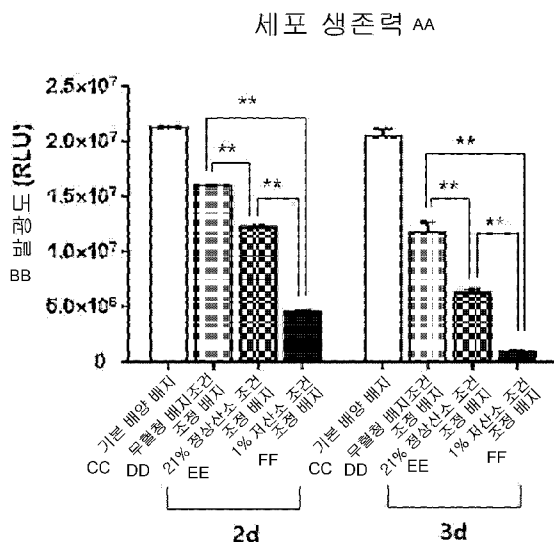




- (51) 국제특허분류: *A61K 35/33* (2014.01) *C12N 5/077* (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/013063
- (22) 국제출원일: 2019 년 10 월 4 일 (04.10.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0120579 2018 년 10 월 10 일 (10.10.2018) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR). 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김동익 (KIM, Dong Ik); 06355 서울시 강남구 광평로 19길 15, 105동 1001호, Seoul (KR). 김애경 (KIM, Ae Kyeong); 06103 서울시 강남구 봉은사로43길 26, 5층, Seoul (KR). 한규현 (HAN, Kyu Hyun); 01753 서울시 노원구 동일로216길 47, 506동 501호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20, 601호, 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: COMPOSITION FOR INDUCING CANCER CELL DEATH, COMPRISING CONDITIONED MEDIUM PREPARED BY CULTURING FIBROBLAST IN HYPOXIC CONDITION, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 저산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 제조한 조정 배지를 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물 및 이의 제조 방법



AA ... Cell viability
BB ... Luminescence (RLU)
CC ... Fundamental culture medium
DD ... Serum-free medium conditioned medium
EE ... 21% Normoxic conditioned medium
FF ... 1% Hypoxic conditioned medium

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for inducing cancer cell death, comprising a conditioned medium prepared by culturing fibroblasts in a hypoxic condition, a medium composition for inducing cancer cell death or for inducing the inhibition of cancer cell proliferation, a pharmaceutical composition for treating or preventing cancer, and a method for preparing a composition for induction of cancer cell death. The conditioned medium prepared by culturing fibroblasts in a hypoxic condition according to the present invention can be used to inhibit the proliferation of cancer cells and to induce cancer cells to undergo death, thereby finding applications in anticancer agents. In addition, the conditioned medium prepared by the method of the present invention can be used to specifically kill cancer cells only, without inducing the death of neighboring normal cells and as such, can be advantageously used in a pharmaceutical composition, clinically immediately applicable, for treatment or prevention of cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지(conditioned medium)를 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물, 암세포 사멸 유도용 또는 암세포 증식 억제 유도용 배지 조성물, 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물 및 암세포 사멸 유도용 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지를 이용하면 암세포의 증식을 억제하면서 사멸을 유도할 수 있어, 항암제로 활용할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법으로 제조한 조정 배지를 이용하면 주변 정상 세포의 사멸을 유도하지 않으면서 암세포만을 특이적으로 사멸시킬 수 있어 임상으로 바로 적용 가능한 암 치료 또는 예방용 약학적 조성물로 효과적으로 이용될 수 있다.



(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))

명세서

발명의 명칭: 저산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 제조한 조정 배지를 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물 및 이의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지(conditioned medium)를 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물, 암세포 사멸 유도용 또는 암세포 증식 억제 유도용 배지 조성물, 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물 및 암 세포 사멸 유도용 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 유전자의 정상적인 제어가 이루어지지 않아 발생하는 질병, 대표적으로 암으로 통칭되는 질환에 대한 효과적이고 전통적인 치료 방법은 외과적으로 종양을 절제하여 제거하는 방법이 활용되고 있었으나, 원발성 암이 타 기관으로 전이가 되는 경우는 외과적 수술이 불가하여 항암 약물 치료 요법이 사용되었다. 약물 치료로 사용되는 항암제는 주로 단분자 물질을 유기적 또는 무기적 방법으로 합성하여 사용하고 있다. 이러한 방식의 전통적 약물 치료법은 많은 부작용을 수반하는데, 그 중 한 가지는 약물로 사용되는 물질이 인위적으로 합성된 생체 외부 유래 물질이라는 것과 항암 물질의 작용점이 이미 과다 발현된 단백질을 목적으로 한다는 점이다.
- [4] 섬유아세포(fibroblast)는 선유아세포(線維芽細胞)라고도 불리는 세포로, 결합조직의 고유세포로서 조면소포체와 골지체의 양호한 발육을 특징으로 하는 타원성인 핵과 방추상인 원형질을 갖춘 세포를 말한다. 많은 장기(臟器; internal organs viscera)에 존재하는 간질계세포(間質系細胞; mesenchymal cell)에서 실질세포(實質細胞; parenchymal cell)를 메꾸는 역할을 하는 세포도 포함하며, 교질(collagen)과 프로테오글리칸(proteoglycan) 등 세포간질물질합성 분비능이 있고, 근아세포(myoplast)와는 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.
- [5] 또한 섬유아세포는 혈청 또는 섬유아세포 증식인자(fibroblast growth factor: FGF) 등에 의해 증식하며, 접촉저지(contact inhibition)하면 돌담모양처럼 모양이 변형되며, 정상섬유아세포에서는 계대배양을 반복하는 경우 50대가 되면 거의 사멸하는 것으로 알려져 있다. 상기와 같은 섬유아세포의 접촉저지기능상실(接觸沮止機能喪失; loss of function for contact inhibition)을 이용하여 발암의 선별(screening)에 사용하고 있으며, 세포의 증식연구, 특히 증식인자(growth factor)의 신호전달을 연구하는 데 많이 사용하고 있다.
- [6] 현재까지 많은 천연물 및 단백질 또는 펩티드성 항암제와 화학합성 항암제가 개발되어 사용되고 있으나, 대부분 생체 내 정상세포에도 영향을 나타내는 심각한 부작용을 나타낼 뿐만 아니라, 암종에 따라 또는 동일한 암종이라도

환자에 따라서 동일한 치료효과가 나타나지 않는 경우가 일반적이다. 이에 따라 전 세계적으로 이러한 문제점들을 해결한 신개념 항암제로서, 생체 내 정상세포에는 영향을 미치지 않으면서도, 암세포만을 선택적으로 제거할 수 있으면서, 더 나아가 모든 종류의 암세포를 제거할 수 있는 항암제를 개발하기 위하여 많은 연구의 필요성이 요구되고 있다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 이에 본 발명자들은 암세포에만 특이적인 사멸을 유도하는 효과를 나타내 항암제로 사용할 수 있는 가능성을 가진 자연적으로 존재하는 세포 및 단백질에 관해 연구하던 중 저산소 배양환경에서 섬유아세포를 배양하여 제조한 섬유아세포 조정 배지가 암세포의 증식을 억제하면서 동시에 세포사멸(apoptosis)을 유도할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[9] 따라서, 본 발명의 목적은 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지(conditioned medium)를 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물, 암세포 사멸 유도용 또는 암세포 증식 억제 유도용 배지 조성물, 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물 및 암 세포 사멸 유도용 조성물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[10]

과제 해결 수단

[11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지(conditioned medium)를 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물을 제공한다.

[12] 또한, 본 발명은 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지(conditioned medium)를 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포의 사멸 유도 방법을 제공한다.

[13] 또한 본 발명은 저산소 환경에서 배양한 섬유아세포(fibroblast) 배양액을 포함하는 암세포 사멸 유도용 또는 암세포 증식 억제 유도용 배지 조성물을 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 저산소 환경에서 배양한 섬유아세포(fibroblast) 배양액을 암세포에 처리하는 단계를 포함하는, 암세포 사멸 유도 또는 암세포 증식 억제 유도 방법을 제공한다.

[15] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[17] 또한 본 발명은 섬유아세포(fibroblast)를 저산소 환경에서 배양하여 조정

배지를 제조하는 단계;를 포함하는 암 세포 사멸 유도용 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[18]

발명의 효과

[19] 본 발명의 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지를 이용하면 암세포의 증식을 억제하면서 사멸을 유도할 수 있어, 항암제로 활용될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법으로 제조한 조정 배지를 이용하면 주변 정상 세포의 사멸을 유도하지 않으면서 암세포만을 특이적으로 사멸시킬 수 있어 임상으로 바로 적용 가능한 암 치료 또는 예방용 약학적 조성물로 효과적으로 이용될 수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 저산소 조건에서 배양한 섬유아세포 조정 배지를 48 시간(2일) 및 72 시간(3일) 동안 배양한 경우에 발생하는 Hela 세포 증식 억제능을 확인한 실험 결과를 나타낸 도이다(*P<0.05, **P<0.01).

[22] 도 2A는 기본 배양 배지, 무혈청 배지조건, 21% 정상산소 조건, 1% 저산소 조건 배지 별 아넥신 V 분석을 통한 Hela 세포의 세포사멸(apoptosis)의 정도를 나타낸 결과를 나타낸 도이다.

[23] 도 2B는 기본 배양 배지, 무혈청 배지조건, 21% 정상산소 조건, 1% 저산소 조건 배지 별 아넥신 V 분석을 통한 Hela 세포의 세포사멸(apoptosis)의 정도를 그래프화하여 나타낸 도(도 2B)이다(*P<0.05, **P<0.01).

[24] 도 3은 기본 배양 배지, 무혈청 배지조건, 21% 정상산소 조건, 1% 저산소 조건 배지별 암세포의 Caspase3/7 활성을 측정된 결과를 나타낸 도이다(*P<0.05, **P<0.01).

[25] 도 4는 기본 배양 배지, 무혈청 배지조건, 21% 정상산소 조건, 1% 저산소 조건 배지별 암세포의 미토콘드리아 막 포텐셜 변화를 측정된 실험 결과를 나타낸 도이다(*P<0.05, **P<0.01).

[26] 도 5A는 기본 배양 배지, 무혈청 배지조건, 21% 정상산소 조건, 1% 저산소 조건 배지 별 암세포 세포 주기를 계수한 결과를 나타낸 도이다.

[27] 도 5B는 암세포의 각각의 세포 주기에 해당하는 암세포를 기본 배양 배지, 무혈청 배지조건, 21% 정상산소 조건, 1% 저산소 조건 배지 별로 표시한 결과를 나타낸 도이다(*P<0.05, **P<0.01).

[28] 도 6은 저산소 농도 조건을 1% 및 5%로 하고 섬유아세포를 배양하여 제조한 조정 배지에서 확인한 암세포 사멸 효과를 확인한 실험 결과를 나타낸 도이다(*P<0.05, **P<0.01).

[29]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [30] 본 발명은 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지(conditioned medium)를 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물을 제공한다.
- [31] 또한, 본 발명은 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지(conditioned medium)를 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포의 사멸 유도 방법을 제공한다.
- [32] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [33]
- [34] 본 발명에서 사용하는 용어 "섬유아세포"란 섬유아세포(fibroblast)는 선유아세포(線維芽細胞)라고도 불리는 세포로, 결합조직의 고유세포로서 조면소포체와 골지체의 양호한 발육을 특징으로 하는 타원성인 핵과 방추상인 원형질을 갖춘 세포를 말한다.
- [35] 본 발명에서의 용어, '배지(culture media)'는 체외배양 조건에서 세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배양액을 의미하고, 섬유아세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 또한, 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium; CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 배지에는 예들 들어, 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), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 반드시 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [36] 본 발명에서 사용하는 용어 "조정 배지(conditioned medium, CM)"란, 섬유아세포를 배양하여 수득된 배양액 자체, 또는 그로부터 섬유아세포가 제거된 배양 상층액을 의미하며, "섬유아세포 배양 상층액", "섬유아세포 배양액" 또는 "섬유아세포 배양 배지"와 호환적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 배지는 영양혼합물(Nutrient Mixture)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 영양 혼합물은 세포배양에 일반적으로 사용되는 각종 아미노산, 비타민, 무기염 등을 포함하는 혼합물로서, 상기 아미노산, 비타민, 무기염 등을 혼합하여 제조하거나 상업적으로 제조된 영양 혼합물을 사용할 수 있다. 상업적으로 제조된 영양혼합물은 M199, MCDB110, MCDB202, MCDB302 등을 예로 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 본 발명의 일 구체예에서는 저산소 환경에서 섬유아세포를 배양하여 조정 배지를 제조하였으며, 상기 제조된 조정 배지가 항암활성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한 본 발명의 일 구체예에서 확인한 상기 항암 활성은 암세포 증식 억제, 암세포 사멸(apoptosis) 유도, 암세포 세포 주기 억류로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 활성인 것을 확인하였다. 특히 본 발명에서는 세포 사멸 유도 활성이 caspase 3/7 활성 증가 또는 미토콘드리아 막 포텐셜 감소에 의한 것임을 확인하였다.

- [38] 본 발명에 있어서 “저산소” 환경 조건은 정상 대기 산소 농도인 21%보다 낮은 산소 농도를 의미하는 것으로, 0.5% 내지 7% 산소 농도일 수 있으나, 바람직하게는 0.7% 내지 5% 산소 농도일 수 있으며, 보다 바람직하게는 1%의 산소 농도를 포함하는 배양 조건일 수 있다.
- [39]
- [40] 또한, 본 발명은 저산소 환경에서 배양한 섬유아세포(fibroblast) 배양액을 포함하는, 암세포 사멸 유도용 또는 암세포 증식 억제 유도용 배지 조성물을 제공한다.
- [41] 또한, 본 발명은 저산소 환경에서 배양한 섬유아세포(fibroblast) 배양액을 암세포에 처리하는 단계를 포함하는, 암세포 사멸 유도 또는 암세포 증식 억제 유도 방법을 제공한다.
- [42] 본 발명의 저산소 환경에서 배양한 섬유아세포 배양액을 포함하는 배지 조성물은 상기 조성물이 처리된 암세포의 caspase 3/7 활성을 증가시키거나 또는 미토콘드리아 막 포텐셜을 감소시킴으로써 암세포의 사멸을 유도할 수 있는 바, 효과적으로 암세포 사멸 유도 용도로 활용할 수 있다. 또한 본 발명의 저산소 환경에서 배양한 섬유아세포 배양액을 포함하는 배지 조성물은 처리된 암세포의 세포 주기를 억류시킬 수 있어 효과적으로 암세포 증식 억제 용도로 활용할 수 있다.
- [43]
- [44] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [45] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [46] 본 발명에서의 '암'이란 정상적인 세포사멸 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하고, 주변 조직으로 침윤할 수 있는 특징을 갖는 질병군을 말한다. 본 발명의 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 췌장교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [47] 본 발명의 약학적 조성물은 저산소 환경에서 섬유아세포를 배양하여 제조한 조정 배지를 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체 즉 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중

1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및/또는 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제 또는 흡입제로 제제화하는 것이 바람직하다.

[48] 본 발명의 약학적 조성물의 투여방법은 특별히 제한되는 것은 아니나, 목적하는 방법에 따라 정맥내, 피하, 복강 내, 흡입 또는 국소적용과 같이 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 치료를 필요로 하는 개체에 투여됨으로서 경감된 질병 상태에 대한 치료에 충분한 본 발명의 치료용 물질의 양을 의미한다. 치료용 물질의 효과적인 양은 특정 화합물, 질병 상태 및 그의 심각도, 치료를 필요로 하는 개체에 따라 달라지며, 이는 당업자에 의해 통상적으로 결정될 수 있다. 비제한적 예로서, 본 발명에 의한 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로는 0.0001 ~ 1000 mg/일, 바람직하게는 1 ~ 500 mg/일이며, 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회에 분할 투여할 수도 있다.

[49] 본 발명에서 '개체'란 암의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[50]

[51] 또한 본 발명은 섬유아세포(fibroblast)를 저산소 환경에서 배양하여 조정 배지를 제조하는 단계;를 포함하는 암 세포 사멸 유도용 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[52] 본 발명의 섬유아세포를 저산소 환경에서 배양하여 조정 배지를 제조하는 단계는 섬유아세포를 정상 대기 산소 농도인 21%보다 낮은 산소 농도에서 배양하는 단계를 포함하며, 상기 저산소 환경은 0.5% 내지 7% 산소 농도 환경일 수 있으나, 바람직하게는 0.7% 내지 5% 산소 농도 환경일 수 있으며, 보다 바람직하게는 1%의 산소 농도 환경을 말한다.

[53] 본 발명의 조정 배지 제조하는 단계에서 사용하는 배지는 예를 들어, 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), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등을 사용할 수 있으나, 반드시 이들로 제한되는 것은 아니다.

[54] 본 발명의 제조 방법을 통한 암 세포 사멸 유도용 조성물을 이용하면 암세포의

증식을 억제하고 암세포의 세포 주기 억류시켜 상기 조성물을 처리한 암세포의 사멸을 효율적으로 유도할 수 있다.

[55]

[56] 본 발명을 이하 실시예를 통하여 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 발명을 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[57]

발명의 실시를 위한 형태

[58] 실시예 1. 섬유아세포(fibroblast) 배양을 통한 조정 배지의 제조

[59] 실험에 사용한 섬유아세포를 정상 대기 산소 농도 조건(21% O₂) 및 저산소 농도 조건(1% 및 5% O₂)에서 2주 이상 배양한 후, 각각의 산소 조건 환경에서 배양한 섬유아세포 2x10⁵ 개의 세포를 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Media)(Gibco, Grand NY, 미국)에 10% FBS (Fetal Bovine Serum)(Gibco, Grand NY, 미국) 및 1% 항생제(페니실린/스트렙토마이신)(Gibco, Grand NY, 미국)를 첨가한 배양배지 용액 10ml을 첨가한 100mm 배양 플레이트에 seeding 하고 5일 동안 배양하였다. 이후, 섬유아세포의 세포 confluency가 90%가 될 때 1 X PBS로 세척하였다. 이후, 무혈청 조건의 DMEM 6ml를 섬유아세포에 첨가하였다. 24시간 이후, 배지를 수득하였으며, 수득한 배지를 300g로 5분 동안 원심분리를 수행하였다. 상층액을 수득하여 이를 -80°C에서 냉동보관하였다. 이후, 이하의 실시예에서는 본 실시예에서 수득한 조정 배지를 사용하였다.

[60]

[61] 실시예 2. 저산소 환경에서 배양한 섬유아세포 조정 배지의 암세포 증식 억제능의 확인

[62] 저산소 농도 조건에서 배양한 섬유아세포 조정 배지가 암세포의 증식을 억제할 수 있는지 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 96 웰 white 플레이트의 각 웰에 1x10⁴ 개의 자궁경부암 세포인 Hela 세포를 넣고 1일 동안 배양하였다. 이후, 정상 대기 산소 농도 조건(21% O₂)과 저산소 농도 조건(1% O₂)에서 배양된 실시예 1에서 수득한 섬유아세포 조정 배지 100 μ l를 배지에 첨가하였다. 이 후, 48 시간(2일) 및 72 시간(3일) 동안 배양 후 CellTiter-Glo assay 2.0 reagent (Promega, USA)를 100 μ l 첨가하고 10분 동안 반응시켰다. 반응 이후에 GLOMAX Multi Detection System (Promega BioSystems Sunnyvale, Inc. USA)으로 발광을 분석하였고, 분석을 수행한 결과를 도 1에 나타내었다. 기본 배양 배지는 1% 항생제, DMEM 및 10% FBS가 첨가된 기본 배양 배지를 의미하고, 무혈청 배지조건 조정 배지는 1% 항생제와 DMEM만이 첨가된 무혈청 조건의 배양배지를 의미하며, 21% 정상산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 정상산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미하고, 1% 저산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 1% 저산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미한다.

[63] 도 1에서 확인한 바와 같이, 각 배지 조건에서 2일 동안 hela 세포를 배양한 경우, 배양배지의 대조군인 무혈청 배지조건 조정 배지 대비 21% 정상산소 조건 조정 배지 및 1% 저산소 조건 조정 배지에서 hela 세포의 증식이 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 1% 저산소 조건 조정 배지는 대조군인 무혈청 배지조건 조정 배지 보다 암세포의 증식이 1/3정도 수준으로까지 감소한 것이 확인되었으며, 21% 정상산소 조건 조정 배지와 비교한 경우에 암세포 증식 수준은 약 1/2 이하로 감소된 것을 확인하였다. 상기와 같은 조정 배지의 암세포 증식 억제능은 3일 동안 배양한 경우에 두드러지게 나타났는데, 21% 정상산소 조건 조정 배지 및 1% 저산소 조건 조정 배지에서 배양한 경우 hela 세포의 증식 억제가 2일 동안 배양한 경우보다 더욱 나타났으며, 특히 1% 저산소 조건 조정 배지에서는 암세포의 증식억제능이 현저하게 나타났다. 종합적으로 저산소 환경에서 섬유아세포를 배양한 경우에 있어서 그 배양 배지는 암세포 증식 억제능력이 더욱 우수하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[64]

[65] 실시예 3. 저산소 농도에서 배양한 섬유아세포 조정 배지의 아넥신 V를 통한 암세포 사멸 효과의 확인

[66] 저산소 농도 조건에서 배양하여 제조한 섬유아세포 조정 배지가 암세포를 사멸시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 아넥신 V 발현 분석을 수행하였다. 6 웰 배양 플레이트의 각 웰에 1.5×10^5 Hela 세포를 넣고 하루 동안 배양 후, 정상 대기 산소 농도 조건(21% O_2)과 저산소 농도 조건(1% O_2)에서 배양된 실시예 1에서 수득한 섬유아세포 조정 배지 2 ml를 플레이트에 첨가하였다. 이 후, 48 시간 동안 Hela 세포를 배양하고 이를 FITC 아넥신(Annexin) V apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) 으로 염색한 후, 세포자동해석분리장치(FACS) Caliber flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 결과를 분석하였고, 그 결과를 각각 2A 및 도 2B에 나타내었다. 기본 배양 배지는 1% 항생제, DMEM 및 10% FBS가 첨가된 기본 배양 배지를 의미하고, 무혈청 배지조건 조정 배지는 1% 항생제와 DMEM만이 첨가된 무혈청 조건의 배양배지를 의미하며, 21% 정상산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 정상산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미하고, 1% 저산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 1% 저산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미한다.

[67] 도 2A 및 2B에 나타난 바와 같이, 아넥신 V 분석을 통하면 세포의 세포사멸을 확인할 수 있는데, 기본 배양 배지 및 무혈청 배지 조건에서 배양한 경우 암세포가 사멸이 거의 없어 생존한 세포의 수가 대부분인 것을 확인하였다. 다만, 초기 세포 사멸(early apoptosis)은 무혈청 배지조건 조정 배지 대비 21% 정상산소 조건 조정 배지 및 1% 저산소 조건 조정 배지에서 배양한 Hela 세포에서 유의하게 나타나는 것을 확인하였다. 후기 세포 사멸 즉 사멸한 암세포(late apoptosis/dead)는 특히 저산소 환경에서 배양한 1% 저산소 조건 조정

배지의 경우에 21% 정상산소 조건 조정 배지 대비 사멸한 암세포의 수가 현저하게 상승한 것을 확인할 수 있었는데, 약 3배 이상 증가한 것이 확인되었다. 이를 통하여 저산소 환경에서 배양한 조정 배지는 암세포의 세포 사멸을 유도하고, 최종적으로는 암세포의 사멸까지 유도할 수 있음을 확인하였다.

[68]

[69] 실시예 4. 저산소 농도에서 배양한 섬유아세포 조정 배지의 **caspase 3/7** 활성 분석을 통한 암세포 사멸 효과의 확인

[70] 저산소 농도 조건에서 배양하여 제조한 섬유아세포 조정 배지에서 배양한 암세포의 caspase 3/7 활성을 확인함으로써 상기 조정 배지가 암세포의 사멸을 유도하는지 확인하는 실험을 수행하였다. 96 웰 white 플레이트의 각 웰에 1×10^4 개의 Hela 세포를 넣고 1일 동안 배양하였다. 이 후, 정상 대기 산소 농도 조건(21% O_2)과 저산소 농도 조건(1% O_2)에서 배양된 실시예 1에서 수득한 섬유아세포 조정 배지 100 μ l를 배지에 첨가하였다. 12, 24, 48시간 동안 상기 배지에서 배양한 후 Caspase-Glo 3/7 Assay(Promega, USA)를 100 μ l 첨가한 후에 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 GLOMAX Multi Detection System (Promega BioSystems Sunnyvale, Inc. USA)으로 발광을 분석하였으며, 상기 분석을 수행한 결과를 도 3에 나타내었다. 기본 배양 배지는 1% 항생제, DMEM 및 10% FBS가 첨가된 기본 배양 배지를 의미하고, 무혈청 배지조건 조정 배지는 1% 항생제와 DMEM만이 첨가된 무혈청 조건의 배양배지를 의미하며, 21% 정상산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 정상산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미하고, 1% 저산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 1% 저산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미한다.

[71] 도 3에서 확인한 바와 같이, 조정 배지에서 배양을 시작하여 12시간이 경과한 후에는 세포사멸 마커인 caspase 3/7 활성이 대조군인 무혈청 배지조건 조정 배지 대비 1% 저산소 조건 조정 배지에서 증가하였으며, 24시간이 경과한 후에 보다 현저하게 그 활성이 증가된 것을 확인하였다. 특히 48시간이 경과된 경우에는 대조군인 무혈청 배지조건 조정 배지 대비 1% 저산소 조건 조정 배지에서 caspase 3/7 활성이 2배 이상 증가된 것을 확인하였다. 이에, 섬유아세포를 저산소 환경에서 배양하여 제조된 조정 배지에서 암세포를 배양시키면 세포 사멸인자인 caspase 3/7의 활성이 현저하게 증가한 것을 확인하여, 상기 조정 배지를 통하면 암세포를 현저하게 세포 사멸시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[72]

[73] 실시예 5. 저산소 농도에서 배양한 섬유아세포 조정 배지의 미토콘드리아 막 포텐셜(Mitochondria membrane potential) 분석을 통한 암세포 사멸 효과의 확인

[74] 세포 사멸이 발생하면 미토콘드리아의 막 포텐셜의 변화가 발생한다. 이에, 저산소 농도 조건에서 배양하여 제조한 섬유아세포 조정 배지가 암세포를 사멸시킬 수 있는지 여부를 미토콘드리아 막 포텐셜 분석을 통하여 확인하는 실험을 수행하였다. 96 웰 black 플레이트의 각 웰에 1×10^4 개의 Hela 세포를 넣고

1일 동안 배양하였다. 이 후, 정상 대기 산소 농도 조건(21% O₂)과 저산소 농도 조건(1% O₂)에서 배양된 실시예 1에서 수득한 섬유아세포 조정 배지 100 μ l를 배지에 첨가하였다. 12, 24 및 48시간 동안 상기 배지에서 배양한 후 Orange Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK)을 처리하였고, 이 후 Mithras 2LB 943 Multimode Reader (Berthold Biotechnologies, Bad Wildad, Germany)로 형광(Ex/Em = 540/590 nm)의 조건에서 그 결과를 분석하였고, 이를 도 4에 나타내었다. 기본 배양 배지는 1% 항생제, DMEM 및 10% FBS가 첨가된 기본 배양 배지를 의미하고, 무혈청 배지조건 조정 배지는 1% 항생제와 DMEM만이 첨가된 무혈청 조건의 배양배지를 의미하며, 21% 정상산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 정상산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미하고, 1% 저산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 1% 저산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미한다.

- [75] 도 4에서 확인한 바와 같이, 조정 배지에서 배양을 시작하여 24시간이 경과한 후에 대조군인 무혈청 배지조건 조정 배지 대비 21% 정상산소 조건 조정 배지 및 1% 저산소 조건 조정 배지에서 배양한 경우에 암세포의 미토콘드리아 막 포텐셜이 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 특히 48시간이 경과된 후에는 21% 정상산소 조건 조정 배지 보다 1% 저산소 조건 조정 배지에서 배양한 경우에 암세포의 막 포텐셜이 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 저산소 환경에서 배양한 조정 배지는 암세포의 사멸을 유도하여 미토콘드리아 막 포텐셜의 현저한 감소를 확인할 수 있었다.

[76]

- [77] 실시예 6. 저산소 농도에서 배양한 섬유아세포 조정 배지의 암세포의 세포 주기 억류 효과의 확인

- [78] 저산소 농도 조건에서 배양하여 제조한 섬유아세포 조정 배지가 암세포의 세포주기를 억류시켜 세포의 증식을 억제시킬 수 있는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 6 웰 배양 플레이트의 각 웰에 1.5×10^5 개의 Hela 세포를 넣고 하루 동안 배양한 후, 정상 대기 산소 농도 조건(21% O₂)과 저산소 농도 조건(1% O₂)에서 배양된 실시예 1에서 수득한 섬유아세포 조정 배지 2 ml를 플레이트에 첨가하였다. 이후 24시간 동안 배양한 후 Hela 세포를 프로피디움 요오드화물(Propidium Iodide)(Abcam, Cambridge, UK)로 염색한 후, FACSVerse™ flow cytometer (BD, USA)로 분석을 수행하였으며, 배지 별 암세포 세포 주기를 계수한 결과를 도 5A에, 암세포의 각각의 세포 주기에 해당하는 암세포를 배지별로 표시한 결과를 도 5B에 나타내었다. 기본 배양 배지는 1% 항생제, DMEM 및 10% FBS가 첨가된 기본 배양 배지를 의미하고, 무혈청 배지조건 조정 배지는 1% 항생제와 DMEM만이 첨가된 무혈청 조건의 배양배지를 의미하며, 21% 정상산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 정상산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미하고, 1% 저산소 조건 조정

배지는 실시예 1에서 수득한 1% 저산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미한다.

- [79] 도 5A 및 5B에서 확인한 바와 같이, 21% 정상산소 조건 조정 배지 보다 1% 저산소 조건 조정 배지를 처리하여 배양한 경우에 Hela cell에서 G0/G1기는 다소 증가하였으나, S기 및 G2/M기에 해당하는 세포의 수는 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 암세포는 정상세포 대비 현저한 세포 증식이 특징으로 나타나는데, 저산소 환경에서 배양한 조정 배지에서 암세포를 배양하면 배양한 암세포의 세포 주기 중 세포가 분열하는 M기가 감소함과 동시에 세포 분열이 없는 G0/G1기 및 S기가 증가하는바, 세포 주기 억류 효과가 나타나 암세포의 전체적인 증식이 억제되는 효과가 종합적으로 나타날 수 있음을 확인하였다.

[80]

- [81] 실시예 7. 섬유아세포 조정 배지의 최적화된 암세포 증식억제 효과가 나타나는 저산소 농도 조건의 확인

- [82] 상기 실시예 2 내지 6의 저산소농도 조건에서 배양한 섬유아세포 조정 배지에 있어서, 저산소 농도 조건이 어느 정도인 경우에 암세포 사멸효과가 가장 우수한지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 96 웰 white 플레이트의 각 웰에 1×10^4 개의 자궁경부암 세포인 Hela 세포를 넣고 1일 동안 배양하였다. 이 후, 정상 대기 산소 농도 조건(21% O_2)과 저산소 농도 조건(1% O_2)에서 배양된 실시예 1에서 수득한 섬유아세포 조정 배지 100 μ l를 배지에 첨가하였다. 48시간 동안의 배양 이후, hela 세포를 CellTiter-Glo assay 2.0 reagent (Promega, USA)를 100 μ l 첨가하여 10분간 반응시켰다. 이 후 GLOMAX Multi Detection System (Promega BioSystems Sunnyvale, Inc. USA)으로 발광을 분석하였고, 이를 분석한 실험 결과를 도 6에 나타내었다. 기본 배양 배지는 1% 항생제, DMEM 및 10% FBS가 첨가된 기본 배양 배지를 의미하고, 무혈청 배지조건 조정 배지는 1% 항생제와 DMEM만이 첨가된 무혈청 조건의 배양배지를 의미하며, 21% 정상산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 정상산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미하고, 1% 저산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 1% 저산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미하며, 5% 저산소 조건 조정 배지는 실시예 1에서 수득한 5% 저산소 조건에서 섬유아세포를 배양하여 수득한 조정 배지를 의미한다.

- [83] 도 6에서 확인한 바와 같이, 저산소 농도 조건 중 1% 산소 농도 조건 조정 배지가 5% 산소 농도 조건 조정 배지보다 유의할 정도로 암세포의 증식을 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이에, 항암효과가 최적으로 나타나는 저산소 농도의 조건은 1%인 것을 확인할 수 있었다.

[84]

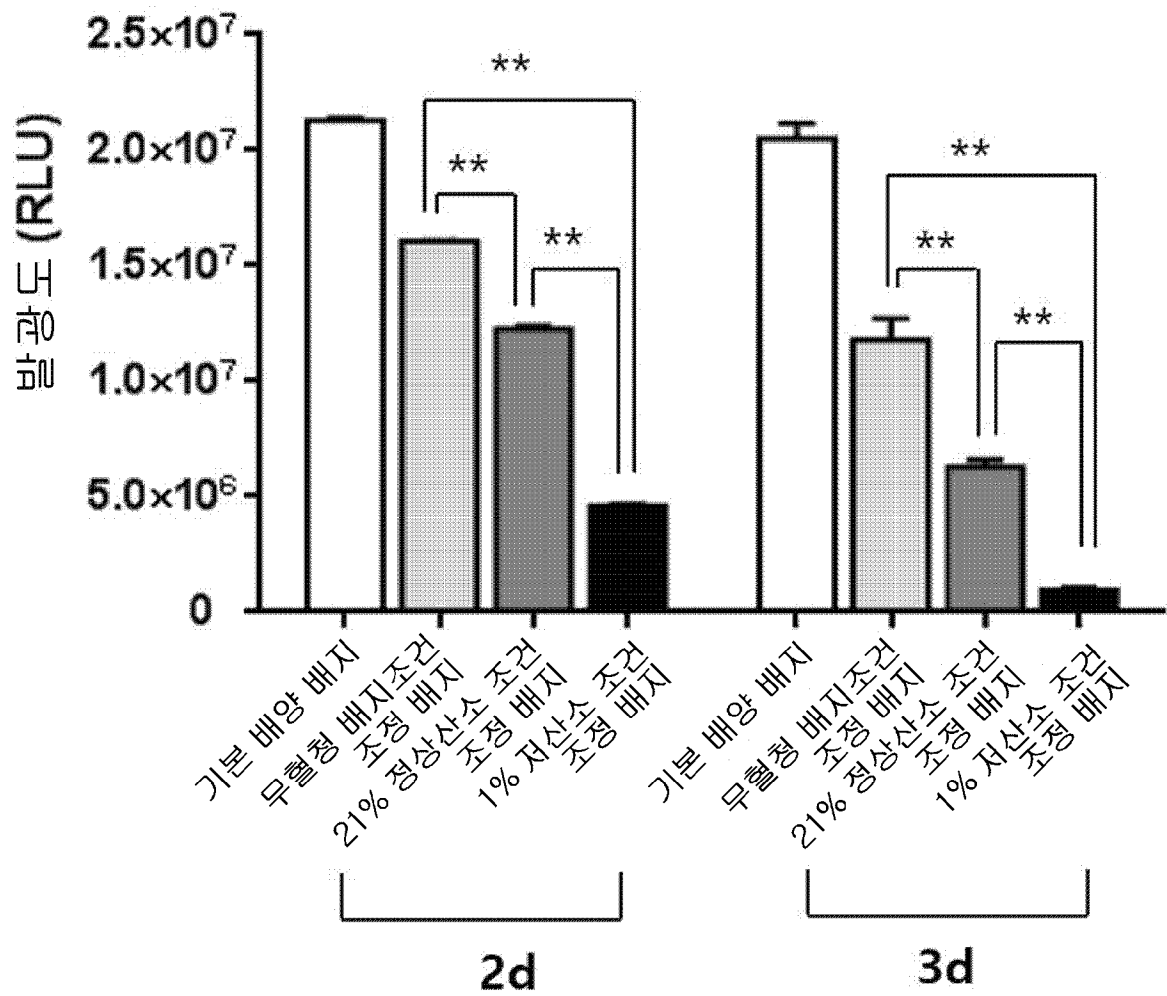
[85]

청구범위

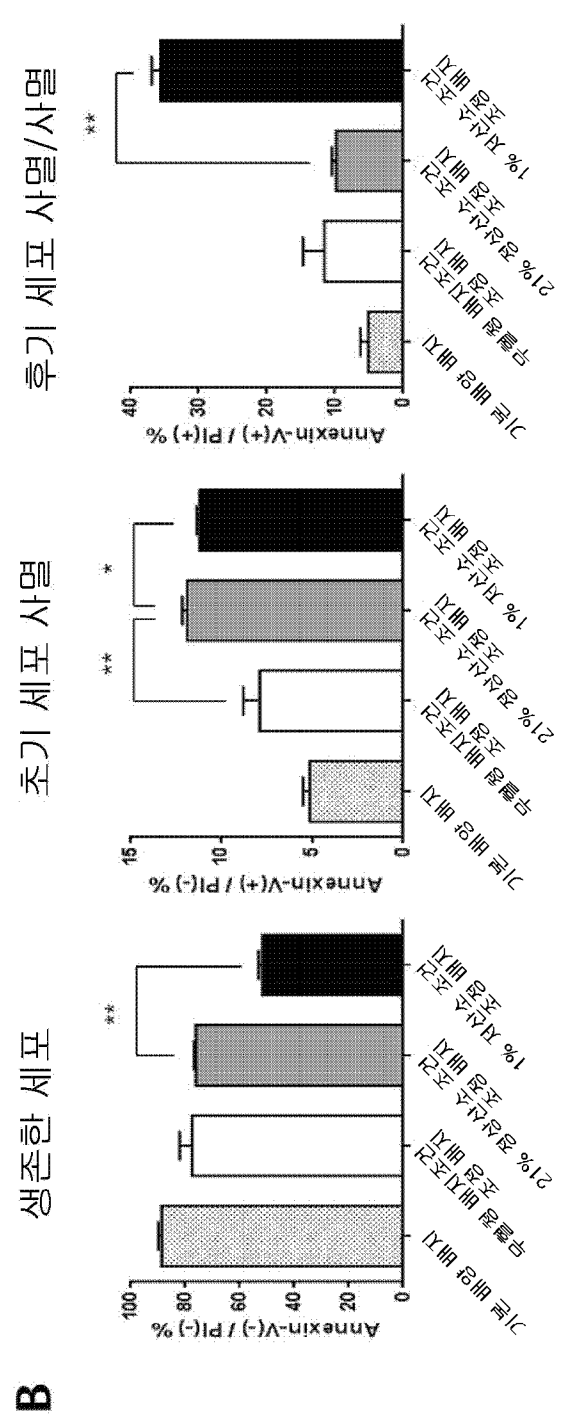
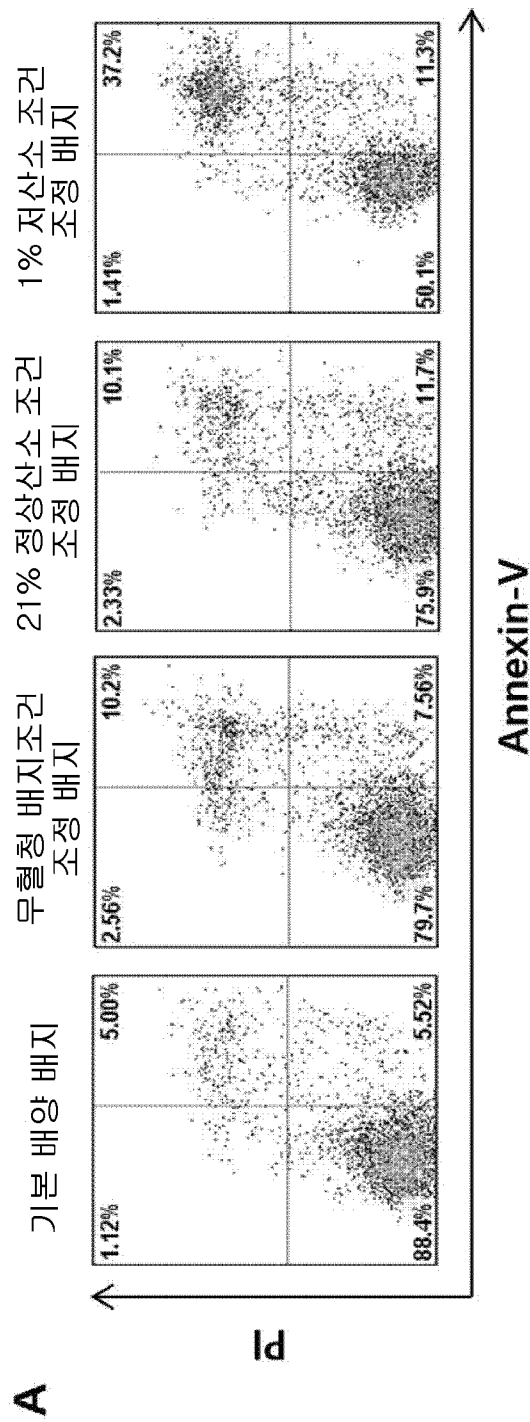
- [청구항 1] 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지(conditioned medium)를 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 저산소 환경은 0.5% 내지 7%의 산소를 포함하는 배양 조건인, 암세포 사멸 유도용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 조정 배지는 항암 활성을 나타내는 것인, 암세포 사멸 유도용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 항암 활성은 암세포 증식 억제, 암세포 사멸(apoptosis) 유도 및 암세포 세포 주기 억류로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 활성인, 암세포 사멸 유도용 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 암세포 사멸 유도 활성은 caspase 3/7 활성 증가 또는 미토콘드리아 막 포텐셜 감소에 의한 것인, 암세포 사멸 유도용 조성물.
- [청구항 6] 저산소 환경에서 배양한 섬유아세포(fibroblast) 배양액을 포함하는, 암세포 사멸 유도용 또는 암세포 증식 억제 유도용 배지 조성물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 섬유아세포(fibroblast)를 저산소 환경에서 배양하여 조정 배지를 제조하는 단계;를 포함하는 암 세포 사멸 유도용 조성물의 제조 방법.
- [청구항 10] 저산소 환경에서 섬유아세포(fibroblast)를 배양하여 제조한 조정 배지(conditioned medium)를 암세포에 처리하는 단계를 포함하는 암세포의 사멸 유도 방법.

[도1]

세포 생존력

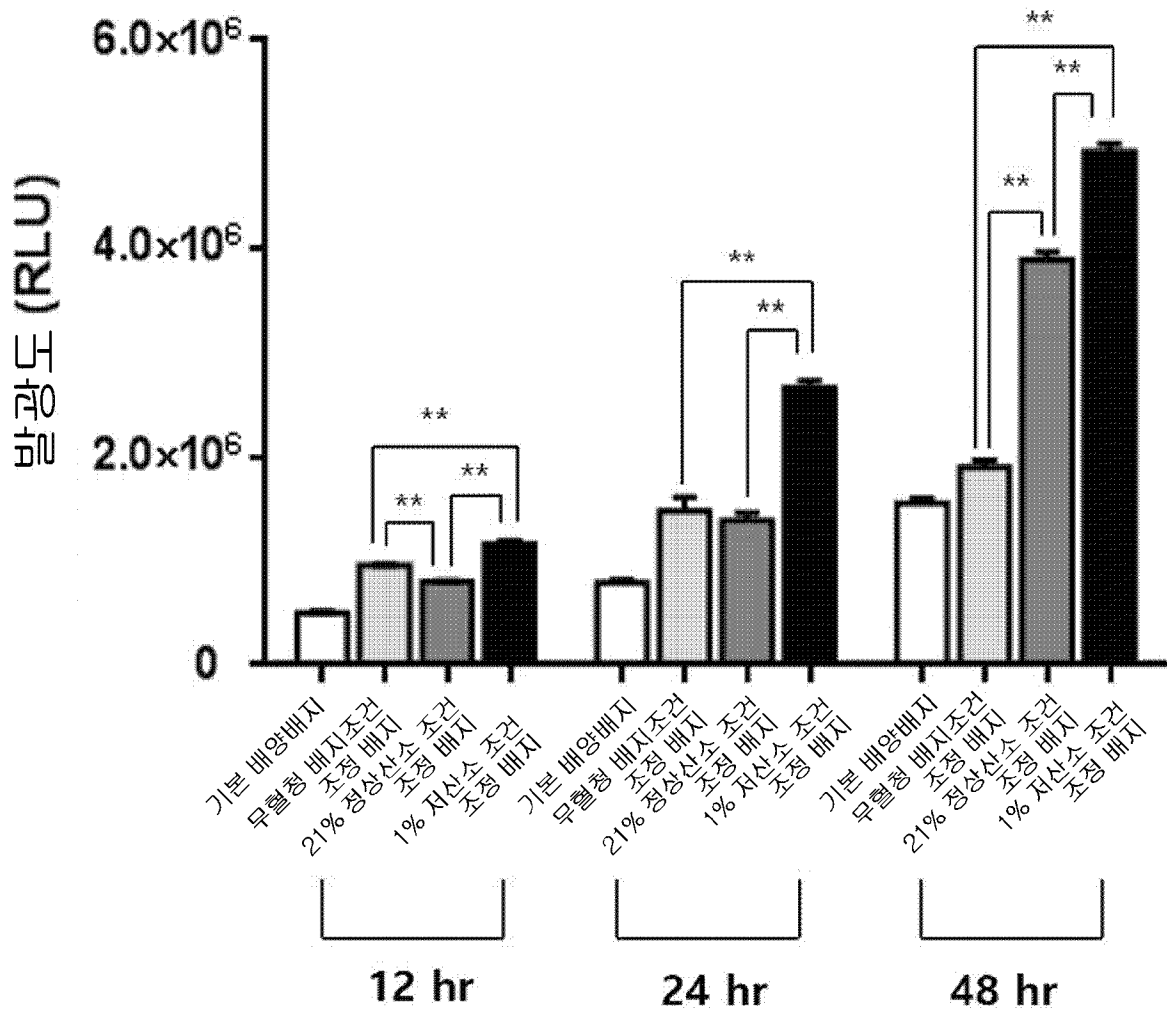


[도2]



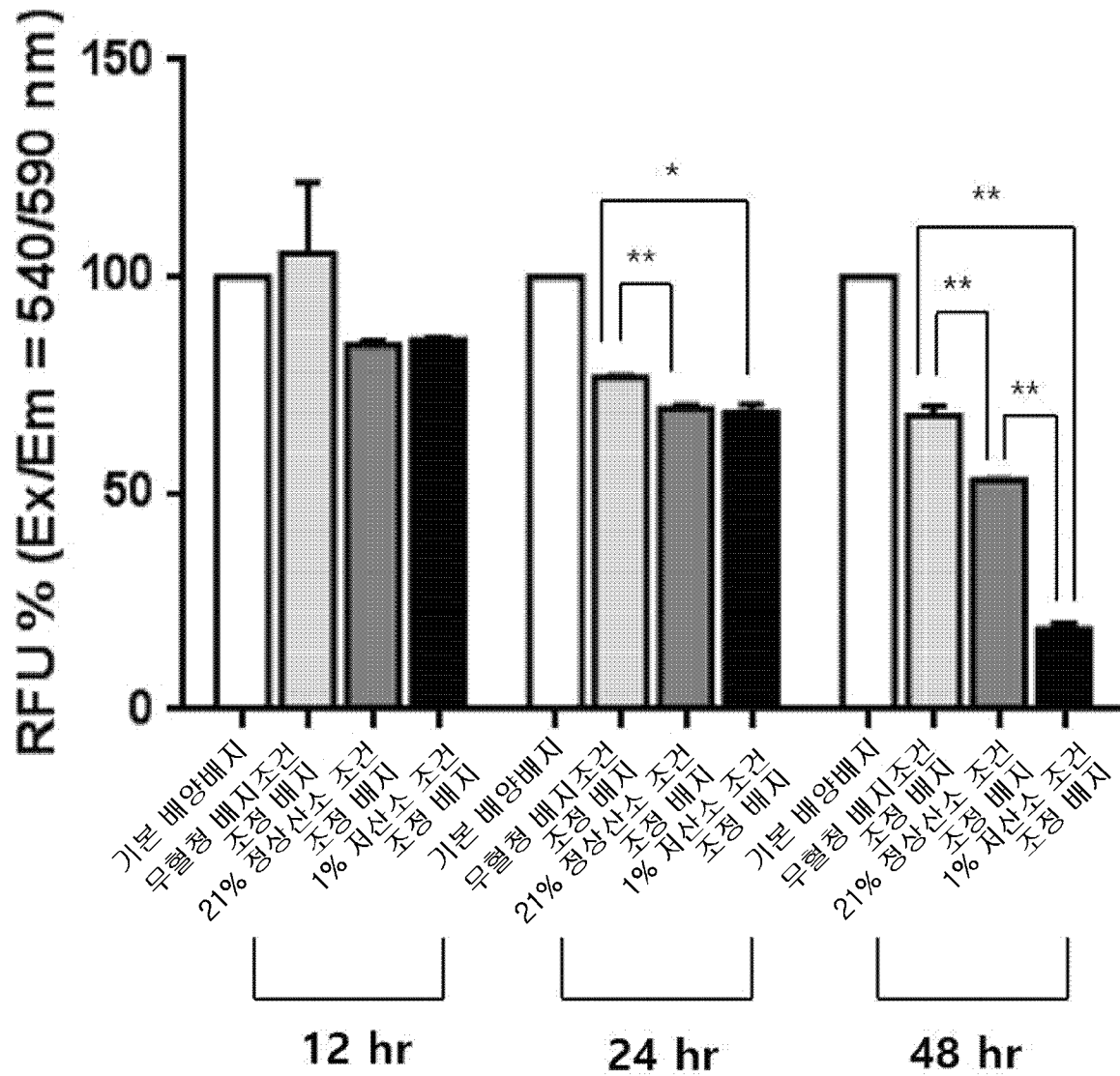
[도3]

Caspase 3/7 활성

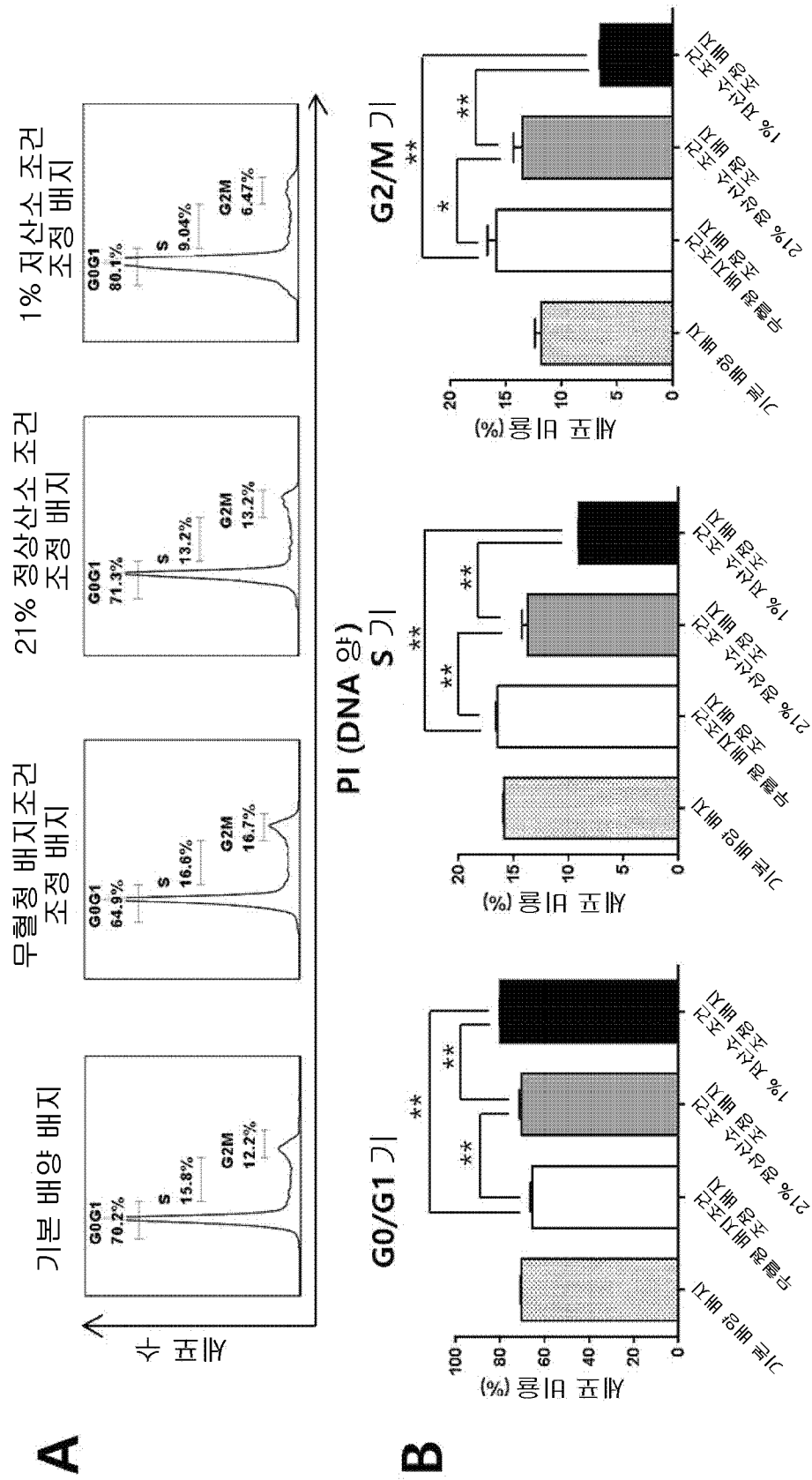


[도4]

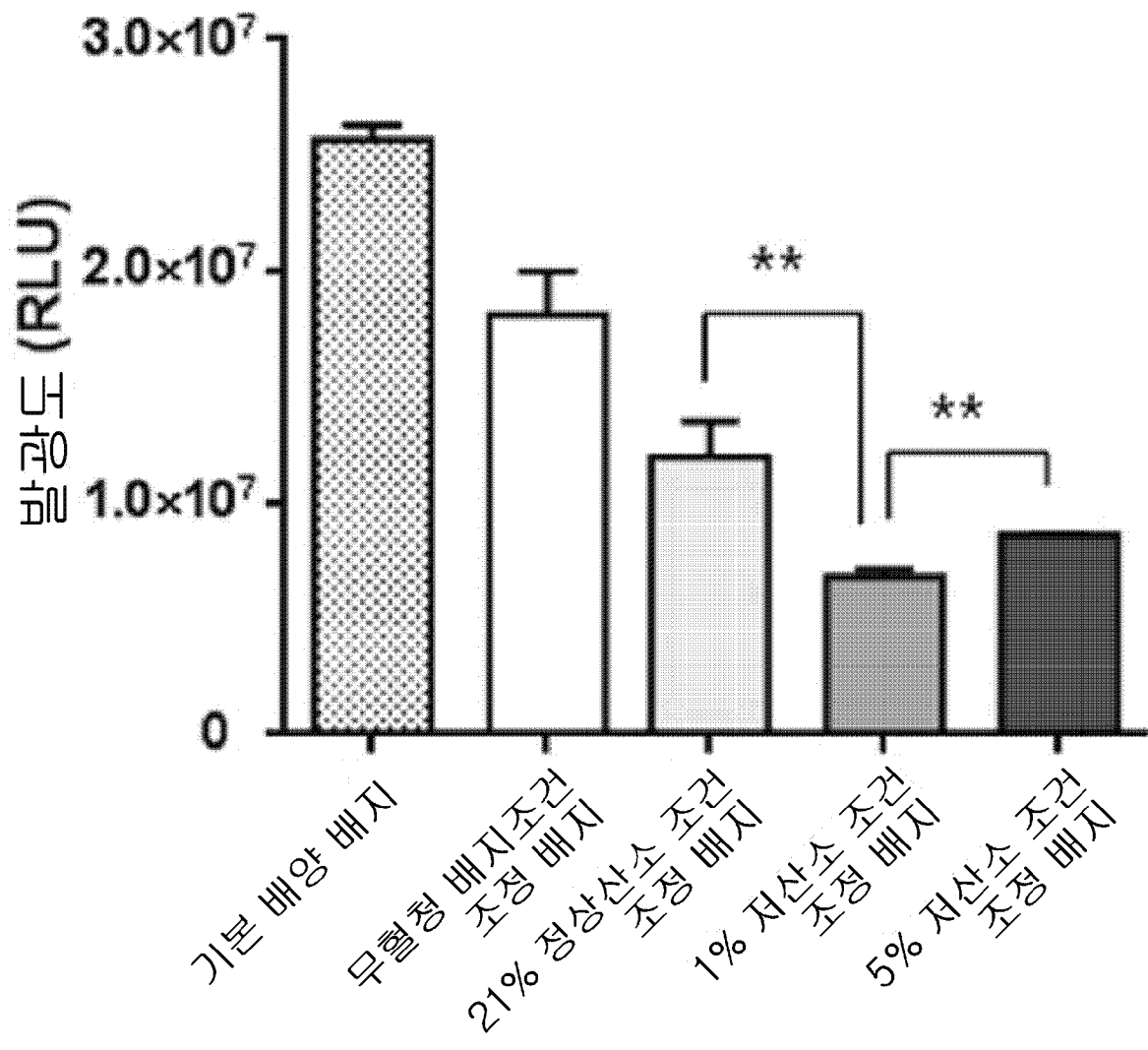
미토콘드리아 막 포텐셜



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/013063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/33(2014.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12N 5/077(2010.01)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 35/33; A61K 35/12; A61K 35/54; A61K 9/70; C12N 005/08; C12N 5/077; A61P 35/00

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: hypoxia, fibroblast, anticancer, conditioned medium, culture

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1610985 B1 (HISTOGEN, INC.) 08 April 2016 See paragraphs [0027], [0035], [0038]; claims 1, 8.	1-9
X	KR 10-2017-0141788 A (HISTOGEN, INC.) 26 December 2017 See paragraphs [0021], [0041], [0042]; claims 1-9, 15, 17.	1-9
X	US 2011-0064786 A1 (PAGE, R. L. et al.) 17 March 2011 See paragraph [0064]; claims 1, 2, 9, 10, 13, 20, 21.	1-9
A	KR 10-2012-0089235 A (HISTOGEN, INC.) 09 August 2012 See the entire document.	1-9
A	US 2004-0005704 A1 (CSETE, M. et al.) 08 January 2004 See the entire document.	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

10 JANUARY 2020 (10.01.2020)

Date of mailing of the international search report

10 JANUARY 2020 (10.01.2020)

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

International application No.

PCT/KR2019/013063

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 10 pertains to a method for treatment of the human body, including a step for direct treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/013063

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1610985 B1	08/04/2016	AU 2009-314506 A1	20/05/2010
		AU 2009-314506 B2	23/07/2015
		BR P10921249 A2	23/10/2018
		BR P10921249 A8	04/12/2018
		CA 2743871 A1	20/05/2010
		CA 2743871 C	11/10/2016
		CN 102497871 A	13/06/2012
		CN 102497871 B	15/10/2014
		EP 2365815 A2	21/09/2011
		EP 2365815 B1	18/09/2019
		JP 2012-508739 A	12/04/2012
		JP 5916388 B2	11/05/2016
		RU 2011123788 A	20/12/2012
		RU 2523339 C2	20/07/2014
		US 10143708 B2	04/12/2018
		US 2010-0124573 A1	20/05/2010
		US 2011-0097403 A1	28/04/2011
		US 2015-0246076 A1	03/09/2015
		US 2017-0071985 A1	16/03/2017
		US 2019-0201439 A1	04/07/2019
		US 8852637 B2	07/10/2014
		US 9034312 B2	19/05/2015
		US 9506038 B2	29/11/2016
		WO 2010-056378 A2	20/05/2010
		WO 2010-056378 A3	08/10/2015
KR 10-2017-0141788 A	26/12/2017	AU 2016-256455 A1	07/12/2017
		CA 2983832 A1	03/11/2016
		CN 107735097 A	23/02/2018
		EP 3288565 A1	07/03/2018
		JP 2018-518463 A	12/07/2018
		US 2018-0117092 A1	03/05/2018
		WO 2016-176620 A1	03/11/2016
		WO 2016-176620 A8	03/11/2016
US 2011-0064786 A1	17/03/2011	US 9290740 B2	22/03/2016
		WO 2009-111087 A1	11/09/2009
KR 10-2012-0089235 A	09/08/2012	AU 2009-209022 A1	06/08/2009
		AU 2009-209022 B2	12/06/2014
		AU 2010-271212 A1	01/03/2012
		AU 2010-271212 B2	16/07/2015
		BR P10906972 A2	14/07/2015
		CA 2714387 A1	06/08/2009
		CA 2714387 C	19/06/2018
		CA 2767600 A1	13/01/2011
		CN 102066558 A	18/05/2011
		CN 102066558 B	08/02/2017
		CN 102482698 A	30/05/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/013063

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		CN 102482698 B	25/09/2018
		DK 2451964 T3	30/04/2018
		EP 2262891 A1	22/12/2010
		EP 2451964 A1	16/05/2012
		EP 2451964 B1	24/01/2018
		ES 2667265 T3	10/05/2018
		HR P20180594 T1	10/08/2018
		HU E038882 T2	28/12/2018
		JP 2011-510662 A	07/04/2011
		JP 2014-221070 A	27/11/2014
		JP 5647007 B2	24/12/2014
		KR 10-1650957 B1	24/08/2016
		KR 10-2011-0011599 A	08/02/2011
		MX 2012000455 A	11/04/2012
		NO 2451964 T3	23/06/2018
		PL 2451964 T3	31/08/2018
		PT 2451964 T	07/05/2018
		RU 2012104650 A	20/08/2013
		RU 2631488 C2	22/09/2017
		SG 10201500237 A	29/04/2015
		US 2010-0047305 A1	25/02/2010
		US 2010-0158975 A1	24/06/2010
		US 2010-0166824 A1	01/07/2010
		US 2010-0196963 A1	05/08/2010
		US 2010-0210530 A1	19/08/2010
		US 2013-0344161 A1	26/12/2013
		US 2017-0145380 A1	25/05/2017
		US 8257947 B2	04/09/2012
		US 8524494 B2	03/09/2013
		US 8530415 B2	10/09/2013
		US 8535913 B2	17/09/2013
		US 9512403 B2	06/12/2016
		WO 2009-097559 A1	06/08/2009
		WO 2011-006107 A1	13/01/2011
		ZA 201006148 B	26/10/2011
US 2004-0005704 A1	08/01/2004	AU 2000-18246 A1	05/06/2000
		AU 2000-21542 A1	05/06/2000
		CA 2351551 A1	25/05/2000
		CA 2351556 A1	25/05/2000
		EP 1131406 A2	12/09/2001
		EP 1144591 A2	17/10/2001
		EP 1144591 A3	06/02/2002
		JP 2002-530067 A	17/09/2002
		JP 2002-530068 A	17/09/2002
		US 2001-0034061 A1	25/10/2001
		US 6184035 B1	06/02/2001
		US 6184035 B2	06/02/2001
		US 6589728 B2	08/07/2003
		US 6610540 B1	26/08/2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/013063

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 6759242 B1	06/07/2004
		WO 00-29549 A2	25/05/2000
		WO 00-29549 A3	11/10/2001
		WO 00-29550 A2	25/05/2000
		WO 00-29550 A3	19/10/2000

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/33(2014.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12N 5/077(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/33; A61K 35/12; A61K 35/54; A61K 9/70; C12N 005/08; C12N 5/077; A61P 35/00

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: 저산소(hypoxia), 섬유아세포(fibroblast), 항암(anticancer), 조정배지(conditioned medium), 배양(culture)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-1610985 B1 (히스토젠, 인코포레이티드) 2016.04.08 단락 [0027], [0035], [0038]; 청구항 1, 8	1-9
X	KR 10-2017-0141788 A (히스토젠, 인코포레이티드) 2017.12.26 단락 [0021], [0041], [0042]; 청구항 1-9, 15, 17	1-9
X	US 2011-0064786 A1 (PAGE, R. L. 등) 2011.03.17 단락 [0064]; 청구항 1, 2, 9, 10, 13, 20, 21	1-9
A	KR 10-2012-0089235 A (히스토젠, 인코포레이티드) 2012.08.09 전체 문헌	1-9
A	US 2004-0005704 A1 (CSETE, M. 등) 2004.01.08 전체 문헌	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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 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

2020년 01월 10일 (10.01.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 01월 10일 (10.01.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

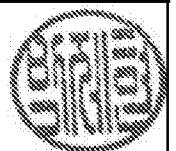
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박제현

전화번호 +82-42-481-3349



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 10은 인체에 대한 직접적인 처치 단계를 포함하는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1610985 B1	2016/04/08	AU 2009-314506 A1 AU 2009-314506 B2 BR PI0921249 A2 BR PI0921249 A8 CA 2743871 A1 CA 2743871 C CN 102497871 A CN 102497871 B EP 2365815 A2 EP 2365815 B1 JP 2012-508739 A JP 5916388 B2 RU 2011123788 A RU 2523339 C2 US 10143708 B2 US 2010-0124573 A1 US 2011-0097403 A1 US 2015-0246076 A1 US 2017-0071985 A1 US 2019-0201439 A1 US 8852637 B2 US 9034312 B2 US 9506038 B2 WO 2010-056378 A2 WO 2010-056378 A3	2010/05/20 2015/07/23 2018/10/23 2018/12/04 2010/05/20 2016/10/11 2012/06/13 2014/10/15 2011/09/21 2019/09/18 2012/04/12 2016/05/11 2012/12/20 2014/07/20 2018/12/04 2010/05/20 2011/04/28 2015/09/03 2017/03/16 2019/07/04 2014/10/07 2015/05/19 2016/11/29 2010/05/20 2015/10/08
KR 10-2017-0141788 A	2017/12/26	AU 2016-256455 A1 CA 2983832 A1 CN 107735097 A EP 3288565 A1 JP 2018-518463 A US 2018-0117092 A1 WO 2016-176620 A1 WO 2016-176620 A8	2017/12/07 2016/11/03 2018/02/23 2018/03/07 2018/07/12 2018/05/03 2016/11/03 2016/11/03
US 2011-0064786 A1	2011/03/17	US 9290740 B2 WO 2009-111087 A1	2016/03/22 2009/09/11
KR 10-2012-0089235 A	2012/08/09	AU 2009-209022 A1 AU 2009-209022 B2 AU 2010-271212 A1 AU 2010-271212 B2 BR PI0906972 A2 CA 2714387 A1 CA 2714387 C CA 2767600 A1 CN 102066558 A CN 102066558 B CN 102482698 A	2009/08/06 2014/06/12 2012/03/01 2015/07/16 2015/07/14 2009/08/06 2018/06/19 2011/01/13 2011/05/18 2017/02/08 2012/05/30

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		CN 102482698 B	2018/09/25
		DK 2451964 T3	2018/04/30
		EP 2262891 A1	2010/12/22
		EP 2451964 A1	2012/05/16
		EP 2451964 B1	2018/01/24
		ES 2667265 T3	2018/05/10
		HR P20180594 T1	2018/08/10
		HU E038882 T2	2018/12/28
		JP 2011-510662 A	2011/04/07
		JP 2014-221070 A	2014/11/27
		JP 5647007 B2	2014/12/24
		KR 10-1650957 B1	2016/08/24
		KR 10-2011-0011599 A	2011/02/08
		MX 2012000455 A	2012/04/11
		NO 2451964 T3	2018/06/23
		PL 2451964 T3	2018/08/31
		PT 2451964 T	2018/05/07
		RU 2012104650 A	2013/08/20
		RU 2631488 C2	2017/09/22
		SG 10201500237 A	2015/04/29
		US 2010-0047305 A1	2010/02/25
		US 2010-0158975 A1	2010/06/24
		US 2010-0166824 A1	2010/07/01
		US 2010-0196963 A1	2010/08/05
		US 2010-0210530 A1	2010/08/19
		US 2013-0344161 A1	2013/12/26
		US 2017-0145380 A1	2017/05/25
		US 8257947 B2	2012/09/04
		US 8524494 B2	2013/09/03
		US 8530415 B2	2013/09/10
		US 8535913 B2	2013/09/17
		US 9512403 B2	2016/12/06
		WO 2009-097559 A1	2009/08/06
		WO 2011-006107 A1	2011/01/13
		ZA 201006148 B	2011/10/26
US 2004-0005704 A1	2004/01/08	AU 2000-18246 A1	2000/06/05
		AU 2000-21542 A1	2000/06/05
		CA 2351551 A1	2000/05/25
		CA 2351556 A1	2000/05/25
		EP 1131406 A2	2001/09/12
		EP 1144591 A2	2001/10/17
		EP 1144591 A3	2002/02/06
		JP 2002-530067 A	2002/09/17
		JP 2002-530068 A	2002/09/17
		US 2001-0034061 A1	2001/10/25
		US 6184035 B1	2001/02/06
		US 6184035 B2	2001/02/06
		US 6589728 B2	2003/07/08
		US 6610540 B1	2003/08/26

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 6759242 B1	2004/07/06
WO 00-29549 A2	2000/05/25
WO 00-29549 A3	2001/10/11
WO 00-29550 A2	2000/05/25
WO 00-29550 A3	2000/10/19