(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0092898
(43) 공개일자 2019년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) *C12N 9/02* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0696 (2013.01)
C12N 9/0071 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0012182
(22) 출원일자 2018년01월31일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김종훈
서울특별시 강북구 삼양로27길 80, 301동 1001호 (미아동, 두산위브트레지움아파트)
이재훈
서울특별시 강동구 올림픽로 664, 102동 420호 (천호동, 대우한강베네시티)
(74) 대리인
이처영, 장제환

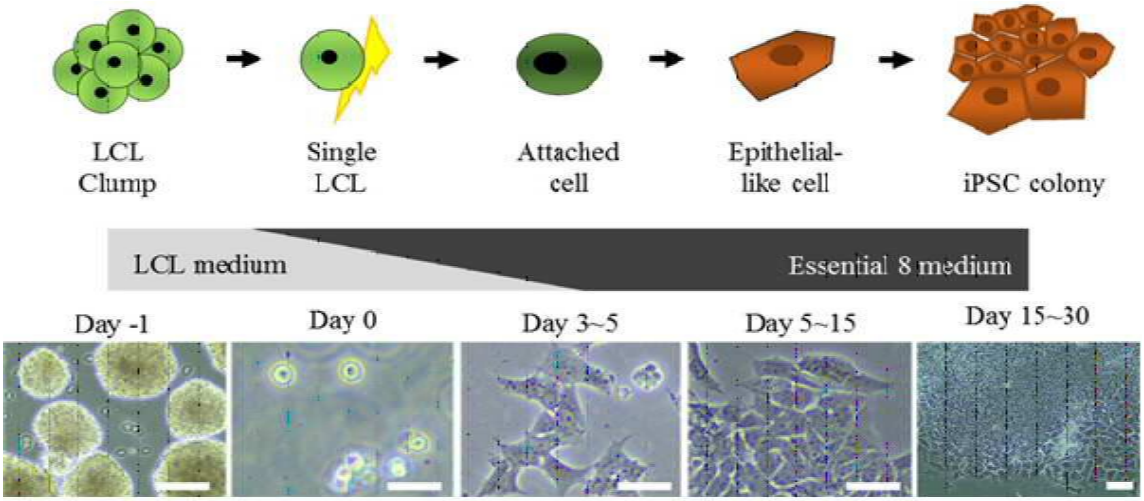
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **한국인 호발성 CYP 유전형을 포함하는 유도만능줄기세포주**

(57) 요 약

본 발명은 한국인 호발성 CYP (Cytochrome P450) 유전형을 포함하는 유도만능줄기세포주에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 한국인 호발성 CYP 유전형을 갖는 림프아구세포주를 이용하여 유도만능줄기세포주를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 한국인 호발성 CYP 유전형을 포함하는 유도만능줄기세포주는 인체 내에서 약물독성 대사를 직접적으로 담당하고 있는 간세포 또는 다양한 세포로 분화가 가능하고, 체외에서 무한증식이 가능하므로 한국인에게 적합한 신약개발, 약물의 대사, 약효 및 부작용 연구에 매우 유용하다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
G01N 33/5073 (2013.01)
C12N 2501/727 (2013.01)
C12N 2506/11 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711055822
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발
연구과제명 줄기세포로부터 생산된 간세포의 품질향상을 통한 상용화 및 줄기세포 분비단백질 MFG-E8의 간조직 재생효능 최적화
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 한국인의 CYP 유전형 분석용 유도만능줄기세포주의 제조방법:

(a) 인간 CYP (Cytochrome P450) 변이 유전형을 포함하는 림프아구세포주에 리프로그래밍 인자를 도입하는 단계; 및

(b) 상기 리프로그래밍 인자가 도입된 림프아구세포주를 배양하여 유도만능줄기세포주로 유도하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 림프아구세포주는 CYP2C19*2/*2, CYP3A5*3C/*3C 및 CYP2D6*10/*10로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 CYP 변이 유전형을 포함하는 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포주의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포주는 CYP2C19*2/*2, CYP3A5*3C/*3C 및 CYP2D6*10/*10로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 CYP 변이 유전형을 포함하는 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포주의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포주는 (i) CYP2C19*2/*2; (ii) CYP3A5*3C/*3C; (iii) CYP2D6*10/*10 및 CYP2C19*2/*2; (iv) CYP2D6*10/*10 및 CYP3A5*3C/*3C; (v) CYP2C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*3C; 또는 (vi) CYP2D6*10/*10, CYP3C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*C;의 CYP 변이 유전형을 포함하는 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포주의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 리프로그래밍 인자는 Oct3/4, shp53, Sox2, Klf4, L-myc, 및 Lin28으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포주의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는 ROCK(Rho-associated kinase) 억제제를 함유하는 림프아구세포주 배양액으로 배양하는 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포주의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 Y-27632인 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포주의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계는 림프아구세포주 배양액과 만능줄기세포주 배양액의 혼합비를 조절하여 배양하

는 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포주의 제조방법.

청구항 9

제1항의 방법으로 제조된 인간 CYP (Cytochrome P450) 변이 유전형을 포함하는 한국인의 CYP 유전형 분석용 유도만능줄기세포주.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포주는 CYP2C19*2/*2, CYP3A5*3C/*3C 및 CYP2D6*10/*10로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 CYP 변이 유전형을 포함하는 것을 특징으로 하는 한국인의 CYP 유전형 분석용 유도만능줄기세포주.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포주는 (i) CYP2C19*2/*2; (ii) CYP3A5*3C/*3C; (iii) CYP2D6*10/*10 및 CYP2C19*2/*2; (iv) CYP2D6*10/*10 및 CYP3A5*3C/*3C; (v) CYP2C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*3C; 또는 (vi) CYP2D6*10/*10, CYP3C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*C;의 CYP 변이 유전형을 포함하는 것을 특징으로 하는 한국인의 CYP 유전형 분석용 유도만능줄기세포주.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 한국인 호발성 CYP (Cytochrome P450) 유전형을 포함하는 유도만능줄기세포주에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 한국인 호발성 CYP 유전형을 갖는 림프아구세포주를 이용하여 유도만능줄기세포주를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 단일염기다형성 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)에 대한 연구는 세계적으로 활발히 진행되고 있으며, SNP에 따른 환자의 표현형과 치료접근의 차이에 대한 관심이 높다. 동일한 약물을 환자에게 투여하여도 환자의 유전형에 따라서 효과가 있거나 없으며, 일부 환자는 약물 이상반응으로 인해 사망하는 등의 부작용이 발생하기도 한다. 미국에서는 매년 10만 명의 환자가 약물유전체 특성 차이로 사망하고 있다. 따라서 약물 치료 효과 및 부작용을 정확히 예측하기 위한 효과적인 연구용 세포주 개발이 필요하다.

[0004] 특히 인체 내에 들어온 약물들의 대사 및 해독을 담당하는 장기인 간에는 Cytochrome P450 효소 (CYP 효소)가 있으며, 이 효소들은 현재 시판되고 있는 약물 대부분의 대사에 참여한다 (Ulrich M Zanger *et al., Pharmacology and Therapeutics*, 138:103-141, 2013). CYP 효소는 유전적다형성 (Genetic polymorphsim)에 따라 효소 기능의 차이가 크게 나타날 수 있으며 (Nada Bozina *et al, Genetic polymorphism of CYP enzymes*, 60:217-242, 2009), 이런 유전적다형성을 유발하는 SNP에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 또한 인종별로 특정 CYP 효소에서 호발성이 높은 SNP가 존재한다는 연구 결과에 따라, 같은 약물이라도 인종에 따라 효과 및 부작용이 다를 수 있다 (C.F.Samer *et al., Drug Metabolism and Toxicology,* 8(3):371-382, 2012). 약물유전체적 특성과 약물투약의 부작용은 Troglitazone (제품명 Rezulin)의 예에서 잘 나타난다. 1997년 레쥴린 (Rezulin)이란 당뇨병치료제는 FDA 승인 약물이었으나, 간과 심장에 큰 손상을 입히는 부작용이 밝혀졌으며 58명의 사망자를 내고 2000년에 시장에서 퇴출되었다 (M. Chojkier, *Hepatology,* 41:237-246, 2005). 또한 타모시펜 (Tamoxifen)의 경우에도, CYP 효소 SNP에 따라 약물효과가 있는 중간대사체 (metabolite) 전환 속도가 느리거나 현저히 낮을 수 있다 (MP Goetz *et al., Clinical Pharmacology and Therapeutics,* 83(1):160-166, 2008).

[0005] 종래기술은 CYP SNP 유전형을 갖는 genomic DNA를 연구하거나, 해당 유전형을 갖는 microsome 등의 대체재를 구

매하여 사용한다 (KR 10-2013-0091514). 특히 관련 유전형을 포함하는 환자 유래 초대배양간세포 (환자의 몸에서 직접 추출한 간세포)를 이용하거나, 특정 유전형을 갖는 환자의 의료연구 케이스를 토대로 발전했다 (Ulrich M Zanger *et al., Pharmacology and Therapeutics*, 138:103-141, 2013; Nada Bozina *et al, Genetic polymorphism of CYP enzymes*, 60:217-242, 2009; C.F.Samer *et al., Molecular Diagnosis and Therapy*, 17:165-18, 2013; Joseph McGraw et al., *Drug Metabolism and Toxicology*, 8(3):371-382, 2012). 그러나 특정 유전형을 갖는 환자를 대상으로 할 경우, 해당 약물이나 케이스에 관한 연구만 가능하며 추가적인 연구에 어려움이 있다. 또한 특정 유전형을 포함하는 환자 유래 초대배양간세포는 획득량에 한계가 있고, 체외에서 증식이 되지 않아 연구의 재현성에 문제가 있으며, 획득한 환자별로 개인차가 크다. 필요할 경우 일부 외국의 기업으로부터 초대배양간세포를 구입하는 경우, 판매하고 있는 간세포가 대부분 다른 인종에서 추출한 간세포로서 한국인 호발성 CYP SNP에 대한 연구에 큰 제한이 따른다.

[0006] 최근 정밀의학 및 개인맞춤형의학이 이슈로 대두 되면서 국내에서도 한국인의 약물유전형 진단을 위한 진단 방법을 개발하고 개선하는 연구가 현저히 증가 추세에 있다. 따라서, 한국인에서 유전형 분석을 위해 표준 유전자의 불멸화세포주로 제작하고 완성된 세포주에서 분리된 genomic DNA를 표준화된 유전물질로 이용하고자 하는 연구 (KR 10-2015-0015748)가 진행되었다.

[0007] 하지만, 한국인의 약물유전형에 따른 실질적인 약물 대사경로, 효능, 부작용을 연구하려면, 인체 내에서 약물·독성 대사를 직접적으로 담당하고 있는 간세포 또는 다양한 세포로 분화가 가능하고, 체외에서 무한증식이 가능한 한국인 호발성 유전형을 갖는 세포주의 제작이 필요하다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 인체의 대부분 세포로 분화가 가능하고, 다양한 약물대사 경로 및 이로 인해 생성되는 중간대사물의 2차 독성까지도 검출할 수 있는 한국인 호발성 유전형을 갖는 세포주를 제작하고자 예의 노력한 결과, 인체자원은행에서 분석된 유전형 정보를 토대로 한국인 호발성 유전형을 갖는 불멸화된 림프아구세포주 (lymphoblastoid cell line)를 선별하여 이 세포를 토대로 한국인 호발성 유전형을 보유한 유도만능줄기세포를 제작할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 한국인에게 적합한 신약개발, 약물의 대사, 약효 및 부작용 연구를 위해 한국인 호발성이며 약물대사와 밀접한 관계가 있는 (i) CYP2C19*2/*2; (ii) CYP3A5*3C/*3C; (iii) CYP2D6*10/*10 및 CYP2C19*2/*2; (iv) CYP2D6*10/*10 및 CYP3A5*3C/*3C; (v) CYP2C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*3C; 또는 (vi) CYP2D6*10/*10, CYP3C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*C;의 CYP 변이 유전형을 갖으면서 다양한 세포로 분화가 가능한 유도만능줄기세포주를 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 유도만능줄기세포주를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 인간 CYP (Cytochrome P450) 변이 유전형을 포함하는 림프아구세포주에 리프로그래밍 인자를 도입하는 단계; 및 (b) 상기 리프로그래밍 인자가 도입된 림프아구세포주를 배양하여 유도만능줄기세포주로 유도하는 단계를 포함하는 한국인의 CYP 유전형 분석용 유도만능줄기세포주의 제조방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 인간 CYP (Cytochrome P450) 변이 유전형을 포함하는 한국인의 CYP 유전형 분석용 유도만능줄기세포주를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 한국인 호발성 CYP 유전형을 포함하는 유도만능줄기세포주는 인체 내에서 약물독성 대사를 직접적으로 담당하고 있는 간세포 또는 다양한 세포로 분화가 가능하고, 체외에서 무한증식이 가능하므로 한국인에게 적합한 신약개발, 약물의 대사, 약효 및 부작용 연구에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 인체자원은행으로부터 분양받은 genomic DNA의 CYP2C19*2/*2 지노타이핑 결과로 적합하지 않은 genomic DNA인 50번, 56번 genomic DNA가 배제된 것이다.

도 2는 인체자원은행으로부터 분양받은 genomic DNA의 CYP2D6*10/*10 지노타이핑 결과로 적합하지 않은 genomic DNA인 8번, 50번, 80번, 103번 genomic DNA가 배제된 것이다.

도 3은 인체자원은행으로부터 분양받은 genomic DNA의 CYP3A5*3C/*3C 지노타이핑 결과로 적합하지 않은 genomic DNA인 50번, 80번, 41~45번, 84번, 86번, 87번 genomic DNA가 배제된 것이다.

도 4는 림프아구세포주로부터 유도만능줄기세포주를 제작하는 것에 대한 도식도 및 세포의 사진이다 (Scale bar: 100㎛).

도 5는 성장주기에 따른 유도만능줄기세포주 제작 효율을 비교한 것이다.

도 6은 제작된 유도만능줄기세포주에서 잔여 플라스미드 DNA가 계대를 거듭하여 결국 제거된 것을 보여준 것이다.

도 7은 제작된 유도만능줄기세포주에서 EBV 유래 잔여물 판별 결과로 EBV 유래 잔여물이 없는 것을 보여준 것이다.

도 8은 제작된 유도만능줄기세포주를 형태학상 분석 (scale bar: 100㎛)한 것으로, 형태학상 줄기세포주 모양을 확인한 것이다.

도 9는 제작된 유도만능줄기세포주의 전분화능을 PCR로 확인한 것이다.

도 10은 제작된 유도만능줄기세포주의 전분화능을 면역형광 염색으로 확인한 것이다 (scale bar: 100㎛).

도 11은 제작된 유도만능줄기세포주의 전분화능을 알칼리 포스파타아제 염색으로 확인한 것이다 (scale bar: 100㎛).

도 12는 자연분화한 유도만능줄기세포주의 유전자 발현을 비교한 것이다 (GAPDH 발현을 기준으로 상대값).

도 13은 자연분화한 유도만능줄기세포주의 형태학적 분석과 면역조직학적 염색을 이용한 자연분화능력을 검증한 것이다 (scale bar: 100㎛).

도 14는 제작된 유도만능줄기세포에서 마이코플라스마 감염 여부를 확인한 것이다.

도 15는 유도만능줄기세포주 i2의 STR 분석 결과이다.

도 16은 유도만능줄기세포주 i3의 STR 분석 결과이다.

도 17은 유도만능줄기세포주 i4의 STR 분석 결과이다.

도 18은 유도만능줄기세포주 i5의 STR 분석 결과이다.

도 19는 유도만능줄기세포주 i6의 STR 분석 결과이다.

도 20은 유도만능줄기세포주 i7의 STR 분석 결과이다.

도 21은 유도만능줄기세포주 i8의 STR 분석 결과이다.

도 22는 유도만능줄기세포주 i10의 STR 분석 결과이다.

도 23은 유도만능줄기세포주의 Sequencing 결과이다.

도 24는 제작된 유도만능줄기세포의 유전형과 예상 효소능력을 나타낸 것이다. 유전형에 따라 정상은 EM(Extensive metabolizer), 감소된 효소능력은 IM(Imtermediate metabolizer), 효소능력이 없는 경우는 PM(Poor metabolizer)로 표현하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술

분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0020] 본 발명에서는 한국인 호발성이며 약물대사와 밀접한 관계가 있는 인간 CYP (Cytochrome P450) 유전형 CYP2D6*10/*10 (rs1065852), CYP2C19*2/*2 (rs4244285), CYP3A5*3C/*3C (rs776746)을 선별하고, 림프아구세포주(lymphoblastoid cell line, LCL)를 이용하여 해당 유전형을 갖으면서 다양한 세포로 분화가 가능한 6종의 유도만능줄기세포주 (i) CYP2C19*2/*2; (ii) CYP3A5*3C/*3C; (iii) CYP2D6*10/*10 및 CYP2C19*2/*2; (iv) CYP2D6*10/*10 및 CYP3A5*3C/*3C; (v) CYP2C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*3C; 및 (vi) CYP2D6*10/*10, CYP3C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*C;를 제작하였다.

[0021] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 (a) 인간 CYP (Cytochrome P450) 변이 유전형을 포함하는 림프아구세포주에 리프로그래밍 인자를 도입하는 단계; 및 (b) 상기 리프로그래밍 인자가 도입된 림프아구세포주를 배양하여 유도만능줄기세포주로 유도하는 단계를 포함하는 한국인의 CYP 유전형 분석용 유도만능줄기세포주의 제조방법에 관한 것이다.

[0022] 만능줄기세포는 생물체 내의 모든 형태의 세포들로 분화하는 능력을 갖는 세포를 의미한다. 유도만능줄기세포는 배아줄기세포처럼 오랜 기간 배양될 수 있고, 다양한 체세포로 분화될 수 있으며, 이 중 약물대사 및 효능·독성 검사에 중요하게 이용되는 신경세포, 간세포, 심장세포 등이 포함된다. 또한 이용한 세포가 유도만능줄기세포가 되는 과정에서 원래 세포가 갖는 유전적 특성이 유지되므로, 이를 이용해 특정 유전형을 갖는 유도만능줄기세포의 제작이 가능하다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 림프아구세포주는 CYP2C19*2/*2, CYP3A5*3C/*3C 및 CYP2D6*10/*10로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 CYP 변이 유전형을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 유도만능줄기세포주는 CYP2C19*2/*2, CYP3A5*3C/*3C 및 CYP2D6*10/*10로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 CYP 변이 유전형을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0025] CYP2D6*10/*10(rs1065852)는 시판 약물의 1/4을 대사하는 CYP2D6의 활성이 현저하게 감소하는 특성을 나타내며, 인종마다 유전적다형성이 다르게 나타난다. CYP2D6*10/*10은 특히 asian에서 많이 나타나며(38.1%~70.0%), african-american(1.0~8.6%)이나 caucasian(1.4~6.1%)로 다른 인종에서는 그 정도가 낮다. 한국인의 경우, 45% 수준의 호발성을 나타내므로 약물대사 및 효능·독성 연구의 중요한 타겟이다.

[0026] CYP2C19*2/*2(rs4244285)는 인종별로 발현비율은 다르나(Caucasian;13.00%, African-american;25.00%, Asian;27.4~45.5%), asian에서 그 비율이 가장 높으며, 한국인의 경우, 28.3% 정도의 호발성을 나타낸다. 마찬가지로 시장 약물 10% 이상의 주요 효소로 기능하므로 중요한 연구 타겟이다.

[0027] CYP3A4/5는 시장에 존재하는 1/3 정도의 약물에 주요하게 대사하며, CYP3A5*3C/*3C(rs776746)은 인종별로 발현율이 높은 편이며(caucasian;8.5%, african-american;19.8%, asian;25~34%), 한국인은 25.5% 정도가 해당 효소의 기능이 없는 것으로 연구되었다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 유도만능줄기세포주는 (i) CYP2C19*2/*2; (ii) CYP3A5*3C/*3C; (iii) CYP2D6*10/*10 및 CYP2C19*2/*2; (iv) CYP2D6*10/*10 및 CYP3A5*3C/*3C; (v) CYP2C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*3C; 또는 (vi) CYP2D6*10/*10, CYP3C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*C;의 CYP 변이 유전형을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 리프로그래밍 인자는 Oct3/4, shp53, Sox2, Klf4, L-myc, 및 Lin28으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 유도만능줄기세포주 제작 방법에는 여러 가지가 있으나, 본래 세포의 유전형을 변동시키지 않고 리프로그래밍 인자 (reprogramming factor)의 발현을 높여 만능줄기세포주로 유도하는 방법이 존재한다. 본 발명에서 사용된 방법은 플라스미드 DNA (plasmid DNA)를 사용하여, 리프로그래밍 인자인 Oct3/4, shp53, Sox2, Klf4, L-myc, Lin28의 발현량을 높여, 림프아구세포주로부터 유도만능줄기세포주를 제작하였다. 플라스미드 DNA는 본래 세포의 염색체와 독립적으로 복제되므로 원래 세포의 유전형에는 영향을 미치지 않는다. 또한 세포가 증식을 반복할수록 사람세포 내에서는 자연스럽게 제거가 되기 때문에 유도만능줄기세포주 제작에 매우 용이한 방법으로 알려져 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 ROCK(Rho-associated kinase) 억제제를 함유하는 림프아구세포주 배양액으

로 배양하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 Y-27632인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 림프아구세포주 배양액과 만능줄기세포주 배양액의 혼합비를 조절하여 배양하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 인간 CYP (Cytochrome P450) 변이 유전형을 포함하는 한국인의 CYP 유전형 분석용 유도만능줄기세포주에 관한 것이다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 유도만능줄기세포주는 CYP2C19*2/*2, CYP3A5*3C/*3C 및 CYP2D6*10/*10로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 CYP 변이 유전형을 포함하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 (i) CYP2C19*2/*2; (ii) CYP3A5*3C/*3C; (iii) CYP2D6*10/*10 및 CYP2C19*2/*2; (iv) CYP2D6*10/*10 및 CYP3A5*3C/*3C; (v) CYP2C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*3C; 또는 (vi) CYP2D6*10/*10, CYP3C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*C;의 CYP 변이 유전형을 포함하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] CYP 유전형은 약물 및 독성대사를 담당하는 간세포의 CYP 효소 기능에 영향을 준다. 약물 대사에 중요하게 작용하는 간에는 CYP 효소가 있는데, 시판된 약물 대사의 대부분에 참여한다. CYP 효소는 유전적다형성 (Genetic polymorphism)에 따라 효소 기능의 차이가 크게 나타날 수 있으며, 이런 유전적다형성을 유발하는 SNP에 대한 연구가 활발히 이뤄지고 있다. 또한 인종별로 특이적으로 높은 CYP 효소 SNP 경향성을 갖는다는 연구결과에 따라, 같은 약물이라도 인종에 따라 효과 및 부작용이 다를 수 있다.

[0038] 신약개발, 기존 약물의 환자 적용 가능여부, 효능 및 부작용 연구에 사용되는 기존 기술은 암세포주, 동물모델, 초대배양세포(primary cell)이 대표적이다.

[0039] 암세포주의 경우, 정상세포가 아닌 암환자 유래 세포로서, 약물기능·독성 연구에는 주로 간암세포주 (HepG2, Huh7 등)가 사용된다. 암세포주는 배양이 쉽고 빠르게 연구에 이용할 수 있으나, 정상세포와 기능적 특성이 상이하여 실제 효과를 반영한다고 보기 어렵다.

[0040] 동물모델은 종간 차이에 의해 동물모델마다 실험결과가 상이하며 항상 인간과 동일한 효과가 나타난다고 보기 어렵다. 또한 최근 연구윤리문제로 실험동물의 숫자를 제한하는 추세로 좋은 모델이라고 보긴 어렵다.

[0041] 초대배양세포는 인간 조직에서 얻은 세포를 얼리거나 바로 배양하여 사용하는 모델로, 약물의 효능·효과를 보기에 가장 적합하나 얻는 대상마다 기능상의 차이가 크며, 적은 공급 때문에 세포를 수급하기 원활하지 않다. 그리고 구입하는 초대배양세포의 경우, 주로 해외수입이며 따라서 인종 간 차이가 큰 약물 대사반응을 보기에 적합하지 않다.

[0042] 따라서 약물·독성 대사에 주요하게 작용하는 CYP 유전형을 반영하되, 동시에 한국인 호발성 CYP SNP를 갖는 세포 모델이 요구된다. 유도만능줄기세포주는 다양한 세포로 분화가 가능하여 단일종류 세포 연구뿐만 아니라, 실험목적에 따라 다양한 세포로 구성된 오가노이드(organoid) 연구에도 이용이 가능하다.

[0043] 본 발명은 한국인 호발성 CYP SNP 중, 대표적인 세 가지를 다양한 조합으로 구성하여 유도만능줄기세포주를 만듦으로써, 신약개발·약물의 효능 및 부작용 연구·약물대사에 관한 연구에 보다 실제적이고 경제적으로 접근할 수 있도록 하였다.

[0045] 림프아구세포주(lymphoblastoid cell line, LCL)는 증식이 제한적인 기본 세포들과 달리 Epstein-Barr virus (EBV)를 통해 무한히 증식할 수 있는 세포로 바뀐 B 임파구성 세포이다. 불멸화 과정이 성공적으로 이뤄져 세포주가 되면, 배양세포는 끊임없이 증식되며 보통은 이 세포에서 많은 양의 genomic DNA를 얻는 것으로 개체별·인종별 유전적 다양성을 분석하고 약물의 효능 및 독성에 대한 약물유전학 연구에 이용된다. 액체질소 등을 이용해 장기적으로 냉동보관 된 다양한 LCL은 유래 세포의 유전적 특성을 유지하고 있기 때문에 특정 세포로 분화할 수 있다면, 원하는 유전형을 갖는 세포를 제작할 수 있다. 만약 환자에게서 얻은 경우라면, 실제의 약물대사 및 효능·독성과 실험적 결과를 비교할 수 있는 중요한 연구시료가 된다.

[0046] 그러나, 개체별·인종별 유전적 다양성은 약물의 효능 및 독성에 있어 차이를 가져온다. 따라서 약물 개발의 초기 단계에서 이와 같은 약제학적으로 중요한 단백질의 유전적 다양성을 고려하는 것은 약물 개발 실패에 대한

위험성을 낮추고, 국민 건강을 향상하는 중요한 요소이다. 약물 개발뿐만 아니라, 수입되는 약물의 경우, 자국민을 중심으로 개발되었으므로 인종마다 약물의 복용량 및 효능·부작용에도 차이가 있으므로 이에 대한 사전분석이 필요하다.

[0047] 그러므로, 본 발명의 한국인 호발성 CYP SNP를 갖는 한국인의 CYP 유전형 분석용 유도만능줄기세포주는 다양한 세포주로 분화유도가 가능하며, 특히 인체 내에서 약물·독성 대사를 직접적으로 담당하고 있는 간세포로의 분화가 가능하므로 LCL세포를 활용할 경우 불가능한 실질적인 약물대사 및 독성 연구에 이용할 수 있다. 또한, 보다 다양한 약물대사 경로 및 이로 인해 생성되는 중간대사물의 2차 독성까지도 검출할 수 있다는 장점이 있다. 즉, 본 발명은 한국인에게 적합한 신약개발·약물의 효능 및 부작용 연구·약물대사에 관한 연구에 보다 실제적이고 경제적으로 접근할 수 있는 동시에 본 발명의 아이디어를 응용하면 개체별·인종별 차이를 대변하는 개개의 CYP SNP-유도만능줄기세포주를 제작할 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서, 유도만능줄기세포주를 제작할 수 있는 세포는 림프아구세포주 (LCL, Lymphoblastoid cell line) 이외에도 섬유아세포 (Fibroblast), 골수유래단핵세포 (Bone marrow mononuclear cells), 외주혈단핵세포 (PBMC, Peripheral blood mononuclear cells) 등이 모두 가능하다.

[0049] 림프아구세포주 (LCL)는 다른 세포주에 비해 획득이 용이하며, 증식이 쉽고, 장기간 보관 가능하다는 장점을 갖고 있어, 다른 세포주보다 산업화/대량연구에 용이하다. 또한, 병원에서 채혈 및 분석이 용이한 샘플은 주로 혈액이며, 국제적으로 다양한 환자 유래 세포주를 저장하고 있는 것은 림프아구세포주이다 (예: 대한민국 인체자원은행, 일본, 미국 및 영국의 세포주은행).

[0050] 하지만 혈액에서 얻을 수 있는 외주혈단핵세포 (PBMC)는 유도만능줄기세포를 만들기 위해서는 4시간 이내로 냉장보관 된 세포여야 효율이 일정 수준 이상이며, 증식하지 않은 단점이 있다. 따라서 PBMC를 무한증식이 가능한 LCL로 EBV 감염을 통해 제작하여 증식 및 보관할 수 있다.

[0051] 섬유아세포의 경우, 피부진피까지 puncture 해야 얻을 수 있으며 세포주가 증식하긴 하나 특정 passage까지만 유도만능줄기세포 제작 효율이 유지되며, 계대배양을 반복하면 세포가 더 이상 증식하지 않거나 유전형이 망가지는 단점이 있다. 골수유래단핵세포도 이런 단점을 보유하고 있다.

[0052] 상기 세포주는 병원을 통해 획득하거나 구입해야 하지만, 유전형 연구를 위해 수집된 LCL을 사용하면 방대하게 수집된 유전적다형성을 유도만능줄기세포주 제작에 이용할 수 있다.

[0053] LCL은 제작 및 저장에 용이하며, 장기간 저장 및 배양에도 문제가 없으나, 이를 위해 PBMC가 LCL로 되는 선행단계가 필요하다. 이에 따라 림프아구세포주를 이용한 유도만능줄기세포주 제작에 예상 가능한 문제를 검토하였다.

[0054] 제작된 LCL과 PBMC는 99.94~99.98% (Affymetrix 6.0 platform 기준), 99.8% (Affymetrix Birdseed algorithm) 유전적 일치성을 보이며, 여기에 genome sequencing을 통하면 신뢰성을 높일 수 있다 (Shirley *et al., Human Mutant* 33(7):1075-1086, 2012). 본 발명에서 제작된 유도만능줄기세포주는 모두 SNP genotyping과 sequencing 마쳤기에 신뢰할 수 있으며, LCL유래 iPSC을 통해 제작된 조현병 모델에서 유전자발현 패턴에 변화가 없었으며, 약물에 대한 유전자 발현도 실제 양상을 반영하는 것으로 확인되었다 (Nakazawa *et al., chizophrenia Research* 181:75-82, 2017). 따라서 질병모델 제작을 위한 세포주로서의 가치를 갖는다.

[0056] 일반적으로 많이 사용하는 섬유아세포주 (Fibroblast)는 LCL에 비해 수획이 어렵고, 특정 유전형 보유 세포주 획득/구입이 어렵지만 LCL은 그 점에서 인체자원은행 등을 통해 훨씬 쉽게 해당 유전형 세포주를 획득할 수 있다. 추가적으로 본 발명에서 사용한 플라스미드를 통한 유도만능줄기세포주 제작 방법은 섬유아세포주 기반으로 연구되었으나, 제작 효율 및 경제성 측면에서 본 발명의 방법이 우월함을 확인하였다 (Generation of human pluripotent stem cells (hiPSCs) from fibroblasts using episomal vectors, Invitrogen. Publication Par Number MAN0007034).

[0057] 제작 효율 측면에서도 섬유아세포주 기반 유도만능줄기세포주 제작방법은 0.001~0.02% 효율을 보이는 반면, 본 발명의 효율은 0.004~0.02% 효율로 기존 섬유아세포주 기반 유도만능줄기세포주 제작방법보다 기복이 적으며 효율 또한 높았다 (표 1).

표 1

[0058]

Cell ID	Total DNA	Sex	Age	Reprogramming efficiency
LCL-#2	7.2μg	Male	47	0.004%
LCL-#3	7.2μg	Male	54	0.002%
LCL-#4	7.2μg	Female	47	0.020%
LCL-#5	7.2μg	Male	50	0.007%
LCL-#6	7.2μg	Female	63	0.018%
LCL-#7	7.2μg	Female	45	0.004%
LCL-#8	7.2μg	Female	48	0.007%
LCL-#10	7.2μg	Male	57	0.004%

[0059] 경제성 측면에서도 본 발명은 섬유아세포주 기반 유도만능줄기세포 제작방법에 비해 우수함을 보였다. 섬유아세포주 기반 유도만능줄기세포주 제작의 권장사항은 N2B27 배양액에 CHALP molecule cocktail을 첨가하도록 권장하며, 약 15일간 해당 배양액을 사용한다 (Generation of human pluripotent stem cells (hiPSCs) from fibroblasts using episomal vectors, Invitrogen. Publication Par Number MAN0007034). 그리고, 이후에 Essential 8 Medium으로 바꿔 배양한다. CHALP molecule cocktail은 CHIR99021(GSK3β inhibitor) 3μM, A-83-01 (TGF-β/Activin/Nodal receptor inhibitor) 0.5μM, hLIF (Human Leukemia Inhibitor Factor) 10ng/mL, HA-100(ROCK inhibitor) 10μM로 구성되며, 사용하기 직전에 섞어줘야 한다. 따라서 노동집약적이며 다양한 물질이 필요한 기존 방법보다 쉽고 보다 간편하게 효율적으로 유도만능줄기세포주를 제작할 수 있다.

[0061] **[실시예]**

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0064] **실시예 1: 한국인의 DNA 시료 확보 및 SNP 분석**

[0065] 한국인 128명의 DNA 시료를 인체자원은행으로부터 분양받아 확보하였다. 사전 IRB (Institutional Review Board) 심의를 거쳐 분양 신청하였으며, 모든 과정에서 생명윤리 규정을 준수하였다. 인종별 유전적다형성 결과는 기존 발표된 연구논문을 참조하여 정리하였으며, 이를 토대로 한국인 호발성 유전형을 선발하였다.

[0066] 분양받은 genomic DNA의 전기영동 결과를 토대로 DNA 농도와 질이 준수한 100여 개의 DNA를 선별하였다. 각 genomic DNA는 10ng/㎕ 농도로 희석하여 각 시료당 10ng씩 DNA 지노타이핑 (Genotyping) 실험에 이용하였다. 분석에는 TaqMan SNP Genotyping Assays (Cat.4362691)을 사용하였으며, CYP2D6*10/*10(rs1065852) 확인을 위해 C_11484460_40 모델이, CYP2C19*2/*2(rs4244285) 확인을 위해 C_25986767_70 모델이, CYP3A5*3C/*3C(rs776746) 확인을 위해 C_26201809_30 모델이 사용되었다.

[0067] 지노타이핑 분석 결과로 한국인 호발성 인간 CYP 유전형을 단일로 보유하거나 i)CYP2C19*2/*2; ii)CYP3A5*3C/*3C; 두 가지만 갖거나 iii)CYP2D6*10/*10 및 CYP2C19*2/*2; iv)CYP2D6*10/*10 및 CYP3A5*3C/*3C; v)CYP2C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*3C; 또는 전부 갖거나 vi)CYP2D6*10/*10, CYP3C19*2/*2 및 CYP3A5*3C/*C;와 모두 정상인 그룹으로 나눴다 (도 1, 2 및 3). 분류 결과를 토대로 인체자원은행에 림프아구세포주를 분양 신청하여 제공받았다.

[0069] **실시예 2: 림프아구세포주 배양**

[0070] 림프아구세포주 배양액은 RPMI 1640 medium (GIBCO)를 기본으로 하여, 20% Fetal bovine serum (Pan biotech), Penicillin/streptomycin (GIBCO), Non-essential amino acid (GIBCO), Glutamax supplement (GIBCO)를 첨가

한 배양액을 사용했다. 림프아구세포주는 T75 flask를 똑바로 세워 10~20ml 림프아구세포주 배양액에 suspension culture 하였으며, 3일에 한 번 배양액을 교체하며 계대배양 하였다. 계대배양은 림프아구세포주가 포함된 배양액 전체는 15ml 튜브에 옮겨 1000rpm에서 5분간 원심분리 하여 세포만 남기고 배양액을 모두 제거한 뒤, 새로운 배양액으로 부유하고 새로운 T75 flask 3개로 나눠 옮겨준 다음 5% 이산화탄소, 37℃ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0072] **실시예 3: 유도만능줄기세포 제작**

[0073] 리프로그래밍에 사용되는 플라스미드 DNA는 총 3종류로 Addgene사 (#277077, #27078, #27080)에서 구입하였으며, 각각 3ug씩 사용할 수 있도록 3차 증류수에 녹여두었다. 전기천공법 (electroporation)을 위해 Thermo 사의 Neon™ Transfection System kit (Cat.MPK10096)을 사용하였다. 유도만능줄기세포 제작 방법의 대략적인 흐름과 세포 모양의 변화는 도 4에 나타냈다.

[0074] 또한 항생제가 포함되지 않는 배양액을 사용해야 유도만능줄기세포 제작의 효율이 증가하지만, 대량생산 및 산업화를 위해서는 오염위험을 줄이기 위해 항생제를 포함하는 것이 안전하다고 판단하였다. 따라서 흔히 쓰이는 항생제를 첨부하여 제작효율 감소 정도를 확인하였으며, 최소 농도를 추정하였다 (표 2). Penicillin/streptomycin (GIBCO. Cat.15140-122), Gentamicin (GIBCO. Cat.15750-060), Amphotericin B (GIBCO. Cat.15290-018), Plasmocure™ (Invivogen. Cat.Ant-PC). Penicillin/streptomycin과 Gentamicin은 박테리아 감염을 막는데 사용되며, Amphotericin B는 효모 및 다세포 진균 오염 예방에 이용되며, plasmocure™는 mycoplasma 오염 예방에 사용된다. 사용가능 농도는 모든 항생제를 모두 혼합하여 처리했을 때, 유도만능줄기세포의 제작효율이 절반 미만으로 떨어지지 않는 농도를 확인한 것이다. 항생제는 림프아구세포주를 배양하는 순간부터 유도만능줄기세포주가 제작되고 난 뒤까지 사용가능했다. 다만 전기천공한 당일과 익일에 항생제가 포함되면 생착효율이 낮은 것으로 확인되어, 전기천공 당일과 익일은 항생제가 포함되지 않는 배양액을 사용하였다.

표 2

[0075]

항생제	추천 농도	사용가능 농도
Penicilin/streptomycin	100 Units/100μg/ml	100 Units/100μg/ml
Gentamicin	0.5~50μg/ml	50μg/ml
Amphotericin B	0.25~2.50μg/ml	0.25μg/ml
Plasmocure	50μg/ml	50μg/ml

[0076] 유도만능줄기세포주 제작의 구체적인 방법을 다음과 같다.

[0077] 림프아구세포주는 유도만능줄기세포 제작 2일 (40~56시간) 전에, 계대배양을 하여 활발히 증식하는 상태가 되도록 유도하였다. 림프아구세포주 세포성장주기를 지수증식기 (Log phase)로 설정하기 위함이며, 시기를 늦춰 정상기 (stationary phase)에 유도만능줄기세포를 제작하면 효율이 절반 이하로 감소함을 확인하였다 (도 5). 제작 1일 전에 Y-27632 (Tocris) 10nM가 포함된 림프아구세포주 배양액 (RPMI1640, 20% inactivated fetal bovine serum, Penicillin/streptomycin, Non-essential amino acid, Glutamax supplement)에 배양하여 유도만능줄기세포 제작 과정 중의 세포사멸을 최소화할 수 있었다.

[0078] 15ml 튜브에 배양액 전체를 옮겨 1000rpm에서 5분간 원심분리 하고 원심분리 된 세포만 남기고 배양액을 모두 제거한 뒤, 림프아구세포주 배양액으로 부유하였다. 부유된 세포의 수를 측정하여 15ml 튜브에 백만 개의 살아있는 세포가 되도록 배양액을 덜어낸 다음, 이 또한 원심분리하여 세포 펠렛만 남도록 상등액을 제거하였다.

[0079] Matrigel (Corning, Cat.354277)을 1/1000로 DMEM/F12 (GIBCO) 배양액에 희석하여 6-well plate에 1ml씩 균등하게 넣어 상온에서 1시간 동안 코팅하였다. 코팅이 끝나면 용액을 제거하고 Y-27632 (Tocris) 10nM이 포함된 림프아구세포주 배양액을 2ml 넣어, 전기천공한 세포를 최대한 빠르게 안정화된 배양환경으로 옮겨주기 위하여 미리 이산화탄소 인큐베이터에 넣어두었다.

[0080] 1.5ml 튜브에 3종류의 플라스미드 DNA (pCXLE-hOct3/4-shp53, pCXLE-hUL, pCXLE-hSK)가 각각 3ug이 되도록 넣어 섞어두었다. 이 때, 전체 볼륨이 10ul을 넘지 않도록 한다.

[0081] Neon™ Transfection System kit에 포함된 R buffer. 100ul로 원심분리하여 둔 림프아구세포주를 부유하고, 부유된 용액은 섞어둔 플라스미드 DNA와 조심스레 충분히 섞어준다. Electroporator (NanoEnTek. Cat.MP-100)에 E buffer, 3ml을 충전하고 조건을 1600V, 10ms, 3 pulses로 설정하였다.

[0082] Neon™ Transfection System kit에 포함된 Nano tip으로 플라스미드 DNA와 세포가 섞인 용액을 100ul 따내어, electroporator에서 전기천공 하였다. 이 때, 용액 내에 기포가 없도록 해야 실험 성공률이 높다. 전기청공된 세포를 이산화탄소 인큐베이터에 넣어둔 6-well plate에 천천히 넣어주고 16시간 이상 배양하였다.

[0083] 리프로그래밍 인자가 들어간 림프아구세포주는 시간이 지날수록 부유세포가 아니라 well 바닥에 붙어 점차 넓적해지고 모양이 바뀌게 된다. 이를 유도하기 위해 만능줄기세포 배양액 mTeSR1 medium (StemCell Tech) 또는 Essential 8 medium (Thermo)을 림프아구세포주 배양액과 섞어 쓸 수 있다. 확인 결과 둘 사이의 효율 차이는 크지 않지만, 처음 사용했던 만능줄기세포배양액을 지속해서 사용하는 편이 더 좋다.

[0084] 전기청공 이튿날 세포를 전부 15ml 튜브에 덜어 1000rpm, 5분, 원심분리하였다. 단, well 바닥에 붙은 세포나 잔류세포가 있을 수 있으므로 바로 6-well plate에 Y-27632 10nM가 첨가된 림프아구세포주 배양액과 만능줄기세포 배양액을 8:2로 섞어 2ml 가량 넣어주었다. 원심분리가 끝나면 상등액을 제거하고 pellet을 블루팁을 이용해 따뜻한 혼합배양액으로 부드럽게 풀어주었다. 이를 6-well plate에 방울방울 떨어뜨려 넣은 뒤, 고르게 퍼지도록 흔들어 넣고 배양하여, 48시간 후 위의 과정을 반복하되, 만능줄기세포 배양액 비율이 1:1이 되도록 바꿔주었다. 48시간 후에는 만능줄기세포 배양액 비율이 75%가 되도록 바꿔주며 배양액 용량을 3ml로 늘려주었다. 48시간이 더 지난 후에는 만능줄기세포 배양액으로만 배양하며, 이때부터는 Y-27632를 첨가하지 않는다. 일반적으로 1~10일 사이에 well 바닥에 붙은 세포가 나타나는데, 이 과정에서 well 바닥에 붙은 세포의 수가 더 이상 늘어나지 않으면, 부유한 세포를 모두 제거하고 만능줄기세포 배양액을 2ml씩 매일 바꿔주며 배양하였다. 10일 이후에도 붙은 세포가 늘어나지 않아도 부유한 세포를 모두 제거하는 편이 오히려 제작효율이 좋으며, 약 20일까지 매일 만능줄기세포 배양액으로 바꿔준다. 30일 이후에도 well 가운데와 가장자리 부분에 붙은 세포가 확인되지 않으면 다시 제작하였다.

[0085] Well 바닥에 붙은 세포 (attached cell)가 점차 모여 세포군체 (cell colony)를 형성하기 시작하면, 배양액의 양을 늘리고 유도만능줄기세포 선별을 위한 단계로 넘어간다.

[0087] **실시예 4: 유도만능줄기세포 선별**

[0088] 세포군체 (Cell colony)는 모양이 각기 다를 수 있으며, 선별을 위한 크기에 도달하는 시기도 제각각이다. 따라서 세포군체 중 하나라도 특정 크기 (300~400개의 세포가 군체를 이루면)에 도달하면, 12-well plate에 Matrigel (Corning, Cat.354277)을 1/1000로 DMEM/F12 (GIBCO) 배양액에 희석하여 500ul 도포하였다. 상온에서 1시간 코팅한 후 도포액을 제거하고, Y-27632 (Tocris) 10nM이 포함된 만능줄기세포 배양액을 1ml 넣은 뒤, 이산화탄소 인큐베이터에 넣어둔다.

[0089] 선별한 군체를 떼어내는데는 멸균된 블루팁 (blue tip)과 화이트팁 (white tip)을 이용하였다. 우선 블루팁 끝에 화이트팁을 꽂은 뒤, 화이트팁 끝으로 군체를 십자모양으로 사등분 한다. 사등분된 군체는 블루팁 끝으로 조심스레 떼어내어 12-well plate로 옮겨 주었다. 24시간 뒤 선별된 유도만능줄기세포가 제대로 자라는지 확인하여, 문제가 없다면 매일 새로운 만능줄기세포 배양액으로 교체하고, 군체가 또 다시 충분히 커지면 6-well plate로 계대배양 하였다. 계대배양 방법은 상기의 방법과 동일하다.

[0091] **실시예 5: 제작된 유도만능줄기세포주의 잔여 플라스미드 DNA 판별**

[0092] 계대배양을 반복하여 세포주의 passage가 10~15 이상 되면, 전기청공법으로 주입한 플라스미드 DNA가 세포분열로 인해 자연스럽게 제거된 형태가 될 확률이 높다. 따라서 이를 판별하기 위해 DNA를 추출하였다. GeneAll Exgene™ Tissue SV (GeneAll)를 이용해 DNA를 추출하였으며, 추출된 DNA는 10ng/ul로 희석하여 준비하였다.

[0093] 주입한 플라스미드 DNA 3종을 확인하기 위해, 플라스미드 DNA 특이적으로 중합효소연쇄반응 (PCR, polymerase

chain reaction)을 일으켜 신호증폭이 일어나는지 확인하였다. 양성대조군 (positive control)으로 플라스미드 DNA 3종을 각각 1ng씩 사용하여 PCR을 하였다. 양성대조군과 비교하는 DNA도 1ng씩 사용하여 PCR을 진행하며, PCR 결과는 전기영동을 통해 확인하였다 (표 3).

[0094] 확인 결과, 초기 유도만능줄기세포주는 플라스미드 DNA가 남아있으나, passage 15 이상된 유도만능줄기세포주는 플라스미드 DNA가 자연스럽게 제거된 것을 알 수 있었다 (도 6).

표 3

[0095] 잔여 플라스미드 DNA 판별을 위한 프라이머(primer) 정보

서열번호	명칭	프라이머 서열
1	*pCXLE-Oct3/4-primer* (F)	5’-CATTCAAACTGAGGTAAGGG-3’
2	*pCXLE-Oct3/4-primer* (R)	5’-TAGCGTAAAAGGAGCAACATAG-3’
3	*pCXLE-Lin28-primer* (F)	5’-AGCCATATGGTAGCCTCATGTCCGC-3’
4	*pCXLE-Lin28-primer* (R)	5’-TAGCGTAAAAGGAGCAACATAG-3’
5	*pCXLE-Sox2-primer* (F)	5’-TTCACATGTCCCAGCACTACCAGA-3’
6	*pCXLE-Sox2-primer* (R)	5’-TTTGTTTGACAGGAGCGACAAT-3’

[0097] **실시예 6: 제작된 유도만능줄기세포주의 EBV 유래 잔여물 판별**

[0098] 유도만능줄기세포주 제작에 이용된 림프아구세포주는 EBV 감염으로 불멸화된 B 림프아구성 세포이므로, EBV 감염과 관련된 유래 잔여물이 남아있는지 검토해야 한다. EBV의 주요 유전자인 *EBNA-1, EBNA-2, LMP-2A, BZLF-1* 발현을 PCR을 통해 확인하였다.

[0099] 구체적으로 다음과 같다. 유도만능줄기세포의 세포를 수획하여 1.5ml 튜브에 Trizol 1ml와 함께 넣고 voltexing 하였다. 이를 15분 동안 얼음에 박아둔 뒤, 20% volume의 클로로포름 (chloroform)을 첨가한 뒤, 잘 흔들어 섞었다. 얼음에 20분 박아둔 뒤, 4℃로 냉각된 원심분리기를 이용하여 13000rpm, 15분 동안 원심분리 하였다. 분리된 층에서 투명한 부분만 새로운 1.5ml 튜브로 옮긴 다음, 동량의 isopropanol을 넣어 살짝 흔들어준 뒤, 얼음에 20분 박아둔다. 4℃로 냉각된 원심분리기를 이용하여 13000rpm, 15분 동안 원심분리하면 1.5ml 튜브 밑바닥에 분리된 RNA 펠렛이 모이게 된다. 상등액을 제거하고 75% 에탄올을 1ml 조심스럽게 넣은 뒤, 다시 동일한 조건에서 원심분리 하였다. 에탄올을 완전히 제거하고 얼음 위에서 말려주면 1.5ml 튜브 밑바닥에서 하얀 RNA 펠렛을 관찰할 수 있다. 여기에 nuclearase-free water 20ul를 넣어 녹인 뒤, 농도를 측정하였다.

[0100] 분리한 RNA 1ug을 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA는 oligo dT, dNTP, reverse transcriptase (Thermo), RNAse inhibitor (Fermentas)와 RNA 1ug을 넣은 PCR 튜브를 42℃ 1시간, 72℃ 20분 반응하여 제작하였다. 제작된 cDNA 1ul를 *EBNA-1, EBNA-2, LMP-2A, BZLF-1* 프라이머와 각각 PCR하여 얻은 product를 전기영동하였다. 이때, 양성대조군으로는 유도만능줄기세포주를 제작할 때, 사용했던 림프아구세포주의 cDNA를 사용하였다 (표 4).

[0101] 그 결과, 유도만능줄기세포 제작에 사용되었던 림프아구세포주에서는 EBV 관련 유전자 발현이 나타나지만, 제작된 유도만능줄기세포주에서는 전혀 없는 것을 확인할 수 있었다 (도 7).

표 4

[0102] EBV 유래 잔여물 판별을 위한 프라이머(primer) 정보

서열번호	명칭	프라이머 서열
7	*EBNA-1* (F)	5‘-CCAGCAAGAAGAGGAGGTGG-3’
8	*EBNA-1* (R)	5‘-TGGTGTGATGTCGTGTGGAG-3’
9	*EBNA-2* (F)	5‘-CATAGAAGAAGAAGAGGATGAAGA-3’
10	*EBNA-2* (R)	5‘-GTAGGGATTCGAGGGAATTACTGA-3’
11	*LMP-2A* (F)	5‘-AGGAACGTGAATCTAATGAAGA-3’
12	*LMP-2A* (R)	5‘-AAGTGACAACCGCAGTAAGCA-3’
13	*BZLF-1* (F)	5‘-CACGGTAGTGCTGCAGTTGC-3’
14	*BZLF-1* (R)	5‘-CCCAGAATCAACAGACTAACCAAGCCG-3’

[0104] **실시예 7: 제작된 유도만능줄기세포주의 형태학상 (morphological) 분석**

[0105] 인간유래 유도만능줄기세포주는 형태학상 (morphological)으로 인간배아줄기세포주와 매우 유사하다. 세포의 모양이 둥글고 큰 핵과 인을 갖으며, 세포군체의 모양도 유사하다. 배양된 유도만능줄기세포주는 계대배양 전에 도립현미경 (Eclipse TS100 model, Nikon)을 이용해 관측했으며, 이미징은 i-solution IMTcam3 (IMT i-solution Inc)을 이용하여 얻었다 (도 8).

[0107] **실시예 8: PCR을 이용한 제작된 유도만능줄기세포주의 전분화능 (pluripotency) 검증**

[0108] 유도만능줄기세포주가 전분화능 마커로 알려진 *OCT4*, *NANOG* 유전자 발현이 활발한지 확인하기 위하여 실시예 6의 방법으로 cDNA를 제작하였다. cDNA 1ul와 *OCT4*, *NANOG* 프라이머를 각각 넣은 PCR 튜브를 PCR하여 얻은 product를 전기영동 하였다. 이 때, 유전자 발현 정도를 비교하기 위해 *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 발현을 하우스키핑 유전자 (housekeeping gene)으로 설정하여 비교하였다 (표 5). 제작된 유도만능줄기세포주의 전분화능 유전자 발현을 확인하였다 (도 9).

표 5

[0109] 분화능 검증을 위한 프라이머(primer) 정보

서열번호	명칭	프라이머 서열
15	*OCT4* (F)	5'-CGTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG-3'
16	*OCT4* (R)	5'-AAGGGCCGCAGCTTACACATGTTC-3'
17	*NANOG* (F)	5'-CCAAAGGCAAACAACCCACT-3'
18	*NANOG* (R)	5'-TGAATTGTTCCAGGTCTGGTTG-3'
19	*GAPDH* (F)	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
20	*GAPDH* (R)	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

[0111] **실시예 9: 면역조직화학적 염색을 이용한 제작된 유도만능줄기세포주의 전분화능(pluripotency) 검증**

[0112] 유도만능줄기세포주가 전분화능을 가졌다면, 전분화능을 나타내는 단백질 마커로 알려진 Oct4와 SSEA-4가 면역형광 염색 (immunofluorescent staining)방법을 통해 나타날 것이다.

[0113] 우선 배양된 세포를 4% 파라포름알데히드 (paraformalehyde)로 20분 간 상온에서 고정 (fixation)하였다. 이후 고정된 세포를 PBS (phosphate buffer saline)로 5분간 3번 수세한다. 단, SSEA-4는 세포막 (cell membrane)에서 관측될 것이므로 세부염색 방법에서 차이가 있다. 블로킹 (blocking) 과정에서 SSEA-4는 10% donkey serum만 들어간 PBS를 사용하였다. Oct4와 나머지 일차항체의 경우, 0.3% triton X-100, 10% donkey serum이 들어간 PBS를 사용하였다. 블로킹은 상온에서 45분간 진행하였다. 이후 일차항체(primary antibody)와 이차항체(secondary antibody)는 표 6에 나타난 것과 같이 처리하였다. 일차항체는 4℃ 저온에서 12시간 이상 처리하였으며, 이차항체는 상온에서 90분간 처리하였다. 일차항체 염색 후에는 PBS로 5분간 3번 수세한 뒤, 이차항체를 처리하였다. 세포핵을 염색하기 위해 DAPI (4 ‘, 6-diamidino-2-phenylindol)를 상온에서 10분간 처리하였다. 면역형광 염색이 끝난 세포는 형광현미경 (Axiovert 200M fluorescence microscope, Zewiss)을 사용하여 이미징 하였다. 제작된 유도만능줄기세포주에서 Oct4와 SSEA-4 단백질을 확인하였다 (도 10).

표 6

[0114] 일차항체와 이차항체 정보

항체 이름	카탈로그 (회사명)	항체 이름	카탈로그 (회사명)
OCT4	SC-9081 (Santa cruz)	SOX1	AF3369 (R&D)
SSEA-4	MAB4304 (Millipore)	TUJ1	PRB-435P (COVANCE)
NESTIN	MAB1259 (R&D)	ALB	A3293 (Sigma Aldrich)

FOXA2	07-633 (Millipore)	Donkey anti mouse 488	A21202 (Invitrogen)
BRY	AF2085 (R&D)	Donkey anti goat 488	A11055 (Invitrogen)
SOX17	AF1924 (R&D)	Donkey anti rabbit 488	A21206 (Invitrogen)
MIXL1	SC-98664 (Santa Cruz)	Donkey anti mouse 594	A21203 (Invitrogen)
AFP	A8452 (Sigma Aldrich)	Donkey anti goat 594	A11058 (Invitrogen)
MAP2	M9942 (Sigma Aldrich)	Donkey anti rabbit 594	A21207 (Invitrogen)

[0116] **실시예 10: 제작된 유도만능줄기세포주의 알칼리 포스파타아제(Alkaline phosphatase) 염색**

[0117] 배양된 세포를 차가운 80% 에탄올로 1분간 고정한 뒤, PBS로 2번 수세한다. 알칼리 포스파타아제 염색을 위해 시판되는 Vector® Blue Alkaline Phosphatase Substrate (Cat. SK-5300, Vector laboratories)을 사용하였다. 구체적으로 100mM Tris-HCl, ph 8.2-8.5 buffer를 5ml 준비하고 제품에 포함된 Reagent 1, 2, 3를 차례로 두 방울씩 넣어준다. 잘 섞어준 혼합액을 세포에 넣고, 상온, 암실에서 30분간 처리한다. 2번 PBS로 수세한 뒤, 1ml의 PBS를 넣고 도립현미경 (Eclipse TS100 model, Nikon)을 이용해 관측했으며, 이미징은 i-solution IMTcam3 (IMT i-solution Inc)을 이용하여 얻었다. 제작된 유도만능줄기세포주에서 전분화능 마커인 알칼리 포스파타아제가 존재함을 확인하였다 (도 11).

[0119] **실시예 11: 유도만능줄기세포주의 자연분화 유도**

[0120] 유도만능줄기세포주가 외배엽성, 중배엽성, 내배엽성 세포로 분화 가능함을 증명하기 위해 세포를 자연분화(spontaneous differentiation)하도록 유도하였다. 자연분화란 만능줄기세포 배양액에 포함된 요소가 없이 배양되어, 자연스럽게 다양한 세포로 분화되도록 배양하는 것을 의미한다. 이를 통해 세포의 분화능력을 검증할 수 있다.

[0121] 자연분화 방법은 다음과 같다. DMEM/F12 (Dulbecco ‘s Modified Eagle Medium/Factor 12, GIBCO)에 10% Fetal bovine serum (Pan biotech), Penicillin/streptomycin (GIBCO)를 첨가한 자연분화 배양액을 사용하였다. 계대배양을 해야 할 정도로 자란 유도만능줄기세포주에 collagenase type IV를 1mg/mL로 처리하고 이산화탄소 인큐베이터에 둔다. 세포군체가 조각나지 않도록 주의하여, 블루팁으로 배양액을 뿌려주며 떼어낸다. 이를 5ml 파이펫 (pipette)으로 조심스럽게 모아 15ml tube로 옮겨준 뒤, 1000rpm, 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거하고 자연분화 배양액을 넣어 부유하였다. 아무런 처리되지 않은 petri dish에 세포 덩어리가 부유할 정도로 충분한 양의 자연분화 배양액을 넣어주고 세포를 옮겨주었다. 격일로 배양액의 절반만 덜어내고 새로운 자연분화 배양액을 넣어주고, 이 때 부유한 세포 덩어리의 손실을 최소로 하였다. 이렇게 세포 덩어리를 배양하면 EB (embryoid body)가 형성된다. PCR 검증을 위해서는 8일간 부유배양한 EB를 수획하여 이용하였다. 면역조직화학적 염색을 위해서는 8일간 부유배양한 EB를 gelatin-coated 12-well plate로 옮겨 배양하였다. EB는 well 바닥에 붙어 자라게 되며, 격일로 자연분화 배양액을 교체하며 배양하였다. 추가로 8일이 지나면 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

[0123] **실시예 12: PCR을 이용한 유도만능줄기세포주의 자연분화 능력 검증**

[0124] 실시예 11의 8일차 EB에서 cDNA를 합성하여 PCR 검증에 이용하였다. 사용한 프라이머는 외배엽성 마커로 알려진 *NESTIN*, *MAP2*, *TUJ1*, 중배엽성 마커로 알려진 *MIXL1*, *FOXA2*, *Brachyury (BRY)*, 내배엽성 마커로 알려진 *HNF4α*, *AFP*를 사용하였다. 이 때, 유전자 발현 정도를 비교하기 위해 *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 발현을 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)로 설정하여 비교하였다 (표 7 및 도 12).

표 7

[0125] 자연분화 능력 검증을 위한 프라이머(primer) 정보

서열번호	명칭	프라이머 서열
21	*NESTIN* (F)	5’-GCCCTGACCACTCCAGTTTA-3’
22	*NESTIN* (R)	5’-GGAGTCCTGGATTTCCTTCC-3’
23	*MAP2* (F)	5’-AATAGACCTAAGCCATGTGACATCC-3’

24	*MAP2* (R)	5’-AGAACCAACTTTAGCTTGGGCC-3’
25	*TUJ1* (F)	5’-CATGGACAGTGTCCGCTCAG-3’
26	*TUJ1* (R)	5’-CAGGCAGTCGCAGTTTCCAC-3’
27	*MIXL1* (F)	5’-GGTACCCCGACATCCACTT-3’
28	*MIXL1* (R)	5’-TGAGTCCAGCTTTGAACCAA-3’
29	*FOXA2* (F)	5’-TTCTCCATCAACAACCTCATGTCC-3’
30	*FOXA2* (R)	5’-GTAGTGCATCACCTGTTCGTAGG-3’
31	Brachyury (*BRY*) (F)	5’-AGCCACTGCTTCCCTGAGAC-3’
32	Brachyury (*BRY*) (R)	5’-AGGCTGGGGTACTGACTGGA-3’
33	*HNF4α* (F)	5’-TCTCATGTTGAAGCCACTGC-3’
34	*HNF4α* (R)	5’-GGTTTGTTTTCTCGGGTTGA-3’
35	*AFP* (F)	5’-TGAAAACCCTCTTGAATGCC-3’
36	*AFP* (R)	5’-TCTTGCTTCATCGTTTGCAG-3’
37	*GAPDH* (F)	5’-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3’
38	*GAPDH* (R)	5’-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3’

[0127] **실시예 13: 유도만능줄기세포주의 형태학성 분석과 면역형광 염색을 이용한 자연분화 능력 검증**

[0128] 실시예 11의 방법으로 16일 동안 자연분화한 유도만능줄기세포는 외배엽성, 중배엽성, 내배엽성 마커로 염색하여 다양한 세포로 분화되었는지 확인하였다. 동시에 형태학성 분석을 통해 다양한 세포로 분화되었는지 검증하였다.

[0129] 형태학적 분석은 면역형광 염색 직전의 샘플을 이용했으며, 도립현미경(Eclipse TS100 model, Nikon)을 이용해 관측했으며, 이미징은 i-solution IMTcam3 (IMT i-solution Inc)을 이용하여 얻었다. 면역형광 염색 방법은 실시예 9의 방법과 동일하다 (표 6 및 도 13).

[0131] **실시예 14: 유도만능줄기세포주의 마이코플라스마(mycoplasma) 감염 여부 검증**

[0132] 마이코플라스마 (mycoplasma)는 제작된 유도만능줄기세포주 뿐만 아니라, 기탁 혹은 판매되는 세포주에서 감염여부가 검증되어야 하는 바이러스와 세균의 중간 성질을 갖는 미생물이다. 따라서 마이코플라스마 감염여부를 시판되는 마이코플라스마 검진 키트인 e-Myco Mycoplasma PCR detection kit (ver.2.0) (iNtRON, Cat.25235)를 사용하여 검증하였다. 음성대조군 (negative control)은 삼차증류수를 사용했으며, 양성대조군 (positive control)은 키트 내에 포함된 것을 사용했으며, 전기영동을 통해 product를 비교하였다.

[0133] 비교 결과 제작된 유도만능줄기세포주는 마이코플라스마에 감염되지 않았음을 확인했다 (도 14).

[0135] **실시예 15: 유도만능줄기세포주의 SNP 분석**

[0136] 제작된 유도만능줄기세포주는 분양받은 림프아구세포주의 genomic DNA를 분석했던 방법과 동일하게 TaqMan SNP Genotyping Assays (Cat.4362691)을 사용하였으며, CYP2D6*10/*10(rs1065852) 확인을 위해 C_11484460_40 모델이, CYP2C19*2/*2(rs4244285) 확인을 위해 C_25986767_70 모델이, CYP3A5*3C/*3C(rs776746) 확인을 위해 C_26201809_30 모델이 사용되었다. 양성대조군으로 각 유도만능줄기세포주의 원형이 되는 림프아구세포주의 genomic DNA가 사용되었고, 음성대조군으로는 삼차증류수를 사용했다.

[0137] 지노타이핑 결과, 유도만능줄기세포주를 제작하는 과정에서 해당 SNP에 변동이 없음이 확인되었다.

[0139] **실시예 16: 짧은연쇄반복 (Short tandem repeat; STR) 분석**

[0140] 짧은연쇄반복 (short tandem repeat, STR)은 유전체 (genome)의 비암호화 영역 (non-coding region)에 존재하며, 2~13 nucleotide unit이 반복적으로 나타나는 특징을 갖는다. STR은 개인마다 핵심반복단위 (core repeat unit)의 반복수가 다르기 때문에, 개인식별과 유래 세포 검증을 위해 널리 쓰이고 있다. 분석의 기본 원리는 형광 dye가 표지된 프라이머를 사용한 PCR product를 capillary electrophoresis를 통하여 고해상도로 분석한다.

이에 사용된 장비는 Applied biosystem 사의 3130xl 및 3730xl DNA analyzer 장비를 사용했으며, 코스모진텍(대한민국)에 의뢰하여 진행하였다. 분석된 유전자 자리 (gene locus)는 총 16가지로 D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, AMEL, D3S1358, D21S11, D18S51, D8S1179, FGA, D2S1338, D19S433 이다. 제작된 모든 유도만능줄기세포주에서 유래 세포와 100% 동일함이 증명되었다 (도 15 내지 22).

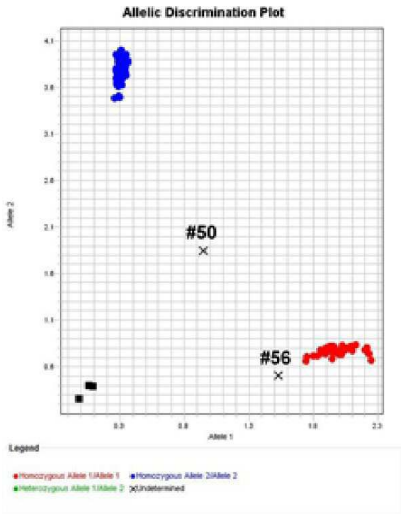
[0142] **실시예 17: 유도만능줄기세포의 Sequencing**

[0143] 제작된 유도만능줄기세포주의 SNP가 염기서열 상에서도 온전히 보전되었음을 확인하기 위하여, 해당 염기서열의 sequencing을 코스모진텍(대한민국)에 의뢰하여 확인하였다. 분석된 유전자 내의 위치는 각각 CYP2D6*10/*10(rs1065852), CYP2C19*2/*2(rs4244285), CYP3A5*3C/3C(rs776746)이며, 제작된 유도만능줄기세포주에서 염기서열도 온전히 보전되었음을 확인하였다 (도 23).

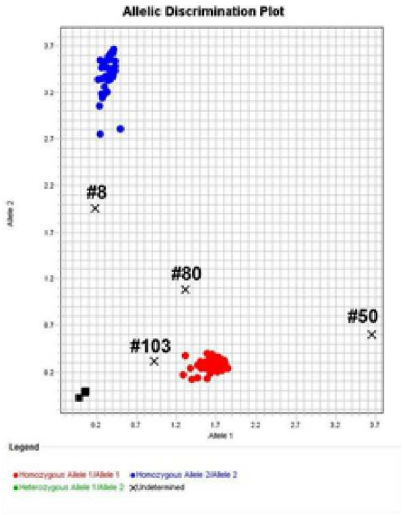
[0145] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

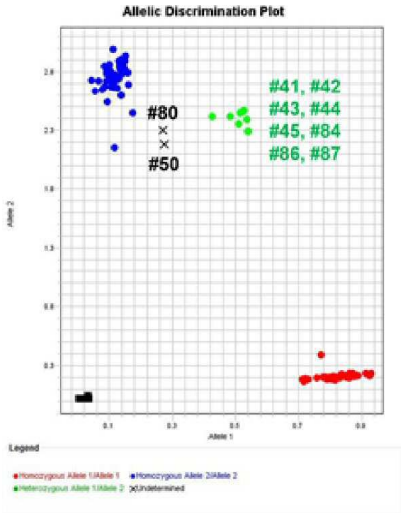
도면1



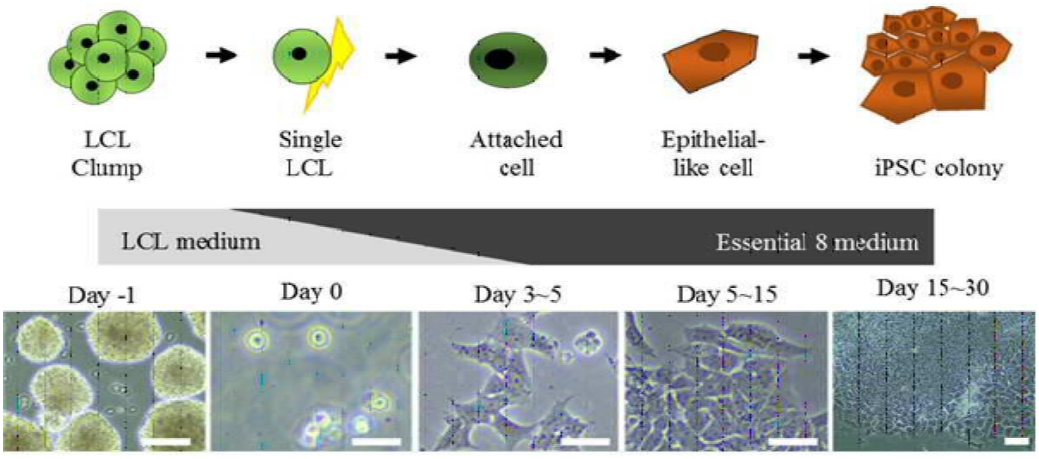
도면2


Allelic Discrimination Plot
#8
#80
#103
#50
Allele 1
Allele 2
Legend

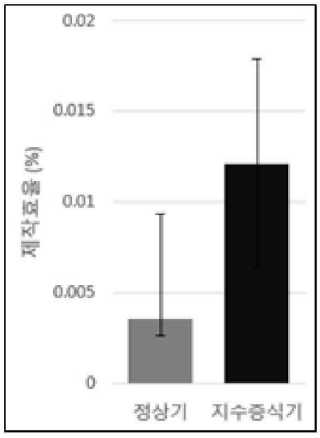
도면3


Allelic Discrimination Plot
#80
#50
#41, #42
#43, #44
#45, #84
#86, #87
Allele 1
Allele 2
Legend

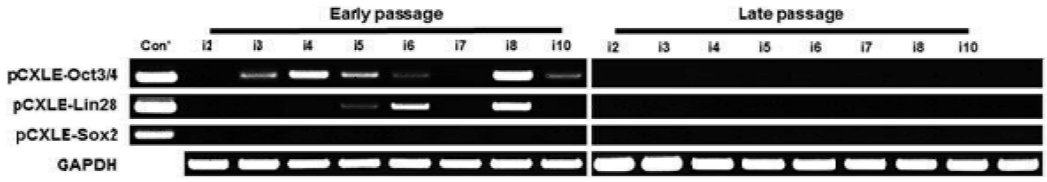
도면4


LCL Clump
Single LCL
Attached cell
Epithelial-like cell
iPSC colony
LCL medium
Essential 8 medium
Day -1
Day 0
Day 3~5
Day 5~15
Day 15~30

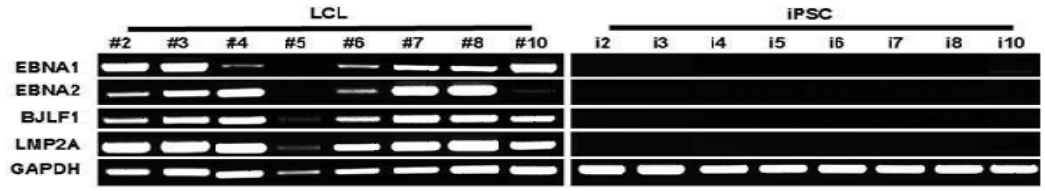
도면5



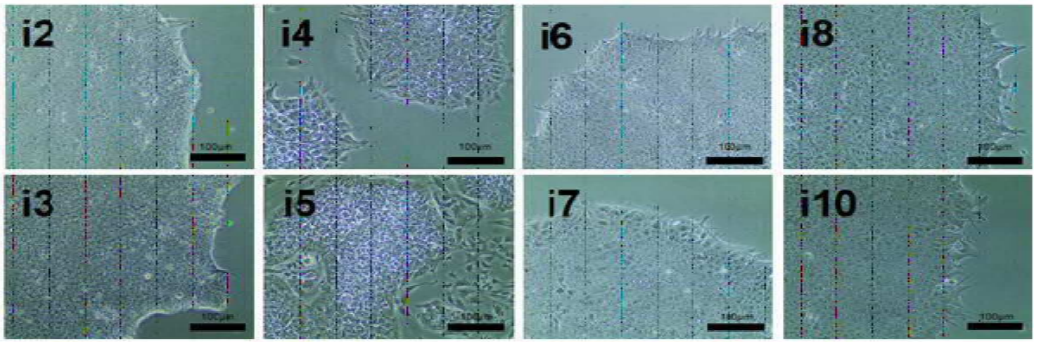
도면6



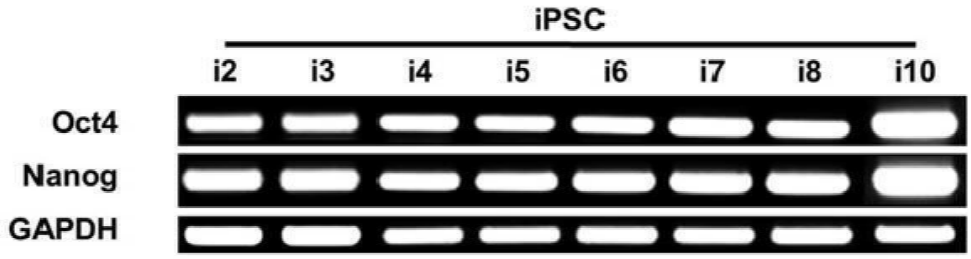
도면7



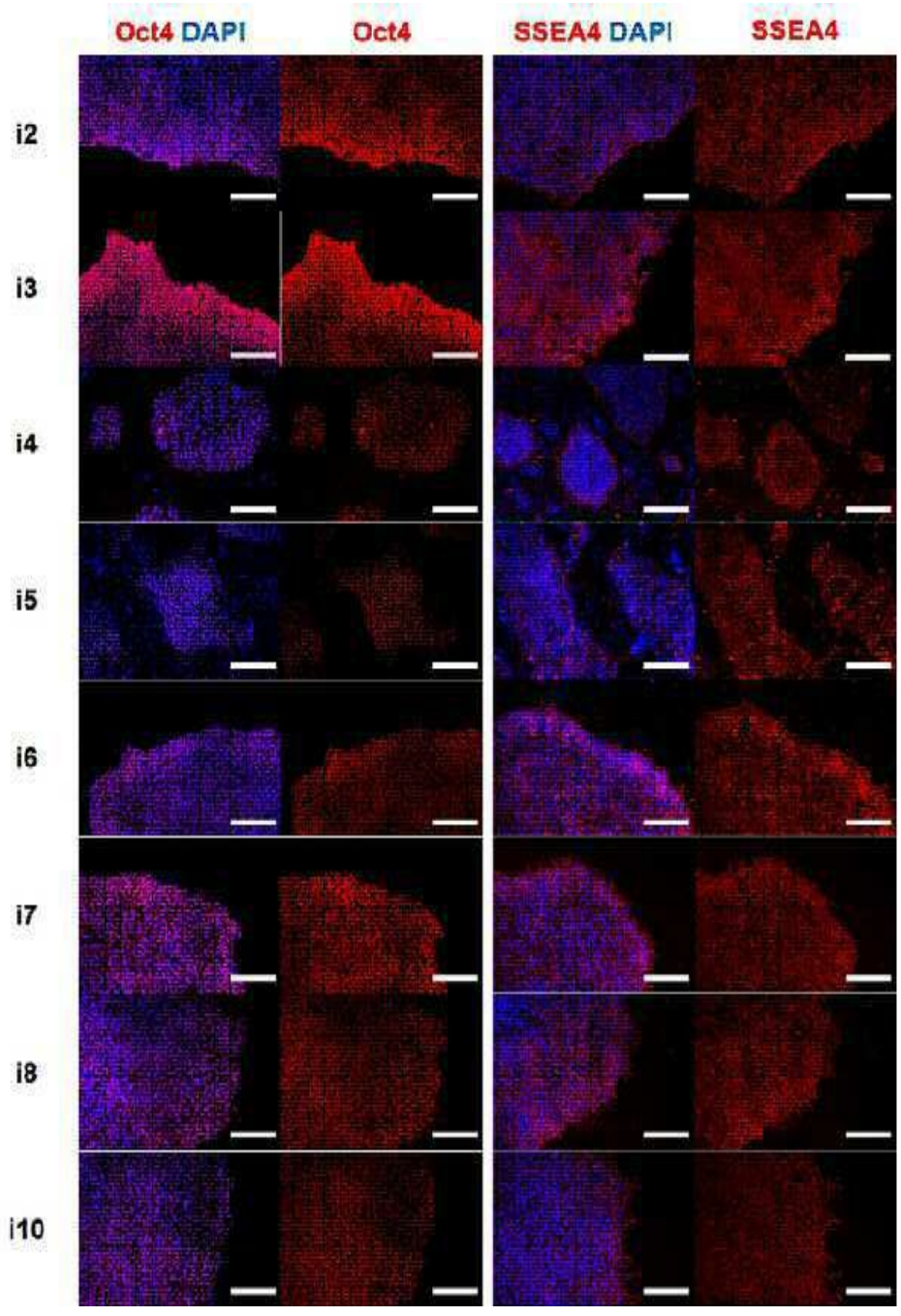
도면8



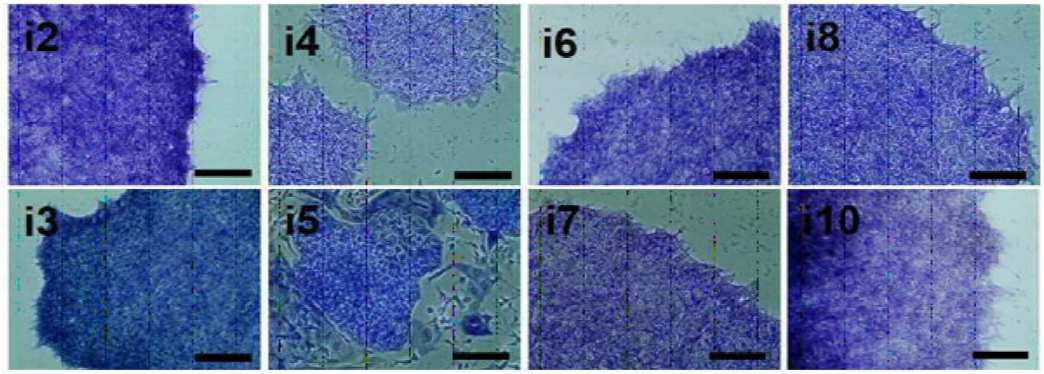
도면9


iPSC
i2
i3
i4
i5
i6
i7
i8
i10
Oct4
Nanog
GAPDH

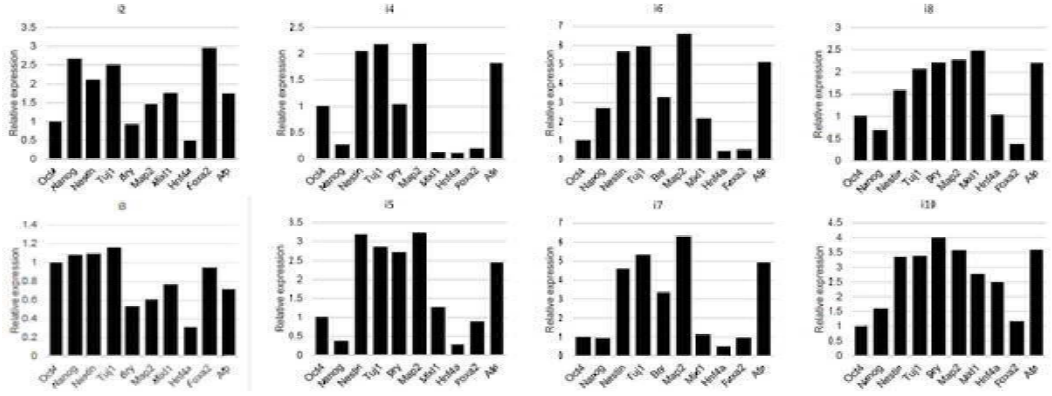
도면10


Oct4 DAPI
Oct4
SSEA4 DAPI
SSEA4
i2
i3
i4
i5
i6
i7
i8
i10

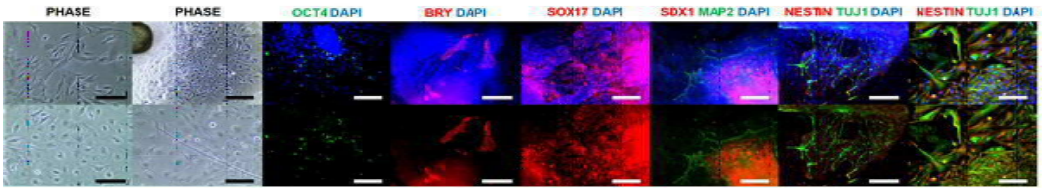
도면11



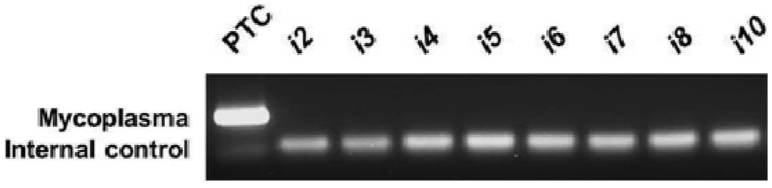
도면12



도면13



도면14



도면15

Sample No. 2
Match Analysis

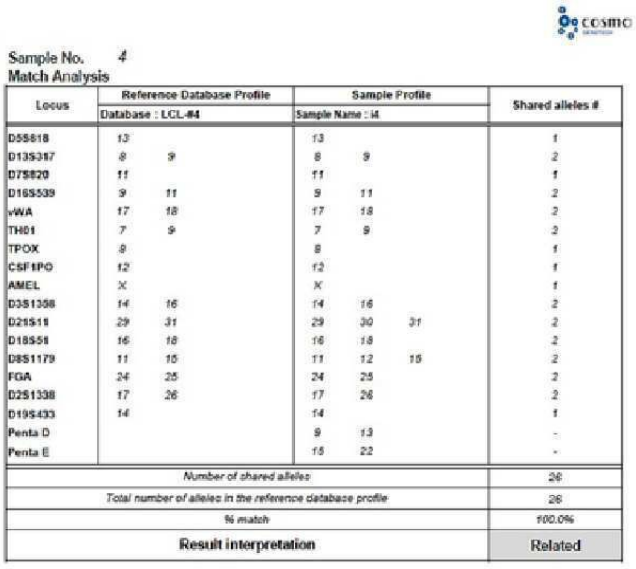
Locus	Reference Database Profile		Sample Profile		Shared alleles #
	Database : LCL-#2		Sample Name : i2		
D5S818	9	11	9	11	2
D13S317	10	12	10	12	2
D7S820	11	12	11	12	2
D16S539	11		11		1
vWA	18	20	18	20	2
TH01	7	9	7	9	2
TPOX	11		11		1
CSF1PO	10		10		1
AMEL	X	Y	X	Y	2
D3S1358	16	18	16	18	2
D21S11	29	33.2	29	33.2	2
D18S51	13	20	13	20	2
D8S1179	14	16	14	16	2
FGA	22	23	22	23	2
D2S1338	22	23	22	23	2
D19S433	14	14.2	14	14.2	2
Penta D			9	11	-
Penta E			11	12	-
Number of shared alleles					29
Total number of alleles in the reference database profile					29
% match					100.0%
Result interpretation					Related

도면16

Sample No. 3
Match Analysis

Locus	Reference Database Profile		Sample Profile		Shared alleles #
	Database : LCL-#3		Sample Name : i3		
D5S818	9	10	9	10	2
D13S317	8	12	8	12	2
D7S820	11	12	11	12	2
D16S539	9	10	9	10	2
vWA	16	19	16	19	2
TH01	6	7	6	7	2
TPOX	8	9	8	9	2
CSF1PO	11	12	11	12	2
AMEL	X	Y	X	Y	2
D3S1358	15	17	15	17	2
D21S11	29	32.2	29	32.2	2
D18S51	16	19	16	19	2
D8S1179	14	15	14	15	2
FGA	22	25	22	25	2
D2S1338	18	20	18	20	2
D19S433	14	14.2	14	14.2	2
Penta D			8	9	-
Penta E			16	OL	-
Number of shared alleles					32
Total number of alleles in the reference database profile					32
% match					100.0%
Result interpretation					Related

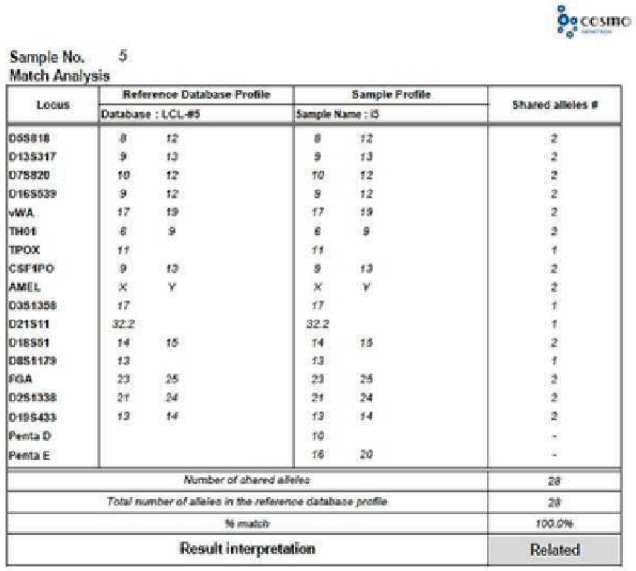
도면17



Sample No. 4
Match Analysis

Locus	Reference Database Profile Database : LCL-#4	Sample Profile Sample Name : i4	Shared alleles #
D5S818	13	13	1
D13S317	8 9	8 9	2
D7S820	11	11	1
D16S539	9 11	9 11	2
vWA	17 18	17 18	2
TH01	7 9	7 9	2
TPOX	8	8	1
CSF1PO	12	12	1
AMEL	X	X	1
D3S1358	14 16	14 16	2
D21S11	29 31	29 30 31	2
D18S51	16 18	16 18	2
D8S1179	11 15	11 12 15	2
FGA	24 25	24 25	2
D2S1338	17 26	17 26	2
D19S433	14	14	1
Penta D		9 13	-
Penta E		15 22	-
Number of shared alleles			28
Total number of alleles in the reference database profile			28
% match			100.0%
Result interpretation			Related

도면18



Sample No. 5
Match Analysis

Locus	Reference Database Profile Database : LCL-#5	Sample Profile Sample Name : i5	Shared alleles #
D5S818	8 12	8 12	2
D13S317	9 13	9 13	2
D7S820	10 12	10 12	2
D16S539	9 12	9 12	2
vWA	17 19	17 19	2
TH01	6 9	6 9	2
TPOX	11	11	1
CSF1PO	9 13	9 13	2
AMEL	X Y	X Y	2
D3S1358	17	17	1
D21S11	32.2	32.2	1
D18S51	14 15	14 15	2
D8S1179	13	13	1
FGA	23 25	23 25	2
D2S1338	21 24	21 24	2
D19S433	13 14	13 14	2
Penta D		10	-
Penta E		16 20	-
Number of shared alleles			28
Total number of alleles in the reference database profile			28
% match			100.0%
Result interpretation			Related

도면19

Sample No. 6
Match Analysis

Locus	Reference Database Profile		Sample Profile		Shared alleles #
	Database : LCL-#6		Sample Name : i6		
D5S818	11	13	11	13	2
D13S317	8	10	8	10	2
D7S820	12		12		1
D16S539	10		10		1
vWA	17		17		1
TH01	9		9		1
TPOX	8	11	8	11	2
CSF1PO	12	13	12	13	2
AMEL	X		X		1
D3S1358	15		15		1
D21S11	30	31	30	31	2
D18S51	13	14	13	14	2
D8S1179	9	13	9	13	2
FGA	19	23	19	23	2
D2S1338	19	24	19	24	2
D19S433	12	14.2	12	14.2	2
Penta D			9		-
Penta E			5	11	-
Number of shared alleles					26
Total number of alleles in the reference database profile					26
% match					100.0%
Result interpretation					Related

도면20

Sample No. 7
Match Analysis

Locus	Reference Database Profile		Sample Profile		Shared alleles #
	Database : LCL-#7		Sample Name : i7		
D5S818	9	12	9	12	2
D13S317	8	9	8	9	2
D7S820	10	11	10	11	2
D16S539	9		9		1
vWA	18	20	18	20	2
TH01	6	9	6	9	2
TPOX	8		8		1
CSF1PO	11		11		1
AMEL	X		X		1
D3S1358	16	17	16	17	2
D21S11	30	32.2	30	32.2	2
D18S51	14	15	14	15	2
D8S1179	11	12	11	12	2
FGA	22	25	22	25	2
D2S1338	17	24	17	24	2
D19S433	13	14	13	14	2
Penta D			10		-
Penta E			11	13	-
Number of shared alleles					28
Total number of alleles in the reference database profile					28
% match					100.0%
Result interpretation					Related

도면21

Sample No. 8
Match Analysis

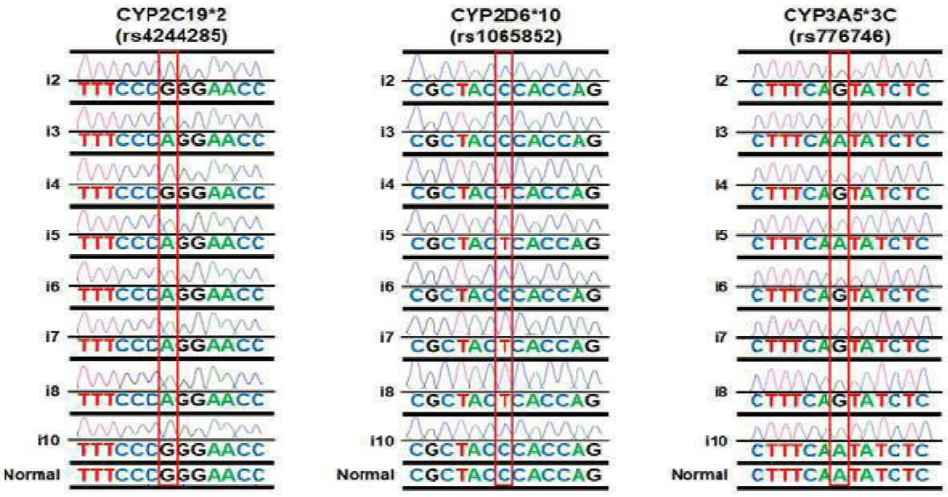
Locus	Reference Database Profile Database : LCL-#8		Sample Profile Sample Name : i8		Shared alleles #
D5S818	12		12		1
D13S317	8	10	8	10	2
D7S820	10	14	10	14	2
D16S539	9	10	9	10	2
vWA	17	18	17	18	2
TH01	6	9	6	9	2
TPOX	8	9	8	9	2
CSF1PO	11	13	11	13	2
AMEL	X		X		1
D3S1358	16	18	16	18	2
D21S11	30	31.2	30	31.2	2
D18S51	12	14	12	14	2
DBS1179	12	14	12	14	2
FGA	21	24	21	24	2
D2S1338	20	25	20	25	2
D19S433	13	14	13	14	2
Penta D			9		-
Penta E			16	17	-
Number of shared alleles					30
Total number of alleles in the reference database profile					30
% match					100.0%
Result interpretation					Related

도면22

Sample No. 9
Match Analysis

Locus	Reference Database Profile Database : LCL-#10		Sample Profile Sample Name : i10		Shared alleles #
D5S818	10	11	10	11	2
D13S317	11	12	11	12	2
D7S820	8	10	8	10	2
D16S539	10	11	10	11	2
vWA	16	18	16	18	2
TH01	9		9		1
TPOX	8	11	8	11	2
CSF1PO	12		12		1
AMEL	X	Y	X	Y	2
D3S1358	15	16	15	16	2
D21S11	30		30		1
D18S51	15	16	15	16	2
DBS1179	11	12	11	12	2
FGA	19	24	19	24	2
D2S1338	17	20	17	20	2
D19S433	14		14		1
Penta D			9	13	-
Penta E			11	18	-
Number of shared alleles					28
Total number of alleles in the reference database profile					28
% match					100.0%
Result interpretation					Related

도면23



도면24

Name	2D6*10 rs1065852	2C19*2 rs4244285	3A5*3C rs776746
i2	wt/wt EM	wt/wt EM	*3C/*3C PM
i3	wt/wt EM	*2/*2 IM	wt/wt EM
i4	*10/*10 IM	wt/wt EM	*3C/3C PM
i5	*10/*10 IM	*2/*2 IM	wt/wt EM
i6	wt/wt EM	*2/*2 IM	*3C/*3C PM
i7	*10/*10 IM	*2/*2 IM	*3C/*3C PM
i8	*10/*10 IM	*2/*2 IM	*3C/*3C PM
i10	wt/wt EM	wt/wt EM	wt/wt EM

서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Reflecting Highly Polymorphic CYP Genotypes in Korean

<130> P18-B008

<160> 38

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCXLE-Oct3/4(F)

<400> 1

cattcaaact gaggtaaggg 20

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> pCXLE-Oct3/4(R)

<400> 2

tagcgtaaaa ggagcaacat ag 22

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCXLE-Lin28(F)

<400> 3

agccatatgg tagcctcatg tccgc 25

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCXLE-Lin28(R)

<400> 4

tagcgtaaaa ggagcaacat ag 22

<

210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCXLE-Sox2(F)

<400> 5

ttcacatgtc ccagcactac caga 24

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCXLE-Sox2(R)

<400> 6

tttgtttgac aggagcgaca at 22

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EBNA-1 (F)

<400> 7

ccagcaagaa gaggaggtgg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EBNA-1 (R)

<400> 8

tggtgtgatg tcgtgtggag 20

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EBNA-2 (F)

<400> 9

catagaagaa gaagaggatg aaga 24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EBNA-2 (R)

<400> 10

gtagggattc gagggaatta ctga 24

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LMP-2A (F)

<400> 11

aggaacgtga atctaatgaa ga 22

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LMP-2A (R)

<400> 12

aagtgacaac cgcagtaagc a 21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BZLF-1 (F)

<400> 13

cacggtagtg ctgcagttgc 20

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BZLF-1 (R)

<400> 14

cccagaatca acagactaac caagccg 27

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oct4 (F)

<400> 15

cgtgaagctg gagaaggaga agctg 25

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oct4 (R)

<400> 16

aagggccgca gcttacacat gttc 24

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanog (F)

<400> 17

ccaaaggcaa acaacccact 20

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanog (R)

<400> 18

tgaattgttc caggtctggt tg 22

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH (F)

<400> 19

gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH (R)

<400> 20

gaagatggtg atgggatttc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nestin (F)

<400> 21

gccctgacca ctccagttta 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nestin (R)

<400> 22

ggagtcctgg atttccttcc 20

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Map2 (F)

<400> 23

aatagaccta agccatgtga catcc 25

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Map2 (R)

<400> 24

agaaccaact ttagcttggg cc 22

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tuj1 (F)

<400> 25

catggacagt gtccgctcag 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tuj1 (R)

<400> 26

caggcagtcg cagtttccac 20

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mixl1 (F)

<400> 27

ggtaccccga catccactt 19

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mixl1 (R)

<400> 28

tgagtccagc tttgaaccaa 20

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxa2 (F)

<400> 29

ttctccatca acaacctcat gtcc 24

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxa2 (R)

<400> 30

gtagtgcatc acctgttcgt agg 23

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Brachyury (F)

<400> 31

agccactgct tccctgagac 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Brachyury (R)

<400> 32

aggctggggt actgactgga 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hnf4a (F)

<400> 33

tctcatgttg aagccactgc 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hnf4a (R)

<400> 34

ggtttgtttt ctcgggttga 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Afp (F)

<400> 35

tgaaaaccct cttgaatgcc 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Afp (R)

<400> 36

tcttgcttca tcgtttgcag 20

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gapdh (F)

<400> 37

gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gapdh (R)

<400> 38

gaagatggtg atgggatttc 20