

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호  
**WO 2013/137567 A1**

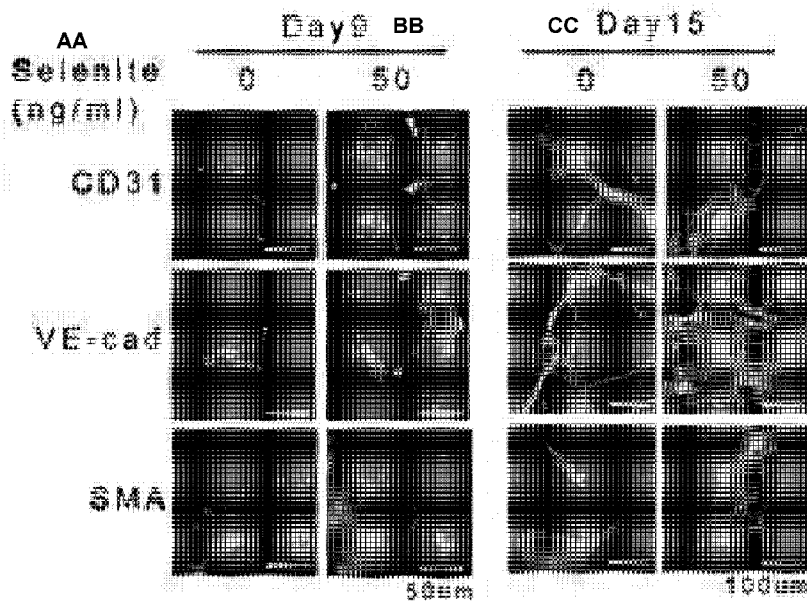
(43) 국제공개일  
2013년 9월 19일 (19.09.2013)

WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류:  
C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/074 (2010.01)  
C12N 5/02 (2006.01) C12N 5/078 (2010.01)
  - (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/001403
  - (22) 국제출원일: 2013년 2월 21일 (21.02.2013)
  - (25) 출원언어: 한국어
  - (26) 공개언어: 한국어
  - (30) 우선권정보:  
10-2012-0027285 2012년 3월 16일 (16.03.2012) KR
  - (71) 출원인: **아주대학교 산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 443-749 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5, Gyeonggi-do (KR).
  - (72) 발명자: **서원희 (SUH, Won Hee)**; 463-786 경기도 성남시 분당구 정자동 상록마을우성아파트 308동 403호, Gyeonggi-do (KR). **송선화 (SONG, Sun Hwa)**; 442-190 경기도 수원시 팔달구 우만동 516-6번지 경희빌 204호, Gyeonggi-do (KR).
  - (74) 대리인: **특허법인 이룸 (ERUUM PATENT LAW FIRM)**; 135-851 서울시 강남구 대치동 1005-8 보성빌딩 5층, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
  - (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:**
- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
  - 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DIFFERENTIATING HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS INTO BLOOD PROGENITOR CELLS, VASCULAR ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS, ENDOTHELIAL CELLS, AND SMOOTH MUSCLE CELLS USING SELENIUM

(54) 발명의 명칭 : Selenium을 이용한 인간 만능줄기세포의 혈액전구세포, 혈관전구세포, 내피세포 및 평활근세포로의 분화방법



AA ... Selenite (ng/ml) BB ... Day 9 CC ... Day 15

(57) Abstract: The present invention relates to a method for increasing the efficiency of differentiating human pluripotent stem cells into blood progenitor cells, vascular endothelial progenitor cells, vascular endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. More particularly, the present invention relates to a method for differentiating human pluripotent stem cells using a medium to which selenium is added. The present invention can enable human pluripotent stem cells to be selectively differentiated into mesenchymal stem cells, and the present invention has the remarkable effect of differentiating human pluripotent stem cells into blood progenitor cells, vascular endothelial progenitor cells, vascular endothelial cells, and vascular smooth muscle cells with high efficiency. Therefore, the present invention can be expected to significantly contribute to the development of a cell therapy for cardiovascular diseases or a cell therapy for hematodyscrasia using human pluripotent stem cells.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2013/137567 A1

---

본 발명은 인간 만능줄기세포의 혈액 및 혈관전구세포, 혈관내피세포 및 혈관평활근세포로의 분화효율을 높이는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 selenium 이 첨가된 배지를 사용하여 인간 만능줄기세포를 분화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 인간 만능줄기세포를 선택적으로 중배엽 줄기세포로 분화시킬 수 있으며, 높은 효율로 혈액전구세포, 혈관전구세포, 혈관내피세포, 및 혈관평활근세포 등으로 분화시킬 수 있는 우수한 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 인간 만능줄기세포를 이용한 심혈관계 질환 세포치료제 또는 혈액질환 세포치료제 개발에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

# 명세서

## 발명의 명칭:

S e l e n i u m

을 이용한

인간 만능줄기세포의 혈액전구세포, 혈관전구세포, 내피세포 및  
평활근세포로의 분화방법

### 기술분야

- [1] 본 발명은 selenium을 사용하여 인간 만능줄기세포를 분화시키는 방법으로, 구체적으로 인간 만능줄기세포를 효과적으로 혈액전구세포, 혈관전구세포, 혈관내피세포 및 혈관평활근세포 등으로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화될 수 있는 세포로서, 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되며, 분화가 완료되어 세포분열이 정지된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있어 증식(proliferation; expansion)하는 특성이 있으며, 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다른 세포로도 분화될 수 있어 분화에 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.
- [3] 이러한 줄기세포는 다양한 방법으로 분류할 수 있다. 그 중 가장 흔히 이용되는 방법 중 하나는 줄기세포가 분리된 개체에 따른 것으로, 배아(embryo)에서 분리된 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)와 성체에서 분리된 성체줄기세포(adult stem cell)로 나눌 수 있다. 또 다른 흔한 분류는 줄기세포의 분화능에 따른 것으로, 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cells)는 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 전분화능(pluripotency)의 세포로서 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell) 및 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC), 배아생식선세포(embryonic germ cell, EGC), 배아종양세포(embryonic carcinoma cell, ECC) 등이 이에 해당된다. 다분화능 및/또는 단분화능 줄기세포로는 성체줄기세포를 예로 들 수 있다.
- [4] 배아줄기세포는 배아발생초기인 포배기(blastocyte)의 세포내괴(inner cell mass)로부터 형성되며, 모든 세포로 분화가능한 잠재력을 가지고 있어 어떠한 조직 세포로도 분화될 수 있으며, 또한 사멸하지 않고(immortal) 미분화상태에서 배양가능하며, 성체줄기세포와 달리 배세포(germ cell)의 제조도 가능하므로 다음 세대로 유전될 수 있는 특징도 가지고 있다(Thomson et al., Science, 282:

1145-1147, 1998; Reubinoff et al., Nat. Biotechnol., 18: 399-404, 2000). 인간 배아줄기세포는 인간 배아 형성시 세포내피(inner cell mass) 만을 분리하여 배양함으로써 제조되는데, 현재 전 세계적으로 만들어진 인간 배아줄기세포는 불임시술 뒤 남은 냉동배아로부터 얻어진 것이다. 한편, 배아줄기세포에 더하여, 만능줄기세포의 개념으로 포함되고 있는 것으로 유도만능줄기세포(iPSC)가 있다. 유도만능줄기세포(iPSC)는 분화가 끝난 성체세포를 여러 가지 방법으로 역분화시켜, 분화 초기 단계인 배아줄기세포로의 상태로 회귀시킨 세포이다. 현재까지 역분화 세포는 유전자 발현과 분화능에서 만능줄기세포인 배아줄기세포와 거의 동일한 성격을 나타내는 것으로 보고되어 있다.

[5] 상기에서 살펴본 바와 같이, 인간 만능줄기세포는 끊임없이 증식하여 일정한 수를 유지하려는 자가재생산능력(self-renewal)과 함께 거의 모든 체세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency)을 가지고 있어, 인간 만능줄기세포 연구는 발생학, 재생의학, 및 신약개발 등 여러 학술분야에서 급진적인 진보를 가져올 것으로 예상되고 있으며, 인간 만능줄기세포를 원하는 세포로 분화하여 당뇨병, 신경계 질환, 심혈관계 질환 등의 여러 난치병 환자에 세포치료제로 사용될 수 있다는 면에서 매우 활용가치가 높다. 특히, 허혈성 심혈관계 질환을 가진 인구가 늘어나고, 기존의 수술이나 약물 치료에 부적응하는 환자를 위해 성체줄기세포를 이용한 세포치료법이 연구되고 있으나, 충분한 수의 성체줄기세포를 확보하는데 어려움을 겪고 있다. 이에 성체줄기세포보다 자가증식능력과 분화능력이 뛰어난 인간 만능줄기세포를 혈관내피세포로 분화하여 치료에 활용하고자 하는 노력이 활발하게 진행되고 있다.

[6] 인간 만능줄기세포를 심혈관계 질환 세포치료제로 실용화하기 위해서는 우선 환자이식에 필요한 충분한 수의 분화된 세포를 확보하여야 하는데, 이를 위해서는 인간 만능줄기세포를 혈관전구세포 혹은 혈관내피 및 평활근세포로 효과적으로 분화 유도하는 기술이 필수적이다.

[7] 이와 관련하여, 마우스 유래 골수 기질 세포(stromal cell)와의 공배양을 이용하거나, 소혈청(fetal bovine serum; FBS) 혹은 인간재조합 성장인자/사이토카인을 이용하여 인간 배아줄기세포를 혈관내피세포로 분화하는 방법이 보고된 바 있다. 이 중 마우스 유래 골수 기질과의 공배양을 이용한 분화법은, 마우스 골수 유래의 기질 세포를 지지층(feeder layer)으로 사용하여 인간 배아줄기세포와 10% FBS 배양액 조건하에 공배양한 다음 KDR 양성 세포를 분리하는 방법으로, 분리한 KDR 양성 세포는 10% FBS와 VEGF(vascular endothelial growth factor A)가 함유된 배양액에서 더 분화시켜 혈관내피세포를 얻게 된다(Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Nonoguchi A, Suzuki Y, Chao TH, Sawada N, Fukunaga Y, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Kondo Y, Nito S, Suemori H, Nakatsuji N, Nishikawa S, Nakao

- K. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Oct;27(10):2127-34).
- [8] 또한, 2007년 MIT의 Robert Langer 연구팀은 소혈청을 이용하여 인간 배아줄기세포를 혈관세포로 분화유도하는 방법을 보고하였다. 상기 방법은 인간 배아줄기세포의 3차원적 배상체(embryonic body: EB)를 만든 후, 배상체를 20% FBS가 첨가된 배양액에서 12일 간 배양하고, 유세포 분석기를 이용하여 CD34 양성 세포를 분리한 후 혈관내피세포로의 분화를 위해 5% FBS가 첨가된 EGM-2 (endothelial growth medium-2)에서 10일에서 15일 더 배양하여 CD31 양성 혈관내피세포를 얻는 방법이다(Vascular Progenitor cells isolated from human embryonic stem cells give rise to endothelial and smooth muscle-like cells and form vascular networks in vivo. Ferreira LS, Gerecht S, Shieh HF, Watson N, Rupnick MA, Dallabrida SM, Vunjak-Novakovic G, Langer R. *Circulation Research* 2007;101:286-94).
- [9] 이에 더하여, 2007년 Scadden 연구팀은 3차원적인 배상체 대신 인간 배아줄기세포를 2차원적 단일층(monolayer)으로 배양하여 혈관내피세포로 분화하는 방법을 보고하였다. 상기 방법 역시 15% FBS를 이용하여 CD34 양성 세포로 분화한 뒤 5% FBS가 첨가된 EGM-2에서 7-10일 배양함으로써 CD31 양성 혈관내피세포의 분화를 유도하였다(endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels in vivo. Wang ZZ, Au P, Chen T, Shao Y, Daheron LM, Bai H, Arzigian M, Fukumura D, Jain RK, Scadden DT. *Nature Biotechnology* 2007;25:317-8).
- [10] 상기에서 살펴본 바와 같이, 인간 배아줄기세포를 혈관세포로 분화시키는 종래의 방법은 소혈청 혹은 동물유래 세포와의 공배양을 이용하고 있어 인간 배아줄기세포에서 분화된 혈관내피세포를 임상 적용함에 있어 동물 유래 병원균체(pathogen)에 의한 오염(예를 들어, 세균 및 바이러스 감염 가능성) 및 그로 인한 환자의 면역반응 등을 초래할 수 있는 문제점이 존재한다.
- [11] 상기 문제점을 극복하기 위해 최근에는 혈청 및 동물 유래원이 포함되지 않는 새로운 분화방법의 연구가 활발히 진행되고 있다. 구체적으로, 혈관세포로의 분화에 필요한 인간 재조합 성장인자/사이토카인, 특히 인간 재조합 VEGF-A(human recombinant vascular endothelial growth factor A), 인간 재조합 BMP-4(human recombinant bone morphogenic protein-4), 인간 재조합 bFGF(human recombinant basic fibroblast growth factor), 또는 인간 재조합 악티빈 A(human recombinant Activin A)를 포함하는 무-혈청(serum free) 및 무-이종(異種)물질(xeno-free) 배지를 이용하여 임상적용시의 안전성을 확보하고자 하였다.
- [12] 그러나 인간 만능줄기세포에서 분화된 혈관세포를 심혈관계 질환 세포치료제로 실용화하기 위해서는 현재까지 개발된 분화법을 개선함으로써 분화효율을 높여 환자이식에 필요한 충분한 수의 분화된 세포를 확보하는 것이 가장 중요하다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [13] 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 혈청 및 동물 유래 물질 또는 동물 유래 세포를 사용하지 않는 혈관내피세포 분화방법의 효율을 개선하는 기술을 개발하고자 다양한 연구를 수행하였으며, 그 결과 selenium을 포함하는 인간 재조합 성장인자/사이토카인 배지를 사용하여 인간 만능줄기세포를 높은 효율의 혈액전구, 혈관전구, 혈관내피 및 혈관평활근 세포로 분화시킬 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [14] 따라서, 본 발명은 selenium이 첨가된 인간 재조합 성장인자/사이토카인 분화배지를 이용하여 인간 만능줄기세포를 선택적으로 중배엽으로 분화하여 혈액 및 혈관전구세포 혹은 혈관내피 및 평활근세포로의 분화효율을 증가시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [15] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제 해결 수단

- [16] 본 발명은 selenium (셀레늄)을 포함하는 배지를 사용하여 인간 만능줄기세포를 중배엽 줄기세포로 분화시키는 방법을 제공한다. 본 발명에서 사용되는 인간만능줄기세포는 인간 배아줄기세포, 인간 유도만능줄기세포, 배아생식세포, 및 배아중양세포를 포함한다.
- [17] 본 발명의 일 구현예로 상기 중배엽 줄기세포는 혈액전구세포, 혈관전구세포, 혈관내피세포 및 혈관평활근 세포 등으로 분화될 수 있다.
- [18] 본 발명의 다른 구현예로 상기 배지는 인간 재조합 성장인자 또는 사이토카인을 추가적으로 함유할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 인간 재조합 성장인자 또는 사이토카인에는 제한이 없으나, 인간 재조합 BMP-4, 인간 재조합 bFGF 및/또는 인간 재조합 VEGF를 포함할 수 있다.

### 발명의 효과

- [19] 본 발명의 방법에 따른 selenium을 포함하는 분화 배지를 사용할 경우, 인간 만능줄기세포를 선택적으로 중배엽 줄기세포로 분화시킬 수 있는 효과가 있으며, 궁극적으로 높은 효율로 혈액전구세포, 혈관전구세포, 혈관내피세포, 및 혈관평활근세포 등으로 분화시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 인간 배아줄기세포의 분화 과정 중 selenium 처리하지 않은 군(흰색)과 처리한 군(검은색: selenium 20 ng/ml, 회색: selenium 50 ng/ml)에서 세포의 유전자 발현 양상을 분석한 결과로서, 분화 전(H9), 분화 후 각각 8일, 15일 경과한 세포의 유전자 발현을 실시간 RT-PCR한 결과를 나타낸 것이다(A: 미분화 인간 배아줄기세포 마커 유전자, B: 중배엽 특이 마커 유전자, C: 내배엽 특이 마커

- 유전자, D: 외배엽 특이 마커 유전자).
- [21] 도 2는 인간 배아줄기세포의 분화 과정 중 selenium 처리하지 않은 군과 처리한 군(50 ng/ml)에서의 세포 분화를 면역형광염색법으로 분석한 결과로서, 분화 후 각각 9일 및 15일 경과한 세포의 중배엽, 내배엽, 외배엽으로의 분화 결과를 나타낸 것이다(CD34: 중배엽 마커, AFP(a-fetoprotein): 내배엽 마커,  $\beta$  III-tubulin: 외배엽 마커).
- [22] 도 3은 인간 배아줄기세포의 분화 과정 중 selenium 처리하지 않은 군(흰색)과 처리한 군(검은색: selenium 20 ng/ml, 회색: selenium 50 ng/ml)에서 세포의 유전자 발현 양상을 분석한 결과로서, 분화 전(H9), 분화 후 각각 8일, 15일 경과한 세포의 유전자 발현을 실시간 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 것이다. EC(endothelial cell)와 SMC(smooth muscle cell)은 각각 혈관내피세포와 혈관평활근세포 특이 유전자 발현 확인을 위한 양성 대조군으로 사용하였다(A: 혈관내피세포 특이 마커 유전자, B: 혈관평활근세포 특이 마커 유전자).
- [23] 도 4는 인간 배아줄기세포의 분화 과정 중 selenium 처리하지 않은 군과 처리한 군(50 ng/ml)에서 혈관내피세포 및 혈관평활근세포로의 분화를 보여주는 면역형광염색 결과이다(혈관내피세포 특이 마커: CD31, VE-cad, 혈관평활근세포 특이 마커: SMA).
- [24] 도 5는 인간 배아줄기세포의 분화 과정 중 selenium 처리하지 않은 군과 처리한 군(20 or 50 ng/ml)에서 인간 배아줄기세포의 혈관전구 및 혈관내피세포로의 분화 양상을 유세포 분석방법으로 분석한 결과를 나타낸 것이다. 인간 배아줄기세포에서 분화 15일 경과 후 회수한 세포를 CD31(혈관내피세포 특이 마커) 및 CD34(혈관전구세포 특이 마커) 항체와 반응시켜 유세포 분석을 실시하였다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 본 발명에서 사용된 용어 '줄기세포'는 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 마스터 세포를 지칭한다. 줄기세포는 발달 가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 2개의 딸줄기세포, 또는 하나의 딸줄기세포와 하나의 유래('전이(transit)') 세포로 분열될 수 있으며, 이후에 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다. 본 발명에서 사용된 용어 '만능줄기세포'는 생체를 구성하는 3가지 배엽(germ layer), 즉 내배엽(endoderm), 중배엽(mesoderm), 외배엽(ectoderm) 모두로 분화할 수 있는 만능성을 지닌 줄기세포를 지칭하며, 일반적으로 배아줄기세포와 유도만능줄기세포, 배아생식세포, 배아중양세포가 이에 해당된다.
- [26] 본 발명에서 사용된 용어 '배아줄기세포'는 수정 후 발생 초기인 배반포기(blastocyst)의 내부세포덩어리(세포내괴, inner cell mass)에서 분리하여 배양한 세포로 만능성(pluripotency)을 지니는 세포를 지칭한다. 본 발명에서 사용된 용어 '성체세포'는 배아세포와 반대되는 용어로, 태어나서 생존하는

성체로부터 유래한 세포를 지칭한다. 본 발명에서 사용된 용어 ‘유도만능줄기세포(iPSC)’는 이미 분화가 완성된 성체세포들에 대하여 인위적으로 역분화과정 (재프로그래밍)을 수행하여 유도된 세포들로 만능분화능(pluripotency)을 가진다. 본 발명에서 사용된 용어 ‘배아생식세포’는 태아의 생식용기(gonadal ridge) 부위에서 발생하는 원시생식세포(primordial germ cell)로부터 유도된 세포를 지칭하며 배아줄기세포와 유사한 특징을 갖으나 배아줄기세포보다는 약한 분화능력과 분열능력을 지닌다. 본 발명에서 사용된 용어 ‘배아종양세포’는 원시생식세포(primordial germ cell)의 종양화에 의하여 형성된 악성종양(teratocarcinomas)으로부터 확립된 미분화 줄기세포로서 배아줄기세포가 확립되기 전에 다분화능 연구의 주재료로 사용되었다. 배아종양세포는 비록 염색체 이상 등의 문제점을 지니고 있지만 전분화능을 지니고 있다.

- [27] 본 발명에서 사용된 용어 "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화되는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다. 일반적으로 비교적 단순한 계(系)가 둘 이상의 질적으로 다른 부분계(部分系)로 분리되는 현상이다. 예를 들면, 개체발생에서 처음에 동질적이었던 알 부분 사이에 머리카락 몸통 등의 구별이 생기거나 세포에도 근세포라든가 신경세포 등의 구별이 생기는 것과 같이 처음에 거의 동질적이었던 어떤 생물계의 부분 사이에 질적인 차이가 생기는 것, 또는 그 결과로서 질적으로 구별할 수 있는 부역 또는 부분계로 나누어져 있는 상태를 분화라고 한다.
- [28] 본 발명에서 사용된 용어 ‘세포 치료제’는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포 치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포 치료제 및 줄기세포 치료제로 분류된다.

[29]

- [30] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하고자 한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[31]

[32] [실시예]

[33] 실시예 1. selenium 포함 배지를 이용한 인간 만능줄기세포의 분화

[34] <단계 I>

[35] 미분화 상태의 인간 배아줄기세포(H9, WiCell, USA)를 세포 박리액(ReproCell,

Japan)을 이용하여 공지의 방법(Takahashi K et al. Cell (2007) 131, 861-872)에 따라 배상체를 형성시켰다.

- [36] 상기로부터 얻은 배상체를 인간 재조합 BMP-4(10 ng/ml, Prospec), 인간 재조합 bFGF(5 ng/ml, Prospec), 인간 재조합 VEGF(10 ng/ml, R&D), sodium selenite(20-50 ng/ml, Sigma), 및 10% 혈청 대체물(Knockout™ Serum Replacement xenofree, Gibco)로 보충된 DMEM/F12 (Gibco, 조성:

<http://www.atcc.org/Portals/1/Pdf/30-2006.pdf>)에 8일 동안 저 산소 분압 상태(3% 산소농도) 조건에서 부유 배양하였다. 대조군의 경우 sodium selenite를 배지에 첨가하지 않은 동일한 조건에서 분화시켰다.

[37]

[38] <단계 II>

- [39] 상기 단계 I에서 분화시킨 배상체를 파이펫(pipet)을 사용하여 배양접시로 옮기고, 접시바닥에 붙인 후, 인간 재조합 BMP-4(20 ng/ml, Prospec), 인간 재조합 bFGF(5 ng/ml, Prospec), 인간 재조합 VEGF(50 ng/ml, R&D), sodium selenite(20-50 ng/ml, Sigma)로 보충된 EBM-2(endothelial cell Basal Medium-2, Lonza)에 정상 산소 분압 상태(즉, 20% 산소농도)에서 추가로 7일 동안 배양시켰다. 대조군의 경우 sodium selenite를 배지에 첨가하지 않은 동일한 조건에서 분화시켰다.

[40]

[41] 실시예 2. selenium 처리에 의한 중배엽 관련 유전자 발현 증가 확인

- [42] 상기 실시예 1로부터 각각 분화 8일, 15일 경과 후 세포를 회수하여, 실시간 RT-PCR을 통하여 외배엽, 내배엽, 중배엽으로의 분화 양상을 조사하였다.

- [43] 구체적으로, Trizol(Invitrogen)을 이용하여 상기 세포의 RNA를 추출하고, 유전자들의 발현을 실시간(Real-time) PCR 법을 이용하여 관찰하였다. 이를 위해 우선 1 µg의 RNA를 Superscript first-strand synthesis system(Invitrogen)를 통해 cDNA로 합성하고, 각 유전자의 프라이머 및 Real time PCR SYBR-Green PCR master mix (Applied Biosystems)를 이용하여 증폭된 유전자 발현을 Step One Plus™ Real-time PCR system(Applied Biosystems)으로 측정하였으며, 그 결과로도 1에 나타내었다.

- [44] 이때, 사용된 프라이머는 하기 표 1과 같다.

- [45] 표 1

[Table 1]

표지인자	서열	서열번호	
Oct4	forward	5'-gacaggggggaggggaggagctagg-3'	1
	reverse	5'-cttcctccaaccagttgccccaaac-3'	2
Nanog	forward	5'-tttgaagctgctggggaag-3'	3
	reverse	5'-gatgggaggaggggagagga-3'	4
Brachyury	forward	5'-accagttcatagcggtagc-3'	5
	reverse	5'-ccattgggagtaccagggtt-3'	6
Mesp1	forward	5'-ctcgtctcgtccccagactc-3'	7
	reverse	5'-gcagtttctcccgtcactg-3'	8
CD34	forward	5'-tggaccgcgctttgct-3'	9
	reverse	5'-ccctgggtaggtaactctggg-3'	10
Sox17	forward	5'-cgctttcatggtgtgggctaaggacg-3'	11
	reverse	5'-tagttgggggtgtcctgcatgtgctg-3'	12
Gata6	forward	5'-taattccattccatgactc-3'	13
	reverse	5'-cctatgtagagcccatcttg-3'	14
Pax6	forward	5'-tgtccaacggatgtgtgagt-3'	15
	reverse	5'-tttccaagcaagagtggac-3'	16
Nestin	forward	5'-cctgtcagaagaatttgagg-3'	17
	reverse	5'-actttctcctcatctgcaa-3'	18
CD31	forward	5'-aggtgttggtggaaggagtg-3'	19
	reverse	5'-cgtgtagttgccactgtgct-3'	20
VEcadherin	forward	5'-cggtcaaactgccatactt-3'	21
	reverse	5'-cagcccaaagtgtgtgagaa-3'	22
SMA	forward	5'-agaacatggcatcatcacca-3'	23
	reverse	5'-tacatggctgggacattgaa-3'	24
Myocardin	forward	5'-ctgctgtaaagtccaaatcc-3'	25
	reverse	5'-taggtagctgaatcggtgtt-3'	26
GAPDH	forward	5'-aagggtcatcatctctgcc-3'	27
	reverse	5'-gtgatggcatggactgtggt-3'	28

[46]

[47] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 미분화 인간 배아줄기세포(H9)와 비교시 분화 과정 중에 미분화 줄기세포의 마커인 Oct4 및 Nanog 유전자의 발현이 현저히 감소하였고, 반면에 외배엽(Pax6, Nestin), 중배엽(Brachyury, Mesp1, CD34), 내배엽(Sox17, Gata6) 마커인 다양한 유전자의 발현이 증가됨을 확인할 수 있다. 특히, 분화 중 selenium을 포함하는 배지를 사용한 경우 외배엽 및 내배엽에 비하여 중배엽 마커 유전자의 발현이 현저히 증가함을 알 수 있다.

[48]

[49] 실시예 3. selenium 처리에 의한 인간 만능줄기세포의 중배엽 전구세포로의 선택적 분화확인

[50] Selenium이 인간 만능줄기세포의 중배엽 분화를 선택적으로 증가시킨다는 것을 검증하기 위하여, 분화 9일째 및 15일째 세포에 CD34, alpha-fetoprotein(AFP), 혹은 bIII-tubulin 항체를 이용한 면역형광염색을 실시하였다.

[51] 구체적으로, 상기 실시예 1로부터 얻은 분화된 세포를 4% 파라포름알데히드에 10분간 고정하고, 0.5% Triton X-100에서 10분 동안 반응시켰다. 10% 염소 혈청(goat serum)이 들어있는 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 30분 동안 블로킹(blocking)하고, CD31, VE-cadherin, SMA, CD34, AFP, 혹은 bIII-tubulin 1차 항체를 4 °C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS로 세척하고 형광이 표지된 2차 항체와 상온에서 약 2시간 동안 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 마지막으로 4,6-디아미노-2-페닐인돌 (DAPI)로 핵을 염색한 후 Nikon ECLIPSE Ti-U inverted microscope(Nikon Instruments Inc.)을 이용하여 관찰하였다.

[52] 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, selenium 처리에 의해서 CD34(혈액 및 혈관전구세포 특이 마커) 양성 세포의 수가 현저히 증가함을 관찰할 수 있었으며, 반면, selenium 처리에 의해서 AFP(내배엽 세포 마커) 양성 혹은 bIII-tubulin(외배엽 세포 마커) 양성 세포의 수는 증가하지 않는다는 것을 알 수 있다.

[53] 상기 결과는 인간 만능줄기세포가 CD34 양성 세포가 포함된 중배엽 세포로 선택적으로 분화하는 것이 selenium에 의하여 촉진됨을 의미한다.

[54]

[55] 실시예 4. selenium 처리에 의한 인간 만능줄기세포의 혈관내피 및 혈관평활근세포로의 유전자 발현 촉진 확인

[56] 상기 실시예 1로부터 얻은 분화 8일 및 15일 경과 후의 세포를 회수하여, 실시간 RT-PCR을 통하여 혈관내피세포 및 혈관평활근세포로의 분화 양상을 조사하였다. RT-PCR 방법은 상기 실시예 2의 방법과 동일하게 수행하였다.

[57] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 미분화 인간 배아줄기세포(H9)와 비교시 분화 과정 중에 혈관내피세포 특이 마커인 PECAM(CD31) 및 VE-cadherin 유전자

발현뿐만 아니라, 혈관평활근세포의 특이 마커인 SMA 및 Myocardin 유전자의 발현도 증가함을 확인할 수 있다.

[58] 특히, 분화 중 selenium을 포함하는 배지를 사용한 경우 분화 15일 경과 후에 PECAM, VE-cadherin, SMA, 및 Myocardin 유전자의 발현이 selenium이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 현저히 증가함을 알 수 있다.

[59]

[60] 실시예 5. selenium 처리에 의한 인간 만능줄기세포의 혈관내피 및 혈관평활근세포로의 선택적 분화 촉진 확인

[61] Selenium이 인간 만능줄기세포의 혈관내피 및 혈관평활근세포로의 분화를 선택적으로 증가시킨다는 것을 검증하기 위하여, 분화 9일째 및 15일째 세포에 CD31, VE-cadherin, 혹은 SMA 항체를 이용한 면역형광염색을 실시하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[62] 그 결과, selenium (50 ng/ml) 처리에 의해서 CD31 및 VE-cadherin(혈관내피세포 특이 마커) 양성 세포의 수가 현저히 증가하였으며, selenium(50 ng/ml) 처리에 의해서 SMA(혈관평활근세포 특이 마커) 양성 세포의 수도 현저히 증가하였다.

[63] 상기 결과로부터, selenium에 의하여 인간 만능줄기세포가 혈관내피 및 혈관평활근세포로 선택적으로 분화되는 것을 촉진시킴을 알 수 있다.

[64]

[65] 이에 더하여, 상기 면역형광염색 결과를 정량적으로 확인하기 위하여, 인간 배아줄기세포에서 분화 15일째 세포를 회수하여 유세포 분석(Fluorescence activated cell sorting: FACS, Aria flow cytometry, BD Bioscience)을 실시하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[66] 구체적으로, 상기 세포를 Accutase(Innovative cell technologies Inc.)로 15분간 처리하여 분리한 후 형광물질이 복합화 되어 있는 항체(anti-human CD31, CD34 항체)와 4°C에서 1시간 반응시키고 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하였다.

[67] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 분화 15일째 세포 중 혈액 및 혈관전구세포 특이 마커인 CD34 양성 세포의 수가 전체의 3.6%인 것이 selenium 처리에 의해 약 5%로 증가되는 것을 알 수 있다. 또한 혈관내피세포 특이 마커인 CD31 양성 세포의 수가 전체의 15.9%인 것이 selenium 처리에 의해 19-20%로 증가됨을 알 수 있다.

[68] 상기 결과는 selenium이 인간 만능줄기세포의 혈액전구, 혈관전구, 혈관내피 및 혈관평활근세포로의 분화를 선택적으로 증가시킨다는 것을 의미한다.

[69]

[70] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며

한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

### 산업상 이용가능성

- [71] 본 발명의 우수한 효율적 분화 유도 기술은 인간 만능줄기세포를 심혈관계 질환 세포치료제로 실용화하는데 필수적인 기술로 본 발명은 심혈관계 질환 세포치료제의 실용화에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 selenium에 의해 CD34 양성 세포인 조혈모세포(hematopoietic progenitor cells)로의 분화도 촉진되어 조혈모세포 이식으로 치료할 수 있는 면역결핍질환, 재생불량성빈혈, 혈색소병, 골수성 백혈병 및 악성 림프종 등과 같은 악성질환 세포치료의 실용화에 크게 기여할 것으로 기대된다.

### 서열목록 Free Text

- [72] <110> AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION  
FOUNDATION
- [73]
- [74] <120> Selenium-based differentiation method of human pluripotent stem
- [75] cells into hematopoietic progenitor, vascular progenitor,
- [76] endothelial and smooth muscle cells
- [77]
- [78] <130> PCT01689
- [79]
- [80] <150> KR 10-2012-0027285
- [81] <151> 2012-03-16
- [82]
- [83] <160> 28
- [84]
- [85] <170> KopatentIn 2.0
- [86]
- [87] <210> 1
- [88] <211> 24
- [89] <212> DNA
- [90] <213> Artificial Sequence
- [91]
- [92] <220>
- [93] <223> Oct4 forward primer
- [94]
- [95]
- [96] <400> 1
- [97] gacaggggga ggggaggagc tagg 24

- [98]  
[99]  
[100] <210> 2  
[101] <211> 26  
[102] <212> DNA  
[103] <213> Artificial Sequence  
[104]  
[105] <220>  
[106] <223> Oct4 reverse primer  
[107]  
[108]  
[109] <400> 2  
[110] cttccctcca accagttgcc ccaaac 26  
[111]  
[112]  
[113] <210> 3  
[114] <211> 20  
[115] <212> DNA  
[116] <213> Artificial Sequence  
[117]  
[118] <220>  
[119] <223> Nanog forward primer  
[120]  
[121]  
[122] <400> 3  
[123] tttggaagct gctggggaag 20  
[124]  
[125]  
[126] <210> 4  
[127] <211> 20  
[128] <212> DNA  
[129] <213> Artificial Sequence  
[130]  
[131] <220>  
[132] <223> Nanog reverse primer  
[133]  
[134]  
[135] <400> 4

- [136] gatgggagga ggggagagga 20  
[137]  
[138]  
[139] <210> 5  
[140] <211> 20  
[141] <212> DNA  
[142] <213> Artificial Sequence  
[143]  
[144] <220>  
[145] <223> Brachyury forward primer  
[146]  
[147]  
[148] <400> 5  
[149] acccagttca tagcgggtgac 20  
[150]  
[151]  
[152] <210> 6  
[153] <211> 20  
[154] <212> DNA  
[155] <213> Artificial Sequence  
[156]  
[157] <220>  
[158] <223> Brachyury reverse primer  
[159]  
[160]  
[161] <400> 6  
[162] ccattgggag taccaggtt 20  
[163]  
[164]  
[165] <210> 7  
[166] <211> 20  
[167] <212> DNA  
[168] <213> Artificial Sequence  
[169]  
[170] <220>  
[171] <223> Mesp1 forward primer  
[172]  
[173]

[174] <400> 7  
[175] ctcgtctcgt ccccagactc 20  
[176]  
[177]  
[178] <210> 8  
[179] <211> 20  
[180] <212> DNA  
[181] <213> Artificial Sequence  
[182]  
[183] <220>  
[184] <223> Mesp1 reverse primer  
[185]  
[186]  
[187] <400> 8  
[188] gcagtttctc ccgetcactg 20  
[189]  
[190]  
[191] <210> 9  
[192] <211> 16  
[193] <212> DNA  
[194] <213> Artificial Sequence  
[195]  
[196] <220>  
[197] <223> CD34 forward primer  
[198]  
[199]  
[200] <400> 9  
[201] tggaccgcgc tttgct 16  
[202]  
[203]  
[204] <210> 10  
[205] <211> 21  
[206] <212> DNA  
[207] <213> Artificial Sequence  
[208]  
[209] <220>  
[210] <223> CD34 reverse primer  
[211]

[212]  
[213] <400> 10  
[214] ccctgggtag gtaactctgg g 21  
[215]  
[216]  
[217] <210> 11  
[218] <211> 26  
[219] <212> DNA  
[220] <213> Artificial Sequence  
[221]  
[222] <220>  
[223] <223> Sox17 forward primer  
[224]  
[225]  
[226] <400> 11  
[227] cgctttcatg gtgtgggcta aggacg 26  
[228]  
[229]  
[230] <210> 12  
[231] <211> 26  
[232] <212> DNA  
[233] <213> Artificial Sequence  
[234]  
[235] <220>  
[236] <223> Sox17 reverse primer  
[237]  
[238]  
[239] <400> 12  
[240] tagttggggt ggtcctgcat gtgctg 26  
[241]  
[242]  
[243] <210> 13  
[244] <211> 20  
[245] <212> DNA  
[246] <213> Artificial Sequence  
[247]  
[248] <220>  
[249] <223> Gata6 forward primer

[250]  
[251]  
[252] <400> 13  
[253] taattccatt cccatgactc 20  
[254]  
[255]  
[256] <210> 14  
[257] <211> 20  
[258] <212> DNA  
[259] <213> Artificial Sequence  
[260]  
[261] <220>  
[262] <223> Gata6 reverse primer  
[263]  
[264]  
[265] <400> 14  
[266] cctatgtaga gcccatcttg 20  
[267]  
[268]  
[269] <210> 15  
[270] <211> 20  
[271] <212> DNA  
[272] <213> Artificial Sequence  
[273]  
[274] <220>  
[275] <223> Pax6 forward primer  
[276]  
[277]  
[278] <400> 15  
[279] tgtccaacgg atgtgtgagt 20  
[280]  
[281]  
[282] <210> 16  
[283] <211> 20  
[284] <212> DNA  
[285] <213> Artificial Sequence  
[286]  
[287] <220>

[288] <223> Pax6 reverse primer  
[289]  
[290]  
[291] <400> 16  
[292] tttccaagc aagagtggac 20  
[293]  
[294]  
[295] <210> 17  
[296] <211> 20  
[297] <212> DNA  
[298] <213> Artificial Sequence  
[299]  
[300] <220>  
[301] <223> Nestin forward primer  
[302]  
[303]  
[304] <400> 17  
[305] cctgtcagaa gaattgagg 20  
[306]  
[307]  
[308] <210> 18  
[309] <211> 20  
[310] <212> DNA  
[311] <213> Artificial Sequence  
[312]  
[313] <220>  
[314] <223> Nestin reverse primer  
[315]  
[316]  
[317] <400> 18  
[318] actttctcc tcactgcaa 20  
[319]  
[320]  
[321] <210> 19  
[322] <211> 20  
[323] <212> DNA  
[324] <213> Artificial Sequence  
[325]

- [326] <220>  
[327] <223> CD31 forward primer  
[328]  
[329]  
[330] <400> 19  
[331] aggtgttggt ggaaggagtg 20  
[332]  
[333]  
[334] <210> 20  
[335] <211> 20  
[336] <212> DNA  
[337] <213> Artificial Sequence  
[338]  
[339] <220>  
[340] <223> CD31 reverse primer  
[341]  
[342]  
[343] <400> 20  
[344] cgtgtagttg ccactgtgct 20  
[345]  
[346]  
[347] <210> 21  
[348] <211> 20  
[349] <212> DNA  
[350] <213> Artificial Sequence  
[351]  
[352] <220>  
[353] <223> VEcadherin forward primer  
[354]  
[355]  
[356] <400> 21  
[357] cgtcaaaact gcccatactt 20  
[358]  
[359]  
[360] <210> 22  
[361] <211> 20  
[362] <212> DNA  
[363] <213> Artificial Sequence

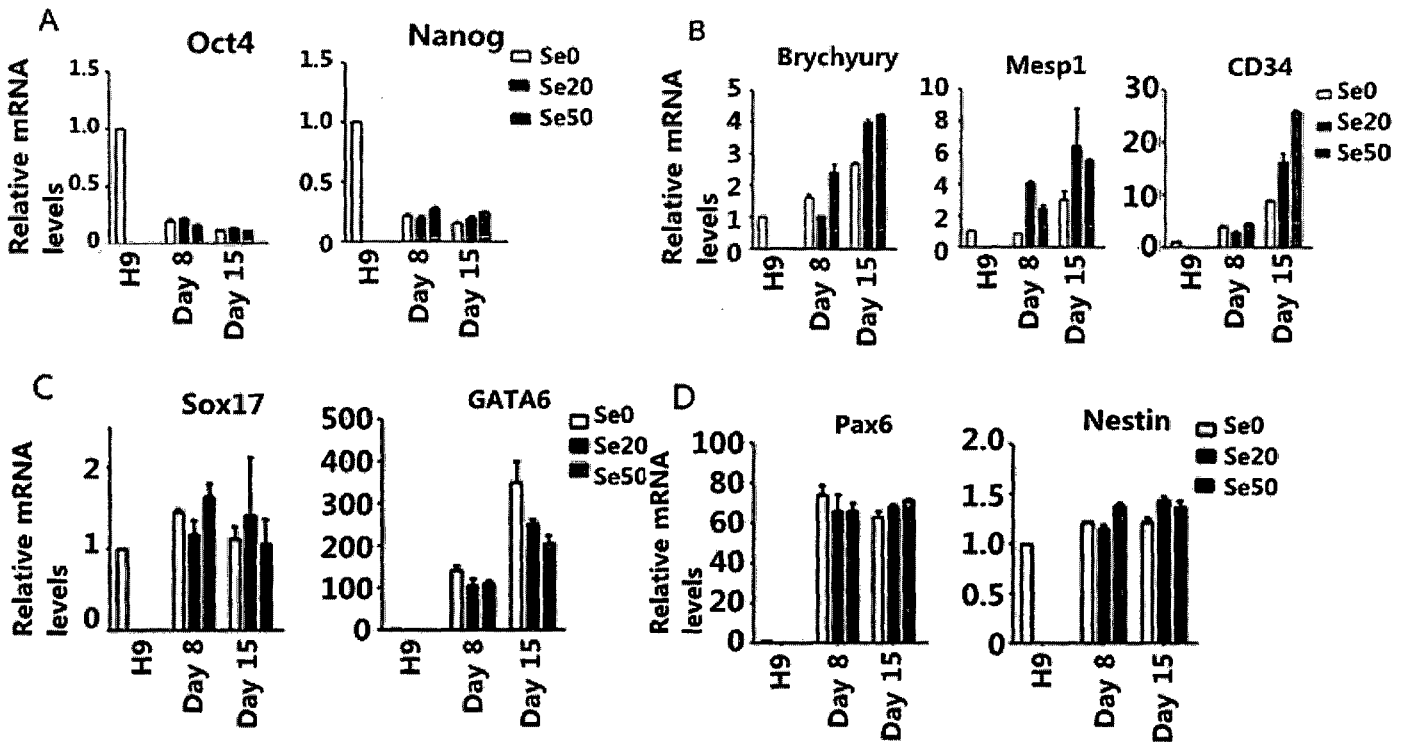
[364]  
[365] <220>  
[366] <223> VEcadherin reverse primer  
[367]  
[368]  
[369] <400> 22  
[370] cagcccaaag tgtgtgagaa 20  
[371]  
[372]  
[373] <210> 23  
[374] <211> 20  
[375] <212> DNA  
[376] <213> Artificial Sequence  
[377]  
[378] <220>  
[379] <223> SMA forward primer  
[380]  
[381]  
[382] <400> 23  
[383] agaacatggc atcatcacca 20  
[384]  
[385]  
[386] <210> 24  
[387] <211> 20  
[388] <212> DNA  
[389] <213> Artificial Sequence  
[390]  
[391] <220>  
[392] <223> SMA reverse primer  
[393]  
[394]  
[395] <400> 24  
[396] tacatggctg ggacattgaa 20  
[397]  
[398]  
[399] <210> 25  
[400] <211> 20  
[401] <212> DNA

[402] <213> Artificial Sequence  
[403]  
[404] <220>  
[405] <223> Myocardin forward primer  
[406]  
[407]  
[408] <400> 25  
[409] ctgctgtaaa gtccaaatcc 20  
[410]  
[411]  
[412] <210> 26  
[413] <211> 20  
[414] <212> DNA  
[415] <213> Artificial Sequence  
[416]  
[417] <220>  
[418] <223> Myocardin reverse primer  
[419]  
[420]  
[421] <400> 26  
[422] taggtagctg aatcgggtgtt 20  
[423]  
[424]  
[425] <210> 27  
[426] <211> 20  
[427] <212> DNA  
[428] <213> Artificial Sequence  
[429]  
[430] <220>  
[431] <223> GAPDH forward primer  
[432]  
[433]  
[434] <400> 27  
[435] aagggtcatc atctctgccc 20  
[436]  
[437]  
[438] <210> 28  
[439] <211> 20

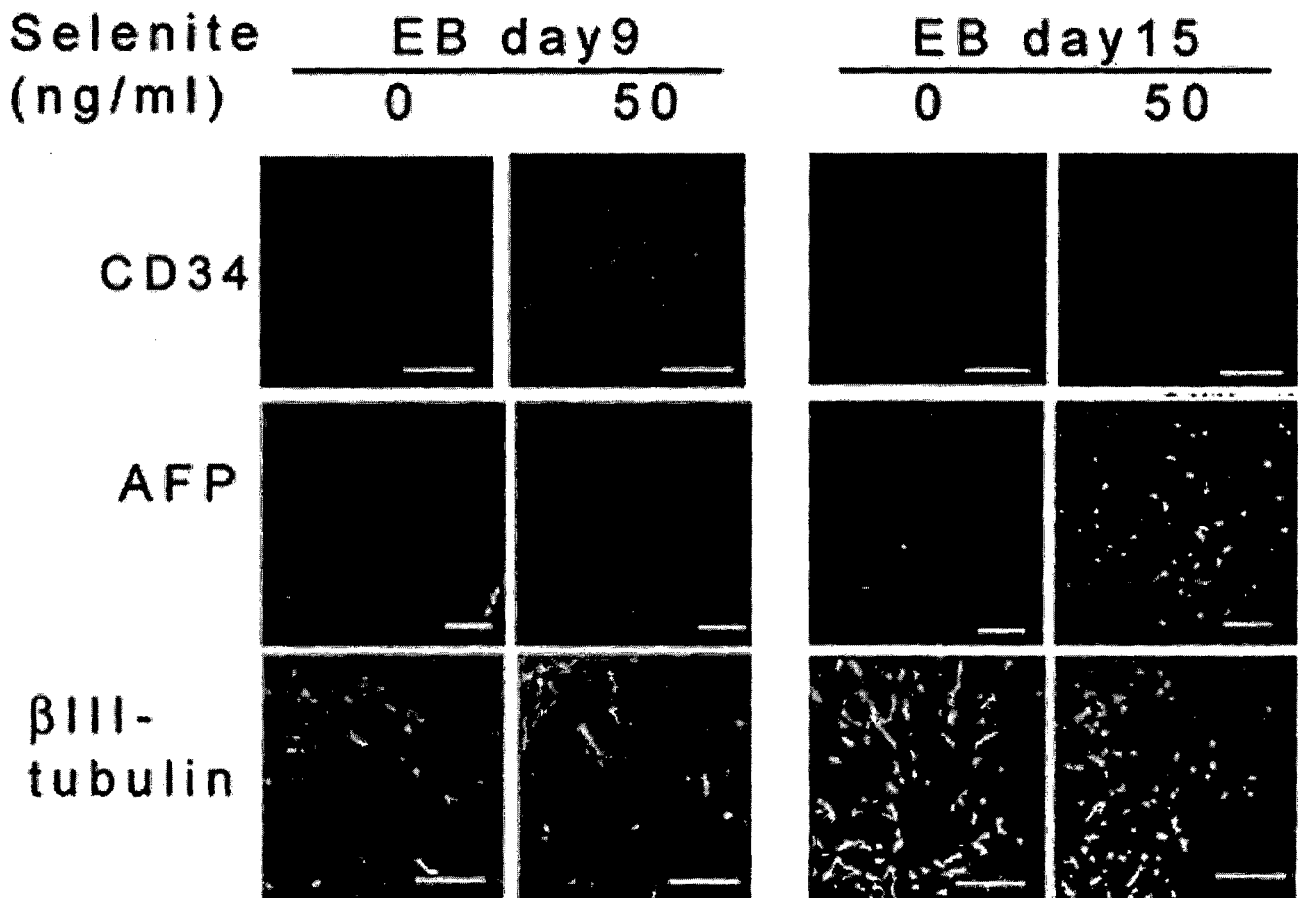
- [440] <212> DNA  
[441] <213> Artificial Sequence  
[442]  
[443] <220>  
[444] <223> GAPDH reverse primer  
[445]  
[446]  
[447] <400> 28  
[448] gtgatgcat ggactgtggt 20  
[449]  
[450]

## 청구범위

- [청구항 1] 셀레늄(selenium)을 포함하는 배지를 사용하여 인간 만능줄기세포를 중배엽 줄기세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,  
상기 인간 만능줄기세포는 외배엽, 중배엽, 및 내배엽으로 분화되는 세포인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,  
상기 인간 만능줄기세포는 인간 배아줄기세포, 인간 유도만능줄기세포, 배아생식세포, 및 배아종양세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,  
상기 중배엽 줄기세포는 혈액전구세포, 혈관전구세포, 혈관내피세포, 및 혈관평활근 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포로 분화되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서,  
상기 배지는 인간 재조합 성장인자, 사이토카인, 또는 혈청을 추가적으로 함유하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,  
상기 인간 재조합 성장인자 또는 사이토카인은 인간 재조합 BMP-4, 인간 재조합 bFGF, 및 인간 재조합 VEGF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

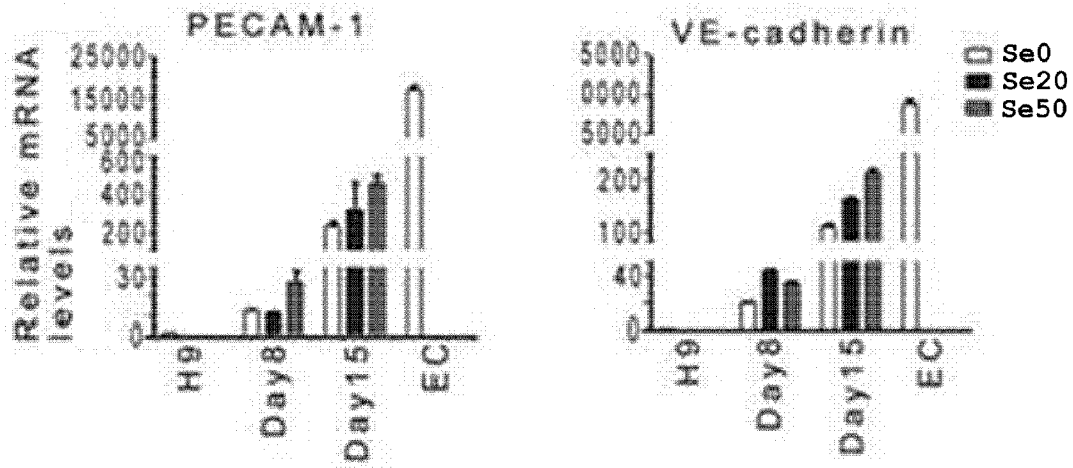


[Fig. 2]

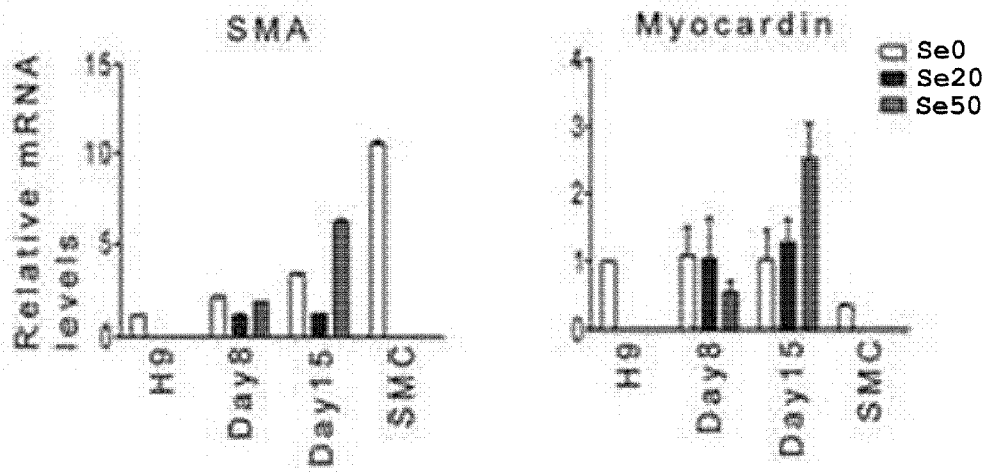


[Fig. 3]

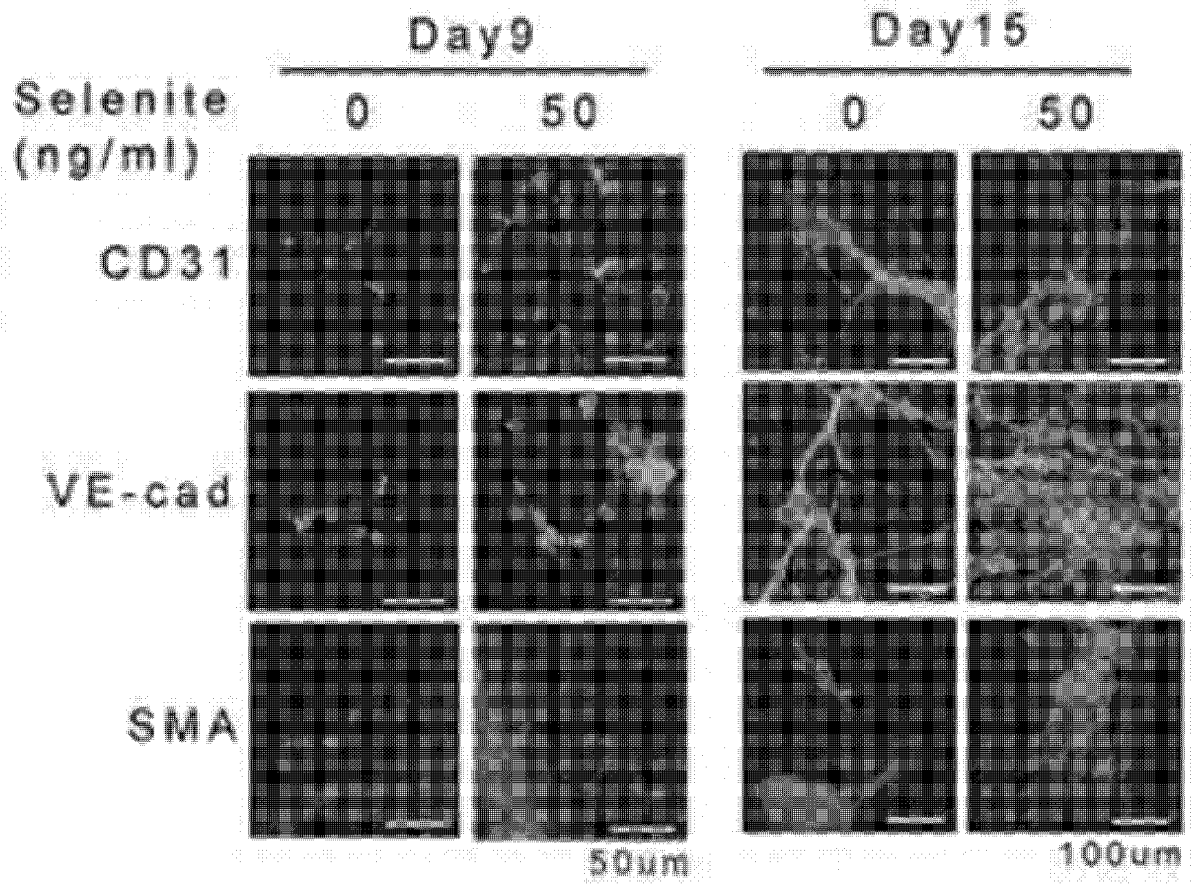
A



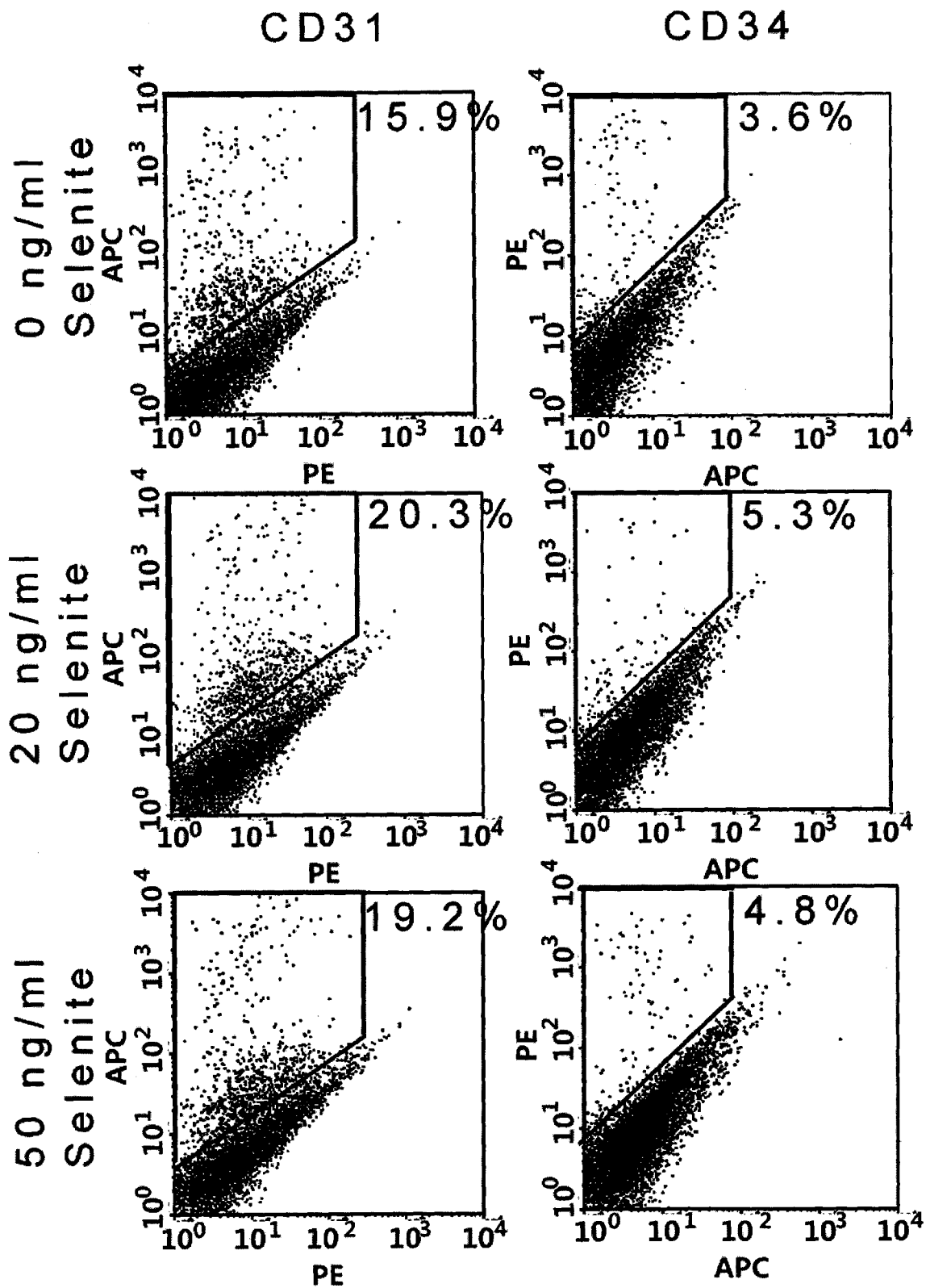
B



[Fig. 4]



Day 15



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2013/001403**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12N 5/0735(2010.01)i, C12N 5/02(2006.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, C12N 5/078(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 5/0735; C12N 5/02; C12N 5/074; C12N 5/078

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 aboveElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: selenium, endothelial cell differentiation, smooth muscle differentiation

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PEIFFER, I. et al., "Simultaneous differentiation of endothelial and trophoblastic cells derived from human embryonic stem cells", Stem Cells and Development, 2007, vol. 16, pages 393-401. See abstract; pages 394, 396-397; figure 1.	1-6
X	ZAMBIDIS, E.T. et al., "Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development", Blood, 01 August 2005, vol. 106, pages 860-870. See abstract; page 861.	1-6
A	GUAN, K. et al., "Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro", Cytotechnology, 1999, vol. 30, pages 211-226. See abstract; pages 213, 217 and 219; figure 1.	1-6
A	CONLEY, B.J. et al., "Derivation propagation and differentiation of human embryonic stem cells", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004, vol. 36, pages 555-567. See abstract; page 561; table 2.	1-6

 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

"I" 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 JUNE 2013 (26.06.2013)

Date of mailing of the international search report

**26 JUNE 2013 (26.06.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2013/001403**

Patent document  
cited in search report

Publication  
date

Patent family  
member

Publication  
date

NONE

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
C12N 5/0735(2010.01)i, C12N 5/02(2006.01)i, C12N 5/074(2010.01)i, C12N 5/078(2010.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
C12N 5/0735; C12N 5/02; C12N 5/074; C12N 5/078

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: selenium, endothelial cell differentiation, smooth muscle differentiation

**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	PEIFFER, I. et al., 'Simultaneous differentiation of endothelial and trophoblastic cells derived from human embryonic stem cells', Stem Cells and Development, 2007년, 16권, 393-401면. 초록; 394, 396-397면; 그림 1 참조.	1-6
X	ZAMBIDIS, E.T. et al., 'Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development', Blood, 2005년8월1일, 106권, 3호, 860-870면. 초록; 861면 참조.	1-6
A	GUAN, K. et al., 'Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro', Cytotechnology, 1999년, 30권, 211-226면. 초록; 213, 217, 219면; 그림 1 참조.	1-6
A	CONLEY, B.J. et al., 'Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells', The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004년, 36권, 555-567면. 초록; 561면; 표 2 참조.	1-6

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 2013년 06월 26일 (26.06.2013)	국제조사보고서 발송일 2013년 06월 26일 (26.06.2013)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 이효진 전화번호 82-42-481-8743
--	-----------------------------------

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음