

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 10월 1일 (01.10.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/147574 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/02 (2006.01) C12N 5/074 (2010.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/002992
- (22) 국제출원일: 2015년 3월 26일 (26.03.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0035610 2014년 3월 26일 (26.03.2014) KR
- (71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HAN-YANG) [KR/KR]; 133-791 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이상훈 (LEE, Sang-Hun); 143-200 서울시 광진구 광나루로 56길 32 구의현대 2단지아파트 205동 402호, Seoul (KR). 장미윤 (CHANG, Mi Yoon); 463-500 경기도 성남시 분당구 미금로 22번길 10 무지개마을주공 12단지아파트 1209-1304, Gyeonggi-do (KR). 이

용희 (RHEE, Yong-Hee); 133-070 서울시 성동구 마조로 9길 16-5, Seoul (KR).

(74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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.

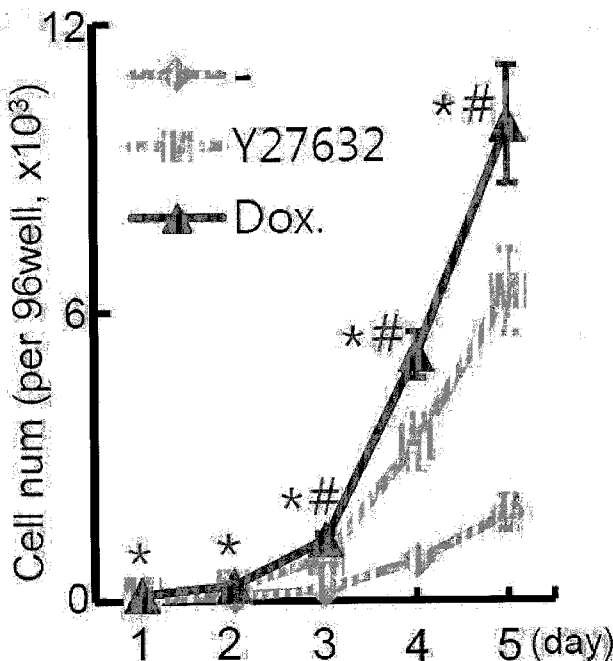
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: IMPROVEMENT IN SURVIVAL AND PROLIFERATION OF STEM CELLS BY DOXYCYCLINE

(54) 발명의 명칭: 독시사이클린에 의한 줄기세포의 생존 및 증식 향상

도 13



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for culturing stem cells, containing doxycycline as an active ingredient, and a method for culturing stem cells to increase the survival and proliferation of stem cells. When the stem cells are cultured, the survival and proliferation of stem cells can be increased by using the composition and culturing method of the present invention.

(57) 요약서: 본 발명은 독시사이클린을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 배양용 조성물 및 줄기세포의 생존 및 증식을 증대시키는 줄기세포 배양 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물 및 배양 방법을 사용함으로써 줄기세포 배양시 줄기세포의 생존(survival) 및 증식(proliferation)을 증대시킬 수 있다.



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, **공개:**

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,

KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG). — 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

【명세서】

【발명의 명칭】

독시사이클린에 의한 줄기세포의 생존 및 증식 향상

5 【기술분야】

본 발명은 대한민국 교육과학기술부의 지원 하에서 과제번호 201201700010001 에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 재단법인 한국연구재단, 연구사업명은 “기초연구사업/선도연구센터육성지원사업/기초의과학분야(MRC)” ,

10 연구과제명은 “줄기세포로부터 중뇌 도파민 신경세포로의 분화 및 이식연구” , 주관기관은 한양대학교 산학협력단, 연구기간은 2012. 09. 01 ~ 2013. 08. 31 이다.

또한 본 발명은 대한민국 미래창조과학부의 지원 하에서 과제번호 201300000000890 에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의
15 연구관리전문기관은 재단법인 한국연구재단, 연구사업명은 “이공분야 기초연구사업/일반연구자지원사업/여성과학자” , 연구과제명은 “Sox2 인자를 이용한 상피세포의 신경줄기세포를 통한 도파민성 신경세포로의 교차분화 연구” , 주관기관은 한양대학교 산학협력단, 연구기간은 2013. 05. 01 ~ 2014. 4. 30 이다.

20 또한 본 발명은 대한민국 미래창조과학부의 지원 하에서 과제번호 201300000260001 에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 재단법인 한국연구재단, 연구사업명은 “원천기술개발사업/바이오의료기술개발사업/줄기세포연구사업” , 연구과제명은 “중뇌도파민신경세포 분화, 생존, 기능획득기전 이해를 통한
25 파킨슨 증후군 줄기세포 치료기술 개발” , 주관기관은 한양대학교 산학협력단, 연구기간은 2013. 06. 01 ~ 2014. 5. 31 이다.

본 특허출원은 2014 년 3 월 26 일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2014-0035610 호에 대하여 우선권을 주장하며,
30 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 줄기세포의 생존 및 증식을 증대시키는 줄기세포 배양용 조성물 및 줄기세포 배양 방법에 관한 것이다.

【배경기술】

5 줄기세포 특히 hESC(Human embryonic stem cell) 및 iPSCs(induces pluripotent stem cells)는 발생 생물학, 질병 모델링 및 재생 의학에 대한 중요한 도약의 발판을 제공한다(1, 2, 3, 4). 그러나 기술적으로 hESC/iPSCs 는 배양하기 어렵고, 특히 세포 분리 및 해리에 있어서, 느린 성장 및 불량한 생존율을 보인다. 그러므로, hESCs 는 보조하는 피더

10 층(2) 상의 클러스터 내에서 고유하게 배양된다. hESC/iPSCs 가 화학적으로 정의된 배지(4)를 갖는 매트릭셀 내에서 배양된다면, 피더-프리 배양은 가능하다. 게다가 현탁액(5) 내에서, 마이크로 어레이(4, 6)를 가지고 또는 합성 폴리머(7) 상에서, hESC/iPSCs 를 배양하는 것과 같은 방법이 소개되었다. 그러나 상기의 새로운 기술들은 비용이 많이 들고,

15 제한된 확장성을 가지며, 높은 배치(batch) 간의 변동성을 갖는다. ROCK 억제제인 Y-27632 가 세포 해리 후의 세포 아폽토시스를 방지하고, 플레이트에 도달 후의 세포 생존성을 향상(8, 9)시키기 위해 사용되지만, 상기 화학물질의 이점은 세포 해리 후의 짧은 주기로 제한되며, 세포 생존 및 증식에 대한 그 지속적인 효과가 의심된다(10). 그러므로 낮은

20 비용으로 가능하고, 강력하며, 확장가능하고, 사용이 쉬우며, 효과가 지속적인 배양 방법들이, 기초 연구 및 임상 응용에서의 hESC/iPSCs 의 광범위한 적용을 가능케하기 위하여 더욱 발전되어야 한다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그

25 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 내용】

30 【해결하고자 하는 과제】

본 발명자들은 줄기세포를 배양시 줄기세포의 생존(survival) 및 증식(proliferation)을 증대시키기 위한 줄기세포 배양용 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 독시사이클린을 이용하는 경우 줄기세포의 생존(survival) 및 증식(proliferation)이 증대되는 것을
 5 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 줄기세포 배양용 조성물을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 줄기세포의 생존 및 증식을 증대시키는 줄기세포 배양 방법을 제공하는데 있다.

10 본 발명의 다른 목적은 줄기세포 생존 및 증식을 증대시키기 위한 독시사이클린을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 배양용 조성물의 용도를 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명,
 15 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제 해결 수단】

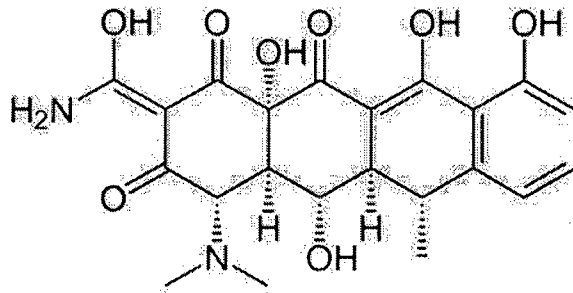
본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 독시사이클린을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 배양용 조성물을 제공한다.

20

본 발명자들은 줄기세포를 배양시 줄기세포의 생존(survival) 및 증식(proliferation)을 증대시키기 위한 줄기세포 배양용 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 독시사이클린을 이용하는 경우 줄기세포의 생존(survival) 및 증식(proliferation)이 증대되는 것을
 25 규명하였다.

본 발명의 줄기세포 배양용 조성물의 유효성분인 독시사이클린은 테트라사이클린 계열의 항생제로서 하기 화학식 1로 나타낸 화합물이다.

[화학식 1]



독시사이클린은 라임병(lyme disease), 만성 전립성염, 부비강염, 골반 연증성 질환, 여드름, 주사비(rosacea), 리케치아(rickettsial) 감염의 치료에 사용되는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 상기와 같은 용도가 공지되어 있는 독시사이클린을 줄기세포의 배양을 위한 새로운 용도로서 이용하는 경우, 줄기세포의 배양에 효과적이라는 결론을 도출하여 본 발명을 완성하였다.

본 발명의 일 구현예에 의하면, 본 발명인 줄기세포 배양용 조성물은 줄기세포의 생존(survival) 및 증식(proliferation)을 증대시킨다. 줄기세포 배양을 위한 조성물은 줄기세포 자체가 단시간 내에 사멸하지 않고 장기간 생존할 수 있도록 해야 하며, 줄기세포의 증식이 활발하게 이루어지도록 해야 한다. 본 발명자들은 줄기세포 배양용 배지에 독시사이클린을 처리하는 경우, 줄기세포가 생존 및 증식하는데 불리한 고농도 인슐린 환경 하에서도 줄기세포의 사멸이 억제되고, 줄기세포의 증식이 증가되는 것을 확인하였다(참조: 도 1). 또한 줄기세포가 저농도로 존재하는 환경이 줄기세포 증식에 불리함에도 불구하고, 독시사이클린을 처리하는 경우에는 저농도의 줄기세포의 생존 및 증식도 증대되는 것을 확인하였다(참조: 도 2). 이는 다른 계열의 항생제에서는 나타나지 않는 효과이며, 같은 테트라사이클린 계열의 항생제 중에서도 뛰어난 효과이다(참조: 도 4). 또한, 이를 통하여 독시사이클린-매개의 세포 생존 증대 효과가 그것의 항생제 효능과 연관되어 있는 것은 아님을 시사한다.

본 발명의 일 구현예에 의하면, 본 발명의 줄기세포는 전능성 줄기세포(totipotent stem cell), 다능성 줄기세포(pluripotent stem cell), 중복성 줄기세포(Multipotent stem cell) 또는 단분화성 줄기세포(Unipotent stem cell)이다.

본 발명의 일 구체예에 의하면, 전술한 일 구현예의 전능성 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cell), 배아생식세포(embryonic germ cells) 또는 배아종양세포(embryonic carcinoma cells)이다. 더욱 구체적으로 상기 전능성 줄기세포는 배아줄기세포이다.

5 본 발명의 다른 구체예에 의하면, 전술한 일 구현예의 다능성 줄기세포는 역분화 다능성 줄기세포(induced Pluripotent stem cell)이다. 역분화 다능성 줄기세포는 본 명세서 상에서 iPSCs 와 같은 약칭으로도 기재된다.

본 발명의 다른 구체예에 의하면, 전술한 일 구현예의 중복성
10 줄기세포는 신경 줄기세포(neural stem cell), 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell) 또는 간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)이다. 더욱 구체적으로 상기 중복성 줄기세포는 신경 줄기세포이다. 더욱 더 구체적으로 상기 신경 줄기세포는 바이러스성 역분화 줄기세포 유래의 신경 줄기세포이다. 상기 바이러스성 역분화 줄기세포는
15 구체적으로 레트로 바이러스성 hiPS-NSCs(Retro human induced Pluripotent stem cell-neural stem cells) 또는 렌티 바이러스성 hiPS-NSCs(Lenti human induced Pluripotent stem cell-neural stem cells)일 수 있다. 상기 바이러스성 역분화 줄기세포 유래의 신경 줄기세포는 도 6 에 나타낸 바와 같이 계대 배양을 진행하는 동안 계대 수가 증가하면서, 세포가
20 사멸함을 알 수 있다. 그러나 독시사이클린을 처리하는 경우 이러한 문제를 극적으로 해결할 수 있음을 확인하였다(참조: 도 6). 이는 역분화 줄기세포 및 이를 이용하여 유도한 새로운 다능성 줄기세포, 중복성 줄기세포 또는 단분화성 줄기세포를 안정적으로 배양할 수 있도록 한다.

본 발명자들은 대표적인 전능성 줄기세포인 배아줄기세포, 다능성
25 줄기세포인 역분화 다능성 줄기세포, 중복성 줄기세포인 신경 줄기세포의 배양에 독시사이클린이 효과가 있음을 여러 실시예를 통하여 규명하였다. 각기 다른 발생의 진행 정도를 보이는 여러 줄기세포의 배양에 대하여 예외 없이 독시사이클린이 줄기세포의 생존 및 증식을 증대시키는 효과를 보임을 알 수 있으며, 이를 통해 다양한 줄기세포에 대하여 동일 또는 이에 준하는
30 생존 및 증식 증대 효과를 보일 것을 쉽게 유추할 수 있다.

본 발명의 줄기세포는 구체적으로 예를 들면, 인간, 마우스, 소, 말, 염소, 양, 개, 고양이, 토끼 또는 조류로부터 유래된 것이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 독시사이클린을 1 nM-5000 μ M 함량으로 포함한다. 본 명세서 상의 도 4
5 4 에는 MTT assay 결과가 표시되어 있고, 1 nM 의 독시사이클린의 첨가로도 배양 세포의 생존력이 향상되는 것을 관찰하였다. 또한, 도 32 에는 독시사이클린 무처리 대조군에 대한 상대 생존력을 나타내었으며, 도 29 의 PI3 카이네이즈 활성화도 측정을 나타내었는바, 이를 통해서도 상기 함량 범위의 독시사이클린을 처리시 배양 세포 생존력 증대 효과를 관찰할 수
10 있다. 더욱 구체적으로 본 발명의 조성물은 독시사이클린을 0.01 μ M-5000 μ M 함량으로 포함하고, 더욱 더 구체적으로는 0.1 μ M-5000 μ M 함량으로 포함하며, 더욱 더 구체적으로는 1 μ M-5000 μ M 함량으로 포함하고, 더욱 더 구체적으로는 10 μ M-5000 μ M 함량으로 포함한다.

15 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 줄기세포의 생존 및 증식을 증대시키는 줄기세포 배양 방법을 제공한다:

(a) 줄기세포 배양용 배지를 준비하는 단계;

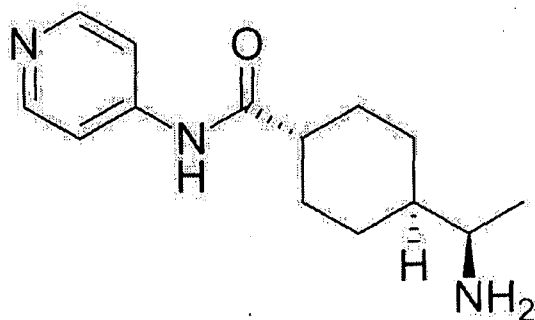
(b) 상기 단계 (a)에서 준비된 배지에 독시사이클린을 처리하여 줄기세포를 배양하는 단계.

20 본 발명의 방법에 있어서, 사용 가능한 줄기세포 배양용 배지는 특별한 제한이 없고, 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지도 사용이 가능하다. 구체적으로 예를 들면, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. *Science* 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., *Nat. New Biol.* 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., *J. Exp. Med.* 147:923(1978)), 199 배지 (Morgan et al., *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., *J. Amer. Med. Assoc.* 199:519(1967)), F12 (Ham, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. *Exp. Cell Res.* 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, 25 Dulbecco, R. et al., *Virology* 8:396(1959)), DMEM 과 F12 의 혼합물 (Barnes, D. et al., *Anal. Biochem.* 102:255(1980)), Way-mouth's MB752/1
30

(Waymouth, C. *J. Natl. Cancer Inst.* 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., *In Vitro* 14:11(1978)) 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 독시사이클린의 처리는 줄기 세포를 배양하는 동안 1 회 또는 2 회 이상 처리하는 가능하며, 바람직하게는 2 회 이상 처리할 수 있으며, 더 바람직하게는 일정 시간 간격으로 2 회 이상 처리할 수 있고, 구체적으로 예를 들면 24 시간 간격으로 2 회 이상 첨가할 수 있다. 독시사이클린을 최초 1 회 만 일반적으로 사용하는 인간배아줄기세포 배지, 구체적으로 예를 들어 시판되는 Stemcell Technology 사의 mTESR 배지, Millipore 사의 Pluristem 배지 등에 섞어서 배양하더라도, 독시사이클린을 첨가하지 않은 배지를 대조군으로 봤을 때, 대조군에 비하여 더욱 더 효율적으로 6 일간의 배지 교환없이 인간배아줄기세포의 배양이 가능하다(참조: 도 19). 특히 독시사이클린을 첨가하였을 때, 일주일간 배지 교환없이 사용가능한 제품으로 시판된 Millipore 사의 Pluristem 배지보다도 높은 생존율을 보인다.

본 발명의 일 구현예에 의하면, 본 발명의 단계 (b)는 Y-27632 를 독시사이클린과 함께 처리한다. 본 구현예의 Y-27632 는 하기 화학식 2 에서 나타난 화합물에 해당하며, ROCK(rho-associated protein kinase) 억제제로서 구체적으로 p160ROCK 를 선택적으로 억제하는 특징이 있다.

[화학식 2]



상기 Y-27632 는 종래 줄기세포의 배양에 도움을주는 첨가제로서 알려져 있다. 그러나 Y-27632 를 사용하는 경우 배양 세포의 형태(morphology)에 변형이 발생하는 문제가 있다(참조: 도 16). 그러나 독시사이클린을 사용하는 경우에는 이러한 문제가 발생하지 않으며, 줄기세포의 생존이나 증식을 증대시키는 효능도 Y-27632 에 비하여 더욱

뛰어나다는 결과를 도출하였다(참조: 도 13, 15 및 17). 다만, Y-27632 를 장기간 사용시 상술한 세포 형태의 변형 문제가 있음에도 불구하고, Y-27632 를 독시사이클린과 병용 사용하는 경우, 줄기 세포의 배양에 가장 효과적임을 알 수 있다(참조: 도 30).

- 5 본 발명의 일 구체예에 의하면, 본 발명의 단계 (b)에서 Y-27632 는 매 계대 중 최초 1 회에만 처리한다. 구체적으로 예를 들면, 독시사이클린을 24 시간 간격으로 줄기세포 배양 배지에 처리하는 경우에 있어서, 독시사이클린의 최초 1 회 처리 시에만 Y-27632 를 함께 처리한다. 본 구체예에 의하면, Y-27632 를 장기간 사용하는 경우 발생할 수 있는 세포
- 10 형태의 변형 문제의 발생 우려가 없으면서도, 독시사이클린 또는 Y-27632 의 단독 사용시에 비하여 더욱 우수한 줄기 세포의 생존 및 증식 증대 효과를 얻을 수 있다(참조: 도 30).

- 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 줄기세포 배양을 위한
- 15 독시사이클린의 용도를 제공한다.

- 본 발명은 상기 본 발명의 또 다른 일 양태인 독시사이클린을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 배양용 조성물을 이용하는 것이고, 상기
- 본 발명의 또 다른 일 양태인 줄기세포의 생존 및 증식을 증대시키는 줄기세포 배양 방법에 따라 실시할 수 있는 것으로서, 중복되는 내용에
- 20 대해서는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 독시사이클린을 유효성분으로 포함하는 배지조성물의 줄기세포 배양을 위한 용도를 제공한다.

- 본 발명은 상기 본 발명의 또 다른 일 양태인 독시사이클린을
- 25 유효성분으로 포함하는 줄기세포 배양용 조성물을 이용하는 것이고, 상기 본 발명의 또 다른 일 양태인 줄기세포의 생존 및 증식을 증대시키는 줄기세포 배양 방법에 따라 실시할 수 있는 것으로서, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

30 【발명의 효과】

 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 줄기세포 배양용 조성물을 제공한다.

(b) 본 발명은 줄기세포의 생존 및 증식을 증대시키는 줄기세포 배양 방법을 제공한다.

(c) 본 발명은 독시사이클린 또는 독시사이클린을 유효성분으로 포함하는 배지조성물의 줄기세포 배양을 위한 용도를 제공한다.

(d) 본 발명의 줄기세포 배양용 조성물을 이용하는 경우, 다양한 줄기세포의 생존(survival) 및 증식(proliferation)을 모두 증대시킬 수 있다.

(e) 본 발명의 줄기세포 배양용 조성물을 이용하는 경우, 특히 바이러스성 역분화 줄기세포로부터 유도된 다양한 줄기세포들의 장기간 계대배양에 따른 아폽토시스성 세포 사멸 및 조기 노화를 방지할 수 있다.

(f) 본 발명의 줄기세포 배양용 조성물을 이용하는 경우, 배지 교환 시기를 늘리는 효과가 있다. 특히 Millipore 사의 배지교환시기를 늘리는 시판배지인 Pluristem 보다 더욱 높은 효율을 보이고, 일반적인 시판 배지에 첨가 사용 시에 배지의 효율을 크게 증대하는 효과가 있다.

(g) 본 발명의 줄기세포 배양 방법을 이용하는 경우, 저렴한 비용으로 줄기세포를 안정적으로 배양할 수 있는 방법을 제공할 수 있다.

(h) 본 발명의 줄기세포 배양 방법을 이용하는 경우, 다양한 줄기세포의 생존 및 증식을 획기적으로 증대시킬 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 hNSC(human neural stem cell) 배양물에 있어서의 고농도의 인슐린에 의해 유발되는 아폽토시스성 세포사멸을 독시사이클린 첨가에 의해 억제할 수 있음을 나타낸다.

도 2 는 hNSC(human neural stem cell) 배양물에 있어서의 낮은 세포 농도에 의해 유발되는 아폽토시스성 세포사멸을 독시사이클린 첨가에 의해 억제할 수 있음을 나타낸다.

도 3 은 뉴론 생존상의 독시사이클린의 효과를 나타낸다.

도 4 및 도 5 는 독시사이클린, 이와 유사체(미노사이클린, 테트라사이클린) 및 다른 항생제의 세포 생존 효과를 비교한 것을 나타낸다.

도 6, 7 은 독시사이클린 보충이 세포 계대배양 동안 바이러스성 hiPS-유래 NSCs 에 있어서의 이른 노화 및 아폽토시스성 세포 사멸을 예방하는 것을 나타낸다.

5 도 7 은 독시사이클린 처리(우측) 및 비처리(좌측)의 레트로-2-hiPS-NSC 배양물에 있어서, 계대수 4 의 마지막 날, 대표적인 β -갈락토시다아제(위, 세포 노화) 및 활성화 캐스페이즈 3(아래, 아폽토시스)-염색 세포를 나타낸다.

도 8 및 도 9 는 AP+ 콜로니 형성 효율을 나타낸다.

10 도 10 은 독시사이클린 처리에 의해 수정된 항-/프로-아폽토시스성 유전자에 대한 발현 어레이를 나타낸다.

도 11 은 hESC 세포 확장에 대한 장기간(long-term) 배양에 있어서의 세포 성장 곡선을 나타낸다.

도 12 는 독시사이클린-보충 배양물의 8 계대 배양 후 H9 세포의 수정되지 않은 핵형을 나타낸다.

15 도 13 은 hESC 생존 및 유지에 있어서의 독시사이클린 및 Y-27632 의 효과 비교한 것으로서, 5 일간의 세포 성장을 나타낸다.

도 14 는 hESC 생존 및 유지에 있어서의 독시사이클린 및 Y-27632 의 효과 비교한 것으로서, 형성된 콜로니의 수를 나타낸다.

20 도 15 는 hESC 생존 및 유지에 있어서의 독시사이클린 및 Y-27632 의 효과 비교한 것으로서, 형성된 콜로니의 크기를 나타낸다.

도 16 은 무처리, Y-27632-처리, 및 독시사이클린-처리한 배양물로부터의 대표적인 콜로니의 위상차 이미지를 나타낸다.

도 17 은 AP+ 미분화된 콜로니의 %비율을 나타낸다.

25 도 18 은 독시사이클린으로 처리한 H9 세포 내에서의 인간 줄기 세포 전사 인자를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 무처리 배양에서의 발현 수준과 비교한 것을 나타낸다.

도 19 는 인간 배아 줄기세포 배양시 독시사이클린의 처리만으로 배지 교환 시기를 늘리는 효과가 있음을 나타낸다.

30 도 20 내지 22 은 세포 해리-유발의 엑토미오신 과활성화가 Y-27632 에 의해 방지되었으나, 독시사이클린 처리에 의해서는 방지되지 않는 것을 나타낸다.

도 23 은 독시사이클린에 의해 활성화된 세포 내부 신호의 추정을 나타낸다.

도 24 는 독시사이클린 처리 0 분, 10 분 및 30 분 후의 상기 신호 활성화를 웨스턴블랏 분석으로 더 측정한 결과를 나타낸다.

5 도 25 내지 27 은 AP+ 콜로니의 수(도 25), 크기(도 26), 및 퍼센트 비율(도 27)에 대한 독시사이클린-유발 효과가 PI3K-Akt 신호에 특이적인 차단제에 의해 차단되었음을 나타낸다.

도 28 은 일반적인 방사능 사진 기반 PI3K 활성 분석을 나타낸다.

10 도 29 는 PI3K 활성화에 대한 독시사이클린의 효과를 PI3 kinase activity/inhibitor assay kit^R를 이용하여 측정한것을 나타낸다.

도 30 은 독시사이클린과 함께 매 계대의 첫날에 Y-27632 를 처리하여 준 경우에 줄기세포의 생존 및 증식이 증대되는 결과를 나타낸다.

도 31 은 독시사이클린을 첨가하여 20 계대까지 배양하여도 기본적인 인간배아줄기세포의 성질이 변하지 않음을 나타낸다.

15 도 32 는 독시사이클린 무처리 대조군에 대한 독시사이클린 처리 실시예에 있어서의 배양 줄기세포의 상대 생존력을 나타낸다.

20

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

25

실시예

실험 재료 및 방법

세포 배양

30 HYE-08-02 하의 한양대학교(서울, 대한민국)의 IRB(institutional review board)에 의해 승인된 hESC 리서치 가이드라인을 기초로 hESCs 및

hiPSCs 를 배양하였다. 본 실험에서 사용된 hESCs 및 hiPSCs 는 하기 표 1 및 표 2 에 나타내었다.

【표 1】

hESC 주(line)		
본 명세서 상에서 사용된 명칭	핵형(karyotype)	확립 기관
HSF6(UC06)	여성(46, XX)	UCSF
H9(WA09)	여성(46, XX)	Wi cell

5

【표 2】

hiPSC 주(line)					
본 명세서 상에서 사용된 명칭	본 명칭	원천 (인간)	재프로그래밍 인자	방법	확립기관
레트로-1	Rv-hiPS 01-1	신생 섬유아세포	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	레트로바이러스	하버드 (harvard)
레트로-2	Rv-hiPS 02-3	신생 섬유아세포	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	레트로바이러스	하버드 (harvard)
렌티-1	IMR90-1	IMR-90	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28	렌티바이러스	UW 톰슨(UX thomson)
렌티-2	IMR90-4	IMR-90	OCT4, SOX2, NANOG, LIN28	렌티바이러스	UW 톰슨(UX thomson)
프로-1	piPSC-#1	신생 섬유아세포	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	단백질	하버드 (harvard)
프로-2	piPSC-#2	신생 섬유아세포	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	단백질	하버드 (harvard)

미분화 hESC/iPSC 의 확장 및 유지를 위해, 4 ng/mL 의 염기성 섬유아세포증식인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)(R&D Systems)가 보충된 KSR-배지(세럼 대체물 결실)(Invitrogen) 내의 MEF 세포(CF1 mouse, Charles River Kingston)의 피더층(feeder layer) 상에서

10

세포를 배양하였다. 새롭게 준비한 MEF 피더층 상으로 hESC/iPSC 집락을 기계적으로 분할 및 이동시키는 것에 의해 매주 계대 배양하였다. 콜로니 형성 분석 및 확실한 다른 실험들을 위하여, hESC/iPSC 집락을 TrypLE(Invitrogen) 또는 콜라겐분해효소 IV(0.1 mg/mL; STEMCELL technology)를 이용한 1-5 세포 내로 분리하였고, 피더층없이, TESR 배지(STEMCELL technology)를 이용하여 Matrigel™ 상에서 배양하였다. 배지 교체 및 bFGF 보충을 특별한 언급없이 매일 수행하였다. hNSC 집락은 종래 알려진 hESCs 및 hiPSCs 의 in vitro 분화(16, 18)에 의해 유래되었다. hNSCs 를 ITSA 배지(13, 18) 내의 bFGF(20 ng/mL) 확장하였고, 장기간 확장을 위해 매주 계대배양하였다. hNSCs 의 최종 분화는 bFGF 가 없지만, 뇌-유래 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor)(20 ng/mL)(R&D Systems), 신경 아교 세포계 유도 신경영양인자(glial cell line derived neurotrophic factor)(20 ng/mL)(R&D Systems), 또는 디부티릴 cAMP(0.5 mmol/L)(Sigma)가 존재하는 조건에서 유도되었다. 다음의 화합물들을 사용하였다: 독시사이클린(Sigma), 미노사이클린(Sigma), 테트라사이클린(Sigma), 카나마이신(Sigma), 블라스티시딘(Invitrogen), 클로람페니콜(Sigma), Y-27632(Calbiochem), LY294002(Calbiochem), Wortmannin(Millipore), PD98059(Calbiochem).

20 독시사이클린 단독 사용에 따른 효과 분석

인간배아줄기세포 및 역분화 줄기세포(표 1 및 표 2 참조)에 동일한 효과를 보이나, 구체적으로 H9(WA-09) 인간 배아줄기세포를 계대배양하면서 하나의 그룹에는 독시사이클린을 처리하지 않았고(대조구), 또 다른 하나의 그룹에는 매일 독시사이클린을 첨가하여 배양하였다. 계대 배양은 콜라지네이즈를 이용하여 세포를 떼어내고, 중력에 의해 배아줄기세포를 가라앉히는 방법을 사용하여 1:5 로 분할 계대배양하였다. Accutase™ 나 트립신을 이용하여 떼어내어도 독시사이클린의 세포 생존의 효과를 볼 수 있었다. 매 계대 배양시 동일한 효과가 관찰되었고 8 계대까지 관찰하였으며, 계대 배양 후 6 일째에 그 효과를 비교 관찰하였다. 향후 20 계대까지의 실험에서도 세포 생존의 지속적인 효과를 볼 수 있었고, 세포의 특성이 변하지 않았다.

독시사이클린 사용으로 배지 교환없이 배양 효과 분석

- 구체적으로 H9(WA-09) 인간 배아줄기세포를 배양하면서 하나의 그룹에는 독시사이클린을 처리하지 않았고(대조구), 또 다른 하나의
- 5 그룹에는 독시사이클린을 첨가하여 배지 교환 없이 6 일간 배양하였다. 배양은 콜라지네이즈를 이용하여 세포를 떼어내고, 중력에 의해 배아줄기세포를 가라앉히는 방법을 사용하여 1:5 로 분할 배양시 배지를 첨가하여 교환 없이 6 일간 배양하였다. Accutase™ 나 트립신을 이용하여 떼어내어도 독시사이클린의 세포 생존의 효과를 볼 수 있었다.
- 10 피더층없이, TESR 배지(STEMCELL technology)를 이용하여, 혹은 Pluristem 배지 (Millipore)를 이용하여 Matrigel™ 상에서 배양하거나 마우스 피더층에 보통의 배아줄기세포 배지를 사용하여 배양하여 세포 생존 효과를 비교하였다.

15 면역 염색법

- 배양된 세포를 PBS 내의 4% 파라포름알데히드로 고정하였고, 표 3 에 기재된 1 차 항체와 함께 4℃에서 하루 동안 배양하였다. 시각화를 위해 적절한 형광-표지된 2 차 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 이용하였다. 염색된 샘플을 DAPI 마운트 용액(Vector Laboratories)을
- 20 이용한 VECTASHIELD 내에 마운트 하였다.

【표 3】

항체	희석비율	구입처
마우스 모노클로날 항체		
알파-페토프로틴(AFP)	1:500	R&D systems
글루타메이트	1:500	Sigma-Aldrich
뉴론-특이적 클래스III 베타-튜불린(TuJ1)	1:500	Covance
Oct3/4	1:200	Santa Cruz Biotechnology
평활근 액틴(SMA)	1:500	R&D
중양 거부 항원(TRA) 1-60	1:500	Millipore
타이로신 히드록실레이즈(TH)	1:200	ImmunoStar

토끼 폴리클로날 항체		
브라큐리(Brachyury)	1:500	Abcam
감마-아미노부티르산(GABA)	1:700	Sigma
GFAP	1:400	DAKO
간세포 핵 인자 3-베타(HNF-3 β /Foxa2)	1:500	Santa Cruz Biotechnology
세로토닌	1:2000	Sigma
TH	1:500	Pei-freez Biologicals
TuJ1	1:2000	Covance

세포 주기 및 사멸 분석

- 세포 생존능력은 종래 알려진 MTT 분석(28)에 의해 결정하였다.
- 5 아폽토시스성(apoptotic) 세포 사멸은, 아폽토시스성 세포-특이적 표지자인 절단된 캐스페이즈-3(cleaved Caspase-3) 및 아넥신(Annexin) V/PI 에 대하여 양성인 세포의 현미경 상에서의 직접 계수(counting)에 의한 백분율에 의해 추정하였다. 아넥신 V/PI-염색된 세포를 FACS(CantoTMII)(Chemometec) 및 NucleoCounter®(NC-3000TM)(Chemometec)를
- 10 이용하여 더 계수하였다. 각각의 세포 주기 단계 상에 축적된 세포 분포를 결정하기 위하여 FACS 분석을 적용하였다. 노화 β -갈락토시다아제 염색 키트(Senescence β -Galactosidase Staining Kit(Cell Signaling)를 이용하여 제조자의 지침에 따라 세포 노화를 결정하였다.

15 알칼리 포스파타아제 활성 분석

알칼리 포스파타아제 기질 키트 I(벡터)을 제조자의 지침에 따라 집락 내의 알칼리 포스파타아제 활성을 분석하기 위해 사용하였다.

전분화능의 측정

- 20 2 주간 피더-프리(feeder-free) 배양물로부터 dFGF 를 제거하는것에 의해 3 개의 생식 계통으로의 hESCs 의 *In vitro* 분화를 유도하였고, 그 후 세포를 내배엽(Foxa2, α -태아 단백질(Ferroprotein), 중배엽(smooth muscle

actin(SAM)) 및 , 외배엽(Tuj1, GFAP)에 대해 특이적인 마커를 위해 면역 염색하였다. 6 주령 NOD/SCID 마우스의 생식선 하에 1×10^6 H9 hESCs(독시사이클린의 존재하에 8 계대수로 56 일간 배양)를 주사하는 것에 의해, In vivo 기형종(teratoma) 형성을 유도하였다. 8 주 후, 얻어진 종양을 제거하고, 파라핀에 침지시켰다. 구획은 헤마톡실린 및 에오신(H&E)을 이용하여 염색하였다.

염색체분석(Karyotyping)

대한민국 서울의 네오딘 의학 연구소(NEODIN medical institute)에서의 표준 G 밴딩(standard G banding)에 의해, 독시사이클린($1 \mu\text{g/mL}$)의 존재하에서 보존된 hESCs(H9) 상에서 염색체분석이 수행되었다.

정량적 PCR 분석

공지된 방법을 통해(29) 총 RNA 준비 및 cDNA 합성을 수행하였다. RT² Profiler PCR Array^R(Qiagen)를 사용하는 세포 아파토시스-관련 단백질(cat. 330231 PAHS-012ZA) 및 인간 줄기 세포 전사인자(cat. 330231 PAHS-501ZA)에 대하여 고-처리율 유전자 발현 프로파일링을 수행하였다. 일반적인 리얼-타임 PCR 분석을 이용하여 결과를 더 확인하였다.

세포 내의 신호 활성화의 측정

인간 포스포-키나아제 분석(Proteome ProfilerTM 분석)(R&D systems) 및 CBA 복합화 비드-기반 면역 분석(560005, 560010, 560012, 560013, 560015, 560059, 560065, 560093, 560150, 560792, BD)을 이용하여 제조자의 지침에 따라, 독시사이클린의 처리에 의해 활성화된 세포 내의 신호를 검출하였다. 상기 검출에 의해 얻은 결과를 확인하거나, 액틴미오신 과활성화와 관련된 E-캐드헤린 및 pMLC 와 같은 단백질의 수준을 확인하기 위해, 공지된 방법을 통해(30) 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다.

PI3 키나아제 활성 분석

공지된 방법에 의해(31) 일반적인 방사선사진-기반 PI3K 활성 분석을 수행하였다. 요컨대, 독시사이클린의 존재 또는 부재 하에 배양된 H9 hESCs로부터의 총 세포 추출물로부터, 항-PI3K 항체(anti-p85)를 이용하여 PI3K를 면역 침강시켰다. 효소 반응은 [γ -³²P]ATP 및 L-a17

- 5 포스파티딜이노시톨(기질)을 침전물에 첨가하는 것에 의해 개시하였고, 반응에 의해 방사능표지된 물질은 방사능 사진을 이용하여 검출하였다. PI3K 활성화에 대한 독시사이클린의 효과는, 세포 추출물의 부재에서 재조합 클래스 I PI3K 효소 단백질 및 기질(PIP2)이 결합되는 상업적으로 이용가능한 키트(PI3 kinase activity/inhibitor assay kit^R(Millipore))를
10 이용하여 더 확인하였다. PI3K 활성화/억제자 활성화는 약간 변형된 제조자의 지침에 따라 측정하였다.

독시사이클린과 Y-27632 병용 사용에 따른 효과 분석

- 인간배아줄기세포 및 역분화 줄기세포 (표 1 및 표 2 참조)에 동일한
15 효과를 보이나, 구체적으로 H9(WA-09) 인간 배아줄기세포를 계대배양하면서 하나의 그룹에는 독시사이클린과 Y27632를 처리하지 않았고(대조구), 다른 하나의 그룹에는 독시사이클린(1 μ g/ml)만을 매일 처리하였으며, 또 다른 하나의 그룹에는 Y-27632(10 μ M)를 매일 처리하였고, 또 다른 하나의 그룹에는 매 계대 첫날에 독시사이클린과 Y-27632를 동시에 첨가하고, 다음
20 날부터는 독시사이클린만을 첨가하여 배양하였다.

통계 분석

- 두 그룹의 통계적인 비교는 스튜던트 양측(2-tailed) t 검정 또는 양측 짝지은(2-tailed paired) t 검정에 의해 수행하였다. 둘 이상의
25 그룹을 비교하기 위해, 셰페(Scheffe) 또는 투키 사후 분석(Tukey post-hoc analysis)(SPSS Inc)을 이용한 1원 분산분석(one-way ANOVA)을 적용하였다.

실험 결과

- 인간 NSCs(hNSCs)가 hESC/iPSCs의 *in vitro* 분화에 의해 유래되었다.
30 hESC/iPSC-유래의 NSCs(hES/iPS-NSCs)는 대표적인 NSC-특이적 표지자(13)인 네스틴(nestin)을 균질하게 발현하였다. 상기 네스틴+hNSCs는 bFGF(basic

fibroblast growth factor)에 의해 확장될 수 있고, bFGF의 제거 및 결합성 신경영양인자의 존재하에서 뉴론 세포로 분화된다(13, 14).

도 1 내지 도 7

5 도 1 내지 도 7은 hNSCs의 배양물 및 hESC/iPSCs로부터 유도된 뉴론 상의 독시사이클린 보충의 효과를 나타낸다.

독시사이클린은 hNSC 배양물에 있어서의 고농도의 인슐린(참조: 도 1) 또는 낮은 세포 농도(참조: 도 2)에 의해 유발되는 아폽토시스성 세포 사멸을 방지한다. (a) $1.4 \times 10^5/\text{cm}^2$ 또는 (b) $3.4 \times 10^4/\text{cm}^2$ 로 도말된 H9 hESC-유래의 NSCs를 독시사이클린 보충($1 \mu\text{g/mL}$)과 함께 또는 보충 없이 배양하였다. 생존가능한 세포 계수 및 활성화된(절단된) 캐스페이즈 3에 대해 양성인 세포에 의해 아폽토시스성 세포 사멸을 측정하였다. 높은 인슐린 농도를 갖는 배양물에서의, 대표적인 위상차 및 절단된 캐스페이즈 3 염색된 이미지는 왼쪽 패널에 나타내었다. 스케일바는 $50 \mu\text{m}$ 를 나타낸다.

도 3은 뉴론 생존상의 독시사이클린의 효과를 나타낸다. 뉴론의 하위유형은 9일간 H9 hESC-NSCs의 분화에 의하여 유도되었다. 뉴론 배양물은 5일간 독시사이클린의 보충에 의해 또는 보충 없이 유지하였다. 배양 마지막 날, 도파민 활성(TH), 세로톤 활성(serotonin) 및 GABA 활성(GABA) 뉴론을 구별하기 위하여 면역 염색을 수행하였다. 스케일바는 $50 \mu\text{m}$ 를 나타낸다.

도 4 및 도 5는 독시사이클린, 이와 유사체(미노사이클린, 테트라사이클린) 및 다른 항생제의 세포 생존 효과를 비교한 것을 나타낸다. H9 hESCs 유래 hNSCs의 분화 동안, 정해진 농도의 항생제를 배양배지에 보충하였다. 세포 생존력은 MTT 분석에 의해 분화 5일째날 측정하였다. 각각의 항생제-처리된 배양물로부터의 가장 높은 MTT 값(세포 생존능)은 도 5에서 비교하였다. 무처리 대조구(점선)와 $p < 0.01$ 에서 매우 달랐다. 미노사이클린, 테트라사이클린과 같은 유사체에 비하여 독시사이클린의 세포 생존 증진 효과가 더욱 우수하였으며, 다른 항생제의 경우에는 이러한

효과를 발휘하지 못하였다. 이는 독시사이클린-매개의 세포 생존 증대 효과가 그것의 항생제 효과와 연관되어 있지는 않은 것을 보여준다.

도 6, 7 은 독시사이클린 보충이 세포 계대배양 동안 바이러스성 hiPS-유래 NSCs 에 있어서의 이른 노화 및 아폽토시스성 세포 사멸을 예방하는 것을 나타낸다. 레트로바이러스성(Retro-2, 가운데 도), 렌티바이러스성 hiPSC 주(line)(Lenti-1, 우측 도) 및 H9 hESCs(대조구, 좌측 도)로부터 유래된 NSCs 는 독시사이클린 보충의 존재 또는 부존재 하에서 매 7 일마다 계대배양 하는 것에 의해 확장되었다. 도 6 에 나타낸 세포 성장 곡선은 매 계대의 마지막 날에 총 생존 가능한 세포의 수를 계수하는 것에 의해 표시하였다. $p < 0.01$ 에서의 독시사이클린-보충된 배양물에 있어서, 생존 가능한 세포 수의 대폭적인 증가를 보였다.

도 7 은 독시사이클린 처리(우측) 및 비처리(좌측)의 레트로-2-hiPS-NSC 배양물에 있어서, 계대수 4 의 마지막 날, 대표적인 β -갈락토시다아제(위, 세포 노화) 및 활성화 캐스페이즈 3(아래, 아폽토시스)-염색 세포를 나타낸다. 스케일바는 $50 \mu\text{m}$ 를 나타낸다.

바이러스 유래 iPSCs 의 NSC 로의 분화는 7 계대 이상의 생존이 어려운 제약이 있었으나, 독시사이클린의 처리로 이 문제를 해결하였다.

도 8 내지 도 18

독시사이클린 보충은, 배양에 있어서 세포 생존 및 미분화 hESC/iPSCs 의 유지를 강화하였다.

도 8 및 도 9 는 AP⁺ 콜로니 형성 효율을 나타낸다. 해리된 hESC/iPSCs 는 4×10^4 세포/6 cm 접시로 도말하고, 독시사이클린($1 \mu\text{g/ml}$)의 존재 또는 부존재 하에서, mTESR 배지를 이용한 피더-프리 매트릭스에서 배양하였다. 5 일 후 배양물을 염색하고, 알칼리 포스파테이즈(alkaline phosphatase, AP), 미분화 hESC/iPSC 표지자, 및 AP⁺ 콜로니를 계수하였다. $p < 0.01$, $n=5-8$, 스튜던트 양측 t 검정을 이용하였다. 도 9 는 대표적인 H9 hESCs 로부터의 AP⁺ 콜로니이다. 스케일바는 $100 \mu\text{m}$ 이다.

도 10 은 독시사이클린 처리에 의해 수정된 항-/프로-아폽토시스성 유전자에 대한 발현 어레이를 나타낸다. H9 hESCs 를 독시사이클린의 존재

또는 부존재하에서 배양하였고, RT² PCR Profiler Array^R 를 이용하여 항-/프로-아폽토시스성 유전자의 발현 수준을 추정하였다. 좌측에 나타난 것은 독시사이클린-처리된 배양물에 있어서의 증가된 항-아폽토시스성(빨간 점들) 및 감소된 프로-아폽토시스성(파란 점들) 전사의 경향을 보여주는 'volcano plot'이다. 수직의 분홍색 선은 유전자 발현 역치(threshold)에서의 1.5 배 변화를 나타낸다. $p < 0.05$ (수평의 파란선)에서 독시사이클린 처리에 의해 상당히 증가- 또는 감소-조절된 유전자는 각각의 막대 그래프로 나타내었다.

도 11 은 hESC 세포 확장에 대한 장기간(long-term) 배양에 있어서의 세포 성장 곡선을 나타낸다. 독시사이클린(1 $\mu\text{g/ml}$)이 포함된 또는 포함되지 않은 bFGF-보충된 KSR 배지 내의 MEF 피더 상에서, 56 일 동안 8 계대수로, H9 hESCs 를 배양하였다. 곡선은 매 계대의 마지막 날에 총 생존 가능한 세포 수를 계수하는 것에 의해 나타내었다. $p < 0.001$ 에서의 동일한 세포 계대에 있어서의, 각각의 무처리 대조구와 상당히 달랐다. 독시사이클린의 처리에 의하여 세포 수의 뚜렷한 증가를 확인하였다.

도 12 는 독시사이클린-보충 배양물의 8 계대 배양 후 H9 세포의 수정되지 않은 핵형을 나타낸다. 20 개의 무작위-선정한 핵 내에서 염색체 분석을 수행하였다. 독시사이클린에 의하여 염색체의 손상이나 변화가 유발되지 않았다.

도 13 내지 18 은 hESC 생존 및 유지에 있어서의 독시사이클린 및 Y-27632 의 효과 비교한 것을 나타낸다. 해리된 H9 세포를 낮은 세포 농도(500 세포/웰, 96-웰 플레이트)에서 도말하였고, 메트리젤-mTeSR 에서, 독시사이클린(1 $\mu\text{g/ml}$) 또는 Y-27632(10 μM)를 사용하거나 사용함이 없이 5 일 동안 배양하였다. 5 일간의 세포 생장은 도 13 에 나타내었다. 독시사이클린을 처리하는 경우, 무처리의 대조구는 물론이고, Y-27632 에 비하여도 확연한 세포 수의 증가를 확인할 수 있었다. 형성된 콜로니의 수(참조: 도 14) 및 크기(참조: 도 15)를 비교하였다. 클론의 수는 세포 생존과 관계되어 있으며, 클론의 크기는 세포의 증식과 관계되어 있다. 독시사이클린을 처리하는 경우 무처리 대조군에 비하여 세포의 생존 및 증식이 상당히 증대됨을 확인하였고, Y-27632 에 비하여 세포의 증식 증대 효과가 월등함을 확인하였다. * $p < 0.001$ 대조구와 비교, # $p < 0.05$ Y-27632

처리군과 비교, 투키 포스트-호크 분석을 이용한 1 원 분산분석(One-way ANOVA), $n=5$ 독립 연구를 수행하였다(도 13 내지 도 15).

도 16 은 무처리, Y-27632-처리, 및 독시사이클린-처리한 배양물로부터의 대표적인 콜로니의 위상차 이미지를 나타낸다. 지정된
5 세포의 고성능 이미지이며, 스케일바는 $50\mu\text{m}$ 를 나타낸다. Y-27632 를 처리하는 경우 세포의 형태(morphology)에 변화가 발생함을 관찰하였고, 이는 세포에 좋지 않은 영향을 미침을 의미한다. 그러나 독시사이클린을 처리하는 경우에 이러한 형태의 변화가 관찰되지 않았으며, 이는 독시사이클린의 처리가 Y-27632 처리로 인한 문제를 해결할 수 있음을
10 의미한다.

도 17 은 AP+ 미분화된 콜로니의 %비율을 나타낸다. $*p<0.01$ 대조구와 비교, $\#p<0.05$ Y-27632 처리군과 비교, 각각의 그룹에서 $n=9$, 분산분석(ANOVA)을 수행하였다. 독시사이클린을 처리하는 경우 미분화된 클론의 %비율이 무처리 대조구 및 Y-27632 를 처리하는 경우에 비하여 높게
15 측정되었다.

도 18 은 독시사이클린으로 처리한 H9 세포 내에서의 인간 줄기 세포 전사 인자를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 무처리 배양에서의 발현 수준과 비교한 것을 나타낸다. 산포도에서, 분홍색 직선은 유전자 발현 역치(threshold)에서의 2 배 변화를 나타낸다. 전분화능(빨간 점)과
20 연관된 유전자의 발현을 선정하고, 대조구와 상대되는 독시사이클린 처리 배양물 내의 배율 변화(fold change)는 오른쪽 그래프에 나타내었다.

hESC 와 iPSCs 의 배양시 독시사이클린의 처리만으로 줄기세포의 생존율을 높일 수 있음을 확인하였다. 특히, 종래의 배아줄기세포 생존 향상에 우수한 효과가 알려져 있고 상용화된 Y-27632 와 비교하는 경우에도
25 월등한 효과를 확인할 수 있었다.

도 19

인간 배아 줄기세포는 매일 사이토카인의 첨가와 배지 교환을 해 줘야하는 불편으로 많은 연구자들이 배양이 어려움을 겪고 있으나, 단순히
30 독시사이클린의 처리만으로 배지 교환 시기를 늘리는 효과를 확인하였다(참조: 도 19). 이는 배지를 교환하기 어려운 실험 조건, 예를

들면 배지교체 없이 지속적인 세포 성장 관측이 필요한 실험에 있어서 매우 유용하며, 배지를 교체해야하는 실험자의 수고를 덜 수 있다. 현재 배지교환 없이 배아줄기세포를 7 일간 생존시킬수 있다고 알려진 Millipore 사의 Pluristem 배지에 독시사이클린을 첨가하여도 월등한 배양향상 효과를 볼 수 있으며, 다른 배지에 독시사이클린을 첨가하는 것만으로도 Pluristem 배지에 비해 더욱 효율적인 배아줄기세포 배양이 가능하다.

도 20 내지 도 29

10 독시사이클린은 PI3K-Akt 신호 활성화를 통해 미분화 hESCs 의 세포 생존과 유지를 가능하게 한다.

도 20 내지 22 은 세포 해리-유발의 엑토미오신 과활성화가 Y-27632 에 의해 방지되었으나, 독시사이클린 처리에 의해서는 방지되지 않는 것을 보여준다. H9 hESCs 를 독시사이클린 또는 Y-27632 와 함께 또는 15 상기 화합물 없이(대조군), 세포 해리 전 1 시간 동안 배양하였다. 세포는 세포 해리 0 분, 10 분 및 30 분 후 회수하였고, 세포-해리-유발의 아파토시스와 연관된 단백질을 검출하기 위하여 웨스턴블랏을 실시하였다(참조: 도 20). 도 21 및 22 은 Y-27632 또는 독시사이클린 20 처리된 배양물 내에서의 대표적인 pMLC-면역염색 이미지 및 해리된 hESCs 의 위상차 이미지를 나타낸다. Y-27632 또는 독시사이클린으로 전처리된 세포를 해리시켰고, 직접 mTESR 를 갖는 메트리젤 상에 도말하였으며, 상기 화학물질의 지속적인 존재하에 배양하였다. 상기 이미지는 도말(해리) 후 지정된 시간에 수집하였다. 스케일바는 10 μ m 이다. 도 20 에서 볼 수 25 있듯이, Y-27632 를 전처리하는 경우에는 E-카드헤린은 감소하지 않고, pMLC 는 감소하는 것을 관찰할 수 있으나, 대조적으로 독시사이클린을 전처리하는 경우에는 무처리의 대조구와 마찬가지로 E-카드헤린은 감소하고 pMLC 는 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이는 독시사이클린이 Y-27632 와 같은 ROCK 억제제가 아님을 보여준다.

30 도 23 은 독시사이클린에 의해 활성화된 세포 내부 신호의 추정을 나타낸다. H9 hESCs 는 획득 전에 독시사이클린(1 μ g/ml)과 함께 또는

독시사이클린 없이(대조군) 30 분간 배양하였고, 46 인산화된 세포내 단백질들을 검출하기 위해 고안된 인간 포스포키나아제 블랏 어레이^R를 이용하여 면역블랏 분석하는데 이용하였다. 상기 어레이 분석은 3 회 수행되었다. 무처리 대조구 및 독시사이클린 처리 세포의 블랏의 대표

5 쌍을 나타내었다. 블랏에 있어서, 독시사이클린-처리군 중 대조구와 비교하여 그 강도가 1.5 배 이상인 점 들은 점선 원으로 표시하였다. 참조 점은 밑줄로 표시하였다. 오른쪽의 그래프는 세 개의 블랏으로부터 표시된 점의 강도의 수치적으로 분석된 값을 나타낸다. $p < 0.001^{**}$ 및 $p < 0.05^{*}$ 에서의 짝 비교 t 검정(paired t-test) 결과가 대조구와 상당히

10 달랐다. 독시사이클린 처리 0 분, 10 분 및 30 분 후의 상기 신호 활성화를 웨스턴블랏 분석으로 더 측정하였다(참조: 도 24). 도 20 에서도 독시사이클린 처리시 pAKT 신호의 증가를 관찰할 수 있었듯이, 도 23 에 있어서 독시사이클린-매개의 생존 및 미분화 hESCs 의 유지에 대하여 어떠한 세포 내부 신호 단백질이 영향을 미치는가 결정하기 위하여 46 개 세포 내부

15 신호 단백질의 활성을 인간 포스포-키나아제 분석(Proteome ProfilerTM, R&D Systems)를 이용하여 스크린하였다(참조: 도 23). 그 결과 독시사이클린 처리 배양물에 있어서 pAKT 의 두드러진 활성화를 관찰할 수 있었다. PI3K-Akt 세포 내부 신호가 hESC 다능성 및 자기-재생의 유지에 대한 가장 중요한 신호 경로로서 밝혀졌다.

20 본 발명자들은 hESC 생존(참조: 도 25), 자기-재생(참조: 도 26), 및 미분화 상태의 유지(참조: 도 27)에 대한 독시사이클린의 효과가 PI3K 억제제인 LY29007 및 워트만닌(Wortmannin)에 의해 감소 또는 제거됨을 확인하였다.

25 도 25 내지 27 은 AP+ 콜로니의 수(도 25), 크기(도 26), 및 퍼센트 비율(도 27)에 대한 독시사이클린-유발 효과가 PI3K-Akt 신호에 특이적인 차단제에 의해 차단되었음을 나타낸다. PI3K-Akt 차단제인 LY29002(20 μ M) 또는 워트만닌(wortmannin)(100 μ M) 또는 Raf-Erk 차단제인 PD98059(10 μ M)를 포함하거나 또는 포함하지 않는 독시사이클린(1 μ g/ml)

30 또는 비히클(DMSO)의 존재 하에서 5 일 동안 해리된 H9 세포를 배양하는 것에 의해 콜로니 형성 분석을 수행하였다. $n=3$ 독립 실험이며, 투키

포스트-호크 분석을 이용한 1 원 분산분석(one-way ANOVA)에 있어서, *p<0.001 에서 비히클로 처리한 대조구 배양물 및 #p<0.005 에서 독시사이클린 단독으로 처리한 배양물과 상당히 달랐다.

도 28 및 29 는 독시사이클린에 의해 강화된 PI3K 효소 활성을 나타낸다. 도 28 은 일반적인 방사능 사진 기반 PI3K 활성 분석을 나타낸다. 분석을 위한 양성 대조구로서, PI3K 활성은, 알려진 PI3K 억제제(엑콜)(31)(왼쪽 도)를 포함하는 또는 포함하지 않는 대조세포주(인간 유방 암 세포 MDA-MB-231)에서 동시에 결정하였다. 도 29 는 PI3K 활성에 대한 독시사이클린의 효과를 PI3 kinase activity/inhibitor assay kit^R 를 이용하여 측정한것을 나타낸다. 분석은 또한 다른 항생제 또는 알려진 PI3k 억제제(대조구)의 존재하에서 수행되었다: 독시사이클린(Dox); 테트라사이클린(Tet); 미노사이클린(Mino); 카나마이신(Kan); Chloramphenicol(Chlor); Blastcidine(Blas). 그래프는 억제제/활성제 없는 활성을 제외한 후의 계산된 PI3K 효소 활성을 나타낸다. 독시사이클린 복용량-의존 PI3K 활성 곡선도 표시하였다.

독시사이클린 처리에 의해 직접적으로 포스포-AKT 가 증가되는 PI3-키나아제를 활성화 시킴으로서 인간 줄기세포 생존력 증대 등의 주역할을 야기하게 됨을 확인하였다.

도 30

독시사이클린과 함께 매 계대의 첫날에 Y-27632 를 처리하여 준 경우에 줄기세포의 생존 및 증식이 증대됨을 관찰할 수 있었다(참조: 도 30).

도 31

독시사이클린과 함께 20 계대 배양시에도 인간배아줄기세포의 마커인 알칼라인포스포테이즈(AP), TRA 1-60, Oct4 가 발현됨을 관찰할 수 있었다(참조: 도 31).

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의
5 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

1. Yu J, Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev* 22, 1987-1997 (2008).

2. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A.
10 Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399-404 (2000).

3. Thomson JA, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147 (1998).

4. Ludwig TE, et al. Derivation of human embryonic stem cells in
15 defined conditions. *Nat Biotechnol* 24, 185-187 (2006).

5. Steiner D, et al. Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nat Biotechnol* 28, 361-364 (2010).

6. Rodin S, et al. Long-term self-renewal of human pluripotent
20 stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat Biotechnol* 28, 611-615 (2010).

7. Villa-Diaz LG, Ross AM, Lahann J, Krebsbach PH. Concise review: The evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells* 31, 1-7 (2013).

25 8. Watanabe K, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25, 681-686 (2007).

9. Ohgushi M, et al. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent
30 stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 225-239 (2010).

10. Harb N, Archer TK, Sato N. The Rho-Rock-Myosin signaling axis determines cell-cell integrity of self-renewing pluripotent stem cells. PLoS One 3, e3001 (2008).

11. Bendall SC, et al. IGF and FGF cooperatively establish the
5 regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. Nature 448, 1015-1021 (2007).

12. Singh AM, et al. Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. Cell Stem Cell 10,
10 312-326 (2012).

13. Park CH, et al. In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. Journal of neurochemistry 92, 1265-1276 (2005).

14. Perrier AL, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons
15 from human embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 12543-12548 (2004).

15. Rhee YH, et al. Insulin concentration is critical in culturing human neural stem cells and neurons. Cell death & disease 4, e766 (2013).

20 16. Ko JY, et al. Human embryonic stem cell-derived neural precursors as a continuous, stable, and on-demand source for human dopamine neurons. Journal of neurochemistry 103, 1417-1429 (2007).

17. Hong S, Kang UJ, Isacson O, Kim KS. Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term
25 proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons. Journal of neurochemistry 104, 316-324 (2008).

18. Rhee YH, et al. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of
30 Parkinson disease. The Journal of clinical investigation 121, 2326-2335 (2011).

19. Feng Q, et al. Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* 28, 704-712 (2010).

20. Jantzie LL, Cheung PY, Todd KG. Doxycycline reduces cleaved
5 caspase-3 and microglial activation in an animal model of neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25, 314-324 (2005).

21. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T,
10 Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15769-15774 (1998).

22. Kim HS, Suh YH. Minocycline and neurodegenerative diseases.
15 *Behavioural brain research* 196, 168-179 (2009).

23. Sakata H, et al. Minocycline-preconditioned neural stem cells enhance neuroprotection 1 after ischemic stroke in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 3462-3473 (2012).

24. Wang AL, et al. Minocycline inhibits LPS-induced retinal
20 microglia activation. *Neurochemistry international* 47, 152-158 (2005).

25. Hu X, et al. Minocycline protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein in rats. *Eur J Pharmacol* 638, 84-89 (2010).

26. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Galvez J. Minocycline: far
25 beyond an antibiotic. *British journal of pharmacology* 169, 337-352 (2013).

27. Lee HH, O'Malley MJ, Friel NA, Chu CR. Effects of doxycycline on mesenchymal stem cell chondrogenesis and cartilage
30 repair. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 21, 385-393 (2013).

28. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. Br J Cancer 56, 279-285 (1987).

29. Brederlau A, et al. Transplantation of human embryonic stem
5 cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. Stem Cells 24, 1433-1440 (2006).

30. Chang MY, et al. Bcl-XL/Bax proteins direct the fate of embryonic cortical precursor cells. Mol Cell Biol 27, 4293-4305 (2007).

10 31. Hyun KH, et al. Eckol suppresses maintenance of stemness and malignancies in glioma stem-like cells. Toxicology and applied pharmacology 254, 32-40 (2011).

【특허청구범위】**【청구항 1】**

독시사이클린을 유효성분으로 포함하는 줄기세포 배양용 조성물.

5 **【청구항 2】**

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포 배양용 조성물은 줄기세포의 생존(survival) 및 증식(proliferation)을 증대시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

10 **【청구항 3】**

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 전능성 줄기세포(totipotent stem cell), 다능성 줄기세포(pluripotent stem cell), 중복성 줄기세포(Multipotent stem cell) 또는 단분화성 줄기세포(Unipotent stem cell)인 것을 특징으로 하는 조성물.

15

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 전능성 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cell), 배아생식세포(embryonic germ cells) 또는 배아종양세포(embryonic carcinoma cells)인 것을 특징으로 하는 조성물.

20

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 전능성 줄기세포는 배아줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

25 **【청구항 6】**

제 3 항에 있어서, 상기 다능성 줄기세포는 역분화 다능성 줄기세포(induced Pluripotent stem cell)인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

제 3 항에 있어서, 상기 중복성 줄기세포는 신경 줄기세포(neural stem cell), 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell) 또는 간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)인 것을 특징으로 하는 조성물.

5 **【청구항 8】**

제 7 항에 있어서, 상기 중복성 줄기세포는 신경 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

10 **【청구항 9】**

제 8 항에 있어서, 상기 신경 줄기세포는 바이러스성 역분화 줄기세포 유래의 신경 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

15 **【청구항 10】**

제 1 항에 있어서, 상기 독시사이클린은 1 nM -5000 μ M 함량으로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

20 **【청구항 11】**

다음 단계를 포함하는 줄기세포의 생존 및 증식을 증대시키는 줄기세포 배양 방법:

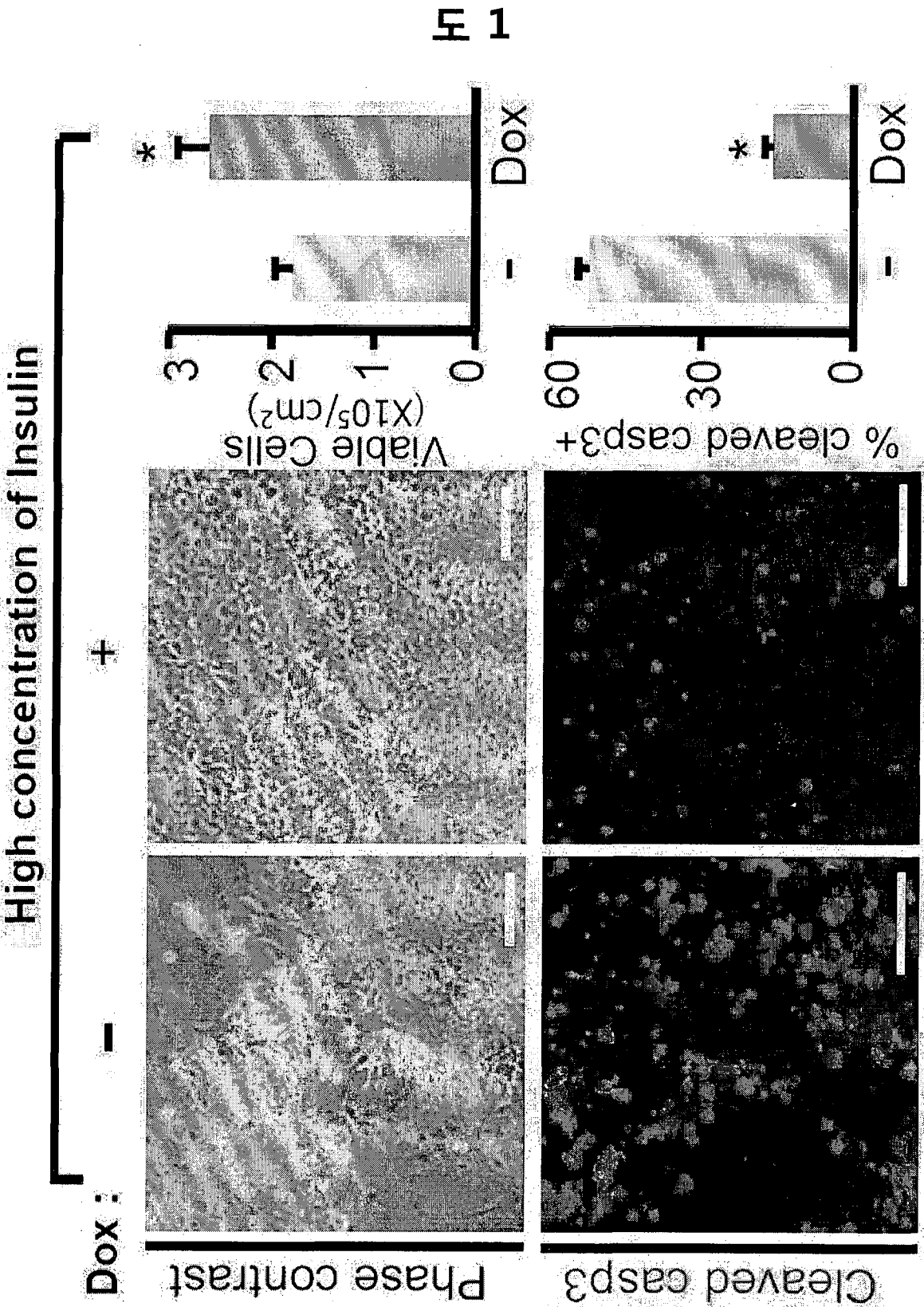
- (a) 줄기세포 배양용 배지를 준비하는 단계;
 (b) 상기 단계 (a)에서 준비된 배지에 독시사이클린을 처리하여 줄기세포를 배양하는 단계.

25 **【청구항 12】**

제 11 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 Y-27632 를 독시사이클린과 함께 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

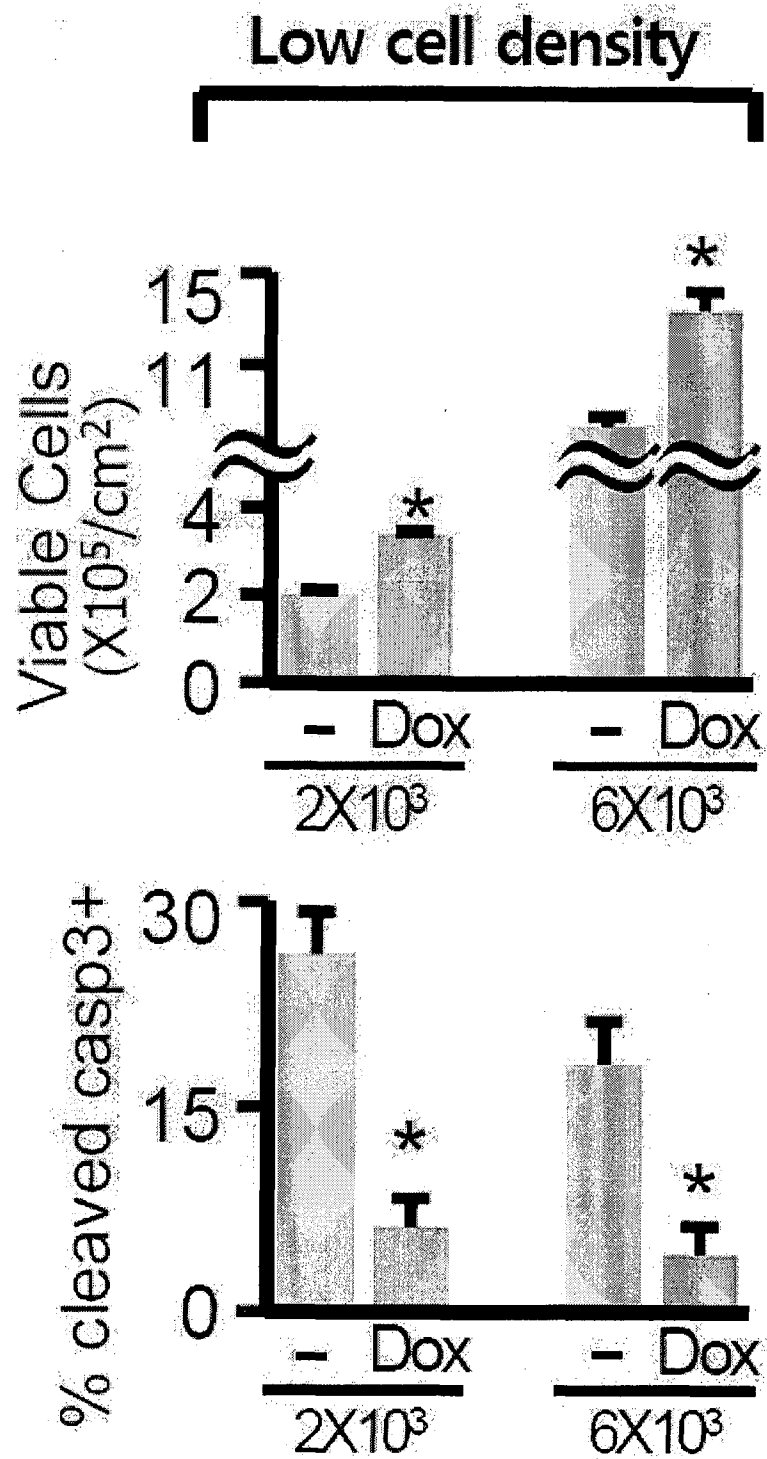
30 **【청구항 13】**

제 12 항에 있어서, 상기 Y-27632 는 매 계대 중 최초 1 회에만 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.



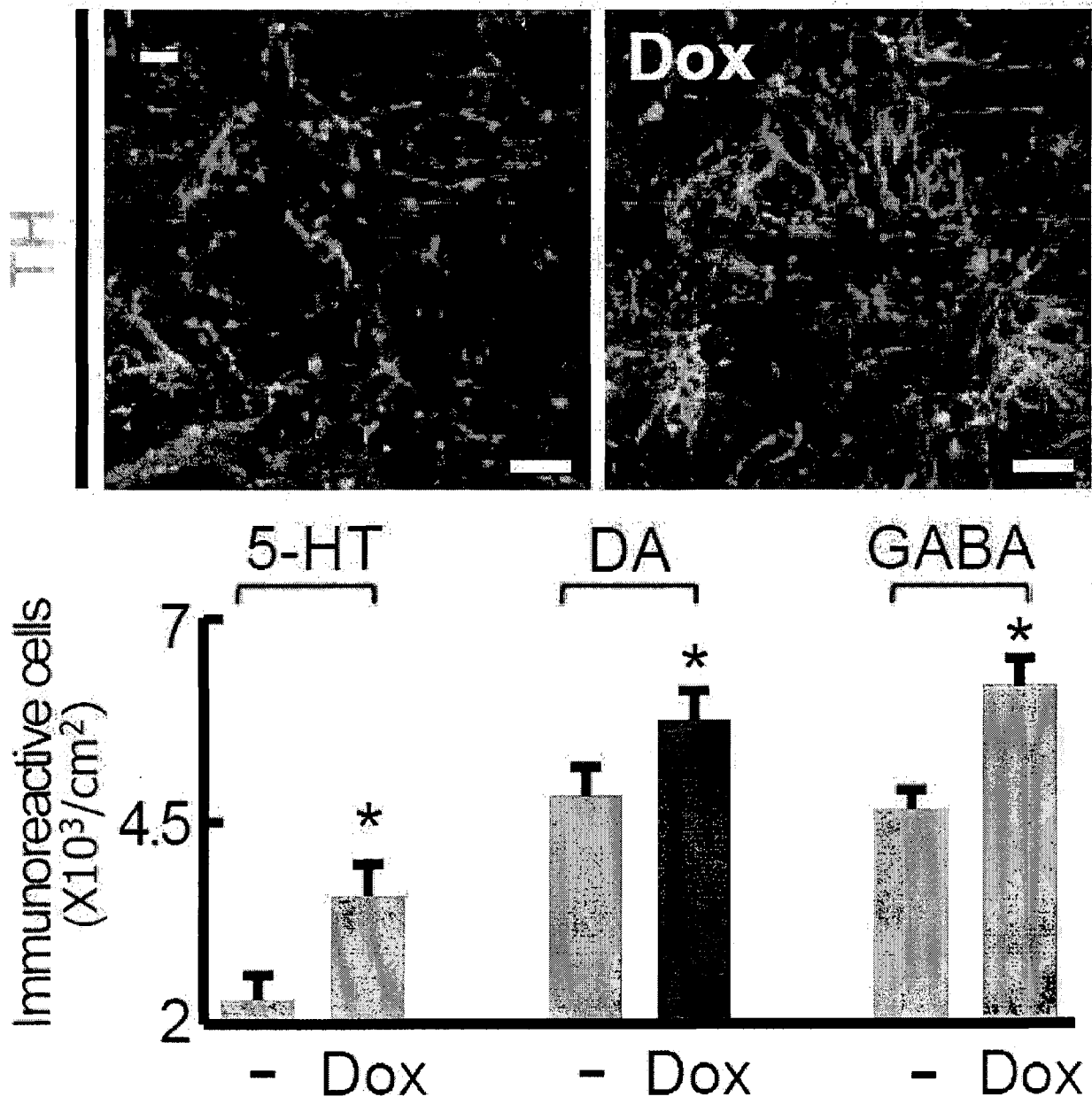
2/32

도 2

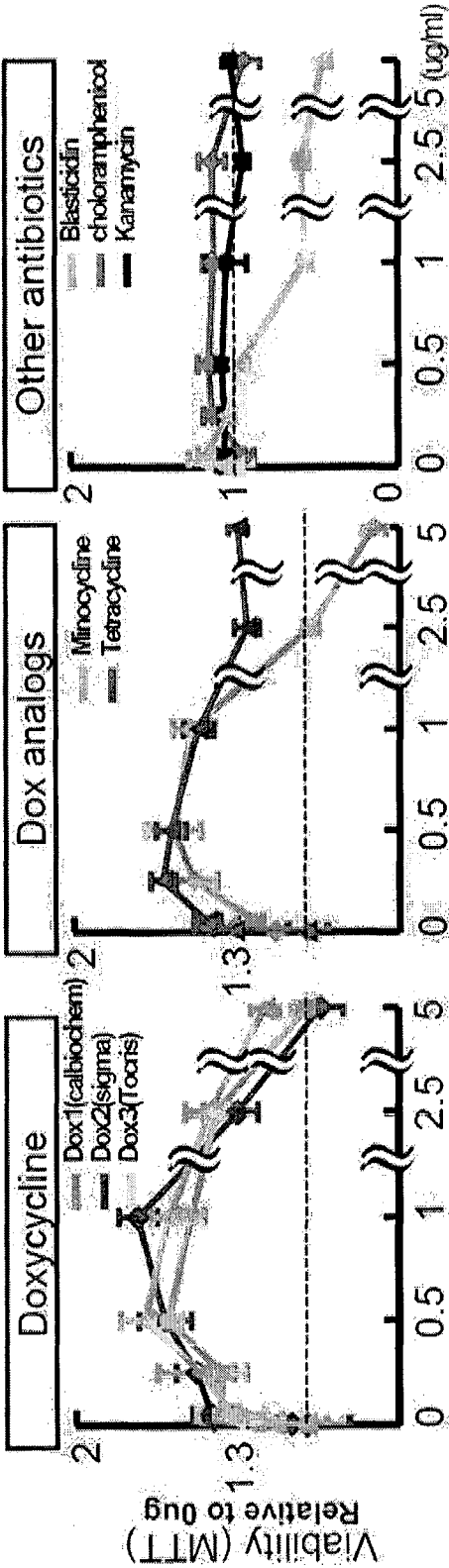


3/32

도 3



도 4



5/32

도 5

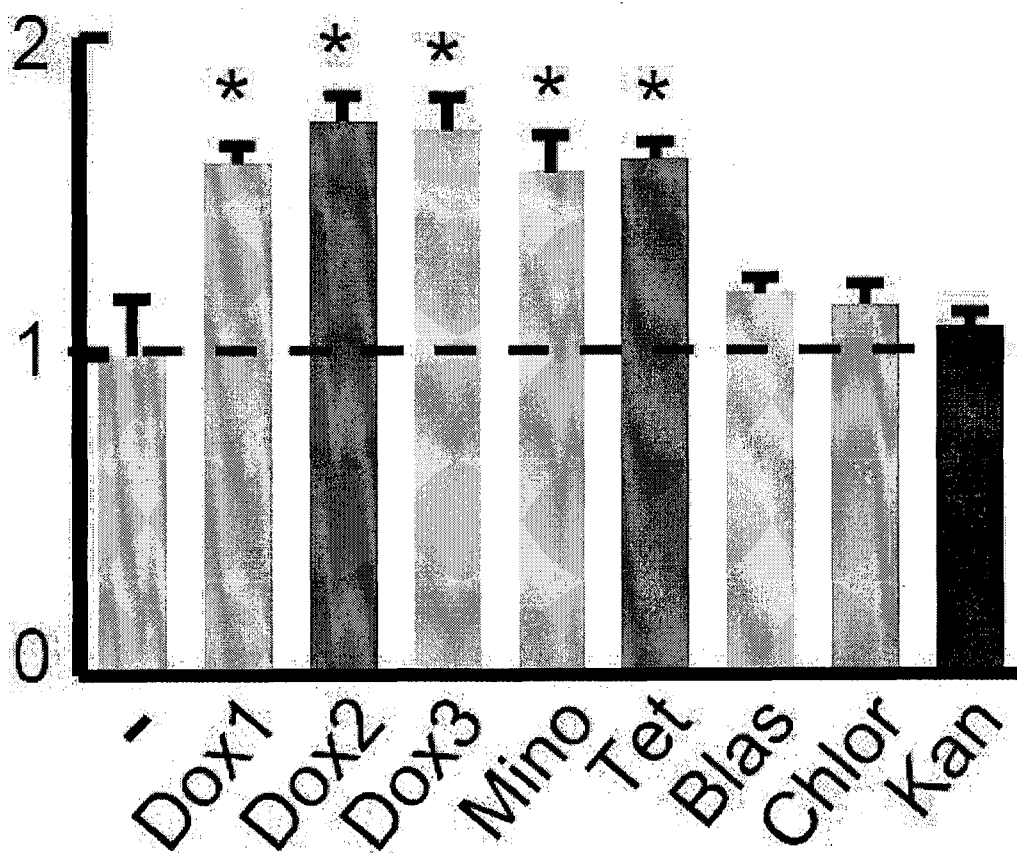
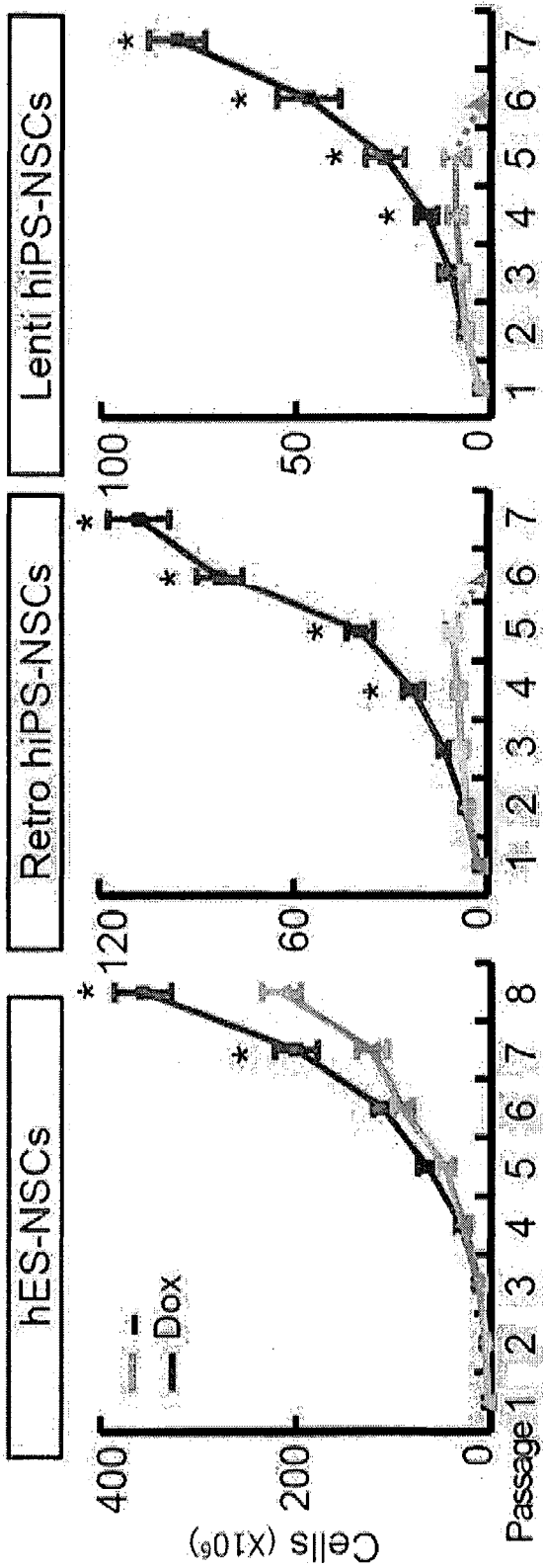
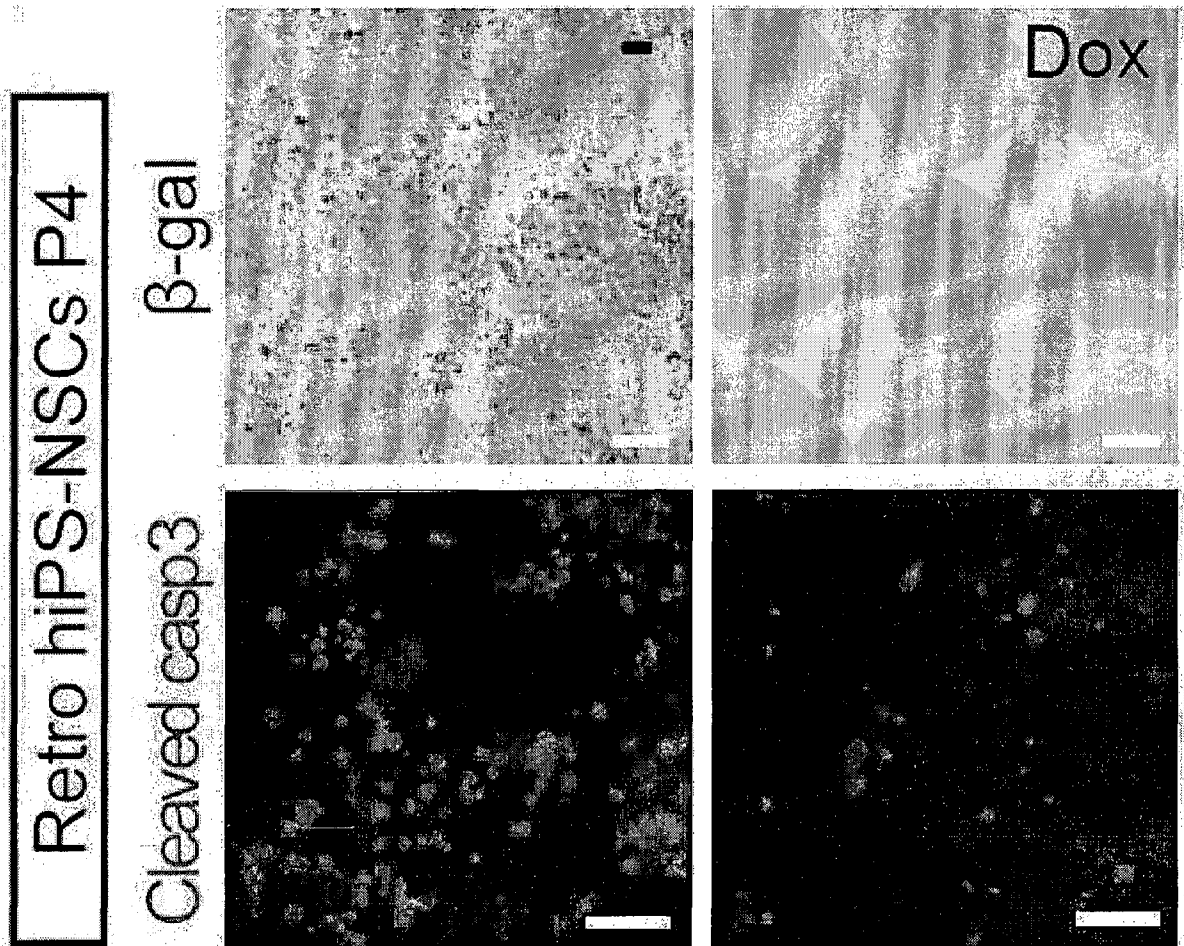


Figure 6



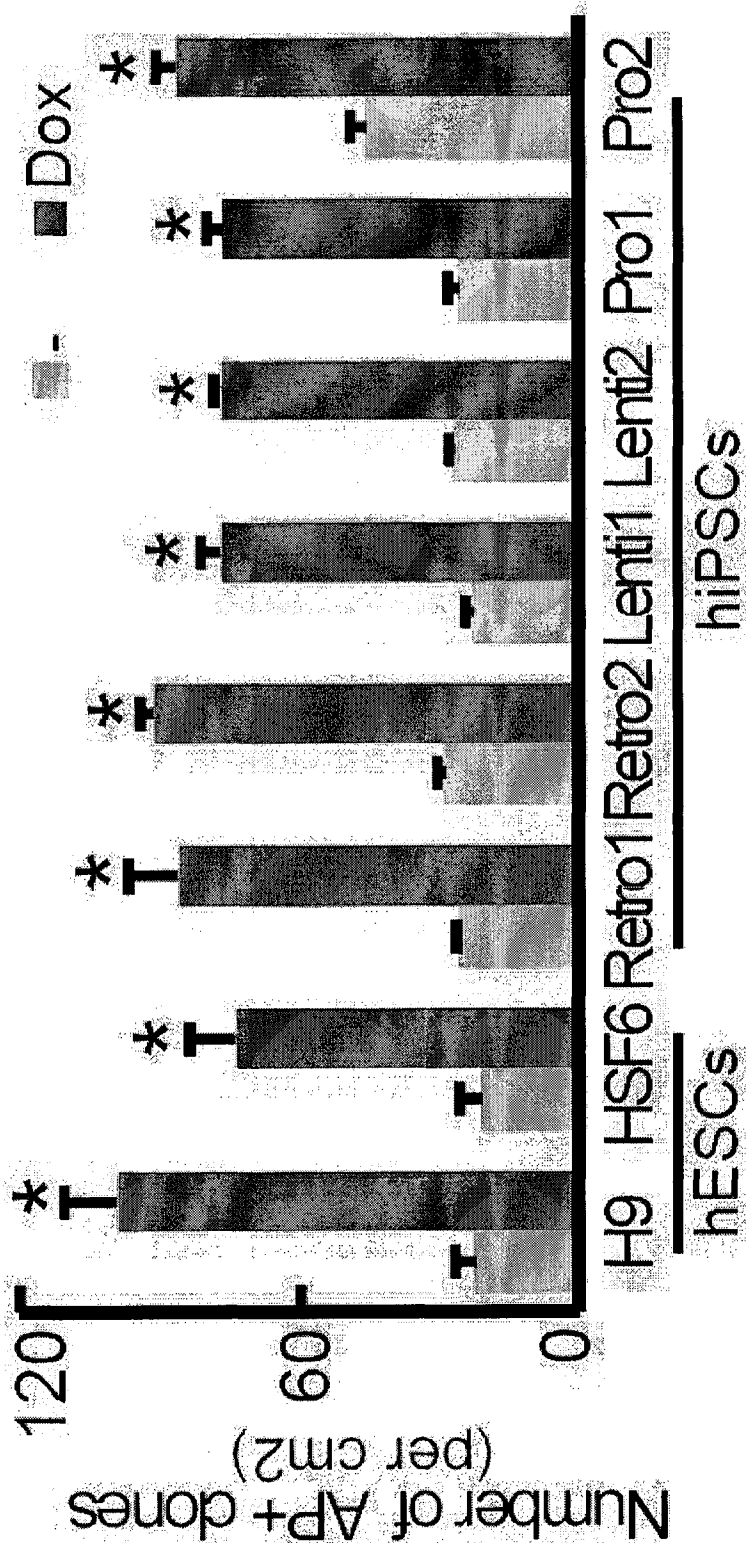
7/32

도 7



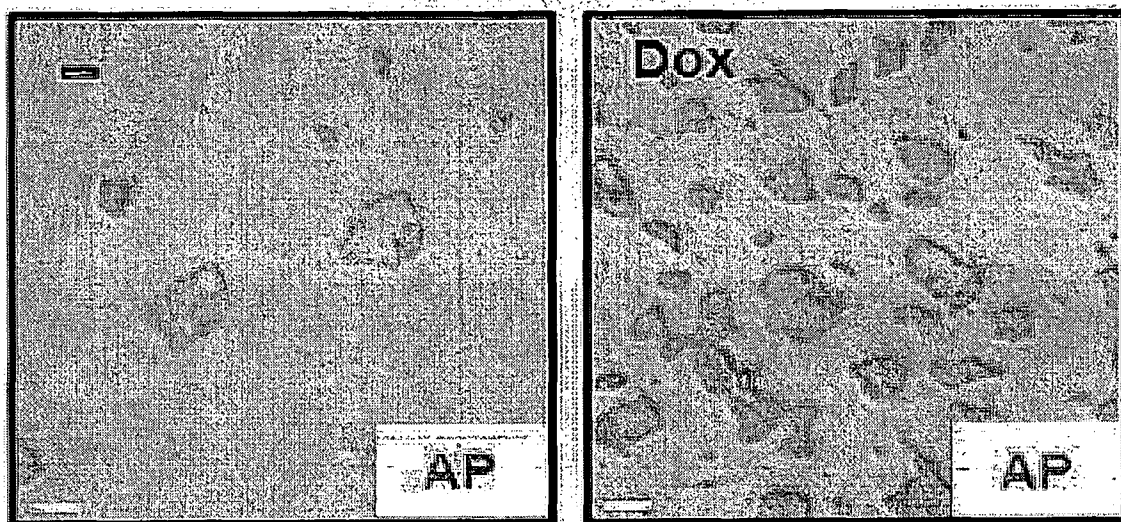
8/32

Figure 8



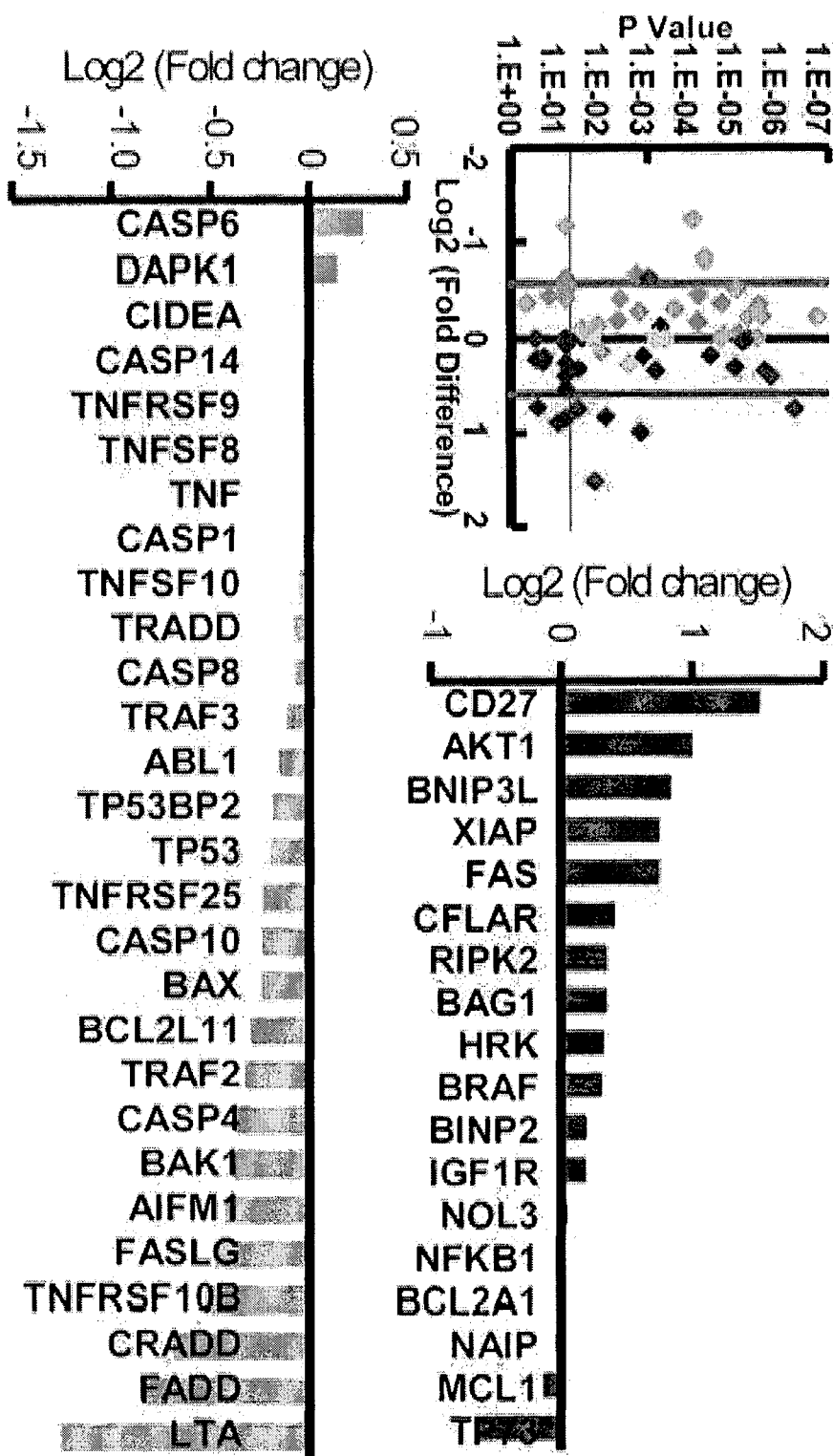
9/32

도 9



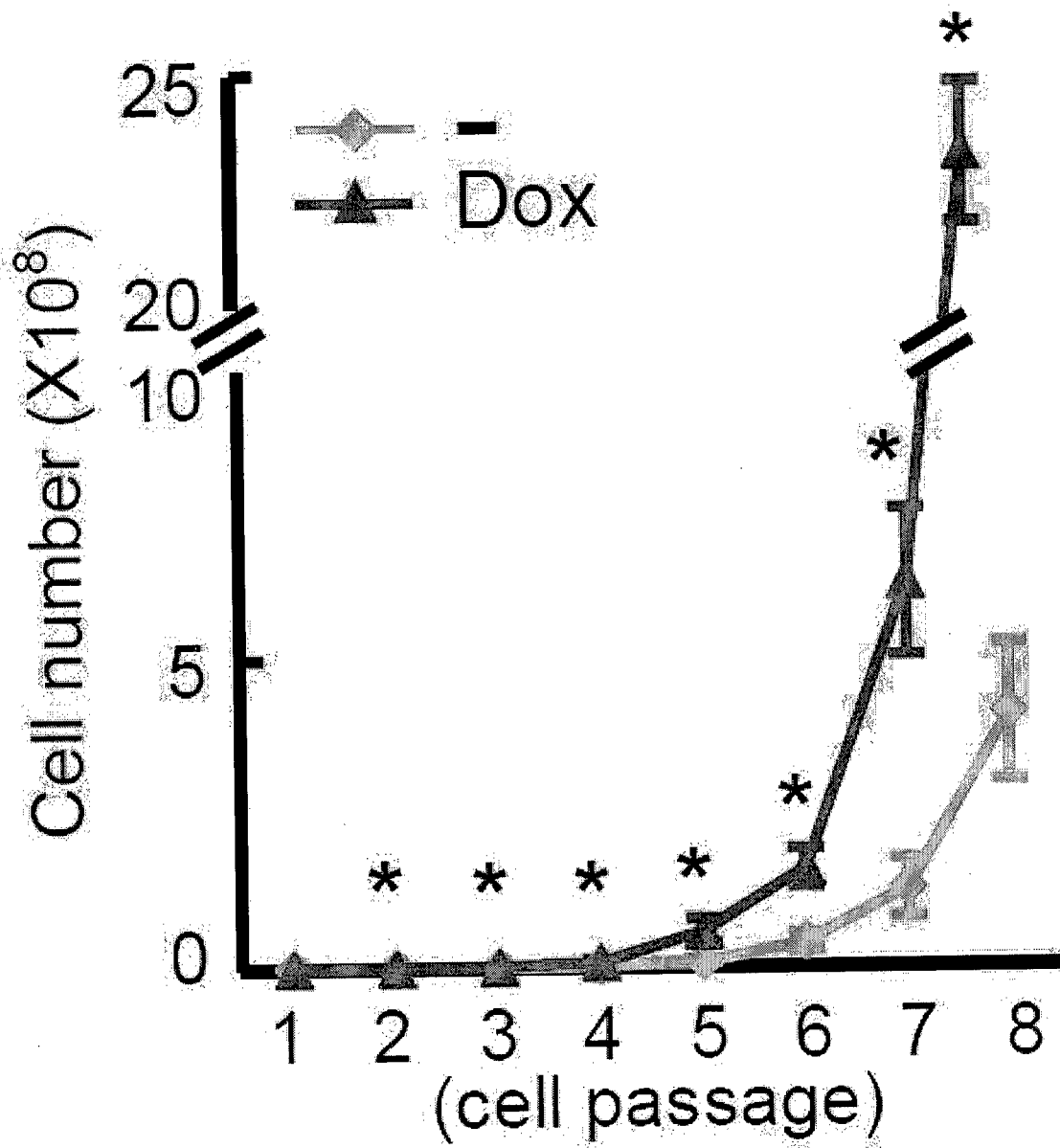
10/32

도 10



11/32

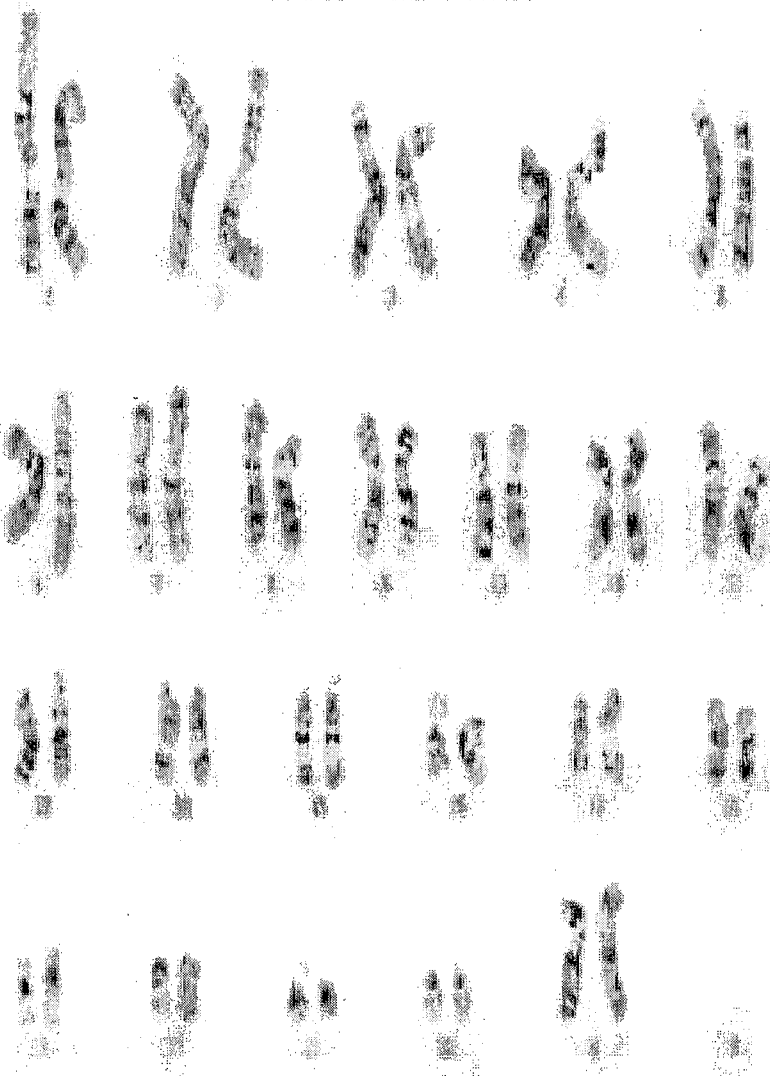
도 11



12/32

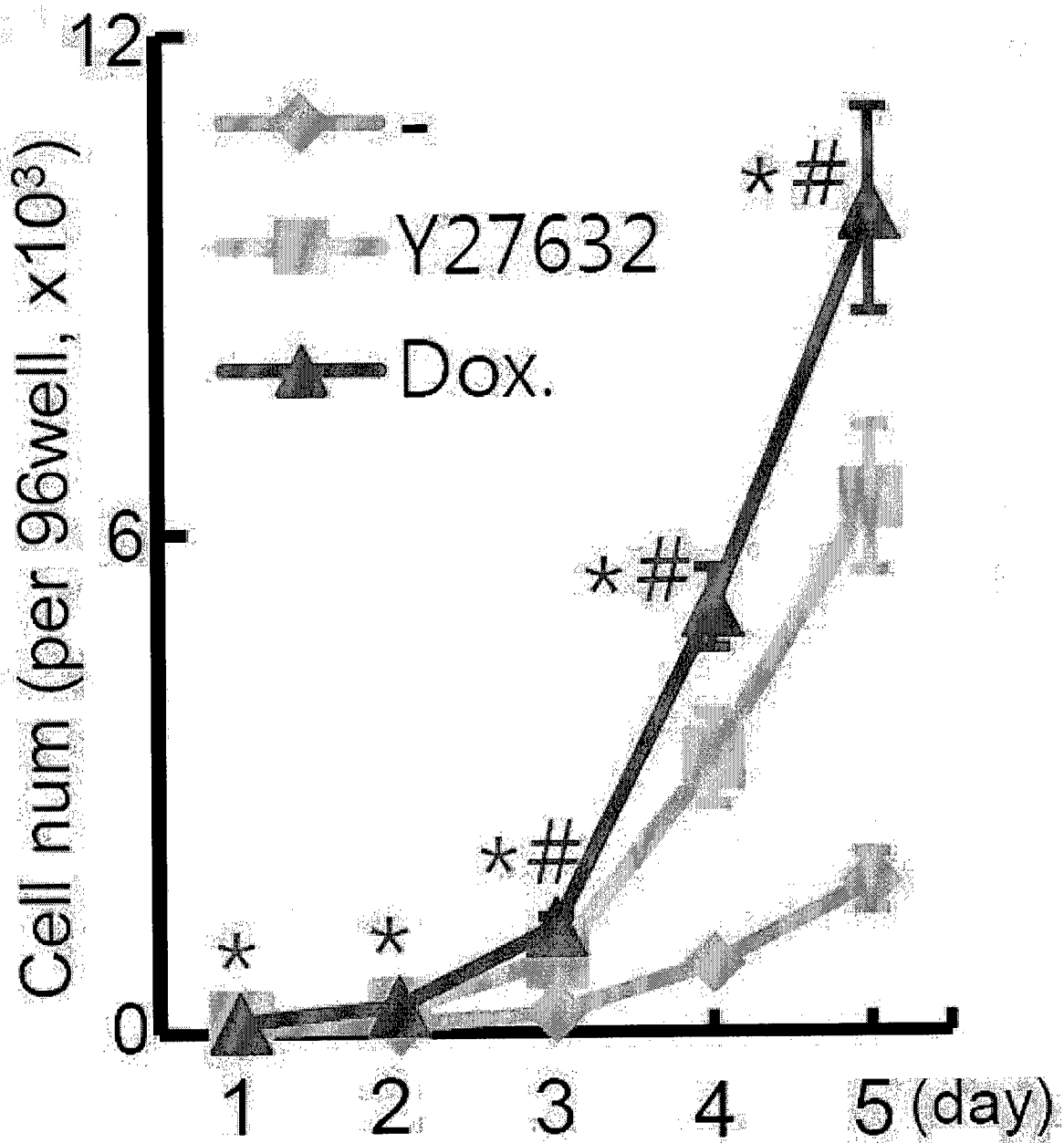
도 12

Karyotype of
Dox-treated H9,
46 XX



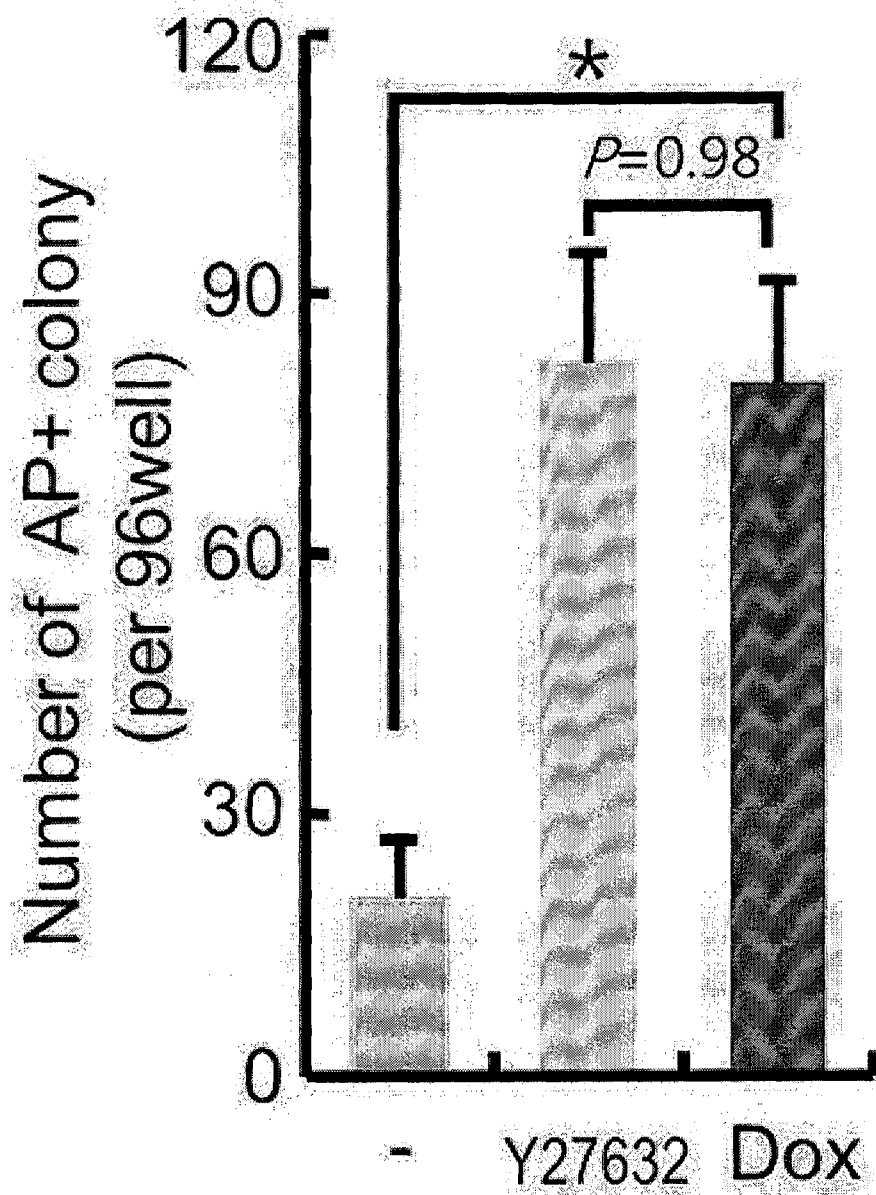
13/32

도 13



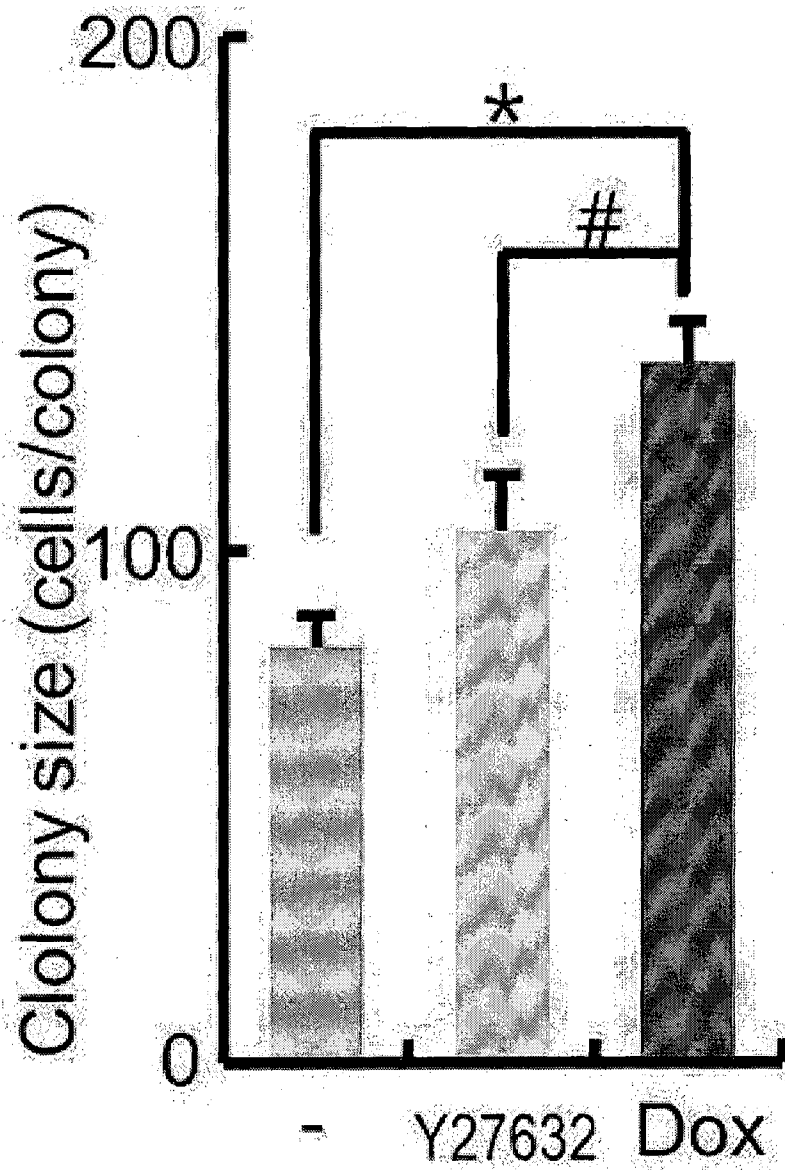
14/32

도 14



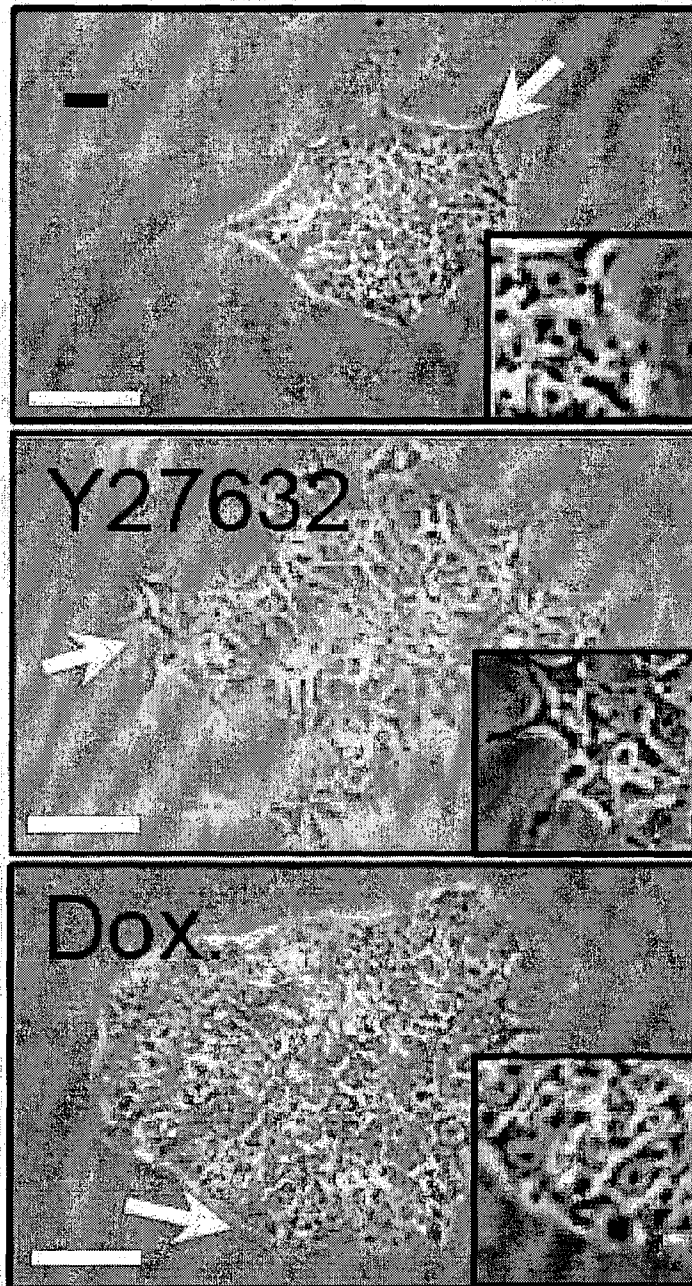
15/32

도 15



16/32

도 16



17/32

도 17

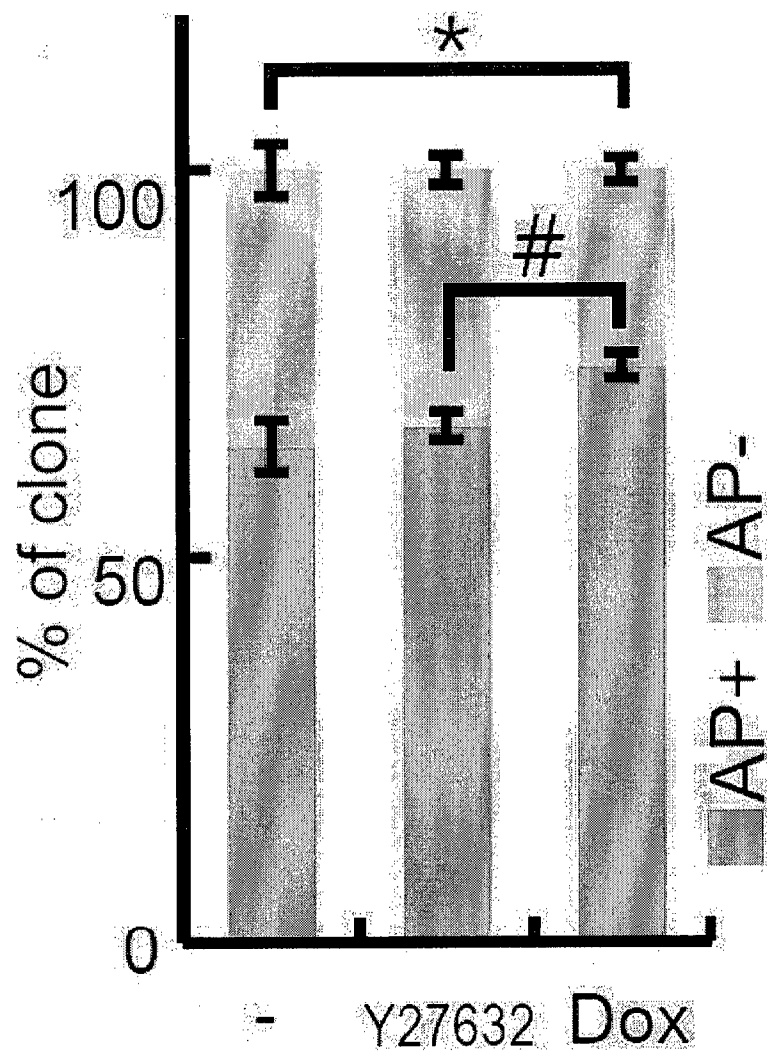
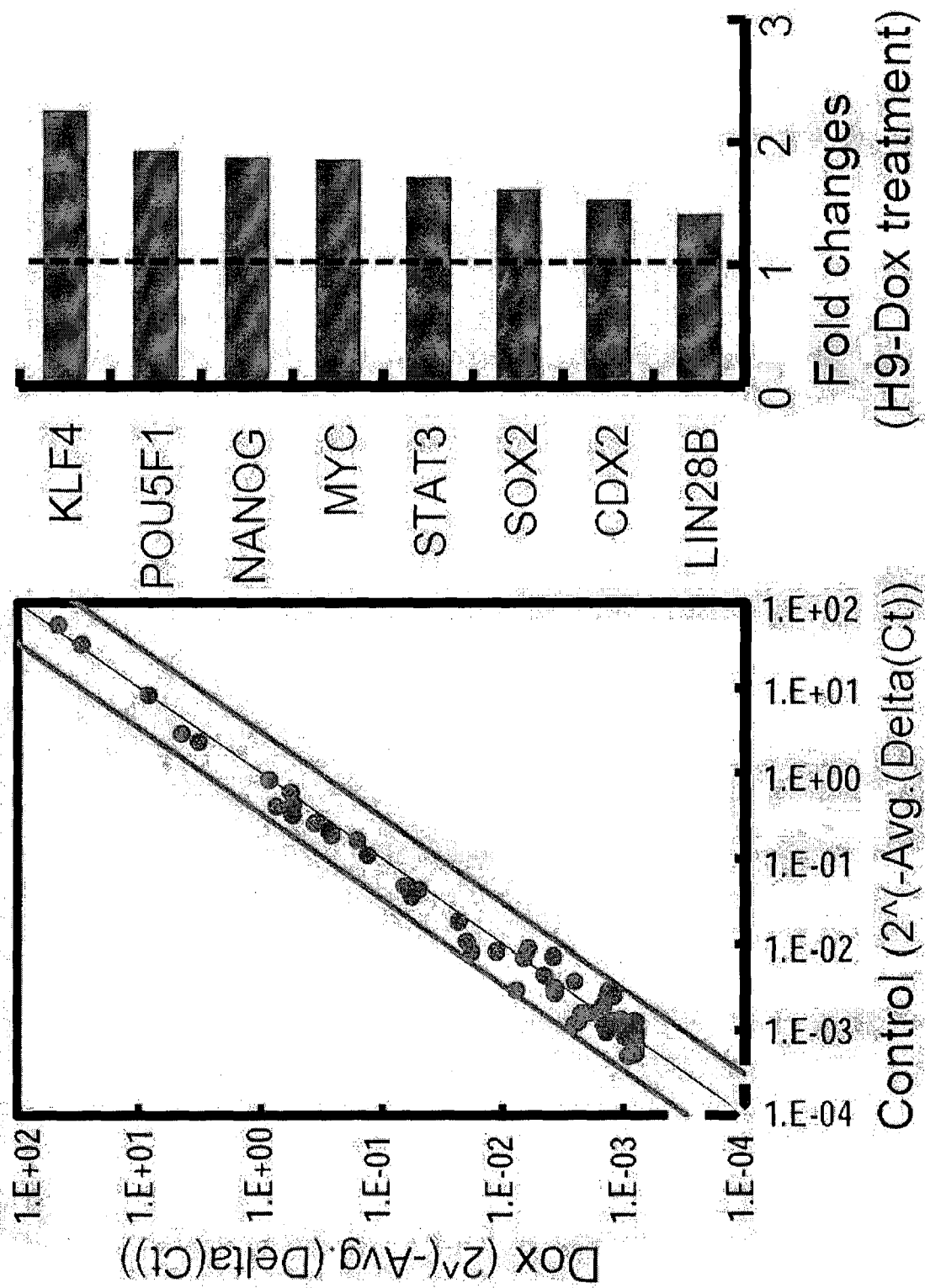
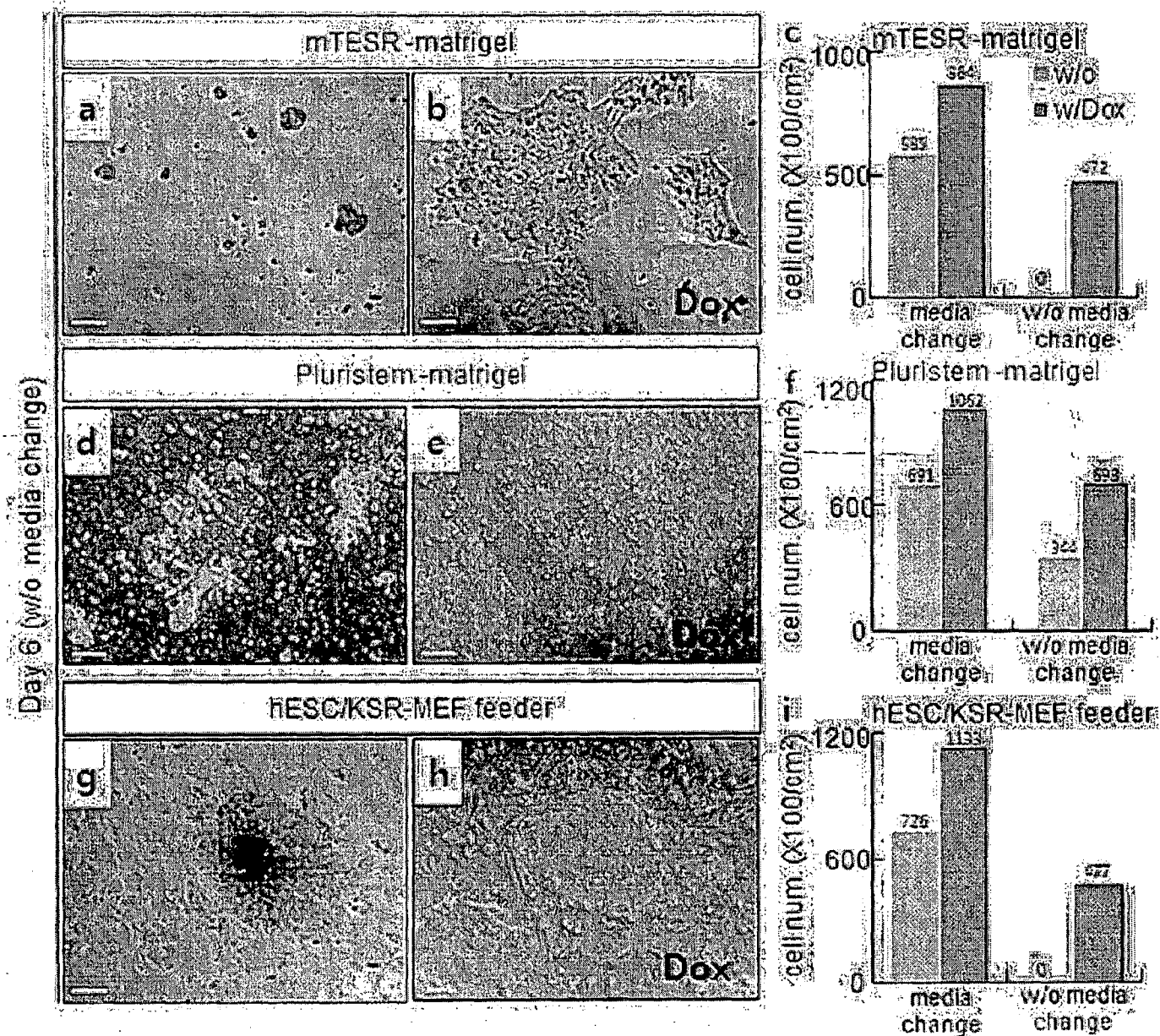


Figure 18

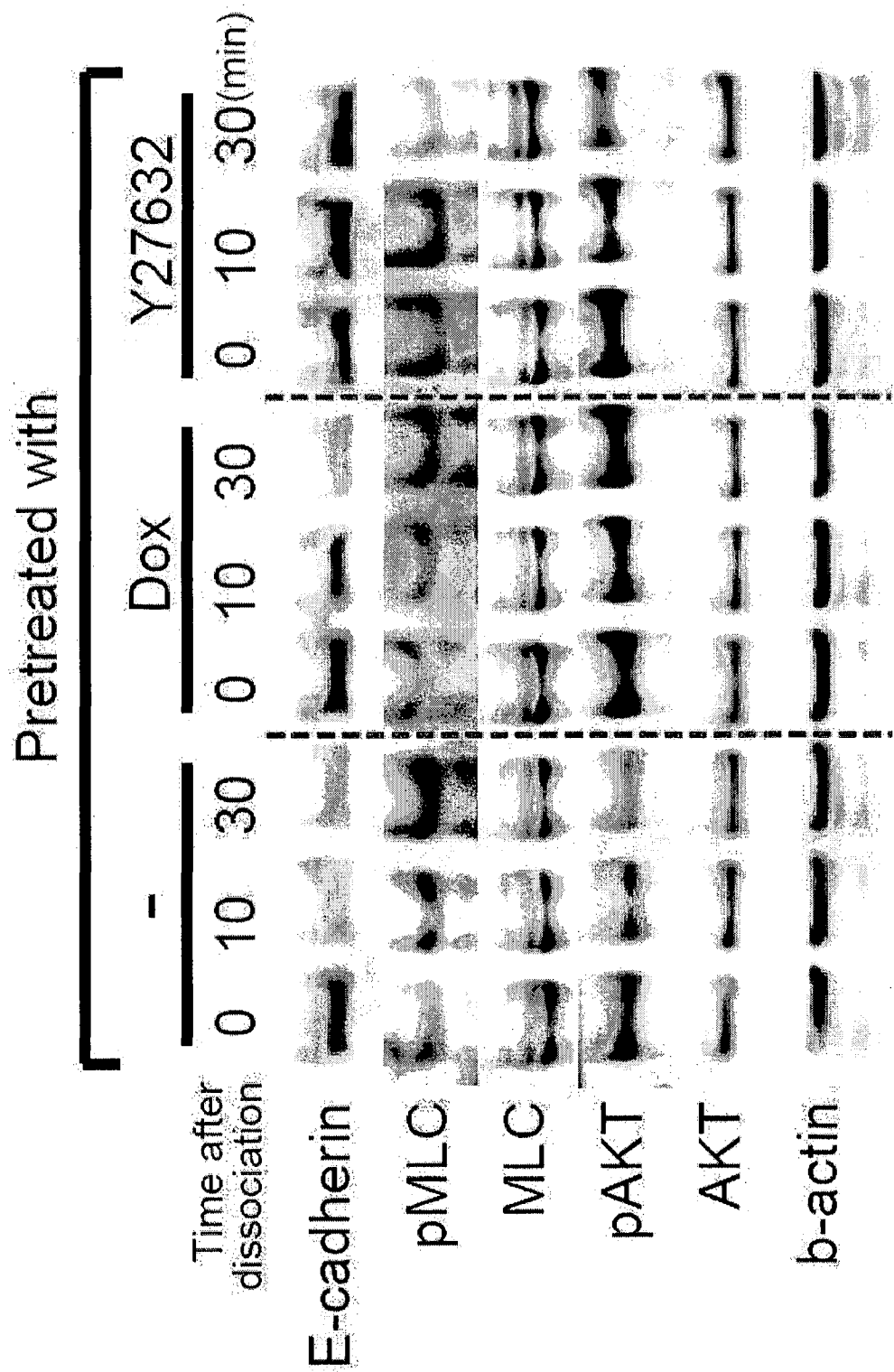


19/32

도 19

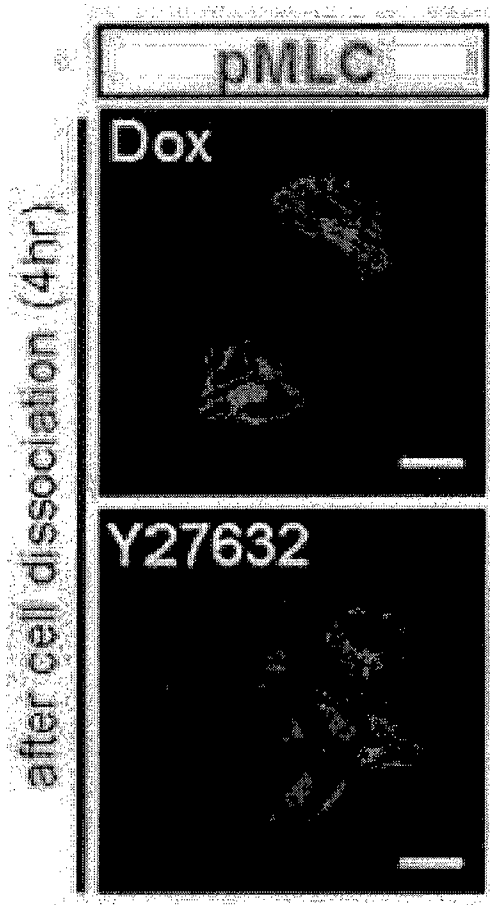


도 20



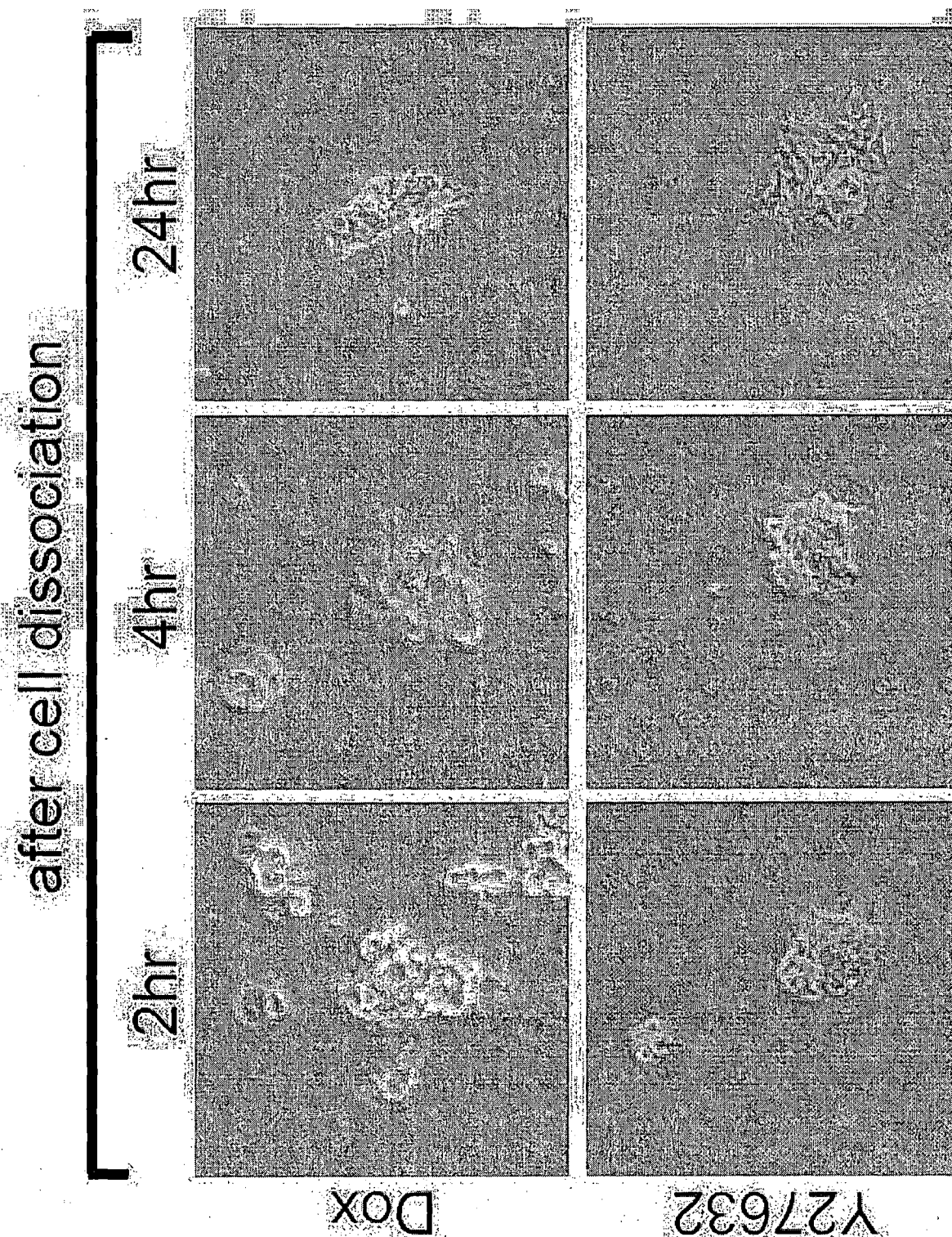
21/32

도 21

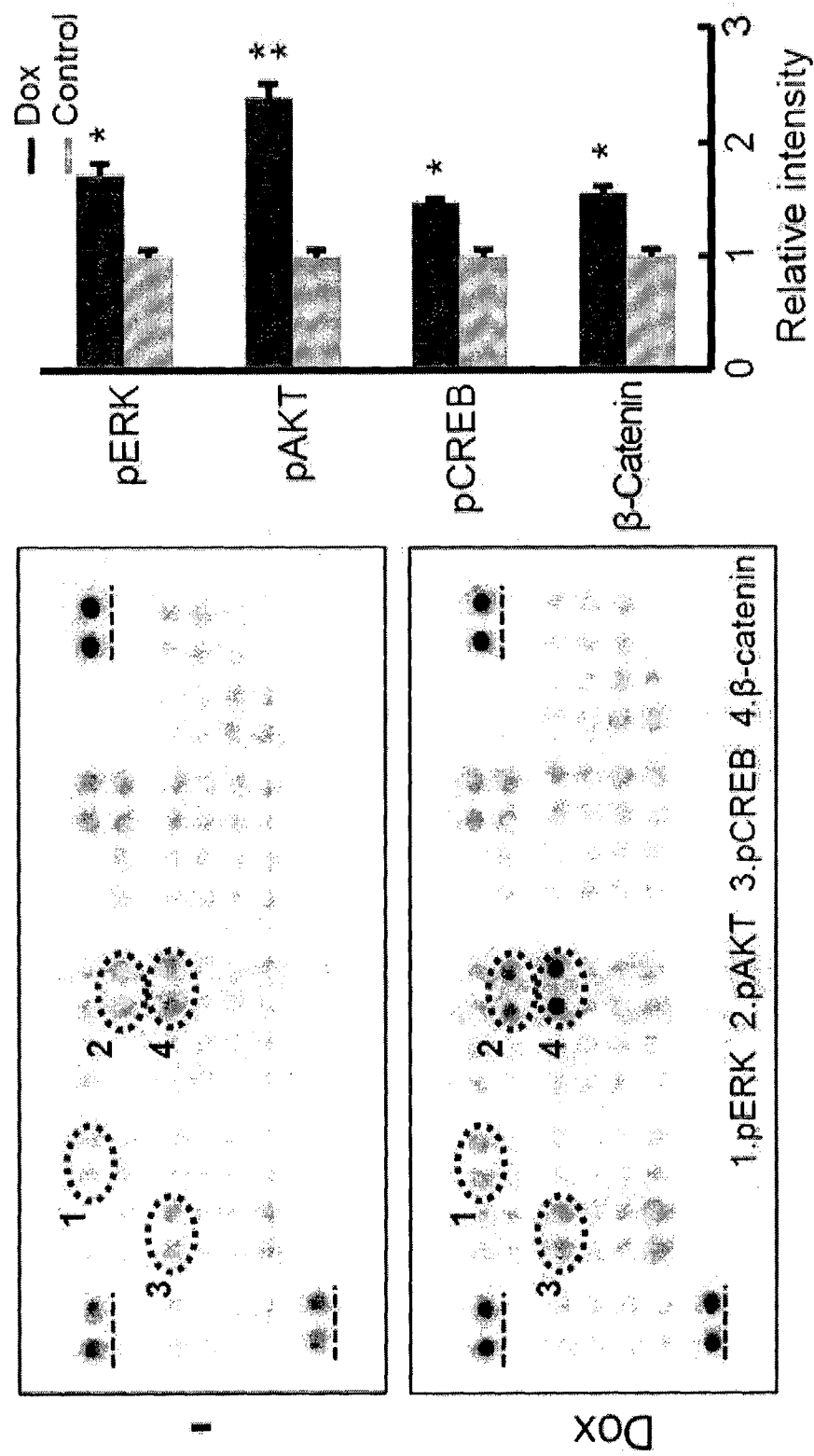


22/32

도 22

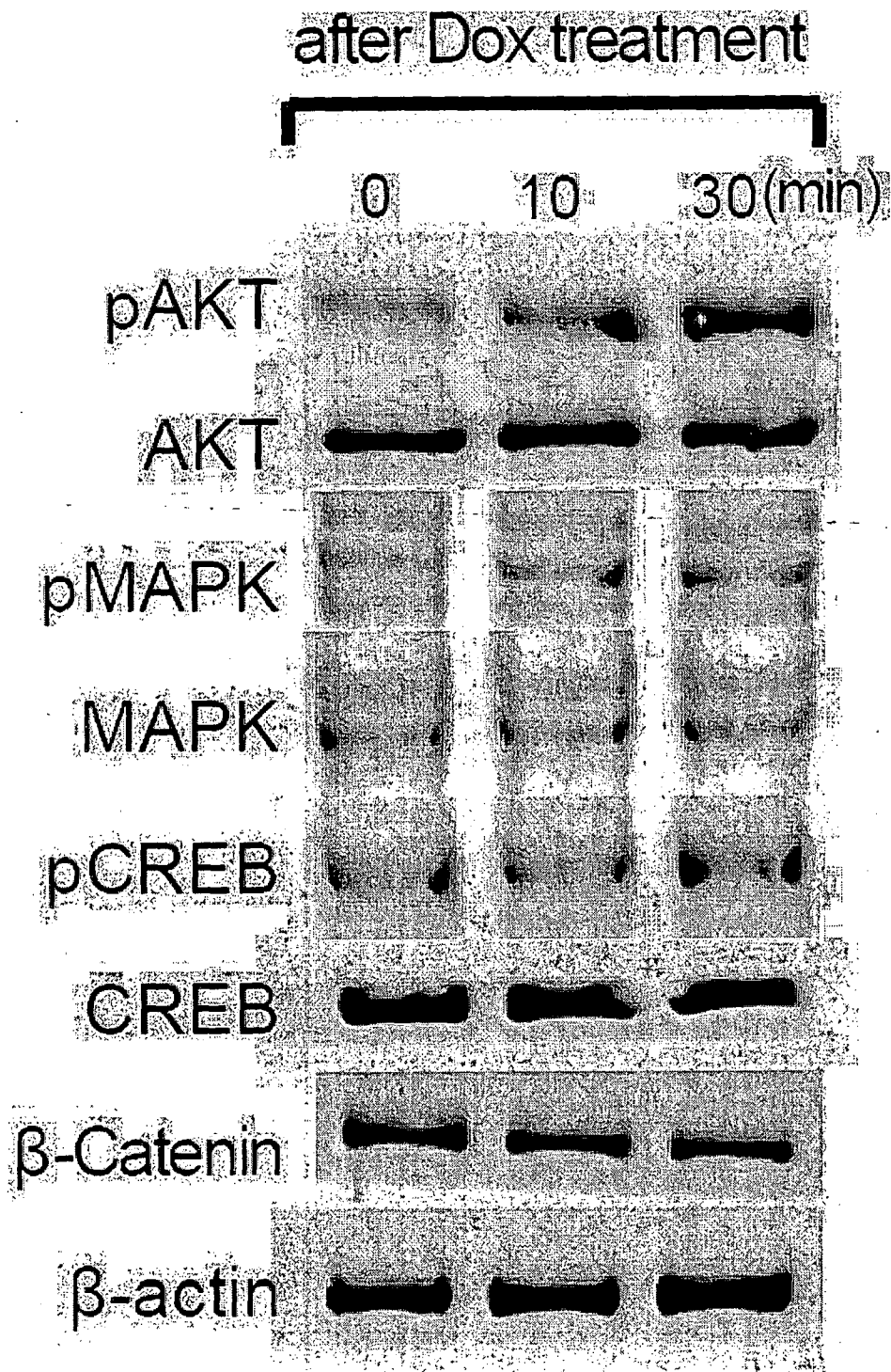


도 23



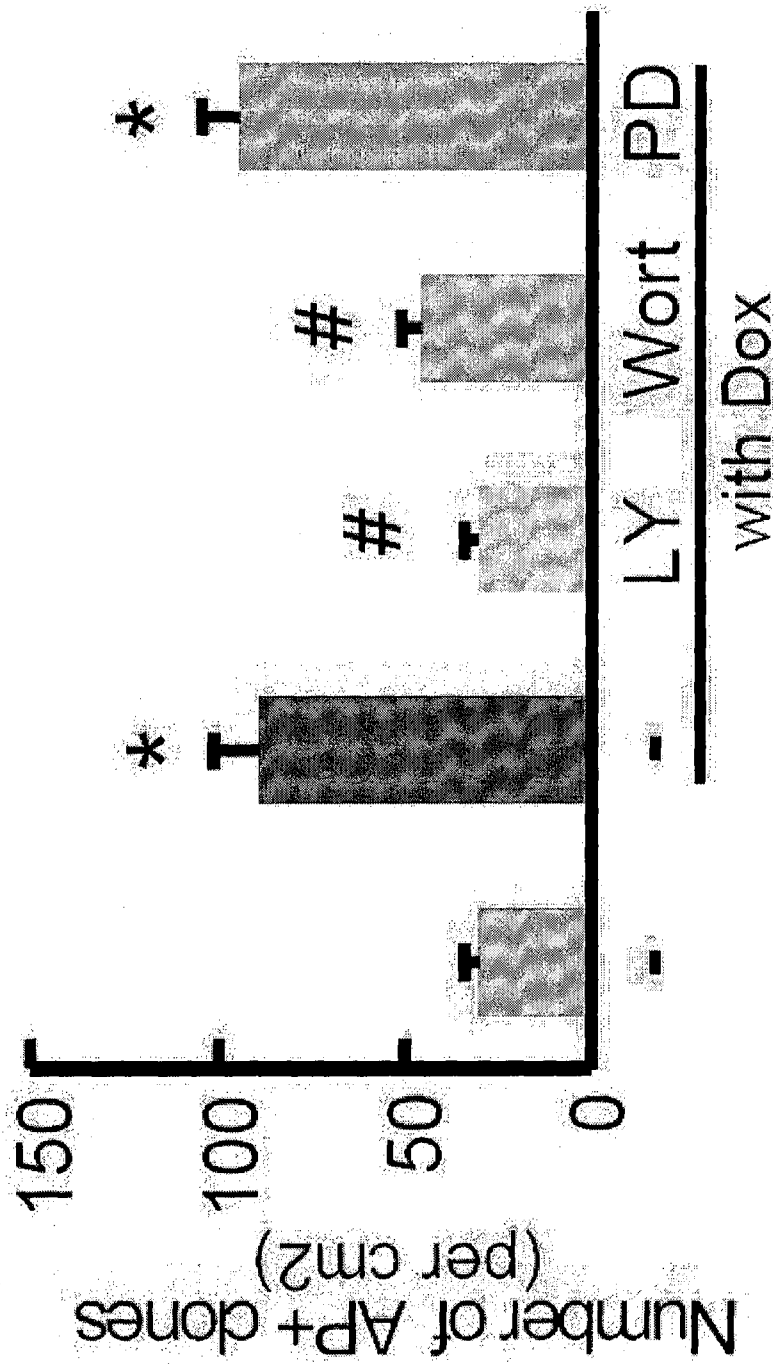
24/32

도 24

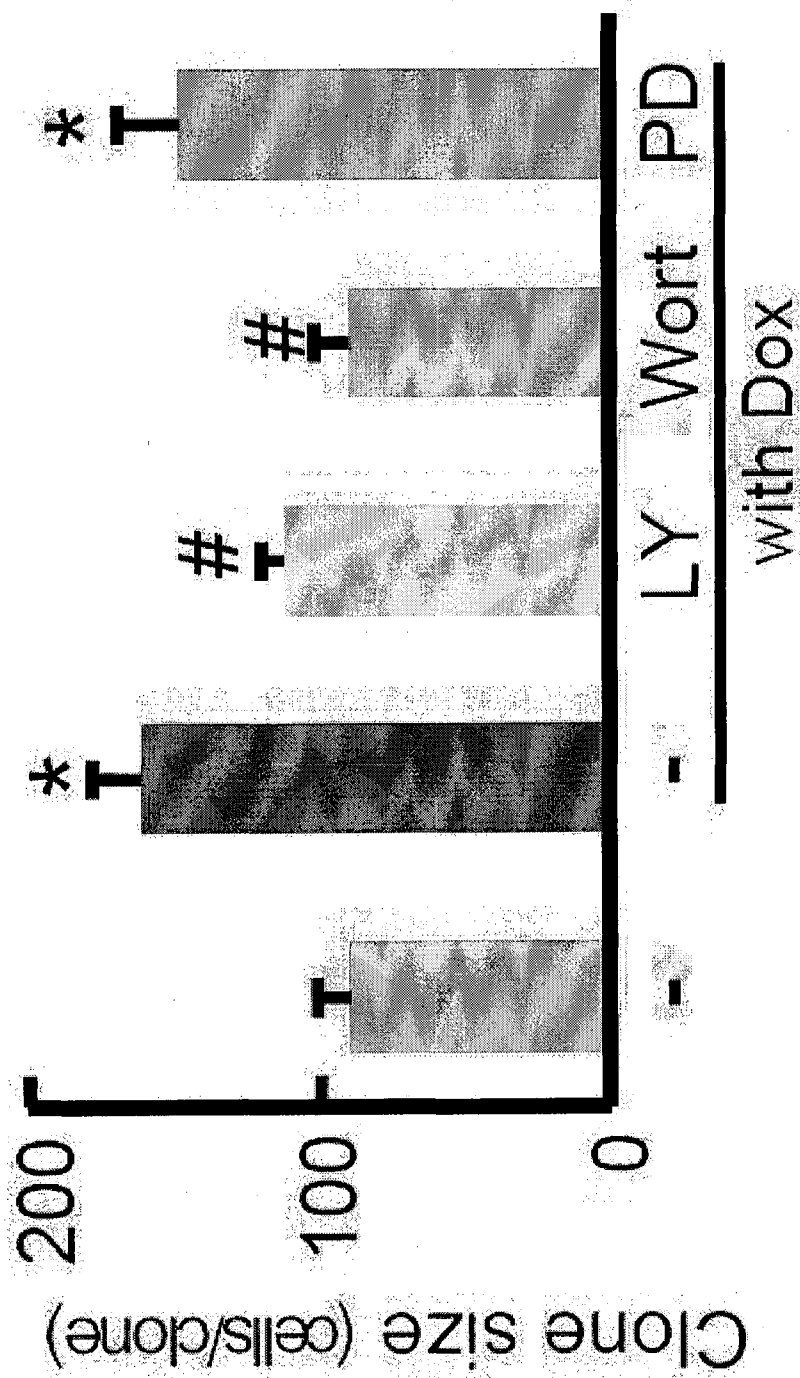


25/32

Figure 25

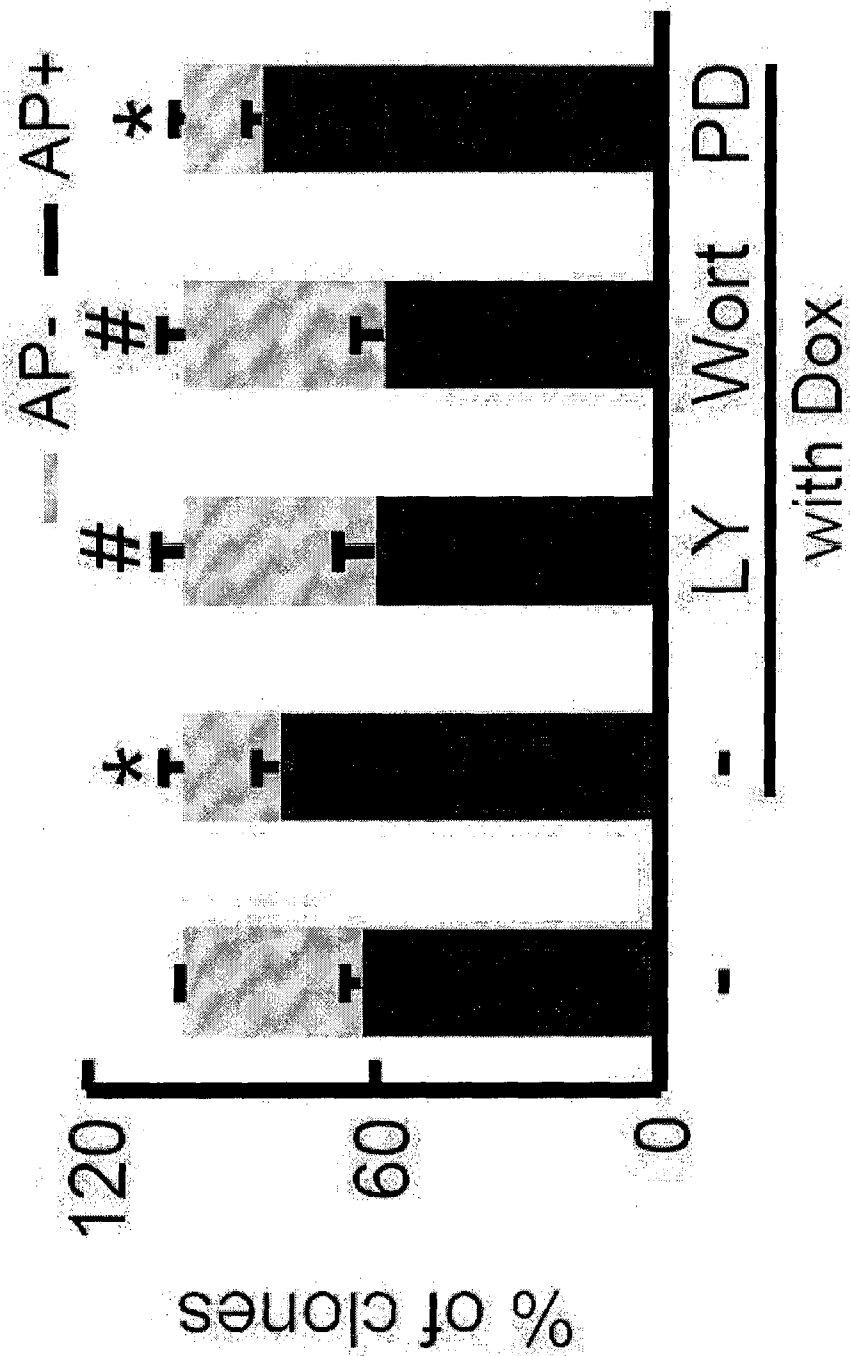


도 26

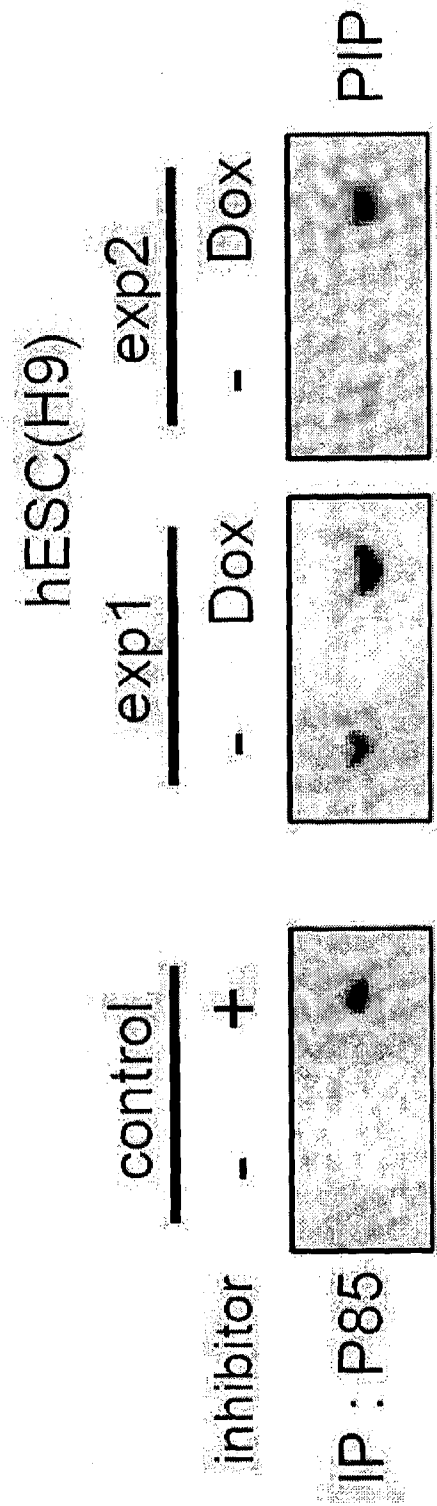


27/32

도 27

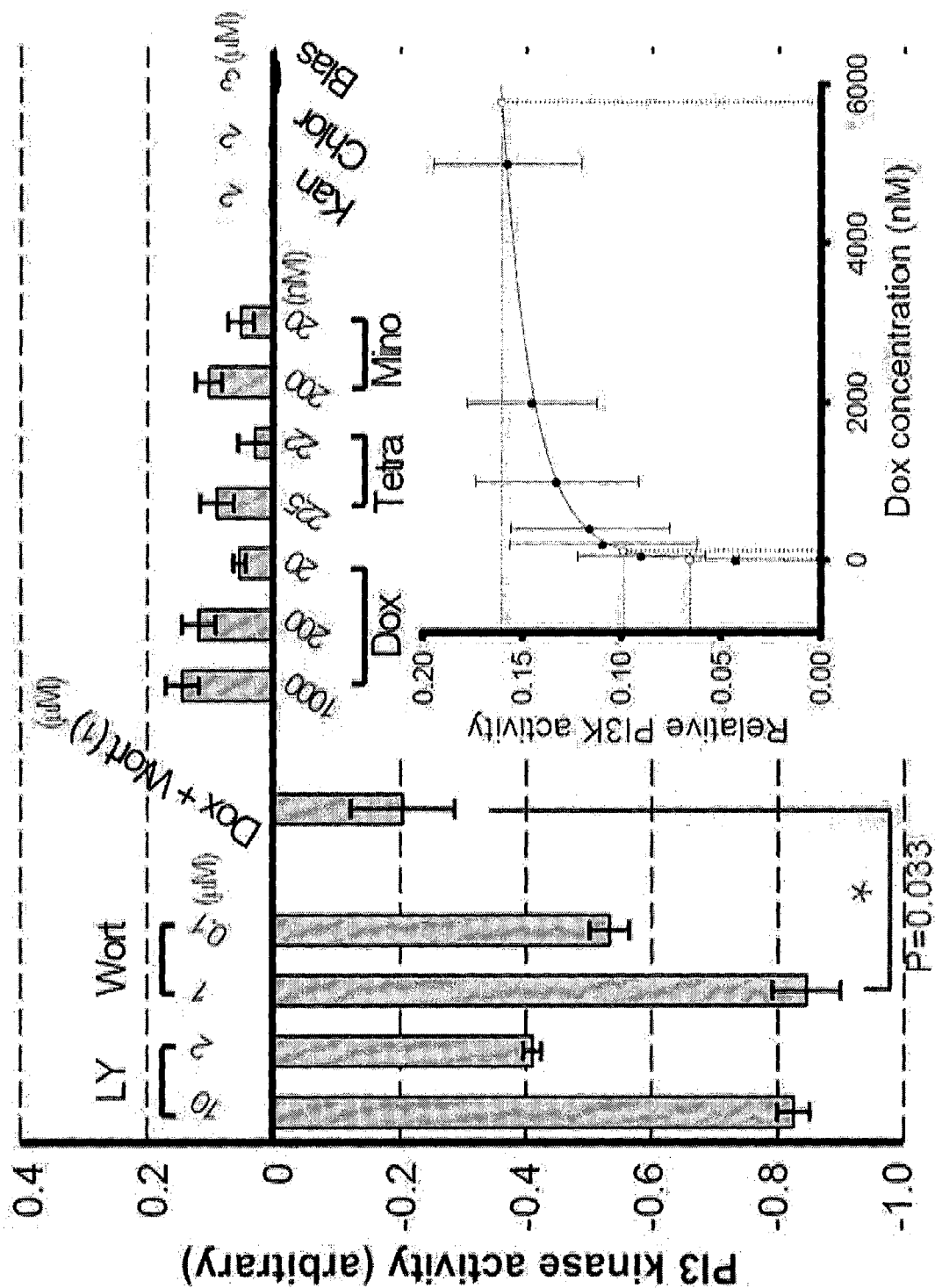


도 28



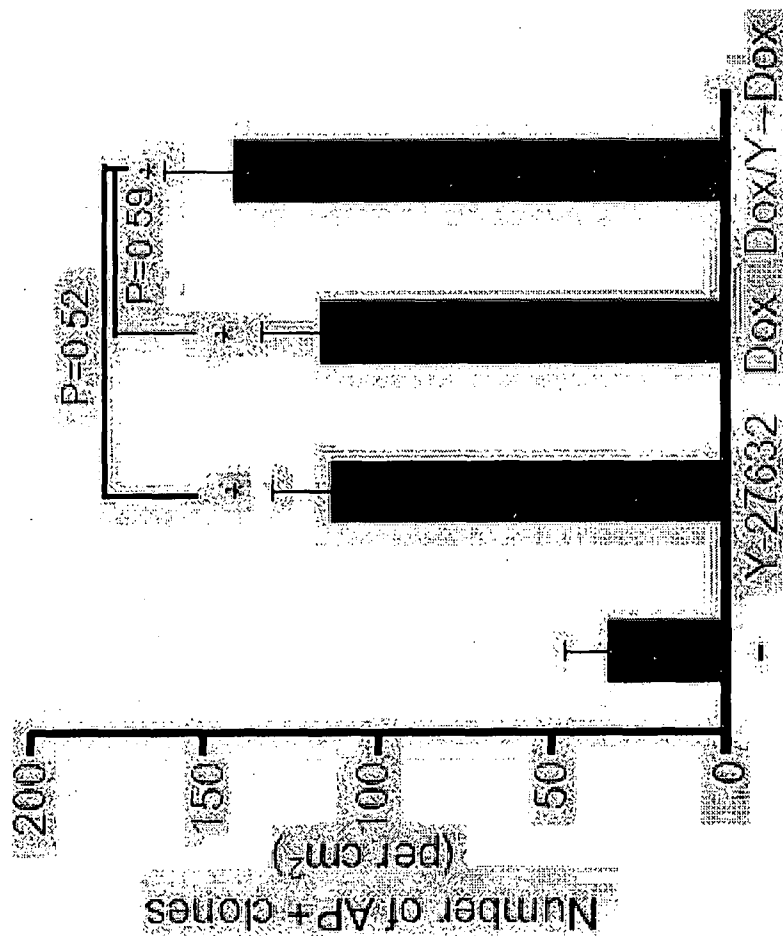
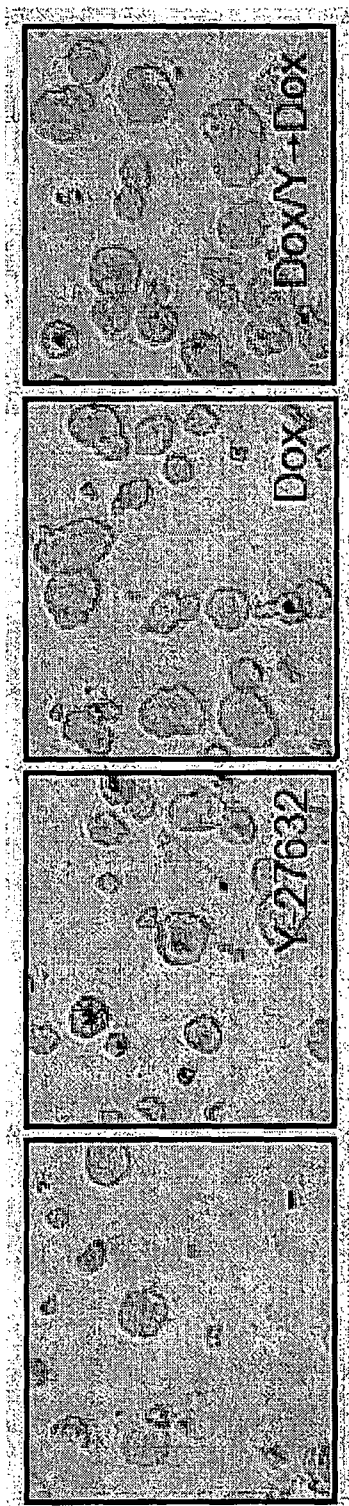
29/32

5 29



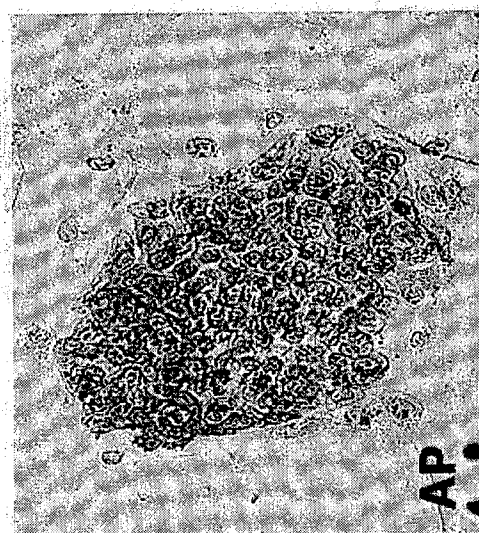
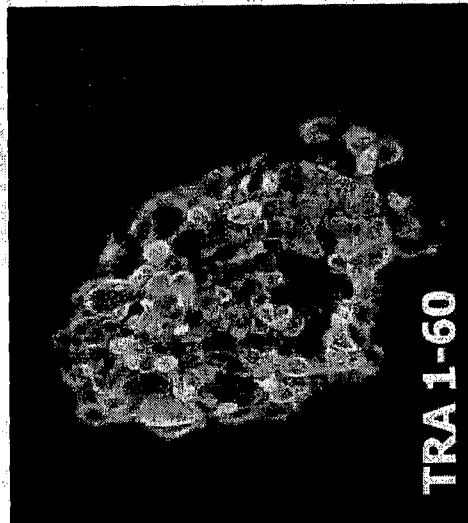
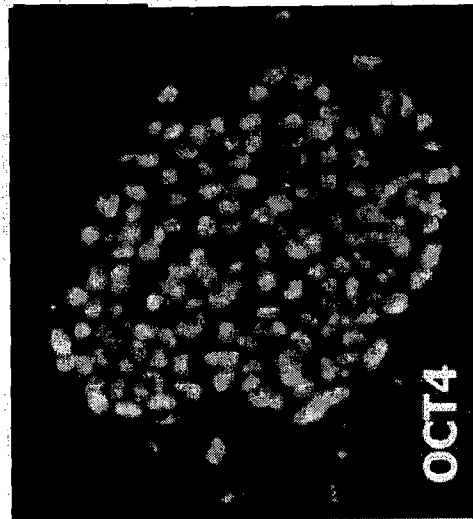
30/32

도 30



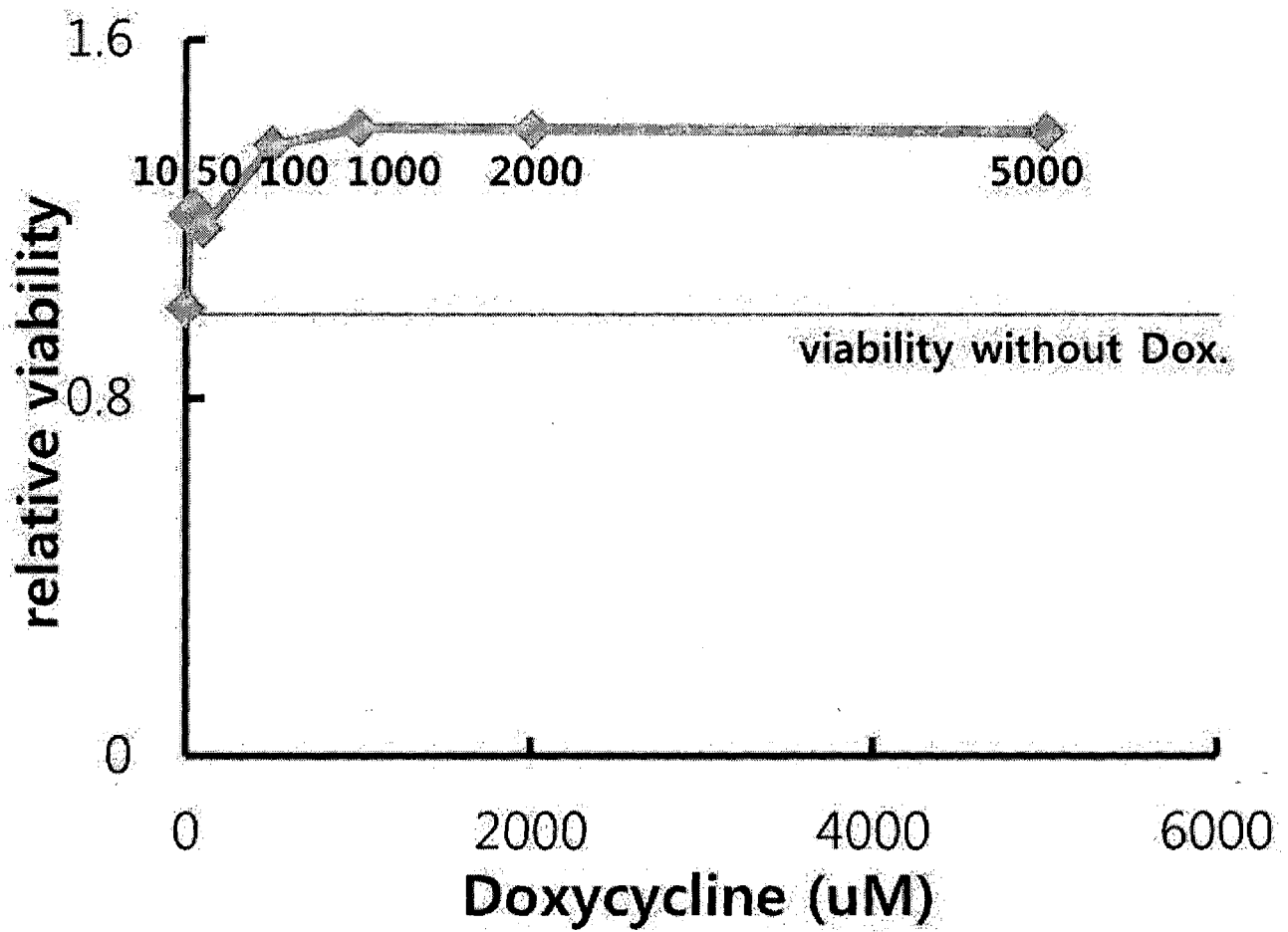
31/32

도 31



32/32

도 32



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/002992**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/02(2006.01)i, C12N 5/0735(2010.01)i, C12N 5/074(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 5/02; C12N 5/00; C12N 5/06; C12N 5/08; C12N 15/09; C12N 15/86; C12N 5/0735; C12N 5/074

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: doxycycline, stem cell, neural stem cell, survival, proliferation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MALIK, YS. et al., "Doxycycline can stimulate cytoprotection in neural stem cells with oxygen-glucose deprivation-reoxygenation injury: A potential approach to enhance effectiveness of cell transplantation therapy", Biochemacal and Biophysical Research Communications, vol. 432, 2013, pp. 355-358. See abstract; fig. 2-4.	1-11
Y		12,13
X	WATANABE, K. et al., "A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells", Nature Biotechnology, vol. 25, no. 6, June 2007, pp. 681-686. See abstract; fig. 2-3.	1-11
Y		12,13
X	US 2005-0176140 A1 (BENEDICT, Daniel et al.) 11 August 2005 See claim 4.	1-11
Y		12,13
X	US 2010-0062534 A1 (HOCHEDLINGER, Konrad et al.) 11 March 2010 See paragraphs [0105]-[0119].	1,3,6,10
A		2,4,5,7-9,11-13



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

"I" 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

18 JUNE 2015 (18.06.2015)

Date of mailing of the international search report

18 JUNE 2015 (18.06.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/002992

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2103685 A1 (HELMHOLTZ ZENTRUM MNCHEN DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FUR GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH)) 23 September 2009	1,3,6,10
A	See claim 10; paragraphs [0106]-[0111].	2,4,5,7-9,11-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/002992

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2005-0176140 A1	11/08/2005	NONE	
US 2010-0062534 A1	11/03/2010	NONE	
EP 2103685 A1	23/09/2009	EP 2268796 A1	05/01/2011
		JP 2011-516042 A	26/05/2011
		US 2011-0061118 A1	10/03/2011
		WO 2009-115295 A1	24/09/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/02(2006.01)i, C12N 5/0735(2010.01)i, C12N 5/074(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/02; C12N 5/00; C12N 5/06; C12N 5/08; C12N 15/09; C12N 15/86; C12N 5/0735; C12N 5/074

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:독시사이클린, 줄기세포, 신경줄기세포, 생존, 증식

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	MALIK, YS. et al., 'Doxycycline can stimulate cytoprotection in neural stem cells with oxygen-glucose deprivation-reoxygenation injury: A potential approach to enhance effectiveness of cell transplantation therapy', Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.432, 2013, pp.355-358. 초록; Fig.2-4 참조.	1-11
Y		12, 13
X	WATANABE, K. et al., 'A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells', Nature Biotechnology, vol.25, no.6, 2007.6., pp.681-686. 초록; Fig.2-3 참조.	1-11
Y		12, 13
X	US 2005-0176140 A1 (DANIEL BENEDICT 외 1명) 2005.08.11. 청구항 4 참조.	1-11
Y		12, 13
X	US 2010-0062534 A1 (HOCHEDLINGER KONRAD 외 1명) 2010.03.11. 식별번호 [0105]~[0119] 참조.	1, 3, 6, 10
A		2, 4, 5, 7-9, 11-13

☒ 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

2015년 06월 18일 (18.06.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 06월 18일 (18.06.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이효진

전화번호 +82-42-481-8743



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	EP 2103685 A1 (HELMHOLTZ ZENTRUM MNCHEN DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FUR GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH)) 2009.09.23. 청구항 10; 식별번호 [0106]~[0111] 참조.	1,3,6,10
A		2,4,5,7-9,11-13

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2005-0176140 A1	2005/08/11	없음	
US 2010-0062534 A1	2010/03/11	없음	
EP 2103685 A1	2009/09/23	EP 2268796 A1	2011/01/05
		JP 2011-516042 A	2011/05/26
		US 2011-0061118 A1	2011/03/10
		WO 2009-115295 A1	2009/09/24