(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월29일
(11) 등록번호 10-2160721
(24) 등록일자 2020년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) *C12N 5/0735* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/00 (2013.01)
C12N 5/0606 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7012407(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년12월19일
심사청구일자 2019년05월24일
(85) 번역문제출일자 2019년04월29일
(65) 공개번호 10-2019-0049918
(43) 공개일자 2019년05월09일
(62) 원출원 특허 10-2017-7014775
원출원일자(국제) 2011년12월19일
심사청구일자 2017년06월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/065900
(87) 국제공개번호 WO 2012/087965
국제공개일자 2012년06월28일
(30) 우선권주장
61/426,369 2010년12월22일 미국(US)
61/496,991 2011년06월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Lin, T. et al.(Nature Methods, November 2009, vol.6, no.11, pp.806-808)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
페이트 세러퓨틱스, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 92121, 샌디에이고, 스위트 200, 3535 제너럴 아토믹스 코트
(72) 발명자
발라메르, 바흐람
미국, 캘리포니아 91344, 그라나다 힐스, 17113 리셋 스트리트
아부자루어, 램지
미국, 캘리포니아 92128, 샌디에이고, 10840 세이버 힐 드라이브 221
플린, 피터
미국, 캘리포니아 92037, 라 호야, 611 시 레인
(74) 대리인
특허법인한얼

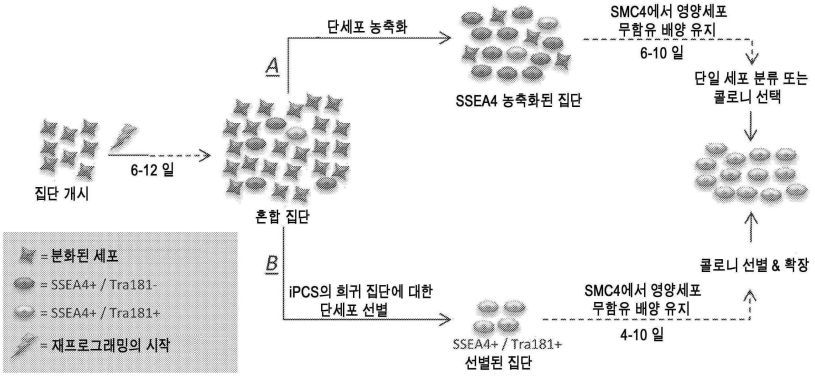
전체 청구항 수 : 총 23 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **단세포 분류 및 iPSC의 증강된 재프로그래밍을 위한 세포 배양 플랫폼**

(57) 요 약

본 발명은, 인간 유도된 만능 줄기세포(iPSC)를 생성 및 배양하는 영양세포 비함유 조건을 포함하여, 줄기세포를 배양하기 위한 세포 배양 조건을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은, 만능 세포의 장기간 배양, 영양세포 비함유 환경에서 세포의 재프로그래밍, 만능 세포의 단일-세포 분리, 만능 세포의 세포 분류, 비분화 상태의 유지, 향상된 재프로그래밍의 효율 및 천연 만능 세포의 생성을 허용하는 배양 플랫폼을 제공한다.

대 표 도



명 세 서

청구범위

청구항 1

영양세포-비함유 (feeder-free) 환경에서 인간 만능 (pluripotent) 세포를 배양하는 방법으로서,

영양세포-비함유 배양 배지에서 인간 만능 세포를 계대하는 단계, 및 그로써 계대 동안 상기 세포의 만능성을 유지하는 단계를 포함하고,

상기 계대가 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 영양세포-비함유 배양 배지가:

인간 만능 세포의 만능성을 유지하면서 적어도 1회의 세포 분열을 가능케 하고;

적어도 5회의 세포 분열 또는 적어도 10회의 세포 분열 동안 인간 만능 세포의 만능성 유지를 가능케 하고;

성장 인자 및 사이토킨이 없거나 또는 마트리겔(Matrigel^{TM}) 부재이고,

bFGF를 함유하지 않는 특성 중 적어도 하나를 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것이 세포를 (a) A-83-01, (b) BIO 또는 CHIR99021, (c) PD98059 또는 PD0325901, 및 (d) 티아조비빈 또는 Y27632와 접촉시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것이 세포를 (a) A-83-01 또는 SB431542, (b) BIO, (c) PD98059 또는 PD0325901, 및 (d) 티아조비빈 또는 Y27632와 접촉시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 5

해리된 (dissociated) 인간 만능 세포를 배양하는 방법으로서,

a) 인간 만능 세포를 해리시켜 해리된 세포를 수득하는 단계; 및

b) 해리된 세포를 영양세포-비함유 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때

상기 접촉이 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하고,

상기 세포의 만능성이 유지되는 것인, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 방법이:

(i) 인간 만능 세포를 해리하는 단계가 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하고;

(ii) 인간 만능 세포를 해리하는 단계 전에, TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하고;

(iii) 인간 만능 세포를 해리하는 단계 후에, 상기 해리된 세포를 배양 배지 중에 현탁시키고, 상기 현탁이 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하는 것 중 하나를 포함하고,

상기 해리된 세포의 핵형이 배양 후에도 유지되고;

상기 해리된 세포의 생존능이 해리 전에, 그동안에, 또는 그 후에 제제의 혼합물과 접촉되지 않은 해리된 세포의 생존능에 비해 적어도 10%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200%, 및 적어도 500%로 구성된 군으로부터 선택되는 수준으로 증강되는 것인, 방법.

청구항 7

인간 유도 만능 줄기세포를 생성하기 위해 영양세포-비함유 환경에서 복수의 인간 세포의 재프로그래밍 효율을 향상시키는 방법으로서:

복수의 인간 세포를 적어도 Oct4를 포함하는 적어도 하나의 만능성 인자와 접촉시키는 단계;

상기 복수의 세포를 영양세포-비함유 배양 배지와 접촉시켜, 재프로그래밍을 유도하는 단계로서, 이때 상기 접촉이 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하는 단계; 및

재프로그래밍된 세포를 영양세포-비함유 배양 배지에서 계대하는 단계를 포함하고,

상기 계대된 세포가 재프로그래밍된 상태를 유지하고, 그로 인해 재프로그래밍 효율이 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하지 않은 재프로그래밍 효율과 비교하여 적어도 10%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 300%, 및 적어도 500%로 구성된 군으로부터 선택되는 수준으로 향상되고;

상기 재프로그래밍 효율이 재프로그래밍에 요구된 시간 또는 재프로그래밍된 세포 수에 의해 측정되는 것인, 방법.

청구항 8

인간 유도 만능 줄기세포 (iPSCs)를 수득하는 방법으로서:

(a) 복수의 인간 세포를 처리하여 재프로그래밍을 유도하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)로부터의 복수의 세포를 포함하는 해리된 세포의 현탁액을 제조하는 단계;

(c) 현탁액 중의 해리된 세포를 분류하여 하나 이상의 만능성 마커를 발현하는 분류된, 해리된 세포를 수득하는 단계; 및

(d) 하나 이상의 만능성 마커를 발현하는 분류된, 해리된 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 이때

상기 분류된 세포의 만능성이 유지되고;

상기 단계 (a), (b), (c) 및 (d) 중 적어도 하나가 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 방법이:

(a) 복수의 인간 세포를 처리하여 재프로그래밍을 유도하는 단계가 상기 복수의 세포를 적어도 Oct4를 포함하는 적어도 하나의 만능성 인자와 접촉시키는 것을 포함하고;

(b) 해리된 세포의 현탁액을 제조하는 단계가 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하고;

(c) 세포를 분류하여 SSEA4, TRA160, TRA181, TRA1-85, TRA2-54, GCTM-2, TG343, TG30, CD9, CD29, CD30, CD50, CD133, CD140a, CD56, CD73, CD105, CD31, CD34, OCT4, Nanog, 및 Sox2를 포함하는 만능성 마커의 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상을 발현하는 세포를 수득하고;

(d) 하나 이상의 만능성 마커가 SSEA4, CD30, 및 TRA160 또는 TRA181이고;

(e) 세포를 영양세포-비함유 환경에서 처리하고, 현탁하고, 분류하고, 배양하고;

(f) 유도 만능 줄기세포가 복수의 세포를 처리하여 재프로그래밍을 유도한 후 2 내지 22일째에 수득되고;

(g) 유도 만능 줄기세포가 복수의 세포를 처리하여 재프로그래밍을 유도한 후 4 내지 18일째에 수득되고;

(h) 유도 만능 줄기세포가 복수의 세포를 처리하여 재프로그래밍을 유도한 후 4 내지 22일 이내에 수득되고;

(i) 유도 만능 줄기세포가 복수의 세포를 처리하여 재프로그래밍을 유도한 후 6 내지 18일 이내에 수득되고;

(j) 유도 만능 줄기세포가 복수의 세포를 처리하여 재프로그래밍을 유도한 후 10 내지 16일 이내에 수득되는 특성 중 적어도 하나를 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

복수의 세포로부터 인간 만능 세포를 고갈시키는 방법으로서:

(a) 만능 세포를 포함하는 세포의 혼합물을 포함하는 해리된 세포의 현탁액을 수득하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 분류하여 하나 이상의 만능성 마커를 발현하는 세포를 제거함으로써, 세포의 혼합물로부터 만능 세포를 고갈시키는 단계를 포함하고,

상기 방법이 단계 (a) 전에, 단계 (a) 동안에, 또는 단계 (a) 전 및 동안 둘 다에 현탁액 중의 세포의 혼합물에서 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하고; 그로써 인간 만능 세포가 없는 복수의 세포를 수득하는 것인, 방법.

청구항 11

게놈 안정성을 갖는 인간 유도 만능 줄기세포 (iPSCs)를 수득하는 방법으로서:

세포를 영양세포-비함유 배양 배지와 접촉시키는 단계로, 상기 접촉된 세포가 만능 세포를 수득하기에 충분한 조건하에서 배양되고, 상기 조건이 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하는 단계; 및

영양세포-비함유 배양 배지 중에서 상기 만능 세포를 계대하는 단계를 포함하고, 이때

상기 만능 세포의 만능성이 유지되고 만능 세포가 게놈 안정성을 가지는 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 만능 세포를 수득하기에 충분한 조건이 세포를 적어도 Oct4를 포함하는 만능성 인자와 접촉시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 13

인간 유도 만능 줄기세포 (iPSCs)의 게놈 안정성을 유지하도록 iPSCs를 배양하는 방법으로서:

만능 세포를 영양세포-비함유 배양 배지 중에서 배양하고 계대하는 단계로서, 상기 배양 및 계대가 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하는 단계; 및

그로써 배양 동안 만능 세포의 게놈 안정성 및 만능성을 유지하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 세포 배양이 만능 세포의 게놈 안정성을 유지하면서 적어도 2회, 적어도 5회, 적어도 10회, 또는 적어도 15회 계대 동안 배양 배지 중에서 만능 세포의 배양을 포함하는 것인, 방법.

청구항 15

단세포 해리된, 유도 만능 세포, 또는 이의 클론 집단을 포함하는 치료용 세포를 제조하는 방법으로서, 상기 방법이:

유도 만능 세포를 하나 이상의 해리 효소로 처리하여 단세포 해리된 만능 세포를 수득하는 단계, 및

TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 단계를 포함하고,

(i) 상기 유도 만능 세포의 만능성 및 생존능이 단세포 해리된 만능 세포에서 유지되고, (ii) 유도 만능 세포가 인간 세포인 것인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 방법이 하나 이상의 만능성 마커를 발현하는 하나 이상의 단일 분해된 만능 세포를 선택하고

분리함으로써 단세포 해리된 만능 세포를 분류하여 하나 이상의 단일 해리된, 유도 만능 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 17

게놈 안정한 단세포 해리된, 유도 만능 세포를 포함하는 치료용 세포를 제조하는 방법으로서, 상기 방법이:

유도 만능 세포를 하나 이상의 해리 효소로 처리하여 단세포 해리된 만능 세포를 수득하고, 그로써 향상된 게놈 안정성을 갖는 유도 만능 세포를 수득하는 단계를 포함하고,

상기 유도 만능 세포가 (a) Oct4, 및 선택적으로, Sox2 및 Klf4의 하나 이상을 포함하는 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 체세포 내로 도입하고, (b) TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해함으로써, 유도 만능 세포를 생성하여 수득되는 인간 세포인 것인, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 유도 만능 세포에서 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 19

단세포 인간 유도 만능 줄기세포 또는 이의 클론 집단을 수득하는 방법으로서, 상기 방법이:

a) 인간 유도 만능 줄기세포를 해리하고 생성된 해리 세포를 영양세포-비함유 배양 배지에 현탁하여 영양세포-비함유 세포 현탁액을 제공하는 단계;

b) 영양세포-비함유 세포 현탁액을 분류하여 단일 만능 줄기세포에 대해 농축된 (enriched) 분류된 세포를 수득하는 단계;

c) 하나 이상의 단일 만능 줄기세포를 분리하는 단계; 및

d) 영양세포-비함유 배양 배지에서 단계 b)로부터 수득된 단일 만능 줄기세포를 배양 및 팽창시키는 단계를 포함하고,

i) 상기 단계 a), b) 또는 c) 중 하나 이상이 TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것을 포함하고; ii) 만능 줄기세포의 만능성 및 생존능이 단일 만능 줄기세포 및 그의 클론 집단에서 유지되는 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 방법이:

a) 분류가 하나 이상의 만능성 마커를 발현하는 세포에 대한 자기 비드 또는 유동 세포계수에 의해 수행되고;

b) 단일 만능 줄기세포에 대해 농축된, 분류된 세포가 하나 이상의 만능성 마커를 발현하는 세포에 비해 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200%, 및 적어도 500%로 구성된 군으로부터 선택되는 수준으로 농축되고;

c) 하나 이상의 만능성 마커가 SSEA4, TRA160, TRA181, TRA1-85, TRA2-54, GCTM-2, TG343, TG30, CD9, CD29, CD30, CD50, CD133/프로미닌, CD140a, CD56, CD73, CD105, CD31, CD34, OCT4, Nanog 또는 Sox2를 포함하는 것 중 하나 이상의 특징을 갖는 것인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것이 세포를 (i) 티아조비빈 또는 Y27632, (ii) A-83-01 또는 SB431542, (iii) BIO 또는 CHIR99021, 및 (iv) PD98059 또는 PD0325901과 접촉시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 22

제16항에 있어서, 상기 방법이 하나의 선택된 단일 해리된, 유도 만능 세포를 팽창시켜 유도 만능 세포의 클론 집단을 수득하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, TGFβ 수용체, GSK3, MEK, 및 Rock 각각을 특이적으로 저해하는 것이 세포를 (a) A-83-01 또는 SB431542, (b) BIO 또는 CHIR99021, (c) PD98059, 및 (d) 티아조비빈 또는 Y27632와 접촉시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] [서열목록에 관한 진술]

[0002] 본 출원과 관련된 서열목록은 종이 카피 대신에 텍스트 포맷으로 제공되며, 본 명세서에 참조로서 포함된다. 서열목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 FATE_094_00WO_ST25.txt이다. 2011년 12월 15일에 작성된 당해 텍스트 파일은 4 KB이고, EFS-Web을 통해 전자문서로 제출된다.

[0004] [관련 출원의 상호 참조]

[0005] 본 출원은 35 U.S.C. §119(e)하에 2010년 12월 22일자로 출원된 미국 가출원 번호 제61/426,369호 및 2011년 6월 14일자로 출원된 미국 가출원 번호 제61/496,991호의 이익을 청구하고, 이들 각각은 이의 전체가 참조로서 포함된다.

[0007] [기술분야]

[0008] 본 발명은, 인간 유도된 만능 줄기세포(iPSC)를 생성 및 배양하는 영양세포 비함유 조건을 포함하여, 줄기세포를 배양하기 위한 세포 배양 조건에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은, 만능 세포의 장기간 배양, 영양세포 비함유 환경에서 세포의 재프로그래밍, 만능 세포의 단일-세포 분리, 만능 세포의 세포 분류, 비분화 상태의 유지, 향상된 재프로그래밍의 효율 및 천연 만능 세포의 생성을 허용하는 배양 플랫폼에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0010] 만능 줄기세포 생물학의 응용은 재생 의학을 위한 새로운 문을 연다. 성장 인자의 칵테일에서 이식전 낭포를 배양함으로써 인간 배아 줄기세포(hESC)의 유도는, 신장된 자가 재생하는 세포 모집단이 시험관내 또는 생체내에서 치료 관련 세포 계통으로 분화될 수 있는 다수의 유망한 세포 치료 방법을 유도했다. ESC 생물학의 추가의 응용에 있어서 및 이식전 유전자 분석을 사용함으로써, 몇몇 유전자 질환 배경으로부터 ESC 라인을 유도할 수 있고, 따라서 조직 배양 접시에서 이들 질환을 모델화할 수 있게 되었다. 그러나, ESC 기술에 대한 일부 제한: 즉 ESC가 유될 수 있는 유전자 배경의 범위가 기술적으로 및 정책적으로 한정되고, ESC의 유전자 배경이 항상 공지된 것은 아니며, ESC 유도된 세포 요법의 사용이 실질적으로 동종이식편이고, 이는 전형적인 조직/기관 이식체와 동일한 거부 위험이 된다.

[0011] 주된 진보에 있어서, 만능 세포 모집단은 성인의 말단 분화된 세포로부터 생성되고, 이러한 유도된 세포는 유도된 만능 줄기세포(iPSC)로 불리운다. iPSC 기술은 임의의 공여체로부터의 세포를 만능의 자가 재생 상태로 재프로그래밍하게 하고, 따라서 임의의 유전자 배경으로부터 균질한 세포 모집단의 신장을 허용한다. iPSC는 ESC에 관한 윤리적 고려사항을 극복하고, 고생산성 약물 스크리닝을 위한 임의의 유전자 인간 질환 또는 생체이물 약물 독성 스크리닝을 위한 간세포 및 심근 세포의 모델을 유도하기 위해 사용할 수 있다. 추가로, iPSC는 궁극적으로, 이식 거부를 방지할 수 있는 자가조직 이식에서 환자 자신의 세포로부터 생성된 세포 요법을 야기할 수 있다. 발현 및 분화 분석은 iPSC가, 다중 ESC 라인을 비교하는 경우에 관찰된 것들과 유사한 정도로 클론 iPSC 배양물 사이의 편차와 함께 분자 수준에서 ESC와 매우 유사한 것으로 밝혀졌다.

[0012] iPSC는 일반적으로 완전한 프로그래밍에 요구되는 것을 밝혀진 몇몇 주요 유전자, 즉 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 및 Nanog의 조합물의 이소성(ectopic) 발현에 의해 생성되어 왔다. iPSC는 본래 주요 전사 인자를 발현시키기 위해 통합 바이러스 시스템을 사용하여 생성되었다. 그러나, 삽입 돌연변이유발 및 iPSC 분화 후에 외인성 유전자 재활성화 가능성에 기인한 영구적인 게놈 변화는 후속의 약물 스크리닝 및 이들 방법에 의해 생성된 세포의 치료학적 적용에 대한 잠재적 문제를 나타낼 수 있다. 실제로, 분화된 신경구로서 이식한 경우, 설치류에서 큰 비율의 종양 형성 클론과 함께, 동일한 바이러스 시스템을 사용하여 생성한 iPSC 클론 사이의 상당한 차이가 보고되었다. 연구는 동일한 바이러스 방법을 사용하여 생성한 iPSC가 분화되면 상이하게 거동할 수 있음을 시사한다. 이소성 유전자 통합 부위에서의 차이는 상이한 삽입 돌연변이유발 및 이식유전자 발현의 후성적 조절을 생성할 수도 있다. 통합 시스템을 포함하는 iPSC 생성 방법의 경우, 다수의 클론은 만능 및 분화된 상태에서 안정한 것을 동정하기 위해 유도 및 스크리닝될 필요가 있다. 따라서, 소정 공여체 세포 공급원으로부터 클론 iPSC의 신속한 유도 방법이 유리할 수 있다. 아데노바이러스 또는 에피솜 일과성 발현 등과 같이 iPSC 생성을 위한 비-통합 시스템의 사용이 입증되었지만, 효율이 낮았다. 이들 시스템은 iPSC 생성에서 안전성 및 안정성 문제를 해결할 수 있지만, 임의의 DNA-기반 재프로그래밍 방법을 사용하는 경우에 게놈 통합 가능성이 존재하고, 이는 iPSC 유도된 세포 요법의 개발에서 이들의 사용전에 평가될 필요가 있다.

[0013] 절제가능한 바이러스 시스템 및 게놈 전체 발현 프로파일링은 통합된 발현 카세트를 갖는 iPSC가 절제된 바이러스 인자를 갖는 동일한 클론보다 ESC에 덜 유사함을 나타낸다. 추가로, 가장 통상적으로 사용된 전사 인자가 세포 계대 펩티드와의 융합 단백질로서 이. 콜라이에서 발현되는 단백질 단독 재프로그래밍이 현재 입증되었다. 복수 용량의 정제된 단백질은 iPSC 생성을 야기하는 쥐 섬유아세포에 적용되었다. 이러한 단백질 단독 시스템을 사용하는 재프로그래밍의 효율은 매우 낮았다. 이는 단백질 전사의 효율, 단백질의 특이적 활성 및/또는 단백질의 안정성에 기인할 수 있다.

[0014] 단백질 형질도입 또는 mRNA를 통한 만능 유전자의 이소성 발현 또는 이들의 도입에 의해 분화된 세포를 재프로그래밍하는 방법은 수개월 및 통상의 지식을 가진 줄기세포 생물학자의 지식을 필요로 한다. 재프로그래밍된 세포의 동정은 먼저 시각에 의해 수행된다: ESC 유사 콜로니 형태에 대한 스크리닝. 이러한 콜로니는 손으로 선발되고, 통상 기계적으로 계대되고, 신장되어야 한다. 만능성 인자의 도입은 또한 불완전하게 재프로그래밍된 세포 뿐만 아니라 형질전환된 세포 콜로니를 생성한다. 연구자들은 형질전환된 세포의 배경으로부터 진정한 iPSC 콜로니를 동정할 수 있지만, 이는 효율적인 방법이 아니다. 이어서, 진정한 만능 모집단으로서 추가의 특성화 및 인식이 요구되고, 통상적으로 만능 마커에 대한 면역세포화학 염색, 유전자 발현 및 후성적 분석, 및 3개의 생식세포 층(외배엽, 중배엽 및 내배엽)으로 분화하는 만능 모집단의 능력을 포함한다. 만능 세포가 동정 및 선별되면, 이러한 세포는 일반적으로 콜로니로서 성장하고, 재플레이팅 전에 세포를 선발 및 기계적 분리하여 세포를 장기간 유지함으로써 수동 계대를 필요로 한다.

[0015] 다양한 이식전 및 이식후 단계로부터 유도된 배아 줄기세포는 뚜렷한 만능 상태를 나타낸다. 예를 들면, 배반포의 내부 세포 매쓰로부터 유도된 세포는 보다 "순순한" 것으로 간주되고, 랜덤으로 분화되는 보다 높은 경향과 함께 보다 "프라이밍된(primed)" 것으로 간주되는 이식 후 유도된 세포와는 매우 상이한 주요 특성을 갖는다.

나이브 세포는 보다 "근거있는 상태"로 존재하는 것처럼 보이고, 이들의 미분화 상태를 유지하기 위한 외인성 신호전달을 필요로 하지 않는다. 한편, 프라이밍된 세포는 TGFβ, 액티빈 및 bFGF를 포함하는 주요 사이토킨의 외인성 신호전달을 필요로 하고, 이들의 미분화 상태를 유지하는 ERK/MAPK 세포 경로에 매우 의존적이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] iPSC 생성 공정에 대한 개선은 기술적 장벽을 극적으로 저하시킬 수 있고, 당해 공정을 촉진시킬 수 있으며, 약물 스크리닝 및 세포 요법 등과 같은 기술의 산업적 적용을 위한 세포의 후속적 신장 및 분화를 가능하게 할 수 있다. 외인성 물질의 사용 없이 iPSC의 보다 효율적인 제조방법 및 재프로그래밍된 세포의 보다 효율적인 동정 및 선별방법이 요구되고 있다. 천연 상태의 인간 만능 줄기세포를 촉진시키는 iPSC의 생성방법은 질환 수정, 지시된 분화 및 제조-규모 신장 등과 같은 재생 의학에서 장래의 작용을 위해 매우 유리할 것이다. 추가로, 단세포 계대 및 신장성을 가능하게 하는 소정 배양 조건에서 iPSC의 보다 효율적인 생산 방법이 요구되고 있다.

과제의 해결 수단

[0019] 발명의 간단한 요약

[0020] 본 발명의 한 가지 양태는, 쥐 배아 줄기세포가 아닌 만능 세포를, 세포의 만능성을 유지하는 적어도 하나의 제제를 포함하는 배양 배지에서 영양세포-비함유 환경에서, 배양 동안 세포의 만능성을 유지하면서, 배양하는 것을 포함하는, 영양세포-비함유 환경에서 만능 세포를 배양하는 방법으로서, 상기 제제가 i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 및 iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 배양 방법을 제공한다.

[0021] 특정한 양태에서, 배양 배지는 세포의 만능성(pluripotency)을 유지하면서, 적어도 1회의 세포 분열을 허용하기에 충분한 양의 제제를 포함한다. 추가의 양태에서, 배양 배지는 세포의 만능성을 유지하는 적어도 2개의 제제를 포함한다. 특정한 양태에서, 배양 배지는 세포의 만능성을 유지하는 적어도 3개, 또는 4개의 제제를 포함한다.

[0022] 또 다른 특정한 양태에서, 세포의 만능성을 유지하는 제제는 Rock 억제제를 포함한다. 특정한 양태에서, Rock 억제제는 티아조비빈 또는 Y27632이다.

[0023] 한 가지 양태에서, 세포의 만능성을 유지하는 제제는 TGFβ 억제제를 포함하고, 특정한 양태에서 TGFβ 억제제는 A-83-01 또는 SB431542이다.

[0024] 특정한 양태에서, 세포의 만능성을 유지하는 제제는 GSK3 억제제를 포함하고, 특정한 양태에서 GSK3 억제제는 CHIR99021 또는 BIO이다.

[0025] 본 발명의 한 가지 양태에서, 세포의 만능성을 유지하는 제제는 MEK 억제제를 포함한다. 특정한 양태에서, MEK 억제제는 PD98059 또는 PD032901이다.

[0026] 특정한 양태에서, 배양 배지는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함한다. 본 발명의 보다 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0027] 본 발명의 일부 양태에서, 세포의 만능성은 적어도 5회의 세포 분열 동안 유지된다. 또 다른 양태에서, 세포의 만능성은 적어도 10회의 세포 분열 동안 유지된다.

[0028] 일부 양태에서, 세포는 임의로 가용성 피브로넥틴의 존재하에, 성장 인자 및 사이토킨의 부재하에 배양된다. 추가의 양태에서, 세포는 마트리겔(Matrigel™)의 부재하에 배양되고, 또 다른 양태에서, 배양 배지는 bFGF를 실질적으로 함유하지 않는다.

[0029] 본 발명의 특정한 양태에서, 만능 세포는 인간 배아 줄기세포 또는 인간 유도된 만능 줄기세포이다.

[0030] 본 발명의 또 다른 양태는, 쥐 배아 줄기세포가 아닌 만능 세포를 성장 인자 및 사이토킨의 부재하에 배양하는 것을 포함하는, 만능 세포를 배양하는 방법을 제공한다.

[0031] 특정한 양태에서, 상기 방법은 만능 세포를, 세포의 만능성을 유지하면서 적어도 1회의 세포 분열을 허용하도록 세포의 만능성을 유지하는, 적어도 하나의 제제를 포함하는 배양 배지에서, 배양하는 것을 포함하고, 여기서 상

기 제제는 (i) TGFβ 억제제, (ii) GSK3 억제제, (iii) MEK 억제제, 및 (iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0032] 한 가지 양태에서, 만능 세포는 인간 배아 줄기세포 또는 인간 유도된 만능 줄기세포이다.

[0033] 추가의 양태에서, 배양 배지는 (i) TGFβ 억제제, (ii) GSK3 억제제, (iii) MEK 억제제, 및 (iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 4개의 제제를 포함하고, 특정한 양태에서, 배양 배지는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함하고, 다른 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0034] 본 발명의 또 다른 양태는, 인간 만능 세포를 분리시켜 분리된 세포를 수득하는 단계 및 분리된 세포를 단세포의 생존능을 증강시키는 적어도 하나의 제제를 포함하는 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 제제가 a) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 및 iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 분리된 세포의 생존능이 증강되는, 분리된 인간 만능 세포를 수득하는 방법을 제공한다.. 특정한 양태에서, 분리된 세포의 생존능은 적어도 10%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200% 또는 적어도 500% 증강된다.

[0035] 다른 양태에서, 본 발명의 방법은, 분리된 세포의 만능성을 유지하면서, 분리된 세포를 배양 배지에서 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 5회 또는 적어도 10회 계대 동안 배양하는 것을 추가로 포함한다.

[0036] 특정한 양태에서, 배양 후의 분리된 세포의 핵형은 분리 전의 동일한 세포 모집단의 핵형과 실질적으로 유사하다.

[0037] 일부 양태에서, 방법은 제제의 존재하에 분리시키는 것을 포함한다. 다른 양태에서, 방법은 만능 세포를 분리 전에 상기 제제와 접촉시키는 것을 포함한다. 특정한 양태에서, 분리된 세포를 배양 배지와 접촉시키는 것은 분리된 세포를 배양 배지에서 현탁시키는 것을 포함한다.

[0038] 다른 양태에서, 본 발명은 세포를 영양세포-비함유 환경에서 적어도 하나의 소분자 제제를 포함하는 배양 배지와 접촉시켜, 상기 배양 배지와 접촉시키기 전의 세포와 비교하여 증가된 효능을 갖는 세포를 수득하는 것을 포함하고, 상기 소분자 제제는 i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 및 iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 영양세포-비함유 환경에서 세포의 효능을 증가시키는 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 배양 배지는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함하고, 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0039] 한 가지 양태에서, 접촉은 세포를 세포의 효능을 증가시키기에 충분한 조건하에 배양하는 것을 포함한다.

[0040] 일부 양태에서, 세포는 배아 줄기세포, 만능 세포, 다능 세포, 비-만능 세포 및 체세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0041] 특정한 양태에서, 세포는 쥐 배아 줄기세포가 아니다. 다른 특정한 양태에서, 세포는 인간 세포이고, 특정한 양태에서 세포는 유도된 만능 줄기세포이다.

[0042] 일부 양태에서, 방법은 세포를 적어도 하나의 만능 인자와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 만능 인자는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 소분자를 포함한다. 일부 양태에서, 만능 인자는 외인성 전사 인자이다. 특정한 양태에서, 외인성 전사 인자는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog 폴리펩티드, 또는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog를 코딩하는 폴리펩티드를 포함한다. 다른 양태에서, 폴리펩티드는 세포막을 통한 전달을 허용하는 아미노산 서열을 포함한다. 다른 특정한 양태에서, 외인성 전사 인자는 Oct4, Sox2, 및 Klf4 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0043] 다른 양태에서, 증가된 효능을 갖는 세포는, 내인성 Oct4, Nanog, KLF4, SSEA4, TRA 1-81로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 만능 줄기세포 마커의 발현; 만능 줄기세포 형태; 생식세포 전달에 관여하는 능력; 기형종 형성; 출발 계통과 상이한 계통으로 분화 또는 교차분화하는 능력; 시험관내 삼계열 분화 중의 하나 이상을 특징으로 한다. 일부 양태에서, 증가된 효능을 갖는 세포는 배양 배지와의 접촉 전의 세포와 비교하여 Oct4의 적어도 2배 높은 수준을 발현한다. 다른 양태에서, 증가된 효능을 갖는 세포는 통상적으로 배양된 iPSC와 비교하여 적어도 2배 낮은 Xist 활성을 갖는다. 추가의 양태에서, 증가된 효능을 갖는 세포는 치밀 반구형 콜로니 형태를 갖는다.

[0044] 일부 양태에서, 증가된 효능을 갖는 세포는 TGFβ, 액티빈 및 MEK 신호전달 경로의 외인성 자극의 부재하, 및 임의로 bFGF 경로의 외인성 자극의 부재하에 만능성을 복제하고 유지한다.

[0045] 다른 양태에서, 방법은 증가된 효능을 갖는 세포를 세포의 효능을 유지하면서 적어도 1회의 세포 분열을 허용하도록 영양세포-비함유 환경에서 i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 또는 iv) Rock 억제제 중의 적어도 하나의 존재하에 배양하는 것을 추가로 포함한다. 특정한 양태에서, 세포는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제의 존재하에 배양되고, 다른 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0046] 본 발명은 또한, 상기 임의의 양태에 의해 제조된 증가된 효능을 갖는 세포를 제공한다.

[0047] 본 발명은, 세포의 모집단을 재프로그래밍을 유도하기에 충분한 조건하에서, i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 및 iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 소분자 제제와 영양세포-비함유 환경에서 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 재프로그래밍의 효율이 세포 모집단을 소분자 제제와 접촉시키지 않은 재프로그래밍의 효율과 비교하여 적어도 10%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 300% 또는 적어도 500% 향상되는, 세포 모집단을 영양세포-비함유 환경에서 재프로그래밍하는 효율을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0048] 특정한 양태에서, 세포는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제와 접촉되고; 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0049] 일부 양태에서, 재프로그래밍 전의 세포 모집단은 비-만능 세포를 포함한다. 다른 양태에서, 재프로그래밍의 효율은 재프로그래밍에 요구된 시간 또는 재프로그래밍된 세포 수에 의해 측정된다.

[0050] 다른 양태에서, 재프로그래밍을 유도하기에 충분한 조건은 세포 모집단을, Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog 폴리펩티드, 또는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 외인성 전사 인자와 접촉시키는 것을 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 조건은 세포 모집단을 Oct4, Sox2, 및 Klf4 폴리펩티드 또는 Oct4, Sox2, 및 Klf4를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0051] 본 발명의 또 다른 양태는, 혼합된 세포 모집단을 포함하는 분리된 세포의 현탁액을 영양세포 비함유 환경에서 수득하는 단계 및 세포를 상기 현탁액 내에서 분류하여 하나 이상의 만능 마커를 발현하는 세포를 수득함으로써, 만능 세포로 농축된 세포의 농축 모집단을 수득하는 단계를 포함하는, 세포 모집단을 영양세포 비함유 환경에서 분류하여 만능 세포로 농축 세포 모집단을 수득하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 현탁액은 i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 또는 iv) Rock 억제제 중의 적어도 하나를 포함한다. 추가의 양태에서, 상기 분류는 자기 비드 또는 유동 세포계수에 의해 수행된다. 특정한 양태에서, 상기 분류는 자기 비드에 의해 수행된다. 다른 특정한 양태에서, 상기 분류는 유동 세포계수에 의해 수행된다.

[0052] 일부 양태에서, 방법은 농축 세포 모집단을, 임의로 가용성 피브로넥틴과 조합하여, i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 또는 iv) Rock 억제제 중의 적어도 하나를 포함하는 배양 배지에서 배양하는 것을 추가로 포함한다.

[0053] 특정한 양태에서, 상기 현탁액 중의 혼합된 세포 모집단은 분류 전에, i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 또는 iv) Rock 억제제 중의 적어도 하나와 접촉된다. 특정한 양태에서, 혼합된 세포 모집단은 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제와 접촉되고; 다른 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0054] 특정한 양태에서, 혼합된 세포 모집단은 하나 이상의 만능 마커를 발현하는 세포를 포함한다. 특정한 양태에서, 하나 이상의 만능 마커는 SSEA4, TRA160, TRA181, TRA1-85, TRA2-54, GCTM-2, TG343, TG30, CD9, CD29, CD30, CD50, CD133/프로미닌, CD140a, CD56, CD73, CD105, CD31, CD34, OCT4, Nanog 또는 Sox2를 포함한다. 특정한 양태에서, 만능 마커는 SSEA4, TRA181, TRA160 및 CD30으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0055] 특정한 양태에서, 상기 방법은, 혼합된 세포 모집단을 하나 이상의 만능 인자와 접촉시켜 재프로그래밍을 유도하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 접촉은 하나 이상의 만능 인자를 혼합된 세포 모집단 중의 세포로 도입함을 포함한다. 특정한 양태에서, 만능 인자는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog 폴리펩티드, 또는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 다른 특정한 양태에서, 만능

인자는 Oct4, Sox2, 및 Klf4 폴리펩티드, 또는 Oxt4, Sox2, 및 Klf4 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0056] 특정한 양태에서, 만능 세포는 유도된 만능 세포이다.

[0057] 일부 양태에서, 농축 세포 모집단은 하나 이상의 만능 마커를 발현하는 세포에 대해 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200% 또는 적어도 500% 농축된다.

[0058] 본 발명의 또 다른 양태는, 세포 모집단을 처리하여 재프로그래밍을 유도하는 단계; 세포 모집단을 포함하는 분리된 세포의 현탁액을 제조하는 단계; 상기 현탁액 중의 세포를 분류하여 하나 이상의 만능 마커를 발현하는 분류된 세포를 수득하는 단계; 하나 이상의 만능 마커를 발현하는 분류된 세포를 배양하여 유도된 만능 줄기세포(iPSC)를 수득하는 단계를 포함하는, 유도된 만능 줄기세포를 수득하는 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 분류된 세포는 사이토킨 및 성장 인자의 부재하에, 임의로 영양세포 비함유 환경에서, 및 임의로 가용성 피브로넥틴의 존재하에 배양된다.

[0059] 일부 양태에서, 세포 모집단은 i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 또는 iv) Rock 억제제 중의 적어도 하나와 접촉된다. 특정한 양태에서, 세포 모집단은 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제와 접촉되고; 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0060] 다른 양태에서, 세포 모집단을 처리하여 재프로그래밍을 유도하는 단계는 세포 모집단을 하나 이상의 만능 인자와 접촉시키는 것을 포함한다. 특정한 양태에서, 만능 인자는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog 폴리펩티드, 또는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28, 또는 Nanog를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정한 양태에서, 만능 인자는 Oct4, Sox2, 및 Klf4 폴리펩티드, 또는 Oct4, Sox2, 및 Klf4 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0061] 다른 양태에서, 세포 모집단을 처리하여 재프로그래밍을 유도하는 단계는 세포 모집단을 i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 또는 iv) Rock 억제제 중의 적어도 하나와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 특정한 양태에서, 세포는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제와 접촉되고, 다른 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0062] 다른 양태에서, 현탁액은 i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 또는 iv) Rock 억제제 중의 적어도 하나를 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 현탁액은 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함하고, 다른 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0063] 일부 양태에서, 분류는 유동 세포계수 또는 자기 비드에 의해 수행된다. 특정한 양태에서, 세포는 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 만능 마커를 발현하는 세포를 수득하기 위해 분류된다. 다른 특정한 양태에서, 하나 이상의 만능 마커는 SSEA4, TRA160, TRA181, TRA1-85, TRA2-54, GCTM-2, TG343, TG30, CD9, CD29, CD30, CD50, CD133/프로미닌, CD140a, CD56, CD73, CD105, CD31, CD34, OCT4, Nanog 또는 Sox2를 포함한다. 특정한 양태에서, 하나 이상의 만능 마커는 SSEA4, TRA160, TRA181 및 CD30으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 하나 이상의 만능 마커는 SSEA4, CD30 및 TRA160 또는 TRA181이다. 또 다른 양태에서, 세포는 재프로그래밍 모집단으로부터 비-재프로그래밍된 세포를 고갈시키기 위해 특이적 마커를 사용하여 분류된다.

[0064] 일부 양태에서, 배양은 세포를 i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 및 iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 소분자 제제를 포함하는 배양 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 특정한 양태에서, 배양 배지는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함하고, 다른 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0065] 특정한 양태에서, 세포는 영양세포 비함유 환경에서 배양된다. 특정한 양태에서, 세포는 영양세포-비함유 환경에서 처리, 현탁, 분류 및 배양된다.

[0066] 일부 양태에서, 유도된 만능 줄기세포는 약 2 내지 22일째에 수득된다. 특정한 양태에서, 유도된 만능 줄기세포는 약 4 내지 약 18일째에 수득된다.

[0067] 다른 양태에서, 유도된 만능 줄기세포는, 세포 모집단을 처리하여 재프로그래밍을 유도한 후, 약 4 내지 약 22

일 이내에 수득된다. 특정한 양태에서, 유도된 만능 줄기세포는, 세포 모집단을 처리하여 재프로그래밍을 유도한 후, 약 6 내지 약 18일 이내에 수득되고, 다른 특정한 양태에서, 유도된 만능 줄기세포는, 세포 모집단을 처리하여 재프로그래밍을 유도한 후, 약 10 내지 약 16일 이내에 수득된다.

[0068] 본 발명은 또한 또 다른 양태에서 상기 임의의 방법으로 수득된 유도된 만능 줄기세포를 제공한다.

[0069] 본 발명은 추가로 만능 세포를 갖는 혼합된 세포 모집단을 포함하는 분리된 세포의 현탁액을 수득하는 단계 및 b) 상기 현탁액 중의 세포를 분류하여 하나 이상의 만능 마커를 발현하는 세포를 제거함으로써, 세포 모집단으로부터 만능 세포를 고갈시키는 단계를 포함하는, 세포의 모집단으로부터 만능 세포를 고갈시키는 방법을 제공한다.

[0070] 일부 양태에서, 혼합된 세포 모집단은 다능 세포 또는 (성인) 체세포를 포함한다. 다른 양태에서, 현탁액 중의 혼합된 세포 모집단은, i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 및 iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 소분자 제제를 포함하는 배양 배지에서 상기 현탁액을 수득하기 전에 배양된다. 특정한 양태에서, 배양 배지는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함하고, 다른 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0071] 본 발명의 추가의 양태에서, 현탁액은 i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 및 iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 소분자 제제를 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 현탁액은 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함하고, 다른 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0072] 일부 양태에서, 분류는 유동 세포계수에 의해 수행된다. 다른 양태에서, 분류는 항체-피복된 자기 비드 농축에 의해 수행된다.

[0073] 본 발명의 일부 양태는, 세포를 영양세포 비함유 환경에서 게놈 안정성을 갖는 만능 세포를 수득하기에 충분한 조건하에서, i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 및 iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 소분자 제제와 접촉시키는 것을 포함하는, 게놈 안정성을 갖는 만능 세포를 수득하는 방법을 제공한다.

[0074] 일부 양태에서, 세포는 배아 줄기세포, 만능 세포, 다능 세포, 비-만능 세포 및 체세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 특정한 양태에서, 상기 세포는 비-만능 세포를 포함한다.

[0075] 특정한 양태에서, 상기 조건은 세포를 적어도 하나의 만능 인자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 만능 인자는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog 폴리펩티드, 또는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 외인성 전사 인자이다. 특정한 양태에서, 만능 인자는 Oct4, Sox2, 및 Klf4 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0076] 본 발명의 일부 양태에서, 소분자 제제는 Rock 억제제를 포함한다. 특정한 양태에서, Rock 억제제는 티아조비빈 또는 Y27632이고, 보다 특정한 양태에서, Rock 억제제는 티아조비딘이다.

[0077] 본 발명의 다른 양태에서, 소분자 제제는 TGFβ 억제제를 포함한다. 일부 양태에서, TGFβ 억제제는 A-83-01 또는 SB431542이다.

[0078] 일부 양태에서, 소분자 제제는 GSK3 억제제를 포함하고, 특정한 양태에서, GSK3 억제제는 CHIR99021 또는 BIO이다.

[0079] 본 발명의 다른 양태에서, 소분자 제제는 MEK 억제제를 포함한다. 일부 특정한 양태에서, MEK 억제제는 PD98059 또는 PD032901이다.

[0080] 본 발명의 일부 양태에서, 소분자 제제는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함한다. 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0081] 본 발명은 추가로, 만능 세포를 영양세포-비함유 환경에서, 만능 세포의 게놈 안정성을 유지하는 적어도 하나의 제제를 포함하는 배양 배지에서, 배양 동안 세포의 만능성을 유지하면서 배양하는 것을 포함하는, 만능 세포를 배양하여 상기 세포의 게놈 안정성을 유지하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 제제는 i) TGFβ 억제제, ii) GSK3 억제제, iii) MEK 억제제, 및 iv) Rock 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0082] 특정한 양태에서, 상기 조건은 상기 세포를 적어도 하나의 만능 인자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 만능 인자는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog 폴리펩티드, 또는 Oct4, Sox, Klf, Myc, Lin28 또는 Nanog를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 외인성 전사 인자이다. 특정한 양태에서, 만능 인자는 Oct4, Sox2, 및 Klf4 폴리펩티드를 포함한다.

[0083] 일부 양태에서, 배양 배지는 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 4개의 제제를 포함한다.

[0084] 본 발명의 일부 양태에서, 상기 제제는 Rock 억제제를 포함한다. 특정한 양태에서, Rock 억제제는 티아조비빈 또는 Y27632이고, 보다 특정한 양태에서, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0085] 본 발명의 다른 양태에서, 상기 제제는 TGFβ 억제제를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 TGFβ 억제제는 A-83-01 또는 SB431542이다.

[0086] 일부 양태에서, 상기 제제는 GSK3 억제제를 포함하고, 특정한 양태에서, 상기 GSK3 억제제는 CHIR99021 또는 BIO이다.

[0087] 본 발명의 다른 양태에서, 상기 제제는 MEK 억제제를 포함한다. 일부 특정한 양태에서, 상기 MEK 억제제는 PD98059 또는 PD032901이다.

[0088] 본 발명의 일부 양태에서, 상기 제제는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 TGFβ 억제제는 SB431542이고, 상기 GSK3 억제제는 CHIR99021이고, 상기 MEK 억제제는 PD0325901이고, 상기 Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0089] 본 발명의 일부 양태에서, 만능 세포는 만능 세포의 게놈 안정성을 유지하면서, 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 5회, 적어도 10회 또는 적어도 15회 계대 동안 배양 배지에서 배양된다.

발명의 효과

[0091] 본 발명은, 만능 세포의 장기간 배양, 영양세포 비함유 환경에서 세포의 재프로그래밍, 만능 세포의 단일-세포 분리, 만능 세포의 세포 분류, 비분화 상태의 유지, 향상된 재프로그래밍의 효율 및 천연 만능 세포의 생성을 허용하는 배양 플랫폼을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0093] **도 1. 영양세포 비함유 기층상의 인간 만능 줄기세포의 단세포 배양물에 대한 다양한 소분자 칵테일의 효과**

a. 상이한 형태는 단세포 분리된 인간 만능 줄기세포를 영양세포 비함유 환경에서 소분자의 다양한 조합물로 처리하는 경우에 입증되었다. ROCKi/MEKi/TGFβi/GSKi의 조합물을 함유하는 배지는 인간 만능 줄기세포의 왕성한 성장 및 생존능을 전달했다. **b.** 일부 소분자는 만능 줄기세포, 즉 MEKi/TGFβi/GSKi의 유지를 지지하고, 다른 소분자는 만능 중기 세포, 즉 Rocki의 단세포 분해를 촉진시켰지만, 이들 소분자, 즉 ROCKi/MEKi/TGFβi/GSKi의 독특한 조합은 만능 마커 Tra181에 양성인 고도 증식성 콜로니에 의해 나타난 바와 같이 미분화 상태를 유지하면서 단세포 분해를 지지했다. Tra181, 적색; DAPI, 청색. **c.** MEKi/TGFβi/GSKi/ROCKi의 조합은, hiPSC를 마트리겔 상에 1×10^5개 세포로 씨딩하고 4일 후에 생존 세포 수 및 생존능 비율을 트립판 청색으로 측정하여 채점한 경우, 생존능 및 증식을 지지했다. **d.** MEKi/TGFβi/GSKi와 조합하는 경우, 티아조비빈과 함께 배양한 콜로니는 Y27632와 함께 MEKi/TGFβi/GSKi에 의해 지지된 배양물과 비교하여 형태가 보다 조밀한 것처럼 보인다. **e.** MEKi/TGFβi/GSKi와 조합하여 Y27632 또는 티아조비빈에서 배양한 hiPSC의 SSEA4 및 Tra181의 표면 발현에 대한 유동-세포계수 분석은 티아조비빈이, Y27632를 갖는 배합물과 비교하여, 미분화 상태에서 세포의 유지를 지지함을 나타낸다.

도 2. 영양세포 비함유 및 단세포 배양물에 인간 만능 줄기세포 적용

a. 영양세포 세포상에서 생성된 iPSC는 SMC4 배지를 이용하여 영양세포 비함유 및 단세포 배양 조건에 용이하게 적용되었다. 그러나, 통상의 배양 조건하에서 단세포 분해 및 배양시에, 세포 생존은 불안정하고, 한정된 세포 부착 및 성장이 관찰된다. **b.** 영양세포 비함유 환경에 적용하면, iPSC는 SMC4 배지에서 연속 유지하는 경우, 영양세포 비함유 표면 상에 단세포로서 통상 배양되었다.

도 3. 단세포 및 영양세포 비함유 인간 만능 줄기세포 배양물의 장기간 유지

a. 10회 계대 동안 영양세포 비함유 배양물 중의 SMC4 배지에서 유지된 단세포 분리된 인간 만능 줄기세포는 면

역형광 분석에 의해 만능 마커 Nanog 및 Tra181을 발현시켰다. **b.** 도 3B는, 인간 만능 줄기세포를 단세포로 분리하여 통상의 배양 배지 또는 SMC4 배지에 위치시킨지 4시간 후에 7 아미노액티노마이신 D(7AAD) 염색 세포의 비율을 나타낸다. 단세포 분리된 인간 만능 줄기세포는, 7AAD 염색 및 유동-세포계수 분석에 의해 관찰된 바와 같이, SMC4 배지에서 배양하는 경우, 통상의 배양 배지보다 현저히 증가된 생존능을 나타냈다. **c.** 유동 세포계수에 의한 정량 모집단 분석은, 단세포로 분리되고 SMC4 배지에서 유지된 거의 모든 세포가 미분화 상태의 다중 마커를 발현시키는 것으로 밝혀졌다. **d.** 전체 발현 분석은, 단세포로서 계대하고 영양세포 세포 비함유 SMC4 배지에서 유지한 iPSC와 H1 세포를 포함하여 영양세포 세포 상에서 배양하고 계대 동안 세포 클럼프로서 유지한 인간 ESC 사이에서 높은 상관관계를 나타냈다. **e.** iPSC는 SMC4 배지를 사용하여 영양세포 세포 비함유 시스템에서 배양하고, 단세포로서 계대하였지만, 이들의 본래 공급원 섬유아 세포는 H1 및 HuES9를 포함하여 인간 ESC와 유사한 만능 마커의 어레이를 발현시키지 않았다. **f.** 재프로그래밍 인자의 외인성 발현은, 외인성 인자 양성 대조군(4일 후 재프로그래밍 인자를 발현하는 렌티바이러스로 감염시킨 섬유아 세포)과 달리, 영양세포 비함유 완경에서 유지된 iPSC에서 효과적으로 중지되었다. 영양세포 비함유 iPSC에서 재프로그래밍 인자의 내인성 발현은 H1 및 HuES9를 포함하는 ESC와 유사했다. **g.** 영양세포 비함유 환경에서 단세포로서 11회 계대 후, 인간 만능 줄기세포는 정상 핵형을 보유했다. **h.** SMC4를 통상의 분화 배지로 치환한지 14일 후, 영양세포 비함유 환경에서 유지된 세포는, 배외 마커 이외에, 단지 천연 및 전능성 줄기세포에 의해 정상적으로 발현되는 외배엽, 내배엽 및 중배엽 생식세포 층을 나타내는 유전자 발현을 나타냈다. **i.** 면역형광 분석: iPSC는 SMC4 배지를 사용하여 영양세포 세포 비함유 시스템에서 배양하고, 통상의 분화 배지로 전이시에 모든 3개 체세포 유형으로 용이하게 발달하는 단세포로서 계대했다. 중배엽, 알파 평활근 액틴(αSMA); 외배엽, 베타 투불린 III(βTUB III); 내배엽, Sox17. **j.** 기형 형성 분석은, SMC4 배지에서 배양한 인간 만능 줄기세포가 3개 생식세포 층을 나타내는 세포 유형으로 성장하고 따라서 이들의 만능 효능을 보유함을 입증한다.

도 4. 인간 만능 줄기세포의 증강된 단세포 분류 및 후속의 영양세포 비함유 배양

인간 만능 줄기세포의 분류에 대한 입증은, 최적화 SMC4 또는 SMC4+피브로넥틴 배지가 보충된 영양세포 비함유 배지에서 만능 마커 발현 및 분류된 세포의 후속 유지에 기반한다. **a.** 분류 전에, 인간 만능 줄기세포를 단세포로 분리하고, 항체 마커에 의해 SSEA4 및 Tra-181로 표지했다. 세포는 만능 마커, SSEA4 및 TRA181의 표면 마커 발현에 기반한 FAC 기술을 사용하여 분류했다. 분류후 세포는 먼저 SMC4 + 피브로넥틴 배지에서 씨딩하고, 이를 24 내지 72시간 후에 SMC4 배지로 교환했다. 분류 1일 후, 분류된 세포는 5일까지 분할하고, 수백개의 세포로 이루어진 거대 콜로니가 존재한다. **b.** 분류된 세포는 만능 마커 Tra160의 이들의 발현을 보유했다. Tra160, 적색; DAPI, 청색. **c.** 분류후 5계대 후, 즉 배양시에 대략 1개월 후, 정량적 유동 세포계수 분석은 분류된 iPSC의 대부분이 SSEA4 및 Tra181 염색에 기반한 이들의 만능 상태를 보유했음을 나타냈다. **d.** SSEA4+ 및 Tra181+ 인간 만능 줄기세포로부터 유래된 다양한 밀도의 세포(6웰 플레이트의 웰당 500 이벤트의 클론 밀도, 대략 Cm당 52 이벤트)를 영양세포 비함유 표면 상에 플레이팅하고, SMC4+ 피브로넥틴 배지를 보충했다. 분류 7일 후, 다수의 알칼리성 포스파타제 양성 콜로니가 각각의 씨딩 웰에서 나타났다. **e.** 유도된 알칼리성 포스파타제 양성 콜로니를 채점했다. 대략 8 내지 10%의 씨딩 이벤트는 거의 컨플루언트 웰을 생성하는 웰당 16,000 이벤트로 콜로니를 생성했다. N.C., 정확한 계수를 방지하는 컨플루언시에 기인하여 계산되지 않음. **f.** SSEA4+ 및 Tra181+ 인간 만능 줄기세포는 웰당 1 이벤트, cm^2당 대략 3 이벤트를 포함하는 다양한 농도로 96 웰-플레이트에서 직접 분류했다. 웰은 분류 8일 후에 알칼리성 포스파타제를 위해 염색했다. **g.** 각 웰은 8일에 알칼리성 포스파타제 콜로니에 대해 채점했다.

도 5. SMC4 배지의 부재 및 존재하에 재프로그래밍 역학

a. Oct4, Sox2, Klf4 및 cMyc의 이소성 발현에 의한 재프로그래밍 발현 7일 후, 세포는 통상의 배지에서 유지하거나 SMC4 배지로 변경했다. 재프로그래밍 20일 후, 임의의 iPSC 유사 콜로니가 통상의 배양 배지에서 형성되고, 다수의 iPSC-유사 콜로니가 SMC4 배지로 변경된 세포에서 나타났다. **b.** SMC4 배지 중의 다수의 iPSC 유사 콜로니는 알칼리성 포스파타제를 발현시킨 반면, 통상의 배지 중의 소수의 콜로니는 알칼리성 포스파타제를 발현시켰다.

도 6. SMC4 배지 중의 배양물은 천연 특성을 촉진시킨다.

a. SMC4에 대한 인간 만능 줄기세포의 적용 및 통상적으로 유지된 인간 만능 줄기세포와의 비교의 개략도. **b.** 계층적 클러스터링은 아피메트릭스(Affymetrix) 전체 유전자 발현 및 IMR90 모 세포로부터 유래된 hiPSC(통상적으로 유도된 hiPSC(Conv) 및 SMC4 배지 적용된 hiPSC(SMC4 배지)) 사이의 피어슨 계수에 기반하고, 이들 둘 다는 각각의 배지에서 11회 계대 동안 배양하였고, 이는 hiPSC가 서로 유사하고 이들의 모 IMR90 세포와 상이함을

증명한다. **c.** Xist 발현은 이들의 모 IMP90 세포주와 비교하여 통상의 포맷으로 배양한 hiPSC에서 적절하게 억제되지만, 이는 SMC4 배지에서 배양한 hiPSC에서 상당히 억제되고 암컷 hESC, HUES9의 수준과 유사했다. **d.** X-염색체 위치된 유전자는 통상적으로 배양된 hiPSC에서의 발현과 비교하여 SMC4 배지에서 배양된 hiPSC에서 더욱 고도로 발현되었다. **e.** 영양세포 세포로 다시 전이하는 경우, SMC4 배지에서 유지된 hiPSC는, 통상의 배지에서 배양한 hiPSC와 비교하여, 보다 많은 3차원 형상 및 보다 적은 평평한 형태에 의해 관찰된 바와 같이 마우스 ESC와 더욱 유사한 형태를 나타낸다.

도 7. SMC4 배지에서 생성 및 유지는 인간 만능 줄기세포의 미분화 상태를 향상시킨다.

a. SMC4 배지에서 생성하고 FF 배양물 중의 SMC4 배지에서 유지한 클론 FTi91 및 93, 및 통상의 배지에서 생성하고 영양세포 세포 상에 유지한 클론 FTi99의 동시 생성(parallel generation)에 대한 개략도. **b.** 계층적 클러스터링은 유도된 만능 라인 사이의 밀접한 관계 및 출발 세포주(FTC1)로부터의 먼 관계를 나타내는 아피메트릭스 전체 유전자 발현 및 피어슨 계수에 기반한다. **c.** 계층적 클러스터링은 Hues9, H1, FTi99, FTi91 및 FTi93 중에서 모두 4배 상이하게 발현된 유전자에 기반하고, 이는 통상의 시스템에서 배양한 만능 라인 대 SMC4 배지에서 배양한 라인 사이의 분리를 증명한다. **d.** SMC4 배지 그룹(FTi91 및 93) 대 통상의 배양 그룹(Hi, Hues9 및 FTi99) 사이에 비교된 천연 및 계통 분화와 관련된 선택 유전자의 아피메트릭스 유전자 발현은 SMC4 배지 세트에서 만능 계통-특이적 유전자 발현의 현저한 감소와 관련된 다수 유전자의 발현 증가를 나타낸다. **e.** 천연 상태로 hiPSC를 유도하는 다양한 방법의 개략도. 하부 패널은 프라이밍된 상태와 비교하여 천연 상태의 잇점을 기재한다.

도 8. 재프로그래밍 공정 동안 생성된 비-iPSC 콜로니

a. 재프로그래밍 공정에서 초기 전형적 세포 모집단: 면역 염색은 주요 신속 성장 세포가 SSEA4 음성 및 불가피한 비-만능 세포인 콜로니를 형성했음을 나타냈다. 이들 세포를 형질전환시키고, 고도의 증식성이고, 신속하게 성장하고, 배양물을 조절했다. 콜로니 1은 iPSC 콜로니로 될 가능성을 갖는 SSEA4 양성 콜로니를 나타내고, 콜로니 2는 고도 증식 속도를 갖지만 만능 마커 염색에 대해 음성인 형질전환된 모집단을 나타낸다. **b.** 다수의 비-iPSC 콜로니는 단일 만능 마커의 발현을 나타낸 반면, 진정한 iPSC 콜로니는 다중 만능 마커의 발현을 나타냈다. 재프로그래밍의 후기 단계에서, 다양한 콜로니가 형성되었는데, 일부 콜로니(즉, 콜로니 1)는 SSEA4 및 Tra181에 대해 2배 양성인 반면, 다른 콜로니(즉, 콜로니 4 및 5)는 마커 중의 하나에 대해서만 양성이거나 어떤 마커에 대해서도 양성이지 않았다.

도 9. 세포 분류를 사용한 iPSC 등의 만능 세포의 선별

만능 세포 및 비-만능 세포의 혼합물로부터 만능 세포의 농축 및 선별에 사용된 단세포 배양 시스템 및 세포 분류 방법의 개략도.

도 10. 만능 마커의 동정

$SSEA4^+/Tra181^+$ 세포에 특이적인 추가의 마커를 조사하기 위해, 다양한 표면 마커를 평가했다. Tra160 발현의 검출은 Tra181 발현과 양호하게 관련되는 것으로 증명되었기 때문에, 양성 대조군으로 사용되었다. CD200 및 CD90은 $SSEA^-/Tra181^-$ 및 $SSEA^+/Tra181^+$ 모집단 둘 다를 유사하게 염색하기 때문에 만능 세포에 대해 특이적이지 않은 것 같고, $SSEA^+/Tra181^+$ 모집단에 대한 특이성은 CD9로 관찰되지 않았다. 그러나, CD50 및 CD30은 $SSEA^-/Tra181^-$ 모집단과 비교하여 $SSEA4^+/Tra181^+$ 모집을 우선적으로 동정하는 것 같다.

도 11. CD30은 Nanog 발현 클론에 특이적이다.

a. 모든 유도된 클론이 SSEA4 및 Tra181 둘 다를 발현하는 주요 모집단을 나타냄을 입증하는 다양한 hiPSC 라인의 SSEA4/Tra181 발현에 대한 대표적 유동 프로파일. **b.** (A)에서 관찰된 게이트에 기반하여, 각 세포주의 CD30 및 CD9 유동 프로파일을 평가했다. **c.** 다양한 라인의 상대적 Nanog 발현을 또한 평가했다. **d.** 요약 표는 CD30 발현만이 Nanog 발현과 관련됨을 입증한다.

도 12. 재프로그래밍 공정 동안 비-재프로그래밍된 세포의 고갈은 재프로그래밍된 세포를 농축시킨다.

재프로그래밍 공정 동안, 재프로그래밍 및 비-재프로그래밍 세포의 혼합 모집단이 존재하고, 소수의 세포 모집단만이, SSEA4 및 Tra181 발현(흑색의 점선 화살표로 지시됨)에 의해 나타낸 바와 같이, 완전 만능으로 재프로그래밍된 세포를 나타낸다. 그러나, 비-재프로그래밍된 세포가 제거되거나 혼합 모집단으로부터 고갈되는 경우,

SSEA4 및 Tra181 양성 모집단의 상당한 농축이 입증되었다. 회색 실선 화살표로 지시된 바와 같이, CD13 음성 세포 모집단은 CD13 저 및 고 모집단 세포와 비교하여 SSEA4 및 Tra181 양성 세포의 상당히 농축 모집단을 나타냈다.

도 13. IMR90 및 ASC를 포함하는 다양한 공급원으로부터 만능 줄기세포의 단세포 분류 및 농축에 의한 증강된 세포 재프로그래밍

a. 재프로그래밍 공정에서 초기 세포 모집단은 SSEA4+ 세포의 단세포 분류에 의해 농축되었다. 재프로그래밍된 및 비-재프로그래밍된 세포를 함유하는 출발 세포 모집단은 효소에 의해 단세포로 분리하고, 독특한 만능 마커를 위해 염색하고, 면역접합된 자기 비드에 의한 표면 마커 발현에 기반하여 분류함으로써 SSEA4에 양성인 세포 모집단을 수득했다. $SSEA4^+$ 세포에 대한 이러한 농축 후, 10,000 SSEA4+ 세포를 마트리겔(Matrigel™) 피복된 접시에 씨딩하고, 통상의 배지 또는 SMC4 배지에서 FF 환경에서 배양했다. AP 염색은 분류 8일 후에 수행했다. 보다 이들의 우측 코너의 작은 삽입된 패널은 세포 형태를 나타내는 이미지이다. 알칼리성 포스파타제 양성 콜로니는 통상의 배양물에서 검출되지 않은 반면, 다수의 알칼리성 포스파타제 양성 콜로니가 SMC4 배지로 유도되었다. **b.** SMC4 배지의 존재 또는 부재하에 마트리겔(Matrigel™) 상에서 세포 재프로그래밍으로부터 유도된 $SSEA4^+/Tra181^+$ 콜로니의 수를 채점했다. **c.** SMC4 배지를 사용하여 영양세포 비함유 조건 및 단세포 배양물에서 IMR90 섬유아 세포 또는 지방 줄기세포로부터 유래된 iPSC 클론은 만능 마커를 발현시켰다. **d.** 단세포 분류 방법을 사용하여 유도한 iPSC 클론의 전체 모집단 유동 세포계수 분석은 대부분의 세포가 중요 만능 마커에 양성임을 나타냈다. **e.** iPSC는 SSEA4 및 영양세포 비함유 배양물에 대한 단세포 분류를 사용하여 생성했지만, 이들의 본래 공급원 섬유아세포 또는 지방 줄기세포를 생성하지 않았고, H1 및 HuES9를 포함하는 인간 ESC와 유사한 만능 마커 어레이를 발현시켰다. **f.** 재프로그래밍 인자의 외인성 발현은, 3일후 재프로그래밍 인자를 발현하는 렌티바이러스로 감염시킨 대조군 섬유아 세포와는 달리, 단세포 분류 및 영양세포 비함유 배양물을 사용하여 생성한 iPSC에서 효과적으로 침묵했다. **g.** iPSC는 분화시 모두 3개 체세포 형태로 용이하게 발달한 SSEA4에 기반한 단세포 분류를 사용하여 생성했다. 내배엽, FoxA2; 중배엽, 알파 평활근 액틴(αSMA); 외배엽, 베타 투불린 III(βTUBIII).

도 14. 만능 줄기세포의 독특한 모집단의 선별을 위한 단세포 분류

a. FACS 분류를 사용하여, 재프로그래밍 공정에서 초기 $SSEA4^+/Tra181^+$인 독특한 및 희귀한 세포 모집단을 선별하고, 24 내지 72시간 후에 SMC4 배지로 교환한 SMC4+ 피브로넥틴 배지가 보충된 영양세포 비함유 배양물로 옮겼다. 추가로 6일 배양 후, $SSEA4^+/Tra181^+$ 유도된 iPSC 콜로니는 영양세포 비함유 배양물에서 성장하는 것으로 나타났다. 그러나, SSEA4-/Tra181- 콜로니를 옮기고 영양세포 비함유 배양물에서 유지하는 경우, 알칼리성 포스파타제 발현 콜로니는 14일 배양 후에 검출되지 않았다. **b.** 다양한 $SSEA4^+/Tra181^+$ 분류된 세포를 콜로니로 발달시키고, 이들의 SSEA4 및 Tra181 발현을 유지시켰다.

도 15. 영양세포 비함유 조건하에서 iPSC의 생성 및 주요 특성화를 위한 고생산성 방법

3개 인자(Oct, Sox, Klf) 유도된 섬유아세포를 2단계 방식으로 분류하여, SMC4 배지(및 분류 동안 SMC4+ 피브로넥틴 배지를 사용)를 사용하여 효율적인 96-웰 플레이팅 플랫폼을 전달했다. 개개 콜로니를 함유하는 웰을 표지하고, 4×96-웰 플레이트로 신장시켰다. 하나의 세트는 마스터-플레이트로서 디자인하여 신장시키고, 다른 3개의 플레이트는 SSEA4 및 Tra181을 포함하는 표면 마커 발현용 유동 세포계수 분석, Nanog을 포함하는 중요 마커의 발현에 대한 qRT PCR 및 Oct4 및 Nanog를 포함하는 만능 마커에 대한 전이유전자 침묵 및 면역형광을 포함하는 특성화를 위해 처리했다. 특성화 판독에 기반하여, 선별된 hiPSC 클론을 추가의 분석을 위해 신장시키고, 저장했다. 데이터 패널은 FTC5의 고생산량 플랫폼 hiPSC 생성 동안 운반된 클론의 스냅사진(웰 31-40 및 96-웰 플레이트에 의해 표시됨)을 나타낸다. qPCR 패널에서, 발현은 Gapdh로 표준화했다. Nanog 발현은 Hi hESC에 비례하고, 전이유전자 발현은 FTC5의 감염 4일후에 비례한다(감염 4일). 특성화 판독에 기반하여, 선별된 hiPSC 클론을 추가의 분석을 위해 신장시키고, 저장했다. 강조된 예에서, 웰 37은 이의 다중-파라미터 만능 프로파일에 기반하여 신장용 후보로서 동정되었고, FTC5 클론 1로서 명명했다. 면역-형광 이미지는 5× 확대하여 촬영했다.

도 16. SMC4 배지의 존재하에 3-인자(폴리시스트론성-OKS) hiPSC의 고생산성 플랫폼, 클론 및 FF 유도

a. 상기 방법으로부터 유도된 클론 FTi91 및 FTi93은 만능 마커의 발현을 위해 염색했다. **b.** FTC1(포피 섬유아세포), H1 및 Hues9(hESC 라인), FTi91 및 93(FTC1 유도된 hiPSC 클론) 및 4일 P.I.(감염후 4일째)에 대한 만

능 마커의 내인성 발현의 qRT-PCT. 발현은 Gapdh에 대해 표준화하고, 각 유전자 그룹 내에서 상대적이다. **c.** Oct4 프로모터 메틸화 상태. 개방 원은 비메틸화 CpG 섬을 나타내고, 흑색 원은 메틸화 CpG 섬을 나타낸다. **d.** 분화 28일 후에 클론 FTi91 및 93의 EB 형성 및 분화. 내배엽, FoxA2; 중배엽, 알파 평활근 액틴(αSMA); 외배엽, Tuj1. **e.** hiPSC 클론으로부터 유도된 핵형의 조직학적 절편을 생성하고 FF 배양물 및 SMC4 배지에서 유지했다. 흑색 화살표는 목적하는 부분을 가리킨다: 중배엽, 백색 지방 조직; 외배엽, 뉴런; 내배엽, 선.

도 17. SMC4 배지에서 만능 줄기세포의 생성 및 유지는 게놈 통합성을 유지하고, 만능 세포를 농축시킬 수 있다.

a. 어레이 비교 게놈 하이브리드화에 의해 평가된 복제 수 편차. 하부 표는 SMC4 배지 배양된 인간 만능 줄기세포 및 이들의 모 세포주 사이의 최소 복제 수 편차를 입증하는 데이터의 해석 요약이다. **b.** G-밴드 중기 세포의 세포유전자 분석. 하부 표는 SMC4 배지에서 장기간 영양세포 비함유 배양 후에 게놈 안정성을 나타내는 데이터의 요약이다.

도 18. FF 및 SMC4 배양하에 FTC5 및 FTC7 유도된 클론 hiPSC의 특성화

고생산성 플랫폼의 재현성을 측정하기 위해, 추가의 환자 승낙 라인 FTC5 및 FTC7을 hiPSC 생성에 대해 시험했다. **a.** 개개 FTC5 및 FTC7에서 발현된 만능 마커 Oct4, Tra181, Nanog 및 Tra160의 대표적 면역형광 염색은 OKS로 유도된 hiPSC 클론을 유도했고, 다중 플랫폼을 사용하여 생성했다. **b.** FTC5 및 FTC7의 대표적 계통 특이적 염색은 분화 유도 28일 후에 hiPSC를 유도했다. 내배엽, FoxA2; 중배엽, 알파 평활근 액틴(αSMA); 외배엽, Tuj1. **c.** FTC5 및 FTC7로부터 G-밴드 중기 세포의 세포유전자 분석은 다양한 계대에서 장기간 FF 및 단세포 배양 후에 hiPSC 클론을 유도했다.

도 19. 세포 표면 마커를 사용하는 만능 배양물의 유지 방법

a. 만능 줄기세포의 모집단은 영양세포 비함유 및 SMC4 플랫폼에서 Tra181 농축에 의해 입증된 바와 같이 배양 동안 추가로 농축되었다. **b.** 만능 세포 모집단의 배양 동안, 모집단 내의 일부 세포 모집단은 분화를 개시할 수 있고 이들의 만능을 소실할 수 있다. 만능, 즉 Tra181 농축을 위한 선별 방법을 사용하여, 미분화 세포의 균질한 배양물을 수득했다.

도 20. 비-만능, 세미-만능 및 완전-만능 줄기세포의 이종 모집단으로부터 분화 세포의 분리

재프로그래밍된 인간 섬유아세포 모집단의 FACS 분류: 만능 마커 SSEA4-/Tra181-(청색 박스; 하부 좌측 박스)에 대한 2배 음성 세포가 분류되면, 알칼리성 포스파타제(AP) 양성 콜로니가 검출되어 1주 배양후 만능 및 잠재적 종양원성의 소실을 나타내는 반면, 2배 양성 모집단 SSEA4+/TRA181+(오렌지색 박스; 상부 우측 박스)의 분류는, AP+ 콜로니의 형성에 의해 입증된 바와 같이, 만능 세포에 대한 모집단의 선별 및 농축을 생성했다.

도 21. 영양세포 비함유 배양물 상의 인간 만능 줄기세포의 사이토킨 비함유 배양

a. 인간 만능 줄기세포는 젤라틴 피복된 표면에서 배양하고 bFGF를 포함하는 임의의 사이토킨의 부재하에 SMC4 배지가 보충되는 경우, 이들의 성장 및 형태를 유지했다. **b.** 인간 만능 줄기세포 콜로니 내의 개개 세포를 나타내는 확대된 이미지. **c.** 계대 3에서 SSEA4 및 Tra181 공발현은 사이토킨 비함유 배양된 인간 만능 줄기세포가 이들의 미분화 상태를 유지했다는 추가의 증거를 제공했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0094] 본 발명은 인간 유도된 만능 줄기세포(iPSC)를 생성 및 배양하는 영양세포 비함유 조건을 포함하는, 줄기세포를 배양하기 위한 강력한 배양 시스템을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 영양세포 비함유 환경에서 만능 세포의 장기간 배양; 영양세포 비함유 환경에서 세포의 재프로그래밍; 만능 세포의 단세포 분리, 만능 세포의 세포 분류; 재프로그래밍의 향상된 효율; 천연 만능 세포의 생성 및 만능 세포의 동정 및 선별을 위한 마커의 동정을 허용하는 배양 플랫폼을 제공한다. 본 발명의 배지 및 배양 방법은 단세포 분리된 인간 줄기세포의 생존능 및 생존을 지지하고, 줄기세포의 미분화 상태를 유지하여, 분화 없이 분리된 단세포의 배양 및 계대를 허용한다.

[0096] **정의**

[0097] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "재프로그래밍(reprogramming)" 또는 "탈분화(dedifferentiation)" 또는 "세포 효능의 증가" 또는 "발달 효능의 증가"는 세포의 효능을 증가시키거나 세포를 보다 덜 분화된 상태로 탈분화시키는 방법을 지칭한다. 예를 들면, 세포 효능이 증가된 세포는 비-재프로그래밍된 상태의 동일한 세포와 비교하여 보다 큰 발달 가소성(즉, 보다 만흥 세포 형태로 분화할 수 있음)을 갖는다. 달리 말하면, 재프로그래밍된

세포는 비-재프로그래밍된 상태의 동일한 세포보다 덜 분화된 상태로 존재하는 것이다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "효능"은 세포에 접근가능한 모든 발단 옵션의 합계(즉, 발달 효능)를 지칭한다. 당해 기술분야의 통상의 기술자는 세포 효능이 대부분의 형성 세포로부터, 분화전능 줄기세포(이는 적어도 형성 세포에 대한 최대 발달 효능을 갖는다), 말단 분화 세포(이는 최소 발달 효능을 갖는다)에 이르는 연속성임을 인지할 것이다. 세포 효능의 연속성은, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 분화전능 세포, 만능 세포, 다능 세포, 올리고능 세포, 단능 세포 및 말단 분화 세포를 포함한다. 엄격한 측면에서, 줄기세포는 만능이고, 따라서 임의의 성숙 세포 형태로 성장할 수 있다. 그러나, 다능, 올리고능 또는 단능 선조 세포는 계통 제한된 줄기세포(예: 간엽성 줄기세포, 지방 조직 유도된 줄기세포 등) 및/또는 선조 세포로서 종종 지칭된다.

[0099] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "만능"은 신체 또는 세포체(즉, 배아 막)의 모든 계통을 형성하는 세포의 능력을 지칭한다. 예를 들면, 배아 줄기세포는 3개의 생식세포 층, 외배엽, 중배엽 및 내배엽 각각으로부터 세포를 형성할 수 있는 만능 줄기세포 형태이다. 만능은 불완전한 또는 부분적으로 만능 세포(예: 피포 줄기세포 또는 EpiSC)(이는 완전한 기관으로 성장할 수 없다)로부터 보다 원시의 보다 만능 세포(이는 완전한 기관(예: 배아 줄기세포)으로 성장할 수 있다)에 이르는 범위의 발달 효능의 연속이다. 세포 만능의 수준은 세포의 만능 특징을 평가함으로써 측정할 수 있다. 만능 특징은, 이들로 한정되는 것은 아니지만, i) 만능 줄기세포 형태; ii) 이들로 한정되는 것은 아니지만, SSEA1(마우스 단독), SSEA3/4; TRA1-60/81; TRA1-85, TRA2-54, GCTM-2, TG343, TG30, CD9, CD29, CD133/프로미닌, CD140a, CD56, CD73, CD105, CD31, CD34, OCT4, Nanog 및/또는 Sox2, 및 본 발명에 기재된 바와 같이 CD30 및 CD50을 포함하는 만능 줄기세포 마커의 발현; iii) 마우스 키메라에서 생식선 전이에 관여하는 만능 마우스 줄기세포의 능력; iv) 4배체 배 상보성 분석을 사용하여 배아 막에 관여하는 만능 줄기세포의 능력; v) 만능 줄기세포의 기형종 형성; vi) 배양체의 형성 및 vii) 불활성 X 염색체 재활성화를 포함한다.

[0100] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "만능 줄기세포 형태"는 배아 줄기세포의 전통적 형태 특징을 지칭한다. 정상의 배아 줄기세포 형태는, 높은 핵 대 세포질 비율, 핵인(nucleoli)의 현저한 존재 및 전형적 세포간 공간과 함께, 원형의 작은 형상임을 특징으로 한다.

[0101] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "다능"은 한 계통의 다중 세포형을 형성하는 성숙 줄기세포의 능력을 지칭한다. 예를 들면, 조혈 줄기세포는 혈액 세포 계통의 모든 세포, 예를 들면, 임파 및 골수 세포를 형성할 수 있다.

[0102] "부착"은 용기에 부착하는 세포, 예를 들면, 적절한 배양 배지의 존재하에 멸균 플라스틱(또는 피복된 플라스틱) 세포 배양 접시 또는 플라스크에 부착하는 세포를 지칭한다. 특정한 부류의 세포는, 이들이 세포 배양 용기에 부착하지 않는 한, 배양물에 유지되지 않거나 성장하지 않는다. 특정한 부류의 세포("비부착 세포")는 부착 없이 배양물에서 유지되고/되거나 증식한다.

[0103] "배양물" 또는 "세포 배양물"은 시험관내 환경에서 세포의 유지, 성장 및/또는 분화를 지칭한다. "세포 배양 배지", "배양 배지"(각각의 경우에 단수 "배지"), "보충물" 및 "배지 보충물"은 세포 배양물을 배양하는 영양 조성물을 지칭한다.

[0104] "배양한다"는 조직 또는 신체 외부에서, 예를 들면, 멸균 플라스틱(또는 피복된 플라스틱) 세포 배양 접시 또는 플라스크에서 세포의 유지, 증식(성장) 및/또는 분화를 지칭한다. "배양"은, 영양, 호르몬 및/또는 다른 인자의 공급원이 당해 세포를 증식 및/또는 유지하는 것을 돕기 때문에, 배양 배지를 이용할 수도 있다.

[0105] 본원에 사용된 바와 같이, "분리된"은 다른 셀 또는 표면(예: 배양 플레이트 표면)으로부터 실질적으로 분리되거나 정제된 세포를 지칭한다. 예를 들면, 세포는 기계적 또는 효소적 방법에 의해 동물 또는 조직으로부터 분리될 수 있다. 달리는, 시험관 내에서 응집하는 세포는, 클러스터, 단세포 또는 단세포와 클러스터의 혼합물의 현탁액으로 분해하는 것과 같이, 효소적으로 또는 기계적으로 서로 분리될 수 있다. 또 다른 대체 양태에서, 부착 세포는 배양 플레이트 또는 기타 표면으로부터 분리된다. 따라서, 분리는 세포외 매트릭스(ECM) 및 기질(예: 배양물 표면)과의 세포 상호작용을 파괴하거나 세포 사이의 ECM을 파괴하는 것을 수반할 수 있다.

[0106] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "농축하다" 및 "농축하는"은 세포의 조성물 등의 조성물에서 특정 성분의 양의 증가를 지칭하고, "농축된"은 세포 모집단 등의 세포 조성물을 기재하기 위해 사용되는 경우, 농축되기 전의 세포 모집단에서 이러한 성분의 비율과 비교하여 특정 성분의 양이 비례적으로 증가된 세포 모집단을 지칭한다. 예를 들면, 세포 모집단 등의 조성물은 표적 세포 유형(즉, 특정한 특성을 갖는 세포)에 대하여 농축될 수 있고, 따라서 농축되기 전의 세포 모집단에 존재하는 표적 세포의 비율과 비교하여 증가된 비율 또는 퍼센트의 표적 세포 유형을 가질 수 있다. 세포 모집단은 당해 기술분야에 공지된 세포 선별 및 분류 방법에 의해 표적

세포 유형을 농축할 수 있다. 본 발명의 일부 양태에서, 세포 모집단은 본원의 실시예에 기재된 바와 같은 분류 또는 선별 공정에 의해 농축된다. 본 발명의 특정한 양태에서, 표적 세포 모집단을 농축하는 방법은 표적 세포 모집단에 대해 당해 세포 모집단을 적어도 약 20% 농축하고, 이는 농축 세포 모집단이 당해 모집단을 농축하기 전의 모집단보다 대략 약 20% 이상의 표적 세포 유형을 포함함을 의미한다. 한 가지 양태에서, 표적 세포 모집단을 농축하는 방법은 표적 세포 모집단에 대하여 당해 세포 모집단을 적어도 약 30+%, 40+%, 50+%, 60+%, 70+%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 또는 적어도 약 98% 또는 특정한 양태에서 약 99%까지 농축한다.

[0107] 본 발명의 특정한 양태에서, 세포 모집단은 만능 세포 또는 만능 특성을 나타내는 세포의 양에 대하여 농축된다. 본 발명의 특정한 양태에서, 재프로그래밍되는 세포의 모집단은, 이들로 한정되는 것은 아니지만, SSEA4, TRA 1-60, TRA-1-81, CD30 또는 CD50을 포함하는 만능 마커의 발현 등과 같은 만능의 특성을 갖는 표적 세포에 대해 농축된다. 본 발명의 또 다른 특정한 양태에서, 재프로그래밍되는 세포 모집단 등의 세포 모집단은 분화 또는 비만능 세포에 특이적인 표면 마커를 사용하여 비만능 세포가 고갈되며, 이러한 표면 마커는, 예를 들면, CD13, CD26, CD34, CD45, CD31, CD46 또는 CD7을 포함할 수 있다. 따라서, 생성되는 세포 모집단은 만능 세포가 농축 세포 모집단으로 기재될 것이다. 본 발명의 특정한 양태에서, 농축 세포 모집단 중의 세포는 독특한 유전자 또는 단백질 발현 프로파일, 예를 들면, SSEA4, TRA 1-60, TRA-1-81, CD30 및 CD50 등의 적어도 2개의 만능 마커의 세포 표면 발현을 갖는 표적 세포에 대해 농축된다. 일부 양태에서, 세포 모집단은 2개 이상의 만능 마커를 발현하는 표적 세포에 대해 농축된다. 특정한 양태에서, 세포 모집단은 Tra-180 또는 Tra-160과 조합하여 SSEA4를 발현하는 표적 세포에 대해 농축된다. 보다 특정한 양태에서, 세포 모집단은 SSEA4, Tra181 및 CD30을 발현하는 표적 세포에 대해 농축된다. 한 가지 양태에서, 농축 세포 모집단에서 세포의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%는 만능 세포 등의 표적 세포 유형이다.

[0108] 따라서, 일부 양태에서, 본 발명은 SSEA4, TRA 1-60, TRA-1-81, CD30 및 CD50 등과 같은 만능 마커의 세포 표면 발현에 기반하여 세포 모집단을 분류하고, 이러한 마커를 발현하는 세포의 분획을 수집하여 만능 세포가 농축 세포 모집단을 수득함으로써 만능 세포를 위한 세포 모집단을 풍부화하는 방법을 제공한다. 본 발명의 다른 양태에서, 세포 모집단은 CD13, CD26, CD34, CD45, CD31, CD46 및 CD7 등과 같은 분화 또는 분화된 세포의 마커의 세포 표면 발현에 기반하여 세포 모집단을 분류하고, 이러한 세포의 세포 모집단을 고갈시켜 만능 세포가 농축 세포 모집단을 수득함으로써 만능 세포에 대해 농축된다. 특정한 양태에서, 세포 모집단은 CD13의 발현에 기반하여 분류되고, CD13+ 세포는 당해 세포 모집단으로부터 제거되어 만능 세포가 농축 세포 모집단을 수득한다.

[0109] 본원에 사용된 바와 같이, "영양세포 세포" 또는 "영양세포"는, 영양세포 세포가 제2 세포 유형의 지지를 위한 성장 인자 및 영양소를 제공함에 따라, 제2 유형의 세포와 공-배양되어 제2 유형의 세포가 성장할 수 있는 환경을 제공하는 형태의 세포를 기재하기 위한 사용된 용어이다. 영양세포 세포는 이들이 지지하고 있는 세포와 상이한 종으로부터 임의로 기원한다. 예를 들면, 줄기세포를 포함하는 특정 유형의 인간 세포는 마우스 배아 섬유아세포 및 비사멸 마우스 배아 섬유아세포의 제1 배양물에 의해 지지될 수 있다. 영양세포 세포는, 방사선조사 또는 미토마이신 등의 항-세포분열 제제를 사용한 처리에 의해 다른 세포와 공-배양되어 이들이 지지하는 세포가 성장하는 것을 방지하는 경우에 통상 불활성화될 수 있다. 상기로 제한하지 않는, 한 가지 특정한 영양세포 세포 유형은 인간 피부 섬유아세포 또는 인간 배아 줄기세포 등의 인간 영양세포일 수 있다. 또 다른 영양세포 세포 유형은 마우스 배아 섬유아세포(mEF)일 수 있다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같이, "영양세포-비함유"(FF) 환경은, 영양세포 세포를 실질적으로 함유하지 않고 영양세포 세포의 배양에 의해 예비-조절되지 않은 세포 배양물 또는 배양 배지 등의 환경을 지칭한다. "예비 조절된" 배지는 영양세포 세포가 소정 기간, 예를 들면, 적어도 1일 동안 배지 내에서 배양된 후에 수거된 배지를 지칭한다. 예비 조절된 배지는 다수의 매개 물질, 예를 들면, 배지에서 배양한 영양세포 세포에 의해 분비되는 성장 인자 및 사이토킨을 함유한다.

[0111] 본 발명의 특정한 양태에서, 영양세포 비함유 환경은, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 인간 섬유아세포, 케라티노사이트 및 배아 줄기세포를 포함하는 인간 영양세포 세포를 실질적으로 함유하지 않고, 특정한 양태에서 또한 영양세포 세포에 의해 예비 조절되지 않는다. 본 발명의 추가의 양태에서, 영양세포 비함유 환경은 동물 영양세포 세포를 실질적으로 함유하지 않고, 추가로, 특정한 양태에서 영양세포 세포로 예비 조절되지 않는다. 본 발명의 특정한 양태에서, 영양세포 비함유 환경은 인간 및 동물 영양세포 세포를 실질적으로 함유하지 않고, 다른 특정한 양태에서 영양세포 비함유 환경은 인간 및 동물 영양세포 세포를 실질적으로 함유하지 않고 영양세포

세포로 예비 조절되지 않는다.

[0112] 게놈 안정성은 DNA를 정확하게 복제하고 DNA 복제 공정의 통합성을 유지하는 세포의 능력을 지칭한다. 본 발명의 세포를 기재하기 위해 본원에 사용된 바와 같이, "게놈 안정한 세포" 및 "게놈 안정성을 갖는 세포"는, 정상 인간 체세포와 비교하여 돌연변이체 및 염색체 이상의 빈도와 실질적으로 유사한, 돌연변이 및 염색체 이상(전좌, 비정배성, 복제수 변이 및 이배체화)의 빈도를 나타내는 세포를 지칭한다.

[0113] "성분"은, 화학적 또는 생물학적 기원이든, 세포의 성장 및/또는 분화를 유지 및/또는 촉진시키기 위해 세포 배양 배지에 사용될 수 있는 임의의 화합물 또는 기타 물질을 지칭한다. 용어 "성분", "영양소" 및 "구성분"은 상호 교대로 사용될 수 있다. 세포 배양 배지에 사용되는 통상의 성분은, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 아미노산, 염, 금속, 당, 지질, 핵산, 호르몬, 비타민, 지방산, 단백질 등을 포함할 수 있다. 생체 외에서 세포의 배양을 촉진 및/또는 유지하는 다른 성분은 목적 효과를 위해 필요에 따라 당해 기술분야의 통상의 기술자가 선택할 수 있다.

[0114] "분리물" 또는 "분리하는"은 이의 자연 환경으로부터 조성물 또는 물질을 분리하고 수집하는 것, 예를 들면, 조직 또는 신체로부터 개개의 세포 또는 세포 배양물을 분리하는 것을 지칭한다. 한 가지 측면에서, 세포 모집단 또는 조성물은 자연과 관련될 수 있는 세포 및 물질을 실질적으로 함유하지 않는다. 표적 세포 모집단과 관련하여 "분리된" 또는 "정제된" 또는 "실질적으로 천연인"은, 전체 세포 모집단을 구성하는 표적 세포에 대하여, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 및 특정한 양태에서 적어도 약 95% 순수한 세포 모집단을 지칭한다. 세포 모집단 또는 조성물의 순도는 당해 기술분야에 공지된 적절한 방법으로 평가할 수 있다. 예를 들면, 만능 세포의 실질적으로 순수한 모집단은, 전체 세포 모집단을 구성하는 만능 세포에 대하여, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 및 특정한 양태에서 적어도 약 95% 및 특정한 양태에서 약 98% 순수한 세포 모집단을 지칭한다. 용어 "본질적으로 순수한"은 본원에서 "실질적으로 순수한"과 상호 교대로 사용된다.

[0115] "계대" 또는 "계대하는"은, 세포를 목적하는 정도로 증식시키는 경우, 세포를 다중 세포 배양 표면 또는 용기로 나누고 플레이팅하는 작용을 지칭한다. 일부 양태에서, "계대" 또는 "계대하는"은 세포를 나누고, 희석하고 플레이팅하는 것을 지칭한다. 세포가 제1 배양 표면 또는 용기로부터 후속 세트의 표면 또는 용기로 계대됨에 따라, 후속 배양은 본원에서 "제2 배양" 또는 "1차 계대" 등으로 지칭될 수 있다. 새로운 배양 용기로 나누고 플레이팅하는 각각의 작용은 1회 계대로 간주된다.

[0116] "플레이팅"은 세포가 세포 배양 용기에 부착 및 퍼지도록 세포 또는 세포들을 배양 용기에 위치시키는 것을 지칭한다.

[0117] "만능 인자"는 단독으로 또는 다른 제제와 조합하여, 세포의 발달 효능을 증가시킬 수 있는 제제를 지칭한다. 만능 인자는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 및 세포의 발달 효능을 증가시킬 수 있는 소분자를 포함한다. 예시적 만능 인자는, 예를 들면, 전사 인자 및 소분자 재프로그래밍 제제를 포함한다. 전사 인자는, 본원에서 용도가 달리 지시되는 않는 한, 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라 단백질(즉, 폴리펩티드)을 지칭할 수 있다. 예시적 전사 인자는, 예를 들면, Oct, Klf, Myc 및 Sox 폴리펩티드, 및 이들 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 추가의 전사 인자의 예는 본원에서 제공된다.

[0118] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은, 달리 명시되지 않는 한, 통상의 의미, 즉 아미노산 서열에 따라 상호 교대로 사용된다. 폴리펩티드는 특정한 길이로 제한되지 않고, 예를 들면, 이들은 전체 길이 단백질 서열 또는 전체 길이 단백질의 단편을 포함할 수 있고, 폴리펩티드의 해독후 변형체, 예를 들면, 글리코실화물, 아세틸화물, 포스포릴화물 등 뿐만 아니라 당해 기술분야에 공지된 기타 변형체를 포함할 수 있고, 이들 둘 다는 자연 발생 및 비자연 발생일 수 있다. 본 발명의 방법에 사용된 폴리펩티드는 다양한 공지된 재조합 및/또는 합성 기술을 사용하여 제조할 수 있다.

[0119] 본 발명의 방법은, 특정한 양태에서, 예를 들면, 적어도 약 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000개 등의 연속 아미노산 또는 그 이상(모든 중간 길이를 포함함)의 본원에 기재된 폴리펩티드를 포함하는 본원에 기재된 폴리펩티드의 활성 단편(예를 들면, Sox-2, c-Myc, Oct3/4, Klf4, Lin28, Nanog 등 또는 이의 기질, 보조인자 및/또는 하류 작동자)를 사용한다. 특정한 양태에서, 본원에서 사용된 단편 또는 단편의 배합물은 본원에 기재된 방법에 사용하는 경우에 만능을 조절, 유도 및/또는 유지하는 능력을 보유한다.

[0120] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리펩티드 조성물의 변이체(예를 들면, Sox-2, c-Myc, Oct3/4, Klf4, Lin28, Nonog 등, 또는 이의 기질, 보조인자 및/또는 하류 작동자)를 사용한다. 본 발명에 의해 일반적으

로 포함되는 폴리펩티드 변이체는, 이의 길이를 따라, 본원에 기재되는 폴리펩티드 서열에 대해 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상의 동일성(하기 기재된 바와 같이 측정됨)을 통상 나타낼 것이다. 특정한 양태에서, 사용된 변이체 또는 변이체의 조합물은 본원에 기재된 만능을 유도하는 능력을 보유한다.

[0121] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 이의 길이를 따라, 본 명세서의 기재에 따라 사용된 야생형 포유동물 폴리펩티드의 상응하는 영역에 대해 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성(하기 기재한 바와 같이 측정됨)을 나타내는 폴리펩티드 변이체를 사용한다.

[0122] 폴리펩티드 변이체는 하나 이상의 치환체, 결실체, 부가체 및/또는 삽입체에서 자연 발생 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 이러한 변이체는 자연 발생할 수 있거나, 예를 들면, 본 발명의 방법에 사용된 하나 이상의 상기 폴리펩티드 서열을 변형시키고 당해 기술분야에 공지된 다수의 기술을 사용하여 이들의 효과를 평가함으로써 합성적으로 생성할 수 있다.

[0123] "증식시키다"는 하나의 세포가 실질적으로 동일한 2개의 세포로 분할되거나 세포 모집단의 수가 증가하는 특성(예를 들면, 복제하기 위해)을 지칭한다.

[0124] "증식"은 조직 또는 신체 외부, 예를 들면, 플라스틱(또는 피복된 플라스틱) 세포 배양 접시 또는 플라스크 등의 멸균 용기에서 세포를 성장(예: 세포 증식을 통한 복제)시키는 것을 지칭한다.

[0125] "제1 배양물"은 분리된 세포가 배양 배지와 함께 제1 배양 용기에 위치되어 있는 세포, 조직 및/또는 배양물을 지칭한다. 세포, 조직 및/또는 배양물은 유지 및/또는 증식할 수 있지만, 당해 세포, 조직 및/또는 배양물이 제1 용기에 잔류하는 한, 당해 세포, 조직 및/또는 배양물은 제1 배양물로서 지칭된다.

[0126] 용어 "소분자 재프로그래밍 제제" 또는 "소분자 재프로그래밍 화합물"은 본원에서 상호 교대로 사용되고, 단독으로 또는 다른 만능 인자와 조합하여, 세포의 발달 효능을 증가시킬 수 있는 소분자를 지칭한다. "소분자"는 분자량 약 5 kD 미만, 약 4 kD 미만, 약 3 kD 미만, 약 2 kD 미만, 약 1 kD 미만 또는 약 0.5 kD 미만을 갖는 제제를 지칭한다. 소분자는 핵산, 펩티드유사체, 펩토이드, 탄수화물, 지질 또는 기타 유기 또는 무기 분자일 수 있다. 화학적 및/또는 생물학적 혼합물, 예를 들면, 진균, 박테리아 또는 조류 추출물의 라이브러리는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 본 발명의 임의의 분석법으로 스크리닝할 수 있다. 특정한 양태에서, 본원에 사용된 소분자 재프로그래밍 제제는 분자량 10,000 달톤 미만, 예를 들면, 8000, 6000, 4000, 2000 달톤 미만, 예를 들면, 50 내지 1500, 500 내지 1500, 200 내지 2000, 500 내지 5000 달톤을 갖는다.

[0127] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로 함유하지 않는" 및 "본질적으로 함유하지 않는"은 상호 교대로 사용되고, 세포 모집단 또는 배양 배지를 기재하기 위해 사용되는 경우, 명시된 물질을 함유하지 않는, 예를 들면, 명시된 물질을 95% 비함유, 96% 비함유, 97% 비함유, 98% 비함유, 99% 비함유하거나 통상의 수단으로 측정할 때에 검출 불가능한 조성물을 지칭한다. 유사한 의미는, 특정 물질 또는 조성물의 성분의 부재를 지칭하는 경우, 용어 "~의 부재"에 적용될 수 있다.

[0129] **본 발명에 사용하기 위한 세포**

[0130] 본 발명에 사용하기 위한 세포의 출발 모집단은 본질적으로 임의의 적합한 공급원으로부터 유래할 수 있고, 세포 유형 또는 만능 상태와 관련하여 이종성 또는 동종성일 수 있다. 한 가지 양태에서, 세포는 포유동물 세포이고, 특정한 양태에서, 세포는 설치류, 고양이, 개, 돼지, 염소, 양, 말, 소 또는 영장류로 이루어진 그룹으로부터 선택된 포유동물로부터 분리된다. 특정한 양태에서, 포유동물은 인간이다. 다른 특정한 양태에서, 본 발명에 따라 사용 또는 처리되는 세포는 본질적으로 임의의 접근가능한 성숙 세포 유형을 포함하는 성숙 세포이다.

[0131] 세포는 체세포, 비-만능, 불완전 또는 부분 만능 줄기세포, 다능 세포, 올리고능 세포, 단능 세포, 말단 분화된 세포 또는 상기의 임의의 조합을 포함하는 혼합된 세포 모집단일 수 있다. 본 발명의 방법에 사용된 만능 세포는, 배아 줄기세포를 포함하는 자연 발생 줄기세포일 수 있거나, 유도된 만능 줄기세포일 수 있다. "혼합된" 세포 모집단은 다양한 정도의 발달 효능을 갖는 세포 모집단이다. 예를 들면, 혼합된 세포 모집단은 당해 혼합된 모집단이 만능 세포, 부분 만능 세포 및 비-만능 세포, 예를 들면, 완전 분화된 세포를 포함하도록, 재프로그래밍되는 세포를 포함할 수 있다.

[0132] 한 가지 양태에서, 출발 세포 모집단은 성숙 또는 신생 줄기/선조 세포로부터 선택된다. 특정한 양태에서, 줄기/선조 세포의 출발 모집단은 중배엽 줄기/선조 세포, 내배엽 줄기/선조 세포 및 외배엽 줄기/선조 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0133] 또 다른 양태에서, 줄기/선조 세포의 출발 모집단은 중배엽 줄기/선조 세포이다. 중배엽 줄기/선조 세포의 설명적 예는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 중배엽 줄기/선조 세포, 내배엽 줄기/선조 세포, 골수 줄기/선조 세포, 제대 줄기/선조 세포, 지방 조직 유도된 줄기/선조 세포, 조혈 줄기/선조 세포(HSC), 간엽성 줄기/선조 세포, 근육 줄기/선조 세포, 신장 줄기/선조 세포, 골아 줄기/선조 세포, 연골 줄기/선조 세포 등을 포함한다.

[0134] 다른 관련 양태에서, 주기/선조 세포의 출발 모집단은 외배엽 줄기/선조 세포이다. 외배엽 줄기/선조 세포의 설명적 예는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 뉴런 줄기/선조 세포, 망막 줄기/선조 세포, 피부 줄기/선조 세포 등을 포함한다.

[0135] 다른 관련 양태에서, 줄기/선조 세포의 출발 모집단은 내배엽 줄기/선조 세포이다. 내배엽 줄기/선조 세포의 설명적 예는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 간 줄기/선조 세포, 췌장 줄기/선조 세포, 상피 줄기/선조 세포 등을 포함한다.

[0136] 특정한 양태에서, 출발 세포 모집단은 췌장 섬 세포, CNS 세포, PNS 세포, 심근 세포, 골격근 세포, 평활근 세포, 조혈 세포, 골 세포, 간 세포, 지방 세포, 신장 세포, 폐 세포, 연골세포, 피부 세포, 소낭 세포, 혈관 세포, 상피 세포, 면역 세포, 내피 세포 등을 포함한다.

[0138] **세포의 재프로그래밍 유도 및 효능 증가**

[0139] 다양한 전략이 세포에서 만능을 유도하거나 효능을 증가시키기 위해[참조: Takahashi, K., and Yamanaka, S., *Cell* 126, 663-676 (2006); Takahashi *et al.*, *Cell* 131, 861-872 (2007); Yu *et al.*, *Science* 318, 1917-1920 (2007); Zhou *et al.*, *Cell Stem Cell* 4, 381-384 (2009); Kim *et al.*, *Cell Stem Cell* 4, 472-476 (2009); Yamanaka *et al.*, 2009; Saha, K., Jaenisch, R., *Cell Stem Cell* 5, 584-595 (2009)] 및 재프로그래밍의 효능을 향상시키기 위해[참조: Shi *et al.*, *Cell Stem Cell* 2, 525-528 (2008a); Shi *et al.*, *Cell Stem Cell* 3, 568-574 (2008b); Huangfu *et al.*, *Nat Biotechnol* 26, 795-797 (2008a); Huangfu *et al.*, *Nat Biotechnol* 26, 1269-1275 (2008b); Silva *et al.*, *Plos Bio* 6, e253. doi: 10.1371/journal. pbio. 0060253 (2008); Lyssiotis *et al.*, *PNAS* 106, 8912-8917 (2009); Ichida *et al.*, *Cell Stem Cell* 5, 491-503 (2009); Maherali, N., Hochedlinger, K., *Curr Biol* 19, 1718-1723 (2009b); Esteban *et al.*, *Cell Stem Cell* 6, 71-79 (2010); Feng *et al.*, *Cell Stem Cell* 4, 301-312 (2009)] 추구되고 있다.

[0140] 일반적으로, 재프로그래밍 기술은, 폴리뉴클레오티드-, 폴리펩티드- 및/또는 소분자 기반 방법을 직접 또는 간접적으로 사용하는 특정한 세포 경로의 조절을 수반한다. 세포의 발달 효능은, 예를 들면, 세포를 하나 이상의 만능 인자와 접촉시킴으로써 증가될 수 있다. 본원에 사용된 "접촉"은 세포를 만능 인자(예: 소분자, 단백질, 펩티드 등)의 존재하에 배양하거나 만능 인자를 세포 내로 도입하는 것을 수반한다. 만능 인자는 당해 세포를, 단백질 등의 전사 인자를 포함하는 인자의 존재하에, 세포 내로 전사 인자의 도입을 허용하는 조건하에서 배양함으로써 세포 내로 도입될 수 있다[참조: Zhou H et al., Cell Stem Cell. 2009 May 8; 4(5): 381-4; WO/2009/117439]. 세포 내로의 도입은, 예를 들면, 일과성 방법, 예를 들면, 단백질 형질도입, 미세주입, 비-통합 유전자 전달, mRNA 형질도입 등 또는 기타 적합한 기술을 사용하여 촉진될 수 있다. 일부 양태에서, 전사 인자는 세포 내로 도입된 재조합 벡터로부터의 발현에 의해, 또는 세포를 폴리펩티드가 세포 내로 들어가도록 외인성 전사 인자 폴리펩티드의 존재하에 배양함으로써 세포 내로 도입될 수 있다.

[0141] 특정한 양태에서, 만능 인자는 전사 인자이다. 세포 효능의 증가, 확립 또는 유지와 관련되는 예시적 전사 인자는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, Oct-3/4, Cdx-2, Gbx2, Gsh1, HesX1, HoxA10, HoxA11, HoxB1, Irx2, Isl1, Meis1, Meox2, Nanog, Nkx2.2, Onecut, Otx1, Oxt2, Pax5, Pax6, Pdx1, Tcf1, Tcf2, Zfhx1b, Klf-4, Atbf1, Esrrb, Gcnf, Jarid2, Jmjd1a, Jmjd2c, Klf-3, Klf-5, Mel-18, Myst3, Nac1, REST, Rex-1, Rybp, Sall4, Sall1, Tif1, YY1, Zeb2, Zfp281, Zfp57, Zic3, Coup-Tf1, Coup-Tf2, Bmi1, Rnf2, Mta1, Pias1, Pias2, Pias3, Piasy, Sox2, Lef1, Sox15, Sox6, Tcf-7, Tcf711, c-Myc, L-Myc, N-Myc, Hand1, Mad1, Mad3, Mad4, Mxi1, Myf5, Neurog2, Ngn3, Olig2, Tcf3, Tcf4, Foxc1, Foxd3, BAF155, C/EBPβ mafa, Eomes, Tbx-3; Rfx4, Stat3, Stella, 및 UTF-1을 포함한다. 예시적 전사 인자는 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 Nanog를 포함한다.

[0142] 소분자 재프로그래밍 제제는 또한 만능 인자이고, 또한 재프로그래밍의 유도 및 세포 효능의 유지 또는 증가를 위해 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 본 발명의 일부 양태에서, 하나 이상의 소분자 재프로그래밍 제제가 체세포의 만능성을 유도하거나, 세포의 효능을 증가 또는 유지하거나, 재프로그래밍의 효율을 향상시키기 위해 사용된다.

[0143] 일부 양태에서, 소분자 재프로그래밍 제제는 재프로그래밍하는 효율을 향상시키기 위해 본 발명의 방법에 사용된다. 재프로그래밍의 향상은 (1) 만능 세포의 재프로그래밍 및 생성에 요구되는 시간의 감소(예를 들면, 소분자 부재하의 유사하거나 동일한 공정과 비교하여, 만능 세포를 생성하는 시간을 적어도 1일 단축시킴으로써) 또는 달리는 (2) 특정 공정에 의해 생성된 만능 세포 수의 증가(예를 들면, 소분자 부재하의 유사하거나 동일한 공정과 비교하여, 소정 기간 내에 생성된 만능 세포의 수를 적어도 10%, 30%, 50%, 100%, 200%, 500% 등까지 증가시킴으로써)에 의해 측정될 수 있다. 일부 양태에서, 재프로그래밍의 효율의 2배 내지 20배 향상이 관찰된다. 일부 양태에서, 재프로그래밍의 효율은 20배 이상 향상된다. 일부 양태에서, 소분자 재프로그래밍 제제 부재하의 당해 방법과 비교하여 100배 이상의 효율 향상이 관찰된다(예를 들면, 생성된 만능 세포 수의 100배 이상의 증가).

[0144] 몇몇 부류의 소분자 재프로그래밍 제제는 세포 효능의 증가, 확립 및/또는 유지에 중요할 수 있다. 예시적 소분자 재프로그래밍 제제는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, H3K9 메틸화를 억제하거나 H3K4 메틸화를 촉진시키는 제제; 히스톤 탈아세틸화를 억제하거나 히스톤 아세틸화를 촉진시키는 제제; L-유형 Ca 채널 활성화제; cAMP 경로의 활성화제; DNA 메틸트랜스퍼라제(DNMT) 억제제; 핵 수용체 리간드; GSK3 억제제; MEK 억제제; TGFβ 수용체/ALK5 억제제; HDAC 억제제; Erk 억제제; ROCK 억제제; FGFR 억제제; 및 PARP 억제제를 포함한다. 예시적 소분자 재프로그래밍 제제는 GSK3 억제제; MEK 억제제; TGFβ 수용체/ALK5 억제제; HDAC 억제제; Erk 억제제, 및 ROCK 억제제를 포함한다. 이들 부류의 소분자 제제 각각은 하기에 보다 상세히 기재된다.

[0145] 본 발명의 일부 양태에서, 소분자 재프로그래밍 제제는, 만능을 유도하고 재프로그래밍하는 효율을 향상시키고/시키거나 세포의 효능을 증가 또는 유지하기 위해 본 발명의 방법에서 하나 이상의 전사 인자의 치환에 사용된다. 예를 들면, 일부 양태에서, 세포는 하나 이상의 소분자 재프로그래밍 제제와 접촉되고, 여기서 당해 제제는 재프로그래밍하는 효율을 향상시키기에 충분한 양으로 포함된다. 다른 양태에서, 하나 이상의 소분자 재프로그래밍 제제가 전사 인자 이외에 본 발명의 방법에서 사용된다. 한 가지 양태에서, 세포는 세포 효능을 증가, 확립 및/또는 유지하거나 재프로그래밍 공정의 효율을 향상시키는 조건하에서 하나 이상의 만능 전사 인자 및 하나 이상의 소분자 재프로그래밍 제제와 접촉된다.

[0146] 또 다른 양태에서, 세포는 세포의 효능을 증가, 확립 및/또는 유지하거나 재프로그래밍하는 효율을 향상시키기에 충분한 조건 및 시간 동안 적어도 하나의 만능 전사 인자 및 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 소분자 재프로그래밍 제제와 접촉된다. 세포의 효능 또는 분화의 상태는 본원의 다른 곳에서 기재된 만능 특징을 모니터링함으로써 평가할 수 있다.

[0147] 한 가지 양태에서, 세포는 하나 이상의 만능 인자 및/또는 소분자 재프로그래밍 제제의 배합물을 포함하는 조성물과 접촉되며, 여기서 만능 인자 및 소분자는 세포의 만능성을 증가시키거나 유도한다. 본 발명의 세포는 시험관내, 생체외 도는 생체내에서 접촉될 수 있는 것으로 간주된다.

[0149] **만능 세포의 특성화**

[0150] 재프로그래밍의 유도 후, 재프로그래밍된 세포는 만능과 관련되는 관련 및 검출가능한 형태학적, 분자 및/또는 생화학적 변화에 기반하여 선별할 수 있다. 세포 효능의 평가에 있어서 개별적으로 또는 조합하여 모니터링될 수 있는 세포 만능의 구체적 특성은, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 유전자 발현, 메틸화 및 생체내 및 시험관내 특성, 예를 들면, i) 둥글고 평평한 만능 줄기세포 형태; ii) SSEA1(마우스 만능 줄기세포), SSEA3/4(인간 만능 줄기세포); TRA1-60/81; TRA1-85, TRA2-54, GCTM-2, TG343, TG30, CD9, CD29, CD133/프로미닌, CD140a, CD56, CD73, CD105, CD31, CD34, OCT4, Nanog 및/또는 Sox2를 포함하는 만능 줄기세포 마커 및 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 CD30 및 CD50 및 상기 마커의 배합물의 발현; iii) 마우스 키메라에서 생식세포 전달에 관여하는 만능 줄기세포의 능력; iv) 4배성 배아 상보성 분석을 사용하는 배아 막에 관여하는 만능 줄기세포의 능력; v) 만능 줄기세포의 기형종 형성; vi) 부정배체의 형성 및 시험관내 삼계열 분화; 및 vii) 불활성 X 염색체 재활성화를 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 임의의 특징의 서브세트는 세포 효능의 모니터링에 사용된다. 한 가지 양태에서, 만능 세포는 평평한 원형 콜로니 형태, SSEA4 및 Oct4의 발현 및 키메라 및 기형종을 형성하는 능력을 특징으로 한다.

[0151] 본원에 기재된 바와 같이, 만능은 연속성으로 존재하고, 유도된 만능 줄기세포는 "프라이밍된" 상태 및 "천연" 상태 둘 다로 존재하는 것으로 나타나며, 천연 상태의 세포가 보다 큰 분화 효능을 가질 수 있다. 통상의 배양 배지에서 생성된 유도된 만능 줄기세포는 프라이밍된 상태로 존재하고, 이식후 섬유아세포로부터 유래된 세포와 매우 밀접하게 닮는 반면, 천연 iPSC는 마우스 배아 줄기세포 또는 이식전 섬유아세포로부터 유래된 세포와 매

우 밀접하게 닮은 만능 특성을 나타낸다. 프라이밍된 및 천연 세포 상태는, 콜로니 형태의 차이, 중요 신호전달 경로의 억제 또는 활성화에 대한 세포 반응, 유전자 발현 표시 및 배아외 세포와 관련된 유전자를 재활성화시키는 능력을 포함하는, 다양한 차이에 의해 규정할 수 있다. 예를 들면, 프라이밍된 만능 상태를 나타내는 통상의 iPSC는 평평한 콜로니 형태를 나타낸느 반면, 천연 iPSC는 마우스 배아 줄기세포와 유사한 조밀한 반구형 콜로니 형태를 나타낸다. 추가로, 통상의 iPSC는 TGFβ, 액티빈 및 bFGF 등의 중요 사이토킨의 외부 신호전달을 필요로 하고, 미분화 상태의 유지를 위해 ERK/MEK 세포 신호전달에 의존하며, 이들 경로가 세포를, 예를 들면, TGFβ 또는 MEK 억제제와 접촉시킴으로써 억제되는 경우를 구별한다. 대조적으로, 천연 세포는 외부 신호전달을 필요로 하지 않고, TGFβ 및 MEK 신호전달 경로의 억제제로 처리하는 경우에도 만능을 유지한다.

[0152] 추가로, 유전자 발현 분석은 천연 및 프라임 만능 세포 사이에서 상당한 차이를 나타낸다. 예를 들면, 천연 iPSC는 상당히 억제된 Xist 발현을 갖는 반면, 통상의 iPSCS는 Xist 발현의 적당한 억제만을 나타내며; 천연 세포는 현저한 X 염색체 재활성화, 및 통상의 iPSC에서 관찰된 발현과 비교하여 X 염색체 상에 위치된 유전자의 증가된 발현을 나타내고; 천연 세포는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, Gata6, CDX2 및 CGB를 포함하는 배아외 줄기세포 마커를 발현한다. 대조적으로, Foxa2, Sox17 및 브라큐리(Brachyury) 등의 계통 특이적 유전자와 같은 초기 분화 마커는 천연 iPSC에 비해 통상의 iPSC에서 매우 고도로 발현된다. 천연 만능 상태의 세포를 동정하는데 유용한 추가의 마커는 Klf4, Tbx3, Gbx2, Lin28, Soc3의 증가 또는 Otx2, Sox17, Cer1, FoxA2, Zic1, Lhx2, Xist의 감소를 포함한다.

[0153] 본 발명의 특정한 양태에서, 천연 세포는 통상의 iPSC와 비교하여 적어도 2배, 적어도 5배 또는 적어도 10배 감소되는 Xist 발현을 나타낸다. 본 발명의 일부 양태에서, 천연 만능 상태의 세포는 통상의 iPSC보다 2배 낮은 Xist 발현 및 통상의 iPSC보다 3배 높은 수준에서 X 염색체 상에 위치된 적어도 5개 유전자의 발현을 갖는다.

[0154] X 염색체 재활성화는, 통상의 iPSC에서 이러한 유전자의 수준과 비교하여, 적어도 2배, 3배, 5배 또는 그 이상의 수준에서 X 염색체 상에 위치된 적어도 5개 유전자, 적어도 10개 유전자 또는 특정한 양태에서, 적어도 100개 유전자의 증가된 발현에 의해 나타낼 수 있다.

[0155] 본 발명의 특정한 양태에서, 본 발명의 만능 세포는 다중 세포 계대, 예를 들면, 적어도 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20회 또는 그 이상의 계대를 위한 만능 특성을 보유한다.

[0157] **본 발명의 방법에 사용하기 위한 배양 배지 플랫폼**

[0158] 본 발명의 배양 배지(즉, 배양 플랫폼)는 화학적으로 규정된 스톡 기초 배지, 및 영양세포 비함유 환경에서 만능 세포의 장기간 배양, 영양세포 비함유 환경에서 세포의 재프로그래밍, 만능 세포의 단세포 분리, 만능 세포의 세포 분류, 미분화 상태의 유지, 향상된 재프로그래밍의 효율 및 순수한 만능 세포의 생성을 허용하는, 소분자 억제제를 포함하는 소분자의 각종 조합을 포함한다.

[0159] 본 발명의 배양 배지에 사용하기 위한 화학적으로 규정된 스톡 기반 배지는 줄기세포의 유지, 성장 및/또는 분화를 지지하기에 적합한 임의의 규정된 기초 배지, 예를 들면, 통상의 인간 배아 줄기세포 배지일 수 있다. 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 규정된 기초 배지의 예는, 이들로 한정되지 않지만, 둘베코 변형된 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium; "DMEM"), 기초 배지 이글(BME), DMEM/F-12(1:1 DMEM 및 F-12 vol:vol); 배지 199; F-12(Ham) 영양소 혼합물; F-10 (Ham) 영양소 혼합물; 최소 필수 배지(MEM), 윌리엄 배지(Williams' Media) E; 및 RPMI 1640을 포함하고, 이들 모두는 기타 중에서 기브코-비알엘/라이프 테크놀로지스, 인코포레이티드(Gibco-BRL/Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Md.)로부터 이용가능하다. 이들 배지 중의 다수의 몇몇 변형태가 이용가능하고, 본 발명의 배양 배지를 구성하는데 특히 유용한 것들은, 이들로 한정되지 않지만, DMEM 11966, DMEM 10314, MEM 11095, 윌리엄 배지 E 12251, Ham F12 11059, MEM-알파 12561, 및 배지-199 11151(모두 기브코-비알엘/라이프 테크놀로지스(Gibco-BRL/Life Technologies) (1995-1996 카탈로그)로부터 이용가능하다)를 포함한다. 배양 배지는, 예를 들면, 다음 중의 하나 이상을 포함할 수 있다: 아미노산, 비타민, 유기 염, 무기 염, 미량 원소, 완충 염, 당, ATP 등(적합한 기초 배지 성분은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich of Saint Louis, Mo.)로부터 이용가능하다).

[0160] 본 발명의 세포 배양 배지에 사용하기 위한 소분자 및 이의 부류는 이하에 보다 충분히 기술한다. 특별한 양태에서, 본 발명의 배양 배지는 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 이상의 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 ROCK 억제제를 포함한다. 특정한 양태에서, 본 발명의 배양 배지는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 ROCK 억제제를 포함한다. 본 발명의 세포 배양 배지 및 방법에 사용하기 위한 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 ROCK 억제제의 예는 이하 기술된다. 배양 배지는 추가로 PARP 억제제, 예를 들면, 올라파리브(AZD-

2281)를 포함할 수 있다.

[0162] **GSK-3β 억제제**

[0163] GSK-3β의 억제제는, 이들로 한정되지 않지만, GSK-3β를 결합하는 항체, 우성 음성 GSK-3β 변이체, 및 GSK-3β를 표적화하는 siRNA 및 안티센스 핵산을 포함한다. 기타 예시적인 GSK-3β 억제제는, 이들로 한정되지 않지만, 켄폴론, l-아자켄폴론, CHIR99021, CHIR98014, AR-A014418, CT 99021, CT 20026, SB216763, AR-A014418, 리튬, SB 415286, TDZD-8, BIO, BIO-아세톡심, (5-메틸-1H-피라졸-3-일)-(2-페닐퀴나졸린-4-일)아민, 피리도카바졸-사이클로펜타디에닐루테늄 착물, TDZD-8 4-벤질-2-메틸-1,2,4-티아디아졸리딘-3,5-디온, 2-티오(3-요오도벤질)-5-(1-피리딜)-[1,3,4]-옥사디아졸, OTDZT, 알파-4-디브로모아세토페논, AR-AO 144-18, 3- (1-(3-하이드록시프로필)-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일]-4-피라진-2-일-피롤-2,5-디온; TWS1 19 피롤로피리미딘 화합물, L803 H-KEAPPAPPQSpP-NH2 또는 이의 미리스토일화 형태; 2-클로로-1-(4,5-디브로모-티오펜-2-일)-에 탄온, SB216763, 및 SB415286을 포함한다. 본 발명의 세포 배양 배지에 사용하기 위한 예시적인 GSK3 억제제는 CHIR99021, BIO, 및 켄폴론을 포함하고, CHIR99021이 특별한 양태에서 바람직하다.

[0165] **ERK/MEK 억제제**

[0166] 예시적인 ERK/MEK 경로의 억제제는, 이들로 한정되지 않지만, MEK 또는 ERK에 대한 항체, 우성 음성 MEK 또는 ERK 변이체, 및 MEK 및/또는 ERK의 발현을 억제하는 siRNA 및 안티센스 핵산을 포함한다. 기타 예시적인 ERK/MEK 억제제는, 이들로 한정되지 않지만, PD0325901, PD98059, U0126, SL327, ARRY-162, PD184161, PD184352, 수니티니브, 소라페니브, 반데타니브, 파조파니브, 악시티니브, GSK1 120212, ARRY-438162, R05126766, XL518, AZD8330, RDEA1 19, AZD6244, FR180204 및 PTK787를 포함한다.

[0167] 추가의 MEK/ERK 억제제는 국제 공개된 특허 출원 제WO 99/01426호, 제WO 02/06213호, 제WO 03/077914호, 제WO 05/051301호 및 제WO2007/044084호에 기술된 화합물을 포함한다.

[0168] MEK/ERK 억제제의 추가의 예시적인 예는 다음 화합물을 포함한다: --6-(4-브로모-2-클로로-페닐아미노)-7-플루오로-3-메틸-3H-벤조이미다졸-e-5-카복실산(2,3-디하이드록시-프로폭시)-아미드; 6-(4-브로모-2-클로로-페닐아미노)-7-플루오로-3-(테트라하이드로-피란-2-일-메틸)-3H-벤조이미다졸-5-카복실산(2-하이드록시-에톡시)-아미드, 1-[6-(4-브로모-2-클로로-페닐아미노)-7-플루오로-3-메틸-3H-벤조이미다졸-5-일]-2-하이드록시-에탄온, 6-(4-브로모-2-클로로-페닐아미노)-7-플루오로-3-메틸-3H-벤조이미다졸-e-5-카복실산(2-하이드록시-1,1-디메틸-에톡시)-아미드, 6-(4-브로모-2-클로로-페닐아미노)-7-플루오로-3-(테트라하이드로-푸란-2-일-메틸)-3H-벤조이미다졸-5-카복실산(2-하이드록시-에톡시)-아미드, 6-(4-브로모-2-플루오로-페닐아미노)-7-플루오로-3-메틸-3H-벤조이미다졸-e-5-카복실산(2-하이드록시-에톡시)-아미드, 6-(2,4-디클로로-페닐아미노)-7-플루오로-3-메틸-3H-벤조이미다졸-5--카복실산(2-하이드록시-에톡시)-아미드, 6-(4-브로모-2-클로로-페닐아미노)-7-플루오로-3-메틸-3H-벤조이미다졸-e-5-카복실산(2-하이드록시-에톡시)-아미드, 이후 MEK 억제제 1로서 언급됨; 2-[(2-플루오로-4-요오도페닐)아미노]-N-(2-하이드록시에톡시)-1,5-디메틸-6--옥소-1,6-디하아디로피리딘-3-카복스아미드; 이후, MEK 억제제 2로서 지칭됨; 및 4-(4-브로모-2-플루오로페닐아미노)-N-(2-하이드록시에톡시)-1,5-디메틸-6--옥소-1,6-디하이드로피리다진-3-카복스아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염. 특정한 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지에 사용하기 위한 MEK/ERK 억제제는 PD98059이다.

[0170] **TGFβ 수용체/ALK5 억제제**

[0171] 예시적인 ALK5 억제제는 ALK5에 대한 항체, ALK5의 우성 음성 변이체, 및 ALK5의 발현을 억제하는 안티센스 핵산을 포함한다. 기타 예시적인 ALK5 억제제는, 이들로 한정되지 않지만, SB431542, A-83-01, 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H- 피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604, SB-505124, 및 피리딘 유도체를 포함한다[참조: 본원에 참조로 인용된 제WO2008/006583호].

[0172] 추가로, "ALK5 억제제"는 비특이적 키나제 억제제를 포함하는 것으로 의도되지 않고, "ALK5 억제제"는 ALK5 이외에, ALK4 및/또는 ALK7을 억제하는 억제제, 예를 들면, SB-431542를 포함하는 것으로 이해되어야 한다[참조: Inman, et al, JMoI. Phamacol. 62(1): 65-74 (2002)].

[0173] ALK5를 억제하는 효과를 나타내는 본원에서의 데이터를 고려하여, TGFβ/액티빈 경로의 억제가 유사한 효과를 가질 것으로 간주된다. 따라서, 임의의 억제제, 예를 들면, TGFβ/액티빈 경로의 업스트림 또는 다운스트림을 본원에서 각각의 단락에서 기술된 바와 같이 ALK5 억제제와 함께 또는 ALK5 억제제 대신에 사용될 수 있다. 예시적인 TGFβ/액티빈 경로 억제제는, 이들로 한정되지 않지만, TGFβ 수용체 억제제, SMAD 2/3 포스포릴화의 억제제, SMAD 2/3와 SMAD 4의 상호작용 억제제, 및 SMAD 6 및 SMAD 7의 활성화제/작용제를 포함한다. 또한, 이하

기술된 분류는 단지 조직 목적이고, 당해 분야의 기술자는 화합물이 경로 내의 하나 이상의 지점에 영향을 미칠 수 있고, 따라서 화합물은 규정된 분류 하나 이상에서 기능할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0174] TGFβ 수용체 억제제는 항체, 우성 변이체 및 TGFβ 수용체를 표적화하는 siRNA 또는 안티센스 핵산을 포함할 수 있다. 억제제의 특별한 예는, 이들로 한정되지 않지만, SU5416; 2-(5-벤조[1,3]디옥솔-5-일-2-3급-부틸-3H-이미다졸-4-일)-6-메틸피리딘 하이드로클로라이드(SB-505124); 레르데리뮴브(CAT-152); 메텔리무마브(CAT-192); GC-1008; ID1 1; AP-12009; AP-11014; LY550410; LY580276; LY364947; LY2109761; SB-505124; SB-431542; SD-208; SM16; NPC-30345; Ki26894; SB-203580; SD-093; 글리벡; 3,5,7,2',4'-펜타하이드록시피아본(Morin); 액티빈-M108A; PI 44; 가용성 TBR2-Fc; 및 TGFβ 수용체를 표적화하는 안티센스 세포 감염된 종양 세포를 포함한다[참조: Wrzesinski, et al, Clinical Cancer Research 13(18):5262-5270 (2007); Kaminska, et al., Acta Biochimica Polonica 52(2):329-337 (2005); and Chang, et al., Frontiers in Bioscience 12:4393-4401 (2007)].

[0175] 본 발명의 세포 배양 배지에 사용하기 위한 예시적인 TGFβ 수용체 억제제는 SB431542, A-83-01, 및 RepSox를 포함한다. 특별한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이다.

[0177] **ROCK 억제제**

[0178] ROCK는 Rho의 표적 단백질로서 작용하는 세린/트레오닌 키나제이다(이중 3개의 이소형은 RhoA, RhoB 및 RhoC로서 존재한다). 예시적인 ROCK 억제제는, 이들로 한정되지 않지만, ROCK의 항체, 우성 음성 ROCK 변이체, 및 ROCK의 발현을 억제하는 siRNA 및 안티센스 핵산을 포함한다. 기타 예시적인 ROCK 억제제는, 이들로 한정되지 않지만, 티아조비빈, Y27632, 파수딜, AR122-86, Y27632 H-1152, Y-30141, Wf-536, HA-1077, 하이드록실-HA-1077, GSK269962A, SB-772077-B, N-(4-피리딜)-N'-(2,4,6-트리클로로페닐)우레아, 3-(4-피리딜)-1H-인돌, 및 (R)-(+)-트랜스-N-(4-피리딜)-4-(1-아미노에틸)-사이클로헥산카복스아미드를 포함한다.

[0179] 본 발명의 세포 배양 배지에 사용하기 위한 예시적인 ROCK 억제제는 티아조비빈, Y27632, 피린테그린 및 블렙비스타틴을 포함한다. 특정한 양태에서, ROCK 억제제는 티아조비빈이다.

[0181] **FGFR 억제제**

[0182] 예시적인 FGFR 억제제는, 이들로 한정되지 않지만, FGFR에 대한 항체, 우성 음성 FGFR 변이체, 및 FGFR의 발현을 억제하는 siRNA 및 안티센스 핵산을 포함한다. 기타 예시적인 FGFR 억제제는, 이들로 한정되지 않지만, RO-4396686, CHIR-258, PD 173074, PD 166866, ENK-834, ENK-835, SU5402, XL-999, SU6668, R04383596, 및 BIBF-1120를 포함한다.

[0184] **PARP 억제제**

[0185] PARP 억제제는 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제("PARP")를 억제한다. PARP 단백질은 세포에서 DNA 수복 경로를 조절하는 기능을 하는 DNA 수복 효소이다. PARP는 염기 제거 수복(BER) 경로와 관련되고, PARP 억제는 만능 세포의 재프로그래밍 또는 유지 동안 세포의 게놈 안정성을 촉진시킬 수 있다. 본 발명의 세포 배양 배지에 사용하기 위한 예시적인 PARP 억제제는, 제한 없이, 이니파리브, 베리파리브 및 올라파리브(AZD - 2281)를 포함한다.

[0186] 본 발명의 세포 배양 배지 중의 체세포의 양은 변할 수 있고, 사용되는 특정 분자 및 조합, 배지 중에서 배양될 세포의 형태, 및 본 발명의 배양 배지를 위한 용도의 특별한 적용을 포함하는 특별한 배양 조건에 따라 최적화될 수 있다. 일부 양태에서, 소분자는 배지에 만능성을 유도하고, 재프로그래밍하는 효율을 향상시키거나 세포의 효능을 증가시키거나 유지시키기에 충분한 농도로 존재한다.

[0187] 특별한 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지 중의 소분자의 바람직한 농도 및 조합은 표 1에 제시된다. 본 발명의 세포 배양 배지의 특별한 양태에서, 세포 배양 배지는 표 1에 기술된 바와 같이 "SMC4" 배지이다. SMC4 배지는 통상의 인간 ESC 배지 및 특별한 경로 조절제 및 표 1에 제시된 첨가제를 포함한다. 배지의 성분은 배지에 이러한 화합물에 대해 표 1에 제시된 최적의 범위 내의 양으로 존재할 수 있고, 표 1에 제시된 최적의 농도로 존재한다. SMC4 배지의 양태는 임의로 하나 이상의 대체 및 표 2에 제시된 경로 조절제 및 활성화제를 표 2에 제시된 최적의 범위 내의 농도로, 특정한 양태에서는 표 2에 제시된 최적 농도 내의 농도로 임의로 포함할 수 있다. 배지의 특별한 양태에서, SMC4 배지는 가용성 피브로넥틴을 포함하고, 전반적으로 "SMC4 + 피브로넥틴"으로서 지칭된다.

[0188] 일부 양태에서, 본 발명의 배양 배지는 하나 이상의 Oct 폴리펩티드, Klf 폴리펩티드, Myc 폴리펩티드, 및 Sox 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 배양 배지는 세포를 포함하지 않는다. 일부 양태에서, 배양 배

지는 추가로 세포, 예를 들면, 비만능 세포, 부분적 만능 세포, 만능 세포, 또는 각종 상태의 효능을 갖는 세포를 함유하는 혼합 세포 모집단을 추가로 포함한다.

[0190] **표 1. 세포 배양물 성분 및 첨가제**

[0191] 이하 표는 단세포 계대 및 단일 분류 및 농축 과정을 경험하는 세포의 생존능 및 만능성을 향상시키고, 재프로그래밍 공정을 향상시킬 뿐만 아니라 만능 줄기세포를 미분화 상태로 유지시키기 위해 사용될 수 있는 분자, 및 이들이 영향을 미치는 신호전달 경로를 나열한다.

SMC4 배지	최적 농도	최적 농도 범위
통상적인/기초 인간 ESC 배지 제형		
DMEM/F12 (또는 DMEM, 또는 HIGH GLUCOSE DMEM, 또는 KNOCK-OUT DMEM)	1 x	1 x
L-글루타민	2 mM	1 내지 10 mM
비필수 아미노산	1 x	0.5 내지 5 x
2-머캅토에탄올	100 μM	10 내지 500 μM
bFGF	10ng /mL	1 내지 100 ng/mL
특별한 경로 억제제 및 첨가제		
ERK/MEK/MAPK • PD0325901	0.4 μM	.01 내지 100 μM
Wnt/β 카테닌/GSK • CHIR99021	1 μM	.01 내지 100 μM
Rho/ROCK/미오신 II • 티아조비빈	5 μM	.01 내지 500 μM
TGFB/ALK • SB431542	2 μM	.01 내지 100 μM
세포외 매트릭스		
MATRIGEL™	제조자의 지시에 따라	
젤라틴	제조자의 지시에 따라	

[0192]

[0194] SMC4 + 피브로넥틴은 가용성 피브로넥틴을 약 5㎍/mL의 농도로 포함하는, 상기한 바와 같은 SMC4 배지를 의미한다. 피브로넥틴은 SMC4 배지에 약 05 내지 500㎍/mL의 농도 범위로 존재할 수 있다.

[0196] **표 2. 영양세포 비함유 시스템 상에서 단세포 계대, 세포 분류 및 배양시 세포상 만능성 및 생존능을 향상시키기 위한 특별한 대체 세포 배양 성분 및 첨가제**

특별한 대체 배지 및 경로 조절제 및 첨가제의 예		
	최적 농도	최적 범위
ERK/MEK/MAPK • PD98059	10 μM	.01 내지 500 μM
Wnt/β 카네틴/GSK • Bio • 켄파울론 • XAV939	 2 μM 5 μM 1 μM	 .01 내지 100 μM .01 내지 100 μM .01 내지 100 μM
Rho/ROCK/미오신 II • Y27632 • 블레비스타틴 • 피린테그린	 10 μM 5 μM 1 μM	 .01 내지 500 μM .01 내지 500 μM .01 내지 100 μM
TGFB/ALK • A-83-01	 1 μM	 .01 내지 100 μM

[0197]

[0198]

• RepSox • TFGβ	1 μM 250 ng/mL	.01 내지 100 μM 1 내지 25,000 ng/mL
PI3K/AKT/PTEN • 인슐린 • IGF • PDK2 작용제 • PDK1 작용제 PS48	 10 μg/mL 10 ng /mL 1 μM 5uM	 1 내지 100 μg/mL 1 내지 100 ng/mL .01 내지 100μM .01 내지 500 uM
FGF/FGFR • bFGF • PD173074 • SU5401	 10ng /mL 0.1 μM 2 μM	 1 내지 100 ng/mL .001 내지 10 μM .01 내지 100 μM
EGF/EGFR • EGF • AG1478	 10 ng /mL 1 μM	 1 내지 100 ng/mL .01 내지 100 μM
p53 • 피피트린-α • 피피트린-μ	 5 μM 2 μM	 .01 내지 500 μM .01 내지 500 μM
헤지호그 • 사이클로파민	 1 μM	 .01 내지 100 μM
Notch/Delta • DAPT	 1 μM	 .01 내지 100 μM
크로마틴 & 히스톤 변경제/아세틸화/메틸화 VALPROIC ACID • 5 AZA • 부티레이트 • 파르네이트 • BIX01294 • RG108 • 트라닐사이프로민 하이드로클로라이드 • 트리코스타틴 A	 0.5 mM 1 mM 1 mM 2 μM 1 μM 1 μM 100 μM 100 nM	 0.05 내지 5 mM .01 내지 100 mM .01 내지 100 mM .01 내지 200 μM .01 내지 200 μM .01 내지 200 μM .001 내지 10 mM .01 내지 1000 nM
항산화제 • 아스코르브산 • 환원된 산소 • 토코트리에놀	 10 μg/mL 5 % 25 μM	 0.01 내지 1000 μg/mL 1 내지 20 % .1 내지 1000 μM
JAK/STAT • LIF • IL6	 1,000 U/mL 10 ng/mL	 10 내지 10,000 U/mL .1 내지 1000 ng/mL
BMP • BMP • 도르소몰핀 • LDN-193189	 10 ng/mL 1 μM 2 μM	 .01 내지 1000 ng/mL .01 내지 100 μM .01 내지 500 μM
PARP • 올라파리브 (AZD2281)	 1 μM	 .01 내지 100 μM
KLF • 포르스콜린 • AICAR	 10 μM 0.5 mM	 .01 내지 100 μM .001 내지 100 mM

[0199]

Ca2+ 채널 활성화제 • Bay K 8644	 1 μM	 .01 내지 100 μM
녹아웃 혈청 대체물	20 %v/v	2 내지 80 %v/v
무-XENO 녹아웃 혈청 대체물	20 %v/v	2 내지 80 %v/v
트랜스페린	1 mg/mL	.01 내지 100 mg/mL
알부민	.5 mg/mL	.1 내지 10 mg/mL
N2	1 x	.1x 내지 10 x
B27	1 x	.1x 내지 10 x

[0201] **사이토킨 및 성장 인자**

[0202] 본 발명의 일부 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지는 실질적으로 사이토킨 및/또는 성장 인자를 함유하지 않고, 임의로 영양세포 비함유 환경이다. 기타 양태에서, 세포 배양 배지는 보충물, 예를 들면, 혈청, 추출물, 성장 인사, 호르몬, 사이토킨 등을 함유한다.

[0203] 각종 성장 인자 및 배양 배지에서의 이들의 용도는 당해 기술분야에서 익히 공지되었고, 예를 들면, ECM 단백질, 라미닌 1, 피브로넥틴, 콜라겐 IV 이소형, 프로테아제, 프로테아제 억제제, 세포 표면 접착 단백질, 세포 신호전달 단백질, 카드헤린, 클로라이드 세포내 채널 1, 막 관통 수용체 PTK7, 인슐린형 성장 인자, 인히빈 베타 A, TGFβ/액티빈/노달 신호전달 경로의 유도제 및 액티빈 A를 포함한다. 배양 배지에 사용된 사이토킨은, 예를 들면, 다음 중의 하나 이상을 포함할 수 있다: 성장 인자, 예를 들면, 상피 성장 인자(EGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 간세포 성장 인자(HGF), 인슐린형 성장 인자 1(IGF-1), 인슐린형 성장 인자 2(IGF-2), 케라티노사이트 성장 인자(KGF), 신경 성장 인자(NGF), 혈소판 유도 성장 인자(PDGF), 형질 변환 성장 인자 베타(TGF-β), 혈관 내피 세포 성장 인자(VEGF) 트랜스페린, 각종 인터류킨(예: IL-1 내지 IL-18), 각종 콜로니 자극 인자(예: 과립구/대식 세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)), 각종 인터페론(예: IFN-. 감마.) 및 줄기세포에 대한 영향을 갖는 기타 사이토킨, 예를 들면, 줄기세포 인자(SCF) 및 에리트로포이에틴(Epo). 이러한 사이토킨은, 예를 들면, 알 앤 디 시스템스(R&D Systems, Minneapolis, Minn.)로부터 상업적으로 수득될 수 있고, 천연 또는 재조합형일 수 있다. 일부 양태에서, 광범위한 종류의 포유동물 세포의 배양을 위해, 기초 배지는 FGF를 약 0.01-100ng/ml, 약 0.2-20ng/ml, 및 특별한 양태에서 약 0.5-10ng/ml의 농도로 함유한다. 기타 사이토킨은, 사용될 경우, 실험적으로 측정된 농도로 또는 설정된 사이토킨 기술에 의해 안내된 바와 같이 첨가될 수 있다.

[0204] 본 배지에 포함될 수 있는 추가 성분은 인슐린(특히, 인슐린 Zn^{++}) 및 트랜스페린이다. 시판되는(예를 들면, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.)로부터) 이들 추가 성분은 본 배지에 약 0.1 내지 약 100㎍/ml 또는 약 1 내지 약 10㎍/ml의 농도 범위로 제형화될 수 있다. 추가로, 재조합 인슐린 EH는 인슐린의 아연계 염을 동물- 또는 인간 유도 인슐린을 치환할 수 있다. 기타 성분 또는 치환체를 당해 기술분야의 기술자에게 공지된 바와 같이 보충 조성물에 첨가할 수 있다.

[0205] 사이토킨 및 보충물의 유사 성분이 기초 배지에 대신 (또는 이외에) 포함될 수 있다. 이러한 성분은 통상적으로 보충 조성물이 통상적으로 기초 배지를 저장하기 위해 정기적으로 사용된 약 4℃보다 오히려 약 -20℃에서 인습적으로 저장될 때 보충 조성물과 함께 포함된다. 사이토킨 및 유사 성분은 -20℃에 근접한 온도에서 명료하게 더 양호할 수 있다.

[0207] **본 발명의 방법에 사용하기 위한 기질**

[0208] 임의의 적합한 용기 또는 세포 배양 용기를 기초 배지 및/또는 세포 배양 보충물 중의 세포 배양물용 지지체로서 사용할 수 있다. 지지체 상의 기질 피복은 필요하지 않다. 그러나, 배양 용기의 표면을 접착 촉진 기질(예: 콜라겐, 피브로넥틴, RGD-함유 폴리펩티드, 젤라틴 등)으로 피복시키면 세포의 부착을 촉진시키고, 이에 의해 본원에서 기술된 세포 배양 배지 및 보충물의 효과를 향상시킬 수 있다. 세포를 배양하고 계대하기 위해 적합한 기질은 당해 분야에 공지되어 있고, 제한 없이, 젤라틴, 라미닌, 피브로넥틴, 콜라겐, 엘라스틴, 오스테오폰틴, 천연 발생 세포주 생성된 매트릭스, 예를 들면, Matrigel™과 합성 또는 인공 표면, 예를 들면, 폴리아민 단층 및 카복시 말단 단층의 혼합물을 포함한다.

[0210] **영양세포 비함유 환경**

[0211] 세포는 통상적으로 영양세포 세포 상에서 또는 영양세포 세포로 예비 조절되고 소 태아 혈청을 함유하는 배양 환경에서 배양되지만, 이러한 환경은 임상 및 치료 용도용 세포를 생성하는데 부적합할 수 있다. 예를 들면, 이러한 이종-오염된 환경에서 배양된 세포는 일반적으로 인간 세포 이식용으로 부적합한 것으로 간주되는데, 이는 동물 성분에의 노출이 치료될 환자에게 심각한 면역 거부를 제공하고, 동정되지 않은 병원균을 전달할 수 있고, 잠재적으로 동물 레트로바이러스를 재활성화시킬 수 있다. 동물 비함유 배양 배지, 예를 들면, 본 발명의 영양세포 비함유 환경을 사용하는 배양 시스템은 임상 등급 세포주, 특히 hESC 및 iPSC 세포주의 생성을 촉진시킨다.

[0212] 본 발명의 일부 양태에서, 본 발명의 영양세포 비함유 환경은 제한 없이 인간 섬유아세포, 케라티노사이트 및 배아 줄기세포를 포함하는 인간 영양세포 세포를 본질적으로 함유하지 않고, 영양세포 세포에 의해 예비 조절되지 않는다. 본 발명의 추가의 양태에서, 영양세포 비함유 환경은 본질적으로 동물 영양세포 세포를 함유하지 않고, 추가로 일부 양태에서는 영양세포 세포에 의해 예비 조절되지 않는다. 본 발명의 특별한 양태에서, 영양세포 비함유 환경은 인간 영양세포 세포 및 동물 영양세포 세포 둘 다를 본질적으로 함유하지 않고, 보다 특별한 양태에서 영양세포 비함유 환경은 인간 영양세포 세포 및 동물 영양세포 세포 둘 다를 본질적으로 함유하지 않고, 영양세포 세포에 의해 예비 조절되지 않는다.

[0213] 본 발명의 영양세포 비함유 세포 배양 배지는 만능 세포를 배양하고, 세포를 재프로그래밍하고, 만능 세포의 단세포 분리, 만능 세포의 세포 분류, 순수한 만능 세포의 생성 및 세포의 미분화 상태의 유지를 포함하는 본 발명의 방법에 사용된다. 본 발명의 특별한 방법에서, 영양세포 비함유 환경을 본 발명에 사용하여 만능성을 유도하고, 재프로그래밍하는 효율을 향상시키고/시키거나 세포의 효능을 증가시키거나 유지시킨다. 특별한 양태에서, 영양세포 비함유 환경은 실질적으로 사이토킨 및 bFGF를 포함하는 성장 인자를 함유하지 않는다.

[0215] **분리**

[0216] 세포의 단세포, 예를 들면, 단세포 현탁액으로의 분리는 효소 또는 기계적 수단에 의해 달성될 수 있다. 세포의 단세포로의 분리를 허용하는 것으로 당해 기술분야에 공지된 임의의 효소 제제를 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 분리제는 트립신/EDTA, TrypLE-셀렉트, 콜라게나제 IV 및 디스파제로부터 선택된다.

[0217] 킬레이트제, 예를 들면, EDTA, 아큐타제 또는 AccuMax가 또한 본 발명의 방법에 따라서 세포를 분리하는데 단독으로 또는 효소 제제와 함께 사용될 수 있다. 분리제는 칼슘 및 마그네슘 비함유 PBS에 용해되어 단세포로의 분리를 촉진시킬 수 있다.

[0218] 분리 동안 및 분리 후 세포의 생존을 향상시키기 위해, 생존 촉진 물질을 첨가할 수 있다(예: 성장 인자, 세포사 및 아폽토시스에 관련된 세포 경로의 억제제, 또는 조절 배지). 일부 양태에서, 통상의 배지에서 배양된 세포를 분리하고, 단세포를 하나 이상의 소분자 억제제를 갖는 본 발명의 세포 배양물, 예를 들면, SMC4 배지 또는 SMC4 + 피브로넥틴에 위치시킨다. 분리된 단세포는 임의로 영양세포 비함유 환경에 위치시킬 수 있다. 기타 양태에서, 세포를 분리하기 전에 영양세포 비함유 환경에서 배양하고, 하나 이상의 소분자 억제제를 갖는 본 발명의 세포 배양물, 예를 들면, SMC4 배지 또는 SMC4 + 피브로넥틴에 위치시키고, 이는 임의로 영양세포 비함유 환경일 수 있다.

[0219] 단세포로의 효소 분리는 기계적 힘에 의해 지지될 수 있다. 대안적으로, 분리제는, 예를 들면, 세포를 분리하기 위해 기계적 도구, 예를 들면, 피펫 또는 날카로운 마이크로 모세관을 사용함과 같은 단지 기계적 힘일 수 있다.

[0220] 세포 배양물 및 배지 수집에 대한 일반적 기술은 대규모 포유동물 세포 배양[참조: Hu et ah, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 148, 1997]; 혈청 비함유 배지[참조: K. Kitano, Biotechnology 17:73, 1991]; 대규모 포유동물 세포 배양[참조: Curr. Opin. Biotechnol. 2:375, 1991]; 및 포유동물 세포의 현탁 배양[참조: Birch et al., Bioprocess Technol. 19:251, 1990]에 개설된다. 기타 흥미로운 문헌은 [Understanding Media(참조: M. McLuhan, Mentor N.Y., 1964)] 및 [Medium is the Massage(참조: M. McLuhan & Q. Fiore, Bantam N.Y., 1967)]를 포함한다.

[0221] 본 발명의 실행에 유용한 일반적 기술의 추가의 정교함을 위해, 개업의는 세포 생물학, 조직 배양 및 발생학의 표준 교과서 및 검토를 참조할 수 있다. 여기에는 문헌[참조: "Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach" (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987); "Guide to Techniques in Mouse Development" (P. M. Wasserman et al. eds., Academic Press 1993); "Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro" (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993); "Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy" (P. D. Rathjen et al, al., 1993)]이 포함된다. 줄기세포의 분화는 문헌[참조: Differentiation of stem cells is reviewed in Robertson, Meth. Cell Biol. 1 '5:173, 1997; and Pedersen, Reprod. Fertil. Dev. 10:31,1998]에 검토된다.

[0223] **농축 및 고갈 전략**

[0224] 본 발명은 또한 iPSCs를 생성하는 효율을 증가시키는 방법으로서 만능 세포를 위한 세포 모집단을 풍부화하는 전략을 제공한다. 농축 전략은 비교적 단시간에 클론 iPSC 콜로니를 유도하여 iPSC 생성 효율을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 농축 방법은 만능 마커를 발현시키는 세포를 동정하여 수득하기 위해 재프로그래밍을 유도한 세포 모집단을 분류하고, 이에 의해 만능 세포로 농축 세포 모집단을 수득하는 것을 포함한다. 분류된 세포는 재프로그래밍을 유도하고, 재프로그래밍을 경험하는 혼합 세포 모집단을 포함하여 모집단이 만능 세포, 부분 만능 세포 및 비만능 세포, 예를 들면, 완전 분화 세포를 포함하도록 한다. 하나의 양태에서, 분류된 세포 모집단은 만능 마커를 재프로그램하고 발현시키도록 유도된다. 일부 양태에서, 세포는 재프로그래밍이 약 4 내지 30일, 약 4 내지 24일, 약 6 내지 22일 또는 약 8 내지 약 12일 동안 야기된 후, 배양된다. 추가의 농축 방법론은 만능 세포의 농축 모집단을 수득하기 위해 분화 또는 비만능 마커를 발현시키는 소포의 고갈을

포함한다.

[0225] 본 발명의 농축 전략은 분류될 세포 모집단의 단세포 현탁액을 수득하는 것을 포함한다. 본 발명의 한 양태에서, 단세포 현탁액은 모집단에서 세포를 분리하고 세포를 재현탁시켜 수득한다. 분리된 세포를 유지시키거나 세포 분류를 실행하기 위한 임의의 적합한 용액 또는 배지에 재현탁시킬 수 있다. 특별한 양태에서, 단세포 현탁액은 하나 이상의 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 함유한다. 특정한 양태에서, 단세포 현탁액은 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함하고, 특정의 특별한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다.

[0226] 본 발명의 농축 공정에서, 세포를 분류하여 만능 세포를 수득하거나, 세포는 비-재프로그래밍되거나 비-만능 세포의 고갈이고, 이에 의해 만능 세포로 농축 세포 모집단을 수득한다. 하나의 양태에서, 단세포 현탁액을 제조한 다음, 단세포는, 예를 들면, 적합한 항체를 사용하여 만능 마커를 염색함과 같이, 분류를 위해 제조한다. 세포는 세포를 적합한 분류 방법에 의해, 예를 들면, 자기 비드 또는 유동 혈구 계산(FACS) 분류로 분류할 수 있다.

[0227] 세포는 Oct, Sox, Nanog, SSEA3/4; TRA1-60/81; TRA1-85, TRA2-54, GCTM-2, TG343, TG30, CD9, CD29, CD133/프로미닌, CD140a, CD56, CD73, CD105, CD31, CD34, OCT4, KLF4, SSEA1(마우스), 및 본 발명에서 입증된 바와 같이, CD30 및 CD50의 발현을 포함하여 각종 만능 마커에 기반하여 분류될 수 있다. 각종 양태에서, 세포는 둘 이상, 셋 이상 또는 넷 이상의 만능 마커에 기반하여 분류된다. 특정한 양태에서, 세포는 SSEA4의 발현에 기반하여 분류되고, 특정의 특별한 양태에서 TRA181 또는 TRA160과 함께 SSEA4 발현에 기반하여 분류된다. 특정한 양태에서, 세포는 SSEA4, Tra181 또는 Tra160 및 CD30에 기반하여 분류된다. 특별한 양태에서, 세포는, 이들로 한정되지 않지만, CD13, CD26, CD34, CD45, CD31, CD46 또는 CD7을 포함할 수 있는 분화 세포의 표면 마커를 사용하여 비-재프로그래밍된 세포를 초기에 고갈시킨 다음, 만능 마커, 예를 들면, SSEA4, Tra181 및 CD30로 농축한다.

[0228] 만능 마커에 대해 양성인 세포를 수득하기 위한 분류 후, 목적하는 세포 분획은 만능 세포로 농축된 세포 모집단이다. 만능 세포로 농축된 모집단은 세포 배양 시스템, 예를 들면, 통상의 hESC 배지 또는 본 발명의 세포 배양 배지에 위치시킬 수 있다. 세포 배양 시스템은 영양세포 세포로 보충될 수 있거나, 임의로 영양세포 비함유 환경일 수 있다. 일부 양태에서, 만능 마커를 발현시키는 분류된 세포를 영양세포 세포 보충된 배양 시스템에 위치시킨 다음, 영양세포 비함유 환경으로 옮긴다. 세포 배양 시스템은 표 1에 제시된 하나 이상의 특정 경로 조절제 및 첨가제로 보충될 수 있다. 하나의 양태에서, 세포 배양 배지는 영양세포 비함유 환경이고, 하나 이상의 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함하고; 특별한 양태에서, 세포 배양 배지는 TGFβ 억제제, GSK3 억제제, MEK 억제제, 및 Rock 억제제를 포함하고; 특정한 양태에서, TGFβ 억제제는 SB431542이고, GSK3 억제제는 CHIR99021이고, MEK 억제제는 PD0325901이고, Rock 억제제는 티아조비빈이다. 본 발명의 기타 특별한 양태에서, 세포 배양 시스템은 표 1에 제시된 Matrigel™ 피복된 조직 플레이트, 통상의 hESC 배지 및 특정의 경로 조절제를 포함하는 영양세포 비함유 환경이다. 하나의 양태에서, 세포 배양 시스템은, 임의로 표 2에 제시된 임의의 대체 배지 및 경로 조절제와 배합된, 표 1에 기술된 SMC4 배지를 포함한다.

[0229] 농축 세포 모집단은 본원에서 기술된 세포 배양 시스템에서 배양하여 통상적으로 분류 후 약 3 내지 약 25일, 분류 후 약 5 내지 9일 또는 분류 후 약 5 내지 7일에 나타나는 iPSC 콜로니를 수득할 수 있다. iPSC 콜로니는 클론 신장을 위해 채집되거나 분류될 수 있다. 본 발명의 농축 전략을 사용하여, 세포 모집단을 만능 세포로 3배 농축시킨다.

[0230] 본 발명은 또한 바람직하지 않은 세포의 세포 모집단의 고갈 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 세포 모집단, 예를 들면, 재프로그래밍을 경험한 세포 모집단 또는 만능 세포 모집단은 분화 세포의 고갈이다. 본 발명의 방법에서, 만능 세포 또는 재프로그래밍을 유도한 세포 모집단은 분화 세포의 세포 표면 마커를 갖는 세포의 고갈일 수 있다. 세포 모집단은 분화 세포의 표면 마커, 예를 들면, CD13, CD26, CD34, CD45, CD31, CD46, 또는 CD7에 기반하여 분류될 수 있고, 분화 세포의 마커를 발현시키는 세포는 만능 세포로 농축된 세포 모집단을 수득하기 위한 세포 모집단으로부터 분리할 수 있다. CD13은 본 발명의 특별한 양태에서 분화 세포의 표면 마커로서 사용된다.

[0231] 기타 양태에서, 분화를 야기하는 세포 모집단, 예를 들면, 목적하는 계통으로 분화되도록 야기된 세포 모집단은 분화성 세포 또는 분화 세포 모집단을 수득하기 위한 만능 세포의 고갈이다. 일부 양태에서, 분화 세포 모집단

은 특정 계통으로 분화되도록 야기된 세포 모집단, 예를 들면, ESCs 또는 iPSCs를 포함한다. 세포 모집단은 상기한 분류 기술을 사용하여, 예를 들면, 만능 마커에 기초하는 자기 비드 또는 FACs에 따르는 모집단에서 세포를 분류하는 만능 세포의 고갈일 수 있다. 일부 양태에서, 분화 세포를 포함하는 세포 모집단은 만능 마커를 사용하는 FACs로 분류되고, 만능 마커를 발현시키는 세포의 고갈인 분획이 수득된다. 기타 양태에서, 세포 모집단은 분화 마커, 예를 들면, CD13, CD26, CD34, CD45, CD31, CD46 또는 CD7과 같은 계통 특이적 마커에 기반하여 FACs로 분류하여 만능 마커의 고갈 분획을 수득한다. CD13은 본 발명의 특별한 양태에서 분화 세포의 표면 마커로서 사용된다.

[0232] 본 발명의 실행은 구체적으로 반대로 기술되지 않는 한, 당해 기술분야에 속하는 화학, 생화학, 유기 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술, 유전학, 면역학, 세포 생물학, 줄기세포 프로토콜, 세포 배양 및 이식 유전 생물학의 통상적인 방법을 사용하고, 이중 다수는 예시 목적으로 이하 기술된다. 이러한 기술은 다음 문헌에 충분히 설명된다[참조: Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press, New York, 1991); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, Ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Fire et al., RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development (Cambridge University Press, Cambridge, 2005); Schepers, RNA Interference in Practice (Wiley-VCH, 2005); Engelke, RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts ofsiRNA Technology (DNA Press, 2003); Gott, RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology; Human Press, Totowa, NJ, 2004); Sohail, Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application (CRC, 2004); Clarke and Sanseau, microRNA: Biology, Function & Expression (Nuts & Bolts series; DNA Press, 2006); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir andCC Blackwell, eds., 1986); Riott, Essential Immunology, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2002); Embryonic Stem Cell Protocols: Volume I: Isolation and Characterization (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006); Embryonic Stem Cell Protocols: Volume II: Differentiation Models (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006); Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kursad Turksen Ed., 2006); Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, and Bruce A. Bunnell Eds., 2008); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine) (Christopher A. Klug, and Craig T. Jordan Eds., 2001); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kevin D. Bunting Ed., 2008) Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Leslie P. Weiner Ed., 2008); Hogan et al., Methods of Manipulating the Mouse Embyro (2nd Edition, 1994); Nagy et al, Methods of Manipulating the Mouse Embryo (3rd Edition, 2002), and The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), 4th Ed., (Univ. of Oregon Press, Eugene, Oreg., 2000)].

[0233] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 단수 형태 "a," "an" 및 "the"는 내용이 명백하게 다르게 기술하지 않는 한, 복수 기준을 포함한다.

[0234] 본 명세서 전반에 걸쳐, 내용이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다", "포함한다" 및 "포함하는"은 기술된

단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 포함하지만, 임의의 기타 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 배제하지 않음을 함축하는 것으로 이해된다. "~로 이루어진"은 포함하는 것을 의미하고, 구 "~로 이루어진"에 무엇이 따르는지에 제한된다. 따라서, 구 "~로 이루어진"은 나열된 요소가 필요하거나 강제되고, 어떤 기타 요소가 존재할 수 없음을 기술한다. "본질적으로 ~로 이루어진"이란 구 다음에 나열된 임의의 요소를 포함함을 의미하고, 나열된 요소에 대해 명세서에서 구체화된 활성 또는 작용을 방해하지 않거나 관여하지 않는 기타 요소에 제한된다. 따라서, 구 "본질적으로 ~로 이루어진"은 나열된 요소가 필요하거나 강제되고, 기타 요소가 임의적이고 이들이 나열된 요소의 활성 또는 작용에 영향을 미치는지 미치지 않는지에 따라 존재하거나 존재하지 않을 수 있음을 기술한다.

[0235] 상기한 각종 양태를 배합하여 추가의 양태를 제공할 수 있다. 본 명세서에서 언급되고/되거나 출원 데이터 시트에 나열된 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비특허 공보 모두는 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다. 양태의 국면은, 필요에 따라, 추가의 양태를 아직 제공하지 않은 각종 특허, 출원 및 공보의 개념을 사용하기 위해 변형시킬 수 있다.

[0236] 이러한 변화 및 기타 변화가 상기 상세한 설명에 비추어 양태에 수행될 수 없다. 일반적으로, 이하 특허청구범위에서, 사용된 용어들은 특허청구범위를 명세서 및 특허청구범위에 기술된 특정한 양태에 제한되는 것으로 해석되어서는 안되고, 이러한 특허청구범위가 자격을 부여하는 등가물의 전체 범위와 함께 모든 가능한 양태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 특허청구범위는 명세서에 의해 제한되지 않는다.

[0238] **실시예**

[0239] **실시예 1**

[0240] **실험 방법**

[0241] **A. 만능 줄기세포의 세포 배양**

[0242] 영양세포(feeder)-비함유 적응 전에, 인간 유도 만능 줄기세포(hiPSCs)를 영양세포 세포(미토마이신 C 처리된 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 세포(Millipore)) 상에 유지시키고, 통상의 배지로 배양했다. 이 적용에 사용된 "통상의 배지"는 DMEM/F12(Mediatech), lOng/mL bFGF(Invitrogen), 20% v/v 녹아웃 혈청 대체물(Invitrogen), 1% v/v 비필수 아미노산(Mediatech), 2mM L-글루타민(Mediatech) 및 100μM β-머캅토에탄올(Invitrogen)을 함유하는 기초 인간 배아 줄기세포(hESC) 배지를 의미한다. 통상의 배지는 또한 표 1의 제1 단락에 기술된다. hiPSC는, 콜로니를 미세한 끝 유리 피펫을 사용하여 작은 단편으로 기계적 절단 및 스크랩하여 5 내지 7일마다 계대하고(집단 계대), 수집하고, 매일 hESC 배지를 첨가하여 새롭게 씨딩된 미토마이신 C 처리된 MEF 세포 상에서 1:3 내지 1:6 희석 계대시켰다. 세포 배양물을 37℃ 및 5% CO_2.로 설정된 가습화된 배양기에서 유지시켰다.

모집단(clump) 계대를 사용하여 영양세포 세포로 통상의 배지 중의 세포를 배양하는 것은 본원에서 "통상의 배양"으로서 언급된다.

[0243] 단세포 분리를 위해, hiPSC를 포스페이트 완충 식염수(PBS)(Mediatech)로 1회 세척하고, 37℃에서 아큐타제(Accutase)(Millipore) 또는 TrypL(Invitrogen)으로 3 내지 5분 동안 처리한 후, 피펫팅하여 단세포로 파괴했다. 이어서, 단세포 현탁액을 상기한 바와 같은 통상의 배지와 동일 용적으로 혼합하고, 300g에서 5분 동안 회전 강하시키고, SMC4 배지 또는 SMC4 + 피브로넥틴 배지에 재현탁시켰다. 대부분의 경우, 단세포 분리된 세포를 0.4μM PD0325901, 1μM CHIR99021, 5μM 티아조비빈 및 2μM SB431542(모두 Biovision)를 포함하는 소분자 및 첨가제로 보충된 통상의 hESC 배지로 구성된 SMC4 배지에 유지시켰다. 소분자를 배지에 첨가하기 전에 -20℃에서 DMSO 중에서 5 내지 25μM의 스톡 농도로 유지시켰다. 모든 작동 배지는 4주 이하 동안 4℃로 유지시켰다. ROCK 억제제 중에서, 티아조비빈을 갖는 배양물이 미분화 상태로 세포를 유지시키기 위해 Y27632에 비해 바람직하다.

[0244] 적합한 배지에 재현탁 후, 세포를 37℃에서 1 내지 2시간 동안 Matrigel™(1:25 희석; BD Biosciences)으로 이미 피복된 영양세포 비함유 조직 배양 플레이트(BD Falcon)로 옮겼다. 이 포맷에서, 세포는 통상적으로 격일로 신선한 배지를 수용하고, 컨플루엔시(confluency)가 66 내지 75%에 달할 때 계대시키고, 이는 통상적으로 계대 후 4 내지 5일에 발생한다. 각 계대로, 세포는 단세포로 재분리되고, 1:5 내지 1:10의 묽은 계대에서 Matrigel™(BD Biosciences)로 피복된 새로운 조직 플레이트로 옮겼다. 규정된 성장 인자 부재 배양물을 위해, 세포 현탁액을 1% 젤라틴(Mediatech)으로 이미 피복된 조직 배양 플레이트에 첨가했다. 세포를 SMC4 배지가 실질적으로 모든 사이토킨 및 bFGF를 포함하는 성장 인자를 실질적으로 함유하지 않는 것 이외에는, 상기한 바와 같이 유지

시키고 계대시킨다.

[0245] 동결 목적으로, 세포를 단세포로 분리시키고, 10% v/v DMSO(Mediatech)로 보충된 SMC4 + 피브로넥틴에 재현탁시키고, 냉동관(Nalgene)에 위치시켰다. 일단 뚜껑이 덮히면, 냉동관을 미스터 프로스티(Mr. Frosty)(Nalgene) 안에 위치시키고, -80℃에서 밤새 유지시켰다. 다음날 냉동관을 장기간 저장을 위해 액체 질소로 옮겼다. 해동시키기 위해, 동결된 냉동관을 37℃ 수욕에서 대부분의 얼음이 녹을 때까지 약 1 내지 2분 동안 위치시켰다. 이어서, 해동된 셀 용액을 신선한 통상의 hESC 배지와 완만하게 혼합하고, 300g에서 5분 동안 회전 강하시켰다. 세포 용액을 SMC4 + 피브로넥틴 배지에 재현탁시키고, Matrigel™(BD Biosciences) 피복된 조직 배양 플레이트 위에 옮겼다. 모든 기타 세포 배양물 인큐베이션으로와 같이, 세포를 37℃ 및 5% CO_2에서 설정된 가습화된 배양기에서 유지시켰다.

[0247] **B. 재프로그래밍의 유도**

[0248] 재프로그래밍 공정을 개시하기 위해, 재프로그래밍 인자(인간 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28, 및 Nanog의 가변적 조합)의 이소적 발현은 렌티바이러스의 형질도입 또는 기타 방법, 예를 들면, 단백질 단독 처리를 사용하여 달성했다. 대부분의 경우, 출발 세포를 젤라틴(Mediatech) 피복 표면 위에서 10% 컨플루엔시(즉, 6개 웰 플레이트의 웰당 1×10^5 세포)에서 플레이팅했다. 바이러스 감염 방법을 위해, 새롭게 수집된 렌티바이러스를 1:2의 희석액으로 첨가하고, 4㎍/mL 폴리브렌(Millipore)으로 보충하고, 650g에서 32℃에서 1.5시간 동안 회전 감염시켰다. 배양물을 37℃ 및 5% CO_2로 추가의 7시간 동안 옮겼다. 배양 완료 후, 세포를 PBS로 3회 세척하고, 신선한 배지를 공급했다. 영양세포 비함유 배양 시스템 중의 IMR90 섬유아세포와 같은 세포의 감염 곤란성으로, 이 공정은 초기 감염 48시간 후 한번 더 반복했다. 재프로그래밍을 유도하는 비유전적 방법, 예를 들면, 세포에 직접 단백질 적용의 사용을 위해, 재프로그래밍 인자를 구성하는 단백질 혼합물 또는 칵테일을 8㎍/mL에서 세포 용액에 첨가하고, 배지 교환 전에 24시간 동안 유지시켰다. 이 단계를 추가의 2 내지 4회 반복했다. 모든 출발 세포를 최초 단백질 첨가 후 4일까지 이들 자체의 각각의 체세포 배지에서 인큐베이션시키고, 이 시점에 배지를 한 파트의 체세포 배지와 한 파트의 통상의 hESC 배지로 교환했다. 컨플루엔시에 이른 경우(일반적으로 4 내지 6일 사이), 세포를 트립신화하고, 동일 파트의 배양 배지와 혼합하고, 300g에서 5분 동안 회전 강하시키고, 1:1 체세포/통상의 hESC 배지에 재현탁시키고, 거대한 배양 플레이트 속에서 1:4 내지 1:6 증식시켰다. 예를 들면, 6개 웰 플레이트 중에서 두 웰 중의 세포를 일반적으로 10cm 접시 상에서 증식시킨다. 증식 다음날, 배지를 완전히 통상의 hESC 배지로 교환했다. 증식된 세포가 컨플루엔시에 도달하면(일반적으로, 8 내지 12일 사이), 이들을 농축을 위해 처리한다[참조: 독특한 모집단 농축]. 모든 경우에, 배지를 통상적으로 격일로 교체했다.

[0250] **C. 독특한 모집단 농축**

[0251] 출발 세포를 개별적인 렌티바이러스 작제물 또는 Oct4 및/또는 Klf4 및/또a똔또 Sox2, 및/또는 Myc를 함유하는 폴리시스트론성 벡터를 포함하는 각종 전략으로 재프로그래밍을 유도하고, 약 8 내지 12일 동안 배양한 후(상기 참조), 세포를 단세포로 분리하고[참조: 만능 줄기세포의 세포 배양], 각종 만능 표면 마커, 체세포 마커 및/또는 불완전 재프로그래밍 마커로 염색시켰다. 간단하게, 분리된 세포를 행크 균형 염 용액(Invitrogen), 4% 태아 소 혈청(Invitrogen) 및 lOmM Hepes(Invitrogen)를 함유하는 염색 용액에 재현탁시키고, 얼음 위에서 유지시켰다. 권장된 제조업자의 희석에 따라, 접합된 1차 항체를 세포 용액에 첨가하고, 용액을 15분 동안 얼을 위에서 배양했다. 세포 용액을 세척하고, 염색 완충액에 재현탁시키고, 얼음 위에서 유지시켰다. 이 시점에, 형광 활성화 세포 분류(BD Biosciences, 이하 참조) 및 자기 세포 분류(Miltenyi Biotec, 이하 참조)를 포함하는 각종 농축/고갈 전략을 취했다.

[0252] 유동 혈구 계산 분류를 FACS 아리아(BD, Biosciences) 상에서 수행했다. 사용된 1차 항체는 구체화된 바와 같이 SSEA4(BD Biosciences), Tra-181(Biosciences), Tra-161(BD Biosciences), CD30(BD Biosciences), 및 CD50(BD Biosciences)을 포함한다. 이어서, 분류된 세포를 회전 강하시키고, SMC4 + 피브로넥틴 배지에 재현탁시키고, Matrigel™ 피복된 조직 배양 플레이트로 옮겼다. 마이크로웰, 즉 96 웰 플레이트 속에서 분류될 경우, 플레이트를 300g에서 2분 동안 회전 강하시켰다. SMC4 + 피브로넥틴 배지를 3 내지 4일 동안 격일로 교환했다. 3 내지 4일 후, SMC4 + 피브로넥틴 배지를 통상적으로 배양물에서 잔류 시간 동안 SMC4 배지로 교환했다. 콜로니 형성은 통상적으로 분류 후 7 내지 9일에 나타났다. 유동 혈구 계산 분석을 구아바 이지사이트 8HT(Millipore) 상에서 수행했다.

[0253] MACS 마이크로비드(Miltenyi Biotec) 분리를 프로토콜에 따라 수행했다. 간략하게, 세포를 단세포로 분리하고[참조: 만능 줄기세포의 세포 배양], 구체화된 바와 같이, SSEA4(BD Biosciences), Tra-1-81(BD Biosciences),

Tra-160(BD Biosciences), CD30(BD Biosciences), 및 CD50(BD Biosciences)을 포함하는 적합한 FITC-접합 1차 항체로 염색시켰다. 이어서, 세포를 항-FITC 마이크로비드(Miltenyi Biotec)를 사용하여 자기적으로 표지화했다. 이어서, 표지된 세포 현탁액을 LS MACS 컬럼(Miltenyi Biotec) 상에 적하했다. 양성적으로 또는 음성적으로 선택된 분획으로부터 수집된 세포를 300g에서 5분 동안 회전 강하시키고, SMC4 + 피브로넥틴에 재현탁시키고, Matrigel™(BD Biosciences) 피복된 조직 배양 플레이트로 옮겼다. 다음날, 신선한 배지를 배양물에 첨가한 후, 격일로 교체했다. 3 내지 4일 후, SMC4 + 피브로넥틴 배지를 배양물에서 잔류하는 시간 동안 SMC4 배지로 교체했다. 콜로니는 통상적으로 분류 후 5 내지 7일째에 나타났다.

[0255] **D. 알칼리성 포스파타제 염색**

[0256] 세포를 4% v/v 파라포름알데히드(Alfa Aesar)에서 30초 동안 고정시키고, PBS로 3회 세척하고, 알칼리성 포스파타제 염색 키트(Sigma-Aldrich)로 염색했다. 간단하게, 1mL의 아질산나트륨 용액을 1mL FRV-알칼리성 용액에 첨가하고, 혼합하고 25℃에서 2분 동안 배양했다. 이어서, 용액을 45mL의 H_2O와 혼합한 다음 1mL 나프톨 AS-BI 알칼리성 용액을 첨가했다. 알칼리성-염료 혼합물을 고정된 세포에 첨가하고, 25℃에서 15분 동안 배양한 후, PBS 세척했다. 이어서, 세포를 알칼리성 포스파타제의 존재에 대해 평가했다.

[0258] **E. 면역형광 염색**

[0259] 세포를 4% v/v 파라포름알데히드(Alfa Aesar)를 사용하여 15분 동안 고정시키고, 0.2% v/v Tween을 함유하는 PBS(PBST)(Fisher Scientific)로 3회 세척하고, PBS 중의 0.15% v/v 트리톤X-100(Sigma-Aldrich)을 사용하여 25℃에서 1시간 동안 침투성화했다. 침투성화 후, 세포를 25℃에서 30분 동안 PBST(PBSTB)(Fisher Scientific) 중의 1% v/v BSA(Invitrogen)로 차단시켰다. PBSTB를 완만하게 제거 후, 세포를 PBSTB 중의 1차 항체로 4℃에서 밤새 배양했다. 이 연구에서 사용된 1차 항체는 Nanog(Abeam), Tra-1-60(BD Biosciences), Tra-181(BD Biosciences), SSEA4(BD Biosciences), β-III 투불린(R&D Systems), a-평활근 액틴(Sigma) 및 Sox17(R&D Systems)을 포함한다. 밤새 배양 후, 세포를 PBST로 3회 세척하고, PBSTB로 1:200 희석된 2차 항체(Alexa 488 또는 555; Invitrogen)로 25℃에서 1시간 동안 염색했다. 세포를 PBST로 3회 세척하고, 훽스트(Hoechst) 염료(Invitrogen)로 염색했다. 염색된 세포의 이미지를 형광 현미경 검사법 및 CCD 카메라를 사용하여 포획했다

[0261] **F. 분화 및 기형종 형성의 유도**

[0262] 영양세포 비함유 iPSC는 두 단층 및 배아체로서 분화되었다. 단층 분화를 위해, 세포가 일반적으로 이들의 분화 시 이들의 증식을 감소시키기 때문에, iPSC를 분화 배지를 교체하기 전에 컨플루엔시에 도달하도록 했다. 간략하게, 컨플루엔시에 도달시에, SMC4 배지를 DMEM/F12(Mediatech), 20% 소 태아 혈청(Invitrogen), 1% 비-필수 아미노산(Mediatech), 2mM L-글루타민(Mediatech) 및 100μM β-머캅토에탄올을 함유하는 분화 배지로 교체했다. 배지가 교체되면, iPSC를 14일 동안 분화시켰다. 배지를 2 내지 3일 마다 교체했다. 배아체("EB") 형성 및 분화를 위해, hiPSC를 아큐타제(Millipore)로 단세포 분리하고, 분화 배지에 최종 농도 75,000 세포/mL로 재현탁시키고, 5uM 티아조비반을 첨가했다. 세포를 V-기저 96-웰 비조직 배양 플레이트(Nunc)에서 100μM/웰로 접종하고, 950g에서 5분 동안 원심분리했다. 다음 날, 치밀한 "볼형 모집단"을 약 30 내지 40EBs/웰에서 P1000을 사용하여 초저 결합 6-웰 플레이트(Corning)에 옮겼다. 7일 후, 전이 EBs 1:1에서 Matrigel 피복된 6-웰 플레이트로 옮겼다. 배양물에서 3주 후, 세포를 고정시키고 염색했다.

[0263] 기형종 이식 및 분석은 적용된 줄기세포(Menlo Park, CA)로 수행했다. 간략하게, 1 내지 2백만 단세포 분리된 hiPSC를 100uL SMC4 배지 보충된 배지 및 100uL Matrigel에서 혼합하고, 베이지색 SCID 마우스의 신피막 및 고환에 도입했다. 발달된 기형종을 채취하고, 구획화하고, 각종 분화된 세포 형태 및 구조에 대해 분석했다.

[0265] **G. RT-qPCR 및 qPCR 분석**

[0266] RNA를 피코퓨어(PicoPure) RNA 분리 키트(MDS Analytical Technologies)를 사용하여 분리하고, 0.5㎍ RNA를 사용하여 iScript cDNA 합성 키트(Bio-Rad)를 사용하는 제1 본쇄 cDNA를 생성했다. 상대적인 유전자 발현 수준은 표 3에 이하 나열된 TaqMan Fast Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems) 및 FAM-표지된 TaqMan 프로브를 사용하여 측정했다.

[0268] **표 3. ABI 프라이머 및 프로브**

ABI 프라이머 및 프로브	
심볼	**분석 ID**
내인성 SOX2	Hs00602736_s1
내인성 LIN28	Hs00702808_s1
내인성 MYC	Hs00905030_m1
ZFP42 (REX1)	Hs00399279_m1
DPPA2	Hs00414521_g1
DPPA4	Hs00216968_m1
DNMT3B	Hs01003405_m1
GAPDH	Hs99999905_m1

[0269]

주문제작한 프라이머 및 프로브			
유전자	**순방향 프라이머**	**역방향 프라이머**	**프로브**
Transgenic Oct4	CTGGTTGGAGGGAAGGTAATCTAG (서열번호 1)	TTTTGTAATCCAGAGGTTGATTGTTC (서열번호 2)	CCCCGACGCGTCT (서열번호 3)
형질전환 Klf4	GCCTTACACATGAAGAGGCATTT (서열번호 4)	TTTTGTAATCCAGAGGTTGATTGTTC (서열번호 2)	CCCCGACGCGTCT (서열번호 3)
형질전환 Myc	TCTTGTGCGTAACTCGAGTCTAGAG (서열번호 5)	TTTTGTAATCCAGAGGTTGATTGTTC (서열번호 2)	CCCCGACGCGTCT (서열번호 3)
형질전환 Lin28	CCGGAGGCACAGAATTGAC (서열번호 6)	TTTTGTAATCCAGAGGTTGATTGTTC (서열번호 2)	CCCCGACGCGTCT (서열번호 3)
형질전환 Sox2	CACTGCCCCTCTCACACATG (서열번호 7)	TTTTGTAATCCAGAGGTTGATTGTTC (서열번호 2)	CCCCGACGCGTCT (서열번호 3)
형질전환 Nanog	CATGCAACCTGAAGACGTGTAA (서열번호 8)	TTTTGTAATCCAGAGGTTGATTGTTC (서열번호 2)	CCCCGACGCGTCT (서열번호 3)
내인성 Oct4	GGGTTTTTGGGATTAAGTTCTTCA (서열번호 9)	GCCCCCACCCTTTGTGTT (서열번호 10)	TCACTAAGGAAGGAATTG (서열번호 11)
내인성 Klf4	AGCCTAAATGATGGTGCTTGGT (서열번호 12)	TTGAAAACTTTGGCTTCCTTGTT (서열번호 13)	AGTCTTGGTTCTAAAGGTACC (서열번호 14)
내인성 Nanog	TGATGCCCATCCAGTCAATCT (서열번호 15)	CCTCGCTGATTAGGCTCCAA (서열번호 16)	ATGGAGGGTGGAGTATG (서열번호 17)

[0270]

[0272] **H. 유전자 발현 분석**

[0273] 총 RNA를 피코 퓨어 RNA 분리 키트 5(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 세포로부터 분리했다. 간략하게, 비오티닐화 aRNA는 임의의 제2 라운드 증폭을 사용하는 MessageAmp II aRNA 증폭 키트(Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX)를 위한 표준 프로토콜을 사용하여 제조한 다음, 표준 프로토콜을 사용하는 MessageAmp II 비오틴 증강 키트(Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX)를 사용하여 비오틴 표지된 aRNA로 전사했다. 비오틴 표지된 aRNA를 정제하고, 아피메트릭스(Affymetrix) 권장 사항에 따라서 단편화했다. 20㎍의 단편화된 aRNA를 사용하여 인간 게놈 U133 플러스 2.0 칩(Affymetrix Inc. Santa Clara, CA)에 45℃에서 16시간 동안 교배시켰다. 어레이를 세척하고, 아피메트릭스 유체공학 스테이션 450에서 염색하고, 아피메트릭스 유전자칩 스캐너 3000 7G를 사용하여 스캐닝했다. 이미지 데이터를 디폴트 분석 셋팅을 사용하는 아피메트릭스 발

현 콘솔 소프트웨어를 사용하여 분석했다. 어레이를 로그 스케일 강력한 다중-어레이 분석(RMA)으로 표준화하고, 게노믹스 3.1용 스팟파이어(Spotfire)로 가시화했다(Tibco Spotfire, Palo Alto, CA).

[0275] **I. 핵형 분석 및 복사 번호 변화 분석**

[0276] 세포 유전학 분석을 위스콘신주 매드슨(Madison, WI)에 소재하는 셀 라인 제네틱스(Cell Line Genetics)에 의해 20개의 G-밴드화 중기 세포에 대해 수행했다.

[0277] 고해상도 비교 게놈 하이브리드화(NimbleGen 12x135k) 및 후속적인 복사 번호 변화 분석이 위셀(WiCell)(Madison, WI)에 의해 수행되었다.

[0279] **실시예 2**

[0280] **영양세포 비함유 배양 환경을 가능하게 하는 세포 배양 조건 및 방법 및 만능 줄기세포의 효소 단세포 분리 및 계대**

[0281] 본 실시예는 만능 세포 모집단의 배양 및 분리에 관한 것이다. 이러한 세포 모집단은, 이들로 한정되지 않지만, 배아 줄기세포(ESC), 체세포 핵 전이(SCNT)를 통해 또는 만능 인자의 도입을 통해 유도된 만능 세포-유도된 만능 줄기세포(iPSC)를 포함한다. 만능 줄기세포 배양 조건은 전통적으로 조사 또는 미토마이신-C 처리를 통해 유사분열적으로 불활성이도록 하지만 줄기세포 배양물의 지지에 필요한 성장 인자 및 영양소를 제공하는 영양세포-세포의 사용을 포함한다. 영양세포 세포의 사용 없이 줄기세포 모집단을 배양하는 것은 줄기세포의 균일 모집단이 필요한 연구 및 산업적 적용에 유리할 수 있거나, 규모화 될 경우, 산업적 활성은 줄기세포 생성물에 대해 이종 부재 규정 배양 조건을 필요로 한다. 현재 실시예에서, 특정 세포 신호전달 경로의 다수의 소분자 조절제를 시험하여 개개의 소분자 또는 소분자의 조합("칵테일")을 영양세포 비함유 시스템에서 만능 세포의 배양을 향상시키는데 사용할 수 있는지를 입증했다.

[0282] 만능 세포 모집단이 영양세포를 사용하지 않고, 대신 통상의 hESC 세포 배양 배지(예를 들면, 표 1의 제1 단락에 기술된 통상적/기초 배지 형성) 중의 Matrigel™ 과 같은 보다 규정된 세포외 매트릭스를 사용하여 배양되는 경우, 세포 생존능 및 만능성은 지지되지 않았다(도 1). 그러나, Rock 키나제의 소분자 억제제를 사용하면 이러한 조건하에서 세포 생존능을 향상시킨다. 또한, MAP 키나제의 소분자 억제제를 사용하면, 세포 생존능에서 변화가 주목될 수 있지만, TGFβ 및 Wnt/β-카테닌 경로는 영양세포의 부재하에 세포의 만능 특성을 유지시킨다. MEK, TGFβ 및 GSK3 억제제와 병용된 Rock 키나제 억제제의 조합은 영양세포 비함유 환경에서 배양될 경우, 만능 줄기세포의 생존능 및 만능성 둘 다를 유지시킨다.

[0283] ESC 또는 iPSCs와 같은 만능 세포는 통상적으로 모집단으로서 성장한다. 전통적으로, 이러한 세포는 당해 기술분야의 숙련된 연구원에 의해 인지된 형태로 콜로니를 수동으로 선택함으로써 신장되고 계대된다. 이러한 과정은 이 문서의 실시예 1에 기술된다(집단 계대로서 기술된다). 이어서, 선택된 콜로니를 기계적으로 분쇄하고, 분리된 세포를 재플레이팅한다. 만능 세포 모집단의 신속한 신장은 효소 단세포 계대의 사용으로부터 이로울 수 있다. 효소, 예를 들면, 트립신 및 아큐타제는 통상적으로 계대 동안 세포의 단세포 분리를 위해 사용된다.

[0284] 특별한 증거에서, iPSC 세포는 도 3b에서 7AAD 혼합에 의해 알 수 있는 바와 같이, 영양세포 비함유 환경에서 효소 계대시키고 단세포로서 씨딩할 경우, 생존능의 상당한 강하를 나타냈다. 표 1에 나열된 것들과 같은 배지 조성물을 포함하는 본 발명의 배양 플랫폼을 사용하여, 만능 세포 모집단을 영양세포 비함유 배양물에서 배양시키고, 크게 향상된 세포 생존능 및 만능성의 유지와 함께 단세포 계대 동안 효소 분리했다. 보다 구체적으로, 통상적/기초 hESC 배지 배합물 및 세포 신호전달 경로, 예를 들면, MAP 키나제 경로, TGFβ 경로, Wnt/β-카테닌 경로 및 Rho/Rock 경로의 조절제의 조합을 사용함으로써, 만능 줄기세포 생존능 및 만능성은 단세포 분해 및 영양세포 비함유 배양을 필요로 하는 적용 동안 유지되었다.

[0285] 도 2에 도시된 바와 같이, 영양세포-세포 배양물 상에서 모집단 계대를 사용하여 생성된 iPSCs는 효소, 예를 들면, 아큐타제를 사용하여 분리되고 영양세포 비함유 시스템에서, 예를 들면, 표 1에 기술된 바와 같이 SMC4 또는 SMC4 + 피브로넥틴 배지 조성물의 사용과 함께 Matrigel™ 상에서 단세포로서 플레이팅했다. 세포 생존능은 분리된 세포가 사용된 이러한 배지에 기술된 소분자의 조합물을 함유하는 배지에 위치될 경우에만 유지되었다. 통상의 배지의 사용은, 만능 세포가 단세포로 효소 분리되고, 영양세포 비함유 환경에서 플레이팅될 경우 거대한 세포 손실을 유도한다. 세포가 영양세포 비함유 배양물 및 단세포 계대에 익숙해지면, 이들은 SMC4 배지의 사용과 함께 이러한 방식으로 계속 유지시켰다. 영양세포 비함유 단세포 계대 조건에 익숙해진 hiPSC 세포의 완전 특성화는 도 3에 도시된다. 이들 세포의 만능 상태는 다수 계대 후 유지되었고; 만능 마커는 면역형광 및 유전자 발현에 의해 동정되었다. 추가로, 약 99.8%의 세포는 유동 혈구 계산에 의해 측정된 바와 같이 SSEA4 및

Tral-81 양성 염색을 유지시켰다. 이들 세포의 유전자 발현 프로파일은 영양세포 상에서 배양된 인간 ESC와 유사했다. hiPSC 중의 도입 유전자의 침묵은 유지되었고, 핵형은 모두 표준이었고, 영양세포-세포 배양물에서 성장된 동일한 클론과 동일하다. 또한, 이러한 방식으로 계대되고 유지된 hiPSCs는 시험관내 분화 및 기형종 형성 둘 다에 의해 입증된 바와 같이(도 3i 및 3j) 3개의 배 층으로 분화되었다.

[0287] **실시예 3**

[0288] **만능성 및 세포 생존능을 유지하면서 만능 세포의 단세포 분류를 가능하게 하는 방법 및 배양 조건**

[0289] 실시예 2에 기술된 바와 같이, ESCs 또는 iPSCs의 줄기세포 배양물을 통상적으로 영양세포 세포 상에서 배양하고, 세포 콜로니를 수동적 선택하여 계대한 다음, 이를 재플레이팅 이전에 기계적으로 분리한다. 숙련된 연구원들은 콜로니 형태에 기초하는 만능 비분화 특성을 갖는 줄기세포 콜로니를 인지할 수 있고, 만능 세포를 선택하는 방법으로서 이를 사용할 수 있다. 따라서, 만능 모집단 또는 목적하는 특성을 갖는 모집단을 일부 세포가 덜 바람직하지 않은 특성을 갖는 세포, 예를 들면, 배양물 또는 죽은 세포의 모집단에서 분화 신호를 나타내는 세포의 모집단으로부터 선별하고 수동적으로 농축할 수 있다. 이 방법은 어렵고, 목적하는 세포 모집단을 선택하는 숙련된 연구원에 의존한다. 세포가 목적하는 특성에 기반하여 개별적으로 선택되는 세포 농축 또는 분류 기술의 사용은 따라서 당해 분야에 크게 이로울 수 있다. 현재 이용가능한 기술, 예를 들면, 자기 활성화 세포 분류(MACS) 또는 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 사용하는 상기한 농축 단계는 농축 및 배양물에서의 역 씨딩 전에 단세포 포맷으로 만능 세포 모집단의 효소 계대를 필요로 한다. 또한, 영양세포 지지된 배양물의 사용은 영양세포 비함유 배양 시스템의 사용을 필요로 하는 이러한 기술에 덜 바람직할 것이다.

[0290] 특별한 양태에서, 표 1에 기술된 바와 같은 본 발명의 배지 조성물, 및 실시예 1 및 2에 기술된 방법을 사용하여, 만능 세포 모집단은 단세포 분리되고, 세포 분류 공정, 예를 들면, 자기 활성화 세포 분류(MACS) 또는 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 사용하여 농축되고, 만능성 또는 세포 생존능의 손실 없이 영양세포 비함유 배양물 상에서 씨딩되었다.

[0291] 특별한 예에서, 도 4에 도시된 바와 같이, SMC4 배지(표 1)에서 유지된 단세포 분리된 만능 세포의 모집단을 선택하고, 세포 표면 마커 $SSEA4^{+}/Tra181^{+}$에 대해 양성인 세포에 기초하는 FACS에 의해 분류한다. 이러한 표면 항원은 만능성의 마커로서 통상적으로 사용된다. 이어서, 분류된 이중 양성 모집단을 영양세포 비함유 배양물(Matrigel™ ECM 피복물)로 옮기고, SMC4 배지(표 1)로 역 교환하기 전에 2 내지 4일 동안 SMC4 배지(표 1) 또는 SMC4 + 피브로넥틴 배지에서 성장시켰다. 세포 분열은 분류 24시간 이내에 나타났고, 세포는 분류 5일 후 컨플루엔시 부근에 있었다. 분류된 세포는 추가의 5회 계대 동안 배양된 단세포이고, 미분화 상태의 마커를 표현할 뿐만 아니라 $SSEA4^{+}/Tra181^{+}$ 세포(도 4b 및 4c)를 위한 이중 염색 유동 혈류 계산에 의해 판단된 바와 같이 만능 세포의 실질적으로 순수한 모집단을 나타냈다.

[0292] 배양 동안 만능 줄기세포의 농축 및 분류 예에서, 만능 세포 및 분화 세포 둘 다를 함유하는 배양물은 Tra181에 대해 양성인 세포로 농축했고, 이어서 $Tra181^{+}$ 세포의 계대를 계속하여 만능 줄기세포의 순수한 모집단을 유지시켰다(도 17c).

[0293] 만능 세포의 단세포 분류의 효능을 조사했다. 도 4d에서 알 수 있는 바와 같이, FACS 기구에 의해 측정된 바와 같이, 각종 후-분류 사건의 수를 SMC4 배지 또는 SMC4 + 피브로넥틴 배지를 사용하여 영양세포 비함유 배양 시스템에서 플레이팅하고, 알칼리성 포스파타제 양성 세포의 수를 등급화했다. 알칼리성 포스파타제는 만능 콜로니 형성의 초기 지시제이다. 정량화된 분류 후 씨딩 효율은, 씨딩된 세포수당 알칼리성 양성 콜로니의 수로 제시된 바와 같이, 이 시스템에서 약 8 내지 10%인 것으로 제시되었다(도 4e). 만능 세포 모집단의 유지에서 단세포 분류의 잠재성의 추가의 증명에서, iPSC 배양물은 FACS에 적용된 만능 마커 SSEA4 및 Tra181에 특이적이고, 이들 마커에 기반하여 선택된 형광 접합된 항체로 표지된 분리된 단세포였다. 선택된 $SSEA4^{+}/Tra181^{+}$ 세포를 96-웰 플레이트에서 FACS 기구로부터 직접 이벤트/웰 1 내지 9에서 플레이팅했다. 웰 당 겨우 1건의 이벤트가 클론 알칼리성 포스파타제-양성 콜로니를 생성했다(도 4f 및 4g). 따라서, 이러한 단세포 분류 시스템을 특정 세포 표면 마커와 관련된 바람직한 특성에 기초하는 만능 세포의 클론 선택을 위해 사용했다.

[0295] **실시예 4**

[0296] **영양세포 비함유 배양 시스템 중에서 만능 상태에 대해 세포의 효율적인 재프로그래밍을 가능하게 하는 방법 및 조건**

[0297] 산업상 및/또는 임상적 적용을 위한 iPSCs의 사용은 완전 규정된 배양 조건, 구체적으로 이종 비함유 조건에서 세포의 생성, 선택 및 유지를 필요로 한다. 따라서, 영양세포 비함유 배양 조건에서 세포상 재프로그래밍이 매우 바람직하다. 그러나, 섬유아세포 및 케라티노사이트는 피부 생검 또는 모낭을 통한 접근에 기인하여 재프로그래밍에 가장 통상적으로 사용된 세포이지만, 이러한 세포 형태의 재프로그래밍의 효율은 매우 낮고, 영양세포 비함유 배양물에서 이러한 세포를 재프로그래밍하는 효율적인 방법은 아직 입증되지 않았다.

[0298] 실시예 2에 기술된 바와 같이, 세포 신호전달 경로- 구체적으로, MAP 키나제 경로, TGFβ 경로, Wnt/β-카테닌 경로 및 Rho/Rock 경로의 억제제의 존재하에 통상의 hESC 줄기세포의 사용은 영양세포-세포의 부재하에 만능 배양물의 성장 및 유지 및 효소 단세포 계대를 사용하는 이러한 배양물의 신장을 가능하게 한다. 당해 실시예에서, iPSC 세포가 영양세포-세포가 결여된 배양 시스템에서 생성되었다. 구체적으로, 인간 섬유아세포를 만능성 인자 Oct4, KLF4, Sox2, 및 C-myc를 발현시키는 바이러스로 감염시켰다. 재프로그래밍 프로토콜은 실시예 1에 기술된 바와 같이 영양세포 세포보다 Matrigel™™ 상에서 플레이팅된 세포로 수행했다.

[0299] 통상의 hESC 줄기세포 배지 또는 SMC4 배지(표 1)에 나열된 특정 경로 조절제로 보충된 통상의 hESC 배지를 사용하는 영양세포 비함유 세포상 재프로그래밍로 비교했다. 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 개별적인 렌티바이러스 발현 Oct4, Klf4, Sox2, 및 Myc를 사용하는 재프로그래밍의 유도 20일 후, 많은 iPSC-유사 콜로니가 SMC4 배지로 보충된 영양세포 비함유 배양물에서 제시된 반면, 통상의 hESC 배지 단독에서 유지된 배양물에서는 소수의 또는 어떤 콜로니도 제시되지 않았다. SMC4 배지에서 생성된 콜로니의 후속적인 특성화는 이들 중 다수가 진정한 iPSC 콜로니라는 것을 나타냈다. 세포는 면역형광, 유동 혈구 계산 및 유전자 발현 프로파일(도 13c내지 e)을 사용하여 만능 마커 Oct4, Nanog, Sox2, KLF4, SSEA4 및 TRA 1-81의 발현에 의해 만능성인 것으로 측정되었다. 추가로, 세포는 분화 배지에서 배양될 경우, 모든 세 배 층으로 효과적으로 분화시키는 것으로 나타났다. 따라서, 영양세포 비함유 배양 시스템에서 iPSCs의 효율적 발생은 본 발명에 의해 입증되었다. 기타 재프로그래밍 방법과 비교하여 이 접근법의 효율은 실시예 8 및 표 4에 기술된다.

[0301] **실시예 5**

[0302] **순수한 상태의 만능 세포의 생성 및 유지에 사용된 세포 배양 조성물**

[0303] 최근의 연구는 후성 재프로그래밍을 통해, 말기 분화 세포는 원종형 상태[참조: Xie, H., Ye, M., Feng, R., and Graf, T. 2004], 상이한 분화 세포 상태[참조: Szabo, Bhatia 2010] 또는 심지어 배아형 상태[참조: Takahashi et al., 2006], 예를 들면, iPSCs에 역으로 의지하는 능력을 갖는다. iPSCs의 생성이 보다 통상적으로 되지만, 소정의 실험에서 체세포의 단지 아주 작은 퍼센트를 iPSCs로 재프로그래밍한다. 다수의 파라미터가 체세포의 증식 상태, 유전자 활성 또는 억제를 유도하는 추가의 돌연변이 생성, 유전자 전달 및 환경 신호 포맷을 포함하는 이 낮은 효율에 기인하는 것으로 간주된다. iPSCs로서 동정된 모든 세포가 ESCs와 유사하게 작용하는 것은 아니라는 것이 또한 보고되었다. 예를 들면, 유전자 발현 프로파일링은 다수의 iPSCs가 이들의 ESC 상당물에의 발현 프로파일에서 상당한 차이를 나타낸다는 것을 입증했다. 또한, Xist 활성 및 X-염색체 재활성화 분석의 연구는 일부 ESCs가 순수한 상태(즉, 만능성의 접지 상태)로 존재하는 반면, 대부분, 그렇지 않으면 모든 유도된 iPSCs가 준비된 상태(즉, 분화될 준비된)로 존재한다는 것을 보여준다. 배합된 이러한 차이는 감소된 만능성 및 특정 세포 형태를 향한 iPSCs의 분화에서의 저효율에 기인하여 재생 의학에서 iPSCs의 값을 감소시킬 수 있었다.

[0304] 순수한 및 준비된 상태 배후의 메카니즘에 관련된 중요한 세포 경로를 표적화함으로써, 본 발명자들은 통상의 iPSCs를 포함하는 준비된 상태로 존재하는 만능 줄기세포를 순수한 상태로 변형시키는 능력을 입증했다. 표 1에 나열된 배지 조성물을 사용하여 이러한 준비된 만능 세포 및 통상의 iPSCs를 순수한 상태로 추가로 재프로그래밍할 수 있었다. 보다 구체적으로, 체세포를 재프로그래밍하거나 세포 신호전달 경로, 예를 들면, MAP 키나제 경로, TGFβ 경로, 및/또는 Wnt/β-카테닌 경로의 조절제를 함유하는 배지 중에서 iPSCs를 배양함으로써, 생성된 또는 배양된 iPSCs의 유전자 발현 특성은 통상의 iPSCs(통상의 배양 배지에서 생성되고/되거나 배양되고 세포 신호전달 경로의 조절제와 접촉되지 않은 iPSCs)보다 더 ESC-유사해졌다. 계층적 모집단화에서 입증된 바와 같이, 통상의 배지 및 SMC4 배지 유도된 hiPSCs는 모두 서로 유사했고, 이들의 부모 라인 IMR90과 상이했다(도 6b). 그러나, SMC4 배지에서 배양된 iPSCs가 영양세포 세포 상에서 역 플레이팅될 경우, 이들은 통상적으로 배양된 iPSCS보다 마우스 ESCs에 보다 근접하게 닮았고, 순수 상태의 또 다른 증거이다(도 6e). 또한, SMC4 배지에서 배양된 iPSCs는 상당히 감소된 Xist 활성 및 향상된 X-염색체의 유전자의 발현을 가졌다(도 6c 및 6d). 최종적으로, SMC4 배지에서 배양된 iPSCs는 모두 3개의 배 층으로 분화될 뿐만 아니라 순수한 상태로 존재하는 세포에 대해 유일하게 관찰된 능력인 배외 세포와 관련된 유전자를 재활성화하는 능력을 입증했다(도 3h).

따라서, 준비된 상태로 존재하는 iPSCs를 포함하는 만능 줄기세포를 SMC4 배지에서 배양하면 순수한 상태를 촉진시키고, 분화 효능을 향상시킨다.

[0305] SMC4 보충된 배지 및 세포 분류 플랫폼(도 7)을 사용하여 생성된 hiPSC 클론의 만능 상태를 측정하기 위해, hiPSCs는 동일한 출발 섬유아세포 주 및 3-인자 폴리시스트론성 벡터 발현 Oct4, Klf4 및 Myc로부터 유도되었지만, 모집단 계대 및 영양세포 세포(FTi99)를 포함하는 통상의 배양물 하에 유지시켰다. 각종 클론 뿐만 아니라 hESCs로부터 mRNA의 아피메트릭스 세계적 유전자 발현 분석을 수행했다(도 7b). 모든 만능 주는 대조군 섬유아세포 주와 상이한 프로파일(FTC1, Pearson score 0.886) 및 본질적으로 서로 유사한 발현 프로파일(Pearson score 0.969)을 갖는 것으로 나타났다. 열 지도 서명(heat map signature)을 생성하여 hESCs/FTi99(영양세포 세포 및 통상의 배지 상에서 생성되고 유지시킨 hESCs 또는 hiPSCs) 및 FTi91/FTi93(영양세포 비함유 및 SMC4 배지 상에서 생성되고 유지시킨 hiPSCs) 그룹(도 7c) 사이에서 4배까지 차별적으로 발현되었던 1,739 프로브를 나타냈다. 1,739 차별 발현된 전사물 내에서 유전자의 깊이 분석에서, 흥미로운 경향으로서 동정되었다: 통상적으로 순수한 상태와 관련된 다수의 만능 유전자가 FTi91/FTi93 그룹에서 상향 조절되었고, 보다 두드러지게, 준비 상태와 관련된 다수의 분화된 유전자는 이 그룹 내에서 억제되었다(도 7d). SMC4 배지 생성된 hiPSCs의 본 전반적인 분석은 배양 조건이 출발 세포주 또는 파생 전략에 대해 미분화 상태를 결정하는데 보다 영향력이 있는 역할을 한다고 제안한다. 데이터는 또한 SMC4 배양 조건에서 유도되거나 이에 적응된 클론이 바람직한 품질을 갖는 순수한 특성, 예를 들면, 초기 계통 마커의 감소된 발현을 갖는 매우 미분화 상태를 입증한다고 제시한다(도 7e).

[0307] **실시예 6**

[0308] **진정한(bona fide) HIPSCS를 동정하기 위한 항체 칵테일의 확인**

[0309] 만능 줄기세포 표면 마커를 조사했다. SSEA4 및 Tra181 발현 이외에, CD30 및 CD50의 발현도 또한 동정되었고, 추가의 만능성 표면 마커를 나타내는 것으로 간주되었다(도 10). Oct4, Klf4 및 Sox2를 발현시키는 폴리시스트론성 렌티바이러스를 사용하여 재프로그래밍된 세포는 각종 효능 상태를 나타내고, Nanog 발현과 같은 진정한 만능 마커를 포함하는 적은 세포로 동정되었다. 지금까지, 표면 마커 발현에 기초하는 만능 hiPSCs를 정확하게 동정하는 신뢰가능한 방법이 없다. 예를 들면, 도 11에 제시된 바와 같이, SSEA4, Tra181 및 CD9에 대해 양성인 것으로 동정되었던 일부 클론 모집단은 Nanog를 발현시키지 않았고, 부정확하게 hiPSCs로서 동정되었다.

[0310] 본 발명은 진정 만능 세포의 마커 Nanog를 발현시키는 세포 모집단을 동정하는 세포 표면 마커의 조합을 제공한다. 구체적으로, CD30, SSEA4 및 Tra181의 표면 마커에 양성인 세포는 Nanog를 발현하는 세포를 동정한다(도 11).

[0311] 첨가된 농축의 추가의 예에서, 재프로그래밍을 경험한 세포 모집단을 분류하여 CD13 표면 마커 발현에 양성인 세포를 동정하였고, 이러한 CD13+ 세포를 재프로그래밍 세포 모집단으로부터 제거했다. CD13+ 모집단은 체세포 및 비재프로그래밍된 세포에 상관되고, CD13+ 세포의 세포의 재프로그래밍 모집단을 고갈시키면 SSEA4/Tra181 양성 세포의 농축을 향상시킨다(도 12). 도 12에서 입증된 바와 같이, 체세포가 21일 동안 Oct4, Klf4 및 Sox2를 발현시키는 폴리시스트로성 벡터를 사용하여 재프로그래밍되면, 다양한 표면 마커 발현 패턴을 갖는 각종 세포 모집단이 단지 SSEA4 및 Tra181 양성 세포를 나타내는 세포의 최소의 서브 세트와 함께 생성되었다(도 12, 점선 화살표). 그러나, 동일 모집단이 CD13 발현에 기반하여 먼저 평가하였고(도 12, 실선 화살표), CD13에 대해 음성인 모집단 서브세트(즉, CD13 세포의 고갈됨)는 SSEA4 및 Tra181 발현 세포(11.04%, 도 12)에 대해 상당히 농축된 모집단을 나타냈다. 반대로, 고수준의 CD13을 발현시킨 세포의 서브세트는 SSEA4 및 Tra181 둘 다를 발현시킨 약간의 세포를 나타냈다(1.14%, 도 12).

[0313] **실시예 7**

[0314] **분화 세포로부터 유래된 만능 줄기세포의 생성에서 단세포 분류의 사용**

[0315] 도 8a에서 알 수 있는 바와 같이, 재프로그래밍이 Oct4, Klf4, Sox2, 및 myc를 발현시키는 개별적 렌티바이러스를 사용하여 유도되는 재프로그래밍 공정에서 초기에 섬유아세포 세포 배양이 형태 상이한 세포의 콜로니를 함유한다. 이러한 세포의 일부는 만능성의 마커에 대해 양성으로 염색된 반면, 나머지는 단순히 변형된 신속 성장 세포였다. 재프로그래밍 공정내의 이 단계에서, 세포 콜로니가 계속 iPSCs를 형성하는 세포 형태만으로는 명백하지 않다. 급성장, 변형되었지만 만능이 아닌 세포는 신속하게 배양물을 접수했다. 따라서, 재프로그래밍화 공정에서 초기에 iPSCs를 위해 선택된 농축 단계를 갖는 것이 유리할 것이다. 추가로, 도 8에 도시된 바와 같이, 몇몇 콜로니는 재프로그래밍 공정 동안 다수의 만능 마커를 발현시켰고, 진정한 iPSCs였고, 반면에 몇몇 콜로니

는 완전히 재프로그래밍되지 않았고, 단지 일부 만능성의 마커를 발현시켰다. 도 8b에서 콜로니 1은 SSEA4 및 Tra181 둘 다에 대해 양성이었고, 반면에 콜로니 4 및 5는 하나 또는 나머지 마커에 대해서 단지 양성이었다. 따라서, 콜로니 형태학에 의해서보다는 만능성의 세포 표면 마커 또는 다수의 마커를 동시에 사용하여 만능 세포를 선택하는 것이 보다 효율적이고 덜 기술적으로 힘들 것일 것이다.

[0316] 본원에서 또한 제공된 세포 농축 및/또는 분류 형태학과 배합된 본원에서 기술된 세포 배양 조성물을 사용하여 재프로그래밍 공정 동안 만능성의 표면 마커를 나타내는 개별 세포를 선택함으로써 iPSCs를 보다 큰 숫자로 보다 짧은 기간내에 유도할 수 있었다. 보다 구체적으로, 도 9a 및 b에 개략적으로 도시된 바와 같이, 재프로그래밍 동안 만능 마커에 기초하는 단세포 분류 및 농축을 사용하여 iPSCs를 생성하는 두 경로를 본 발명의 방법을 사용하여 수행했다.

[0317] 경로 *A*에서, 재프로그래밍의 개시 후, 여러 효능 상태에서 세포의 혼합 모집단이 생성되었다. 세포 혼합 모집단은 분화 세포, 부분 재프로그래밍 세포, 재프로그래핑 세포 및 재프로그래밍을 경험한 세포를 함유한다. 세포 모집단은 SSEA4와 같은 만능 마커를 발현시키는 세포에 대해 자기 비드 분류 또는 유동 혈구 계산 분류[참조: 형태학에 대한 실시예 1]를 사용하여 농축했다. 농축시, 세포를 SMC4 배지(표 1) 또는, 특별한 양태에서, SMC4 + 피브로넥틴 배지에 약 3일 동안 유지시킨 후 SMC4 배지로 교체하고, 약 6 내지 10일 배양기간 후, iPSC 콜로니를 SSEA4 및 TRA181과 같은 마커의 생 배양 염색에 기반하여 동정했고, 클론 신장에 대해 채집하거나 분류했다(도 9).

[0318] 경로 *B* 개략도(도 9)하에, 재프로그래밍의 개시 후 초기에 혼합 세포 모집단을 분류하여 둘 이상의 만능 마커에 대해 양성인 세포의 드문 모집단을 수득했다. 이러한 마커는 SSEA4 및 TRA181을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 만능 마커의 조합을 발현시키는 선택된 세포를 영양세포 세포 보충된 배양 시스템 또는 영양세포 비함유 배양 시스템, 구체적으로 표 1에 기술된 세포 배양 배지 조성물로 보충된 것들로 옮겼다. 이러한 방식으로, iPSC 콜로니는 이미 기술된 방법론과 비교하여 상당히 축소된 스케쥴 및 기술적 장벽으로 생성되었다.

[0319] 이러한 기술의 특별한 증명에서, IMR90 섬유아세포 세포를 Oct4 및 Sox2, 및 Klf 및 c-Myc(OSKM)를 발현시키는 렌티바이러스로 감염시켰다. 영양세포 비함유 배양물의 수일 후, 재프로그래밍 세포를 이들의 체세포 배양 배지로부터 SMC4 배지(표 1)로 보충된 영양세포 비함유 배양물로 교체했다. 재프로그래밍 개시 후 8일째에, 감염된 세포 모집단은 유동 혈구 계산 분석에 의해 만능 마커 SSEA4를 발현시킨 세포의 온건한 서브 모집단을 함유하는 것으로 나타냈다(도 13a). 실시예 1에 기술된 자기 활성화 세포 분류를 사용하여, 만능 모집단을 SSEA4를 발현시키는 세포로 3배 농축시켰다(도 13a). SSEA4 발현 세포에 대해 세포의 농축 후, 분류된 세포를 Matrigel™을 함유하고 통상의 hESC 배지 또는 SMC4 배지로 또는 특별한 양태에서, SMC4 + 피브로넥틴 배지로 보충된 영양세포 비함유 배양물로 옮겼다. 배양물의 알칼리성 포스파타제 염색은 MEK, GSK3, Rock 키나제 및 TGFβ의 소분자 억제제의 사용이 단세포 분류를 사용하는 만능 세포의 농축을 지지하지만, 통상의 기초 배지는 그렇지 않았음을 보여준다(도 13a).

[0320] 3개의 독립 실험의 정량화는 단지 소분자 억제제의 존재하에 단세포 분류에 의한 만능 세포 선택을 명백하게 입증했다(도 13b). 이러한 방식으로 농축된 세포로부터의 콜로니를 SMC4 배지에서 추가로 배양하였고, 진정한 iPSCs로 특성화했다: 진정한 iPSCs는 면역형광 및 유동 혈구 계산으로 만능 마커 SSEA4 및 Tra181에 대해 양성 염색했고(도 13c 및 d); 인간 ESC와 유사한 유전자 발현 프로파일을 나타냈고(도 13e); 외인성 이식 유전자의 중요한 침묵을 나타내고(도 13f), 모두 3개 배 층으로 분화시킬 수 있었다(도 13g). 만능 세포 콜로니는 동일한 프로토콜이 통상의 배양 조건(영양세포 세포를 함유하고, SMC4가 결여된 통상의 배양 배지로 이루어지는)과 함께 사용될 경우, 거의 관찰되지 않았다. 따라서, 만능성의 세포 표면 마커에 기초하는 단세포 분류를 사용하여 세포 재프로그래밍 동안 만능 세포 모집단을 강건하게 농축하는 능력은 표 1에 나열된 세포 신호전달 경로 억제제, 및 첨가제의 사용에 좌우된다. 추가로, 향상된 후-분류 씨딩은 첨가제 피브로넥틴이 3일 동안 배양 시스템에 사용될 경우에 관찰되었다. 이 재프로그래밍 공정은 또한 인간 아디포스 유도된 줄기세포를 포함하는 기타 출발 세포 형태에 대해 완료되었다.

[0321] 기술의 추가의 예에서, FACS를 비-재프로그래밍 세포, 부분 재프로그래밍 세포 및 완전 재프로그래밍 세포의 혼합물로부터 세포의 만능 모집단의 농축용으로 사용했다. 이전 실시예에 의한 바와 같이, IMR90 섬유아세포 세포를 Oct4 및 Sox2, 및 Klf4/c 및 Myc(OSKM)를 발현시키는 렌티바이러스로 감염시켰다. 섬유아세포 감염 수일 후, 세포 배양물을 SMC4 배지 중의 영양세포 비함유 배양물로 교체했다. 감염된 세포 모집단은 만능성의 SSEA4 및 Tra181 마커 둘 다에 대해 양성인 적당한 세포 모집단을 함유한다(도 14a). 두 만능 마커에 대해 양성인 세포를 선택하고, 두 마커에 대해 음성이거나 하나의 마커에 대해서만 양성인 세포로부터 분리했다.후속적인 영양세포

비함유 배양물과 표 1에 기술된 바와 같이 보충된, 일부 양태에서 피브로넥틴을 함유하는 배지와의 비교는 두 마커에 대해 양성인 세포로부터의 배양물이 후속적으로 만능 iPSCs로서 특성화되는 콜로니를 형성하는 반면, 만능 마커에 대해 음성인 것으로 FACS에 의해 제어된 세포는 알칼리성 포스파타제-양성 콜로니를 생성하지 않는다는 것을 나타냈다(도 14a, b). 보다 구체적으로, 기초 배지 배합물에의 첨가제로서 신호전달 분화 MEK, GSK, Rock 및 TGFβ의 억제제는 재프로그래밍 공정에서 초기에 만능 세포의 분류 선택 및 농축에 FACS의 사용을 촉진시킨다. 추가로, 향상된 후-분류 씨딩은 첨가제 피브로넥틴이 3일 동안 배양 시스템에 사용될 때 관찰되었다.

[0322] SMC4 배지 및 배양 시스템의 이점을 다음으로 사용하여 영양세포 비함유 클론 유도된 hiPSCs를 생성하기 위한 고처리량 방법을 개발했다. 계획은 SMC4 배지로 재프로그래밍하고 만능 마커의 조합에 의해 지시된 바와 같이 성실하게 재프로그래밍된 드문 개별 세포를 선택하도록 유도된 세포를 처리하기 위해 고안되었다. 또한, 본 발명자들은 재프로그래밍 공정을 이중 마커 유동-혈구 계산, qRTPCR 및 면역형광의 선택 검정에 기초하는 상위 계층 클론을 효과적으로 선택하기 위한 다중 플랫폼을 커플링시켰다(도 15).

[0323] 최적화된 다중 프로토콜에서, 재프로그래밍은 3-인자(OKS) 폴리시스트론성 바이러스를 사용하여 개시하였고, $SSEA4^{+}/Tra181^{+}$ 모집단의 초기 벌크 FACS 분류는 30일째에 96 웰-플레이트 속에서 $SSEA4^{+}/Tra181^{+}$의 FACS 재분류가 따르는 감염 후 20일째에 완료했다(도 15 및 b). 이 전략은 다수의 클론의 유도를 허용하고, 만능 마커를 발현시키고 외인성 유전자 활성의 감쇠 및 Oct4 촉진제의 탈메틸화를 나타내는 클론 FTC1 클론 1 및 2의 생성을 허용했다(도 15a-c). FTC 1 클론 1 및 2는 또한 시험관내 및 생체내에서 3개의 체세포 계보로 분화함으로써 만능인 것으로 나타났다(도 15d, e). 선택된 클론은 또한 염색체 무결성에 대해 평가했고, 기타 재프로그래밍 전략에 대해 현저하게 향상된 FF 배양물 중에서 20개의 연속 단세포 계대 후에도 이들의 부모 주 및 정상적인 핵형으로부터 최소의 카피 수 변화를 갖는 것으로 입증되었다(도 17)

[0324] 플랫폼의 재현성을 측정하기 위해, 추가의 섬유아세포 주, FTC5 및 FTC7를 Oct4, Klf 및 Sox2를 발현하는 폴리시스트론성 벡터를 사용하여 재프로그래밍하기 위해 유도하고, 도 15에 기술된 바와 같이 고처리량 플랫폼에 적용했다. 도 18에 기술된 바와 같이, FTC5 및 FTC7 섬유아세포 주로부터 유도된 콜로니는 이들의 미분화 상태를 유지시키고, 이들의 만능성 및 게놈 안정성을 보유하는 것으로 나타났다. 따라서, 3개의 만능성 인자. SMC4 배양 배지 및 다중 특성화 플랫폼의 조합은 고처리량 방식으로 클론 유도되고 게놈 안정한 hiPSCs의 동정, 선택 및 신장을 허용하면서 영양세포 비함유 재프로그래밍의 동역학을 향상시킨다.

[0326] **실시예 8**

[0327] **다중 IPSC 클론을 신속하게 생성하기 위한 방법 및 배양 조성물**

[0328] 만능 유전자, 예를 들면, Oct4, Sox2, Klf4, c-myc, Lin28 및 Nanog의 이소성 발현에 의해 인간 iPSCs의 생성은 비능률적이고 기계적으로 요구하는 공정이다. 영양세포 세포 지지체를 포함하는 배양 시스템과 함께 숙주 세포 게놈 중에서 만능 인자 이식 유전자의 렌티바이러스 또는 레트라바이러스 통합에 관계하는 전략은 전통적으로 iPSC 생성을 위한 가장 효율적인 방법이었다. 잠재적인 만능 세포가 감염 후 21 내지 30일에 나타나고, 이들이 감염 후 30 내지 45일 사이에 수동 "집단" 계대에 의해 클론적으로 유도되는 경우, 인간 iPSC 생성에 바이러스 및 영양세포 세포 방법론을 사용하는 역사 연구의 문헌 개관은 iPS 세포가 되는 감염 세포의 0.001%-0.01%의 효율을 나타낸다(표 4).

[0329] 만능 유전자를 도입하는 기타 방법은 변형 단백질의 에피솜 벡터 시스템 및 형질 도입을 포함한다. 이러한 방법은 iPSC 기술의 최종 임상 적용에 대해 중요한 개발로서 간주된다. 그러나, 이러한 방법론은 바이러스 시스템을 사용하는 재프로그래밍보다 효율이 훨씬 더 낮다. 추가로, 재프로그래밍 공정의 효율도 또한 축소되고, 또는 산업적 및 치료적 사용을 위한 iPSCs의 개발을 방해하여 영양세포 세포 비함유 시스템이 통상의 줄기세포 배지 배합물과 함께 사용할 경우, 일부 상태에서는 불가능하다. 체세포 재프로그래밍은 확률 공정으로서 특성화되었고, 대다수의 세포는 결국 경시적으로 재프로그래밍한다. 그러나, 단일 재프로그래밍으로 다수의 iPSC 클론을 생산하는 강건하고 기술적으로 용이하고 효율적이고 계량가능한 방법은 아직 기술되지 않았다.

[0330] 본 발명은 세포 배양 조건 및 비교적 짧은 시간에 현재 방법보다 적은 기술적 장벽으로 클론 iPSC 콜로니를 유도하는 방법론을 제공한다. 구체적으로, 그리고 도 13b에서 알 수 있는 바와 같이, SMC4 배지 중의 첨가제로서 특정의 신호전달 경로의 소분자 억제제의 사용은 SMC4 배지가 사용되지 않을 경우보다 대단히 큰 효율에서 영양세포 비함유 배양 환경에서 iPSC 콜로니의 생성을 허용한다. MEK, GSK, Rock 및 TGFβ 신호전달 경로의 억제제를 사용하여 영양세포 비함유 환경에서 효율적인 재프로그래밍을 허용했다.

[0331] 도 13 및 표 4로부터 알 수 있는 바와 같이, 3개의 독립적인 재프로그래밍 실험에서, 어떤 콜로니도 나타나지

않거나 또는 하나의 콜로니가 통상의 hESC 배지가 영양세포 비함유 환경에서 재프로그래밍 공정에 사용될 경우에만 나타난 반면, 소분자 배양 첨가제(즉, SMC4 배지)는 영양세포 비함유 재프로그래밍 이벤트를 0.035%의 효율까지 향상시키고, 감염 후 14 내지 21일째에 콜로니 및 28 내지 35일째까지 클론 iPSCs의 유도를 유도한다. 따라서, 소분자 억제제의 사용은 재프로그래밍하는 시간 및 재프로그래밍되는 세포의 비율에 대한 재프로그래밍 효율을 증가시킨다. 이 접근법을 사용하여 생성된 콜로니는 표준 절차, 예를 들면, 면역형광 및 유전자 발현 프로파일링을 사용하여 만능성인 것으로 특성화되었다.

[0332] 이 기술의 추가의 증명에서, 분화된 세포는 개별적 만능 유전자 Oct4, Klf4, Sox2, 및 Myc를 발현시키는 바이러스로 감염시켰고, SMC4 배지 및 영양세포 비함유 배양 환경(표 1)에서 8 내지 12일 동안 배양시켰다. 이 시점에서, 실시예 6 및 도 13 및 14에서 기술된 바와 같이, 세포를 FACS 또는 MACS 단세포 분류를 사용하여 농축하여 만능 마커, 예를 들면, SSEA4 및 Tra181을 위한 양성 염색으로 규정된 만능 세포의 소집단을 수득했다. 이 접근법을 사용하여, iPSC 생산 스케쥴은 크게 축소되었고, 재프로그래밍된 세포의 비율과 관련하여, 분류 직후(10 내지 16일째) 수일 내에 나타나는 콜로니와 함께 0.22% 효율이 입증되었다. 재프로그래밍의 효율은 감염 후 21-28일째에 클론 iPSC의 유도를 이끌어냈다.

[0333] 재프로그래밍의 향상된 효율의 추가의 증명에서, 3개(Oct4, Klf 및 Sox2) 또는 4개(Oct4, Klf4, Sox2, 및 myc)의 만능 인자가 동일 촉진제 원소로부터 발현된 폴리시스트론성 벡터 시스템을 최적화된 SMC4 배지, 영양세포 비함유 배양물 및 SSEA4 및 TRA181을 사용하는 단세포 분류 시스템과 함께 사용하여 감염 후 6 내지 8일째에 처음으로 나타난 콜로니와 함께 0.756%의 재프로그래밍하는 효율을 유도했다. 이 방법은 너무 효율적이어서 iPSC 콜로니가 감염 후 단지 4일만 존재했다. 이 기술은 전통적인 iPSC 생성 방법에 대해 상당한 향상을 나타낸다.

[0335] **표 4. 각종 전략에서 재프로그래밍 동역학**

[0336] N.I., 동정되지 않음; * iPSC-형 콜로니의 형태학상 외관; ** 씨딩된 세포당 SSEA4+/Tra181+의 수로서 계산됨; *** iPSc 콜로니가 신장되어 클론 주로서 유지되는데 필요한 시간(Tra181/SSEA4 염색에 기초). 회색 박스는 문헌 연구로부터의 데이터를 나타낸다. 개별적 인자 바이러스; 감염은 중요한 전사 인자 중의 하나를 각각 발현시키는 개별적 바이러스를 배합하여 수행하고, 3개는 조합 Oct4/Klf4/Sox2를 나타내고, 4개는 조합 Oct4/Klf4/Sox2/cMyc를 나타낸다.

재프로그래밍 전략	콜로니의 외관 (일수)*	효율 (%)**	클론성 모집단의 유도 (일수)***
개개의 4 인자 바이러스 + 영양세포-세포 + 통상적인 배지	21-30	0.001-0.01	30-45
개개의 4 인자 바이러스 + 영양세포 세포 + 통상적인 배지 + TGFβi + MEKi	14-21	0.01-0.1	28-42
개개의 4 인자 바이러스 - 영양세포 세포 + *SMC4*	14-21	0.035 ± 0.015	28-35
개개의 4 인자 바이러스 - 영양세포 세포 + 농축 + 통상적인 배지	N.I.	---	---
개개의 4 인자 바이러스 - 영양세포 세포 + 농축 + *SMC4*	10-16	0.220 ± 0.120	21-28
개개의 3 인자 바이러스 - 영양세포 세포 + 농축 + *SMC4*	18-24	0.032 ± 0.018	24-35
폴리시스트론성 4 인자 바이러스 - 영양세포 세포 + 농축 + *SMC4*	6-8	0.756 ± 0.238	18-24
폴리시스트론성 3 인자 바이러스 - 영양세포 세포 + 농축 + *SMC4*	10-14	0.276 ± 0.084	21-28

[0337]

[0339] **실시예 9**

[0340] **단세포 분류 및 농축을 사용하여 분화된 세포 모집단으로부터 만능 세포 모집단을 고갈시키는 방법**

[0341] 약물 스크리닝 및 줄기세포 생물학의 일부 임상 적용은 만능 세포 ESCs 또는 iPSCs로부터 특별한 계보로 분화되는 균일한 세포 모집단의 생성을 필요로 한다. 분화된 세포 모집단을 만능 세포로 오염시키면 생체내에서 종양/기형종 형성을 유도할 수 있다. 분화된 세포를 위한 세포 모집단을 농축하거나 세포 모집단으로부터 만능 세포를 고갈시키는 방법은 본원에서 실시예 3 및 6에 기술된 분류 기술을 포함할 수 있다. 구체적으로 단세포 분류 공정 동안 만능 세포의 분화 또는 부분 분화를 예방하기 위해 세포 배양 배지에 소분자 첨가제의 사용은, 본 발명에 의해 제공된 바와 같이, 만능 세포가 전체적으로 분화된 세포 모집단으로부터 음성적으로 선택되도록 한다. 역으로, 세포 분류에 의해 세포 모집단으로부터 분화된 세포의 양성적 선택은 만능 세포가 만능성의 표면 마커에 대해 완전히 양성으로 잔류하는 배양 조건하에서 더욱 효과적일 수 있다. 도 20에서 알 수 있는 바와 같이, 완전 분화된 섬유아세포 및 만능 세포의 혼합 모집단을 세포가 표 1에 기술된 배양 환경에서 예비배양될 경우, FACS를 사용하여 효과적으로 분리시켰다. 소분자 배양 첨가제를 또한 분류 과정 동안 사용하여 단세포 현탁액을 안정화시킬 수 있다. 도 20으로부터, 만능 마커에 음성으로 선택된 세포가 후속적인 배양 및 알칼리성 포스파타제에 대한 염색시 만능 세포를 완전히 비함유하는 것으로 나타났다는 것을 알 수 있다.

[0343] **실시예 10**

[0344] **영양세포 비함유 배양물 상에서 만능 줄기세포의 사이토킨 및 성장 인자 비함유 배양**

[0345] 실시예 2에서 논의된 바와 같이, 통상의 인간 만능 배양 시스템은 영양세포 세포 및 사이토킨, 예를 들면, bFGF를 포함하고, 이는 인간 만능 줄기세포를 미분화 상태로 유지시키기 위한 외주 자극으로서 작용한다. 그러나, 영양세포 세포 및 재조합 사이토킨을 생성하는 방법은 이종 오염물의 공급원으로서 작용한다. 또한, 영양세포 세포로부터 분비된 중요 인자(들) 및 사이토킨에 의해 자극된 정확한 세포상 경로는 아직 동정되지 않았다. 따

라서, 인간 만능 줄기세포의 통상의 배양은 질병 규정된 시스템을 나타내고, 임상적 등급 제조로의 전이를 방해할 수 있다.

[0346] 이 문제를 해결하기 위해, 본 발명은 실시예 2에서 논의된 영양세포 비함유 및 단세포 계대 시스템이 SMC4 배지 제형으로부터 bFGF 및 기타 사이토킨 및 성장 인자를 제거함으로써 추가로 변형되는 추가의 양태를 포함한다. 추가로, 본 발명의 하나의 양태에서, Matrigel™이 동물 유도되고 완전히 특성화되지 않는 세포외 매트릭스를 나타내기 때문에, Matrigel™을 젤라틴으로 교체했다. 이러한 본 발명의 양태는 iPSCs를 포함하는 만능 줄기세포의 고유 자체 재생 및 유지를 허용하는 완전 규정된 사이토킨 비함유 배양 시스템을 제공한다.

[0347] 도 21a 및 21b에서 입증된 바와 같이, Oct4, Klf4, 및 Sox2를 함유하는 폴리시스트론성 벡터 시스템으로 생성되고 영양세포 비함유 환경에서 유지된 인간 만능 줄기세포, 예를 들면, iPSCs는 젤라틴 피복된 배양 표면 상에서 추가의 사이토킨 또는 성장 인자, 예를 들면, bFGF를 함유하지 않는 SMC4 배지로 용이하게 단세포 계대시켰다. 이러한 완전 규정 시스템에서 다수 계대 후, iPSCs를 Tra181 및 SSEA4의 공-발현에 의해 입증된 바와 같이 이들의 만능 상태를 유지시킨다(도 21c). 추가로, 본 발명자들은 이 완전 규정된 사이토킨 비함유 시스템에서 iPSCs의 생성을 입증했다. 따라서, 하나의 양태에서, 본 발명은 SMC4 배지와 젤라틴의 조합을 포함하는 성장 인자 및 사이토킨 부재의 완전 규정된 배양 시스템을 제공한다.

[0349] **실시예 11**

[0350] **만능 줄기세포의 생성 및 유지에서 게놈 안정성**

[0351] 연구는 만능 줄기세포의 재프로그래밍 공정 및 후속적인 배양이 게놈 이상에 대한 높은 경향을 유도할 수 있다는 것을 제시한다. 또한, 영양세포 비함유 배양은 핵형 이상 세포의 클론 과성장을 일으킬 수 있는 것으로 나타났다. 도 17a, 17b및 18c에서 입증된 바와 같이, 본 발명은 게놈 안정성을 갖는 세포를 수득하기 위한 재프로그래밍 방법 뿐만 아니라 게놈 안정성을 갖는 재프로그래핑된 세포를 유지시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에서, 세포가 Oct4, Klf4 및 Sox2를 함유하는 3-인자 폴리시스트론성 작제물을 사용하여 재프로그래핑될 때, 게놈 안정성은 두 재프로그래밍 공정 뿐만 아니라 장기간 영양세포 비함유 배양 동안 유지되었다. 도 17a에서 제시된 바와 같이, 고해상도 비교 게놈 하이브리드화는, hiPSCs가 생성되고 SMC4 배지를 사용하는 장기간 영양세포 비함유 배양물에서 유지될 경우, 최소한의 카피 수 변화가 검출되었음을 입증했다. 또한, 게놈 안정성은 도 17b 및 18C에서 입증된 바와 같이 통상적인 장기간 영양세포 비함유 및 단세포 배양 동안 유지되었다.

[0353] **실시예 12**

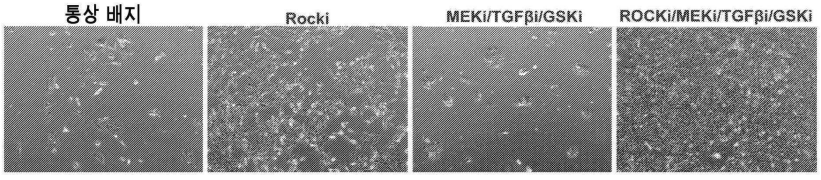
[0354] **세포 표면 마커를 사용하는 배양 동안 만능 세포의 세포 모집단의 유지**

[0355] 줄기세포 배양물의 만능성을 유지시키기 위해 만능 세포 배양물로부터 분화된 세포를 제거하는 것이 흔히 유용하다. 지금까지, 이 공정은 세포 배양물로부터 분화된 세포를 수동적으로 채집하거나 상당히 분화된 모집단으로부터 미분화된 세포를 수집함을 필요로 한다. 두 공정은 노동 집약적이며, 숙련된 훈련을 필요로 하고, 형태학에 기초하는 세포의 선택에 좌우되고, 이는 항상 배양액 중의 세포의 진정한 만능성 상태의 지표일 수는 없다(도 8).

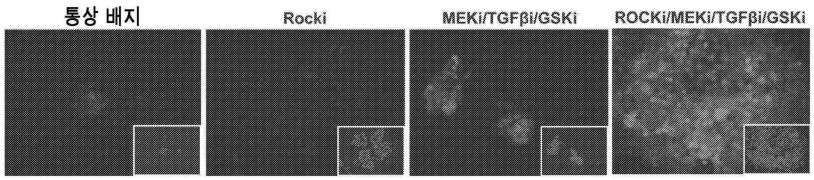
[0356] 향상된 공정에서, 본 발명은 통상적인 배양 동안 미분화 세포를 효율적이고 정확하게 선택하는 능력을 제공한다. 도 19a에서 입증된 바와 같이, SMC4 배지 및 FF 배양물 중에 유지된 hiPSCs 모집단을 용이하게 농축하거나 분류하여 미분화된 만능 세포의 세포 배양을 유지시켰다. 또 다른 예에서, 도 19b에 기술된 바와 같이, 통상 폐기될 대부분의 분화 세포 모집단은 Tra181 발현에 의해 기술된 바와 같은 대부분의 미분화된 만능 세포를 달성하기 위해 세포 배양물로부터 제거될 수 있다.

도면

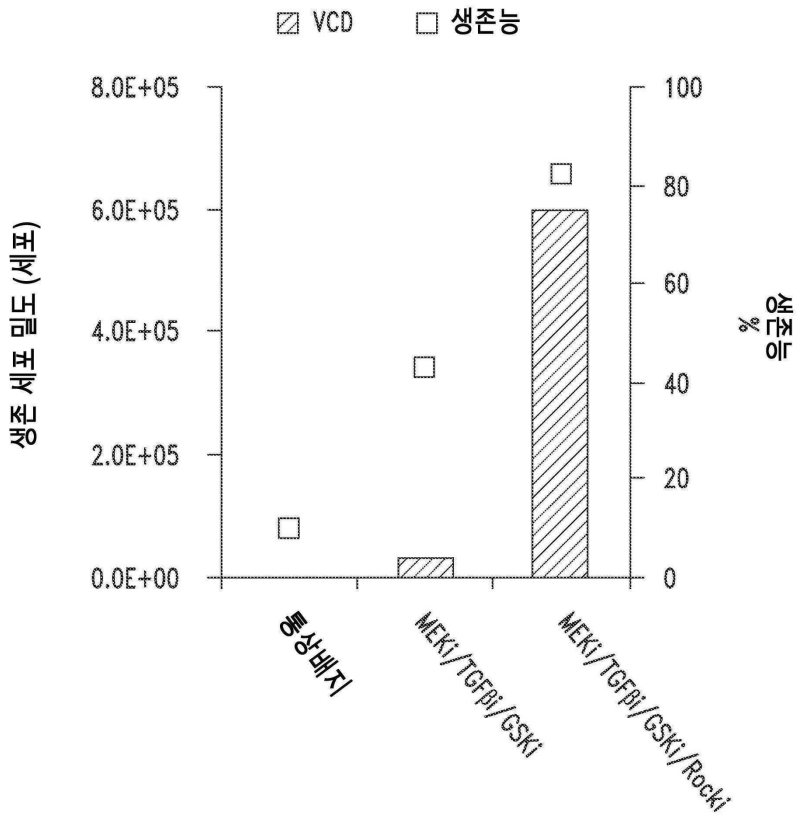
도면1a



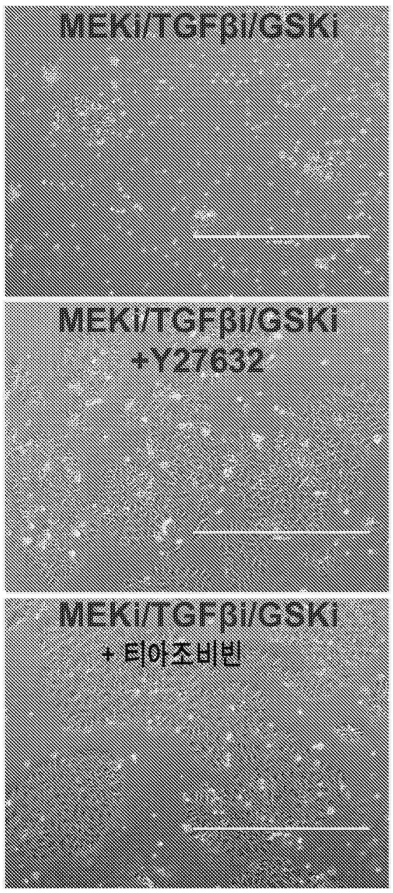
도면1b


통상 배지
Rocki
MEKi/TGFβi/GSKi
ROCKi/MEKi/TGFβi/GSKi

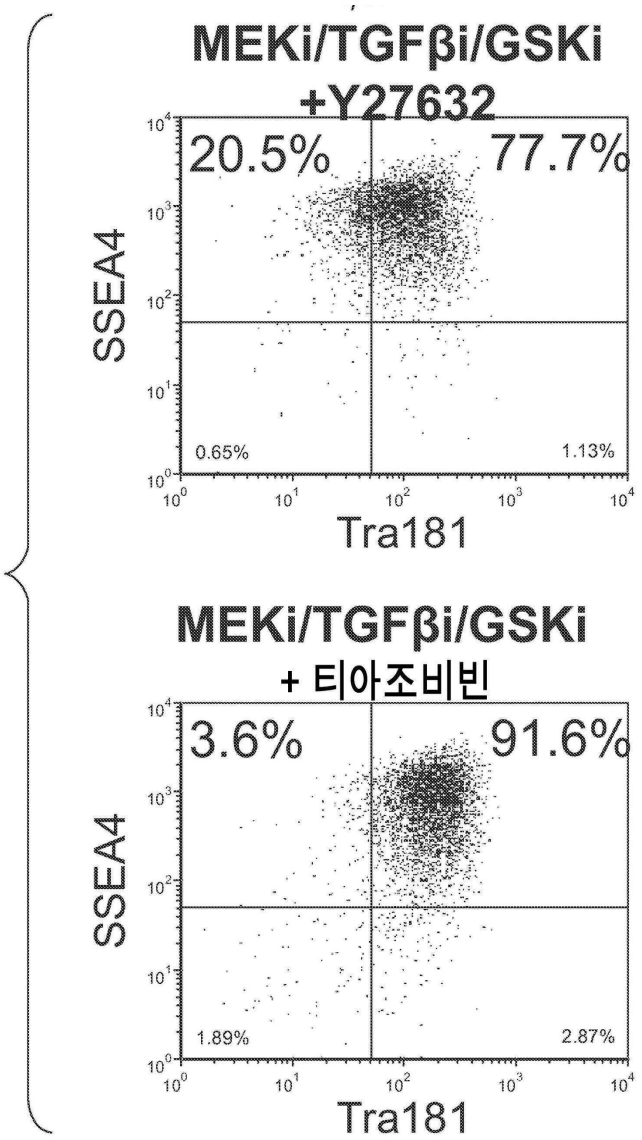
도면1c


VCD
생존능
8.0E+05
6.0E+05
4.0E+05
2.0E+05
0.0E+00
100
80
60
40
20
0
생존 세포 밀도 (세포)
%
통상배지
MEKi/TGFβi/GSKi
MEKi/TGFβi/GSKi/Rocki

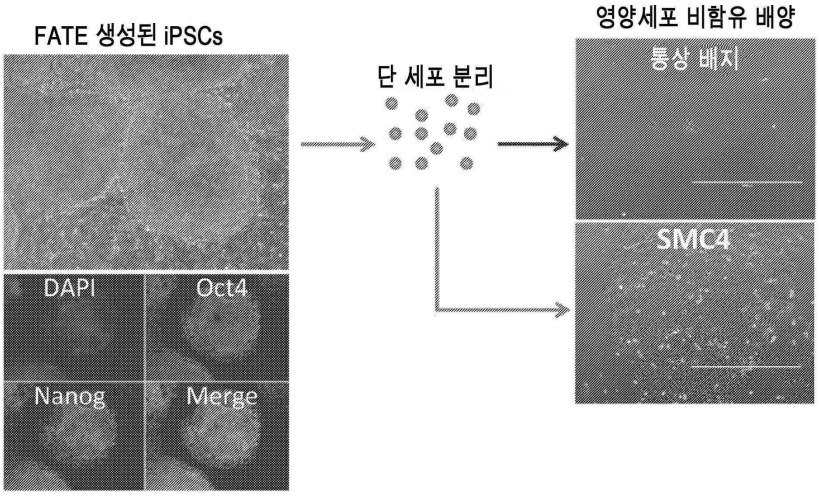
도면1d


MEKi/TGFβi/GSKi
MEKi/TGFβi/GSKi
+Y27632
MEKi/TGFβi/GSKi
+ 티아조비빈

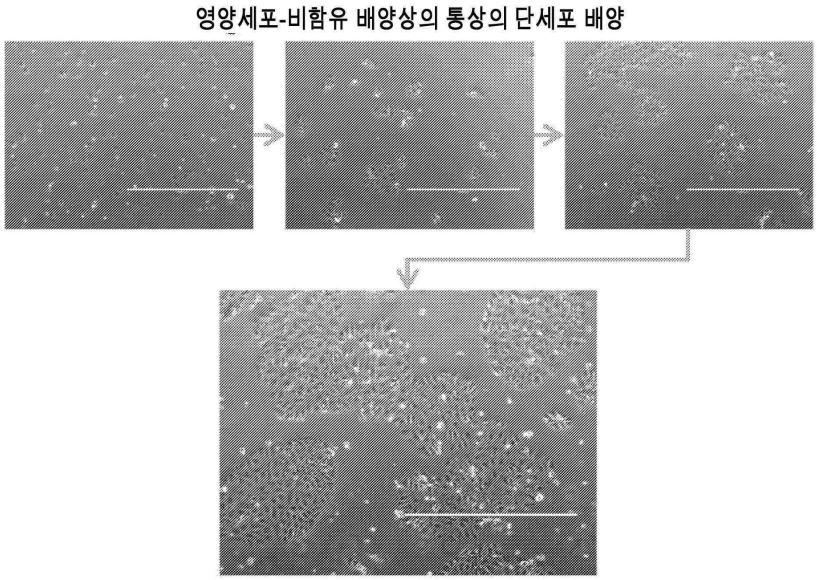
도면1e


MEKi/TGFβi/GSKi
+Y27632
20.5%
77.7%
0.65%
1.13%
SSEA4
Tra181
MEKi/TGFβi/GSKi
+ 티아조비빈
3.6%
91.6%
1.89%
2.87%
SSEA4
Tra181

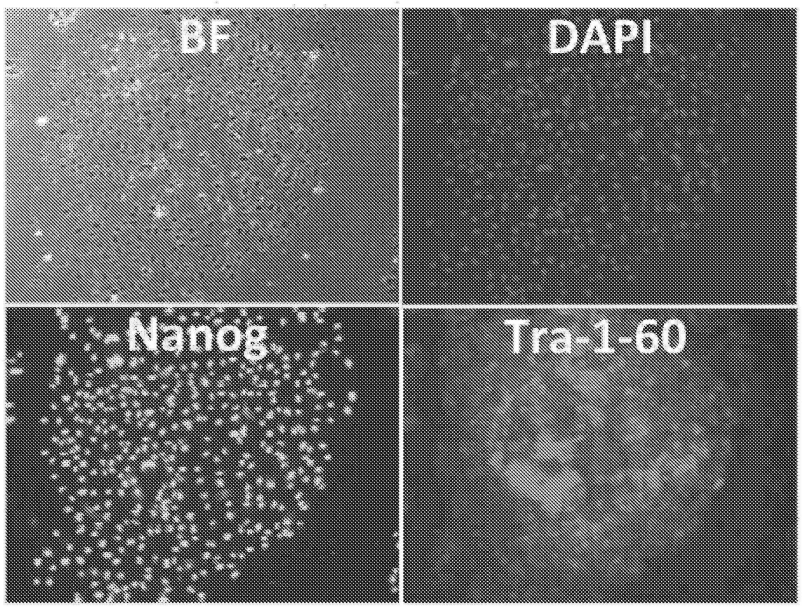
도면2a


FATE 생성된 iPSCs
DAPI
Oct4
Nanog
Merge
단 세포 분리
영양세포 비함유 배양
통상 배지
SMC4

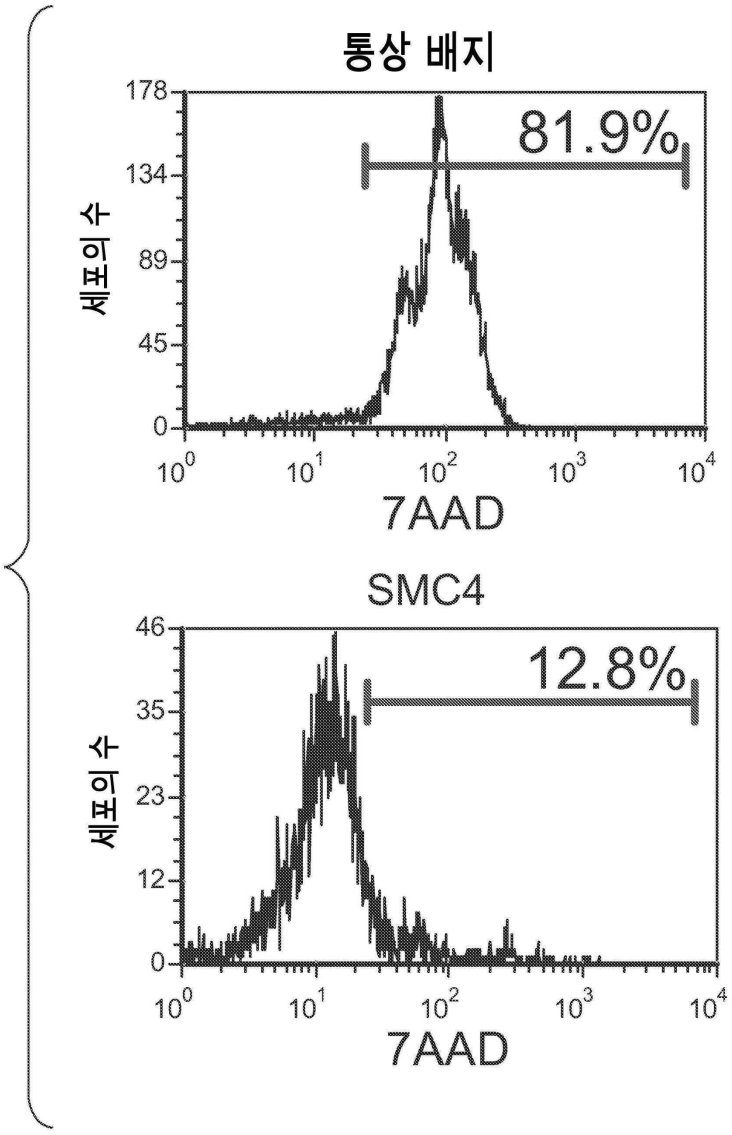
도면2b



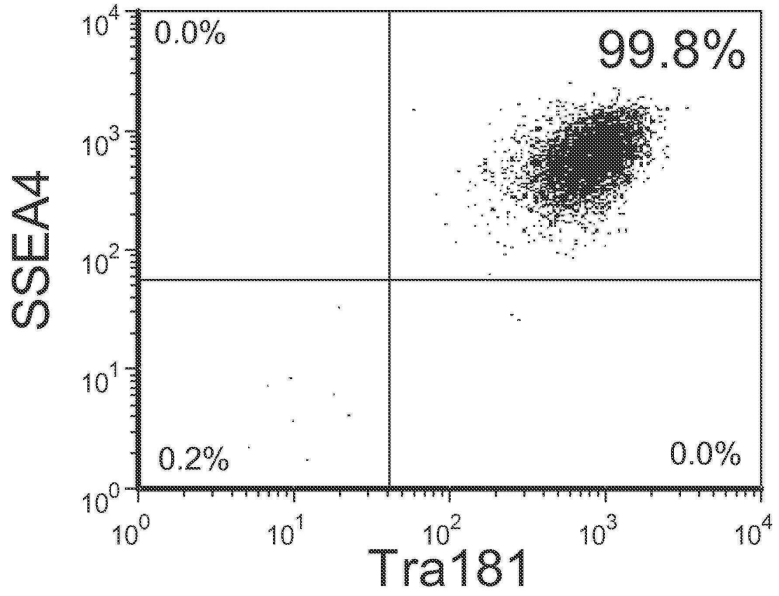
도면3a



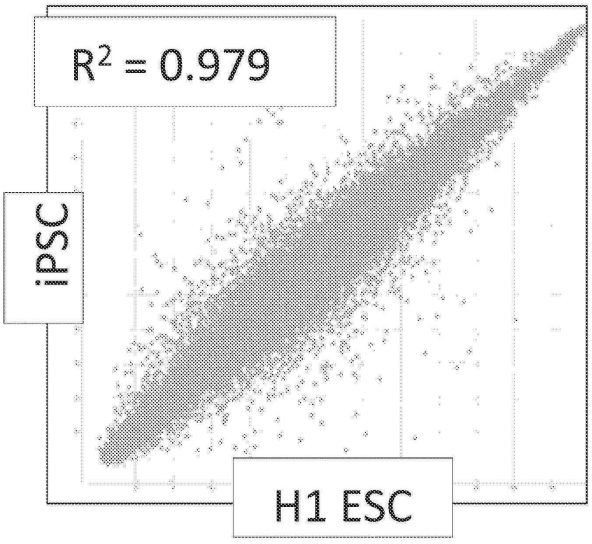
도면3b


통상 배지
81.9%
세포의 수
178
134
89
45
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
7AAD
SMC4
12.8%
세포의 수
46
35
23
12
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
7AAD

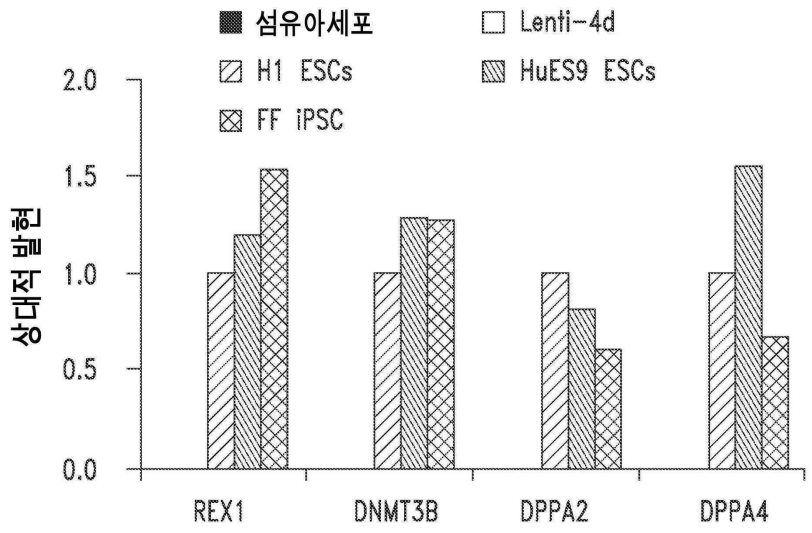
도면3c


0.0%
99.8%
0.2%
0.0%
SSEA4
Tra181
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

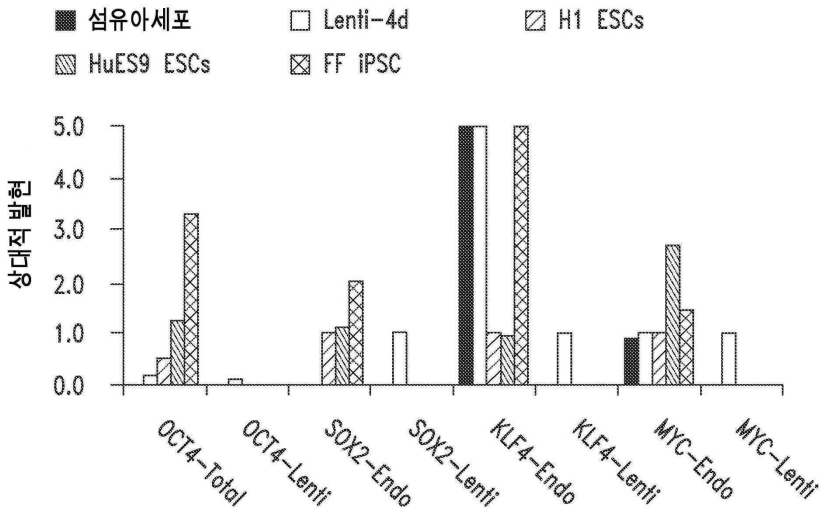
도면3d


R^2 = 0.979
iPSC
H1 ESC

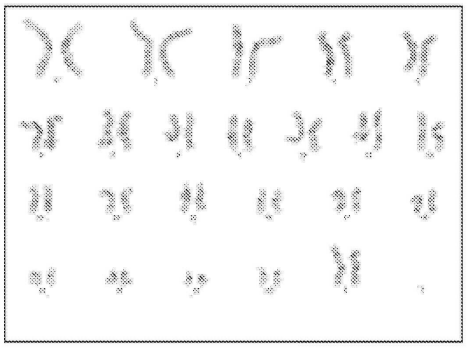
도면3e



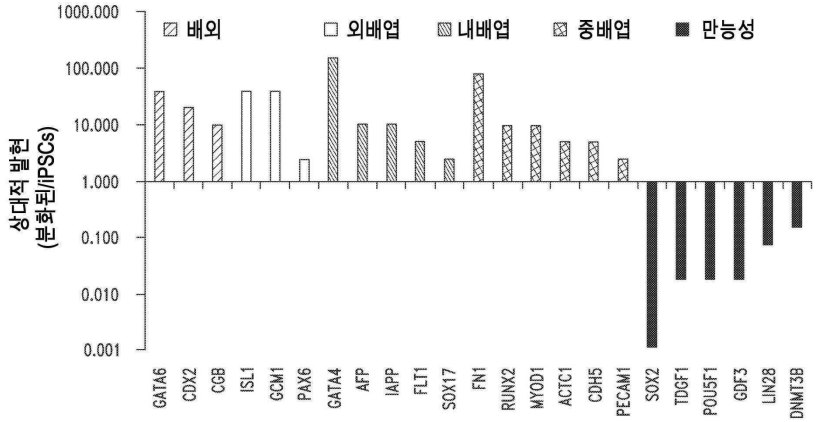
도면3f



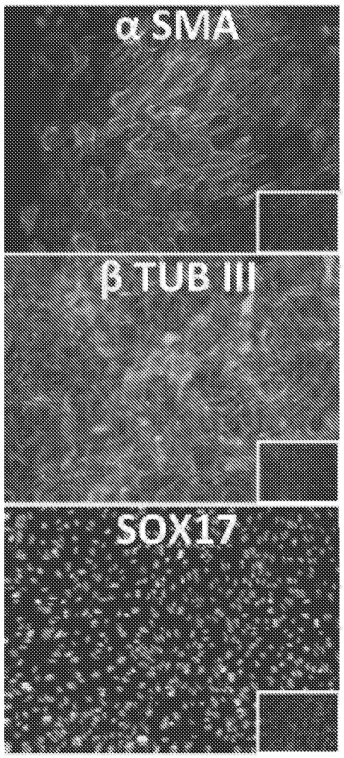
도면3g



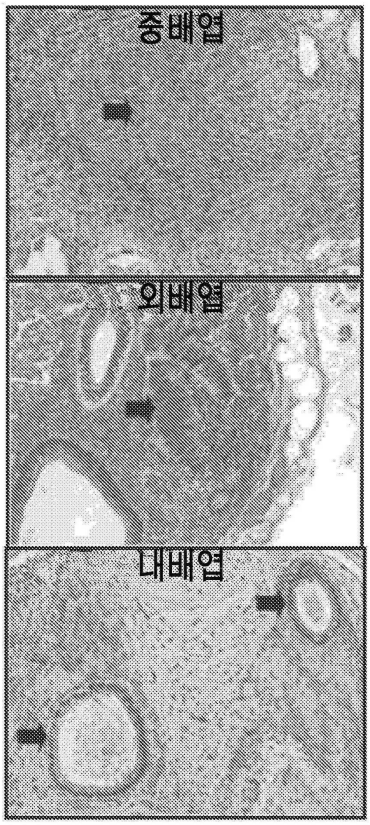
도면3h


1000.000
100.000
10.000
1.000
0.100
0.010
0.001
상대적 발현
(분화된/iPSCs)
배외
외배엽
내배엽
중배엽
만능성
GATA6
CDX2
CGB
ISL1
GCM1
PAX6
GATA4
AFP
IAPP
FLT1
SOX17
FN1
RUNX2
MYOD1
ACTC1
CDH5
PECAM1
SOX2
TDGF1
POU5F1
GDF3
LIN28
DNMT3B

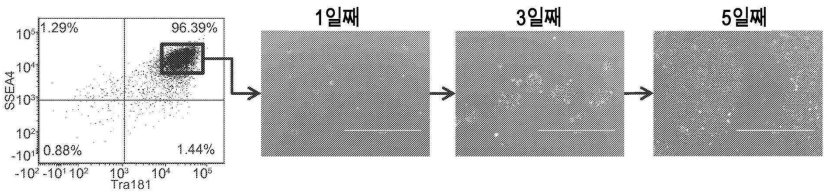
도면3i


α SMA
β TUB III
SOX17

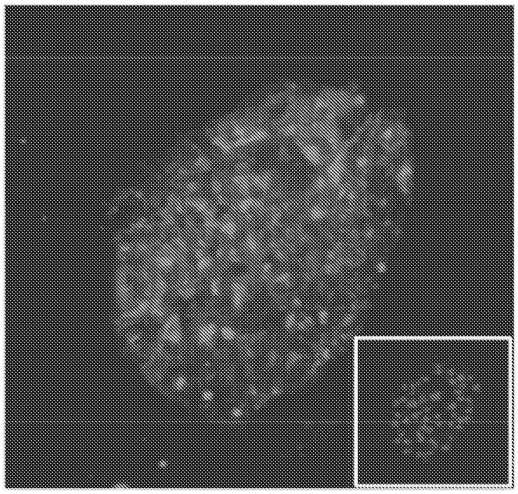
도면3j



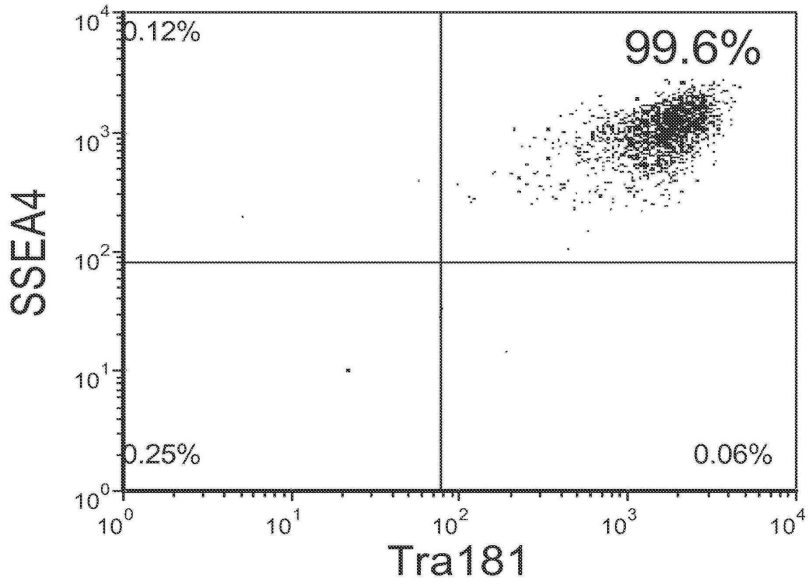
도면4a



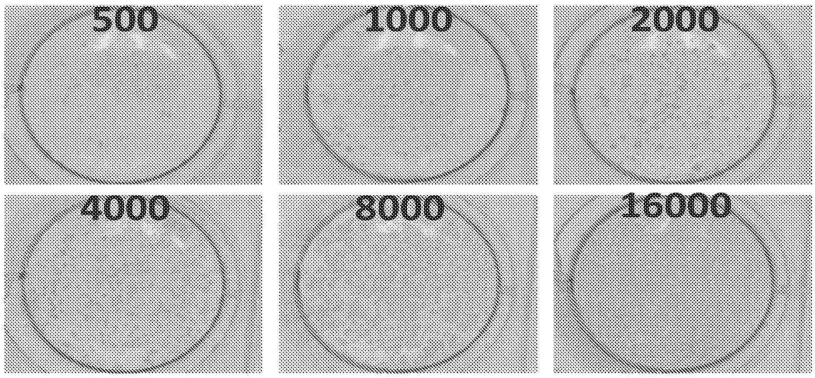
도면4b



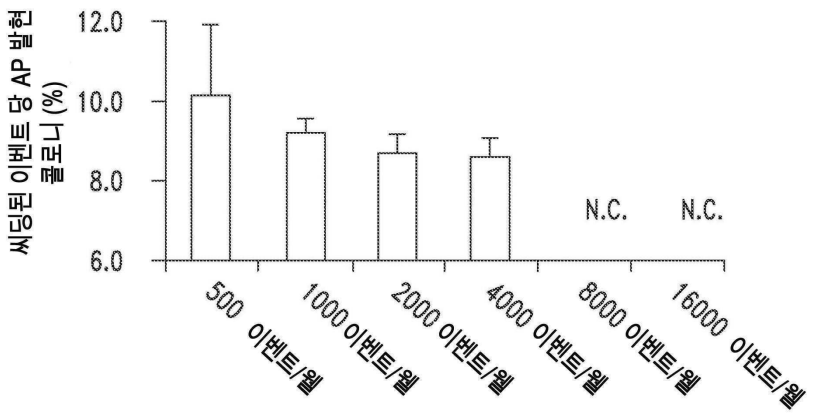
도면4c



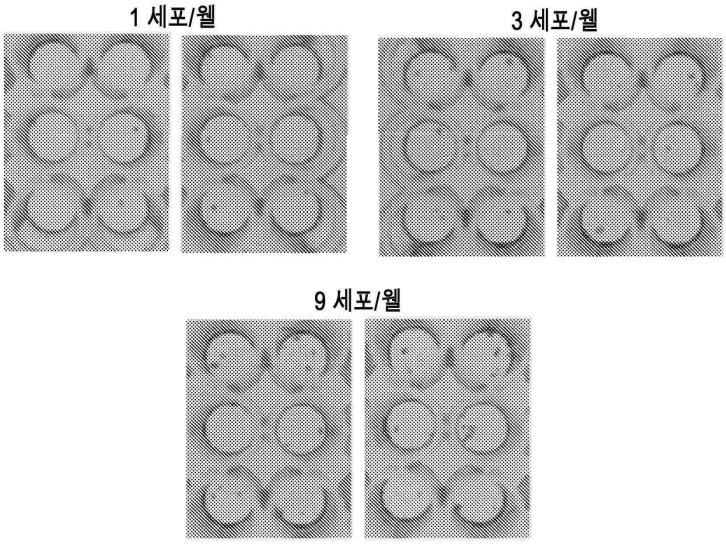
도면4d



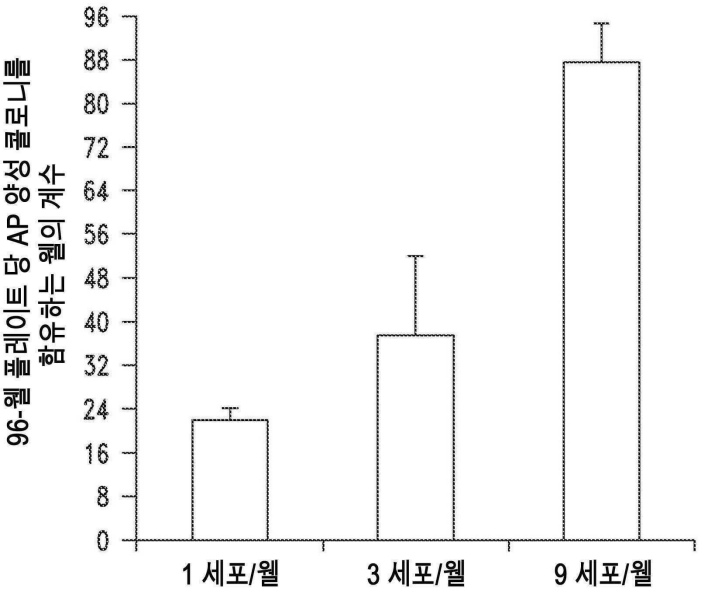
도면4e



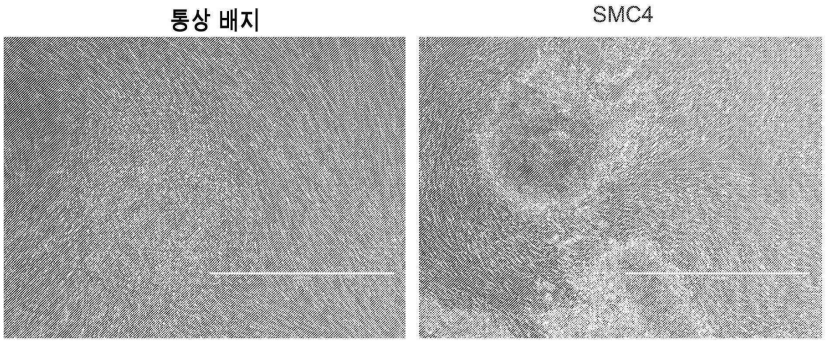
도면4f



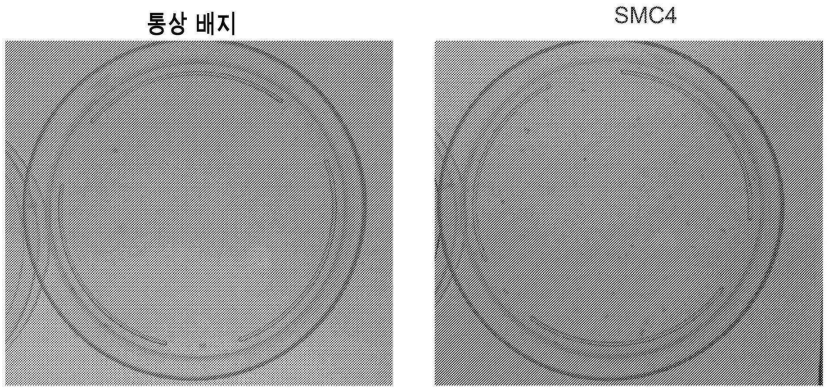
도면4g



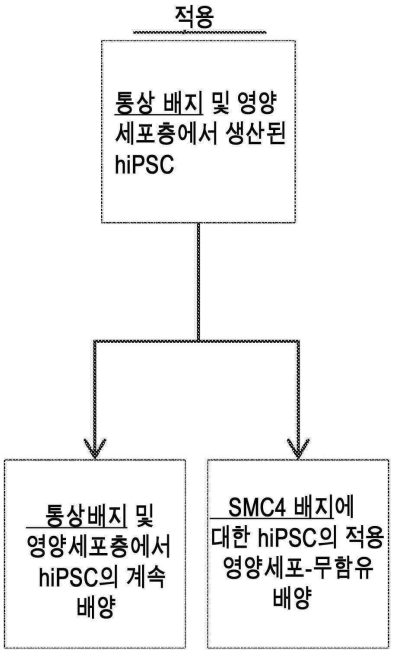
도면5a



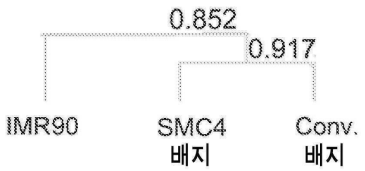
도면5b



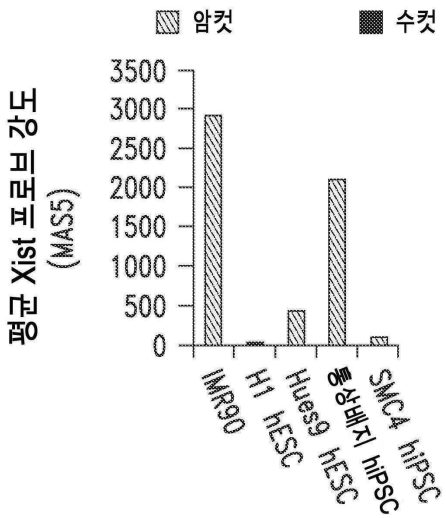
도면6a



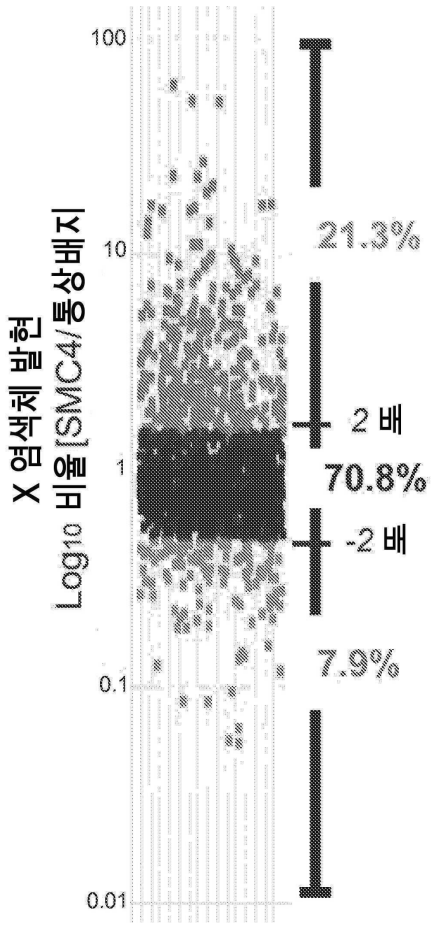
도면6b



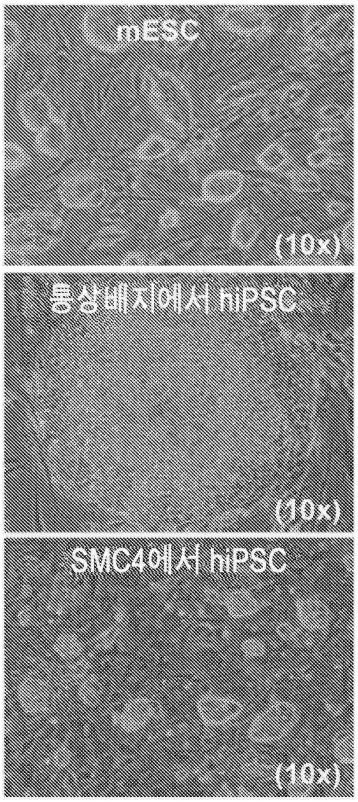
도면6c


암컷
수컷
평균 Xist 프로브 강도 (MAS5)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IMR90
H1 hESC
Hues9 hESC
통상배지 hiPSC
SMC4 hiPSC

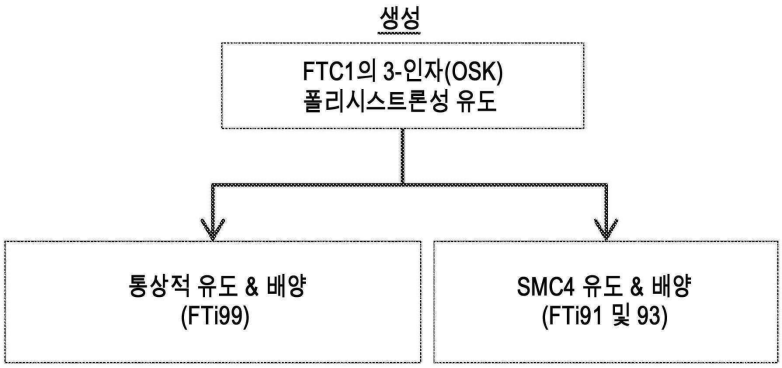
도면6d


X 염색체 발현
Log10 비율[SMC4/통상배지]
100
10
1
0.1
0.01
21.3%
2 배
70.8%
-2 배
7.9%

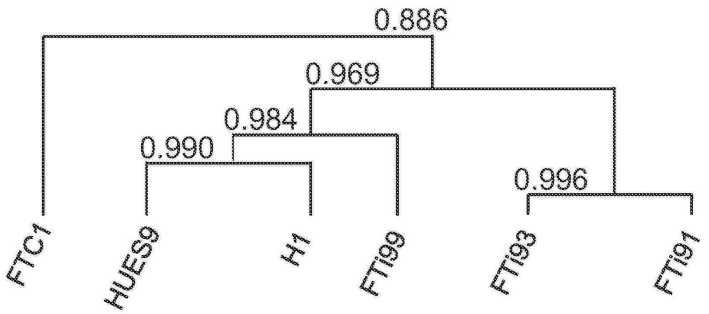
도면6e



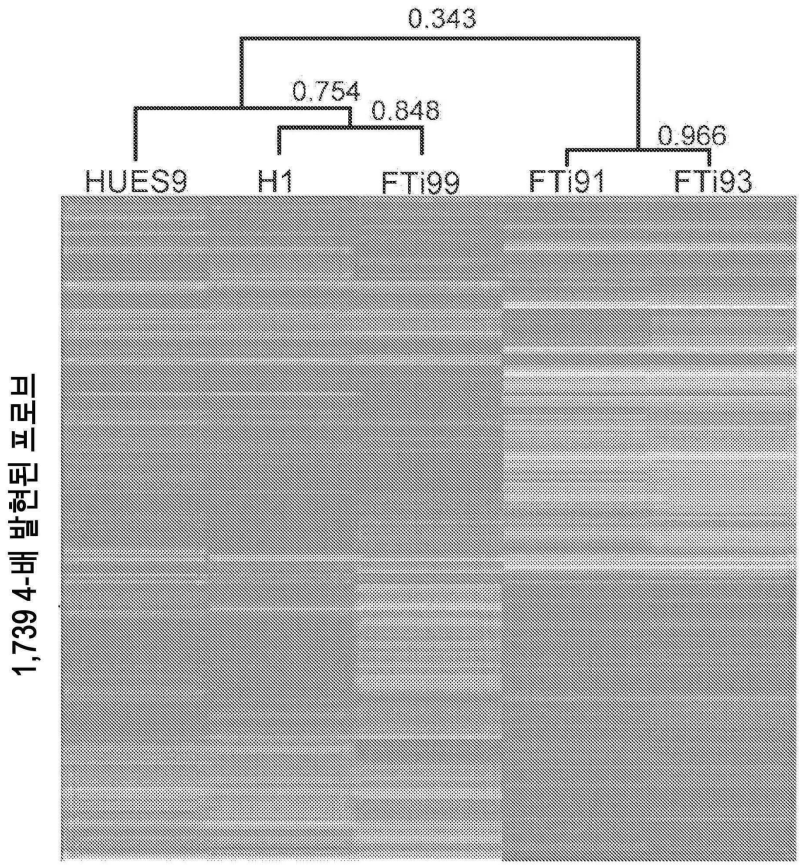
도면7a



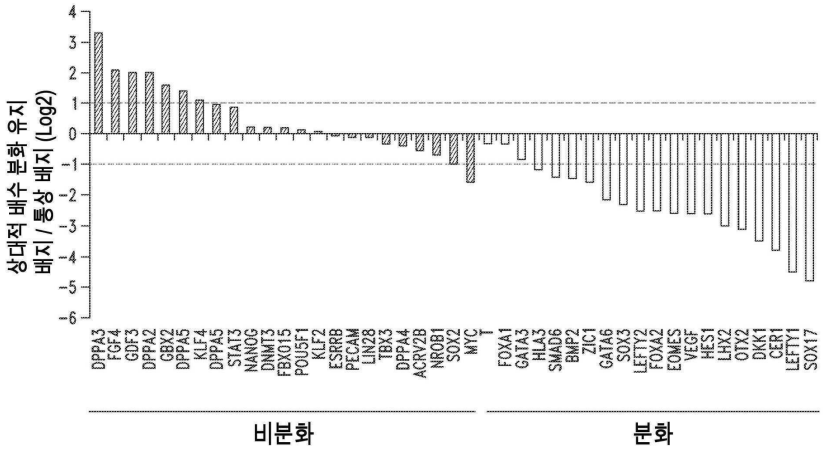
도면7b



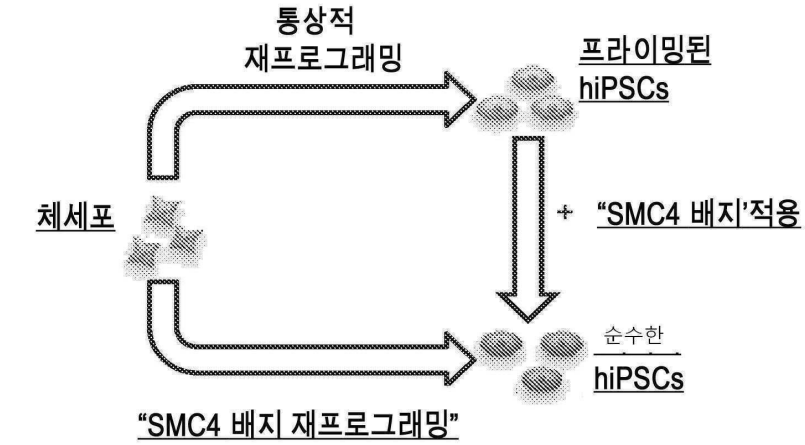
도면7c


0.343
0.754
0.848
0.966
HUES9
H1
FTi99
FTi91
FTi93
1,739 4-배 발현된 프로브

도면7d

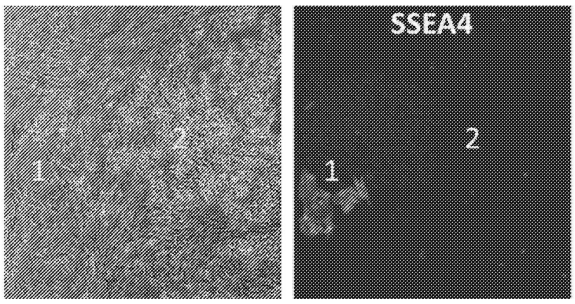

상대적 배수 분화 유지
배지 / 통상 배지 (Log2)
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
DPPA3
FGF4
GDF3
DPPA2
GBX2
DPPA5
KLF4
DPPA5
STAT3
NANOG
DNMT3
FBXO15
POU5F1
KLF2
ESRRB
PECAM
LIN28
TBX3
DPPA4
ACRV2B
NROB1
SOX2
MYC
T
FOXA1
GATA3
HLA3
SMAD6
BMP2
ZIC1
GATA6
SOX3
LEFTY2
FOXA2
EOMES
VEGF
HES1
LHX2
OTX2
DKK1
CER1
LEFTY1
SOX17
비분화
분화

도면7e

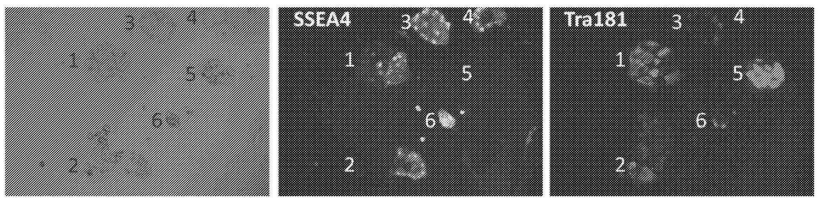


순수한 상태 (Naïve State)
- 장기간 FF & 단세포 배양
- 계통 마커의 감소된 발현
- 개선된 클론형성능
- 게놈 안정성

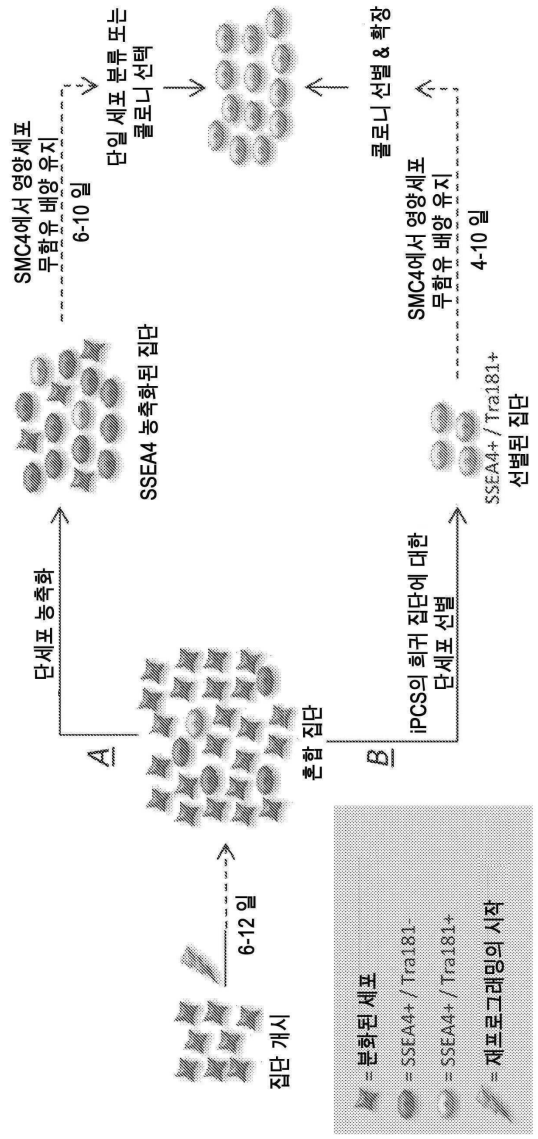
도면8a



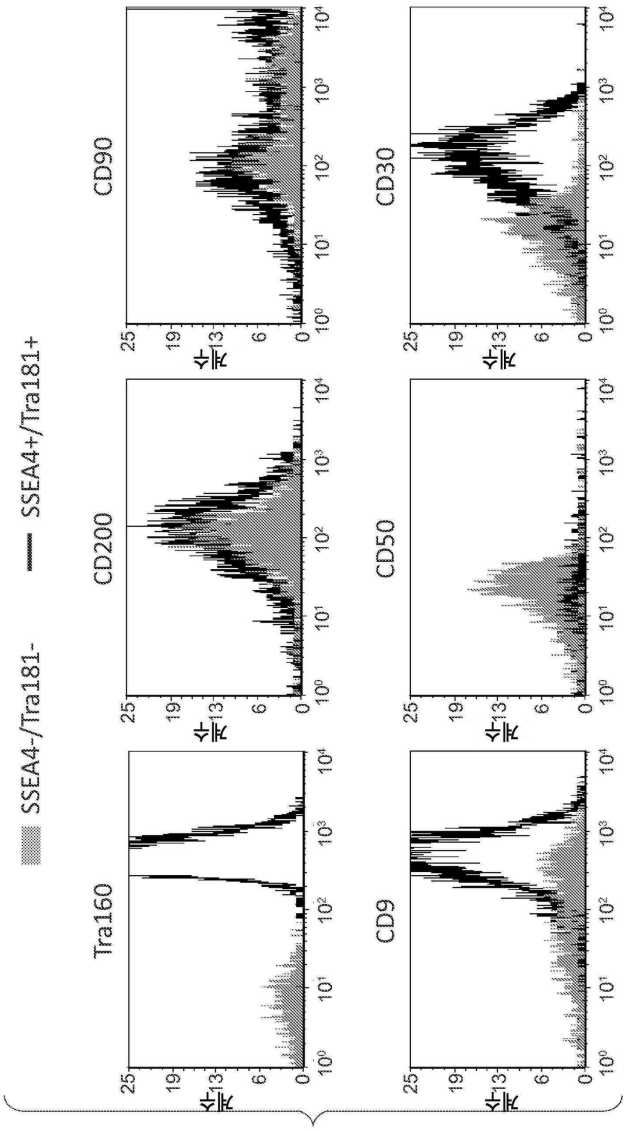
도면8b



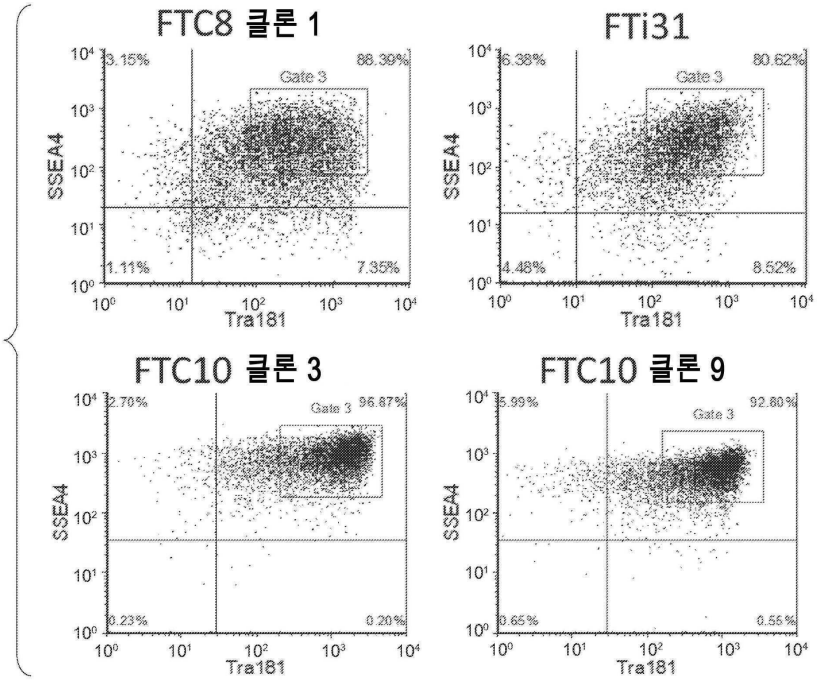
도면9


SMC4에서 영양세포
무함유 배양 유지
6-10 일
단일 세포 분류 또는
콜로니 선택
콜로니 선별 & 확장
SSEA4 농축화된 집단
단세포 농축화
A
혼합 집단
B
iPCS의 희귀 집단에 대한
단세포 선별
SMC4에서 영양세포
무함유 배양 유지
4-10 일
SSEA4+ / Tra181+
선별된 집단
6-12 일
집단 게시
= 분화된 세포
= SSEA4+ / Tra181-
= SSEA4+ / Tra181+
= 재프로그래밍의 시작

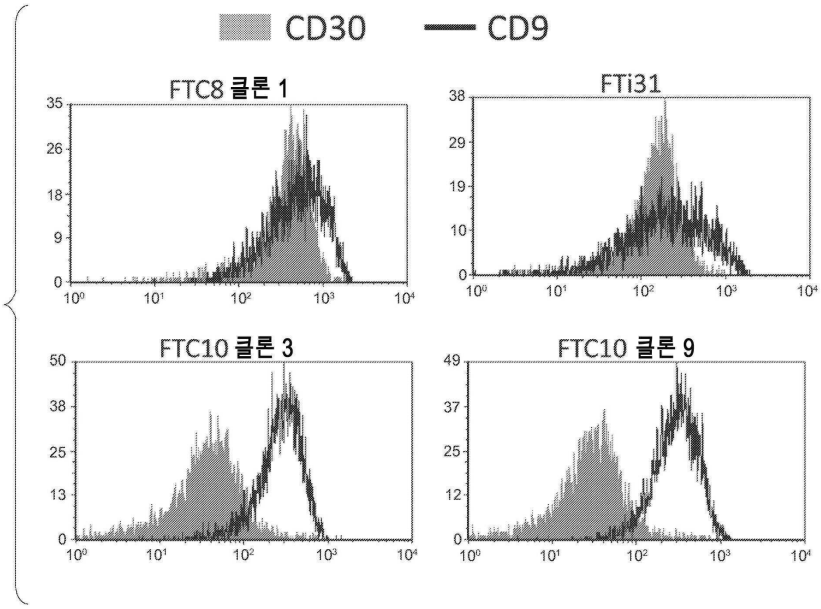
도면10


SSEA4-/Tra181-
SSEA4+/Tra181+
Tra160
CD200
CD90
CD9
CD50
CD30
세포수
25
19
13
6
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

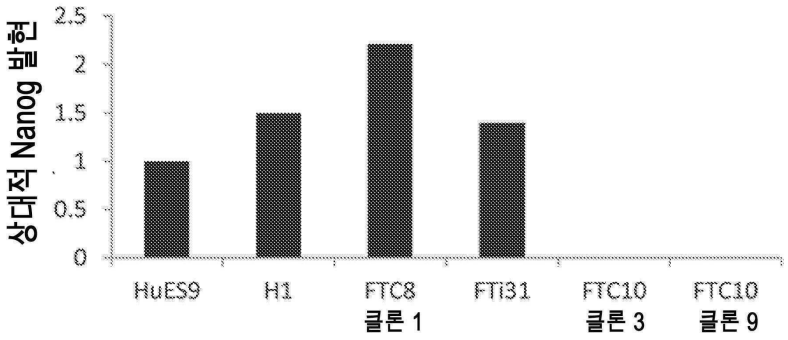
도면11a


FTC8 클론 1
FTi31
FTC10 클론 3
FTC10 클론 9
SSEA4
Tra181
Gate 3
3.15%
88.39%
1.11%
7.35%
6.38%
80.62%
4.48%
8.52%
2.70%
96.87%
0.23%
0.20%
5.99%
92.80%
0.65%
0.55%

도면11b


CD30
CD9
FTC8 클론 1
FTi31
FTC10 클론 3
FTC10 클론 9

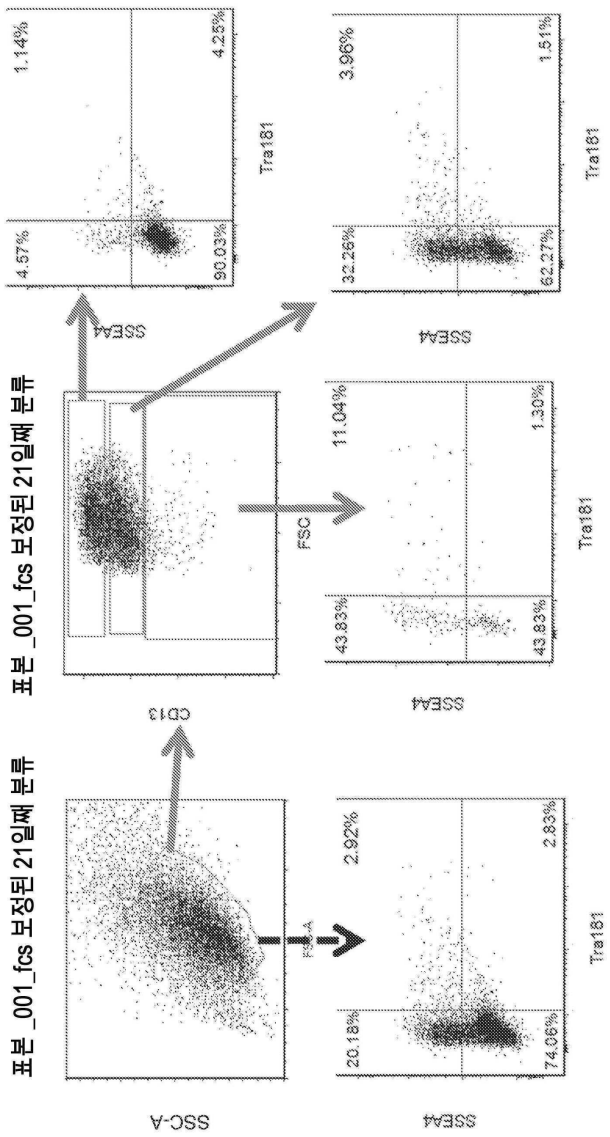
도면11c



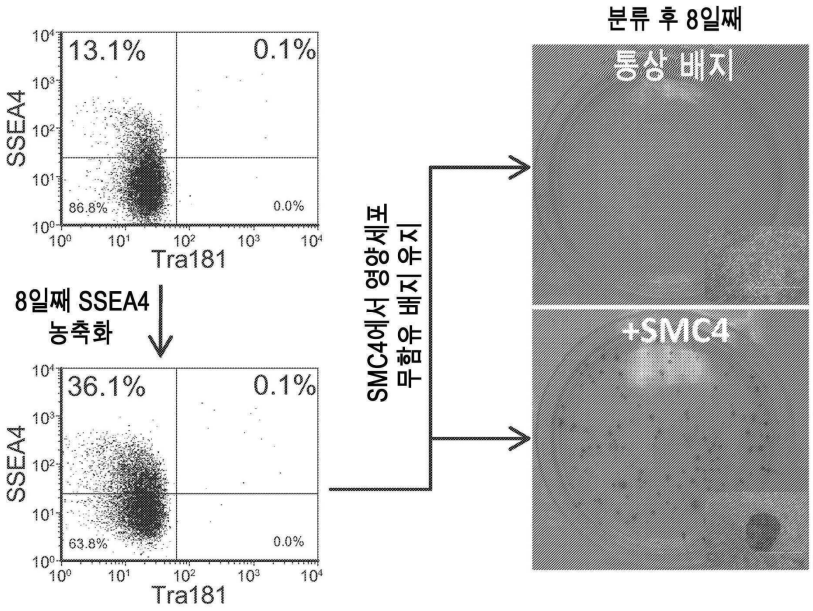
도면11d

클론	CD30 발현	Nanog 발현
FTC8 클론 1	+	+
FTi31	+	+
FTC10 클론 3	-	-
FTC10 클론 9	-	-

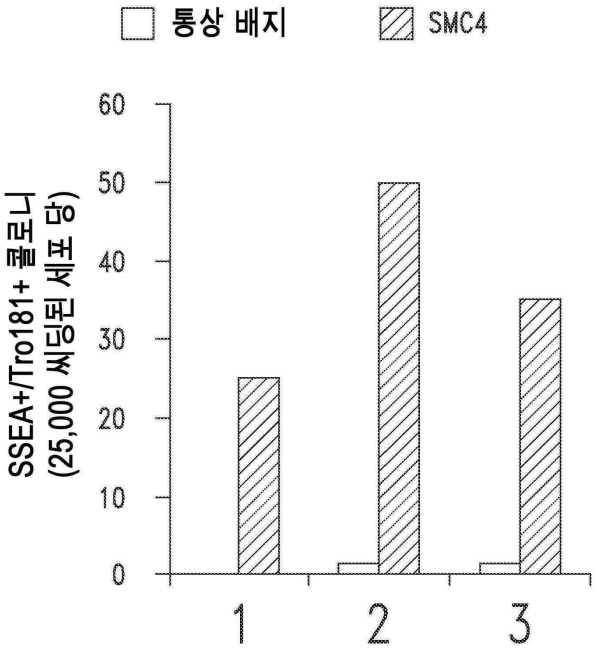
도면12


표본 _001_fcs 보정된 21일째 분류
SSC-A
SSEA4
20.18%
2.92%
74.06%
2.83%
Tra181
CD13
FSC
43.83%
11.04%
43.83%
1.30%
Tra181
SSEA4
32.26%
3.96%
62.27%
1.51%
Tra161
SSEA4
4.57%
1.14%
90.03%
4.25%
Tra181
SSEA4

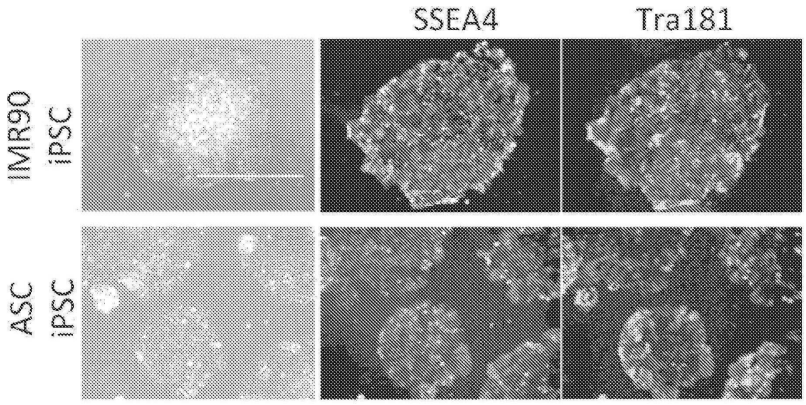
도면13a


분류 후 8일째
13.1%
0.1%
86.8%
0.0%
SSEA4
Tra181
8일째 SSEA4
농축화
36.1%
0.1%
63.8%
0.0%
SSEA4
Tra181
SMC4에서 영양세포
무함유 배지 유지
통상 배지
+SMC4

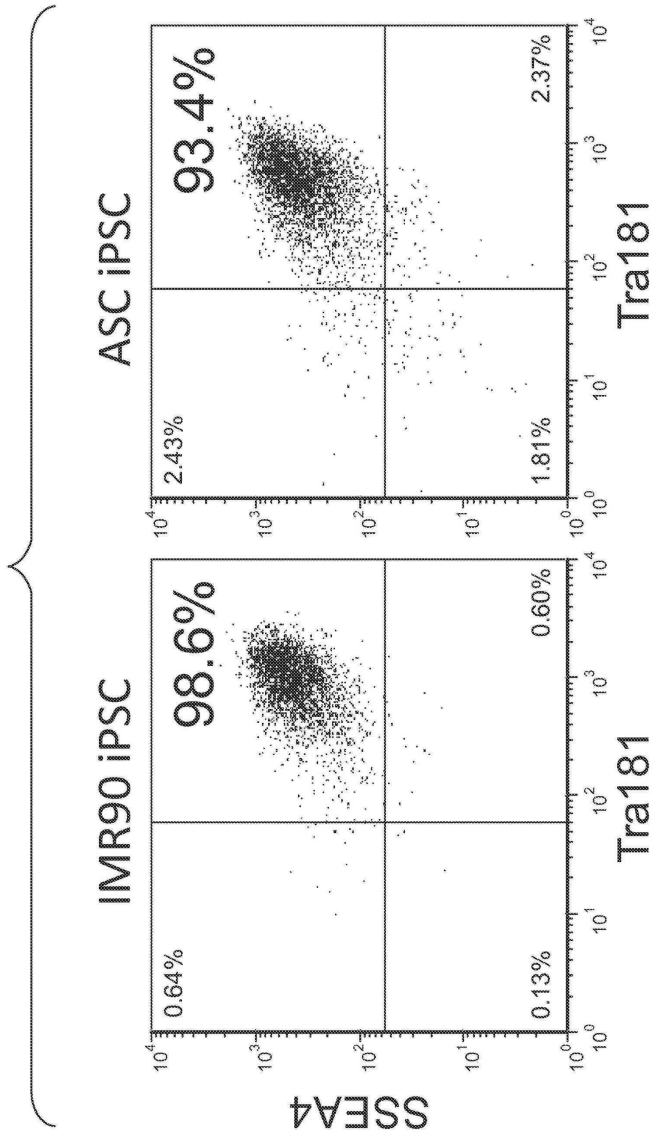
도면13b


통상 배지
SMC4
SSEA+/Tro181+ 콜로니
(25,000 씨딩된 세포 당)
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3

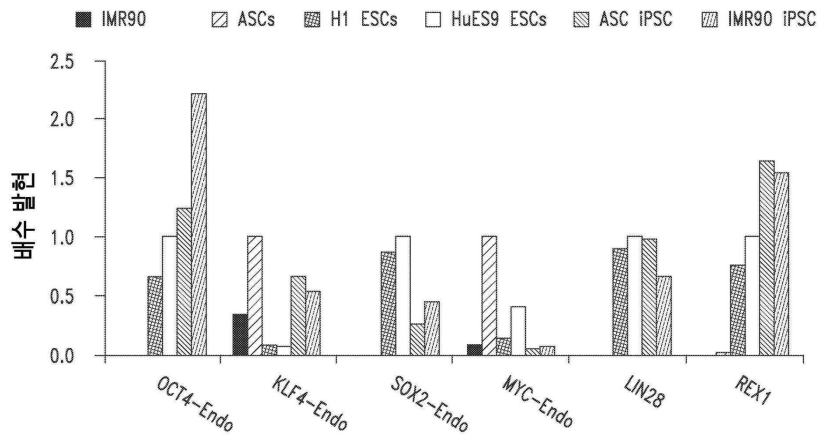
도면13c


SSEA4
Tra181
IMR90 iPSC
ASC iPSC

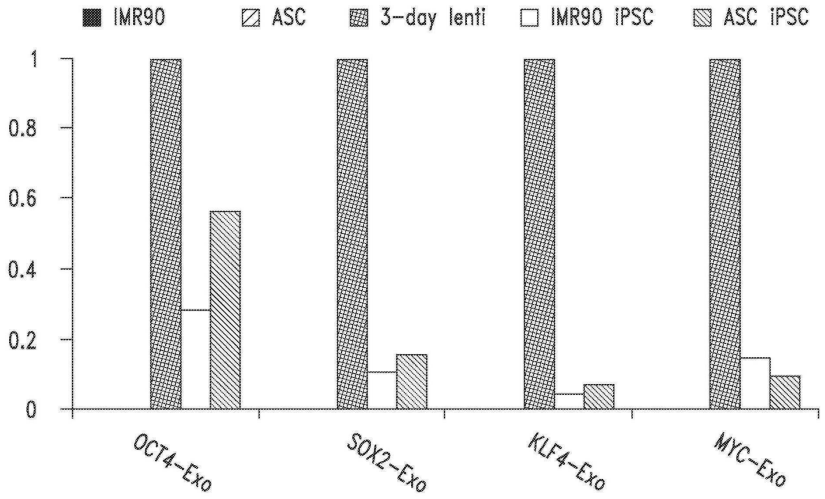
도면13d


IMR90 iPSC
98.6%
0.64%
0.60%
0.13%
ASC iPSC
93.4%
2.43%
2.37%
1.81%
SSEA4
Tra181
Tra181

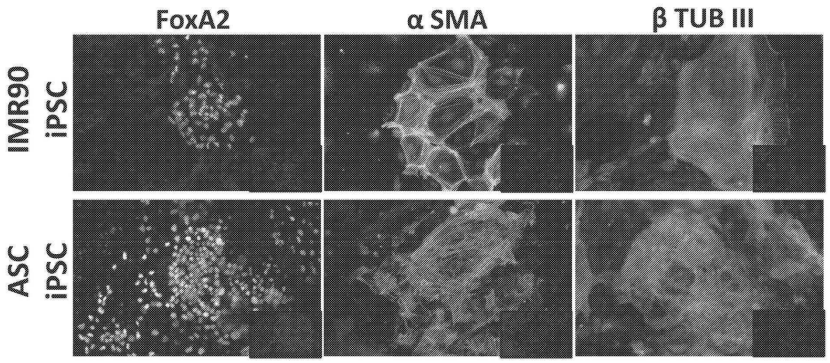
도면13e



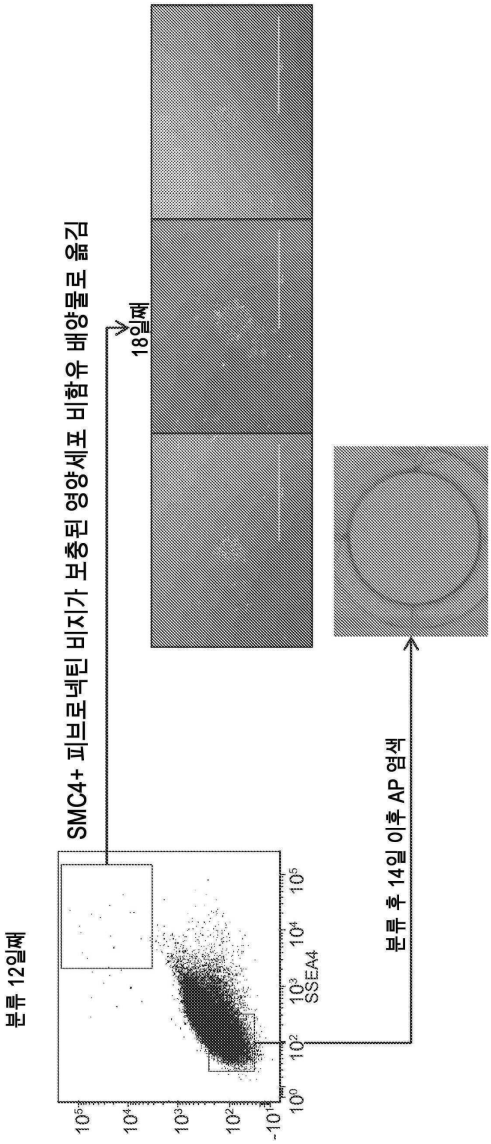
도면13f



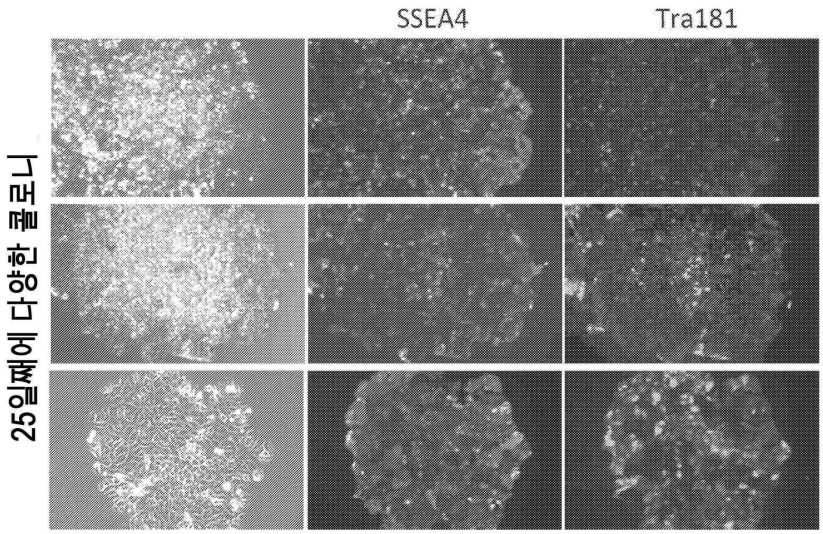
도면13g



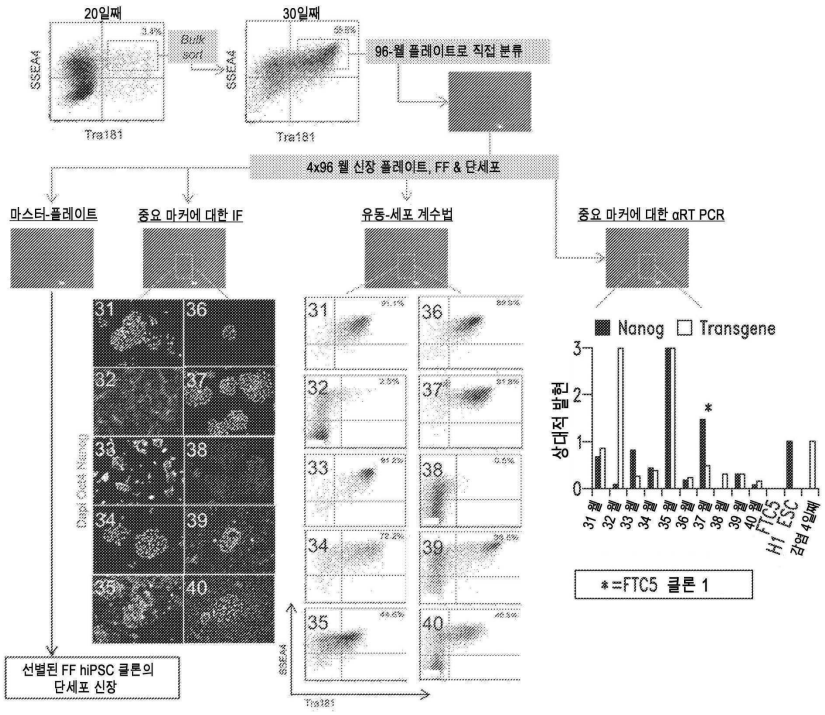
도면14a


분류 12일째
SMC4+ 피브로넥틴 비지가 보충된 영양세포 비함유 배양물로 옮김
18일째
분류 후 14일 이후 AP 염색
SSEA4

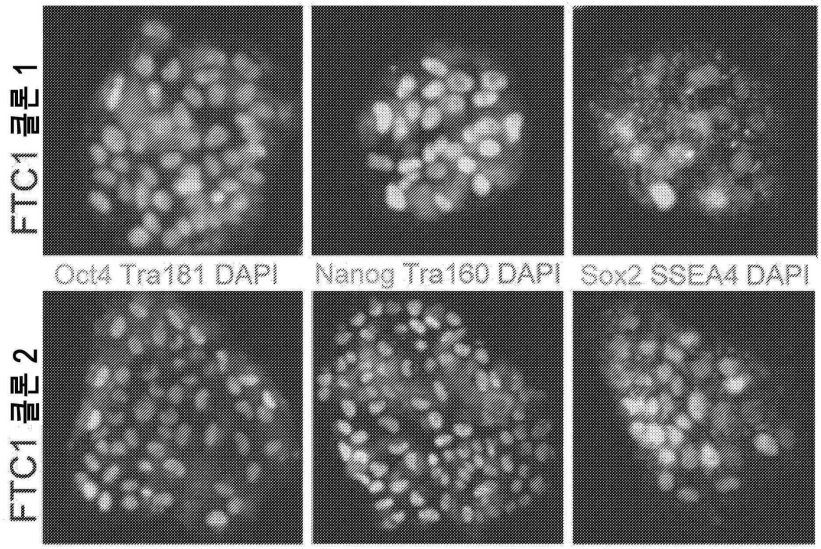
도면14b


SSEA4
Tra181
25일째에 다양한 콜로니

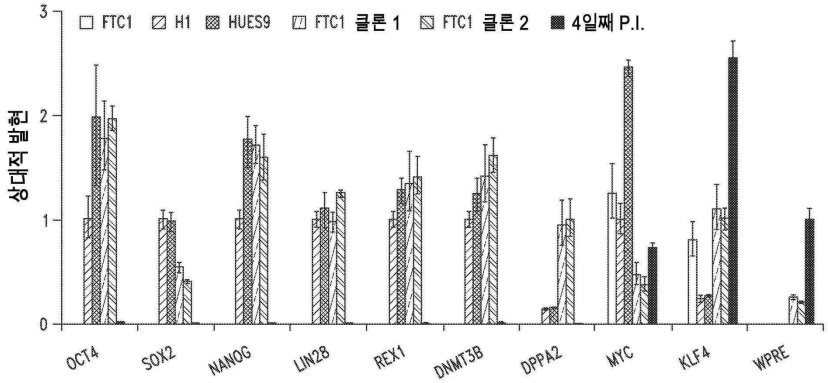
도면15


20일째
30일째
Bulk sort
SSEA4
Tra181
96-웰 플레이트로 직접 분류
4x96 웰 신장 플레이트, FF & 단세포
마스터-플레이트
중요 마커에 대한 IF
유동-세포 계수법
중요 마커에 대한 qRT PCR
Dapi Oct4 Nanog
Nanog
Transgene
상대적 발현
*=FTC5 클론 1
선별된 FF hiPSC 클론의 단세포 신장

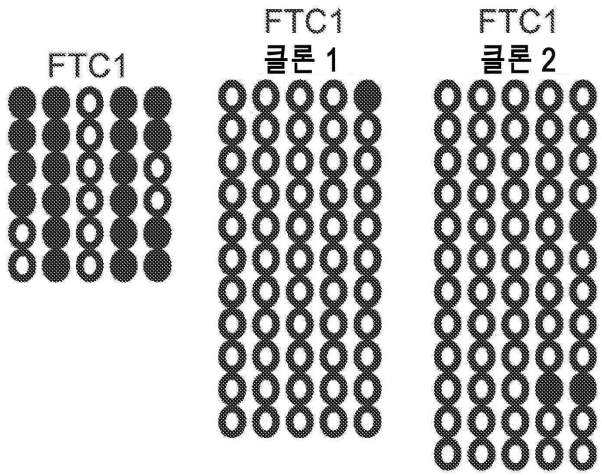
도면16a


FTC1 클론 1
FTC1 클론 2
Oct4 Tra181 DAPI
Nanog Tra160 DAPI
Sox2 SSEA4 DAPI

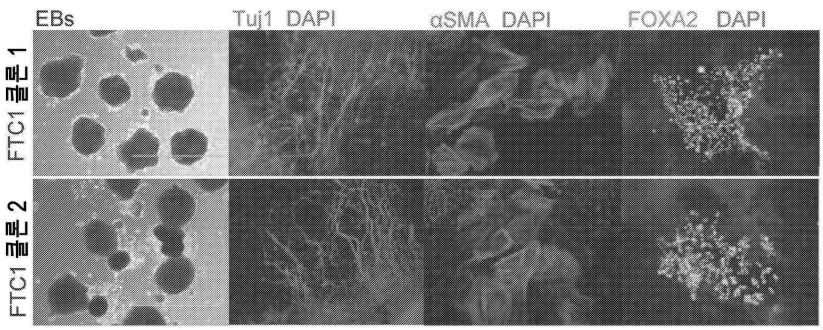
도면16b



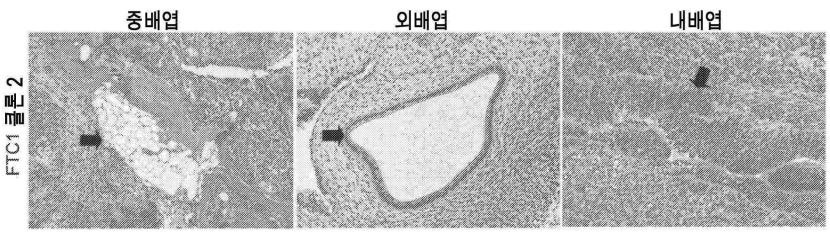
도면16c



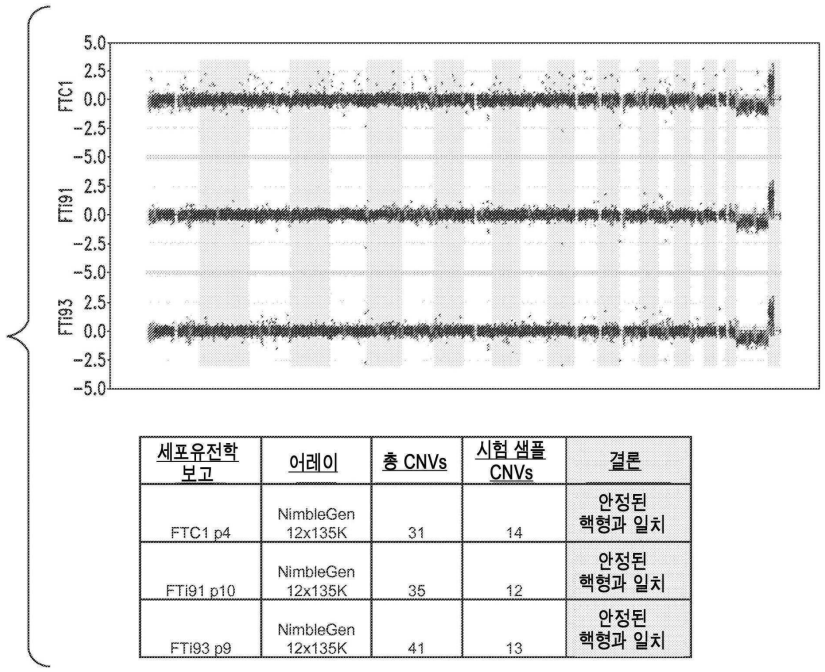
도면16d



도면16e

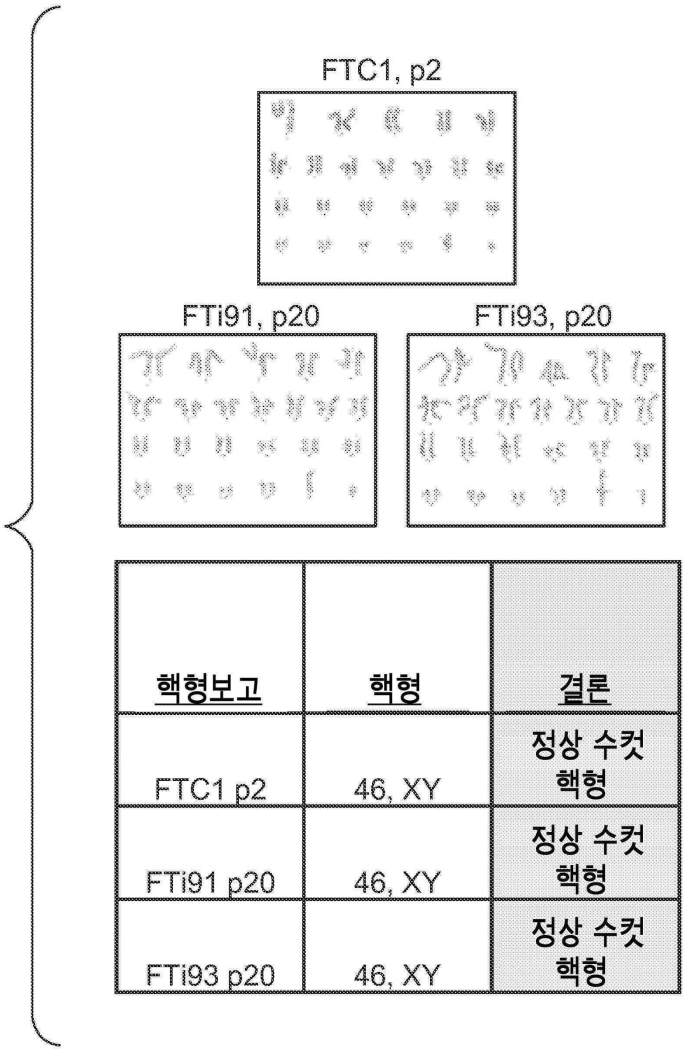


도면17a



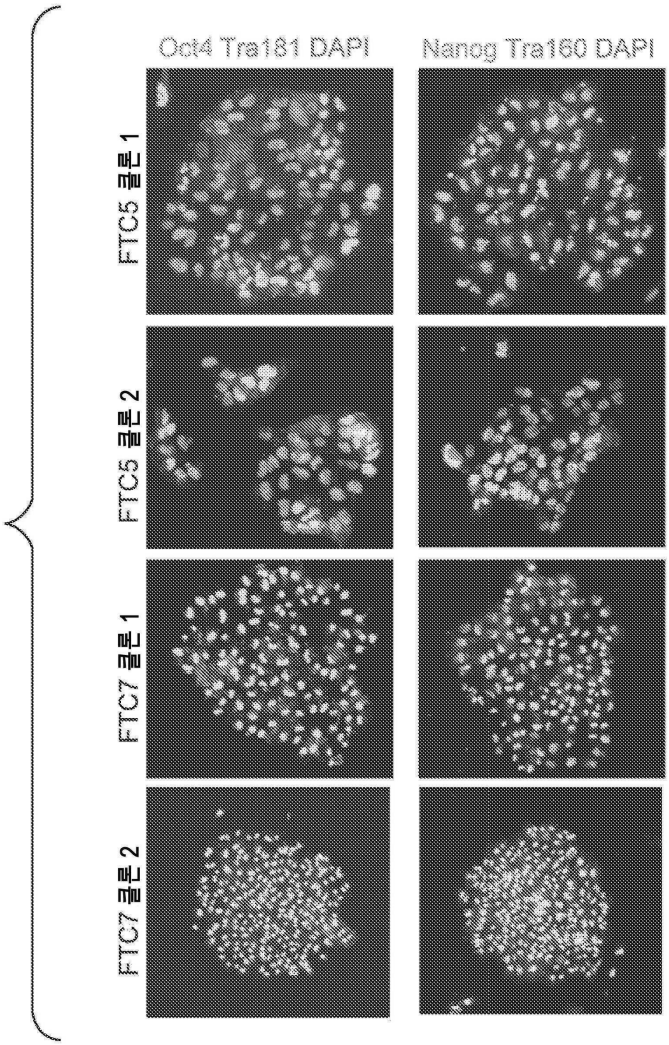
세포유전학 보고	어레이	총 CNVs	시험 샘플 CNVs	결론
FTC1 p4	NimbleGen 12x135K	31	14	안정된 핵형과 일치
FTi91 p10	NimbleGen 12x135K	35	12	안정된 핵형과 일치
FTi93 p9	NimbleGen 12x135K	41	13	안정된 핵형과 일치

도면17b

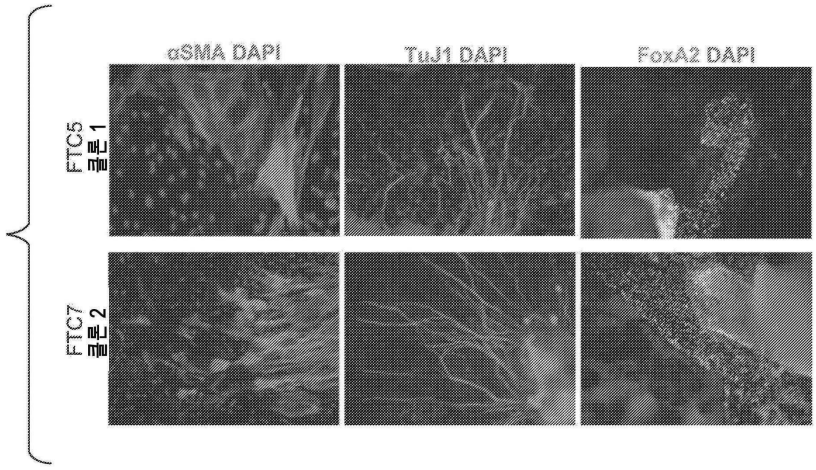


핵형보고	핵형	결론
FTC1 p2	46, XY	정상 수컷 핵형
FTi91 p20	46, XY	정상 수컷 핵형
FTi93 p20	46, XY	정상 수컷 핵형

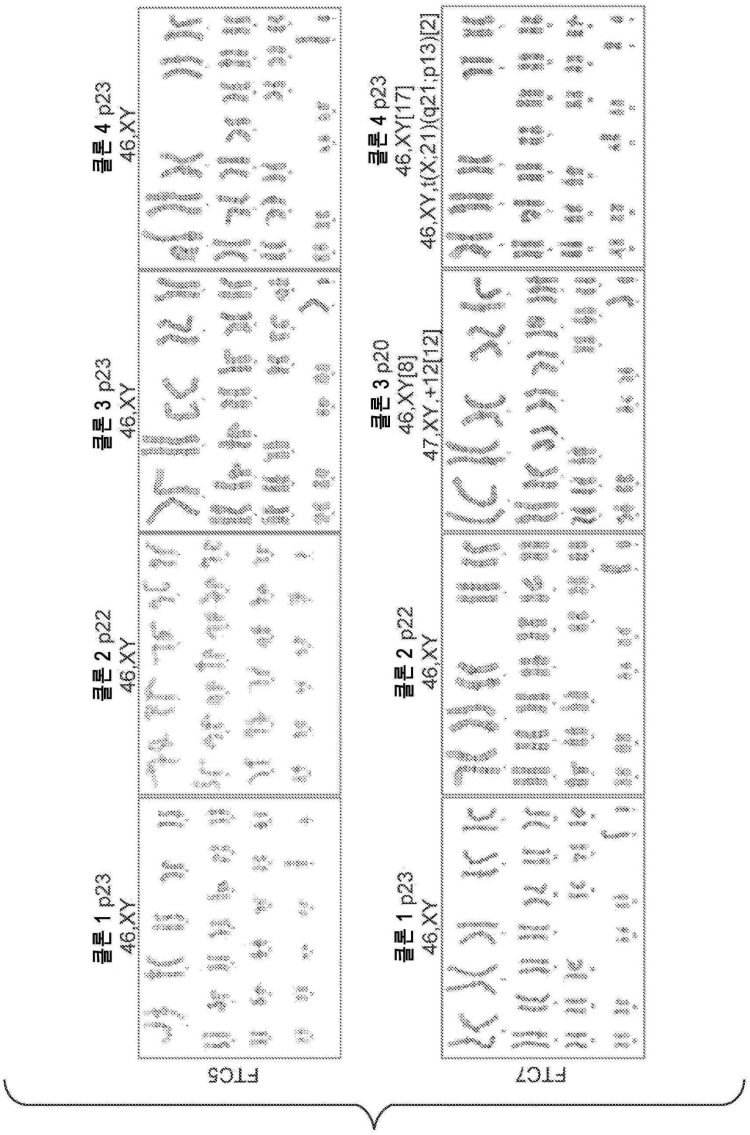
도면18a


Oct4 Tra181 DAPI
Nanog Tra160 DAPI
FTC5 클론 1
FTC5 클론 2
FTC7 클론 1
FTC7 클론 2

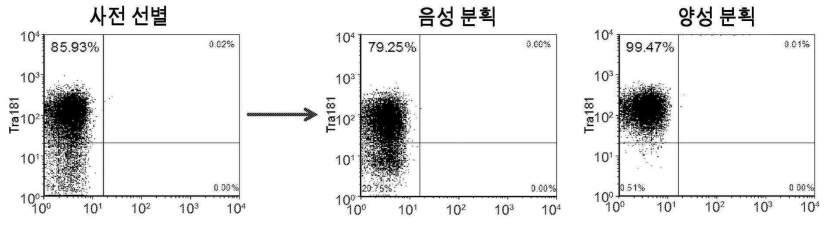
도면18b


αSMA DAPI
TuJ1 DAPI
FoxA2 DAPI
FTC5 클론 1
FTC7 클론 2

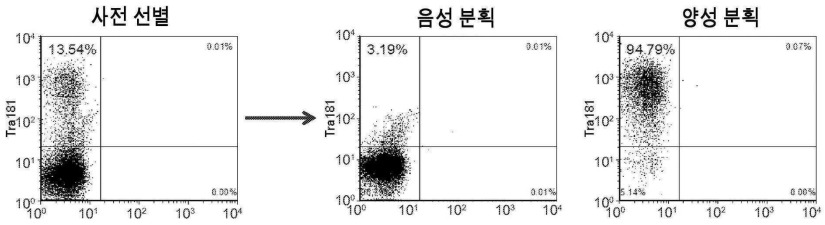
도면18c



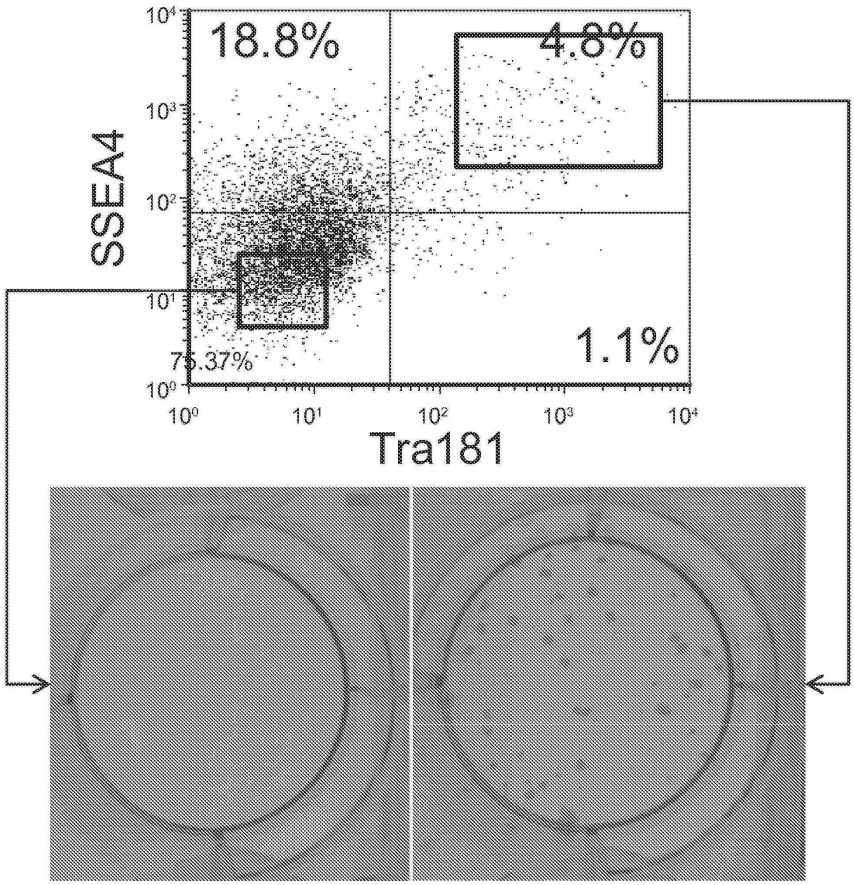
도면19a



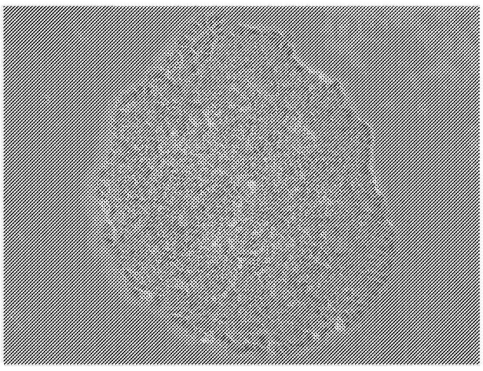
도면19b



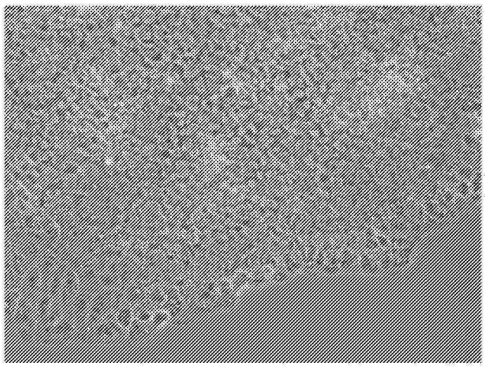
도면20



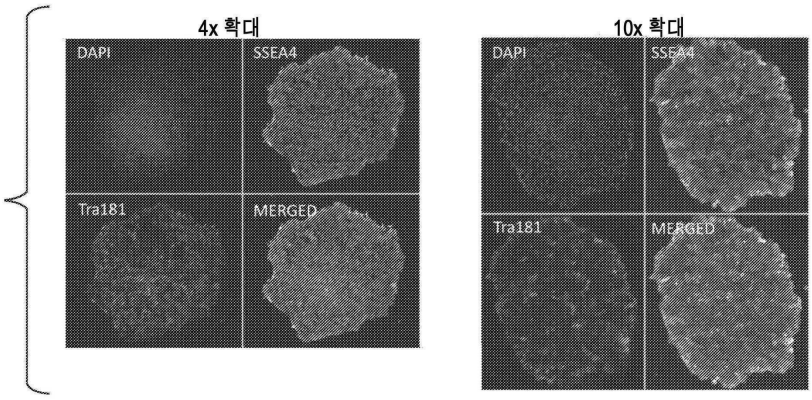
도면21a



도면21b



도면21c



서 열 목 록

<110> FATE THETAPEUTICS, INC.

<120> CELL CULTURE PLATFORM FOR SINGLE CELL SORTING AND ENHANCED REPROGRAMMING OF IPSCS

<130> IPA130591-US-D1D1

<150> US 61/426,369

<151> 2010-12-22

<150> US 61/496,991

<151> 2011-06-14

<160> 17

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trangenic Oct4 forward primer

<400> 1

ctggttggag ggaaggtaat ctag 24

<210> 2

<211> 26

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transgenic Oct4, Klf4, Myc, Lin28, Sox2 and Nanog reverse primer

<400> 2

ttttgtaatc cagaggttga ttgttc 26

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transgenic Oct4, Klf4, Myc, Lin28, Sox2 and Nanog Probe

<400> 3

ccccgacgcg tct 13

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transgenic Klf4 forward primer

<400> 4

gccttacaca tgaagaggca ttt 23

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transgenic Myc forward primer

<400> 5

tcttgtgcgt aactcgagtc tagag 25

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transgenic Lin28 forward primer

<400> 6

ccggaggcac agaattgac 19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transgenic Sox2 forward primer

<400> 7

cactgcccct ctcacacatg 20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transgenic Nanog forward primer

<400> 8

catgcaacct gaagacgtgt aa 22

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endogenous Oct4 forward primer

<400> 9

gggtttttgg gattaagttc ttca 24

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endogenous oct4 reverse primer

<400> 10

gcccccaccc tttgtgtt 18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endogenous Oct4 probe

<400> 11

tcactaagga aggaattg 18

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endogenous Klf4 forward primer

<400> 12

agcctaaatg atggtgcttg gt 22

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endogenous Klf4 reverse primer

<400> 13

ttgaaaactt tggcttcctt gtt 23

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endogenous Klf4 probe

<400> 14

agtcttggtt ctaaaggtac c 21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engogenous Nanog forward primer

<400> 15

tgatgcccat ccagtcaatc t 21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endogenous nanog reverse primer

<400> 16

cctcgctgat taggctccaa 20

<210> 17

<211> 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endogenous nanog probe

<400> 17

000