



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2017-0064542  
(43) 공개일자 2017년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/074 (2010.01) A01K 67/027 (2006.01)  
C12N 15/85 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C12N 5/0696 (2013.01)  
A01K 67/027 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7011424  
(22) 출원일자(국제) 2015년09월18일  
심사청구일자 2017년04월26일

(85) 번역문제출일자 2017년04월26일  
(86) 국제출원번호 PCT/CN2015/089963  
(87) 국제공개번호 WO 2016/045550  
국제공개일자 2016년03월31일

(30) 우선권주장  
201410504189.8 2014년09월26일 중국(CN)

(71) 출원인  
**홍 구안 리미티드**  
중국 100080 베이징 #3-1 하이디안 다 지 피프틴  
쓰 플로어 룸 1301-에이1519-1  
**베이징 바이탈스타 바이오테크놀로지 컴퍼니, 리  
미티드**  
중국 베이징 100107, 차오양 디스트릭트, 양산 로  
드 넘버 4  
**פקינג 유니버시티**  
중국 베이징 100871 하이디안 디스트릭트 이헤이  
우안 로드 5

(72) 발명자  
**덩, 홍쿠이**  
중국 베이징 100871 하이디안 디스트릭트 이헤이  
우안 로드 넘버 5 진 광 라이프사이언스 빌딩 룸  
넘버 433  
**팡, 리궈**  
중국 베이징 100871 하이디안 디스트릭트 이헤이  
우안 로드 넘버 5 진 광 라이프사이언스 빌딩 룸  
넘버 431  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
**한양특허법인**

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **TGFβ 신호 전달 독립적 나이브형 유도 만능 줄기 세포, 제조 방법 및 사용**

**(57) 요약**

비나이브형 다능성 줄기 세포를 TGFβ 신호 전달 독립적(TSI) 나이브형 다능성 줄기세포(iPSC)로 전환/리프로그래밍하기 위한 인자의 혼합체가 제공된다. 또한, 세포가 TSI 나이브형 iPSC로 리프로그래밍되기 위해 충분한 시간 동안, 리프로그래밍될 세포를 유효량의 화합물과 접촉시킴으로써 비나이브형 PSC를 TSI 나이브형 iPSC로 리프로그래밍하기 위한 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

*C12N 15/8509* (2013.01)  
*A01K 2227/105* (2013.01)  
*A01K 2267/025* (2013.01)  
*C12N 2501/115* (2013.01)  
*C12N 2501/727* (2013.01)  
*C12N 2501/734* (2013.01)  
*C12N 2506/1307* (2013.01)

(72) 발명자

**리우, 캉**

중국 베이징 100871 하이디안 디스트릭트 이헤이우  
안 로드 넘버 5 진 광 라이프사이언스 빌딩 룸 넘  
버 431

**양, 웨이펑**

중국 베이징 102200 창펑 디스트릭트 성밍 위안 로  
드 넘버 19

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

분리된 다능성 세포의 세포 잠재력을 확장하기 위한 세포 배양 배지 조성물로서,

이하의 군의 각각으로부터의 나이브형(naive) 다능성의 화학적 유도 물질(CINP)을 포함하는, 조성물.

TGFβ 신호 전달 독립적(TSI) 나이브형 유도 만능 줄기 세포(PSC)로의 비나이브형 세포의 리프로그래밍에 대해 유효량의

- (1) 시토카인,
- (2) 글리코겐 합성 키나아제(GSK) 억제제,
- (3) 세포의 신호 조절 키나아제(ERK) 1/2 억제제,
- (4) c-Jun N 말단 키나아제(JNK) 억제제,
- (5) 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 및
- (6) p38 미토겐 활성화 단백질 키나아제(MAPK) 억제제.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

시토카인은 인간의 억제 인자(LIF, "L"), 인터류킨(IL)-6, IL-11, IL-27, IL-31, 백혈병 억제 인자, 온코스타틴 M, 카디오토프린(cardiotrophin)-1, 뉴로포이에틴(neuropoietin) 및 카디오토프린 유사 시토카인 인자 1로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

GSK 억제제는 GSK3 억제제인, 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서,

ERK 1/2 억제제는 PD0325901(*N*-[(2*R*)-2,3-디히드록시프로폭시]-3,4-디플루오로-2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]-벤즈아미드); PD198306(*N*-(시클로프로필메톡시)-3,4,5-트리플루오로-2-[(4-요오도-2-메틸페닐)아미노]-벤즈아미드); SL 327(α-[아미노[(4-아미노페닐)티오]메틸렌]-2-(트리플루오로메틸)벤젠아세트니트릴); 및 U0126(1,4-디아미노-2,3-디시아노-1,4-비스[2-아미노페닐티오]부타디엔으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 조성물).

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서,

GSK 억제제는 CHIR99021[6-[[2-[[4-(2,4-디클로로페닐)-5-(5-메틸-1*H*-이미다졸-2-일)-2-피리미디닐]아미노]에틸]아미노]-3-피리딘카르보니트릴]; BIO-아세톡심; GSK 3I 억제제 XV; SB-216763; CHIR 99021 트리히드로클로라이드; GSK-3 억제제 IX[(2*Z*, 3*E*)-6'-브로모-3-(히드록시이미노)-[2,3'-비인돌리닐리덴]-2'-온]; GSK 3IX[6-브로모인디루빈-3'-옥심]; GSK-3β 억제제 XII[3-[[6-(3-아미노페닐)-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일]옥시]페놀]; GSK-3 억제제 XVI[6-(2-(4-(2,4-디클로로페닐)-5-(4-메틸-1*H*-이미다졸-2-일)-피리미딘-2-일)아미노)에틸-아미노]-니코티노니트릴]; SB-415286[3-[(3-클로로-4-히드록시페닐)아미노]-4-(2-니트로페닐)-1*H*-피롤-2,5-디온]; 및 Bio[(2'*Z*,3'*E*)-6-브로모인디루빈-3'-옥심]으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서,

JNK 억제제는 SP600125(안트라[1-9-*cd*]피라졸-6(2*H*)-온); I 78D3(4-(2,3-디히드로-1,4-벤조디옥신-6-일)-2,4-디히드로-5-[(5-니트로-2-티아졸릴)티오]-3*H*-1,2,4-트리아졸-3-온); CEP 1347((9*S*,10*R*,12*R*)-5-16-비스[(에틸티오)메틸]-2,3,9,10,11,12-헥사히드로-10-히드록시-9-메틸-1-옥소-9,12-에폭시-1*H*-디인돌로[1,2,3-*fg*:3',2',1'-*kl*]피롤로[3,4-*i*][1,6]벤조디아조신-10-카르복실산 메틸에스테르); 및 SU 3327(-[(5-니트로-2-티아졸릴)티오]-1,3,4-티아디아졸-2-아민)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서,

p38 MAPK 억제제는 SB 203580 히드로클로라이드(4-[5-(4-플루오로페닐)-2-[4-(메틸술포닐)페닐]-1*H*-이미다졸-4-일]피리딘히드로클로라이드); SB202190(4-[4-(4-플루오로페닐)-5-(4-피리디닐)-1*H*-이미다졸-2-일]페놀); DBM 1285 디히드로클로라이드(*N*-시클로프로필-4-[4-(4-플루오로페닐)-2-(4-피페리디닐)-5-티아졸릴]-2-피리미딘아민 디히드로클로라이드); SB 239063(트랜스-4-[4-(4-플루오로페닐)-5-(2-메톡시-4-피리미디닐)-1*H*-이미다졸-1-일]시클로헥산올); SKF 86002 디히드로클로라이드(6-(4-플루오로페닐)-2,3-디히드로-5-(4-피리디닐)이미다조[2,1-*b*]티아졸 디히드로클로라이드)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

CHIR99021; PD0325901; bFGF; SP600125; SB 203580 및 SP600125를 포함하는 조성물.

#### 청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

세포 배양 배지를 포함하는 조성물.

#### 청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

키트에 있어서, 저분자량 화합물은 나이브형 다능성을 유도하기 위한 분화된 세포용 세포 배양 배지에 투입하기 위해 상대적인 양으로 존재하는, 조성물.

#### 청구항 11

TSI 나이브형 PSC의 생성 방법으로서,

비나이브형 PSC를 TSI 나이브형 PSC로 리프로그래밍하기 위해 유효한 기간 동안에 청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 기재된 조성물로 공여 세포를 배양하는 것을 포함하는, 방법.

#### 청구항 12

청구항 11에 있어서,

공여 세포는 배아 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포, 다분화능 줄기 세포, 혈액학적 기원의 세포, 배아 기원의 세포, 피부 유래 세포, 섬유아세포, 지방 세포, 상피 세포, 내피 세포, 간충직 세포(mesenchymal cell), 유조직 세포(parenchymal cell), 신경학적 세포(neurological cell), 및 결합 조직 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 13

청구항 12에 있어서,

공여 세포는 마우스 배아 줄기 세포, 인간 배아 줄기 세포, 및 유도 만능 줄기 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 14**

청구항 11 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,  
공여 세포는 4 내지 14일의 기간 동안에 배양되는, 방법.

**청구항 15**

청구항 14에 있어서,  
TSI 나이브형 PSC를 분리하는 것을 더 포함하는 방법.

**청구항 16**

청구항 15에 있어서,  
상기 TSI 나이브형 PSC는 단일 세포로서 접종되고, 청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 기재된 조성물을 포함하는 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 것을 더 포함하는 방법.

**청구항 17**

청구항 11 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 기재된 방법 중 어느 하나에 의해 얻어지는 분리된 TSI 나이브형 PSC.

**청구항 18**

분리된 TSI 나이브형 PSC.

**청구항 19**

청구항 17 또는 청구항 18에 있어서,  
공여 세포와 동일한 기관으로부터 분리된 미처리 상응 세포와 비교할 경우, PRDM14, KLF5, ZFP42 (REX1), LIFR, TBX3, 및 NANOG로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커의 발현이 상향 조절되는, 세포.

**청구항 20**

청구항 17 또는 청구항 18에 있어서,  
공여 세포와 동일한 기관으로부터 분리된 미처리 상응 세포와 비교할 경우, TRA-1-60, TRA-1-81, 및 SSEA-4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커의 발현이 상향 조절되는, 세포.

**청구항 21**

청구항 17 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서,  
공여 세포와 상응하는 기관으로부터 분리된 미처리 상응 세포와 비교할 경우, SSAEA-1의 발현이 하향 조절되는, 세포.

**청구항 22**

청구항 17 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서,  
TGFβ1 수용체 억제제의 존재 하의 대조군에 대한 TRA-1-81-양성 세포의 비율의 배수 변화에 의해 측정된 바와 같이, 세포는 적어도 5일 동안 TGFβ1 수용체 억제제의 존재 하에서 대조군의 배양 후에 다능성을 유지하는, 세포.

**청구항 23**

청구항 20 내지 청구항 26 중 어느 한 항에 기재된 분리된 세포를 적어도 10%, 20% 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 포함하는 TSI 나이브형 PSC의 분리된 개체군.

**청구항 24**

청구항 20 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 기재된 TSI 나이브형 PSC를 포함하는 치료용 조성물로서, 주사, 보철 장치의 이식 또는 조직 공학 매트릭스에 의해 개체에 투여하기 위해 제형화되는, 조성물.

**청구항 25**

청구항 20 또는 청구항 21에 기재된 분리된 TSI 나이브형 PSC를 포함하는 세포 배양, 및

- (1) 시토카인,
- (2) 글리코젠 합성 키나아제(GSK) 억제제,
- (3) 세포외 신호 조절 키나아제(ERK) 1/2 억제제,
- (4) c-Jun N 말단 키나아제(JNK) 억제제,
- (5) 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 및
- (6) p38 미토겐 활성화 단백질 키나아제(MAPK) 억제제를 포함하는 배양 배지.

**청구항 26**

청구항 25에 있어서,

상기 배양 배지는 TSI 나이브형 PSC를 미분화 및 나이브형 다능 상태로 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 계대(passage) 동안 효과적으로 유지하는, 세포 배양.

**청구항 27**

청구항 25에 있어서,

TSI 나이브형 PSC는 배양에 있어서 8개월까지 배양 후에 정상 핵형을 유지하는, 세포 배양.

**청구항 28**

발달 단계에서 표적 기관의 발달의 결핍과 관련된 이상을 갖는 비인간 포유 동물 수용체의 기관의 생성 방법으로서,

- a) 공여체 포유 동물로부터 유래된 TSI 나이브형 PSC를 준비하는 것; b) 수용체 포유 동물의 배반포 단계 수정란에 TSI 나이브형 PSC를 이식하는 것; c) 비인간 대리모 포유 동물의 자궁에서 수정란을 발달시켜 동복자(litter)를 얻는 것; 및 d) 상기 동복자로부터 표적 기관을 얻는 것을 포함하는, 방법.

**청구항 29**

청구항 28에 있어서,

생성되는 기관은 췌장, 신장, 흉선, 및 모발로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 30**

청구항 28에 있어서,

수용체 포유 동물은 Sa111 녹아웃 마우스, Pdx1-Hes1 형질 전환 마우스, Pdx1 녹아웃 마우스, 및 누드 마우스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 마우스인, 방법.

**청구항 31**

청구항 28에 기재된 방법에 따라 생산되는 비인간 포유 동물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 일반적으로 TGF-β 신호 전달 독립적(TSI) 나이브형(naive) 유도 만능 줄기 세포(induced

[0001]

pluripotent stem cell)에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 설치류의 연구는 다능성 줄기 세포(pluripotent stem cell, PSC)가 2개의 뚜렷하고 안정적인 다능 상태: 나이브형 및 프라임드형(primed) 다능 상태로 분류될 수 있는 것을 나타냈다(Nichols 등, *Cell Stem Cell*, 4:487-492 (2009)). 나이브 상태는 착상전 마우스 배반포 배아의 내세포괴(inner cell mass, ICM)로부터 유래된 마우스 배아 줄기 세포(mESC)로 대표되고(Evans 등, *Nature*, 292:154-156 (1981); Brook 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:5709-5712 (1997)), 한편 프라임드 상태는 착상후 마우스 외배반으로부터 안정화된 마우스 외배반 줄기 세포(mEpiSC)에 상응한다(Tesar 등, *Nature*, 448:196-199 (2007); Brons 등, *Nature*, 448:191-195 (2007)). 또한, 나이브형 및 프라임드형 다능성 줄기 세포는 자기 재생을 지지하기 위해서 상이한 유전자 발현 프로파일 및 상이한 신호 전달 경로를 보유한다. 예를 들어, mESC는 LIF 신호 전달, 또는 세포의 조절 단백질 키나아제(ERK)와 글리코젠 합성 키나아제-3(GSK3)의 결합 억제를 필요로 하고, 한편 mEpiSC는 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF) 및 형질 전환 성장 인자-β(TGF-β) 신호 전달에 의존한다(Tesar 등, *Nature*, 448:196-199 (2007); Ying 등, *Nature*, 453:519-523 (2008)). 게다가, 암컷의 mESC는 활성 X 염색체 상태를 유지하지만, 암컷의 mEpiSC는 X 불활성 상태로 유지된다. 또한, 프라임드형 PSC는 증식 속도가 느린 평평해진 콜로니를 형성하고, 단일 세포 계대 배양(passaging)을 처리하기 힘든 한편, 나이브형 PSC는 빠르게 성장하고, 단일 세포 계대 배양을 통해 번식될 수 있다(Nichols, *Cell Stem Cell*, 4:487-49 (2009)). 가장 중요하게는, 프라임드형 다능성 줄기 세포와는 대조적으로, 나이브형 PSC는 시험관내에서 마킹되지 않은 계통 구축 바이어를 가지며, 체내에서 고등급 키메라를 갖는 초기 배반포의 ICM으로 재증식시킬 수 있고(Bradley 등, *Nature*, 309:255-256 (1984); Nichols, *Cell Stem Cell*, 4:487-49 (2009)), 키메라 동물 모델을 만드는데 중요한 나이브형 PSC를 만들 수 있고, 포유류 유전자 기능 및 초기 발달을 연구할 수 있다.

[0003] 뚜렷한 나이브형 및 프라임드형 다능 상태는 설치류에서 잘 안정화되었지만, 인간 및 원숭이의 ESC 및 유도 만능 줄기 세포(iPSC) 등의 종래의 영장류 PSC는 유전자 발현 프로파일, 증식에 요구되는 신호 전달 경로, 및 단일 세포 계대 배양에 대한 불내성의 측면에서는 착상후 마우스 EpiSC와 더 유사하다(Thomson 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:7844-7848 (1995); Thomson 등, *Science*, 282:1145-1147 (1998); Takahashi 등, *Cell*, 131:861-872 (2007); Yu 등, *Science*, 318:1917-1920 (2007); Liu 등, *Cell Stem Cell*, 3:587-590 (2008)). 따라서, 영장류의 나이브형 다능 상태가 안정화될 수 있는지 여부와 그 방법이 중요한 질문으로 남아있다. 최근의 연구에서는 프라임드형 PSC의 전환 또는 LRH-1 및 RARG의 이소성 발현 또는 소분자의 사용과 같은 체세포의 직접적인 리프로그래밍에 의해 시험관내에서 나이브형 인간 PSC를 유도하는 것이 보고되어 있다(Smaghe 등, *PLoS One*, 8:e58601 (2013); Li 등, *Cell Stem Cell*, 4:16-19 (2009); Buecker 등, *Cell Stem Cell*, 6:535-546 (2010); Hanna 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107:9222-9227 (2010); Wang 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:18283-18288 (2011)). 그럼에도 불구하고, 설치류의 나이브형 PSC 특성의 완전한 세트의 부재는 영장류에서의 안정적인 나이브형 다능 상태의 필요성을 나타낸다. 가장 최근, 몇몇 보고서는 시험관내에서 뚜렷하고 안정적인 외인성 독립적 인간 나이브형 다능 상태를 안정화했다(Gafni 등, *Nature*, 504:282-286 (2013); Chan 등, *Cell Stem Cell*, 13:663-675 (2013); Ware 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111:4484-4489 (2014); Theunissen 등, *Cell Stem Cell*, 15(4):471-87 (2014)). 또한, 일부 연구에서는 TGFβ와 같은 고가의 성장 인자를 포함하는 세포 배양에 있어서 유지될 수 있는 다능성 줄기 세포를 확인했다. 인간 나이브형 PSC의 유도에서는 마우스와는 상이한 신호 전달 경로를 필요로 하기 때문에, 시험관내에서 비인간 영장류, 예를 들어 붉은털 원숭이로부터의 나이브형 PSC, 또는 일부 성장 인자에 대한 요구를 제거하는 방법을 사용한 나이브형 PSC를 생성하는 방법이 여전히 요구되고 있다.

[0004] 따라서, 본 발명의 목적은 형질 전환 성장 인자 신호 전달 독립적(TSI) 나이브형 유도 만능 줄기 세포를 제공하는 것이다.

[0005] 또한, 본 발명의 목적은 비나이브형 PSC를 TSI 나이브형 유도 만능 줄기 세포로 전환하는 방법을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 나이브 상태의 TSI 나이브형 유도 만능 줄기 세포를 유지하는 방법을 제공하는 것이다.

**발명의 내용**

[0007] 비나이브형 다능성 줄기 세포를 나이브형 다능성 줄기 세포로 전환/리프로그래밍하는데 사용할 수 있는 인자/화합물의 혼합제, 이하 혼합제가 확인되었다. 혼합제는, 나이브 상태로 화학적으로 유도된 TGF-β 신호 전달 독립적

(TSI) 나이브형 다능성 줄기 세포(즉, TSI 나이브형 PSC)를 생성하고, 나이브 상태로 그렇게 생성된 세포를 유지하는데 사용된다. 화합물의 혼합제는 비나이브형 PSC를 TSI 나이브형 PSC로 결합하여 리프로그래밍하는 유효량의 본 명세서의 하기 화합물(나이브형 다능성의 화학적 유도 물질(CINP))을 들 수 있다: (1) 시토키인; (2) 글리코젠 합성 키나아제(GSK) 억제제; (3) ERK 1/2 억제제; (4) c-Jun N 말단 키나아제/스트레스 활성화 단백질 키나아제(JNK/MAPK) 억제제; (5) 염기성 섬유아세포 성장 인자; 및 (6) p38 미토겐 활성화 단백질 키나아제 억제제. 바람직한 실시형태에 있어서, 시토키인은 백혈병 억제 인자(LIF)("L)이고; GSK 억제제는 화학명 [6-[[2-[[4-(2,4-디클로로페닐)-5-(5-메틸-1H-이미다졸-2-일)-2-피리미디닐]아미노]에틸]아미노]-3-피리딘카르보닐]의 아미노피리미딘, CHIR99021("C")이고; ERK 1/2 억제제는 PD0325901이고; JNK 억제제는 SP600125(안트라[1-9-*cd*]피라졸-6(2*H*)-온)이고; p38 억제제는 SB203580(4-[5-(4-플루오로페닐)-2-[4-(메틸술폰닐)페닐]-1*H*-이미다졸-4-일]피리딘)이다. 이 유효량의 화합물의 혼합제는 비나이브형 다능성 줄기 세포를 TSI 나이브형 PSC로 리프로그래밍하는데 사용할 수 있다.

[0008] 또한, 본 명세서에 개시된 화합물의 혼합제를 사용하여 공여 세포를 리프로그래밍함으로써 비나이브형 PSC를 나이브형 PSC로 유도/리프로그래밍하는 방법을 제공한다. 리프로그래밍되는 세포(즉, 공여 세포)는 세포를 TSI 나이브형 PSC로 리프로그래밍하는데 충분한 시간 동안 혼합제와 접촉된다. 공여 세포가 다능성 줄기 세포가 아닌 일부 실시형태에 있어서, 공여 세포는 우선 프라임드형 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로 전환된다. 이 실시형태에 있어서, 프라임드형 iPSC는 4 내지 14일, 바람직하게는 7 내지 10일 동안 본 명세서에 개시된 화합물의 혼합제 중에서 최초로 배양된다. 바람직한 실시형태에 있어서, 세포 배양 배지는 PKC 억제제, ROCK 억제제, TGFβ, NOTCH 억제제, TGFβ 억제제 또는 FGFR 억제제를 포함하지 않는다. 보다 바람직하게는, 화합물의 혼합제는 TGFβ를 포함하지 않는다. TSI 나이브형 PSC는 화합물의 혼합제를 생성하는데 사용되는 동일한 화합물의 혼합제로 보충되는 다능성 줄기 세포 배양 배지에서 나이브 상태로 분리 및 유지된다.

[0009] 또한, TSI 나이브형 PSC가 제공된다. TSI 나이브형 PSC는 적어도 TGFβ1 신호 전달과는 별도로 다능성을 유지할 수 있기 때문에 확인되었다. 본 명세서에 개시된 화합물의 혼합제와 접촉된 비나이브형 리프로그래밍된 PSC 세포는: (i) 형태학적으로(배양에 있어서 돔 형상 콜로니의 형성에 기초), (ii) 기능적으로, 이하의 특징들: (a) TGFβ1과는 별도로 다능성의 유지(TGFβ1 수용체 억제제의 존재하의 대조군에 비해 TRA-1-81-양성 세포의 비율의 배수 변화에 의해 측정); (b) 3개의 배아층의 조직으로 분화하는 세포의 능력; (c) PRDM14, KLF5, ZFP42 (REX1), LIFR, TBX3, 및 NANOG와 같은 하나 이상의 나이브 상태 관련 전사물의 상향 조절된 발현; (d) TRA-1-60, TRA-1-81, 및 SSEA-4와 같은 다능성에 대한 하나 이상의 마커의 상향 조절된 발현; (e) SSEA-1과 같은 다능성에 대한 하나 이상의 마커의 하향 조절; (f) 체내에서 이종간 키메라를 형성하는 능력을 포함하는 성질에 기초한 TSI 나이브형 PSC로서 확인된다. TSI 나이브형 PSC는, 미처리 세포와 비교할 경우, 상기 성질 중 적어도 하나, 바람직하게는 2개, 3개, 4개 또는 모두를 갖는 점에서, 본 명세서에 개시된 혼합제에 노출되지 않은 세포와는 상이하다. 상향 조절 또는 하향 조절은 TSI 나이브형 PSC가 얻어진 상용 세포 중에서 측정된 인자의 레벨을 비교함으로써 결정된다.

[0010] 본 명세서에 개시된 TSI 나이브형 PSC는 적어도 이들을 생성하기 위해 사용된 방법, 즉 그 기원에 의해 인간 또는 마우스 ESC 또는 iPSC와 구별될 수 있다. 예를 들어, ESC가 자연 발생 세포인 경우, 반면 TSI 나이브형 PSC는 본 명세서에 기재된 바와 같이 비나이브형 PSC를 소분자의 결합에 의해 처리함으로써 얻어지는 경우에, 자연 발생적이 아니다(상응하는 자연 발생 ESC에서 발견되지 않는 특성의 소유에 의해 입증된 바와 같음).

[0011] TSI 나이브형 PSC는 배양 또는 유도되어 원하는 유형의 세포로 분화할 수 있다. TSI 나이브형 PSC 및 그 자손은 수많은 응용 분야에서 사용할 수 있으며, 세포 치료, 동물 모델 및 조직 공학을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

**도면의 간단한 설명**

[0012] 도 1a는 플레이팅 후 8일 동안 시험 신호 전달 조절자로 기초 전환 조건 하에서 확장된 나이브형 iPSC에 대한 콜로니수를 나타내는 막대 그래프이다. 다능성의 유지는 총 콜로니 중 TBX3 및 TRA-1-81 이중 양성 콜로니의 비율에 의해 측정되었다. 음성 대조군: 2i/LIF(백혈병 억제 인자) + bFGF(n = 3개의 웰). 모든 값은 3개의 웰의 반복으로부터의 평균값 ± SEM이다. 도 1b 및 도 1c는 플레이팅 후 5일 동안 시험 신호 전달 조절자로 기초 전환 조건 하에서 확장된 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC에 대한 콜로니수를 나타낸다. 다능성의 유지는 총 콜로니 중 TBX3 또는 TRA-1-81- 단일 양성 콜로니의 비율에 의해 측정되었다. 음성 대조군: 2i/LIF + bFGF. 모든 값은 3개의 웰의 반복으로부터의 평균값 ± s.e.m이다.

도 2a는 안정화된 프라임드형 iPSC계의 계놈으로 통합된 에피소말 벡터의 손실의 정량적 RT-PCR 분석을 나타낸

다. Fibro-D6: 에피소말 백터의 감염 후 6일 동안의 섬유아세포; EViPS-1, 2: 에피소말 백터계에 의해 안정화된 2개의 프라임드형 iPSC계. 모든 값은 3개의 독립적인 실험으로부터의 평균값  $\pm$  s.e.m이다. 도 2b는 나이브형 iPSC(DRN-1, DRN-2, DRN-3), 암컷 나이브형 iPSC(FN-1, FN-2, FN-3) 및 에피소말 유도 나이브형 iPSC(EVN-1, EVN-2, EVN-3)로 직접 전환되는 붉은털 원숭이에 있어서 다능성 마커 유전자 발현의 RT-PCR 분석을 나타낸다 (ES-7.5: 붉은털 원숭이 ES계). 도 2c는 프라임드형 iPSC 및 나이브형 iPSC의 단일 세포 계대 배양 후의 콜로니 재형성을 나타낸다. 다능성 유지는 계대 배양 후 5일째에 TRA-1-81-양성 콜로니수에 의해 측정했다( $n = 3$ 개의 웰).  $p < 0.0001$ (스튜던트의 t-검정). 모든 값은 3개의 웰의 반복으로부터의 평균값  $\pm$  SEM이다. 도 2d는 나이브형 iPSC의 다능성 유전자 발현의 RT-PCR 분석을 나타낸다(N1, N2, N3: 3개의 독립적으로 안정화된 나이브형 iPSC계; ES-7.5: 붉은털 원숭이의 ESC계).

도 3a 및 도 3b는 최적화된 전환 조건 하에서 확장된 나이브형 iPSC에 대한 TRA-1-81+뚝 형상 콜로니수의 배수 변화를 나타낸다(도 3a). 프라임드형 iPSC는 hESC 배지에서 확장되었다(도 3b). 시험된 신호 전달 조절자는 다음과 같다: 1mM JAK 억제제, 10mM SB431542(TGF  $\beta$ R 억제제), 2ng/ml TGF- $\beta$ 1, 및 2mM SU5402(FGFR 억제제). 다능성 유지는 대조군(나이브형 iPSC에 대해 최적화된 전환 조건)에 대한 TRA-1-81-양성 뚝 형상 콜로니 또는 대조군(프라임드형 iPSC를 위한 hESC 배지)에 대한 TRA-1-81-양성 콜로니의 비율의 배수 변화에 의해 측정되었다. 상이한 컬럼은 개개의 세포계를 나타낸다( $n = 3$ 개의 상이한 웰). N1, N2, N3: 3개의 나이브형 iPSC계; P1, P2, P3: 3개의 프라임드형 iPSC계. 모든 값은 3개의 웰의 반복으로부터의 평균값  $\pm$  SEM이다. 도 3c는 최적화된 전환 조건 하에서 확장된 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC에 대한 TRA-1-81+콜로니수의 배수 변화를 나타낸다(2i/LIF+bFGF+SP600125+SB203580). Ly294002의 상이한 농도를 5일 동안 나타낸 바와 같이 시험했다. 다능성 유지는 TRA-1-81 양성 뚝 형상 콜로니수에 의해 측정했다. 모든 값은 3개의 웰의 반복으로부터의 평균값  $\pm$  s.e.m이다. 도 3d는 최적화된 전환 조건 하에서 확장된 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC에 대한 TRA-1-81+콜로니수의 배수 변화를 나타낸다(2i/LIF+bFGF+SP600125+SB203580). 또한, 2ng/ml TGF- $\beta$ 1 단독 및 10  $\mu$ M SB431542(TGF- $\beta$ R 억제제)를 갖는 2ng/ml TGF- $\beta$ 1을 시험했다. 다능성 유지는 대조군(2i/LIF+bFGF+SP600125+SB203580)에 대한 2ng/ml TGF- $\beta$ 1 양성 뚝 형상 콜로니의 배수 변화에 의해 측정했다. 모든 값은 3개의 웰의 반복으로부터의 평균값  $\pm$  s.e.m이다. 도 3e는 XIST 발현의 qPCR 및 RT-PCR 분석을 나타낸다(FN-1 및 FN-2: 암컷의 나이브형 iPSC계; FP-1 및 FP-2: 암컷의 프라임드형 iPSC계; FF-1 및 FF-2: 암컷의 섬유아세포계; N1: 수컷의 나이브형 iPSC계; MF: 수컷의 섬유아세포계). RT-PCR의 결과는 프라임드형 iPSC에 있어서 XIST의 평균 발현 레벨에 비례하여 나타내어진다(암컷 #1 및 #2: 2개의 암컷 세포원; N: 나이브형; P: 프라임드형; F: 섬유아세포). 모든 값은 3개의 독립적인 실험으로부터의 평균값  $\pm$  SEM이다. 도 3f는 계층적 클러스터링을 사용한, 프라임드형(P1, P2) 및 나이브형 iPSC(N1, N2, FN-1, FN-2)의 전체 게놈 발현 프로파일(RNA-seq)에 대해 행해진 클러스터링을 나타낸다. 도 3g는 원숭이의 나이브형 및 프라임드형 iPSC 사이의 상향 및 하향 조절된 신호 전달 경로 관련 유전자 카테고리를 나타내는 유전자 온톨로지(GO) 분석을 나타낸다. 도 3h 내지 도 3j는 나이브형 및 프라임드형 iPSC에 있어서의 전형적인 다능성 및 계통 특이적 마커 유전자 발현의 정량적 PCR 검증을 나타낸다. 모든 값은 3개의 독립적인 실험으로부터의 평균값  $\pm$  SD이다.  $p < 0.0001$ (스튜던트의 t-검정).

도 4a 및 도 4b는 레트로 바이러스 유도(OK-1, OK-2, OK-3) 및 에피소말 백터 유도(EV-1, EV-2, EV-3) 붉은털 원숭이 프라임드형 iPSC에 있어서의 다능성 마커 유전자 발현의 RT-PCR 분석을 나타낸다. "엔도"는 내재성 유전자 발현을 나타낸다. 도 4c는 모든 외인성 전사 인자 유전자의 발현의 정량적 RT-PCR 분석을 나타내는 막대 그래프이다. 모든 값은 3개의 독립적인 실험으로부터의 평균값  $\pm$  s.e.m이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

#### I. 정의

[0014]

본 명세서에서 사용되는 용어 "화학적 유도 만능 줄기 세포"(ciPSC)란 하나 이상의 세포 감염된 유전자의 발현에 의해서가 아니라, 비다능성 세포를 화학물과 접촉시킴으로써, 다능성이 아닌 세포, 즉 다분화성 또는 분화된 세포로부터 유래된 다능성 세포를 나타낸다.

[0015]

본 명세서에서 사용되는 "2i"는 글리코젠 합성 키나아제-3 및 미토겐 활성화 단백질 키나아제 신호 전달의 이중 억제제를 갖는 ESC 배양 배지, 예를 들어 2i로 보충된 ESC 배양 배지를 나타낸다(CHIR99021 및 PD0325901).

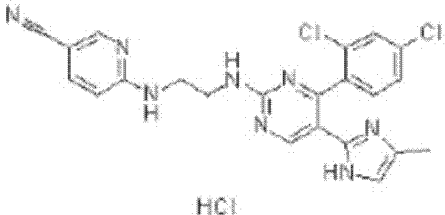
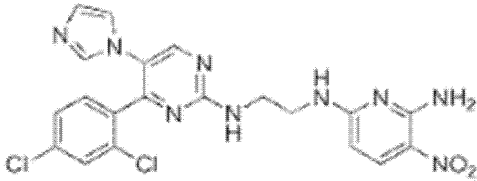
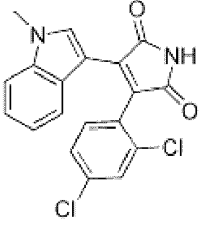
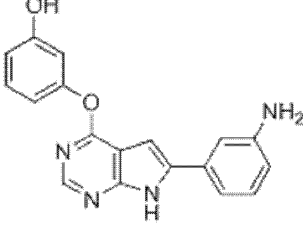
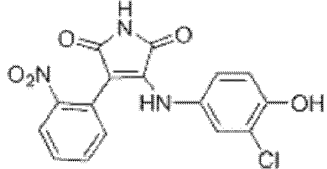
[0016]

본 명세서에서 사용되는 용어 "유도 만능 줄기 세포"(iPSC)는 비다능성 세포로부터 인위적으로 유도된 다능성 줄기 세포의 한 유형이다. CiPSC는 iPSC이며; 그러나, 그것들은 다능성을 부여하기 위해 유전자 공학에 의해 생성된 것이 아니라는 점에서 일부 iPSC와는 상이하다.

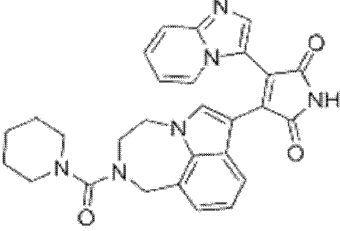
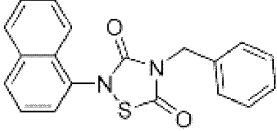
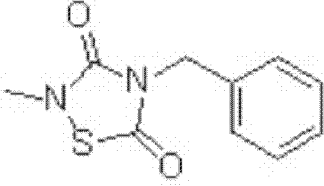
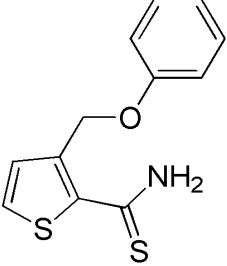
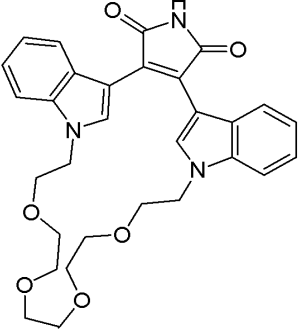
- [0017] TSI 나이브형 PSC를 나타낼 때의 용어 "분리된" 또는 "정제된"이란, 나이브형 다능성 세포가 아닌 오염 세포 유형이 적어도 10%, 20% 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 없는, 화학적으로 나이브 유도된 나이브형 다능성 줄기 세포를 나타낸다. 분리된 TSI 나이브형 PSC는 또한 용해성 자연 발생 분자가 실질적으로 없을 수도 있다.
- [0018] 본 명세서에서 사용되는 "배지" 및 "배양 배지"란 세포 배양 환경을 나타낸다. 배지는 전형적으로는 등장액이며, 액체, 젤상, 또는 반고체일 수 있고, 예를 들어 세포 접착 또는 지지를 위한 매트릭스를 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 배지는 세포를 배양하는데 필요한 영양적, 화학적, 및 구조적 지지를 위한 구성 요소를 포함할 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 "다능성"(pluripotency 또는 pluripotent)이란 3개의 배엽층: 내배엽(예를 들어, 위장 내부층, 위장관, 폐), 중배엽(예를 들어, 근육, 뼈, 혈액, 비뇨 생식기), 또는 외배엽(예를 들어, 표피 조직 및 신경계) 중 어느 하나로 분화할 가능성을 갖는 줄기 세포를 나타낸다. 다분화능 줄기 세포는 플라스틱이 적고, 보다 차별화되며, 특정 기관 내의 몇몇 유형의 세포 중 하나가 될 수 있다. 예를 들어, 다분화능 혈액 줄기 세포는 적혈구 전구 세포, 백혈구 또는 혈소판 생성 세포로 발전할 수 있다. 성체 줄기 세포는 다분화능 줄기 세포이다. 지방 유래 줄기 세포는 다분화능이다.
- [0020] 본 명세서에서 "다능성 세포"는 "다능성 줄기 세포"와 상호 교환적으로 사용된다.
- [0021] 용어 "소분자"는 2,000달톤 미만, 보다 바람직하게는 1,500달톤 미만, 가장 바람직하게는 1,000달톤 미만의 분자량을 갖는 유기 또는 유기 금속 화합물과 같은 분자를 나타낸다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "TGFβ 신호 전달 독립적(TSI) 나이브형 PSC"는 본 명세서에 개시된 화합물의 혼합제 중에서 비나이브형 PSC 세포를 배양함으로써 "나이브형" PSC가 되는 특징이 인위적으로 비나이브형 PSC(공여 세포)에 부여되고, 나이브형 PSC로의 전환/리프로그래밍이 TGFβ 신호 전달과 독립적인, PSC를 나타낸다. 공여 세포는 다능성을 유지하는 능력이 TGFβ 신호 전달 의존성인 비PSC 및 PSC를 포함한다. TGFβ 신호 전달 독립성은 TGFβ1과 독립적인, 적어도 5일 동안 배양될 때에 다능성을 유지하기 위한 나이브형 PSC의 능력에 의해 결정된다(TGFβ1 수용체 억제제의 존재 하에서 대조군에 대한 TRA-1-81-양성 세포의 비율의 배수 변화에 의해 측정). 나이브형 PSC의 TGFβ 신호 전달 독립성을 결정하는 일례는 하기에서 논의되는 바와 같이 "세포 배양" 하에서 제공된다.
- [0023] **II. 조성물**
- [0024] 비나이브형 다능성 줄기 세포를 TGF-β 신호 전달 독립적(TSI) 나이브형 PSC로 전환하기 위한 화합물의 혼합제는 비나이브형 PSC를 TGF-β 신호 전달 독립적(TSI) 나이브형 PSC로 전환하고, 배양에 있어서 나이브 상태로 세포를 유지하기 위한 유효량의 본 명세서에 개시된 화합물을 포함한다. 화합물의 혼합제는 바람직하게는 PKC 억제제, ROCK 억제제, TGFβ, NOTCH 억제제, TGFβ 억제제 또는 FGFR 억제제를 포함하지 않는다. 보다 바람직하게는, 화합물의 혼합제는 TGFβ를 포함하지 않는다.
- [0025] 본 명세서에 개시된 조성물은 또한 분리된 TGF-β 신호 전달 독립적(TSI) 나이브형 PSC를 포함한다.
- [0026] **A. 비나이브형 PSC를 TGF-β 신호 전달 독립적(TSI) 나이브형 PSC로 리프로그래밍하기 위한 화합물의 혼합제**
- [0027] 화합물의 혼합제로는 시토카인, 소분자 및 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF) 등의 단백질 인자를 들 수 있다. 가장 바람직한 혼합제로는 4ng/ml bFGF, 10ng/ml 인간 LIF, CHIR99021(3μM) 및 PD0325901(0.5μM), 및 SP600125(10μM) 및 SB203580(10μM)을 들 수 있다.
- [0028] 1. 시토카인
- [0029] 바람직한 시토카인은 1 내지 100ng/ml, 바람직하게는 1 내지 50 및 보다 바람직하게는 1 내지 30ng/ml 범위의 농도로 사용되는, 인터류킨 6 클래스 시토카인인 인간 백혈병 억제 인자(LIF)("L")이다. IL-6는 IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, 백혈병 억제 인자, 온코스타틴 M, 카디오토로핀-1, 뉴로포이에틴(neuropoietin) 및 카디오토로핀 유사 시토카인 인자 1(신규 뉴로트로핀 1 및 B 세포 자극 인자-3이라고도 알려짐), 및 IL-6의 2개의 바이러스 유사체를 포함하는 구조적으로 관련된 시토카인의 그룹인 뉴로포이에틴의 설립 멤버인 원형(prototypical)의 4-나선형 번들 시토카인이다. 이들 시토카인의 인터류킨 6 계열의 멤버는 LIF에 대해 개시된 동등한 농도로, 본 명세서에 개시된 조성물에서 사용될 수 있다.
- [0030] 2. 소분자

- [0031] 본 명세서에 개시된 화학적 혼합제로는 2,000달톤 미만, 보다 바람직하게는 1,500달톤 미만, 가장 바람직하게는 1,000달톤 미만의 분자량을 갖는 유효량의 소분자 단독 또는 단백질과의 조합을 들 수 있다. 소분자는 900달톤 이하 또는 500달톤 이하의 분자량을 가질 수도 있다. 보다 큰 분자는 화학적으로 유도된 리프로그래밍, 바람직하게는 본 명세서에서 인정된 소분자와 동일한 경로를 목적으로 하는데 사용될 수 있다.
- [0032] (i) ERK 1/2 억제제
- [0033] 바람직한 ERK 1/2 억제제는 0.1 내지 5 μM, 바람직하게는 0.5와 3 사이, 및 보다 바람직하게는 1.5와 1 μM 사이 범위의 농도의 PD0325901(*N*-[(2*R*)-2,3-디히드록시프로폭시]-3,4-디플루오로-2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]-벤즈아미드)이다. 예를 들어, 혼합제로는 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 μM의 농도의 PD0325901을 들 수 있다. 그러나, 다른 유용한 억제제로는 PD198306(*N*-(시클로프로필메톡시)-3,4,5-트리플루오로-2-[(4-요오도-2-메틸페닐)아미노]-벤즈아미드); SL 327(α-[아미노[(4-아미노페닐)티오]메틸렌]-2-(트리플루오로메틸)벤젠아세트나이트릴); 및 U0126(1,4-디아미노-2,3-디시아노-1,4-비스[2-아미노페닐티오]부타디엔)을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0034] (ii) GSK 억제제
- [0035] GSK 억제제는 바람직하게는 GSK3를 억제하고, 바람직하게는 GSK3에 대해 선택적이다. 적합한 GSK 억제제는 글리코젠 합성 키나아제 3 억제제인 아미노피리미딘, CHIR99021이다. C1NP 조성물로는 0.01 내지 20 μM, 바람직하게는 1과 3 사이, 및 보다 바람직하게는 1.5와 3 μM 사이 농도의 CHIR99021을 들 수 있다. 예를 들어, C1NP로는 0.01, 0.05, 0.1, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 10, 20 μM 농도의 CHIR99021을 들 수 있다. 당업자가 필요로 하는 유효량을 용이하게 미세 조정할 수 있기 때문에 이들 수치 사이에 속하는 농도가 고려된다.
- [0036] 그러나, 다른 GSK 억제제는 상업적으로 입수 가능하며, 본 명세서에 개시된 조성물에 사용될 수 있다. 예로는 BIO-아세톡심; GSK 3I 억제제 XV; SB-216763; CHIR99021의 히드로클로라이드염인 CHIR99021 트리히드로클로라이드; GSK-3 억제제 IX[(2*Z*, 3*E*)-6'-브로모-3-(히드록시이미노)-[2,3'-비인돌리닐리덴]-2'-온]; GSK 3 IX[6-브로모인디루빈-3'-옥심]; GSK-3β 억제제 XII[3-[[6-(3-아미노페닐)-7H-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일]옥시]페놀]; GSK-3 억제제 XVI[6-(2-(4-(2,4-디클로로페닐)-5-(4-메틸-1*H*-이미다졸-2-일)-피리미딘-2-일)아미노)에틸-아미노]-니코티노나이트릴]; SB-415286[3-[(3-클로로-4-히드록시페닐)아미노]-4-(2-니트로페닐)-1*H*-피롤-2,5-디온]; 및 Bio[(2'*Z*,3'*E*)-6-브로모인디루빈-3'-옥심]을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 비나이브형 세포를 TSI 나이브형 PSC로 리프로그래밍하기 위한 혼합제에 포함될 수 있는 유용한 화합물의 제한되지 않는 리스트를, 그 구조를 포함하여 표 1에 제공한다.
- [0038] [표 1]

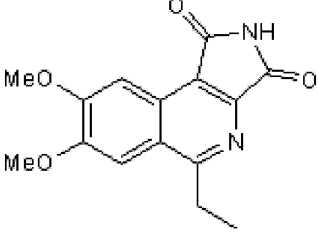
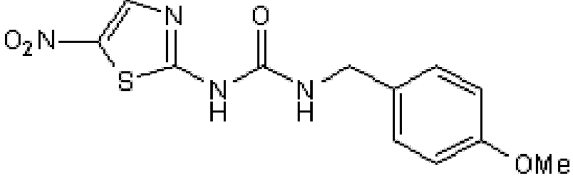
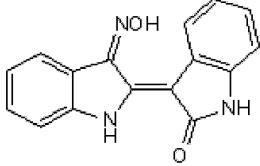
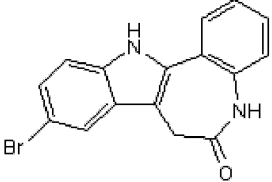
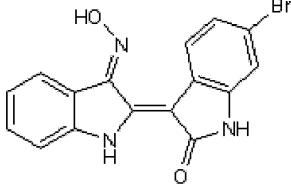
[0039] 유용한 화합물

|                  |  |
|------------------|--|
| <p>CHIR99021</p> |  <p>HCl</p> |
| <p>CHIR98014</p> |             |
| <p>SB216763</p>  |             |
| <p>TWS119</p>    |           |
| <p>SB415286</p>  |           |

[0040]

|                  |   |
|------------------|---|
| <p>LY2090314</p> |    |
| <p>티데글루십</p>     |    |
| <p>TDZD-8</p>    |    |
| <p>CBM1078</p>   |   |
| <p>TD114-2</p>   |  |

[0041]

|                     |  |
|---------------------|--|
| 3F8                 |   |
| AR-A 014418         |   |
| FRATide             | <p>Ser-Gln-Pro-Glu-Thr-Arg-Thr-Gly-Asp-Asp-Asp-Pro-His-Arg-Leu-Leu-Gln-Gln-Leu-Val-Leu-Ser-Gly-Asn-Leu-Ile-Lys-Glu-Ala-Val-Arg-Arg-Leu-His-Ser-Arg-Arg-Leu-Gln</p> |
| 인디루빈-3'-옥심          |   |
| L803                | <p>Lys-Glu-Ala-Pro-Pro-Ala-Pro-Pro-Gln-pSer-Pro</p>  |
| 켄 파울론 (Kenpaullone) |   |
| BIO                 |   |

[0042]

[0043]

(iii) JNK 억제제

[0044]

바람직한 JNK 억제제는 1과 100 μM 사이, 바람직하게는 1 내지 50 및 보다 바람직하게는 1 내지 30 μM 사이 농도의 SP600125(안트라[1-9-*cd*]피라졸-6(2*H*)-온)이다. 예를 들어, 조성물의 혼합제로는 5, 10, 15, 20, 25 또는 30 μM SP600125를 들 수 있다. 당업자가 필요로 하는 유효량을 용이하게 미세 조정할 수 있기 때문에 이들 수치 사이에 속하는 농도가 고려된다.

[0045]

다른 유용한 JNK 억제제로는 BI 78D3(4-(2,3-디히드로-1,4-벤조디옥신-6-일)-2,4-디히드로-5-[(5-니트로-2-티아졸릴)티오]-3*H*-1,2,4-트리아졸-3-온); CEP 1347((9*S*,10*R*,12*R*)-5-16-비스[(에틸티오)메틸]-2,3,9,10,11,12-헥사히드로-10-히드록시-9-메틸-1-옥소-9,12-에폭시-1*H*-디인돌로[1,2,3-*fg*:3',2',1'-*kl*]피롤로[3,4-*i*][1,6]벤조디아조신-10-카르복실산 메틸에스테르); 및 SU 3327(-[(5-니트로-2-티아졸릴)티오]-1,3,4-티아디아졸-2-아민); AEG 3482(6-페닐이미다조[2,1-*b*]-1,3,4-티아디아졸-2-술폰아미드)를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0046]

(iv) p38 MAPK 억제제

[0047]

바람직한 p38 MAPK 억제제는 1과 100 μM 사이, 바람직하게는 1 내지 50 μM 및 보다 바람직하게는 1 내지 30 μM 범위의 농도로 사용되는 SB203580(4-[5-(4-플루오로페닐)-2-[4-(메틸술폰닐)페닐]-1*H*-이미다졸-4-일]피리딘)이

다. 예를 들어, 조성물의 혼합제로는 5, 10, 15, 20, 25 또는 30  $\mu\text{M}$  SB203580을 들 수 있다. 다른 유용한 p38 MAPK 억제제로는 SB 203580 히드로클로라이드(4-[5-(4-플루오로페닐)-2-[4-(메틸술폰닐)페닐]-1H-이미다졸-4-일]피리딘히드로클로라이드); SB202190(4-[4-(4-플루오로페닐)-5-(4-피리디닐)-1H-이미다졸-2-일]페놀); DBM 1285 디히드로클로라이드(*N*-시클로프로필-4-[4-(4-플루오로페닐)-2-(4-피페리디닐)-5-티아졸릴]-2-피리미딘아민 디히드로클로라이드); SB 239063(트렌스-4-[4-(4-플루오로페닐)-5-(2-메톡시-4-피리미디닐)-1H-이미다졸-1-일]시클로헥사놀); SKF 86002 디히드로클로라이드(6-(4-플루오로페닐)-2,3-디히드로-5-(4-피리디닐)이미다조[2,1-*b*]티아졸 디히드로클로라이드)를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0048] **3. 단백질 인자**

[0049] 재조합 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)와 같은 단백질 인자는 비나이브형 PSC를 TSI 나이브형 PSC로 전환하기 위한 프로토콜에서 효과적인 것이 입증되었다. bFGF는 10ng/mL 내지 200ng/mL의 농도 범위, 바람직하게는 10ng/mL의 농도에서 사용될 수 있다. 사용할 수 있는 다른 인자로는 FGF1-18을 들 수 있다.

[0050] **B. 유도되는 세포(공여 세포)**

[0051] TSI 나이브형 PSC는 다능성 세포, 또는 일부 실시형태에서 원숭이, 예를 들어 붉은털 원숭이, 침팬지, 고릴라, 개코 원숭이와 같은 비인간 영장류로부터 얻어지는 부분적으로 또는 완전히 분화된 세포를 유도/리프로그래밍함으로써 얻어진다. 그러나, 다른 실시형태에 있어서, 유도/리프로그래밍되는 세포는 인간으로부터 얻어진다. 출처로는 골수, 섬유아세포, 태아 조직(예를 들어, 태아 간 조직), 말초 혈액, 제대혈, 채장, 피부 또는 임의의 기관 또는 조직을 들 수 있다.

[0052] 바람직한 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC는 다능성 세포, 예를 들어 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로부터 얻어진다. iPSC로는 유전자 공학 및/또는 순수 화학적 리프로그래밍에 의해 얻어지는 세포를 들 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC는 배반포로부터 얻어진다.

[0053] 바람직하게는, iPSC는 화학적으로 유도된 섬유아세포, 지방 유래 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 장표피로부터의 세포로부터 얻어진다. 일부 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC는 화학적으로 유도된 신생아(예를 들어 포피) 또는 성인 섬유아세포로부터 얻어진다. 그러나, iPSC는 다분화능 줄기 세포, 혈액학적 기원의 세포, 배아 기원의 세포, 피부 유래 세포, 섬유아세포, 지방 세포, 상피 세포, 내피 세포, 간엽 세포, 유조직 세포(parenchymal cell), 신경 세포, 및 결합 조직 세포를 포함하는 다른 세포 유형으로부터 얻을 수 있지만, 상기 세포들로 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 명세서에 개시된 방법에 사용할 수 있는 다능성 세포는 해당 분야에서 공지되어 있으며, 배양 시에 세포를 유지하는 방법을 포함하여 기재되어 있다.

[0055] 공여 세포는 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 세포 공급원으로 작용할 적절한 기관 또는 조직을 분해함으로써 분리될 수도 있다. 예를 들어, 조직 또는 기관은 기계적 분해 및/또는 이웃하는 세포 사이의 결합을 약화시키는 소화 효소 및/또는 킬레이트제로 처리될 수 있으므로, 조직을 분산시켜, 감지할 수 있는 세포 파괴 없이 개개의 세포의 현탁액을 형성할 수 있다. 효소 해리는 조직을 난작(mincing)하고, 난작된 조직을 트립신, 키모 트립신, 콜라게나아제, 엘라스타아제, 및/또는 히알루로니다아제, DNase, 프로나아제, 디파아제 등과 같은 하나 이상의 효소로 처리함으로써 달성할 수 있다. 또한, 기계적 파쇄는 다수의 방법에 의해 달성할 수 있으며, 그라인더, 블렌더, 체, 호모지나이저, 압력셀, 또는 초음파 입사기(insonator)의 사용을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0056] **C. TGF- $\beta$  신호 전달 독립적(TSI) 나이브형 PSC**

[0057] TSI 나이브형 PSC는 이하의 특징들: (a) TGF $\beta$  1과는 별도로 다능성 유지(TGF $\beta$  1의 존재하의 대조군에 대한 TRA-1-81-양성 세포의 비율의 배수 변화에 의해 측정); (b) 3개의 배아 배엽의 조직으로 분화하는 세포의 능력; (c) PRDM14, KLF5, ZFP42 (REX1), LIFR, TBX3, 및 NANOG와 같은 전사물과 관련된 하나 이상의 나이브 상태의 상향 조절된 발현; (d) TRA-1-60, TRA-1-81, 및 SSEA-4와 같은 다능성에 대한 하나 이상의 마커의 상향 조절된 발현; (e) SSEA-1 등의 다능성에 대한 하나 이상의 마커의 하향 조절; (f) 체내에서 이중간 키메라를 형성하는 능력에 기초하여 (i) 형태학적으로, (ii) 기능적으로 확인할 수 있다.

[0058] TSI 나이브형 PSC는 돔 형상 콜로니를 형성한다. 따라서, 본 명세서에 예시된 세포 배양에 따라 돔 형상 콜로니의 형성은 TSI 나이브형 PSC로 확인될 수 있다. TSI 나이브형 PSC는 당업계에 공지된 방법을 사용하여, 3개의

배엽층, 외배엽, 중배엽 및 내배엽 각각으로부터 하나 이상의 세포/조직으로 분화하는 능력을 갖는다.

[0059] 외배엽은 배아의 외부층을 생성하고, 배아의 표피에서 형성된다. 외배엽은 표면 외배엽, 신경능, 및 신경관으로 발달한다. 표면 외배엽은 표피, 모발, 손톱, 안구의 수정체, 피지선, 각막, 치아의 에나멜, 구강 및 비강의 상피로 발달한다. 외배엽의 신경능은: 말초 신경계, 부신수질, 멜라닌 세포, 얼굴 연골로 발달한다. 외배엽의 신경관은: 뇌, 척수, 뇌하수체 후엽, 운동 뉴런, 및 망막으로 발달한다.

[0060] 내배엽은 먼저 납작한 세포로 이루어지고, 이후에는 원주형이 된다. 그것은 구강과 인두의 일부 및 직장의 말단부(외배엽의 내포에 의해 선이 그어져 있음)를 제외한 전체 소화관의 상피계를 형성한다. 그것은 또한 간 및 췌장; 이관 및 고실의 상피; 기관, 기관지, 및 폐포; 방광 및 요도의 일부; 및 갑상선 및 가슴샘의 난포 내벽을 포함하여, 소화관으로 개방되는 모든 분비선의 내벽 세포를 형성한다. 내배엽은: 위, 대장, 간, 췌장, 방광, 기관의 상피부, 폐, 인두, 갑상선, 부갑상선, 및 창자를 형성한다.

[0061] 중배엽은 결합 조직, 근육(매끄럽고 가로무늬), 림프계, 뼈, 장막, 연골, 지방 조직, 순환계, 진피, 비뇨 생식계, 및 척삭을 형성한다.

[0062] TSI 나이트브형 PSC는 TGFβ1과는 독립적으로 다능성을 유지하는 능력에 있어서, 미처리의 상응하는 시험관내 배양 세포 또는 다른 PSC와 추가적으로 구별될 수 있다(TGFβ1 수용체 억제제의 존재 하의 대조군에 대한 TRA-1-81-양성 세포의 비율의 배수 변화에 의해 측정). 예를 들어, 다른 PSC와는 대조적으로, TSI 나이트브형 PSC는 TGFβ1 수용체 억제제의 존재 하에서 배양 후 적어도 5일 동안 다능성을 유지할 수 있다. 나이트브형 PSC의 TGFβ 신호 전달 독립성을 결정하는 예는 "세포 배양"에서 제공된다. 간단히 말해, TSI 나이트브형 PSC는 최적화된 전환 배지에서서의 붉은털 원숭이의 나이트브형 iPSC 배양에 대해 개시된 바와 같이 배양된다. 최적화된 전환 배지는 TGFβ1 수용체 억제제로 보충될 수 있고, 보충된 배지의 TSI 나이트브형 PSC, TRA-1-81-양성 세포는 실시예에서 기재된 바와 같이 확인되고, TGFβ1 수용체 억제제의 보충 없이 유사하게 배양된 TSI 나이트브형 PSC와 비교된다. 나이트브형 세포는 50% 미만, 바람직하게는 40% 미만, 30%, 20%, 10%, 5% 또는 미만의 TRA-1-81-양성 세포의 감소에 기초하여 TSI 나이트브형 PSC로서 특징지어지고, 이 어세이에서 대조군과 비교할 경우, 즉 TRA-1-81-양성 세포의 감소가 2배를 넘는 경우, 나이트브형 PSC는 본 명세서에서 정의된 TSI 나이트브형 PSC로 특징지어지지 않는다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 미처리 대조군과의 비교 시에 처리 세포로부터 얻어진 콜로니에서의 확연한 분화 및 감소된 TRA-1-81 발현에 의해 측정된 바와 같이, TSI 나이트브형 PSC는 Rho-관련, 단백질 키나아제 함유 이중코일(ROCK), 예를 들어 Y27632[(+)-(R)-트랜스-4-(1-아미노에틸)-N-(4-피리딜)시클로헥산카복사미드++ + 디히드로클로라이드](10 μM) 및 단백질 키나아제 C(PKC) 억제제, 예를 들어 G06983[3-[1-[3-(디메틸아미노)프로필]-5-메톡시-1H-인돌-3-일]-4-(1H-인돌-3-일)-1H-피롤-2,5-디온](5 μM)의 선택적 억제제의 존재 하에서 다능성을 유지할 수 없는 점에서 다른 PSC와 구별될 수 있다.

[0063] **III. 제조 방법**

[0064] **A. 비PSC의 TSI 나이트브형 PSC로의 리프로그래밍**

[0065] TSI 나이트브형 PSC는 유도/리프로그래밍되는 세포(본 명세서에서는 공여 세포)를, 세포가 TSI 나이트브형 PSC로 리프로그래밍되는 것을 야기하기에 충분한 시간 동안, 본 명세서에 개시된 화합물의 혼합제를 함유하는 배지와 접촉시킴으로써 생성된다.

[0066] 공여 세포는 유효량의 본 명세서에 개시된 혼합제와 접촉되어 세포의 TSI 나이트브형 PSC로의 리프로그래밍을 유도 및/또는 향상시킨다. 당업자는 하기 실시예에서 개요를 서술하는 방법, 또는 기술분야의 공지된 다른 방법을 사용함으로써, 완전한 리프로그래밍을 제공하기 위해 요구되는 본 명세서에 개시된 화합물의 농도를 용이하게 결정할 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, 공여체는 다능성 줄기 세포, 예를 들어 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포(iPSCs)이다. iPSC로는 유전자 공학 및/또는 순수 화학적 리프로그래밍에 의해 얻어지는 세포를 들 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, TSI 나이트브형 PSC는 배반포로부터 얻어진다.

[0067] 공여 세포가 다능성 줄기 세포, 예를 들어 섬유아세포가 아닌 경우의 실시형태에 있어서, 공여 세포는 TSI 나이트브형 PSC로 리프로그래밍되기 전에 프라임드형 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로 전환될 수 있다. 대안적으로, 세포는 TSI 나이트브형 PSC로 직접 전환될 수 있다. 비다능성 줄기 세포를 유도 만능 줄기 세포로 전환하기 위한 방법은 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들면 Liu 등, *Cell Stem Cell*, 3:587-590 (2008); Zhao 등, *Cell Stem Cell*, 3:475-479 (2008), Okita 등, *Nat. Methods*, 8:409-412 (2011)에 기재되어 있다. iPSC는 다능성으로의 유도 후, TSI 나이트브형 PSC로의 리프로그래밍 전에 20일과 40일 사이, 바람직하게는 25일과 35일 사이의 기간 동안에 iPSC용 배지에서 유지된다(Liu 등, *Cell Stem Cell*, 3:587-590 (2008); Zhao 등, *Cell Stem Cell*, 3:475-

479 (2008), Okita 등, *Nat. Methods*, 8:409-412 (2011)). 예를 들어, Liu 등, *Cell Stem Cell*, 3:587-590 (2008)에 기재된 바와 같은, 리프로그래밍 인자(OCT4, KL4)를 함유하는 레트로바이러스 인자에 의한 섬유아세포의 형질 주입 후, 이렇게 생성된 iPSC는 2일마다 교체되는 배지를 갖는, 실시예에 기재된 소분자로 보충된 줄기 세포 배지에서 배양된다. iPSC 콜로니는 TSI 나이트형 PSC로 리프로그래밍하기 위해 20 내지 40일 정도, 바람직하게는 25 내지 35일 정도로 선택되고, iPSC를 위한 배양 조건의 배양 보조 세포 상에서 유지된다. iPSC를 TSI 나이트형 PSC로 리프로그래밍하기 위해, 프라임드형 iPSC는 4일과 14일 사이, 바람직하게는 7일과 10일 사이의 기간 동안에 본 명세서에 개시된 화합물의 혼합제 중에서 최초로 배양된다.

[0068] 비다능성 줄기 세포, 예를 들어 섬유아세포에 대한 TSI 나이트형 PSC로의 직접적인 전환을 위해, 예를 들어 Liu 등, *Cell Stem Cell*, 3:587-590 (2008)에 기재된 바와 같이 세포는 리프로그래밍 인자를 함유하는 레트로바이러스 벡터에 감염되고, 15일 내지 35일, 바람직하게는 15일과 20일 사이, 보다 바람직하게는 20일의 기간 동안 기본 배지(DF12, 20%KSR, 염기성 섬유아세포 성장 인자)에서 유지된다. 이어서 세포 배양 배지는 7일과 10일 사이의 기간 동안에, 비나이트형 PSC의 TSI 나이트형 PSC로의 리프로그래밍을 위한 인자의 혼합제를 함유하는 세포 배양 배지로 교환된다.

[0069] 바람직한 실시형태에 있어서, 세포의 TSI 나이트형 PSC로의 리프로그래밍을 위한 세포 배양 배지는 PKC 억제제, ROCK 억제제, TGFβ, NOTCH 억제제, TGFβ 억제제 또는 FGFR 억제제를 포함하지 않는다. 보다 바람직하게, 화합물의 혼합제는 TGFβ를 포함하지 않는다. TSI 나이트형 PSC는 분리되어, 그것들을 생성하는데 사용된 동일한 화합물의 혼합제를 포함하는 적합한 줄기 세포 배양 배지에서 나이트 상태로 유지된다.

[0070] 얻어지는 세포는 이하의 특징들: (a) TGFβ1과는 별도로 다능성 유지(TGFβ1 수용체 억제제의 존재하의 대조군에 대한 TRA-1-81-양성 세포의 비율의 배수 변화에 의해 측정); (b) 3개의 배아 배양의 조직으로 분화하는 세포의 능력; (c) PRDM14, KLF5, ZFP42(REX1), LIFR, TBX3, 및 NANOG와 같은 전사물과 관련된 하나 이상의 나이트 상태의 상향 조절된 발현; (d) TRA-1-60, TRA-1-81, 및 SSEA-4와 같은 다능성에 대한 하나 이상의 마커의 상향 조절된 발현; (e) SSEA-1과 같은 다능성에 대한 하나 이상의 마커의 하향 조절; (f) 체내에서 이종간 키메라를 형성하는 능력에 기초하여 (i) 형태학적으로, (ii) 기능적으로 확인된다.

[0071] **B. TSI 나이트형 PSC의 분리**

[0072] 실질적으로 정제된 TSI 나이트형 PSC의 개체군을, 예를 들어 배양원으로부터의 추출에 의해(예를 들어, 밀도 구배 원심분리 및/또는 유동 세포 분석법을 통해) 얻을 수 있다. 순도는 임의의 적절한 방법에 의해 측정할 수 있다. 다능성 세포는, 예를 들어 유동 세포 분석법(예를 들어 FACS 분석)에 의해 99% 내지 100% 정제될 수 있다. TSI 나이트형 PSC는 예를 들어, 유도 만능 줄기 세포 상의 마커 또는 마커의 조합에 결합하는 분자(예를 들어, 항체, 항체 유도체, 리간드 또는 Fc-펩티드 융합 분자)를 활용함으로써 분리되고, 그렇게 함으로써 분자에 결합하는 세포를 양성적으로 선택할 수 있다(즉, 양성 선택). 양성 선택법의 다른 예로는 원하는 세포 유형 및 원하지 않는 세포 유형의 혼합 개체군에서 원하는 세포 유형의 성장을 우선적으로 촉진시키는 방법을 들 수 있다. 또는, 원하는 세포 유형에 존재하지 않지만, 원하지 않는 세포 유형에 존재하는 마커에 결합하는 분자를 사용함으로써, 이러한 마커를 함유하는, 원하지 않는 세포를 원하는 세포로부터 제거할 수 있다(즉, 음성 선택). 다른 음성 선택법으로는 원하는 세포 유형 및 원하지 않는 세포 유형의 혼합 개체군에서 원하지 않는 세포 유형의 성장을 우선적으로 죽이거나 억제하는 방법을 들 수 있다. 따라서, 음성 선택, 양성 선택, 또는 그 조합을 사용함으로써, 줄기 세포의 농축 개체군이 만들어질 수 있다.

[0073] 분리를 위한 절차로는 항체 도포 자석 비드, 친화 크로마토그래피, 단일 클론 항체에 결합된 세포독성제, 또는 단일 클론 항체, 예를 들어 보체 및 세포 독소와 결합되어 사용되는 약제를 사용한 자기 분리, 및 고체 매트릭스(예를 들어, 플레이트)에 부착되는 항체에 의한 "패닝", 또는 다른 종래의 기술을 들 수도 있다. 정밀한 분리를 제공하는 기술로는, 각기 다른 정도의 정교함, 예를 들어 복수의 컬러 채널, 낮은 각도 및 둔각 광 산란 채널, 및 임피던스 채널을 가질 수 있는 형광 활성화 세포 분류기를 들 수 있다. 항체는 직접적인 분리를 가능하게 하는, 자석 비드 등의 마커, 지지체에 결합된 아비딘 또는 스트렙타비딘에 의해 제거될 수 있는 비오틴, 또는 특정 세포 유형의 분리를 용이하게 하기 위해 형광 활성화 세포 분류기와 사용될 수 있는 형광 색소와 결합될 수도 있다. 유도 만능 줄기 세포의 생존도에 지나치게 해가 되지 않는 임의의 기술을 채용할 수도 있다. 일 실시형태에 있어서, 세포는 마커에 대한 항체(예를 들어, TRA-1-81 항체)로 배양되고, 마커에 대해 양성으로 염색된 세포는 수동으로 선택되어 계대 배양된다.

[0074] 농축 방법의 조합을 사용하여 정제 또는 농축의 시간 또는 효율성을 향상시킬 수도 있다. 예를 들어, 목적의 세포 유형을 나타내지 않는 마커를 갖는 세포를 제거하기 위한 농축 단계 후, 형광 활성화 세포 분류기(FACS) 또

는 높은 특이성을 갖는 다른 방법론에 의해 세포가 더 분리 또는 농축될 수도 있다. FACS와 함께 다중 색상 분석을 채용할 수도 있다. 세포는 특정 항원에 대한 염색 또는 그 결핍의 정도에 기초하여 분리될 수도 있다. 형광 색소를 사용하여 특정 항원에 대해 특이적인 항체를 표지할 수도 있다. 이러한 형광 색소로는 피코빌리 단백질, 예를 들어 피코에리트린 및 알로피코시아닌, 플루오레세인, 및 텍사스 레드를 들 수 있다.

**[0075] C. TSI 나이브형 PSC(및 그들의 후대)의 배양 및 보존**

**[0076]** TSI 나이브형 PSC는 배양 시에 확장되고, 추후의 검색 및 사용을 위해 저장될 수 있다. 세포의 배양 또는 줄기 세포의 혼합 배양이 확인되면, 조직 형성 여부와 관계없이 세포 밀도는 세포 증식에 도움이 되는 조건 하에서 결정되므로 세포의 개체군은 새로운 배지로의 통과에 의해 시험관내에서 유사 분열로 확장된다. 이러한 배양 방법으로는, 예를 들어 분화를 유도하는 특정 성장 인자(예를 들어, IGF, EGF, FGF, VEGF, 및/또는 기타 성장 인자)가 결핍된 배지에서 세포를 통과시키는 것을 포함할 수 있다. 충분한 세포 밀도에 도달하면 배양된 세포를 새로운 배지로 옮길 수 있다.

**[0077]** 바람직한 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC를 유지하기 위한 세포 배지는, 예를 들어 유도 나이브형 다능성에 사용되는 것과 동일한 농도로, 본 명세서에 개시된 화합물의 혼합제로 보충되는, N2B27 배지이며, 즉 본 명세서에 개시된 화합물의 혼합제를 사용하여 비나이브형 다능성 세포를 TSI 나이브형 PSC로 리프로그래밍하고, 세포를 나이브 상태로 유지한다. 예를 들어, TSI 나이브형 PSC를 유지하기 위한 세포 배지는 N2B27 배지(BSA 없음), 5% KSR(녹아웃 혈청 대체물)로 보충된 N2B27 배지(BSA 없음)일 수 있다. 다른 기본 배지 또한 사용할 수 있으며, 예를 들어 20% KSR로 보충된 DF12 배지이다. 이들 기본 배지는 상술한 바와 같은 화합물의 혼합제로 보충된다. 본 발명의 일부 실시형태에 따르면, 유효량의 본 명세서에 개시된 화합물의 혼합제를 포함하는 세포 배지는 배양 시에 2 내지 100계대(passage) 동안 TSI 나이브형 PSC를 미분화 및 나이브 상태로 유지할 수 있다. 예를 들어, 혼합제는 배양 시에 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10계대 동안, 바람직하게는 배양 시에 10계대를 넘는 동안, 예를 들어 약 20계대 동안, 예를 들어 배양 시에 적어도 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50, 약 55, 약 60, 약 65, 약 70, 약 75 및 약 80계대 동안 TSI 나이브형 PSC를 미분화 및 나이브 상태로 유지할 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC는 배양 시에 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10 초과, 예를 들어 약 20계대 동안, 예를 들어 배양 시에 적어도 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50, 약 55, 약 60, 약 65, 약 70, 약 75 및 약 80계대 동안 정상적인 핵형을 유지한다. 본 명세서에 예시된 바와 같이, 개시된 화합물의 혼합제는 단일 세포 계대 배양 TSI 나이브형 PSC를 배양 시에 적어도 8개월 동안 정상적인 핵형으로 유지할 수 있다.

**[0078]** 세포는 Doyle 등, (eds.), 1995, 세포 및 조직 배양: 실험실 절차, John Wiley & Sons, Chichester에 기재된 것과 같이, 공지의 방법에 따라 저장하기 위해 저온 보존될 수 있다. 예를 들어, 세포는 5 내지 10% 글리세롤의 유무에 관계없이, 15 내지 20% 소 태아 혈청(FBS) 및 10% 디메틸설폭시드(DMSO)를 함유하는 배지와 같은 "동결 배지" 중에서, 예를 들어 약 4 내지  $10 \times 10^6$  세포/ml의 밀도로 현탁될 수도 있다. 유리 또는 플라스틱 바이알에 세포를 나눈 다음 밀봉하여 프로그램 작동 가능하거나 수동의 냉동고의 동결실로 옮긴다. 최적 동결 속도는 경험적으로 결정될 수도 있다. 예를 들어, 용해열을 통한  $-1^\circ\text{C}/\text{분}$ 의 온도 변화를 주는 동결 프로그램이 사용될 수도 있다. 세포를 함유하는 바이알이  $-80^\circ\text{C}$ 에 도달하면, 액체 질소 저장 영역으로 옮긴다. 저온 보존된 세포는 수년간 저장할 수 있다.

**[0079] IV. 사용 방법**

**[0080]** 원하는 세포 유형 또는 형태를 야기할 수 있는 줄기 세포의 용이하게 이용 가능한 근원의 확인은 치료법에 의한 치료, 조직 공학 및 연구에 중요하다. 줄기 세포의 유용성은 이식, 조직 공학, 혈관 신생의 조절, 혈관 형성, 장기 재생, 동물 모델, 세포 교체 또는 세포 치료뿐만 아니라 질병의 예방 등에 매우 유용하다. 이러한 줄기 세포는 또한 유전자 요법의 일부로서 대상체에 유전자를 도입하는데 사용될 수 있다.

**[0081] A. 분화된 체세포(재분화 세포)의 제공**

**[0082]** 일단 안정화되면, 줄기 세포의 배양은 후대 세포, 예를 들어 새로운 조직을 생성할 수 있는 섬유아세포를 생성하는데 사용될 수도 있다. TSI 나이브형 PSC가 도입되어 3개의 배엽층, 예를 들어 상피 세포를 포함하는 피부 및 모발 세포, 케라틴 세포, 멜라닌 세포, 지방 세포, 골, 근육 및 결합 조직 형성 세포, 예를 들어 근육 세포, 연골 세포, 골 세포, 폐포 세포, 유조직 세포, 예를 들어 간 세포, 콩팥 세포, 부신 세포, 및 도세포, 혈액 세포, 망막 세포(및 귀에 모발 세포를 형성하거나 입맛을 자극하는 것과 같은 감각 지각에 관여하는 기타 세포), 및 신경을 포함하는 신경 조직 중 어느 하나로부터 세포로 분화될 수 있다.

[0083] 일 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC는 "외배엽 분화" 배지에 세포를 노출시킴으로써 외배엽 기원의 세포로 분화하도록 유도된다. 또 다른 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC는 "중배엽 분화 배지"에 세포를 노출시킴으로써 중배엽 기원의 세포로 분화하도록 유도된다. 또 다른 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC는 "내배엽 배지"에 세포를 노출시킴으로써 내배엽 기원의 세포로 분화하도록 유도된다. "내배엽", "중배엽" 및 "외배엽" 배지의 구성 요소는 당업자에게 공지되어 있다. 공지된 포 표면 마커를 사용하여 세포가, 상응하는 세포 배지의 계통의 세포로 실제 분화하고 있는 것을 확인할 수 있다. 3개의 배엽층의 분화를 확인하기 위해 가장 일반적으로 허용되는 마커는 내배엽 세포에 대한 알파 태아 단백질, 중배엽에 대한 알파 평활근 액틴, 및 외배엽에 대한 베타-III 튜블린이고, 모두 이들 조직의 발달에 있어서 매우 초기에 정상적으로 발현된다.

[0084] 섬유아세포 또는 기타 세포 유형으로의 줄기 세포의 분화 후에, 그로부터 조직의 생성은 특정 외인성 성장 인자에 의해, 또는 줄기 세포 배양의 배양 조건(예를 들어, 밀도)을 변화시킴으로써 유발될 수 있다. 원하는 세포 유형의 세포로의 세포의 분화를 유도하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, TSI 나이브형 PSC는 세포의 환경에 물질(예를 들어, 성장 인자, 효소, 호르몬, 또는 기타 신호 전달 분자)을 첨가함으로써 분화하도록 유도될 수 있다. 분화를 유도하는데 사용될 수 있는 인자의 예로는 에리스로포이에틴, 콜로니 자극 인자, 예를 들어 GM-CSF, G-CSF, 또는 M-CSF, 인터류킨, 예를 들어, IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, 백혈병 억제 인자(LIF), 또는 강제 인자(Steel Factor, St1), 조직 위탁 세포를 갖는 공생 배양, 또는 줄기 세포가 특정 계통으로 위탁되도록 유도하기 위한 기타 계통 위탁 세포 유형을 들 수 있다.

[0085] 재분화 세포는 배양 시에 확장되어 추후 검색 및 사용을 위해 저장될 수 있다.

[0086] **B. 세포 치료법**

[0087] TSI 나이브형 PSC의 치료적 용도로는 암, 상처, 신생물, 상해, 바이러스 감염, 당뇨병 등으로부터 야기되는 질병 및 장애를 포함하는 각종 병리학적 상태를 치료하기 위해 유도 만능 줄기 세포, 줄기 세포 개체군, 또는 그 후대를 개체에 이식하는 것을 들 수 있다. 현재 당업계에 공지된 임의의 방법에 따라, 치료는 새로운 조직을 생성하기 위한 세포의 사용, 및 따라서 생성되는 조직의 사용을 수반할 수도 있다. 세포는 체내에서 새로운 조직을 생성할 수 있도록 조직 손상의 부위에 직접적으로 이식, 주입되거나 그렇지 않으면 투여될 수도 있다. 일 실시형태에 있어서, 투여로는 유전자 변형된 TSI 나이브형 PSC 또는 그 후대의 투여를 들 수 있다.

[0088] 바람직한 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC는 자가 조직 세포로부터 얻어지며, 즉 공여 세포는 자가 조직이다. 그러나, 세포는 이종 세포로부터 얻어질 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 공여 세포는 수용자와 유전적으로 관련된 공여체로부터 얻어진다. 또 다른 실시형태에 있어서, 공여 세포는 수용자와 유전적으로 관련 없는 공여체로부터 얻어진다.

[0089] TSI 나이브형 PSC가 수용 대상과 비교하여 이종(비자가/동종이계) 근원으로부터 유래된 경우, 수반되는 면역 억제 요법은 전형적으로 투여되며, 예를 들어 면역 억제제인 시클로스포린 또는 FK506의 투여이다. 그러나, 인간 유도 만능 줄기 세포의 미숙 상태로 인해, 이러한 면역 억제 요법은 요구되지 않을 수도 있다. 따라서, 일 실시형태에 있어서, 인간 유도 만능 줄기 세포는 면역 조절(예를 들어, 면역 억제) 요법의 부재 하에 수용자에게 투여될 수 있다. 또는, 세포는 유체의 교환을 허용하지만, 세포/세포 접촉을 방지하는 막 중에 캡슐화될 수 있다. 마이크로캡슐화된 세포의 이식은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 Ballard 등, *수술*, 117:189-94, 1995; 및 Dixit 등, *세포 이식*, 1:275-79 (1992)이다.

[0090] **(i) 당뇨병**

[0091] 당뇨병(Diabetes mellitus, DM)은 췌장이 충분한 인슐린을 생성하지 않거나, 또는 생성되는 인슐린에 세포가 반응하지 않기 때문에 대상자의 혈당이 높은 대사성 질환군이다. 인슐린 요법의 유망한 대체법은 인슐린이 필요한 환자에게 도세포를 제공하는 것이다. Shapiro 등, *N Engl J Med.*, 343(4):230-8 (2000)에서는 베타 세포/도세포의 이식이 당뇨병 환자에게 치료법을 제공하는 것을 설명하고 있다. 수많은 인슐린 유형을 상업적으로 이용 가능하지만, 이들 제제는 주사제로서 제공된다. 인간 유도 만능 줄기 세포는 당뇨병을 예방하거나 치료하기 위한 도세포의 대체 근원을 제공한다. 예를 들어, 유도 만능 줄기 세포는 분리되어, 췌장 세포로 분화되고, 대상자에게 전달될 수 있다. 또는, 유도 만능 줄기 세포는 대상자의 췌장으로 전달되어 체내에서 도세포로 분화될 수 있다. 따라서, 세포는 당뇨병의 발생을 방지 또는 치료하기 위한 이식을 위해 유용하다. 췌장 도세포의 생존도 및 효력에 영향을 주지 않으면서 시토키인 노출 후의 염증을 감소시키는 방법이, 예를 들어 미국 특허 제 8,637,494, Naziruddin, 등에 개시되어 있다.

[0092] **(ii) 신경변성 장애**

[0093] 신경변성 장애는 질병, 유전적 질환, 또는 외상성 또는 허혈성 척수 또는 뇌 손상 등의 부상의 결과로서 뉴런의 열화를 수반하는 질환을 특징으로 한다. 신경변성 상태는 뉴런의 손상 또는 열화와 관련된 질병 또는 장애 또는 증상 또는 원인 또는 효과를 포함한다. 신경변성 질환으로는 알렉산더병, 알파병, 알츠하이머병, 루게릭병, 모세혈관 확장성 운동 실조증, 카나반병, 코케인 증후군, 대뇌피질 기저 핵변성증, 크로이츠펠트-야콥병, 헌팅턴병, 케네디병, 크라베병, 루이소체 치매, 마카도-조셉병, 다발성 경화증, 파킨슨병, 펠리제우스-메르츠바하병, 니이먼-픽병, 원발성 측삭 경화증, 레프섬병, 샌드호프병, 설더병, 스틸-리차드슨-울스제브스키병, 척수 매독 또는 손상된 신경과 관련된 다른 임의의 질환을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 다른 신경변성 질환으로는 외상성 척수 손상, 허혈성 척수 손상, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상, 및 유전적 질환을 들 수 있고, 또는 이들에 의해 유발될 수 있다.

[0094] 특히, 개시된 방법은 세포가 신경변성 질환을 개선할 수 있도록 시험관내에서 확장된 NSC, 신경 전구 세포, 또는 신경 전구체를 필요로 하는 대상자에게 이식하는 것을 포함한다. 확장된 신경 줄기 세포의 이식을 사용하여 경련, 강직, 발작, 마비 또는 다른 임의의 근육의 활동 과잉의 증상과 함께 다양한 형태의 척수병증을 앓고 있는 대상자들의 보행 기능을 개선할 수 있다. 상이한 신경변성 질환의 치료에 대한 신경 세포 및 신경 전구 세포를 확장 및 이식하는 방법이, 예를 들어 미국 특허 제 8,236,299, Johe 등에 개시되어 있다.

[0095] **(iv) 암 치료**

[0096] TSI 나이브형 PSC 및 그 후대의 치료적 용도는 유도 만능 줄기 세포, 줄기 세포 개체군, 또는 그 후대를 개체에 이식하여 암과 관련된 증상을 치료 및/또는 개선하는 것을 포함한다. 예를 들어, 일 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC는 대상자의 세포를 죽이거나, 감소시키거나, 손상시키는 화학 요법을 받은 암 환자에게 투여될 수 있다. 암에 대한 전형적인 줄기 세포 이식에 있어서, 매우 많은 양의 화학 요법은 종종 방사선 치료와 함께 사용되어 모든 암 세포의 파괴를 시도한다. 이 치료법은 또한 골수에서 줄기 세포를 죽인다. 치료 직후, 파괴된 것들을 대체하기 위해 줄기 세포가 부여된다.

[0097] 또 다른 실시형태에 있어서, TSI 나이브형 PSC는 적어도 하나의 추가적인 치료 인자에 의해 형질 전환되거나 변형(탈분화 인자에 추가하여)될 수 있다. 예를 들어, TSI 나이브형 PSC가 분리되면, 세포는 치료용 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 의해 형질 전환된 다음에 대상자에게 이식 또는 투여되거나, 원하는 세포 유형으로 분화 및 이식되어 대상자에게 전달될 수도 있다. 이러한 조건 하에서, 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드 생성물의 전달을 위해 대상자 내에서 발현된다.

[0098] **(v) 조직 공학**

[0099] TSI 나이브형 PSC 및 그 후대는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 조직 공학 구조물을 제조하는데 사용될 수 있다. 조직 공학 구조물은 손상된 기관 또는 조직의 회복 또는 대체를 위한 보철 장치를 포함하여 다양한 목적을 위해 사용될 수도 있다. 그들은 또한 구조물의 세포에 의해 분비되는 단백질 또는 기타 분자에 대한 체내 전달 계로서, 또는 일반적인 약물 전달계로서 작용할 수도 있다. 조직 공학 구조물은 또한 조직 기능의 시험관내 모델로서, 또는 다양한 치료 또는 약제의 효과를 시험하기 위한 모델로서의 용도가 발견되었다. 줄기 세포의 이식을 위한 가장 일반적으로 사용되는 생체 재료학적 스캐폴드는 Willerth, S.M. 및 Sakiyama-Elbert, S.E., *조직 및 세포 전달을 구성하기 위한 줄기 세포와 생체 재료 스캐폴드의 결합* (2008년 7월 9일), StemBook 편, 줄기 세포 연구 단체, StemBook에서 검토되었다. 조직 공학 기술은 흔히 조직 성장을 유지하고 촉진하기 위한 적절한 배양 기질의 선택을 수반한다. 일반적으로, 이들 기질은 원하는 조직에 대해 원하는 형상의 스캐폴드를 형성하기 위해서 3차원이어야 하며, 가공 가능해야 한다.

[0100] 미국 특허 제 6,962,814는 일반적으로 조직 공학 구조물 및 공학 나이브형 조직의 제조 방법이 개시되어 있다. 특정 실시예에 대해, 미국 특허 제 7,914,579, Vacanti 등에는 조직 공학 인대 및 힘줄이 개시되어 있다. 미국 특허 제 5,716,404에는 폴리머 매트릭스와 조합하여 이식된 해리 근육 세포를 사용하여 유방 조직의 재건 또는 확대를 위한 방법 및 조성물이 개시되어 있다. 미국 특허 제 8,728,495에는 자가 피부 섬유아세포를 사용한 연골의 회복을 개시하고 있다. Duailibi 등에 의한 미국 공개 출원 제 20090029322에는 치아 대체물을 제조하는데 사용하기 위한 치아 조직을 형성하기 위한 줄기 세포의 사용이 개시되어 있다. 미국 공개 출원 제 2006/0019326에는 뇌동맥류의 치료를 위한 세포-종양 조직 공학 폴리머가 개시되어 있다. Atala에 의한 미국 공개 출원 제 2007/0059293에는 손상된 기관, 예를 들어 신장, 심장, 간, 비장, 췌장, 방광, 요관 및 요도를 대체하는데 사용될 수 있는 조직 공학 구조물(및 이러한 구조물을 제조하기 위한 방법)이 개시되어 있다.

[0101] **(vi) TSI 나이브형 PSC로부터 생성되는 세포(후대)**

- [0102] TSI 나이브형 PSC는 3개의 배엽층, 예를 들어, 상피 세포, 케라틴 세포, 멜라닌 세포, 지방 세포를 포함하는 피부 및 모발 세포, 근세포, 연골 세포, 골세포와 같은 골, 근육 및 결합 조직을 형성하는 세포, 폐포 세포, 간세포, 신세포, 부신세포와 같은 유조직 세포, 및 도세포(예를 들어, 알파 세포, 델타 세포, PP 세포, 및 베타 세포), 혈액 세포(예를 들어, 백혈구, 적혈구, 대식 세포, 및 림프구), 망막 세포(및 귀의 모발 세포를 형성하거나 혀의 입맛을 자극하는 것과 같은 감각 지각에 관여하는 기타 세포), 및 신경을 포함하는 신경 조직으로부터 세포로 분화되도록 유도될 수 있다.
- [0103] **(vii) 치료용 조성물**
- [0104] TSI 나이브형 PSC는 체내 또는 시험관내/체외에서 탈분화를 촉진하기 위한 대상자, 조직 또는 세포와의 투여, 전달 또는 접촉을 위해 제형화될 수 있다. 성장 인자, 분화 또는 탈분화를 유도하는 기타 인자, 분비물, 면역 조절제, 항염증제, 회귀 인자, 신경 분포를 촉진시키고, 혈관 형성을 촉진하거나 림프관을 강화시키는 생물학적 활성 화합물 및 약물과 같은 추가의 인자를 포함시킬 수 있다.
- [0105] 유도 다능 세포는 TSI 나이브형 PSC 또는 TSI 나이브형 PSC 후대의 개체군을 단독으로, 또는 담체 또는 지지 구조물 위 또는 안에 포함하는 조성물을 통해 환자에게 투여될 수 있다. 많은 실시형태에 있어서, 담체는 요구되지 않는다. 세포가 요구되는 부위 위 또는 안으로 주입에 의해 세포가 투여될 수 있다. 이러한 경우, 세포는 전형적으로 세정되어 세포 배지를 제거하고, 생리적 완충액 중에 현탁된다.
- [0106] 다른 실시형태에 있어서, 세포는 지지 구조물 위 또는 안에 제공 또는 포함된다. 지지 구조물은 메쉬, 고체 지지체, 스케폴드, 관, 다공성 구조, 및/또는 히드로겔일 수도 있다. 지지 구조물은 전체적으로 또는 부분적으로 생분해성 또는 비생분해성일 수도 있다. 지지체는 천연 또는 합성 폴리머, 티탄과 같은 금속, 뼈 또는 수산화인회석, 또는 세라믹으로 형성될 수도 있다. 천연 폴리머로는 콜라겐, 히알루론산, 다당류, 및 글리코사미노글리칸을 들 수 있다. 합성 폴리머로는 폴리히드록실산, 예를 들어 폴리락트산, 폴리글리콜산, 및 그 코폴리머, 폴리히드록시알카노에이트, 예를 들어 폴리히드록시부티레이트, 폴리오르토에스테르, 폴리산 무수물, 폴리우레탄, 폴리카보네이트, 및 폴리에스테르를 들 수 있다. 이들은 이식물, 관, 메쉬, 또는 히드로겔의 형태일 수도 있다.
- [0107] *고체 지지체*
- [0108] 지지 구조물은 느슨한 직물 또는 부직포일 수도 있으며, 여기서 세포는 메쉬 안 및 위에 접촉된다. 구조로는 고체 구조 지지체를 들 수도 있다. 지지체는 관, 예를 들어 신경 축삭의 재성장을 위한 신경관일 수도 있다. 지지체는 스텐트 또는 밸브일 수도 있다. 지지체는 세포의 내성장 및/또는 다공성 구조로의 세포의 접촉을 가능하게 하는 다공성 계면을 갖는 무릎 또는 엉덩이, 또는 그 일부와 같은 관절 보철물일 수도 있다. 많은 다른 유형의 지지 구조물 또한 가능하다. 예를 들어, 지지 구조물은 스폰지, 발포체, 산호, 또는 내부 공극을 갖는 생체 적 합성 무기 구조물, 또는 폴리머 섬유를 짜 넣은 메쉬 시트로 형성될 수 있다. 이들 지지 구조물은 공지의 방법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0109] 지지 구조물은 히드로겔-세포 혼합물의 형상을 만들고 지지하는 공극 유사 캐비티 또는 간극을 갖는 투과성 구조물일 수도 있다. 예를 들어, 지지 구조물은 다공성 폴리머 메쉬, 천연 또는 합성 스폰지, 또는 금속, 또는 골 또는 수산화인회석 등의 재료로 형성되는 지지 구조물일 수 있다. 지지 구조물의 공극률은 영양분이 구조물 안으로 확산됨으로써, 세포 내부에 효과적으로 도달하고, 세포에 의해 생성된 폐기물이 구조물의 외부로 확산될 수 있도록 해야 한다.
- [0110] 지지 구조물은 새로운 조직이 요구되는 공간과 일치하도록 형상이 만들어질 수 있다. 예를 들어, 지지 구조물은 연소된 피부 영역 또는 손실된 연골 또는 뼈 부분의 형상과 일치하도록 형상이 만들어질 수 있다. 그것이 제조되는 재료에 따라서, 지지 구조물은 절삭, 성형, 주조, 또는 원하는 형상을 생성하는 임의의 다른 방법에 의해 형상이 만들어질 수 있다. 지지체는 지지 구조물이 세포에 의해 접촉되기 전 또는 후에 형상이 만들어질 수 있고, 또는 후술하는 바와 같이 히드로겔-세포 혼합물에 의해 충전된다.
- [0111] 적합한 폴리머의 예는 글리콜리드와 락티드의 90:10 코폴리머인 폴리글락틴이고, VICRYL™ 편조 흡수성 봉합사로서 제조된다(Ethicon Co., Somerville, N.J.). 폴리머 섬유(예를 들어, VICRYL™)는 펠트형 폴리머 시트로 직조되거나 압축될 수 있으며, 그 후에 원하는 임의의 형상으로 절단될 수 있다. 또는, 폴리머 섬유는 지지 구조물에 요구되는 형상으로 이들을 주조하는 주형 내에서 함께 압축될 수 있다. 일부 경우에, 추가 폴리머는 섬유 메쉬에 추가 구조물을 변경 또는 부여하기 위해 성형되므로 폴리머 섬유에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 폴리글리콜 섬유 메쉬의 이 시트에 폴리락트산 용액을 첨가할 수 있고, 이 결합물을 함께 성형하여 다공성 지지 구조물

을 형성할 수 있다. 폴리락트산은 폴리글리콜산 섬유와 가교 결합함으로써, 이들 개개의 섬유를 도포하고, 성형된 섬유의 형상을 고정시킨다. 폴리락트산은 또한 섬유 사이의 공간을 채운다. 따라서, 공극률은 지지체 안으로 도입되는 폴리락트산의 양에 따라 달라질 수 있다. 원하는 형상으로 섬유 메쉬를 성형하기 위해 요구되는 압력은 꽤 적당할 수 있다. 요구되는 것은 섬유가 폴리락트산의 결합 및 도포 작용의 효과를 발휘하기 시작하기 위해 충분히 오랫동안 제자리에서 유지되는 것이다.

[0112] 대안적으로, 또는 추가적으로, 지지 구조물은 당업계에 공지된 기술에 의해 생성되는 다른 유형의 폴리머 섬유 또는 폴리머 구조물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리머 용액으로부터 용매를 증발시킴으로써 얇은 폴리머막을 얻을 수 있다. 원하는 형상의 양각 패턴을 갖는 주형으로부터 증발되는 경우에 이들 막은 원하는 형상으로 구조될 수 있다. 폴리머 겔은 또한 당업계에 공지된 압축 성형 기술을 사용하여 얇은, 투과성 폴리머 구조물로 성형될 수 있다.

[0113] 히드로겔

[0114] 또 다른 실시형태에 있어서, 세포는 히드로겔과 혼합되어 세포-히드로겔 혼합물을 형성한다. 히드로겔은 주사 또는 카테터에 의해, 또는 다른 지지 구조물의 이식 시에 투여될 수도 있다. 가교 결합은 투여 전, 도중, 또는 후에 발생할 수도 있다.

[0115] **D. 동물 모델 및 기관 재생**

[0116] 분리된 TSI 나이브형 PSC는 원하는 종(공여체)으로부터, 동일하거나 상이한 종의 제 2 동물(수여체)로 TSI 나이브형 PSC를 결합시키는 동물 모델을 생성하는데 사용될 수 있다. 공여 동물은 인간, 마우스, 쥐, 돼지, 소, 양, 염소, 말, 개, 침팬지, 고릴라, 오랑우탄, 원숭이, 마모셋 등의 포유 동물일 수 있다. 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 동물 모델을 제공하는데 사용되는 공여 포유 동물은 인간이고, 수여 포유 동물은 비인간이다. 다른 실시형태에 있어서, 공여 동물과 수여 동물은 크기가 일치한다. 수여체는 돼지, 쥐, 마우스, 소, 양, 염소, 말, 개, 침팬지, 고릴라, 오랑우탄, 원숭이, 마모셋, 및 보노보와 같은 인간 이외의 임의의 동물일 수도 있다. TSI 나이브형 PSC는 인간이 아닌 포유 동물의 기관 재생에 사용될 수 있고; 포유 동물이 발달 단계에서 기관의 발달의 결핍과 관련된 이상을 갖는 경우에 TSI 나이브형 PSC는 포유 동물의 원하는 기관을 생성하는데 사용될 수 있다.

[0117] 상기 방법은 당업계에 공지된 방법을 사용하여, 수혜 비인간 포유 동물의 배반포 단계 수정란으로 TSI 나이브형 PSC를 이식하는 것; 비인간 대리 부모 포유 동물의 자궁에 수정란을 성장시켜 동복자를 얻는 것; 및 동복자로부터 기관을 얻는 것을 포함한다. 생성될 수 있는 기관의 예로는 신장, 심장, 췌장, 소뇌, 폐, 갑상선, 모발, 및 흉선 등의 고정된 형상을 갖는 고체 기관을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 수혜 배아는 돼지, 쥐, 마우스, 소, 양, 염소, 말, 개, 침팬지, 고릴라, 오랑우탄, 원숭이, 마모셋 등과 같은 인간 이외의 임의의 동물일 수도 있다.

[0118] 인간화된 마우스 모델을 생성하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고(미국 공개 제 20110258715), 예를 들어 Ito 등, *세포 및 분자 면역학*, 9:208-214 (2012)에서 검토되었다. 기관을 재생하는데 사용될 수 있는, 목적의 기관의 발달과 관련된 이상을 갖는 수혜 배아의 예로는 발달 단계에서 신장의 발달 결핍과 관련된 이상을 갖는 *Sal11* 녹아웃 동물(Nishinakamura 등, *Development*, 128:3105-3115 (2001)); 발달 단계에서 췌장의 발달 결핍과 관련된 이상을 갖는 *Pdx1* 녹아웃 동물(Offield 등, *Development*, 122: 983-995 (1996)); 발달 단계에서 소뇌의 발달 결핍과 관련된 이상을 갖는 *Wnt-1(int-1)* 녹아웃 동물(McMahon 등, *Cell*, 62:1073-1085, (1990)); 발달 단계에서 폐 및 갑상선의 발달 결핍과 관련된 이상을 갖는 *T/ebp* 녹아웃 동물(Kimura 등, *Genes and Development*, 10:60-69, 1996); 또는 섬유아세포 성장 인자(FGF) 수용체(FGFR)의 세포내 도메인의 결핍을 과발현하고, 신장 및 폐와 같은 여러 기관의 결핍을 유발하는(Celli 등, *EMBO J.*, 17:1642-655, (1998)) 우성 음성 형질 전환 돌연변이 동물 모델이 사용될 수 있다. 또는, 누드 마우스는 모발 또는 흉선을 생성하는데 사용될 수 있다. 미국 공개 제 20110258715에 기재된 "파운더" 동물 또한 사용될 수도 있다.

[0119] **V. 키트**

[0120] 본 명세서에 개시된 화학 혼합제를 포함하는 키트가 제공된다. 화학 혼합제는 상술한 바와 같다. 이들은 원하는 농도를 생성하기 위해 세포 배지에 첨가하는 것을 용이하게 하기 위해 정의된 농도를 갖는 형태일 수도 있다. 키트는 공여 세포 유형에 의거하여 원하는 농도 범위 및 투여 시간을 제공하는 지침을 포함할 수도 있다. 키트는 또한 나이브형 다능성을 유도하기 위한 공여 세포의 배양을 위해 화학 혼합제와 미리 혼합된 세포 배지를 포함할 수도 있다.

[0121] 본 발명은 이하의 실시예를 참조함으로써 더 이해될 수 있지만, 이들 실시예로 제한되는 것은 아니다.

[0122] 실시예

[0123] 실험 절차

[0124] 프라임드형 iPSC로부터의 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC의 생성

[0125] 이 연구에 사용된 성체 붉은털 원숭이(Macaca mulatta, #9, #2, #11, 및 #12)는 개별 케이지에 넣어 두었다. 모든 동물 절차는 군사 의료 과학의 중국 아카데미의 실험 동물 센터에 의해 승인되었고, 붉은털 원숭이 체세포의 사용은 북경 대학 기관 심사위원회에 의해 허가되었다. 섬유아세포는 붉은털 원숭이의 귀 가장자리로부터 분리되었고, 리프로그래밍 인자 OCT4 및 KLF4를 함유하는 레트로 바이러스 벡터에 감염되었다. 소분자로 보충된 배지는 2일마다 변경되었다. 프라임드형 iPSC 콜로니는 바이러스성 형질 도입 후 대략 25 내지 35일에 선택되어 인간 ESC 배지(D/F12 + 20% 녹아웃 혈청 대체물[KSR] + 4ng/ml bFGF)에서 확장되었다. 나이브 상태 전환을 위해, 프라임드형 iPSC 콜로니를 아큐타아제에 의해 해리시키고, 배양 보조 세포 상에 재접종했다. 4ng/ml bFGF, 10ng/ml 인간 LIF, CHIR99021(3 μM) 및 PD0325901(0.5 μM), 및 SP600125(10 μM) 및 SB203580(10 μM)에 의해 최적화된 전환 배지를 매일 변경했다. 대략 7 내지 10일에, 돔 형상 콜로니를 선택한 후에 다능성 및 분화 특성의 추가 분석을 위해 새로운 배양 보조 세포로 옮겼다.

[0126] (a) 레트로 바이러스 감염 및 붉은털 원숭이 프라임드형 iPSC 생성

[0127] 리프로그래밍 인자(OCT4, KLF4)를 함유하는 레트로 바이러스 벡터가 이전의 보고서(Liu H 등, 2008)에 기재되어 있다. 레트로 바이러스 생성, 수집 및 감염 또한 기재된 바와 같이 실시되었다(Liu H 등, 2008 및 Zhao, Y 등, 2008). 소분자 VPA(0.5mM; Sigma), CHIR99021(3 μM; Stemgent), 616452(1 μM; Calbiochem) 및 트라닐시프로민(5 μM; Tocris)으로 보충된 배지를 2일마다 변경했다. 붉은털 원숭이 프라임드형 iPSC 콜로니는 바이러스성 형질 도입 후 25 내지 35일째 정도에 선택되었고, 붉은털 원숭이 프라임드형 iPSC에 대한 배양 조건에서 배양 보조 세포 상에 유지되었다.

[0128] (b) 프라임드형 iPSC로부터의 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC의 생성

[0129] 붉은털 원숭이 프라임드형 iPSC를 아큐타아제에 의해 단일 세포로 해리하고, 배양 보조 세포 상에 재접종했다. 4ng/ml bFGF(R&D Systems), 10ng/ml 인간 LIF(Millipore), CHIR99021(3 μM; Stemgent) 및 PD0325901(0.5 μM; Stemgent)을 갖는 전환 배지를 매일 변경했다. 대략 7 내지 10일째에, 돔 형상 콜로니를 선택하고, 새로운 배양 보조 세포로 옮겼다. 또한, 전형적인 2i/LIF 조건 - 10ng/ml 인간 LIF(Millipore), CHIR99021(3 μM; Stemgent) 및 PD0325901(0.5 μM; Stemgent)이한 시험되고, 음성 대조군의 역할을 했다.

[0130] (c) 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC에 대한 전환 조건의 최적화

[0131] 붉은털 원숭이 프라임드형 iPSC는 아큐타아제에 의해 단일 세포로 해리되어 배양 보조 세포로 재접종되었다. 4ng/ml bFGF(R&D Systems), 10ng/ml 인간 LIF(Millipore), CHIR99021(3 μM; Stemgent) 및 PD0325901(0.5 μM; Stemgent)을 갖는 기본 배지를 매일 변경했다. 배양 조건의 최적화를 위해 시험된 소분자는 SB203580(10 μM; Tocris), SP600125(10 μM; Tocris), Y27632(10 μM; Tocris) 및 G06983(5 μM; Tocris)이었다. 8일 동안의 처리 후, 세포를 고정하고, TRA-1-81에 대해 면역 염색했다.

[0132] 붉은털 원숭이 섬유아세포로부터의 나이브형 iPSC의 직접 전환

[0133] 리프로그래밍 인자(OCT4, SOX2 및 KLF4)를 함유하는 레트로 바이러스 벡터가 기재되어 있다(Liu H 등, 2008). 기본 배지(KO-DMEM, 15%KSR)는 감염 후에 2일마다 변경했다. 대략 20일째에, 또 다시 7 내지 10일 동안 4ng/ml bFGF(R&D Systems), 10ng/ml 인간 LIF(Millipore), CHIR99021(3 μM; Stemgent), PD0325901(0.5 μM; Stemgent), SB203580(10 μM; Tocris) 및 SP600125(10 μM; Tocris)를 함유하는 최적화된 전환 배지로 교환했다. 그 후에, 돔 형상 콜로니를 선택하고 새로운 배양 보조 세포로 옮겼다.

[0134] 세포 배양

[0135] 1차 붉은털 원숭이 피부 섬유아세포를 2세령 붉은털 원숭이의 귀 가장자리로부터 분리했다. 섬유아세포 및 293T 세포를 10% 소 태아 혈청(Invitrogen)을 함유하는 돌베코 수정 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; Hyclone)에서 배양했다. Thomson 등(Thomson J A 등, 1995)에 의해 안정화된 붉은털 원숭이 배아 줄기(ES) 세포(ES-7.5), 및 붉은털 원숭이 프라임드형 iPSC를 이전에 기재한 바와 같이 배양 및 계대 배양했다(Liu H 등, 2008). 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC를 85% 녹아웃 DMEM(KO-DMEM, Invitrogen), 15% 녹아웃 혈

청 대체물(KSR, Invitrogen), N2 보충물(100X, Invitrogen), 1mM L-글루타민, 0.1mM NEAA, 4ng/ml bFGF(R&D systems)를 갖는 0.1mM 2-ME, 10ng/ml 인간 LIF(Millipore), CHIR99021(3 μM; Stemgent), PD0325901(0.5 μM; Stemgent), SB203580(10 μM; Tocris) 및 SP600125(10 μM; Tocris)가 포함된, 최적화된 전환 배지에서 배양했다. 아큐타아제(Millipore)를 사용하여 배양 보조 세포 상에 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC를 4일마다 단일 세포 계대 배양했다. 최적화된 전환 배지에 의해 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>, 37°C에서 TSI 나이브형 PSC를 배양하고, 배지를 매일 변경했다.

[0136] **붉은털 원숭이 프라임드형 iPSC 및 나이브형 iPSC의 신호 전달 분석**

[0137] 붉은털 원숭이 프라임드형 iPSC를 기재된 바와 같이 유지했다(Liu H 등, 2008). 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC를 4ng/ml bFGF(R&D Systems), 10ng/ml 인간 LIF(Millipore), CHIR99021(3 μM; Stemgent), PD0325901(0.5 μM; Stemgent), SB203580(10 μM; Tocris) 및 SP600125(10 μM; Tocris)를 갖는 최적화된 배지에 유지했다. 시험된 신호 전달 변조기는 SU5402(2 μM; Tocris), SB431542(10 μM; Tocris), Stattic(1 μM; Tocris) 및 TGF-β 1(2ng/ml, Peprotech)이었다. 5일 동안의 처리 후, 세포를 고정시키고, TRA-1-81에 대해 면역 염색했다.

[0138] **알칼리성 포스파타아제(ALP) 검출 및 면역 형광 검사**

[0139] ALP 활성을 검출하기 위해, 인산 완충 식염수로 세포를 3회 세정하고, BCIP/NBT(Promega)로 15분 동안 염색했다. 면역 형광 검사를 위해, 1차 항체는 SSEA-1(1:50, Chemicon), SSEA-4(1:20, Santa Cruz Biotechnology), TRA-1-60(1:50, Santa Cruz Biotechnology), TRA-1-81(1:50, Santa Cruz Biotechnology), NANOG(1:100, R&D Systems), TBX3(1:200, Abcam), H3K27me3(1:200, Millipore), GATA4(1:200, Santa Cruz Biotechnology), OCT4(1:200, Abcam) 및 SOX2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology)에 대한 항체를 포함했다. 2차 항체는 로다민 표지 당나귀 항마우스 IgG(1:100, Santa Cruz Biotechnology), 로다민 표지 당나귀 항토끼 IgG(1:100, Santa Cruz Biotechnology), 로다민 표지 염소 항마우스 IgM(1:100, Santa Cruz Biotechnology) 및 로다민 표지 당나귀 항염소 IgG(1:100, Santa Cruz Biotechnology)였다. 핵 염색을 위해 DAPI(Roche Applied Science)를 사용했다.

[0140] **RT-PCR 및 계놈 PCR**

[0141] TRIzol(Invitrogen)을 사용하여 세포로부터 총 RNA를 분리하고, 제조사의 프로토콜에 따라 EasyScript 역전사 효소(TransGen Biotech)를 사용하여 역전사시켰다. 2×EasyTaq SuperMix(TransGen Biotech)를 사용하여 상이한 유전자의 PCR 증폭을 행했다. 계놈 PCR을 위해, DNeasy 혈액 & 조직 키트(QIAGEN)로 계놈 DNA를 추출했다. 사용된 프라이머를 표 2에 열거한다.

[0142] **[표 2]**

[0143] 사용된 프라이머 목록

| 정량적 RT-PCT을 위한 프라이머 |                                       |
|---------------------|---------------------------------------|
| CD44-S              | CTGCCGCTTTGCAGGTGTA (SEQ ID NO:1)     |
| CD44-A              | CATTGTGGGCAAGGTGCTATT (SEQ ID NO:2)   |
| DUSP10-S            | ATCGGCTACGTCATCAACGTC (SEQ ID NO:3)   |
| DUSP10-A            | TCATCCGAGTGTGCTTCATCA (SEQ ID NO:4)   |
| DLL1-S              | GATTCTCCTGATGACCTCGCA (SEQ ID NO:5)   |
| DLL1-A              | TCCGTAGTAGTGTTCGTCACA (SEQ ID NO:6)   |
| NCAM1-S             | GGCATTTACAAGTGTGTGGTTAC (SEQ ID NO:7) |
| NCAM1-A             | TTGGCGCATTCTTGAACATGA (SEQ ID NO:8)   |
| SOX1-S              | GGAATGGGAGGACAGGATTT (SEQ ID NO:9)    |
| SOX1-A              | AACAGCCGGAGCAGAAGATA (SEQ ID NO:10)   |
| PAX6-S              | AAGGATGTTGAACGGCAGA (SEQ ID NO:11)    |
| PAX6-A              | TCCGTTGGAAGTGTGAGT (SEQ ID NO:12)     |
| HPRT-S              | TGACACTGGCAAAACAATGCA (SEQ ID NO:13)  |
| HPRT-A              | GGTCCTTTTACCAGCAAGCT (SEQ ID NO:14)   |
| EOMES-S             | CGCCACCAAACTGAGATGAT (SEQ ID NO:15)   |
| EOMES-A             | CACATTGTAGTGGGCAGTGG (SEQ ID NO:16)   |
| CDX2-S              | CAGTCGCTACATCACCATCC (SEQ ID NO:17)   |
| CDX2-A              | TTTCCTCTCCTTTGCTCTGC (SEQ ID NO:18)   |

[0144]

|          |  |
|----------|--|
| HAND1-S  | AACTCAAGAAGGCGGATGG (SEQ ID NO:19)         |
| HAND1-A  | CGGTGCGTCCTTTAATCCT (SEQ ID NO:20)         |
| ID1-S    | AAACGTGCTGCTCTACGACA (SEQ ID NO:21)        |
| ID1-A    | TAGTCGATGACGTGCTGGAG (SEQ ID NO:22)        |
| ID3-S    | CTACAGCGCGTCATCGACTA (SEQ ID NO:23)        |
| ID3-A    | TCGTTGGAGATGACAAGTTCC (SEQ ID NO:24)       |
| ZIC1-S   | GCGCTCCGAGAATTTAAAGA (SEQ ID NO:25)        |
| ZIC1-A   | GTCGCTGCTGTTAGCGAAG (SEQ ID NO:26)         |
| NANOG-S  | GATTTGTGGGCCTGAAGAAA (SEQ ID NO:27)        |
| NANOG-A  | CAGATCCATGGAGGAAGGAA (SEQ ID NO:28)        |
| MIXL1-S  | AGCTGCTGGAGCTCGTCTT (SEQ ID NO:29)         |
| MIXL1-A  | CGCCTGTTCTGGAACCATAC (SEQ ID NO:30)        |
| DNMT3A-S | AGTACGACGACGACGGCTA (SEQ ID NO:31)         |
| DNMT3A-A | CACACTCCACGAAAAGCAC (SEQ ID NO:32)         |
| DNMT3B-S | AGGGAAGACTCGATCCTCGTC (SEQ ID NO:33)       |
| DNMT3B-A | GTGTGTAGCTTAGCAGACTGG (SEQ ID NO:34)       |
| DNMT3L-S | TGAACAAGGAAGACCTGGACG (SEQ ID NO:35)       |
| DNMT3L-A | CAGTGCCTGCTCCTTATGGCT (SEQ ID NO:36)       |
| LIFR-S   | AGCGGGAGACAACACGAAAA (SEQ ID NO:37)        |
| LIFR-A   | CCAGGAAGGGCATCAATCAC (SEQ ID NO:38)        |
| SOX2-S   | GGCGAACCATCTCTGTGGTC (SEQ ID NO:39)        |
| SOX2-A   | CAACCTGCATGGCCATTTTT (SEQ ID NO:40)        |
| ESRRB-S  | TGGCTGGGTTTTGTTTGGTC (SEQ ID NO:41)        |
| ESRRB-A  | TTAAAGTGTGGCCCGAGGAA (SEQ ID NO:42)        |
| ZNF521-S | CAACTGACAGATGGAGTGGATG (SEQ ID NO:43)      |
| ZNF521-A | GCTAGGGGAAGTCTGATCCTT (SEQ ID NO:44)       |
| PRDM14-S | AATCATTGGTGGCGACAACGA (SEQ ID NO:45)       |
| PRDM14-A | CCCGTACAGAACGAAGTGCAG (SEQ ID NO:46)       |
| DPPA3-S  | TTAATCCAACCTACATCCCAGGG (SEQ ID NO:47)     |
| DPPA3-A  | AGGGGAAACAGATTCGCTACTA (SEQ ID NO:48)      |
| TBX3-S   | GAGGCTAAAGAACTTTGGGATCA (SEQ ID NO:49)     |
| TBX3-A   | CATTTCCGGGTCGGCCTTA (SEQ ID NO:50)         |
| KLF5-S   | CCTGGTCCAGACAAGATGTGA (SEQ ID NO:51)       |
| KLF5-A   | GAACTGGTCTACGACTGAGGC (SEQ ID NO:52)       |
| REX-S    | CCCTGAAGGTCATCCACAGCC (SEQ ID NO:53)       |
| REX1-A   | GTGCCCATCCACATTGTCCT (SEQ ID NO:54)        |
| PRDM14-S | AATCATTGGTGGCGACAACGA (SEQ ID NO:55)       |
| PRDM14-A | CCCGTACAGAACGAAGTGCAG (SEQ ID NO:56)       |
| XIST-S   | TAATGTGCCAGATACCATGCTGGG (SEQ ID NO:57)    |
| XIST-A   | ACTTAACCTCACCAGTAAAGTCTTGAT (SEQ ID NO:58) |

[0145]

| RT-PCR을 위한 프라이머 |  |
|-----------------|--|
| endo OCT4--S    | CAGATCAGCCACATTGCCAG (SEQ ID NO:59)        |
| endo OCT4-A     | CAAAAGCCCTGGCACAACTCT (SEQ ID NO:60)       |
| endo SOX2-S     | GGTTACCTCTTCCTCCACTCC (SEQ ID NO:61)       |
| endo SOX2-A     | CCTCCATTTCCTCGTTTT (SEQ ID NO:62)          |
| endo c-MYC-S    | GCGTCGTGGGAAGGGAGATAC (SEQ ID NO:63)       |
| endo c-MYC-A    | ACCGAGTCGTAGTCGAGGTCATA (SEQ ID NO:64)     |
| endo KLF4-S     | TTTTCGGTTTTGGCTTCGTTTC (SEQ ID NO:65)      |
| endo KLF4-A     | GTCCAGGTCCAGGAGATCGTTG (SEQ ID NO:66)      |
| DPPA4-S         | CCACCCCGCATCTTGAA (SEQ ID NO:67)           |
| DPPA4-A         | CTAACATCTGCCACCCACC (SEQ ID NO:68)         |
| Cripto-S        | CCCATGGGGATACAGCACAG (SEQ ID NO:69)        |
| Cripto-A        | AAGGCAGATGCCAACTAGCA (SEQ ID NO:70)        |
| DNMT3B-S        | GGTGGAGGCAGACAGTGGGA (SEQ ID NO:71)        |
| DNMT3B-A        | TGGTACATGGCTTTTCGATAGG (SEQ ID NO:72)      |
| SALL4-S         | CGACTCGTCCTCGCTGATA (SEQ ID NO:73)         |
| SALL4-A         | CCATGTTGCTTGGCCTGT (SEQ ID NO:74)          |
| NANOG-S         | CCTATGCCTGTGATTTGTGGG (SEQ ID NO:75)       |
| NANOG-A         | AGGTTGTTTGCCTTTGGGAC (SEQ ID NO:76)        |
| DPPA2-S         | CCCCTCCCTTGCCAACCATT (SEQ ID NO:77)        |
| DPPA2-A         | CACTGCCTTGCGTTTCCTCGA (SEQ ID NO:78)       |
| LIN28-S         | GTTCGGCTTCCTGTCCAT (SEQ ID NO:78)          |
| LIN28-A         | CACTCCCAATACAGAACCCC (SEQ ID NO:80)        |
| GAPDH-S         | AATCCCATCACCATCTCCAGGAG (SEQ ID NO:81)     |
| GAPDH-A         | CACCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC (SEQ ID NO:82)    |
| XIST-S          | TAATGTGCCAGATACCATGCTGGG (SEQ ID NO:83)    |
| XIST-A          | ACTTAACCTCACCAGTAAAGTCTTGAT (SEQ ID NO:84) |

| 게놈 PCR을 위한 프라이머 |   |
|-----------------|---|
| pMX-S           | CCTCAAAGTAGACGGCATCGCA (SEQ ID NO:85)   |
| pMX OCT4-A      | TTATTCGGGGCACCTGCTTGA (SEQ ID NO:86)    |
| pMX SOX2-A      | AACCTGAGGCCACAGTACGC (SEQ ID NO:87)     |
| pMX KLF4-A      | CTCCGACAAAAGTTTCCACTCTGC (SEQ ID NO:88) |
| pMX c-MYC-A     | AGGCGTGACCGCAACGTAGG (SEQ ID NO:89)     |
| pMX GFP-A       | GGGGTAGCGGCTGAAGCACT (SEQ ID NO:90)     |
| EBNA-1-S        | ATCAGGGCCAAGACATAGAGATG (SEQ ID NO:91)  |
| EBNA-1-A        | GCCAATGCAACTTGGACGTT (SEQ ID NO:92)     |

[0146]

[0147]

**실시간 PCR**

[0148]

RNeasy Plus Mini Kit(QIAGEN)를 사용하여, 배양된 세포의 전체 웰로부터 총 RNA를 분리했다. TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(TransGen Biotech)를 사용하여 RNA를 cDNA로 전환했다. Power SYBR® Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)를 사용하여 ABI Prism 7300 서열 검출 시스템에서 PCR을 실시했다. 델타-델타 Ct법을 사용하여 데이터를 분석했다. 실시간 PCR에 사용된 프라이머는 표 2에 열거한다.

[0149]

**테라토마 형성**

[0150]

붉은털 원숭이의 나이브형 및 프라임드형 iPSC를 채취하고, DF12 배지에서 재현탁했다. 융합성 60-mm 접시로부터의 세포를 비비만성 당뇨병/중증 복합 면역 결핍(NOD/SCID)의 마우스(중국)에게 피하 주사했다. 테라토마는 붉은털 원숭이 프라임드형 iPSC에 대해서는 6 내지 8주 후에, 나이브형 iPSC에 대해서는 4 내지 5주 후에 형성되었다. 그 후에 테라토마를 파라핀에 매워 넣고, 헤마톡실린 및 에오신 염색을 위해 가공했다.

[0151]

**핵형 분석**

[0152]

북경 대학교 의학 유전학 센터에서 G 밴드 염색체 분석을 행했다.

[0153]

**마우스 배아 현미 조작, 온조직 표본 고정 염색, 및 이미징**

[0154] 나이브형 및 프라임드형 iPSC 주사를 위해, 세포를 트립신화하고, ICR 이배체 마우스 배아의 8 세포 단계 배아 또는 E3.5 배반포에 미량 주사했다(배아당 6 내지 10 세포). 대략 15개의 주사 배아를 교배 후 2.5일에 상상 임신한 암컷의 각각의 자궁각으로 옮겼다. Abcam으로부터의 온조직 표본 고정 염색 절차 하에서 항인간 핵 항체 (클론 235-1, 1:200, Millipore)로 온조직 표본 고정 염색을 위해 E10-E11 발달 단계에서 배아를 해부했다. 전체 배아 슬라이스 표본 이미징을 위해, E16 발달 단계에서 배아를 해부하고, 이어서 포매, 동결, 및 슬라이싱 (10mm 두께 슬라이스)한 후에, 항인간 핵 항체 및 GATA4(1:200, Santa Cruz Biotechnology) 또는 OCT4(1:200, Abcam) 및 NANOG(1:200, R&D Systems)로 공동 염색했다. 공초점 분석을 위해, 올려진 배아 및 슬라이싱된 표본을 UltraVIEW VoX 시스템(PerkinElmer), Andor's Revolution WD 회전 디스크 공초점 현미경 시스템(Andor), 또는 ImageXpress 마이크로 하이 컨텐츠 스크리닝 시스템(MolDev)에 의해 이미징했다.

[0155] **붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC의 생성**

[0156] 초기 실험에서, OCT4 및 KLF4를 과발현하고, 마우스에서 오직 Oct4의 과발현에 의해서만 리프로그래밍을 용이하게 한다고 보고되어 있는(Li 등, *Cell Res.*, 21:196-204 (2011)) 소분자 결합의 존재 하에서 세포를 배양함으로써 붉은털 원숭이의 프라임드형 iPSC계가 최초로 확인되었다. 얻어진 프라임드형 iPSC계는 시험관내 및 체내에서 다능성을 갖는 인간 ESC 배지에서 유지될 수 있었지만(도 4a, 도 4c 및 도시하지 않은 데이터), 그것들은 마우스에서 나이브형 다능성을 유지하는 2i/LIF 상태로 옮겨질 때 신속하게 분화되어 다능성을 상실하고(2i/LIF)(도 1a), 따라서 설치류의 나이브형 다능성을 지지하는 믿을 만한 상태가 원숭이의 나이브형 다능 상태를 확인하는데 충분하지 않은 것을 시사한다.

[0157] 2i/LIF의 존재 하에서 프라임드형 iPSC를 나이브 상태로 전환하기 위해, 몇몇 경로 변조기를 시험했다. 마우스 ESC와 형태학적으로 유사한 돔 형상 콜로니는 bFGF가 2i/LIF 상태에 첨가되었을 때에만 나타났다. 다능성 마커 TRA-1-81 및 OCT4에 대한 알칼리성 포스파타아제(ALP) 염색 및 면역 염색은 TRA-1-81-양성 돔 형상 콜로니가 2i/LIF 상태에서의 배양 5일 후에 bFGF의 존재 하에서 유지된 것을 나타냈다(도시하지 않은 데이터). 특히, 이들 세포 콜로니는 또한 나이브형 다능성의 전형적인 마커 유전자인, TBX3을 발현한다(도시하지 않은 데이터)(Dunn 등, *Science*, 344:1156-1160 (2014); Niwa 등, *Nature*, 460:118-122 (2009)). 이들 결과는 전환 효율은 낮았지만, 프라임드형 iPSC를 전환하는 맥락에서 2i/LIF 상태로의 bFGF 첨가의 중요성을 나타낸다(8% 내지 10%의 총 콜로니는 TRA-1-81/TBX3 이중 양성 및 돔 형성이었음)(도 1a 및 도시하지 않은 데이터). 이들 전환된 TRA-1-81/TBX3 이중 양성 iPSC는 나이브형 iPSC로서 확인되었다.

[0158] **붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC에 대한 전환 조건 최적화**

[0159] 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC를 생성하는데 bFGF가 어떻게 작용하는지 이해하기 위해, 미토겐 활성화 단백질 키나아제(MAPK) 신호 전달 경로인, 주요 경로 bFGF 하류를 조사했다. 포유 동물 세포에는 적어도 3개의 특징지어진 MAPK 패밀리가 있다: 고전적인 MAPK(ERK), C-Jun N 말단 키나아제/스트레스 활성화 단백질 키나아제(JNK/MAPK), 및 p38 키나아제(Zhang 등, *Cell Res*, 12:9-18 (2002)). 이들 중 어느 것이 주된 역할을 했는지 확인하기 위해서, ERK, JNK, 및 p38에 특이적인 길항제가 이전의 전환 조건 하에서 개별적으로 또는 조합되어 시험되었다. PD0325901, 고전적인 MAPK/ERK의 억제제 및 2i/LIF 조건의 필수 구성 요소는 TBX3/TRA-1-81 이중 양성 돔 형상 콜로니의 전환 및 유지를 위해 필수적이었다(도시하지 않은 데이터). 또한, 2개의 다른 분자, JNKi에 대한 SP600125 및 p38i에 대한 SB203580은 각각 이들 전환 조건에서 나이브형 PSC의 전환 효율을 크게 향상시킬 수 있다(도 1a, 도 1b 및 도 1c). 이들 2개의 억제제의 조합은 총 콜로니의 75%에 대해 전환 효율을 더 향상시켰다(도 1a 및 도시하지 않은 데이터). 또한, 이들 콜로니를 채취하고 단일 세포가 통과되었을 때, 마우스 배아 섬유아세포 배양 보조 세포에서 배양 3일 후에 전형적인 ALP 양성, 돔 형상 콜로니가 나타났다. 면역 염색에 의한 추가 동정은 이들 콜로니가 TRA-1-81-양성인 것을 나타내고, 다능성으로 남은 것을 시사한다(도시하지 않은 데이터).

[0160] 전환 조건을 최적화하기 위해, 인간 나이브형 ESCs/iPSC의 생존 및 유지에 도움이 되는 것으로 밝혀진 Y27632(ROCK 억제제) 및 G0 6983(PKC 억제제) 또한 시험했다(Gafni 등, *Nature*, 504:282-286 (2013)). 그러나, 우리는 이들 2개의 화합물이 콜로니에서 분화를 촉진하고, TRA-1-81 발현을 감소시키는 것을 발견했고(도시하지 않은 데이터), 이는 인간과 원숭이에서 나이브형 다능성을 안정화하기 위한 신호 전달 조절에 대한 상이한 요구를 암시한다.

[0161] 최종적으로, bFGF 및 2i/LIF의 존재 하에서 SP600125와 SB203580의 조합을 사용함으로써, 안정적인 TRA-1-81/TBX3 이중 양성 돔 형상 나이브형 iPSC는 프라임드형 iPSC로부터 고효율에서(2i/hLIF+bFGF 단독보다 10배 높음) 성공적으로 안정화되었다(도 1a). 특히, 이 최적화된 배양 조건에 의해, 붉은털 원숭이 섬유아세포는 OCT4,

SOX2, 및 KLF4의 과발현에 의해 직접 TRA-1-81-양성 돌 형상 콜로니로 리프로그래밍되었다(도시하지 않은 데이터). 이 최적화된 배양 조건은 또한 이전에 기재한 에피소말 백터에 의거한 비바이러스성 통합법을 사용하여 나이브형 iPSC를 안정화하고(Okita, 등, *Nat. Methods*, 8:409-412 (2011))(도 2a, 도 2b, 및 도시하지 않은 데이터), 인간 나이브형 유도 만능 줄기 세포를 안정화하는데(도시하지 않은 데이터) 사용되었다. 안정화된 나이브형 iPSC는 아큐타아제를 사용하여 4 내지 5일마다 단일 세포 계대 배양될 수 있었고, 높은 성장률을 보였다(도 2c 및 도시하지 않은 데이터).

[0162] **붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC의 다능성 특성**

[0163] 이들 나이브형 iPSC가 실제로 다능성인지 여부에 대한 질문은 RT-PCR을 사용하여 해결되었다. RT-PCR 분석은 나이브형 iPSC가 OCT4, SOX2, SALL4, 및 NANOG를 포함한 내인성 다능성 마커 유전자를 발현한 것을 나타냈다(도 2b 및 도 2d). 나이브형 iPSC의 다능성 특성은 면역 염색에 의해 더 조사되었다. 특히, 이들 세포는 TRA-1-60, TRA-1-81, 및 SSEA-4를 포함한 다능성 특이성 표면 마커에 대해 양성으로 염색되었지만, SSEA-1에 대해서는 아니었다(도시하지 않은 데이터). 또한, 나이브형 iPSC는 MIXL1, CDX2, ZIC1, HAND1, EOMES, SOX1, PAX6, DLL1, 및 ZNF521의 하향 조절을 나타냈다(도시하지 않은 데이터). 반면, 이들 세포는 정상 핵형(수컷에 대해서는 42, XY 및 암컷에 대해서는 42, XX)을 가졌고, 8개월 이상의 단일 세포 계대 배양에 대해 돌 형상 형태 및 ALP 활성을 유지했다(도시하지 않은 데이터). 최종적으로, 나이브형 iPSC의 분화 가능성을 분석하기 위해, 3개의 배아층으로 분화하는 능력을 시험했다. 나이브형 iPSC는 수용체 마우스에 주사 후 4 내지 5주에 체내에서 검출된 모든 3개의 배아층의 조직을 갖는 테라토마를 형성했다(도시하지 않은 데이터). 따라서, 이들 결과는 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC가 다능성 특성 및 분화 가능성을 갖는 것을 나타낸다.

[0164] **붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC는 프라임드형 iPSC와는 상이한 성질을 갖는다**

[0165] 프라임드형 iPSC와 나이브형 iPSC의 차이를 더 조사하기 위해, 연구는 상이한 신호 전달 자극 또는 억제제에 대한 프라임드형 iPSC와 나이브형 iPSC의 뚜렷한 반응 패턴에 초점을 두었다(Greber 등, *Cell Stem Cell*, 6:215-226 (2010); Niwa 등, *Nature*, 460:118-122 (2009); Vallier 등, *Dev.*, 136:1339-1349 (2009)). 이 데이터는 나이브형 iPSC의 자기 재생이 마우스 및 사람의 나이브형 iPSC와 유사한, LIF 신호 전달에 의존하는 것을 나타냈다. JAK/STAT3 억제제에 노출되는 경우, 나이브형 iPSC는 TRA-1-81의 발현을 크게 감소시키면서 용이하게 분화되었고, 프라임드형 iPSC는 다능성 성질을 유지했다(도 3a 및 도 3b). 중요하게는, 인간의 세포에서와 마찬가지로, bFGF 신호 전달은 붉은털 원숭이의 프라임드형 iPSC 및 나이브형 iPSC 자기 재생 모두에 요구되었다. FGFR 억제제 SU5402의 존재 하에서, 프라임드형 iPSC 또는 나이브형 iPSC에 의해 형성된 TRA-1-81-양성 콜로니가 거의 없어, 영양류의 다능성 조절에서 이 경로의 역할을 시사한다(도 3a 및 도 3b). Ly294002, 전형적인 포스파티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K) 억제제는 농도에 의존하는 방법에서 나이브형 전환 공정을 심각하게 차단할 수 있고, 나이브 상태 안정화에서 FGF 하류 PI3K 신호 전달의 역할을 시사한다(도 3c). 흥미롭게도, 배지에 특이적이며 선택적인 TGF- $\beta$ -RI 억제제 SB431542의 첨가는 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC에는 아무런 효과가 없었지만, 프라임드형 iPSC 자기 재생에는 치명적이었으며, 이는 붉은털 원숭이의 프라임드형 iPSC 및 보고된 인간의 나이브형 iPSC(Gafni 등, *Nature*, 504:282-286 (2013); Theunissen 등, *Cell Stem Cell*, 15(4):471-87 (2014))와는 다른 것을 나타내고, TGF- $\beta$  신호 전달은 원숭이의 나이브형 iPSC 자기 재생에 불필요했다. 또한, 배지로의 TGF- $\beta$ 의 첨가는 나이브형 iPSC의 자기 재생에 대해서는 치명적이었지만 프라임드형 iPSC에 대해서는 아니었다(도 3a, 도 3b 및 도 3d).

[0166] 그 후에 암컷의 나이브형 iPSC에서 X 염색체 활성화를 분석했다. 최적화된 조건에 의해 유도된 암컷의 나이브형 iPSC는 핵에서의 H3K27me3 병소(foci)의 손실 및 XIST 발현 레벨의 극적인 하향 조절에 의해 나타난 바와 같이, X 염색체 재활성화 상태를 보유했다(도 3e 및 도시하지 않은 데이터). 그에 반해, 암컷의 프라임드형 iPSC는 H3K27me3 병소의 명확한 존재 및 체세포에서와 같은 XIST의 높은 발현 레벨을 갖는, X 염색체 불활성화 상태를 유지한다(도 3e 및 도시하지 않은 데이터). 따라서, 이들 결과는 상이한 종들 사이의 나이브형 iPSC에서의 X 활성화 상태의 보존을 시사한다.

[0167] 이어서, RNA 염기서열(RNA-seq) 분석에 의해 나이브형 iPSC와 프라임드형 iPSC 사이의 전체적인 유전자 발현 패턴을 비교했다. 계층 차원의 유전자 발현 클러스터링은 나이브형 iPSC가 뚜렷한 유전자 발현 패턴을 갖는 프라임드형 iPSC와는 별도로 클러스터링되는 것을 나타냈다(도 3f 및 도시하지 않은 데이터). 유전자 온톨로지(GO) 용어 분석은 나이브형 iPSC와 프라임드형 iPSC 사이의 주요 발달 신호 전달 및 대사에 관한 유전자 발현 패턴의 변화를 나타냈다(도 3g). 중요하게도, 프라임드형 iPSC와 비교하여, PRDM14, KLF5, ZFP42 (REX1), LIFR, TBX3, 및 NANOG와 같은 다수의 나이브 상태 관련 전사체는 나이브형 iPSC에서 상향 조절되었다(도 3f, 도 3g, 및

S3E). 한편, 나이브형 iPSC는 또한 HOXA2, MEIS1, 및 DLL1을 포함한, 계통 특이적 유전자의 발현의 감소를 나타냈으며, 프라임드형 iPSC에서는 낮지만 감지할 수 있는 정도의 레벨로 발현되었다(도 3h, 도 3i 및 도 3j). 종합적으로, 이들 데이터는 붉은털 원숭이에 있어서 나이브형 iPSC의 유전자 발현 패턴이 프라임드형 iPSC와는 완전히 다르며, 마우스 및 인간에 있어서의 이전의 연구와 유사한 것을 나타냈다(Gafni 등, *Nature*, 504:282-286 (2013); Chan 등, *Cell Stem Cell*, 13:663-675 (2013); Ware 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111:4484-4489 (2014); Theunissen 등, *Cell Stem Cell*, 15(4):471-87 (2014)).

[0168] 최종적으로, 체내에서 이종간 키메라를 생성하는데 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC의 능력을 시험하기 위해, 나이브형 및 프라임드형 iPSC를 8-세포 단계 배아 또는 ICR 마우스의 배아 3.5일째(E3.5) 배반포로 미세 주사한 후에 E10 내지 E11 발달 단계로 발달시켰다(표 3).

[0169] [표 3]

[0170] 이종간 키메라 분석의 요약

| 발달 단계  | 원숭이의 단순 iPSC 주사      |          |          |          |          |          |          |          | 초회형원자극 iPSC 주사 |          |          |
|--------|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------|----------|----------|
|        | 8세포                  | 8세포      | 8세포      | 배반포      | 배반포      | 배반포      | 배반포      | 합계       | 배반포            | 배반포      | 합계       |
| 세포계    | h1                   | h2       | h3       | h4       | h5       | h6       | h7       | h8       | h9             | h10      | h11      |
| 주사된 배아 | 20                   | 20       | 20       | 20       | 20       | 20       | 20       | 20       | 20             | 20       | 20       |
| 계생된 배아 | 2                    | 2        | 14       | 2        | 20       | 12       | 10       | 100      | 23             | 23       | 90       |
| 키메라 배아 | 1(E10.5)<br>0(E10.5) | 2(E10.5) | 0(E10.5) | 1(E10.5) | 2(E10.5) | 0(E10.5) | 0(E10.5) | 0(E10.5) | 0(E10.5)       | 0(E10.5) | 0(E10.5) |
|        | 0(E10.5)             | 1(E10.5) | 0(E10.5) | 0(E10.5) | 1(E10.5) | 0(E10.5) | 0(E10.5) | 2(E10.5) | 0(E10.5)       | 0(E10.5) | 0(E10.5) |

[0171]

[0172] 체내에서 붉은털 원숭이 iPSC 유래 세포의 존재를 검출하기 위해, 원숭이 세포의 핵을 특이적으로 표시할 수 있는 항인간 핵 항체(hNA)의 온조직 표본 고정 면역 염색(도시하지 않은 데이터)을 사용했다. 특히, 프라임드형 iPSC와는 대조적으로, 나이브형 iPSC를 갖는 키메라 배아가 얻어졌다(도시하지 않은 데이터). 특히, 3개의 나이브형 iPSC계로부터 생성된 6개의 키메라 배아 중 3개는 나이브형 iPSC 유래 세포의 광범위한 통합을 나타냈다(도시하지 않은 데이터). 이들 나이브형 iPSC 유래 세포가 키메라 배아의 배아 발달에 기여할 수 있는 여부를 더 조사하기 위해, E16 발달 단계에서 키메라 배아 중의 나이브형 iPSC 유래 세포의 분포를 분석했다. 2개의 독립적인 나이브형 세포계로부터 2개의 E16 키메라 배아를 더 분석했다. 나이브형 iPSC 유래 세포는 장, 간, 심장, 및 뇌와 같은 수용체 마우스의 많은 조직 및 기관으로 통합되었다. OCT4 및 NANOG를 포함한, 다능성 마커의 발현은 키메라 배아 중의 hNA+ 세포에서 검출될 수 없고(도시하지 않은 데이터), 이는 나이브형 iPSC 유래 세포에서의 다능성 상실을 시사한다. 흥미롭게도, 심장 영역의 나이브형 iPSC 유래 세포의 고급 통합 또한 관찰되었다(도시하지 않은 데이터). 또한, 이 단계에서 심장의 대부분의 hNA+ 세포에서 심장 특이적 마커 GATA4(인간과 마우스 GATA4 양방과 반응하는 GATA4 항체에 의해 염색됨으로써 검출)가 발현되었고(도시하지 않은 데이터)(Kuo 등, *Genes Dev.*, 11:1048-1060 (1997)), 이는 이들 나이브형 iPSC 유래 세포가 발달 중인 심장으로 통합될 때에 심장의 원기(fate)로 더 분화될 수도 있는 것을 시사한다. 아울러, 이들 데이터는 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC 유래 세포가 이종간 키메라 배아를 생성하고, 추가 분화에 의해 마우스 조기 배아로 재증식할 수 있는 것을 시사한다.

[0173] 논의

[0174] 본 연구는 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC가 프라임드형 iPSC로부터의 전환 또는 시토키인과 소분자 억제제의 간단한 조합으로 섬유아세포의 전사 인자 구동 리프로그래밍에 의해 성공적으로 생성될 수 있다는 증거를 제공한다. 게다가, 이 전환 조건은 또한 나이브형 iPSC의 자기 재생 회로의 장기간의 안정적인 유지 관리를 가능하게 한다. 중요하게도, 본 명세서에 개시된 발견은 마우스 배아로의 이종간 키메라 능력을 갖는, 나이브형 다능성이 비인간 영장류에서 유래될 수 있는 것을 나타낸다(도시하지 않은 데이터).

[0175] 생성된 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC는 프라임드형 iPSC 및 종래의 영장류 ESC와는 구별되는 많은 세포 특성을 갖는다. 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC는 단일 세포 계대 배양이 가능하며, 안정적인 돔 형상 형태와 정상 핵형으로 장기간 번식될 수 있다. 이들 세포는 LIF 및 MAPK 독립적 bFGF 신호 전달에 반응하여 다능성의 특징을 갖는 자기 재생을 한다. H3K27me3 핵 병소의 결핍 및 XIST 전사의 하향 조절은 나이브형 iPSC의 전(pre) X 불활성화 상태를 나타냈다. 또한, 이들 연구에서 안정화된 원숭이의 나이브형 iPSC는 또한 마우스와 사람의 나이브

형 다능성 줄기 세포와 의한 발현 특징을 공유한다. 예를 들어, NANOG 및 PRDM14를 포함한, 나이브 상태 관련 유전자의 상향 조절이 관찰되었고, 이는 마우스의 나이브형 다능 상태를 보호하고, 신호 전달 경로 및 세포내 후성 유전의 이중 조절을 통해 계통 구축을 억제하는 역할을 한다(Silva 등, *Cell*, 138:722-737 (2009); Yamaji 등, *Cell Stem Cell*, 12:368-382 (2013); Grabole 등, *EMBO Rep.*, 14:629-637 (2013)). 이 결과는 DLL1 및 MEIS1과 같은 계통 특이적 유전자 발현의 감소와 일치하며(van Es 등, *Nat Cell. Biol.*, 14:1099-1104 (2012); Hisa 등, *EMBO J.*, 23:450-459 (2004)), 이는 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC의 보다 미성숙한 상태를 나타낸다(도 3h 내지 도 3j). 따라서, 원숭이에 있어서 2개의 다능 상태의 전적으로 뚜렷한 표현형은 영장류에 있어서 다능성 네트워크 조절의 매커니즘을 조사하기 위한 우수한 모델 시스템을 제공할 수도 있다.

[0176] 이 연구에서 또 다른 중요한 발견은 원숭이의 나이브형 iPSC가 마우스 배아로 주사되는 경우에 이종간 키메라를 생성할 수 있다는 것이다. 이 어세이는 인간의 나이브형 PSC를 평가하는데 사용되어 왔지만, 이들 세포가 다능성 유전자 발현을 상실하고, 체내에서 분화되어 조직에 기여할 수 있는지 여부는 불분명하다(Gafni 등, *Nature*, 504:282-286 (2013); Theunissen 등, *Cell Stem Cell*, 15(4):471-87 (2014)). 여기서, 온조직 표본 고정 염색, 전체 배아 슬라이싱, 및 이미징을 사용하여 키메라 원숭이-마우스 배아 중의 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC 유래 세포의 분포의 개요를 얻었다. 조직 특이적 마커를 갖는 항인간 핵 항체의 공동 염색 및 전체 배아 슬라이스 표본에 대한 다능성 특이적 마커의 부재는 키메라 배아 중의 나이브형 iPSC 유래 세포가 더 분화하여 배아 발달에 기여할 수도 있는 것을 추가적으로 나타냈다. 따라서, 전체 배아 분석은 나이브형 다능성의 보다 엄격한 증거를 제공하기 위해 대안적인 전략을 제공할 수도 있다.

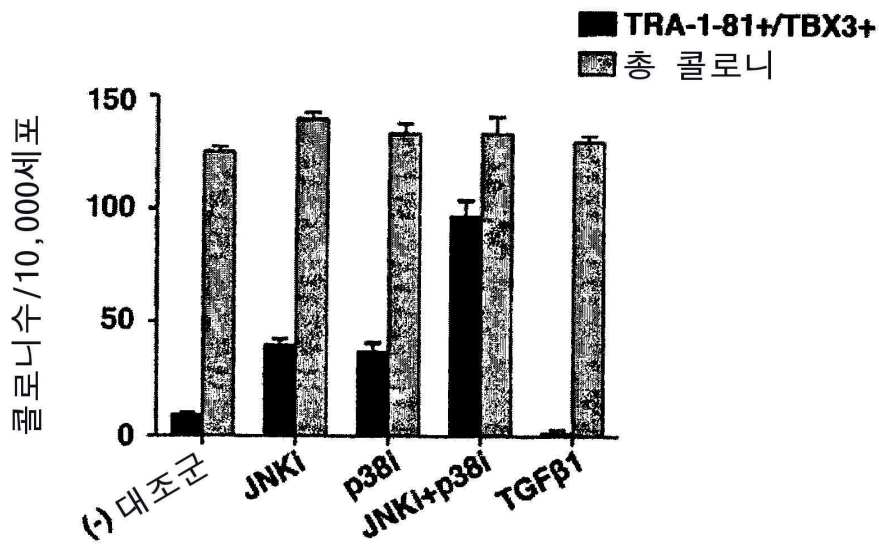
[0177] 이들 발견은 또한 마우스, 원숭이, 및 인간 세포의 나이브형 다능 상태를 달성하기 위한 조건의 진화적 보존 및 변화를 나타낸다. 첫째로, 데이터는 LIF/STAT3 신호 전달이 원숭이에서 뿐만 아니라 다른 2개의 종에서도 나이브 상태를 지지하는 것을 나타냈고, 이는 나이브형 다능 네트워크를 안정화함에 있어서 LIF/STAT3 신호 전달의 근본적인 효과를 시사한다. 둘째로, MAPK, ERK, JNK, 및 p38의 3개의 중심 구성 요소의 길항 작용(Zhang과 Liu, *Cell Res*, 12:9-18 (2002))은 3개의 종의 나이브형 다능 상태를 달성하는데 중요하다. 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC는 자기 재생을 유지하기 위해 bFGF 신호 전달에 의존한다. 이 발견은 인간 세포가 나이브형 다능 상태를 획득하기 위한 bFGF 신호 전달의 중요성 및 필수성을 나타낸 최근의 보고서와 일치하며(Gafni 등, *Nature*, 504:282-286 (2013); Chan 등, *Cell Stem Cell*, 13:663-675 (2013); Ware 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111:4484-4489 (2014)), 이는 bFGF 신호 전달이 인간 및 원숭이 세포의 나이브 상태를 유지하는 역할을 하는 것을 나타낸다. 그에 반해, bFGF 신호 전달은 마우스의 나이브형 다능성의 유지에 부정적인 영향을 미치고; 이는 이전의 보고서에서 시사한 바와 같이, 상이한 종의 뚜렷한 유전적 배경에 의한 것일 수 있다(Hanna 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107:9222-9227 (2010)). 영장류 나이브형 PSC에서의 bFGF의 MAPK 하류가 억제될 필요가 있기 때문에, PI3K와 같은 bFGF의 하류의 다른 신호 전달 경로는 영장류에서의 나이브형 다능성에 긍정적인 영향을 미칠 수도 있다(도 3c 및 도시하지 않은 데이터). 또한, 전환 과정 시에 TGF- $\beta$  신호 전달의 독립성이 밝혀졌다. 이는 TGF- $\beta$  신호 전달의 존재에 의존하는 인간의 나이브형 PSC의 다른 보고와는 대조적이다(Gafni 등, *Nature*, 504:282-286 (2013); Theunissen 등, *Cell Stem Cell*, 15(4):471-87 (2014); 미국 공개 제 2014/0315301).

[0178] 전반적으로, 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC의 생성은 2개의 상이한 다능 상태(나이브형 및 프라임드형)가 종 전체에 걸쳐 보존되는 것을 나타낸다. 가장 중요하게는, 나이브형 다능성 줄기 세포를 유도하는데 마우스, 원숭이, 및 인간 종 사이의 유사점 및 차이점의 발견은 나이브형 다능성의 미스터리를 풀어내는데 도움이 될 수도 있으며, 다른 종에서 실제 나이브형 PSC를 얻는데 유용할 수도 있다. 반면, 붉은털 원숭이의 나이브형 iPSC의 유래는 또한 전임상 연구 및 질병 모델링에서의 응용을 위한 유용한 세포 근원을 제공한다.

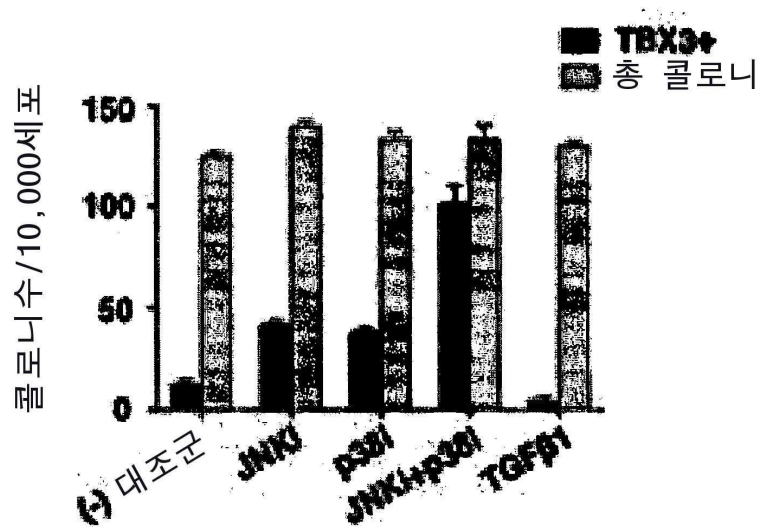
[0179] 상술한 명세서에서 본 발명은 특정 실시형태와 관련하여 기재되었고, 많은 세부사항이 예시의 목적으로 제시되었지만, 본 발명은 추가의 실시형태를 허용하며, 본 명세서에 기재된 특정 세부사항은 본 발명의 기본 원리로부터 벗어나는 일 없이 많이 변화될 수 있는 것을 당업자들은 이해할 것이다.

도면

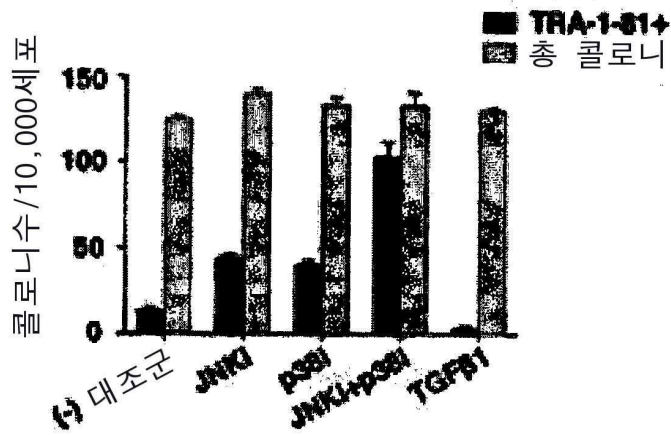
도면1a



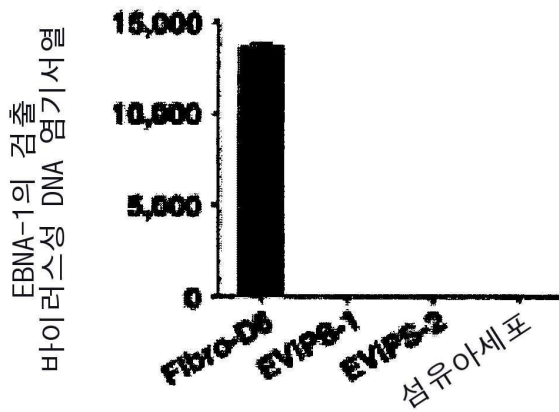
도면1b



도면1c



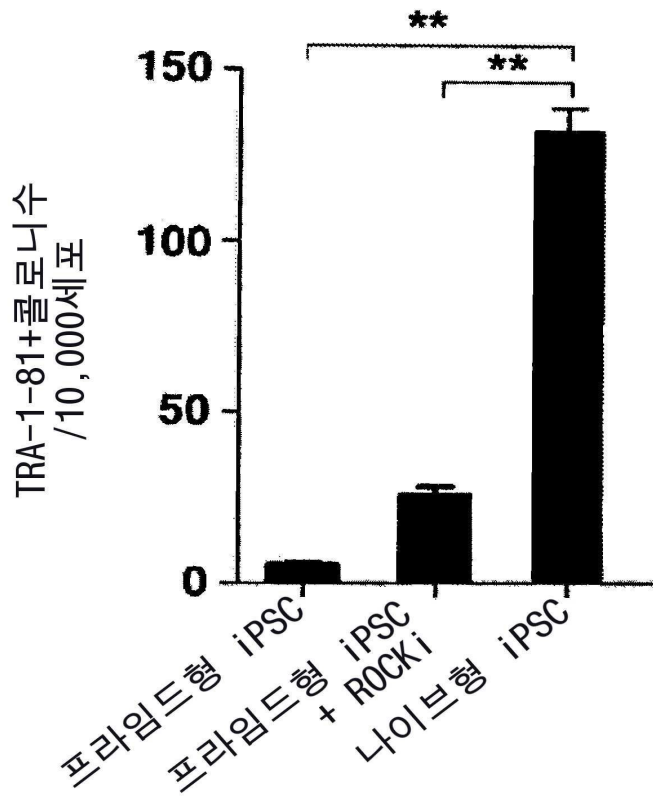
도면2a



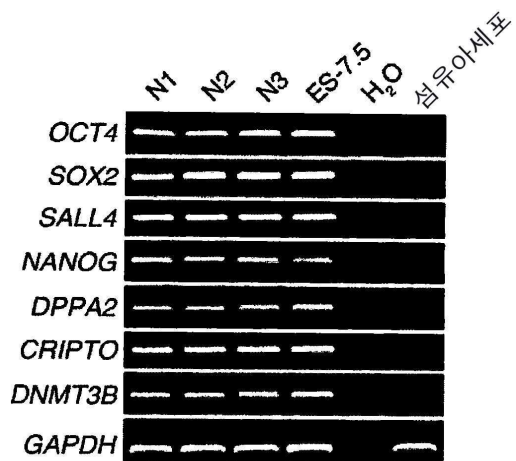
도면2b



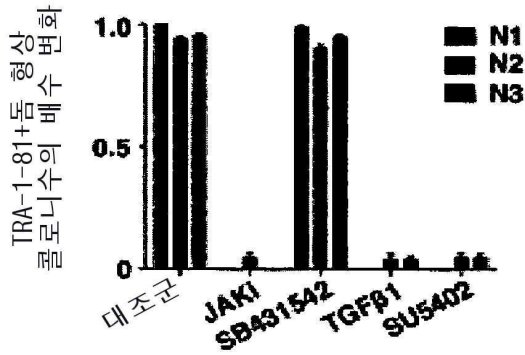
도면2c



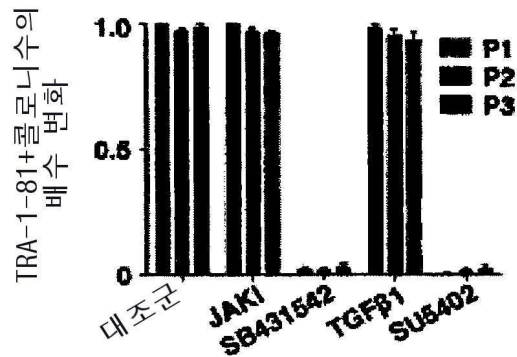
도면2d



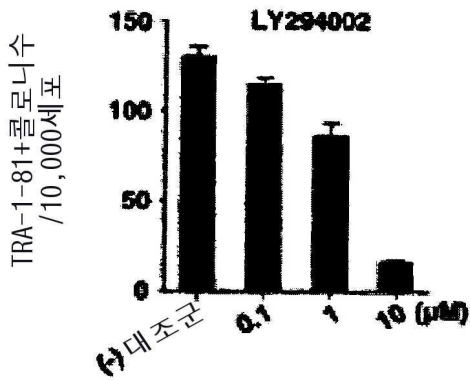
도면3a



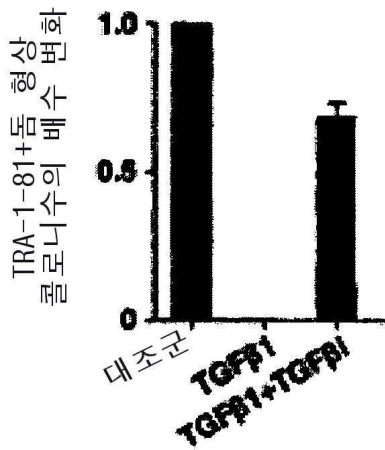
도면3b



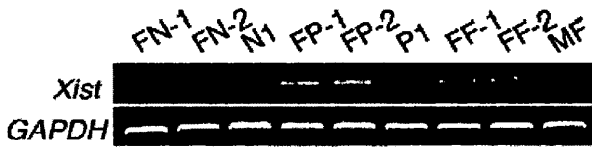
도면3c



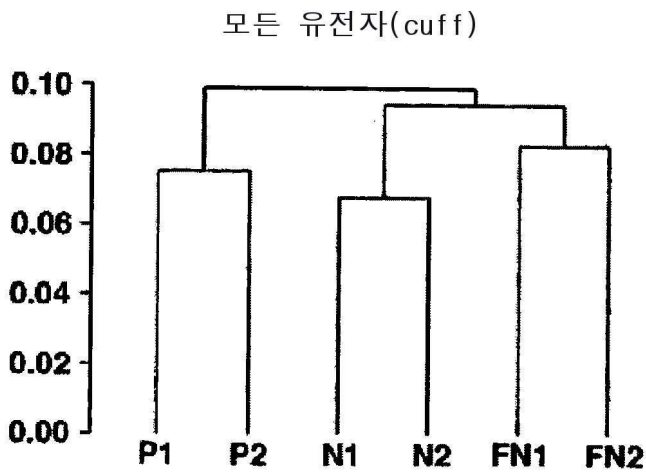
도면3d



도면3e

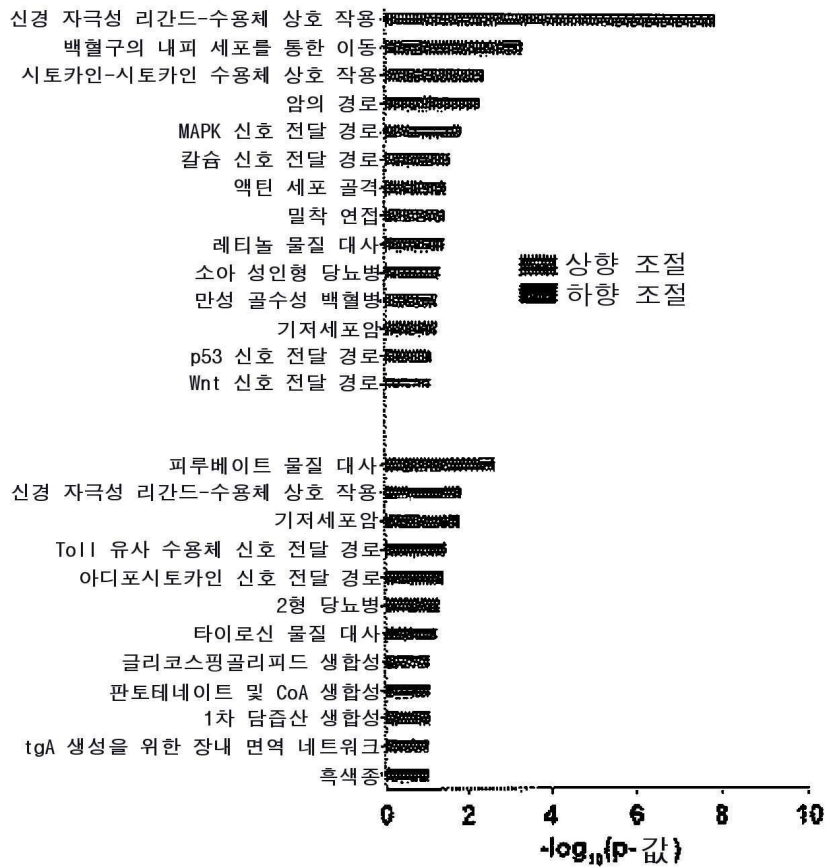


도면3f

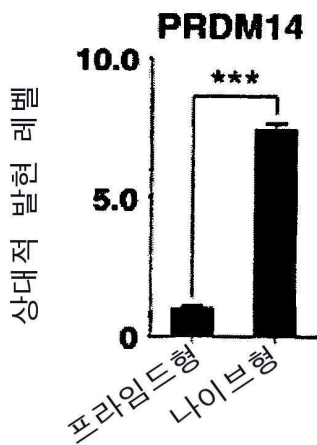


도면3g

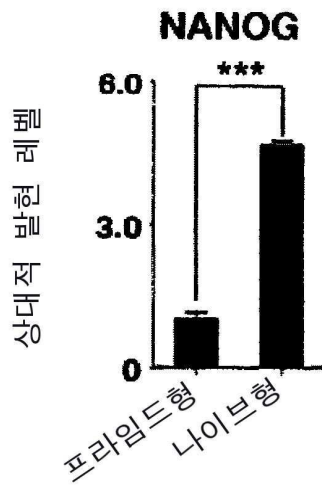
### GO 용어 분석



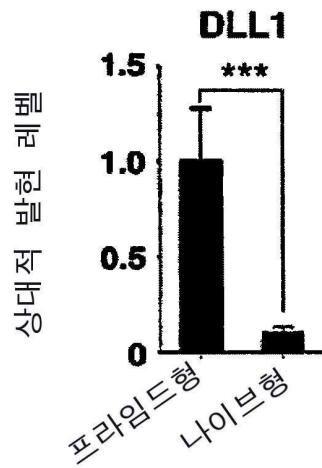
도면3h



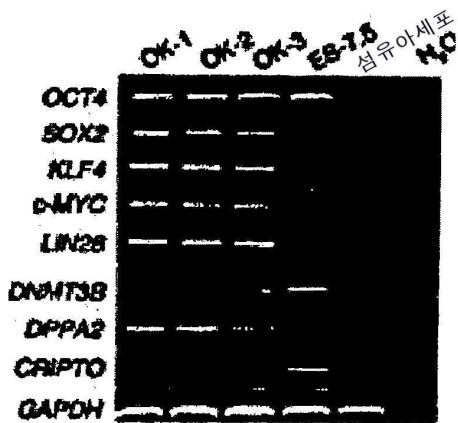
도면3i



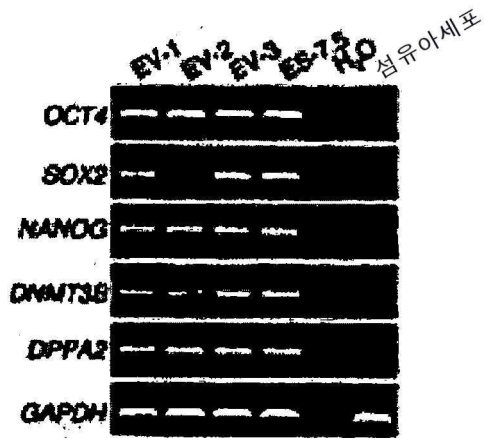
도면3j



도면4a



도면4b



도면4c

