(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 6 월 27 일 (27.06.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/125073 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/074 (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/016519

(22) 국제출원일: 2018 년 12 월 21 일 (21.12.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0178706 2017 년 12 월 22 일 (22.12.2017) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김병수 (**KIM, Byoung Soo**); 06005 서울시 강남구 압구정로29길 69, 201-603, Seoul (KR). 이승진 (**LEE, Seung Jin**); 03414 서울시 은평구 연서로11길 32-9, Seoul (KR). 강가원 (**KANG, Ka Won**); 03116 서울시 종로구 난계로 241, 1808호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 윤대웅 (**YOON, Dae Woong**); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922, 301호, Seoul (KR).

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

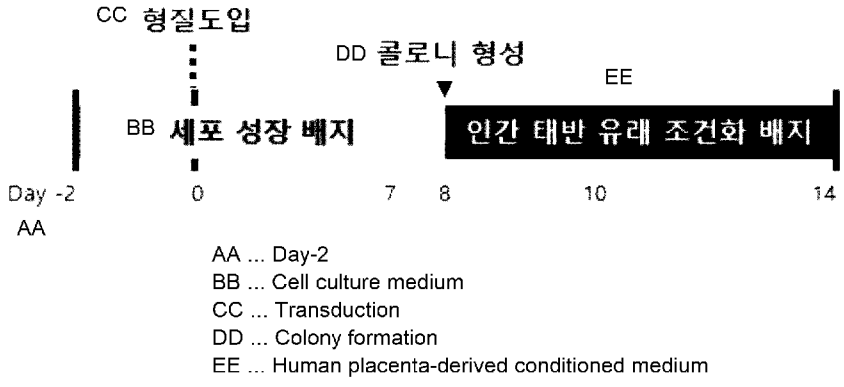
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** PLACENTA-DERIVED CELL-CONDITIONED MEDIUM FOR INDUCING DEDIFFERENTIATION FROM SOMATIC CELL TO INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL AND DEDIFFERENTIATION-INDUCING METHOD USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지 및 이를 이용한 역분화 유도 방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a placenta-derived cell-conditioned medium for inducing dedifferentiation from somatic cells to induced pluripotent stem cells and a dedifferentiation-inducing method using the same. When the placenta-derived cell-conditioned medium for inducing dedifferentiation according to the present invention is employed, personalized dedifferentiated stem cells can be stably established using a medium composed of human-derived products only. Provision of a human placenta-derived environment similarly represents an in vivo environment and allows the production of a cell therapy product without problems for clinical application.

(57) **요약서:** 본 발명은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지 및 이를 이용한 역분화 유도 방법에 관한 것이다. 본 발명의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 이용하는 경우, 개인 맞춤형 역분화 줄기세포를 오직 인간 유래 산물로 구성된 배지를 이용하여 안정적으로 확립할 수 있고, 인간 태반에서 유래한 환경을 제공함으로써 생체환경과 유사하게 재현하고 임상 적용에 문제가 없는 세포치료제를 제조할 수 있다.

WO 2019/125073 A1

명세서

발명의 명칭: 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지 및 이를 이용한 역분화 유도 방법

기술분야

[1] 본 발명은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지 및 이를 이용한 역분화 유도 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 줄기세포 치료제의 생산을 위해서는 그 공급원이 되는 줄기세포의 대량 체외 배양이 필수적으로 이루어져야 하고, 안전하면서 경제적이어야 임상에서 세포치료제로 사용될 수 있다.

[3] 그러나, 현재 사용되는 인간 전능성 줄기세포의 증식 배양을 위하여 동물유래 지지세포를 사용하는 방법 및 동물유래 산물을 포함하고 있는 특수 젤을 도포한 용기에서 배양하는 방법은 이종단백 오염으로 인한 안전성 문제가 발생할 수 있고, 고가의 특수 젤을 사용하는 경우에는 경제적인 면에서 대량생산에 적합하지 않다.

[4] 태반유래세포 조건화 배지를 이용하는 경우 무동물, 무지지세포를 이용한 전능성 줄기세포를 배양할 수 있고, 케모카인 수용체인 CXCR2의 기전에 의해서 전능성 줄기세포의 증식 및 분화가 가능하다.

[5] 따라서, 본 발명자들은 줄기세포 배양에 유용함을 입증한 태반유래세포 조건화 배지를 전능성 줄기세포로의 역분화에 적용함으로써 세포 치료제 개발에 활용할 수 있을 것으로 예상하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명자들은 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 개발하고자 예의 연구 노력하였다.

[7] 그 결과 태반유래세포 조건화 배지를 이용하지 않은 경우에 비하여 체세포로부터 전능성 줄기세포로의 역분화 효율을 증가시킬 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[8] 따라서, 본 발명의 목적은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 다른 목적은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 이용한 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[11] 본 발명자들은 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 태반유래세포 조건화 배지를 이용하지 않은 경우에 비하여, 체세포로부터 전능성 줄기세포로의 역분화 효율을 증가시킬 수 있음을 규명하였다.

[12] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[13] 본 발명의 일 양태는 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지에 관한 것이다.

[14] 상기 체세포는 OCT4, SOX2, c-Myc 및 KLF4로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산 서열로 형질변환된 것일 수 있으며, 예를 들어, OCT4 단백질을 코딩하는 핵산 서열, SOX2 단백질을 코딩하는 핵산 서열, c-Myc 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 KLF4 단백질을 코딩하는 핵산 서열로 형질변환된 것일 수 있다.

[15] 상기 OCT4 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 이와 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[16] 또한, 상기 OCT4 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 OCT4 단백질을 코딩하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 OCT4 단백질을 코딩하는 것일 수 있으며, 이와 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[17] 상기 SOX2 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있 며, 이와 실질적인 동일성을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[18] 또한, 상기 SOX2 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 SOX2 단백질을 코딩하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 SOX2 단백질을 코딩하는 것일 수 있으며, 이와 실질적인 동일성을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[19] 상기 c-Myc 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있 며, 이와 실질적인 동일성을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[20] 또한, 상기 c-Myc 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 c-Myc 단백질을 코딩하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 c-Myc 단백질을 코딩하는 것일 수 있으며, 이와 실질적인 동일성을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[21] 상기 KLF4 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있 며, 이와

실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[22] 또한, KLF4 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 KLF4 단백질을 코딩하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 KLF4 단백질을 코딩하는 것일 수 있으며, 이와 실질적인 동일성을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

[23] 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 대상 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 최소 70%의 상동성, 최소 80%의 상동성 또는 최소 90%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.

[24] 서열의 비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 통해 인터넷 상에서 blastp, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램을 이용할 수 있다.

[25] [표1]

서열번호	명칭	서열목록	비고
1	OCT4	MAGHLASDFAFSPPPGGGGDGPGGPEPGWVDPRTWL SFQGPPGGPGIGPGVGPGSEVWGIPPCPPPYEFCGGMA YCGPQVGVGLVPQGGLETSQPEGEAGVGVESNSDGA SPEPCTVTPGAVKLEKEKLEQNPEESQDIKALQKELEQ FAKLLKQKRITLGYTQADVGLTLGVLFGKVFSQTTIC RFEALQLSFKNMCKLRPLLQKWVEEADNNENLQEIC KAETLVQARKRKRTSIENRVRGNLENLFLQCPKPTLQ QISHIAQQLGLEKDVVRVWFCNRRQKGKRSSSDYAQ REDFEAAGSPFSGGPVSFPLAPGPHFGTPGYGSPHFTA LYSSVPFPEGEAFPPVSVTTLGSPMHSN	
2	SOX2	MYNMMETELKPPGPQQTSGGGGGNSTAAAAGGNQK NSPDRVKRPMNAFMVWSRGQRRKMAQENPKMHNSE ISKRLGAEWKLLSETEKRPFIDEAKRLRALHMKEHPD YKYRPRRKTKTLMKKDKYTLPGGLLAPGGNSMASG VGVGAGLGAGVNQRMDSYAHMNGWSNGSYSMMQ DQLGYPQHPGLNAHGAAQMQPMHRYDVSALQYNS MTSSQTYMNGSPTYSMSYSQQGTPGMALGSMGSVV KSEASSSPPVVTSSSHSRAPCQAGDLRDMISMYLPGAE VPEPAAPSRLHMSQHYQSGPVPGTAINGTLPLSHM	
3	c-Myc	MDFFRVVENQQPPATMPLNVSFTNRNYDLDYDSVQP YFYCDEEENFYQQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTP PLSPSRRSGLCSPSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTAD QLEMVTELLGGDMVNQSFICDPDDETFIKNIIIQDCM WSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSGSPNPARGHSV CSTSSLYLQDLSAAASECIDPSVVFPYPLNDSSSPKSCA SQDSSAFSPSSDSLLSSTESSPQGSPEPLVLHEETPPTTS SDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGH SKPPHSPLVLKRCHVSTHQHNYAAPPSTRKDYPAAKR VKLDSVRVLRQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNV LERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKA TAYILSVQAEEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNS CA	
4	KLF	MAVSDALLPSFSTFASGPAGREKTLRQAGAPNNRWR	

	4	EELSHMKRLPPVLPGRPYDLAAATVATDLESGGAGA ACGGSNLAPLPRRETEEFNDLLDLDFILSNSLTHPPESV AATVSSSASASSSSSPSSSGPASAPSTCSFTYPIRAGND PGVAPGGTGGGLLYGRESAPPPTAPFNLADINDVSPSG GFVAELLRPELDPVYIPPQQPQPPGGGLMGKFVLKAS LSAPGSEYGSPSVISVSKGSPDGSHPVVVAPYNGGPPR TCPKIKQEAVSSCTHLGAGPPLSNGHRPAAHDFPLGR QLPSRTTPTLGLEEVLSSRDCHPALPLPPGFHPHPGPN YPSFLPDQMQPQVPPLHYQGQSRGFVARAGEPCVCW PHFGTHGMMLTPPSSPLELMPPGSCMPEEPKPKRGRR SWPRKRTATHTCDYAGCGKTYTKSSHLKAHLRTHTG EKPYHCDWDGCGWKFARSDELTRHYRKHTGHRPFQ CQKCDRAFSRSDHLALHMKRHF	

[26] 상기 체세포는 내피세포, 상피세포 및 태반세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[27] 상기 태반유래세포는 인간 융모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포일 수 있다.

[28] 상기 태반유래세포 조건화 배지는 세포 성장 배지에 배양한 인간 태반유래세포를 포함하는 것일 수 있다.

[29] 본 발명의 다른 일 양태는 다음의 단계를 포함하는 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법에 관한 것이다:

[30] 인간 태반유래세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에서 배양하는 태반유래세포 배양 단계; 및

[31] 세포 성장 배지로부터 인간 태반유래세포 배양물을 포함하는 배양액을 수거하는 배양액 수거 단계.

[32] 상기 태반유래세포는 인간 융모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것일 수 있다.

[33] 상기 배양 단계의 배양액은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)/F-12일 수 있으며, 예를 들어, 10% FBS, 10% 페니실린 그리고 10% 피루브산 나트륨(sodium pyruvate)을 포함한 DMEM, 고-글루코즈 배지인 것일 수 있다.

[34] 상기 배양액은 혈청대체제를 추가적으로 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, KnockOut쩨 Serum Replacement (KnockOut쩨 SR)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[35] 상기 수거 단계에서 수거된 배양액은 태반유래세포 배양물이 포함된 것일 수있으며, 예를 들어, 인간 태반유래세포 배양물을 포함하는 것일 수 있다.

[36] 본 발명의 다른 일 양태는 다음의 단계를 포함하는 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도 방법에 관한 것이다:

[37] 체세포에 OCT4, SOX2, c-Myc 및 KLF4로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 형질도입하는 체세포 형질변환 단계; 및

[38] 형질변환된 체세포를 태반유래세포 조건화 배지에 배양하는 체세포 배양 단계.

[39] 상기 체세포는 내피세포, 상피세포 및 태반세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[40] 상기 태반유래세포는 인간 융모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것일 수 있다.

[41] 상기 역분화 유도 방법은 체세포 배양 단계에서 형성된 콜로니로부터 줄기세포를 분리하는 줄기세포 분리 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[42] 상기 줄기세포 분리 단계는 줄기세포 표지 마커로 염색하여 수행하는 것일 수 있으며, 예를 들어, Tra-60, 알칼리포스파타제(Alkaline phosphatase), SSEA4, TRA-1-60 및 TRA-1-80 등으로 염색하여 수행되는 것일 수 있으며, 형성된 콜로니가 줄기세포인지 확인 하기 위해 라이브 스태인(Live stain)을 통해 분리 할 수 있다.

[43] 상기 역분화 유도 방법은 콜로니로부터 분리된 줄기세포에서 OCT-4, NANOG, SSEA-4 및 Tra-81로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 단백질의 활성을 확인하는 줄기세포 활성 검증 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[44] 상기 활성 검증 단계는 역분화 인자를 7일동안 형질 도입하고 태반유래세포조건화배지 또는 E8에서 3일 동안 역분화 줄기세포를 유도한 후에 알칼리포스파타제 염색을 통해 리프로그래밍 효율을 비교하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[45] 상기 역분화 유도 방법은 콜로니로부터 분리된 줄기세포로 생체외에서 배아구를 형성하여 외배엽, 중배엽 또는 내배엽으로의 분화능을 확인하는 줄기세포 분화능 검증 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[46] 상기 외배엽으로의 분화능 확인은 TUJ1, Nestin, Otx2, SOX1 및 Pax6로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 항체로 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[47] 상기 중배엽으로의 분화능 확인은 Desmin, Brachyury, HAND1 및 Snail로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 항체로 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[48] 상기 내배엽으로의 분화능 확인은 AFP, GATA-4, SOX17, HNF4A 및 FOXA2로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 항체로 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[49] 본 발명은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지 및 이를 이용한 역분화 유도 방법에 관한 것으로, 본 발명의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 이용하는 경우, 개인 맞춤형 역분화

줄기세포를 오직 인간 유래 산물로 구성된 배지를 이용하여 안정적으로 확립할 수 있으며, 태반유래세포 조건화 배지를 이용하지 않은 경우에 비하여 체세포로부터 전능성 줄기세포로의 역분화 효율을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[50] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 과정을 나타낸 모식도를 나타낸다.

[51] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 과정에서의 형태학적 변화를 나타낸 사진이다.

[52] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따라 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 줄기세포 표지 마커인 ALP을 염색한 결과를 나타낸 사진이다.

[53] 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라 일반 배지 대비 태반유래세포 조건화 배지에서 유도된 전능성 줄기세포로의 역분화 효율 비교 결과를 나타낸 그래프이다.

[54] 도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따라 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 면역조직화학적 방법을 통해 줄기세포 특이적 유전자의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

[55] 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따라 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 중합효소 연쇄 반응을 통해 줄기세포 특이적 유전자의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[56] 도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따라 혈관내피세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 크로모좀 분석을 통해 핵형을 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

[57] 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따라 태반세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 크로모좀 분석을 통해 핵형을 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

[58] 도 5c는 본 발명의 일 실시예에 따라 섬유아세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 크로모좀 분석을 통해 핵형을 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

[59] 도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따라 체세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포로 생체 외에서 테라토마(기형종)를 형성하여 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로의 분화능을 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

[60] 도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따라 체세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포로 면역이 결핍된 생쥐에서 기형종을 형성하는지 검증한 결과 사진다.

[61] 도 6c는 본 발명의 일 실시예에 따라 체세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포로 면역이 결핍된 생쥐에서 기형종을 형성하는지 검증한 결과

사진다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[62] 성장 배지에 배양한 인간 태반유래세포 배양물을 포함하는 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

발명의 실시를 위한 형태

[63] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[64]

[65] **실시예 1: 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화**

[66] 도 1과 같이, 3종의 인간 체세포인 내피세포(Primary Umbilical Vein Endothelial Cells, ATCC #PCS-100-010), 상피세포(Primary Dermal Fibroblasts, ATCC # PCS-201-012) 및 태반세포를 샌다이 바이러스 역분화 인자(OCT4, SOX2, c-Myc, KLF4)로 형질변환시킨 후 7일 동안 성장배지를 제공하여 배양하였다.

[67] 태반세포는 임신한 지 7주에 치료적인 유산을 받은 건강한 임산부로부터 서면 동의를 받은 후 제왕절개로의 외과적 수술에 의해 분리된 태반 조직으로부터 얻었다.

[68] 구체적으로, 태반의 융모막 융모조직으로부터 세포를 분리하였고, 분리한 태반세포를 20% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 100 U/ml 페니실린(penicillin) 그리고 100 g/ml 스트렙토마이신(streptomycin)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지에 0.1% 젤라틴(gelatin)이 코팅된 플라스크에서 일주일 동안 배양하였다.

[69] 형질변환은 키트(CytoTune째-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, Life Technologies)를 구입하여 사용하였다.

[70] 형질변환된 체세포를 새로운 배양용기로 이식하고 8일 경과 시 태반유래세포 조건화 배지를 제공하여 배양하였으며 이로부터 24시간 이내에 콜로니가 형성되었다.

[71] 도 2와 같이, 이 중 줄기세포 표지 마커인 Tra-60을 염색하여 확인된 역분화 줄기세포를 선택적으로 분리 배양하였다. 이때 대조군으로는 상용화된 배양액(define Essential 8 medium: E8)을 사용하였다.

[72]

[73] **실시예 2: 역분화 줄기세포의 확인**

[74] 체세포에서 유도된 역분화 줄기세포에서 전능성 줄기세포의 특성인 자가재생 능력이 있는지의 여부를 알칼라인 포스파테이즈 염색을 통해서 확인하였고, 그 효율을 대조군인 E8 배지에서 역분화를 유도한 대조군과 비교하였다. 알칼라인

포스파테이즈 염색은 키트(ES Cell Characterization kit, Chemicon International)를 사용하여 수행하여, 그 결과를 도 3a에 나타내었으며, 이를 효율(%)로 계산하여 그래프를 만들어 그 결과를 도 3b 및 표 2에 나타내었다.

[75] [표2]

조건	Cells plated	Colonies/well	Efficiency (%)
E8	1 X 10^5	312 ±0.05	0.312
PCCM	1 X 10^5	3921 ±0.01	3.921

[76] 도 3a에서 확인할 수 있듯이, 태반유래세포 조건화 배지에서 전능성 줄기세포의 특성을 나타내는 세포가 현저하게 많은 것을 육안으로도 관찰할 수 있었다. 또한, 도 3b 및 표 2에서 확인할 수 있듯이, 총 100000개의 세포에서 각각 E8에서는 312±0.05개 그리고 PCCM에서는 3921±0.01개의 세포에서 ALP의 활성을 보였으며, 태반유래세포 조건화 배지에서 역분화 효율이 대조군에 비해 약 10배 높은 것으로 나타났다.

[77]

[78] **실시예 3: 역분화 줄기세포의 특이성 확인**

[79] **3-1. 특이적 표지 인자 발현량 확인**

[80] 전능성 줄기세포 특이적 표지 인자인 OCT-4, NANOG, SSEA-4, Tra-81 등의 발현량 확인을 통하여 줄기세포의 기능을 하는지 검증하였다. 3가지 확립한 줄기세포주가 그 특성을 유지하는지 확인하기 위해, 면역 형광 염색법을 이용하여 역분화 줄기세포에 특이적인 표지 인자들의 발현을 확인하였다. 먼저, 면역 형광 염색을 위해 cover slip에 세포를 배양을 하고, 줄기세포 특이적 마커인 OCT-4와 SSEA-4의 발현을 면역 형광 염색법으로 측정하였다.

[81] 구체적으로, 70 내지 80%의 세포가 성장하면 10분 동안 4% 파라포름알데히드로 세포를 고정시켰다. 그 다음, 10분 동안 0.1% 트라이톤 X100를 세포에 침투시키고, 1차 항체인 OCT-4 (Cell Signaling Technology #2750)과 SSEA-4 (Millipore # MAB4304)을 1:1000으로 희석하여 처리하였다. 그 다음, 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음 날 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 처리하고, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)을 처리하여 암조건에서 5분 동안 방치한 후 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 다음, 실시간 연쇄 중합효소반응(Quantitative real-time PCR Analysis)을 이용하여 신경 줄기세포 특이적인 인자 OCT-4, Nanog, REX-1의 mRNA 발현 정도를 측정하였다. 구체적으로, 키트(Qiagen RNeasy kit, Qiagen Hilden, Germany)를 이용하여 역분화줄기세포로 유도된 세포로부터 RNA를 분리하고, 2ug의 RNA, 올리고(dT) 및 역전사효소(Superscript II reverse transcriptase, Gibco)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 각각의 cDNA에 각각 하기 표 3에 기재된 OCT-4, Nanog 및 REX-1유전자의 프라이머와 마스터믹스(iQ SYBR Green qPCR Master Mix)를

넣고 기기(Bio-Rad iCycler iQ system, Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 분석하여, 그 결과를 도 4a 내지 도 4b 및 표 4에 나타내었다.

[82] [표3]

서열번호	명칭	서열목록(5->3)	비고
5	OCT-4_F	TCTCGCCCCCTCCAGGT	
6	OCT-4_R	CTGCTTCGCCCTCAGGC	
7	Nanog_F	AAAGAATCTTCACCTATGCC	
8	Nanog_R	GAAGGAAGAGGAGAGACAGT	
9	REX-1_F	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT	
10	REX-1_R	GCGTACGCAAATTAAAGTCCAGA	
11	GAPDH_F	GAGTCCACTGGCGTCTTCAC	
12	GAPDH_R	TTCACACCCATGACGAACAT	

[83] [표4]

	H1 control	HUVEC_iPSC	PLACENTA_iPSC	FIBROBLAST_iPSC
OCT-4	1.0733333	1.21	1.09	1.0923333
Nanog	1.1233333	1.4333333	1.39	1.1366667
REX-1	1.1333333	1.4466667	1.3666667	1.35

[84] 도 4a에서 확인할 수 있듯이, 역분화 줄기세포에서 줄기세포 특이적 표지 마커인 OCT4 및 SSEA4가 강하게 발현되었다. 또한, 도 4b 및 표 4에서 확인할 수 있듯이, 역분화 줄기세포에서 세포 내 전능성 줄기세포 특이적 단백질의 함량이 대조군인 인간 배아줄기세포주 H1(WiCell, Wisconsin, USA)에 비해 높게 나타났다.

[85]

[86] **3-2. 크로모좀 분석**

[87] 역분화 줄기세포가 정상적인 핵형을 유지하는지를 크로모좀 분석을 통해서 측정하고 하여 안정성을 검증하였다. 구체적으로, 크로모좀 분석을 위하여 역분화 줄기세포 1.5 X 10^6 cells에 0.1 g/ml 콜세미드(colcemid)를 3 내지 4시간 동안 처리하였다. 그 다음, 0.25% 트립신(Trypsin)-EDTA를 5분 동안 처리하여 배양접시로부터 분리한 후, 37℃에서 20분 동안 0.075M KCl 용액에 배양하였다. 그 다음, 메탄올과 아세트산을 3:1 비율로 혼합하여 세포를 고정한 후 확립된 역분화 줄기세포의 핵형을 300 밴드 레벨의 해상도에서 측정하여, 그 결과를 도 5a 내지 도 5c에 나타내었다.

[88] 도 5a 내지 도 5c에서 확인할 수 있듯이, 크로모좀 분석을 통해 역분화 줄기세포가 정상적인 핵형을 유지하고 있는 것으로 확인하였다. 태반유래조건화 배지를 사용하여 총 3가지의 다양한 체세포에서 고효율로 확립한 역분화 줄기세포에서 특이적 마커 등을 통해 특성 및 안정성을 검증하였다.

[89]

[90] **실시예 4: 역분화 줄기세포의 분화능 확인**

[91] **4-1. 분화능 확인**

[92] 역분화된 전능성 줄기세포가 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로 분화할 수 있는 능력이 있는지 생체 외에서 배아구를 형성하여 분화능을 확인하였다. 구체적으로, 생체 외에서의 분화능을 확인하기 위하여 부착이 되지 않는 배양용기에 배아구를 2주동안 형성하고 각각 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로 분화할 수 있는지 확인하기 위해 면역형광법을 수행하였다.

[93] 구체적으로, 10분 동안 4% 파라포름알데히드로 세포를 고정시킨 후 15분 동안 0.1% 트라이톤 X100를 세포에 침투시킨 후 1시간 동안 3% 말 혈청(horse serum)이 포함된 PBS로 블로킹하였다. 그 다음, 1차 항체인 TUJ1(COVANCE #MRB-435P), Nestin(Abcam #ab22035), Desmin(Santacruz #sc-14026), AFP(Santacruz #sc-166335)를 1:1000으로 희석하여 처리하고 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날 2차 항체를 처리하여 1시간 동안 상온에서 배양하고, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)을 암조건에서 5분 동안 방치한 후 형광 현미경으로 관찰하여, 그 결과를 도 6a에 나타내었다.

[94] 도 6a에서 확인할 수 있듯이, 외배엽으로 분화된 신경 상피(Neuroepithelium)를 TUJ1과 Nestin 마커를 통해 확인하였고, 중배엽으로 분화된 연골(Cartilage)을 중배엽 마커인 Desmin으로 확인하였다. 그리고 내배엽으로 분화된 장표피(Intestinal epithelium)을 면역조직화학법을 수행하여 검증하고 생체 외 배아구가 형성된 것에서 외배엽으로 분화가 되었는지 중배엽 마커인 Desmin 및 내배엽 마커인 AFP가 발현되는 것을 면역형광법을 통해 검증하였다.

[95]

[96] **4-2. 기형종 형성 검증**

[97] 생체 내의 분화능을 확인하기 위하여, 면역이 결핍된 생쥐에서 기형종을 형성하는지 검증하였다. 구체적으로, 면역이 결핍된 생쥐의 피하조직에 역분화된 전능성 줄기세포를 1.0 X 10^6 cells 주입하여 12주 경과 후 형성된 기형종에 대하여 면역조직화학 기법을 수행하여 검증하였다.

[98] 구체적으로, 형성된 테라토마 사이즈 =1cm^3 가 되었을 때 이산화탄소 가스를 사용하여 안락사를 진행하였다. 외과적 시술을 통하여 테라토마를 적출 하고 4% 포름알데하이드에 고정시켰다. 탈수(Dehydration) 후에 자일렌에 조직을 오래 담가 클리닝 하였다. 60℃ 오븐에서 액체 파라핀 용기에 조직을 넣고 침윤하였다. 조직을 몰드에 포매하여 슬라이드 글라스에 붙여서 말린 후, 60℃ 오븐에 넣어 약

하루 정도 탈파라핀을 수행하였다. 해리스 헤마톡실린(H)을 상온에서 30초 동안 노출 시킨 에오신(E)을 1분동안 상온에서 인큐베이션하여 조직학적 분석을 진행하여, 그 결과를 도 6b 및 도 6c에 나타내었다.

[99] 도 6b 및 6c에서 확인할 수 있듯이, 면역이 결핍된 생쥐의 피하조직에서 기형종이 생성된 것을 관찰하였다. 결과적으로 생체 내 및 생체 외에서의 역분화된 전능성 줄기세포의 분화능을 확인함으로써, 인간 태반유래 조건화배지를 이용하여 역분화된 줄기세포를 원하는 세포로 분화할 수 있는 능력을 검증하였다.

산업상 이용가능성

[100] 본 발명은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지 및 이를 이용한 역분화 유도 방법에 관한 것이다.

청구범위

[청구항 1] 성장 배지에 배양한 인간 태반유래세포 배양물을 포함하는 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 태반유래세포는 인간 융모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 체세포는 OCT4, SOX2, c-Myc 및 KLF4로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산 서열로 형질변환된 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 체세포는 내피세포, 상피세포 및 태반세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

[청구항 5] 다음의 단계를 포함하는 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법:

인간 태반유래세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에서 배양하는 태반유래세포 배양 단계; 및

세포 성장 배지로부터 인간 태반유래세포 배양물을 포함하는 배양액을 수거하는 배양액 수거 단계.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 태반유래세포는 인간 융모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법.

[청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 배양액은 DMEM/F-12인 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 배양액은 혈청대체제를 추가적으로 포함하는 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법.

[청구항 9] 다음의 단계를 포함하는 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도 방법:

체세포에 OCT4, SOX2, c-Myc 및 KLF4로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 형질도입하는 체세포 형질변환 단계; 및

형질변환된 체세포를 태반유래세포 조건화 배지에 배양하는 체세포 배양 단계.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 태반유래세포는 인간 융모막판에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 체세포는 내피세포, 상피세포 및 태반세포로

이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

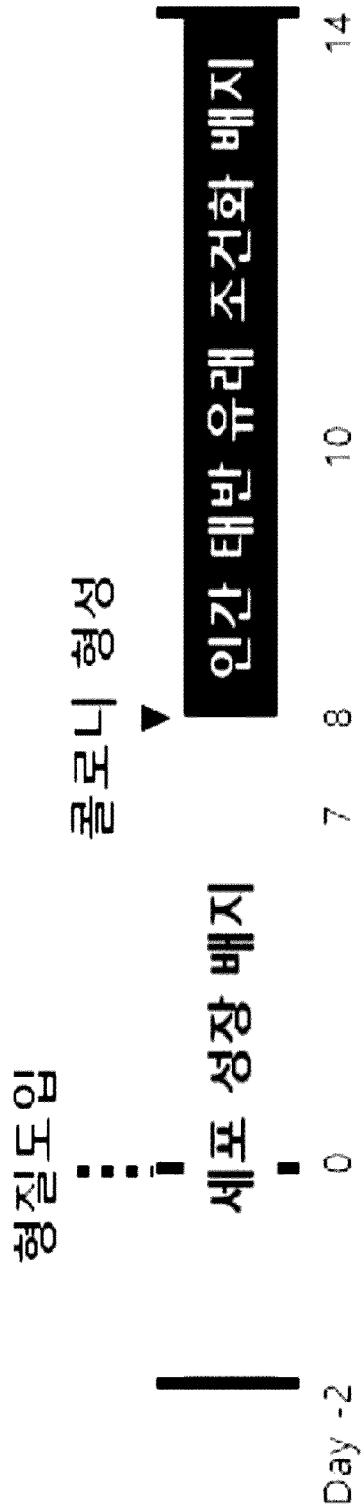
[청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 역분화 유도 방법은 체세포 배양 단계에서 형성된 콜로니로부터 줄기세포를 분리하는 줄기세포 분리 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 줄기세포 분리 단계는 줄기세포 표지 마커로 염색하여 수행되는 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

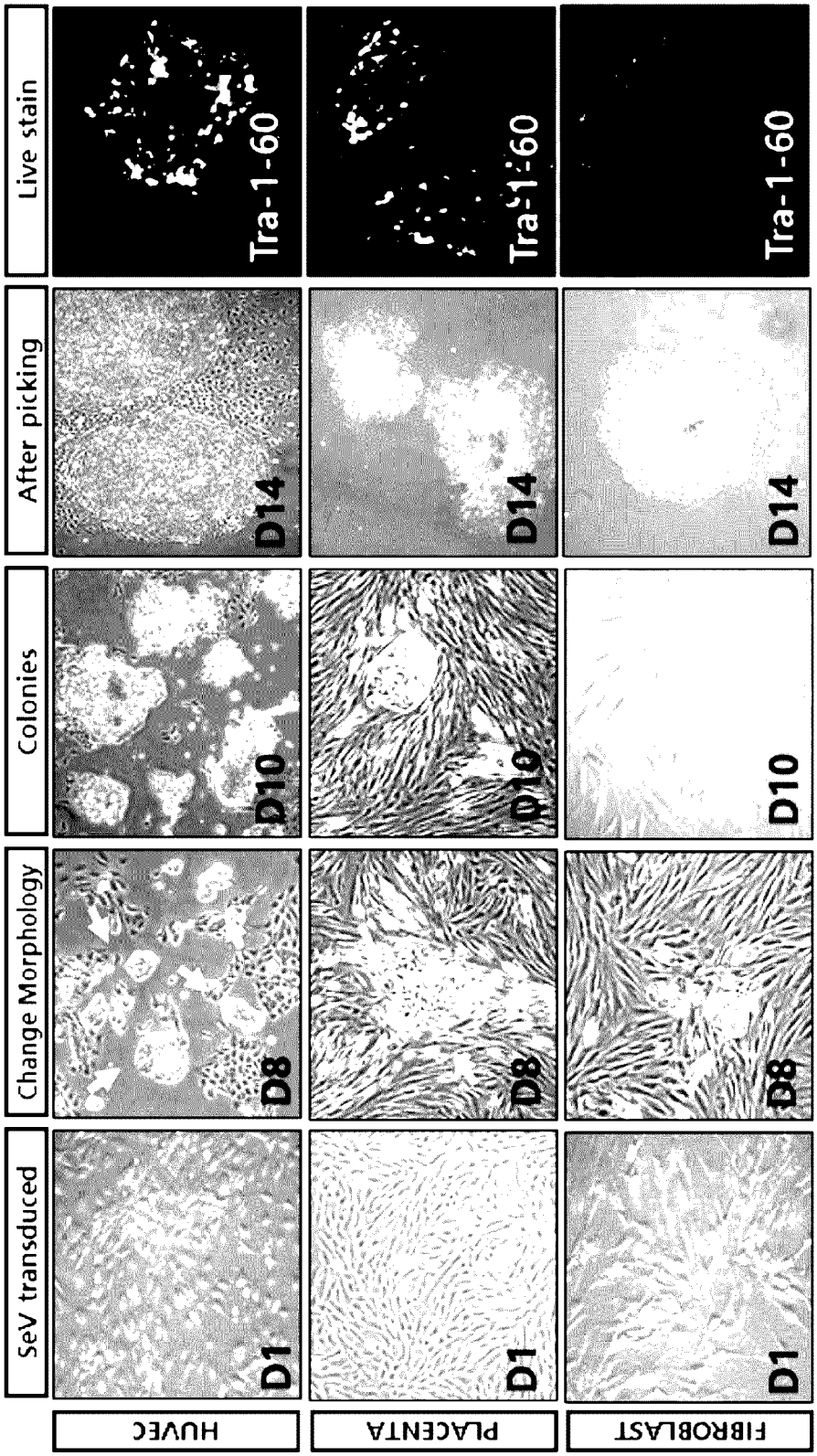
[청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 역분화 유도 방법은 콜로니로부터 분리된 줄기세포에서 OCT-4, NANOG, SSEA-4 및 Tra-81로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 단백질의 활성을 확인하는 줄기세포 활성 검증 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

[청구항 15] 제12항에 있어서, 상기 역분화 유도 방법은 콜로니로부터 분리된 줄기세포로 생체외에서 배아구를 형성하여 외배엽, 중배엽 또는 내배엽으로의 분화능을 확인하는 줄기세포 분화능 검증 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

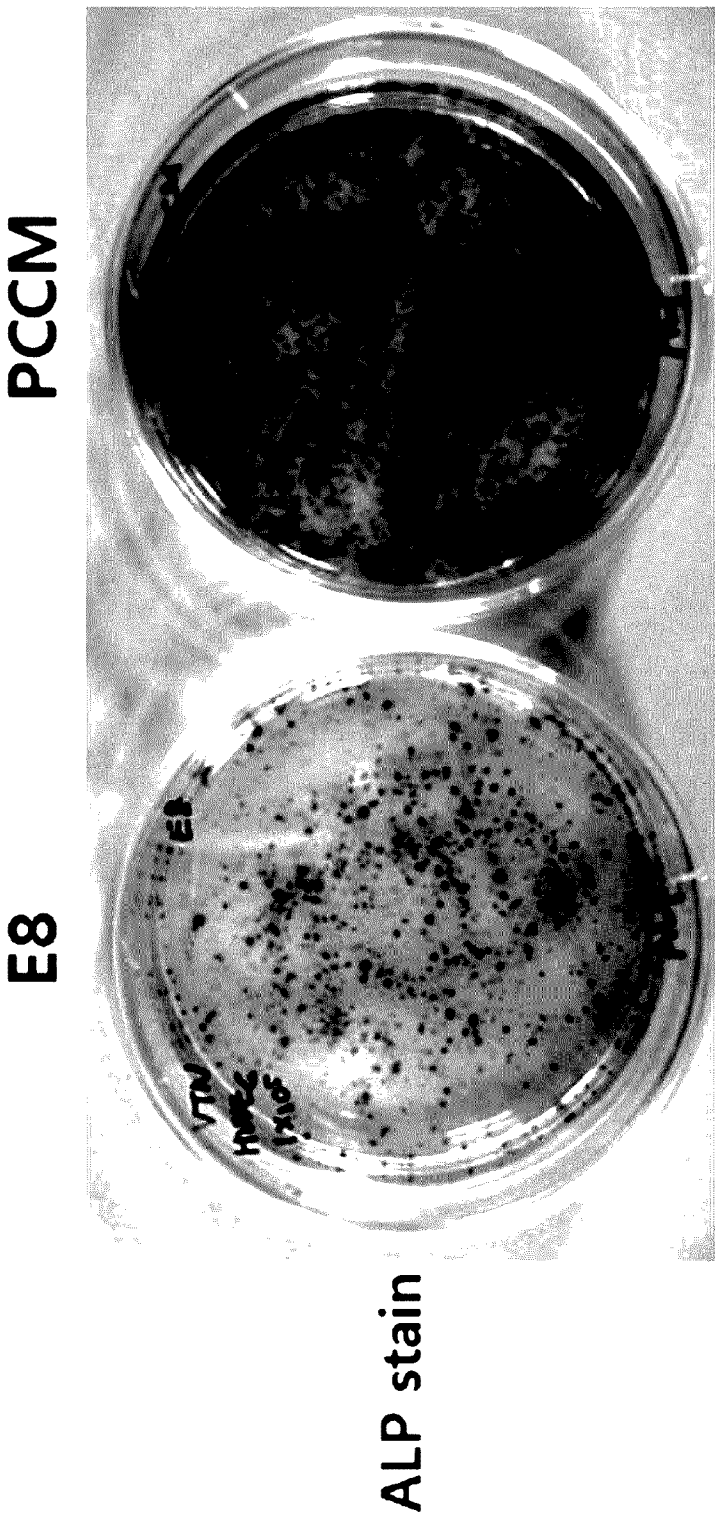
[도1]



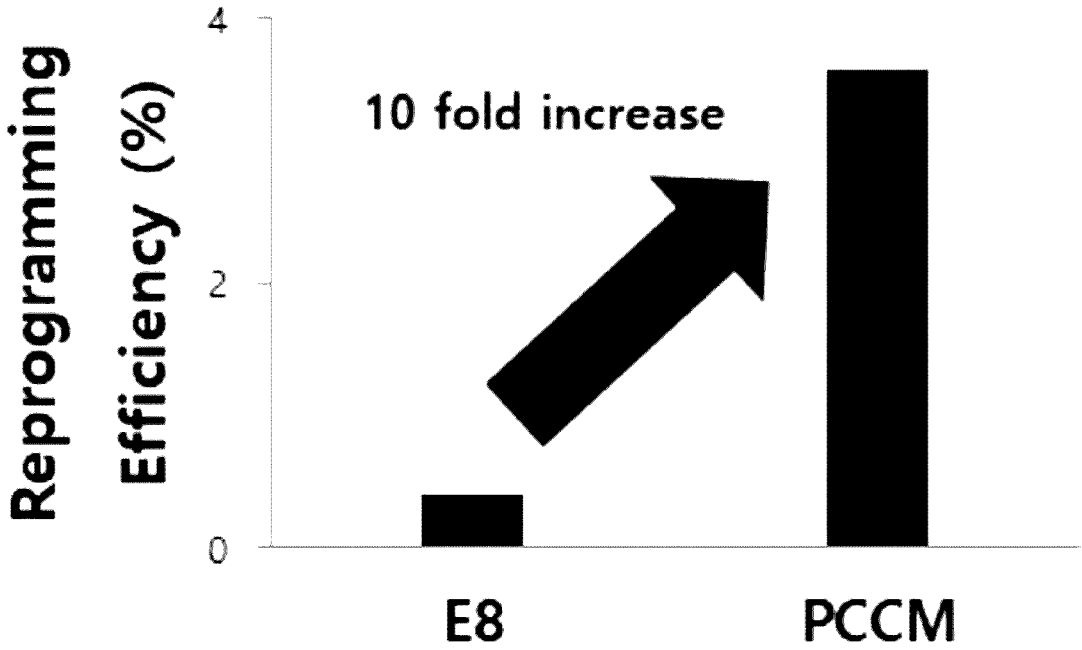
[도2]


SeV transduced
Change Morphology
Colonies
After picking
Live stain
HUVEC
PLACENTA
FIBROBLAST
D1
D8
D10
D14
Tra-1-60

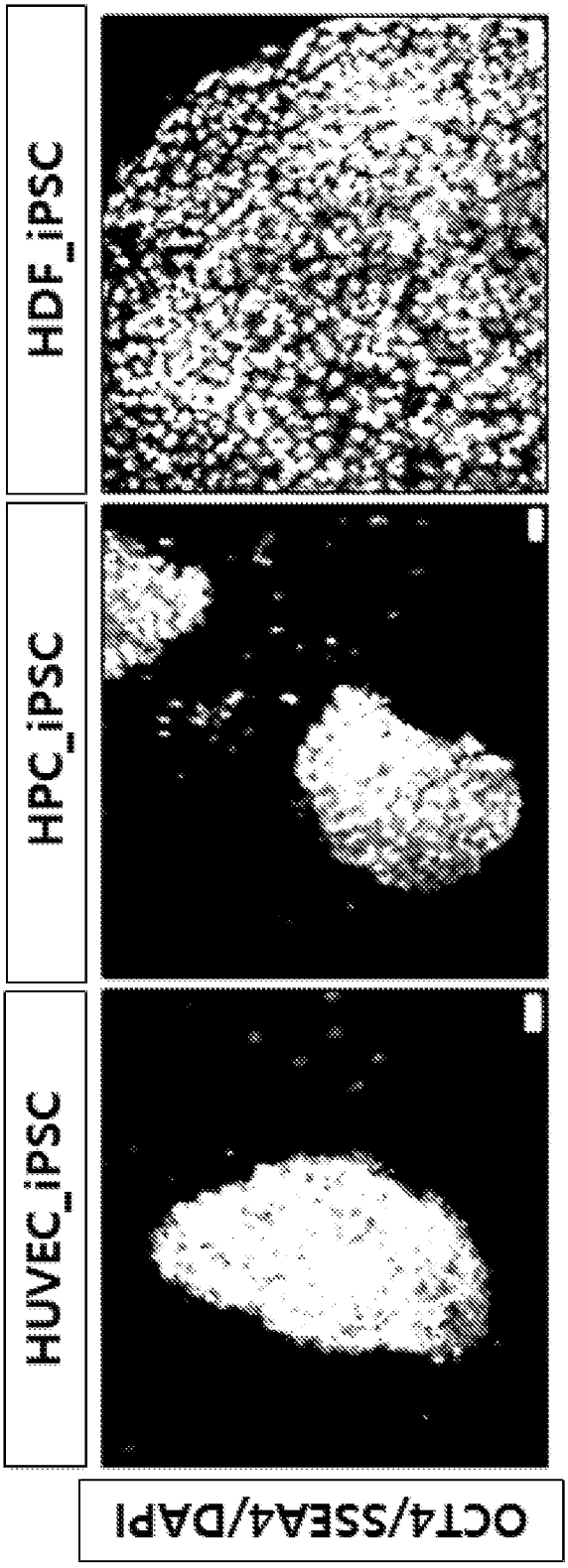
[도3a]



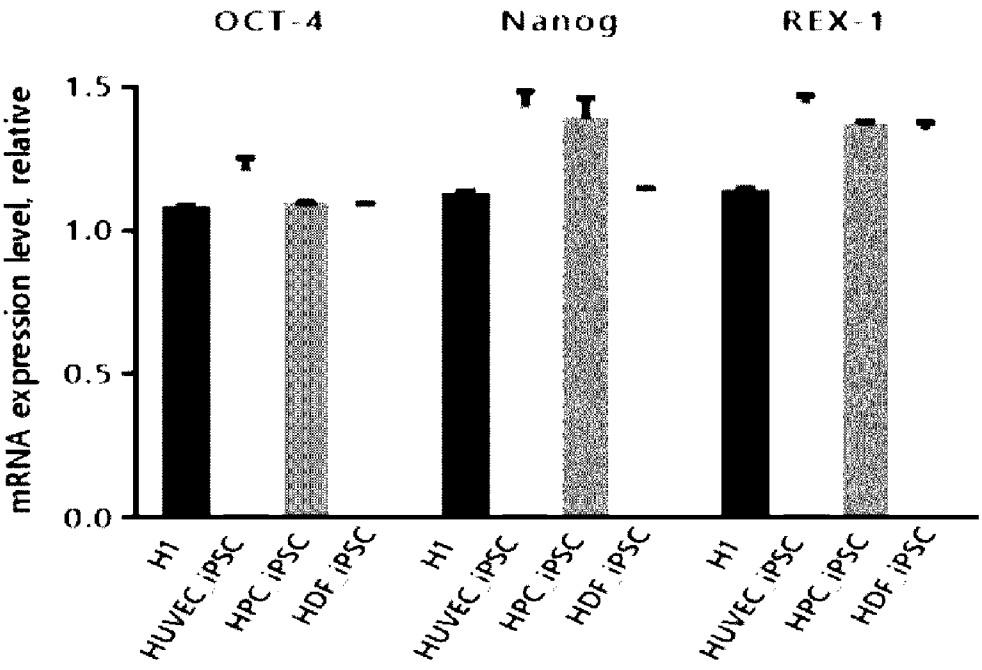
[도3b]



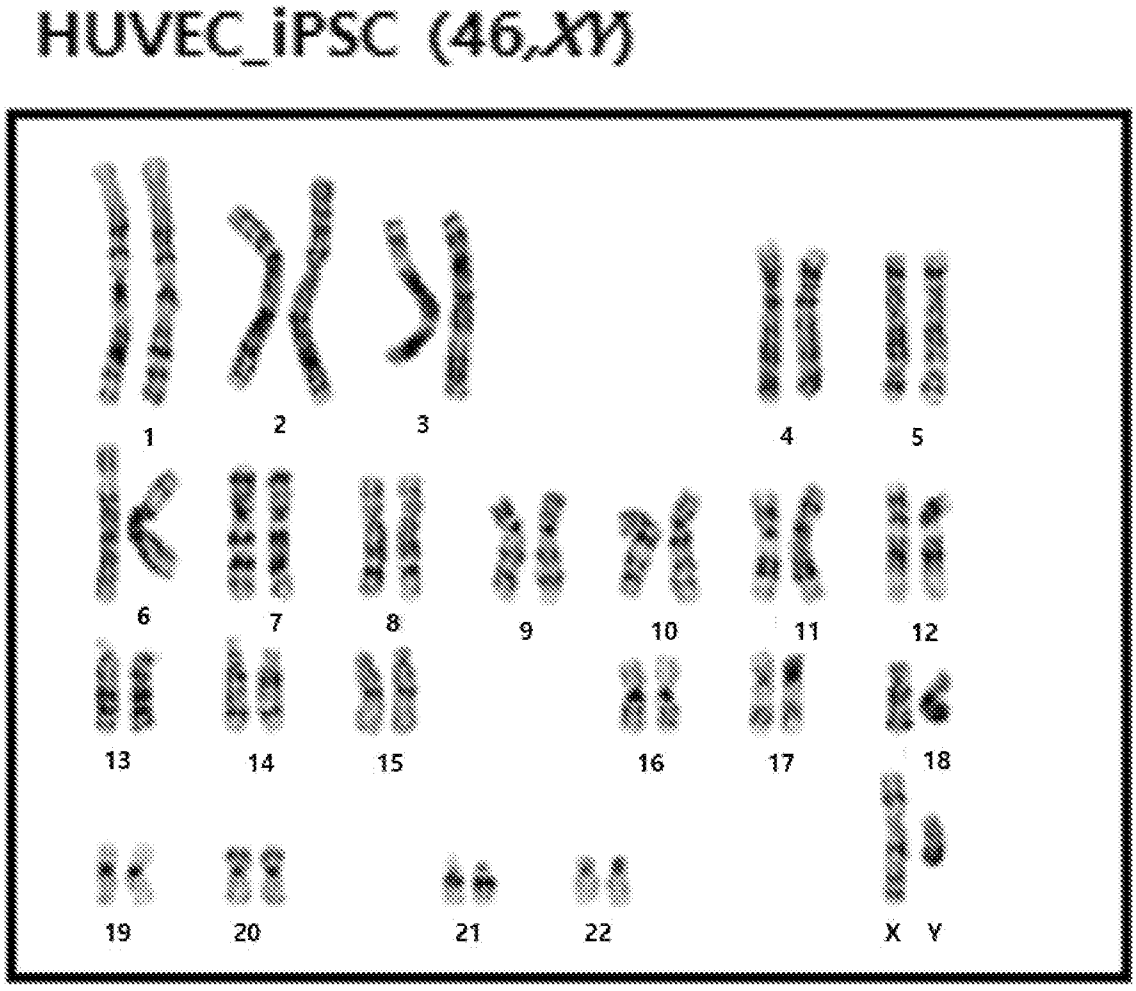
【도 4a】



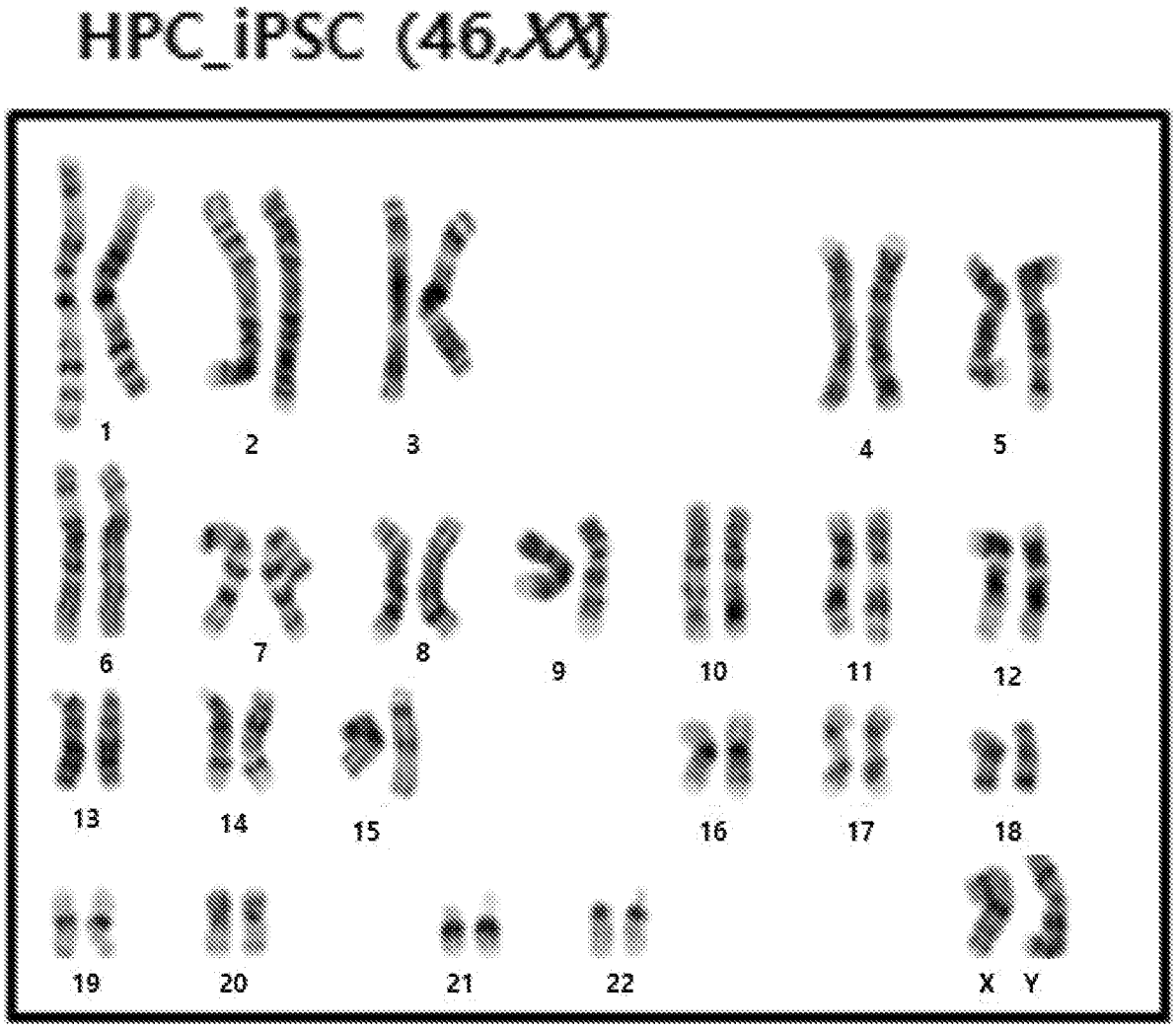
【도 4b】


OCT-4
Nanog
REX-1
mRNA expression level, relative
1.5
1.0
0.5
0.0
H1
HUVEC iPSC
HPC iPSC
HDF iPSC

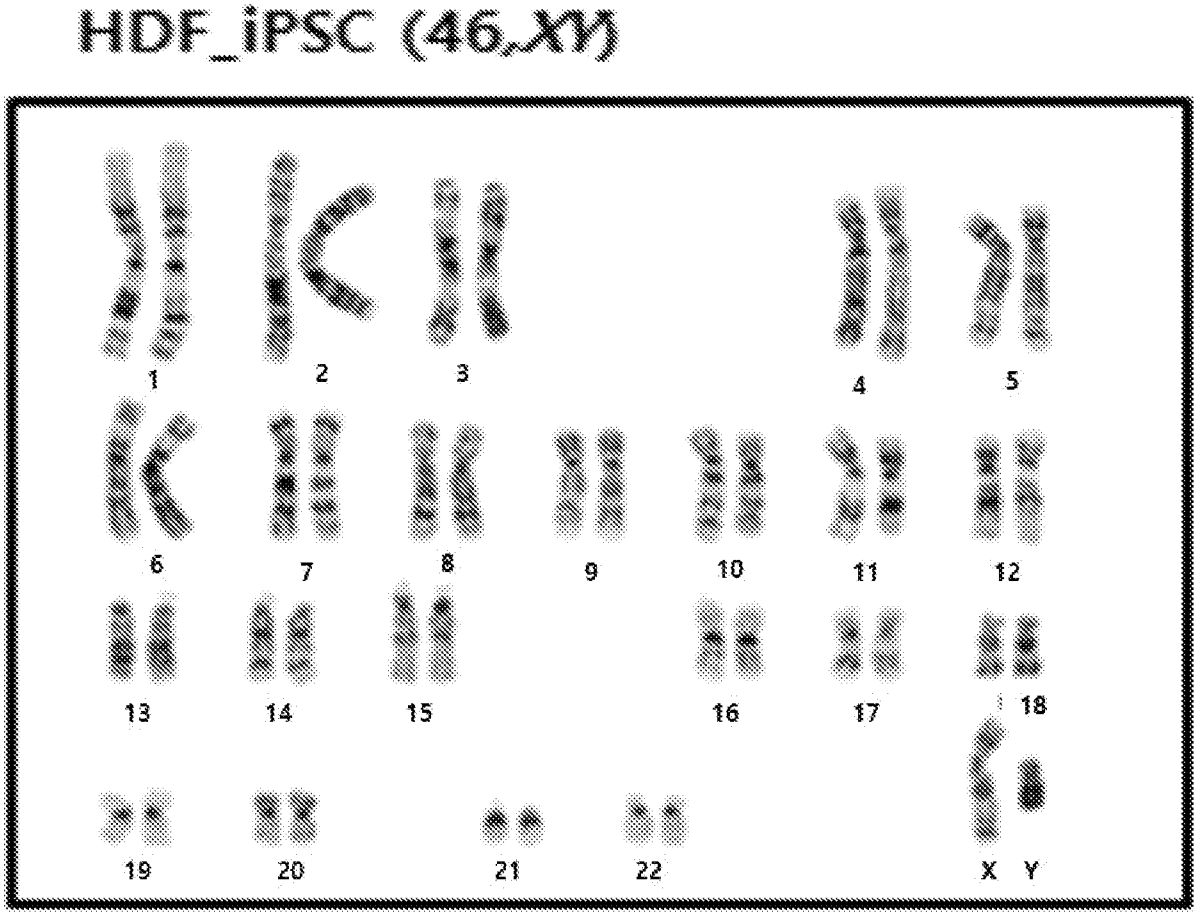
【도 5a】


HUVEC_iPSC (46,XY)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
X
Y

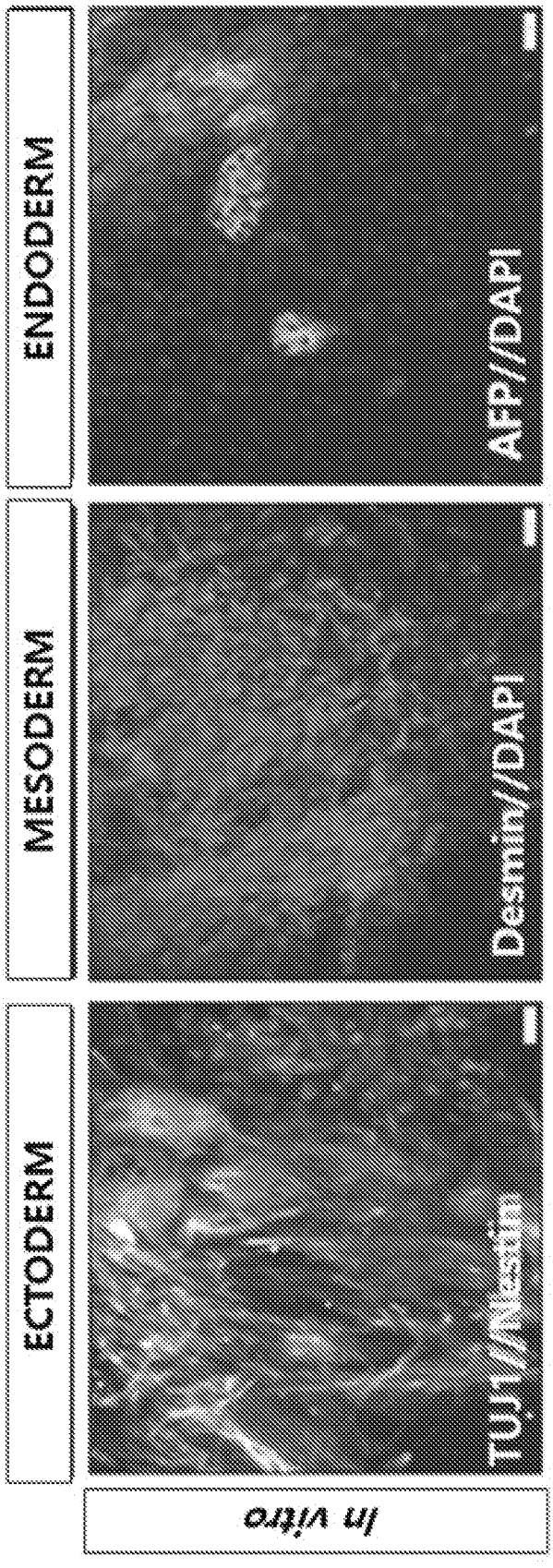
【도 5b】



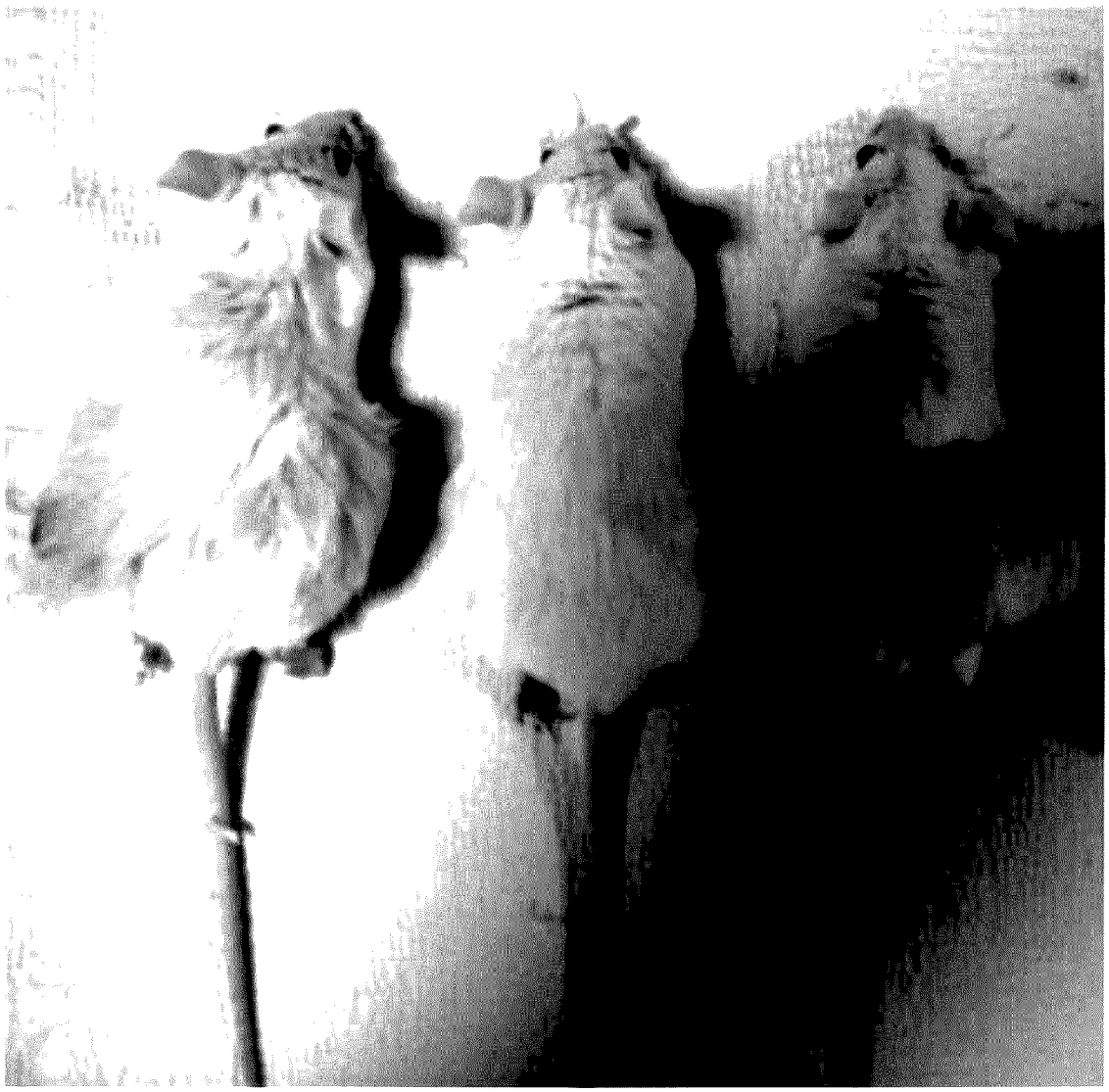
【도 5c】



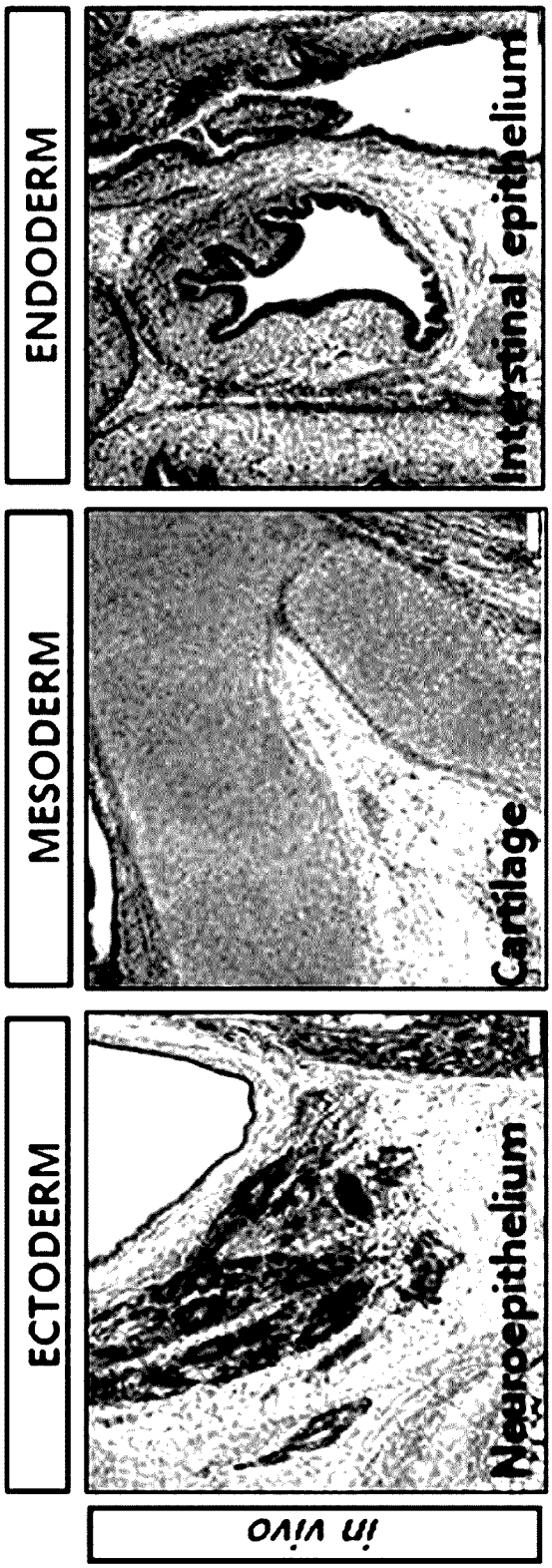
【도 6a】


ENDODERM
MESODERM
ECTODERM
AFP//DAPI
Desmin//DAPI
TUJ1//Nestin
In vitro

[도6b]



[도6c]


ENDODERM
MESODERM
ECTODERM
Intestinal epithelium
Cartilage
Neuroepithelium
in vivo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/016519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/074(2010.01)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; A61K 35/50; A61L 27/38; C12N 5/02; C12N 5/0735; C12N 5/077

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: placenta-derived cell, dedifferentiation, conditioned medium

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1395214 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 16 May 2014 See claims 1-3; paragraphs [0018]-[0019] and [0037].	1-15
A	KR 10-2009-0076989 A (ANTHROGENESIS CORPORATION) 13 July 2009 See the entire document.	1-15
A	WO 2012-008733 A2 (MARIA BIOTECH) 19 January 2012 See the entire document.	1-15
A	OLIVEIRA, M. S. et al., "Placental-derived Stem Cells: Culture, Differentiation and Challenges", World J. Stem Cells, 26 May 2015, vol. 7, no. 4, pages 769-775 See the entire document.	1-15
A	EVANGELISTA, M. et al., "Placenta-derived Stem Cells: New Hope for Cell Therapy?", Cytotechnology, 28 September 2008, vol. 58, no. 1, pages 33-42 See the entire document.	1-15

☐ 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 APRIL 2019 (22.04.2019)	**22 APRIL 2019 (22.04.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/016519

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1395214 B1	16/05/2014	KR 10-2012-0118407 A	26/10/2012
KR 10-2009-0076989 A	13/07/2009	CN 101631852 A	20/01/2010
		CN 103255098 A	21/08/2013
		CN 104099290 A	15/10/2014
		JP 2010-507392 A	11/03/2010
		JP 2013-216661 A	24/10/2013
		US 0105399 B2	23/10/2018
		US 2008-0213228 A1	04/09/2008
		US 2014-0017211 A1	16/01/2014
		US 2017-056452 A1	02/03/2017
		US 8562972 B2	22/10/2013
		US 9339520 B2	17/05/2016
		WO 2008-051568 A2	02/05/2008
		WO 2008-051568 A3	24/07/2008
WO 2012-008733 A2	19/01/2012	KR 10-2012-0006386 A	18/01/2012
		WO 2012-008733 A3	19/04/2012

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2018/016519

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/074(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 5/074; A61K 35/50; A61L 27/38; C12N 5/02; C12N 5/0735; C12N 5/077

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:태반유래세포, 역분화, 조건화 배지

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-1395214 B1 (고려대학교 산학협력단) 2014.05.16 청구항 1-3; 단락 [0018]-[0019] 및 [0037] 참조.	1-15
A	KR 10-2009-0076989 A (안트로제네시스 코포레이션) 2009.07.13 전체 문헌 참조.	1-15
A	WO 2012-008733 A2 ((주)마리아 바이오텍(MARIA BIOTECH)) 2012.01.19 전체 문헌 참조.	1-15
A	OLIVEIRA, M. S. 등, 'Placental-derived stem cells: Culture, differentiation and challenges', World J. Stem Cells, 2015.05.26, 7권, 4호, 페이지 769-775 전체 문헌 참조.	1-15
A	EVANGELISTA, M. 등, 'Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy?', Cytotechnology, 2008.09.28, 58권, 1호, 페이지 33-42 전체 문헌 참조.	1-15

☐ 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
2019년 04월 22일 (22.04.2019)	2019년 04월 22일 (22.04.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/016519

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1395214 B1	2014/05/16	KR 10-2012-0118407 A	2012/10/26
KR 10-2009-0076989 A	2009/07/13	CN 101631852 A	2010/01/20
		CN 103255098 A	2013/08/21
		CN 104099290 A	2014/10/15
		JP 2010-507392 A	2010/03/11
		JP 2013-216661 A	2013/10/24
		US 0105399 B2	2018/10/23
		US 2008-0213228 A1	2008/09/04
		US 2014-0017211 A1	2014/01/16
		US 2017-056452 A1	2017/03/02
		US 8562972 B2	2013/10/22
		US 9339520 B2	2016/05/17
		WO 2008-051568 A2	2008/05/02
		WO 2008-051568 A3	2008/07/24
WO 2012-008733 A2	2012/01/19	KR 10-2012-0006386 A	2012/01/18
		WO 2012-008733 A3	2012/04/19