(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2011 년 7 월 21 일 (21.07.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/087178 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2010/000775

(22) 국제출원일: 2010 년 2 월 9 일 (09.02.2010)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2010-0002739 2010 년 1 월 12 일 (12.01.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL)** [KR/KR]; 서울 종로구 연건동 28, 110-744 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김효수 (KIM, Hyo-Soo)** [KR/KR]; 서울 서초구 반포동 반포자이 APT 114 동 1901 호, 137-040 Seoul (KR). **강현재 (KANG, Hyun-Jae)** [KR/KR]; 서울 종로구 사직동 풍림스페이스본 105 동 1010 호, 110-054 Seoul (KR). **이은주 (LEE, Eun-Joo)** [KR/KR]; 서울 성북구 정릉 2 동 중앙하이츠 2 단지 202 동 1305 호, 136-779 Seoul (KR).

(74) 대리인: **이명진 (LEE, Myoung-Jin)**; 서울 강남구 역삼동 725-32 우일빌딩 1 층, 135-921 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

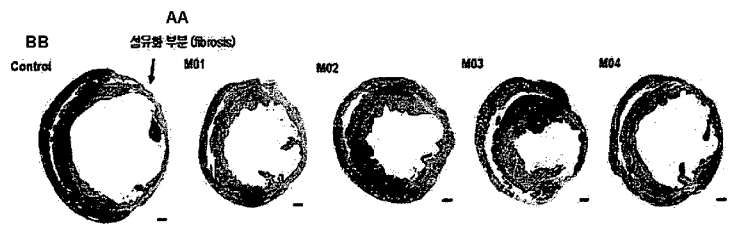
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,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

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) **Title**: SCREENING METHOD FOR THE IN-VIVO ACTIVE INDICATOR OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

(54) **발명의 명칭** : 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표지자를 선별하는 방법

【도 6】



(57) **Abstract**: The present invention relates to a screening method for the in-vivo active indicator (biomarker) of human mesenchymal stem cells. The method comprises the steps of: performing the DNA array of the human mesenchymal stem cells of which in-vivo activity is different; selecting genes which show difference of expression among the human mesenchymal stem cells; and confirming a biomarker which indicates an in-vivo activity difference among the human mesenchymal cells of the genes. Further, the present invention provides a biomarker selected according to said method and provides a system which indicates the in-vivo activity of the human mesenchymal stem cells using the biomarker. According to the present invention, the method is able to discriminate previous differences among various in-vivo activities of the human mesenchymal stem cells in vitro of which the genetic background and/or origin is different, and useful developments for cross-derived cell therapy and screening are expected.

(57) **요약서**: 본 발명은 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표지자(바이오마커)를

[다음 쪽 계속]

WO 2011/087178 A1

선별하는 방법에 관한 것으로, 생체내 활성도가 상이한 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 DNA 어레이(array)를 실시하는 단계; 상기 인간 중배엽 줄기세포간 발현의 차이를 보이는 유전자들을 선별하는 단계; 및 상기 유전자들 중 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도 차이를 표지하는 바이오마커를 확인하는 단계를 포함한다. 또한 본 발명은 상기 방법에 따라 선별된 바이오마커를 제공하며, 나아가 상기 바이오마커를 이용하여 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성을 표식화하는 시스템을 제공한다. 본 발명에 따르면, 유전적 배경 및/또는 기원이 상이한 인간 중배엽 줄기세포의 다양한 생체 활성도의 차이를 생체외에서 선 판별하는 것이 가능하며, 이는 타가 유래 세포치료제 개발 및 선발에 있어 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

【명세서】

【발명의명칭】

인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표지자를 선별하는 방법

【기술분야】

<1> 본 발명은 다양한 유전적 배경 또는 기원을 가지는 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도 차이를 나타내는 생체내 활성 표지자(바이오마커)를 선별하는 방법, 및 상기 바이오마커를 이용한 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표식화 시스템 등에 관한 것이다.

【배경기술】

<2> 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화(differentiation)할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되며, 분화가 완료되어 세포분열이 정지된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있어 증식(proliferation; expansion)하는 특성이 있으며, 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다른 세포로도 분화될 수 있어 분화에 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

<3> 줄기세포는 그 분화능에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cells)는 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력(totiportent)을 지닌 전분화능(pluripotency)의 세포로서 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell) 및 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPS) 등이 이에 해당된다. 다분화능 및 또는 단분화능 줄기세포로는 성체줄기세포를 예로 들 수 있다.

<4> 배아줄기세포는 배아발생초기인 포배기(blastocyte)의 세포내괴(inner cell mass)로부터 형성되며, 모든 세포로 분화가능한 잠재력(totipotent)을 가지고 있어 어떠한 조직 세포로도 분화될 수 있으며, 또한 사멸하지 않고(immortal) 미분화상태에서 배양가능하며, 성체줄기세포와 달리 배세포(germ cell)의 제조도 가능하므로 다음 세대로 유전될 수 있는 특징을 가지고 있다(Thomson et al., Science, 282: 1145-1147, 1998; Reubinoff et al., Nat. Biotechnol., 18: 399-404, 2000).

<5> 인간 배아줄기세포는 인간 배아 형성시 세포내괴(inner cell mass)만을 분리하여 배양함으로써 제조되는데, 현재 전 세계적으로 만들어진 인간 배아줄기세포는

불임시술 뒤 남은 냉동배아로부터 얻어진 것이다. 모든 세포로 분화될 수 있는 전분화능을 가진 인간 배아줄기세포를 세포치료제로 이용하기 위한 다양한 시도가 이루어져 왔지만 아직 암발생의 위험과 면역거부반응의 높은 벽을 완전히 제어하지 못하고 있는 실정이다.

<6> 이에 대한 보완책으로 최근 보고 되고 있는 것으로 유도만능줄기세포(iPS)가 있다. 만능줄기세포의 개념으로 포함되고 있는 iPS 는 분화가 끝난 성체세포를 여러 가지 방법으로 역분화시켜, 분화 초기 단계인 배아줄기세포로의 상태로 회귀시킨 세포이다. 현재까지 역분화 세포는 유전자 발현과 분화능에서 만능줄기세포인 배아줄기세포와 거의 동일한 성격을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 하지만 이러한 iPS의 경우도 자가 세포를 이용하여 면역거부반응의 위험성은 배제할 수 있으나, 암발생의 위험성은 여전히 해결해야 할 과제로 남아있다.

<7> 최근 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로 면역조절기능과 함께 암발생의 위험성이 없는 중배엽 줄기세포가 제시되고 있다. 중배엽 줄기세포는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 및 심근세포 등으로의 분화가 가능한 다능성을 가진 세포로 면역 반응을 조절하는 기능도 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 중배엽 줄기세포는 골수, 제대혈, 지방조직 등 다양한 조직에서 분리, 배양이 가능하나 각 기원에 따른 세포 표면 표지자가 조금씩 다르기 때문에 중배엽 줄기세포를 명확히 정의하는 것은 용이하지 아니하다. 다만 골세포, 연골세포, 및 근육세포로 분화가 가능하며, 소용돌이 모양의 형태를 가지고, 기본적인 세포 표면 표지자인 CD73(+), CD105(+), CD34(-) 및 CD45(-)를 발현하는 경우 일반적으로 중배엽 줄기세포로 규정하고 있다.

<8> 특히 중배엽 줄기세포의 능력(생체내 활성도)에 있어서도 각 기원에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있으나 현재까지 그 능력의 차이를 표지 할 수 있는 생체내 활성 표지자(바이오마커)는 보고된 바 없다. 이와 관련하여, 상이한 유전적 기원 및/또는 배경을 가지는 중배엽 줄기세포들의 경우, 위에서 언급한 기존의 중배엽 줄기세포를 규정하는 기준들에 대하여는 서로 차이점을 나타내지 아니하지만 각각의 생체내 활성에 있어서는 차이를 나타낼 수 있다. 중배엽 줄기세포를 세포치료제로 사용함에 있어서, 그 생체내 활성도의 차이가 세포 치료제의 궁극적 차이를 유발한다는 점을 고려해 볼 때, 중배엽 줄기세포의 세포 치료제로서의 효율성 및 실용성을 극대화 하기 위해서는 다양한 유전적 기원 및/또는 배경을 가지는 중배엽 줄기세포들의 생체내 활성도의 차이를 판별할 수 있는 생체내 활성 표지자(바이오

마커)를 찾아내는 것이 재생 의학 및 세포치료제 실용화를 위한 당업계의 과제라 할 수 있을 것이다.

<9> 또한, 중배엽 줄기세포가 세포치료제로 이용되기 위해서는 재생의학 및/또는 세포치료 분야에서 요구되는 최소 세포수(약 $1X10^9$ 정도)를 만족시켜야 하는데, 적정조건을 잡고 기준을 정하는 실험까지 고려한다면 필요한 세포수는 더욱 늘어나게 된다. 따라서 기존의 다양한 기원의 중배엽 줄기세포로부터 이 정도의 양을 공급하려면 in vitro(체외) 실험에서 최소 10번 이상의 계대가 필요하게 되는데 이 경우 세포가 노화되고 변형되어 더 이상 세포치료제로서의 목적을 달성하기에는 적합하지 아니할 수 있다. 설령 이러한 세포로 조건과 기준을 잡았다 하더라도 정작 세포치료 목적으로 사용할 시점에는 이미 그 세포가 바닥이 나서 다른 사람의 중배엽 줄기세포를 써야 하고 그럴 경우 또 다른 세포이용에 따른 부가적인 실험을 다시 거쳐야 하는 문제가 발생할 수 있다.

<10> 이에 대한 가장 이상적인 대안은 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표지자를 이용하여 그 활성도를 표식화 하고, 나아가 이를 도표화 · bank 화 함으로써 세포치료제로서의 적절한 최소의 중배엽 줄기세포 수를 계산할 수 있는 시스템을 제공하는 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<11> 본 발명은 상이한 유전적 배경 및/또는 기원을 가지는 여러 인간 중배엽 줄기세포의 다양한 생체내 활성도 차이를 생체외에서 선 판별할 수 있는 방법을 제공하고자 한다. 또한 본 발명은 다양한 기원의 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 차이를 표지할 수 있는 바이오마커를 제공하고, 나아가 상기 바이오마커를 이용하여 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도를 표식화 할 수 있는 일반화된 시스템을 제공하고자 한다.

【기술적 해결방법】

<12> 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 다양한 유전적 배경 및/또는 기원을 가지는 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 차이를 나타내는 바이오마커를 검색 및 확인하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 생체내 활성도가 상이한 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 DNA 어레이(array)를 실시하는 단계; 상기 인간 중배엽 줄기세포간 발현의 차이를 보이는 유전자들을 선별하는 단계; 및 상기 유전자들 중 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도 차이를 표지하는 바이오마커를 확인하는 단

계를 포함한다.

<13> 구체적으로, 상기 생체내 활성도는 허혈성 심혈관 래트(rat) 모델을 이용하여 심혈관 질환을 호전시키는 능력을 측정함으로써 그 차이를 비교할 수 있으며, 상기 선별된 유전자들에 대하여 그 단백질의 양적 발현 수준과 생체내 활성도와의 상관관계를 확인함으로써 궁극적으로 중배엽 줄기세포의 바이오마커를 선별해 낼 수 있다.

【유리한 효과】

<14> 본 발명에 따르면, 상이한 유전적 배경 및/또는 기원을 가지는 여러 인간 중배엽 줄기세포의 다양한 생체 활성의 차이를 생체외에서 선 판별하는 것이 가능하며, 이는 타가 유래 세포치료제 개발 및 선발에 있어 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 또한 본 발명은 인간 중배엽 줄기세포의 바이오마커를 이용하여 상이한 유전적 배경 또는 기원을 가지는 여러 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도를 표식화 하고 이를 도표화 · bank 화하여 궁극적으로 규격화하는 것을 가능하게 한다. 따라서, 중배엽 줄기세포가 가지는 생체내 활성 차이로 인한 case by case 평가 문제를 극복할 수 있을 뿐만 아니라 나아가 세포치료 및 재생의학에 필요한 고기능의 적절한 인간 중배엽 줄기세포수의 도출을 가능하게 할 것이다.

<15> 궁극적으로 본 발명은 인간 중배엽 줄기세포의 세포치료제로서의 효율성을 증대시킴으로서 세포치료제의 실용화를 앞당기는데 기여할 수 있을 것으로 기대되며 나아가 심혈관계질환, 신경계질환 등의 난치병 치료제 개발에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

【도면의 간단한 설명】

<16> 도 1 내지 도 3은 허혈성 동물 모델 실험을 위해 적절한 실험 조건을 잡은 결과를 나타낸 것으로, 도 1은 전체적인 time line을 나타내며, 도 2는 세포 수에 따른 8주째의 심전도 변화를 보여 주는 그림이고, 도 3은 좌심실 확장기내경(LVEDD) 및 좌심실 수축기내경(LVESD) 등을 수치화하여 나타낸 것이다.

<17> 도 4 내지 도 8은 동정된 인간 제대혈 유래 중배엽 줄기세포 4종의 생체내 활성도를 측정한 결과를 나타낸 것으로, 도 4는 8주째의 심전도 결과를 보여주는 그림이고, 도 5는 좌심실 확장기내경(LVEDD) 및 좌심실 수축기내경(LVESD) 등을 수치화하여 나타낸 것이며, 도 6은 전체적인 심장의 크기 변화와 벽 두께 및 섬유화를 볼 수 있게 염색 한 그림이고, 도 7 및 도 8은 이를 수치화하여 나타낸 것이다.

<18> 도 9 내지 도 12는 생체내 활성도 차이를 검증하기 위한 조직 분석 결과를

보여주는 것으로, 도 9는 미세 혈관의 분포를 염색하여 나타낸 것이고, 도 10은 이를 수치화하여 나타낸 것이며, 도 11은 세포 사멸을 염색하여 나타낸 것이고, 도 12는 이를 수치화 하여 나타낸 것이다.

<19> 도 13 내지 도 16은 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표지자를 선별하는 과정을 보여주는 것으로, 도 13은 MO1 과 MO2 에 대해 DNA array 를 실시한 결과를 나타낸 것이며, 도 14는 이들 중 세표 표면 관련 유전자 5개를 선별한 것이고, 도 15는 이를 RNA 수준에서 확인한 결과이며, 도 16은 FACS 로 단백질 수준에서 확인한 결과이다.

<20> 도 17은 4종 세포에 대한 CD146 의 western blot 및 FACS 결과를 나타낸 것이다.

<21> 도 18은 4종 세포에 대한 N-cadherin의 western blot 2회 실시 결과를 나타낸 것이다.

<22> 도 19 내지 도 23은 N-cadherin 의 활성을 관찰한 결과를 나타낸 것으로, 도 19는 cadherin이 ERK 및/또는 AKT 활성화에 미치는 효과를 나타낸 것이며, 도 20은 상기 효과가 N-cadherin 에 의한 것임을 확인한 결과이고, 도 21은 N-cadherin 의 RNA 수준에서의 발현 억제시 세포 사멸이 증가되는 것을 관찰한 그림이며, 도 22는 PI FACS 결과를 나타낸 것이며, 도 23은 N-cadherin blocking 에 의해 VEGF 가 RNA 와 protein 수준에서 모두 억제되는 것을 나타낸 그림이다.

<23> 도 24 및 도 25는 N-cadherin 의 혈관 형성능에 대한 효과를 나타내는 것으로, 도 24는 N-cadherin 의 유사 혈관 형성능을 보여주는 것이며, 도 25는 실질적인 혈관내피세포의 혈관 형성과정에서의 N-cadherin 의 역할을 나타낸 것이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

<24> 본 발명은 다양한 유전적 배경 및/또는 기원을 가지는 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도 차이를 판별할 수 있는, 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표지자(바이오마커)를 검색 및 확인하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 생체내 활성도가 상이한 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 DNA 어레이(array)를 실시하는 단계; 상기 인간 중배엽 줄기세포간 발현의 차이를 보이는 유전자들을 선별하는 단계; 및 상기 유전자들 중 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도 차이를 표지하는 바이오마커를 확인하는 단계를 포함한다.

<25> 본 발명에 사용되는 인간 중배엽 줄기세포는 그 유전적 배경 및/또는 기원에 있어서 제한이 없다. 예를 들면 상이한 개체로부터 얻은 여러 인간 제대혈 유래 중

배엽 줄기세포들을 사용할 수 있다. 본 발명에서는 α-MEM(Invitrogen ™) +10% FBS(fetal bovine serum) 배지에서 상기 중배엽 줄기세포를 배양할 수 있다. 본 발명에 사용되는 상이한 유전적 배경 및/또는 기원을 가지는 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 체외(in vitro) 동정 평가를 실시하면 기존의 일반적인 중배엽 줄기세포를 규정하는 특징을 동일하게 나타낸다; 골세포, 연골세포, 및 근육세포로 분화가 가능하며, 소용돌이 모양의 형태를 가지고, 기본적인 세포 표면 표지자인 CD73(+), CD105(+), CD34(-) 및 CD45(-)를 발현한다. 한편, 상기 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 생체내 활성도 평가를 실시하면 그 활성도에 차이를 나타낼 수 있다. 구체적으로, 생체내(in vivo) 활성도 평가를 위해 허혈성 심혈관 래트(rat) 모델을 이용할 수 있다. 허혈성 심혈관 래트 모델이라 함은 심장의 관상동맥을 결찰시켜 허혈상태를 유도하여 만든 동물 허혈성 심혈관 질환 모델을 의미한다. 상기 질환 모델의 허혈 주위 심근육에 각각 동일한 수의 중배엽 줄기세포를 주입하고 심전도를 측정하여 그 호전도를 비교함으로써 생체내 활성도를 평가할 수 있다. 상기 세포 주입은 상기 질환 모델 화 후 7일 내지 10일째에 실시할 수 있으며, 심전도 측정은 4주 후, 바람직하게는 4주 내지 8주째에 실시할 수 있다.

<26> 본 발명에서는 in vitro 중배엽 줄기세포 동정 평가시 유의적 차이를 나타내지 아니하는 4종의 인간 제대혈 유래 중배엽 줄기세포들(MO1, MO2, MO3, MO4)에 대하여 상기 허혈성 심혈관 래트(rat) 모델을 이용하여 심혈관 질환의 호전도를 관찰한 결과 상기 4종의 세포가 활성도의 차이를 나타내었다(도 4 내지 도 8 참조). 구체적으로 MO2 가 가장 높은 활성을 보였으며, MO1 이 가장 낮은 활성을 나타내었다. 통상의 허혈성 심혈관 질환의 호전은 우선적으로 허혈 부위에 혈관을 공급하고 그 부위의 세포 사멸을 막음으로 이루어질 수 있다. 상기 4종의 중배엽 줄기세포들이 심혈관 질환을 호전시키는 기전을 알아보기 위하여 혈관공급 및 세포 사멸에 대한 효과를 살펴본 결과, 심혈관 질환을 호전시키는 능력과 동일한 순(MO2〉 MO3〉 MO4〉 MO1)으로 그 효과에 차이를 나타내었다(도 9 내지 도 12 참조). 즉, MO2 를 주입한 경우, 혈관공급 및 세포 사멸 방지에 가장 큰 효과를 나타내었다.

<27> 본 발명은 in vitro 의 중배엽 줄기세포 동정 평가에서는 동일한 결과를 나타내지만 in vivo 활성 평가에서는 차이를 나타내는 상기 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 그 생체내 활성의 차이를 표지할 수 있는 바이오마커를 검색하기 위하여 DNA array 를 실시하는 단계 및 상기 인간 중배엽 줄기세포간 발현의 차이를 보이는 유전자들을 선별하는 단계를 포함한다.

<28> 구체적으로, 상기 4종의 중배엽 줄기세포들 중 생체내 활성도가 가장 높은 MO2 와 활성도가 가장 낮은 MO1 에 대하여 DNA array 를 3회 반복실시하여 MO2 에서 상대적으로 발현이 높은 세표 표면 관련 유전자 5개를 선별하였다(도 13 및 도 14 참조). 일반적으로 DNA array 결과는 그 진실성이 70% 이므로, 실질적으로 RNA 수준 및 단백질 수준에서의 발현을 모두 확인하는 것이 필요하다. 따라서, 상기 5개의 유전자에 대하여 추가로 RNA 수준 및 단백질 수준에서 그 발현을 다시 확인한 후 CD146 과 N-cadherin 을 선별하였다(도 15 및 도 16 참조).

<29> 또한 본 발명은 상기 유전자들 중 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도 차이를 표지하는 바이오마커를 확인하는 단계를 포함한다. 구체적으로 상기 선별된 표지자들에 대하여 각각 그 단백질 발현 수준과 생체내 활성도의 상관관계를 관찰함으로써 최종적으로 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표지자(바이오마커)를 확인할 수 있다. 상기 단백질 발현은 항원-항체 반응을 이용한 웨스턴 블롯(western blot) 및/또는 형광세포분석기(FACS)를 이용하여 확인할 수 있으며, CD146 의 경우 그 단백질 발현 수준과 상기 4종의 중배엽 줄기세포들의 생체내 활성도의 차이에 대하여 상관관계가 형성되지 아니하는 것으로 확인되었다(도 17 참조). 반면, N-cadherin 의 경우 상기 4종 중배엽 줄기세포 각각의 그 단백질 발현 수준과 생체내 활성도 차이에 있어서 상관관계가 관찰되었다(도 18 참조).

<30> 상기 결과로부터, 다양한 유전적 배경 또는 기원을 가지는 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도 차이를 표지할 수 있는 바이오마커로 N-cadherin 이 최종 선별 확인되었다. 따라서 본 발명은 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도 차이를 표지할 수 있는 바이오마커를 제공한다.

<31> 추가적으로, 본 발명자들은 상기 N-cadherin 의 활성을 확인하는 실험을 실시하였다. 일반적으로 세포의 생리기전을 설명하는 경우, 세포의 활성을 나타내는 가장 핵심적 인자인 ERK(extracellular signal-regulated kinase) 와 AKT(V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG) 인산화를 통한 활성화를 고찰하게 된다. 대부분의 세포들은 상기 두 인자의 활성통로를 이용하여 분열, 이동, 및 생존하고, 각종 인자들을 분비한다.

<32> 본 발명자들은 Ca-의존적 세포간 부착 인자인 cadherin의 기능을 제거 후 다시 자극하는 실험을 실시하였으며, 그 결과 cadherin 은 AKT 가 아닌 ERK 의 활성화를 조절하는 기능을 가짐이 관찰되었다(도 19 참조). 이는 ERK 통로가 인간 중배엽 줄기세포의 생리 활성 통로로 사용될 수 있다는 것을 시사한다. 또한 상기 결과

는 cadherin 중 N-cadherin 에 의한 것으로 확인되었으며(도 20 참조), 상기 N-cadherin 은 세포간의 결합은 물론 세포의 사멸을 조절하는 기능도 가지는 것으로 나타났다(도 21 및 도 22 참조). 이에 더하여 중배엽 줄기세포의 대표적 특성 중 하나인 분비능 조절에 대한 N-cadherin의 효과를 살펴보았다. 구체적으로 심혈관 질환을 호전시키는 데 있어서 주요 paracrine(주변분비) factor 인 VEGF(vascular endothelial growth factor, 혈관내피세포 성장인자)가 N-cadherin blocking 에 의해 RNA 및 단백질 수준에서 모두 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 23 참조). 상기 결과로부터 N-cadherin 은 중배엽 줄기세포의 대표적 특성 중 하나인 분비능 조절에도 관여하고 있음을 알 수 있다.

<33> 또한 혈관형성시 N-cadherin 의 역할을 살펴본 결과, N-cadherin이 혈관 손상 질환의 호전에 중요한 인자인 혈관 형성능을 증가시키는 것으로 나타났다(도 24 및 도 25 참조). 결론적으로, N-cadherin 은 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도의 차이를 표지할 수 있는 바이오마커일 뿐만 아니라 다양한 생체 활성 조절 인자로도 작용함을 알 수 있다.

<34> 본 발명은 또한 상기 인간 중배엽 줄기세포의 바이오마커를 이용하여 다양한 유전적 배경 및/또는 기원을 가지는 여러 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도를 표식화할 수 있는 시스템을 제공한다. 따라서 인간 중배엽 줄기세포가 세포치료제로서 사용됨에 있어서 그 효율성 및 실용성을 증가시키는 효과를 기대할 수 있다. 상기 시스템은 다양한 유전적 배경 또는 기원을 가지는 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 N-cadherin 유전자의 발현을 확인하는 단계, 및 상기 N-cadherin 의 단백질 발현 수준을 비교 분석하는 단계를 포함할 수 있다.

<35> 중배엽 줄기세포를 세포치료제로 사용하기 위해서는 이미 언급한 바와 같이 충분한 양의 세포를 공급하는 것이 우선되어야 하는데, 이를 위해서는 중배엽 줄기세포의 계대배양이 필요하다. 그러나 계대배양을 계속하게 되면 중배엽 줄기세포가 노화되어 분열능력이 없어지고 그 활성(분화능)을 잃어버리게 되는 문제를 발생시킬 수 있다. 이와 관련하여 본 발명에 의해 선별된 상기 인간 중배엽 줄기세포의 바이오마커를 이용하면 다양한 유전적 배경 및/또는 기원을 가지는 여러 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도의 표식화가 가능하고 이를 도표화, bank 화함으로써 세포치료 및 재생의학에 필요한 고기능의 적절한 인간 중배엽 줄기세포 수의 도출을 가능하게 한다. 궁극적으로, 본 발명은 인간 중배엽 줄기세포의 세포치료제로서의 효율성을 증대시킴으로서 세포치료제의 실용화를 앞당기는데 크게 기여할 수 있

을 것으로 기대된다.

<36>

<37> 이하, 하기 실시예를 들어 본 발명의 실시 형태를 구체적으로 설명하겠으나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<38>

<39> **[실시예]**

<40> 본 발명에서는 MEDIPOST(주)에서 제공받은 4종의 유전적 기원이 다른 인간 제대혈 유래 중배엽 줄기세포를 사용하였다. 상기 세포들은 유전적 기원이 상이한 여러 인간 제대혈에서 단핵구 세포들을 정형화된 방법으로 분리하고 이들을 고착배양시 부착하여 자라나는 세포들을 대상으로 인간 중배엽 줄기세포 동정 실험을 실시하여 선별된 것으로, 중배엽 줄기세포의 양성 세포 표지자(CD29, CD44, CD73, CD105, CD166, HLA-ABC) 95%이상 표현과 음성 세포 표지자(CD34, CD45, HLA-DR) 5% 미만의 획일적 표현 확인, 및 중배엽 줄기세포의 다중 분화능을 확인한 후 "인간 제대혈 유래 중배엽 줄기세포"로 동정·분류된 세포들이다(각각 MO1, MO2, MO3, MO4 로 명명함).

<41>

<42> **실시예 1. 인간 중배엽 줄기세포의 생체내(in vivo) 활성도 평가**

<43> In vitro 중배엽 줄기세포 동정 평가에서 유의적 차이를 나타내지 아니하는 상기 4종의 중배엽 줄기세포들(MO1, MO2, MO3, MO4)에 대하여 생체내 활성도 평가를 실시하였다. 상기 생체내 활성도를 평가하기 위하여 허혈성 심혈관 래트(rat) 모델을 이용하였으며, 상기 허혈성 심혈관 래트 모델이라 함은 심장의 관상동맥을 결찰시켜 허혈상태를 유도하여 만든 동물 허혈성 심혈관 질환 모델을 의미한다.

<44>

<45> **(1) 세포수 및 생체내 활성도 평가 조건 설정**

<46> 먼저 적정 세포수 및 생체내 활성도 평가 조건을 설정하기 위한 실험을 실시하였다. 구체적으로, 상기 4종(MO1, MO2, MO3, 및 MO4)의 중배엽 줄기세포 중 하나를 무작위로 선발하여(passage 6-7), 최소 효과 세포수 및 방법을 개발하고 정형화하기 위한 사전 실험을 수행하였다. 질환 모델 rat 1마리당 $1X10^3$개, $1X10^4$개, $1X10^5$개, $1X10^6$개, 및 $1X10^7$개를 주입한 후 그 생체내 활성도를 평가하여 도 1 내지

도 3에 나타내었다. 상기 4종의 중배엽 줄기세포 각각에 대하여 최소 7 마리 이상의 rat 를 사용하였다.

<47> 도 1 은 전체적인 time line 을 보여주는 것으로, 상기 질환 모델화 후 4일째 baseline 심전도를 측정하였다. 그리고, 상기 질환 모델화 후 7일째에 상기 중배엽 줄기세포를 상기 질환 모델에 주입하였으며, 8주째에 심전도를 측정하여 질환의 호전여부를 분석하였다. 세포 수에 따른 8주째의 심전도 변화(도 2 참조)와 심장 수축 및 확장의 수치 등(도 3 참조)을 바탕으로 최저 효과 세포 수를 정하였다. 최저 효과 세포 수는 세포의 각 차이를 규명하고자 할 때 필요한 것으로, 최저 효과 세포 수 이상의 세포를 주입하면 당연히 효과는 더욱 좋아지지만 개별적 비교차이를 보고자 할 때는 최소 효과 세포 수를 주입하는 것이 바람직하다.

<48> 도 2에 나타난 바와 같이, baseline 심전도에서는 위쪽 물결 무늬의 좌심실 심벽운동성이 없어 진 것을 알 수 있고, 8주 후 심전도에서는 위쪽 물결 무늬의 좌심실 심벽 운동의 호전도를 볼 수 있다. 도 3은 좌심실 확장기내경(Left ventricular end-diastolic dimension(LVEDD)), 좌심실 수축기내경(Left ventricular end-systolic dimension(LVESD)), 좌심실 분획단축(Left ventricular end-fractional shortening(LVFS)), 좌심실 구혈률(Left ventricular end-ejection fraction(LVEF))을 수치화하여 나타낸 것으로, 이때 좌심실 분획단축(LVFS)은 LVEDD-LVESD/LVEDD로 정의되며, 좌심실 구혈률(LVEF)은 $LVEDD^2$-$LVESD^2$/$LVEDD^2$ 로 정의된다. 좌심실 확장기내경(LVEDD) 및 좌심실 수축기내경(LVEDD)이 작을수록, 좌심실 분획단축(LVFS) 및 좌심실 구혈률(LVEF)이 클수록 높은 호전도를 나타낸다. 따라서 도 2 및 도 3의 결과로부터, 최저 효과 세포 수는 $1X10^5$개로 정하는 것이 바람직하다는 것을 알 수 있다.

<49>

<50> **(2) 생체내 활성도 평가**

<51> 상기 실시예 1(1) 의 결과에 기초하여, 상기 4종(MO1, MO2, MO3, 및 MO4)의 중배엽 줄기세포(passage 6-7)를 각각 상기 질환 모델 rat 1마리당 $1X10^5$개 주입하였으며, 8주째에 심전도를 측정하여 질환의 호전 여부를 분석하였다. 상기 4종의 중배엽 줄기세포 각각에 대하여 최소 7 마리 이상의 rat 를 사용하였으며 상기 질환 모델화 후 4일째 baseline 심전도를 측정하였다.

<52> 심전도 측정결과를 보여주는 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 8주 후 4종의

줄기세포 심전도를 비교해 보면, 위쪽 물결 무늬의 좌심실 심벽운동성이 없는 baseline 심전도에 비해, MO2 를 주입한 경우, 위쪽 물결 무늬의 좌심실 심벽 운동이 상대적으로 현저히 호전된 것을 볼 수 있다. 또한 도 5에 나타난 바와 같이, MO2 에서 호전도의 표지인 좌심실 확장기내경(LVEDD) 및 좌심실 수축기내경(LVESD)이 작고, 좌심실 분획단축(LVFS) 및 좌심실 구혈률(LVEF)이 현저하게 높은 것을 알 수 있다.

<53> 이에 더하여 전체적인 심장의 크기 변화와 벽 두께 및 섬유화(fibrosis)를 비교해 보았다. 도 6은 전체적인 심장의 크기 변화와 벽 두께 및 섬유화를 볼 수 있게 염색한 그림으로, 섬유화는 MT 염색을 통하여 가시화하였으며 그림에서 푸른 부분이 섬유화를 표시한다. 도 7은 섬유화 면적을, 도 8은 심장벽의 두께를 각각 수치화하여 나타낸 것이다. 일반적으로 심장이 허혈에 노출되었을 경우, 도 6의 control(중배엽 줄기세포를 주입하지 않은 군)에서 볼 수 있는 바와 같이, 심장벽의 섬유화로 인해 심벽이 얇아지고, 운동성 상실과 부피 확장이 일어난다. 이와 관련하여 4종의 세포들을 비교해 보면, 도 6에 나타난 바와 같이 MO2 를 주입한 경우 허혈에 노출되었음에도 통상의 진행과 같은 심벽의 얇아짐, 운동성 상실 및 부피 확장 등과 같은 현상이 다른 세포들을 주입한 군에 비해 상대적으로 현저히 줄어든 것을 알 수 있으며, 이를 수치화한 도 7 및 도 8에서도 이를 명백히 알 수 있다.

<54> 상기 결과로부터, 4종의 유전적 기원이 다른 인간 제대혈 유래 중배엽 줄기세포들이 중배엽 줄기세포의 in vitro 동정 평가에서는 유의적 차이가 없는 결과를 나타내지만 생체내 활성도 평가에는 차이가 있음을 알 수 있다.

<55>

<56> **(3) 작용기전을 통한 생체내 활성도 차이 검증**

<57> 상기 4종의 인간 제대혈 유래 중배엽 줄기세포들의 생체내 활성도 차이를 심혈관 질환의 호전 기전을 통해 검증해 보는 실험을 실시하였다. 통상의 허혈성 심혈관 질환은 우선적으로 허혈 부위에 혈관을 공급하고 동시에 그 부위의 세포 사멸을 막음으로 호전된다.

<58> 상기 4종 세포의 혈관 공급에 미치는 영향을 보기 위하여 혈관 특이적 발현 단백질인 Iso Lectin B4 의 항원-항체반응을 이용하여 4종의 세포를 주입시 미세혈관의 분포를 살펴보았다. 본 실험은 8주째 rat 심장을 4% 포르말린으로 고정 후, 파라핀 조직화하여 자른 후 얹은 슬라이드를 이용하여 수행하였다. 구체적으로, 슬

라이드의 조직에서 파라핀 제거 및 탈수 과정을 거친 후 혈관 특이적 1차 항체 Iso Lectin B4 을 반응시키고 12시간 후 세척한 다음, 2차 항체 FITC 를 반응시키고 2 시간 후 세척하여 형광 현미경으로 관찰하였다. 상기 염색결과를 도 9에 나타내었으며, 도 10는 미세혈관 밀도(capillary density)를 수치화하여 나타낸 것이다. 도 9의 확대한 그림(merged) 및 도 10에서 잘 알 수 있는 바와 같이, MO2 를 주입한 경우 가장 높은 혈관 분포를 나타내었다.

<59> 또한 사멸세포의 표지인 조각 DNA(TUNEL)의 항원-항체 반응을 이용하여 상기 4종 세포의 세포 사멸에 미치는 영향을 살펴보았다. 본 실험은 상기 미세혈관 분포 실험과 동일한 방법으로 준비된 조직 슬라이드를 이용하여, 세포 사멸시 일어나는 조각난 DNA 에 형광 표지된 dUTP를 반응 시킨 후, 형광현미경으로 관찰하는 방법을 이용하였다. 그 염색결과를 도 11에 나타내었으며, 도 12는 이를 수치화한 것이다. 도 11 및 도 12에 나타난 바와 같이, MO2 를 주입한 경우 세포 사멸이 가장 적게 일어난 것을 알 수 있다.

<60> 결론적으로, 4종의 유전적 기원이 다른 인간 제대혈 유래 중배엽 줄기세포들이 중배엽 줄기세포의 in vitro 동정 평가에서는 유의적 차이가 없는 결과를 나타내지만 생체내 활성도 평가에서는 차이를 나타내었으며, 이와 상관된 기전 연구를 통하여 그 차이를 검증할 수 있었다.

<61>

<62> **실시예 2. 생체내 활성 표지자 선별 및 확인**

<63> 상기 실시예 1의 결과로부터, 생체내 활성도가 가장 높은 MO2 와 가장 활성도가 낮은 MO1 을 이용하여 생체내 활성 차이를 예측할 수 있는 표지자(바이오마커)를 확인하는 실험을 실시하였다.

<64>

<65> **(1) DNA array**

<66> MO1 및 MO2 에 대하여 DNA array 를 3회 반복실시하였다. 세포를 배양 후 RNA 를 추출하여 cDNA 를 합성한 다음, 인간 유전자 올리고 탐침자가 있는 슬라이드에 반응시켰다. 반응의 정도를 기준샘플 MO1 과 비교하여 MO2 에서 높을수록 붉은 색의 명도가 높아지게 표시하고, 낮은 것은 녹색의 명도가 높아지도록 표시하였다. 도 13은 MO1 보다 MO2 에서 발현이 높은(up-regulated) 유전자를 붉은 색으로, MO1 보다 MO2 에서 발현이 낮은(down-regulated) 유전자를 녹색으로 표지하여 나타낸 것이다. 도 14는 이들 중 MO2 에서 발현이 높은 세표 표면 관련 유전자 5개를

선별한 것으로 좌측 그림은 scatter plot 형식으로 나타낸 그림이며, MO2 에서 발현이 2배 이상 높은 유전자들을 보여주고 있다. 도 14의 우측 그림은 MO2 에서 발현이 높은 유전자만을 붉은 색으로 따로 분류하여 표시한 것이다.

<67>

<68> **(2) RNA 및 단백질 수준에서의 발현 비교**

<69> 상기 DNA array 결과 선별된 5개의 유전자에 대하여 RNA 및 단백질 수준에서의 발현을 비교하였다. MO1 및 MO2 를 배양 후 RNA 를 추출하고, 중합 효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 후 상기 DNA array에서 선별된 5종의 유전자들에 대한 특이적 프라이머(primer)를 이용하여 real-time PCR 로 확인한 결과를 도 15에 나타내었다. 또한 MO1 및 MO2 를 배양 후 trypsin 으로 처리하여 single cell 로 분리한 다음, 상기 DNA array에서 선별된 5종의 유전자들에 대한 항체를 이용하여 반응시키고, 2차 항체 반응 후 형광세포분석기(FACS) 로 단백질 수준에서 확인한 결과를 도 16에 나타내었다.

<70> 상기 RNA 및 단백질 수준에서의 확인 결과, MO1 에 비해 MO2 에서 현저하게 높은 발현을 나타내는 2개의 표지자(CD146 과 N-cadherin)가 최종적으로 선별되었다.

<71>

<72> **(3) CD146 및 N-cadherin 의 단백질 발현과 생체내 활성 비교**

<73> 최종 선별된 상기 두 유전자 CD146 및 N-cadherin 에 대하여 상기 4종 세포내에서의 단백질 발현 수준을 양적으로 비교하는 실험을 실시하였다.

<74> 구체적으로 MO1, MO2, MO3, 및 MO4 를 배양 후(passage 7), 단백질을 분리하여 CD146 및 N-cadherin 각각에 대하여 항원-항체 반응을 이용한 western blot 을 실시하였다. 상기 방법은 세포를 환원제로 용해시킨 후 SDS-polyacrylamide(폴리아크릴아미드) gel 전기영동하고 Coomassie brilliant blue 로 염색하여, 전기영동으로 분리된 단백질 대(band)를 확인하거나 nitrocellulose(니트로셀룰로오즈) 또는 nylone membrane(나일론 막)에 옮긴 후 항원-항체 반응을 이용하여 특정 항체에 대한 항원(단백질)을 찾아내는 기법이다. CD146 에 대하여는 항원-항체 반응을 실시 후 형광세포분석기(FACS)를 이용하여 단백질 발현 정도를 추가적으로 비교 확인하였다. 도 17은 CD146의 western blot 및 FACS 결과를 나타낸 것이며, 도 18은 N-cadherin 의 western blot 2회 실시 결과를 나타낸 것이다.

<75> 도 17에서 알 수 있는 바와 같이, CD146 의 경우 MO2 에 비해 MO4 에서 더

많이 발현되는 것으로 나타났다. 상기 결과는 CD146 의 발현은 상기 4종의 세포간 생체내 활성도의 차이(MO2> MO3> MO4> MO1)와 상관관계가 형성되지 않음을 시사하는 것이며, 따라서 CD146 은 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도의 차이를 표지할 수 있는 적절한 바이오마커가 아님을 의미한다. N-cadherin 의 경우, 도 18에 나타난 바와 같이 N-cadherin 의 단백질 수준에서의 발현이 상기 4종의 세포간 생체내 활성도의 차이(MO2> MO3> MO4> MO1)와 상관관계가 형성됨을 알 수 있다.

<76> 상기 결과로부터, 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도의 차이를 표지할 수 있는 바이오마커로 N-cadherin 이 선별되었다.

<77>

<78> **실시예 3. N-cadherin의 생리활성 확인**

<79> 상기 실시예 2로부터 인간 중배엽 줄기세포의 바이오마커로 확인된 N-cadherin 에 대하여 그 구체적인 생리활성을 확인하는 실험을 실시하였다.

<80>

<81> **(1) ERK 및/또는 AKT에 대한 영향**

<82> 세포의 생리기전 설명시 ERK 와 AKT 의 인산화를 통한 활성화는 세포의 활성을 나타내는 가장 핵심적 인자들이다. 따라서 먼저 Ca(칼슘)-의존적 세포간 부착인자인 cadherin 의 상기 인자들에 대한 효과를 알아보는 실험을 실시하였다. 구체적으로 N-cadherin 발현이 높은 MO2 를 80-90% 가 채워지는 정도로 배양 후 Ca-의존적 세포간 부착을 파괴하기 위하여 칼슘 chelator 인 EDTA 를 처리하였다. 이 후 다시 부착 인자들의 활성을 유도하기 위하여 $CaCl_2$(염화칼슘)를 처리한 다음, ERK 및/또는 AKT의 인산화에 의한 활성화를 보기 위하여 30분, 1시간, 및 2시간 간격으로 세포를 채취(sampling)하였다.

<83> 도 19에 나타난 바와 같이, Ca-의존적 세포간 cadherin 부착을 파괴하기 위한 칼슘 chelator 인 EDTA 처리(+) 후 AKT의 인산화에 의한 활성화는 변화가 없으나, ERK의 활성화(pERK)가 억제되는 것이 관찰되었다(도 19, lane 2 참조). 반면, Ca-의존적 세포간 부착 인자들의 재부착을 유도하기 위한 $CaCl_2$ 처리 그룹에서는 ERK의 인산화에 의한 활성화가 다시 증가되는 것으로 나타났다. 일반적으로 상기 ERK 및 AKT의 활성화는 세포의 종류와 조건에 따라 달라지며, 통상적으로는 30분에서 2시간 사이에 적정 시간대를 잡을 수 있다. 본 실험을 통하여 인간 제대혈 유래 중배엽 줄기세포의 Ca-의존적 세포간 부착 인자인 cadherin 은 AKT가 아닌 ERK의

인산화에 의한 활성화를 조절하는 기능을 가지며, $CaCl_2$ 처리후 활성화 증가를 가장 잘 볼 수 있는 시간대가 1시간째임을 알 수 있다(도 19, lane 4 참조).

<84> 이에 더하여 상기 도 19의 결과가 Ca-의존적 세포간 부착 인자인 cadherin 중 N-cadherin 에 의한 것인지를 알아보기 위하여 N-cadherin blocking antibody (항체) 처리 후 반응을 살펴보았다. 구체적으로 N-cadherin 발현이 높은 MO2 를 80-90% 가 채워지는 정도로 배양 후 Ca-의존적 세포간 부착을 파괴하기 위하여 칼슘 chelator 인 EDTA를 처리하였다. 이 후 N-cadherin 또는 CD146 중화기능을 가진 항체를 이용하여 N-cadherin 또는 CD146 의 기능을 억제하고, 다시 부착 인자들의 활성을 유도하기 위하여 $CaCl_2$ 를 처리한 다음, 도 19의 결과에서 도출된 ERK의 활성화를 보기 위하여 처리 후 1시간째 세포를 sampling 하였다.

<85> 도 20에 나타난 바와 같이, 전체 ERK(tERK) 에 대비하여 ERK의 인산화(pERK) 에 의한 활성화가 N-cadherin blocking 에 의해 억제되는 것을 볼 수 있다(도 20, lane 4 참조). Control(대조군)로 사용한 CD146 blocking antibody 의 경우, N-cadherin blocking antibody 를 사용했을 때와는 달리 pERK 에 아무런 변화가 없음을 알 수 있다(도 20, lane 3 참조).

<86>

<87> **(2) 세포 사멸에 미치는 효과**

<88> N-cadherin의 세포 사멸에 미치는 효과를 살펴보기 위해 RNA 수준에서 발현을 억제 할 수 있는 siRNA 기법을 이용하였다. 구체적으로, 세포내 유전자의 발현을 억제 시키는 siRNA 기법은 RNA 와 100% 동일한 염기 19개를 체외에서 합성 후 세포내로 주입하여 RNA 수준에서부터 억제하여 최종적으로 단백질 발현을 억제시키는 기법으로, 체외에서 합성된 RNA 와 100% 동일한 염기 19개는 체내에서 상동 RNA 와 결합하여 이중 RNA를 만들게 되고 세포는 이를 인지하여 잘게 잘라 분해한다. 상기 방법으로 만들어진 N-cadherin siRNA 를 세포내로 주입하여 발현 억제를 확인한 후 세포 사멸 정도를 관찰한 결과를 도 21에 나타내었으며, 도 22는 세포를 70% EtOH(에탄올)로 고정하고, 세포 핵을 요오드화 프로피디움(Propidium Iodide, PI) 염색 후 FACS 를 sub G1(도 22의 M1 부분)으로 측정하여 세포 사멸이 일어난 세포를 관찰한 결과이다. Sub G1을 이용하면 2n - 4n의 세포주기에 포함되지 않는 세포사가 일어난 세포의 비율을 확인할 수 있다.

<89> 도 21에 나타난 바와 같이, 무작위, 불매치 서열의 합성 siRNA 가 주입된

Cont si 세포 그룹과 비교하여 N-cadherin siRNA 그룹에서는 세포와 세포 사이의 결합력이 떨어져 있음을 알 수 있고, 도 22에 나타난 바와 같이 이와 함께 세포사도 증가되는 것을 알 수 있다(5.8% v. 8.0%). 상기 결과로부터 N-cadherin 은 세포간의 결합 및 이를 통한 세포 사멸의 조절에도 관여하고 있는 것으로 나타났다.

<90>

<91> **(3) 중배엽 줄기세포의 분비능에 대한 효과**

<92> 심혈관 질환 호전의 주요 paracrine factor 인 VEGF 에 대한 N-cadherin 의 효과를 살펴보았다. 구체적으로, N-cadherin 발현이 높은 MO2 를 80-90% 가 채워지는 정도로 배양 후 Ca-의존적 세포간 부착을 파괴하기 위하여 칼슘 chelator 인 EDTA 를 처리하였다. 이후 N-cadherin 중화기능을 가진 항체를 이용하여 N-cadherin 기능을 억제하고, 다시 부착 인자들의 활성을 유도하기 위하여 $CaCl_2$ 를 처리하고 24시간 후 배양액과 세포를 수집하였다. 수집된 배양액에 VEGF 항원-항체 반응을 유도 하여 그 양을 정량화 하고(도 23의 ELISA 결과 참조), 세포의 RNA를 추출 후 중합 반응을 유도하여 VEGF의 발현량을 확인하였다(도 23의 RT-PCR 결과 참조).

<93> 도 23에 나타난 바와 같이, control 로 사용된 IgG 를 첨가한 경우에 비하여 N-cadherin 중화기능을 가진 항체를 이용하여 N-cadherin 기능을 억제한 그룹(neuN-cad)에서 VEGF 가 RNA(RT-PCR 결과 참조) 및 단백질 수준(ELISA 결과 참조)에서 모두 억제되는 것을 알 수 있다. 상기 결과로부터 N-cadherin 은 중배엽 줄기세포의 대표적 특성 중 하나인 분비능 조절에도 관여하고 있는 것으로 나타났다.

<94>

<95> **(4) 혈관 형성능에 대한 효과**

<96> 혈관 형성시 N-cadherin 의 역할을 보기 위한 실험을 실시하였다. 통상적으로 혈관 형성능을 보기 위하여 사용하는 성장인자가 적은 matrigel BD ™ 을 사용하였다. 구체적으로, matrigel BD ™ (BD Biosciences 제조)을 코팅 후 37℃ 에서 고형화를 유도한 배양 디쉬(dish)에 세포(MO1, MO2)를 뿌린 후 12시간째 N-cadherin 염색하여 MO1 및 MO2 단독으로 유사 혈관을 형성하는 능력을 관찰하여 그 결과를 도 24에 나타내었다. 통상적으로 혈관을 직접적으로 만드는 혈관내피세포가 아닌 세포에 의해 만들어지는 체외 튜브 형성 결과는 체내에서 직접적 증명을 하기 전에는 모두 유사 혈관 형성능으로 분류한다. 도 24 에 나타난 바와 같이, N-cadherin

의 발현이 높은 세포(MO2)가 N-cadherin 의 발현이 낮은 세포(MO1)에 비하여 자체적으로도 유사 혈관 형성도가 높은 것을 알 수 있다.

<97> 또한 MO1 및 MO2 를 인간 탯줄 혈관 내피세포(HUVEC)와 matrigel 에 혼합 배양하여 전형적 혈관 형성 정도를 관찰하였다. 구체적으로, matrigel BD ™ 을 코팅 후 37℃ 에서 고형화를 유도한 배양 dish 에 MO1 또는 MO2 와 인간 탯줄 혈관 내피세포(HUVEC)를 동일 수로 뿌린 후 관찰하였다. 또한 MO2 에 대하여 트립신(trypsin)을 처리한 후, N-cadherin 중화기능을 가진 항체를 이용하여 N-cadherin 기능을 억제시킨 다음(neuN-cad), 인간 탯줄 혈관 내피세포와 동일한 수로 뿌린 후 상기 항체를 처리하지 아니한 MO2 의 경우와 비교하여 도 25에 나타내었다.

<98> 도 25에서 알 수 있는 바와 같이, N-cadherin 의 발현이 높은 MO2 의 경우 혈관내피세포와의 혈관 형성 기여능이 높았으며, N-cadherin 항체 처리시 혈관 형성능이 저하되는 것으로 나타났다. 상기 결과로부터 MO2 에서 혈관 형성능이 높게 나타난 것은 N-cadherin 에 의한 것임을 확인할 수 있으며, 이는 N-cadherin 이 혈관 손상 질환의 호전에 중요한 인자인 혈관 형성능의 조절에도 관여한다는 것이 명백하다.

<99> 결론적으로, N-cadherin 은 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도의 차이를 표지할 수 있는 바이오마커일 뿐만 아니라 다양한 생체 활성 조절 인자로도 작용하는 것으로 나타났다.

【산업상 이용 가능성】

<100> 본 발명은 인간 중배엽 줄기세포의 바이오마커를 이용하여 상이한 유전적 배경 또는 기원을 가지는 여러 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도를 표식화 하고 이를 도표화 · bank 화하여 궁극적으로 규격화하는 것을 가능하게 하며, 나아가 세포치료 및 재생의학에 필요한 고기능의 적절한 인간 중배엽 줄기세포수의 도출을 가능하게 한다. 궁극적으로 본 발명은 인간 중배엽 줄기세포의 세포치료제로서의 효율성을 증대시킴으로서 세포치료제의 실용화를 앞당기는데 기여할 수 있을 것으로 기대되며 나아가 심혈관계질환, 신경계질환 등의 난치병 치료제 개발에 크게 기여할 수 있을 것이다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

하기 단계들을 포함하는, 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표지자(바이오마커)를 선별하는 방법:

a) 생체내 활성도가 상이한 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 DNA 어레이(array)를 실시하는 단계;

b) 상기 인간 중배엽 줄기세포간 발현의 차이를 보이는 유전자들을 선별하는 단계; 및

c) 상기 유전자들 중 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성도 차이를 표지하는 바이오마커를 확인하는 단계.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 인간 중배엽 줄기세포들은 체외(in vitro) 동정 평가에서 유의적 차이가 없는 결과를 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 생체내 활성도는 심혈관 질환을 호전시키는 능력을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 심혈관 질환의 호전도는 허혈성 심혈관 래트(rat) 모델을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 상기 심혈관 질환의 호전도의 측정은 상기 질환 모델에 상기 인간 중배엽 줄기세포를 주입 후 4주 내지 8주째 측정한 심전도 결과를 비교하는 것을 포함하는 방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 인간 중배엽 줄기세포를 상기 질환 모델화 후 7 내지 10일째 주입하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 인간 중배엽 줄기세포를 상기 질환 모델 래트 1마리당 $1X10^5$개 주입하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 1항에 있어서, 상기 인간 중배엽 줄기세포는 인간 제대혈 유래 중배엽 줄

기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제 1항에 있어서, 상기 b) 단계의 유전자에 대하여 RNA 수준 및 단백질 수준에서 그 발현의 차이를 측정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

제 1항에 있어서, 상기 c) 단계는 상기 b) 단계에서 선별된 유전자들에 대하여 그 단백질의 양적 발현 수준과 생체내 활성도와의 상관관계를 확인하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 선별된 인간 중배엽 줄기세포의 바이오마커.

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 상기 바이오마커는 심혈관 질환을 호전시키는 것에 관여하는 것을 특징으로 하는 바이오마커.

【청구항 13】

제 11항에 있어서, 상기 바이오마커는 혈관 형성능을 증가시키는 것을 특징으로 하는 바이오마커.

【청구항 14】

제 11항에 있어서, 상기 바이오마커는 인간 중배엽 줄기세포의 분비능의 조절에 관여하는 것을 특징으로 하는 바이오마커.

【청구항 15】

제 11항에 있어서, 상기 바이오마커가 N-cadherin 인 바이오마커.

【청구항 16】

하기 단계들을 포함하는, 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표식화 시스템:

a) 다양한 유전적 배경 또는 기원을 가지는 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 N-cadherin 유전자의 발현을 확인하는 단계; 및

b) 상기 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 상기 N-cadherin 의 단백질 수준에서의 발현정도를 비교 분석하는 단계.

【청구항 17】

제 16항에 있어서, 상기 생체내 활성은 심혈관 질환을 호전시키는 능력을 포

함하는 것을 특징으로 하는 시스템.

【청구항 18】

하기 단계들을 포함하는, 인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표지자(바이오마커)를 선별하는 방법:

a) 생체내 활성도가 상이한 인간 중배엽 줄기세포들에 대하여 DNA 어레이(array)를 실시하는 단계;

b) 상기 인간 중배엽 줄기세포들 중 가장 높은 생체내 활성을 보이는 세포에서 상대적으로 현저하게 발현되는 유전자들을 선별하는 단계; 및

c) 상기 유전자들 중 그 단백질 발현 수준이 상기 중배엽 줄기세포들의 생체내 활성도 차이와 상관관계를 가지는 유전자를 확인하는 단계.

【청구항 19】

제 18항에 있어서, 상기 인간 중배엽 줄기세포들은 체외(in vitro) 동정 평가시 유의적 차이가 없는 결과를 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 20】

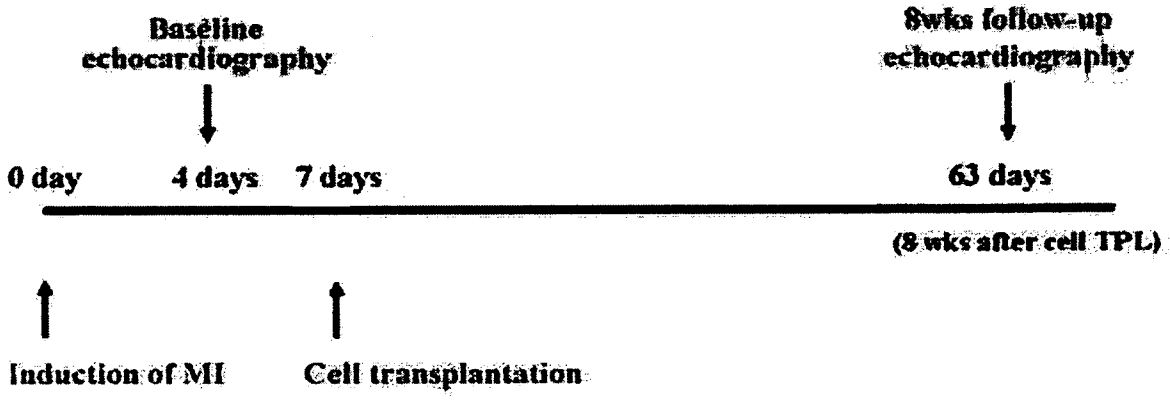
제 18항에 있어서, 상기 생체내 활성도는 심혈관 질환의 호전도를 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 21】

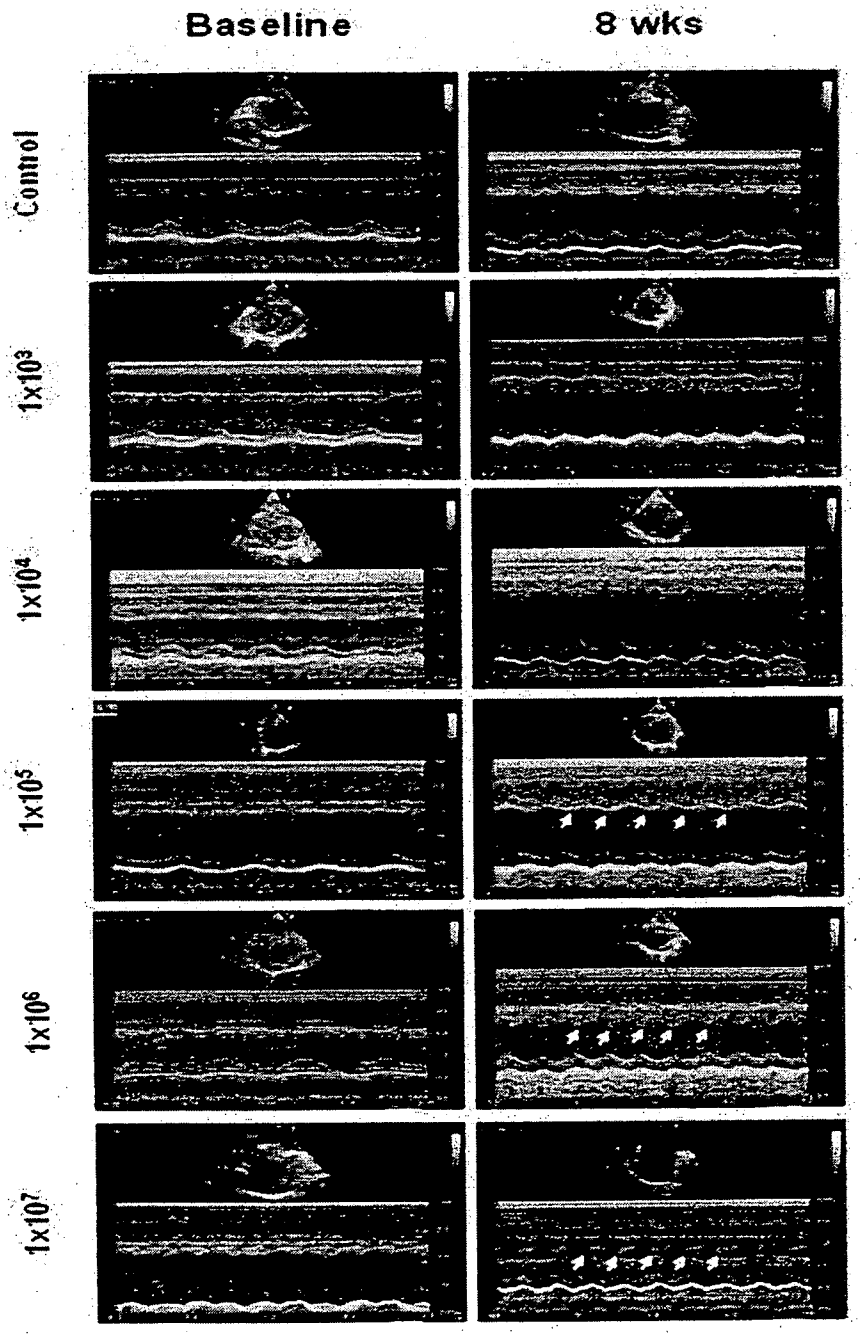
제 18항에 있어서, 상기 인간 중배엽 줄기세포는 인간 제대혈 유래 중배엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【도면】

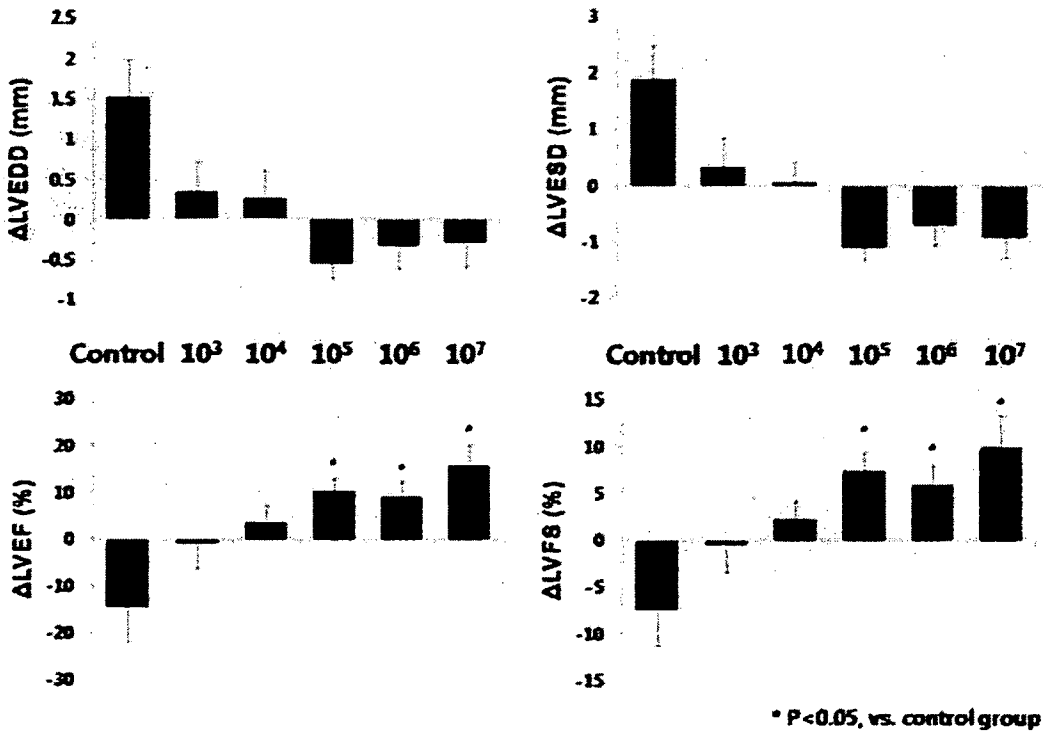
【도 1】


Baseline
echocardiography
8wks follow-up
echocardiography
0 day
4 days
7 days
63 days
(8 wks after cell TPL)
Induction of MI
Cell transplantation

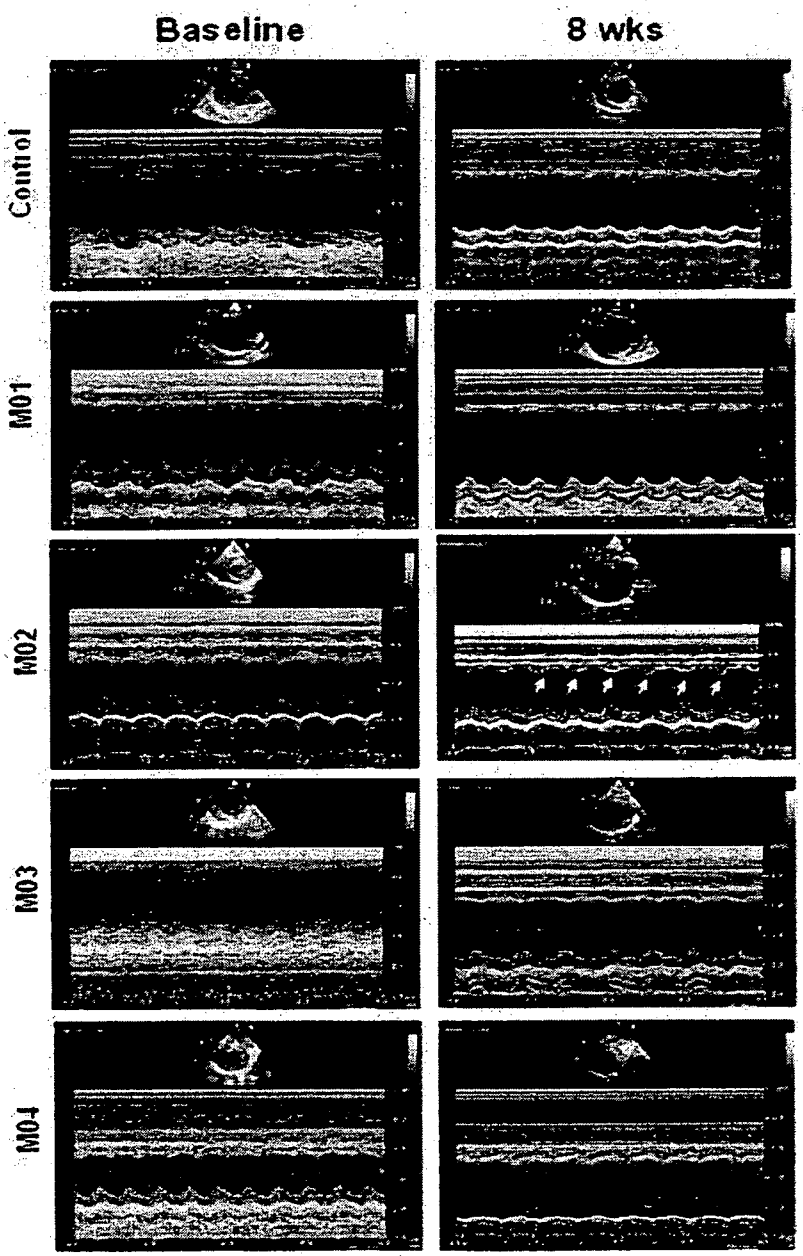
【도 2】



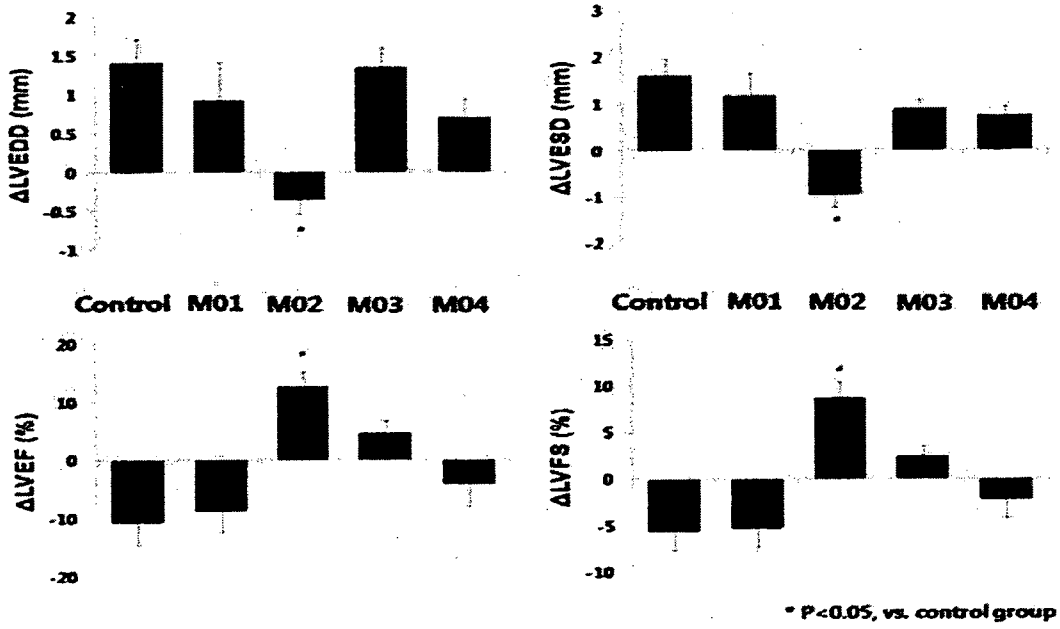
【도 3】


ΔLVEDD (mm)
ΔLVESD (mm)
Control 10³ 10⁴ 10⁵ 10⁶ 10⁷
ΔLVEF (%)
ΔLVFS (%)
Control 10³ 10⁴ 10⁵ 10⁶ 10⁷
* P<0.05, vs. control group

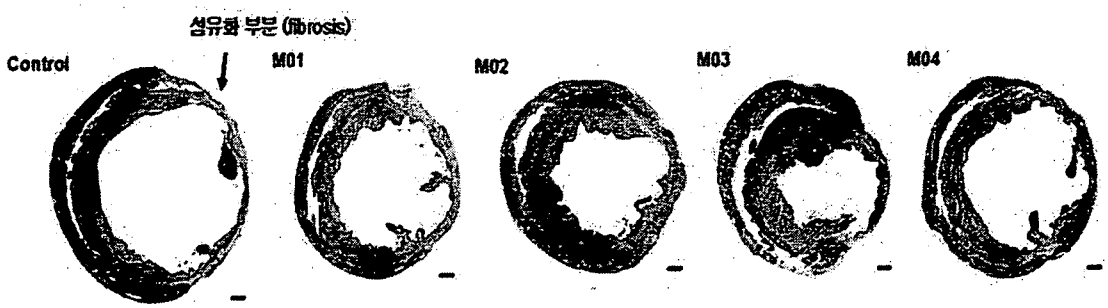
【도 4】



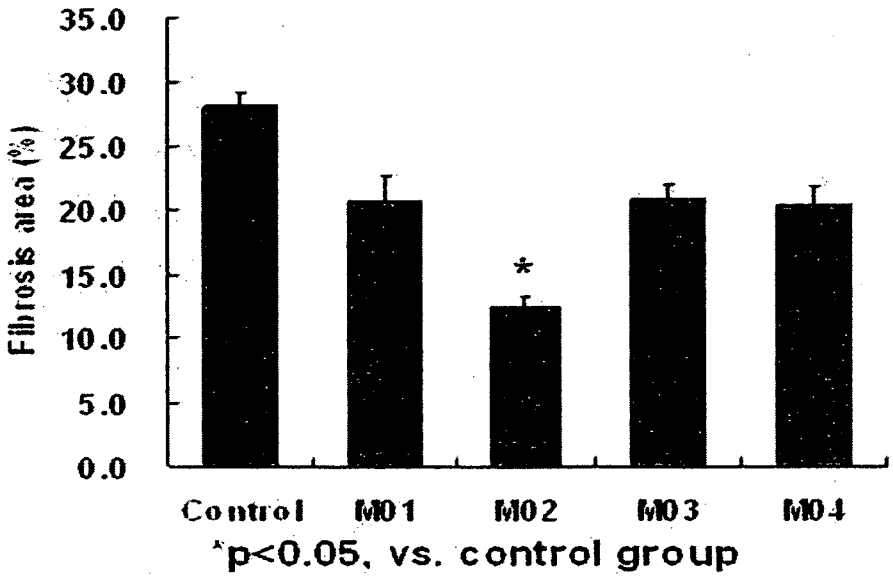
【도 5】


ΔLVEDD (mm)
ΔLVESD (mm)
Control M01 M02 M03 M04
Control M01 M02 M03 M04
ΔLVEF (%)
ΔLVFS (%)
* P<0.05, vs. control group

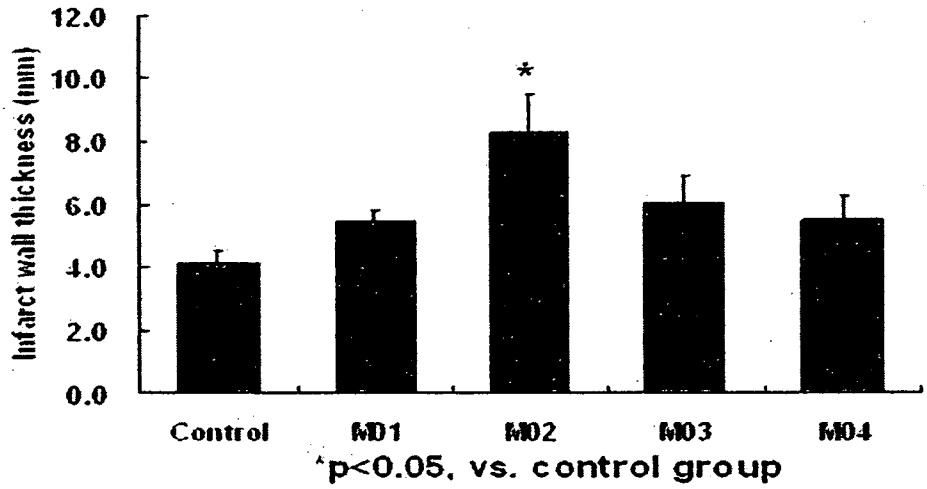
【도 6】


섬유화 부분 (fibrosis)
Control
M01
M02
M03
M04

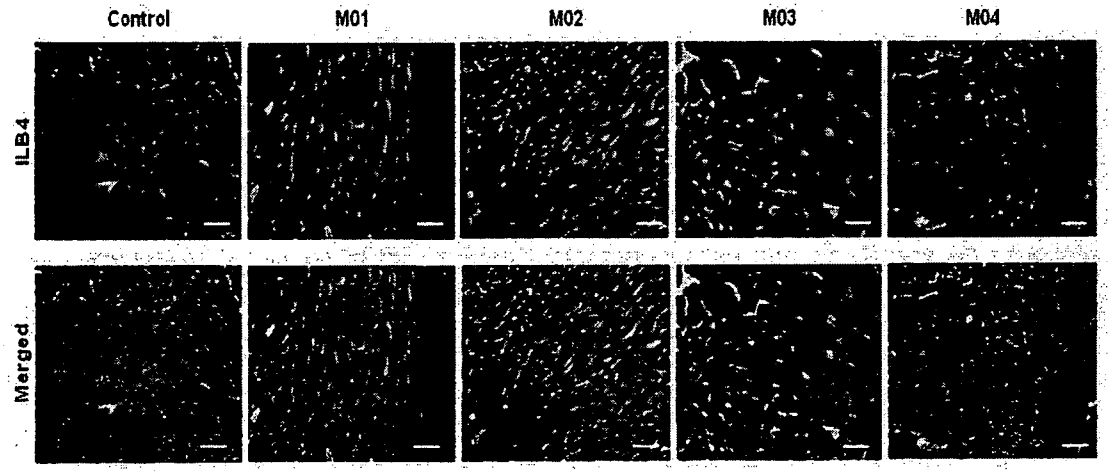
【도 7】


35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
Fibrosis area (%)
*
Control
M01
M02
M03
M04
*p<0.05, vs. control group

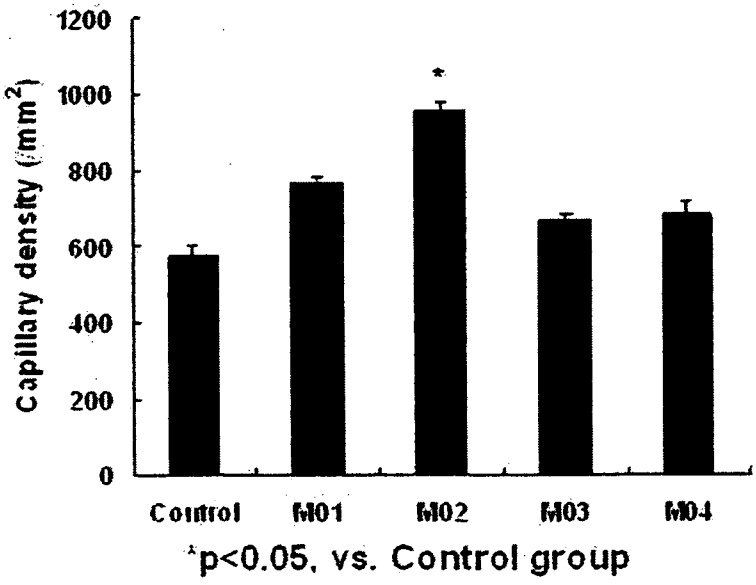
【도 8】


12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
Infarct wall thickness (mm)
*
Control
M01
M02
M03
M04
*p<0.05, vs. control group

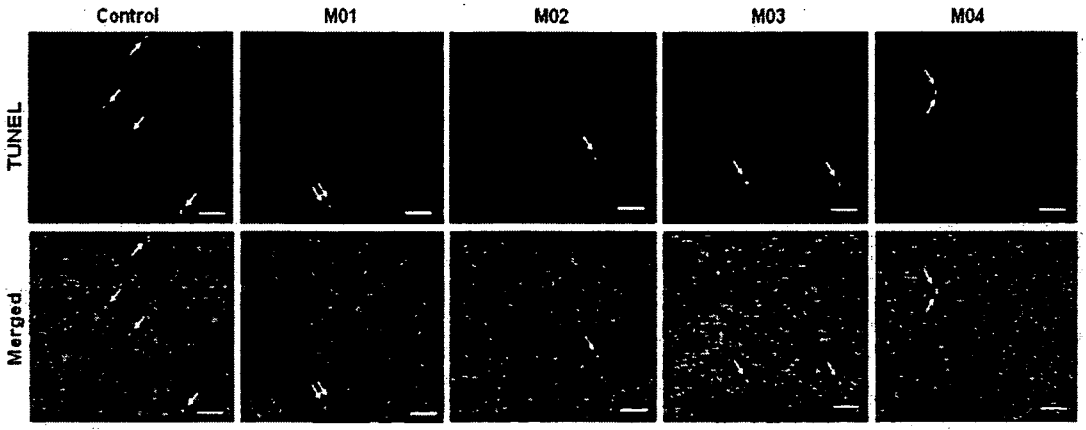
【도 9】


Control
M01
M02
M03
M04
ILB4
Merged

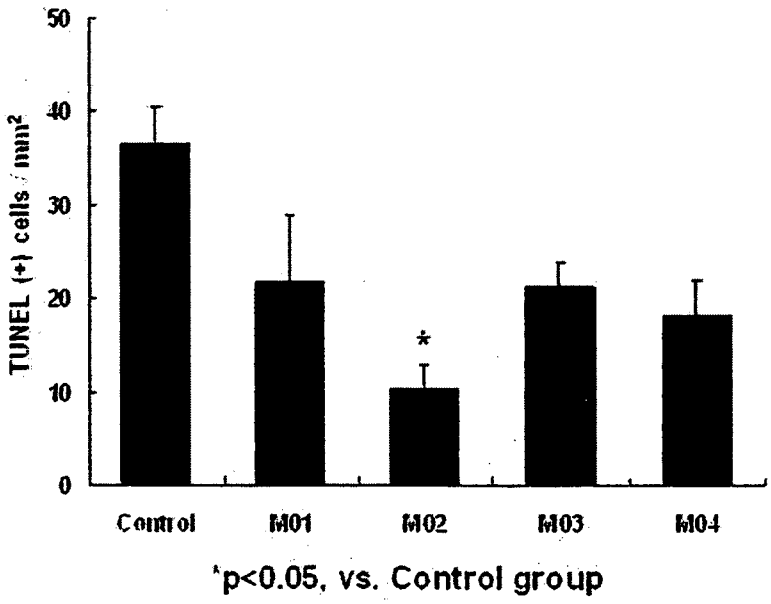
【도 10】


Capillary density (/mm2)
1200
1000
800
600
400
200
0
*
Control
M01
M02
M03
M04
*p<0.05, vs. Control group

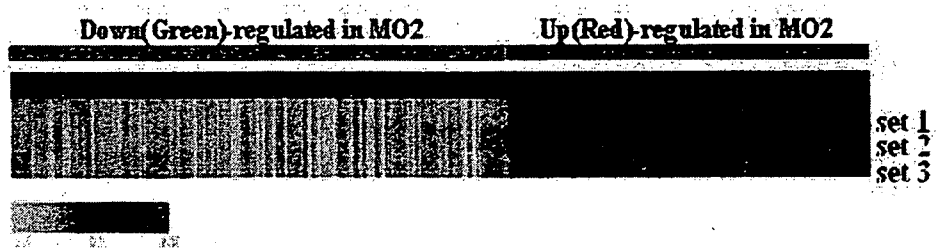
【도 11】


Control
M01
M02
M03
M04
TUNEL
Merged

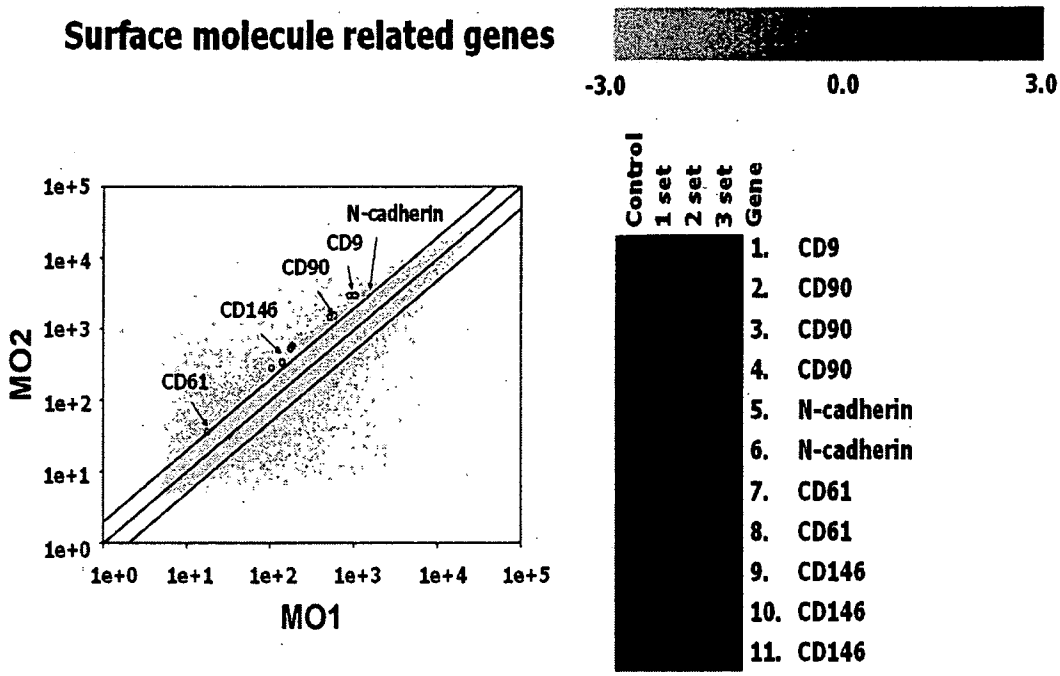
【도 12】


TUNEL (+) cells / mm²
50
40
30
20
10
0
*
Control
M01
M02
M03
M04
*p<0.05, vs. Control group

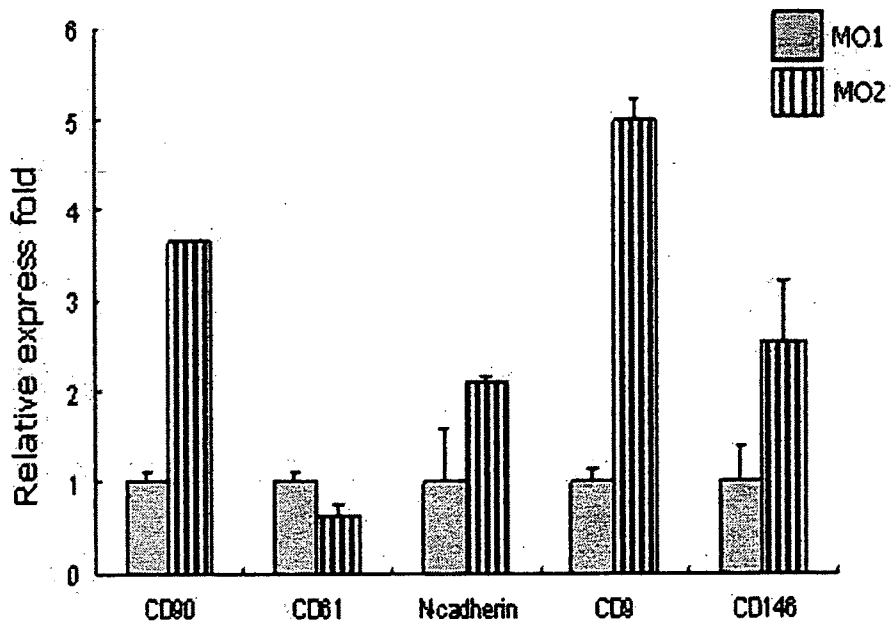
【도 13】


Down(Green)-regulated in MO2
Up(Red)-regulated in MO2
set 1
set 2
set 3

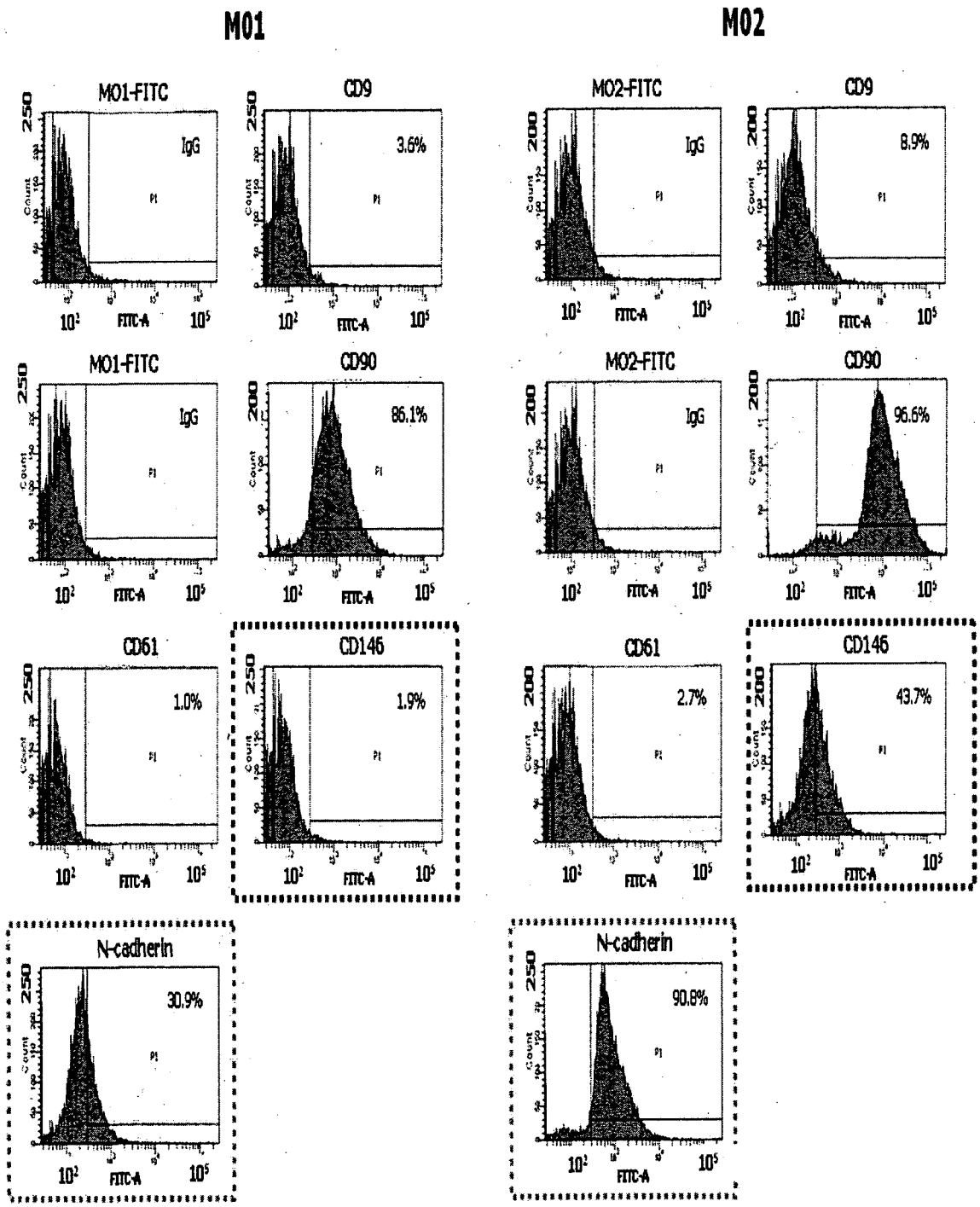
【도 14】


Surface molecule related genes
-3.0
0.0
3.0
MO2
MO1
1e+0
1e+1
1e+2
1e+3
1e+4
1e+5
N-cadherin
CD9
CD90
CD146
CD61
Control
1 set
2 set
3 set
Gene
1. CD9
2. CD90
3. CD90
4. CD90
5. N-cadherin
6. N-cadherin
7. CD61
8. CD61
9. CD146
10. CD146
11. CD146

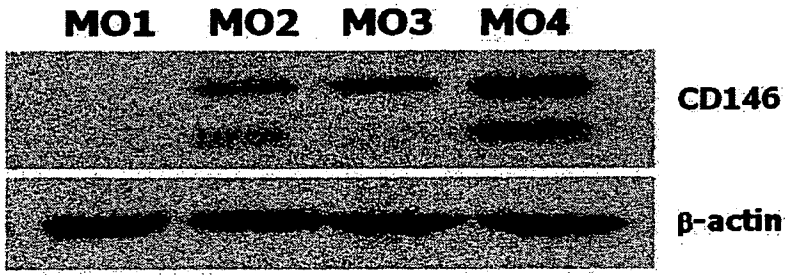
【도 15】

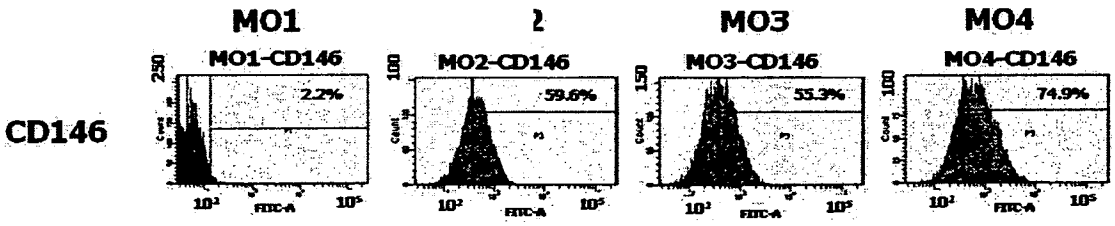

MO1
MO2
Relative express fold
0
1
2
3
4
5
6
CD90
CD61
N-cadherin
CD9
CD146

【도 16】

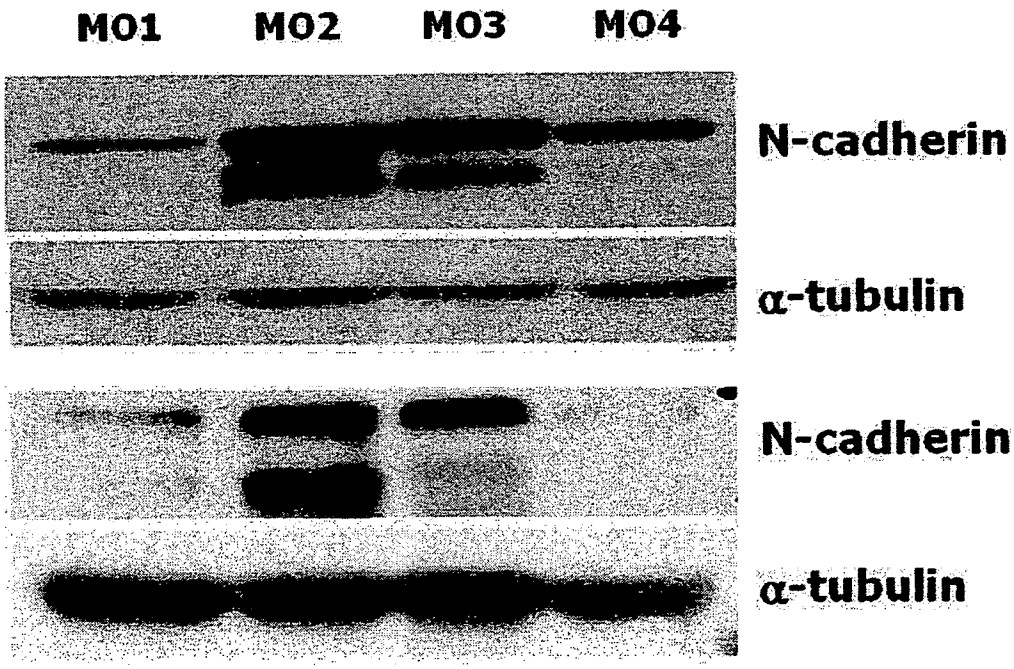

M01
M02
M01-FITC
IgG
CD9
3.6%
M02-FITC
IgG
CD9
8.9%
M01-FITC
IgG
CD90
86.1%
M02-FITC
IgG
CD90
96.6%
CD61
1.0%
CD146
1.9%
CD61
2.7%
CD146
43.7%
N-cadherin
30.9%
N-cadherin
90.8%
Count
FITC-A

【도 17】

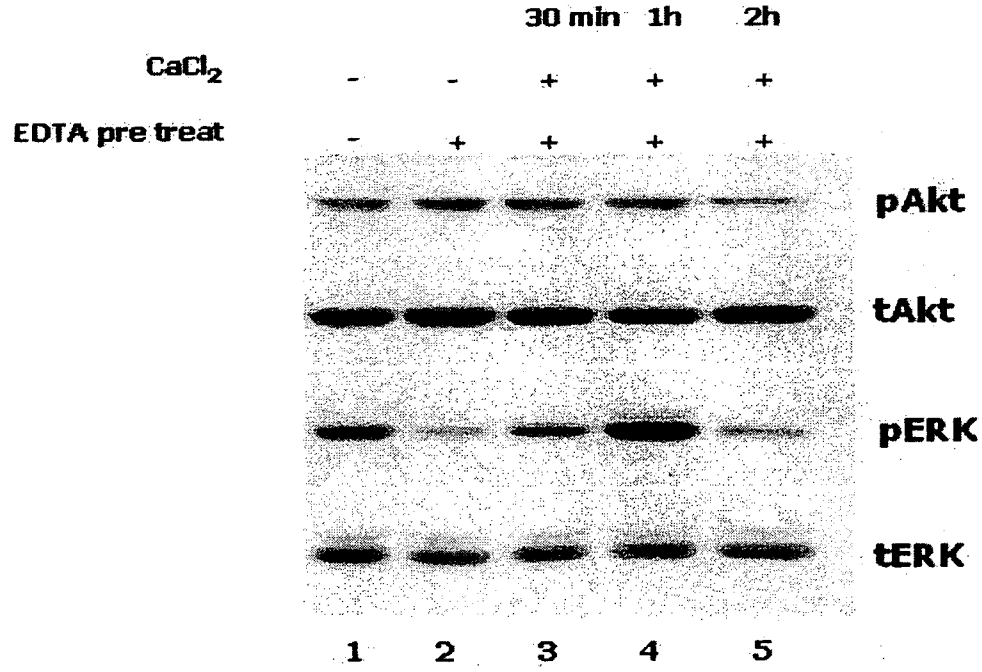

MO1
MO2
MO3
MO4
CD146
β-actin


CD146
MO1
MO1-CD146
2.2%
MO2
MO2-CD146
59.6%
MO3
MO3-CD146
55.3%
MO4
MO4-CD146
74.9%

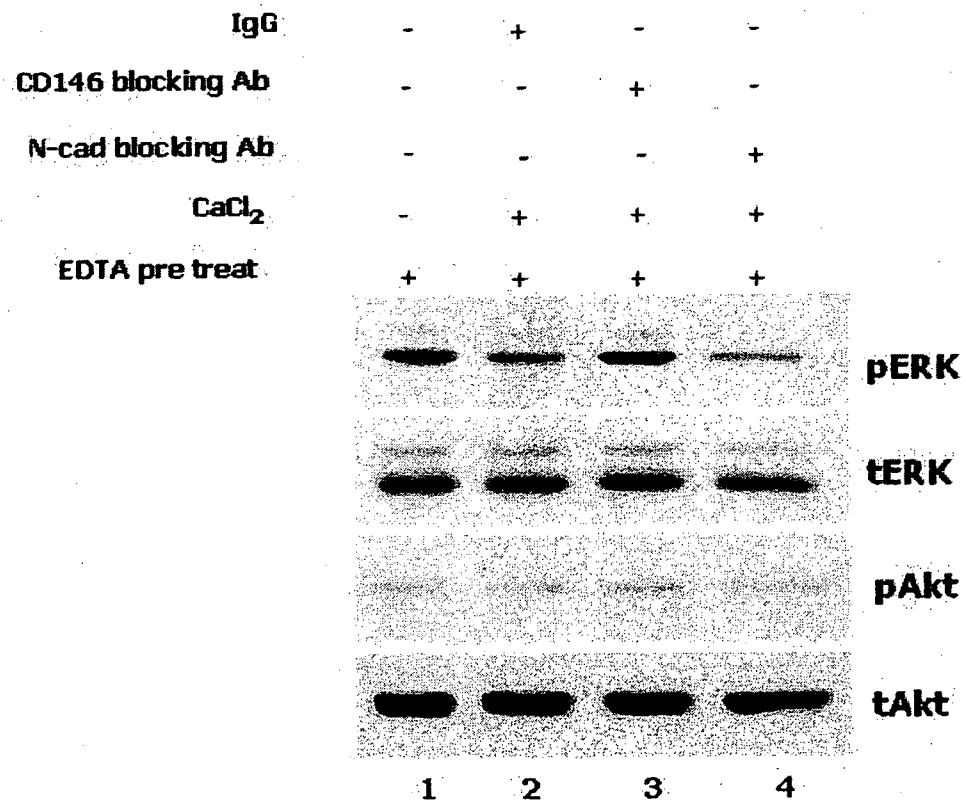
【도 18】


MO1
MO2
MO3
MO4
N-cadherin
α-tubulin
N-cadherin
α-tubulin

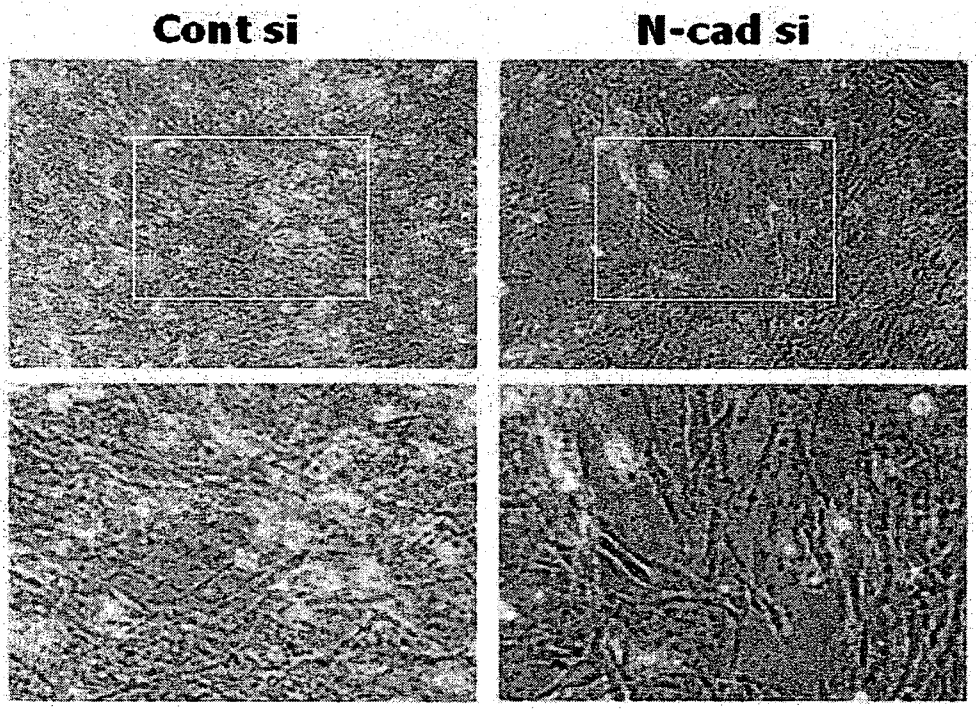
【도 19】


30 min
1h
2h
CaCl2
EDTA pre treat
pAkt
tAkt
pERK
tERK
1
2
3
4
5

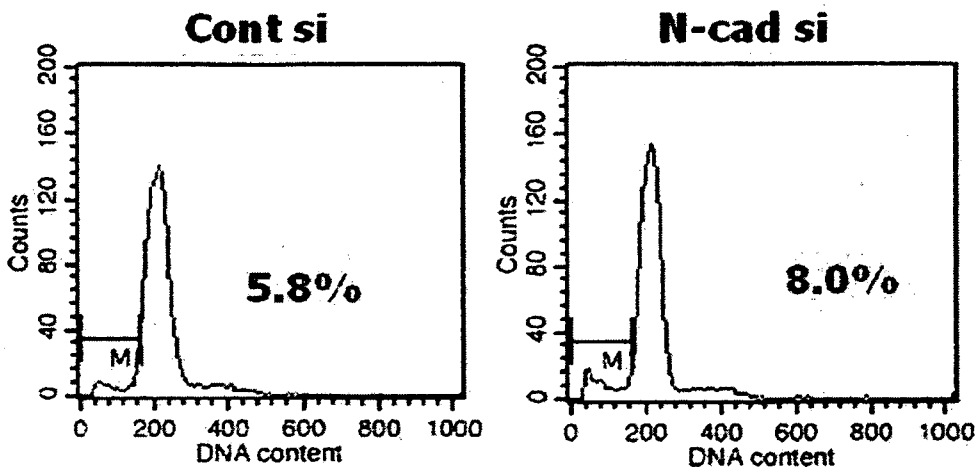
【도 20】


IgG
CD146 blocking Ab
N-cad blocking Ab
CaCl2
EDTA pre treat
pERK
tERK
pAkt
tAkt
1
2
3
4

【도 21】



【도 22】



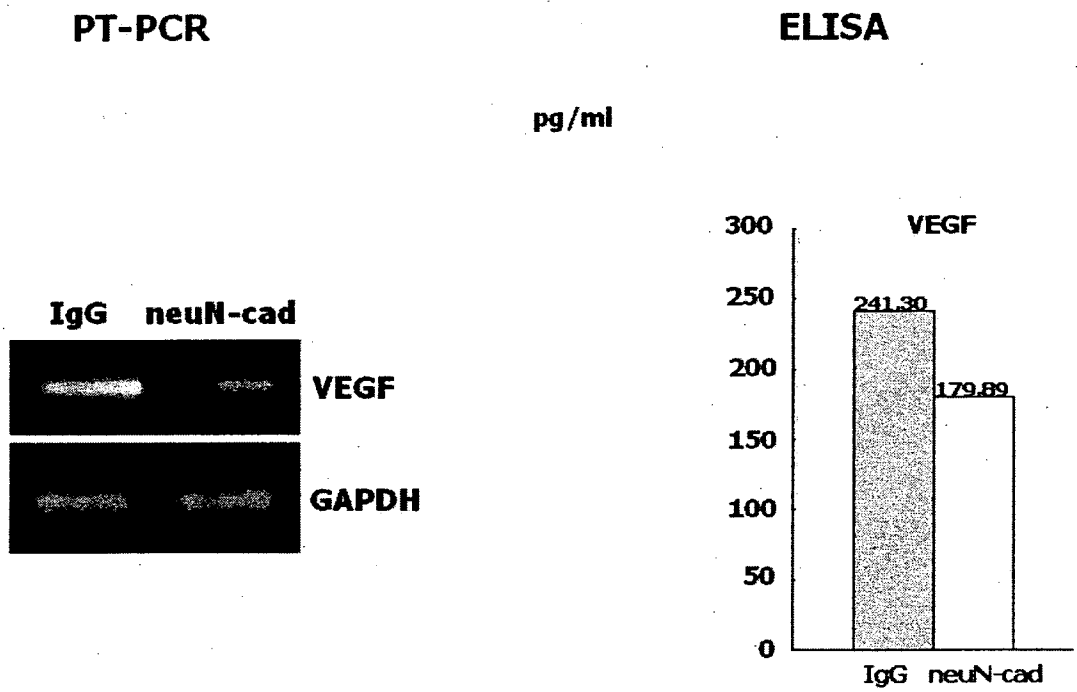
File: 091102.004
Sample ID: # Si con -2
Total Events: 10000

Marker	Left.	Right	% Total
All	0.	1023	100.00
M1	0.	160	5.82

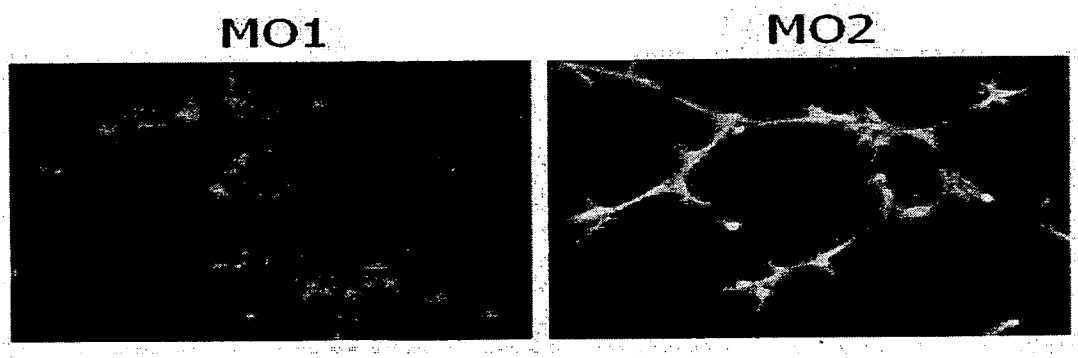
File: 091102.006
Sample ID: # Si N -2
Total Events: 10000

Marker	Left.	Right	% Total
All	0.	1023	100.00
M1	0.	160	8.03

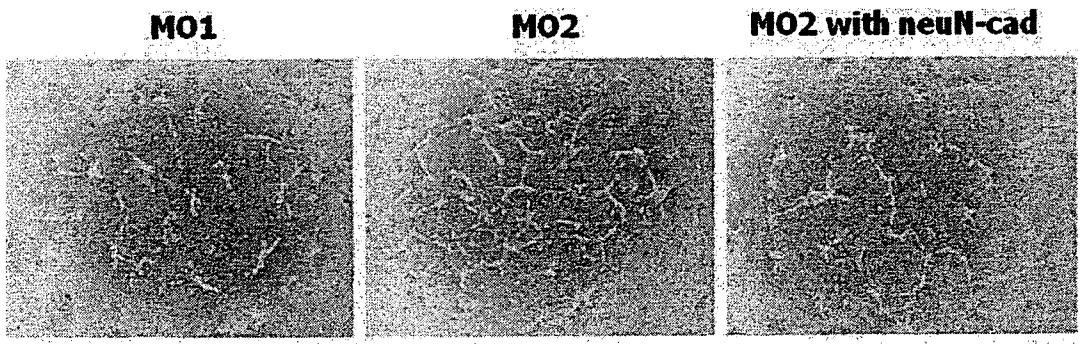
【도 23】


PT-PCR
ELISA
pg/ml
IgG neuN-cad
VEGF
GAPDH
300
250
200
150
100
50
0
VEGF
241.30
179.89
IgG neuN-cad

【도 24】


MO1
MO2

【도 25】


MO1
MO2
MO2 with neuN-cad

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2010/000775

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/12(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)

C12Q 1/68

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)

NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), "mesenchymal stem cell, classification, microarray, biomarker, ischemic heart, cord blood stem cell, etc."

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tarnok, A. et al., "Phenotypes of stem cells from diverse origin" Cytometry A, January 2010, vol. 77, no. 1, pp 6-10 (Epub. 18 December 2009)	1,2,9,10,18,19
Y	- See the entire main text, especially abstract and table 1.	3-8,20,21
X	Menicanin, D. et al., "Genomic profiling of mesenchymal stem cells" Stem Cell Rev, March 2009, vol. 5, no. 1, pp 36-50 (Epub. 18 February 2009)	1,2,9,10,18,19
Y	- See the entire main text, especially abstract; table 1 to table 4.	3-8,20,21
Y	Tang, J. et al., "Combination of chemokine and angiogenic factor genes and mesenchymal stem cells could enhance angiogenesis and improve cardiac function after acute myocardial infarction in rats" Mol Cell Biochem, January 2010, vol. 339, no. 1-2, pp 107-18 (Epub. 8 January 2010) - See the entire main text, especially abstract; pages 109, 115-117; figure 1.	3-7,20
Y	Ichim, T. E. et al., "Placental mesenchymal and cord blood stem cell therapy for dilated cardiomyopathy" Reprod Biomed Online, June 2008, vol. 16, no. 6, pp 898-905 (Epub. 14 April 2007) - See the entire main text, especially abstract; pages 902-903.	8,21

☒ 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	Date of mailing of the international search report
28 MARCH 2011 (28.03.2011)	**28 MARCH 2011 (28.03.2011)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 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/KR2010/000775

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Riekstina, U. et al., "Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived form bone marrow, adipose tissue, heart and dermis' Stem Cell Rev, December 2009, vol. 5, no. 4, pp 378-86 - See the entire main text.	1-10,18-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2010/000775

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **11-17**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See extra sheet.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of item 2 of Box No.II

1) Claims 11-15 relate to "a biomarker for human mesencymal stem cells". However, the claims only describe a functional expression of the biomarker and, do not describe the specific technical constitution at all, and thus an effective international search report cannot be established.

2) Claims 16 and 17 relate to "a labeling system of human mesenchymal stem cell activity in vivo". However, since it is unclear what the system means, the subject matter to be protected is not clearly defined. Therefore, an effective international search report cannot be established.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2010/000775

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2010/000775

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/12(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/68

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))
NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), 'mesenchymal stem cell, classification, microarray, biomarker, ischemic heart, cord blood stem cell, etc.'

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	Tarnok, A. et al., `Phenotypes of stem cells from diverse origin` Cytometry A, January 2010, Vol. 77, No. 1, pp6-10 (Epub. 18 December 2009) -본문 전체, 특히 초록 및 표1 참조.	1,2,9,10,18,19 3-8,20,21
X Y	Menicanin, D. et al., 'Genomic profiling of mesenchymal stem cells' Stem Cell Rev, March 2009, Vol. 5, No. 1, pp36-50 (Epub 18 February 2009) -본문 전체, 특히 초록; 표1 내지 표4 참조.	1,2,9,10,18,19 3-8,20,21
Y	Tang, J. et al., 'Combination of chemokine and angiogenic factor genes and mesenchymal stem cells could enhance angiogenesis and improve cardiac function after acute myocardial infarction in rats' Mol Cell Biochem, January 2010, Vol. 339, No. 1-2, pp107-18 (Epub. 8 January 2010) -본문 전체, 특히 초록; 페이지 109, 115-117; 도1 참조.	3-7,20
Y	Ichim, T. E. et al., 'Placental mesenchymal and cord blood stem cell therapy for dilated cardiomyopathy' Reprod Biomed Online, June 2008, Vol. 16, No. 6, pp898-905 (Epub. 14 April 2007) -본문 전체, 특히 초록; 페이지 902-903 참조.	8,21

☒ 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 특허 문헌

"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	국제조사보고서 발송일
2011년 03월 28일 (28.03.2011)	**2011년 03월 28일 (28.03.2011)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
이준혁
전화번호 82-42-481-8115

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2010/000775

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	Riekstina, U. et al., 'Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis' Stem Cell Rev, December 2009, Vol. 5, No. 4, pp378-86 -본문 전체 참조.	1-10,18-21

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2010/000775

제**2**기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견**(**첫 번째 용지의 **2**의 계속**)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☒ 청구항: **11-17**
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
별지 참조.

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제**3**기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견**(**첫 번째 용지의 **3**의 계속**)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

제2기재란의 2항목 계속.

1) 청구항 11 내지 청구항 15는 '인간 중배엽 줄기세포의 바이오마커'에 관한 것으로, 상기 바이오마커를 기능적인 표현으로만 기재하고 있을 뿐, 구체적인 기술구성에 관하여서는 전혀 기재되어 있지 않으므로, 유효한 국제조사를 수행할 수 없습니다.

2) 청구항 16 및 청구항 17은 '인간 중배엽 줄기세포의 생체내 활성 표식화 시스템'에 관한 것으로, 상기 시스템이 의미하는 것이 불명확하여, 보호받고자 하는 사항이 명확하게 정의되지 않으므로, 유효한 국제조사를 수행할 수 없습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2010/000775

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음