(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 9 월 11 일 (11.09.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/133792 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/002039

(22) 국제출원일: 2015 년 3 월 3 일 (03.03.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0025095 2014 년 3 월 3 일 (03.03.2014) KR
10-2015-0029725 2015 년 3 월 3 일 (03.03.2015) KR

(71) 출원인: 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단 (UNIST ACADEMY-INDUSTRY RESEARCH CORPORATION) [KR/KR]; 689-798 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).

(72) 발명자: 김정범 (KIM, Jeong Beom); 621-794 경상남도 김해시 율하 1 로 64, 403 동 1802 호, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 153-803 서울시 금천구 가산디지털 1 로 151 이노플렉스 1 차 601 호, Seoul (KR).

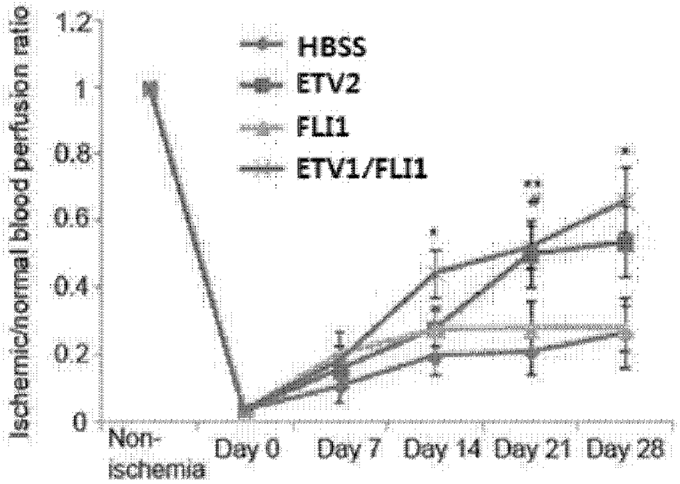
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,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

(54) **Title**: COMPOSITION FOR INDUCING DIRECT TRANSDIFFERENTIATION OF SOMATIC CELL INTO VASCULAR PROGENITOR CELL, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭** : 체세포로부터 혈관 전구 세포로의 직접교차분화 유도용 조성물 및 이의 용도



(57) **Abstract**: The present invention relates to a composition for inducing direct transdifferentiation of a somatic cell into a vascular progenitor cell and a use thereof and, more specifically, to a composition for inducing direct transdifferentiation of a somatic cell into a vascular progenitor cell, a pharmaceutical composition for the prevention or treatment of ischemic vascular diseases, a cell therapeutic agent for the prevention or treatment of ischemic vascular diseases, a composition for screening a therapeutic drug for ischemic vascular diseases, a 3D printing biological material composition for the production of an artificial tissue for the treatment of ischemic vascular diseases, and a method for direct transdifferentiatiion of a somatic cell into a vascular progenitor cell. By producing a vascular progenitor cell by direct transdifferentiation of a somatic cell according to the present invention, it is possible to reduce the production period of the vascular progenitor cell and to avoid the formation of teratoma, which is a side effect of an induced pluripotent stem cell, thereby minimizing the side effects of a stem cell therapeutic agent.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2015/133792 A1

본 발명은 체세포로부터 혈관 전구 세포로의 직접교차분화 유도용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 상세하게는 체세포로부터 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물, 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 세포치료제, 허혈성 혈관질환 치료 약물 스크리닝용 조성물, 허혈성 혈관질환 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물 및 체세포를 혈관 전구 세포로 직접교차분화하는 방법에 대한 것이다. 본 발명에 따라 체세포로부터 직접교차분화를 통해 혈관 전구 세포를 제조함으로써, 혈관 전구 세포의 제조기간을 줄일 수 있으며, 유도만능줄기세포의 부작용인 기형종 형성을 피해갈 수 있도록 하여, 줄기세포 치료제의 부작용을 최소화할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 체세포로부터 혈관 전구 세포로의 직접교차분화 유도용 조성물 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 체세포로부터 직접교차분화인자 *ETV2, FLI1*의 각 단백질, 단백질을 코딩하는 핵산분자 및 단백질을 코딩하는 핵산분자가 도입되어 단백질을 발현하는 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 1이상을 포함하는 체세포로부터 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물 및 상기 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 체세포로부터 혈관 전구 세포 및 혈관세포로 직접교차분화하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 체세포로부터 직접교차분화하는 방법에 의해 분화 유도된 혈관 전구 세포 및 혈관세포를 포함하는 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 세포치료제, 약물 스크리닝용 조성물, 또는 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 혈관의 생성은 크게 혈관모세포(angioblast)나 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell)가 분화하여 혈관망상구조(primitive vascular network)를 이루는 혈관형성(vasculogenesis)과 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 혈관신생(angiogenesis)으로 구분할 수 있다. 혈관형성과정 동안 혈관 전구 세포는 혈관내피세포(endothelial cell) 등으로 분화하여 주요 혈관을 형성하게 되며, 혈관형성과정은 혈관 전구 세포의 분화 양상에 따라 몸통의 혈관이 생성될 때와 같이 혈관내피세포가 제자리에서 분화하게 되는 제1형 혈관형성 및 심장내막(endocardium)이나 머리부분에 혈관이 형성되는 경우와 같이 혈관 전구 세포가 넓은 범위에서 이동하며 분화하게 되는 제2형 혈관형성, 2가지 형태로 나뉘어질 수 있다. 이는 태아의 발생과정을 포함하여 상처치유, 배란, 임신과 같은 생리적 상태 뿐 아니라, 염증, 종양 등의 다양한 병리적 상태에서도 중요한 기전으로 작용하고 있어, 이에 대한 연구가 진행되어왔다.

[3] 혈관의 손상은 다양한 허혈성 질환을 유도하며, 혈관의 손상을 치료하기 위한 방법으로 내생(endogenous) 세포를 재생(restoration)하거나, 혈관을 형성하는 기능성 혈관 세포를 이식하는 방법을 통해 근본적으로 치료할 수 있다. 이와 관련하여, 기능성 혈관세포를 이식하여 치료함에 있어서, 혈관세포의 효과적인 분화방법이 명확하지 않았을 뿐 아니라, 많은 양의 세포를 얻는 것이 어려운 문제가 있었다.

[4] 또한, 배아줄기세포(embryonic stem cells, ESCs) 및 유도된 만능줄기세포에서 혈관세포로의 분화를 유도하는 방법도 있으나, 목적하는 세포로의 유도효율이 낮고 특정 세포로 분화 시 상기 배아줄기세포 또는 만능줄기세포로부터

종양유전자가 존재할 수 있는 위험성이 있기 때문에 문제가 있다. 또한, 역분화 줄기세포는 배아 파괴와 관련된 윤리적인 문제점 및 이식과정의 면역거부반응을 해결할 수 있는 장점을 나타냄에도 불구하고, 배아줄기세포와 마찬가지로 여전히 기형종 형성의 가능성을 내포하고 있다는 단점이 있다.

[5] 또한, 체세포로부터 직접교차방법을 통해 혈관 전구 세포를 제조하는 방법은 아직 보고된 바 없으며, 특히, *ETV2*(Ets variant gene 2) 또는 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1)의 트랜스덕션(tranduction)을 통한 체세포의 직접교차분화에 의한 혈관세포의 다능성(Multipotency)의 확립은 알려진 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명의 목적은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 유효성분으로 포함하는 체세포로부터 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물을 제공하는데 있다.

[7] 본 발명의 다른 목적은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 세포치료제, 허혈성 혈관질환 치료 약물 스크리닝용 조성물 및 허혈성 혈관질환 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물을 제공하는데 있다.

[8] 본 발명의 또 다른 목적은 체세포를 혈관 전구 세포로 직접교차분화하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 유효성분으로 포함하는 체세포로부터 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물을 제공한다.

[10] 또한, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell)를 제공한다.

[11] 또한, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 혈관

전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[12] 또한, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터, 상기 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포 또는 상기 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.

[13] 또한, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환 치료 약물 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물을 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 체세포를 혈관 전구 세포로 직접교차분화하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[16] 본 발명은 체세포로부터 직접교차분화를 통해 혈관 전구 세포를 제조함으로써, 혈관 전구 세포의 제조기간을 줄일 수 있으며, 유도만능줄기세포의 부작용인 기형종 형성을 피해갈 수 있도록 하여, 줄기세포 치료제의 부작용을 최소화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 *ETV2*의 상보적 DNA를 암호화하는 렌티바이러스의 개열지도를 나타낸 것이다.

[18] 도 2는 *FLI1*의 상보적 DNA를 암호화하는 렌티바이러스의 개열지도를 나타낸 것이다.

[19] 도 3은 감염 5일 후 *ETV2* 및 *FLI1*의 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[20] 도 4는 *ETV2*, *FLI1* 또는 *ETV2*/*FLI1*로 형질전환하여 제조된 혈관 전구 세포의 시간에 따른 위상대비 이미지(phase-contrast image)를 나타낸 것이다.

[21] 도 5는 제조된 혈관 전구 세포의 분화된 마커인 vWF, α-SMA 및 CD31의 발현을 나타낸 면역형광 이미지를 나타낸 것이다.

[22] 도 6은 제조된 혈관 전구 세포를 마우스에 이식한 후, 시간에 따른 혈류를 히스토그램 픽셀(colored histogram pixels)을 기초로 계산하여 나타낸 것이다.

[23] 도 7은 제조된 혈관 전구 세포를 마우스에 이식한 후, 허혈성 대 비허혈성 다리의 혈류 비율을 LDPI index로서 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24] 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 유효성분으로 포함하는 체세포로부터 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물을 제공한다.

[25] 본 발명에서, *ETV2*(Ets variant gene 2)는 ETS(E26 transformation-specific 또는 E-twenty-six) 패밀리 중 하나로, NCBI 등록번호 NM_014209.3으로 등록되어 있다. ETS 인자는 배아 혈관발달에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히, *ETV2*는 혈관내피분화에 있어서 필수적인 조절 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 체세포로부터 혈관 전구 세포로의 직접교차분화를 유도하는 기능에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

[26] 또한, *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 역시 ETS 패밀리 중 하나이며, NCBI 등록번호 NM_002017.4로 등록되어 있다. 적아세포(erythoblast)에서 구조 활성화(constitutive activation)를 나타내어, 적혈구의 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 특히, *FLI1*이 혈관 전구 세포로의 직접교차분화를 유도하는 기능에 대해서는 상기 *ETV2*와 마찬가지로 전혀 알려진 바가 없다.

[27] 본 발명의 *ETV2*, *FLI1* 또는 이들의 조합체는 단백질 또는 이의 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 제공될 수 있는데, 상기 단백질은 인간과 마우스, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 유래의 모든 *ETV2* 또는 *FLI1*을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 사용되는 *ETV2* 또는 *FLI1* 단백질은 이의 야생형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 *ETV2* 또는 *FLI1* 단백질의 변이체를 포함한다.

[28] 상기 단백질의 변이체란, *ETV2* 또는 *FLI1* 단백질의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 상기 변이체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이거나 필요에 의해서 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체일 수 있고, 물리, 화학적 환경에 대한 구조적 안정성이 증대되거나 생리학적 활성이 증대된 변이체일 수 있다.

[29] 또한, 본 발명에서 *ETV2* 또는 *FLI1*을 코딩하는 핵산은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 *ETV2* 또는 *FLI1* 단백질을 코딩하는 염기서열로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 *ETV2*

또는 *FLI1* 단백질을 코딩하는 염기서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(genomic DNA, cDNA) 또는 RNA 분자일 수 있다.

[30] 또한, 본 발명에서 '벡터'는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.

[31] 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 및 에피조말(episomal) 벡터 등을 포함한다. 바람직하게는, 바이러스 벡터일 수 있다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스(Retrovirus), 예를 들어 HIV(Human immunodeficiency virus), MLV(Murineleukemia virus) ASLV(Avian sarcoma/leukosis), SNV(Spleen necrosis virus), RSV(Rous sarcoma virus), MMTV(Mouse mammary tumor virus), 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노 관련 바이러스(Adeno-associatedvirus) 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 등에서 유래한 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특히, 벡터는 직접교차분화의 효율을 높이고자 하는 목적에서 사용하는 것으로서, 바꾸고자 하는 세포에 관련된 유전자를 일반 체세포에 과발현시키는 것이면 어떤 벡터를 사용하더라도 본 발명의 효과를 나타낼 수 있다. 본 발명의 구체적인 일례로서, 상기 벡터는 *ETV2* 또는 *FLI1*을 발현하는 렌티바이러스 벡터일 수 있으며, 더욱 구체적으로, SFFV 프로모터인 SF 기반의 렌티바이러스 벡터일 수 있다.

[32] 또한, *ETV2* 또는 *FLI1* 단백질을 암호화하는 핵산은 당 분야의 공지 방법, 예를 들어 벡터 형태의 네이키드 DNA로 세포내로 전달하거나, 리포좀(Liposome), 양이온성 고분자(Cationic polymer)등을 이용하여 세포 내로 도입할 수 있다.

[33] 상기 리포좀은 유전자 전달을 위하여 DOTMA나 DOTAP 등의 양이온성 인지질을 혼합하여 제조한 인지질 막으로, 양이온성의 리포좀과 음이온성의 핵산이 일정 비율로 혼합하면 핵산-리포좀 복합체를 형성하여 세포 내로 도입될 수 있다.

[34] 구체적으로, 본 발명에서 *ETV2* 또는 *FLI1* 단백질을 암호화하는 핵산분자는, *ETV2* 또는 *FLI1* 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 packaging-defective 헬퍼 플라스미드와 함께 체세포 내로 도입될 수 있다. 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 등을 포함하며 이에 제한되지 않는다.

[35] 본 발명에서 용어 "체세포"는, 생식세포를 제외한 모든 세포를 의미할 수 있다. 예를 들어, 섬유아세포, 근육세포, 신경세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, 주피세포(pericyte), 성상교세포(astrocyte), B세포, 혈액세포, 상피세포 신경줄기세포, 조혈모세포, 중간엽줄기세포 또는 제대혈 줄기세포 등을 사용할

수 있다. 그러나, 직접교차분화는 시작세포가 체세포이면 특정 조직세포 여부에 상관없이 적용할 수 있으므로, 상기에 제한되지 않는다. 본 발명 실시예에서는 섬유아세포(fibroblast)를 이용하여 직접교차분화를 유도하였다.

[36] 본 발명에서, 혈관 전구 세포는 체내에서 혈관의 구성요소인 혈관내피세포(endothelial cell), 혈관평활근세포, 혈관주위세포 또는 혈관세포 등으로 분화할 수 있는 능력을 지닌 전구세포를 의미한다. 또한, 본 발명에서 “iVPC”는 유도된 혈관 전구 세포를 의미하며, 예를 들어, 본 발명의 방법에 따른 직접교차분화를 통하여 체세포로부터 유도된 혈관 전구 세포를 의미한다.

[37]

[38] 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[39] 또한, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.

[40] 또한, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환 치료 약물 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[41] 상기 허혈성 혈관질환은 혈관이 외부적 요인 또는 내부적 요인으로 인하여 손상되어 혈류장애가 발생하는 모든 질환을 의미하며, 체내 특정 부위에서의 발생에 제한되는 것이 아니다. 구체적인 일례로, 상기 허혈성 혈관질환은 뇌혈관질환, 심혈관질환, 하지허혈성질환, 말초혈관질환 또는 허혈성 근육괴사일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적인 일례로, 상기 뇌혈관질환은 뇌경색, 뇌졸중 또는 뇌출혈일 수 있으나, 뇌혈관 손상에 따른 혈류장애에 의한 질환이면 모두 포함될 수 있으며, 상기 질환에 제한되는 것은 아니다. 또 다른 보다 구체적인 일례로, 상기 심혈관질환은 동맥경화증, 허혈성 재관류 손상, 재발협착증, 동맥 염증, 혈관벽 재형성, 심실 재형성, 속심실 조율, 관산 미세색전증, 빈맥, 서맥, 압력 과부하, 관상 동맥 결찰, 부정맥, 뇌졸중, 협심증, 심근경색, 심부전 또는 고혈압일 수 있으나, 심혈관 손상에 따른 혈류장애에 의한 질환이면 모두 포함될 수 있으며, 상기 질환에 제한되는 것은 아니다.

[42]

[43] 본 발명에서 있어서, "세포치료제"는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다.

[44]

[45] 또한, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 상기 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물을 제공한다.

[46]

[47] 또한, 본 발명은 *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 체세포를 혈관 전구 세포로 직접교차분화하는 방법을 제공한다.

[48] 보다 구체적으로, 체세포를 배지에서 배양하는 단계, 상기 배양한 체세포에 *ETV2*, *FLI1* 또는 이들의 조합 유전자를 삽입한 벡터로 형질도입(transduction) 시키는 단계, 및 상기 감염된 체세포를 직접교차분화를 유도할 수 있는 배양조건에서 배양하는 단계를 포함한다.

[49] 상기 체세포의 배양에 사용되는 배지는 당해 분야에서 체세포 배양 뿐 아니라 줄기세포(stem cell) 및 전구세포(progenitor cell) 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 모두 포함할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 형질도입된 섬유아세포를 황산프로타민(protamine sulfate, Sigma)을 보충한 배지에서 배양하였으며, 상기 황산프로타민 외에도, 세포의 배양에 있어서 필요한 요소들은 제한없이 포함할 수 있다.

[50] 또한, 상기 체세포를 직접교차분화를 유도할 수 있는 배양조건은 당해 분야에서 체세포에 대하여 직접교차분화를 유도하는 데 통상적으로 사용되는 배지를 포함할 수 있으며, 본 발명의 구체적인 일례로서, 10% FBS를 포함하는 minimal essential media(MEM), 2mM L-글루타민, β-머캅토에탄올, 페니실린/스트렙토마이신 및 10ng/ml $VEGF_{165}$ 를 포함하는 혈관 전구세포 성장배지를 사용할 수 있다.

[51] 본 발명에서 직접교차분화로 유도된 혈관 전구 세포는 기존 혈관의 분화 및 이에 관련된 혈관세포증식에 관여하여 새로운 혈관형성에 도움을 주며, 혈관세포의 수와 밀도를 동시에 증가시킴으로써, 허혈성 질환에 대해 우수한 치료효과를 나타낼 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[52] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[53]

[54] **실시예 1. 유도된-혈관 전구 세포(induced-vascular progenitor cells, iVPC)의 제조**

[55] 진피 섬유아세포를 섬유아세포 배지(10% FBS를 포함하는 DMEM high glucose, 2mM L-글루타민, 1x MEM 비필수적 아미노산(nonessential amino acid), β-머캅토에탄올, 1x페니실린/스트렙토마이신)에서 배양하였다.

[56] *ETV2* 및 *FLI1*의 상보적 DNA를 암호화하는, SFFV 프로모터인 SF 기반의 렌티바이러스 벡터를 packaging-defective 헬퍼 플라스미드와 함께 Fugene 6 transfection reagent (Roche)를 이용하여 293 세포에 감염시켰다. 48시간 후, Zaehres, H. & Daley, G. Q., (2006), Methods Enzymol 420, 49-64에 기재된 방법대로, 바이러스 상층액을 얻었다.

[57] 0.1% 젤라틴 코팅된 6-웰 플레이트 당 세포수 $1x10^4$개의 밀도로 진피 섬유아세포를 분주하고, 6μg/ml의 황산프로타민(protamine sulfate, Sigma)을 보충한, *ETV2* 및 *FLI1* (1:1)의 바이러스를 포함한 상층액과 함께 24시간동안 배양하였다. 형질도입(transduction) 효율을 SF-GFP 대조군 바이러스로 계산하였다.

[58] 감염 2일 후, 상기 세포들을 새로운 섬유아세포 배지로 다시 분주하고, 상기 배지를 혈관 전구세포 성장배지(10% FBS 를 포함하는 minimal essential media(MEM, Sigma), 2mM L-글루타민, β-머캅토에탄올, 페니실린/스트렙토마이신, 10ng/ml $VEGF_{165}$ (Peprotech))로 교체하였다. 이후, 3일마다 새로운 배지로 교체하였으며, 증식을 위해 콜로니를 물리적으로 분리하였다.

[59]

[60] **실시예 2. RT-PCR 및 위상차 현미경(phase-contrast microscopy)을 이용한 *ETV2* 및 *FLI1* 의 발현 확인**

[61] 감염 5일 후 *ETV2* 및 *FLI1*의 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다.

[62] 구체적으로, 감염 5일 후 RNeasy kit (Qiagen)를 이용하여 전체 RNA를 각 세포로부터 추출하고, Omniscript RT (Qiagen) 를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Taq DNA polymerase, recombinant (Invitrogen)를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[63] RT-PCR 후 아가로즈 젤에 로딩하여 발현여부를 확인하였으며, GAPDH를 대조군으로 사용하였다(도 3).

[64] 또한, 위상차 현미경(phase-contrast microscopy)을 이용하여 촬영한 도 4에

나타난 바와 같이, 감염된 후 10~11일 이내에 *ETV2* 및 *ETV2/FLI1* 에 의해 감염된 세포군에서 콜로니가 나타나기 시작하였으며, 시간이 지날수록 콜로니의 수가 증가하는 것을 확인하였다.

[65] 본 발명자들은 감염된 후 30일 이내, *FLI1*으로 감염된 세포군에서 콜로니를 관찰하였다. 콜로니를 증식시키기 위하여, 상기 세포군을 물리적으로 분리하여 젤라틴 코팅 접시(gelatin-coated dish)에서 배양하였다.

[66]

[67] **실시예 3. 면역세포화학을 이용한 혈관전구세포의 In vitro 분석**

[68] 면역세포화학을 수행하기 위하여, 세포를 4% 파라-포름알데하이드(para-formaldehyde)에서 10분간 고정하고 0.1% Triton X-100으로 10분동안 처리하여 투과성으로 만들었다. 세포는 4% FBS/PBS 블라킹(blocking) 용액에서 30분간 배양하고 그 뒤에 상온에서 블라킹 용액으로 희석시킨 1차 항체와 1시간 동안 반응시켰다. 사용한 1차 항체는 다음과 같다; vWF (1:400, abcam), CD31 (1:200, Chemicon) 및 α-SMA(1:200, abcam).

[69] 1차 항체와 반응시킨 후, 0.05% PBST(tween20/PBS)로 3회 세척하였다. 이후 2차 형광항체를 PBS로 희석하여 1시간 동안 세포와 반응시켰다(Alexa Fluor 488 및 568; 1:1000, Molecular Probes). 0.05% PBST 로 3번 세척한 후, 핵을 Hoechst 33342 (Thermo Scientific)을 이용하여 15초간 대비염색(counterstained)하였다. 염색 후 Olympus Cell^TIRF (UOBC center, UNIST) 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[70] 혈관전구세포는 혈관내피세포와 평활근세포로 분화가 가능한 성질을 가지고 있으며, 상기 CD31과 vWF 는 혈관내피세포의 마커로 사용하였으며, α-SMA는 평활근세포 마커로서 사용하였다. 면역세포화학 분석을 통하여, *ETV2*, *FLI1* 및 *ETV2/ FLI1*에 의한 형질전환을 통해 제조된 각 유도된-혈관 전구 세포(induced-VPC, iVPC)들을 확인하였다(도 5).

[71]

[72] **실시예 4. 유도된-혈관 전구 세포(induced-VPC, iVPC)의 허혈성 질환 치료효과 확인**

[73] 허혈성 다리 모델에서 *ETV2*, *FLI1* 및 *ETV2/FLI1*로 형질전환하여 제조한, 각 유도된-혈관 전구 세포(induced-VPC, iVPC)군이 혈류회복에 치료효과를 나타내는지 알아보기 위하여, 각각의 유도된-혈관 전구 세포(induced-VPC, iVPC)를 이식하고 일정 기간 후 혈류를 측정하였다.

[74] 구체적으로, 넙다리 동맥의 절제 및 레이저 도플러 관류 이미징(laser Doppler perfusion imaging)을 위해 흉선이 없는 누드마우스(수컷, 8-10주령, 몸무게 17-22g)를 160 mg/kg의 펜토바비탈을 주입하여 마비시켰다. 외장골동맥의 곁가지로서 근위(proximal) 조직부터 복재(saphenous)정맥 및 슬와(popliteal)정맥으로 나뉘어지는 원위지점(distal point)까지 넙다리 동맥을 절개하였다. 동맥결찰법(arterial ligation) 후에, 다음과 같은 실험군으로 마우스를

나누었다; *ETV2*, *FLI1* 및 *ETV2*/*FLI1* iVPC 및 대조군(HBSS; 식염수 주입) (n=8 per each group).

[75] 이식하기 전, 상기 세포들을 CM-Dil (Invitrogen)로 표지하였다. 이후 각 마우스에 1 × 10^6 cells (80μL) 또는 HBSS를 중앙대퇴부에 있는 박근(薄筋)의 4지점에 근육내 주입하였다. 허혈성 혈류 및 정상 다리에 세포 이식 당일, 7일, 14일 및 28일 후 레이저 도플러 관류 이미지 분석기(laser Doppler perfusion imaging (LDPI) analyzer, Moor instruments, Devon, UK)를 이용하여 측정하였다(도 6).

[76] 허혈성 다리 및 비허혈성 다리의 혈류를 유색의 히스토그램 픽셀(colored histogram pixels)을 기초로 계산하였다. 붉은색 및 파란색은 각각 높고 낮은 혈류를 나타내었다. 혈액의 흐름을 허혈성 대 비허혈성 다리 혈류의 비율을 나타내는 LDPI index로서 나타내었다. 도 7에서 수술 전의 비율, 1은 양 다리의 동일한 혈액의 흐름을 나타낸 것이다.

[77] 상기 측정결과와 관련, 도 6 및 도 7에서 나타난 바와 같이, 이식된 모든 iVPC 세포군들이 허혈성 다리 모델에서 혈류의 회복을 나타내었다. 특히, *ETV2*/*FLI1* 세포군에서 대조군에 비해 눈에 띄게 증가한 혈류회복을 나타내는 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 유효성분으로 포함하는 체세포로부터 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, HIV(Human immunodeficiency virus) 벡터, MLV(Murineleukemia virus) 벡터, ASLV(Avian sarcoma/leukosis) 벡터, SNV(Spleen necrosis virus) 벡터, RSV(Rous sarcoma virus) 벡터, MMTV(Mouse mammary tumor virus) 벡터, 아데노바이러스(Adenovirus) 벡터 및 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 및 에피조말(episomal) 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 벡터인 것을 특징으로 하는 체세포로부터 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 체세포는 섬유아세포, 근육세포, 신경세포, 위점막세포, 배상세포, G세포, 주피세포(pericyte), 성상교세포(astrocyte), B세포, 혈액세포, 상피세포, 신경줄기세포, 조혈모세포, 중간엽줄기세포 및 제대혈 줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 세포인 것을 특징으로 하는 체세포로부터 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell)로의 직접교차분화 유도용 조성물.

[청구항 4] *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하여 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포(vascular progenitor cell).

[청구항 5] *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 제4항에 따른 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 허혈성 혈관질환은 뇌혈관질환, 심혈관질환, 하지허혈성질환, 말초혈관질환 또는 허혈성 근육괴사인 것을 특징으로 하는 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 7] *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 제4항에 따른

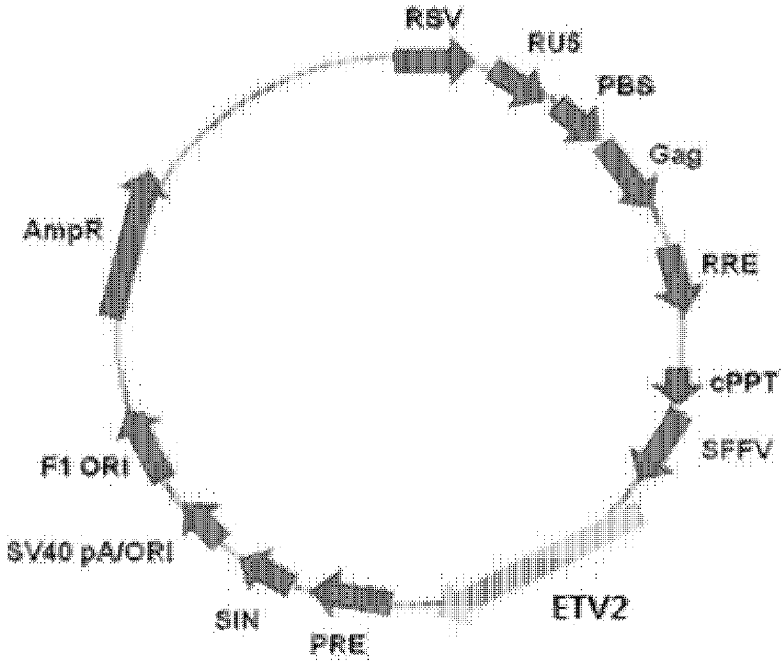
직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환의 예방 또는 치료용 세포치료제.

[청구항 8] *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 제4항에 따른 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환 치료 약물 스크리닝용 조성물.

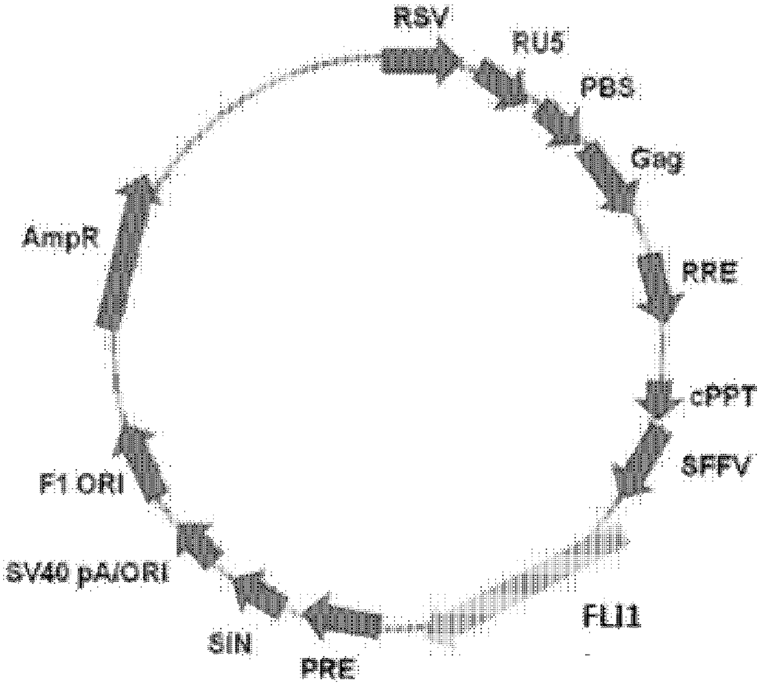
[청구항 9] *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자가 도입된 벡터 또는 제4항에 따른 직접교차분화 유도된 혈관 전구 세포를 유효성분으로 포함하는 허혈성 혈관질환 치료용 인공조직 제작을 위한 3D 프린팅 생체 소재 조성물.

[청구항 10] *ETV2*(Ets variant gene 2) 및 *FLI1*(Friend leukemia virus integration 1) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자가 도입된 벡터를 체세포에 도입하는 단계를 포함하는 체세포를 혈관 전구 세포로 직접교차분화하는 방법.

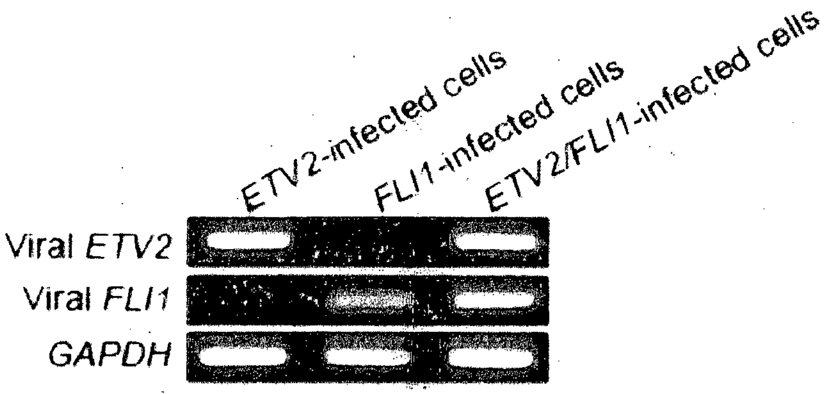
[Fig. 1]


RSV
RU5
PBS
Gag
RRE
cPPT
SFFV
ETV2
PRE
SIN
SV40 pA/ORI
F1 ORI
AmpR

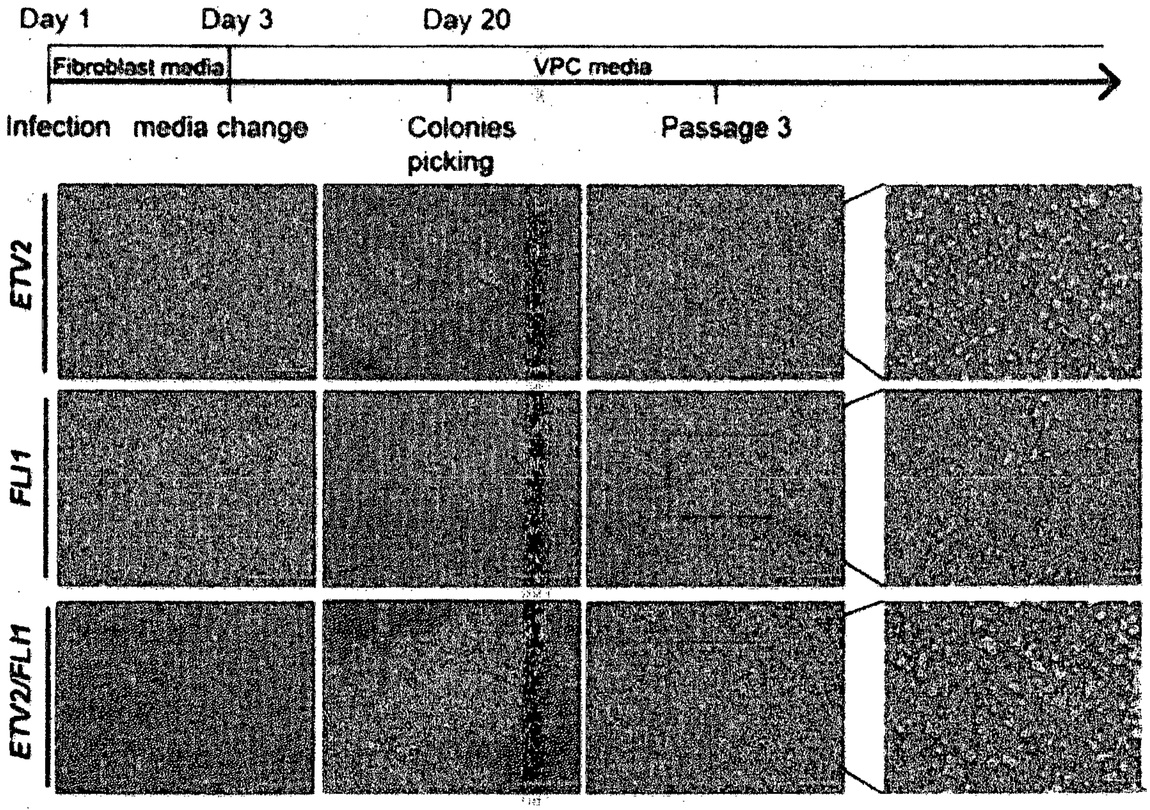
[Fig. 2]


RSV
RU5
PBS
Gag
RRE
cPPT
SFFV
FLI1
PRE
SIN
SV40 pA/ORI
F1 ORI
AmpR

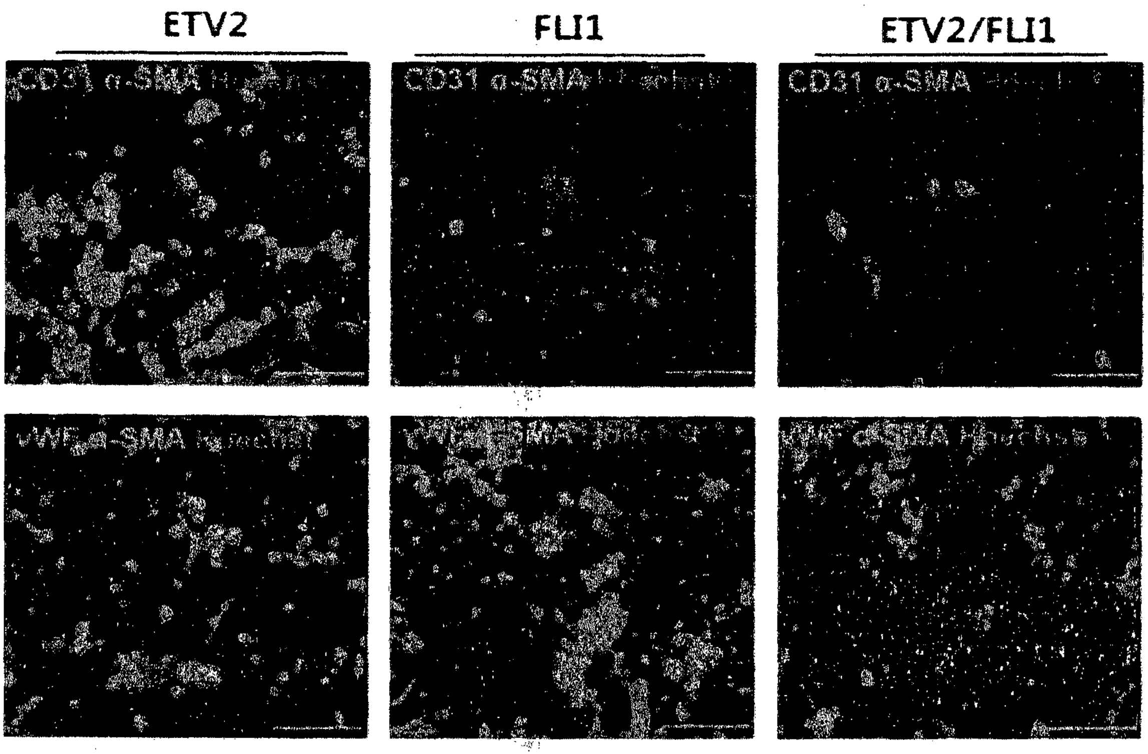
[Fig. 3]


ETV2-infected cells
FLI1-infected cells
ETV2/FLI1-infected cells
Viral ETV2
Viral FLI1
GAPDH

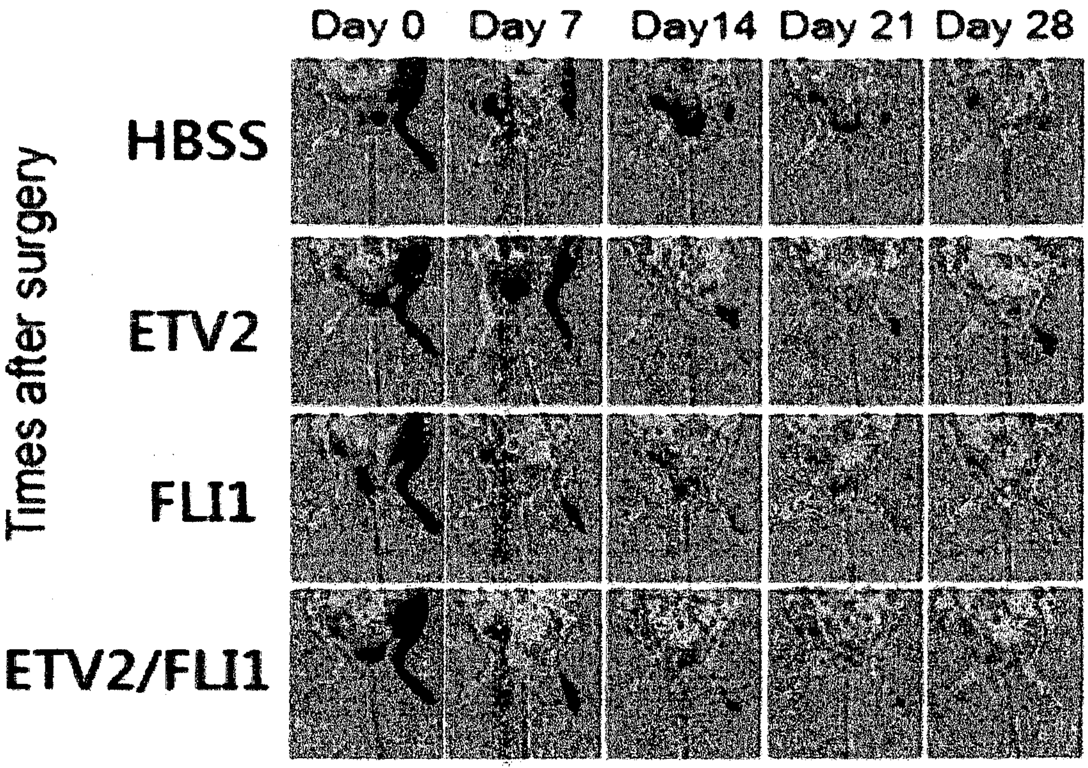
[Fig. 4]


Day 1
Day 3
Day 20
Fibroblast media
VPC media
Infection
media change
Colonies picking
Passage 3
ETV2
FLI1
ETV2/FLI1

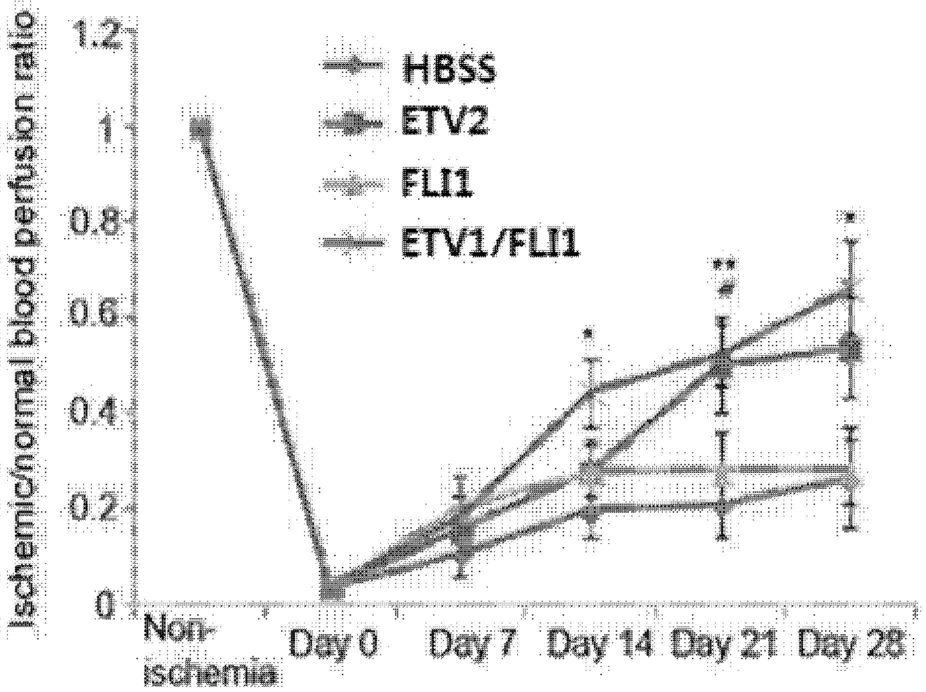
[Fig. 5]


ETV2
FLI1
ETV2/FLI1
CD31 α-SMA
vWF α-SMA

[Fig. 6]


Day 0
Day 7
Day14
Day 21
Day 28
Times after surgery
HBSS
ETV2
FLI1
ETV2/FLI1

[Fig. 7]


Ischemic/normal blood perfusion ratio
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
HBSS
ETV2
FLI1
ETV1/FLI1
Non-ischemia
Day 0
Day 7
Day 14
Day 21
Day 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/002039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i, A61P 9/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 48/00; C12N 5/10; C12N 15/12; A61P 9/10; A61P 9/00

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), Google scholar Search & Keywords: ETV2, FLI1, vector, somatic cell, endothelial progenitor cell, reprogramming, inducement, ischemic disease, cardiovascular disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012-006440 A2 (CELLULAR DYNAMICS INTERNATIONAL, INC. et al.) 12 January 2012 See claims 1, 12, 27, 29, 32, 33, 34, 35, 36, paragraphs [0009], [0019], [0120], [0121], [0136] to [0149], [0237]	1-9
A	Michael Ginsberg et al., "Efficient Direct Reprogramming of Mature Amniotic Cells into Endothelial Cells by ETS Factors and TGFβ Suppression", Cell, Vol. 151(3), pages 559-575 (Published on 26 October 2012) See the entire document.	1-9
A	Kelly Lammerts van Bueren et al., "Regulation of endothelial and hematopoietic development by the ETS transcription factor Etv2", Curr opin hematol, Vol. 19(3), pages 199-205 (Published on May 2012) See the entire document.	1-9

☐ 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
23 JUNE 2015 (23.06.2015)	**23 JUNE 2015 (23.06.2015)**
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/KR2015/002039

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.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 10 claims a method for direct transdifferentiation of a somatic cell into a vascular progenitor cell through the introduction of a vector of which the ETV2 gene is inserted into a somatic cell, and corresponds to a method for treating diseases of the human body, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

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:

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/KR2015/002039

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2012-006440 A2	12/01/2012	CA 2804595 A1	12/01/2012
		EP 2591093 A2	15/05/2013
		EP 2591093 A4	08/01/2014
		JP 2013-535186 A	12/09/2013
		US 2012-009618 A1	12/01/2012
		US 2014-349398 A1	27/11/2014
		US 8785192 B2	22/07/2014
		WO 2012-006440 A3	05/04/2012

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/002039

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i, A61P 9/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 48/00; C12N 5/10; C12N 15/12; A61P 9/10; A61P 9/00

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), 구글학술검색 & 키워드: ETV2, FLI1, 벡터, 체세포, 혈관전구세포, 교차분화, 유도, 허혈성 질환, 심혈관 질환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2012-006440 A2 (CELLULAR DYNAMICS INTERNATIONAL, INC. 외 2명) 2012.01.12 청구항 1, 12, 27, 29, 32, 33, 34, 35, 36, 단락번호 [0009], [0019], [0120], [0121], [0136] 내지 [0149], [0237] 참고	1-9
A	Michael Ginsberg 외 15명, "Efficient Direct Reprogramming of Mature Amniotic Cells into Endothelial Cells by ETS Factors and TGFβ Suppression", Cell, Vol. 151(3), pages 559-575 (2012.10.26. 공개) 전문 참고	1-9
A	Kelly Lammerts van Bueren 외 1명, "Regulation of endothelial and hematopoietic development by the ETS transcription factor Etv2", Curr opin hematol, Vol. 19(3), pages 199-205 (2012.5. 공개) 전문 참고	1-9

☐ 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
2015년 06월 23일 (23.06.2015)	2015년 06월 23일 (23.06.2015)

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

심사관
정의준
전화번호 +82-42-481-8148

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: 10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 10은 체세포에 ETV2 유전자가 삽입된 벡터를 도입하여 혈관전구 세포로 직접 교차분화하는 방법을 청구하고 있고, 이는 인간의 질병의 치료방법에 관한 것이므로, PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사를 할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

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.

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.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/002039

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2012-006440 A2	2012/01/12	CA 2804595 A1	2012/01/12
		EP 2591093 A2	2013/05/15
		EP 2591093 A4	2014/01/08
		JP 2013-535186 A	2013/09/12
		US 2012-009618 A1	2012/01/12
		US 2014-349398 A1	2014/11/27
		US 8785192 B2	2014/07/22
		WO 2012-006440 A3	2012/04/05