(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 11 월 18 일 (18.11.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/230704 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 35/35 (2014.01) *C12N 5/077* (2010.01)
A61K 35/15 (2014.01) *C12N 5/0784* (2010.01)
A61K 39/39 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/006068

(22) 국제출원일: 2021 년 5 월 14 일 (14.05.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0058661 2020 년 5 월 15 일 (15.05.2020) KR

(71) 출원인: **서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: **조남혁 (CHO, Nam Hyuk)**; 01792 서울시 노원구 노원로 214, 6동 1006호, Seoul (KR). **이재원 (LEE, Jae Won)**; 02863 서울시 성북구 삼선교로 46-6, 305호, Seoul (KR). **장나윤 (JANG, Na Yoon)**; 03081 서울시 종로구 창경궁로22길 17-6, 103호, Seoul (KR). **김영근 (KIM, Young Keun)**; 06009 서울시 강남구 압구정로61길 37, 72동 1109호, Seoul (KR). **박범철 (PARK, Bum Chul)**; 04700 서울시 성동구 마장로 137, 213 동 802호, Seoul (KR).

(74) 대리인: **특허법인 태웅 (TW INTERNATIONAL PATENT AND LAW FIRM)**; 06749 서울시 서초구 강남대로 221, 209호, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

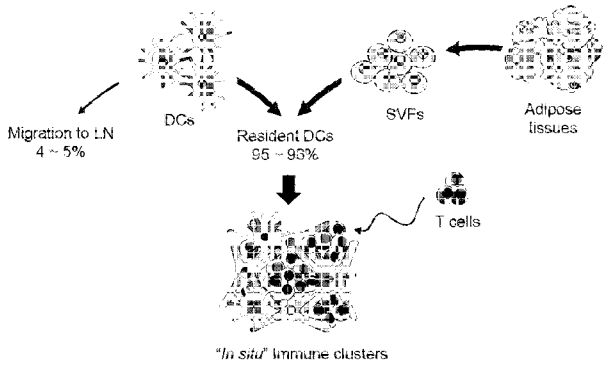
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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 제21조(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR ENHANCING IMMUNE RESPONSE BY USING ACTIVATION FUNCTION OF DENDRITIC CELLS OF STROMAL VASCULAR FRACTIONS ISOLATED FROM ADIPOSE TISSUES

(54) 발명의 명칭: 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 수지상세포의 활성화 기능을 이용한 면역 반응 증진용 조성물

[도15]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for enhancing an immune response by using the activation function of dendritic cells of stromal vascular fractions isolated from adipose tissues, and, particularly, to an antitumor compound for enhancing an immune response.

(57) 요약서: 본 발명은 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 수지상세포의 활성화 기능을 이용한 면역 반응 증진용 조성물에 관한 것으로, 특히 항종양 용도의 면역 반응 증진용 조성물을 개시한다.

WO 2021/230704 A1

명세서

발명의 명칭: 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 수지상세포의 활성화 기능을 이용한 면역 반응 증진용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 수지상세포의 활성화 기능을 이용한 면역 반응 증진용 조성물에 관한 것으로, 특히 항종양 용도의 면역 반응 증진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 수지상 세포는 적응 면역에서 항원-특이적 T 세포 반응을 강하게 유도한다. T 세포 반응에서 수지상 세포의 촉진은 특히 항종양 면역 반응에서 중요하다. 수지상 세포는 종양세포에서 특징적으로 보이는 종양 항원을 잡아 가장 가까운 림프절 (draining lymph node)로 운반한다. 림프절에서 수지상세포는 교차 제시(cross presentation)를 통해 세포독성 T 림프구로 가지고 있던 종양 항원을 제시한다. 항종양 효능에서의 중요한 역할과 임상 적용의 안전성을 기반으로, 수지상 세포는 암 면역치료법에 이용된다. 첫 임상시험은 1990년대에 있었지만, 치료 반응률은 20년 동안 15% 미만이었다. 낮은 반응률을 향상시키기 위해서 수지상세포 치료법은 몇 가지 장애물들을 극복해야 한다. 먼저 수지상세포가 림프절로 이동하고 적응 면역 반응을 개시하기 위해 T 세포와 만날 기회를 만드는 것이 중요하다. 여러 논문에서 15% 미만의 수지상 세포만이 림프절로 이동할 수 있으며 대부분이 주입한 부위에 남아있다고 보고하였다. 더욱이, 종양미세환경은 종양 부위 뿐만 아니라 종양 근처의 림프절의 항종양 면역 반응도 억제하는데, 이는 수지상 세포 기반 면역치료가 가진 능력을 제한한다. 그러므로 항원 특이적 면역 반응을 증가시키고 수지상 세포 기반 치료법이 가진 가능성을 완전히 이용하기 위해서는 주입한 부위에 남아있는 수지상 세포를 이용하고 종양미세환경의 효과를 피하는 것은 필수적이다.

[3] 수지상 세포는 적절한 T 세포 활성화를 위한 "림프성 기관의 특별화된 구획 (Speciallized compartments of lymphoid organs)"이라고 불리는 특별한 위치에서 T 세포와 만난다. 이 기관은 섬유 간질세포(fibroblastic reticular cells, FRC)와 내피 간질세포(ednothelial cell)를 포함하는 서로 다른 CD45- 비조혈 간질세포 (non-hematopoietic stromal cell)로 구성된다. 간질세포는 일반적으로 섬유아세포 마커인 포도플라닌(PDPN, gp38)과 내피세포 마커인 CD31(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)의 발현 확인으로 구분할 수 있다. PDPN+ CD31- FRC 는 수용성 항원을 전달하는 conduit system 을 구성하고 면역 세포가 이동할 수 있는 3차원 세포 네트워크를 형성함으로써 구조적인 지지를 제공한다. FRC에 의해 생산되는 케모카인인 CCL19과 CCL21은 CCR7+ T 세포와 수지상 세포를 불러온다. 그 결과, T 세포와 수지상 세포의 상호작용이 증가하고, 수지상세포의

성숙이 촉진되며 수지상 세포에 의한 항원 제시가 이루어진다. 또한 FRC는 인터루킨(IL)-7과 IL-15의 분비를 통해 T 세포와 수지상세포의 항상성을 조절한다. 추가적으로, FRC에서 발현되는 PDPN은 수지상세포의 이동성 (motility)을 촉진한다. 최근에, FRC에서 분비된 IL-6는 염색질 리모델링을 통해 CD8+ T 세포의 생존과 대사를 향상시키고 조직에 상주하는 기억 T 세포를 생산하도록 이끌었다. PDPN+CD31+ lymphatic endothelial cells (LEC)은 백혈구와 림프의 이동을 조정하는 유입 림프관과 유출 림프관을 구성하고, T 세포의 분화를 조절한다. PDPN-CD31+ blood endothelial cells(BEC)는 high endothelial venules(HEV)와 혈관을 구성한다. BEC는 혈류에서 림프구의 혈구 누출에 관여한다. 따라서 기질세포가 구조적이고 기능적으로 도움을 주기 때문에, 수지상 세포 기반 면역치료에서 수지상 세포는 완전한 항종양 T 세포 반응을 유도할 수 있는 기질세포의 도움이 필요하다. 그러나 기질 세포는 림프절 내에 단지 5% 미만만 존재하기 때문에 이러한 기질 세포를 분리하여 치료제에 직접 이용하는 것은 사실상 불가능에 가깝다.

[4] 본 발명은 몸에 상당량 존재하는 지방 조직으로부터 분리한 기질혈관분획(stromal vascular fraction, SVF)이 림프절의 기질 세포와 유사하게 수지상세포에 의한 항종양 T 세포 반응 유도를 향상킬 수 있음을 개시한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명의 목적은 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 수지상세포의 활성화 기능을 이용한 면역증진용 조성물을 제공하는 데 있다.

[6] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제 해결 수단

[7] 본 발명자들은 아래의 실시예에서 확인되는 바와 같이, 내장 지방조직과 피하 지방조직을 분리하여 혼합하고 그 혼합물로부터 분리한 기질혈관분획(stromal vascular fraction, SVF)이 표현형이나 기능에 있어서 림프절 기질세포와 유사한 세포들로 구성되어 있음과, 상기 SVF를 3차원 배양하여 얻은 SVF 스페로이드(spheroid)가 면역세포의 이동 통로가 되는 혈관을 형성할 수 있음을 확인하였고, SVF 스페로이드가 면역세포를 불러들이고 활성화시키는 케모카인 등 다양한 인자들(Spp1, Ccl8, Cxcl5, Postn, Cxcl16, Ccl17 등)를 높게 발현하고 또 수지상세포의 성숙과 생존을 조절하는 인자로 알려진 인자인 오스테오폰틴(osteopontin, Spp1)도 높게 발현함을 확인하였으며, 또 SVF 스페로이드가 시험관내 시험에서 수지상세포를 비롯한 면역세포를 유인하며 생체내 시험에서 수지상세포와 함께 생채내에서 이식될 때 수지상세포와 T 세포의 상호작용을 증진시킴을 확인하였다. 나아가 본 발명자들은 SVF 2차원 배양물을 수지상세포와 시험관내에서 공동배양하거나 특정 항원(ovalbumin, OVA)이 탑재된 수지상세포와 함께 생체내에 이식하였을 때 SVF 2차원

배양물이 수지상세포의 활성화를 촉진하고 수지상세포의 생존율을 향상시킴으로써 효과적으로 T 세포를 활성화시켜 항원 특이적 T 세포의 반응을 증진시킴을 확인하였으며, 특정 항원(OVA)을 발현하는 B16 멜라노마 세포(B16-OVA)가 이식된 마우스에 SVF 스페로이드가 그 항원(OAV)이 탑재된(OVA-loaded) 수지상세포와 함께 주입될 경우 종양이 성장이 억제되고 실험동물의 생존율도 향상됨을 확인하였다.

[8] 본 발명은 전술한 바의 실험 결과에 기초하여 제공되는 것으로, 본 발명은 일 측면에 있어서, 지방조직에서 분리된 기질혈관분획 특히 그 기질혈관분획의 스페로이드와 항원이 탑재된 수지상세포를 유효성분으로 포함하는 면역반응 증진용 조성물로 파악할 수 있다. 여기서 면역반응은 적응 면역 반응(Adaptive immune response), 바람직하게는 세포 매개 면역 반응(cell-mediated immune response) 더 바람직하게는 T 세포에 의한 면역반응을 의미한다.

[9] 본 발명에서, 지방조직에서 분리된 기질혈관분획은 2차원 배양물 형태 또는 3차원 배양물인 스페로이드 형태로 사용될 수 있으나, 바람직하게는 스페로이드 형태로 사용될 수 있다.

[10] 본 발명의 면역증진용 조성물은 수지상세포에 탑재된 항원이 바이러스 유래 항원일 경우 바이러스 감염증 치료 또는 예방을 위한 항바이러스용 면역증진용 조성물로 파악될 수 있고, 수지상세포에 탑재된 항원이 박테리아 등 병원성 미생물 유래 항원일 경우 그러한 미생물에 의한 감염증 치료 또는 예방을 위한 항미생물용 면역증진용 조성물로 파악될 수 있으며, 수지상세포에 탑재된 항원이 종양세포 유래 항원일 경우 종양 치료 또는 예방을 위한 항종양 면역증진용 조성물로 파악될 수 있다.

[11] 본 발명의 면역증진용 조성물은 임의의 바이러스 감염증, 임의의 박테리아 등 미생물 감염증 치료 또는 예방을 위한 용도로 사용될 수 있으며, 바람직하게는 임의의 종양 치료 또는 예방을 위한 항종양 용도로 사용될 수 있다.

[12] 본 발명에서, 수지상세포는 본 발명의 면역증진용 조성물이 투여되는 개체로부터 얻어진 자가(autologous) 수지상세포이거나, 다른 개체로부터 얻어진 동종의 수지상세포이거나 이종의 개체로부터 얻어진 이종의 수지상세포일 수 있다. 이종의 개체로부터 얻어진 수지상세포는 본 발명의 면역증진용 조성물이 투여되는 개체가 사람일 경우 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물로부터 얻어진 것일 수 있다. 이러한 수지상세포는 골수, 말초혈, 제대혈 유래일 수 있다.

[13] 본 발명에서, 수지상세포는 미성숙 수지상세포 또는 성숙 수지상세포일 수 있으며, 바람직하게는 성숙 수지상세포일 수 있다. 성숙 수지상세포는 미성숙 수지상세포에 비해 세포 표면에 MHC II형 분자, T 세포 보조자극인자인 CD80, CD86, CD83 등과 면역 자극 인자인 사이토카인 IL-12, IL-10, TNF 등을 고농도로 발현하며, 형태적으로 미성숙 수지상세포는 부드러운 표면을 갖는 원형이지만 성숙 수지상세포는 그 표면이 거칠고 다중 위족(multiple pseudopodia) 갖는다.

미성숙 수지상세포를 성숙화시키는 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 그러한 방법으로서 예컨대 골수, 말초혈, 제대혈에서 분리되어 마이크로파아지, 수지상세포 등으로 분화할 수 있는 CD34+ 조혈세포 등의 미분화 전구세포를 IFN-α 등의 수지상세포 성숙화 인자와 함께 배양시키는 방법(유럽특허 제922,758호), GM-CSF, TNF-α, IL-3 등의 수지상세포 성숙화 인자와 함께 배양하는 방법(유럽특허 제663,930호), 조혈 성장 인자와 사이토카인의 혼합물과 배양하는 방법(WO 95/28479), LPS(lipopolysaccharide) 등과 LPS(lipopolysaccharide)와 함께 배양하는 방법(Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2011, 300, C1205-C1214; Annu. Rev. Immunol., 2003, 21, 335-376) 등이 예시될 수 있다. 본 명세서에서 인용되는 문헌은 상기 문헌을 포함하여 모두 본 명세서의 일부로서 간주된다.

[14] 본 발명에서, 지방조직에서 분리된 기질혈관분획(SVF)은 효소적 분리 방법(Enzymatic isolation methods)과 기계적 분리 방법(Mechanical isolation methods)에 의해 지방조직으로부터 분리되어 얻어질 수 있다.

[15] 효소적 분리 방법은 먼저 지방조직 또는 지방 흡입물(Lipoaspirate)을 PBS, LBS(Lactated Ringer's solution), HBSS(Hank's Balanced Salt Solution) 등의 수용성 염 용액(aqueous salt solution)으로 2~3회 세척하고, 세척한 지방조직 또는 지방 흡입물에 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 등을 분해하는 효소를 처리한다. 이러한 효소 처리는 통상 37℃에서 30분 내지 2시간 동안 교반(agitating)하면서 이루어진다. 효소 처리 후에는 원심분리하게 되는데 원심분리에 의해 효소 처리된 지방조직 또는 지방흡입물은 (i) 지방조직이나 오일층과 (ii) 수용액층 그리고 (ii) 펠릿(pellet)층으로 나뉘어지는데, 나머지 층은 버리고 펠릿층을 수득하게 된다. 이 펠릿에 기질혈관분획이 함유되어 있다.

[16] 이러한 효소적 분리 방법에 있어서, 세포외기질 등을 분해할 목적으로 사용될 수 있는 효소는 클로스트리듐 히스토리티쿰(*Clostridium histolyticum*)으로부터 분리된 제1 유형의 콜라게나아제(collagenase)나 제2 유형의 콜라게나아제를 비롯하여, *P. polymyxa*로부터 분리된 중성 단백 가수분해 효소(neutral protease)인 디스파아제(dispase), *G. stearothermophilus*나 *B. thermoproteolyticus*로부터 분리된 서모리신(thermolysin) 등을 사용할 수 있다. 또한 이러한 용도로 시판되는 효소 혼합물 예컨대 제1, 제2 유형의 콜라게나아제와 디스파아제 효소 혼합물인 CIzyme™ AS(Vitacyte LLC, Indianapolis, Indiana) 또는 제1, 제2 유형의 콜라게나아제와 서모리신 효소 혼합물인 Liberase™ Research Grade(Roche Diagnostic, Based, Switzerland) 등을 사용할 수도 있다.

[17] 상기 콜라게나아제 등과 더불어 DNA 분해 효소 등 핵산분해소가 세포를 분리할 때 죽은 세포로부터 흘러나온 염색체를 분해함으로써 결과적으로 세포 분리의 효율성을 향상시킬 목적으로 사용될 수도 있다.

[18] 기계적 분리 방법은 상기 효소적 분리 방법에서처럼 세척하고 원심분리하여 펠릿을 회수함으로서 이루어지는데, 원심분리 전 펠릿의 회수를 용이하게

위하여 그 세척물에 대해 교반/진동(shaking/vibrating)이 수행될 수도 있다.

[19] 지방조직으로부터 기질혈관분획의 분리 방법과 관련해서 더 구체적인 것은 문헌[Aronowitz et al. SpringerPlus (2015) 4:713] 등을 참조할 수 있다.

[20] 이러한 기질혈관분획은 림프구, 지방세포 전구체, 지방세포-유래 기질 세포, 섬유아세포, 내피세포, 주피세포(pericytes)와 같은 다양한 세포로 구성되어 있다(Stem Cell Res Ther 2017 Jun 15;8(1):145). SVF를 배양하면 림프구들은 죽어서 제거되고 부착성을 가진 여러 종류의 기질 세포를 얻을 수 있다(Cytotherapy 15, 641-648, 2013).

[21] 본 발명에서, 기질혈관분획은 임의의 포유동물의 지방조직으로부터 수득할 수 있으며, 보다 바람직하게는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이의 지방조직으로부터 수득할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 인간, 마우스, 래트 또는 원숭이로부터 수득할 수 있으며, 가장 바람직하게는 인간 또는 마우스로부터 수득할 수 있다.

[22] 또 본 발명에서, 기질혈관분획은 임의의 지방조직으로부터 얻어질 수 있다. 피하 지방조직(subcutaneous fat tissue)이나 기관 주위의 지방조직인 내장 지방조직(visceral fat tissue)으부터 얻어질 수 있으며, 또 갈색 지방조직이나 백색 지방조직으로부터 얻어질 수 있다.

[23] 또 본 발명에서 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 2차원 배양물은 기질혈관분획을 2차원으로 단층 배양하여 세포 배양물의 한쪽면이 배양 접시 등의 배양면에 붙어 자라게 배양한 것을 말한다.

[24] 또 본 발명에서 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 스페로이드는 지방조직에서 분리된 기질혈관분획을 3차원 배양하여 구체 모양으로 얻어지는 것으로 당업계에서 이러한 스페로이드를 얻기 위한 다양한 3차원 배양 방법이 공지되어 있다. 그러한 방법으로서 예컨대 현적배양(haning-drop cultures) 방법(Biotechnol Bioeng 2003, 83(2):173-80; Trends Biotechnol 2004, 22(4):195-202; Crit Rev Oncol Hematol 2000, 36(2-3):107-22), 표면 유착 방지 처리 마이크로 웰 플레이트(microwell plates with non-adhesive surface)를 이용한 배양 방법(Cancer Res 1977, 37(10):3639-43; In Vitro Cell Dev Biol Anim 2001, 37(10):656-67), 미세 제작 구조틀(microfabricated microstructures)을 이용한 배양 방법(Biomed Microdevices 2008, 10(2):197-202; Tissue Eng 2007, 13(8):2087-94), 회전 바이오리액터를 이용한 배양 방법(In Vitro Cell Dev Biol Anim 1997, 33(6):459-66; Nat Med 1998, 4(8):901-7), 표면 조절 배양기 또는 스캐폴드(surface modified substrates or scaffolds)를 이용한 배양 방법(Tissue Eng 2007, 13(7):1455-68; Tissue Eng 2006, 12(5):1357-68), 외력(external forces)을 이용한 배양 방법(Cell Transplant 2006, 15(6):521-32; Biotechnol Bioeng 2007, 98(3):694-700), 스페로이드 칩(spheroid on a chip)을 이용한 배양 방법(Biomaterials 2007, 28(3):559-66;Biomaterials 2006, 27(36):6032-42) 등을 들 수 있다. 지방조직에서 분리된 기질혈관분획을 배양하여 스페로이드를 얻기 위한 3차원 배양 방법과

관련하여 더 구체적인 것은 문헌[Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2020, 63(6):245-51] 등을 참조할 수 있다.

[25] 또 본 발명에서 수지상세포에의 항원 탑재(loading)는 항원 처리(antigen processing)에 의해 수지상세포의 표면에 MHC와 복합체 형태로 항원 펩타이드가 제시되도록 함으로써 이를 선택적으로 인지하는 T 세포 수용체를 가진 T 세포 등의 활성을 유도함으로써 항바이러스, 항미생물, 항종양 등의 면역반응 높이기 위한 것이다. 이러한 수지상세포에의 항원 탑재 방법으로서는 펩타이드 항원 자체를 도입하여 사용하거나, RNA 등 항원 발현 유전자, 항원 발현 바이러스 벡터, 항원에 결합한 HIV(human immunodeficiency virus)의 Tat 펩타이드 등의 세포투과성 펩타이드를 처리하여 수지상세포 내에서 항원 단백질이 발현하도록 하는 방법 등이 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명의 실시예에서처럼 Fe3O4-ZnO 코어(Fe3O4) 셸(ZnO) 구조의 나노입자(Fe3O4-ZnO core-shell nanoparticles, FZ-NP)를 이용할 수도 있다. 수지상세포에의 항원 탑재 방법과 관련하여 더 구체적인 것은 문헌[Immunol Res. 2017, 65:798-810] 등을 참조할 수 있다.

[26] 또 본 발명에서 항원은 바이러스 유래 항원, 박테리아 등 병원성 미생물 유래 항원, 종양 유래 항원일 수 있는데, 종양 항원은 암세포 유래 임의의 항원 즉 표면 발현 단백질, 표면 발현 수용체, 종양세포 내부의 펩타이드나 단백질, 종양세포의 용해물 등일 수 있다.

[27] 이러한 종양 항원은 암세포에서만 발현되거나 정상세포에 비해 암세포에서 과발현되는 것이 바람직하나데, 예컨대 교모세포종(glioblastoma)에서 발현되는 EGFRvIII(epidermal growth factor receptor variantIII), 역형성 갑상선암이나 유방암, 폐암, 신경교종(glioma) 등에 과발현되는 EGFR(Epidermal growth factor receptor), 유두성 갑상선 암(papillary thyroid cancer) 등에서 과발현 메타스틴 수용체(Metastin receptor), 유방암 등에서 과발현되는 ErbB 계열의 수용체 타이로신 카이나제(Receptor tyrosine kinases), 유방암, 방광암, 담낭암(Gallbladder cancers), 담관암(Cholangiocarcinomas), 위식도접합부암(esophagogastric junction cancers) 등에서 과발현되는 HER2(Human epidermal growth factor receptor 2), 육두성 신암종 등에서 과발현되는 타이로신 카이나제-18-수용체(c-Kit), 식도선암 등에 과발현되는 HGF 수용체 c-Met, 유방암 등에서 과발현되는 CXCR4 또는 CCR7, 전립선암에서 과발현되는 엔도테린-A 수용체, 직장암 등에서 과발현되는 PPAR-δ(peroxisome proliferator activated receptor δ), 난소암 등에서 과발현되는 PDGFR-α(Platelet-derived growth factor receptor α), 간암, 다발성 골수종 등에서 과발현되는 CD133, 폐암, 대장암, 위암, 췌장암, 유방암, 직장암, 결장암, 갑상선 수질암 등에서 과발현되는 CEA(carcinoembryonic antigen), 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 유방암 등에서 과발현되는 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule), 신경모세포종 등에서 과발현되는 GD2(disialoganglioside), 간세포암 등에서 과발현되는 GPC3(Glypican 3), 전립선암 등에서 과발현되는

PSMA(Prostate Specific Membrane Antigen), 난소암, 유방암, 결장암, 폐암, 췌장암 등에서 과발현되는 TAG-72(tumor-associated glycoprotein 72), 흑색종 등에서 과발현되는 GD3(disialoganglioside), 혈액암, 고형암 등에서 과발현되는 HLA-DR(human leukocyte antigen-DR), 진행성 고형암 등에서 과발현되는 MUC1(Mucin 1), 진행성 폐암(advanced non-small-cell lung cancer) 등에서 과발현되는 NY-ESO-1(New York esophageal squamous cell carcinoma 1), 비인두종양(Nasopharyngeal neoplasms) 등에서 과발현되는 LMP1(Latent membrane protein 1), 폐암, 비호지킨 림프종, 난소암, 결장암, 대장암, 췌장암 등에서 과발현되는 TRAILR2(tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor), 혈관 신생 인자 수용체인 VEGFR2(vascular endothelial growth factor receptor 2), 간세포암 등에서 과발현되는 HGFR(hepatocyte growth factor receptor) 등일 수 있으며, 또한 암 줄기세포의 표면 항원인 CD44, CD166 등일 수 있다. 당업계에는 정상세포에 비해 암세포에서 과발현되는 많은 항원이 알려져 있으며, 상기 예시된 것 이외의 기타의 종양 항원과 관련해서 더 구체적인 것은 문헌[Anne T Collins et al. Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. Cancer Res. 2005 Dec 1;65(23):10946-51], 문헌[Chenwei Li et al. Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. Cancer Res. 2007 Feb 1;67(3):1030-7], 문헌[Shuo Ma et al. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. Int J Biol Sci. 2019 Sep 7;15(12):2548-2560], 문헌[Dhaval S Sanchala et al. Oncolytic Herpes Simplex Viral Therapy: A Stride Toward Selective Targeting of Cancer Cells. Front Pharmacol. 2017 May 16;8:270] 등을 참조할 수 있다.

[28] 본 발명의 면역증진용 조성물은 그것이 항종양 용도로 사용될 경우 수지상세포에 탑재되는 항원을 발현하는 임의의 암세포에 대해 사용될 수 있다. 암세포라면 식도암, 위암, 대장암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 유방암, 자궁 경부암, 자궁 내막체암, 난소암, 전립선암, 고환암, 흑색종, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 골암, 결합 조직암, 피부암, 뇌암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종, 다발성 골수종, 혈액암 등 암종을 불문한다.

[29] 본 발명에서 항종양은 암세포의 사멸, 암세포의 생존능 저하, 암세포의 증식 억제에 따른 암이 가지는 병리적 증상의 억제나 지연, 암 전이 억제, 암 재발 억제를 포함하는 의미이다.

[30] 본 발명의 면역증진용 조성물은 허가된(approved) 임의의 항바이러스제, 임의의 항미생물제(즉 항생제), 임의의 항암제와 병용 또는 혼합되어 사용될 수 있다. 항암제와 병용 또는 혼합되어 사용될 경우 그러한 항암제로는 대사 길항제, 알킬화제, 토포아이소머라제 길항제, 미세소관 길항제, 식물유래 알칼로이드 등 암세포에 세포독성을 나타내는 임의의 항암제, 임의의 사이토카인 의약품, 임의의 항체 의약품, 임의의 면역관문 억제제 의약품, 임의의 세포 치료제(car-T cell therarpy, car-NK cell therapy) 의약품 등을 포함한다. 구체적으로 탁솔, 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴,

제피티닙, 보르테조밉, 수니티닙, 카보플라틴, 시스플라틴, 리툭시맙, 엘로티닙, 소라페닙, IL-2 의약품, INF-α 의약품, INF-γ 의약품, 트라스투주맙, 블리나투모맙, 이필리무맙, 펨브롤리주맙, 니볼리주맙, 아테졸리주맙(Atezolizumab), 두발루맙(Durvalumab), 베바시주맙, 세툭시맙, 티사젠렉루셀(Tisagenlecleucel, 킴리아), 액시캡타젠 실로루셀(Tisagenlecleucel Axicabtagene Ciloleucel, 예스카타) 등이 예시될 수 있으며, 이들 예시된 항암제 이외에도 당업계에 공지된 여타의 항암제도 제한없이 본 발명의 조성물과 혼합되어 사용되거나 병용 사용될 수 있다.

[31] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하여 투여 경로에 따라 당업계에 공지된 통상의 방법으로 제제화되어 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

[32] 그러한 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제는 인체에 특별한 독성을 가지지 않으면서 약물의 활성이나 특성을 저해하지 않는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물(예를 들면, 식염수 및 멸균수), 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 링거액, 완충제, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 덱스트란, 알부민, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 특히 본 발명의 약제학적 조성물이 액상 용액으로 제제화될 경우 적합한 담체 또는 부형제로서는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등의 성분 중에서 하나 이상의 성분을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 의약품 첨가제 등을 첨가하여 사용할 수 있다.

[33] 본 발명의 약제학적 조성물이 비경구 투여제 특히 주사제로 제제화될 수 있는데, 이 경우 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 특히 용액, 현탁액 등의 형태로 제제화할 수 있다.

[34] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 피부, 병변 내(intralesional), 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복 내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설하, 질 내, 직장 경로, 신장 캡슐 등 비경구 투여 경로에 의하여 투여될 수 있다.

[35] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량(유효량)은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 결정할 수 있다. 바람직한 양태에 있어 본 발명의 약제학적 조성물은 단위 용량 형태의 주사제로 제조되며, 단위 용량

형태의 주사제로 제조될 경우 본 발명의 약제학적 조성물의 단위 용량 당 포함되는 기질혈관분획 스페로이드나 수지상세포는 10^2-10^8 cells 범위일 수 있다.

[36] 다른 양태에 있어서, 본 발명은 전술한 바의 본 발명의 면역증진용 약제학적 조성물을 유효량으로 환자 등의 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 면역증진 방법에 관한 것이다. 본 발명의 면역증진용 조성물이 바이러스 항원이 탑재된 수지상세포를 포함함으로써 항바이러스 용도로 사용될 경우 상기 면역증진 방법은 바이러스 감염증 치료 또는 예방 용도일 수 있고, 본 발명의 면역증진용 조성물이 박테리아 등 병원성 미생물 항원이 탑재된 수지상세포를 포함함으로써 항미생물 용도로 사용될 경우 상기 면역증진 방법은 병원성 미생물의 감염증 치료 또는 예방 용도일 수 있으며, 본 발명의 면역증진용 조성물이 종양 항원이 탑재된 수지상세포를 포함함으로써 항종양 용도로 사용될 경우 상기 면역증진 방법은 항종양(암 치료 또는 예방) 용도일 수 있다.

[37] 본 발명의 면역증진 방법은 본 발명의 면역증진용 조성물에 포함된 기질혈관분획의 스페로이드와 항원이 탑재된 수지상세포가 그 항원에 특이적인 T 세포를 활성시켜 항바이러스, 항미생물, 항종양 활성을 나타내게 함으로써 가능해진다. 따라서 본 발명의 면역증진 방법은 그러한 항원을 가지는 임의의 바이러스 감염증, 그러한 항원을 가지는 미생물 감염증, 그러한 항원을 가지는 임의의 암종에 대해서 적용이 가능하다.

[38] 본 발명의 면역증진 방법이 항종양 용도로 암 치료 또는 예방을 위해 사용될 경우 다른 암 치료법과 제한없이 병용되어 사용될 수 있다. 예컨대 앞서 예시된 세포독성 항암제, 사이토카인 의약품, 항체 의약품, 면역관문 억제제 의약품, 세포 치료제(car-T cell therarpy, car-NK cell therapy) 의약품, 방사선 치료 요법, 수술 요법 등이 본 발명의 조성물의 투여 전.후나 동시 투여 방식으로 병용 사용될 수 있다.

[39] 본 발명의 치료 방법에서 유효량은 그 적용 대상인 환자 등에 의료 전문가 등의 제언에 의한 투여 기간 동안 본 발명의 조성물이 투여될 때, 암 치료 또는 예방 효과 등 의도한 의학적 효과를 나타낼 수 있는, 본 발명의 조성물이 투여되는 양을 말한다. 이러한 유효량은 전술한 바와 같이 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태 등에 따라 의료 전문가 등 당업자가 적절히 결정할 수 있다.

[40] 다른 측면에 있어서는 본 발명은 지방조직에서 분리된 기질혈관분획 특히 그 기질혈관분획의 스페로이드와 수지상세포를 유효성분으로 포함하는 면역반응 증진용 조성물 또는 이러한 조성물을 유효량으로 환자 등의 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 면역증진 방법으로 파악할 수 있다.

[41] 전술한 바와 같이 아래의 실시예에서 본 발명자들은 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 스페로이드가 수지상세포와 함께 생채내에서 이식될 때 수지상세포와 T 세포의 상호작용을 증진시킴을 확인하였으며, 또 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 2차원 배양물을 수지상세포와 시험관내에서

공동배양하였을 때 수지상세포의 활성화를 촉진하고 수지상세포의 생존율을 향상시킴으로써 효과적으로 T 세포를 활성화시킴을 확인하였다.

[42] 이러한 결과들은 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 스페로이드와 수지상세포가 함께 투여될 때 면역반응, 구체적으로 세포 매개 면역반응(cell-mediated immune response) 더 구체적으로는 T 세포에 의한 면역반응을 증진시킴을 보여주는 것이라 할 수 있다.

[43] 본 발명의 면역반응 증진용 조성물이나 그러한 조성물을 투여하는 면역증진 방법도, 혈관기질분획과 항원이 탑재된 수지상세포를 포함하는 본 발명의 면역증진용 조성물이나 이러한 조성물을 이용한 면역증진 방법과 관련하여 전술한 바와 같이, 항바이러스 용도, 항미생물 용도 또는 항종양 용도로 사용될 수 있으며, 이들 조성물과 방법도 전술한 바와 같이 구체화되어 사용될 수 있다.

[44] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 지방조직에서 분리된 기질혈관분획 특히 그 기질혈관분획의 스페로이드를 유효성분으로 포함하는 수지상세포 성숙화 조성물에 관한 것이다.

[45] 전술한 바와 같이 아래의 실시예에서 본 발명자들은 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 스페로이드가 면역세포를 불러들이고 활성화시키는 케모카인 등 다양한 인자들(Spp1, Ccl8, Cxcl5, Postn, Cxcl16, Ccl17 등)를 높게 발현하고 또 수지상세포의 성숙과 생존을 조절하는 인자로 알려진 인자인 오스테오폰틴(osteopontin)을 또한 높게 발현하며, 수지상세포와 시험관내에서 공동배양하였을 때 기질혈관분획의 2차원 배양물이 수지상세포의 활성화를 촉진하고 수지상세포의 생존율을 향상시킴을 확인하였다.

[46] 이러한 결과들은 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 스페로이드가 수지상세포의 성숙화를 유도하고 나아가 활성화, 생존율 향상을 유도할 수 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

[47] 수지상세포를 항종양 등의 용도로 면역 치료 등에 활용하기 위해서는, 체외(ex vivo)에서 수지상세포를 분화 제조하는 기술과 더불어 T 세포 면역 반응을 효과적으로 유도하기 위한 성숙화 기술이 필수적이다. 전술한 바와 같이 성숙 수지상세포는 다량의 IL-12, IL-10, TNF 등의 사이토카인을 발현하며, 이들 사이토카인은 T 세포 면역반응 유도에 직접적으로 관여한다. 성숙화를 통한 이러한 변화에 의해 수지상세포의 T 세포 면역반응 유도능이 크게 증가하게 된다.

[48] 본 발명의 수지상세포 성숙화 조성물은 수지상세포의 성숙화 인자로 당업계에 공지된 IFN-α, IL-1β, IL-6, IL-3, TNF-α, IFN-γ, PGE2, OK432(Picibanil) 등을 추가로 포함할 수 있으며, RPMI(Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지, serum free 배지인 X-VIVO15 등에 첨가되어 사용될 수 있다.

[49] 본 발명의 수지상세포 성숙화 조성물은 약제학적 조성물로 제조되어 환자 등 대상체에 투여되어 사용되거나, 수지상세포를 체외(ex vivo)에서 성숙화, 증식시키기 위한 목적으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[50] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 수지상세포의 활성화 기능을 이용한 면역반응 증진용 조성물, 구체적으로 지방조직에서 분리된 기질혈관분획 특히 그 기질혈관분획 스페로이드와 항원이 탑재된 수지상세포를 유효성분으로 포함하는 면역반응 증진용 조성물, 지방조직에서 분리된 기질혈관분획 특히 그 기질혈관분획의 스페로이드와 수지상세포를 유효성분으로 포함하는 면역반응 증진용 조성물 등을 제공할 수 있다.

[51] 본 발명의 조성물은 항바이러스 용도, 항미생물 용도, 항종양 용도 등으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[52] 도 1 내지 도 5는 지방조직에서 분리한 지질혈관분획을 배양하였을 때 림프노드 기질세포와 유사한 특성과 기능을 가짐을 보여주는 결과이다.

[53] 도 6은 지방조직에서 분리한 지질혈관분획의 스페로이드가 면역세포의 이동 통로가 되는 혈관을 형성할 수 있음을 보여주는 결과이다.

[54] 도 7 내지 도 11은 지방조직에서 분리한 지질혈관분획의 스페로이드가 수지상세포를 유인하고 수지상세포가 T 세포와 상호작용하는 것을 증진시키며, T 세포가 대부분 CD4+ 효과기 T 세포로 분화되어 면역반응을 수행하는 것임을 보여주는 결과이다.

[55] 도 12 및 도 13은 지방조직에서 분리한 지질혈관분획의 2차원 배양물 또는 그 스페로이드가 수지상세포의 생존율을 향상시키고 항원이 탑재된 수지상세포와 함께 항원 특이적 T 세포의 면역반응을 증진시킴을 보여주는 결과이다.

[56] 도 14는 지방조직에서 분리한 지질혈관분획의 스페로이드가 종양 항원(OVA)이 탑재된 수지상세포와 함께 종양 항원(OVA)을 발현하는 B16 멜라노마 세포(B16-OVA)가 이식된 마우스에 투여될 때 종양의 크기를 감소시키고 마우스 생존율을 향상시킴을 보여주는 결과이다.

[57] 도 15는 본 발명의 개념도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[58] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[59]

[60] 실시예

[61] **1.** 시료 및 실험 방법

[62] **1.1** 마우스

[63] C57BL/6 야생형 마우스(Koatech, Seoul, Republic of Korea)와 C57BL/10NAGCSAni-(KO) Rag2(H-2b) 마우스 (Taconic Biosciences, NY, US)는 서울대학교 의과대학에 위치한 특정 병원체 부재 시설에서 사육되었다. 모든

마우스들은 수컷이며 6~12주령의 마우스들을 사용했다. 모든 마우스 실험들은 서울대학교 동물실험 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)에 의해 승인되었다(IACUC Number : SNU-150115-2-7, SNU-160212-2-7, SNU-171123-4-7).

[64] **1.2 기질혈관분획(SVF)의 분리와 스페로이드 배양**

[65] 내장(Viscera)과 피부(Skin)에서 지방조직을 모으고 잘게 자른 뒤, 조직은 0.8mg/ml 콜라겐 분해효소와 100ug/ml DNA 분해효소 I(DNaseI)이 들어있는, 3% bovine serum albumin(BSA)(MP biomedicals, CA, US), 1.0mM CaCl2 (Sigma-Aldrich, MO, US), 0.8mM MgCl2 (Sigma-Aldrich, MO, US)가 포함된 살균된 Hank's balanced salt solution (Intron, Seoul, Republic of Korea)에서 1시간 동안 170rpm으로 37℃의 진탕배양기에서 배양되었다. 3분 동안 500g의 조건에서 원심분리 후, 상층액은 제거하고 펠렛인 기질혈관분획(Stromal vascular fraction, SVF)을 분리하였다(도 1a). 그리고나서 10% fetal bovine serum(Gibco, MA, US)과 1% penicillin/streptomycin(Gibco, MA, US)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(Welgene, Daegu, Republic of Korea)에서 배양하였다.
스페로이드(spheroids)를 만들기 위해선, 6~10일 동안 배양한 SVF를 트립신으로 처리하여 수를 세었다. 배양된 SVF는 스페로이드 필름(Incyto, Cheonan, Republic of Korea)에 분주하였다. SVF-스페로이드 361개(19X19)가 스페로이드 필름에서 형성되었음을 확인하고, 이를 이틀 이상 배양한 뒤, SVF-스페로이드를 실험에 사용했다.

[66] **1.3 재조합 ZnO-결합 펩타이드(ZBP)-난백알부민(OVA) 단백질의 생산**

[67] 재조합 ZnO-결합 펩타이드(ZBP)-난백알부민(OVA) 단백질(ZBPOVA)을 생산하기 위해서, 먼저 B16MO5 세포주의 유전체 DNA를 DNeasy Blood & Tissue Kits(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 추출했다. 추출된 DNA는 PCR로 증폭(Forward primer: 5'-TTT GAA TTC ATG GGC TCC ATC GGT GCA-3' 서열번호 1, Reverse primer: 5'-AAA CTC GAG AGG GGA AAC ACA TCT GCC-3', EcoRI, XhoI restriction sites underlined)하고 3xZBP (BamHI-RPHRKGGDARPHRKGGDARPHRKGGDA-EcoRI, 서열번호 3)로 암호화된 pET23d-ZBP vector에서 복제되었다. 복제된 벡터는 pET23d-ZBPOVA는 제조사의 설명서에 따라 *E. coli* HIT Competent BL21 균주(RBCBioscience, New Taipei City, Taiwan)로 형질전환 되었다. ZBPOVA는 이전에 설명한 방법(Nature methods 3, 55-64, 2006; Biochemistry and Molecular Biology Education 39, 28-37, 2011)에서 적절히 개조된 프로토콜로 정제되었다. 간단하게, isopropylthiogalactoside (IPTG; 0.1mM)에 의해 단백질 발현이 유도된 *E. coli* 배양액을 리소자임 (1mg/ml)과 단백질분해효소 억제제 칵테일이 추가된 얼음처럼 차가운 완충액(300mM NaCl, 50mM phosphate, pH=8.0)으로 30분 동안 용해시키고 추가로 초음파 처리에 의해 용해되었다. 용해물은 원심분리하고 상층액을 모아 여과하고 AKTAstart(GEHealthcare, IL, US)와 HisTrap™

FF(GEHealthcare, IL, US)를 사용하여 컬럼으로 정제하였다. 단백질은 밤새 4℃ PBS에서 투석했다. 내독소는 이전에 설명된 바와 같이(Microbial cell factories 10, 57, 2011) Triton X-114를 이용해서 정제된 단백질에서 제거했다. 정제된 단백질의 내독소 오염 여부는 제조업체의 지침에 따라 Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, US)를 사용하여 확인했다. 정제된 ZBPOVA 단백질은 SDS-PAGE로 정량화하고 이후에 사용하기 전까지 -80℃에서 보관했다.

[68] **1.4 골수유래수지상세포 분리, 항원 전달과 성숙**

[69] 이전에 설명된 바와 같이(Nat Nanotechnol **6**, 675-682, 2011) 골수는 분리되어 수지상세포로 분화되었다. 간단하게 설명하자면, Rag2 결핍(knock-out) 마우스의 골수는 분리되고 10% FBS, 1.5ng/ml recombinant mouse GM-CSF(PeproTech, NJ, US), 1.5ng/ml mouse IL-4(PeproTech, NJ, US), 1% penicillin/streptomycin, 50μg/ml gentamicin(Gibco, MA, US), 2mM L-glutamine(Gibco, MA, US), 50nM β-mercaptoethanol(Gibco, MA, US)가 추가된 Iscove's modified Eagle medium(IMDM)(Gibco, MA, US)에서 배양되었다. 미성숙 수지상세포는 6~8일 동안 배양되었다. 배지는 하루 걸러 교체해주었다, 미성숙 골수유래수지상세포(BMDC)로 내부 항원 운반을 위해 Fe3O4-ZnO 코어 셸 구조의 나노입자(Fe3O4-ZnO core-shell nanoparticles, FZ-NP)이 사용되었다. 100ug FZ-NPs는 PBS로 3번 wash하고, FZ-NPs는 20ug ZBP-OVA와 서로 결합하도록 1시간 동안 상온에서 배양항쓰다. 그 뒤, ZBP-OVA와 FZ-NPs(NP-OVA)는 IMDM으로 3번 wash하였다. 다음 1×10^6 수지상세포는 37℃에서 1시간 동안 NP-OVA와 배양하였다. 성숙 과정을 위해, 수지상세포는 1ug/ml 지질다당류(LPS, lipopolysaccharide)로 16~18시간동안 처리하였다. LPS에 의해 성숙된 수지상세포는 실험 전에 IMDM으로 3번 wash하였다.

[70] **1.5 유세포 분석과 항체**

[71] 세포는 10% goat serum(Thermo Fisher Scientific, MA, US), 10% rat serum(Thermo Fisher Scientific, MA, US), 10% mouse serum(Sigma-Aldrich, MO, US), 10 μg/ml anti-CD16/CD32(2.4G2) antibody(BD Pharmingen, NJ, US)으로 구성된 super-block solution으로 blocking하였다. 이어서 30분 동안 얼음에서 APC/Cy7-conjugated anti-CD45, BV405-conjugated anti-CD11c, alexa488-conjugated anti-CD11c, APC-conjugated anti-B220, PE-conjugated anti-CD11b, APC-conjugated anti-PDPN, FITC-conjugated antiICAM-1, PE/Cy7-conjugated anti-CD31, PE-conjugated anti-LTβR, FITC-conjugated anti-VCAM-1, PE-conjugated anti-CD140α, PerCP/Cy5.5-conjugated anti-CD44, PE/Cy7-conjugated anti-CD86, APC-conjugated antiI-Ab, BV605-conjugated anti-Ki67, PE-conjugated anti-DC-SIGN (Biolegend, CA, US), PE-conjugated anti-CD3, BV421-conjugated anti-CD3, PerCP-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8, APC-conjugated anti-Gr-1, BV605-conjugated anti-CD62L, FITC-conjugated anti-I-Ab, PE-conjugated anti-CD40 (BD Pharmingen,

NJ, US), PE/Cy7-conjugated anti-CD4, eFlour 450-conjugated anti-CD3, PE/Cy7-conjugated anti-F4/80, APC-conjugated anti-CD80 (eBioscience, CA, US)로 표면 표지(surface marker) 염색을 하였다. 살아있는 세포는 Zombi Aqua(Biolegend, CA, US)나 7-aminoactinomycin D(7-AAD) (BD Pharmingen, NJ, US)로 따로 염색하였다. 세포는 LSRFortessa X-20 flow cytometer, BD LSRII flow cytometer(BD Pharmingen, NJ, US), CytoFLEX S(Beckman Coulter, CA, US)를 이용하여 측정하였다. 데이터는 FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA)로 분석하였다.

[72] **1.6 신장 캡슐로 이식**

[73] SVF-스페로이드나 수지상세포를 신장 캡슐로 이식하는 것은 이전에 언급한대로 수행하였다(Biochem Biophys Res Commun 514, 1081-1086, 2019). 간단하게 설명하자면, 마우스를 마취시키고 수술할 측면의 털을 제거한 후, 피부를 소독 후 절개하고 신장을 외부로 노출시켰다. 신장 캡슐 표면은 30 게이지 바늘(BD Pharmingen, NJ, US)로 찢고, 이식편은 threaded plunger(Hamilton, NV, US)를 이용해 천천히 주입하였다. 절개 부위는 고온의 cautery(Bovie medical corporation, NY, US)로 지져서 봉합하였다. 신장은 몸 안으로 다시 넣고 피부를 봉합하였다.

[74] **1.7 정량 PCR**

[75] RNA 추출은 표준 프로토콜을 따라 Trizol reagent를 이용해 수행하였다. Complementary(상보성) DNA(cDNA)는 reverse transcript premix kit(Intron, Seoul, Republic of Korea)를 이용해 순차적으로 합성되었다. SVF가 림프절기질세포의 주요한 케모카인을 분비할 수 있는지를 확인하기 위해, mRNA 발현을 SYBR Green master mix(Life Technologies, CA, US)와 CFX Real Time PCR Detection System(Bio-Rad Laboratories, CA, US)을 이용하여 정량 PCR(qPCR)로 측정했다. 각 샘플은 2번 반복 실험으로 진행되었다. 상대적인 mRNA 발현은 β-actin (Actb)의 값을 기준으로 계산되었다. 프라이머는 표 1에 정리했다.

[76] [표1]

Gene	정방향 프라이머	역방향 프라이머
CCL19	CCTGGGAACATCGTGAAAGC (서열번호 3)	TAGTGTGGTGAACACAACAGC (서열번호 4)
CCL21	GTGATGGAGGGGGTCAGGA (서열번호 5)	GGGATGGGACAGCCTAAACT (서열번호 6)
CXC13	GGCCACGGTATTCTGGAAGC (서열번호 7)	GGGCGTAACTTGAATCCGATC TA (서열번호 8)
CXCL12	CATCAGTGACGGTAAACCAG (서열번호 9)	CACAGTTTGGAGTGTTGAGG (서열번호 10)
Actb	TGTTACCAACTGGGACGACATG (서열번호 11)	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAAC (서열번호 12)

[77] **1.8 mRNA 염기서열 분석**

[78] SVF와 SVF-스페로이드의 유전자 발현 특징을 확인하기 위해, 항-CD45 microbeads와 magnetic cell separation(MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)을 사용해서 SVF으로부터 $CD45^-$ 세포를 분류하고 total RNA를 분리했다. RNA의 quality(품질)은 RNA 6000 Nano Chip(Agilent Technologies, Amstelveen, Netherlands)를 사용하여 Agilent 2100 bioanalyzer로 측정했고, RNA의 양은 ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, MA, US)를 사용하여 정량화했다. 라이브러리는 SMARTer Stranded RNA-Seq Kit (Clontech Laboratories, CA, US)를 이용하여 total RNA로부터 생성되었다. Poly(A) RNA Selection Kit(LEXOGEN, Vienna, Austria)를 이용하여 Polyadenylated mRNA를 특이적으로 분리하고, cDNA 합성, 단편화와 PCR에 의한 증폭를 위한 전단 가공(shearing)을 순차적으로 수행했다. 평균 단편 크기는 Agilent 2100 bioanalyzer로 측정했고 정량화는 StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies, CA, US)으로 평가했다. 라이브러리는 HiSeq 2500(Illumina, CA, US)에 의해 paired-end 100-bp 판독으로 염기서열분석을 했다. 시퀀싱 데이터는 TopHat을 이용해 도표화했다. 데이터는 ExDEGA (E-biogen, Seoul, Republic of Korea)로 분석하고, Prism 8(GraphPad, CA, US)으로 시각화했다.

[79] **1.9 효소결합면역흡착분석(ELISA)**

[80] 세포 배양 상층액에서 CCL21과 osteopontin의 번역 수준에서의 발현은 제조업체의 지침에 따라 각각 Research and Diagnostic Systems(MN, US)과 Lifespan Biosciences (WA, US)에서 구입한 ELISAM kit로 측정되었다.

[81] **1.10 주화성 분석**

[82] SVF-스페로이드의 화학적 유인 능력을 확인하기 위해, 제조업체의 설명에 따라 μ-Slide Chemotaxis kit(Cat#80326; Ibidi, Germany)를 이용하여 주화성

분석(Chemotaxis assay)을 실시하였다. 1.5mg/ml Type I Collagen solution(Corning, NY, US)은 관찰 지역에 주입되었다. 배지 내의 SVF-스페로이드 또는 배지는 왼쪽 공간에 주입되었고 비장세포는 오른쪽 공간에 삽입되었다. 살아있는 세포 이미징은 24시간의 배양 기간 동안 FV1000(Olympus corporation, Tokyo, Japan)으로 촬영되었다.

[83] **1.11 기질혈관분획(SVF)과 수지상세포(DC) 또는 비장세포 공동배양**

[84] 24-well plate에서 1×10^6/well 수지상세포, 1×10^6/well 비장세포, 1×10^6/well 성숙 수지상세포 (mature DC) 또는 1×10^6/well 비장세포와 배양된 2×10^4/well SVF를 준비하여 공동배양하였다. 배양 후, 세포들은 유세포분석기를 이용해 분석되었다.

[85] **1.12 생체외(in vitro), 생체내(in vivo) 이미징**

[86] 생체외에서 배양된 SVF는 현미경(Olympus corporation, Tokyo, Japan)과 VisiView software (Visitron systems, Puchheim, Germany)으로 관찰되었다. 생체 내 신장 캡슐 이식으로 인한 구조를 확인하기 위해 이식편을 수술 2주 후 모아서 frozen section media(Leica Biosystems, IL, US)에 넣고 빠르게 액체 질소에서 얼렸다. 샘플들은 5~6um 두께로 냉동 절편을 만들고 실험 전까지 -80℃에서 보관했다. 조직학적 분석을 위해, 헤마톡실린-에오신(H&E) 염색을 하였다. 공초점 이미징을 위해, 절편 샘플은 4% 파라포름알데하이드에서 고정되고 FITC-labeled anti-CD3, FITC-labeled anti-CD8(BD Pharmingen, NJ, US), alexa 647-labeled anti-CD31, alexa 594-labeled anti-PDPN, alexa 647-labeled anti-CD11c, Alexa 647-labeled anti-CD4 (Biolegend, CA, US), alexa 594-labeled anti-VEGFR3 (Bioss Antibodies, MA, US), 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Thermo Fisher Scientific, MA, US)로 염색하였다. 공초점 이미지는 FV3000(Olympus corporation, Tokyo, Japan)으로 촬영되었으며 IMARIS version 9.3 (Bitplane, Zurich, Switzerland)으로 분석했다.

[87] **1.13 항원 특이적 면역 반응 평가**

[88] SVF-스페로이드, 수지상세포 각각 또는 이들의 혼합 주입이 효과적으로 항원 특이적 면역 반응을 유도하는지 평가하기 위해, 각 조합(1×10^6 수지상세포/mouse 또는 361개의 SVF-스페로이드/mouse 또는 둘 다)은 서로 다른 주에 1회씩, 총 2회를 각 마우스의 신장 캡슐에 이식했다. 각 그룹에서 주입된 수지상세포에는 NP-OVA를 세포내로 섭취시킨 뒤 이식하였고, SVF-스페로이드 단독 이식 그룹에는 동일한 양의 NP-OVA를 함께 주입했다. 첫 면역을 하고 5주 후, OVA-특이적 T 세포를 확산시키기 위해 각 마우스에서 분리된 비장 세포를 각각 H-2K^b 주조직 적합성 복합체(MHC) I형과 I-A^b MHC II형에 의해 각각 제시되는 OVA 257-264 펩타이드와 OVA 339-323 펩타이드(InvivoGen, CA, US)와 배양하였다. 24시간 동안 배양 후, 세포들을 30분 동안 4℃에서 항-MHC 사량체(tetramer)로 염색하고 세포 표면 염색을 추가로 30분을 한 뒤, 유세포 분석을 수행하였다. APC-labeled tetramer SIINFEKL-H-2K^{b}와 PE-labeled tetramer

AAHAEINEA-I-A^b은 미국의 National Institutes of Health Tetramer Core Facility에서 제공받았다.

[89] **1.14 종양 접종 및 항종양 효과 검사**

[90] 종양 접종을 위해, OVA-발현 악성 흑색종 B16MO5(5×10^4 cells/mouse)를 마우스의 왼쪽 측면에 주입했다. 7일 후, 각 조합(1×10^6 수지상세포/mouse, 361개의 SVF스페로이드/mouse)을 매주 3회 신장 캡슐 아래에 삽입했다. 각 그룹당 5마리의 마우스로 구성되었다. 항종양 효과를 조사하기 위해, 종양 크기와 생존율을 평가했다. 종양 크기는 2~3일마다 측정했다. 종양 부피(mm^3)는 1/2×[(짧은 지름)×(긴 지름)^2]으로 계산했다. 종양 크기가 2000mm^3 이상 성장하면, 마우스는 죽은 것으로 간주했다.

[91] **1.15 통계 분석**

[92] 데이터는 통계 분석을 위해서 GraphPad Prism software로 분석되었다. RNA 염기서열분석은 ExDEGA version 2.5로 수행되었다.

[93]

[94] **2. 실험 결과**

[95] **2.1 지방조직으로부터 분리한 SVF의 특성**

[96] 지방조직에서 추출한 SVF은 최초 0일째(D0) 대부분 크기가 작고(FSC<250K, FSC: forward scatter, SCC: side scatter) 원형 모양의 세포들이었으나 배양하면(D3: 배양 3일째, D6:배양 6일째) 크기가 크고(FSC>250K) 긴 모양의 세포들로 대체되었다(도 1b~1d). 이러한 세포 변화를 자세히 확인하기 위하여 유세포 분석을 수행하였을 때 CD45+ 조혈세포 집단(hematopoietic cell population)는 배양하면 감소하고(23.4%→5.94%) CD45- 비조혈세포(non-hematopoietic cell population)는 증가함(76.0%→93.7%)을 확인하였다(도 1e, 1f).

[97] 마커 분석을 통해 이러한 세포 변화에 따른 세포 유형을 분석한 결과 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 및 B220+ B 세포들은 빠르게 감소하였고 CD11c+ 수지상세포는 배양 10일까지 유지되었으며(도 2a~2d), CD11b+ F4/80+ 대식세포와 Gr-1+ 호중구 세포는 감소하였다(도 2e. 2f). 도 2에서 P#0, P#1, P#2는 각각 계대 횟수 0번, 1번, 2번을 의미한다.

[98] 림프절 기질 세포(lymph node stromal cell)의 하위그룹(subtype)은 PDPN과 CD31 마커를 사용하여 PDPN+ CD31-는 섬유아세망세포(fibroblastic reticular cell, FRC), PDPN+ CD31+는 림프내피세포(lymphatic endothelial cell, LEC), PDPN- CD31+는 혈액내피세포(Blood endothelial cell, BEC)로 분류되는데, 지방조직에서 분리한 SVF를 배양하여 유세포 분석을 실시하면 CD45- 세포 그룹은 림프절 기질 세포의 표현형(phenotype)과 비슷하게 PDPN+ CD31-, PDPN+ CD31+, PDPN- CD31+ 로 구분되는 특성을 보이는 것을 확인하였다(도 3a~3e). SVF는 특히 5일 이상 배양시 60% 이상, 10일 이상 배양시 80% 이상 FRC의 표현형(PDPN+ CD31-)을 보이는 것으로 확인되었다(도 3b).

[99] PDPN+ CD31- FRC 유사 표현형을 보이는 SVF를 FRC 특이적 마커를 활용해

추가적으로 확인한 결과, 이들 세포는 LTβR(Lymphotoxin β receptor), CD140α(Platelet-derived growth factor α), VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1(Intracelluar adhesion molecule-1) 등 FRC 특이적 마커를 발현하는 것을 확인하였다(도 4). 도 4에서 P#0, P#1, P#2는 각각 계대 횟수 0번, 1번, 2번을 의미한다.

[100] 이와 같은 표현형 외에, SVF가 기능적으로도 림프노드 기질 세포와 비슷하게 작동 하는지 알아보기 위해서 여러 가지 자극원 TLR3-agonist(PolyI:C, plC), TLR7-agonist(Imiquimod), αLTβR(αLT) 및 LTβR 리간드(anti-LTβR, LIGHT, L)를 24시간 동안 처리하고 정량적 PCR로 mRNA를 정량하였을 때 림프노드 기질 세포가 분비하는 대표적인 케모카인인 Ccl19, Ccl21, Cxcl13, Cxcl12을 발현하는 것을 확인할 수 있었다(도 5a). 3차원 세포 배양 방법인 스페로이드 형태로 배양시(SVF 스페로이드, SPH) 2차원 배양 SVF(SVF)에 비해 훨씬 많은 케모카인인 Ccl19, Ccl21, Cxcl13을 발현할 수 있음을 확인하였다(도 5b).

[101] 이상과 같은 결과들은 지방조직으로부터 분리한 SVF가 표현형이나 기능에 있어서 림프절 기질세포와 유사한 세포들로 구성되어 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

[102] **2.2 SVF 스페로이드의 혈관 형성 능력**

[103] mRNA 분석으로 3차원 배양 방식으로 8일 배양한(D8) 배양한 SVF 스페로이드(SPH)와 2차원 배양 방식(monolayer)으로 배양한 SVF(SVF)의 유전자 발현을 비교하였을 때, SVF 스페로이드로 배양하면 혈관생성에 관련한 11개의 유전자들의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었고(도 6a, 6b), 유세포 분석을 실시하였을 때 CD31+ 세포들(PDPN-CD31+ BEC, PDPN+ CD31+ LEC)이 증가함을 확인할 수 있었다(도 6c). 도 6에서 >10은 유전자 발현의 배수(fold change) 값이 대조군(SVF(D8)) 평균의 10배 초과를 의미하고 <0.1은 0.1배 미만을 의미하고, P#0, P#1은 각각 각각 계대 횟수 0번, 1번을 의미한다.

[104] 실제로 in vivo에서 혈관 형성 능력이 있는지를 확인하기 위하여 SVF 스페로이드를 마우스의 신장 캡슐에 이식하였을 때 이식 2주 후 이식 표면에서 혈관이 형성됨을 확인하였으며(도 6d), 생성된 혈관은 각각 림프구와 내피세포 마커인 VEGFR3와 CD31에 대해 양성임을 확인하였다(도 6e). 또한 동결단면(frozen section) 이미지를 통해 CD3+ T 세포는 CD31+ 세포와 상호작용하여 이동하는 것으로 보였다(도 6f).

[105] 이상과 같은 결과들은 SVF 스페로이드가 면역세포의 이동 통로가 되는 혈관을 형성할 수 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

[106] **2.3 SVF 스페로이드의 수지상세포의 유인 능력과 T 세포와 수지상세포의 상호작용 증진 능력**

[107] mRNA 분석을 통해 3차원 배양 SVF 스페로이드(SPH)에서 케모카인, 사이토카인, 성장인자의 유전자 발현 변화를 확인한 결과, 0일째(D0) 2차원 배양 SVF에 비해 면역세포를 불러오거나 활성화시키는 인자들의 발현이 통계적으로

유의성(p value <0.05) 있게 증가하였음을 확인하였다(도 7a). 도 7a에서 >10은 유전자 발현의 배수(fold change) 값이 대조군(SVF(D0)) 평균의 10배 초과를 의미하고 <0.1은 0.1배 미만을 의미한다. 구체적으로 혈관신생을 유도하는 인자인 Vegfa(vascular endothelial growth factor α) 유전자, Pdgfc(platelet derived growth factor C) 유전자 발현이 증가하였고, 세포외기질을 분해하여 세포 이동 통로를 열어주는 Mmp 8, 10 및 13(Matrix metalloproteinase 8, 10, 13) 유전자 발현 또한 증가하였으며, 면역세포를 불러들이고 활성화시키는 인자인 *Spp1, Ccl8, Cxcl5, Postn, Cxcl16, Ccl17* 유전자 발현도 증가하였다. 특히 수지상세포의 성숙과 생존을 조절하는 인자로 알려진 인자 osteopontin에 대한 유전자 *Spp1*의 발현이 증가하였는데, 배양 상층액에 있는 osteopontin을 정량한 결과 SVF 스페로이드에서 그 농도 매우 높게 증가하였음을 확인하였다(도 7b).

[108] 이러한 결과들은 SVF 스페로이드가 면역세포를 불러들이고 활성화시키는 다양한 인자들을 발현함을 보여주는 것이라 할 수 있다.

[109] 상기 SVF 스페로이드에서 분비되는 케모카인 등이 실제로 면역세포를 불러올 수 있는지 확인하기 위해서 콜라겐 층을 이용하여 이동 분석(migration assay)를 24시간 수행하였는데, 그 결과 오른쪽에 있는 비장세포(splenocyte)가 왼쪽에 있는 SVF 스페로이드(SPH)로 향해서 시간이 지날수록 이동하는 것을 확인할 수 있었다(도 8a). SVF 스페로이드의 면역세포 유인 능력에 대해서 CD3+ T 세포와 수지상세포인 BMDCs(bone marrow-derived dendritic cells)에 대해서 이동 분석(migration assay)를 수행하였을 때 CD3+ T 세포는 이동하지 못하였지만 수지상세포인 BMDCs는 SVF 스페로이드로 이동함을 확인하였다(도 8b, 8c, 8d).

[110] SVF 스페로이드가 in vivo에서 면역세포의 유인 능력이 있는지를 확인하기 위하여 마우스 신장 캡슐에 SVF 스페로이드(SVF)를 이식하였을 때 CD3+ T 세포를 유인하지 못하였으나 성숙 수지상세포(mDC) BMDCs를 같이 이식하였을 때 많은 CD3+ T 세포를 유인함을 확인하였으며 이러한 CD3+ T 세포는 PDPN+ SVF 세포와 혼재되어 있음을 확인하였다(도 9a: SVF 스페로이드 단독 이식군, 9b: 성숙 수지상세포 단독 이식군, 9c: SVF 스페로이드와 성숙 수지상세포를 함께 주입한 이식군). 수지상세포 BMDCs만을 이식하였을 때도 CD3+ T 세포를 유인하였지만 수지상세포를 SVF 스페로이드와 함께 이식하였을 때 더 많은 CD3+ T 세포를 유인함을 확인하였다(도 9d).

[111] 상기 SVF 스페로이드에 의해 유인된 T 세포들은 CD4+, CD8+ T 세포들과 CD11c+ 수지상세포들을 포함하고 있었으며(도 10a, 10b), 유세포 분석(flow cytometry)으로 정량화하였을 때 성숙 수지상세포(mDC)와 SVF 스페로이드를 이식한 그룹(SPH+mDC)에서 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포가 가장 많이 있었음을 확인할 수 있었고, 또 CD8+ T 세포, CD11c+ 수지상세포가 많이 존재함을 확인할 수 있었다(도 10c~10j). 이러한 결과들은 SVF 스페로이드가 수지상세포와 함께 존재할 때 CD3+ T 세포의 침윤을 증가시킬 수 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

[112] SVF 스페로이드가 수지상세포와 함께 존재할 때 유인된 상기 T 세포들이 CD62L-CD44+ 효과기 T 세포(CD62L-CD44+ effector T cell), CD62L+CD44+ 기억 T 세포(CD62L+CD44+ memory T cell), CD62L+CD44- 미성숙 T 세포 (CD62L+CD44- naive T cell) 중 어떤 상태인지 알기 위해서 유세포 분석(flow cytometry)으로 더 상세히 분석하였을 때 이식편에 모여든 T 세포 중에 CD4+ 효과기 T 세포가 가장 많은 부분을 차지 하고 있다(도 11a, 11b).

[113] 이상과 같은 결과들은 SVF 스페로이드가 수지상세포를 유인하고 수지상세포가 T 세포와 상호작용하는 것을 증진시키며, T 세포가 대부분 CD4+ 효과기 T 세포로 분화되어 면역반응을 수행하는 것임을 보여준다 할 수 있다.

[114] **2.4 SVF 스페로이드와 수지상세포의 복합체는 항원 특이적 T 세포의 반응을 증진시킴**

[115] SVF(SVF의 2차원 배양물)가 수지상세포와 T 세포의 상호작용을 조절하는 기작을 확인하기 위하여 2차원 배양물인 SVF와 성숙 수지상세포(mature DC, mDC)를 공동배양 했을 때, 수지상세포의 활성화마커인 CD40, CD80, MHCII, DC-SIGN의 발현이 미성숙 수지상세포(immature DC, iDC), 성숙 수지상세포 단독 배양에 비해 실제로 증가함을 확인할 수 있었다(도 12a). 또한, 2차원 배양물인 SVF와 성숙 수지상세포를 1일 동안 공동배양하고 7 AAD로 염색하여 세포사멸 정도를 살펴보았을 때 미성숙 수지상세포(iDC)와 성숙 수지상세포(mDC) 단독배양에 비해 SVF와 공동배양했을 때 성숙 수지상세포 (SVF+mDC)의 생존율이 향상됨을 확인하였다(도 12b). 또 이차원 배양물인 SVF와 비장세포를 7일 동안 공동배양하고 7 AAD를 염색했을 때도 비장세포 단독 배양 (Spl) 보다 SVF와 7일간 공동배양한 비장세포 (SVF+Spl)이 약 8배 높은 생존율을 보였다(도 12c).

[116] SVF 스페로이드와 mDC 복합체가 항원 특이적 T 세포의 반응을 증진시킬 수 있는지를 살펴보기 위하여 (i) 미처리(untreated, UT), (ii) SVF 스페로이드와 OVA(ovabulbumin) 이식군(SPH), (iii) OVA를 탑재한 성숙 수지장세포(mDC) 이식군(mDC), (iv) SVF 스페로이드와 OVA를 탑재한 성숙 수지상세포(mDC) 이식군(SPH+mDC)으로 나누어(n=5), 마우스 신장 캡슐에 실험 시작시와 2주째 2회 이식하고(도 13a), 4주 후 MHC 사중체(tetramer)에 제시된 OVA 펩티드를 염색하여 OVA 항원 특이적 CD4+, CD8+ T 세포의 비율을 살펴보았을 때 CD4+, CD8+ T 세포의 비율이 SVF 스페로이드와 OVA로 활성화사킨 mDC 이식군에서 높게 증가함을 확인하였다(도 13b). 여기서 항원인 OVA는 Fe3O4-ZnO 나노 입자에 결합시켜 수지상세포로의 탑재에 사용하였다.

[117] 이러한 결과들은 성숙 수지상세포를 SVF 이차원 배양물이나 그 스페로이드와 공동배양하거나 공동이식할 경우 수지상세포의 활성화가 촉진되고 생존율이 향상됨으로써 결과적으로 보다 효과적으로 T 세포를 활성화시켜 항원 특이적 T 세포의 반응을 증진시킬 수 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

[118] **2.5 SVF 스페로이드와 수지상세포의 복합체의 항종양 활성**

[119] 앞에서와 확인하였던 증가된 항원특이적 T 세포 면역반응이 실제로 암세포의 성장을 억제하는 항암 효과가 있는지 확인하기 위해서, OVA를 발현하는 B16 멜라노마 세포(B16-OVA)를 마우스의 옆구리에 주입하고, 앞에서와 같이 (i) 미처리(untreated, UT), (ii) SVF 스페로이드와 OVA(ovabulbumin) 이식군(SPH), (iii) OVA를 탑재한 mDC 이식군(mDC), (iv) SVF 스페로이드와 OVA를 탑재한 mDC 이식군(SPH+mDC)으로 나누어(n=5), 마우스 신장 캡슐에 총 3번 1주일 간격으로 이식하였다(도 14a). 여기서도 항원인 OVA는 Fe3O4-ZnO 나노 입자에 결합시켜 수지상세포로의 탑재에 사용하였다. 32일 동안의 실험 결과, SVF 스페로이드와 OVA로 활성화사킨 mDC 이식군에서 종양의 성장이 가장 많이 억제되었고 또한 생존율도 실험 기간 동안 100%를 유지하였다(도 14b, 14c, 14d). 따라서, SVF 스페로이드와 수지상세포가 수지상세포 단독으로 주입하는 것에 비해 효과가 증가했음을 알 수 있었다.

[120] 이상과 같이, 지방조직에서 분리한 기질혈관분획(SVF)이 수지상세포 이식 부위에 수지상세포와 함께 이식될 때 그 이식된 부위에서 수지상세포를 활성화시켜 결과적으로 T 세포의 반응을 증진시킬 수 있음을 확인할 수 있다(도 15).

청구범위

[청구항 1] 지방조직에서 분리된 기질혈관분획과 항원이 탑재된 수지상세포를 유효성분으로 포함하는 면역반응 증진용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 기질혈관분획은 2차원 배양물 또는 3차원 배양물인 스페로이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 면역반응은 T 세포에 의한 면역반응인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 항원은 바이러스 유래 항원, 병원성 미생물 유래 항원 또는 종양 유래 항원인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 바이러스 감염증 치료 또는 예방을 위한 항바이러스용 면역증진용 조성물, 병원성 미생물에 의한 감염증 치료 또는 예방을 위한 항미생물용 면역증진용 조성물 또는 종양 치료 또는 예방을 위한 항종양 면역증진용 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 수지상세포는 상기 조성물이 투여되는 개체로부터 얻어진 자가(autologous) 수지상세포이거나, 다른 개체로부터 얻어진 동종의 수지상세포이거나 이종의 개체로부터 얻어진 이종의 수지상세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 수지상세포는 미성숙 수지상세포 또는 성숙 수지상세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 지방조직은 피하 지방조직(subcutaneous fat tissue)이나 기관 주위의 지방조직인 내장 지방조직(visceral fat tissue)인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 항원은 종양 유래 항원이고,
그 종양 유래 항원은 종양세포의 표면 발현 단백질, 종양세포의 표면 발현 수용체, 종양세포 내부의 펩타이드, 종양세포 내부의 단백질 또는 종양세포의 용해물인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 항원은 종양 유래 항원이고,
그 종양 유래 항원은 EGFRvIII, EGFR, 메타스틴 수용체(Metastin receptor), 수용체 타이로신 카이나제(Receptor tyrosine kinases), HER2(Human

epidermal growth factor receptor 2), 타이로신 카이나제-18-수용체(c-Kit), HGF 수용체 c-Met, CXCR4, CCR7, 엔도테린-A 수용체, PPAR-δ(peroxisome proliferator activated receptor δ), PDGFR-α(Platelet-derived growth factor receptor α), CD133, CEA(carcinoembryonic antigen), EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule), GD2(disialoganglioside), GPC3(Glypican 3), PSMA(Prostate Specific Membrane Antigen), TAG-72(tumor-associated glycoprotein 72), GD3(disialoganglioside), HLA-DR(human leukocyte antigen-DR), MUC1(Mucin 1), NY-ESO-1(New York esophageal squamous cell carcinoma 1), LMP1(Latent membrane protein 1), TRAILR2(tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor), VEGFR2(vascular endothelial growth factor receptor 2), HGFR(hepatocyte growth factor receptor), CD44 또는 CD166인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 항바이러스제, 항미생물제, 항암제와 병용 또는 혼합되어 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 13] 지방조직에서 분리된 기질혈관분획과 수지상세포를 유효성분으로 포함하는 면역반응 증진용 조성물.

[청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 기질혈관분획은 2차원 배양물 또는 3차원 배양물인 스페로이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

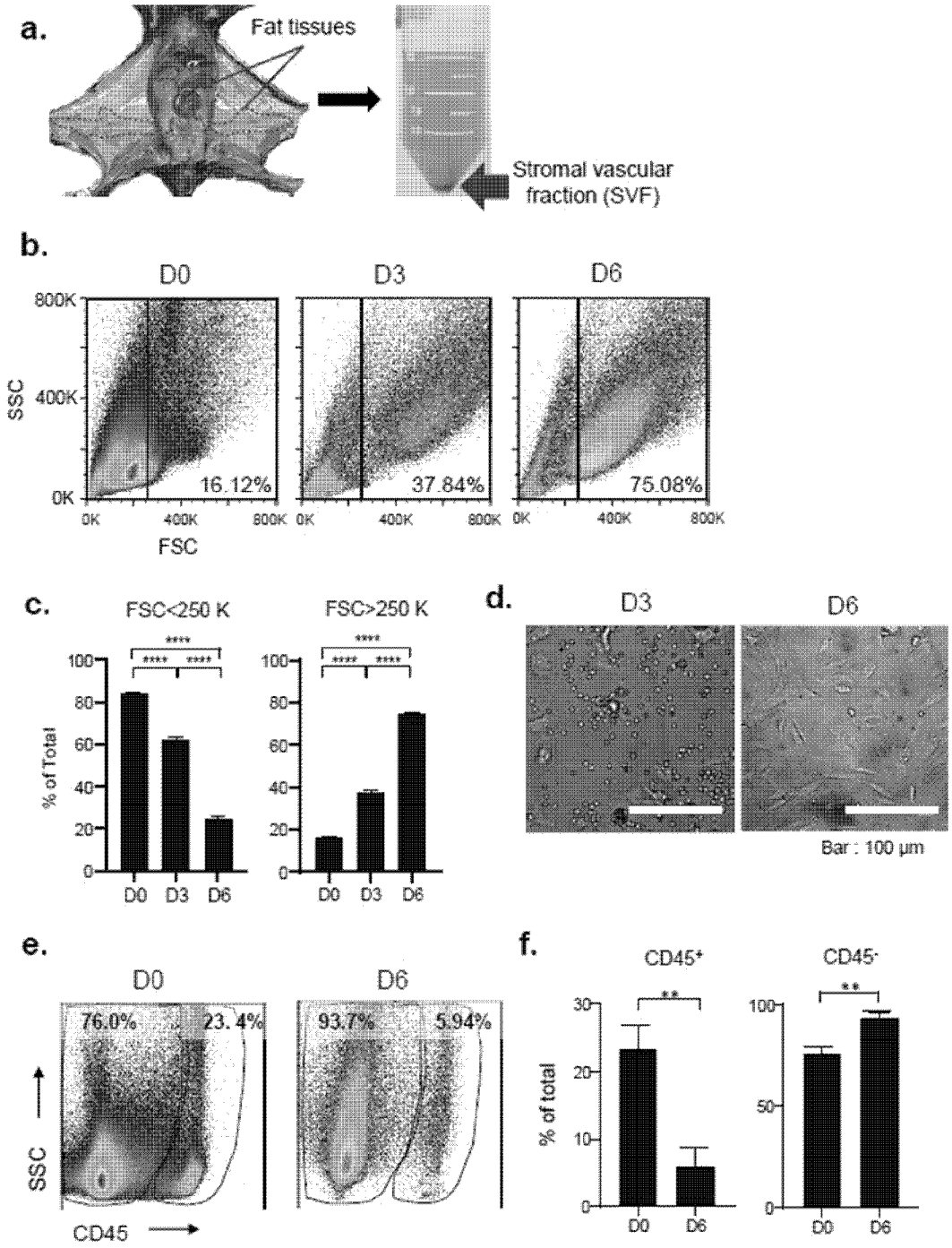
[청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 면역반응은 T 세포에 의한 면역반응인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 조성물은 바이러스 감염증 치료 또는 예방을 위한 항바이러스용 면역증진용 조성물, 병원성 미생물에 의한 감염증 치료 또는 예방을 위한 항미생물용 면역증진용 조성물 또는 종양 치료 또는 예방을 위한 항종양 면역증진용 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

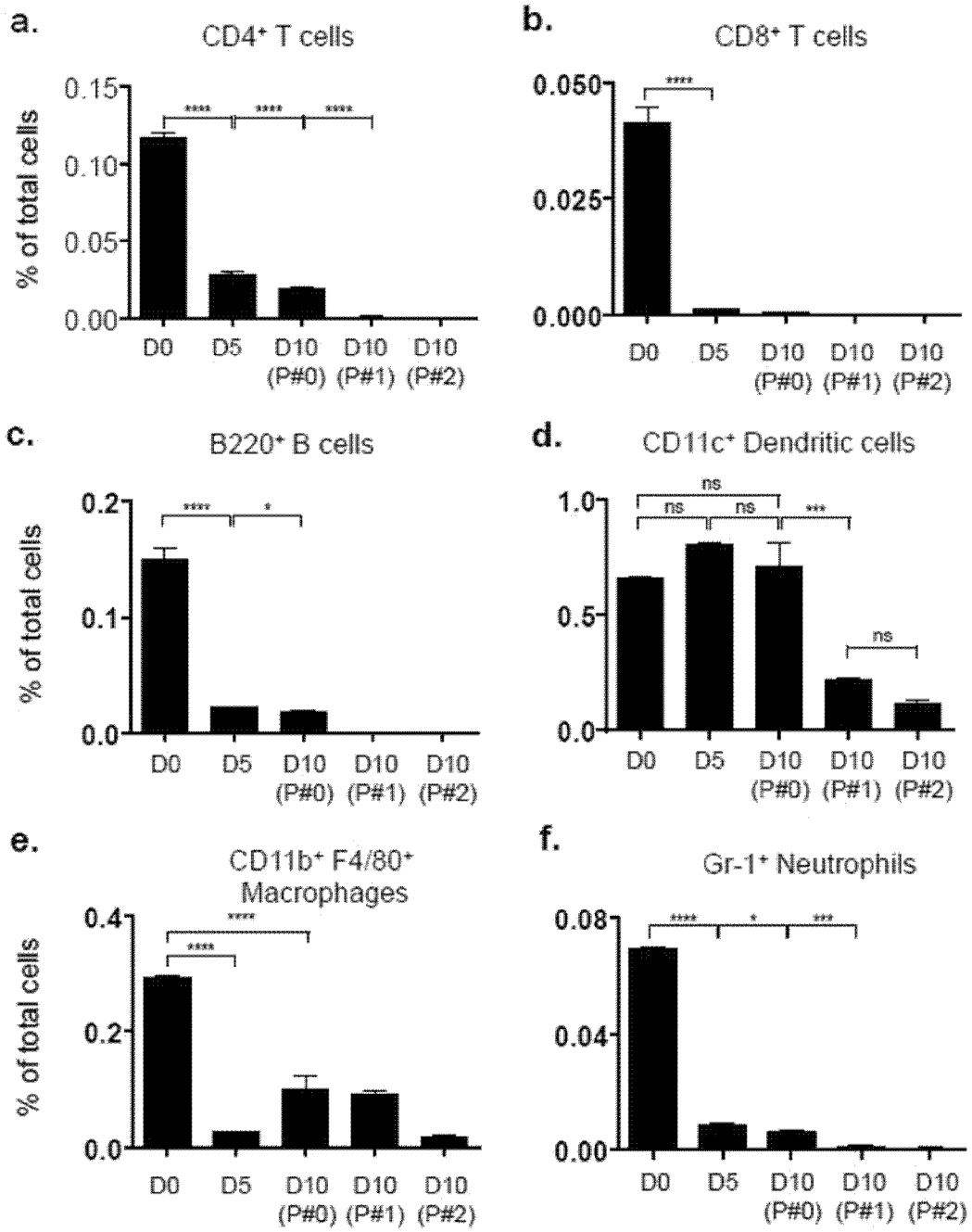
[청구항 17] 지방조직에서 분리된 기질혈관분획의 스페로이드를 유효성분으로 포함하는 수지상세포 성숙화 조성물.

[청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 기질혈관분획은 2차원 배양물 또는 3차원 배양물인 스페로이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

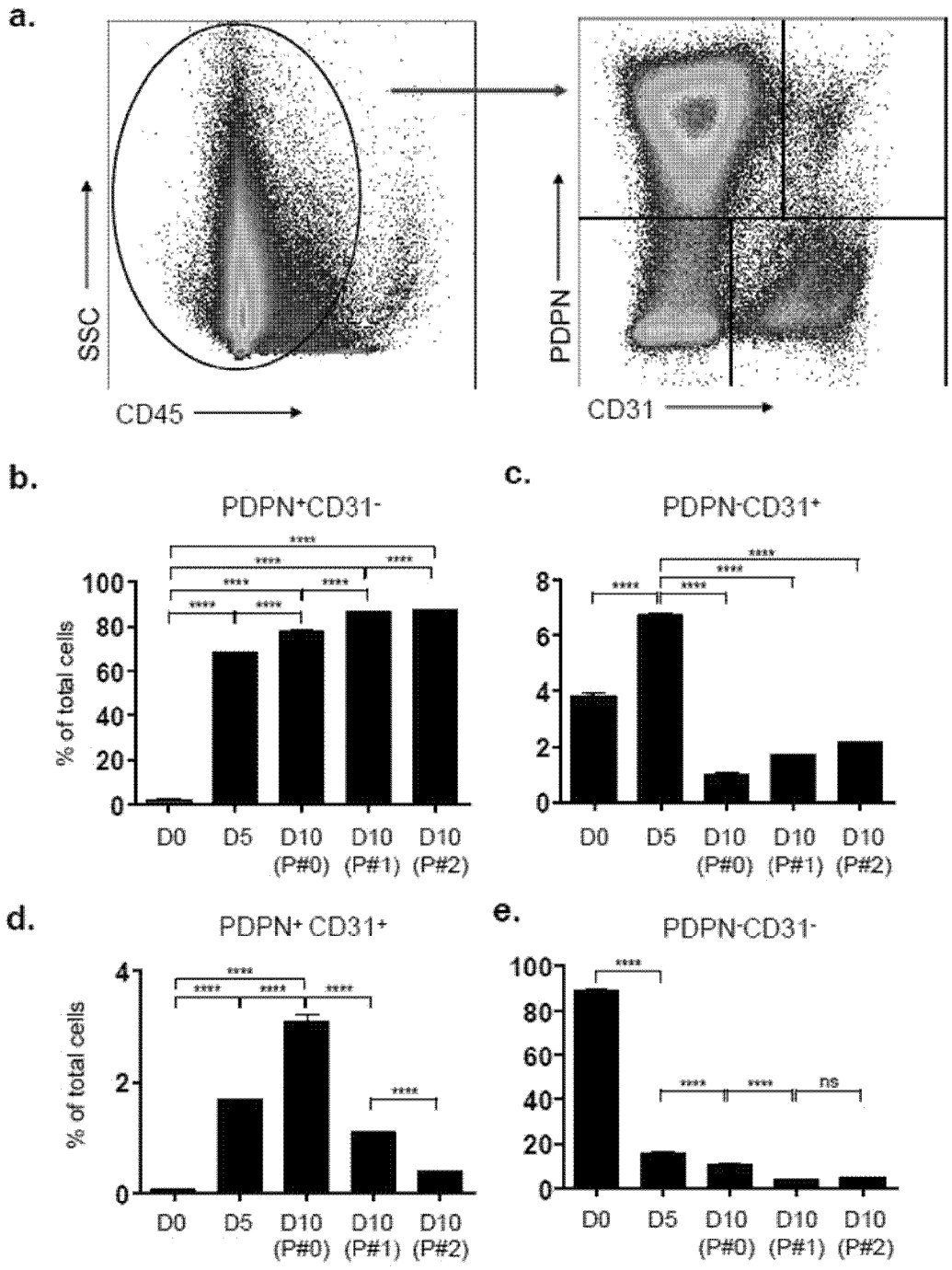
[도1]


a.
Fat tissues
Stromal vascular fraction (SVF)
b.
D0
D3
D6
800K
400K
0K
SSC
16.12%
37.84%
75.08%
FSC
c.
FSC<250 K
FSC>250 K
% of Total
D0 D3 D6
d.
D3
D6
Bar : 100 μm
e.
D0
D6
76.0%
23.4%
93.7%
5.94%
SSC
CD45
f.
CD45+
CD45-
% of total
D0 D6

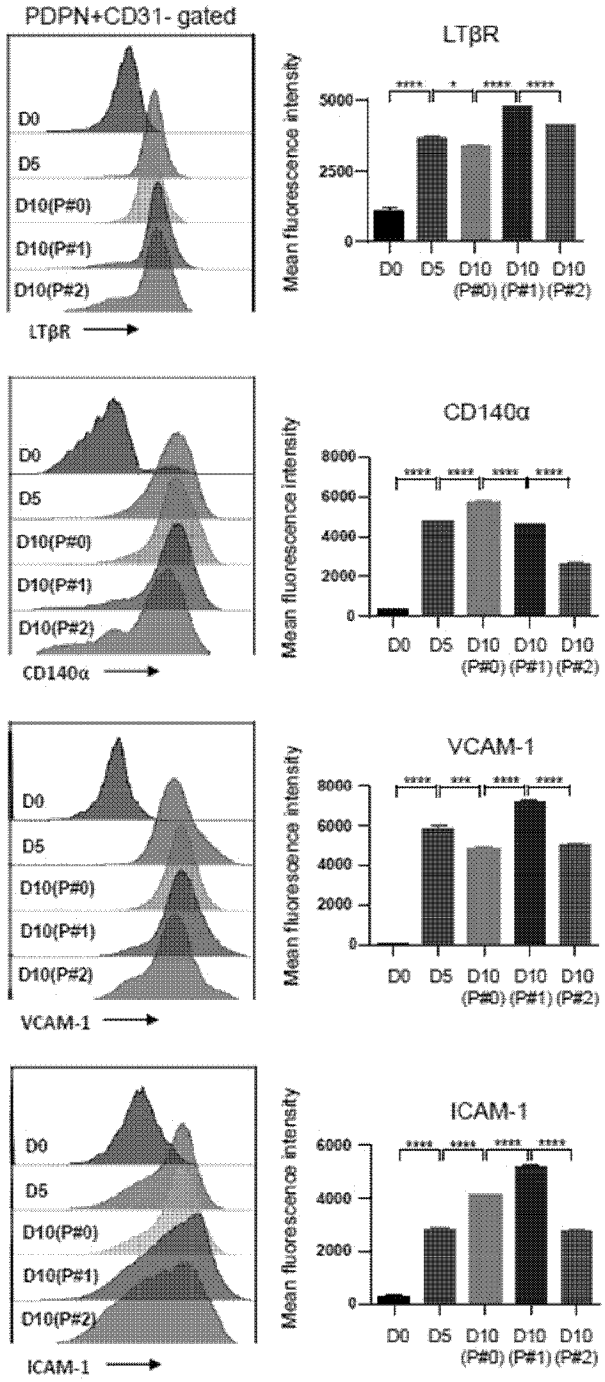
[도2]


a.
CD4+ T cells
% of total cells
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
****
D0
D5
D10 (P#0)
D10 (P#1)
D10 (P#2)
b.
CD8+ T cells
0.050
0.025
0.000
****
c.
B220+ B cells
0.2
0.1
0.0
****
*
d.
CD11c+ Dendritic cells
1.0
0.5
0.0
ns
ns
ns
***
e.
CD11b+ F4/80+ Macrophages
0.4
0.2
0.0
****
****
f.
Gr-1+ Neutrophils
0.08
0.04
0.00
****
*
***

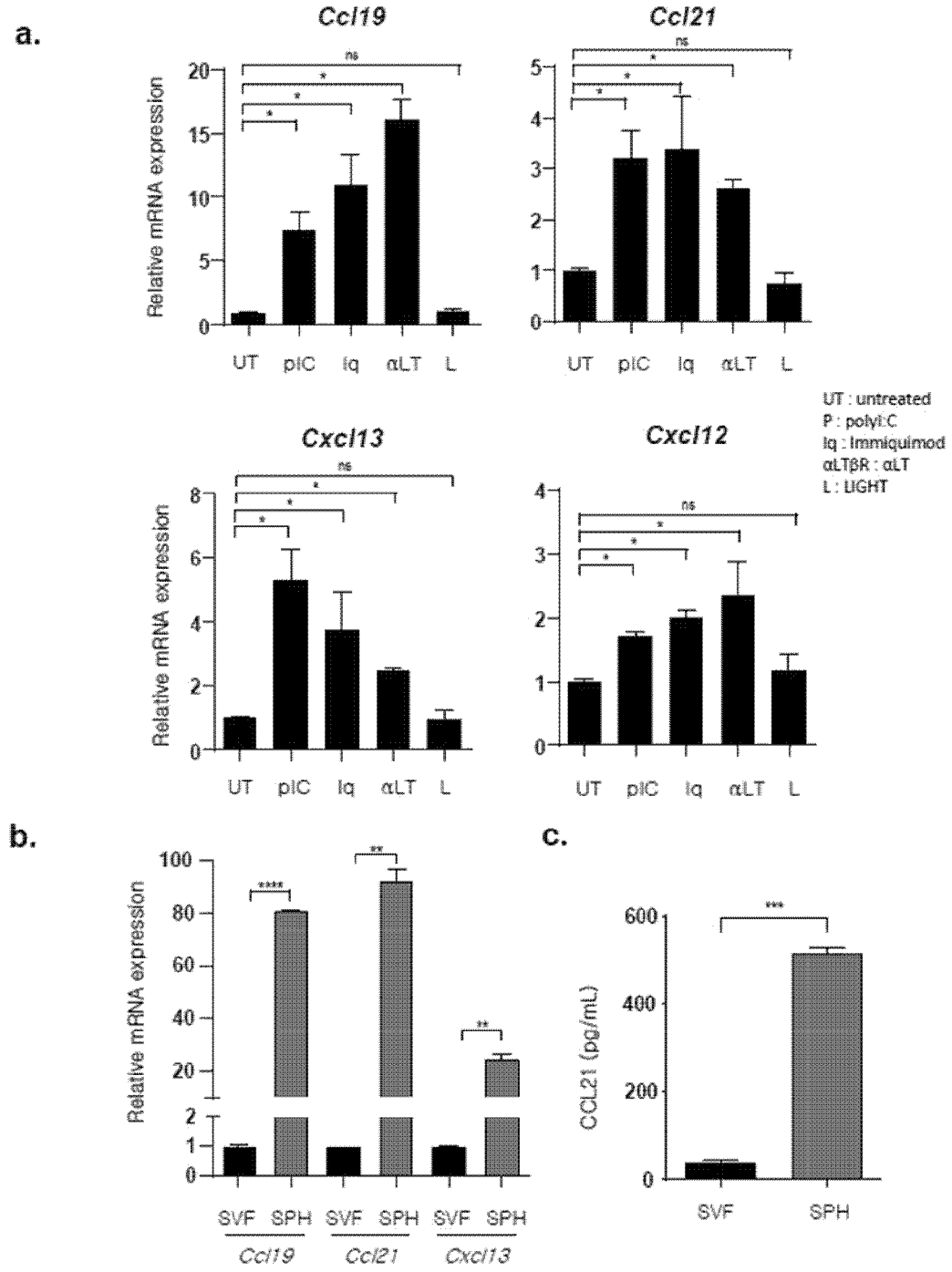
[도3]


a.
SSC
CD45
PDPN
CD31
b.
PDPN+CD31-
% of total cells
D0
D5
D10 (P#0)
D10 (P#1)
D10 (P#2)
c.
PDPN-CD31+
d.
PDPN+ CD31+
e.
PDPN-CD31-
ns

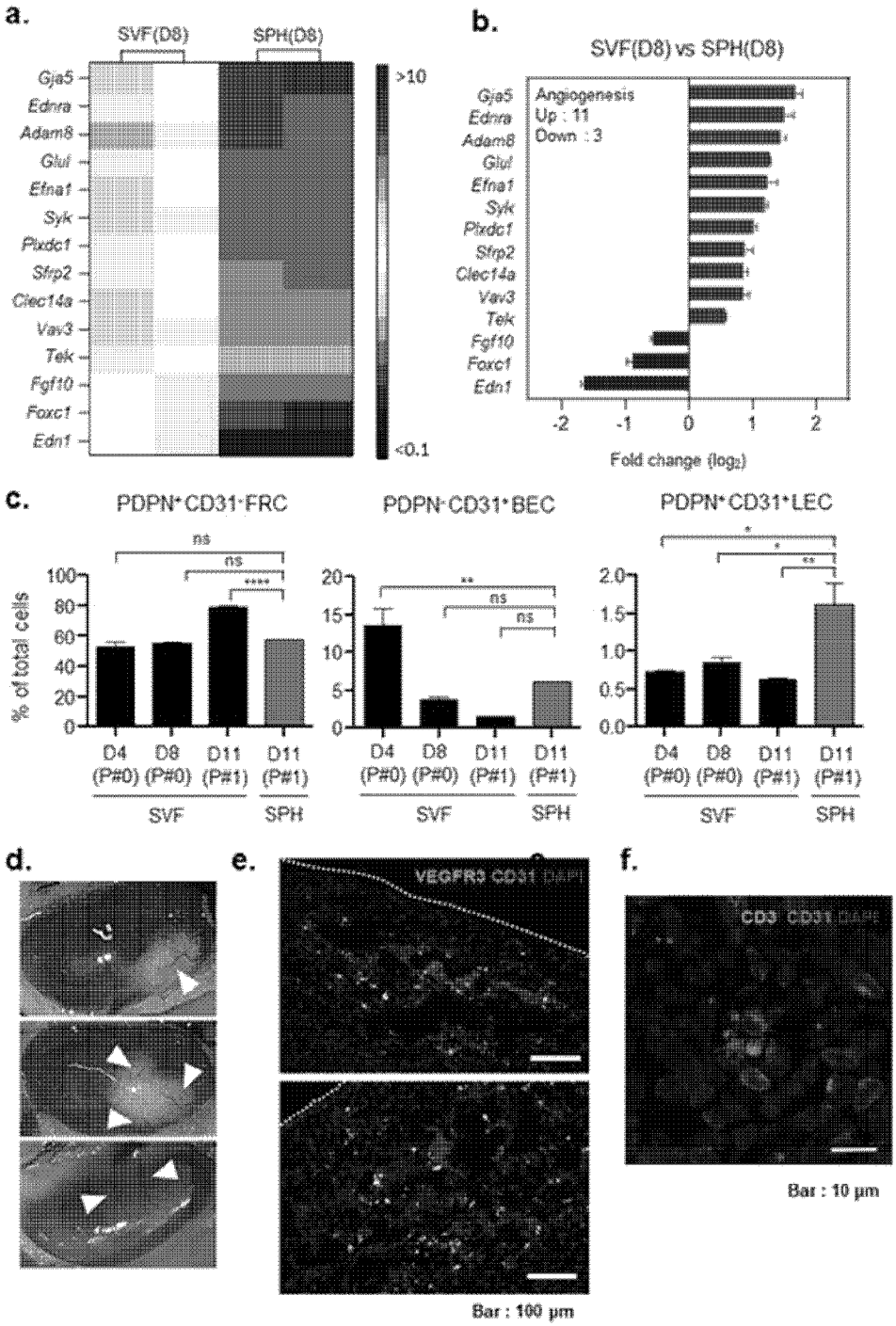
[도4]


PDPN+CD31- gated
D0
D5
D10(P#0)
D10(P#1)
D10(P#2)
LTβR
CD140α
VCAM-1
ICAM-1
Mean fluorescence intensity
D0 D5 D10 (P#0) D10 (P#1) D10 (P#2)

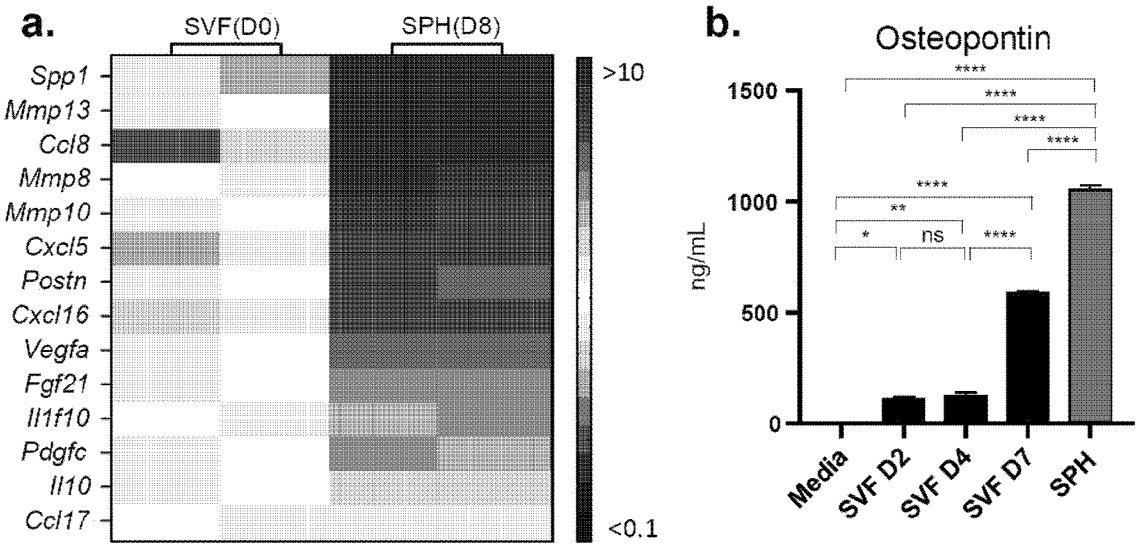
[도5]


a.
Ccl19
Ccl21
Cxcl13
Cxcl12
Relative mRNA expression
UT
pIC
Iq
αLT
L
ns
UT : untreated
P : polyI:C
Iq : Immiquimod
αLTβR : αLT
L : LIGHT
b.
Relative mRNA expression
SVF
SPH
Ccl19
Ccl21
Cxcl13
c.
CCL21 (pg/mL)
SVF
SPH

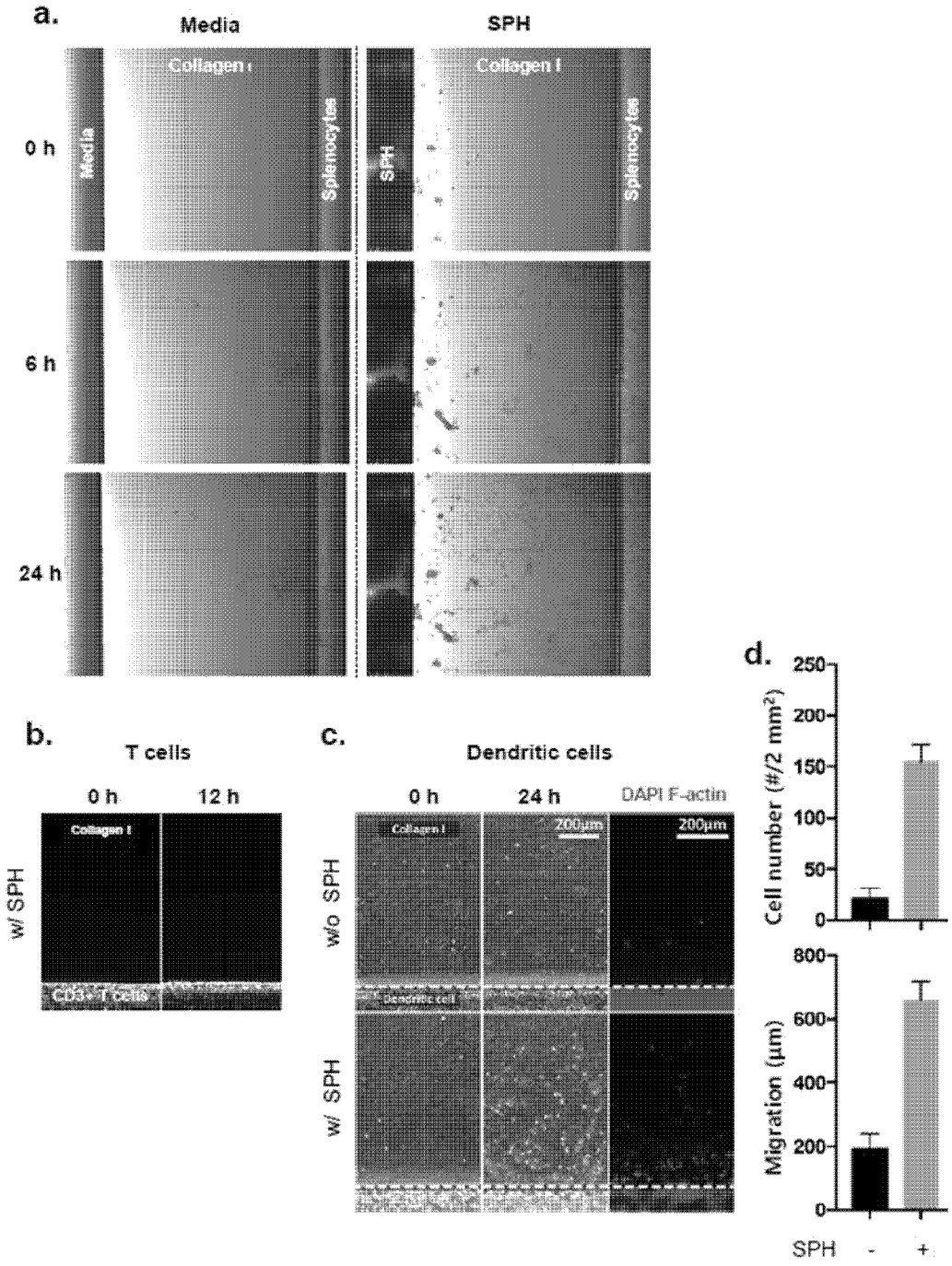
[도6]


a.
SVF(D8)
SPH(D8)
Gja5
Ednra
Adam8
Glul
Efna1
Syk
Plxdc1
Sfrp2
Clec14a
Vav3
Tek
Fgf10
Foxc1
Edn1
>10
<0.1
b.
SVF(D8) vs SPH(D8)
Angiogenesis
Up : 11
Down : 3
-2
-1
0
1
2
Fold change (log2)
c.
PDPN+CD31-FRC
PDPN-CD31+BEC
PDPN+CD31+LEC
% of total cells
D4 (P#0)
D8 (P#0)
D11 (P#1)
D11 (P#1)
SVF
SPH
d.
e.
VEGFR3 CD31 DAPI
Bar : 100 μm
f.
CD3 CD31 DAPI
Bar : 10 μm

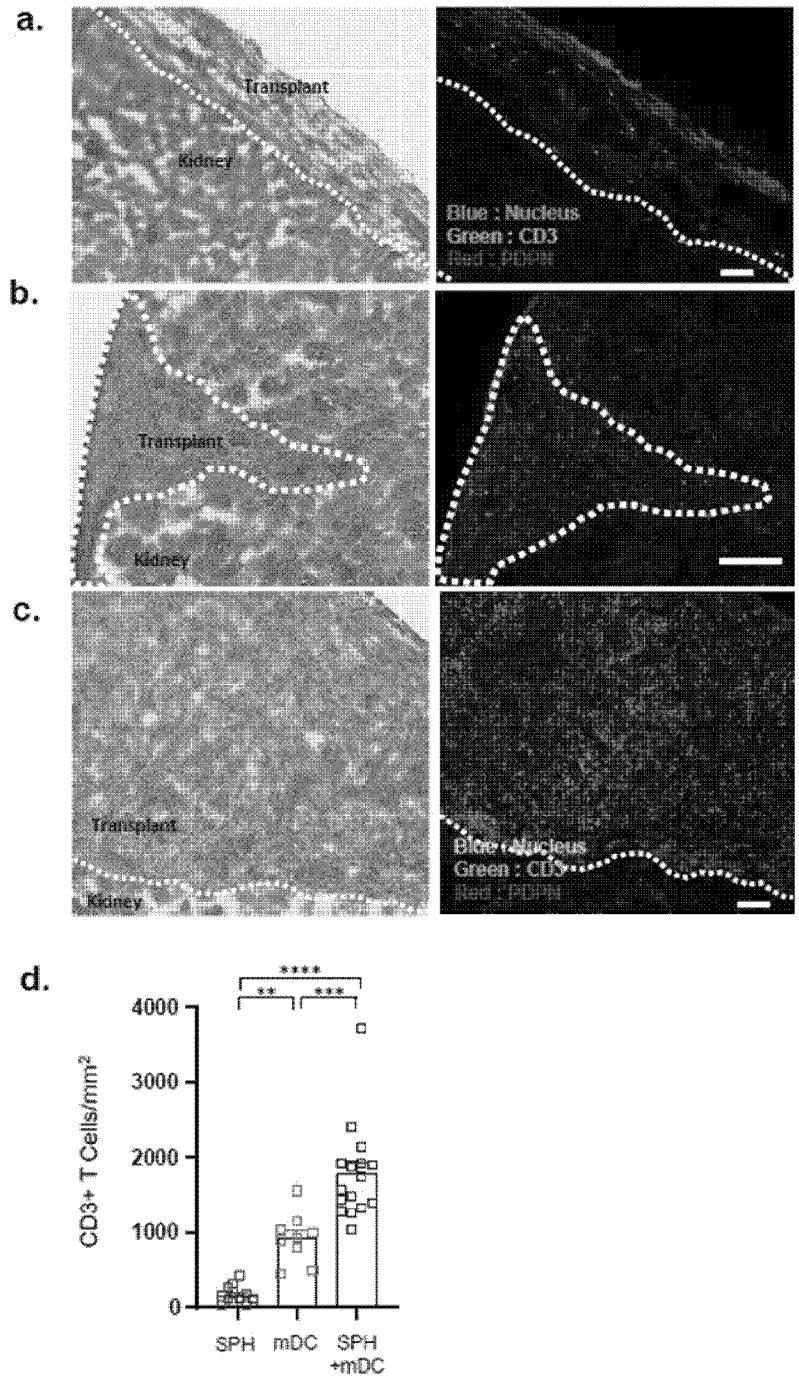
[도7]


a.
SVF(D0)
SPH(D8)
Spp1
Mmp13
Ccl8
Mmp8
Mmp10
Cxcl5
Postn
Cxcl16
Vegfa
Fgf21
Il1f10
Pdgfc
Il10
Ccl17
>10
<0.1
b.
Osteopontin
ng/mL
1500
1000
500
0
****
**
*
ns
Media
SVF D2
SVF D4
SVF D7
SPH

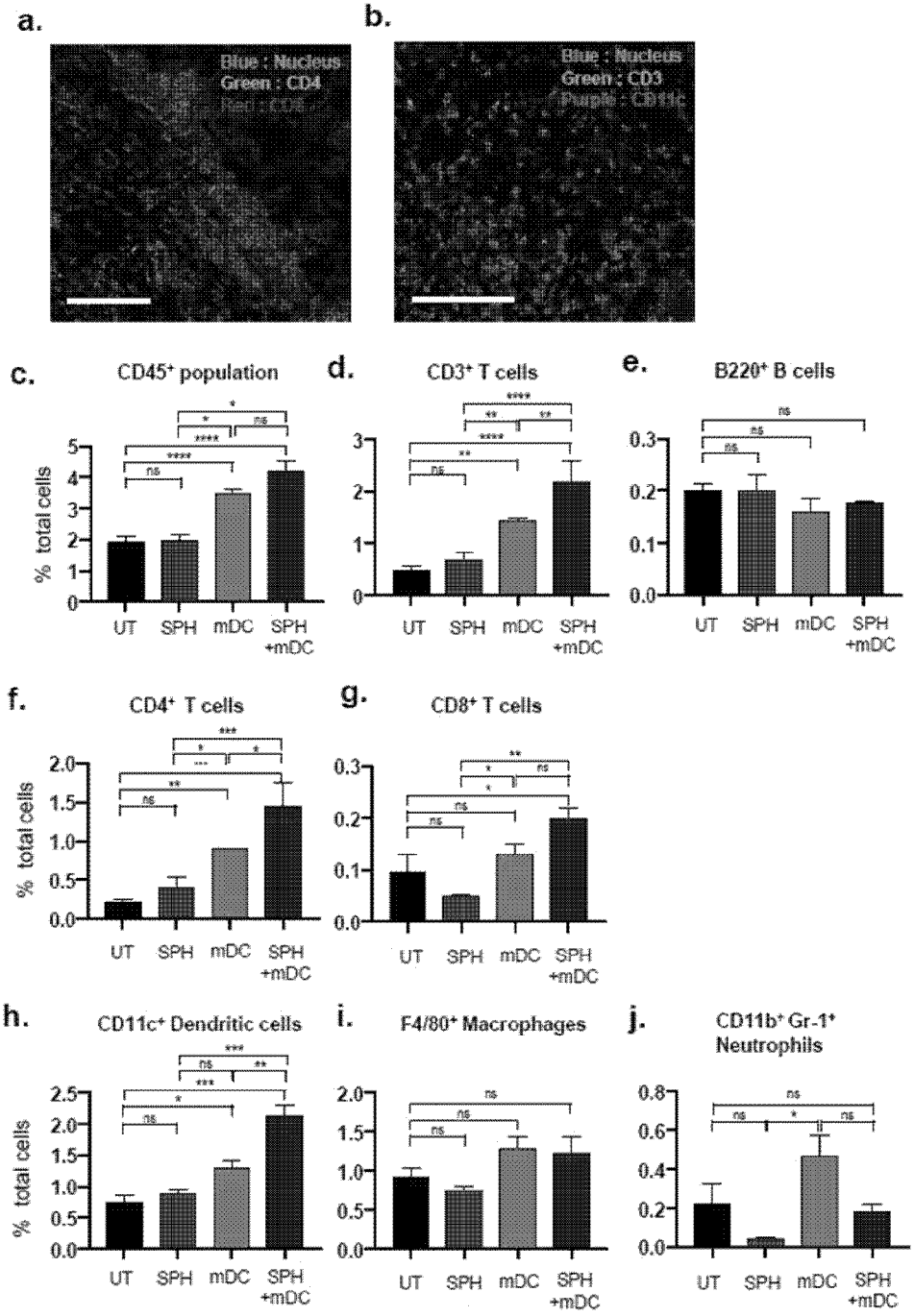
[도8]


a.
Media
SPH
Collagen I
Collagen I
Media
Splenocytes
SPH
Splenocytes
0 h
6 h
24 h
b.
T cells
0 h
12 h
Collagen I
w/ SPH
CD3+ T cells
c.
Dendritic cells
0 h
24 h
DAPI F-actin
Collagen I
200μm
200μm
w/o SPH
Dendritic cell
w/ SPH
d.
Cell number (#/2 mm²)
250
200
150
100
50
0
Migration (μm)
800
600
400
200
0
SPH - +

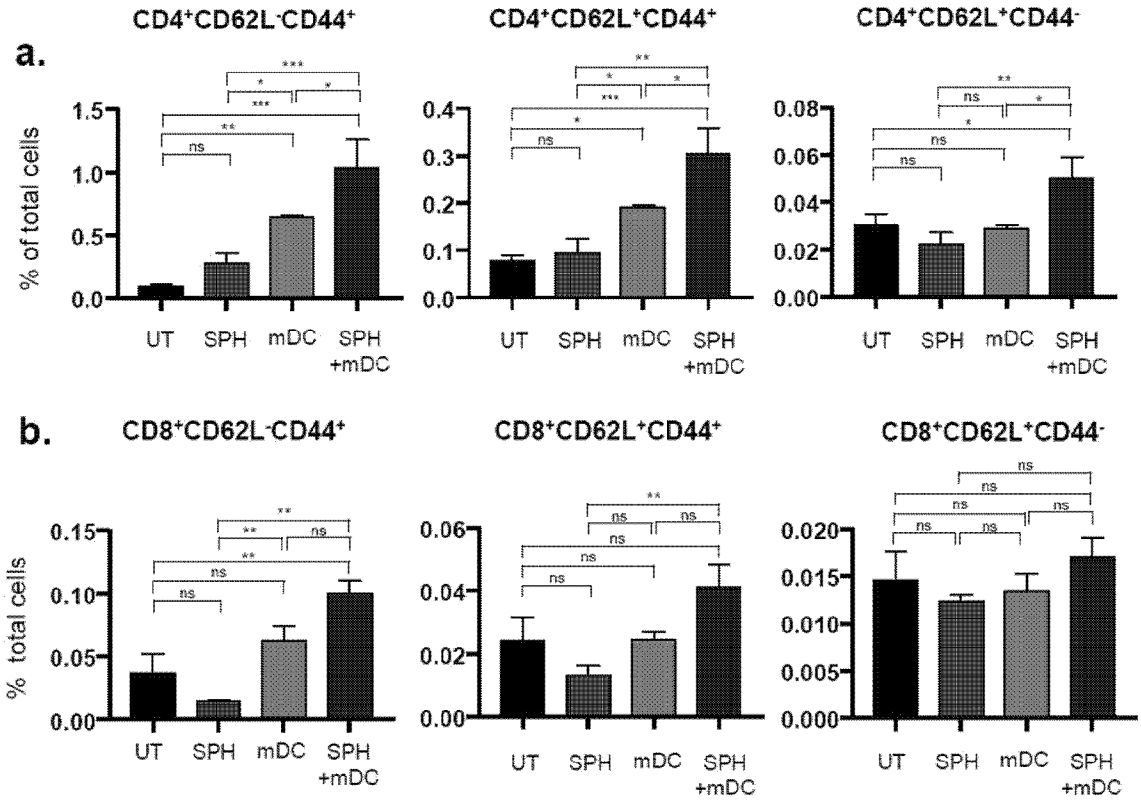
[도9]


a.
Transplant
Kidney
Blue : Nucleus
Green : CD3
Red : PDPN
b.
Transplant
Kidney
c.
Transplant
Kidney
Blue : Nucleus
Green : CD3
Red : PDPN
d.
****
**
***
4000
3000
2000
1000
0
CD3+ T Cells/mm²
SPH
mDC
SPH +mDC

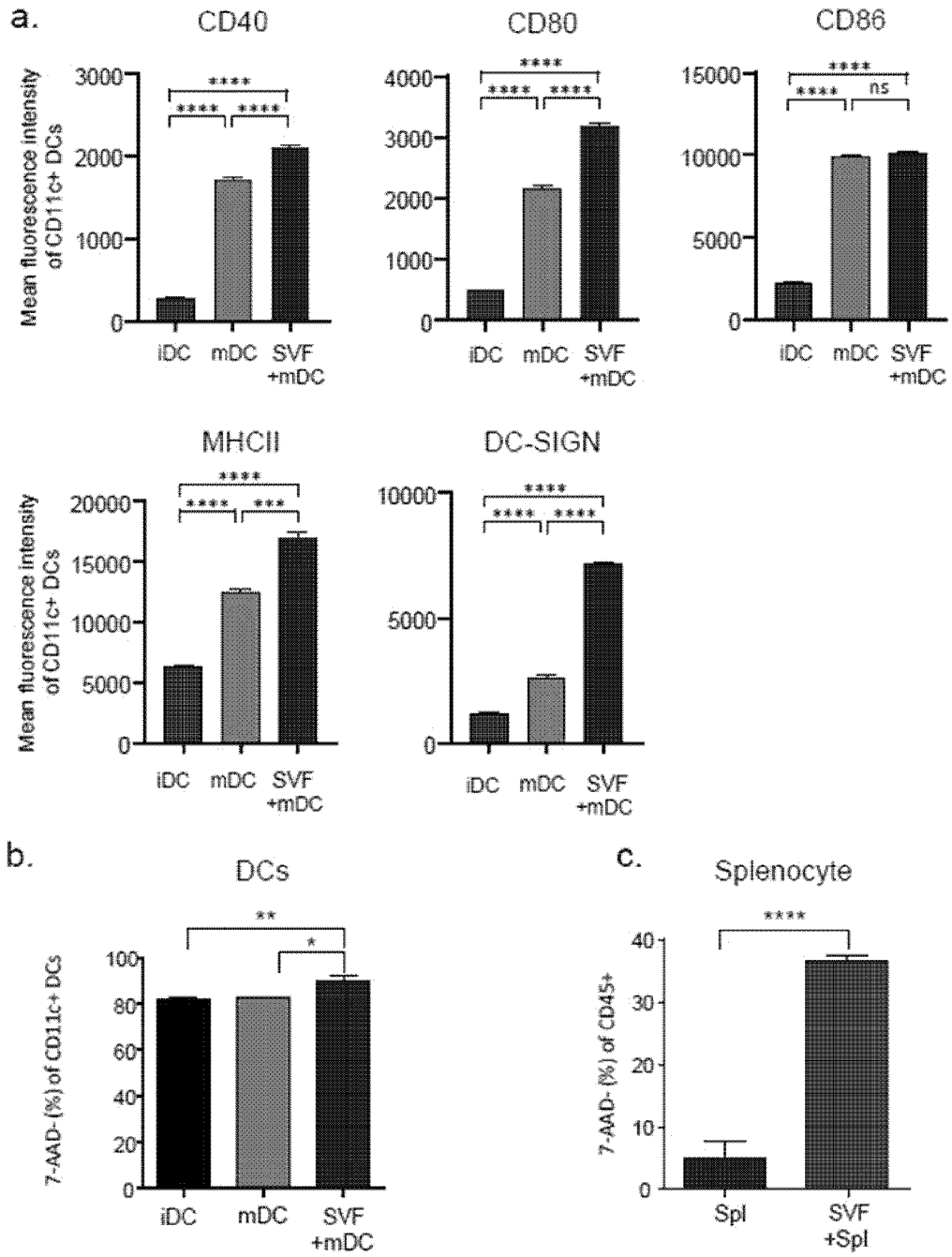
[도10]


a.
Blue : Nucleus
Green : CD4
b.
Blue : Nucleus
Green : CD3
Purple : CD11c
c.
CD45+ population
% total cells
d.
CD3+ T cells
e.
B220+ B cells
f.
CD4+ T cells
% total cells
g.
CD8+ T cells
h.
CD11c+ Dendritic cells
% total cells
i.
F4/80+ Macrophages
j.
CD11b+ Gr-1+ Neutrophils
UT
SPH
mDC
SPH +mDC

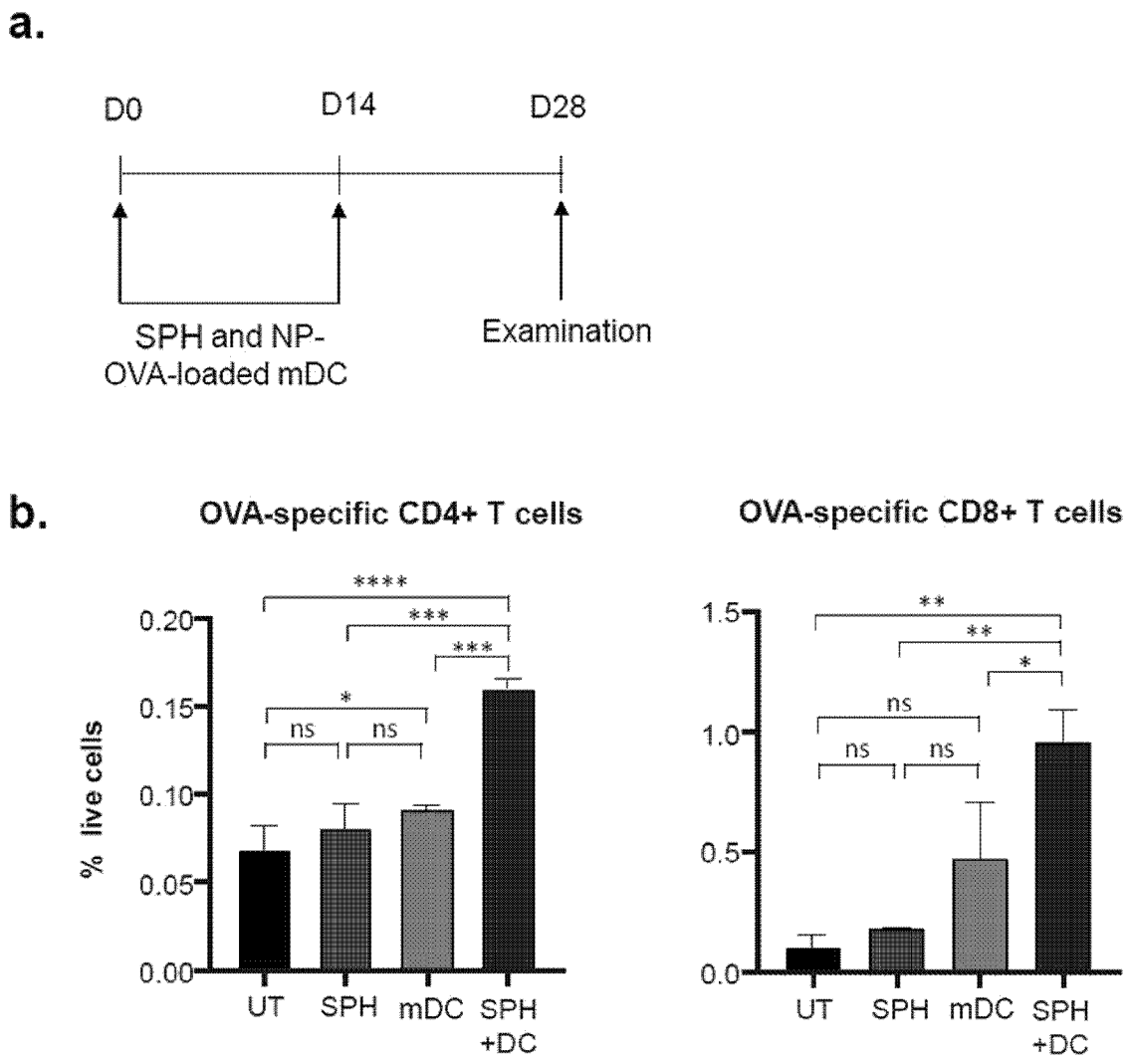
[도11]


a.
CD4+CD62L-CD44+
CD4+CD62L+CD44+
CD4+CD62L+CD44-
% of total cells
UT
SPH
mDC
SPH +mDC
b.
CD8+CD62L-CD44+
CD8+CD62L+CD44+
CD8+CD62L+CD44-
% total cells

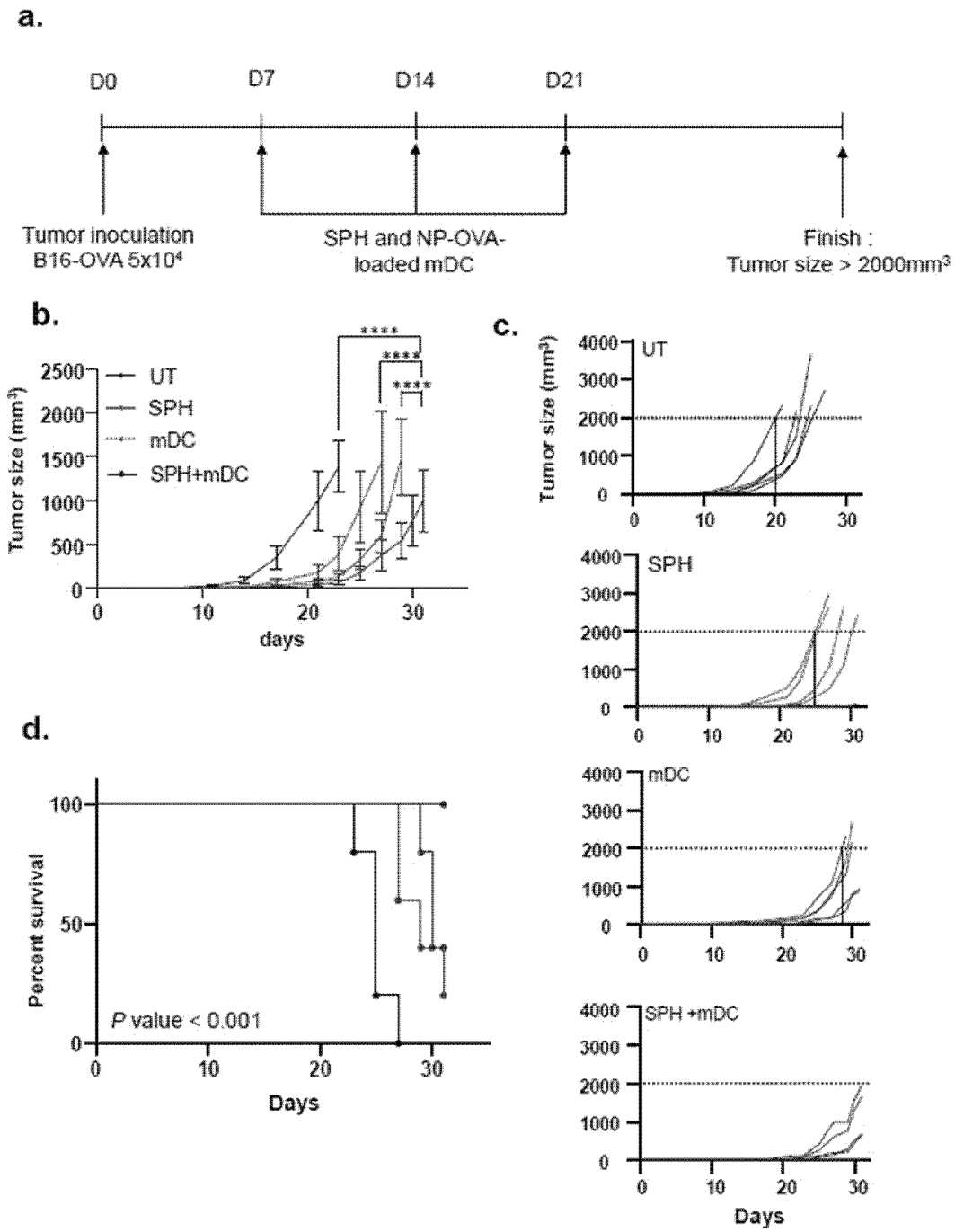
[도12]


a.
CD40
CD80
CD86
MHCII
DC-SIGN
Mean fluorescence intensity of CD11c+ DCs
iDC
mDC
SVF +mDC
b.
DCs
7-AAD- (%) of CD11c+ DCs
c.
Splenocyte
7-AAD- (%) of CD45+
Spl
SVF +Spl

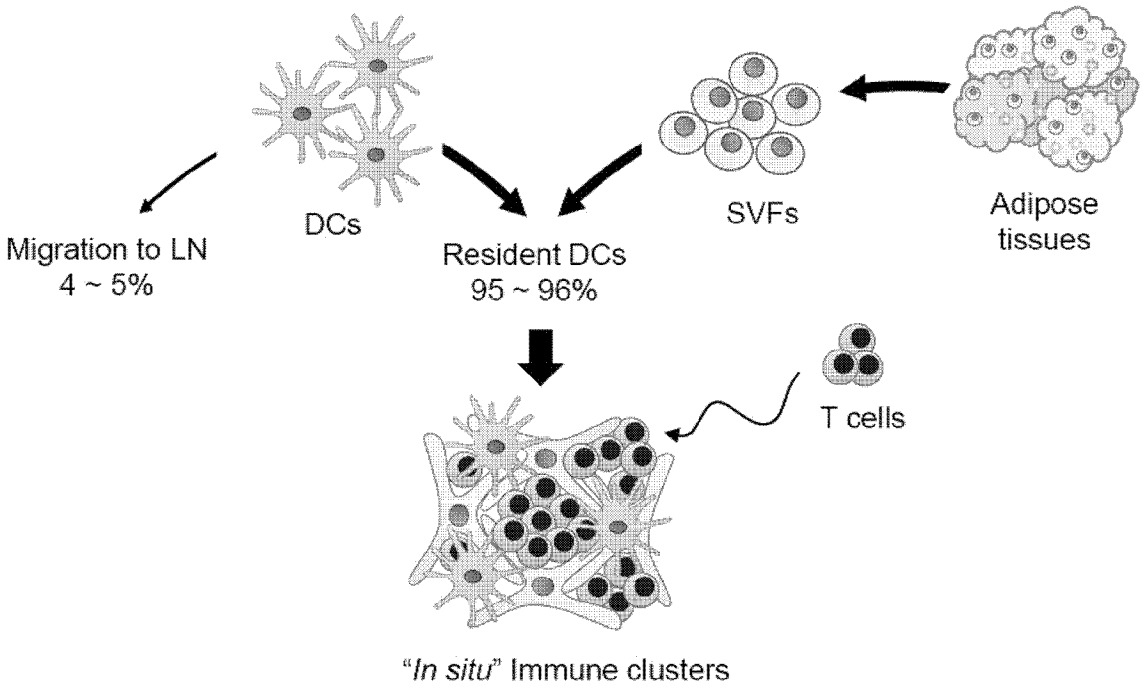
[도13]


a.
D0
D14
D28
SPH and NP-OVA-loaded mDC
Examination
b.
OVA-specific CD4+ T cells
OVA-specific CD8+ T cells
% live cells
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
1.5
1.0
0.5
0.0
****
***
***
*
ns
ns
**
**
*
ns
ns
ns
UT
SPH
mDC
SPH +DC

[도14]


a.
D0
D7
D14
D21
Tumor inoculation
B16-OVA 5x10⁴
SPH and NP-OVA-loaded mDC
Finish :
Tumor size > 2000mm³
b.
Tumor size (mm³)
UT
SPH
mDC
SPH+mDC
****
****
****
days
c.
Tumor size (mm³)
UT
SPH
mDC
SPH +mDC
Days
d.
Percent survival
P value < 0.001
Days

[도15]


Migration to LN
4 ~ 5%
DCs
Resident DCs
95 ~ 96%
SVFs
Adipose
tissues
T cells
"In situ" Immune clusters

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/006068

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/35(2014.01)i; **A61K 35/15**(2014.01)i; **A61K 39/39**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **C12N 5/077**(2010.01)i; **C12N 5/0784**(2010.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 35/35(2014.01); A61K 35/12(2006.01); A61K 35/76(2006.01); C12Q 1/04(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 지방조직 유래 기질혈관분획(adipose-derived stromal vascular fraction), 수지상세포(dendritic cell), 면역반응(immune response)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2018-0042284 A (STEMIMMUNE, INCORPORATED) 25 April 2018 (2018-04-25) See abstract; and paragraphs [0072]-[0077].	1-18
A	WCULEK, Stefanie K. et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. Nature Reviews Immunology. 29 August 2019, vol. 20, pp. 7-24. See entire document.	1-18
A	BOWLES, Annie C. et al. Immunomodulatory effects of adipose stromal vascular fraction cells promote alternative activation macrophages to repair tissue damage. Stem Cells. 2017, vol. 35, pp. 2198–2207. See entire document.	1-18
A	ANDERSON, Per et al. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating self-reactive T cell responses and dendritic cell function. Stem Cells International. 2017, vol. 2017, no. 2389753. See entire document.	1-18
A	US 2012-0164113 A1 (VICTOR, Steven) 28 June 2012 (2012-06-28) See entire document.	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 August 2021	**30 August 2021**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/006068

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2018-0042284 A	25 April 2018	CN 108135996 A	08 June 2018
		EP 3334456 A2	20 June 2018
		JP 2018-527344 A	20 September 2018
		JP 6788663 B2	25 November 2020
		KR 10-2201147 B1	11 January 2021
		US 10105436 B2	23 October 2018
		US 10857225 B2	08 December 2020
		US 2017-0043010 A1	16 February 2017
		US 2018-0326048 A1	15 November 2018
		US 2021-0046178 A1	18 February 2021
		WO 2017-027757 A2	16 February 2017
		WO 2017-027757 A3	23 March 2017
US 2012-0164113 A1	28 June 2012	CN 103443272 A	11 December 2013
		EP 2658969 A1	06 November 2013
		EP 2658969 A4	23 July 2014
		KR 10-2014-0048840 A	24 April 2014
		US 2013-0189234 A1	25 July 2013
		US 8440440 B2	14 May 2013
		WO 2012-091911 A1	05 July 2012

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/006068

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/35(2014.01)i; **A61K 35/15**(2014.01)i; **A61K 39/39**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **C12N 5/077**(2010.01)i; **C12N 5/0784**(2010.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/35(2014.01); A61K 35/12(2006.01); A61K 35/76(2006.01); C12Q 1/04(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 지방조직 유래 기질혈관분획(adipose-derived stromal vascular fraction), 수지상세포(dendritic cell), 면역반응(immune response)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2018-0042284 A (스템이뮨, 인코포레이티드) 2018.04.25 요약; 및 [0072]-[0077] 참조.	1-18
A	WCULEK, STEFANIE K. 등, "Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy." Nature Reviews Immunology, 2019.08.29., 20권, 페이지 7-24 전체 문헌 참조.	1-18
A	BOWLES, ANNIE C. 등, "Immunomodulatory effects of adipose stromal vascular fraction cells promote alternative activation macrophages to repair tissue damage." Stem Cells, 2017, 35권, 페이지 2198–2207 전체 문헌 참조.	1-18
A	ANDERSON, PER 등, "Allogeneic adipose-derived mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating self-reactive T cell responses and dendritic cell function." Stem Cells International, 2017, 2017권, 2389753호 전체 문헌 참조.	1-18
A	US 2012-0164113 A1 (VICTOR, STEVEN) 2012.06.28 전체 문헌 참조.	1-18

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2021년08월27일(27.08.2021)	**2021년08월30일(30.08.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	정다원
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/006068

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0042284 A	2018/04/25	CN 108135996 A	2018/06/08
		EP 3334456 A2	2018/06/20
		JP 2018-527344 A	2018/09/20
		JP 6788663 B2	2020/11/25
		KR 10-2201147 B1	2021/01/11
		US 10105436 B2	2018/10/23
		US 10857225 B2	2020/12/08
		US 2017-0043010 A1	2017/02/16
		US 2018-0326048 A1	2018/11/15
		US 2021-0046178 A1	2021/02/18
		WO 2017-027757 A2	2017/02/16
		WO 2017-027757 A3	2017/03/23
US 2012-0164113 A1	2012/06/28	CN 103443272 A	2013/12/11
		EP 2658969 A1	2013/11/06
		EP 2658969 A4	2014/07/23
		KR 10-2014-0048840 A	2014/04/24
		US 2013-0189234 A1	2013/07/25
		US 8440440 B2	2013/05/14
		WO 2012-091911 A1	2012/07/05