



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월04일

(11) 등록번호 10-1774206

(24) 등록일자 2017년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/09 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)*C12N 15/85* (2006.01) *C12N 5/074* (2010.01)*C12N 5/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7004663

(22) 출원일자(국제) 2010년08월06일

심사청구일자 2015년08월06일

(85) 번역문제출일자 2012년02월22일

(65) 공개번호 10-2012-0047968

(43) 공개일자 2012년05월14일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2010/063733

(87) 국제공개번호 WO 2011/016588

국제공개일자 2011년02월10일

(30) 우선권주장

61/232,402 2009년08월07일 미국(US)

61/307,306 2010년02월23일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20090047263 A1*

CELL STEM CELL. 2008, vol. 3, no. 5, PAGEs
475-479.*SCIENCE. 2009.05., vol. 324, no. 5928, PAGEs
797-801.NATURE. 2009.04., vol. 458, no. 7239, PAGEs
766-770.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠

일본 교토후 교토시 사쿄쿠 요시다촌마치 36반치
1

(72) 발명자

오키타 게이스케

일본 교토후 교토시 사쿄쿠 쇼고인 가와하라쵸 53
고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠 센터 포
아이피에스 셀 리서치 앤드 어플리케이션 나이

나카가와 마사토

일본 교토후 교토시 사쿄쿠 쇼고인 가와하라쵸 53
고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠 센터 포
아이피에스 셀 리서치 앤드 어플리케이션 나이

야마나카 신야

일본 교토후 교토시 사쿄쿠 쇼고인 가와하라쵸 53
고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠 센터 포
아이피에스 셀 리서치 앤드 어플리케이션 나이

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 유도된 다능성 줄기 세포의 효율적인 확립 방법

(57) 요약

(a) Oct3/4 또는 이를 인코딩하는 핵산, (b) Klf4 또는 이를 인코딩하는 핵산, 및 (c) Sox2 또는 이를 인코딩하는 핵산 뿐 아니라 (d1) L-Myc 또는 이를 인코딩하는 핵산 및/또는 (d2) p53 의 기능적 저해제를 체세포와 접촉시키는 것을 포함하는 iPS 세포 제조 방법이 본 발명에서 제공된다. Oct3/4 를 인코딩하는 핵산, (b) Klf4 를 인코딩하는 핵산, (c) Sox2 를 인코딩하는 핵산, (d1) L-Myc 를 인코딩하는 핵산 및 (e) Lin28 또는 Lin28b 를 인코딩하는 핵산이 벡터의 복제에 필수적인 벡터 구성 요소의 5' 및 3' 측 상에 동일한 배향으로 위치한 loxP 서열을 갖는 에피솜 벡터에 삽입되고, (d2) p53 에 대한 shRNA 를 인코딩하는 핵산이 일시적 발현을 보장하는 벡터 (플라스미드 벡터 등)에 삽입되고, 이들 모든 핵산이 체세포에 이동되는 것이 바람직하다.

명세서

청구범위

청구항 1

(a) Oct3/4를 인코딩하는 핵산, (b) Klf4를 인코딩하는 핵산, (c) Sox2를 인코딩하는 핵산, (d) L-Myc를 인코딩하는 핵산, (e) Lin28 또는 Lin28b를 인코딩하는 핵산, 및 (f) p53에 대한 siRNA 및 shRNA, 이들을 인코딩하는 DNA, 및 p53의 우성 음성 돌연변이체를 인코딩하는 핵산으로 이루어지는 군에서 선택되는 핵산을 체세포와 접촉시키는 것을 포함하는 iPS 세포 제조 방법으로, (a), (b), (c), (d) 및 (e)의 핵산들이 플라스미드 벡터(들)의 형태로 체세포 내로 도입되는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, (f)의 핵산이 p53에 대한 shRNA 또는 p53의 우성 음성 돌연변이체를 인코딩하는 DNA이며, 플라스미드 벡터 형태로 체세포 내로 도입되는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, (d) 및 (e)의 핵산들이 동일한 플라스미드 벡터 내로 혼입되고, 5' - 3'의 배향으로 폴리시스트론성으로 연결되는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 플라스미드 벡터가 에피솜 벡터인 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 에피솜 벡터가, 5 차 계대까지, 계대된 총 iPS 세포 중의 50% 이상의 iPS 세포로부터 탈락하는 자가-제거 벡터인 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 에피솜 벡터가 벡터의 복제에 필수적인 벡터 구성 요소의 5' 및 3' 측 상에 서로 동일한 배향으로 위치한 loxP 서열을 갖는 방법으로서, 여기에서 상기 필수적인 벡터 구성 요소는 EBNA-1 유전자 또는 SV40 large T 항원 유전자인 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, Cre 재조합효소로 세포를 처리하는 과정을 포함하지 않는 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 체세포가 인간 세포인 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, (a), (b), (c), (d), (e) 및 (f)의 핵산들을 체세포와 접촉시키는 것에서 iPS 세포의 확립까지의 기간 동안 비-인간 동물로부터의 요소의 부재 하에 체세포를 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 인간 세포를 피더 세포(feeder cell)로서 사용하거나, 피더 세포를 사용하지 않는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 피더 세포가 체세포와 동일한 개체로부터 유래하는 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득되는, iPS 세포의 계놈 내로 핵산의 삽입

(integration) 을 거치지 않고 (a) 내지 (f) 의 핵산을 손실한 iPS 세포의 정제된 집단.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인공 다능성 줄기 (이하, iPS 로 지칭함) 세포의 효율적 확립 방법 및 이를 위한 시약, 더 구체적으로는 (a) Oct3/4 또는 이를 인코딩하는 핵산, (b) Klf4 또는 이를 인코딩하는 핵산, 및 (c) Sox2 또는 이를 인코딩하는 핵산 뿐 아니라 (d1) L-Myc 또는 이를 인코딩하는 핵산 및/또는 (d2) p53 의 기능적 저해체를 체세포와 접촉시킴으로써 iPS 세포를 확립하는 방법, 및 상기 (a) 내지 (c) 및 (d1) 및/또는 (d2)로 이루어지는 iPS 세포 유도체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 (a) 내지 (c) 의 핵산 인자 뿐 아니라 (d1) 및/또는 (d2)의 핵산 인자를 포함하는 에피솜 벡터, 또는 에피솜 벡터 및 loxP 서열의 조합인 벡터, 특히 초기 자가-제거 유형의 에피솜 벡터, 및 에피솜 벡터를 사용하여 계놈 내에서 핵산 인자의 통합을 거치지 않고 외인성 핵산 인자가 제거된 iPS 세포를 신속하게 확립하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

최근, 마우스 및 인간 iPS 세포가 차례로 확립되었다. Yamanaka 등은 Oct3/4, Sox2, Klf4 및 c-Myc 유전자를

마우스 유래의 섬유모세포에 도입하고, 세포로 하여금 그 유전자를 발현하게 함으로써 iPS 세포를 유도했다 [WO 2007/069666 A1; Takahashi, K. and Yamanaka, S., *Cell*, 126: 663-676 (2006)]. 이후, iPS 세포는 또한 c-Myc 유전자 이외에 3 개의 인자를 사용하여 제조될 수 있다는 것이 밝혀졌다 [Nakagawa, M. et al., *Nat. Biotechnol.*, 26: 101-106 (2008)]. 또한, Yamanaka 등은 인간 피부 섬유모세포에 마우스에서 사용된 것과 동일한 4 개의 유전자를 도입함으로써 iPS 세포를 확립하는데 성공하였다 [WO 2007/069666 A1; Takahashi, K. et al., *Cell*, 131: 861-872 (2007)]. 한편, Thomson 등의 그룹은 Klf4 및 c-Myc 대신에 Nanog 및 Lin28을 사용하여 인간 iPS 세포를 제조하였다 [WO 2008/118820 A2; Yu, J. et al., *Science*, 318: 1917-1920 (2007)].

[0003] 그러나, iPS 세포 확립 효율은 1% 미만으로 낮다. 특히, iPS 세포 확립의 극히 낮은 효율의 문제점은, 이들이 iPS 세포로부터 분화된 조직 또는 개체에서 종양생성을 유발하기 쉬운 c-Myc 이외의 3 개의 인자 (Oct3/4, Sox2 및 Klf4)를 체세포에 도입하여 제조되는 경우에 발생한다.

[0004] 바이러스 벡터 예컨대 레트로바이러스 및 렌티바이러스는 비-바이러스성 벡터보다 높은 트랜스펙션 효율을 제공하므로, iPS 세포의 더 용이한 생성을 가능하게 하는데 유리하다. 그러나, 레트로바이러스 및 렌티바이러스는 염색체에 통합되어, iPS 세포의 임상 적용의 관점에서의 안정성 문제를 갖는다. 이러한 이유로, 염색체에서 벡터 통합 없이 아데노바이러스 벡터 또는 비-바이러스성 벡터 예컨대 플라스미드를 사용하여 생성된 iPS 세포가 보고되었다 [Stadtfeld, M. et al., *Science*, 322: 945-949 (2008); Okita, K. et al., *Science*, 322: 949-953 (2008); Yu, J. et al., *Science*, 324: 797-801 (2009)]. 그러나, 이러한 벡터는 레트로바이러스 및 렌티바이러스보다 iPS 세포 확립 효율이 낮다. 가능하게는 iPS 세포 선별 조건 하의 재프로그래밍 인자의 계속적인 높은 발현의 요건으로 인해, 특정 빈도로 염색체에 혼입된 재프로그래밍 인자를 갖는 안정한 발현 주가 심지어 플라스미드 벡터 (일반적으로 혼입을 일으키지 않을 것으로 인식됨)를 사용하는 경우에도 수득되는 일부 경우가 있다 [Okita, K. et al., *Science*, 322: 949-953 (2008); Kaji, K. et al., *Nature*, 458: 771-775 (2009)].

[0005] 따라서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스를 사용하는 iPS 세포의 최초 확립 이후 염색체로부터의 외인성 유전자 제거에 의해 높은 확립 효율과 안정성을 조화시키려는 시도가 이루어졌다. 예를 들어, 렌티바이러스 및 Cre-loxP 시스템의 조합을 포함하는 기술이 보고되었다 [Chang, C.W. et al., *Stem Cells*, 27: 1042-1049 (2009); Soldner, F. et al., *Cell*, 136: 964-977(2009)]. 그러나 이러한 보고에서는, loxP 서열이 LTR에 삽입되어 Cre 재조합 효소 처리 이후에 남아 있는 loxP 서열 외부의 LTR 서열에 의해 주변의 종양유전자의 활성화 위험을 최소화하고, 또 다른 프로모터 예컨대 CMV 또는 EF1 α 가 삽입되어 재프로그래밍 인자를 전사하는 복합체 구성물이 사용되므로; 더 쉽게 구성될 수 있는 벡터의 개발이 필요하다. 외인성 핵산 인자는 piggyBac 트랜스포존을 사용하여 완전히 제거될 수 있지만 [Kaji, K. et al., *Nature*, 458: 771-775 (2009)], 내인성 유자를 방해할 가능성은 계획에서의 일시적인 통합이 불가피하므로 배제될 수 없다.

[0006] 반면 상술된 낮은 iPS 세포 확립 효율 이외에, 염색체 외부의 안정한 자기 복제가 가능한 에피솜 벡터의 사용을 포함하는 방법에서는, 약물 선택 중지시 벡터의 자발적 제거는 효율이 낮으며 오래 걸린다 [Yu, J. et al., *Science*, 324: 797-801 (2009)]. 이러한 이유로, 높은 효율로 단시간에 벡터를 제거하면서 iPS 세포 확립 효율을 개선하는 방법이 필요하다.

[0007] 또한, 또다른 문제가 인간 iPS 세포에 대한 임상 적용을 찾는데서 발생하는데; 세포는 iPS 세포 확립 및 유지 배양 동안 기타 동물 종 예컨대 혈청 및 피더 세포 (feeder cell)로부터 유래된 요소로 오염될 수 있다. 따라서, 재프로그래밍 인자 이동에서 인간 iPS 세포 확립 및 유지 배양까지의 모든 작업은 "제노-프리 (Xeno-free)" 조건 (이종 요소가 함유되지 않음) 하에 수행되는 것이 바람직하다. 그러나, 무-바이러스 조건 하에 확립된 인간 iPS 세포에서는, 재프로그래밍 인자 이동에서 iPS 세포 확립 및 유지 배양까지의 단계 중 하나 이상의 단계에서 이종 요소가 사용되는 것이 통례적인 실행이었다 [Okita, K. et al., *Science*, 322: 949-953 (2008); Yu, J. et al., *Science*, 324: 797-801 (2009); Kaji, K. et al., *Nature*, 458: 771-775 (2009)]. 반면, 제노-프리 조건 하에 확립된 모든 인간 iPS 세포는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스에 의해 재프로그래밍 유전자로 트랜스펙션되고, 이중 어느 것도 무-바이러스 조건 하에 제조되지 않았다 [Rodriguez-Piza, I. et al., *Stem Cells*, 28: 36-44 (2010); Ross, P.J. et al., *Stem Cells Dev.*, 2009 Dec 23. (Epub ahead of print)].

발명의 내용

[0008] 발명의 개요

본 발명은 임상 적용에 적합한 안전한 인간 iPS 세포의 효율적 확립에 관한 것이다. 따라서 iPS 세포, 특히 인간 iPS 세포의 확립 효율을 개선하는 수단, 및 이러한 수단을 사용하여 iPS 세포를 효율적으로 제조하는 방법을 제공하는 것이 본 발명의 제 1 목적이다. 게놈 내에서 핵산 인자의 통합을 거치지 않고 외인성 핵산 인자를 손실한 iPS 세포를 신속하게 확립하는 방법을 제공하는 것이 본 발명의 제 2 목적이다. 재프로그래밍 인자 이동에서 iPS 세포 확립 및 유지 배양까지의 기간 동안 임의의 바이러스 또는 이종 요소를 사용하지 않고 (즉, 무-바이러스 제노-프리 조건 하에) 인간 iPS 세포를 생성하여, 인간 임상 환경에 안전하게 사용될 수 있는 인간 iPS 세포를 제공하는 것이 본 발명의 제 3 목적이다.

[0010] 상기 기재된 문제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 먼저 레트로바이러스 벡터를 사용하여 재프로그래밍 유전자의 적합한 조합을 찾는 것을 조사하였다. 에피솜 벡터를 사용하여 인간 iPS 세포를 확립하기 위해 Yu, J. 등에 의해 사용된 6 개의 인자 [Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28 (SV40 Large T 항원은 확립 효율 개질체로 취급되고, 재프로그래밍 유전자로부터 배제됨)] [Science, 324: 797-801 (2009)]를 기반으로, 본 발명자들은 Nanog 를 제외한 5 개의 인자를 사용하거나, c-Myc 대신에 L-Myc 를 포함하는 Nanog 를 제외한 5 개의 인자를 사용하여 인간 피부 섬유모세포 (HDF)로부터 인간 iPS 세포를 유도하고자 시도하였다. 예기치않게, 인간 iPS 세포는 6 개의 인자를 사용하는 것보다 Nanog 이외의 5 개의 인자를 사용하여 더 효율적으로 확립되었다. 또한 c-Myc 를 L-Myc 로 대체한 결과로서, 확립 효율이 크게 개선되었다. 따라서, 에피솜 벡터를 사용하여 6 개의 인자의 사용과 c-Myc 대신 L-Myc 를 포함하는 5 개의 인자의 사용 사이의 인간 iPS 세포 확립 효율을 실제로 비교하였다. 그 결과로서, 확립 효율은 6 개의 인자를 사용한 것에 비해, c-Myc 대신 L-Myc 를 포함하는 5 개의 인자를 사용하여 크게 증가된다는 것이 밝혀졌다.

[0011] 다음으로, 6 개의 인자 또는 c-Myc 대신 L-Myc 를 포함하는 Nanog 이외의 5 개의 인자는, p53 에 대한 shRNA 를 인코딩하는 에피솜 벡터와 함께 HDF 에 이동된다. p53 의 기능적 저해의 결과로서, c-Myc 대신 L-Myc 를 포함하는 5 개의 인자에 비해 유사한 정도로 6 개의 인자를 사용하여 iPS 세포가 수득된다. 5 개의 인자가 p53 의 기능적 저해와 조합되는 경우, 확립 효율은 보다 더 크게 증가된다. SNL 세포 이외에 마우스 태아 섬유모세포 (MEF) 를 트랜스펙션 이후 HDF 의 계대시 피더 세포로서 사용함으로써, 인간 iPS 세포 확립 효율이 극적으로 개선된다는 것이 또한 밝혀졌다.

[0012] 본 발명자들은 이동된 에피솜 벡터가 iPS 세포 확립 후에 신속하게 iPS 세포로부터 분계되도록 벡터 구성 요소의 말단 모두에 위치하는 loxP 서열과 Cre 재조합효소의 작용에 의해 이의 자체 복제에 본질적인 이의 구성 요소가 절단되게 하는 에피솜 벡터를 고안하였다. 인간 iPS 세포의 확립 후에, 세포의 게놈 DNA 및 염색체의 DNA 를 단리시키고 전이유전자의 존재 또는 부재 하에 개별적으로 시험하였다. 그 결과, 이동된 벡터가 어떤 DNA 에서도 검출되지 않았고; 예기치 않게, 상기 벡터가 Cre 재조합효소를 사용하지 않고 세포로부터 신속하게 분계된 초기 자가-제거 벡터인 것으로 밝혀졌다.

[0013] 또한, 본 발명자들은 상술된 에피솜 벡터를 사용하여 재프로그래밍 인자 이동에서 iPS 세포 확립 및 유지 배양 까지 완전한 무-바이러스 및 제노-프리 조건 하에 인간 iPS 세포를 생성하는데 성공하였다.

[0014] 이러한 결과로부터, 본 발명자들은 인간 iPS 세포 확립 효율이 재프로그래밍 인자로부터 Nanog 를 배제하고 c-Myc 대신 L-Myc 를 사용하거나 그 대신에 p53 의 기능적 저해제를 사용함으로써 크게 개선될 수 있거나, 이에 추가로 게놈 내 핵산 인자의 통합을 거치지 않고 외인성 핵산 인자가 손실된 iPS 세포가 에피솜 벡터의 디자인을 정교하게 하여 신속하게 얻어질 수 있으며, 인간 iPS 세포가 상술된 재프로그래밍 인자 및 에피솜 벡터를 조합함으로써 무-바이러스 및 제노-프리인 조건 하에 생성될 수 있다는 것을 발견하였고, 본 발명을 완성하였다.

[0015] 따라서, 본 발명은 하기를 제공한다:

[1] (a) Oct3/4 또는 이를 인코딩하는 핵산, (b) Klf4 또는 이를 인코딩하는 핵산, 및 (c) Sox2 또는 이를 인코딩하는 핵산 뿐 아니라 (d1) L-Myc 또는 이를 인코딩하는 핵산 및/또는 (d2) p53 의 기능적 저해제를 체세포와 접촉시키는 것을 포함하는 iPS 세포 제조 방법.

[2] 상기 [1]에 있어서, (e) Lin28 또는 Lin28b 또는 이를 인코딩하는 핵산을 체세포와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

[3] 상기 [1] 또는 [2]에 있어서, p53 의 기능적 저해제가 p53 에 대한 siRNA 및 shRNA 및 이를 인코딩하는 DNA 로 이루어지는 군에서 선택되는 핵산인 방법.

- [0019] [4] 상기 [2] 또는 [3]에 있어서, (a) Oct3/4를 인코딩하는 핵산, (b) Klf4를 인코딩하는 핵산, (c) Sox2를 인코딩하는 핵산, (d1) L-Myc를 인코딩하는 핵산 및/또는 (d2) p53에 대한 shRNA를 인코딩하는 핵산 뿐 아니라 (e) Lin28 또는 Lin28b를 인코딩하는 핵산을 체세포에 이동시키는 것을 포함하는 방법.
- [0020] [5] 상기 [4]에 있어서, 전술한 (a), (b), (c), (d1) 및 (e)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 핵산을 에피솜 벡터의 형태로 이동시키는 방법.
- [0021] [6] 상기 [4] 또는 [5]에 있어서, (d2) p53에 대한 shRNA를 인코딩하는 핵산을 세포 내에서 자가-복제할 수 없는 플라스미드 벡터의 형태로 이동시키는 방법.
- [0022] [7] 상기 [5] 또는 [6]에 있어서, 에피솜 벡터가 50% 이상의 빈도로 5차 계대에 의해 iPS 세포로부터 분계하는 자가-제거 벡터인 방법.
- [0023] [8] 상기 [5] 내지 [7] 중 어느 하나에 있어서, 에피솜 벡터가 핵산 복제에 필수적인 벡터 구성 요소의 5' 및 3' 측 상에 동일한 배향으로 위치한 loxP 서열을 갖는 방법.
- [0024] [9] 상기 [8]에 있어서, Cre 재조합효소로 세포를 처리하는 과정을 포함하지 않는 방법.
- [0025] [10] 상기 [1] 내지 [9] 중 어느 하나에 있어서, 체세포가 인간 세포인 방법.
- [0026] [11] 상기 [10]에 있어서, 전술한 인자 (a), (b), (c) 뿐 아니라 (d1) 및/또는 (d2), 또는 추가의 (e)를 체세포와 접촉시키는 것에서 iPS 세포의 확립까지의 기간 동안 비-인간 동물로부터의 요소의 부재 하에 세포를 배양하는 것을 포함하는 방법.
- [0027] [12] 상기 [11]에 있어서, 인간 세포를 피더 세포로서 사용하거나, 피더 세포를 사용하지 않는 방법.
- [0028] [13] 상기 [12]에 있어서, 피더 세포가 체세포와 동일한 개체로부터 유래하는 방법.
- [0029] [14] (a) Oct3/4를 인코딩하는 핵산, (b) Klf4를 인코딩하는 핵산, (c) Sox2를 인코딩하는 핵산, (d1) L-Myc를 인코딩하는 핵산 및/또는 (d2) p53에 대한 shRNA를 인코딩하는 핵산 뿐 아니라 (e) Lin28 또는 Lin28b를 인코딩하는 핵산을 포함하는 iPS 세포 유도 촉진제.
- [0030] [15] 상기 [14]에 있어서, 전술한 (a), (b), (c), (d1) 및 (e)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 핵산이 에피솜 벡터의 형태인 촉진제.
- [0031] [16] 상기 [14] 또는 [15]에 있어서, (d2) p53에 대한 shRNA를 인코딩하는 핵산이 세포 내에서 자가-복제할 수 없는 플라스미드 벡터의 형태인 촉진제.
- [0032] [17] 상기 [15] 또는 [16]에 있어서, 에피솜 벡터가 50% 이상의 빈도로 5차 계대에 의해 iPS 세포로부터 분계하는 자가-제거 벡터인 촉진제.
- [0033] [18] 상기 [15] 내지 [17] 중 어느 하나에 있어서, 에피솜 벡터가 전술한 각각의 핵산 복제에 필수적인 벡터 구성 요소의 5' 및 3' 측 상에 동일한 배향으로 위치한 loxP 서열을 갖는 촉진제.
- [0034] [19] 상기 [5] 내지 [9] 중 어느 하나에 따른 방법에 의해 수득되는, 게놈 내 핵산의 통합을 거치지 않고 전술한 핵산을 손실한 iPS 세포.
- [0035] [20] 상기 [19]에 있어서, 인간 iPS 세포인 iPS 세포.
- [0036] [21] 상기 [11] 내지 [13] 중 어느 하나에 따른 방법에 의해 수득되는, 비-인간 동물로부터의 임의의 오염 요소를 갖지 않는 인간 iPS 세포.
- [0037] [22] 체세포를 제조하는데 있어서, 상기 [19] 내지 [21] 중 어느 하나에 따른 iPS 세포의 용도.
- [0038] [23] 상기 [19] 내지 [21] 중 어느 하나에 있어서, 체세포 제조에서 세포 공급원으로서 역할하는 iPS 세포.
- [0039] c-Myc 대신의 L-Myc의 사용 및/또는 p53의 기능적 저해제의 사용 뿐 아니라 Nanog의 비-사용은 iPS 세포 확립 효율을 현저하게 증가시킬 수 있으므로, 인간 iPS 세포, 특히 극도로 낮은 확립 효율을 갖는 6개 인자 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Nanog, Lin28)를 사용하여 게놈 내 재프로그래밍 유전자를 통합하는 것을 포함하지 않는 유형의 인간 iPS 세포를 생성시키는데 특히 유용하다. 추가적으로, 독립적으로 개발된 에피솜 벡터의 사용은 게놈 내 외인성 핵산 인자의 통합을 포함하지 않고 iPS 세포를 확립시키고, 에피솜이 이의 확립 후 iPS 세포로부터 신속히 분계되도록 할 수 있어, 이로써 상기 벡터가 통상적인 에피솜 벡터보다 더 초기에 세포

로부터 분계될 수 있다. 더욱이, 인간 iPS 세포가 재프로그래밍 인자 이동에서 iPS 세포 확립 및 유지까지의 기간 동안 완전한 무-바이러스 및 제노-프리 (xeno-free) 조건 하에서 생성될 수 있기 때문에, 본 발명의 방법은 인간 iPS 세포를 재생 의학에 적용하는데 있어서 매우 유용하다.

[0040] 하기에서, 에피솜 백터를 사용하여 확립된 iPS 세포는 때때로 본 명세서에서 "epi-iPS 세포" 또는 "epi-iPSC"로 축약된다.

[0041] 또한, 도입된 유전자의 조합이 "Y1, Y2, Y3, Y4, T1, T2 또는 T3"으로 축약되는 경우, 조합은 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

[표 1]

[0043] 플라스미드 혼합물의 요약

혼합물 명칭	플라스미드 명칭	양 (ug)	유전자
Y1	pCXLE-hOct4	1	OCT3/4
	pCXLE-hSK	1	SOX2, KLF4
	pCXLE-hMLN	1	C-MYC, LIN28, NANOG
Y2	pCXLE-hOct4shp53	1	OCT3/4, p53에 대한 shRNA
	pCXLE-hSK	1	SOX2, KLF4
	pCXLE-hMLN	1	C-MYC, LIN28, NANOG
Y3	pCXLE-hOct4	1	OCT3/4
	pCXLE-hSK	1	SOX2, KLF4
	pCXLE-hUL	1	L-MYC, LIN28
Y4	pCXLE-hOct4shp53	1	OCT3/4, p53에 대한 shRNA
	pCXLE-hSK	1	SOX2, KLF4
	pCXLE-hUL	1	L-MYC, LIN28
T1	pEP4EO2SET2K	1.125	OCT3/4, SOX2, SV40LT, KLF4
	pEP4EO2SEN2K	1.125	OCT3/4, SOX2, NANOG, KLF4
	pCEP4-M2L	0.75	C-MYC, LIN28
T2	pEP4EO2SET2K	0.91	OCT3/4, SOX2, SV40LT, KLF4
	pEP4EO2SCK2MEN2L	2.09	OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC, NANOG, LIN28
T3	pEP4EO2SET2K	0.8	OCT3/4, SOX2, SV40LT, KLF4
	pEP4EO2SEN2L	1.05	OCT3/4, SOX2, NANOG, LIN28
	pEP4EO2SEM2K	1.15	OCT3/4, SOX2, C-MYC, KLF4

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 케트로바이러스를 사용하여 다양한 유전자를 신생아 인간 피부 섬유모세포에 이동시켜 확립된 인간 iPS 세포 콜로니의 사진 표시이며, O는 Oct3/4를 나타내고, S는 Sox2를 나타내고, K는 Klf4를 나타내고, L은 Lin28을 나타내고, N은 Nanog을 나타내고, M은 c-Myc를 나타내고, U는 L-Myc를 나타낸다. "O-M-L"과 같은 인자의 합동 표시는 2A 서열을 통해 상기 인자의 번역 부위를 연결시켜 제조된 구성을 표시한다. 각각의 사진 밑의 숫자는 비-ES-성 콜로니의 수 / ES-성 콜로니의 수를 표시한다.

도 2는 도 1에서 나타낸 결과 중 일부의 그래프 표시이다. ES-성 콜로니의 수를 짙은 색 막대로 표시하고, 비-ES-성 콜로니의 수를 윤곽을 그린 막대로 표시하였다. 도 2에서, "6 개 인자"는 Oct3/4, Sox2, Klf4, Lin28, Nanog 및 c-Myc 또는 L-Myc 유전자가 이동된 경우를 표시하고; "ctrl"은 전술한 6 개 유전자에서 Nanog 외의 5 개 유전자가 이동된 경우를 표시하고; "L-M", "M-L", "L-U" 및 "U-L"은 그에 연결된 각각의 인자 (L은 Lin28을 나타내고, M은 c-Myc를 나타내고, U는 L-Myc를 나타냄)를 갖는 구성을 및 Oct3/4, Sox2 및 Klf4가 이동된 경우를 표시한다.

도 3은 5 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hKSO, pCXLE-hMLN 및 pCXLE-SV40LT를 성인 인간 피부 섬유모세포에 이동시켜 확립된 iPS 세포 콜로니의 사진 표시이다. 좌측의 플레이트는 iPS 세포 확립시의 사진을 나타내며; 우측 플레이트는 3 차 계대 (p3) 시의 사진을 나타낸다.

도 4는 4 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hKSO 및 pCXLE-hMLN을 성인 인간 피부 섬유모세포에 이동시켜 확립된 iPS 세포 콜로니의 사진 표시이다. 좌측 플레이트는 iPS 세포 확립시의 사진이며; 우측 플레이트는 2 차 계대 (p2) 시의 사진이다.

도 5는 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL (상단 좌측 패널), 또는 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL (상단 우측 패널), 또는 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL (하단 좌측 패널)을 성인 인간 피부 섬유모세포에 이동시켜 확립된 iPS 세포 콜로니의 사진 표시이다. 각 패널에서 윗줄은 피더 세포로서 MEF를 사용하여 수득한 결과를

나타낸다. 각 패널에서 아랫줄은 피더 세포로서 MSTO 세포를 사용하여 수득한 결과를 나타낸다. 좌측 부분에서 콜로니 번호가 없는 가장 우측에서의 사진은 비-ES-성 콜로니의 사진이다.

도 6 은 표 2 에 나타낸 결과의 그래프 표시이다. ES-성 콜로니의 수를 짙은 색 막대로 표시하고, 비-ES-성 콜로니의 수를 윤곽을 그린 막대로 표시하였다. 좌측으로부터 나타낸 것은 하기의 조합 각각을 이동시켜 수득한 결과이다:

- (1) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (2) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (3) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (4) pCXLE-GFP.

도 7 은 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hMLN (상단 좌측 패널), 또는 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL (하단 좌측 패널), 또는 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hMLN (상단 우측 패널), 또는 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL (하단 우측 패널) 을 6 세 인간 피부에서 유래한 섬유모세포에 이동시켜 확립된 iPS 세포 콜로니의 사진 표시이다. 각 패널에서 윗줄은 피더 세포로서 MEF 를 사용하여 수득한 결과를 나타낸다. 각 패널에서 아랫줄은 피더 세포로서 MSTO 세포를 사용하여 수득한 결과를 나타낸다.

도 8 은 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hMLN (상단 좌측 패널), 또는 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL (하단 좌측 패널), 또는 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hMLN (상단 우측 패널), 또는 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL (하단 우측 패널) 을 8 개월 인간의 피부에서 유래한 섬유모세포에 이동시켜 확립된 iPS 세포 콜로니의 사진 표시이다. 각 패널에서 윗줄은 피더 세포로서 MEF 를 사용하여 수득한 결과를 나타낸다. 각 패널에서 아랫줄은 피더 세포로서 MSTO 세포를 사용하여 수득한 결과를 나타낸다.

도 9 는 표 3 에서 나타낸 결과 (TIG120 사용) 의 그래프 표시이다. ES-성 콜로니의 수를 짙은 색 막대로 표시하고, 비-ES-성 콜로니의 수를 윤곽을 그린 막대로 표시하였다. 좌측으로부터 나타낸 것은 하기의 조합 각각을 이동시켜 수득한 결과이다:

- (1) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (2) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (3) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (4) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (5) pCXLE-GFP.

도 10 은 표 3 에 나타낸 결과 (TIG121 사용) 의 그래프 표시이다. ES-성 콜로니의 수를 짙은 색 막대로 표시하고, 비-ES-성 콜로니의 수를 윤곽을 그린 막대로 표시하였다. 좌측으로부터 나타낸 것은 도 9 에 대한 설명에서의 (1) 내지 (5) 에서와 동일하다.

도 11 은 각 유형의 피더 세포에 대해 표 3 에서 나타낸 결과 (TIG120 사용) 의 그래프 표시이다. 좌측으로부터 나타낸 것은 도 9 에 대한 설명에서의 (1) 내지 (5) 에서와 동일하다.

도 12 는 계놈 PCR 에 의한 계놈 내 외인성 유전자 (Klf4, c-Myc, OriP) 통합의 존재 또는 부재에 대한 5 개의 상이한 iPS 세포 검사 결과를 나타내는데, "L" 은 긴 DNA 에 대한 결과를 표시하고, "S" 는 짧은 DNA 에 대한 결과를 표시한다. "347A1" 로 표시하는 것은 실시예 2 에서 확립된 iPS 콜로니에 대한 결과이고; "349A1" 는 실시예 3 에서 확립된 iPS 콜로니에 대한 결과를 표시하고; "341A5" 는 Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 및 Nanog 으로 이루어지는 6 개 유전자를 태아 인간 섬유모세포에 이동시켜 확립된 iPS 콜로니에 대한 결과를 표시하고; "345A1" 은 "345A1" 에 대한 것과 동일한 유전자를 이동시켜 수득한 또다른 iPS 콜로니에 대한 결과를 표시하고; "352A3" 은 "341A5" 에 대한 것과 동일한 유전자를 이동시켜 수득한 또다른 iPS 콜로니에 대한 결과를 표시한다. HDF 는 비-트랜스펙션된 태아 인간 섬유모세포의 계놈에 대한 결과를 표시하며, "레트로" 는 레트로바이러스 백터를 사용하여 Oct3/4, Sox2, Klf4 및 c-Myc 로 이루어지는 4 개 유전자를 태아 인간 섬유모세포에 이동시켜 확립된 iPS 콜로니에 대한 결과를 표시한다. 도 12 에서, "엔도" (윤곽을 그린 화살표)

는 내인성 유전자를 나타내며, "Tg" (짙은 색의 화살표) 는 외인성 유전자를 나타낸다.

도 13 은 pCX-EGFP, pCXE-EGFP 및 pCXLE-EGFP 를 HDF 에 이동시켜 수득한 세포의, 이동 후 제 6 일 및 제 14 일에 찍은 형광 사진 (GFP 관찰 영상) 을 나타낸다.

도 14 는 심지어 p53 shRNA 가 플라스미드 벡터 (EBNA-1 및 oriP 가 결여된 플라스미드 벡터) 를 사용하여 이동 되는 경우에도 iPS 세포가 확립될 수 있는지 여부를 측정하는 검사 결과의 그래프 표시이다. ES-성 콜로니의 수를 짙은 색 막대로 표시하고, 비-ES-성 콜로니의 수를 윤곽을 그린 막대로 표시하였다. 좌측으로부터 나타낸 것은 하기 조합 각각을 이동시켜 수득한 결과이다:

- (1) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (2) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (3) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN, pSilencer-shp53,
- (4) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (5) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (6) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL, pSilencer-shp53,
- (7) pCXLE-EGFP.

도 15 는 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL 을 호모-HLA 4 유전자형을 갖는 건강한 인간으로부터의 치수 줄기 세포주 DP74 및 DP94 에 이동시켜 확립된 iPS 세포 콜로니의 사진 표시이다.

도 16 은 다양한 재프로그래밍 유전자를 치수 줄기 세포주 DP74 에 이동시켜 수득한 ES-성 콜로니 계수 결과의 그래프 표시이다. ES-성 콜로니의 수를 짙은 색 막대로 표시하고, 비-ES-성 콜로니의 수를 윤곽을 그린 막대로 표시하였다. 좌측으로부터 나타낸 것은 하기 조합 각각을 이동시켜 수득한 결과이다:

- (1) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (2) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN,
- (3) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (4) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL,
- (5) pEP4-E02S-ET2K, pEP4-E02S-EN2K, pCEP4-M2L (도 16 에서의 톰슨 믹스 1),
- (6) pEP4-E02S-ET2K, pEP4-E02S-Ck2M-EN2L (도 16 에서의 톰슨 믹스 2),
- (7) pEP4-E02S-ET2K, pEP4-E02S-EN2L, pEP4-E02S-EM2K (도 16 에서의 톰슨 믹스 3),
- (8) pCXLE-GFP.

도 17 은 도 16 에서와 동일하나 DP94 주를 사용하는 실험 결과의 그래프 표시이다.

도 18 은 에피솜 벡터를 사용하여 이동된 EGFP 의 발현량 (형광 세기) 의 주단위 측정 결과를 나타낸다. 상단 패널: FACS 에 의해 분석한 형광 세기 차트. 가로좌표축은 형광 세기를 나타내고; 세로좌표축은 세포 수를 나타낸다. 차트에서의 각각의 % 값은 GFP-양성 세포의 비를 나타낸다. 하단 패널: 세포의 형광 사진 (GFP-양성 영상).

도 19 는 실시간 PCR 에 의한, 확립된 iPS 세포의 18 개 클론의, 그에 의해 보유된 에피솜 벡터의 카피 수에 대한 검사 결과의 그래프 표시이다. 세로좌표축은 1×10^4 세포 당 에피솜 벡터의 카피 수를 표시한다. "elepo 6d" 는 재프로그래밍 유전자 이동 후 제 6 일에서의 세포를 나타내고, "기원" 은 이동에 사용된 HDF 를 나타낸다.

도 20 은 정량 PCR 에 의한, 확립된 iPS 세포의 9 개 클론에서의 Oct3/4 발현량의 검사 결과의 그래프 표시이다. 윤곽을 그린 막대는 외인성 및 내인성 유전자의 발현량의 합 (총 발현량) 을 표시하고, 짙은 색 막대는 외인성 유전자의 발현량을 표시한다. 도 20 에서, "elepoD4" 는 트랜스펙션 후 제 4 일에서의 세포를 나타내고, "KhES1" 및 "KhES3" 은 인간 ES 세포를 나타낸다.

도 21 은 Sox2, Klf4, L-Myc 및 Lin28 에서 수행한 도 20 에서와 동일한 실험 결과의 그래프 표시이다.

도 22 는 피부 섬유모세포 (TIG 및 HDF), 출발 TIG 및 HDF, 및 인간 ES 세포로부터 확립된 인간 iPS 세포에서의 DNA 마이크로어레이 분석에 의한, 각각의 유전자의 발현량에 있어서의 차이를 기준으로 하는 군집 분석 결과를 나타낸다.

도 23 은 인간 ES 세포 (KhES3) 와 HDF (좌측 차트), 또는 에피솜 벡터를 사용하여 확립된 인간 iPS 세포와 인간 ES 세포 (KhES3) (우측 차트) 사이에 유전자 발현 패턴이 상이한지 여부를 측정하기 위해 수행된 DNA 마이크로어레이 분석 결과의 산점도를 나타낸다.

도 24 는 에피솜 벡터를 사용하여 확립된 인간 iPS 세포의 CGH 어레이 분석 결과를 나타낸다. 데이터를 트랜스펙션에 사용된 TIG 세포 (TIG120) 에 대한 변동으로서 나타낸다.

도 25 는 ReproCELL 배지를 사용하여, 피더 세포로서 사용한 DP74 주와 함께 에피솜 벡터를 사용하여 확립된 iPS 세포를 배양하여 수득한 1 차 계대시의 세포 형태를 나타내는 사진 표시이다 (우측). 좌측 플레이트는 피더 세포로서 MSTO 를 사용하여 수득한 사진을 나타낸다.

도 26 은 제노-프리 조건 (제노-프리 배지 사용, 피더 세포 비사용) 하에 에피솜 벡터를 사용하여 확립된 iPS 세포를 배양하여 수득한 1 차 계대시의 세포 형태를 나타내는 사진 표시이다. 좌측 플레이트는 통상적 ReproCELL 배지를 사용하여 수득한 사진을 나타낸다.

도 27 은 제노-프리 조건 (제노-프리 배지 사용, 피더 세포로서 DP74 주 사용) 하에 에피솜 벡터를 사용하여 확립된 iPS 세포를 배양하여 수득한 1 차 계대시의 세포 형태를 나타내는 사진 표시이다.

도 28 은 제노-프리 조건 하에 pCXLE-EGFP 를 DP74 에 이동시킨 결과를 나타낸다. 좌측에 나타낸 것은 통상적 조건 (대조군) 하의 이동 결과이다. 상단 패널: 위상차 영상, 하단 패널: GFP 관찰 영상.

도 29 는 표 9 에서 나타낸 6 가지 상이한 조건 하의 세포 배양에 따른, 제노-프리 조건 하에 트랜스펙션한 후 제 26 일에 출현한 ES 세포성 콜로니 형태의 사진 표시이다.

도 30 은 에피솜 발현 벡터의 구조를 나타낸다. 세 가지 플라스미드를 Y4 혼합물에 대해 사용하였다 (이 도면에서, pCXLE-hOct4-shp53 은 pCXLE-hOct3/4-shp53 으로서 기재됨). 재프로그래밍 인자 (OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28 및 p53 에 대한 shRNA) 를 흑색으로 나타낸다. 프로모터 (CAG), WPRE, 폴리아데닐화 신호 (pA), EBNA-1, OriP 및 2 개의 loxP 위치를 또한 나타낸다.

도 31 은 epi-iPSC 클론에 남아 있는 에피솜 벡터의 카피 수를 나타낸다. A: DP-유래 epi-iPS 세포의 결과. B: 섬유모세포-유래 epi-iPS 세포의 결과. 팔호 안의 수는 각 클론의 계대 수를 표시한다. 또한, 각 클론에 대해 사용한 세포의 수를 나타낸다. 양성 대조군으로서, 레트로바이러스-유래 iPS 클론 (253G-4) 및 Y4 혼합물의 전기천공 6 일 후 섬유모세포를 분석하였다 (fibro-d6).

도 32 는 RT-PCR 분석에 의한 다능성 세포 마커 유전자의 발현을 나타낸다. A: DP-유래 epi-iPS 세포의 결과. B: 섬유모세포-유래 epi-iPS 세포의 결과. 총 RNA 를 Y1 (454B-1), Y2 (454C-2), Y3 (454D-1) 및 Y4 (454E-2, 451F-3, 457C-1, 453F-2, 404C-2, 409B-2, 414C-2, 418C-1, 421C-1, 426C-2, 427D-4 및 428C-2) 조합으로 확립된 epi-iPSC 클론으로부터 단리하였다. 레트로바이러스-유래 iPSC 클론 (201B-7 및 253G-4) 및 hESC 주 (KhES-3 및 H9) 를 또한 검사하였다. OCT3/4 및 Sox2 로 라벨링한 레인에서 PCR 프라이머는 오직 내인성 유전자만을 증폭시킨 한편, Ret-Oct 레인에서 PCR 프라이머는 레트로바이러스 Oct3/4 전이유전자를 특이적으로 증폭시켰다. G3PDH 를 적재 대조군으로서 분석하였다. 음성 대조군으로서, 총 RNA 를 Y4 혼합물의 전기천공 4 일 후 인간 피부 섬유모세포로부터 단리하였다 (HDF-elepo).

도 33 은 NANOG 프로모터 부위의 DNA 메틸화 상태를 나타낸다. 백색 원 (open circle) 및 흑색 원 (closed circle) 은 각각 비메틸화 및 메틸화 CpG 를 표시한다.

도 34 는 epi-iPSC 클론에서 유래한 기형종을 나타낸다. 도 34A: 454E-2 의 결과. 신경 조직 (A), 연골 (B), 근육 (C) 및 장-성 상피 (D) 의 혜마톡실린 및 에오신 염색을 나타낸다. 눈금 막대 = 50 μm . 도 34B: 404C-2, 409B-2, 418C-1, 421C-1, 428C-2 및 454D-1 의 결과. 신경 조직, 연골 및 장-성 상피의 혜마톡실린 및 에오신 염색을 나타낸다. 눈금 막대 (하부-우측 코너) = 50 μm .

도 35 는 epi-iPSC 클론 (클론 454E-2) 으로부터의 도파민성 뉴런으로의 분화를 나타낸다. 도 35A: TuJ1 (녹색, E), TH (적색, F) 에 대한 면역염색 영상, 및 Hoechst 33342 (청색, G) 를 사용하는 핵 염색과의 병합

영상을 나타낸다. 눈금 막대 = 20 μm . 도 35B: (A-C) DAPI 핵 염색 (청색) 과의 네스틴 (녹색) 및 Ki67 (적색)에 대한 이중 면역염색. 고배율 영상을 (D)에 나타낸다. (E 및 F) Pax6 (적색) 및 TH (녹색)에 대한 이중 면역염색. (G) DAPI 와의 TH (적색) 및 TuJ1 (녹색)에 대한 이중 면역염색. (H 및 I) TH (적색) 및 MAP2ab (녹색)에 대한 이중 면역염색. (J 및 K) TH (적색) 및 소포성 모노아민 운반체 2 (VMAT2, 녹색)에 대한 이중 면역염색. 눈금 막대: (A-C, E-G) 에서는 100 μm ; (D, H-K) 에서는 20 μm .

도 36은 인간 말초 혈액 단핵 세포로부터의 iPS 세포의 확립을 나타낸다. 도 36a는 실험 절차의 개론을 나타낸다. 도 36b는 3개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL을 인간 말초 혈액 단핵 세포에 이동시켜 확립된 iPS 세포 콜로니의 사진 표시이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046]

발명의 상세한 설명

[0047]

본 발명은 (a) Oct3/4 또는 이를 인코딩하는 핵산, (b) Klf4 또는 이를 인코딩하는 핵산, 및 (c) Sox2 또는 이를 인코딩하는 핵산 뿐 아니라 (d1) L-Myc 또는 이를 인코딩하는 핵산 및/또는 (d2) p53의 기능적 저해제를 체세포와 접촉시키는 것을 포함하는 iPS 세포의 제조 방법을 제공한다.

[0048]

(A) 체세포의 공급원

[0049]

포유류 기원 (예를 들어 인간, 마우스, 원숭이, 돼지, 랙트 등)의 생식 세포 이외의 임의의 세포가 iPS 세포의 제조를 위한 출발 물질로서 사용될 수 있다. 예시에는, 각질화 상피 세포 (예를 들어, 각질화 표피 세포), 점막 상피 세포 (예를 들어, 혀 표층의 상피 세포), 외분비샘 상피 세포 (예를 들어, 젖샘 세포), 호르몬 분비세포 (예를 들어, 부신수질), 대사 또는 저장을 위한 세포 (예를 들어, 간세포), 접면을 구성하는 내막 상피 세포 (예를 들어, 유형 I 폐포 세포), 폐쇄관의 내막 상피 세포 (예를 들어, 혈관 내피 세포), 수송 능력을 갖는 섬모를 가진 세포 (예를 들어, 기도 상피 세포), 세포외 매트릭스 분비를 위한 세포 (예를 들어, 섬유아세포), 팔약성 세포 (예를 들어, 평활근 세포), 혈액 및 면역계의 세포 (예를 들어, T 림프구), 감각 관련 세포 (예를 들어, 샘세포 (bacillary cells)), 자율신경계 뉴런 (예를 들어, 콜린성 뉴런), 감각 기관의 지주세포 및 말초 뉴런 (예를 들어, 위성 세포), 중추 신경계의 신경 세포 및 아교 세포 (예를 들어, 별아교 세포), 색소 세포 (예를 들어, 망막 색소 상피 세포), 그의 전구 세포 (조직 전구 세포) 등이 포함된다. 세포 분화 정도, 세포가 수집되는 동물의 연령 등에 대해서는 제한이 없고; 심지어 미분화 전구 세포 (체세포 줄기 세포를 포함) 및 최종적으로 분화된 성숙 세포가 본 발명에서 체세포의 공급원으로서 유사하게 사용될 수 있다.

[0050]

미분화 전구 세포의 예시에는 조직 줄기 세포 (체세포 줄기 세포), 예컨대 신경 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 간엽 줄기 세포, 지방-유래 간질 (줄기) 세포 및 치수 줄기 세포가 포함된다. 조혈 및 중간엽 줄기 세포는 골수, 제대혈 및 태반에 풍부하게 함유된다. 골수, 제대혈 및 태반은 많은 공공 및 민간 혈액 은행에 기탁되고, 혈액성 질환 예컨대 백혈병의 치료에 사용되었으므로, 상기 기탁된 골수, 제대혈 및 태반은 또한 iPS 세포 은행을 위한 체세포의 공급원으로서 이용될 수 있다. 특히, 제대혈은 출산시에 수득된 탯줄로부터 쉽게 수집될 수 있으므로, 제대혈로부터 수득된 조혈 및 간엽 줄기 세포는 iPS 세포 은행을 위한 체세포의 바람직한 공급원이다. 치수 줄기 세포는 또한 iPS 세포 은행을 위한 체세포의 공급원으로 역할하는 것으로 예측되는데, 이는 치수 줄기 세포가 치주 질환 등의 치료를 위해 발치된 사랑니 및 기타 치아로부터 단리 및 제조되어 쉽게 이용 가능하기 때문이다.

[0051]

최종적으로 분화된 성숙 세포의 예는 말초 혈액 단핵 세포 예컨대 T 세포 및 B 세포를 포함한다. 말초 혈액의 샘플링은 최소 침습성이고 임상 검정에서 일상적으로 수행된다. 임상 검정 이후에 사용되지 않고 남은 소량 부피의 말초 혈액 샘플은 보통 폐기되므로, 이는 iPS 세포 은행을 위한 체세포의 바람직한 공급원이다. 특히, T 세포는 상대적으로 쉽게 시험판 내에서 확장될 수 있으므로, iPS 세포는 심지어 소량 부피의 말초 혈액 샘플로부터도 확립될 수 있다. 인간 말초 혈액 T 세포로부터의 iPS 세포 생성이 최근 여러 그룹에 의해 보고되었다 (Seki et al., *Cell Stem Cell*, 7: 11-14 (2010); Loh et al., *Cell Stem Cell*, 7: 15-19 (2010); Staerk et al., *Cell Stem Cell*, 7: 20-24 (2010)).

[0052]

체세포의 공급원으로서 포유류 개체의 선택은 특별히 제한되지 않지만; 수득된 iPS 세포를 인간에서의 재생 의학에 이용하려면, 이식편 거부 방지의 측면에서, 환자 자신 또는 환자의 것과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 HLA 유형을 가진 또 다른 사람으로부터 체세포를 수집하는 것이 바람직하다. 본원에 사용된 "실질적으로 동일한 HLA 유형"은, 공여자의 체세포로부터 유래된 iPS 세포의 분화를 유도함으로써 수득되는 이식용 세포가 면

역액제제 등을 이용하면서 환자에게 이식했을 때 융합될 수 있을 정도로 환자의 것과 공여자의 HLA 유형이 맞는다는 것을 의미한다. 예를 들어, 실질적으로 동일한 HLA 유형에는, 주요 HLA (예를 들어, HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 의 3 개의 주요 자리, HLA-Cw 를 추가로 포함하는 4 개의 주요 자리) 가 동일한 HLA 유형 (이하 동일한 의미를 적용함) 등을 포함한다. 수득한 iPS 세포가 인간에게 투여 (이식) 되지 않지만, 예를 들어 환자의 약물 수용성 또는 부작용을 평가하기 위한 스크리닝에 대한 세포의 공급원으로서 사용되는 경우, 약물 수용성 또는 부작용과 관련한 동일한 유전자적 다양성을 가진 환자 또는 또 다른 사람 유래의 체세포를 수집하는 것이 마찬가지로 필요하다.

[0053] 포유류로부터 단리된 체세포는 핵 재프로그래밍의 단계에 적용되기 전에 세포의 선택에 따라 이의 배양에 적합한 그 자체로 공지된 배지를 사용하여 사전-배양될 수 있다. 상기 배지의 예는 이에 제한되지는 않으나, 약 5 내지 20% 의 태아 소 혈청 (FCS) 을 함유하는 최소 영양 배지 (MEM), 둘째로 개질된 이글 배지 (DMEM), RPMI1640 배지, 199 배지, F12 배지 등을 포함한다. 예를 들어, 치수 줄기 세포가 체세포로서 사용되는 경우, 간엽 줄기 세포용 배지, 예컨대 간엽 줄기 세포 기초 배지 (Lonza) 를 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 이동 시약 예컨대 양이온성 리포솜이 체세포를 핵 재프로그래밍 물질 및 p53 의 기능적 저해제 (및 필요한 경우 또 다른 iPS 세포 확립 효율 증진제) 와 접촉시키는데 사용되는 경우, 때로는 이동 효율이 감소되는 것을 방지하도록 배지를 무-혈청 배지로 대체하는 것이 바람직하다.

[0054] 인간 임상 적용에 적합한 완전한 제노-프리 인간 iPS 세포를 수득하기 위해, 비-인간 동물로부터 유래된 임의의 요소, 예컨대 FCS 를 함유하지 않는 배지를 사용하는 것이 더 바람직하다. 다양한 체세포 (특히, 재조합 인간 단백질 예컨대 성장 인자) 의 배양에 적합한 인간-유래 요소, 비필수 아미노산, 비타민 등으로 보충된 기초 배지를 포함하는 배지가 시판되고; 당업자들은 체세포의 공급원에 따라 적절한 제노-프리 배지를 선택할 수 있다. 제노-프리 배지를 사용하여 사전 배양된 체세포는 적절한 제노-프리 세포 해리 용액을 사용하여 배양 용기로부터 해리되고, 회수되고, 이후 핵 재프로그래밍 물질 및 p53 의 기능적 저해제와 접촉된다.

(B) 핵 재프로그래밍 물질

[0056] 본원에서 사용된 바와 같은 "핵 재프로그래밍 물질" 은 체세포로부터 iPS 세포를 유도할 수 있는 단백질성 인자 (들) 또는 이를 인코딩하는 핵산 (벡터에 통합된 형태를 포함) 일 수 있다. 본 발명에 사용되는 핵 재프로그래밍 물질은 Oct3/4, Klf4 및 Sox2 또는 이를 인코딩하는 핵산 (Klf4 및/또는 Sox2 는 이의 기능을 대체할 수 있는 것으로 보고된 또 다른 인자로 대체될 수 있음) 중 하나 이상으로 이루어진다. p53 의 기능적 저해제가 조합에 사용되지 않는 경우, L-Myc 또는 이를 인코딩하는 핵산, 및 Lin28 또는 Lin28b 또는 이를 인코딩하는 핵산이 추가적인 핵 재프로그래밍 물질로서 조합된다. 본 발명에 사용되는 핵 재프로그래밍 물질은 Nanog 또는 이를 인코딩하는 핵산을 배제한다. 구체적으로는 본 발명에 사용되는 핵 재프로그래밍 물질은 하기 조합에 의해 예시된다 (여기서는, 단백질성 인자에 관한 명칭만을 나타냄):

[0057] (1) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc (여기서, Sox2 는 Sox1, Sox3, Sox15, Sox17 또는 Sox18 로 대체할 수 있고; Klf4 는 Klf1, Klf2 또는 Klf5 로 대체할 수 있음)

[0058] (2) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, SV40 Large T 항원 (이하, SV40LT)

[0059] (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E6

[0060] (4) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E7

[0061] (5) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E6, HPV16 E7

[0062] (6) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, Bmi1

[0063] (7) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28

[0064] (8) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, SV40LT

[0065] (9) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, TERT, SV40LT

[0066] (10) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, SV40LT

[0067] (11) Oct3/4, Esrrb, Sox2, L-Myc (Esrrb 는 Esrrg 로 대체할 수 있음)

[0068] (12) Oct3/4, Klf4, Sox2

- [0069] (13) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, SV40LT
- [0070] (14) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E6
- [0071] (15) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E7
- [0072] (16) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E6, HPV16 E7
- [0073] (17) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, Bmil
- [0074] (18) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28
- [0075] (19) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, SV40LT
- [0076] (20) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, TERT, SV40LT
- [0077] (21) Oct3/4, Klf4, Sox2, SV40LT
- [0078] (22) Oct3/4, Esrrb, Sox2 (Esrrb 는 Esrrg 로 대체할 수 있음).
- [0079] 상기 조합에서, Lin28b 는 Lin28 대신에 사용될 수 있다. Esrrb 또는 Esrrg [상기 (11) 및 (22)] 를 사용하는 경우, Klf4 는 이와의 조합으로 사용될 수 있다.
- [0080] 상기 (1) 내지 (22) 의 내에 있지 않지만 (1) 내지 (22) 중 어느 하나의 구성 요소 모두를 포함하고 추가로 임의로 선택된 기타 물질을 포함하는 임의의 조합이 또한 본 발명의 "핵 재프로그래밍 물질" 의 범주에 포함될 수 있다. 단, 핵 재프로그래밍을 거치기 위한 체세포는 핵 재프로그래밍을 야기하기에 충분한 수준으로 상기 임의 하나의 (1) 내지 (22) 중 하나 이상의 구성요소를 내인성적으로 발현하며, 하나 이상의 구성 요소를 배제 한 잔여 구성요소만으로의 조합이 또한 본 발명의 "핵 재프로그래밍 물질" 의 범주에 포함될 수 있다.
- [0081] 이러한 조합 중, Oct3/4, Sox2, Klf4, Lin28 (Lin28b) 및 L-Myc 로 이루어지는 5 개의 인자, 및 Oct3/4, Sox2, Klf4 및 Lin28 (Lin28b) 로 이루어지는 4 개의 인자는 바람직한 핵 재프로그래밍 물질이다. 또한 바람직한 것은 상기 5 또는 4 개의 인자 및 추가적인 SV40 Large T 항원으로 이루어지는 6 또는 5 개의 인자이다.
- [0082] 후술되는 핵 재프로그래밍 물질의 마우스 및 인간 cDNA 서열에 대한 정보는 WO 2007/069666 (공보에서, Nanog 는 ECAT4 로 기재됨. Lin28, Lin28b, Esrrb, Esrrg, L-Myc 에 대한 마우스 및 인간 cDNA 서열 정보는 각각 하기 NCBI 접근 번호를 참조로 하여 취득될 수 있음) 에 언급된 NCBI 접근 번호를 참조하여 이용가능하고; 당업자는 이러한 cDNA 를 쉽게 단리할 수 있다.
- | | | | |
|--------|--------|--------------|--------------|
| [0083] | 유전자 명칭 | 마우스 | 인간 |
| [0084] | Lin28 | NM_145833 | NM_024674 |
| [0085] | Lin28b | NM_001031772 | NM_001004317 |
| [0086] | Esrrb | NM_011934 | NM_004452 |
| [0087] | Esrrg | NM_011935 | NM_001438 |
| [0088] | L-Myc | NM_008506 | NM_001033081 |
- [0089] 핵 재프로그래밍 물질로서 사용하기 위한 단백질성 인자는 수득된 cDNA 를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 호스트 세포에 도입하고, 재조합 단백질성 인자를 배양된 세포 또는 이의 조건화 배지로부터 회수함으로써 제조될 수 있다. 한편, 사용된 핵 재프로그래밍 물질이 단백질성 인자를 인코딩하는 핵산인 경우, 수득된 cDNA 는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 에피솜 벡터 등에 삽입되어 발현 벡터를 구성하고, 벡터는 핵 재프로그래밍 단계를 거친다.
- [0090] (c) 핵 재프로그래밍 물질의 체세포로의 이동 방법
- [0091] 핵 재프로그래밍 물질의 체세포로의 이동은 세포로의 단백질 이동에 대해 자체적으로 공지된 방법을 사용하여 달성될 수 있는데, 단 물질은 단백질성 인자이다. 상기 방법은 예를 들어 단백질 이동 시약을 사용하는 방법, 단백질 이동 도메인 (PTD)- 또는 세포 침투 펩티드 (CPP)-융합 단백질을 사용하는 방법, 마이크로인젝션 방법 등을 포함한다. 단백질 이동 시약은 시판되며, 양이온성 지질 기재의 것, 예컨대 BioPOTER 단백질 운반 시약 (Gene Therapy System), Pro-JectTM 단백질 트랜스펙션 시약 (PIERCE) 및 ProVectin (IMGENEX); 지질 기재의

것, 예컨대 Profect-1 (Targeting Systems); 멤브레인-침투성 펩티드 기재의 것, 예컨대 Penetratin Peptide (Q biogene) 및 Chariot Kit (Active Motif), HVJ 외피 (일본의 불활성화된 적혈구 응집 바이러스) 를 이용한 GenomONE (ISHIHARA SANGYO KAISHA, LTD.) 등이 포함된다. 이동은 이러한 시약에 첨부된 프로토콜에 따라 달성될 수 있으며, 통상적인 과정은 하기에 기재된 바와 같다. 핵 채프로그래밍 물질(들)은 적당한 용매 (예를 들어, PBS 또는 HEPES 와 같은 완충 용액) 로 회석되며, 이동 시약이 침가되며, 혼합물은 실온에서 약 5 내지 15 분 동안 인큐베이션되어 복합체를 형성하고, 배지를 무-헬청 배지로 교체한 후 상기 복합체를 세포에 침가하고, 세포를 37°C 에서 1 내지 수 시간 동안 인큐베이션한다. 이후, 배지를 제거하고, 헬청이 함유된 배지로 교체한다.

[0092] 개발된 PTD 에는, 단백질의 세포외 도메인을 이용하는 것, 예컨대 초파리 유래 AntP, HIV-유래 TAT (Frankel, A. 등, *Cell* 55, 1189-93 (1988) 또는 Green, M. & Loewenstein, P. M. *Cell* 55, 1179-88 (1988)), Penetratin (Derossi, D. 등, *J. Biol. Chem.* 269, 10444-50 (1994)), Buforin II (Park, C. B. 등 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 8245-50 (2000)), Transportan (Pooga, M. 등 *FASEB J.* 12, 67-77 (1998)), MAP (모델 양친매성 펩티드) (Oehlke, J. 등 *Biochim. Biophys. Acta.* 1414, 127-39 (1998)), K-FGF (Lin, Y. Z. 등 *J. Biol. Chem.* 270, 14255-14258 (1995)), Ku70 (Sawada, M. 등 *Nature Cell Biol.* 5, 352-7 (2003)), 프리온 (Prion) (Lundberg, P. 등 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 85-90 (2002)), pVEC (Elmquist, A. 등 *Exp. Cell Res.* 269, 237-44 (2001)), Pep-1 (Morris, M. C. 등 *Nature Biotechnol.* 19, 1173-6 (2001)), Pep-7 (Gao, C. 등 *Bioorg. Med. Chem.* 10, 4057-65 (2002)), SynB1 (Rousselle, C. 등 *Mol. Pharmacol.* 57, 679-86 (2000)), HN-I (Hong, F. D. & Clayman, G L. *Cancer Res.* 60, 6551-6 (2000)), 및 HSV-유래 VP22 가 포함된다. PTD로부터 유래한 CPP 는, 폴리아르기닌, 예컨대 11R (*Cell Stem Cell*, 4, 381-384 (2009)) 및 9R (*Cell Stem Cell*, 4, 472-476 (2009)) 을 포함한다.

[0093] 핵 채프로그래밍 물질의 cDNA 및 PTD 또는 CPP 서열을 혼입한 융합 단백질 발현 벡터가 제조되고, 이 벡터를 사용하여 재조합 발현이 수행된다. 융합 단백질이 회수되고 이동에 사용된다. 이동은 단백질 이동 시약이 침가되지 않는 것을 제외하고는 상기와 동일한 방식으로 수행될 수 있다.

[0094] 팀 직경이 약 1 μm 인 유리 바늘에 단백질 용액을 위치시켜, 그 용액을 세포에 주입하는 방법인 마이크로인젝션은 단백질의 세포로의 이동을 확실하게 한다.

[0095] 단백질 이동 작업은 하나 이상의 임의로 선택된 횟수 (예를 들어, 1 회 이상 내지 10 회 이하, 또는 1 회 이상 내지 5 회 이하 등) 로 수행될 수 있다. 바람직하게는, 이동 작업은 2 회 이상 (예를 들어, 3 회 또는 4 회) 반복적으로 수행될 수 있다. 반복된 이동 작업에 대한 횟수 간격은 예를 들어 6 내지 48 시간, 바람직하게는 12 내지 24 시간이다.

[0096] 그러나, iPS 세포의 확립 효율을 고려하면, 핵 채프로그래밍 물질은 바람직하게는 인자 그대로 보다는 단백질성 인자를 인코딩하는 핵산의 형태로 사용될 수 있다. 핵산은 DNA 또는 RNA, 또는 DNA/RNA 키메라일 수 있으며, 이중가닥 또는 단일가닥일 수 있다. 바람직하게는, 핵산은 이중가닥 DNA, 특히 cDNA 이다.

[0097] 핵 채프로그래밍 물질의 cDNA 는 숙주 체세포에서 기능할 수 있는 프로모터를 포함하는 적당한 발현 벡터에 삽입된다. 유용한 발현 벡터에는, 예를 들어 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스바이러스 및 센다이 (Sendai) 바이러스, 동물 세포에서의 발현을 위한 플라스미드 (예를 들어, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo) 등이 포함된다.

[0098] 사용되는 벡터의 종류는 수득한 iPS 세포의 의도하는 용도에 따라 적당히 선택될 수 있다. 유용한 벡터는 아데노바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 센다이 바이러스 벡터, 에피솜 벡터 등을 포함한다.

[0099] 발현 벡터에 사용된 프로모터의 예시에는, EF1 α 프로모터, CAG 프로모터, SR α 프로모터, SV40 프로모터, LTR 프로모터, CMV (사이토메갈로바이러스) 프로모터, RSV (라우스 육종 바이러스) 프로모터, MoMuLV (몰로니 마우스 백혈병 바이러스) LTR, HSV-TK (헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제) 프로모터 등이 포함되며, EF1 α 프로모터, CAG 프로모터, MoMuLV LTR, CMV 프로모터, SR α 프로모터 등이 바람직하다.

[0100] 발현 벡터는, 프로모터 이외에, 필요하다면 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 선별가능한 마커 유전자, SV40 복제 기원 등을 포함할 수 있다. 선별가능한 마커 유전자의 예시에는, 디히드로폴레이트 리덕타아제 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 푸로마이신 내성 유전자 등이 포함된다.

[0101] 핵 채프로그래밍 물질 (채프로그래밍 유전자) 인 핵산은 상이한 발현 벡터에 개별적으로 통합될 수 있거나, 2

개 이상, 바람직하게는 2 내지 3 개의 상이한 유전자가 단일 발현 벡터에 통합될 수 있다. 상이한 발현 벡터에 개별적으로 통합되는 경우 높은 트랜스펙션 효율을 제공하는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하는 것이 바람직하고, 상이한 유전자가 단일 발현 벡터에 통합되는 경우 플라스미드, 아데노바이러스 또는 에피솜 벡터 등을 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 2 개 이상의 상이한 유전자를 혼입한 발현 벡터 및 하나의 유전자만을 혼입한 상이한 발현 벡터를 조합하여 사용할 수 있다.

[0102] 상기 문맥에서, 다수의 재프로그래밍된 유전자 [예를 들어, Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28 (Lin28b), 및 SV40LT 중에서 선택된 2 개 이상, 바람직하게는 2 또는 3 개 이상의 상이한 유전자] 가 하나의 발현 벡터에서 통합되고, 이러한 유전자는 바람직하게는 폴리시스템트론 발현을 가능하게 하는 서열을 통해 발현 벡터로 통합될 수 있다. 폴리시스템트론 발현을 가능하게 하는 서열을 사용함으로써, 하나의 발현 벡터로 통합되는 다수의 유전자를 더욱 효과적으로 발현시키는 것이 가능하다. 폴리시스템트론 발현을 가능하게 하는 유용한 서열은, 예를 들어, 구제역 바이러스의 2A 서열 (SEQ ID NO:63; PLoS ONE 3, e2532, 2008, Stem Cells 25, 1707, 2007), IRES 서열 (미국 특허 제 4,937,190 호) 등을 포함하며, 2A 서열이 바람직하다. 다수의 재프로그래밍된 유전자가 폴리시스템트론성으로 연결되어 하나의 발현 벡터로 삽입되는 경우, 재프로그래밍된 유전자의 순서는 특별하게 제한되지 않고; 예를 들어, (i) Sox2 및 Klf4, (ii) L-Myc 및 Lin28 (Lin28b), (iii) Klf4, Sox2 및 Oct3/4 가 서로 5'에서 3'로의 배향 순서로 함께 연결될 수 있다.

[0103] 재프로그래밍된 유전자를 갖는 발현 벡터는 벡터의 선택에 따라 자체적으로 공지된 기술에 의해 세포에 유도될 수 있다. 바이러스 벡터의 경우, 예를 들어, 핵산 함유 플라스미드는 적절한 패키징 세포 (예를 들어, Plat-E 세포) 또는 상보 세포주 (예를 들어, 293-세포)에 유도되고, 배양 상청액에서 제조된 바이러스 벡터는 회수되고, 상기 벡터는 바이러스 벡터에 적합한 방법에 의해 세포에 감염된다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터를 사용한 구체적인 방법이 WO2007/69666, *CeII*, 126, 663-676 (2006) 및 *CeII*, 131, 861-872 (2007)에 개시되어 있다. 렌티바이러스 벡터를 사용한 구체적인 방법이 *Science*, 318, 1917-1920 (2007)에 개시되어 있다. iPS 세포가 재생 의학에서 세포 공급원으로서 이용되는 경우, 재프로그래밍된 유전자의 발현 (재활성화)은 iPS 세포에서 유래한 분화된 세포로부터 재생된 조직에서의 발암의 위험을 잠재적으로 증가시키고; 따라서, 재프로그래밍된 유전자는 바람직하게는 세포의 염색체에 통합되지 않고 일시적으로 발현된다. 이러한 관점으로부터, 염색체 내로의 통합이 드문 아데노바이러스 벡터의 사용이 바람직하다. 아데노바이러스 벡터를 사용하는 구체적인 방법이 *Science*, 322, 945-949 (2008)에 개시되어 있다. 아데노-관련 바이러스 벡터가 또한 염색체 내로의 통합의 빈도에 있어서 낮고 세포 독성 및 염증-유발 면에서 아데노바이러스 벡터보다 낮기 때문에, 이는 또다른 바람직한 벡터로서 언급될 수 있다. 센다이 바이러스 벡터는 염색체의 외부에서 안정적으로 존재할 수 있고 요구되는 바와 같은 siRNA를 사용하여 분해되고 제거될 수 있기 때문에, 이 또한 바람직하게 이용된다. 센다이 바이러스 벡터와 관련하여 *J. Biol. Chem.*, 282, 27383-27391 (2007), *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 85, 348-362 (2009) 또는 JP-B-3602058에 기재된 것이 사용될 수 있다.

[0104] 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터가 사용되는 경우, 심지어 전이유전자의 침묵화가 발생한 경우라도, 이는 재활성화되는 것이 가능하며; 따라서 바람직하게는 예를 들어, 필요 없어지게 되면 핵 재프로그래밍된 물질을 인코딩하는 핵산을 Cre-loxP 시스템을 사용하여 잘라내는 방법이 바람직하게 사용될 수 있다. 즉, 앞서 핵산의 양끝에 loxP 서열을 배열하여, iPS 세포를 유도한 후, Cre 재조합효소로 하여금 플라스미드 벡터 또는 아데노바이러스 벡터를 사용하는 세포에 작용시켜, loxP 서열 사이에 긴 부위를 잘라낼 수 있다. LTR U3 부위의 인핸서-프로모터 서열은 삽입 돌연변이에 의해 그의 부근에서 숙주 유전자를 상향조절할 수 있기 때문에, 서열의 결실 또는 SV40의 것과 같은 폴리아데닐화 서열을 이용한 서열 치환으로 제조된 3'-자가-불활성화 (SIN) LTR을 사용하여, 절단 없이 게놈 내에 잔류하는 loxP 서열의 LTR 외부에 의해 내인성 유전자의 발현 조절을 회피하는 것이 보다 바람직하다. Cre-loxP 시스템 및 SIN LTR을 사용하는 구체적인 방법이 Chang et al., *Stem Cells*, 27: 1042-1049 (2009)에 개시되어 있다.

[0105] 한편, 비-바이러스 벡터인 플라스미드 벡터가 리포펙틴법, 리포솜법, 전기천공법, 인산칼슘 공침법, DEAE 텍스트란법, 마이크로인젝션법, 유전자 총 (gene gun) 법 등을 사용하여 세포에 이동될 수 있다. 플라스미드를 벡터로서 사용하는 구체적인 방법은, 예를 들어 *Science*, 322, 949-953 (2008) 등에 기재되어 있다.

[0106] 플라스미드 벡터, 아데노바이러스 벡터 등을 사용하는 경우, 트랜스펙션은 1회 이상의 임의로 선택된 횟수 (예를 들어, 1회 내지 10회, 1회 내지 5회 등)로 수행될 수 있다. 두 종류 이상의 발현 벡터를 체세포에 도입하는 경우, 이러한 모든 종류의 발현 벡터를 동시에 체세포에 도입하는 것이 바람직하나; 그러한 경우일지라도, 트랜스펙션은 1회 이상의 임의로 선택된 횟수 (예를 들어, 1회 내지 10회, 1회 내지 5회 등)로 수

행될 수 있으며, 바람직하게는 트랜스펙션은 2 회 이상 (예를 들어, 3 회 또는 4 회) 반복하여 수행될 수 있다.

[0107] 아데노바이러스 또는 플라스미드를 사용하는 경우에는 또한, 전이유전자는 염색체에 통합될 수 있고; 따라서 서던 블롯 또는 PCR로 염색체로의 유전자 삽입의 부재를 확인하는 것이 결국 필요하다. 이러한 이유로, 앞서 언급한 Cre-loxP 시스템과 같이, 전이유전자가 염색체에 통합된 후 유전자를 제거하는 방법을 사용하는 것이 유리할 수 있다. 구현예의 또 다른 바람직한 방식에 있어서, 전이유전자를 트랜스포존을 사용하여 염색체에 통합시킨 후, 트랜스포사아제로 하여금 플라스미드 벡터 또는 아데노바이러스 벡터를 사용하는 세포에 작용하도록 하여 전이유전자를 염색체로부터 완전히 제거하는 방법을 사용할 수 있다. 바람직한 트랜스포존의 예로서, 인시목 곤충으로부터 유래한 트랜스포존인 piggyBac 등을 언급할 수 있다. piggyBac 트랜스포존을 사용하는 구체적인 방법은 Kaji, K. et al., *Nature*, 458: 771-775 (2009), Woltjen et al., *Nature*, 458: 766-770 (2009)에 개시되어 있다.

[0108] 또 다른 바람직한 비-통합 유형 벡터는 에피솜 벡터이고, 이는 염색체 외부에서 자가-복제가 가능하다. 에피솜 벡터를 사용하는 구체적인 방법은 Yu et al., *Science*, 324, 797-801 (2009)에 개시되어 있다. 본 발명의 특히 바람직한 구현예에 있어서, 에피솜 벡터의 복제를 위해 필수적인 벡터 구성 요소의 5' 및 3' 측에 동일한 배향으로 위치한 loxP 서열을 갖는 에피솜 벡터가 사용될 수 있다. 에피솜 벡터는 염색체 외부에서 자가-복제가 가능하기 때문에 게놈 내에 통합되지 않는 경우일지라도 숙주 세포에서 안정적인 유전자 발현이 보장될 수 있다. 그러나, 벡터는 iPS 세포가 확립되기 전에 신속하게 제거되는 것이 바람직하다. 2 개의 loxP 서열 사이에서의 에피솜 벡터의 복제를 위해 필수적인 벡터 구성 요소를 측면에 배치하고, Cre 재조합효소의 작용에 의해 벡터 구성 요소를 제거하여 벡터를 iPS 세포로부터 초기에 분계될 수 있게 함으로써 에피솜 벡터가 자가-복제 잠재력을 상실하게 할 수 있다.

[0109] 본 발명에서 사용되는 에피솜 벡터의 예는 벡터 성분으로서 자가-복제에 필요한 EBV, SV40 등으로부터 유래한 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 자가-복제에 필요한 벡터 성분은 특별하게는 복제 기원 및 복제를 조절하기 위해 복제 기원에 결합되는 단백질을 인코딩하는 유전자로 예시되고; 예로서 복제 기원 oriP 및 EBV에 대한 EBNA-1 유전자 및 복제 기원 ori 및 SV40에 대한 SV40 large T 항원 유전자를 포함한다.

[0110] 에피솜 발현 벡터는 재프로그래밍된 유전자의 전사를 조절하는 프로모터를 포함한다. 사용되는 프로모터는 상기에 기재된 바와 같을 수 있다. 상술한 바와 같이 에피솜 발현 벡터는 원하는 바와 같은 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 선별 마커 유전자 등을 추가로 함유할 수 있다. 선별 마커 유전자의 예는 디히드로폴레이트 리덕타아제 유전자, 네오마이신 내성 유전자 등을 포함한다.

[0111] 본 발명에서 유용한 loxP 서열은 박테리오파지 P1-유래 야생형 loxP 서열 (SEQ ID NO:29)에 부가하여, 재프로그래밍된 유전자의 복제를 위해 필요한 벡터 성분에 측면 배치된 위치에서 동일한 배향으로 위치한 경우에서 재조합에 의해 loxP 서열의 측면에 배치된 서열을 결실시킬 수 있는 임의로 선택된 돌연변이체 loxP 서열을 포함한다. 이러한 돌연변이체 loxP 서열의 예는 5' 반복영역에서 돌연변이화된 lox71 (SEQ ID NO:30), 3' 반복영역에서 돌연변이화된 lox66 (SEQ ID NO:31), 및 스페이서 부분에서 돌연변이화된 lox2272 및 lox511를 포함한다. 벡터 구성 요소의 5' 및 3' 측에 위치한 2 개의 loxP 서열은 동일하거나 그렇지 않을 수 있더라도, 스페이서 부분에서 돌연변이화된 2 개의 돌연변이체 loxP 서열은 동일하여야 한다 (예를 들어, 한 쌍의 lox2272 서열, 한 쌍의 lox511 서열). 5' 반복영역에서 돌연변이화된 돌연변이체 loxP 서열 (예를 들어, lox71) 및 3' 반복영역에서 돌연변이화된 돌연변이체 loxP 서열 (예를 들어, lox66)의 조합이 바람직하다. 이러한 경우, 염색체에 잔존하는 loxP 서열은 재조합의 결과로서 5' 측 및 3' 측의 반복 영역에서의 이중 돌연변이를 가지고, 따라서 Cre 재조합효소에 의해 인식되기 어렵게 되어 원하지 않는 재조합으로 인해 염색체에 결실 돌연변이를 야기하는 위험을 감소시킨다. 돌연변이체 loxP 서열 lox71 및 lox66이 조합하여 사용되는 경우, 각각은 앞서 언급한 벡터 성분의 임의의 5' 및 3' 측에 위치될 수 있으나, 돌연변이체 loxP 서열은 돌연변이화된 부분이 각각의 loxP 서열의 외부 말단에 놓여질 수 있도록 배향되어 삽입될 필요가 있다. 본 발명의 바람직한 에피솜 벡터가 Cre 재조합효소에 의해 작용되지 않고서도 세포로부터 초기에 분계된 자가-제거 벡터일지라도, 에피솜 벡터가 세포로부터 제거되는데 장시간이 소요되는 예외적인 경우가 있을 수 있다. 따라서, loxP 서열은 제조시 Cre 재조합효소 처리로 인해 원하지 않는 재조합과 같은 위험에 대비해 설계되는 것이 바람직하다.

[0112] 각각의 2 개의 loxP 서열은 재프로그래밍된 유전자 (즉, 복제 기원, 또는 복제를 제어하기 위해 복제 기원에 결합되는 단백질을 인코딩하는 유전자 서열)의 복제를 위해 필수적인 벡터 구성 요소의 5' 및 3' 측에 동일한 배향으로 위치한다. loxP 서열의 측면에 위치한 벡터 구성 요소는 복제 기원 또는 복제를 제어하기 위해 복제 기원에 결합되는 단백질을 인코딩하는 유전자 서열 중 하나, 또는 둘 모두일 수 있다.

- [0113] RNA 안정성을 증가시키기 위해, 에피솜 벡터 또는 플라스미드 벡터가, 예를 들어, 재프로그래밍된 인자 암호화 부위 및 폴리아데닐화 신호 사이에 삽입된 마멋 (woodchuck) 간염 바이러스 후전사 조절 요소 (WPRE) 서열을 가질 수 있다.
- [0114] 에피솜 벡터는, 예를 들어, 리포펙틴법, 리포솜법, 전기천공법, 인산칼슘 공침법, DEAE 텍스트란법, 마이크로인젝션법, 유전자 총 법 등을 사용하여 벡터가 세포에 도입될 수 있게 한다. 특별하게는, 예를 들어, *Science*, 324: 797-801 (2009)에 기재된 방법을 사용할 수 있다.
- [0115] 재프로그래밍된 유전자의 복제를 위해 필요한 벡터 성분이 iPS 세포로부터 제거되었는지 여부는 주형으로서 iPS 세포로부터 단리된 에피솜 분획물과 함께 프로브 또는 프라이머로서 벡터 성분 및/또는 loxP 서열 부근에서의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 사용하여 서던 블로트 분석 또는 PCR 분석을 수행하고, 밴드의 존재 또는 부재 또는 검출된 밴드의 길이를 측정함으로써 확인할 수 있다. 에피솜 분획물은 본 기술분야에서의 명백한 방법에 의해 제조될 수 있다; 예를 들어, *Science*, 324: 797-801 (2009) 등에 기재된 방법이 사용될 수 있다.
- [0116] 하기 실시예에 기술된 바와 같이, 본 발명에 의해 제공되는 loxP 서열을 함유하는 일부의 에피솜 벡터는 벡터를 구성하는 외인성 핵산 인자 (재프로그래밍된 유전자 포함) 가 세포의 게놈에 일시적으로라도 통합되지 않은 임의의 에피솜 벡터의 필수적 효과뿐만 아니라 체세포에 이동시 에피솜의 형태인 벡터가 Cre 재조합효소로 처리되지 않고 iPS 세포로부터 초기에 분계되는 의외의 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명은 또한 iPS 세포의 확립에 충분한 재프로그래밍 인자의 일정 수준의 발현을 나타낸 후 세포로부터 초기에 분계되는 자가-제거 에피솜 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상의 빈도에서 5 차 계대에 의해 iPS 세포로부터 분계되는 것을 특징으로 한다. 대안적으로, 자가-제거 에피솜 벡터는 이동 후 1 주 내에 1×10^4 세포 당 카피 수가 대략 10^6 세포인 한편, 상기 벡터는 iPS 세포의 확립시 (예를 들어, 벡터 이동 후 약 4 주) 1×10^4 세포 당 카피 수가 100 이하, 바람직하게는 50 이하, 보다 바람직하게는 30 이하로 감소되는 정도로 세포에서 불안정해지는 것을 특징으로 한다.
- [0117] 특히, 본 발명의 초기 자가-제거 벡터는 1 이상의, 바람직하게는 2 이상의, 보다 바람직하게는 3 이상의, 특히 바람직하게는 모든 하기 구조적 특징 (i) 내지 (iv) 를 갖는다.
- [0118] (i) 2 개의 loxP 서열은 에피솜 벡터의 복제를 위해 필수적인 벡터 구성 요소 (예를 들어, EBNA-1 유전자 및 SV40 large T 항원 유전자, 바람직하게는 EBNA-1 유전자) 의 5' 및 3' 측에 동일한 배향으로 위치한다.
- [0119] (ii) 재프로그래밍 인자를 인코딩하는 핵산은 CAG 프로모터에 의해 제어된다.
- [0120] (iii) 재프로그래밍 인자를 인코딩하는 핵산은 토키 β -글로빈 폴리아데닐화 신호에 의해 제어된다.
- [0121] (iv) WPRE 서열은 재프로그래밍 인자를 인코딩하는 핵산 및 폴리아데닐화 신호 사이에 존재한다.
- [0122] (D) p53 의 기능적 저해제
- [0123] 본 발명에 있어서, 상술한 핵 재프로그래밍된 물질에 부가하여, p53 의 기능적 저해제를 출발 세포와 접촉시키는 것이 보다 바람직하다. 본원에 언급된 바와 같이 "p53 기능의 저해제" 는 (a) p53 단백질의 기능 또는 (b) p53 유전자의 발현을 저해할 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 즉, p53 단백질에 직접적으로 이의 기능을 저해하도록 작용하는 물질 및 p53 유전자에 직접적으로 이의 발현을 저해하도록 작용하는 물질뿐만 아니라 p53 단백질의 기능 또는 p53 유전자의 발현의 저해를 유발하도록 p53 신호 전달과 연관된 인자에 작용하는 물질이 또한 본원에서 언급한 바와 같은 "p53 기능의 저해제" 의 범위에 포함된다. 바람직하게는, p53 의 기능적 저해제는 p53 유전자, 보다 바람직하게는 p53 에 대한 siRNA 또는 shRNA 를 인코딩하는 발현 벡터의 발현을 저해하는 물질이다.
- [0124] p53 단백질의 기능을 저해하는 물질의 예는 p53 의 화학적 저해제, p53 의 우성 음성 돌연변이체 또는 이를 인코딩하는 핵산, 항-p53 길항제 항체 또는 이를 인코딩하는 핵산, p53-반응 요소의 공통 서열을 포함하는 디코이 핵산, p53 경로를 저해하는 물질 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, p53 의 화학적 저해제, p53 의 우성 음성 돌연변이체 또는 이를 인코딩하는 핵산 및 p53 경로 저해제를 언급할 수 있다.
- [0125] (D1) p53 의 화학적 저해제
- [0126] p53 의 화학적 저해제의 예는 WO 00/44364 에 개시된 피피트린 (PFT)- α 및 - β 에 의해 유형화된 p53 저해제, Storm et al. (*Nat. Chem. Biol.*, 2, 474 (2006) 에 개시된 PFT- μ , 이의 유사체 및 이의 염 (예를 들어, 염산

염, 브롬화수소산염 등과 같은 산부가염) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이들 중에서, PFT- α 및 이의 유사체 [2-(2-이미노-4,5,6,7-테트라히드로벤조티아졸-3-일)-1-*D*-톨릴에탄올, HBr (제품명: 피피트린- α) 및 1-(4-니트로페닐)-2-(4,5,6,7-테트라히드로-2-이미노-3(2H)-벤조티아졸릴)에탄올, HBr (제품명: 피피트린- α , p-니트로)], PFT- β 및 이의 유사체 [2-(4-메틸페닐)이미다조[2,1-b]-5,6,7,8-테트라히드로벤조티아졸, HBr (제품명: 피피트린- α , 시클릭) 및 2-(4-니트로페닐)이미다조[2,1-b]-5,6,7,8-테트라히드로벤조티아졸 (제품명: 피피트린- α , p-니트로, 시클릭)], 및 PFT- μ [페닐아세틸레닐술포아미드 (제품명: 피피트린- μ)] 가 Merck 에서 시판된다.

[0127] p53 의 화학적 억제제와 체세포와의 접촉은 수용성 또는 비수용성 용매에 적절한 농도로 저해제를 용해시키고, 저해제 농도가 p53 기능이 완전하게 억제되고 세포 독성을 유발하지 않는 범위로 저하되도록 인간 또는 마우스로부터 단리된 체세포의 배양에 적합한 배지 (예를 들어, 최소 필수 배지 (MEM), 둘베코 개질된 이를 배지 (DMEM), RPMI1640 배지, RPMI1640 배지, 199 배지, F12 배지 등 (약 5 내지 20% 의 소 태아 혈청이 보충됨))에 저해제의 용액을 침가하고, 주어진 기간 동안 세포를 배양함으로써 수행될 수 있다. 저해제 농도는 사용되는 저해제의 종류에 따라 변화되고, 약 0.1 nM 내지 약 100 nM 의 범위에서 적절하게 선택된다. 접촉 기간은 세포의 핵 재프로그래밍이 달성되기에 충분한 한 특별히 제한되지 않고; 대개 저해제는 양성 콜로니가 출현할 때까지 배지 내에서 공존할 수 있다.

[0128] p53 유전자는 종양 억제 유전자로서 공지되어 있고; p53 기능의 영구적인 저해는 발암의 위험을 잠재적으로 증가시킨다. 배지로의 단순한 침가에 의해 세포에 도입할 수 있다는 장점뿐만 아니라 iPS 세포의 도입 후 저해제를 함유하는 배지를 제거함으로써 용이하고 신속하게 p53 기능의 저해를 종결할 수 있는 능력 때문에 p53 의 화학적 저해제는 유용하다.

[0129] (D2) p53 의 우성 음성 돌연변이체

[0130] p53 의 우성 음성 돌연변이체의 선택은 돌연변이체가 체세포에서 내인성적으로 발현되는 야생형 p53 단백질에 대해 이의 기능을 저해하도록 경쟁적으로 작용할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는다; 예를 들어, 세린에 대한 마우스 p53 의 DNA-결합 부위에 위치한 위치 275 (인간의 경우, 위치 278) 에서 프롤린의 점 돌연변이로 인한 p53P275S (de Vries, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 2948-2953 (2002)); 마우스 p53 의 위치 14-301 (인간 P53 의 경우 위치 11-304 에 해당) 에서 아미노산의 결실로 인한 p53DD (Bowman, T., *Genes Develop.*, 10, 826-835 (1996)); 등을 언급할 수 있다. 다른 공지된 돌연변이체는, 예를 들어, 마우스 p53 의 위치 58 (인간의 경우 위치 61) 에서 세린의 알라닌으로의 점 돌연변이로 인한 p53S58A; 인간 p53 의 위치 135 (마우스의 경우 위치 132) 에서 시스테인의 티로신으로의 점 돌연변이로 인한 p53C135Y; 마우스 p53 의 위치 135 (인간의 경우 위치 138) 에서 알라닌의 발린으로의 점 돌연변이로 인한 p53A135V; 위치 172 (인간의 경우 위치 175) 에서 아르기닌의 히스티딘으로의 점 돌연변이로 인한 p53R172H; 위치 270 (인간의 경우 위치 273) 에서 아르기닌의 히스티딘으로의 점 돌연변이로 인한 p53R270H; 마우스 p53 의 위치 278 (인간의 경우 위치 281) 에서 아스파트산의 아스파라긴으로의 점 돌연변이로 인한 p53D278N 등을 포함하고; 이들은 동일한 방법으로 사용될 수 있다.

[0131] p53 의 우성 음성 돌연변이체는, 예를 들어, 하기 기재된 기술에 의해 수득될 수 있다. 우선, 적절한 뉴클레오티드를 SEQ ID NO:1 또는 3 으로 나타내는 마우스 또는 인간 p53 cDNA 서열 정보에 기초하여 프로브 또는 프라이머로서 합성하고, 마우스 또는 인간 p53 cDNA 가 하이브리드화 방법 또는 (RT-)PCR 방법을 사용하여 마우스 또는 인간 세포 또는 조직에서 유래한 mRNA, cDNA 또는 cDNA 라이브러리로부터 클로닝되고, 적절한 플라스미드에 서브클로닝된다. 돌연변이체가 도입되는 위치의 코돈 (예를 들어, p53P275S 의 경우 SEQ ID NO:1 로 나타내는 뉴클레오티드 서열에서의 뉴클레오티드 번호 951-953 으로 나타내는 CCT) 이 다른 원하는 아미노산을 인코딩하는 코돈 (예를 들어, p53P275S 의 경우 TCT) 으로 대체되는 형태에 있어서, 상기 위치를 포함하는 프라이머가 합성되고, 역 (inverse) PCR 이 주형으로서 p53 cDNA 를 혼입한 플라스미드와 함께 프라이머를 사용하여 수행됨으로써, 원하는 우성 음성 돌연변이체를 인코딩하는 핵산을 얻는다. p53DD 와 같은 결실 돌연변이체의 경우, 프라이머는 결실되는 위치 외부에 설계되고 역 PCR 은 상술한 바에 따라 수행될 수 있다. 이와 같이 얻어진 우성 음성 돌연변이체를 인코딩하는 핵산을 숙주 세포에 도입하고, 배양된 세포 또는 이의 조건화 배지로부터 재조합 단백질을 회수함으로써, 원하는 우성 음성 돌연변이체가 얻어질 수 있다.

[0132] 우성 음성 돌연변이체와 체세포와의 접촉은 상술한 단백질성 핵 재프로그래밍 물질과 동일한 방법으로 이루어질 수 있다. 상술한 바와 같이, p53 기능의 영구적 저해는 발암의 위험을 잠재적으로 증가시킨다. 그러나, p53 의 우성 음성 돌연변이체는 프로테아제에 의해 분해가 진행되고, 트랜스펙션된 세포에서 점차적으로 사라지

기 때문에, 이와 상응하게 세포에서 내인성적으로 발현된 p53의 기능이 회복되고, 돌연변이체 단백질의 사용은 치료 목적을 위한 iPS 세포의 이용에서와 같이 높은 안전성이 요구되는 경우에 적합할 수 있다.

[0133] (D3) p53의 우성 음성 돌연변이체를 인코딩하는 핵산

본 발명의 구현예의 또 다른 바람직한 방식에 있어서, p53 기능의 저해제는 p53의 우성 음성 돌연변이체를 인코딩하는 핵산이다. 핵산은 DNA 또는 RNA, 또는 DNA/RNA 키메라일 수 있고, 바람직하게는 DNA이다. 핵산은 이중가닥 또는 단일가닥일 수 있다. p53의 우성 음성 돌연변이체를 인코딩하는 cDNA는 돌연변이체 단백질의 제조와 관련하여 상술한 기술에 의해 클로닝될 수 있다.

[0135] 따라서, 핵 쟈프로그래밍 물질(재프로그래밍 유전자)인 앞서 언급한 핵산과 같이 단리된 cDNA가 적절한 발현 벡터로 삽입되어, 체세포에 이동될 수 있다.

[0136] (D4) p53 경로 저해제

본원에서 용어 p53 경로는 p53을 활성화시킬 수 있는 모든 업스트림 신호 전달계 및 활성화된 p53에 의해 중재되는 모든 다운스트림 신호 전달계를 포함하는 의미로 사용된다. 따라서, p53 경로 저해제는 앞서 언급한 신호 전달 경로 중 임의의 하나를 저해하는 모든 물질을 포함하나, 구현예의 바람직한 방식에 있어서, p53 경로 저해제는 전사가 p53에 의해 활성화되는 p21의 발현 또는 기능(Myc 저해 활성)을 저해하는 물질이고; 예를 들어, p21에 대한 siRNA, shRNA, 앤티센스 핵산, 리보자임 등을 언급할 수 있다. 이러한 p21의 발현을 저해하는 핵산은 하기에 기재되는 p53에 대한 siRNA, shRNA, 앤티센스 핵산 및 리보자임을 위한 방법과 동일한 방법으로 제조되고 합성될 수 있고, 체세포에 도입될 수 있다. 핵산은 이들을 발현하는 벡터의 형태로 제공될 수 있고, 벡터는 하기에 기재되는 p53에 대한 siRNA, shRNA, 앤티센스 핵산 또는 리보자임을 발현하는 벡터에 관한 방법과 동일한 방법으로 구성되어 체세포에 도입될 수 있다.

[0138] 구현예의 또 다른 바람직한 방식에 있어서, p53 경로 저해제는 ARF-MDM2-p53 경로를 저해하는 물질이며; 예를 들어, ARF-MDM2-p53 경로 저해제로서 핵외유출 또는 이의 유비퀴틴화 또는 이를 인코딩하는 핵산을 촉진시키기 위해 p53에 직접적으로 결합하는 MDM2, p53에 대한 MDM2의 작용을 저해하는 p19^{ARF} 또는 ATM(돌연변이화된 모세혈관확장성운동실조증(ataxia-telangiectasia mutated))의 발현 또는 기능을 저해하는 물질(예를 들어, 이들 인자에 대한 siRNA 및 shRNA) 등을 언급할 수 있다.

[0139] (D5) 기타 물질

[0140] p53 단백질의 기능을 저해하는 기타 물질의 예로서, 항-p53 길항체 항체 또는 이를 인코딩하는 핵산을 언급할 수 있다. 항-p53 길항체 항체는 다중클론 항체 또는 단일클론항체일 수 있다. 항체의 이소타입은 특별히 제한되지 않고, 바람직하게는 IgG, IgM 또는 IgA, 특히 바람직하게는 IgG이다. 항체는 전체 항체 분자에 부가적으로, 예를 들어, Fab, Fab', 또는 F(ab')₂와 같은 단편, scFv, scFv-Fc, 미니바디(minibody), 또는 디아바디(diabody)와 같은 유전자 공학 기술에 의해 제조되는 컨쥬게이트 분자, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 단백질-안정화 작용을 갖는 분자로 개질된 이의 유도체일 수 있다. 항-p53 길항체 항체는 자체적으로 공지된 항체 또는 항-혈청 제조방법에 의해 항원으로서 p53 또는 이의 부분 펩티드를 사용하여 생산될 수 있다. 공지된 항-p53 길항체의 예로서, PAb1801(Oncogene Science Ab-2) 및 DO-1(Oncogene Science Ab-6)(Gire and Wynford-Thomas, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 1611-1621(1998)) 등을 언급할 수 있다. 항-p53 길항체를 인코딩하는 핵산은 종래의 방법에 의해 항-p53 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마로부터 단리될 수 있다. 수득되는 H-사슬 및 L-사슬 유전자는 단일-사슬 항체를 인코딩하는 핵산이 제조되도록 서로 연결될 수 있다.

[0141] p53 단백질의 기능을 저해하는 또 다른 물질로서, 항-p21 길항체 항체 또는 이를 인코딩하는 핵산을 언급할 수 있다. 항-p21 길항체 항체 및 이를 인코딩하는 핵산은 또한 앞서 언급한 항-p53 길항체 및 이를 인코딩하는 핵산과 같이 제조될 수 있다.

[0142] p53 단백질의 기능을 저해하는 또 다른 물질은 p53-반응성 요소의 공통 서열(예를 들어, Pu-Pu-Pu-G-A/T-T/A-C-Py-Py-Py(Pu: 퓨린 염기, Py: 퍼리미딘 염기); SEQ ID NO:27)을 포함하는 디코이 핵산이다. 이러한 핵산은 자동화된 DNA/RNA 합성기를 사용하여 앞서 언급한 뉴클레오티드 서열 정보에 기초하여 합성될 수 있다. 대안적으로, 이러한 디코이 핵산은 시판된다(예를 들어, p53 전사 인자 디코이(transcription factor decoy)(GeneDetect.com)).

항-p53 길항체 항체 및 항-p21 길항체 항체, 또는 항체를 인코딩하는 핵산은 각각 p53의 우성 음성 돌연변이체

또는 돌연변이체를 인코딩하는 핵산의 설명에 기재된 방법을 사용하여 세포에 도입될 수 있다. 앞서 언급한 디코이 핵산은 리포택틴법 등에 의해 세포에 도입될 수 있다.

[0144] 한편, p53 유전자의 발현을 저해하는 물질의 예로서, p53에 대한 siRNA 또는 shRNA, p53에 대한 siRNA 또는 shRNA를 발현하는 백터, p53에 대한 안티센스 핵산 및 p53에 대한 리보자임 등을 언급할 수 있고, p53에 대한 siRNA 또는 shRNA 및 siRNA 또는 shRNA를 발현하는 백터가 바람직하다.

[0145] (D6) p53에 대한 siRNA 또는 shRNA

[0146] p53에 대한 siRNA는, 예를 들어, Elbashir et al. (*Genes Dev.*, 15, 188-200 (2001))에 제시된 규칙에 따라 SEQ ID NO:1 또는 3에 나타낸 마우스 또는 인간 p53 cDNA 서열 정보에 기초하여 설계될 수 있다. siRNA에 대한 표적 서열은 일반 규칙에 따라 AA+(N)₁₉이나, AA+(N)₂₁ 또는 NA+(N)₂₁일 수 있다. 전사 가닥의 5' 말단은 AA일 필요가 없다. 표적 서열의 위치는 특별히 제한되지 않지만, 표적 서열은 5'-UTR 이외의 부위, 출발 코돈으로부터의 약 50개의 염기, 또는 3'-UTR로부터 선택되는 것이 바람직하다. 또한 표적 서열의 GC 함량은 특별히 제한되지 않으나, 함량은 바람직하게는 약 30내지 약 50%이고; 불균일한 GC 분포를 가지지 않고 소수의 반복구간만을 갖는 서열이 바람직하다. polIII 프로모터가 하기 (b2)의 siRNA 또는 shRNA를 발현하는 백터의 설계시 프로모터로서 사용되는 경우, 중합효소 전사가 중지되지 않도록 연속된 4개 이상의 T 또는 A 염기의 서열은 선택되지 않아야 한다.

[0147] 상술한 규칙에 기초하여 선택된 표적 서열 후보는 선택된 표적 서열의 특이성을 확인하기 위하여 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)와 같은 상동성 조사 소프트웨어 프로그램을 사용하여 표적 이외 mRNA에서의 연속적인 16-17개의 염기의 서열에 대한 상동성이 조사되었다. 특이성이 확인된 표적 서열에 대해, AA(또는 NA) 후의 19-21개의 염기 중 TT 또는 UU의 3'-말단 오버행 및 19-21개의 염기 및 TT 또는 UU의 3'-말단 오버행에 상보적인 서열을 갖는 안티센스 가닥으로 구성되는 이중-가닥 RNA가 siRNA로서 설계된다. 또한, shRNA는 루프 구조(예를 들어, 약 8-25개의 염기)를 형성할 수 있는 임의로 선택된 링커 서열을 적절하게 선택하고, 링커 서열을 통해 앞서 언급한 전사 가닥 및 안티센스 가닥을 라이게이션시킴으로써 설계될 수 있다.

[0148] siRNA 및/또는 shRNA의 서열은 다양한 웹사이트에서 무료로 입수 가능한 검색 소프트웨어 프로그램을 이용하여 검색될 수 있다. 이러한 사이트의 예는 siRNA Target Finder (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html) 및 pSilencer™ 발현 백터에 대한 삽입 설계 툴 (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer_converter.html) (둘다 Ambion에 의해 제공됨), 및 GeneSeer (<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>) (RNAi Codex에 의해 제공됨)를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니며; QIAGEN, Takara Bio, SiSearch, Dharmacon, Whitehead Institute, Invitrogen, Promega 등의 웹사이트에서 유사한 검색이 가능하다.

[0149] 아래 제시된 것은 Ambion (SEQ ID NO:5-24) 및 RNAi Codex (SEQ ID NO:25 및 26)의 웹사이트에서 입수 가능한 소프트웨어 프로그램을 이용하여 설계된 마우스 p53에 대한 shRNA의 서열이다. 밀줄친 서열은 다이서(dicer)로 절단한 후 수득되는 dsRNA의 센스 가닥(5' 측) 및 안티센스 가닥(3' 측)이다 (3'-오버행 "TT"를 함유하지 않음). 소문자는 미스매치 또는 루프를 나타낸다.

[SEQ ID NO:5]
 5'-TTTGACTGGATGACTGCCATGGttcaagagaCCATGGCAGTCATCCAGTCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:6]
 5'-TTTGATATCCTGCCATCACCTCttcaagagaGAGGTGATGGCAGGATATCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:7]
 5'-TTTGGCCAAGTGAAGCCCTCCttcaagagaGGAGGGCTTCACTTGGCCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:8]
 5'-TTTGTGAAGCCCTCCGAGTGTCAAGAGAGACAECTCGGAGGGCTTCACTTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:9]
 5'-TTTGCCTCCGAGTGTCAAGAGAGCTCCTGACACTCGGAGGGCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:10]
 5'-TTTGTCTGTTATGTGCACGTACttcaagagaGTACGTGCACATAACAGACTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:11]
 5'-TTTGTACTCTCCTCCCCCTCAATTtcaagagaATTGAGGGAGGAGACTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:12]
 5'-TTTGCTATTCTGCCAGCTGGCttcaagagaCGCCAGCTGGCAGAATAGCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:13]
 5'-TTTGACGTGCCCTGTGCAGTTGttcaagagaCAACTGCACAGGGCACGTCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:14]
 5'-TTTGAAGTCACAGCACATGACGttcaagagaCGTCATGTGCTGTGACTCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:15]
 5'-TTTGTACAGCACATGACGGAGttcaagagaCTCCGTATGTGCTGTGACTTTTT-3'

[0150]

[SEQ ID NO:16]
 5'-TTTGGAAATTGTATCCCGAGTttcaagagaACTCGGGATACAAATTCCCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:17]
 5'-TTTGTACATGTGTAATAGCTCCttcaagagaGGAGCTATTACACATGTACTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:18]
 5'-TTTGACTCCAGTGGAACCTTCttcaagagaGAAGGTTCCCACTGGAGTCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:19]
 5'-TTTGTCCCTTGCCCTGAACTGttcaagagaGCAGTTCAAGGCAAGGACTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:20]
 5'-TTTGATCCGGCGCGTAAACGCttcaagagaGCGTTACGCCCGGGATCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:21]
 5'-TTTGACCAAGAAGGGCCAGTCTttcaagagaAGACTGGCCCTTGTGGTCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:22]
 5'-TTTGAAAGTGGGGCGTACTCAttcaagagaTGAGTCAGGCCCACTTCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:23]
 5'-TTTGTGGGAATAGGTTGATAttcaagagaTATCAACCTATTCCCCAACTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:24]
 5'-TTTGATTCTATCTTGGCCCTCttcaagagaGAGGGCCAAAGATAGAATCTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:25]
 5'-
 TTTGCAuTACAgGTACgTGTGTAgtgtgctgtccTACACATGTACTGTAGTGTTTTTTT-3'
 [SEQ ID NO:26]
 5'-
 TTTGCAGTuTACTTuCCGCCgTAggtgctgtccTATGGCGGGAAGTAGACTGTTTTTTT-3'

[0151]

[0152]

상기와 같이 설계된 센스 가닥 올리고뉴클레오티드 및 안티센스 가닥 올리고뉴클레오티드를 자동 DNA/RNA 합성 기기를 이용하여 별도로 합성하고, 예를 들어, 상기 올리고뉴클레오티드를 적당한 어닐링 완충액 중에서 약 90 내

지 약 95°C에서 약 1분 동안 변성시킨 후, 약 30내지 약 70°C에서 약 1내지 약 8시간 동안 어닐링시킴으로써 p53에 대한 siRNA를 제조할 수 있다. 상기와 같이 설계된 shRNA 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 자동 DNA/RNA 합성기를 이용하여 합성하고, 이를 상기와 같이 셀프-어닐링시킴으로써 p53에 대한 shRNA를 제조할 수 있다.

[0153] siRNA 및 shRNA를 구성하는 뉴클레오티드 분자는 자연발생적 RNA일 수 있지만, 상기 분자는 안정성(화학적 및/또는 효소에 대한) 또는 특이적 활성(mRNA에 대한 친화성)을 증가시키기 위해 다양한 화학적 개질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레아제와 같은 가수분해효소에 의한 분해를 방지하기 위해, siRNA 또는 shRNA를 구성하는 각각의 뉴클레오티드의 인산 잔기(인산염)가, 예를 들어, 화학적으로 개질된 인산 잔기 예컨대 포스포로티오에이트(PS), 메틸포스포네이트, 또는 포스포로디티오네이트로 치환될 수 있다. 각각의 뉴클레오티드의 당(리보오스)의 2'-위치의 히드록시기가 -OR(R은, 예를 들어, CH₃(2'-O-Me), CH₂CH₂OCH₃(2'-O-MOE), CH₂CH₂NHC(NH)NH₂, CH₂CONHCH₃, CH₂CH₂CN 등을 나타냄)로 대체될 수 있다. 또한, 염기부분(피리미딘, 퓨린)이 화학적으로 개질될 수 있으며; 예를 들어, 메틸기 또는 양이온성 작용기를 피리미딘 염기의 5-위치에 도입하거나, 2-위치 카르보닐기를 티오카르보닐로 치환하는 것 등이 언급될 수 있다.

[0154] RNA의 당부분의 구성으로서는, C2'-엔도(S유형) 및 C3'-엔도(N유형)의 2가지 유형이 우세하며; 단일가닥 RNA에서는 상기 2가지 유형의 당부분이 평형을 이루어 존재하지만, 이중가닥이 형성될 때 구성은 N유형으로 고정된다. 그러므로, 표적 RNA에 대한 강한 결합력을 제공하도록 2'산소와 4'탄소를 가교시킴으로써 당부분의 구성이 N유형으로 고정되어 있는 RNA유도체인, BNA(LNA)(Imanishi, T. 등, *Chem. Commun.*, 1653-9, 2002; Jepsen, J.S. 등, *Oligonucleotides*, 14, 130-46, 2004) 및 ENA(Morita, K. 등, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 22, 1619-21, 2003)가 또한 바람직하게 이용될 수 있다.

[0155] 그러나, 자연발생적 RNA의 모든 리보뉴클레오시드 분자를 개질된 유형의 분자로 대체하면 RNAi활성의 상실을 초래할 수 있으므로, 개질된 뉴클레오시드를 RISC복합체가 기능할 수 있는 최소 가능 한도까지 도입해야 한다.

[0156] p53에 대한 siRNA는, 예를 들어, Ambion(예를 들어, Ambion Cat# AM16708, siRNA ID# 69659, 69753, 69843, 187424, 187425, 187426), Santa Cruz(예를 들어, Santa Cruz Cat# sc-29436, 44219) 등으로부터 구입할 수도 있다.

[0157] 또한 인간 p53에 대한 siRNA 및 shRNA는 앞서 언급한 검색 소프트웨어 프로그램 중 하나를 이용하여 SEQ ID NO:3 또는 Refseq. No. (NM_000546)로 나타낸 인간 p53 cDNA의 서열 등을 퀼리(query)로서 입력함으로써 설계되고 합성될 수 있으며, 또는 Ambion 등으로부터 구매할 수도 있다. 구체적으로는, 서열 5'-GACTCCAGTGGTAATCTACTGctcgagCAGTAGATTACCACTGGAGTC-3'^{5'}(SEQ ID NO: 28; 밑줄친 부분은 p53에 대한 표적 서열을 나타내고; 대문자는 dsRNA가 형성되는 부분을 나타냄)을 갖는 인간 p53에 대한 shRNA, 문헌[*Science*, 296, 550-553(2002)]에 기재된 p53에 대한 shRNA 등이 언급될 수 있다.

[0158] p53에 대한 siRNA 또는 shRNA와 체세포의 접촉은, 플라스미드 DNA의 경우와 같이, 리포솜법, 폴리아민법, 전기천공법, 비드법 등을 이용하여 핵산을 세포내에 도입함으로써 달성될 수 있다. 양이온성 리포솜을 이용하는 방법이 가장 통상적이며, 높은 이동효율을 제공한다. Lipofectamine2000 및 Oligofectamine(Invitrogen)과 같은 통상의 트랜스펙션 시약 외에, 예를 들어, GeneEraser™ siRNA 트랜스펙션 시약(Stratagene)과 같은 siRNA의 도입에 적합한 이동 시약이 또한 시판된다.

[0159] (D7) p53에 대한 siRNA 또는 shRNA를 발현하는 벡터

[0160] siRNA를 발현하는 벡터는 직열유형 및 스템루프(헤어핀)유형으로 입수가능하다. 직열유형은 siRNA의 센스가닥에 대한 발현 카세트 및 안티센스가닥에 대한 발현 카세트가 직열로 결찰되어 있는 유형으로서, 각각의 가닥이 세포에서 발현되고 어닐링되어 이중가닥 siRNA(dsRNA)를 형성한다. 한편, 스템루프(헤어핀)유형은 shRNA에 대한 발현 카세트가 벡터내에 삽입되어 있는 유형으로서, shRNA가 세포에서 발현되고 다이서에 의해 가공되어 dsRNA를 형성한다. polII 프로모터(예를 들어, CMV의 조기발현프로모터)가 프로모터로서 이용될 수 있지만, 짧은 RNA를 정확히 전사할 수 있도록 polIII 프로모터를 이용하는 것이 통상적이다. polIII 프로모터로서, 마우스 및 인간 U6-snRNA 프로모터, 인간 H1-RNase P RNA 프로모터, 인간 발린-tRNA프로모터 등이 언급될 수 있다. 전사종결신호로서, 4개 이상의 T잔기의 연속으로 이루어지는 서열이 이용된다.

[0161] 상기와 같이 구축된 siRNA 또는 shRNA 발현 카세트를 그 후 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터 내에

삽입한다. 그러한 벡터로서 바람직하게 이용될 수 있는 것은 핵 재프로그래밍 물질인 핵산 (재프로그래밍 유전자) 과 관련하여 위에서 언급된 것 (바이러스 벡터 예컨대 레트로바이러스, 랜티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스바이러스, 및 센다이 바이러스; 동물 세포 발현 플라스미드; 에피솜 벡터 등) 과 동일하다. 재프로그래밍 유전자와 같은 벡터는 수득된 iPS 세포의 의도되는 용도에 따라 적당히 선택될 수 있다. p53 유전자는 암 억제 유전자로서 알려져 있으며, p53 의 영구적인 기능 저해는 발암 위험을 잠재적으로 증가시킨다. 그러므로, 생성되는 iPS 세포의 의학적 적용을 고려하여, p53 에 대한 siRNA 또는 shRNA 가 세포에서 일시적으로 발현되도록 설계되는 것이 바람직하다. 이러한 이유로, p53 에 대한 siRNA 또는 shRNA 를 인코딩하는 핵산을 보유하는 벡터로서, 자가복제 능력이 없는 플라스미드 벡터 등을 이용하는 것이 매우 바람직하다. 본 발명의 재프로그래밍 인자와 조합되었을 때, p53 에 대한 siRNA 또는 shRNA 는 플라스미드로부터 일시적으로 발현되는 경우에도 충분한 iPS 세포 확립 효율을 제공한다.

[0162] 대안적으로는, p53 에 대한 shRNA 를 인코딩하는 발현 벡터로서, 시판되는 플라스미드 (예를 들어, Addgene 으로부터 시판되는 pMKO.1-puro p53 shRNA2: #10672 등) 에 기초하여 제조된 레트로바이러스 등의 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 에피솜 벡터 등이 이용될 수도 있다. 필요에 따라 앞서 언급한 Cre-loxP 시스템 또는 piggyBac 트랜스포손 시스템이 이용될 수도 있다.

[0163] p53 에 대한 siRNA 또는 shRNA 를 발현하는 벡터와 체세포의 접촉은 상기와 같이 제조된 플라스미드 벡터, 에피솜 벡터 또는 바이러스 벡터를 세포 내에 도입함으로써 달성된다. 이러한 트랜스펙션은 재프로그래밍 유전자와 관련하여 상술한 바와 같은 기술에 의해 달성될 수 있다.

[0164] (D8) 기타 물질

[0165] p53 유전자의 발현을 저해하는 기타 물질로서, p53 에 대한 안티센스 핵산 및 리보자임이 언급될 수 있다.

[0166] 안티센스 핵산은 DNA 또는 RNA, 또는 DNA/RNA 키메라일 수 있다. 안티센스 핵산이 DNA 인 경우, 표적 RNA 와 안티센스 DNA 에 의해 형성되는 RNA:DNA 하이브리드는 내인성 RNase H 에 의해 인식되어 표적 RNA 의 선별적 분해를 야기할 수 있다. 그러므로, RNase H 에 의한 분해를 유도하는 안티센스 DNA 의 경우, 표적 서열은 p53 mRNA 내의 서열 뿐만 아니라, p53 유전자의 일차 전사체의 인트론 부위 내의 서열일 수 있다. 안티센스 핵산의 하이브리드화가 p53 단백질로 번역되는 것을 저해하는 한, 안티센스 핵산에 대한 표적 부위의 길이는 특별히 제한되지 않으나; 표적 부위는 p53 mRNA 의 전체 서열 또는 일부 서열일 수 있고, 가장 짧게는 약 15 개 염기의 서열, 또는 가장 길게는 mRNA 또는 일차 전사체의 전체 서열일 수 있다. 합성의 용이성, 항원성, 세포내 이동성 및 기타 문제를 고려할 때, 약 15 개 내지 약 40 개 염기, 특히 약 18 개 내지 약 30 개 염기로 이루어지는 올리고뉴클레오티드가 바람직하다. 표적 서열의 위치는 5'- 및 3'-UTR, 시작 코돈 근처 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0167] 리보자임은 좁은 의미로는 핵산을 절단하는 효소 활성을 갖는 RNA 를 의미하며, 본원에서는 서열-특이적 핵산 절단 활성을 갖는 한 DNA 를 포괄하는 개념으로 이용된다고 이해된다. 가장 다용도인 리보자임 중 하나는 바이로이드 (viroid) 및 바이루소이드 (virusoid) 와 같은 감염성 RNA 에서 발견되는 자가-스플라이싱 RNA 이며, 해머헤드 유형, 헤어핀 유형 등이 알려져 있다. 해머헤드 유형은 효소 활성을 나타내고 약 40 개 염기 길이를 가지며, 해머헤드 구조 부분에 인접한 양쪽 말단의 여러 개의 염기 (총 약 10 개 염기) 를 표적 mRNA 의 원하는 절단 위치에 상보적인 서열로 만들어 표적 mRNA 를 특이적으로 절단하는 것이 가능하다.

[0168] 안티센스 핵산 또는 리보자임은 자동 DNA/RNA 합성기를 이용하여 합성될 수 있다. 안티센스 핵산 또는 리보자임을 구성하는 뉴클레오티드 분자는 안정성, 특이적 활성 등을 증가시키도록 siRNA 에 대해 상술한 바와 같은 개질을 가질 수 있다.

[0169] 대안적으로는, siRNA 의 경우와 같이, 안티센스 핵산 또는 리보자임은 이들을 인코딩하는 핵산의 형태로 이용될 수도 있다.

[0170] p53 기능의 저해제는 체세포 핵 재프로그래밍 단계에서 p53 기능을 저해하기에 충분한 방식으로 체세포와 접촉될 필요가 있다. 이러한 요건이 만족되는 한, 핵 재프로그래밍 물질 및 p53 기능의 저해제가 체세포와 동시에 접촉되거나, 어느 하나가 먼저 접촉될 수 있다. 한 방식의 구현예에서, 예를 들어, 핵 재프로그래밍 물질이 단백질성 인자를 인코딩하는 핵산이고, p53 기능의 저해제가 화학적 저해제인 경우, 전자의 경우 트랜스펙션 처리에서부터 단백질성 인자의 대량발현까지 주어진 길이의 시간차를 수반하는 한편, 후자의 경우 p53 기능을 신속히 저해할 수 있으므로, 트랜스펙션 처리 후 주어진 길이의 시간 동안 세포가 배양된 후, p53 의 화학적 저해제가 배지에 첨가될 수 있다. 또 다른 방식의 구현예에서, 예를 들어, 핵 재프로그래밍 물질 및 p53 기

능의 저해제가 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 에피솜 벡터 등의 형태로 이용되는 경우, 둘다 동시에 세포 내에 도입될 수 있다.

[0171] (E) iPS 세포 확립 효율 개선제

p53 기능의 저해제 이외에, 또 다른 공지된 iPS 세포 확립 효율 개선제를 체세포와 접촉시킴으로써, iPS 세포 확립 효율의 추가적 증가가 기대된다. iPS 세포 확립 효율 개선제의 예는 히스톤 테아세틸라아제 (HDAC) 저해제 [예를 들어, 밸프로산 (VPA) (*Nat. Biotechnol.*, 26 (7): 795-797 (2008)), 저분자량 저해제 예컨대 트리코스타틴 A, 나트륨 부티레이트, MC 1293, 및 M344, HDAC에 대한 siRNA 및 shRNA와 같은 핵산-기재 발현 저해제 (예를 들어, HDAC1 siRNA Smartpool[®] (Millipore), HDAC1에 대한 HuSH 29mer shRNA 구성물 (Origen) 등), G9a 히스톤 메틸트랜스퍼라아제 저해제 [예를 들어, 저분자량 저해제 예컨대 BIX-01294 (*Ce11 Stem Ce11*, 2: 525-528 (2008)), G9a에 대한 siRNA 및 shRNA와 같은 핵산-기재 발현 저해제 (예를 들어, G9a siRNA (인간) (Santa Cruz Biotechnology) 등) 등], L-칼슘 채널 아고니스트 (예를 들어, Bayk8644) (*Ce11 Stem Ce11*, 3, 568-574 (2008)), UTF1 (*Ce11 Stem Ce11*, 3, 475-479 (2008)), 세포내 신호전달의 변경인자 [예를 들어, Wnt 신호전달 활성화제 (예를 들어, 가용성 Wnt3a) (*Ce11 Stem Ce11*, 3, 132-135 (2008)), TGF-β 저해제, MEK 저해제, 2i/LIF (2i는 미토겐-활성화되는 단백질 키나아제 신호전달 및 글리코겐 신타아제 키나아제-3의 저해제임, *PLoS Biology*, 6 (10), 2237-2247 (2008))], 기타 천연 또는 합성 저분자량 화합물 (예를 들어, 5'-아자시티딘, 티아조비빈, 비타민 C 등), 및 ES 세포-특이적 miRNA [예를 들어, miR-302-367 클러스터 (Mol. *Ce11 Biol.* doi: 10.1128/MCB.00398-08, WO2009/075119), miR-302 (RNA (2008) 14: 1-10), miR-291-3p, miR-294 및 miR-295 (*Nat. Biotechnol.* 27: 459-461 (2009))]를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 앞서 언급한 바와 같이, 핵산-기재 발현 저해제는 siRNA 또는 shRNA를 인코딩하는 DNA를 보유하는 발현 벡터의 형태일 수 있다.

[0173] 핵 재프로그래밍 물질의 상기 구성 요소 중, 예를 들어, SV40 라지 T는 체세포의 핵 재프로그래밍에 비필수적인 보조 인자이기 때문에 iPS 세포 확립 효율 개선제의 범주에 포함될 수도 있다. 핵 재프로그래밍의 메카니즘은 여전히 분명하지 않지만, 핵 재프로그래밍에 필수적인 인자가 아닌 보조 인자가 핵 재프로그래밍 물질 또는 iPS 세포 확립 효율 개선제로 간주되는지 여부는 중요하지 않다. 이처럼, 체세포 핵 재프로그래밍 과정은 핵 재프로그래밍 물질 및 iPS 세포 확립 효율 개선제와 체세포의 접촉으로 초래되는 종합적 사건으로 여겨지기 때문에, 당업자가 그 둘 사이를 구별하는 것이 항상 필수적인 것으로 보이지는 않는다.

[0174] 이러한 기타 iPS 세포 확립 효율 개선제와 체세포의 접촉은 p53의 기능 저해제에 관하여 상술한 바와 같이 달성될 수 있으며, 개선제가 각각 (a) 단백질성 인자, (b) 단백질성 인자를 인코딩하는 핵산, 또는 (c) 저분자량 화합물인 경우에 상응한다.

[0175] 체세포로부터의 iPS 세포 확립의 효율이 핵 재프로그래밍 물질의 부재 하에 수득되는 효율에 비해 유의하게 개선되는 한, 기타 iPS 세포 확립 효율 개선제가 핵 재프로그래밍 물질과 동시에 체세포와 접촉되고, 어느 하나가 먼저 접촉될 수 있으며; 핵 재프로그래밍 물질의 특성에 따라, p53의 기능 저해제와 관련하여 상술한 바와 같은 시점에 핵 재프로그래밍 물질이 체세포와 접촉될 수 있다.

[0176] (F) 배양 조건에 의한 확립 효율의 개선

[0177] 체세포에 대한 핵 재프로그래밍 과정에서 빈산소 조건 하에 세포를 배양함으로써 iPS 세포 확립 효율이 추가로 개선될 수 있다. 본원에서 언급되는 용어 "빈산소 조건"은 세포 배양 시점의 주위 산소 농도가 대기 중의 산소 농도보다 유의하게 더 낮음을 의미한다. 구체적으로는, 보통의 세포 배양에 흔히 이용되는 5-10% CO₂/95-90% 대기 중의 주위 산소 농도보다 더 낮은 산소 농도를 수반하는 조건이 언급될 수 있으며; 예는 18% 이하의 주위 산소 농도를 수반하는 조건을 포함한다. 바람직하게는, 주위 산소 농도는 15% 이하 (예를 들어, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하 등), 10% 이하 (예를 들어, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하 등), 또는 5% 이하 (예를 들어, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하 등)이다. 주위 산소 농도는 바람직하게는 0.1% 이상 (예를 들어, 0.2% 이상, 0.3% 이상, 0.4% 이상 등), 0.5% 이상 (예를 들어, 0.6% 이상, 0.7% 이상, 0.8% 이상, 0.95% 이상 등), 또는 1% 이상 (예를 들어, 1.1% 이상, 1.2% 이상, 1.3% 이상, 1.4% 이상 등)이다.

[0178] 세포 환경에서 빈산소 상태를 만드는 임의의 방법이 이용될 수 있지만, 산소 농도를 조정할 수 있는 CO₂ 인큐베이터에서 세포를 배양하는 것이 가장 쉬운 방법이며, 적합한 경우에 해당한다. 산소 농도를 조정할 수 있는

CO_2 인큐베이터는 다양한 제조사에서 시판된다 (예를 들어, Thermo scientific, Ikemoto Scientific Technology, Juji Field, Wakenyaku 등에 의해 제조된 빈산소 배양용 CO_2 인큐베이터).

- [0179] iPS 세포 확립 효율이 정상 산소 농도 (20%)에 비해 개선되는 것을 막지 않는 한, 빈산소 조건 하의 세포 배양 시작 시간은 특별히 제한되지 않는다. 체세포가 핵 재프로그래밍 물질과 접촉되기 전에, 또는 접촉과 동시에, 또는 접촉 후에 배양이 시작될 수 있지만, 예를 들어, 체세포가 핵 재프로그래밍 물질과 접촉된 직후, 또는 접촉 후 주어진 시간 [예를 들어, 1 내지 10 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9) 일] 후에 빈산소 조건 하의 배양이 시작되는 것이 바람직하다.
- [0180] iPS 세포 확립 효율이 정상 산소 농도 (20%)에 비해 개선되는 것을 막지 않는 한, 빈산소 조건 하의 세포 배양 기간은 특별히 제한되지 않으며; 예는 3 일 이상, 5 일 이상, 7 일 이상 또는 10 일 이상, 및 50 일 이하, 40 일 이하, 35 일 이하 또는 30 일 이하의 기간 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 빈산소 조건 하의 바람직한 배양 기간은 주위 산소 농도에 따라 다르며; 당업자는 이용된 산소 농도에 따라 배양 기간을 적당히 조정할 수 있다. 본 발명의 한 구현예에서, iPS 세포 후보 콜로니가 지표로서의 약물 내성으로 선별되는 경우, 약물 선별을 시작하기 전에 빈산소 조건에서 정상 산소 농도로 회복되는 것이 바람직하다.
- [0181] 게다가, 빈산소 조건 하의 세포 배양에 대한 바람직한 시작 시간 및 바람직한 배양 기간은 또한 이용되는 핵 재프로그래밍 물질의 선택, 정상 산소 농도에서의 iPS 세포 확립 효율 등에 따라 가변적이다.
- [0182] 세포는 핵 재프로그래밍 물질 및 p53 의 기능 저해제 (및 필요에 따라 또다른 iPS 세포 확립 효율 개선제) 와 접촉된 후, 예를 들어, ES 세포 배양에 적합한 조건 하에 배양될 수 있다. 마우스 세포의 경우, 백혈병 저해 인자 (LIF) 를 분화 억제 인자로서 통상의 배지에 첨가하여 배양이 수행된다. 한편, 인간 세포의 경우, 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF) 및/또는 줄기 세포 인자 (SCF) 가 LIF 대신 첨가되는 것이 바람직하다. 통상적으로는, 방사선 또는 항생제 처리되어 세포 분열이 종결된, 피더 세포로서의 마우스 배아 섬유모세포의 공준 하에 세포가 배양된다. 피더로서 통상 이용되는 마우스 배아 섬유모세포는 STO 세포주 (ATCC CRL-1503) 등을 포함하며; iPS 세포의 유도에는, STO 세포에 네오마이신 내성 유전자 및 LIF 유전자를 안정적으로 통합시켜 생성한 SNL 세포 (SNL76/7 STO 세포; ECACC 07032801) [McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990)] 등이 통상적으로 이용된다. 그러나 본 발명에서는, 마우스 배아 일차 섬유모세포 (MEF) 를 이용하는 것이, 인간 iPS 세포 확립 효율의 추가적 개선을 제공하므로 더욱 바람직하다. 미토마이신 C-처리된 MEF 는 Millipore 및 ReproCELL 에서 시판된다. 이러한 피더 세포와의 동시배양은 핵 재프로그래밍 물질의 접촉 전, 접촉시, 또는 접촉 후 (예를 들어, 1-10 일 후)에 시작될 수 있다.
- [0183] 본 발명자들은 핵 재프로그래밍 물질 및 p53 의 기능 저해제를 체세포로 이동시킬 때부터 iPS 세포를 확립하고 유지할 때까지 비-인간 동물에서 유래한 요소를 배양에 이용하지 않고 (즉, 완전 제노-프리 조건 하에), 본 발명의 핵 재프로그래밍 물질 및 p53 의 기능 저해제를, 특히 초기 자가-제거 유형의, 비-바이러스 벡터, 바람직하게는 에피솜 벡터와 조합하여 사용하여 인간 iPS 세포를 생성하는 방법을 최초로 제공하는데 성공하였다. 제노-프리 조건 하에 인간 iPS 세포를 유도하기 위해, 출발 세포는 핵 재프로그래밍 물질 및 p53 의 기능 저해제 (및 필요에 따라 또다른 iPS 세포 확립 효율 개선제) 와 접촉된 후 FCS 및 비-인간 동물에서 유래한 기타 요소가 없는 배지에서 배양된다. 분화 억제 인자로서 배지에 첨가되는 유용한 물질 (예를 들어, bFGF, SCF 등) 은 정제된 인간 단백질, 바람직하게는 재조합 단백질 형태이다. 임의로 선택된 인간 체세포가 피더 세포로서 이용될 수 있으며; 바람직한 피더 세포의 예는 인간 피부 섬유모세포 (HDF), 인간 치수 줄기 세포 등을 포함한다. 피더 세포를 이용하지 않고 인간 iPS 세포를 유도하는 것이 또한 가능하다. 이 경우, 시판되는 제노-프리 코팅제를 마트리겔 및 젤라틴 대신 이용하여 셀 용기를 코팅할 수 있다.
- [0184] iPS 세포의 후보 콜로니는 약물 내성 및 리포터 활성을 지표로서 이용하는 방법에 의해, 및 또한 형태의 육안 검사에 기초하는 방법에 의해 선별될 수 있다. 전자의 예로서, 약물 내성 및/또는 리포터 활성을 대한 콜로니 양성은 재조합 세포를 이용하여 선별되며, 이 경우 다능성 세포 (예를 들어, Fbx15, Nanog, Oct3/4 등, 바람직하게는 Nanog 또는 Oct3/4) 에서 특이적으로 고도로 발현되는 유전자의 자리가 약물 내성 유전자 및/또는 리포터 유전자의 표적이 된다. 상기 재조합 세포의 예로서, β -geo (β -갈락토시다아제 및 네오마이신 포스포 트랜스퍼라아제의 융합 단백질을 인코딩함) 유전자가 Fbx15 유전자 자리에 녹인 (knocked-in) 되어 있는 마우스-유래 MEF (Takahashi & Yamanaka, Cell, 126, 663-676 (2006)), 또는 녹색 형광 단백질 (GFP) 유전자 및 퓨로마이신 내성 유전자가 Nanog 유전자 자리에 통합되어 있는 트랜스제닉 마우스-유래 MEF (Okita 등, Nature, 448, 313-317 (2007)) 등이 언급될 수 있다. 한편, 형태의 육안 검사에 의한 후보 콜로니 선별 방법은, 예를 들어, Takahashi 등에 의해 문헌 [Cell, 131, 861-872 (2007)] 에서 기재된 방법을 포함한다. 리포터

세포를 이용하는 방법이 편리하고 효율적이지만, iPS 세포가 인간 처리를 목적으로 제조되는 경우 안정성의 관점에서 육안 검사에 의한 콜로니 선별이 바람직하다.

[0185] 선별된 콜로니 중 세포의 iPS 세포로서의 정체는 Nanog (또한 Oct3/4) 리포터에 대한 양성 반응 (퓨로마이신 내성, GFP 양성 등), 뿐만 아니라 상기와 같이 가시적 ES 세포성 콜로니의 형성에 의해 확인될 수 있으나; 정확성을 증가시키기 위해, 알칼리성 포스파타아제 염색, 다양한 ES-세포-특이적 유전자 발현의 분석, 및 선별된 세포의 마우스로의 이식 및 기형종 형성의 확인과 같은 시험을 수행하는 것이 가능하다.

[0186] 이렇게 확립된 iPS 세포는 다양한 목적으로 이용될 수 있다. 예를 들어, ES 세포에 관해 보고된 분화 유도 방법을 이용하여, iPS 세포로부터 다양한 세포 (예를 들어, 심근 세포, 혈액 세포, 신경 세포, 혈관 내피 세포, 인슐린-분비 세포 등)로 분화를 유도할 수 있다. 그러므로, 환자 또는 HLA 유형이 동일 또는 실질적으로 동일한 또다른 사람으로부터 수집한 체세포를 이용하여 iPS 세포를 유도하면, iPS 세포를 원하는 세포 (즉, 환자의 병든 기관의 세포, 질환에 치료 효과가 있는 세포 등)로 분화시켜 환자에게 이식하는 자가 또는 동종 이식에 의한 줄기 세포 치료가 가능할 것이다. 게다가, iPS 세포로부터 분화된 기능성 세포 (예를 들어, 간세포)가 상응하는 현존 세포주에 비해 기능성 세포의 생체 내에서의 실제 상태를 더 잘 반영하는 것으로 여겨지므로, 기능성 세포는 제약 후보 화합물 등의 유효성 및 독성에 대한 시험관내 스크리닝에도 적합하게 이용될 수 있다.

[0187] 본 발명은 이후 하기 실시예에 의해 더욱 상세히 설명되지만, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.

[0188] 실시예

[0189] 실시예 1

[0190] 레트로바이러스를 이용한 인간 iPS 세포의 확립

[0191] pMXs 플라스미드 및 Plat-E 패키징 세포 [University of Tokyo 의 Dr. Toshio Kitamura에 의해 공급됨; Morita, S. 등, Gene Ther. 7, 1063-1066 (2000)]에 기초하여 재프로그래밍을 위한 레트로바이러스를 제조하였다. pMXs의 멀티클로닝 위치에 다양한 구성물을 삽입하여 재프로그래밍에 이용할 레트로바이러스 벡터를 수득하였다. 인간 Oct3/4 (도 1에서의 O), 인간 Sox2 (도 1에서의 S), 인간 Klf4 (도 1에서의 K), 인간 c-Myc (도 1에서의 M), 인간 Lin28 (도 1에서의 L), 인간 Nanog (도 1에서의 N), 및 인간 L-Myc (도 1에서의 U), 및 각각의 유전자의 이식된 부위를 구체화 바이러스의 2A 서열을 통해 연결시켜 삽입된 구성물을 제조하였다 [도 1에서, 각각의 유전자에 대한 기호 (위에서 제시됨)는 하이픈으로 연결되어 있음 (예를 들어, O-M-L)]. GFP를 음성 대조군으로서 이용하였다.

[0192] 하루 전에 6-웰 배양 플레이트 (Falcon)에 0.6×10^6 세포/웰로 시딩한 Plat-E 세포에 앞서 언급한 레트로바이러스 벡터를 각각 이동시킴으로써 재프로그래밍을 위한 각각의 레트로바이러스를 제조하였다. 세포를 37°C에서 5% CO₂의 존재 하에 DMEM/10% FCS [10% 태아 송아지 혈청을 DMEM에 첨가하여 제조한 배양 브로쓰 (Nacalai Tesque)]를 이용하여 배양하였다. 벡터 이동을 촉진하기 위해, 4.5 μl의 FuGene6 트랜스펙션 시약 (Roche)을 100 μl의 Opti-MEM I 환원-혈청 배지 (Invitrogen)에 넣고, 세포를 실온에서 5분 동안 정착시켰다. 그 후, 1.5 μg의 각각의 발현 벡터를 첨가하고, 세포를 추가로 실온에서 15분 동안 더 정착시키고, 그 후 세포를 Plat-E 배양 브로쓰에 첨가하였다. 제 2일에, 배지를 새로 공급하여 Plat-E 상청액을 교체하였다. 제 3일에, 배양 상청액을 회수하고 0.45 μm 멀균 필터 (Whatman)를 통해 여과하고, 폴리브렌 (Nacalai)을 4 μg/ml로 첨가하여 바이러스 액체를 수득하였다.

[0193] 본 실험에서, 백인 신생아의 피부로부터 확립된 섬유모세포 (Cell Applications)를 랜티바이러스에 의해 마우스 Slc7a1로 트랜스펙션시킨 후 사용하였다. 상기 섬유모세포를 배양 브로쓰로서 DMEM/10% FCS를 사용하여 100 mm 배양 디쉬에서 5% CO₂의 존재 하에 37°C에서 배양 및 유지하였다. 재프로그래밍 인자를 이동하기 전날에, 배지를 제거하고, 5 ml의 PBS를 첨가하여 세포를 세척하였다. PBS를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen)를 첨가하고, 반응을 37°C에서 약 5분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, DMEM/10% FCS를 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 1.3×10^5 세포를 6-웰 배양 플레이트 (Falcon)의 하나의 웰에 시딩하였다.

[0194] 다음날, 세포를 혼합하고, Plat-E 세포를 사용하여 생성된 각각의 레트로바이러스로 감염시켰다. 24시간 후, 배지를 신선한 공급물로 대체하여 감염을 종결시켰다. 감염 시작 후 제 6일에, 플레이트로부터 배지를

제거하고, 1 ml 의 PBS 를 첨가하여 세포를 세척하였다. PBS 를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen) 을 첨가하고, 반응을 37°C 에서 약 5 분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, DMEM/10% FCS 를 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 5×10^5 세포를 미리 시딩된 피더 세포를 함유하는 100 mm 디쉬에 시팅하였다. 사용된 피더 세포는 세포 분열을 종결시키기 위해 미토마이신 C 로 처리되었던 SNL 세포였다. 다음날, 배지를 4 ng/ml bFGF (Wako) 가 보충된 영장류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL) 로 대체하였다; 상기 배지 교환을 매 2 일마다 계속하였다. 제 35 일에, 인간 ES 세포-성 콜로니를 계수하였다. 콜로니의 사진 및 콜로니 계수를 도 1 에 나타낸다. 콜로니 계수 결과를 도 2 에 요약한다. 유전자의 모든 조합에서, 인간 iPS 콜로니 (ES-성 콜로니) 에 대한 확립 효율은 c-Myc 대신 L-Myc 를 사용하는 것이 훨씬 높았다. c-Myc 또는 L-Myc 가 사용되었는지와 관계없이, 확립 효율은 Nanog 를 포함하는 6 개의 유전자 (도 2 에서의 "6 인자") 를 사용하는 것보다 Nanog 를 제외한 5 개의 유전자 (Oct3/4, Sox2, Klf4, Lin28, 및 c-Myc 또는 L-Myc; 도 2 에서의 ctrl) 를 사용하는 것이 높았다. L-Myc 이 L-Myc-Lin28 (도 2 에서의 U-L) 의 순서로 연결된 채로 사용되었을 때, 확립 효율은 L-Myc 이 사용되었으나 연결되지 않았을 때 수득된 수준에 비해 감소하지 않았다 (개별적으로 이동된 5 개의 유전자: 도 2 에서의 "ctrl").

[0195]

실시예 2

[0196]

에피솜 플라스미드를 사용한 인간 iPS 세포의 확립 (1)

[0197]

재프로그래밍을 위한 플라스미드는 pCX-EGFP (제공: Dr. Masaru Okabe, Osaka University; FEBS Letters, 407, 313-319, 1997) 를 기초로 하여 제조하였다. 먼저, 마멋 (woodchuck) 간염 바이러스 후-전사 조절 요소 (WPRE) 서열을 EGFP 의 다운스트림에 삽입하였다. 세포 내 상기 벡터의 복제를 위한 카세트를, loxP 서열을 pCEP4 (Invitrogen) 의 EBNA-1 의 양 말단 내로 삽입함으로써 제조하였다. EBNA-1 및 orIP 를 함유하는 상기 카세트를, WPRE 를 혼입하는 상기 언급된 pCX-EGFP 의 BamHI 위치 내에 통합시키고, 이것을 pCXLE-EGFP 라고 명명하였다. 상기 pCXLE-EGFP 를 EcoRI 로 처리하고, EGFP 대신에 다양한 구성물을 삽입하여, 재프로그래밍을 위한 플라스미드를 산출하였다. 삽입된 5 개의 구성물은 다음과 같았다: 1) 인간 Oct3/4, 2) 구제역 바이러스의 2A 서열을 통해 인간 Sox2 및 인간 Klf4 의 번역된 부위를 연결시켜 제조된 구성물, 3) 구제역 바이러스의 2A 서열을 통해 인간 Klf4, 인간 Sox2 및 인간 Oct3/4 의 번역된 부위를 연결시켜 제조된 구성물, 4) 구제역 바이러스의 2A 서열을 통해 인간 c-Myc, 인간 Lin28 및 Nanog 의 번역된 부위를 연결시켜 제조된 구성물, 및 5) SV40 Large T 항원 (각각의 구성물은 CAG 프로모터 및 토키 b-글로빈 polyA 서열의 제어 하에 있음), 이들은 각각 pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hKSO, pCXLE-hMLN, 및 pCX-SV40LT 로 지칭되었다 (pCX-SV40LT 는 WPRE 서열, EBNA-1 카세트 및 loxP 서열 중 어느 것도 갖지 않은 플라스미드임).

[0198]

본 실험에서, 36 세 백인 여성의 안면 피부로부터 확립된 섬유모세포 (Cell Applications, Lot1388) 를 사용하였다. 상기 섬유모세포를 DMEM/10% FCS [10% 소 태아 혈청을 DMEM (Nacalai Tesque) 에 첨가하여 제조된 배양 브로쓰] 를 사용하여 100 mm 배양 디쉬에서 5% CO₂ 의 존재 하에 37°C 에서 배양 및 유지하였다. 플라스미드 이동 시, 배지를 제거하고, 5 ml 의 PBS 를 첨가하여 세포를 세척하였다. PBS 를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen) 를 첨가하고, 반응을 37°C 에서 약 5 분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, DMEM/10% FCS 를 첨가하여 세포를 혼탁시킨 후, 800 rpm 에서 5 분 동안 원심분리하여, 상청액을 제거하였다. 총 3 μg 의 플라스미드 (0.5 μg pCXLE-hOct4, 1 μg pCXLE-hSK, 0.5 μg pCXLE-hKSO, 0.5 μg pCXLE-hMLN, 0.5 μg pCX-SV40LT) 를 Microporator (AR BROWN) 를 사용하여 세포에 이동시켰다. 상기 이동은 1650 V 에서 10 ms 동안 3 회 펄스로 100 μl 칩을 사용하여 일어났다. 트랜스펙션된 세포를 3 ml 의 DMEM/10% FCS 를 함유하는 6-웰 배양 플레이트 (Falcon) 로 이동시켰고, 37°C 에서 5% CO₂ 의 존재 하에 6 일 동안 배양하였다. 이어서, 배지를 제거하고, 2 ml 의 PBS 를 첨가하여 세포를 세척하였다. PBS 를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen) 를 첨가하고, 반응을 37°C 에서 약 5 분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, DMEM/10% FCS 를 첨가하여 세포를 혼탁시킨 후, 2×10^5 세포를 미리 시팅된 피더 세포를 함유하는 100 mm 디쉬에 시팅하였다. 사용된 피더 세포는 미토마이신 C-처리된 MEF 였다. 다음날, 배지를 4 ng/ml bFGF (Wako) 가 보충된 영장류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL) 로 교체하였다; 상기 배지 교환을 매 2 일마다 계속하였다. 제 26 일에, 하나의 인간 ES 세포-성 콜로니가 출현하였다. 확립 시 콜로니의 사진을 도 3 (좌) 에 나타낸다. 3 차 계대 시 콜로니의 사진을 도 3 (우) 에 나타낸다. 하나의 ES-성 콜로니가 2×10^5 세포로부터 확립될 수 있을 것이다.

- [0199] 실시예 3
- [0200] 에피솜 플라스미드를 사용한 인간 iPS 세포의 확립 (2)
- [0201] 실시예 2에서 사용되었던 pCXLE-SV40LT 이외의 4 개의 상이한 플라스미드를 재프로그래밍에 대해 사용하였다: pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hKSO, 및 pCXLE-hMLN.
- [0202] 본 실험에서, 36 세 백인 여성의 안면 피부로부터 확립된 섬유모세포 (Cell Applications, Lot1388)를 사용하였다. 상기 섬유모세포를 DMEM/10% FCS [10% 소 태아 혈청을 DMEM (Nacalai Tesque)에 첨가하여 제조된 배양 브로쓰]를 사용하여 100 mm 배양 디쉬에서 5% CO₂의 존재 하에 37°C에서 배양 및 유지하였다. 틀라스미드 이동 시, 배지를 제거하고, 5 ml의 PBS를 첨가하여 세포를 세척하였다. PBS를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen)를 첨가하고, 반응을 37°C에서 약 5 분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, DMEM/10% FCS를 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 6x10⁵ 세포를 15 ml 원심분리 튜브에 회수하였다. 혼탁액을 800 rpm에서 5 분 동안 원심분리하여, 상청액을 제거하였다. 총 3 µg의 플라스미드 (1 µg pCXLE-hOct4, 1 µg pCXLE-hSK, 0.5 µg pCXLE-hKSO, 0.5 µg pCXLE-hMLN)를 Microporator (AR BROWN)를 사용하여 세포에 이동시켰다. 상기 이동은 1650 V에서 10 ms 동안 3 회 펄스로 100 µl 칩을 사용하여 일어났다. 트랜스펙션된 세포를 3 ml의 DMEM/10% FCS를 함유하는 6-웰 플레이트 (Falcon)로 이동시켰고, 37°C에서 5% CO₂의 존재 하에 6 일 동안 배양하였다. 이어서, 배지를 제거하고, 2 ml의 PBS를 첨가하여 세포를 세척하였다. PBS를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen)를 첨가하고, 반응을 37°C에서 약 5 분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, DMEM/10% FCS를 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 1x10⁵ 세포를 미리 시딩된 피더 세포를 함유하는 100 mm 디쉬에 시딩하였다. 사용된 피더 세포는 미토마이신 C-처리된 MEF 또는 SNL76/7 이었다. 다음날, 배지를 4 ng/ml bFGF (Wako)가 보충된 영장류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL)로 교체하였다; 상기 배지 교환을 매 2 일 마다 계속하였다. MEF가 피더로서 사용된 경우에는, 하나의 인간 ES 세포-성 콜로니가 제 24 일에 출현하였다. 확립 시 콜로니의 사진을 도 4 (좌)에 나타낸다. 2 차 계대 시 콜로니의 사진을 도 4 (우)에 나타낸다. 하나의 ES-성 콜로니가 1x10⁵ 세포로부터 확립될 수 있을 것이다. SNL76/7이 피더로서 사용된 경우에는, iPS 콜로니가 확립되지 않을 것이다.
- [0203] 실시예 4
- [0204] 에피솜 플라스미드를 사용한 인간 iPS 세포의 확립 (3)
- [0205] 실시예 2 및 3에 나타내는 바와 같이, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 및 Nanog로 이루어지는 6 개의 유전자, 또는 상기 동일한 6 개 및 부가적인 SV40 Large T로 이루어지는 7 개의 유전자가 에피솜 플라스미드를 사용하여 세포에 이동되는 경우에는, 오직 약 0 내지 1 개의 iPS 세포만이 1 내지 2x10⁵ 세포로부터 확립될 수 있을 것이다. 동일한 7 개의 유전자를 사용할 때의 이러한 낮은 유도 효율은 또한 [Science, 324, 797-801 (2009)]에 기재되어 있다. 그러므로, 확립 효율을 향상시키기 위해, 실시예 1의 예비 실험에서 바람직한 결과를 제공하였던 L-Myc (L-Myc-Lin28 연합 구성물)를 사용한 반면, 필요없는 것으로 판단되었던 Nanog는 사용하지 않았다. 추가로, 인간 p53에 대한 shRNA를 인코딩하는 DNA [5'-GACTCCAGTGGTAATCTACttcaagagaGTAGATTACCACTGGAGTC-3' (SEQ ID NO:32): 밑줄친 부분은 p53에 대한 표적 서열이고; 대문자는 dsRNA가 형성되는 부분을 나타냄; 이하 간단히 p53 shRNA로서 언급됨]가 또한 사용되었다.
- [0206] 실시예 2에서 제조된 pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, 및 pCXLE-hMLN 외에, 1) 실시예 2에서 제조된 pCXLE-EGFP를 EcoRI로 처리하고, EGFP (pCXLE-hUL) 대신 구제역 바이러스의 2A 서열을 통해 인간 L-Myc 및 인간 Lin28의 번역된 부위를 연결시킴으로써 제조된 구성물을 혼입함으로써 제조된 플라스미드 및 2) pCXLE-hOct4 (pCXLE-hOct4-shp53)의 BamHI 위치 내에 삽입된 p53 (U6 프로모터에 의해 유도됨)에 대한 shRNA를 발현하는 구성물을 혼입하는 플라스미드를 제조하고 사용하였다. pCXLE-EGFP를 대조군으로서 사용하였다. pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL의 구조를 도 30에 나타낸다 (본 도면에서, pCXLE-hOct4-shp53은 pCXLE-hOct3/4-shp53으로서 기재됨).
- [0207] 본 실험에서, 21 세 일본인 여성의 피부로부터 확립된 섬유모세포 (JCRB, TIG113)를 렌티바이러스에 의해 마우스 Slc7a1로 트랜스펙션시킨 후 사용하였다. 상기 섬유모세포를 DMEM/10% FCS [10% 소 태아 혈청을 DMEM (Nacalai Tesque)에 첨가하여 제조된 배양 브로쓰]를 사용하여 100 mm 배양 디쉬에서 5% CO₂의 존재 하에 37

℃에서 배양 및 유지하였다. 플라스미드 이동 시, 배지를 제거하고, 5 ml의 PBS를 첨가하여 세포를 세척하였다. PBS를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen)를 첨가하고, 반응을 37℃에서 약 5분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, DMEM/10% FCS를 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 6×10^5 세포를 15 ml 원심분리 투브에 회수하였다. 혼탁액을 800 rpm에서 5분 동안 원심분리하여, 상청액을 제거하였다. 표 2에 나타낸 플라스미드 (총 3 μ g)를 Microporator (AR BROWN)를 사용하여 세포에 이동시켰다. 상기 이동은 1650 V에서 10 ms 동안 3회 펄스로 100 μ l 칩을 사용하여 일어났다. 트랜스펙션된 세포를 3 ml의 DMEM/10% FCS를 함유하는 6-웰 배양 플레이트 (Falcon)로 이동시켰고, 37℃에서 5% CO₂의 존재 하에 7일 동안 배양하였다. 이어서, 배지를 제거하고, 2 ml의 PBS를 첨가하여 세포를 세척하였다. PBS를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen)를 첨가하고, 반응을 37℃에서 약 5분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, DMEM/10% FCS를 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 1.5×10^5 세포를 미리 시딩된 피더 세포를 함유하는 100 mm 디쉬에 시딩하였다. 사용된 피더 세포는 미토마이신 C-처리된 MEF 또는 SNL76/7이었다. 다음날, 배지를 4 ng/ml bFGF (Wako)가 보충된 영장류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL)로 교체하였다; 상기 배지 교환을 매 2일마다 계속하였다. 제 28일에, 출현한 인간 ES 세포-성 콜로니를 계수하였다. 콜로니의 사진을 도 5에 나타낸다. 콜로니 계수 결과를 표 2 및 도 6 (MEF 가 피더로서 사용됨)에 나타낸다.

[0208]

[표 2]

실시예 번호	벡터 함량 (μ g) (Microporator 조건 : 1650V, 10ms, x3)					MEF 피더		MSTO 피더		
	pCXLE-hOct4	pCXLE-hOct4-shp53	pCXLE-hSK	pCXLE-hMLN	pCXLE-hUL	pCXLE-EGFP	비-ES 성	ES 성	비-ES 성	ES 성
375A	1		1	1			0	1	0	0
375B, D	1		1		1		10	13	3	6
375C, E		1	1		1		71	136	87	132
대조군						3	0	0	0	0

375A-C: MEF 피더 ; 375D-E: MSTO 피더

[0209]

[0210] 어떠한 피더를 사용했던지 간에 iPS 콜로니 (ES-성 콜로니)가 확립될 수 있었지만, MEF를 사용하면 보다 많은 콜로니가 확립되었다. Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, 및 Lin28로 이루어진 5개의 유전자를 사용했던 경우, 확립 효율은 통상의 6개의 유전자 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 및 Nanog)를 사용한 것에 비해 증가하였다. p53 shRNA를 추가로 첨가하였으므로, 확립 효율은 현저하게 증가하였다.

[0211] 실시예 5

[0212] 예피솜 플라스미드를 사용한 인간 iPS 세포의 확립 (4)

[0213] 재프로그래밍에 사용된 플라스미드는 실시예 4에서의 5개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN, pCXLE-hUL, 및 pCXLE-hOct4-shp53과 동일하였다; pCXLE-EGFP를 대조군으로서 사용하였다.

[0214] 본 실험에서, 6세 일본인 여성의 피부로부터 확립된 섬유모세포 (JCRB, TIG120) 및 8개월 일본인 여성의 피부로부터 확립된 섬유모세포 (JCRB, TIG121)를 렌티바이러스에 의해 마우스 Slc7a1로 트랜스펙션시킨 후 사용하였다. 상기 섬유모세포를 DMEM/10% FCS [10% 소 태아 혈청을 DMEM (Nacalai Tesque)에 첨가하여 제조된 배양 브로쓰]를 사용하여 100 mm 배양 디쉬에서 5% CO₂의 존재 하에 37℃에서 배양 및 유지하였다. 플라스미드 이동 시, 배지를 제거하고, 5 ml의 PBS를 첨가하여 세포를 세척하였다. PBS를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen)를 첨가하고, 반응을 37℃에서 약 5분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, DMEM/10% FCS를 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 6×10^5 세포를 15 ml 원심분리 투브에 회수하였다. 혼탁액을 800 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 표 3에 나타낸 플라스미드 (총 3 μ g)를 Microporator (AR BROWN)를 사용하여 세포에 이동시켰다. 상기 이동은 1650 V에서 10 ms 동안 3회 펄스로 100 μ l 칩을 사용하여 일어났다. 트랜스펙션된 세포를 3 ml의 DMEM/10% FCS를 함유하는 6-웰 배양 플레이트 (Falcon)로 이동시켰고, 37℃에서 5% CO₂의 존재 하에 7일 동안 배양하였다. 이어서, 배지를 제거하고, 2 ml의 PBS를 첨가하여 세포를 세척하였다. PBS를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen)를 첨가하고, 반응을 37℃에서 약 5분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, DMEM/10% FCS

를 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 1×10^5 세포를 미리 시딩된 피더 세포를 함유하는 100 mm 디쉬에 시팅하였다. 사용된 피더 세포는 미토마이신 C-처리된 MEF 또는 SNL76/7 이었다. 다음날, 배지를 4 ng/ml bFGF (Wako) 가 보충된 영장류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL)로 교체하였다; 상기 배지 교환을 매 2 일 마다 계속하였다. 제 28 일에, 출현한 인간 ES 세포-성 콜로니를 계수하였다. 콜로니의 사진을 도 7 (TIG120 이 사용됨) 및 도 8 (TIG121 이 사용됨) 에 나타낸다. 콜로니 계수 결과를 표 3, 도 9 (TIG120 이 사용됨, MEF 가 피더로서 사용됨) 및 도 10 (TIG121 이 사용됨, MEF 가 피더로서 사용됨) 에 나타낸다.

[0215]

[표 3]

실시예 번호	HDF 공급원	벡터 함량 (μg) (Microporator 조건 : 1650V, 10ms, x3)						MEF 피더		MSTO 피더	
		pCXLE-hOct4	pCXLE-hOct4-shp53	pCXLE-hSK	pCXLE-hMLN	pCXLE-hUL	pCXLE-EGFP	비-ES 성	ES 성	비-ES 성	ES 성
380A	TIG120	1		1	1			1	3	0	0
380B	TIG120		1	1	1			7	11	1	2
380C	TIG120	1		1		1		4	16	0	4
380D	TIG120		1	1		1		37	71	17	25
대조군	TIG120						3	0	0	0	0
380E	TIG121	1		1	1			2	3	0	0
380F	TIG121		1	1	1			11	10	1	4
380G	TIG121	1		1		1		9	23	0	0
380H	TIG121		1	1		1		24	97	5	11
대조군	TIG121						3	0	0	0	0

[0216]

통상의 6 개의 유전자 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 및 Nanog) 를 사용한 것과 비교하면, 확립 효율은 부가적인 p53 shRNA 를 사용하면 증가하였다. 추가로, Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, 및 Lin28 로 이루어진 5 개의 유전자가 사용되는 경우, 확립 효율은 통상의 6 개의 유전자를 사용한 것에 비해 증가하였다. p53 shRNA 를 추가로 첨가하였으므로, 확립 효율은 여전히 현저하게 증가하였다.

[0217]

MEF 를 피더 세포로서 사용하여 수득된 결과 및 SNL76/7 (MSTO) 을 사용하여 수득된 결과를 도 11 (TIG120 이 사용됨) 에 비교하였다. 어떠한 피더를 사용했던지 간에 iPS 콜로니 (ES-성 콜로니) 가 확립될 수 있었지만, MEF 를 사용하면 다수의 콜로니가 확립되었다.

[0218]

실시예 6

[0219]

iPS 콜로니 내 외인성 유전자의 존재 또는 부재 확인 (1)

[0220]

에피솜 플라스미드를 사용하여 재프로그래밍 유전자를 이동시켜 확립된 5 개의 상이한 iPS 세포를 계놈 내 외인성 유전자의 통합의 존재 또는 부재에 대해 시험하였다.

[0221]

6-웰 배양 플레이트 (Falcon) 에서 거의 합류성 (confluent) 이 된 후, 2 ml 의 PBS 를 첨가하여 iPS 세포를 세척하였다. PBS 를 제거한 후, 400 μl 의 계놈 회수 완충액 (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 프로테이나아제 K) 을 첨가하여 세포를 용해시키고, 세포를 1.5 ml 투브에 회수하고, 이후 세포 용리액을 55°C 에서 밤새 인큐베이션시켰다. 이것을 150 μl 의 PCI (페놀, 클로로포름 및 이소아밀 알코올의 25:24:1 혼합물) 와 15 분 동안 혼합시키고, 13200 rpm 에서 10 분 동안 원심분리하였다. 수성 층 (상부 층) 을 회수하고 1 ml 의 에탄올과 혼합하였다. 생성된 침전물을 또 다른 투브에 회수하고, 이것을 긴 DNA 로서 사용하였다. 침전물이 제거된 남은 액체를 13200 rpm 에서 15 분 동안 원심분리하였다. 생성된 침전물을 짧은 DNA 로서 사용하였다. 각각의 DNA 를 70% 에탄올로 세척하고 TE 완충액에 용해하여 PCR 주형을 수득하였다. PCR 을 각 반응에서 주형으로서 사용된 50 ng 의 긴 DNA 또는 250 ng 의 짧은 DNA 로, TaKaRa EX Taq (Takara Shuzo) 를 사용하여 수행하였다. 하기 프라이머를 조합으로 사용하였다.

[0222]

Klf4 의 검출: hKlf4-S1016 ACC CAT CCT TCC TGC CCG ATC AGA (SEQ ID NO:33)

[0223]

hKlf4-AS1170 ATC ACA AGT GTG GGT GGC GGT CCT (SEQ ID NO:34)

[0224]

c-Myc 의 검출: hMyc-S547 GCC GCC TCA GAG TGC ATC GAC (SEQ ID NO:35)

[0225]

hMyc-AS947 CGA GTG GAG GGA GGC GCT GCG TAG (SEQ ID NO:36)

- [0227] pCEP4 유래의 Or iP 의 검출: pEP4-SF1 TTC CAC GAG GGT AGT GAA CC (SEQ ID NO:37)
- [0228] pEP4-SR1 TCG GGG GTG TTA GAG ACA AC (SEQ ID NO:38)
- [0229] Or iP 의 검출 시, 또한 200, 20, 또는 2 fg 의, 출발 섬유모세포의 계놈에 이동되었던 플라스미드 (도 12 에서의 "+플라스미드") (50 ng) 를 첨가하여 제조된 대조군 상에 PCR 을 수행하였다. 결과를 도 12 에 나타낸다. 시험된 임의의 iPS 세포에서, 외인성 유전자 (Tg)로부터의 Klf4 및 c-Myc 및 백터 구성 요소 Or iP 중 어느 것도 긴 DNA (도 12 에서의 L) 또는 짧은 DNA (도 12 에서의 S) 에서 검출되지 않았다; 이것은 이동된 에피솜 플라스미드가 세포에서 자발적으로 분계된 것으로 추정되었다.
- [0230] 실시예 7
- [0231] 에피솜 플라스미드를 사용한 인간 iPS 세포의 확립 (5)
- [0232] 체세포의 공급원으로서 다양한 연령의 남성 및 여성 일본인 및 백인의 피부로부터 확립된 섬유모세포 (HDF) 를 실시예 5 와 동일한 방식으로 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL 을 사용하여, p53 shRNA 와 함께 Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, 및 Lin28 로 이루어지는 5 개의 유전자로 트랜스펙션시켰다. MSTO 또는 MEF 는 피더 세포로서 역할하였다. 섬유모세포를, 하나는 마우스 Slc7a1 이 혼입되었고 다른 것은 혼입되지 않은 2 개의 형태로 공급하였다. 트랜스펙션 후 제 27 일 내지 제 32 일에 출현한 인간 ES 세포-성 콜로니를 계수하였다. 결과를 (n=1 내지 5) 표 4 에 함께 나타낸다.

[0233] [표 4]

명칭	연령	성별 ¹	인종 ²	콜로니 수	N
HDF1419	태아	F	-	68.7	4
TIG121	8m	M	J	97	1
TIG120	6	F	J	41.7	4
HDF1388	36	F	C	3.4	5
TIG114	36	M	J	4	1
HDF1429	45	M	C	50	1
HDF1377	53	F	C	26	1
HDF1437	56	M	C	47	3
HDF1554	77	F	C	12	2
TIG107	81	F	J	3.5	2

¹ F: 여성 , M: 남성² J: 일본인 , C: 백인

[0234]

- [0235] 상기 표에서, 콜로니 계수를 1×10^5 HDF 당 확립된 콜로니의 평균 수로서 나타낸다. 표 4로부터 증명되듯이, iPS 세포가 세포 공급원 대상의 연령, 성별, 및 인종과 관계없이 확립될 수 있었다는 것을 발견하였다. 또한 iPS 세포가 Slc7a1 이 이동되었는지의 여부와 관계없이 확립될 수 있었다는 것도 발견되었다 (별도의 데이터는 나타내지 않음).

[0236] 실시예 8

[0237] 일시적 발현 플라스미드를 사용한 p53 shRNA 의 이동

- [0238] p53 유전자는 암 억제 유전자로서 알려져 있다; 장기간 p53 의 기능적 저해는 잠재적으로 발암 위험을 증가시킨다. 그러므로, 심지어 p53 shRNA 가 일시적 발현 백터 (EBNA-1 및 or iP 가 결여된 통상의 플라스미드 백터: 이하, 플라스미드 백터) 에 의해 발현되었던 경우에도 iPS 세포가 에피솜 백터로서 확립될 수 있는지의 여부를 측정하기 위해 조사를 수행하였다.

- [0239] 에피솜 백터와 플라스미드 백터 사이에서 유전자 발현의 소실 범위의 차이가 있는지의 여부를 측정하기 위해 예비 연구를 수행하였다. 본 실험에서, pCX-EGFP (제공: Dr. Masaru Okabe, Osaka University; FEBS Letters, 407, 313-319, 1997), 실시예 2 에서 제조된 pCXLE-EGFP, 및 pCXE-EGFP (pCXLE-EGFP로부터 10xP 서열을 제거함으로써 제조된 플라스미드) 를 사용하였다. 각각의 플라스미드의 HDF1419 내로의 이동 후 제 6 일 및 제 14 일에, GFP 의 발현을 시험하였다. 상기 이동은 Microporator 를 사용하여 1650 V 에서 10 ms 동안 3 회 펄스로 100 μ l 칩을 사용하여 일어났다. 결과를 도 13 에 나타낸다. 모든 플라스미드에 대해, GFP 형광을 제 6 일에 관찰하였으나, 발현된 양은 다른 2 개에 대한 것보다 pCX-EGFP 에 대한 것이 낮았

다. 제 14 일에, 형광은 여전히 관찰되었으나, 발현된 양은 다른 2 개에 대한 것보다 pCX-EGFP 에 대한 것이 상당히 낮았다. 상기 발견은 유전자 발현이 에피솜 벡터에서보다 플라스미드 벡터에서 일찍 소실되었음을 확인시켜주었다.

[0240] 그 다음, 심지어 p53 shRNA 가 플라스미드 벡터를 사용하여 이동된 경우에도 iPS 세포가 확립되었는지의 여부를 측정하기 위해 조사를 수행하였다. 이동을 위해, 하기 플라스미드 또는 에피솜 벡터를 사용하였다.

[0241] (a) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN

[0242] (b) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN, pSilencer-shp53

[0243] [pSilencerTM (Ambion) 의 U6 프로모터의 다운스트림에 p53 shRNA 를 삽입함으로써 제조된 pSilencer-shp53]

[0244] (c) pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL

[0245] (d) pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL, pSilencer-shp53

[0246] 이동을 위해, 0.75 μ g [(b) 및 (d)] 또는 1 μ g [(a) 및 (c)] 의 각각의 벡터를 사용하였다 (총 3 μ g).

[0247] 피더 세포로서 MEF 와 함께, 체세포로서 36 세 백인 여성의 피부로부터 확립된 섬유모세포 (HDF1388) 를 사용하여 실시예 5 와 동일한 방식으로 iPS 세포를 확립하였다. 이동은 Microporator 를 사용하여 1650 V 에서 10 ms 동안 3 회 펄스로 100 μ l 칩을 사용하여 일어났다. 이동 후 제 27 일에, 출현한 인간 ES 세포-성 콜로니를 계수하였다. 결과를 도 14 에 나타낸다. 조합 (a) 및 (b) (도 14 에서의 +M-L-N 의 에피 (Epi) 대 트랜스 (Trans)), 및 조합 (c) 및 (d) (도 14 에서의 +U-L 의 에피 대 트랜스) 를 비교하면, p53 shRNA 의 이동을 위한 에피솜 벡터의 사용과 플라스미드 벡터의 사용 사이에 확립된 콜로니의 수에 큰 차이는 없었고; 심지어 이동을 위해 플라스미드 벡터를 사용해도 iPS 세포가 잘 확립될 수 있다는 것이 입증되었다.

[0248] 실시예 9

[0249] 호모-HLA 유전자형을 갖는 건강한 인간 유래의 치수 줄기 세포로부터의 iPS 세포의 확립

[0250] 4 개의 유전자 좌 HLA-A, HLA-B, HLA-Cw 및 HLA-DRB1 에 대한 호모-유전자형을 갖는 건강한 인간 유래의 치수 줄기 세포 (세포주 DP74 및 DP94) 가 Drs. Takahiro Kunisada 및 Kenichi Tezuka (Gifu University) 에 의해 제공되었다. 상기 세포주는 [J. Dent. Res., 87 (7): 676-681 (2008)] 및 WO 2010/013359 에 기재된 바와 같이 확립되었다. 2 개의 세포주의 상기 언급된 4 개의 HLA 유전자형 및 이의 대립유전자 빈도 [일본인에서의 모든 대립유전자 중 4 개의 HLA 유전자형을 갖는 각각의 대립유전자 (반수체형) 의 빈도] 를 표 5 에 나타낸다.

[0251] [표 5]

	HLA 대립유전자				집단
	A	B	Cw	DRB1	
DP74	2402	5201	1202	1502	10%
DP94	1101	1501	0401	0406	1.5%

[0252]

[0253] 재프로그래밍을 위한 5 개의 상이한 플라스미드: pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hMLN, pCXLE-hUL 및 pCXLE-hOct4-shp53 을 사용하여 실시예 5 와 동일한 방식으로 iPS 세포가 확립되었다. 또한 [Science, 324: 797-801 (2009)] 에 기재된 플라스미드를 이동시켜 iPS 세포가 확립되었다 (톰슨 믹스). 각각의 경우에 총 3 μ g 의 벡터를 사용하였다; 상기 이동은 Microporator 를 사용하여 1650 V 에서 10 ms 동안 3 회 펄스로 100 μ l 칩을 사용하여 일어났다. MSTO 를 피더 세포로서 사용하였다.

[0254] pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL 을 DP74 및 DP94 로 이동시켜 확립된 iPS 세포의 사진을 도 15 에 나타낸다. 이동 후 제 28 일에 출현한 인간 ES 세포-성 콜로니를 계수하였다. 결과를 도 16 및 17 에 나타낸다 (각각의 수는 3 회 실험에 대한 평균 및 표준 편차를 나타낸다). DP74 주 (도 16) 및 DP94 주 (도 17) 모두의 경우, p53 shRNA (pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL) 와 함께 Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, 및 Lin28 로 이루어지는 5 개의 유전자의 이동으로 최고의 확립 효율이 수득되었고; 양호한 결과가 HDF 와 같이 수득되었다.

- [0255] 실시예 10
- [0256] iPS 콜로니 내 외인성 유전자의 존재 또는 부재 확인 (2)
- [0257] 예비 연구에서, pCXLE-EGFP 가 HDF 로 이동되었고, 어떻게 EGFP 의 발현이 소실되었는지를 측정하기 위해 연구를 수행하였다. 이동 후 제 1 주 내지 제 4 주까지의 매 주에, 1×10^4 세포 내 EGFP 의 발현된 양 (형광 세기) 를 FACS 에 의해 분석하였다. 결과를 도 18 에 나타낸다. EGFP 의 발현량 및 발현을 나타내는 세포의 수는 주마다 감소하였고; 트랜스펙션 4 주 후, GFP-양성 세포가 2.4% 정도로 감소하였다.
- [0258] 이어서, pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL 의 HDF 로의 이동에 의한 확립 직후에, 18 개의 상이한 iPS 클론을 외인성 유전자의 존재 또는 부재에 대해 시험하였다.
- [0259] 5 $\mu\ell$ 의 계놈 회수 완충액 ($167 \mu\text{g}/\text{ml}$ 프로테이나아제 K 가 보충된 TaKaRa EX Taq 에 대한 완충액) 을 함유하는 0.2 ml 투브를 제공하였다. 트랜스펙션 후 제 30 일에, 각각의 iPS 세포의 콜로니를 디쉬로부터 물리적으로 해리시키고, 상기 투브에 회수하였다. 회수 후, 투브를 55°C 에서 3 시간 동안 인큐베이션시켜 세포 용리액 을 수득하였다. $\text{H}_2\text{O} 10 \mu\ell$ 첨가 후, 용해물을 95°C 에서 3분 동안 가열하여 프로테이나아제 K 를 불활성화 시켰다. 이를 그 자체로 실시간 PCR 을 위한 주형으로서 사용하였다. SYBR 프리믹스 EX Taq II (Takara Shuzo) 를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 에피솜 벡터의 카피 수를 계산하기 위해 EBNA-1 에 대한 PCR 프라이머 쌍을 설계하고, 세포 수를 추정하기 위해 내인성 FBXO15 자리에 또다른 다른 프라이머 쌍을 설계하였다.
- [0260] EBNA-1 프라이머 (에피솜 벡터의 검출을 위해)
- [0261] EBNA-183F ATC AGG GCC AAG ACA TAG AGA TG (SEQ ID NO:39)
- [0262] EBNA-243R GCC AAT GCA ACT TGG ACG TT (SEQ ID NO:40)
- [0263] Fbx15 프라이머 (내인성 대립형질의 검출을 위해)
- [0264] hFbx15-2F GCC AGG AGG TCT TCG CTG TA (SEQ ID NO:41)
- [0265] hFbx15-2R AAT GCA CGG CTA GGG TCA AA (SEQ ID NO:42)
- [0266] 증폭된 EBNA-1 의 양을, 증폭된 Fbx15 의 양으로부터 계산된 반응 혼합물 중에서 세포 계수에 의해 교정하고, 1×10^4 세포 당 에피솜 벡터의 카피 수를 계산하였다. 결과를 도 19 에 나타냈다. 18 개의 클론에 대한 평균은 1×10^4 세포 당 20.3 ± 13.7 카피로 매우 낮았고, 이는 외인성 유전자 (에피솜 벡터) 의 매우 소량만이 트랜스펙션 후 30 일간 남아 있음을 입증하는 것이다.
- [0267] 다음으로, 세포를 계대 배양한다는 점을 제외하고는 동일한 실험을 수행하였다.
- [0268] 1x EX Taq 완충제 (Takara) 및 $167 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 프로테이나아제 K 로 이루어지는 신선한 세포 용균 용액을 제조하였다. 확립된 iPS 세포를 분석하기 위해, 60-mm 디쉬에서 배양한 세포를 CTK 처리로 피더 세포의 제거 후 세포 스크래퍼로 수확하였다. 세포를 투브에 두고 원심분리하고, 세포 펠릿을 $200 \mu\ell$ 의 용균 용액으로 용균 시켰다. 55°C 에서 3 시간 인큐베이션하고, 이어서 95°C 에서 프로테이나아제 K 불활성화 후, 용해물을 정량 PCR 분석에 사용하였다. FBXO15 및 EBNA-1 둘 모두에 대한 증폭절을 갖는 pCXLE-hFbx15-cont2 플라스미드를 표준 증폭을 위해 사용하였다.
- [0269] DP-유래된 epi-iPS 세포의 결과를 도 31A 에 나타냈다. 트랜스펙션 6 일후 세포 당 에피솜 벡터의 약 200 카피를 검출하였다. 대조적으로, 시험된 7 개 중 5 개의 클론에서는 임의의 EBNA-1 DNA 를 검출할 수 없었다. 남아 있는 2 개의 클론에서, 각각 -0.001 및 2 카피를 검출하였다 (도 31A). 후자의 클론은 플라스미드가 염색체로 통합되기 쉽다.
- [0270] 섬유모세포-유래된 epi-iPS 세포의 결과를 도 31B 에 나타냈다. 몇몇 클론에서 (404C-2 및 409B-2 포함), 임의의 에피솜 벡터를 검출할 수 없었다. 이를 자료는 대부분의 epi-iPSC 클론에서, 에피솜 벡터가 자발적으로 손실됨을 입증하는 것이다.
- [0271] 실시예 11
- [0272] iPS 콜로니에서 외인성 유전자의 발현의 존재 또는 부재의 확인

[0273] pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL 을 HDF 로 이동시켜 확립한 후 5 차 내지 9 차 계대에서, 9 개의 상이한 iPS 클론을 외인성 유전자의 발현의 존재 또는 부재에 대해 검사하였다.

[0274] 6-웰 플레이트의 하나의 웰에서 iPS 세포로부터 총 RNA 를 추출하였다; 이의 1 μ g, 프라이머 dT (20) 및 역 전사효소 Rever Tra Ace (TOYOBIO) 를 사용하여 상보성 가닥 DNA 로 mRNA 를 역전사하였다. 반응 생성물의 최종 부피는 20 μ l 였다. 이러한 역 전사에 60 μ l 의 H₂O 를 첨가하였다. 한편으로는 발현되는 외인성 유전자의 양 및 발현되는 내인성 유전자의 양의 합 (발현되는 총량) 을 측정하기 위해, 다른 한편으로는 발현되는 외인성 유전자의 양을 측정하기 위해, 하기 표 6 에 나타낸 프라이머 세트를 사용하여, 주형으로서 반응 생성물 1 μ l (RNA 의 12.5 ng 에 등가) 로, 표지자로서 SYBR Green II 로 정량 PCR 을 각각의 전이유전자에 대해 수행하였다. 사용되는 PCR 조건은 하기와 같았다: 95°C 에서 30 초 동안의 1 사이클, 이어서 94°C 에서 10 초 동안, 60°C 에서 10 초 동안, 및 72°C 에서 30 초 동안의 50 사이클.

[표 6]

hOct3/4 (총)	hOct3/4-S944	#40-56	CCG CAG GGC CCC ATT TGGTAC (SEQ ID NO: 43)
	hOct3/4-as	#10-25	ACC TCAGTTTGAATGCATGGAGAGC (SEQ ID NO: 44)
hOct3/4 (Tg)	hOct4-1072F	#74-74	CATTCAAACTGAGGTAGCGG (SEQ ID NO: 45)
	WPRE-70R	#74-73	TAGCGTAAAAGGAGAACATAG (SEQ ID NO: 46)
hKLF4 (총)	hKlf4-S1016	#62-88	ACC CAT CCT TCC TGC CGG ATC AGA (SEQ ID NO: 47)
	hKlf4-AS1048	#43-94	TTGGTAATGGAGCGGCGGGAC TTG (SEQ ID NO: 48)
hKlf4 (Tg)	hKLF4-S1380	#66-24	cca oct ogc ctta cat gaa ga (SEQ ID NO: 49)
	WPRE-70R	#74-73	TAGCGTAAAAGGAGAACATAG (SEQ ID NO: 50)
hSOX2 (총)	hSox2-S875	#66-23	tcc aca tgt ccc agc adt acc aga (SEQ ID NO: 51)
	HsSox2-AS	#31-72	TCACAT GTG TGAGAGGG CAG TGT CC (SEQ ID NO: 52)
hSox2 (Tg)	hSox2-S875 (66-23)	#66-23	tcc aca tgt ccc agc adt acc aga (SEQ ID NO: 53)
	FMDV-2A-R2	#74-72	TTT GTT TGA CAG GAG CGA CAAT (SEQ ID NO: 54)
hL-Myc (총)	hMCL1-S1027	#71-59	GCGAAC OCA AGA CCC AGG CCT CCT OC (SEQ ID NO: 55)
	hMCL1-AS1145	#71-60	CAG CGG GTC TGC TOG CAC CGT GAT G (SEQ ID NO: 56)
hLMyc (Tg)	hLMyc-1005F	#74-76	GGCTGAGAAGAG GAT GGCTAC (SEQ ID NO: 57)
	FMDV-2A-R2	#74-72	TTT GTT TGA CAG GAG CGA CAAT (SEQ ID NO: 58)
hLin28 (총)	hLin28-S502	#49-64	AGCCATA TGGTAGOCTCATGTC CGC (SEQ ID NO: 59)
	hLIN28-AS	#47-6	TCAAAT CTG TGC CTC CGG GAG CAG GGT AGG (SEQ ID NO: 60)
hLin28 (Tg)	hLin28-S502	#49-64	AGCCATA TGGTAGOCTCATGTC CGC (SEQ ID NO: 61)
	WPRE-70R	#74-73	TAGCGTAAAAGGAGAACATAG (SEQ ID NO: 62)

[0276]

[0277] 다음으로, pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hsK 및 pCXLE-HuL 각각(이는 트랜스펙션에 대해 사용됨) 은 10⁶ 카피/ μ l 용액으로서 제조하고, 이러한 용액을 연속적으로 10 배 희석시켰다. 각각의 출발 용액 및 연속적 희석으로 (주형으로서), 정량 PCR 을 동일한 방식으로 수행하였다. 각각의 재프로그래밍 유전자에 대해, 발현되는 총량을 측정하기 위한 프라이머 세트 및 발현되는 외인성 유전자의 양을 측정하기 위한 프라이머 세트 각각에 대해 표준 곡선을 생성하였다. 각각의 iPS 세포에 대한 정량 PCR 의 결과를 이러한 표준 곡선을 이용하여 전환시키고, 총 RNA 의 12.5 ng 당 각각의 유전자의 카피 수를 발현되는 외인성 유전자의 양 및 발현되는 총량으로서 계산하였다. 세로좌표 축 상에서 이러한 카피 수의 대수 플롯을 도 20 (Oct3/4) 및 도 21 (Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28) 에 나타냈다 (회색 영역은 검출 한계 하에서의 값을 나타냄). 다수의 클론 (409B-2 및 421C-1 포함) 이 관찰되었고 이때 발현 수준은 조사되는 모든 외인성 유전자의 검출 한계 하에 있었다. 이들 세포를 선택하는 것이 보다 안전한 iPS 세포가 이용될 수 있게 하는 것으로 나타났다.

[0278]

실시예 12

[0279]

인간 Epi-iP 세포의 특징 분석

[0280]

1) 마이크로어레이 분석 및 CGH 어레이 분석

[0281]

유전자 발현 패턴이, pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL 을 피부 섬유모세포 (TIG 및 HDF) 로 이동시켜 확립된 인간 iPS 세포, 인간 ES 세포, 및 TIG 및 HDF (이동에 사용됨) 중에서 상이한지 여부를 측정하기 위해, DNA 마이크로어레이 분석을 Cell1, 131, 861 - 872 (2007)]에서 기술된 바와 같이 수행하였다. 다양한 세포 사이에 상호관계 계수를 표 7 에 나타냈다.

[0282]

[표 7]

이레이 이	409B-2 (p7)	418C-1 (p7)	421C-1 (p7)	428C-2 (p9)	428C-2 (p7)	KhES1 (7-5-4-5-4)	KhES3 (4-9-4-4-4)	TG107-Sic	TG120-Sic	HDF1388-Sic
409B-2 (p7)	1.000000	0.988557	0.982883	0.982627	0.984413	0.974758	0.984130	0.984364	0.787134	0.792555
418C-1 (p7)	0.988557	1.000000	0.980910	0.981387	0.984424	0.970780	0.982916	0.982731	0.796518	0.802684
421C-1 (p7)	0.982683	0.980810	1.000000	0.988431	0.980866	0.978521	0.985702	0.984871	0.785027	0.801948
428C-2 (p9)	0.982627	0.981387	0.988431	1.000000	0.983527	0.980344	0.988320	0.988782	0.797564	0.803887
428C-2 (p7)	0.984413	0.984424	0.980966	0.983527	1.000000	0.972649	0.982585	0.985471	0.792073	0.798452
KhES1 (7-5-4-5-4)	0.974758	0.970780	0.976521	0.980344	0.972849	1.000000	0.983036	0.983429	0.780730	0.788327
KhES3 (4-9-4-4-4)	0.984430	0.982616	0.982616	0.985702	0.988320	0.982585	1.000000	0.983120	0.783260	0.821393
KhES3 (4-9-4-4-4)	0.984434	0.982731	0.984871	0.988782	0.983429	0.983429	1.000000	0.787711	0.795464	0.820877
TG107-Sic	0.787134	0.798518	0.795027	0.797584	0.792073	0.760730	0.783260	0.787711	1.000000	0.986470
TG120-Sic	0.792555	0.800264	0.801948	0.803697	0.798452	0.768327	0.795464	0.795074	1.000000	0.987098
HDF1388-Sic	0.820812	0.827104	0.824806	0.832218	0.820714	0.813383	0.821393	0.820877	0.882880	1.000000

[0283]

[0284]

다양한 유전자 중에서 발현되는 양에서의 차이에 기초한 군집 분석의 결과를 도 22 에 나타냈다. 산포 플롯 분석의 결과를 도 23 에 나타냈다. 에피솜 벡터를 사용하여 확립된 iPS 세포는 발현 패턴이 ES 세포와 유사하게 나타났고, 따라서 iPS 세포가 ES 세포와 유사함이 증명되었다.

[0285]

CGH 어레이 분석의 결과를 도 24 에 나타냈다. 이동에 사용된 TIG 세포와 비교시 주요한 변칙은 나타나지 않았다. 몇몇 세포 상에서 G 밴드 염색에 의해 핵형 분석에서 특이사항은 발견되지 않았다.

[0286]

상기 기술된 실험에서, 하기 어레이 및 스캐너를 사용하였다:

[0287]

- 인간 GE 에 대한 어레이: G4112F 전체 인간 게놈 마이크로어레이 키트, 4x44K (Agilent)

[0288]

- 인간 CGH 에 대한 어레이: G4426B#14950 인간 게놈 CGH 마이크로어레이 키트 4x44K (Agilent)

[0289]

- 스캐너: DNA 마이크로어레이 스캐너, 모델 G2539A

[0290]

2) RT-PCR 분석

[0291]

epi-iPS 세포에서, OCT3/4, SOX2, NANOG 및 ESG1 과 같은 다능성 줄기 세포 마커의 발현을 조사하였다.

DP-유래된 epi-iPS 세포의 결과를 도 32A 에 나타내고, 섬유모세포-유래된 epi-iPS 세포의 결과를 도 32B 에 나타냈다. RT-PCR 분석은, epi-iPSC 클론이 이들 유전자를 hESC 및 레트로바이러스-유래된 iPSC 클론에서 와 필적하는 수준으로 발현함을 나타냈다.

[0292] 3) 바이슬피트 서열화

[0293] 게놈 DNA 를 피더 세포를 제거 후 iPS 세포로부터 추출하고, 이미 기술된 바와 같이 분석하였다 ([K. Takahashi et al, *Cell* 131, 861 (Nov. 30, 2007)]).

[0294] NANOG 의 프로모터 부위에서 CpG 위치의 DNA 메틸화 수준은 모체 HDF 및 DP 세포에서 높았으나, epi-iPS 및 ES 세포에서는 낮았다 (도 33).

[0295] 4) 기형종 형성

[0296] 생체 내 epi-iPSC 의 분화 가능성을 조사하였다. 세포를 CTK 용액으로 수화하고 원심분리하였다. 세포 펠럿을 DMEM/F12 중에서 재현탁시켰다. 합류성 60-mm 디쉬로부터 세포의 절반을 SCID 마우스 (CREA, Japan) 의 고환에 주입하였다. 주입 8 내지 12 주 후, 종양을 해부하고, PBS 중에서 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 파라핀-포매된 조직을 구획화하고 혼마토자일린 및 에오신으로 염색하였다. 결과를 도 34 에 나타냈다. 조직학적 검사로, 이들 종양이 기형종이고 모든 3 개의 세균 층의 조직을 함유함을 확인하였다 (신경 상피, 연골, 근육 및 장-성 상피 포함) (도 34A 및 B).

[0297] 5) 생체외 분화

[0298] BMP 길항제 및 액티빈/노달 저해제에 의한 이중 SMAD 저해와 조합된 배상체성 응집물 (SFEB) 방법의 무-혈청 배양을 사용하여 도파민성 뉴런으로의 생체외-유도 분화를 수행하였다 (M. Eiraku et al, *Cell Stem Cell* 3, 519 (2008)).

[0299] 도파민성 뉴런의 도입을 위해, 분화 배지를 하기와 같이 제조하였다: 5% 녹아웃 혈청 대체물로 보충된 DMEM/F12 (KSR; Invitrogen), 2 mM 글루타민, 0.1 mM 비필수 아미노산, 및 0.1 mM 2-메르캅토에탄올. iPS 세포를 Accumax (Invitrogen) 에서 단일 세포로 분리하고, 96-웰 저 세포-부착 플레이트 (LIPIDIURE-COAT PLATE A-U96, NOF Corporation) 를 사용하여 9000 세포/150 μl /웰의 밀도에서 하기로 보충된 분화 배지에서 신속하게 재-응집시켰다: 10 μM Y-27632, 2 μM 도르소모르핀, 및 10 μM SB431542 (Sigma). 배양 5 일 후, 세포 응집물을 100 ng/ $\text{m}\ell$ FGF-8 및 20 ng/ $\text{m}\ell$ 로 자극하였다. 제 8 일에, 200 ng/ $\text{m}\ell$ SHH 가 배지에 존재 하였다. 제 12 일에, 응집된 세포를 회수하고, 200 ng/ $\text{m}\ell$ SHH 를 갖는 NB 배지 (B27 보충물을 함유하는 신경기저 배지; Invitrogen) 중에서 60 mm 폴리-오르니틴/라미닌-코팅된 디쉬에 이동시켰다. 이후, 배지를 제 15 일에 1 ng/ $\text{m}\ell$ 의 FGF-20 및 12.5 ng/ $\text{m}\ell$ 의 bFGF 로 보충된 NB 배지로 바꾸었다. 세포를 제 22 일에 수화하고, 2 ng/ $\text{m}\ell$ GDNF, 20 ng/ $\text{m}\ell$ BDNF, 400 μM dbcAMP, 및 200 μM 아스코르브산으로 보충된 NB 배지 중에서 웰 당 2×10^5 의 밀도로 8-웰 챔버 플레이트 상에 시딩하였다. 제 29 일에 분화된 세포를 면역염색 분석을 위해 고정하였다. 하기에 대한 1 차 항체를 사용하였다: 네스틴 (Chemicon), Ki67 (Novocastra), Pax6 (Covance), 베타III-튜불린 (Covance Research Products), 티로신 히드록실라제 (Chemicon), MAP2ab (Sigma), 및 VAMT-2 (PeLFreeze). 적절한 경우, Alexa488, Alexa594, 또는 Cy5 로 컨쥬게이션한 2 차 항체를 사용하였다. 핵을 가시화하기 위해, 200 ng/ $\text{m}\ell$ 의 4',6'-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI) 을 최종 세척에 첨가하였다.

[0300] 결과를 도 35 에 나타냈다. 대다수의 세포는 미성숙 신경 마커 네스틴을 발현하였다 (도 35B-A). 세포의 몇몇을 여전히 증식시켰고 이는 Ki67 에 대해 양성이었다 (도 35B-B, C, D). 미성숙 신경 세포의 군집은 Pax6 에 대해 양성인 반면, 보다 성숙한 세포 군집은 도파민성 뉴런, 티로신 히드록실라제 (TH) 의 마커를 발현하였고, 이어서 SHH 및 FGF8 과 같은 유도 인자로 처리하였다 (도 35B-E, 35B-F). TH-양성 세포를 또한 중성 마커 Tuj1 및 MAP2ab, 및 도파민 트랜스포터 VMAT2 로 동시위치시켰다 (도 35A-E, F, G, 35B-G, H, I, J, K). 그러므로, epi-iPSC 는 도파민성 뉴런으로 분화하기 위한 가능성을 갖는다. Y3 혼합물 (pCXLE-hOct4, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL) 의 사용에 의해 확립된 epi-iPSC 를 또한 유사하게 분석하였다 (RT-PCR, 카페 수 분석, 핵형화 및 기형종 형성). 결과적으로, epi-iPSC 는 Y4 혼합물 (pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL) 의 사용에 의해 확립된 epi-iPSC 에 필적하는 것으로 확인되었다. 각각의 epi-iPSC 클론의 분석 리스트를 표 8 에 나타냈다.

[0301]

[표 8]

표 8. Epi-iPS 클론 목록

클론	기원	연령	성별	인종	인자	유전자 발현		바이슬피트 카피수 분석	핵형화	HLA	STR	기형 종	Dopa	RPE
						RT-PCR	마이크로어레이							
404C-2	HDF1388	36	F	C	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
409B-2	HDF1388	36	F	C	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
414C-2	HDF1388	36	F	C	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
418C-1	TIG114	36	M	J	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
421C-1	TIG107	81	F	J	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
426C-2	HDF1554	77	F	C	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
427D-4	HDF1437	56	M	C	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
428C-2	TIG120	6	F	J	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
451F-3	DP74	16	F	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
453F-2	DP94	16	F	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
454B-1	DP74	16	F	Y1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
454C-2	DP74	16	F	Y2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
454D-1	DP74	16	F	Y3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
454E-2	DP74	16	F	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
454F-1	DP74	16	F	T2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
457C-1	DP74	16	F	Y4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND

ND, 본 분화 프로토콜에서 RPE 분화를 검출할 수 없었음 (N=1)

[0302]

실시예 13

[0303]

제노-프리 조건 하 (이종 요소 부재) 의 iPS 세포의 확립 및 배양

[0304]

재생 의학 분야에서 에피솜 벡터를 사용하여 확립된 iPS 세포의 이용에서, 핵심은 제노-프리 조건 하에서 iPS 세포의 확립 및 유지에 있다. 따라서, 하기 기술된 바와 같이 조사하였다.

[0305]

1) 피더 세포로서 치수 줄기 세포의 사용

[0306]

인간 iPS 세포가 확립될 수 있고 이는 심지어 인간 피부 섬유모세포 (HDF) (트랜스펙션에 사용됨) 가 피더 세포로서 사용될 때에도 유지될 수 있음이 공지되어 있다 ([Takahashi et al., PLoSOne, vol.4, issue 12, e8067 (2009)]). 자가유래 피더 세포의 사용이 제노-프리 조건 하에서 iPS 세포의 유지를 가능하게 하기 때문에 임상 적용에서 고려하는 것이 매우 높아졌다. 따라서, 치수 줄기 세포주 DP74 가 피더 세포로서 역할을 할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 조사하였다. 사용한 iPS 세포는 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL 를 HDF 에 이동시켜 확립된 인간 iPS 세포였다. 사용한 배양 브로쓰는, 통상의 영장류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL) 에 bFGF (Wako) 를 4 ng/mL 로 첨가함으로써 제조된 배지였다 (이하, ReproCELL 배지). 1 계대 후 세포의 사진을 도 25 에 나타냈다. ES-성 형태를, 피더 세포로서 MSTO 의 사용과 비교시 등가 정도로 유지하였다.

[0307]

2) 제노-프리 조건 하에서 iPS 세포의 유지 (1)

[0308]

제노-프리 배지 TeSR2 (Stemcell Technologies) 및 제노-프리 플레이트 코팅제 CELLstart (GIBCO) 를 사용하여 완전한 제노-프리 조건 하에서 iPS 세포가 유지되는지 여부를 결정하기 위해 조사하였다 (피더 세포를 사용하지 않음). 사용된 iPS 세포는 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL 를 HDF 에 이동시켜 확립된 인간 iPS 세포였다. 1 계대 후 세포의 사진을 도 26 에 나타냈다. ReproCELL 배지를 사용할 때, 세포는 이의 형태가 변화하기 시작하는 반면, TeSR2 를 사용할 때, 세포는 분화되지 않은 형태를 유지했다.

[0309]

3) 제노-프리 조건 하에서 iPS 세포의 유지 (2)

[0310]

피더 세포로서 DP74 주를 사용하여, iPS 세포가 제노-프리 배지 TeSR (Stemcell Technologies) 및 KSR-XF [하기로 보충된 녹아웃 DMEM (Invitrogen) : 15% 녹아웃 SR XenoFree (Invitrogen), 2 mM GlutaMAX-I (Invitrogen), 0.1 mM 비필수 아미노산 (Invitrogen), 0.1 mM 2-페르캅토에탄올 (Invitrogen) 및 8 ng/mL bFGF (Wako)] 를 사용하여 유지될 수 있는지 여부를 측정하기 위해 조사하였다. 사용된 iPS 세포는, pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL 를 HDF 에 이동시켜 확립된 인간 iPS 세포였다. 1 계대 후 세포의 사진을 도 27 에 나타냈다. 어떤 제노-프리 배지를 사용했든지 간에, ES-성 형태를 유지하였다.

[0311]

실시예 14

[0312]

제노-프리 조건 하의 트랜스펙션

[0313]

제노-프리 조건이 iPS 세포 확립 후 뿐만 아니라, iPS 세포 확립 전에도, 즉 재프로그래밍 유전자를 채세포에

이동시에도 상기 목적을 제공하는지 여부를 측정하기 위해 조사하였다.

[0315] 예비 연구에서, pCXLE-EGFP 를 Microporator 를 사용하여 DP74 에 이동시켰다. 사용된 제노-프리 배지는 StemPro MSC-SFM (Invitrogen) 였다.

[0316] DP74 를 배양 브로쓰로서 StemPro MSC-SFM (Invitrogen) 을 사용하여 CELLstart-코팅된 100 mm 배양 디쉬에서 5% CO₂ 의 존재 하에 37°C 에서 배양 및 유지하였다. pCXLE-EGFP 의 이동시에, 배지를 제거하고, 세포를 5 ml 의 PBS 를 첨가하여 세척하였다. PBS 를 제거한 후, 제노-프리 세포 분리 용액 TripLE select (Invitrogen) 를 첨가하고, 반응을 37°C 에서 약 5 분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, StemPro MSC-SFM 을 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 세포를 15 ml 원심분리 퓨브 내로 회수하였다. 혼탁액을 800 rpm 에서 5 분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 세포를 다시 StemPro MSC-SFM 에서 혼탁시킨 후, 6×10⁵ 세포를 1.5 ml 퓨브 내로 회수하였다. 혼탁액을 800 rpm 에서 5 분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. pCXLE-EGFP (3 µg) 을 Microporator 를 사용하여 세포에 이동시켰다. 이러한 이동은 100 µl 칩 (1850 V 에서 20 ms 동안 1 펄스, 또는 1200 V에서 30 ms 동안 2 펄스) 을 사용하여 일어났다. 트랜스펙션된 세포를 3 ml 의 StemPro MSC-SFM 을 함유하는 CELLstart-코팅된 6-웰 배양 플레이트 (Falcon) 에 이동시키고, 37°C 에서 5% CO₂ 의 존재 하에 7 일 동안 배양하였다. 결과를 도 28 에 나타냈다. 제노-프리 배지 (StemPro MSC-SFM) 을 사용할 때, 이동 효율은 1850 V, 20 ms, 1 펄스의 조건 하에서 낮았다. 그러나, 조건을 1200 V, 30 ms, 2 펄스로 변경시켰을 때, 세포 생존률 및 이동 효율이 증가하였다. 따라서, 후자의 조건을 이후의 트랜스펙션에 사용하였다.

[0317] 3 개의 상이한 플라스미드 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL 을 재프로그래밍에 사용하였다. 실험에서, 치수 줄기 세포주 DP74 를 사용하였다. DP74 주를 StemPro MSC-SFM 을 배양 브로쓰로서 사용하여 CELLstart-코팅된 100 mm 배양 디쉬에서 5% CO₂ 의 존재 하에 37°C 에서 배양 및 유지하였다. 플라스미드 이동시, 배지를 제거하고, 세포를 5 ml 의 PBS 를 첨가하여 세척하였다. PBS 를 제거한 후, TripLE select (Invitrogen) 을 첨가하고, 반응을 37°C 에서 약 5 분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, StemPro MSC-SFM 을 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 세포를 15 ml 의 원심분리 퓨브 내로 회수하였다. 혼탁액을 800 rpm 에서 5 분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 세포를 다시 StemPro MSC-SFM 중에서 혼탁시키고, 6×10⁵ 세포를 1.5 ml 의 퓨브 내로 회수하였다. 혼탁액을 800 rpm 에서 5 분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 3 개의 상이한 플라스미드 (각각 1 µg, 총 3 µg) 를 Microporator 를 사용하여 세포에 이동시켰다. 이러한 이동은 1200 V 에서 30 ms 동안 2 펄스로 100 µl 의 칩을 사용하여 일어났다. 트랜스펙션된 세포를 3 ml 의 StemPro MSC-SFM 을 함유하는 CELLstart-코팅된 6-웰 배양 플레이트 (Falcon) 에 이동시키고, 5% CO₂ 의 존재 하에 7 일 동안 37°C 에서 배양하였다. 이후, 배지를 제거하고, 세포를 2 ml 의 PBS 를 첨가하여 세척하였다. PBS 를 제거한 후, TripLE select (Invitrogen) 을 첨가하고, 반응을 37°C 에서 약 5 분 동안 수행하였다. 세포가 떠오른 후, StemPro MSC-SFM 을 첨가하여 세포를 혼탁시키고, 세포를 15 ml 의 원심분리 퓨브 내로 회수하였다. 혼탁액을 800 rpm 에서 5 분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 세포를 다시 StemPro MSC-SFM 중에서 혼탁하고, 1×10⁵ 세포를 표 9 에 나타낸 다양한 조건 하에서 100 mm 디쉬에 시딩하였다. 다음날, 배지를 표 9 에 나타낸 배지로 대체하고; 이러한 배지 교체를 2 일마다 계속하였다. 이동 후 제 26 일에 출현한 인간 ES 세포-성 콜로니의 사진을 도 29 에 나타냈다.

[0318] [표 9]

번호	배지	피더 세포
1	ReprotoCELL 배지	MSTO
2	TeSR2	MSTO
3	KSR-XF	MSTO
4	TeSR2	DP74 세포 (자가-피더, CELLstart)
5	KSR-XF	DP74 세포 (자가-피더, CELLstart)
6	TeSR2	피더 세포 없음 (CELLstart 로 코팅됨)

[0319]

[0320] 어떤 배지 및 피더 세포를 사용했든지 간에, iPS 콜로니는 확립될 수 있었다. 표 9 에서 4번 내지 6 번에 대한 결과 (모두 제노-프리 조건 하에서 수득됨) 는 특히, iPS 세포가 에피솜 벡터를 사용하는 무-바이러스 조

건 하에서, 및 트랜스펙션 시점으로부터 완전한 제노-프리 조건 하에서, 치수 줄기 세포로부터 확립 및 유지될 수 있음을 입증한다.

[0321] 실시예 15

[0322] 인간 말초 혈액 단핵 세포로부터 iPS 세포의 확립

[0323] 발현 플라스미드 3 μ g (1 μ g 의 pCXLE-hOct4-shp53, pCXLE-hSK 및 pCXLE-hUL) 을, 제조사의 지시사항에 따라 인간 T 세포 키트로 Nucleofector (Lonza) 로 신선하게 단리된 말초 단핵 세포 (5.0×10^6) 내로 전기영동하였다. 프로그램 V-24 의 조건을 사용하였다. 6 시간 후, 트랜스펙션된 혈액 세포를 사이토카인 (IL-6, sIL-6R, SCF, TPO, Flit3/4-리간드, 및 IL-2) 및 항-CD3/CD28 항체로 자극하였다. 2 일 후, 세포를 MEF 피더로 덮은 6-웰 플레이트 상에 시딩하였다. 이후, 배양 배지를 도 36a 에서 설명한 바와 같이 시딩 후 X-vivo 10 (IL-6, sIL-6R, SCF, TPO, Flit3/4-리간드 및 IL-2 로 보충됨) 으로부터 hES 배지로 점차적으로 바꾸었다. 콜로니를 제 29 일에 사진 찍었다 (도 36b). 플랫 hESC-성 형태를 갖는 인간 iPS 콜로니를 확립할 수 있었다.

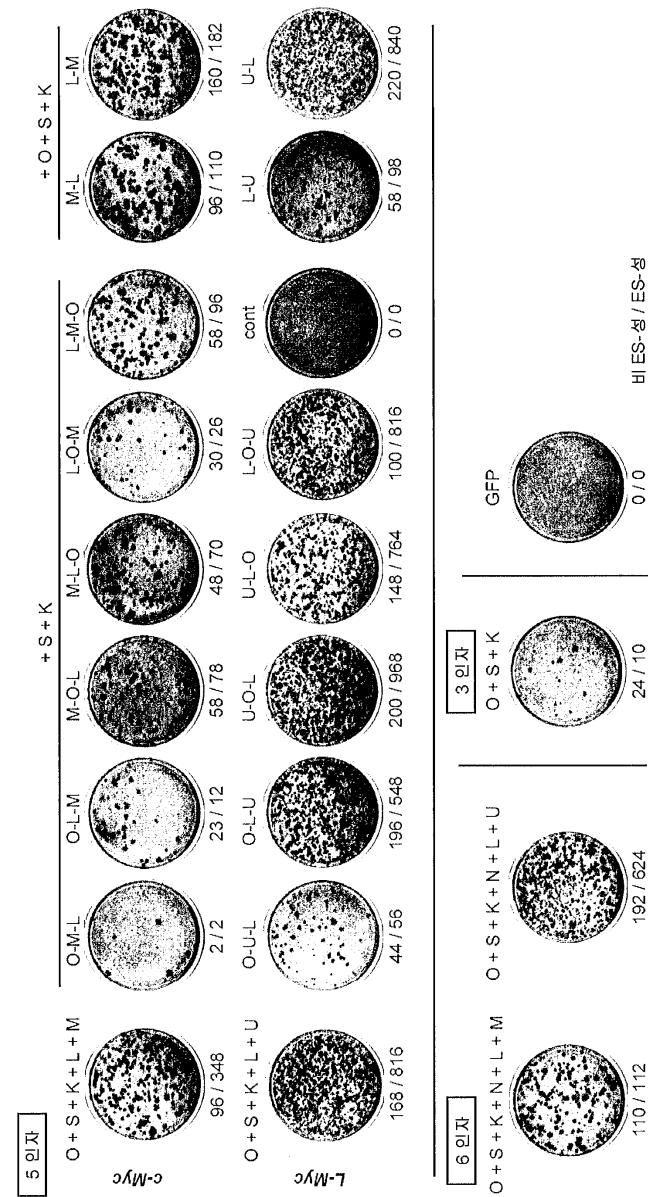
[0324] 본 발명이 바람직한 구현예를 강조하면서 기술하였으나, 당업자가 이 바람직한 구현예를 변형할 수 있음이 명백하다. 본 발명은, 본 발명이 본 명세서에서 상세하게 기술된 방법 이외의 방법에 의해 구현될 수 있도록 의도된다. 따라서, 본 발명은 첨부된 "청구항" 의 요지 및 범주에 포함된 모든 변형을 포괄한다.

[0325] 또한, 특허 및 특허 출원을 비롯하여 본원에서 인용된 임의의 발행물에 개시된 내용은 본원에 개시된 정도로 그 전문이 본원에서 참고로 포함된다.

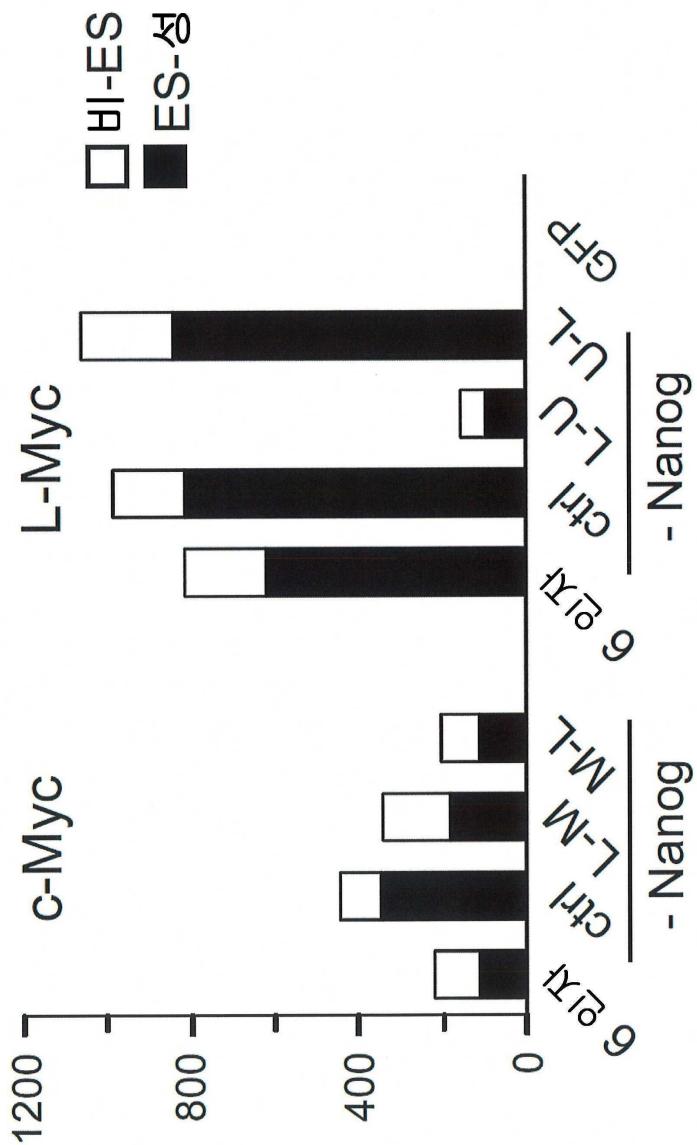
[0326] 본 출원은 본원에 그 내용이 참고로 포함되는 미국 가출원 제 61/232,402 호 및 제 61/307,306 호를 기초로 한다.

도면

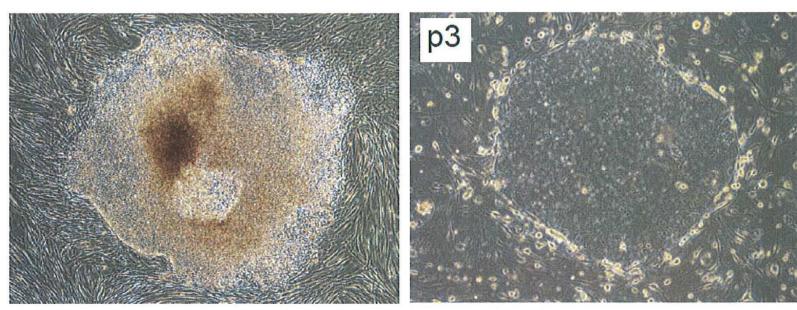
도면1



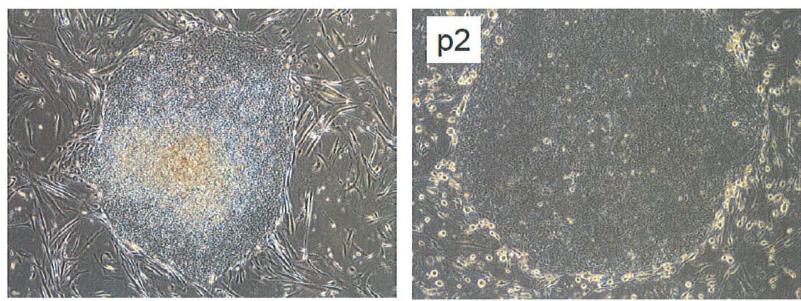
도면2



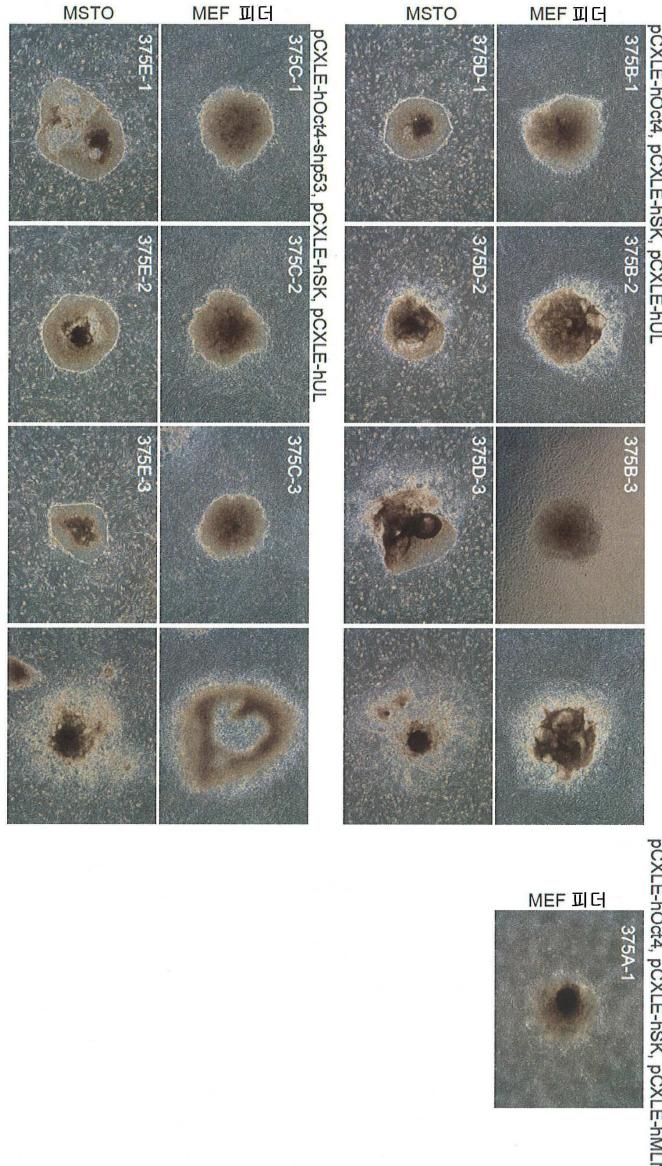
도면3

1콜로니 / 2×10^5 세포

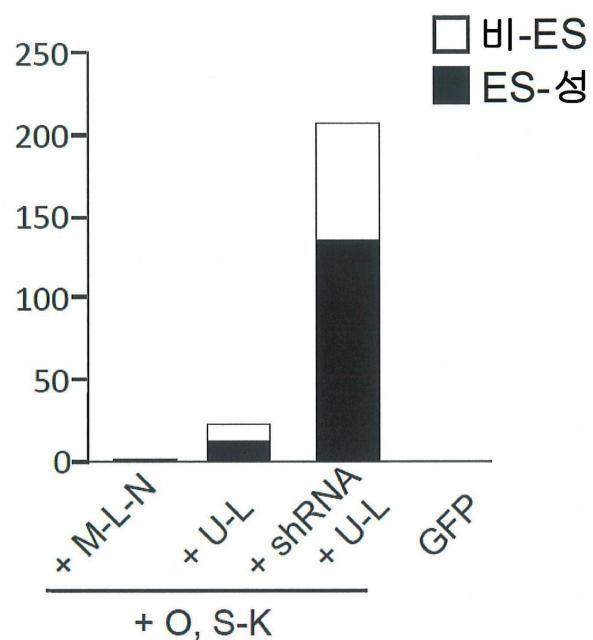
도면4



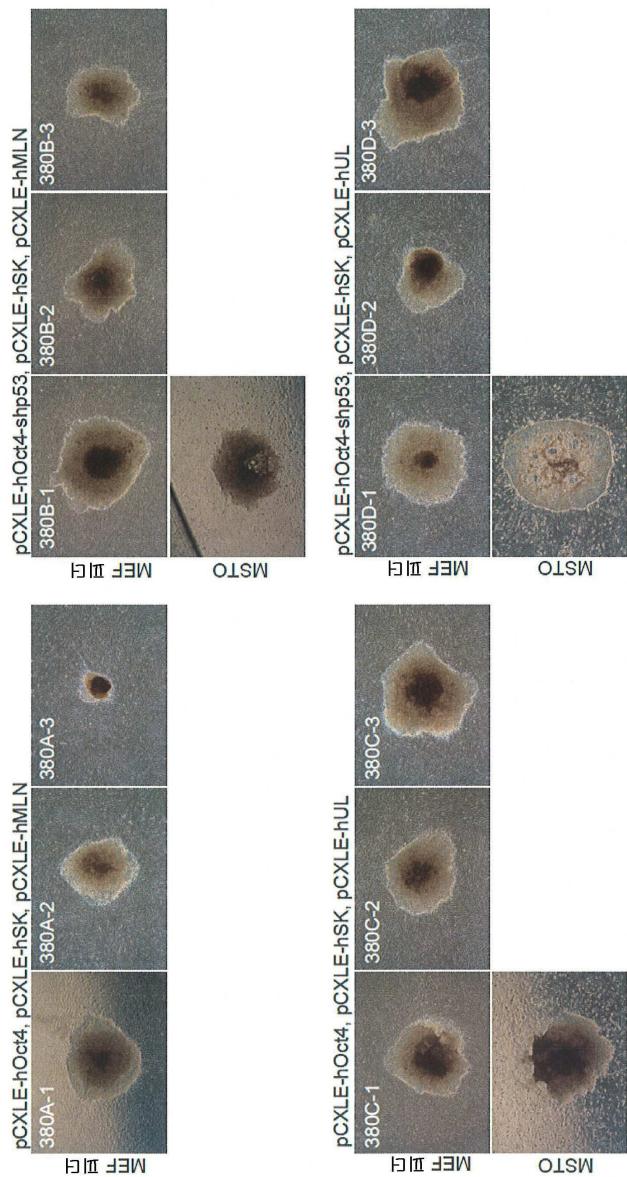
도면5



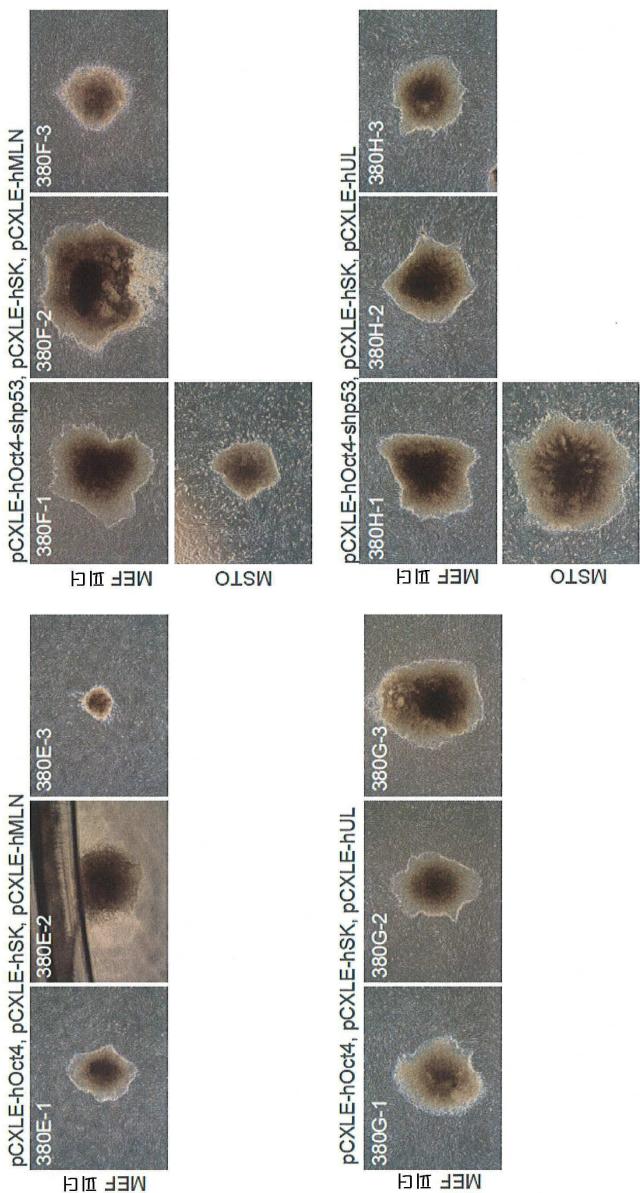
도면6



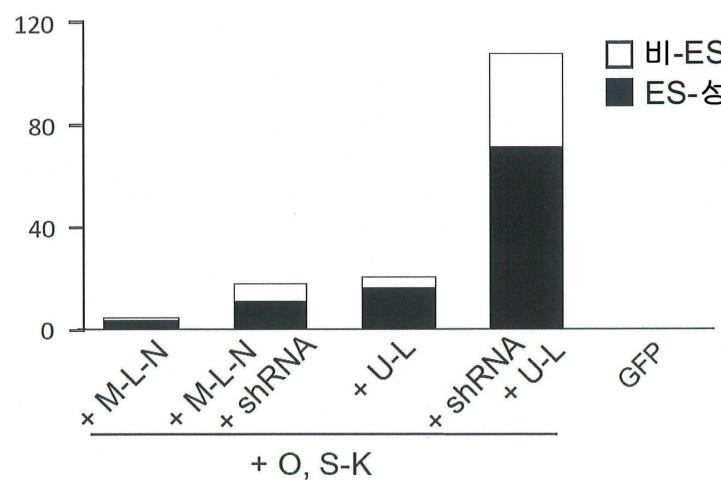
도면7



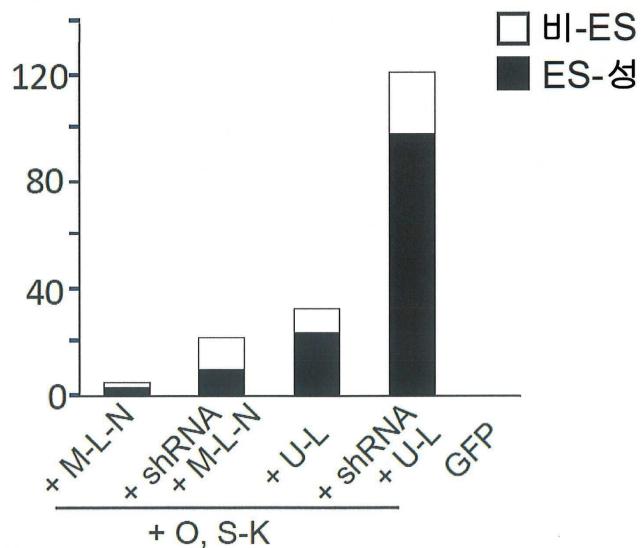
도면8



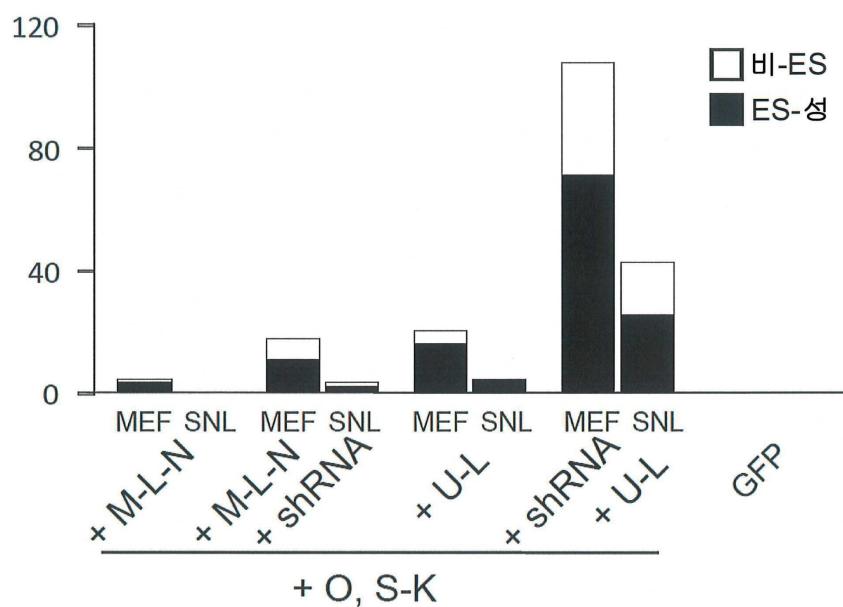
도면9



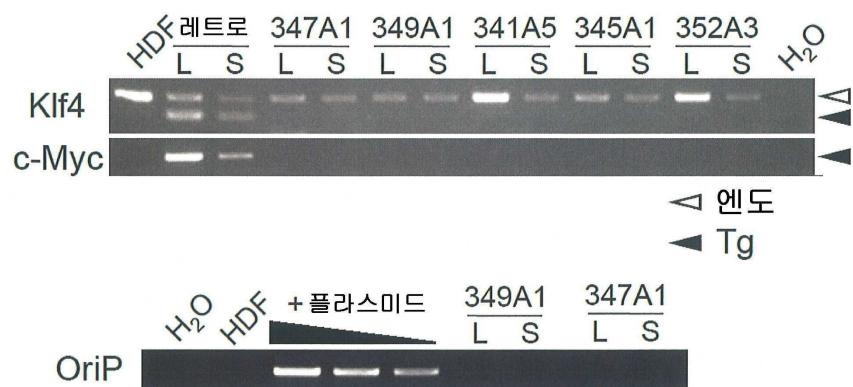
도면10



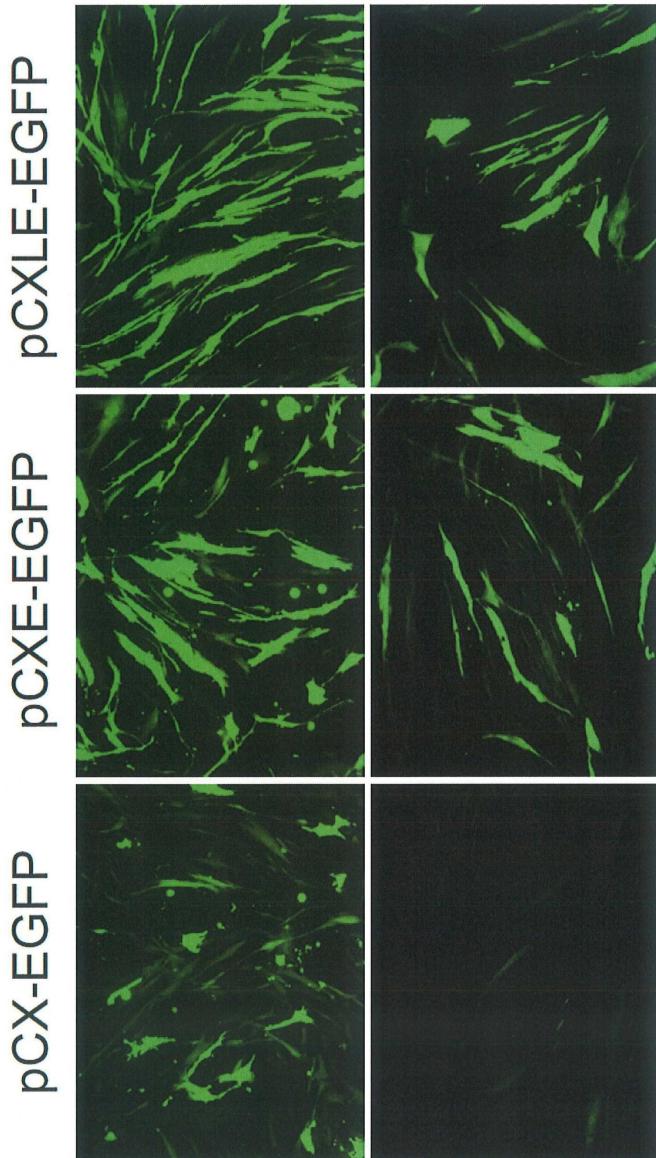
도면11



도면12

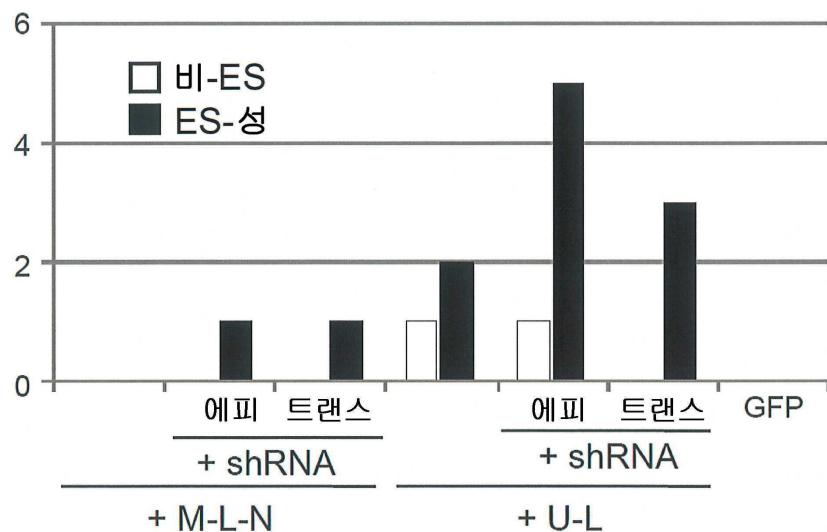


도면13

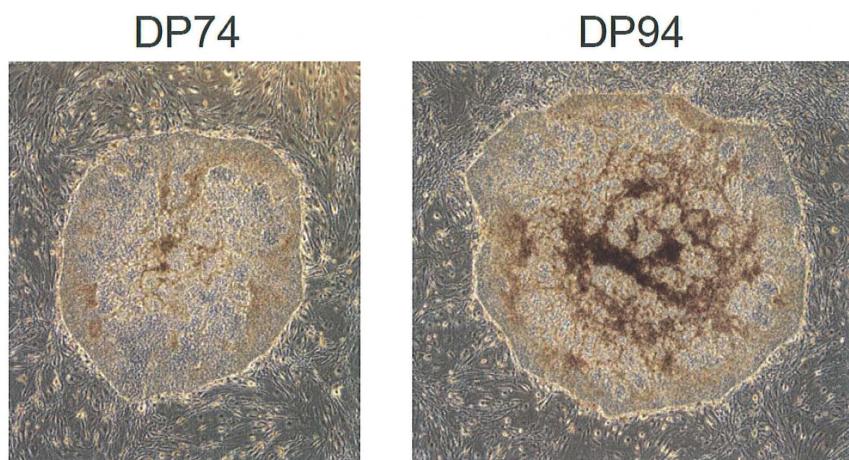


도면 14
도면 6

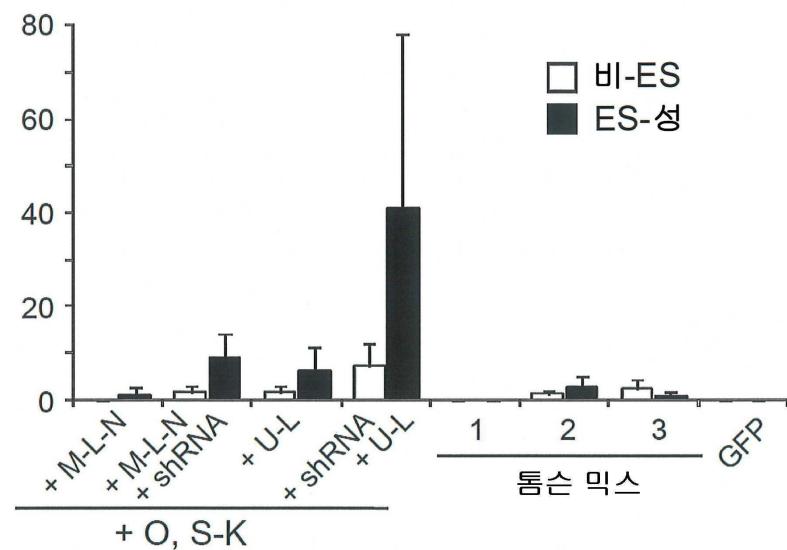
도면14



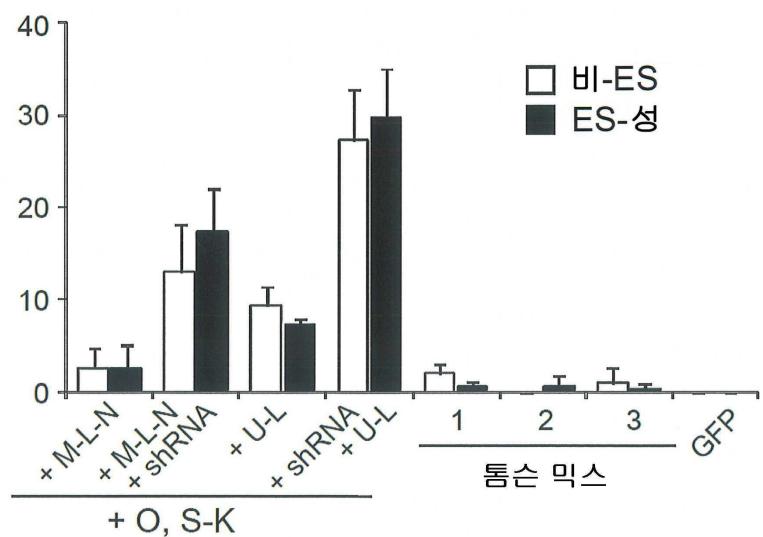
도면15



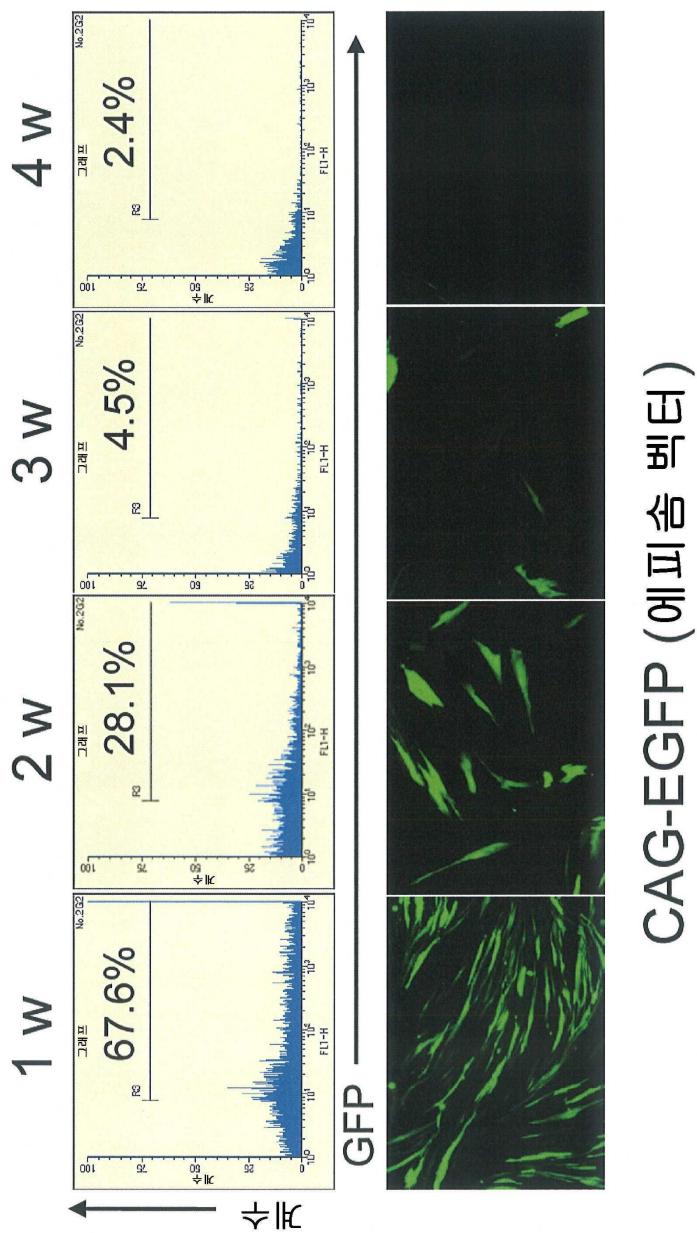
도면16



도면17

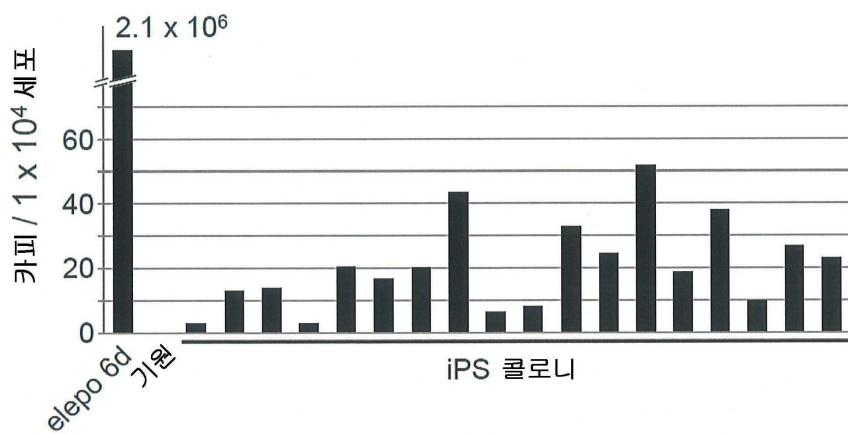


도면18

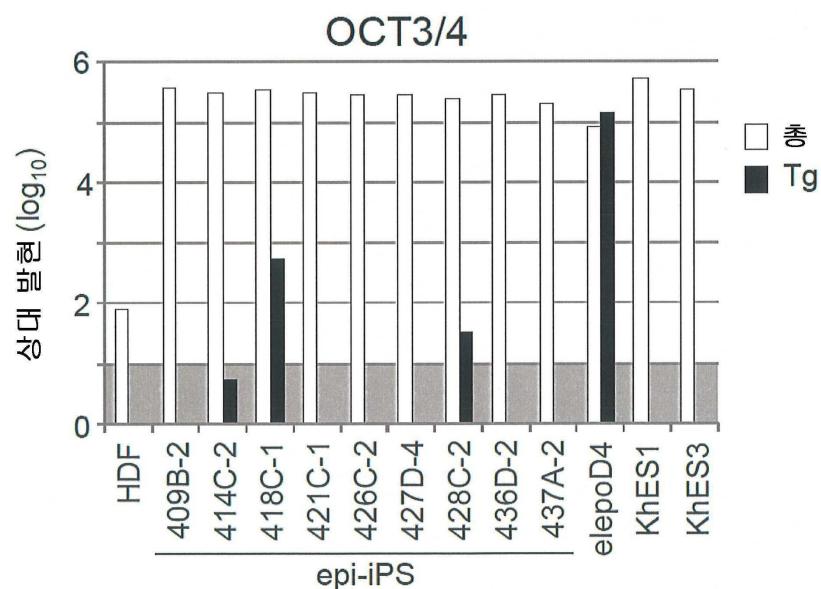


CAG-EGFP (에피 솔 벡터)

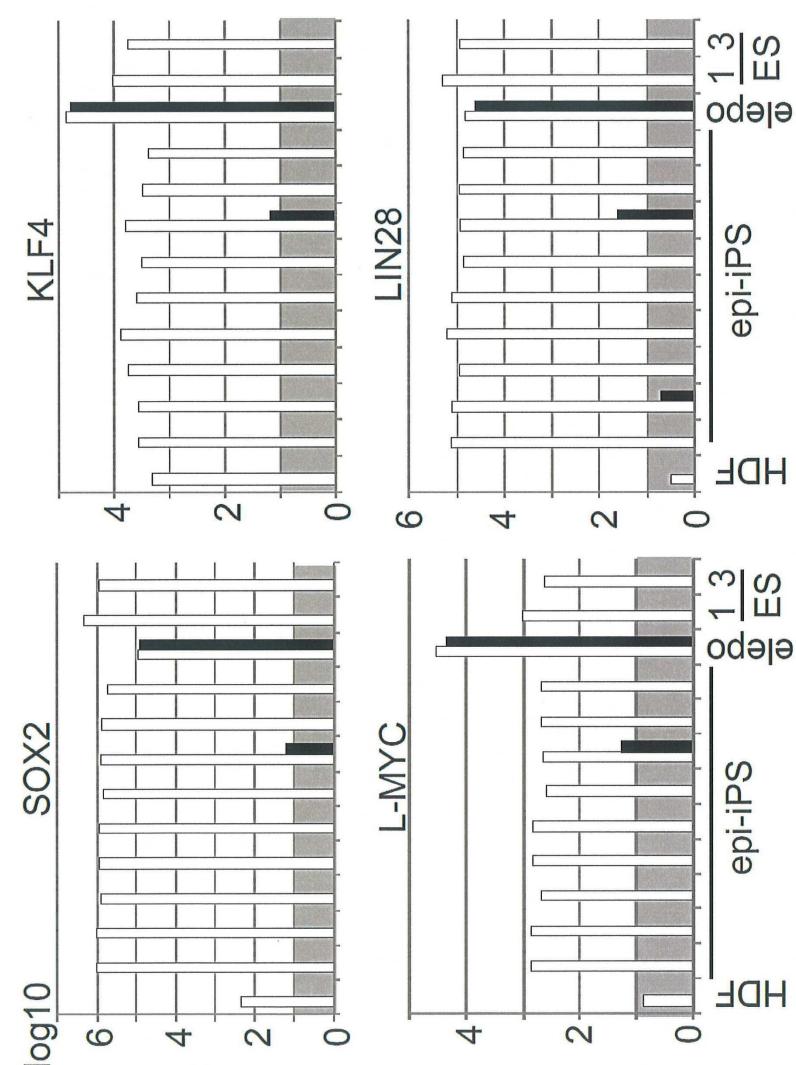
도면19



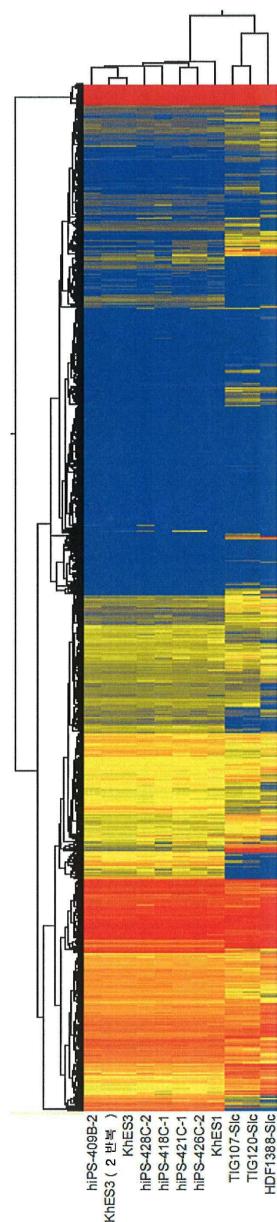
도면20



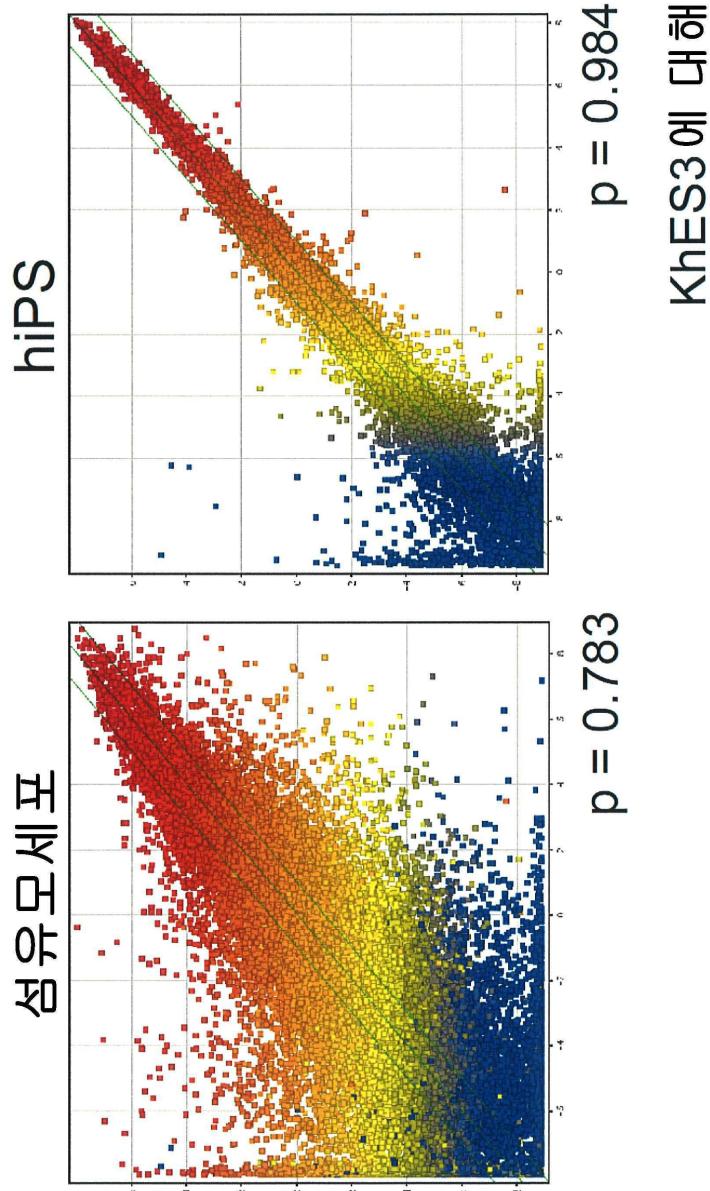
도면21



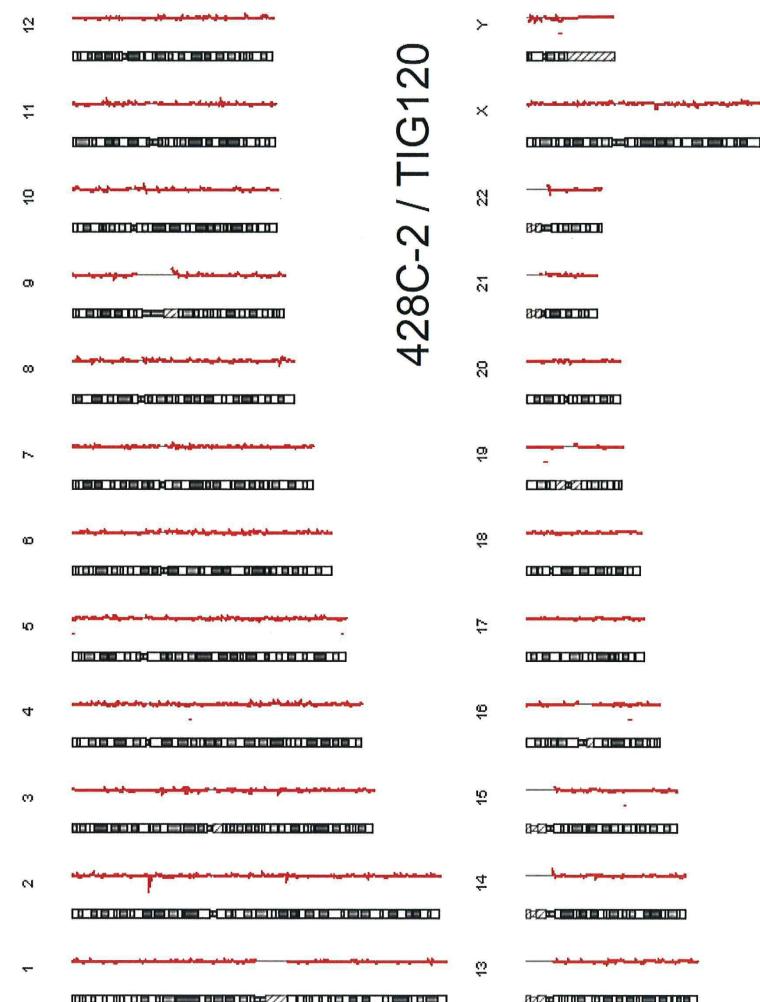
도면22



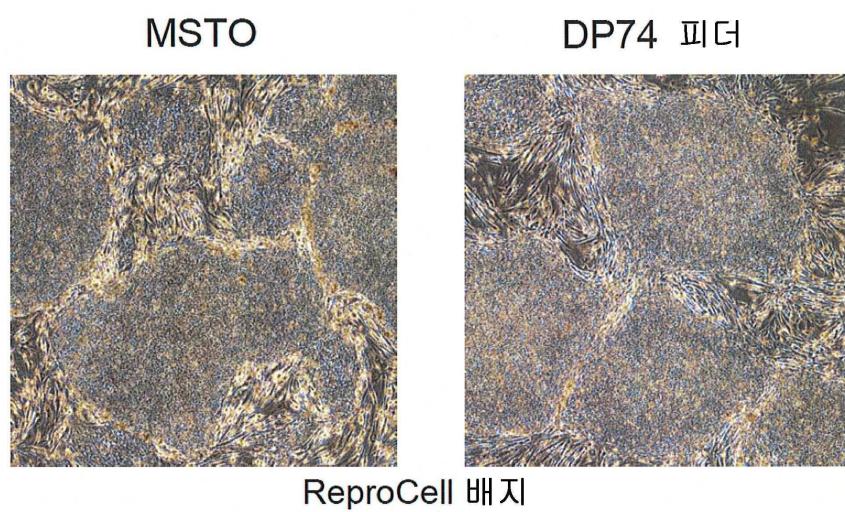
도면23



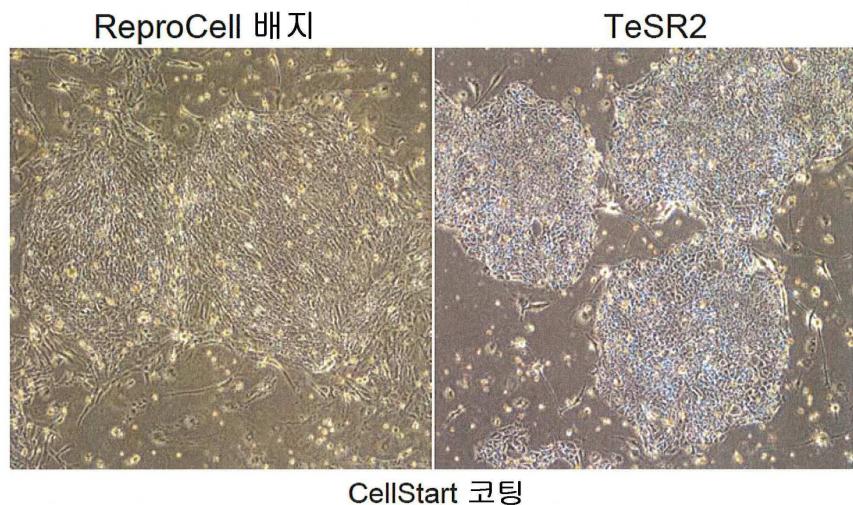
도면24



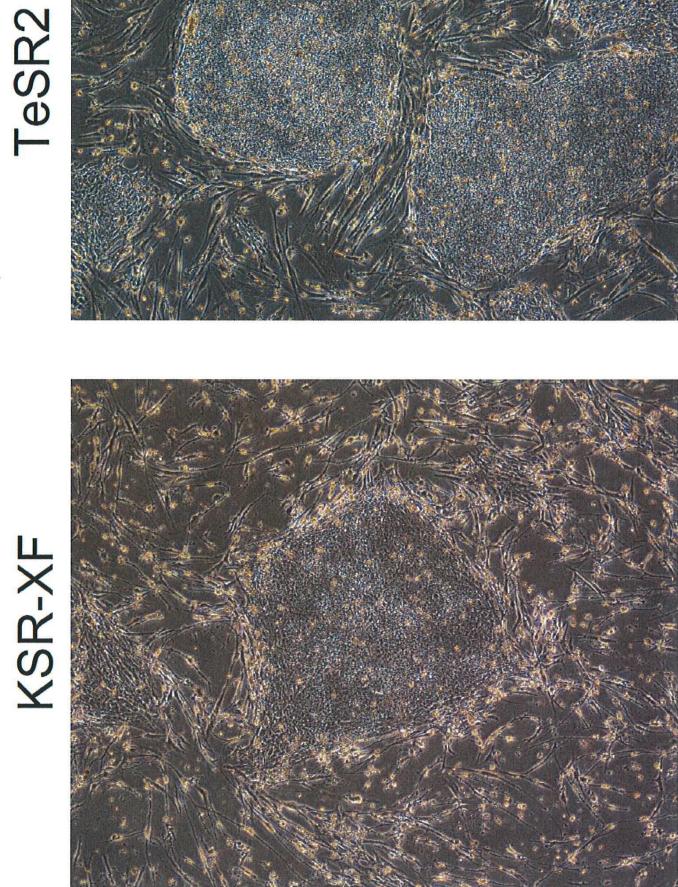
도면25



도면26



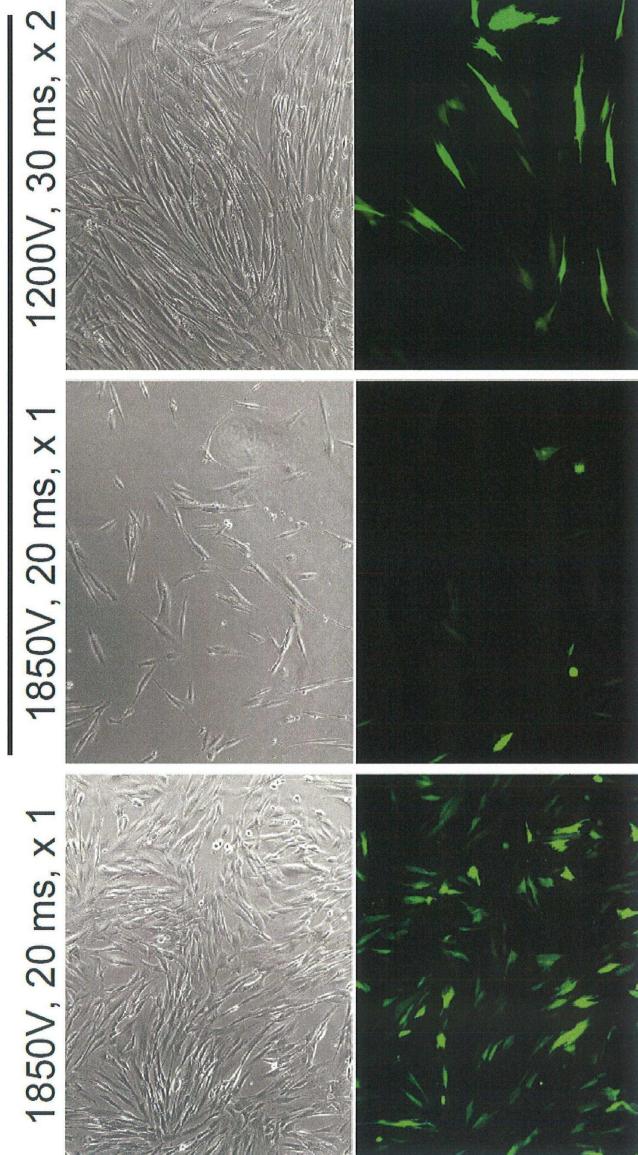
도면27



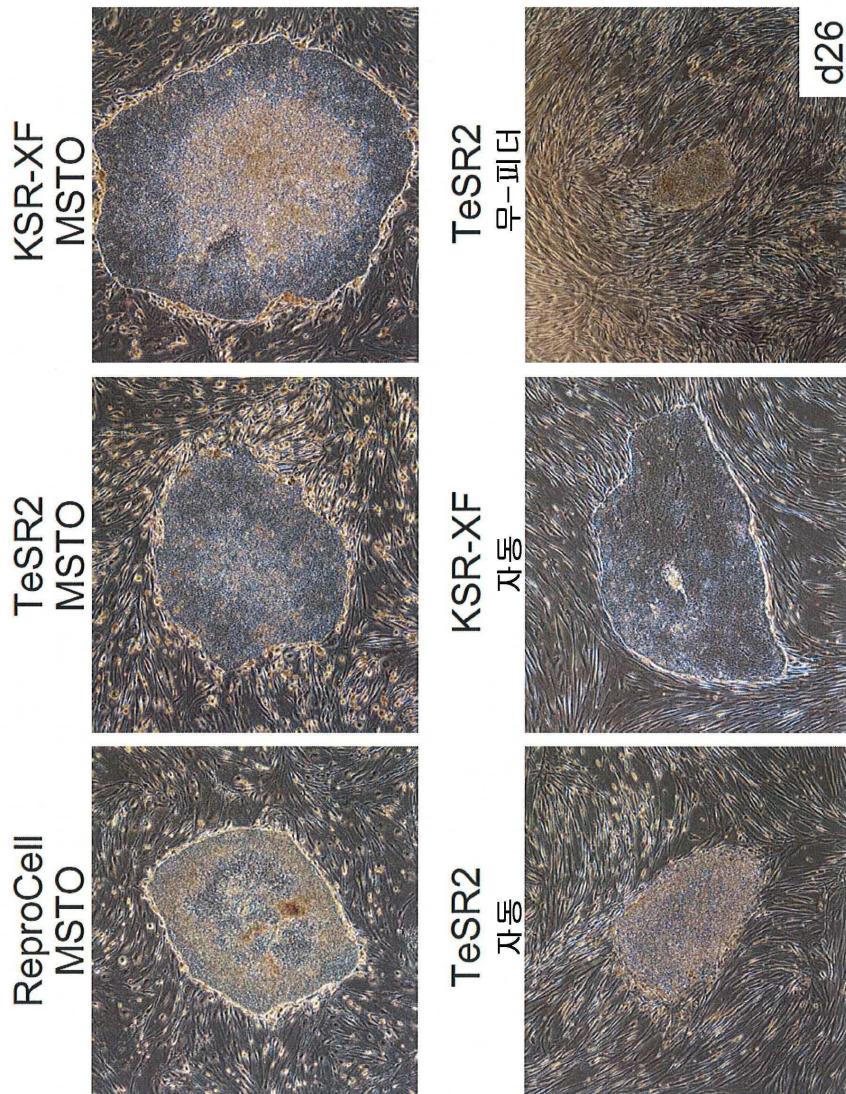
도면28

제노-프리

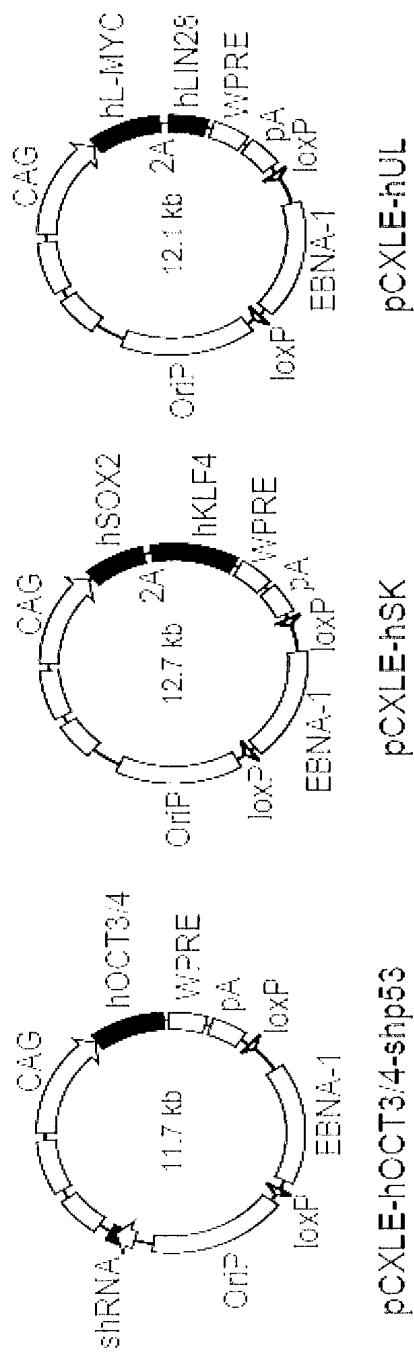
대조군



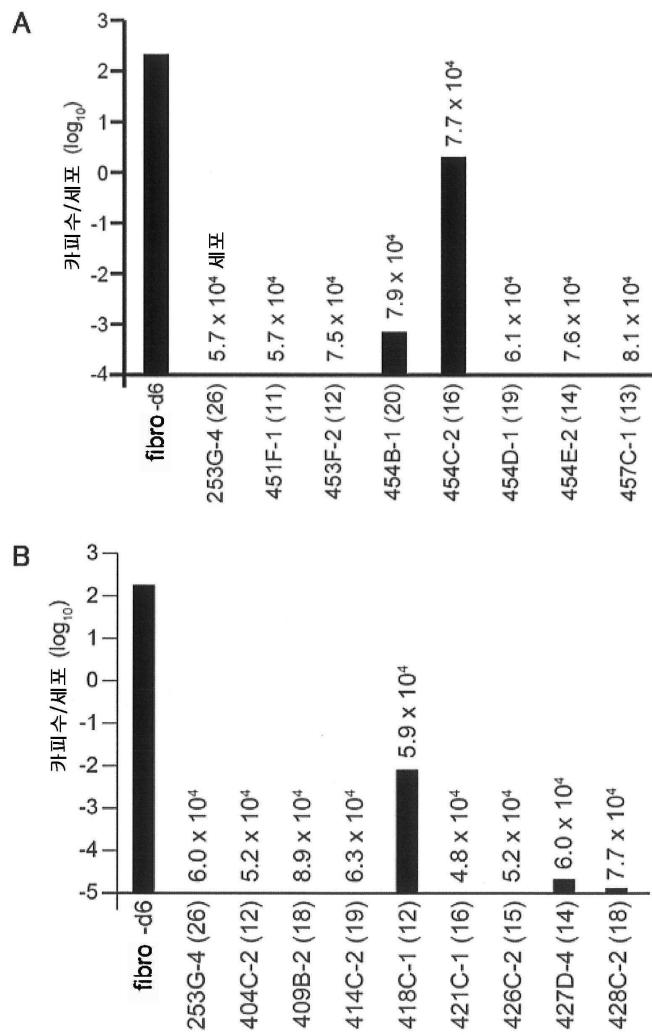
도면29



도면30

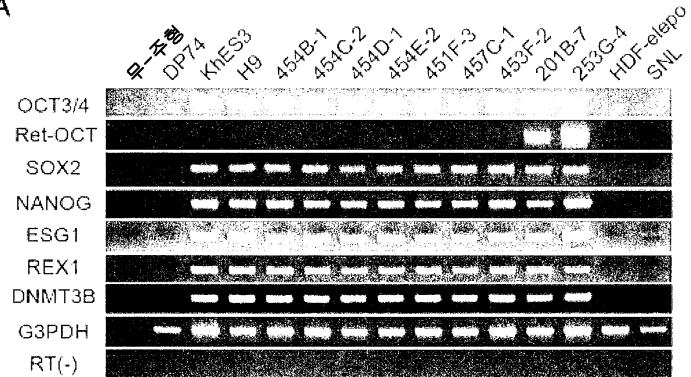


도면31

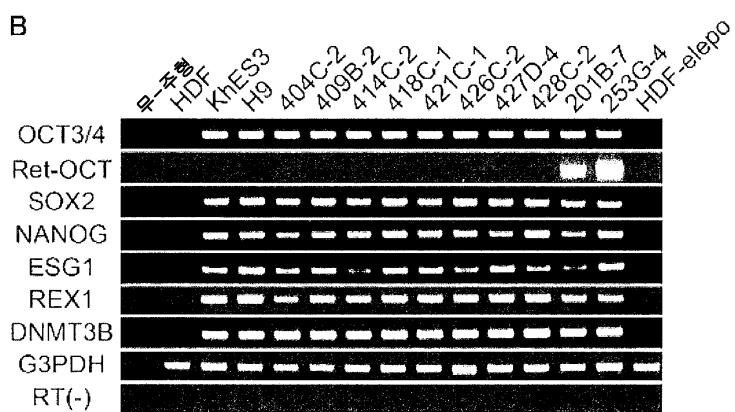


도면32

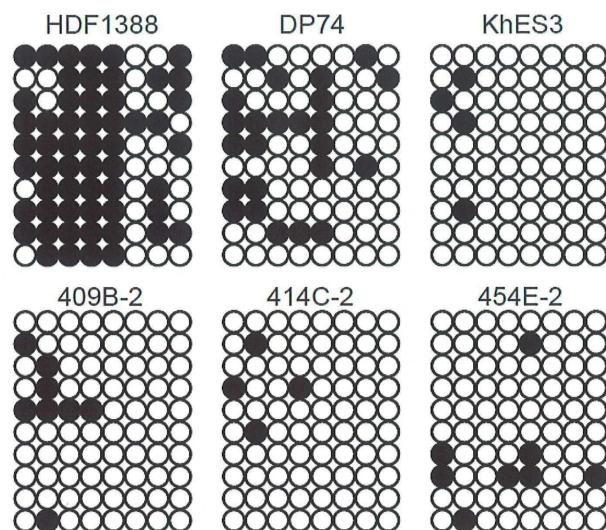
A



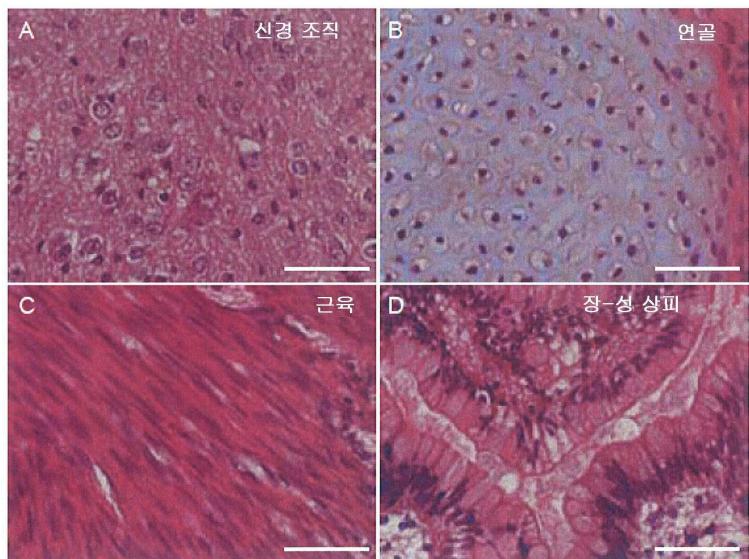
B



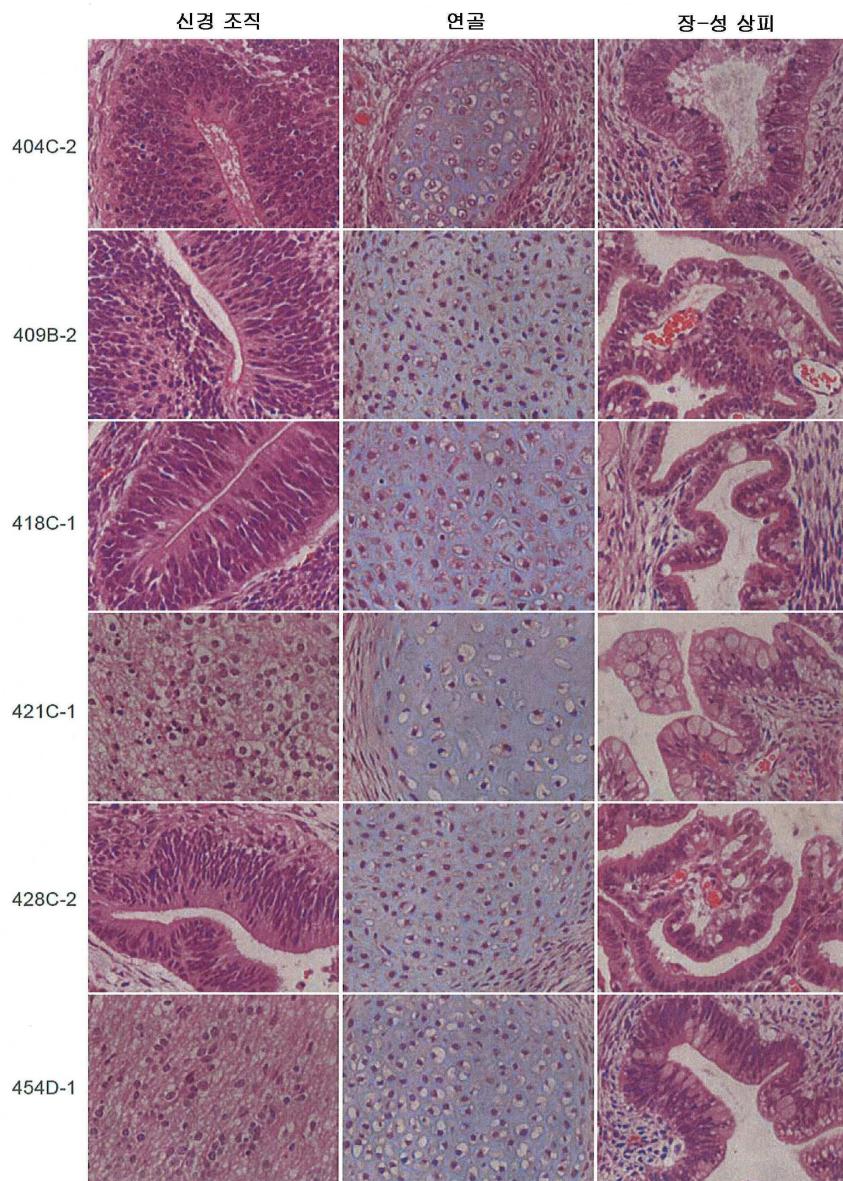
도면33



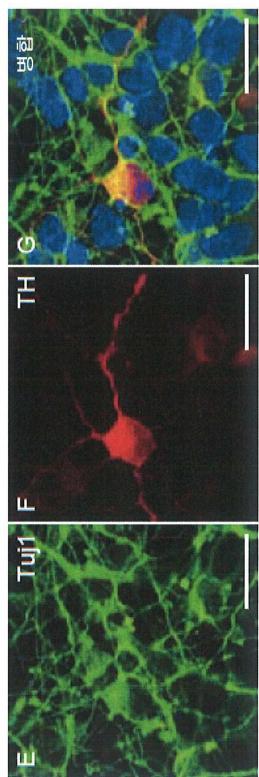
도면34a



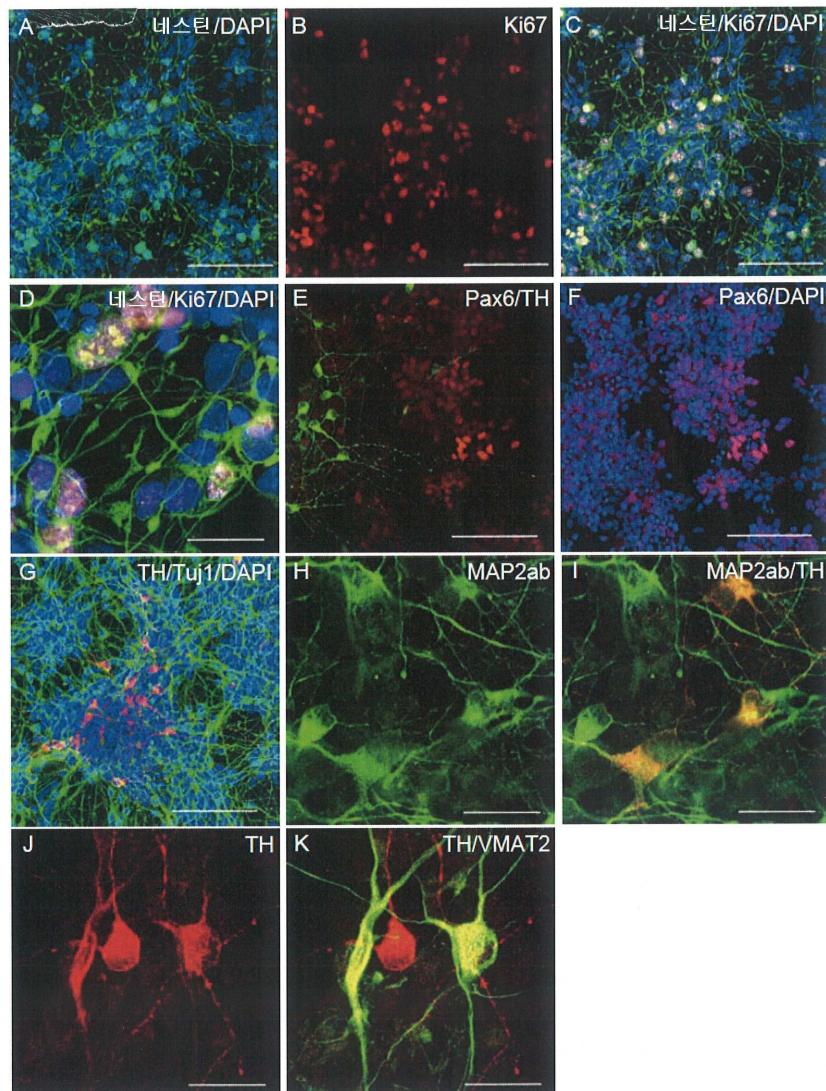
도면34b



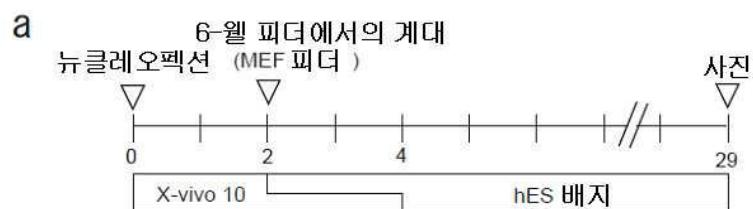
도면35a



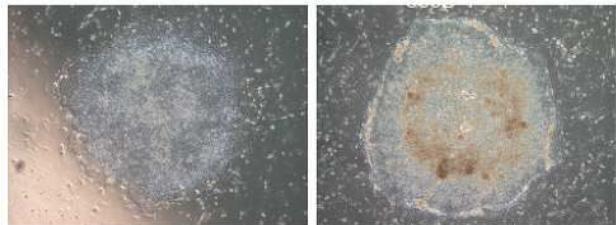
도면35b



도면36



b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Kyoto University

<120> METHOD OF EFFICIENTLY ESTABLISHING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

<130> 091561

<150> US 61/232,402

<151> 2009-08-07

<150> US 61/307,306

<151> 2010-02-23

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1782

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (129)..(1301)

<400> 1

aagttctgta gcttcagttc attgggacca tcctggctgt aggttagcgac tacagttagg	60
gggcacccat cattcaggcc ctcatcctcc tccttcccag cagggtgtca cgtttctccg	120

aagactgg atg act gcc atg gag gag tca cag tcg gat atc agc ctc gag	170
--	-----

Met Thr Ala Met Glu Glu Ser Gln Ser Asp Ile Ser Leu Glu	
---	--

1	5	10
---	---	----

ctc cct ctg agc cag gag aca ttt tca ggc tta tgg aaa cta ctt cct	218
---	-----

Leu Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Gly Leu Trp Lys Leu Leu Pro	
---	--

15	20	25	30
----	----	----	----

cca gaa gat atc ctg cca tca cct cac tgc atg gac gat ctg ttg ctg	266
---	-----

Pro Glu Asp Ile Leu Pro Ser Pro His Cys Met Asp Asp Leu Leu	
---	--

35	40	45
----	----	----

ccc cag gat gtt gag gag ttt ttt gaa ggc cca agt gaa gcc ctc cga	314
---	-----

Pro Gln Asp Val Glu Glu Phe Phe Glu Gly Pro Ser Glu Ala Leu Arg	
---	--

50	55	60
----	----	----

gtg tca gga gct cct gca gca cag gac cct gtc acc gag acc cct ggg	362
---	-----

Val Ser Gly Ala Pro Ala Ala Gln Asp Pro Val Thr Glu Thr Pro Gly

65	70	75	
cca gtg gcc cct gcc cca gcc act cca tgg ccc ctg tca tct ttt gtc			410
Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Thr Pro Trp Pro Leu Ser Ser Phe Val			
80	85	90	
cct tct caa aaa act tac cag ggc aac tat ggc ttc cac ctg ggc ttc			458
Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Asn Tyr Gly Phe His Leu Gly Phe			
95	100	105	110
ctg cag tct ggg aca gcc aag tct gtt atg tgc acg tac tct cct ccc			506
Leu Gln Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Met Cys Thr Tyr Ser Pro Pro			
115	120	125	
ctc aat aag cta ttc tgc cag ctg gcg aag acg tgc cct gtg cag ttg			554
Leu Asn Lys Leu Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu			
130	135	140	
tgg gtc agc gcc aca cct cca gct ggg agc cgt gtc cgc gcc atg gcc			602
Trp Val Ser Ala Thr Pro Pro Ala Gly Ser Arg Val Arg Ala Met Ala			
145	150	155	
atc tac aag aag tca cag cac atg acg gag gtc gtg aga cgc tgc ccc			650
Ile Tyr Lys Lys Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro			
160	165	170	
cac cat gag cgc tgc tcc gat ggt gat ggc ctg gct cct ccc cag cat			698
His His Glu Arg Cys Ser Asp Gly Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His			
175	180	185	190
ctt atc cgg gtg gaa gga aat ttg tat ccc gag tat ctg gaa gac agg			746
Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Tyr Pro Glu Tyr Leu Glu Asp Arg			
195	200	205	
cag act ttt cgc cac agc gtc gta cct tat gag cca ccc gag gcc			794
Gln Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Ala			
210	215	220	

ggc tct gag tat acc acc atc cac tac aag tac atg tgt aat agc tcc		842	
Gly Ser Glu Tyr Thr Thr Ile His Tyr Lys Tyr Met Cys Asn Ser Ser			
225	230	235	
tgc atg ggg ggc atg aac cgc cga cct atc ctt acc atc atc aca ctg		890	
Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu			
240	245	250	
gaa gac tcc agt ggg aac ctt ctg gga cggt gac agc ttt gag gtt cgt		938	
Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asp Ser Phe Glu Val Arg			
255	260	265	270
gtt tgt gcc tgc cct ggg aga gac cgc cgt aca gaa gaa aat ttc		986	
Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Phe			
275	280	285	
cgc aaa aag gaa gtc ctt tgc cct gaa ctg ccc cca ggg agc gca aag		1034	
Arg Lys Lys Glu Val Leu Cys Pro Glu Leu Pro Pro Gly Ser Ala Lys			
290	295	300	
aga gcg ctg ccc acc tgc aca agc gcc tct ccc ccg caa aag aaa aaa		1082	
Arg Ala Leu Pro Thr Cys Thr Ser Ala Ser Pro Pro Gln Lys Lys			
305	310	315	
cca ctt gat gga gag tat ttc acc ctc aag atc cgc ggg cgt aaa cgc		1130	
Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Lys Ile Arg Gly Arg Lys Arg			
320	325	330	
ttc gag atg ttc cgg gag ctg aat gag gcc tta gag tta aag gat gcc		1178	
Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala			
335	340	345	350
cat gct aca gag gag tct gga gac agc agg gct cac tcc agc tac ctg		1226	
His Ala Thr Glu Glu Ser Gly Asp Ser Arg Ala His Ser Ser Tyr Leu			
355	360	365	
aag acc aag aag ggc cag tct act tcc cgc cat aaa aaa aca atg gtc		1274	
Lys Thr Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Thr Met Val			
370	375	380	
aag aaa gtg ggg cct gac tca gac tga ctgcctctgc atccccgtccc		1321	

Lys Lys Val Gly Pro Asp Ser Asp

385 390

catcaccagg cccccctct cttgtgttc ttatgacttc agggctgaga cacaatcc	1381
ccggtccctt ctgtgcctt ttttaccttg tagctaggc tcagccccct ctctgagtag	1441

tggttcctgg cccaagttgg ggaatagggtt gatagttgtc aggtctctgc tggcccagcg	1501
aaattctatc cagccagttg ttggaccctg gcacctacaa tgaaatctca ccctacccca	1561
caccctgtaa gattctatct tggccctca tagggtccat atcctccagg gcctactttc	1621
cttccattct gcaaaggctg tctgcattta tccacccccc accctgtctc cctcttttt	1681
ttttttttac cccttttat atatcaattt cctatttac aataaaattt tgttatcact	1741
aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa a	1782

<210> 2

<211> 390

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Thr Ala Met Glu Glu Ser Gln Ser Asp Ile Ser Leu Glu Leu Pro

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Gly Leu Trp Lys Leu Leu Pro Pro Glu

20	25	30
----	----	----

Asp Ile Leu Pro Ser Pro His Cys Met Asp Asp Leu Leu Leu Pro Gln

35	40	45
----	----	----

Asp Val Glu Glu Phe Phe Glu Gly Pro Ser Glu Ala Leu Arg Val Ser

50	55	60
----	----	----

Gly Ala Pro Ala Ala Gln Asp Pro Val Thr Glu Thr Pro Gly Pro Val

65	70	75	80
----	----	----	----

Ala Pro Ala Pro Ala Thr Pro Trp Pro Leu Ser Ser Phe Val Pro Ser

85	90	95
----	----	----

Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Asn Tyr Gly Phe His Leu Gly Phe Leu Gln

100	105	110
-----	-----	-----

Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Met Cys Thr Tyr Ser Pro Pro Leu Asn

115	120	125
-----	-----	-----

Lys Leu Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val
 130 135 140
 Ser Ala Thr Pro Pro Ala Gly Ser Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr
 145 150 155 160
 Lys Lys Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His
 165 170 175
 Glu Arg Cys Ser Asp Gly Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile
 180 185 190

 Arg Val Glu Gly Asn Leu Tyr Pro Glu Tyr Leu Glu Asp Arg Gln Thr
 195 200 205
 Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Ala Gly Ser
 210 215 220
 Glu Tyr Thr Thr Ile His Tyr Lys Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met
 225 230 235 240
 Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp
 245 250 255

 Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asp Ser Phe Glu Val Arg Val Cys
 260 265 270
 Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Phe Arg Lys
 275 280 285
 Lys Glu Val Leu Cys Pro Glu Leu Pro Pro Gly Ser Ala Lys Arg Ala
 290 295 300
 Leu Pro Thr Cys Thr Ser Ala Ser Pro Pro Gln Lys Lys Pro Leu
 305 310 315 320

 Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Lys Ile Arg Gly Arg Lys Arg Phe Glu
 325 330 335
 Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala His Ala
 340 345 350
 Thr Glu Glu Ser Gly Asp Ser Arg Ala His Ser Ser Tyr Leu Lys Thr
 355 360 365
 Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Thr Met Val Lys Lys

370	375	380	
 Val Gly Pro Asp Ser Asp			
385	390		
<210> 3			
<211> 2586			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220><221> CDS			
<222> (198)..(1379)			
<400> 3			
gattgggtt ttccctccc atgtgctaa gactggcgct aaaagtttg agtttcaa			60
aagtcttagag ccaccgtcca gggagcagg agctgctgg ctccgggac acttgcgtt			120
cgggctggga gcgtgcttc cacgacggtg acacgcttc ctggattggc agccagactg			180
ccttcgggt cactgcc atg gag gag ccg cag tca gat cct agc gtc gag			230
Met Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu			
1	5	10	
ccc cct ctg agt cag gaa aca ttt tca gac cta tgg aaa cta ctt cct			278
Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro			
15	20	25	
gaa aac aac gtt ctg tcc ccc ttg ccg tcc caa gca atg gat gat ttg			326
Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu			
30	35	40	
atg ctg tcc ccg gac gat att gaa caa tgg ttc act gaa gac cca ggt			374
Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly			
45	50	55	
cca gat gaa gct ccc aga atg cca gag gct gct ccc ccc gtg gcc cct			422
Pro Asp Glu Ala Pro Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro			
60	65	70	75
gca cca gca gct cct aca ccg gcg gcc cct gca cca gcc ccc tcc tgg			470
Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Trp			
80	85	90	

ccc ctg tca tct tct gtc cct tcc cag aaa acc tac cag ggc agc tac	518		
Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr			
95	100	105	
ggt ttc cgt ctt ggc ttc ttg cat tct ggg aca gcc aag tct gtg act	566		
Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr			
110	115	120	
tgc acg tac tcc cct gcc ctc aac aag atg ttt tgc caa ctg gcc aag	614		
Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys			
125	130	135	
acc tgc cct gtg cag ctg tgg gtt gat tcc aca ccc ccg ccc ggc acc	662		
Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr			
140	145	150	155
cgc gtc cgc gcc atg gcc atc tac aag cag tca cag cac atg acg gag	710		
Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu			
160	165	170	
gtt gtg agg cgc tgc ccc cac cat gag cgc tgc tca gat agc gat ggt	758		
Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly			
175	180	185	
ctg gcc cct cct cag cat ctt atc cga gtg gaa gga aat ttg cgt gtg	806		
Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val			
190	195	200	
gag tat ttg gat gac aga aac act ttt cga cat agt gtg gtg gtg ccc	854		
Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro			
205	210	215	
tat gag ccg cct gag gtt ggc tct gac tgt acc acc atc cac tac aac	902		
Tyr Glu Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn			
220	225	230	235
tac atg tgt aac agt tcc tgc atg ggc ggc atg aac cgg agg ccc atc	950		
Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile			
240	245	250	
ctc acc atc atc aca ctg gaa gac tcc agt ggt aat cta ctg gga cgg	998		

Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg
 255 260 265

aac agc ttt gag gtg cgt gtt tgt gcc tgt cct ggg aga gac cgg cgc 1046
 Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg
 270 275 280

aca gag gaa gag aat ctc cgc aag aaa ggg gag cct cac cac gag ctg 1094
 Thr Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu
 285 290 295

ccc cca ggg agc act aag cga gca ctg ccc aac aac acc agc tcc tct 1142

Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser
 300 305 310 315

ccc cag cca aag aag aaa cca ctg gat gga gaa tat ttc acc ctt cag 1190
 Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln
 320 325 330

atc cgt ggg cgt gag cgc ttc gag atg ttc cga gag ctg aat gag gcc 1238
 Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala
 335 340 345

ttg gaa ctc aag gat gcc cag gct ggg aag gag cca ggg ggg agc agg 1286
 Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Ser Arg
 350 355 360

gct cac tcc agc cac ctg aag tcc aaa aag ggt cag tct acc tcc cgc 1334
 Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg
 365 370 375

cat aaa aaa ctc atg ttc aag aca gaa ggg cct gac tca gac tga 1379
 His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 380 385 390

cattctccac ttcttgttcc ccactgacag cctccaccc ccatctctcc ctccccgtcc 1439
 attttgggtt ttgggtcttt gaacccttgc ttgcaatagg tgtgcgtcag aagcacccag 1499
 gacttccatt tgctttgtcc cggggctcca ctgaacaagt tggcctgcac tggtgtttg 1559

ttgtgggag gaggatggg agtaggacat accagcttag atttaaggt tttactgtg 1619

agggatgtt gggagatgta agaaatgttc ttgcagttaa gggttagttt acaatcagcc	1679
acattctagg taggggccca cttcaccgta ctaaccaggg aagctgtccc tcactgttga	1739
attttctcta acttcaaggc ccataatctgt gaaatgctgg catttgcacc tacctcacag	1799
agtgcattgt gagggtaat gaaataatgt acatctggcc ttgaaaccac cttttattac	1859
atggggctta gaacttgacc cccttgaggg tgcttgtcc ctctccctgt tggtcggtgg	1919
gttggtagtt tctacagttt ggcagctgg tagtagagg gagttgtcaa gtctctgctg	1979
gccccagccaa accctgtctg acaacctttt ggtgaacctt agtacctaaa agggaaatctc	2039

accccatccc acaccctgga ggatttcata tcttgtatata gatgatctgg atccaccaag	2099
acttggttta tgctcagggt caattcttt tttctttttt ttttttttt ttctttttct	2159
ttagagactgg gtctcgctt gttggccagg ctggagtggaa gtggcgtgat cttggcttac	2219
tgcagccctt gcctccccgg ctgcagcagt cctgcctcag cctccggagt agctgggacc	2279
acaggttcat gccaccatgg ccagccaact tttgcatgtt ttgttagagat ggggtctcac	2339
agtgttgccc aggctggctt caaactcctg ggctcaggcg atccacacgtt ctcagcctcc	2399
cagagtgcgtg ggattacaat tgtgagccac cacgtccage tggaagggtc aacatcttt	2459

acattctgca agcacatctg catttcacc ccacccttcc cctccttctc cctttttata	2519
tcccatttt atatcgatct ctatttac aataaaactt tgctgccacc tgtgtgtctg	2579
aggggtg	2586

<210> 4

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu C

1 5 10 15

Glu₁ Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu₁₁ Asn Asn Va

20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp

35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro

50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 65 70 75 80
 Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
 85 90 95

 Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
 100 105 110
 Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
 115 120 125
 Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
 130 135 140
 Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
 145 150 155 160

 Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
 165 170 175
 Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
 180 185 190
 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
 195 200 205
 Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220

 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 225 230 235 240
 Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 245 250 255
 Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270
 Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 275 280 285

 Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300
 Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys

305	310	315	320
Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu			
325	330	335	
Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp			
340	345	350	

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His			
355	360	365	
Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met			
370	375	380	
Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp			

385	390		
-----	-----	--	--

<210> 5

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 5

tttgactgga tgactgccat ggttcaagag accatggcag tcatccagtc ttttt	56
--	----

<210> 6

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 6

tttgatatcc tgccatcacc tcttcaagag agaggtgtatgc caggatatac ttttt	56
--	----

<210> 7

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 7

tttggcccaa gtgaaggccct ctttcaagag aggaggcctt cacttggccc ttttt	56
---	----

<210> 8

<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> shRNA against p53
<400> 8
tttgtgaagc cctccgagtg tcttcaagag agacactcg agggcttcac ttttt 56

<210> 9
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> shRNA against p53
<400> 9
tttgcctcc gagtgtagg agttcaagag actcctgaca ctggaggc ttttt 56

<210> 10
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> shRNA against p53
<400> 10
tttgtctgtt atgtgcacgt acttcaagag agtacgtgca cataacagac ttttt 56

<210> 11
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> shRNA against p53
<400> 11
tttgtactct cctccctca atttcaagag aattgagggg aggagagtac ttttt 56

<210> 12
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> shRNA against p53
<400> 12

tttgcattc tgccagctgg cgttcaagag acgccagctg gcagaatagc ttttt	56
<210> 13	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> shRNA against p53	
<400> 13	
tttgacgtgc cctgtcgagt ttttcaagag acaactgcac agggcacgtc ttttt	56
<210> 14	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> shRNA against p53	
<400> 14	
tttgaagtca cagcacatga cgttcaagag acgtcatgtg ctgtgacttc ttttt	56
<210> 15	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> shRNA against p53	
<400> 15	
tttgtcacag cacatgacgg agttcaagag actccgtcat gtgctgtgac ttttt	56
<210> 16	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> shRNA against p53	
<400> 16	
tttggaaatt tgtatccgaa gtttcaagag aactcgggat acaaatttcc ttttt	56
<210> 17	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> shRNA against p53	

<400> 17

tttgtacatg tgtaatagct ccttcaagag aggagctatt acacatgtac tttttt 56

<210> 18

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 18

tttgactcca gtggAACCT tcttcaagag agaaggTTCC cactggAGTC tttttt 56

<210> 19

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 19

tttgccttt gccctgaact gcttcaagag agcagtttag ggcaaaggac tttttt 56

<210> 20

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 20

tttgatccgc gggcgtaaac gcttcaagag agcgTTACG cccgcggatc tttttt 56

<210> 21

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 21

tttgaccaag aaggcccagt cttaaAGAG aagactggcc cttcttggtc tttttt 56

<210> 22

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 22

tttcaaagg gggctgact cattcaagag atgagtccagg cccactttc tttttt 56

<210> 23

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 23

tttgttgggg aataggttga tattcaagag atatcaacct attcccaac tttttt 56

<210> 24

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 24

tttgattcta tcttgggcc tttcaagag agagggcca agatagaatc tttttt 56

<210> 25

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 25

tttgcatac aggtacgtgt gtagtgtgct gtcctacaca tgtacttgc gtgttttt 59

<210> 26

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 26

tttgcgtt acttuccgcc gtagtgtgct gtcctatggc gggaaatgaga ctgttttt 59

<210> 27

<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	p53 responsive element	
<400>	27	
rrrgwwcyyy		10
<210>	28	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	shRNA against p53	
<400>	28	
gactccagtg gtaatctact gctcgagcag tagattacca ctggagtc		48
<210>	29	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Bacteriophage P1	
<400>	29	
ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat		34
<210>	30	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mutant loxP (lox71) sequence	
<400>	30	
taccgttcgt atagcataca ttatacgaag ttat		34
<210>	31	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mutant loxP (lox66) sequence	
<400>	31	
ataacttcgt atagcataca ttatacgaac ggta		34
<210>	32	

<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> shRNA against p53	
<400> 32	
gactccagtg gtaatctact tcaagagagt agattaccac tggagtc	47
<210> 33	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 33	
accatatcctt cctgccccat caga	24
<210> 34	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 34	
atcacaagtg tgggtggcgg tcct	24
<210> 35	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 35	
gccggccct cagagtgcata cgac	24
<210> 36	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 36	

cgagtgagg gaggcgtgc gtag	24
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 37	
 ttccacgagg gtatgtacc	20
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 38	
 tcggggtgt tagagacaac	20
 <210> 39	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 39	
 atcagggcca agacatagag atg	23
<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 40	
 gccaatgcaa ctggacgtt	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	

<400> 41	
gccaggaggt ctgcgtgta	20
<210> 42	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 42	
aatgcacggc tagggtcaaa	20
<210> 43	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 43	
ccccagggcc ccattttgg acc	23
<210> 44	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 44	
acctcagttt gaatgcattt gagagc	26
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 45	
cattcaaact gaggtttaggg	20
<210> 46	
<211> 22	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 46	
tagcgtaaaa ggagcaacat ag	22
<210> 47	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 47	
accatatcctt cctgccccat caga	24
<210> 48	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 48	
ttggtaatgg agcggcgga ct tg	24
<210> 49	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 49	
ccacacctgcc ttacacatga aga	23
<210> 50	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 50	
tagcgtaaaa ggagcaacat ag	22
<210> 51	

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 51

ttcacatgtc ccagcaaac caga 24

<210> 52

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 52

tcacatgtgt gagagggca gtgtgc 26

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 53

ttcacatgtc ccagcaaac caga 24

<210> 54

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 54

tttgttgcg aggagcgaca at 22

<210> 55

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 55

gcgaacccaa gacccaggcc tgctcc 26

<210> 56	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 56	
caggggtct gctcgacccg tgatg	25
<210> 57	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 57	
ggctgagaag aggatggcta c	21
<210> 58	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 58	
tttgttgac aggagcgaca at	22
<210> 59	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 59	
agccatatgg tagcctcatg tccgc	25
<210> 60	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	

<400> 60	
tcaattctgt gcctccggga gcagggtagg	30
<210> 61	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 61	
agccatatgg tagcctcatg tccgc	25
<210> 62	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 62	
tagcgtaaaa ggagcaacat ag	22
<210> 63	
<211> 81	
<212> DNA	
<213> Foot-and-mouth disease virus	
<400> 63	
aaaattgtcg ctccgtcaa acaaactttt aactttgatt tactcaaact ggctgggat	60
gtagaaagca atccaggtcc a	81