

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 8월 3일 (03.08.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/131353 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/077 (2010.01) A61K 35/32 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/000031
- (22) 국제출원일: 2017년 1월 2일 (02.01.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0011238 2016년 1월 29일 (29.01.2016) KR
- (71) 출원인: **울지대학교 산학협력단 (EULJI UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 13135 경기도 성남시 수정구 산성대로 553, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: **권혁준 (KWON, Hyuck Joon)**; 03984 서울시 마포구 동교로 39길 11, 1407호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: **한윤호 (HAN, Yun Ho)**; 06651 서울시 서초구 사임당로 28 나이스빌딩 2층 울민국제특허법률사무소, 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, 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.

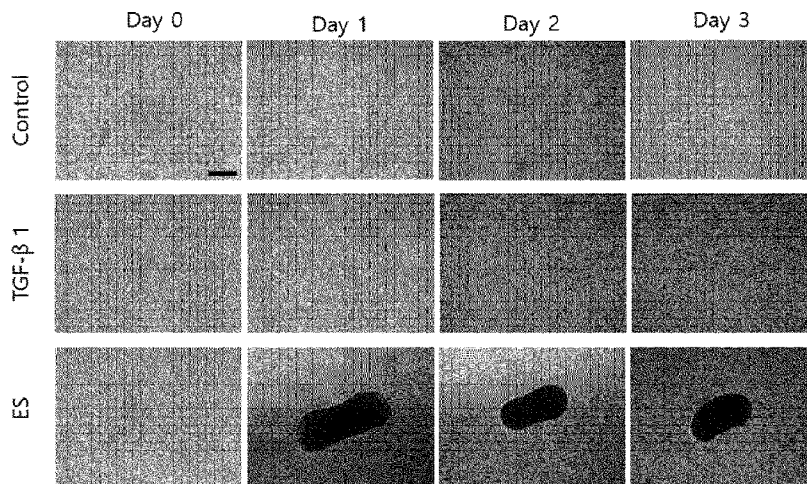
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

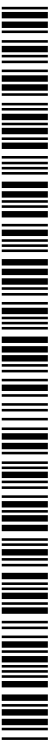
(54) Title: METHOD FOR INDUCING TRANSDIFFERENTIATION OF FIBROBLASTS INTO CHONDROCYTES

(54) 발명의 명칭 : 섬유아세포의 연골세포로의 교차분화 유도방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for inducing transdifferentiation of cells, and provides a method for trans-differentiation of skin-derived fibroblasts into chondrocytes, comprising: a fibroblast microcluster formation step of culturing fibroblasts in a high density so as to form microclusters of fibroblasts; and an electrical stimulation step of applying a current or a magnetic field to the microclusters of fibroblasts while culturing the same in a culture liquid not containing growth factors.

(57) 요약서: 본 발명은 세포의 교차분화 유도방법에 관한 것으로서, 섬유아세포를 고밀도 배양하여 섬유아세포 미세군집을 형성시키는 섬유아세포 미세군집 형성단계; 및 상기 섬유아세포 미세군집을 성장인자가 포함되지 않은 배양액에서 배양하면서 전류 또는 전기장을 가하는 전기자극 단계를 포함하는 피부 유래 섬유아세포의 연골세포로의 교차분화방법을 제공한다.



WO 2017/131353 A1

명세서

발명의 명칭: 섬유아세포의 연골세포로의 교차분화 유도방법 기술분야

- [1] 본 발명은 세포의 교차분화 유도방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 섬유아세포의 연골세포로의 교차분화 유도방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 연골조직은 인체 중에서도 아주 독특한 조직으로써 혈관이 없고, 신경 또한 없으며 또한 재생이 잘 일어나지 않는다. 연골분화에 중요하다고 알려진 전사인자인 SOX5, SOX6, SOX9 3종의 단백질의 과발현을 유도하는 유전자를 피부세포에 도입하여 연골세포로 직접 교차분화시키는 데 성공하였으나 세포의 섬유아세포(fibroblast)로서의 성질이 완전히 제거되지 않아 유리연골이 아닌 섬유연골인 것으로 보인다(Ikeda, T., *et al.*, *Arthritis Rheum.* 50: 3561-3573, 2004). 4종의 전사인자를 분화된 세포에 도입하여 인공적으로 줄기세포로 만드는 역분화기술이 개발되면서 역분화를 통해 만든 줄기세포인 iPSC를 이용한 조직재생연구가 활발히 진행되고 있으나, iPSC를 이용한 조직재생은 역분화과정과 원하는 세포로 분화시키는 과정, 이렇게 두 단계를 거쳐야 하는 복잡성과 iPSC를 분화시킬 때 분화되지 않은 세포가 암을 유발할 수 있는 위험성 등의 단점이 있다. 상기 iPSC를 이용한 조직재생의 단점을 극복하고자 최근에는 이미 분화된 세포를 원하는 세포로 분화시키는 교차분화 기술개발의 중요성이 대두되고 있다. 특히, 피부세포는 환자의 몸에서 손쉽게 채취가 가능하고 증식시키기가 매우 쉽기 때문에 피부세포를 통한 교차분화로 조직을 재생하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 인공유도 줄기세포로 유도하는 전사인자 두 종(c-Myc, Klf4)과 연골분화를 유도하는 전사인자 Sox9 단백질의 과발현을 유도하는 유전자를 마우스의 피부세포에 도입하여 유리연골로 직접 교차분화시키는데 성공하였다는 보고가 있다(Hiramatsu, K. *et al.*, *Journal of Clinical Investigation*, 121: 640-657, 2011). 또한, 인공유도 줄기세포로 유도하는 전사인자 두 종(c-Myc 및 Klf4)와 연골분화를 유도하는 전사인자 Sox9의 과발현을 유도하는 유전자를 인간의 피부세포에도 도입할 경우 유리연골로 직접 교차분화가 가능하다는 보고가 있다(Outani, H. *et al.*, *PLoS ONE*, 8:e77365, 2013).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [3] 그러나 상술한 유전자 도입에 의한 교차분화 유도는 유전자도입의 효율이 낮고 유전자가 세포내 염색체에 끼어들어가면서 다른 유전자를 파괴시켜 암의 발생과 같은 부작용을 야기할 수 있는 문제점이 있다. 상기 유전자 도입법 외에는 섬유아세포를 연골세포로 교차분화시키는 효율적인 방법은 개발되지

않고 있다.

- [4] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 보다 효율적인 섬유아세포의 연골세포로의 교차분화 유도방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

- [5] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 섬유아세포를 고밀도 배양하여 섬유아세포 미세군집을 형성시키는 섬유아세포 미세군집 형성단계; 및 상기 섬유아세포 미세군집을 성장인자가 포함되지 않은 배양액에서 배양하면서 전기자극을 가하는 전기자극 단계;를 포함하는 피부 유래 섬유아세포의 연골세포로의 교차분화방법을 제공한다.
- [6] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 교차분화방법에 의해 생성된 교차분화 연골세포가 제공된다.
- [7] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 교차분화 연골세포를 유효성분으로 함유하는 연골손상 질환 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

발명의 효과

- [8] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 종래 방법보다 효율적인 섬유아세포의 연골세포로의 교차분화 유도효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [9] 도 1은 비교예 1(아무것도 처리하지 않음), 비교예 2(TGF- β 1 처리) 및 본 발명의 일 실시예에 따른 전기자극 처리시 성인의 섬유아세포의 형태변화를 관찰한 현미경 사진이다.
- [10] 도 2는 비교예 1(아무것도 처리하지 않음)과 본 발명의 실시예에 따른 전기자극 처리시 연골세포 및 섬유아세포의 마커유전자의 발현양상을 확인한 것으로, 실시간 RT-PCR로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [11] 도 3은 비교예 1과 본 발명의 일 실시예에 따른 전기자극 처리시 제2형 콜라겐에 대한 면역화학염색(immunocytochemistry) 분석 결과를 나타내는 형광현미경 사진이다.
- [12] 도 4는 비교예 1과 본 발명의 일 실시예에 따른 전기자극 처리시 프로테오글리칸(proteoglycan)을 염색하는 알시안블루염색(alcian blue staining) 분석 결과를 나타내는 광학현미경 사진이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [13] 용어의 정의:
- [14] 본 문서에서 사용되는 용어를 정의하면 하기와 같다.
- [15] 본 문서에서 사용되는 용어 "섬유아세포"는 동물 조직의 구조적 골격인 세포외 기질 및 콜라겐을 합성하는 유형의 세포를 의미하며, 주로 상처 치유에서 중요한

역할을 수행하며, 동물의 결합조직에서 가장 흔한 세포이다.

[16] 본 문서에서 사용되는 용어 "결합조직(connective tissue)"는 생체에서 다른 조직 및 기관을 지지, 연결 또는 분리하는 네 가지 유형의 생물학적 조직 중 하나이다.

[17] 본 문서에서 사용되는 용어 "피부세포"는 피부는 멜라닌 세포가 활동하면서 색소 형성, 혹은 멜라닌이 생기는데 멜라닌 세포를 포함한 피부 구성 세포들을 의미한다. 상기 멜라닌 세포는 햇빛 안의 위험할 수 있는 자외선 중 일부를 흡수한다. 이는 또한 DNA 수리 효소들을 가지고 있어 UV 피해를 회복하도록 돕고, 이러한 효소들을 만드는 유전자가 결핍된 사람들은 피부암에 걸릴 확률이 높다. 피부는 인체의 가장 큰 기관으로 알려져 있다. 표면에서는, 피부는 몸을 덮음으로써, 모든 기관 중 가장 큰 표면을 차지한다. 더욱이, 중량에서도, 피부는 체내의 어떤 기관 하나보다도 더 많은 무게를 차지하는데, 이는 전체 체중의 15% 가량이 된다. 평균적인 성인 인간에게는, 피부의 표면적은 1.5-2.0 m²이고, 대부분 두께가 2-3 mm 정도이다. 평균적으로 6.5 cm²(1 제곱 인치)의 피부는 650개의 땀샘과, 20개의 혈관과, 60,000개의 멜라닌 세포와, 1,000개가 넘는 신경 말단을 가지고 있다.

[18] 본 문서에서 사용되는 용어 "연골"은 발생하는 과정을 제외하면, 대부분의 경우에서 관절의 일부를 이루고 있다. 움직임이 비교적 적게 필요한 경우, 골과 골 사이를 연골로 연결하는 연골 관절 형태를 보인다. 한편, 많은 운동이 필요한 경우에는 두 개의 연골면이 활액을 사이에 두고 접촉하는 활막관절을 덮고 있는 관절연골의 마찰계수가 매우 낮아서, 마찰이 거의 없이 움직일 수 있다는 사실에 기인한다. 연골은 연골세포, 섬유질기질로 구성된다. 상기 연골로의 분화를 촉진시키기 위한 성장인자의 최소조건은 초기에 1-2회의 transforming growth factor-beta (TGF-β)의 투여로 충분한 연골형성을 얻을 수 있다면 조직공학적인 신생연골의 형성이 좀 더 경제적으로 이루어질 수 있으며, 연골형성의 정도는 TGF-β의 투여회수에 비례하여 계속적인 투여가 필요하다(Kim, H.J., *et al.*, *Cells Tissues Organs*, 190:1-10, 2009).

[19] 본 문서에서 사용되는 용어 "연골세포"는 건강한 연골에서 발견되는 유일한 세포로서, 주로 콜라겐 및 프로테오글리칸으로 구성되는 연골성 기질(cartilaginous matrix)를 생성하고 유지하는 기능을 수행한다. 연골로 변환될 모체세포가 증식함에 따라, 간엽 조직 세포들의 단위 면적 당 수가 늘어나서 치밀한 구조를 이루며, 모체의 내부에 있는 세포는 차츰 호염성을 나타내는데, 이러한 세포를 연골아세포(chondroblast)라 한다. 연골아세포는 교원 섬유와 기질을 형성하는 바, 중심부에 있는 세포가 계속해서 더 많은 기질을 형성함에 따라, 연골 모세포들이 서로 분리되면서 연골세포(chondrocyte)로 분화된다. 연골세포는 소강(lacunae) 속에 들어 있으며, 다량의 지방질과 글리코젠을 함유하고 있다. 연골 세포와 소강은 연골 내에서 그들의 존재하는 위치에 따라, 모양이 변화한다. 연골하막에 있는 연골 세포는 그 장축이 표면에 평행하도록, 즉 섬유아세포와 같이 평평하게 배열된다. 연골 심층에 있는 세포와 그의 소강은

일반적으로 둥근 형태로 되어 있다.

- [20] 본 문서에서 사용되는 용어 "미세군집(micromass)"은 외래성 성장인자나 3차원 스캐폴드 없이 세포를 고밀도 배양하여 형성된 3차원 세포배양체를 의미한다. 통상의 단일층 배양(monolayer culture)와 달리 세포를 고밀도(약 1×10^6 내지 1×10^8 cells/ml)로 배양접시의 벽에 닿지 않도록 점적하여 배양할 경우, 바닥의 세포들은 배양접시에 부착하며, 세포들이 전체적으로는 3차원적으로 적층되어 배양되는데 이렇게 생성된 3차원 적층 세포들을 미세군집이라고 한다.
- [21] 본 문서에서 사용되는 용어 "교차분화(reprogramming/conversion/trans-differentiation)"는 고등생물에서 전혀 다른 세포타입을 가지는 성숙한(분화가 끝난) 세포간의 전환을 유도하는 과정을 의미한다. 상기는 유도만능 줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)로 리프로그래밍하고 이를 재분화하여 목적하는 세포로 만들어야 하는 과정과 달리, 유도만능 줄기세포 단계를 거치지 않고 바로 목적하는 세포로의 전환을 유도한다는 점에서 차이를 가진다. 현재 직접 교차분화는 질병모델링과 신약발굴 등에 이용될 가능성을 인정받고 있으며, 미래에는 유전자 치료 그리고 재생의학 등에도 응용될 수 있을 것이라 기대된다.
- [22] 본 문서에서 사용되는 용어 "제1형 콜라겐"은 콜라겐 섬유라고 알려진 호중성 섬유다발을 형성하는 콜라겐 단백질 중 가장 풍부한 단백질로서 COL1A1 유전자에 의해 인코딩되는 $\alpha 1$ 및 COL1A2 유전자에 의해 인코딩되는 $\alpha 2$ 를 포함한다. 상기 제1형 콜라겐은 주로 힘줄 및 피부와 같은 조직에서 발견된다.
- [23] 본 문서에서 사용되는 용어 "제2형 콜라겐"은 연골에 많이 분포하는 콜라겐으로서, 약 20%가 콘드로이틴 형태를 나타내고 있으며, 이를 암호화하는 COL2A 유전자의 돌연변이가 선천성 척추골단 이형성증과 같은 질환의 원인이 되기도 한다.
- [24] 본 문서에서 사용되는 용어 "Aggrecan(AGC)"는 연골특이성 프로테오글리칸 핵 단백질(PS PCP) 또는 콘드로이틴 황산 프로테오글리칸 1 으로 알려진 ACAN 유전자에 의해 암호화되는 인체 단백질이다. 상기 단백질은 렉티칸(콘드로이틴 황산 프로테오글리칸)의 구성원으로서, 연골조직에서 세포외 기질의 통합적인 부분이고 연골에서 압축을 지탱하고 있다.
- [25] 본 문서에서 사용되는 용어 "SOX9"는 SOX-9 유전자에 의해 암호화되는 인체 전사인자 단백질을 의미한다. SOX9은 HMG-box(고운동성군-박스)의 DNA 결합 단백질과 함께 CCTTGAG 시퀀스를 인식하며, 연골 분화하는 동안에 스테로이드성 유전인자 1과 항-뮐러 호르몬(AMH) 유전자의 전사를 조절한다.
- [26] 본 문서에서 사용되는 용어 "TGF- β "는 조직의 섬유화 및 세포외기질(extacellular matrix, ECM)의 리모델링에서 중요한 역할을 하는 단백질로서, COL1A2 뿐만 아니라 CCN2/CTGF, PAI-1 및 TIMP-1를 상향 조절하며, 피부 섬유아세포의 COL1A2 프로모터는 TGF- β 자극에 따라 그

활성이 달라진다.

[27] 발명의 상세한 설명:

[28] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다.

[29] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 섬유아세포를 고밀도 배양하여 섬유아세포 미세군집을 형성시키는 섬유아세포 미세군집 형성단계; 및 상기 섬유아세포 미세군집을 성장인자가 포함되지 않은 배양액에서 배양하면서 전기자극을 가하는 전기자극 단계;를 포함하는 피부 유래 섬유아세포의 연골세포로의 교차분화방법을 제공한다.

[30] 상기 교차분화방법은 체외(in vitro)에서 수행될 수 있다.

[31] 상기 교차분화방법에 있어서, 상기 섬유아세포는 힘줄(tendon), 인대(ligament), 근육, 피부, 각막, 치주, 연골(cartilage), 뼈, 혈관, 소장, 대장 또는 추간판(intervertebral disc) 유래의 섬유아세포일 수 있다.

[32] 상기 교차분화방법에 있어서, 상기 섬유아세포는 1×10^6 내지 1×10^8 cells/ml의 농도로 파종될 수 있다.

[33] 상기 교차분화방법에 있어서, 상기 전기자극은 직류 전류 또는 교류 전류에 의한 것일 수 있다.

[34] 상기 교차분화방법에 있어서, 상기 전기자극은 1 내지 100 V/cm, 1 내지 50 V/cm, 1 내지 20 V/cm, 1 내지 10 V/cm 또는 3 내지 7 V/cm의 전기장 세기를 가질 수 있고, 상기 전기자극은 초당 1 내지 100회, 1 내지 50회, 1 내지 20회, 1 내지 10회 또는 3 내지 7회의 주기로, 각 회당 1 내지 30 ms, 1 내지 20 ms, 1 내지 15 ms 또는 5 내지 10 ms 동안 인가될 수 있고, 상기 전기자극 단계는 12시간 내지 10일, 1 내지 8일, 또는 2 내지 5일 동안 수행될 수 있다.

[35] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 교차분화방법에 의해 생성된 교차분화 연골세포가 제공된다.

[36] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 상기 교차분화 연골세포를 유효성분으로 함유하는 연골손상 질환 치료용 약학적 조성물이 제공된다. 상기 약학적 조성물은 유효성분이 교차분화 연골세포이므로 달리 세포치료제라고 할 수 있다.

[37] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 연골손상 질환은 반월상연골 손상, 삼각섬유연골 복합체 손상, 반복된 외상에 의해 심한 연골 손상 또는 일부 연골의 손상, 골관절염(퇴행성 관절염) 또는 류마티스성 관절염일 수 있다.

[38] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포치료제 또는 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예컨대, 그러한 경로에는 비경구 투여, 예를 들어, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 활막강내 투여 및 관절강내 투여가 포함되며, 특히 환부의 관절강내 투여가 가장 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[39] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포치료제 또는 약학적 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다.

약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 또한 본 발명에 따른 세포치료용 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 최신판]에 상세히 기재되어 있다.

- [40] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포치료제 또는 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [41] 또한 상기 세포치료제 또는 약학적 조성물은 유효성분인 교차분화 연골세포가 표적 환부로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 본 발명의 일 실시예에 따른 세포치료제 또는 약학적 조성물은 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양의 교차분화 연골세포를 포함할 수 있다. 용어 '치료적으로 유효한 양'은 연구자, 의사, 의사 또는 기타임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 세포치료제 또는 약학적 조성물에 포함되는 교차분화 연골세포의 투여량은 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.
- [42] 그러므로 본 발명의 세포치료제 또는 약학적 조성물 내에 포함되는 교차분화 연골세포의 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따른 세포치료제 또는 약학적 조성물은 연골손상 질환의 치료가 필요한 부위(세포, 조직 또는 장기), 예컨대 손상된 연골이 존재하는 관절강에 투여될 수 있다.
- [43] 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다. 예컨대, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포치료제 또는 약학적 조성물의 투여량은 상기 교차분화 연골세포를 기준으로 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg(체중), 보다 바람직하게는 1.0×10^6 내지 1.0×10^8 세포/kg(체중)일 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의

연령, 체중, 성별, 병적상태, 음식, 투여시간, 투여경로, 배설속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개 부위 또는 2개 부위 이상에 투여할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 허혈기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 치료의 대상동물로서는, 인간 및 그 밖의 목적으로 하는 포유동물을 예로 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등이 포함된다.

- [44] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포치료제 또는 약학적 조성물은 일 구현예에서, 개체로부터 섬유아세포를 분리하여, 이를 생체외(in vitro)에서 본원에 따른 방법으로 처리하여 연골세포로 교차분화시킨 후 이를 다시 상기 개체의 환부에 이식하는 질환의 예방 또는 치료를 위한 엑스 비보(ex vivo) 세포 치료법에 사용될 수 있다.
- [45] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.
- [46] 실시예 1: 각종 조직으로부터 섬유아세포의 분리
- [47] 1-1: 피부조직으로부터 섬유아세포의 분리
- [48] 성인 남성의 손목으로부터 3 cm 떨어진 팔뚝의 피부조직을 70% 이소프로필 알코올로 깨끗이 닦아 소독한 후, 상기 소독부위를 1% 리도카인으로 국소마취한 후 2-mm 편치로 피부조직을 채취하여, 피부 생검을 4-5 조각으로 추가 절제한 후, 멸균된 T25 플라스크에 글루타맥스(glutamax)가 보충되고 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1% HEPES, 1% 피루브산 나트륨 및 20% 열-불활성화 우태아혈청이 첨가된 DMEM-F12 배지 2 ml을 분주하고, 플라스틱 바닥이 배지로 완전히 젖으면 배지를 제거한 다음, 배지 바닥에 피부 조각을 조심스럽게 놓고, 상기 DMEM-F12 배지 0.5 ml을 가한 후, 상기 플라스크를 5% CO₂, 37°C의 조건의 세포배양기로 옮긴 후 3일간 배양하였다. 상기 피부조직은 손목 부위 말고 말초신경이 덜 밀집된 껌볼 부분에서 채취하는 것이 가능하다.
- [49] 그런 다음, 매일 플라스크를 관찰하여 피부조직으로부터 세포들이 자라나오면, 1 ml 정도의 추가 배지를 조심스럽게 가한 후, 최초 세포층으로부터 섬유아세포들이 자라나오는 것을 확인되면, 트립신을 처리하여 세포들은 T75 플라스크로 옮겼다.
- [50] 1-2: 근육으로부터 섬유아세포의 분리

[51] 근육으로부터 섬유아세포의 분리는 Agley 등의 방법으로 수행할 수 있다(Agley *et al.*, *J. Cell Biol.*, 126(24): 5610-5625, 2013). 구체적으로 성인 남성 외측광근(vastus lateralis)으로부터 외부 흡입을 가미한 바늘 생검 방법으로 근육조직을 채취한 다음, 눈에 보이는 지방 또는 결합조직을 제거하고 근육조직을 2 mg/ml의 콜라게나제 B(collagenase B, Roche, Genrmay) 및 2 mg/ml의 dipase II 가 첨가된 기본 배지(PromoCell, Germany) 내에서 1 mm3 미만의 더 작은 조각으로 분쇄한 후, 15분 간격으로 근육-유래 세포를 분리시키기 위해 추가적으로 분쇄하면서 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 상기 효소 분리는 증식 배지(PromoCell, Germany)의 첨가에 의해 종결되고 세포 현탁액을 100 μ m 필터에 통과시켜 근섬유 파편을 제거하고, 여과된 세포를 20°C에서 6분간 657 xg로 원심분리한다.

[52] **1-3: 인대로부터의 섬유아세포의 분리**

[53] 인대로부터 섬유아세포의 분리는 기본적으로 종래의 방법으로 수행하였다 (Ge *et al.*, *Cell Transplantation*, 14: 573-583, 2005). 구체적으로 2.2 내지 2.5 kg의 웅성 뉴질랜드 흰토끼의 뒷다리 무릎 인대의 퇴골 삽입부 및 경골 삽입부를 제거한 후, 인대로부터 활막초(synovial sheath) 및 인대주변부 조직(periligamentous tissues)을 제거한다. 전방십자인대(anterior cruciate ligament, ACL) 및 내측측부인대(medial collateral ligament, MCL)을 분리한 후 각 인대를 1x1x1 mm의 크기로 조심스럽게 절제한 후 5 ml의 0.25% 콜라게나제(Gibco, USA)로 37°C에서 6시간 동안 진탕반응시킨 후 DMEM으로 2번 세척한다. ACL로부터 분리된 인대 세포를 T25 플라스크에서 10% FBS, 10,000 U/ml 페니실린, 10,000 U/ml 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민이 보충된 DMEM(pH 7.4)에 현탁하여 37°C 5% CO₂의 조건에서 3일 간격으로 배양한 후, 사용전까지 계대배양하거나 일부를 액체질소를 이용하여 동결시킨 후 -70°C 냉동고에 사용 전까지 보관한다.

[54] **1-4: 치은 조직으로부터의 섬유아세포의 분리**

[55] 치은조직으로부터 섬유아세포의 분리는 임 등의 방법으로 수행하였다(임현필 외, 대한치과보철학회지 제44권 제1호, pp. 112-123, 2006). 먼저, 치주 수술 후 얻어진 건강한 치은 조직을 항생제가 함유된 인산완충용액(PBS)으로 5회 세척한 후 0.2% dispase(Gibco, USA)가 함유된 Hank's balanced salt solution(Gibco, USA)내에 4°C, 16 내지 22시간 두어 상피와 결합조직을 분리한다. 얻어진 결합조직을 항생제가 함유된 PBS로 5회 세척하고 약 1x1x1 mm 크기로 세절한 후 35 mm 배양접시에 5-6개 조각을 배지 첨가 없이 30분 동안 5% CO₂ 세포배양기에 두어 조직이 배양접시에 부착되면 항생제와 10% 우태아혈청이 함유된 DMEM 배지를 첨가한다. 다음날 배지를 교환하고 그 후로는 3일 마다 교환한다. 조직으로부터 성장된 세포가 밀생에 도달하면 PBS로 세척한 후 0.05% 트립신/0.53 mM EDTA(Gibco, USA)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기 내에 5분간 두어, 세포가 배양접시로부터 분리되면 10% FBS가 함유된 DMEM 배지 1 ml를 첨가한 후 1000 rpm에서 10분간 원심분리하고 세포만을 모아

계대배양한다.

[56] 실시예 2: 섬유아세포의 미세군집 배양 및 전기자극 인가

[57] 상기 실시예 1-1에서 분리된 섬유아세포(fibroblast)를 어떠한 성장인자도 첨가하지 않은 배양액(DMEM-high glucose, FBS 10%)을 담은 배양접시에서 충분히 배양한 후, 2×10^7 cells/ml 농도의 세포현탁액 $10 \mu\text{l}$ 를 35 mm 배양접시에 떨어뜨리고 나서 이를 1시간 동안 인큐베이터(37°C , CO_2 5%)에 두어 미세군집(micromass)을 형성시켰다. 그 후 형성된 미세군집에 어떠한 성장인자도 첨가하지 않은 배양액(DMEM-high glucose, FBS 10%) 3 ml를 넣고, 여기에 다채널 전기자극 장치(C-Pace stimulator, Ion-Optics Co., MA)를 사용하여 5 V/cm의 전기장을 0.008초씩 초당 5회 간격으로 3일간 인가하면서 배양하였다.

[58] 비교예 1:

[59] 상기 실시예 1-1에서 분리된 피부유래 섬유아세포를 배양접시에서 충분히 배양한 후, 2×10^7 cells/ml 농도의 세포현탁액 $10 \mu\text{l}$ 를 35 mm 배양접시에 떨어뜨려 미세군집(micromass) 배양을 수행하였다. 그 후 상기 미세군집에 어떠한 성장인자도 첨가하지 않은 배양액(DMEM-high glucose, FBS 10%) 3 ml를 넣고 3일간 배양하였다.

[60] 비교예 2:

[61] 상기 실시예 1-1에서 분리된 피부유래 섬유아세포를 배양접시에서 충분히 배양한 후, 2×10^7 cells/ml 농도의 세포현탁액 $10 \mu\text{l}$ 를 35 mm 배양접시에 떨어뜨려 미세군집 배양을 수행하였다. 그 후 형성된 미세군집에 TGF- β 1(10 ng/ml)을 첨가한 배양액(DMEM-high glucose, FBS 10%) 3 ml를 넣고 3일간 배양하였다.

[62] 실험예 1: 세포 형태학적 변화 관찰

[63] 상기 실시예에서 특정 전기자극 조건(5 V/cm의 전기장세기, 8 ms의 인가시간, 5 Hz 주파수)으로 피부세포가 응집되면서 연골세포로 효과적으로 분화된다는 것을 증명하였다. 상기 결과로 인해 본 발명에서 보여준 장점 및 효과로는 실제 생체 내에서 연골분화시에 일어나는 응집현상이 효과적으로 유도되었다(도 1 하단 참조).

[64] 반면, 아무런 처리를 하지 않은 비교예 1 및 성장인자 TGF- β 를 처리한 비교예 2의 경우 시간의 경과에도 불구하고 세포의 응집현상은 관찰되지 않았다(도 1 상단 및 중단).

[65] 실험예 2: 마커유전자 발현 변화 관찰

[66] 2-1: 실시간 RT-PCR 분석

[67] 상기 실험예 1의 형태학적 관찰에 이어, 본 발명의 일 실시예에 따른 방법에 의해 섬유아세포가 실제 연골세포로 교차분화되었는지 확인하기 위해 상기 실시예 1 그리고 비교예 1 및 2에 의해 처리된 세포에 대하여 실시간 RT-PCR을 이용하여 세포 표현형 표지유전자의 발현수준을 측정하였다. 구체적으로, 하기 표 1에 기재된 프라이머를 이용하여 실시간 RT-PCR을 수행한 결과, 전기자극만

처리시(실시예 1) 피부세포 표지유전자인 COL1A1(약 1/10배) 및 COL1A2(약 1/5배)의 발현은 아무것도 처리하지 않은 대조군(비교예 1)과 TGF-β1처리군 대비 크게 감소하였고, 연골세포 표지유전자인 COL2A(약 20배), AGC(약 5배) 및 SOX9(약 9배)은 발현이 크게 증가하였다(도 2 참조).

[68] [표1]

프라이머명	핵산서열(5'→3')	서열번호
COL1A1-F	GTCGAGGGCCAAGACGAAG	1
COL1A1-R	CAGATCACGTCATCGCACAAC	2
COL1A2-F	AATTGGAGCTGTTGGTAACGC	3
COL1A2-R	CACCAGTAAGGCCGTTTGC	4
COL2A1-F	GTGGAGCAGCAAGAGCAA	5
COL2A1-R	TGTTGGGAGCCAGATTGT	6
AGC-F	AGGAGACAGAGGGACACGTC	7
AGC-R	TCCACTGGTAGTCTTGGGCAT	8
SOX9-F	TTCCGCGACGTGGACAT	9
SOX9-R	TCAAACCTCGTTGACATCGAAGGT	10
GAPDH-F	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	11
CAPDH-R	TTCTAGACGGCAGGTCAGGT	12

[69] **2-2: 면역화학염색**

[70] 연골세포로의 분화여부를 더 확인하기 위해, 아무것도 처리하지 않은 성인의 섬유아세포(비교예 1)와 전기자극을 가한 섬유아세포(실시예 2)에 대하여 제2형 콜라겐에 대한 면역화학분석을 수행하였다. 구체적으로, 각 세포들을 파라포름알데하이드(4%)를 이용하여 실온에서 20분 동안 고정시키고 PBS 용액으로 3번 씻어낸 후, Triton X-100(0.3%)을 포함한 양의 혈청(5%)으로 1시간 동안 실온에서 블로킹반응을 시켰다. 그 후, 토끼에서 생산한 type II collagen 항체(1:500; EnoGene Biotech, New York, NY, USA)을 4°C에서 12시간 동안 반응시킨 후, PBS 용액으로 3회 세척하였다. 그런 다음, Alexa488가 부착된 2차항체(1:200; Invitrogen)를 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 0.1% Triton X-100을 포함한 PBS로 3번 세척한 후, 핵을 Hoechst 33258(Dojindo, Tokyo, Japan)로 염색하였다. 그 결과, 연골세포 분화 표지 단백질인 제2형 콜라겐 단백질은 대조군인 비교예 1에서는 전혀 검출되지 않았으나, 전기자극을 인가한 실시예 1의 세포에서는 뚜렷하게 발현됨을 확인할 수 있었다(도 3 참조). 상기 결과는 아무것도 처리하지 않은 피부유래 섬유아세포와 달리 전기자극을 가한 섬유아세포가 연골세포로 실질적으로 교차분화했음을 시사하는 것이다.

[71] **2-3: 알시안블루 염색**

[72] 연골세포로의 분화여부를 더 확인하기 위해, 아무것도 처리하지 않은 성인의 섬유아세포(비교예 1)와 전기자극을 가한 섬유아세포(실시예 2)에 대하여 연골세포 표지인자인 프로테오글리칸(proteoglycan)을 염색하는 알시안블루 염색을 수행하였다. 구체적으로, 각 세포들을 파라포름알데하이드(4%)를 이용하여 실온에서 20분 동안 고정시키고 PBS 용액으로 3번 씻어낸 후, pH 2.5인 알시안블루 용액(Nacalai tesque, INC., Japan)을 첨가하여 실온에서 12시간 동안 반응시킨 후, PBS 용액으로 3회 세척한 후 관찰하였다. 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이, 전기자극이 없었던 비교예 1(대조군)의 경우는 프로테오글리칸이 거의 발현되지 않았지만 어떠한 성장인자도 도입하지 않은 채 단순히 전기자극만을 가하면서 섬유아세포를 배양액(DMEM/F12, FBS 10%)에서 3일간 배양한 실시예 2의 경우는 프로테오글리칸이 뚜렷하게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

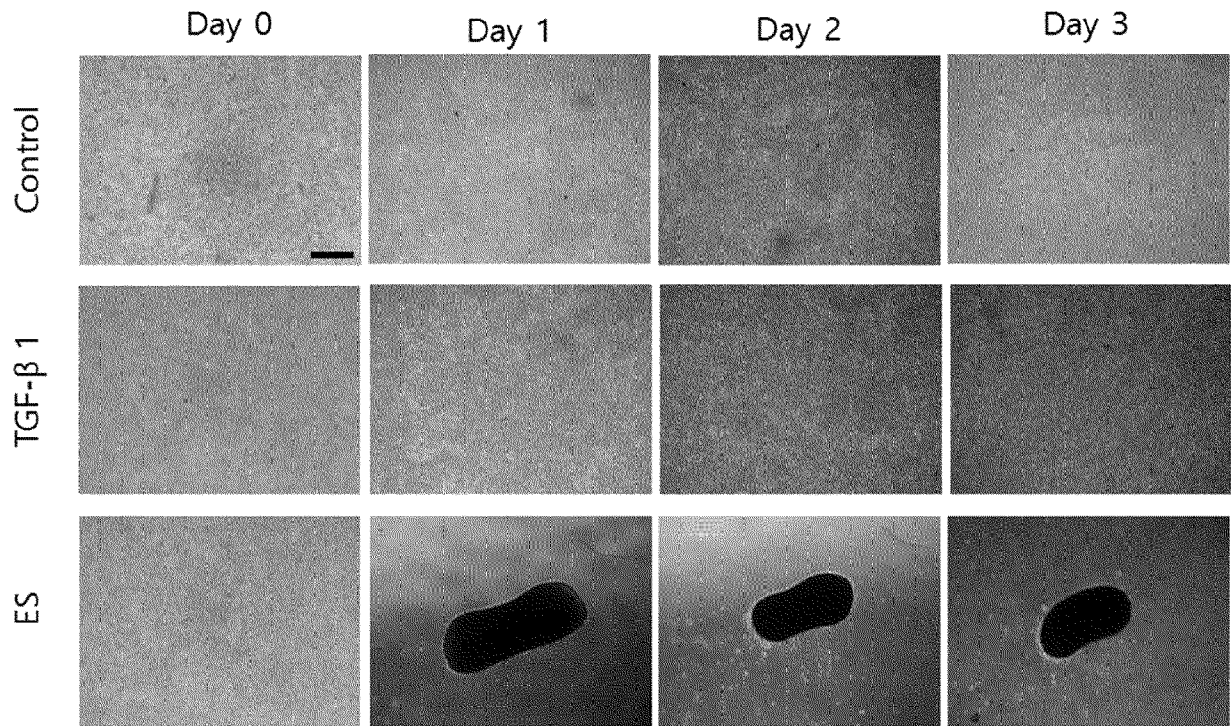
[73] 본 발명의 일 실시예에 따른 방법을 사용할 경우, 3일이라는 매우 짧은 기간에 그 어떠한 유전자요법이나 성장인자의 사용 없이 섬유아세포의 연골세포로의 교차분화를 유도할 수 있음을 알 수 있다. 이는 종래의 분화가 완료가 된 세포를 줄기세포로 탈분화시킨 후 이를 다시 연골세포로 분화시키는 2단계 분화방법에 비해 더욱 간단하며, 줄기세포 사용으로 인한 암 발생의 가능성을 획기적으로 낮출 뿐만 아니라 유전자 요법을 사용하지 않기 때문에 원하지 않은 부작용을 최소화할 수 있다는 점에서 매우 유용하다. 더구나, 섬유아세포는 피부, 인대, 근육, 치주 등의 조직으로부터 수득이 용이하고 대량으로 증식이 가능하기 때문에, 분리 및 증식이 쉽지 않은 간엽계 줄기세포를 대신하여 보다 경제적이고 대량으로 연골세포를 생산하는 것이 가능하다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 방법은 연골손상 치료제의 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[74] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예 및 실험예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

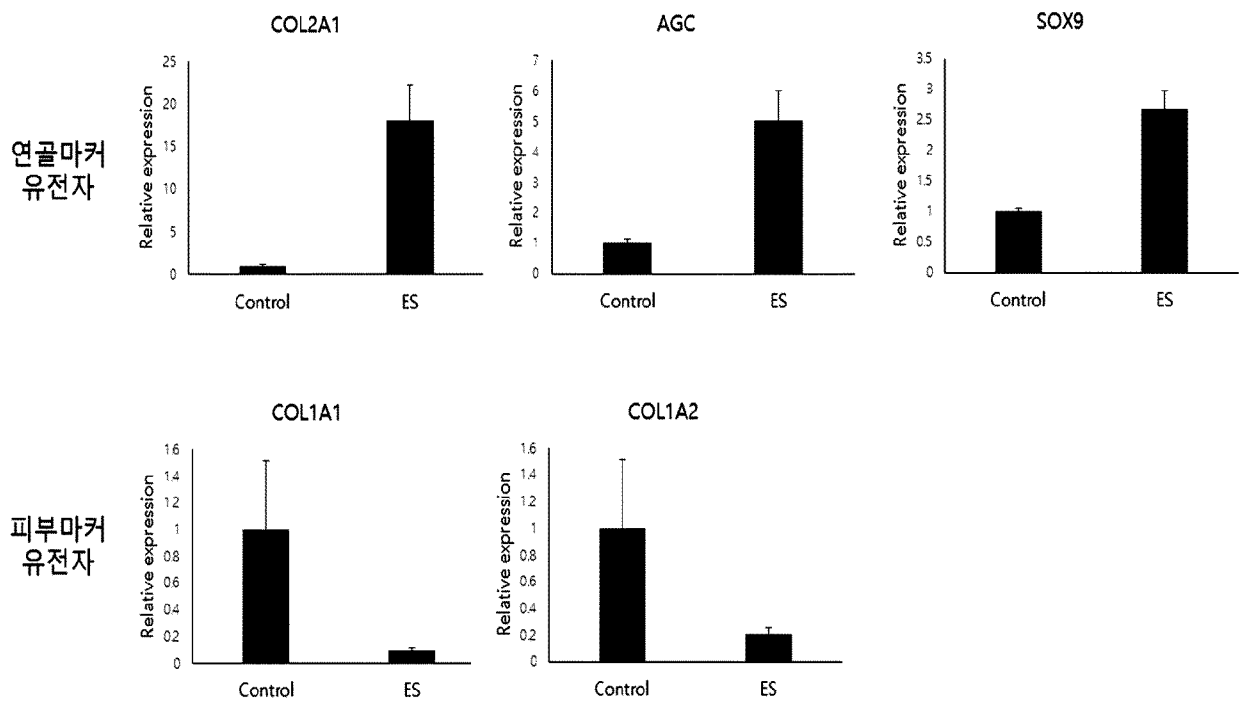
청구범위

- [청구항 1] 섬유아세포를 고밀도 배양하여 섬유아세포 미세군집을 형성시키는 섬유아세포 미세군집 형성단계; 및
상기 피부세포 집합체를 성장인자가 포함되지 않은 배양액에서 배양하면서 전기자극을 가하는 전기자극 단계를 포함하는 피부 유래 섬유아세포의 연골세포로의 교차분화방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
체외(in vitro)에서 수행되는, 교차분화방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 섬유아세포는 힘줄(tendon), 인대(ligament), 근육, 피부, 치주, 각막, 연골(cartilage), 뼈, 혈관, 소장, 대장 또는 추간판(intervertebral disc) 유래의 섬유아세포인, 교차분화방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 섬유아세포는 1×10^6 내지 1×10^8 cells/ml의 농도로 파종되는, 교차분화방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 전기자극은 직류 전류 또는 교류 전류에 의한 것인, 교차분화방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 전기자극은 0.1 내지 100 V/cm의 전기장 세기를 갖는, 교차분화방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 전기자극은 초당 1 내지 100회의 주기로 각 회당 1 내지 50 ms 동안 인가되는, 교차분화방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 전기자극 단계는 1 내지 10일간 수행되는, 교차분화방법.
- [청구항 9] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 교차분화된 피부조직 유래의 교차분화 연골세포.
- [청구항 10] 제9항의 교차분화 연골세포를 유효성분으로 함유하는 연골손상 질환의 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 연골손상 질환은 반월상연골 손상, 삼각섬유연골 복합체 손상, 반복된 외상에 의해 심한 연골 손상 또는 일부 연골의 손상, 골관절염(퇴행성 관절염) 또는 류마티스성 관절염인, 약학적 조성물.

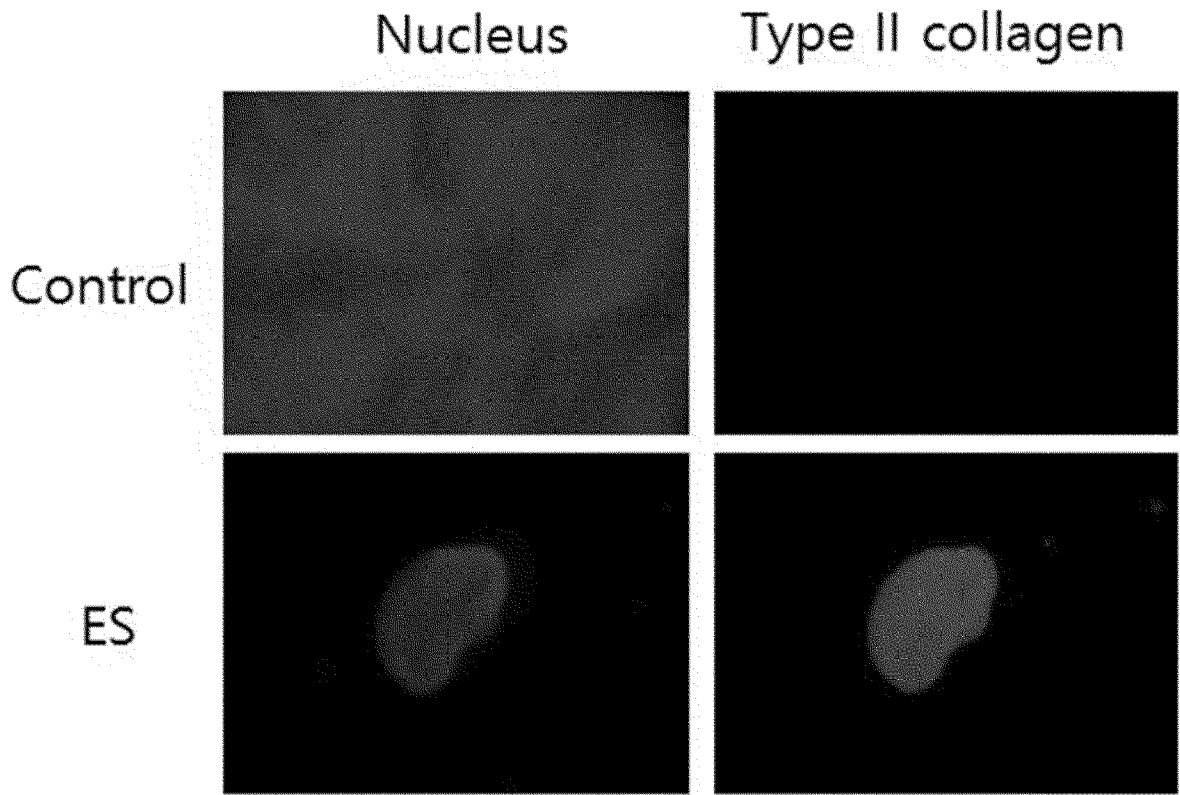
[도1]



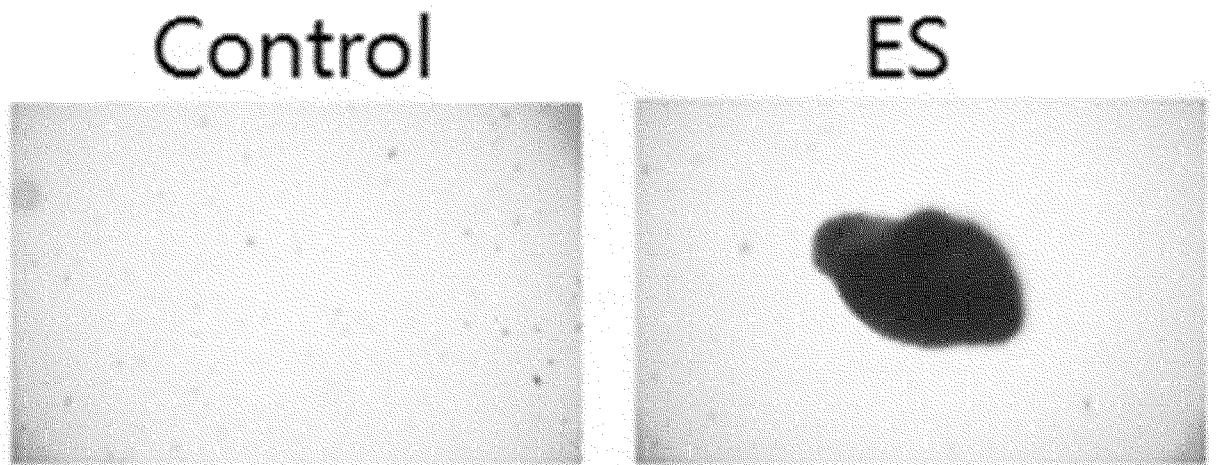
[도2]



[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000031

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/077(2010.01)i, A61K 35/32(2006.01)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 5/077; C12N 13/00; A61K 31/706; A61K 31/7068; A61K 35/32; 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: fibroblast, electrical stimulation, chondrocyte, transdifferentiation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2012-0029367 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 26 March 2012 See abstract; claims 1 and 13-14; paragraph [0068].	9-11
A		1-8
X	KR 10-2005-0044849 A (INHA SCHOOL FOUNDATION) 13 May 2005 See claims 7-8.	9-11
X	KR 10-2014-0137882 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 03 December 2014 See claims 15-16.	9-11
A	ALT, Eckhard et al., "Fibroblasts Share Mesenchymal Phenotypes with Stem Cells, but Lack Their Differentiation and Colony-forming Potential", Biology of the Cell, 2011, vol. 103, no. 4, pages 197-208 See the entire document.	1-11
A	US 2013-0089908 A1 (CREECY, Courtney M. et al.) 11 April 2013 See claims 1-3.	1-11
PX	KR 10-1653197 B1 (EULJI UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 01 September 2016 See claims 1-8; paragraphs [0038]-[0039].	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

20 MARCH 2017 (20.03.2017)

Date of mailing of the international search report

20 MARCH 2017 (20.03.2017)

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/KR2017/000031

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date		
KR 10-2012-0029367 A	26/03/2012	EP 2617415 A2	24/07/2013		
		EP 2617415 B1	20/04/2016		
		EP 3056198 A2	17/08/2016		
		KR 10-1362639 B1	13/02/2014		
		KR 10-1524929 B1	01/06/2015		
		KR 10-2013-0103481 A	23/09/2013		
		US 2013-0236969 A1	12/09/2013		
		US 2015-0252003 A1	10/09/2015		
		US 9068166 B2	30/06/2015		
		WO 2012-036512 A2	22/03/2012		
		WO 2012-036512 A3	31/05/2012		
		KR 10-2005-0044849 A	13/05/2005	WO 2005-045008 A1	19/05/2005
		KR 10-2014-0137882 A	03/12/2014	KR 10-1555650 B1	25/09/2015
US 2013-0089908 A1	11/04/2013	US 8945894 B2	03/02/2015		
		WO 2013-049598 A1	04/04/2013		
KR 10-1653197 B1	01/09/2016	NONE			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 5/077(2010.01)i, A61K 35/32(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 5/077; C12N 13/00; A61K 31/706; A61K 31/7068; A61K 35/32; 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: 섬유아세포, 전기자극, 연골세포, 교차분화

C. 관련 문헌

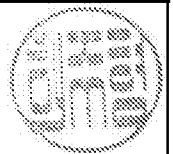
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2012-0029367 A (연세대학교 산학협력단) 2012.03.26 요약; 청구항 1 및 13-14; 단락 [0068] 참조.	9-11
A		1-8
X	KR 10-2005-0044849 A (학교법인 인하학원) 2005.05.13 청구항 7-8 참조.	9-11
X	KR 10-2014-0137882 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2014.12.03 청구항 15-16 참조.	9-11
A	ALT, ECKHARD 등, 'Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential', Biology of the Cell, 2011, 제103권, 제4권, 197-208 페이지 전체 문헌 참조.	1-11
A	US 2013-0089908 A1 (CREECY, COURTNEY M. 등) 2013.04.11 청구항 1-3 참조.	1-11
PX	KR 10-1653197 B1 (울지대학교 산학협력단) 2016.09.01 청구항 1-8; 단락 [0038]-[0039] 참조.	1-11

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일 2017년 03월 20일 (20.03.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 03월 20일 (20.03.2017)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150
---	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0029367 A	2012/03/26	EP 2617415 A2	2013/07/24
		EP 2617415 B1	2016/04/20
		EP 3056198 A2	2016/08/17
		KR 10-1362639 B1	2014/02/13
		KR 10-1524929 B1	2015/06/01
		KR 10-2013-0103481 A	2013/09/23
		US 2013-0236969 A1	2013/09/12
		US 2015-0252003 A1	2015/09/10
		US 9068166 B2	2015/06/30
		WO 2012-036512 A2	2012/03/22
		WO 2012-036512 A3	2012/05/31
		KR 10-2005-0044849 A	2005/05/13
KR 10-2014-0137882 A	2014/12/03	KR 10-1555650 B1	2015/09/25
US 2013-0089908 A1	2013/04/11	US 8945894 B2	2015/02/03
		WO 2013-049598 A1	2013/04/04
KR 10-1653197 B1	2016/09/01	없음	