틸렌 글라이콜, 텍스트란, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐알코올(PVA), 혈청, 혈장 및 다른 거대분자를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 저온보존 조성물은 하나 이상의 저온보호제, 예를 들어 글라이세롤, 다이메틸 설펍사이드(DMSO), 및/또는 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)(이들로 제한되지는 않음)을 포함한다.

- [0031] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "저온보존된 상태"는 저온보존된 온도에 있는 상태를 의미한다.
- [0032] 구체적인 실시형태에서, 저온보존 온도는 약 0℃ 이하, 약 -20℃ 이하, 약 -50℃ 이하, 약 -60℃ 이하, 약 -70℃ 이하, 약 -80℃ 이하, 약 -90℃ 이하, 약 -100℃ 이하, 약 -110℃ 이하, 약 -120℃ 이하, 약 -135℃ 이하, 약 -196℃ 이하, 약 -70℃ 내지 약 -200℃의, 또는 액체 질소 중의 온도를 포함한다.
- [0033] 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료(예를 들어, 세포, 조직, 기관 또는 바이러스 입자)는 세포 안정화 배지와 배합/혼합되기 전에 저체온 보존된 상태에 있다. 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료(세포, 조직, 기관)는 세포 안정화 배지와 배합/혼합되기 전에 동결건조된 상태에 있다.
- [0034] 소정의 실시형태에서, 세포는 세포 안정화 배지와 배합/혼합되기 전에 세포 배양 하에 있다. 세포는 준포화상태(sub-confluence)에서, 지수 성장기에서, 포화상태에서 또는 포화상태 후에 수확될 수 있다.
- [0035] 소정의 실시형태에서, 세포는 세포 안정화 배지와 배합/혼합되기 전에 대상체(예를 들어, 환자)로부터 수확된다.
- [0036] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지와 배합/혼합되기 전에, 세포는 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 생존능력을 갖는다.
- [0037] 소정의 실시형태에서, 세포는 중앙 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 세포는 섬유아세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 세포는 줄기세포를 포함한다.
- [0038] 소정의 실시형태에서, 세포는 포유류 세포, 예를 들어 인간, 돼지, 개, 말 또는 소 세포(제한되지는 않음)를 포함한다.
- [0039] 소정의 실시형태에서, 본 방법은 본 세포 안정화 배지에 의해 처리되는 생물학적 재료를 대상체(예를 들어, 환자)에게 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0040] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 (세포 안정화 배지의 전체 중량을 기준으로) 약 5중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는, 세포 안정화 배지의 전체 중량을 기준으로, 약 2중량% 내지 약 20중량%, 약 3중량% 내지 약 18중량%, 약 4중량% 내지 약 17중량%, 약 5중량% 내지 약 16중량%, 약 5중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량% 내지 약 7.5중량%, 약 10중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량% 내지 약 6중량%, 약 6중량% 내지 약 7.5중량%, 약 7.5중량% 내지 약 10중량%, 약 5중량% 내지 약 10중량%, 약 6중량% 내지 약 7.5중량%, 약 6중량% 내지 약 10중량%, 약 6중량% 내지 약 15.7중량%, 약 7.5중량% 내지 약 10중량%, 약 7.5중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량%, 약 6중량%, 약 7.5중량%, 약 10중량%, 또는 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함한다.
- [0041] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 약 5중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴, 및 용매(예를 들어, 배양 배지, 예컨대 DMEM, 물, 완충제, 식염수 용액 등)을 포함한다(또는 이들로 이루어지거나 본질적으로 이들로 이루어진다). 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 젤라틴의 농도가 약 5중량% 내지 약 15.7중량%의 범위인 수성 젤라틴 용액을 포함한다(또는 이들로 이루어지거나 본질적으로 이들로 이루어진다).
- [0042] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 약 5중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴, 및 완충제 시스템(예를 들어, 생리학적 완충제)을 포함한다(또는 이들로 이루어지거나 본질적으로 이들로 이루어진다). 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 약 5중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴, 및 염 용액, 및/또는 임의의 생리학적 용액을 포함한다(또는 이들로 이루어지거나 본질적으로 이들로 이루어진다).
- [0043] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 약 5중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴, 및 배양 배지(예를 들어, 세포 배양 배지)를 포함한다(또는 이들로 이루어지거나 본질적으로 이들로 이루어진다).
- [0044] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지에서, 젤라틴은 액체 조성물과 혼합된다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 약 5중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴, 및 액체 조성물을 포함한다(또는 이들로 이루어지거나 본질적으로 이들로 이루어진다). 액체 조성물의 비제한적인 예는 물, 배양 배지, 배양 배지의 혼합물, 완충제

시스템(예를 들어, 생리학적 완충제), 염 용액, 및/또는 임의의 생리학적 용액을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 액체 조성물은 보충제, 첨가제, 몇몇 배지 성분의 추가적인 양 등을 더 포함한다.

- [0045] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 2개의 구성성분을 포함한다(또는 이들로 이루어지거나 본질적으로 이들로 이루어진다): 약 5중량% 내지 약 15.7중량%의 범위의 농도에서 세포 안정화 배지 중에 존재하는 젤라틴인 제1 구성성분; 식염수 용액(예를 들어, 등장성 식염수 용액), 완충제 시스템(예를 들어, 생리학적 완충제), 물, 및/또는 배양 배지(예를 들어, 세포 배양 배지)인 제2 구성성분.
- [0046] 본 개시내용은 생물학적 재료의 생존능력(예를 들어, 세포 생존능력)을 유지시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 생물학적 재료(예를 들어, 세포, 조직, 기관 또는 바이러스 입자)를 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 안정화 배지의 전체 중량을 기준으로 약 5중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴 세포를 포함한다.
- [0047] 생물학적 재료(예를 들어, 세포, 조직, 기관 또는 바이러스 입자)는 임의의 적합한 방법에 의해 본 세포 안정화 배지와 배합될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 생물학적 재료에 첨가된다. 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료는 세포 안정화 배지에 첨가된다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 세포 현탁액 중에 세포를 제공하는 단계 및 선택적으로 혼합하면서 세포 안정화 배지를 세포 현탁액에 첨가하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 세포 현탁액 중에 세포를 제공하는 단계 및 선택적으로 혼합하면서 세포 현탁액을 세포 안정화 배지에 첨가하는 단계를 포함한다.
- [0048] 소정의 실시형태에서, 세포는 본 세포 안정화 배지와 배합/혼합되기 전에 이미 배양 배지 또는 보존 배지가 없다(예를 들어, 원심분리되고, 수확되고, 완충 용액 중에 선택적으로 세척됨).
- [0049] 소정의 실시형태에서, 세포 및 본 세포 안정화 배지를 혼합하기 전에, 세포는 세포 현탁액 중에 있다. 소정의 실시형태에서, 세포는 배양 배지(예를 들어, 세포 배양 배지), 완충제 시스템(예를 들어, 생리학적 완충제), 염 용액, 및/또는 생리학적 용액 중에 현탁된다.
- [0050] 소정의 실시형태에서, 세포는 약  $10^4$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^9$ 개의 세포/ml, 약  $10^4$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^8$ 개의 세포/ml, 약  $7.5 \times 10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^7$ 개의 세포/ml, 약  $5 \times 10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $5 \times 10^7$ 개의 세포/ml, 약  $8 \times 10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^7$ 개의 세포/ml, 약  $9 \times 10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^7$ 개의 세포/ml, 약  $10^6$ 개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^7$ 개의 세포/ml, 약  $5 \times 10^6$ 개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^7$ 개의 세포/ml, 약  $7.5 \times 10^6$ 개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^7$ 개의 세포/ml, 약  $7.5 \times 10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^6$ 개의 세포/ml, 약  $10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^7$ 개의 세포/ml, 약  $10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^8$ 개의 세포/ml, 약  $10^4$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^7$ 개의 세포/ml의 범위, 약  $7.5 \times 10^5$ 개의 세포/ml, 약  $7.5 \times 10^6$ 개의 세포/ml, 또는 약  $7.5 \times 10^7$ 개의 세포/ml, 약  $10^5$ 개의 세포/ml, 약  $10^6$ 개의 세포/ml, 또는 약  $10^7$ 개의 세포/ml의 농도에서 세포 현탁액 중에 존재한다. 소정의 실시형태에서, 세포는 약  $7.5 \times 10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^7$ 개의 세포/ml의 범위의 농도에서 세포 현탁액 중에 존재한다. 소정의 실시형태에서, 세포는 약  $7.5 \times 10^6$ 개의 세포/ml의 농도에서 세포 현탁액 중에 존재한다. 세포 현탁액 중의 세포의 농도는  $10^9$ 개의 세포/ml 초과 또는  $10^4$ 개의 세포/ml 미만일 수 있다.
- [0051] 소정의 실시형태에서, 세포 및 본 세포 안정화 배지는 혼합되어 혼합물을 형성한다.
- [0052] 본 개시내용은 세포 생존능력을 유지시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 하나 이상의 세포를 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 혼합물은 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함한다.
- [0053] 소정의 실시형태에서, 세포의 혼합물(세포 현탁액 중에 있거나 있지 않을 수 있음) 및 본 세포 안정화 배지(또는 생물학적 재료 및 세포 안정화 배지의 조합)는, (혼합물의 전체 중량을 기준으로) 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 혼합물(또는 조합)은, 혼합물(또는 조합)의 전체 중량을 기준으로, 약 0.5중량% 내지 약 20중량%, 약 0.6중량% 내지 약 18중량%, 약 0.7중량% 내지 약 17중량%, 약 0.8중량% 내지 약 16중량%, 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%, 약 0.5중량% 내지 약 15.7중량%, 약 1중량% 내지 약 17중량%, 약 2중량% 내지 약 14중량%, 약 3중량% 내지 약 9.5중량%, 약 4중량% 내지 약 14중량%, 약 2.4중량% 내

지 약 7중량%, 약 9.3중량% 내지 약 14.6중량%, 약 5중량% 내지 약 7.5중량%, 약 10중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량% 내지 약 6중량%, 약 6중량% 내지 약 7.5중량%, 약 7.5중량% 내지 약 10중량%, 약 5중량% 내지 약 10중량%, 약 6중량% 내지 약 7.5중량%, 약 6중량% 내지 약 10중량%, 약 6중량% 내지 약 15.7중량%, 약 7.5중량% 내지 약 10중량%, 약 7.5중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량%, 약 6중량%, 약 7.5중량%, 약 10중량%, 또는 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함한다.

[0054] 소정의 실시형태에서, 세포 및 본 세포 안정화 배지는 혼합되어 혼합물을 형성하고, 여기서 세포는 약  $10^4$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^9$ 개의 세포/ml, 약  $10^4$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^8$ 개의 세포/ml, 약  $10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^7$ 개의 세포/ml, 약  $10^6$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^7$ 개의 세포/ml, 약  $10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^6$ 개의 세포/ml, 약  $10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^8$ 개의 세포/ml, 약  $10^4$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^7$ 개의 세포/ml의 범위, 약  $10^5$ 개의 세포/ml, 약  $10^6$ 개의 세포/ml, 또는 약  $10^7$ 개의 세포/ml의 농도로 혼합물 중에 존재한다. 소정의 실시형태에서, 세포는 약  $10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^7$ 개의 세포/ml의 범위의 농도로 혼합물 중에 존재한다. 소정의 실시형태에서, 세포는 약  $10^6$ 개의 세포/ml의 농도로 혼합물 중에 존재한다. 혼합물 중의 세포의 농도는  $10^9$ 개의 세포/ml 초과 또는  $10^4$ 개의 세포/ml 미만일 수 있다.

[0055] 소정의 실시형태에서, 혼합 단계에 대해, 세포 안정화 배지 대 세포 현탁액(또는 생물학적 재료를 함유하는 조성물)의 용적비는 약 3 내지 약 25, 약 5 내지 약 20, 약 6 내지 약 18, 약 6 내지 약 15, 약 6.25 내지 약 12.5, 약 7 내지 약 12.5, 약 6.25 내지 약 15, 약 6.25 내지 약 20, 약 8 내지 약 12.5, 약 9 내지 약 12.5, 약 5 내지 약 12.5, 약 5 내지 약 10, 약 5 내지 약 8의 범위, 약 5, 약 6, 약 6.25, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 12.5, 약 13, 약 14, 또는 약 15이다.

[0056] 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료(예컨대, 세포 현탁액 중에 있거나 있지 않을 수 있는 세포) 및 본 세포 안정화 배지의 혼합물 중의 세포의 생존능력은, 혼합물이 약 1시간 내지 약 8시간, 약 2시간 내지 약 8시간, 약 3시간 내지 약 8시간, 약 2시간 내지 약 4시간, 약 1시간 내지 약 6시간, 약 4시간 내지 약 8시간, 약 1시간 내지 약 5시간, 약 1시간 내지 약 4시간, 약 1시간 내지 약 3시간, 약 1시간 내지 약 2시간, 약 2시간 내지 약 4시간, 약 2시간 내지 약 3시간, 약 3시간 내지 약 5시간, 약 5분 내지 약 20분, 약 5분 내지 약 30분, 약 10분 내지 약 1시간, 약 20분 내지 약 1시간의 범위, 약 30분, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간 또는 약 8시간의 시간 기간 동안 약 25°C, 약 27°C, 약 30°C, 또는 약 37°C의 온도에서 항온처리된 후, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만 또는 약 1% 미만 감소한다.

[0057] 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료(예컨대, 세포 현탁액 중에 있거나 있지 않을 수 있는 세포) 및 본 세포 안정화 배지의 혼합물 중의 세포의 생존능력은, 혼합물이 약 1시간 내지 약 8시간, 약 2시간 내지 약 8시간, 약 3시간 내지 약 8시간, 약 2시간 내지 약 4시간, 약 1시간 내지 약 6시간, 약 4시간 내지 약 8시간, 약 1시간 내지 약 5시간, 약 1시간 내지 약 4시간, 약 1시간 내지 약 3시간, 약 1시간 내지 약 2시간, 약 2시간 내지 약 4시간, 약 2시간 내지 약 3시간, 약 3시간 내지 약 5시간, 약 5분 내지 약 20분, 약 5분 내지 약 30분, 약 10분 내지 약 1시간, 약 20분 내지 약 1시간의 범위, 약 30분, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간 또는 약 8시간의 시간 기간 동안 약 25°C, 약 27°C, 약 30°C, 또는 약 37°C에서 항온처리된 후, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%이다.

[0058] 본 개시내용은 생물학적 재료(예를 들어, 하나 이상의 세포, 조직, 기관) 및 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함하는 조성물을 제공한다. 소정의 실시형태에서, 조성물은 (조성물의 전체 중량을 기준으로) 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 조성물은, 조성물의 전체 중량을 기준으로, 약 0.5중량% 내지 약 20중량%, 약 0.6중량% 내지 약 18중량%, 약 0.7중량% 내지 약 17중량%, 약 0.8중량% 내지 약 16중량%, 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%, 약 0.5중량% 내지 약 15.7중량%, 약 1중량% 내지 약 17중량%, 약 2중량% 내지 약 14중량%, 약 3중량% 내지 약 9.5중량%, 약 4중량% 내지 약 14중량%, 약 2.4중량% 내지 약 7중량%, 약 9.3중량% 내지 약 14.6중량%, 약 5중량% 내지 약 7.5중량%, 약 10중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량% 내지 약 6중량%, 약 6중량% 내지 약 7.5중량%, 약 7.5중량% 내지 약 10중량%, 약 5중량% 내지 약 10중량%, 약 6중량% 내지 약 7.5중량%, 약 6중량% 내지 약 10중량%, 약 6중량% 내지 약 15.7중량%, 약 7.5중량% 내지 약 10중량%, 약 7.5중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량%, 약 6중량%, 약 7.5중량%, 약 10중량%, 또는 약 15.7

중량%의 젤라틴을 포함한다.

- [0059] 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료(예를 들어, 세포, 조직, 기관 또는 바이러스 입자)는 저온보존(저온보존된 상태)으로부터 해동된다(또는 해동되었다). 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료는 저온보존 하에 있다. 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료는 저온보존으로부터 해동되는 공정에 있거나 해동되었다.
- [0060] 본 세포 안정화 배지는 액체 또는 고체일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지는 예컨대 건조 형태(예를 들어, 분말, 정제, 과립 또는 임의의 다른 적합한 물리적 형태)의 또는 예를 들어 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 15X, 20X 등의 스톱 용액으로서 액체 형태의 농축물 조성물이다. 스톱 용액은 예를 들어 배양 배지, 생리학적 용액, 완충제, 물 등에 의해 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 15X, 20X 등으로 희석될 수 있다. 세포 안정화 배지의 건조 형태는 예를 들어 배양 배지, 생리학적 용액, 완충제, 물 등을 첨가함으로써 액체로 전환될 수 있다(예를 들어, 배양 배지, 생리학적 용액, 완충제, 물 등 중에 예를 들어 용해됨).
- [0061] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 성분의 농도는 본 세포 안정화 배지의 스톱 용액 중의 성분의 농도이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 성분의 농도는 본 세포 안정화 배지의 작업 용액 중의 성분의 농도이다.
- [0062] 본 세포 안정화 배지는 용액일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 본 명세서에 기재된 성분의 수성 용액이다.
- [0063] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지를 제조할 때, 본 명세서에 기재된 성분(예를 들어, 젤라틴, 젤라틴 유도체, 및/또는 알부민)은 균형화된 전해질 용액(예를 들어, 식염수 용액, 배양 배지, 예컨대 세포 배양 배지) 중에 용해된다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 노르말 삼투질농도를 유지시키기 위해 전해질(예컨대, 나트륨, 칼륨, 및/또는 클로라이드 이온)의 적절한 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 식염수 용액은 인산염 완충 식염수 용액(PBS)이다. 일 실시형태에서, 식염수 용액은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 염화 나트륨, 염화칼륨, 황산마그네슘, 인산칼륨, 염화칼슘 및 중탄산나트륨. 일 실시형태에서, 식염수 용액은 등장성 식염수 용액(예를 들어, 혈장 또는 체액과 등장성)이다.
- [0064] 본 세포 안정화 배지는 완충제 시스템(예를 들어, 생리학적 완충제)을 포함할 수 있다. 본 세포 안정화 배지는 균형 염 용액 또는 임의의 생리학적 용액을 포함할 수 있다.
- [0065] 완충제 시스템의 비제한적인 예는 인산 완충제(예를 들어, 인산염 완충 식염수(PBS)), BES, TES, 아세트아미도 글라이신, 글라이신 아마이드, 글라이실글라이신, TRICINE, TALP, 트리스-에탄올아민, 베로날 및 HEPES를 포함한다.
- [0066] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지 중의 완충제의 농도는 약 1mM 내지 약 1000mM, 약 1mM 내지 약 200mM, 약 5mM 내지 약 200mM, 또는 약 5mM 내지 약 50mM의 범위이다.
- [0067] 배양 배지의 비제한적인 예는 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Media: DMEM), 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium: MEM), 닉아웃-DMEM(KO-DMEM), 글래스고 최소 필수 배지(Glasgow Minimal Essential Medium: G-MEM), 이글스 기본 배지(Basal Medium Eagle: BME), DMEM/Ham F12, 어드밴스트 DMEM/Ham F12, 이스코브(Iscove) 변형 돌베코 배지 및 최소 필수 배지(MEM), Ham F-10, Ham F-12, Medium 199, RPMI 1640 배지, 및 이들의 조합 및/또는 이들의 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 세포 배양물은 DMEM이다.
- [0068] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지는 실온 또는 상온(예를 들어, 25°C)에서 약 6.0 내지 약 8.5, 약 6.5 내지 약 8, 약 6.9 내지 약 7.5, 또는 약 7.2 내지 약 7.4의 범위의 pH를 갖는다.
- [0069] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 단일 형태로 패키징된다. 일 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 10ml, 50ml, 100ml, 500ml 또는 1 l의 용적으로 패키징된다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 1X, 5X, 10X 또는 20X 용액으로서 패키징된다.
- [0070] 본 세포 안정화 배지는 본 명세서에 기재된 성분을 혼합함으로써 고체 형태로 또는 물, 완충제, 용액, 배양 배지 등 중에 성분을 용해시킴으로써 수성 용액으로서 얻어질 수 있다.
- [0071] 본 명세서에 사용된 바대로, 백분율 "%(w/v)"는 퍼센트 중량 대 용적(그램의 w 및 밀리리터의 v)이고; 백분율 "%(v/v)"는 퍼센트 용적 대 용적이고; 백분율 "%(w/w)" 또는 "중량%"는 퍼센트 중량 대 중량이다.
- [0072] 숫자 값의 언급에서 용어 "약"은 기재된 숫자 값의 ±10%를 의미한다. 다른 말로, 숫자 값은 기재된 값의 90% 내지 기재된 값의 110%의 범위일 수 있다.

- [0073] **젤라틴**
- [0074] 본 세포 안정화 배지는 젤라틴 및/또는 젤라틴 유도체를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "젤라틴"은 젤라틴 또는 젤라틴 유도체를 의미할 수 있다. 임의의 젤라틴 또는 젤라틴 유도체는 본 세포 안정화 배지에서 사용될 수 있다.
- [0075] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지 중의 젤라틴은 약 15킬로달톤(kD) 내지 약 40kD, 약 25kD 내지 약 40kD, 약 25kD 내지 약 50kD, 약 25kD 내지 약 45kD, 약 40kD 내지 약 50kD, 약 10kD 내지 약 100kD, 약 40kD 내지 약 100kD, 약 50kD 내지 약 100kD, 약 100kD 내지 약 200kD, 약 100kD 내지 약 250kD, 약 80kD 내지 약 200kD, 약 150kD 내지 약 200kD, 약 100kD 내지 약 150kD, 또는 약 50kD 내지 약 200kD의 범위의 분자량(또는 중량 평균 분자 질량, 또는 평균 분자 질량)을 갖는다.
- [0076] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지 중의 젤라틴은 약 4.5 내지 약 9, 약 5 내지 약 9, 약 5 내지 약 7, 약 6 내지 약 7, 약 5 내지 약 6, 약 7 내지 약 9, 또는 약 4.7 내지 약 5.2의 범위의 등전점(pI)을 갖는다.
- [0077] 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 포유류 조직으로부터 유래된다. 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 동물 콜라겐으로부터 얻어진다. 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 동물, 예컨대 소, 닭, 돼지 및 어류의 가죽, 골, 연결 조직, 힘줄, 인대 등(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 원료로부터 유래된다. 일 실시형태에서, 젤라틴은 소 소스, 돼지 소스, 또는 이들의 조합 기원이다. 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 소 골 및 돼지 가죽, 소 가죽, 돼지고기, 소 생가죽, 및/또는 어피로부터 기원한다. 일 실시형태에서, 젤라틴은 가죽 유래 젤라틴 또는 소 유래 젤라틴이다.
- [0078] 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 콜라겐의 부분 가수분해에 의해 제조된 단백질 및 펩타이드의 혼합물이다. 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 콜라겐의 가수분해된 형태이다. 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 변성된 콜라겐의 형태이다. 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 변성된 콜라겐을 포함한다.
- [0079] 소정의 실시형태에서, 젤라틴은 A형 젤라틴 또는 B형 젤라틴일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바대로, A형 젤라틴은 산 처리된 원료로부터 얻어진 젤라틴이고; B형 젤라틴은 알칼리 처리된 원료로부터 얻어진 젤라틴이다.
- [0080] 소정의 실시형태에서, 젤라틴을 제조하기 위해, 콜라겐 가수분해는 화학 가수분해, 및/또는 열 가수분해에 의해 수행된다. 일 실시형태에서, 콜라겐은 젤라틴을 제조하기 위해 (예를 들어, 물 중에) 비등되거나 (광범위하게) 가열된다.
- [0081] 소정의 실시형태에서, 젤라틴을 제조하기 위해, 콜라겐 가수분해는 산-가수분해, 알칼리-가수분해, 및/또는 효소 가수분해에 의해 수행된다.
- [0082] 소정의 실시형태에서, 젤라틴의 제조 공정은 3개의 주요 단계를 함유한다: 전처리, 주요 추출 단계, 및 정련 및 회수 처리. 전처리는 주요 추출 단계에 원료가 준비되게 하고, 최종 젤라틴 생성물의 물리화학 특성에 부정적인 효과를 가질 수 있는 불순물을 제거한다. 주요 추출 단계는 젤라틴으로 콜라겐을 가수분해하기 위해 다단계 추출로서 뜨거운 물 또는 희석 산 용액에 의해 수행될 수 있다. 정련 및 회수 처리는 젤라틴 용액으로부터 물을 제거하기 위해, 추출하고자 하는 젤라틴을 블렌딩하기 위해, 그리고/또는 건조되고 블렌딩되고 분쇄된 최종 생성물을 얻기 위해 여과, 청징, 증발, 살균, 건조, 러팅(rutting), 분쇄 및/또는 체질을 포함한다.
- [0083] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지는 특수 제조 기법, 예컨대 한외여과에 의해 종래의 젤라틴으로부터 얻어진 분별화된 젤라틴을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 분별화된 젤라틴은 펩타이드/폴리펩타이드의 선택된 부분(들)의 제거에 의해, 또는 펩타이드/폴리펩타이드의 개별 분획의 혼합물에 의해 얻어진다.
- [0084] 젤라틴 유도체는 화학적으로 변형된 젤라틴, 예를 들어 석신일화 젤라틴, 티올화 젤라틴, 아세틸화 젤라틴, 프탈화 젤라틴, 석신일 젤라틴, 옥시폴리젤라틴 또는 우레아 가교결합된 젤라틴(이들로 제한되지는 않음)이다. 일 실시형태에서, 석신일화된 젤라틴은 석신산 또는 이의 염, 또는 석신산 무수물에 의해 가교결합된 젤라틴이다. 소정의 실시형태에서, 젤라틴 유도체는 젤라틴을 무수물, 예컨대 석신산, 시트라콘산, 이타콘산, 아코니트산 또는 말레산 무수물과 반응시킴으로써 얻어진다. 미국 특허 제8,865,397호 및 6,103,269호.
- [0085] **폴리펩타이드**
- [0086] 본 세포 안정화 배지는 임의의 적합한 폴리펩타이드를 함유할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 폴리펩타이드 성분 및 액체 성분을 포함한다.
- [0087] 폴리펩타이드는, 본 명세서에 사용된 바대로, 임의의 조직 유래 또는 합성으로 제조된 폴리펩타이드, 예컨대 콜

라겐 유래 성분(예컨대, 젤라틴)을 포함하도록 의도된다. 구체적인 실시형태에서, 폴리펩타이드는 약 50개의 아미노산 잔기 내지 약 30,000개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 약 100개의 아미노산 잔기 내지 약 20,000개의 아미노산 잔기, 더 바람직하게는 약 200개의 아미노산 잔기 내지 약 10,000개의 아미노산 잔기, 훨씬 더 바람직하게는 약 300개의 아미노산 잔기 내지 약 5,000개의 아미노산 잔기, 가장 바람직하게는 약 500개의 아미노산 잔기 내지 약 2,000개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(또는 이들로 이루어질 수 있다).

- [0088] 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 젤라틴, 알부민, 또는 이들의 조합물을 포함한다.
- [0089] 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 젤라틴 또는 젤라틴 유도체(예를 들어, 석신일화된 젤라틴)이다. 소정의 실시형태에서, 폴리펩타이드는 다른 젤라틴 유사 성분, 예컨대 케라틴, 테코린, 아그레칸, 엘라스틴, 라미닌, 니도겐, 피블린, 피브릴린, 콜라겐, 분별화된 젤라틴, 콜라겐 가수분해물, 식물 단백질, 식물 단백질 가수분해물, 엘라스틴 가수분해물, 당단백질(프로테오글라이킨 포함), 및 이들의 혼합물이다.
- [0090] 조직의 다른 유형으로부터 유래된 폴리펩타이드를 또한 사용할 수 있다. 예는 동맥, 성대, 흉막, 기관, 기관지, 폐포 증격, 인대, 이개연골 또는 배근막으로부터의 조직 추출물; 간의 망상 네트워크; 신장의 기저막; 또는 신경계의 신경초, 거미막, 경막 또는 연뇌막을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0091] 폴리펩타이드는 천연 성분, 및/또는 합성 성분을 포함할 수 있다. 천연 성분의 예는 천연 발생 단백질 및 폴리펩타이드를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0092] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는, 세포 안정화 배지의 전체 중량을 기준으로, 약 2중량% 내지 약 20중량%, 약 3중량% 내지 약 18중량%, 약 4중량% 내지 약 17중량%, 약 5중량% 내지 약 16중량%, 약 5중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량% 내지 약 7.5중량%, 약 10중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량% 내지 약 6중량%, 약 6중량% 내지 약 7.5중량%, 약 7.5중량% 내지 약 10중량%, 약 5중량% 내지 약 10중량%, 약 6중량% 내지 약 7.5중량%, 약 6중량% 내지 약 10중량%, 약 6중량% 내지 약 15.7중량%, 약 7.5중량% 내지 약 10중량%, 약 7.5중량% 내지 약 15.7중량%, 약 5중량%, 약 6중량%, 약 7.5중량%, 약 10중량%, 또는 약 15.7중량%의 (본 명세서에 기재된 바와 같은) 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함한다.

[0093] **알부민**

- [0094] 임의의 알부민 또는 알부민 유도체는 본 세포 안정화 배지에서 사용될 수 있다.
- [0095] 알부민의 비제한적인 예는 혈청 알부민(예를 들어, 인간 혈청 알부민 또는 HSA), 혈장 알부민(예를 들어, 인간 혈장 알부민), 소 혈청 알부민, 및/또는 합성 혈청 알부민), 난알부민, 식물 알부민, 또는 이들의 조합물을 포함한다. 알부민의 비제한적인 예는 또한 소 태아 혈청을 포함한다.
- [0096] 알부민은 (예를 들어, 천연 소스로부터 정제된) 천연 기원 또는 재조합 기원(재조합 알부민)일 수 있다. 일 실시형태에서, 알부민은 인간 기원의 생물학적 재료로부터의 정제에 의해 제조된다. 이것은 혈액으로부터 얻은 혈장의 분별화를 위한 종래의 기법(Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) 459 pp), 또는 문헌[J. Liataud et al. (13th International IABS Conference, Budapest; A: "Purification of proteins. Development of biological standard", Karger (ed.), Bale, 27 (1973) 107 pp)]에 기재된 기법에 따라 인간 태반으로부터의 추출에 의해 얻어질 수 있다. 일 실시형태에서, 재조합 알부민은 진핵생물 숙주에서 제조된다.
- [0097] 일 실시형태에서, 용어 "알부민"은 이 단백질의 다형으로부터 생긴 인간 알부민의 임의의 천연 변이체를 포함한다.

[0098] **하이드로겔**

- [0099] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지는 하이드로겔이다. 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지는 온도의 변화에 반응하여 유동 가능한 상태(액체 상태)로부터 겔 상태로 전이를 겪는 열가역적 하이드로겔이다. 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지는 상 전이 온도 이상에서 자유 유동 상 또는 액상에 있고, 상 전이 온도 미만에서 겔상(고상, 유동 불가 상)에 있다. 미국 특허 제6,231,881호 및 제6,730,315호.
- [0100] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지는 상 전이 온도 초과에서 유체 상(예를 들어, 젤라틴 용액)을 갖고, 상 전이 온도 이하에서 겔상(예를 들어, 젤라틴 하이드로겔)을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 유체 상과 겔상 사이의 전환은 연속 공정이다. 소정의 실시형태에서, 겔상에서, 세포 안정화 배지의 겔화의 정도는 작동 가능한 하이드로겔을 제공한다. 소정의 실시형태에서, 상 전이 온도는 또한 세포 안정화 배지의 점도가 세포 안정화 배지가 작동 가능한 하이드로겔이도록 보장하는 임계 온도일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 상 전이 온도는 융점

이다.

- [0101] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 약 20℃ 내지 약 45℃, 약 20℃ 내지 약 40℃, 약 21℃ 내지 약 39℃, 약 22℃ 내지 약 38℃, 약 23℃ 내지 약 37℃, 약 25℃ 내지 약 37℃, 약 28℃ 내지 약 37℃, 약 30℃ 내지 약 37℃, 약 32℃ 내지 약 37℃의 범위, 약 37℃, 또는 약 37℃ 초과 상 전이 온도를 갖는다.
- [0102] 소정의 실시형태에서, 액상 내의 세포 안정화 배지는 혼합물을 형성하도록 생물학적 재료(예를 들어, 세포, 조직, 기관, 바이러스 입자 등)와 배합/혼합된다.
- [0103] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 혼합물을 형성하도록 생물학적 재료(예를 들어, 세포, 조직, 기관, 바이러스 입자 등)와 혼합되기 전에 세포 안정화 배지를 액화시키도록(또는 액체 상태로 세포 안정화 배지를 유지시키도록) 약 20℃ 내지 약 45℃, 약 20℃ 내지 약 40℃, 약 21℃ 내지 약 39℃, 약 22℃ 내지 약 38℃, 약 23℃ 내지 약 37℃, 약 25℃ 내지 약 37℃, 약 28℃ 내지 약 37℃, 약 30℃ 내지 약 37℃, 약 32℃ 내지 약 37℃의 범위, 약 37℃, 또는 약 37℃ 초과 온도에 배치된다.
- [0104] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 약 5분 내지 약 1시간, 약 5분 내지 약 50분, 약 5분 내지 약 40분, 약 5분 내지 약 30분, 약 8분 내지 약 30분, 약 10분 내지 약 30분, 약 15분 내지 약 25분, 약 20분 내지 약 30분, 또는 약 10분 내지 약 20분의 범위의 겔화 시간을 갖는다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "겔화 시간"은 유체 상으로부터 겔상으로 전환시키도록 본 세포 안정화 배지에 필요한 시간을 의미한다.
- [0105] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지(세포 안정화 배지의 겔상)는 약 125 내지 약 225, 약 175 내지 약 225, 약 190 내지 약 225, 약 175 내지 약 325, 약 190 내지 약 325, 약 225 내지 약 325의 범위, 적어도 또는 약 175, 적어도 또는 약 190, 적어도 또는 약 225, 약 190, 또는 약 200의 볼륨 값을 갖는다.
- [0106] **다른 성분**
- [0107] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 사카라이드, 아미노산, 사이토카인, 지질, 성장 인자, 항생제(예를 들어, 페니실린, 스트렙토마이신 등), 항진균제, 스테로이드 호르몬, 단백질 호르몬, 혈청, 아미노산 유사체, 아미노산 유도체, 및 2가 양이온 킬레이터, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 또는 이의 염, 단백질, 염, 폼아마이드, 메톡실화 화합물, 및/또는 중합체(예를 들어, 폴리비닐 피롤리돈 및 폴리비닐 알코올), 또는 이들의 조합물을 더 포함한다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 글라이신, 글라이세롤, 수크로스, 글루코스, 또는 이들의 조합물을 더 포함한다.
- [0108] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 약 300mg/l 내지 약 8,000mg/l, 약 500mg/l 내지 약 7,000mg/l, 약 1000mg/l 내지 약 6000mg/l, 약 1000mg/l 내지 약 4500mg/l, 약 500mg/l 내지 약 2300mg/l, 약 1,000mg/l, 약 4,500mg/l, 약 500mg/l, 또는 약 2,300mg/l의 글루코스를 포함한다.
- [0109] **사카라이드**
- [0110] 사카라이드는 올리고사카라이드, 예컨대 단당류 및 이당류, 다당류 등을 포함한다. 사카라이드는 당을 포함한다.
- [0111] 사카라이드의 비제한적인 예는 수크로스, 소르비톨, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 트레할로스, 만노스, 라피노스, 스타키오스, 텍스트란, 자일로스, 아라비노스, 만니톨, 자일리톨, 미요-이노시톨, 락토스, 말토스, 셀로비오스, 락티톨, 말티톨, 메틸 셀룰로스, 카복시메틸 셀룰로스, 글라이코겐, 아밀로스, 아밀로펙틴, 이눌린, 나트륨 알기네이트, 에틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 잔탄검, 글루코사민, 갈락토사민, 및 이들의 조합물을 포함한다. 미국 특허 제6,673,607호 및 제7,094,601호.
- [0112] **아미노산**
- [0113] 본 세포 안정화 배지는 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다.
- [0114] 아미노산은 광학 이성질체, 즉 D-이성질체 및 L-이성질체 둘 다를 포함한다. 아미노산은 알파-아미노산, 및 베타-아미노산, 감마-아미노산, 델타-아미노산, 및 비천연 아미노산을 포함한다. 아미노산의 비제한적인 예는 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌, 글라이신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아스파라긴, 타이로신, 라이신, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 및 이들의 조합물을 포함한다[Cryobiology, 41(4):257-279 (2000)].
- [0115] 아미노산 유도체는 본 조성물 및 방법에서 또한 사용될 수 있다. 아미노산 유도체의 비제한적인 예는 아미노산

염 및 아미노산 용매화물을 포함한다. 아미노산염의 비제한적인 예는 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염, 예컨대 나트륨염, 칼륨염 및 칼슘염; 할로겐산염, 예컨대 하이드로플루오르산염, 하이드로클로르산염, 하이드로브롬산염 및 하이드로요오드산염; 무기산염, 예컨대 질산염, 과염소산염, 황산염 및 인산염; 및 유기산염, 예컨대 푸마르산염, 석신산염, 시트르산염, 옥살산염, 말레산염, 아세트산염, 락톤염 및 아스코르브산염을 포함한다. 아미노산 용매화물의 비제한적인 예는 수화물, 알코올레이트(예를 들어, 메탄올레이트, 에탄올레이트) 및 에터레이트(예를 들어, 다이에틸 에터레이트)를 포함한다.

[0116] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지 내의 아미노산 농도는 0.01 내지 10.0중량%, 또는 0.1 내지 1.0중량%이다.

[0117] **비타민**

[0118] 또 다른 실시형태에서, 세포 안정화 배지는 하나 이상의 비타민을 더 포함한다. 비타민의 비제한적인 예는 D-칼슘 판토테네이트, 폴린 클로라이드, 엽산, 니아신아마이드, 피리독신 HCl, 티아민 HCl 및 리보플라빈을 포함한다.

[0119] **염**

[0120] 소정의 실시형태에서, 본 세포 안정화 배지는 하나 이상의 염, 예를 들어 무기 염, 및/또는 유기 염을 더 포함한다. 무기 염의 비제한적인 예는 염화칼륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨 및 일염기성 인산나트륨, 일염기성 인산칼륨, 이염기성 인산칼륨, 중탄산나트륨, 염화칼슘, 염화마그네슘, 중탄산칼륨, 칼륨 모노포스페이트, 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0121] 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지 또는 조성물은 혈청을 포함하지 않는다. 소정의 실시형태에서, 세포 안정화 배지 또는 조성물은 직접적인 인간 또는 동물 기원의 임의의 원료, 또는 인간 또는 동물 기원의 재료를 사용하여 제조된 재료를 포함하지 않는다.

[0122] 세포 안정화 배지 또는 조성물은 다른 선택적인 성분, 예를 들어 펩타이드, 다른 단백질, 당 알코올, 아미노 사카라이드, 당단백질, 및 알코올, pH 조절제, 보습제, 보존제, 점도 조절제, 또는 이들의 조합(이들로 제한되지는 않음)을 포함할 수 있다. 미국 특허 제9,055,739호.

[0123] **해동**

[0124] 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료(세포, 조직, 기관)는 본 세포 안정화 배지와 혼합되기 전에 또는 혼합된 후 저온보존(저온보존된 상태)으로부터 해동된다(또는 해동되었다).

[0125] 생물학적 재료를 보존하기 위한 적절한 저장 조건은 생물학적 재료 생존가능을 유지시키는 임의의 이러한 조건을 포함할 수 있다. 이러한 조건은 약 0°C 이하, 약 -20°C 이하, 약 -50°C 이하, 약 -60°C 이하, 약 -70°C 이하, 약 -80°C 이하, 약 -90°C 이하, 약 -100°C 이하, 약 -110°C 이하, 약 -120°C 이하, 약 -135°C 이하, 약 -196°C 이하의, 또는 액체 질소 중의 저온보존 온도를 포함할 수 있다. 저체온 보존을 위해, 온도는 8°C 내지 0°C일 수 있다. 동결건조된 샘플의 경우에, 온도는, 재료가 습도로부터 멀리 있는 한, 0°C 초과(예를 들어, 실온, 상온 등) 또는 0°C 미만의 임의의 온도일 수 있다.

[0126] 생물학적 재료는 생물학적 재료가 필요할 때까지 일, 주, 개월 또는 년의 기간 동안 보존된 상태(예를 들어, 저온보존된 상태)에 있을 수 있다. 필요할 때, 저온보존된 생물학적 재료는 회수되고 해동된다.

[0127] 소정의 실시형태에서, 저온보존 조성물 내의 생물학적 재료는 약 42°C 이하, 약 10°C 내지 약 40°C, 약 20°C 내지 약 37°C, 실온, 또는 약 37°C의 온도에서 (예를 들어, 물 욕 내에 저온관 또는 저온바이알을 배치함으로써) 물 욕 내에 해동된다.

[0128] 일 실시형태에서, 저온보존 조성물 내의 생물학적 재료는 약 37°C에서 물 욕 내에 해동된다. 선택적으로, 이것은 더 낮은 온도, 예컨대 4°C로 또는 얼음에서 이후 이동될 것이다.

[0129] 소정의 실시형태에서, 증가 가열 속도(또는 온도 상승 가열 속도)를 갖는 "증가(step up)" 해동 공정을 사용한다. 예를 들어, 저온바이알은 대략 신체 온도인 온도로 이동되기 전에 증가 온도를 갖는 순차적인 저장 환경, 예를 들어 대략 37°C의 온도, 또는 임의의 다른 적합한 온도를 갖는 물 욕에 배치될 수 있다.

[0130] 소정의 실시형태에서, 저온보존 조성물 내의 저온보존된 생물학적 재료는 약 5°C/분 내지 약 80°C/분, 약 10°C/분 내지 약 70°C/분, 약 10°C/분 내지 약 60°C/분, 약 10°C/분 내지 약 50°C/분, 약 10°C/분 내지 약 40°C/분,

약 10℃/분 내지 약 30℃/분, 약 10℃/분 내지 약 20℃/분, 약 20℃/분 내지 약 40℃/분의 범위, 약 20℃/분 초과, 약 25℃/분 초과, 약 30℃/분 초과, 약 35℃/분 초과, 약 40℃/분 초과, 또는 약 30℃/분 초과의 가온 속도로 해동된다.

[0131] 소정의 실시형태에서, 해동 후, 본 세포 안정화 배지에 의해 처리되기 전에 또는 처리된 후, 생물학적 재료를 세척하고, 적절한 배지 중에 현탁시키고, 조사 또는 임상 분야에서 사용하기에 필요한 배대로 처리한다.

[0132] 소정의 실시형태에서, 해동 후 그리고 본 세포 안정화 배지에 의해 처리한 후, 세포를 재배양을 위해 배양 접시로 옮긴다. 세포는 조사 또는 임상 분야 전에 약 30분, 약 1시간, 약 6시간, 약 12시간, 약 24시간, 약 48시간, 약 72시간, 약 86시간, 약 110시간, 약 1주, 약 2주, 또는 3주 초과 기간 동안 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. 미국 특허 공보 제20170196221호.

[0133] 소정의 실시형태에서, 부착성 세포 또는 반부착성 세포의 소생은 해동 시 즉시 그리고 본 세포 안정화 배지에 의한 처리 후에 재배양된다.

[0134] 소정의 실시형태에서, 해동 후 그리고 본 세포 안정화 배지에 의한 처리 후, 생물학적 재료는 배양 단계를 개재함이 없이 생체내 사용된다.

[0135] 소정의 실시형태에서, 해동 후 그리고 본 세포 안정화 배지에 의한 처리 후, 세포는 의도된 용도에 적합한 유체 또는 다른 배지 중에 재현탁될 수 있다. 예를 들어, 세포는 임의의 삼투압 지지 용액 중에 재현탁될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 생리학적 상용성 완충제, 예컨대 완충 용액 중에 재현탁될 수 있다. 바람직하게는, 생체내 편리한 전달을 위한 조성물을 제공하는 임의의 생리학적 상용성 재료는 세포를 재현탁시키도록 사용될 수 있다.

[0136] **세포의 생존능력**

[0137] 본 조성물 및 방법은 세포 생존능력을 유지시킨다.

[0138] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "생존능력"은 생존가능 생물학적 재료의 백분율(예컨대, 예를 들어 DNA 및 /또는 온전한 세포막 시스템의 존재에 기초한 세포, 또는 생존가능 바이러스)을 의미한다. 소정의 실시형태에서, 생존가능 생물학적 재료는 보존 상태로부터의 이의 방출 후 대사상 활성이거나 대사상 활성이 되는 몇몇 생존가능 세포 또는 세포의 분획을 포함하는 생물학적 재료를 의미한다.

[0139] 소정의 실시형태에서, 생물학적 재료(예를 들어, 세포 또는 바이러스)의 생존능력은 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%이다.

[0140] 소정의 실시형태에서, 본 조성물 및 방법은 세포가 괴사 및 아포토시스의 제한된 양 또는 최소를 나타내는 것을 보장한다. 소정의 실시형태에서, 괴사 및/또는 아포토시스는 세포의 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만 또는 약 1% 미만에서 관찰된다.

[0141] 생존능력은 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 생존능력은 트리판 블루 내재화 시험을 이용하여 또는 프로피듐 요오다이드 흡수를 측정함으로써 측정된다. 소정의 실시형태에서, 생존능력은 세포가 효율적으로 부착하는 능력을 평가함으로써(예를 들어, 부착 검정) 측정된다. 소정의 실시형태에서, 증식 검정은 부착된 세포가 저온보존 후 예상된 배대로 증식할 수 있는지를 결정하도록 이용될 수 있다. 부착 및 증식 효율은 저온보존을 겪지 않은 대조군 세포와 비교될 수 있다.

[0142] 세포의 생존능력 및 기능을 결정하기 위해 당해 분야에 다양한 시험이 공지되어 있다. 소정의 실시형태에서, 이 시험은 세포 유형 및 세포의 원하는 사용에 따라 달라진다.

[0143] 줄기세포 또는 선구체 세포를 위해, 본 명세서에 기재된 방법은 세포가 이의 다능성을 유지시키는 것을 추가로 보장할 수 있다. 이것은 계통 특이적 마커의 발현의 결정에 의해 확립될 수 있다. 예를 들어, 간엽성 줄기세포의 기능성 규명은 지방생성, 골원성 및 연골성 분화 가능성을 나타내는 mRNA의 계통 특이적 발현을 검출하기 위해 상업적으로 이용 가능한 분화 키트 및 RT-PCR을 이용하여 시험관내 지방생성, 골원성 및 연골성 분화의 유도를 포함할 수 있다. 유사하게, 비분화된 줄기세포의 품질은 mRNA의 단리 및 세포 특이적 마커에 대한 시험에 의해 시험될 수 있다. 특정한 실시형태에서, 기재된 계통의 세포로 분화하는 능력은 유지되고, 즉 비처리된 세포와 유의미하게 다르지 않다. 배아 줄기(ES) 세포의 다능성은 예를 들어 Oct4-GFP 발현, 알칼리 포스파타제 발현의 상승 및 SSEA-1 표면 당단백질 발현을 포함하는 분야 공지된 방법을 이용하여 시험될 수 있다. 몇몇 시험관

내 방법은 실험 치료 후 줄기세포 회복을 평가하도록 적용될 수 있다. 이 평가는 막 통합성, 대사 및 다른 기능 검정 및/또는 배양에서의 콜로니 성장, 및 형광성 검정, 예컨대 SYTO/EB를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 소정의 실시형태에서, 분화 시험, 면역표현형 규명, 및/또는 형태의 검사는 줄기세포 및/또는 선구체 세포를 평가하도록 사용될 수 있다.

[0144] 접합자에 대해, 난할 속도는 어떠한 세포 손상이 있는지를 결정하기 위해 결정되고 대조군과 비교될 수 있다. 난모세포의 생존능력은 저온보존 이후의 세포의 형태학적 특징의 검사에 의해 결정될 수 있다. 형태학적으로 생존가능 난모세포는 온전한 투명대 및 혈장 막 및 굴절성 세포질을 나타내는 한편, 비생존가능 난모세포는 광 현미경 하에 가시화될 때 퇴행하는 것으로 보인다. 난모세포 생존능력 및 기능에 대한 궁극적인 기준은 시험관내 및 생체내 건강한 정자가 수정하는 이의 역량, 이어서 난할, 배반포, 및/또는 태아의 부화 또는 발생이다. 미국 특허 제9,538,745호.

[0145] 소정의 실시형태에서, 본 보존 조성물 및 방법, 및 생물학적 재료는 조사 및/또는 임상 분야(예를 들어, 세포 기반 치료, 이식, 재생 의학, 진단학 및 유전자 시험, 감시, 독성 시험 및 시험관내 수정을 위한, 세포/조직 banking)에 사용될 수 있다.

[0146] **생물학적 재료**

[0147] 용어 "생물학적 재료"는 세포, 세포 응집체, 조직, 기관, 생물학적 유체, 바이러스 입자, 및 임의의 다른 막성 집합체, 예컨대 리포솜(천연 또는 합성)을 의미한다.

[0148] 세포 또는 조직의 임의의 유형은 본 조성물(예를 들어, 세포 안정화 배지) 및 방법에 의해 치료될 수 있다.

[0149] 소정의 실시형태에서, 세포는 포유류 세포, 예를 들어 인간 세포, 쥐와 세포, 돼지과 세포, 개과 세포, 말과 세포 및 소과 세포(이들로 제한되지는 않음)이다. 세포는 멸종에 처하거나 멸종 위기인 종인 포유류 유래일 수 있다. 세포는 인간 또는 비인간 포유류, 예를 들어 세르코피테코이데아(Cercopithecoidea) 과, 호미노이데아(Hominoidea) 상과, 카니스 파밀리아리스(Canis familiaris), 펠리스 카투스(Felis catus), 크리세티다에 종(Cricetidae spp.), 에쿠스 종(Equus spp.)(예를 들어, 에쿠스 카발루스(Equus caballus), 에쿠스 아시누스(Equus assinus)), 에퀴다에(Equidae) 과, 보스 타우루스(Bos taurus), 보스 인디쿠스(Bos indicus), 보비다에(Bovidae) 과, 카멜리다에(Camelidae) 과, 부발루스 부발리스(Bubalus bubalis), 카프라 아에가그루스 히르쿠스(Capra aegagrus hircus), 세르비다에(Cervidae) 과, 세르비나에(Cervinae) 과, 오비스 아리에스(Ovis aries), 오비스 카나덴시스(Ovis canadensis), 카프라 히르쿠스(Capra hircus), 수스 스크로파 도메스티카(Sus scrofa domestica), 메소크리세투스 종(Mesocricetus spp.), 무스텔라 비손(Mustela vison), 카비아 포르셀루스(Cavia porcellus), 메리오네스 웅귀쿨라투스(Meriones unguiculatus), 친칠라 라니게르(Chinchilla laniger), 래터스 노르베지커스(Rattus norvegicus), 래터스 종(Rattus spp.), 무스 무스쿨루스(Mus musculus), 레오포리다에(Leporidae) 과, 오리톨라구스 쿠니쿨루스(Oryctolagus cuniculus), 코부스 종(Kobus spp.), 갈루스 종(Gallus spp.), 멜레아그리아 갈로파보(Meleagria gallopavo), 아나티다에 종(Anatidae spp.), 무스텔라 푸토리우스(Mustela putorius), 콜롬바 도메스티카(Columba domestica), 콜롬바 리비아(Columba livia), 누미다 멜레아그리스(Numida meleagris), 오르니토르힌쿠스 아나티누스(Ornithorhynchus anatinus), 파보 크리스타투스(Pavo cristatus), 비손 종(Bison spp.), 스트루티오 종(Struthio spp.), 라마 글라마(Lama glama), 레아 종(Rhea spp.), 드로미세이우스 종(Dromiceius spp.), 라마 파코스(Lama pacos), 란기페르 타란두스(Rangifer tarandus), 보스 그루니엔스(Bos grunniens), 카멜루스 박트리아누스(Camelus bactrianus), 카멜루스 드로메다리우스(Camelus dromedarius), 및 임의의 멸종에 처하거나 멸종 위기인 종 유래일 수 있다.

[0150] 본 조성물 및 방법은 미생물, 박테리아, 비포유류 동물 세포(예를 들어, 곤충 세포, 조류 세포, 어류 세포 등), 또는 식물 세포를 치료하도록 사용될 수 있다.

[0151] 세포의 비제한적인 예는 줄기세포, 선구체 세포, 배아, 정자, 난모세포, 생식모세포 및 접합자를 포함한다.

[0152] 세포는 종양 세포 또는 비종양 세포일 수 있다. 일 실시형태에서, 세포는 섬유아세포이다.

[0153] 생물학적 재료는, 제한 없이, 하기 중 어느 하나를 포함할 수 있다: 섬유아세포, 줄기세포, 선구체 세포, 전혈 또는 이의 분획, 적혈구, 백혈구, 제대혈 또는 이의 분획, 제대혈 세포, 골수, 난모세포, 정자, 난자, 배아, 연골, 난소, 심장, 피부, 신장, 간, 폐. 또한, 이러한 생물학적 재료는 세포 유기체를 포함할 수 있고, 이는 진핵 생물 또는 원핵생물, 예를 들어 박테리아 및 효모 등일 수 있다. 추가적으로, 생물학적 재료는 또한 저온보존 생존할 수 있는 완전 다세포 유기체, 예컨대 선충을 포함할 수 있다. 혈액의 분획은 혈액 세포(백혈구 및/또는

적혈구)를 포함하는 혈액, 혈장 및/또는 용질 및/또는 세포 이하 성분(예를 들어, 세포의 분획, 예컨대 혈소판, 분해된 세포의 성분 등), 단백질, 지질, 항체 등의 임의의 분획을 포함할 수 있다.

- [0154] 본 조성물 및 방법은 췌장 소도 세포, 연골세포, 신경 기원의 세포, 간 기원의 세포, 안과학적 기원의 세포, 정형외과 기원의 세포, 연결 조직으로부터의 세포 및 생식 기원의 세포, 및 심장 및 심혈관 기원의 세포(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 조직 및 기관으로부터 유래된 세포 재료(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 세포의 임의의 유형을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0155] 줄기세포는 성체 줄기세포, 배아 줄기세포, 유도 다능성 줄기세포(iPSC), 말초 혈액 줄기세포, 제대혈 줄기세포, 간엽성 줄기세포, 조직 및 기관 또는 다른 소스, 예를 들어 태아 및/또는 배아 소스, 및 줄기세포와 다른 세포의 혼합물 및 상이한 소스로부터 유래된 줄기세포를 포함한다. 성체 줄기세포는 골수 줄기세포, 조혈 줄기세포, 피부 줄기세포, 눈 줄기세포, 신경 줄기세포, 심장 줄기세포 등을 포함한다.
- [0156] 소정의 실시형태에서, 내배엽 기원의 줄기세포는 폐 상피 줄기세포, 위장관 줄기세포, 췌장 줄기세포 또는 간 타원형 세포 및/또는 이의 선구체 세포이다. 특정한 실시형태에서, 비뇨생식기 기원의 세포는 유방 및 전립샘 줄기세포 또는 난소 및 고환 줄기세포 및/또는 이의 선구체 세포로서 분류된다. 특정한 실시형태에서, 중배엽 기원의 세포는 골수 세포, 조혈 줄기세포, 기질 줄기세포 또는 심장 줄기세포 및/또는 이의 선구체 세포이다. 특정한 실시형태에서, 외배엽 기원의 세포는 신경 줄기세포, 피부 줄기세포 또는 눈 줄기세포 및/또는 이의 선구체 세포이다.
- [0157] 본 개시내용의 조성물(예를 들어, 세포 안정화 배지) 및 방법을 사용하여 치료될 수 있는 세포 유형은 예를 들어 분화 세포, 예컨대 섬유아세포, 상피 세포, 심장근육세포, 간세포, 신경 세포, 표피 세포, 케라틴세포, 조혈 세포, 멜라닌세포, 연골세포, B 세포, T 세포, 적혈구, 대식세포, 단핵구 또는 근육 세포; 및 미분화 세포, 예컨대 배아, 간엽성 또는 성체 줄기세포를 포함한다. 세포는 반수체, 이배체 또는 사배체일 수 있다. 다른 세포는 방광, 뇌, 식도, 나팔관, 심장, 장, 쓸개, 신장, 간, 폐, 난소, 췌장, 전립선, 척수, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 기관, 요관, 요도 또는 자궁으로부터의 세포를 포함한다.
- [0158] 추가의 특정한 실시형태에서, 세포는 성인 뇌, 골수, 혈관, 골격근, 피부, 치아, 심장, 장, 간 또는 다른 성인 조직으로부터 얻어진다. 특정한 실시형태에서, 세포는 내배엽, 비뇨생식기, 중배엽 또는 외배엽 기원으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0159] 조직은 각막, 연골, 골, 피부, 심장 판막, 랑게르한스섬, 인간, 동물, 어류, 조개류 및 식물로부터의 배아, 및 인간 및 동물로부터의 난소 조직을 포함한다. 본 조성물 및 방법은 또한 조작된 조직 및 조직 작제물을 치료할 수 있다.
- [0160] 소정의 실시형태에서, 본 조성물 및 방법은 보조 생식 기술에서, 또는 화학치료 또는 방사선 치료를 겪은 환자에 대해 난모세포 또는 정자를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 상기 방법은 또한 줄기세포의 치료에 사용될 수 있고, 이는 이후 줄기세포 기반 치료, 세포 이식, 조직 조작 및 재생 의학의 기본으로서 사용될 수 있다. 상기 방법은 종의 보존을 위해 보조 생식 기술에서 미래의 사용을 위해 멸종될 위험에 있거나 희귀한 동물로부터의 난모세포 또는 정자를 치료하기 위해 또한 사용될 수 있다. 상기 방법은 예를 들어 동물, 예컨대 소, 돼지 및 양으로부터의 배아 줄기세포, 생식모세포, 난모세포 또는 정자를 치료하기 위한 동물 농사 목적(예를 들어, 동물의 교배 및 사육)을 위해 추가로 사용될 수 있다.
- [0161] 생물학적 재료는 다양한 질환의 치료에 유용할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 눈 세포는 연령 관련 황반 변성(습성 또는 건성), 당뇨병성 황반 부종, 특발성 맥락막 혈관신생 또는 고도근시 황반 변성(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 눈 질환을 치료하기 위해 사용된다. 몇몇 눈 실시형태에서, RPE 세포를 사용한다. 몇몇 실시형태에서, 심장 줄기세포는 심혈관 장애, 예컨대 심근경색, 허혈성 심장 조직 손상, 울혈성 심부전, 동맥류, 죽상동맥경화증 유도된 사건, 뇌혈관 사건(뇌졸중) 및 관상동맥 동맥 질환을 치료하기 위해 사용된다. 몇몇 실시형태에서, 간 줄기세포는 간 질환, 예컨대 간염, 간경변, 암 등을 치료하기 위해 사용된다. 무엇보다도 다른 조직, 예컨대 신장, 폐, 췌장, 장, 골 및/또는 연골, 및 신경 조직에서의 질환은 본 명세서에 개시된 방법 및 장치에 의해 치료될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 수확된 골수 줄기세포는 백혈병, 암, 또는 혈액 세포 수를 감소시키는 치료로 인해 감소된 조혈 세포를 증식시키도록 사용될 수 있다.
- [0162] 본 조성물 및 방법은 또한 치료의 다양한 방법에서 유용하다. 세포성 치료, 또는 세포 치료는 일반적으로 손상된 조직 및/또는 세포를 대체하거나 보수하기 위한 인간 또는 동물 세포의 이식을 포함할 수 있다. 세포 치료는 관절에서의 손상된 연골을 재구축하고, 척수 손상을 보수하고, 약해진 면역계를 강화시키고, 자가면역 질환을

치료하고, 신경학적 장애, 예컨대 알츠하이머병, 파킨슨병 및 뇌전증을 갖는 환자를 돕도록 사용된다. 추가의 용도는 넓은 범위의 만성 병태, 예컨대 동맥경화증, 선천성 결손 및 성 기능장애의 치료를 포함한다.

[0163] 세포 치료는 통상적으로 이종성, 동종이계(또 다른 인간 도너로부터의), 또는 자가(여기서, 세포는 동일한 환자로부터 추출되고 이 환자로 다시 이식됨)인 전체 세포 또는 세포 추출물의 주사를 수반한다.

[0164] 바이러스 또는 바이러스 입자는 임의의 바이러스일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 바이러스 또는 바이러스 입자는 아데노바이러스, 아데노 연관된 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스 등을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 바이러스 또는 바이러스 입자는 유전자 치료에서 사용될 수 있는 것이다.

[0165] **키트**

[0166] 본 개시내용은 또한 (본 명세서에 기재된 바와 같은 고체 또는 액체 형태의) 본 세포 안정화 배지 또는 본 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 이러한 키트는 세포 안정화 배지 또는 본 조성물을 포함하는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 키트는 (생물학적 재료를 포함하거나 포함하지 않을 수 있는) 세포 안정화 배지 또는 본 조성물을 포함한다. 일 실시형태에서, 키트는 본 세포 안정화 배지에 의해 치료하기 위한 생물학적 재료를 포함한다.

[0167] 몇몇 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 키트는 세포 안정화 배지 및 방법을 이용하여 생물학적 재료를 치료하기 위한 설명서를 포함한다. 키트는 대상체가 치료를 요하는지를 확인하는 것에 기초하여 치료에 적합한 대상체를 선택하는 것의 설명을 더 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 설명서는 치료를 요하는 대상체에게 본 세포 안정화 배지에 의해 처리된 생물학적 재료를 투여하는 것의 설명을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 키트에 제공된 설명서는 라벨 또는 패키지 인서트 상의 서면 설명서이다. 라벨 또는 패키지 인서트는 생물학적 재료의 임상 및/또는 조사 분야를 또한 나타낼 수 있다.

[0168] 키트의 부품은 동시에 또는 연대순으로 시차를 두어, 즉 키트의 임의의 성분에 대해 상이한 시점에 및 동일한 또는 상이한 시간 간격에 의해 사용될 수 있다. 시간 간격은 원하는 효과를 얻도록 선택될 수 있다.

[0169] 본 명세서에 제공된 키트는 적합한 패키징에 있다. 적합한 패키징은 바이알(예를 들어, 저온바이알), 병, 앰플, 관(예를 들어, 저온관), 백, 플라스크, 단지, 가요성 패키징 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 특정한 장치, 예컨대 동결 용기, 저온바이알 및/또는 저온관과 조합하여 사용하기 위한 패키지가 또한 고려된다.

[0170] 키트는 선택적으로 추가적인 성분, 예컨대 완충제 및 해석 정보를 제공할 수 있다. 보통, 키트는 용기 및 용기에서의 또는 이와 연관된 라벨 또는 패키지 인서트(들)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 키트의 내용물을 포함하는 제조 물품을 제공한다.

[0171] 하기는 본 발명의 예이고, 제한으로서 해석되지 않는다.

[0172] **실시예 1**

[0173] 실험 1호

[0174] 젤라틴을 Gelita(젤라틴은 소 생가죽으로부터 제조됨; 배취 L600217호)로부터 얻었다. DMEM 중에 젤라틴을 용해 시킴으로써 15.7중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다.

[0175] 글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 중의 태아 피부 섬유아세포 세포인 FE002-SK2 세포를 저온보존으로부터 해동하였다. 이후, 이 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하였다.

[0176] 대조군 샘플로서, 글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 중의 세포를 저온보존으로부터 해동하고, 이후 세포 현탁액을 DMEM과 혼합하여 혼합물을 형성하였다.

[0177] 세포 안정화 배지(또는 대조군 샘플에 대한 DMEM) 대 세포 현탁액의 용적비는 12.5이다. 1000 $\mu$ l의 PIPETMAN(등록상표) 및 선단을 이용하여 (세포 현탁액 중의) 세포 및 세포 안정화 배지(또는 대조군 샘플에 대한 DMEM)를 흡인에 의해 혼합하였다.

[0178] 혼합물을 30 $^{\circ}$ C 또는 37 $^{\circ}$ C에서 0시간(시간 0, 항온처리 무), 2시간 또는 4시간 동안 해동하였다. 각각의 컨디션에 대한 샘플을 중복 반복하였다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용하여 평가하였다. 세포의 생존능력은 [(살아 있는 세포 수)/(전체 세포 수)] x 100%의 식에 의해 계산되었다.

[0179] 표 1에 기재된 바대로, 30℃ 또는 37℃에서 2시간 또는 4시간 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지 내의 세포는 이의 생존능력을 유지시켰다. 다른 말로, 30℃ 또는 37℃에서 2시간 또는 4시간 동안 항온처리된 후, 세포의 생존능력은 시간 0에서 이의 생존능력과 유사하였다. 대조적으로, DMEM과 혼합된 세포의 생존능력은 30℃ 또는 37℃에서 2시간 또는 4시간 동안 항온처리된 후 약 48%(2시간) 또는 56%(4시간) 감소하였다. 이 실험은 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지의 보호성 효과를 확인시켜준다.

표 1

항온처리 시간	항온처리 온도(℃)	젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지와 혼합된 세포 현탁액		DMEM과 혼합된 세포 현탁액	
		세포 생존능력	평균 생존능력	세포 생존능력	평균 생존능력
0	37	80%	79%	75%	77%
		78%		79%	
2시간	30	81%	78%	29%	34%
		75%		39%	
	37	84%	82%	40%	33%
		79%		25%	
4시간	30	78%	75%	39%	40%
		73%		49%	
	37	75%	76%	25%	40%
		76%		45%	

[0180]

[0181] 실험 2호

[0182] 젤라틴을 GELITA(로트 L600217)로부터 얻었다. 물 중에 젤라틴을 용해시킴으로써 15.7중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다.

[0183] 글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하였다. 이후, 이 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하였다. 세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비는 12.5이다. 1000 μl의 PIPETMAN(등록상표) 및 선단을 이용하여 (세포 현탁액 중의) 세포 및 세포 안정화 배지를 흡인에 의해 혼합하였다.

[0184] 혼합물을 37℃에서 0시간(시간 0, 항온처리 무), 1시간, 2시간, 4시간, 8시간 또는 24시간 동안 해동하였다. 각각의 컨디션에 대한 샘플을 중복 반복하였다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용하여 평가하였다. 세포의 생존능력을 본 명세서에 기재된 바대로 계산하였다.

[0185] 표 2에 기재된 바대로, 37℃에서 4시간 이하(1시간, 2시간 또는 4시간) 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지 내의 세포는 이의 생존능력을 유지시켰다. 다른 말로, 37℃에서 4시간 이하 동안 항온처리된 후, 세포의 생존능력은 시간 0에서 이의 생존능력과 유사하였다. 37℃에서 항온처리의 8시간 후, 세포 생존능력은 여전히 70% 초과로 유지될 수 있다. 이 실험은 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지의 보호성 효과를 확인시켜준다.

표 2

37℃ 항온처리	세포 생존능력	평균 생존능력
0 시간	78%	78%
	78%	
1 시간	80%	80%
	80%	
2 시간	77%	78%
	79%	
4 시간	78%	79.50%
	81%	
8 시간	70%	73%
	76%	
24 시간	41%	38.50%
	36%	

[0186]

[0187] 실험 3호

[0188] 젤라틴을 GELITA(로트 L600217)로부터 얻었다. 물 중에 젤라틴을 용해시킴으로써 15.7중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다.

[0189] DMSO를 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하였다. 이후, 이 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하였다. 대조군 샘플로서, DMSO를 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하고, 이후 세포 현탁액을 DMEM 또는 10% FBS/DMEM과 혼합하여 혼합물을 형성하였다.

[0190] 세포 안정화 배지(또는 대조군 샘플에 대한 DMEM) 대 세포 현탁액의 용적비는 10이다. 1000 $\mu$ l의 PIPETMAN(등록 상표) 및 선단을 이용하여 (세포 현탁액 중의) 세포 및 세포 안정화 배지(또는 대조군 샘플에 대해 DMEM 또는 10% FBS/DMEM)를 흡인에 의해 혼합하였다.

[0191] 혼합물을 25 $^{\circ}$ C에서 0시간(시간 0, 항온처리 무), 2시간, 4시간 또는 8시간 동안 해동하였다. 각각의 조건에 대한 샘플을 중복 반복하였다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용하여 평가하였다. 세포의 생존능력을 계산하였다.

[0192] 표 3에 기재된 바대로, 25 $^{\circ}$ C에서 2시간 또는 4시간 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지 내의 세포는 이의 생존능력을 유지시켰다. 다른 말로, 25 $^{\circ}$ C에서 2시간 또는 4시간 항온처리된 후, 세포의 생존능력은 시간 0에서 이의 생존능력과 유사하였다. 25 $^{\circ}$ C에서 항온처리의 8시간 후, 세포 생존능력은 여전히 80% 초과로 유지될 수 있다. 대조적으로, DMEM과 혼합된 세포의 생존능력은 25 $^{\circ}$ C에서 8시간 이하 동안 항온처리된 후 약 13%(2시간), 21%(4시간) 또는 32%(8시간) 감소하였다. 유사하게, 10% FBS/DMEM과 혼합된 세포의 생존능력은 25 $^{\circ}$ C에서 8시간 이하 동안 항온처리된 후 약 19%(2시간) 또는 34%(4시간 또는 8시간) 감소하였다. 이 실험은 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지의 보호성 효과를 확인시켜준다.

표 3

항온처리 시간	젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지와 혼합된 세포 현탁액		DMEM 과 혼합된 세포 현탁액		10% FBS/DMEM 과 혼합된 세포 현탁액	
	세포 생존능력	평균 생존능력	세포 생존능력	평균 생존능력	세포 생존능력	평균 생존능력
0	93%	90%	81%	83.50%	84%	84.50%
	87%		86%		85%	
2 시간	87%	87.50%	72%	73%	68%	68.50%
	88%		74%		69%	
4 시간	86%	84.50%	62%	66%	58%	56%
	83%		70%		54%	
8 시간	82%	82.50%	55%	56.50%	55%	55.50%
	83%		58%		56%	

[0193]

[0194] 실험 4호

[0195] 젤라틴을 Nippi(젤라틴을 소, 돼지 및/또는 어류 등으로부터 제조함. 소스; 로트 S150806호)로부터 얻었다. 물 중에 젤라틴을 용해시킴으로써 10중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다.

[0196] 글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하였다. 이후, 이 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하였다. 세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비는 12.5이다.

[0197] 실험 1 내지 3호와 다르게, 이 실험에서, (세포 현탁액 중의) 세포 및 세포 안정화 배지를 칩을 갖는 주사기를 이용하여 흡인에 의해 혼합하였다. 임상 환경에서, 주사기에 연결된 18G 칩은 세포 및 세포 안정화 배지를 흡인시키고 혼합하도록 사용될 것이다.

[0198] 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 0시간(시간 0, 항온처리 무), 2시간, 4시간, 6시간, 8시간 또는 24시간 동안 해동하였다. 각각의 조건에 대한 샘플을 3중 반복 또는 중복 반복하였다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용하여 평가하였다. 세포의 생존능력을 본 명세서에 기재된 바대로 계산하였다.

[0199] 표 4에 기재된 바대로, 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 이하(2시간, 4시간 또는 6시간) 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지 내의 세포는 이의 생존능력을 유지시켰다. 다른 말로, 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 이하 동안 항온처리된 후, 세포의 생존능력은 시간 0에서 이의 생존능력과 유사하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 항온처리의 8시간 후, 세포 생존능력

은 약간 감소하였다. 37℃에서 항온처리의 24시간 후, 세포 생존능력은 약 30%로 감소하였다. 이 실험은 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지의 보호성 효과를 확인시켜준다.

표 4

항온처리 시간	세포 생존능력	평균 세포 생존능력 (평균±SD)
0 시간	80%	78±1.7%
	77%	
	77%	
2 시간	86%	85.3±1.2%
	84%	
	86%	
4 시간	86%	82±3.6%
	79%	
	81%	
6 시간	83%	81.7±1.5%
	80%	
	82%	
8 시간	80%	72.3±6.8%
	70%	
	67%	
24 시간	38%	29±12.7%
	20%	

[0200]

본 명세서에 사용된 바와 같은, "SD"는 표준 편차를 나타낸다.

[0201]

실험 5호

[0202]

젤라틴을 Nippi(로트 S150806)로부터 얻었다. 물 중에 젤라틴을 용해시킴으로써 10중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다.

[0203]

글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하였다. 이후, 이 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하였다. 세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비는 12.5이다.

[0204]

(세포 현탁액 중의) 세포 및 세포 안정화 배지를 침을 갖는 주사기를 이용하여 흡인에 의해 혼합하였다. 임상 환경에서, 주사기에 연결된 18G 침은 세포 및 세포 안정화 배지를 흡인시키고 혼합하도록 사용될 것이다.

[0205]

혼합물을 25℃ 또는 30℃에서 0시간(시간 0, 항온처리 무), 2시간, 4시간, 6시간, 8시간 또는 24시간 또는 72시간 동안 해동하였다. 각각의 조건에 대한 샘플을 3중 반복 또는 중복 반복하였다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용하여 평가하였다. 세포의 생존능력을 본 명세서에 기재된 바대로 계산하였다.

[0206]

표 5에 기재된 바대로, 25℃에서 24시간 이하(2시간, 4시간, 6시간, 8시간 또는 24시간) 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지 내의 세포는 이의 생존능력을 유지시켰다. 다른 말로, 25℃에서 24시간 이하 동안 항온처리된 후, 세포의 생존능력은 시간 0에서 이의 생존능력과 유사하였다. 30℃에서 8시간 이하(2시간, 4시간, 6시간 또는 8시간) 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지 내의 세포는 이의 생존능력을 유지시켰다. 다른 말로, 30℃에서 8시간 이하 동안 항온처리된 후, 세포의 생존능력은 시간 0에서 이의 생존능력과 유사하였다. 0℃에서 항온처리의 24시간 후, 세포 생존능력은 여전히 70% 초과로 유지될 수 있다.

[0207]

표 5

항온처리 시간	25℃		30℃	
	세포 생존능력	평균 세포 생존능력(평균±SD)	세포 생존능력	평균 세포 생존능력(평균±SD)
0 시간	75%	74.5±0.7%	75%	74.5±0.7%
	74%		74%	
2 시간	81%	81±2%	80%	82.3±2.1%
	79%		84%	
	83%		83%	
4 시간	83%	83.3±1.5%	81%	84.3±2.9%
	82%		86%	
	85%		86%	
6 시간	86%	84±2.6%	80%	83±3%
	85%		86%	
	81%		83%	
8 시간	86%	86±1%	80%	82.3±2.5%
	85%		85%	
	87%		82%	
24 시간	86%	84±2.6%	80%	77.3±2.5%
	85%		77%	
	81%		75%	
72 시간	46%	51.5±7.8%	14%	11.5±3.5%
	57%		9%	

[0208]

[0209]

실험 6호

[0210]

젤라틴을 Nippi(로트 S150806)로부터 얻었다. 물 중에 젤라틴을 용해시킴으로써 5중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다.

[0211]

글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하였다. 이후, 이 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하였다.

[0212]

대조군 샘플로서, 글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하고, 이후 세포 현탁액을 DMEM과 혼합하여 혼합물을 형성하였다.

[0213]

세포 안정화 배지(또는 대조군 샘플에 대한 DMEM) 대 세포 현탁액의 용적비는 12.5이다. 1000 $\mu$ l의 PIPETMAN(등록상표) 및 선단을 이용하여 (세포 현탁액 중의) 세포 및 세포 안정화 배지(또는 대조군 샘플에 대해 DMEM)를 흡인에 의해 혼합하였다.

[0214]

혼합물을 37℃에서 0시간(시간 0, 항온처리 무) 또는 2시간 동안 해동하였다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용하여 평가하였다. 세포의 생존능력을 계산하였다.

[0215]

표 6에 기재된 바대로, 37℃에서 2시간 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지와 혼합된 세포의 생존능력은 DMEM과 혼합된 세포의 생존능력보다 높았다.

표 6

항온처리 시간	젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지와 혼합된 세포 현탁액		DMEM 과 혼합된 세포 현탁액	
	세포 생존능력	평균 생존능력	세포 생존능력	평균 생존능력
0	86%	86%	72%	67.50%
	-		63%	
2 시간	65%	67%	43%	43%
	69%		-	

[0216]

[0217]

실험 7호

[0218] 젤라틴을 Nippi(로트 S150806)로부터 얻었다. 물 중에 젤라틴을 용해시킴으로써 6중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다.

[0219] 글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하였다. 이후, 이 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하였다.

[0220] 대조군 샘플로서, 글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하고, 이후 세포 현탁액을 DMEM과 혼합하여 혼합물을 형성하였다.

[0221] 세포 안정화 배지(또는 대조군 샘플에 대한 DMEM) 대 세포 현탁액의 용적비는 12.5이다. 1000 $\mu$ l의 PIPETMAN(등록상표) 및 선단을 이용하여 (세포 현탁액 중의) 세포 및 세포 안정화 배지(또는 대조군 샘플에 대해 DMEM)를 흡인에 의해 혼합하였다.

[0222] 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 0시간(시간 0, 항온처리 무) 또는 2시간 동안 해동하였다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용하여 평가하였다. 세포의 생존능력을 계산하였다.

[0223] 표 7에 기재된 바대로, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지와 혼합된 세포의 생존능력은 DMEM과 혼합된 세포의 생존능력보다 높았다.

표 7

항온처리 시간	젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지와 혼합된 세포 현탁액		DMEM 과 혼합된 세포 현탁액	
	세포 생존능력	평균 생존능력	세포 생존능력	평균 생존능력
0	86%	86%	72%	67.50%
	-		63%	
2시간	65%	67%	43%	43%
	69%		-	

[0224]

실험 8호

[0225]

[0226] 젤라틴을 Nippi(로트 S150806)로부터 얻었다. 물 중에 젤라틴을 용해시킴으로써 7.5중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다.

[0227] 글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하였다. 이후, 이 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하였다.

[0228] 대조군 샘플로서, 글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하고, 이후 세포 현탁액을 DMEM과 혼합하여 혼합물을 형성하였다.

[0229] 세포 안정화 배지(또는 대조군 샘플에 대한 DMEM) 대 세포 현탁액의 용적비는 12.5이다. 1000 $\mu$ l의 PIPETMAN(등록상표) 및 선단을 이용하여 (세포 현탁액 중의) 세포 및 세포 안정화 배지(또는 대조군 샘플에 대해 DMEM)를 흡인에 의해 혼합하였다.

[0230] 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 0시간(시간 0, 항온처리 무) 또는 2시간 동안 해동하였다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용하여 평가하였다. 세포의 생존능력을 계산하였다.

[0231] 표 8에 기재된 바대로, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지와 혼합된 세포의 생존능력은 DMEM과 혼합된 세포의 생존능력보다 높았다.

표 8

항온처리 시간	젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지와 혼합된 세포 현탁액		DMEM 과 혼합된 세포 현탁액	
	세포 생존능력	평균 생존능력	세포 생존능력	평균 생존능력
0	86%	86%	72%	67.50%
	-		63%	
2 시간	70%	60%	43%	43%
	68%		-	

[0232]

[0233]

실험 9호

[0234]

젤라틴을 GELITA(로트 L600217)로부터 얻었다. 물 중에 젤라틴을 용해시킴으로써 15.7중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다.

[0235]

글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하였다. 이후, 이 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하였다.

[0236]

세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비는 6.25이다. 1000 $\mu$ l의 PIPETMAN(등록상표) 및 선단을 이용하여 (세포 현탁액 중의) 세포 및 세포 안정화 배지를 흡인에 의해 혼합하였다.

[0237]

혼합물을 27 $^{\circ}$ C 또는 37 $^{\circ}$ C에서 0시간(시간 0, 항온처리 무), 2시간 또는 4시간 동안 해동하였다. 각각의 조건에 대한 샘플을 중복 반복하였다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용하여 평가하였다. 세포의 생존능력을 계산하였다.

[0238]

표 9에 기재된 바대로, 27 $^{\circ}$ C 또는 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 또는 4시간 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지 내의 세포는 이의 생존능력을 유지시켰다. 다른 말로, 27 $^{\circ}$ C 또는 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 또는 4시간 동안 항온처리된 후, 세포의 생존능력은 시간 0에서 이의 생존능력과 유사하였다.

표 9

항온처리 시간	항온처리 온도( $^{\circ}$ C)	젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지와 혼합된 세포 현탁액	
		세포 생존능력	평균 생존능력
0	37	67%	66%
		65%	
2 시간	27	74%	72.50%
		71%	
	37	66%	68%
		70%	
4 시간	27	73%	73%
		73%	
	37	66%	65.50%

[0239]

[0240]

실험 10호

[0241]

젤라틴을 GELITA(로트 L600217)로부터 얻었다. 물 중에 젤라틴을 용해시킴으로써 15.7중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다.

[0242]

글라이세롤을 포함하는 저온보존 조성물 내의 세포를 저온보존으로부터 해동하였다. 이후, 이 세포 현탁액을 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하였다. 세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비는 12.5이다.

[0243]

(세포 현탁액 중의) 세포 및 세포 안정화 배지를 침을 갖는 주사기를 이용하여 흡인에 의해 혼합하였다. 임상 환경에서, 주사기에 연결된 18G 침은 세포 및 세포 안정화 배지를 흡인시키고 혼합하도록 사용될 것이다.

[0244]

혼합물을 23 $^{\circ}$ C, 27 $^{\circ}$ C 또는 30 $^{\circ}$ C에서 0시간(시간 0, 항온처리 무), 1시간 또는 2시간 동안 해동하였다. 각각의 조건에 대한 샘플을 중복 반복하였다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용하여 평가하였다. 세포의 생존능력을 본 명세서에 기재된 바대로 계산하였다(표 10).

표 10

항온처리 시간	항온처리 온도(℃)	세포 생존능력	평균 생존능력
1 시간	23	49%	54%
		59%	
	27	71%	68%
		65%	
	30	74%	75.50%
		77%	
2 시간	23	44%	37%
		30%	
	27	51%	51%
		51%	
	30	74%	74.50%
		75%	

[0245]

[0246] 실시예 2 세포 생존능력에 대한 젤라틴 농도 및 온도의 효과

[0247] 실험 조건은 표 11에 기재되어 있다.

표 11

온도	25℃ 또는 37℃
젤라틴 농도	1 중량%, 3 중량%, 17 중량%
세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비	5 또는 12.5
항온처리 시간	0, 2, 4, 8 시간

[0248]

[0249] 1중량%, 3중량% 또는 17중량%의 젤라틴을 함유하는 세포 안정화 배지를 제조하였다. 세포 안정화 배지를 37℃ 물 욕에서 항온처리하여 세포와 혼합되기 전에 유상으로 전환하도록 보장하였다.

[0250] 세포를 증식시키고 수확하고 저온보존하였다. 실험 전에, 태아 피부 섬유아세포 세포인 FE002-SK2 세포(계대배양 12; P12)의 3개 내지 5개의 저온관을 해동하였다. 모든 저온관은 0.4ml 중에  $3 \times 10^6$ 개의 세포를 함유하였다. 모든 3개 내지 5개의 저온관의 내용물을 배합하고 혼합하였다.

[0251] DMEM 군에 대해:

[0252] (1) 5배 희석: 20 $\mu$ l의 세포를 80 $\mu$ l의 DMEM(5배 희석된 세포)과 배합하였다. 해동 후 세포의 수를 계수하였다.

[0253] (2) 12.5배 희석: 20 $\mu$ l의 세포를 230 $\mu$ l의 DMEM(12.5배 희석된 세포)과 배합하였다. 해동 후 세포의 수를 계수하였다.

[0254] 세포 안정화 배지(젤라틴을 포함) 군에 대해:

[0255] (1) 5배 희석, 37℃: 200 $\mu$ l의 세포 및 800 $\mu$ l의 세포 안정화 배지(젤라틴 용액)를 1.5ml의 에펜도르프 관에 첨가하고 혼합하였다. 세포 생존능력을 시간 0(T0)에 분석하였다. 남은 시험 샘플을 37℃ 물 욕에서 항온처리하였다. 2시간(T2), 4시간(T4) 및 8시간(T8)의 시점에서 세포 생존능력을 다시 분석하였다.

[0256] (2) 12.5배 희석, 37℃: 200 $\mu$ l의 세포 및 2300 $\mu$ l의 젤라틴 용액을 15ml의 원심분리 관에 첨가하고 혼합하였다. 세포 생존능력을 시간 0(T0)에 분석하였다. 남은 시험 샘플을 37℃ 물 욕에서 항온처리하였다. 2시간(T2), 4시간(T4) 및 8시간(T8)의 시점에서 세포 생존능력을 분석하였다.

[0257] 유사하게, 세포 생존능력을 25℃에서 5배 희석 및 12.5배 희석에 대해 또한 시험하였다.

표 12 상이한 배수(5X 또는 12.5X)에서 젤라틴 용액에 의해 희석되고 25℃에서 항온처리된 후 세포 생존능력

	5X 희석	세포 생존능력(%) (평균±SD)	12.5X 희석	세포 생존능력(%) (평균±SD)
DMEM	T0	81±0	T0	78.5±0.7
젤라틴 (1 중량%)	T0	80±2.8	T0	64.5±0.7
	T2	80.5±0.7	T2	63±1.4
	T4	76.5±2.1	T4	61.5±2.1
	T8	73±1.4	T8	57.5±0.7
젤라틴 (3 중량%)	T0	80.5±2.1	T0	70±1.4
	T2	77.5±2.1	T2	60±1.4
	T4	78.5±0.7	T4	57±1.4
	T8	74.5±0.7	T8	45.5±3.5
젤라틴 (17 중량%)	T0	74±2.8	T0	63.5±0.7
	T2	68±0	T2	64.5±0.7
	T4	64.5±0.7	T4	53.5±2.1
	T8	53±5.7	T8	50.5±0.7

[0258]

표 13 상이한 배수(5X 또는 12.5X)에서 젤라틴 용액에 의해 희석되고 37℃에서 항온처리된 후 세포 생존능력

	5X 희석	세포 생존능력(%) (평균±SD)	12.5X 희석	세포 생존능력(%) (평균±SD)
DMEM	T0	81±0	T0	77.0±0
젤라틴 (1 중량%)	T0	77.5±3.5	T0	71.0±5.7
	T2	78.0±1.4	T2	65.5±0.7
	T4	74.5±3.5	T4	54.5±6.4
	T8	62.5±3.5	T8	21.5±2.1
젤라틴 (3 중량%)	T0	78.5±3.5	T0	73.5±4.9
	T2	76.0±1.4	T2	66.5±0.7
	T4	75±1.4	T4	49.0±0
	T8	65.0±1.4	T8	22.5±9.2
젤라틴 (17 중량%)	T0	74.0±0	T0	69.0±5.7
	T2	72.0±1.4	T2	62.0±0
	T4	70±1.4	T4	58.5±2.1
	T8	53.5±12.0	T8	38.0±1.4

[0259]

표 14 5X 에서 젤라틴 용액에 의해 희석되고 25℃에서 항온처리된 후 세포 생존능력(원데이터)

25℃, 희석 인자 : 5X							
	전체 세포 (세포/ml)	비생존가능 세포 (세포/ml)	생존가능 세포 (세포/ml)	세포 생존능력 (%)	평균 생존능력 (%)	SD	세포 생존능력(%) (평균±SD)
DMEM-1(희석 5X)	1.15E+06	2.09E+05	9.44E+05	81	81	0.0	81±0
DMEM-2(희석 5X)	1.16E+06	2.12E+05	9.52E+05	81			
1%-T0-1	1.25E+06	2.18E+05	1.03E+06	82	80	2.8	80±2.8
1%-T0-2	1.10E+06	2.35E+05	8.71E+05	78			
3%-T0-1	1.28E+06	2.23E+05	1.06E+06	82	80.5	2.1	80.5±2.1
3%-T0-2	1.22E+06	2.46E+05	9.82E+05	79			
17%-T0-1	1.26E+06	3.00E+05	9.61E+05	76	74	2.8	74±2.8
17%-T0-2	1.21E+06	3.38E+05	8.77E+05	72			
1%-T2-1	1.20E+06	2.35E+05	9.68E+05	80	80.5	0.7	80.5±0.7
1%-T2-2	1.18E+06	2.24E+05	9.58E+05	81			
3%-T2-1	1.11E+06	2.62E+05	8.50E+05	76	77.5	2.1	77.5±2.1
3%-T2-2	1.13E+06	2.38E+05	9.01E+05	79			
17%-T2-1	1.12E+06	3.60E+05	7.67E+05	68	68	0.0	68±0
17%-T2-2	1.14E+06	3.64E+05	7.76E+05	68			
1%-T4-1	1.13E+06	2.76E+05	8.54E+05	75	76.5	2.1	76.5±2.1
1%-T4-2	1.12E+06	2.40E+05	8.87E+05	78			
3%-T4-1	1.20E+06	2.59E+05	9.49E+05	78	78.5	0.7	78.5±0.7
3%-T4-2	1.30E+06	2.63E+05	1.03E+05	79			
17%-T4-1	1.23E+06	4.43E+05	7.91E+05	64	64.5	0.7	64.5±0.7
17%-T4-2	1.26E+06	4.40E+05	8.23E+05	65			
1%-T8-1	1.12E+06	2.88E+05	8.38E+05	74	73	1.4	73±1.4
1%-T8-2	1.10E+06	3.00E+05	8.00E+05	72			
3%-T8-1	1.24E+06	3.07E+05	9.40E+05	75	74.5	0.7	74.5±0.7
3%-T8-2	1.29E+06	3.30E+05	9.62E+05	74			
17%-T8-1	1.19E+06	6.08E+05	5.87E+05	49	53	5.7	53±5.7
17%-T8-2	1.26E+06	5.44E+05	7.25E+05	57			

[0260]

표 15 12.5X에서 젤라틴 용액에 의해 희석되고 25℃에서 항온처리된 후 세포 생존능력(원데이터)

25℃, 희석 인자: 12.5X							
	전체 세포 (세포/ml)	비생존가능 세포 (세포/ml)	생존가능 세포 (세포/ml)	세포 생존능력 (%)	평균 생존능력 (%)	SD	세포 생존능력(%) (평균±SD)
DMEM-1 (희석 12.5X)	4.45E+05	9.78E+04	3.47E+05	78	78.5	0.7	78.5±0.7
DMEM-2 (희석 12.5X)	4.92E+05	1.02E+05	3.90E+05	79			
1%-T0-1	4.70E+05	1.69E+05	3.01E+05	64	64.5	0.7	64.5±0.7
1%-T0-2	4.77E+05	1.65E+05	3.12E+05	65			
3%-T0-1	4.43E+05	1.36E+05	3.06E+05	69	70	1.4	70±1.4
3%-T0-2	4.64E+05	1.32E+05	3.31E+05	71			
17%-T0-1	4.43E+05	1.61E+05	2.82E+05	63	63.5	0.7	63.5±0.7
17%-T0-2	4.02E+05	1.41E+05	2.61E+05	64			
1%-T2-1	4.55E+05	1.69E+05	2.85E+05	62	63	1.4	63±1.4
1%-T2-2	4.39E+05	1.58E+05	2.81E+05	64			
3%-T2-1	4.63E+05	1.86E+05	2.77E+05	59	60	1.4	60±1.4
3%-T2-2	4.66E+05	1.80E+05	2.85E+05	61			
17%-T2-1	5.97E+05	2.04E+05	3.93E+05	65	64.5	0.7	64.5±0.7
17%-T2-2	5.78E+05	2.04E+05	3.74E+05	64			
1%-T4-1	4.12E+05	1.49E+05	2.62E+05	63	61.5	2.1	61.5±2.1
1%-T4-2	3.79E+05	1.50E+05	2.29E+05	60			
3%-T4-1	4.97E+05	2.05E+05	2.92E+05	58	57	1.4	57±1.4
3%-T4-2	4.65E+05	2.02E+05	2.62E+05	56			
17%-T4-1	4.78E+05	2.29E+05	2.48E+05	52	53.5	2.1	53.5±2.1
17%-T4-2	4.86E+05	2.16E+05	2.70E+05	55			
1%-T8-1	3.11E+05	1.30E+05	1.81E+05	58	57.5	0.7	57.5±0.7
1%-T8-2	2.89E+05	1.23E+05	1.65E+05	57			
3%-T8-1	4.85E+05	2.49E+05	2.35E+05	48	45.5	3.5	45.5±3.5
3%-T8-2	4.41E+05	2.47E+05	1.94E+05	43			
17%-T8-1	5.69E+05	2.79E+05	2.90E+05	50	50.5	0.7	50.5±0.7
17%-T8-2	5.76E+05	2.81E+05	2.95E+05	51			

[0261]

표 16 5X에서 젤라틴 용액에 의해 희석되고 37℃에서 항온처리된 후 세포 생존능력(원데이터)

37℃, 희석 인자: 5X							
	전체 세포 (세포/ml)	비생존가능 세포 (세포/ml)	생존가능 세포 (세포/ml)	세포 생존능력 (%)	평균 생존능력 (%)	SD	세포 생존능력(%) (평균±SD)
DMEM-1(희석 5X)	1.30E+06	2.37E+05	1.06E+06	81	81	0.0	81.0±0
DMEM-2(희석 5X)	1.26E+06	2.36E+05	1.02E+06	81			
1%-T0-1	1.30E+06	2.50E+05	1.05E+06	80	77.5	3.5	77.5±3.5
1%-T0-2	1.28E+06	3.09E+05	9.73E+05	75			
3%-T0-1	1.35E+06	2.50E+05	1.10E+06	81	78.5	3.5	78.5±3.5
3%-T0-2	1.23E+06	2.85E+05	9.44E+05	76			
17%-T0-1	1.23E+06	3.15E+05	9.17E+05	74	74	0.0	74.0±0
17%-T0-2	1.14E+06	2.88E+05	8.56E+05	74			
1%-T2-1	1.32E+06	3.03E+05	1.01E+06	77	78	1.4	78.0±1.4
1%-T2-2	1.40E+06	2.88E+05	1.11E+06	79			
3%-T2-1	1.26E+06	3.15E+05	9.49E+05	75	76	1.4	76.0±1.4
3%-T2-2	1.39E+06	3.07E+05	1.08E+06	77			
17%-T2-1	1.25E+06	3.61E+05	8.89E+05	71	72	1.4	72.0±1.4
17%-T2-2	1.35E+06	3.53E+05	1.00E+06	73			
1%-T4-1	1.20E+06	3.31E+05	8.72E+05	72	74.5	3.5	74.5±3.5
1%-T4-2	1.29E+06	2.92E+05	1.00E+06	77			
3%-T4-1	1.30E+06	3.05E+05	1.00E+06	76	75	1.4	75±1.4
3%-T4-2	1.33E+06	3.42E+05	9.93E+05	74			
17%-T4-1	1.34E+06	4.06E+05	9.36E+05	69	70	1.4	70±1.4
17%-T4-2	1.44E+06	4.09E+05	1.03E+06	71			
1%-T8-1	1.17E+06	4.01E+05	7.69E+05	65	62.5	3.5	62.5±3.5
1%-T8-2	1.07E+06	4.26E+05	6.43E+05	60			
3%-T8-1	1.38E+06	4.97E+05	8.86E+05	64	65	1.4	65.0±1.4
3%-T8-2	1.41E+06	4.74E+05	9.35E+05	66			
17%-T8-1	1.31E+06	7.15E+05	5.98E+05	45	53.5	12.0	53.5±12.0
17%-T8-2	8.36E+05	3.17E+05	5.19E+05	62			

[0262]

표 17 12.5X에서 젤라틴 용액에 의해 희석되고 37℃에서 항온처리된 후 세포 생존능력(원데이터)

37℃, 희석 인자: 12.5X							
	전체 세포 (세포/ml)	비생존가능 세포 (세포/ml)	생존가능 세포 (세포/ml)	세포 생존능력 (%)	평균 생존능력 (%)	SD	세포 생존능력(%) (평균±SD)
DMEM-1(희석 5X)	4.75E+05	1.08E+05	3.67E+05	77	77	0.0	77.0±0
DMEM-2(희석 5X)	4.92E+05	1.09E+05	3.82E+05	77			
1%-T0-1	4.71E+05	1.17E+05	3.53E+05	75	71	5.7	71.0±5.7
1%-T0-2	4.64E+05	1.50E+05	3.13E+05	67			
3%-T0-1	4.82E+05	1.06E+05	3.76E+05	77	73.5	4.9	73.5±4.9
3%-T0-2	4.42E+05	1.31E+05	3.11E+05	70			
17%-T0-1	4.43E+05	1.54E+05	2.89E+05	65	69	5.7	69.0±5.7
17%-T0-2	4.66E+05	1.22E+05	3.43E+05	73			
1%-T2-1	4.26E+05	1.47E+05	2.78E+05	65	65.5	0.7	65.5±0.7
1%-T2-2	4.25E+05	1.43E+05	2.81E+05	66			
3%-T2-1	4.77E+05	1.55E+05	3.21E+05	67	66.5	0.7	66.5±0.7
3%-T2-2	4.50E+05	1.48E+05	3.01E+05	66			
17%-T2-1	4.06E+05	1.53E+05	2.53E+05	62	62	0.0	62.0±0
17%-T2-2	4.08E+05	1.51E+05	2.56E+05	62			
1%-T4-1	3.99E+05	1.63E+05	2.35E+05	59	54.5	6.4	54.5±6.4
1%-T4-2	3.50E+05	1.73E+05	1.77E+05	50			
3%-T4-1	4.49E+05	2.27E+05	2.22E+05	49	49	0.0	49.0±0
3%-T4-2	4.85E+05	2.43E+05	2.42E+05	49			
17%-T4-1	4.30E+05	1.71E+05	2.59E+05	60	58.5	2.1	58.5±2.1
17%-T4-2	4.13E+05	1.76E+05	2.36E+05	57			
1%-T8-1	2.99E+05	2.30E+05	6.91E+04	23	21.5	2.1	21.5±2.1
1%-T8-2	2.69E+05	2.14E+05	5.56E+04	20			
3%-T8-1	4.30E+05	3.04E+05	1.26E+05	29	22.5	9.2	22.5±9.2
3%-T8-2	4.57E+05	3.08E+05	7.71E+04	16			
17%-T8-1	3.20E+05	1.99E+05	1.21E+05	37	38	1.4	38.0±1.4
17%-T8-2	3.72E+05	2.26E+05	1.45E+05	39			

[0263]

[0264]

**토의**

[0265]

결과는 해동 후 세포 생존능력이 DMEM과 비교하여 1중량%, 3중량% 또는 17중량%의 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지와 항온처리될 때 더 높다는 것을 보여준다. 25℃ 또는 37℃에서, 세포 안정화 배지에 의해 5배 희석된 세포는 세포 안정화 배지에 의해 5배 희석된 세포와 비교하여 더 높고 연장된 생존능력을 나타냈다.

[0266]

**실시에 3 세포 생존능력에서의 작업 젤라틴 농도의 효과**

[0267]

표 18 및 도 1 내지 9는 실시예 1 및 실시예 2에서 실험 번호 1 내지 10("Exp. 1" 내지 "Exp. 10")의 데이터에 기초한 세포 생존능력에 대한 젤라틴의 작업 농도의 효과를 보여준다.

표 18

	세포 안정화 배지(젤라틴 조성물) 및 세포 현탁액의 혼합물 내의 젤라틴의 작업 농도 (중량%)	젤라틴 조성물 및 세포 현탁액의 혼합물의 항온처리 온도(℃)	항온처리 시간(h)	세포 생존능력
실험 1	14.54%	37	0	79.0%
	(DMEM 단독) 0%	37	0	77.0%
	14.54%	30	2	78.0%
	(DMEM 단독) 0%	30	2	34.0%
	14.54%	37	2	82.0%
	(DMEM 단독) 0%	37	2	33.0%
	14.54%	30	4	75.0%
	(DMEM 단독) 0%	30	4	40.0%
	14.54%	37	4	76.0%
(DMEM 단독) 0%	37	4	40.0%	
실험 2	14.54%	37	0	78.0%
	14.54%	37	1	80.0%
	14.54%	37	2	78.0%
	14.54%	37	4	79.5%
	14.54%	37	8	73.0%
	14.54%	37	24	38.5%
실험 3 (CPA는 DMSO임)	14.27%	25	0	90.0%
	(DMEM 단독) 0%	25	0	83.5%
	(10%FBS/DMEM) 0%	25	0	84.5%
	14.27%	25	2	87.5%
	(DMEM 단독) 0%	25	2	73.0%
	(10%FBS/DMEM) 0%	25	2	68.5%
	14.27%	25	4	84.5%
	(DMEM 단독) 0%	25	4	66.0%
	(10%FBS/DMEM) 0%	25	4	56.0%
	14.27%	25	8	82.5%
	(DMEM 단독) 0%	25	8	56.5%
(10%FBS/DMEM) 0%	25	8	55.5%	
실험 4	9.26%	37	0	78.0%
	9.26%	37	2	85.3%
	9.26%	37	4	82.0%
	9.26%	37	6	81.7%
	9.26%	37	8	72.3%
	9.26%	37	24	29.0%

[0268]

실험 5	9.26%	25	0	74.5%
	9.26%	30	0	74.5%
	9.26%	25	2	81.0%
	9.26%	30	2	82.3%
	9.26%	25	4	83.3%
	9.26%	30	4	84.3%
	9.26%	25	6	84.0%
	9.26%	30	6	83.0%
	9.26%	25	8	86.0%
	9.26%	30	8	82.3%
	9.26%	25	24	84.0%
	9.26%	30	24	77.3%
	9.26%	25	72	51.5%
9.26%	30	72	11.5%	
실험 6	4.63%	37	0	86.0%
	(DMEM 단독) 0%	37	0	67.5%
	4.63%	37	2	67.0%
	(DMEM 단독) 0%	37	2	43.0%
실험 7	5.56%	37	0	86.0%
	(DMEM 단독) 0%	37	0	67.5%
	5.56%	37	2	66.0%
	(DMEM 단독) 0%	37	2	43.0%
실험 8	6.94%	37	0	86.0%
	(DMEM 단독) 0%	37	0	67.5%
	6.94%	37	2	69.0%
	(DMEM 단독) 0%	37	2	43.0%
실험 9	13.53%	37	0	66.0%
	13.53%	27	2	72.5%
	13.53%	37	2	68.0%
	13.53%	28	4	73.0%
	13.53%	37	4	65.5%
실험 10	14.54%	23	1	54.0%
	14.54%	27	1	68.0%
	14.54%	30	1	75.5%
	14.54%	23	2	37.0%
	14.54%	27	2	51.0%
	14.54%	30	2	74.5%
실시예 2	(DMEM 단독) 0%	25	0	81.0%

[0269]

(표 14)	0.80%	25	0	80.0%
	0.80%	25	2	80.5%
	0.80%	25	4	76.5%
	0.80%	25	8	73.0%
	2.40%	25	0	80.5%
	2.40%	25	2	77.5%
	2.40%	25	4	78.5%
	2.40%	25	8	74.5%
	13.60%	25	0	74.0%
	13.60%	25	2	68.0%
	13.60%	25	4	64.5%
	13.60%	25	8	53.0%
	실시예 2 (표 15)	(DMEM 단독) 0%	25	0
0.92%		25	0	64.5%
0.92%		25	2	63.0%
0.92%		25	4	61.5%
0.92%		25	8	57.5%
2.76%		25	0	70.0%
2.76%		25	2	60.0%
2.76%		25	4	57.0%
2.76%		25	8	45.5%
15.64%		25	0	63.5%
15.64%		25	2	64.5%
15.64%		25	4	53.5%
15.64%		25	8	50.5%
실시예 2 (표 16)	(DMEM 단독) 0%	37	0	81.0%
	0.80%	37	0	77.5%
	0.80%	37	2	78.0%
	0.80%	37	4	74.5%
	0.80%	37	8	62.5%
	2.40%	37	0	78.5%
	2.40%	37	2	76.0%
	2.40%	37	4	75.0%
	2.40%	37	8	65.0%
	13.60%	37	0	74.0%
	13.60%	37	2	72.0%
	13.60%	37	4	70.0%
	13.60%	37	8	53.5%

[0270]

실시예 2 (표 17)	(DMEM 단독) 0%	37	0	77.0%
	0.92%	37	0	71.0%
	0.92%	37	2	65.5%
	0.92%	37	4	54.5%
	0.92%	37	8	21.5%
	2.76%	37	0	73.5%
	2.76%	37	2	66.5%
	2.76%	37	4	49.0%
	2.76%	37	8	22.5%
	15.64%	37	0	69.0%
	15.64%	37	2	62.0%
	15.64%	37	4	58.5%
	15.64%	37	8	38.0%

[0271]

[0272] 실시예 4 해동 후 세포 생존능력을 유지시키기 위한 젤라틴 기반 용액과 다른 용액 사이의 비교

[0273] 재료

[0274] ADAM Accuchip 및 ADAM 용액은 NanoEnTek로부터 얻었다. DMEM 및 소 태아 혈청(FB)은 Gibco로부터 얻었다. 소 혈청 알부민은 Sigma로부터 얻었다.

[0275] 시험 용액(세포 안정화 배지, DMEM 또는 FBS)은 하기를 포함한다:

[0276] • 용액 A("Soln A"): DMEM

- [0277] • 용액 B("SoIn B"): DMEM 중의 젤라틴 10중량%
- [0278] • 용액 C("SoIn C"): DMEM 중의 알부민 5중량%
- [0279] • 용액 D("SoIn D"): DMEM 중의 알부민 10중량%
- [0280] • 용액 E("SoIn E"): DMEM 중의 알부민 15.7중량%
- [0281] • 용액 F("SoIn F"): FBS

[0282] 섬유아세포 세포(FE002-SK2)를  $7.5 \times 10^6$  개의 세포/ml의 농도로 글라이세롤을 함유하는 저온보존 조성물 중에 동결시켰다.

[0283] 1150 $\mu$ l의 각각의 시험 용액 A 내지 F를 각각의 용액에 대해 3개의 관에 의해 2ml의 에펜도르프 관에 분배하였다.

[0284] 저온보존된 섬유아세포 세포를 37 $^{\circ}$ C 물 욕에서 해동시켰다. 모든 세포 현탁액을 1개의 관에 혼주하였다. 100 $\mu$ l의 해동된 세포 현탁액을 1150 $\mu$ l의 시험 용액을 함유하는 에펜도르프 관의 각각에 첨가하여 혼합물을 형성하였다. 시험 용액(세포 안정화 배지 또는 DMEM 또는 FBS) 대 세포 현탁액의 용적비는 11.5이다.

[0285] 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 해동한다. 각각의 컨디션에 대한 샘플은 3중 반복되었다. 세포의 전체 수, 살아 있는 세포의 수 및 죽은 세포의 수를 ADAM-MC Automatic Cell Counter(Digital Bio)를 이용함으로써 평가하였다. 세포의 생존능력을 [(살아 있는 세포 수)/(전체 세포 수)] x 100%의 식에 의해 계산하였다.

[0286] 표 19에 기재된 바대로, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 항온처리된 후, 젤라틴을 포함하는 세포 안정화 배지 내의 세포의 생존능력은 약 77.3%이었다. 5중량%, 10중량%, 또는 15.7중량% 알부민을 포함하는 세포 안정화 배지 내의 세포의 생존능력은 각각 약 48.7%, 49.7% 및 60.7%이었다. 젤라틴 기반 용액은 다른 시험된 용액보다 양호하게 해동된 세포 생존능력을 유지시킬 수 있었다.

표 19 다양한 시험 용액과 혼합된 세포의 생존능력

항온처리 시간 = 2 시간							
시험 용액	번호	전체 세포 (세포/ml)	비생존가능 세포 (세포/ml)	생존가능 세포 (세포/ml)	세포 생존능력 (%)	세포 생존능력(%)	
						평균	SD
용액 A (DMEM)	1	2.29E5	1.36E5	9.24E4	40	40.0	6.0
	2	2.12E5	1.38E5	7.38E4	34		
	3	2.35E5	1.26E5	1.08E5	46		
용액 B (DMEM 중의 10 중량% 젤라틴)	1	4.29E5	1.02E5	3.27E5	76	77.3	1.5
	2	4.30E5	8.93E4	3.40E5	79		
	3	4.53E5	1.03E5	3.50E5	77		
용액 C (DMEM 중의 5 중량% 알부민)	1	2.59E5	1.19E5	1.39E5	53	48.7	7.5
	2	2.97E5	1.37E5	1.59E5	53		
	3	2.53E5	1.49E5	1.03E5	40		
용액 D (DMEM 중의 10 중량% 알부민)	1	2.44E5	1.21E5	1.23E5	50	49.7	2.5
	2	2.47E5	1.17E5	1.29E5	52		
	3	2.23E5	1.17E5	1.05E5	47		
용액 E (DMEM 중의 15.7 중량% 알부민)	1	2.39E5	1.07E5	1.31E5	55	60.7	5.1
	2	2.56E5	8.91E4	1.67E5	65		
	3	2.57E5	9.74E4	1.59E5	62		
용액 F (FBS)	1	3.96E5	1.57E5	2.38E5	60	60.7	3.1
	2	4.51E5	1.61E5	2.89E5	64		
	3	4.10E5	1.70E5	2.40E5	58		

- [0287]
- [0288] 예시적인 시스템 및 방법은 하기 항목에 기재되어 있다:

[0289] 항목 1. 세포 생존능력을 유지시키는 방법으로서, 하나 이상의 세포를 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하는 단계(여기서, 세포 안정화 배지는, 세포 안정화 배지의 전체 중량을 기준으로, 약 5중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함함)를 포함하는, 방법.

[0290] 항목 2. 항목 1에 있어서, 세포 안정화 배지는 약 5중량% 내지 약 7.5중량%의 젤라틴을 포함하는, 방법.

- [0291] 항목 3. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포 안정화 배지는 약 10중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함하는, 방법.
- [0292] 항목 4. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 혼합물은, 혼합물의 전체 중량을 기준으로, 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함하는, 방법.
- [0293] 항목 5. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 혼합물은 약 2.4중량% 내지 약 7중량%의 젤라틴을 포함하는, 방법.
- [0294] 항목 6. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 혼합물은 약 9.3중량% 내지 약 14.6중량%의 젤라틴을 포함하는, 방법.
- [0295] 항목 7. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 세포는 혼합 단계 전에 세포 현탁액 중에 있는, 방법.
- [0296] 항목 8. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비는 약 6.25 내지 약 12.5의 범위인, 방법.
- [0297] 항목 9. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비는 약 5 내지 약 10의 범위인, 방법.
- [0298] 항목 10. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 약  $7.5 \times 10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^7$ 개의 세포/ml의 범위의 농도로 세포 현탁액 중에 있는, 방법.
- [0299] 항목 11. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 혼합 단계 전에, 하나 이상의 세포는 저온보존된 상태에서부터 해동된 저온보존 조성물 중에 있는, 방법.
- [0300] 항목 12. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 저온보존된 상태는 약  $-70^{\circ}\text{C}$  및  $-200^{\circ}\text{C}$ 의 범위의 온도에 있는, 방법.
- [0301] 항목 13. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 적어도 70%의 해동 후 생존능력을 갖는, 방법.
- [0302] 항목 14. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 적어도 80%의 해동 후 생존능력을 갖는, 방법.
- [0303] 항목 15. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 저온보존 조성물은 글라이세롤, 다이메틸 설펍사이드(DMSO), 및/또는 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)을 포함하는, 방법.
- [0304] 항목 16. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포 안정화 배지를 혼합 단계 전에 약  $25^{\circ}\text{C}$  내지 약  $37^{\circ}\text{C}$ 의 범위의 온도에 배치하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0305] 항목 17. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 젤라틴은 약 100킬로달톤(kD) 내지 약 200kD의 범위의 중량 평균 분자 질량을 갖는, 방법.
- [0306] 항목 18. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 젤라틴은 변성된 콜라겐을 포함하는, 방법.
- [0307] 항목 19. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포 안정화 배지는 약 190 내지 약 325의 범위의 블룸 값을 갖는 열가역적 하이드로겔인, 방법.
- [0308] 항목 20. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 포유류 세포인, 방법.
- [0309] 항목 21. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 인간, 돼지, 개, 말 또는 소 세포인, 방법.
- [0310] 항목 22. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 종양 세포를 포함하는, 방법.
- [0311] 항목 23. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 섬유아세포를 포함하는, 방법.
- [0312] 항목 24. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 줄기세포를 포함하는, 방법.
- [0313] 항목 25. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 약  $10^5$ 개의 세포/ml 내지 약  $10^7$ 개의 세포/ml의 범위의 농도로 혼합물 중에 존재하는, 방법.
- [0314] 항목 26. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포 안정화 배지는 아미노산, 사이토카인, 지질, 성장 인자, 항생제, 항진균제, 스테로이드 호르몬, 단백질 호르몬, 또는 이들의 조합물을 더 포함하는, 방법.

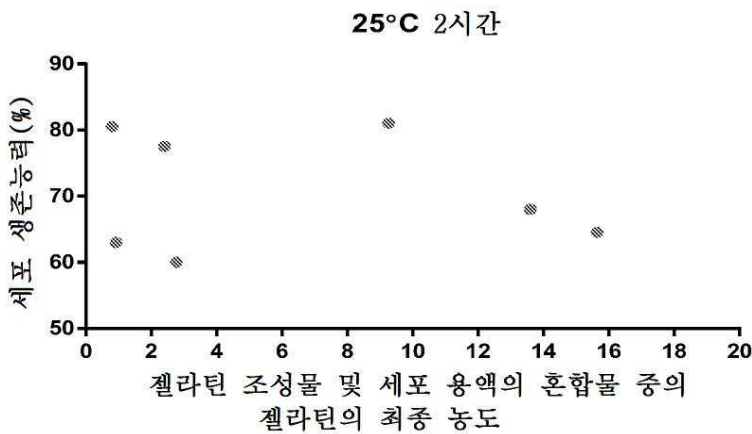
- [0315] 항목 27. 세포 생존능력을 유지시키는 방법으로서, 하나 이상의 세포를 세포 안정화 배지와 혼합하여 혼합물을 형성하는 단계(여기서, 혼합물은 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함함)를 포함하는, 방법.
- [0316] 항목 28. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 혼합물은 약 2.4중량% 내지 약 7중량%의 젤라틴을 포함하는, 방법.
- [0317] 항목 29. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 혼합물은 약 9.3중량% 내지 약 14.6중량%의 젤라틴을 포함하는, 방법.
- [0318] 항목 30. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 세포는 혼합 단계 전에 세포 현탁액 중에 있는, 방법.
- [0319] 항목 31. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비는 약 6.25 내지 약 12.5의 범위인, 방법.
- [0320] 항목 32. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포 안정화 배지 대 세포 현탁액의 용적비는 약 5 내지 약 10의 범위인, 방법.
- [0321] 항목 33. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 약  $7.5 \times 10^5$  개의 세포/ml 내지 약  $7.5 \times 10^7$  개의 세포/ml의 범위의 농도로 세포 현탁액 중에 있는, 방법.
- [0322] 항목 34. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 혼합 단계 전에, 하나 이상의 세포는 저온보존된 상태에서부터 해동된 저온보존 조성물 중에 있는, 방법.
- [0323] 항목 35. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 적어도 70%의 해동 후 생존능력을 갖는, 방법.
- [0324] 항목 36. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 저온보존 조성물은 글라이세롤, 다이메틸 설펍사이드(DMSO), 및/또는 폴리에틸렌 글라이콜(PEG)을 포함하는, 방법.
- [0325] 항목 37. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포 안정화 배지를 혼합 단계 전에 약 25°C 내지 약 37°C의 범위의 온도에 배치하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0326] 항목 38. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 젤라틴은 약 100킬로달톤(kD) 내지 약 200kD의 범위의 중량 평균 분자 질량을 갖는, 방법.
- [0327] 항목 39. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 젤라틴은 변성된 콜라겐을 포함하는, 방법.
- [0328] 항목 40. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 포유류 세포인, 방법.
- [0329] 항목 41. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 인간, 돼지, 개, 말 또는 소 세포인, 방법.
- [0330] 항목 42. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 종양 세포를 포함하는, 방법.
- [0331] 항목 43. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 섬유아세포를 포함하는, 방법.
- [0332] 항목 44. 이전의 항목 중 어느 하나에 있어서, 세포는 줄기세포를 포함하는, 방법.
- [0333] 항목 45. 하나 이상의 세포 및 약 0.8중량% 내지 약 15.7중량%의 젤라틴을 포함하는, 조성물.
- [0334] 항목 46. 항목 45에 있어서, 약 2.4중량% 내지 약 7중량%의 젤라틴을 포함하는, 조성물.
- [0335] 항목 47. 항목 45 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 약 9.3중량% 내지 약 14.6중량%의 젤라틴을 포함하는, 조성물.
- [0336] 항목 48. 항목 45 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 세포는 저온보존된 상태에서부터 해동된, 조성물.
- [0337] 항목 49. 항목 45 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 세포는 적어도 70%의 해동 후 생존능력을 갖는, 조성물.
- [0338] 항목 50. 항목 45 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 젤라틴은 약 100킬로달톤(kD) 내지 약 200kD의 범위의 중량 평균 분자 질량을 갖는, 조성물.
- [0339] 항목 51. 항목 45 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 젤라틴은 변성된 콜라겐을 포함하는, 조성물.
- [0340] 항목 52. 항목 45 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 세포는 포유류 세포인, 조성물.

- [0341] 항목 53. 항목 45 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 세포는 인간, 돼지, 개, 말 또는 소 세포인, 조성물.
- [0342] 항목 54. 항목 45 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 세포는 종양 세포를 포함하는, 조성물.
- [0343] 항목 55. 항목 45 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 세포는 섬유아세포를 포함하는, 조성물.
- [0344] 항목 56. 항목 45 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 세포는 줄기세포를 포함하는, 조성물.
- [0345] 항목 57. 항목 45 내지 56 중 어느 하나의 조성물을 포함하는 키트.

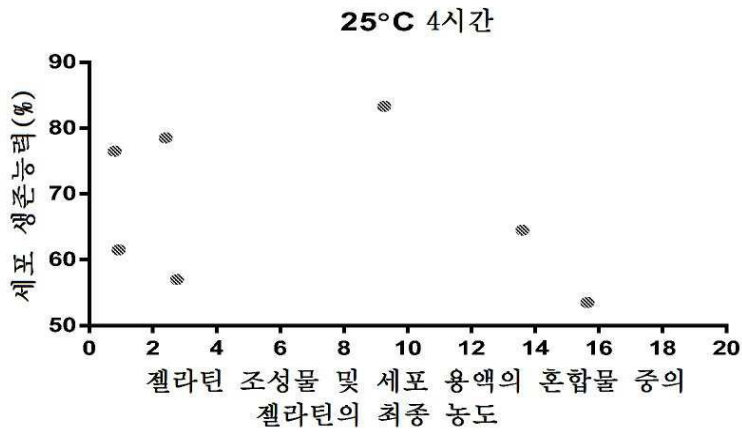
[0346] 본 발명의 범위는 상기 구체적으로 도시되고 기재된 것에 의해 제한되지 않는다. 당업자는 재료, 구성, 건축 및 치수의 도시된 예의 적합한 대안이 있다는 것을 인식할 것이다. 특허 및 다양한 공보를 포함하는 많은 참고문헌은 본 발명의 설명에서 인용되고 기재되어 있다. 이러한 참고문헌의 인용 및 토의는 단지 본 발명의 설명을 명확히 하도록 제공되고, 어떤 참고문헌이 본 명세서에 기재된 발명의 선행 기술이라는 인정이 아니다. 본 명세서에 인용되고 기재된 모든 참고문헌은 그 전문이 참고로 본 명세서에 포함된다. 본 명세서에 기재된 것의 변경, 변형 및 다른 실행은 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 당업자에게 일어날 것이다. 본 발명의 소정의 실시형태가 도시되고 기재되어 있지만, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 변경 및 변형이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 명확할 것이다. 상기 설명에 기재된 대상은 제한으로서가 아니라 오직 예시로서 제공된다.

**도면**

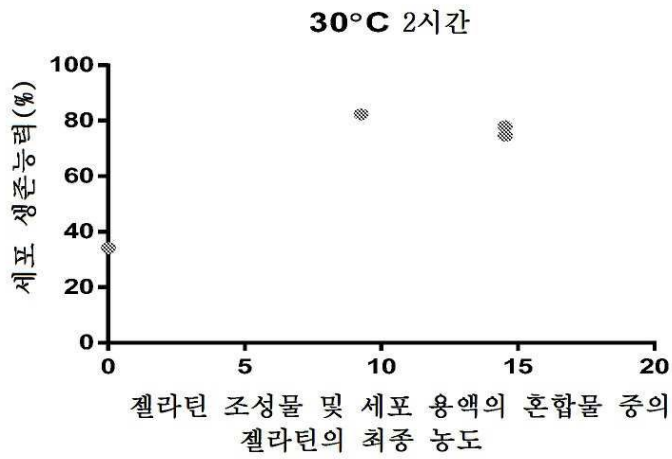
**도면1**



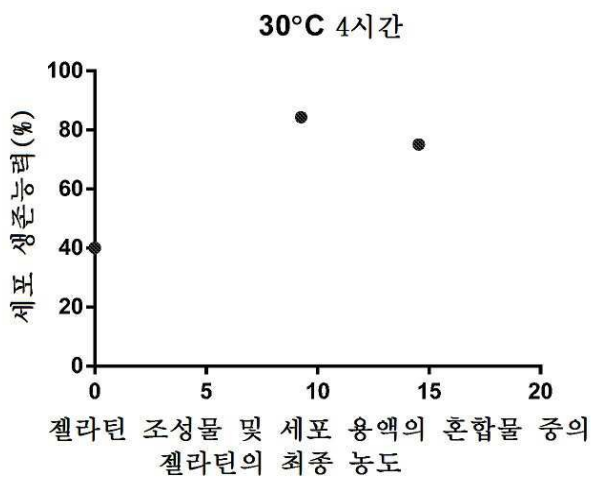
도면2



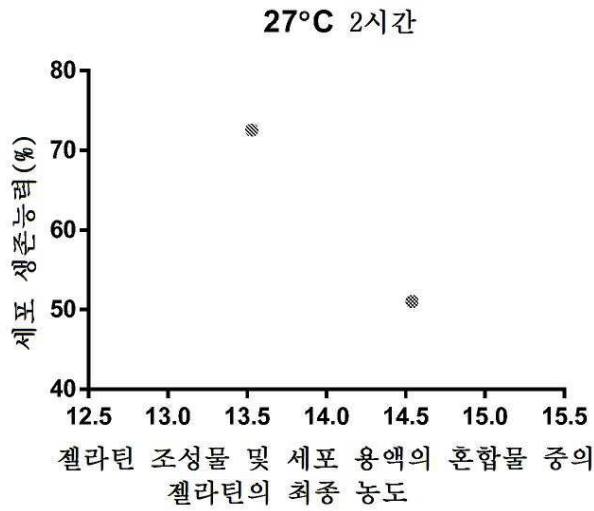
도면3



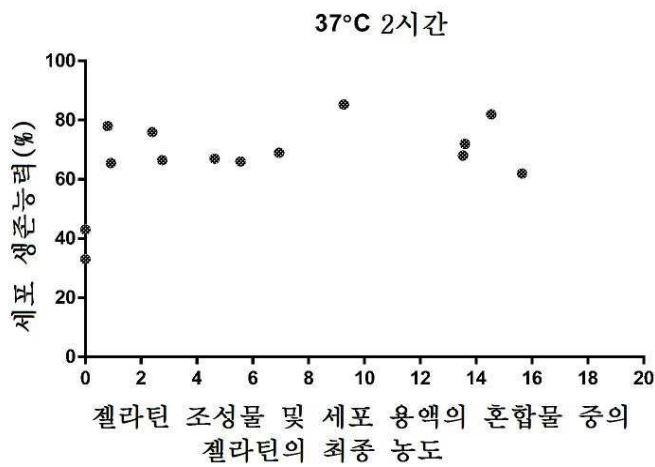
도면4



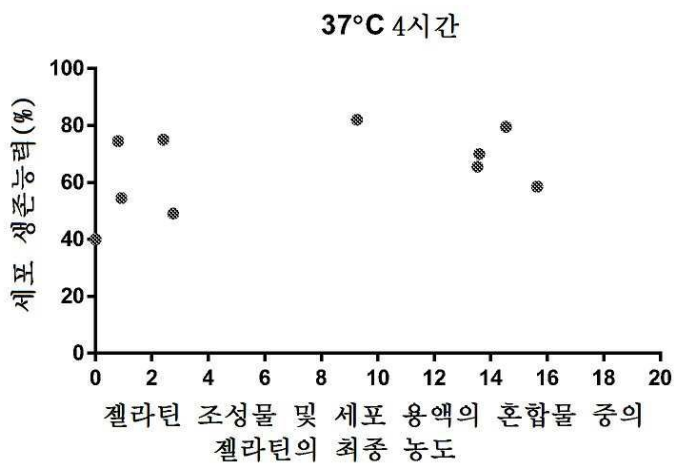
도면5



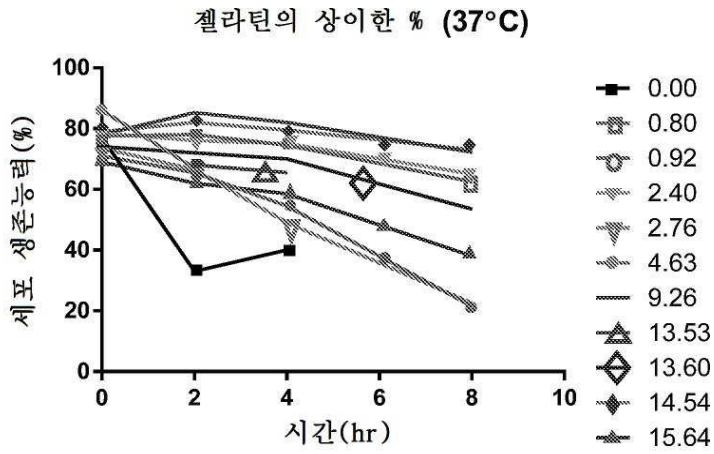
도면6



도면7



도면8



도면9

