



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0105670
(43) 공개일자 2018년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) A61K 35/545 (2014.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0696 (2013.01)
A61K 35/545 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7023128
(22) 출원일자(국제) 2017년01월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년08월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/013229
(87) 국제공개번호 WO 2017/123789
국제공개일자 2017년07월20일
(30) 우선권주장
62/277,784 2016년01월12일 미국(US)

(71) 출원인
론자 위커스빌 아이엔씨.
미합중국 21793 메릴랜드주, 위커스빌, 박스 포트
로드 8830
(72) 발명자
아브라함, 아이탄
미국, 메릴랜드 20854, 포트맥, 그린리프 애비뉴
12232
페인, 토마스
영국, 캠브리지 CB4 1DW, 스칼라 워크 57
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
황이남

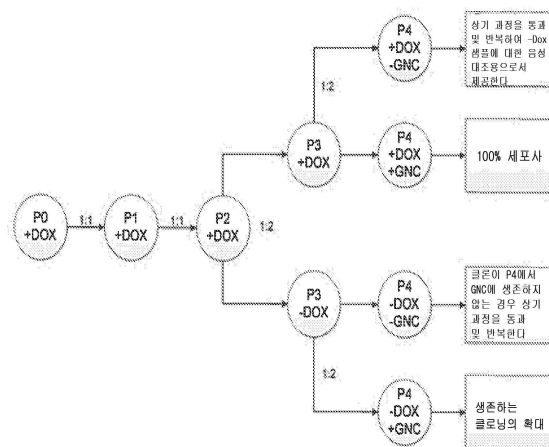
전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 벡터-프리 유도만능 줄기세포를 생성시키기 위한 방법 및 벡터

(57) 요약

본 발명은 개략적으로 재프로그래밍 벡터를 함유하지 않는 유도만능 줄기세포(iPSC)의 생성 방법에 관한 것이다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 재프로그래밍 인자 및/또는 합성적 전사 인자를 함유하는 적어도 하나의 발현 카세트 및 자살 유전자를 포함하는 에피솜 벡터(들)를 도입시킴으로써 체세포에서 만능성을 유도하는 것에 관한 것이다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 재프로그래밍 인자 및/또는 합성적 전사 인자를 함유하는 발현 카세트 및 전사에 의해 조절되는 EBNA-1 유전자를 포함하는 에피솜 벡터(들)를 도입시킴으로써 체세포에서 만능성을 유도하는 것에 관한 것이다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 재프로그래밍 인자 및/또는 합성적 전사 인자를 함유하는 발현 카세트, 및 자살 유전자 및 전사에 의해 조절되는 EBNA-1 유전자를 둘 다 포함하는 에피솜 벡터(들)를 도입시킴으로써 체세포에서 만능성을 유도하는 것에 관한 것이다.

대표도 - 도1



iPSC 콜로니 확대 및 분석 과정

(52) CPC특허분류

C12N 2501/60 (2013.01)
C12N 2501/602 (2013.01)
C12N 2501/603 (2013.01)
C12N 2501/604 (2013.01)
C12N 2501/605 (2013.01)
C12N 2501/606 (2013.01)
C12N 2501/608 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

영, 로버트, 제이.

영국, 런던 NW2 1SR, 오프 더 베일, 햄릿 스퀘어
67

프리드리히 벤 눈, 인바.

미국, 메릴랜드 20852, 록빌, 콩그레스 레인, 303

명세서

청구범위

청구항 1

재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법으로서,

(a) 재프로그래밍 벡터(들)를 인간 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 재프로그래밍 벡터(들)가 바이러스 복제 기점, 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트, 및 자살 유전자를 포함하는, 단계와;

(b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자, 상기 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키는 단계와;

(c) 상기 제2 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 iPSC를 생성시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 자살 유전자가 티미딘 키나제 및 시토신 데아미나제로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 복제 기점이 OriP인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트가 EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 체세포가 인간 말초 혈액 단핵세포, 섬유아세포, 각질세포, 조혈세포, 간엽 세포, 간세포, 위세포 및 β 세포로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, Nanog, KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 또는 Sox-2 및 Oct-4 모두 중에서 선택되는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 및 KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, (d) (c)의 세포 집단을 에피솜 재프로그래밍 벡터의 존재에 대해 선별하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, (e) 에피솜 재프로그래밍 벡터를 함유하지 않는 (d)의 선별된 세포를 배양하는 단계를 더 포함

하는 방법.

청구항 11

제9항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 선별이 qPCR 벡터 검출 분석을 포함하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b) 후에, 그러나 단계 (c) 전에, 제2 세포 집단의 세포를 계대배양하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 계대배양 후 단계 (c)가 추가의 계대배양 없이 일어나는 방법.

청구항 14

에피솜 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSC)의 생성 방법으로서,

(a) 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)가

(i) OriP 복제 기점,

(ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트,

(iii) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및

(iv) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는, 단계와;

(b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자, 상기 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키는 단계와;

(c) 상기 제2 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 에피솜 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSC를 생성시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 체세포가 인간 말초 혈액 단핵세포, 섬유아세포, 각질세포, 조혈세포, 간엽 세포, 간세포, 위 세포 및 β 세포로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, iPSC 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, Nanog, KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 또는 Sox-2 및 Oct-4 모두를 포함하는 방법.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 및 KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 19

재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법으로서,

(a) 재프로그래밍 벡터를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 재프로그래밍 벡터가

(i) 바이러스 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트, (iii) 염색체의 복제 및 상기 재프로그래밍 벡터의 분할을 조절하는 유전자, 및 (iv) 조절된 프로모터 시스템을 포함하는, 단계와;

(b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자, 상기 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 제1 세포 집단의 배양 동안 에피솜 재프로그래밍 벡터가 복제되는 단계와;

(c) 상기 제2 세포 집단을 배양하고, 상기 염색체의 복제 및 상기 재프로그래밍 벡터의 분할을 조절하는 유전자가, 상기 재프로그래밍 벡터가 세포 분열 동안 상실되어 상기 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성하도록 조절되는 단계를 포함하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 에피솜 재프로그래밍 벡터의 전사를 조절하는 유전자가 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체 활성화된 시스템을 포함하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 독시사이클린이 단계 (b)에서 배양 동안 존재하고, 독시사이클린이 단계 (c)에서는 존재하지 않는 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 독시사이클린이 단계 (b)에서 배양 동안 존재하지 않고, 독시사이클린이 단계 (c)에서는 존재하는 방법.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 복제 기점이 OriP인 방법.

청구항 24

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트가 EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 방법.

청구항 25

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 체세포가 인간 말초 혈액 단핵세포, 섬유아세포, 각질세포, 조혈 세포, 간엽 세포, 간세포, 위세포 및 β 세포로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 26

제19항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, iPS 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, Nanog, KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 27

제19항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, iPS 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 또는 Sox-2 및 Oct-4를 포함하는 방법.

청구항 28

제19항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 및 KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 29

제19항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, (d) (c)의 세포 집단을 에피솜 재프로그래밍 벡터의 존재에 대해

선별하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, (e) 에피솜 재프로그래밍 벡터를 함유하지 않는 (d)의 선별된 세포를 배양하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 선별이 qPCR 벡터 검출 분석을 포함하는 방법.

청구항 32

제19항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세포 집단을 계대배양하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 33

제19항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c)가 제1 세포 집단의 계대배양 없이 발생하는 방법.

청구항 34

에피솜 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법으로서,

(a) 에피솜 재프로그래밍 벡터를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가

(i) OriP 복제 기점,

(ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트,

(iii) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및

(iv) 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체 조절된 프로모터 시스템(TetOn 또는 TetOff)을 포함하는, 단계를 포함;

(b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 복제되는 단계와;

(c) 상기 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 복제되지 않는 단계와;

(d) 상기 제3 세포 집단으로부터 콜로니를 선택하여 제4 세포 집단을 생성시키는 단계와;

(e) 상기 제4 세포 집단을 배양하여, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 체세포가 섬유아세포, 각질세포, 조혈세포, 간엽 세포, 간세포, 위세포 및 β 세포로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, iPS 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, Nanog, KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, iPS 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 또는 Sox-2 및 Oct-4를 포함하는 방법.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 및 KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 39

재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSC)의 생성 방법으로서,

(a) 재프로그래밍 벡터를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는단계로, 상기 재프로그래밍 벡터가 (i) 바이러스 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트, (iii) 염색체의 복제 및 상기 재프로그래밍 벡터의 분할을 조절하는 유전자, (iv) 조절된 프로모터 시스템 및 (v) 자살 유전자를 포함하는, 단계와;

(b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자, 상기 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 복제되는 단계와;

(c) 상기 제2 세포 집단을 배양하고, 상기 염색체의 복제 및 분할을 조절하는 유전자가, 상기 재프로그래밍 벡터가 세포 분열 동안 상실되어 상기 재프로그래밍 벡터가 실질적으로 없는 iPSCs를 포함하는 제3 세포 집단을 생성하도록 조절되는 단계와;

(d) 상기 제3 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 상기 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 자살 유전자가 티미딘 키나제 및 시토신 데아미나제로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 복제 기점이 OriP인 방법.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트가 EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 방법.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 체세포가 섬유아세포, 각질세포, 조혈세포, 간엽 세포, 간세포, 위세포 및 β 세포로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 44

제39항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, Nanog, KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 45

제39항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 또는 Sox-2 및 Oct-4를 포함하는 방법.

청구항 46

제39항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 및 KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 47

제39항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC 재프로그래밍 인자를 암호화하는 발현 카세트의 전사를 조절하는 유전자가 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체 활성화된 시스템을 포함하는 방법.

청구항 48

제39항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 독시사이클린이 단계 (b)에서 배양 동안 존재하고, 독시사이클린이 단계 (c)에서는 존재하지 않는 방법.

청구항 49

제39항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 독시사이클린이 단계 (b)에서 배양 동안 존재하지 않고, 독시사이클린이 단계 (c)에서는 존재하는 방법.

청구항 50

제39항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, (e) (d)의 제3 세포 집단을 에피솜 재프로그래밍 벡터의 존재에 대해 선별하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 51

제39항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 에피솜 재프로그래밍 벡터를 포함하는 (d)의 제3 세포 집단 중의 세포는 배양되지 않는 방법.

청구항 52

제9항 또는 제10항에 있어서, 선별이 qPCR 벡터 검출 분석을 포함하는 방법.

청구항 53

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세포 집단을 계대배양하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 54

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c)가 제1 세포 집단의 계대배양 없이 발생하는 방법.

청구항 55

에피솜 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSC)의 생성 방법으로서,

(a) 에피솜 재프로그래밍 벡터를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가

(i) OriP 복제 기점,

(ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트,

(iii) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드,

(iv) 테트라사이클린 또는 유도체 조절된 프로모터 시스템(TetOn 또는 TetOff), 및

(v) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는, 단계와;

(b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 복제되는 단계와;

(c) 상기 제2 세포 집단을 배양하여, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 실질적으로 없는 iPSCs를 포함하는 제3 세포 집단을 생성시키고, 상기 제2 세포 집단의 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 복제되지 않는 단

계와;

(d) 상기 제3 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 56

제52항에 있어서, iPS 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, Nanog, KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 57

제52항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, iPS 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 또는 Sox-2 및 Oct-4를 포함하는 방법.

청구항 58

제52항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 및 KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 59

(a) OriP 복제 기점;

(b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트;

(c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및

(d) 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터.

청구항 60

(a) OriP 복제 기점;

(b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트;

(c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및

(d) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터.

청구항 61

(a) OriP 복제 기점;

(b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트;

(c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및

(d) 조절된 프로모터 시스템을 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터.

청구항 62

(a) OriP 복제 기점;

- (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트;
- (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및
- (d) TetOn 또는 TetOff 시스템을 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터.

청구항 63

- (a) OriP 복제 기점;
- (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트;
- (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자;
- (d) TetOn 또는 TetOff 시스템; 및
- (e) 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터.

청구항 64

- (a) OriP 복제 기점,
- (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 합성적 전사 인자 또는 이 둘 모두를 암호화하는 발현 카세트;
- (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드;
- (d) TetOn 또는 TetOff 시스템, 및
- (e) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터.

청구항 65

제56항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, Nanog, KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 벡터.

청구항 66

제56항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 또는 Sox-2 및 Oct-4를 포함하는 벡터.

청구항 67

제56항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 재프로그래밍 인자가 Sox-2, Oct-4, 및 KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상을 포함하는 벡터.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 개략적으로 재프로그래밍 벡터를 함유하지 않는 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs)의 생성 방법에 관한 것이다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 재프로그래밍 인자 및/또는 합성적 전사 인자를 함유하는 적어도 하나의 발현 카세트 및 자살 유전자를 포함하는 에피솜 벡터(들)를 도입시킴으로써, 체세포에서 만능성을 유도하는 것에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 유도만능 줄기세포(iPSCs)를 생성시키는 현재의 세포성 재프로그래밍 방법은 재프로그래밍 인자를 전달하는데 종종 레트로바이러스를 사용한다(문헌 [Schlaeger et al., "A comparison of non-integrating reprogramming methods," *Nat Biotechnol* 33(1): 58-63 (2015) ("슐래거(Schlaeger)"])). 상기 바이러스로부터의 RNA는 DNA로 역전사되며, 숙주 세포의 게놈내로 통합된다. 그러나, 이러한 세포는 치료학적 용도를 위한 규제 지침하에서 허용될 수 없다. 결과적으로 iPSCs에 임의의 외인성 DNA 서열이 확실히 없게 하는 다른 재프로그래밍 방법이 필요하다.
- [0003] 슐래거에 의해 요약된 바와 같이, 주요 접근법들은 미세-RNA의 존재 및 부재하의 메신저 RNA 형질감염, 및 에피솜, EBNA-1 기반 발현 벡터의 사용을 포함한다. 전자인, RNA-기반 방법은 iPSC를 효율적으로 생성시킬 수 있지만, 노동의 요구조건 및 성공률(방법 견고성)뿐만 아니라 세포 유형 및 공여자 특이성과 관련된 상당한 문제들이 존재한다.
- [0004] 에피솜 벡터 재프로그래밍은 상기 방법의 모든 필요한 특징들을 고려한, 재프로그래밍에 매력적인 '만능' 시스템을 나타낸다. 그러나 무-외인성 DNA 계통을 확립시키기 전에, 연장된 벡터 유지 또는 숙주 세포 게놈내로의 통합으로 인해, 광범위한 계대배양을 필요로 하는 주요 문제가 여전히 남는다.
- [0005] 에피솜 벡터를 사용하는 현재의 세포성 재프로그래밍 프로토콜들은 생성되는 iPSC 계통이 벡터-프리이도록 하는 정량적인 수단을 고려할 필요가 있다. 최근에 생성된 iPSC는 전형적으로 형질감염후 20 내지 30일째에 P0 플레이트로부터 채집된다. 상기 콜로니의 대부분은 채집시 벡터를 유지하며, 벡터-상실 동역학은 상이한 iPSC 클론들에서 다양하다. 이때 일부 클론은 낮은 계대수(5 내지 10회)에서 무-벡터로서 확인되며, 다른 것들은 높은 계대수(15 내지 30회)에서 확인된다. 이는 다수의 iPSC 콜로니를 P0 플레이트로부터 채집하고 벡터 제거가 달성될 때까지 연장된 기간 동안 상기를 계속 배양하는 것을 필요로 하게 한다. 이러한 실행은 시간과 비용이 중요한 인자인 세포요법 용도에 장애가 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0006] 일부 실시태양에서, 본 발명은 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법을 제공하며, 이 방법은 (a) 재프로그래밍 벡터(들)를 인간 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 재프로그래밍 벡터(들)가 바이러스 복제 기점, 적어도 하나의 iPSC 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트, 및 자살 유전자를 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자(들), 및/또는 상기 합성적 전사 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 세포 집단을 생성시키는 단계를 포함한다.
- [0007] 일부 실시태양에서, 본 발명은 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법에 관한 것이며, 이 방법은 (a) 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)가 (i) OriP 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트, (iii) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 잔기 EBNA-1의 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 (iv) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자, 및/또는 상기 합성적 전사 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 에피솜 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성하도록 조절되는 단계를 포함한다.
- [0008] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법을 제공하며, 이 방법은 (a) 재프로그래밍 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 재프로그래밍 벡터가 (i) 바이러스 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍

화 인자(들), 및/또는 합성적 전사 인자(들)를 암호화하는 발현 카세트, (iii) 염색체의 복제 및 상기 재프로그래밍화 벡터의 분할을 조절하는 유전자, 및 (iv) 조절된 프로모터 시스템을 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍화 인자, 및/또는 상기 합성적 전사 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 제1 세포 집단의 배양 동안 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 복제되는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 배양하고, 상기 염색체의 복제 및 상기 재프로그래밍화 벡터의 분할을 조절하는 유전자가, 상기 재프로그래밍화 벡터가 세포 분열 동안 상실되어 상기 재프로그래밍화 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성하도록 조절되는 단계를 포함한다.

[0009] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 에피솜 재프로그래밍화 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법을 제공하며, 이 방법은 (a) 에피솜 재프로그래밍화 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 (i) OriP 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍화 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트, (iii) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 (iv) 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체 조절된 프로모터 시스템(TetOn 또는 TetOff)을 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 복제되는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 복제되지 않는 단계와; (d) 상기 제3 세포 집단으로부터 콜로니를 선택하여 제4 세포 집단을 생성시키는 단계와; (e) 상기 제4 세포 집단을 배양하여, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성시키는 단계를 포함한다.

[0010] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 재프로그래밍화 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법을 제공하며, 이 방법은 (a) 재프로그래밍화 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 재프로그래밍화 벡터가 (i) 바이러스 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍화 인자(들), 및/또는 합성적 전사 인자(들)를 암호화하는 발현 카세트, (iii) 염색체의 복제 및 상기 재프로그래밍화 벡터의 분할을 조절하는 유전자, (iv) 조절된 프로모터 시스템 및 (v) 자살 유전자를 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍화 인자, 및/또는 상기 합성적 전사 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 재프로그래밍화 벡터가 복제되는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 배양하고, 상기 염색체의 복제 및 분할을 조절하는 유전자가, 상기 재프로그래밍화 벡터가 세포 분열 동안 상실되어 상기 재프로그래밍화 벡터가 실질적으로 없는 iPSCs를 포함하는 제3 세포 집단을 생성하도록 조절되는 단계와; (d) 상기 제3 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 상기 재프로그래밍화 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성시키는 단계를 포함한다.

[0011] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 에피솜 재프로그래밍화 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법을 제공하며, 이 방법은 (a) 에피솜 재프로그래밍화 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 (i) OriP 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍화 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트, (iii) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, (iv) 테트라사이클린 또는 유도체 조절된 프로모터 시스템(TetOn 또는 TetOff), 및 (v) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍화 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 복제되는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 배양하여, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 실질적으로 없는 iPSCs를 포함하는 제3 세포 집단을 생성시키고, 상기 제2 세포 집단의 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 복제되지 않는 단계와; (d) 상기 제3 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성시키는 단계를 포함한다.

[0012] 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점; (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍화 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 (c) 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍화 벡터를 제공한다.

[0013] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점; (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍화 인자,

및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 (d) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 제공한다.

[0014] 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점; (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 (d) 조절된 프로모터 시스템을 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 추가로 제공한다.

[0015] 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점; (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 (d) TetOn 또는 TetOff 시스템을 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 추가적으로 제공한다.

[0016] 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점; (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; (d) TetOn 또는 TetOff 시스템; 및 (e) 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 추가적으로 제공한다.

[0017] 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점, (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; (d) TetOn 또는 TetOff 시스템, 및 (e) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 추가적으로 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 본 발명을 예시하기 위해서, 도면에 본 발명의 몇몇 실시태양들을 묘사한다. 그러나, 본 발명은 이들 도면에 묘사된 실시태양들의 정확한 배열 및 수단으로 제한되지 않는다.

도 1은 iPSC 콜로니 확대 및 분석 절차를 묘사한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] · 정의

[0020] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술과학 용어들은 본 발명과 관련된 분야의 통상적인 숙련가에 의해 이해되는 바와 공통의 의미를 갖는다.

[0021] 본 발명을 상세히 기재하기 전에, 본 발명은 다양할 수 있는 바와 같이, 특정한 조성물 또는 공정 단계들로 제한되지 않는 것으로 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부한 특허청구범위에 사용되는 바와 같이, 단수형 "하나의" 및 "상기"는 문맥상 달리 명백히 지시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. "하나의" 뿐만 아니라 "하나 이상" 및 "적어도 하나"란 용어들은 본 명세서에서 호환적으로 사용될 수 있다.

[0022] 더욱 또한, "및/또는"은 본 명세서에 사용되는 경우 2개의 명시된 각각의 특징 또는 성분이 다른 하나와 함께 있거나 또는 함께 없음을 구체적으로 개시하는 것으로서 간주되어야 한다. 따라서, 본 명세서에서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에 사용되는 바와 같은 "및/또는"이란 용어는 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독) 및 "B"(단독)을 포함하고자 한다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 어구에 사용되는 바와 같은 "및/또는"이란 용어는 하기 각각의 실시태양들을 포함하고자 한다: A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

[0023] 본 명세 전체를 통해, 백분율, 비 등의 표현은 모두 달리 지시되지 않는 한 "중량 기준"이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "중량 기준"은 "질량 기준"이란 용어와 동의어이며, 본 명세서에 정의된 비 또는 백분율이

부피, 두께 또는 일부 다른 도량형보다는 중량에 따라 정의됨을 가리킨다.

- [0024] "약"이란 용어는 본 명세서에서 대략적으로, 정도, 대충 또는 대략을 의미하는데 사용된다. "약"이란 용어가 숫자 범위와 함께 사용되는 경우, 상기는 경계를 제시된 상기 수치의 초과 및 미만으로 연장함으로써 그 범위를 변형시킨다. 일반적으로, "약"이란 용어는 본 명세서에서 진술된 값의 10% 변량 초과 및 미만으로 수치를 변형 시키는데 사용된다.
- [0025] 단위, 접두사 및 기호들을 그들의 국제 단위계(SI) 승인된 형태로 나타낸다. 숫자 범위는 상기 범위를 한정하는 숫자들을 포함한다. 달리 지시되지 않는 한, 아미노산 서열은 아미노에서 카복시 배향으로 좌에서 우로 기입된다. 본 명세서에 제공된 제목들은 본 발명의 다양한 태양 또는 실시태양의 한계가 아니며, 이들은 본 명세서 전체에 참고로 제공될 수 있다. 따라서, 바로 아래에 정의된 용어들은 본 명세서 전체를 참조하여 보다 충분히 한정된다.
- [0026] 본 명세서에서 "포함하는"이란 용어와 함께 기재되는 실시태양들은 어디에서나, "로 이루어지는" 및/또는 "로 근본적으로 이루어지는"에 의해 기재되는 달리 유사한 실시태양들도 또한 제공되는 것으로 이해된다.
- [0027] 아미노산은 본 명세서에서 그의 통상적으로 공지된 3문자 기호에 의해 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회에 의해 권장되는 1-문자 기호에 의해 지칭된다. 뉴클레오티드도 마찬가지로 그의 통상적으로 인정되는 단일-문자 암호에 의해 지칭된다.
- [0028] "재프로그래밍"은 하나의 특정한 세포 유형의 또 다른 것으로의 전환이다. 예를 들어, 재프로그래밍화는 체세포 유형, 예를 들어 섬유아세포의 만능성 세포 유형으로의 전환이다. 세포는 충분한 증식 후, 재프로그래밍화가 가해진 측정 가능한 비율의 세포(자손)가 재프로그래밍화 전보다는 새로운 세포 유형의 표현형 특징을 갖는 경우 재프로그래밍화된다. 몇몇 조건하에서, 상기 새로운 세포 유형의 특징을 갖는 자손의 비율은 적어도 약 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 5%, 25% 또는 그 이상일 수 있다.
- [0029] "벡터" 또는 "구조물"(때때로 유전자 전달 또는 유전자 이동 "비히클"로서 지칭된다)은 시험관내 또는 생체내에서 숙주 세포로 전달되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 거대분자 또는 분자들의 복합체를 지칭한다. 벡터는 선형 또는 환상 분자일 수 있다.
- [0030] "에피솜 벡터"는 상기 벡터가 존재하는 세포 중의 염색체 DNA와 독립적으로 복제하는 벡터(상기 정의된)를 지칭한다.
- [0031] 벡터의 통상적인 유형인 "플라스미드"는 양립성 세포 중의 염색체 DNA와 독립적으로 복제할 수 있는, 염색체 DNA로부터 분리된 염색체-외 DNA 분자이다. 예를 들어, 몇몇 플라스미드, 예를 들어 pUC는 세균에서 독립적으로 복제하나, 포유동물 세포에서는 그렇게 하지 못한다. 몇몇 경우에, 상기는 환상 및 이중-가닥이다.
- [0032] "복제의 기점"("ori") 또는 "복제 기점"은 DNA 복제와 관련된 DNA 서열이다. 통상적으로 상기는 세균 또는 바이러스로부터 유래되며, 각각 별도의 특징들을 갖는다. 세균 'ori'는 세균 세포에서 DNA 복제에 필요하다. 모든 통상적인 플라스미드/벡터는 효율적인 번식을 허용하기 위해 이러한 영역(종종 pUC 벡터로부터 유래된)을 함유하게 된다. 예를 들어, 림프친화성 헤르페스 바이러스로부터의 바이러스 'ori'는 포유동물 세포에서 복제를 허용하는 기능을 한다. 존재하는 경우, 및 적합한 테더링 단백질(예를 들어, EBNA-1)의 존재와 함께, 세포는 DNA 합성이 개시되는 부위 또는 그 부근에서 상기 벡터를 유지하여, 세포 분열 동안 DNA 복제 및 분할을 생성시킬 수 있다. EBV의 ori는 FR 서열(30 bp 반복부의 20개 불완전 사본), 및 바람직하게는 DS 서열을 포함한다. 그러나, EBV 중의 다른 부위들은 EBNA-1에 결합하며, 예를 들어 Rep^{*} 서열은 복제의 기점으로서 DS를 대체할 수 있다. 따라서, EBV의 복제 기점은 FR, DS 또는 Rep^{*} 서열 또는 핵산 변형 또는 상기로부터 유래된 합성적 조합을 통한 임의의 기능상 균등한 서열들을 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 또한 예를 들어 개별 요소의 삽입 또는 돌연변이에 의해서, EBV의 유전자 조작된 복제 기점을 사용할 수 있다.
- [0033] "OriP"란 용어는 인간 세포에서 플라스미드의 복제 및 안정한 유지를 지지하는 엡스타인-바 바이러스 염색체의 영역을 지칭한다.
- [0034] "림프친화성" 헤르페스 바이러스는 림프아세포(예를 들어, 인간 B 림프아세포) 또는 다른 세포 유형에서 복제하고 그의 자연 생활사의 적어도 일부 동안 염색체-외에서 복제하는 헤르페스 바이러스이다. 숙주 감염 후, 이들 바이러스는 상기 바이러스 게놈을 플라스미드로서 유지시킴으로써 상기 숙주를 잠복 감염시킨다. 예시적인 림프친화성 헤르페스 바이러스는 비제한적으로 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus, EBV), 카포시 육종 헤

르페스 바이러스(Kaposi's sarcoma herpes virus, KSHV), 헤르페스 바이러스 다람쥐원숭이(Herpes virus saimiri, HS) 및 마렉병 바이러스(Marek's disease virus, MDV)를 포함한다.

[0035] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "주형"은, 야생형 단백질에 의해 상기 야생형 단백질에 의한 EBV의 OriP에 상응하는 DNA 서열의 결합의 친화성의 적어도 10%인 친화성으로 결합되는 DNA 서열의 주형 중 존재의 결과로서 림프친화성 헤르페스 바이러스의 야생형 단백질(상기 야생형 단백질은 EBNA-1에 상응한다)에 의해 특이적으로 결합되는 DNA 분자이며, 상기로부터 주형 전사가 상기 단백질이 결합된 후 임의로 개시되고/되거나 세포 중 상기 주형의 유지가 증대된다. "통합된 주형"은 세포의 계능 중에서 안정하게 유지되는, 예를 들어 상기 세포의 염색체내에 통합된 것이다. "염색체-외 주형"은 세포에서 안정하게 유지되지만 염색체내로 통합되지는 않는 것이다.

[0036] "조절 요소"란 용어는 집합적으로 프로모터 영역, 폴리아데닐화 신호, 전사 종결 서열, 상류 조절 도메인, 복제 기점, 내부 리보솜 진입 부위("internal ribosome entry site, IRES"), 인헨서, 이어맞춤 접합 등을 지칭하며, 이들은 집합적으로 수용 세포에서 암호화 서열의 복제, 전사, 번역-후 가공 및 번역을 제공한다. 이들 조절 요소는 선택된 암호화 서열이 적합한 숙주 세포에서 복제, 전사 및 번역될 수 있는 한, 모두가 항상 존재할 필요가 있는 것은 아니다.

[0037] "프로모터"란 용어는 본 명세서에서 DNA 조절 서열을 포함하는 뉴클레오티드 영역을 지칭하는 그의 통상적인 의미로 사용되며, 여기에서 상기 조절 서열은 RNA 폴리머라제와 결합할 수 있고 하류(3' 방향) 암호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 유전자로부터 유래된다.

[0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "체세포"란 용어는 난, 정자 등과 같은 생식세포 이외의 임의의 세포를 지칭하며, 그의 DNA를 다음 세대로 직접 전달하지 못한다. 전형적으로, 체세포는 만능성이 없거나 제한된 만능성을 갖는다. 본 명세서에 사용되는 체세포는 천연 발생되거나 또는 유전자 변형될 수 있다. 체세포의 예는 단핵세포, 예를 들어 말초 혈액 단핵세포, 섬유아세포, 각질세포, 조혈세포, 간엽세포, 간세포, 위세포 및 β 세포를 포함한다.

[0039] 세포는 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 에피솜 재프로그래밍 벡터 및 외인성 유전 요소의 10% 미만을 갖는 경우, 상기 요소(들)가 "실질적으로 없으며"(예를 들어, 재프로그래밍 벡터 유전 요소가 실질적으로 없으며), 에피솜 재프로그래밍 벡터 및 외인성 유전 요소의 1% 미만을 갖는 경우, 상기 세포는 상기 요소(들)가 "근본적으로 없다"(예를 들어, 재프로그래밍 벡터 유전 요소가 근본적으로 없다). 그러나, 전체 세포 집단의 0.5% 미만 또는 0.1% 미만이 외인성 유전 요소를 포함하는 세포 집단이 훨씬 더 바람직하다. 따라서, iPS 세포 집단의 경우, 상기 집단의 세포의 0.1% 미만 내지 10%(모든 중간 백분율 포함)가 바람직하지 않은 외인성 유전 요소를 포함한다.

[0040] "인헨서"는 프로모터에 근접하게 위치할 때 상기 인헨서 도메인 부재하의 프로모터로부터 생성되는 전사 활성화에 비해 증가된 전사 활성을 부여하는 핵산 서열을 의미한다.

[0041] "발현 구조물" 또는 "발현 카세트"는 전사를 지시할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 발현 구조물은 적어도, 프로모터 또는 프로모터와 기능상 균등한 구조물을 포함한다. 추가적인 요소, 예를 들어 인헨서 및/또는 전사 종결 신호를 더 포함할 수도 있다.

[0042] "외인성"이란 용어는 세포 또는 유기체 중의 단백질, 유전자, 핵산 또는 폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용될 때, 인공적인 또는 자연적인 수단에 의해 상기 세포 또는 유기체내로 도입된 단백질, 유전자, 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 세포와의 관계에서, "외인성"이란 용어는 단리되고 후속으로 다른 세포 또는 유기체내에 인공적인 또는 자연적인 수단에 의해 도입된 세포를 지칭한다. 외인성 핵산은 상이한 유기체 또는 세포로부터 유래하거나, 또는 상기 유기체 또는 세포내에서 자연적으로 발생하는 핵산의 하나 이상의 추가적인 사본일 수 있다. 외인성 세포는 상이한 유기체로부터 유래하거나, 또는 동일한 유기체로부터 유래할 수 있다. 비제한적인 예로서, 외인성 핵산은 자연 세포의 경우와 상이한 염색체 위치 중에 있거나, 또는 달리, 자연에서 발견되는 경우와 상이한 핵산 서열이 측면에 인접해 있다.

[0043] "계대배양"이란 용어는 선행 배양물로부터의 세포 중 일부 또는 전부를 신선한 생육 배지가 있는 새로운 기질, 예를 들어 새로운 용기로 이동시킴으로써 상기 세포를 계대배양하는 과정을 지칭한다.

[0044] "자살 유전자"란 용어는 무독성 화합물을 독성 형태로 전환시키는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드이다. 자살 유전자의 예는 헤르페스 단순 바이러스 티미딘 키나제/강시클로비어 시스템, 시토신 데아미나제/5-FU 시스템, 및 카복실 에스테라제/이리노테칸 시스템을 포함한다. 종종 자살 유전자는 구성적으로 발현되며, 따라

서 적합한 기질이 제공될 때 세포 독성이 생성된다. 상기 "자살 유전자 기질"은 상기 자살 유전자를 독성 형태로 전환시키는 무독성 화합물이다.

[0045] "에 상응하는"란 용어는 폴리뉴클레오타이드 서열이 참조 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부 또는 전부와 상동성이거나(즉, 동일하지만, 엄격하게는 진화론적으로 관련되지 않은), 또는 폴리펩티드 서열이 참조 폴리펩티드 서열과 일치하는 것을 의미한다. "에 상보성인"이란 용어는 본 명세서에서 상보성 서열이 참조 폴리뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부와 상동성을 의미하는데 사용된다. 예시를 위해서, 뉴클레오타이드 서열 "TATAC"는 참조 서열 "TATAC"에 상응하며, 참조 서열 "GTATA"에 상보성이다.

[0046] 특정 단백질을 "암호화하는" "유전자", "폴리뉴클레오타이드", "암호화 영역", "서열", "분절", "단편" 또는 "트랜스유전자"는 적합한 조절 서열의 조절하에 놓일 때, 시험관내 또는 생체내에서 유전자 산물, 예를 들어 폴리펩티드로 전사되고 임의로 또한 번역되는 핵산 분자이다. 상기 암호화 영역은 cDNA, 게놈 DNA 또는 RNA 형태로 존재할 수 있다. DNA 형태로 존재하는 경우, 상기 핵산 분자는 단일 가닥(즉, 센스 가닥) 또는 이중-가닥일 수 있다. 암호화 영역의 경계는 5'(아미노) 말단의 개시 코돈 및 3'(카복시) 말단의 번역 정지 코돈에 의해 결정된다. 유전자는 비제한적으로 원핵생물 또는 진핵생물 mRNA로부터의 cDNA, 원핵생물 또는 진핵생물 DNA로부터의 게놈 DNA 서열, 및 합성 DNA 서열을 포함할 수 있다. 전사 종결 서열은 대개 상기 유전자 서열에 대해 3'에 위치하게 된다.

[0047] "세포"란 용어는 본 명세서에서 그의 가장 광범위한 당해 분야의 의미로 사용되며, 다세포 유기체의 조직의 구조 단위이고 상기를 외부와 단리시키는 막 구조물에 의해 둘러싸이며, 자기 복제 능력을 갖고, 유전 정보 및 상기를 발현시키기 위한 기전을 갖는 생체를 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 세포는 천연 발생 세포 또는 인공적으로 변형된 세포(예를 들어, 융합 세포, 유전자 변형된 세포 등)일 수 있다.

[0048] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "세포 집단"이란 용어는 클론 세포의 그룹을 포함한다.

[0049] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "줄기세포"란 용어는 자기 복제할 수 있고 만능성인 세포를 지칭한다. 전형적으로, 줄기세포는 손상된 조직을 재생시킬 수 있다. 본 명세서에서 줄기세포는 비제한적으로 배아줄기(embryonic stem, ES) 세포 또는 조직 줄기세포(또한 조직-특이성 줄기세포, 또는 체세포 줄기세포라고도 칭한다)일 수 있다. 상술한 능력을 가질 수 있는 임의의 인공적으로 생성된 세포(예를 들어, 본 명세서에 사용된 바와 같은 융합 세포, 재프로그래밍된 세포 등)가 줄기세포일 수 있다.

[0050] "배아줄기(ES) 세포"는 초기 배아로부터 유래된 만능 줄기세포이다. ES 세포는 1981년에 최초로 확립되었으며, 이는 1989년 이래로 녹아웃 마우스의 생성에 또한 적용되어 왔다. 1998년에, 인간 ES 세포가 확립되었으며, 이는 현재 재생의학에서 이용가능하게 되었다.

[0051] ES 세포와 달리, 조직 줄기세포는 제한된 분화 잠재성을 갖는다. 조직 줄기세포는 조직 중 특정한 위치에 존재하며, 미분화된 세포내 구조를 갖는다. 따라서, 조직 줄기세포의 만능성은 전형적으로 낮다. 조직 줄기세포는 보다 높은 핵/세포질 비를 가지며 세포내 세포소기관을 거의 갖지 않는다. 대부분의 조직 줄기세포는 낮은 만능성, 긴 세포주기, 및 개인의 생명을 넘어서는 증식 능력을 갖는다. 조직 줄기세포는 상기 세포가 유래되는 부위를 기준으로 범주들, 예를 들어 피부계, 소화계, 골수계, 신경계 등으로 분리된다. 피부계에서의 조직 줄기세포는 상피 줄기세포, 모낭 줄기세포 등을 포함한다. 소화계에서의 조직 줄기세포는 체장(공통) 줄기세포, 간 줄기세포 등을 포함한다. 골수계에서의 조직 줄기세포는 조혈 줄기세포, 간엽 줄기세포 등을 포함한다. 신경계에서의 조직 줄기세포는 신경 줄기세포, 망막 줄기세포 등을 포함한다.

[0052] "유도만능 줄기세포"(통상적으로 iPS 세포 또는 iPSCs라 약기한다)는 배아 줄기세포의 한정적인 성질을 유지하기 위해 유전자 및 인자를 발현시킴으로써 배아 줄기세포-유사 상태로 인공적으로 유전학적으로 재프로그래밍된 세포이다. iPSCs는 재프로그래밍 인자라 칭하는 몇몇 인자의 도입에 의해, 비-만능성 세포, 전형적으로 성체 체세포, 또는 말단 분화된 세포, 예를 들어 섬유아세포, 조혈세포, 근세포, 뉴런, 상피세포 등으로부터 유래된다. 합성적 전사 인자는 체세포에 도입되어 상기 세포를 배아 줄기세포-유사 상태로 재프로그래밍할 수 있는 비-천연 발생 재프로그래밍 인자이다.

[0053] "만능성"은 3개의 배엽, 즉 내배엽(내부 위 내벽, 위장관, 폐), 중배엽(근육, 뼈, 혈액, 비뇨생식기), 또는 외배엽(상피 조직 및 신경계) 중 어느 하나로부터 유래된 세포로 분화되는 세포의 능력을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 "만능 줄기세포"는 상기 3개의 배엽 중 어느 하나로부터 유래된 세포로 분화될 수 있는 세포를 지칭한다.

[0054] 핵산 분자와 관련하여 "작동적으로 연결된"은 2개 이상의 핵산 분자(예를 들어, 전사되는 핵산 분자, 프로모터

및 인헨서 요소)가 상기 핵산 분자의 전사를 허용하도록 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 펩티드 및/또는 폴리펩티드 분자와 관련하여 "작동적으로 연결된"은 2개 이상의 펩티드 및/또는 폴리펩티드 분자가 용합물의 각각의 펩티드 및/또는 폴리펩티드 성분의 적어도 하나의 성질을 갖는 단일 폴리펩티드 쇄, 즉 용합 폴리펩티드를 생성시키도록 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 상기 용합 폴리펩티드는 특히 키메릭이며, 다시 말해 이중 분자로 구성된다.

[0055] "상동성"은 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 2개의 폴리펩티드 간의 일치성 퍼센트를 지칭한다. 하나의 서열과 또 다른 서열 간의 상동성은 당해 분야에 공지된 기법에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 서열 정보를 정렬시키고 쉽게 입수할 수 있는 컴퓨터 프로그램을 사용함으로써, 2개의 폴리펩티드 분자 간의 서열 정보의 직접적인 비교에 의해 상동성을 측정할 수 있다. 대안적으로, 상동 영역들 간에 안정한 듀플렉스를 형성하는 조건하에서 폴리뉴클레오티드의 하이브리드화에 이어서, 단일 가닥-특이성 뉴클레아제(들)에 의한 절단, 및 상기 절단된 단편들의 크기 측정에 의해 상동성을 측정할 수 있다. 2개의 DNA, 또는 2개의 폴리펩티드, 서열은 각각 뉴클레오티드 또는 아미노산의 적어도 약 80%, 특히 적어도 약 90%, 및 가장 특히 적어도 약 95%가 상기 방법을 사용하여 측정시, 상기 분자들의 한정된 길이에 걸쳐 합치될 때, 서로에 대해 "실질적으로 상동성"이다.

[0056] · 개요

[0057] 비-통합성 에피솜 벡터에 의한 세포 재프로그래밍의 과정에서, 전형적으로 상기 iPSC 계통이 벡터-프리이도록 하기 위해서 정량적인 수단이 필요하였다. 벡터-프리 iPSCs를 생성시키는 현행 방법은 DNA-매개된 재프로그래밍화를 사용하는 것을 포함하며, P0 플레이트로부터 다수의 iPSC 콜로니를 채집하고, 이들을 정량적인 벡터 검출을 적용하기에 충분한 세포가 존재하는 점까지 확대시킨 다음, 상기 벡터가 제거될 때까지 추가로 배양하는 것을 수반한다. 벡터-프리 콜로니를 3 계대에서 잠재적으로 확인할 수 있었지만, 상기 iPSC 클론의 대부분은 10 계대 이상에서 상기 벡터를 유지한다. 이러한 긴 시간 동안의 배양은 산업적인 공정의 부분으로서 수행될 때 노동 요구, 타임라인 및 비용에 심각한 영향을 준다. 실시태양에서, 본 발명은 보다 신속한 벡터 제거를 촉진하는 2개의 상이한 접근법을 제공한다: i) 재프로그래밍화-후 벡터 유지의 일시적인 조절, 및 ii) 벡터-프리 콜로니의 생육을 선택하기 위한 재프로그래밍화 벡터(들)에 대한 자살 유전자의 통합.

[0058] 실시태양에서, 본 발명은 상기 재프로그래밍화 인자 및/또는 합성적 전사 인자를 전달하는데 사용되는 에피솜 벡터를 포함한 벡터들을 (1) 에피솜 벡터에 자살 유전자를 가하거나, 또는 (2) 벡터상에 존재하는 구성적 EBNA-1 발현 카세트를 하나 이상의 벡터상의 조절된 발현 카세트로 교체하여(이때, EBNA-1 발현은 조절된 프로모터 시스템을 통해 조절된다) 변형시킴으로써, 세포요법을 위한 무-외인성 DNA iPSCs를 생성시키는 방법을 제공한다. 이들 접근법을 개별적으로 또는 함께 사용할 수 있었다.

[0059] 실시태양에서, 본 발명은 (1) 벡터-프리 iPSCs를 식별하기 전에 필요한 배양 계대수의 감소, (2) 벡터-프리 iPSCs를 식별하기 전에 채집 및 유지에 필요한 콜로니 수의 감소, (3) 개별적인 콜로니를 수동으로 채집하는 대신에, iPSC 콜로니를 "풀"로서 수확하는 능력, 및 (4) 전체적인 노동, 시간 및 비용 절감을 포함한 다수의 장점을 제공한다.

[0060] · 자살 유전자

[0061] 자살 유전자는 무독성 화합물의 독성 형태로의 전환을 담당한다. 따라서, 상기는 적합한 시간에 무독성 자살 유전자 기질을 가함으로써, 발현 벡터상에 놓여 벡터 유지에 대한 음성 선택으로서 작용할 수 있다. 상기 에피솜 벡터(들)에 첨가될 수 있는 잠재적인 자살 유전자는 티미딘 키나제 및 시토신 데아미나제를 포함한다. 이들 유전자의 발현은 구성적 프로모터에 의해 조절될 수 있다. 세포사는 오직 배양 배지에 그의 각각의 기질, 강시클로비어(Ganciclovir, GNC) 또는 5-플루로시토신(5-Fluorocytosine, 5-FC)을 첨가한 후에만 유도될 수 있다.

[0062] 상기 재프로그래밍화-후(콜로니 채집 전 또는 직후) 자살 유전자 기질의 제공은 상기 벡터(들)를 유지하는 iPSC 콜로니의 세포사를 유도하게 된다. 살아있는 콜로니는 상기 벡터(들)를 상실한 것이며, 따라서 추가로 채집되고 확대될 수 있다. 선별 분석은 iPSC 콜로니가 비-벡터-프리 iPSC의 확대에 대한 자원의 투자 없이, 장래의 확대, बैंकिंग 및 분화에 유망함에 관한 암시를 제공한다. 마찬가지로, 상기 전략을 벡터-프리인 iPSC 콜로니의 선택에 적용하는 것은 단일 콜로니의 수동 채집의 필요 없이 "풀"로서 iPSCs의 수확을 가능하게 하며, 확고한 세포주의 확립 전에 배양 유도기를 감소시킨다. iPSCs 풀의 수확은 충분한 특성화 및 बैंकिंग을 달성할 시간을 단축시키며, 추가로 하류 세포요법 용도에 효율적인 세포 분화 확률을 증가시키는 다양한 iPSC 풀을 제공한다.

[0063] 벡터 제거 동역학은, P0 플레이트 중에서 발생한 iPSCs가 상기 자살 유전자 기질의 첨가시에 여전히 상기 벡터를 유지하는 경우, 상기 자살 유전자 접근법으로도 콜로니 채집을 지시할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 상기

자살 유전자 기질을, 벡터-프리 iPSC 클론을 식별하기 위해 자원 집약적인 qPCR 선별을 수행할 필요 없이 채집 후 '복제' 플레이트에, 예를 들어 P1에 제공할 수 있다.

[0064] 따라서, 본 발명은 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법을 제공하며, 이 방법은 (a) 재프로그래밍 벡터(들)를 인간 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 재프로그래밍 벡터(들)가 바이러스 복제 기점, 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트, 및 자살 유전자를 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자(들), 및/또는 상기 합성적 전사 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 iPSC를 생성시키는 단계를 포함한다. 실시태양에서, 자살 유전자는 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다.

[0065] iPSC 생성 효율을 증가시키기 위해 자살 유전자를 사용하는 방법의 실시태양에서, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)를 세포에 도입시킨 후에, 상기 세포를, 체세포가 iPSCs로 전환되게 하기에 충분히 오랫동안 배양하며, 다시 말해 배아세포와 일치하는 형질을 갖는 세포 집단을 생성하도록 하는 재프로그래밍 인자의 발현을 수행하도록 배양한다. 실시태양에서, 배아세포와 일치하는 형질을 갖는 세포를 계대배양한다. 실시태양에서, 계대배양 후에, 상기 세포를 상기 자살 유전자 기질(예를 들어, GNC 또는 5-FC)을 제공하기 전에 추가로 계대배양한다. 추가의 실시태양에서, 계대배양 후에, 상기 세포를 상기 자살 유전자 기질의 제공전에 계대배양하지 않는다.

[0066] 실시태양에서, iPSC 생성 효율을 증가시키기 위해 자살 유전자를 사용하는 본 발명의 방법에 사용하기 위해서, 복제 기점은 OriP이다. 추가의 실시태양에서, 상기 복제 기점은 OriP이며, 발현 카세트는 EBV의 EBNA-1, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 89, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 이 둘을 모두 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0067] 실시태양에서, iPSC 생성 효율을 증가시키기 위해 자살 유전자를 사용하는 본 발명의 방법은 세포 집단을 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터의 존재에 대해 선별하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 선별은 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 체세포내에 도입된 후에 상기 방법의 임의의 단계에서 존재할 수 있다. 실시태양에서, 상기 세포를 상기 자살 유전자 기질의 제공에 이어서 선별한다. 선별 방법은 당해 분야의 숙련가들에게 공지되어 있으며, 비제한적으로 qPCR 벡터 검출 분석을 포함한다. 실시태양에서, 에피솜 재프로그래밍 벡터를 여전히 함유하는 자살 유전자 기질 제공에 이은 세포 집단 중의 세포는 추가로 배양하지 않는다.

[0068] 본 발명의 방법은 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)를 생성하는 것을 더 포함하며, 이 방법은 (a) 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)가 (i) OriP 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트, (iii) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 (iv) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자, 및/또는 상기 합성적 전사 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 에피솜 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSC를 생성시키는 단계를 포함한다. EBNA-1 및 유도체에 대한 설명은 문헌 [Levitskaya et al., *Nature*375:685 (1995)], [Levitskaya et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*94:12616-12621 (1997)] 및 [Yin, *Science*301:1371-1374 (2003)]에서 발견되며, 이들은 각각 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.

[0069] 실시태양에서, iPSC 생성 효율을 증가시키기 위해 자살 유전자를 사용하는 본 발명의 방법에 사용하기 위한 체세포는 인간 말초 혈액 단핵세포를 포함한 단핵세포, 섬유아세포, 각질세포, 조혈세포, 간엽 세포, 간세포, 위 세포 및/또는 β 세포를 포함한다. 실시태양에서, iPSC 생성 효율을 증가시키기 위해 자살 유전자를 사용하는 본 발명의 방법에 사용하기 위한 체세포는 인간 말초 혈액 단핵세포이다.

[0070] 실시태양에서, iPSC 생성 효율을 증가시키기 위해 자살 유전자를 사용하는 본 발명의 방법에 사용하기 위한 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4, Nanog, KLF4, cMYC, Lin-28, 및/또는 p53DD를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2 및 Oct-4를 포함한다. 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4, 및 KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상이다. 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4, KLF4,

cMYC, Lin-28 및 p53DD이다.

- [0071] 실시태양에서, 벡터 제거를 촉진하기 위해 상기 자살 유전자 접근법을 단독으로 사용하는 경우, 콜로니 채집 4 내지 5일 전에 적합한 기질을 P0 플레이트에 가한다. 이는 벡터-프리 콜로니의 생존을 선택하게 된다. qPCR 벡터 검출 선별 분석은 생존하는 iPSC 콜로니 중 어느 것이 차후의 확대, banking 및 분화에 유망한지에 대한 추가의 확인을 제공한다. 상기에 언급한 바와 같이, 벡터 제거 동역학에 따라, 나중의 계대로의 자살 유전자 기질의 첨가를 앞당기는 것이 필요할 수도 있다.
- [0072] · EBNA-1의 조절된 발현
- [0073] EBNA-1은 에피솜 재프로그래밍 벡터에서 발견되는 OriP라 칭하는 영역에의 결합 및 세포 분열 동안 염색체 DNA에 대한 테더링의 촉진에 관련된 바이러스 단백질이다. 상기는 형질감염에 이어서 증가된 플라스미드 유지를 생성시킨다. 상기는 초기에는 재프로그래밍 인자 및/또는 합성적 전사 인자의 높은 수준의 발현을 달성하기 위해서 이로인한 반면, 일단 재프로그래밍이 발생하면, 느린 플라스미드 상실을 생성시킨다.
- [0074] 실시태양에서, 본 명세서에 제공된 발명은 EBNA-1을, 재프로그래밍-후 그의 전사를 억제하거나(예를 들어, 테트라사이클린 억제성(TetOff)을 사용함으로써), 또는 단지 재프로그래밍이 발생할 때까지 활성화되는 유도성 시스템(예를 들어, 테트라사이클린 유도성(TetOn))을 사용함으로써 조절한다. EBNA-1 발현의 조절에 대한 또 다른 접근법이 또한 존재한다(예를 들어, 일단 재프로그래밍이 발생했으면, 유도성 안티센스 또는 간섭 RNA가 EBNA-1으로 발현될 수 있다). 유도제, 예를 들어 독시사이클린(doxycycline, Dox)(Tet 시스템의 경우)을 입수할 수 있으며, 이는 현재의 iPSC 생성 공정에 적합하다. 이러한 접근법은 세포 분열 동안 플라스미드의 분해를 감소시키며, 따라서 벡터-프리 세포주의 생성에 필요한 계대수를 감소시킨다.
- [0075] 실시태양에서, 본 발명은 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법을 제공하며, 이 방법은 (a) 재프로그래밍 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 재프로그래밍 벡터가 (i) 바이러스 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자(들), 및/또는 합성적 전사 인자(들)를 암호화하는 발현 카세트, (iii) 염색체의 복제 및 상기 재프로그래밍 벡터의 분해를 조절하는 유전자, 및 (iv) 조절된 프로모터 시스템을 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자, 및/또는 상기 합성적 전사 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 제1 세포 집단의 배양 동안 에피솜 재프로그래밍 벡터가 복제되는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 배양하고, 상기 염색체의 복제 및 상기 재프로그래밍 벡터의 분해를 조절하는 유전자가, 상기 재프로그래밍 벡터가 세포 분열 동안 상실되어 상기 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성하도록 조절되는 단계를 포함한다.
- [0076] 실시태양에서, 염색체의 복제 및 분해의 조절을 위한 본 발명의 방법은 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도제 활성화된 시스템, 예를 들어 TetOn 또는 TetOff 시스템을 사용한다. 실시태양에서, TetOn 시스템을 사용하는 경우, 형질감염된 세포 집단을 EBNA-1 발현을 상향조절하기 위해 배양하는 동안 테트라사이클린, 또는 테트라사이클린 유도제, 예를 들어 독시사이클린이 존재한다. 이어서 상기 세포 집단을 테트라사이클린 또는 유도제의 부재하에서 배양하여 상기 EBNA-1의 발현을 감소시키고, 따라서 상기 에피솜 벡터의 복제 및 분해를 실질적으로 감소시킨다.
- [0077] 실시태양에서, 염색체의 복제 및 분해의 조절을 위한 본 발명의 방법은 TetOff 시스템을 사용한다. TetOff 시스템에서, 형질감염된 세포 집단을 EBNA-1 발현을 상향조절하기 위해 배양하는 동안 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도제, 예를 들어 독시사이클린이 존재하지 않는다. 이어서 상기 세포 집단을 테트라사이클린 또는 유도제의 존재하에서 배양하여 상기 EBNA-1의 발현을 하향조절하고, 따라서 상기 에피솜 벡터의 복제 및 분해를 실질적으로 감소시킨다.
- [0078] 실시태양에서, 염색체의 복제 및 분해의 조절을 위한 본 발명의 방법은 OriP 복제 기점을 사용한다. 추가의 실시태양에서, 상기 복제 기점은 OriP이며, 발현 카세트는 EBV의 EBNA-1, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 89, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도제, 또는 이 둘을 모두 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0079] 실시태양에서, 염색체의 복제 및 분해의 조절을 위한 본 발명의 방법은 세포 집단을 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터의 존재에 대해 선별하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 선별은 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 체세포내에 도입된 후에 상기 방법의 임의의 단계에서 존재할 수 있다. 실시태양에서, 상기 세포를 상기 자살 유전자의 활성화에 이어서 선별한다. 선별 방법은 당해 분야의 숙련가들에게 공지되어 있으며, 비제한적으로 qPCR 벡터 검출 분석을 포함한다.

- [0080] 염색체의 복제 및 분할을 조절하는 방법의 실시태양에서, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터를 세포에 도입시키고 상기 세포를, 체세포가 iPSCs로 전환되게 하기에 충분히 오랫동안 배양한 후에, 즉 배아세포와 일치하는 형질을 갖는 세포 집단을 생성하도록 하는 재프로그래밍 인자 및/또는 합성적 전사 인자의 발현을 수행한 후에, 상기 배아세포와 일치하는 형질을 갖는 세포를 계대배양한다. 실시태양에서, 계대배양 후에, 상기 세포 집단이 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성하도록 배양하기 전에 상기 세포를 추가로 계대배양한다. 추가의 실시태양에서, 계대배양 후에, 상기 세포를 배양 전에 계대배양하지 않으며, 여기에서 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터는 복제되지 않는다.
- [0081] 본 발명은 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법을 추가로 제공하며, 이 방법은 (a) 에피솜 재프로그래밍 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 (i) OriP 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트, (iii) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 (iv) 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체 조절된 프로모터 시스템(TetOn 또는 TetOff)을 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 복제되는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 복제되지 않는 단계와; (d) 상기 제3 세포 집단으로부터 콜로니를 선택하여 제4 세포 집단을 생성시키는 단계와; (e) 상기 제4 세포 집단을 배양하여, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성시키는 단계를 포함한다.
- [0082] 실시태양에서, 염색체의 복제 및 분할을 조절하는 본 발명의 방법은 인간 말초 혈액 단핵세포, 섬유아세포, 각질세포, 조혈세포, 간엽 세포, 간세포, 위세포 및 β 세포일 수 있는 체세포를 사용한다.
- [0083] 실시태양에서, 염색체의 복제 및 분할을 조절하는 본 발명의 방법에 사용하기 위한 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4, Nanog, KLF4, cMYC, MYC1, Lin-28, 및/또는 p53DD를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2 및 Oct-4를 포함한다. 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4 및 Nanog이다. 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4, 및 KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상이다. 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4, KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD이다.
- [0084] 실시태양에서, 벡터 제거를 촉진하기 위해 EBNA-1 발현을 단독으로 조절하는 경우, EBNA-1 발현을 iPSC 콜로니 채집 전 P0 플레이트에 상응하는 시점에서 감소시킨다. 그러나, 현재의 iPSC 생성 공정에서 콜로니 채집을 수행하는 경우, 증가된 수의 벡터-프리 콜로니가 보다 이른 계대수에서 확인된다.
- [0085] · 자살 유전자 및 조절된 염색체의 복제 및 분할의 조합
- [0086] 실시태양에서, 상기 방법의 병용은 추가적인 장점을 제공하며 실험적 접근법에 이로운 변형을 허용한다. EBNA-1-기반 에피솜 벡터의 특성으로 인해, 형질감염-후의 기간(즉 20 내지 30일)에 자살 유전자 기질을 제공하는 것은 P0 플레이트 중에 존재하는 iPSC 콜로니의 광범위한 세포사를 생성시킨다. 이러한 바람직하지 못한 효과를, 상기 자살 유전자에 대한 기질의 첨가에 앞서 벡터 제거를 촉진하기 위해 EBNA-1 발현을 감소시킴으로써 저감시킨다.
- [0087] 상기 방법들을 병용하는 추가적인 장점은 높은 재프로그래밍 효율 및 높은 벡터 제거가 달성되는 경우, iPSC 콜로니를 풀로서 채집하여, 확대, बैं킹 및 특성화를 신속히 처리할 수 있는 것이다.
- [0088] 따라서, 본 발명은 재프로그래밍 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법을 제공하며, 이 방법은 (a) 재프로그래밍 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 재프로그래밍 벡터가 (i) 바이러스 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자(들), 및/또는 합성적 전사 인자(들)를 암호화하는 발현 카세트, (iii) 염색체의 복제 및 상기 재프로그래밍 벡터의 분할을 조절하는 유전자, (iv) 조절된 프로모터 시스템 및 (v) 자살 유전자를 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍 인자, 및/또는 상기 합성적 전사 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 재프로그래밍 벡터가 복제되는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 배양하고, 상기 염색체의 복제 및 분할을 조절하는 유전자가, 상기 재프로그래밍 벡터가 세포 분열 동안 상실되어 상기 재프로그래밍 벡터가 실질적으로 없는 iPSCs를 포함하는 제3 세포

집단을 생성하도록 조절되는 단계와; (d) 상기 제3 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접촉시켜, 상기 재프로그래밍화 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성시키는 단계를 포함한다.

[0089] 본 발명의 조합 방법에서, 실시태양에서, 상기 자살 유전자는 티미딘 키나제 및 시토신 데아미나제로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다.

[0090] 본 발명의 조합 방법에서, 상기 복제 기점은 OriP이다. 추가적인 실시태양에서, 상기 복제 기점은 OriP이며, 발현 카세트는 EBV의 EBNA-1, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 89, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 이 둘을 모두 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0091] 본 발명의 조합 방법에서, iPSC 재프로그래밍화 인자 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트의 전사를 조절하는 유전자는 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체, 예를 들어 독시사이클린, 활성화된 시스템을 포함한다. 실시태양에서, 독시사이클린은 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 세포 집단을 생성하도록 하는 상기 재프로그래밍화 인자의 발현을 수행하기 위해 제1 세포 집단의 배양 동안 존재하며, 독시사이클린은 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 실질적으로 없는 iPSCs를 생성시키기 위해 배양 동안 존재하지 않고, 여기에서 배양 동안, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터는 복제되지 않는다. 실시태양에서, 상기 독시사이클린은 상기 첫 번째 배양 단계 동안 존재하지 않고, 독시사이클린은 상기 두 번째 단계에서 존재하지 않는다.

[0092] 본 발명의 조합 방법에서, 추가적인 실시태양들은 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터의 존재에 대해 상기 세포 집단을 선별하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 선별은 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터를 체세포내에 도입시킨 후 상기 방법의 임의의 단계에서 존재할 수 있다. 실시태양에서, 상기 세포를 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 실질적으로 없는 iPSCs를 포함하는 제3 세포 집단을 생성시키기 위해 제2 세포 집단의 배양에 이어서 선별하며, 여기에서 상기 제2 세포 집단의 배양 동안, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터는 복제되지 않는다. 추가적인 실시태양에서, 상기 세포를 상기 자살 유전자의 활성화에 이어서 선별한다. 선별 방법은 당해 분야의 숙련자들에게 공지되어 있으며, 비제한적으로 qPCR 벡터 검출 분석을 포함한다. 실시태양에서, 상기 제2 세포 집단을 배양하여 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성시킨 후에, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터의 존재에 대해서 상기 세포 집단을 선별한다.

[0093] 본 발명의 조합 방법의 실시태양에서, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터를 세포에 도입시키고, 상기 세포를, 체세포가 iPSCs로 전환되게 하기에 충분히 오랫동안 배양한 후에, 즉 배아세포와 일치하는 형질을 갖는 세포 집단을 생성하도록 하는 상기 재프로그래밍화 인자 및/또는 합성적 전사 인자의 발현을 수행하도록 배양한 후에, 상기 배아세포와 일치하는 형질을 갖는 세포를 계대배양한다. 실시태양에서, 계대배양 후에, 상기 세포를, 상기 세포 집단이 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성하도록 배양하기 전에 추가로 계대배양한다. 추가적인 실시태양에서, 계대배양 후에, 상기 세포를 배양 전에 계대배양하지 않으며, 여기에서 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터는 복제되지 않는다. 본 발명의 조합 방법의 추가적인 실시태양에서, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터를 세포에 도입시킨 후에, 상기 세포를, 체세포가 iPSCs로 전환되게 하기에 충분히 오랫동안 배양하며, 다시 말해 배아세포와 일치하는 형질을 갖는 세포 집단을 생성하도록 하는 상기 재프로그래밍화 인자 및/또는 합성적 전사 인자의 발현을 수행하도록 배양한다. 실시태양에서, 상기 배아세포와 일치하는 형질을 갖는 세포를 계대배양한다. 실시태양에서, 계대배양 후에, 상기 세포를 상기 자살 유전자 기질(예를 들어, GNC 또는 5-FC)을 제공하기 전에 추가로 계대배양한다. 추가의 실시태양에서, 계대배양 후에, 상기 세포를 상기 자살 유전자 기질의 제공전에 계대배양하지 않는다.

[0094] 본 발명은 에피솜 재프로그래밍화 벡터(들)가 근본적으로 없는 인간 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 생성 방법을 추가로 제공하며, 이 방법은 (a) 에피솜 재프로그래밍화 벡터(들)를 체세포내에 도입시켜 제1 세포 집단을 생성시키는 단계로, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 (i) OriP 복제 기점, (ii) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍화 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트, (iii) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, (iv) 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체 조절된 프로모터 시스템(TetOn 또는 TetOff), 및 (v) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는, 단계와; (b) 상기 제1 세포 집단을 배양하여 상기 재프로그래밍화 인자, 및/또는 상기 합성적 전사 인자의 발현을 수행하여 배아줄기세포와 일치하는 형질을 갖는 제2 세포 집단을 생성시키고, 상기 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 복제되는 단계와; (c) 상기 제2 세포 집단을 배양하여, 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 실질적으로 없는 iPSC를 포함하는 제3 세포 집단을 생성시키고, 상기 제2 세포 집단의 배양 동안 상기 에피솜 재프로그래밍화 벡터가 복제되지 않는 단계와; (d) 상기 제3 세포 집단을 자살 유전자 기질과 접

촉시켜, 상기 에피솜 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSC를 생성시키는 단계를 포함한다.

- [0095] 실시태양에서, 본 발명의 조합 방법은 인간 말초 혈액 단핵세포, 섬유아세포, 각질세포, 조혈세포, 간엽 세포, 간세포, 위세포 및 β 세포일 수 있는 체세포를 사용한다.
- [0096] 실시태양에서, 본 발명의 조합 방법에 사용하기 위한 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4, Nanog, KLF4, cMYC, Lin-28, 및/또는 p53DD를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2 및 Oct-4를 포함한다. 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4 및 Nanog이다. 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4, 및 KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD 중 하나 이상이다. 실시태양에서, 상기 iPSC 재프로그래밍 인자는 Sox-2, Oct-4, KLF4, cMYC, Lin-28 및 p53DD이다.
- [0097] · 에피솜 재프로그래밍 벡터
- [0098] 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점; (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 (c) 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 제공한다.
- [0099] 추가적인 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점; (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 (d) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 제공한다.
- [0100] 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점; (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 (d) 조절된 프로모터 시스템을 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 추가로 제공한다.
- [0101] 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점; (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 (d) TetOn 또는 TetOff 시스템을 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 추가로 제공한다.
- [0102] 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점; (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자; (d) TetOn 또는 TetOff 시스템; 및 (e) 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 추가로 제공한다.
- [0103] 실시태양에서, 본 발명은 (a) OriP 복제 기점, (b) 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 재프로그래밍 인자, 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트; (c) EBV의 EBNA-1, EBNA-1의 잔기 65 내지 89가 결실된 EBNA-1의 유도체, EBNA-1의 잔기 90 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체, 또는 EBNA-1의 잔기 65 내지 328이 결실된 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; (d) TetOn 또는 TetOff 시스템, 및 (e) 티미딘 키나제 또는 시토신 데아미나제 자살 유전자를 포함하는 에피솜 재프로그래밍 벡터를 추가로 제공한다.
- [0104] 실시태양에서, 본 발명의 방법은 상기 재프로그래밍 벡터가 근본적으로 없는 iPSCs를 생성시키기 위해 단일 벡터 또는 다수의 벡터를 사용한다. 예를 들어, 실시태양에서, 상기에 논의된 바와 같은 EBV의 조절된 EBNA-1 또는 EBNA-1의 유도체는 상기 발현 카세트 재프로그래밍 인자 및/또는 합성적 전사 인자와 동일한 벡터상에 있지 않다. 마찬가지로, 실시태양에서, 상기 자살 유전자 및/또는 조절된 프로모터 시스템은 별도의 벡터상에 있다.
- [0105] · 재프로그래밍 인자
- [0106] iPSCs를 생성시키기 위해서 재프로그래밍 인자들이 필요하다. 하기의 인자들 또는 인자들의 조합을 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 몇몇 태양에서, Sox 및 Oct(특히 Oct3/4)를 암호화하는 핵산을 상기 재프로그래밍 벡

터내에 포함시키게 된다. 예를 들어, 하나 이상의 재프로그래밍 벡터는 Sox2, Oct4, Nanog 및 임의로 Lin28을 암호화하는 발현 카세트, 또는 Sox2, Oct4, Klf4 및 임의로 c-Myc를 암호화하는 발현 카세트, 또는 Sox2, Oct4, 및 임의로 Esrrb를 암호화하는 발현 카세트, 또는 Sox2, Oct4, Nanog, Lin28, Klf4, c-Myc, 및 임의로 SV40 큰 T 항원을 암호화하는 발현 카세트를 포함할 수 있다. 이들 재프로그래밍 인자를 암호화하는 핵산들을 동일한 발현 카세트, 상이한 발현 카세트, 동일한 재프로그래밍 벡터, 또는 상이한 재프로그래밍 벡터 중에 포함시킬 수 있다.

[0107] Oct4 및 Sox 유전자 계열의 몇몇 구성원들(Sox1, Sox2, Sox3, 및 Sox15)이, 그들의 부재가 유도를 불가능하게 하는 유도 과정에 수반되는 중요한 전사 조절자로서 확인되었다. 그러나, Klf 계열(Klf1, Klf2, Klf4, 및 Klf5), Myc 계열(c-Myc, L-Myc, 및 N-Myc)의 몇몇 구성원들, Nanog, 및 Lin28을 포함한 추가적인 유전자들이 상기 유도 효율을 증가시키는 것으로 확인되었다.

[0108] Oct4(Pou5f1)는 팔랑체("Oct") 전사 인자 계열의 하나이며, 만능성의 유지에 중요한 역할을 한다. 세포, 예를 들어 할구 및 배아줄기세포에서 Oct4의 부재는 자발적인 세포영양막 분화를 유도하며, 따라서 Oct4의 존재는 배아줄기세포의 만능성 및 분화 잠재성을 생성시킨다. Oct1 및 Oct6을 포함한 상기 "Oct" 계열 중의 다양한 다른 유전자들은 유도를 이끌어내지 못한다.

[0109] 유전자의 Sox 계열은 Oct4와 유사하게 만능성의 유지와 관련되지만, 상기는 만능 줄기세포에서 광범위하게 발현되는 Oct4와 대조적으로, 다분화능 및 단분화능 줄기세포와 관련된다. Sox2는 재프로그래밍 유도에 사용되는 초기 유전자인 반면, 상기 Sox 계열 중의 다른 유전자들은 유도 과정에도 또한 작용하는 것으로 밝혀졌다. Sox1은 Sox2와 유사한 효율로 iPS 세포를 생성시키며, 유전자 Sox3, Sox15, 및 Sox18도 또한 iPS 세포를 생성시키지만, 감소된 효율을 갖는다.

[0110] Lin28은 분화 및 증식과 관련하여 배아줄기세포 및 배아 암종세포에서 발현되는 mRNA 결합 단백질이다.

[0111] 본 발명의 방법 및 벡터에 사용되는 재프로그래밍 인자는 천연 또는 비-천연발생일 수 있다. 비-천연 발생 재프로그래밍 인자를 본 명세서에서 합성적 전사 인자라 칭한다. 합성적 전사 인자를 또한 체세포내에 도입시켜 상기 세포를 배아줄기세포-유사 상태로 재프로그래밍할 수 있다. 합성적 전사 인자는 재프로그래밍 효율을 증대시키고 동역학을 가속화할 수 있다. 추가적인 합성적 전사 인자들이 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다.

[0112] 본 발명에 사용되는 재프로그래밍 단백질은 대략 동일한 재프로그래밍 기능을 갖는 단백질 동족체에 의해 치환될 수 있다. 상기 동족체를 암호화하는 핵산을 또한 재프로그래밍에 사용할 수 있었다. 보존적인 아미노산 치환, 즉 예를 들어 극성 산성 아미노산으로서 아스파르트산-글루탐산; 극성 염기성 아미노산으로서 리신/아르기닌/히스티딘; 비-극성 또는 소수성 아미노산으로서 류신/이소류신/메티오닌/발린/알라닌/글리신/프롤린; 극성 또는 하전되지 않은 친수성 아미노산으로서 세린/쓰레오닌이 바람직하다. 보존적인 아미노산 치환은 또한 측쇄 기준 분류를 포함한다. 예를 들어, 지방족 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신이고; 지방족-하이드록실 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 세린 및 쓰레오닌이고; 아미드-함유 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 아스파라진 및 글루타민이고; 방향족 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판이고; 염기성 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 리신, 아르기닌 및 히스티딘이고; 황-함유 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 시스테인 및 메티오닌이다. 예를 들어, 류신의 이소류신 또는 발린에 의한 치환, 아스파테이트의 글루타메이트에 의한 치환, 쓰레오닌의 세린에 의한 치환, 또는 아미노산의 구조적으로 관련된 아미노산에 의한 유사한 치환은 생성되는 폴리펩티드의 성질에 큰 영향을 주지 않을 것으로 예상하는 것은 타당하다. 아미노산 변화가 기능성 폴리펩티드를 생성시키는지의 여부는 상기 폴리펩티드의 특이적인 활성을 분석함으로써 쉽게 결정할 수 있다.

[0113] · 자살 유전자

[0114] 자살 유전자를 암 치료법에서 시험하였다. 오늘날 암 치료에 사용되는 통상적인 화학요법의 주요 한계는 낮은 치료 지수, 및 정상 조직에 대한 약물 효과로부터 발생하는 부작용이다. 증가된 종양 선택성을 갖는 치료법을 개발하는데 가장 혁신적인 접근법 중 하나는 유전자 요법이다.

[0115] 자살 유전자 요법에 근원하는 근본적인 개념은 하기와 같다: 체계적으로 입수할 수 있는 전구-약물을 활성 항-신생물제로 국소적으로 대사하는 효소를 암호화하는 유전자를 종양 환경내에 선택적으로 도입시킨다. 암 치료법을 위한 자살 유전자 접근법의 첫 번째 예는 헤르페스 단순 바이러스 티미딘 키나제 유전자의 신생물 BALB/c 쥐 K3T3 육종 세포주내로의 도입이었다. 강시클로비어(티미딘 키나제에 의해, 세포 키나제에 의해 삼인산화 후 독성으로 되는 화합물로 전환된다)에 의한 치료는 시험관내에서 종양 세포의 파괴를 생성시켰다. 강시클로비어

를 상기 세포주에 의해 생성된 K3T3 육종 종양을 갖는 BALB/c 마우스에게 투여한 결과 생체내에서 상기 종양의 파괴가 발생하였다. 자살 유전자 요법에 대한 중심 원리는 건강한 숙주 조직과 암세포 간에 이용 가능한 생화학적 차이를 인공적으로 생성시키는 것이다.

[0116] 본 발명에서, 자살 유전자를 활용하여 여전히 에피솜 재프로그래밍 벡터를 함유하는 iPSCs를 제거한다. 상기 자살 유전자 시스템이 활성화되면, 오직 상기 에피솜 벡터를 함유하는 세포만이 살해된다.

[0117] · 벡터-프리 유도만능 줄기세포를 생성시키기 위한 염색체-외 벡터

[0118] 상술한 바와 같이, 인간 체세포로부터 만능 줄기세포의 생성은 재프로그래밍 유전자의 이소성 발현에 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 달성되었다. 물론 쥐 백혈병 바이러스와 같은 재조합 레트로바이러스는 안전한 방식으로 숙주 게놈내에 통합하는 능력을 갖는다. 상기는 상기 숙주 게놈내로의 통합을 허용하는 역전사효소를 함유한다. 렌티바이러스는 레트로바이러스의 하위부류이다. 상기는 분열하는 세포뿐만 아니라 분열하지 않는 세포의 게놈내에 통합하는 능력 덕분에 벡터로서 광범위하게 적합하다. 이들 바이러스 벡터는 또한 보다 넓은 맥락으로 광범위하게 사용되어 왔다: 재프로그래밍, 분화 및 전환분화를 포함한 세포의 분화 프로그래밍. RNA 형태의 바이러스 게놈은 상기 바이러스가 세포에 진입하여 DNA(상기는 이어서 바이러스 인티그라제 효소에 의해 랜덤한 위치에서 상기 게놈내에 삽입된다)를 생성시킬 때 역전사된다. 상기 논의된 바와 같이, 숙주 게놈내로의 상기 바이러스 뉴클레오티드의 통합은 세포요법 기반 치료학적 용도에 바람직하지 않다.

[0119] 따라서, 몇몇 실시태양에서, 본 발명은 유도만능 줄기세포, 및 외인성 유전 요소, 예를 들어 선행 방법들에서 사용되는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터로부터의 상기 요소가 근본적으로 없는 다른 목적하는 세포 유형을 생성시키는 방법을 제공한다. 이들 방법은 염색체-외 복제 벡터, 또는 에피솜에 의해 복제할 수 있는 벡터를 이용한다.

[0120] · 엡스타인-바 바이러스

[0121] 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr Virus, EBV) 또한 인간 헤르페스바이러스 4(HHV-4)는 헤르페스 계열(헤르페스 단순 바이러스 및 거대세포바이러스를 포함한다)의 바이러스이다. EBV는 그의 게놈을 염색체외에서 유지하며, 세포분열 동안 세포내에서 그의 복제 및 그의 유지를 위해 오직 2개의 필수적인 특징에 의존하는 효율적인 복제 및 유지를 위해서 숙주 세포 기구와 공동으로 작용한다. 하나의 요소, OriP가 시스로 존재하며 복제 기점으로 작용한다. 다른 인자, EBNA1은 OriP 내의 서열에 결합함으로써, 트랜스로 기능하여 플라스미드 DNA의 복제 및 유지를 촉진한다.

[0122] · OriP

[0123] OriP는 인간 세포에서 플라스미드의 복제 및 안정한 유지를 지지하는 엡스타인-바 바이러스 염색체의 한 영역이다. 상기는 DNA 복제가 개시되는 부위이거나 또는 그 부근의 부위이며, 반복부의 계열(family of repeats, FR) 및 2회 대칭(dyad symmetry, DS)으로서 공지된, 대략 1 킬로염기 쌍으로 떨어진 2개의 시스-작용 서열들로 구성된다.

[0124] FR은 30 bp 반복부의 21개 불완전 사본으로 구성되며, 20개의 고 친화성 EBNA1-결합 부위를 함유한다. FR이 EBNA1에 의해 결합되는 경우, 상기는 10 kb까지 떨어져 시스로 프로모터의 전사 인헨서로서 작용하며, 핵 유지 및 FR 함유 플라스미드의 충실한 유지에 기여한다. OriP 플라스미드의 효율적인 분할도 또한 FR에 기인하는 듯하다. 상기 바이러스는 FR 중에 20개의 EBNA1-결합 부위를 유지하도록 진화되었지만, 효율적인 플라스미드 유지는 이들 부위 중 단지 7개만을 필요로 하며, 총 12개의 EBNA1-결합 부위를 갖는, DS의 3개 사본의 중합체에 의해 재구성될 수 있다.

[0125] 상기 2회 대칭 요소(DS)는 EBNA1의 존재하에서 DNA 합성의 개시에 충분하며, 개시는 DS에서 또는 그 부근에서 발생한다. 바이러스 DNA 합성의 종료는 FR에서 일어나는 것으로 생각되는데, 그 이유는 FR이 EBNA1에 의해 결합될 때 상기가 2D 젤 전기영동에 의해 관찰된 바와 같이 복제 분기점 장벽으로서 기능하기 때문이다. DS로부터 DNA 합성의 개시는 세포주기당 1회로 허가되며, 세포 복제 시스템의 성분들에 의해 조절된다. DS는, FR에서 발견되는 경우보다 더 낮은 친화성이기는 하지만, 4개의 EBNA1-결합 부위를 함유한다. DS의 위상배치는 상기 4개의 결합 부위가 2개의 부위들의 쌍으로서 배열되도록 되어 있으며, 이때 각 쌍 사이에 21 bp 중심 대 중심 간격 및 2개의 비-쌍 내부 결합 부위 사이에 33 bp 중심 대 중심 간격을 갖는다.

[0126] DS내에서 상기 요소들의 기능상 역할은 Rep^{*}(DS를 비효율적으로 대체할 수 있는 요소로서 확인되었다)라

칭하는, EBV의 게놈의 또 다른 영역에 대한 연구에 의해 확인되었다. Rep^{*}의 8배 중합은 그의 복제의 지지에서 DS만큼 효율적인 요소를 생성시켰다. Rep^{*}의 생화학적 해체는 그의 복제 기능에 중요한 21 bp 중심 대 중심 간격을 갖는 한 쌍의 EGNA1-결합 부위를 확인하였다(ibid). Rep^{*}의 최소 복제자는, 복제 기능이 상기 중합체 중 모든 인접 서열들이 람다 파지로부터 유래된 서열로 교체된 후에도 유지되었으므로, 상기 EBNA1-결합 부위의 쌍인 것으로 밝혀졌다. DS와 Rep^{*}와의 비교는 공통 기전을 밝혀내었다: 이들 복제자는, 휘어지고 EBNA1에 의해 결합된, 한 쌍의 적합하게 이격된 부위를 통해 세포 복제 기구를 모집함으로써 DNA 합성의 개시를 지지한다.

[0127] 포유동물 세포에서 복제하는 추가의 염색체-외 플라스미드는 EBV와 관련없이 존재하며, EBV의 라지(Raji) 균주 내 개시 대역과 유사하게 보인다. 예를 들어, "핵 스캐폴드/기질 부착 영역"(scaffold/matrix attachment regions, S/MAR) 및 확고한 전사 단위를 함유하는 플라스미드가 당해 분야에 존재한다. 그의 S/MAR은 인간 인터페론-베타 유전자로부터 유래하며, A/T 풍부이고, 핵 기질과의 그의 결합 및 저 이온 강도에서 또는 초나선 DNA에 포매시 그의 바람직한 폴림에 의해 작동적으로 한정된다. 상기 플라스미드는 반보존적으로 복제하며, ORC 단백질에 결합하고, 그의 DNA 전체를 통해 무작위로 유효하게 DNA 합성의 개시를 지지한다. 상기는 약물 선택 없이 증식하는 햄스터 및 인간 세포에서 효율적으로 유지되며, 돼지 배아에 도입될 때 태아 동물의 대부분의 조직에서 GFP의 발현을 지지할 수 있다.

[0128] · EBNA1

[0129] Epstein 바 핵 항원 1(Epstein Barr nuclear antigen 1, EBNA1)은 OriP의 FR 및 DS 또는 Rep^{*}에 결합하여, 각각의 세포 분열 동안 세포 염색체와 독립적으로, 그러나 상기 염색체와 협력하여 상기 EBV 플라스미드의 복제 및 딸 세포로의 충실한 분할을 촉진하는 DNA-결합 단백질이다.

[0130] EBNA1의 641개 아미노산(amino acid, AA)은 돌연변이 및 결실 분석에 의해 그의 변화된 기능과 관련된 도메인들로 분류되었다. AA40-89 및 AA329-378 간의 2개 영역은 EBNA1에 의해 결합시 2개의 DNA 요소를 시스 또는 트랜스로 연결할 수 있으며, 따라서 이들은 연결 영역 1 및 2(LR1, LR2)라 지칭되었다. EBNA1의 이들 도메인의 GFP에의 융합은 상기 GFP를 유사분열 염색체로 귀소시킨다. LR1 및 LR2는 복제에 기능상 불필요하며; 둘 중 어느 하나의 결실은 DNA 복제를 지지할 수 있는 EBNA1의 유도체를 생성시킨다. LR1 및 LR2는 아르기닌 및 글리신 잔기가 풍부하며, A/T 풍부 DNA와 결합하는 AT-후크 동기와 닮았다. EBNA1의 LR1 및 LR2의 시험관내 분석은 A/T 풍부 DNA에 결합하는 이들의 능력을 입증하였다. 하나의 이러한 AT-후크를 함유하는 LR1이 EBNA1의 DNA-결합 및 이량체화 도메인에 융합했을 때, 상기는 야생형 EBNA1보다 덜 효율적이기는 하지만, OriP 플라스미드의 DNA 복제에 충분한 것으로 밝혀졌다.

[0131] LR2는 OriP 복제의 EBNA1의 지지에 필요치 않다. 추가로, EBNA1의 N-말단 절반이 HMG1a와 같은 AT-후크 동기를 함유하는 세포 단백질로 교체될 수 있으며, 여전히 복제 기능을 유지한다. 이러한 발견은 LR1 및 LR2의 AT-후크 활성이 인간 세포에서 OriP의 유지에 필요할 것임을 암시한다.

[0132] EBNA1의 잔기 중 세 번째(AA91-328)는 글리신-글리신-알라닌(glycine-glycine-alanine, GGA) 반복부로 이루어지며, 프로테오솜 분해 및 제거를 억제함으로써 숙주 면역 응답을 피하는 EBNA1의 능력과 관련된다. 상기 반복부는 또한 시험관내 및 생체내에서 EBNA1의 번역을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 상기 도메인의 큰 결실은 세포 배양물에서 EBNA1의 기능에 뚜렷한 영향을 주지 않는다.

[0133] 핵 국소화 신호(nuclear localization signal, NLS)는 AA379-386에 의해 암호화되며, 이는 또한 세포 핵 수입 기구와 관련된다.

[0134] 마지막으로, C-말단(AA458-607)은 EBNA1의 중복하는 DNA-결합 및 이량체화 도메인을 암호화한다. DNA에 결합된 이들 도메인의 구조는 X-선 결정학에 의해 분석되었으며, 유두종바이러스의 E2 단백질의 DNA-결합 도메인과 유사한 것으로 밝혀졌다.

[0135] 본 발명의 실시태양에서, 재프로그램화 벡터는 OriP, 및 세포 분열 동안 플라스미드 복제 및 그의 적합한 유지를 지지하는데 능숙한 EBNA1의 한 버전을 암호화하는 약기된 서열을 모두 함유하게 된다. 야생형 EBNA1의 아미노-말단 1/3내의 고도로 반복적인 서열 및 다양한 세포에서 입증된 독성을 갖는 25 아미노산 영역의 제거는 OriP와 관련된 EBNA1의 트랜스-작용 기능에 불필요하다. 따라서, EBNA1의 약기된 형태인 예시적인 유도체(델타 UR1으로서 공지됨)를 상기 플라스미드-기반 시스템내 OriP와 사용할 수 있었다. 염색체의 주형으로부터 전사를 활성화시킬 수 있는 EBNA1 유도체의 보다 많은 예들을 당해 분야에서, 예를 들어 문헌 [Kirchmaier and

Sugden, *J. Virol.* 71(3):1776-1775(1997)] 및 [Kennedy and Sugden, *Mol. Cell. Biol.* 23(19):6901-6908 (2003)](이들은 본 명세서에 참고로 인용된다)에서 입수할 수 있다.

[0136] 본 발명에 사용되는 EBNA-1의 유도체는 폴리펩티드이며, 상기는 상응하는 야생형 폴리펩티드에 비해 변형된 아미노산 서열을 갖는다. 상기 변형은 EBNA-1 중의 LR1(잔기 약 40 내지 약 89)의 독특한 영역(잔기 약 65 내지 약 89)에 상응하는 영역 중의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함하며, 상기 생성되는 유도체가 목적하는 성질을 갖는 한, 예를 들어 이량체화하고 OriP에 상응하는 ori를 함유하는 DNA에 결합하고, 핵에 국소화되고, 세포독성이지 않고, 염색체외로부터의 전사를 활성화시키지만 통합된 주형으로부터의 전사는 실질적으로 활성화하지 않는 한, EBNA-1의 다른 잔기들, 예를 들어 잔기 1 내지 약 잔기 40, 잔기 약 90 내지 약 328("Gly-Gly-Ala" 반복 영역), 잔기 약 329 내지 약 377(LR2), 잔기 약 379 내지 약 386(NLS), 잔기 약 451 내지 약 608(DNA 결합 및 이량체화), 또는 잔기 약 609 내지 약 641에 상응하는 영역들 중의 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함할 수 있다. 치환은 L형보다는 D, 뿐만 아니라 다른 주지된 아미노산 유사체, 예를 들어 비천연 아미노산, 예를 들어 알파-이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산 등을 사용하는 치환을 포함한다. 이들 유사체는 포스포세린, 포스포쓰레오닌, 포스포티로신, 하이드록시프롤린, 감마-카복시글루타메이트; 히프루산, 옥타하이드로인돌-2-카복실산, 스타틴, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산, 페니실라민, 오르니틴, 시트룰린, 알파-메틸-알라닌, 파라-벤조일-페닐알라닌, 페닐글리신, 프로파길글리신, 사르코신, 입실론-N,N,N-트리메틸리신, 입실론-N-아세틸리신, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시리신, 오메가-N-메틸아르기닌, 및 다른 유사한 아미노산 및 이미노산 및 3급-부틸글리신을 포함한다.

[0137] 보존적 아미노산 치환, 즉 예를 들어 극성 산성 아미노산으로서 아스파르트산-글루탐산; 극성 염기성 아미노산으로서 리신/아르기닌/히스티딘; 비-극성 또는 소수성 아미노산으로서 류신/이소류신/메티오닌/발린/알라닌/글리신/프롤린; 극성 또는 하전되지 않은 친수성 아미노산으로서 세린/쓰레오닌이 바람직하다. 보존적 아미노산 치환은 또한 측쇄 기준 분류를 포함한다. 예를 들어, 지방족 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신이고; 지방족-하이드록실 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 세린 및 쓰레오닌이고; 아미드-함유 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 아스파라진 및 글루타민이고; 방향족 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판이고; 염기성 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 리신, 아르기닌 및 히스티딘이고; 황-함유 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 시스테인 및 메티오닌이다. 예를 들어, 류신의 이소류신 또는 발린에 의한 치환, 아스파테이트의 글루타메이트에 의한 치환, 쓰레오닌의 세린에 의한 치환, 또는 아미노산의 구조적으로 관련된 아미노산에 의한 유사한 치환은 생성되는 폴리펩티드의 성질에 큰 영향을 주지 않을 것으로 예상하는 것은 타당하다. 아미노산 변화가 기능성 폴리펩티드를 생성시키는지의 여부는 상기 폴리펩티드의 특이적인 활성을 분석함으로써 쉽게 결정할 수 있다.

[0138] 본 발명의 범위내에 있는 아미노산 치환은 일반적으로, (a) 치환 영역 중 펩티드 주쇄의 구조, (b) 표적 부위에서 상기 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지하는 것에 대한 영향이 그다지 상이하지 않은 치환들을 선택함으로써 수행된다. 천연 잔기들은 공통적인 측쇄 성질을 기준으로 하기의 그룹들로 분류된다:

[0139] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0140] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0141] (3) 산성: asp, glu;

[0142] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0143] (5) 쇠 배향에 영향을 주는 잔기: gly, pro; 및

[0144] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0145] 본 발명은 또한 비-보존적 치환을 갖는 폴리펩티드를 구상한다. 비-보존적 치환은 상술한 부류들 중 하나의 구성원의 또 다른 것에 대한 교환을 수반한다.

[0146] 상기 폴리펩티드 또는 상기 폴리펩티드의 아미노 잔기의 산 부가염을, 상기 폴리펩티드 또는 아민을 1 당량 이상의 목적하는 무기 또는 유기산, 예를 들어 염산과 접촉시킴으로써 제조할 수 있다. 상기 폴리펩티드의 카복실기의 에스테르를 또한 당해 분야에 공지된 통상적인 방법 중 어느 하나에 의해 제조할 수 있다.

[0147] · 벡터 제작 및 전달

- [0148] 몇몇 실시태양에서, 재프로그래밍 또는 분화 프로그래밍 벡터를, 상술한 바와 같은 재프로그래밍 인자, 분화 프로그래밍 인자 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 핵산 서열 외에, 세포에서 이들 재프로그래밍 인자를 발현하는 추가적인 요소들을 포함하도록 제작한다. 실시태양에서, 이들 벡터의 성분 및 전달 방법을 하기에 개시한다.
- [0149] · 벡터
- [0150] 플라스미드- 또는 리포솜-기반 염색체외 벡터, 예를 들어 OriP-기반 벡터, 및/또는 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 벡터의 사용은 큰 DNA 단편들을 세포에 도입되게 하고 염색체외에서 유지되게 한다.
- [0151] 다른 염색체외 벡터는 다른 림프친화성 헤르페스 바이러스-기반 벡터를 포함한다. 림프친화성 헤르페스 바이러스는 림프아세포(예를 들어, 인간 B 림프아세포)에서 복제하고 그의 자연 생활사의 일부에 대한 플라스미드가 되는 헤르페스 바이러스이다. 예시적인 림프친화성 헤르페스 바이러스는 비제한적으로 EBV, 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV); 헤르페스 바이러스 다람쥐원숭이(HS) 및 마력병 바이러스(MDV)를 포함한다. 또한 에피솜-기반 벡터의 다른 공급원들, 예를 들어 효모 ARS, 아데노바이러스, SV40 또는 BPV를 제공한다.
- [0152] 벡터는 또한, 유전자 전달 및/또는 유전자 발현을 추가로 조절하거나 또는 달리 표적화된 세포에 이로운 성질을 제공하는 다른 성분 또는 기능을 포함할 수 있다. 이러한 다른 성분은 예를 들어 세포에의 결합 또는 표적화에 영향을 주는 성분(세포-유형 또는 조직-특이성 결합을 매개하는 성분 포함); 세포에 의한 벡터 핵산의 흡수에 영향을 주는 성분; 흡수 후 세포내 폴리뉴클레오티드의 국소화에 영향을 주는 성분(예를 들어, 핵 국소화를 매개하는 작용제); 및 폴리뉴클레오티드의 발현에 영향을 주는 성분을 포함한다.
- [0153] · 조절 요소
- [0154] 상기 벡터에 포함되는 진핵생물 발현 카세트는 바람직하게는 (5'에서 3' 방향으로) 단백질-암호화 서열에 작동적으로 연결된 진핵생물 전사 프로모터, 중개 서열을 포함하는 이어맞춤 신호, 및 전사 종결/폴리아데닐화 서열을 함유한다.
- [0155] · 프로모터/인핸서
- [0156] "프로모터"는 전사의 개시 및 속도를 조절하는 핵산 서열의 영역인 조절 서열이다. 상기는 조절 단백질 및 분자가 핵산 서열에 결합하여 특이적인 전사를 개시시킬 수 있는 유전 요소, 예를 들어 RNA 폴리머라제 및 다른 전사 인자를 함유할 수 있다. "작동적으로 위치한", "작동적으로 연결된", "조절하에서", 및 "전사 조절하에서"란 어구들은 프로모터가 핵산 서열의 전사 개시 및/또는 발현을 조절하기 위해 상기 서열과 관련하여 정확한 기능상 위치 및/또는 배향으로 있는 것을 의미한다.
- [0157] 본 발명의 EBNA-1-암호화 벡터에 사용하기에 적합한 프로모터는 상기 EBNA-1 단백질을 암호화하는 발현 카세트의 발현을, EBV OriP-함유 벡터를 안정하게 유지하기에 충분한 정상 상태 수준의 EBNA-1 단백질을 생성시키도록 지시하는 것들이다. 프로모터는 또한 재프로그래밍 인자 및/또는 합성적 전사 인자를 암호화하는 발현 카세트의 효율적인 발현에 사용된다.
- [0158] 프로모터는 일반적으로 RNA 합성을 위한 출발 부위를 배치하는 기능을 하는 서열을 포함한다. 그의 가장 잘 알려진 예는 TATA 박스이나, TATA 박스가 없는 일부 프로모터, 예를 들어 포유동물 말단 테옥시 뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 유전자에 대한 프로모터, 및 SV40 후기 유전자에 대한 프로모터에서, 상기 출발 부위 위에 놓인 별도의 요소 자체가 상기 개시 장소의 고정을 돕는다. 추가적인 프로모터 요소는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 상기는 상기 출발 부위의 상류 30 내지 110 bp 영역에 위치하지만, 다수의 프로모터들이 또한 상기 출발 부위의 하류에 기능성 요소를 함유하는 것으로 나타났다. 프로모터의 "조절하에" 암호화 서열을 가져오기 위해서, 하나를 상기 선택된 프로모터의 하류(즉 3')의 전사 관독 프레임의 전사 개시 부위의 5' 단부에 배치한다. 상기 "상류" 프로모터는 상기 DNA의 전사를 자극하고 암호화된 RNA의 발현을 촉진한다.
- [0159] 프로모터 요소들 간의 간격은 흔히 유연하며, 따라서 프로모터 기능은 요소들이 서로에 대해 뒤집어지거나 이동될 때 보존된다. tk 프로모터에서, 프로모터 요소들 간의 간격은 활성의 감도가 시작하기 전에 떨어져 50 bp까지 증가될 수 있다. 상기 프로모터에 따라, 개별적인 요소들은 협력해서 또는 독립적으로 전사를 활성화시키는 기능을 할 수 있는 것으로 보인다. 프로모터는 "인핸서"와 함께 사용될 수도, 또는 사용되지 않을 수도 있으며, 상기 인핸서는 핵산 서열의 전사 활성화에 관련된 시스-작용 조절 서열을 지칭한다.
- [0160] 프로모터는, 암호화 분절 및/또는 엑손의 상류에 위치한 5' 비-암호화 서열을 단리시킴으로써 수득될 수 있는 바와 같이, 핵산 서열과 자연적으로 결합된 것일 수 있다. 이러한 프로모터를 "내인성"이라 칭할 수 있다. 유

사하게, 인헨서는 핵산 서열과 자연적으로 결합된 것일 수 있으며, 상기 핵산 서열의 하류 또는 상류에 위치한다. 대안적으로, 상기 암호화 핵산 분절을 재조합 또는 이중 프로모터(자연 환경에서 그의 핵산 서열과 통상적으로 결합되지 않은 프로모터를 지칭한다)의 조절하에 위치시킴으로써 몇몇 장점이 얻어지게 된다. 재조합 또는 이중 인헨서는 또한 그의 자연 환경에서 핵산 서열과 통상적으로 결합되지 않는 인헨서를 지칭한다. 이러한 프로모터 또는 인헨서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인헨서, 및 임의의 다른 바이러스 또는 원핵생물 또는 진핵생물 세포로부터 단리된 프로모터 또는 인헨서, 및 "천연 발생"이 아닌, 즉 상이한 전사 조절 영역, 및/또는 발현을 변경시키는 돌연변이의 상이한 요소들을 함유하는 프로모터 또는 인헨서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 구성에 가장 통상적으로 사용되는 프로모터는 베타-락타마제(페니실리나제), 락토스 및 트립토판(trp) 프로모터 시스템을 포함한다. 프로모터 및 인헨서의 핵산 서열을 합성적으로 생성시키는 이외에, 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술, 예를 들어 PCR을 본 명세서에 개시된 조성물들과 관련하여 사용하여 서열들을 생성시킬 수 있다. 더욱 또한, 실시태양에서, 비-핵 세포소기관, 예를 들어 미토콘드리아, 염록체 등 내에서 서열의 전사 및/또는 발현을 지시하는 조절 서열을 또한 사용할 수 있다.

[0161] 발현을 위해 선택된 세포소기관, 세포 유형, 조직, 기관 또는 유기체에서 DNA 분절의 발현을 유효하게 지시하는 프로모터 및/또는 인헨서를 사용하는 것이 중요하다. 상기 사용되는 프로모터는 구성적이고, 조직-특이적이며, 유도성이고/이거나, 재조합 단백질 및/또는 펩티드의 대규모 생산에 유리한 바와 같이, 도입된 DNA 분절의 높은 수준의 발현을 지시하기에 적합한 조건하에서 유용할 수 있다. 상기 프로모터는 이중 또는 내인성일 수 있다.

[0162] T3, T7 또는 SP6 세포질 발현 시스템의 사용은 하나의 실시태양이다. 진핵생물 세포는 적합한 세균성 폴리머라제가 전달 복합체의 부분으로서 또는 추가적인 유전자 발현 구조물로서 제공되는 경우, 몇몇 세균성 프로모터로부터의 세포질 전사를 지지할 수 있다.

[0163] 프로모터의 비제한적인 예는 초기 또는 후기 바이러스 프로모터, 예를 들어 SV40 초기 또는 후기 프로모터, 거대세포바이러스(cytomegalovirus, CMV) 전초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스(Rous Sarcoma Virus, RSV) 초기 프로모터; 진핵생물 세포 프로모터, 예를 들어 베타 액틴 프로모터(Ng, S. Y., *Nuc. Acid Res.* 17: 601-615, 1989, Quitsche et al., *J. Biol. Chem.* 264: 9539-9545, 1989), GADPH 프로모터(Alexander et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85: 5092-5096, 1988, Ercolani et al., *J. Biol. Chem.* 263: 15335-15341, 1988), 메탈로티오네인 프로모터(Karin et al. *Cell* 36: 371-379, 1989; Richards et al., *Cell* 37: 263-272, 1984); 및 연쇄된 응답 요소 프로모터, 예를 들어 환상 AMP 응답 요소 프로모터(cre), 혈청 응답 요소 프로모터(sre), 포르볼 에스테르 프로모터(TPA) 및 최소 TATA 박스 부근의 응답 요소 프로모터(tre)를 포함한다. 인간 성장 호르몬 프로모터 서열(예를 들어, 진뱅크(Genbank), 수납 번호 X05244, 뉴클레오티드 283-341로 기재된 인간 성장 호르몬 최소 프로모터) 또는 마우스 유방 종양 프로모터(ATCC, Cat. No. ATCC 45007로부터 입수할 수 있다)를 사용하는 것도 또한 가능하다. 구체적인 예는 포스포글리세레이트 키나제(phosphoglycerate kinase, PGK) 프로모터이다.

[0164] · 개시 신호 및 내부 리보솜 결합 부위

[0165] 특정한 개시 신호가 또한 암호화 서열의 효율적인 번역에 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접한 서열들을 포함한다. 상기 ATG 개시 코돈을 포함한, 외인성 번역 조절 신호를 제공할 필요가 있을 수 있다. 당해 분야의 통상적인 숙련가는 쉽게 이를 결정하고 필요한 신호를 제공할 수 있다. 상기 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 목적하는 암호화 서열의 판독 프레임과 "인-프레임"이어야 함이 주지되어 있다. 상기 외인성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 천연이거나 합성적일 수 있다. 발현 효율을, 적합한 전사 인헨서 요소의 포함에 의해 증대시킬 수 있다.

[0166] · 다중 클로닝 부위

[0167] 벡터는 다중 클로닝 부위(multiple cloning site, MCS)를 포함할 수 있으며, 이는 다수의 제한 효소 부위를 함유하는 핵산 영역으로, 상기 부위 중 어느 하나를 표준 재조합 기술과 함께 사용하여 상기 벡터를 절단할 수 있다. "제한 효소 절단"은 핵산 분자 중의 오직 특정한 위치에서만 기능하는 효소에 의한 핵산 분자의 촉매적 절단을 지칭한다. 이들 제한 효소 중 다수를 상업적으로 입수할 수 있다.

[0168] · 이어맞춤 부위

[0169] 실시태양에서, 본 발명의 방법에 사용되는 벡터는 이어맞춤 부위를 포함한다. 대부분의 전사된 진핵생물 RNA 분자들은 주요 전사물로부터 인트론을 제거하기 위해 RNA 이어맞춤을 겪게 된다. 게놈 진핵생물 서열을 함유하는 벡터는 단백질 발현을 위한 전사물의 적합한 가공을 보장하기 위해서 공여자 및/또는 수용자 이어맞춤 부위

를 필요로 할 수 있다.

[0170] · 종결 신호

[0171] 실시태양에서, 본 발명의 벡터 또는 구조물은 적어도 하나의 종결 신호를 포함한다. "종결 신호" 또는 "종결자"는 RNA 폴리머라제에 의한 RNA 전사물의 특정한 종결에 관련된 DNA 서열로 구성된다. 따라서, 몇몇 실시태양에서 RNA 전사물의 생산을 종료시키는 종결 신호가 제공된다. 종결자는 생체내에서 바람직한 메시지 수준을 달성하기 위해 필요할 수 있다.

[0172] 진핵생물계에서, 상기 종결자 영역은 또한 폴리아데닐화 부위를 노출시키기 위해서 새로운 전사물의 부위-특이적인 절단을 허용하는 특정한 DNA 서열을 포함할 수 있다. 이는 전문화된 내인성 폴리머라제가 전사물의 3' 단부에 약 200 A 잔기(폴리A)의 신장부를 가하도록 신호를 전달한다. 상기 폴리A 꼬리로 변형된 RNA 분자는 보다 안정적으로 보이며, 보다 효율적으로 번역된다. 따라서, 진핵생물을 수반하는 다른 실시태양에서, 종결자는 상기 RNA의 절단에 대한 신호를 포함하는 것이 바람직하며, 상기 종결자 신호가 상기 메시지의 폴리아데닐화를 촉진하는 것이 보다 바람직하다. 상기 종결자 및/또는 폴리아데닐화 부위 요소는 메시지 수준을 증대시키고, 상기 카세트로부터 다른 서열로의 번역초과를 최소화하는 작용을 할 수 있다.

[0173] 본 발명에 사용하기 위해 제공된 종결자는 본 명세서에 기재되거나 당해 분야의 통상적인 숙련가에게 알려진 임의의 공지된 전사 종결자, 예를 들어 비제한적으로 유전자의 종결 서열, 예를 들어 소 성장 호르몬 종결자 또는 바이러스 종결 서열, 예를 들어 SV40 종결자를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 종결 신호는 예를 들어 서열 절두로 인해 전사가능한 또는 번역가능한 서열이 없을 수도 있다.

[0174] · 폴리아데닐화 신호

[0175] 발현, 특히 진핵생물 발현에서, 전형적으로 전사물의 적합한 폴리아데닐화를 수행하기 위해 폴리아데닐화 신호를 포함하게 된다. 상기 폴리아데닐화 신호의 성질은 본 발명의 성공적인 실행에 중요한 것으로 여겨지지 않으며, 임의의 이러한 서열을 사용할 수 있다. 바람직한 실시태양은, 편리하고 다양한 표적 세포에서 잘 기능하는 것으로 공지된 SV40 폴리아데닐화 신호 또는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 폴리아데닐화는 전사물의 안정성을 증가시키거나 또는 세포질 수송을 촉진할 수 있다.

[0176] · 선택 및 선별성 마커

[0177] 본 발명의 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 핵산 구조물을 함유하는 세포를 시험관내 또는 생체내에서, 발현 벡터 중에 마커를 포함시킴으로써 식별할 수 있다. 이러한 마커는 상기 세포에 식별 가능한 변화를 부여하여 상기 발현 벡터를 함유하는 세포의 용이한 식별을 허용한다. 일반적으로, 선택 마커는 선택을 허용하는 성질을 부여하는 것이다. 양성 선택 마커는 상기 마커의 존재가 그의 선택을 허용하는 것인 반면, 음성 선택 마커는 그의 존재가 그의 선택을 방지하는 것이다. 양성 선택 마커의 예는 약물 내성 마커이다.

[0178] 대개 약물 선택 마커의 포함은 형질전환체의 클로닝 및 식별에 도움이 되며, 예를 들어 네오마이신, 퓨로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티딘올에 대한 내성을 부여하는 유전자가 유용한 선택 마커이다. 조건의 실행을 근거로 형질전환체의 구별을 허용하는 표현형을 부여하는 마커들 외에, 선별성 마커, 예를 들어 GFP(그의 기준은 열량 분석이다)를 포함한 다른 유형의 마커들이 또한 제공된다. 대안적으로, 음성 선택 마커로서 선별성 효소, 예를 들어 헤르페스 단순 바이러스 티미딘 키나제(thymidine kinase, tk) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)가 사용될 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 또한, 가능하게는 FACS 분석과 함께, 면역학적 마커를 어떻게 사용하는 지를 알고 있다. 상기 사용되는 마커는, 상기가 유전자 산물을 암호화하는 핵산과 동시에 발현될 수 있는 한, 중요한 것으로 여겨지지 않는다. 선택 및 선별성 마커의 추가적인 예는 당해 분야의 숙련가에게 주지되어 있다. 본 발명의 하나의 특징은 선택 및 선별성 마커를 사용하여, 분화 프로그램화 인자가 세포에서 목적하는 변경된 분화 상태를 수행한 후에 벡터-프리 세포를 선택하는 것을 포함한다.

[0179] · 벡터 전달

[0180] 본 발명에 의한 재프로그램화 또는 분화 프로그램화 벡터의 체세포내로의 도입은 본 명세서에 기재된 바와 같이 또는 당해 분야의 통상적인 숙련가에게 공지된 바와 같이, 세포의 형질전환을 위해 핵산 전달에 적합한 임의의 방법을 사용할 수 있다. 이러한 방법은 비제한적으로, 예를 들어 미세주입을 포함한 생체의 형질감염에 의한; 일렉트로포레이션에 의한; 칼슘 포스페이트 침전에 의한; DEAE-덱스트란에 이어서 폴리에틸렌 글리콜의 사용에 의한; 직접적인 음파 로딩에 의한; 리포솜 매개된 형질감염 및 수용체-매개된 형질감염에 의한; 미세투사 충격

에 의한; 탄화 규소 섬유와의 교반에 의한; 아그로박테리움-매개된 형질전환에 의한; 원형질체의 PEG-매개된 형질전환에 의한; 건조/억제-매개된 DNA 흡수, 및 이러한 방법들 중 임의의 조합에 의한 DNA의 직접적인 전달을 포함한다. 본 발명의 벡터를 전달하기 위한 추가적인 방법은 "세포 압착"을 포함하며, 상기 방법은 거대분자 및 나노물질을 세포로 전달하기 위한 세포의 급속한 기계적 변형을 수반한다. 예를 들어 문헌 [Sharei, "Cell Squeezing as a Robust, Microfluidic Intracellular Delivery Platform," J. Vis. Exp. 81:1-7 (2013)](내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)을 참조한다.

[0181] · 리포솜-매개된 형질감염

[0182] 본 발명의 몇몇 실시태양에서, 핵산을 예를 들어 리포솜과 같은 지질 복합체 중에 포집할 수 있다. 리포솜은 인지질 이중층 막과 내부 수성 매질을 특징으로 하는 소낭성 구조물이다. 다층 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다수의 지질 층을 갖는다. 상기는 인지질이 과잉의 수용액 중에 현탁될 때 자발적으로 형성된다. 상기 지질 성분은 폐쇄된 구조의 형성 전에 자기-재배열을 겪고 상기 지질 이중층 사이에 물과 용해된 용질을 포집한다. 또한 리포펙타민(김코(Gibco) BRL) 또는 슈퍼펙트(Superfect)(퀴아젠(Qiagen))와 복합체를 형성한 핵산을 제공한다. 상기 사용되는 리포솜의 양은 상기 리포솜의 성질뿐만 아니라, 사용되는 세포에 따라 변할 수 있으며, 예를 들어 100만 내지 1000만개의 세포당 약 5 내지 약 20 μg 의 벡터 DNA가 사용될 수 있다.

[0183] · 일렉트로포레이션

[0184] 본 발명의 몇몇 실시태양에서, 핵산을 일렉트로포레이션을 통해 세포소기관, 세포, 조직 또는 유기체내에 도입시킨다. 일렉트로포레이션은 세포 및 DNA의 현탁액의 고-전압 방전에의 노출을 수반한다. 수용자 세포를 기계적 처리에 의해 형질전환에 보다 민감하게 만들 수 있다. 또한, 상기 사용되는 벡터의 양은 상기 사용되는 세포의 성질에 따라 변할 수 있으며, 예를 들어 100만 내지 1000만개의 세포당 약 5 내지 약 20 마이크로그램의 벡터 DNA가 제공될 수 있다.

[0185] 일렉트로포레이션을 사용하는 진핵생물 세포의 형질감염은 매우 성공적이었다. 이러한 방식으로, 마우스 프리(pre)-B 림프구를 인간 카파-면역글로불린 유전자로 형질감염시켰으며(Potter et al., 1984), 래트 간세포를 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 유전자로 형질감염시켰다(Tur-Kaspa et al., 1986).

[0186] · 칼슘 포스페이트

[0187] 본 발명의 다른 실시태양에서, 핵산을 칼슘 포스페이트 침전을 사용하여 세포에 도입시킨다. 인간 KB 세포를 상기 기법을 사용하여 아데노바이러스 5 DNA로 형질감염시켰다. 또한 상기 방식으로, 마우스 L(A9), 마우스 C127, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 및 HeLa 세포를 네오마이신 마커 유전자로 형질감염시켰고, 래트 간세포를 다양한 마커 유전자들로 형질감염시켰다.

[0188] · DEAE-텍스트란

[0189] 또 다른 실시태양에서, 핵산을 DEAE-텍스트란에 이어서 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 세포로 전달한다. 이러한 방식으로, 리포터 플라스미드를 마우스 골수종 및 적백혈병 세포내에 도입시켰다.

[0190] · 음파 로딩

[0191] 본 발명의 추가적인 실시태양은 직접적인 음파 로딩에 의한 핵산의 도입을 포함한다. LTK-섬유아세포를 음파 로딩에 의해 티미딘 키나제 유전자로 형질감염시켰다.

[0192] · 수용체 매개된 형질감염

[0193] 더욱 더, 핵산을 수용체-매개된 전달 비히클을 통해 표적 세포로 전달할 수 있다. 이는 표적 세포에서 발생하게 되는 수용체-매개된 세포이물흡수에 의한 거대분자의 선택성 흡수의 장점을 이용한다. 다양한 수용체의 세포 유형-특이성 분배에 비추어, 이러한 전달 방법은 본 발명에 또 다른 정도의 특이성을 더한다.

[0194] 몇몇 수용체-매개된 유전자 표적화 비히클은 세포 수용체-특이성 리간드 및 핵산-결합체를 포함한다. 다른 것들은 전달되는 핵산이 작동적으로 부착된 세포 수용체-특이성 리간드를 포함한다. 본 발명의 몇몇 태양에서, 리간드는 표적 세포 집단상에서 특이적으로 발현되는 수용체에 상응하도록 선택된다.

[0195] 다른 실시태양에서, 세포-특이성 핵산 표적화 비히클의 핵산 전달 비히클 성분은 리포솜과 함께 특정한 결합 리간드를 포함할 수 있다. 상기 전달되는 핵산(들)은 상기 리포솜내에 수용되며, 상기 특정한 결합 리간드는 상기 리포솜막내에 기능적으로 통합된다. 상기 리포솜은 따라서 표적 세포의 수용체(들)에 특이적으로 결합하고

내용물을 세포로 전달하게 된다. 이러한 시스템은, 예를 들어 상피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF) 수용체의 상향조절을 나타내는 세포로의 핵산의 수용체-매개된 전달에 상기 EGF가 사용되는 시스템을 사용하여 기능성으로 되는 것으로 나타났다.

[0196] 더욱 추가의 실시태양에서, 표적화된 전달 비히클의 핵산 전달 비히클 성분은 리포솜 자체일 수 있으며, 상기 리포솜은 바람직하게는 세포-특이성 결합을 지시하는 하나 이상의 지질 또는 당단백질을 포함하게 된다. 예를 들어, 락토실-세라미드, 갈락토스-말단 아시알글리오시드가 리포솜에 통합되었으며, 간세포에 의한 인슐린 유전자의 흡수에서 증가가 관찰되었다(Nicolau et al., 1987). 본 발명의 조직-특이성 형질전환 구조물을 유사한 방식으로 표적 세포내로 특이적으로 전달할 수 있다.

[0197] · 미세투사 충격

[0198] 미세투사 충격 기법을 사용하여 핵산을 적어도 하나의 세포소기관, 세포, 조직 또는 유기체내로 도입시킬 수 있다. 상기 방법은 DNA-코팅된 미세투사물을 고속으로 가속화하여 상기 투사물이 세포 살해 없이 세포막을 뚫고 상기 세포에 진입할 수 있게 하는 능력에 의존한다. 당해 분야에 공지된 광범위하게 다양한 미세투사 충격 기법이 존재하며, 이들 중 다수를 본 발명에 적용할 수 있다.

[0199] 상기 미세투사 충격에서, 하나 이상의 입자를 적어도 하나의 핵산으로 코팅하고 추진력에 의해 세포내로 전달할 수 있다. 소입자를 가속화시키기 위한 다수의 장치들이 개발되었다. 하나의 이러한 장치는 전류를 생성시키는 고전압 방전에 의존하며, 상기 전류는 차례로 추진력을 제공한다. 사용된 미세투사물은 생물학적으로 불활성인 물질, 예를 들어 텅스텐 또는 금 입자나 비드로 이루어졌다. 예시적인 입자는 텅스텐, 백금, 및 바람직하게는 금으로 구성된 것들을 포함한다. 일부 예에서 금속 입자상의 DNA 침전은 미세투사 충격을 사용하여 DNA를 수용자 세포로 전달하는데 필요하지 않게 된다. 그러나, 입자들은 DNA로 코팅되는 것보다는 DNA를 함유할 수 있다. DNA-코팅된 입자는 입자 충격을 통한 DNA 전달 수준을 증가시킬 수 있지만, 실제로 및 자체가 필요하지는 않다.

[0200] 상기 충격을 위해서, 현탁액 중의 세포를 필터 또는 고체 배양 배지상에 농축시킨다. 대안적으로, 미성숙 배아 또는 다른 표적 세포를 고체 배양 배지상에 배열할 수도 있다. 상기 충돌되는 세포를 상기 미세투사 정지 플레이트 아래에 적합한 거리로 위치시킨다.

[0201] · iPS 세포의 선택

[0202] 본 발명의 몇몇 태양에서, 재프로그래밍 벡터를 체세포내에 도입시킨 후에, 확대를 위해 세포를 배양하게 되며 (형질감염된 세포를 농축시키기 위해 양성 선택 또는 선별성 마커와 같은 벡터 요소의 존재에 대해 임의로 선택된다), 재프로그래밍 벡터는 상기 세포에서 재프로그래밍 인자를 발현하고 세포 분열과 함께 복제 및 분할하게 된다. 이들 발현된 재프로그래밍 인자는 체세포 계능을, 자립 만능성 상태를 확립시키도록 재프로그래밍 되며, 그 동안 또는 벡터 존재의 양성 선택의 제거 후에, 외인성 유전 요소가 점차적으로 상실된다. 이들 유도만능 줄기세포를, 상기 세포가 만능 배아줄기세포와 유사한 특징을 공유할 것으로 예상되기 때문에, 배아줄기세포 특징을 근거로 상기 체세포로부터 유래된 자손 중에서 선택할 수 있다. 추가적인 음성 선택 단계를 또한 사용하여, 재프로그래밍 벡터 DNA의 부재를 시험하거나 또는 선택 마커를 사용함으로써, 외인성 유전 요소가 근본적으로 없는 iPSC 세포의 선택을 가속화하거나 도울 수 있다.

[0203] · 배아줄기세포 특징에 대한 선택

[0204] iPSCs는 하기의 관점들에서 자연적으로-단리된 만능 줄기세포(예를 들어, 마우스 및 인간 배아줄기세포, 각각 mESC 및 hESC)와 유사하며, 따라서 자연적으로-단리된 만능 줄기세포에 대한 iPSCs의 일치성, 진정성 및 만능성을 확인한다. 따라서, 본 발명에 개시된 방법들로부터 생성된 유도만능 줄기세포를 하기의 배아줄기세포 특징 중 하나 이상을 근거로 선택할 수 있었다.

[0205] · 세포 생물학적 성질

[0206] 형태학: iPSCs는 ESC와 형태학적으로 유사하다. 각각의 세포는 둥근 모양, 큰 핵 및 부족한 세포질을 가질 수 있다. iPSCs의 콜로니는 또한 ESC의 콜로니와 유사할 수 있었다. 인간 iPSCs는 hESC와 유사한, 예리한 테두리의 편평하고 콤팩트 콜로니를 형성하며, 마우스 iPSCs는 mESC와 유사한 콜로니를 형성하고, hESC의 경우보다 덜 편평하고 더 응집된 콜로니를 형성한다.

[0207] 생육 성질: 배가 시간 및 유사분열 활성은, 줄기세포가 그의 정의 부분으로서 자기-재생되어야 하므로, ESC의 초석이다. iPSCs는 유사분열 활성이고, 능동적으로 자기-재생되며, 증식성이고, ESC와 동등한 속도로 분열성일

수 있다.

- [0208] 줄기세포 세포외 마커: iPSCs는 ESC상에서 발현된 세포 표면 항원 마커를 발현할 수 있다. 인간 iPSCs는 hESC에 특이적인 마커, 예를 들어 비제한적으로 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E를 발현하였다. 마우스 iPSCs는 mESC와 유사하게, SSEA-1을 발현하였지만, SSEA-3이나 SSEA-4는 발현하지 않았다.
- [0209] 줄기세포 유전자: iPSCs는 Oct-3/4, Sox-2, Nanog, GDF3, REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4, 및 hTERT를 포함한, 미분화된 ESC에서 발현되는 유전자들을 발현할 수 있다.
- [0210] 텔로머라제 활성: 텔로머라제는 약 50 세포 분열의 헤이플릭 분열한계에 의해 제한되지 않는 세포 분열을 지속시킬 필요가 있다. hESC는 자기-재생 및 증식을 지속시키기 위해 높은 텔로머라제 활성을 발현하며, iPSCs도 또한 높은 텔로머라제 활성을 나타내고 상기 텔로머라제 단백질 복합체 중의 필요 성분인 hTERT(인간 텔로머라제 역전사효소)를 발현한다.
- [0211] 만능성: iPSCs는 ESCs와 유사한 방식으로 3배엽으로 분화될 수 있다.
- [0212] 신경 분화: iPSCs는 뉴런으로 분화되어, 베타III-튜불린, 티로신 하이드록실라제, AADC, DAT, ChAT, LMX1B 및 MAP2를 발현할 수 있다. 카테콜아민-결합된 효소의 존재는 iPSCs가 hESC처럼 도파민작동성 뉴런으로 분화될 수 있음을 가리킬 수 있다. 줄기세포-관련된 유전자들은 분화 후 하향조절된다.
- [0213] 심장 분화: iPSCs는 자발적으로 박동하기 시작한 심근세포로 분화될 수 있었다. 심근세포는 TnTc, MEF2C, MYL2A, MYHC베타, 및 NKX2.5를 발현하였다. 줄기세포-관련된 유전자들은 분화 후 하향조절된다.
- [0214] 기형종 형성: 면역결핍 마우스내에 주입된 iPSCs는 일정 시간 후, 예를 들어 9주 후에 자발적으로 기형종을 형성할 수 있다. 기형종은 3개의 배엽, 내배엽, 중배엽 및 외배엽으로부터 유래된 조직을 함유하는 다계통의 종양이며; 상기는 전형적으로 단지 하나의 세포 유형의 것인 다른 종양들과 다르다. 기형종 형성은 만능성에 대한 랜드마크 시험이다.
- [0215] 배양체: 배양물 중의 hESC는 "배양체"라 칭하는 공모양의 배아-유사 구조를 자발적으로 형성하며, 이는 유사분열 활성이고 분화성인 hESC의 코어 및 3개의 배엽 모두로부터 완전히 분화된 세포의 주변부로 이루어진다. iPSCs도 또한 배양체를 형성할 수 있으며 주변부의 분화된 세포를 갖는다.
- [0216] 배반포 주입: hESC는 자연적으로 배반포의 내부 세포 덩어리(배아모체)내에 존재하며, 상기 배아모체에서 배아로 분화하는 반면 배반포의 외피(세포영양막)는 배아의 조직으로 분화한다. 상기 중공 세포영양막은 살아있는 배아를 형성할 수 없으며, 따라서 상기 배아모체내의 배아줄기세포가 분화하여 배아를 형성하는 것이 필요하다. 미세피펫에 의해 세포영양막내에 주입되어 수용 여성으로 이동되는 배반포를 생성시키는 iPSCs는 살아있는 키메라 마우스 새끼: 신체 전체에 걸쳐 10% 내지 90 통합된 iPSCs 유도체 및 키메라화를 갖는 마우스를 생성시킬 수 있다.
- [0217] · 후생적 재프로그래밍
- [0218] 프로모터 탈메틸화: 메틸화는 메틸기의 DNA 염기로의 이동, 전형적으로 메틸기의 CpG 부위(인접한 시토신/구아닌 서열) 중 시토신 분자로의 이동이다. 유전자의 광범위한 메틸화는, 발현 단백질의 활성을 방지하거나 발현을 방해하는 효소를 모집함으로써 발현을 방해한다. 따라서, 유전자의 메틸화는 전사를 방지함으로써 상기 유전자를 유효하게 침묵시킨다. Oct-3/4, Rex1 및 Nanog을 포함한, 만능성-관련 유전자의 프로모터는 iPSC에서 탈메틸화될 수 있으며, 이는 그의 프로모터 활성 및 iPSCs 중 만능성-관련 유전자의 능동적인 촉진 및 발현을 보인다.
- [0219] 히스톤 탈메틸화: 히스톤은 다양한 크로마틴-관련된 변형을 통해 그의 활성을 수행할 수 있는 DNA 서열에 구조적으로 국소화된 압축 단백질이다. Oct-3/4, Sox-2 및 Nanog과 결합된 H3 히스톤은 탈메틸화되어, Oct-3/4, Sox-2 및 Nanog의 발현을 활성화시킬 수 있다.
- [0220] · 무잔기 특징에 대한 선택
- [0221] 본 발명에서 재프로그래밍 벡터, 예를 들어 OriP-기반 플라스미드는 염색체외에서 복제하여 수세대후 숙주 세포에서 그의 존재를 상실하게 된다. 그러나, 외인성 벡터 요소가 근본적으로 없는 자손 세포에 대한 추가적인 선택 단계는 상기 과정을 촉진하게 된다. 예를 들어, 자손 세포의 샘플을 당해 분야에 공지된 바와 같이 추출하여 외인성 벡터 요소의 존재 또는 상실을 시험할 수 있다.

- [0222] 대안적인 또는 보완적인 접근법은 RT-PCR, PCR, FISH(형광 원위치 하이브리드화), 유전자 배열, 또는 하이브리드화(예를 들어, 서던 블롯)와 같은 통상적인 방법을 사용하여, 자손 세포에서 외인성 유전 요소의 부재를 시험하는 것이다.
- [0223] · iPS 세포의 배양
- [0224] 개시된 방법을 사용하여 재프로그래밍화 백터와 함께 체세포를 도입시킨 후에, 이들 세포를 만능성을 유지하기에 충분한 배지에서 배양시킬 수 있다. 본 발명에서 생성된 유도만능 줄기(iPS) 세포의 배양은 영양류 만능 줄기 세포, 보다 구체적으로 배아줄기세포의 배양을 위해 개발된 다양한 배지 및 기법들을 사용할 수 있다.
- [0225] 예를 들어, 인간 배아줄기(human embryonic stem, hES) 세포처럼, iPS 세포를 80% DMEM(길코 #10829-018 또는 #11965-092), 열 불활성화되지 않은 20% 제한된 소 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), 1% 불필수 아미노산, 1 mM L-글루타민, 및 0.1 mM 베타-머캅토에탄올 중에서 유지시킬 수 있다. 대안적으로, ES 세포를 80% 녹아웃 DMEM(길코 #10829-018), 20% 혈청 대체물(길코 #10828-028), 1% 불필수 아미노산, 1 mM L-글루타민 및 0.1 mM 베타-머캅토에탄올로 제조된 무혈청 배지 중에서 유지시킬 수 있다. 사용 직전에, 인간 bFGF를 약 4 ng/ml의 최종 농도로 가한다(WO 99/20741).
- [0226] IPS 세포는 ES 세포처럼 SSEA-1, SSEA-3 및 SSEA-4(디벨로프멘탈 스터디스 하이브리도마 뱅크(Developmental Studies Hybridoma Bank), 국립 아동 건강 및 인간 개발 연구소(National Institute of Child Health and Human Development), 미국 메릴랜드주 베세즈다 소재), 및 TRA-1-60 및 TRA-1-81(Andrews et al., in Robertson E, ed. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. IRL Press, 207-246, 1987)에 대한 항체들을 사용하여, 면역조직화학 또는 유식 세포측정에 의해 식별할 수 있는 특징적인 항원을 갖는다. 배아줄기세포의 만능성을, 대략 0.5 내지 10×10^6 세포를 8 내지 12주 된 수컷 SCID 마우스의 뒷다리 근육에 주입함으로써 확인할 수 있다. 3개 배엽 각각의 적어도 하나의 세포 유형을 나타내는 기형종이 발생한다.
- [0227] 실시예
- [0228] 본 발명을 이제 하기의 실시예들을 참조하여 기재한다. 이들 실시예는 단지 예시적일 뿐이며 본 발명을 결코 이들 실시예로 제한하는 것으로 해석해서는 안 되고, 오히려 본 명세서에 제공된 교시들의 결과로서 자명해지는 모든 변화를 포함하는 것으로 해석해야 한다.
- [0229] 실시예 1
- [0230] 물질 및 방법
- [0231] 프로토콜: 4D 뉴클레오펙터(Nucleofector)를 사용하는 에피솜 플라스미드 및 재프로그래밍화 인헨서 A에 의한 인간 PBMC의 공급자-독립적인 재프로그래밍화
- [0232] 물질:
- [0233] 1. hPBMC(론자(Lonza) Cat. CC-2702, (50×10^6 세포/바이알)
- [0234] 2. 론자 L7 hPSC 배양 배지(상표) 및 보충 키트
- [0235] 3. 론자 L13 hPSC 계대배양 용액(상표)
- [0236] 4. 론자 L7 hPSC 기질(상표)
- [0237] 5. 론자 4D 뉴클레오펙터(상표)
- [0238] 6. 론자P3 1차 세포 4D-뉴클레오펙터(상표) 키트
- [0239] 7. 론자 에피솜 재프로그래밍화 키트(상표)
- [0240] a. 에피솜 재프로그래밍화 플라스미드 믹스(상표)
- [0241] b. 에피솜 인헨서 A(상표)
- [0242] 8. 6- 및 12-웰 조직 배양물 처리된 플레이트
- [0243] 9. PBMC 기본 배지: HPGM(상표): 항생제가 없는 포이에틱스(Poietics)(상표) 조혈 선조세포 생육 배지

- [0244] 10. PBMC 배지 보충제(표 참조)
- [0245] 11. 원심분리기 튜브
- [0246] 12. 1XPBS
- [0247] 13. 드라이 아이스
- [0248] 14. 파라필름(Parafilm)(상표)
- [0249] 15. 저산소 가슴 세포 배양 배양기(3% CO₂; 5% CO₂)
- [0250] 16. 가슴 세포 배양 배양기(20.9% O₂; 5% CO₂)
- [0251] 프라이밍 단계(0 내지 6일) 동안, 세포수의 현저한 감소가 관찰된다. 상기 프로토콜을 10-50 x 10⁶ 출발 세포 수에 대해 최적화한다. 프라이밍이 10 x 10⁶ 세포 미만인 경우, 상기 세포를 추가로 2일 동안 프라이밍, 8일째에 핵전달(nucleofecting)에 대해 고려한다.
- [0252] 보충된 HPGM은 4℃에서 보관시 10일까지 양호하다. 모든 원심분리를 실온에서 수행해야 한다.
- [0253] 절차
- [0254] PBMC 기본 배지 및 매일 필요한 보충물을 갖는 PBMC 배지의 양을 계획하고 추정한다. 필요한 양을 적합한 온도로 가져온다.
- [0255] 제0일: 액체 질소 탱크로부터 hPBMC의 바이알을 제거한다. 잠수용 캡 없이 37℃ 수욕에서 바이알을 지체없이 해동시키기 시작한다. 매우 소량의 얼음이 보이는 경우, 바이알을 수욕으로부터 제거한다. 바이알 외면을 70% 에탄올로 닦는다.
- [0256] 바이알의 내용물을 50 ml 원심분리기 튜브로 옮긴다.
- [0257] 49 ml의 실온 PBMC 기본 배지를 세포에 서서히 적가한다. 다량의 부피를 한 번에 상기 세포에 가하지 않는다. 이는 삼투성 쇼크를 유발할 수 있다.
- [0258] 세포를 200 x g에서 15분 동안 수집한다.
- [0259] 상기 튜브로부터, 세포 펠릿을 건드리지 않고 배지를 제거한다.
- [0260] 상기 세포 펠릿을, 모든 보충물을 함유하는 10 ml PBMC 배지에 서서히 현탁시킨다. 세포를 카운트한다.
- [0261] 세포를 2-4 x 10⁶ 세포/ml로 6-웰 조직 배양물 처리된 플레이트에 시딩한다.
- [0262] 정상 산소 조건(20.9% O₂; 5% CO₂)하에서 37℃ 가슴 배양기에 플레이트를 놓는다.
- [0263] 제3일: 상기 세포를 15 ml 원심분리기 튜브로 옮긴다. 웰을 1 ml 기본 PBMC 배지로 세정한다. 상기 세포를 200 x g에서 5분 동안 수집한다. 상기 튜브로부터, 세포 펠릿을 건드리지 않고 배지를 제거한다.
- [0264] 상기 세포 펠릿을, 모든 보충물을 함유하는 10 ml PBMC 배지에 서서히 현탁시킨다. 세포를 카운트한다.
- [0265] 세포를 0.5-1 x 10⁶ 세포/ml로 6-웰 플레이트에 시딩한다.
- [0266] 정상 산소 조건(20.9% O₂; 5% CO₂)하에서 37℃ 가슴 배양기에 플레이트를 놓는다.
- [0267] 제5일: 삽입 설명서에 따라 제6일을 위해 L7 hPSC 기질(상표)을 갖는 6-웰 플레이트를 준비한다.
- [0268] 제6일: 6-웰 플레이트로부터 기질 용액을 제거한다. 필요한 각 웰에, 모든 보충물을 함유하는 2 ml PBMC 배지를 가한다. 각 웰에 6 μl 에피솜 인헨서 A(상표)를 가한다.
- [0269] 37℃ 저산소 가슴 배양기(3% O₂; 5% CO₂)에서 1시간 동안 예비-평형화시킨다.
- [0270] 배양기로부터 세포를 제거한다. 15 ml 튜브로 옮긴다. 1 ml 기본 PBMC 배지로 웰을 세정한다. 세포를 카운트한다.

- [0271] 1×10^6 세포를 적어도 2개의 15 ml 튜브로 옮긴다.
- [0272] 하나의 튜브는 핵전달되지 않게 되고 계놈 DNA 대조용으로서 준비하게 된다. 상기 대조용은 나중에 상기 iPSC 계통의 정체를 확인하는데 사용될 수 있다(STR 분석).
- [0273] 튜브를 원심분리기로 옮기고 세포를 200 x g에서 5분 동안 수집한다. 대조용 튜브를 상기 핵전달 반응이 완료될 때까지 한쪽으로 치워 놓는다.
- [0274] 각각의 핵전달을 위해서: 100 μ l P3 뉴클레오펙터(상표) 용액을 3 μ g의 에피솜 재프로그래밍화 플라스미드 믹스(상표)를 함유하는 하나의 튜브내로 피펫팅한다.
- [0275] 원심분리기 튜브 중에 수집된 세포로부터 상등액을 제거한다.
- [0276] 각 튜브의 세포를 상기 제조된 핵전달 시약(단계 20)에 현탁시킨다.
- [0277] P3 뉴클레오펙터(상표) 용액에의 세포 노출을 최소화해야 한다. 상기 4D 뉴클레오펙터(상표)를 통해 한 번에 오직 하나의 튜브만을 준비하고 처리한다.
- [0278] 세포를 뉴클레오큐벳(Nucleocuvette)(상표)으로 옮기고 4D 뉴클레오펙터(상표)에 넣는다. 기포 발생을 피하고 프로그램 EO-115를 사용하여 세포를 핵전달한다.
- [0279] 뉴클레오펙션(상표) 키트와 함께 공급된 전용 피펫을 사용하여, 대략 500 μ l의 예온된 PBMC 배지(모든 보충물을 함유한다)를 상기 큐벳에 가하고 세포를 상기 평형화된 6-웰 플레이트 중 하나의 웰에 바로 옮긴다.
- [0280] 세포를 2일 동안 37°C 저산소 가습 배양기(3% O₂; 5% CO₂)에 넣는다.
- [0281] 계놈 DNA 대조용 샘플의 마무리 처리: 배지를 단계 18에서 제쳐놓은 세포를 함유하는 튜브로부터 제거한다. 1 ml 혈청학적 피펫을 사용하여, 세포를 1X PBS에 현탁시키고 1.5 ml 원심분리기 튜브로 옮긴다. 세포를 300 x g에서 5분 동안 원심분리시킨다. 상등액을 조심스럽게 제거한다. 세포 펠릿을 드라이 아이스상에서 급속-동결시키고 샘플을 -80°C에서 보관한다.
- [0282] 제8일: 핵전달된 세포가 있는 각 웰에 보충물을 함유하는 2 ml L7 hPSC 배양 배지(상표)를 가한다.
- [0283] 세포를 2일 동안 37°C 저산소 가습 배양기(3% O₂; 5% CO₂)에 넣는다.
- [0284] 제10일: 배지를, 보충물을 함유하는 2 ml L7 hPSC 배양 배지(상표)로 교체한다.
- [0285] 세포를 2일 동안 37°C 저산소 가습 배양기(3% O₂; 5% CO₂)에 넣는다.
- [0286] 제14일에 출발하여 하루 걸러 배지 교환을 계속한다: 보충물을 함유하는 2 ml L7 hPSC 배양 배지(상표)로 배지를 교체한다. 콜로니가 계대배양하기에 충분히 클 때까지 하루 걸러 배지 교환을 반복한다.

PBMC 배지 보충물(핵전달후 프라이밍 및 회수를 위해 HPGM에 가함)			
성분	판매자	스톡 농도	최종 농도
1-티오글리세롤	시그마 #M6145		200 μ M
폴로-트랜스페린	R&D 시스템즈 #2914-HT	20 mg/ml	100 μ g/ml
덱사메타손	시그마 #D1756	10 mM (10,000X)	1 μ M
SCF	펩프로테크(PeproTech) #300-07	100 μ g/ml (2,000X)	100 ng/ml
EPO	R&D 시스템즈 #287-TC-500	2 U/ μ l (1,000X)	2 U/ml
IL-3	펩프로테크 #200-03	10 μ g/ml	10 ng/ml
IGF-1	펩프로테크 #100-11	40 ng/ μ l	40 ng/ml

- [0287]
- [0288] iPSC 콜로니의 계대배양: L7 hPSC 기질(상표)이 있는 12-웰 플레이트(들)를 준비한다.

- [0289] 보충물을 함유하는 L7 hPSC 배양 배지(상표)를 사용하여 별도의 웰내에 존재하는 초기 콜로니를 수동으로 계대 배양한다(P1).
- [0290] 정상 산소 조건(20.9% O₂; 5% CO₂)하에서 37℃ 가습 배양기에 플레이트를 놓는다.
- [0291] 일단 콜로니를 수동으로 새로운 플레이트로 계대배양하였으면, 인간 iPSC 배양물을 정상 산소 조건(20.9% O₂; 5% CO₂)하에서 37℃ 가습 배양기에서 배양해야 한다(단계 36).
- [0292] P3 및 나중의 계대를 위해서, 삽입 설명서에 따라 L7 hPSC 계대배양 용액(상표)을 사용하여, 확대 동안 콜로니를 계대배양한다.
- [0293] 단계 1, 실험 목표 1: EBNA-1 발현을 조절함으로써 iPSC에서의 벡터 제거 동역학을 측정한다
- [0294] 상기 실험을 위해서 상기 EBNA-1 서열을 기능성 TetOn 벡터로부터의 TRE 프로모터의 하류에 클로닝하여 TetOn-EBNA-1 벡터를 생성시키게 된다. 상기 시스템에서 EBNA-1 발현은 독시사이클린(Dox)의 존재하에서(TetOn 시스템) 활성화하게 된다. 동일한 클로닝 전략을 사용하여, TetOn-eGFP 벡터를 생성시켜 Tet 조절용 대조용 벡터로서 사용하게 된다. 조절된 대 구성적 EBNA-1 발현의 효과를 시험하기 위해서, EBNA-1 발현을 구동하는 CAG 프로모터를 함유하는 벡터를 생성시킨다. 상기 TetOn-EBNA-1 벡터 및 CAG-EBNA-1 벡터를 모두 OriP 영역의 존재 및 부재하에서 시험하게 된다. 최종적으로, 상기 '시험' 벡터는 구성적 eGFP 발현 카세트(SV40 프로모터)를 함유하고 상기 OriP 영역을 함유한다. 상기 '시험' 벡터는 재프로그래밍 인자들을 함유하는 표준 벡터의 모방물이다. 에피솜 벡터 제거에 대한 EBNA-1 조절의 효과를 탐구하기 위해 사용되는 벡터의 목록 및 설명에 대해서는 표 1을 참조한다.
- [0295] 상기 벡터들을 다양한 조합으로 iPSC내로 동시-형질감염시키며, 형질감염된 세포를 15 계대 동안 Dox의 존재 또는 부재하에서 유지하게 된다(형질감염 조건 및 예상되는 효과의 요약에 대해서 표 2를 참조한다). 적용 가능한 경우 GFP 리포터의 발현을 모니터링하게 된다. 세포 펠릿을 모든 세포 계대에서 수집하게 된다. 벡터 제거의 상태를 2 내지 3회 세포 계대시마다 qPCR 벡터 검출 선별 분석을 사용하여 검사하게 된다.

표 1

[0296]

iPSC에서 에피솜 벡터 제거에 대한 EBNA-1 조절의 효과를 탐구하기 위해 사용되는 벡터들의 목록		
벡터		설명
TetOn-eGFP	TetOn 조절된 eGFP (Dox에 의해 활성화된)	TetOn 조절용 대조용 벡터
TetOn-EBNA-1	TetOn 조절된 EBNA-1 (Dox에 의해 활성화된)	조절된 EBNA-1 벡터
CAG-EBNA-1	구성적으로 발현된 EBNA-1	구성적 EBNA-1 벡터
TetOn-EBNA-1 (OriP)	TetOn 조절된 EBNA-1 (Dox에 의해 활성화된)	조절된 EBNA-1 벡터
CAG-EBNA-1 (OriP)	구성적으로 발현된 EBNA-1	구성적 EBNA-1 벡터
SV40-eGFP (OriP)	구성적으로 발현된 eGFP	시험 벡터 - eGFP

표 2

[0297]

벡터 제거에 대한 형질감염 조건 및 예상되는 효과의 요약			
조건	처리	조건 목적	예상되는 효과
SV40-eGFP (OriP)	N/A	형질감염 효율성 대조용, 및 벡터 유지에 대한 음성 대조용	벡터는 일시적이므로, 약 2주 후에 빠른 벡터 제거로 인해 GFP 발현의 빠른 감소가 예상된다.
SV40-eGFP (OriP) : CAG-EBNA-1 (OriP)	N/A	벡터 유지 양성 대조용	EBNA-1 발현의 추가와 함께, 일시적인 벡터가 에피솜 벡터로서 행동하게 된다. >15 계대수에서 느린 벡터 제거로 인해 GFP 발현의 느린 감소가 예상된다.

TetOn-eGFP	+Dox (다중 농도를 시험할 수 있다)	Tet 조절 대조용	GFP의 Dox 의존적인 발현. Dox 존재는 GFP 발현을 유도한다. EBNA-1만큼 빠른 벡터 제거는 존재하지 않는다.
TetOn-eGFP	-Dox	Tet 조절 대조용	Dox의 결여로 인해 eGFP 발현의 유도가 없다. EBNA-1만큼 빠른 벡터 제거는 존재하지 않는다.
SV40-eGFP (OriP) : TetOn-EBNA-1	+Dox (다중 농도를 시험할 수 있다)	EBNA1 발현의 Tet 조절	EBNA-1의 Dox 의존적인 발현 및 상응하는 벡터 제거율(높은 EBNA-1 발현의 경우 >15 계대수).
SV40-eGFP (OriP) : TetOn-EBNA-1	-Dox	EBNA1 발현의 Tet 조절	Dox의 결여로 인해 EBNA-1 발현의 유도가 없다. <7 계대수에서 빠른 벡터 제거
SV40-eGFP (OriP) : TetOn-EBNA-1 (OriP)	+Dox (다중 농도를 시험할 수 있다)	EBNA1 발현의 Tet 조절	EBNA-1의 Dox 의존적인 발현 및 상응하는 벡터 제거율(높은 EBNA-1 발현의 경우 >15 계대수). EBNA-1 벡터상의 OriP 포함은 유지 동역학에 추가의 영향을 줄 수 있다.
SV40-eGFP (OriP) : TetOn-EBNA-1 (OriP)	-Dox	EBNA1 발현의 Tet 조절	Dox의 결여로 인해 EBNA-1 발현의 유도가 없다. <7 계대수에서 빠른 벡터 제거. EBNA-1 벡터상의 OriP 포함은 유지 동역학에 추가의 영향을 줄 수 있다.

[0298] 단계 1, 실험 목표 2: iPSCs에서 벡터 제거 동역학에 대한 자살 유전자 통합의 효과를 시험한다

[0299] 자살 유전자 티미딘 키나제(TK) 서열을 표 1에 기재된 SV40-eGFP(OriP), TetOn-EBNA-1 및 CAG-EBNA-1 벡터내에 클로닝하게 된다(목록에 대해서는 표 3을 참조한다). 상기 SV40-eGFP(OriP) 벡터를 형질감염 효율성 대조용을 제공하는데 사용하게 되며 '시험' 벡터로서 사용하게 된다. 형질감염을 위한 벡터들의 조합을 표 4에 나타낸다. 시험된 EBNA-1 벡터는 처음에는 OriP 영역을 함유하게 되나, 적합한 경우 OriP를 함유하지 않는 변체들도 또한 시험할 수 있다(따라서 표 3에 포함된다).

[0300] TK 벡터와 함께 사용하기 위한 GNC의 최적의 농도를 측정하기 위해서, 표준 실시예 따라 살해 곡선을 작성하게 된다. iPSCs를 SV40-eGFP-TK(OriP)로 형질감염시킨 다음, 형질감염 48시간 후에 다양한 GNC 농도로 처리하게 된다(형질감염 조건 및 예상되는 효과의 요약에 대해서는 표 4를 참조한다). 일단 최적의 GNC 농도가 측정되면, 상기 실험을 EBNA-1 발현 벡터로 반복하여 상기 최적의 GNC 농도에 대한 그의 응답을 확인하게 된다. 셀 티터-글로(Cell Titer-Glo) 발광 세포 생육성 분석(프로메가(Promega))를 사용하여 생육성 세포의 수를 측정하게 된다. 또한, 셀이벤트(CellEvent)(상표) 카스파제-3/7 그린 레디프로프스(Caspase-3/7 Green ReadyProbes) 시약(인비트로젠(Invitrogen))을 사용하여 세포사멸성 세포의 수를 측정하게 된다.

표 3

[0301]

iPSC에서 자살 유전자 활성화에 사용되는 벡터들의 목록	
벡터	설명
SV40-eGFP TK (OriP)	자살 유전자(TK)를 갖는 구성적으로 발현된 eGFP
TetOn-EBNA-1TK	구성적 프로모터로부터 발현된 자살 유전자(TK)를 갖는 조절된 EBNA-1
CAG-EBNA-1TK	자살 유전자(TK)를 갖는 구성적으로 발현된 EBNA-1
TetOn-EBNA-1TK (OriP)	구성적 프로모터로부터 발현된 자살 유전자(TK)를 갖는 OriP를 함유하는 조절된 EBNA-1
CAG-EBNA-1TK (OriP)	자살 유전자(TK)를 갖는 OriP를 함유하는 구성적 EBNA-1

표 4

[0302]

형질감염 조건 및 예상되는 효과의 요약			
조건	처리	조건 목적	예상되는 효과

SV40-eGFPTK (OriP)	-GNC	TK 음성 대조용	자살 유전자(TK) 기질의 결여는 세포사를 생성시키지 않는다
SV40-eGFPTK (OriP) : CAG-EBNA-1 TK (OriP)	-GNC	TK 음성 대조용	자살 유전자(TK) 기질의 결여는 세포사를 생성시키지 않는다
SV40-eGFPTK (OriP)	+0.2 μ M GNC	최적 GNC 농도 확인	TK 기질 결과(GNC)는 세포사의 용량 의존적인 유도를 생성시킨다
SV40-eGFPTK (OriP)	+2 μ M GNC		
SV40-eGFPTK (OriP)	+20 μ M GNC		
SV40-eGFPTK (OriP) : CAG-EBNA-1 TK (OriP)	+0.2 μ M GNC	최적 GNC 농도 확인	TK 기질 결과(GNC)는 세포사의 용량 의존적인 유도를 생성시킨다
SV40-eGFPTK (OriP) : CAG-EBNA-1 TK (OriP)	+2 μ M GNC		
SV40-eGFPTK (OriP) : CAG-EBNA-1 TK (OriP)	+20 μ M GNC		
SV40-eGFPTK (OriP) : TetOn-EBNA-1TK (OriP)	-Dox -GNC	TK 음성 대조용	자살 유전자(TK) 기질의 결여는 세포사를 생성시키지 않는다
SV40-eGFPTK (OriP) : TetOn-EBNA-1TK (OriP)	+Dox -GNC		
SV40-eGFPTK (OriP) : TetOn-EBNA-1TK (OriP)	-Dox 측정된 바와 같은 최적의 GNC 농도와 함께	TK 활성화 양성 대조용	TK 기질 결과(GNC)는 세포사의 용량 의존적인 유도를 생성시킨다 Dox는 백터 유지 동역학에 영향을 줄 수 있으며 따라서 용량 응답에 영향을 줄 수 있다.
SV40-eGFPTK (OriP) : TetOn-EBNA-1TK (OriP)	+Dox 측정된 바와 같은 최적의 GNC 농도와 함께		

[0303] 단계 2, 실험 목표 1: EBNA-1 발현의 조절에 이어서 백터-프리 콜로니 선별을 위한 자살 유전자 활성화에 의해 iPSCs 콜로니 중의 백터 제거를 촉진한다

[0304] 상기 실험을 위해서 재프로그래밍화 백터를, 단계 1 실험에 사용된 SV40-eGFP 대신에, OriPTK 백터내에 Oct4, Sox2, KLF4, cMYC, Lin28, 및 p53DD를 클로닝함으로써 생성하게 된다. 또한, 상술한 TetOn-EBNA-1TK 백터를 EBNA-1 조절 및 자살 유전자 활성화에 사용하게 된다(세포 재프로그래밍화 및 백터 제거 유도에 사용되는 백터의 목록 및 설명에 대해서는 표 5를 참조한다). 세포 재프로그래밍화를 유도하기 위해서, PBMC를 Oct4-TK (OriP), Sox2/KLF4TK (OriP), cMYC/Lin28TK (OriP), mp53DDTK (OriP) 및 TetOn-EBNA-1TK 백터들로 동시-핵전달하게 된다.

[0305] 핵전달된 세포를 P0 플레이트상에 도말하고 재프로그래밍화 프로토콜(상기 재프로그래밍화 프로토콜에 대해서는 별지 A를 참조한다)에 기재된 바와 같이 배양하고 Dox의 존재하에서 배양하여 EBNA-1 발현 및 상기 재프로그래밍화 백터의 유지를 허용하게 된다. P0 플레이트상에 존재하는 콜로니를 별도의 웰에 수동으로 계대배양하고 Dox가 보충된 배양 배지를 공급하게 된다. 각 클론의 P1 콜로니를 또한 1:1 비로 계대배양하고 Dox가 보충된 배양 배지를 공급하게 된다. 각 클론의 P2 콜로니를 또한 1:2 비로 2개의 웰로 계대배양하고 Dox가 보충된 배양 배지를 공급하게 된다. 2개의 웰로부터의 각 클론의 P3 콜로니를 1:2 비로 계대배양하여 4개의 복제 웰을 생성하게 된다. 각각의 iPSC 클론의 2개 웰을 Dox가 보충된 배양 배지에서 유지시키는 반면, 다른 2개는 Dox가 없는 배지에서 배양하게 된다. P4에서, 여전히 상기 백터를 보유하는 콜로니의 세포사를 유도하기 위해서, GNC를 각각의 iPSC 클론의 2개 웰(Dox로 처리된 하나 및 Dox로 처리되지 않은 하나)의 배양 배지에 가하게 된다. 세포사는 Dox와 배양된 모든 콜로니에서 관찰되어야 한다. Dox로 처리되지 않은 웰로부터 생존하는 클론을 추가로 확대하게 된다. P4에서 GNC 처리에 생존한 클론이 없는 경우, 나머지 복제 웰을 P5로 계대배양하게 되며 상기 과정을 백터-프리 클론이 확인될 때까지 반복하게 된다. 상기 확대 과정 동안 세포 펠릿을 수집하고 qPCR 백터 검출 선별 분석을 사용하여 분석하여 백터 제거를 확인하게 된다(iPSC 콜로니 확대 및 분석 과정을 묘사하는 도 1을 참조한다). 상기 재프로그래밍화 과정 및 상기 재프로그래밍화되는 주어진 체세포의 능력에 대한 양성 대조용으로서, 상기 세포를 오키타(Okita) 재프로그래밍화 세트로 핵전달하게 된다(Okita, K. et al. (2013). "An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells." *Stem Cells* 31(3): 458-66).

표 5

[0306]

세포 재프로그래밍 및 벡터 제거의 유도에 이어서 자살 유전자 활성화에 의한 선별에 사용되는 벡터들의 목록	
벡터	설명
Oct4-TK (OriP)	구성적으로 발현된 Oct4, 재프로그래밍 벡터
Sox2/KLF4TK (OriP)	구성적으로 활성화된 Sox2 및 KLF4, 재프로그래밍 벡터
cMYC/Lin28TK (OriP)	구성적으로 활성화된 cMYC 및 Lin28, 재프로그래밍 벡터
mp53DDTK (OriP)	구성적으로 활성화된 p53, 재프로그래밍 벡터
TetOn-EBNA-1TK	TetOn 조절된 EBNA-1 (Dox에 의해 활성화된) 및 구성적으로 발현된 자살 유전자 (TK)
TetOn-EBNA-1TK (OriP)	TetOn 조절된 EBNA-1 (Dox에 의해 활성화된) 및 구성적으로 발현된 자살 유전자 (TK)

[0307]

단계 2, 실험 목표 2: EBNA-1 발현의 조절에 이어서 자살 유전자 활성화에 의한 P0 플레이트에서 벡터 제거의 유도 가능성을 측정한다

[0308]

세포 재프로그래밍은 절대 발현 수준 및 일시적인 면 모두에서 체세포 중의 재프로그래밍 인자의 발현을 조절하는 능력에 의존한다. 현재의 방법들은 상기 두 관점 모두에서 최적이지 않은 것으로 폭넓게 예상된다.

[0309]

벡터 제거를 유도하기 위해 EBNA-1 유도를 제거하는(배지로부터 Dox를 제거함으로써) 타이밍은 잠재적으로 상기 프로그래밍 효율에 부정적 영향을 줄 수 있다. 상기 P0 플레이트로부터 iPSC 콜로니를, 개별적인 콜로니들 대신에 풀로서 채집할 수 있기 위해서, 상기 재프로그래밍 효율에 영향을 주지 않으면서 Dox 회수에 최적인 시점을 측정할 필요가 있다. 상기 실험을 위해서 PBMC를 Oct4-TK (OriP), Sox2/KLF4TK (OriP), cMYC/Lin28TK (OriP), mp53DDTK (OriP) 및 TetOn-EBNA-1TK 벡터들로 동시-핵전달하고, Dox의 존재하에서 재프로그래밍 프로토콜(상기 재프로그래밍 프로토콜에 대해서는 별지 A를 참조한다)에 기재된 바와 같이 배양하여 EBNA-1 발현 및 상기 재프로그래밍 벡터의 유지를 허용하게 된다.

[0310]

Dox는 표 6에 나타난 바와 같이 핵전달 후의 다양한 시점들에서 배양 배지로부터 회수하게 된다. 다양한 실험 조건하에서 iPSC 콜로니의 출현을 위상차 현미경을 사용하여 모니터링하게 된다. 콜로니가 계대배양하기에 충분히 클 때, GNC를 상기 배양 배지에 가하여 TK를 활성화시키고 벡터-프리 콜로니의 생존에 대해 선택하게 된다. 생존하는 콜로니들을 추가로 채집하고 확대하게 된다. 상기 확대 과정 동안 세포 펠릿을 수집하고 qPCR 벡터 검출 선별 분석을 사용하여 분석하여 벡터 제거를 확인하게 된다. 상기 재프로그래밍 과정 및 상기 재프로그래밍화되는 주어진 체세포의 능력에 대한 양성 대조용으로서, 상기 세포를 오키타 재프로그래밍 세트(Okita, Yamakawa et al. 2013)로 핵전달하게 된다.

표 6

[0311]

P0 플레이트상의 실험 조건 및 Dox 제거 스케줄				
	웰 1-2	웰 3-4	웰 5-6	웰 7-8
0-8일	+Dox	+Dox	+Dox	-Dox
8-16일	+Dox	+Dox	-Dox	-Dox
16-24일	+Dox	-Dox	-Dox	-Dox
24-28일	+Dox/+GNC	-Dox/+GNC	-Dox/+GNC	-Dox/+GNC
조건 목적	새로운 재프로그래밍 세트에 대한 시험	재프로그래밍 효율에 대한 Dox 회수 효과 시험	재프로그래밍화에 대한 음성 대조용	

[0312]

지지 데이터: 자살 유전자를 발현하지 않는 hPSC에 대한 자살 유전자 기질의 세포독성 효과

[0313]

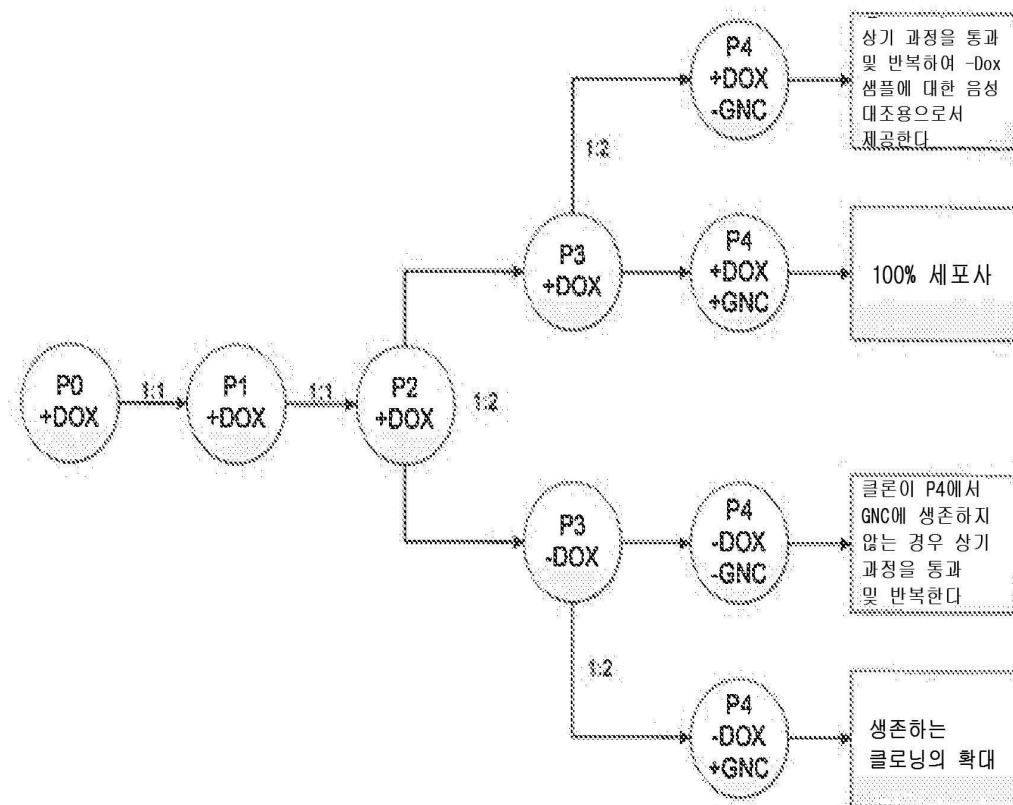
발명자들은 세포 재프로그래밍 동안 또는 상기 재프로그래밍 후에 체세포에서 자살 유전자가 활성화되는 것을 제안하므로, 각각의 자살 유전자를 발현하지 않는 hiPSC에 대한 강시클로비어 및 5-FC의 세포독성 효과를 시험하였다. hiPSC를 0.2, 2 또는 20 μ M의 최종 농도의 강시클로비어의 존재하에서 48시간 동안 배양하고 5-FC를 1, 10 및 100 μ M의 최종 농도로 hiPSC에 가하였다. 48시간 후에 세포를 고정시키고 알칼리성 포스포타제 활성화에 대해 염색하였다. 염색 결과는 hiPSC에 대한 강시클로비어 또는 5-FC의 세포독성 효과를 보이지 않는다. 추가적인 실험은 상기 자살 유전자를 발현하는 hiPSC 중의 강시클로비어 및 5-FC의 필요 수준을 측정하여, 필요한 최소 농도를 측정하게 된다.

[0314] hPSC에 대한 독시사이클린의 긍정적 효과

[0315] EBNA-1 조절을 독시사이클린 유도성 프로모터 시스템의 사용에 의해 잠재적으로 달성할 수 있었다. 최근의 간행물은 독시사이클린이 hPSC 생존 및 자기-재생에 극적인 효과를 발휘하는 것을 보고하였다(Chang, M. Y. et al. "Doxycycline enhances survival and self-renewal of human pluripotent stem cells." *Stem Cell Reports* 3(2):353-64 (2014)). 독시사이클린 효과는 그의 항균 작용과 관련되지 않고, PI3K-AKT 세포내 신호의 직접적인 활성화에 의해 매개된다. 이러한 발견은 독시사이클린이 줄기세포 배양에 유용한 보충제로서 상기 세포의 생육 및 유지를 촉진하며, 따라서 상기의, EBNA-1 발현의 조절에의 사용에 대한 부정적 효과가 예상되지 않음을 암시한다.

도면

도면1



iPSC 콜로니 확대 및 분석 과정