(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 8 월 10 일 (10.08.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/135631 A1

(51) 국제특허분류:
A01N 1/02 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/28* (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/000859

(22) 국제출원일: 2017 년 1 월 25 일 (25.01.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0012155 2016 년 2 월 1 일 (01.02.2016) KR

(71) 출원인: **주식회사 녹십자랩셀 (GREEN CROSS LAB CELL CORPORATION)** [KR/KR]; 16924 경기도 용인시 기흥구 이현로 30 번길 107, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **황유경 (HWANG, Yu Kyeong)**; 16924 경기도 용인시 기흥구 이현로 30 번길 107, Gyeonggi-do (KR). **민보경 (MIN, Bokyung)**; 16924 경기도 용인시 기흥구 이현로 30 번길 107, Gyeonggi-do (KR). **최하나 (CHOI, Hana)**; 16924 경기도 용인시 기흥구 이현로 30 번길 107, Gyeonggi-do (KR). **김효진 (KIM, Hyojin)**; 16924 경기도 용인시 기흥구 이현로 30 번길 107, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **제일특허법인 (FIRSTLAW P.C.)**; 06775 서울시 서초구 마방로 60, Seoul (KR).

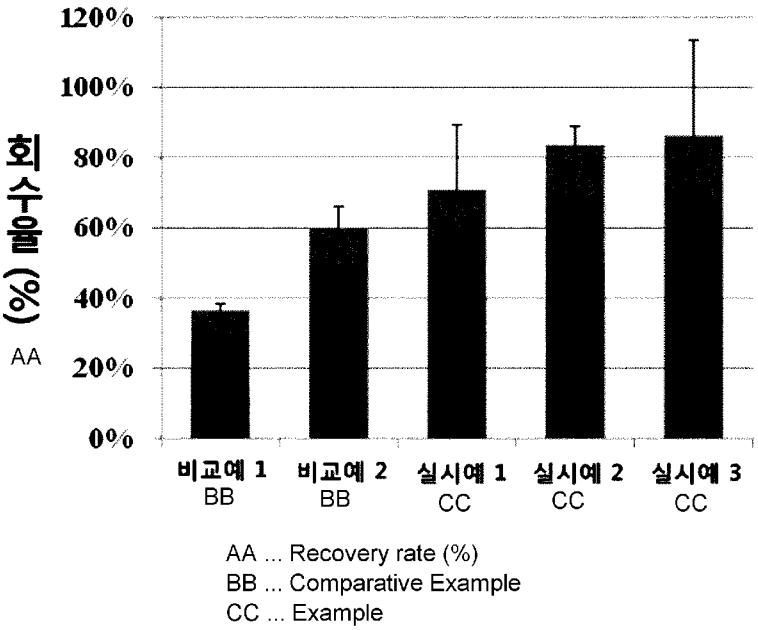
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: MEDIUM COMPOSITION FOR CRYOPRESERVATION OF CELL AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 세포의 동결보존용 배지 조성물 및 이의 용도



(57) **Abstract**: The present invention relates to a medium composition for the cryopreservation of cells, which exhibits excellent cell recovery rates, cell viability rates and cell activity after thawing, and a pharmaceutical composition comprising the medium composition and therapeutic cells. Also, the medium composition of the present invention allows for readily administering the cryopreserved therapeutic cells to a subject without additional procedures such as washing, separation, etc. Therefore, the composition may be used as an excellent medium composition for cell cryopreservation or as an excellent therapeutic composition.

(57) **요약서**: 본 발명은 해동 이후의 세포 회수율, 세포 생존율 및 세포 활성이 우수한 세포의 동결보존용 배지 조성물, 및 상기 배지 조성물과 치료용 세포를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 배지 조성물은 세척, 분리 등과 같은 추가적인 절차 없이 동결보존된 치료용 세포를 개체에 바로 투여할 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 우수한 세포 동결보존용 배지 조성물 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다.

WO 2017/135631 A1

명세서

발명의 명칭: 세포의 동결보존용 배지 조성물 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 해동 이후의 세포 회수율, 세포 생존율 및 세포 활성이 우수한 세포의 동결보존용 배지 조성물, 및 상기 배지 조성물과 치료용 세포를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 동물세포를 배양하는 방법의 발전과 더불어, 이는 단백질 의약품의 생산을 포함하는 다양한 분야의 생물학적 연구에 널리 적용되고 있다. 동물세포를 이용하여 단백질 의약품을 생산할 때, 장기간 동안 세포주의 특성을 유지할 수 있는 보존방법으로 동결보존(cryopreservation)이 주로 사용되고 있다.

[4] 동결보존을 통해 세포 배양 및 유지의 어려움을 극복할 수 있고, 세균이나 마이코플라즈마(mycoplasma) 등으로부터의 오염을 방지할 수 있다. 또한, 세포주의 형질전환을 방지할 수 있을 뿐만 아니라, 실험 및 생산의 재현성을 확보할 수 있다.

[5] 일반적으로, 동결보존 과정에서 동물세포는 세포손상을 입게 되는데, 세포가 낮은 온도에 노출되면서 세포 내의 기관과 세포 기능에 장애가 발생하게 된다. 따라서, 동결보존 후에 세포의 동일성을 확보하기 위해서는 세포에 따른 특성과 생존율을 유지할 수 있는 동결보존 방법의 개발과 검증이 실시되어야 한다.

[6] 동물세포를 동결보존하는 일반적인 방법으로는 혈청이 포함된 세포 배양용 배지에 10% 다이메틸설폭사이드(DMSO)를 첨가하여 세포막을 보호하고, 서서히 냉각하여 -196℃ 액체질소에서 보존하는 방법이 사용된다. 그러나, 상기와 같은 방법은 혈청이 갖는 문제점으로 인해 단백질 생산 등의 공정에서 사용 빈도가 감소하고 있다. 또한, 혈청 내 미량 성분들은 세포의 성장에 영향을 미치고 있으나, 이들 성분의 분석이 어려울 뿐만 아니라, 생산 시기나 장소에 따라 그 성분이 달라질 수 있는 문제가 있다.

[7] 또한, 혈청은 대부분 동물 유래이고, 사람으로부터 유래되었다고 하더라도 바이러스 등에 의한 감염에 노출되어 있다. 따라서, 이를 포함하는 조성물을 세포 치료제와 같이 직접적인 치료 약물로 사용하는 데에는 안전성의 문제가 있다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 이에, 본 발명자들은 동물세포를 장기간 동결보존할 수 있고, 혈청을 포함하지 않아 세포치료제의 조성으로 유용하게 사용할 수 있는 동결보존용 배지

조성물을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

[10] 따라서, 본 발명의 목적은 세포의 동결보존용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 다른 목적은, 상기 동결보존용 배지 조성물을 포함하는 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 총 조성물에 대하여, 15 내지 55 v/v%의 알부민, 20 내지 30 v/v%의 덱스트란, 2 내지 8 v/v%의 다이메틸설폭사이드 및 15 내지 55% v/v%의 세포 배양 배지를 포함하는 세포 동결보존용 배지 조성물을 제공한다.

[14] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 조성물 및 면역세포를 유효성분으로 함유하는 암 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[15] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 조성물 및 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 질환 및 면역관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[16]

발명의 효과

[17] 본 발명에 따른 세포 동결보존용 배지 조성물 내에서 세포를 동결시키면, 세포 해동하였을 때 해동된 세포의 생존율이 높을 뿐만 아니라 세포의 활성도 유지된다. 또한, 상기 조성물은 세척, 분리 등과 같은 추가적인 절차 없이 동결보존된 치료용 세포를 해동 후에 개체에 바로 투여할 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 우수한 세포 동결보존용 배지 조성물 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다.

[18]

도면의 간단한 설명

[19] 도 1a 내지 도 1d는 본 발명의 일 실시예에서 제조한 세포의 동결보존용 배지 조성물로 동결한 NK 세포를 해동하고 IL-2로 배양한 후 회수율(도 1a 및 도 1c) 및 생존율(도 1b 및 도 1d)을 나타낸다.

[20] 도 2a 내지 도 2d는 본 발명의 일 실시예에서 제조한 세포의 동결보존용 배지 조성물로 동결한 NK 세포의 K562 세포에 대한 세포 독성을 해동 직후(도 2a 및 도 2b) 및 해동 후 IL-2로 배양한 후(도 2c 및 도 2d)에 측정한 값을 나타낸다.

[21] 도 3a 및 도 3b는 본 발명의 일 실시예에서 제조한 세포의 동결보존용 배지 조성물로 동결한 HuT78 세포를 해동 후 3일 동안 배양한 뒤에 측정한 세포의 수(도 3a) 및 생존율(도 3b)을 나타낸다.

[22] 도 4a 및 도 4b는 본 발명의 일 실시예에서 제조한 세포 동결보존용 배지 조성물로 동결한 K562 세포를 해동 후 3일 동안 배양한 뒤에 측정한 세포의

수(도 4a) 및 생존율(도 4b)을 나타낸다.

[23]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[25] 본 발명은 총 조성물에 대하여, 15 내지 55 v/v%의 알부민, 20 내지 30 v/v%의 덱스트란, 2 내지 8 v/v%의 다이메틸설폭사이드 및 15 내지 55% v/v%의 세포 배양 배지를 포함하는 세포의 동결보존용 배지 조성물을 제공한다.

[26] 본 명세서에서 사용된 용어 "동결보존(cryopreservation)"은 동결을 통해 장기간에 걸쳐 세포를 안정하게 유지시키는 것을 의미한다. 세포는 일반적으로 배양과정에서 일만 개 중에 한 개 정도의 비율로 돌연변이가 일어난다. 또한, 장기간에 걸쳐 세포의 계대를 계속하면, 본래의 세포집단과는 다른 세포집단으로 변할 수 있고, 심하게는 세포가 가진 특정 기능이 소실되는 경우도 있다. 또한, 계대배양 중 마이코플라스마 등에 감염될 수도 있다. 이러한 문제점으로 인하여 세포의 고유한 특성이 소실되기 전에 세포를 동결시키고 이를 보존하며 필요 시에 꺼내어 사용할 수 있도록 세포의 동결 보존을 수행한다.

[27] 세포의 동결보존은 동결시키고자 하는 세포에 동결억제제를 처리함으로써 수행되며, 본 발명의 조성물은 동결억제제에 의한 세포 손상을 막기 위하여, 알부민, 덱스트란, 다이메틸설폭사이드 및 세포 배양 배지를 포함하여, 세포의 동결보존에 있어 안전성 및 안정성을 향상시켰다.

[28] 이에 사용된 용어 "동결억제제"는 세포를 -80℃ 내지 -200℃의 초저온 상태에서 보관할 때 사용되는 물질이다. 특히, 상기 물질은 동결과 해동과정에서 필연적으로 동반되는 얼음 결정의 형성과 이온 및 삼투압의 불균형에 따른 세포의 손상을 최소화할 수 있다.

[29] 본 명세서에서 사용된 용어 "알부민(albumin)"은 인간 알부민의 전체 또는 생물학적 활성이 있는 인간 알부민의 일부분을 의미한다. 상기 알부민은 동결보존에 있어 혈청과 동등하거나 더 우수한 무동물성(animal-free) 대체제로서 사용될 수 있으며, 동결보존용 조성물에 첨가되어 세포를 안정화시키는 역할을 한다.

[30] 상기 알부민은 미국 국립 보건원의 GenBank에서 Accession Number가 ANC98520.1일 수 있고, 상기 단백질과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 95% 이상, 가장 구체적으로 98% 이상의 유사성을 나타내는 아미노산 서열을 모두 포함할 수 있다. 또한, 상기 알부민과 동일하거나 이에 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질 변이체도 포함할 수 있다.

[31] 본 발명의 조성물에 포함되는 알부민의 함량은 총 조성물의 부피에 대해 15 내지 55 v/v%, 구체적으로 18 내지 40 v/v%, 보다 구체적으로는 20 내지 35

v/v%일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 알부민의 함량은 총 조성물에 대해 20 v/v%, 35 v/v% 또는 50 v/v%일 수 있다. 이때, 상기 v/v%는 총 조성물의 부피에 대한 각 성분의 부피 백분율을 의미한다.

[32] 본 명세서에서 사용된 용어 "덱스트란(dextran)"은 D-글루코스의 중합체인 다당류를 의미한다. 상기 덱스트란은 중량 평균 분자량에 따라 덱스트란 1, 덱스트란 40, 덱스트란 70 등과 같이 분류할 수 있다. 일 실시예로 상기 덱스트란은 덱스트란 40일 수 있다.

[33] 본 발명의 조성물에 포함되는 덱스트란의 함량은 총 조성물의 부피에 대해 20 내지 30 v/v%, 구체적으로 23 내지 27 v/v%일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 덱스트란의 함량은 총 조성물에 대해 25 v/v%일 수 있다.

[34] 본 명세서에서 사용된 용어 "다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)"는 세포막 투과성 동결보존제로 사용되며, 세포막을 투과하여 세포 내 수분을 치환하고 냉동시 얼음 결정이 형성되는 것을 억제한다.

[35] 본 발명의 조성물에 포함되는 다이메틸설폭사이드의 함량은 총 조성물의 부피에 대해 2 내지 8 v/v%, 구체적으로 4 내지 6 v/v%일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 다이메틸설폭사이드의 함량은 총 조성물에 대해 5 v/v%일 수 있다.

[36] 본 명세서에서 사용된 용어 "세포 배양 배지"는 당, 아미노산, 각종 영양물질, 무기질 등과 같이 세포의 성장 및 증식에 필수적인 요소를 포함하는, 시험관 내(*in vitro*)에서 세포의 성장 및 증식을 위한 혼합물을 의미한다. 세포 배양 배지는 특정 세포 배양을 위해 최적화될 수 있으며, 그 예로는 세포 성장의 지지를 위해 조제된 기본 배양 배지, 세포로부터 단백질 생산을 촉진하도록 조제된 세포 배양 생산 배지, 영양소들을 고농도로 농축시켜 만든 농축 배지가 있다.

[37] 상기 세포 배양 배지에 포함될 수 있는 성분은 글리세린, L-알라닌, L-아르기닌 하이드로클로라이드, L-시스테인 하이드로클로라이드-모노하이드레이트, L-글루타민, L-히스티딘 하이드로클로라이드-모노하이드레이트, L-리신 하이드로클로라이드, L-메티오닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-발린, L-아스파라긴-모노하이드레이트, L-아스파르트산, L-시스틴 2HCl, L-글루탐산, L-이소류신, L-류신, L-페닐알라닌, L-트립토판, L-티로신 디소듐염 디하이드레이트, i-이노시톨, 티아민 하이드로클로라이드, 나이아신아미드, 피리독신 하이드로클로라이드, 바이오틴, D-판토텐산칼슘, 엽산, 리보플라빈, 비타민 B12, 염화나트륨(NaCl), 탄산수소나트륨($NaHCO_3$), 염화칼륨(KCl), 염화칼슘($CaCl_2$), 인산수소나트륨 모노하이드레이트(NaH_2PO_4-H_2O), 황산동 펜타하이드레이트($CuSO_4$-$5H_2O$), 황산제이철 헵타하이드레이트($FeSO_4$-$7H_2O$), 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘($MgSO_4$), 인산수소이나트륨(Na_2HPO_4), 황산아연 헵타하이드레이트($ZnSO_4$-$7H_2O$), D-글루코즈(덱스트로즈), 소듐 피루베이트, 히포크산틴 Na, 리놀렌산, 리포산, 푸트레신 2HCl 및 티미딘으로 구성되는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[38] 본 발명에 따른 세포 배양 배지는 인위적으로 제조하여 사용하거나, 상업적으로 시판되는 것을 사용할 수 있다. 상업적으로 시판되고 있는 세포 배양 배지의 예는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, α-MEM(α-Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), cellgro SCGM, X-VIVO, AIM-V 등이 있다.

[39] 상기 배양 배지의 함량은 총 조성물의 부피에 대해 15 내지 55 v/v%, 구체적으로 30 내지 52 v/v%일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 배양 배지의 함량은 총 조성물 100 v/v%에 대하여 20 v/v%, 35 v/v% 또는 50 v/v%일 수 있다.

[40] 본 발명의 동결보존용 조성물로 보존할 수 있는 세포는 동물세포일 수 있으나, 본 발명의 조성물에 의하여 안정적으로 동결보존될 수 있는 세포라면 모두 사용가능하다. 상기 세포는 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 생쥐, 토끼 등으로부터 유래한 세포일 수 있고, 구체적으로는 상기 동물로부터 유래한 면역세포, 종양세포, 제대혈 세포, 줄기세포, 상피세포, 1차 배양세포(primary cell) 등일 수 있다.

[41]

[42] 또한, 본 발명의 동결보존용 조성물은 완충제, 등장화제 또는 세포사멸 억제제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 완충제는 시트레이트, 포스페이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 옥살레이트, 락테이트, 아세테이트, 히스티딘 및 트리스로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다. 한편, 상기 등장화제는 염화나트륨, 염화칼륨, 붕산, 붕산나트륨, 만니톨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌, 글리콜, 말토스, 자당, 에리쓰리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 트리할로즈 및 포도당으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다. 상기 세포사멸 억제제는 ROCK(Rho-associated kinase) 억제제, 카탈라아제(catalase) 및 zVAD-fmk로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[43]

[44] 본 발명은 본 발명에 따른 동결보존용 조성물을 첨가한 세포를 동결시키는 단계를 포함하는 세포 동결보존 방법을 제공한다.

[45] 본 발명의 동결보존용 조성물을 첨가한 세포의 동결은 통상적인 방법을 통하여 수행될 수 있으며, 그 예로는 유리화 동결, 완만 동결 등이 있다. 유리화 동결은 CRF(controlled rate freezing)와 같은 장비를 이용하여 1분당 일정한 속도로 온도를 조절하여 세포를 동결시키는 방법으로, -80℃에 도달하면 동결된 세포를 질소 탱크에 보관한다. 한편, 완만 동결은 세포가 포함된 동결보존용 조성물이 담긴 바이알을 이소프로필 알코올이 담긴 냉동용 컨테이너 박스에 넣고, -70℃ 이하의 초저온 냉동고에서 12시간 내지 24시간 동안 온도를 일정하게 떨어뜨려 세포를 동결시키는 방법이다. 이후, 동결된 세포는 액체 질소 탱크에 보관한다.

[46] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 세포 동결보존 방법은 유리화 동결일 수 있다. 상기 유리화 동결은 CRF를 사용하여, 1) 상온의 세포를 4℃로 냉각하는 단계; 2) 분당 -1℃ 씩, -8℃로 냉각하는 단계; 3) 분당 -25℃ 씩, -65℃로 냉각하는 단계; 4) 분당 15℃ 씩, -14℃로 승온하는 단계; 5) 분당 -1℃ 씩, -45℃로 냉각하는 단계; 및 6) 분당 -10℃ 씩, -90℃로 냉각하는 단계를 포함할 수 있다.

[47] 상기 세포 동결보존 방법은 적정 농도의 세포를 바이알에 포함하여 수행할 수 있다. 상기 세포의 농도는 바이알 당 $1x10^4$ 내지 $1x10^8$ cell/㎖, 구체적으로 $1x10^5$ 내지 $1x10^7$ cell/㎖일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 상기 농도는 세포의 종류에 따라 달라질 수 있다.

[48]

[49] 본 발명은 본 발명의 조성물 및 면역세포를 유효성분으로 함유하는 암 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[50] 상기 조성물은 상기 서술된 세포의 동결보존용 배지 조성물과 동일하다. 다만, 약학 조성물로 사용되는 경우에 포함될 수 있는 세포 배양 배지는 혈청, 페놀레드 또는 β-머캅토에탄올과 같이 독성물질이 포함되지 않은 배지인 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물은 인체 독성이 없어, 해동 후 개체에 직접 투여될 수 있다.

[51] 본 명세서에서 사용된 용어 "면역세포"는 인체의 면역반응에 관여하는 세포로 자연살해세포, T 세포, B 세포, 수지상세포 등이 있다. 구체적으로, 상기 면역세포는 자연살해세포일 수 있다.

[52] 상기 암은 방광암, 유방암, 위암, 폐암, 난소암, 갑상선암, 자궁경부암, 중추신경암, 교아종, 간암, 피부암, 췌장암, 위암, 대장암, 직장암, 식도암, 신장암, 폐암, 상피암, 혈액암, 전립선암, 연조직육종, 다발성 경화증 등을 포함할 수 있다.

[53] 본 명세서에서 사용된 용어 "감염성 질환"은 바이러스 또는 병원균의 감염을 원인으로 하는 병적상태를 의미하고, 이는 호흡기, 혈액, 피부접촉 등을 통해 전염 또는 감염될 수 있는 질환을 모두 포함한다. 상기 감염성 질환의 예는 B형 및 C형 간염, 인간 파필로마 바이러스(human papilloma virus, HPV) 감염, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus) 감염, 바이러스성 호흡기 질환, 인플루엔자 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[54]

[55] 또한, 본 발명은 본 발명의 조성물 및 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[56] 상기 조성물은 상기 서술된 세포의 동결보존용 배지 조성물과 동일하다. 다만, 약학 조성물로 사용되는 경우에 포함될 수 있는 세포 배양 배지는 혈청, 페놀레드 또는 β-머캅토에탄올과 같이 독성물질이 포함되지 않은 배지인 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물은 인체 독성이 없어, 해동 후 개체에 직접 투여될 수 있다.

[57] 본 명세서에서 사용된 용어 "줄기세포(stem cell)"는 다양한 세포로 분화가 가능한 전분화능을 갖는 세포를 의미한다. 상기 줄기세포는 인간배아줄기세포, 골수줄기세포, 중간엽줄기세포, 인간신경줄기세포, 경구막점막세포 등을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포일 수 있다.

[58] 본 명세서에서 사용된 용어 "퇴행성 질환"은 조직의 비가역적인 양적 소실로 인하여 해당 조직이 원래의 기능을 상실하는 병적 상태를 의미한다. 상기 퇴행성 질환은 뇌신경질환, 허혈성 질환, 피부손상, 골질환, 퇴행성 관절염 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[59]

[60] 또한, 본 발명은 본 발명의 조성물 및 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[61] 본 명세서에서 사용된 용어 "면역질환"은 과도하거나(excessive), 원치않는(undesired) 면역반응을 원인으로 조직이 손상되는 모든 병적 상태를 의미한다. 따라서, 상기 용어 "면역질환"은 "면역과다 질환"과 동일한 의미를 가지며, "면역질환의 예방 또는 치료용 조성물"은 "면역 억제제"와 동일한 의미를 가진다.

[62] 상기 면역질환은 이식편대 숙주질환, 이식편 거부반응, 만성 염증성 질환, 염증성 통증, 신경병성 통증, 만성 폐색성 호흡기 질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 및 자가면역 질환을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[63] 상기 용어 "자가면역질환"은 면역 세포가 자신과 외부물질을 구별하지 못하고 자신을 공격하여 발생하는 병적 상태를 의미한다. 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 전신성홍반성낭창(systemic lupus erythematosis), 하시모토씨 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 그레브스 병(Grave's disease), 다발성경화증(multiple sclerosis), 경피증(Scleroderma), 중증근무력증(myasthenia gravis), 제1형 당뇨(type I diabetes), 알레르기성 뇌척수염(allergic encephalomyelitis), 사구체신염(glomerulonephritis), 백반증(vitilligo), 베제트병(Becet's disease), 크론병(Crohn's disease), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 혈소판 감소성 자반증(thrombocytopenic purpura), 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 자가면역성 용혈성 빈혈(autoimmune anemia), 부신백질이영양증(adrenoleukodystrophy, ALD) 및 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus, SLE)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[64]

[65] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[66] 또한, 상기 약학 조성물은 약학 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 용액 또는 현탁액, 또는 국소 투여용

제제로서 연고제 등이 있다. 본 발명의 조성물을 제형화할 때, 일반적으로 사용되는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 함께 사용할 수 있다.

[67] 상기 조성물의 1회 투여량은 전체 조성물 기준으로 체중 1 kg 당 약 1 ㎍ 내지 50 ㎎일 수 있고, 면역세포 및 줄기세포 등의 치료용 세포의 투여량은 성인을 기준으로 1일, 1 내지 10^8, 10 내지 10^5, 10^2 내지 10^3개일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 상기 투여량 및 투여 횟수는 질병의 정도, 투여 경로뿐만 아니라 환자의 체중, 연령 및 성별 등과 같은 인자를 고려하여 결정할 수 있다.

[68]

발명의 실시를 위한 형태

[69] 이하, 본 발명을 하기 실시예, 비교예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예, 비교예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.

[70]

[71] **실시예** 1 내지 3. 동결보존용 배지 조성물의 제조

[72]

[73] 동결보존용 배지 조성물을 제조하기 위해, 5 ㎖의 DMSO, 25 ㎖의 덱스트란 40, 50 ㎖의 알부민주 및 세포배양배지로서 20 ㎖의 RPMI1640을 혼합하였다(실시예 1). 상기와 같은 방법으로 실시예 2 및 3 또한 하기 표 1에 기재된 바와 같은 함량으로 다이메틸설폭사이드(DMSO, BIONICHE PHARMA, 미국), 덱스트란 40(대한약품공업, 한국), 알부민주(녹십자, 한국) 및 RPMI1640(Gibco, 미국)을 포함하는 동결보존용 배지 조성물을 제조하였다.

[74]

[75] **비교예** 1 내지 6. 동결보존용 배지 조성물의 제조

[76]

[77] 상기 실시예에 대한 비교예로서, 5 ㎖의 DMSO 및 95 ㎖의 알부민주를 혼합하여 동결보존용 배지 조성물을 제조하였다(비교예 1). 상기와 같은 방법으로 비교예 2 내지 6 또한 하기 표 1에 기재된 바와 같은 함량으로 다이메틸설폭사이드(DMSO, BIONICHE PHARMA, 미국), 덱스트란 40(대한약품공업, 한국), 알부민주(녹십자, 한국) 또는 RPMI1640(Gibco, 미국)을 포함하는 동결보존용 배지 조성물을 제조하였다.

[78] [표1]

	실시예 1	실시예 2	실시예 3	비교예 1	비교예 2	비교예 3	비교예 4	비교예 5	비교예 6
DMSO(v/v%)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
덱스트란 40(v/v%)	25	25	25	-	25	25	25	25	25
알부민주(v/v%)	50	35	20	95	70	10	5	1	0
RPMI1640(v/v%)	20	35	50	-	-	60	65	69	70

[79]

[80] **실험예** 1. 동결 및 해동 후, NK 세포 평가

[81]

[82] **1.1.** NK 세포의 동결 및 해동

[83]

[84] 상기 실시예 1 내지 3, 비교예 1 내지 6에서 제조된 동결보존용 배지 조성물로 NK 세포를 동결한 뒤, 이를 해동하여, 상기 동결보존용 배지 조성물을 평가하였다.

[85] 먼저, 인간의 말초혈액(서울대학교병원, 한국)에서 단핵구를 분리하였다. 분리된 단핵구에서 CliniMACS 시스템을 이용하여 CD3 양성인 세포를 제거하고, 이를 시드(seed) 세포로써 사용하였다. 한편, 2,000 cGy로 감마선 조사한 단핵구는 NK 세포 배양을 위한 지지세포로써 사용하였다. 시드세포 및 지지세포를 500 IU/㎖의 IL-2, 항 CD3 항체인 10 ㎍/㎖의 OKT3 및 1 v/v% 혈장을 포함하는 CellGro® SCGM 배지(CellGenix, 독일)에서 $0.5x10^6$ cell/㎖ 내지 $1x10^6$ cell/㎖의 농도를 유지하며 배양하였다. 배양은 37℃, 5% CO_2 조건으로 14 내지 21일간 하였다.

[86] 상기 배양된 NK 세포를 모아 4℃, 1,500 rpm의 조건으로 10분 동안 원심분리하였다. 펠렛을 RPMI1640 배지로 세척하고, 세포의 수를 계수하였다. $1x10^8$개의 세포가 되도록 15 ㎖ 튜브에 분주한 뒤, 이를 상기와 동일한 조건으로 원심분리하여 펠렛을 수득하였다. 수득된 펠렛을 실시예 1 내지 3, 비교예 1 내지 6에서 제조된 동결보존용 조성물로 동결하였다.

[87] 세포를 하기 표 2에 기재된 조건으로 CRF(controlled rate freezing) 후, 동결된 세포를 베이퍼 LN2 탱크(vapor LN2 tank)에서 일정기간 동안 보관하여 세포 동결을 수행하였다. 동결된 세포를 꺼내어 37℃ 항온 수조에서 빠르게 해동하였다. 여기에 세포 부피의 10배에 해당하는, 10% 우태아 혈청을 포함하는 RPMI1640 배지를 첨가하여 세포를 현탁하고, 이를 4℃, 1,200 rpm의 조건으로

10분간 원심분리하여 세포를 수득하였다.

[88] [표2]

0 단계	End Temp. +4℃
1 단계	End Temp. -8℃; Slope -1℃/분
2 단계	End Temp. -65℃; Slope -25℃/분
3 단계	End Temp. -14℃; Slope +15℃/분
4 단계	End Temp. -45℃; Slope -1℃/분
5 단계	End Temp. -90℃; Slope -10.00℃/분

[89]

[90] **1.2.** NK 세포의 배양

[91]

[92] 상기 수득한 세포를 500 IU/㎖의 IL-2 및 10% 우태아 혈청을 포함하는 RPMI1640 배지에 $2x10^6$ cell/㎖의 농도가 되도록 재현탁하였다. 재현탁된 세포 10 ㎖을 T75 플라스크에 분주하고, 배양 3일째에 동량의 배지를 추가하여 7일간 배양하였다.

[93]

[94] **1.3. 생존 세포 수 및 생존율 확인**

[95]

[96] 상기 배양한 NK 세포의 생존 세포 수 및 생존율은 ADAM cell counter Accustain kit(DigitalBio)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하여 측정하였다.

[97] 먼저, 상기 실험예 1.2에서 배양한 세포를 계수하여 $1x10^6$ cell/㎖의 농도가 되도록 PBS로 희석하였다. 희석된 세포를 14 ㎕씩 바닥이 둥근 96 웰 플레이트의 2개의 웰에 각각 분주하였다. 상기 2개의 웰 중 하나에는 총 세포 수를 측정할 수 있는 T 용액(solution) 14 ㎕를 첨가하여 희석된 세포와 섞어준 뒤, 이중 14 ㎕를 취하여 계수기 칩(chip)의 T 패널에 넣었다. 한편, 죽은 세포 수를 측정할 수 있는 N 용액을 다른 하나의 웰에 14 ㎕ 첨가하여 희석된 세포와 섞어준 뒤, 이중 14 ㎕를 취하여 계수기 칩의 N 패널에 넣어주었다. 상기 칩을 ADAM 계수기에 삽입하고 생존 세포 수를 측정하여 그 결과를 도 1a 내지 도 1d에 나타내었다.

[98] 도 1a 및 도 1c에서 동결한 세포의 해동 후 IL-2로 배양한 후 회수율은, 동결 시 바이알(vial) 내의 세포 수를 기준으로 해동 후 IL-2로 배양한 후 생존 세포 수를 백분율로 나타내었고, 이를 하기 표 3 및 표 4에 나타내었다.

[99] [표3]

	평균	표준편차
비교예1	36	2
비교예2	60	5.8
실시예1	72	18.1
실시예2	82	6.2
실시예3	85	27.6

[100]

[101] [표4]

	평균	표준편차
실시예 3	78.5	13.6
비교예 3	67.6	23.1
비교예 4	58.9	2.4
비교예 5	57.8	20.8
비교예 6	45.0	6.5

[102]

[103] 한편, 도 1b 및 도 1d에서 동결한 세포의 해동 후 IL-2로 배양한 후 생존율은, 총 세포 수를 기준으로 생존 세포 수를 백분율로 나타내었고, 이를 하기 표 5 및 표 6에 나타내었다.

[104] [표5]

	평균	표준편차
비교예1	42	23
비교예2	67	13
실시예1	76	6
실시예2	80	11
실시예3	79	7

[105]

[106] [표6]

	평균	표준편차
실시예 3	72	6
비교예 3	68	15
비교예 4	66	11
비교예 5	66	9
비교예 6	65	11

[107]

[108] 도 1a 내지 도 1d 및 상기 표 3 내지 표 6에 나타난 바와 같이, 배양 7일 후 실시예 1 내지 3의 동결보존용 배지 조성물을 사용하였을 때 세포의 회수율 및 생존율이 70% 이상으로 높게 나타났다. 반면, DMSO와 알부민주를 포함(비교예 1), DMSO, 덱스트란 40과 알부민주를 포함(비교예 2), DMSO, 덱스트란 40, 15 v/v% 미만의 알부민주와 RPMI1640을 포함하는(비교예 3 내지 6) 동결보존용 배지 조성물은 낮은 세포 회수율 및 생존율을 보였다.

[109]

[110] **1.4.** NK 세포 활성 평가

[111]

[112] 실시예 1 내지 3 및 비교예 1 내지 6의 동결배지에서 동결하고 해동한 NK 세포의 세포 활성을 확인하기 위하여, 종양 세포에 NK 세포를 처리하여 종양 세포 살상능을 확인하였다. 이때, 실험예 1.1에서 해동 직후 수득한 NK 세포와 실험예 1.2에서 배양 후 수득한 NK 세포의 활성을 각각 평가하였다.

[113] 먼저, 종양 세포인 K562 세포(ATCC, 미국)는 10% 소태아 혈청이 포함된 RPMI1640 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건하에서 배양하였다. 상기 배양한 세포를 트립신 처리하여 회수한 뒤, $1x10^6$ cell/㎖의 농도가 되도록 상기 배양 배지로 현탁하였다. 여기에 1 mM calcein AM(Life Technologies, 미국)을 최종 농도가 30 μM이 되도록 첨가하였다. 상기 세포를 37℃, 5% CO_2 조건에서 1시간 동안 배양하여 종양 세포를 형광으로 표지하였다.

[114] 표지된 종양 세포를 10 ㎖의 배양 배지로 세척한 뒤, $1x10^5$ cell/㎖의 농도가 되도록 재현탁하여 바닥이 둥근 96 웰 플레이트에 100 ㎕씩 분주하였다. 여기에 상기 실험예 1.1 및 실험예 1.2에서 해동 직후 및 배양 후 수득한 세포를, NK 세포[이펙터 세포(effector cell, E)] 및 K562 세포[표적 세포(target cell, T)]에 대한 수의 비율이 10:1, 3:1, 1:1 및 0.3:1이 되도록 혼합하여, 이를 100 ㎕씩 첨가하였다. 이때, 자발적인 방출(spontaneous release)은 종양 세포에 동량의 배지를, 최대 방출(maximun release)은 종양 세포에 동량의 2% 트리톤X-100을 첨가하였다.

[115] 이를 37℃, 5% CO_2 조건에서 4시간 동안 반응시킨 뒤, 4℃에서 2,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 100 ㎕의 상층액을 검은 웰 플레이트로 옮겨 385 ㎚/450

㎚의 조건에서 형광측정기로 형광을 측정하였다. 얻어진 형광 측정값을 이용하여 하기 수학식 1로 NK 세포에 의한 종양 세포의 용해율(%)을 계산하여, 도 2a 내지 도 2d에 나타내었고, 이를 하기 표 7 내지 표 10에 나타내었다. 표 7에서 자연살해세포 공여자 n은 6이고, 표 8에서 자연살해세포 공여자 n은 3이다.

[116] [수식1]

$$\text{용해율}(\%)=\frac{\text{샘플웰평균형광값}-\text{자발적방출웰평균형광값}}{\text{최대방출웰평균형광값}-\text{자발적방출웰평균형광값}}\times 100$$

[117]

[118] [표7]

해동 직후	비교예1	비교예2	실시예1	실시예2	실시예3
E10	44	60	59	65	76
E3	22	32	32	42	52
E1	8	13	12	17	24
E0.3	2	4	9	7	8

[119]

[120] [표8]

해동 직후	실시예 3	비교예 3	비교예 4	비교예 5	비교예 6
E30	90	84	82	77	66
E10	65	53	50	47	37
E3	33	24	21	21	16
E1	13	10	7	9	6
E0.3	5	5	2	3	4

[121]

[122] [표9]

배양 후	비교예1	비교예2	실시예1	실시예2	실시예3
E10	84	87	86	86	88
E3	68	82	77	76	77
E1	45	61	52	46	45
E0.3	17	28	21	19	18

[123]

[124] [표10]

배양 후	실시예 3	비교예 3	비교예 4	비교예 5	비교예 6
E30	84	81	84	82	80
E10	83	82	82	77	73
E3	76	71	67	65	56
E1	50	41	35	34	29
E0.3	22	14	13	14	10

[125]

[126] 도 2a 및 도 2b와 상기 표 7 및 표 8에 나타난 바와 같이, 동결된 세포를 해동한 직후, 종양에 대한 세포독성은 알부민 함량이 10% 이하이거나 70% 이상일 경우 실시예와 비교해서 세포독성이 낮은 것으로 나타났다. 일반적으로 활성화된 면역세포를 동결하면 세포의 활성이 감소되어 면역세포의 기능이 감소되는 것으로 알려져 있지만 동결배지 조성에 따라 해동된 세포의 활성이 다르게 유지됨을 확인할 수 있었다. 특히, 실시예 3의 경우 동결 후 해동했을 때 가장 높은 NK 세포 활성을 유지함을 확인할 수 있었다.

[127] 반면, 동결된 세포를 일정 기간 동안 배양한 뒤, 종양 세포에 대한 세포독성을 확인한 결과는, 도 2c 및 도 2d와 상기 표 9 및 표 10에 나타난 바와 같이, 모든 실시예 및 비교예에서 유사한 것으로 나타났다. 이는 세포를 배양하는 과정에서 배지에 첨가된 IL-2에 의해 감소된 NK 세포의 활성이 회복되었기 때문인 것으로 판단된다.

[128]

[129] **실험예** 2. 해동 후, 종양 세포 평가

[130]

[131] 상기 실시예 1 내지 3 및 비교예 1 내지 6에서 제조한 동결보존용 배지 조성물이 종양 세포의 동결에도 사용할 수 있는지 여부를 확인하였다.

[132] 먼저, 인간 T 림프종 세포인 HuT78(ATCC, 미국) 및 인간 백혈병 세포인 K562(ATCC, 미국)는 각각 10% 우태아 혈청 또는 20% 우태아 혈청이 포함된 RPMI1640 배지로 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 상기 배양한 세포를 회수하여 각각의 배양 배지로 현탁한 후, HuT78 세포는 $1x10^7$ cell/㎖의 농도로, K562 세포는 $4x10^6$ cell/㎖의 농도로 바이알에 넣어 동결하였다. 세포 동결은 상기 실험예 1.1에 서술된 바와 동일하게 수행하였다. 상기 동결한 세포는 각각의 배양 배지로 재현탁하여 $1x10^6$ cell/㎖의 농도가 되도록 분주하여 4일간 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

[133] 상기 배양한 세포는 상기 실험예 1.3과 동일한 방법으로 생존한 세포 수 및 생존율을 측정하였다. HuT78 세포에 대한 생존 세포 수 및 생존율은 도 3a 및 도 3b에, K562 세포에 대한 동일한 결과는 도 4a 및 도 4b에 나타내었다.

[134] 그 결과, 도 3a 내지 도 4b에 나타난 바와 같이 종양 세포인 HuT78 및 K562 세포는 실시예 1 내지 3의 동결보존용 배지 조성물과 비교예 2의 동결보존용 배지 조성물에서 생존 세포 수 및 생존율이 유사한 것으로 나타났다. 반면, 비교예 1의 동결보존용 배지 조성물은 현저히 낮은 생존 세포 수 및 생존율을 나타내었다.

청구범위

[청구항 1] 총 조성물의 부피에 대하여, 15 내지 55 v/v%의 알부민, 20 내지 30 v/v%의 덱스트란, 2 내지 8 v/v%의 다이메틸설폭사이드 및 15 내지 55 v/v%의 세포 배양 배지를 포함하는 세포 동결보존용 배지 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 알부민이 18 내지 40 v/v%로 포함되는 것인, 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 덱스트란이 23 내지 27 v/v%로 포함되는 것인, 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 다이메틸설폭사이드가 4 내지 6 v/v%로 포함되는 것인, 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 세포 배양 배지가 30 내지 52 v/v%로 포함되는 것인, 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 세포가 동물세포인, 조성물.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 동물세포가 면역세포인, 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 면역세포가 자연살해세포인, 조성물.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 세포와 함께 대상체에 직접 투여되는 것인, 조성물.

[청구항 10] 제1항의 조성물을 첨가한 세포를 동결시키는 단계를 포함하는, 세포 동결보존 방법.

[청구항 11] 제1항의 조성물 및 면역세포를 유효성분으로 함유하는 암 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 면역세포가 자연살해세포인, 약학 조성물.

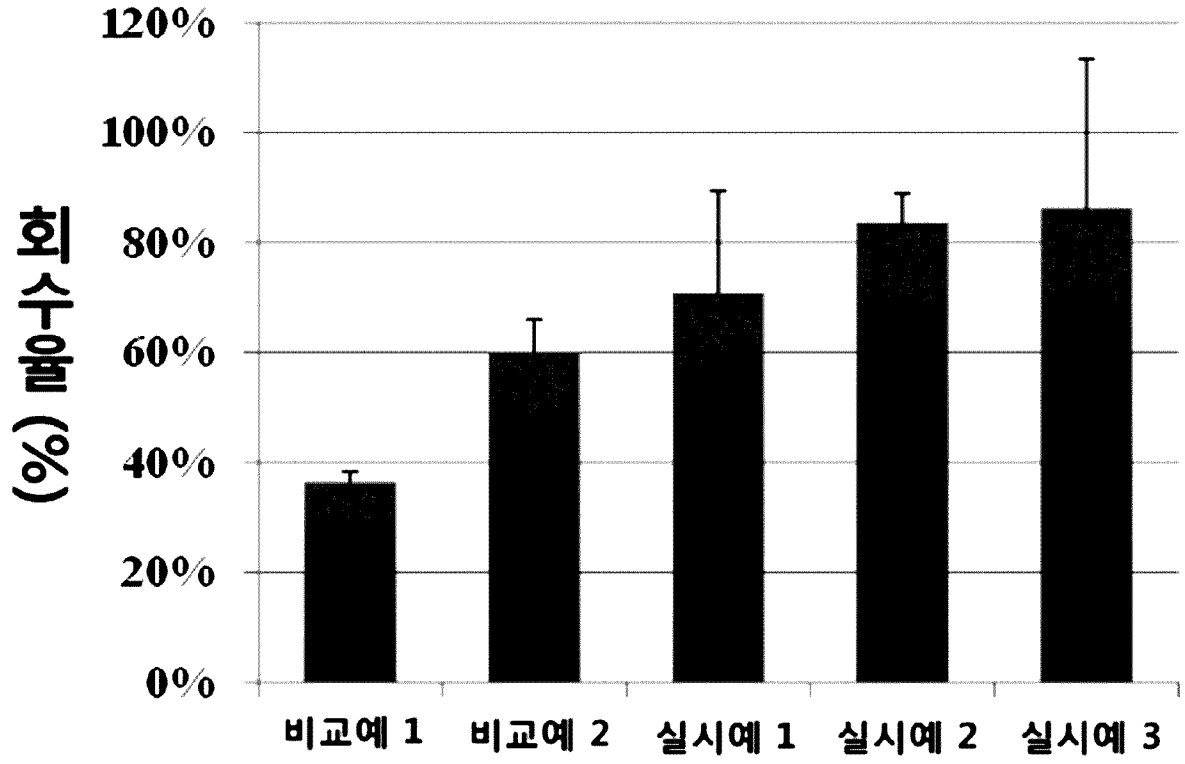
[청구항 13] 제1항의 조성물 및 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 줄기세포가 중간엽줄기세포인, 조성물.

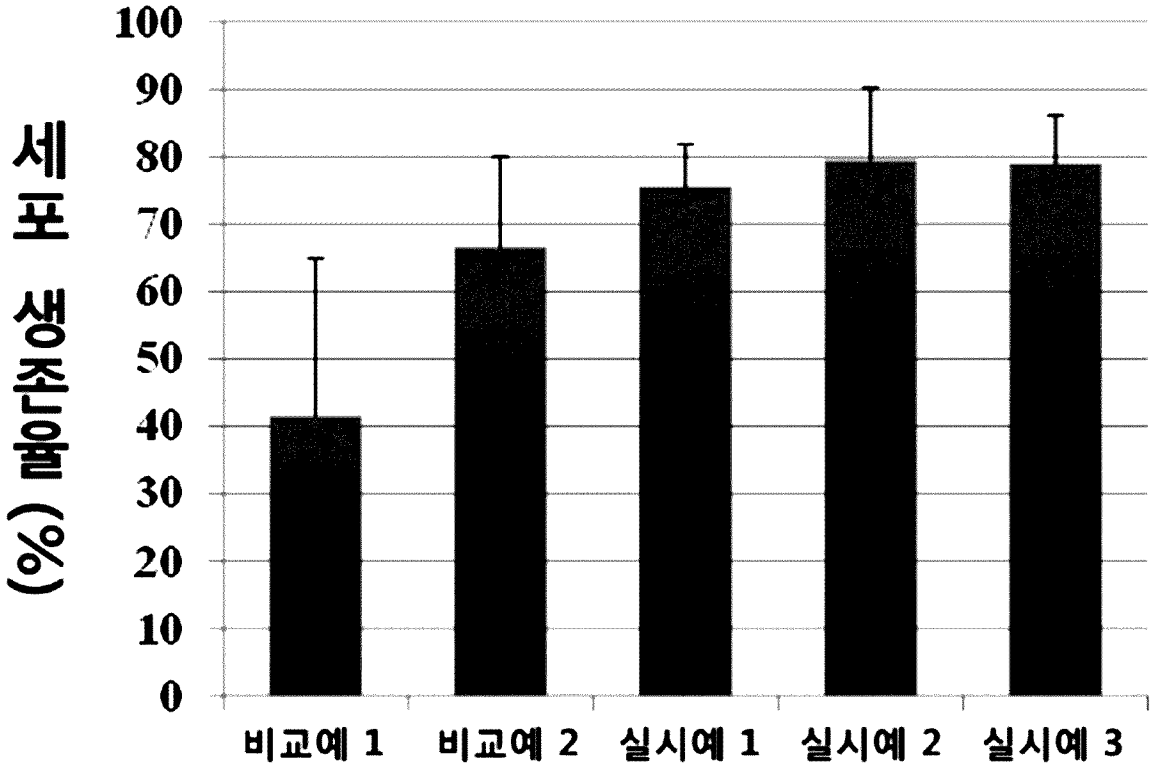
[청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 퇴행성 질환이 뇌신경질환, 허혈성 질환, 피부손상, 골질환 및 퇴행성 관절염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 조성물.

[청구항 16] 제1항의 조성물 및 중간엽줄기세포를 유효성분으로 함유하는 이식편대숙주질환, 이식편 거부반응, 자가면역질환, 만성 염증성 질환, 염증성 통증, 신경병성 통증 및 만성 폐색성 호흡기 질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)으로 구성된 군으로부터 선택되는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

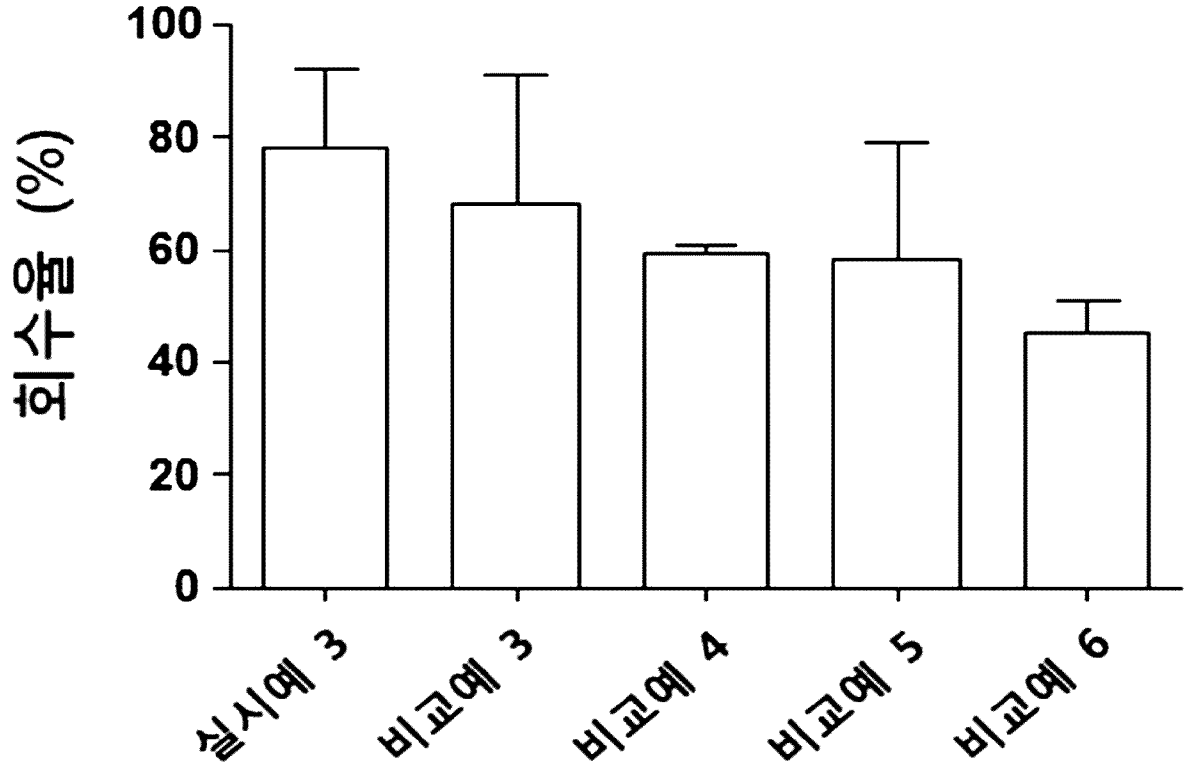
[도1a]


120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
회수율(%)
비교예 1
비교예 2
실시예 1
실시예 2
실시예 3

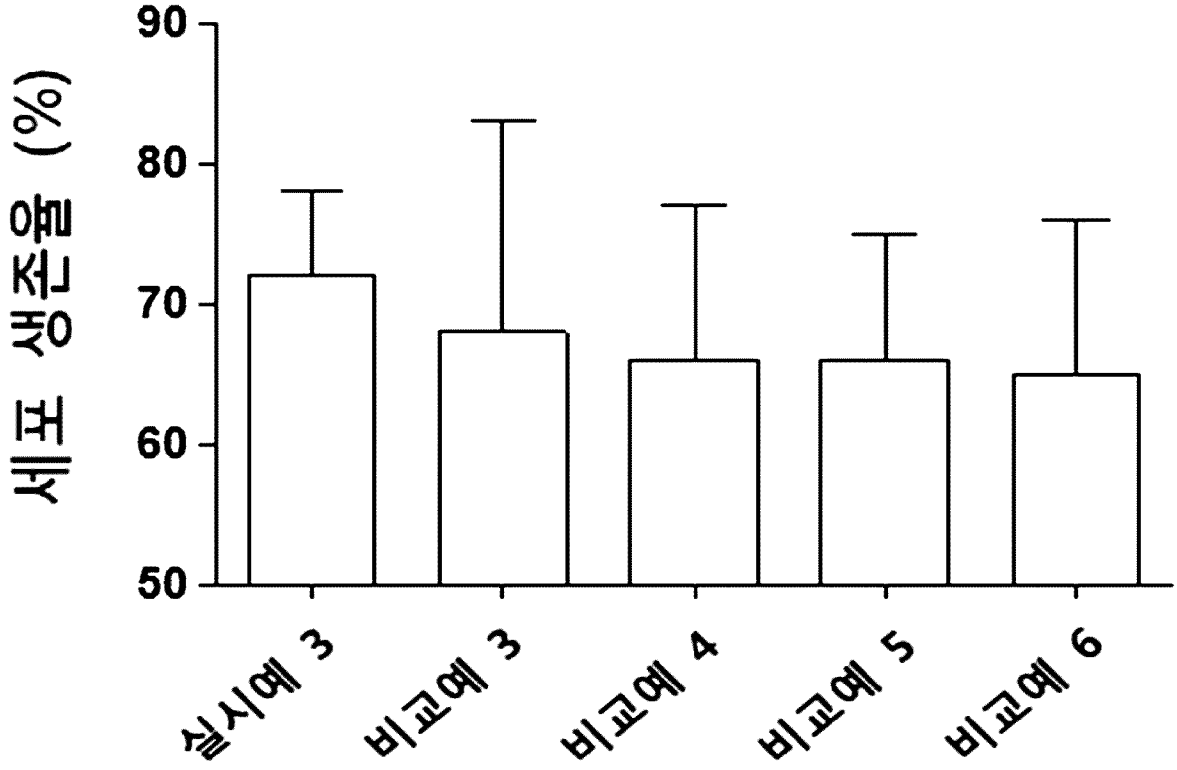
[도1b]


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
세포 생존율(%)
비교예 1
비교예 2
실시예 1
실시예 2
실시예 3

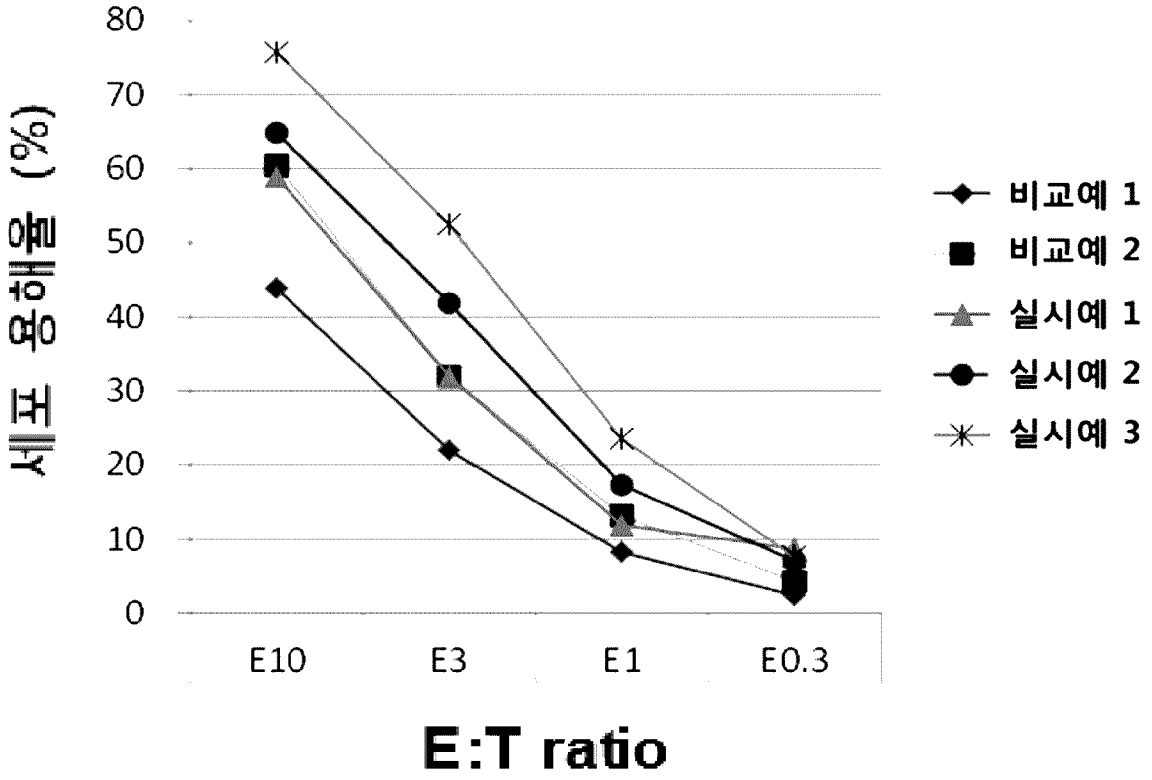
[도1c]


회수율 (%)
100
80
60
40
20
0
실시예 3
비교예 3
비교예 4
비교예 5
비교예 6

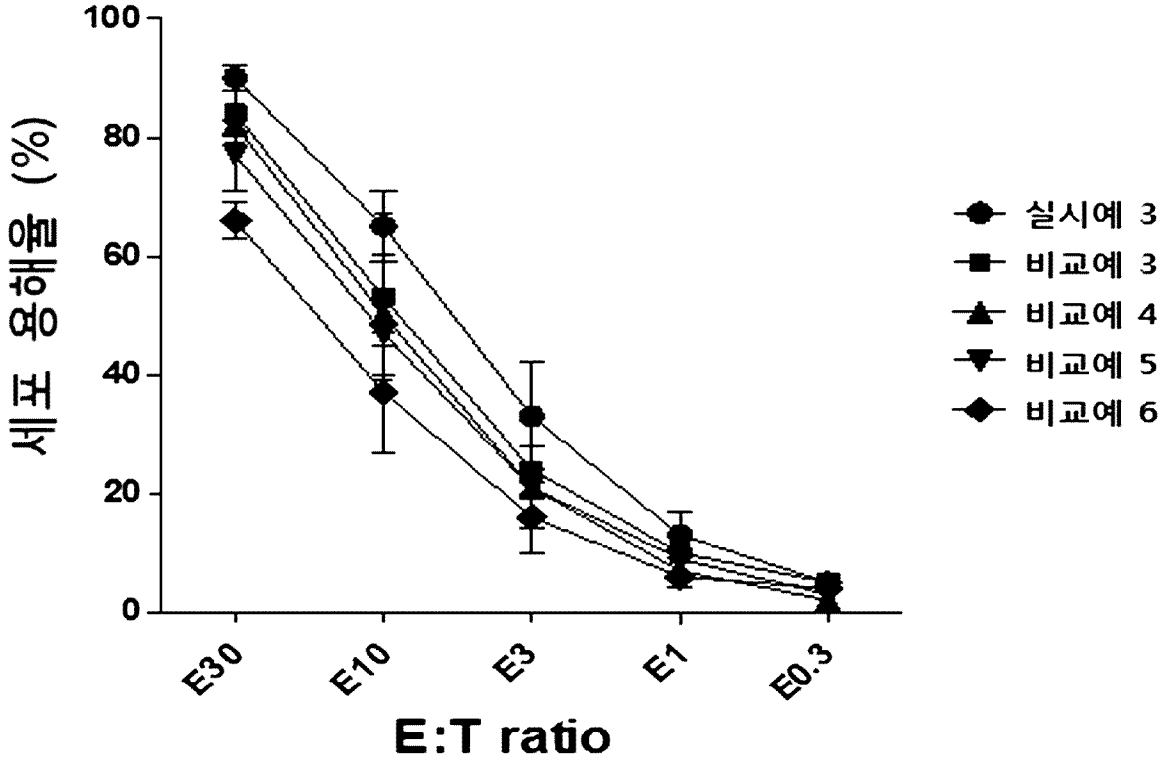
[도1d]


세포 생존율 (%)
90
80
70
60
50
실시예 3
비교예 3
비교예 4
비교예 5
비교예 6

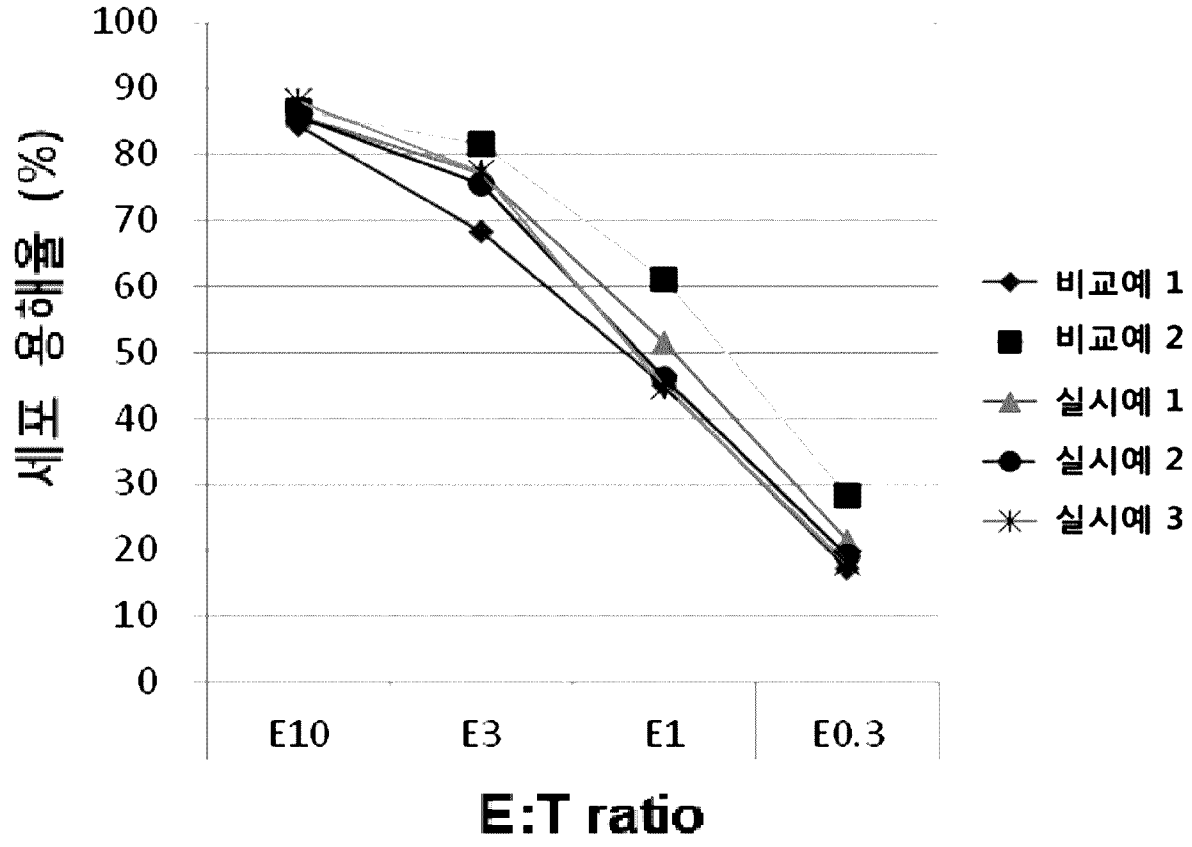
[도2a]


80
70
60
50
40
30
20
10
0
세포 용해율 (%)
E10
E3
E1
E0.3
E:T ratio
비교예 1
비교예 2
실시예 1
실시예 2
실시예 3

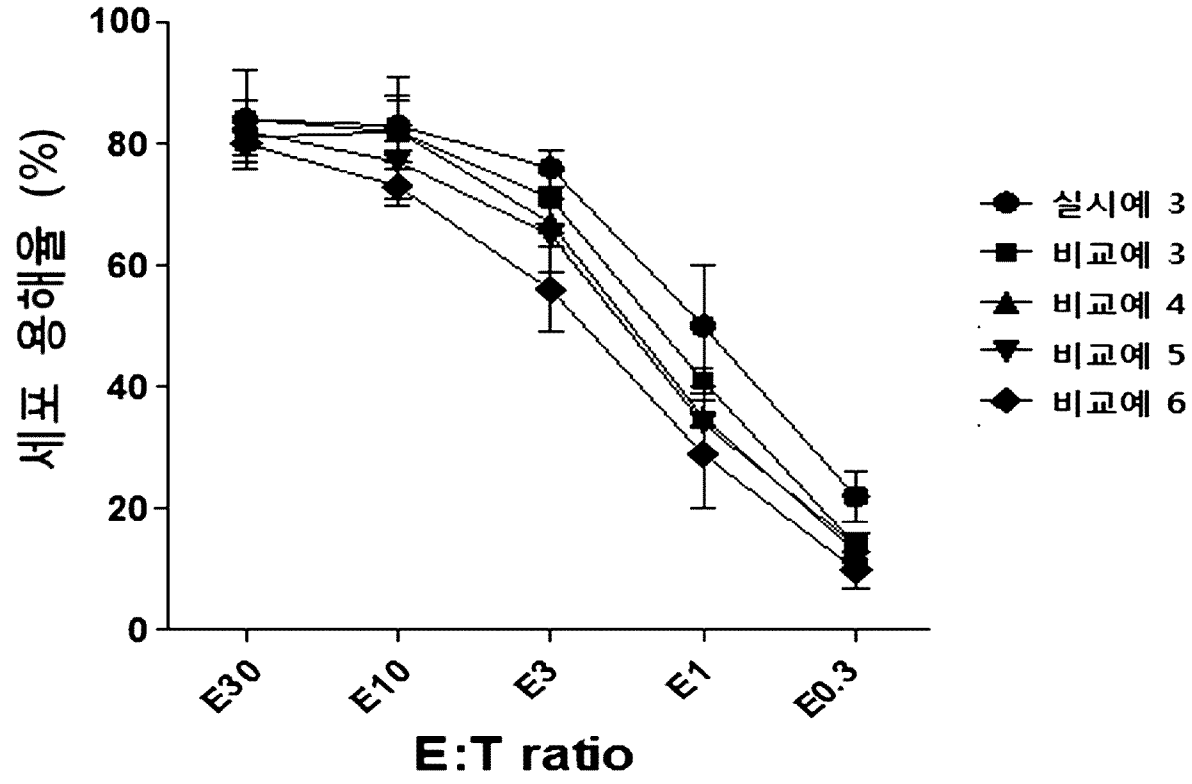
[도2b]


100
80
60
40
20
0
세포 용해율 (%)
E30
E10
E3
E1
E0.3
E:T ratio
실시예 3
비교예 3
비교예 4
비교예 5
비교예 6

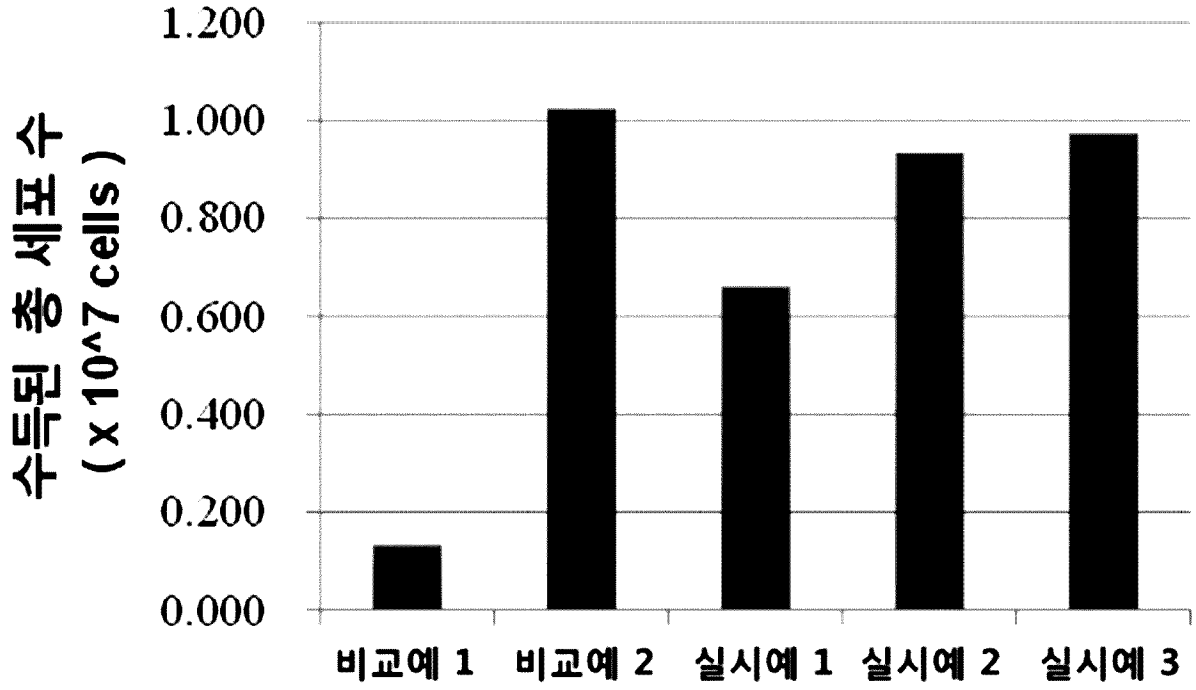
[도2c]


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
세포 용해율 (%)
E10
E3
E1
E0.3
E:T ratio
비교예 1
비교예 2
실시예 1
실시예 2
실시예 3

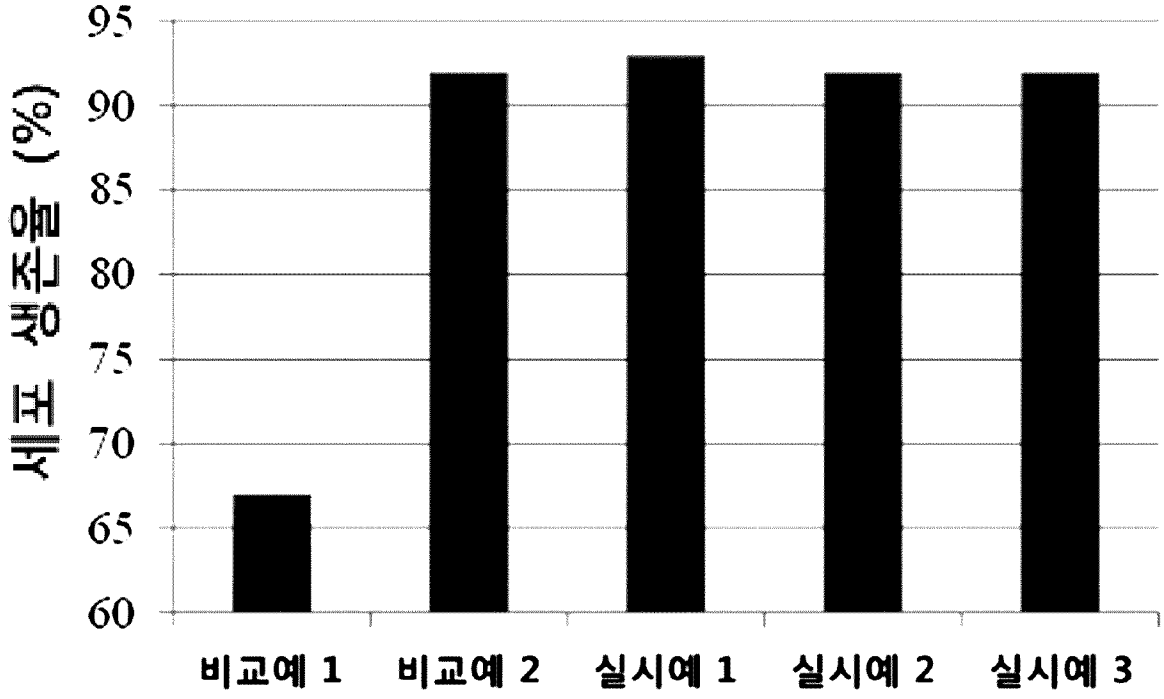
[도2d]


100
80
60
40
20
0
세포 용해율 (%)
E30
E10
E3
E1
E0.3
E:T ratio
실시예 3
비교예 3
비교예 4
비교예 5
비교예 6

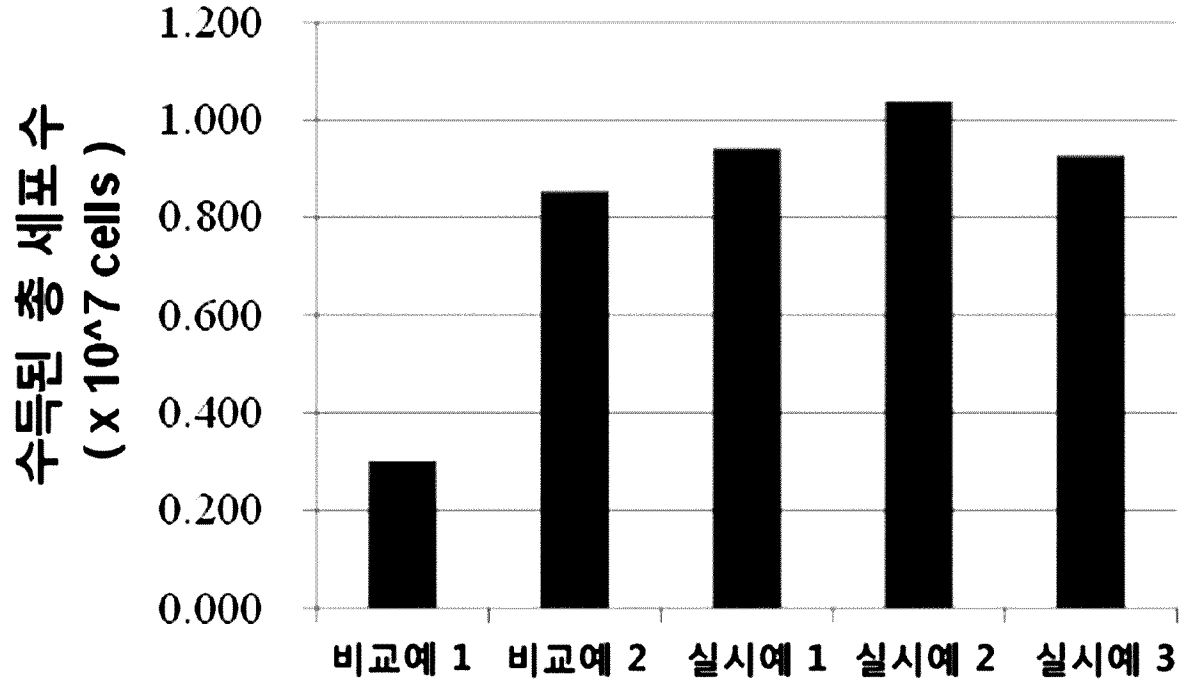
[도3a]


수득된 총 세포 수
(x 10^7 cells)
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
비교예 1
비교예 2
실시예 1
실시예 2
실시예 3

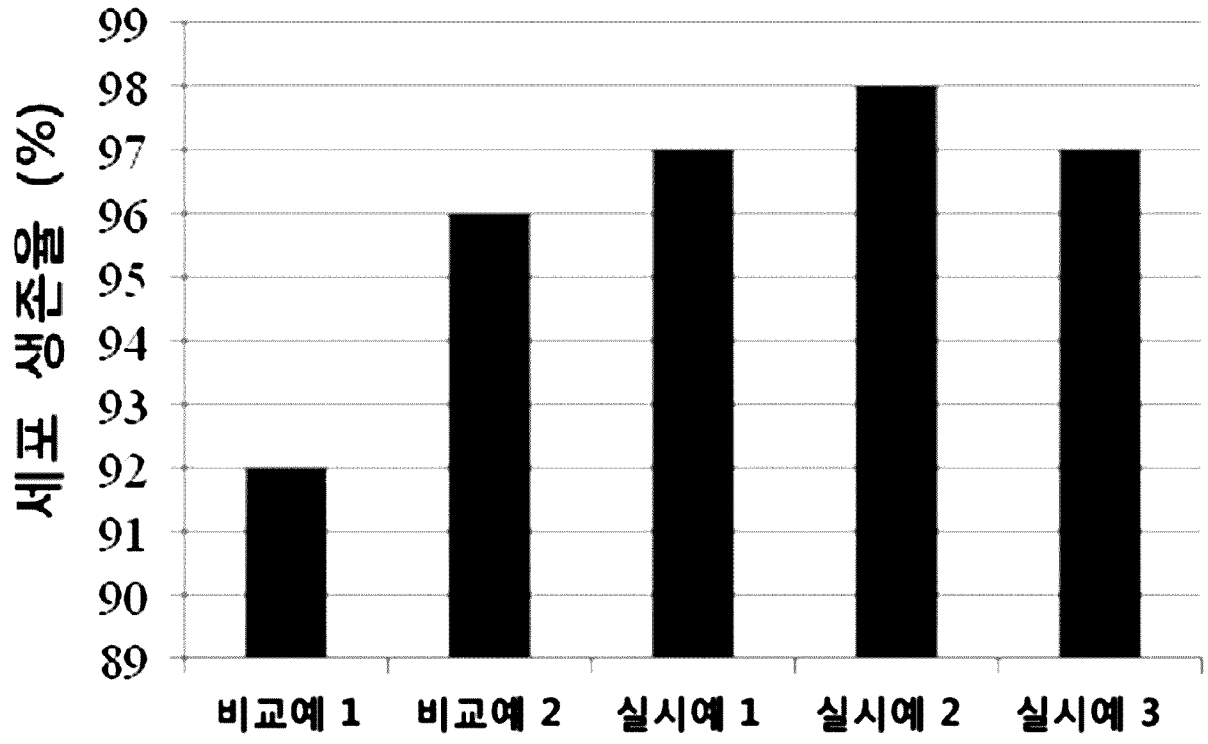
[도3b]


세포 생존율 (%)
95
90
85
80
75
70
65
60
비교예 1
비교예 2
실시예 1
실시예 2
실시예 3

[도4a]


수득된 총 세포 수
(x 10^7 cells)
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
비교예 1
비교예 2
실시예 1
실시예 2
실시예 3

[도4b]


세포 생존율 (%)
99
98
97
96
95
94
93
92
91
90
89
비교예 1
비교예 2
실시예 1
실시예 2
실시예 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/000859

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 1/02(2006.01)i, C12N 5/0783(2010.01)i, C12N 5/0775(2010.01)i, A61K 35/17(2014.01)i, A61K 35/28(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)

A01N 1/02; A61K 35/56; C12N 5/0789; C12N 5/0783; C12N 5/0775; A61K 35/17; A61K 35/28

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: cryopreservation, medium, albumin, dextran, dimethyl sulfoxide, nonserum

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014-0220551 A1 (PRIMEGEN BIOTECH. LLC.) 07 August 2014 See paragraph [0004]; claims 1-8.	1-10
Y		11-16
Y	KR 10-2014-0123503 A (MOGAM INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH et al.) 22 October 2014 See abstract; claims 1 and 12-18.	11,12
Y	FARINI et al., "Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in Chronic Diseases", Stem Cells International, vol. 2014, document ID 306573, pages 1-11 (2014) See abstract.	13-16
A	KR 10-2007-0103431 A (REGENETECH, INC.) 23 October 2007 See claims 1-3 and 9.	1-16
A	US 2015-0320031 A1 (PHARMACOSMOS A/S.) 12 November 2015 See claims 1, 16, 17, 28, 30 and 35.	1-16

☐ 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	Date of mailing of the international search report
28 APRIL 2017 (28.04.2017)	**01 MAY 2017 (01.05.2017)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/000859

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2014-0220551 A1	07/08/2014	NONE	
KR 10-2014-0123503 A	22/10/2014	AU 2012-354438 A1	27/06/2013
		AU 2012-354438 B2	31/03/2016
		CN 104204194 A	10/12/2014
		EP 2794859 A1	29/10/2014
		JP 2015-502756 A	29/01/2015
		JP 6010136 B2	19/10/2016
		KR 10-1644984 B1	12/08/2016
		US 2015-0118207 A1	30/04/2015
		WO 2013-094988 A1	27/06/2013
KR 10-2007-0103431 A	23/10/2007	CA 2596083 A1	03/08/2006
		CN 101142310 A	12/03/2008
		EP 1859024 A2	28/11/2007
		IL 184700 A	03/12/2007
		JP 2008-528034 A	31/07/2008
		WO 2006-081435 A2	03/08/2006
		WO 2006-081435 A3	08/03/2007
US 2015-0320031 A1	12/11/2015	AR 093662 A1	17/06/2015
		AU 2013-351058 A1	28/05/2015
		CA 2891198 A1	05/06/2014
		CN 104918486 A	16/09/2015
		EA 201591052 A1	30/09/2015
		EP 2934109 A1	28/10/2015
		IL 239027 A	30/07/2015
		JP 2016-501873 A	21/01/2016
		KR 10-2015-0095723 A	21/08/2015
		MX 2015006617 A	16/12/2015
		SG 11201504116 A	29/06/2015
		WO 2014-083169 A1	05/06/2014

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2017/000859

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01N 1/02(2006.01)i, C12N 5/0783(2010.01)i, C12N 5/0775(2010.01)i, A61K 35/17(2014.01)i, A61K 35/28(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A01N 1/02; A61K 35/56; C12N 5/0789; C12N 5/0783; C12N 5/0775; A61K 35/17; A61K 35/28

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: 동결보존, 배지, 알부민, 덱스트란, 다이메틸설폭사이드, 비혈청

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2014-0220551 A1 (PRIMEGEN BIOTECH LLC) 2014.08.07 단락 [0004]; 청구항 1-8 참조.	1-10
Y		11-16
Y	KR 10-2014-0123503 A (재단법인 목암생명공학연구소 등) 2014.10.22 요약; 청구항 1 및 12-18 참조.	11,12
Y	FARINI 등, `Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases`, Stem Cells International, 2014권, 문헌 ID 306573, 페이지 1-11 (2014) 초록 참조.	13-16
A	KR 10-2007-0103431 A (리제네텍 인코포레이티드) 2007.10.23 청구항 1-3 및 9 참조.	1-16
A	US 2015-0320031 A1 (PHARMACOSMOS A/S) 2015.11.12 청구항 1, 16, 17, 28, 30 및 35 참조.	1-16

☐ 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

"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
2017년 04월 28일 (28.04.2017)	2017년 05월 01일 (01.05.2017)

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

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/000859

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2014-0220551 A1	2014/08/07	없음	
KR 10-2014-0123503 A	2014/10/22	AU 2012-354438 A1	2013/06/27
		AU 2012-354438 B2	2016/03/31
		CN 104204194 A	2014/12/10
		EP 2794859 A1	2014/10/29
		JP 2015-502756 A	2015/01/29
		JP 6010136 B2	2016/10/19
		KR 10-1644984 B1	2016/08/12
		US 2015-0118207 A1	2015/04/30
		WO 2013-094988 A1	2013/06/27
KR 10-2007-0103431 A	2007/10/23	CA 2596083 A1	2006/08/03
		CN 101142310 A	2008/03/12
		EP 1859024 A2	2007/11/28
		IL 184700 A	2007/12/03
		JP 2008-528034 A	2008/07/31
		WO 2006-081435 A2	2006/08/03
		WO 2006-081435 A3	2007/03/08
US 2015-0320031 A1	2015/11/12	AR 093662 A1	2015/06/17
		AU 2013-351058 A1	2015/05/28
		CA 2891198 A1	2014/06/05
		CN 104918486 A	2015/09/16
		EA 201591052 A1	2015/09/30
		EP 2934109 A1	2015/10/28
		IL 239027 A	2015/07/30
		JP 2016-501873 A	2016/01/21
		KR 10-2015-0095723 A	2015/08/21
		MX 2015006617 A	2015/12/16
		SG 11201504116 A	2015/06/29
		WO 2014-083169 A1	2014/06/05