

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 5월 3일 (03.05.2018)



(10) 국제공개번호
WO 2018/080038 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/0735 (2010.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/010772
- (22) 국제출원일: 2017년 9월 28일 (28.09.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0138657 2016년 10월 24일 (24.10.2016) KR
10-2017-0125324 2017년 9월 27일 (27.09.2017) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 나덕렬 (NA, Duk Lyul); 06317 서울시 강남구 언주로 110, 5동 1205호, Seoul (KR). 장중욱 (CHANG, Jong Wook); 04728 서울시 성동구 금호로 117, 104동 306호, Seoul (KR). 손효진 (SON, Hyo Jin); 05536 서울

시 송파구 토성로 38-6, 107동 202호, Seoul (KR). 명수현 (MYEONG, Su Hyeon); 07936 서울시 양천구 오목로 11길 17-8, B동 202호, Seoul (KR).

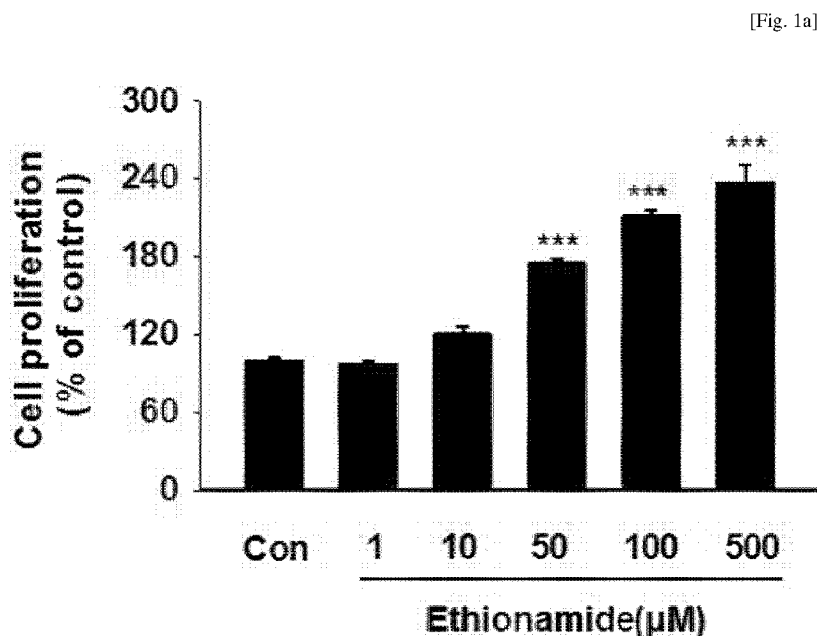
(74) 대리인: 특허법인 아이시스 (ISIS IP LAW LLC); 06160 서울시 강남구 테헤란로63길 14, 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: METHOD FOR ENHANCING PROLIFERATION CAPABILITY OF STEM CELLS USING ETHIONAMIDE

(54) 발명의 명칭: 에티오나마이드를 이용한 줄기세포 증식능 향상 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a medium composition for enhancing proliferation of stem cells, comprising ethionamide, and a use thereof. It is possible, according to the present invention, to mass-produce highly-efficient next-generation stem cells through a simple and safe method of controlling a culturing environment, without using genetic modification or viral vectors, etc.

(57) 요약서: 본 발명은, 에티오나마이드(ethionamide)를 포함하는 줄기세포 증식 향상용 배지 조성물, 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 유전자 조작이나 바이러스 벡터 등을 사용하지 않으면서 배양환경 조절이라는 간편하고도 안전한 방법을 통하여, 차세대 고효율 줄기세포를 대량 생산할 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2018/080038 A1



LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 에티오나마이드를 이용한 줄기세포 증식능 향상 방법 기술분야

- [1] 본 발명은, 에티오나마이드(ethionamide)를 포함하는 줄기세포 증식 향상용 배지 조성물, 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 중간엽 줄기세포는 그 다분화능과 함께, 조직의 재생, 치료 및 면역 반응에 관여하는 세포로 알려져 있어, 이와 같은 특성을 이용하여 제대혈, 골수 등으로부터 중간엽 줄기세포를 분리 배양하여 다양한 질환의 치료제로 개발하고자 하는 노력이 있어왔다. 그러나 줄기세포를 계대배양함에 따라 노화가 진행되며 세포 분화가 일어나므로 줄기세포능(stemness)을 잃게 되는 문제가 있다.
- [3] 즉, 윤리적인 문제가 없는 성체줄기세포를 이용한 세포치료제의 개발을 위해서는, 세포의 줄기세포능을 유지하면서 효과적으로 증식시킬 수 있는 방법을 확립하는 것이 필수적이나, 성체줄기세포는 증식율이 낮고, 쉽게 노화되어 한 조직에서 얻을 수 있는 세포의 수가 한정적이라는 한계가 있다.
- [4] 이러한 문제를 해결하여 줄기세포 효율을 증진시키기 위한 방안으로서, 바이러스 벡터를 이용한 유전자 조작이나 특정 단백질을 과발현시키는 방법이 제안되어 왔으나(한국 등록특허, KR10-1101835), 이는 안정성 문제로 인하여 임상 적용에는 한계가 있는 바, 1세대 줄기세포 연구를 통해 특정질환 치료를 위한 임상적용 가능성은 검증되었으나 낮은 효율과 효과기전 규명이 미흡하고 안전성 확보 또한 해결되지 않고 있다.
- [5] 이와 관련하여, 최근 분화세포(differentiated cell)에 비하여 배아줄기세포(ESC)와 유도만능줄기세포(iPS)에서 해당(glycolysis) 대사과정이 증가하고 산화적 인산화(oxidative phosphorylation) 대사과정이 감소되어 있음이 보고됨으로써, 대사과정을 조절하는 리프로그래밍(reprogramming)을 통해 줄기세포의 줄기세포능(stemness) 유지 및 세포 노화억제를 통한 고효율 줄기세포 개발 가능성이 제시되고 있다. 그러나 이에 대한 분자생물학적 기전은 거의 밝혀지지 않았으며, 아직 효율적인 조절기술은 개발되지 못하고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 이에, 본 발명자는 줄기세포의 노화를 억제하고 세포 생존 및 증식율을 향상시킬 수 있는 방법에 대하여 예의 연구한 결과, 종래 항생제로 알려져 있는 에티오나마이드(ethionamide)가 줄기세포를 효과적으로 증식시킬 수 있음을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[7] 따라서, 본 발명은, 에티오나마이드(ethionamide)를 포함하는, 줄기세포 생존/증식 향상용 배지 조성물, 및 이의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[8]

[9] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[10] 본 발명은, 에티오나마이드(ethionamide)를 포함하는, 줄기세포 증식 향상용 배지 조성물을 제공한다.

[11] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 에티오나마이드는 배지에 1 내지 500 μ M의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 한다.

[12] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 배지는 소태아혈청(FBS) 및 겐타마이신(gentamicin)이 첨가된 α -MEM(Minimum Essential Media) 배지인 것을 특징으로 한다.

[13] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포 또는 성체줄기세포인 것을 특징으로 한다.

[14] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 성체줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 한다.

[15] 또한, 본 발명은 상기 배지 조성물에 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포 증식 향상방법을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 얻어진, 증식능이 향상된 줄기세포를 제공한다.

[17] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[18] 본 발명에 의하면, 유전자 조작이나 바이러스 벡터 등을 사용하지 않으면서 배양환경 조절이라는 간편하고도 안전한 방법을 통하여, 차세대 고효율 줄기세포를 대량 생산할 수 있다.

[19] 또한, 본 발명에 의하면, 줄기세포의 대사 과정을 선택적으로 조절할 수 있는 분자생물학적 기전, 대사조절 마커를 규명함으로써 고효율 줄기세포 개발에 대한 새로운 방법론을 제시할 수 있다.

도면의 간단한 설명

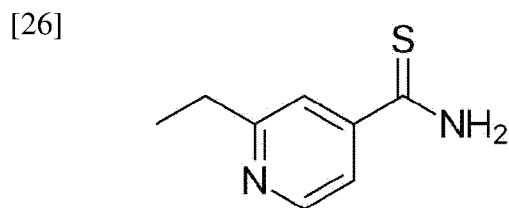
[20] 도 1은, 에티오나마이드 처리에 의한 인간 중간엽 줄기세포의 증식 향상을 검증한 BrdU 어세이 결과로서, 에티오나마이드의 처리 농도(도 1a) 및 처리 시간(도 1b)에 따른 인간 제대 중간엽 줄기세포의 증식률을 비교한 결과이다.

- [21] 도 2는, 에티오나마이드 처리에 의한 인간 중간엽 줄기세포의 표면 항원 발현을 검증한 유세포 분석 결과로서, 에티오나마이드를 처리하지 않고 배양한 대조군(Control) 및 처리하여 배양한 인간 제대 중간엽 줄기세포(Ethionamide-primed MSCs)에 대하여 인간 중간엽 줄기세포의 양성 마커(도 2a) 및 음성 마커(도 2b)의 발현양상을 비교한 결과이다.
- [22] 도 3은, 에티오나마이드 처리에 의한 인간 중간엽 줄기세포의 분화능 검증 결과로서, 에티오나마이드를 처리하지 않고 배양한 대조군(Control) 및 처리하여 배양한 인간 제대 중간엽 줄기세포(Ethionamide-primed MSCs)의 지방세포(도 3a), 골세포(도 3b), 및 연골세포(도 3c)로의 분화효율을 나타낸 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [23] 본 발명은, 에티오나마이드를 포함하는, 줄기세포 증식 향상용 배지 조성물을 제공한다.
- [24] 종래, 에티오나마이드(2-ethylpyridine-4-carbothioamide)는 티오나마이드 계열의 항생제로서 세균에 의한 감염 질환 치료 용도가 알려져 있었으나, 본 발명에서는 에티오나마이드의 줄기세포능 향상 용도를 최초로 발견하였다.

[25] [ethionamide]



- [27] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 에티오나마이드 처리에 의한 줄기세포의 증식 향상능을 확인하였다.
- [28] 본 발명의 일실시예에서는, 에티오나마이드를 다양한 농도 즉, 1, 10, 50, 100, 및 500 μ M의 농도로 처리한 배지에서 인간 제대 중간엽 줄기세포를 배양하였을 때 50 μ M 이상의 처리농도에서 상기 중간엽 줄기세포의 증식이 유의하게 증가하는 것을 확인하였고, 에티오나마이드를 72시간 동안 처리하는 경우 증식향상 효율이 가장 높게 나타나는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [29] 본 발명의 다른 실시예에서는, 에티오나마이드를 처리하여 배양한 인간 제대 중간엽 줄기세포의 표면 항원의 발현양상을 분석하여 에티오나마이드를 처리하지 않은 대조군과 동일한 것을 확인하였고, 또한 지방세포, 골세포, 및 연골세포로 분화를 유도하여 대조군과 분화능에 차이가 없는 것을 통해 중간엽 줄기세포의 특성이 잘 유지되는 것을 확인하였다(실시예 3 및 4 참조).
- [30] 상기 결과들은 에티오나마이드 처리를 통해 인간 중간엽 줄기세포의 특성은 그대로 유지하면서 증식을 효과적으로 향상시킬 수 있음을 보여주는 것이다.
- [31] 본 발명에서 배지에 포함되는 에티오나마이드의 농도에 제한은 없으나, 바람직하게는 1~500 μ M의 농도, 보다 바람직하게는 50~500 μ M로 포함될 수 있으며 더욱 바람직하게는 100 μ M의 농도로 포함될 수 있다.

- [32] 본 발명에서 세포 배양에 이용되는 배지에 제한은 없으나, 예컨대 소태아혈청(FBS) 및 젠타마이신이 첨가된 α -MEM(Minimum Essential Media) 배지인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게 상기 소태아혈청은 10%, 젠타마이신은 50 ug/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [33] 본 발명에서 '줄기세포'란 미분화된 세포로서 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 서로 다른 종류의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말한다. 본 발명의 줄기세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있으며, 인간 및 비인간 포유류를 포함한 임의의 유형의 동물 유래일 수 있고, 상기 줄기세포가 성체로부터 유래된 것이든 배아로부터 유래된 것이든 이에 한정되지 않는다.
- [34] 본 발명의 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 성체 줄기세포를 포함하며, 바람직하게는 성체 줄기세포이다. 상기 성체 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell), 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포, 다분화능 줄기세포 또는 양막상피세포일 수 있으며, 바람직하게는 중간엽 줄기세포이나, 이에 한정되지 않는다. 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반 등으로부터 유래된 중간엽 줄기세포일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [35] 본 발명에서, '제대-유래 줄기세포(Wharton's Jelly-derived stem cells)'라 함은 제대로부터 분리된 줄기세포를 모두 포함하며, 포유류의 태아가 태반에서 성장할 수 있도록 모체와 배를 연결해주는 줄을 의미할 수 있으며, 일반적으로 와튼 젤리(Wharton's Jelly)로 둘러싸인 3개의 혈관, 즉, 2개의 배꼽 동맥과 1개의 배꼽 정맥으로 구성된 조직을 의미할 수 있다.
- [36] 본 발명에서, '태반-유래 줄기세포(placenta-derived stem cells)'라 함은 태반으로부터 분리된 줄기세포를 모두 포함하며, 바람직하게는 체외로 분리된 인간의 태반으로부터 분리된 4종류의 줄기세포, 즉 (1) 양막 상피세포(human amniotic epithelial cells, hAEC), (2) 양막에서 유래한 중간엽 줄기세포(human amniotic mesenchymal stromal cells 또는 human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSC), 3) 융모막 중간엽 줄기세포(human chorionic mesenchymal stromal cells 또는 human chorionic mesenchymal stem cells, hCMSC), 및 (4) 융모 영양막 세포(human chorionic trophoblastic cells, hCTC)를 포함한다.
- [37] 중간엽줄기세포의 분리는 당업자에게 자명한 방법으로 수행될 수 있으며, 예를 들면, Pittenger 등(Science 284: 143, 1997)와 van 등(J. Clin. Invest., 58: 699, 1976)의 문헌들에 개시되어 있는 방법으로 분리할 수 있다.
- [38] 본 발명에서 줄기세포 증식 향상이란, 세포노화가 억제되고 세포증식능 및 단백질 항상성이 향상됨으로써 줄기세포 특성이 유지되는 의미를 포함하며, 이에 의해 줄기세포 마커인 Nanog, Oct4 또는 KLF4 유전자 등의 발현이 증가될 수 있다. 이들 유전자는 배아줄기세포에서 많이 발현하는 줄기세포의 전분화능, 즉 줄기세포 특성을 유지하는데 중요한 역할을 하는 유전자로 알려져 있다.
- [39] 또한, 본 발명은 상기 배지 조성물에 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는

줄기세포 증식 향상방법, 및 이에 의해 얻어진 증식능이 향상된 줄기세포를 제공한다.

[40] 또한, 본 발명은 상기 줄기세포를 포함하는, 다양한 질환 치료용 세포 치료제를 제공한다.

[41]

[42] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[43]

[44] **[실시예]**

[45] **실시예 1. 인간 제대 중간엽 줄기세포의 준비**

[46] 인간 제대 중간엽 줄기세포는 삼성서울병원의 IRB(IRB# 2015-09-023-003)에 의해 승인된 기준에 따라 탯줄을 확보한 후, 다음의 방법으로 중간엽 줄기세포를 분리하였다.

[47] 우선, 3-4 cm의 탯줄 조직을 잘게 자르고, 세포 외 기질을 분해하기 위해 콜라게나아제 용액(Gibco, USA)을 60-90분 동안 처리한 후, 0.25% 트립신(Gibco, USA)을 넣고 30분 동안 37°C에서 분해시켰다. 이후, 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)(Biowest, USA)을 넣고 1000xg에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 얻고, 10% FBS와 50 ug/ml 젠타마이신(Gibco, USA)이 첨가된 MEM 배지(Minimum Essential Media) (Gibco, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 환경에서 세포를 배양하여, passage 5 또는 6의 중간엽 줄기세포를 실험에 사용하였다.

[48]

[49] **실시예 2. 인간 중간엽 줄기세포의 증식 향상 확인**

[50] 에티오나마이드 처리에 따른 세포 증식 향상효과를 알아보기 위해, 상기 실시예 1의 방법에 따라 준비한 인간 제대 중간엽 줄기세포(1×10⁴ 세포)를 96 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 에티오나마이드를 다양한 농도(1~500 μM)로 처리하고 72시간 후에 세포증식 분석을 수행하였다. 이를 위해, 세포의 DNA 합성 시에 결합되는 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)를 이용한 BrdU cell proliferation assay kit(Cell Signaling Technology, USA)로 분석하였다. 구체적으로는, BrdU를 세포에 첨가하고 24시간 동안 반응시킨 후 세포를 고정하고 DNA를 변성시켰다. 다음으로 상기 세포에 Anti-BrdU 항체를 처리하고, HRP(horse-radish peroxidase)가 연결된 2차 항체를 사용하여 TMB(Tetramethylbenzidine) 기질과 반응시킨 후, ELISA reader로 450 nm에서 흡광도 수치를 측정하였다.

[51] 그 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같이, 에티오나마이드를 50 uM 이상으로 처리하였을 때 세포의 증식률이 유의하게 향상된 것을 확인하였다. 또한, 에티오나마이드를 각각 10 uM 또는 100 uM로 처리하고 처리 시간에 따른 증식효율을 비교한 결과, 도 1b에 나타낸 바와 같이 에티오나마이드를 72시간

동안 처리하였을 때 가장 유의한 증식률 향상을 확인하였다.

[52]

[53] 실시예 3. 에티오나마이드가 처리된 인간 중간엽 줄기세포의 세포 표면 항원 분석

[54] 에티오나마이드 약물이 처리된 상태에서 배양한 인간 제대 중간엽 줄기세포의 특성을 확인하기 위하여, 유세포 분석(fluorescence-activated cell sorting; FACS)을 통해 상기 중간엽 줄기세포의 표면항원의 발현을 관찰하였다.

[55] 보다 구체적으로, 인간 제대 중간엽 줄기세포(2×10^5)를 1.5 ml 마이크로 튜브에 동등하게 나누어 담고 2% FBS가 포함된 PBS(phosphate-buffered saline)를 100 μ l씩 처리한 후 FITC(fluorescein isothiocyanate), PE(phycoerythrin) 또는 APC(allophycocyanin)가 포함된 항체를 처리하고 상온에서 20분 동안 반응시켰다. 본 실시예에서는 양성, 음성 마커를 포함하여 CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, 및 HLA-DR 항체를 사용하여 발현여부를 관찰하였다. 상기 반응 후 2% FBS가 포함된 PBS로 항체 반응을 중화시킨 다음 유세포 분석기를 이용하여 양성 및 음성 마커들의 발현여부를 확인하였다.

[56] 먼저 양성 마커인 CD44, CD73, CD90, CD105, CD166의 발현여부를 확인한 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이 에티오나마이드를 처리하지 않은 대조군(control)과 비교할 때 에티오나마이드를 처리하여 배양한 인간 중간엽 줄기세포(Ethionamide-primed MSCs)가 상기 마커들을 유사한 수준으로 발현하고 있는 것을 확인하였으며, 음성 마커인 CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR 역시 대조군과 동일하게 발현하지 않는 것을 확인하였다.

[57] 상기 결과를 통해 에티오나마이드를 처리하여 배양하였음에도 중간엽 줄기세포의 특성이 잘 유지되고 있는 것을 알 수 있었다.

[58]

[59] 실시예 4. 에티오나마이드가 처리된 인간 중간엽 줄기세포의 분화능 분석

[60] 상기 실시예 3의 결과에 더하여, 에티오나마이드를 처리하여 배양한 인간 제대 중간엽 줄기세포의 분화능이 잘 유지되는지 알아보기 위해 각각 지방세포, 골세포, 및 연골세포로 분화를 유도한 후 분화정도를 정량화하였다.

[61] 구체적으로, 지방세포 또는 골세포로의 분화를 유도하기 위해 에티오나마이드가 처리된 배지에서 배양한 인간 제대 중간엽 줄기세포(1×10^5)를 6 well plate에 분주한 후 adipogenesis, osteogenesis differentiation kit(Gibco, USA)를 이용하여 1주일에 2회씩 배지를 교환하면서 약 3주 동안 분화를 유도하였다. 이후 지방세포와 골세포로 분화시킨 세포에 대하여 각각 Oil red O 염색과 Alizarin Red S 염색을 실시하여 지방세포 및 골세포로의 분화여부를 확인하였다. 지방세포의 정량화는 분화한 배양용기에서 배지를 모두 제거한 후 완전히 마르게 하여 100% 이소프로판올(isopropanol)을 넣고 상온에서 10분간 배양한 후 100% 이소프로판올과 분화된 세포가 골고루 섞이게 한 뒤 500 nm에서 흡광도를

측정하여 분화 정도를 수치화 하였다. 골세포의 정량화는 Alizarin Red S 염색 정량화 assay kit(Sciencell, USA)를 사용하여 분화 정도를 정량화 하였다.

- [62] 한편, 연골세포로의 분화를 유도하기 위해서 15 ml 튜브에 5×10^5 개의 pellet 상태의 세포를 연골세포 유도 배지(high-glucose DMEM(Biowest, France), 100 nM 덱사메타손(dexamethasone, Sigma-Aldrich, USA), 50 mg/mL L-아스코르브산(L-ascorbic acid, Sigma-Aldrich, USA), 100 mg/mL 피루브산 나트륨(sodium pyruvate, Sigma-Aldrich, USA), 40 mg/mL L-프롤린(L-proline, Sigma-Aldrich, USA), 10 ng/mL TGF- β 3(transforming growth factor β 3, R&D Systems, USA), 500 ng/mL BMP-6(bone morphogenic protein 6, R&D Systems, USA), 50 mg/mL ITS+ premix(Becton Dickinson, USA))로 약 4주 동안 분화를 유도하였다. 연골세포로 분화한 세포는 OCT compound(Tissue-Tek, USA)를 이용하여 고정시킨 후 10 μ m 두께로 절단한 후 슬라이드 절편을 0.1% 사프란인-O(Safranin-O) 용액으로 염색하여 분화여부를 확인하였다. 또한, 연골세포의 정량화는 Image J analysis program(National Institutes of Health, USA)을 이용하여 염색 정도를 정량화 하였다.

- [63] 분석 결과, 도 3a 내지 도 3c에 나타난 바와 같이 에티오나마이드를 처리하여 배양한 인간 제대 중간엽 줄기세포(Ethionamide-primed MSCs)는 에티오나마이드를 처리하지 않은 대조군(control)과 비교할 때 각각 지방세포, 골세포, 및 연골세포로 분화가 잘 이루어진 것을 확인하였다.

- [64] 상기 결과를 통해 에티오나마이드를 처리하여 배양하였음에도 중간엽 줄기세포의 분화능이 잘 유지되고 있는 것을 알 수 있었다.

[65]

- [66] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

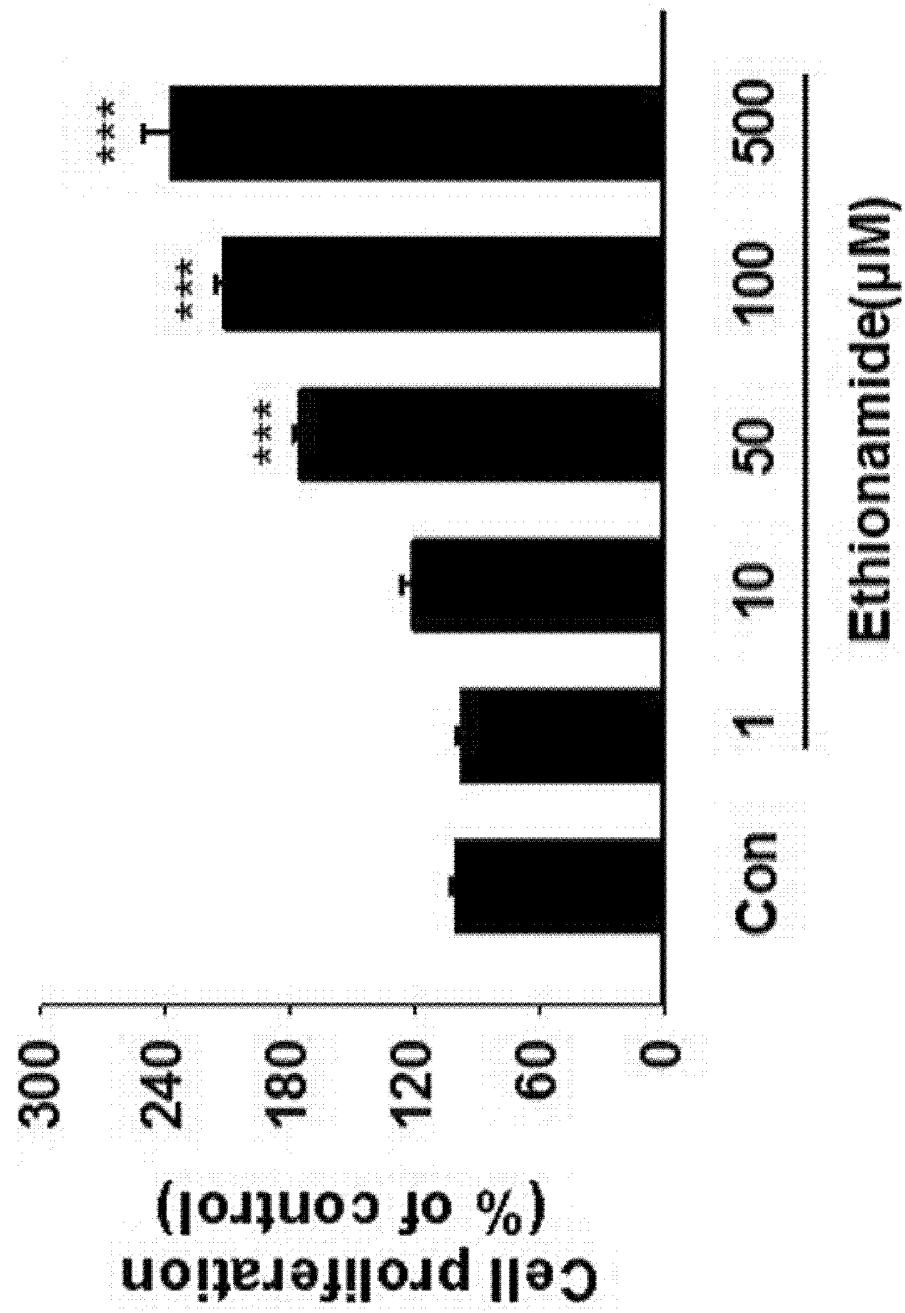
산업상 이용가능성

- [67] 본 발명에 따른 에티오나마이드는 인간 중간엽 줄기세포의 특성은 그대로 유지하면서 세포의 증식을 효율적으로 향상시키는 바, 상기 에티오나마이드 및 이를 포함하는 배지 조성물은 줄기세포를 이용한 기초연구, 치료제 및 화장품 개발 등의 관련 산업 분야에서 양질의 줄기세포를 다량 확보하는데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

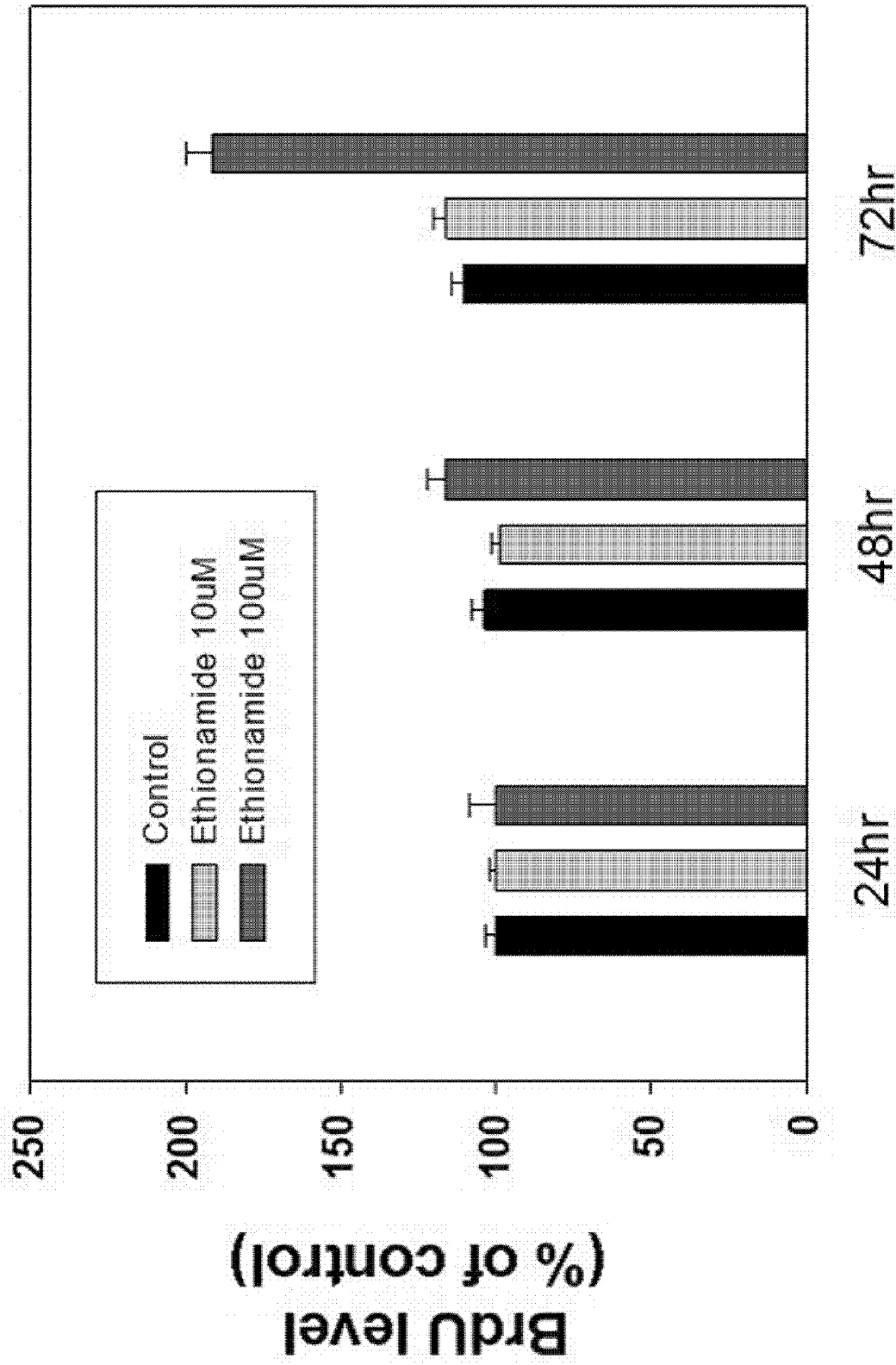
청구범위

- [청구항 1] 에티오나마이드(ethionamide)를 포함하는, 줄기세포 증식 향상용 배지 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 에티오나마이드는 배지에 1 내지 500 μM 의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 배지 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 배지는 소태아혈청(FBS) 및 겐타마이신(gentamicin)이 첨가된 α -MEM(Minimum Essential Media) 배지인 것을 특징으로 하는, 배지 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포 또는 성체줄기세포인 것을 특징으로 하는, 배지 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 성체줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 배지 조성물.
- [청구항 6] 제 1 항의 배지 조성물에 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포 증식 향상방법.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 줄기세포 증식 향상방법.
- [청구항 8] 제 6 항의 방법에 의해 얻어진, 증식능이 향상된 줄기세포.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서, 상기 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

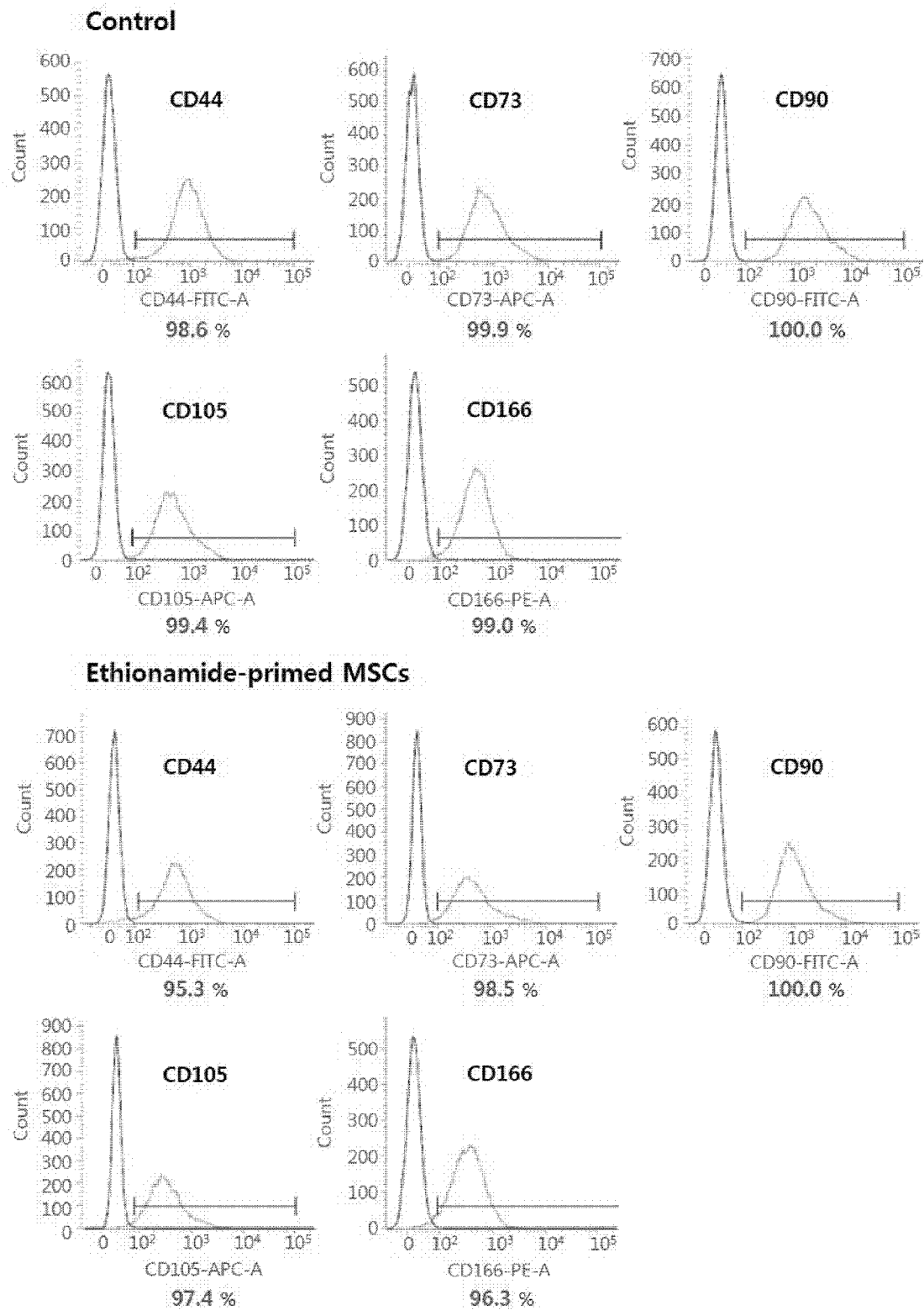
[Fig. 1a]



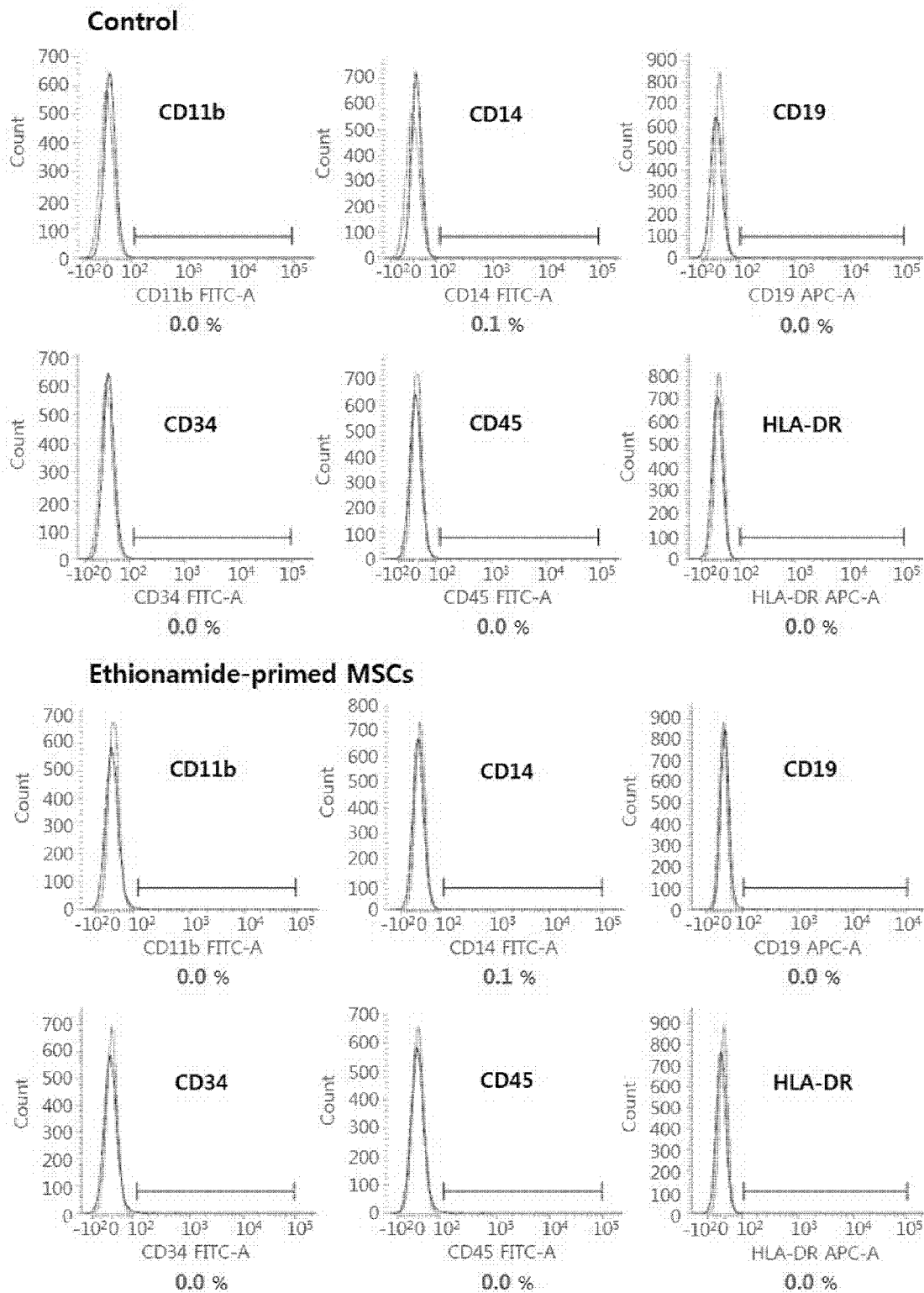
[Fig. 1b]



[Fig. 2a]

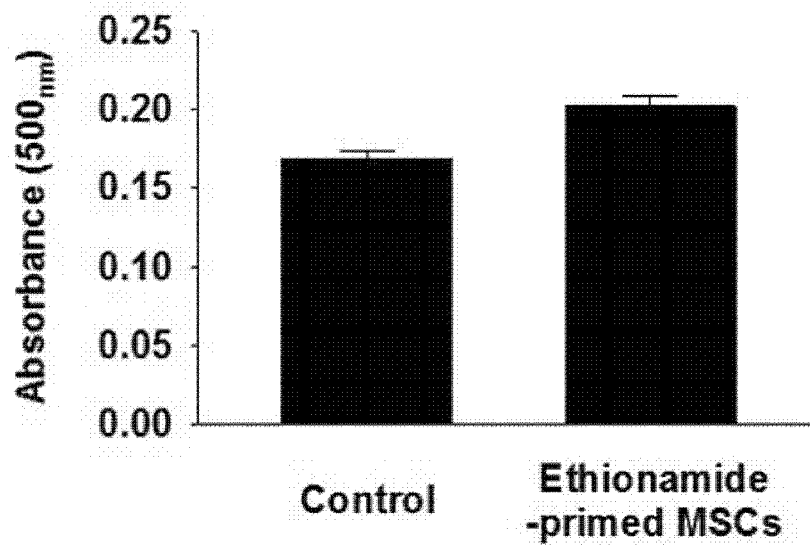
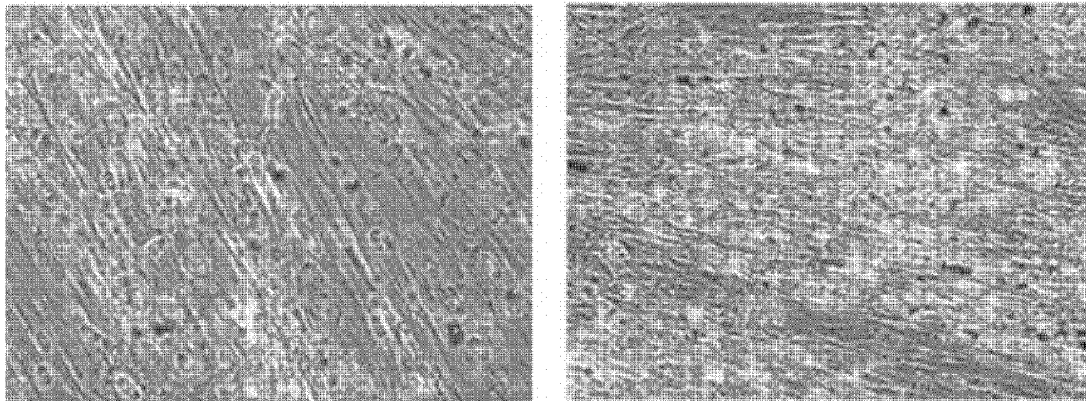


[Fig. 2b]



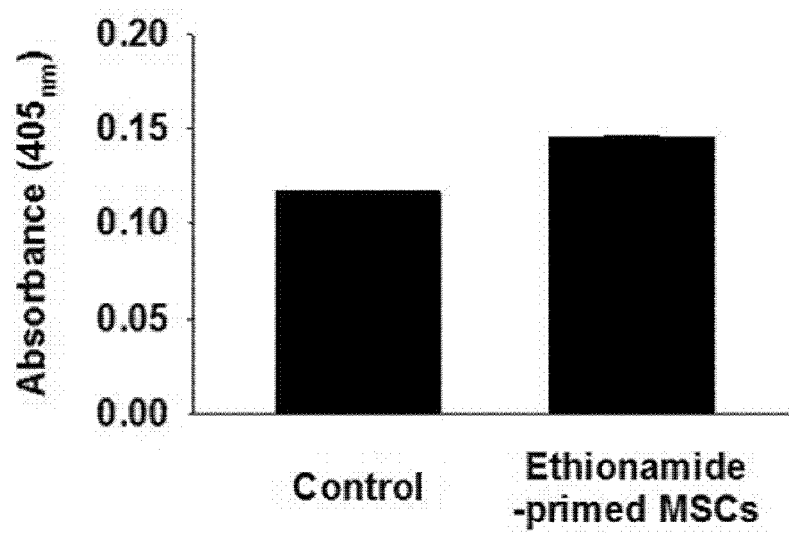
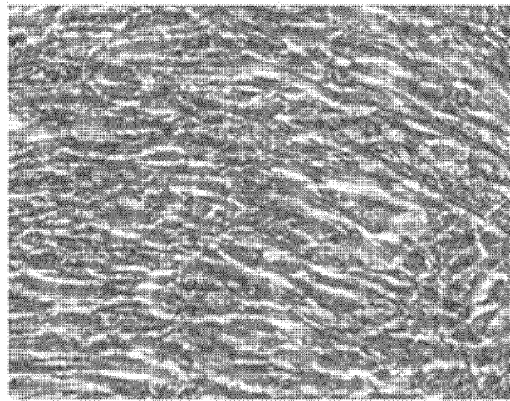
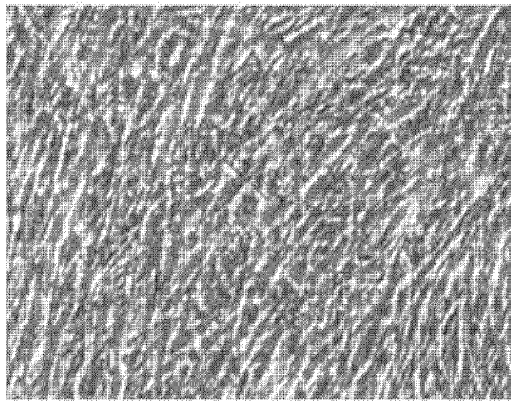
[Fig. 3a]

Adipogenesis

Control**Ethionamide-primed MSCs**

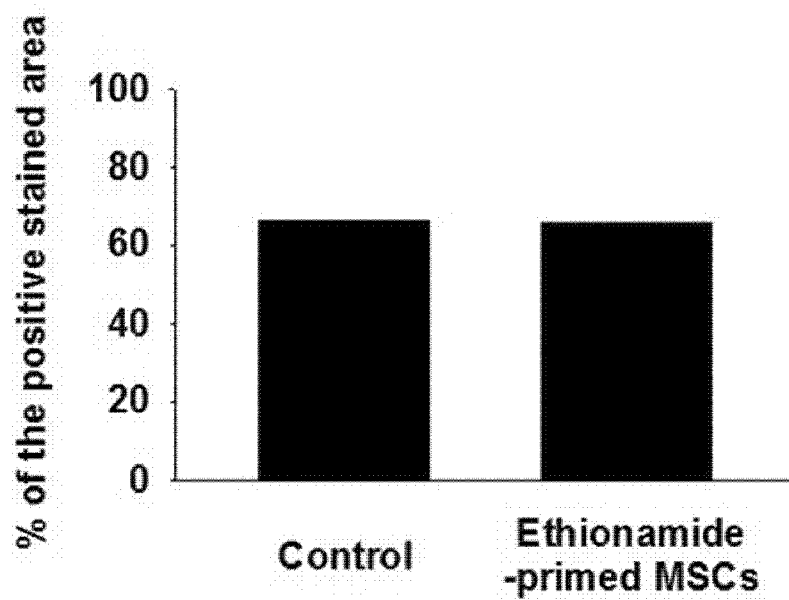
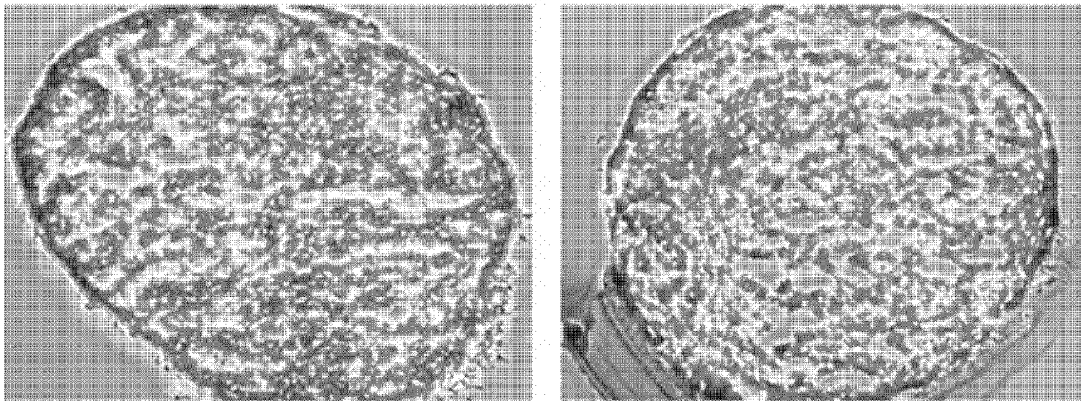
[Fig. 3b]

Osteogenesis

Control**Ethionamide-primed MSCs**

[Fig. 3c]

Chondrogenesis

Control**Ethionamide-primed MSCs**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/010772**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/0735(2010.01)i, C12N 5/0775(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 5/0735; C12N 5/077; C12N 5/074; C12N 5/0775

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: ethionamide, stemness, medium composition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015-009884 A1 (THE HAMNER INSTITUTES) 22 January 2015 See claims 8, 14 and 22; pages 7, 21, 28 and 29.	1,2,4-9
Y		3
Y	KR 10-2015-0004762 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) 13 January 2015 See claim 1; paragraphs [0036] and [0037].	3
A	KR 10-2011-0085231 A (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 27 July 2011 See claim 1.	1-9
A	KR 10-2011-0072839 A (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 29 June 2011 See claim 1.	1-9
A	KATRAHALLI, U. et al., "The Effect of Anti-tubercular Drug, Ethionamide on the Secondary Structure of Serum Albumins: a Biophysical Study", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, vol. 59, pages 102-108 See the entire document.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 JANUARY 2018 (16.01.2018)

Date of mailing of the international search report

16 JANUARY 2018 (16.01.2018)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/010772

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2015-009884 A1	22/01/2015	EP 3021850 A1	25/05/2016
		US 2016-0263108 A1	15/09/2016
		WO 2015-009879 A1	22/01/2015
		WO 2015-009881 A1	22/01/2015
		WO 2015-009882 A2	22/01/2015
		WO 2015-009882 A3	12/11/2015
		WO 2015-009883 A1	22/01/2015
KR 10-2015-0004762 A	13/01/2015	KR 10-1632108 B1	27/06/2016
		WO 2015-002474 A1	08/01/2015
KR 10-2011-0085231 A	27/07/2011	KR 10-1133553 B1	05/04/2012
KR 10-2011-0072839 A	29/06/2011	KR 10-1249801 B1	03/04/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/0735(2010.01)i, C12N 5/0775(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/0735; C12N 5/077; C12N 5/074; C12N 5/0775

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: 에티오나마이드, 줄기세포성, 배지 조성물

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2015-009884 A1 (THE HAMNER INSTITUTES) 2015.01.22	1,2,4-9
Y	청구항 8, 14 및 22; 페이지 7, 21, 28 및 29 참조.	3
Y	KR 10-2015-0004762 A (서울대학교병원) 2015.01.13	3
	청구항 1; 단락 [0036] 및 [0037] 참조.	
A	KR 10-2011-0085231 A (차의과학대학교 산학협력단) 2011.07.27	1-9
	청구항 1 참조.	
A	KR 10-2011-0072839 A (차의과학대학교 산학협력단 등) 2011.06.29	1-9
	청구항 1 참조.	
A	KATRAHALLI, U. 등, 'The effect of anti-tubercular drug, ethionamide on the secondary structure of serum albumins: a biophysical study', Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 제59권, 102-108 페이지	1-9
	전체 문헌 참조.	

☐ 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

2018년 01월 16일 (16.01.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 01월 16일 (16.01.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

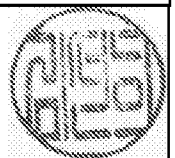
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2015-009884 A1	2015/01/22	EP 3021850 A1 US 2016-0263108 A1 WO 2015-009879 A1 WO 2015-009881 A1 WO 2015-009882 A2 WO 2015-009882 A3 WO 2015-009883 A1	2016/05/25 2016/09/15 2015/01/22 2015/01/22 2015/01/22 2015/11/12 2015/01/22
KR 10-2015-0004762 A	2015/01/13	KR 10-1632108 B1 WO 2015-002474 A1	2016/06/27 2015/01/08
KR 10-2011-0085231 A	2011/07/27	KR 10-1133553 B1	2012/04/05
KR 10-2011-0072839 A	2011/06/29	KR 10-1249801 B1	2013/04/03