



- (51) 국제특허분류:
C12N 5/074 (2010.01) C07D 311/30 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/009111
- (22) 국제출원일: 2013년 10월 11일 (11.10.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0113636 2012년 10월 12일 (12.10.2012) KR
- (71) 출원인: 서강대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION SOGANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 121-742 서울시 마포구 백범로 35 서강대학교 테이아르관 306호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 차혁진 (CHA, Hyuk Jin); 135-863 서울시 강남구 선릉로 130길 19 서광아파트 101동 106호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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).

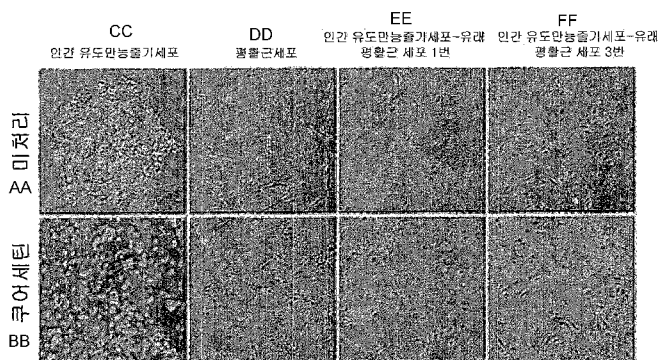
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD FOR SUPPRESSING TERATOMA FORMATION VIA SELECTIVE CELL DEATH INDUCTION IN UNDIFFERENTIATED HUMAN-INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 발명의 명칭: 미분화 인간 유도만능줄기세포의 선택적 세포사멸 유도를 통한 테라토마 형성 억제 방법

Fig. 1a



AA ... Unprocessed
BB ... Quercetin
CC ... Human-induced pluripotent stem cells
DD ... Smooth muscle cells
EE ... Human-induced-pluripotent-stem-cell-derived smooth muscle cells No. 1
FF ... Human-induced-pluripotent-stem-cell-derived smooth muscle cells No. 3

(57) Abstract: The present invention relates to a production method for induced-pluripotent-stem-cell-derived differentiated cells, from which undifferentiated induced pluripotent stem cells (iPS) have been eliminated, the method comprising the steps of: (a) preparing a cell sample comprising undifferentiated induced pluripotent stem cells and differentiated cells by differentiating induced pluripotent stem cells; and (b) selectively causing the death of the undifferentiated induced pluripotent stem cells by subjecting the product of step (a) to processing either with quercetin of formula 1 below or with YM-155 of formula 2 below. According to the present invention, the present invention makes it possible to effectively selectively cause the death only of undifferentiated induced pluripotent stem cells by causing induced pluripotent stem cells to differentiate into specific differentiated cells and then carrying out culturing in a differentiating culture medium comprising quercetin or YM-155, and, in the induced pluripotent stem cell differentiation method according to the present invention, only undifferentiated induced pluripotent stem cells that are a cause of teratoma formation are selectively caused to die, and thus differentiated differentiating cells are completely unaffected. In other words, the invention can be expected to ensure safety as the possibility of tumour formation during clinical use as a cell therapeutic agent

is eliminated since the survival and functioning of the differentiated cells is maintained unchanged.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 (a) 유도만능줄기세포를 분화시켜 미분화 유도만능줄기세포 및 분화세포 (differentiated cells)를 포함하는 세포시료를 준비 (preparation)하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 다음 화학식 1의 '쿠어세틴 (Quercetin)' 또는 다음 화학식 2의 YM-155를 처리하여 미분화 유도만능줄기세포를 선택적으로 사멸시키는 단계를 포함하며, 미분화 유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된, 유도만능줄기세포 유래 분화세포의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 유도만능줄기세포로부터 특정 분화세포로 분화시킨 후, 쿠어세틴 또는 YM-155를 포함하는 분화용 배지에서 배양함으로써, 미분화된 유도만능줄기세포만을 효과적으로 선택적 사멸시킬 수 있으며, 본 발명에 따른 유도만능줄기세포 분화방법은 테라토마 형성의 원인이 되는 미분화된 유도만능줄기세포만을 선택적 사멸하여 분화된 분화세포에는 전혀 영향을 미치지 않는다. 즉, 분화세포의 생존능 및 기능은 그대로 유지시키므로, 임상에서 세포 치료제로의 적용 시 종양 형성 가능성을 배제함으로써 안전성 확보가 기대된다.

【명세서】

【발명의 명칭】

미분화 인간 유도만능줄기세포의 선택적 세포사멸 유도를 통한 테라토마 형성 억제 방법

5

【기술 분야】

본 발명은 대한민국 교육과학기술부의 지원 하에서 과제번호 2011-0030832에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 “기초연구사업-선도연구센터육성사업 (이공학분야)-유전체 불안정성 제어연구센터”, 연구과제명은 “줄기세포 유전체 안정성 유지 신호 연구”, 주관기관은 서강대학교, 연구기간은 2011. 09. 07 ~ 2018. 08. 31 이다.

본 특허출원은 2012년 10월 12일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2012-0113636 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 미분화 인간 유도만능줄기세포의 선택적 세포사멸 유도를 통한 테라토마 형성 억제법에 관한 것이다.

【배경 기술】

인간 유도만능줄기세포는, 인간 몸을 구성하는 삼배엽성(내배엽, 중배엽, 외배엽)으로 분화될 수 있는 전분화능(Pluripotency)을 가지며 끊임없이 분열을 거듭하는 특성(self-renewal)을 가지는 세포로서, 재생의학(regenerative medicine)에 필요한 세포들, 예를 들어, 신경세포, 간세포, 혈액세포 등으로의 분화와 관련하여 다양한 연구가 진행되고 있다.

인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 세포를 얻기 위해서는, 인간 유도만능 줄기세포를 특정 세포로 분화를 유도하고, 분화된 세포의 특정 표지 인자(surface makers)의 항체를 이용하여 인지된 세포를 유세포 분리기(Fluorescent Activated Cells Sorter : FACS)를 통해 분리하여 분화된 세포만을 얻거나(Fukuda, H 등, "Fluorescence-Activated Cell Sorting-Based Purification of Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursors Averts Tumor Formation After Transplantation" Stem

Cells(2006)(24.3: 763-771)), 또는 항체를 이용하여 표지시킨 후 자성을 이용한 분리법(Magnetic Cell sorting: MACS)이 사용되고 있다(David, R 등, "Magnetic Cell Sorting Purification of Differentiated Embryonic Stem Cells Stably Expressing Truncated Human Cd4 as Surface Marker" Stem Cells(2005)(23.4: 77-82)). 자성을 이용한 분리법(MACS)은 유세포 분리기를 이용할 경우 시행되는 레이저에 대한 세포의 노출의 위험을 제거할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

그러나, FACS 및 MACS 방법 모두 미분화된 유도만능 줄기세포의 혼재 가능성을 배제할 수 없기 때문에, 100%의 순도로 분화된 세포만을 분리하는 것은 기술적인 한계가 있다. 특히, 유도만능 줄기세포에서 유래한 분화세포에서 미분화세포가 혼재되어 있을 가능성이 존재하여, 유도만능 줄기세포를 이용한 세포치료제 개발에 있어서 테라토마라는 미분화 만능 줄기세포에서 유래한 종양형성 위험에 대한 문제점이 끊임없이 대두되고 있는 실정이다. 따라서, 분화된 세포에는 영향이 없이, 테라토마의 위험성이 내재된 미분화 세포를 선택적으로 제거하는 기술의 개발이 당 업계에 요구되고 있다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 순수하게 얻을 수 있는 방법, 특히 테라토마 형성의 원인이 되는 미분화 유도만능 줄기세포의 종양 형성 가능성을 제거하여 분화된 세포만을 순수하게 얻을 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 항-세포사멸 인자인 서바이빈(Survivin)의 발현을 억제하는 쿼세틴(Quercetin) 또는 YM-155 를 처리하면, 분화된 세포에는 전혀

영향을 미치지 않으면서 미분화 유도만능줄기세포만이 효과적으로 선택적 사멸된다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된, 유도만능줄기세포 유래 분화세포의
5 제조방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된 세포 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 미분화 유도만능줄기세포의 선택적 사멸용 조성물을 제공하는 데 있다.

10

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

【과제의 해결 수단】

15 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하며, 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된, 유도만능줄기세포 유래 분화세포의 제조방법을 제공한다:

(a) 유도만능줄기세포를 분화시켜 미분화 유도만능줄기세포 및 분화세포(differentiated cells)를 포함하는 세포시료를
20 준비(preparation)하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 결과물에 쿼세틴(Quercetin) 또는 YM-155 을 처리하여 미분화 유도만능줄기세포를 선택적으로 사멸시키는 단계.

본 발명자들은 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 순수하게 얻을 수 있는 방법, 특히 테라토마 형성의 원인이 되는 미분화 유도만능 줄기세포의 종양 형성 가능성을 제거하여 분화된 세포만을 순수하게 얻을 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 항-세포사멸 인자인 서바이빈(Survivin)의 발현을 억제하는 쿼세틴(Quercetin) 또는 YM-155 를 처리하면, 분화된 세포에는 전혀
25 영향을 미치지 않으면서 미분화 유도만능줄기세포만이 효과적으로 선택적 사멸된다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

30

본 발명의 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된, 유도만능줄기세포 유래 분화세포의 제조방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:

단계 (a): 유도만능줄기세포를 분화시켜 미분화 유도만능줄기세포 및 분화세포(differentiated cells)를 포함하는 세포시료 준비(preparation)

본 발명에 따르면, 우선 유도만능줄기세포를 분화시켜 미분화 유도만능줄기세포 및 분화 세포를 포함하는 세포시료를 준비한다.

상기 세포시료는 다양하게 준비될 수 있다. 예를 들어, 유도만능줄기세포를 분화시킨(예컨대, 평활근 세포로 분화) 결과물이 상기 세포시료이다. 유도만능줄기세포를 분화시킨 결과물에는 일반적으로 모든 세포들이 분화세포를 포함하지 않으며, 미분화 유도만능줄기세포가 소량 잔존 해 있는 비균질 파플레이션을 이룬다. 따라서, 분화시킨 결과물을 세포 치료제로 이용하기 위해서는 미분화 유도만능줄기세포의 완전한 제거가 필요하다.

본 명세서에서 사용되는 용어 “유도만능줄기세포”는 비-전분화능 세포(예를 들면, 체세포)로부터 특정 유전자를 삽입하여 인위적으로 유래된 전분화능 줄기세포이다. 상기 유도만능줄기세포는 줄기세포 유전자 및 단백질 발현, 염색체 메틸화, 배가시간(doubling time), 배아체 형성, 테라토마 형성, 생존성 키메라 형성, 교잡성 및 분화성을 가지는 면에서 전분화능 줄기세포(예를 들면, 배아줄기세포)와 동일하다고 여겨진다.

본 명세서에서 사용되는 용어 “분화세포”는 줄기세포가 특정 분화 자극에 의해 특정 세포로 분화가 진행된 세포이다.

본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 유도만능줄기세포는 인간, 소, 말, 염소, 양, 개, 고양이, 마우스, 래트 또는 조류로부터 유래된 것이고, 바람직하게는 인간 유도만능줄기세포이다.

상기 유도만능줄기세포는 분화된 세포를 3 종 또는 4 종의 유전자를 도입시켜 배아줄기세포의 전분화성을 유도한 전능 세포를 의미하며, 이러한 유도만능줄기세포는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 용이하게 구축될 수 있다(Takahashi K, Yamanaka S (August 2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast

cultures by defined factors". *Cell* 126(4):663-76). 예를 들어, 마이토마이신-C 를 처리하여 증식을 억제시킨 생쥐 배아 섬유아세포(MEF)가 지지세포로서 포함되고, 소태아혈청(FBS), β -머캅토에탄올 및 비-필수 아미노산이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)과 같은 적절한 배지에서 배양한 후, 혈청대체물, β -머캅토에탄올, 비-필수 아미노산 및 bFGF2 로 보충된 Knockout-DMEM 에서 계대 배양하여 유도만능 줄기세포를 얻을 수 있다. 알려진 유도만능줄기세포주로서 예컨대, SES-8 (Tae-Hee Lee 등, "Functional Recapitulation of Smooth Muscle Cells Via Induced Pluripotent Stem Cells From Human Aortic Smooth Muscle Cells" *Circulation Research*(2010) (106:120-128)) 등을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 방법에서 이용되는 유도만능줄기세포는 유래되는 대상에 대하여 자가(autologous)이거나 또는 타가(allogenic)일 수 있으나, 바람직하게는 자가이다. 자가 유도만능줄기세포는 객체 자신의 조직으로부터 유도만능줄기세포를 분리 및 배양하여 제조된다.

본 발명의 방법에 있어서, 쿠어세틴 또는 YM-155 가 처리되는 세포시료는 유도만능줄기세포를 분화시켜 얻은 어떠한 결과물도 포함한다.

예를 들어, 유도만능줄기세포를 특정 세포로 분화시켜 얻은 세포 파플레이션 및 유도만능줄기세포로부터 유래된 배상체(embryoid body)를 분화시켜 얻은 세포 파플레이션 등을 본 발명에서 이용할 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "배상체(embryoid body)" 는 배아 줄기 세포가 자연 분화되어 형성되는 세포 덩어리로, 내배엽, 중배엽 및 외배엽의 3 가지 배아 배엽층(three germ layer)으로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포 집합체를 의미하며, 얻어진 배상체는 적당한 배지 상태에서 유지될 수 있다. 유도만능줄기세포로부터 배상체를 형성하는 방법은 당업계에 알려진 다양한 방법을 통해 실시할 수 있다. 예를 들어, Kim J 등, "Effective Isolation and Culture of Endothelial Cells in Embryoid Body Differentiated from Human Embryonic Stem Cells" *Stem cell and Development*(2007)(16:269-280)에 개시된 방법에 따라 유도만능줄기세포를 혈청(또는 혈청 대체물), L-글루타민, 비필수 아미노산, 및 β -머캅토에탄올을 포함하는 DMEM/F12 배지에서 배양함으로써, 배상체를

형성할 수 있다. 또한, 유도만능줄기세포의 콜로니를 공배양된 주변 지지세포(MEF)로부터 분리하여, bFGF2 가 첨가되지 않은 배양액, 즉, 혈청대체물, β -머캅토에탄올, 비-필수 아미노산 및 bFGF2 로 보충된 Knockout-DMEM 중에서 부유 배양함으로써 배상체를 형성할 수 있다.

- 5 본 발명의 방법에 있어서, 얻고자 하는 세포의 종류에 따라 다양한 조성의 기질 세포를 배지에 함유할 수 있으며, 상기 배상체의 분화방법은 공지의 방법에 따라 수행할 수 있다. 예를 들어, Cho SW 등 “Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia” Circulation (2007)(20;116(21):2409-19)에 개시된
10 바와 같이, 유도만능줄기세포 유래의 배상체를 내피 세포(Endothelial cells)로 분화시키는 경우, 배상체를 적절한 배양용 배지(예를 들어, 10% 소태아혈청(FBS) 및 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 DMEM/F12 배지)에서 약 9 일간 부유 배양시킴으로써 얻을 수 있다. 이와 같이 얻은 배상체는
15 예컨대, 파이펫을 이용하여 물리적인 힘을 가해, 배상체의 중심부를 분리하여 얻을 수 있으며, 이렇게 분리한 인간 배상체의 중심부는 상기 줄기세포 분화용 배지(예컨대, ECM-2)에서 배양될 수 있다. 상기과 같은 방법을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- 20 단계 (b): 상기 단계 (a)의 결과물에 쿼세틴 (Quercetin) 또는 YM-155 을 처리하여 미분화된 유도만능줄기세포를 선택적으로 사멸시키는 단계

- 이어서, 미분화 유도만능줄기세포를 선택적으로 제거하기 위하여, 상기 단계 (a)의 결과물에 쿼세틴 (Quercetin) 또는 YM-155 을 처리한다. 그
25 결과, 분화세포에는 전혀 영향을 미치지 않아 분화세포의 생존능 및 기능은 그대로 유지되고, 미분화된 유도만능줄기세포만이 선택적으로 사멸된다.

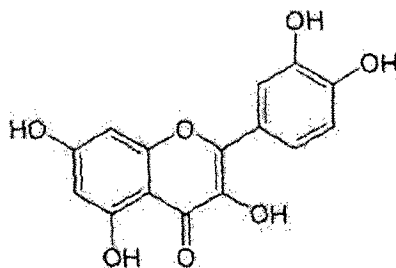
- 본 명세서에서 미분화 유도만능줄기세포를 언급하면서 사용되는 용어 “제거 (depletion or removal)” 는 비균질 세포 파플레이션으로부터 미분화 유도만능줄기세포가 실질적으로 제거되어 테라토마를 형성하지 않는
30 것을 의미한다. 예를 들어, 용어 “제거” 는 본 발명의 방법이 적용된 시료에서 미분화 유도만능줄기세포의 양이 1% 미만, 바람직하게는 0.5%

미만, 보다 바람직하게는 0.1% 미만, 가장 바람직하게는 실질적으로 없는 것을 의미한다. 상기 용어 "%" 는 세포개수(cell count)를 기준으로 한 백분율이다.

본 명세서에서 세포 사멸은 특별하게 다르게 언급되지 않는 한, 아폽토시스를 의미한다. 아폽토시스(apoptosis)는 다세포에서 일어나는 프로그램화된 세포사멸(programmed cell death: PCD)이다(Alberts, Bruce et al., (2008). "Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells". Molecular Biology of the Cell(5th ed.). Garland Science. p. 1115). 아폽토시스의 생화학적 현상은 세포의 형태를 변화시키고 사멸을 이끈다. 이러한 변화는 세포막의 기포형성, 세포 수축, 핵 파쇄, 염색체 응축 및 염색체 DNA 파쇄를 포함한다. 세포괴사와 다르게, 아폽토시스에 의해 생산된 아폽토틱 바디는 세포 밖으로 유출되어 세포를 손상시키기 전에 탐식형 세포(phagocytic cells)가 에워싸서 제거하게 된다.

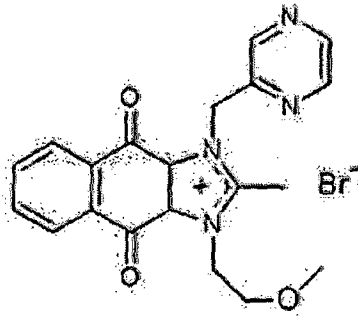
본 발명에서 이용되는 쿠어세틴(Quercetin)은 항-세포사멸 인자인 서바이빈(Survivin)의 화학적 억제제이며, 화학명은 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one 으로 하기 화학식 1의 구조를 갖는다:

화학식 1



본 발명에서 이용되는 YM-155 은 항-세포사멸 인자인 서바이빈(Survivin)의 화학적 억제제이며, 화학명은 4,9-Dihydro-1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(2-pyrazinylmethyl)-1H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromide 으로, 하기 화학식 2의 구조를 갖는다:

화학식 2



본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 처리되는 쿠어세틴의 농도는 20-100 μM 이며, 보다 바람직하게는 30-90 μM , 보다 더 바람직하게는 40-80 μM , 가장 바람직하게는 50 μM 이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 YM-155 의 농도는 2-80 nM 이며, 보다 바람직하게는 5-70 nM, 보다 더 바람직하게는 10-60 nM, 가장 바람직하게는 10-50 nM 이다.

본 발명의 단계 (b)의 배양 기간은 크게 제한되지 않으나, 바람직하게는 약 5-100 시간, 보다 바람직하게는 약 10-50 시간, 보다 더 바람직하게는 약 15-30 시간, 가장 바람직하게는 약 24 시간이다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의해 미분화 유도만능줄기세포가 제거된 세포 조성물을 제공한다.

본 발명의 조성물은 상기 상술된 본 발명의 방법에 의해 제조된 것이기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

상기 본 발명의 방법에 의해 미분화 유도만능줄기세포가 제거된 세포 조성물은 다양한 응용성을 가지며, 특히 세포 치료제로서 이용될 수 있다.

예를 들어, 미분화 유도만능줄기세포가 제거된, 근세포로 분화된 결과물인 경우에는 근이양증(muscular dystrophy), 근위축증(muscular atrophy), 근육염(Myositis), 다발성 근육염(polymyositis), 말초혈관 질환(peripheral vascular disease) 및 섬유증(fibrosis)과 같은 근육 손상 질환, 신경근육계 질환, 근육계 관절염, 퇴행성 근육 질환 및 허혈성 근육 질환 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 근육계 질환의 세포치료 요법에 대한 우수한 공급원으로서 역할을 할 수 있다.

또한, 예를 들어, 미분화 유도만능줄기세포가 제거된, 신경세포로 분화된 결과물인 경우에는 뇌졸중(stroke), 외상성 뇌손상, 뇌성마비, 간질, 알츠하이머병, 다발성경화증, 파킨슨병, 척추 손상 질환(spinalcord injury disease), 치매, 간성 뇌증 및 저산소증, 탈수초질환, 헌팅톤병, 근위축성 척수측색경화증, 퇴행성 질환 및 허혈성 질환 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 신경계 질환의 세포치료 요법에 대한 우수한 공급원으로서 역할을 할 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 쿼세틴(Quercetin) 또는 YM-155 를 포함하는 미분화 유도만능줄기세포의 선택적 사멸용 조성물을 제공한다.

본 발명의 조성물은 상기 본 발명의 방법에 이용하는 쿼세틴(Quercetin) 또는 상기 YM-155 를 포함하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 유도만능줄기세포로부터 특정 분화세포로 분화시킨 후, 쿼세틴 또는 YM-155 을 포함하는 분화용 배지에서 배양함으로써, 미분화된 유도만능줄기세포만을 효과적으로 선택적 사멸시킬 수 있다.

(b) 본 발명에 따른 유도만능줄기세포 분화방법은 테라토마 형성의 원인이 되는 미분화된 유도만능줄기세포만을 선택적 사멸하여 분화된 분화세포에는 전혀 영향을 미치지 않는다. 즉, 분화세포의 생존능 및 기능은 그대로 유지시키므로, 임상에 있어 세포 치료제로의 적용 시 종양 형성 가능성을 배제함으로써 안전성 확보가 기대된다.

【도면의 간단한 설명】

도 1a 는 인간 대동맥 평활근세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC)에서 유래한 인간 유도만능줄기세포(iPS), HASMC, iPS 에서 분화-유래된 평활근 세포 1 번(iPS-SMC-1) 및 iPS 에서 분화-유래된 평활근

세포 3 번(iPS-SMC-3)에 50 μ M 의 쿠어세틴을 24 시간 처리한 후, 세포사멸 정도를 세포사멸 특이 세포형으로 확인한 현미경 사진이다. 그 결과, 쿠어세틴 처리 시 인간 유도만능줄기세포에서, 뚜렷한 세포사멸 특이 세포 표현형이 관찰되었다. 도 1b 는 면역 블랏팅법을 이용하여, 도 1a 와 같은 방법으로 처리한 세포 용해액의 세포사멸 표지 단백질을 확인한 결과이다. 그 결과, 쿠어세틴 처리시 인간 유도만능줄기세포에서, 세포사멸 시 발생하는 Parp-1 의 절단(T 형), 카스파아제 3 번 및 9 번의 절단형(cleaved 카스파아제)이 발현되었다.

도 2a 는 다양한 농도의 쿠어세틴(QC)를 처리하여, 농도 의존적인 유도만능줄기세포의 세포사멸 정도를 세포사멸 특이 세포 표현형으로 확인한 현미경 사진이다. 도 2b 는 Annexin V 법을 이용하여, 도 2a 의 다양한 농도의 쿠어세틴에 의한 iPS 및 HASMC 의 세포사멸 정도를 확인한 결과이다. 도 2c 는 도 2b 에서 얻은 세포사멸 정도를 그래프로 나타낸 결과로서, iPS 및 HASMC 의 각 생존세포(live cells)의 비율을 보여준다.

도 3a 는 HASMC 및 iPS-SMC3 에 50 μ M 의 쿠어세틴을 24 시간 처리한 후, 면역형광법을 이용하여 평활근세포에서 특이적으로 발현하는 것으로 알려진 α -Smooth muscle actin (α -SMA)의 발현을 확인한 결과이다. 도 3b 는 RT-PCR 을 이용하여, 도 3a 와 같은 방법으로 처리한 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3 의 세포 내 α -SMA 의 mRNA 발현 수준을 확인한 결과이다. 도 3c 는 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3 에 50 μ M 의 쿠어세틴 또는 DMSO 를 24 시간 처리한 후, ATP 또는 75mM 의 칼륨 용액(75K⁺)을 처리하여 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3 의 세포내 칼슘 농도를 측정함으로써 인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인한 결과이다. 도 3d 는 도 3c 에서 측정된 내부 칼슘 농도를 그래프로 나타낸 결과이다.

도 4a 는 50 μ M 의 쿠어세틴을 24 시간 처리한 미분화 유도만능줄기세포를 마우스의 고환에 주입하여, 10 주 후 테라토마 형성능을 대조군과 비교한 결과이다. 도 4b 는 도 4a 의 테라토마 형성여부를 확인하기 위해, Secretory epithelium 및 Neural rosette structure 를 각각 PAS 염색, H&E 염색한 결과이다.

도 5 는 iPS, HASMC 및 iPS-SMC-3 에 다양한 농도의 YM-155 를 24 시간 처리한 후, 세포사멸 정도를 세포사멸 특이 세포형으로 확인한 현미경

사진이다. 그 결과, YM-155 처리 시 인간 유도만능줄기세포에서, 농도의존적으로 뚜렷한 세포사멸 특이 세포 표현형이 관찰되었다.

도 6a 는 Annexin V 법을 이용하여, 다양한 농도의 YM-155 에 농도의존적인 iPS, HASMC 및 iPS-SMC3 의 세포사멸 정도를 확인하고 유세포
5 분리법을 통해 측정한 결과이다. 도 6b 는 도 6a 에서 얻은 세포사멸 정도를 그래프로 나타낸 결과로서, iPS, HASMC 및 iPS-SMC3 의 각 생존세포 (live cell)의 비율을 보여준다.

도 7a 는 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3 에 50 nM 의 YM-155 또는 DMSO 를 24
10 시간 처리한 후, ATP 또는 75mM 의 칼륨 용액($75K^+$)을 처리하여 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3 의 세포내 칼슘 농도를 측정함으로써, 인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인한 결과이다. 도 7b 는 도 7a 에서 측정된 내부 칼슘 농도를 그래프로 나타낸 결과이다.

도 8a 는 인간 유도만능줄기세포 및 인간 유도만능줄기세포 유래의 평활근세포(SMC3)을 1:1 로 혼합하고, 쿠어세틴 50 μ M 을 24 시간 동안
15 처리한 후 SSEA-4(녹색) 및 절단형 카스파아제-3(빨강색)(위쪽 패널), 또는 SMA(녹색) 및 절단형 카스파아제-3(빨강색)(아래쪽 패널)로 면역염색 분석한 결과를 보여준다. 스케일 바는 100 μ m 를 나타낸다. 도 8b 는 SMA-양성 파플레이션 또는 SSEA-4-양성 파플레이션에서의 절단형 카스파아제-3 양성 파플레이션의 백분율을 나타낸다. **는 'P<0.01' 의
20 유의성을 나타낸다.

도 9a 는 인간 유도만능줄기세포 및 평활근의 1:1 혼합물을 마우스에 주입한 결과를 나타낸다. 미처리 또는 10 mM YM155 를 전처리한 인간 유도만능줄기세포를 마우스에 주입하여 형성된 테라토마의 이미지를 보여준다. NC 는 세포를 주입하지 않은 마우스의 고환이다. 도 9b 는
25 인간 유도만능줄기세포를 주입한 마우스에서 형성된 테라토마의 H&E, Masson's trichrome 및 Acian Blue 염색 결과를 보여준다. 테라토마는 내장 상피, 연골, 분비 상피 및 신경 로제트 구조를 나타내는 세포를 생산하였다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

재료 및 방법

시약

10 쿼세틴(Quercetin, Cat # Q0125)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서, YM-155(Cat # S1130)은 Selleck chemicals 에서 구매하였다.

인간 유도만능줄기세포(iPS)의 배양 및 분화

마이토마이신-C 를 처리한 생쥐 배아 섬유아세포(MEF)가 지지세포로서 포함된 ESC 배지(20% KnockOut™ 혈청 대체물, 0.1% 겐타마이신(gentamycin), 1% 비-필수 아미노산, 0.1% β -머캅토에탄올 및 4 ng/ml bFGF 가 보충된 DMEM/F/12)에서 인간 대동맥 평활근세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC)에서 유래한 인간 유도만능줄기세포(iPS)(Lee, T.H., et al., (2010). Functional recapitulation of smooth muscle cells via induced pluripotent stem cells from human aortic smooth muscle cells. Circ Res 106, 120-128)를 계대 배양하였다.

본 발명의 쿼세틴 및 YM-155 에 대한 전처리를 위하여, iPS 는 매트리지엘이 코팅된 60 mm 디쉬에서 mTeSR™1 배지(29106, Stem Cell Technology)로 배양하여 평활근세포(smooth muscle cells: SMC)로의 분화를 유도하였다.

인간 대동맥 평활근 세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC) 및 인간 유도만능 줄기세포-유래 분화세포(iPS-SMC)의 배양

인간 대동맥 평활근 세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC) 및 인간 유도만능 줄기세포-유래 분화세포, 즉 인간 유도만능 줄기세포-유래 평활근 세포(iPS-SMC)는 상술한 참조문헌(Lee et al., 2010)에 기재된

바와 같이, SMCN 배지(ScienCell research laboratories, cat # 1101)에서 배양하였다.

면역블롯팅법(Immunoblotting) 및 면역형광세포화학염색법(Immunofluorescence cytochemistry, IFC)

면역블롯팅 분석에 이용한 항체는 항-PARP1(SC-7150) 및 항- β -액틴(SC-47778)은 Santa Cruz Biotech Inc.(CA, 미국)에서 구매하였다. 또한, 항-카스파아제-9(Cat# 9502) 및 항-cleaved 카스파아제-3(Cat# 9661)은 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구매하였다.

IFC 에 사용된 제 1 차 항체(1:200)는 항- α -smooth muscle actin (α -SMA) (Dako Inc, Carpinteria, Calif)을 사용하였다. Axioscope A1 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 이미지들을 얻고 분석하였다.

실시간 PCR(Real-time PCR)

RNA 추출 및 cDNA 합성은 일반적인 프로토콜(VanGuilder HD, et al (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis". Biotechniques 44 (5): 619-626)을 이용하였다.

본 실시예에서 이용되는 유전자-특이적 프라이머 서열은 다음과 같다:

β -액틴: 5'-GTCCTCTCCCAAGTCCACAC-3', 5'-GGGAGACCAAAGCCTTCAT -3'
 α -SMA: 5'- AGAACATGGCATCATCACCA-3', 5'-TACATGGCTGGGACATTGAA-3'

FACS 분석

모든 FACS 분석에는 FACS calibur™ (BD Biosciences) 및 CellQuest 소프트웨어를 이용하였다. 세포는 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™)를 이용하여 제품에 동봉된 프로토콜에 기재된 바와 같이 염색하였다.

테라토마 형성 및 면역조직화학법

이미 분화된 세포의 경우 테라토마 형성능력이 없기 때문에, 쿠어세틴 또는 YM-155 의 테라토마 형성 억제 효과를 확인하기 위하여,

미분화된 상태의 세포가 포함된 조건을 만들어 테라토마 형성 실험을 실시하였다. 즉, iPS 로부터 형성된 배상체(EB)에 쿠어세틴(100 μ M) 또는 YM-155(10 nM)을 24 시간 동안 처리한 세포(약 5×10^6 cells) 또는 미처리한 세포(약 5×10^6 cells)를 수득하고, NOD/SCID 마우스(Charles River Laboratories, Yokohama, Japan)의 고환에 주입하여 테라토마를 형성시켰다. 주입 10 주 후, 상기 이종 이식된 세포(xenograft mass)을 수득하여 4% PFA 에 2 주 동안 고정시키고, Tissue-Tek VIP embedding machine (Miles Scientific, Naperville, IL) 및 Thermo Shandon Histocenter2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 이용하여 파라핀에 포매하였다. 상기 제조된 파라핀 블록은 Leica RN2065 microtome (Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 절편(2 μ m 두께)으로 만들었다. 테라토마의 형성을 확인하기 위하여 헤마토자일린-에오신(H&E), PAS(Periodic-Acid-Schiff) 염색한 후, 숙련된 병리학자가 분석하였다.

본 발명의 모든 실험들은 차의과대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee of CHA University)의 승인을 받았으며, 본 발명의 모든 과정은 미국 국립보건원(NIH publication no. 85-23, revised 1996)에서 발행한 'Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals' 에 따라 수행하였다.

20 세포내 칼슘(Ca^{2+}) 측정

평활근세포로의 분화가 완료된 분화세포의 기능을 확인하기 위하여 세포내 칼슘 반응을 이용하였다. 상술한 참조문헌(Lee et al., 2006)에 기재된 바와 같이, 세포 내외의 칼슘 이동(calcium transients)은 약리적 시약, ATP 또는 75 mM K^+ 용액을 이용하여 유도하였으며, 칼슘 인디케이터 Fura-2 (Molecular Probes, Eugene, OR)를 이용하여 형광으로 값을 수치화하여 측정하고 이미지화하였다.

실험 결과

쿠어세틴에 의한 미분화 인간 유도만능줄기세포의 세포사멸 및 인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포(iPS-SMC)의 확인

쿠어세틴의 세포사멸

쿠어세틴의 미분화 인간 유도만능줄기세포에 대한 선택적 세포사멸을 확인하기 위하여, 인간 대동맥 평활근세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC)에서 유래한 인간 유도만능줄기세포(iPS), HASMC, iPS 에서 분화-유래된 평활근 세포 1 번(iPS-SMC-1) 및 iPS 에서 분화-유래된 평활근 세포 3 번에 50 μ M 의 쿠어세틴을 24 시간 처리하고 세포사멸 시 나타나는 세포사멸 특이 세포 표현형을 확인한 결과, 쿠어세틴 처리 시 인간 유도만능줄기세포에서, 뚜렷한 세포사멸 특이 세포 표현형이 발견되었다(도 1a). 또한, 면역 블랏팅법을 이용하여, 세포사멸 관련 표지 단백질을 확인한 결과, 쿠어세틴 처리시 인간 유도만능줄기세포에서, 세포사멸 시 발생하는 Parp-1 의 절단(T 형), 카스파아제 3 번 및 9 번의 절단형(cleaved 카스파아제)이 발현되었다(도 1b).

다양한 농도의 쿠어세틴(QC)를 처리 시, 농도 의존적인 유도만능줄기세포의 세포사멸 정도를 세포사멸 특이 세포 표현형으로 확인하였다(도 2a). 또한, Annexin V 법을 이용하여, 다양한 농도의 쿠어세틴에 의한 iPS 및 HASMC 의 세포사멸 정도를 확인하였고, 이를 그래프로 나타내어 iPS 및 HASMC 의 각 생존세포(live cells)의 비율을 확인하였다(도 2b 및 c).

인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포(iPS-SMC)의 기능확인

인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인하기 위하여, HASMC 및 iPS-SMC3 에 50 μ M 의 쿠어세틴을 24 시간 처리한 후, 면역형광법을 이용하여 평활근세포에서 특이적으로 발현하는 것으로 알려진 α -Smooth muscle actin(α -SMA)의 발현을 확인한 결과 α -SMA 의 발현을 확인하였고, 또한 RT-PCR 을 이용하여, iPS-SMC1 및 iPS-SMC3 의 세포 내 α -SMA 의 mRNA 발현도 확인하였다(도 3a 및 b).

또한, 인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인하기 위하여, iPS-SMC1 및 iPS-SMC3 에 50 μ M 의 쿠어세틴 또는 DMSO 를 24 시간 처리한 후, ATP 또는 75mM 의 칼륨 용액(75K⁺)을 처리하여 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3 의 세포내 칼슘 농도를 측정된 결과, 평활근세포로서의 기능을 확인하였다(도 3c 및 d).

테라토마 형성능

쿠어세틴의 처리시 테라토마 형성여부를 확인하기 위해, 50 μ M의 쿠어세틴을 24 시간 처리한 미분화 유도만능줄기세포를 마우스의 고환에 주입하여, 10 주 후 테라토마 형성능을 대조군(쿠어세틴 미처리 유도만능줄기세포)과 비교한 결과, 대조군에서 Secretory epithelium 및 Neural rosette structure 이 확인되었고, 이를 각각 PAS 염색 및 H&E 염색하여 테라토마의 형성을 확인하였다.

YM-155 에 의한 미분화 인간 유도만능줄기세포의 세포사멸 유도 및 인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포(iPS-SMC)의 확인

YM-155의 세포사멸

YM-155의 미분화 인간 유도만능줄기세포에 대한 선택적 세포사멸을 확인하기 위하여, 인간 대동맥 평활근세포(human aortic smooth muscle cells: HASMC)에서 유래한 인간 유도만능줄기세포(iPS), HASMC 및 iPS에서 분화-유래된 평활근 세포 3 번에 다양한 농도의 YM-155을 24 시간 처리하고 세포사멸 시 나타나는 세포사멸 특이 세포 표현형을 확인한 결과, 농도 의존적인 YM-155 처리 시 인간 유도만능줄기세포에서, 뚜렷한 세포사멸 특이 세포 표현형이 발견되었다(도 5).

또한, Annexin V 법을 이용하여, 다양한 농도의 YM-155에 의한 iPS, HASMC 및 iPS-SMC3의 세포사멸 정도를 확인하였고, 이를 그래프로 나타내어 iPS, HASMC 및 iPS-SMC3의 각 생존세포(live cells)의 비율을 확인하였다(도 6a 및 b).

인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포(iPS-SMC)의 기능확인

인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인하기 위하여, iPS-SMC1 및 iPS-SMC3에 50 nM의 YM-155 또는 DMSO를 24 시간 처리한 후, ATP 또는 75 mM의 칼륨 용액(75K⁺)을 처리하여 iPS-SMC1 및 iPS-SMC3의 세포내 칼슘 농도를 측정된 결과, 평활근세포로서의 기능을 확인하였다(도 7a 및 b).

쿠어세틴 처리에 의한 분화된 세포의 기능에 대한 영향 확인

인간 유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포의 기능을 확인하기 위하여, 인간 유도만능줄기세포 및 인간유도만능줄기세포에서 분화-유래된 평활근세포를 1:1 로 혼합하여 배양한 파플레이션에 50 μ M 쿠어세틴을 24 시간 동안 처리하고, SMA-양성 파플레이션 또는 SSEA-4-양성 파플레이션에서의 절단형 카스파아제-3 양성 파플레이션을 확인한 결과, 인간 유도만능줄기세포-평활근세포의 혼합 세포 파플레이션에서 쿠어세틴 처리 후 SSEA-4 양성 파플레이션 내 절단형 카스파아제-3 양성 파플레이션이 우세한 것을 확인하였다(도 8a 및 b).

10

서바이빈 억제제인 YM-155 의 인간 유도만능줄기세포의 사멸 유도

서바이빈 억제제인 YM-155 의 인간 유도만능줄기세포의 선별적 사멸을 확인하기 위해, 인간 유도만능줄기세포 및 평활근의 1:1 혼합물을 마우스에 주입한 결과를 나타낸다. 미처리 또는 10 mM YM155 를 전처리한 인간 유도만능줄기세포를 마우스에 주입하여 테라토마를 유도한다(도 9a). 인간 유도만능줄기세포를 주입한 마우스에서 형성된 테라토마의 H&E, Masson's trichrome 및 Acian Blue 염색한 결과, YM-155 의 24 시간 단회 처리에 의해 테라토마의 형성이 억제됨을 보여준다.

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

25

【특허청구범위】

【청구항 1】

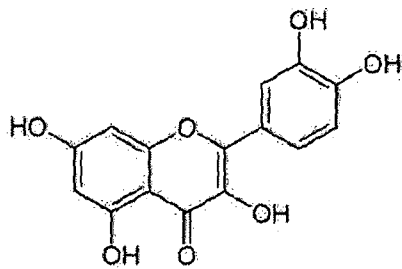
다음 단계를 포함하며, 미분화 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPS)가 제거된, 유도만능줄기세포 유래 분화세포의

5 제조방법:

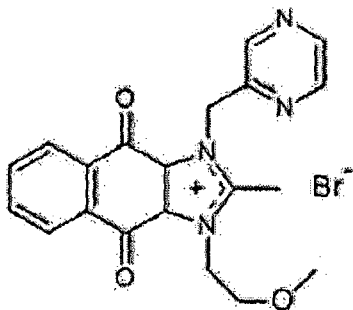
(a) 유도만능줄기세포를 분화시켜 미분화 유도만능줄기세포 및 분화세포(differentiated cells)를 포함하는 세포시료를 준비(preparation)하는 단계; 및

10 (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 다음 화학식 1 의 쿼세틴(Quercetin) 또는 화학식 2 의 YM-155 을 처리하여 미분화 유도만능줄기세포를 선택적으로 사멸시키는 단계.

화학식 1



화학식 2



【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포는 인간, 소, 말, 염소, 양, 개, 고양이, 마우스, 래트 또는 조류로부터 유래된 것을 특징으로 하는

20 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 쿼세틴 및 YM-155 의 농도는 각각 20-100 μM 및 2.5-80 nM 인 것을 특징으로 하는 방법.

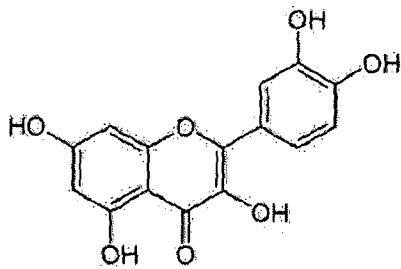
5 【청구항 4】

상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 미분화 유도만능줄기세포가 제거된 세포 조성물.

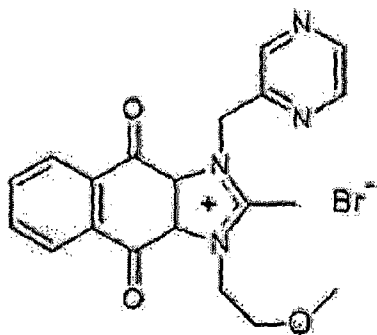
【청구항 5】

10 다음 화학식 1 의 쿼세틴(Quercetin) 또는 화학식 2 의 YM-155 를 포함하는 미분화 유도만능줄기세포의 선택적 사멸용 조성물.

화학식 1

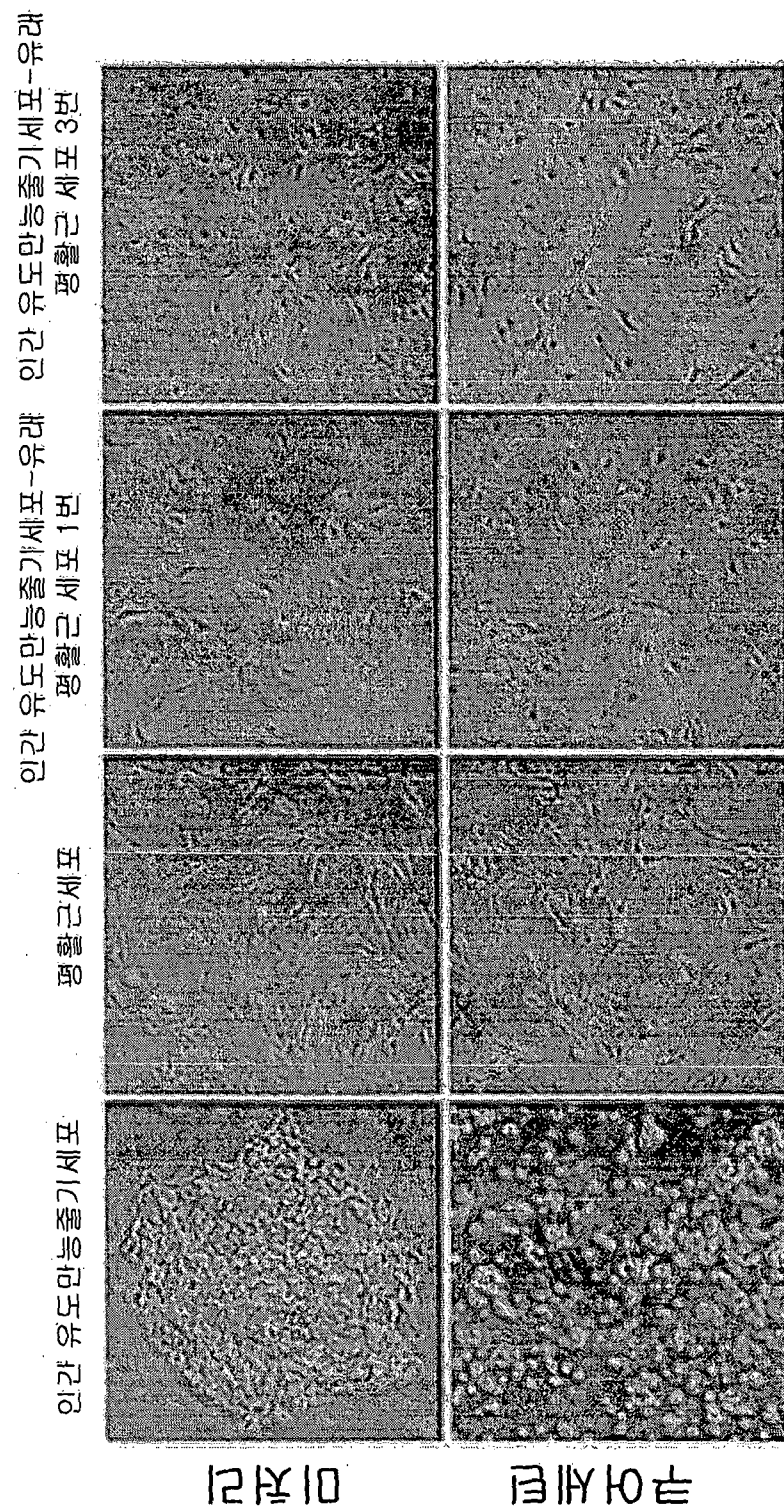


화학식 2



15

Fig. 1a



2/16

Fig. 1b

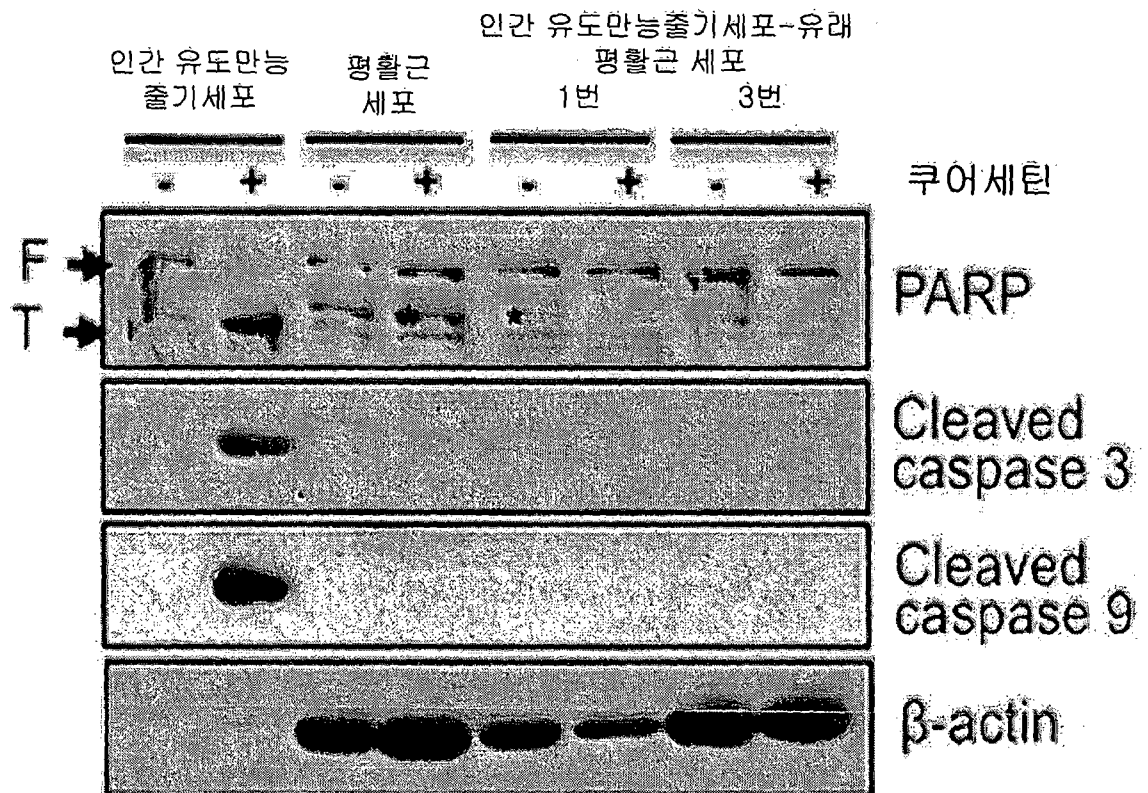
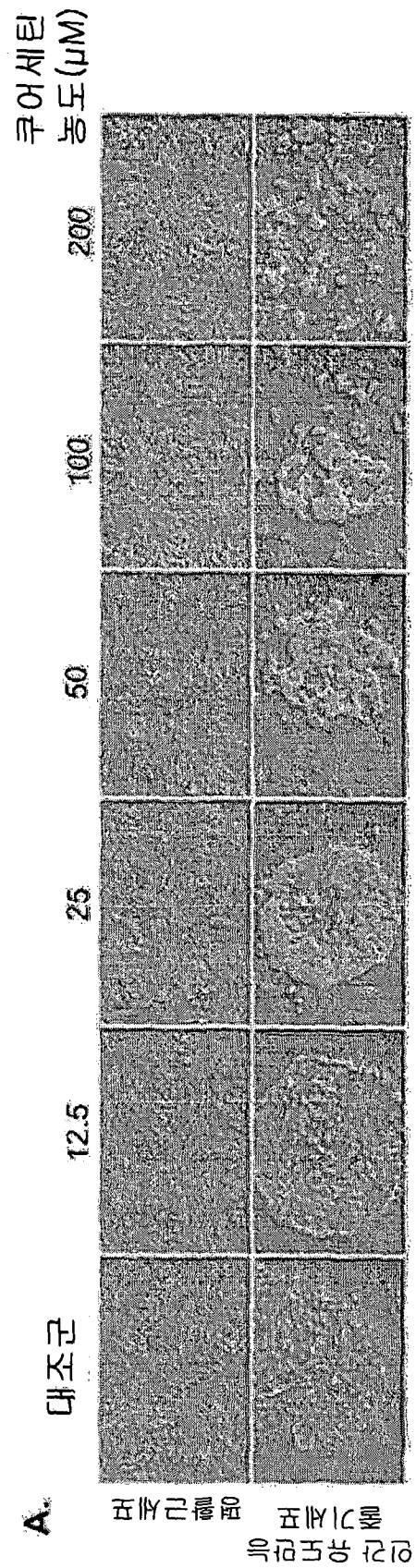
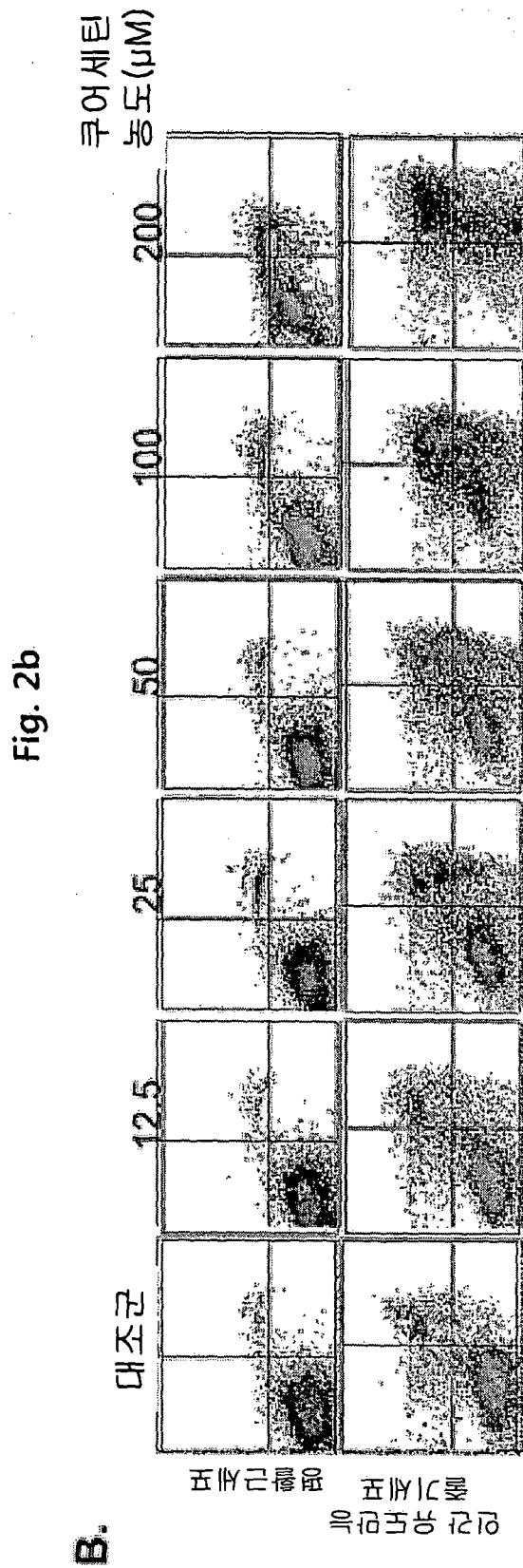


Fig. 2a



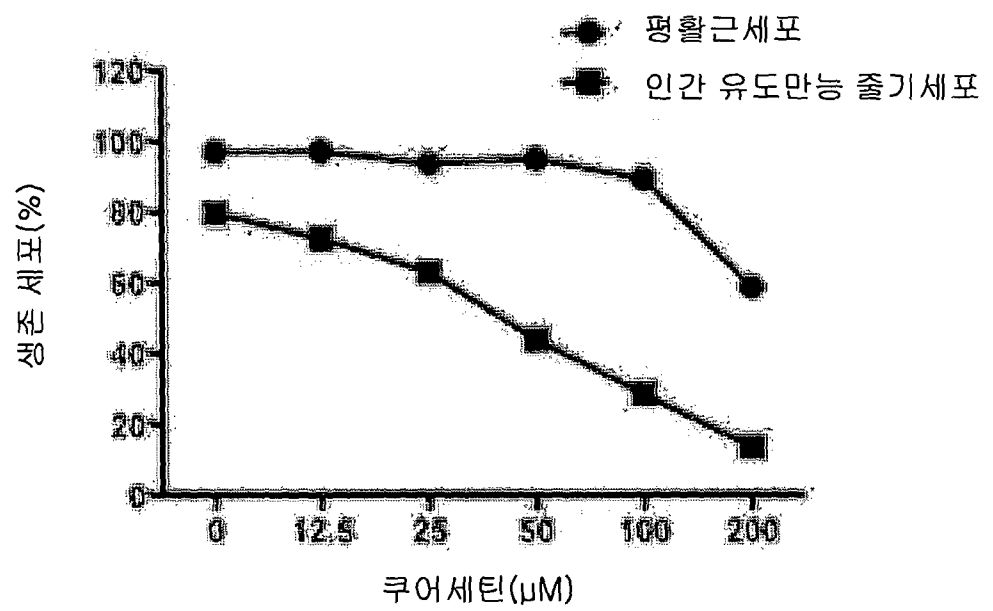
4/16



5/16

Fig. 2c

C.



6/16

Fig. 3a

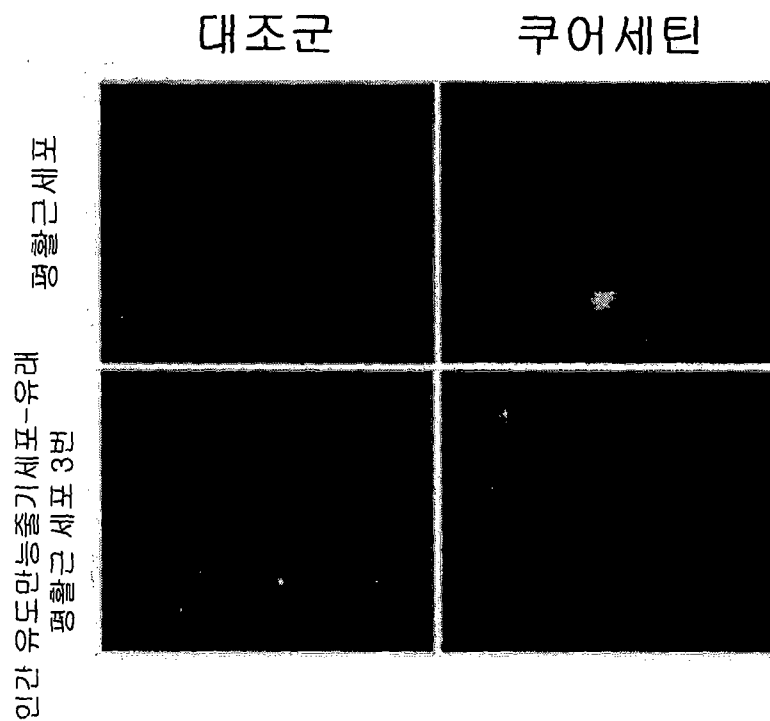
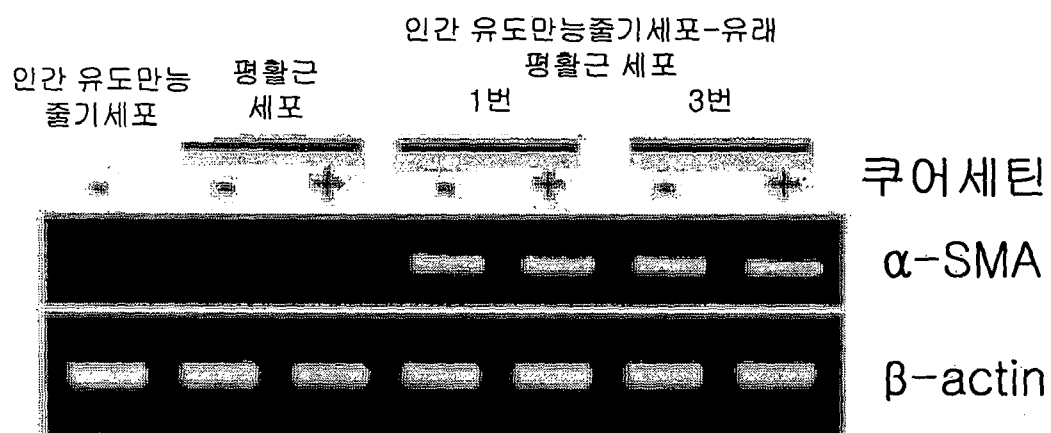


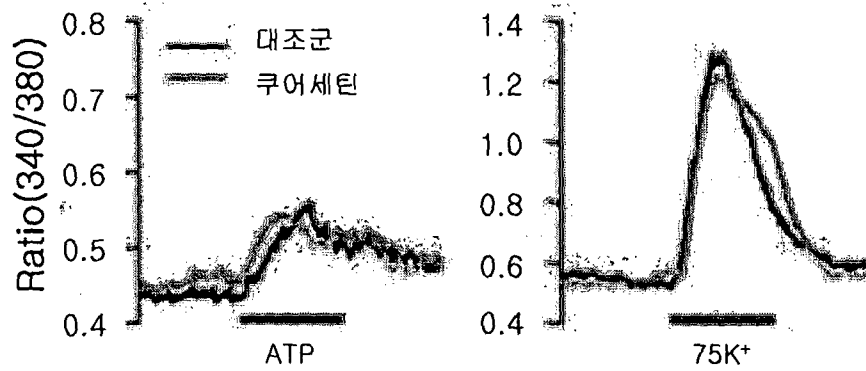
Fig. 3b



7/16

Fig. 3c

인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포 1번



인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포 3번

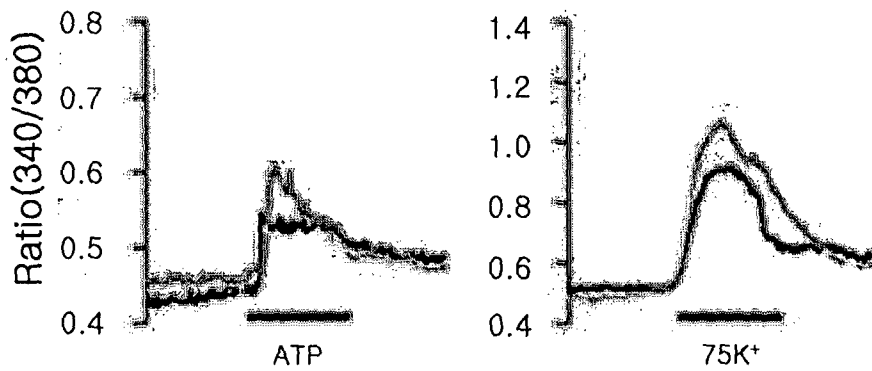
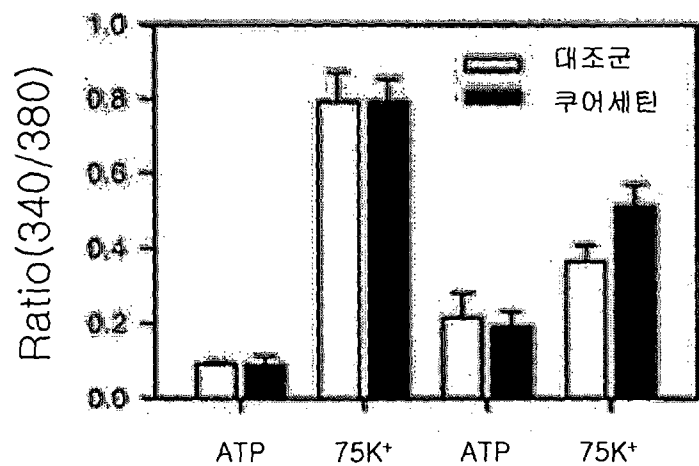


Fig. 3d



인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포 1번 인간 유도만능줄기세포-유래 평활근 세포 3번

8/16

Fig. 4a

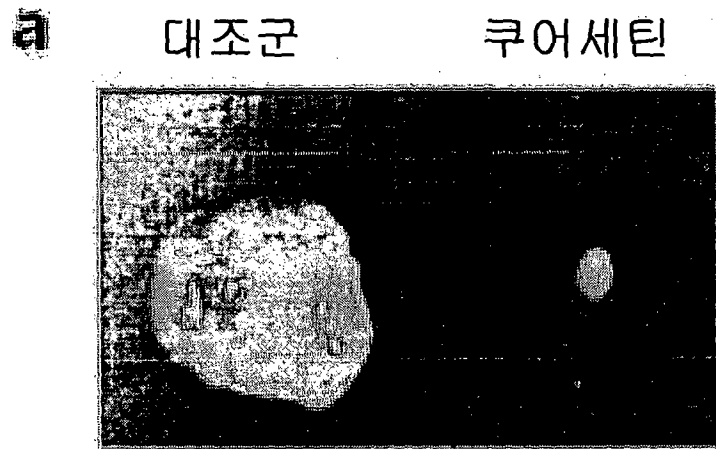


Fig. 4b

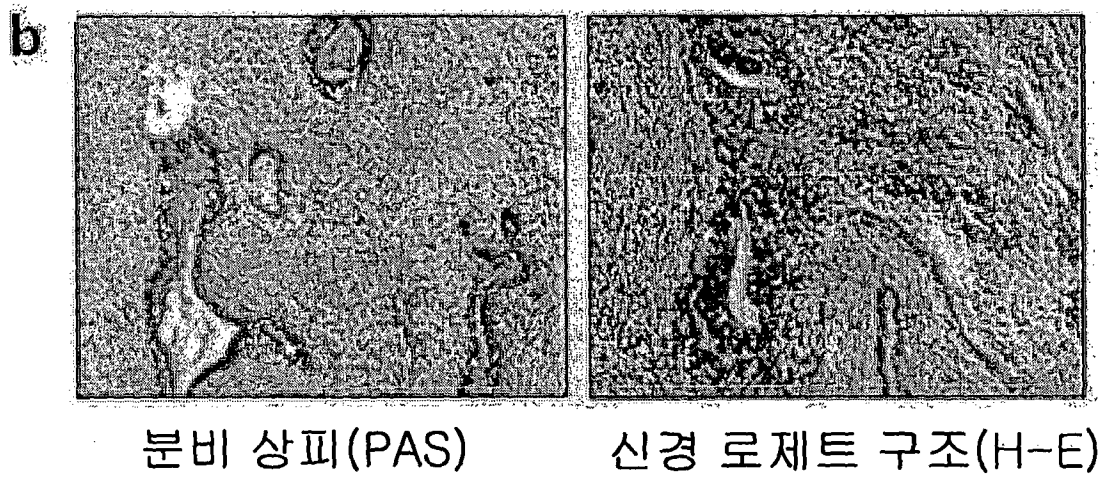
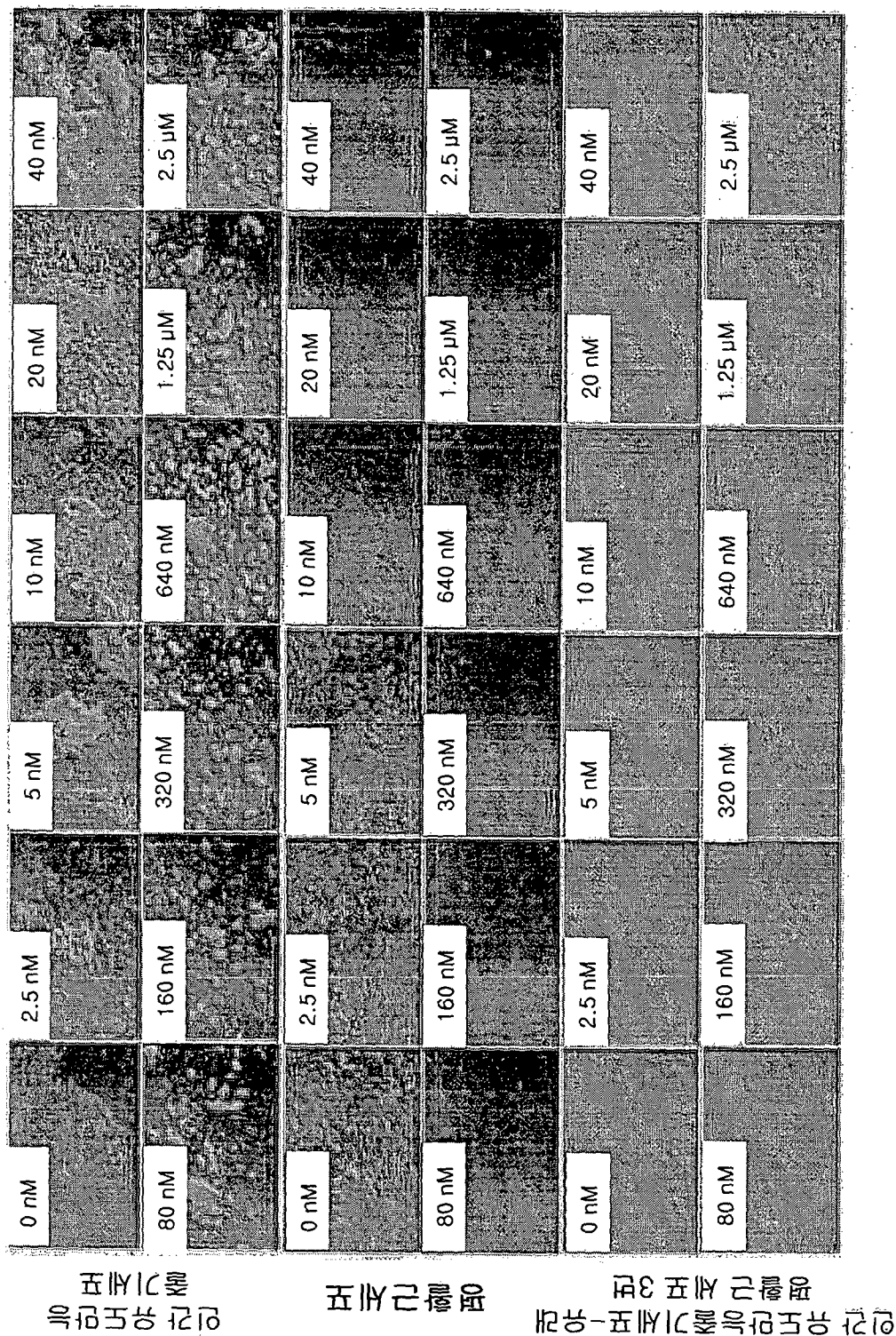
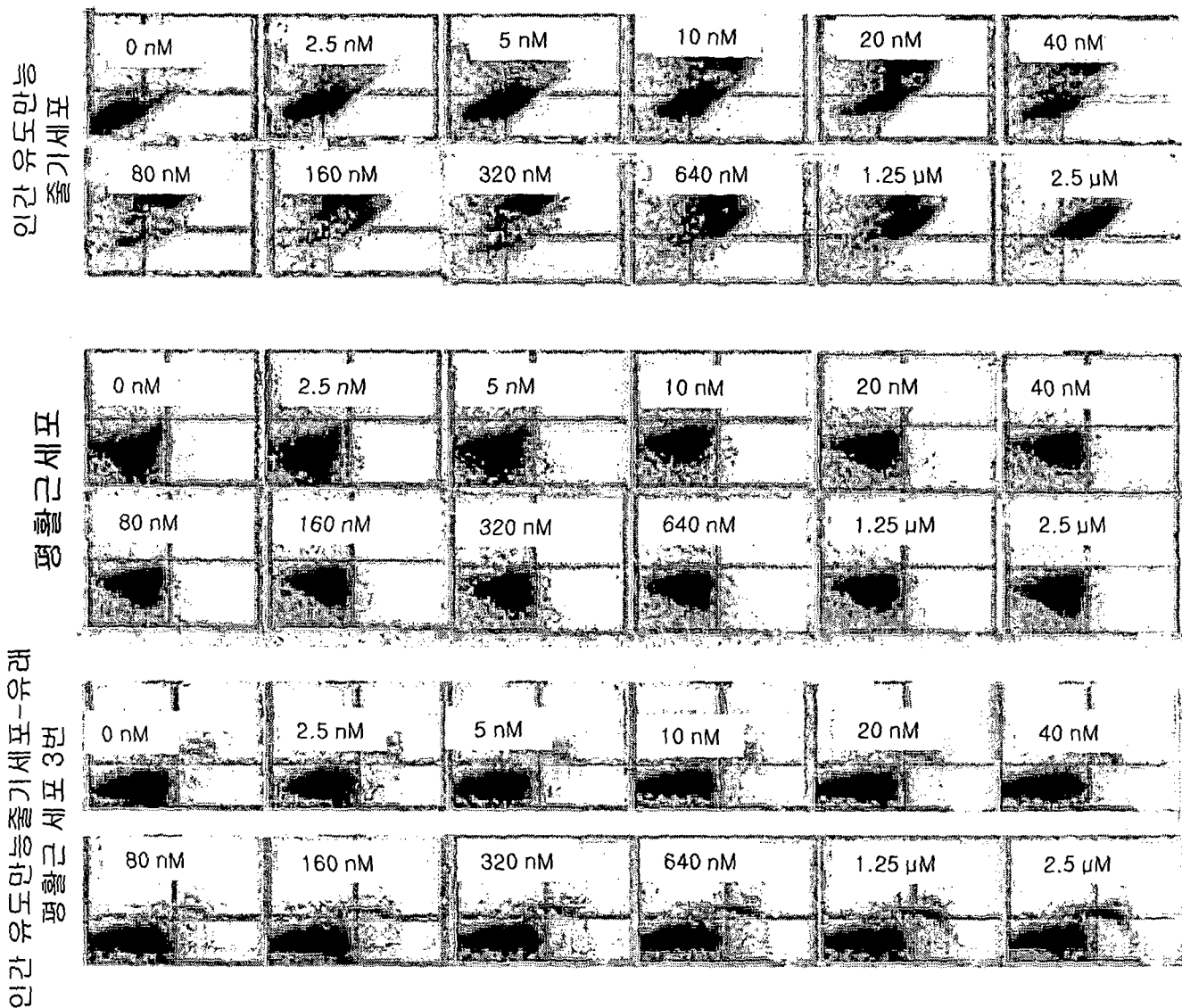


Fig. 5



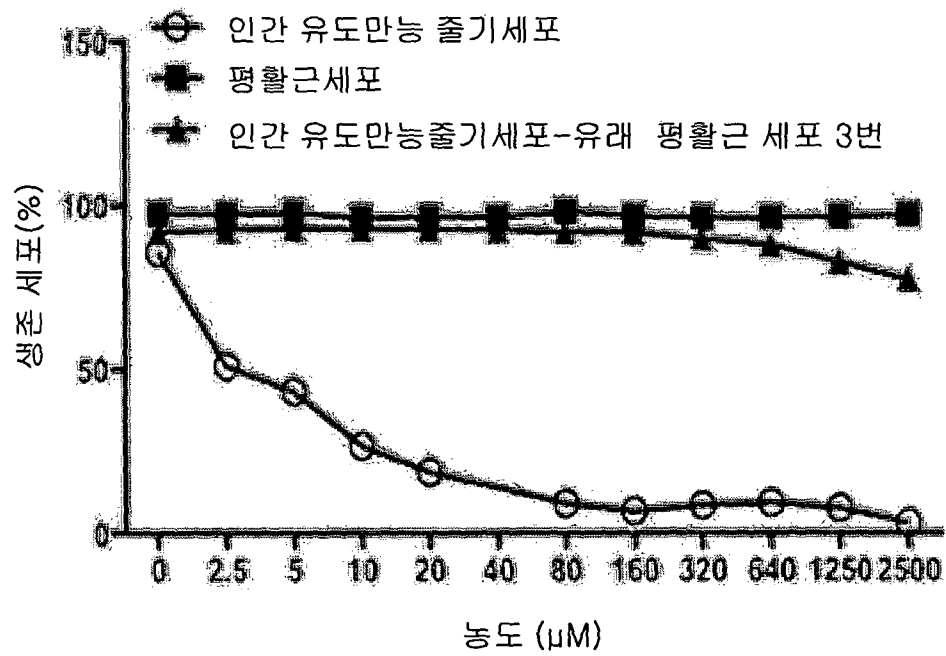
10/16

Fig. 6a



11/16

Fig. 6b



12/16

Fig. 7a

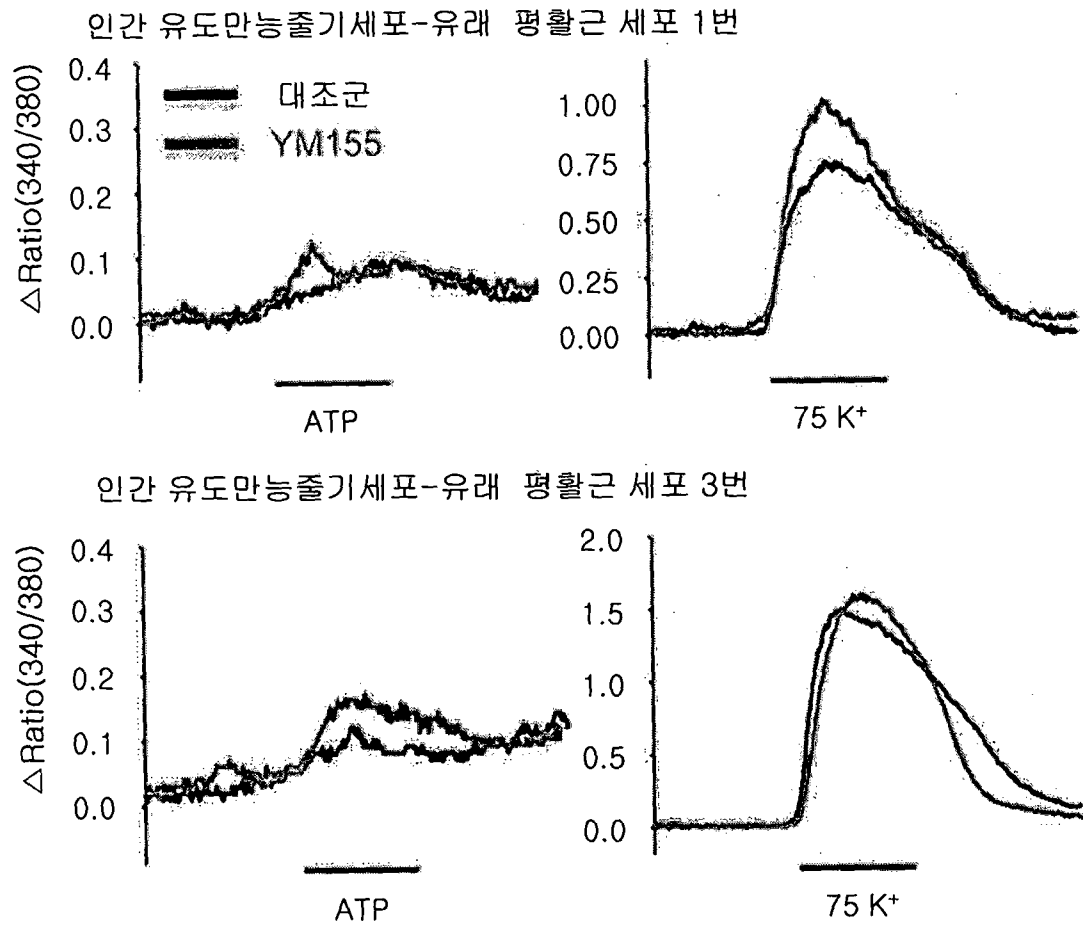


Fig. 7b

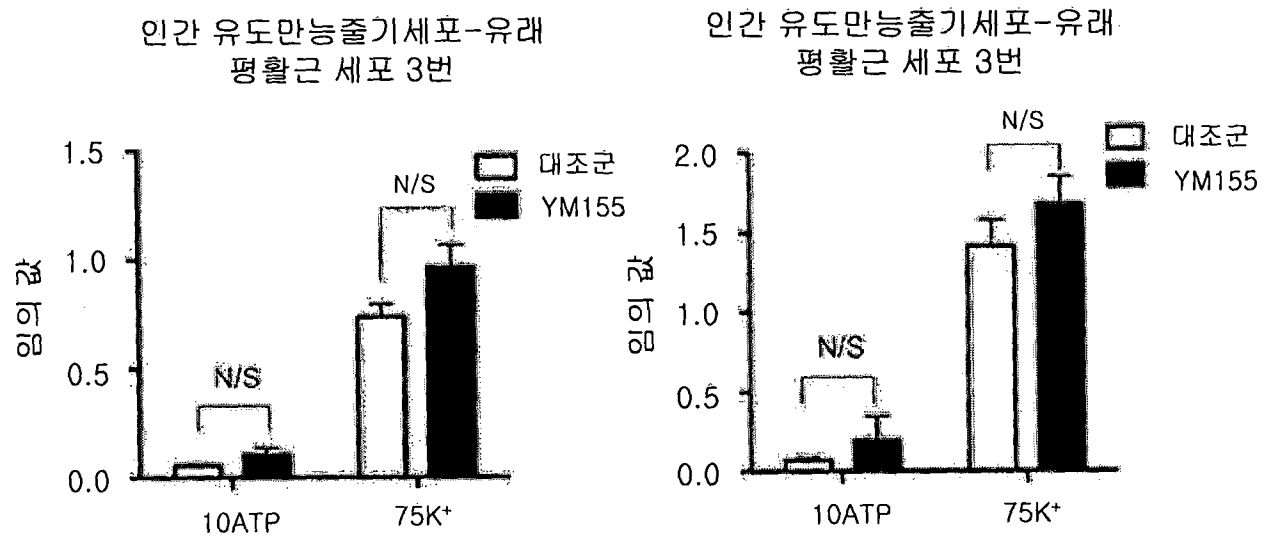
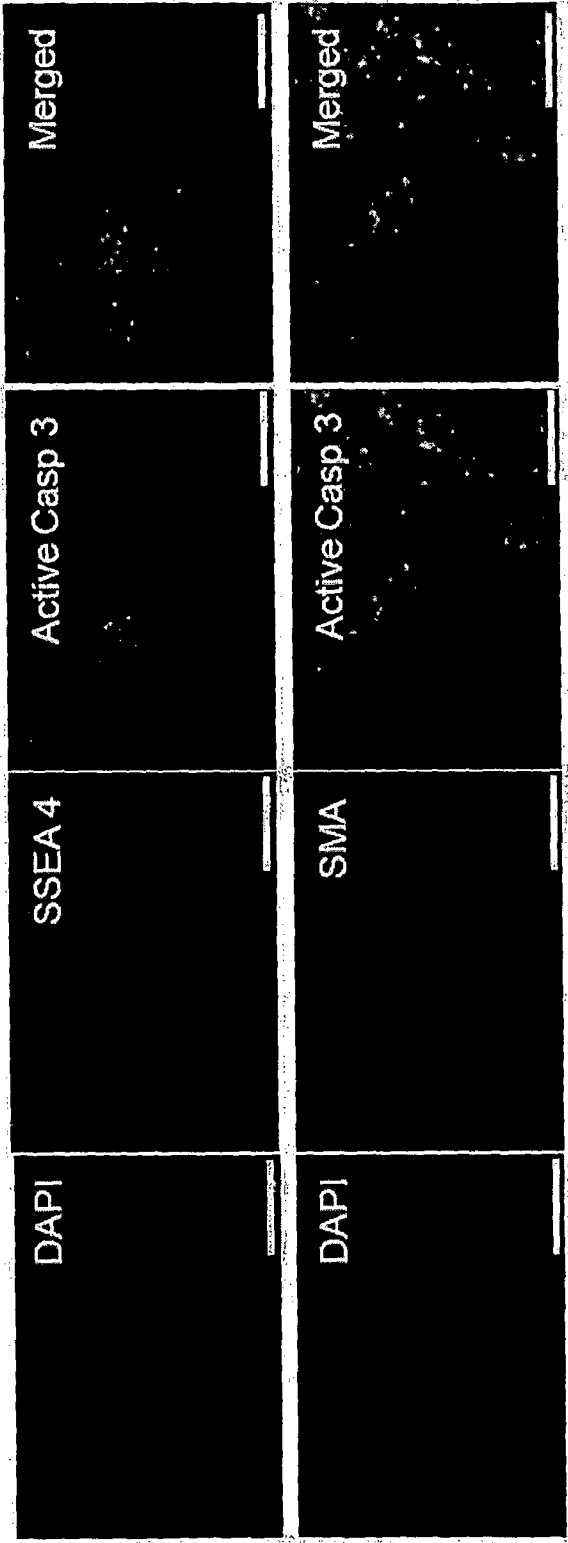


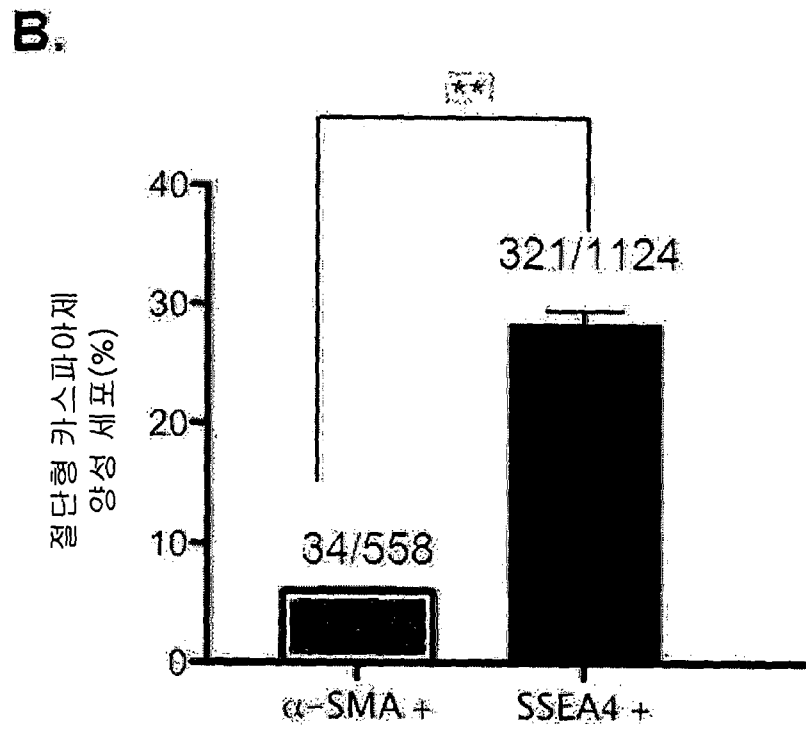
Fig. 8a

A.



15/16

Fig. 8b



16/16

Fig. 9a

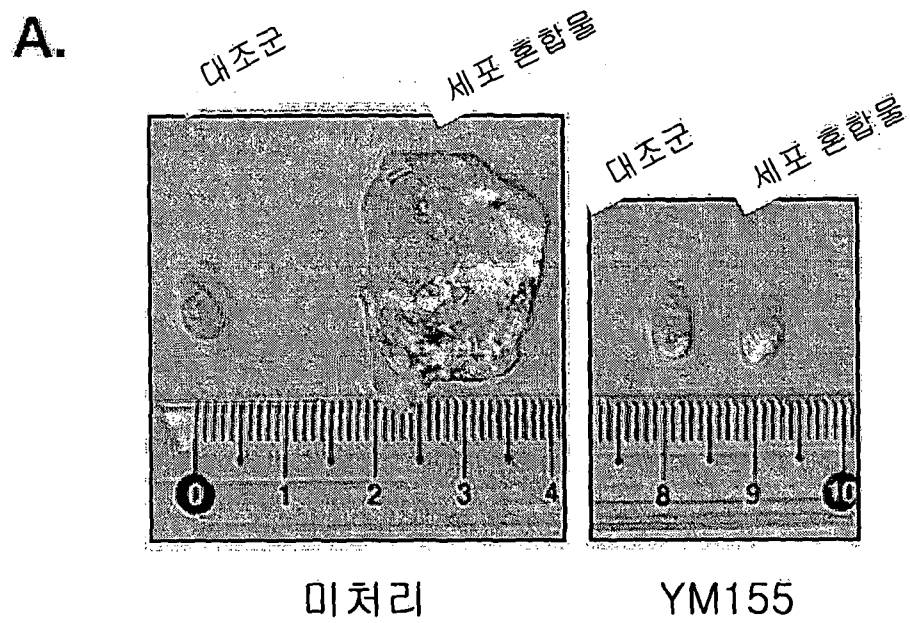
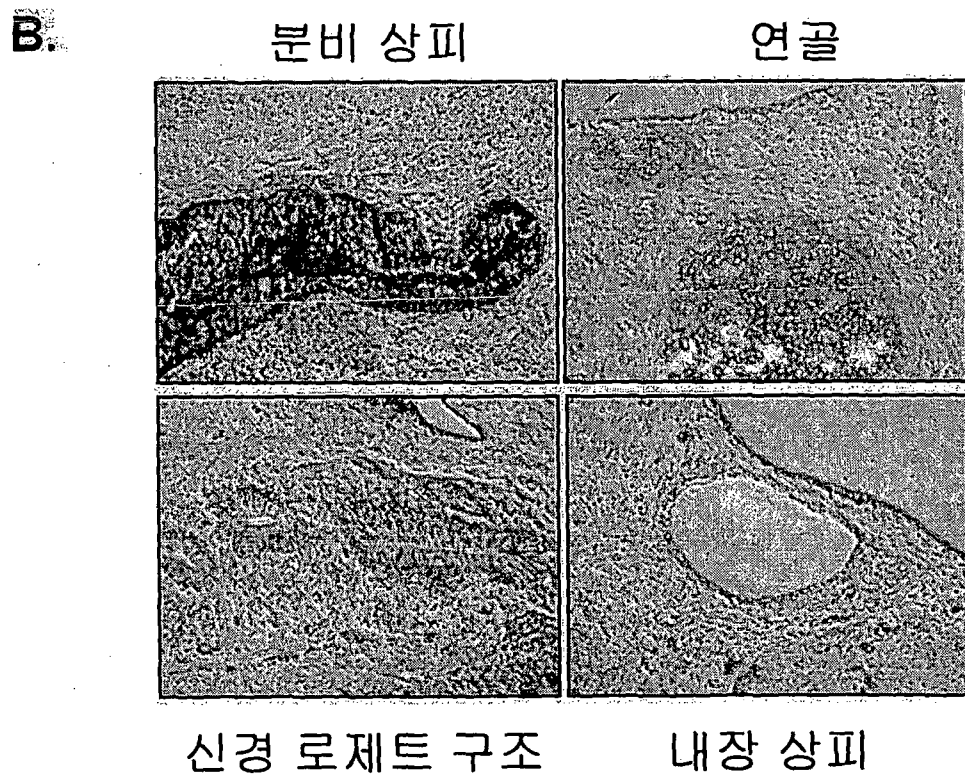


Fig. 9b



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/009111**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/074(2010.01)i, C12N 1/36(2006.01)i, C07D 311/30(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 5/074; C12N 5/071; C12N 5/02; C12N 5/0775; C12N 1/36; C07D 311/30

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: Quercetin, YM-155, apoptosis, embryonic stem cell, iPS cells, differentiation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2011-0042426 A (CHA UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 27 April 2011 See abstract; claims 1, 2; paragraphs [0016], [0026]; figure 7.	1-5
A	KR 10-0717724 B1 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 14 May 2007 See abstract.	1-5
A	SHEN, S-C, et al., "Differential Apoptosis-Inducing Effect of Quercetin and its Glycosides in Human Promyeloleukemic HL-60 Cells by Alternative Activation of the Caspase 3 Cascade.", Journal of Cellular Biochemistry, vol. 89, no. 5, pages 1044-1055 (01 August 2003) See abstract.	1-5
A	SASAKI, M. et al., "Quercetin-Induced PC12 Cell Death Accompanied by Caspase-Mediated DNA Fragmentation.", Biol. Pharm. Bull., vol. 30, no. 4, pages 682-686 (April 2007) See abstract; pages 682, 685; table 1.	1-5
A	YAMANAKA, K. et al., "Antitumor Activity of YM155, a Selective Small-Molecule Survivin Suppressant, Alone and in Combination with Docetaxel in Human Malignant Melanoma Models.", Clinical Cancer Research, vol. 17, pages 5423-5431 (07 July 2011 Published on online) See abstract; page 5424; figures 2B, 5A.	1-5

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 NOVEMBER 2013 (11.11.2013)

Date of mailing of the international search report

12 NOVEMBER 2013 (12.11.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/009111

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0042426 A	27/04/2011	NONE	
KR 10-0717724 B1	14/05/2007	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/074(2010.01)i, C12N 1/36(2006.01)i, C07D 311/30(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/074; C12N 5/071; C12N 5/02; C12N 5/0775; C12N 1/36; C07D 311/30 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: Quercetin, YM-155, apoptosis, embryonic stem cell, iPS cells, differentiation		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2011-0042426 A (차의과학대학교 산학협력단) 2011.4.27. 초록; 청구항 1,2; 식별번호 [0016], [0026]; 도면 7 참조.	1-5
A	KR 10-0717724 B1 (부산대학교 산학협력단) 2007.5.14. 초록 참조.	1-5
A	SHEN, S-C, et al., 'Differential Apoptosis-Inducing Effect of Quercetin and its Glycosides in Human Promyeloleukemic HL-60 Cells by Alternative Activation of the Caspase 3 Cascade.', Journal of Cellular Biochemistry, 89권, 5호, 1044-1055면 (2003.8.1.) 초록 참조.	1-5
A	SASAKI, M. et al., 'Quercetin-Induced PC12 Cell Death Accompanied by Caspase-Mediated DNA Fragmentation.', Biol. Pharm. Bull., 30권, 4호, 682-686면 (2007.4.) 초록; 682, 685면; 표 1 참조.	1-5
A	YAMANAKA, K. et al., 'Antitumor Activity of YM155, a Selective Small-Molecule Survivin Suppressant, Alone and in Combination with Docetaxel in Human Malignant Melanoma Models.', Clinical Cancer Research, 17권, 5423-5431면 (2011.7.7. 온라인 공개). 초록; 5424면; 그림 2B, 5A 참조.	1-5
☐ 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 2013년 11월 11일 (11.11.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 11월 12일 (12.11.2013)
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 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0042426 A	2011/04/27	없음	
KR 10-0717724 B1	2007/05/14	없음	