



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월28일  
(11) 등록번호 10-2269612  
(24) 등록일자 2021년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)  
C12N 5/0775 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
A61L 27/3604 (2013.01)  
A61L 27/3804 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-7036692  
(22) 출원일자(국제) 2014년06월26일  
심사청구일자 2019년04월10일  
(85) 번역문제출일자 2015년12월24일  
(65) 공개번호 10-2016-0024881  
(43) 공개일자 2016년03월07일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/063581  
(87) 국제공개번호 WO 2014/207135  
국제공개일자 2014년12월31일  
(30) 우선권주장  
61/839,578 2013년06월26일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
CN102284084 A\*  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
스텝폼 에이피에스  
덴마크 디케이-2920 샬로텐룬 회스트바이 21  
(72) 발명자  
켈르, 스티그-프레데리크 트로얀  
덴마크 디케이-2920 샬로텐룬 회스트바이 21  
(74) 대리인  
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이수희

(54) 발명의 명칭 미용적 지방 충전물 위해 또는 안면 충전 및/또는 회생을 위해 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포를 이용하는 지방 충전물

(57) 요약

본 발명은 채취된 지방 조직과 혼합된 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방; 예를 들어  $1.0 \times 10^5$  내지  $2.0 \times 10^7$ 의 비로 포함하는 조성물 및 미용적 지방 충전/확대를 위한 또는 안면 충전/회생을 위한 제제로서 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

**C12N 5/0667** (2013.01)  
A61L 2400/06 (2013.01)  
A61L 2430/04 (2013.01)  
A61L 2430/34 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

JP2012525157 A  
KR1020080037281 A  
KR1020090043559 A  
US20050025755 A1  
US20100279405 A1  
Aesthetic Surgery Journal, 2010, Vol. 30, No. 1, pp. 78-81

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

채취된 지방 조직과 혼합된 체외(ex-vivo) 확장 1차 계대배양(P0) 지방조직-유래 줄기 세포(adipose tissue-derived stem cell: ASC)를 포함하는 조성물의 제조방법으로서,

- 돌베코 변형 이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) 또는 알파 최소 필수 배지(α-MEM), 1 내지 5% 페니실린-스트렙토마이신, 1 내지 5 IU/ml 무보존제 헤파린 및 2 내지 20% 풀링 인간 혈소판 용해물(pooled Human Platelet Lysate: pHPL)로 이루어진 성장 배지에서 단리된 기질 혈관 분획(Stromal vascular fraction: SVF)으로부터 상기 ASC를 체외 확장시키는 단계,
- 상기 1차 계대배양(P0)에서 상기 ASC를 채취하는 단계, 및
- 상기 ASC를, 별도의 지방 흡입 절차로부터 수득되는 채취된 지방 조직과, 상기 지방 조직의 ml 당  $20 \times 10^6$  내지  $20 \times 10^7$  ASC의 비( $20 \times 10^6$  내지  $20 \times 10^7$  ASC/ml 지방 조직)로 혼합하는 단계를 포함하는, 조성물의 제조방법.

**청구항 2**

별도의 지방 흡입 절차로부터 수득되는 채취된 지방 조직과 혼합된 체외 확장 1차 계대배양(P0) 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를 적어도  $20 \times 10^6$  내지  $20 \times 10^7$  ASC/ml 지방 조직의 비로 포함하는 조성물로서, 상기 체외 확장 1차 계대배양(P0) 지방조직-유래 줄기 세포(adipose tissue-derived stem cell: ASC)를 돌베코 변형 이글배지(DMEM) 또는 알파 최소 필수 배지(α-MEM), 1 내지 5% 페니실린-스트렙토마이신, 1 내지 5 IU/ml 무보존제 헤파린 및 2 내지 20% 풀링 인간 혈소판 용해물(pHPL)로 이루어진 성장 배지에서 배양시키고, 상기 1차 계대배양(P0)에서 채취한, 조성물.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 미용적 유방 증진을 위한 또는 미용적 안면 증진을 위한 유방 충전제 또는 안면 충전제로서 사용하기 위한, 조성물.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부 지방 이식물을 이용하는 연조직 충전에 관한 것이다. 이들은 미용적 유방 충전/확대 또는 안면 충전 및/또는 회생을 위해 사용될 수 있다.

**발명의 내용**

[0002] 성형 수술에서 빈번한 도전은 볼륨 결핍의 수정 및 존재하는 볼륨의 확대이다. 볼륨 결핍을 수정할 때 또는 존재하는 조직을 확대할 때, 소위 필러 또는 이식물인 충전 재료를 사용할 필요가 종종 있다. 자가 지방 이식물(지방 충전물)은 연조직의 복원 및 확대(예를 들어, 미용적 유방 확대)를 가능하게 하며, 미학적 수술과 재건 수술 둘 다에서 점점 더 사용되고 있다. 자가 지방조직은, 그것이 생체에 적합하고, 다용도이며, 자연스럽게 생기고, 비면역원성이며, 저렴하고, 공여 부위 이환율이 낮기 때문에, 연조직의 확대를 위한 이상적인 필러가 되는 것으로 고려되었다<sup>1,2</sup>. 그러나, 이식된 지방 이식물은 예측가능하지 않고 종종 생착률이 낮는데, 이는 조사자들이 그의 생착력을 증가시키는 새로운 방법을 추구하는 이유이다. 지방조직-유래 중간엽 줄기세포(adipose tissue-derived stem cell: ASC)가 풍부한 이종 지방 이식물을 조사하는 한 가지 동물 연구는 상기 기법이 유효하고 재생가능하며, 비풍부화에 비해 이식물의 잔여 볼륨을 증가시킨다는 것을 나타내었다<sup>3</sup>. 최근의 인간 연구는 증가된 잔여 용적 및 더 양호한 품질의 이식 조직을 위해 지방 이식물에 ASC를 더하는 것의 이점 및 현저한 효과를 입증하고 확인하였다<sup>4</sup>.

[0003] 미용 산업에서, 미용적 안면 충전/회생을 위해 이용가능한 용액은 대부분 인공적(예를 들어, 보툴리눔 독소 A형, 하이알루론산, 콜라겐, 칼슘하이드록실아파타이트, 폴리락틱산, 폴리메틸-메타크릴산염 마이크로스피어)이다. 따라서, 결과는 종종 낮은 다능성 및 생체적합성 때문에 결국 자연스럽게 못한 외관을 초래한다. 인공 필러는 다양한 질병 증상으로부터 미용 결함까지의 범위에서 가능한 유해한 생리적 부작용을 지니고 시간에 따라 분해된다. 자가 지방 조직은 상기 기재한 바와 같은 동일한 필러 용액이 되는 것으로 고려된다. 그러나, 안면 충전/회생을 위해 자가 지방을 이용하여 치료한(즉, 줄기 세포 풍부화 없이) 환자에 대한 결과는 이식물의 예측가능하지 않은 생착 때문에 결국 불균형의 결과를 가져올 수 있다.

[0004] 일부 외과의사는 더 양호하고 더 예측가능한 이식물을 취하는 것이 소위 세포기질분획(stromal vascular fraction: SVF)을 이식물에 첨가함으로써 달성될 수 있다는 것을 제안한다<sup>5,6</sup>. SVF는 지방조직이 지방 흡입술에 의해 채취되고, 지방 세포가 콜라게나제를 이용하여 효소적으로 분해될 때 형성되는 세포 펠렛이다. SVF는 소량의 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를 함유하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 다음의 용어를 구별하는 것은 중요하다:

- [0006] 1) 전통적인 지방 충전물: 지방만
- [0007] 2) 줄기세포지방이식(Cell-assisted lipotransfer): 지방 + SVF
- [0008] 3) 줄기세포 풍부화 지방 충전물: 지방 + 체외 확장된 ASC
- [0009] 4) 줄기 세포 충전: 체외 확장 ASC

[0010] 본 특허 출원에서, 본 발명자들은 상기 용어 3)과 4)만을 언급한다.

[0011] 줄기 세포의 정의는 본 특허 출원에서 언급된다:

[0012] 세포기질 분획을 파종 및 배양할 때 배양물 표면에 점착성인 세포.

[0013] 유방과 안면 적용 둘 다에 대해, 자가 또는 동종이계 세포가 사용될 수 있다.

[0014] 본 발명은 미용적 안면 충전 및 회생에 그리고 미용적 유방 충전/확대에 특히 적합하다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0015] 본 발명은 채취된 지방 조직과 혼합된 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방; 예를 들어  $1.0 \times 10^5$  내지  $2.0 \times 10^7$ 의 비로 포함하는 조성물 및 미용적 유방 충전/확대를 위한 또는 안면 충전/회생을 위한 제제(agent)로서 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물의 용도에 관한 것이다.
- [0016] *ASC를 채취하기 위한 수술 절차*
- [0017] 환자는 외래환자 부수적 지방 흡입술을 받는다.
- [0018] 표준 멸균 지방 흡입술 기법에 의해 지방흡입물을 채취할 것이다. 절개를 통해, 흡윤액을 피하 지방 내로 침투시킨다. 표준 지방 흡입술 장치(예를 들어, 바이브라셋(Vibrasat)(등록상표))를 이용하여 지방흡입물을 획득하고, 멸균 용기 내에 밀봉한다. 지방흡입물을 임상 줄기 세포 연구실에 보낸다.
- [0019] *ASC의 단리 및 배양*
- [0020] ASC 단리 및 체외 확장은 세포 요법 시설에서 우수 의약품 제조관리기준(good manufacturing practice: GMP) 및 임상 줄기 세포 확장을 위해 승인된 연구실에서 승인된 프로토콜에 따라 수행될 것이다.
- [0021] 지방흡입물을 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하고 나서, 원심분리시킨다. 세포기질분획(SVF)을 단리시키기 위해, 상청액을 인큐베이션시키고, 콜라게나제를 이용하여 효소적으로 분해한다(GMP 등급). 성장 배지를 이용하여 효소적 활성을 중화시킨다. 현탁액을 60 내지 100 $\mu$ m 필터를 이용하여 여과시키고 원심분리시킨다. 배양 배지에서 세포 펠렛을 재현탁시키고, SVF를 함유하는 펠렛 내 세포를 계수화한다. 대안의 단리 방법은 폐쇄 시스템, 예를 들어, GID SVF-1(상표명) 시스템을 이용하여 SVF를 단리시킨다. SVF를 돌베코 변형 이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) 또는 알파 최소 필수 배지( $\alpha$ -MEM), 1 내지 5% 페니실린-스트렙토마이신, 1 내지 5 IU/ml 무보존제 헤파린 및 2 내지 20% 풀링 인간 혈소판 용해물 pHPL 또는 임의의 다른 대안적 성장 배지, 예를 들어, 소 태아 혈청으로 이루어진 배양 배지 중에 파종된다. 1차 배양물(primary culture: PO)을 인큐베이션시킨다. 비부착 세포를 폐기하고 나서, 세포 배양 플라스크를 PBS로 조심해서 린스하고, 배지를 바꾼다. 배지는 3 내지 7일 동안 변화된다. 배양 동안 그리고 ASC의 채취일에 모든 배양 플라스크/스택(stack)을 병원균 오염에 대해 시험할 것이다.
- [0022] *pHPL 생성*
- [0023] pHPL은 문헌[Schallmoser et al. <sup>7</sup>]에 기재된 바를 약간 변형하여 제조될 수 있다. 간략하게, 사전동의 후에, 건강한 혈액 공여자로부터 전혈 단위를 수집한다. 모든 혈액 공여물을 현행법에 입각하여 감염성 질환 마커에 대해 시험한다. 연층(buffy coat)을 적혈구 세포 및 혈장으로부터 분리시킨다. 4개의 연층 단위를 1단위의 혈장을 이용하여 1단위의 혈소판 풍부 혈장(platelet-rich plasma: PRP) 내로 모으고 나서, -20 $^{\circ}$ C 내지 -80 $^{\circ}$ C에서 저장한다. 최소 10 단위의 PRP를 수욕에서 해동시키고, 이어서, 단일 PRP 배취(batch) 내로 모은다. 모은 PRP 배취를 더 작은 분획으로 분취화하고 나서, -20 $^{\circ}$ C 내지 -80 $^{\circ}$ C에서 냉동시킨다. 다음에, 단일의, 모은 PRP 배취로부터의 모든 분취된 백을 수욕에서 해동시키고 나서, 원심분리시켜(예를 들어, 4000g에서 15분 동안) 혈소판 단편을 침전시킨다. 최종적으로, pHPL-함유 상청액을 새로운 백에 옮기고 나서, 세포 배양 배지의 제조에서 이후의 사용을 위해 -40 $^{\circ}$ C 내지 -80 $^{\circ}$ C에서 저장한다.
- [0024] *ASC 채취 절차*
- [0025] ASC를 P0-P4에서 채취한다. 모든 세포 배양 플라스크/스택을 PBS로 세척하고 나서, 화학적(예를 들어, 트리플 셀렉트(Tryple Select)) 또는 물리적 가공 중 하나를 이용하여 세포를 플라스틱 표면으로부터 분리시킨다. ASC를 함유하는 현탁액을 원심분리시키고(예를 들어, 300 g에서 5분 동안), 상청액을 제거하고 나서, PBS 중에서 재현탁시킨 후에 세포 펠렛을 수집한다. PBS를 이용하여 ASC 세포 펠렛을 세척하고, ASC를 원심분리시키고, 각각의 세척 절차 후에 상청액을 폐기한다. 세포를 3회 계수화하고 나서, 평균 계수를 계산할 것이다. ASC는, ASC에 대한 특징이 되는 것으로 평가되는 1) 병원균 오염의 부재, 2) 90%보다 큰 ASC의 생착력 3) 형태를 포함하는 임상 용도로 그들을 방출시키기 전에 조심해서 제어될 것이다. ASC를 승인된 멸균 용기 내에서 운반할 것이다.
- [0026] *지방흡입술, 이식 표본 및 지방 충전물 절차*
- [0027] 국소 및 일반적 마취 하에서 수술 절차를 수행한다. 표준 멸균 지방 흡입술 기법에 의해 지방흡입물을 채취한다. 절개를 통해 흡윤액(예를 들어, 클레인스(Kleins) 용액)을 뚫은 침투자(infiltrator)를 이용하여 공여 부위 내에 침투시킨다. 채취 캐놀라는 직경이 2 내지 5mm이며 뚫은 팁(tip)을 지니고, 채취 장치(예를

들어, 바이브라셋(Vibrasat)(등록상표)에 연결된다. 필요하다면, 식염수를 이용하여 지방 흡입물을 세척한다. 채취한 지방 흡입물은 침전된 채로 두거나, 교반시키거나 원심분리시킨다(예를 들어, 100 g에서 5분 동안). 분리 절차 후에, 오일층(상부 수준)을 디캔팅시키고 나서, 수층(하부 수준)을 또한 주사기 밖으로 배출시킨다. 이 식을 위해 대부분 지방 이식물로 구성된 중간층을 사용한다.

[0028] 본 발명의 적용분야:

[0029] 미용적 유방 충전: 채취한 지방 조직을 채취된 체외 확장 ASC와  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비, 바람직하게는  $1.0 \times 10^5$  내지  $2.0 \times 10^7$  지방의 비로 혼합하고 나서, 미용적 확대를 위해 유방 내로 분취물(aliquot)로서 주사한다.

[0030] 주사 기법의 예:

[0031] 유방 조직 밖 구조가 손상되는 것을 피하기 위해 풍부화된 지방 이식물을 수평으로(신체에 평행) 긴 바늘을 이용하여 유방에 주사한다. 유륜 가장자리 주위의 몇몇 지점으로부터 그리고 가변 방향 및 면으로 유선하 주름의 몇몇 지점에 바늘을 삽입하여 이식물의 균일하고 자연스럽게 생기는 분포를 달성한다.

[0032] 안면 충전 및 주름 보정에 대해: 채취한 지방 조직을 표준 충전에 대해 채취된 체외 확장 ASC와  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비, 바람직하게는  $1.0 \times 10^5$  내지  $2.0 \times 10^7$  지방의 비로 혼합한다. 필요한 충전의 양에 따라서 줄기 세포의 양을 증가시킬 것이며, 더 적은 충전은 더 고농도의 ASC를 필요로 한다. 목적으로 하는 효과가 순수하게 조직 품질 개선 문제라면, ASC만을 사용할 것이고, 세포를 균일하게 분포시키기 위해 PBS 중에 용해할 것이다.

[0033] 주사 기법의 예:

[0034] 필터로서 사용될 때, 지방 이식물은 표적 면적 밖 구조를 손상시키는 것을 피하기 위해 수평으로(표면과 평행) 긴 바늘을 이용하여 분취물로서 주사된다. 이식물의 균일하고 자연스럽게 나타나는 분포를 달성하기 위해 바늘을 몇몇 지점으로부터 그리고 가변적 방향과 평면으로 삽입한다.

[0035] 순수하게 조직 품질 개선을 위해 사용할 때, 용해된 ASC는 얇고 뾰족한 바늘을 이용하여 진피 및 피하에 주사되고, 표적 면적 내에서 균일하게 분포된다.

[0036] 절개 및 주사 부위를 봉합하고, 수술 후 압박 가먼트(postoperative compression garment)를 공여 부위에 그리고 일부 경우에 또한 수용 부위에 적용한다.

[0037] 본 발명의 임상적 이점 및 신규성

[0038] ASC(체외 확장) 풍부화된 지방 이식물 또는 ASC만은 결코 유방 또는 안면에서 주사용으로 임상적으로 사용된 적이 없으며, 결코 문헌에 기재된 적도 없고 본 발명자들이 미국 특허 제61/839,578호의 특허 출원 전에 다른 사람들과 이들 임상 용도의 생각을 공유한 적도 없다. 지방 이식물의 생착 및 품질을 개선시키기 위해 체외 확장 ASC를 이용하는 풍부화 지방 이식물의 생각은, 상기 언급한 바와 같이 본 발명의 임상 용도가 결코 입증된 적이 없다고 해도(즉, 미용적 유방 충전 및 안면 충전), 뮤린 모델<sup>3</sup>에서 그리고 인간<sup>4</sup>에서 개념 연구의 최근의 증거에서 입증되었다. 본 발명(즉, 안면 충전/회생 및 미용적 유방 충전/확대의 목적을 위해 체외 확장된 ASC의 적용)은 전통적인 소위 "세포 보조 지방-충전"에 대해 비확장 ASC의 소분획을 포함하는 새로 단리된 SVF의 용도와 상당히 상이하다는 것을 강조하여야 한다. 본 방법은 문헌에 기재되었고, 전통적인 지방 충전물보다 상당히 양호하지 않은 예측가능하지 않은 임상 결과로 인간에게 적용되었다<sup>8</sup>. 안면 충전을 위해 체외 확장 ASC를 이용하는 것에 대한 이유는 지방 세포와 대조적으로 주사 후에 줄기세포가 생존한다는 것을 입증한 상기 언급한 연구에 의해 뒷받침된다. 추가적으로, ASC는 저산소증 및 물리적 노출에 대해 매우 저항성이다<sup>9-11</sup>. 충전 재료로서 줄기 세포만을 이용함으로써, 믿을 수 있는 잔여 볼륨/확대가 달성될 수 있다.

[0039] 인공 재료의 부작용을 피하여 자연스러운 외관, 비면역원성을 포함하는 생체에 적합한 지속 가능한 유방 및 안면 필터를 제조하는 것으로부터의 다수의 임상적 이점이 있으며, 절차는 자가이식일 수 있다. 대부분의 환자는 복부, 대퇴부, 팔 및 궁둥이 상에 천연 지방을 보존하는데, 이를 사용할 수 있다. 이런 방법으로, 환자는 맞춤형의 목적으로 하는 신체 재조각(re-sculpturing)을 얻는다. 자가 지방조직은 간단한 지방 흡입술에 의해 그리고 후속 주사에 의해 용이하게 이식될 수 있으며, 환자에 대해 불편함이 거의 없고 부작용의 위험이 거의 없다.

- [0040] **실시예**
- [0041] **연구 결과 - 개념 연구의 증거**(예를 들어, 문헌[Kolle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 2013; 382: 1113-20]에 기재한 연구 설계와 유사함):
- [0042] **연구 목적:**
- [0043] 고용량의 자가 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)가 풍부한 지방 이식물을 비풍부화 지방 이식물(통상적인 지방이식물)과 비교한다.
- [0044] **연구 설계:**
- [0045] 정제된 지방 이식물(ASC 풍부화가 있는 것과 없는 것(대조군))을 각각의 참가자에 대해 준비한다. 지방 이식물을 피하로 주사한다.
- [0046]  $20 \times 10^6$  ASC/ml의 농도의 풍부화된 지방 이식물을 선택한다 - 대략 2,000배 생리학적 수준.
- [0047] 주사한 지방 이식물의 용적을 주사 직후에 그리고 121일 후에 자기 공명 영상화(magnetic resonance imaging: MRI)에 의해 측정하고, 기준 MRI와 비교한다.
- [0048] **결과:**
- [0049] 대조군 이식물에 비해, ASC-풍부화된 지방 이식물은 상당히 더 높은 잔여 용적을 가진다. 심각한 유해 사건은 관찰되지 않았다.
- [0050] **양태:**
- [0051] 상기에 따르면, 본 발명을 다음의 양태에 의해 추가로 기재할 수 있으며, 이때, 줄기 세포에 대한 언급은 달리 반대로 구체화되지 않는 한, 자가 세포와 동종이계 세포 둘 다에 대한 언급으로서 이해되어야 한다.
- [0052] 1. 유방 충전 방법에서 사용하기 위한 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물.
- [0053] 2. 안면 충전 방법에서 사용하기 위한 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포.
- [0054] 3. 채취된 지방 조직과 혼합된 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 확장 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비로 포함하는 조성물.
- [0055] 4. 유방 충전을 위한 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물의 용도.
- [0056] 5. 안면 충전을 위한 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포의 용도.
- [0057] 6. 유방 충전제로서 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물의 용도.
- [0058] 7. 안면 충전제로서 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포의 용도.
- [0059] 8. 미용적 유방 충전을 위한 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포의 용도.
- [0060] 9. 미용적 유방 충전을 위한 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포의 용도.
- [0061] 10. 노화 징후의 치료를 위한 의약의 제조에서 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포의 용도.
- [0062] 11. 유방 충전 방법으로서, 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 풍부화 지방 이식물을 채취된 지방 조직과  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비로 혼합하되, 상기 지방은 이식물의 균일하고 자연스럽게 생기는 분포를 달성하기 위해 유통 가장자리 주위의 몇몇 지점으로부터 그리고 가변 방향 및 면으로 유선하 주름의 몇몇 지점에 바

늘을 삽입함으로써 수평으로(신체와 평행) 긴 바늘을 이용하여 분취물로서 또는 스트링(string)으로서 주사하는, 유방 충전 방법.

- [0063] 12. 안면 충전 방법으로서, 세포를 균일하게 분포시키기 위해 확장된 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를 채취된 지방 조직과  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비로 혼합하거나 또는 PBS 중에 용해시키되, 지방 이식물은 표적 면적 밖 구조를 손상시키는 것을 피하기 위해 수평으로(표면에 평행) 긴 바늘을 이용하여 분취물로서 또는 스트링으로서 주사되고, 이식물의 균일하고 자연스럽게 생기는 분포를 달성하기 위해 바늘을 몇몇 지점으로부터 그리고 다양한 방향 및 면으로 삽입하는, 안면 충전 방법.
- [0064] 13. 안면 충전 방법으로서, 세포를 균일하게 분포시키기 위해 확장된 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를 채취된 지방 조직과  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비로 혼합하거나 또는 PBS 중에 용해시키되, 용해시킨 ASC는 얇고 뾰족한 바늘을 이용하여 진피 내로 주사되며, 표적 면적 내에서 균일하게 분포되고, 절개 및 주사 부위는 봉합되고, 수술후 압박 가먼트는 공여 부위에 그리고 일부 경우에 또한 수용 부위에 적용되는, 안면 충전 방법.
- [0065] 14. 미용적 유방 충전 방법으로서, 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 풍부화 지방 이식물을 채취한 지방 조직과  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비로 혼합하되, 상기 지방은 이식물의 균일하고 자연스럽게 생기는 분포를 달성하기 위해 유륜 가장자리 주위의 몇몇 지점으로부터 그리고 가변 방향 및 면으로 유선하 주름의 몇몇 지점에 바늘을 삽입함으로써 수평으로(신체와 평행) 긴 바늘을 이용하여 분취물로서 또는 스트링으로서 주사하는, 미용적 유방 충전 방법.
- [0066] 15. 미용적 안면 충전 방법으로서, 세포를 균일하게 분포시키기 위해 확장된 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를 채취된 지방 조직과  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비로 혼합하거나 또는 PBS 중에 용해시키되, 상기 지방 이식물은 표적 면적 밖의 구조를 손상시키는 것을 피하기 위해 수평으로(표면에 평행) 긴 바늘을 이용하여 분취물로서 또는 스트링으로서 주사되고, 상기 바늘은 이식물의 균일하고 자연스럽게 생기는 분포를 달성하기 위해 몇몇 지점으로부터 그리고 가변 방향 및 면으로 삽입되는, 미용적 안면 충전 방법.
- [0067] 16. 미용적 안면 충전 방법으로서, 세포를 균일하게 분포시키기 위해 확장된 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를 채취된 지방 조직과  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비로 혼합하거나 또는 PBS 중에 용해시키되, 용해시킨 ASC는 얇고 뾰족한 바늘을 이용하여 진피 내에 주사되며 표적 면적에서 균일하게 분포되고, 절개 및 주사 부위는 봉합되며, 수술후 압박 가먼트가 공여 부위에 그리고 일부 경우에 또한 수용 부위에 적용되는, 미용적 안면 충전 방법.
- [0068] 17. 피부에 제제를 도입하는 미용적 방법으로서, 제제는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포를 포함하는, 피부에 제제를 도입하는 미용적 방법.
- [0069] 18. 피부에 제제를 도입하는 미용적 방법으로서, 상기 제제는 채취된 지방 조직과 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비로 혼합하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0070] 19. 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포 풍부화 지방 이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포의 사용에 의한 피부의 지방 충전 방법.
- [0071] 20. 채취된 지방 조직과 혼합된 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC) 풍부 지방이식물 또는 체외 확장 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를  $5.0 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^8$  ASC/ml 지방의 비로 포함하는 조성물의 사용에 의한 피부의 지방 충전 방법.

[0072] 참고문헌

- 1 Leuchter I, Schweizer V, Hohlfeld J, Pasche P. Treatment of velopharyngeal insufficiency by autologous fat injection. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267: 977-83.
- 2 Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg* 2001; 28: 111-9.
- 3 Lu F, Li J, Gao J, et al. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2009; 124: 1437-46.
- 4 Kolle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2013; 382: 1113-20.
- 5 Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 2008; 32: 48-55.
- 6 Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 2006; 12: 3375-82.
- 7 Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* 2007; 47: 1436-46.
- 8 Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, et al. Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2013; 66: 1494-503.
- 9 Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109: 1292-8.
- 10 Rasmussen JG, Frobert O, Pilgaard L, et al. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy* 2010.
- 11 Thangarajah H, Vial IN, Chang E, et al. IFATS collection: adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia. *Stem Cells* 2009; 27: 266-74.

[0073]

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

채취된 지방 조직과 혼합된 체외(ex-vivo) 확장 1차 배양(P0) 지방조직-유래 줄기 세포(adipose tissue-derived stem cell: ASC)를 포함하는 조성물의 제조방법으로서,

- 돌베코 변형 이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) 또는 알파 최소 필수 배지( $\alpha$ -MEM), 1 내지 5% 페니실린-스트렙토마이신, 1 내지 5 IU/ml 무보존제 헤파린 및 2 내지 20% 풀링 인간 혈소판 용해물(pooled Human Platelet Lysate: pHPL)로 이루어진 성장 배지에서 단리된 기질 혈관 분획(Stromal vascular fraction: SVF)으로부터 상기 ASC를 체외 확장시키는 단계,

- 상기 1차 계대(P0)에서 상기 ASC를 채취하는 단계, 및
  - 상기 ASC를, 별도의 지방 흡입 절차로부터 취득되는 채취된 지방 조직과, 상기 지방 조직의 ml 당  $20 \times 10^6$  내지  $20 \times 10^7$  ASC의 비( $20 \times 10^6$  내지  $20 \times 10^7$  ASC/ml 지방 조직)로 혼합하는 단계를 포함하는, 조성물의 제조방법.

**【변경후】**

채취된 지방 조직과 혼합된 체외(ex-vivo) 확장 1차 계대배양(P0) 지방조직-유래 줄기 세포(adipose tissue-derived stem cell: ASC)를 포함하는 조성물의 제조방법으로서,

- 돌베코 변형 이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) 또는 알파 최소 필수 배지( $\alpha$ -MEM), 1 내지 5% 페니실린-스트렙토마이신, 1 내지 5 IU/ml 무보존제 헤파린 및 2 내지 20% 풀링 인간 혈소판 용해물(pooled Human Platelet Lysate: pHPL)로 이루어진 성장 배지에서 단리된 기질 혈관 분획(Stromal vascular fraction: SVF)으로부터 상기 ASC를 체외 확장시키는 단계,

- 상기 1차 계대배양(P0)에서 상기 ASC를 채취하는 단계, 및
  - 상기 ASC를, 별도의 지방 흡입 절차로부터 취득되는 채취된 지방 조직과, 상기 지방 조직의 ml 당  $20 \times 10^6$  내지  $20 \times 10^7$  ASC의 비( $20 \times 10^6$  내지  $20 \times 10^7$  ASC/ml 지방 조직)로 혼합하는 단계를 포함하는, 조성물의 제조방법.

**【직권보정 2】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 청구항 2

**【변경전】**

별도의 지방 흡입 절차로부터 취득되는 채취된 지방 조직과 혼합된 체외 확장 1차 배양(P0) 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를 적어도  $20 \times 10^6$  내지  $20 \times 10^7$  ASC/ml 지방 조직의 비로 포함하는 조성물로서, 상기 체외 확장 1차 배양(P0) 지방조직-유래 줄기 세포(adipose tissue-derived stem cell: ASC)를 돌베코 변형 이글배지(DMEM) 또는 알파 최소 필수 배지( $\alpha$ -MEM), 1 내지 5% 페니실린-스트렙토마이신, 1 내지 5 IU/ml 무보존제 헤파린 및 2 내지 20% 풀링 인간 혈소판 용해물(pHPL)로 이루어진 성장 배지에서 배양시키고, 1차 계대(P0)에서 채취한, 조성물.

**【변경후】**

별도의 지방 흡입 절차로부터 취득되는 채취된 지방 조직과 혼합된 체외 확장 1차 계대배양(P0) 지방조직-유래 줄기 세포(ASC)를 적어도  $20 \times 10^6$  내지  $20 \times 10^7$  ASC/ml 지방 조직의 비로 포함하는 조성물로서, 상기 체외 확장 1차 계대배양(P0) 지방조직-유래 줄기 세포(adipose tissue-derived stem cell: ASC)를 돌베코 변형 이글배지(DMEM) 또는 알파 최소 필수 배지( $\alpha$ -MEM), 1 내지 5% 페니실린-스트렙토마이신, 1 내지 5 IU/ml 무보존제 헤파린 및 2 내지 20% 풀링 인간 혈소판 용해물(pHPL)로 이루어진 성장 배지에서 배양시키고, 상기 1차 계대배양(P0)에서 채취한, 조성물.