(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2011 년 3 월 31 일 (31.03.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/037301 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/07 (2010.01) *C12N 5/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2009/007141

(22) 국제출원일: 2009 년 12 월 2 일 (02.12.2009)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2009-0089330 2009 년 9 월 22 일 (22.09.2009) KR

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

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **박영배 (PARK, Young-Bae)** [KR/KR]; 서울 강남구 신사동 632 번지 하이츠파크 A 동 701 호, 135-895 Seoul (KR). **김효수 (KIM, Hyo-Soo)** [KR/KR]; 서울 서초구 반포동 반포자이 아파트 114 동 1901 호, 137-040 Seoul (KR). **권유욱 (KWON, Yoo-Wook)** [KR/KR]; 서울 강남구 삼성 2 동 삼성래미안 2 차 106 동 2001 호, 135-507 Seoul (KR). **조현재 (CHO, Hyun-Jai)** [KR/KR]; 서울 송파구 잠실 6 동 장미아파트 23 동 401 호, 138-918 Seoul (KR). **백재승 (PAEK, Jae-Seung)** [KR/KR]; 경기도 군포시 산본동 한양목련아파트 1223 동 1502 호, 435-040 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **이명진 (LEE, Myoung Jin)** 등; 서울시 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, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

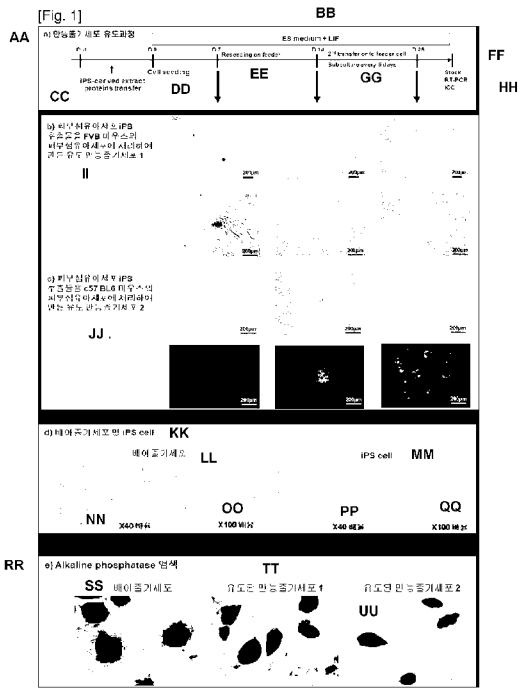
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: METHOD FOR DERIVATION OF PLURIPOTENT STEM CELLS FROM ADULT CELLS AND PLURIPOTENT STEM CELLS PRODUCED BY METHOD

(54) **발명의 명칭** : 성체세포로부터 만능줄기세포를 유도하는 방법 및 그 방법에 의해 제조된 만능줄기세포

[Fig. 1]



AA ... Procedure for deriving pluripotent stem cells
BB ... ES medium + LIF
CC ... iPS-derived extract proteins transfer
DD ... Cell seeding
EE ... Reseeding on feeder
FF ... 2nd transfer onto feeder cell
GG ... Subculture every 5 days
HH ... Stock RT-PCR ICC
II ... Induced pluripotent stem cells 1 produced by treating skin fibroblast cells of the FVB mouse with iPS extract from skin fibroblast cells
JJ ... Induced pluripotent stem cells 2 produced by treatming skin fibroblast cells of the c57BL6 mouse with iPS extract from skin fibroblast cells
KK ... Embryonic stem cell and iPS cell
LL ... Embryonic stem cell
MM ... iPS cell
NN ... X40 magnification
OO ... X100 magnification
PP ... X40 magnification
QQ ... X100 magnification
RR ... Alkaline phosphatase stain
SS ... Embryonic stem cell
TT ... Induced pluripotent stem cell 1
UU ... Induced pluripotent stem cell 2

(57) **Abstract**: The present invention relates to a method for manufacturing personalized pluripotent stem cells having the same differentiation potency as embryonic stem cells, which comprises the following steps: (a) preparing protein extracts separated from various types of undifferentiated stem

[다음 쪽 계속]

WO 2011/037301 A1

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))

cells induced through a variety of methods (induced Pluripotent Stem cells, iPS); (b) infusing the extracts into adult cells; and (c) deriving pluripotent stem cells having the same differentiation potency as embryonic stem cells by culturing the adult cells infused with the extracts. In addition, the present invention relates to pluripotent stem cells produced by the method and cell therapy products which include the pluripotent stem cells. The present invention provides a very easy and highly efficient method for manufacturing pluripotent stem cells from differentiated, adult somatic cells using iPS protein extracts. Thus, the method of the present invention does not raise ethical issues associated with the destruction of embryos and poses less risks for carcinogenesis from use of tumorigenic viruses, which has been the most conventional iPS derivation method to date. In addition, the pluripotent stem cells, derived with the method of the present invention, have the same genetic origin as the converted adult cells, and eventual use as individualized, cell therapy products having less immune response rejection, is anticipated.

(57) 요약서: 본 발명은 배아줄기세포와 동일한 분화능을 가지는 맞춤형 만능줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것으로, a)다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 역분화 줄기세포 또는 유도만능줄기세포(induced Pluripotent Stem cells, iPS)에서 단백질을 분리하는 추출물 제조 단계; b)상기 추출물을 성체세포에 주입하는 단계; 및 c)추출물이 주입된 성체세포를 배양하여 배아줄기세포와 동일한 분화능을 가지는 만능줄기세포를 유도하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 만능줄기세포 및 상기 만능줄기세포를 포함하는 세포 치료제에 관한 것이다. 본 발명은 iPS 단백질 추출물을 사용하여 성체의 분화된 체세포로부터 만능줄기세포를 매우 용이하게 그리고 고효율로 제조하는 방법을 제공한다. 따라서 배아의 파괴라는 윤리적 문제를 발생시키지 아니하며, 현재까지 알려진 가장 일반적인 iPS 유도방법인 발암성 바이러스의 사용에 기인한 암발생의 위험이 없다. 이에 더하여 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포는 사용된 성체세포와 그 유전적 기원이 동일하므로 궁극적으로 면역거부반응이 없는 맞춤형 세포 치료제의 실용화에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 성체세포로부터 만능줄기세포를 유도하는 방법 및 그 방법에 의해 제조된 만능줄기세포

기술분야

[1] 본 발명은 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 역분화 줄기세포 또는 유도만능줄기세포(induced Pluripotent Stem cells, iPS)의 추출물을 분화된 성체세포에 주입하여 재프로그램화 시킴으로써 맞춤형 만능줄기세포를 제조하는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 만능줄기세포 및 상기 만능줄기세포를 포함하는 세포 치료제에 관한 것이다.

배경기술

[2] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화될 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 이러한 줄기세포는 다양한 방법으로 분류할 수 있다. 그 중 가장 흔히 이용되는 방법 중 하나는 줄기세포가 분리된 개체에 따른 것으로, 배아(embryo)에서 분리된 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)와 성체에서 분리된 성체줄기세포(adult stem cell)로 나눌 수 있다. 또 다른 흔한 분류는 줄기세포의 분화능에 따른 것으로, 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포라 함은 생체를 구성하는 3가지 배엽(germ layer) 모두로 분화될 수 있는 다기능성을 지닌 줄기세포를 지칭하며, 일반적으로 배아줄기세포가 이에 해당된다. 성체줄기세포는 다분화능 또는 단분화능 줄기세포로 구분할 수 있다.

[3] 배아줄기세포는 한 개체를 구성하는 모든 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 만능줄기세포이지만 세포 제조과정에서 배아의 파괴라는 심각한 윤리적 문제점이 존재하며, 또한 제한된 난자로부터 유래하기 때문에, 세포 치료제 개발과 관련하여 각 개체간의 면역 적합성 부재로 인한 이식거부반응의 문제가 발생할 수 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로, 성체에서 유래한 세포를 역분화시켜 배아줄기세포와 유사한 맞춤형 만능줄기세포를 제조하기 위한 여러 가지 방법들이 시도되어 왔다.

[4] 대표적인 방법으로 체세포 핵치환법(somatic cell nuclear transfer, SCNT), 세포융합법(fusion with ES cell), 특정인자주입법(reprogramming by defined factor)이 있다. 체세포 핵치환법은 그 효율이 매우 낮아 난자가 대량으로 필요하다는 점에서 문제가 되며, 세포융합법은 유도된 세포가 2쌍의 유전자를 더 가지고 있어 세포의 안정성 측면에서 문제점이 있다. 그리고 특정 유전자를 삽입하여 역분화를 유도하는 기술인 특정인자주입법은 발암유전자를 포함하는 바이러스를 이용하는 방법으로 암발생의 위험이 있으며, 이에 더하여 낮은 효율 및 방법적인 측면에서의 난이도로 인해 세포 치료제 개발과 관련한 실용가능성

면에서 문제점이 제기되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명은 배아를 파괴하는 윤리적 문제가 없고, 안정성 및 안전성이 확보됨과 동시에, 세포 치료제 개발의 실용화를 위한 고효율의 맞춤형 만능줄기세포 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 만능줄기세포를 제공하고, 나아가 상기 맞춤형 만능줄기세포를 함유하는 세포 치료제를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[6] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 역분화 줄기세포 또는 유도만능줄기세포(iPS)의 단백질 추출물을 분화된 성체세포에 주입하여 성체세포를 재프로그램화 시킴으로써 면역거부반응이 없는 맞춤형 만능줄기세포를 제조하고자 한다.

발명의 효과

[7] 본 발명은 맞춤형 만능줄기세포를 제조함에 있어 배아의 파괴로 인한 윤리적 문제가 없고, 암유전자를 포함하는 바이러스를 사용하지 아니하므로 암세포 형성 위험이 없는 안전한 만능줄기세포의 제조가 가능하다. 또한 본 발명은 iPS 단백질 추출물을 사용함으로써 종래의 방법에 비하여 매우 용이하게 그리고 현저히 높은 효율로 만능줄기세포를 제조할 수 있으며 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포는 사용된 성체세포와 그 유전적 기원이 동일하므로 궁극적으로 각 개체에 맞추어진 면역적합성 세포 치료제의 실용화를 가능하게 한다. 따라서 본 발명은 심혈관질환, 신경계질환, 당뇨병 등의 다양한 난치병을 치료하는데 크게 기여할 수 있을 것이며 나아가 안전성이 확보된 고효율의 동물복제방법을 제공할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[8] 도 1은 성체세포에 iPS 단백질 추출물을 주입하여 배양시 배아줄기세포와 거의 동일한 만능줄기세포가 유도되는 것을 보여주는 그림으로 총 배양과정의 개략도(a), 유도된 만능줄기세포(b, c), 대조군으로 배아줄기세포 및 단백질 추출물 제조에 사용한 iPS(d), 배아줄기세포 및 유도된 만능줄기세포의 Alkaline phosphatase 염색 결과(e)를 나타낸 것이다.

[9] 도 2는 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포의 유전자 발현(a) 및 단백질 발현(b) 을 나타낸 것이다.

[10] 도 3은 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포의 생체 내 분화능을 시험한 결과를 나타낸 것이다.

[11] 도 4는 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포의 생체 내 만능성을 검증하기 위하여 4배체상보(tetraploid complementation)기술을 이용해 만든 12.5일 배의 배아를 나타낸 것이다.

[12] 도 5는 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포가 단백질 추출물을 주입한

성체세포에서 기원하였음을 입증하기 위하여 특정 MIT (microsatellite) 마커를 사용하여 유전자 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[13] 본 발명은 배아줄기세포와 동일한 분화능을 가지는 맞춤형 만능줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것으로, a)다양한 방법으로 제조된 모든 종류의 역분화 줄기세포 또는 유도만능줄기세포(iPS)에서 단백질을 분리하는 추출물 제조 단계; b)상기 추출물을 성체세포에 주입하는 단계; 및 c)상기 추출물이 주입된 세포를 배양하여 배아줄기세포와 동일한 분화능을 가지는 만능줄기세포를 유도하는 단계를 포함한다.

[14] 본 발명에서 사용된 용어 '배아줄기세포'는 수정 후 발생 초기인 배반포기(blastocyst)의 내부세포덩어리(세포내괴, inner cell mass)에서 분리하여 배양한 세포로 만능성(pluripotency)을 지니는 세포를 지칭한다. 본 발명에서 사용된 용어 '성체세포'는 배아세포와 반대되는 용어로, 태어나서 생존하는 성체로부터 유래한 세포를 지칭한다. 본 발명에서 사용된 용어 '만능줄기세포'는 생체를 구성하는 3가지 배엽(germ layer), 즉 내배엽(endoderm), 중배엽(mesoderm), 외배엽(ectoderm) 모두로 분화할 수 있는 만능성을 지닌 줄기세포를 지칭한다. 전통적으로 배아줄기세포가 이 범주에 속한다. 본 발명에서 사용된 용어 역분화 줄기세포 또는 유도만능줄기세포(iPS)'는 이미 분화가 완성된 성체세포들에 대하여 인위적으로 역분화과정(재프로그램화)을 수행하여 유도된 세포들로 만능분화능(pluripotency)을 가진다. 본 발명에서 사용된 용어 '맞춤형 만능줄기세포'는 만능줄기세포를 만들기 위해 사용한 공여세포(성체세포)와 제조된 만능줄기세포가 유전적으로 동일함을 지칭하며, 이는 맞춤형 만능줄기세포가 공여세포(성체세포)로부터 기원하여 유도된 세포임을 나타낸다. 본 발명에서 사용된 용어'분화(differentiation)'는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다. 본 발명에서 사용된 용어'세포 치료제'는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포 치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포 치료제, 줄기세포 치료제로 분류되며 본 발명은 특히 줄기세포 치료제에 관한 것이다.

[15] 본 발명은 다양한 유전적 배경을 가진 모든 성체세포에 적용될 수 있는 광범위한 만능줄기세포 제조방법을 제공한다. 본 발명에 사용되는 성체세포의 유전적 배경에는 제한이 없으며, 예를 들어 C-57 BL6와 FVB 유래 마우스의 피부섬유아세포(skin fibroblast, sFB)와 동종의 심장섬유아세포(cardiac fibroblast,

cFB)를 사용할 수 있다.

[16] 본 발명은 iPS 를 배양하여 추출물을 제조하는 단계를 포함한다. 본 발명에서는 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 의 4 가지 요소를 이용하는 역분화 방법을 포함한 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 iPS 가 사용될 수 있으며, 예를 들면 마우스 배아줄기세포의 단백질 추출물을 주입하여 유도된 iPS도 사용 가능하다. 구체적으로, 배양 중인 iPS 를 단백질 분해 효소로 처리한 후 그 추출물을 수합하여 각각의 iPS 로부터 유래하는 단백질을 추출한다. 추출물 제조 단계에서 이용된 기술은 기존의 단백질 추출 방법을 응용하여 고농도의 단백질 추출물을 제조하는 방법으로 하기 실시예에서 상세하게 설명하고자 한다. 본 발명의 맞춤형 만능줄기세포의 제조 효율을 고려할 때 상기 단백질 추출물의 농도는 10 내지 50 mg/ml 가 바람직하며, 20 내지 30 mg/ml 가 더욱 바람직하다. 상기 농도 범위를 벗어나면 유도효율이 현저히 저하된다.

[17] 본 발명은 상기 방법에 따라 iPS 에서 분리한 단백질 추출물을 성체세포에 주입하는 단계를 포함한다. 상기 주입을 위하여 세포막 투과효소를 성체세포에 처리하여 투과화(permeabilization) 시킨 다음 iPS 추출물이 세포내로 유입될 수 있도록 한다. 세포막 투과효소로는 일 실시예로 스트렙토라이신 O(streptolysin O)를 사용할 수 있다.

[18] 본 발명은 iPS 추출물이 주입된 성체세포를 배양하여 맞춤형 만능줄기세포를 유도하는 단계를 포함한다. 상기 추출물이 주입된 성체세포의 배양을 위해 배아줄기세포 배지를 사용할 수 있으며, 구체적으로 성체세포에 상기 추출물을 주입 후 바로 배아줄기세포 배지로 교환해서 계속 배양한다. 배아줄기세포 배지로는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 0.1mM MEM (Minimum Essential Medium) 비필수 아미노산, 0.1mM β-머캅토에탄올, 100U/ml 페니실린, 100㎍/ml 스트렙토마이신, 20 ng/ml LIF (Leukemia Inhibitory Factor, 백혈병억제인자)가 첨가된 배지를 사용할 수 있으며, 상기 DMEM에 첨가되는 화합물의 농도는 본 발명의 효과를 달성할 수 있는 범위 내에서 변할 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다.

[19] 본 발명은 상기 성체세포를 지지세포(feeder cell)층이 있는 배양 조건으로 옮겨 추가로 배양하는 과정을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예로 상기의 iPS 추출물을 성체세포에 주입 후, 배아줄기세포 배지를 사용하여 7일간 배양한 다음 지지세포층이 있는 배양 조건으로 옮긴다. 지지세포층에서 다시 7일간 배양 한 후, 즉 배양 14일째 새로운 지지세포층으로 다시 옮긴 다음, 5일 마다 계대 배양하는 과정을 수행할 수 있다. 상기 지지세포로는 STO 세포를 사용할 수 있다.

[20] 또한 본 발명은 a)iPS 에서 20 내지 30 mg/ml의 단백질 추출물을 제조하는 단계; b)성체세포에 세포막 투과효소를 처리하는 단계; c)세포막 투과효소를 처리한 성체세포에 상기 추출물을 주입하는 단계; d)상기 추출물을 성체세포에 주입 후 바로 배아줄기세포 배지로 배양하는 단계; 및 e)배양 7일 후 지지세포층이 있는

배양 조건으로 옮겨 추가로 배양하는 단계를 포함한다.

[21] 상기 방법에 의해 성체세포에서 유도된 역분화 줄기세포는 배아줄기세포와 동일한 분화능을 가진다. 구체적으로, 세포의 모양에 있어서 본 발명에 의해 유도된 만능줄기세포는 그 모양이 배아줄기세포와 거의 동일함을 알 수 있다(도 1d,e 참조). 또한 배아줄기세포의 특징적인 유전자(Nanog, Oct4, Sox-2, ERas) 및 단백질(Oct4, SSEA1)의 발현여부를 조사한 결과 본 발명에 의해 유도된 만능줄기세포에서 배아줄기세포와 동일하게 상기 유전자 및 단백질이 발현됨을 확인하였다(도 2 참조). 이에 더하여 본 발명에 의해 유도된 만능줄기세포가 배아줄기세포와 동일한 만능분화능(pluripotency)을 가지는지 여부를 확인하는 실험을 실시하였다. 먼저 면역결핍 마우스(mouse)를 사용하여 생체내 분화능을 조사한 결과, 내배엽, 중배엽, 외배엽 등으로 분화할 수 있는 기형종(teratoma)이 형성됨을 확인할 수 있었다 (도3 참조). 다음으로, 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포의 생체내 만능성을 추가적으로 증명하기 위하여 4배체 상보(tetraploid complementation)기술을 사용하였다. 이 기술은 줄기세포의 만능성을 생체내에서 규명할 수 있는 가장 엄격한 기준으로서 그 방법은 수정 후 세포가 두 개인 상태의 배아에 조작을 가하여 세포를 하나로 융합하여 염색체의 수를 2n 에서 4n 으로 만들어 태반 관련 조직으로만 성장할 수 있게 하고, 이 상태의 배아와 iPS 를 가임신한 암쥐의 자궁에 착상시켜 후손을 출생토록 하는 것이다. 도 4에 따르면 4배체 상보 기술을 이용하여 가임신 암쥐에 착상시킨 후 12.5일 배의 배아를 보여줌으로써 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포가 온전한 개체를 만들 수 있는 능력이 있다는 것을 증명하였다.

[22] 또한 유도된 만능줄기세포가 단백질 공여체인 iPS 가 아닌 성체세포에서 기원하였음을 확인하기 위하여 특정 MIT(microsatellite) 마커를 사용하여 게놈 DNA(genomic DNA)에 대한 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 그 결과 본 발명에서 유도된 만능줄기세포는 성체세포에서 유래된 맞춤형 만능줄기세포임을 확인할 수 있었다(도 5참조).

[23] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의해 유도된 만능줄기세포는그 분화능에 있어 배아줄기세포와 동일한 만능성을 가지며, 사용된 성체세포와 그 유전적 기원이 동일한 맞춤형 만능줄기세포임이 명백하다. 따라서 본 발명의 만능줄기세포 제조방법은 맞춤형 세포 치료제 개발의 실용화에 기여함과 아울러 포유류를 포함한 동물성체의 복제에도 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[24] 이하, 하기 실시예를 들어 본 발명에 대하여 더욱 구체적으로 설명 하고자 한다. 다만 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 이루어질 수 있는 다양한 변형을 모두 포함한다는 것은 명백하다.

[25] **실시예 1. 성체세포로부터 맞춤형 만능줄기세포의 유도**

[26] (1) iPS 추출물의 제조단계

[27] C57 마우스 배아줄기세포(C57 mES) 의 추출물을 주입하여 제조된 마우스 피부섬유아세포 유래 iPS 에 대하여 0.25% 트립신-EDTA를 3분동안 처리하여 수집한 후 인산완충액 (phosphate-buffered saline, PBS) 으로 세정하였다. 세포 펠렛을 차가운 세포 용균 완충액 (100 mM HEPES, pH 8.2, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol, 및 프로테아제 저해제) 1ml 로 재현탁하고 5분에 한번씩 볼텍싱하면서 30~45분 동안 얼음 위에 두었다. 20-게이지 바늘을 꼽은 주사기로 3~5번 통과시켜 균질화(homogenization)시키고 15,000rpm 으로 30분 동안, 4℃에서 원심분리하였다. 상등액을 새로운 튜브에 옮기고 -80℃에서 보관하였다. 추출한 단백질의 농도는 20~30 mg/ml 범위였다.

[28] (2) 성체세포의 세포투과 단계

[29] 본 발명에서는 성체세포로 C57 BL6 마우스의 피부섬유아세포 (C57sFB) 와 FVB 마우스의 피부섬유아세포 (FVBsFB) 를 사용하였다. 상기 섬유아세포에 트립신-EDTA를 처리한 후 차가운 PBS로 세정하였다. 세포 펠렛을 차가운 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} free Hank's balanced salt solution (HBSS) 으로 재현탁 (세포수 100,000 개당 100㎕ 주입)한 후, 1.5ml 튜브로 옮겼다. 120g, 5분간, 4℃ 로 swing-out rotor에서 원심분리하여 얻은 세포 펠렛을 다시 차가운 HBSS 97.7㎕로 재현탁시킨 후 37℃ 수조(water bath)에서 2분간 반응시켰다. Streptolysin O(SLO) 를 차가운 HBSS 로 희석 (1:10) 시켜 100 g/ml 의 농도로 만들고, 상기 반응액에 SLO 희석액 2.3㎕ 를 첨가하여 최종 SLO 농도가 230 ng/ml 가 되게 하였다. 그 후 10분에 한 번씩 위아래로 섞어 주면서, 37℃ 수조에서 50분간 반응시킨 다음 얼음위에서 차가운 HBSS 200㎕ 를 첨가하고 120g, 4℃에서 swing-out rotor를 사용하여 5분간 원심분리를 실시하였다.

[30] (3) iPS 추출물을 성체세포에 주입하는 단계

[31] 상기 세포투과 과정을 거친 성체세포 펠렛에 대하여 상기 iPS 추출물 200㎕ 로 재현탁하여 1㎕당 1000세포가 되도록 하였다. 그리고, ATP-재생 시스템 (10 mM 크레아틴 포스페이트 및 25g/ml 크레아틴 키나아제), 각각 1mM 의 뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP) 를 첨가하고, 10분에 한번씩 위아래로 섞어주면서 37℃ 수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 원형질막을 재봉합하기 위하여 2 mM $CaCl_2$ 가 함유된 배아줄기세포 배지 1㎖ 를 첨가하여 37℃ 배양기에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 배아줄기세포 배지로는 DMEM 에 10% FBS, 0.1mM MEM 비필수 아미노산(Gibco BRL 제조), 0.1mM β-머캅토에탄올(Sigma 제조), 100U/ml 페니실린(Sigma 제조), 100㎍/ml 스트렙토마이신(Sigma 제조), 20 ng/ml 백혈병 억제인자(LIF)가 첨가된 배지를 사용하였다. PBS 세정 후, 세포 펠렛을 상기 배지로 재현탁시킨 후 0.1% 젤라틴이 코팅된 dish 에 100,000개의 세포를 seeding 하였다.

[32] (4) iPS 추출물이 주입된 성체세포를 배양하여 맞춤형 만능줄기세포를 유도하는 단계

[33] 상기 dish 를 5% CO_2가 공급되는 배양기에서 37℃를 유지하며 배양하였으며,

상기 (3) 에서와 동일한 배아줄기세포 배지를 사용하였다. 배양 첫 2일 후 배지를 교환해 주었으며 그 후는 매일 배지를 교환해주었다. 배양 7일째 mitomycin C(MMC)가 처리된 지지세포 위에 배양하였고, 한 개의 dish를 두 개로 나누어 즉, 1:2의 비율로 옮겨서 배양하였다. 배양 14일째(D14) 새로운 지지세포에 다시 옮겨서 배양하였다. 지지세포로는 STO 세포를 사용하였다.

[34] 이 후 매일 배지를 교환해주며 5일에 한번 주기로 새로운 지지세포 위로 옮겼다. 평균적으로 배양 14일째(D14) 되는 날에 맞춤형 만능줄기세포를 얻을 수 있었다. 배양과정에서 콜로니의 수를 측정한 결과, 지지세포인 STO 세포에 옮긴 후, 4일째(D11) 작은 콜로니가 대략적으로 4-5개 관찰되고, 7일째(D14) 좀 더 성숙되고 크기가 비교적 큰 콜로니가 20-30개 관찰되며, 10일째(D17)는 200개 이상의 콜로니를 얻을 수 있었으며, 배양 18일째(D25)는 그 수를 헤아릴 수가 없을 정도의 많은 성숙한 유도만능줄기세포를 관찰할 수 있었다.

[35] 상기의 방법에 의하여 맞춤형 만능줄기세포가 유도되는 전체적인 과정을 보여주는 개략도를 도 1a)에 나타내었다. 상기 방법에 의해 유도된 만능줄기세포 1(FVBsFB-iPSe1) 및 2(C57sFB-iPSe2)를 도 1b) 및 1c) 에 나타내었으며, 상기 유도만능줄기세포는 그 모양에 있어서 배아줄기세포 및 본 발명에서 단백질 추출물 제조에 사용된 iPS 와 서로 구분이 불가능할 정도의 유사성을 보여주었다(도 1d 참조). 또한, 상기 방법에 의해 유도된 만능줄기세포는 배아줄기세포의 특징인 Alkaline phosphatase 염색 양성 소견(보라색)을 나타내었다(도 1e 참조). 염색 음성 부분(회색)은 지지세포이다.

[36] **실시예 2. 맞춤형 만능줄기세포의 유전자 및 단백질 특성 분석**

[37] (1) 유전자 발현분석

[38] 상기 실시예 1에서 제조된 만능줄기세포를 트립신-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 지지세포 제거를 위해 배양 dish 에 넣어 배양기에서 30분간 두었다. 붙지 않은 미분화 만능줄기세포를 회수한 다음, TRIzol 시약 (Invitrogen 사 제조)을 사용하여 전체 RNA를 분리하였다. 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 cDNA를 합성한 후 Nanog, Oct4, Sox-2, E-Ras, Klf-4, c-Myc, 및 대조유전자인 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR 을 진행하였다. Nanog, Oct4, Sox-2 및 ERas 는 배아줄기세포에서 보이는 특징적 유전자이며, Klf-4, c-Myc 유전자는 배아줄기세포 및 성체세포 모두에서 양성으로 보일 수 있는 비특이적인 유전자이다. PCR 산물을 아가로스 겔 전기영동으로 분석하여, 이들 유전자의 발현을 확인한 결과를 도 2의 a) 에 나타내었다.

[39] 도 2의 a)에 따르면, 지지세포(STO) 및 유도과정을 거치기 전의 성체세포(C57sFB 및 FVBsFB) 에서는 배아줄기세포의 특징적인 유전자인 Nanog, Oct4, Sox-2, E-Ras 가 발현되지 않은 반면, 본 발명의 방법에 의해 유도된 만능줄기세포 (FVBsFB-iPSe1 및 C57sFB-iPSe2)에서는 이들 특징적인 유전자들이 발현되었다. 도 2 a)의 C57 mES 는 C57 마우스배아줄기세포를

의미하며, FVBsFB-iPS 는 마우스 배아줄기세포의 추출물로 유도된 iPS 를 의미한다. 또한 비특이적인 유전자인 Klf-4 와 c-Myc 는 유도과정을 거치기 전후의 세포들 모두에서 발현됨을 알 수 있다.

[40] (2) 단백질 발현분석

[41] 본 발명의 방법에 의해 유도된 만능줄기세포 C57sFB-iPSe2 에 대하여 배아줄기세포의 특이 단백질인 SSEA1(stage-specific embryonic antigen-1) 과 Oct4의 발현여부를 확인하였다. Alkaline phosphatase 염색은 통상의 염색 키트 (Dako사 제조)를 사용하였으며, 배아줄기세포의 특이적인 단백질인 SSEA1 과 Oct4의 발현은 이에 대한 항체를 이용하여 단백질 발현여부를 분석하였다. 염색 과정은 우선 100% 메탄올을 이용하여 세포를 고정한 후, PBS로 세정을 하고 1% BSA 용액으로 블로킹(blocking)을 하였다. SSEA1 과 Oct4에 대한 1차 항체 (각각 Santa Cruz Biotechnology사 제조) 를 처리하여 4℃에서 18시간 동안 반응시킨 후, PBS로 세정을 하고, 1차 항체에 대한 형광이 붙은 2차 항체 (Santa Cruz Biotechnology사 제조) 를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 세정을 하고, 마운팅(mounting) 용액으로 마운팅을 한 후 공초점현미경(confocal microscopy)을 사용하여 발현 여부를 분석하여 그 결과를 도 2의 b) 에 나타내었다. BF 는 bright field를 의미하며, DAPI 는 4',6-diamidino-2-phenylindole 를 의미한다. 도 2의 b)에 따르면, 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포는 배아줄기세포의 특이 단백질인 SSEA1과 Oct4가 발현됨을 알 수 있다.

[42] **실시예 3. 맞춤형 만능줄기세포의 분화능 분석**

[43] 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포가 분화능에 있어 배아줄기세포와 동일한 만능성(pluripotency)을 가지는지 그 여부를 시험하였다.

[44] (1) 생체 내 분화유도

[45] 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포의 생체 내 분화능을 분석하기 위해 지지세포 위에서 배양한 미분화 만능줄기세포 콜로니를 지지세포위에서의 배양 18일째(D25) 트립신-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 지지세포 제거를 위해 배양 dish 에 넣어 배양기에서 30분간 두었다. 붙지 않은 미분화 만능줄기세포를 회수하여 $1x10^7$ 세포를 중증복합면역결핍증(severe combined immune deficiency, SCID) 마우스에 피하주사(subcutaneous injection)하였다. 4주 후 형성된 기형종을 수확하여 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde, PFA)로 고정시킨 후 통상적인 파라핀 포매(embedding)를 실시하였다. 10㎛ 두께로 조직을 잘라 헤마톡실린(Hematoxylin) 및 에오신(Eosin) 염색을 하였다.

[46] 도 3에 따르면, 본 발명의 방법으로 제조된 유도만능줄기세포를 주입한 곳에서 육안적으로 기형종(teratoma)이 형성됨을 알 수 있으며 (a), 보다 상세하게는 조직학적으로 외배엽 유래인 신경조직(신경상피, 신경글리아조직 등, 도 3b 참조), 중배엽 유래인 골조직 및 근육조직(선형상피, 연골, 근육 등, 도 3c 참조), 그리고 내배엽 유래인 췌장조직(원주상피, 위분비성 췌성, 편평상피 등, 도 3d 참조) 등으로 분화할 수 있는 기형종이 형성됨을 보여주었다.

[47] 상기 실험을 통해 본 발명의 방법으로 유도된 세포가 실제로 생체 내에서 배아줄기세포와 동일한 분화능, 즉 외배엽, 중배엽, 및 내배엽으로 분화할 수 있는 만능성(pluripotency) 을 가짐을 확인할 수 있었다.

[48] (2) 사배체 상보기술을 이용한 생체내 만능성 검증

[49] 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포의 생체내 만능성을 검증하기 위하여 4배체 상보(tetraploid complementation) 기술을 사용하였다. 수정된 마우스의 2세포기 상태의 배아에 전기적 조작을 가하여 세포를 하나로 융합하여 염색체의 수를 2n 에서 4n 으로 만들어 태반 관련 조직으로만 성장할 수 있게 하고, 이 상태의 배아와 iPS 를 가임신한 암쥐의 자궁에 착상시켜 실제로 배아가 발생하도록 한 다음, 새끼가 출생이 되도록 유지 및 관찰 하였다. 도 4는 4배체 상보 기술을 이용하여 암쥐에 착상시킨 후 12.5일 배의 배아를 보여준다. 따라서 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포가 온전한 개체를 만들 수 있는 능력이 있다는 것이 명백하다.

[50] **실시예 4. 유전형 분석을 통한 맞춤형 만능줄기세포 검증**

[51] 본 발명에서 유도된 만능줄기세포가 단백질 공여체인 iPS 가 아니라 성체세포에서 기원하였음을 입증하기 위하여 특정 MIT (microsatellite) 마커를 사용하여 유전자 PCR을 수행한 결과를 도 5에 나타내었다. 구체적으로, 지지세포 위에서 배양한 미분화 만능줄기세포 콜로니를 지지세포위에서의 배양 18일째(D25) 트립신-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 차가운 PBS로 세정하였다. 세포 펠렛을 PBS 200㎕ 로 재현탁하고 1.5ml 튜브로 옮겼다. 통상의 DNeasy Blood & Tissue Kit 와 DNeasy 미니 스핀 칼럼 (mini spin column) 을 사용하여, 게놈 DNA를 추출하였다. 개체간의 유전적 다형성을 검증할 수 있는 특정 MIT 마커인 D6Mit102 와 D2Mit285 에 대한 프라이머를 이용하여 게놈 DNA에 대한 PCR을 진행하였다. PCR 산물을 2% 아가로스 겔 전기영동하고, EtBr로 염색하여 크기를 확인하였다.

[52] 도 5에 따르면, C57 마우스에서 유래한 성체세포(C57 cFB; C57 BL6 mouse 유래 cardiac fibroblast) 와 FVB 마우스에서 유래한 성체세포(FVB sFB; FVB mouse 유래 skin fibroblast) 간에는 유전형이 일치하지 않으며, C57 마우스 유래 배아줄기세포(C57 mES) 는 C57 마우스 유래 성체세포와 동일한 유전형을 보여준다. 또한 C57 마우스 배아줄기세포 (C57 mES)의 추출물을 FVB 마우스 유래 성체세포 (FVBsFB) 에 주입하여 유도된 만능줄기세포(FVBsFB-iPS)는 FVB 마우스 유래 성체세포 (FVBsFB)와 유전형이 일치하며, 추출물을 제공한 배아줄기세포(C57 mES)와는 유전형이 일치하지 않음을 보여주었다. 이는 유도된 만능줄기세포(FVBsFB-iPS)가 추출물이 주입된 성체세포(FVBsFB)에서 유래하는 맞춤형 만능줄기세포임을 증명하는 결과이다.

[53] 이에 더하여 FVB 마우스 유래의 iPS 단백질 추출물을 C57 마우스 유래 피부섬유아세포에 주입하여 제조된 본 발명의 유도만능줄기세포(C57sFB-iPSe2)의 경우, 추출물을 제공한 FVB 마우스 유래

성체세포(FVB sFB)와는 그 유전형이 일치하지 아니하며 추출물을 주입한 C57 마우스 유래 성체세포(C57 cFB)와 그 유전자형이 일치함을 나타내었다. 따라서 본 발명에서 제조된 유도만능줄기세포는 그 유도된 성체세포와 동일한 유전자형을 가지는 면역적합성 맞춤형 만능줄기세포임이 명백하다.

산업상 이용가능성

[54] 본 발명은 종래의 방법에 비하여 매우 용이하게 그리고 현저히 높은 효율로 만능줄기세포를 제조할 수 있으며 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포는 각 개체에 맞추어진 면역적합성 세포 치료제의 실용화를 가능하게 한다. 따라서 본 발명은 심혈관질환, 신경계질환, 당뇨병 등의 다양한 난치병을 치료하는데 크게 기여할 수 있을 것이며 나아가 안전성이 확보된 고효율의 동물복제방법을 제공할 수 있을 것이다.

청구범위

[청구항 1] 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 역분화 줄기세포 또는 유도만능줄기세포에서 단백질을 분리하는 추출물 제조 단계; 상기 추출물을 성체세포에 주입하는 단계; 및 상기 추출물이 주입된 성체세포를 배양하여 배아줄기세포와 동일한 분화능을 가지는 만능줄기세포를 유도하는 단계를 포함하는 맞춤형 만능줄기세포 제조 방법.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 단백질 추출물의 농도가 10-50 mg/ml 인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 3] 제 2항에 있어서, 단백질 추출물의 농도가 20-30 mg/ml 인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 추출물 주입 전, 성체세포에 대하여 세포막 투과효소를 처리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 5] 제 1항에 있어서, 배아줄기세포 배지를 사용하여 상기 추출물이 주입된 성체세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 추출물을 성체세포에 주입하자마자 바로 배아줄기세포 배지로 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 7] 제 5항에 있어서, 상기 배아줄기세포 배지로 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 0.1mM MEM (Minimum Essential Medium) 비필수 아미노산, 0.1mM β-머캅토에탄올, 100U/ml 페니실린, 100㎍/ml 스트렙토마이신, 및 20 ng/ml 백혈병억제인자가 첨가된 것을 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 추출물이 주입된 성체세포를 지지세포층으로 옮겨서 추가로 배양하는 단계를 더 포함하는 방법.

[청구항 9] 제 8항에 있어서, 지지세포가 STO 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 10] 제 8항에 있어서, 상기 추출물이 주입된 성체세포 배양 7일째에 지지세포층으로 옮기는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 11] a) 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 역분화 줄기세포 또는 유도만능줄기세포에서 20-30 mg/ml 농도의 단백질을 추출하는 단계;

b) 성체세포에 세포막 투과효소를 처리하는 단계;

c) 상기 추출물을 상기 성체세포에 주입하는 단계;

d) 상기 추출물을 상기 성체세포에 주입 후 바로 배아줄기세포

배지로 배양하는 단계; 및

e) 상기 성체세포 배양 7일 후 지지세포층이 있는 배양 조건으로 옮겨 추가로 배양하는 단계를 포함하는 맞춤형 만능줄기세포 제조 방법.

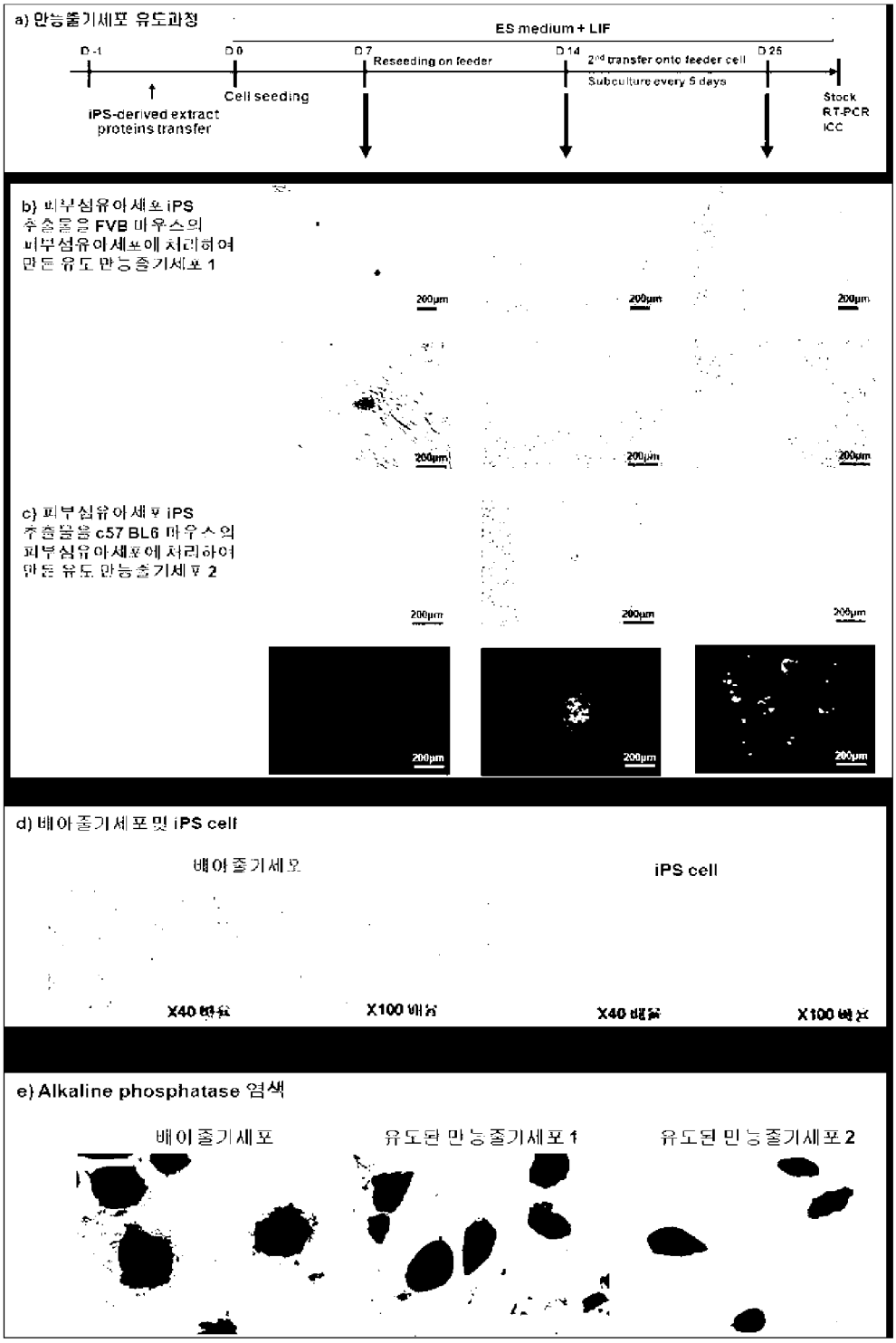
[청구항 12] 제 11항에 있어서, 상기 성체세포를 지지세포층으로 옮긴 후 14일간 더 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 13] 제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항의 방법에 의해 유도된 맞춤형 만능줄기세포.

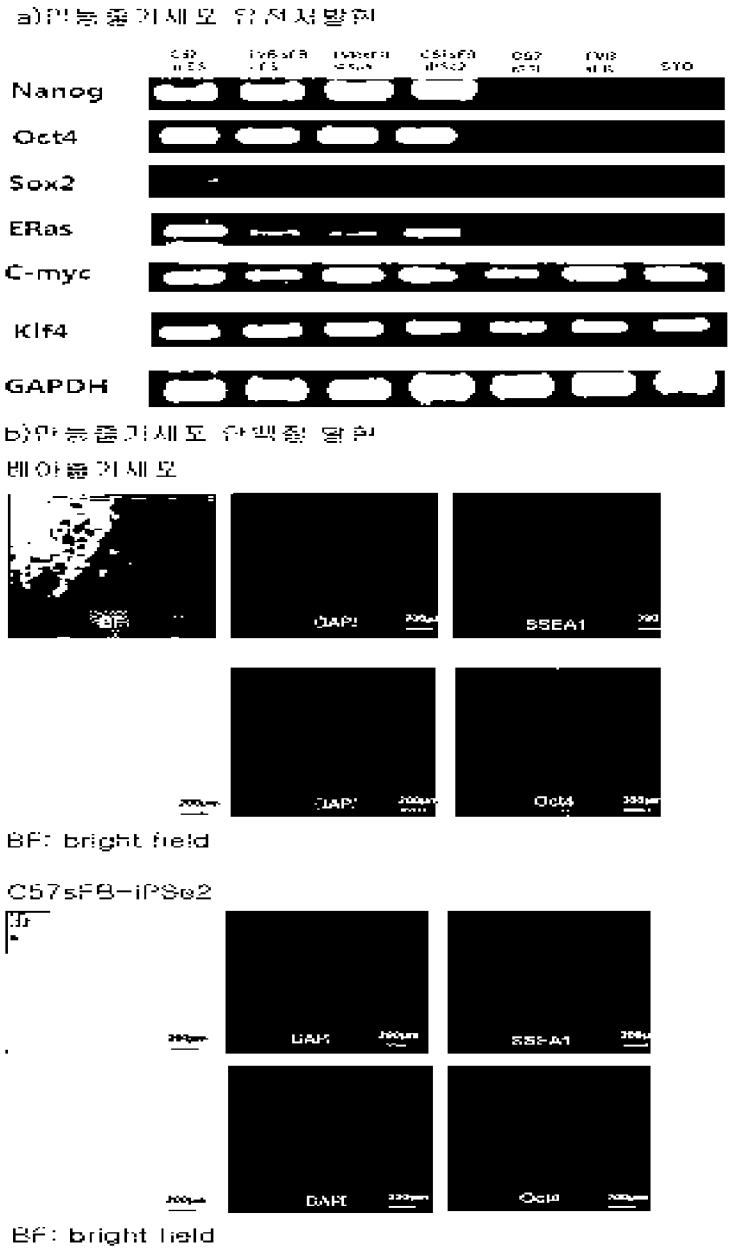
[청구항 14] 제 13항의 맞춤형 만능 줄기세포를 포함하는 세포 치료제.

WO 2011/037301 PCT/KR2009/007141

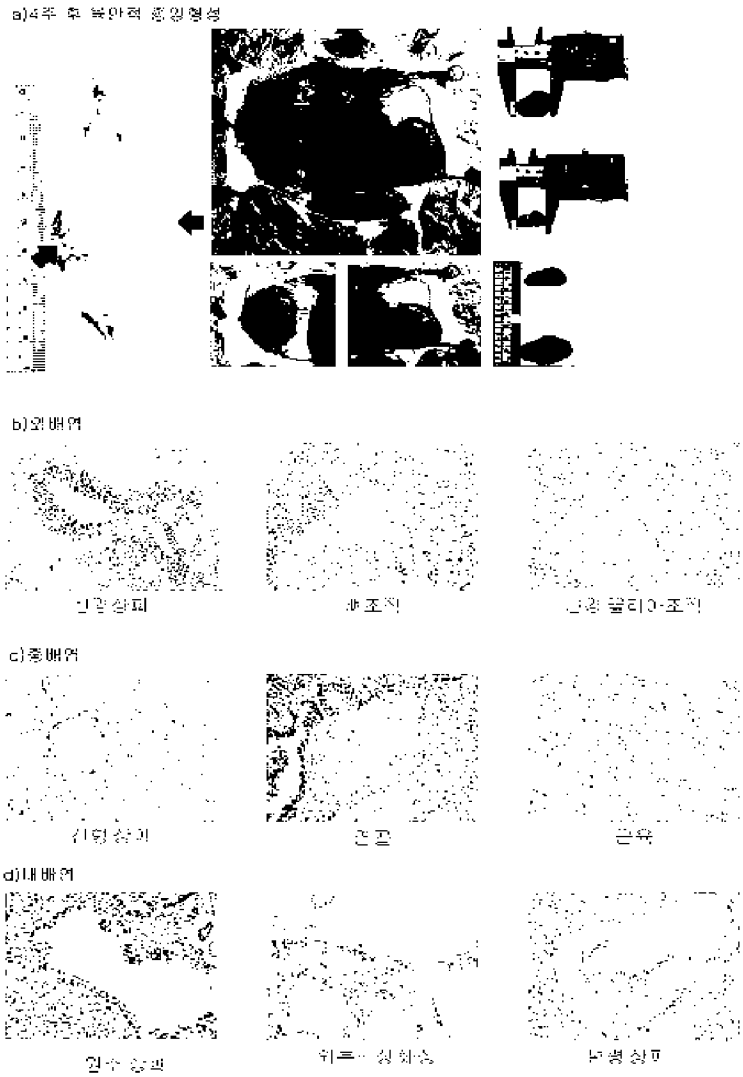
[Fig. 1]



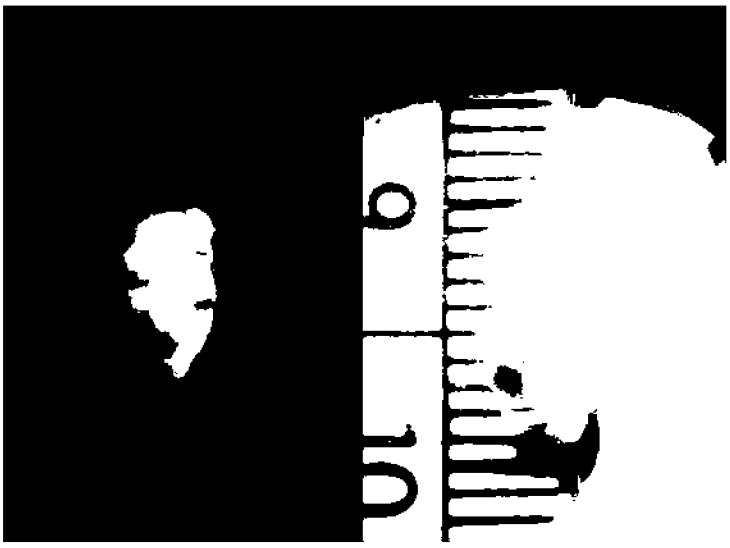
[Fig. 2]


Nanog
Oct4
Sox2
ERas
C-myc
Klf4
GAPDH
DAPI
SSEA1
DAPI
Oct4
BF: bright field
C57sFB-iPSe2
DAPI
SSEA1
DAPI
Oct4
BF: bright field

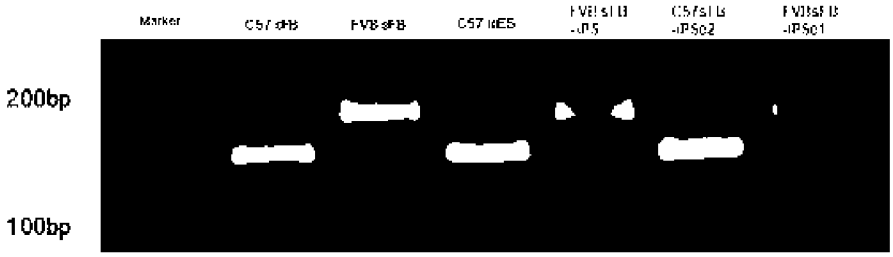
[Fig. 3]



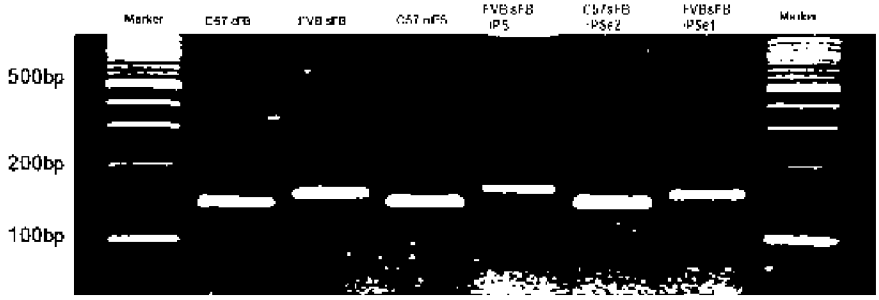
[Fig. 4]



[Fig. 5]



D8Mit102-Genomic DNA PCR



D8Mit285-Genomic DNA PCR

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2009/007141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/07(2010.01)i, A61P 9/00(2006.01)i, C12N 5/00(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 5/07; C12N 5/02; C12N 5/08

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) & PubMed
Keywords: iPS, stem cell extract, dedifferentiation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Circulation Res., 2008, vol. 102, pages e107-e117. Abstract, figures 1-8	1-14
X	Experimantal Cell Res., 2008, vol. 314, pages 2634-2642. Abstract, figures 1-8	1-14
A	Cell Stem Cell, 05 June 2009, vol. 4, no. 6, pages 472-476. Abstract, figures 1, 2	1-14
E	KR 10-2009-0130582 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) 24 December 2009 Abstract, the figures and the claims	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	Date of mailing of the international search report
22 NOVEMBER 2010 (22.11.2010)	**22 NOVEMBER 2010 (22.11.2010)**
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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2009/007141

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0130582 A	24.12.2009	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2009/007141

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/07(2010.01)i, A61P 9/00(2006.01)i, C12N 5/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 5/07; C12N 5/02; C12N 5/08

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) & PubMed
키워드: iPS, stem cell extract, dedifferentiation

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Circulation Res., 2008년, 제102권, 제e107-e117면. 초록, 도면 1-8	1-14
X	Experimantal Cell Res., 2008년, 제314권, 제2634-2642면. 초록, 도면 1-8	1-14
A	Cell Stem Cell, 2009,년 6월 5일, 제4권, 제6호, 제472-476면. 초록, 도면 1,2	1-14
E	KR 10-2009-0130582 A (서울대학교병원) 2009.12.24 초록, 도면 및 청구항	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 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
2010년 11월 22일 (22.11.2010)	**2010년 11월 22일 (22.11.2010)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 선사로 139,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
김경미
전화번호 82-42-481-8161

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2009/007141

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0130582 A	2009.12.24	없음	