

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 2일 (02.01.2020)

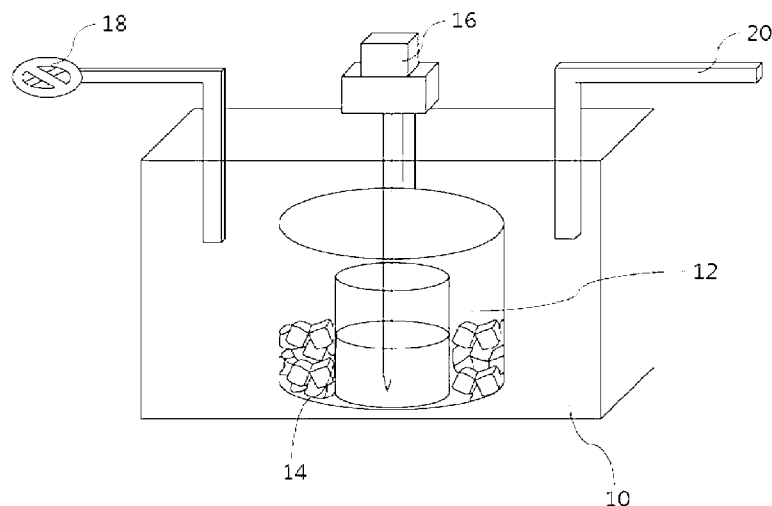


(10) 국제공개번호
WO 2020/004698 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 5/00* (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01) *A61K 35/12* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/007652
- (22) 국제출원일: 2018년 7월 5일 (05.07.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0074243 2018년 6월 27일 (27.06.2018) KR
- (71) 출원인: (주) 티아라줄기세포연구소 (TIARA STEM CELL INSTITUTE) [KR/KR]; 51573 경상남도 창원시 성산구 완암로 50, 벡스동 916호, 916-1호, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 김영실 (KIM, Young Sil); 51573 경상남도 창원시 성산구 창원천로 94번길 19, 101동 406호, Gyeongsangnam-do (KR). 박정은 (PARK, Jung Een); 51241 경상남도 창원시 마산회원구 내서읍 광려천남로 267, 108동 1303호, Gyeongsangnam-do (KR). 이혜진 (LEE, Hye Jin); 51512 경상남도 창원시 성산구 원이대로 522번길 4, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 김대현 (KIM, Dae Hyun); 51535 경상남도 창원시 성산구 창원대로 754 4층 6호, Gyeongsangnam-do (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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(54) Title: PREPARATION METHOD FOR CELL CULTURE MEDIUM COMPOSITION, PREPARATION METHOD FOR STEM CELL LYSATE EXTRACT (SHELLED STEM CELL) USING PREPARATION METHOD FOR CELL CULTURE MEDIUM COMPOSITION AND THREE-CONDITIONAL EXTRACTION METHOD OF EFFECTIVE INGREDIENT FROM STEM CELL, ANTI-ARTHRITIS THERAPEUTIC COMPOSITION USING SAME, ANTI-INFLAMMATORY THERAPEUTIC COMPOSITION USING SAME, AND CELL-REGENERATING THERAPEUTIC COMPOSITION

(54) 발명의 명칭: 세포배양용 배지 조성물 제조방법, 세포배양용 배지 조성물 제조방법과 줄기세포 유효성분 3 저 추출법을 이용한 줄기세포파쇄추출물(셸드줄기세포) 제조방법, 이를 이용한 항관절염 치료용 조성물, 이를 이용한 항염증 치료용 조성물 및 세포재생 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a preparation method for a cell culture medium composition and an extraction method for a stem cell lysate extract using the preparation method for a cell culture medium composition and a three-conditional extraction method of effective ingredients from stem cells. The cell culture medium composition comprises a base medium, hyaluronic acid, and an additive composition. The present invention has the advantage of preventing the damage of effective ingredients of stem cells because the stem cells are lysed in the three conditions of low temperature, low pressure, and storage when effective ingredients are extracted from stem cells. According to another embodiment, the preparation method for a stem cell lysate extract by using the preparation method



WO 2020/004698 A1

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

for a mass stem cell culture medium and the three-conditional extraction method comprises: a first step of extracting stem cells; a second step of culturing the extracted stem cells in the medium of the medium composition; a third step of subculturing the stem cells; a fourth step of acquiring cells from the cultured stem cells; a fifth step of lysing the acquired cells; and a sixth step of filtering the lysate.

(57) 요약서: 본 발명은 세포배양용 배지 조성물 제조방법 및 세포배양용 배지 조성물 제조방법과 줄기세포 유효성분 3저 추출법을 이용한 줄기세포파쇄추출물 제조방법에 관한 것으로 한다. 세포 배양용 배지 조성물은, 기본배지와, 히알루론산과, 첨가조성물을 포함하여 구성되는 것을 특징으로 한다. 본 발명은 줄기세포의 유효성분을 추출할 때 저온, 저압, 저장이라는 3저 환경에서 줄기세포의 파쇄가 이루어지기 때문에 줄기세포의 유효성분이 손상되는 것을 방지할 수 있는 이점이 있는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 다른 실시예인 줄기세포 대량배양용 배지 조성법과 줄기세포 유효성분 3저 추출법을 이용한 줄기세포파쇄추출물 제조방법의 구성은, 줄기세포를 추출하는 제 1단계와, 배지조성물의 배지에 상기 추출된 줄기세포를 배양하는 제 2단계와, 상기 줄기세포를 계대배양하는 제 3단계와, 상기 배양된 줄기세포에서 세포를 획득하는 제 4단계와, 상기 획득된 세포를 파쇄하는 제 5단계와, 상기 파쇄된 물질을 여과하는 제 6단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 한다.

명세서

발명의 명칭: 세포배양용 배지 조성물 제조방법, 세포배양용 배지 조성물 제조방법과 줄기세포 유효성분 3저 추출법을 이용한 줄기세포파쇄추출물(셀드줄기세포) 제조방법, 이를 이용한 항관절염 치료용 조성물, 이를 이용한 항염증 치료용 조성물 및 세포재생 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 세포배양용 배지 조성물 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 줄기세포를 대량으로 배양하여 수득률을 높일 수 있고, 줄기세포 내의 유효성분 수득률을 높일 수 있는 세포배양용 배지 조성물 제조방법 및 세포배양용 배지 조성물 제조방법과 줄기세포 유효성분 3저 추출법을 이용한 줄기세포파쇄추출물 제조방법, 이를 이용한 항염증 치료용 조성물 및 세포재생 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 줄기세포(stem cell)는 여러 종류의 신체 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 미분화 세포로, 다양한 조직 세포로 분화할 수 있는 능력 때문에 이를 이용한 연구가 많이 행해지고 있다. 줄기세포 중 성체 줄기세포는 지방, 골수, 재대혈 또는 태반 등과 같은 부위에서 쉽게 얻을 수 있으며, 배아 줄기세포에 비해 윤리적 문제가 적고, 사용자 본인의 세포를 이용하면 면역거부반응도 적기 때문에 이를 이용한 연구가 많이 이루어지고 있다.
- [3] 성체 줄기세포를 바로 주입하는 치료는 면역거부반응 등의 이유로 자가치료에 한정된다. 이 자가치료의 한계를 뛰어넘기 위해서는 줄기세포를 파쇄하여 면역거부반응을 일으키는 면역원성이 붙어 있는 세포막을 제거하는 것이 하나의 방법이 될 수 있다. 본원발명의 발명자는 상기 줄기세포파쇄추출물의 개념을 처음으로 정립하고 그 원천 특허를 출원한 바 있다. 그 원천 특허의 장점은 면역거부반응을 일으키는 면역원성이 붙어 있는 세포막을 제거함으로써 누구나 사용이 가능한 범용성이 있기 때문에 대량배양을 할 이유가 성립되고, 그 결과 줄기세포의 대중화와 산업화를 이룰 수 있다.
- [4] 그래서, 줄기세포의 대중화와 산업화를 이루기 위해서 줄기세포의 대량배양에 유용한 방법과 그 유효성분을 추출하는 방법의 지속적인 연구 및 개발이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 줄기세포를 대량으로 배양하여, 세포의 수득을 높이는 줄기세포 대량배양용 배지 조성법과,

줄기세포 유효성분 수집율을 높일 수 있는 줄기세포 유효성분 3저 추출법을 이용한 줄기세포과쇄추출물 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [6] 상술한 목적을 달성하기 위한 것으로, 본 발명인 세포 배양용 배지 조성물 제조방법은, 기본배지와, 히알루론산과, 첨가조성물을 포함하여 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [7] 상기 첨가조성물은, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 히드록시프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 발린, bFGF, EGF, VEGF, KGF, HGF, TGF, 비타민C, 비타민B1, 비타민B12, 비타민E, 셀레늄, 트랜스페린을 포함하여 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [8] 상기 기본배지는, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F12, DMEM-F12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), MacCoy's 5A 배지, AmnioMax, AminoMaxII complete Medium, Chang's Medium MesemCult-XF Medium 중 어느 하나인 것을 특징으로 한다.
- [9] 상기 첨가조성물은 상기 배지조성물에 대하여 히알루론산은 10 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 글리신은 1ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 히스티딘은 1ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 이소류신은 1ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 메티오닌은 1ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 페닐알라닌은 1ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 프롤린은 10ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 히드록시프롤린은 5ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 세린은 1ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 트레오닌은 1ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 트립토판은 1ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 티로신은 1ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 발린은 2ng/ml의 농도로 포함되고, 상기 bFGF는 9 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 EGF는 1.5 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 VEGF는 1 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 KGF는 1.2 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 HGF는 0.5 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 TGF는 0.5 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 비타민C는 2 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 비타민B1는 0.5 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 비타민B12는 3 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 비타민E는 500 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 셀레늄은 1.8 μ g/ml의 농도로 포함되고, 상기 트랜스페린은 12 μ g/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 한다.
- [10] 그리고, 줄기세포 대량배양용 배지 조성법과 줄기세포 유효성분 3저 추출법을 이용한 줄기세포과쇄추출물 제조방법은, 줄기세포를 추출하는 제 1단계와, 상술한 배지조성물의 배지에 상기 추출된 줄기세포를 배양하는 제 2단계와, 상기 줄기세포를 계대배양하는 제 3단계와, 상기 배양된 줄기세포에서 세포를 획득하는 제 4단계와, 상기 획득된 세포를 과쇄하는 제 5단계와, 상기 과쇄된 물질을 여과하는 제 6단계와, 상기 6단계 여과된 물질을 동결건조하여 보관

하거나 활용하는 7단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 한다.

- [11] 상기 제 5단계에서, 내부에 공간이 형성되는 외부와 내부가 차단되는 몸체부(10)와, 상기 몸체부(10) 내부에 마련되고 상방이 개구되는 제 1용기부(12)와, 상기 제 1용기부(12)에 대해 상대적으로 작은 크기로 형성되며, 상기 제 1용기부(12) 내에 마련되며 상방이 개구되어 내부에 줄기세포가 투입되는 제 2용기부(14)와, 상기 제 2용기부(14) 내부의 줄기세포를 파쇄하는 파쇄부(16)와, 상기 몸체부(10) 내부로 공기의 유동을 단속하는 밸브(18)와, 상기 몸체부(10) 내부에서 공기를 흡입하는 펌프(20)를 포함하는 줄기세포 유효성분 추출장치를 이용하고, 상기 줄기세포는 저장성 용액에 투입후 상기 제 2용기부에 투입하는 것을 특징으로 한다.
- [12] 본 발명의 다른 실시예인 줄기세포파쇄추출물을 이용한 항염증 치료용 조성물인 것을 특징으로 한다.
- [13] 본 발명의 또 다른 실시예인 줄기세포파쇄추출물을 이용한 세포재생 치료용 조성물인 것을 특징으로 한다.
- [14] 본 발명의 또 다른 실시예인 줄기세포파쇄추출물을 이용한 항관절염 치료용 조성물인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [15] 본 발명에 의한 세포배양용 배지 조성물 제조방법 및 세포배양용 배지 조성물 제조방법과 줄기세포 유효성분 3저 추출법을 이용한 줄기세포파쇄추출물 제조방법의 효과는 다음과 같다.
- [16] 혈청을 사용하지 않아 안정하며, 스캐폴드를 사용하여 배양이 증대되어 줄기세포의 유효인자의 수득률이 높아지는 이점이 있다.
- [17] 줄기세포의 유효성분을 추출할 때 저온, 저압, 저장이라는 3저 환경에서 줄기세포의 파쇄가 이루어지기 때문에 줄기세포의 유효성분이 손상되는 것을 방지할 수 있는 이점이 있다.
- [18] 그리고, 상기 두 가지 방법을 이용한 줄기세포파쇄추출물은 면역거부반응을 일으키는 면역원성이 붙은 세포막이 완전히 제거되어 누구나 사용이 가능한 범용성이 있어서 줄기세포의 대중화와 산업화를 이룰 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 본 발명에 의한 줄기세포 유효성분 3저 추출장치를 보인 도면.
- [20] 도 2는 본 발명에 의한 줄기세포파쇄추출물의 항 관절염 효과를 확인하기 위하여 연골세포의 특정마커인 CD44를 이용하여 연골세포임을 확인하는 도면.
- [21] 도 3은 연골세포에 줄기세포파쇄성분추출물을 농도별 처리하여 24시간 배양, 세포생존율을 측정하여 물질의 세포에 대한 독성을 확인하는 도면.
- [22] 도 4는 연골세포에 IL-1 α 를 처리해 염증을 일으킨 후, 염증을 일으킨 연골세포에 줄기세포파쇄추출물을 농도별 처리하여 염증매개 인자인 NO생성 억제제를 확인한 도면.

- [23] 도 5는 IL-1 α 처리로 유도된 연골세포에 줄기세포파쇄추출물을 처리한 후 유도된 NO의 생성 억제 효과는 iNOS와 COX-2의 발현 억제와 연관을 확인한 도면.
- [24] 도 6은 줄기세포파쇄추출물을 처리한 연골세포는 IL-1 α 에 의한 NF- κ B 단백질이 핵내로 이동되는 것을 억제하는 것을 확인한 도면.
- [25] 도 7은 IL-1 α 에 의해 염증이 발생한 연골세포에 줄기세포파쇄추출물을 처리하여 iMAPKs 활성을 확인한 도면.
- [26] 도 8은 유전학적 발현을 통해 본 줄기세포추출물의 항염증 효과 확인하는 도면.
- [27] 도 9는 연골 형성 발달에 관여하는 sox-9의 유전자를 통해 연골형성 효과를 확인하는 도면.
- [28] 도 10은 본 발명에 의한 줄기세포파쇄추출물을 농도별 처리한 결과 유의한 세포 독성의 발현 유무를 보인 도면.
- [29] 도 11은 본 발명에 의한 줄기세포파쇄추출물을 LPS와 동시에 처리한 결과 세포 독성의 발현유무를 보인 도면.
- [30] 도 12는 본 발명에 의한 줄기세포파쇄추출물을 LPS와 처리한 결과 세포 형태의 변화를 보인 도면.
- [31] 도 13은 본 발명에 의한 줄기세포파쇄추출물을 LPS와 처리한 결과 산화질소 농도의 변화를 보인 도면.
- [32] 도 14는 본 발명에 의한 줄기세포파쇄추출물을 LPS와 처리한 결과 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 변화를 보인 도면.
- [33] 도 15는 본 발명에 의한 줄기세포파쇄추출물을 LPS와 처리한 결과 TNF α 의 변화를 보인 도면
- [34] 도 16은 본 발명에 의한 줄기세포파쇄추출물을 LPS와 처리한 결과 IL-1 β 의 변화를 보인 도면.
- [35]
- [36] 10: 몸체부 12: 제 1용기부
- [37] 14: 제 2용기부 16: 파쇄부
- [38] 18: 밸브 20: 펌프
- [39]

발명의 실시를 위한 형태

- [40] 이하, 본 발명에 의한 세포배양용 배지 조성물 제조방법 및 세포배양용 배지 조성물 제조방법과 줄기세포 유효성분 3제 추출법을 이용한 줄기세포파쇄추출물 제조방법의 바람직한 실시예가 첨부된 도면을 참고하여 상세하게 설명한다.
- [41] 먼저, 본 발명인 줄기세포 유효성분 추출장치는 도 1에 도시된 바와 같이, 내부에 공간이 형성되는 외부와 내부가 차단되는 몸체부(10)와, 상기 몸체부(10) 내부에 마련되고 상방이 개구되는 제 1용기부(12)와, 상기 제 1용기부(12)에 대해

상대적으로 작은 크기로 형성되며, 상기 제 1용기부(12) 내에 마련되며 상방이 개구되어 내부에 줄기세포가 투입되는 제 2용기부(14)와, 상기 제 2용기부(14) 내부의 줄기세포를 파쇄하는 파쇄부(16)와, 상기 몸체부(10) 내부로 공기의 유동을 단속하는 밸브(18)와, 상기 몸체부(10) 내부에서 공기를 흡입하는 펌프(20)를 포함하여 구성될 수 있다.

[42] 먼저, 본 발명인 추출장치에는 몸체부(10)가 마련된다. 상기 몸체부(10)는 도 1에 도시된 바와 같이, 내부에 밀폐된 공간이 마련되어 외부와 내부가 차단되도록 한다.

[43] 상기 몸체부(10) 내부에는, 제 1용기부(12)가 마련된다. 상기 제 1용기부(12)는 내부에 공간이 마련되고 상부가 개방되도록 형성된다. 상기 제 1용기부(12)에는 얼음이 적재되어 아래에서 설명될 제 2용기부(14) 내부의 줄기세포의 온도를 낮게 만드는 역할을 한다.

[44] 상기 제 1용기부(12) 내부에는 제 2용기부(14)가 마련된다. 상기 제 2용기부(14)는 상기 제 1용기부(12)와 마찬가지로 내부에 공간이 마련되고 상부가 개방되도록 형성된다. 특히, 상기 제 2용기부(14)는 상기 제 1용기부(12)보다 상대적으로 작은 크기로 형성되며, 상기 제 2용기부(14)는 상기 제 1용기부(12) 내부에 적재될 수 있다. 상기 제 2용기부(14)에는 줄기세포가 적재될 수 있다.

[45] 그리고, 본 발명에는 파쇄부(16)가 더 마련될 수 있다. 상기 파쇄부(16)는 상기 제 2용기부(14) 내부에 적재되는 줄기세포를 초음파를 이용하여 파쇄하는 역할을 한다.

[46] 또한, 본 발명에는 외부와 공기가 유동되는 유로가 마련되며, 상기 유로를 통한 공기의 흐름을 선택적으로 차단하는 밸브(18)가 마련된다. 상기 유로의 타단에는 펌프(20)가 마련되어 상기 몸체부(10) 내부의 공기를 외부로 배출시켜 상기 몸체부(10) 내부를 진공 상태로 만들 수 있다.

[47] 또한, 상기 제 2용기부에 투입되는 줄기세포는 저장액에 넣어 상기 줄기세포가 팽창되도록 할 수 있다. 즉, 상기 줄기세포를 증류수 같은 저장액에 넣어 상기 줄기세포가 삼투압에 의하여 팽창되도록 하여 작은 충격으로 파쇄되도록 할 수 있다.

[48]

[49] 그리고, 본 발명에 의한 줄기세포 대량배양용 배지조성물 및 의 배지조성방법에 대해 상세하게 설명한다.

[50]

[51] 본 발명에서는 새로운 배지를 제조하여 세포수득량을 높이고, 세포를 파쇄하였을 때 유효성분을 더욱 많이 수득할 수 있도록 한다.

[52] 상기 배지는 기본 배지는 동물 세포의 배양에 통상적으로 사용되는 공지의 배지들로서, 예컨대 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F12, DMEM-F12,

α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), MacCoy's 5A 배지, AmnioMax, AminoMaxII complete Medium, Chang's Medium MesemCult-XF Medium 등일 수 있으나, 특별히 이에 한정되지 아니한다.

- [53] 그리고, 상기 배지에 첨가조성물을 추가한다. 상기 첨가조성물은 히알루론산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 히드록시프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 발린, bFGF, EGF, VEGF, KGF, HGF, TGF, 비타민C, 비타민B1, 비타민B12, 비타민E, 셀레늄, 트랜스페린을 포함하여 구성될 수 있다.
- [54] 먼저, 상기 첨가조성물 중 히알루론산이 포함된다. 상기 히알루론산은 세포배양시 스캐폴드 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 10 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [55] 그리고, 상기 첨가조성물에는 글리신이 포함된다. 상기 글리신은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [56] 상기 첨가조성물에는 히스티딘이 포함된다. 상기 히스티딘은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [57] 상기 첨가조성물에는 이소류신이 포함된다. 상기 이소류신은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [58] 상기 첨가조성물에는 메티오닌이 포함된다. 상기 메티오닌은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [59] 상기 첨가조성물에는 페닐알라닌이 포함된다. 상기 페닐알라닌은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [60] 상기 첨가조성물에는 프롤린 포함된다. 상기 프롤린은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 10ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [61] 상기 첨가조성물에는 히드록시프롤린이 포함된다. 상기 히드록시프롤린은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 5ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [62] 상기 첨가조성물에는 세린이 포함된다. 상기 세린은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [63] 상기 첨가조성물에는 트레오닌이 포함된다. 상기 트레오닌은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여

- 1ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [64] 상기 첨가조성물에는 트립토판이 포함된다 상기 트립토판은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [65] 상기 첨가조성물에는 티로신이 포함된다 상기 티로신은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [66] 상기 첨가조성물에는 발린이 포함된다 상기 발린은 아미노산으로 세포의 성장에 영양성분 역할을 하는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 2ng/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [67]
- [68] *그리고, 상기 첨가조성물에는 bFGF가 포함된다. 상기 bFGF는 배양되는 세포의 성장을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 9 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [69] 상기 첨가조성물에는 EGF가 포함된다. 상기 EGF는 배양되는 세포의 성장을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1.5 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [70] 상기 첨가조성물에는 VEGF가 포함된다. 상기 VEGF는 배양되는 세포의 성장을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [71] 상기 첨가조성물에는 KGF가 포함된다. 상기 KGF는 배양되는 세포의 성장을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1.2 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [72] 상기 첨가조성물에는 HGF가 포함된다. 상기 HGF는 배양되는 세포의 성장을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 0.5 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [73] 상기 첨가조성물에는 TGF가 포함된다. 상기 TGF는 배양되는 세포의 성장을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 0.5 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [74] 그리고, 상기 첨가조성물에는 비타민C가 포함된다. 상기 비타민C는 배양되는 세포의 성장을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 2 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [75] 상기 첨가조성물에는 비타민B1가 포함된다. 상기 비타민B1는 배양되는 세포의 성장을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 0.5 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [76] 상기 첨가조성물에는 비타민B12가 포함된다. 상기 비타민B12는 배양되는 세포의 성장을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 3 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [77] 상기 첨가조성물에는 비타민E가 포함된다. 상기 비타민E는 배양되는 세포의 성장을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 500 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [78] 그리고, 상기 첨가조성물에는 셀레늄이 포함된다. 상기 셀레늄은 세포의 활성을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 1.8 μ g/ml의 농도로 포함될 수

있다.

[79] 상기 첨가조성물에는 트랜스페린이 포함된다. 상기 트랜스페린은 세포의 활성을 돕는 것으로, 상기 배지조성물에 대하여 $12\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함될 수 있다.

[80] 그리고, 본 발명에 의한 줄기세포 유효성분 추출장치를 이용하여 세포배양용 배지 조성물 제조방법 및 세포배양용 배지 조성물 제조방법과 줄기세포 유효성분 3저 추출법을 이용한 줄기세포파쇄추출물 제조방법에 대해 설명한다.

[81]

[82] 제 1단계: 줄기세포를 인체의 지방, 골수, 제대혈 또는 태반 중 어느 하나에서 추출한다. 본원발명에서는 지방흡입술로 지방을 수거한 후 효소처리와 여러번 원심분리를 통하여 정제하여 지방줄기세포를 분리한다.

[83]

[84] 제 2단계: 상기 분리된 줄기세포를 상술한 본원발명의 대량배양용 배지조성물을 사용하여 만든 배지를 이용하여 배양한다. 상기 줄기세포 대량배양용 배지조성물을 이용하게 되면 줄기세포의 성장속도를 높여 줄기세포의 수득율이 높아진다.

[85]

[86] 제 3단계; 줄기세포가 배양된 배양액을 제거한 다음 줄기세포를 분리하고 세포부유액을 수득하여 계대배양한다.

[87]

[88] 제 4단계: 세포가 충분한 밀도로 자라면 세포를 플레이트에서 분리한다. 줄기세포를 분리한 후 생리식염수 또는 PBS(phosphate buffer saline)를 이용하여 수차례 세척한다. Cell counting 기로 세포수를 측정하여 항상 일정한 농도의 부유액을 만든다.

[89]

[90] 제 5단계; 줄기세포막의 파쇄가 가능하도록 상등액을 제거하고 증량제를 첨가한다. 초음파를 가하여 줄기세포 유효성분 3저 추출법으로 세포를 파쇄한다. 현미경을 통해 줄기세포가 전부 파쇄된 것이 확인되면 파쇄를 종료한다. 상기 3저 추출법의 과정을 거치면 단시간 내 효과적인 세포막 파쇄를 하여 줄기세포 내부의 성장인자와 세포활성물질 등 유효성분의 대부분이 유지된다.

[91]

[92] 제 6단계: 저장성 증량제와 줄기세포 파쇄 혼합물에는 줄기세포 내용물인 다양한 성장인자, 세포활성물질과 함께 세포막 잔여물이 존재한다. 그 중 필요하지 않은 세포막 잔여물을 원심분리 및 미세필터를 사용하여 제거한다. 이때 세포막에 붙어있는 면역거부반응을 일으키는 면역원성이 제거되어 누구나 사용 가능한 줄기세포 유효성분이 추출된다.

[93]

- [94] *
- [95] 제 7단계; 상기를 거쳐 만든 줄기세포 파쇄추출물을 냉동 보관하거나 동결 건조하여 보관하고, 활용한다.
- [96]
- [97] 상기 단계를 거쳐 얻은 유효성분들을 줄기세포파쇄추출물이라 하며 일명 쉼드줄기세포(Shelled Stem Cell)라 한다.
- [98]
- [99] 이하, 본 발명에 의한 첨가조성물에 의한 줄기세포 대량배양용 배지 조성물을 이용하여 줄기세포의 파쇄추출물 유효성분 추출하여 실험한 결과를 나타낸 것이다.
- [100]
- [101] [비교예 1]
- [102] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 혈청으로 FBS가 11,12중량부 첨가되고, 항생제로 penicillin이 0.6중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정에 의하여 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [103]
- [104] [실시예 2]
- [105] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 혈청이 포함되지 않고 영양성분들이 함유된 세럼(serum) 20중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [106]
- [107] [실시예 3]
- [108] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 표 1에 나타난 본 발명의 첨가조성물을 5중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [109]
- [110] [실시예 4]
- [111] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 표 1에 나타난 본 발명의 첨가조성물을 10중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [112]
- [113] [실시예 5]
- [114] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 표 1에 나타난 본 발명의 첨가조성물을 15중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [115]
- [116] [실시예 6]

- [117] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 표 1에 나타난 본 발명의 첨가조성물을 20중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [118]
- [119] [실시예 7]
- [120] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 표 1에 나타난 본 발명의 첨가조성물을 25중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [121]
- [122] [실시예 8]
- [123] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 표 1에 나타난 본 발명의 첨가조성물을 30중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [124]
- [125] [실시예 9]
- [126] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 표 1에 나타난 본 발명의 첨가조성물을 35중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [127]
- [128] [실시예 10]
- [129] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 표 1에 나타난 본 발명의 첨가조성물을 40중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [130]
- [131] [실시예 11]
- [132] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 표 1에 나타난 본 발명의 첨가조성물을 45중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [133]
- [134] [실시예 12]
- [135] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100중량부에 표 1에 나타난 본 발명의 첨가조성물을 50중량부 혼합한 배지에 줄기세포를 배양하고, 이를 상술한 과정을 따라 성장시키고, 유효인자를 추출하였다.
- [136]

[137] [표1]

분류	종류	농도	
스캐폴드	히알루론산	10	$\mu\text{g/ml}$
아미노산	글리신	1	ng/ml
	히스티딘	1	ng/ml
	이소류신	1	ng/ml
	메티오닌	1	ng/ml
	페닐알라닌	1	ng/ml
	프롤린	10	ng/ml
	히드록시프롤린	5	ng/ml
	세린	1	ng/ml
	트레오닌	1	ng/ml
	트립토판	1	ng/ml
	티로신	1	ng/ml
	발린	2	ng/ml
성장인자	bFGF	9	$\mu\text{g/ml}$
	EGF	1.5	$\mu\text{g/ml}$
	VEGF	1	$\mu\text{g/ml}$
	KGF	1.2	$\mu\text{g/ml}$
	HGF	0.5	$\mu\text{g/ml}$
	TGF	0.5	$\mu\text{g/ml}$
비타민	비타민C	2	$\mu\text{g/ml}$
	비타민B1	0.5	$\mu\text{g/ml}$
	비타민B12	3	$\mu\text{g/ml}$
	비타민E	500	$\mu\text{g/ml}$
미량원소	셀레늄	1.8	ng/ml
	트랜스페린	12	$\mu\text{g/ml}$

[138]

[139] 다음으로, 본 발명에 의한 세포 배양용 배지 조성물에 의한 세포를 배양한 결과 세포가 수득된 양을 비교한 실험결과를 설명한다.

[140]

[141]

[142] [표2]

측정 형태		세포파쇄 전 수득
검출량(평균)0	군	세포수득량(개/ml)
	대조군	1.1×10^4
	비교예 1	2.3×10^5
	실시예 1	8.7×10^5
	실시예 2	8.6×10^5
	실시예 3	8.9×10^5
	실시예 4	9.3×10^5
	실시예 5	9.7×10^5
	실시예 6	1.2×10^6
	실시예 7	1.5×10^6
	실시예 8	1.8×10^6
	실시예 9	2.1×10^6
	실시예 10	2.4×10^6
	실시예 11	2.5×10^6
	실시예 12	2.5×10^6

[143] 표 2에 나타난 바와 같이, 실시예 2 내지 실시예 12의 결과 세포의 수득량이 높음을 확인할 수 있다. 다만, 실시예 2의 경우 혈청을 투입하는 실시예 1과 근사하며, 실시예 11 및 실시예 12는 증가율이 상대적으로 낮아 수득 효율이 떨어지는 것을 확인할 수 있다.

[144]

[145] 다음으로, 본 발명에 의한 세포 배양용 배지 조성물에 의한 세포를 배양한 결과 수득된 세포를 파쇄한 결과 유효성분의 검출량을 비교한 실험결과를 설명한다. 특히, 실시예 1과 비교하여 첨가조성물의 추가량이 동일한 실시예 6을 비교하였다.

[146]

[147] [표3]

측정 형태	검출량 (평균)				
	군	대조군	비교예 1	실시예 1	실시예 6
세포파쇄 후	총단백 (mg/ml)	50.48 ±1.07	181.12 ±1.45	961.53 ±2.03	2002.13±2.82
세포파쇄 후	TGF(pg/ml)	13.06±1.85	113.76±2.22	124.84±2.01	230.90±2.24
세포파쇄 후	VEGF(pg/ml)	110.01±3.52	350.07±2.68	721.04±4.27	1902.35±3.59
세포파쇄 후	KGF(pg/ml)	9.37±0.25	55.63±0.47	105.97±0.49	460.04±0.52
세포파쇄 후	프로콜라겐(ng/ml)	83.10±1.43	261.26±4.61	451.10±2.08	1498.66±16.42

[148]

[149] 표 3에 나타난 바와 같이, 실시예 6의 결과 세포의 유효성분의 검출량이 높음을 확인할 수 있다. 또한, 실시예 1과 비교하여 수득량이 유사하거나 큰 실시예 3 내지 실시예 10의 경우 실시예 1 및 비교예 1에 비하여 검출량이 높을 것임을 예상할 수 있다.

[150]

[151] 이하 줄기세포파쇄추출물이 연골세포에 작용하여 항 관절염 및 연골 재생 효과를 확인하는 시험을 상세하게 설명한다.

[152]

[153] **1-1. 관절연골세포의 분리 및 배양**

[154]

[155] 시험 전, Wistar rat 계 암컷 흰쥐의 연골을 채취하여 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양 후, 연골세포의 특정마커인 CD44를 이용해 연골세포임을 확인한다.(배양조건 37°5% CO²)

[156]

[157] **1-2. 결과**

[158] 연골세포의 특정마커인 CD44를 이용하여 연골세포임을 확인하였다.

[159]

[160] **2-1. 세포독성 및 NO생성 억제효과**

[161] 1) 연골세포에 줄기세포파쇄성분추출물을 농도별 처리하여 24시간 배양, 세포생존율을 측정하여 물질의 세포에 대한 독성을 확인한다.

[162] 2) 연골세포에 IL-1 α 를 처리해 염증을 일으킨다.

[163] 3) 염증을 일으킨 연골세포에 줄기세포파쇄성분추출물을 농도별 처리하여
염증매개 인자인 NO생성 억제를 확인한다.(*NO;Nitric Oxide)

[164]

[165] 2-2. 결과

[166] 1) 농도별 처리하여 세포생존율을 측정한 결과, 20 ng까지의 농도에서
세포독성을 나타내지 않았다. (농도 0,5,10,20 ng/ml)

[167] 2) 염증유도물질인 IL-1 α 를 처리한 세포에서는 NO가 증가함 확인하였다.
염증을 유도한 연골세포에 줄기세포파쇄성분추출물을 처리한 결과 20ng/ml의
농도에서 약 30%의 염증억제 반응을 확인하였다.(농도 염증유도안한세포,
염증유도한세포, 5,10,20ng)

[168]

[169] **3-1. iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현 변화**

[170] 1) IL-1 α 처리한 연골세포에 양성대조군인 Carprofen(비스테로이드성 물질)과
줄기세포파쇄성분추출물의 적용하여 NO생성과 COX-2, NF- κ B 발현의 연관성을
확인한다.

[171] NO: 염증이 발생하였을 때 증가하는 수치

[172] COX-2: 일종의 단백질, 염증인자에 의해 활성이 증가했다가 염증이 사라짐에
따라 감소하는 물질

[173] 2) 염증을 일으킨 연골세포에 줄기세포파쇄성분추출물의 처리가 NF- κ B의
발현에 미치는 영향을 확인한다.

[174]

[175] **3-2. 결과**

[176] 1) IL-1 α 처리로 유도된 연골세포에 줄기세포파쇄성분추출물을 처리한 결과

[177] IL-1 α 처리로 유도된 NO의 생성 억제 효과는 iNOS와 COX-2의 발현 억제와
연관이 있음을 의미한다.

[178] 2) 줄기세포파쇄성분추출물을 처리한 연골세포는 IL-1 α 에 의한 NF- κ B
단백질이 핵내로 이동되는 것을 억제함으로써 IL-1 α 에 의해 유도되는 주요 염증
신호전달 경로인 NF- κ B pathway를 차단 할 수 있음을 확인하였다.

[179]

[180] **4. iMAPKs 활성화에 미치는 영향**

[181] 1) IL-1 α 에 의해 염증이 발생한 연골세포에 줄기세포파쇄성분추출물을
처리하여 iMAPKs 활성을 확인한다.

[182] 1)항염증 기전확인

[183] 줄기세포파쇄성분추출물의 항염증 효능이 p38 MAPK 신호전달 억제를 통하여
이루어짐을 의미한다.

[184]

[185]

[186] ***5-1. 연골형성 및 발달에 관여하는 인자 qPCR 측정**

- [187] 1) 유전학적 발현을 통해 본 줄기세포성분추출물의 항염증 효과 확인한다.
 [188] 2) 연골 형성 발달에 관여하는 sox-9의 유전자를 통해 연골형성을 확인한다.

[189]

[190] **5-2. 결과**

- [191] 1) MMPs는 연골조직의 이화작용에 관여하는 주요 단백질로서,
 IL-1 α (염증유발물질)를 처리했을 때 MMP-13의 유전자 발현이 크게
 증가되었으나, 줄기세포파쇄성분추출물의 처리 시 발현이 감소되는 것을
 확인하였다.
 [192] 2) 연골 형성 및 발달에 관여하는 SOX-9의 유전자도
 줄기세포파쇄성분추출물의 농도별 처리에 따라 유전자 발현이 증가되는 것을
 확인하였다.

[193]

- [194] 이하 줄기세포파쇄추출물이 항염증 작용 효과를 확인하는 시험을 상세하게
 설명한다.

[195]

[196] **1-1. 세포독성평가**

- [197] 1) 줄기세포파쇄추출물(T-stem)을 0.1 μ g/ml부터 3 μ g/ml의 농도로 마우스
 대식세포 (RAW 246.7)에 24시간 동안 처리하였다.
 [198] 2) 줄기세포파쇄추출물과 LPS 동시에 처리하였다.

[199]

[200] **1-2. 결과**

- [201] 1) 도 10에 도시된 바와 같이, 줄기세포파쇄추출물 단독으로 농도별 처리결과,
 통계적으로 유의한 세포 독성이 나타나지 않았다.
 [202] 2) 도 11에 도시된 바와 같이, 마우스 대식세포의 염증반응 유발물질인
 Lipopolysaccharide (LPS) 1 μ g/ml과 함께 줄기세포파쇄추출물을 처리한 결과 세포
 독성이 나타나지 않았다.

[203]

[204] **2-1. 세포형태변화**

- [205] 줄기세포파쇄추출물을 2 μ g/ml을 마우스 대식세포 (RAW 246.7)에 24시간
 처리한 후, 세포형태 변화를 확인하였다.

[206]

[207] **2-2. 결과**

- [208] 염증유발인자인 LPS 1 μ g/ml을 처리한 그룹에서 대조군 그룹에 비해
 대식세포의 활성화가 비교적 증가함을 확인하였다.
 [209] 도 12에 도시된 바와 같이, 줄기세포파쇄추출물과 LPS 1 μ g/ml을 함께 처리한
 세포에서 LPS 1 μ g/ml를 단독으로 처리한 그룹에 비해 대식세포의 활성화가
 비교적 적게 발생하였다.

[210]

[211] **3-1. 산화질소**

[212] 생성염증유발인자인 LPS 1 μ g/ml를 전처리한 마우스 대식세포(RAW 246.7)에 줄기세포파쇄추출물을 0.4 μ g/ml에서 2 μ g/ml까지 농도로 24시간 처리한 후, griess assay를 통해 세포의 산화질소농도를 확인하였다.

[213]

[214]

[215] ***3-2. 결과**

[216] LPS 자극에 의해 산화질소의 생성이 증가하였다.

[217] 도 13에 도시된 바와 같이, LPS만 처리한 그룹에 비해 LPS와 줄기세포파쇄추출물을 같이 처리한 그룹에서 산화질소의 농도가 통계적으로 유의한 감소를 확인하였다.

[218]

[219]

[220] ***4-1. iNOS 및 COX-2 단백질 발현 변화**

[221] 염증유발인자인 LPS 1 μ g/ml를 전처리한 마우스 대식세포(RAW 246.7)에 시험물질 줄기세포파쇄추출물을 1 μ g/ml과 2 μ g/ml의 농도로 24시간 처리한 후, western blot 분석을 통해 염증성 효소 iNOS와 COX2 단백질 발현을 확인하였다.

[222]

[223] **4-2. 결과**

[224] 도 14에 도시된 바와 같이, LPS만 처리한 그룹에 비해 시험물질 T-STEM을 같이 처리한 그룹에서 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 감소함을 확인하였다.

[225]

[226] **5-1. 염증성 사이토카인 생성**

[227] 염증유발인자인 LPS 1 μ g/ml를 전처리한 마우스 대식세포(RAW 246.7)에 줄기세포파쇄추출물을 1 μ g/ml과 2 μ g/ml의 농도로 24시간 처리한 후, ELISA 분석법을 통해염증성 사이토카인 생성(TNF α , IL-1 β)을 확인하였다.

[228]

[229] **5-2. 결과**

[230] LPS 자극에 의해 염증성 사이토카인의 생성량이 증가함을 확인하였다.

[231] 도 15 및 도 16에 도시된 바와 같이, 시험물질 줄기세포파쇄추출물 처리에 의해 염증성 사이토카인의 감소를 관찰하였다.

[232]

[233] 본 발명에 의한 줄기세포 파쇄추출물의 유효성분의 효능은 다음과 같다.

[234]

[235] 먼저, 치매의 원인은 베타아밀로이드 독성단백질과 타우 단백질의 변성으로 발생되는데, 제대혈유래 중간엽 줄기세포를 알츠하이머병 생쥐의 양쪽 해마에 반복 이식했을 때 기억력 향상, 뇌 내 베타 아밀로이드의 양을 감소시키며,

생쥐의 뇌조직에서 베타 아밀로이드를 생성시키는 효소인 β -secretase1의 양이 감소되고, 미세아교세포의 염증성 시토카인의 분비가 억제되고 항염증 시토카인의 분비가 증가됨을 확인된다. 위 결과들로 인해 타우 단백질의 과인산화도 억제된다.

[236]

[237] 따라서, 중간엽 줄기세포가 알츠하이머 치매의 진행을 억제시키고, 치매의 원인이 되는 베타아밀로이드 독성단백질의 양을 감소시킨다는 결과가 있어, 줄기세포파쇄성분추출물(셀드줄기세포)은 면역거부반응을 제거한 줄기세포 유효성분이 밀집되어있는 물질로 치매치료에 사용될 수 있을 것이다. 또한, 본 발명을 통해 세포 수득률, 유효성분의 수득률을 높였으므로, 기존 줄기세포 자체를 사용하는 것보다 위험성이 적고 효과가 뛰어난 치료제로 사용될 수 있다.

[238]

[239] 그리고, 잇몸병은 치아뿌리와 잇몸의 뼈, 잇몸 등에 염증이 생김으로 인해 발병되는데, 본 발명의 줄기세포의 파쇄추출물이 잇몸, 잇몸뼈를 재생할 수 있도록 줄기세포가 도움이 될 수 있다.

[240]

[241] 즉, 줄기세포 성장인자들이 염증억제, 뼈, 연골, 잇몸세포 재생, 상처치유재생 촉진 도움을 주므로 잇몸치료제로 사용될 수 있다, 특히, 프로콜라겐, 그물망처럼 생긴 콜라겐 네트워크가 세포와 세포를 서로 단단하게 접착시켜주며, 세포가 만들어지고 혈관, 뼈, 관절 등 인체의 많은 부분이 제 기능을 하도록 도와주는 환경 제공을 제공하므로 잇몸병치료제로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명을 통해 세포 수득률, 유효성분의 수득률을 높였으므로, 기존 줄기세포 자체를 사용하는 것보다 위험성이 적고 효과가 뛰어난 치료제로 사용될 수 있다.

[242]

[243] 그리고, 관절 및 관절주위염은 노화, 부상 등 관절주위 염증으로 인해 발생되는데, 본 발명의 줄기세포 파쇄추출물이 염증억제, 뼈, 연골, 잇몸세포 재생, 상처치유재생 촉진 도움을 주므로 잇몸치료제로 사용될 수 있다. 프로콜라겐 그물망처럼 생긴 콜라겐 네트워크가 세포와 세포를 서로 단단하게 접착시켜주며, 세포가 만들어지고 혈관, 뼈, 관절 등 인체의 많은 부분이 제 기능을 하도록 도와주는 환경 제공을 제공하므로, 관절염 및 관절주위염의 치료제로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명을 통해 세포 수득률, 유효성분의 수득률을 높였으므로, 기존 줄기세포 자체를 사용하는 것보다 위험성이 적고 효과가 뛰어난 치료제로 사용될 수 있다.

[244]

[245] 그리고, 탈모의 원인은 환경적요인, 유전적요인 등 다양한데, 본 발명에 의한 줄기세포 파쇄추출물 중 VEGF 성장인자가 모낭성장에 도움을 주고, KGF 및 모근을 자극하여 모발 강화에 도움을 주므로 탈모의 치료제로 사용될 수 있다.

또한, 본 발명을 통해 세포 수득률, 유효성분의 수득률을 높였으므로, 기존 줄기세포 자체를 사용하는 것보다 위험성이 적고 효과가 뛰어난 치료제로 사용될 수 있다.

[246]

[247] 그리고, 피부노화의 원인은 환경적 요인, 유전적 요인 등 다양한데, 본 발명인 줄기세포 파쇄추출물 중 KGF, 새로운 세포생성(콜라겐)기능을 통해 주름방지, 회복, 피부보호, 젊은피부유지 및 UV자극방어하는데 도움을 주고, 그물망처럼 생긴 콜라겐 네트워크가 세포와 세포를 서로 단단하게 접착시켜주어, 피부탄력에 도움을 주므로 피부치료제로 사용할 수 있다. 또한, 본 발명을 통해 세포 수득률, 유효성분의 수득률을 높였으므로, 기존 줄기세포 자체를 사용하는 것보다 위험성이 적고 효과가 뛰어난 치료제로 사용될 수 있다.

[248] 이와 같이, 상술한 본 발명의 기술적 구성은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자가 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시 될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

[249] 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌것으로서 이해되어야 하고, 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위에 나타나며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 기본배지;
 히알루론산; 및
 첨가조성물을 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 세포 배양용 배지 조성물 제조방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
 상기 첨가조성물은,
 글리신, 히스티딘, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린,
 히드록시프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 발린, bFGF, EGF,
 VEGF, KGF, HGF, TGF, 비타민C, 비타민B1, 비타민B12, 비타민E, 셀레늄,
 트랜스페린을 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 세포 배양용 배지 조성물 제조방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
 상기 기본배지는,
 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F12, DMEM-F12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), MacCoy's 5A 배지, AmnioMax, AminoMaxII complete Medium, Chang's Medium MesemCult-XF Medium 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 세포 배양용 배지 조성물 제조방법.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서,
 상기 첨가조성물은 상기 배지조성물에 대하여 히알루론산은 $10\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함되고,
 상기 글리신은 1ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 히스티딘은 1ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 이소류신은 1ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 메티오닌은 1ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 페닐알라닌은 1ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 프롤린은 10ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 히드록시프롤린은 5ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 세린은 1ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 트레오닌은 1ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 트립토판은 1ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 티로신은 1ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 발린은 2ng/ml 의 농도로 포함되고,
 상기 bFGF는 $9\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함되고,

상기 EGF는 1.5 μ g/ml의 농도로 포함되고,
 상기 VEGF는 1 μ g/ml의 농도로 포함되고,
 상기 KGF는 1.2 μ g/ml의 농도로 포함되고,
 상기 HGF는 0.5 μ g/ml의 농도로 포함되고,
 상기 TGF는 0.5 μ g/ml의 농도로 포함되고,
 상기 비타민C는 2 μ g/ml의 농도로 포함되고,
 상기 비타민B1는 0.5 μ g/ml의 농도로 포함되고,
 상기 비타민B12는 3 μ g/ml의 농도로 포함되고,
 상기 비타민E는 500 μ g/ml의 농도로 포함되고,
 상기 셀레늄은 1.8 μ g/ml의 농도로 포함되고,
 상기 트랜스페린은 12 μ g/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 세포
 배양용 배지 조성법을 이용한 줄기세포파쇄추출 제조방법.

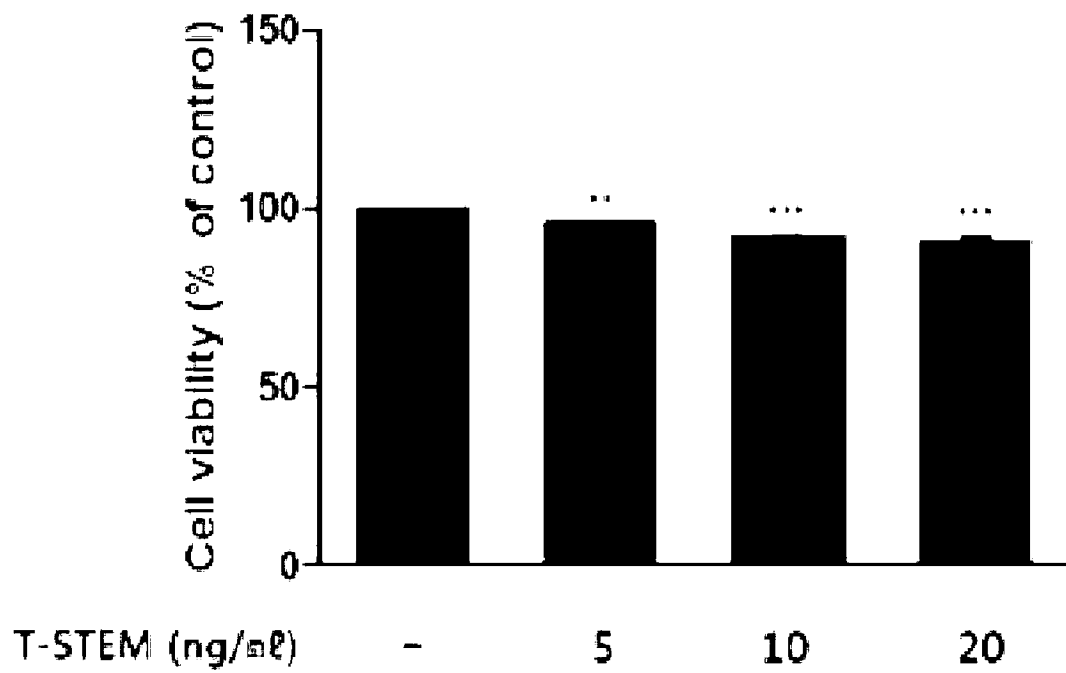
[청구항 5] 줄기세포를 추출하는 제 1단계;
 제 1항의 배지조성물의 배지에 상기 추출된 줄기세포를 배양하는 제
 2단계;
 상기 줄기세포를 계대배양하는 제 3단계;
 상기 배양된 줄기세포에서 세포를 획득하는 제 4단계;
 상기 획득된 세포를 파쇄하는 제 5단계; 및
 상기 파쇄된 물질을 여과하는 제 6단계;
 상기 6단계 여과된 물질을 동결건조하여 보관 하거나 활용하는 7단계;
 를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 줄기세포 대량배양용 배지
 조성법과 줄기세포 유효성분 3저 추출법을 이용한 줄기세포파쇄추출물
 제조방법.

[청구항 6] 제 5항에 있어서,
 상기 제 5단계에서,
 내부에 공간이 형성되는 외부와 내부가 차단되는 몸체부(10)와,
 상기 몸체부(10) 내부에 마련되고 상방이 개구되는 제 1용기부(12)와,
 상기 제 1용기부(12)에 대해 상대적으로 작은 크기로 형성되며, 상기 제
 1용기부(12) 내에 마련되며 상방이 개구되어 내부에 줄기세포가
 투입되는 제 2용기부(14)와,
 상기 제 2용기부(14) 내부의 줄기세포를 파쇄하는 파쇄부(16)와, 상기
 몸체부(10) 내부로 공기의 유동을 단속하는 밸브(18)와, 상기 몸체부(10)
 내부에서 공기를 흡입하는 펌프(20)를 포함하는 줄기세포 유효성분
 추출장치를 이용하고,
 상기 줄기세포는 저장성 용액에 투입후 상기 제 2용기부에 투입하는 것을
 특징으로 하는 줄기세포 유효성분 3저 추출법을 이용한
 줄기세포파쇄추출물 제조방법.

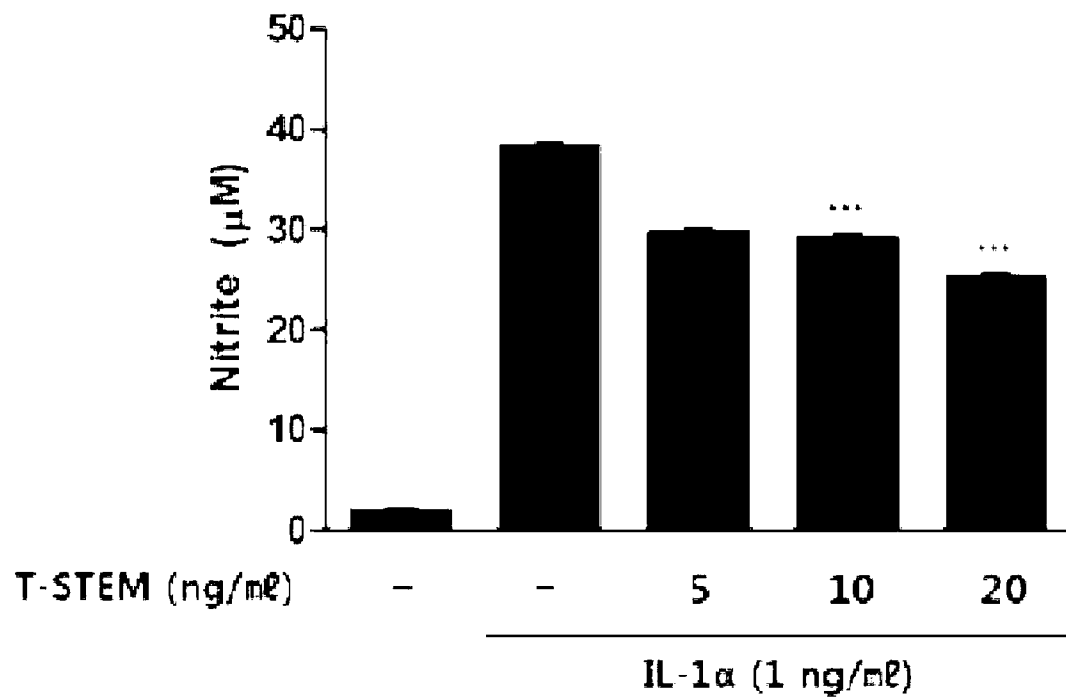
[청구항 7] 제 5항의 줄기세포파쇄추출물을 이용한 항염증 치료용 조성물.

- [청구항 8] 제 5항의 줄기세포파쇄추출물을 이용한 세포재생 치료용 조성물.
[청구항 9] 제 5항의 줄기세포파쇄추출물을 이용한 항관절염 치료용 조성물.

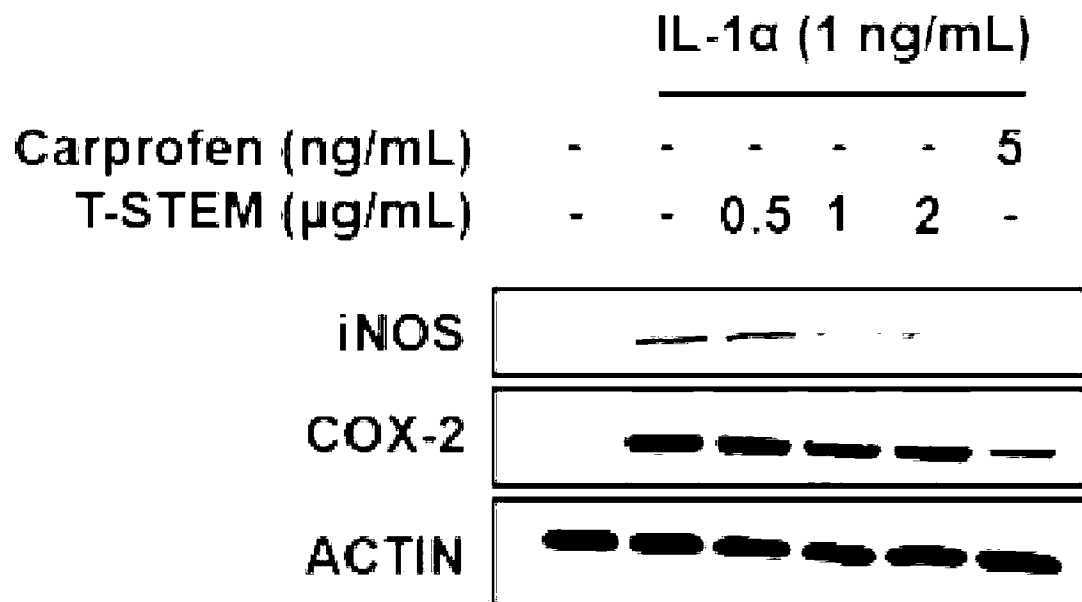
[도3]



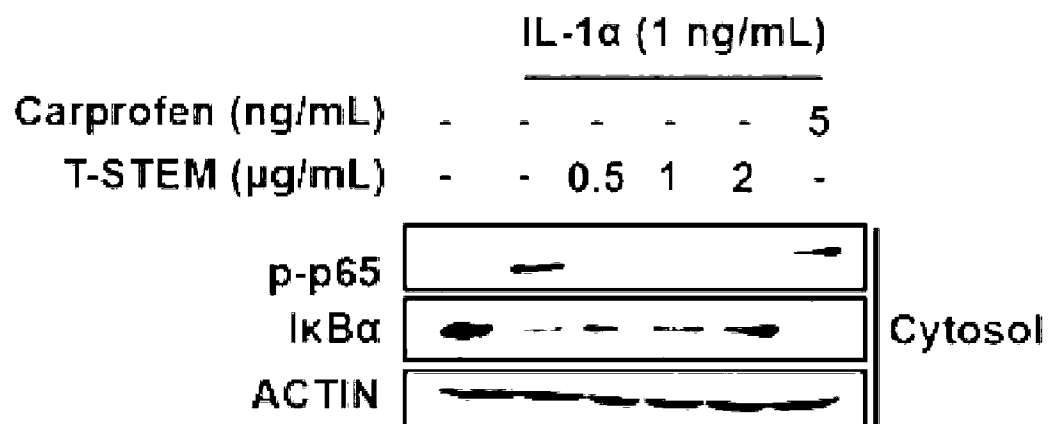
[도4]



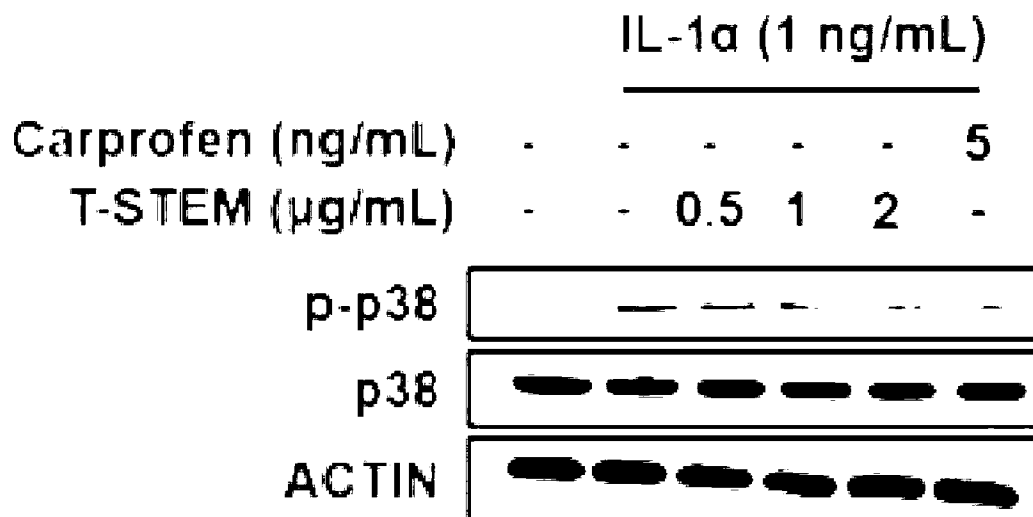
[도5]



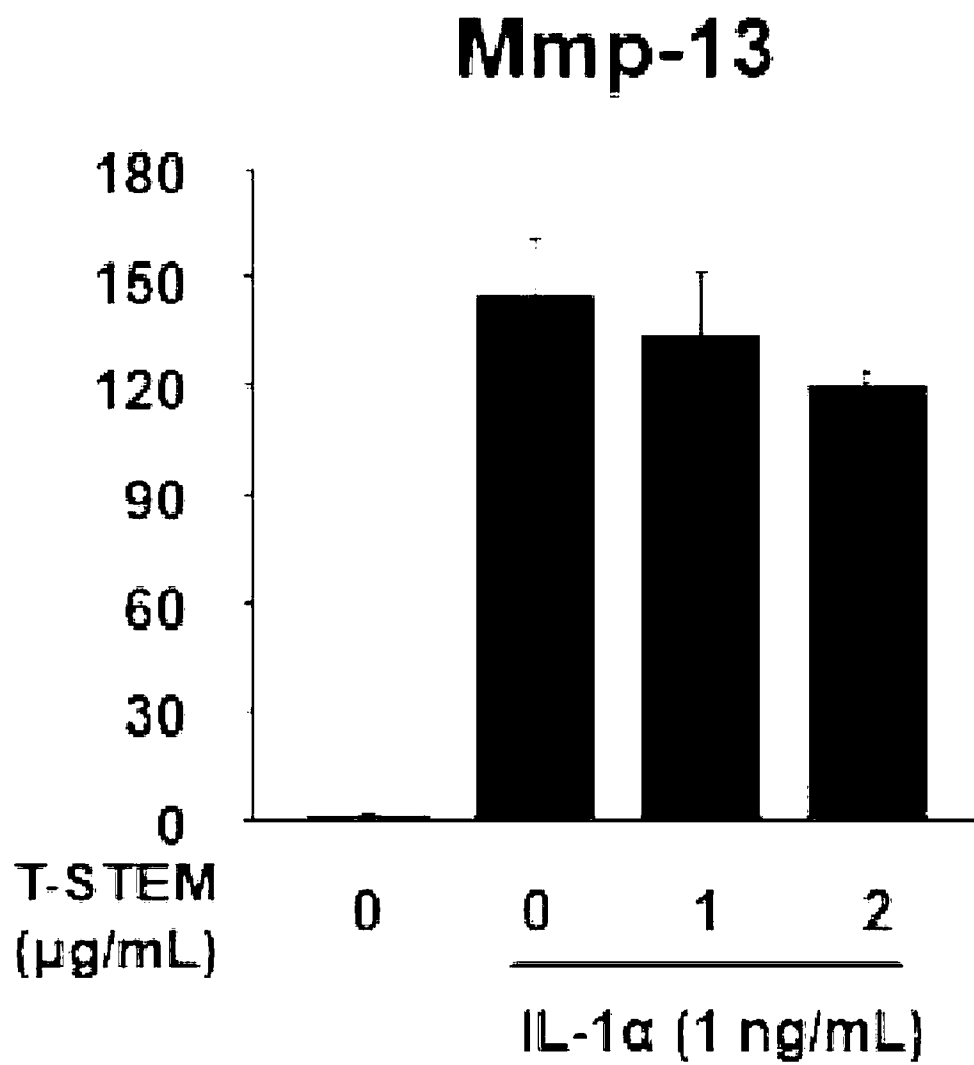
[도6]



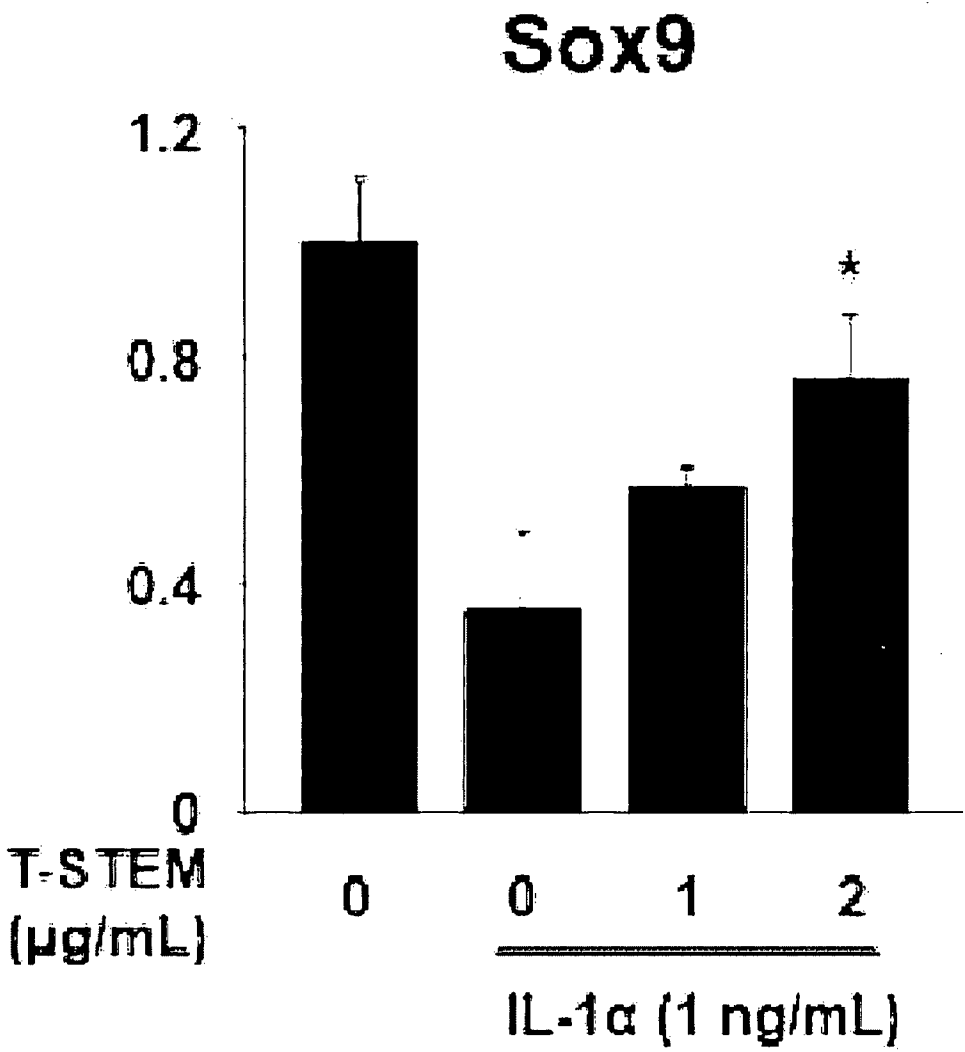
[도7]



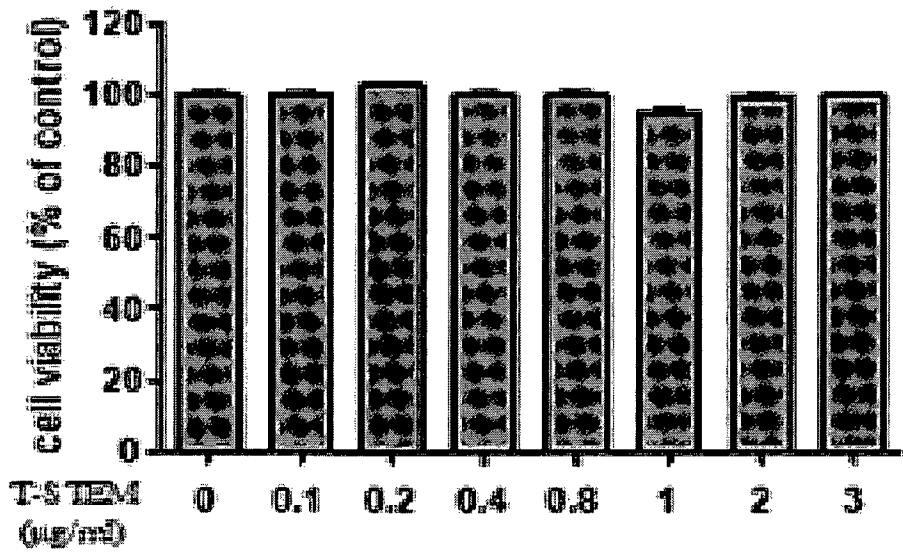
[도8]



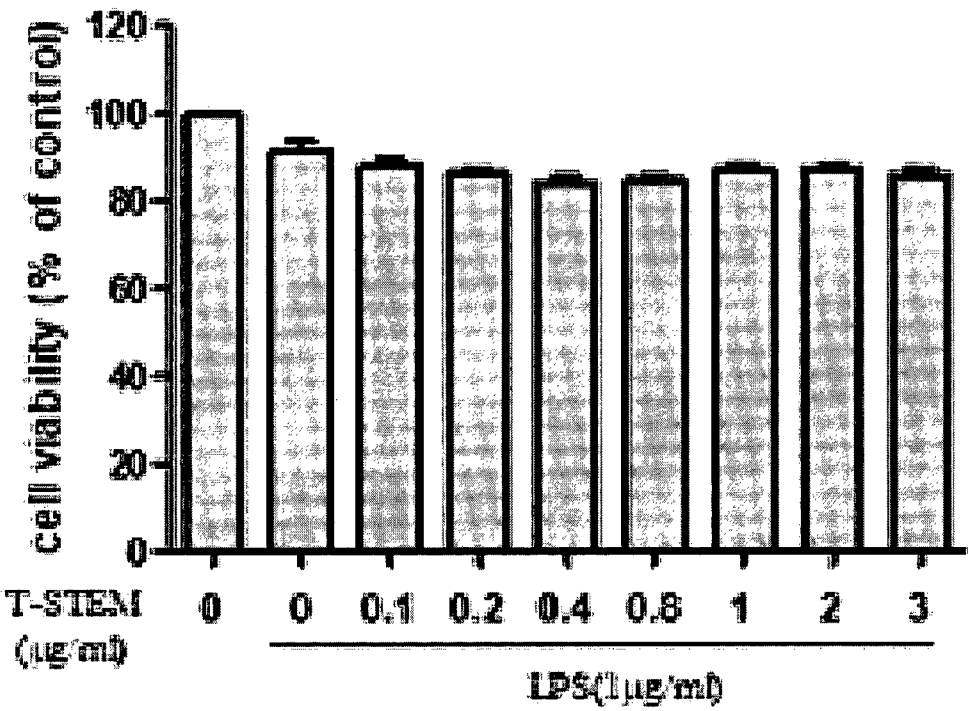
[도9]



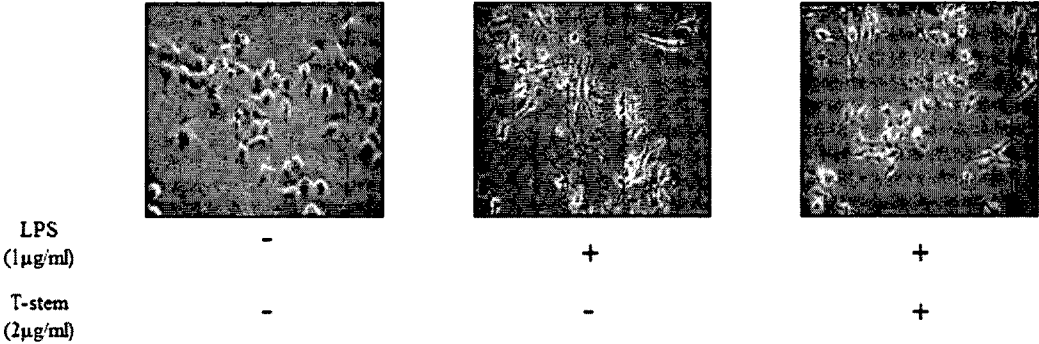
[도10]



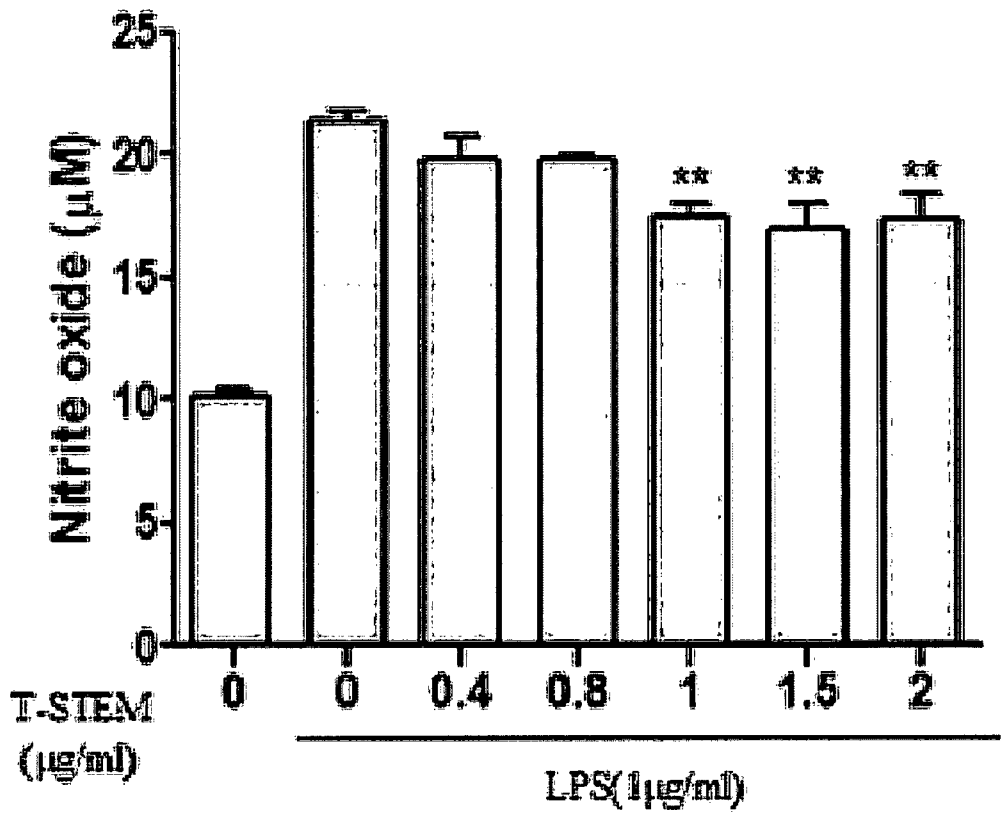
[도11]



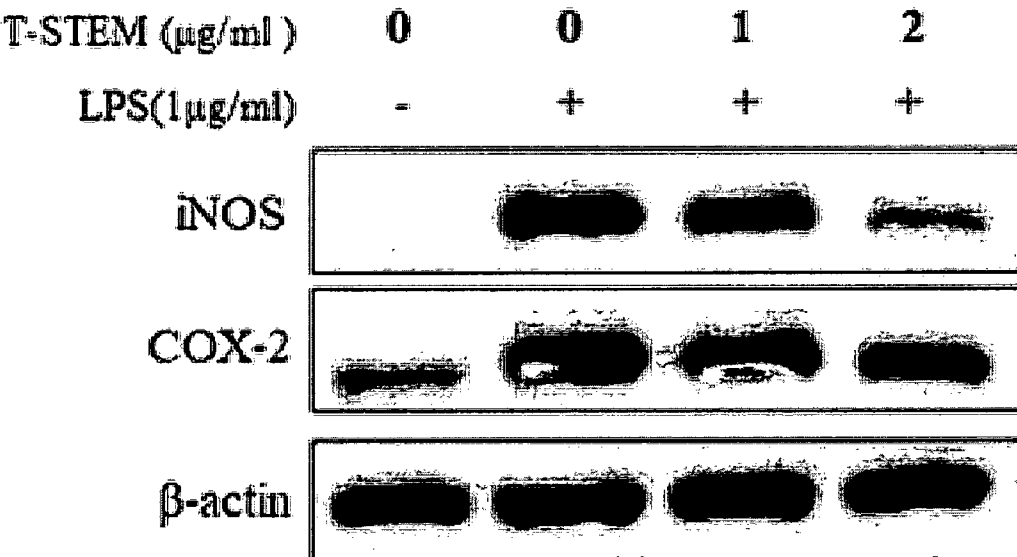
[도12]



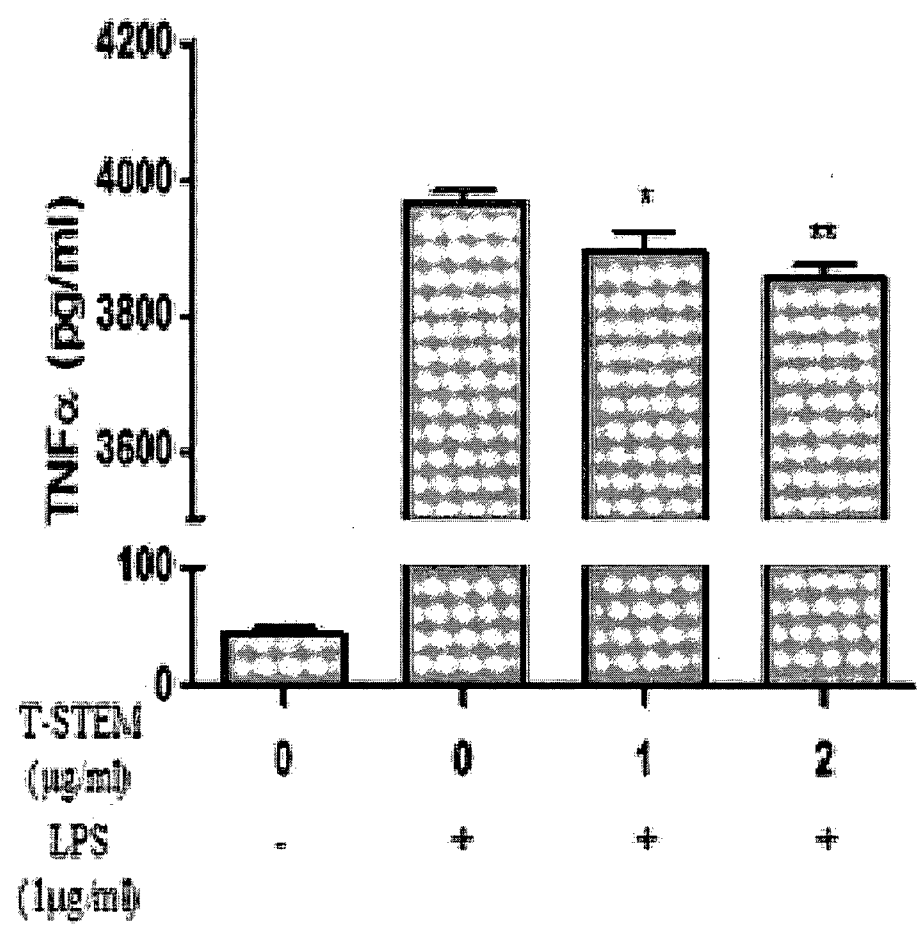
[도13]



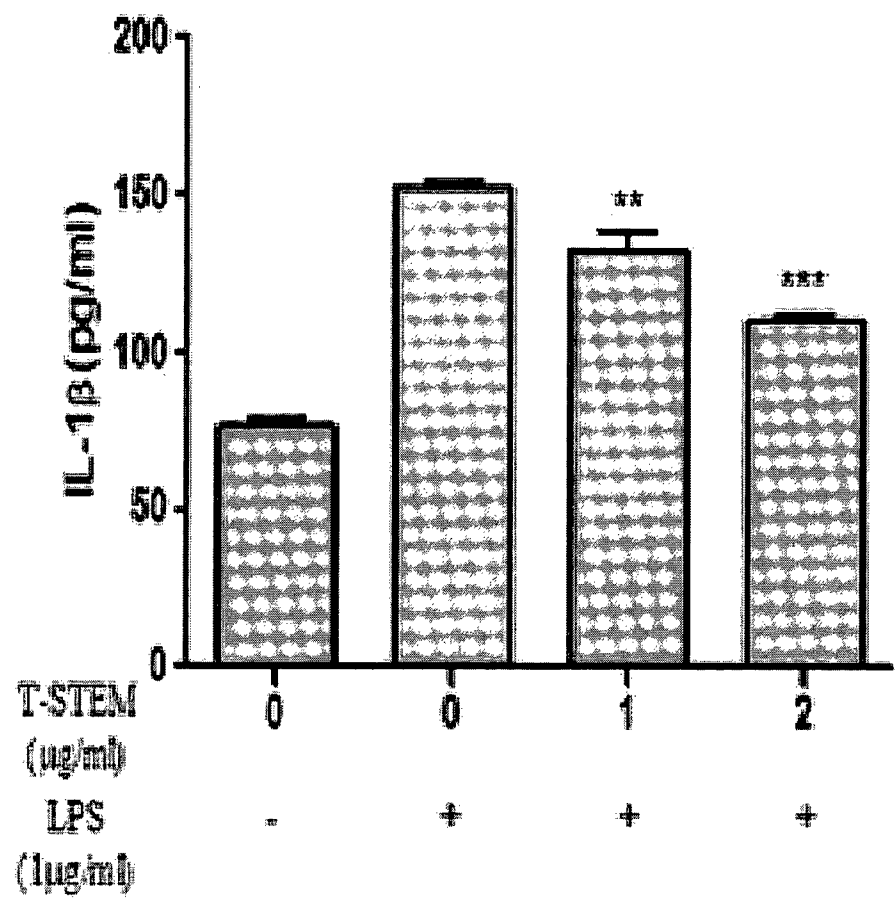
[도14]



[도15]



[도16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/007652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/00(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/00; A23L 33/10; A61K 35/28; A61K 35/50; B02C 18/14; B02C 19/18; C12M 1/00; C12M 1/33; C12N 5/071; C12N 5/0735; C12N 5/074; A61K 35/12; A61P 29/00

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: basal medium, hyaluronic acid, additive composition, method for preparing medium composition for cell culture, method for preparing stem cell lysis extract, composition for antiinflammatory treatment, composition for cell regeneration treatment, composition for antiarthritic treatment

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2017-0111057 A (ANTEROGEN CO., LTD.) 12 October 2017 See abstract; claims 1, 2, 5, 7; paragraphs [0010], [0080].	1,3
Y		2,4-9
Y	KR 10-2017-0014537 A (TIARA STEM CELL INSTITUTE) 08 February 2017 See abstract; claim 2; paragraphs [0016]-[0032].	2,4-9
Y	KR 10-2013-0099927 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 06 September 2013. See claim 1; paragraphs [0038], [0039].	2,4
X	KR 10-2015-0038190 A (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al.) 08 April 2015 See claims 1, 10, 33; paragraphs [0001]-[0003], [0166], [0169]; figure 6.	6
A	JP 2005-130730 A (HITACHI KOKI CO., LTD.) 26 May 2005 See claim 1 and figure 6.	1-9
A	KR 10-2017-0113447 A (THE ASAN FOUNDATION) 12 October 2017 See abstract; and claims 1, 3, 4.	1-9
A	JP 2009-082862 A (ELEKON KAGAKU KK.) 23 April 2009 See claim 1 and paragraph [0008].	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

“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

31 MAY 2019 (31.05.2019)

Date of mailing of the international search report

31 MAY 2019 (31.05.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/007652

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0111057 A	12/10/2017	WO 2017-164467 A1	28/09/2017
KR 10-2017-0014537 A	08/02/2017	None	
KR 10-2013-0099927 A	06/09/2013	AU 2011-285531 A1	21/02/2013
		BR 112013002811 A2	02/08/2016
		CA 2807418 A1	09/02/2012
		CA 2807418 C	04/04/2017
		CN 103180434 A	26/06/2013
		CN 108531444 A	14/09/2018
		DK 2601288 T3	30/05/2016
		EP 2601288 A2	12/06/2013
		IL 224431 A	24/03/2013
		JP 2013-532492 A	19/08/2013
		JP 2017-018137 A	26/01/2017
		JP 6043999 B2	14/12/2016
		SG 187699 A1	28/03/2013
		US 2012-0178166 A1	12/07/2012
		US 2012-0202291 A1	09/08/2012
		US 2016-0194611 A1	07/07/2016
		US 9279103 B2	08/03/2016
		US 9279107 B2	08/03/2016
		US 9644186 B2	09/05/2017
		WO 2012-019122 A2	09/02/2012
		WO 2012-019122 A3	03/05/2012
KR 10-2015-0038190 A	08/04/2015	AU 2013-294057 A1	05/03/2015
		BR 112015001620 A2	04/07/2017
		CA 2879624 A1	30/01/2014
		CN 104640974 A	20/05/2015
		CN 108753678 A	06/11/2018
		CN 108753679 A	06/11/2018
		CN 108795838 A	13/11/2018
		CN 108796028 A	13/11/2018
		DK 2878664 T3	05/11/2018
		EP 2878664 A1	03/06/2015
		EP 3409761 A1	05/12/2018
		HK 1210499 A1	22/04/2016
		HK 1210807 A1	06/05/2016
		IL 236878 A	31/03/2015
		JP 2014-223087 A	04/12/2014
		JP 2018-042571 A	22/03/2018
		JP 5629893 B2	26/11/2014
		JP 6270152 B2	31/01/2018
		RU 2015106003 A	10/09/2016
		RU 2665793 C2	04/09/2018
		SG 10201704503 A	28/07/2017
		SG 11201500512 A	29/04/2015
		TW 201420755 A	01/06/2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/007652

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		TW 201831673 A	01/09/2018
		TW 1627273 B	21/06/2018
		WO 2014-017513 A1	30/01/2014
JP 2005-130730 A	26/05/2005	None	
KR 10-2017-0113447 A	12/10/2017	WO 2017-171491 A1	05/10/2017
JP 2009-082862 A	23/04/2009	US 2009-0088669 A1	02/04/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/00(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/00; A23L 33/10; A61K 35/28; A61K 35/50; B02C 18/14; B02C 19/18; C12M 1/00; C12M 1/33; C12N 5/071; C12N 5/0735; C12N 5/074; A61K 35/12; A61P 29/00

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: 기본배지, 히알루론산, 첨가조성물, 세포 배양용 배지 조성물 제조 방법, 줄기세포파쇄추출물 제조방법, 항염증 치료용 조성물, 세포재생 치료용 조성물, 항관절염 치료용 조성물

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2017-0111057 A ((주)안트로젠) 2017.10.12 요약; 청구항 1, 2, 5, 7; 단락 [0010], [0080] 참조.	1,3
Y		2,4-9
Y	KR 10-2017-0014537 A (주식회사 티아라줄기세포연구소) 2017.02.08. 요약; 청구항 2; 단락 [0016]-[0032] 참조.	2,4-9
Y	KR 10-2013-0099927 A (위스콘신 얼럼나이 리서어치 화운데이션) 2013.09.06. 청구항 1; 단락 [0038], [0039] 참조.	2,4
X	KR 10-2015-0038190 A (닛산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤 등) 2015.04.08. 청구항 1,10,33; 단락 [0001]-[0003], [0166], [0169]; 도 6 참조.	6
A	JP 2005-130730 A (HITACHI KOKI CO., LTD.) 2005.05.26. 청구항 1 및 도면 6 참조.	1-9
A	KR 10-2017-0113447 A (재단법인 아산사회복지재단) 2017.10.12. 요약; 및 청구항 1, 3, 4 참조.	1-9
A	JP 2009-082862 A (ELEKON KAGAKU KK.) 2009.04.23. 청구항 1 및 단락 [0008] 참조.	1-9

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 05월 31일 (31.05.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 05월 31일 (31.05.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



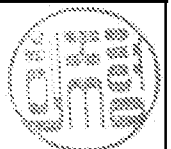
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0111057 A	2017/10/12	WO 2017-164467 A1	2017/09/28
KR 10-2017-0014537 A	2017/02/08	없음	
KR 10-2013-0099927 A	2013/09/06	AU 2011-285531 A1 BR 112013002811 A2 CA 2807418 A1 CA 2807418 C CN 103180434 A CN 108531444 A DK 2601288 T3 EP 2601288 A2 IL 224431 A JP 2013-532492 A JP 2017-018137 A JP 6043999 B2 SG 187699 A1 US 2012-0178166 A1 US 2012-0202291 A1 US 2016-0194611 A1 US 9279103 B2 US 9279107 B2 US 9644186 B2 WO 2012-019122 A2 WO 2012-019122 A3	2013/02/21 2016/08/02 2012/02/09 2017/04/04 2013/06/26 2018/09/14 2016/05/30 2013/06/12 2013/03/24 2013/08/19 2017/01/26 2016/12/14 2013/03/28 2012/07/12 2012/08/09 2016/07/07 2016/03/08 2016/03/08 2017/05/09 2012/02/09 2012/05/03
KR 10-2015-0038190 A	2015/04/08	AU 2013-294057 A1 BR 112015001620 A2 CA 2879624 A1 CN 104640974 A CN 108753678 A CN 108753679 A CN 108795838 A CN 108796028 A DK 2878664 T3 EP 2878664 A1 EP 3409761 A1 HK 1210499 A1 HK 1210807 A1 IL 236878 A JP 2014-223087 A JP 2018-042571 A JP 5629893 B2 JP 6270152 B2 RU 2015106003 A RU 2665793 C2 SG 10201704503 A SG 11201500512 A TW 201420755 A	2015/03/05 2017/07/04 2014/01/30 2015/05/20 2018/11/06 2018/11/06 2018/11/13 2018/11/13 2018/11/05 2015/06/03 2018/12/05 2016/04/22 2016/05/06 2015/03/31 2014/12/04 2018/03/22 2014/11/26 2018/01/31 2016/09/10 2018/09/04 2017/07/28 2015/04/29 2014/06/01

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		TW 201831673 A	2018/09/01
		TW I627273 B	2018/06/21
		WO 2014-017513 A1	2014/01/30
JP 2005-130730 A	2005/05/26	없음	
KR 10-2017-0113447 A	2017/10/12	WO 2017-171491 A1	2017/10/05
JP 2009-082862 A	2009/04/23	US 2009-0088669 A1	2009/04/02