



- (51) 국제특허분류:
G01N 27/26 (2006.01) C12N 5/074 (2010.01)
G01N 27/416 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/007541
- (22) 국제출원일: 2015년 7월 21일 (21.07.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0020911 2015년 2월 11일 (11.02.2015) KR
- (71) 출원인: 서강대학교 산학협력단 (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) [KR/KR]; 121-742 서울시 마포구 백범로 35 서강대학교 데이아르관 306호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 차혁진 (CHA, Hyuk-Jin); 135-863 서울시 강남구 선릉로 130길 19 서광아파트 101동 106호, Seoul (KR). 최정우 (CHOI, Jeong-Woo); 140-013 서울시 용산구 서빙고로 35 (2/9) 용산시티파크 103-603, Seoul (KR). 예철현 (YEA, Cheol-Heon); 121-110 서울시 영등포구 여의동로 97 대우트럼프월드 2차 B-2802, Seoul (KR). 정호창 (JEONG, Ho Chang); 336-834 충청남도

아산시 인주면 현대로 1029번길 200-17 현대자동차 사원아파트 104동 701호, Chungcheongnam-do (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.

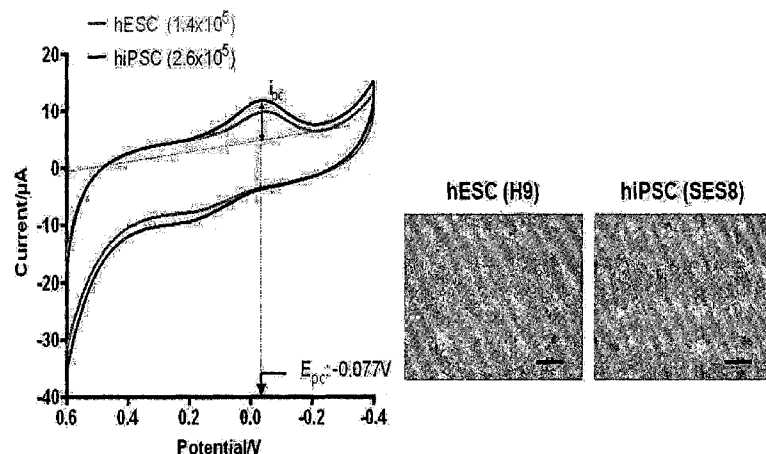
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CELL CHIP-BASED QUANTITATIVE ANALYSIS OF UNDIFFERENTIATED HUMAN PLURIPOTENT STEM CELL

(54) 발명의 명칭 : 미분화 인간 만능줄기세포의 세포칩 기반 정량 분석 방법

도 2a



(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting an undifferentiated pluripotent stem cell, and a cell-chip using the same. Since the cell chip-based quantitative analysis method of the present invention does not use antibodies, unlike flow cytometry or real-time PCR which has been conventionally used for the quantitative analysis of pluripotent stem cells, there is an advantage in that it is possible to conveniently and rapidly perform quantitative analysis, and since the function of cells is not affected even after analysis, it is possible to recover and use the cells used in the analysis. The detection method of the present invention uses a specific E_{pc} (-0.077 V) of hPSCs, and can quantitatively analyze the number of cells of undifferentiated hPSCs from the signal intensity (I_{pc}), which proportionately increases with the number of cells of undifferentiated hPSCs. The cell chip-based electrochemical assessment of the present invention can be performed in a relatively short time, and is thus convenient. Further, it is possible to obtain a high reproduction value having a clear linearity (linearity of 0.99 or more).

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]





OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, **공개:**
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 검출방법 및 이를 이용한 세포칩에 관한 것이다. 본 발명의 세포칩 기반의 정량적 분석 방법은 종래 만능줄기세포의 정량적 분석을 위해서 이용하던 유세포 분석법 또는 실시간 PCR 법과 달리 항체를 사용하지 않기 때문에 간편하고 빠르게 정량적 분석이 가능하며, 분석 후에도 세포의 기능에 영향이 없어 분석에 사용한 세포를 회수하여 사용가능하다는 장점이 있다. 본 발명의 검출방법은 hPSCs의 특이적 E_{pc} (-0.077 V)를 이용한 것으로서, 미분화 hPSCs의 세포 수에 따라 비례적으로 증가하는 신호 강도(i_{pc})로부터 미분화 hPSCs의 세포 수를 정량적으로 분석할 수 있다. 본 발명의 세포칩 기반의 전기화학적 평가는 상대적으로 단시간 내에 이루어져 간편하고 명확한 선형성(선형성 0.99 이상)을 가지는 높은 재현 값을 얻을 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 미분화 인간 만능줄기세포의 세포칩 기반 정량 분석 방법

기술분야

- [1] 본 특허출원은 2015년 2월 11일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2015-0020911호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 미분화 인간 만능줄기세포의 세포칩 기반 정량 분석 방법에 관한 것이다.

[3]

배경기술

- [4] 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cells, hESCs), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs) 및 체세포 핵 이식(Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT)에 의한 배아줄기세포(ntESCs)와 같은 인간 만능성 줄기세포(human pluripotent stem cells, hPSCs)는 체내의 모든 세포 타입으로 분화할 수 있는 능력으로 인해 줄기세포 치료제의 유망한 자원으로 생각되어져 왔다(1, 2). 특히, transgene free iPSCs 및 ntESCs가 성공적으로 구축됨으로써, PSC 기반 세포치료의 임상 적용에서 가장 심각한 장애물로 여겨졌던 면역 거부현상을 회피할 수 있게 되었고, 이로써 자가 조직 줄기세포 이식이 가능하게 되었다(3). 하지만 세포치료 과정에서 발생하는 미분화 만능성 줄기세포에 의한 테라토마 형성의 위험성은 여전히 존재한다. 테라토마의 위험성에도 불구하고(4-7), 현재 인간 ESCs 유래의 테라토마 형성에 대한 인 비보 동물연구는 마우스 ESCs (murine ESCs, mESCs) 유래의 테라토마 형성에 대한 인 비보 동물연구와 달리 매우 제한적이다(8-12). 이러한 mESCs 및 hESCs 간의 테라토마 형성 발생정도의 차이는 숙주 의존성 종양생성 편향(bias)로 나타났다(13). 이에, 최근 영장류 모델에서 미분화 hESCs 존재에 의한 테라토마 형성은 hPSCs 기반 세포치료의 과정에서 테라토마 형성의 위험성을 암시하는 실제적인 예시이다(14).
- [5] 미분화된 hPSCs의 테라토마 형성의 위험성을 낮추기 위하여, 분화된 세포를 선별하거나 세포독성 항체(16, 17), 화합물(18, 19) 또는 자살유전자 시스템(20, 21)을 이용한 미분화 PSCs를 제거하는 방법 등 다방면으로 많은 연구가 이루어졌다(15). 이후, 미분화 PSCs를 제거한 후, 항체를 이용한 인 비트로 유세포 분석(FACS), 실시간 PCR 또는 면역염색(22-24)에 의해 성공적으로 미분화 PSCs가 제거되었는지 평가하는 과정을 거친다. 하지만 hPSCs 오염을 확인하기 위한 FACS 분석 및 면역염색은 세포 표면에 타겟 단백질을 라벨링해야 하고, 따라서 항체 게이팅(gating)에서 가지는 테크닉적 한계로 인해

정량화가 어려운 단점이 있다(35). 이와 유사하게 실시간 PCR 분석에서도 다수의 세포 또는 전체 세포 집단이 필연적으로 파괴될 수 있다(26). 따라서 안전 평가 후, 현재의 이용 가능한 기술들은 소중한 분화 세포의 재사용이 어렵고, 다단계의 모니터링이 불가능하다는 한계를 가진다. hPSCs 유래의 적절한 분화 레벨에 도달하기까지 줄기세포 치료를 위한 엄격한 임상 기준 및 노동집약적 실험 프로토콜을 고려하면, 분화 줄기세포의 이중성 집단에서 hPSCs 오염을 결정하기 위한 비-파괴적, 비-라벨링 방법의 구축이 필요하다. 최근, hPSCs를 특이적으로 표지하는 화학 염료 화합물 (Kyoto probe 1)(41) 및 미분화 hPSCs 개수에 비례적으로 나타내는 가용성 다당쇄 포도칼릭신(hyperglycosylated podocalyxin) 검출을 위한 샌드위치 분석 시스템('GlycoStem' test)이 개발되었다(26).

- [6] 전기화학적 세포기반 바이오센서(biosensor)는 지난 십여 년 동안 다양한 타입의 세포를 모니터링할 수 있는 비-파괴적, 비-라벨링 방법으로써 활발히 개발되어왔다(43, 44). 각 타입의 세포는 특이적 세포표면인자들에 의해, 변하는 전류와 저항 값에 의한 세포 특유의 순환 전압 전류(cyclic voltammetry (CV)) 프로파일을 가진다(45).
- [7] 본 발명자들은 이를 응용하여 미분화 hPSCs의 특이적 전기화학적 포텐셜(E_{pc})을 발견하였으며, 이를 간단한 세포칩 기반 순환 전압 전류법 (cyclic voltammetry technique)으로 검출하였다. 또한, 본 발명에서는 세포치료 기반 hPSCs의 안전성을 확인하고 동시에 미분화 만능줄기세포의 정량적 분석이 가능한 지속적인 모니터링 방법을 제안한다.
- [8]
- [9] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 줄기세포 치료제로서 이용되는 만능성(pluripotent) 줄기세포의 테라토마 형성 위험을 평가하기 위한 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 미분화 만능성 줄기세포에서 특이적으로 발생하는 전기화학적 포텐셜($E_{pc} = -0.077$ V)이 있음을 발견하였고, 이를 이용하여 분화된 세포 및 미분화된 줄기세포의 혼합 집단에서 미분화 줄기세포를 검출하고, 나아가 미분화 줄기세포를 정량적으로 분석할 수 있는 방법을 개발하게 되었다. 본 발명의 전기화학적 특성을 이용한 미분화 줄기세포 검출방법은 전체 과정이 다단계로 이루어지는 FACS 또는 실시간 PCR과 달리, 상대적으로 단시간 내에

간편하게 이루어지고 줄기세포에 손상을 주지 않으므로 높은 재현성을 가지는 검출결과를 얻을 수 있다.

[12] 따라서, 본 발명의 목적은 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 검출방법을 제공하는 데 있다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 정량분석방법을 제공하는 데 있다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 검출을 위한 세포칩(cell-chip)을 제공하는데 있다.

[15]

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

[17]

과제 해결 수단

[18] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 검출방법을 제공한다:

[19] (a) 줄기세포에 전기적 펄스(electric pulse)를 인가하는 단계; 및

[20] (b) 줄기세포의 전기화학적 포텐셜(cathodic peak potential, E_{pc})을 측정하는 단계;

[21] 상기 단계 (b)에서 $-0.155 \text{ V} < E_{pc} < 0.000 \text{ V}$ 인 전기화학적 신호가 검출되는 경우, 미분화 만능성 줄기세포가 존재하는 것으로 판단한다.

[22]

[23] 본 발명자들은 줄기세포 치료제로서 이용되는 만능성(pluripotent) 줄기세포의 테라토마 형성 위험을 평가하기 위한 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 미분화 만능성 줄기세포에서 특이적으로 발생하는 전기화학적 포텐셜($-0.155 \text{ V} < E_{pc} < 0.000 \text{ V}$)이 있음을 발견하였고, 이를 이용하여 분화된 세포 및 미분화된 줄기세포의 혼합 집단에서 미분화 줄기세포를 검출하고, 나아가 미분화 줄기세포를 정량적으로 분석할 수 있는 방법을 개발하게 되었다. 본 발명의 전기화학적 분석을 이용한 미분화 줄기세포 검출방법은 전체 과정이 다단계로 이루어지는 FACS 또는 실시간 PCR과 달리, 상대적으로 단시간 내에 간편하게 이루어지고 줄기세포 자체에 손상을 주지 않으므로 높은 재현성을 가지는 검출결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다.

[24] 테라토마-free 줄기세포 치료를 위하여, 줄기세포의 분화 종료 후 미분화 만능성 줄기세포(PSCs)의 정확한 정량화 및 잔존하는 미분화 PSCs를 제거하는 일련의 과정들이 중요하다. 이에 사용되는 일반적인 방법인 FACS (fluorescent activated cell sorting) 또는 실시간 PCR 분석법은 민감도(sensitivity) 및 재순환성(recyclability)에 제한이 있다. 이에 본 발명자들은 세포칩 기술을 이용하여 인 비트로(in vitro)에서 PSCs의 특이적 전기화학적 포텐셜(E_{pc}) 기반 인

시투(*in situ*) 비-라벨 모니터링 시스템을 디자인하였다. 자발적인 분화 이후 -0.077 볼트에서 인간 배아줄기세포(hESCs) 및 인간 유도만능줄기세포(hiPSCs)의 E_{pc} 가 모두 사라짐을 관찰하였다.

- [25] 흥미로운 점은, 모니터링을 위한 전기적 시험법은 hiPSCs의 분화 모세포인 평활근 세포의 성장률 및 분자적 특성에 적은 영향을 준다는 것이다. 미분화 hPSCs를 제거하기 위한 YM-155 처리 후, 특이적 E_{pc} 가 완전히 사라짐을 관찰할 수 있었으며, 이는 hPSCs의 특이적 E_{pc} 검출이 미분화 hPSCs의 오염을 모니터링하여 효율적이고 경제적으로 테라토마 형성의 위험성을 평가할 수 있는 유효한 접근법이 될 수 있음을 의미한다.
- [26] 본 발명자들은 미분화 hPSCs의 특이적 전기화학적 포텐셜(E_{pc})을 발견하였으며, 이를 간단한 세포칩 기반 순환 전압 전류법(cyclic voltammetry technique)으로 검출하였다. 미분화 hPSCs로부터의 전기화학적 강도 (cathodic peak current, i_{pc})는 미분화 hPSCs 수에 대하여 명확한 선형성을 나타내었으며($R^2 = 0.99$), 이는 세포칩에서 시그널 강도로부터 미분화 hPSCs 수를 추정할 수 있음을 의미한다. 본 발명의 방법이 적용된 hiPSCs 분화 모세포인 평활근 세포(human aortic smooth muscle cells, hASMCs)가 여전히 생존한다는 점, 이들의 유전자 발현 및 핵형(karyotypes)이 전기화학적 분석에 의해 영향을 받지 않는다는 점을 고려하면, 본 발명의 기술은 세포치료 기반 hPSCs의 안정성을 확인하기 위한 지속적인 모니터링 방법으로서 여러 번에 걸쳐 적용될 수 있는 안전하고 경제적인 방법임이 확실하다.
- [27] 본 발명의 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 검출방법은 궁극적으로 세포치료 시 테라토마(teratoma)를 형성하는 미분화 줄기세포의 존재를 확인하여 임상 또는 실험에 적용가능한 줄기세포 집단인지 평가하기 위한 방법으로서, “미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells) 및 분화된 세포(differentiated cells)를 포함하는 세포 시료에서 미분화 만능성 줄기세포만을 특이적으로 검출하는 방법”, “미분화 줄기세포를 포함하는 이종성 세포집단에서 미분화 만능성 줄기세포를 검출하는 방법” 또는 “테라토마 형성의 위험성 측정방법”과 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [28] 본 발명이 적용되는 줄기세포는 줄기세포의 특성, 즉 미분화, 무한정 증식 및 특정세포로의 분화능을 갖는 줄기세포로서, 만능성 줄기세포(pluripotent stem cells)이며, 예컨대 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 배아생식세포, 배아중양세포 및 성체줄기세포를 포함한다. 본 발명에 따르면, 상기 만능성 줄기세포는 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포이다. 한편, 만능성 줄기세포는 개개 형태의 단일 세포일 수 있지만, 만능성 줄기세포의 응집체인 배아유사체 또는 배아체(embryonic body) 형태일 수 있다. 배아줄기세포는 배반포의 내부세포괴(ICM)로부터 유래되고, 배아생식세포는 5-10 주령의 생식융기(gonadal ridge)의 원시생식세포로부터 유래된다. 한편, 만능성 줄기세포는 인 비트로에서 무한정 증식되며, 3종류의 모든 배아층(외배엽,

중배엽과 내배엽)으로부터 유래되는 다양한 세포로 분화될 수 있는 능력을 갖는다. 유도만능줄기세포는 비-전분화능 세포(예를 들면, 체세포)로부터 특정 유전자를 삽입하여 인공적으로 유래된 전분화능 줄기세포의 하나이다. 유도만능줄기세포는 줄기세포 유전자 및 단백질 발현, 염색체 메틸화, 배가시간(doubling time), 배아체 형성, 테라토마 형성, 생존성 키메라 형성, 교잡성 및 분화성을 가지는 면에서 전분화능 줄기세포(예를 들면, 배아줄기세포)와 동일하다고 여겨진다.

[29]

[30] 이하, 본 발명의 미분화 만능성 줄기세포의 검출방법에 대하여 상세히 설명한다:

[31] 단계 (a): 전기적 펄스(electric pulse) 인가

[32] 우선, 분석하고자 하는 세포 또는 세포 집단(cell population)에 대하여 전기적 펄스를 인가한다.

[33] 본 발명에서 전기적 펄스를 인가하는 방법은 세포 또는 세포 배양액에 전극을 접촉 또는 침지시켜 전기적 펄스를 가지는 교류 전류 또는 전압을 인가하는 방식을 사용하며, 이에 사용될 수 있는 전류 또는 전압의 인가장치가 특별히 제한되는 것은 아니다.

[34] 상기 세포 또는 세포 집단은 미분화 만능성 줄기세포를 포함한 분화 혼합물(미분화 줄기세포와 분화된 세포가 공존) 또는 상기 분화 혼합물에서 분화된 세포를 선별하여 분리한 결과물이다. 상기 만능성 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 배아생식세포, 배아중양세포 또는 성체줄기세포이다.

[35] 상기 줄기세포는 종래 기술에서 줄기세포 배양에 이용하는 보편적인 배지를 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 배지는 mTeSR1 [(Ludwig, T.E. et al., *Nature methods* 3:637-646(2006)], Eagle's MEM [Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. *Science* 130:142(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 medium [Morgan et al., *Proc. Soc. Exp. BioMed.*, 73:1(1950)], CMRL 1066, RPMI 1640 [Moore et al., *J. Amer. Med. Assoc.* 199:519(1967)], F12[Ham, *Pro. 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, Dulbecco, R. et al., *virology* 8:396(1959)], DMEM 및 F12의 믹스쥬어 (mixture) [Barnes, D. et al., *Anal. Biochem.* 102:225(1980)], Way-mouth's MB752/1[Waymouth, C. *J. Natl. Cancer Inst.* 22:1003(1959)], McCoy's 5A [McCoy, T. A., et al, *Pro. soc. Exp. Bio. Med.* 100:115(1959)], MCDB의 시리즈 [Ham, R.G et al., *In Vitro* 14:11(1978)], 및 이의 변형배지를 포함한다. 배지의 상세한 기술은 R. Ian Freshney, *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Inc., New York에서 알 수 있으며, 상기 기술은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[36] 본 발명의 일 예에 따르면, 본 발명에서는 배양 조건에서 오는 스트레스를 최소화하기 위하여 hPSCs를 mTeSR1 배지에서 배양하였다. 한편, 본 발명의 검출과정이 수행되는 동안 세포들은 feeder-free 상태 하에서 배양되는 것이 바람직하다.

[37]

[38] 단계 (b): 전기화학적 포텐셜 측정

[39] 이어, 줄기세포의 전기화학적 포텐셜(cathodic peak potential, E_{pc})을 측정한다. 만약, “ $-0.155 \text{ V} < E_{pc} < 0.000 \text{ V}$ ” 인 전기화학적 신호가 검출되는 경우, 미분화 만능성 줄기세포가 존재하는 것으로 판단할 수 있다.

[40] 본 발명에 따르면, 상기 줄기세포의 전기화학적 포텐셜(E_{pc})은 세포 수가 증가함에 따라 보다 낮은 수치가 검출되었다. 본래 E_{pc} 는 순수 화학물질 용액에서는 화합물 농도가 극심하게 변하지 않는 이상 많이 변하는 경우가 없으나, 세포를 전극에 직접 붙이는 본 측정기법의 특성 상 세포가 전극에 붙음으로 인해서 전극의 저항값이 변화하여 E_{pc} 가 세포 수의 증가에 따라 negative shift 현상이 나타난다. Negative 전압으로의 변화는 환원에 필요로 되는 에너지 또는 포텐셜이 더욱 필요해진다는 것을 의미하며, 증가되는 전극 저항값이 그 원인으로 추정된다.

[41] 본 발명에 일 예에 따르면, 상기 전기화학적 포텐셜(E_{pc}) 측정시 “ $-0.155 \text{ V} < E_{pc} < 0.000 \text{ V}$ ” 인 전기화학적 신호가 검출되는 경우 미분화 만능성 줄기세포가 존재하는 것으로 판단할 수 있다. 본 발명의 다른 예에 따르면, 미분화 만능성 줄기세포 존재시 검출되는 전기화학적 포텐셜의 수치범위는 “ $-0.135 \text{ V} < E_{pc} < -0.020 \text{ V}$ ”, “ $-0.120 \text{ V} < E_{pc} < -0.035 \text{ V}$ ”, 또는 “ $-0.110 \text{ V} < E_{pc} < -0.050 \text{ V}$ ”이다. 본 발명의 특정 예에 따르면, 상기 전기화학적 포텐셜의 수치범위는 $-0.103 \text{ V} < E_{pc} < -0.052 \text{ V}$ 이다. 본 발명의 다른 특정 예에 따르면, 상기 전기화학적 포텐셜의 수치는 $E_{pc} = -0.077 \text{ V}$ 이다. 본 발명의 실시예에 따르면, 가장 많이 측정된 전압은 -0.077 V 이며, 세포 수가 증가함에 따라 최고 -0.103 V 가, 적은 세포 수의 경우 -0.052 V 가 나타났다(도 2b, 도 2c 및 도 4b 참조).

[42] 특정 세포 타입의 전기화학적 포텐셜(cathodic peak potential, E_{pc})은 서로 다른 표면 단백질로 인한 세포 표면의 특이적 산화환원전위(redox potential)에 의해 생성된다. 본 발명자들은 분화된 세포와 비교하여 hPSCs의 광범위한 표면 단백질을 고려하였을 때, hPSCs가 미분화 상태를 유지하는 동안 특이적 E_{pc} 를 나타내리라 예상하였다. 예상대로, 본 발명자들은 hPSCs의 특이적 E_{pc} 를 발견하였으며, 이 강도(cathodic peak current, i_{pc})는 세포 수에 따라 비례적으로 증가하였고(선형성 0.99 이상)(도 2 참조), 분화가 진행되는 동안 급격히 감소하였다(도 3 참조). 즉, 본 발명에 따르면, 상기 E_{pc} (예컨대, -0.077 V) 인 전기화학적 신호강도(i_{pc})는 미분화 만능성 줄기세포의 수에 비례하여 증가한다.

[43] 전기화학적 포텐셜(cathodic peak potential, E_{pc})은 전기분석법의 하나인 볼타메트리를 통하여 측정할 수 있다. 볼타메트리(voltammetry)는 고체 전극

등에서 전류 전위곡선을 얻는 방법의 하나로써, 삼각파를 이용하여 전극 전압을 주기적으로 변화시켜, 용액 중의 화합물과 전극 물질의 산화-환원거동을 알 수 있다. 순환 전압 전류법(Cyclic voltammetry, CV)이라고도 한다.

[44] 한편, 전기화학적 특성은 전해질 조성에 의해 크게 영향을 받기 때문에, 불필요한 시그널을 최소화하기 위하여 PBS를 사용하는 것이 바람직하다.

[45] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 전기화학적 측정 전 세포를 PBS(0.01M, PH 7.4)로 세척하였고, CV 검출은 mTeSR1 (Stem Cell Technologies, #05850)에서 0.1 V/s 로, -0.2 V 내지 0.6 V의 범위에서 수행하였다.

[46] 본 발명의 검출방법에서 검출되는 미분화 만능성 줄기세포는 완전히 분화되기 전 단계의 줄기세포를 의미하며, 따라서 본 발명에서는 줄기세포에서 특정 세포로 완전 분화되기 전 중간 단계에서 형성되는 배아유사구조체(embryonic body)의 검출도 가능하다.

[47]

[48] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 정량분석방법을 제공한다:

[49] (a) 세포에 전기적 펄스(electric pulse)를 인가하는 단계;

[50] (b) 상기 세포의 전기화학적 포텐셜(cathodic peak potential, E_{pc})로서 $-0.155 \text{ V} < E_{pc} < 0.000 \text{ V}$ 의 신호를 측정하는 단계; 및

[51] (c) 상기 E_{pc} 의 전기화학적 신호강도(cathodic peak current, i_{pc})에 따른 미분화 세포의 수를 정량하는 단계.

[52] 상기 세포 집단은 미분화 만능성 줄기세포를 포함한 분화 혼합물(미분화 줄기세포와 분화된 세포가 공존) 또는 상기 분화 혼합물에서 분화된 세포를 선별하여 분리한 결과물이다. 분화 혼합물에서 또는 분화된 세포를 분리한 이후에도 미분화 hPSCs의 수를 정확히 평가하는 것은 매우 중요하다. 잔여 미분화 hPSCs는 hPSCs 세포 치료에서 심각한 위험요소 중의 하나이며, 이는 세포 치료로서 일단 인 비보로 hPSCs가 주입된 후 테라토마 형성의 가능성이 있기 때문이다.

[53] 미분화 만능줄기세포의 정량적 분석은 분화 종료 후 남아있는 미분화 만능줄기세포에 의한 테라토마 형성 위험성을 평가하는 데 매우 중요한 단계이다. 현재는 미분화 만능줄기세포의 특이적인 표면 표지자 (SSEA3, TRA-1-60, SSEA4 등)의 항체를 이용한 유세포 분석법과, 미분화 만능줄기세포의 특이 유전자 (Oct-4, Sox2, Nanog, Lin28a 등)의 프라이머를 이용한 RT-PCR 법이 사용되고 있다. 그러나 상술한 유세포 분석법과 RT-PCR법의 경우, 분석에 사용된 세포를 회수하지 못하기 때문에 분화 과정에 필요한 세포를 분석용으로 따로 분화시켜야 한다는 단점이 있다. 또한 각 분화 단계에서 필요할 때마다 여러 번 미분화 만능줄기세포의 정량적 분석을 수행하기 어려우며, 분화과정에 추가 비용이 소요된다. 그리고 항체를 이용한 유세포 분석법이나 RT-PCR 법은 24시간 이상 소요되는 복잡한 단계가 필요한

분석법으로서 샘플 자체에 포함된 세포의 정량적 분석이 불가능하고 샘플간의 상대적인 비교만 가능하다.

- [54] 그러나 본 발명의 정량적 분석방법은 항체를 사용하지 않기 때문에 간편하고 신속하게 정량적 분석이 가능하며, 분석 후에도 세포의 기능에 영향이 없어, 분석에 사용한 세포를 회수하여 세포 치료 또는 다른 분석시험에 사용할 수 있다.
- [55] 본 발명에 따르면, 상기 전기화학적 신호강도(i_{pc})는 미분화 만능성 줄기세포의 수에 비례하여 증가한다. 상술한 바와 같이, E_{pc} 는 전기분석법의 하나인 볼타메트리를 통하여 측정할 수 있으며, 본 발명에서는 순환 전압 전류법(cyclic voltammetry technique)을 이용하였다. 미분화 hPSCs로부터의 전기화학적 신호강도(i_{pc})는 미분화 hPSCs 수에 대하여 명확한 선형성을 나타내었으며($R^2 = 0.99$), 이는 전기화학적 신호강도(i_{pc})로부터 미분화 hPSCs 수를 추정할 수 있음을 의미한다.
- [56] 본 발명에 따르면, 미분화 만능성 줄기세포 존재시 검출되는 전기화학적 포텐셜의 수치범위는 “ $-0.135 \text{ V} < E_{pc} < -0.020 \text{ V}$ ”, “ $-0.120 \text{ V} < E_{pc} < -0.035 \text{ V}$ ”, 또는 “ $-0.110 \text{ V} < E_{pc} < -0.050 \text{ V}$ ”이다.
- [57] 본 발명에 따르면, 상기 만능성 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 배아생식세포, 배아중양세포 또는 성체줄기세포이다.
- [58] 본 발명의 정량분석방법은 상술한 미분화 만능성 줄기세포의 검출방법을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [59]
- [60] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 세포의 수용 또는 흡착이 가능한 기판(substrate)을 포함하는 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 검출을 위한 세포칩(cell-chip)을 제공한다. 상기 세포에 전기적 펄스(electric pulse)를 인가한 후 세포의 전기화학적 포텐셜(cathodic peak potential, E_{pc})을 측정하였을 때, $-0.155 \text{ V} < E_{pc} < 0.000 \text{ V}$ (실시예에서는 $E_{pc} = -0.077 \text{ V}$ 로 나타남) 인 전기화학적 신호가 검출되는 경우 미분화 만능성 줄기세포가 존재하는 것으로 판단한다.
- [61] 본 발명에 따르면, 미분화 만능성 줄기세포 존재시 검출되는 전기화학적 포텐셜의 수치범위는 “ $-0.135 \text{ V} < E_{pc} < -0.020 \text{ V}$ ”, “ $-0.120 \text{ V} < E_{pc} < -0.035 \text{ V}$ ”, 또는 “ $-0.110 \text{ V} < E_{pc} < -0.050 \text{ V}$ ”이다.
- [62] 본 명세서에서 용어 “기판(substrate)”은 세포를 수용할 수 있는 고상 기질(solid substrate)로서, 상기 기판은 유기 중합체(organic polymer) 또는 무기 물질(inorganic materials)로 이루어질 수 있으며, 본 발명에서 이용될 수 있는 기판은 표면 특성에 무관하게 어떠한 것도 이용 가능하다.
- [63] 상기 유기 중합체(organic polymer)는 폴리아미드 동중중합체(homopolymer) 또는 공중합체(copolymer)(예컨대, 나일론), 내열플라스틱

플루오르화(fluorinated) 중합체(예컨대, 폴리비닐리덴 플루오르화물 PVDF), 폴리비닐할로겐화물(예컨대, 폴리비닐클로라이드 PVC), 폴리설펜, 셀룰로오스 물질(예컨대, 종이, 니트로셀룰로오스 또는 셀룰로오스 아세테이트), 폴리올레핀, 폴리아크릴아미드(예컨대, 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드), 폴리글리콜산(PGA), 폴리유산(PLA), 폴리글락틴 910 (Vicryl®폴리글루코네이트(Maxon™), 폴리디옥사논(PDS), 폴리-4-하이드록시 부틸레이트, 카본, 탄소나노튜브, 콜로이드 및 천연 중합체(예컨대, 아가로스 또는 하이알루로난)를 포함한다. 상기 무기 물질(inorganic materials)은 유리, 석영, 실리카, 은, 금, 알루미늄, 구리, 티타늄, 기타 실리콘-포함 물질(예컨대, 실리콘 옥사이드 또는 니트라이드), 금속 산화물(예컨대, 알루미늄 옥사이드), 금속합금, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄 및 갈륨 아르세나이드를 포함한다.

- [64] 본 발명에서 고상 기질로서 이용될 수 있는 금속은 특별하게 제한되지 않으며, 당업계에서 이용되는 어떠한 금속도 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 이용되는 금속 고상 기질은 표면의 형상, 크기 및 화학적 조성은 특별히 제한되지 않는다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “금속 고상 기질”은 금속, 금속 옥사이드 및 합금의 기질을 모두 포괄하는 의미를 갖는다. 예를 들어, 본 발명에서 이용될 수 있는 금속 고상 기질은, 금, 은, 동, 백금, 구리, 알루미늄, 티타늄, 상기 금속의 합금(예컨대, 금과 구리의 합금) 또는 금속 옥사이드 기판을 포함한다. 금속 고상 기질은 금속으로 이루어진 고상 기질뿐만 아니라, 금속이 표면 코팅된 기판도 포함한다. 한편, 상기 기판(substrate)은 전극 상의 세포가 광학 현미경으로 잘 관찰될 수 있도록 투명 또는 반투명 상태임이 바람직하다.
- [65] 본 발명의 세포칩은 작업전극(working electrode), 상대전극(counter electrode) 및 표준전극(reference electrode)을 포함하는 3-전극 시스템이다. 본 발명의 일 예에 따르면, 상기 작업전극은 하층-상층 방향으로 유리(glass)-티타늄(Ti)-금(gold) 막으로 구성된다. 즉, 작업전극은 금과 유리 간의 접착을 위하여 유리 상에 티타늄(Ti) 막을 스퍼터링(sputtering)하고, Ti 상에 금 막을 스퍼터링하여 제작할 수 있다. 이러한 기질(substrate)은 전극 상의 세포가 광학 현미경으로 잘 관찰될 수 있는 반-투명(semi-transparent) 상태이다. 본 발명의 일 예에 따르면, 상기 작업전극(working electrode)은 Au, 상대전극(counter electrode)은 Pt, 표준전극(reference electrode)은 Ag/AgCl을 이용하였다.
- [66] 한편, 전기화학적 측정을 위한 줄기세포를 세포칩 상에 고정시키기 위하여 상기 기판의 작업전극 상에 매트릭젤(matrigel)을 코팅하며, 상기 매트릭젤 상에 세포를 분주하여 배양한다.
- [67] 본 발명의 세포칩은 상기 기판 이외에 세포 배양물을 수용하기 위하여 별도의 챔버(chamber)를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [68] 세포칩에서의 전기화학적 포텐셜(E_{pc})은 mTeSR1 존재 하의 줄기세포에서 측정된다.
- [69] 본 발명의 세포칩은 상술한 미분화 만능성 줄기세포의 검출방법 및

정량분석방법을 이용하기 때문에, 이들 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[70]

발명의 효과

[71] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[72] (a) 본 발명은 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 검출방법 및 이를 이용한 세포칩에 관한 것이다.

[73] (b) 본 발명의 세포칩 기반의 정량적 분석 방법은 종래 만능줄기세포의 정량적 분석을 위해서 이용하던 유세포 분석법 또는 실시간 PCR법과 달리 항체를 사용하지 않기 때문에 간편하고 빠르게 정량적 분석이 가능하며, 분석 후에도 세포의 기능에 영향이 없어 분석에 사용한 세포를 회수하여 사용가능하다는 장점이 있다.

[74] (c) 본 발명의 검출방법은 hPSCs의 특이적 E_{pc} (-0.077 V)를 이용한 것으로서, 미분화 hPSCs의 세포 수에 따라 비례적으로 증가하는 신호 강도(i_{pc})로부터 미분화 hPSCs의 세포 수를 정량적으로 분석할 수 있다.

[75] (d) 본 발명의 세포칩 기반의 E_{pc} 평가는 상대적으로 단시간 내에 이루어져 간편하고 명확한 선형성(선형성 0.99 이상)을 가지는 높은 재현 값을 얻을 수 있다.

[76]

도면의 간단한 설명

[77] 도 1a 및 도 1b는 hPSCs의 인 시투 검출을 위한 세포칩 구축의 모식도를 나타낸다. 도 1a는 작업전극을 포함하는 세포칩의 모식도로서, hPSCs를 수용하고 있는 이미지를 나타낸다(왼쪽 패널). 도 1b는 세포칩 상에 세포 분주 후 1일(Day 1) 및 4일(Day 4) 쯤의 hPSCs 광학현미경 이미지를 나타낸다. scale bar = 400 μ m.

[78] 도 2a 내지 도 2c는 hPSCs의 전기화학적 검출 및 정량분석 결과를 나타낸다. 도 2a는 1.4×10^5 /hESC (회색 실선) 또는 2.6×10^5 /hiPSCs (검은색 실선)의 순환 전압 전류분석 및 음극 피크 전류(i_{pc} , 적색 화살표 및 실선)결과이다(왼쪽 패널). 또한 알칼라인 포스파타아제 활성 분석 후 hESC (H9) 및 hiPSCs (SES8)의 광학현미경 이미지를 관찰하였다(적색으로 나타남, 오른쪽 패널). scale bar = 200 μ m. 한편, hESC (도 2b, 왼쪽 패널) 및 hiPSCs (도 2c, 왼쪽 패널)의 세포 수 의존적인 CV 피크 변화가 나타났다. 각각을 CV 피크 전류(i_{pc}) 대 세포 수의 산점도(Scatter plot), E_{pc} 대 세포 수의 선형회귀분석으로 나타내었다(도 2b 및 도 2c의 오른쪽 패널). 도 2b의 세포 수는 각각 0.7×10^5 , 3.1×10^5 및 6.5×10^5 이고, 도 2c의 세포 수는 각각 1.2×10^5 , 2.6×10^5 및 4.5×10^5 이다.

[79] 도 3a 내지 도 3e는 hPSCs 특이적 i_{pc} 를 나타낸다. 도 3a는 hiPSC(적색, 가장 위쪽 및 가장 아래쪽 그래프), hASMC (청색) 및 i-dSMC (검은색)의 CV 그래프(왼쪽

패널); 및 hiPSC의 세포 수 의존적 표준 곡선(적색)과 비교하여 hASMC (청색) 또는 i-dSMC (검은색)의 CV 피크 전류 대 세포 수의 산점도(오른쪽 패널)를 나타낸다. 도 3b는 hiPSCs 자발적 분화의 과정을 간략히 나타낸 것이다. 각각은 전형적인 배아체(embryonic body, EB) 및 EB로부터 분화된 세포를 나타낸다(왼쪽 아래 이미지). scale bar = 200 μ m 및 500 μ m. 도 3b의 오른쪽 패널은 hiPSC 및 이로부터 7일간 분화된 세포(EB Dif.)의 Oct4, Nanog, Pax6 (외배엽), Brachyury T (중배엽) 및 Sox17 (내배엽)의 RT-PCR 분석결과를 나타낸다. 도 3c는 hiPSC (적색, 가장 위쪽 및 가장 아래쪽 그래프) 및 분화된 세포(EB Dif)(청색)의 CV 그래프(왼쪽 패널) 및; hiPSC 세포 수 의존적 표준 곡선(적색)과 비교하여 분화된 세포(EB Dif.)의 CV 피크 전류 대 세포 수의 산점도를 나타낸다(오른쪽 패널). 도 3d는 hESC 자발적 분화의 과정을 간략히 나타낸 것이다. * 해당 일자에 샘플로부터 mRNA 발현 및 i_{pc} 측정을 위한 샘플을 수거하였음, 세포칩 상의 hESCs 및 분화된 세포(Dif)의 광학현미경 이미지임(Dif). scale bar = 500 μ m (왼쪽 패널). 도 3d의 오른쪽 패널은 분화 후 0, 3, 6, 및 7일 후, 각 샘플로부터의 Oct4 또는 Nanog의 실시간 PCR 분석결과이다. 도 3e는 해당 분화일에서의 CV 피크 전류(청색, Y축) 및 세포수(회색, Y축)의 그래프를 나타낸다.

[80] 도 4a 내지 도 4e는 혼합 배양 조건에서 hPSCs로부터의 i_{pc} 검출결과를 나타낸다. 도 4a는 hiPSCs 및 hASMCs 세포 혼합물의 광학현미경 이미지(왼쪽 패널), scale bar = 200 μ m; SSEA4 면역형광이미지(적색); DAPI 이미지(청색)를 나타낸다. SSEA4 양성인 영역은 점선으로 표시하였다. scale bar = 100 μ m. 도 4b는 고정된 수의 hASMCs와 hiPSCs의 세포 수 증가에 따른 CV 피크의 변화(왼쪽 패널) 및 i_{pc} :세포 수의 선형회귀분석 결과를 나타낸다(오른쪽 패널). hiPSCs 세포 수는 각각 3.3×10^4 , 5.0×10^4 , 8.3×10^4 및 11×10^4 이다. 도 4c는 Oct4, Sox2, Nanog, Lin28a의 mRNA fold ratio: 혼재된 hiPSCs의 세포 비율(%)에 대한 산점도, 선형회귀(왼쪽 패널); 및 비-선형회귀(오른쪽 패널)를 나타낸 실시간 PCR 분석결과이다. 도 4d 및 도 4e의 세포 비율(%)은 각각 hASMCs 또는 인간 진피 섬유아세포(human dermal fibroblast, hDF)와 혼합된 hiPSCs (도 4d) 및 hESCs(도 4e)의 세포 비율을 나타낸다. Oct4 (4d) 또는 SSEA3 (4e) 양성 집단의 재현율을 유세포 분석법을 통해 나타내었으며, 이를 선형회귀그래프로 나타내었다(오른쪽 패널).

[81] 도 5는 전기화학 측정 이후 평활근 세포의 손상 정도를 측정한 결과이다. 도 5a는 전기화학 측정 후, 3일 뒤에 hASMCs의 세포사멸 집단을 검출하기 위한 Annexin V 및 7-AAD의 FACS 분석 결과이다(P.C: 세포사멸유도의 양성대조군). 각 조건에서의 Annexin V 양성 집단을 그래프에 나타내었다(오른쪽 패널). 도 5b는 추가적인 3일 동안 IncuCyte FLR을 이용하여 전기적 자극 유무에 따른 세포 성장률을 분석한 결과이다. 도 5c는 자극 유무에 따른 PARP1/2 cleavage (화살표), cleaved caspase 3 및 H2AX 인산화(pH2AX)를 면역블로팅 분석한 결과이다(P.C: 세포사멸유도의 양성대조군). α/β 튜불린(tubulin)은 단백질 로딩의 대조군으로

사용하였다. 도 5d는 자극 유무에 따른 hASMCs의 광학현미경(위쪽 패널, scale bar = 200 μ m), 또는 면역형광 이미지(아래쪽 패널, α -SMA:녹색, DAPI: 청색, scale bar = 50 μ m)를 나타낸다. 도 5e는 자극 유무에 따른 α -SMA의 실시간 PCR 분석(왼쪽 패널) 또는 면역블로팅 분석(오른쪽 패널) 결과이다(NS: not significant, PCNA: 단백질 로딩 대조군). 도 5f는 자극 유무에 따른 hASMCs의 핵형을 나타낸다.

- [82] 도 6a 내지 도 6d는 안전성 보장을 위한 미분화 hPSCs의 인시투 모니터링의 유효성을 나타낸 것으로서, 도 6a는 농도 의존적인 YM-155 처리 24시간 후, hiPSCs의 CV 피크 전류 그래프(청색, Y축 오른쪽) 및 세포 수(회색, Y축 왼쪽)를 나타내며, 도 6b는 농도 의존적인 YM-155 처리 24시간 후, hESC의 CV 피크 전류를 나타낸다. 도 6c는 hiPSCs 및 hASMCs의 혼합 배양 조건에서 YM-155 처리 (YM155 tx)의 간략한 과정을 나타낸다(왼쪽 패널). 30 nM YM-155 처리 24시간 후, 세포칩 상의 hiPSCs 및 hAMSCs의 광학현미경 이미지를 관찰하였다(정상적인 hiPSCs 콜로니는 검은색 점선으로, 형태가 변한 hiPSCs는 적색 점선으로 나타내었다(scale bar = 500 μ m)). 도 6d는 혼합 배양 조건에서 YM-155의 용량별 처리 24시간 후, 측정된 CV 피크 전류 및 동일한 세포 수의 무처리 hASMCs의 CV 피크 전류를 나타낸다.

- [83] 도 7은 미분화 hPSCs의 인시투 모니터링의 활용에 대한 모식도이다.

- [84] 도 8a는 PBS 조건 하에서 hiPSCs의 개수에 따른 i_{pc} 를 측정한 결과이고, 도 8b는 각기 다른 세포 타입에서 다른 E_{pc} 가 관찰되었음을 나타낸 결과이다. hPSCs(-0.077V), PC12 갈색세포종 세포(0.13V), MCF7 유방암 세포(0.05V), SH-SY5Y 신경모세포종 세포(-0.10V).

- [85] 도 9a 및 도 9b는 hASMCs와 혼합된 hiPSCs의 세포 비율(%)에 따른 hPSCs 특이적 케라틴 설페이트 항원인 TRA-1-60 또는 SSEA3에 대한 유세포 분석 결과이며, 유사한 선형성이 나타남을 보여준다($R^2 = 0.995$, TRA-1-60; $R^2 = 0.934$, SSEA3).

- [86] 도 10은 hESC와 이에서 유래된 분화세포와의 혼합 배양조건에서 40 nM YM-155 처리 후, 활성 카스파제 3에 의한 세포 사멸은 SSEA3+ 양성 집단에서만 나타났으며 SSEA3- 음성 집단에서는 나타나지 않음을 보여준다.

[87]

발명의 실시를 위한 형태

- [88] 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.

[89]

[90] 실시예

[91] 실험재료 및 실험방법

[92] 화합물 및 기타 재료

[93] DPBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline)은 StemCell Technologies Inc. (Vancouver, Canada)에서 구입하였다. 세포 배양을 위한 4-웰 플라스틱 챔버(Lab-Tek(R))는 Thermo fisher scientific (USA)에서 구입하였다. 본 발명에서 사용된 화합물은 상업적으로 구매할 수 있다.

[94]

[95] 작업전극의 제작

[96] 본 발명에서는 작업전극(Au), 상대전극(Pt) 및 표준전극(Ag/AgCl)으로 구성된 일반적인 3-전극 전기화학 시스템을 도입하였다. 작업전극은 금과 유리 간의 접착을 위하여 유리 상에 5 nm 두께의 티타늄(Ti) 막을 스퍼터링(sputtering)하고, Ti 상에 50 nm 두께의 금 막을 스퍼터링하여 준비하였다. 이러한 기질(substrate)은 전극 상의 세포가 광학 현미경으로 잘 관찰될 수 있는 반-투명(semi-transparent) 상태이다. 상기 전극을 알코올 및 증류수에서 5분간 소니케이션하여 세척하였다. 이어 금 전극을 피라나 용액(H_2SO_4 : H_2O_2 =7:3)에서 65°C에서 5분간 침지시켰다. 피라나 용액 처리 후, 상기 금 전극을 100% 알코올 및 증류수에서 세척하였다. 마지막으로 안정적인 순환 전압 전류도(cyclic voltammogram)를 나타낼 때까지, 상기 전극을 10 mM PBS에서 전기화학적으로 세척하였다. 전기화학적 측정을 위하여 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS)을 이용하여 폭 2 cm, 길이 2 cm, 높이 0.5 cm의 플라스틱 챔버를 작업전극 상에 고정시켰다. PSCs 흡착을 위하여, 매트릭셀(BD Biosciences)은 hESC 기초 배지(DMEM/F12, 1% non-essential amino acids, 0.1% β -머캅토에탄올 및 0.1% 젠타마이신(gentamycin)으로 1:80으로 희석하여 1시간 이상동안 작업전극 상에 코팅하였다. DMEM-F12 하에서 1시간 동안 1:80 희석된 매트릭셀 (BD, #354277)을 작업전극 상에 코팅하였다.

[97]

[98] 세포 배양

[99] hESCs (H9; Wicell Research Institute)와 hiPSCs (SES8;(32))는 mTeSR1 배지(StemCell Technologies)에서 feeder-free 조건하에서 배양되었다. hASMCs와 i-dSMCs는 평활근 세포 특이적 배지인 SMCM (ScienCell Research Laboratories)에서 배양되었으며, hDFs는 10% FBS(소태아혈청)와 0.1% 젠타마이신이 첨가된 DMEM 배지(Gibco)에서 배양되었다. 알칼라인 포스파타아제 염색은 알칼라인 포스파타아제 키트(Sigma)에서 제공하는 방법에 따라 수행되었다.

[100]

[101] 전기화학적 검출방법

[102] CHI660C Potentiostat (CHInstruments, Austin, TX, USA)를 이용하여 순환 전압 전류(Cyclic voltammetry, CV) 방법을 수행하였다. 작업전극으로서 Au 전극,

표준전극으로서 Ag/AgCl (1M KCl) 및 상대전극으로 Pt 와이어를 기반으로 한 가공된 칩을 사용하였다. 전기화학적 측정을 위하여, 세포를 PBS(0.01M, PH 7.4)로 세척하였다. CV 검출은 mTeSR1 (Stem Cell Technologies, #05850)에서 0.1 V/s 로, -0.2 V 내지 0.6 V의 범위에서 수행하였다. 모든 측정은 적어도 3회 이상 실시하였으며, 세포 수는 검출 후에 계산되었다.

[103]

[104] *자발적 분화*

[105] 자발적 분화는 배아체(embryonic body) 형성 또는 직접적인 소태아혈청(fetal bovine serum)을 이용하는 두 가지 방법으로 수행되었다. 배아체 형성을 위해, 조각 낸 hiPSCs는 20% 혈청 대체물(serum replacement)을 포함하는 hESC 기초 배지에서 부유 상태로 배양되었다. 생성된 배아체는 DMEM 배지에서 세포배양 디쉬에 붙여진 후, 지시된 날짜까지 배양되었다. 직접적인 소태아혈청 분화를 위해, 세포 부착 3일 후, mTeSR1 배지는 DMEM 배지로 교체되어 지시된 날짜까지 분화시켰다.

[106]

[107] *RNA 추출 및 실시간 PCR*

[108] RNA는 RNA 추출 키트(Intron)를 이용해 얻은 후, 500ng RNA는 Prime Script RT Master Mix(Takara)를 이용해 제공하는 방법에 따라 cDNA(complementary DNA)로 합성되었다. 실시간 RCR은 SYBR Premix Ex Taq(Takara)를 이용해 LightCycler 480 II 장비에서 수행되었으며, 본 발명에서 사용된 유전자 특이적 프라이머는 표 1에 명시되었다.

[109]

[110] [표1]
프라이머서열

유전자	Forward 서열	Reverse 서열
POU5F1	5-CCCCAGGGCCCCATTTTGGT ACC-3	5-ACCTCAGTTTGAATGCATGG GAGAGC-3
NANOG	5-AAATTGGTGATGAAGATGTA TTCG-3	5-GCAAAACAGAGCCAAAAAC G-3
SOX2	5-TTCACATGTCCCAGCACTACC AGA-3	5-TCACATGTGTGAGAGGGGCA GTGTGC-3
LIN28A	5-CACGGTGCGGGCATCTG-3	5-CCTTCCATGTGCAGCTTACTC -3
PAX6	5-TGTCCAACGGATGTGTGAGT- 3	5-TTTCCCAAGCAAAGATGGAC- 3
T	5-ACCCAGTTCATAGCGGTGAC- 3	5-CCATTGGGAGTACCCAGGTT- 3
SOX17	5-AGCAGAATCCAGACCTGCAC -3	5-TTGTAGTTGGGGTGGTCCTG- 3
ACTA2	5-CATCACCAACTGGGACGACA TGGA-3	5-GCATAGCCCTCATAGATGGG GACATTG-3
ACTB	5-GTCCTCTCCCAAGTCCACAC- 3	5-GGGAGACCAAAAGCCTTCAT -3
GAPDH	5-AAGGGTCATCATCTCTGCCC- 3	5-GTGATGGCATGGACTGTGGT- 3

[111]

[112]

[113] 면역염색 및 면역블로팅

[114] 세포는 4% 포름알데히드로 고정된 후, 0.1% 트리톤 X-100을 이용해 투과(permeabilization)하였다. 3% 소혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 포함하는 TBS-T를 이용하여 블로킹(blocking)한 후, 지시된 1차 항체를 이용해 반응시켰다. 세포는 세척 후, Cy2-(Jackson ImmunoResearch Laboratories) 또는 Alexa594-(Life Technologies) 결합된 2차 항체를 이용해 반응시킨다. 핵은 DAPI를 이용하여 염색하였다. 이미지는 BX53 연구용 현미경을 이용하여 분석되었으며, 사용된 1차 항체는 다음과 같다. SSEA4 (1:400, R&D Systems) 및 α -Smooth Muscle Actin (1:100, Sigma). 면역블로팅 방법은 이전에 기술된 논문에서와 같이 시행되었으며, 사용된 1차 항체는 다음과 같다. PCNA 및

PARP1/2 (Santa Cruz), Cleaved Caspase 3, P-Histone H2A.X (S139) 및 α/β tubulin (Cell Signaling) 및 α -Smooth Muscle Actin (Sigma).

[115]

[116] 유세포 분석법 및 세포사멸 측정

[117] 세포는 각각의 형광이 결합된 항체로 염색하여 FACSCalibur (BD Biosciences) 장비를 이용하여 분석되었다. 사용된 항체는 다음과 같다. Oct4 (Abcam), FITC Rat Anti-SSEA3 및 PE Mouse Anti-Human TRA-1-60 (BD Pharminogen). 세포사멸 측정을 위하여, 세포는 PE Annexin V 세포사멸 측정 키트 및 PE Active Caspase 3 세포사멸 키트 (BD Pharminogen)를 이용하여 제공하는 방법에 의해 수행되었다.

[118]

[119] 성장곡선 측정 및 *G-band* 핵형 분석

[120] hASMCs의 전기적 자극 유무에 따른 세포성장율은 IncuCyte FLR (Essen Bioscience) 장비를 이용하여 3일 동안, 3시간 간격으로 측정되었다. 핵형분석을 위해, hASMCs는 100 ng/ml 콜시미드(colcemid)를 2시간 처리 후 샘플링 되었다. 샘플은 1% 구연산 나트륨(sodium citrate)으로 저장 상태(hypotonic condition)를 구성 후, 카노이 용액(Carnoy's solution)으로 고정시켰다. 핵형분석은 G-분염법(G-banding)을 통해 분석되었다.

[121]

[122] 통계분석

[123] 그래프는 평균(mean)과 표준편차($\pm$ s.d)로 표기하였다. 세 그룹 이상의 통계적 유의성은 분산분석(one- 혹은 two-way analysis of variance, ANOVA)을 통해, 두 그룹은 t검정(Student's t-test)을 통해 분석되었다.

[124]

[125] 실험결과

[126] hPSCs의 인 시투(*in situ*) 검출을 위한 세포칩 구축

[127] 본 발명자들은 3-전극 시스템(27, 28)에 기반한 전기화학적 세포칩을 디자인 하였다. 세포칩은 플래티늄 작업 전극 상에 놓여진 표준 전극(reference electrode, Ag/AgCl) 및 상대 전극(counter electrode, Pt)으로 구성된다(도 1a, 왼쪽 패널). hPSCs는 투명 플라스틱 커버가 있는 매트릭셀/골드 코팅 플레이트 상에서 배양하였다(도 1a, 오른쪽 패널). hESCs 또는 hiPSCs가 세포칩 상에 놓여질 경우, 전체 과정이 수행되는 동안 세포들은 feeder-free 상태 하에서 적어도 4 일간 이상 없이 잘 배양된다(도 1b). 이러한 세포칩 시스템은 전기적 펄스를 변화시킴으로써 미분화 hPSCs의 특이적 E_{pc} 를 검출하고자 한다.

[128]

[129] hPSCs의 전기화학적 검출 및 정량

[130] 전기화학적 특성은 전해질 조성에 의해 크게 영향을 받기 때문에, 불필요한 시그널을 최소화하기 위하여 PBS를 사용하는 것이 바람직하다(28). 하지만 다른 인간 세포주와 달리, hPSCs는 배양 조건에서 오는 스트레스에 매우 취약하기

때문에 hPSCs는 mTeSR1 배지에서 배양하였으며(29, 30), 이후 실험에 사용하였다. 알칼라인 포스파타아제 활성 염색으로서 동정되었던 hESCs (H9: 왼쪽 패널) 및 hiPSCs (SES8: 오른쪽 패널)의 E_{pc} 는 -0.077V 로 관찰되었다(도 2a). 이러한 특이적 시그널은 PBS 조건 하에서 유사하게 관찰되었으며, 이는 hPSCs의 E_{pc} 는 배지의 조성에 의존하지 않음을 의미한다(도 8a). 가장 중요한 점은, PC12 갈색세포종 세포(at 0.13V), MCF7 유방암 세포(at 0.05V) 또는 SH-SY5Y 신경모세포종 세포(at -0.10) 등 각기 다른 세포 타입에서 다른 E_{pc} 가 관찰되었으며, 이는 hPSCs의 E_{pc} 값이 hPSCs 특이적으로 나타난다는 것을 의미한다(도 8b).

[131] 또한 -0.077V 에서 검출된 hPSCs의 전기화학적 신호강도(cathodic peak current, i_{pc})가 세포의 수에 비례하여 증가하였다(70,000 - 650,000 cells). 전기화학적 신호강도(i_{pc}) 및 세포 수의 선형적 연관성은 각각 0.999 (hESCs, 도 2b) 및 0.986 (hiPSCs, 도 2c)로 나타났으며, 이는 세포 수에 따라 전기화학적 신호 강도의 선형성(linearity)을 보여주었다.

[132]

[133] hPSCs의 특이적 i_{pc}

[134] 세포 수에 대한 i_{pc} 의 높은 선형성 (0.98 이상)은 hPSCs에서 관찰되는 -0.077V 에서의 i_{pc} 를 간단히 측정함으로써 세포수를 추론하는데 유용하게 이용될 수 있다. 마지막으로 본 발명자들은 E_{pc} 를 비교하기 위하여 유전적 바탕을 같이 하는(32) hiPSCs, 인간 대동맥 평활근 세포(human aortic smooth muscle cells, hASMCs), hiPSCs의 모세포 및 hiPSCs 유래의 평활근 세포(i-dSMC) 등의 세포를 이용하였다.

[135] hiPSCs, hASMCs 및 i-dSMCs를 같은 세포 수(200,000 cells)로서 세포칩에 분주하고 이들의 i_{pc} 를 측정하였다. 도 3a 에서 볼 수 있는 바와 같이, i_{pc} 는 오직 hiPSCs에서만 측정되었으며 hASMCs 및 i-dSMCs에서는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 도 2a에서와 같은 hPSCs 의 E_{pc} 는 미분화 hPSCs에 특이적인 시그널임을 의미한다. hASMCs 또는 i-dSMCs의 세포 수를 점진적으로 증가시켰을 때에도 유의적인 신호가 관찰되지 않았다(도 3a, 오른쪽 패널).

[136] hASMCs 및 i-dSMCs에서의 i_{pc} 결여가 평활근 세포의 특성 때문이라는 가능성을 피하기 위하여, hiPSCs를 14일 동안 3가지 germ layer로 자발적으로 분화시켰다(도 3b, 왼쪽 패널)(33). 상기 germ layer는 각각의 특이적 마커 유전자 발현(Pax6 - 외배엽; Brachyury T - 중배엽; Sox17 - 내배엽)에 의해 확인되었다(도 3b, 오른쪽 패널). 흥미롭게도, hiPSCs의 분화된 세포로부터의 i_{pc} 는 다시 소멸되었다(도 3c, 왼쪽 패널). 세포 수가 계속해서 증가함에도 불구하고(550,000 cells), 분화된 세포의 시그널 강도는 계속 낮게 유지되었다(도 3c, 오른쪽 패널). hESCs에서도 이와 유사한 결과가 관찰되었다. 10일 동안, hESCs의 자발적 분화는 시간 의존적으로 Oct4 및 Nanog의 발현이 현저히 감소하였다(도 3d, 오른쪽 패널). 전기화학적 피크 전류(i_{pc} , 청색)는 전체 세포 수(회색)가 현저히

증가하는 동안 분화 의존적으로 감소하였다(도 3e). 따라서, 본 발명자들은 세포 칩에서 0.077V 에서 관찰된 hPSCs의 전기화학적 E_{pc} 가 미분화 hPSCs에 대한 특이적인 시그널인 것으로 판단하였다.

[137]

[138] 혼합 배양 조건에서 hPSCs로부터의 i_{pc} 검출

[139] 잔여 미분화 hPSCs는 hPSCs 기반 세포 치료에서 심각한 위험요소 중의 하나이며, 이는 세포 치료로서 일단 인 비보에 hPSCs가 주입된 후 테라토마 형성의 가능성이 있기 때문이다(4). 따라서, 분화 혼합물에서 또는 세포를 분리한 이후에도 미분화 hPSCs의 수를 정량적으로 평가하는 것은 매우 중요하다. 경우에 따라, 소분자(23, 33) 또는 hPSCs 특이적 항체(34)를 이용하여 잔여 미분화 hPSCs를 제거하는 추가적인 과정이 필요할 수 있다. 이에 대한 검증을 위해, 혼합 배양 조건에서 hPSCs로부터의 특이적 i_{pc} 는 검출되어야 한다. 혼합 배양에서 hPSCs의 i_{pc} 검출이 미분화 hPSCs의 수를 평가하는 유효한 방법임을 증명하기 위하여, 제시된 수의 hiPSCs를 일정 수의 hASMCs와 함께 배양하여, 분화 후 미분화 hPSCs의 존재를 묘사하였다. 그 결과, 도 4a에서 볼 수 있듯이, 혼합 배양 조건에서 미분화 hiPSCs는 SSEA4 (Stage-specific embryonic antigen 4) 염색으로 확연히 구분되었다(점선, 도 4a). 일정 hASMCs 세포 수에서 미분화 hiPSCs가 점진적으로 증가됨에 따라, i_{pc} 는 여전히 비례적으로 증가하였다($R^2 = 0.997$, 도 4b, 오른쪽 패널). 이러한 결과는 미분화 hPSCs로부터의 시그널이 분화된 세포에 의해 영향을 받지 않음을 의미한다.

[140] 이어, 최근의 미분화 hPSCs의 정량방법인 실시간 PCR 및 FACS 분석과 본 발명의 “세포 칩”의 신뢰도를 비교하였다. 특히 보존된 RNA 결합 단백질인 Lin28 homolog A (Lin28a)는 망막 상피세포로의 분화 후 미분화 hPSCs의 마커이며(35), 현재 이의 반상 변성에 대한 임상 적용이 이루어지고 있다(36). Lin28a 및 다른 전형적인 만능성 특이적 마커, 예컨대 Oct4, Sox2 및 Nanog는 혼재된 미분화 hPSCs의 세포 비율이 증가함에 따라 점진적으로 증가하지만, hPSCs 비율에 따른 mRNA 비율의 선형성은 세포 칩의 선형성과 비교하여 낮게 나타났다($R^2 0.88$)(도 4c, 왼쪽 패널). 대신, mRNA 비율의 적합성은 S자 곡선(sigmoid curve)에 더욱 가깝게 나타났다($R^2 0.9981$)(도 4c, 오른쪽 패널). 또한, Oct4 (hiPSCs, 도 4d) 및 전형적인 미분화 표면 마커(31)인 SSEA3 (hESCs, 도 4e)를 이용한 FACS 분석으로 미분화 혼재된 hPSCs 세포 비율에 따른 Oct4 또는 SSEA3 양성 집단의 선형성을 분석하였다. 도 4d 및 도 4e에서 볼 수 있듯이, 세포 수에 대한 FACS 분석의 선형성은 0.95 이상으로 나타났으며($R^2 = 0.997$, Oct-4; $R^2 = 0.958$, SSEA-3), 이는 세포 칩의 선형성과 거의 동일하였다. 또한, hASMCs와 혼합된 hiPSCs에서 다른 항체를 이용한 FACS 분석에서도 유사한 선형성 결과를 얻었다($R^2 = 0.995$, TRA-1-60; $R^2 = 0.934$, SSEA3)(도 9a 및 도 9b 참조).

[141]

[142] 측정 후 평활근 세포의 무손상

[143] FACS 또는 실시간 PCR 분석의 결과 많은 수의 세포들이 회복 불능의 상태로 손실되는 것과 달리, 세포칩 상의 세포들은 측정 후 여전히 생존하고 있었으며, 이는 본 발명의 세포칩에 사용된 전기적 펄스가 세포에 큰 손상을 주지 않음을 예견할 수 있다. 특히 측정 후, 분화된 세포의 지속적인 사용을 위하여 분화된 세포를 모델로 손상 정도를 분석하였다. 우선, hASMCs에서 전기적 펄스에 의한 세포 사멸반응은 나타나지 않았다(도 5a). 또한, 전기적 측정 이후에도 hASMCs가 여전히 활발히 성장함을 통해, 이는 측정과정 동안 전기적 펄스가 hASMCs 성장 및 생존에 최소한의 영향만 준다는 것을 의미한다(도 5b). 이어, 전기적 펄스에 의해 예상치 못한 세포 기능 이상을 초래할 수 있는 세포 스트레스 반응을 활성 카스파제 3의 형성뿐만 아니라 DNA 손상(예컨대, 자외선 또는 이온화 방사선), 산화 스트레스(예컨대, 활성산소종) 및 삼투 스트레스(37-39) 등에 의해 증가되는 H2AX의 인산화 레벨을 통해 측정하였다. 그 결과, 전기적 펄스에 의해 활성 카스파제 3 및 H2AX 인산화가 나타나지 않음을 확인하였다(도 5c). 또한, 전기적 펄스의 인가 후에도 hASMCs의 전형적인 분자적 마커인 α 평활근 액틴(smooth muscle actin, α -SMA)의 일정한 레벨과 함께 세포의 형태적 변화가 없었고(도 5d 및 도 5e), 핵형 분석 결과도 정상적으로 나타났다(도 5f). 이로써 본 발명자들은 hASMCs는 세포칩 측정 이후에도 세포들이 정상 상태로 유지되므로, 이들 세포를 세포 치료에 이용될 수 있음을 확인하였다.

[144]

[145] *안전성 보장을 위한 미분화 hPSCs의 인 시투 모니터링 밸리테이션*

[146] 이전 연구에서 본 발명자들은 미분화 hPSCs의 선택적 사멸을 유도하는 두 가지 소분자(33)를 보고하였다. 이에, YM-155에 의한 명확한 세포 사멸 유도로 인하여 hPSCs의 YM-155 처리는 감소하는 세포 수만큼 i_{pc} 를 감소시킬 것이라 예상하였다. 예상대로, 세포 수 및 i_{pc} 가 YM-155 처리 용량에 의존적으로 현저히 감소되었다(도 6a, hiPSCs; 도 6b, hESC). 잔여 미분화 hPSCs의 비-라벨 세포칩 기반 정량은 tumor-free 세포 치료에 대한 안전성 보장을 위해 추가적인 미분화 세포 처리가 요구되는지 판단하기 위한 중요한 마지막 단계에 적용될 수 있다. 이러한 상황을 묘사하기 위해, hiPSCs는 hASMCs와 함께 배양되었다. 세포칩에서 혼합 배양 후, hiPSCs는 여전히 hPSCs 특이적 콜로니 형태를 유지하는 반면(도 6c, 왼쪽 패널, 검은색 점선), YM-155 처리 24시간 후에는 hASMCs에서는 아니지만 hiPSCs에서 일반적인 콜로니 수축 형태를 보였다(도 6c, 왼쪽 패널, 적색 점선). YM-155 처리 후 활성 카스파제 3에 의한 세포 사멸이 SSEA3+ 양성 집단에서만 나타났으며 SSEA3- 음성 집단에서는 나타나지 않음을 통해(도 10), 도 6c의 YM-155 처리 후 세포칩 상에서의 형태 변화는 hiPSCs 특이적 세포 사멸로 인해 나타났음을 알 수 있다. 이러한 조건 하에서, hiPSCs 및 hASMCs 혼합 배양시의 i_{pc} 는 YM-155 용량 의존적으로 점차 감소하였다(도 6d). 특히, 40 nM YM-155 처리 시, i_{pc} 레벨은 hASMCs만큼 낮아졌으며, 이는 이전

연구결과와 같이 40 nM YM-155에서 hiPSCs가 유의적으로 감소되었음을 나타낸다(19).

- [147] 상술한 데이터들은 본 발명자들이 고안한 세포칩이 분화 종료단계에서 hPSCs 특이적 i_{pc} 평가를 통해 미분화 hPSCs의 존재를 확인하여 테라토마 형성을 차단할 수 있음을 제시하는 유효한 방법론(methodology)을 보여준다.

[148]

[149] 논의

- [150] 인 *비보*에서의 hPSCs의 종양형성능(tumorigenicity)은 이들 자체의 암 유사 성질에 기인하며(예컨대, 높은 텔로머라아제 활성 및 활발한 세포주기), 이러한 종양형성능은 만능성 줄기세포(PSCs) 기반 세포치료에 있어 중요한 장벽으로 남아있다. 이를 해결하기 위하여, hPSCs 특이적 항체 또는 소분자 등을 이용하여 분화 후 잔여 미분화 hPSCs의 선택적 사멸을 유도하는 많은 방법들이 시도되어 왔다. 그러나 hPSCs를 제거한 이후에도 임상 적용을 위해서는 hPSCs의 성공적인 제거를 위한 추가적인 단계가 요구된다. 하지만, 현재 사용되는 실시간 PCR 또는 FACS와 같은 hPSCs의 존재를 확인할 수 있는 기술로는 세포 치료에 사용될 수 있는 많은 양의 세포 집단이 소모된다.

- [151] 특정 세포 타입의 E_{pc} 는 서로 다른 표면 단백질로 인한 세포 표면의 특이적 산화환원전위(redox potential)에 의해 생성된다(46). 분화된 세포와 비교하여 hPSCs의 광범위한 표면 단백질을 고려하면, hPSCs가 미분화 상태를 유지하는 동안 특이적 E_{pc} 를 나타내리라는 것을 예상할 수 있다(34, 40). 예상대로, 본 발명자들은 hPSCs의 특이적 E_{pc} 를 발견하였으며, 이에 대한 i_{pc} 는 세포 수에 따라 비례적으로 증가하였으며(선형성 0.99 이상)(도 2 참조), 분화과정 동안 급격히 감소하였다(도 3 참조). 중요한 것은, 시그널의 강도가 혼합 배양 조건에서도 높게 유지되었다는 것인데(도 4b), 이러한 분화 후 세포 혼합물에서 hPSCs의 특이적 i_{pc} 는 테라토마 형성 세포(미분화 hPSCs)의 존재 가능성에 대한 정보를 제공한다(도 7 참조). 특정 레벨의 i_{pc} 가 일단 검출되면, 이는 잔여 hPSCs의 존재로 인하여 나타났음으로 간주하여, 세포 치료의 안전성 확보를 위해서는 본 발명자들이 이전에 보고한 ‘줄기세포 독소(stem-toxins)’를 이용하여 추가적으로 hPSCs의 선택적인 제거 단계가 적용되어야 할 것이다(도 7 참조).

- [152] 전체 과정이 다단계로 이루어지는 FACS 또는 실시간 PCR과 달리, 세포칩 기반의 i_{pc} 평가는 상대적으로 단시간 내에 이루어져 간편하고 명확한 선형성을 가지는 높은 재현 값을 얻을 수 있다. 한편, Lin28a의 실시간 PCR의 주기 임계값(cycle threshold (Ct) value)을 결정하는 것이 단일 hPSC의 분석에 매우 민감함의 장점을 가지지만(35), 본 발명의 도 4c에 따르면, Lin28a를 포함하는 hPSCs 특이적 마커의 실시간 PCR 분석은 세포칩 기반 분석 또는 FACS 보다 낮은 선형성을 나타냄을 알 수 있었다(도 4 참조). 따라서, 실시간 PCR 분석은 세포 혼합물에서 hPSCs의 수를 정확히 추정하기에는 사용이 적합하지 않다. 대신 hPSCs 특이적 형광 프로브(41) 및 hPSCs에서 분비되는 다당쇄

포도칼릭신(hyperglycosylated podocalyxin)(26)은 세포 혼합물에서의 hPSCs 검출에 적합함은 보고된 바 있다. 실제로, hPSCs의 특이적 i_{pc} 는 높은 선행성과 재현성을 나타내었으며(도 4 참조), hPSCs의 수를 측정하기 위한 전자 장치 타입을 개발하는데 적용될 수 있다. 나아가서 hPSCs에서 산화환원 상태를 최대화하는 세포칩의 구성을 최적화함으로써 i_{pc} 측정의 민감도를 향상시키는 후속 연구가 중요하게 요구 될 것이다(47). 현재의 i_{pc} 검출은 최저 30,000 개까지 가능하며(도 4b), 이들 세포 수는 설치류 모델에서 테라토마를 형성시키는 최소 hPSCs의 수에 가깝다(42).

[153] 결과적으로, 본 발명자들은 세포칩 기반 분석을 이용하여 세포 수에 따른 높은 선행성을 나타내는 hPSCs의 특이적 i_{pc} 를 증명하였다. 분화 또는 hPSCs의 제거를 위한 추가 과정 이후의 i_{pc} 측정은 향후 hPSCs 유래 테라토마-free 세포 이식을 위한 중요한 지표를 제공할 것이다.

[154]

[155] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[156]

[157] 참고문헌

[158] 1. Robinton, D.A. & Daley, G.Q. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481, 295-305 (2012).

[159] 2. Lerou, P.H. & Daley, G.Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev* 19, 321-331 (2005).

[160] 3. Araki, R. et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* 494, 100-104 (2013).

[161] 4. Lee, A.S., Tang, C., Rao, M.S., Weissman, I.L. & Wu, J.C. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nature Medicine* 19, 998-1004 (2013).

[162] 5. Blum, B. & Benvenisty, N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Advances in Cancer Research*, Vol 100 100, 133-+ (2008).

[163] 6. Cunningham, J.J., Ulbright, T.M., Pera, M.F. & Looijenga, L.H.J. Lessons from human teratomas to guide development of safe stem cell therapies. *Nature Biotechnology* 30, 849-857 (2012).

[164] 7. Ben-David, U. & Benvenisty, N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature Reviews Cancer* 11, 268-277 (2011).

[165] 8. Brederlau, A. et al. Transplantation of human embryonic stem 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).
- [166] 9. Arnhold, S., Klein, H., Semkova, I., Addicks, K. & Schraermeyer, U. Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45, 4251-4255 (2004).
- [167] 10. Moon, J. et al. Stem Cell Grafting Improves Both Motor and Cognitive Impairments in a Genetic Model of Parkinson's Disease, the Aphakia (ak) Mouse. *Cell Transplantation* 22, 1263-1279 (2013).
- [168] 11. Fujikawa, T. et al. Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *American Journal of Pathology* 166, 1781-1791 (2005).
- [169] 12. Bjorklund, L.M. et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2344-2349 (2002).
- [170] 13. Erdo, F. et al. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23, 780-785 (2003).
- [171] 14. Doi, D. et al. Prolonged Maturation Culture Favors a Reduction in the Tumorigenicity and the Dopaminergic Function of Human ESC-Derived Neural Cells in a Primate Model of Parkinson's Disease. *Stem cells* 30, 935-945 (2012).
- [172] 15. Ben-David, U. & Benvenisty, N. Chemical ablation of tumor-initiating human pluripotent stem cells. *Nature Protocols* 9, 729-740 (2014).
- [173] 16. Choo, A.B. et al. Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem cells* 26, 1454-1463 (2008).
- [174] 17. Tan, H.L., Fong, W.J., Lee, E.H., Yap, M. & Choo, A. mAb 84, a cytotoxic antibody that kills undifferentiated human embryonic stem cells via oncosis. *Stem Cells* 27, 1792-1801 (2009).
- [175] 18. Ben-David, U., Nudel, N. & Benvenisty, N. Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nature Communications* 4 (2013).
- [176] 19. Lee, M.O. et al. Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E3281-E3290 (2013).
- [177] 20. Schuldiner, M., Itskovitz-Eldor, J. & Benvenisty, N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. *Stem Cells* 21, 257-265 (2003).

- [178] 21. Rong, Z.L., Fu, X.M., Wang, M.Y. & Xu, Y. A Scalable Approach to Prevent Teratoma Formation of Human Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry* 287, 32338-32345 (2012).
- [179] 22. Cunningham, J.J., Ulbright, T.M., Pera, M.F. & Looijenga, L.H. Lessons from human teratomas to guide development of safe stem cell therapies. *Nat Biotechnol* 30, 849-857 (2012).
- [180] 23. Ben-David, U. & Benvenisty, N. Chemical ablation of tumor-initiating human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 9, 729-740 (2014).
- [181] 24. Goldring, C.E. et al. Assessing the safety of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell* 8, 618-628 (2011).
- [182] 25. Kuo, T.F. et al. Selective elimination of human pluripotent stem cells by a marine natural product derivative. *Journal of the American Chemical Society* 136, 9798-9801 (2014).
- [183] 26. Tateno, H. et al. A medium hyperglycosylated podocalyxin enables noninvasive and quantitative detection of tumorigenic human pluripotent stem cells. *Scientific reports* 4, 4069 (2014).
- [184] 27. Kim, T.H., Ko, E.B., Kim, S.J. & Choi, J.W. Nanoscale film fabrication of various peptides on neural stem cell chip. *Journal of biomedical nanotechnology* 9, 307-311 (2013).
- [185] 28. El-Said, W.A., Kim, T.H., Chung, Y.H. & Choi, J.W. Fabrication of new single cell chip to monitor intracellular and extracellular redox state based on spectroelectrochemical method. *Biomaterials* 40, 80-87 (2015).
- [186] 29. Rao, B.M. & Zandstra, P.W. Culture development for human embryonic stem cell propagation: molecular aspects and challenges. *Current opinion in biotechnology* 16, 568-576 (2005).
- [187] 30. Ludwig, T.E. et al. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nature methods* 3, 637-646 (2006).
- [188] 31. Thomson, J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147 (1998).
- [189] 32. Lee, T.H. et al. Functional recapitulation of smooth muscle cells via induced pluripotent stem cells from human aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 106, 120-128 (2010).
- [190] 33. Lee, M.O. et al. Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013).
- [191] 34. Tang, C. et al. An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nature Biotechnology* 29, 829-U886 (2011).
- [192] 35. Kuroda, T. et al. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual

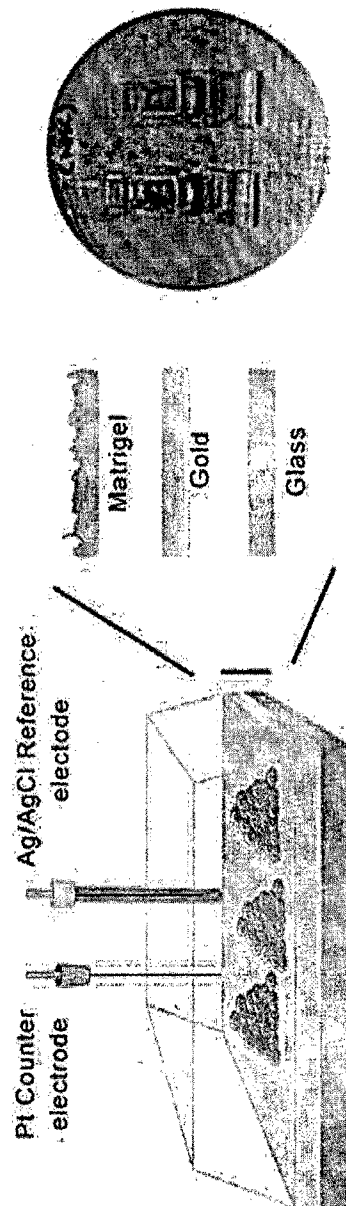
- undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One* 7, e37342 (2012).
- [193] 36. Schwartz, S.D. et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *The Lancet* (2014).
- [194] 37. Wang, L., Dai, W. & Lu, L. Osmotic stress-induced phosphorylation of H2AX by polo-like kinase 3 affects cell cycle progression in human corneal epithelial cells. *J Biol Chem* 289, 29827-29835 (2014).
- [195] 38. Li, Z., Yang, J. & Huang, H. Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *FEBS Lett* 580, 6161-6168 (2006).
- [196] 39. Cha, H. et al. Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. *Cancer Res* 70, 4112-4122 (2010).
- [197] 40. Choi, H.S. et al. Development of a decoy immunization strategy to identify cell-surface molecules expressed on undifferentiated human embryonic stem cells. *Cell Tissue Res* 333, 197-206 (2008).
- [198] 41. Hirata, N. et al. A chemical probe that labels human pluripotent stem cells. *Cell reports* 6, 1165-1174 (2014).
- [199] 42. Lee, A.S. et al. Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells. *Cell Cycle* 8, 2608-2612 (2009).
- [200] 43. Nandakumar, V. et al. A Low-Cost Electrochemical Biosensor for Rapid Bacterial Detection. *Ieee Sens J* 11, 210-216 (2011).
- [201] 44. Liu, J.Y. et al. Highly sensitive and selective detection of cancer cell with a label-free electrochemical cytosensor. *Biosens Bioelectron* 41, 436-441 (2013).
- [202] 45. El-Said, W.A., Yea, C.H., Kim, H., Oh, B.K. & Choi, J.W. Cell-based chip for the detection of anticancer effect on HeLa cells using cyclic voltammetry. *Biosens Bioelectron* 24, 1259-1265 (2009).
- [203] 46. Toma, H.E., Araki, K. & Dovidaukas, S. A cyclic voltammetry experiment illustrating redox potentials, equilibrium constants and substitution reactions in coordination chemistry. *Journal of Chemical Education* 77, 1351-1353 (2000).
- [204] 47. Chen, J. et al. Classification of cell types using a microfluidic device for mechanical and electrical measurement on single cells. *Lab on a chip* 11, 3174-3181 (2011).

청구범위

- [청구항 1] 다음 단계를 포함하는 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 검출방법:
 (a) 줄기세포에 전기적 펄스(electric pulse)를 인가하는 단계; 및
 (b) 줄기세포의 전기화학적 포텐셜(cathodic peak potential, E_{pc})을 측정하는 단계;
 상기 단계 (b)에서 $-0.155 \text{ V} < E_{pc} < 0.000 \text{ V}$ 인 전기화학적 신호가 검출되는 경우, 미분화 만능성 줄기세포가 존재하는 것으로 판단한다.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 E_{pc} 는 $-0.110 \text{ V} < E_{pc} < -0.050 \text{ V}$ 인 것을 특징으로 하는 검출방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 E_{pc} 의 전기화학적 신호강도(cathodic peak current, i_{pc})는 미분화 만능성 줄기세포의 수에 비례하여 증가하는 것을 특징으로 하는 검출방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 만능성 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 배아생식세포, 배아중양세포 또는 성체줄기세포인 것을 특징으로 하는 검출방법.
- [청구항 5] 다음 단계를 포함하는 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 정량분석방법:
 (a) 줄기세포에 전기적 펄스(electric pulse)를 인가하는 단계;
 (b) 상기 줄기세포의 전기화학적 포텐셜(cathodic peak potential, E_{pc})로서 $-0.155 \text{ V} < E_{pc} < 0.000 \text{ V}$ 의 신호를 측정하는 단계; 및
 (c) 상기 E_{pc} 의 전기화학적 신호강도(cathodic peak current, i_{pc})에 따른 미분화 세포의 수를 정량하는 단계.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 E_{pc} 는 $-0.110 \text{ V} < E_{pc} < -0.050 \text{ V}$ 인 것을 특징으로 하는 정량분석방법.
- [청구항 7] 제 5 항에 있어서, 상기 E_{pc} 의 전기화학적 신호강도(cathodic peak current, i_{pc})는 미분화 만능성 줄기세포의 수에 비례하여 증가하는 것을 특징으로 하는 정량분석방법.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서, 상기 만능성 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 배아생식세포, 배아중양세포 또는 성체줄기세포인 것을 특징으로 하는 정량분석방법.
- [청구항 9] (a) 줄기세포가 흡착 가능한 기판(substrate) 및 (b) 줄기세포를 수용 가능한 챔버(chamber)를 포함하는 미분화 만능성 줄기세포(undifferentiated pluripotent stem cells)의 검출을 위한 세포칩(cell-chip)으로서, 상기 줄기세포에 전기적 펄스(electric pulse)를 인가한 후 줄기세포의 전기화학적 포텐셜(cathodic peak potential, E_{pc})을 측정하였을 때, $-0.155 \text{ V} < E_{pc} < 0.000 \text{ V}$ 인 전기화학적 신호(i_{pc})가 검출되는 경우 미분화 만능성

- 줄기세포가 존재하는 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 세포칩.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서, 상기 E_{pc} 는 $-0.110\text{ V} < E_{pc} < -0.050\text{ V}$ 인 것을 특징으로 하는 세포칩.
- [청구항 11] 제 9 항에 있어서, 상기 세포칩은 작업전극(working electrode), 상대전극(counter electrode) 및 표준전극(reference electrode)을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포칩.
- [청구항 12] 제 9 항에 있어서, 상기 전기화학적 포텐셜(E_{pc})은 mTeSR1 배지 존재 하의 줄기세포에서 측정되는 것을 특징으로 하는 세포칩.

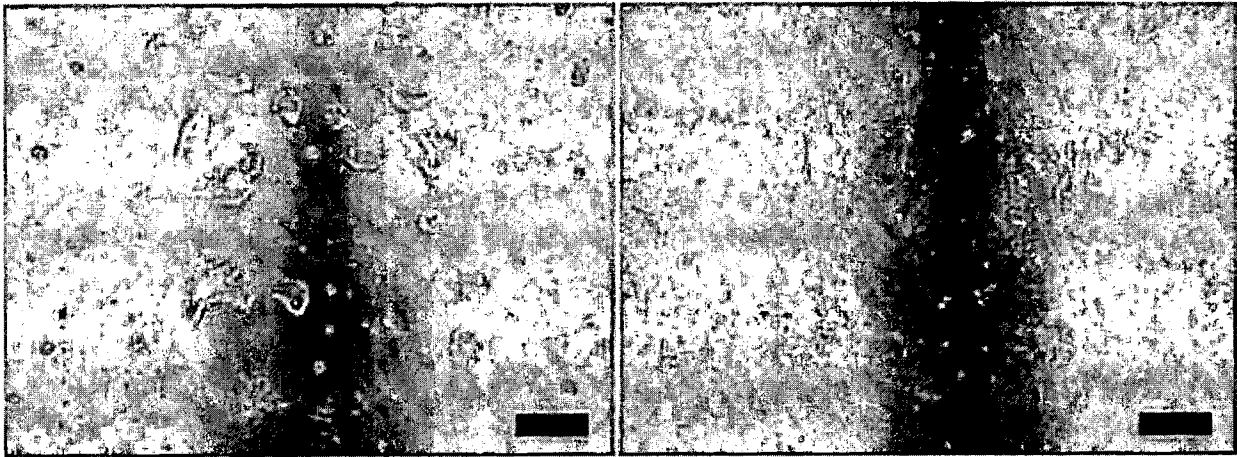
도 1a



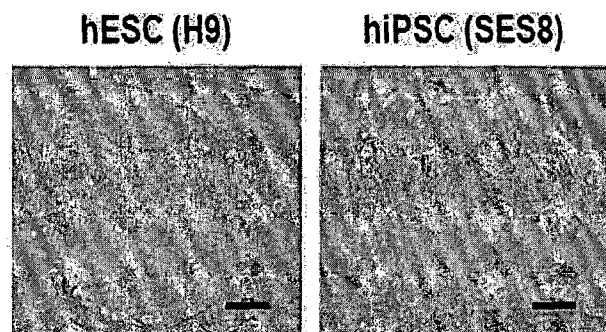
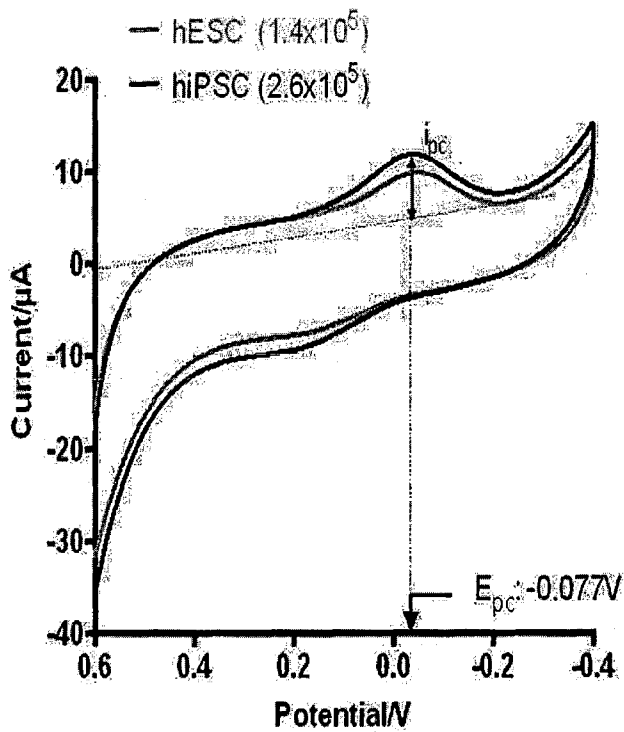
도 1b

Day 1

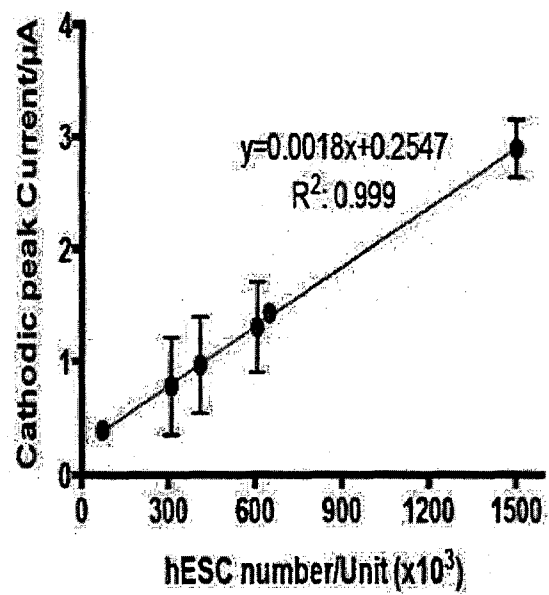
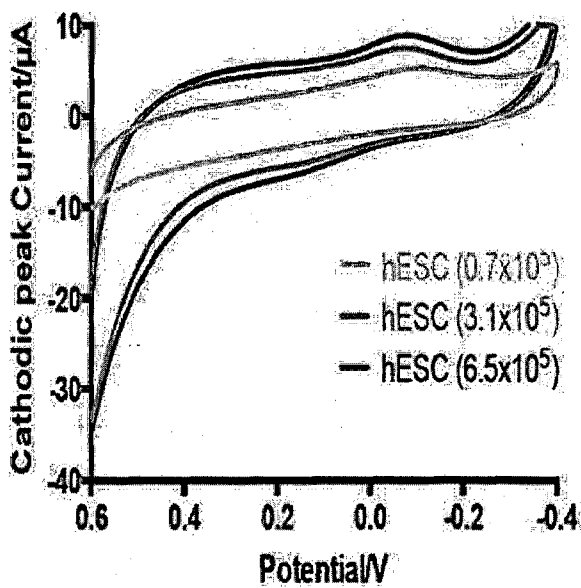
Day 4



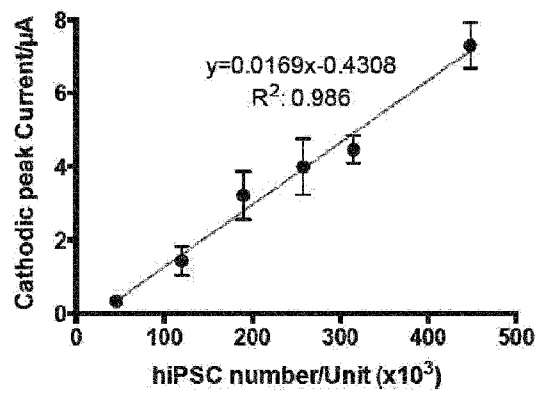
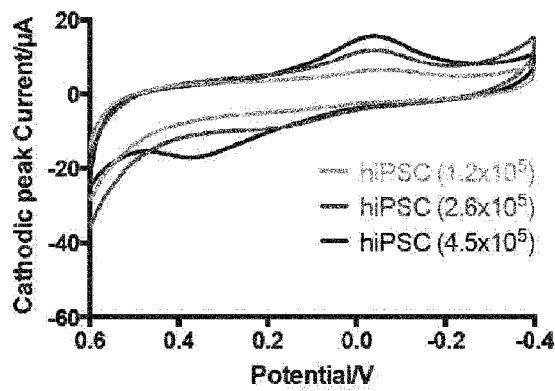
2a



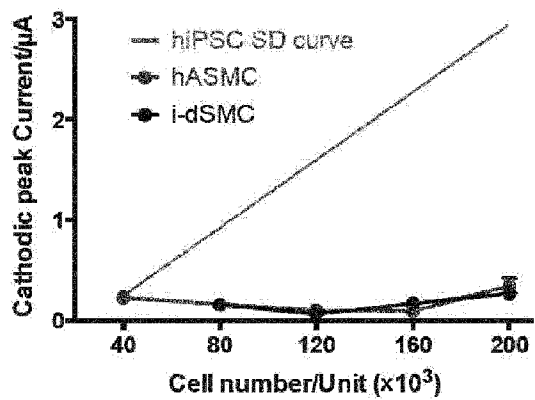
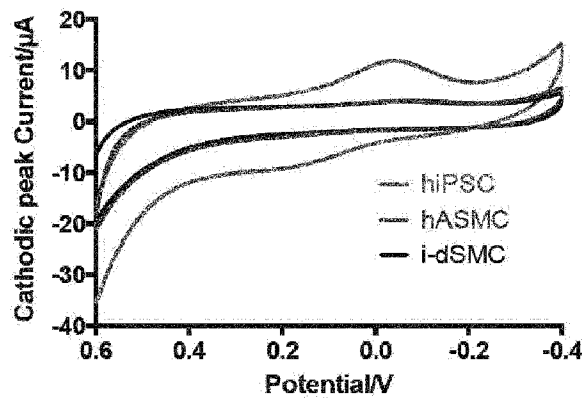
2b



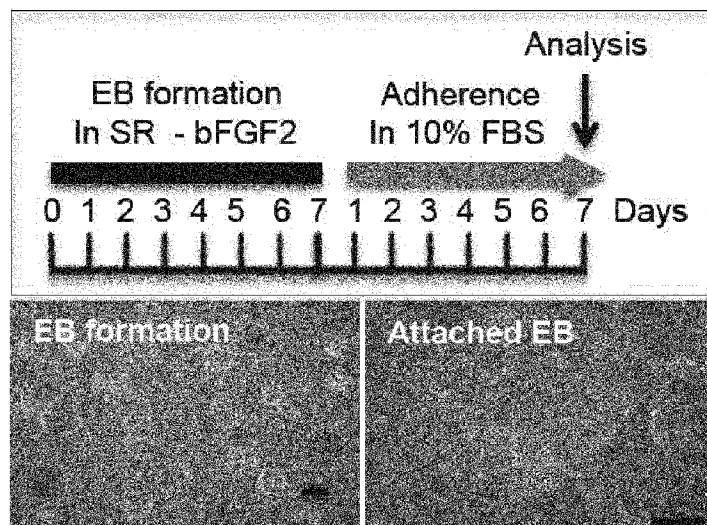
[도2c]



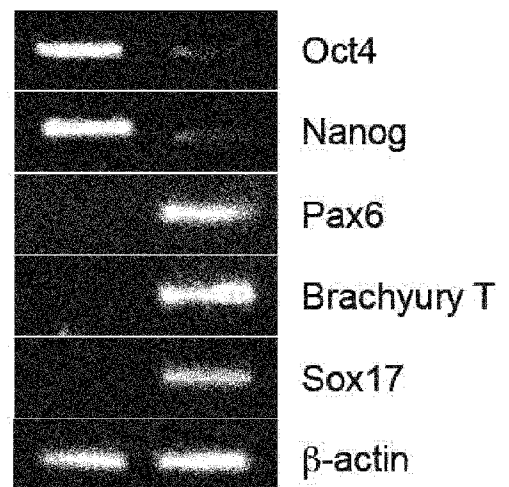
[도3a]



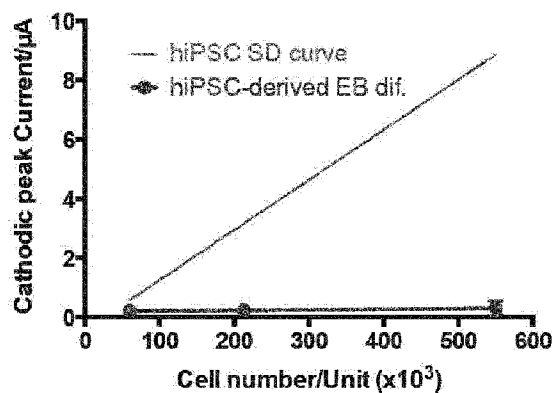
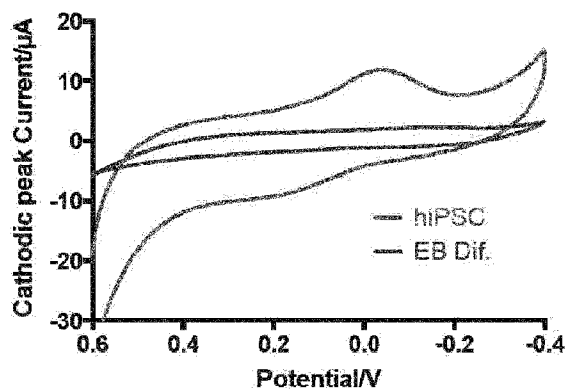
[도3b]



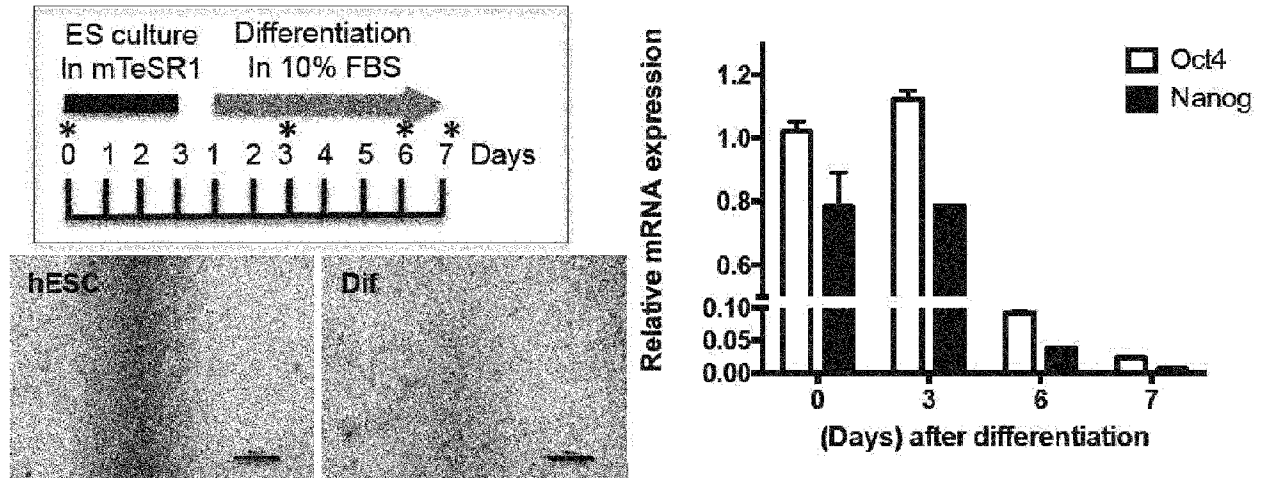
hiPSC EB Dif.



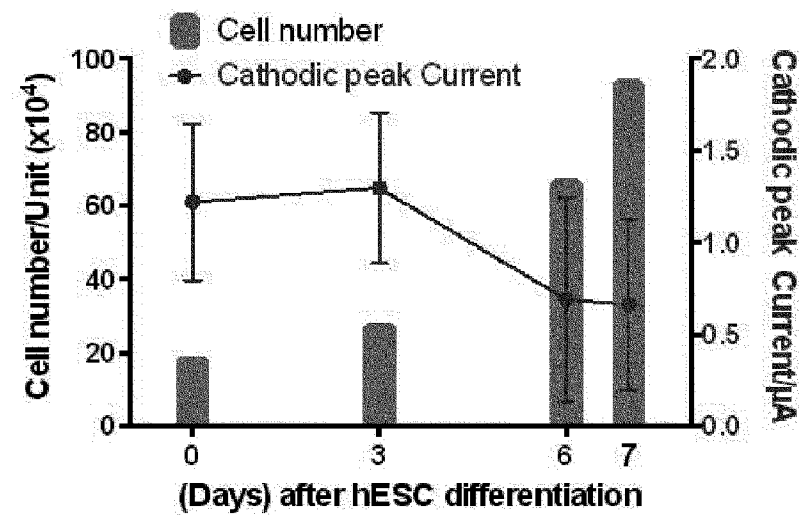
[도3c]



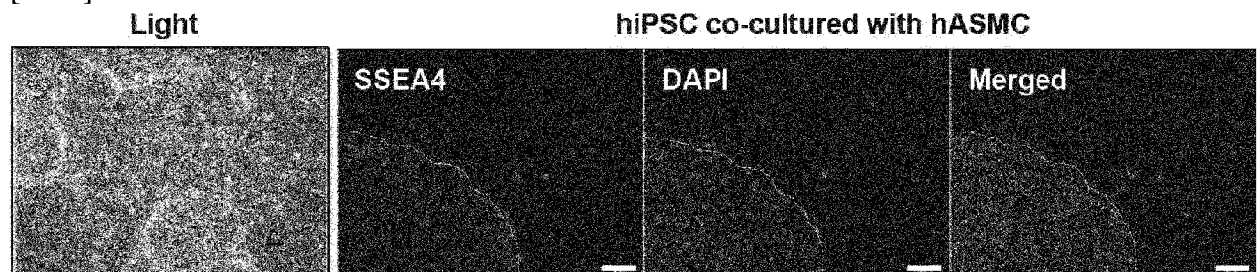
[도3d]



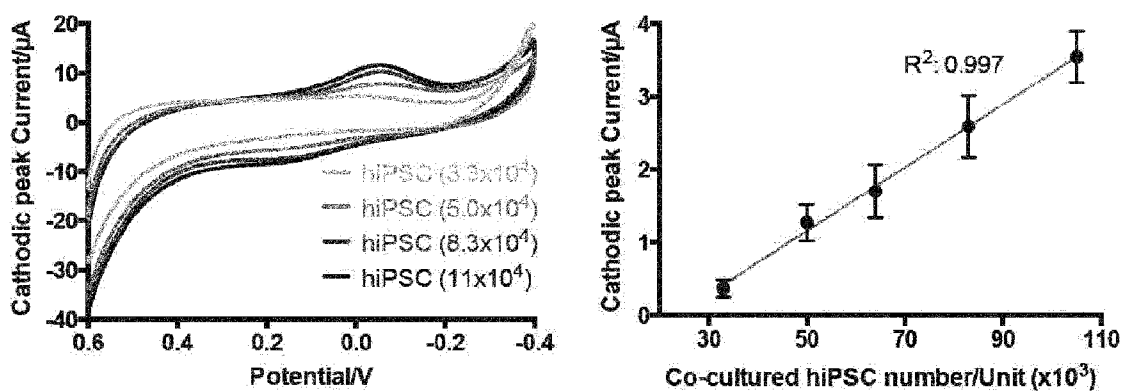
[도3e]



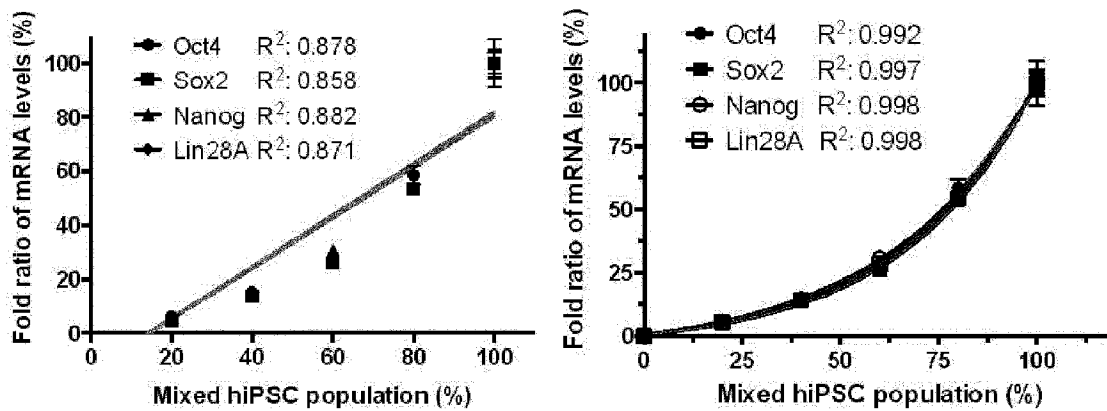
[도4a]



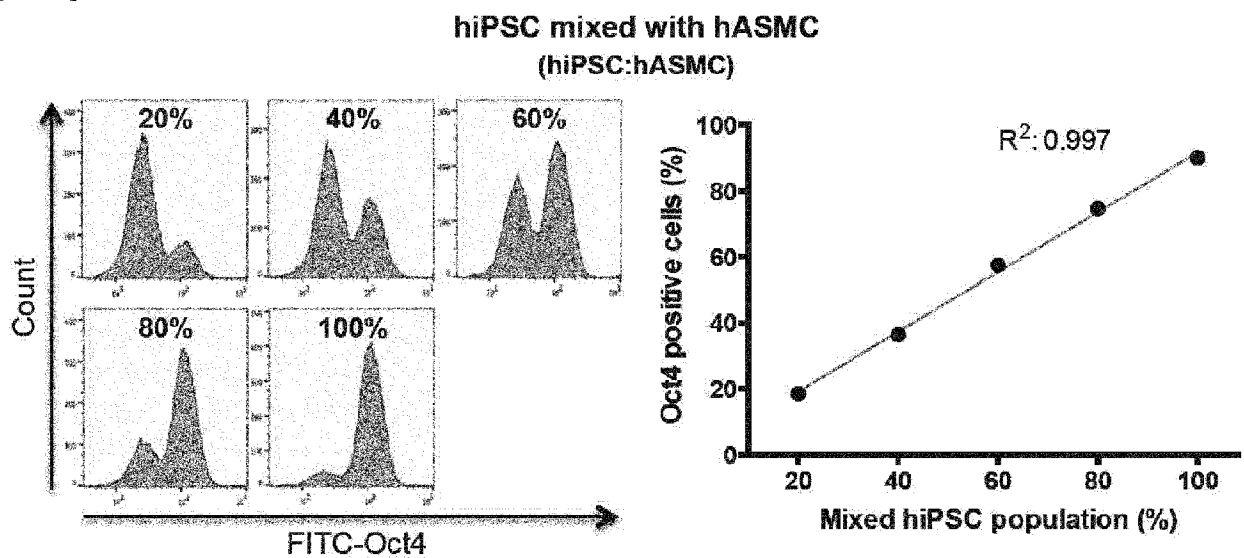
[도4b]



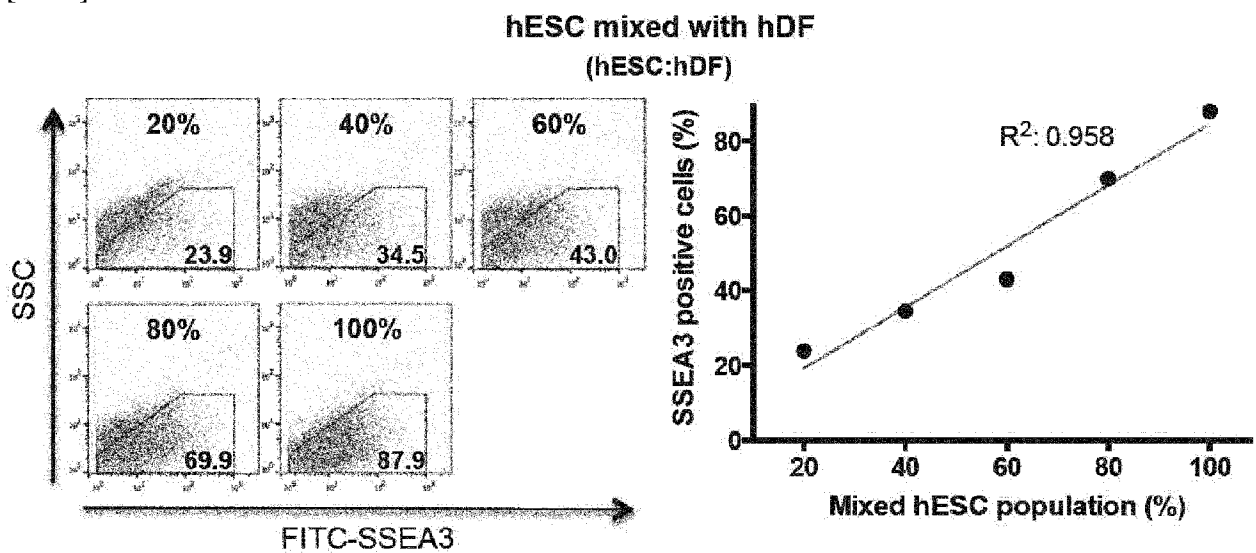
[도4c]



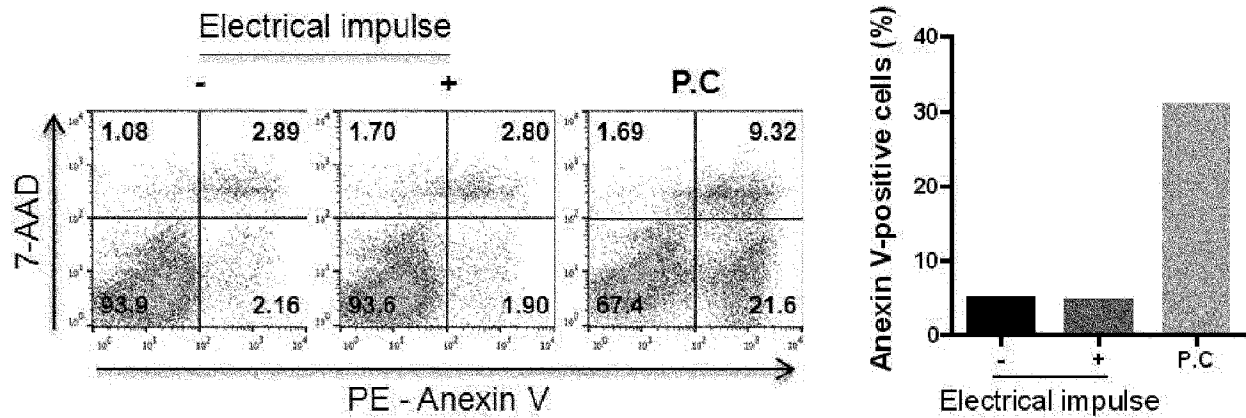
[도4d]



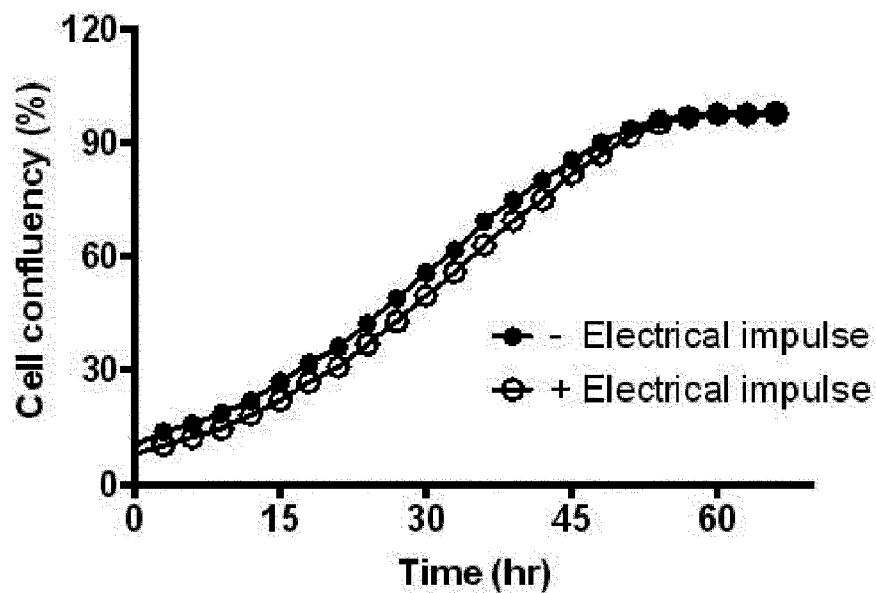
[도4e]



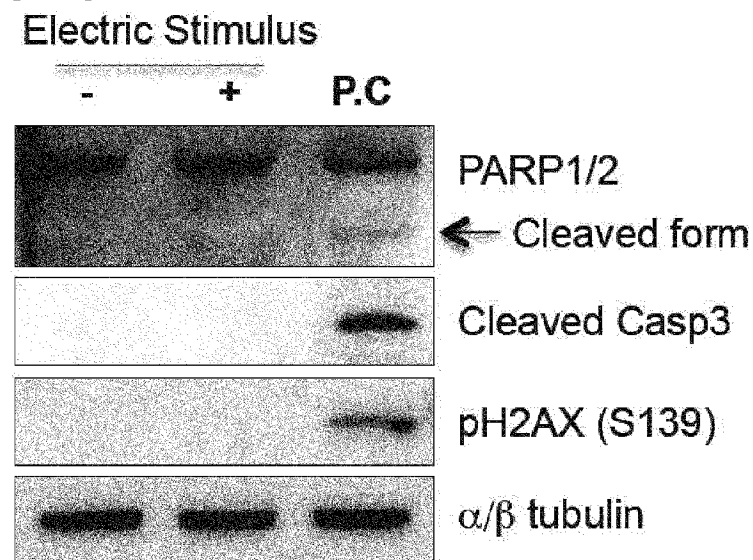
[도5a]



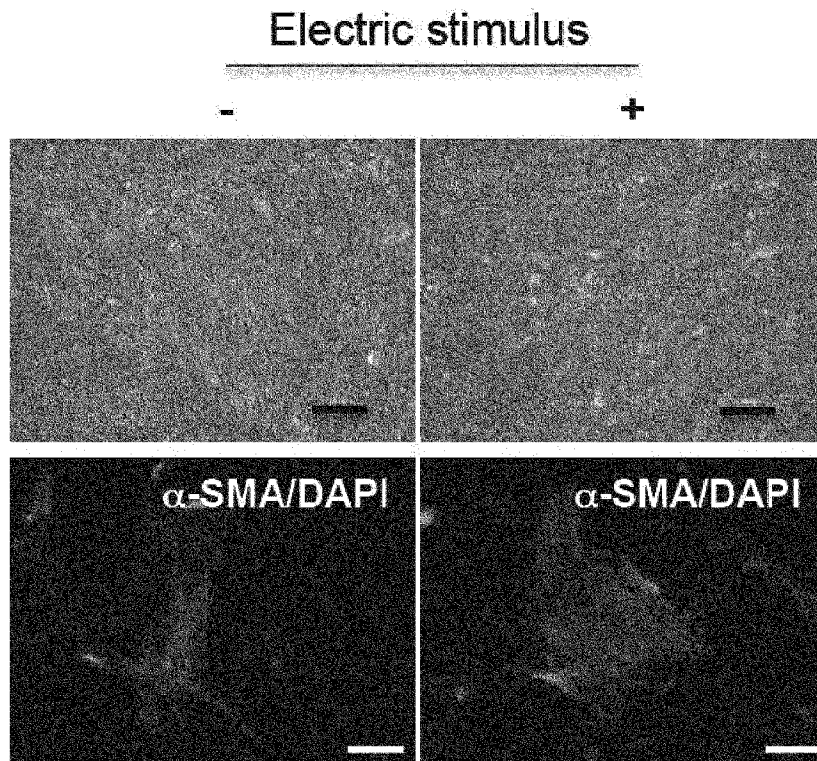
[도5b]



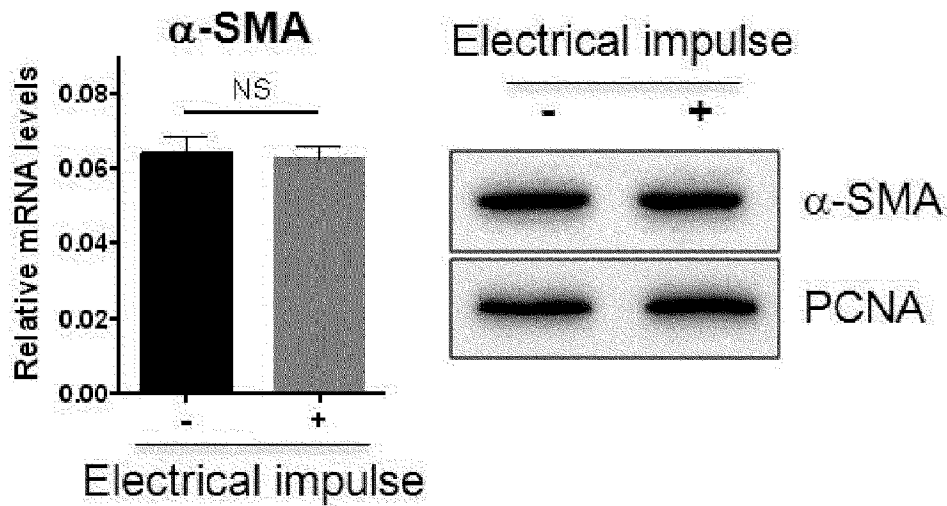
[도5c]



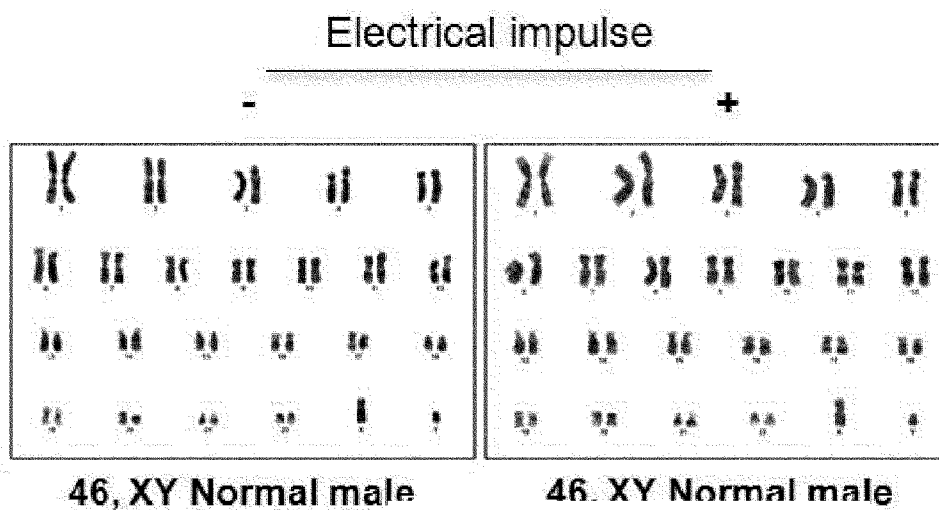
[도5d]



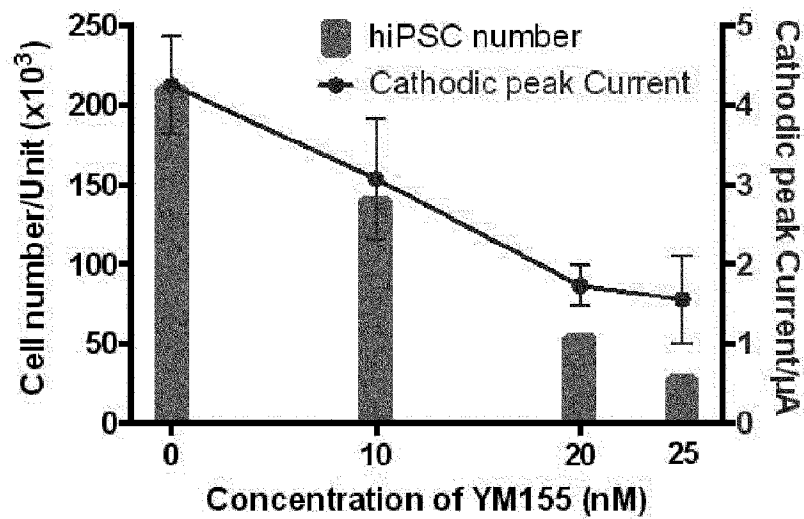
[도5e]



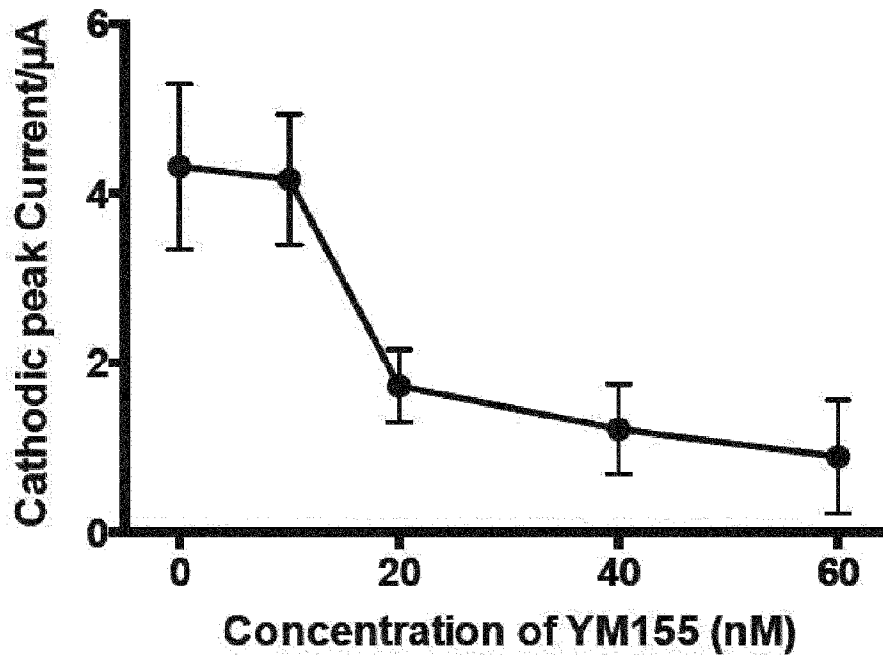
[도5f]



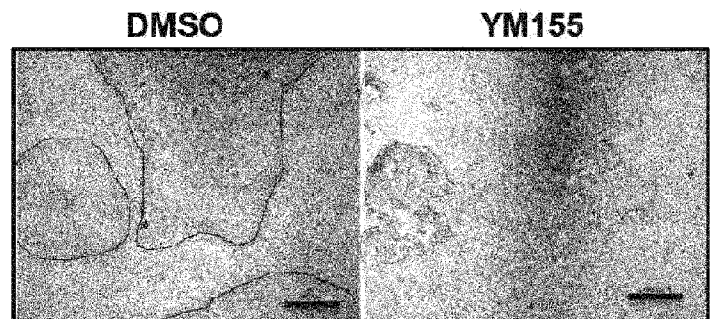
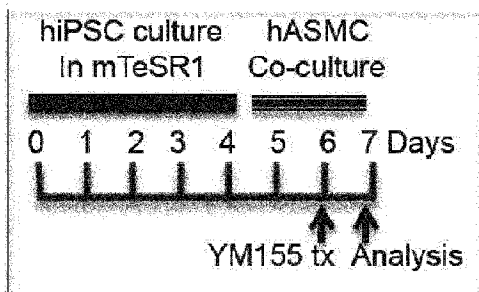
[도6a]



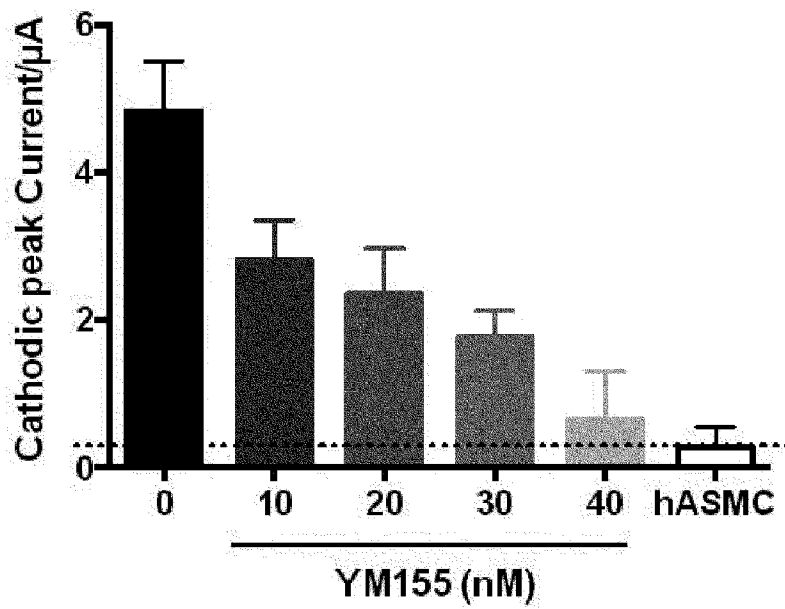
[도6b]



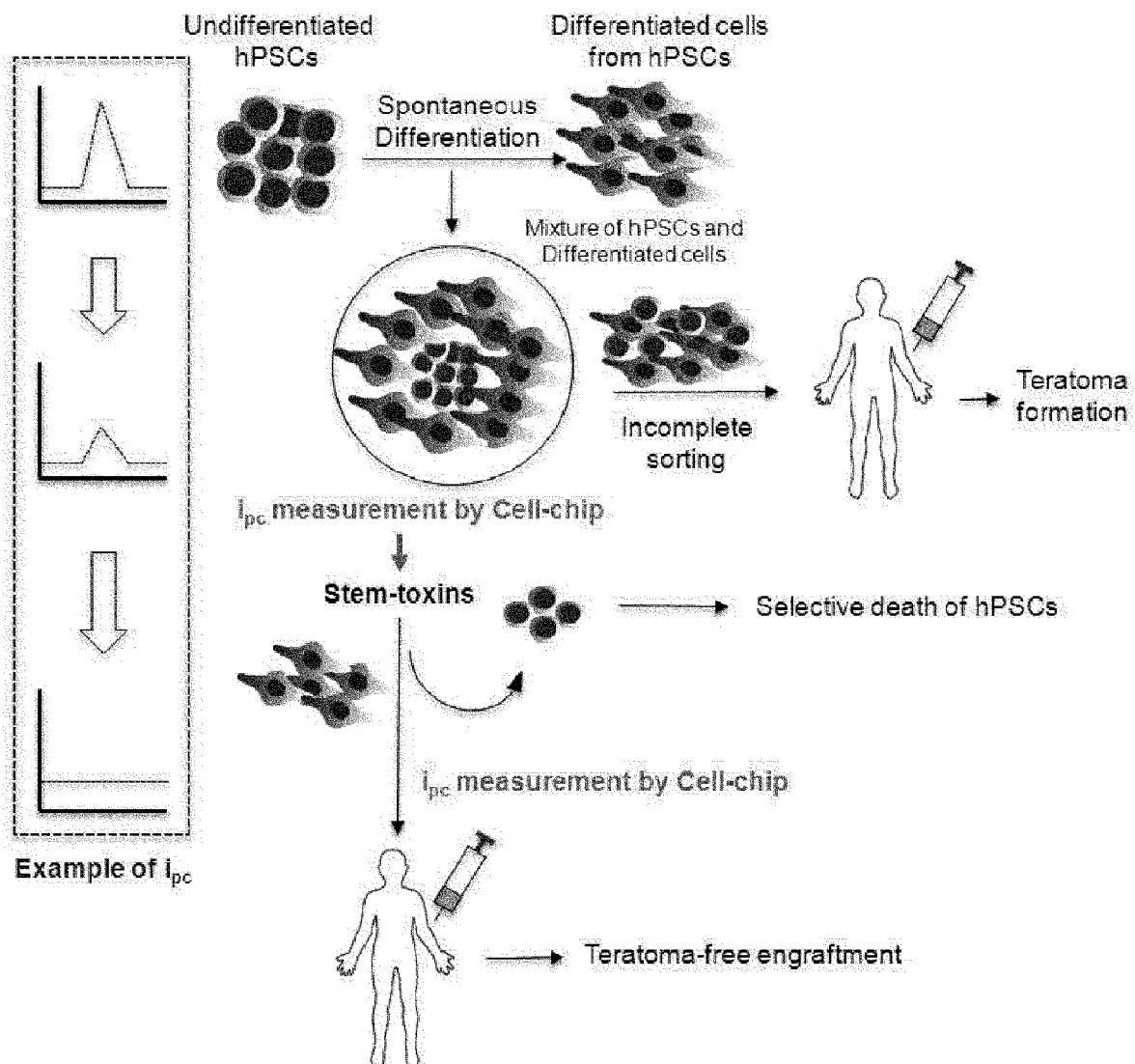
[도6c]



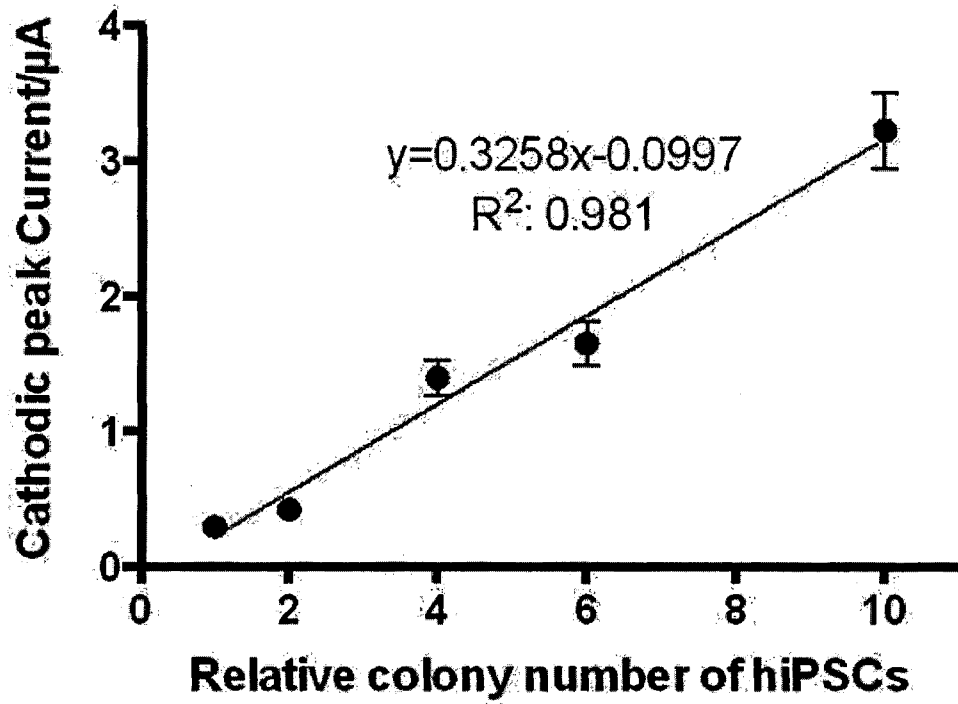
[도6d]



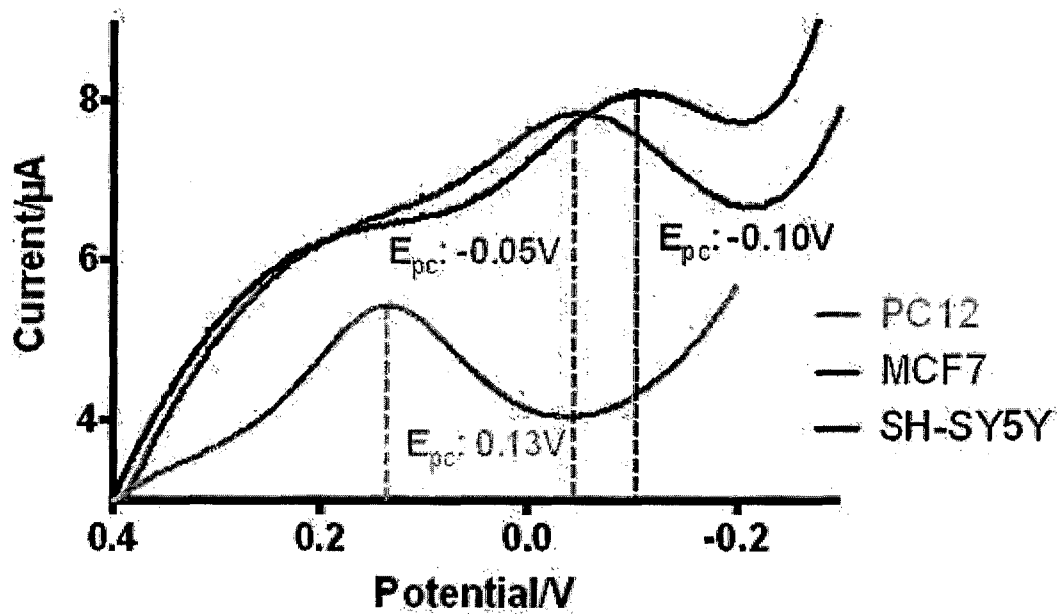
[도7]



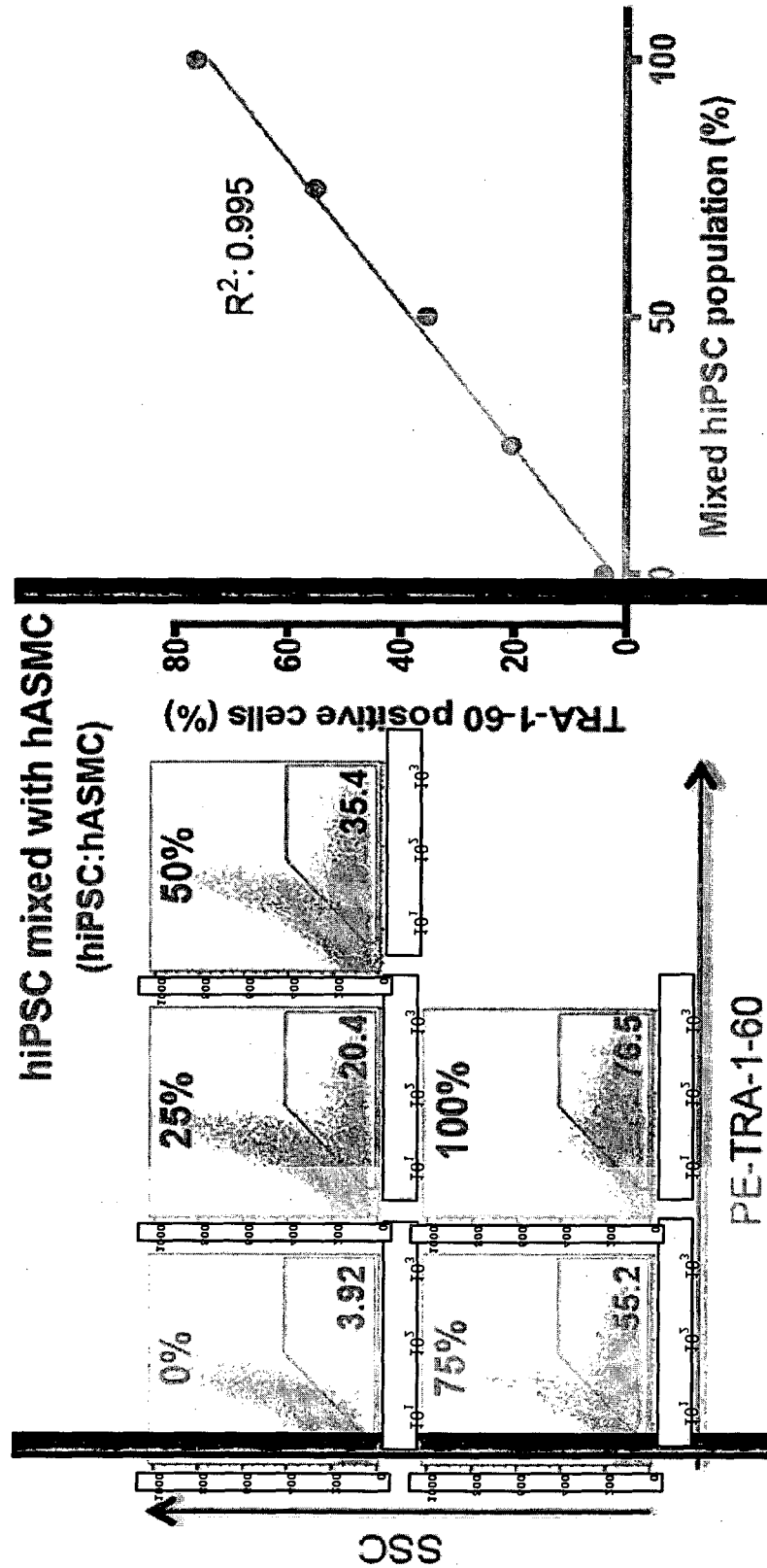
도 8a



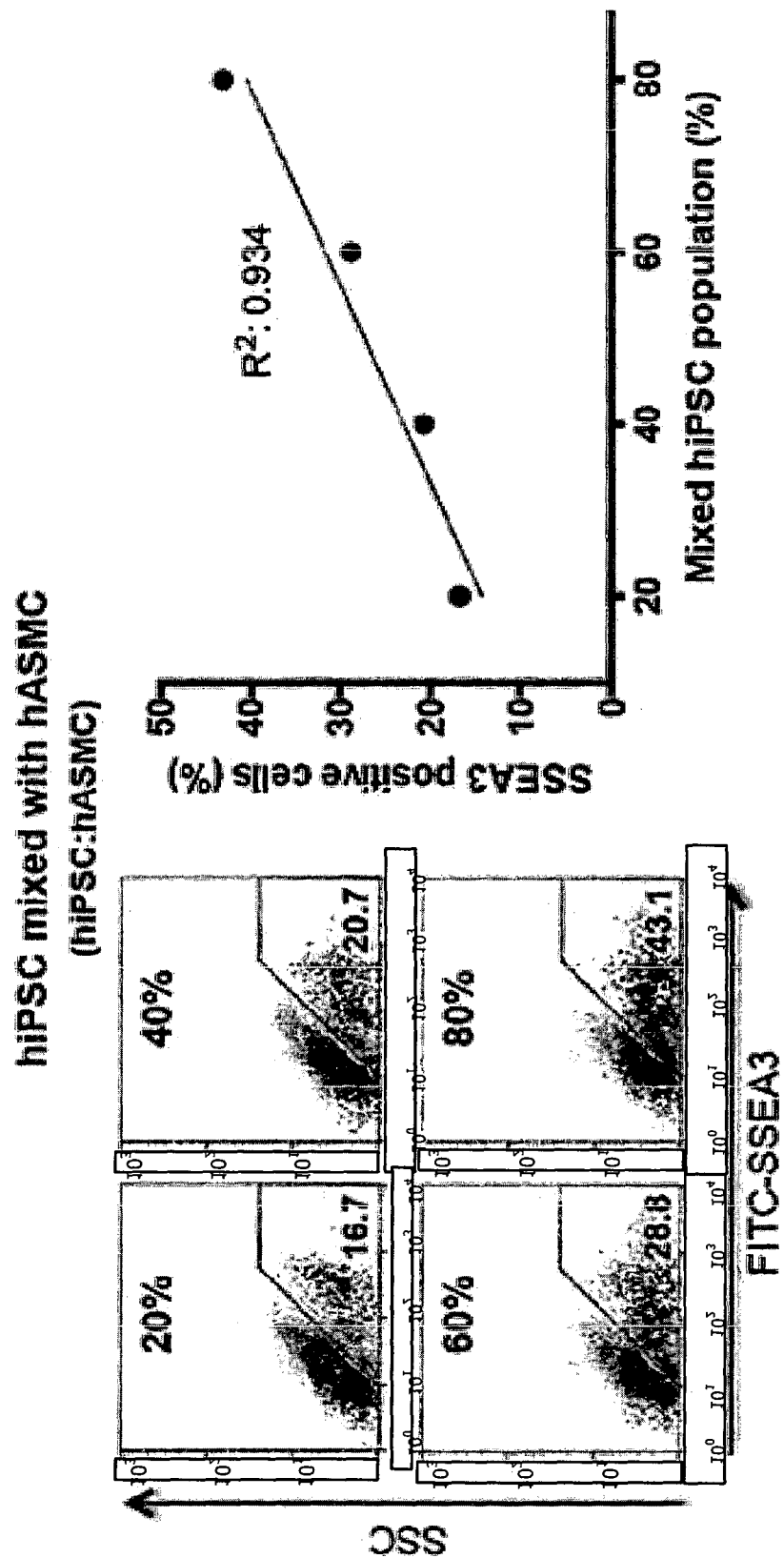
도 8b



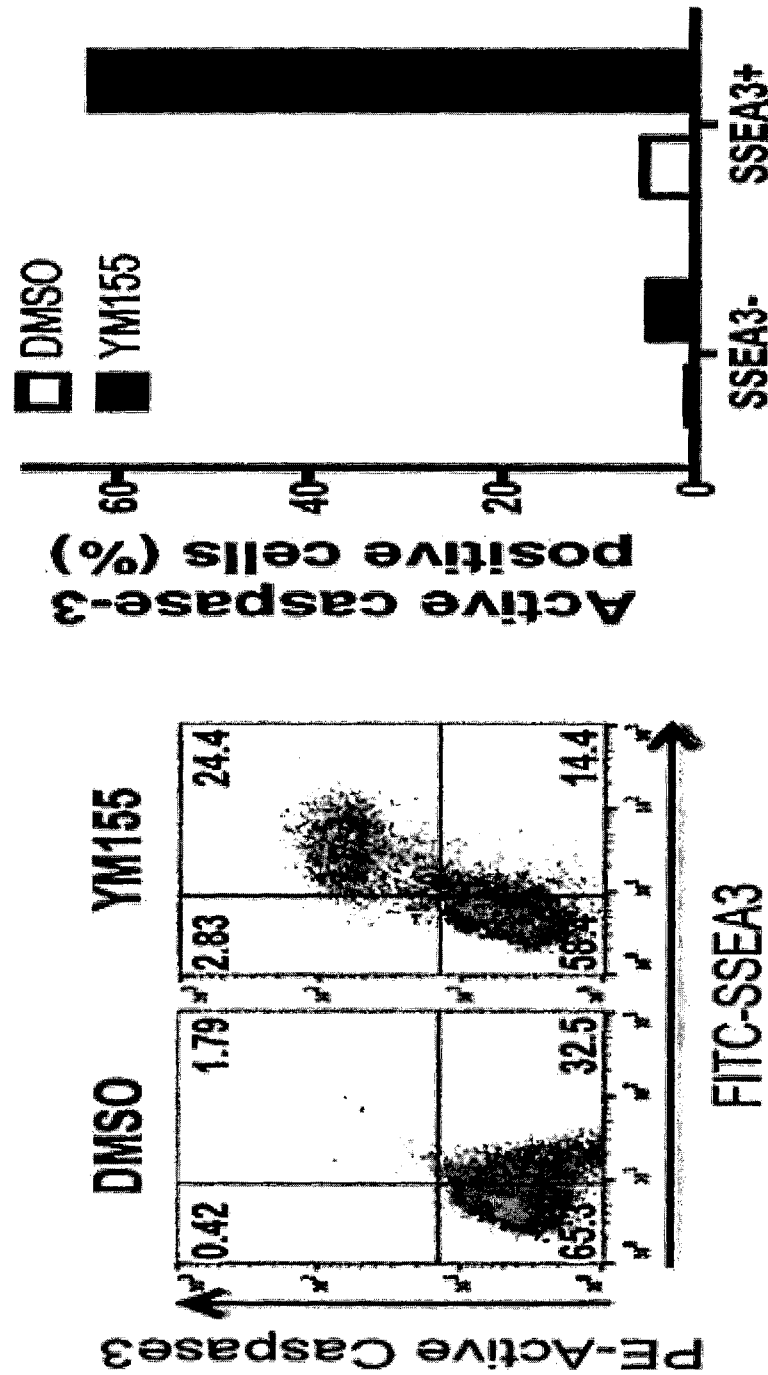
도 9a



도 9b



도 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/007541**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 27/26(2006.01)i, G01N 27/416(2006.01)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)

G01N 27/26; C12Q 1/04; G01N 37/00; G01N 33/573; G01N 33/53; C12Q 1/68; G01N 21/65; C12M 1/34; G01N 27/416; 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: undifferentiated, pluripotent stem cells, cell-chip, fixed quantity, potential

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NEEDHAM, Karina et al., "Electrophysiological Properties of Neurosensory Progenitors derived from Human Embryonic Stem Cells", 07 November 2013, vol. 12, no. 1, pages 241-249 (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187050611300161X) See pages 241-244 and figure 3C.	1-12
A	JP 2014-039535 A (UNIV. OF ELECTRO-COMMUNICATIONS) 06 March 2014 See abstract and claims 1-4.	1-12
A	JP 2013-238463 A (HYOGO PREFECTURE) 28 November 2013 See abstract, claims 1-3 and figure 8.	1-12
A	US 2012-0301889 A1 (IVERSON et al.) 29 November 2012 See paragraphs [0013]-[0021] and claims 10-14.	1-12
A	WO 2013-063406 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 02 May 2013 See abstract and claims 1-3.	1-12



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

11 NOVEMBER 2015 (11.11.2015)

Date of mailing of the international search report

11 NOVEMBER 2015 (11.11.2015)

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

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/007541

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2014-039535 A	06/03/2014	NONE	
JP 2013-238463 A	28/11/2013	NONE	
US 2012-0301889 A1	29/11/2012	NONE	
WO 2013-063406 A1	02/05/2013	US 2014-0273207 A1	18/09/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 27/26(2006.01)i, G01N 27/416(2006.01)i, C12N 5/074(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 27/26; C12Q 1/04; G01N 37/00; G01N 33/573; G01N 33/53; C12Q 1/68; G01N 21/65; C12M 1/34; G01N 27/416; 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: 미분화, 만능줄기세포, 세포칩, 정량, 포텐셜

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KARINA NEEDHAM et al., `Electrophysiological properties of neurosensory progenitors derived from human embryonic stem cells`, 07 November 2013, 제12권, 제1호, 페이지 241-249 (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187050611300161X) 페이지 241-244 및 도면 3C 참조.	1-12
A	JP 2014-039535 A (UNIV. OF ELECTRO-COMMUNICATIONS) 2014.03.06 요약 및 청구항 1-4 참조.	1-12
A	JP 2013-238463 A (HYOGO PREFECTURE) 2013.11.28 요약, 청구항 1-3 및 도면 8 참조.	1-12
A	US 2012-0301889 A1 (IVERSON et al.) 2012.11.29 단락 [0013]-[0021] 및 청구항 10-14 참조.	1-12
A	WO 2013-063406 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2013.05.02 요약 및 청구항 1-3 참조.	1-12

☐ 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 11월 11일 (11.11.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 11월 11일 (11.11.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

강성철

전화번호 +82-42-481-8405



국제출원번호
PCT/KR2015/007541

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2014-039535 A	2014/03/06	없음	
JP 2013-238463 A	2013/11/28	없음	
US 2012-0301889 A1	2012/11/29	없음	
WO 2013-063406 A1	2013/05/02	US 2014-0273207 A1	2014/09/18