

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 2월 15일 (15.02.2018) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2018/030720 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/079 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/008466
- (22) 국제출원일: 2017년 8월 4일 (04.08.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0101954 2016년 8월 10일 (10.08.2016) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정내, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 주천기 (JOO, Choun Ki); 06695 서울시 서초구 방배로 63, 201동 504호, Seoul (KR). 목지원 (MOK,

Jeon Won); 06291 서울시 강남구 삼성로 151, 2동 1103호, Seoul (KR). 주희정 (JU, Hee Jung); 06727 서울시 서초구 효령로 72길 33, Seoul (KR). 최준섭 (CHOI, Jun Sub); 17027 경기도 용인시 처인구 포곡읍 둔전로 15, 108동 401호, Gyeonggi-do (KR).

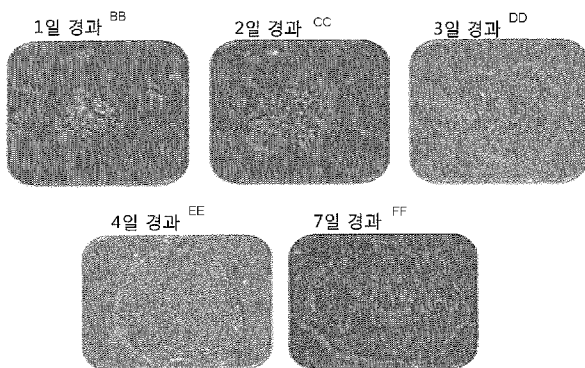
(74) 대리인: 특허법인 광장리앤코 (LEE & KO IP); 04532 서울시 중구 남대문로 63, 25층, Seoul (KR).

(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,

(54) Title: METHOD AND SYSTEM FOR CULTURING CORNEAL STEM CELL-LIKE CELL LINE BY INDUCING DIFFERENTIATION OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL USING PROTEIN LIGAND

(54) 발명의 명칭: 단백질 리간드를 이용하여 유도만능줄기세포의 분화를 유도하는 각막 줄기세포 유사 세포주를 배양하는 방법 및 시스템

실시예 1의 피더 비포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포 AA



AA ... Induced pluripotent stem cell cultured in feeder-free culture medium of embodiment 1
BB ... One day elapsed
CC ... Two days elapsed
DD ... Three days elapsed
EE ... Four days elapsed
FF ... Seven days elapsed

(57) Abstract: The present invention provides a method for culturing a corneal stem cell-like cell line by inducing the differentiation of an induced pluripotent stem cell, the method comprising the steps of: preparing a basal medium comprising DMEM F12, L-ascorbic acid, sodium selenite and sodium chloride; adding, to the basal medium, an additive for culturing an induced pluripotent stem cell; producing a feeder-free culture medium by coating the basal medium with a vitronectin recombinant human protein; adding, to the feeder-free culture medium, an induced pluripotent stem cell and culturing same; adding, to the feeder-free culture medium, an additive for creating an environment for stem cell growth; consecutively adding BMP4 and Wnt3a to the feeder-free culture medium in order to induce the differentiation of the induced pluripotent stem cell into a corneal stem cell-like cell line; and culturing, in a PI culture fluid, the cell differentiated from the induced pluripotent stem cell.

(57) 요약서: 본 발명은 유도만능줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cell)의 분화를 유도하여 각막 줄기세포 유사 세포주를 배양하는 방법으로서, DMEM F12, L-아스코르브산, 아셀렌산 나트륨(Sodium selenite), 및 염화 나트륨을 포함하는 기본 배지를 준비하는 과정; 상기 기본배지에 유도만능줄기세포 배양용 첨가제를 첨가하는 과정; 상기 기본배지에 비트로넥틴 재조합 인간 단백질을 코팅하여 피더 비포함 배지(feeder free culture medium)를 제조하는 과정; 상기 피더 비포함 배지에 유도만능줄기세포를 첨가하여 배양하는 과정; 상기 피더 비포함 배지에 줄기세포 성장 환경 조성용 첨가제를 첨가하는 과정; 상기 유도만능줄기세포를 각막 줄기세포 유사 세포주로 분화하도록 유도하기 위해, 피더 비포함 배지에 BMP4 및 Wnt3a를 순차적으로 첨가하는 과정; 및 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI 배양액에서 배양하는 과정;을 포함하는 방법을 제공한다.

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 역
내 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), 유
럽 (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: 단백질 리간드를 이용하여 유도만능줄기세포의 분화를 유도하는 각막 줄기세포 유사 세포주를 배양하는 방법 및 시스템

기술분야

- [1] 본 발명은 단백질 리간드를 이용하여 유도만능줄기세포의 분화를 유도하는 각막 줄기세포 유사 세포주를 배양하는 방법 및 시스템에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 줄기세포는 우리 몸을 구성하는 모든 세포로 분화될 수 있는 만능세포를 의미한다. 이론적으로 줄기세포는 모든 세포로 분화될 수 있으며, 이들의 분화 메커니즘을 이해하고 원하는 세포로 분화시킨다면, 각종 신체 장기를 복원 또는 재생하는 것이 가능하다.
- [3] 다만, 줄기세포는 생체에 이식되면 스스로 증식하고 분화하여 암세포화 되는 성질을 가지고 있기 때문에, 줄기세포 자체를 조직의 재생이나 치료에 사용할 수는 없다.
- [4] 또한, 세포주화 된 유도만능줄기세포(iPSC)는 배양하는 기간이 길수록, 세대 배양하는 횟수가 많아 질수록 줄기세포의 능력이 감소되며, 원하지 않는 세포로 분화되거나 사멸될 가능성이 높아져 기대 효과가 저하된다.
- [5] 따라서, 유도만능줄기세포를 줄기세포의 성격을 계속 유지시키며 배양할 수 있고, 분화될 세포에 가장 적합한 상태로 배양하여, 줄기세포를 원하는 세포로 분화시키는 비율을 향상시킬 수 있는 기술에 대한 필요성이 높은 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점과 과거로부터 요청되어온 기술적 과제를 해결하는 것을 목적으로 한다.
- [7] 본 출원의 발명자들은 심도 있는 연구와 다양한 실험을 거듭한 끝에, 이후 설명하는 바와 같이, 유도만능줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cell)의 분화를 유도하여 각막 줄기세포 유사 세포주를 배양하는 방법으로서, 기본배지에 비트로넥틴 재조합 인간 단백질을 코팅하여 피더 비포함 배지(feeder free culture medium)를 제조하고, 피더 비포함 배지에서 유도만능줄기세포를 배양한 후, BMP4 및 Wnt3a를 순차적으로 첨가하여 유도만능줄기세포를 각막 줄기세포 유사 세포주로 분화하도록 유도하는 경우, 각막 이식 시 면역 반응이 낮은 세포를 제공할 수 있고, 각막 줄기세포 유사 세포주로의 분화능이 향상되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제 해결 수단

- [8] 따라서, 본 발명에 따른 유도만능줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cell, iPSC)의 분화를 유도하여 각막 줄기세포 유사 세포주를 배양하는 방법은,
- [9] DMEM F12, L-아스코르브산, 아셀렌산 나트륨(Sodium selenite), 및 염화 나트륨을 포함하는 기본 배지를 준비하는 과정;
- [10] 상기 기본배지에 유도만능줄기세포 배양용 첨가제를 첨가하는 과정;
- [11] 상기 기본배지에 비트로넥틴 재조합 인간 단백질을 코팅하여 피더 비포함 배지(feeder free culture medium)를 제조하는 과정;
- [12] 상기 피더 비포함 배지에 유도만능줄기세포를 첨가하여 배양하는 과정;
- [13] 상기 피더 비포함 배지에 줄기세포 성장 환경 조성용 첨가제를 첨가하는 과정;
- [14] 상기 유도만능줄기세포를 각막 상피 세포로 분화하도록 유도하기 위해, 피더 비포함 배지에 BMP4 및 Wnt3a를 순차적으로 첨가하는 과정; 및
- [15] 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI 배양액에서 배양하는 과정;을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [16] 하나의 구체적인 예에서, 상기 유도만능줄기세포 배양용 첨가제는 홀로 트랜스페린(Holo transferrin), bFGF, TGF 베타1, 및 인슐린을 포함할 수 있다.
- [17] 하나의 구체적인 예에서, 상기 줄기세포 성장 환경 조성용 첨가제는 EGF 및 인슐린을 포함할 수 있다.
- [18] 하나의 구체적인 예에서, 상기 BMP4 및 Wnt3a를 순차적으로 첨가하는 과정에서, BMP4를 첨가하고 약 2일 내지 4일간 처리 후, Wnt3a를 첨가할 수 있고, 상세하게는 BMP4를 첨가하고 약 3일간 처리 후 Wnt3a를 첨가할 수 있다
- [19] 하나의 구체적인 예에서, 상기 BMP4 및 Wnt3a를 순차적으로 첨가하는 과정에서, Wnt3a를 첨가하고 약 2일 내지 4일간 처리할 수 있고, 상세하게는 Wnt3a를 첨가하고 약 3일간 처리할 수 있다.
- [20] 하나의 구체적인 예에서, 상기 PI 배양액은 판세린(Panserin):이소코브 미디어(Isocove Media)를 중량을 기준으로 2:1 내지 1:2, 상세하게는 1:1로 포함할 수 있다.
- [21] 하나의 구체적인 예에서, 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI 배양액에서 1주 내지 3주 동안 배양할 수 있다.
- [22] 하나의 구체적인 예에서, 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI 배양액에서 배양 후, 계대 배양하는 과정을 더 포함할 수 있다.
- [23] 하나의 구체적인 예에서, 상기 계대 배양 시, 계대 배양액은 에피 미디어(Epi media), FBS, 히드로코르티손, 인슐린, 콜레라독소(choleratoxin), 및 EGF를 포함할 수 있다.
- [24] 하나의 구체적인 예에서, 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI 배양액에서 3주 동안 배양한 후 계대 배양할 수 있다.
- [25] 본 발명은 또한, 유도만능줄기세포의 분화를 유도하여 각막 줄기세포 유사 세포주를 배양하는 시스템을 제공한다.
- [26] 상기 시스템은, DMEM F12, L-아스코르브산, 아셀렌산 나트륨, 및 염화

나트륨을 포함하는 기본 배지에 유도만능줄기세포 배양용 첨가제를 첨가하고, 비트로넥틴 재조합 인간 단백질을 코팅하여 제조된 피더 비포함 배지;

- [27] 상기 피더 비포함 배지에서 배양된 유도만능줄기세포;
- [28] 상기 피더 비포함 배지에 첨가되는 줄기세포 성장 환경 조성용 첨가제;
- [29] 상기 피더 비포함 배지에서 배양된 유도만능줄기세포 및 줄기세포 성장 환경 조성용 첨가제가 포함된 배지에 유도만능줄기세포를 각막 줄기세포 유사 세포주로 분화하도록 유도하기 위해 순차적으로 첨가되는 BMP4 및 Wnt3a; 및
- [30] 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 배양하기 위한 PI배양액;을 포함할 수 있다.
- [31] 하나의 구체적인 예에서, 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI 배양액에서 배양 후, 계대 배양하기 위한 계대 배양액을 더 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 실시예 1의 피더 비포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포를 시간 경과에 따라 촬영한 사진이다;
- [33] 도 2는 비교예 1의 피더 포함 배지에서 7일간 배양한 유도만능줄기세포를 촬영한 사진이다;
- [34] 도 3 및 도 4는 실시예 1의 피더 비포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포를 비분화 iPSC 마커로 면역염색하고, 단백질 발현 배열(array)을 사용한 결과를 촬영한 사진이다;
- [35] 도 5 내지 도 8은 실시예 1에 대한 마커의 발현 상태를 촬영한 사진이다;
- [36] 도 9는 실시예 1의 Wnt3a 처리 후 PI 배양액에서 1주 동안 배양한 세포에 대해, Air Lift를 3주간 수행한 결과를 촬영한 사진이다;
- [37] 도 10은 마커 Pax6, CK3, 및 Hoechst를 사용하여, 실시예 1 및 실시예 2에서 계대 배양된 세포들의 증식율을 측정한 사진이다;
- [38] 도 11은 실시예 1의 계대 배양액에서 배양한 각막 상피 줄기 세포를 Air Lift 배양한 결과를 촬영한 사진이다.
- [39]

발명의 실시를 위한 형태

- [40] 이하에서는, 본 발명의 실시예를 참조하여 설명하지만, 이는 본 발명의 더욱 용이한 이해를 위한 것으로, 본 발명의 범주가 그것에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [41]
- [42] <실시예 1>
- [43] 유도만능줄기세포를 배양하기 위하여, DMEM F12, L-아스코르브산, 아셀렌산 나트륨, 및 염화 나트륨을 포함하는 기본 배지를 준비하고, pH 7.4로 조절하였다. 기본배지에 유도만능줄기세포 배양용 첨가제로서 홀로 트랜스페린을 10 $\mu\text{g/ml}$, bFGF을 100 ng/mL, TGF 베타1을 1.74ng/ml, 및 인슐린을 20 $\mu\text{g/ml}$ 첨가하였다.

- [44] 피더(feeder)를 사용하여 줄기세포를 배양하는 경우, 분화된 각막 상피 세포를 이식 시 면역 반응이 문제될 수 있으므로, 피더를 사용하지 않는 피더 비포함 배지를 제조하기 위하여, 기본배지에 비트로넥틴 재조합 인간 단백질(Vitronectin Recombinant Human Protein)을 코팅하고, 다음으로 유도만능줄기세포를 7일간 배양하였다.
- [45] 비트로넥틴 재조합 인간 단백질 코팅은 다음의 과정을 통해 실시하였다. 6 well plate 배양 용기 기준으로, 9 ml의 DPBS(Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 가 없는 Phosphate buffered Saline)에 60 μl 의 비트로넥틴 재조합 인간 단백질 (50 $\mu\text{g/ml}$)을 투입하여 희석하고, 이를 각 well에 1.5 ml 넣고, 건조하지 않게 한 다음, 냉장상태 (약 4°C)에서 12시간 반응시켰다. 이후, 1시간 동안 실온에서 반응 시키고, PBS로 세척하였다.
- [46] 배양된 유도만능줄기세포를 각막 상피 세포로 분화시키기 위해, 우선, 피더 비포함 배지에 줄기세포 성장 환경 조성용 첨가제로서, EGF를 10 ng/ml 및 인슐린을 5 $\mu\text{g/ml}$ 첨가하였다.
- [47] 다음으로, 외배엽 프로지니터(ectoderm progenitors)를 초기에 유도하기 위하여 BMP4를 100 ng/ml 첨가하고 3일간 처리하였고, 다음으로 각막 줄기세포 유사 세포주로 분화를 위하여 Wnt3a를 100 ng/ml 첨가하고 3일간 처리하였다.
- [48] 다음으로, 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 판세린:이소코브 미디어를 중량을 기준으로 1:1로 혼합한 PI 배양액에서 약 1주 내지 3주 동안 배양하였다.
- [49] PI 배양액에서 약 1주 내지 3주 동안 배양한 세포들을 계대 배양하였다. 계대 배양액은 DMEM:F12를 중량을 기준으로 3:1로 혼합한 에피 미디어에, FBS (Fetal Bovine Serum, 소태아혈청)를 중량을 기준으로 5%로 첨가하고, 히드로코르티손을 50 ng/ml, 인슐린을 5 $\mu\text{g/ml}$, 콜레라독소를 30 ng/ml, 및 EGF를 10 ng/ml 포함하도록 제조하여 사용하였다.
- [50]
- [51] <실시예 2>
- [52] 실시예 1에서 계대 배양액을 PI 배양액과 동일한 조성으로 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 배양하였다.
- [53]
- [54] <비교예 1>
- [55] 유도만능줄기세포를 배양하기 위하여, DMEM F12, L-아스코르브산, 아셀렌산 나트륨, 및 염화 나트륨을 포함하는 기본 배지를 준비하고, pH 7.4로 조절하였다. 기본배지에 유도만능줄기세포 배양용 첨가제로서 홀로 트랜스페린을 10 $\mu\text{g/ml}$, bFGF를 100 ng/mL, TGF 베타1을 1.74ng/ml, 및 인슐린을 20 $\mu\text{g/ml}$ 첨가하였다. 피더로서 MMC (mitomycin C) 처리한 MEF (mouse embryonic fibroblast) 피더를 25,000 cells/cm² 첨가하고, 다음으로 유도만능줄기세포를 배양하였다.
- [56]
- [57] <실험예 1>

- [58] 실시예 1의 피더 비포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포와, 비교예 1의 피더 포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포의 배양 상태를 관찰하였다. 그 결과를 촬영한 사진을 도 1 및 도 2에 나타내었다.
- [59] 도 1은 실시예 1의 피더 비포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포를 시간 경과에 따라 촬영한 사진이고, 도 2는 비교예 1의 피더 포함 배지에서 7일간 배양한 유도만능줄기세포를 촬영한 사진이다.
- [60] 도 1 및 도 2를 참조하면, 실시예 1의 피더 비포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포가 비교예 1의 피더 포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포에 비해, 콜로니를 명확하게 형성하고 있음을 확인할 수 있고, 이는 실시예 1의 유도만능줄기세포가 크기와 형태가 균일한 상태로 배양된 것으로 볼 수 있다.
- [61]
- [62] <실험예 2>
- [63] 실시예 1의 피더 비포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포를 비분화 iPSC 마커인 SOX2, OCT4A, SSEA4, TRA-1-81, TRA1-60S로 면역염색하고, 단백질 발현 배열을 사용하여 확인하였다. 그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.
- [64] 우선, 도 3을 참조하면, 배양된 유도만능줄기세포(iPSC)에서 줄기세포 특성이 있음을 나타내는 단백질 마커인 TRA-1-81, TRA1-60S, SSEA4, OCT4A의 발현 유무를 확인하였다.
- [65] 다음으로, 도 4를 참조하면, 배양된 유도만능줄기세포에서 단백질을 분리하고, 단백질 발현 양상을 비교하기 위하여 줄기세포 마커에 대한 protein array를 실시하였고, 줄기세포의 마커인 SOX2, OT 3/4의 발현을 확인하였다.
- [66]
- [67] <실험예 3>
- [68] 실시예 1의 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포로부터 분화된 세포를, PI 배양액에서 배양 전 및 3주간 배양한 후에 대하여 각각, 각막 줄기세포 마커 (ABCG2, Δ Np63, Pax6, CK14) 및 각막 상피 세포 마커 (CK3, CK12)로 발현 상태를 분석하였다.
- [69] 그 결과, 실시예 1의 경우, Wnt3a를 처리하여 3주간 배양 시 각막 줄기세포 마커인 ABCG2 및 Δ Np63와 각막 상피 세포 마커인 CK3 및 CK12가 모두 관찰되었다. 실시예 1에 대한 마커의 발현 상태를 촬영한 사진을 도 5 내지 도 8에 나타내었다.
- [70] 도 7 및 도 8을 참조하면, Wnt3a 처리 후 3주 동안 배양된 줄기세포(iPSC)에서 CK14, Pax6를 확인한 결과 두 단백질이 발현되었음을 알 수 있다. 또한, Wnt3a를 처리한 배양된 줄기세포(iPSC)에서 각막 상피 줄기세포의 마커인 ABCG2의 발현은 일부 감소하였으나 각막 상피 세포 분화 마커인 CK3의 발현은 증가하였음을 알 수 있다.
- [71]

[72] <실험예 4>

[73] 실시예 1의 유도만능줄기세포로부터 분화된 각막 상피 줄기세포의 각막 상피세포 분화 능력을 확인하기 위한 Air Lift 배양을 실시하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[74] 도 9를 참조하면, 실시예 1의 Wnt3a 처리 후 PI 배양액에서 1주 동안 배양한 세포에 대해, Air Lift를 3주간 수행한 결과 약 3층 내지 4층의 각막 상피 세포층이 형성되었음을 확인할 수 있었다.

[75]

[76] <실험예 5>

[77] 실시예 1 및 실시예 2에서 계대 배양된 세포들의 증식률을 측정하였다. 마커 Pax6, CK3, 및 Hoechst를 사용하였고, 그 결과를 도 10에 나타내었고, 에피 미디어를 포함하는 계대 배양액을 사용한 실시예 1의 결과를 왼쪽에 나타내었고, PI 배양액을 계대 배양액으로 사용한 실시예 2의 결과를 오른쪽에 나타내었다.

[78] 도 10을 참조하면, 에피 미디어를 포함하는 계대 배양액을 사용한 실시예 1의 경우에 더욱 높은 밀집도를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[79] 또한, 계대 배양 이전에 PI 배양액에서 1주, 2주, 및 3주간 배양 후, 각각을 계대 배양하였다. PI 배양액에서 3주간 배양 후 계대 배양한 세포가 각막 상피 세포의 형태를 가장 잘 유지하면서 각막 상피 세포와 각막 상피 줄기세포 마커의 발현을 지속적으로 유지하였다. 이를 통해, 분화율이 70% 이상인 각막 줄기세포 유사 세포주를 얻을 수 있었다.

[80]

[81] <실험예 6>

[82] 에피 미디어를 포함하는 계대 배양액에서 배양한 각막 상피 줄기 세포를 Air Lift 배양한 결과, 다층의 세포층이 형성되었음을 전자현미경을 통해 관찰하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었고, 이를 통해, 다층의 세포층이 형성되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[83]

[84] 이상 본 발명의 실시예를 참조하여 설명하였지만, 본 발명이 속한 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

산업상 이용가능성

[85] 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 유도만능줄기세포의 분화를 유도하여 각막 줄기세포 유사 세포주를 배양하는 방법 및 시스템은, 각막 이식 시 면역 반응이 낮은 각막 상피 세포를 제공할 수 있다.

[86] 본 발명에 따른 방법 및 시스템은 유도만능줄기세포로부터 각막 줄기세포 유사 세포주로의 분화능을 향상시킬 수 있다.

- [87] 본 발명에 따른 방법 및 시스템으로부터 제공되는 각막 상피 줄기세포 유사 세포주는, 각막 상피 세포의 분화 연구 및 각막 질환 치료를 위한 각막 상피 이식 연구에 응용 및 활용할 수 있다.

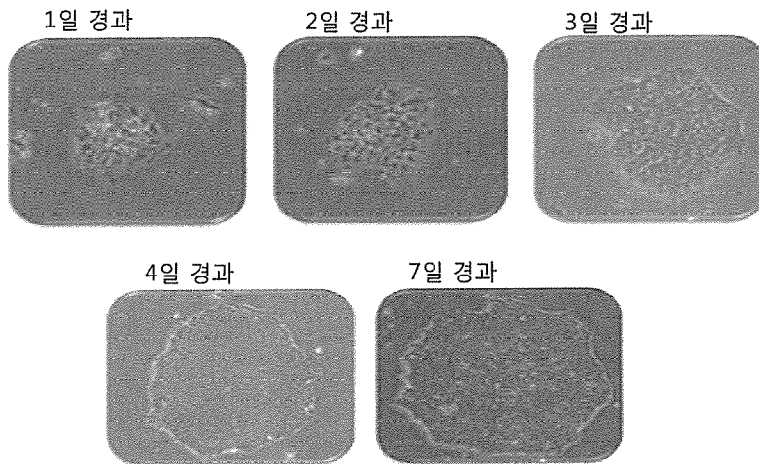
청구범위

- [청구항 1] 유도만능줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cell)의 분화를 유도하여 각막 줄기세포 유사 세포주를 배양하는 방법으로서,
유도만능줄기세포를 각막 줄기세포 유사 세포주로 분화하도록 유도하기 위해, 피더 비포함 배지(feeder free culture medium)에 BMP4 및 Wnt3a를 순차적으로 첨가하는 과정; 및
상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 배양하는 과정;
을 포함하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 각막 상피 세포로 분화를 유도하기 전에,
피더 비포함 배지를 제조하는 과정;
상기 피더 비포함 배지에 유도만능줄기세포를 첨가하여 배양하는 과정;
및
상기 피더 비포함 배지에 줄기세포 성장 환경 조성용 첨가제를 첨가하는 과정을 더 포함하는 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 피더 비포함 배지를 제조하는 과정은,
DMEM F12, L-아스코르브산, 아셀렌산 나트륨(Sodium selenite), 및 염화 나트륨을 포함하는 기본 배지를 준비하는 과정;
상기 기본배지에 유도만능줄기세포 배양용 첨가제를 첨가하는 과정; 및
상기 기본배지에 비트로넥틴 재조합 인간 단백질을 코팅하여 피더 비포함 배지(feeder free culture medium)를 제조하는 과정을 포함하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI 배양액에서 배양하는 방법.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포 배양용 첨가제는 홀로 트랜스페린(Holo transferrin), bFGF, TGF 베타1, 및 인슐린을 포함하는 방법.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 줄기세포 성장 환경 조성용 첨가제는 EGF 및 인슐린을 포함하는 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 BMP4 및 Wnt3a를 순차적으로 첨가하는 과정에서, BMP4를 첨가하고 2일 내지 4일간 처리 후 Wnt3a를 첨가하는 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 BMP4 및 Wnt3a를 순차적으로 첨가하는 과정에서, Wnt3a를 첨가하고 2일 내지 4일간 처리하는 방법.
- [청구항 9] 제4항에 있어서, 상기 PI 배양액은 판세린(Panaserin):이소코브 미디어(Isocove Media)를 중량을 기준으로 2:1 내지 1:2로 포함하는 방법.
- [청구항 10] 제4항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI 배양액에서 1주 내지 3주 동안 배양하는 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI

- 배양액에서 배양 후, 계대 배양하는 과정을 더 포함하는 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 계대 배양 시, 계대 배양액은 에피 미디어(Epi media), FBS, 히드로코르티손, 인슐린, 콜레라독소(choleratoxin), 및 EGF를 포함하는 방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI 배양액에서 3주 동안 배양한 후 계대 배양하는 방법.
- [청구항 14] 유도만능줄기세포의 분화를 유도하여 각막 줄기세포 유사 세포주를 배양하는 시스템으로서,
 DMEM F12, L-아스코르브산, 아셀렌산 나트륨, 및 염화 나트륨을 포함하는 기본 배지에 유도만능줄기세포 배양용 첨가제를 첨가하고,
 비트로넥틴 재조합 인간 단백질을 코팅하여 제조된 피더 비포함 배지;
 상기 피더 비포함 배지에서 배양된 유도만능줄기세포;
 상기 피더 비포함 배지에 첨가되는 줄기세포 성장 환경 조성용 첨가제;
 상기 피더 비포함 배지에서 배양된 유도만능줄기세포 및 줄기세포 성장 환경 조성용 첨가제가 포함된 배지에 유도만능줄기세포를 각막 상피 세포로 분화하도록 유도하기 위해 순차적으로 첨가되는 BMP4 및 Wnt3a 및
 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 배양하기 위한 PI배양액;
 을 포함하는 시스템.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 PI 배양 후, 계대 배양하기 위한 계대 배양액을 더 포함하는 시스템.

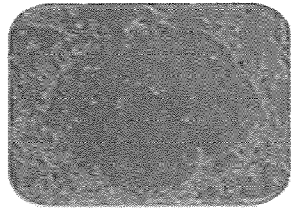
[도1]

실시에 1의 피더 비포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포

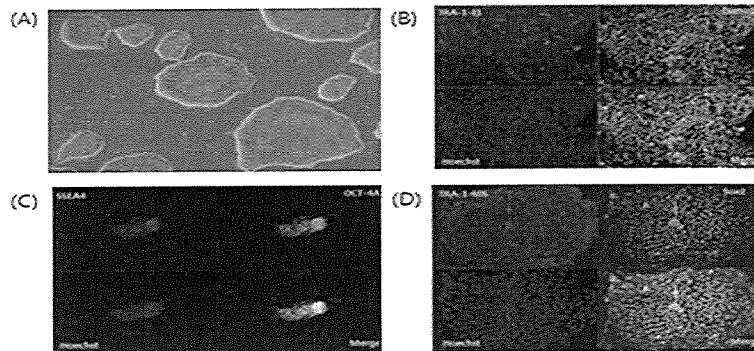


[도2]

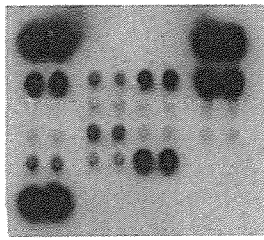
비교예 1의 피더 포함 배지에서 배양한 유도만능줄기세포



[도3]

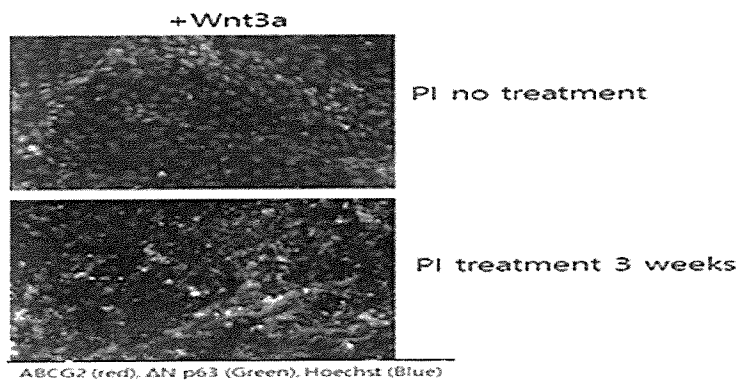


[도4]

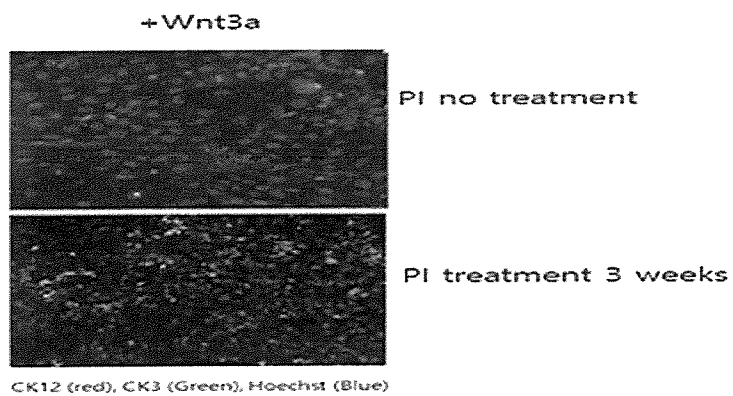


	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Reference Spots	Reference Spots					Reference Spots	Reference Spots
B	Oct-3/4	Oct-3/4	Nanog	Nanog	SOX2	SOX2	E-Cadherin	E-Cadherin
C	α -Fetoprotein (AFP)	α -Fetoprotein (AFP)	GATA-4	GATA-4	HNF-3 β /FoxA2	HNF-3 β /FoxA2	POX-1/PPI1	POX-1/PPI1
D	SOX17	SOX17	Otx2	Otx2	TP63/TP73L	TP63/TP73L	Goosecoid (GSC)	Goosecoid (GSC)
E	Snail	Snail	VEGF R2/KDR/Flk-1	VEGF R2/KDR/Flk-1	HCG	HCG	Negative Control (PBS)	Negative Control (PBS)
F	Reference Spots	Reference Spots						

[도5]



[도6]



[도7]

+Wnt3a



PI culture

PI treatment 3 weeks

CK14 (red), Pax6 (Green), Hoechst (Blue)

[도8]

Wnt3a

- 3w



ABCG2

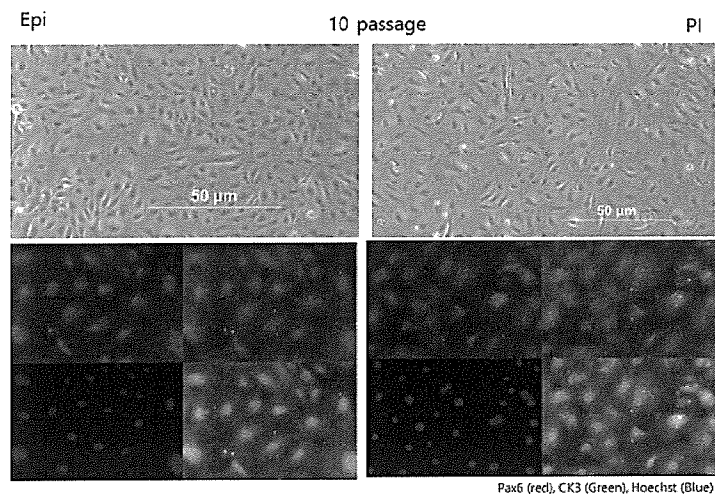


CK3

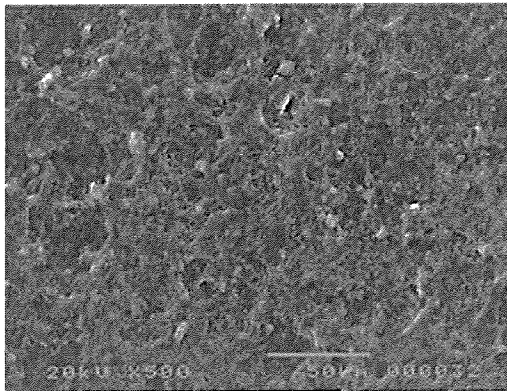
[도9]



[도10]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008466

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/079(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)

C12N 5/079; C12N 5/10; A61K 35/34

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: induced pluripotent stem cell, similar cell strain of cornea stem cell, BMP4, Wnt3a

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE, Hyun Soo et al., ARVO Annual Meeting Abstract: "Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Corneal Limbal Progenitor Cells", Investigative Ophthalmology & Visual Science, April 2014, vol. 55, page 1 See page 1, Method section.	1-15
Y	WO 2016-114285 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 21 July 2016 See claims 1, 3 and 9-12; paragraphs [0010], [0038]-[0041], [0045], [0058] and [0101].	1-15
Y	WO 2015-042356 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES) 26 March 2015 See claims 1, 7 and 9; page 20, lines 5-20.	3,5,14-15
Y	VARGHESE, Viji Mary et al., "Optimization of Culture Conditions for an Efficient Xeno-feeder Free Limbal Cell Culture System towards Ocular Surface Regeneration", Microscopy Research and Technique, 2010, vol. 73, pages 1045-1052 See abstract; pages 1048 and 1050; figure 2; table 1.	4,9-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 10 NOVEMBER 2017 (10.11.2017)	Date of mailing of the international search report 10 NOVEMBER 2017 (10.11.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008466

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DHAMODARAN, Kamesh et al., "One for All: a Standardized Protocol for Ex Vivo Culture of Limbal, Conjunctival and Oral Mucosal Epithelial Cells into Corneal Lineage", Cytotherapy, (Electronic publishing) April 2016, vol. 18, pages 546-561 See page 556, table II.	12
A	LEKHANONT, Kaevalin et al., "A Serum-and Feeder-free Technique of Culturing Human Corneal Epithelial Stem Cells on Amniotic Membrane", Molecular Vision, 30 June 2009, vol. 15, pages 1294-1302 See the entire document.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/008466

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2016-114285 A1	21/07/2016	AU 2016-207513 A1 CA 2973187 A1 KR 10-2017-0092694 A	20/07/2017 21/07/2016 11/08/2017
WO 2015-042356 A1	26/03/2015	US 2016-0230143 A1 US 2016-0340652 A1	11/08/2016 24/11/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/079(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/079; C12N 5/10; A61K 35/34

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: 유도만능줄기세포, 각막 줄기세포 유사 세포주, BMP4, Wnt3a

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	LEE, HYUN SOO 등, ARVO Annual Meeting Abstract: 'Differentiation of human induced pluripotent stem cells into corneal limbal progenitor cells', Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2014.04, 제55권, 1 페이지 페이지 1, Method 섹션 참조.	1-15
Y	WO 2016-114285 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 2016.07.21 청구항 1, 3 및 9-12; 단락 [0010], [0038]-[0041], [0045], [0058] 및 [0101] 참조.	1-15
Y	WO 2015-042356 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES) 2015.03.26 청구항 1, 7 및 9; 페이지 20, 라인 5-20 참조.	3, 5, 14-15
Y	VARGHESE, VIJI MARY 등, 'Optimization of culture conditions for an efficient xeno-feeder free limbal cell culture system towards ocular surface regeneration', Microscopy Research and Technique, 2010, 제73권, 1045-1052 페이지 초록; 페이지 1048 및 1050; 도면 2; 표 1 참조.	4, 9-15

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 11월 10일 (10.11.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 11월 10일 (10.11.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



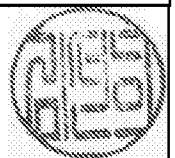
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	DHAMODARAN, KAMESH 등, ‘One for all: a standardized protocol for ex vivo culture of limbal, conjunctival and oral mucosal epithelial cells into corneal lineage’, Cytotherapy, (전자공개) 2016.04, 제18권, 546-561 페이지 페이지 556, 표 II 참조.	12
A	LEKHANONT, KAEVALIN 등, ‘A serum-and feeder-free technique of culturing human corneal epithelial stem cells on amniotic membrane’, Molecular Vision, 2009.06.30, 제15권, 1294-1302 페이지 전체 문헌 참조.	1-15

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2016-114285 A1	2016/07/21	AU 2016-207513 A1 CA 2973187 A1 KR 10-2017-0092694 A	2017/07/20 2016/07/21 2017/08/11
WO 2015-042356 A1	2015/03/26	US 2016-0230143 A1 US 2016-0340652 A1	2016/08/11 2016/11/24