

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 12월 31일 (31.12.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/209013 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01) A61K 35/12 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005634
- (22) 국제출원일: 2014년 6월 25일 (25.06.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0073187 2013년 6월 25일 (25.06.2013) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 140-210 서울시 용산구 이태원로 55길 48, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김동익 (KIM, Dong Ik); 135-991 서울시 강남구 광평로 19길 15, 105동 1001호, Seoul (KR). 김애경 (KIM, Ae Kyeong); 135-867 서울시 강남구 선릉로 112길 21-11, 202호, Seoul (KR). 김민희 (KIM, Min Hee); 135-520 서울시 강남구 광평로 19길 10, 1006동 1112호, Seoul (KR). 김도형 (KIM, Do Hyung); 157-836 서울시 강서구 등촌로 39나길 3, 501호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).

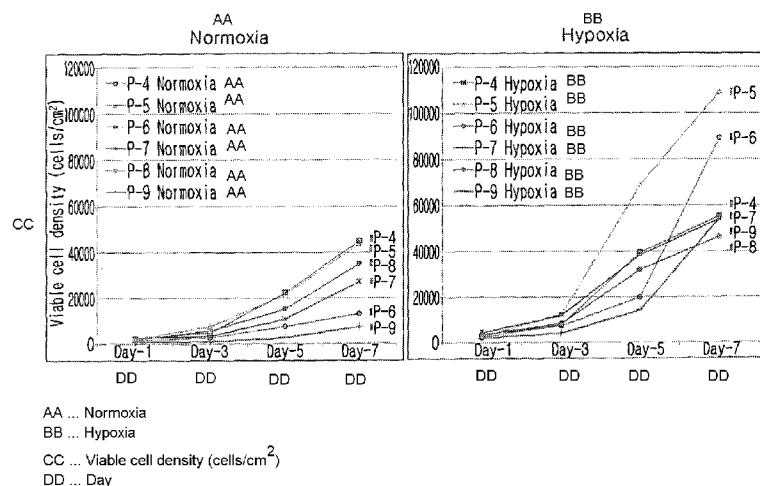
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, 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, 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))
- 명세서와 별도로 규칙 13의 2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의 2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

(54) Title: NOVEL STEM CELLS HAVING CHARACTERISTICS OF ENDOTHELIAL CELLS AND DERIVED FROM MES-ENCHYMAL STEM CELLS

(54) 발명의 명칭 : 중간엽 줄기세포로부터 유래된, 내피세포의 특성을 포함하는 신규한 줄기세포



(57) Abstract: The present invention relates to stem cells having characteristics of endothelial cells and derived from mesenchymal stem cells, and to a method for producing the stem cells from mesenchymal stem cells. Further, the present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating ischemic diseases, the composition containing the stem cells or a culture liquid thereof. The stem cells according to the present invention have characteristics of both endothelial cells and stem cells, and retain a high cell proliferation rate, cell migration ability, and DNA conservation ability, thereby exhibiting active angiogenesis ability in ischemic diseases, and thus can be effectively used to prevent or treat ischemic diseases.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2014/209013 A1



본 발명은 중간엽 줄기세포로부터 유래된, 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포 및 중간엽 줄기세포로부터 상기 줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 줄기세포 또는 이의 배양액을 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 줄기세포는 내피세포 및 줄기세포의 특성을 모두 가지며, 높은 세포 증식률, 세포 이동능 및 DNA 보전능을 갖는바, 허혈성 질환에서 활발한 신생혈관 형성능을 나타내므로, 허혈성 질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 중간엽 줄기세포로부터 유래된, 내피세포의 특성을 포함하는 신규한 줄기세포

기술분야

- [1] 본 발명은 중간엽 줄기세포로부터 유래된, 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포 및 중간엽 줄기세포로부터 상기 줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [2] 또한 본 발명은 상기 줄기세포 또는 이의 배양액을 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 허혈 (Ischemia)이란 신체기관, 조직 또는 부위로의 혈류 공급 감소 상태를 말하며, 궁극적으로 비가역적인 손상인 세포 및 조직의 괴사(necrosis)로 이어지게 된다. 특히, 뇌나 심장은 혈류 부족에 가장 민감한 신체 기관으로서, 예를 들어, 뇌졸중 또는 두부 손상 등으로 조직에 허혈이 발생하면 허혈폭포반응 (ischemic cascade)이라고 불리는 과정들이 촉발되어 뇌 조직이 영구적으로 손상된다.
- [4] 허혈성 질환은 혈액 공급의 기질적 장애에 의한 국소성 빈혈에 관련된 질환으로, 외상, 허혈성 뇌혈관 장애(뇌졸중, 뇌경색 등), 허혈성 신경증, 허혈성 폐질환, 감염증에 관련된 허혈성 질환, 사지의 허혈성 질환, 허혈성 심질환(허혈성 심근증, 심근경색증, 허혈성 심부전 등) 등을 들 수 있다.
- [5] 줄기세포 치료제를 포함한 세포치료제(cell therapy product)는 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가(autologous), 동종(allogeneic) 또는 이종(xenogeneic) 세포를 체외에서 증식 또는 선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용하는 의약품으로 정의된다. 줄기세포 치료제는 이종 특히 줄기세포를 사용하는 경우를 의미하며, 현재 대표적인 응용 분야는 신경질환, 심질환, 폐질환, 간질환, 암과 같이 손실된 세포의 회복과 재생이 필수적이면서도 자연스럽게 잘 이루어지지 않는 경우에서 활발하게 개발이 진행되고 있다.
- [6]
- [7] 줄기세포는 다분화 잠재능을 가지고 있어서 손상된 조직에서 필요한 세포로의 분화를 유도할 수 있다는 점에서 세포치료에서 잠재력이 크지만, 현재 개발수준에서는 체내 이식 후 생존율이 높지 않아서 실제로 임상 적용에서 광범위하고 안정적으로 성공한 예를 찾기 어렵다.
- [8] 특히, 지방, 골수 또는 제대혈 유래 줄기세포치료제가 허혈성 질환 치료에 사용될 수 있고, 혈관을 재생시킬 수 있는 것으로 밝혀졌으나, 2차원 배양으로

허혈부위에 이식된 줄기세포의 대부분은 사멸되어 세포치료제의 치료 효능이 크지 않은 문제점이 있어 왔다. 또한, 레만(Rehman J) 등은 지방 유래 줄기세포에서 혈관 재생에 관련된 인자가 분비된다는 것을 보고하였으나(Circulation 2004; 109(10): 1292-8), 이 방법에서도 역시 줄기세포가 단일 세포 형태로 허혈 부위에 이식되어 이식된 세포의 생존율이 극히 낮았다. 나아가, 나카가미(Nakagami H) 등은 지방 유래 줄기세포를 VEGF와 HGF로 처리한 후 마우스 하지 허혈 부위에 이식하는 내용을 보고하였다 (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25(12): 2542-7). 그 결과 VEGF와 HGF로 처리하지 않고 이식된 지방 유래 줄기세포보다 혈관 재생 효과가 높았으나, VEGF, HGF 등의 성장인자는 농도에 따라서는 암을 유발할 가능성이 높아 임상 적용이 어려운 문제가 있었다.

- [9] 이에, 본 발명자는 세포치료제로 이용될 수 있는 새로운 줄기세포주의 발명을 위하여 예의 노력한 결과, 내피세포의 특성을 포함하는 신규한 줄기세포를 발명하고, 이의 허혈성 질환 모델에서의 효과를 확인하여 본 발명의 완성하기에 이르렀다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명의 일 양상은 중간엽 줄기세포로부터 유래된, 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포 및 중간엽 줄기세포로부터 상기 줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [11] 또한 본 발명의 일 양상은 상기 줄기세포 또는 이의 배양액을 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 본 발명의 일 양상은 중간엽 줄기세포 (Mesenchymal stem cell)로부터 유래된, 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포를 제공한다.
- [14] 이하 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.
- [15]
- [16] 본 발명에 있어서, 본 발명자는 중간엽 줄기세포를 저산소분압 조건하에서 배양하여, 새로운 특성, 즉, 내피세포의 특성 및 줄기세포의 특성을 모두 포함하는 신규한 세포주를 제조하였으며, 이 신규한 특성을 갖는 세포주에 대하여 MTSC (Mesothelial stem cell)이라는 명칭을 부여하였다.
- [17] 따라서, 본 발명의 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포는 줄기세포의 마커인 CD 44, CD 105, CD 90 및 CD 73가 양성이며, 중간엽 줄기세포에 비하여 CD 45, CD 144, CD 31 및 CD 34의 발현이 증가된 것을 특징으로 한다.
- [18] 본 명세서에서 사용된 용어 줄기세포는, 다양한 신체 조직으로 분화할 수 있는 능력을 갖는 미분화 세포로서, 이는 만능 줄기 세포(totipotent stem cell), 전분화능

줄기세포 (pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류될 수 있다.

- [19] 본 명세서에서 사용된 용어 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 뼈, 연골, 지방, 근육세포를 포함한 여러 가지 중배엽성 세포 또는 신경세포와 같은 외배엽성 세포로도 분화하는 능력을 가진 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)이다. 상기 중간엽 줄기세포는 바람직하게는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막, 용모막, 탈락막, 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 것으로부터 유래될 수 있다. 또한, 상기 중간엽 줄기세포는 인간, 태아 또는 인간을 제외한 포유동물로부터 유래될 수 있다. 상기 인간을 제외한 포유동물은 보다 바람직하게는 개과 동물, 고양이과 동물, 원숭이과 동물, 소, 양, 돼지, 말, 랫트, 마우스 또는 기니피그 등일 수 있으며, 그 유래를 제한하지 않는다.
- [20] 본 발명의 상기 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포는 혈관신생인자 및 줄기세포인자가 발현될 수 있으며, 상기 혈관신생인자는 AAMP (angio-associated migratory protein), bFGF(basic fibroblast growth factor) 또는 ANG-1 (Angiopoietin-2)일 수 있으며, 상기 줄기세포인자는 Sall4 (Sal-like protein), KLF-4(Kruppel-like factor, oct(octamer-binding transcription factor) 또는 Nanog 일 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포는 아폽토시스인자가 발현될 수 있으며, 상기 아폽토시스인자는 TNF-b (Tumor necrosis factor-b), BAX, BCL2 (B-cell lymphoma 또는 P53일 수 있다. 상기 발현은 유전자 또는 단백질의 발현 모두를 포함할 수 있다.
- [21] 본 발명의 상기 줄기세포의 특성은 세포증식능이 향상되거나, 세포이동능이 향상되거나, DNA 보전능 향상된 것일 수 있다.
- [22] 또한, 상기 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포는 한국생명공학연구원에 기탁되었으며, 수탁번호는 KCTC 12404BP 일 수 있다.
- [23] 본 발명의 상기 줄기세포는 상기한 바와 같이, 중간엽 줄기세포를 저산소 분압에서 배양하여 유도할 수 있다. 상기 저산소 분압은 0.1 내지 10 %일 수 있다. 바람직하게는 0.5 % 내지 5 %, 더욱 바람직하게는 1 %일 수 있다.
- [24] 또한, 상기 배양은 별도의 성장인자의 첨가 없이 수행될 수 있다.
- [25]
- [26] 본 발명의 다른 양상은 중간엽줄기세포를 저산소분압 조건에서 배양하는 단계를 포함하는, 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포의 제조 방법을 제공한다.
- [27] 상기 저산소분압은 0.1 내지 10 %일 수 있다. 바람직하게는 0.5 % 내지 5 %, 더욱 바람직하게는 1 %일 수 있다.
- [28] 또한, 상기 배양은 기타의 성장인자의 처리 없이 수행될 수 있다.
- [29]
- [30] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 줄기세포 또는 이의 배양액을 포함하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [31] 상기 줄기세포는 내피세포 및 줄기세포의 특성을 모두 가지며, 높은 세포 증식률, 세포 이동능 및 DNA 보전능을 갖는바, 허혈성 질환에서 활발한 신생혈관 형성능을 나타내므로, 허혈성 질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.
- [32] 상기 허혈성 질환은 허혈성 심장질환, 심근경색, 협심증, 하지동맥 허혈성 질환, 사지말단부 허혈성 질환, 허혈성 신경증, 허혈성 폐질환, 허혈성 대장염, 허혈성 심부전, 폐색성 동맥경화증 또는 허혈성 뇌혈관 질환일 수 있으며, 상기 허혈성 뇌질환은 예를 들면, 혈전증, 색전증, 일과성 허혈발작, 뇌경색, 뇌출혈, 뇌졸중, 지주막하 출혈, 백질 이상증 또는 소경색 일 수 있다.
- [33] 상기 조성물이 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 제조되는 경우, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [34]
- [35] 상기 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [36] 상기 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 상기 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 100-100,000,000 (10^2 - 10^8) cell/kg 범위 내이다. 용어 "약학적 유효량"은 암을 예방 또는 치료하는 데, 또는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [37] 상기 조성물은 당해 당업자가 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. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제

또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 단회 또는 필요시 추가 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [38] 본 발명에 따른 줄기세포는 내피세포 및 줄기세포의 특성을 모두 가지며, 높은 세포 증식률, 세포 이동능 및 DNA 보존능을 갖는바, 허혈성 질환에서 활발한 신생혈관 형성능을 나타내므로, 허혈성 질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [39] 도 1은 정상산소분압 (Normoxia)에서 배양된 MSC 및 저산소분압 (Hypoxia)에서 배양된 MTSC의 세포 증식능을 계대 횡수별로 나타낸 도이다.
- [40] 도 2는 계대수 6의 정상산소분압 (Normoxia)에서 배양된 MSC 및 저산소분압 (Hypoxia)에서 배양된 MTSC의 세포 증식능을 비교한 도이다.
- [41] 도 3은 계대수 4에서의 정상산소분압 (Normoxia)에서 배양된 MSC 및 저산소분압 (Hypoxia)에서 배양된 MTSC의 형태학적 특징을 나타낸 도이다.
- [42] 도 4는 정상산소분압 (Normoxia)에서 배양된 MSC 및 저산소분압 (Hypoxia)에서 배양된 MTSC의 세포 이동능을 관찰한 도이다.
- [43] 도 5는 정상산소분압 (Normoxia)에서 배양된 MSC 및 저산소분압 (Hypoxia)에서 배양된 MTSC의 세포 이동능을 비교한 도이다.
- [44] 도 6은 정상산소분압 (Normoxia)에서 배양된 MSC 및 저산소분압 (Hypoxia)에서 배양된 MTSC의 유전자 발현양을 비교한 도이다.
- [45] 도 7은 정상산소분압 (Normoxia)에서 배양된 MSC 및 저산소분압 (Hypoxia)에서 배양된 MTSC의 DNA 손상을 비교한 도이다.
- [46] 도 8은 하지허혈 동물모델에서 MSC와 MTSC의 혈관신생능력을 확인한 도이다.
- [47] 도 9는 하지허혈 동물모델에서 MSC와 MTSC의 혈관신생능력을 면역조직화학법을 이용하여 관찰한 도이다.
- [48] 도 10은 하지허혈 동물모델에서 MSC와 MTSC의 유전자 발현 양상을 비교한 도이다.
- [49] 도 11은 저산소분압 (Hypoxia) (1%)에서 배양된 MTSC에서 내피 세포의 표면 단백질인 CD31 이 발현됨을 확인하고, normoxia (20%)에서 배양된 MSC에서는 발현되지 않음을 확인한 도이다.
- [50] 도 12는 저산소분압 (Hypoxia) (1%)에서 배양된 MTSC 에서 세포 성장 및 허혈 치료에 영향을 미치는 VEGF의 발현이 높음을 확인한 도이다.
- [51] 도 13은 분화 실험 결과 MTSC는 MSC에 비해 지방세포로의 분화는 억제 되었으나, 골세포로의 분화는 증진됨을 확인한 도이다.

[52]

발명의 실시를 위한 형태

[53]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[54]

[55]

실시예1: 중간엽 줄기세포 (Mesenchymal stem cell, MSC) 및 MTSC (Mesentelial stem cell) 의 배양

[56]

2.5X10⁵의 hUCB-MSC2 (human Umbilical Cord blood derived-MSC 2) (PromoCell (미국)에서 구입: order number : C12972, Lot Number : 1080102.3)를 100 cm²의 페트리 디쉬에 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)/ 10% 소태아혈청, 100 U/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신이 추가된 저 글루코오스를 포함하는 페트리 디쉬에 도말하였다.

[57]

MTSC는 저산소분압 (hypoxia) 조건 (1, 5 또는 10 %의 산소분압, 특히 1%의 산소분압과 5 %의 CO₂)하에서 MSC를 배양하여 수득하였다. 배양은 저 글루코오스/ 10% 소태아혈청, 100 U/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신이신을 포함하는 저 글루코오스 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 에서 배양하였다. 80 %의 밀집도에서, 각 조건하의 세포를 0.25 %의 트립신을 이용하여 수확하고, 상기 배지에 2,000 세포/cm²로 재도말하였다.

[58]

또한, 상기 MTSC를 KRIBB (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)에 2013.05.02 일자로, 수탁번호 KCTC 12404BP로서 기탁하였다.

[59]

[60]

실시예 2: MTSC (Mesentelial stem cell)의 증식 특성의 확인

[61]

정상 산소 분압 조건 하에서 배양된 MSC와 저산소분압 조건하에서 배양된 MTSC를 4 내지 9 계대배양한 세포에 대한 세포 증식능을 생세포밀도 (viable cell density) (cells/cm²)를 이용하여 분석하였다.

[62]

저산소분압 (Hypoxia)의 조건은 실시예 1과 같으며, 정상 산소 분압 (Normoxia)의 조건은 hUCB-MSC2 (human Umbilical Cord blood derived-MSC 2)를 100 cm²의 페트리 디쉬에 2.0X10⁵세포/플레이트의 농도로 배양기간(Day-1,3,5,7)별로 5 플레이트씩 도말하였다. 정상산소분압 및 저산소분압에서 각각 배양하고 배양기간별로 0.25 %의 트립신을 이용하여 세포를 페트리디쉬에서 분리하여 혈구계수기 (Hemocytometer)를 이용하여 세포수를 3회 반복 계수하여 평균 세포수를 확인한다.

[63]

그 결과를 도 1 및 하기의 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[64]

[65]

표 1

[Table 1]

Normoxia	Day-1	Day-3	Day-5	Day-7
P-4 Normoxia	2143	4762	22321	45015
P-5 Normoxia	2143	7478	21429	43713
P-6 Normoxia	1548	2679	7440	13021
P-7 Normoxia	2500	3333	10789	26972
P-8 Normoxia	1964	5536	15253	34877
P-9 Normoxia	670	982	2500	7440

[66]

[67] 표 2

[Table 2]

Hypoxia	Day-1	Day-3	Day-5	Day-7
P-4 Hypoxia	2619	7738	39435	55432
P-5 Hypoxia	2679	12277	68750	109003
P-6 Hypoxia	3571	7321	19940	89286
P-7 Hypoxia	4464	12024	38318	54315
P-8 Hypoxia	3571	8304	31994	46503
P-9 Hypoxia	2098	4196	14167	54613

[68]

[69] 도 1, 표 1과 표 2에서 나타난 바와 같이, MSC를 저산소분압에서 배양한 MTSC의 경우, 계대 횟수와 관계없이, MSC보다 높은 세포 증식능을 나타내는 것을 알수 있다.

[70] 6 계대 (6 passage)에서의 MSC 및 MTSC의 세포 증식률을 구체적으로 비교한 결과를 도 2 및 하기의 표 3에 나타내었으며, p 값을 표 4에 나타내었다.

[71]

[72] 표 3

[Table 3]

	Day-1	Day-3	Day-5	Day-7
Normoxia	1548	2679	7440	13020
Hypoxia	3571	7321	19940	89285

[73]

[74] 표 4

[Table 4]

P value	Day 1-3	Day 1-5	Day 1-7	Day 3-5	Day 3-7	Day 5-7
Normoxia	0.0044	0.000051	0.00074	0.00014	0.001	0.011
Hypoxia	0.000811	0.00023	0.0000027	0.00072	0.0000034	0.0000114
	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7		
passage별	0.00105	0.000282	0.000716	0.0000074		

[75]

[76] 도 2, 표 3 및 4에 나타난 바와 같이, 6 계대에서의 MTSC의 세포 증식률은 MSC의 세포증식률보다 유의적으로 높음을 알 수 있다.

[77]

[78] 또한, MSC 및 MTSC의 4 계대에서의 세포형태를 OLYMPUS-CKX41 현미경을 이용하여 관찰하고, Lumenera corporation INFINITY ANALYZE 프로그램을 이용하여 이미지를 촬영하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[79]

도 3에 나타난 바와 같이, 저산소분압에서 배양된 MTSC의 경우, 줄기세포의 특징을 더 명확히 나타내었다.

[80]

[81] 실시예 3: MTSC의 이동 (migration) 특성의 확인

[82]

정상 산소분압 (Normoxia)의 MSC와 저산소분압 (Hypoxia)의 MTSC 세포의 이동능 (migration)을 μ -디쉬 35mm, 고 배양-삽입 (high culture-insert)을 이용하여 이동한 구역을 분석함으로써 확인하였다.

[83]

구체적으로, 각 μ -디쉬 35 mm에 정상 산소분압 (Normoxia)의 MSC와 저산소분압 (Hypoxia)의 MTSC 배양액을 각 웰당 3×10^4 세포/70 μ l를 시딩 (seeding)하고, 37 °C에서 24시간 동안 배양한 후, 배양 삽입 (culture-insert)을 제거하였으며, 10% DMEM 2ml를 첨가한 후, 현미경으로 촬영하였다 (n=3). 그 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[84]

도 4에 나타난 바와 같이, 저산소분압에서의 MTSC가 정상산소분압에서의 MSC에 비하여 유의적으로 높은 세포 이동능을 나타내었다.

[85]

도 5는 세포의 이동능 (migration)을 분석한 사진으로, 도 5에 나타난 바와 같이, 배양 삽입 (culture-insert)을 제거한 공간에, 일정시간이 경과한 후 세포가 없는 빈공간을 계산하여 정상산소분압과 저산소분압에서 배양한 세포의 세포 이동능을 비교한 결과, 저산소분압 환경 배양세포가 높은 이동능을 보이는 것을 확인하였다.

[86]

[87] 실시예 4: MTSC의 유전자 발현 특성의 확인

[88]

MSC와 MTSC의 RNA를 추출하였다. 줄기세포성 (stemness) 마커인 Sall4 (Sal-like protein 4)

,KLF-4(Kruppel-likefactor4),OCT-4(octamer-bindingtranscriptionfactor4)Nanog및 HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1)와, 혈관 신생 마커인 AAMP (angio-associated migratory cell protein), bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 ANG-1 (Angiopoietin-1) 및 아폽토시스 마커 TNF- β (Tumor necrosis factor- β), BAX (Bcl 2-associated X protein), BCL2 (B-cell lymphoma 2 및 P53 (protein 53 또는 tumor protein 53)를 이용하여 qRT-PCR를 수행하였다.

[89] 구체적으로는, 정상산소분압과 저산소분압에서 배양한 세포에서 mRNA를 추출 후 cDNA로 변환, qRT-PCR을 진행하였다. qRT-PCR 방법은 다음과 같다. 각 근조직에 분리한 mRNA에서 변형된 cDNA 40ng/ul, 프라이머 10ng, SYBR Green 을 넣어 qRT-PCR 기계를 이용하여 95도에서 10초 동안 1 사이클, 95도에서 5초에서 및 60도에서 34초 동안 40사이클, 및 95도에서 15초동안, 60도에서 60초 동안 및 95도에서 15초동안 1 사이클을 돌려서 증폭시키고 발현양을 확인하였으며, 이 결과를 정상산소분압에서 배양한 MSC와 비교하였으며, 이를 도 6에 나타내었다.

[90] 도 6에 나타난 바와 같이, 정상산소분압 대비 저산소분압에서 배양된 세포에서 AAMP, bFGF, ANG-1 과 같은 혈관형성인자의 발현이 각각 1.02배, 2.04배, 2.66배 높으며, TNF-b, BAX, BCL2, P53 과 같은 아폽토시스인자 유전자 발현양도 높아 안전성이 높음을 확인하였다. 또한 Sall4, KLF-4, Oct, Nanog 의 발현양이 높아 줄기세포성이 높음을 확인하였다. HIF-1 의 발현양 확인으로 hypoxia 에서 배양된 세포에서 HIF-1의 발현양이 증가함을 확인하였다. HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1)는 저산소 환경에서 발현하는 전사 인자로서, 저산소분압 (hypoxia)으로 유도된 세포에서 높게 발현된 것은, 이 세포가 저산소분압 (hypoxic) 상태에서 배양되었다는 증거이며, HIF-1이 활성화 되면 신생혈관생성이 활성화 된다.

[91]

[92] 실시예 7: MTSC의 DNA 보전능의 확인

[93] 정상산소분압에서의 MSC와 저산소분압에서의 MTSC의 DNA 보전능을 p-H2AX (S139)를 이용하여 확인하였다. 상기 두 세포에서 DNA를 분리하여 PCR (Polymerase Chain Reaction) 을 통해 발현 여부를 확인하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다. α p-H2AX은 DNA의 보전능을 보는 주요 지표에 해당하며, 유전적 안정성 마커인 α p-H2AX (S139)가 유발되는 것은 유전적으로 안정하지 못함을 의미한다.

[94] 도 7에 나타난 바와 같이, 정상산소분압에서는 세포의 계대가 진행할수록 α p-H2AX (S139)발현을 확인할 수 있었으며 이는 세포의 안정성이 저하됨을 의미한다. 반면, 저산소분압의 세포에서는 계대 횟수가 증가하여도 α p-H2AX (S139)가 안정적으로 유지되는바, 계대 횟수가 증가함에도 불구하고 DNA의 손상이 확인되지 않았음을 의미하며, 이에, MSC에 비하여 높은 유전적 안정성을 확인할 수 있었다.

[95]

[96] 실시예 6: MTSC의 마커 발현의 확인

[97] 세포 특성을 확인하기 위하여 유세포 분석을 수행하였다. CD45, CD73, CD44, CD105, CD90, CD31, CD34 및 CD144에 대한 항체로 세포 표면을 표시하였다. 구체적으로 MSC와 MTSC를 배양하여 분리한 후, CD45, CD73, CD44, CD105, CD90, CD31, CD34 및 CD144를 각세포의 표면에 부착시켜, 유세포 분석기 (FACS: Fluorescence-activated cell sorting)를 이용하여 분석하였다.

[98] 확인된 마커의 발현 양상을 하기의 표 5에 나타내었다.

[99]

[100] 표 5

[Table 5]

마커	MSC	MTSC
CD 44	99.96%	99.93%
CD 105	99.94%	99.97%
CD 90	99.98%	99.94%
CD 73	97.69%	99.94%
CD 45	0.09%	27.58%
CD 144	1.19%	26.42%
CD 31	0.26%	20.95%
CD 34	1.33%	39.93%

[101]

[102] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, MSC보다 MTSC는 줄기세포 마커인 CD44, CD105, CD90 및 CD73에 대하여 양성이고, 내피세포 (endothelial cell) 마커인 CD144, CD31, CD34에 대해서도, MSC보다 양성 비율이 높음을 확인할 수 있었다. 또한 CD45에도 양성 비율이 높음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 실험결과를 종합하여 보면, 저산소 분압에서 배양된 MTSC는 종래 MSC의 세포 특성과는 다르게, 줄기세포성을 유지하면서 내피세포로서의 특성을 함께 포함하며, 세포 증식능, 세포 이동능, 및 DNA 보존능이 MSC에 비하여 증가된 특성을 포함하는 신규한 줄기세포주인 것을 확인하였다.

[103]

[104] 실시예 6: 하지허혈 마우스 모델에서의 MTSC (Mesentherial stem cell)의 특성 확인

[105] (1) 하지허혈 마우스에서의 모세 혈관의 관찰

[106] 3 내지 6 세대수의 1×10^6 개의 MSC 및 MTSC 세포를 $60 \mu\text{l}$ 의 생리식염수에 부유시켜 마우스의 허혈성 하지에 주입하였다. 마우스는

(주)오리엔트바이오에서 구입하였으며, 계통은 Balb-C/nude 6주령을 사용하여 하지허혈 모델을 유도하였다. 하지허혈 모델 유도 방법은, 마우스의 하지 대퇴동맥을 묶고, 자르는 방법을 사용하였다. 두 세포는 하지허혈 유도 후 바로 하지 대퇴 근육 (대퇴동맥 결찰 부위)에 근육 주사로 이식하였다. 세포를 주입한 후 4주 후, 하지근을 수확하고, 혈관신생 효과를 확인하였다.

[107] 모세혈관 계수 (capillary count)의 확인 결과를 도 8에 나타내었다.

[108] 도 8에 나타난 바와 같이, MTSC가 이식된 군이 허혈성 모델 및 MSC가 이식된 군에 비하여 유의적으로 높은 신생혈관 생성능력을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[109]

[110] 또한, MTSC의 신생혈관 생성능력은 면역조직화학 (immunohistochemistry, IHC)을 통하여 확인하였다. 구체적으로는 수확된 하지근육 조직을 파라핀블록으로 만든 후, 4 μ m로 섹션하여 슬라이드에 올려 굳혔다. 그 슬라이드는 혈관내피세포에 특이적으로 결합하는 CD31 또는 vWF 마커를 붙여 근 조직내의 계수를 확인하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[111] 도 9에 나타난 바와 같이, MTSC가 이식된 군이 허혈성 모델 및 MSC가 이식된 군에 비하여 유의적으로 높은 신생혈관 생성능력을 나타낸다는 것을 육안으로 확인할 수 있었다.

[112]

[113] (2) 하지허혈 마우스에서의 유전자 발현의 확인

[114] 하지허혈 마우스 모델에서 MSC와 MTSC를 주입한 후 유전자 발현 양상을 qRT-PCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction) 을 이용하여 확인하였다. 구체적으로는, 세포 치료 4주 후 수확한 근 조직에서 mRNA를 분리하여, CD31, Ang-1 그리고 PIGF의 프라이머 (primer)와 섞어 qRT-PCR을 시행하였다. 시험 방법은 다음과 같다. 각 근조직에 분리한 mRNA에서 변형된 cDNA 40ng/ul, primer 10ng, SYBR Green 을 넣어 qRT-PCR 기계를 이용하여 95도에서 10초 동안 1 사이클, 95도에서 5초 동안 및 60도에서 34초동안 40사이클, 및 95도에서 15초 동안, 60도에서 60초 동안, 및 95도에서 15초 동안 1 사이클을 돌려서 증폭시키고 발현량을 확인하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[115] 도 10에 나타난 바와 같이, CD31, ANG-1, PIGF, AAMP 및 PFG와 같은 혈관 형성인자의 발현량이 MSC 처리군에 비하여 MTSC 처리군에서 월등히 높음을 확인하였다.

[116]

[117] **실시예 7: MTSC (Mesentherial stem cell)에서의 내피세포 마커인 CD31의 발현을 확인**

[118] 저산소분압 (1%)에서 배양된 MTSC (Mesentherial stem cell)에서의 내피 세포의 표면 단백질인 CD31이 발현되는 지 확인하기 위하여 하기의 방법으로 실험을 실시하였다.

- [119] 1.2 x 10⁴/well세포를 seeding 하여 정상산소 분압(20%) 과 저산소 분압(1%) 에서 각각 4일동안 배양. 4일 후 PBS로 배지를 씻어 내고 4% formalin 으로 10분 동안 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 씻고, Triton X-100 이 포함된 PBS로 세포의 membrane을 파괴하였다. 1% BSA 로 30분동안 blocking 한 후, Texas-Red 가 붙은 CD31 안티바디를 붙여 1시간 동안 방취 후 PBS로 씻어내고 DAPI를 붙여 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.
- [120] 도 11에 나타난 바와 같이, 저산소분압 (1%)에서 배양된 MTSC (Mesenthelial stem cell)에서는 내피 세포의 마커로 이용되는 CD31가 발현됨이 확인되지만, 정상산소분압 (20%)에서 배양된 MSC는 CD31의 발현이 전혀 확인되지 않았다.
- [121]
- [122] 실시예 8: MTSC (Mesenthelial stem cell)에서의 VEGF의 발현 정도 확인
- [123] 저산소분압 (1%)에서 배양된 MTSC (Mesenthelial stem cell)에서의 세포 성장 및 허혈 치료에 영향을 미치는 VEGF이 고발현되는지 확인하기 위하여 하기의 방법으로 실험을 실시하였다.
- [124] 1.2 x 10⁴/well세포를 seeding 하여 정상산소 분압(20%) 과 저산소 분압(1%) 에서 각각 4일동안 배양하였다. 4일 후 PBS로 배지를 씻어 내고 4% formalin 으로 10분 동안 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 씻고, Triton X-100 이 포함된 PBS로 세포의 membrane을 파괴하였다. 1% BSA 로 30분동안 blocking 한 후, Texas-Red 가 붙은 VEGF 안티바디를 붙여 1시간 동안 방취 후 PBS로 씻어내고 DAPI를 붙여 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.
- [125] 도 12에 나타난 바와 같이, 저산소분압 (1%)에서 배양된 MTSC (Mesenthelial stem cell)에서는 VEGF가 풍부하게 발현됨이 확인되지만, 정상산소분압 (20%)에서 배양된 MSC는 VEGF이 매우 적은양으로 발현되는 것을 확인하였다.
- [126]
- [127] 실시예 9: MTSC (Mesenthelial stem cell)의 분화특성 확인
- [128] 저산소분압 (1%)에서 배양된 MTSC (Mesenthelial stem cell)과 정상산소분압 (20%)에서 배양된 MSC의 분화능을 비교하기 위하여 하기의 방법으로 실험을 실시하였다.
- [129] 2 x 10⁴/well세포를 seeding 한 후 정상산소 분압(20%) 과 저산소 분압(1%) 에서 각각 4일간 배양 한 후, 4일째 Adipogenesis differentiation medium (StemPro Adipogenesis Differentiation Kit-Gibco) 과 Osteogenesis differentiation medium (StemPo Osteogenesis Differentiation Kit-GIBO) 를 이용하여 각 산소 분압에서 분화 유도하였다.
- [130] 분화 유도 후 adipogenesis는 14일째, Osteogenesis는 21일째 염색하였다. 염색은 하기와 같이 진행하였다.
- [131] Adipogenesis 염색의 경우, 배지를 제거 한 후 PBS로 씻어 주고 10% formalin으로 30분간 세포를 고정하였다. 60% isopropanol을 5분간 처리 후 Oil Red O를 넣어 5분간 정치하였다. Oil Red O를 씻어 내고 Hematoxylin으로 카운트

스테이닝 하여 현미경으로 관찰하였다.

[132] Osteogenesis 염색의 경우, 배지를 제거 한 후 PBS로 씻어 주고 10% formalin으로 30분간 세포를 고정하고 2% Alzarin Red S를 5분간 처리 후 씻어 내고 현미경으로 관찰하였다.

[133] 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[134] 도 13에 나타난 바와 같이, 저산소분압 (1%)에서 배양된 MTSC (Mesenthelial stem cell)에서는 정상산소분압 (20%)에서 배양된 MSC 보다 지방세포로의 분화는 억제되나, 골세포로의 분화는 증가됨을 확인하였다.

[135]

국 제 양 식

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명
국제기탁기관에 의해 규정 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수탁: 김동익
삼성의료원
대한민국 135-719, 서울특별시 강남구 일원로 81

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: Mesenthelial stem cell C2-1	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 12404BP
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☒ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 ☒ 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2013년 5월 2일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: Korean Collection for Type Cultures 주소: 한국생명공학연구원(KRIIB) 대한민국 305-806 대전광역시 유성구 과학로 123	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 배 경 숙 서명일: 2013.05.06

BP/4 형식(KCTC Form 17)

단일 페이지

(원문과 상위 없음을 확인함) 대리인 : 변리사 김 순 응



청구범위

- [청구항 1] 중간엽 줄기세포 (Mesenchymal stem cell)로부터 유래된, 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 CD 44⁺, CD 105⁺, CD 90⁺ 및 CD 73⁺이며; 중간엽 줄기세포에 비하여 CD 45, CD 144, CD 31 및 CD 34의 발현이 증가된 것을 특징으로 하는, 줄기세포.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 혈관신생인자 및 줄기세포인자가 발현되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 혈관신생인자는 AAMP (angio-associated migratory protein), bFGF(basic fibroblast growth factor) 및 ANG-1 (Angiopoietin-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포.
- [청구항 5] 청구항 3에 있어서, 상기 줄기세포인자는 Sall4 (Sal-like protein 4), KLF-4 (Kruppel-like factor 4), OCT-4(octamer-bindingtranscriptionfactor-4), 및 Nanog로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 아폽토시스인자가 발현되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 아폽토시스인자는 TNF-b (Tumor necrosis factor-b), BAX (Bcl 2-associated X protein), BCL2 (B-cell lymphoma 및 P53 (protein 53)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 줄기세포.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 세포증식능의 향상, 세포이동능의 향상 및 DNA 보전능 향상으로부터 선택되는 특징을 갖는 것인, 줄기세포.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포를 저산소분압에서 배양하여 유도된 것인, 줄기세포.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 저산소분압은 0.1 내지 10 %인 것을 특징으로 하는, 줄기세포.
- [청구항 11] 청구항 1에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막, 융모막, 탈락막, 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 것으로부터 유래된 것인, 줄기세포.
- [청구항 12] 청구항 1에 있어서, 상기 줄기세포는 수탁번호 KCTC 12404BP인 것인 줄기세포.
- [청구항 13] 중간엽줄기세포를 저산소분압 조건에서 배양하는 단계를 포함하는, 내피세포의 특성을 포함하는 줄기세포의 제조 방법.
- [청구항 14] 청구항 13에 있어서, 상기 저산소분압은 1 내지 10 %인 것인,

줄기세포의 제조 방법.

[청구항 15]

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항의 줄기세포 또는 이의 배양액을 포함하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

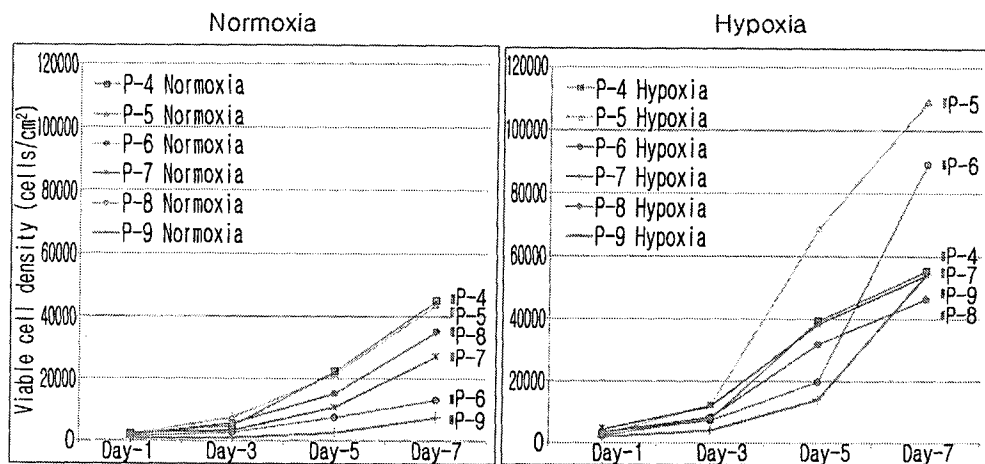
[청구항 16]

청구항 15에 있어서, 상기 허혈성 질환은 허혈성 심장질환, 심근경색, 협심증, 하지동맥 허혈성 질환, 사지말단부 허혈성 질환, 허혈성 신경증, 허혈성 폐질환, 허혈성 대장염, 허혈성 심부전, 폐색성 동맥경화증 및 허혈성 뇌혈관 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

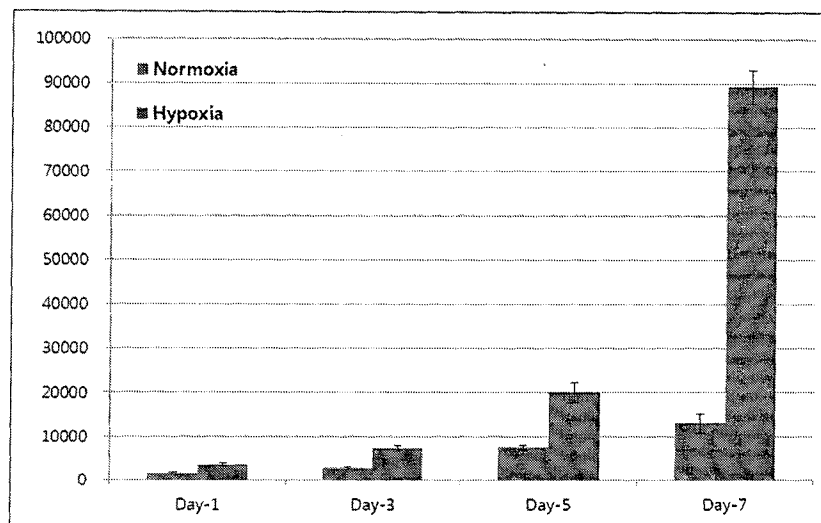
[청구항 17]

청구항 16에 있어서, 상기 허혈성 뇌질환은 혈전증, 색전증, 일과성 허혈발작, 뇌경색, 뇌출혈, 뇌졸중, 지주막하 출혈, 백질 이상증 및 소경색으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

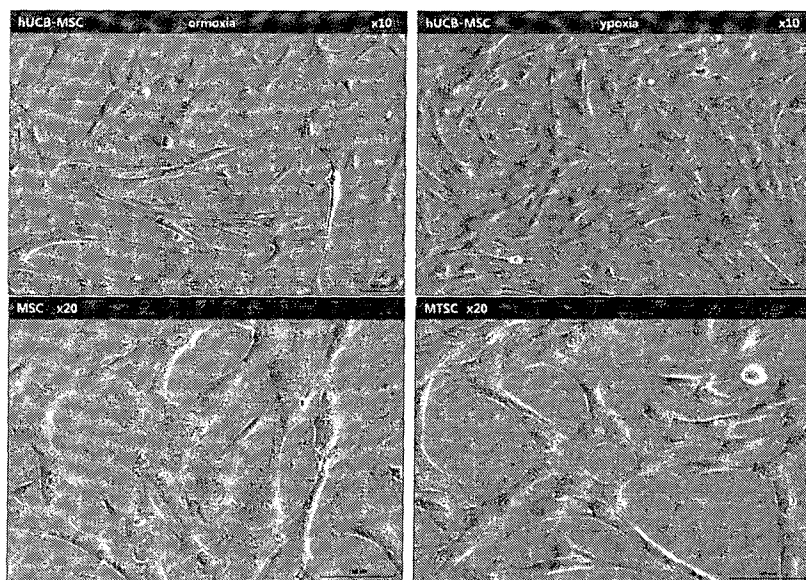
[Fig. 1]



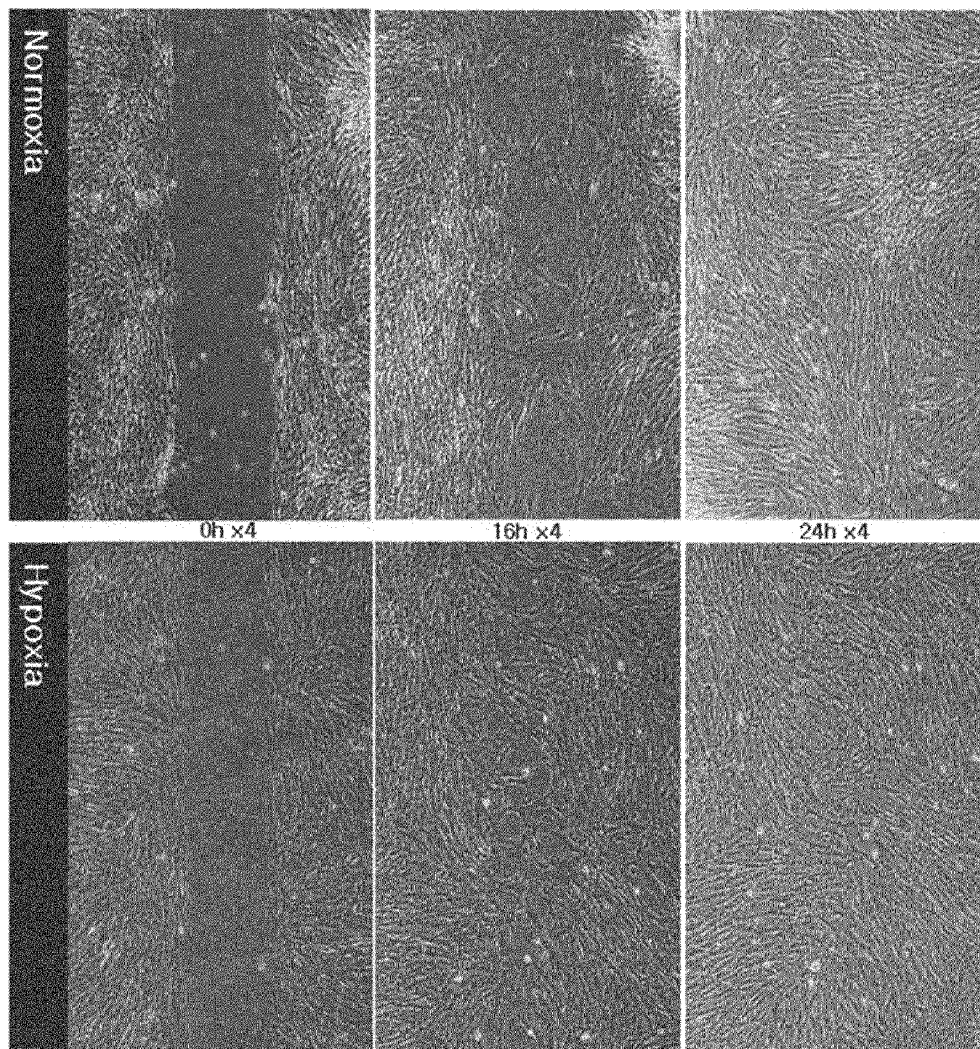
[Fig. 2]



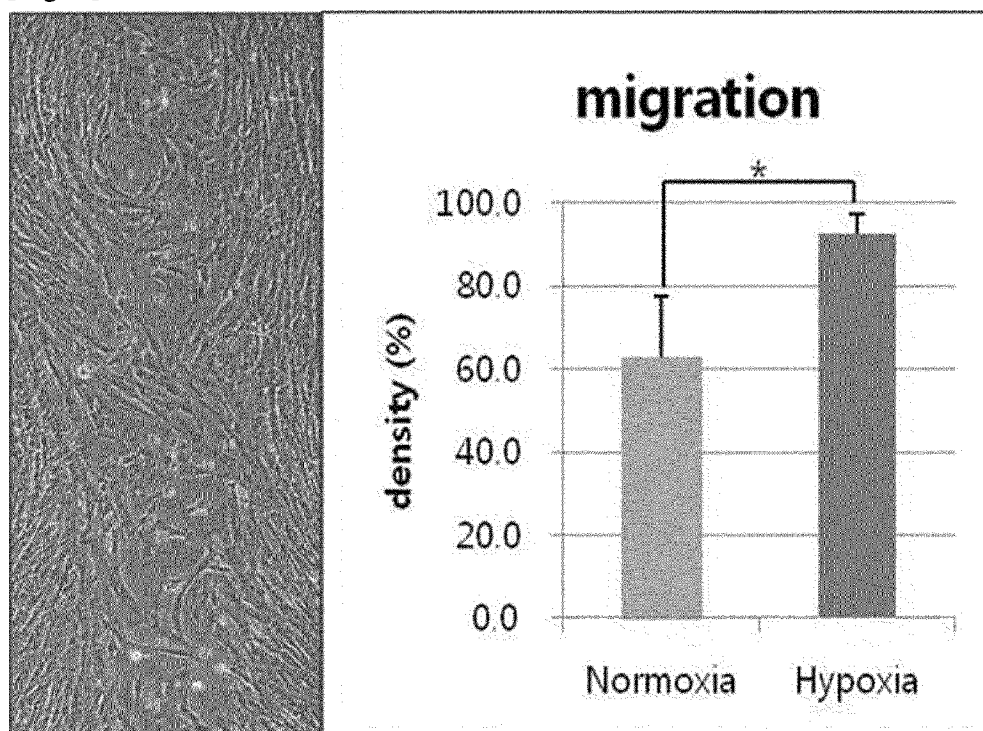
[Fig. 3]



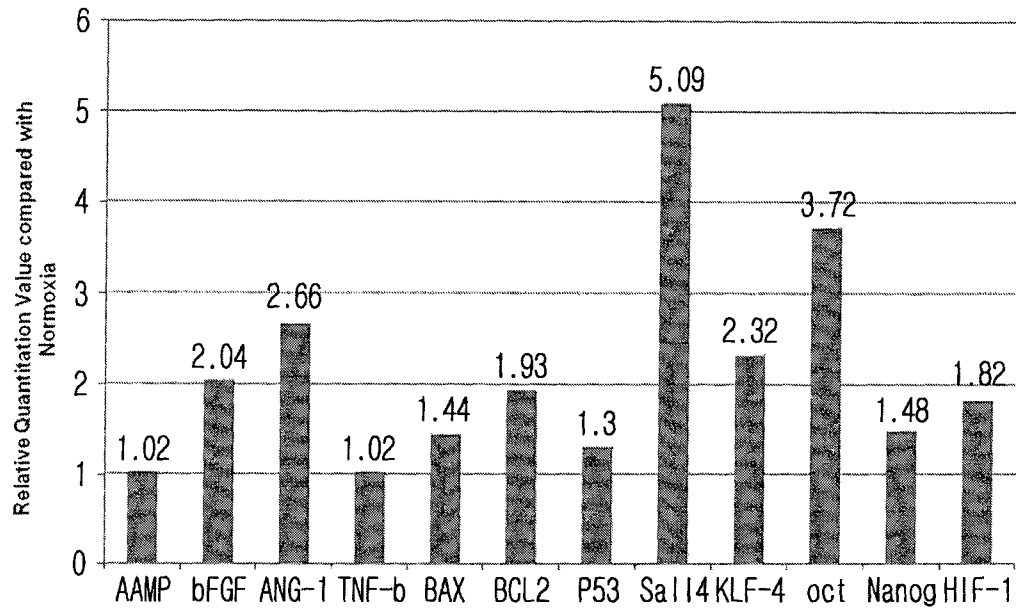
[Fig. 4]



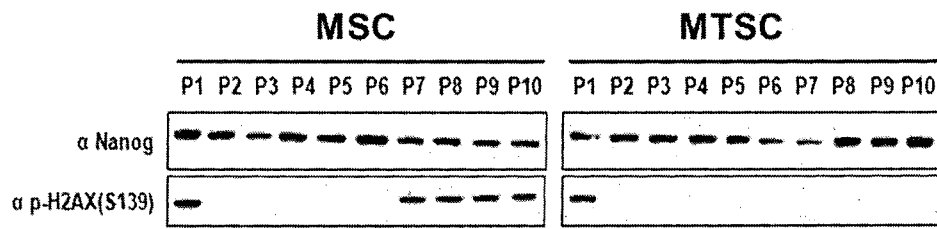
[Fig. 5]



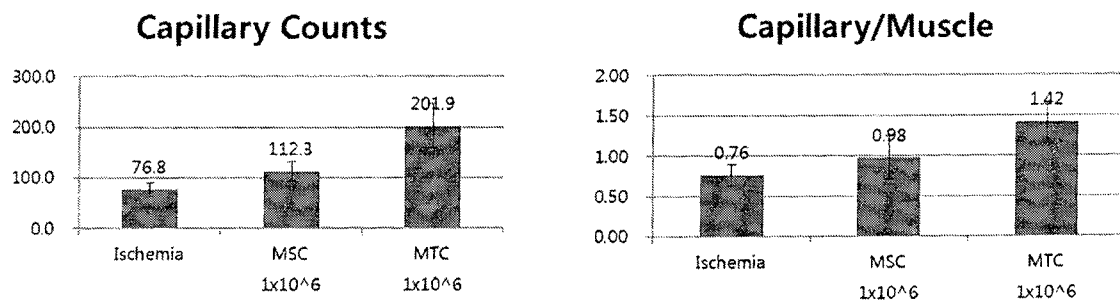
[Fig. 6]



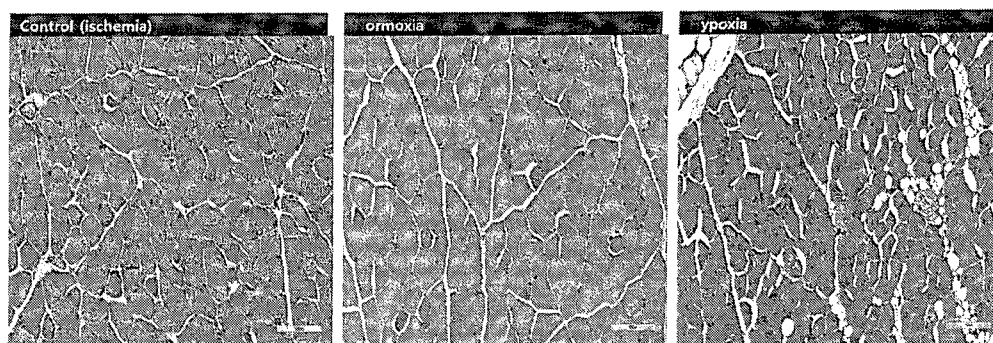
[Fig. 7]



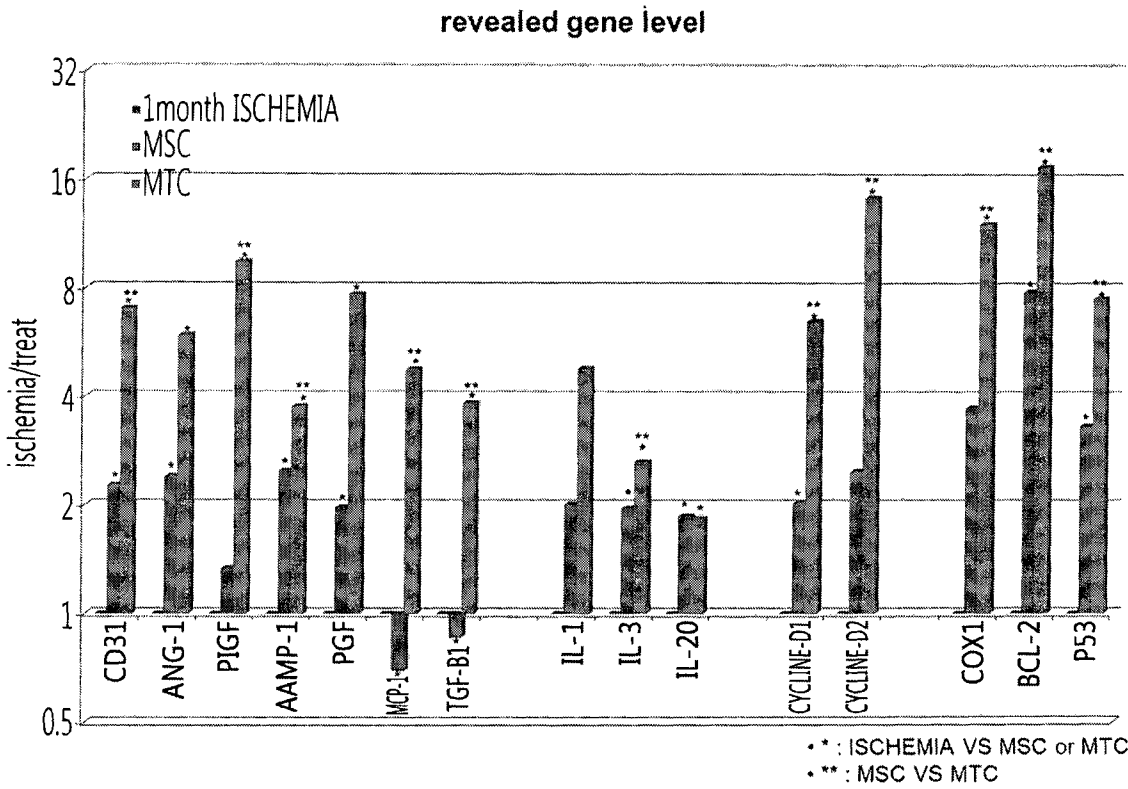
[Fig. 8]



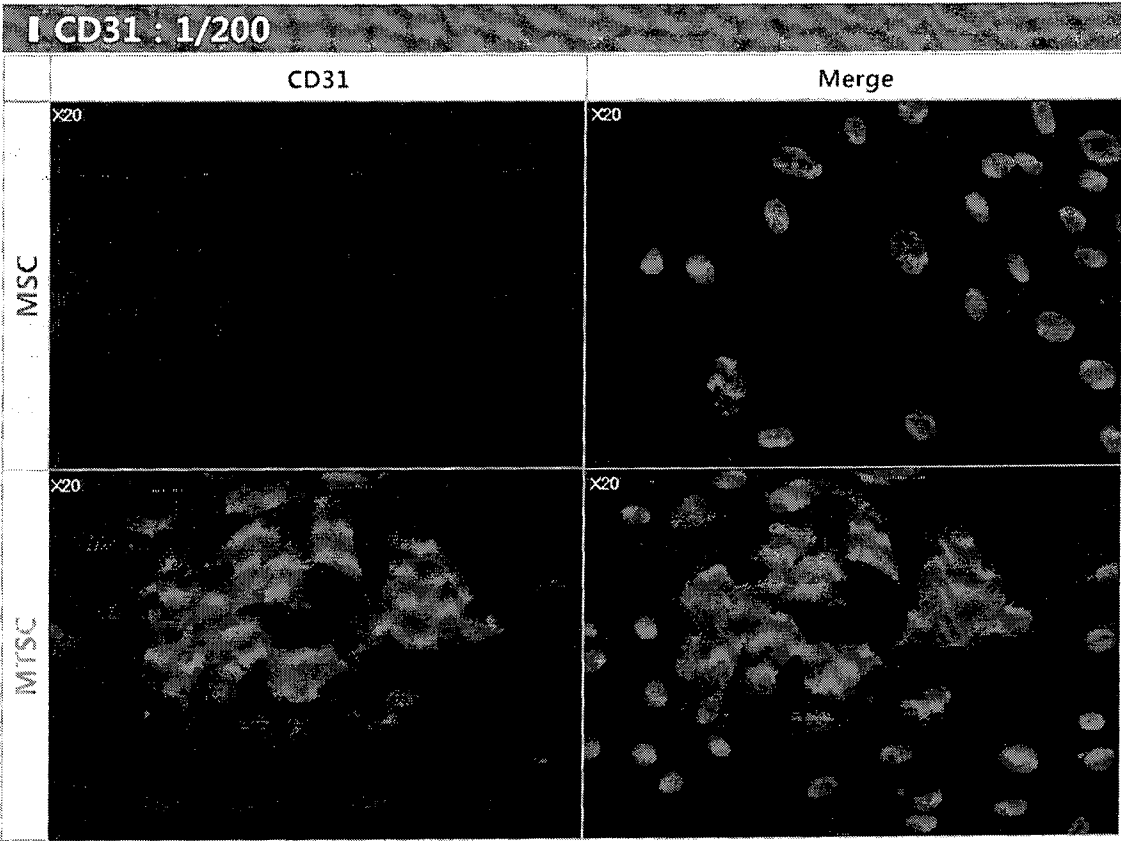
[Fig. 9]



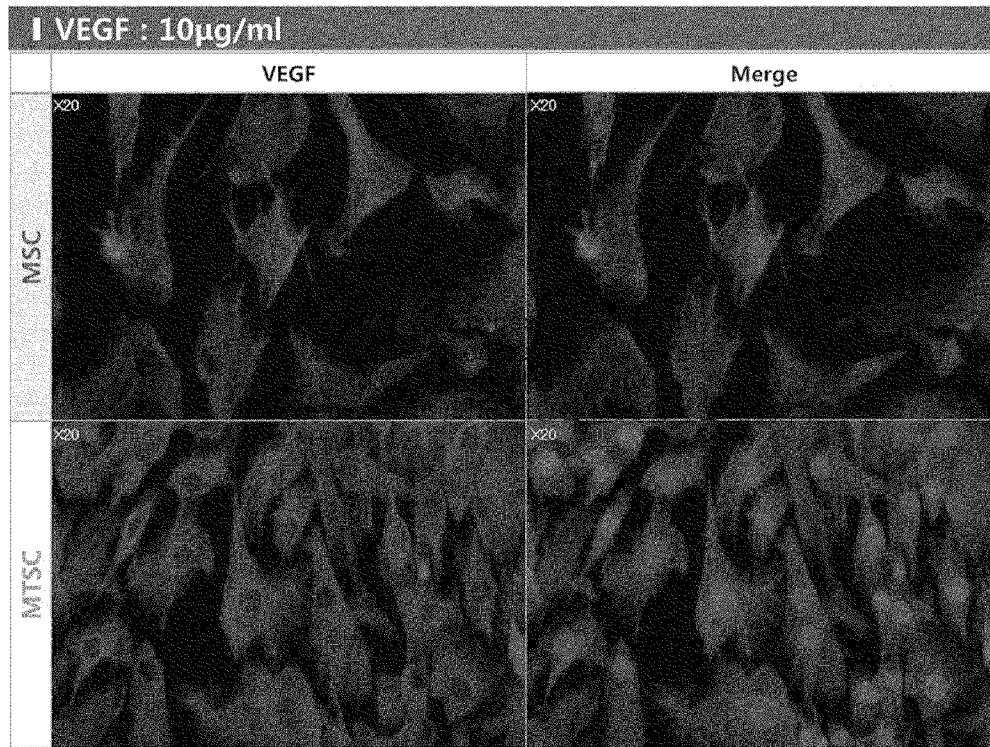
[Fig. 10]



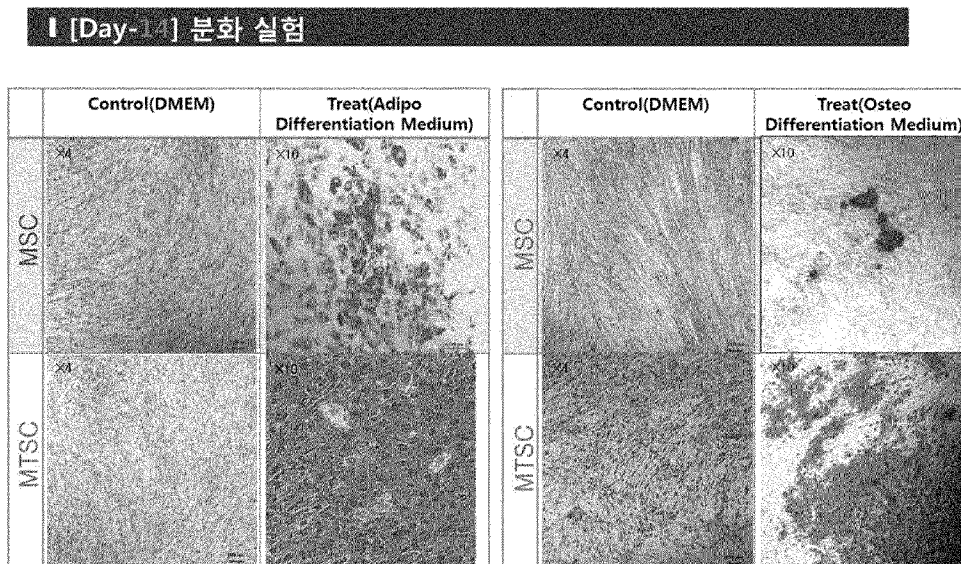
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0775(2010.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, C12N 5/02(2006.01)i, A61K 35/12(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 5/0775; C12N 5/074; C12N 5/02; A61K 35/12

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: mesenchymal stem cells, endothelial cell, low-oxygen condition, CD45, CD144, CD34

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WAGEY, R. et al., "Low oxygen culture condition accelerates cell expansion of mouse mesenchymal progenitors", MSC Conference 2007, Poster No. 223, (17 March 2008 published on online) See abstract; tables 1, 3	1-11,13,14
Y		15-17
A		12
Y	ROSOVA, I. et al., "Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells", Stem Cells, 2008, vol. 26, pp. 2173-2182 (29 May 2008 published on online) See abstract; pages 2178, 2180	15-17
A		1-14
Y	LIAO, W. et al., "Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke", Transplantation, 2009, vol. 87, no. 3, pp. 350-359 (15 February 2009) See abstract; pages 356, 358	15-17
A		1-14



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

28 AUGUST 2014 (28.08.2014)

Date of mailing of the international search report

29 AUGUST 2014 (29.08.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005634

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAVRENTIEVA, A. et al., "Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells", Cell Communication and Signaling, 2010, vol. 8, no. 18, pp. 1-9 (16 July 2010) See abstract; pages 2, 5; figures 3, 4	1-17
A	ESTRADA, JC. et al., "Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis", Cell Death and Differentiation, 2012, vol. 19, no. 5, pp. 743-755 (02 December 2011 published on online) See abstract; page 743	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005634

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/0775(2010.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, C12N 5/02(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/0775; C12N 5/074; C12N 5/02; A61K 35/12 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: 중간엽줄기세포, 내피세포, 저산소 조건, CD45, CD144, CD34		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WAGEY, R. et al., 'Low oxygen culture condition accelerates cell expansion of mouse mesenchymal progenitors', MSC Conference 2007, Poster No.223, (2008.3.17. 온라인 공개) 초록; Table 1, 3 참조	1-11, 13, 14
Y		15-17
A		12
Y	ROSOVA, I. et al., 'Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells', Stem Cells, 2008, vol.26, pp.2173-2182 (2008.5.29. 온라인 공개) 초록; 2178, 2180면 참조	15-17
A		1-14
Y	LIAO, W. et al., 'Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke', Transplantation, 2009, vol.87, no.3, pp.350-359 (2009.2.15.) 초록; 356, 358면 참조	15-17
A		1-14
☒ 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 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 08월 28일 (28.08.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 08월 29일 (29.08.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 이효진 전화번호 +82-42-481-8743 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LAVRENTIEVA, A. et al., 'Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells', Cell Communication and Signaling, 2010, vol.8, no.18, pp.1-9 (2010.7.16.) 초록; 2, 5면; Fig.3, 4 참조	1-17
A	ESTRADA, JC. et al., 'Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis', Cell Death and Differentiation, 2012, vol.19, no.5, pp.743-755 (2011.12.2. 온라인 공개) 초록; 743면 참조	1-17

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음