



- (51) 국제특허분류:
C12N 5/074 (2010.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/000735
- (22) 국제출원일: 2015년 1월 23일 (23.01.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0005926 2015년 1월 13일 (13.01.2015) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 조이숙 (CHO, Yee Sook); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 손미영 (SON, Mi Young); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 설빛나 (SEOL, Bin Na); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, 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, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

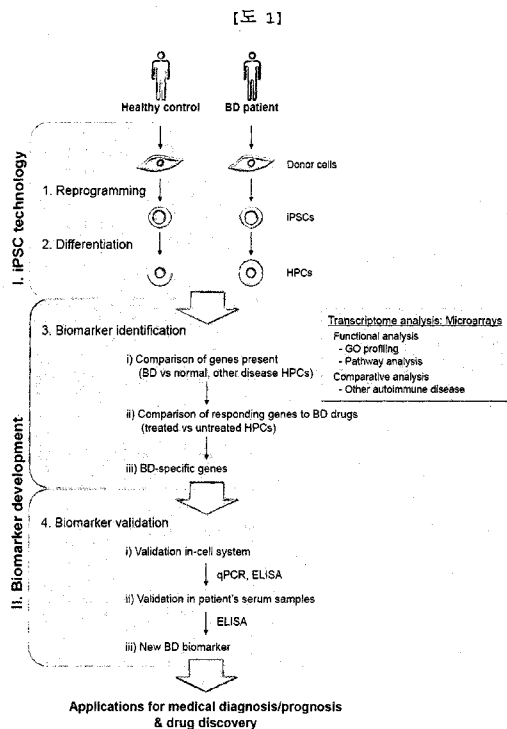
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: BEHCET'S DISEASE HUMAN CELL MODEL AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 베체트병의 인간 세포 모델 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from Behcet's disease (BD) patients, a method for preparing hematopoietic progenitor cells (HPCs) differentiated and induced therefrom, and a use of the cells as a BD human cell model. Specifically, the induced pluripotent stem cells derived from fibroblasts from BD patients can differentiate into hematopoietic progenitor cells that reproduce disease characteristics shown in the BD patients, and the levels of genetic expression and protein secretion of intracellular infective cytokines and chemokines, which are BD disease symptoms, can be effectively validated in the cells. Therefore, the BD human cell model and biomarker of the present invention can be favorably used in the BD pathogenesis mechanism analysis study and the BD medicine development study.

(57) 요약서: 본 발명은 베체트병(Behcet's disease, BD) 환자로부터 유래된 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs) 및 이로부터 분화 유도된 조혈전구세포(hematopoietic progenitor cells, HPCs)의 제조 방법, 및 상기 세포를 베체트병의 인간 세포모델로서 이용하는 용도에 관한 것으로, 구체적으로 베체트병 환자의 섬유아세포로부터 유래된 유도만능 줄기세포는, BD 환자에서 나타나는 질환의 특징을 재현하는 조혈전구세포로 분화할 수 있으며, 상기 세포에서 BD의 질환 증상인 세포 내 전염성 사이토카인 및 케모카인의 유전자 발현 및 단백질 분비 수준 등을 효과적으로 확인할 수 있으므로, 본 발명의 BD 인간 세포 모델 및 바이오마커는 BD의 발병 기전 분석 연구 및 치료제 개발 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

베체트병의 인간 세포 모델 및 이의 용도

5 【기술분야】

본 발명은 베체트병(Behcet's disease) 환자로부터 유래된 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs) 및 이로부터 분화 유도된 조혈전구세포(hematopoietic progenitor cells, HPCs)의 제조 방법, 상기 세포를 베체트병의 인간 세포모델로서 이용하는 용도, 및 상기 세포를 이용하여
10 발굴된 베체트병-특이적인 바이오마커의 용도에 관한 것이다.

【배경기술】

베체트병(Behcet's disease, BD)은 만성적으로 재발성인, 전신성의 면역-연관된 질병으로, 모든 크기의 동맥 및 정맥에 영향을 미치기 때문에,
15 신체의 넓은 범위에서 증상과 신호를 유발한다(Sakane et al., 1999; Verity et al., 2003). BD는 현재 세계적으로 나타나는 질병이나, 중동이나 지중해 연안 지역과 아시아에서 더욱 빈번하게 나타난다. 몇몇의 약물들은 손상을 입은 기관들을 대상으로 BD의 증상을 완화시키거나, 합병증을 방지하는데 도움을 줄 수 있으나, 현재까지 BD에 대해 완치의 방법은 없으며, 또한, 진단하는 방법과
20 예후를 판단할 수 있는 정확한 지표 또는 마커도 개발된 바 없는 실정이다.

BD의 병원(etiology) 및 발병 기전은 아직 불분명하나, 연구자들은 감염성 또는 환경적인 인자, 유전적인 요소, 및 면역 시스템의 이상(abnormalities)과 같은 요소들이 관련되어 있는 것으로 가정하고 있다.
25 감염성 병원으로서, 단순 포진 바이러스(herpes simplex virus) (Eglin et al., 1982; Sohn et al., 1998), 스트렙토코커스 산구이니스(*Streptococcus sanguinis*)(Yoshikawa et al., 1996), 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)(Ersoy et al., 2007) 및 칼라마이디아 슈모니아(*Chlamydia pneumonia*)

(Ayaslioglu et al., 2004) 등이 BD의 유발 요인으로 작용하는 것에 대해 보고된 바 있다.

인간의 열 충격 단백질(heat shock proteins, HSP)-60과 상호 반응하는 미생물의 HSP-65는 T 세포의 활성화에 대해 반응할 수 있는 것으로 예상되며, 이는 BD에서 감염에 의한 면역 반응과 자가면역(autoimmunity)에서 중요한 역할을 한다(Ergun et al., 2001; Kaneko et al., 1997; Lehner, 1997). 또한, 다른 연구들은 인터류킨(IL)-23R, IL-10(Mizuki et al., 2010; Remmers et al., 2010), STAT(Hou et al., 2012), 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen, HLA)-B51(Demirseren et al., 2014; Ohno et al., 1982), 단핵 백혈구 화학주화성의 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)(Hou et al., 2010), 이동 억제 요소(migration inhibitory factor, MIF)(Zheng et al., 2012) 및 miR-155(Zhou et al., 2014) 등이 BD에 대한 민감성에 작용할 수 있는 유전적인 요인임을 보고한 바 있다.

BD에서 자연 면역(innate immunity) 및 획득 면역(acquired immunity) 모두를 포함하는 비정상적인 면역 반응은 또한 BD의 병리학적 기작을 밝혀내기 위해 광범위하게 연구되었다(Kapsimali et al., 2010). 유전적으로 내인적(intrinsic) 및 외인적(extrinsic)인 촉진 요소에 의해 영향을 받는 T 세포 매개의 면역 반응은 BD의 면역 발병 기전에서 중심적인 역할을 하는 것으로 여겨진다. 활성화된 T의 비율 증가가 BD의 질병 활성화와 연관되어있고(Bank et al., 2003; Triolo et al., 2003), 호중구의 과활성화(Neutrophil hyperactivation) 또한 BD와 연관되어 있으며(Carletto et al., 1997; Eksioglu-Demiralp et al., 2001), IL-1(Hamzaoui et al., 1990; Pay et al., 2006), IL-6(Adam and Calikoglu, 2004; Wang et al., 1992), IL-8(Zouboulis et al., 2000) 및 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor, TNF)(Touma et al., 2010)와 같은 전-염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 증가된 수준이 BD 환자 내에서 면역 반응과 연관되어 있음이 보고되었다. 많은 연구 결과에서 BD의 병인 기전에서 우세한 Th1 반응이 중심적 역할을 하고 있음을 확인하였다(Frassanito et al., 1999; Ilhan et al.,

2008). 활성화된 BD 환자 내에서 Th1 사이토카인(IL-12, IL-18, IFN)의 수준이 증가하는 반면, Th2 사이토카인인 IL-4의 수준은 감소한다(Vaccarino et al., 2013; Zhou et al., 2012). Th1 반응의 양극화와 일치하는, CXCR3 및 CCR5를 포함하는 Th1-관련 케모카인 수용체의 발현은 BD 환자에서 또한
 5 상향-조절된다(Ben Ahmed et al., 2004; Houman et al., 2004). 최근 연구들은 또한, 전-염증성 사이토카인 IL-17을 생산하는 Th17 세포의 비율이 Th1 세포에 비해 활성화 BD를 가지는 환자에서 높게 나타나며(Hamzaoui, 2011), 또한, BD에서 Th22 세포에 의해 만들어지는 염증성 사이토카인 IL-22의 발현 수준이 높아져, 염증성 반응에 연관됨을 보고하였다(Sugita et al., 2013).

10

이와 같이, BD에 대한 연구들이 계속되고, 발전 되었음에도 불구하고, 발병 증상 및 신호가, 시간의 흐름에 따라 다양한 정도로 신체 전체에 걸쳐 복합적인 위치에 영향을 미치는 수많은 다른 염증성 질병의 것과 유사하게 나타나며, BD의 징후(manifestations)는 수개월 또는 심지어 수년간 나타날
 15 수도 있고 지속적인 것처럼 보이지 않을 수도 있어 다른 면역질환과 구별된 BD의 진단 및 치료법을 적용하기가 매우 어려운 실정이다.

현재 많이 사용되고 있는 BD에 대한 최근의 임상 진단 방법은 국제 베체트병 연구그룹(International Study Group for Behcet's Disease(ISGBD), 1990)과 일본 베체트병 연구회에서 제안한 기준(Behcet's Disease Research
 20 Committee of Japan, 1987)에 기반하고 있으며, 복합적이고, 종합적인 경험과 주관적인 판단에 의존적이다. 현재까지 BD의 검출 및 진단, 치료 방법, 예후 등에 적용하기 위한 신뢰할 만한 임상적인 바이오마커는 존재하지 않는다. 따라서, BD-특이적 바이오마커의 추가적인 연구가 BD의 조기 치료 및 적절한 치료법 개발을 위해 필수적으로 요구되고 있는 실정이다.

25

줄기세포(stem cell)는 조직을 구성하는 각 세포로 분화되기 전단계의 세포로서, 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있으며, 미분화 상태에서 무한 증식이 가능한 자가재생산능 및 특정 분화 자극에 의해 다양한 조직의

세포로 분화될 수 있는 잠재적 가능성인 분화능을 가진 세포를 말한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되며, 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있어 증식(proliferation, expansion)하는
 5 특성이 있으며, 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다른 종류의 특정 세포로도 분화될 수 있어 분화에 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)를 포함하는 인간 전분화능 줄기세포(Human pluripotent stem cells; hPSCs)는 인체를
 10 구성하는 거의 모든 조직 세포 종류로 분화할 수 있는 우수한 분화능을 가지고 있다. 특히, 환자-유래 iPSCs의 경우 시험관 내 분화 시스템에서 환자와 같은 면역적, 유전적 특성을 가진 조직-특이적 분화세포를 생산할 수 있음으로 인해 면역 거부반응이 없는 환자-맞춤형 세포치료제 개발뿐만 아니라, 기관 형성(organogenesis)의 초기 발달 동안에 복합적 질병의 메커니즘을
 15 이해하는데 효과적인 평가자로 알려져 있다(Muotri, A. R. (2009) *Epilepsy Behav* 14 Suppl 1: 81-85; Marchetto, M. C., B. Winner, et al. (2010) *Hum Mol Genet* 19(R1): R71-76).

현재까지, 다양한 유전적 질병을 가지는 환자로부터 유래된 iPSCs가 질병과-관련 있는 세포 종류로 직접 분화되었을 때 질병-특이적인
 20 표현형(phenotypes)을 나타냄이 보고되고 있다(Park, I. H. et al. *Cell* 134, 877-886 (2008); Tiscornia, G. et al. *Nature medicine* 17, 1570-1576 (2011)). 이러한 질병-특이적인 iPSCs는 질병의 직접적인 원인 또는 손상부위와 관련 있는 조직 세포로 분화될 수 있음으로 인해, 질환 특성을 보유한 분화 조직-세포는 질병의 원인을 규명하기 위한 구체적인 기작 연구 또는 치료제
 25 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

질환-특이 iPSCs 기술을 이용하여 발굴된 질병-특이적 바이오마커는 질병 특성, 상태 또는 속도의 지표로 사용될 수 있으며(Ziegler et al., 2012;

Zineh 및 Huang, 2011), 이들의 추가적인 개발은 조직, 세포 또는 생체액(biofluid)을 포함하는 질병에 관련된 생체 시료의 이용 가능성을 넓히는데 기여할 수 있다. 환자로부터 유래된 인간 일차적인 세포는 바이오마커의 개발을 위해 유용하게 사용될 수 있으나, 이들은 일반적으로

5 수득하는데 어려울 뿐 아니라 시험관 내(in vitro)에서 제한된 수명을 가진다. 하지만, 증식 및 분화능이 우수한 인간의 유도만능 줄기세포(iPSCs)는 기관-특이적인 전구 세포 및 특정 기능을 수행하는 성숙한 세포를 제한없이 생산할 수 있는 잠재력이 있어 기술적으로 다양한 적용을 가능케 한다. 환자의 질병 표현형 및 임상적인 증상을 잠재적으로 나타낼 수 있는 환자

10 유래의 iPSCs는 진단, 예측(prognostic), 예견(predictive) 및 치료적인 용도를 위한 질병-특이적인 바이오마커를 개발하는데 있어서 뚜렷한 장점을 제공한다.

따라서, 본 발명자들은 환자-유래 iPSCs 기술을 기반으로 베체트병(BD)을 연구하기 위한 인간 세포 모델을 확립하기 위해 노력한 결과, 우선적으로 BD

15 환자의 섬유아세포로부터 BD 유래의 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)를 제작하였고, 이로부터 질병과 관련된 분화 세포인 조혈전구세포(hematopoietic precursor cell, HPCs)의 분화를 유도하였다. 상기 BD 환자 유래의 iPSCs는 시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo)에서 전분화능(pluripotency)을 가져, iPSCs로서의 특징을 나타냄을 확인하였다.

20 BD 환자 유래의 iPSCs로부터 베체트병과 관련된 질환 모델 세포인 HPCs로 분화를 유도한 결과, 비교를 통한 전사체 분석(Comparative transcriptome analysis)에서 BD 바이오마커에 대한 후보자로서 8 개 유전자(AGTR2, CA9, CD44, CXCL1, HTN3, IL-2, PTGER4 및 TSLP)를 선별하고, 이들이 건강한 대조군과 비교하여 차별화되는 뚜렷한 유전자 발현 양상을 나타냄을 확인하였으며,

25 류마티스 관절염과 같은 다른 면역성 질환을 가지는 환자로부터 유래된 iPSCs 및 HPCs와도 발현 수준이 구별되는 것을 확인하였다. 또한, 선별된 8개 후보 유전자군을 대상으로 단백질 수준에서의 BD-x특이적인 발현변이를 조사한 결과, CXCL1의 단백질 발현 증가가 BD와 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였다. BD

환자-유래 체세포, BD-iPSCs, BD-HPCs 등의 BD 세포 질환 모델 및 BD 환자
 혈청에서 CXCL1 단백질 분비가 BD와 연관되어 특이적으로 증가되어 있음을
 확인함으로써 CXCL1은 성능이 우수한 BD 바이오마커로서 유전자 발현 및
 단백질 발현 수준 모두에서 BD-특이적인 바이오마커로서 기능할 수 있음을
 5 확인하였다. 또한, 상업적으로 시판되고 있는 FDA 승인 항염증제 및
 면역억제제 34종을 대상으로 약물 반응성을 조사한 결과, BD-HPCs의 인간
 세포질환모델로서의 유용성 및 CXCL1의 바이오마커로서의 우수성을 선택성,
 재현성 및 민감성 측면에서 검증하였다. 본 발명의 BD 질환모델세포,
 환자-유래 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs) 및
 10 iPSCs-유래 HPCs를 이용하여 바이오마커 유전자 및 단백질을 BD의 진단 및
 약물 스크리닝 방법에 적용할 수 있음을 확인하여, BD의 발병 원인 규명 연구
 및 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있는 BD의 인간 세포 모델 및
 바이오마커를 제시함으로써 본 발명을 완성하였다.

15 【선행기술문헌】

【비특허문헌】

(비특허문헌 1)Agrawal, R. et al., 2014. Indian J Ophthalmol. 62:74-81.

(비특허문헌 2)Aktas Cetin, E. et al., 2013. Rheumatol Int. 33:733-741.

(비특허문헌 3)Ben Ahmed et al., 2004. Arthritis Rheum. 50:2291-2295.

20 (비특허문헌 4)Davatchi, F. 2012. Patholog Res Int. 2012:607921.

(비특허문헌 5)Durante, W. et al., 1994. Thromb Res. 75:63-71.

(비특허문헌 6)Evereklioglu, C. et al., 2002. Mediators Inflamm.
 11:87-93.

(비특허문헌 7)Firestein, G.S. 2003. Nature. 423:356-361.

25 (비특허문헌 8)Frassanito, M.A. et al., 1999. Arthritis Rheum.
 42:1967-1974.

(비특허문헌 9)Hamzaoui, K. 2011. Clin Exp Rheumatol. 29:S71-76.

(비특허문헌 10)Houman, H. et al., 2004. J Autoimmun. 23:267-273.

(비특허문헌 11)Kontogiannis, V., and R.J. Powell. 2000. Postgrad Med J. 76:629-637.

(비특허문헌 12)Leek, R.D. et al., 1994. J Leukoc Biol. 56:423-435.

(비특허문헌 13)Mege, J.L. et al., 1993. J Rheumatol. 20:1544-1549.

5 (비특허문헌 14)O'Neill, T.W. et al., 1994. Br J Rheumatol. 33:115-117.

(비특허문헌 15)Sakane, T. et al., 1999. N Engl J Med. 341:1284-1291.

(비특허문헌 16)Salvagiottto, G. et al., 2011. PLoS One. 6:e17829.

(비특허문헌 17)Son, M.Y. et al., 2013. Stem Cells. 31:2374-2387.

(비특허문헌 18)Son, M.Y. et al., 2011a. PLoS One. 6:e19134.

10 (비특허문헌 19)Son, M.Y. et al., 2011b. J Cell Mol Med. 15:152-165.

(비특허문헌 20)Son, M.Y. et al., 2014. Hum Mol Genet. 23:1802-1816.

(비특허문헌 21)Sugita, S. et al., 2013. J Immunol. 190:5799-5808.

(비특허문헌 22)Tanaka, T. et al., 2012. Blood. 120:1299-1308.

(비특허문헌 23)Vaccarino, L. et al., 2013. Biochem Genet.

15 (비특허문헌 24)Verity, D.H. et al., 2003. Br J Ophthalmol. 87:1175-1183.

(비특허문헌 25)Zhou, Z.Y. et al., 2012. Autoimmun Rev. 11:699-704.

(비특허문헌 26)Ziegler, A. et al., 2012. Hum Genet. 131:1627-1638.

(비특허문헌 27)Zineh, I., and S.M. Huang. 2011. Biomark Med. 5:705-713.

20

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs) 기술을 이용하여 베체트병(Behcet's disease, BD) 환자의 질환 특성을
25 그대로 반영할 수 있는 인간 세포 모델을 개발하고, 이의 용도를 제공하는
것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 i) 내지 iii) 중 어느 하나 이상을 특징으로 하는 베체트병(Behcet's disease, BD)의 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs) 모델을 제공한다.

i) 정상 세포의 iPSCs 형태;

5 ii) OCT4, NANOG, TRA-1-60 및 SSEA를 포함하는 전분화능 마커(pluripotency marker) 단백질을 발현; 및

iii) OCT4, SOX2, NANOG 및 REX를 포함하는 전분화능 마커 유전자 mRNA를 발현.

또한, 본 발명은

10 i) 시험관 내(in vitro)에서 베체트병 환자로부터 분리된 섬유아세포(fibroblasts)를 iPSCs로 유도하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 유도된 iPSCs를 수득하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 베체트병 iPSCs 모델의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 하기 i) 내지 vi) 중 어느 하나 이상을 특징으로 하는 베체트병의 조혈전구세포(hematopoietic progenitor cells, HPCs) 모델을 제공한다:

i) CD43 및 CD45를 포함하는 조혈 마커 발현;

ii) SCL, GATA1, GATA2, KDR, CD34, CD43 및 CD45를 포함하는 조혈 마커 유전자 발현;

20 iii) 정상 세포에 비해, IL-6, IL-8 및 TNF α 를 포함하는 전-염증성 사이토카인의 분비 수준 증가; 및

iv) 정상 세포에 비해, CXCL1 유전자의 발현 수준 증가;

v) 정상 세포에 비해, CXCL1 단백질의 분비 수준 증가; 및

vi) 정상 세포에 비해, IL-2 유전자의 발현 수준 증가.

25 또한, 본 발명은

i) 시험관 내에서 베체트병 환자로부터 분리된 섬유아세포를 iPSCs로 제작하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 제작한 iPSCs를 조혈전구세포(hematopoietic

progenitor cells, HPCs)로 유도하는 단계; 및

iii) 상기 단계 ii)에서 유도된 HPCs를 수득하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 베체트병 조혈전구세포 모델의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

5 i) 베체트병 iPSCs 모델로부터 배상체(embryoid body, EB) 또는 조혈전구세포(HPCs)로 분화를 유도하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 유도된 배상체의 분화 마커 또는 조혈전구세포의 특징을 분석하는 단계를 포함하는, iPSCs 또는 조혈전구세포를 베체트병의 모델로 사용하는 방법을 제공한다.

10 또한, 본 발명은 하기 유전자 또는 하기 유전자를 특이적으로 증폭하는 프라이머 쌍을 하나 또는 둘 이상 포함하는, 베체트병(Behcet's disease, BD)의 진단용 키트:

서열번호 1의 염기서열로 구성되는 AGTR2(angiotensin II receptor, type 2) 유전자;

15 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 CA9(carbonic anhydrase IX) 유전자;

서열번호 3의 염기서열로 구성되는 CD44 유전자;

서열번호 4의 염기서열로 구성되는 HTN3(histatin 3) 유전자;

서열번호 5의 염기서열로 구성되는 PTGER4(prostaglandin E receptor 4, subtype EP4) 유전자; 및

20 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 TSLP(thymic stromal lymphopoietin) 유전자를 제공한다.

또한, 본 발명은 하기 단백질 또는 하기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는, 베체트병의 진단용 키트:

25 서열번호 9의 아미노산 서열로 구성되는 AGTR2(angiotensin II receptor, type 2) 단백질;

서열번호 10의 아미노산 서열로 구성되는 CA9(carbonic anhydrase IX) 단백질;

서열번호 11의 아미노산 서열로 구성되는 CD44 단백질;

서열번호 12의 아미노산 서열로 구성되는 HTN3(histatin 3) 단백질;

서열번호 13의 아미노산 서열로 구성되는 PTGER4(prostaglandin E receptor 4, subtype EP4) 단백질; 및

5 서열번호 14의 아미노산 서열로 구성되는 TSLP(thymic stromal lymphopoietin) 단백질을 제공한다.

또한, 본 발명은

i) 개체로부터 분리된 시료를 제 9항 또는 제 11항의 키트에 처리하는 단계;

10 ii) 상기 단계 i)에서 처리한 키트에서 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 분석하는 단계; 및

15 iii) 상기 단계 ii)에서 분석한 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 증가하는 경우 상기 개체를 베체트병에 걸리거나 또는 베체트병에 걸릴 위험이 있는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 베체트병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

i) 제 9항 또는 제 11항의 키트에 피검물질을 처리하는 단계;

ii) 상기 단계 i)의 처리한 키트에서 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 분석하는 단계; 및

20 iii) 상기 단계 ii)에서 분석한 유전자 또는 단백질의 수준이 무처리 대조군에 비교하여 감소하는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 베체트병의 치료제 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

25 또한, 본 발명은 하기 유전자 또는 하기 유전자를 특이적으로 증폭하는 프라이머 쌍을 하나 또는 둘 이상 포함하는, 베체트병(Behcet's disease, BD)의 진단용 키트의 용도:

서열번호 1의 염기서열로 구성되는 AGTR2(angiotensin II receptor, type 2) 유전자;

서열번호 2의 염기서열로 구성되는 CA9(carbonic anhydrase IX) 유전자;

서열번호 3의 염기서열로 구성되는 CD44 유전자;

서열번호 4의 염기서열로 구성되는 HTN3(histatin 3) 유전자;

서열번호 5의 염기서열로 구성되는 PTGER4(prostaglandin E receptor 4, subtype EP4) 유전자; 및

5 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 TSLP(thymic stromal lymphopoietin) 유전자를 제공한다.

아울러, 본 발명은 하기 단백질 또는 하기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는, 베체트병의 진단용 키트의 용도:

10 서열번호 9의 아미노산 서열로 구성되는 AGTR2(angiotensin II receptor, type 2) 단백질;

서열번호 10의 아미노산 서열로 구성되는 CA9(carbonic anhydrase IX) 단백질;

서열번호 11의 아미노산 서열로 구성되는 CD44 단백질;

15 서열번호 12의 아미노산 서열로 구성되는 HTN3(histatin 3) 단백질;

서열번호 13의 아미노산 서열로 구성되는 PTGER4(prostaglandin E receptor 4, subtype EP4) 단백질; 및

서열번호 14의 아미노산 서열로 구성되는 TSLP(thymic stromal lymphopoietin) 단백질을 제공한다.

20

【유리한 효과】

본 발명의 베체트병(Behcet's disease, BD) 환자의 섬유아세포로부터 유래된 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)는, BD 환자에서 나타나는 질환의 특징을 재현하는 조혈전구세포(hematopoietic progenitor cells, HPCs)로 분화할 수 있으며, 상기 세포에서 BD의 질환 증상인 세포 내 전염성 사이토카인 및 케모카인의 유전자 발현 및 단백질 분비 수준 등을 효과적으로 확인할 수 있으므로, 본 발명의 BD 인간 세포 모델은 BD의 발병 기전 분석 연구 및 치료제 개발 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

25

【도면의 간단한 설명】

도 1은 베체트병(Behcet's disease, BD) 환자 유래의 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)를 제조하고, 바이오마커를
5 개발하기 위한 본 발명의 모식도이다.

도 2는 BD 유래의 iPSCs 제조 과정을 나타내는 모식도이다.

도 3은 BD 유래 iPSCs의 특징을 확인한 도이다;

도 3a는 BD-iPSCs의 집락 형태 및 전분화능 마커 발현을 확인한 도이고;

도 3b는 건강한 대조군 유래의 iPSCs(대조군-iPSCs) 및 BD-iPSCs의
10 핵형을 비교한 도이며;

도 3c는 BD 유래 iPSCs의 전분화능 마커 유전자의 발현을 정량적으로 확인한 도이고;

도 3d는 시험관 내에서 BD-iPSCs로부터 분화된 배상체(embryoid body, EB)의 삼배엽 분화-특이성 마커 유전자의 발현을 확인한 도이고; 및

15 도 3e는 생체 내(in vivo)에서 BD-iPSCs로부터 기형종 발생을 유도하여 전분화능을 확인한 도이다.

도 4는 BD 유래 iPSCs로부터 조혈전구세포(hematopoietic progenitor cells, HPCs)의 분화를 나타낸다;

도 4a는 BD-iPSCs로부터 BD-HPCs를 분화하는 과정을 나타내는
20 모식도이고; 및

도 4b는 분화된 BD-HPCs를 선별하기 위해 CD43 및 CD45 양성세포의 비율을 확인한 도이다.

도 5는 BD-iPSCs 유래 HPCs의 특징을 나타낸다;

도 5a 대조군 및 BD 환자 유래의 체세포, iPSCs 및 HPCs에서 조혈 마커
25 유전자의 발현을 확인한 도이고;

도 5b는 세포 집락 형성 분석을 통해 BD-iPSCs 유래 HPCs의 조혈 계통 세포로의 분화 가능성을 확인한 도이며; 및

도 5c는 BD-iPSCs 유래 HPCs의 IL-6, IL-8, TNF α 및 INF γ 를 포함하는

전-염증성 사이토카인의 분비 수준을 확인한 도이다.

도 6은 BD 환자 유래의 iPSCs 및 HPCs에서 유전자 발현 양상 분석을 통한 베체트병 바이오마커 유전자 선별을 나타내는 도이다;

5 도 6a은 BD 환자 유래의 HPCs로부터 BD 특이적인 유전자를 BD 바이오마커로서 선별하기 위한 과정을 나타내는 모식도이며;

도 6b는 BD 환자 유래의 체세포, iPSCs 및 HPCs의 전체적인 유전자 발현 양상을 확인한 마이크로어레이 분석을 나타낸 도이고;

도 6c는 BD-HPCs에서 상승 발현되는 양상을 나타내는 생물학적 경로들을 확인한 KEGG 경로 분석을 나타내는 도이며; 및

10 도 6d는 BD-HPCs에서 사이토카인 및 케모카인을 암호화하는 유전자로서 선별한 217 개 유전자의 발현 정도를 대조군 유래 HPCs와 비교한 도이다.

도 7은 BD 환자 유래의 체세포, iPSCs 및 HPCs에서 사이토카인 및 케모카인의 유전자 발현 정도를 대조군과 비교한 마이크로어레이 분석을 나타낸다.

15 도 8은 BD 및 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis, RA) 환자 유래 세포의 유전자 발현 양상을 확인하기 위한 주성분분석(Principal component analysis, PCA) 결과를 나타낸다.

도 9는 BD-HPCs에서 약물 처리를 통한 바이오마커 후보 유전자의 선별을 나타낸다;

20 도 9a는 프레드니솔론(prednisolone, PRED) 또는 황산히드록시클로로퀸(hydroxychloroquine sulfate, HCQ)의 처리 유무에 따른 BD-HPCs 내 전체적인 유전자 발현 양상의 변화를 나타내는 도이고;

도 9b는 PRED 또는 HCQ 처리 농도에 따른 BD-HPCs에 대한 세포 독성을 확인한 도이며;

25 도 9c는 PRED 또는 HCQ 처리 유무에 따른 BD-HPCs에 대한 세포 집락의 형태 변화 여부를 확인한 도이고;

도 9d는 PRED 또는 HCQ 처리 유무에 따른 BD-HPCs 내 생물학적 과정의 유전자 발현 정도의 변화를 확인한 도이며;

도 9e는 PRED 또는 HCQ 처리 유무에 따른 BD-HPCs 내 분자적인 기능을 가지는 유전자 발현 정도의 변화를 확인한 도이고; 및

도 9f는 PRED 또는 HCQ 처리에 대해 BD-HPCs 내 상향 조절되는 항염증성 사이토카인 및 케모카인 유전자의 유사한 발현 변화를 확인한 도이다.

5 도 10은 BD-HPCs의 진단 및 약물 반응 예측을 위한 BD 바이오마커의 선별을 나타낸다;

 도 10a는 BD 바이오마커 후보군 유전자로서 선별한 AGTR2, CA9, CD44, CXCL1, HTN3, IL-2, PTGER4 및 TSLP의 8 개 유전자에 대해, PRED 또는 HCQ 처리 유무에 따른 BD-HPCs 내 유전자 발현 변화를 마이크로어레이 분석을 통해
10 비교한 도이며; 및

 도 10b는 BD 바이오마커 후보군 유전자에서 PRED 또는 HCQ 처리 유무에 따른 BD-HPCs 내 유전자 발현 변화를 정량적으로 비교한 도이다.

 도 11은 BD-HPCs에서 BD 바이오마커를 이용한 진단 방법으로서의 적용 여부를 확인한 도이다;

15 도 11a는 독립적인 BD 환자 유래의 HPCs의 배양 상층액 내 CXCL1 단백질 농도를 확인한 도이고;

 도 11b는 BD 환자 3 명으로부터 각각 수득한 체세포로부터 유래된 HPCs의 배양 상층액 내 CXCL1 단백질 농도를 확인한 도이며;

20 도 11c는 BD 환자 유래의 체세포 및 iPSCs의 배양 상층액 내 CXCL1 단백질의 농도를 확인한 도이고;

 도 11d는 BD-iPSCs로부터 분화된 간세포(내배엽), 심장근육세포(중배엽) 및 신경 전구체(외배엽)과 같은 다른 세포에서 CXCL1 유전자의 발현 수준을 정량 비교한 도이며; 및

25 도 11e는 BD-iPSCs로부터 분화된 간세포(내배엽), 심장근육세포(중배엽) 및 신경 전구체(외배엽)과 같은 다른 세포의 배양 상층액 내 CXCL1 단백질 농도를 비교한 도이다.

 도 12는 대조군 및 BD 환자로부터 수득한 혈청 시료 내에서 CXCL1 및 IL-6 단백질의 농도를 확인한 도이다.

도 13은 BD-HPCs에서 BD 바이오마커를 이용한 약물 스크리닝으로의 적용 여부 확인한 도이다;

도 13a는 34 개의 FDA 승인된 약물을 처리하였을 때, BD-HPCs 배양 상층액 내 IL-6의 농도 변화를 확인한 도이며; 및

5 도 13b는 34 개의 FDA 승인된 약물을 처리하였을 때, BD-HPCs 배양 상층액 내 CXCL1의 농도 변화를 확인한 도이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

10

본 발명은 하기 i) 내지 iii) 중 어느 하나 이상을 특징으로 하는 베체트병(Behcet's disease, BD)의 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs) 모델을 제공한다:

i) 정상 세포의 iPSCs 형태;

15 ii) OCT4, NANOG, TRA-1-60 및 SSEA를 포함하는 전분화능 마커(pluripotency marker) 단백질을 발현; 및

iii) OCT4, SOX2, NANOG 및 REX를 포함하는 전분화능 마커 유전자 mRNA를 발현.

본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 BD 환자와 건강한
20 대조군을 선별하고(표 1 참조) 이들로부터 분리된 섬유아세포의 체세포로부터 전분화능을 가진 iPSCs(BD-iPSCs)를 제작한 결과(도 1 및 도 2 참조), BD-iPSCs는 BD 환자와 유전적으로 동일성을 가지고(표 2 참조), 정상적인 배아줄기세포(hESCs)와 유사한 집락 형태 및 핵형을 나타내며(도 3a 및 도 3b 참조), BD-iPSCs는 시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo)에서 전분화능을
25 가지는 것을 확인하였다(도 3 참조).

따라서, 본 발명의 BD 유래의 iPSCs 모델은 BD 환자의 세포와 동일한 특성을 유지하면서 전분화능을 나타내므로, 상기 iPSCs 모델은 BD의 신경 발달을 위한 분석 연구에 이용하는 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은

i) 시험관 내(in vitro)에서 베체트병 환자로부터 분리된 섬유아세포(fibroblasts)를 iPSCs로 유도하는 단계; 및

5 ii) 상기 단계 i)에서 유도된 iPSCs를 수득하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 베체트병 iPSCs 모델의 제조 방법을 제공한다.

상기 단계 i)의 유도는 전분화능 마커(pluripotent marker)의 이소성 발현(ectopic expression)을 사용하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하며, 구체적으로 상기 이소성 발현은 리프로그래밍 인자(reprogramming factor)인
10 OCT4, SOX2, C-MYC 및 KLF4을 포함하는 레트로바이러스(retrovirus)를 이용하는 방법(Son MY et. al, Stem cells 31, 2374-2387; 2013) 또는 상기 리프로그래밍 인자를 발현하는 에피솜 벡터의 형질전환을 통한 방법 등을 포함하는, iPSCs를 제조하기 위해 당업계에 알려진 방법이라면 어떠한 것도 사용할 수 있다.

본 발명의 BD 유래의 iPSCs 모델은 BD 환자의 세포와 동일한 특성을
15 유지하면서 전분화능을 나타내므로, 상기 iPSCs 모델의 제조방법은 BD의 신경 발달을 위한 분석 연구에 이용하는 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 하기 i) 내지 vi) 중 어느 하나 이상을 특징으로 하는 베체트병의 조혈전구세포(hematopoietic progenitor cells, HPCs) 모델을
20 제공한다.

i) CD43 및 CD45를 포함하는 조혈 마커 발현;

ii) SCL, GATA1, GATA2, KDR, CD34, CD43 및 CD45를 포함하는 조혈 마커 유전자 발현;

iii) 정상 세포에 비해, IL-6, IL-8 및 TNF α 를 포함하는 전-염증성
25 사이토카인의 분비 수준 증가; 및

iv) 정상 세포에 비해, CXCL1 유전자의 발현 수준 증가;

v) 정상 세포에 비해, CXCL1 단백질의 분비 수준 증가; 및

vi) 정상 세포에 비해, IL-2 유전자의 발현 수준 증가.

본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 BD-iPSCs으로부터 분화된 세포를 BD에 대한 세포 모델로서 사용할 수 있는지 확인하기 위해, BD-iPSCs를 조혈전구세포(HPCs)로 분화 유도한 결과(도 4a 참조), BD-iPSCs로부터 분화된 HPCs(BD-HPCs)는 CD43 및 CD45 양성 세포로서(도 4b 참조), 조혈 마커 유전자 발현을 발현하고, BFU-E(적혈구계 세포; erythroid cells), CFU-G(과립성 백혈구; granulocytes), CFU-M(대식 세포; macrophages) 및 CFU-GM(과립성 백혈구, 대식세포)와 같은 다가-계통의 조혈 세포로 분화되는 것을 확인하였다(도 5 참조).

또한, 본 발명자들은 BD에서 나타나는 대표적인 표현형을 BD-HPCs에서 나타낼 수 있는지 확인하기 위해, BD 환자에서 분비 수준이 증가하는 것으로 보고된 사이토카인인 IL-6, IL-8, TNF α 및 INF γ 를 포함하는 전-염증성 사이토카인의 분비 수준을 확인한 결과, 정상 대조군에 비해 BD-HPCs에서 IL-6, IL-8 및 TNF α 의 분비 수준이 증가하며(도 5c 참조), 면역 반응의 활성화 상태와 같은 BD의 병리학적인 증상에 대해 BD-iPSCs로부터 유래된 HPCs에서 유의적으로 나타낼 수 있어, BD-iPSCs가 베체트병의 모델로서 사용될 수 있음을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 BD 환자 유래의 iPSCs로부터 분화된 조혈전구세포는 조혈전구세포로서의 분화능을 가지는 동시에, BD 환자에서 나타나는 염증성-사이토카인의 분비 증가 정도를 효과적으로 확인할 수 있으므로, 상기 조혈전구세포는 BD의 발병 연구를 위한 인간 유래 세포 모델로서 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은

i) 시험관 내에서 베체트병 환자로부터 분리된 섬유아세포를 iPSCs로 제작하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 제작한 iPSCs를 조혈전구세포로 유도하는 단계; 및

iii) 상기 단계 ii)에서 유도된 HPCs를 수득하는 단계를 포함하는,

시험관 내에서 베체트병 조혈전구세포 모델의 제조 방법을 제공한다.

상기 단계 i)의 유도는 전분화능 마커(pluripotent marker)의 이소성 발현(ectopic expression)을 사용하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하며, 구체적으로 상기 이소성 발현은 리프로그래밍 인자(reprogramming factor)인 OCT4, SOX2, C-MYC 및 KLF4을 포함하는 레트로바이러스(retrovirus)를 이용하는 방법(Son MY et. al, Stem cells 31, 2374-2387; 2013) 또는 상기 리프로그래밍 인자를 발현하는 에피솜 벡터의 형질전환을 통한 방법 등을 포함하는, iPSCs를 제조하기 위해 당업계에 알려진 방법이라면 어떠한 것도 사용할 수 있다.

본 발명의 BD 환자 유래의 iPSCs로부터 분화된 조혈전구세포는 조혈전구세포로서의 분화능을 가지는 동시에, BD 환자에서 나타나는 염증성-카이토카인의 분비 증가 정도를 효과적으로 확인할 수 있으므로, 상기 조혈전구세포 모델의 제조 방법은 BD의 발병 연구를 위한 인간 유래 세포 모델로서 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은

i) 베체트병 iPSCs 모델로부터 배상체(embryoid body, EB) 또는 조혈전구세포(HPCs)로 분화를 유도하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)에서 유도된 배상체의 분화 마커 또는 조혈전구세포의 특징을 분석하는 단계를 포함하는, iPSCs 또는 조혈전구세포를 베체트병의 모델로 사용하는 방법을 제공한다.

상기 배상체의 분화마커는 외배엽(ectoderm) 마커인 NESTIN 및 TUJ1, 내배엽(endoderm) 마커인 SOX17 및 FOXA2, 및 중배엽(mesoderm) 마커인 알파-평활근 액틴(α -smooth muscle actin, α -SMA) 및 DESMIN 중 어느 하나 이상을 발현하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 조혈전구세포는 하기 i) 내지 vi) 중 어느 하나를 특징으로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

i) CD43 및 CD45를 포함하는 조혈 마커 발현;

ii) SCL, GATA1, GATA2, KDR, CD34, CD43 및 CD45를 포함하는 조혈 마커

유전자 발현;

iii) 정상 세포에 비해, IL-6, IL-8 및 TNF α 를 포함하는 전-염증성 사이토카인의 분비 수준 증가; 및

iv) 정상 세포에 비해, CXCL1 유전자의 발현 수준 증가;

5 v) 정상 세포에 비해, CXCL1 단백질의 분비 수준 증가; 및

vi) 정상 세포에 비해, IL-2 유전자의 발현 수준 증가.

본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 BD 환자의 체세포, iPSCs 및 이로부터 분화된 HPCs에서 발현되는 유전자가 정상 세포의 유전자 발현 양상과 비교하였을 때 차이를 나타내는 유전자를 선별하기 위해, 10 마이크로어레이 분석을 통한 정상 세포 및 BD 환자 유래 세포의 유전자 발현 수준을 비교한 결과(도 6a 참조), BD 환자 유래의 섬유아세포 및 iPSCs에서는 유의적인 발현 차이를 나타내지 않는 반면, BD-HPCs에서 정상 대조군에 비해 1.7 배 이상 발현 수준이 증가하는 유전자로서, 217 개의 사이토카인, 케모카인 15 및 이들의 수용체 패밀리를 암호화하는 유전자를 선별하였다(도 6 참조).

또한, BD 환자 체세포에서 전염증성 사이토카인의 분비 수준이 유의적으로 높으며, BD-HPCs 또한 동일한 특징을 나타내는 것을 확인한 반면, BD-HPCs에서 IL-6, IL-8 및 TNF α 를 포함하는 사이토카인 및 케모카인의 유전자 발현 정도가 변화하지 않았으므로(도 7 참조), BD 환자와 연관된 신규한 20 유전자를 추가적으로 선별하기 위해서, BD와 유사한 증상을 가지는 것으로 보고된 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis, RA) 환자로부터 유래된 iPSCs 및 HPCs를 제작하여 BD-HPCs와 유전자 발현 양상을 비교한 결과, 총 217 개 유전자 중에서 사이토카인 및 케모카인 관련된 유전자만이 BD-HPCs 및 RA-HPCs에서 공통적으로 조절되는 유전자로서 11 개의 유전자를 선별하였다(도 8 참조).

25 또한, BD 환자에 대하여, 약물 반응을 예측할 수 있도록 하는 분자적인 바이오마커를 선별하기 위해서, BD 환자의 치료에 사용되고 있는 약물인 프레드니솔론(prednisolone, PRED) 또는 황산히드록시클로로퀸(hydroxychloroquine sulfate, HCQ)의 처리 유무에 따른

BD-HPCs 내 유전자 발현 변화를 확인한 결과, BD-HPCs에서 정상 대조군에 비해 높은 발현 수준을 나타내나, 약물 처리 후 정상 수준으로 발현 수준이 감소하는, BD 바이오마커 후보군 유전자로서 AGTR2, CA9, CD44, CXCL1, HTN3, IL-2, PTGER4 및 TSLP의 8 개 유전자를 선별하였다(도 9 및 도 10 참조).

- 5 또한, 본 발명자들은 선별한 BD 특이적인 바이오마커가 BD 지표로서 혈청, 조직 및 세포 시료 내에서 측정될 수 있는지 확인하기 위해, CXCL1을 대상으로 배양액에 분비된 단백질 발현 수준 및 유전자 발현 수준을 확인한 결과, BD-HPCs에서 정상 대조군에 비해 유의적인 단백질 분비 수준 및 유전자 발현 수준의 증가를 나타내는 것을 확인하였으며, BD-HPCs에서 나타나는 CXCL1 분비
10 수준의 증가 정도는 BD 환자의 체세포 또는 BD-iPSCs에서 나타나는 바에 비해 현저한 차이를 나타내는 것을 확인하였다(도 11 및 도 12 참조).

- 또한, 본 발명에서 선별한 BD 바이오마커를 BD에 대한 약물 스크리닝에 적용할 수 있는지 여부를 확인하기 위해서, 34 개의 약물을 처리한 BD-HPCs에서 CXCL1의 분비 수준을 확인한 결과, IL-6 및 CXCL1이 약물 처리에 대해
15 BD-HPCs에서 분비 경향은 유사하나, CXCL1이 IL-6에 비해 약물에 대한 민감도가 높은 것을 확인하였다(도 13 참조).

- 따라서, 본 발명의 BD 환자 유래의 iPSCs 및 이로부터 분화된 조혈전구세포는 BD 환자에서 나타나는 유전자 발현 패턴을 유사하게 유지하고
20 있을 뿐 아니라, 약물에 대한 유전자 발현 및 염증성-사이토카인 분비 수준의 변화를 유의적으로 확인할 수 있으므로, 상기 BD 환자 유래의 iPSCs 및 이로부터 분화된 조혈전구세포는 BD의 진단 및 치료제 스크리닝 방법의 세포 모델로서, CXCL1은 바이오마커로서 유용하게 사용될 수 있다.

- 25 또한, 본 발명은 하기 유전자 또는 하기 유전자를 특이적으로 증폭하는 프라이머 쌍을 하나 또는 둘 이상 포함하는, 베체트병(Behcet's disease, BD)의 진단용 키트를 제공한다.

또한, 본 발명은 하기 유전자 또는 하기 유전자를 특이적으로 증폭하는

프라이머 쌍을 하나 또는 둘 이상 포함하는, 베체트병(Behcet's disease, BD)의 진단용 키트의 용도를 제공한다.

서열번호 1의 염기서열로 구성되는 AGTR2(angiotensin II receptor, type 2) 유전자;

5 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 CA9(carbonic anhydrase IX) 유전자;

서열번호 3의 염기서열로 구성되는 CD44 유전자;

서열번호 4의 염기서열로 구성되는 HTN3(histatin 3) 유전자;

서열번호 5의 염기서열로 구성되는 PTGER4(prostaglandin E receptor 4, subtype EP4) 유전자; 및

10 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 TSLP(thymic stromal lymphopoietin) 유전자.

본 발명의 베체트병의 진단용 키트에는 추가로 하기 유전자 또는 하기 유전자를 특이적으로 증폭하는 프라이머 쌍을 하나 또는 둘 이상 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:

15 서열번호 7의 염기서열로 구성되는 CXCL1 유전자; 및

서열번호 8의 염기서열로 구성되는 IL-2 유전자.

본 발명의 베체트병 바이오마커는 베체트병 세포 모델에서 유의적으로 증가하는 발현 수준을 나타낼 뿐 아니라, BD 치료제를 처리하였을 때 발현 수준이 정상 세포 수준으로 감소하며, 이러한 증가 또는 감소하는 발현 수준은
20 기존에 베체트병 바이오마커로 사용되고 있는 IL-6 보다 유의적인 민감성을 나타내므로, 상기 바이오마커 유전자는 베체트병의 진단용 키트에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 베체트병의 진단용 키트에 있어서, 베체트병 바이오마커
25 유전자의 발현 수준을 분석하는 체제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드이며, 상기 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 베체트병의 진단용 키트는, RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, 경쟁적 PCR(competitive PCR) 키트, 실시간 PCR(real-time PCR) 키트, RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA) 키트, 노던 블롯팅(Northern blotting) 키트 또는 DNA 칩 키트 등의 형태로서 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않고, mRNA 또는 DNA에 상보적으로 결합하는 방식을 이용한다면 당업자에게 알려진 모든 공지의 방법을 통해 이루어질 수 있다.

또한, 본 발명은 하기 단백질 또는 하기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는, 베체트병의 진단용 키트를 제공한다.

또한, 본 발명은 하기 단백질 또는 하기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는, 베체트병의 진단용 키트의 용도를 제공한다.

서열번호 9의 아미노산 서열로 구성되는 AGTR2(angiotensin II receptor, type 2) 단백질;

서열번호 10의 아미노산 서열로 구성되는 CA9(carbonic anhydrase IX) 단백질;

서열번호 11의 아미노산 서열로 구성되는 CD44 단백질;

서열번호 12의 아미노산 서열로 구성되는 HTN3(histatin 3) 단백질;

서열번호 13의 아미노산 서열로 구성되는 PTGER4(prostaglandin E receptor 4, subtype EP4) 단백질; 및

서열번호 14의 아미노산 서열로 구성되는 TSLP(thymic stromal lymphopoietin) 단백질.

본 발명의 베체트병의 진단용 키트는 추가로 하기 단백질 또는 하기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 하나 또는 둘 이상 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:

서열번호 15의 아미노산 서열로 구성되는 CXCL1 단백질; 및

서열번호 16의 아미노산 서열로 구성되는 IL-2 단백질.

본 발명의 베체트병 바이오마커는 베체트병 세포 모델에서 유의적으로 증가하는 분비 수준을 나타낼 뿐 아니라, BD 치료제를 처리하였을 때 분비 수준이 정상 세포 수준으로 감소하며, 이러한 증가 또는 감소하는 분비 수준은
 5 기준에 베체트병 바이오마커로 사용되고 있는 IL-6 보다 유의적인 민감성을 나타내므로, 상기 바이오마커 단백질은 베체트병의 진단용 키트에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 베체트병의 진단용 키트는, ELISA(Enzyme-linked immnosorbent
 10 assay) 키트, 샌드위치 ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트 등의 형태로서 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않고, 펩타이드 또는 단백질의 아미노산 서열에 상보적으로 결합하는 방식을 이용한다면 당업자에게 알려진 모든 공지의 방법을 통해 이루어질 수 있다.

15 본 발명의 베체트병의 진단용 키트에 있어서, 상기 항체는 다클론 항체 및 단클론 항체 모두를 포함할 수 있다.

다클론 항체는 당업자에 알려진 종래 방법에 따라 면역원(antigen)으로 상기 단백질 또는 그의 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 이러한 외부 숙주로는 마우스, 랫트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 예로 들 수
 20 있으며, 면역원은 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 근육내, 복강내 또는 피하주사 등의 방법으로 투여되어 외부 숙주를 면역화시킨다. 면역화된 외부 숙주로부터 정기적으로 혈청을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리, 정제하여 본 발명의 베체트병 바이오마커 단백질에 특이적인 다클론
 25 항체를 제조할 수 있다.

단클론 항체는 당업자에 알려진 융합(fusion)에 의한 불멸화된 세포주 생성방법(Kohler G et al., Nature, 256:495-497, 1975)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법을 간략히 설명하면, 먼저 순수한 본 발명의 베체트병

바이오마커 단백질 단백질 또는 그의 단편으로 마우스를 면역시키거나, 이의 펩티드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 마우스에 면역시킨다. 면역이 된 마우스로부터 분리한 항체-생산 B 임파구를 인간 또는 마우스의 골수종세포와 융합하여 불멸화된 하이브리도마 세포를 생성한다. 이어,

5 효소면역분석법(ELISA; Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)으로 하이브리도마 세포의 단클론 항체의 생성 여부를 조사하여 양성 클론을 선발하고 이를 배양한 후 항체를 분리, 정제하거나 쥐의 복강에 주입한 후 복수를 채취하여 본 발명의 베체트병 바이오마커 단백질에 특이적인 단클론 항체를 제조할 수 있다.

10 또한, 본 발명의 베체트병 바이오마커 단백질의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

15 상기 본 발명의 베체트병 바이오마커 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지로 제작된 웰플레이트, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기

20 합성수지에는 폴리에스터, 폴리비닐, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다. 또한, 개체로부터 수득된 시료를 고형 기질에 결합된 본 발명의 베체트병 바이오마커 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체와 접촉시키는 경우, 시료는 항체와 접촉 전에 알맞은 정도로 희석될 수 있다.

25 상기 키트는 추가로 상기 본 발명의 베체트병 바이오마커 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 특이적으로 결합하는 검출체를 포함할 수 있다. 상기 검출체는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등으로 표지한 접합체(conjugate)일 수 있고, 바람직하게는 상기 본

발명의 베체트병 바이오마커 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 2차 항체일 것이다. 예를 들어, 상기 발색효소는 퍼록시다제(oxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 또는 산성 포스파타제(acid phosphatase)[예: 양고추냉이 퍼록시다제(horseradish peroxidase)]일 수 있고; 형광물질인 경우, 콜로이드 골드(Colloid gold), 플루오레신카복실산(FCA), 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), RITC(Rhodamine-B-isothiocyanate), 플루오레신 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 등을 사용하는 것이 가능하나, 이에 제한되지 않는다.

상기 키트는 상기 항원항체 복합체의 항원항체 반응을 측정하는 방법 또는 상기 항원항체 복합체에 검출체를 처리한 후 검출체의 양을 측정함으로써 MCI를 진단할 수 있다. 상기 항원항체 반응으로서 효소면역측정법 (ELISA), 면역침강법, 형광면역법, 효소기질발색법, 항원항체응집법 등을 들 수 있고, 검출체의 양 측정이나 존재 검출은 발색, 형광, 발광, 화학발광(chemiluminescence), 흡광도, 반사 또는 투과를 통해 이루어질 수 있다.

상기 검출체의 양을 탐색하는 방법으로는 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템을 이용하는 것이 바람직하고, 여기에는 검출체에 결합된 발색효소의 발색을 유도하는 기질을 처리하여 발색반응을 측정하는 방법; 검출체로 형광물질이 부착되어 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법 또는 검출체로 방사선 동위원소가 부착되어 방사선을 검출함으로써 수행되는 방사선법; 검출체의 표지 없이 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법 또는 SPR 시스템을

영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

예를 들어 발색을 유도하는 기질은 발색효소에 따라 선택하여 사용하는 것이 바람직하며, TMB (3,3',5,5'-tetramethyl bezidine), ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], OPD (o-phenylenediamine) 등을
5 사용할 수 있다. 이때, 발색제 기질은 완충용액(0.1 M NaAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. TMB와 같은 발색기질은 검출체에 결합된 발색효소에 의해 분해되어 발색 침적체를 생성하고 그 발색 침적체의 침적 정도를 육안으로 확인함으로써 본 발명의 베체트병 바이오마커 단백질
10 단백질의 존재 유무를 검출한다. 또한, 상기 형광법은 형광 스캐너 프로그램을 이용하여 상기 형광물질로 라벨링된 검출체를 스포팅하여 신호를 확인하는 방법으로, 이 방법을 적용하여 결합 정도를 확인할 수 있다. 상기 SPR 시스템은 형광법과는 달리 시료를 형광물질로 표지할 필요가 없이 항체의 결합 정도를 실시간으로 분석하는 것이 가능하나 동시다발적인 시료 분석이
15 불가능하다는 단점이 있다. SPRI의 경우에는 미세정렬 방법을 이용하여 동시다발적인 시료 분석이 가능하지만 탐지 강도가 낮은 단점이 있다.

상기 키트는 상기 항원항체 결합 반응 및 검출체의 결합반응 후, 남은 물질들을 제거하기 위한 세척액을 추가로 포함할 수 있다. 상기 세척액은 인산염 완충용액, NaCl 및 트윈 20(Tween 20)을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02
20 M 인산염 완충용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05% 트윈 20(Tween 20)으로 구성된 완충용액(PBST)이 더욱 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 세척액은 항원항체 결합반응 후 항원항체 결합체에 검출체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지용액은 바람직하게는 황산 용액(H₂SO₄)이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

25 상기 키트는 본 발명의 베체트병 바이오마커 단백질 표준 항원을 포함하는 양성 대조군과 상기 항원이 주입되지 않은 동물의 항혈청을 포함하는 음성 대조군을 추가적으로 포함할 수 있다.

또한, 본 발명의 베체트병 바이오마커 단백질 발현 수준 측정은 단백질

칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 및 샌드위치 ELISA로 구성된 군으로부터 선택할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또한, 본 발명은

- i) 개체로부터 분리된 시료를 본 발명의 키트에 처리하는 단계;
- ii) 상기 단계 i)에서 처리한 키트에서 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 분석하는 단계; 및
- iii) 상기 단계 ii)에서 분석한 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 증가하는 경우 상기 개체를 베체트병에 걸리거나 또는 베체트병에 걸릴 위험이 있는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 베체트병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

본 발명의 베체트병 바이오마커는 베체트병 세포 모델에서 유의적으로 증가하는 분비 수준을 나타내어, 기존에 베체트병 바이오마커로 사용되고 있는 IL-6 보다 유의적인 민감성을 나타내므로, 본 발명의 베체트병 바이오마커 유전자 및 단백질은 베체트병의 진단 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

아울러, 본 발명은

- i) 본 발명의 키트에 피검물질을 처리하는 단계;
- ii) 상기 단계 i)의 처리한 키트에서 유전자 또는 단백질의 발현 수준을

분석하는 단계; 및

iii) 상기 단계 ii)에서 분석한 유전자 또는 단백질의 수준이 무처리 대조군에 비교하여 감소하는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 베체트병의 치료제 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

5

본 발명의 베체트병 바이오마커는 베체트병 치료제를 처리한 베체트병 세포 모델에서 정상 세포 수준으로 발현 수준이 감소하여, 기존에 베체트병 바이오마커로 사용되고 있는 IL-6 보다 유의적인 민감성을 나타내므로, 본 발명의 베체트병 바이오마커 유전자 및 단백질은 베체트병의 치료제 후보

10

물질의 스크리닝 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

15

<실시예1> 베체트병(Behcet's disease, BD) 유래의 유도-만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)의 제조

<1-1> 베체트병 환자 및 건강한 대조군의 선별 및 시료의 획득

본 발명의 실시예를 수행하기 위해서, BD 환자와 건강한 대조군을

20

선별하고, 이들로부터 체세포(somatic cell)을 획득하였다.

구체적으로, BD 여성 환자 2 명(평균 나이: 39 ± 1 세) 및 건강한 대조군인 여성 2 명(평균 나이: 61 ± 10 세)으로부터 생검(biopsy)을 수행하여 진피의 섬유아세포(Dermal fibroblast, DF) 및 활액세포(synovial cell, SNC)를 분리하였다. 혈액 시료는 남성 4 명 및 여성 3 명의 총 7 명으로 구성된 BD

25

환자군(평균 나이: 46.8 ± 9.3 세) 및 건강한 대조군(평균 나이: 55.0 ± 3.8 세)으로부터 각각 획득하였다. 이들의 진단은 베체트병에 대한 국제 연구 그룹의 진단 기준에 기반하였다(O'Neill, T.W. et al., 1994. Br J Rheumatol. 33:115-117.). 또한, 모든 연구는 국가생명윤리심의위원회(Korea National

IInstitute for Bioethics Policy; KoNIBP)에서 승인한 바를 따랐다(IRB no. P01-201404-BS-05).

그 결과, 하기 [표 1]에 기재된 바와 같이 BD 환자 및 건강한 대조군을 선별하였고, 이로부터 활액세포(SNC) 또는 진피 섬유아세포(DF)를 체세포로서
5 수득하였다.

【표 1】

본 발명의 BD-iPSCs 및 대조군-iPSCs를 제조하기 위한 체세포를 수득한 환자의 정보

실험군명	질병	체세포 종류	성별/연령	HLA B51	리프로그래밍 (방법, 인자)
대조군 1	건강한 대조군	활액세포(SNC)	여성/71	음성	레트로바이러스 , OSKM
BD 1	베체트병(BD)	활액세포(SNC)	여성/40	음성	레트로바이러스 , OSKM
대조군 2	건강한 대조군	진피 섬유아세포(DF)	여성/51	음성	레트로바이러스 , OSKM
BD 2	베체트병(BD)	진피 섬유아세포(DF)	여성/38	양성	레트로바이러스 , OSKM
RA 1	류마티스 관절염 (Rheumatoid arthritis, RA)	활액세포(SNC)	여성/19	음성	레트로바이러스 , OSKM
RA 2	류마티스 관절염 (Rheumatoid arthritis, RA)	진피 섬유아세포(DF)	여성/61	음성	레트로바이러스 , OSKM

<1-2> BD 유래의 iPSCs(BD-iPSCs)의 제조

본 발명의 실시예를 수행하기 위하여, OCT4, SOX2, C-MYC 및 KLF4를

발현하는 레트로바이러스(retrovirus)를 이용한 리프로그래밍 배양(Son, M.Y. et al., 2013)을 통해 BD 환자 체세포로부터 전분화능을 가진 iPSCs(BD-iPSCs)를 제작하였다(도 2).

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 BD 환자 유래의 DF 및 SNC에
 5 OCT4, SOX2, C-MYC 및 KLF4를 인코딩(encoding)하는 레트로바이러스를
 형질감염한 후, 미토마이신 C(mitomycin C; Sigma 사, 미국)을 처리한 MEF
 지지체(feeder) 위에 두었다(Son, M.Y. et al., 2013; Son, M.Y. et al., 2014).
 형질감염된 세포는 20% 낙아웃 SR(knockout SR; Invitrogen 사, 미국), 1%
 비-필수 아미노산(Non-Essential Amino acids, NEAA; Invitrogen 사, 미국), 1 mM
 10 L-글루타민(L-glutamine; Invitrogen 사, 미국), 0.1 mM
 베타-머캅토에탄올(β -mercaptoethanol; Sigma 사, 미국) 및 10 ng/ml
 FGF2(bFGF; Invitrogen 사, 미국)를 포함하는 DMEM/F12 배지(Invitrogen 사,
 미국)로 구성된 인간 iPSCs 배지를 매일 갈아주면서 배양하였다. 배양 개시 2
 또는 3 주 후에, 인간 배아 줄기 세포(human embryonic stem cell, hESCs)와
 15 유사한 iPSCs 집락(colony)를 수득하였다. 수득한 BD 유래 iPSCs(BD-iPSCs)는
 이전에 공지된 바를 따라 인간 iPSCs 배지의 MEF 지지체 층에서 유지하거나,
 mTeSR1(STEMCELL Technologies 사, 캐나다) 또는 MEF-조건된 배지의 매트릭셀(BD
 biosciences 사, 미국) 위에서 유지하였다(Son, M.Y. et al., 2011a).
 대조군으로는, 건강한 대조군의 SNC 또는 DF 세포를 상기와 동일한 방법을
 20 수행하여 대조군 iPSCs의 제작을 유도하였으며, 인간 배아 줄기 세포주(hESC
 line)인 H9 세포주(WiCell Research Insititute, 미국)을 사용하였다.

<실시예 2> BD 유래 iPSCs의 특징 확인

<2-1> BD-iPSCs의 형태학적(morphology) 특징 확인

25 BD-iPSCs의 형태학적 특징을 확인하기 위하여, BD-iPSCs의 집락 형태 및
 핵형을 확인하였고, 단연쇄반복(Short Tandem Repeat, STR) 분석을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>과 동일한 방법으로 BD-iPSCs의
 리프로그래밍을 유도한 다음, 위상차 현미경(phase-contrast microscopy)으로

BD-iPSCs 집락의 형태를 확인하였다. 또한, 젠덱스 사(GenDix Inc., 한국)에 의뢰하여 표준 염색체 G-결합 분석(Standard chromosomal G-banding analysis)을 통해 핵형 분석을 수행하였다. 아울러, 휴먼패스 사(HumanPass Inc., 한국)에 의뢰하여 대조군-iPSCs 및 BD-iPSCs의 STR 유전형질 분석(STR genotyping)을 수행하고, 이를 정상 인간 배아줄기세포주인 H9 hESCs와 비교하였다.

그 결과, 도 3a, 도 3b 및 하기 [표 2]에서 나타난 바와 같이, BD-섬유아세포로부터 유래된 BD-iPSCs의 유전적인 동일성(identity)를 확인하였고(표 2), 제작된 BD-iPSCs는 인간 배아줄기세포(hESCs)와 유사한 집락 형태 및 핵형을 나타내는 것을 확인하였다(도 3a 및 도 3b).

【표 2】

BD 환자 유래의 iPSCs에 대한 STR 프로파일

위치/클론	H9 hESC		BD 1		BD iPSCs 1		BD 2		BD iPSCs 2	
D8S1179	8	14	11	15	11	15	12	13	12	13
D21S11	30	30	29	29	29	29	30	32.2	30	32.2
D7S820	9	11	11	11	11	11	8	11	8	11
CSF1PO	11	11	13	13	13	13	12	12	12	12
D3S1358	13	16	16	17	16	17	16	18	16	18
TH01	9.3	9.3	7	9	7	9	7	9	7	9
D13S317	9	9	12	12	12	12	10	10	10	10
D16S539	12	13	9	9	9	9	9	12	9	12
D2S1338	18	24	18	26	18	26	19	25	19	25
D19S433	12	15	14.2	14.2	14.2	14.2	13	15.2	13	15.2
vWA	17	17	16	17	16	17	15	16	15	16
TPOX	10	10	8	9	8	9	8	11	8	11
D18S51	12.3	13	13	15	13	15	17	23	17	23
D5S818	11	12	9	11	9	11	11	12	11	12
FGA	26	28	22	24	22	24	19	22	19	22
성염색체	XX		XX		XX		XX		XX	

15

<2-2> BD-iPSCs의 AP(Alkaline phosphatase) 염색

BD 환자로부터 유래한 BD-iPSCs의 전분화능 특성을 확인하기 위하여,

전분화능 마커인 알칼라인 포스파타아제 염색(Alkaline phosphatase staining, AP staining)을 실시하였다.

구체적으로, AP 염색 키트(Alkaline phosphatase kit, Sigma Aldrich사, 미국)를 사용하여 구연산(citrate)-아세트-포름알데하이드(Formaldehyde) 용액을, 상기 실시예 <1-2>에서 제작한 BD-iPSCs에 가하여 고정(fix)한 다음, 나프톨/패스트 레드 바이올렛(Naphthol/ Fast Red violet)을 포함하는 AP 염색 용액을 가하여, 15 분 동안 상온에 방치하여 염색하였다. 염색 후, 세포 이미지는 위상차 현미경(Phase contrast microscope)(모델명: IX51; 올림푸스 사, 일본)을 이용하여 촬영하였다.

10 그 결과, 도 3a에서 나타난 바와 같이 BD-iPSCs는 전분화능 마커인 AP에 양성 염색됨을 확인하였다(도 3a).

<2-3> BD 유래 iPSCs의 다분화능(pluripotency) 마커 단백질 발현 확인

15 BD 환자로부터 유래된 미분화 상태의 BD-iPSCs가 전분화능을 나타내는지 추가적으로 확인하기 위하여, BD-iPSCs에서 전분화능 마커(pluripotency maker) 단백질의 발현을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에서 제작한 BD-iPSCs에 4% 포름알데히드(formaldehyde)를 처리하여 실온에서 20 분간 고정하고, 0.1% 트리톤 X-100(triton X-100)을 포함하는 PBS 용액을 20 분간 처리하여 세포막에 투과성(Permeability)을 부여하였다. 처리 후, 상기 처리한 세포를 2% 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)로 1 시간 동안 차단(blocking)한 다음, 1차 항체로 항-OCT4 항체(1:200 희석, sc-9081, Santa Cruz Biotechnology 사, 미국), 항-NANOG 항체(1:100 희석, sc-33759, Santa Cruz Biotechnology 사, 미국), 항-TRA-1-60 항체(1:100 희석, MAB4360, Chemicon 사, 미국) 또는 항-SSEA4 항체(1:100 희석, MAB1435, R&D Systems 사, 미국)를 각각 처리하여 4℃에서 밤새 배양한 후, PBEST로 여러 번 세척하였다. 세척 후, 알렉사 플루오르 488(Alexa Fluor 488) 또는 알렉사 플루오르 594(Alexa Fluor 594)가 결합된 2차 항체(1:400 희석, Invitrogen 사, 미국)를 처리하고 1 시간 동안 실온에서

방치한 다음, 최종적으로 다시 PBST로 세척하여 BD-iPSCs를 면역형광염색하고, 형광 현미경(fluorescence microscope; 제품명: Axiovert 200M microscope; Carl Zeiss 사, 독일) 또는 위상차 현미경(올림푸스 사, 일본)으로 관찰하여 OCT4, NANOG, TRA-1-60 및 SSEA4 단백질의 발현을 확인하였다. 발현의 정도를

5 대조하기 위해 4'6-디아미디노-2-페닐인돌(4'6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)을 처리하여 세포의 핵을 염색하여 비교하였다.

그 결과, 도 3a에서 나타난 바와 같이 BD-iPSCs에서 전분화능 마커인 OCT4, NANOG, TRA-1-60 및 SSEA4 단백질이 정상 세포 수준으로 발현하는 것을 확인하였다(도 3a).

10

<2-4> BD 유래 iPSCs의 다분화능(pluripotency) 마커 유전자 발현 확인

BD 환자로부터 유래된 미분화 상태의 BD-iPSCs가 전분화능을 나타내는지 추가적으로 확인하기 위하여, 정량적 실시간 PCR(Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)을 수행하여 BD-iPSCs에서 전분화능 마커 유전자의 mRNA 전사 수준을

15 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>의 방법을 수행하여 BD-iPSCs를 제작한 다음, RNeasy 미니 키트(Qiagen 사, 미국)를 사용하여 제조사의 제공된 프로토콜을 따라, BD-iPSCs로부터 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 1 내지 2 μ g을 주형으로 하고, Superscript III cDNA 합성 키트(Invitrogen 사, 미국)를

20 이용하여 세포 유전체의 cDNA를 합성하기 위한 역전사 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)을 수행하였다. RT-PCR 종료 후, 상기 RT-PCR의 반응 산물 및 하기 [표 3]에 기재된 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여, ABI PRISM 7500 Fast Real-time PCR system(Applied Biosystems 사, 미국)을 이용하여 qRT-PCR 반응을 수행하였다. 발현 수준을 보정하기 위한 대조군으로

25 GAPDH 유전자를 상기와 동일한 방법을 수행하여 발현량을 확인하였으며, hESC에서의 발현량을 기준으로 하여 대조군 및 BD 환자의 SNC 또는 DF 시료, 및 이로부터 제작된 각각의 iPSCs에서의 OCT4, SOX2, NANOG 및 REX1 유전자의 mRNA 상대적인 발현 수준(fold relative to hESC)을 계산하였다. 모든 실험은

각각의 시료 당 3 회 반복 수행하였으며, 각각의 타겟 유전자에 대한 CT 값은 제조사에 의해 제공되는 소프트웨어를 사용하여 결정하였다.

【표 3】

5 본 발명에서 정량적 실시간 PCR(Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)을 수행하기 위해 사용한 프라이머 및 이의 서열

타겟 유전자	유전자 명칭	정방향 프라이머		역방향 프라이머	
—	유전자 명칭	염기서열	서열번호	염기서열	서열번호
다분화능 마커 유전자	04-Oct	gagaaggatgtggtcccagtgtg	서열번호: 1	CAGAGGAAAGGACACTGGTCCC	서열번호: 2
—	SOX2	AGAACCCCAAGATGCACAAC	서열번호: 3	ATGTAGGTCTGCGAGCTGGT	서열번호: 4
	NANOG	CAAAGGCAAACAACCCACTT	서열번호: 5	ATTGTTCAGGTCTGGTTGC	서열번호: 6
	REX1	AATGCGTCATAAGGGGTGAG	서열번호: 7	TCAATGCCAGGTATTCCTCC	서열번호: 8
조혈세포 마커 유전자	SCL	AATCGAGTGAAGAGGAGACC	서열번호: 9	TGGTCATTGAGCAGCTT	서열번호: 10
	GATA1	gggatcacactgagcttgc	서열번호: 11	acccttgattctggtgtgg	서열번호: 12
	GATA2	gcgtctccagcctcatctt	서열번호: 13	ggaagagtccgctgctgtag	서열번호: 14
	KDR	ccagccaagctgtctcagt	서열번호: 15	ctgcatgtcaggttgcaaag	서열번호: 16
	CD34	ATGGCTTCCTCCTCCCTCCT	서열번호: 17	ATCCCTGCTCAACCCCTCTG	서열번호: 18
	CD43	atgtctccaacgacctccac	서열번호: 19	agacttccgtctgcaaaga	서열번호: 20
	CD45	AGCTAAGGCGACAGAGATGC	서열번호: 21	TCCAATGTGCTGTGTCTCTCC	서열번호: 22
BD 특이적 유전자	AGTR2	ttcccttccatgttctgacc	서열번호: 23	aaacacactgcggagcttct	서열번호: 24
	CA9	cactcctgccctctgacttc	서열번호: 25	agagggtgtggagctgctta	서열번호: 26
	CD44	aaggtggagcaaacacacc	서열번호: 27	agctttttcttctgcccaca	서열번호: 28
	CXCL1	agggaattcaccccaagaac	서열번호: 29	tggatttgtcactgttcagca	서열번호: 30
	HTN3	tcttggtctcatgtttcc	서열번호: 31	cctcgatgtgaatgatgcttt	서열번호: 32
	IL-2	tgcaactcctgtcttgatt	서열번호: 33	gccttcttgggcatgtaaaa	서열번호: 34
	PTGER4	gacctgttgggcactttgtt	서열번호: 35	tggacgcatagactgcaaag	서열번호: 36
	TSLP	tgggacaaaagtaccgagt	서열번호: 37	tgggcaccagatagctaagg	서열번호: 38

그 결과, 도 3c에서 나타난 바와 같이 대조군 및 BD 환자 유래의 SNC 및

DF 시료에서는 전분화능 마커 유전자인 OCT4, SOX2, NANOG 및 REX1 유전자의 mRNA 발현 수준이 나타나지 않는 것이 비해, 대조군 및 BD 환자 유래의 iPSCs에서는 OCT4, SOX2, NANOG 및 REX1 유전자의 mRNA 발현 수준이 hESC와 유사한 수준으로 발현하는 것을 확인하였다(도 3c).

5

<2-5> 시험관 내(In vitro)에서 BD 유래 iPSCs의 다분화능 확인

BD 유래의 iPSCs가 시험관 내에서 전분화능(pluripotent)을 나타내는지 확인하기 위해, BD-iPSCs로부터 배상체(embryoid body, EB)를 형성하도록 분화를 유도한 다음, BD-배상체에서 내배엽(endoderm) 마커인 SOX17 및 FOXA2, 10 중배엽(mesoderm) 마커인 알파-평활근 액틴(α -smooth muscle actin, α -SMA) 및 DESMIN, 및 외배엽(ectoderm) 마커인 NESTIN 및 TUJ1의 세 가지 배엽(germ layer) 마커의 발현을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>의 방법을 수행하여 제작한 BD-iPSCs을, 10% 혈청 대체물(serum replacement, SR)을 포함하는 DMED/F12 배지인 배상체 15 분화 배지(embryoid body differentiation medium)에서 7 일간 배양하여 BD-iPSCs 유래의 배상체(BD-EB)로 분화를 유도하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <2-3>과 동일한 방법으로 면역형광염색하여 NESTIN, TUJ1, SOX17, FOXA2, α -SMA 또는 DESMIN 단백질의 발현을 확인하였다. 상기 면역형광염색을 위한 1차 항체로서 항-DESMIN 항체(1:50 희석; AB907, Chemicon 사, 미국), 항- α -SMA 20 항체(1:400 희석; A5228, Sigma-Aldrich 사, 미국), 항-FOXA2 항체(1:500 희석; ab40874, Abcam 사, 미국), 항-SOX17 항체(1:100 희석; MAB1924, R&D Systems 사, 미국), 항-TUJ1 항체(1:500 희석; PRB-435P, Covance 사, 미국) 또는 항-NESTIN 항체(1:100 희석; MAB5326, Chemicon 사, 미국)를 각각 사용하였고, 발현의 25 정도를 대조하기 위해 4'6-디아미디노-2-페닐인돌(4'6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)을 처리하여 세포의 핵을 염색하여 비교하였다.

그 결과, 도 3d에서 나타난 바와 같이 BD 분화세포는 NESTIN, TUJ1, SOX17, FOXA2, α -SMA 또는 DESMIN 단백질의 세 가지 형태 배엽 마커를 모두 발현하여

전분화능을 나타내는 것을 확인하였다(도 3d).

<2-6> 생체 내(In vivo)에서 BD 유래 iPSCs의 다분화능 확인

BD 유래의 iPSCs가 생체 내에서 전분화능(pluripotent)을 나타내는지
5 확인하기 위해, 면역력 저하 누드마우스에서 BD-iPSCs의 기형종 형성(teratoma formation)을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>와 동일한 방법을 수행하여 제작한
BD-iPSCs를 1×10^6 세포로 계수하여 매트릭셀과 혼합한 다음, SPF/VAF 면역결핍
누드마우스(오리엔트 바이오 사, 한국)의 등 옆부분 지역(dorso-lateral
10 area)에 피하로 주입한 후, 마우스를 사육하였다. 주입 후 2 개월이 경과한
후에, 상기 마우스를 희생한 후, 기형종을 수득하여, 4% 포르말데하이드를
가하고 파라핀에 고정하였다. 그런 다음, 파라핀에 포매한(embedded) 조직을
잘라내어, 헤마토실린(hematoxylin) 및 에오신(Eosin)을 처리하여 H&E
염색(Hematoxylin & Eosin staining)을 통해 내배엽(endoderm),
15 외배엽(ectoderm) 및 중배엽(mesoderm)의 기형종(teratoma) 형성을 확인하였다.

그 결과, 도 3e에서 나타난 바와 같이 BD-iPSCs로부터 외배엽인 표피
조직(Epidermis), 중배엽인 지방세포(Adipose tissue) 및 연골(cartilage), 및
내배엽인 내장-유사 상피 세포(Gut-like epithelium)에서 기형종이 형성되는
것을 확인하였다(도 3e).

20 <실시예 3> BD 유래의 조혈 조혈종조조전구체 세포(hematopoietic progenitor cells, HPCs)의 분화 유도

<3-1> BD-iPSCs로부터 HPCs로의 분화 유도

BD 환자로부터 수득한 혈청 내에서 특이적인 사이토카인의 수준이
25 증가하거나 변하는 것은, BD에 대한 질병의 마커 또는 위험 인자가 될 수
있다(Agrawal et al., 2014; Aktas Cetin et al., 2013). 추가로, 다양한 성장
인자, 사이토카인, 및 케모카인의 비정상적으로 조절된 생산은 조혈전구세포에
의해 분비되어, 최종적으로 분화된 세포(hematopoietic cell)는 BD 환자 내의

면역반응과 연관되어 나타난다(Durante et al., 1994; Leek et al., 1994). 따라서, 본 발명자들은 BD-iPSCs으로부터 분화된 HPCs를, BD에 대한 모델로서 사용할 수 있는지 확인하기 위해, 도 4a에 나타난 모식도와 같이, 이전에 공지된 방법을 따라 지지체가 없고(feeder-free), 혈청이 없는(serum-free),
 5 정의된 시스템을 사용하여 BD-iPSCs을 HPCs으로 분화 유도하였다(Salvatiotto et al., 2011)(도 4a).

구체적으로, 인간 플라즈마 피브로넥틴(human plasma fibronectin; Invitrogen 사, 미국)을 6-웰 플레이트에 3 mg/cm²으로 전-코팅하고, Rho-연관된 인산화 효소(Rho-associated kinase)(제품명: H1152, Sigma 사, 미국)의
 10 억제제를 첨가한 mTeSR1 배지를 첨가하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <1-2>와 동일한 방법을 수행하여 제작한 BD-iPSCs에 TrypLE(Invitrogen 사, 미국)을 처리한 후, 상기 mTeSR1 배지에 접종하여 배양하였다. 24 시간 후에, mTeSR1 배지를 제거하고, 하기 [표 4]에 기재된 조성을 포함하는 IMDM(Invitrogen 사, 미국)인 조혈 몰입 배지(hematopoietic commitment medium)에서 BD-iPSCs를 6
 15 일 동안 추가 배양하였다. 그런 다음, 상기 조혈 몰입 배지를 제거하고, 하기 [표 4]에 기재된 조성을 포함하는 IMDM인 조혈 성숙 배지(hematopoietic maturation medium)에서 BD-iPSCs를 7 일 동안 추가 배양하여, BD-iPSCs로부터 분화된 HPCs(BD-HPCs)를 획득하였다. 모든 배양은 질소로 균형을 맞춘, 5% 산소(O₂)의 저산소 환경에서 수행되었다.

20

【표 4】

본 발명에서 BD-HPCs 분화 유도를 위해 사용한 배지의 조성

배지명	조성		
	농도	물질명	제조사
조혈몰입배지	1×	HIT	Stem Cell Technologies사, 미국
	450 mM	모노티오글리세롤(monothioglycerol)	Sigma사, 미국
	0.1 mM	비-필수 아미노산(NEAA)	Invitrogen사, 미국
	2 mM	L-글루타민	Invitrogen사, 미국

	50 ng/ml	재조합 BMP4(recombinant BMP4)	인간 human	R&D Systems사, 미국
	50 ng/ml	재조합 VEGF(recombinant VEGF)	인간 human	Invitrogen사, 미국
조혈성숙배지	5 U/ml	헤파린(heparin)		Sigma사, 미국
	25 ng/ml	인간 재조합 FLT3L		Peptrotech사, 미국
	25 ng/ml	트롬보포에이틴(Thrombopoietin, TPO)		Invitrogen사, 미국
	25 ng/ml	인간 재조합 SCF		Invitrogen사, 미국
	10 ng/ml	IL-3		Invitrogen사, 미국
	10 ng/ml	IL-6		Invitrogen사, 미국

<3-2> 분화된 BD-HPCs의 선별

상기 방법으로 분화된 BD-iPSCs 유래의 HPCs를 선별하기 위해, 유세포 분석(flow cytometry analysis)을 수행하여 CD43 및 CD45 양성 세포를 선별하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <3-1>의 방법을 수행하여, BD-iPSCs로부터 BD-HPCs의 분화를 총 14 일 동안 유도하였다. 그런 다음, 상기 유도된 BD-HPCs를 수득하고, 0.25% 트립신(trypsin)/EDTA을 이용하여 분리하고, 1×10^6 세포 당 100 μ l의 PBS/1% FBS를 가하여 세포를 현탁하였다. 그런 다음, 항-CD43-PE 항체 및 항-CD45-APC 항체(이상 Miltenyi Biotech 사, 독일)를 4°C에서 30 분 동안 처리하여 BD-HPCs를 표지하고, PBS/1% FBS로 2 회 세척한 후, FACSCanto™ II 시스템(BD Biosciences 사, 미국)을 이용하여 제조사의 제공하는 프로토콜에 따라 유세포 분석을 수행하였다. 수행한 결과는 BD FACSDiva 소프트웨어(BD Biosciences 사, 미국)으로 분석하였다.

그 결과, 도 4b에서 나타난 바와 같이 14 일 동안의 분화 유도 후에, BD-iPSCs 및 대조군-iPSCs로부터, 각각 80% 이상의 세포가 CD43 및 CD45에 대해 양성을 나타내는 HPCs로 분화된 것을 확인하였다(도 4b).

<실시예 4> BD-iPSCs 유래 HPCs의 특징 확인

<4-1> BD-iPSCs 유래 HPCs의 조혈 마커 유전자 발현 확인

BD-iPSCs 유래 HPCs(BD-HPCs)의 분화 효과를 확인하기 위하여, qRT-PCR을 수행하여 BD 환자 및 대조군 유래의 SNC 및 DF의 체세포, iPSCs 및 HPCs에서 조혈 마커 유전자인 SCL, GATA1, GATA2, KDR, CD34, CD43 및 CD45 유전자의 mRNA 전사 수준을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2> 및 <3-1>의 방법을 수행하여 BD-iPSCs 및 BD-HPCs의 분화를 유도하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <2-4>와 동일한 방법으로 qRT-PCR 반응을 수행하여, SCL, GATA1, GATA2, KDR, CD34, CD43 및 CD45 유전자의 mRNA 전사 수준을 확인하였다. 발현 수준을 보정하기 위한 대조군으로 GAPDH 유전자를 상기와 동일한 방법을 수행하여 발현량을 확인하였으며, 대조군-iPSCs에서의 상기 유전자의 발현량을 기준으로 대조군 및 BD 환자의 SNC 또는 DF 시료, 이로부터 제작된 각각의 iPSCs, 및 HPCs에서의 조혈 마커 유전자의 mRNA 상대적인 발현 수준(fold relative to iPSCs)를 계산하였다.

그 결과, 도 5a에서 나타난 바와 같이 대조군 및 BD 환자에서 유래된 HPCs 모두 효과적으로 분화되어, 조혈 마커 유전자인 SCL, GATA1, GATA2, KDR, CD34, CD43 및 CD45 유전자의 발현 수준을 유의적으로 나타내는 것을 확인하였다(도 5a).

<4-2> BD-iPSCs 유래 HPCs의 조혈 계통 세포로의 분화 가능성 확인

BD-HPCs가 다가-계통 조혈 세포(multi-lineage hematopoietic cell)로 분화될 수 있는지의 가능성을 확인하기 위해서, BD-HPCs를 조혈 계통 세포로 분화한 후 집락-형성 단위(colony-forming unit, CFU) 분석을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2> 및 <3-1>의 방법을 수행하여 BD-iPSCs 및 BD-HPCs의 분화를 유도하였다. 그런 다음, CD45 마이크로비드(CD45 MicroBeads)를 사용하여 MACS 분리(Magnetic Activated Cell Sorter separation)를 통해 정제한 CD45⁺ HPCs를, 상업적으로 사용 가능한 메틸셀룰로오스-기반의 무혈청 배지(available methylcellulose-based

serum-free medium; 제품명: MethoCult™ Optimum; Cat no. 04034, Stem Cell Technologies 사, 미국)에서 3 주 동안 배양한 다음, 제조사의 제공하는 프로토콜을 따라 CFU 분석을 수행하였다. CFU 숫자는 도립 현미경(inverted microscope)을 사용하여 수동적으로 계수하였다.

- 5 그 결과, 도 4d에서 나타난 바와 같이 대조군-HPCs 및 BD-HPCs 모두가 BFU-E(적혈구계 세포; erythroid cells), CFU-G(과립성 백혈구; granulocytes), CFU-M(대식 세포; macrophages) 및 CFU-GM(과립성 백혈구, 대식세포)와 같은 다가-계통의 조혈 세포로 분화되어, 집락(colony)를 형성하는 것을 확인하였으며(도 5b, 왼쪽), 104 개의 세포 당 각각의 계통-위탁
- 10 세포(lineage-committed cells)에 대한 CFU 숫자는 대조군-HPCs 및 BD-HPCs 간에 유의적인 차이를 나타내지 않음을 확인하였다(도 5b, 오른쪽).

<4-3> BD-iPSCs 유래 HPCs의 조혈 계통 세포로의 분화 가능성 확인

- BD에서 나타나는 대표적인 표현형을 BD-HPCs에서 나타낼 수 있는지
- 15 확인하기 위해, BD 환자에서 분비 수준이 증가하는 것으로 보고된 사이토카인인 IL-6, IL-8, TNF α 및 INF γ 를 포함하는 전-염증성 사이토카인의 분비 수준을 확인하였다.

- 구체적으로, 상기 실시예 <1-2> 및 <3-1>의 방법을 수행하여 BD-iPSCs 및 BD-HPCs의 분화를 유도하여, 세포를 수득하였다. 수득한 세포는 파쇄한 후,
- 20 원심분리하고 세포 상층액(cell supernatant)을 분리한 다음, 인간 IL-6, 인간 IL-8 또는 인간 TNF α 의 검출을 위해 사용하는 상업적 ELISA 키트(모두 R&D systems 사, 미국)를 사용하여, 제조사의 제공하는 프로토콜을 따라 ELISA 분석을 수행하였다. 분석 후에는 Spectra Max M3 마이크로플레이트 리더기(Molecular Devices 사, 미국)를 사용하여 IL-6, IL-8 및 TNF α 의 농도를
- 25 정량하여, 건강한 대조군 유래의 iPSCs로부터 분화 유도한 HPCs와 비교하였다.

그 결과, 도 5c에서 나타난 바와 같이 건강한 대조군 유래의 iPSCs로부터 분화 유도된 HPCs(con iPSCs-HPCs)에서 분비된 전-염증성 사이토카인의 농도에 비해 BD-HPCs에서 유의적으로 높은 발현 수준을 나타내어,

IL-6는 1.7 내지 1.8배 높은 분비 수준을 나타내었고, IL-8는 39.3 내지 41.5 배 높은 분비 수준을 나타내었으며, TNF α 는 2.5 내지 5.6 배 높은 분비 수준을 나타내는 것을 확인하였다(도 5c). 이를 통해, 면역 반응의 활성화 상태와 같은 BD의 병리학적인 증상에 대해 BD-iPSCs로부터 유래된 HPCs에서
 5 유의적으로 나타낼 수 있으므로, BD-iPSCs가 베체트병의 모델로서 사용될 수 있음을 확인하였다.

<실시에 5> BD 환자 유래의 iPSCs 및 이로부터 분화된 조혈 전구체 세포의 유전자 발현 양상을 통한 베체트병 바이오마커 유전자의 선별

10 <5-1> 정상 세포 및 BD 환자 유래 세포의 유전자 발현 양상 비교

BD 환자의 체세포, iPSCs 및 이로부터 분화된 HPCs에서 발현되는 유전자가, 정상 세포의 유전자 발현 양상과 비교하였을 때 차이를 나타내는 유전자를 선별하기 위해, 도 6a에 나타난 모식도를 따라 마이크로어레이 분석을 통한 정상 세포 및 BD 환자 유래 세포의 유전자 발현 수준을 확인하여
 15 이를 비교하였다(도 6a).

구체적으로, 상기 실시예 <1-2> 및 <3-1>의 방법을 수행하여 BD-iPSCs 및 BD-HPCs의 분화를 유도하여, BD 환자 유래의 섬유아세포(체세포), 이로부터 유래된 BD-iPSCs 및 BD-HPCs를 각각 획득하였다. 획득한 BD-체세포, BD-iPSCs 및 BD-HPCs로부터, RNeasy Mini 키트(Qiagen 사, 미국)을 이용하여 각각의 세포
 20 전체 RNA를 추출하고, Cy3로 표지하여, 단일-색상 플랫폼 분석 기반의 Whole Human Genome Microarray 4X44K v2(Agilent Technology 사, 미국)와 혼성화하고, 제조사의 제공하는 프로토콜에 따라 마이크로어레이 분석을 수행하여, 정상 대조군과 BD 환자 유래의 세포 간 유전자 발현 양상을 비교하였다.

그런 다음, 비교한 결과를 분석하기 위해서, GeneSpring GX 7.3(Agilent
 25 Technology 사, 미국)으로 유전자 발현 분석 및 주성분 분석(principal component analysis, PCA)을 수행하여, 정상 대조군과 BD 환자 유래 세포 간에 1.7 배 이상의 발현 비율을 나타내는 유전자를 선별하였다. 선별한 유전자의 기능은 GeneCard 데이터베이스(<http://www.genecards.org/>)를 사용하여

확인하였고, 위계적 군집 분석(hierarchical cluster analysis) 및 히트맵(heat map) 분석은 MeV v4.9를 이용하여 작성하였다. KEGG 경로 분석(KEGG pathway analysis)은 DAVID Bioinformatics Resource

(<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)를 이용하여 수행하였다. 또한, 생물학적

- 5 과정 및 분자적 기능을 분석하기 위해서는, PANTHER (Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships; <http://www.pantherdb.org/>)을 이용하였고, 생물학적 네트워크에 관한 정보는 사이토스케이프(Cytoscape; <http://www.cytoscape.org/>)를 이용하여 정보를 수집하였다.

- 그 결과, 도 6에서 나타난 바와 같이 con iPSCs-HPCs와 비교하였을 때, 10 BD-HPCs에서 1.7 배 이상의 유전자 발현 수준을 나타낸 유전자로서, 총 1,355 개 유전자를 선별하였으며, 히트맵 분석 및 군집 분석 수행을 통해 건강한 대조군 유래의 체세포(섬유아세포), iPSCs 및 HPCs와 BD 환자 유래의 세포 사이에서 전체적인 유전자 발현은 유의적인 변화를 나타내지 않는 것을 확인하였다(도 6b). 또한, KEGG 경로 분석 결과, BD-HPCs에서 상승 발현되는 15 양상을 나타내는 경로들은, 질병과 관련된 연관성이 강한 사이토카인 및 케모카인을 포함하는, 다양한 생장 인자와 관련되어 있음을 확인하였다(도 6c). 또한, 유전자 온톨로지(gene ontology) 및 GeneCard 데이터베이스 분석을 통해, 상기 선별한 1,355 개 유전자 중에서, 16.01%인 217 개 유전자가 BD-HPCs에서 사이토카인, 케모카인 및 이들의 수용체 패밀리를 암호화하는 유전자임을 20 확인하였다. BD-HPCs에서 나타난 바와 비교하였을 때, BD 환자 유래의 섬유아세포 및 iPSCs에서는 정상 대조군 유래 세포와 비교하여 상기 217 개 유전자에 대해 유의적인 발현 차이를 나타내지 않는 것을 확인하였다(도 6d).

25 <5-2> 정상 세포 및 BD 환자 유래 세포의 전염증성 사이토카인 유전자 발현 정도 비교

BD 환자의 체세포, iPSCs 및 이로부터 분화된 HPCs에서 유의적으로 높은 수준의 분비량을 나타내는 것으로 보고된 전염증성 사이토카인에 있어서 유전자 발현 정도를 확인하기 위해, IL-6, IL-8 및 TNF α 를 포함하는

사이토카인 및 케모카인의 유전자 발현 정도를 분석하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2> 및 <3-1>의 방법을 수행하여 BD-iPSCs 및 BD-HPCs의 분화를 유도하여, BD 환자 유래의 섬유아세포(체세포), 이로부터 유래된 BD-iPSCs 및 BD-HPCs를 각각 수득하였다. 그런 다음, 상기 실시예
5 <5-1>의 방법을 수행하여 마이크로어레이 및 히트맵 분석을 통해 IL-6, IL-8, TNF, IFNG, IL-10, IL-12A, IL-12B, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17B, IL-18, IL-1A, IL-1B, IL4 및 CCR5의 유전자 발현 양상을 확인하였다.

그 결과, 도 5c 및 도 7에서 나타난 바와 같이 정상 대조군에 비해서 BD-HPCs의 배양액 내에 분비된 IL-6, IL-8 및 TNF α 의 수준이 유의적으로
10 증가하는 것에 비해(도 5c), BD-HPCs 내에서 IL-6, IL-8 및 TNF α 의 유전자 발현 수준에서는 유의적인 차이를 나타내지 않는 것을 확인하였다(도 7).

<5-3> BD 환자 및 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis, RA) 유래 세포의 유전자 발현 양상 비교

15 BD 환자와 연관된 신규한 유전자를 추가적으로 선별하기 위해서, BD와 유사한 증상을 가지는 것으로 보고된 류마티스 관절염(RA) 환자로부터 유래된 iPSCs 및 HPCs를 제작하여 BD-HPCs와 유전자 발현 양상을 비교하였다(Evereklioglu, C. et. al., 2002.; Mege, J.L. et. al., 1993.).

구체적으로, 상기 실시예 <1-2> 및 <3-1>의 방법을 수행하여 BD-iPSCs 및
20 BD-HPCs의 분화를 유도하여, BD 환자 유래의 섬유아세포(체세포), 이로부터 유래된 BD-iPSCs 및 BD-HPCs를 각각 수득하였다. 또한, 류마티스 관절염 환자 유래의 체세포를 수득하여, BD 세포와 동일한 방법으로 류마티스 관절염 환자의 체세포, 이로부터 유래된 RA-iPSCs 및 RA-HPCs를 각각 수득하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <5-1>의 방법을 수행하여 선별한 217개의 유전자에 대한 세포 내
25 유전자 발현 양상을 확인하고, 주성분분석(Principal component analysis, PCA)을 수행하여, 사이토카인 및 케모카인의 발현 양상을 나누어 비교하였다.

그 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이 BD-특이적으로 발현되는 유전자의 발현 패턴을 나타냄을 확인하였으며(도 8), 총 217 개 유전자 중에서

사이토카인 및 케모카인 관련된 유전자만이 BD-HPCs 및 RA-HPCs에서 공통적으로 조절되는 유전자로서 11 개의 유전자를 선별하였다.

<5-4> BD-HPCs에서 약물 처리를 통한 바이오마커 후보 유전자의 선별

- 5 BD 환자에 대하여, 약물 반응을 예측할 수 있도록 하는 분자적인 바이오마커를 선별하기 위해서, BD 환자의 치료에 사용되고 있는 약물인 프레드니솔론(prednisolone, PRED) 또는 황산히드록시클로로퀸(hydroxychloroquine sulfate, HCQ)의 처리 유무에 따른 BD-HPCs 내 유전자 발현 변화를 확인하였다.
- 10 구체적으로, 상기 실시예 <1-2> 및 <3-1>의 방법을 수행하여 BD-iPSCs 및 BD-HPCs의 분화를 유도하였다. 유도 후, 수득한 세포는 4×10^4 세포/웰의 밀도로 96 웰 플레이트에 접종한 다음, 0.063 내지 32 μ M의 다양한 농도로 PRED 또는 HCQ(Sigma 사, 미국)를 처리하여 4 일 동안 배양하였다. 그런 다음, 20 μ l의 CCK-8 염색 용액을 첨가하고 2 시간 동안 37°C에서 배양함으로써, Cell
- 15 Counting Kit-8(CCK-8; Dojindo Laboratories 사, 일본)을 이용하여 제조사에서 제공하는 프로토콜을 따라 약물 처리에 의해 유도된 세포독성(cytotoxicity)을 확인하였다. 각각의 웰의 흡광도는 Spectra Max M3 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices 사)를 이용하여 450 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 또한, PRED 또는 HCQ를 처리하여 배양한 BD-HPCs를 수득하여, 상기 실시예
- 20 <5-1>의 방법으로 마이크로어레이 분석을 수행하여 유전자 발현 양상을 확인하였다. 확인한 유전자 발현은, Panther classification system(<http://www.pantherdn.org>)를 이용하여 발현량을 비교하여, 무처리 대조군과 비교하여 2 배 이상 발현 차이를 나타내는 유전자를 선별하였다. 무처리 대조군으로는, PRED 또는 HCQ를 처리하지 않은 BD-HPCs를 동일 조건에서
- 25 배양한 후 사용하였다.

그 결과, 도 9에서 나타난 바와 같이 무처리 대조군에 비해, PRED 또는 HCQ를 처리하였을 때 전체적인 유전자 발현 양상이 유의적으로 변화하는 것을 확인하였다(도 9a). 이러한 발현 양상의 변화는 PRED 또는 HCQ에 의해 유도된

세포독성 효과에 기인한 것은 아니며(도 9b 및 도 9c), 생물학적 과정 및 분자적인 기능을 가지는 유전자의 발현 수준이 증가하는 것에 기인하였음을 확인하였다(도 9d 및 도 9e). 또한, PRED 및 HCQ는 BD-HPCs에 유사한 영향을 미쳐, 세포 내에서 상향조절되는 항-염증성 사이토카인 및 케모카인 유전자의 양상이 유사하게 나타나는 것을 확인하였다(도 9f).

<5-5> BD-HPCs의 진단 및 약물 반응 예측을 위한 BD 바이오마커의 선별

BD 환자에서는 발현 수준이 감소하나, 약물을 처리하였을 때 특이적으로 증가하는 유전자를 바이오마커로서 선별하기 위하여, BD-HPCs와 RA-HPCs에 각각 PRED 또는 HCQ를 처리하고, 유전자 발현 수준의 차이를 분석함으로써, BD 바이오마커 유전자를 선별하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2> 및 <3-1>의 방법을 수행하여 BD-HPCs 및 RA-HPCs의 분화를 유도하였다. 유도 후, 상기 실시예 <5-3>과 같이 PRED 또는 HCQ를 처리하고, 마이크로어레이 분석을 수행하여 상기 실시예 <5-1>에서 선별한 217개의 유전자의 발현 양상을 확인하였다. 그런 다음, PRED 또는 HCQ를 처리하지 않은 BD-HPCs에서는 발현 수준이 높으나, PRED 또는 HCQ를 처리한 BD-HPCs에서 발현 수준이 2 배 이상 감소하고, RA-HPCs에서는 발현 수준이 증가하지 않는 유전자를 BD 바이오마커 후보군으로서 선별하였다. 선별한 BD 바이오마커 후보군 유전자는, 상기 실시예 <2-4>와 동일한 방법으로 qRT-PCR 반응을 수행하여 발현 수준을 정상 대조군과 정량적으로 비교하였다.

그 결과, 도 10에서 나타난 바와 같이 총 217 개 유전자 중에서, BD 바이오마커 후보군 유전자로서 AGTR2, CA9, CD44, CXCL1, HTN3, IL-2, PTGER4 및 TSLP의 8 개 유전자를 선별하였으며(도 10a), 유전자 발현의 정량 분석을 통해 상기 8 개 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 또는 약물을 처리한 BD-HPCs에 비해 약물을 처리하지 않은 BD-HPCs에서 특이적으로 발현 증가하는 것을 확인함으로써, 이들을 BD의 진단 및 약물 반응의 예측을 위한 BD 바이오마커로 사용할 수 있음을 확인하였다(도 10b).

<실시에 6> BD-HPCs에서 BD 바이오마커를 이용한 진단 방법으로서 적용 여부 확인

<6-1> 유전자 발현 수준 및 단백질 발현 수준의 확인을 통한 시료 세포 내 바이오마커 발현 수준 확인

5 상기 실시예 <5-4>에서 선별한 BD 특이적인 바이오마커가 BD 지표로서 혈청, 조직 및 세포 시료 내에서 측정될 수 있는지 확인하기 위해, 선별한 바이오마커 중 가장 큰 차이를 나타내었던 CXCL1을 대상으로 배양액에 분비된 단백질 발현 수준을 확인하였다.

10 구체적으로, 상기 실시예 <1-2> 및 <3-1>의 방법을 수행하여 BD-iPSCs 및 BD-HPCs의 분화를 유도하여, 세포를 수득하였다. 수득한 세포는 상기 실시예 <4-3>의 방법으로 세포 상층액을 분리하고 ELISA 분석을 수행하여, 분비된 CXCL1 단백질의 농도를 정량하였다. BD 시료로서 상기 [표 1]에 기재된 2 명의 BD 환자에서 1 명을 추가하여, 3 명의 BD 환자로부터 수득한 독립적인 BD-HPCs를 사용하였으며, 정상 대조군으로는 대조군-iPSCs로부터 분화 유도한 HPCs를
15 사용하였다.

20 또한, 다양한 세포 종류를 시료로 사용하기 위해서는, BD-iPSCs를 내배엽인 간세포(hepatocyte), 중배엽인 심장근육세포(cardiomyocyte) 및 외배엽인 신경 전구체(neural progenitor)로 분화 유도한 후, CXCL1 단백질 분비 수준을 확인하고, 상기 실시예 <2-4>와 동일한 방법으로 qRT-PCR 반응을
수행하여 CXCL1 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

25 그 결과, 도 11에서 나타난 바와 같이, BD-HPCs 배양의 경우에는 CXCL1 분비 수준이 현저히 증가하여, 대조군-HPCs에 비해 5.60 배 증가한 것을 확인한 반면(도 11 a 및 도 11b), BD-섬유아세포주 및 BD-iPSCs를 배양한 경우에는 CXCL1의 분비 수준이 낮아, 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않는 것을
확인하였다(도 11c).

30 또한, HPCs 외에 다른 세포로 분화 유도하였을 경우, BD-iPSCs로부터 분화된 간세포(내배엽), 심장근육세포(중배엽) 및 신경 전구체(외배엽)과 같은 다른 세포 종류에서는 CXCL1 유전자의 발현 상승이 나타나지 않았고(도 11d),

심장근육세포 및 신경 전구체 세포에서는 CXCL1 단백질의 분비 또한 유의적인 발현 증가를 나타내지 않는 반면, BD-iPSCs 유래의 간세포에서는 대조군 유래의 간세포에 비해 CXCL1 단백질의 분비 수준이 2.97 배 증가하는 것을 확인하였다(도 11e). 이를 통해, 본 발명의 BD-HPCs는 바이오마커의 인식 및

5 BD의 분자적인 면역발병기전(immunopathogenesis)을 조사하기 위한 질병 모델로서 사용할 수 있음을 확인하였다.

<6-2> 환자 혈청 시료 내에서 BD 바이오마커의 진단 지표로서의 효과 확인

10 본 발명에서 선별한 BD 특이적인 바이오마커를 진단 지표로서 사용할 수 있는지 확인하기 위하여, CXCL1 단백질과 BD 지표로서 사용되고 있는 IL-6의 단백질의 BD 환자 혈청 내 농도를 확인하였다(Evereklioglu, C. et al., 2002; Hamzaoui, K. 2011.)

구체적으로, BD 환자 및 대조군의 혈청 시료를 분리하여, 상기 실시예 15 <4-3>의 방법으로 ELISA 분석을 수행해 혈청 내 IL-6 및 CXCL1 단백질의 농도를 정량하였다.

그 결과, 도 12에서 나타난 바와 같이 건강한 대조군의 혈청 시료와 비교하였을 때 BD 환자의 혈청 시료에서 CXCL1의 분비 수준이 높은 것에 반해, IL-6의 분비 수준은 유의적인 차이를 나타내지 않는 것을 확인하여, 혈청 내의

20 CXCL1의 수준은 BD에 대해 정확하고 유용한 바이오마커로서 사용될 수 있음을 확인하였다(도 12).

<실시예 7> BD-HPCs에서 BD 바이오마커를 이용한 약물 스크리닝으로의 적용 여부 확인

25 본 발명에서 선별한 BD 바이오마커를 BD에 대한 약물 스크리닝에 적용할 수 있는지 여부를 확인하기 위해서, 약물을 처리한 BD-HPCs에서 CXCL1의 분비 수준을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2> 및 <3-1>의 방법을 수행하여 BD-iPSCs 및

BD-HPCs의 분화를 유도하여, 세포를 수득하였다. 수득한 세포는 상기 [표 4]에 기재된 조혈 성숙 배지를 포함하는 96-웰 플레이트에 4×10^4 세포/웰의 밀도로 접종한 다음, 1 일 동안 배양하였다. 1 일 후에, FDA에서 승인된 라이브러리(#BML-2843, EMZO Life Science Inc., USA)로부터 항염증활성 및

5 면역억제 효과를 나타내는 것으로 알려져 있는 화합물 34 종을 선별한 하기 [표 5]에 기재된 약물을 각각의 웰에 1 μ M의 농도로 처리하고, 2 일 동안 배양하였다. 그런 다음, 300 g에서 10 분 동안 원심분리하여 세포를 제거하고, 각각의 웰로부터 배양 상층액을 수득하였다. 수득한 배양 상층액은 상기 실시예 <4-3>의 방법을 사용하여 ELISA 분석을 통해 배양 상층액 내 CXCL1 및

10 IL-6의 농도를 정량 분석하였다. 무처리 대조군으로서, 약물을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 BD-HPCs를 사용하였다.

【표 5】

BD-HPCs를 이용한 BD 약물 스크리닝 방법을 위해 사용한 FDA 승인된

15 화합물

순 번	이름	분자량	표시(Indication)
1	사이클로스포린 A(Cyclosporine A)	1202.6	면역억제제, 면역조절, 항류마티스, 피부치료제
2	시로리무스(sirolimus)(라파마이신, Rapamycin)	914.2	면역억제제
3	아자치오프린(Azathioprine)	277.3	면역억제제
4	덱사메타손(dexamethasone)	392.5	항염증, 호르몬제, 항종양제
5	메살라닌(Mesalamine)(5-아미노살리실산, 5-Aminosalicylic Acid)	153.1	항염증
6	베타메타손(betamethasone)	392.5	항염증, 면역억제제
7	탈리도마이드(Thalidomide)	258.2	면역억제제, 나균억제제,

			혈관형성억제제
8	클로베타졸 프로피온산(clobetasol propionate)	467.0	항염증, 코르티코스테로이드 (Corticosteroid)
9	플루오시놀론 아세토나이드(Fluocinolone Acetonide)	452.5	항염증
10	히드로코르티손(hydrocortisone)	362.5	항염증
11	히드로코르티손아세테이트(Hydrocortisone Acetate)	404.5	항염증
12	메틸프레드니솔론(methylprednisolone)	374.5	항염증, 구토방지제, 신경보호작용
13	Amcinonide(암시노나이드)	502.6	항염증
14	발살라지드(Balsalazide)	354.3	항염증, 항궤양, 위장제제
15	부데소니비드(Budesonide)	430.5	항염증, 기관지확장제
16	코티존 아세테이트(Cortisone Acetate)	402.5	항염증, 코르티코스테로이드
17	데소나이드(Desonide)	416.5	항염증, 코르티코스테로이드
18	데속시메타손(Desoximetasone)	376.5	항염증, 글루코코르티코이드 (Glucocorticoid)
19	에베로리무스(Everolimus)	958.2	면역억제제
20	플루니솔리드(flunisolide)	434.5	항염증
21	플루오시노나이드(fluocinonide)	494.5	항염증
22	플루오로메톨론(Fluorometholone)	376.5	항염증
23	플루란데레놀리드(Flurandrenolide)	436.5	항염증
24	할시노나이드(Halcinonide)	455.0	항염증
25	케톨락 트로메타민(Ketorolac Tromethamine)	376.4	항염증(NSAID)
26	로테프레드놀 에타보네이트(Loteprednol Etabonate)	467.0	항염증, 항알러지
27	메르캅토프urin 수화물(Mercaptopurine Hydrate)	170.2	면역억제제
28	모메타손 푸로에이트(Mometasone Furoate)	521.4	항염증, 항알러지

29	올살라진 나트륨(Olsalazine · Na)	302.2	염증성 장질환(Inflammatory Bowel Disease) 및 궤양성 대장염(ulcerative colitis)의 치료에서 항염증제로 사용됨
30	옥사프로진(Oxaprozin)	293.3	항염증
31	페니실라민(Penicillamine)(D-페니실라민, D-Penicillamine)	149.2	면역억제제, 킬레이터(chelator)
32	피메클로리무스(pimecrolimus)	810.5	면역억제제, 면역조절제
33	타크로리무스(Tacrolimus; Fk506)	804.0	동종 기관 이식 후에 주로 사용되는 항면역억제제
34	트리암시놀론 아세토니드(Triamcinolone Acetonide)	434.5	항염증; 스테로이드제

그 결과, 도 13에서 나타난 바와 같이 약물을 처리하였을 때, IL-6의 농도는 무처리 대조군에 비해 7.38 내지 23.58%의 감소 수준을 보여 다소 감소하는 경향을 나타내는 것을 확인하였다(도 13a). 이에 반해, CXCL1의 경우에는 IL-6에 비해 유의적으로 농도가 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 34 개 약물 중 9 개의 경우에 40% 이하의 농도 감소 수준을 나타내는 것을 확인하였으며, 이 중 3 개의 약물은 BD의 치료제로서 사용되고 있음을 확인하였다(도 13b). 이를 통해, IL-6 및 CXCL1이 약물 처리에 대해 BD-HPCs에서 분비 경향은 유사하나, CXCL1이 IL-6에 비해 약물에 대한 민감도가 높은 것을 확인하였다(도 13a 및 13b).

【청구의 범위】**【청구항 1】**

하기 i) 내지 iii) 중 어느 하나 이상을 특징으로 하는
베체트병(Behcet's disease, BD)의 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem
5 cells; iPSCs) 모델:

i) 정상 세포의 iPSCs 형태;

ii) OCT4, NANOG, TRA-1-60 및 SSEA를 포함하는 전분화능
마커(pluripotency marker) 단백질을 발현; 및

10 iii) OCT4, SOX2, NANOG 및 REX를 포함하는 전분화능 마커 유전자 mRNA를
발현.

【청구항 2】

i) 시험관 내(in vitro)에서 베체트병 환자로부터 분리된
섬유아세포(fibroblasts)를 iPSCs로 유도하는 단계; 및

15 ii) 상기 단계 i)에서 유도된 iPSCs를 수득하는 단계를 포함하는, 시험관
내에서 베체트병 iPSCs 모델의 제조 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 단계 i)의 유도는 전분화능 마커(pluripotent
20 marker)의 이소성 발현(ectopic expression)을 사용하는 것을 특징으로 하는
시험관 내에서 베체트병 iPSCs 모델의 제조 방법.

【청구항 4】

하기 i) 내지 vi) 중 어느 하나 이상을 특징으로 하는 베체트병의
25 조혈전구세포(hematopoietic progenitor cells, HPCs) 모델:

i) CD43 및 CD45를 포함하는 조혈 마커 발현;

ii) SCL, GATA1, GATA2, KDR, CD34, CD43 및 CD45를 포함하는 조혈 마커
유전자 발현;

iii) 정상 세포에 비해, IL-6, IL-8 및 TNF α 를 포함하는 전-염증성 사이토카인의 분비 수준 증가; 및

iv) 정상 세포에 비해, CXCL1 유전자의 발현 수준 증가;

v) 정상 세포에 비해, CXCL1 단백질의 분비 수준 증가; 및

5 vi) 정상 세포에 비해, IL-2 유전자의 발현 수준 증가.

【청구항 5】

i) 시험관 내에서 베체트병 환자로부터 분리된 섬유아세포를 iPSCs로 제작하는 단계; 및

10 ii) 상기 단계 i)에서 제작한 iPSCs를 조혈전구세포(hematopoietic progenitor cells, HPCs)로 유도하는 단계; 및

iii) 상기 단계 ii)에서 유도된 HPCs를 수득하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 베체트병 조혈전구세포 모델의 제조 방법.

15 【청구항 6】

i) 베체트병 iPSCs 모델로부터 배상체(embryoid body, EB) 또는 조혈전구세포(HPCs)로 분화를 유도하는 단계; 및

20 ii) 상기 단계 i)에서 유도된 배상체의 분화 마커 또는 조혈전구세포의 특징을 분석하는 단계를 포함하는, iPSCs 또는 조혈전구세포를 베체트병의 모델로 사용하는 방법.

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 배상체의 분화마커는 외배엽(ectoderm) 마커인 NESTIN 및 TUJ1, 내배엽(endoderm) 마커인 SOX17 및 FOXA2, 및 중배엽(mesoderm) 마커인 알파-평활근 액틴(α -smooth muscle actin, α -SMA) 및 DESMIN 중 어느 하나 이상을 발현하는 것을 특징으로 하는, iPSCs 또는 조혈전구세포를 베체트병의 모델로 사용하는 방법.

【청구항 8】

제 6항에 있어서, 상기 조혈전구세포는 하기 i) 내지 vi) 중 어느 하나를 특징으로 하는, iPSCs 또는 조혈전구세포를 베체트병의 모델로 사용하는 방법:

i) CD43 및 CD45를 포함하는 조혈 마커 발현;

5 ii) SCL, GATA1, GATA2, KDR, CD34, CD43 및 CD45를 포함하는 조혈 마커 유전자 발현;

iii) 정상 세포에 비해, IL-6, IL-8 및 TNF α 를 포함하는 전-염증성 사이토카인의 분비 수준 증가; 및

iv) 정상 세포에 비해, CXCL1 유전자의 발현 수준 증가;

10 v) 정상 세포에 비해, CXCL1 단백질의 분비 수준 증가; 및

vi) 정상 세포에 비해, IL-2 유전자의 발현 수준 증가.

【청구항 9】

15 하기 유전자 또는 하기 유전자를 특이적으로 증폭하는 프라이머 쌍을 하나 또는 둘 이상 포함하는, 베체트병(Behcet's disease, BD)의 진단용 키트:

서열번호 1의 염기서열로 구성되는 AGTR2(angiotensin II receptor, type 2) 유전자;

서열번호 2의 염기서열로 구성되는 CA9(carbonic anhydrase IX) 유전자;

서열번호 3의 염기서열로 구성되는 CD44 유전자;

20 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 HTN3(histatin 3) 유전자;

서열번호 5의 염기서열로 구성되는 PTGER4(prostaglandin E receptor 4, subtype EP4) 유전자; 및

서열번호 6의 염기서열로 구성되는 TSLP(thymic stromal lymphopoietin) 유전자.

25

【청구항 10】

제 9항에 있어서, 추가로 하기 유전자 또는 하기 유전자를 특이적으로 증폭하는 프라이머 쌍을 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는,

베체트병의 진단용 키트:

서열번호 7의 염기서열로 구성되는 CXCL1 유전자; 및

서열번호 8의 염기서열로 구성되는 IL-2 유전자.

5 【청구항 11】

하기 단백질 또는 하기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는, 베체트병의 진단용 키트:

서열번호 9의 아미노산 서열로 구성되는 AGTR2(angiotensin II receptor, type 2) 단백질;

10 서열번호 10의 아미노산 서열로 구성되는 CA9(carbonic anhydrase IX) 단백질;

서열번호 11의 아미노산 서열로 구성되는 CD44 단백질;

서열번호 12의 아미노산 서열로 구성되는 HTN3(histatin 3) 단백질;

15 서열번호 13의 아미노산 서열로 구성되는 PTGER4(prostaglandin E receptor 4, subtype EP4) 단백질; 및

서열번호 14의 아미노산 서열로 구성되는 TSLP(thymic stromal lymphopoietin) 단백질.

【청구항 12】

20 제 11항에 있어서, 추가로 하기 단백질 또는 하기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는, 베체트병의 진단용 키트:

서열번호 15의 아미노산 서열로 구성되는 CXCL1 단백질; 및

서열번호 16의 아미노산 서열로 구성되는 IL-2 단백질.

25

【청구항 13】

i) 개체로부터 분리된 시료를 제 9항 또는 제 11항의 키트에 처리하는 단계;

ii) 상기 단계 i)에서 처리한 키트에서 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 분석하는 단계; 및

iii) 상기 단계 ii)에서 분석한 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 증가하는 경우 상기 개체를 베체트병에 걸리거나 또는 베체트병에 걸릴 위험이 있는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 베체트병의 진단, 치료, 치료제 반응성 및 예후를 위한 정보를 제공하는 방법.

【청구항 14】

i) 제 9항 또는 제 11항의 키트에 피검물질을 처리하는 단계;

10 ii) 상기 단계 i)의 처리한 키트에서 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 분석하는 단계; 및

iii) 상기 단계 ii)에서 분석한 유전자 또는 단백질의 수준이 무처리 대조군에 비교하여 감소하는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 베체트병의 치료제 후보 물질의 스크리닝 방법.

15

【청구항 15】

하기 유전자 또는 하기 유전자를 특이적으로 증폭하는 프라이머 쌍을 하나 또는 둘 이상 포함하는, 베체트병(Behcet's disease, BD)의 진단용 키트의 용도:

20 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 *AGTR2*(angiotensin II receptor, type 2) 유전자;

서열번호 2의 염기서열로 구성되는 *CA9*(carbonic anhydrase IX) 유전자;

서열번호 3의 염기서열로 구성되는 *CD44* 유전자;

서열번호 4의 염기서열로 구성되는 *HTN3*(histatin 3) 유전자;

25 서열번호 5의 염기서열로 구성되는 *PTGER4*(prostaglandin E receptor 4, subtype EP4) 유전자; 및

서열번호 6의 염기서열로 구성되는 *TSLP*(thymic stromal lymphopoietin) 유전자.

【청구항 16】

하기 단백질 또는 하기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는, 베체트병의 진단용 키트의 용도:

5 서열번호 9의 아미노산 서열로 구성되는 *AGTR2*(angiotensin II receptor, type 2) 단백질;

서열번호 10의 아미노산 서열로 구성되는 *CA9*(carbonic anhydrase IX) 단백질;

서열번호 11의 아미노산 서열로 구성되는 *CD44* 단백질;

10 서열번호 12의 아미노산 서열로 구성되는 *HTN3*(histatin 3) 단백질;

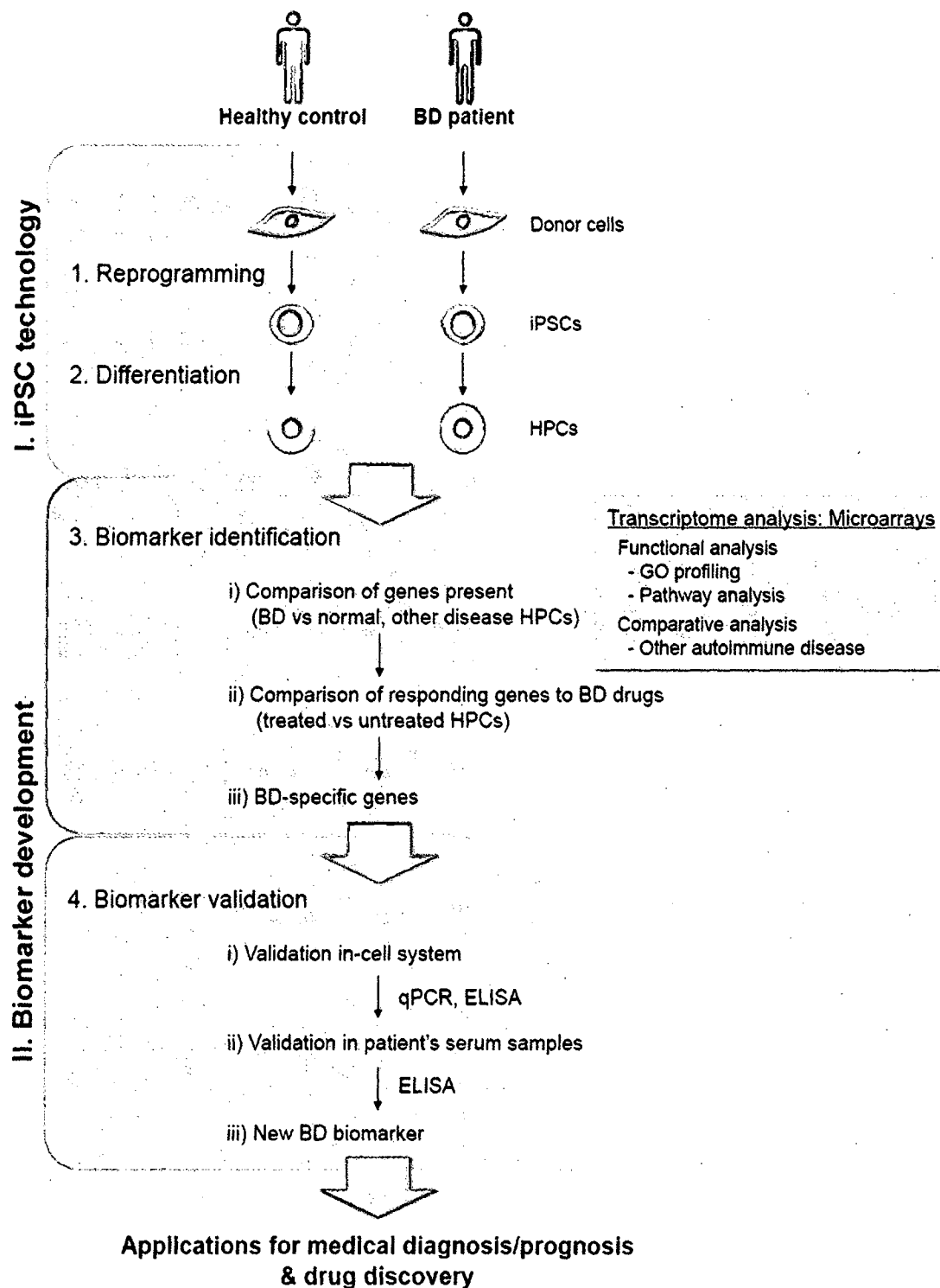
서열번호 13의 아미노산 서열로 구성되는 *PTGER4*(prostaglandin E receptor 4, subtype EP4) 단백질; 및

서열번호 14의 아미노산 서열로 구성되는 *TSLP*(thymic stromal lymphopoietin) 단백질.

15

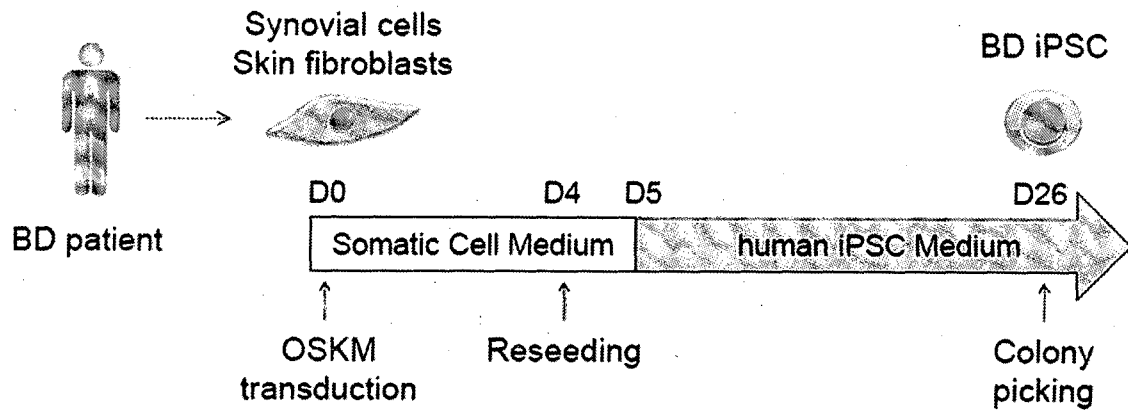
1/21

[도 1]



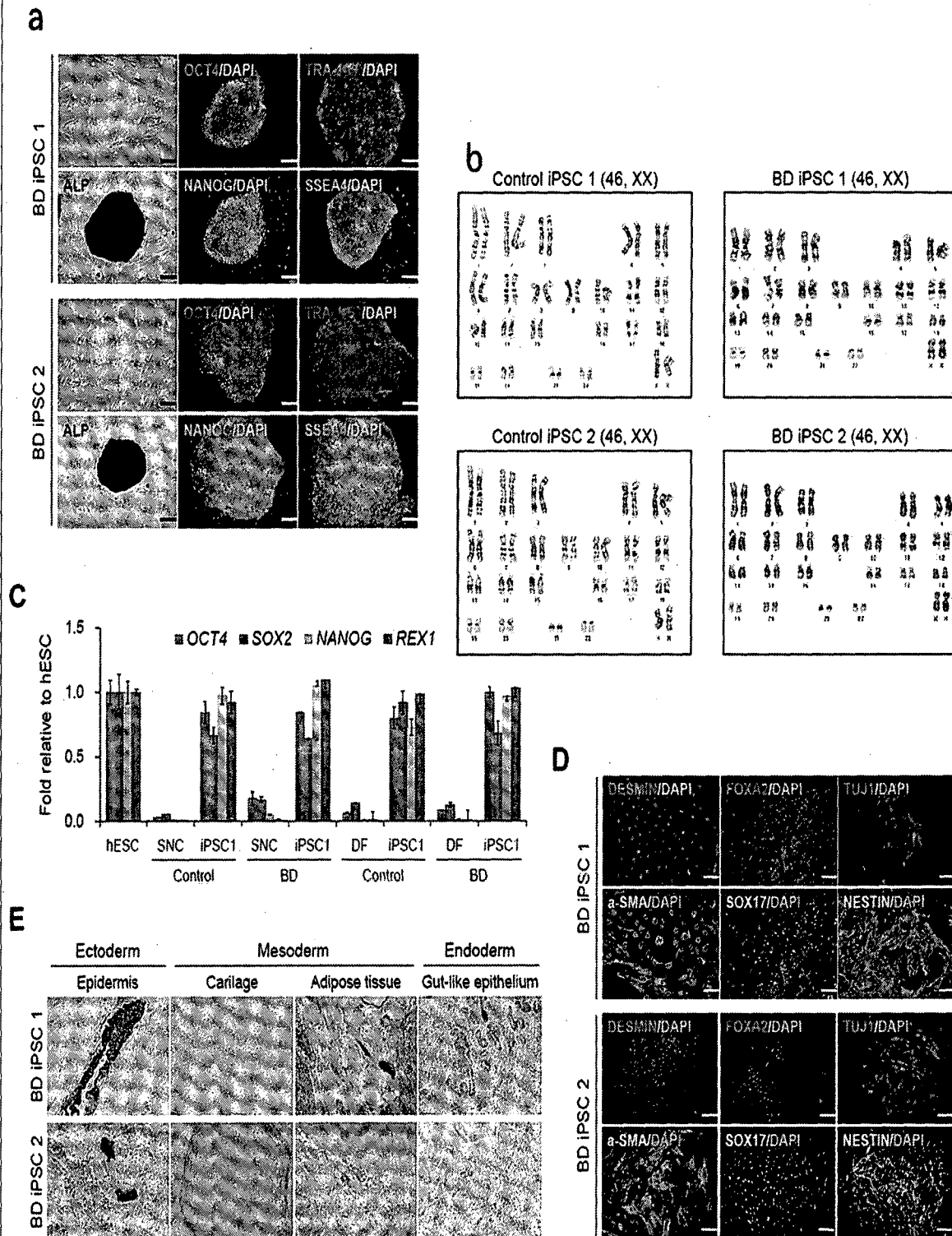
2/21

[도 2]



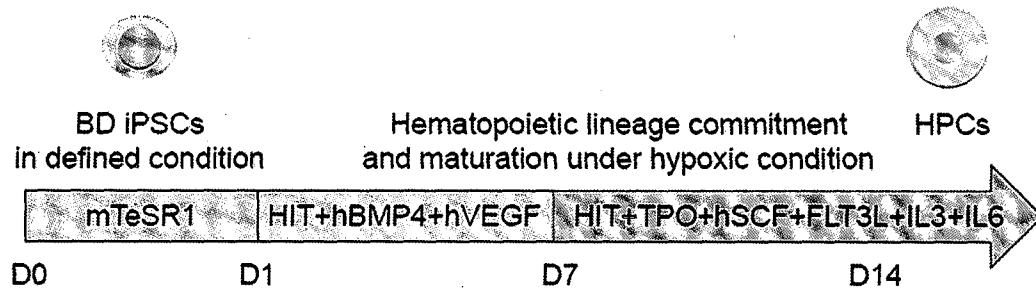
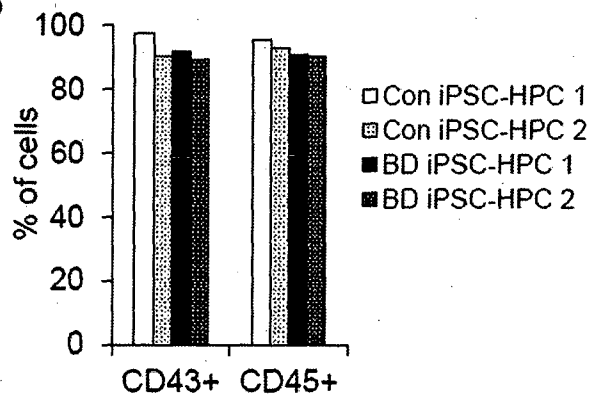
3/21

[도 3]



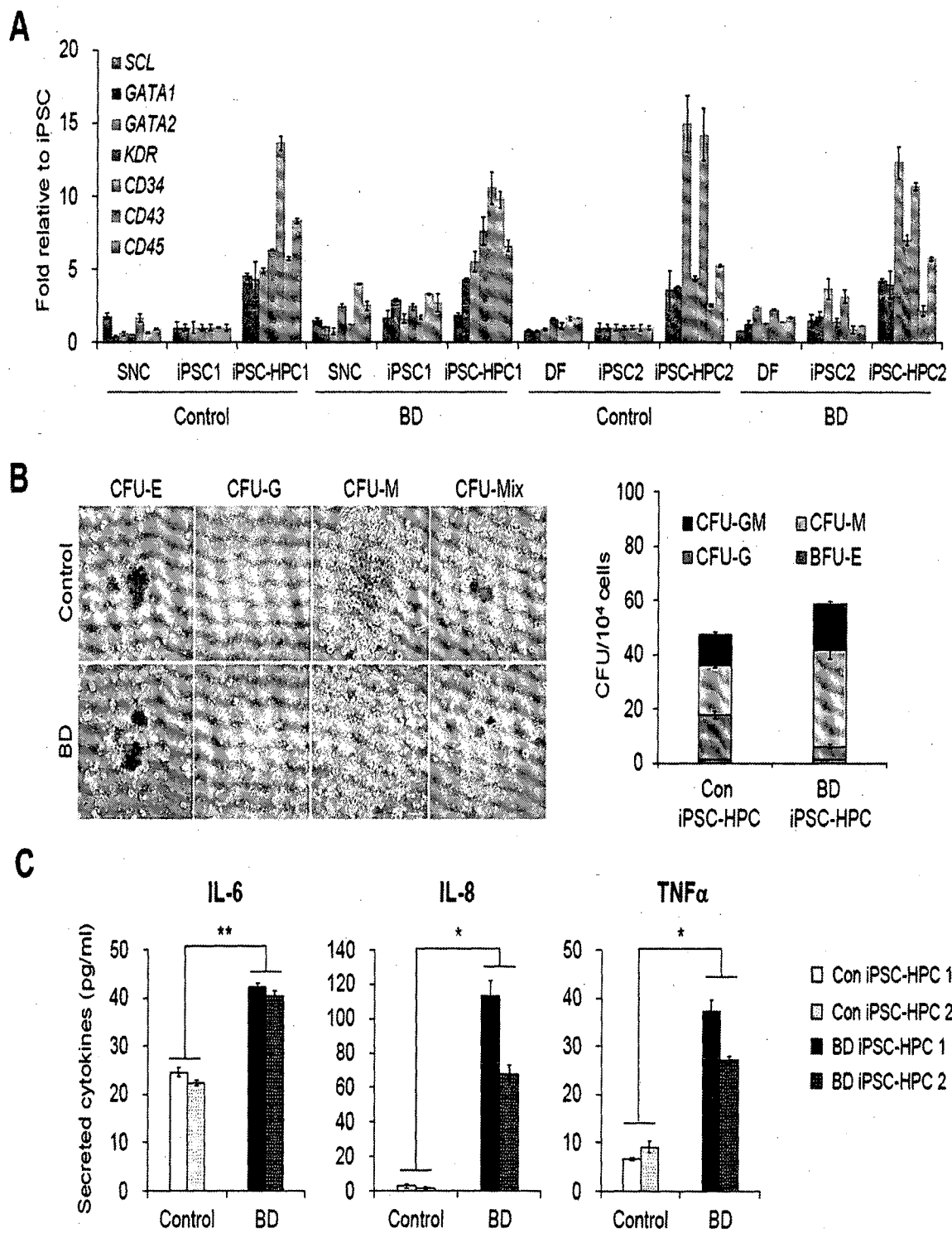
4/21

[도 4]

A**Differentiation into hematopoietic progenitor cells (HPCs)****B**

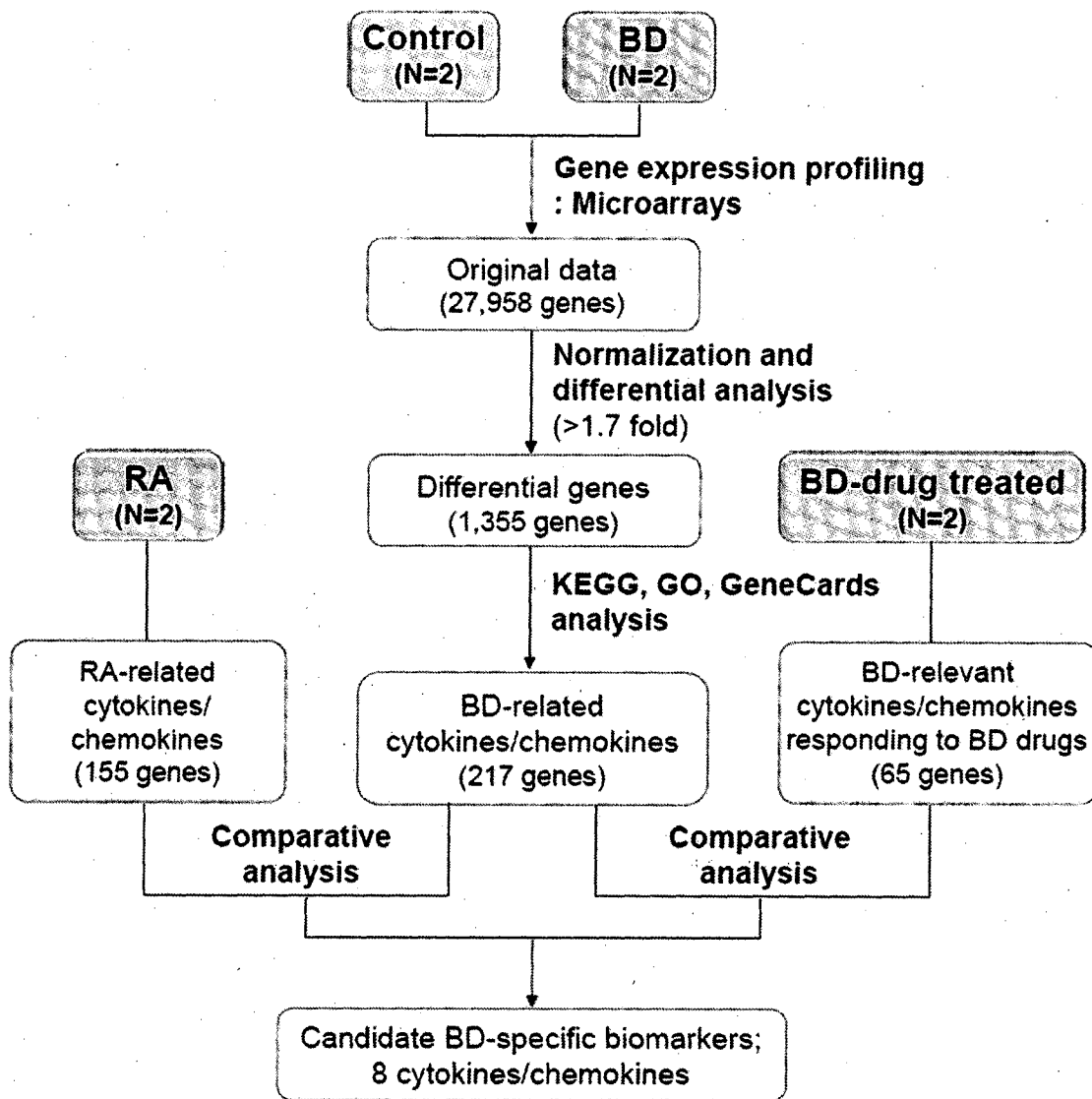
5/21

[도 5]



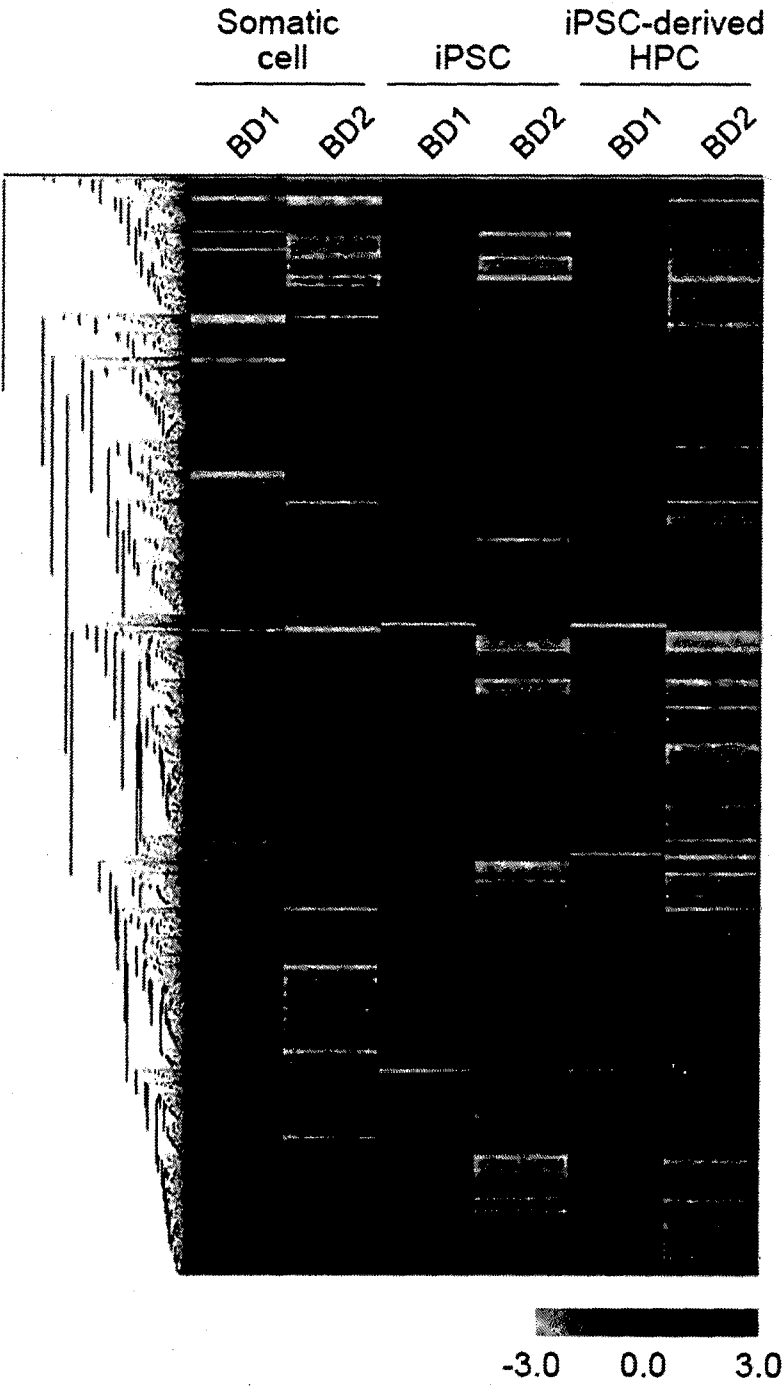
6/21

[도 6a]



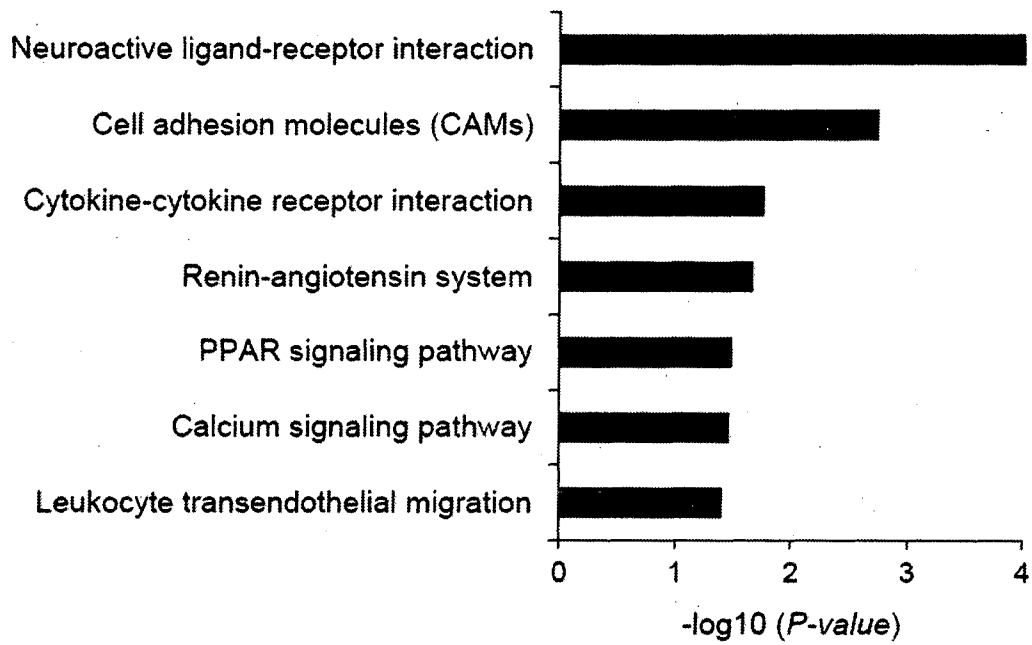
7/21

[도 6b]



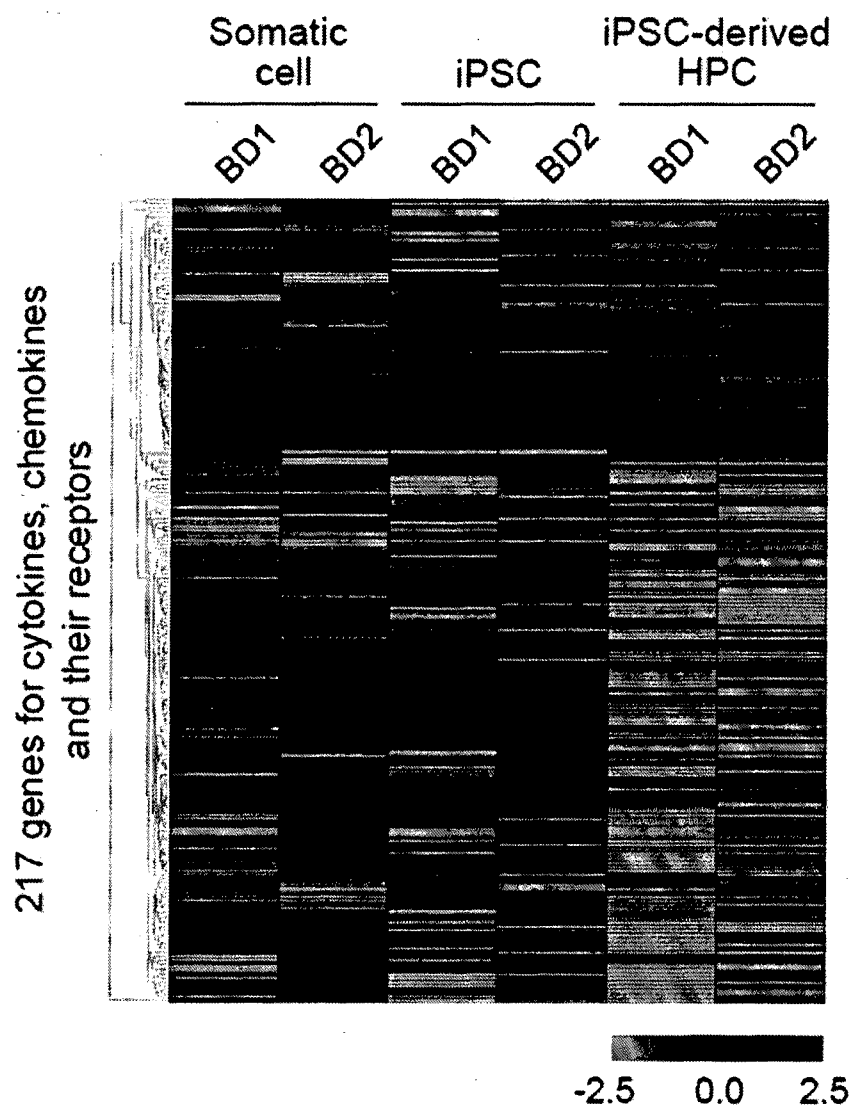
8/21

[도 6c]



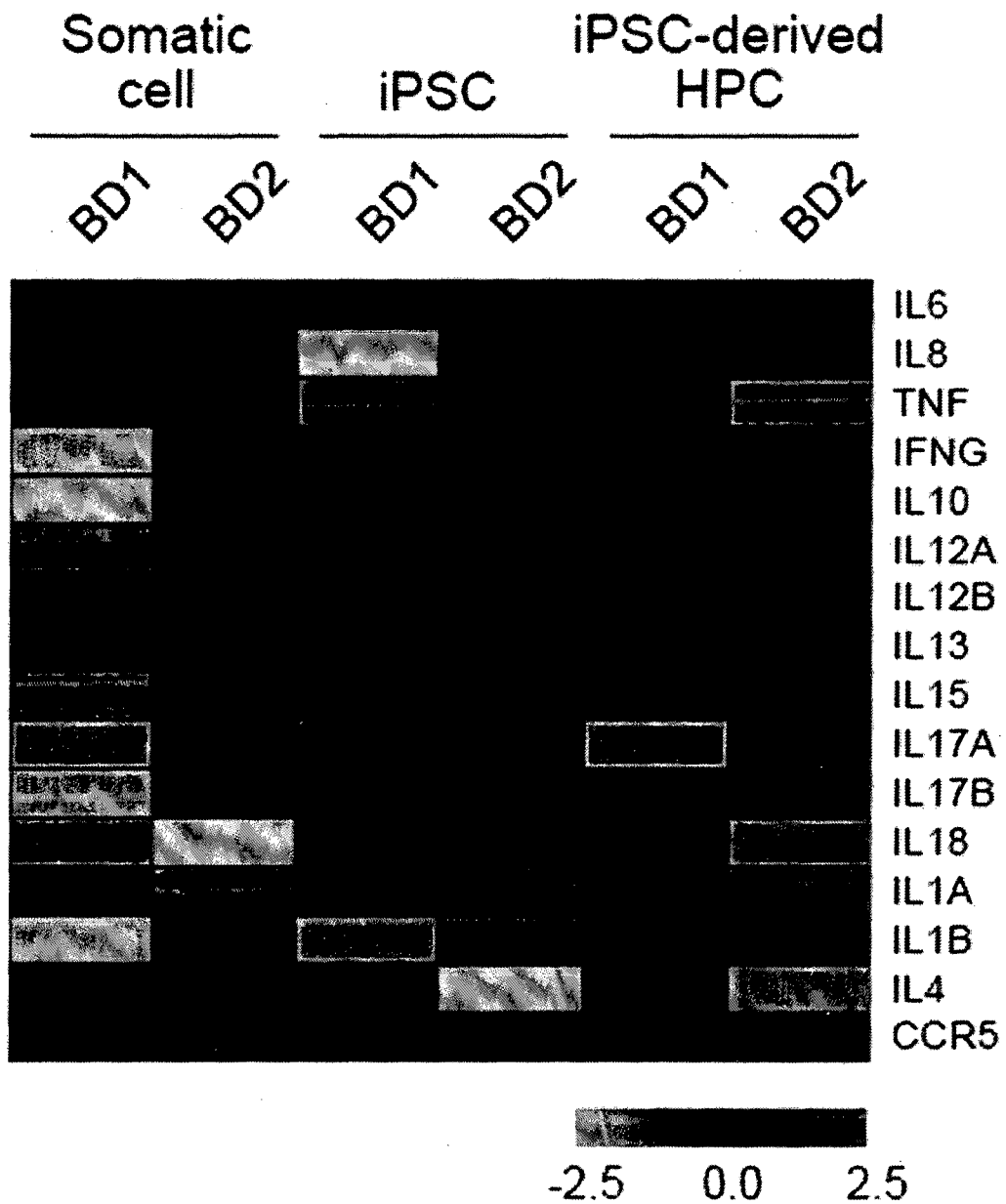
9/21

[도 6d]



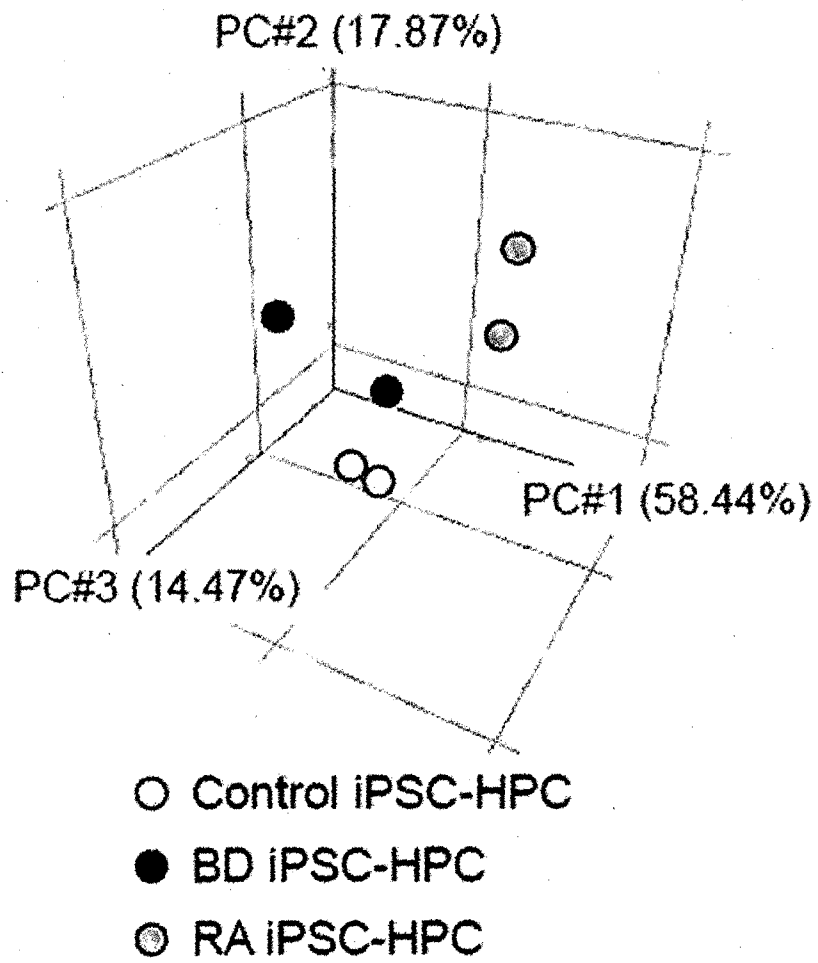
10/21

[도 7]



11/21

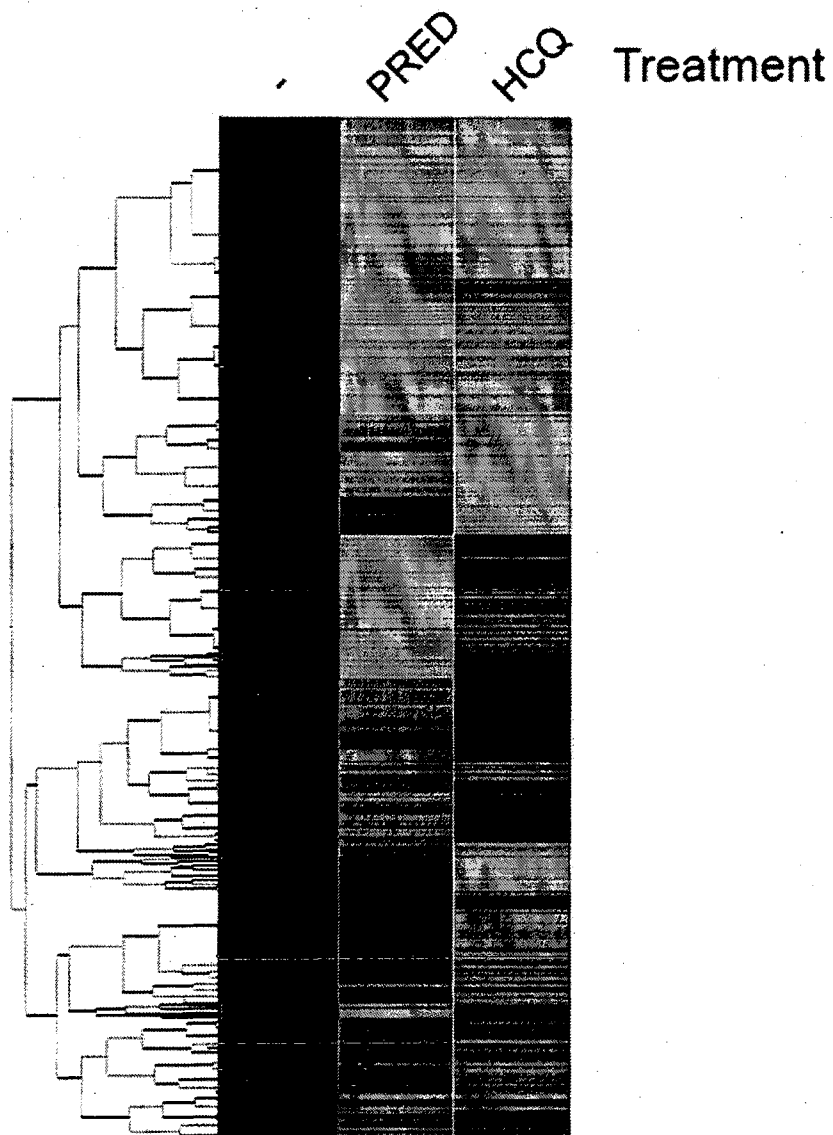
[도 8]



12/21

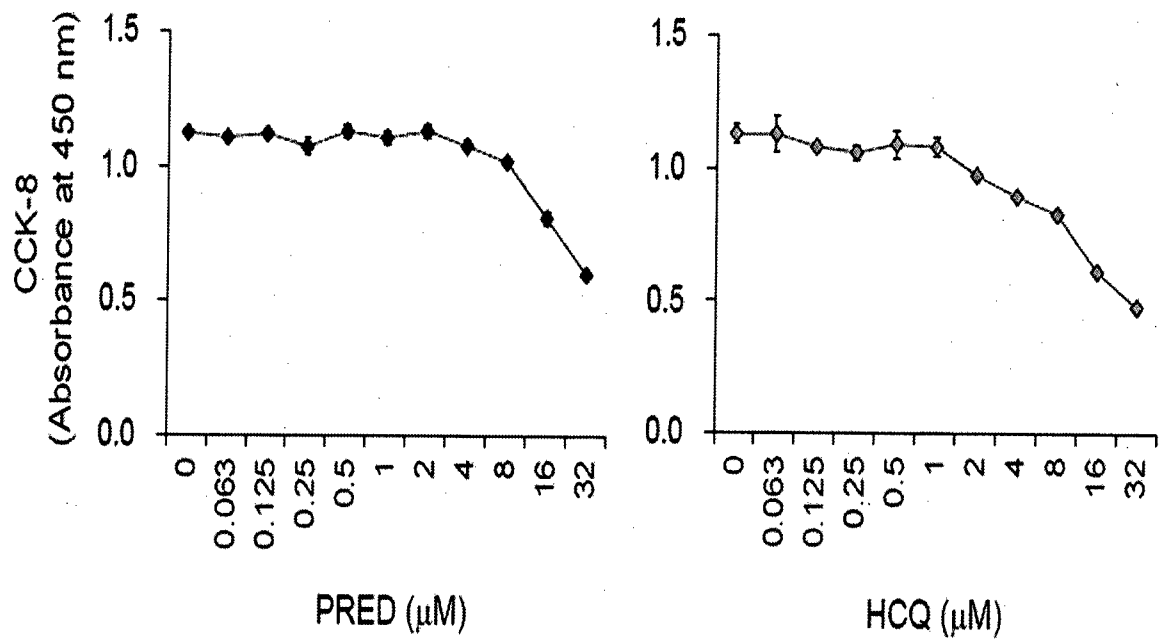
[도 9a]

BD iPSC-HPC



13/21

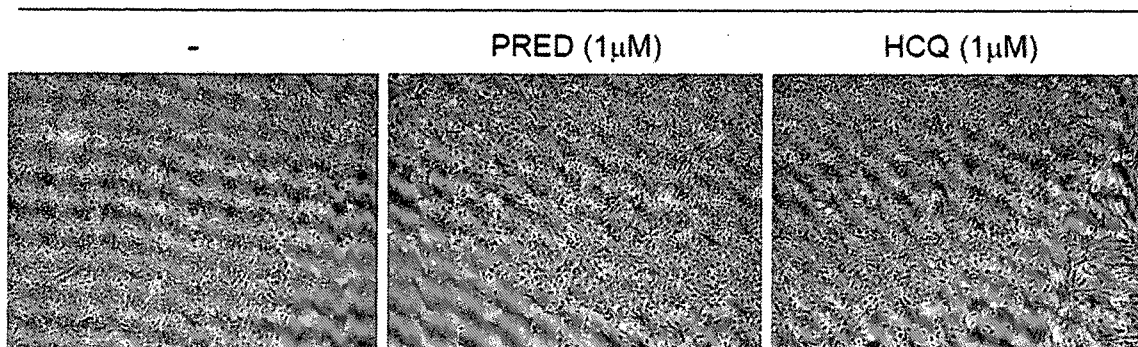
[도 9b]



14/21

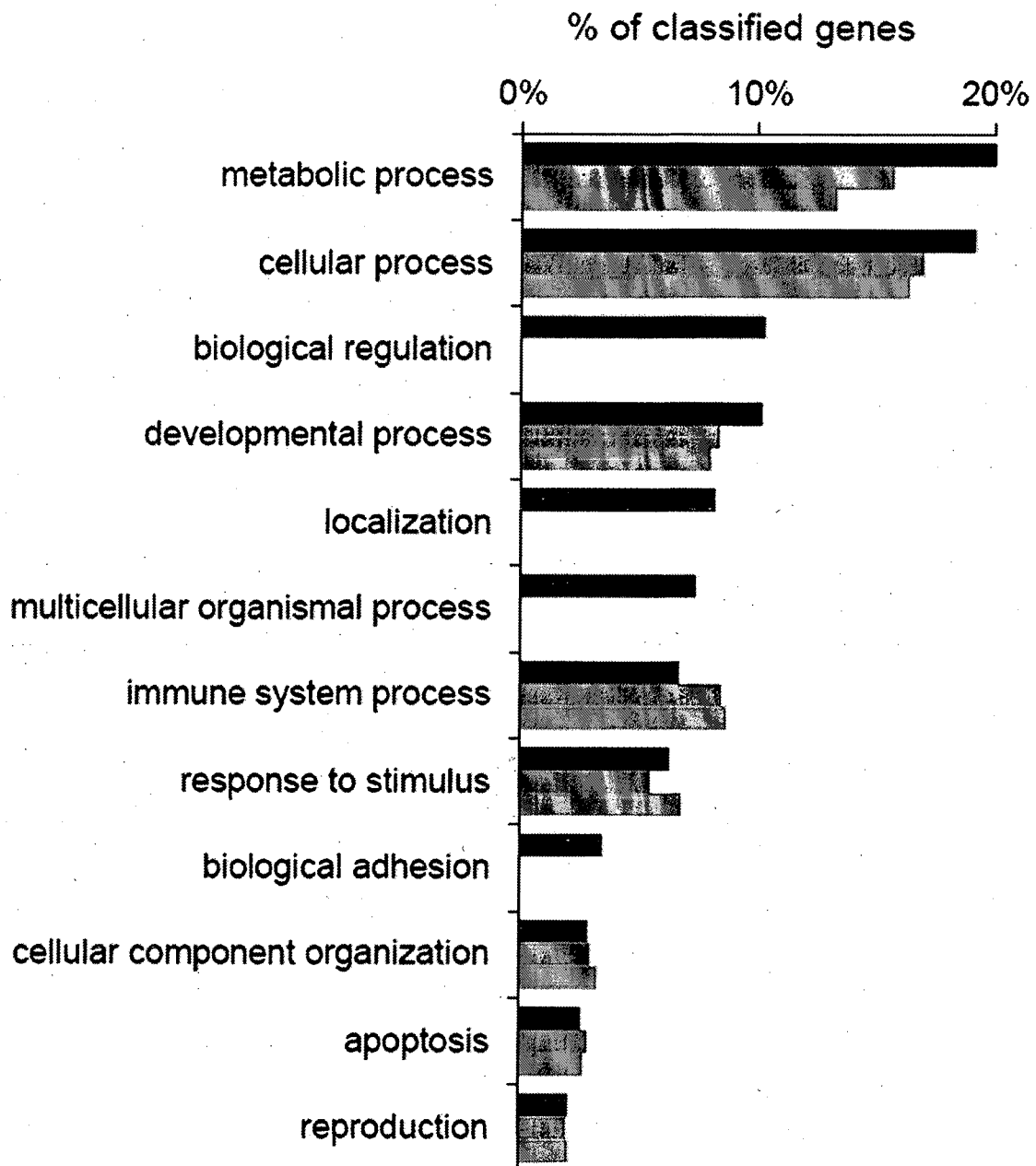
[도 9c]

BD iPSC-HPC



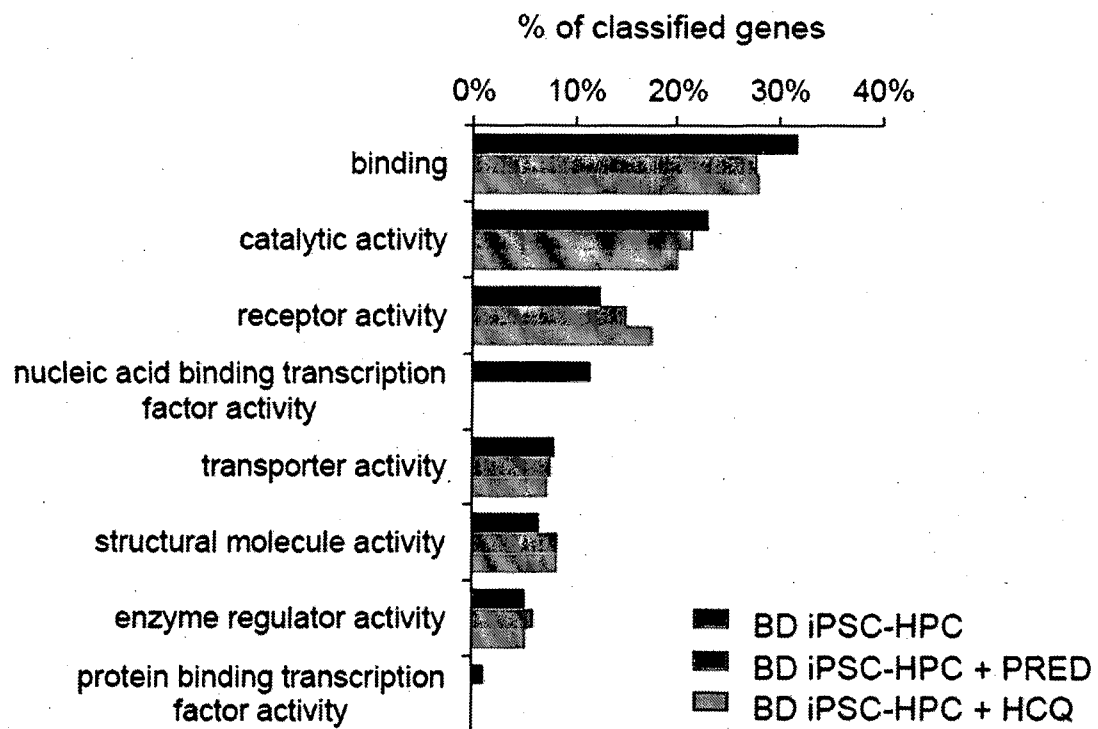
15/21

[도 9d]



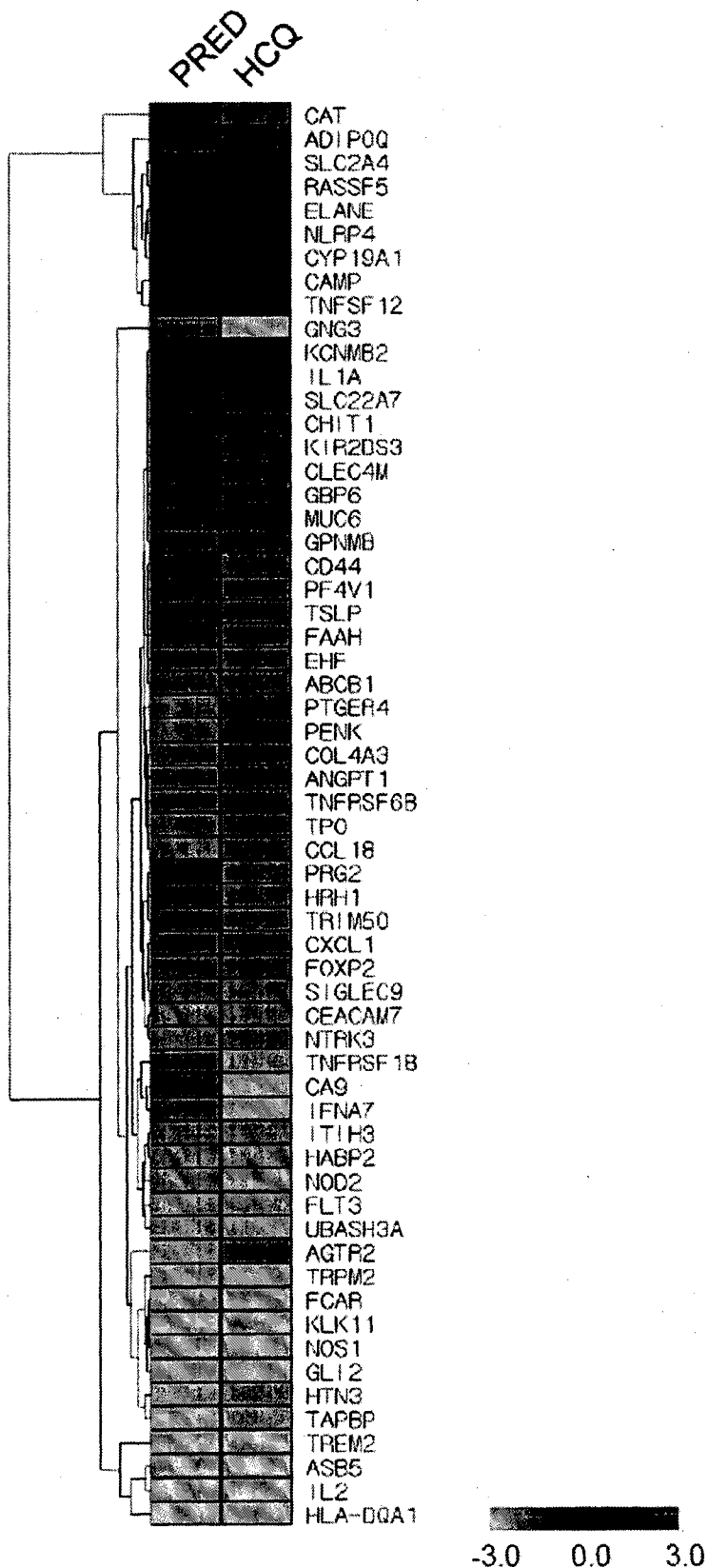
16/21

[도 9e]



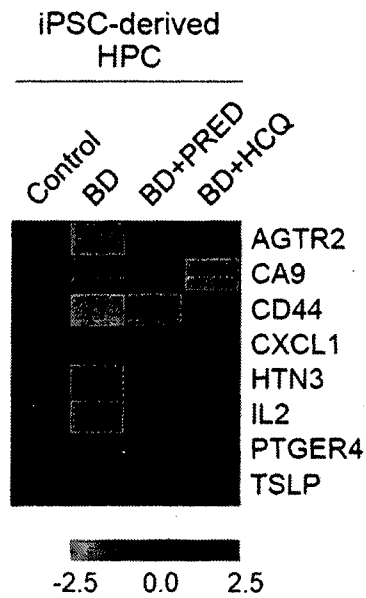
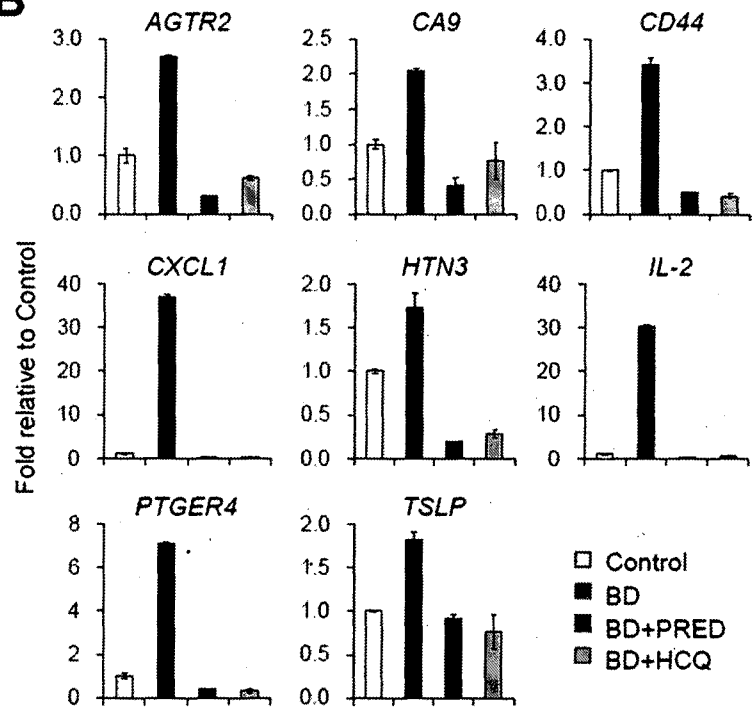
17/21

[도 9f]



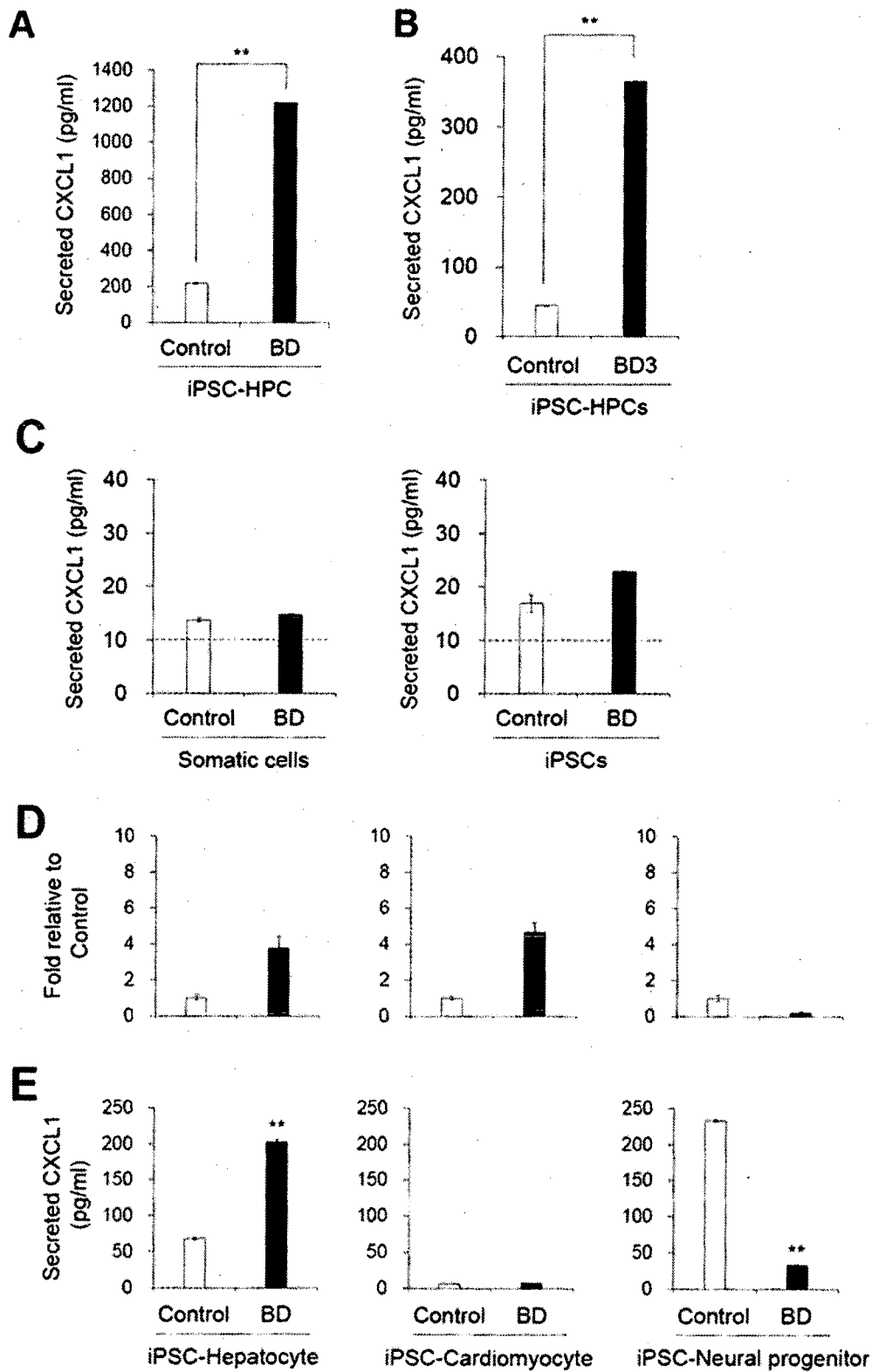
18/21

[도 10]

A**B**

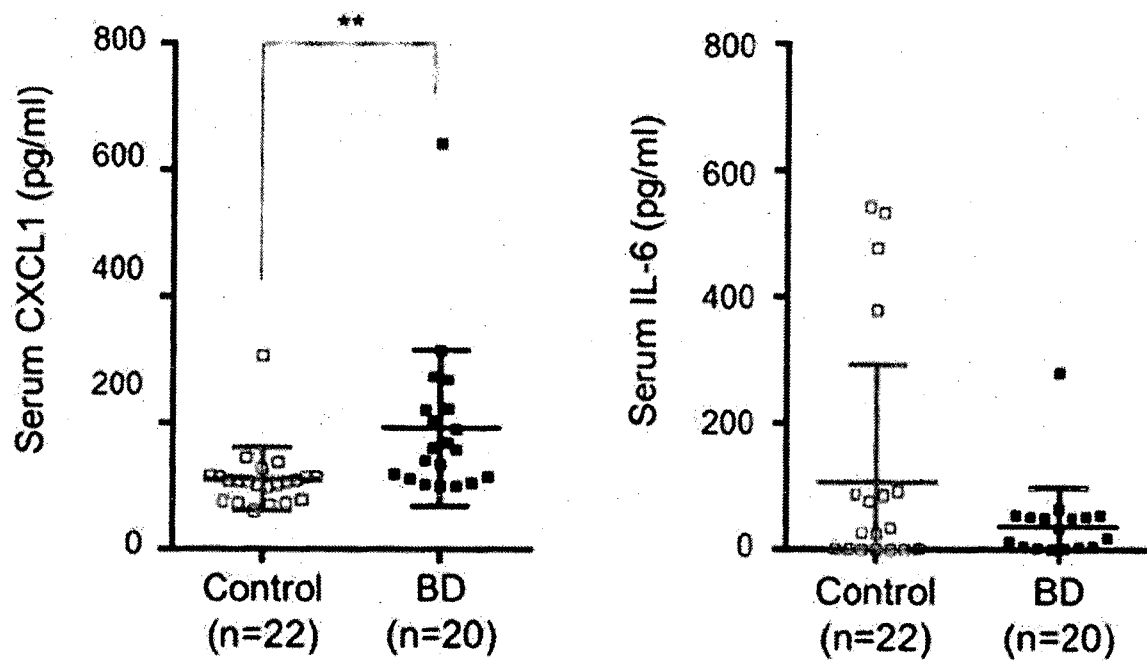
19/21

[11]



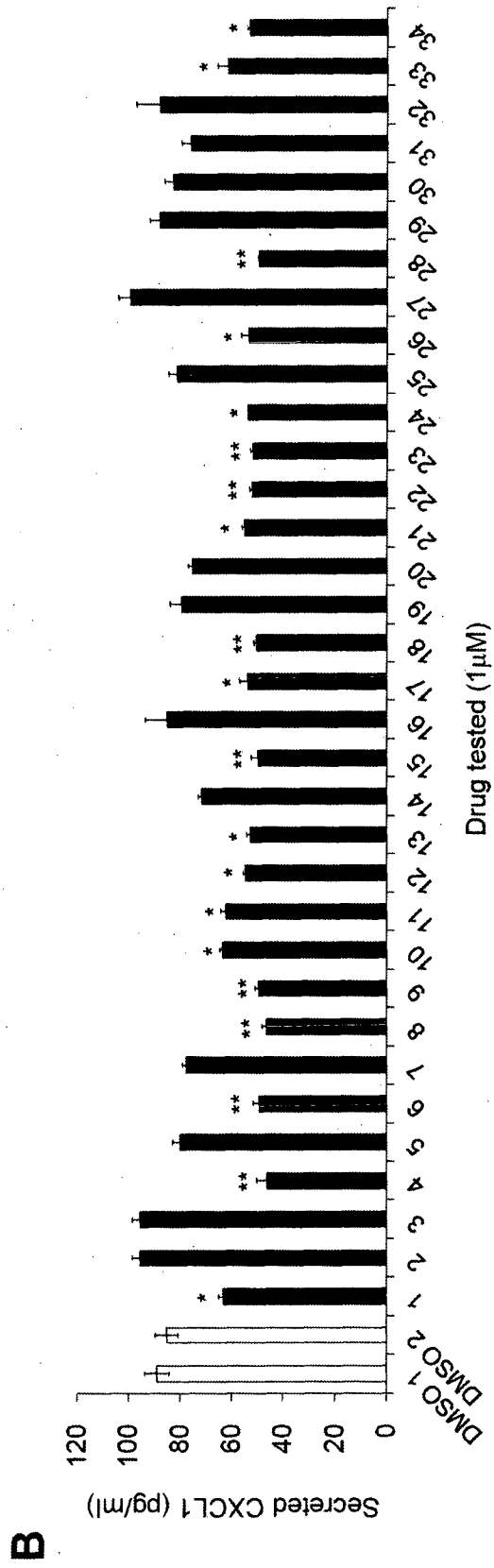
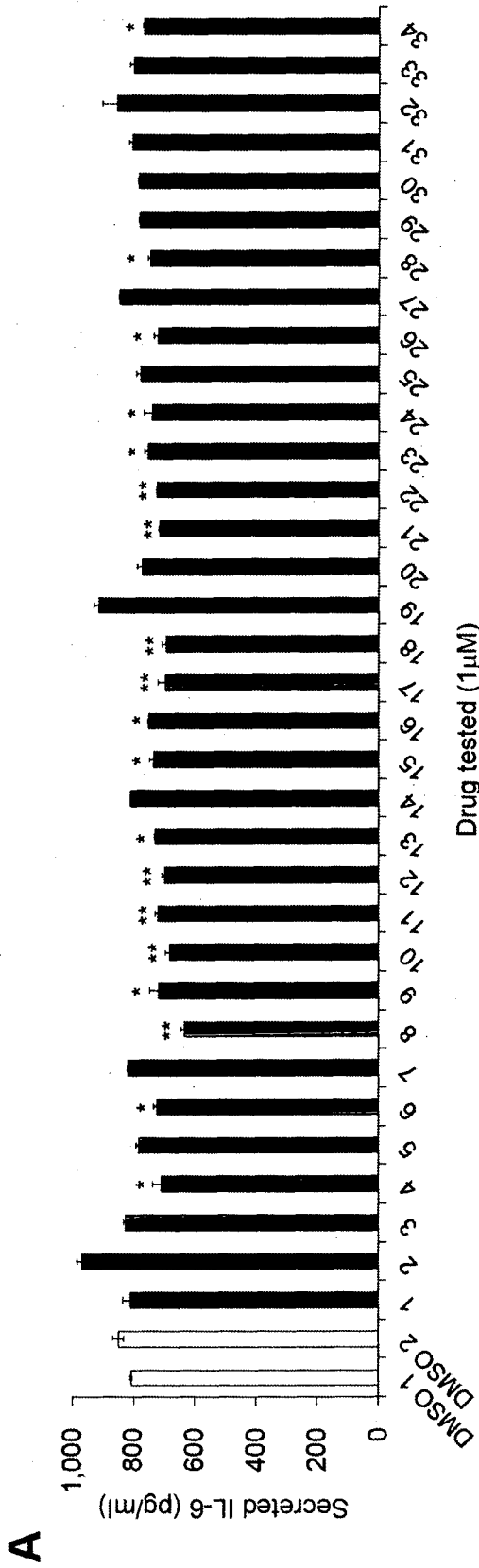
20/21

[도 12]



21/21

[도 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/000735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/074(2010.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/53(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 5/02; C12N 5/0775; C12Q 1/68; G01N 33/50; G01N 33/53

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: bechet's, diagnosis, iPSC, induced pluripotency stem cell, behcet's disease, haematopoietic progenitor cells, AGTR2, CA9, CD44

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Korea Centers for Disease Control and Prevention. R&D Final Report. Research Agency: Seoul National University Hospital Registered publication number (11-1352173-000043-01) "Establishment of National Foundation of Strategy for induced Pluripotent Stem Cells based on National Stem Cell bank" (2013 Publication) (See table 3-1 etc.)	1-8
A		9-16
Y	RAMOS-MEJIA, M., et al., PLoS ONE, Vol. 7(4), p. e35824 (April 2012 Publication) "Residual Expression of the Reprogramming Factors Prevents Differentiation of iPSC Generated from Human Fibroblasts and Cord Blood CD34+ Progenitors" (See abstract, pages 2 to 6 and figures 2 to 4 etc.)	1-8
A		9-16
Y	SALVAGIOTTO, G., et al., PLoS ONE, Vol. 6(3), p. e17829 (March 2011 Publication) "A Defined, Feeder-Free, Serum-Free System to Generate In Vitro Hematopoietic Progenitors and Differentiated Blood Cells from hESCs and hiPSCs" (See pages 5 to 8 and figure 1 etc.)	4-8
A		1-3,9-16
A	KR 10-2009-0043559 A (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 06 May 2009 (See abstract, and the claims etc.)	1-16



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

31 MARCH 2016 (31.03.2016)

Date of mailing of the international search report

31 MARCH 2016 (31.03.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/000735

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.:
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:

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:

Group 1: the invention as in claims 1-3 and 6-8 (a part) relates to an induced pluripotent stem cell model of Behcet's disease, a method for preparing the corresponding model, and a method for using the corresponding model.

Group 2: the invention as in claims 4, 5 and 6-8 (a part) relates to a hematopoietic progenitor cell model of Behcet's disease, a method for preparing the corresponding model, and a method for using the corresponding model.

Group 3: the invention as in claims 9-16 relates to a kit for diagnosing Behcet's disease, a method for using the corresponding kit or a use of the kit.

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/000735

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0043559 A	06/05/2009	AU 2006-285467 A1	08/03/2007
		AU 2006-285468 A1	08/03/2007
		AU 2007-285057 A1	21/02/2008
		CN 101341244 A	07/01/2009
		CN 101341245 A	07/01/2009
		EP 1937801 A1	02/07/2008
		EP 1943334 A1	16/07/2008
		EP 2054506 A1	06/05/2009
		EP 2617428 A1	24/07/2013
		JP 2009-506769 A	19/02/2009
		JP 2009-506770 A	19/02/2009
		JP 2010-500047 A	07/01/2010
		KR 10-2008-0056181 A	20/06/2008
		KR 10-2008-0056182 A	20/06/2008
		US 2010-0323027 A1	23/12/2010
		US 2011-0008298 A1	13/01/2011
		US 2011-0014692 A1	20/01/2011
		US 8815588 B2	26/08/2014
		US 9018005 B2	28/04/2015
		US 9029146 B2	12/05/2015
		WO 2007-027156 A1	08/03/2007
		WO 2007-027157 A1	08/03/2007
		WO 2008-020815 A1	21/02/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/074(2010.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/074; C12N 5/02; C12N 5/0775; C12Q 1/68; G01N 33/50; G01N 33/53

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: 베체트, 진단, iPSC, 유도만능 줄기세포, behcet's disease, 조혈전구세포, AGTR2, CA9, CD44

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	질병관리본부. 학술연구용역과제 최종결과 보고서. 연구기관: 서울대학교 병원 발간등록번호(11-1352173-000043-01) “국가 줄기세포 은행 중심의 역분화 줄기세포 국가전략기반 구축”(2013. 공개) (표3-1 등 참조)	1-8
A		9-16
Y	Ramos-Mejia, M., et al., PLoS ONE, Vol.7(4), p.e35824(2012. 4. 공개) "Residual Expression of the Reprogramming Factors Prevents Differentiation of iPSC Generated from Human Fibroblasts and Cord Blood CD34+ Progenitors" (초록, 제2면 내지 제6면 및 도2 내지 도4 등 참조)	1-8
A		9-16
Y	Salvaggio, G., et al., PLoS ONE, Vol.6(3), p.e17829(2011. 3. 공개) "A Defined, Feeder-Free, Serum-Free System to Generate In Vitro Hematopoietic Progenitors and Differentiated Blood Cells from hESCs and hiPSCs" (제5면 내지 제8면 및 도1 등 참조)	4-8
A		1-3, 9-16
A	KR 10-2009-0043559 A (에이전시 포 사이언스, 테크놀로지 앤드 리서치) 2009.05.06 (초록, 청구항 등 참조)	1-16

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 03월 31일 (31.03.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 03월 31일 (31.03.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

유성진

전화번호 +82-42-481-8215



제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☐ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
☐부록 C/ST.25 텍스트 파일
☐서면 혹은 이미지 파일
- b. ☒PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
☐부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
☐서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 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:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

제1군: 청구항 제1항 내지 제3항 및 제6항 내지 제8항(일부)는 베체트병의 유도만능 줄기세포 모델, 해당 모델의 제조방법 및 해당 모델을 사용하는 방법에 관한 발명임.

제2군: 청구항 제4항, 제5항 및 제6항 내지 제8항(일부)는 베체트병의 조혈전구세포모델, 해당 모델의 제조방법 및 해당 모델을 사용하는 방법에 관한 발명임.

제3군: 청구항 제9항 내지 제16항은 베체트병의 진단용 키트, 해당 키트의 사용방법 또는 용도에 관한 발명임.

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.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2009-0043559 A	2009/05/06	AU 2006-285467 A1	2007/03/08
		AU 2006-285468 A1	2007/03/08
		AU 2007-285057 A1	2008/02/21
		CN 101341244 A	2009/01/07
		CN 101341245 A	2009/01/07
		EP 1937801 A1	2008/07/02
		EP 1943334 A1	2008/07/16
		EP 2054506 A1	2009/05/06
		EP 2617428 A1	2013/07/24
		JP 2009-506769 A	2009/02/19
		JP 2009-506770 A	2009/02/19
		JP 2010-500047 A	2010/01/07
		KR 10-2008-0056181 A	2008/06/20
		KR 10-2008-0056182 A	2008/06/20
		US 2010-0323027 A1	2010/12/23
		US 2011-0008298 A1	2011/01/13
		US 2011-0014692 A1	2011/01/20
		US 8815588 B2	2014/08/26
		US 9018005 B2	2015/04/28
		US 9029146 B2	2015/05/12
		WO 2007-027156 A1	2007/03/08
		WO 2007-027157 A1	2007/03/08
		WO 2008-020815 A1	2008/02/21