



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월29일
(11) 등록번호 10-2631374
(24) 등록일자 2024년01월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/12 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/36 (2006.01) C12M 1/42 (2017.01)
C12N 5/074 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12M 23/04 (2013.01)
C12M 35/02 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7029866(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2012년11월30일
심사청구일자 2022년09월28일
- (85) 번역문제출일자 2022년08월29일
- (65) 공개번호 10-2022-0141823
- (43) 공개일자 2022년10월20일
- (62) 원출원 특허 10-2021-7024088
원출원일자(국제) 2012년11월30일
심사청구일자 2021년07월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/067417
- (87) 국제공개번호 WO 2013/082509
국제공개일자 2013년06월06일
- (30) 우선권주장
61/565,818 2011년12월01일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
US20110286978 A1*
WO2011026222 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
뉴욕 스템 셀 파운데이션, 인코포레이티드
미국, 뉴욕 10019, 뉴욕, 3 플로어, 619 웨스트
54 스트리트
- (72) 발명자
노글 스콧
미국 10031 뉴욕주 뉴욕 해밀턴 플레이스 102
에간 케빈
미국 02114 매사추세츠주 보스턴 스트롱 플레이스
6
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 9 항

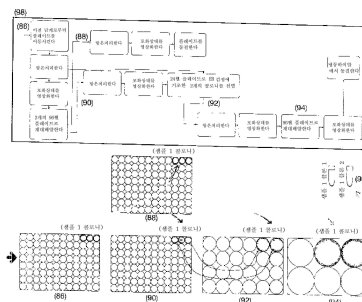
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 유도 다능성 줄기 세포 또는 분화된 세포를 제조하기 위한 자동화 시스템

(57) 요약

본 발명은 성체 체세포로부터 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)를 제조하기 위한 자동화 시스템을 제공한다. 추가로, 줄기 세포로부터 분화된 성체 세포를 제조하기 위해 시스템을 사용한다. 본 발명 시스템은 조직 샘플로부터 체세포를 단리하고, 이러한 세포를 재프로그래밍함으로써 성체 분화 세포로부터 iPSC 세포주를 생성하고, 다른 세포 (뒷면에 계속)

대표도



중에서 다능성 재프로그래밍된 성체 세포를 확인하고 확인된 재프로그래밍된 세포를 증식시키는 데 유용하다.

(52) CPC특허분류

C12M 41/48 (2013.01)

C12M 47/04 (2013.01)

C12N 5/0696 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/580,007 2011년12월23일 미국(US)

61/700,792 2012년09월13일 미국(US)

(72) 발명자

창 스티븐

미국 92064 캘리포니아주 포웨이 카미노 델 발레
12912

솔로몬 수잔 엘.

미국 10024 뉴욕주 뉴욕 센트럴 파크 웨스트 211
아파트 5 쉼

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 플레이트 위에 세포를 위치시키기 위해 구성된 자동화 세포 평판배양 유닛;
 (b) 세포 평판배양 유닛 위의 세포를 분화 인자와 접촉시킴으로써 분화된 세포를 생산하는 자동화된 세포의 분화를 위해 구성된 자동화 유도 유닛; 및
 (c) 분화된 세포에 특이적인 마커를 확인함으로써 유도 유닛에 의해 생산된 분화된 세포를 선택적으로 분류 및 분리하기 위해 구성되고, 복수 개의 샘플을 동시에 병렬적으로 프로세싱하도록 구성된 자동화 분류 유닛을 포함하고, 유도 유닛 및 분류 유닛의 자동화를 제어하는 기능을 갖는 제어기(controller) 소프트웨어를 포함하는, 분화된 세포를 생성하기 위한 자동화 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 분리된 분화된 세포를 증식시키고 증식된 분화된 세포를 선택하기 위한 증식 유닛을 추가로 포함하는 것인 자동화 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서, 분리된 분화된 세포를 냉동시키기 위한 냉동 유닛을 추가로 포함하는 것인 자동화 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서, 유도 유닛은 바이러스 벡터를 사용하여 분화를 개시하는 것인 자동화 시스템.

청구항 5

제4항에 있어서, 유도 유닛은 레트로바이러스 또는 센다이 바이러스를 사용하여 분화를 개시하는 것인 자동화 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서, 유도 유닛은 소분자, 펩타이드, 단백질 또는 핵산을 사용하여 분화를 개시하는 것인 자동화 시스템.

청구항 7

제1항에 있어서, 세포 평판배양 유닛에 의해 사용된 세포를 얻기 위한 세포 बैं킹 유닛을 추가로 포함하는 것인 자동화 시스템.

청구항 8

제7항에 있어서, 세포 बैं킹 유닛은,
 플레이트 위에 생검을 위치시키기 위한 생검 평판배양 유닛;
 세포를 성장시키기 위한 생육 및 계대배양 유닛; 및
 마이코플라스마의 존재를 시험하기 위한 마이코플라스마 시험 유닛을 포함하는 것인 자동화 시스템.

청구항 9

제1항에 있어서, 분화된 세포는 조혈모세포, 근육 세포, 심근 세포, 간 세포, 연골 세포, 상피 세포, 비뇨기관 세포 및 뉴런 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 자동화 시스템.

- 청구항 10
삭제
- 청구항 11
삭제
- 청구항 12
삭제
- 청구항 13
삭제
- 청구항 14
삭제
- 청구항 15
삭제
- 청구항 16
삭제
- 청구항 17
삭제
- 청구항 18
삭제
- 청구항 19
삭제
- 청구항 20
삭제
- 청구항 21
삭제
- 청구항 22
삭제
- 청구항 23
삭제
- 청구항 24
삭제
- 청구항 25
삭제

- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제
- 청구항 37
- 삭제
- 청구항 38
- 삭제
- 청구항 39
- 삭제
- 청구항 40
- 삭제
- 청구항 41
- 삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 분화된 성체 세포로부터 유도 다능성 줄기 세포(induced pluripotent stem cell: iPSC)를 제조하기 위한 자동화 시스템, 더 구체적으로는 조직 샘플로부터 체세포를 단리하고, 이러한 세포를 재프로그래밍함으로써 성체 분화 세포로부터 iPSC 세포주를 생성하고, 다른 세포 중에서 다능성 재프로그래밍된 성체 세포를 확인하고 확인된 재프로그래밍된 세포를 증식시키기 위한 자동화 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기 세포는 세포 분열을 통해 오랜 기간 자기 재생하고 분화 기능을 갖는 세포, 즉 분화된 세포로 분화하도록 유도할 수 있는 미분화 세포이다. 이러한 품질은 다양한 의학 병증에서 손상된 세포 및 조직을 대체하기 위한 치료학적 분야에서 사용하는 데 줄기 세포에 커다란 희망을 제공한다. 배아 줄기(embryonic stem: ES) 세포는

초기 단계 배아의 배반포로부터 유래하고 내배엽, 외배엽 및 중배엽(3개의 배엽 층)(즉, 이들은 "다능성"임)으로 발생할 가능성을 갖는다. 실험실내, ES 세포는 다양한 유형의 조직으로 저절로 분화하는 경향이 있고, 이의 분화 방향의 조절이 도전과제일 수 있다. 인간 ES 세포를 수확하기 위해 배아의 파괴와 관련된 해결되지 않은 윤리적인 문제가 있다. 이러한 문제는 조사 및 치료학적 분야에 대한 이의 이용가능성을 제한한다.

[0003] 분화된 조직 중에서 성체 줄기(adult stem: AS) 세포가 발견되었다. 성체 조직으로부터 얻은 줄기 세포는 전형적으로 세포의 더 제한된 스펙트럼(즉, "다분화능")을 형성하는 가능성을 갖고, 최근의 보고가 특정 유형의 AS 세포에서 유연성을 나타내는 하지만 전형적으로 이것이 발견된 조직의 세포로만 분화한다. 이는 또한 일반적으로 제한된 증식 가능성을 갖는다.

[0004] 분화된 성체 세포로부터 실험실 방법에 의해 유도 다능성 줄기 세포(iPSC 또는 iPSCs)를 제조한다. iPSC는 예를 들면 의학 조사를 수행하기 위한 중요한 도구로서 널리 인식되고 있다. 지금까지, iPSC를 제조하는 기술은 시간 소모적이고 노동 집약적이었다. 섬유아세포와 같은 분화된 성체 세포는 재프로그래밍되고 배양되고 독특한 클론을 나타내는 각각의 콜로니가 형성되게 한다. 이전에, 대부분의 세포가 완전히 재프로그래밍된 iPSC 클론이 아니므로 이러한 유형의 세포를 확인하는 것은 어려웠다. 표준은 iPSC 클론을 세포의 형태에 기초하여 선택하는 것이고, 바람직한 콜로니는 높은 핵 세포질 비율을 갖는 세포를 포함하는 날카롭게 표시된 경계를 보유한다. 클론이 확인될 때, 클론을 매우 얇은 유리 도구로 수동으로 고르고 전형적으로 췌장과 배아 섬유아세포(Murine Embryonic Fibroblast: MEF)인 세포의 "공급(feeder)" 층에서 배양한다. 재프로그래밍 백터에 의한 감염 14일 내지 21일 후 이 단계를 전형적으로 수행한다. 이후, 분자 규명을 수행하기 전에 다시 14일 내지 21일 이상 동안 클론을 증식시킨다.

[0005] 완전 재프로그래밍된 성체 섬유아세포 및 이의 다운스트림 분화 가능성을 신속하고 더 정확하게 확인하고 규명하기 위한 기법을 개발하는 데 초점을 두었다(Bock *et al.*, 2011, *Cell* 144: 439-452; Boulting *et al.*, 2011, *Nat Biotechnol* 29: 279-286). 또한, 예를 들면 표면 단백질의 독특한 발현 패턴에 의해 정의된 살아 있는 종류의 독특한 하위집단을 확인하기 위한 형광 활성화 세포 선별기(Fluorescence Activated Cell Sorting: FAC)의 용도를 기술하고 있는 2011년 6월 13일자에 출원된 공동 소유의 미국 출원 제13/159,030호를 참조한다.

[0006] 따라서, 줄기 세포는 치료학적 적용, 의학 조사, 약제학적 시험 등에 대한 매력적인 세포 공급원이다. 그러나, 이러한 수요 및 다른 수요를 만족시키기 위해 표준 조건 하에 재생 가능한 iPSC 세포주를 신속히 제조하고 단리하기 위한 자동화 시스템에 대한 당해 분야에서의 오랫동안의 수요가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 성체 조직으로부터 체세포를 사용하고 이 체세포, 예를 들면 성체 섬유아세포로부터 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)를 생성하기 위한 시스템을 제공한다. 일 양태에서, 상기 시스템은 또한 출발 시점으로서 이전에 단리된 체세포를 사용한다.

[0008] 본 발명은 iPSC를 생성하기 위한 자동화 시스템으로서,

[0009] 플레이트 위에 체세포를 위치시키기 위한 체세포 평판배양 유닛; 및

[0010] 체세포 평판배양 유닛 위의 체세포를 재프로그래밍 인자와 접촉시켜 iPSC를 생성함으로써 체세포를 자동화 재프로그래밍하기 위한 유도 유닛을 포함하는 시스템을 제공한다.

[0011] 일 실시양태에서, 상기 시스템은 예를 들면 세포 위의 표면 마커를 포함하는 iPSC 특이적 마커를 확인함으로써 예를 들면 유도 유닛에 의해 생성된 iPSC를 선택적으로 분류하고 단리하기 위한 분류 유닛을 추가로 포함한다. 예시적인 일례에서, 체세포는 섬유아세포이다.

[0012] 추가로, 일 양태에서, 본 발명은 줄기 세포, 예를 들면 iPSC, 배아 줄기(ES) 세포 또는 중간엽 줄기(mesenchymal stem: MS) 세포로부터 분화된 성체 세포를 생성하고 단리시키기 위한 자동화 시스템으로서,

[0013] 플레이트 위에 줄기 세포를 위치시키기 위한 줄기 세포 평판배양 유닛; 및

[0014] 줄기 세포 평판배양 유닛 위의 세포를 재프로그래밍 인자와 접촉시켜 분화된 성체 세포를 생성함으로써 줄기 세포를 자동화 재프로그래밍하기 위한 유도 유닛을 포함하는 시스템을 제공한다. 일 실시양태에서, 상기 시스템은 유도 유닛에 의해 생성된 분화된 성체 세포를 선택적으로 분류하고 단리하기 위한 분류 유닛을 추가로 포함한다.

[0015] 일 양태에서, 본 발명은 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)로부터 분화된 성체 세포를 생성하고 단리시키기 위한 자

동화 시스템으로서,

[0016] 플레이트 위에 iPSC를 위치시키기 위한 iPSC 평판배양 유닛; 및

[0017] iPSC 평판배양 유닛 위의 iPSC를 재프로그래밍 인자와 접촉시켜 분화된 성체 세포를 생성함으로써 iPSC를 자동화 재프로그래밍하기 위한 유도 유닛을 포함하는 시스템을 제공한다. 추가의 양태에서, 상기 시스템은 분화된 성체 세포에 특이적인 마커를 확인함으로써 유도 유닛에 의해 생성된 분화된 성체 세포를 선택적으로 분류하고 단리하기 위한 분류 유닛을 추가로 포함한다.

[0018] 본 발명은 또한 본 발명의 시스템을 사용하여 제조된 iPSC, 분화된 또는 전환분화된 세포를 제공한다. 추가로, 본 발명 iPSC 또는 분화된 세포로부터 얻은 세포의 집단을 포함하는 어레이가 본 명세서에 포함된다. 예를 들면, 분화된 세포는 조혈모세포, 근육 세포, 심근 세포, 간 세포, 연골 세포, 상피 세포, 비뇨기관 세포 및 뉴런 세포를 포함한다. 다른 양태에서, 본 발명 시스템에 의해 생성된 세포 뱅크가 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 섬유아세포 세포 뱅크를 얻기 위한 단계를 도시한 도면.

도 2는 섬유아세포 뱅크로부터 줄기 세포 어레이를 얻기 위한 단계를 도시한 도면.

도 3은 iPSC를 생성하기 위한 시스템에서의 단계를 도시한 흐름도.

도 4a 내지 도 4c는 자동화 재프로그래밍 공정 동안 다중 웰 조직 배양 플레이트를 통한 환자 샘플의 흐름의 예를 도시한 도면.

도 5a 내지 도 5c는 작업흐름을 성취하기 위한 설비 구성의 예를 도시한 도면.

도 6A 내지 도 6C는 자동화 생검 생육 추적 시스템을 도시한 도면. 도 6A에서, 생검 또는 버려진 조직을 6웰 접시의 다중 웰에서 평판배양하고, 섬유아세포 생육을 공급하고 영상화하고 계대배양하고 동결시키는 자동화 시스템에 의해 유지시킨다. 통상적인 샘플에 대한 이미지 분석 인터페이스의 예가 도시되어 있다. 도 6B: 독립적으로 생성된 표준 곡선으로부터의 선형 회귀에 기초한 포화상태 측정으로부터 세포수를 외삽한다. 도 6C: 본 발명 자동화 시스템에서 유지된 통상적인 생검 생육에 대한 세포 계수의 예. 환자 샘플마다 외삽된 세포수를 각각의 웰에 독립적으로 작도하여(상부) 샘플로부터의 전체 생산량을 계산한다(바닥).

도 7A 내지 도 7D는 자동화 iPSC 재프로그래밍을 나타내는 FAC 분석 및 그래프를 도시한 도면. 3주 기간 동안 재프로그래밍된 인간 섬유아세포에 대한 다능성 표면 마커의 발현 수준 뒤에 재프로그래밍 동역학을 관찰하고 한정된 세포 집단을 단리하기 위한 최적 시점을 결정한다. 도 7A: 분석에 사용되는 FAC 게이팅 계획. 도 7B: 전통적인 전분화능 표면 마커 SSEA4 및 TRA-1-60을 동시 발현하는 세포의 실질적인 부분은 Oct4, Sox2, Klf4 및 c-Myc와 같은 재프로그래밍 인자를 도입하기 위한 바이러스 벡터를 사용하는 재프로그래밍 동안 모든 시점에서 섬유아세포 마커 CD13을 포함한다. 131 실험으로부터의 집계된 데이터를 나타내는 박스 도면(레트로바이러스, n=66, 센다이 바이러스, n=65)이 도시되어 있다. 센다이 중재 재프로그래밍은 더 많은 SSEA4/TRA-1-60 이중 양성 세포를 생성하고, (C) 표면으로부터 CD13의 제거가 지연된다. (D) 본 발명 자동화 시스템에서 센다이/사이토퉀(Cytotune) 시스템을 사용하여 재프로그래밍된 환자 세포주의 예시적인 염색 패턴. 둘 다 감염후(dpi) 7일 및 13일 둘 다에, SSEA4/TRA-1-60 이중 양성 세포의 반 이상이 CD13을 소실하였다. 추가로, 검정된 시점 둘 다에서, CD13 음성/나노그(Nanog) 양성 세포가 이 분획에 존재하여, CD13에 대한 음성 선택에 의해 이것이 단리될 수 있다는 것을 제시한다.

도 8A 내지 도 8C는 iPSC의 농후화 및 클론 선택을 나타내는 자동화 시스템의 일부 및 FAC 예비 분류 분석을 도시한 도면. 도 8A는 비재프로그래밍된 세포 집단이 섬유아세포 마커에 의한 음성 선택에 의해 iPSC의 배양으로부터 고갈될 수 있다는 것을 도시한다. 이 예에서, 섬유아세포는 2% 확립 iPSC를 포함하는 배양으로부터 효과적으로 제어되어 TRA-1-60 양성 iPSC를 그대로 둔다. 도 8B는 24개의 샘플을 동시에 분류할 수 있는 해밀턴(Hamilton) 액체 핸들러에 통합된 밀테니(Miltenyi) MultiMACS 시스템을 도시한다. 도 8C는 한계 희석으로 96 웰 영상화 플레이트에 평판배양된 항섬유아세포 자기 음성 선택 단계로부터의 iPSC 농후화 분획을 예시한다. 전분화능 표면 마커 TRA-1-60 또는 TRA-1-81을 염색하는 살아 있는 세포를 사용하여 이 플레이트를 스크리닝한다. 단일 콜로니 확인할 수 있는 셀리고 소프트웨어를 사용하는 자동화 이미지 분석에 의해 TRA-1-60 양성 iPSC를 갖는 웰을 확인한다. 계대배양, 증식 및 QC를 위한 표면 마커에 양성인 단일 콜로니를 포함하는 것의 기준 둘 다를 만족시키는 웰을 선택한다.

도 9A 내지 도 9B는 본 명세서에 기재된 득점카드 검정에 대한 예시를 제공하는 도면. 품질 관리 스크린의 제1 단계는 일련의 전분화능 분화 및 전이유전자 마커를 사용하여 3개의 클론의 초기 세트를 선택한다. 도 9A는 2개의 인간 ESC 세포주, 섀다이 양성 대조군, 섬유아세포 음성 대조군 및 5회 및 10회 계대배양에서 검정된 FAC 분류에 의해 유래한 iPSC 세포주에 대해 HK 유전자 발현으로의 정규화 후 전사물 계수를 도시한다. 유사한 조건 하에 유지된 일련의 정상 인간 ESC 및 iPSC 세포주에 대해 모든 검정을 실행한다. 도 9B는 본 발명 품질 관리 스크린의 제2 단계를 예시하고, 이는 추가의 83개의 배엽 층/계통 마커를 사용하여 배양체 검정에서 분화 능력을 모니터링한다. 단일 EB를 생성하고 풀링하여 배양체 득점카드 검정에서 배엽 층 마커의 발현 분석을 위해 RNA를 수집한다. 9개의 상이한 배아 줄기 세포주로부터 수집된 EB에서 유전자 발현의 클러스터 계통도 분석이 도시되어 있다. 정규화 후, 6개의 EB의 직접 용해로부터 생성된 데이터를 벌크 배양으로부터 제조된 EB로부터 추출되고 정제된 전체 RNA로부터 생성된 데이터와 알맞게 비교한다.

도 10A 내지 도 10B는 CNV에 대해 나노스트링 엔카운터(Nanostring nCounter) 검정에 기초한 iPSC의 고속 염색체검사를 나타낸 도면. 도 10A는 BC1 iPSC에서 엔카운터 핵형 검정의 예이고; 도 10B는 염색체 암의 부분 획득 및 소실을 갖는 1016 섬유아세포에서 엔카운터 핵형 검정의 예이다. 아피메트릭스 SNP 6.0 칩 데이터에 대한 비교는 Chr1의 q 암의 부분에서의 카피수 획득(상부 트랙, 1q21.2 - 1q43) 및 Chr6의 긴 암의 일부의 소실(하부 트랙, 6q16.3 - 6q26)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 iPSC 및 분화된 세포를 제조하기 위한 자동화 시스템의 생성에 기초한다. 본 발명 시스템은 표준화 iPSC 세포주를 제조하는 효율 및 재현성을 크게 개선한다. 전형적으로, 조사자는 손으로 iPSC를 생성하고, 이는 조사자 가변성 및 많은 수의 세포를 생성하지 못함으로 인해 세포 이용을 제한한다. 본 발명 시스템은 조직 또는 세포 샘플의 수취로부터 잘 정의된 iPSC 세포주의 많은 스톡의 बैं킹으로 완전한 자동화 시스템에 의해 이러한 문제를 피한다. 상기 시스템은 많은 공여자로부터의 많은 수의 세포의 생성에 대해 일관성 및 불변성을 허용하여 많은 질환에 대한 치료 및 치유를 개발하기 위한 iPSC 기술의 이용을 수월하게 한다.
- [0021] 일 실시양태에서, 본 발명의 작업흐름 시스템은
- [0022] 플레이트 위에 세포를 위치시키기 위한 체세포, 예를 들면 섬유아세포 평판배양 유닛; 및
- [0023] 평판배양 유닛 위의 세포를 재프로그래밍 인자와 접촉시켜 iPSC를 생성함으로써 세포를 자동화 재프로그래밍하기 위한 유도 유닛을 포함하는 iPSC를 생성하고 단리하기 위한 자동화 시스템을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 본 발명 시스템은 예를 들면 표면 마커 또는 형질도입 벡터에 의해 삽입된 녹색 형광 단백질을 포함하는 iPSC 특이적 마커를 확인함으로써 유도 유닛에 의해 생성된 iPSC를 선택적으로 분류하고 단리하기 위한 분류 유닛을 추가로 포함한다. 세포주, 생검, 또는 혈액 등을 포함하는 다른 조직 샘플로부터 체세포를 얻을 수 있다.
- [0024] 다른 실시양태에서, 본 발명은 줄기 세포, 예를 들면 iPSC, 배아 줄기(ES) 세포 또는 중간엽 줄기(MS) 세포로부터 분화된 성체 세포를 생성하고 단리하기 위한 자동화 시스템으로서,
- [0025] 플레이트 위에 세포, 예를 들면 iPSC, ES 또는 MS 세포를 위치시키기 위한 줄기 세포 평판배양 유닛; 및
- [0026] 줄기 세포 평판배양 유닛 위의 세포를 재프로그래밍 인자와 접촉시켜 분화된 성체 세포를 생성함으로써 세포를 자동화 재프로그래밍하기 위한 유도 유닛을 포함하는 시스템을 제공한다. 일 실시양태에서, 상기 시스템은 분화된 성체 세포에 특이적인 마커를 확인함으로써 유도 유닛에 의해 생성된 분화된 성체 세포를 선택적으로 분류하고 단리하기 위한 분류 유닛을 추가로 포함한다.
- [0027] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)로부터 분화된 성체 세포를 생성하고 단리하기 위한 자동화 시스템으로서,
- [0028] 플레이트 위에 iPSC를 위치시키기 위한 iPSC 평판배양 유닛; 및
- [0029] iPSC 평판배양 유닛 위의 iPSC를 재프로그래밍 인자와 접촉시켜 분화된 성체 세포를 생성함으로써 iPSC를 자동화 재프로그래밍하기 위한 유도 유닛을 포함하는 시스템을 제공한다. 일 실시양태에서, 상기 시스템은 분화된 성체 세포에 특이적인 마커를 확인함으로써 유도 유닛에 의해 생성된 분화된 성체 세포를 선택적으로 분류하고 단리하기 위한 분류 유닛을 추가로 포함한다.
- [0030] 본 발명은 분화된 성체 세포로부터 iPSC를 제조하기 위한 자동화 작업흐름 시스템을 제공한다. 대략, 본 발명의

작업흐름 시스템은 성체 분화 세포(예를 들면, 단리된 또는 조직 샘플)로 시작하고 다능성 세포로부터 유래한 iPSC 또는 성체 세포를 생성시키는 새로운 작업흐름 시스템을 제공한다. 일 실시양태에서, 성체 분화 세포는 바람직하게는 예를 들면 피부 생검으로부터 얻은 섬유아세포이다. 자동화 및 로봇공학을 포함한 본 발명의 작업흐름에 의해 성체 섬유아세포를 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)로 전환한다. 본 발명의 작업흐름 시스템은 수천개의 iPSC를 동시에 생성하여 년 대신에 달의 기간으로 이전에 필요했던 가속 기간을 발생시킬 수 있다. 본 발명의 작업흐름 시스템은 출발 물질을 위한 임의의 세포 단리 시스템에 적용되고, 예를 들면 직접 또는 간접 재프로그래밍 및 전환분화에 적용될 수 있다. 본 발명의 작업흐름 시스템은 6, 24, 96, 384, 1536 이상의 크기의 어레이로부터 세포의 세포내 어레이를 이용하는 제조를 허용한다. 본 발명의 작업흐름 시스템은 유연하고, 세포 유형 및 조직에서 여러 반복 및 유연성을 허용한다. 본 명세서의 설명은 예시적인 체세포로서 섬유아세포로 기재되어 있다. 본 명세서에 기재된 바대로, 시스템에서 다른 세포 유형을 사용한다. 이러한 방식으로 예가 제한되는 것으로 의도되지 않는다.

- [0031] 작업흐름 시스템
- [0032] 작업흐름 시스템은 4개의 독립적으로 조작되는 유닛으로 나뉜다:
- [0033] (1) 격리 체세포 단리 및 성장(시스템 1);
- [0034] (2) 격리 검정(시스템 2);
- [0035] (3) 해동, 감염 및 확인(시스템 3, 4 및 5); 및
- [0036] (4) 유지, QC, 팽창 및 동결 (시스템 6, 7 및 8).
- [0037] 추가로, 1.4ml의 매트릭스 스크루 캡 관에서 섬유아세포 및 최종 클론을 저장하기 위한 자동화 -80 저장 및 인출 시스템은 시스템의 일부이다. 각각의 유닛이 수행하는 시스템 및 단계 및 조작이 하기 기재되어 있다.
- [0038] 시스템 1, A 파트: 격리 체세포 단리 및 성장 작업흐름, 생검 프로세싱 예비 마이코플라스마 시험
- [0039] 1. 테크니션은 6웰 접시에서 매주마다 40개의 생검을 평판배양한다;
- [0040] 2. 200-플레이트 용량을 갖는 격리 항온처리기에서 6웰 플레이트를 유지시킨다;
- [0041] 3. 통합 신텔렉트 셀리고 사이토미터(Cyntellect Celigo Cytometer)에서 정기적인 포화상태 체크를 수행한다.
- [0042] 이 자동화 단계를 수행하는 데 필요할 수 있는 시스템 부품은 예의 방식으로 스타레트 매뉴얼 로드(STARlet Manual Load), 4/8/12 ch./MPH를 위한 모듈러 암(Modular Arm), 1000 μ l의 피펫팅 채널(Pipetting Channel)을 갖는 8 채널 및 iSWAP 플레이트 핸들러(모두 해밀턴 사이언스 로보틱스(Hamilton Science Robotics)로부터 구입 가능)를 포함한다. 원심분리가 필요하거나 이를 원하는 경우, 아질런트(Agilent) VSpin 마이크로플레이트 원심분리기를 사용할 수 있다. 소프트웨어는 셀리고(Celigo) API 소프트웨어일 수 있다. 항온처리기는 사이토매트(Cytomat) 항온처리기일 수 있다. 플레이트 취급을 위해, 사이토매트 24 바코드 판독기, 사이토매트 23mm 스택커(Stacker) 및 사이토매트 400mm 이송 스테이션을 사용할 수 있다. 플레이트를 기울이기 위해, 멀티플렉스 틸트 모듈(MultiFlex Tilt Module)을 사용할 수 있다. 시스템 제어기는 윈도우 XP 조작 시스템이 구비된 델 PG일 수 있다. 캐리어 패키지는 Q 그로스 캐리어 패키지일 수 있다.
- [0043] 시스템 1, 파트 B: 격리 성장 작업흐름, 마이코플라스마 시험
- [0044] 1. 항온처리기로부터 격리 성장 스타레트의 텍으로 인출하고, ELISA 기반 마이코플라스마 시험을 위해 웰로부터 플레이트로 배지를 제거한다.
- [0045] 2. 96웰 검정 플레이트를 격리 검정 스타레트로 수동으로 이동시킨다.
- [0046] 시스템 1, 파트 C: 마이코플라스마 시험을 통과한 후 격리 성장 작업흐름
- [0047] 1. 다중 냉동마이알로 분포된 섬유아세포를 증식시키고, 캡핑하고, SAM - 80 $^{\circ}$ C로 이동시킨다.
- [0048] 이 자동화 단계를 수행하기 위해 사용될 수 있는 시스템 부품은 스타레트 오토 로드(STARlet Auto Load)를 사용할 수 있다는 것을 제외하고는, 격리 성장 작업흐름에서 사용된 동일한 부품으로부터 선택될 수 있다. 스펙트럼 맥스 엘 판독기(Spectramax L Reader)를 스펙트럼 획득 디바이스로서 사용할 수 있다.
- [0049] 시스템 2: 격리 검정 작업흐름

- [0050] 1. 글로우 발광 방법(론자 마이코알버트(Lonza MycoAlert))을 이용하여 시험한다.
- [0051] 2. 스펙트럼 획득 디바이스에서 관독되는 발광 플레이트를 수행한다.
- [0052] 이 자동화 단계를 수행하는 데 필요할 수 있는 시스템 부품은 스타레트 매뉴얼 로드, 4/8/12 ch./MPH를 위한 모듈러 압, 1000 μ l의 피펫팅 채널을 갖는 8 채널 및 iSWAP 플레이트 핸들러(모두 해밀턴 사이언스 로보틱스로부터 구입 가능)를 포함한다. 발광 검정을 위해, 바이오텍 시너지 HT 관독기(BioTek Synergy HT Reader)를 사용할 수 있다. 시스템 제어기는 윈도우 XP 조작 시스템이 구비된 텔 PG일 수 있다. 캐리어 패키지는 Q 그로스 캐리어 패키지일 수 있다.
- [0053] 시스템 3, 4 및 5: 해동, 감염 및 확인
- [0054] 해동 모듈 및 감염 모듈
- [0055] 1. SAM-80 $^{\circ}$ C로부터 냉동관을 인출한다(61, 190)
- [0056] 2. 가온 블록에서 해동한다(122)
- [0057] 3. 탈캡핑한다(해밀턴 캡퍼 디캡퍼(Hamilton Capper Decapper))(126)
- [0058] 4. 배지를 희석 동결방지제에 첨가한다(122)
- [0059] 5. 스피닝한다(128)
- [0060] 6. 평판배양 데이터에서 재중단한다(122)
- [0061] 7. 6웰의 웰당 1개의 샘플을 평판배양한다(62, 122)
- [0062] 8. 향온처리기로 이동시킨다(130, 132)
- [0063] 9. 약 3일 내지 4일 동안 섬유아세포를 회수한다
- [0064] 10. 신텔렉트 셀리고 사이토미터에서 포화상태를 체크한다(124)
- [0065] 11. 재프로그래밍을 위해 동일자에 모든 웰의 섬유아세포 계대배양(122)
- [0066] 12. 배치에서, 트립신 계대배양 웰(122)
- [0067] 13. 신텔렉트 셀리고 사이토미터에서 세포를 계수한다(124)
- [0068] 14. 가능한 적은 24웰 플레이트에 샘플을 강화하는 24웰 플레이트의 1-내지-3 웰에서 웰당 한정된 수를 평판배양한다(64, 122)
- [0069] 15. 플레이트를 향온처리기로 밤새 복귀시킨다(130, 132)
- [0070] 16. 플레이트를 인출하고 관 포맷으로 바이러스를 해동하고 24웰 플레이트에서 섬유아세포의 각각의 웰에 첨가한다(130, 122)
- [0071] 17. 매일 부분 배지 교환(122)
- [0072] 자기 분류 모듈
- [0073] 18. 단일 세포 현탁액에 정확도로 배양물을 수확한다(134)
- [0074] 19. 염색 완충제 중에 희석한다(134)
- [0075] 20. 섬유아세포 표면 마커에 대해 자기 비드로 염색한다(134)
- [0076] 21. 세척 단계(134)
- [0077] 22. 자석(다날(Dyna1) 비드를 위해) 또는 컬럼(밀테니 시스템을 위해)에 적용한다(134, 136)
- [0078] 23. 새로운 웰에 비자기 분획으로 인출한다(134)
- [0079] 24. 신텔렉트 셀리고 사이토미터에서 세포를 계수한다(124)
- [0080] 25. 계대배양 배지에서 96웰 플레이트에 웰당 1개 내지 10개의 세포를 전달하기 위해 적절한 세포 밀도로 희석한다(66, 134)

- [0081] 26. 4℃ 항온처리기로부터 새로운 매트릭겔(Matrigel) 또는 매트릭스 코팅된 96웰 플레이트로부터 인출한다(142)
- [0082] 27. 세포를 96웰 매트릭스 플레이트에 분포시키고, 수는 예를 들면 감염마다 플레이트마다 2개로 세포수에 기초한다(66, 134)
- [0083] 28. 플레이트를 항온처리기로 복귀시킨다(132)
- [0084] 29. 매일 부분 배지 교환(122)
- [0085] 콜로니 확인 모듈
- [0086] 30. 항온처리기로부터 콜로니 확인 액체 핸들러로 96웰 플레이트를 인출한다(66, 132, 138)
- [0087] 31. 진분화능 표면 마커에 의한 살아 있는 세포 염색을 수행한다(138)
- [0088] 32. 신텔렉트 셀리고 사이토미터에서 영상화한다(140)
- [0089] 33. 날카로운 콜로니 경계를 갖는 단일-마커 양성 콜로니를 갖는 웰을 확인한다(140)
- [0090] 34. 히트(hit)를 기술 검토하고 계대배양을 위해 원래 샘플마다 6개를 선택하고 플레이트 및 양성 웰 ID를 인출한다.
- [0091] 35. 단일 양성 콜로니를 갖는 웰을 선별한다(138)
- [0092] 36. 4℃ 항온처리기로부터 새로운 매트릭겔 또는 매트릭스 코팅된 96웰 플레이트로부터 인출한다(68, 142)
- [0093] 37. 선택된 웰을 수확하고 가능한 적은 플레이트에 클론을 강화하는 새로운 96웰 매트릭스 플레이트로 계대 배양하고 계대배양 배지에서 각각 평판배양한다(68, 138)
- [0094] 38. 매일 부분 배지 교환(122)
- [0095] 이 자동화 단계를 수행하기 위해 사용될 수 있는 시스템 부품은 하나 이상의 코어 96 프로브헤드 II(CORE 96 PROBEHEAD II) 1000 μ l의 모델 프로브 헤드의 첨가로 격리 성장 작업흐름에서 사용된 동일한 부품으로부터 선택 될 수 있다.
- [0096] 시스템 6, 7 및 8: 유지, QC, 팽창 및 동결
- [0097] 유지 모듈
- [0098] 39. 콜로니 밀도가 매우 충분할 때까지 새로운 96웰 매트릭스 코팅된 플레이트로 클론을 1:1 연속 계대배양 한다(68-72, 160)
- [0099] 40. 96팁 헤드와 약 75% 배지 교환으로 모든 플레이트를 매일 공급한다(160)
- [0100] 41. 신텔렉트 셀리고 사이토미터에서 콜로니 밀도 및 성장률을 정기적으로 모니터링한다(166)
- [0101] 42. 클론의 QC를 위해 플레이트를 생성하기 위해 플레이트 복제한다(74-86, 160)
- [0102] 43. 목표는 여러 QC 검정에서 사용하기 위해 다중 플레이트로 클론을 증식시켜 원래 샘플마다 2-내지-3 고품질 클론이 남을 때까지 빈약하게 수행된 클론을 제거하는 것이다
- [0103] 44. 또한, 빈약한 클론이 제거되어 가능한 적은 플레이트에 클론이 강화하면서, QC 단계를 통과한 클론을 선별하고 재배열한다(80, 86, 160)
- [0104] 45. 이 공정에 걸쳐 매일 공급한다(160)
- [0105] QC 모듈
- [0106] 46. 세포를 수확한다(74, 150)
- [0107] 47. 세포를 계수한다(164)
- [0108] 48. 라인마다 2-6개의 복제물에서 V-바닥 플레이트(5000-10000개의 세포/웰의 범위)에서의 한정된 세포수를 평판배양한다(84, 150)
- [0109] 49. 항온처리기로 복귀시킨다 - (1g 응집)(172)

- [0110] 50. 2일 후 배지 교환(150)
- [0111] 51. 항온처리기에서 추가로 12일 동안 항온처리한다(172)
- [0112] 52. 2일마다 부분 배지 교환(150)
- [0113] 53. 핵산 제조 스테이션으로 옮겨 웰로부터 배지를 제거하여 웰에 배양체가 남는다(84, 192)
- [0114] 54. RNA 용해 완충제 중에 재현탁하고 각각의 샘플에 대해 복제물을 합하고 혼합하고 플레이트가 나노스트링 엔카운터 검정에서 분석에 이용 가능하게 만든다(84, 192)
- [0115] 동결 모듈
- [0116] 55. 증식 계대배양 후 96웰 플레이트로 시작한다(88)
- [0117] 56. 항온처리기에서 6일 항온처리한다(172)
- [0118] 57. 매일 부분 배지 교환(154)
- [0119] 58. 항온처리기로부터 플레이트를 제거한다(88, 162)
- [0120] 59. 배지를 제거한다(완료를 위해 필요)(154)
- [0121] 60. 차가운 예비 동결건조 배지를 첨가한다(성장 배지 중에 희석된 매트릭셀)(154)
- [0122] 61. 1시간 동안 항온처리기에서 항온처리한다(172)
- [0123] 62. 배지를 제거한다(완료를 위해 필요)(154)
- [0124] 63. 차가운 동결 배지(저용적)를 첨가한다(154)
- [0125] 64. 플레이트를 밀봉한다(88, 164)
- [0126] 65. -80°C 저장으로 샘플을 오프라인 취하여 동결시킨다(190)
- [0127] 66. 기상 액체 질소에서 저장한다
- [0128] 냉동바이알 저장
- [0129] 67. 증식 계대배양 후 96웰 플레이트로 시작한다(90)
- [0130] 68. 6일 항온처리한다(172)
- [0131] 69. 매일 부분 배지 교환(154)
- [0132] 70. 24웰 플레이트로 웰을 1:1 계대배양한다(92, 154)
- [0133] 71. 6일 항온처리한다(172)
- [0134] 72. 매일 부분 배지 교환(154)
- [0135] 73. 6웰 플레이트로 웰을 1:1 계대배양한다(94, 154)
- [0136] 74. 4-6일 항온처리한다(172)
- [0137] 75. 매일 부분 배지 교환(154)
- [0138] 76. 항온처리기로부터 플레이트를 제거한다(162)
- [0139] 77. 예비 동결 배지로 부분 배지 교환(154)
- [0140] 78. 1시간 동안 항온처리기에서 항온처리한다(172)
- [0141] 79. 정상 계대배양에 대해 동결을 위해 세포를 수확한다(154)
- [0142] 80. 웰당 매트릭스 관, 2-내지-3 관으로 옮긴다(96, 154)
- [0143] 81. 배지를 스피닝하고 제거한다(168, 154)
- [0144] 82. 차가운 동결 배지를 첨가한다(154)

- [0145] 83. 판을 캡핑한다(170)
- [0146] 84. -80℃ 저장으로 샘플을 오프라인 취한다(190)
- [0147] 격리 성장 작업흐름에서 사용되는 동일한 부품으로부터 이 자동화 단계를 수행하는 데 사용될 수 있는 시스템 부품을 선택할 수 있다.
- [0148] 본 명세서에 사용되는 "성체"는 태아 후, 즉 신생아 단계로부터 삶의 종료까지의 유기체를 의미하고, 예를 들면 전달된 태반 조직, 양수 및/또는 제대혈로부터 얻은 세포를 포함한다.
- [0149] 본 명세서에 사용되는 용어 "성체 분화 세포"는 현재 기재된 자동화 시스템을 사용하여 iPSC를 생성하도록 조정 가능한 성체 유기체로부터 얻은 넓은 범위의 분화된 세포 유형을 포함한다. 바람직하게는, 성체 분화 세포는 "섬유아세포"이다. 이의 덜 활성인 형태의 "섬유세포"라고도 칭하는 섬유아세포는 중간엽으로부터 유래한다. 이의 기능은 예를 들면 콜라겐을 포함하는 세포외 매트릭스 성분의 전구체를 분비시키는 것을 포함한다. 조직학적으로, 섬유아세포는 고분화 세포이지만, 섬유세포는 일반적으로 더 작고 대개 방추 형상으로 기술된다. 본 발명에서 자동화 작업흐름 시스템에 대한 출발 물질로서 임의의 조직으로부터 유래한 섬유아세포 및 섬유세포를 사용할 수 있다.
- [0150] 본 명세서에 사용되는 용어 "유도 다능성 줄기 세포" 또는 iPSC는 줄기 세포가 유래된 또는 변화된, 즉 중배엽, 내배엽 및 외배엽의 모든 3개의 배엽 층 또는 피층의 조직으로 분화할 수 있는 세포로 재프로그래밍된 분화된 성체 세포로부터 생성된다는 것을 의미한다. 생성된 iPSC는 자연에서 발견되지 않으므로 세포를 의미하지 않는다.
- [0151] 본 발명에서 사용되는 포유동물 체세포는 예의 방식으로 성체 줄기 세포, 세르톨리 세포, 내피 세포, 고립막 상피 세포, 뉴런, 척장도세포, 표피 세포, 상피 세포, 간세포, 모낭 세포, 각질세포, 조혈세포, 멜라닌세포, 연골 세포, 림프구(B 및 T 림프구), 적혈구, 대식세포, 단핵구, 단핵 세포, 섬유아세포, 심근 세포, 다른 공지된 근육 세포 및 일반적으로 임의의 살아 있는 체세포를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 섬유아세포를 사용한다. 본 명세서에 사용되는 용어 체세포는 또한 성체 줄기 세포를 포함하도록 의도된다. 성체 줄기 세포는 특정한 조직의 모든 세포 유형을 생성할 수 있는 세포이다. 예시적인 성체 줄기 세포는 조혈모세포, 신경 줄기 세포 및 중간엽 줄기 세포를 포함한다.
- [0152] 본 발명의 하나의 이점은 이식, 약물 개발 검정에서의 사용 또는 질환 모델링에 적합한 동질 또는 동계 인간 세포의 실질적인 무제한 공급을 제공한다는 점이다. 면역 거부를 피하면서 환자에 특이적으로 iPSC를 맞춘다. 따라서, 이것은 숙주 대 이식편 거부 또는 이식편 대 숙주 거부로 인해 발생할 수 있는 이식된 조직의 거부와 같은 현재의 이식 방법과 관련된 상당한 문제를 배제한다. 약물 개발에 사용될 때, 세포는 약물 개발에서 사용될 때 화학물질에 대한 각각의 사람의 반응 또는 질환 모델에서의 이의 개인의 질환의 출현을 나타낸다. 여러 종류의 iPSC, 또는 인간으로부터 유래한 체세포로부터 유래한 iPSC로부터 제조된 완전 분화된 체세포는 세포의 라이브러리로서 iPSC 은행에 저장되고, 줄기 세포 치료로 처치되는 환자의 거부가 없는 체세포, 조직 또는 기관의 제조에 라이브러리에서의 하나 이상의 종류의 iPSC를 사용할 수 있다.
- [0153] 당해 분야에 공지된 방법에 의해 다양한 질환을 치료하기 위해 본 발명의 iPSC를 다수의 상이한 세포 유형으로 분화시킬 수 있다. 예를 들면, 조혈모세포, 근육 세포, 심근 세포, 간 세포, 연골 세포, 상피 세포, 비뇨기관 세포, 뉴런 세포 등으로 분화하도록 iPSC를 유도할 수 있다. 이후, 분화된 세포를 병증을 예방하거나 치료하기 위해 환자의 신체에 다시 이식하거나, 의학 조사를 진행하거나 약물 개발 검정을 개발하기 위해 사용할 수 있다. 따라서, 심근경색, 울혈성 심부전, 뇌졸중, 허혈, 말초 혈관 질환, 알콜성 간 질환, 간경변증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 당뇨병, 암, 관절염, 상처 치유, 면역결핍, 재생불량성 빈혈, 빈혈, 헌팅틴병, 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis: ALS), 리소좀 저장 질환, 다발성 경화증, 척수 손상, 유전 질환 및 특정한 세포 유형/조직의 증가 또는 대체 또는 세포내 탈분화가 바람직한 유사한 질환을 앓는 피험체에 대한 치료로서 또는 피험체에 대한 치료를 개발하기 위해 본 발명의 방법을 사용할 수 있다.
- [0154] 용어 "분화전능"은 성체, 및 태반을 포함하는 배아의 조직에서의 모든 세포를 만드는 발생 가능성을 갖는 세포를 의미한다. 수정란(접합체)은 상실배(수정 후 16 세포기까지)의 세포(난황구)처럼 분화전능이다.
- [0155] 본 명세서에 사용되는 용어 "다능성"은 상이한 조건 하에 모든 3개의 배엽 세포 층, 즉 내배엽(예를 들면, 장 조직), 중배엽(혈액, 근육 및 혈관 포함) 및 외배엽(예컨대, 피부 및 신경)의 세포 유형 특성으로 분화하는 가능성을 갖는 세포를 의미한다. 다능성 세포는 분화전능 세포보다 낮은 발생 가능성을 갖는다. 예를 들면, 누드

마우스 기형종 형성 검정을 이용하여 모든 3개의 배엽 층으로 분화하는 세포의 능력을 결정할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 배아 줄기(ES) 세포 마커의 발현에 의해 전분화능이 또한 입증될 수 있지만, 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법을 이용하여 생성된 세포 또는 세포 집단의 전분화능에 바람직한 시험은 세포가 각각의 3개의 배엽 층의 세포로 분화하는 발생 가능성을 갖는다는 것을 입증한다. 몇몇 실시양태에서, 다능성 세포는 "미분화 세포"라 칭한다. 따라서, 본 명세서에 사용되는 용어 "전분화능" 또는 "다능성 상태"는 모든 3개의 배아 배엽 층(내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로 분화하는 능력을 세포에 제공하는 세포의 발생 가능성을 의미한다. 당해 분야의 당업자는 소정의 세포 유형을 발생시키는 배아 배엽 층 또는 계통을 알 것이다. 다능성 상태의 세포는 전형적으로 장시간 동안, 예를 들면 1년 초과 또는 30회 초과외의 계대배양 동안 실험실내 분열하는 가능성을 갖는다.

[0156] 용어 "다분화능"은 "다분화능 세포"와 관련하여 사용될 때 모든 3개가 아닌 1개 이상의 배엽 층의 세포로 분화하는 발생 가능성을 갖는 세포를 의미한다. 따라서, 다분화능 세포는 또한 "부분 분화된 세포"라 칭할 수 있다. 다분화능 세포는 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 다분화능 세포의 예는 예를 들면 조혈모세포 및 신경 줄기 세포를 포함하는 성체 줄기 세포를 포함한다. "다분화능"은 세포가 다른 계통의 세포가 아닌 소정의 계통의 많은 유형의 세포를 형성할 수 있다는 것을 나타낸다. 예를 들면, 다분화능 조혈세포는 많은 상이한 유형의 혈액 세포(적혈구, 백혈구, 혈소판 등)를 형성할 수 있지만, 뉴런을 형성할 수 없다. 따라서, 용어 "다분화능"은 분화전능 및 다능성보다 낮은 발생 가능성 정도를 갖는 세포의 상태를 의미한다.

[0157] 본 명세서에 사용되는 용어 "줄기 세포" 또는 "미분화 세포"는 자기 복제의 특성을 갖고, 발생 가능성과 관련하여 구체적인 포함된 의미(즉, 분화전능, 다능성, 다분화능 등) 없이 다수의 세포 유형으로 분화하는 발생 가능성을 갖는 미분화 또는 부분 분화된 상태의 세포를 의미한다. 줄기 세포는 증식을 할 수 있고, 이의 발생 가능성을 유지하면서 이러한 줄기 세포를 발생시킬 수 있다. 이론상, 2개의 주요 기전 중 하나로 자기 복제가 발생할 수 있다. 줄기 세포는 비대칭적으로 분열하고(강제적인 비대칭적 분화로 공지됨), 1개의 딸세포는 모 줄기 세포의 발생 가능성을 보유하고 다른 딸세포는 모 세포로부터 여러 명확한 다른 특이적 기능, 표현형 및/또는 발생 가능성을 나타낼 수 있다. 딸세포 그 자체는 증식하고 또한 모체 발생 가능성을 갖는 하나 이상의 세포를 보유하면서 자손을 생성하도록(이후 하나 이상의 성숙 세포 유형으로 분화함) 유도될 수 있다. 분화된 세포는 자체가 다분화능 세포 등으로부터 유래한 다분화능 세포로부터 유래할 수 있다. 각각의 이러한 다분화능 세포가 줄기 세포로서 고려될 수 있지만, 각각의 이러한 줄기 세포의 세포 유형의 범위는 즉 이의 발생 가능성을 생성시킬 수 있고 상당히 변할 수 있다. 대안적으로, 집단에서의 일부 줄기 세포는 집단에서의 일부 줄기 세포를 유지시키면서 스토캐스틱 분화로 공지된 2개의 줄기 세포로 대칭적으로 분열할 수 있고, 집단에서의 다른 세포는 분화된 자손만을 생성한다. 따라서, 용어 "줄기 세포"는 더 특이적인 또는 분화된 표현형으로 분화하는 특정한 상황 하에 발생 가능성을 갖고 실질적으로 분화하지 않고 특정한 상황 하에 증식하는 능력을 보유하는 임의의 하위세트의 세포를 의미한다. 몇몇 실시양태에서, 용어 줄기 세포는 일반적으로 배아 세포 및 조직의 진행성 다양화로 발생하는 것처럼 대개 상이한 방향으로 분화에 의해 예를 들면 완전히 개별적인 특성을 획득함으로써 후손(자손 세포)이 특이적인 천연 모 세포를 의미한다. 일부 분화된 세포는 또한 더 높은 발생 가능성의 세포를 생성시키는 능력을 갖는다. 이러한 능력은 천연이거나 다양한 인자에 의한 치료 시 인공적으로 유도될 수 있다. 줄기 세포로 시작하는 세포는 분화된 표현형으로 진행하지만, 이후 줄기 세포 표현형을 "역발현"하고 재발현하도록 유도될 수 있다(당해 분야의 당업자가 종종 이를 "탈분화" 또는 "재프로그래밍" 또는 "역분화"라 칭함).

[0158] 본 명세서에 사용되는 용어 "배아 줄기 세포"는 배아 배반포의 내부 세포 덩어리의 천연 다능성 줄기 세포를 의미한다(예를 들면, 미국 특허 제 5,843,780호; 제6,200,806호; 제7,029,913호; 제7,584,479호(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨) 참조). 체세포 핵 이식으로부터 유래한 배반포의 내부 세포 덩어리로부터 이러한 세포를 유사하게 얻을 수 있다(예를 들면, 미국 특허 제 5,945,577호, 제5,994,619호, 제6,235,970호(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨) 참조). 배아 줄기 세포는 다능성이고, 발생 동안 외배엽, 내배엽 및 중배엽의 3개의 1차 배엽 층의 모든 유도체를 발생시킨다. 즉, 이는 특이적 세포 유형에 충분하고 필요한 시뮬레이션이 제공될 때 성체의 200개 초과외의 세포 유형의 각각으로 발생할 수 있다. 이는 배아외 막 또는 태반에 기여하지 않고, 즉 분화전능이 아니다.

[0159] 본 명세서에 사용되는 배아 줄기 세포의 구별 특성은 "배아 줄기 세포 표현형"을 규명한다. 따라서, 세포는 배아 줄기 세포의 하나 이상의 독특한 특성을 보유하는 경우 배아 줄기 세포의 표현형을 가져서, 세포는 배아 줄기 세포 표현형을 갖지 않는 다른 세포로부터 구별될 수 있다. 예시적인 구별 배아 줄기 세포 표현형 특성은, 제한 없이, 단백질 및 마이크로RNA를 포함하는 세포내 마커 또는 특이적 세포-표면의 발현, 유전자 발현 프로파일, 메틸화 프로파일, 탈아세틸화 프로파일, 증식 능력, 분화 능력, 핵형, 특정한 배양 조건에 대한 반응성 등

을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 세포의 하나 이상의 특성을 동일한 실험실 내에 배양된 배아 줄기 세포주의 하나 이상의 특성과 비교하여 세포가 "배아 줄기 세포 표현형"을 갖는지를 결정한다.

[0160] 용어 "줄기 체세포"는 본 명세서에 사용되어 태아, 소아 및 성체 조직을 비롯한 비배아 조직으로부터 유래한 임의의 다능성 또는 다분화능 줄기 세포를 의미한다. 천연 줄기 체세포는 혈액, 골수, 뇌, 후각 상피, 피부, 췌장, 골격 근육 및 심근을 포함하는 매우 다양한 성체 조직으로부터 단리된다. 유전자 발현, 인자 반응성 및 배양물 중의 형태에 따라 각각의 이러한 줄기 체세포를 규명할 수 있다. 예시적인 천연 줄기 체세포는 신경 줄기 세포, 신경집 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈모세포 및 췌장 줄기 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본 명세서에 기재된 몇몇 양태에서, "다능성 체세포"는 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법을 이용하여 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉하거나 이를 도입하여 다능성 상태의 것에 이의 발생 가능성이 변경된, 즉 증가된 체세포 또는 체세포의 자손 세포를 의미한다.

[0161] 용어 "조상 세포"는 본 명세서에 사용되어 분화에 의해 발생하는 세포에 비해 더 원시적인(예를 들면, 발생 경로 또는 진행을 따라 더 초기의 단계) 더 높은 발생 가능성, 즉 세포내 표현형을 갖는 세포를 의미한다. 대개, 조상 세포는 유의적인 또는 매우 높은 증식 가능성을 갖는다. 조상 세포는 세포가 발생하고 분화하는 환경 및 발생 경로에 따라 하부 발생 가능성을 갖는 다수의 명확한 세포, 즉 분화된 세포 유형 또는 단일 분화된 세포 유형을 발생시킬 수 있다.

[0162] 본 명세서에 사용되는 용어 "체세포"는 착상전 배아에 존재하거나 이로부터 얻은 세포인 배세포 또는 실험실내 이러한 세포의 증식으로부터 얻은 세포 이외의 임의의 세포를 의미한다. 달리 말하면, 체세포는 생식 세포와 반대인 유기체의 몸을 형성하는 임의의 세포를 의미한다. 포유동물에서, 생식 세포("배우자"로도 공지됨)는 전체 포유동물 배아가 발생하는 접합체라 불리는 세포를 생성하기 위해 수정 동안 융합된 정자세포 및 난세포이다. 포유동물 몸에서의 각각의 다른 세포 유형은 - 이들이 만들어진 세포(생식모세포)인 정자 및 난자 및 미분화, 다능성, 배아 줄기 세포로부터 - 체세포이고: 내부 기관, 피부, 골, 혈액 및 연결 조직은 모두 체세포로 이루어진다. 몇몇 실시양태에서, 체세포는 배아에 존재하거나 이로부터 얻지 않고 실험실내 이러한 세포의 증식으로부터 생기기 않은 체세포를 의미하는 "비배아 체세포"이다. 몇몇 실시양태에서, 체세포는 배아 또는 태아 이외의 유기체에 존재하거나 이로부터 얻거나 실험실내 이러한 세포의 증식으로부터 생기는 세포를 의미하는 "성체 체세포"이다. 달리 기재되지 않은 한, 생체내 및 실험실내 둘 다에서 본 명세서에 기재된 체세포를 재프로그래밍 하기 위한 조성물 및 방법을 수행할 수 있다(여기서, 체세포가 피험체 내에 존재할 때 생체내 실행하고 배양 중에 유지된 단리된 체세포를 이용하여 실험실내 실행한다).

[0163] 용어 "분화된 세포"는 본 명세서에 그 용어가 정의된 것처럼 이의 원래 형태에서 다능성이 아닌 임의의 체세포를 포함한다. 따라서, 용어 "분화된 세포"는 또한 부분 분화된 세포, 예컨대 다분화능 세포, 또는 본 명세서에 기재된 임의의 조성물 및 방법을 이용하여 생성된 안정한, 비다능성 부분 재프로그래밍된 또는 부분 분화된 세포인 세포를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 분화된 세포는 안정한 중간 세포, 예컨대 비다능성, 부분 재프로그래밍된 세포인 세포이다. 배양물 중에 많은 1차 세포를 위치시키면 완전 분화된 특성을 약간 소실할 수 있는 것에 유의해야 한다. 따라서, 이러한 분화된 또는 체세포를 단순히 배양하는 것은 이 세포가 비분화된 세포(예를 들면 미분화 세포) 또는 다능성 세포가 되게 하지 않는다. 분화된 세포(안정한, 비다능성 부분 재프로그래밍된 세포 중간체를 포함)의 전분화능으로의 전이는 배양물 중에 위치시킬 때 분화된 특성을 부분 소실시키는 자극을 넘는 재프로그래밍 자극을 필요로 한다. 재프로그래밍된, 몇몇 실시양태에서, 부분 재프로그래밍된 세포는 또한 일반적으로 배양물 중에 오직 제한된 수의 분열에 대한 능력을 갖는 더 낮은 발생 가능성을 갖는 모 세포에 비해 성장 가능성의 소실 없이 연장된 계대배양을 겪는 능력을 갖는 특성을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 용어 "분화된 세포"는 또한 (예를 들면, 미분화 세포 또는 재프로그래밍된 세포로부터) 덜 특수화된 세포 유형(즉, 발생 가능성 증가)의 세포(여기서, 세포는 세포내 분화 공정을 겪음)로부터 유래한 더 특수화된 세포 유형(즉, 발생 가능성 감소)의 세포를 의미한다.

[0164] 본 명세서에 사용되는 용어 "재프로그래밍"은 세포 또는 세포(예를 들면, 체세포) 집단의 발생 가능성을 역전시키는 과정을 의미한다. 달리 말하면, 재프로그래밍은 더 높은 발생 가능성을 갖는 상태로, 즉 덜 분화된 상태로 뒤로 세포를 유도하는 과정을 의미한다. 재프로그래밍하고자 하는 세포는 재프로그래밍 전에 부분 또는 완전 분화될 수 있다. 본 명세서에 기재된 양태의 몇몇 실시양태에서, 재프로그래밍은 다능성 상태를 갖는 세포의 상태로 분화 상태의 완전 또는 부분 역전, 즉 세포의 발생 가능성을 증가시키는 것을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 재프로그래밍은 다능성 상태로 체세포를 유도하여, 세포가 배아 줄기 세포의 발생 가능성, 즉 배아 줄기 세포 표현형을 갖는 것을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 재프로그래밍은 또한 다분화능 상태로의, 분화 상태의 부분 역전 또는 세포, 예컨대 체세포 또는 단능성 세포의 발생 가능성의 부분 증가를 포함한다. 재프로그래밍은 또한

본 명세서에 기재된 것과 같은 추가의 조작으로 처리될 때 다능성 상태로의 완전한 재프로그래밍에 세포가 더 감수성이 되게 하는 상태로의 세포의 분화 상태의 부분 역전을 포함한다. 이러한 조작은 세포 또는 세포의 자손에 의한 특정한 유전자의 내인성 발현을 발생시킬 수 있고, 이의 발현은 재프로그래밍에 기여하고 재프로그래밍을 유지시킨다. 특정한 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 합성, 변형 RNA 및 이의 방법을 이용한 세포의 재프로그래밍은 세포가 (예를 들면, 다분화능 세포인) 다분화능 상태를 취하게 한다. 몇몇 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 합성, 변형 RNA 및 이의 방법을 이용한 세포(예를 들면 체세포)의 재프로그래밍은 세포가 다능성 유사 상태 또는 배아 줄기 세포 표현형을 취하게 한다. 생성된 세포는 본 명세서에서 "재프로그래밍된 세포", "다능성 체세포" 및 "RNA 유도 다능성 체세포"라 칭한다. 본 명세서에서 칭하는 용어 "부분 재프로그래밍된 체세포"는 본 명세서에 개시된 방법에 의해 더 낮은 발생 가능성을 갖는 세포로부터 재프로그래밍된 세포를 의미하고, 부분 재프로그래밍된 세포는 비다능성의 안정한 중간 상태보다는 다능성 상태로 완전히 재프로그래밍되지 않는다. 이러한 부분 재프로그래밍된 세포는 그 용어가 본 명세서에 정의된 것처럼 다능성 세포보다 낮지만, 다분화능 세포보다 높은 발생 가능성을 가질 수 있다. 부분 재프로그래밍된 세포는 예를 들면 3개 중 1개 또는 2개의 배엽 층으로 분화할 수 있지만, 모든 3개의 배엽 층으로 분화할 수 없다.

[0165] 본 명세서에 사용되는 용어 "재프로그래밍 인자"는 그 용어가 본 명세서에 정의된 것처럼 유전자, 단백질, RNA, DNA 또는 소분자와 같은 발생 가능성 변경 인자를 의미하고, 이의 발현은 덜 분화된 또는 미분화된 상태, 예를 들면 다능성 상태 또는 부분 다능성 상태의 세포로의 세포, 예를 들면 체세포의 재프로그래밍에 기여한다. 재프로그래밍 인자는 예를 들면 임의의 유전자, 단백질, RNA 또는 소분자(실험실내 세포를 재프로그래밍하는 방법에서 이들 중 하나 이상을 치환할 수 있음)를 포함하는 SOX2, OCT3/4, KLF4, 나노그, LIN-28, c-MYC 등과 같은 다능성 상태로 세포를 재프로그래밍할 수 있는 전사 인자일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 합성 변형 RNA 및 이의 방법을 이용한 재프로그래밍 인자의 외인성 발현은 하나 이상의 재프로그래밍 인자의 내인성 발현을 유도하여, 하나 이상의 재프로그래밍 인자의 외인성 발현은 재프로그래밍된 또는 부분 재프로그래밍된 상태에서 세포의 안정한 유지에 더 이상 필요하지 않다. 본 명세서에 사용되는 "실험실내 다능성 상태로의 재프로그래밍"은 예를 들면 난모세포, 배아, 배세포 또는 다능성 세포에 의한 핵 또는 세포질 전달 또는 세포 융합을 필요로 하지 않고/않거나 이를 포함하지 않는 실험실내 재프로그래밍 방법을 의미한다. 재프로그래밍 인자는 또한, 그 용어가 본 명세서에 정의된 것처럼, 덜 분화된 표현형으로 탈분화도록 세포를 유도하는, 단백질 또는 RNA와 같은 발생 가능성 변경 인자를 의미하는 "탈분화 인자"라 칭할 수 있다(즉, 탈분화 인자가 세포의 발생 가능성을 증가시킴).

[0166] 본 명세서에 사용되는 용어 "분화 인자"는, 그 용어가 본 명세서에 정의된 것처럼, 원하는 세포 유형으로 분화하도록 세포를 유도하는, 단백질, RNA 또는 소분자와 같은 발생 가능성 변경 인자를 의미한다(즉, 분화 인자는 세포의 발생 가능성을 감소시킴). 몇몇 실시양태에서, 분화 인자는 세포 유형 특이적 폴리펩타이드일 수 있지만, 이것이 필요한 것은 아니다. 특이적 세포 유형으로의 분화는 1개 초과 분화 인자의 동시의 및/또는 성공적인 발현을 필요로 할 수 있다. 본 명세서에 기재된 몇몇 양태에서, 세포 또는 세포 집단의 발생 가능성을 처음에 본 명세서에 기재된 합성, 변형 RNA를 이용하여 재프로그래밍 또는 부분 재프로그래밍을 통해 증가시키고, 이후 분화 인자를 코딩하는 하나 이상의 합성, 변형 RNA와 접촉시키거나 이를 도입하여 이러한 재프로그래밍에 의해 제조된 세포 또는 이의 자손 세포를 분화하도록 유도하여, 세포 또는 이의 자손 세포는 발생 가능성이 감소한다.

[0167] 세포 개체발생의 맥락에서, 용어 "분화한다" 또는 "분화하는"는 세포가 이의 즉각적인 전구체 세포보다 발생 경로 아래로 추가로 진행하는 발생 과정을 의미하는 상대 용어이다. 따라서, 몇몇 실시양태에서, 그 용어가 본 명세서에 정의된 것처럼, 재프로그래밍된 세포는 계통 제한된 전구체 세포(예컨대, 중배엽 줄기 세포)로 분화할 수 있어서, 결국 경로(예컨대, 조직 특이적 전구체, 예를 들면, 심근아세포 전구체) 아래로 추가로 전구체 세포의 다른 유형으로 분화하고 이후 최종 단계 분화된 세포(특정한 조직 유형에서 특징적인 역할을 함)로 분화할 수 있고, 추가로 증식하는 능력을 보유하거나 보유하지 않을 수 있다.

[0168] 본 명세서에 사용되는 용어 "다능성 중간 세포의 형성 없이"는 바람직하게는 일 단계에서 다른 세포 유형으로의 하나의 세포 유형의 전환분화를 의미하고; 따라서 다능성 중간 세포의 형성 없이 세포의 분화된 표현형 또는 발생 가능성을 변경하는 방법은 세포가 처음에 탈분화(또는 재프로그래밍)되고, 이후 다른 세포 유형으로 분화될 것을 요하지 않는다. 대신에, 세포 유형은 덜 분화된 표현형으로 진행하지 않고 하나의 세포 유형으로부터 다른 세포 유형으로 "전환"된다. 따라서, 전환분화는 세포의 발생 가능성의 변화를 의미하고, 이에 의해 세포는 체장 세포로의 간 세포, 체장 베타 세포로의 체장 알파 세포 등과 같은 유사한 발생 가능성을 갖는 상이한 세포가 되도록 유도된다. 본 발명의 시스템 및 방법은 세포의 전환분화에 매우 적합하다.

- [0169] 용어 "발현"은, 이용 가능한 경우, 예를 들면, 전사, 번역, 폴딩, 변형 및 프로세싱(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는, RNA 및 단백질 및 적절한 경우, 분비 단백질을 생성하는 데 관여하는 세포내 과정을 의미한다. "발현 생성물"은 유전자로부터 전사된 RNA 및 유전자로부터 전사된 mRNA의 번역에 의해 얻은 폴리펩타이드를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 발현 생성물은 마이크로RNA와 같은 폴리펩타이드를 코딩하지 않는 서열로부터 전사된다.
- [0170] 본 명세서에 사용되는 용어 "전사 인자"는 DNA 결합 도메인을 이용하여 DNA의 특이적 부분에 결합하는 단백질을 의미하고, DNA로부터 RNA로 유전 정보의 전사를 제어하는 시스템의 일부이다.
- [0171] 본 명세서에 사용되는 용어 "소분자"는 펩타이드, 펩티도미메틱, 아미노산, 아미노산 유사체, 폴리뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드 유사체, 압타머, 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 유사체, 분자량이 1몰당 약 10,000그램 미만인 유기 또는 무기 화합물(예를 들면, 이종 유기 및 유기 금속 화합물을 포함), 분자량이 1몰당 약 5,000그램 미만인 유기 또는 무기 화합물, 분자량이 1몰당 약 1,000그램 미만인 유기 또는 무기 화합물, 분자량이 1몰당 약 500그램인 유기 또는 무기 화합물 및 이러한 화합물의 염, 에스터 및 다른 약제학적으로 허용되는 형태(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 화학 물질을 의미한다.
- [0172] 본 명세서에 사용되는 용어 "외인성"은 핵산(예를 들면, 합성, 전사 인자를 코딩하는 변형 RNA) 또는 단백질(예를 들면, 전사 인자)이 정상적으로 발견되지 않거나 더 낮은 양으로 발견되는 세포 또는 유기체와 같은 생물학적 시스템으로 인간의 손을 포함하는 과정에 의해 도입된 상기 핵산 또는 단백질을 의미한다. 인자(예를 들면, 전사 인자를 코딩하는 합성, 변형 RNA 또는 단백질, 예를 들면 폴리펩타이드)는 물질을 물려받은 즉각적인 전구체 세포 또는 자손 세포로 도입되는 경우 외인성으로 생각된다. 반대로, 용어 "내인성"은 생물학적 시스템 또는 세포에 고유한 인자 또는 발현 생성물을 의미한다(예를 들면, 유전자의 내인성 발현, 예를 들면 SOX2는 세포에서 내인성 유전자에 의한 SOX2 폴리펩타이드의 생성을 의미함). 몇몇 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 합성, 변형 RNA를 포함하는 조성물 및 방법을 이용하는 발생 가능성 변경 인자와 같은 세포로 하나 이상의 외인성 인자를 도입하는 것은 새로운 발생 가능성에서 세포 또는 이의 자손 세포(들)의 유지에 필수적인 세포 또는 이의 자손 세포(들)에서의 인자 또는 유전자 생성물의 내인성 발현을 유도한다.
- [0173] 본 명세서에 사용되는 용어 "단리된 세포"는 세포가 원래 발견된 유기체로부터 제거된 세포 또는 이러한 세포의 후손을 의미한다. 임의로 세포는 예를 들면 다른 세포의 존재 하에 실험실내 배양된다. 임의로, 세포는 차후에 제2 유기체로 도입되거나 이것(또는 이것이 유래한 세포 또는 세포 집단)이 단리된 유기체로 재도입된다.
- [0174] 본 명세서에 사용되는 단리된 세포 집단과 관련하여 용어 "단리된 집단"은 세포의 혼합 또는 이종 집단으로부터 제거되고 분리된 세포 집단을 의미한다. 몇몇 실시양태에서, 단리된 집단은 세포가 단리되거나 농후화된 이종 집단과 비교하여 "실질적으로 순수한" 세포 집단이다. 몇몇 실시양태에서, 단리된 집단은 다능성 세포가 유래한 이종 체세포 집단과 비교하여 실질적으로 순수한 다능성 세포 집단을 포함하는 단리된 다능성 세포 집단이다.
- [0175] 본 명세서에 사용되는 용어 "합성, 변형 RNA" 또는 "변형 RNA"는, 그 용어가 하기 본 명세서에 정의된 것처럼, 적어도 하나의 변형 뉴클레오타이드를 포함하는 실험실내 제조된 RNA 분자를 의미한다. 본 발명의 방법은 변형 RNA를 필요로 하지 않는다. 본 발명의 방법은 변형 RNA를 필요로 하지 않는다. 합성, 변형 RNA 조성물은 실험실내 기법을 이용하여 합성된 합성, 변형 RNA 단독보다 이러한 변형을 갖는 세포, 조직, 기관 등과 같은 천연 공급원으로부터 단리된 mRNA를 포함하지 않는다. 용어 "합성, 변형 RNA" 또는 "변형 RNA"에 적용되는 용어 "조성물"은 복수의 상이한 합성, 변형 RNA 분자(예를 들면, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 75개, 적어도 90개, 적어도 100개 이상의 합성, 변형 RNA 분자)를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 합성, 변형 RNA 조성물은 추가로 다른 물질(예를 들면, 인터페론 발현 또는 활성의 억제제, 형질도입 시약 등)을 포함할 수 있다. 이러한 많은 수는 (예를 들면, 상이한 폴리펩타이드를 코딩하는) 상이한 서열의 합성, 변형 RNA, 다른 변형을 갖는 동일한 서열의 합성, 변형 RNA 또는 임의의 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0176] 본 명세서에 사용되는 용어 "폴리펩타이드"는 적어도 2개의 아미노산(예를 들면, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 적어도 100개, 적어도 125개, 적어도 150개, 적어도 175개, 적어도 200개, 적어도 225개, 적어도 250개, 적어도 275개, 적어도 300개, 적어도 350개, 적어도 400개, 적어도 450개, 적어도 500개, 적어도 600개, 적어도 700개, 적어도 800개, 적어도 900개, 적어도 1000개, 적어도 2000개, 적어도 3000개, 적어도 4000개, 적어도

5000개, 적어도 6000개, 적어도 7000개, 적어도 8000개, 적어도 9000개, 적어도 10,000개 이상의 아미노산)을 포함하는 아미노산의 중합체를 의미한다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본 명세서에서 상호 교환되어 사용된다. 본 명세서에 사용되는 용어 "펩타이드"는 비교적 짧은 폴리펩타이드, 전형적으로 약 2개 내지 60개의 길이의 아미노산을 의미한다.

- [0177] 마이크로어레이, 특히 "세포 어레이"는 현재 세포 및 유전자 기능의 기본적인 조사를 위해 이의 생물학적 기능과 관련하여 RNA, DNA, 단백질 및 소분자와 같은 큰 생물분자 라이브러리를 스크리닝하는 데 필요하다. 학술원 및 산업 둘 다에서의 많은 조사 시설은 이의 스크리닝 효율, 속도 및 품질을 개선하기 위해 최신 고밀도 어레이를 필요로 한다. 많은 스크린이 처음에 가능하거나 각각 차세대 마이크로어레이 및 세포 어레이의 개발로 상당히 더 공급 가능하다. 본 발명 어레이는 종래의 마이크로플레이트 취급 로봇 및 현미경의 사용성을 보장하도록 통상의 미량적정 스케일 플레이트에 전형적으로 맞아야 한다. 이상적으로는, 어레이는 유일한 변수가 세포주의 유전자형인 것을 제외하고는 동일한 조건 하에 유닛으로서 평가될 필요가 있는 세포주의 임의의 집합일 수 있다. 일례는, 서로에 인접한 웰에서의 미량적정 플레이트에서 평판배양된, 정상 및 질환 특이적 iPSC 세포주 또는 이의 분화된 유도체의 집합이다. 이는 조사자가 다수의 유전자형에서 단일 인자(예를 들면 소분자)의 활성을 조사함과 동시에 적절한 검정을 이용하여 이 인자의 유전자형 특이적 효과를 발견하게 한다.
- [0178] 일 실시양태에서, 본 발명의 시스템은 또한 젓과 배아 섬유아세포(MEF) 공급 층 및 공급 재컨디셔닝 둘 다 하에 배양된 확립된 iPSC 세포주에서 분화를 겪는 세포 중에서 완전 재프로그래밍된 세포에 농후한 세포 집단을 얻기 위해 사요될 수 있다. 본 발명의 시스템은 추가로 고속 스크리닝 캠페인에서 사용하기 위해 96웰 플레이트로 완전 재프로그래밍된 또는 분화된, iPSC 세포의 한정된 하위집단의 실험 분류화를 허용한다.
- [0179] 도 1은 생검의 평판배양(2), 생육 및 계대배양(4)(액체 취급 로봇에 대한 롤링 생성), QC(6)(마이크로플라스마를 위한 자동화 시험) 및 (8) 액체 취급 로봇에 대한 자동화 동결을 포함하는 시스템(1)에 의해 수행된 단계를 도시한다.
- [0180] 도 2는 시스템(2, 3 및 4)에 의해 수행된 단계를 도시한다. 자동화 시스템에 의해 섬유아세포를 평판배양하고(10), 자동화 시스템에 의해 재프로그래밍 인자를 도입하고(12), 자동화 분류 및 단리에 의해 iPSC를 단리하고(14), 자동화 시스템에 의해 원하는 클론을 선택하고 증식시키고(16), 마커 검정 및 배양체 검정에 의해 다능성 상태에 대해 자동화 품질 체크(QC)하고(18), 이후 원하는 세포를 자동화 동결 및 저장한다(20).
- [0181] 도 3은 시스템(1)에 참여한 단계 (22) 내지 단계 (60)을 도시한 흐름도이다.
- [0182] 도 3은 생검으로부터 섬유아세포의 생성을 위한 작업흐름 및 의사결정 나무의 예를 예시한 것이다. 작업흐름은 격리(58) 및 세정 단계(60)로 분할된다. 생검이 시설에 진입하면서, 테크니션은 6웰 플레이트에서 생검을 평판배양하고(22), 플레이트를 자동화 항온처리기로 허용한다(24). 플레이트에 부착하기 위한 소정 시간이 생검에게 제공된 후, 액체 취급 로봇은 자동화 항온처리기로부터 플레이트를 인출하여 자동화 현미경에서 생육의 포화상태를 공급하고 체크한다(26). 플레이트를 항온처리기로 복귀시키고 생육시킨다(28). 액체 핸들러는 항온처리기로부터 플레이트를 제거하고 항생제 및 항진균성 유리 배지에 대해 배지를 교환한다(30). 로봇은 추가로 5일 동안 플레이트를 항온처리기로 이동시킨다(32). 이후, 로봇은 플레이트를 제거하고 마이크로플라스마 시험을 위해 딸 플레이트로 배지를 인출한다(34). 마이크로플라스마 시험을 위해 격리 검정 시스템으로 딸 플레이트를 이동시킨다(36). 이후, 검정으로부터의 양성 신호에 기초하여 선택한다(38). 6웰 플레이트의 모든 웰이 양성 마이크로플라스마 검정 결과에 해당하는 경우(40), 이를 버린다. 6웰 플레이트의 모든 웰이 음성이고 마이크로플라스마를 포함하지 않는 경우, 이를 격리로부터 깨끗한 성장 시스템으로 이동시킨다(46). 몇몇 웰은 양성이고, 몇몇 웰은 음성인 경우, 격리에서 음성 웰을 유지시킨다(42). 음성 웰을 새로운 플레이트로 계대배양하고(44), 항온처리기로 옮기고, 양성 웰을 포함하는 소스 플레이트를 버린다. 이 배양물은 단계를 거쳐 진행하여 마이크로플라스마를 재시험한다(24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38). 성장을 위해 깨끗한 배양물을 모니터링하고(50), 계대배양하고(52), 냉동바이알에서 동결시킨다(54, 56).
- [0183] 도 4a, 도 4ba, 도 4bb 및 도 4c는 자동화 재프로그래밍 과정 동안 다중 웰 조직 배양 플레이트를 통한 환자 샘플의 흐름의 예를 예시한 것이다. 각각의 다이어그램의 상부에서, 흐름도는 작업흐름(70, 88, 98)의 각각의 단계에서 수행된 절차의 흐름을 기술한다. 각각의 다이어그램의 하부에서, 음영 있는 웰 또는 샘플 라벨(61-68, 72-86, 88-96)로 마킹된 웰의 그룹으로 표시된 샘플과 같은 플레이트맵을 갖는 다중 웰 세포 배양 플레이트가 도시되어 있다. 절차를 통한 플레이트-대-플레이트 또는 웰-대-웰의 샘플의 이동이 화살표로 표시된 것처럼 왼쪽으로부터 오른쪽으로 도시되어 있다. 도 4a에 도시된 것처럼, 환자 샘플 및 대조군 섬유아세포 샘플(61)을 6 웰 플레이트(62)의 각각의 웰에서 평판배양할 때 자동화 iPSC 유도화 공정이 시작한다. 이를 재프로그래밍 인자

를 코딩하는 바이러스 또는 재프로그래밍 인자를 세포로 도입하는 다른 수단을 이용하여 감염에 대해 24웰 플레이트(64)의 각각의 웰로 한정된 세포수로 계대배양한다. 다음 단계에서, 재프로그래밍된 샘플에 세포 분류화에 의해 또는 바람직하게는 자기 비드 기반 농후화를 이용하여 비재프로그래밍된 세포를 고갈시키고, 이를 96웰 플레이트(66)에서 다중 웰에서의 클론 밀도로 평판배양한다. 이 2개의 플레이트가 이 예에 기재되어 있다. 이 예에서, 자동화 영상화기에서 면역형광 분석으로 평가된 전분화능 표면 마커에 양성인 단일 클론을 포함하는, 중간에 점을 갖는 웰로 표시된 6웰(66)을 확인한다. 이 클론을 계대배양하고 클론을 96웰 플레이트(68)의 최소 수로 재포맷하도록 선별한다. 이 예시적인 도면은 각각의 출발 샘플마다 6개의 클론을 도식하고, 16개의 출발 샘플로부터의 클론이 96웰 플레이트로 배열될 수 있다는 것을 나타낸다. 평판배양 과정을 수월하게 하기 위해, 다수의 계대배양에 걸쳐 이 선별 단계를 수행하여 클론을 플레이트의 최소 수로 강화할 수 있다. 도 4ba 및 4bb에 도시된 것처럼, 웰 내의 줄기 세포 콜로니의 포화상태가 각각의 출발 샘플(72)에 성취될 때까지 이 클론을 순서대로 계대배양한다. 이후, 각각의 플레이트의 샘플을 2중 플레이트에 복제하여(74-86), 품질 관리(6)하고, 적절한 줄기 세포 특성을 나타내는 클론을 선택한다. QC 공정을 시작하기 위해, 각각의 클론(74)의 다능성 상태를 결정하기 위해 필요한 전분화능 품질 관리 검정에 대한 시스템에 의해 1개의 플레이트를 생성하고, 후속 계대배양(76)에서 앞으로 진행시키기 위해 1개의 플레이트를 생성시킨다. 앞으로 진행될 플레이트를 추가의 품질 관리 및 증식을 위해 다시 3개의 플레이트(78, 80, 82)로 계대배양한다. QC 검정을 위해 1개의 플레이트를 수확하여 핵형 및 유전적 다양성을 규명한다(78). 제2 플레이트(82)를 v-바닥 플레이트로 계대배양하여 iPS 클론의 분화능력을 평가하는 QC 검정을 위한 배양체(84)를 형성한다. 추가의 증식을 위해 최종 플레이트(80)를 앞으로 수행한다. 이전의 전분화능 QC 검정으로부터 품질 관리를 통과하지 않은 각각의 클론은 도 4에 표시된 웰에서 "X"로 표시된 바대로 앞으로 진행하지 않는다. 도 4bb에 기재된 예에서, 강화된 플레이트(86)는 단일 96웰 플레이트에서 개체마다 3개의 iPS 클론으로 표시된 32개 이하의 개체 또는 각각 단일 클론으로 표시된 경우 96개 이하의 개체로부터 iPS 세포주(또는 분화된 세포주)를 포함한다. 1개 내지 3개의 클론이 남아 있을 때까지(86-92), 남은 클론을 가능한 적은 플레이트에 강화한다. 도 4c에 도시된 것처럼, 이를 플레이트에 부착하면서(88) 동결방지를 위해 증식시키거나, 추가로 증식시키고(92-94), 냉동바이알에서 동결보존한다(96). 도 4a에 도시된 전분화능 마커 스크린(70) 및 도 4ba에 도시된 품질 관리 검정으로부터의 임의의 또는 모든 정보를 단독으로 또는 조합으로 이용하여 자동화 과정에서 강화 및 배열을 위해 어떠한 클론을 선택할지를 결정할 수 있다.

[0184] 성체 세포를 형질감염시키고 형질전환시키거나 재프로그래밍하여 iPSC 세포주를 형성하는 방법은 예를 들면 문헌[Takahashi et al., 2007 *Cell*, 131: 861-872, 2007, Yu et al., 2007, *Science*, vol. 318, pp. 1917-1920]에 일반적으로 공지되어 있다. iPSC는 재프로그래밍 인자에 의해 체세포로부터 유도된다. 재프로그래밍 인자는 예를 들면 전사 인자를 포함하는 것으로 고려된다. 성체 세포를 재프로그래밍하는 방법은 예를 들면 특이적 전사 인자의 조합, 예를 들면 Oct3/4, Sox2, Klf4 및 c-Myc 유전자의 조합을 도입하고 발현하는 것을 포함한다. 다른 것은 성체 세포를 형질전환 또는 재프로그래밍하는 데 있어서 다른 전사 인자를 사용할 수 있다는 것을 입증하였다. 이 다른 전사 인자는 예를 들면 문헌[Takahashi et al., 2006 *Cell*, 126: 663-676 및 Huiqun Yin, et al. 2009, *Front. Agric. China* 3(2): 199-208(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)]에 의해 기재된 것처럼 예를 들면, Lin28, 나노그, hTert 및 SV40 큰 T 항원을 포함한다.

[0185] 다른 양태에서, 번역될 때 원하는 단백질 또는 단백질을 제공하는 세포로의 RNA의 직접 도입을 이용하여 iPSC를 생성할 수 있다. 더 고등의 진핵생물 세포는 궁극적으로 세포내 단백질 합성의 전체적인 억제체를 발생시켜, 세포내 독성을 발생시키는 외래, "비자기" RNA에 대한 세포내 방어를 발달시킨다. 이 반응은 부분적으로 I형 또는 II형 인터페론의 생성을 포함하고, 일반적으로 "인터페론 반응" 또는 "세포내 선천 면역 반응"이라 칭한다. 세포내 방어는 정상적으로 합성 RNA를 외래로 인식하고 이의 세포내 선천 면역 반응을 유도한다. RNA를 사용하여 외인성으로 지시된 단백질의 지속 또는 반복 발현을 성취하는 능력이 이의 선천 면역 반응의 유도에 의해 방해받는 특정한 양태에서, 반응을 회피하거나 감소시키는 방식으로 변형된 합성 RNA를 사용하는 것이 바람직하다. 선천 면역 반응의 회피 또는 감소는 예를 들면 세포의 발생 표현형을 변형하기 위해 필요한 외인성으로 도입된 RNA로부터 지속 발현을 허용한다. 일 양태에서, 표적 세포 또는 이의 자손으로의 합성, 변형 RNA의 반복 도입에 의해 지속 발현을 성취한다. 본 발명의 방법은 천연 또는 합성 RNA를 포함한다.

[0186] 일 양태에서, 세포에서 관심 있는 단백질의 외인성 발현을 유도하기 위해 세포에 천연, 변형 또는 합성 RNA를 도입할 수 있다. 예를 들면, 관심 있는 단백질을 생성하는 세포 또는 유기체의 능력을 손상시키거나 예방하는 이 세포 또는 유기체에서의 내인성 유전 결함에 의해 야기된 질환의 치료에 있어서 본 명세서에 기재된 변형, 합성 RNA를 이용하는 관심 있는 단백질의 직접 외인성 발현에 대한 능력이 유용하다. 따라서, 몇몇 실시양태에서, 유전자 치료의 목적을 위해 본 명세서에 기재된 RNA를 포함하는 조성물 및 방법을 이용할 수 있다.

- [0187] 세포내 운명 및/또는 발생 가능성의 변경에 기재된 RNA를 유리하게 사용할 수 있다. 외인성 RNA로부터 단백질을 발현하는 능력은 세포의 발생 가능성의 변경 또는 역전, 즉 세포의 재프로그래밍 및 더 분화된 표현형으로의 세포의 지시된 분화를 허용한다. 세포의 발생 가능성을 변경하는 데 있어서 중요한 양태는 세포 또는 이의 바로 다음 자손에서의 하나 이상의 발생 가능성 변경 인자의 지속 및 연장 발현에 대한 요건이다. 전통적으로, DNA 또는 바이러스 벡터를 세포에 도입함으로써 이러한 지속 발현을 성취한다. 이러한 접근법은 삽입 돌연변이에 대한 가능성으로 인해 제한된 치료학적 유용성을 갖는다.
- [0188] 본 명세서에 기재된 바대로 외인성 RNA로부터 지속된 기간 동안 원하는 단백질 또는 단백질들을 발현하는 능력으로부터의 가장 이익을 얻을 수 있는 분야 중 하나는 초기에 더 분화된 표현형을 갖는 세포로부터의 다능성 또는 다분화능 세포의 생성이다. 이 양태에서, 세포를 덜 분화된 표현형, 즉 더 높은 발생 가능성을 갖는 것으로 재프로그래밍하기 위해 재프로그래밍 인자 또는 인자들을 코딩하는 RNA를 사용한다.
- [0189] 줄기 세포 기술의 주요 목표는 줄기 세포가 원하는 세포 유형으로 분화를 하게, 즉 지시된 분화를 하게 만들거나 전환분화를 통해 세포를 생성하는 것이다. 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법이 세포를 재프로그래밍하기 위해 사용될 뿐만 아니라, 이들은 또한 세포의 원하는 표현형으로의 이 지시된 분화 및 전환분화에 적용 가능하다. 즉, 재프로그래밍을 위해 본 명세서에 기재된 동일한 기술은 그 점에 대해서는 재프로그래밍된 세포 또는 임의의 다른 줄기 세포 또는 전구체 세포의 원하는 세포 유형으로의 분화에 바로 적용 가능하다.
- [0190] 이 양태 및 본 명세서에 기재된 이러한 모든 양태의 몇몇 실시양태에서, 합성, 변형 RNA 분자는 적어도 2종의 변형 뉴클레오사이드를 포함한다. 이러한 일 실시양태에서, 2종의 변형 뉴클레오사이드는 5-메틸사이티딘(5mC), N6-메틸아데노신(m6A), 3,2'-O-다이메틸유리딘(m4U), 2-티오유리딘(s2U), 2' 플루오로유리딘, 유사유리딘, 2'-O-메틸유리딘(Um), 2' 테옥시 유리딘(2' dU), 4-티오유리딘(s4U), 5-메틸유리딘(m5U), 2'-O-메틸아데노신(m6A), N6,2'-O-다이메틸아데노신(m6Am), N6,N6,2'-O-트라이메틸아데노신(m62Am), 2'-O-메틸사이티딘(Cm), 7-메틸구아노신(m7G), 2'-O-메틸구아노신(Gm), N2,7-다이메틸구아노신(m2,7G), N2,N2,7-트라이메틸구아노신(m2,2,7G) 및 이노신(I)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이 양태 및 본 명세서에 기재된 이러한 모든 양태의 이러한 일 실시양태에서, 적어도 2종의 변형 뉴클레오사이드는 5-메틸사이티딘(5mC) 및 유사유리딘이다. (예를 들면, 로시(Rossi)의 US 제2012/0046346호(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨) 참조).
- [0191] 본 발명의 방법에서 사용되는 유전자, 단백질 또는 RNA는 OCT4, SOX1, SOX 2, SOX 3, SOX15, SOX 18, 나노그, KLF1, KLF 2, KLF 4, KLF 5, NR5A2, c-MYC, 1-MYC, n-MYC, REM2, TERT 및 LIN28을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0192] 특정한 소분자 경로 억제제의 첨가에 의해 성체 섬유아세포를 iPSC로 재프로그래밍하는 데 있어서 단일 전사 인자를 사용할 수 있는 것으로 또한 나타났다. 이러한 경로 억제제는 예를 들면 형질전환 성장 인자-베타(TGFβ) 경로 억제제, SB431542(4-[4-(1,3-벤조다이옥솔-5-일)-5-(2-피리다일)-1H-이미다졸-2-일]-벤즈아마이드) 및 A-83-01[3-(6-메틸-2-피리다일)-N-페닐-4-(4-퀴놀리닐)-1H-피라졸-1-카보티오아마이드], 세포외 신호 조절 키나아제(ERK) 및 미세소관 관련 단백질 키나아제(MAPK/ERK) 경로 억제제 PD0325901(N-[(2R)-2,3-다이하이드록시프로폭시]-3,4-다이플루오로-2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]-벤즈아마이드), 베타-카테닌을 안정화시킴으로써 Wnt 신호전달을 활성화하는 GSK3 억제제 CHIR99021[6-((2-((4-(2,4-다이클로로페닐)-5-(4-메틸-1H-이미다졸-2-일)피리미딘-2-일)아미노)에틸)아미노)니코티노나이트릴], 라이신 특이적 데메틸라제1 파르네이트(Parnate)(a/k/a 트라닐사이프롬인), 3'-포스포이노시타이드 의존성 키나아제-1(PDK1) PS48의 소분자 활성화자 [(2Z)-5-(4-클로로페닐)-3-페닐-2-펜텐산], 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제 나트륨 뷰티레이트 및 발프로산, 미토콘드리아 산화를 중재하는 소분자(예를 들면, 2,4-다이나이트로페놀), 해당 대사를 중재하는 소분자(프럭토스 2,6-비스포스페이트 및 옥살레이트), HIF 경로 활성화를 중재하는 소분자(N-옥살로일글라이신 및 케르세틴(Quercetin))(Zhu et al., 2010, *Cell Stem Cell* 7: 651-655(본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)를 포함한다. Zhu 등은 CHIR99021 및 파르네이트와 조합된 Oct4가 성인 인간 표피 각질세포를 재프로그래밍하는 데 있어서 충분하다는 것을 제시한다.
- [0193] 각각의 프로토콜이 다르지만, 일반적인 재프로그래밍 프로토콜은 조직 샘플, 예를 들면 피부 생검으로부터 분화된 성체 세포를 증식시키는 것 및 이를 상기 기재된 바대로 재프로그래밍 인자와 접촉시키는 것, 예를 들면 이를 예를 들면 발현 벡터, 예컨대 다능성 전사 인자에 대한 전사물을 포함하는 바이러스 구성체(construct)로 감염시키는, 즉 형질감염시키는 것으로 이루어진다. 섬유아세포는 분야 공지 방법에 의해, 예를 들면, 문헌(Dimos et. al., 2008, *Science* Vol. 321 (5893): 1218-1221)에 기재된 바대로 분야 공지 방법에 의해 예를 들면 조직을 기계적으로 파괴한 후 효소 분해하여 섬유아세포를 방출하고 섬유아세포를 배양함으로써 얻을 수 있다.

- [0194] 본 발명의 예시적인 양태가 벡터, 예를 들면, 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터를 사용하고, 몇몇 양태에서 벡터는 mRNA 분자를 세포로 이동시키는 것을 포함하는 형질도입 기법에 필요하지 않다.
- [0195] 원하는 벡터가 제공된 지시에 따라 발현 벡터에 의한 섬유아세포의 형질도입을 수행한다. 일정 시간 후(예를 들면, 형질도입 후 약 2일 내지 약 10일 범위), 세포를 분해하고 CD13^{NEG}, SSEA4^{POS} 및 Tra-1-60^{POS} 표면 마커에 길러진 형광 태그 항체와 접촉시킨다. 이후, 분해되고 항체-라벨링된 세포를 인산염 완충 식염수 중에 재현탁시키고 iPSC 클론의 자동화 분류 및 단리로 이동시킨다. 표면 마커 양성 세포를 태그 색상 또는 이의 부재에 의해 조직 배양 배지 또는 MEF로 코팅된 멀티웰(6-96웰) 조직 배양 플레이트 또는 세포 비함유 생물학적 기질을 포함하는 무균 관으로 직접 분류화하고 가시적인 콜로니가 형성될 때까지 배양한다.
- [0196] 이후, 콜로니는 생성된 클론의 광학 현미경 검사 또는 임의로 형광 태그된 항체로 라벨링된 클론의 현미경 형광 검사에 의해 iPSC로 추가로 확인된다. 임의로, 특정한 실시양태에서, 하나 이상의 벡터는 또한 분류 및 확인의 편의를 위해 녹색 형광 단백질(GFP) 발현 마커를 삽입한다. 다능성 ES 세포주와 일치하는 형태학적 특성을 보유하는 각각의 몇몇 콜로니를 배양물로부터 뽑고 개별적으로 증식시켜 단일클론 배양물을 형성한다.
- [0197] 본 발명의 시스템의 바람직한 일 실시양태에서, 처리된 세포를 유전 분석으로 처리하여 iPSC의 조기 확증 및 확인을 제공한다. 바람직하게는, 사우던 블롯에 의해 유전 분석을 수행하지만, 마이크로어레이, 나노스트링, 정량적 실시간 PCR(qPCR), 전체 게놈 서열분석, 면역형광 현미경검사, 유세포 계수법(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 다른 분야 공지 방법을 이용할 수 있다. 재프로그래밍된 인간 섬유아세포에서 알칼리 포스파타제의 효소 활성의 검출, 세포막 표면 마커 SSEA3, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81의 양성 발현 및 KLF4, Oct3/4, 나노그, Sox2 전사 인자의 발현은 클론이 iPSC라는 것을 확인시켜준다. 바람직하게는, 모든 마커가 존재한다.
- [0198] 재프로그래밍 인자로서, 예를 들면 RNA, 예컨대 mRNA, 마이크로RNA, siRNA, 안티센스 RNA 및 이들의 조합을 포함하는 임의의 분야 공지 형질도입 벡터를 사용할 수 있다. 사용할 수 있는 다른 발현 벡터는 예를 들면 레트로 바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 신드비스(Sindbis) 바이러스, 수두 바이러스, 음경 바이러스, 박테리아 과지, 센다이 바이러스 및 이들의 조합을 포함한다. 바람직하게는, 이용된 벡터는 비복제 벡터, 예를 들면 비복제이도록 조작된 센다이 바이러스 벡터 등이다. 바람직한 센다이 바이러스 벡터는 복제를 할 수 없으면서 벡터에 의해 운반된 단백질(들)을 코딩하는 핵산의 생산적 발현을 여전히 하여, 다른 세포로 또는 백신 체내로 비체어로 퍼지는 임의의 가능성을 방지한다. 이러한 유형의 센다이 벡터는 사이토툰(상품명)-iPSC 센다이 바이러스 벡터 키트(DNAVEC, DV-0301)로서 상업적으로 구입 가능하다.
- [0199] 이러한 벡터를 성체 섬유아세포로 삽입하기 위해 예를 들면, 전기천공, 유전자 총 등을 포함하는 임의의 분야 공지 형질도입 방법을 이용할 수 있다. 예를 들면, 리포펙션 등을 위한 형질감염제, 예를 들면 중합체, 인산칼슘, 양이온성 지질에 의해 화학 형질도입을 임의로 수행한다. 벡터 또는 다른 물질을 성체 섬유아세포 세포로 운반하기 위해 세포 침투 펩타이드를 또한 임의로 사용한다. 간단히 말하면, 세포 침투 펩타이드는 단백질로부터 유도된 것, 예를 들면, 단백질 형질도입 도메인 및/또는 벡터 또는 다른 물질을 세포로 운반할 수 있는 양친매성 펩타이드를 포함한다. 예를 들면, 문헌[Heitz et al., 2009 *British Journal of Pharmacology*, 157: 195-206(그 전문이 본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)]에 세포 침투 펩타이드의 내용이 검토되어 있다. 다른 세포 침투 펩타이드가 당해 분야에 공지되어 있고 Heitz(상기)에 의해 개시되어 있다. 예를 들면, 리포솜 및 나노입자를 포함하는 다른 세포 침투 기술은 본 발명의 방법에서 이용되는 것으로 또한 고려된다. 리포솜 및 나노입자는 Heitz(상기)에 의해 또한 기재되어 있다.
- [0200] 형질전환된 세포를 확인하기 위해 항체를 사용할 수 있다. SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 및 Tra-1-81의 인간 다능성 줄기 세포 집단을 확인하고 규명하기 위해 줄기 세포 특이적 표면 단백질에 대한 4개의 항체를 흔히 사용한다. 이 시기 특이적 배아 항원(Stage Specific Embryonic Antigen) 3 및 4(SSEA3 및 SSEA4)는 인간 2102Ep 세포에 존재하는 강글리오사이드의 순차적인 구역을 인식하는 2종의 단일클론 항체이다(Henderson et al., 2002 *Stem Cells* 20: 329-337; Kannagi et al., 1983, *Embo J* 2: 2355-2361). Tra-1-60 및 Tra-1-81 항체는 원래 인간 배아 암종(EC) 세포에 대해 길러지고(PW et al., 1984, *Hybridoma* 3: 347-361), 시알로뮤신의 CD34 관련 패밀리의 구성원인 포도칼릭신으로서 확인된 케라틴황산화 당단백질에서 탄수화물 에피토프를 특이적으로 인식하는 것으로 나타났다(Badcock et al., 1999, *Cancer Research* 59: 4715-4719; Nielsen et al., 2007, *PLoS ONE* 2: e237; Schopperle and DeWolf, 2007, *Stem Cells* 25: 723-730). 몇몇 다른 표면 마커는 ES 세포에서 발현되는 것으로 나타났고 CD326 또는 EpCam(Sundberg et al., 2009, *Stem Cell Res* 2: 113-124), CD24(열 안정 항원) 및 CD133(Barraud et al., 2007, *Journal of Neuroscience Research* 85, 250-259)(Gang et al., 2007, *Blood* 109: 1743-1751)을 포함한다. 찬(Chan) 등(하기 2009년 문헌)은 4개의 인자 레트로 바이러스 형질도입을 통해

재프로그래밍을 겪은 섬유아세포로부터의 진짜 iPSC의 확인이 일정 시간 동안 살아 있는 세포 영상화를 통해 관찰에 의해 성취될 수 있고, 섬유아세포는 세포 표면 마커 CD13 및 D7Fib의 발현을 소실하고 다능성 줄기 세포 마커 SSEA4 및 Tra-1-60의 발현을 획득한다는 것을 보고하고 있다(Chan *et al.*, 2009, *Id.*).

[0201] iPSC를 포함하는 조성물, 예를 들면 본 발명의 자동화 시스템에 의해 제조된 유효량의 iPSC를 포함하는, 조사 도구로서 또는 억제학적 조성물로서 사용되는 조성물이 본 발명의 범위 내에 또한 고려된다.

[0202] 본 발명은 추가로 iPSC를 투여함으로써 이를 필요로 하는 동물 또는 사람에서의 질환 또는 질병을 치료하는 것, 예를 들면 본 발명의 자동화 시스템에 의해 제조된 iPSC 또는 이로부터 유래한 분화된 세포를 투여함으로써 치료 및/또는 조직/기관을 회복하는 방법에 관한 것이다. (외배엽, 중배엽 또는 내배엽 계통의) 적절한 분화된 세포는 본 발명의 방법에 의해 제조된 iPSC로부터 유래할 수 있다. 기관의 유형/치료하고자 하는 손상에 따라 당업자가 투여 방식을 결정할 수 있다. 예를 들면, iPSC 또는 이로부터 유래한 분화된 세포를 (현탁제로서) 주사로 투여할 수 있거나, 생체분해성 기질에 이식할 수 있다.

[0203] 또한, 본 발명은 iPSC, 전환분화된 또는 이로부터 유래한 분화된 세포를 예를 들면 관심 있는 하나 이상의 억제학적 물질과 접촉시키고 이후 접촉된 세포에서 적용된 억제학적 물질(들)의 효과를 검출함으로써 억제학적 물질을 시험하는 방법에 관한 것이다. 효율을 위해, 억제학적 물질(들)을 iPSC 또는 이로부터 유래한 분화된 세포의 배터리에 적용한다. 세포는 조직 공급원, 분화된 세포 유형 또는 대립유전자 공급원이 변하여, 관심 있는 하나 이상의 억제학적 물질에 양호하게 또는 불량하게 반응하는 세포 또는 조직 유형을 확인할 수 있다.

[0204] 추가로, 정확한 유전 결함, 예컨대 골형성부전증, 당뇨병, 퇴행성 신경 질환, 예를 들면 알츠하이머병, 파킨슨 병 등, 다양한 운동 뉴런 질환(MND), 예를 들면 근위축성 측색 경화증(ALS), 원발성 측삭 경화증(PLS), 진행성 근 위축증(PMA) 등에 유전자를 도입하기 위한 비히클로서 본 발명의 자동화 시스템에 의해 제조된 iPSC를 사용할 수 있다.

[0205] 세포를 화합물로 치료하고, 세포에 미치는 화합물의 효과, 예를 들면 세포내 분화에 미치는 효과를 확인하고/하거나 기록함으로써 시험 화합물의 기형발생 또는 발암성 효과를 결정하기 위해, 생물학적 조사를 위한 특이적 세포 유형을 제조하고, 세포 기반 검정, 예를 들면 (세포 독성에 대한 시험 화합물의 효과를 결정하기 위한) 세포 독성 연구를 위한 특이적 세포 유형을 직접적으로 또는 전구체로서 제조하기 위해 본 발명의 자동화 시스템에 의해 제조된 iPSC를 또한 사용할 수 있다.

[0206] 본 발명은 하기 비제한적인 실시예를 참조하여 참조문헌으로 더 잘 이해될 수 있다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시양태를 더 완전히 예시하도록 제시된다. 그러나, 어떠한 방식으로든 본 발명의 넓은 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0207] **실시예 1**

[0208] 도 5a, 도 5b, 도 5c는 작업흐름을 성취하기 위해 필요한 설비 구성의 예를 예시한 것이다. 도 5a는 섬유아세포 은행의 자동화 증식 및 품질 관리를 위한 시스템 구성을 도시한다. 도 5b는 섬유아세포와 같은 환자 샘플의 자동화 해동, 환자 샘플에 의한 재프로그래밍 인자의 자동화 도입, 예컨대 섬유아세포, MultiMACS에 의한 자동화 세포 분류 및 자동화 콜로니 확인 및 재포맷팅을 위한 시스템 구성을 도시한다. 도 5c는 iPS 클론의 자동화 증식, 자동화 배양체 생성 및 자동화 동결을 위한 시스템 구성을 도시한다.

[0209] 섬유아세포 세포 은행의 자동화 유도체화

[0210] 실시예로서, 하드웨어 구성을 사용하여 세포 배양의 향온처리를 허용하는 사이토메트 24C GLS 자동화 향온처리기(108), 자동화 이미지 획득 및 분석을 위한 신텔렉트 셀리고 사이토미터(102), 플레이트 또는 관에서 세포의 원심분리를 위한 아질런트 V-스핀 자동화 원심분리기(106) 및 냉동관의 자동화 캡핑 및 디캡핑을 위한 해밀턴 캡퍼 디캡퍼(104)의 하드웨어 부품에 연결된 해밀턴 스타레트 액체 취급 로봇(100)으로 이루어진 섬유아세포 은행의 유도체화를 성취한다. 이 부품은 하드웨어 부품 중에서 모든 장치와 통신하고 세포 배양물 및 세포의 조작을 제어하는 PC 상의 프로그래밍 가능한 소프트웨어(118)에 의해 추가로 제어된다. 제어기 소프트웨어는 추가로 스케줄링 소프트웨어(120)와 통신하여 시스템 상호작용을 연결한다. 해밀턴 스타레트(100)는 4/8/12 채널 피펫팅을 위한 모듈러 암, 8개의 피펫팅 채널, iSWAP 플레이트 핸들러, 플레이트 및 뚜껑 취급을 위한 CO-RE 그립퍼(Gripper), 배지 교환 동안 플레이트를 기울이기 위한 멀티플렉스 틸트 모듈, 해밀턴 히티드 셰이커(Hamilton Heated Shaker) 2.0, 및 플레이트 및 뚜껑 파크에 의한 액체 취급 플랫폼의 유연한 레이아웃을 위한 캐리어 패키지, 피펫 스택커(stacker), 딸 플레이트 스택커 및 배지를 보유하기 위한 통이 구비된다. 신텔렉트 셀리고(102)는 이미지 획득의 제어 및 이미지 분석을 위해 PC에서 영상화 유닛 및 프로그래밍 가능한 소프트웨어로 이

루어진다. 셀리고가 바람직한 데, 왜냐하면 이것은 영상화 동안 세포 배양 플레이트를 이동시키지 않아 평판배양된 생검의 진탕을 감소시키기 때문이다. 해밀턴 캡퍼 디캡퍼(104) 및 아질런트 V-스핀 원심분리기(106)는 NuAire BSL II 바이오세이프 캐비닛(110) 내의 해밀턴 스타레트와 함께 포함되어 세포 배양 플레이트의 조작 동안 무균 조작 환경을 유지시킨다.

[0211] 자동화 시스템에서 플레이트 취급을 제어하기 위해, 비너스 다이내믹 스케줄러 5.1(120)이 구비된 마이크로랩 스타 비너스 투 베이스 팩(MICROLAB STAR VENUS TWO Base Pack) 4.3 소프트웨어(118)를, 원심분리기를 위한 각각의 부착된 하드웨어 부품 드라이버(106), 캡퍼 디캡퍼(104), 셀리고(102) 및 사이토매트 24(108) 및 시스템의 조작을 통합하는 사이토매트 이송 스테이션과 함께 사용한다. 제공된 제어기 소프트웨어(118)를 이용하여 프로그래밍된 하기 방법은 시스템의 기능에 필요하고 환자 피부 생검으로부터의 섬유아세포주의 유도체화를 성취하기 위해 정의된 서열로 조합될 수 있다:

[0212] 1. 6웰 생검 플레이트(22, 24)를 스타레트(100)에 로딩하고 사이토매트 항온처리기(108)로 옮긴다.

[0213] 2. 셀리고(102)에서 포화상태 체크(26, 28)하고, 스타레트(100)에서 배지 교환한다.

[0214] 3. 셀리고(102)에서 포화상태 체크(28)한다.

[0215] 4. 완전 배지 교환을 위해 스타레트(100)에서 배지 교환(30)한다.

[0216] 5. 스타레트(100) 및 아질런트 V-스핀 원심분리기(106)에서 검정 플레이트 제조(34)한다.

[0217] 6. 스타레트(100)에서 계대배양(44)한다.

[0218] 7. 스타레트(100)에서 계대배양하고 선별(42)한다.

[0219] 8. 스타레트(100)에서 계대배양하고 수확하고 동결한다.

[0220] 9. 플레이트(46, 40)를 사이토매트(108)로부터 스타레트(100)로 인출한다.

[0221] 격리 검정 시스템에서 자동화 마이크로플라스마 시험

[0222] 독립적인 하드웨어 구성은 섬유아세포 बैं크의 마이크로플라스마 시험을 성취하기 위해 사용되고, 바이오텍 시너지 HT 판독기(114)에 연결된 해밀턴 스타레트 액체 취급 로봇(112)으로 이루어진다. 이 부품은 하드웨어 부품 사이에 모든 장치와 통신하고 세포 배양물 및 세포의 조작을 제어하는 PC 상의 프로그래밍 가능한 소프트웨어(116)에 의해 추가로 제어된다. 해밀턴 스타레트(112)는 4/8/12 채널 피펫팅을 위한 모듈러 암, 8개의 피펫팅 채널, iSWAP 플레이트 핸들러, 플레이트 및 뚜껑 취급을 위한 CO-RE 그립퍼, 및 플레이트 및 뚜껑 파크에 의한 액체 취급 플랫폼의 유연한 레이아웃을 위한 캐리어 패키지, 피펫 스테커, 딸 플레이트 스테커 및 검정에 필요한 시약을 보유하기 위한 통이 구비된다.

[0223] 자동화 시스템에서 플레이트 취급을 제어하기 위해, 마이크로랩 스타 비너스 투 베이스 팩 4.3 소프트웨어(116)를 시스템의 조작을 통합하는 바이오텍 시너지 HT 판독기(114)에 대한 부착된 하드웨어 성분 드라이버와 함께 사용한다. 마이크로알버트 마이크로플라스마 검출 검정(36) 및 데이터 분석의 실행을 허용하는 이 소프트웨어를 사용하여 검정 결과(38)를 결정하도록 방법은 프로그래밍된다.

[0224] 재프로그래밍된 세포의 해동, 감염 및 확인을 위한 자동화 시스템

[0225] 섬유아세포를 해동하고, 재프로그래밍 바이러스에 의해 섬유아세포를 감염시키고, 재프로그래밍된 세포의 자기 분류 및 줄기 세포 콜로니의 확인에 필요한 하드웨어 구성은 3개의 해밀턴 STAR 액체 취급 유닛(122, 136, 138), 2개의 사이토매트 48C 항온처리기(132), 1개의 사이토매트 2C 425 항온처리기(142), 2개의 신텔렉트 셀리고 사이토미터(124, 140), 해밀턴 캡퍼 디캡퍼(126), 아질런트 V-Spin(128), 밀테니 MultiMACS 자기 분리 디바이스(136)로 이루어진다. 액체 핸들러, 셀리고, 해밀턴 캡퍼 디캡퍼 및 아질런트 V-스핀은 모두 해밀턴 랙 러너 로보틱 레일(130)에 의해 연결된다. 각각의 해밀턴 스타(Hamilton STAR)는 4/8/12 채널 피펫팅을 위한 모듈러 암, 8개의 피펫팅 채널, iSWAP 플레이트 핸들러, 플레이트 및 뚜껑 취급을 위한 CO-RE 그립퍼, 배지 교환 동안 플레이트를 기울이기 위한 하나 이상의 멀티플렉스 틸트 모듈, 하나 이상의 해밀턴 히터드 웨이커 2.0, 및 플레이트 및 뚜껑 파크에 의한 액체 취급 플랫폼의 유연한 레이아웃을 위한 캐리어 패키지, 피펫 스테커, 딸 플레이트 스테커 및 배지를 보유하기 위한 통이 구비된다. 해밀턴 스타 액체 핸들러(122) 중 하나는 또한 96웰 피펫팅 헤드가 구비된다. 1개의 셀리고(140) 및 사이토매트 2C 항온처리기(142)는 해밀턴 스타(138) 중 하나에 직접 연결되어 자동화 세포 분류를 수월하게 한다. 해밀턴 스타는 세포 배양 플레이트의 조작 동안 무균 조작 환경을

유지하기 위한 뉴아이레(NuAire) BSL II 바이오세이프 캐비닛(144, 146, 148) 내에 포함된다. 남은 부품은 디바이스 중에서 세포 배양 플레이트의 이동 동안 무균 조작 환경을 유지하기 위한 해파 여과 후드에 밀폐된다. 사이트매트 48C 향온처리기(132)는 랙 러너 수송 레일(130)에 의해 시스템의 다른 부품에 연결된다.

- [0226] 자동화 시스템에서 플레이트 취급을 제어하기 위해, 비너스 다이내믹 스케줄러 5.1(156)이 구비된 마이크로랩 스타 비너스 투 베이스 팩 4.3 소프트웨어 제어기(150, 152, 154)를, 모든 해밀턴 스타(122, 134, 138)를 위한 각각의 부착된 하드웨어 부품 드라이버, 원심분리기(128), 캡퍼/디캡퍼(126), 2개의 셀리고(140, 124), 랙 러너(130) 및 사이트매트 24(132), 사이트매트 2C(142) 및 시스템의 조작을 통합하는 관련 사이트매트 이송 스테이션과 함께 사용한다. 제공된 제어기 소프트웨어(150, 152, 154)를 이용하여 프로그래밍된 하기 방법은 시스템의 기능에 필요하고 섬유아세포로부터의 iPS 콜로니의 유도체화를 성취하기 위해 정의된 서열로 조합될 수 있다:
- [0227] 1. 마이크로플라스마 유리 6웰 생검 플레이트(48)를 스타(122)에 로딩하고 깨끗한 성장 조건(60) 하에 사이트매트 향온처리기(132)로 옮긴다.
- [0228] 2. 셀리고(124)에서 포화상태 체크(50)하고, 스타(122)에서 배지 교환한다.
- [0229] 3. 스타(122)에서 계대배양하고 수확(52)하고 동결(54, 56)한다.
- [0230] 4. 섬유아세포(61)를 포함하는 냉동관이 로딩되고 스타(122)에서 해동되는 해동 방법 이후, 관(126)을 디캡핑하고 섬유아세포를 세척한 후, 평판배양 배지에서 세포를 재현탁하고 6웰 플레이트(62)에서 섬유아세포를 평판배양하고 사이트매트 향온처리기(132)로 옮긴다.
- [0231] 5. 완전 배지 교환을 위해 스타레트(122)에서 배지 교환한다.
- [0232] 6. 셀리고(124)에서 포화상태 체크한다.
- [0233] 7. 스타레트(122)에서 24웰 플레이트(64)에서 섬유아세포를 계대배양하고 시딩한다.
- [0234] 8. 스타레트(122)에서 섬유아세포(64)의 감염을 위한 방법.
- [0235] 9. 스타(122, 138, 144)에서 웰에 한정된 용적의 배지를 첨가하기 위한 방법.
- [0236] 10. 스타(122, 138, 144)에서 반의 배지 교환을 실행하기 위한 방법.
- [0237] 11. 밀테니 MultiMACS(136) 및 셀리고(124)에 부착된 스타(144)에서 자기 분류, 희석 및 평판배양(66)을 위한 방법.
- [0238] 12. 스타(122, 138, 144)에서 3/4 배지 교환을 위한 방법.
- [0239] 13. 살아 있는 콜로니에서 면역세포화학 염색을 실행한 후 스타(138) 및 셀리고(140)를 이용하여 콜로니(66)를 자동화 영상화하기 위한 방법.
- [0240] 14. 스타(138)에서 선택된 웰로부터 콜로니(68)를 수확하고 선별하고 재평판배양하기 위한 방법.
- [0241] 15. 플레이트를 사이트매트(132)로부터 스타레트(122, 138, 144)로 인출한다.
- [0242] 재프로그래밍된 세포의 증식, 품질 관리 및 동결을 위한 자동화 시스템
- [0243] 재프로그래밍된 줄기 세포 콜로니를 증식시키고, 품질 관리 검정을 위한 콜로니의 플레이트를 생성시키고, 동결 저장을 위한 플레이트 및 관을 생성하는 데 필요한 하드웨어 구성은 3개의 해밀턴 스타 액체 취급 유닛(150, 154, 160), 사이트매트 24C 향온처리기(172), 1개의 사이트매트 2C 425 향온처리기(174), 1개의 신텔렉트 셀리고 사이트미터(166), 해밀턴 캡퍼 디캡퍼(170), 아질런트 V-스핀(168) 및 아질런트 플레이트록 플레이트 실러(Agilent PlateLoc plate sealer)(164)로 이루어진다. 액체 핸들러, 셀리고, 해밀턴 캡퍼 디캡퍼, 아질런트 V-스핀 및 아질런트 플레이트록 플레이트 실러는 모두 해밀턴 랙 러너 로보틱 레일(162)에 의해 연결된다. 해밀턴 스타 및 스타레트는 4/8/12 채널 피펫팅을 위한 모듈러 암, 8개의 피펫팅 채널, iSWAP 플레이트 핸들러, 플레이트 및 뚜껑 취급을 위한 CO-RE 그립퍼, 배지 교환 동안 플레이트를 기울이기 위한 하나 이상의 멀티플렉스 틸트 모듈, 하나 이상의 해밀턴 히트드 셰이커 2.0, 및 플레이트 및 뚜껑 파크에 의한 액체 취급 플랫폼의 유연한 레이아웃을 위한 캐리어 패키지, 피펫 스택커, 딸 플레이트 스택커 및 배지를 보유하기 위한 통이 구비된다. 스타(160) 중 하나는 또한 배지 교환 및 계대배양을 수월하게 하기 위한 96 채널 멀티채널 피펫팅 헤드를 갖는다. 사이트매트 2C 및 사이트매트 24C 향온처리기는 해밀턴 랙 러너 수송 레일(162)에 의해 해밀턴 스타에 연결되어 자동화 배지 교환을 수월하게 한다. 해밀턴 스타는 세포 배양 플레이트의 조작 동안 무균 조작 환경을 유지하기

위한 뉴아이레 BSL II 바이오세이프 캐비닛(176, 178, 180) 내에 포함된다. 남은 부품은 디바이스 중에서 세포 배양 플레이트의 이동 동안 무균 조작 환경을 유지하기 위한 해파 여과 후드에 밀폐된다.

- [0244] 자동화 시스템에서 플레이트 취급을 제어하기 위해, 비너스 다이내믹 스케줄러 5.1(188)이 구비된 마이크로랩 스타 비너스 투 베이스 팩 4.3 소프트웨어 제어기(182, 184, 186)를, 원심분리기를 위한 각각의 부착된 하드웨어 부품 드라이버, 디캡퍼, 플레이트 실러, 셀리고 및 사이토매트 향온처리기 및 시스템의 조작을 통합하는 사이토매트 이송 스테이션과 함께 사용한다. 하기 방법은 시스템의 기능에 필요하고 플레이트 또는 냉동바이알에서 품질 관리 검정 및 동결을 위해 플레이트에서 세포 배양을 증식시키기 위해 정의된 서열로 조합될 수 있다:
- [0245] 1. 이전 단계로부터 사이토매트 향온처리기(172)로 플레이트(68)를 수용하기 위해 스타(160)에서 로딩 방법.
- [0246] 2. 틸트 모듈 및 8-채널 피펫팅 암을 사용하여 완전 배지 교환을 위해 스타(150, 154, 160)에서 배지 교환.
- [0247] 3. 스타(150, 154, 160) 및 사이토매트 향온처리기(172) 내외로부터 플레이트를 이동시키기 위한 관련 방법으로 셀리고(166)에서 포화상태 체크.
- [0248] 4. 스타(150, 154, 160)에서 96웰 플레이트(68-90)에서 iPSC를 계대배양하고 시딩하기 위한 방법.
- [0249] 5. 스타(150, 154, 160)에서 부분 배지 교환을 실행하기 위한 방법.
- [0250] 6. 스타(150, 154, 160)에서 선택된 96웰로부터 새로운 96웰 플레이트(80, 82, 86, 88)로 콜로니를 수확하고 선별하고 재평판배양하기 위한 방법.
- [0251] 7. 스타(154)에서 선택된 96웰로부터 새로운 24웰 플레이트(90, 92)로 콜로니를 수확하고 선별하고 재평판 배양하기 위한 방법.
- [0252] 8. 스타(154)에서 선택된 24웰로부터 새로운 6웰 플레이트(92, 94)로 콜로니를 수확하고 선별하고 재평판 배양하기 위한 방법.
- [0253] 9. 스타(154)에서 동결 플레이트(88)에서 세포를 계대배양하고 수확하고 분포시킨다.
- [0254] 10. 스타(154)에서 냉동관(96)에서 세포를 계대배양하고 수확하고 분포시킨다.
- [0255] 11. 플레이트를 사이토매트 24C(172) 또는 사이토매트 2C(174)로부터 스타(150, 154, 160)로 인출한다.

[0256] **실시예 2**

[0257] 재프로그래밍을 위한 섬유아세포 बैं크의 생성

[0258] 환자 샘플로부터 iPSC를 유도하기 위한 작업흐름에서의 제1 단계는 성체 세포를 얻고 증식시키는 것이다. 예를 들면, 피부 편지 생검 또는 버려진 진피 조직을 얻고, 이후 조직으로부터 섬유아세포의 배양물을 단리하고 증식시켜 이를 성취한다. 본 발명의 작업흐름에서, 시스템 1 및 2로 이루어진 자동화 시스템에 의해 이를 성취한다. 시스템 1 및 2(100-120) 및 시스템 3(122-132, 154, 190)의 자동화 부품은 환자 생검의 평판배양(2, 22-24), 생육 및 계대배양(4, 26-32)(액체 취급 로봇에 대한 물릴 생성), QC(6, 34-46)(마이크로플라스마를 위한 자동화 시험) 및 액체 취급 로봇에 대한 자동화 동결(8, 48-56)을 포함하는 환자 샘플로부터 냉동관(61)에 저장된 섬유아세포 बैं크를 유도하는 데 필요한 단계를 수행한다. 예를 들면, 생검으로부터 섬유아세포의 생성을 위한 작업 흐름 및 의사결정 나무는 격리(58) 및 세정 단계(60)로 분할된다. 생검이 시설에 진입하면서, 테크니션은 6웰 플레이트에서 생검을 평판배양하고(22), 플레이트를 자동화 향온처리기(24)로 허용하여 격리 작업흐름을 시작한다. 플레이트에 부착하기 위한 소정 시간이 생검에게 제공된 후, 액체 취급 로봇은 자동화 향온처리기로부터 플레이트를 인출하여 자동화 현미경에서 평판배양된 조직으로부터 성체 섬유아세포의 생육의 포화상태를 공급하고 체크한다(26). 플레이트를 향온처리기로 복귀시키고 계속해서 생육시킨다(28). 액체 핸들러는 향온처리기로부터 플레이트를 제거하고 항생제 및 항진균성 유리 배지에 대해 배지를 교환하여(30) 마이크로플라스마 시험에 준비한다. 로봇은 추가로 5일 동안 플레이트를 향온처리기로 이동시킨다(32). 이후, 로봇은 플레이트를 제거하고 마이크로플라스마 시험을 위해 딸 플레이트로 배지를 인출한다(34). 마이크로플라스마 시험을 위해 격리 검정 시스템으로 딸 플레이트를 이동시킨다(36). 이후, 검정으로부터의 양성 신호에 기초하여 선택한다(38). 6웰 플레이트의 모든 웰이 양성 검정 결과에 해당하는 경우(40), 이를 버린다. 6웰 플레이트의 모든 웰이 음성이고 마이크로플라스마를 포함하지 않는 경우, 이를 격리로부터 시스템 3, 4, 5에 의해 제공된 깨끗한 성장 시스템으로 이동시킨다.

다(46). 몇몇 웰은 양성이고, 몇몇 웰은 음성인 경우, 격리에서 음성 웰을 유지시킨다(42). 음성 웰을 새로운 플레이트로 계대배양하고(44), 항온처리기로 옮기고, 양성 웰을 포함하는 소스 플레이트를 버린다. 이 배양물은 단계를 거쳐 진행하여 마이크로플라스마를 재시험한다(24-38). 성장을 위해 깨끗한 배양물을 모니터링하고(50), 계대배양하고(52), 냉동바이알에서 동결시킨다(54, 56, 61).

[0259] 줄기 세포 어레이의 생성

[0260] iPSC를 제조하기 위해, 자동화 시스템(10)에 의해 냉동관(61)에서의 섬유아세포를 평판배양하고, 자동화 시스템(12)에 의해 재프로그래밍 인자를 도입하고, 시스템(14)에서 자동화 분류 및 단리에 의해 iPSC를 단리하고, 자동화 시스템(16)에 의해 원하는 클론을 선택하고, 자동화 시스템(16)에 의해 증식시키고, 마커 검정 및 배양체 검정(18)에 의해 다능성 상태에 대해 자동화 시스템(QC)에 의해 자동화 품질 체크하고, 이후 자동화 시스템(20)에 의해 원하는 세포를 자동화 동결 및 저장한다. 자동화 시스템(3, 4, 5, 6, 7 및 8)에서 이 단계를 수행한다(122-192).

[0261] 예를 들면, 냉동관(61)에서 96명의 환자 및 대조군 섬유아세포 샘플을 6웰 플레이트(62)의 각각의 웰에서 평판 배양할 때 자동화 iPSC 유도체화 공정이 시작한다. 이를 재프로그래밍 인자를 코딩하는 바이러스를 사용하여 감염에 대해 24웰 플레이트의 각각의 웰로 한정된 세포수로 계대배양한다(64). 다음 단계에서, 재프로그래밍된 샘플에 세포 분류화에 의해 또는 바람직하게는 자기 비드 기반 농후화를 이용하여 비재프로그래밍된 세포를 고갈시키고, 이를 96웰 플레이트(66)에서 다중 웰에서의 클론 밀도로 평판배양한다. 이 실시예에서, 전분화능 표면 마커에 양성인 단일 클론을 포함하는 6웰(66)이 확인되었다. 이 클론을 선별하고 96웰 플레이트(68)의 최소 수로 강화할 수 있다. 각각의 출발 샘플(72)에 웰 내의 포화상태가 성취될 때까지 이 클론을 순서대로 계대배양한다. 이후, 각각의 플레이트의 샘플을 2중 플레이트에 복제하고(74, 76), 1개 플레이트는 각각의 클론(74)의 다능성 상태를 결정하기 위해 필요한 전분화능 품질 관리 검정을 위한 것이고 1개의 플레이트는 후속 계대배양(76)에서 앞으로 진행시키기 위한 것이다. 앞으로 진행된 플레이트를 다시 3개의 플레이트(78, 80, 82)로 계대배양한다. 핵형 및 유전 다양성(78)을 평가하는 QC 검정을 위해 1개의 플레이트를 수확하고, iPSC 클론의 분화능력을 평가하는 QC 검정을 위해 1개의 플레이트(82)를 v-바닥 플레이트에 계대배양하여 배양체(84)를 형성하고, 최종 플레이트(80)를 추가의 팽창을 위해 앞으로 진행시킨다. 이전의 전분화능 QC 검정으로부터 품질 관리를 통과하지 않은 각각의 클론은 도 4bb 및 4c에 표시된 웰(80, 82, 90)에서 "X"로 표시된 바대로 앞으로 진행하지 않는다. 1개 내지 3개의 클론이 남아 있을 때까지(86), 남은 클론을 가능한 적은 플레이트에 강화한다. 이 클론을 플레이트(88)에 부착하면서 동결방지를 위해 증식시키거나, 추가로 증식시키고(92, 94), 냉동바이알에서 동결보존한다(96).

[0262] 배아 줄기 세포(ES)는 분화된 성체 세포를 생성하기 위해 본 발명의 자동화 시스템과 사용되는 것으로 또한 고려된다. ES 세포는 초기 단계 배아의 배반포로부터 유래하고 내배엽, 외배엽 및 중배엽(3개의 배엽 층)(즉, 이들은 "다능성"임)으로 발생할 가능성을 갖는다. 실험실내, ES 세포는 다양한 유형의 조직으로 저절로 분화하는 경향이 있고, 이의 분화 방향의 조절이 도전과제일 수 있다. 그러나, 특정한 유형의 분화된 딸세포로의 ES 세포의 지시된 분화에서 몇몇 진전이 성취되었다. 예를 들면, 단계별 분화의 한정된 단계에서 세포 배양물에 첨가된 한정된 인자를 사용하여 기능성 중뇌 도파민 작용성 뉴런으로 인간 ES 세포의 분화를 지시할 수 있다(예를 들면, 문헌[Kriks *et al.*, 2011 *Nature*, Nov. 6. doi: 10.1038/nature10648 (Epub)] 참조). 분화가 균일하지 않으므로, 추가의 연구 또는 조작을 위해 관심 있는 집단을 단리할 필요가 여전히 있다. 본 명세서에 기재된 공정 및 설비는 처음에 다능성 배아 줄기 세포를 유도하고 증식시키고, 또한 자동화 자기 세포 단리를 비롯한 자동화 방법에 의해 이의 분화된 유도체의 하위집단을 단리하기 위해 사용된다.

[0263] 예를 들면, 자동화 공정에 적용 가능한 다중 웰 플레이트에서 기질에서 전체 인간 배반포를 평판배양할 수 있다. 유도 다능성 줄기 세포의 단리를 위해 기재된 로봇 설비 및 방법에 의해 수행된 동일한 자동화 자기 단리 절차를 이용하여 이 평판배양된 배반포로부터의 생육물을 단리한다. 생성된 인간 배아 줄기 세포주를 증식시키고, 품질 관리 검정에 의해 선택하고, 본 명세서에 기재된 동일한 자동화 절차를 이용하여 동결시킨다.

[0264] 추가로, 정의된 인자 또는 체세포 핵 이식에 의해 유도체화되거나 유래한 배반포인, 다능성 줄기 세포를 사용하여, 분화된 유도체는 기재된 작업흐름 및 설비를 이용하여 단리될 수 있다. 세포 운명 변화를 유도하는 데 필요한 정의된 인자의 지시된 적용에 의해 또는 자발 분화 후 분화된 유도체를 얻을 수 있다. 다능성 줄기 세포로부터 신경 세포 운명을 유도하기 위해 예를 들면, TGF 베타 경로의 억제제를 사용할 수 있다. 이후, 신경 세포를 NCAM과 같은 표면 항원의 자기 비드 면역라벨링에 의해 비신경으로부터 단리할 수 있다. 뉴런과 같은 분화된 세포를 자기 단리하고, 선택하고, 배양하고 증식시키기 위해 기재된 작업흐름 및 설비를 사용할 수 있다. 이 과정

은 또한 심장 세포와 같은 다른 분화된 세포 유형에 적용 가능하고, 이 세포 유형의 경우 관심 있는 세포 유형에 특이적인 세포 표면 항원을 인식하는 항체가 존재한다.

- [0265] 다분화능 줄기 세포는 또한 분화된 성체 세포를 생성하기 위해 본 발명의 자동화 시스템과 사용되는 것으로 고려된다. 특히, 본 발명의 자동화 시스템을 사용하여 분화된 성체 세포를 생성하기 위해 중간엽 줄기(MS) 세포를 사용할 수 있다. MS 세포는 특이적 유형의 중간엽, 또는 지방조직, 골조직, 연골조직, 탄력조직, 근육조직 및 섬유 연결조직을 포함하는 연결 조직으로 분화할 수 있는 골수, 혈액, 진피 및 골막 및 태반에서 발견되는 형성 다능성 아세포 또는 배아 유사 세포이다. 이 세포가 진입하는 특이적 분화 경로는 기계적 영향 및/또는 내인성 생리활성 인자, 예컨대 성장 인자, 사이토카인 및/또는 숙주 조직에 의해 확립된 국소 미세환경 조건으로부터의 다양한 영향에 따라 달라진다. 예는 연골 보수를 위한 연골세포의 특성을 갖는 분화된 세포로의 MS 세포의 분화를 포함하고, 예를 들면 미국 특허 제8,048,673호를 참조한다.
- [0266] 염색체 시험
- [0267] 몇몇 양태에서, 나노스트링 엔카운터 Plex2 검정 키트는 집단 중에 불변인 것으로 대개 알려진 400개의 유전자 좌를 표적화하기 위해 사용되고, 세포주 확인의 "지문" 추적과 커플링된 통합된 분자 핵형 분석을 허용한다. 분자 핵형 분석은 세포 배양 유도체화 및 iPSC 세포주의 증식의 과정 동안 유전 안정성을 변화시키기 위해 염색체 암마다 평균 8개의 프로브를 사용한다. 아이덴티티 분석을 또한 다형 유전자좌의 30개의 일반 카피수 변이(CNV)에 기초하여 모든 세포주에서 수행하여, 각각의 계놈의 모호하지 않은 확인을 허용한다.
- [0268] 전분화능 분석
- [0269] 일 양태에서, 표면 마커 염색을 수행하여 세포가 Tra-1-60 표면 마커에 양성이라는 것을 나타내고, 이를 예를 들면 셀리고 자동화 영상화기에 의해 모니터링한다. PSC 세포주는 유의적인 수준의 전분화능 유전자를 나타내야 한다. 일 실시예에서, 본 발명자들은 전분화능을 위한 6개의 마커(Oct4, Klf4, cMyc, 나노그, Lin28, ZFP42 및 Sox2)를 포함하는 (하기 기재된) 100개의 유전자 마커의 프로브 세트를 사용하였다. 이 분석을 수행하기 위해, 본 발명자들은 세포의 샘플을 용해시키고 RNA를 수확하였다. 본 발명자들은 엔카운터 Plex2 검정 키트를 사용하여 여러 샘플 및 수백개의 유전자 표적에서 발현 수준을 분석함과 동시에 PSC 규명화에 대한 고속 접근법을 허용한다. 엔카운터 유전자 발현 검정은 정량적이므로, 선택 기준은 동일한 조건 하에 성장한 분석된 확립된 hESC 세포주의 대조군 패널에 대한 범위 내에 해당하는 발현 수준에 기초한다. 전분화능 유전자 발현 기준을 통과한 세포주를 추가로 증식시키고 배양체(EB) 검정에서 실험실내 분화시킨다.
- [0270] EB 형성 유전자 발현 검정
- [0271] 후성적 및 전사 변이가 인간 다능성 세포주 중에 흔하고, 이 변이가 세포주의 이용성에 상당한 영향을 미칠 수 있는 것으로 나타났다. 예시적인 실시예에서, 유전자 마커의 패널은
- [0272] 각각의 3 배엽 층으로부터 선택된 83개의 상이한 유전자 마커(83개)
- [0273] 5개의 레트로바이러스 전이유전자(단일 검출 프로브를 갖는 4 인자, 1개의 프로브)
- [0274] 5개의 센다이 전이유전자(4 인자 + 벡터 단독, 5개)
- [0275] Oct4, Klf4, cMyc, 나노그, Lin28, ZFP42(전분화능, Sox2는 배엽 군에 있음, 6개의 프로브)
- [0276] 섹스 마커 SRY, XIST(2) - 공여자 섹스는 일치해야 하거나 세포주는 거부된다.
- [0277] 하우스키핑 유전자, ACTB, POLR2A, ALAS1(3개의 프로브).
- [0278] hPSC 세포주 증식 및 저장
- [0279] 자동화 증식:
- [0280] 6웰 플레이트의 2개의 별개의 웰로 초기 세포를 평판배양한 후 이를 CO2 항온처리기 내에 위치시키고 이를 최대 95% 이하의 포화상태로 성장시켜 세포주를 증식시킨다.
- [0281] 저장:
- [0282] 바이알을 처음에 SAM -80 동결기에 위치시켜 초기 저속 냉각을 수행한다. 이 시스템은 시스템이 접근된 시간의 로그 및 온도의 자동화 모니터링을 갖는다.
- [0283] 다음에, 장기간 저장을 위해 바이알을 LN2에 위치시킨다. 모니터링을 위한 품질 관리는 이 제안에서 나중에 기

재되어 있다. 각각의 바이알을 독특한 2D 바코드로 개별적으로 마킹하고 재고품을 LIMS 내에 추적한다.

- [0284] hPSC 세포주 규명
- [0285] iPSC 및 EB 유전자 발현 분석 - EB 검정, 전분화능 마커, 섹스 마커 및 전이유전자 발현에서 배엽 층 분화를 모니터링하기 위해 계통 분화 검정 득점카드(100개의 유전자)를 커버하는 프로브의 세트
- [0286] 동결-해동 분석 세포를 회수 이후 계수하고 6웰 플레이트의 한개의 웰에서 평판배양한다. 콜로니를 출현 첫일차 및 이후 5일 후에 사진 찍고, 콜로니는 36시간 이하의 배가 시간을 나타내야 한다.
- [0287] 표면 마커 분석:
- [0288] 셸리고 자동화 영상화기를 사용하여 Tra-1-60 염색의 고품량 영상화를 이용하는 자동화 시스템을 이용하여 표면 마커 분석을 수행한다.
- [0289] iPSC 및 EB 유전자 발현 분석:
- [0290] 전분화능 유전자 발현 - iPSC 클론은 유의적인 수준의 전분화능 유전자를 나타내야 한다. 본 발명자들은 전분화능을 위한 6개의 마커(Oct4, Klf4, cMyc, 나노그, Lin28, ZFP42 및 Sox2)를 포함하는 (하기 기재된) 100개의 유전자 마커의 프로브 세트를 사용하였다. 이 분석을 수행하기 위해, 본 발명자들은 각각의 선택된 클론에 대해 세포의 샘플을 용해시키고 RNA를 수확하였다. 본 발명자들은 엔카운터 Plex2 검정 키트를 사용하여 여러 샘플 및 수백개의 유전자 표적에서 발현 수준을 분석함과 동시에 iPSC 규명화에 대한 고속 접근법을 허용한다. 엔카운터 유전자 발현 검정은 정량적이므로, 선택 기준은 동일한 조건 하에 성장한 분석된 확립된 hESC 세포주의 대조군 패널에 대한 범위 내에 해당하는 발현 수준에 기초한다. 전분화능 유전자 발현 기준을 통과한 선택된 클론을 추가로 증식시키고 배양체 검정에서 실험실내 분화시킨다.
- [0291] EB 형성 유전자 발현 검정 - 인간 다능성 줄기 세포주 중에 존재하는 후성적 변이의 성질 및 양을 확고히 확립하기 위해, 최근에 유래되고 기능적으로 규명된 20개의 확립된 배아 줄기 세포(ESC)주 및 12개의 iPSC 세포주에 3의 게놈 검정을 적용한다. 포괄적인 세포주 규명의 실험적 부담을 낮추고 기존의 표준 검정에 비해 정확성을 개선하기 위한 단계로서, 이 연구로부터의 모든 데이터를 3의 게놈 검정을 이용하여 생물정보학 득점카드와 조합하고, 이는 임의의 다능성 세포주의 품질 및 이용성의 고속 예상을 가능하게 한다. 본 발명자들은 이 득점카드를 사용하여 본 발명의 iPSC 세포주의 각각의 클론으로부터 형성된 EB로부터 유전자 발현 데이터를 분석하였다. 분화 가능성을 시험하기 위해, 본 발명자들은 96웰 v-바닥 플레이트에서 EB를 생성하는 자동화 시스템을 사용하고, 나노스트링 엔카운터 Plex2 검정 키트를 위한 RNA 수확으로 종료하였다.
- [0292] 각각의 3 배엽 층으로부터 선택된 83개의 상이한 유전자 마커(83개)
- [0293] 5개의 레트로바이러스 전이유전자(단일 검출 프로브를 갖는 4 인자, 1개의 프로브)
- [0294] 5개의 센다이 전이유전자(4 인자 + 벡터 단독, 5개)
- [0295] Oct4, Klf4, cMyc, 나노그, Lin28, ZFP42(전분화능, Sox2는 배엽 군에 있음, 6개의 프로브)
- [0296] 섹스 마커 SRY, XIST(2개)
- [0297] 하우스키핑 유전자, ACTB, POLR2A, ALAS1(3개의 프로브).
- [0298] 핵형 및 아이덴티티 분석
- [0299] 세포주를 수용하기 전에 및 각각의 증식 종료 시, 본 발명자들은 나노스트링 엔카운터 Plex2 검정 키트를 사용하여 세포주 확인의 "지문" 추적과 커플링된 통합된 분자 핵형 분석을 허용하는 400개의 게놈 유전자좌를 표적화하였다. 분자 핵형 분석은 세포 배양 유도체화 및 iPSC 세포주의 증식의 과정 동안 유전 안정성을 변화시키기 위해 염색체 암마다 평균 8개의 프로브를 사용한다. "지문" 아이덴티티 추적 분석은 다형 유전자좌의 30개의 일반 카피수 변이(CNV)에 기초한 조합 서명에 의존하여, 각각의 게놈의 모호하지 않은 확인을 허용한다. 추가로 확인 오류를 피하기 위해, 상대적인 것으로 알려진 조직 공여자는 유사한 CNV를 갖는 것이 이론적으로 가능하므로 동일한 배치에서 처리되지 않는다. 아이덴티티 분석으로부터의 데이터는 초기 CNV 데이터를 상호 참조하여 본 발명의 LIMS 시스템이 모든 세포주를 적절히 추적한다는 것을 보장한다.
- [0300] 동결-해동 분석
- [0301] 동결-해동 분석: 동결보존 후 1개의 바이알을 해동한다. 세포를 회수 이후 계수하고 6웰 플레이트의 한개의 웰

에서 평판배양한다. 배양물을 매일 관찰한다. 콜로니를 출현 첫일자 및 이후 5일 후 사진 찍는다. 콜로니는 처음 관찰 후 5일 내에 직경이 적어도 2배이어야 한다.

[0302] 자동화 생검 생육 추적. 본 발명 시스템을 이용하여, 본 발명자들은 자동화 및 추적 가능한 이미지 분석에 의해 생검 및 다른 조직 공급원의 생육을 추적할 수 있다. 도 6에 도시된 것처럼, 생성 공정 동안 이미지 및 성장물을 추적한다. 도 6A에서, 생검 또는 버려진 조직을 6웰 접시의 다중 웰에서 평판배양하고, 섬유아세포 생육을 공급하고 영상화하고 계대배양하고 동결시키는 자동화 시스템에 의해 유지시킨다. 통상적인 샘플에 대한 이미지 분석 인터페이스의 예가 도시되어 있다. 공여된 샘플마다 단일 플레이트를 사용하여 교차 오염을 최소화한다. (B) 독립적으로 생성된 표준 곡선으로부터 선형 회귀에 기초하여 포화상태 측정으로부터 세포 수를 외삽한다. (C) 본 발명 자동화 시스템에서 유지된 통상적인 생검 생육에 대한 세포 계수의 예. 환자 샘플마다 외삽된 세포 수를 각각의 웰에 독립적으로 작도하여(상부) 샘플로부터의 전체 생산량을 계산한다(바닥).

[0303] 도 7은 자동화 iPSC재프로그래밍을 나타내는 FAC 분석 및 그래프를 도시한다. 3주 기간 동안 재프로그래밍된 인간 섬유아세포에 대한 다능성 표면 마커의 발현 수준 뒤에 재프로그래밍 동역학을 관찰하고 한정된 세포 집단을 단리하기 위한 최적 시점을 결정한다. (A) 분석에 사용되는 FAC 게이팅 계획. (B) 전통적인 전분화능 표면 마커 SSEA4 및 TRA-1-60을 동시 발현하는 세포의 실질적인 부분은 재프로그래밍 인자 Oct4, Sox2, Klf4 및 c-Myc를 도입하기 위한 레트로바이러스 또는 센다이 벡터를 사용하는 재프로그래밍 동안 모든 시점에서 섬유아세포 마커 CD13을 보유한다. 131 실험으로부터의 집계된 데이터를 나타내는 박스 도면(레트로바이러스, n=66, 센다이 바이러스, n=65)이 도시되어 있다. 센다이 중재 재프로그래밍은 더 많은 SSEA4/TRA-1-60 이중 양성 세포를 생성하고, (C) 표면으로부터 CD13의 제거가 지연된다. (D) 본 발명 자동화 시스템에서 센다이/사이토툰(Cytotune) 시스템을 사용하여 재프로그래밍된 환자 세포주의 예시적인 염색 패턴. 7 및 13dpi 둘 다에서, 반초과의 SSEA4/TRA-1-60 양성 양성 세포가 CD13을 소실하였다. 추가로, 검정된 시점 둘 다에서, CD13 음성/나노그 양성 세포는 이 분획에 존재하여, 이것이 CD13에 대한 음성 선택에 의해 단리될 수 있다는 것을 제시한다.

[0304] 도 8은 iPSC의 농후화 및 클론 선택을 나타내는 자동화 시스템의 일부 및 FAC 예비 분류 분석을 도시한다. (A) 비재프로그래밍된 세포 집단이 섬유아세포 마커에 의한 음성 선택에 의해 iPSC의 배양으로부터 고갈될 수 있다. 이 전략은 iPSC를 접촉하지 않고 나뉜다. 이 예에서, 섬유아세포는 2% 확립 iPSC를 포함하는 배양으로부터 효과적으로 제어되어 TRA-1-60 양성 iPSC를 그대로 둔다. (B) 해밀턴 액체 핸들러에 통합된 밀테니 MultiMACS 시스템은 24개의 샘플을 동시에 분류할 수 있다. (C) MultiMACS 시스템에서 항섬유아세포 항체 집합 자기 비드를 사용하여 음성 선택에 의해 유래한 새로 유래한 iPSC의 예시적인 콜로니. 위상차, 사이톡(Sytox)에 의한 핵 염색, TRA-1-60에 의한 표면 마커 염색 및 핵 나노그 염색(비도시). (D) 항섬유아세포 자기 음성 선택 단계로부터의 iPS 농후화 분획을 제한 희석으로 96웰 영상화 플레이트에 평판배양한다. 전분화능 표면 마커 TRA-1-60 또는 TRA-1-81을 염색하는 살아 있는 세포를 사용하여 이 플레이트를 스크리닝한다. 단일 콜로니 확인할 수 있는 셀리고 소프트웨어를 사용하는 자동화 이미지 분석에 의해 TRA-1-60 양성 iPSC를 갖는 웰을 확인한다. 계대배양 및 증식 및 QC를 위해 표면 마커에 양성인 단일 콜로니를 포함하는 것의 기준 둘 다를 만족시키는 웰을 선택한다. (E) (비도시) - 성체 섬유아세포의 자동화 센다이 감염에 의해 제조된 콜로니.

[0305] iPSC 유도는 또한 변형 mRNA의 자동화 형질도입에 의해 입증된다. BJ 섬유아세포로부터의 iPSC 콜로니는 변형 mRNA를 포함하는 형질도입 혼합물의 자동화 전달의 10일 후 효과적으로 회수된다. 추가의 2일 배양 후, 동일한 웰을 TRA-1-60으로 염색하여 미분화 세포를 확인한다. 웰 내의 iPSC는 이것이 미분화 iPSC라는 것을 입증한다. 자동화 시스템에서 자기 비드 고갈을 이용하여 비재프로그래밍된 세포로부터 정제에 의해 단리된 iPSC 콜로니는 효과적으로 회수되었다.

[0306] 유전자 발현을 위한 고속 득점카드 검정을 생성하였다. 본 발명의 품질 관리 스크린의 제1 단계는 3개의 클론의 초기 세트를 선택하기 위해 전분화능 분화 및 전이유전자 마커를 사용한다. 도 9A는 2개의 HESC 세포주, 센다이 양성 대조군, 섬유아세포 음성 대조군 및 5회 및 10회 계대배양에서 평가된 FAC 분류에 의해 유래한 iPS 세포주에 대한 HKK 유전자 발현으로의 정규화 후 전사물 수를 나타낸다. 유사한 조건 하에 유지된 일련의 정상 HESC 및 iPS 세포주에 대해 모든 검정을 실행한다. 96웰 V-바닥 플레이트에서 시스템에서 생성된 배양체의 예시적인 이미지가 도시되어 있지 않다. 화살표는 EB를 나타낸다. 도 9C는 본 발명 품질 관리 스크린의 제2 단계를 예시하고, 이는 추가의 83개의 배양 층/계통 마커를 사용하여 배양체 검정에서 분화 능력을 모니터링한다. 단일 EB를 생성하고 풀링하여 배양체 득점카드 검정에서 배양 층 마커의 발현 분석을 위해 RNA를 생성한다. 9개의 상이한 배아 줄기 세포주로부터 수집된 EB에서의 유전자 발현의 클러스터 계통도 분석이 도시되어 있다. 정규화 후, 6개의 EB의 직접 용해로부터 생성된 데이터를 벌크 배양으로부터 제조된 EB로부터 추출되고 정제된 전체 RNA로부

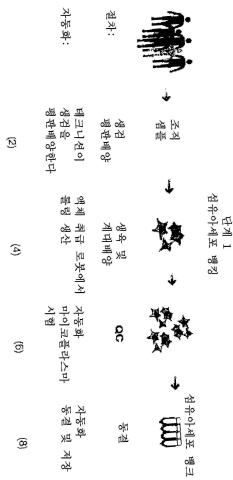
터 생성된 데이터와 양호하게 비교한다.

[0307] 도 10은 CNV를 위한 나노스트링 엔카운터 검정에 기초한 iPSC의 고속 염색체검사를 나타낸다. 도 10A는 BC1 iPSC에서 엔카운터 핵형 검정의 예이고; 도 10B는 염색체 암의 부분 획득 및 소실을 갖는 1016 섬유아세포에서 엔카운터 핵형 검정의 예이다. 아피메트릭스 SNP 6.0 칩 데이터에 대한 비교는 Chr1의 q 암의 부분에서의 카피 수 획득(상부 트랙, 1q21.2 - 1q43) 및 Chr6의 긴 암의 일부의 소실(하부 트랙, 6q16.3 - 6q26)을 나타낸다.

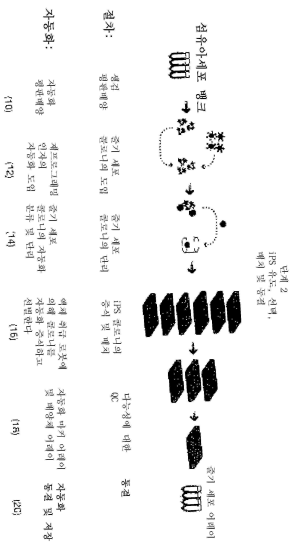
[0308] 본 발명의 바람직한 실시양태가 기재되어 있지만, 본 발명은 이 실시양태로 제한되지 않고, 본 발명의 범위는 특허청구범위에 의해 한정된다.

도면

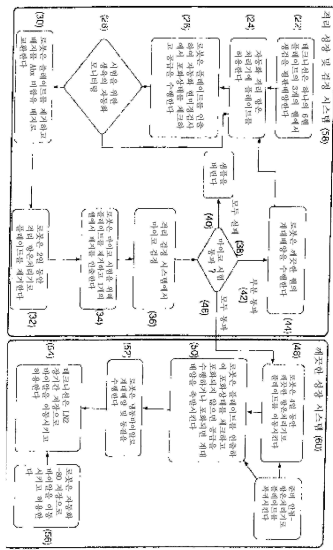
도면1



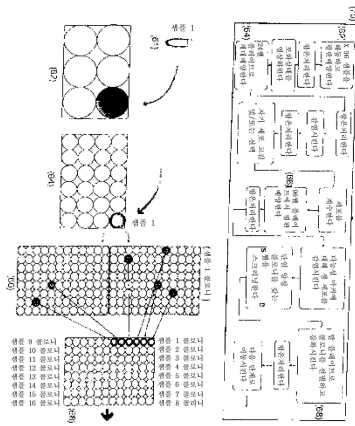
도면2



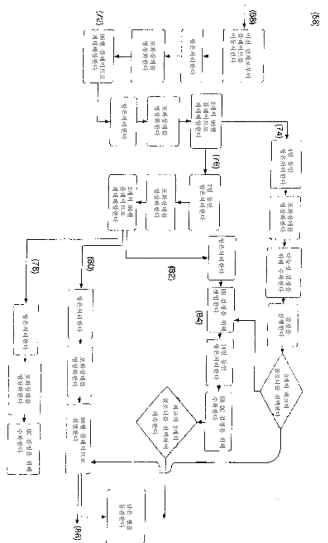
도면3



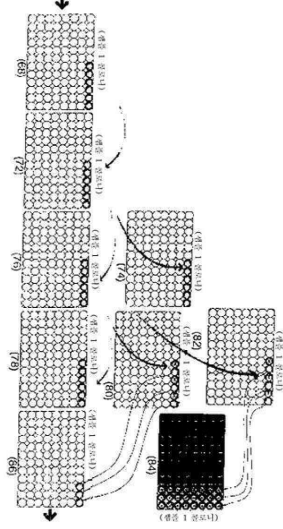
도면4a



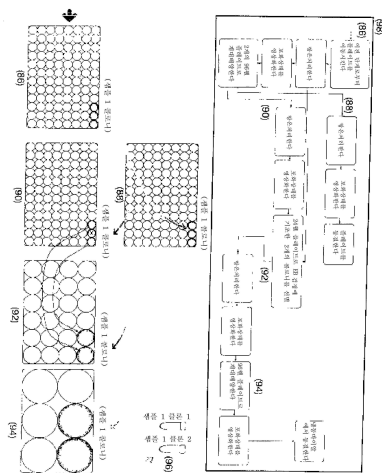
도면4ba



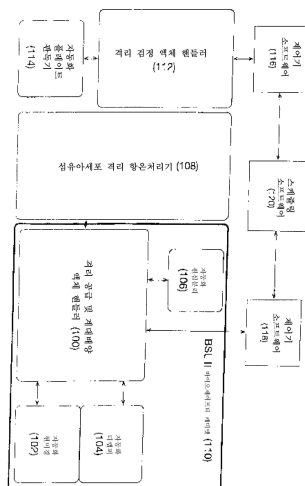
도면4bb



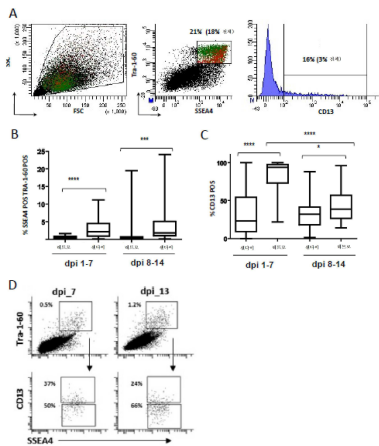
도면4c



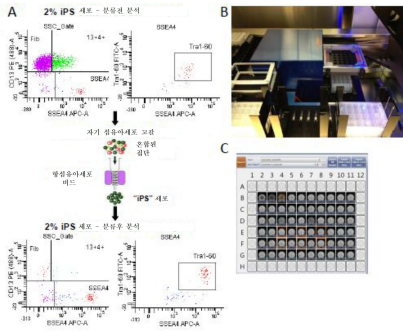
도면5a



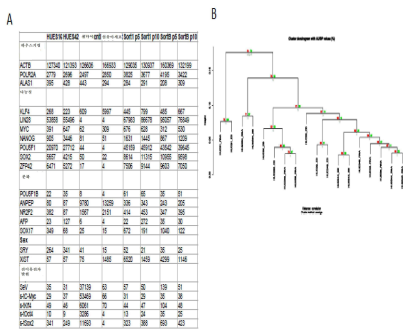
도면7



도면8



도면9



도면10

