(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 6 월 4 일 (04.06.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/111372 A1

(51) 국제특허분류:
A01N 1/02 (2006.01) *C12N 11/10* (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/016677

(22) 국제출원일: 2018 년 12 월 26 일 (26.12.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0151073 2018 년 11 월 29 일 (29.11.2018) KR

(71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (**SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION**) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR). 라이프리버 주식회사 (**LIFELIVER CO., LTD.**) [KR/KR]; 16866 경기도 용인시 수지구 용구대로 2776, 3층, Gyeonggi-do (KR).

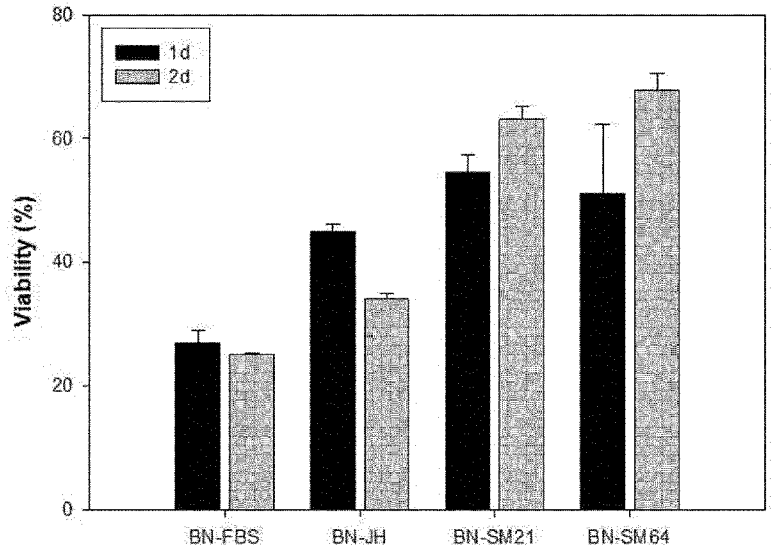
(72) 발명자: 이지현 (**LEE, Ji Hyun**); 48516 부산시 남구 분포로 111, 119-1802, Busan (KR). 이석구 (**LEE, Suk Koo**); 06294 서울시 강남구 언주로30길 56, B-1405, Seoul (KR). 이상훈 (**LEE, Sang Hoon**); 06354 서울시 강남구 광평로31길 27, 101-1301, Seoul (KR). 이두훈 (**LEE, Doo Hoon**); 05797 서울시 송파구 문정로 55, 102-104, Seoul (KR). 노정권 (**NOH, Jeong Kwon**); 11939 경기도 구리시 체육관로 45, 102-505, Gyeonggi-do (KR). 정종갑 (**JUNG, Jong Gab**); 16698 경기도 수원시 영통구 영통로 232, 815-1802, Gyeonggi-do (KR). 윤희훈 (**YOON, Hee Hoon**); 16836 경기도 용인시 수지구 풍덕천로 91, 103-1401, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다래 (**DARAE IP FIRM**); 06235 서울시 강남구 테헤란로 132, 10층 (역삼동, 한독타워), 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,

(54) **Title:** SERUM-FREE CRYOPRESERVATIVE SOLUTION FOR CRYOPRESERVATION OF HEPATOCYTES AND ENCAPSULATED HEPATOCYTE SPHEROIDS AND CRYOPRESERVATION METHOD USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 간세포 및 캡슐화한 간세포 구상체의 동결 보존을 위한 동결보존용 무혈청 용액 및 이를 이용한 동결보존법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a serum-free solution for cryopreserving hepatocytes comprising a histidine-tryptophan-ketoglutaric acid (HTK) solution, dimethyl sulfoxide (DMSO), dexamethasone, and human serum albumin. By adding dexamethasone and/or N-acetylcysteine to conventional cryopreservative solutions, a hepatocyte survival rate, an ammonia removal rate, a urea synthesis rate, and an albumin secretion rate are enhanced as compared to conventional cryopreservative solutions.

(57) **요약서:** 본 발명은 HTK(히스티딘-트립토판-케토글루타르산) 용액, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 덱사메타손 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액에 대한 것으로, 종래의 동결보존용액에 덱사메타손 및/ 또는 N- 아세틸시스테인을 추가하여 종래의 동결보전용액보다 간세포의 생존율, 암모니아 제거율, 우레아 합성율 및 알부민 분비율이 향상된 것을 특징으로 한다.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/111372 A1

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.

(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: 간세포 및 캡슐화한 간세포 구상체의 동결 보존을 위한 동결보존용 무혈청 용액 및 이를 이용한 동결보존법

기술분야

[1] 본 발명은 간세포 및 캡슐화된 간세포 비드의 동결 보존을 위한 동결보존용 무혈청 동결보전용액 및 이를 이용한 간세포 동결보존방법에 대한 것이다.

배경기술

[2] 생체로부터 채취한 각종 조직 세포의 동결보존에 관한 연구는 세포 생물학에 관련된 기초 연구 활동에 있어서 중요한 분야의 하나이다.

[3] 정상세포 및 확립된 세포주를 적절히 저장하는 것은 장기간에 걸쳐 반복적으로 그 정상세포와 세포주를 사용할 수 있도록 할 뿐 아니라, 특히 유용물질 생산 및 의약용으로서 동물 세포를 사용할 경우에는 안전성 및 재현성 확보에 매우 중요하다.

[4] 또한 간, 췌장, 혈관, 골수 세포의 이식 및 세포치료(cell therapy)을 위한 임상연구에 있어서도 첫째, 공여자로부터 획득한 다량의 조직 세포나 줄기세포(stem cell)을 필요시까지 안정적으로 보존 가능하다는 점, 둘째, 다량의 세포를 보존 가능함에 따라 이식용 조직 세포의 수급이 원활하게 유지 될 수 있다는 점에 있어서 임상 의학적으로도 매우 중요한 연구 분야임에 틀림이 없다.

[5] 특히, 간세포 이식과 체외 순환형 생인공간 장치에 있어서 대량의 간세포를 필요시 즉시 사용할 수 있음은 연구의 실용성을 극대화시키는 방안의 하나로 손꼽을 수 있다. 그 예로써 생인공간 장치에서 중요한 역할을 하는 세포는 돼지 간으로부터 분리된 간세포(hepatocyte)를 이용하게 되는데, 신속한 임상치료를 위해서는 환자 발생에 대한 즉응성을 지니는 ready-made bioartificial liver system 제작이 필수적이다. 따라서 필요시마다 복잡하고 많은 시간이 소모되는 간세포 분리와 전처리과정을 수행하기보다는 모든 과정이 완료된 간세포를 대량으로 장기간 안정하게 보관하는 기술이 요구되는 것이다. 이를 위해서는 대량으로 간세포를 동결 보존하는 기술이 필요하게 된다. 그러나 일반적인 방법으로 간세포를 동결 보존하였을 경우 해동 후 세포 생존율이나 활성이 급격히 감소한다. 따라서 고수준의 생존율과 활성 유지가 가능한 간세포 동결 보존 방법이 개발되어야 한다.

[6] 특히 간세포를 응급상황에서 언제든지 생인공간 시스템에 적용하기 위해서는 생인공간에 충진되는 최종 형태인 칼슘-알지네이트 간세포 구상체를 냉동 보존하는 것이 아주 중요하다. 이러한 안정적인 이유 외에 이종간에 발생할 수 있는 병원성 세균이나 바이러스 등을 냉동 보존되어 있는 기간 동안에 검사할 수 있다는 안전성의 측면에서도 상당히 중요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 간세포는 체외 배양 상태에서 거의 증식을 하지 않고 계대 배양을 할 수 없기 때문에 이를 연구에 사용하기 위해서는 매번 새롭게 분리하거나, 동결 보존하여 연구에 사용하여야 하는 어려움이 따른다. 타 조직세포와 달리 간세포의 경우, 장기간 안정적으로 세포를 동결보존 할 수 있는 방법이 확립되어 있지 않다.

[8] 현재까지 진행된 간세포 동결보존에 관한 연구는 대부분 단일세포인 일차 간세포를 냉동 보존하는 것으로, 주로 냉동보호제나 냉동보존액의 조성, 그리고 해동 시 발생하는 warm injury를 줄일 수 있는 polyphenolic compound 같은 항산화제의 사용 하였다. 그러나 구상체 형태의 간세포 및 캡슐화된 간세포의 이용을 위해서는 새로운 동결보존방법이 필요하다. 이의 가장 큰 이유는 단일세포가 아닌 세포-세포간 접촉이 상당히 높은 구상체라는 점과 칼슘-알지네이트라는 새로운 고분자가 첨가된다는 점때문에 발생하는 열역학적 거동의 변형으로 인해 새로운 냉동 방법이 실행 되어져야 한다. 이러한 칼슘-알지네이트 고정화 간세포 구상체의 냉동 보존 방법은 돼지 간세포와 같은 이종세포를 이용하는 경우 외에도 뇌사자 간에서 유래한 인체 간세포를 이용한 생인공간 적용에 있어서도 상당히 중요한 기초자료와 방법들을 제시할 수 있기 때문에 임상적으로 상당히 중요하다.

[9] 일반적으로 세포의 동결 보존의 효과를 증대시키기 위한 조건으로는 동결 보존액의 조성, 냉동보호제의 첨가, 냉각속도의 최적화 등을 들 수 있다. 이 조건들을 적절히 조합한 조직세포의 동결 보존법 최적화 연구가 다양하게 진행되고 있다.

[10] 냉동보호제에는 dimethyl sulfoxide(DMSO), glycerol, starch(HES) 등의 물질들이 있으며 현재 동물세포의 냉동보호제로 DMSO를 일반적으로 사용하고 있다.

[11] DMSO가 동결과 해동 과정에서 얼음결정의 형성을 최소화하지만 동결과 해동과정에서 발생하는 이온과 삼투압 불균형(ionic and osmotic imbalance)과 활성산소유리기(free radical)의 생성으로 인한 세포 손상은 피할 수 없다는 문제점이 있다.

[12] 냉동보존액에는 냉동보호제 외에 일반 생리식염수나 배지, 또는 우태아 혈청 등을 이용한다.

[13] 현재 정상세포 및 세포주 등 동물 세포를 저장하는 데 있어 가장 널리 사용되는 기준 방법은 저장하고자 하는 정상세포 또는 세포주에 최적화된 완전한 세포배양액(complete medium)으로 세포를 재현탁(resuspend)시킨 다음 우태아 혈청(fatal bovine serum, FBS) 등과 같은 10 내지 90% 비인간 동물-유래 혈청에 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 부피비 5-20% 넣고 -80℃에서 천천히 동결시킨 다음 액체 질소에서 보관하는 것이다.

[14] 혈청은 시험관 내(in vitro) 세포 성장 및/또는 증식을 촉진하기 위한 영양원, 또는 호르몬 등과 같은 생물학적 활성 물질의 공급원(resource)으로 사용된다.

[15] 동결과정중에 우태아 혈청내에 존재하는 알부민 등과 같은 단백질은 물의 어는점을 적절히 변화시켜 얼음 결정의 생성을 억제하고 삼투압을 적절히 조절하여 초기 동결과정에서 세포의 성상 유지 및 안정화 작용을 한다. 즉 우태아 혈청은 세포의 증식에 필요한 여러 중요한 인자들의 공급 요소로서뿐만 아니라 초기 동결과정에서도 중요한 역할을 한다. 그러므로 기준 방법에서 우태아 혈청을 사용하지 않고 세포를 동결 저장할 경우에는 충분한 정도로 세포활성도를 기대할 수 없다. 그러나 혈청은 경제적으로 부담이 매우 크며, 또한 자연 생성물이기 때문에 혈청의 구성 성분은 혈청마다 매우 다르다.

[16] 더욱이, 배양된 세포로부터 혈청-유래 단백질 등을 제거함으로써 배양된 세포를 정제해야만 하므로, 복잡합 과정을 야기한다. 더 나아가 배양된 세포가 (바이러스, 병원성 프라이온 등) 알려지지 않은 병원체에 감염될 위험이 있다.

[17] 물론 저장되는 세포의 종류와 이후 사용 목적에 따라서는 우태 혈청 대신 사람의 자가 혈청이나 다른 동물의 혈청이 사용될 수도 있다. 예를 들어, 환자로부터 수득한 세포를 배양하고 배양된 세포를 환자에게 이식하는 자가 이식 치료를 위한 세포의 배양은 동일 환자로부터 수득된 자가 인간 혈청을 사용한다. 이러한 방법으로 배양된 세포의 오염을 피할 수 있다. 그러나 혈청을 생산하기 위하여 많은 양의 혈액이 요구되며, 이는 환자에게 큰 부담이 된다.

[18] 이러한 문제를 피하기 위하여, 혈청이 포함되지 않은 무혈청 동결보존용액이 개발되어야 한다. 무혈청의 냉동보존액을 개발한다면 동결 보존되었던 간세포를 이용한 생인공간을 임상에 바로 적용시킬 수 있다.

과제 해결 수단

[19] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 HTK(히스티딘-트립토판-케토글루타르산) 용액, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 덱사메타손 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액을 제공한다.

[20] 상기 간세포는 일차 간세포, 간세포 구상체, 캡슐화된 간세포 및 캡슐화된 간세포 구상체를 포함할 수 있다.

[21] 상기 캡슐화된 간세포 및 캡슐화된 간세포 구상체는 칼슘-알지네이트 비드 (Ca-alginate bead)로 캡슐화된 것일 수 있다.

[22] 상기 HTK 용액은 30 내지 70중량부를 포함할 수 있다.

[23] 상기 디메틸 설폭사이드(DMSO)은 10 내지 30 중량부를 포함할 수 있다.

[24] 상기 인간 혈청 알부민은 20% 인간 혈청 알부민으로 10 내지 40 중량부를 포함할 수 있다.

[25] 상기 덱사메타손은 5mg/ml 으로 0.1 내지 10 중량부를 포함할 수 있다.

[26] 상기 무혈청 간세포 동결보존용액은 N-아세틸시스테인 (NAC, N-acetyl cysteine)을 추가로 포함할 수 있다.

[27] 상기 N-아세틸시스테인은 0.01 내지 100mM을 포함할 수 있다.

[28] 상기 무혈청 간세포 동결보존용액은 아미노산 용액을 추가로 포함할 수 있다.

[29] 상기 아미노산 용액은 바살 미디엄 이글(BME) 아미노산 용액, 미니멈 에센셜 미디엄 (MEM) 아미노산 용액 또는 헤파타민®(hepatamin®)용액중 어느 하나일 수 있다.

[30] 상기 바살 미디엄 이글(BME) 아미노산 용액은 1 내지 5중량부를 포함할 수 있다.

[31] 상기 미니멈 에센셜 미디엄 (MEM) 아미노산 용액은 0.5 내지 2중량부를 포함할 수 있다.

[32] 상기 헤파타민 용액은 0.1 내지 5 중량부를 포함할 수 있다.

[33] 상기 무혈청 간세포 동결보존용액은 수크로오스 또는 글루코스, 및 인슐린을 추가로 포함할 수 있다.

[34] 상기 수크로오스 또는 글루코스는 0.01 내지 300mM을 포함할 수 있다.

[35] 상기 인슐린은 100U/ml 인슐린을 1 내지 10중량부를 포함할 수 있다.

[36] 또한, 본 발명은 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 상기 무혈청 간세포 동결보존용액에 간세포를 현탁하는 현탁액제조단계 및 상기 현탁액을 동결시키는 동결단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존방법을 제공한다.

[37] 상기 동결단계는 동결온도 감소율이 변화할 수 있다.

[38] 상기 동결온도 감소율은

[39] (a) -1℃/분 속도로 0℃가 되도록 온도 조절되고;

[40] (b) 0℃에서 8분간 유지되고;

[41] (c) -3℃/분의 속도로 -10℃가 되도록 온도 조절되고;

[42] (d) -1℃/분의 속도로 -25℃가 되도록 온도 조절되고;

[43] (e) -50℃/분의 속도로 -75℃가 되도록 온도 조절되고;

[44] (f) -75℃에서 1분간 유지되고;

[45] (g) -12℃/분의 속도로 -40℃가 되도록 온도 조절되고;

[46] (h) -1℃/분의 속도로 -80℃가 되도록 온도 조절될 수 있다.

발명의 효과

[47] 본 발명에 의한 동결보존용액은 우태아혈청과 같은 동물성 추출물를 첨가하지 않음으로써 동결 및 해동과정에서 불필요한 감염 가능성을 배제할 수 있으며, 동결보존된 세포성 인공조직을 치료목적으로 사용할 수가 있다.

[48] 또한, 종래의 동결보존용액에 덱사메타손 및/또는 N-아세틸시스테인을 추가하여 종래보다 간세포의 생존율, 암모니아 제거율, 우레아 합성율 및 알부민 분비율이 향상되었다.

[49] 세포 동결보존의 전 단계에서 냉동보호제인 DMSO를 제외하고 세포를 현탁함으로써 이온과 삼투압 불균형 및 활성산소유리기의 생성으로 인한 세포손상을 감소시켜 장기간의 보관에도 충분한 고수준의 생존율과 활성

유지가 가능한 간세포를 제공할 수 있다.

[50] 본 발명의 개선된 간세포 동결보존방법은 간세포 뿐만 아니라 각종 조직 세포의 안정적인 공급이 가능하게 하여 간질환 생체외 시험 연구, 당뇨 모델 연구, 간신증후군 대사 연구, 간부전에 따른 다장기부전 연구, 중증 화상환자 간부전 연구, 혈우병 등 대사성 희귀질환 연구, 기타 체내 대사 연구의 소재로 활용될 수 있다. 특히, 본 발명에 의해 냉동보존된 칼슘-알지네이트 고정화 간세포 구상체는 전격성 간부전 환자를 치료하기위해 생인공간 시스템에 적용할 경우 응급상황에서 언제든지 해동하여 사용할 수 있으며, 생인공간 시스템 공급의 안정성이라는 측면뿐만 아니라 이종간 발생할 수 있는 병원성 세균이나 바이러스를 검사할 수 있는 충분한 시간을 제공하기 때문에 안전성도 향상시킬 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[51] 도면 1은 FBS 그리고 개선된 무혈청 간세포 동결보존용액(modified JH solution, SM21, 22, 64)을 이용하여 일차 돼지 간세포 (primary pig hepatocyte)를 동결보존 시킨 후 1개월 후 해동하였을 때 간세포의 생존율(도면1(a)), 간세포의 암모니아 제거율(도면 1(b))을 나타낸 결과이다.

[52] 도면 2는 FBS 그리고 개선된 무혈청 간세포 동결보존용액(modified JH solution, SM21, 22, 64)을 이용하여 돼지 간세포 구상체 (pig hepatocyte spheroids)를 동결보존 시킨 후 1개월과 1년 후 해동하였을 때 간세포의 생존율(도면 2(a)),간세포의 암모니아 제거율(도면 2(b)) 을 나타낸 결과이다.

[53] 도면 3는 FBS 그리고 기존의 무혈청 간세포 동결보존용액(JH, 한국등록특허 제1480987호) 및 개선된 간세포 동결보존용액(modified JH solution SM21, SM64)을 이용하여 칼슘-알지네이트 비드로 캡슐화한 간세포 구상체를 6개월 동결보존 시킨 후 해동하였을 때 간세포의 생존율 및 부착율(도면 3(a)), 간세포의 암모니아 제거율(도면 3(b)), 간세포의 우레아 합성율(도면 3(c)), 간세포의 알부민 분비율(도면 3(d))을 나타내고, 살아있는 세포를 fluorescent calcein (FITC)으로 죽은 세포는 Ethidium homodimer-1 (PE)로 염색한 현미경 사진(도면 3(e))이다.

[54] 도면 4는 FBS를 포함하는 해동 용액(FBS), 20% 인간 혈청 알부민을 포함하는 해동용액(ALB) 및 개선된 무혈청 간세포 해동 용액(JHT)을 이용하여 동결된 간세포 구상체를 해동하였을 때 칼슘-알지네이트 비드로 캡슐화된 간세포를 동결보존 시킨 후 해동하였을 때 간세포의 생존율(도면 4(a)), 간세포의 암모니아 제거율(도면 4(b)), 간세포의 우레아 합성율(도면 4(c)), 간세포의 알부민 분비율(도면 4(d)나타낸 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

[55] 본 발명은 바이오산업핵심기술개발사업(유망바이오IP사업화촉진, 대한민국 산업통상자원부)의 간세포 스페로이드 동결보존 기술을 이용한 “off-the-shelf”

바이오인공간 사업화 연구과제(과제고유번호 : 10078349)의 결과물이다.

[56] 본 발명에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액은 간세포를 동결(cryopreservation) 및 보존하여 응급 시에 해동하여 인공간 시스템에서 즉시 사용할 수 있도록 한 용액으로서, 우태아혈청(FBS)을 제외하며,
HTK(히스티딘-트립토판-케토글루타르산) 용액, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 덱사메타손 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[57] 상기 간세포(hepatocyte)는 일차 간세포, 간세포 구상체, 캡슐화된 간세포 및 캡슐화된 간세포 구상체를 포함할 수 있다. 특히 생인공간에 충진되는 최종 형태인 캡슐화된 간세포 구상체인 것이 바람직하다. 상기 캡슐화는 칼슘-알지네이트 비드(Ca-alginate bead)에 의한 것일 수 있다. 상기 칼슘-알지네이트 비드는 1 내지 2, 바람직하게는 1.5중량부의 알지네이트와 혼합되어 캡슐화될 수 있다.

[58] 종래 간세포 동결보존 용액은 단일세포인 일차 간세포에 적용되는 것으로, 구상체(spheroids) 또는 캡슐화된 간세포 및 캡슐화된 간세포 구상체에 대한 동결보존 용액은 존재하지 않았다. 따라서 일반적인 방법으로 간세포 구상체를 동결보존 할 경우, 구상체는 단일세포와 달리 세포-세포 간 접촉면적이 크므로 해동 후 세포 생존율이나 활성이 급격히 감소하였다. 또한, 종래 간세포 동결보존 용액으로는 생인공간에 충진되는 캡슐화된 간세포 및 캡슐화된 간세포 구상체에 있어 칼슘-알지네이트라는 새로운 고분자의 첨가로 인한 열역학적 거동의 변형을 방지할 수 없었다. 이에 반해 본 발명에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액은 특히 캡슐화된 간세포 및 캡슐화된 간세포 구상체에서 간세포의 생존율, 암모니아 제거율, 우레아 합성율 및 알부민 분비율이 우수하다.

[59] 본 발명에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액은 우태아혈청(FBS)을 포함하지 않으므로, 동결보존된 후 해동된 간세포에 별도의 정제를 가하지 않고 바로 생인공간에 충진되어 임상에 적용될 수 있다.

[60] HTK 용액은 전체 용액 볼륨 대비 30 내지 70중량부 포함할 수 있다.

[61] 바람직하게는 40 내지 60중량부 포함할 수 있다. 특히, 50 내지 60중량부가 더욱 바람직하다.

[62] 또한, 본 발명에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액은 디메틸 설폭사이드(DMSO)를 10 내지 30중량부 포함할 수 있다. 바람직하게는 13 내지 18중량부를 포함할 수 있다. 디메틸 설폭사이드(DMSO)는 동결과 해동 과정에서 얼음결정의 형성을 최소화하지만 동결과 해동과정에서 발생하는 이온과 삼투압 불균형 및 활성산소유리기의 생성으로 인한 세포손상은 피할 수 없다는 문제점이 있으므로, 20중량부를 초과할 경우 세포손상의 위험성이 커진다. 반대로 10 중량부 미만으로 첨가할 경우 동결보존 효과가 작아진다.

[63] 그러나 캡슐화한 간세포 및 간세포 구상체의 경우, 칼슘-알지네이트라는 고분자의 첨가량을 고려하여 디메틸 설폭사이드(DMSO)는 30중량부까지

포함할 수 있다.

[64] 상기 인간 혈청 알부민은 10 내지 40중량부 포함할 수 있다. 10중량부 미만일 경우 생존율이 낮아진다. 바람직하게는 10 내지 20중량부일 수 있다.

[65] 본 발명에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액은 수크로오스 또는 글루코스, 인간 혈청 알부민, 또는 인슐린을 추가로 포함할 수 있다.

[66] 또한, 무혈청 간세포 동결보존용액은 추가로 아미노산 용액을 추가로 포함할 수 있다. 아미노산 용액에는 바살 미디엄 이글(BME) 아미노산 용액, MEM 아미노산 용액, 또는 헤파타민® 용액일 수 있다.

[67] 상기 바살 미디엄 이글(BME) 아미노산 용액은 바람직하게는 sigma B6766일 수 있으며, 상기 MEM 아미노산 용액은 바람직하게는 sigma M7145일 수 있다.

[68] 상기 헤파타민은 1L 중에 아미노초산(글리신) 6.750g, L-알라닌 5.475g, L-알기닌 4.500g, L-히스티딘 1.875g, L-루신 8.275g, L-이소루신 6.775g,L-라이신 HCl 6.934g, L-메티오닌 0.450g, L-페닐알라닌 0.600g, L-프로린 6.00g,L-세린 3.450g,L-쓰레오닌 3.375g,L-트립토판 0.375g,L-발린 6.3g 및 N-아세틸-l-시스테인 0.337g을 유효성분으로 포함하는 중외트로파민6%주(중외제약)일 수 있다.

[69] 상기 인슐린은 100U/ml으로 1 내지 10중량부 포함할 수 있다. 동결보존 후 간세포의 생존률 및 부착률을 고려하였을 때 바람직하게는 3 내지 5중량부를 포함할 수 있으며, 3중량부가 가장 바람직하다.

[70] 상기 바살 미디엄 이글(BME) 아미노산 용액은 1 내지 5중량부, 동결보존 후 간세포의 생존률 및 부착률을 고려하였을 때 바람직하게는 1 내지 3, 더욱 바람직하게는 2중량부를 포함할 수 있다. 상기 MEM 아미노산 (sigma M7145)은 0.5 내지 2중량부, 바람직하게는 1중량부를 포함할 수 있다.

[71] 상기 덱사메타손 용액(5mg/mL)은 0.1 내지 10중량부를 포함할 수 있다.

[72] 상기 아세틸시스테인 (NAC, N-acetyl cysteine) 은 0.01 내지 100mM을 포함할 수 있다.

[73] 또한, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위해, 무혈청 간세포 동결보존용액에 간세포를 현탁하는 현탁액 제조단계 및 상기 현탁액을 동결시키는 동결단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존방법을 제공한다.

[74] 상기 현탁액 제조단계는 HTK(히스티딘-트립토판-케토글루타르산) 용액, 덱사메타손 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 제1동결보존용액에 간세포를 현탁하는 현탁단계; 및 상기 간세포가 현탁된 제1동결보존용액에 HTK(히스티딘-트립토판-케토글루타르산) 용액, 인간 혈청 알부민, 및 디메틸 설폭사이드(DMSO)를 포함하는 제2동결보존용액을 첨가하는 첨가단계를 포함할 수 있다.

[75] 상기 제1동결보존용액은 디메틸 설폭사이드(DMSO)를 포함하지 않을 수 있다.

[76] 상기 제1동결보존용액은 추가로 덱사메타손, 인슐린, 아미노산 용액 또는 글루코오스를 포함할 수 있다.

[77] 상기 제2동결보존용액은 본 발명에 따른 간세포 동결보존용액일 수 있다.

[78] 상기 제2동결보존용액은 디메틸 설폭사이드(DMSO)를 포함하지 않는 제1동결보존용액에 디메틸 설폭사이드(DMSO)를 첨가한 것일 수 있다.

[79] 한편, 본 발명은 온도 조절을 이용한 간세포 동결보존 방법을 제공하는 것을 특징으로 한다. 상기 동결보존 방법은 상기한 본 발명에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액을 이용할 수 있다.

[80] 상기 동결보존 방법은 속도제어 냉동기를 이용하여 챔버의 온도를 자동으로 조절할 수 있으며, -80℃까지 온도 변화율을 조절하여 간세포를 동결보존할 수 있다. 챔버의 온도가 아래와 같이 자동적으로 조절된다. (a) -1℃/분 속도로 0℃가 되도록 온도 조절; (b) 0℃에서 8분간 유지; (c) -3℃/분의 속도로 -10℃가 되도록 온도 조절;(d) -1℃/분의 속도로 -25℃가 되도록 온도 조절; (e) -50℃/분의 속도로 -75℃가 되도록 온도 조절; (f) -75℃에서 1분간 유지; (g) -12℃/분의 속도로 -40℃가 되도록 온도 조절; 및 (h) -1℃/분의 속도로 -80℃가 되도록 온도 조절.

[81] 상기한 바와 같이 본 발명에 따른 동결온도 감소율이 변화되는 것을 특징으로 하는 온도 조절을 이용한 간세포 동결보존 방법은 급냉(shock cooling program)과 서냉(slow cooling) 방식을 혼합한 것으로서, 동결보존 시 간세포의 생존율을 향상시키는 효과가 있다.

[82] 이하, 실시예들을 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예들을 통해 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서, 이하의 실시예들에 의하여 본 발명이 제한되어서는 안 된다.

[83] 실시예 1. 글루코스를 포함하지 않은 무혈청 간세포 동결보존용액 (SM21 용액)의 제조

[84] HTK(히스티딘-트립토판-케토글루타르산) 용액 58중량부, 20% 인간 혈청 알부민 20중량부, 100U/ml 인슐린 3중량부, 덱사메타손(Dexamethasone) 1중량부, 50X 바살 미디엄 이글(BME) 아미노산(sigma B6766) 2중량부, MEM 아미노산(sigma M7145) 1중량부, 및 디메틸 설폭사이드(DMSO) 15중량부를 혼합하여 무혈청 간세포 동결보존용액(SM21 용액)을 제조하였다.

[85] 실시예 2. 글루코스 200mM의 무혈청 간세포 동결보존용액(SM22 용액)의 제조

[86] HTK(히스티딘-트립토판-케토글루타르산) 용액 53중량부, 20% 인간혈청 알부민 20중량부, 4M 글루코스 5중량부, 100U/ml 인슐린 3중량부, 덱사메타손(Dexamethasone) 1중량부, 50X 바살 미디엄이글(BME) 아미노산(sigma B6766) 2중량부, MEM 아미노산(sigma M7145) 1중량부, 및 디메틸 설폭사이드(DMSO) 15중량부를 혼합하여 무혈청 간세포 동결보존용액(SM22 용액)을 제조하였다.

[87] 실시예 3. 글루코스를 포함하지 않은 무혈청 간세포 동결보존용액(SM64

용액)의 제조

[88] HTK(히스티딘-트립토판-케토글루타르산) 용액 56중량부, 20% 인간혈청 알부민 20중량부, 100U/ml 인슐린 3중량부, 덱사메타손(Dexamethasone) 1중량부, Hepatamine 2.5중량부, 아세틸시스테인 2.5중량부 및 디메틸 설폭사이드(DMSO) 15중량부를 혼합하여 무혈청 간세포 동결보존용액(SM22 용액)을 제조하였다.

[89] 실시예 4. 무혈청 간세포 해동용액 (JHT)

[90] William's E 배지에, 20% 인간혈청 알부민 20중량부, 200mM 글루코스, 10mM 아세틸시스테인을 혼합하여 무혈청 간세포 해동용액을 제조하였다.

[91] 비교예 1. HDM(호르몬 한정 배지)의 제조

[92] William's E 배지에 표피성장인자(EGF) 20ug/L, 인슐린(insulin) 10mg/L, 하이드로코티손 (hydrocortisone) 1.7 mg/L, 황산구리(CuSO4·5H2O) 24.97 ug/L, 황산아연(ZnSO4·7H2O) 14.38pg/L, 셀레늄산(H2SeO3) 3ug/L, 리놀레산 (linoleic acid) 50 mg/L, 탄산수소나트륨(NaHCO3) 1.05g/L, HEPES 1.19 g/L, 페니실린(penicillin) 58.8 mg/L, 및 스트렙토마이신(streptomycin) 0.1 g/L을 첨가하고, 15중량부의 디메틸 설폭사이드(DMSO)를 첨가하여 HDM(호르몬 한정 배지)을 제조하였다.

[93] 비교예 2. 우태아 혈청(FBS) 용액의 제조

[94] FBS 85중량부와 DMSO 15중량부를 혼합하여 우태아 혈청(FBS) 용액을 제조하였다.

[95] 비교예 3. 글루코스를 포함하지 않은 무혈청 간세포 동결보존용액 (JH 용액)의 제조

[96] HTK(히스티딘-트립토판-케토글루타르산) 용액 59중량부, 20% 인간 혈청 알부민 20중량부, 100U/ml 인슐린 3중량부, 50X 바살 미디엄 이글(BME) 아미노산(sigma B6766) 2중량부, MEM 아미노산(sigma M7145) 1중량부, 및 디메틸 설폭사이드(DMSO) 15중량부를 혼합하여 무혈청 간세포 동결보존용액(JH 용액)을 제조하였다.

[97] 비교예 4. 우태아 혈청(FBS)을 포함하는 해동용액의 제조

[98] FBS 10중량부와 Williams'E medium 90중량부를 혼합하여 우태아 혈청(FBS) 해동용액을 제조하였다.

[99] 비교예 5. 20% 인간 혈청 알부민을 포함하는 해동용액 (ALB)의 제조

[100] 20% 인간 혈청 알부민을 20중량부와 Williams'E medium 80중량부를 혼합하여 인간 혈청 알부민을 포함하는 해동용액 (ALB)을 제조하였다.

[101] 실험예 1. 돼지 간세포 분리

[102] Seglen(Seglen PO. Preparation of rat liver cells. 3.Enzymatic requirements for tissue dispersion. Exp Cell Res 82:391, 1973)에 기재된 방법에서 수정한 2단계 인 시튜(in situ) 콜라게나아제(collagenase) 관류 기법을 이용하여 10kg의 3주 돼지로부터 간세포를 분리하였다. 모든 실험은 미국실험동물관리협회(AALAC)의 가이드라인에 따라 수행되었다.

[103] 실험예 2. 돼지 간세포 구상체 제조

[104] 돼지 간세포는 spinner flask에 비교예 1의 HDM 배지를 이용하여 1x10^6/mL의 농도로 seeding 하고 15rpm의 속도로 교반하면서 10-12시간 배양하여 구상체를 형성한다.

[105] 실험예 3. 칼슘-알지네이트 캡슐화된 돼지 간세포 구상체의 제조

[106] 돼지 간세포 구상체를 3x10^7 cells/ml의 농도로 1.5중량부의 알지네이트와 혼합하고, 100mmol/L의 칼슘용액에 투입하였다. 이후 고농도/고속도 고정기기에 투입하여 칼슘-알지네이트 캡슐화된 돼지 간세포를 제조하였다.

[107] 실험예 4. 돼지 간세포의 동결보존 실험

[108] 실험예 1에 따라 돼지로부터 분리된 일차 간세포에 실시예 1, 2, 3, 및 비교예 2의 용액을 각각 혼합하여 현탁액을 제조하였다.

[109] 상기 현탁액은 얼음 위에서 대기하다가 속도제어 냉동기(Thermo Forma의 CryoMed 사용)로 투입시켜 동결시켰다. 속도제어 냉동기 내에서 챔버의 온도 조절은 (a) -1℃/분 속도로 0℃가 되도록 온도 조절; (b) 0℃에서 8분간 유지; (c) -3℃/분의 속도로 -10℃가 되도록 온도 조절; (d) -1℃/분의 속도로 -25℃가 되도록 온도 조절; (e) -50℃/분의 속도로 -75℃가 되도록 온도 조절; (f) -75℃에 서 1분간 유지; (g) -12℃/분의 속도로 -40℃가 되도록 온도 조절; 및 (h) -1℃/분의 속도로 -80℃가 되도록 온도 조절에 의해 이루어졌다(JH program). 챔버 및 세포 현탁액의 온도는 냉동기의 온도 감지기에 의해 연속적으로 측정하였다. 동결과정이 끝난 후 세포 현탁액이 담긴 동결 바이알을 액체 질소에 담갔다.

[110] 1개월 후 동결보존된 간세포들을 37℃의 워터배스에서 급속 해동시켰다. 비교예 4의 해동용액을 상기 해동된 용액의 50배 부피로 첨가한 후 부드럽게 혼합하였다. 세포들을 50g, 4℃, 3분간 3회 원심 분리하여 세척하고 냉동보존액을 제거하였다. 상기 세포들을 5x10^5cells/ml 농도로 HDM(호르몬 한정 배지)에 투입하였다.

[111] 실험예 5. 돼지 간세포 구상체의 동결보존 실험

[112] 실험예 2에 따라 제조된 돼지 간세포 구상체를 실시예 1, 2, 3, 및 비교예 2의 용액을 각각 혼합하여 현탁액을 제조하였다.

[113] 상기 현탁액은 얼음 위에서 대기하다가 속도제어 냉동기(Thermo Forma의 CryoMed 사용)로 투입시켜 동결시켰다. 속도제어 냉동기 내에서 챔버의 온도 조절은 (a) -1℃/분 속도로 0℃가 되도록 온도 조절; (b) 0℃에서 8분간 유지; (c) -3℃/분의 속도로 -10℃가 되도록 온도 조절; (d) -1℃/분의 속도로 -25℃가 되도록 온도 조절; (e) -50℃/분의 속도로 -75℃가 되도록 온도 조절; (f) -75℃에 서 1분간 유지; (g) -12℃/분의 속도로 -40℃가 되도록 온도 조절; 및 (h) -1℃/분의 속도로 -80℃가 되도록 온도 조절에 의해 이루어졌다(JH program). 챔버 및 세포 현탁액의 온도는 냉동기의 온도 감지기에 의해 연속적으로 측정하였다. 동결과정이 끝난 후 세포 현탁액이 담긴 동결 바이알을 액체 질소에 담갔다.

[114] 1개월 그리고 1년 후, 각각 동결보존된 간세포들을 37℃의 워터배스에서 급속

해동시켰다. 비교예 4의 해동용액을 상기 해동된 용액의 50배 부피로 첨가한 후 부드럽게 혼합하였다. 세포들을 50g, 4℃, 3분간 3회 원심 분리하여 세척하고 냉동보존액을 제거하였다. 상기 세포들을 5x10^5cells/ml 농도로 HDM(호르몬 한정 배지)에 투입하였다.

[115] 실험예 6. 캡슐화된 돼지 간세포 구상체 동결보존 실험

[116] 실시예 1에서 디메틸 설폭사이드(DMSO) 용약을 22.5중량부로 늘리고 HTK 용액을 50.5중량부로 줄인 용액과, 실시예 3에서 디메틸 설폭사이드(DMSO) 용약을 22.5중량부로 늘리고 HTK 용액을 48.5중량부로 줄인 용액 및 비교예 2, 3의 용액을 각각 1.8mL 의 동결바이알에 0.5mL 넣고 캡슐화된 돼지 간세포 구상체를 0.5mL 넣어 혼합하여 제조하였다. 모든 과정은 얼음위에서 행해진다.

[117] 상기 캡슐이 포함된 바이알은 얼음 위에서 대기하다가 속도제어 냉동기(Thermo Forma의 CryoMed 사용)로 투입시켜 동결시켰다. 속도제어 냉동기 내에서 챔버의 온도 조절은 (a) -1℃/분 속도로 0℃가 되도록 온도 조절; (b) 0℃에서 8분간 유지; (c) -3℃/분의 속도로 -10℃가 되도록 온도 조절; (d) -1℃/분의 속도로 -25℃가 되도록 온도 조절; (e) -50℃/분의 속도로 -75℃가 되도록 온도 조절; (f) -75℃에 서 1분간 유지; (g) -12℃/분의 속도로 -40℃가 되도록 온도 조절; 및 (h) -1℃/분의 속도로 -80℃가 되도록 온도 조절에 의해 이루어졌다(JH program). 챔버 및 세포 현탁액의 온도는 냉동기의 온도 감지기에 의해 연속적으로 측정하였다. 동결과정이 끝난 후 세포 현탁액이 담긴 동결 바이알을 액체 질소에 담갔다.

[118] 6달 후 동결보존된 캡슐화된 간세포 구상체들을 37℃의 워터배스에서 급속 해동시켰다. 비교예 4의 해동용액을 상기 해동된 용액의 50배 부피로 첨가한 후 부드럽게 혼합하였다. 세포들을 50g, 4℃, 3분간 3회 원심 분리하여 세척하고 냉동보존액을 제거하였다. 상기 캡슐화된 간세포 구상체는 5x10^5cells/ml 농도로 HDM(호르몬 한정 배지)에 투입하였다.

[119] 실험예 7. 동결보존된 간세포의 생존율, 부착율, 및 암모니아 제거율, 우레아 분비율 및 알부민 합성율 측정

[120] 실험예 4, 5, 6에 따라 동결보존된 돼지 간세포의 생존율을 MTT(3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 컨버젼에 의하여 측정하였다. 암모니아 제거율, 우레아 분비율, 알부민 합성율은 Lee(Lee JH, Lee DH, Son JH, et al: Optimization of chitosanalginate encapsulation process using pig hepatocytes for development of bioartificial liver. J Microbiol Biotechnol 15:7, 2005)의 방법에 따라 측정하였다. 모든 데이터는 3회 실험의 평균값이다.

[121] 도면 1(a)은 본 발명에 따라 실시예 1, 실시예2, 비교예 2 및 실시예 3에 따른 간세포 동결보존 용액을 이용하여 돼지 간세포(Pig hepatocyte)를 동결 보존시킨 후 해동하였을 때 간세포의 생존율 및 부착율을 나타낸 그래프이다. 해동 후(thawing) 생존율(검은색 그래프), 부착율(회색 그래프)을 나타내었다.

[122] 본 발명의 실시예 1에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액(SM21 용액)은 종래

동결보존용액으로 사용된 우태아혈청(FBS) 용액 대비 20% 이상의 높은 생존율을 보였다.

[123] 암모니아 제거율의 경우, 본 발명의 실시예 1과 실시예 3에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액(SM21, SM64 용액)은 종래 동결보존용액으로 사용된 우태아혈청(FBS) 용액 대비 30% 이상의 높은 암모니아 제거율을 보였다. (도면 1(b))

[124] 도면 2(a)는 본 발명에 따라 실시예 1, 실시예2, 비교예 2 및 실시예 3에 따른 간세포 동결보존 용액을 이용하여 돼지 간세포 구상체(Pig hepatocyte spheroids)를 동결 보존시킨 후 해동하였을 때 간세포 구상체의 생존율 및 부착율을 나타낸 그래프이다.

[125] 본 발명의 실시예 2에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액(SM22 용액)은 종래 동결보존용액으로 사용된 우태아혈청(FBS) 용액 대비 25% 이상의 높은 생존율을 보였다.

[126] 암모니아 제거율의 경우, 본 발명의 실시예 2와 실시예 3에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액(SM22, SM64 용액)은 종래 동결보존용액으로 사용된 우태아혈청(FBS) 용액 대비 15% 이상의 높은 암모니아 제거율을 보였다. (도면 2(b))

[127] 도면 3(a)는 본 발명에 따라 실시예 1, 실시예 3, 비교예 2 및 실시예 3에 따른 간세포 동결보존 용액을 이용하여 캡슐화된 돼지 간세포 구상체를 동결 보존시킨 후 해동하였을 때 생존율을 나타낸 그래프이다. 막대그래프는 해동 후(thawing) 생존율(검은색 그래프), 2일째 생존율(회색 그래프)을 나타내었다.

[128] 본 발명의 실시예 1과 실시예 3에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액(SM21, SM64 용액)은 종래 동결보존용액으로 사용된 우태아혈청(FBS) 용액 대비 25% 이상의 높은 생존율을 보였으며 기존의 JH용액 대비 9%이상 높은 생존율을 나타내었으며 2일째 생존율의 경우 우태아혈청(FBS) 용액과 기존의 JH용액 대비 30%이상 높은 생존율을 나타내었다.

[129] 암모니아 제거율의 경우, 본 발명의 실시예 1과 실시예 3에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액 (SM21, SM64 용액)은 종래 동결보존용액으로 사용된 우태아혈청(FBS) 용액 대비 83% 이상의 높은 제거율을 보였으며 기존의 JH용액 대비 49%이상 높은 제거율을 나타내었다. (도면 3(b))

[130] 우레아 분비율의 경우, 본 발명의 실시예 1과 실시예 3에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액 (SM21, SM64 용액)은 종래 동결보존용액으로 사용된 우태아혈청(FBS) 용액 대비 2.7배, 3.2배 높은 분비율을 보였으며 기존의 JH용액 대비 1.4배 이상 높은 분비율을 나타내었다. (도면 3(c))

[131] 알부민 합성능의 경우, 본 발명의 실시예 1과 실시예 3에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액 (SM21, SM64 용액)은 종래 동결보존용액으로 사용된 우태아혈청(FBS) 용액 대비 2배 이상의 높은 합성능을 보였으며 기존의 JH용액 대비 1.4배 이상 높은 합성율을 나타내었다. (도면 3(d))

[132] 도면 3(e)는 해동 후 캡슐내에 살아있는 간세포 구상체를 Fluorescent calcein (FITC)으로 죽은 세포는 Ethidium homodimer-1 (PE)로 염색한 형광염색 현미경사진이다. 본 발명의 실시예 1과 실시예 3에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액 (SM21, SM64 용액)에서 살아있는 간세포의 초록색 형광을 확인할 수 있다.

[133] 실험예 8. 동결된 돼지 간세포 구상체 캡슐의 해동 용액 비교 실험

[134] 실험예 6에서와 같이 1.8mL 의 동결바이알에 캡슐화된 돼지 간세포 구상체를 0.5mL 넣고 비교예 2를 혼합하여 동결보존하였다.

[135] 6개월 후 동결보존된 캡슐화된 간세포 구상체들을 37℃의 워터배스에서 급속 해동시켰다. 실시예 4 및 비교예 4, 5의 해동용액을 상기 해동된 용액의 50배 부피로 첨가한 후 부드럽게 혼합하였다. 세포들을 50g, 4℃, 3분간 3회 원심 분리하여 세척하고 냉동보존액을 제거하였다. 상기 캡슐화된 간세포 구상체는 5x10^5cells/ml 농도로 HDM(호르몬 한정 배지)에 투입하였다.

[136] 도면 4는 칼슘-알지네이트 비드로 캡슐화된 간세포 구상체를 FBS용액을 이용하여 동결보존 후 해동 시 FBS가 포함된 해동 배지 그리고 무혈청 간세포 해동 용액을 이용하여 비교한 실험결과이다.

[137] 현재 대부분의 무혈청 동결용액을 개발하고자 하는 문헌에서 무혈청 동결 후 해동공정에서는 혈청을 포함한 용액 (10% FBS를 포함)을 사용하고 있음. 이는 혈청이 동결과정 중 손상된 세포막의 안정화에 기여하는 것으로 생각되며 특히 단일 세포의 경우 부착율에 크게 영향을 미친다.

[138] 본 발명에서는 기존의 혈청을 대신하여 20% 인간 혈청 알부민을 사용하였으며 아세틸시스테인 (NAC)을 첨가하였다.

[139] NAC는 항산화제로 해동 시 발생하는 손상 (warm injury)를 줄여주는 역활을 수행한다고 볼 수 있다.

[140] 도면 4(a)는 본 발명에 따라 비교예 2로 동결 보존 후 비교예 4, 비교예 5 및 실시예 4에 따른 간세포 해동 용액을 이용하여 캡슐화된 돼지 간세포 구상체를 해동하였을 때 생존율을 나타낸 그래프이다.

[141] 본 발명의 실시예 4에 따른 무혈청 간세포 해동용액 (JHT 용액)은 종래 해동용액으로 사용된 우태아혈청(FBS)이 포함된 용액 대비 18% 이상의 높은 생존율을 나타내었다.

[142] 암모니아 제거율의 경우, 실시예 4에 따른 무혈청 간세포 해동용액 (JHT 용액)은 종래 해동용액으로 사용된 우태아혈청(FBS)이 포함된 용액과 비슷한 제거율을 나타내었다. (도면 4(b))

[143] 우레아 분비율의 경우, 본 발명의 실시예 4에 따른 무혈청 간세포 해동용액 (JHT 용액)은 종래 해동용액으로 사용된 우태아혈청(FBS)이 포함된 용액 대비 1.6배 높은 분비율을 나타내었다. (도면 4(c))

[144] 알부민 합성능의 경우, 본 발명의 실시예 4에 따른 무혈청 간세포 해동용액 (JHT 용액)은 종래 해동용액으로 사용된 우태아혈청(FBS)이 포함된 용액 대비

1.3배 이상의 높은 합성능을 보였으며 2일째 알부민 합성능의 경우 1.7배 이상 높은 합성율을 나타내었다. (도면 4(d))

청구범위

[청구항 1] HTK(히스티딘-트립토판-케토글루타르산) 용액, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 덱사메타손 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 간세포는 일차 간세포, 간세포 구상체, 캡슐화된 간세포 및 캡슐화된 간세포 구상체를 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 캡슐화된 간세포 및 캡슐화된 간세포 구상체는 칼슘-알지네이트 비드 (Ca-alginate bead)로 캡슐화된 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 HTK 용액은 30 내지 70중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 디메틸 설폭사이드(DMSO)은 10 내지 30 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 인간 혈청 알부민은 20% 인간 혈청 알부민으로 10 내지 40 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 덱사메타손은 5mg/ml 으로 0.1 내지 10 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 무혈청 간세포 동결보존용액은 N-아세틸시스테인 (NAC, N-acetyl cysteine)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 N-아세틸시스테인은 0.01 내지 100mM을 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 무혈청 간세포 동결보존용액은 아미노산 용액을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 아미노산 용액은 바살 미디엄 이글(BME) 아미노산 용액, 미니멈 에센셜 미디엄 (MEM) 아미노산 용액 또는 헤파타민®(hepatamin®)용액중

어느 하나인 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 무혈청 간세포 동결보존용액은 인슐린을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

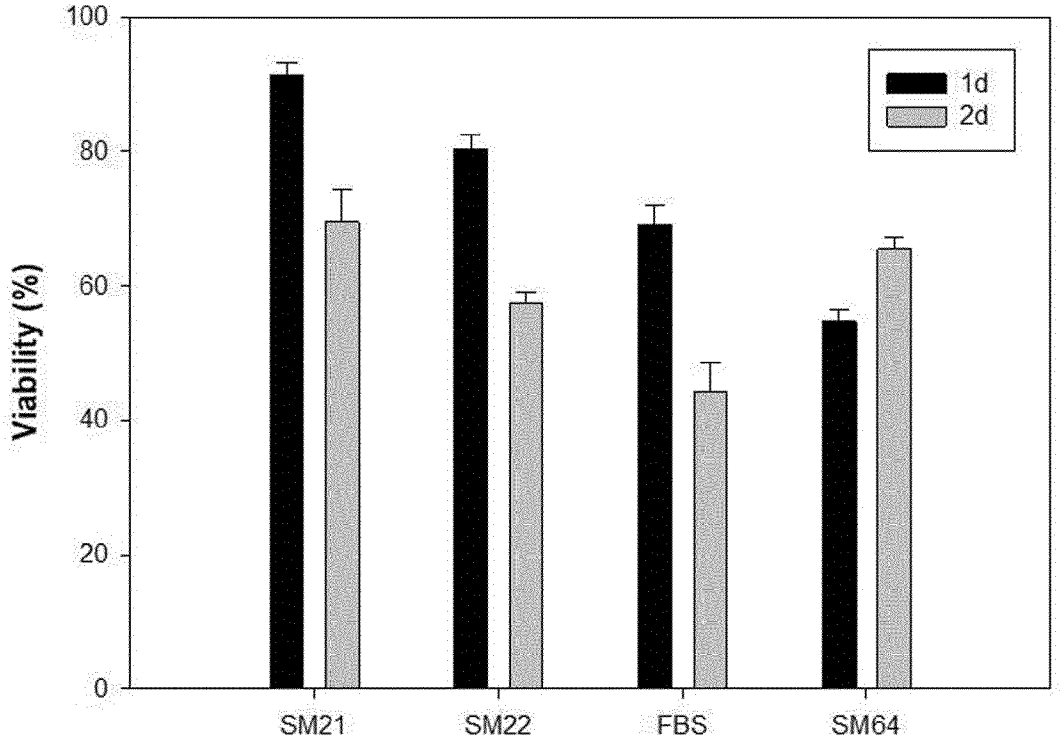
[청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 인슐린은 100U/ml 인슐린으로 1 내지 10중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존용액.

[청구항 14] 제1항 내지 제13항중 어느 한 항에 따른 무혈청 간세포 동결보존용액에 간세포를 현탁하는 현탁액제조단계 및 상기 현탁액을 동결시키는 동결단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존방법.

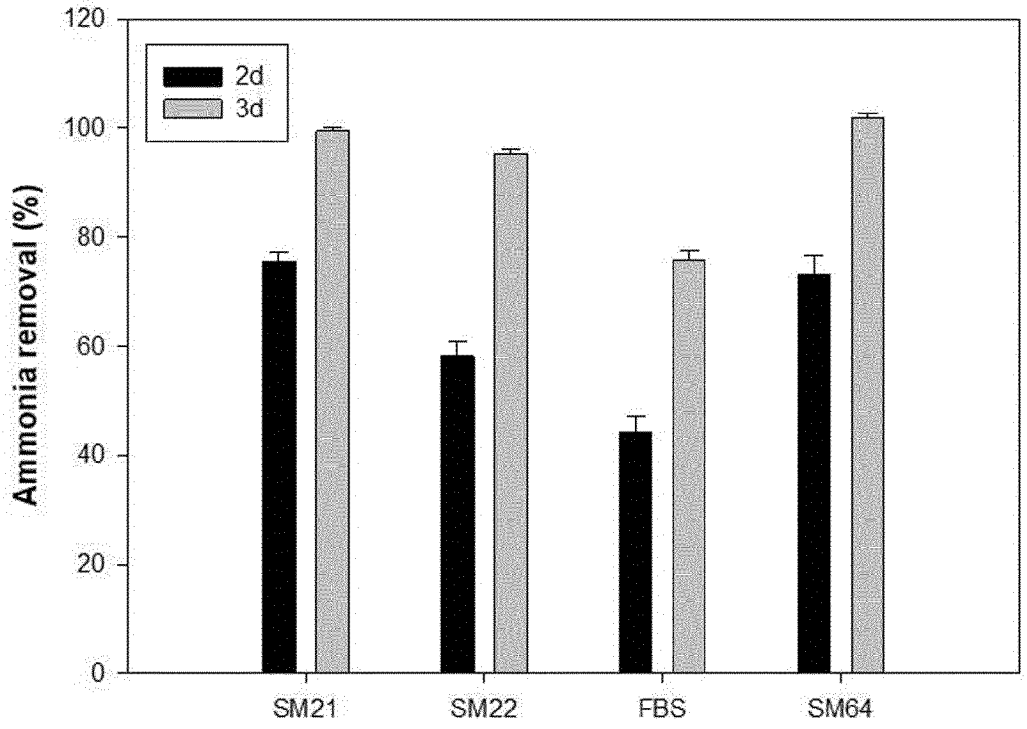
[청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 동결단계는 동결온도 감소율이 변화하는 것을 특징으로 하는 무혈청 간세포 동결보존방법.

[청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 동결온도 감소율은
(a) -1℃/분 속도로 0℃가 되도록 온도 조절되고;
(b) 0℃에서 8분간 유지되고;
(c) -3℃/분의 속도로 -10℃가 되도록 온도 조절되고;
(d) -1℃/분의 속도로 -25℃가 되도록 온도 조절되고;
(e) -50℃/분의 속도로 -75℃가 되도록 온도 조절되고;
(f) -75℃에서 1분간 유지되고;
(g) -12℃/분의 속도로 -40℃가 되도록 온도 조절되고;
(h) -1℃/분의 속도로 -80℃가 되도록 온도 조절되는 것을 특징하는 무혈청 간세포 동결보존방법.

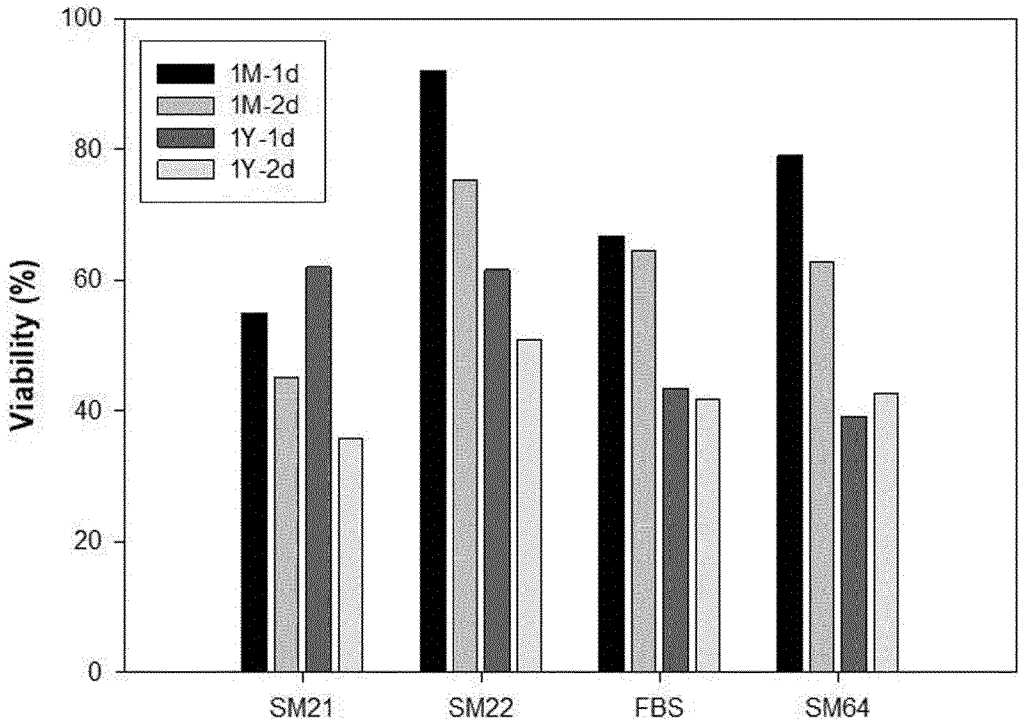
[도1a]


100
80
60
40
20
0
Viability (%)
1d
2d
SM21
SM22
FBS
SM64

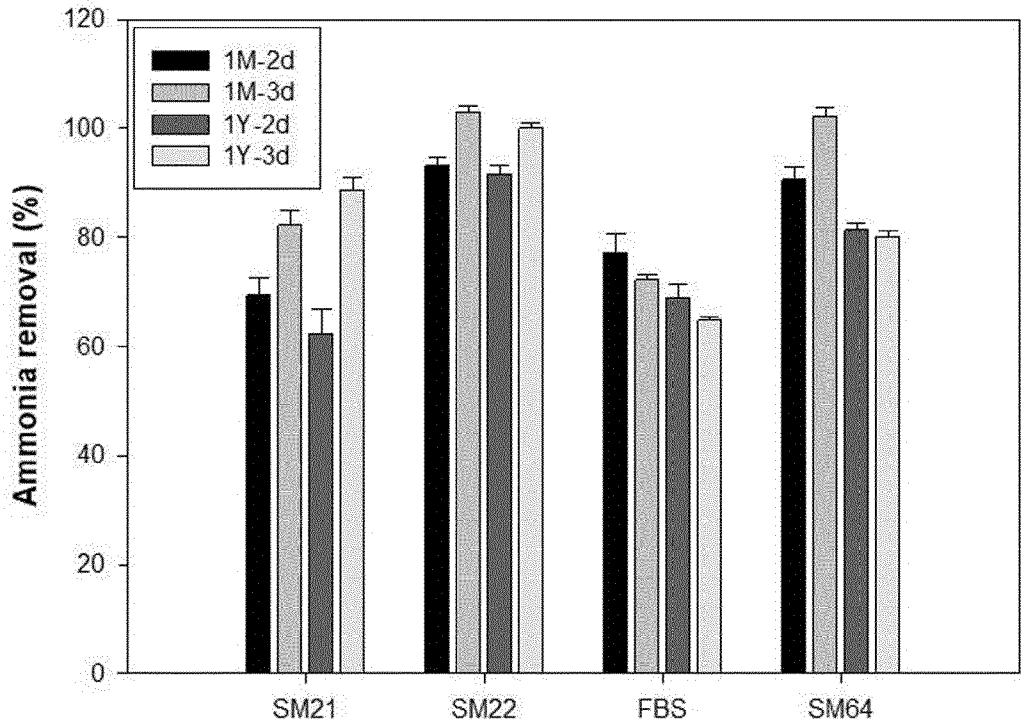
[도1b]


120
100
80
60
40
20
0
Ammonia removal (%)
2d
3d
SM21
SM22
FBS
SM64

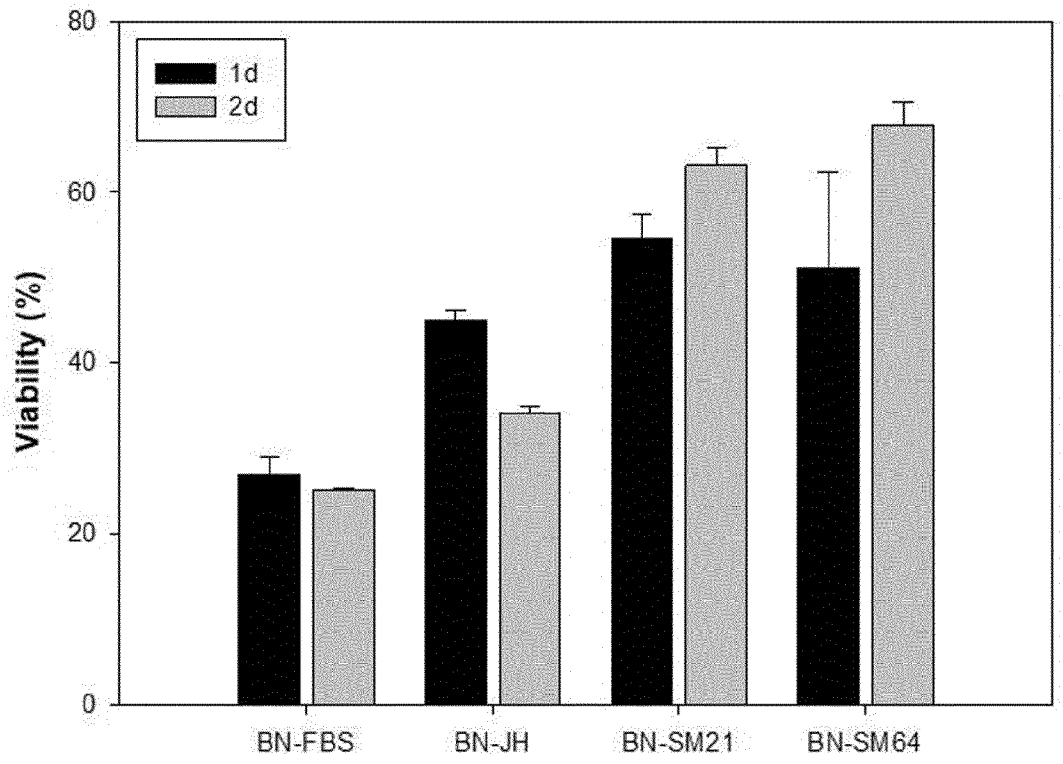
[도2a]


100
80
60
40
20
0
Viability (%)
1M-1d
1M-2d
1Y-1d
1Y-2d
SM21
SM22
FBS
SM64

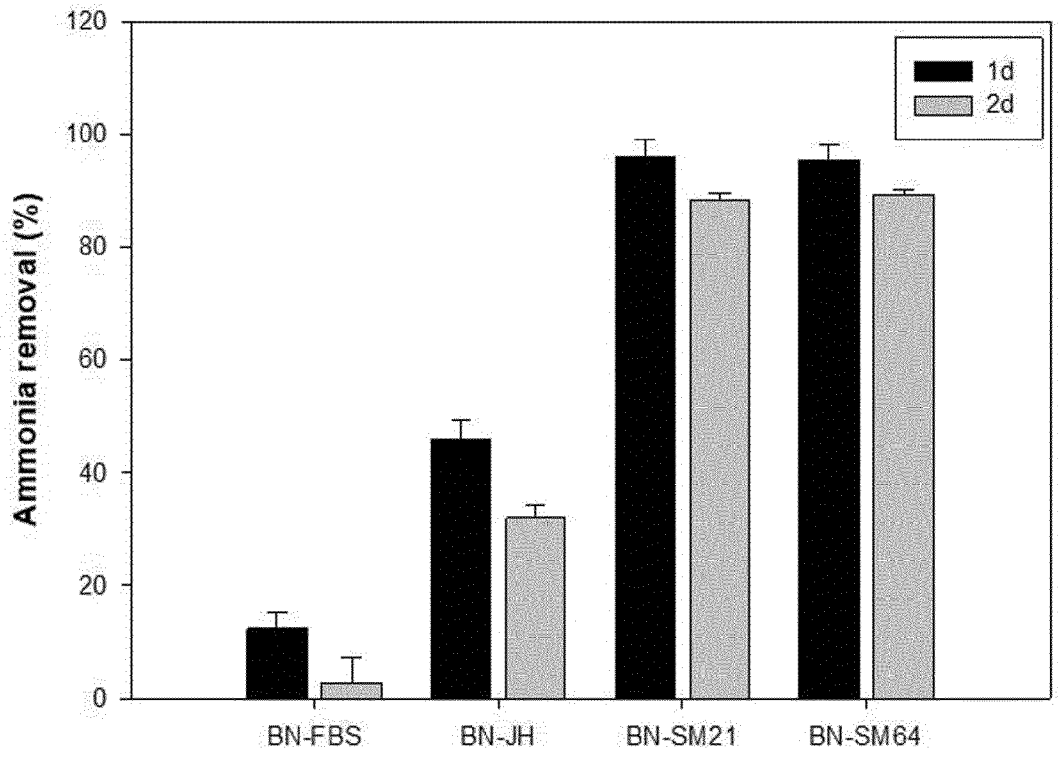
[도2b]


120
100
80
60
40
20
0
Ammonia removal (%)
1M-2d
1M-3d
1Y-2d
1Y-3d
SM21
SM22
FBS
SM64

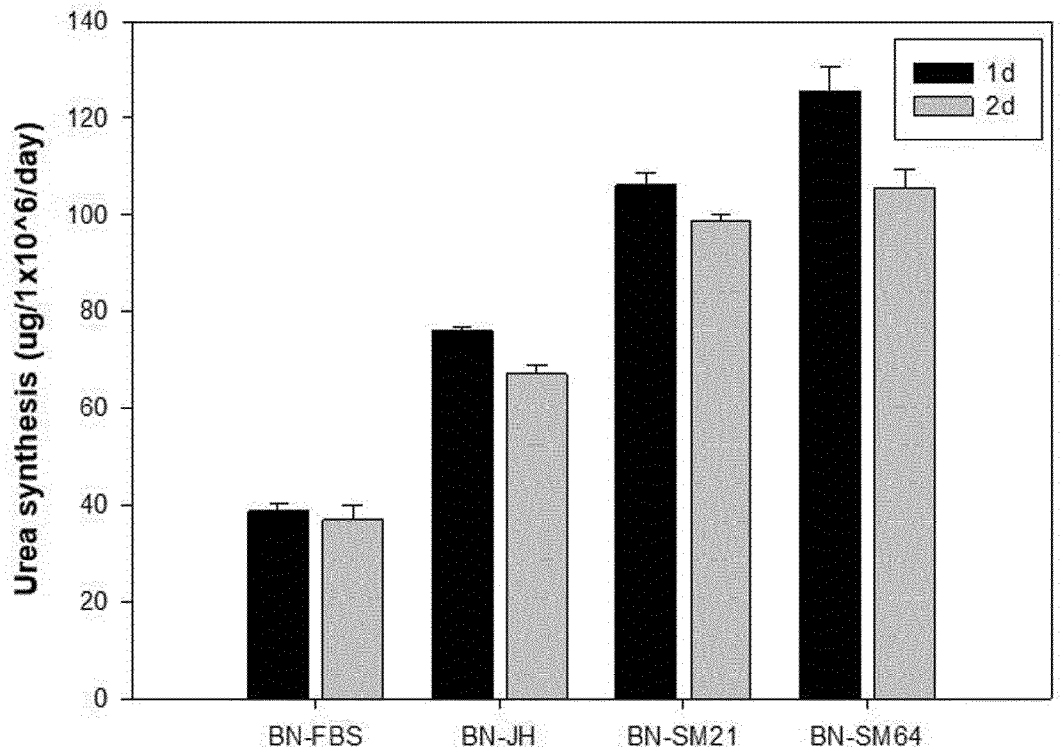
[도3a]


80
60
40
20
0
Viability (%)
1d
2d
BN-FBS
BN-JH
BN-SM21
BN-SM64

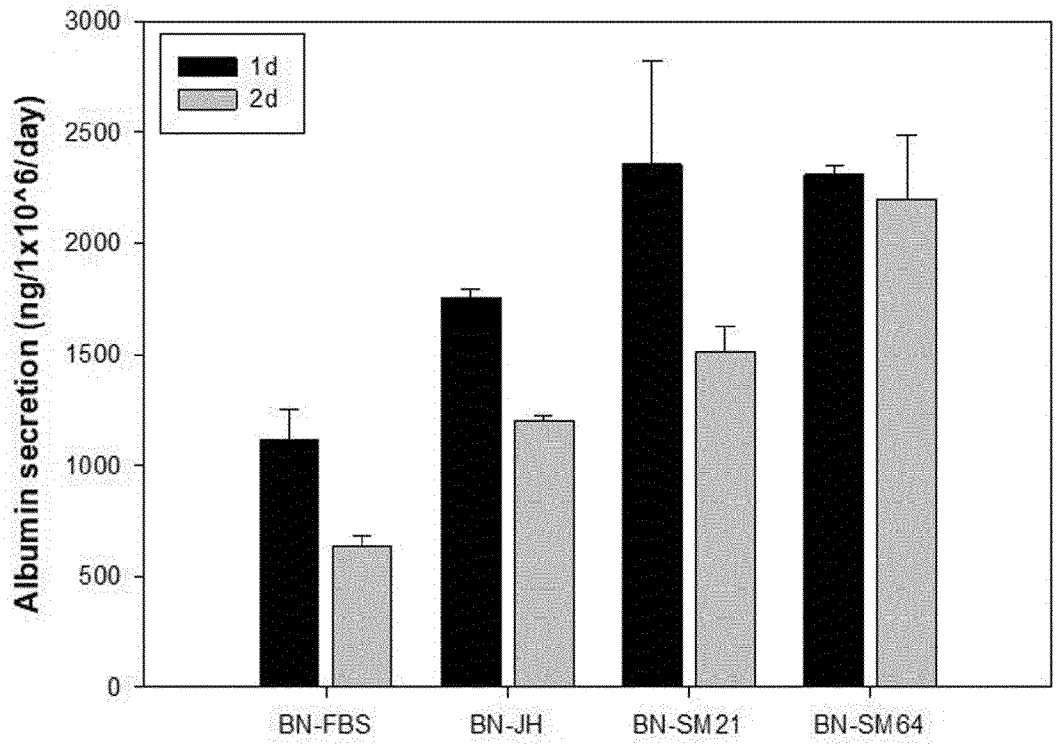
[도3b]


120
100
80
60
40
20
0
Ammonia removal (%)
1d
2d
BN-FBS
BN-JH
BN-SM21
BN-SM64

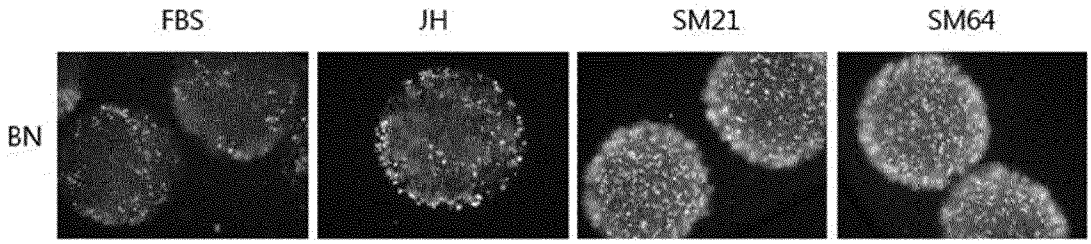
[도3c]


Urea synthesis (ug/1x10^6/day)
140
120
100
80
60
40
20
0
1d
2d
BN-FBS
BN-JH
BN-SM21
BN-SM64

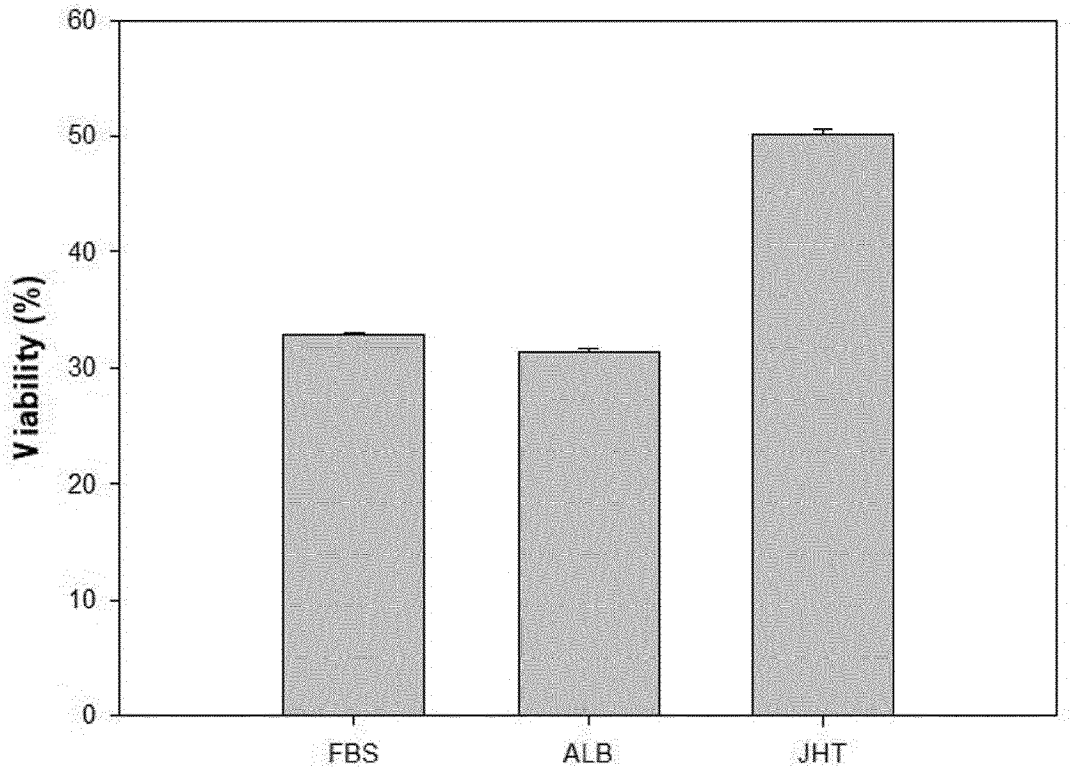
[도3d]


Albumin secretion (ng/1x10^6/day)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1d
2d
BN-FBS
BN-JH
BN-SM21
BN-SM64

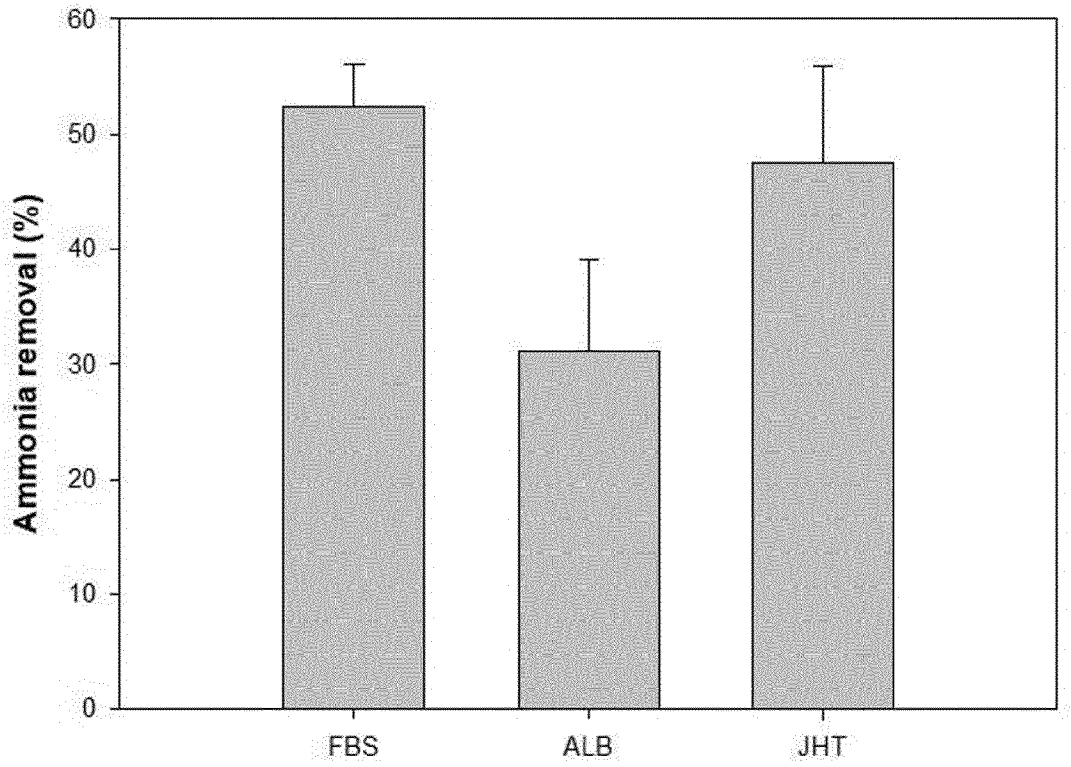
[도3e]



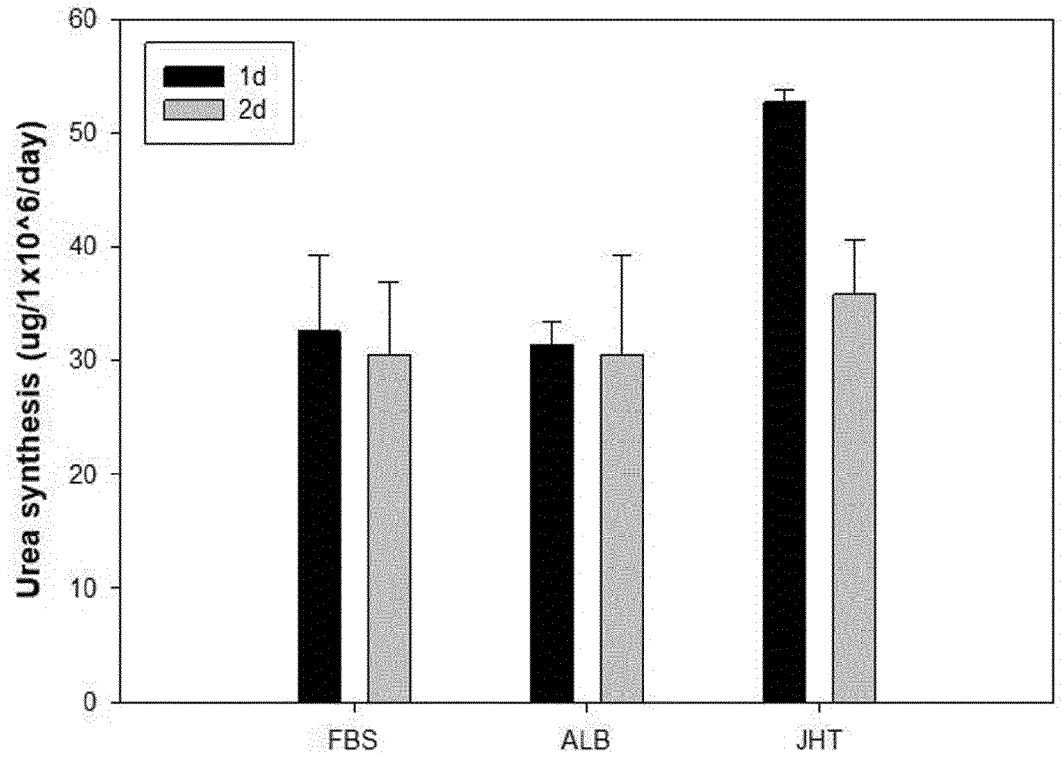
[도4a]



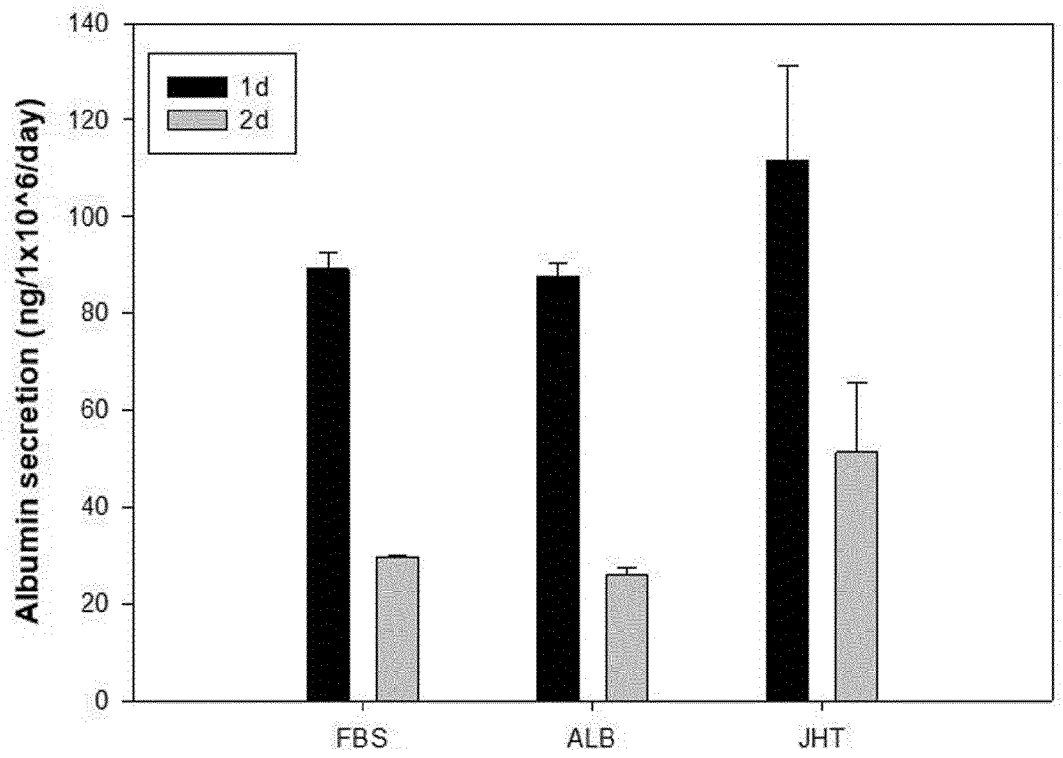
[도4b]


Ammonia removal (%)
60
50
40
30
20
10
0
FBS
ALB
JHT

[도4c]


Urea synthesis (ug/1x10^6/day)
1d
2d
60
50
40
30
20
10
0
FBS
ALB
JHT

[도4d]


Albumin secretion (ng/1x10^6/day)
140
120
100
80
60
40
20
0
1d
2d
FBS
ALB
JHT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/016677

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 1/02(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, C12N 11/10(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; A01N 1/00; C12N 5/071; C12N 11/10

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: histidine-tryptophan-ketoglutaric acid solution, dimethyl sulfoxide, dexamethasone, human serum albumin, serum-free hepatocyte cryopreservation solution

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2014-0132648 A (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) 18 November 2014 See example 1; experimental example 2; and claims 1-7, 13-14.	1-16
Y	JP 2006-524260 A (HUMAN BIOSYSTEMS) 26 October 2006 See paragraph [0007]; claims 1, 4-6; and figure 4.	1-16
Y	LEE, J.-H. et al. Cryopreservation of immobilized rat hepatocytes for the development of a bioartificial liver system. Transplantation Proceedings. 2012, vol. 44, pages 1005-1008 See abstract; and page 1006.	1-16
A	LEE, J.-H. et al. Slow cooling rate with a shock cooling program can effectively cryopreserve pig hepatocytes. Transplantation Proceedings. 2012, vol. 44, pages 1002-1004 See the entire document.	1-16
A	PUHL, Gero et al. Low viscosity histidine-tryptophan-ketoglutarate graft flush improves subsequent extended cold storage in University of Wisconsin solution in an extracorporeal rat liver perfusion and rat liver transplantation model. Liver Transplantation. 2006, vol. 12, pages 1841-1849 See the entire document.	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
27 AUGUST 2019 (27.08.2019)	**27 AUGUST 2019 (27.08.2019)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, 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/KR2018/016677

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0132648 A	18/11/2014	KR 10-1480987 B1	09/01/2015
JP 2006-524260 A	26/10/2006	CA 2522941 A1	04/11/2004
		EP 1619945 A2	01/02/2006
		US 2005-0019917 A1	27/01/2005
		US 2006-0121438 A1	08/06/2006
		US 7029839 B2	18/04/2006
		WO 2004-093658 A2	04/11/2004
		WO 2004-093658 A3	29/09/2005

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/016677

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01N 1/02(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, C12N 11/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A01N 1/02; A01N 1/00; C12N 5/071; C12N 11/10

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: 히스티딘-트립토판-케토글루타르산 용액(histidine-tryptophan-ketoglutaric acid solution), 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 덱사메타손(dexamethasone), 인간 혈청 알부민(human serum albumin), 무혈청 간세포 동결보존용액(serum-free hepatocyte cryopreservation solution)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2014-0132648 A (사회복지법인 삼성생명공익재단) 2014.11.18 실시예 1; 실험예 2; 및 청구항 1-7, 13-14 참조.	1-16
Y	JP 2006-524260 A (HUMAN BIOSYSTEMS) 2006.10.26 단락 [0007]; 청구항 1, 4-6; 및 도면 4 참조.	1-16
Y	LEE, J.-H. 등, "Cryopreservation of immobilized rat hepatocytes for the development of a bioartificial liver system." Transplantation Proceedings, 2012, 44권, 페이지 1005-1008 요약; 및 페이지 1006 참조.	1-16
A	LEE, J.-H. 등, "Slow cooling rate with a shock cooling program can effectively cryopreserve pig hepatocytes." Transplantation Proceedings, 2012, 44권, 페이지 1002-1004 전체 문헌 참조.	1-16
A	PUHL, GERO 등, "Low viscosity histidine□tryptophan□ketoglutarate graft flush improves subsequent extended cold storage in University of Wisconsin solution in an extracorporeal rat liver perfusion and rat liver transplantation model." Liver Transplantation, 2006, 12권, 페이지 1841-1849 전체 문헌 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
2019년 08월 27일 (27.08.2019)	2019년 08월 27일 (27.08.2019)

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

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/016677

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0132648 A	2014/11/18	KR 10-1480987 B1	2015/01/09
JP 2006-524260 A	2006/10/26	CA 2522941 A1	2004/11/04
		EP 1619945 A2	2006/02/01
		US 2005-0019917 A1	2005/01/27
		US 2006-0121438 A1	2006/06/08
		US 7029839 B2	2006/04/18
		WO 2004-093658 A2	2004/11/04
		WO 2004-093658 A3	2005/09/29