

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 10월 18일 (18.10.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/141471 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/0735 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/002696
- (22) 국제출원일: 2012년 4월 10일 (10.04.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0033789 2011년 4월 12일 (12.04.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **차의과학대학교 산학협력단 (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동), 487-010 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: **경**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **황동연 (HWANG, Dong-Youn)** [KR/KR]; 경기도 광주시 오포읍 신현리 e-편한세상아파트 202-1402, 464-895 Gyeonggi-do (KR). **이강인 (LEE, Kang-In)** [KR/KR]; 서울특별시 성북구 정릉 2동 중앙하이츠빌아파트 103-302, 136-779 Seoul (KR).

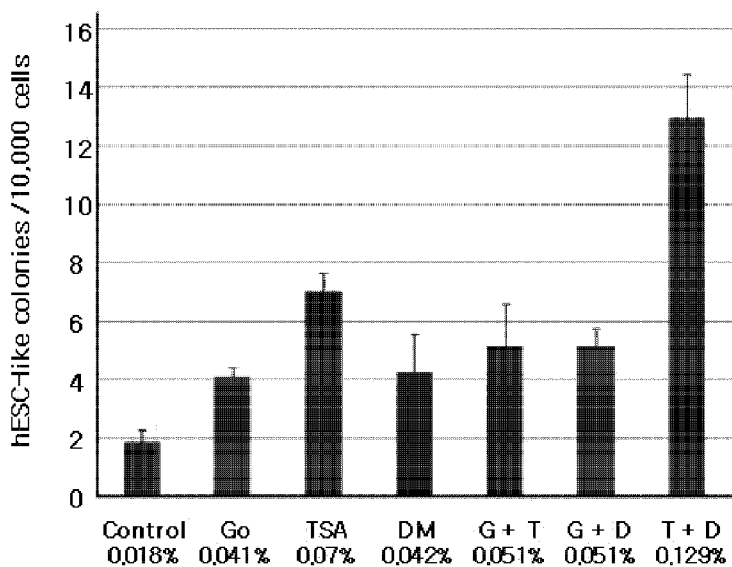
- (74) 대리인: **오국진 (OH, Kook-Jin)**; 서울특별시 서초구 서초동 1708-6 두연빌딩 302 호, 137-884 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS USING A DEDIFFERENTIATION ENHANCER

(54) 발명의 명칭: 역분화-증진제를 이용한 역분화 만능 줄기세포의 제조방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing induced pluripotent stem cells (iPS cells), comprising: (a) culturing human-derived somatic cells, into which genes encoding differentiation-inducing factors are introduced, in a medium containing one or more dedifferentiation enhancers selected from a group consisting of a protein kinase C inhibitor, a histone deacetylase inhibitor, and a bone morphogenetic protein (BMP) pathway blocker; and (b) separating embryonic stem cell-like colonies from the culture obtained in step (a). The method of the present invention may enable the preparation of induced pluripotent stem cells with high efficiency, as well as the preparation of induced pluripotent stem cells under xenopathogen-free and feeder cell-free conditions.

(57) 요약서: 본 발명은 (a) 역분화 유도인자를 코딩하는 유전자가 도입된 인간-유래의 체세포를, 프로틴 키나아제 C 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및 골 형성 단백질 경로 차단제로 이루어진

어린 균으로부터 1 종 이상 선택된 역분화-증진제를 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계; 및 (b) 단계(a)로부터 얻어진 배양물로부터 배아줄기세포-유사 콜로니(embryonic stem cell-like colonies)를 분리하는 단계를 포함하는 역분화 만능 줄기세포(iPS cells)의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 제조방법은 높은 효율로 역분화 만능 줄기세포를 제조할 수 있으며, 또한 무-이종감염물질(xenopathogen-free) 및 무-지지세포(feeder cell-free) 조건하에서 역분화 만능 줄기세포를 제조할 수 있다.



공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 역분화-증진제를 이용한 역분화 만능 줄기세포의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 역분화 만능 줄기세포의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 프로틴 키나아제 C 저해제(protein kinase C inhibitor), 히스톤 데아세틸라제 저해제(histone deacetylase inhibitor), 및/또는 골 형성 단백질 경로 차단제(bone morphogenetic protein (BMP) pathway blocker)를 역분화-증진제로서 사용하여, 높은 효율로 역분화 만능 줄기세포를 제조(generating or preparing)하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명에 따른 제조방법은 무-이종감염물질(xenopathogen-free) 및 무-지지세포(feeder cell-free) 조건하에서 역분화 만능 줄기세포를 제조하는 방법을 포함한다.

배경기술

- [2] 역분화 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPS 세포)는 분화된 세포(예를 들어, 체세포)로부터 역분화되어 얻어진 만능분화능(pluripotency)을 갖는 세포를 지칭하며, 각종 장기 세포로 분화 가능하다. iPS 세포는 역분화 유도인자들에 의해 분화된 세포를 재프로그래밍화(reprogramming)하여 얻어질 수 있으므로, 체세포 핵치환(somatic cell transfer) 없이 환자 면역 적합성 만능 세포주의 생성이 가능하다. 따라서 iPS 세포는 환자의 세포에서 유래될 수 있어 임상에 적용 시 면역 거부반응을 피할 수 있다. 또한, iPS 세포는 난자나 배아를 사용하지 않기 때문에 생명윤리적 논란이나 종교적 비난이 없는 장점이 있다.
- [3] 2006년 8월에 Takahashi, K., 및 Yamanaka, S. 등이 생쥐 세포를 이용한 역분화에 의한 iPS 세포의 형성을 최초로 발표(Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676)한 이래, Takahashi, K. 등 및 Yu, J. 등은 인간세포를 대상으로 역분화에 의한 iPS 세포의 형성을 보고한 바 있다(Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872; 및 Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, New York, NY). Takahashi, K. 등은 iPS 세포를 얻기 위해서는 Sox2, Oct3/4, 및 Klf4의 역분화 유도인자가 필수적으로 필요하고 또한, 추가적으로 c-Myc이 iPS 세포의 형성을 촉진하는 역할을 하는 것을 밝혀냈다. 또한, Yu, J. 등은 Sox2, Oct3/4, 및 Nanog의 역분화 유도인자가 iPS 세포를 얻기 위해 필수적으로 필요하며, Lin28이 존재하는 경우 iPS 세포의

형성이 증가하는 것을 밝혀냈다.

- [4] 한편, 종래의 재프로그래밍(reprogramming)에 의한 iPS 세포의 제조방법, 예를 들어, Takahashi, K. *et al* (2007) *Cell* 131, 861-872 에 따르면, 5×10^4 개의 인간 피부 섬유아세포로부터 약 10 여개의 iPS 세포만이 얻어지는 낮은 효율의 문제점을 가지고 있다. 또한, 소태아혈청(fetal bovine serum) 등의 이종감염물질(xenopathogen)의 사용을 필요로 하며, 역분화 유도 과정에서 동물 유래의 지지세포(feeder cells)의 사용을 필요로 하므로, iPS 세포를 실제 임상에 적용하는데 있어서 안전성 측면에서 한계가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명자들은 높은 효율로 iPS 세포를 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하였다. 그 결과, 특정 물질 즉, 프로틴 키나아제 C 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및/또는 골 형성 단백질 경로 차단제가 체세포의 역분화를 증진하는 활성이 있어, 높은 효율로 iPS 세포를 제조할 수 있다는 것을 발견하였다. 또한, 상기 프로틴 키나아제 C 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및/또는 골 형성 단백질 경로 차단제를 사용할 경우, 무-이종감염물질(xenopathogen-free) 및 무-지지세포(feeder cell-free) 조건하에서 역분화 만능 줄기세포를 제조할 수 있다는 것을 발견하였다.
- [6] 따라서, 본 발명은 프로틴 키나아제 C 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및/또는 골 형성 단백질 경로 차단제를 역분화-증진제로서 사용하는, iPS 세포의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 일 태양에 따라, (a) 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자가 도입된 인간-유래의 체세포를, 프로틴 키나아제 C 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및 골 형성 단백질 경로 차단제로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 역분화-증진제를 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계; 및 (b) 단계(a)로부터 얻어진 배양물로부터 배아줄기세포-유사 콜로니를 분리하는 단계를 포함하는 역분화 만능 줄기세포의 제조방법이 제공된다.
- [8] 본 발명의 역분화 만능 줄기세포의 제조방법에 있어서, 상기 역분화-증진제는 히스톤 데아세틸라제 저해제 및 골 형성 단백질 경로 차단제의 혼합물이 특히 바람직하며, 상기 역분화-증진제의 농도는 0.001 내지 1000 μM 의 범위일 수 있다.
- [9] 본 발명의 일 구현예에서, 단계(a)의 상기 배양은 (i) 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자의 도입에 사용된 배지에 상기 역분화-증진제를 가하여 얻어진 배지("제1 배지") 중에서 3~6 일 동안 1차 배양을 수행하는 단계, (ii) 세포외기질 단백질(extracellular matrix protein)의 존재하에서, 상기 제1 배지 중에서 1.5~3 일 동안 2차 배양을 수행하는 단계, 및 (iii) 인간 배아줄기세포 배양용 배지에 상기

역분화-증진제를 가하여 얻어진 배지("제2 배지") 중에서 15~30 일 동안 3차 배양을 수행하는 단계를 포함할 수 있다.

- [10] 상기 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자의 도입에 사용된 배지 및/또는 상기 인간 배아줄기세포 배양용 배지는 무-이종감염물질 배지일 수 있으며, 상기 (i) 내지 (iii)의 배양이 무-지지세포(feeder cell-free) 조건하에서 바람직하게 수행될 수 있다.

발명의 효과

- [11] 본 발명에 따른 역분화 만능 줄기세포의 제조방법은 프로틴 키나아제 C 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및/또는 골 형성 단백질 경로 차단제를 역분화-증진제로서 사용함으로써, 높은 효율로 역분화 만능 줄기세포를 제조할 수 있다. 또한, 상기 역분화 증진제를 사용할 경우, 역분화 만능 줄기세포의 제조과정 전체를 무-이종감염물질(xenopathogen-free) 및 무-지지세포(feeder cell-free) 조건하에서 수행할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 역분화 만능 줄기세포의 제조방법은 임상에 사용하기에 적합한, 즉 우수한 안전성을 갖는 역분화 만능 줄기세포를 높은 효율로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 프로틴 키나아제 C 저해제(Go6983, Go), 히스톤 데아세틸라제 저해제(트리코스타틴 에이, TSA), 골 형성 단백질 경로 차단제(도르소몰핀, DM)을 각각 혹은 조합하여 처리된 배지를 사용하였을 때, 생성되는 인간 역분화 만능 줄기세포의 생성효율(10,000 개의 세포당 얻어진 iPS 세포 콜로니의 수)을 평가한 결과이다.
- [13] 도 2는 프로틴 키나아제 C 저해제(Go6983, Go) 및 히스톤 데아세틸라제 저해제(트리코스타틴 에이, TSA)를 조합하여 처리된 배지; 또는 프로틴 키나아제 C 저해제(Go6983, Go)를 처리한 배지를 사용하였을 때, 생성되는 인간 역분화 만능 줄기세포를 미분화 표지인 Tra1-60 항체를 이용하여 면역염색한 결과이다.
- [14] 도 3은 프로틴 키나아제 C 저해제(Go6983, Go) 및 히스톤 데아세틸라제 저해제(트리코스타틴 에이, TSA)를 조합하여 처리된 배지; 또는 프로틴 키나아제 C 저해제(Go6983, Go)를 처리한 배지를 사용하였을 때, 미분화 표지 마커인 알칼린 포스파테이즈, Oct4, SSEA4, Tra1-60, 및 Sox2의 발현을 측정된 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [15] 본 명세서에서, "역분화 만능 줄기세포 (induced pluripotent stem cells, iPS 세포)"라 함은 "reprogrammed pluripotent stem cells"로도 지칭되며, 분화된 세포를 재프로그래밍하여(즉, 역분화시켜) 만능분화능(pluripotency)을 갖도록 유도된 세포를 말한다. 상기 역분화 만능 줄기세포는 뇌, 심장 등의 장기 세포로 다양하게 분화될 수 있다.

- [16] 본 발명은 (a) 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자가 도입된 인간-유래의 체세포를, 프로틴 키나아제 C 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및 골 형성 단백질 경로 차단제로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 역분화-증진제를 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계; 및 (b) 단계(a)로부터 얻어진 배양물로부터 배아줄기세포-유사 콜로니를 분리하는 단계를 포함하는 역분화 만능 줄기세포의 제조방법을 제공한다.
- [17] 상기 역분화 유도인자는 재프로그래밍화를 유도할 수 있는 기능을 갖는 모든 인자들을 포함하며, 바람직하게는 재프로그래밍화에 관여하는 것으로 알려져 있는 역분화 유도인자의 조합을 포함한다. 예를 들어, 상기 역분화 유도인자는 재프로그래밍화를 유도하는 것으로 알려져 있는 Sox2, Oct3/4, Nanog, Klf4, Lin28, 및 Myc로 이루어진 군으로부터 2종 이상 선택될 수 있다. 상기 Sox2, Oct3/4, Nanog, Klf4, Lin28, 및 c-Myc의 아미노산 서열 및 염기 서열은 GenBank 등에 공지되어 있다.
- [18] 상기 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자가 도입된 인간-유래의 체세포는 공지의 방법, 예를 들어 Takahashi, K. 등의 방법(Takahashi, K., et al., (2007) *Cell* 131, 861-872) 및/또는 Yu, J. 등의 방법(Yu, J., et al., (2007). *Science*, New York, NY)에 따라 얻어질 수 있다. 즉, 인체로부터 분리된 체세포를 소태아혈청(fetal bovine serum) 및 항생물질(페니실린/스트렙토마이신)을 함유하는 배지(예를 들어, DMEM 배지) 중에 접종하고, 레트로바이러스를 이용하여 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자를 상기 인간-유래의 체세포에 전달할 수 있다. 상기 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자의 전달은 통상 1일 동안 배양함으로써 수행될 수 있으나, 크게 제한되는 것은 아니다. 한편, 상기 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자의 전달은 소태아혈청 등과 같은 이종감염물질(xenopathogen)이 없는 무-이종감염물질 배지(xenopathogen-free medium)를 사용하여 수행되는 것이 최종적으로 얻어지는 역분화 만능 줄기세포의 임상-적용성 측면에서 바람직하다. 따라서, 상기 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자의 도입에 사용된 배지는 무-이종감염물질 배지(xenopathogen-free medium)를 사용하는 것이 바람직하며, 예를 들어 MesenGro™hMSC Medium (StemRD, USA)를 사용할 수 있다.
- [19] 본 발명의 역분화 만능 줄기세포의 제조방법에 있어서, 상기 프로틴 키나아제 C 저해제(protein kinase C inhibitor)는 프로틴 키나아제 C 저해 활성을 갖는 모든 물질을 포함한다. 상기 프로틴 키나아제 C 저해제는
3-[1-[3-(디메틸아미노)프로필]-5-메톡시-1H-인돌-3-일]-4-(1H-인돌-3-일)-1H-피롤-2,5-디온(3-[1-[3-(dimethylamino)propyl]-5-methoxy-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione, Go6983);
3-(1H-인돌-3-일)-4-[2-(4-메틸피페라진-1-일)퀴나졸린-4-일]피롤-2,5-디온(3-(1H-indol-3-yl)-4-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazolin-4-yl]pyrrole-2,5-dione, Sotrastaurin, AEB 071);

3-{1-[3-(아미디노티오)프로필]-1H-인돌-3-일}-3-(1-메틸-1H-인돌-3-일)말레이미드 메탄
 술포네이트(3-{1-[3-(amidinothio)propyl]-1H-indol-3-yl}-3-(1-methyl-1H-indol-3-yl)
 maleimide methane sulfonate, Ro-31-8220);
 13-히드록시옥타데카디에논산(13-hydroxyoctadecadienoic acid);
 2-[1-(3-디메틸아미노프로필)인돌-3-일]-3-(인돌-3-일)
 말레이미드(2-[1-(3-dimethylaminopropyl)indol-3-yl]-3-(indol-3-yl) maleimide, GF
 109203X, Go6850);
 13-((디메틸아미노)메틸)-10,11,14,15-테트라히드로-4,9:16,21-디메테노-1H,13H-
 디벤조(E,K)피롤(3,4-H)(1,4,13)옥사디아자시클로헥사데센-1,3(2H)-디온(13-((di
 methylamino)methyl)-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16,21-dimetheno-1H,13H-dibenzo(E
 ,K)pyrrolo(3,4-H)(1,4,13)oxadiazacyclohexadecene-1,3(2H)-dione, LY-333531,
 Ruboxistaurin, PKC beta inhinitor);
 2,6-디아미노-N-([1-(1-옥소트리데실)-2-피페리딘일]메틸)헥산아미드(2,6-diamin
 o-N-([1-(1-oxotridecyl)-2-piperidiny]methyl)hexanamide, NPC 15437); 및
 4'-데메틸아미노-4'-히드록시스타우로스포르인(4'-demethylamino-4'-hydroxystaurosp
 orine, RK-286C)으로 이루어진 군으로부터 1 종 이상 선택될 수 있으나, 이에
 제한되는 것은 아니다.

- [20] 또한, 상기 히스톤 데아세틸라제 저해제(histone deacetylase inhibitor)는
 N-히드록시-3-(3-페닐설파모일페닐)아크릴아미드(N-Hydroxy-3-(3-phenylsulfamo
 ylphenyl)acrylamide, Belinostat, PXD101, PX105684);
 7-(4-(3-에티닐페닐아미노)-7-메톡시퀴나졸린-6-일옥시)-N-히드록시헵탄아미드(
 7-(4-(3-ethynylphenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-yloxy)-N-hydroxyheptanamide,
 CUDC-101);
 [R-(E,E)]-7-[4-(디메틸아미노)페닐]-N-히드록시-4,6-디메틸-7-옥소-2,4-헵타디엔
 아미드([R-(E,E)]-7-[4-(dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxo-2,4-he
 ptadienamide, Trichostatin A, TSA);
 N-히드록시-N'-페닐옥탄디아미드(N-hydroxy-N'-phenyloctanediamide, Vorinostat,
 SAHA, Zolinza, MK-0683); 발프로익산 또는 그의 염(valproic acid or its salt); 소듐
 부티레이트(Sodium butyrate);
 3-(2-부틸-1-(2-(디에틸아미노)에틸)-1H-벤조[d]이미다졸-5-일)-N-히드록시아크
 릴아미드(3-(2-butyl-1-(2-(diethylamino)ethyl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-N-hydroxy
 acrylamide, SB939);
 N-히드록시-N'-3-피리디닐옥탄디아미드(N-hydroxy-N'-3-pyridinyloctanediamide,
 Pyroxamide, NSC 696085);
 3-(디메틸아미노메틸)-N-[2-[4-(히드록시카바모일)페녹시]에틸]-1-벤조퓨란-2-카
 르복사미드(3-(dimethylaminomethyl)-N-[2-[4-(hydroxycarbamoyl)phenoxy]ethyl]-1-
 benzofuran-2-carboxamide, PCI-24781, CRA-02478);

N-[[4-[(2-아미노페닐)아미노]카르보닐]페닐]메틸]카르바믹산 3-피리디닐메틸 에스테르(N-[[4-[(2-aminophenyl)amino]carbonyl]phenyl]methyl]carbamic acid 3-pyridinylmethyl ester, Entinostat, MS-275, SNDX-275, MS-27-275);
 N-(2-아미노페닐)-4-[[[(4-피리딘-3-일피리미딘-2-일)아미노]메틸]벤젠아미드(N-(2-aminophenyl)-4-[[[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-yl)amino]methyl]benzamide, Mocetinostat, MGCD0103);
 3-[5-(3-(3-플루오로페닐)-3-옥소프로펜-1-일)-1-메틸-1H-피롤-2-일]-N-히드록시-2-프로펜아미드(3-[5-(3-(3-Fluorophenyl)-3-oxopropen-1-yl)-1-methyl-1H-pyrrol-2-yl]-N-hydroxy-2-propenamide, MC1568);
 N-히드록시-3-[4-[2-(2-메틸-1H-인돌-3-일)에틸아미노메틸]페닐]-2(E)-프로펜아미드(N-hydroxy-3-[4-[2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)ethylaminomethyl]phenyl]-2(E)-propenamide, Panobinostat, LBH-589, NVP-LBH589, LBH589);
 3-[4-[N-(2-히드록시에틸)-N-[2-(1H-인돌-3-일)에틸]아미노메틸]페닐]-2(E)-프로페노히드록사믹산(3-[4-[N-(2-hydroxyethyl)-N-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]aminomethyl]phenyl]-2(E)-propenohydroxamic acid, Dacinostat, LAQ824, NVP-LAQ824);
 N-히드록시-2-(4-(((1-메틸-1H-인돌-3-일)메틸)아미노)메틸)피페리딘-1-일)피리미딘-5-카르복사미드(N-hydroxy-2-(4-(((1-methyl-1H-indol-3-yl)methyl)amino)methyl)piperidin-1-yl)pyrimidine-5-carboxamide, JNJ-26481585);
 {6-[(디에틸아미노)메틸]나프탈렌-2-일}메틸
 [4-(히드록시카르바모일)페닐]카르바메이트({6-[(diethylamino)methyl]naphthalen-2-yl}methyl [4-(hydroxycarbamoyl)phenyl]carbamate, Givinostat, Gavinostat, ITF2357, ITF 2357); 및
 4-(4-클로로-2-메틸페녹시)-N-히드록시부탄아미드(4-(4-Chloro-2-methylphenoxy)-N-hydroxybutanamide, Droxinostat)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [21] 또한, 상기 골 형성 단백질 경로 차단제제(bone morphogenetic protein (BMP) pathway blocker)는 노긴(noggin); 코르딘(chordin); 폴리스타틴(follistatin); 및 6-(4-(2-피페리딘-1-일에톡시)페닐))-3-피리딘-4-일피라졸로(1,5-a)피리미딘(6-(4-(2-piperidin-1-ylethoxy)phenyl))-3-pyridin-4-ylpyrazolo(1,5-a)pyrimidine, dorsomorphin)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [22] 본 발명의 역분화 만능 줄기세포의 제조방법에 있어서, 상기 역분화-증진제는 프로틴 키나아제 C 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 골 형성 단백질 경로 차단제를 각각 단독으로 사용하거나, 혹은 2종 이상을 조합하여 사용할 수 있으며, 특히 바람직하게는 히스톤 데아세틸라제 저해제 및 골 형성 단백질 경로 차단제를 조합하여 사용하는 것이 높은 효율로 역분화 만능 줄기세포를 제조할 수 있다.
- [23] 상기 역분화-증진제의 사용량 즉, 배지 중의 농도는 바람직하게는 0.001 내지

1000 μ M, 더욱 바람직하게는 0.01 내지 10 μ M의 범위일 수 있다. 물론, 필요에 따라 상기 농도 범위를 초과하여 사용될 수도 있다.

- [24] 상기 역분화-증진제 존재하에서의 배양, 즉 단계(a)의 상기 배양은 바람직하는 (i) 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자의 도입에 사용된 배지에 상기 역분화-증진제를 가하여 얻어진 배지("제1 배지") 중에서 3~6 일 동안 1차 배양을 수행하는 단계, (ii) 세포외기질 단백질(extracellular matrix protein)의 존재하에서, 상기 제1 배지 중에서 1.5~3 일 동안 2차 배양을 수행하는 단계, 및 (iii) 인간 배아줄기세포 배양용 배지에 상기 역분화-증진제를 가하여 얻어진 배지("제2 배지") 중에서 15~30 일 동안 3차 배양을 수행하는 단계를 포함할 수 있다.
- [25] 상기 단계(i)에서, 상기 1차 배양은 3~6 일 동안, 예를 들어 약 4일 동안 수행될 수 있다. 상기 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자의 도입에 사용된 배지는 무-이종감염물질 배지(xenopathogen-free medium)를 사용하는 것이 바람직하며, 예를 들어, MesenGro™hMSC Medium (StemRD, USA)일 수 있다.
- [26] 상기 단계(ii)는 세포외기질 단백질(extracellular protein)의 존재하에서 단계(i)에서 사용된 배지와 동일한 배지를 사용하여 수행하는 단계로서, 이어지는 3차 배양에 세포를 미리 적응시키는 역할을 한다. 상기 세포외기질 단백질로는 세포 배양에 통상적으로 사용되는 코팅용 단백질, 예를 들어 비트로넥틴(vitronectin), 매트릭젤(Matrigel, BD Biosciences, USA), 셀스타트(CellStart, Invitrogen, USA), 젤라틴(gelatin) 등을 제한없이 사용할 수 있다. 상기 2차 배양은 1.5~3 일 동안, 예를 들어 약 2일 동안 수행될 수 있다.
- [27] 상기 단계(iii)에서, 상기 3차 배양은 15~30 일 동안, 예를 들어 약 18~20일 동안 수행될 수 있다. 상기 인간 배아줄기세포 배양용 배지는 인간 배아줄기세포의 유지배양시 통상적으로 사용되는 배지일 수 있으나, 무-이종감염물질 배지(xenopathogen-free medium)를 사용하는 것이 바람직하며, 예를 들어 넥아웃 제노프리 혈청 대체물, 글루타맥스, 비필수 아미노산, 베타-머캅토에탄올, 항생제, 및 bfgf(basic fibroblast growth factor)를 포함하는 DMEM/F-12 배지일 수 있다. 상기 기본 배지(basal medium)는 DMEM/F-12 배지 뿐만 아니라 통상의 세포배양용 배지일 수 있으며, 예를 들면, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO, USA); MEM (Minimal Essential Medium, GIBCO, USA); BME (Basal Medium Eagle, GIBCO, USA); RPMI 1640 (GIBCO, USA); DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10; GIBCO, USA); α -MEM(α -Minimal essential Medium; GIBCO, USA); G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium, GIBCO, USA); IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium, GIBCO, USA); KnockOut DMEM (GIBCO, USA) 등일 수 있다.
- [28] 상기 (i) 내지 (iii)의 배양은 동물유래의 지지세포를 사용하지 않고, 즉 무-지지세포(feeder cell-free) 조건하에서 특히 바람직하게 수행될 수 있다.
- [29] 본 발명의 제조방법은 단계(a)로부터 얻어진 배양물로부터 배아줄기세포-유사 콜로니를 분리하는 단계[즉, 단계(b)]를 포함한다.

- [30] 역분화 만능 줄기세포의 콜로니는 배양물 중에서 핵이 상대적으로 크면서 세포질은 적은 작고 둥근 세포들이 뭉쳐있는 형태의 형태학적으로 구분되는 모양을 가지고 있으므로, 통상의 방법 예를 들어 알콜램프로 끝을 구부린 파스퇴르 파이펫을 이용한 물리적인 방법으로 이들을 분리할 수 있다.
- [31] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [32] 실시예 1.
- [33] 2개의 6 웰 플레이트에 MesenGro™hMSC Medium (StemRD, USA)(배지-A)를 가하고, 인간 체세포인 지방기질세포(Adipose-derived stromal cell; ADSC)(Lonza, USA)를 한 웰당 1.5×10^5 cells가 되도록 접종한 후, Takahashi, K. 등의 방법(Takahashi, K. *et al* (2007) *Cell* 131, 861-872)에 따라 레트로바이러스를 이용하여 4종의 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)를 전달하였다(1일 동안 배양). 다음 표 1에 나타낸 바와 같이 역분화-증진제를 배지-A에 첨가하여 배지-A1 내지 배지-A7을 준비하고, 배지-A1 내지 배지-A7로 매일 배지를 교환하면서 4일 동안 배양하여 역분화를 유도하였다.
- [34] 각 웰에 트립신/EDTA 처리 및 원심분리하여 각 웰로부터 얻어진 세포를, 비트로넥틴(vitronectin)(5 μ g/ml, BD Biosciences, USA)으로 도포한 6 cm 배양용기에 약 5×10^4 cells가 되도록 접종한 다음, 2일 동안 동일한 매일 각각의 배지(즉, 배지-A1 내지 배지-A7)로 교환하면서 배양하였다.
- [35] 이후, 15% (v/v) 낙아웃 제노프리 혈청 대체물(KnockOut SR XenoFree; GIBCO, USA), 1x 글루타맥스(GIBCO, USA), 1% (v/v) 비필수 아미노산(GIBCO, USA), 0.1mM 베타-머캅토에탄올(GIBCO), 1% (v/v) 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO, USA), 8 ng/ml bfgf(basic fibroblast growth factor)(차바이오앤디오스텍, Korea)로 보충된 DMEM/F-12 (GIBCO, USA)[배지-B]에 역분화-증진제를 첨가하여 준비한 배지-B1 내지 배지-B7(표 1 참조)로 각 웰의 배지를 매일 교체하면서 20일 동안 배양하였다.
- [36] 표 1

[Table 1]

처리군	배지	배지	역분화-증진제
제1군	배지-A1	배지-B1	무처리(대조군)
제2군	배지-A2	배지-B2	Go 5 μ M
제3군	배지-A3	배지-B3	TSA 10 nM
제4군	배지-A4	배지-B4	DM 1 μ M
제5군	배지-A5	배지-B5	Go 5 μ M + TSA 10 nM
제6군	배지-A6	배지-B6	Go 5 μ M + DM 1 μ M
제7군	배지-A7	배지-B7	TSA 10 nM + DM 1 μ M

- [37] - Go: 3-[1-[3-(디메틸아미노)프로필]-5-메톡시-1H-인돌-3-일]-4-(1H-인돌-3-일)-1H-피롤-2,5-디온)(Go6983)
- [38] - TSA: 트리코스타틴 에이(Trichostatin A)
- [39] - DM: 도르소몰핀(dorsomorphin)
- [40]
- [41] 역분화 유도 인자 전달 후, 약 배양 20일 쯤에 iPS 세포 콜로니가 각 웰에서 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며, 배양 25일 쯤에 배아줄기세포-유사 콜로니(hESC-like colonies)를 계수하였다. 10,000 개의 세포당 얻어진 iPS 세포 콜로니의 수를 측정한 결과는 도 1과 같다. 도 1의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따라 프로틴 키나아제 C 저해제, 히스톤 디아세틸라제 저해제, 또는 BMP 경로 저해제를 처리한 군은 대조군에 비해 iPS 세포 콜로니 수가 적어도 2배 이상 증가하였다. 특히, 히스톤 디아세틸라제 저해제(트리코스타틴 에이) 및 BMP 경로 저해제(도르소몰핀)을 동시에 처리한 군은 대조군에 비해 iPS 세포 콜로니 수가 7배 이상으로 현저하게 증가하였다.
- [42]
- [43] 시험예 1. iPS 세포의 확인
- [44] 실시예 1에서, 제5군(Go6983 + TSA) 및 제2군(Go6983)의 배양 25일째 배양액 중의 iPS 세포 콜로니를 미분화 표지인 Tra1-60 항체(Millipore, USA)를 이용하여 염색하였으며, 또한 생성된 iPS 세포 콜로니들의 미분화 표지 마커인 알칼린 포스파테이즈, Oct4, SSEA4, Tra1-60, 및 Sox2의 발현을 측정하였다.
- [45] 즉, 배양 25일째에 콜로니들을 인산완충식염수로 세척한 후 4% 포름알데하이드 용액을 10분간 처리하여 고정하였다. 이를 다시 인산완충식염수로 10분씩 3회 세척한 후, 10% 정상 당나귀 혈청(normal donkey serum) 용액으로 상온에서 1시간 블로킹(blocking)하였다. 일차항체인 mouse Tra1-60 항체를(1:500, Millipore, USA) 실온에서 1시간 동안 처리한 후,

인산완충식염수로 10분씩 3회 세척한 다음, 이차항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG 항체(1:100, Vector Laboratory, USA)를 넣고 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 인산완충식염수로 10분씩 3회 세척한 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Vector Laboratory, USA)를 실온에서 30분 동안 처리하고, 다시 인산완충식염수로 10분씩 3회 세척한 후 DAB Peroxidase Substrate Kit(Vector Laboratory, USA)를 이용하여 발색시켰다.

- [46] 또한, 동일한 방법으로 콜로니들을 인산완충식염수로 세척한 후, 4% 포름알데하이드 용액을 10분 동안 처리하여 고정한 후, 알칼린 포스파테이즈 염색을 다음과 같이 시행하였다. iPS 세포 콜로니들을 10분씩 3회 세척한 후, 100X NBT 용액 (디메틸포름아미드 70% 및 물 30%의 혼합용매 중 50 mg/ml의 니트로 블루 테트라졸리움(Sigma, USA))과 100x XPHOS 용액(물 중의 10 mg/ml의 5-브로모-4-클로로-3-인돌일 포스페이트, 2나트륨염(Sigma, USA))을 AP buffer(100 mM Tris pH 8.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)를 이용하여 1X로 희석하여 iPS 세포 콜로니들을 30분 이상 반응시킨 후 H₂O로 씻어주고 관찰하였다.
- [47] 또한, Oct4, SSEA4, Tra1-60, 및 Sox2의 발현을 측정하기 위하여 면역염색을 다음과 같이 시행하였다. 먼저 iPS 세포 콜로니들을 인산완충식염수로 씻어준 후 4% 포름알데하이드 용액을 10분간 처리하여 고정하였다. 일차항체들인 mouse anti-Oct4 항체(Santa Cruz, USA), mouse anti-SSEA4 항체(Millipore, USA), mouse anti-Tra1-60 항체(Millipore, USA), mouse anti-Sox2 항체(Millipore, USA)들과 실온에서 1시간 동안 반응시키고, 인산완충식염수로 10분씩 3회 세척한 후 이차항체인 Alexa-594 goat anti-mouse IgG (1:200, Invitrogen, USA)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 인산완충식염수로 10분씩 3회 세척한 후, 30 nM 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)(Invitrogen, USA)를 이용하여 핵을 염색하였다. 다시 인산완충식염수로 10분씩 3회 세척한 후 형광현미경으로 관찰하였다
- [48] 미분화 표지인 Tra1-60 항체(Millipore, USA)를 이용하여 염색한 결과는 도 2와 같으며, 생성된 iPS 세포 콜로니들의 미분화 표지 마커인 알칼린 포스파테이즈, Oct4, SSEA4, Tra1-60, 및 Sox2의 발현을 측정한 결과는 도 3과 같다. 상기 도 2 및 3의 결과로부터, 본 발명에 따라 생성된 iPS 세포는 Tra1-60 항체에 대하여 양성반응을 나타내었으며, iPS 세포의 미분화 표지 마커인 알칼린 포스파테이즈, Oct4, SSEA4, Tra1-60, 및 Sox2 모두를 잘 발현하고 있음을 알 수 있다.

청구범위

[청구항 1]

(a) 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자가 도입된 인간-유래의 체세포를, 프로틴 키나아제 C 저해제, 히스톤 데아세틸라제 저해제, 및 골 형성 단백질 경로 차단제로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 역분화-증진제를 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계; 및

(b) 단계(a)로부터 얻어진 배양물로부터 배아줄기세포-유사 콜로니(embryonic stem cell-like colonies)를 분리하는 단계를 포함하는 역분화 만능 줄기세포(iPS cells)의 제조방법.

[청구항 2]

제1항에 있어서, 상기 프로틴 키나아제 C 저해제가

3-[1-[3-(디메틸아미노)프로필]-5-메톡시-1H-인돌-3-일]-4-(1H-인돌-3-일)-1H-피롤-2,5-디온;

3-(1H-인돌-3-일)-4-[2-(4-메틸피페라진-1-일)퀴나졸린-4-일]피롤-2,5-디온;

3-{1-[3-(아미디노티오)프로필]-1H-인돌-3-일}-3-(1-메틸-1H-인돌-3-일)말레이미드 메탄 술포네이트;

13-히드록시옥타데카디에논산;

2-[1-(3-디메틸아미노프로필)인돌-3-일]-3-(인돌-3-일) 말레이미드;

13-((디메틸아미노)메틸)-10,11,14,15-테트라히드로-4,9:16,21-디메테노-1H,13H-디벤조(E,K)피롤(3,4-H)(1,4,13)옥사디아자시클로헥사테센-1,3(2H)-디온;

2,6-디아미노-N-([1-(1-옥소트리데실)-2-피페리딘일]메틸)헥산아미드; 및 4'-데메틸아미노-4'-히드록시스타우로스포린으로

이루어진 군으로부터 1 종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

[청구항 3]

제1항에 있어서, 상기 히스톤 데아세틸라제 저해제가

N-히드록시-3-(3-페닐설파모일페닐)아크릴아미드;

7-(4-(3-에티닐페닐아미노)-7-메톡시퀴나졸린-6-일옥시)-N-히드록시헵탄아미드;

[R-(E,E)]-7-[4-(디메틸아미노)페닐]-N-히드록시-4,6-디메틸-7-옥소-2,4-헵타디엔아미드; N-히드록시-N'-페닐옥탄디아미드;

발프로익산 또는 그의 염; 소듐 부티레이트;

3-(2-부틸-1-(2-(디에틸아미노)에틸)-1H-벤조[d]이미다졸-5-일)-N-히드록시아크릴아미드; N-히드록시-N'-3-피리디닐옥탄디아미드;

3-(디메틸아미노메틸)-N-[2-[4-(히드록시카바모일)페녹시]에틸]-1-벤조퓨란-2-카르복사미드;

N-[[4-[(2-아미노페닐)아미노]카르보닐]페닐]메틸]카르바믹산

- 3-피리디닐메틸 에스테르;
 N-(2-아미노페닐)-4-[(4-피리딘-3-일피리미딘-2-일)아미노]메틸]벤젠아미드;
 3-[5-(3-(3-플루오로페닐)-3-옥소프로펜-1-일)-1-메틸-1H-피롤-2-일]-N-히드록시-2-프로펜아미드;
 N-히드록시-3-[4-[2-(2-메틸-1H-인돌-3-일)에틸아미노메틸]페닐]-2(E)-프로펜아미드;
 3-[4-[N-(2-히드록시에틸)-N-[2-(1H-indol-3-일)에틸]아미노메틸]페닐]-2(E)-프로페노히드록사믹산;
 N-히드록시-2-(4-(((1-메틸-1H-인돌-3-일)메틸)아미노)메틸)피페리딘-1-일)피리미딘-5-카르복사미드;
 {6-[(디에틸아미노)메틸]나프탈렌-2-일}메틸
 [4-(히드록시카르바모일)페닐]카르바메이트; 및
 4-(4-클로로-2-메틸페녹시)-N-히드록시부탄아미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 골 형성 단백질 경로 차단제가 노긴; 코르딘; 폴리스타틴; 및
 6-(4-(2-피페리딘-1-일에톡시)페닐))-3-피리딘-4-일피라졸로(1,5-a)피리미딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 역분화-증진제가 히스톤 데아세틸라제 저해제 및 골 형성 단백질 경로 차단제의 혼합물인 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 역분화-증진제의 농도가 0.001 내지 1000 μM 의 범위인 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 단계(a)의 상기 배양이 (i) 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자의 도입에 사용된 배지에 상기 역분화-증진제를 가하여 얻어진 배지("제1 배지") 중에서 3~6 일 동안 1차 배양을 수행하는 단계, (ii) 세포외기질 단백질(extracellular matrix protein)의 존재하에서, 상기 제1 배지에서 1.5~3 일 동안 2차 배양을 수행하는 단계, 및 (iii) 인간 배아줄기세포 배양용 배지에 상기 역분화-증진제를 가하여 얻어진 배지("제2 배지") 중에서 15~30 일 동안 3차 배양을 수행하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 역분화 유도 인자를 코딩하는 유전자의 도입에 사용된 배지가 무-이종감염물질 배지(xenopathogen-free medium)인 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 인간 배아줄기세포 배양용 배지가

무-이종감염물질 배지(xenopathogen-free medium)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

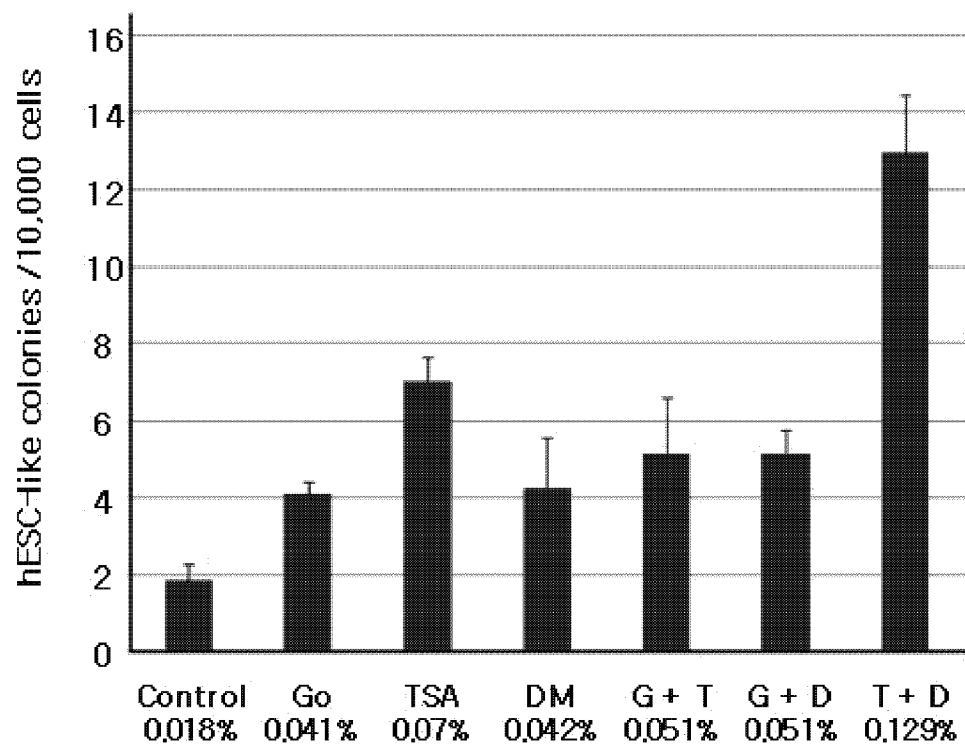
[청구항 10]

제10항에 있어서, 상기 인간 배아줄기세포 배양용 배지가 넥아웃 제노프리 혈청 대체물, 글루타맥스, 비필수 아미노산, 베타-머캅토에탄올, 항생제, 및 bfgf(basic fibroblast growth factor)를 포함하는 DMEM/F-12 배지인 것을 특징으로 하는 제조방법.

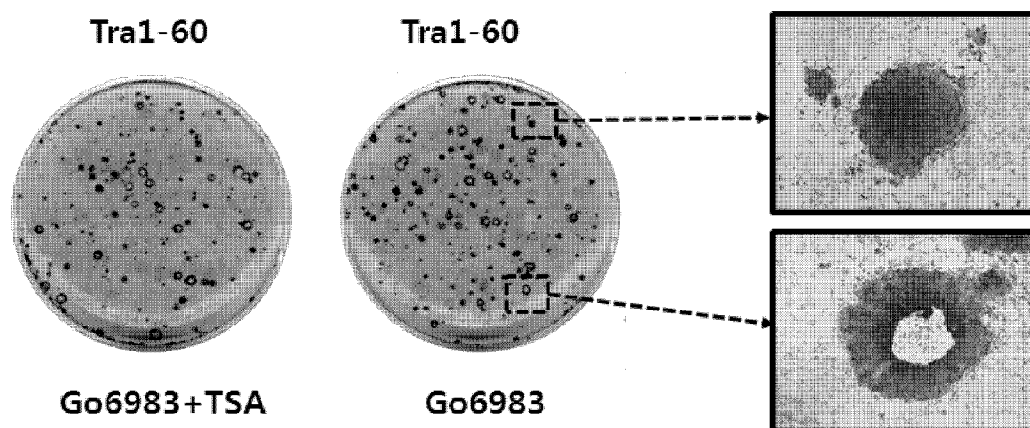
[청구항 11]

제7항에 있어서, 상기 (i) 내지 (iii)의 배양이 무-지지세포(feeder cell-free) 조건하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

