



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월27일
(11) 등록번호 10-1871192
(24) 등록일자 2018년06월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) *C12N 15/85* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0696 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7005088(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2009년06월04일
심사청구일자 2016년03월28일
- (85) 번역문제출일자 2016년02월25일
- (65) 공개번호 10-2016-0025045
- (43) 공개일자 2016년03월07일
- (62) 원출원 특허 10-2010-7029686
원출원일자(국제) 2009년06월04일
심사청구일자 2013년11월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2009/046209
- (87) 국제공개번호 WO 2009/149233
국제공개일자 2009년12월10일
- (30) 우선권주장
61/058,858 2008년06월04일 미국(US)
61/160,584 2009년03월16일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
Goldman, Bruce., 「Embryonic Stem Cells 2.0」, *Nature Reports Stem Cells*, 1 May 2008
(<http://www.nature.com/stemcells/2008/0805/080501/full/stemcells.2008.67.html>)
Ren, C. et al., *Stem Cells*, 2006;24:1338-1347

(73) 특허권자
후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드
미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 유니버시티 리서치 파크

(72) 발명자
맥 아만다
미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 스템 셀 프로덕츠 인코포레이티드
톰슨 제임스
미국 위스콘신주 53711 매디슨 스위트 200 사이언스 드라이브 525 스템 셀 프로덕츠 인코포레이티드

(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 2 항

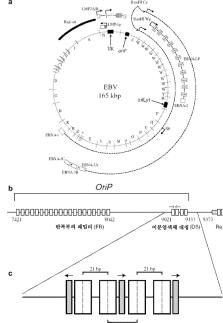
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 비-바이러스 접근법을 사용한 iPS 세포의 생산 방법

(57) 요약

만능 줄기 세포 및 다른 목적 세포 종류의 유도 방법 및 조성물이 개시된다. 예컨대, 특정 관점에서, 본질적으로 벡터가 없는 유도 만능 줄기 세포를 생성하는 방법이 기술된다. 더욱이, 본 발명은 분화 프로그래밍 인자를 발현하기 위해 에피솜성 발현 벡터를 이용하여 외인성 벡터 요소가 본질적으로 없는 유도 만능 줄기 세포 및 목적 세포(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



포 종류를 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12N 2501/60 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2710/16222 (2013.01)
C12N 2800/107 (2013.01)
C12N 2800/108 (2013.01)
C12N 2800/24 (2013.01)
C12N 2820/60 (2013.01)
C12N 2840/105 (2013.01)
C12N 2840/206 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

선택된 사람 개체의 개놈 또는 최종 분화된 사람 세포로부터 유래된 개놈을 포함하는 iPS 세포 집단 중 세포들의 적어도 일부가 에피ゾ임 플라스미드 벡터(episomal plasmid vector)를 포함하고, 상기 iPS 세포 집단 중 1% 미만의 세포들이 외인성 레트로바이러스 요소를 포함하는 iPS 세포 집단으로서,

상기 세포 집단이,

(a) 제1 분화 상태를 갖는 출발 세포 집단을 수득하는 단계;

(b) 상기 에피ゾ임 플라스미드 벡터로서 하나 이상의 분화 프로그래밍 벡터들을 수득하는 단계로서, 상기 각각의 벡터가 Oct4, Sox2, Sox17, Oct4, Nanog, Lin28, c-Myc, Klf4, Esrrb, EBF1, C/EBP α , C/EBP β , Ngn3, Pdx1 및 Mafa로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 분화 프로그래밍 인자들을 암호화하는 하나 이상의 발현 카세트를 포함하고, 상기 인자들은 함께 상기 출발 세포 집단의 분화 상태를 제2 분화 상태로 변경시킬 수 있고, 이때, 하나 이상의 상기 발현 카세트가 상기 복제 오리진에 결합하여 염색체와 주형을 복제하는, EBV의 EBNA-1, 또는 상기 EBNA-1의 잔기 65번 내지 89번의 결실, 상기 EBNA-1의 잔기 90번 내지 328번의 결실, 또는 상기 잔기 결실들 둘다가 있는 EBNA-1의 유도체로부터 선택되는 트랜스-작용 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 상기 출발 세포 집단의 세포가 상기 트랜스-작용 인자를 발현하거나, 하나 이상의 상기 발현 카세트가 상기 트랜스-작용 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 상기 출발 세포 집단의 세포가 상기 트랜스-작용 인자를 발현하는 것인 단계;

(c) 상기 분화 프로그래밍 벡터를 상기 출발 세포 집단의 세포 내로 도입시키는 단계;

(d) 상기 세포를 배양하여, 이 배양된 세포 중의 적어도 일부 세포들에서 제2 분화 상태와 일치하는 형질이 나타나도록 상기 하나 이상의 분화 프로그래밍 인자의 발현을 수행하는 단계; 및

(e) 상기 형질을 가진 세포를 충분한 세대수 동안 추가로 배양하여, 제2 분화 상태를 갖는 세포들을 포함하는 표적 세포 집단으로서, 상기 표적 세포 집단의 1% 미만의 세포가 외인성 레트로바이러스 요소를 포함하는 표적 세포 집단을 제공하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, iPS 세포 집단.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 iPS 세포 집단의 1% 미만의 세포들이 외인성 바이러스 벡터 요소를 포함하는, iPS 세포 집단.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

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

발명의 설명

기술 분야

배경기술

[0001] 본 출원은 2008년 6월 4일에 출원한 미국 출원번호 61/058,858 및 2009년 3월 16일에 출원한 미국 출원번호 61/160,584를 우선권 주장하는 출원으로, 각 전문 명세서는 포기 없이 전문이 참고인용되고 있다.

1. 기술분야

[0003] 본 발명은 일반적으로 분자생물학, 줄기세포 및 분화세포 분야에 관한 것이다. 더 상세하게는, 본 발명은 체세포 및 미분화세포의 분화 프로그래밍(programming) 또는 재프로그래밍(reprogramming)에 관한 것이다.

2. 관련 기술의 설명

[0005] 일반적으로, 줄기세포는 미분화세포이며 성체 기능성 세포의 후손을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 조혈 줄기세포는 여러 종류의 최종 분화된 혈액 세포 중 임의의 세포를 발생시킬 수 있다. 배아 줄기(ES) 세포는 배아에서 유래하고, 만능(pluripotent)이어서, 임의의 기관이나 조직 종류, 또는 적어도 잠재적으로는 완전한 배아로 발달할 가능성을 보유한다.

[0006] 통상 iPS 세포 또는 iPSC로 약칭되는 유도 만능 줄기 (induced pluripotent stem) 세포는 특정 유전자 삽입에

의해, 통상 성체 세포로부터 인위적으로 유도되는 만능 줄기 세포 종류이다. 유도 만능 줄기 세포는 천연 만능 줄기 세포, 예컨대 특정 줄기세포 유전자 및 단백질의 발현, 염색질 메틸화 패턴, 배가 시간, 배상체 형성, 기형종 형성, 생존성 키메라 형성, 및 효능 및 분화능 면에서 배아 줄기 세포와 동일한 것으로 생각하지만, 천연 만능 줄기 세포와의 충분한 관련 정도는 여전히 평가되고 있다.

[0007] iPS 세포는 2006년(Takahashi et al., 2006)에 마우스 세포로부터, 2007년에 사람 세포로부터(Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) 처음 생산되었다. 이것은 줄기 세포 연구의 중요한 진보로 인용되었는데, 그 이유는 연구자들이 논란이 되는 배아 사용 없이 연구에 중요하고 잠재적으로 치료 용도가 있는 만능 줄기 세포를 수득할 수 있도록 했기 때문이다.

[0008] 하지만, 이러한 유도 만능 줄기(iPS) 세포 연구의 이 단계에서, 연구자들은 표적 세포의 계놈으로 유전자를 삽입하는 통합형 바이러스 플라스미드를 이용하며, 이는 삽입 부위에 돌연변이를 도입시킬 가능성이 있다. 따라서, 외인성 바이러스 성분이 본질적으로 없는 만능 줄기 세포를 유도하는 방법의 개발이 필요하다.

[0009] 또한, 세포 치료법과 조직 이식의 의학적 잠재성이 상당하기 때문에, 이용가능한 세포 집단의 세포 분화 상태를 변경시킴에 의한 임의의 바람직한 세포 종류의 생산이 절실히 요구되고 있다. 유기체의 각 특정 세포 종류는 그 종의 계놈을 구성하는 전체 유전자의 하위집단(subset)을 발현한다. 각 세포 종류는 조절된 유전자 패턴의 특정 패턴에 의해 정의된다. 따라서, 세포 분화는 한 세포 종류에서 다른 세포 종류로의 세포 전이이며, 유전자 발현의 한 패턴에서 다른 패턴으로의 전환을 수반한다. 발달 동안 세포 분화는 유전자 조절 네트워크(gene regulatory network)의 결과로 이해할 수 있다. 조절 유전자 및 이의 시스(cis)-조절 모듈은 유전자 조절 네트워크의 마디이고; 이들은 입력을 받고 이 네트워크 내의 다른 곳에서 출력을 창출한다. 또한, 이와 유사한 기전은 예컨대 전술한 체세포로부터 만능성을 유도하는 탈분화, 및 특히 분화된 한 세포 종류의 다른 세포 종류로의 변형을 의미하는 전환분화(transdifferentiation)에도 적용할 수 있다. 분화 상태를 변환시키기 위해, 발달 선택을 조절하는 전사 인자가 연구되었고; 하지만, 역시 바이러스 벡터가 널리 사용되고 있다. 따라서, 개량된 무바이러스성 분화 프로그래밍 방법이 필요한 실정이다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 분화 프로그래밍에 의해 본질적으로 외인성 벡터 요소가 없는 유도 만능 줄기 세포 및 다른 목적 세포 종류를 제공하는데 있어서, 당업계의 주요 결함을 극복하기 위한 것이다. 제1 양태로, 본 발명은 유도 만능 줄기(iPS) 세포 집단의 생산 방법으로, a) 벡터 요소가 복제 오리진과 iPS 재프로그래밍 인자를 암호화하는 하나 이상의 발현 카세트를 함유하는 재프로그래밍 벡터를 수득하는 단계; b) 재프로그래밍 벡터를 체세포 집단 세포 내로 도입시키는 단계; c) 이 세포를 배양하여 집단을 증량시키는 단계; d) 증량된 집단의 후손 세포를 배아 줄기 세포의 하나 이상의 특징을 나타내는 것으로 선택하는 단계; 및 e) 선택된 후손 세포를 배양하여 iPS 세포 집단을 제공하는 단계를 포함하고, 상기 하나 이상의 발현 카세트가 염색체외 주형을 복제하는 복제 오리진에 결합하는 트랜스-작용 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/하거나 체세포가 상기 트랜스-작용 인자를 발현하는 방법을 제공한다. 추가 관점에서, 단계 c 또는 단계 e는 추가로 벡터 요소가 본질적으로 없을 때까지 세포를 배양하는 단계를 포함하거나, 또는 무벡터 iPS 세포의 발생을 용이하게 하는 이하에 기술하는 추가 선택 단계를 포함한다.

[0011] 특정 관점에서, 염색체외 주형을 복제하기 위해, 하나 이상의 발현 카세트는 복제 오리진에 결합하는 트랜스-작용 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나; 대안적으로, 체세포가 복제 오리진에 결합하는 트랜스-작용 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0012] 예시적 양태에서, 복제 오리진은 림프영양성 헤르페스 바이러스 또는 감마헤르페스바이러스, 아데노바이러스, SV40, 소 유두종 바이러스 또는 효모의 복제 오리진, 예컨대 EVB의 oriP에 상응하는 감마헤르페스바이러스 또는 림프영양성 헤르페스 바이러스의 복제 오리진일 수 있다. 추가 관점에서, 림프영양성 헤르페스 바이러스는 앰스타인 바 바이러스(EBV), 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV), 헤르페스 바이러스 사이미리(HS) 또는 마렉병 바이러스(MDV)일 수 있다. 또 다른 관점에서, 감마헤르페스바이러스는 앰스타인 바 바이러스(EBV) 또는 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV)일 수 있다.

[0013] 특정 양태에서, 트랜스-작용 인자는 바람직하게는 EBV의 OriP에 상응하는 복제 오리진의 존재 하에, EBV의 EBNA-1에 상응하는 야생형 단백질에 상응하는 폴리펩타이드 또는 야생형 단백질의 유도체이다. 이 유도체는 야생형 EBNA-1에 비해 통합된 주형 유래의 전사를 활성화하는 능력이 감소되어, 발암성 형질전환을 일으키는 염색체 유전자를 이소성 활성화하는 기회가 감소된 것일 수 있다. 한편, 유도체는 복제 오리진에 결합한 후 염색체

외 주형으로부터 상응 야생형 단백질 활성의 적어도 5%의 전사 활성화를 나타낼 수 있다. 이러한 유도체는 야생형 EBNA-1의 잔기 약 65번 내지 약 89번에 상응하는 잔기의 결실을 보유할 수 있고(서열번호 1은 야생형 EBNA-1 단백질 서열을 가리키고, 이는 서열번호 2에 의해 암호화됨)/있거나 EBNA-1(서열번호 1)의 잔기 약 90번 내지 약 328번에 상응하는 잔기의 결실을 보유하거나, 또는 EBNA-1(서열번호 1)의 잔기 1번 내지 약 40번 및 잔기 약 328번 내지 641번과 적어도 80%의 아미노산 서열 동일성이 있는 유도체일 수 있다. 야생형 EBNA-1의 아미노산 90-328번은 본 발명에서 EBNA-1의 기능에 크게 기여하지 않아서, 이 영역에 존재하는 반복부의 수가 가변적일 수 있는(즉, 이 영역은 전부 또는 부분적으로 결실될 수 있다) Gly-Ala 반복부가 풍부한 영역을 포함한다. 야생형 EBNA-1의 예시적 유도체는 서열번호 4에 의해 암호화된 서열번호 3의 서열을 보유할 수 있다.

[0014] 추가 특정 양태에서, 본 발명은 중량된 집단의 후손 세포로, 본질적으로 벡터 요소가 없는 후손 세포를 선택하는 추가 단계를 수반한다. 이러한 선택적인 추가 선택 단계는, Or iP-기반 벡터와 같은 염색체의 복제 벡터가 경시적으로, 예컨대 형질감염 후 2주 동안 세포로부터 사라지고 iPS 세포가 자기-유지성 만능 상태로 들어간 후 외인성 재프로그래밍 인자를 필요로 하지 않기 때문에, 무벡터 만능 줄기 세포의 발생 가속화를 도울 수 있다. 따라서, 이 추가 단계는 후손 세포가 자기-지속성 만능 상태가 된 후에 한 때, 예컨대 재프로그래밍 벡터가 세포 내로 도입된 후 적어도 약 10일 내지 적어도 약 30일일 수 있다. 벡터 요소-제거된 iPS 세포를 발생시키는 공정을 촉진하기 위해 재프로그래밍 벡터는 추가로 음성 선택 마커를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 추가 단계는 상기 선택 마커를 함유하는 후손 세포를 선택 제제로 제거함으로써 중량 집단의 후손 세포를 선택한다. 예를 들어, 선택 마커는 키나제를 암호화하는 잔류 벡터를 보유한 세포를 제거하기 위해 간사이클로비어(gancyclovir)와 같은 선택 제제의 적용을 가능하게 하는 헤르페스 단순 바이러스-티미딘 키나제를 암호화할 수 있다. 특정 관점에서, 본 방법에 의해 발생된 iPS 세포 집단은 본질적으로 선택 마커가 없는 것이다. 대안적인 또는 보완적인 접근법은 종래 방법, 예컨대 RT-PCR, PCR, FISH(Fluorescent in situ hybridization), 유전자 어레이 또는 하이브리드화(예: 서던 블롯)를 이용하여 후손 세포에서 외인성 유전 요소의 부재를 검사하는 것이다.

[0015] 일부 양태에서, 상기 방법들에 의해 발생된 iPS 세포 집단은 본질적으로 통합된 재프로그래밍 벡터 유전자 요소가 없거나, 또는 본질적으로 벡터 유전자 요소가 없을 수 있다.

[0016] 추가 관점에서, 재프로그래밍 벡터는 리포좀 형질감염, 전기침투, 입자 충격, 인산칼슘, 다중양이온 또는 다중 음이온을 이용하거나, 또는 외인성 유전 요소를 세포 내로 도입시키는데 적당한 임의의 방법을 이용하여 세포 내로 도입시킬 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 체세포는 포유동물에서 유래하거나, 또는 더 구체적으로 사람에서 유래할 수 있다. 체세포는 최종 분화 세포, 또는 조직 줄기 세포일 수 있고, 그 예로 섬유아세포, 조혈 세포 또는 중간엽 세포일 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예를 들어, 체세포는 섬유아세포이다. 체세포는 조직세포 은행에서 유래하거나 또는 선택된 사람 피검체, 구체적으로 살아있는 사람에서 유래할 수 있다. 이러한 체세포의 후손 유래의 개념은 특정 근원, 예컨대 선택된 사람 개체의 상기 체세포로부터 유래된 것으로 생각할 수 있다.

[0018] 일부 다른 관점에서, 후손 세포는 하나 이상의 배아 줄기 세포 특성, 예컨대 미분화 형태, 배아 줄기 세포 특이적 마커 또는 만능성 또는 다중 직계성 분화능 또는 당업계에 공지된 임의의 특성에 대해 선택될 수 있다. 구체적으로, 후손 세포는 편의성 때문에 미분화 형태에 대해 선택될 수 있다. 배아 줄기 세포 특이적 마커는 SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 또는 Tra-1-81, Tra-2-49/6E, GDF3, REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4 및 hTERT로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 특이적 마커일 수 있다. 이러한 선택 단계는 세포가 만능 상태이고 분화 상태로 환원하지 않도록 하기 위해 형질감염 후 한 시점보다 많은 시점에서 이용할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 특정 관점에서, 양성 선택 마커는 당업계에 공지되어 있고, 자기-지속성 만능 상태의 확립에 충분한 시간 기간 후 형질감염된 세포의 농도 또는 형질감염 효율을 향상시키기 위해 본 발명의 방법과 조성물에 이용할 수 있다. 예를 들어, 일부 관점에서, 재프로그래밍 벡터는 추가로 항생제 내성 인자(예: 네오마이신 또는 하이그로마이신 내성 마커) 또는 형광 또는 발광 단백질(예: GFP, RFP, CFP 등)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 같은 양성 선택 마커를 포함할 수 있다. 체세포에 재프로그래밍 벡터가 도입된 후, 양성 선택 마커의 이용은 재프로그래밍 벡터를 보유하는 세포의 농축을 도울 수 있다. 하지만, 이 단계는 선택적이며, 형질감염 효율 및 벡터 상실율에 따라 달라진다. 형질감염 효율이 높다면(예컨대, 90% 이상), 이 벡터 상실은 세포가 자기-지속성 만능 상태를 확립하기에 충분하게 느려서, 이 양성 선택이 필요하지 않을 수도 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, iPS 재프로그래밍 인자는 Sox 패밀리 중 적어도 하나의 구성원 및 Oct 패밀리 중 적어도 하나의 구성원을 포함할 수 있고, 구체적으로 Sox-2 및 Oct-4를 포함할 수 있다. Sox 및 Oct는 ES

세포 동일성을 특정하는 전사 조절 계층에서 중심인 것으로 생각된다. 추가 인자는 재프로그래밍 효율을 증가시킬 수 있고, 그 예로는 Sox-2, Oct-4, Nanog 및 경우에 따라 Lin-28을 포함하는 세트; 또는 Sox-2, Oct-4, Klf 및 경우에 따라 c-Myc를 포함하는 세트가 있다.

[0021] 상기 방법의 일부 다른 관점에서, 단계 d는 자기-지속성 만능 상태를 확립하는데 필요한 시간 기간이 적어도 8일 내지 적어도 30일의 범위이거나, 또는 단계 b 이후 상기 범위 중 임의의 중간 일수의 기간일 수 있다.

[0022] 당업자는 발현 카세트가 프로모터 또는 인핸서와 같은 전사 조절인자에 작동가능하게 결합되어 있을 수 있음을 이해할 것이다.

[0023] 추가 관점에 따르면, 복제 오리진과 염색체외 주형을 복제하기 위해 상기 복제 오리진에 결합하는 트랜스-작용 인자를 암호화하는 하나 이상의 발현 카세트; 및 iPS 재프로그래밍 인자를 포함하는 재프로그래밍 벡터도 개시된다. iPS 재프로그래밍 인자는 Sox 및 Oct, 더 구체적으로 Sox-2 및 Oct-4, 예컨대 Sox-2, Oct-4, Nanog 및 경우에 따라 Lin-28을 함유하는 세트; 또는 Sox-2, Oct-4, Klf 및 경우에 따라 c-Myc를 함유하는 세트를 포함할 수 있다.

[0024] 재프로그래밍 벡터의 특정 관점에서, 재프로그래밍 벡터는 염색체외에서 복제하고/하거나 숙주 세포 계놈 내로 통합되는 능력이 부족하다. 예시적 양태에서, 복제 오리진은 림프영양성 헤르페스 바이러스 또는 감마헤르페스 바이러스, 아데노바이러스, SV40, 소 유두종 바이러스 또는 효모의 복제 오리진, 예컨대 EBV의 oriP에 상응하는 감마헤르페스바이러스 또는 림프영양성 헤르페스 바이러스의 복제 오리진일 수 있다. 추가 관점에서, 림프영양성 헤르페스 바이러스는 앱스타인 바 바이러스(EBV), 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV), 헤르페스 바이러스 사이미리(HS) 또는 마렉병 바이러스(MDV)일 수 있다. 앱스타인 바 바이러스(EBV) 및 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV) 역시 감마헤르페스바이러스의 예이다.

[0025] 재프로그래밍 벡터의 특정 양태에서, 트랜스-작용 인자는 EBV의 EBNA-1에 상응하는 폴리펩타이드 또는 EBV의 EBNA-1에 상응하는 야생형 단백질의 유도체일 수 있다. 이 유도체는 복제 오리진에 결합한 후 염색체외 주형으로부터 상응 야생형 단백질의 5% 이상으로 전사를 활성화하고/하거나 야생형 EBNA-1과 비교했을 때 통합 주형으로부터 전사를 활성화하는 능력이 감소되어, 발암성 형질전환을 일으키는 염색체 유전자를 이소적으로 활성화하는 기회가 감소된 것일 수 있다.

[0026] 유도체의 예로는 통합 주형으로부터 전사를 활성화하는 야생형 EBNA-1 단백질에 존재하는 서열이 없는 유도체, 핵 국재화 서열을 보유하는 유도체, EBNA-1(서열번호 1)의 잔기 약 65번 내지 약 89번에 해당하는 잔기가 결실되고/되거나 EBNA-1(서열번호 1)의 잔기 약 90번 내지 약 328번에 해당하는 잔기가 결실된 유도체, EBNA-1(서열 번호 1)의 잔기 1번 내지 약 40번 및 잔기 약 328번 내지 641번에 대해 적어도 80%의 아미노산 서열 동일성이 있는 유도체, 또는 해당 야생형 EBNA-1의 잔기 1번 내지 약 40번을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 해당 야생형 EBNA-1의 잔기 약 328번 내지 641번을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 유도체를 포함할 수 있다.

[0027] 추가 관점에서, 상기 방법에 따라 생산된 iPS 세포 집단도 제공한다. 또 다른 관점에서, 또한 외인성 레트로바이러스 요소가 본질적으로 없는 iPS 세포 집단 또는 외인성 바이러스 인자 또는 임의의 외인성 핵산 인자, 예컨대 벡터 유전자 요소가 본질적으로 없는 iPS 세포 집단도 개시되며; 더 상세하게는, 세포 집단은 선택된 사람 개체의 계놈을 포함할 수 있다. 추가 관점에서, iPS 세포 집단은 계놈이 원시 폐부 세포(예: 섬유아세포)와 같은 최종 분화 사람 세포에서 유래되고 외인성 레트로바이러스 요소 또는 임의의 외인성 핵산 또는 벡터 유전자 요소가 본질적으로 없는 세포를 함유할 수 있다. 외인성 DNA 요소가 "본질적으로 없는"은 iPS 세포 집단 중 외인성 DNA 요소를 함유하는 세포가 1% 미만, 0.5% 미만, 0.1% 미만, 0.05% 미만 또는 임의의 중간 퍼센트인 것을 의미한다.

[0028] 또 다른 관점에서, 앞에서 설명한 바와 같이 iPS 세포 집단으로부터 분화된 분화 세포, 조직 또는 기관은 개시될 수 있다. 분화 세포는 조혈 세포, 근세포, 뉴런, 섬유아세포 또는 상피세포를 포함할 수 있고; 조직은 신경, 뼈, 위, 상피, 근육, 연골 또는 심장 조직을 포함할 수 있으며; 기관은 뇌, 척수, 심장, 간, 신장, 위, 장 또는 췌장을 포함할 수 있다. 특정 관점에서, 분화 세포, 조직 또는 기관은 배아 줄기 세포를 대체하기 위한 발생 연구, 약물 선별 또는 조직 이식에 사용될 수 있다.

[0029] 무-바이러스 방법은 세포의 분화 상태에서 임의의 변화를 유도하는데 사용될 수 있다. 특정 관점에 따르면, 출발 세포 집단에 비해 변경된 분화 상태를 나타내고 프로그래밍 벡터 유전자 요소가 본질적으로 없는 세포를 보유하는 세포 집단을 제공하는 방법으로, a) 제1 분화 상태를 나타내는 출발 세포 집단을 수득하는 단계; b) 각

벡터가 복제 오리진, 및 함께 출발 세포 집단의 분화 상태를 제2 분화 상태로 변경시킬 수 있는 하나 이상의 분화 프로그래밍 인자를 암호화하는 하나 이상의 발현 카세트를 함유하되, 이 하나 이상의 발현 카세트가 염색체의 주형을 복제하기 위해 복제 오리진에 결합하는 트랜스-작용 인자를 암호화하고/하거나 출발 세포 집단이 상기 트랜스-작용 인자를 발현하는, 하나 이상의 분화 프로그래밍 벡터를 수득하는 단계; c) 이 분화 프로그래밍 벡터(들)를 출발 세포 집단의 세포 내로 도입시키는 단계; d) 이 세포를 배양하여 하나 이상의 재프로그래밍 인자의 발현을 초래하여, 제2 분화 상태와 일치하는 형질을 배양된 세포의 적어도 일부에서 발생시키는 단계; 및 e) 상기 형질을 보유하는 세포를 충분한 세대수 동안 배양하여, 제2 분화 상태를 나타내지만 프로그래밍 벡터 유전자 요소가 본질적으로 없는 세포를 함유하는 세포 집단을 제공하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0030] 특정 관점에서, 염색체의 주형을 복제하기 위해, 적어도 하나의 분화 프로그래밍 벡터에 존재하는 하나 이상의 발현 카세트는 복제 오리진에 결합하는 트랜스-작용 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 대안적으로, 출발 세포는 복제 오리진에 결합하는 트랜스-작용 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 분화 상태를 변경하는 방법은 3가지일 수 있다: 탈분화(또한, 재프로그래밍이라 정의될 수도 있음), 분화 또는 전환분화.

[0032] 본 발명의 특정 관점에서, 탈분화의 예는 체세포, 예컨대 섬유아세포, 각질세포(예: 럼프구), 중간엽 세포, 간 세포, 위 세포 또는 β 세포로부터 만능 유도이다. 제2 분화 상태의 세포의 형질은 또한 배아 줄기 세포의 하나 이상의 특징으로 정의될 수 있다. 분화 프로그래밍 방법에서 만능을 유도하기 위해, 프로그래밍 인자는 또한 Sox 및 Oct, 더 상세하게는 Sox-2 및 Oct-4를 함유하고 경우에 따라 하나 이상의 추가 인자, 예컨대 Nanog, Lin-28, Klf, c-Myc 또는 Esrrb와 배합되는 재프로그래밍 인자로 정의될 수 있다. 또한, 출발 세포는 덜 분화된 세포, 예컨대 조혈 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 중간엽 줄기 세포, 또는 상응하는 선조 세포, 특정 프로그래밍 인자를 내인적으로 발현할 수 있고 더 적은 인자를 필요로 하는 만능 세포로 더욱 쉽게 재프로그래밍될 수 있는 세포일 수 있다. 예를 들어, 신경 선조세포는 외인성 Sox-2 발현의 부재 하에 만능 세포로 재프로그래밍될 수 있다. 또한, 이 방법은 전술한 단계를 기초로 하여 더욱 만능 상태로 프로그래밍되는, 표적 세포 집단을 분화시키는 추가 단계를 포함할 수 있다.

[0033] 다른 관점에서, 분화 방법은 또한 예컨대 만능 또는 다능 세포의 더욱 특별한 세포 운명을 유도하는 방법: 예컨대 배아 줄기 세포 또는 유도된 만능 줄기 세포의 더욱 분화된 세포, 예컨대 조혈 선조세포, 내배엽 선조세포, 췌장 선조세포, 내피 선조세포 또는 망막 선조세포, 또는 더 나아가 최종 분화 세포, 예컨대 심근세포, 혈액 세포, 뉴런, 간세포, 섬 베타 세포 또는 망막 세포로의 분화; 또는 조혈 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 중간엽 줄기 세포뿐 아니라 조혈 선조세포, 내배엽 선조세포, 췌장 선조세포 또는 내피 선조세포와 같은 다능 세포로의 분화를 포함한다. 구체예는 만능 세포가 프로그래밍 인자로서 SOX7 또는 SOX17과 같은 SOX를 이용하는 방법에 의해 내배엽 선조세포로 분화될 수 있는 것이다. 또 다른 예는 조혈 선조세포가 분화 프로그래밍 인자로서 EBF1을 이용한 방법에 의해 B 럼프구로 분화될 수 있는 것이다.

[0034] 추가 관점에서, 본 발명의 방법은 또한 분화된 세포 종류의 다른 분화된 세포 종류로의 전환분화에도 사용할 수 있다. 출발 세포 및 변경된 세포는 최종 분화되거나 또는 특별하게 분화될 수 있고, 예컨대 B 럼프구는 C/EBP (더 상세하게는, C/EBP α 및 C/EBP β)와 같은 프로그래밍 인자에 의해 대식세포로 프로그래밍될 수 있고, 또는 외분비 세포는 C/EBP β 와 같은 인자에 의해 간세포로 프로그래밍되거나 또는 Ngn3(Neurog3으로도 알려짐), Pdx1 및 Mafa를 함유하는 인자에 의해 섬 β -세포로 프로그래밍될 수 있다.

[0035] 더욱이, 본 발명의 특정 관점에서 당해 방법은 분화 프로그래밍 벡터 유전자 요소가 본질적으로 없는 배양된 세포를, 예컨대 분화 프로그래밍 벡터에 포함된 선택 마커가 본질적으로 없는 배양된 세포의 세포를 선택하거나, 또는 당업계에 공지된 방법으로 벡터 유전자 요소의 존재를 직접 검사하여 선택하는 추가 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 프로그래밍 벡터는 항생제 내성 인자(예: 네오마이신 또는 하이그로마이신 내성 마커), 형광 또는 발광 단백질(예: GFP, RFP, CFP 등) 또는 효소(예: 티미딘 키나제)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 같은 선택 마커를 포함할 수 있다. 벡터 유전자 요소의 상실에 대한 선택은 제2 분화 상태가 확립되었을 때 또는 이후 이루어질 수 있다.

[0036] 추가 관점에서, 분화 프로그래밍 벡터는 리포좀 형질감염, 전기침투, 입자 충격, 인산칼륨, 다중양이온 또는 다중음이온을 이용하거나, 또는 외인성 유전 요소를 세포 내로 도입시키는데 적당한 임의의 방법을 이용하여 세포 내로 도입시킬 수 있다. 출발 세포는 포유동물, 더 구체적으로 사람 세포일 수 있다. 추가 관점에서, 또한 이전 방법에 따라 생산된 벡터 유전자 요소가 본질적으로 없고 제2 분화 상태의 세포도 제공한다.

- [0037] 또 다른 관점에서, 복제 오리진 및 이 복제 오리진에 결합하여 염색체의 주형을 복제하는 트랜스-작용 인자를 암호화하는 하나 이상의 발현 카세트; 및 하나 이상의 분화 프로그래밍 인자를 함유하는 분화 프로그래밍 벡터도 제공한다. 분화 프로그래밍 인자는 Sox(예: Sox-2, Sox-7, Sox-17), Oct(예: Oct-4), Nanog, Lin-28, Klf, c-Myc, Esrrb, EBF1, C/EBP(예: C/EBP α , C/EBP β), Ngn3, Pdx 및 Mafa로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있다. 분화 프로그래밍 벡터 골격의 구체예는 에피솜 발현 벡터, 예컨대 pCEP4, pREP4 또는 pEBNA DEST(Invitrogen 제품)일 수 있다. 특정 관점에서, 분화 프로그래밍 벡터는 또한 재프로그래밍 벡터로 정의될 수 있다. 재프로그래밍 벡터는 Sox 패밀리 구성원 및 Oct 패밀리 구성원, 예컨대 Sox-2 및 Oct-4를 포함할 수 있고, 추가로 하나 이상의 인자, 예컨대 Nanog, Lin-28, Klf4, c-Myc 또는 Esrrb를 포함할 수 있다.
- [0038] 분화 프로그래밍 벡터의 특정 관점에서, 복제 오리진은 림프영양성 헤르페스 바이러스 또는 감마헤르페스바이러스, 아데노바이러스, SV40, 소 유두종 바이러스 또는 효모의 복제 오리진, 구체적으로 EBV의 oriP에 상응하는 감마헤르페스바이러스 또는 림프영양성 헤르페스 바이러스의 복제 오리진일 수 있다. 특정 관점에서, 림프영양성 헤르페스 바이러스는 앱스타인 바 바이러스(EBV), 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV), 헤르페스 바이러스 사이미리(HS) 또는 마렉 병 바이러스(MDV)일 수 있다. 앱스타인 바 바이러스(EBV) 및 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV)는 또한 감마 헤르페스바이러스의 예이다.
- [0039] 분화 프로그래밍 벡터의 추가 양태에서, 트랜스-작용 인자는 EBV의 EBNA-1에 상응하는 폴리펩타이드 또는 EBV의 EBNA-1에 상응하는 야생형 단백질의 유도체일 수 있다. 이 유도체는 복제 오리진에 결합한 후 염색체의 주형으로부터 상응 야생형 단백질의 5% 이상의 전사를 활성화하고/하거나 야생형 EBNA-1과 비교했을 때 통합 주형으로부터 전사를 활성화하는 능력이 감소되어, 발암성 형질전환을 일으키는 염색체 유전자를 이소적으로 활성화하는 기회가 감소된 것일 수 있다. 유도체의 예로는 통합 주형으로부터 전사를 활성화하는 야생형 EBNA-1 단백질에 존재하는 서열이 없는 유도체, 핵 국재화 서열을 보유하는 유도체, EBNA-1의 잔기 약 65번 내지 약 89번에 해당하는 잔기가 결실되고/되거나 EBNA-1의 잔기 약 90번 내지 약 328번에 해당하는 잔기가 결실된 유도체, EBNA-1의 잔기 1번 내지 약 40번 및 잔기 약 328번 내지 641번에 대해 적어도 80%의 아미노산 서열 동일성이 있는 유도체, 또는 해당 야생형 EBNA-1의 잔기 1번 내지 약 40번을 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 해당 야생형 EBNA-1의 잔기 약 328번 내지 641번을 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 유도체를 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 방법 및/또는 조성물의 정황에서 논의된 양태들은 여기에 기술된 임의의 다른 방법 또는 조성물과 관련하여 이용될 수 있다. 따라서, 한 방법이나 조성물에 관한 양태는 본 발명의 다른 방법과 조성물에도 적용될 수 있다.
- [0041] 본 명세서에 사용된 핵산과 관련하여 "암호화한다" 또는 "암호화하는"이란 용어들은 당업자가 본 발명을 쉽게 이해할 수 있게 하는데 사용되지만, 이 용어들은 각각 "포함한다" 또는 "포함하는"과 호환해서 사용할 수 있다.
- [0042] 본 명세서에 사용된 단수적 표현은 하나 이상을 의미할 수 있다. 청구항(들)에 "포함하는"이란 용어와 함께 사용될 때 단수적 표현은 하나 또는 하나보다 많은 것을 의미할 수 있다.
- [0043] 청구항들에서 "또는"이란 용어의 사용은 대안만을 의미하는 분명한 표시가 없거나 또는 대안이 상호 배타적이지 않은 한, "및/또는"을 의미하지만, 본 명세서는 오로지 대안 및 "및/또는"을 의미하는 정의를 뒷받침한다. 본 명세서에 사용된, "다른"은 적어도 제2 또는 그 이상을 의미할 수 있다.
- [0044] 본 출원을 통해, "약"이란 용어는 값이 장치, 값을 측정하는데 이용한 방법의 오차 고유 변동, 또는 연구 피검체 간에 존재하는 변동을 포함한다는 것을 가리킨다.
- [0045] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 이하 상세한 설명에서 명확해질 것이다. 하지만, 상세한 설명과 구체적 실시예들은 본 발명의 바람직한 양태들을 나타내지만, 오로지 예시로서 제공한 것으로, 본 발명의 범위 및 취지 내의 다양한 변화 및 변형은 이하 상세한 설명으로부터 당업자에게 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 이하 도면은 본 명세서의 일부로, 본 발명의 특정 관점을 추가 증명하기 위한 것이다. 본 발명은 이러한 도면 중 하나 이상과 여기에 제공된 특정 양태들의 상세한 설명을 참조로 하여 쉽게 이해될 수 있다.
- 도 1A-C: EBV 계놈 및 플라스미드 복제의 잠복 오리진(or iP).
- 도 2: EBNA1의 도메인-기반 모델 및 부분 구조 표현.

도 3: 본 발명에 사용된 수용체 골격 플라스미드의 예시적 예.

도 4: 수용체 골격 플라스미드에 통합될 카세트의 예. 발현에 사용될 수 있는 프로모터의 예로는, PGK, CMV, SV40 및 EF1a를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

도 5: Sox-2, Oct-4, Nanog 및 Lin28(경우에 따라)을 암호화하는 재프로그래밍 플라스미드의 예시적 예.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 본 발명

본 발명은 세포의 다양한 발달 단계의 현행 재프로그래밍 기술 또는 분화 프로그래밍, 예컨대 바이러스 벡터 또는 외인성 요소가 본질적으로 없는 유도 만능 줄기 세포의 생성과 관련된 몇몇 주요 문제를 극복한다. 통합형 바이러스 벡터를 이용한 종래 방법과 반대로, 이 방법은 EBV 요소-기반의 플라스미드와 같은 염색체외 재프로그래밍 또는 분화 프로그래밍 벡터를 이용하여 체세포 또는 줄기 세포에 재프로그래밍 또는 분화 프로그래밍 인자를 형질도입시키고, 이 세포를 배양한 후, 후손 세포를 하나 이상의 배아 줄기 세포 특징에 대해 선택하거나, 또는 세포를 목적한 변경된 분화 상태와 일치하는 형질에 대해 선택한다. 염색체외 복제 벡터, 예컨대 EBV 요소-기반 벡터는 숙주 세포 계놈에 통합되지 않고, 세포를 만능성 또는 목적한 세포 상태로 유도하기에 충분한 기간 후에 시간이 지나서 상실될 것이다. 이러한 방법의 고유 특징은 외인성 유전 요소가 본질적으로 없는 후손 세포를 생산할 것이며, 음성 선택은 이 방법을 용이하게 할 수 있다. 이 방법들은 분화 상태를 변경시켜 벡터 요소가 본질적으로 없는 iPS 세포 또는 임의의 목적한 세포 종류를 분리할 수 있게 한다. 따라서, 이러한 신규 조성물과 방법은 무벡터 iPS 세포 또는 다른 목적 세포 종류가 세포에 바이러스 인자의 웬덤 삽입 또는 지속적 발현에 의해 발현에 의해 일어나는 돌연변이유발의 위험 없이 치료제로 제조 가능하게 할 것이다. 본 발명의 추가 양태 및 장점은 이하에 설명된다.

II. 정의

"재프로그래밍"은 재프로그래밍없이 동일 조건 하에서 나타나는 것보다, 배양물에서 또는 생체내에서 적어도 하나의 신규 세포 종류의 후손을 형성하는 측정가능하게 증가된 능력을 세포에 부여하는 과정이다. 더 구체적으로, 재프로그래밍은 체세포에 만능 잠재력을 부여하는 과정이다. 이것은, 충분한 증식 후에 재프로그래밍 전에는 본질적으로 형성할 수 없던 새로운 세포 종류의 표현형적 특징을 가진 후손이 측정가능한 비율인 것이라는 것을 의미하거나; 그렇지 않다면, 새로운 세포 종류의 특징을 가진 비율이 재프로그래밍 전보다 측정가능하게 많다는 것을 의미한다. 특정 조건 하에, 새로운 세포 종류의 특징을 가진 후손의 비율은 증가 선호도 순으로 적어도 약 1%, 5%, 25% 또는 그 이상일 수 있다.

"분화 프로그래밍"은 분화 재프로그래밍없이 동일한 조건하에서 나타내는 것보다 새로운 분화 상태를 배양물이나 생체내에서 나타내는 적어도 하나의 신규 세포 종류의 후손을 형성하도록 세포를 변화시키는 과정이다. 이 과정은 분화, 탈분화 및 전환분화를 포함한다. "분화"는 덜 특별한 세포가 더욱 특별한 세포 종류로 되는 과정이다. "탈분화"는 부분 또는 최종 분화된 세포가 만능 또는 다능과 같은 초기 발달 단계로 복귀하는 세포 과정이다. "전환분화"는 분화된 한 세포 종류가 다른 분화 세포 종류로 전환하는 과정이다.

"복제 오리진"("ori")은 세포 중의 플라스미드에 존재할 때 플라스미드 중의 결합된 서열을 유지할 수 있는 램프영양성 헤르페스 바이러스와 같은 DNA 서열 및/또는 DNA 합성이 개시하는 부위 또는 그 부근이다. EBV의 ori는 FR 서열(30bp 반복부의 20 불완전 카페), 바람직하게는 DS 서열을 포함하지만, EBV의 다른 부위는 EBNA-1에 결합하고, 예컨대 Rep^{*} 서열은 복제 오리진으로서 DS를 대체할 수 있다(Kirshmaier and Sugden, 1998). 따라서, EBV의 복제 오리진은 FR, DS 또는 Rep^{*} 서열 또는 핵산 변형을 통한 임의의 기능적 등가 서열 또는 이로부터 유래되는 합성 조합을 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 또한 문헌[Linder, et al., 2008]에 구체적으로 기술된 바와 같이, 개별 요소의 삽입 또는 돌연변이 등에 의해 EBV의 유전자 조작된 복제 오리진을 이용할 수 있다.

"램프영양성" 헤르페스 바이러스는 램프아세포(예: 사람 B 램프아세포)에서 복제하는 헤르페스 바이러스 또는 바이러스의 친연 생활사 중 적어도 일부에서 염색체외적으로 복제하는 다른 세포 종류이다. 이러한 바이러스는 숙주를 감염시킨 후, 바이러스 계놈을 플라스미드로서 유지시켜 숙주를 잠복 감염시킨다. 헤르페스 단순 바이러스(HSV)는 "램프영양성" 헤르페스 바이러스가 아니다. 램프영양성 헤르페스 바이러스의 예로는 EBV, 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV), 헤르페스 바이러스 사이미리(HS) 및 마렉 병 바이러스(MDV)가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

- [0054] "벡터" 또는 "작제물"(때로, 유전자 전달 또는 유전자 전이 "비히클"이라고도 불림)은 시험관내 또는 생체내에서 숙주 세포로 전달되어야 하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 거대분자 또는 분자의 복합체를 의미한다.
- [0055] 벡터의 일반적인 종류인 "플라스미드"는 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있는 염색체 DNA로부터 분리된 염색체와 DNA 분자이다. 특정 경우에, 이것은 원형이며 이본쇄이다.
- [0056] 본 명세서에 사용된 "주형"은 립프영양성 헤르페스 바이러스의 야생형 단백질에 의해 특이적으로 결합되는 DNA 분자로, 상기 야생형 단백질은 EBV의 or iP에 상응하는 DNA 서열에 야생형 단백질이 결합하는 친화도의 적어도 10%인 친화도로 야생형 단백질이 결합하는 DNA 서열이 주형 내에 존재하는 결과로서 EBNA-1에 상응하고, 이로부터 단백질이 결합한 후 주형 전사가 선택적으로 개시 및/또는 증강되고/되거나 세포에서 주형의 유지가 증강된다. "통합된 주형"은 세포의 계놈에서 안정하게 유지되는, 예컨대 세포의 염색체에 통합된 것이다. "염색체외 주형"은 세포에서 안정하게 유지되지만, 염색체에 통합되지 않은 것이다.
- [0057] "발현 작제물" 또는 "발현 카세트"란 전사를 유도할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 발현 작제물은 적어도 프로모터 또는 프로모터에 기능적으로 등가인 구조를 포함한다. 또한, 인핸서 및/또는 전사 종결 시그널과 같은 추가 인자도 포함해도 좋다.
- [0058] 세포 또는 유기체 중의 단백질, 유전자, 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 사용된 "외인성"이란 용어는 합성 또는 천연 수단에 의해 세포 또는 유기체 내로 도입된 단백질, 유전자, 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 의미하고, 세포와 관련해서 사용 시에는 분리 후 합성 또는 천연 수단에 의해 다른 세포 또는 유기체로 도입되는 세포를 의미한다. 외인성 핵산은 다른 유기체 또는 세포에서 유래한 것일 수 있고, 또는 그 유기체 또는 세포 내에서 천연적으로 발생하는 핵산의 1회 이상의 추가 카페일 수 있다. 외인성 세포는 다른 유기체에서 유래한 것이거나, 또는 동일한 유기체에서 유래한 것일 수 있다. 비제한적 예로, 외인성 핵산은 천연 세포와 다른 염색체내 위치에 있거나, 또는 천연에서 발견되는 것과 다른 핵산 서열 옆에 인접해 있다.
- [0059] 본 명세서에 사용된 "-에 상응한다"란 용어는 폴리뉴클레오타이드 서열이 참조 폴리뉴클레오타이드 서열 전부 또는 일부와 상동성(즉, 엄격히 진화상 관련된 것이 아닌 동일한)인 것, 또는 폴리펩타이드 서열이 참조 폴리펩타이드 서열과 동일한 것을 의미한다. 이에 반해, 본 명세서에 사용된 "-에 상보적인"이란 용어는 상보성 서열이 참조 폴리뉴클레오타이드 서열 전부 또는 일부와 상동성인 것을 의미한다. 예컨대, 뉴클레오타이드 서열 "TATAC"는 참조 서열 "TATAC"에 상응하고 참조 서열 "GTATA"에 상보적이다.
- [0060] 특정 단백질을 "암호화하는" "유전자", "폴리뉴클레오타이드", "암호화 영역", "서열", "분절", "단편" 또는 "전이유전자"는 적당한 조절 서열의 제어 하에 배치되었을 때 시험관내 또는 생체내에서, 전사되고 경우에 따라 유전자 산물, 예컨대 폴리펩타이드로 해독되기도 하는 핵산 분자이다. 암호화 영역은 cDNA, 계놈 DNA 또는 RNA 형태로 존재할 수 있다. DNA 형태에 존재할 때, 핵산 분자는 일본쇄(즉, 센스 쇄) 또는 이본쇄일 수 있다. 암호화 영역의 경계는 5'(아미노) 말단의 개시 코돈 및 3'(카르복시) 말단의 해독 종결 코돈에 의해 결정된다. 유전자는 원핵생물 또는 진핵생물 mRNA 유래의 cDNA, 원핵생물 또는 진핵생물 DNA 유래의 계놈 DNA 서열, 및 합성 DNA 서열을 포함할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 전사 종결 서열은 일반적으로 유전자 서열의 3'에 위치할 것이다.
- [0061] "조절 요소"란 용어는 프로모터 영역, 폴리아데닐화 시그널, 전사 종결 서열, 상류 조절 도메인, 복제 기원, 내부 리보솜 진입 부위("IRES"), 인핸서, 스플라이스 접합부 등을 통칭하며, 통합적으로 수용체 세포에서 암호화 서열의 복제, 전사, 전사후 프로세싱 및 해독을 제공한다. 이러한 조절 요소는 선택한 암호화 서열이 적당한 숙주 세포 내에서 복제, 전사 및 해독할 수 있는 한, 항상 전부 함께 존재해야 하는 것은 아니다.
- [0062] 통상적인 의미로 본 명세서에 사용된 "프로모터"란 용어는 RNA 폴리머라제에 결합하고 하류(3' 방향) 암호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 유전자에서 유래되는 DNA 조절 서열을 함유하는 뉴클레오타이드 영역을 의미한다.
- [0063] "인핸서"란 프로모터에 근접 위치할 때, 인핸서 도메인의 부재 하에 프로모터로부터 산출되는 전사 활성 대비 증가된 전사 활성을 부여하는 핵산 서열을 의미한다.
- [0064] 핵산 분자와 관련하여 "작동가능하게 결합된"이란 2 이상의 핵산 분자(예: 전사될 핵산 분자, 프로모터 및 인핸서 인자)가 핵산 분자의 전사를 허용하도록 연결된 것을 의미한다. 웨타이드 및/또는 폴리웨타이드 분자와 관련하여 "작동가능하게 결합된"은 2 이상의 웨타이드 및/또는 폴리웨타이드 분자가 융합체의 각 웨타이드 및/또는 폴리웨타이드 성분의 적어도 하나의 성질을 보유하는, 단일 폴리웨타이드 쇄, 즉 융합 폴리웨타이드를 산출하도록 연결된 것을 의미한다. 융합 폴리웨타이드는 키메라, 즉 이종 분자로 구성된 것이 바람직하다.

- [0065] "상동성"은 두 폴리뉴클레오타이드 또는 두 폴리펩타이드 사이에 동일성 퍼센트를 의미한다. 한 서열과 다른 서열 간의 일치가 당업계에 공지된 기술에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 상동성은 서열 정보를 정렬하고 쉽게 이용할 수 있는 컴퓨터 프로그램으로 두 폴리펩타이드 분자 간에 서열 정보를 직접 비교하여 측정할 수 있다. 대안적으로, 상동성은 상동성 영역 간에 안정한 듀플렉스를 형성하는 조건 하에서 폴리뉴클레오타이드를 하이브리드화한 후, 단일 쇄-특이적 뉴클레아제(들)로 분해하고, 분해된 단편의 크기 측정에 의해 측정할 수 있다. 두 DNA 또는 두 폴리펩타이드 서열은 전술한 방법으로 측정했을 때 분자의 일정한 길이 상에서 각각 적어도 약 80%, 바람직하게는 적어도 약 90%, 가장 바람직하게는 적어도 약 95%의 뉴클레오타이드 또는 아미노산이 정합성 일 때 서열은 서로 "실질적으로 상동성"이다.
- [0066] "세포"란 용어는 당업계의 가장 광범위한 의미로 여기에 사용되고, 다세포 유기체의 조직의 구조 단위이고 이를 외부로부터 분리하는 막 구조에 의해 둘러싸여 있고, 자기 복제능이 있고, 유전자 정보 및 이의 발현을 위한 기구를 보유하는 생체를 의미한다. 본 명세서에 사용된 세포는 천연발생의 세포 또는 합성 변형 세포(예: 융합 세포, 유전자 변형 세포 등)일 수 있다.
- [0067] 본 명세서에 사용된, "줄기 세포"란 용어는 자기 복제를 할 수 있고 만능성인 세포를 의미한다. 일반적으로, 줄기 세포는 손상 조직을 재생시킬 수 있다. 여기서 줄기 세포는 배아 줄기(ES)세포 또는 조직 줄기 세포(소위, 조직 특이적 줄기 세포 또는 체세포 줄기 세포라고도 불림)일 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 전술한 능력을 보유할 수 있는 임의의 합성 생산된 세포(예: 본원에서 사용된 융합 세포, 재프로그래밍된 세포 등)는 줄기 세포일 수 있다.
- [0068] "배아 줄기(ES) 세포"는 초기 배아에서 유래되는 만능 줄기 세포이다. ES 세포는 1981년에 처음 확립되었고, 1989년부터 녹아웃 마우스의 생산에 적용되었다. 1998년에 사람 ES 세포가 확립되었고, 현재 재생 의약용으로 입수 가능해지기 시작하고 있다.
- [0069] ES 세포와 달리, 조직 줄기 세포는 제한된 분화능을 보유한다. 조직 줄기 세포는 조직에서 특별한 위치에 존재하고 미분화 세포내 구조를 보유한다. 따라서, 조직 줄기 세포의 만능성은 일반적으로 낮다. 조직 줄기 세포는 핵/세포질 비가 높고 몇몇 세포내 소기관을 보유한다. 대부분의 조직 줄기 세포는 만능성이 낮고, 긴 세포 주기 및 개체의 수명 이상의 증식능을 나타낸다. 조직 줄기 세포는 이 세포가 유래되는 부위를 기초로 하여 카테고리 별로 분리되고, 예컨대 진피계, 소화계, 골수계, 신경계 등이 있다. 진피계의 조직 줄기 세포는 상피 줄기 세포, 모낭 줄기 세포 등을 포함한다. 소화계의 조직 줄기 세포는 췌장(일반) 줄기 세포, 간 줄기 세포 등을 포함한다. 골수계 중의 조직 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포 등을 포함한다. 신경계의 조직 줄기 세포는 신경 줄기 세포, 망막 줄기 세포 등을 포함한다.
- [0070] 통상 iPS 세포 또는 iPSC로 약칭되는 "유도된 만능 줄기 세포"는 비-만능 세포, 통상적으로 성체 체세포, 또는 최종 분화 세포, 예컨대 섬유아세포, 조혈 세포, 근세포, 뉴런, 상피세포 등에 재프로그래밍 인자라 불리는 특정 유전자의 삽입에 의해 합성 제조되는 만능 줄기 세포 종류를 의미한다.
- [0071] "만능성"은 하나 이상의 조직 또는 기관, 또는 바람직하게는 3가지 배아 충 중 임의의 충, 즉 내배엽(위 내막, 위장관, 폐 내부), 중간엽(근육, 뼈, 혈액, 비뇨생식기) 또는 외배엽(상피 조직 및 신경계)을 구성하는 모든 세포로 분화하는 잠재성이 있는 줄기 세포를 의미한다. 본 명세서에 사용된 "만능 줄기 세포"는 3가지 임의의 배 충에서 유래되는 세포, 예컨대 분화전능성 세포 또는 유도된 만능 세포의 직접적인 후손으로 분화할 수 있는 세포를 의미한다.
- [0072] 본 명세서에 사용된 "분화전능 줄기 세포"는 유기체를 구성하는 모든 세포, 예컨대 난자와 정자 세포의 융합으로부터 생산되는 세포를 의미한다. 또한, 수정란의 처음 몇몇 분열에 의해 생산된 세포는 분화전능성이다. 이러한 세포는 배아 및 배아외 세포 종류로 분화할 수 있다. 만능 줄기 세포는 임의의 태아 또는 성인 세포 종류의 근원일 수 있다. 하지만, 혼자서는 태아 또는 성체 동물로 발달할 수 없는데, 그 이유는 태반과 같은 배아외 조직에 기여하는 잠재능이 부족하기 때문이다.
- [0073] 이에 반해, 많은 선조 세포는 다능성, 즉 제한된 수의 세포 운명으로 분화할 수 있다. 만능성 선조 세포는 여러 다른 세포 종류의 근원일 수 있지만, 그 종류는 제한된 수이다. 만능성 줄기 세포의 한 예는 조혈 세포, 즉 여러 종류의 혈액 세포로 발달할 수 있지만 뇌 세포 또는 다른 종류의 세포로 발달할 수는 없는 혈액 줄기 세포이다. 배아를 형성하는 장기 연속 세포 분열의 마지막은 최종 분화된 세포, 또는 특정 기능에 영구적으로 투입되는 것으로 생각되는 세포이다.
- [0074] "자기 재생"은 미분화 상태를 유지하면서 다수의 세포 분열 주기를 반복하는 능력을 의미한다.

- [0075] 본 명세서에 사용된 "체세포"란 용어는 DNA를 다음 세대로 직접 전이시키지 않는 난자, 정자 등과 같은 배 세포 외에 다른 임의의 세포를 의미한다. 일반적으로, 체세포는 만능성이 제한적이거나 없다. 본 명세서에 사용된 체세포는 천연 발생인 체세포 또는 유전자 변형 체세포일 수 있다.
- [0076] 세포는 외인성 유전 요소(들)가 10% 미만일 때 본 명세서에 사용된 것처럼 외인성 유전 요소가 "실질적으로 없고", 상기 유전 요소(들)가 1% 미만일 때 외인성 유전 요소가 "본질적으로 없다". 하지만, 총 세포 집단의 0.5% 미만 또는 0.1% 미만이 외인성 유전 요소를 함유하는 세포 집단이 더 더욱 바람직하다. 따라서, iPS 세포 집단 중 0.1% 미만 내지 10%(모든 중간 퍼센트를 포함해서)의 세포는 바람직하지 않은 외인성 유전 요소를 함유한다.
- [0077] **III. 유도 만능 줄기 세포의 일반적 배경**
- [0078] 본 발명의 특정 양태에 따르면, 염색체외 벡터-기반 시스템으로 체세포 내에 재프로그래밍 인자를 도입시켜 체세포를 재프로그래밍하는 방법이 개시된다. 이 세포의 후손은 이하에 기술되는 바와 같은 다양한 관점에서 배아 줄기 세포와 동일할 수 있지만, 외인성 유전 요소는 본질적으로 없다. 배아 줄기 세포 특징의 이해는 유도 만능 줄기 세포를 선택하는데 도움이 될 수 있다. 줄기 세포 재프로그래밍 연구로부터 알려진 재프로그래밍 인자는 이러한 신규 방법에 사용될 수 있다. 또한, 이러한 유도 만능 줄기 세포가 배아 줄기 세포의 사용에 대한 윤리 장애로 인해 치료 및 연구용으로 배아 줄기 세포를 대체하는데 사용할 가능성이 있다는 것도 고려되어야 한다.
- [0079] **A. 줄기 세포**
- [0080] 줄기 세포는 대부분(전부는 아니지만)의 다세포 유기체에서 발견되는 세포이다. 줄기 세포는 유사분열 세포 분열을 통해 재생하고 다양한 범위의 특수 세포 종류로 분화하는 능력을 특징으로 한다. 포유동물 줄기 세포의 2 가지 일반적인 종류는 포배에서 발견되는 배아 줄기 세포 및 성체 조직에서 발견되는 성체 줄기 세포이다. 발달 배아에서, 줄기 세포는 모든 특수 배아 조직으로 분화할 수 있다. 성체 유기체에서, 줄기 세포 및 선조 세포는 몸에 수복 시스템으로 작용하여 특수 세포를 보충하지만, 혈액, 피부 또는 장 조직과 같은 재생 기관의 턴오버를 정상으로 유지한다.
- [0081] 줄기 세포는 세포 배양을 통해 성장하여 근육이나 신경과 같은 다양한 조직의 세포와 일치하는 특징을 가진 특수 세포로 형질전환될 수 있는 바, 의학적 치료법에서의 사용에 대해 제안되었다. 특히, 배아 세포주, 치료적 클로닝을 통해 발생한 자가 배아 줄기 세포, 및 제대혈 혈액 또는 골수 유래의 고 성형 성체 줄기 세포는 유망한 후보라고 선전했다. 가장 최근에 성체 세포의 유도 만능 줄기 세포로의 재프로그래밍은 배아 줄기 세포를 대체할 엄청난 가능성이 있다.
- [0082] **B. 배아 줄기 세포**
- [0083] 배아 줄기 세포주(ES 세포주)는 포배 또는 이전 상실기 배아의 내세포피(ICM)의 바깥포배판 조직에서 유래되는 세포 배양물이다. 포배는 사람의 초기 배아, 약 4 내지 5일된 배아이고 50 내지 150개 세포로 이루어져 있다. ES 세포는 만능이고 발달 동안 모두 3가지 원시 배 충, 즉 외배엽, 내배엽 및 중배엽의 유도체를 발생시킨다. 환연하면, 이들은 특수 세포 종류에 충분하고 필요한 자극을 제공했을 때 각각 200 종류 이상의 성체 세포로 발달할 수 있다. 이들은 배아외 막 또는 태반에 기여하지 않는다.
- [0084] 현재까지 거의 모든 연구는 마우스 배아 줄기 세포(mES) 또는 사람 배아 줄기 세포(hES)를 이용해 수행되었다. 둘 다 본질적인 줄기 세포 특징을 나타내지만, 미분화 상태를 유지하기 위해 매우 다른 환경을 필요로 한다. 마우스 ES 세포는 젤라틴 층 위에서 성장할 수 있고 백혈병 저해 인자(LIF)의 존재를 필요로 할 수 있다. 사람 ES 세포는 마우스 배아 섬유아세포(MEF)의 영양세포층 위에서 성장할 수 있고, 종종 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF 또는 FGF-2)의 존재를 필요로 한다. 최적의 배양 조건이나 유전자 조작 없이(Chambers et al., 2003), 배아 줄기 세포는 빠르게 분화할 것이다.
- [0085] 또한, 사람 배아 줄기 세포는 여러 전사 인자 및 세포 표면 단백질의 존재에 의해 정의될 수 있다. 전사 인자 Oct-4, Nanog 및 Sox-2는 분화를 유도하는 유전자의 억제 및 만능성의 유지를 보장하는 핵심 조절 네트워크를 형성한다(Boyer et al., 2005). hES 세포를 동정하는데 가장 일반적으로 사용되는 세포 표면 항원으로는, 당지질 SSEA3 및 SSEA4와 캐라탄 셀酹이트 항원 Tra-1-60 및 Tra-1-81을 포함한다.
- [0086] 20년간의 연구 후에도 배아 줄기 세포를 이용한 승인된 치료법이나 사람 시험은 없다. 만능 세포인 ES 세포는 정확한 분화를 위해 특정 시그널을 필요로 하는데, 만일 체내에 직접 주입 시, ES 세포는 많은 여러 종류의 세포로 분화하여 기형종을 유발할 것이다. 이식 거부를 피하면서 ES 세포의 유용한 세포로의 분화는 배아 줄기 세포 연구자들이 아직도 직면하고 있는 얼마 안되는 장애이다. 많은 국가들은 현재 ES 세포 연구 또는 신규 ES 세

포주의 생산에 일시 정지를 취하고 있다. 이들의 무제한적 팽창과 만능성의 병합으로 인해, 배아 줄기 세포는 손상 또는 질병 후 조직 대체 및 재생 의약에 이론적으로 잠재적인 근원으로 남아 있다. 하지만, 이러한 문제를 우회하는 1가지 방도는 직접 재프로그래밍에 의해 체세포 내에서 만능 상태를 유도하는 것이다.

C. 재프로그래밍 인자

iPS 세포의 생성은 그 유도에 사용된 유전자에 매우 중요하다. 다음과 같은 인자 또는 이의 조합은 본 발명에 개시된 벡터 시스템에 사용될 수 있다. 특정 관점에서, Sox 및 Oct(바람직하게는 Oct3/4)를 암호화하는 핵산은 재프로그래밍 벡터에 포함될 것이다. 예컨대, 재프로그래밍 벡터는 Sox-2, Oct-4, Nanog 및 경우에 따라 Lin-28을 암호화하는 발현 카세트, 또는 Sox-2, Oct-4, Klf4 및 경우에 따라 c-myc를 암호화하는 발현 카세트, 또는 Sox-2, Oct-4 및 경우에 따라 Esrrb를 암호화하는 발현 카세트를 포함할 수 있다. 이러한 재프로그래밍 인자를 암호화하는 핵산은 동일한 발현 카세트, 다른 발현 카세트, 동일한 재프로그래밍 벡터 또는 다른 재프로그래밍 벡터에 포함될 수 있다.

Oct-3/4 및 Sox 유전자는 특정 구성원(Sox-1, Sox-2, Sox-3 및 Sox-15)은 부재 시에 유도가 불가능해지는, 유도 과정에 관련된 중요한 전사 조절인자로 동정되었다. 하지만, Klf 패밀리의 특정 구성원(Klf-1, Klf2, Klf4 및 Klf5), Myc 패밀리(C-myc, L-myc 및 N-myc), Nanog 및 LIN28을 비롯한 추가 유전자들이 유도 효율을 증가시키는 것으로 동정되었다.

Oct-3/4(Pouf51)는 8량체("Oct") 전사 인자의 패밀리 중 하나로서, 만능성을 유지하는데 중대한 역할을 한다. Oct-3/4+ 세포, 예컨대 분할세포 및 배아 줄기 세포에서 Oct-3/4의 부재는 자발적인 영양막 분화를 초래하고, 이에 따라 Oct-3/4의 존재는 배아 줄기 세포의 만능성 및 분화 잠재성을 발생시킨다. "Oct" 패밀리 중의 다양한 다른 유전자, 예컨대 Oct-3/4의 근연체, 예컨대 Oct1 및 Oct6은 유도를 이끌어내지 못하여, 유도 과정에 있어서 Oct-3/4의 독점성을 입증했다.

Sox 패밀리 유전자는 Oct-3/4와 유사하게 만능성 유지에 관련되어 있고, 하지만, 만능 줄기 세포에만 발현되는 Oct-3/4와 달리 만능 또는 단분화능 줄기 세포와 관련이 있다. Sox-2는 문헌[Yamanaka et al., Jaenisch et al., 및 Thompson et al.]에 의해 유도에 처음 사용된 유전자이지만, Sox 패밀리의 다른 유전자들도 유도 과정에 작용하는 것으로 밝혀져 있다. Sox1은 Sox-2와 유사한 효율로 iPS 세포를 생산하지만, 유전자 Sox3, Sox15 및 Sox18도 역시 저하된 효율이지만 iPS 세포를 발생시킨다.

배아 줄기 세포에서, Nanog는 Oct-3/4 및 Sox-2와 함께 만능성을 촉진하는데 필수적이다. 따라서, 톰슨 (Thomson) 등은 인자 중 하나로서 Nanog를 이용 시 iPS 세포를 발생하는 것이 가능하다고 보고했지만, Nanog가 유도에 불필요하다는 야마나카(Yamanaka) 등의 보고는 놀라운 것이었다.

LIN28은 분화 및 증식과 관련된 배아 종양 세포 및 배아 줄기 세포에서 발현된 mRNA 결합 단백질이다. 톰슨 등은 불필요하지만 iPS 발생의 한 인자인 것을 증명했다.

Klf 패밀리 유전자의 Klf4는 야마나카 등에 의해 처음으로 동정되고, 마우스 iPS 세포의 발생에 한 인자인 것으로 제니쉬(Jaenisch) 등에 의해 확인되었고, 야마나카 등에 의해 사람 iPS 세포의 발생에 한 인자로서 증명되었다. 하지만, 톰슨 등은 Klf4가 사람 iPS 세포의 발생에는 불필요하고 실제로 사람 iPS 세포를 발생시키지 못하는 것으로 보고했다. Klf2 및 Klf4는 iPS 세포를 발생시킬 수 있는 인자인 것으로 발견되었고, 관련 유전자 Klf1 및 Klf5 역시 효율은 낮지만 iPS 세포를 발생시킬 수 있었다.

Myc 패밀리의 유전자는 암에 연관된 원종양유전자이다. 야마나카 등 및 제니쉬 등은 c-myc가 마우스 iPS 세포의 발생에 연관된 인자임을 증명했고, 야마나카 등은 사람 iPS 세포의 발생에 연관된 인자임을 증명했다. 하지만, 톰슨 등과 야마나카 등은 c-myc가 사람 iPS 세포의 발생에 불필요하다는 것도 보고했다. iPS 세포의 유도에 "myc" 패밀리 유전자의 사용은 c-myc 유도 iPS 세포가 이식된 마우스의 25%가 치명적인 기형종을 발달시켰는 바, 임상 치료제로서 iPS 세포의 예측 못한 사태에 문제점이다. N-myc 및 L-myc는 유사한 효율로 c-myc를 대신하여 유도하는 것으로 확인되었다.

D. 통합 벡터를 이용한 만능 줄기 세포의 유도

iPS 세포는 일반적으로 특정 줄기 세포 관련 유전자의 비-만능 세포, 예컨대 성체 섬유아세포 형질감염에 의해 유래된다. 형질감염은 일반적으로 현행 관습에 따라 통합 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스를 통해 달성된다. 형질감염된 유전자는 유도 효율을 증가시키는 다른 유전자도 제안되어 있지만, 주요 전사 조절인자로 Oct-3/4(Pouf51) 및 Sox-2를 포함한다. 소수의 형질감염된 세포는 중대한 기간 후 만능 줄기 세포와 형태학적 및 생

화학적으로 유사하게 되기 시작하고, 일반적으로 형태학적 선택, 배가 시간을 통해 또는 리포터 유전자 및 항생제 감염을 통해 분리한다.

[0098] 2007년 11월, 두 독립된 연구 팀의 연구(Yu et al., 2007; Yamanaka et al., 2007)에 의해 성체 사람 세포로부터 iPS를 생성하는 중대 사건이 달성되었다. 앞서 마우스 모델에서 사용한 동일한 원리를 이용하여, 야마나카는 사람 삼유아세포를 동일한 4가지 중추 유전자인 Oct3/4, Sox-2, Klf4 및 c-Myc를 레트로바이러스 시스템과 함께 사용하여 만능 줄기 세포로 성공적으로 형질전환시켰지만, c-Myc는 종양유전자성이다. 톰슨 및 동료들은 c-Myc의 사용을 피하면서 Oct-4, Sox-2, NANOG 및 다른 유전자 LIN28을 렌티바이러스 시스템과 함께 사용했다.

[0099] 하지만, 사용된 바이러스 형질감염 시스템은 숙주 게놈의 랜덤 위치에 유전자를 삽입하고; 이것은 발생된 세포가 암에 민감할 수 있어, 이러한 iPSC의 잠재적인 치료 적용 시에 문제가 된다. 따라서, 두 팀의 멤버들은 새로운 전달 방법을 개발할 필요성이 있다고 생각했다.

[0100] 다른 한편, 이소성 재프로그래밍 인자의 강제 지속적 발현은 종양 형성 빈도의 상승과 연관될 수 있고, 이 문제에 대한 최종 해법은 전이유전자-없는 iPS 세포의 발생일 것이다. 한 조의 바이러스 유도 유전자는 재프로그래밍 과정을 개시하는데 필요할 수 있을 수도 있으나, 점차적으로 세포 자신의 내인성 만능 유전자가 활성되어, 바이러스 유전자는 재활성화된 확률 가능성에 의해 사일런싱(silencing) 될 것이다. 최근 연구자들은 외인성 인자가 세포가 자기-지속성 만능 상태로 진입하기 위해 최소 약 10 내지 16일을 필요로 할 수 있음을 증명하고 있다(Brambrink et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008). 전이유전자 발현의 최소 기간의 측정은 iPS 세포를 유도하는 비-레트로바이러스 전달 방법이 당해 개시된 방법 및 이하에 기술되는 iPS 세포에 의해 달성된 장점을 발달시킬 수 있게 한다.

IV. 무벡터 유도 만능 줄기 세포 및 다른 세포 종류의 발생을 위한 염색체외 벡터

[0102] 전술한 바와 같이, 사람 체세포로부터 만능 줄기 세포의 유도는 재프로그래밍 유전자의 이소성 발현을 위한 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터의 사용에 의해 달성되었다. 재조합 레트로바이러스, 예컨대 몰로니(Moloney) 쥐 백혈병 바이러스는 안정한 방식으로 숙주 게놈에 통합되는 능력을 갖고 있다. 이들은 숙주 게놈 내로 통합할 수 있게 하는 역전사효소를 함유한다, 렌티바이러스는 레트로바이러스의 서브클래스이다. 이 바이러스는 분열 세포뿐 아니라 비분열 세포의 게놈에 통합하는 능력 덕분에 벡터로 널리 채택되고 있다. 이러한 바이러스 벡터는 또한 더욱 광범위한 상황, 즉 세포의 분화 프로그래밍, 예컨대 탈분화, 분화 및 전환분화에도 널리 사용되고 있다. RNA 형태의 바이러스 게놈은 바이러스가 세포로 진입할 때 역전사되어, 바이러스 인테그라제 효소에 의해 게놈의 랜덤 위치에 삽입되는 DNA를 생산한다. 따라서, 성공적인 재프로그래밍의 현행 기술은 통합에 기반을 둔 바이러스 접근법에 의존적이다.

[0103] 하지만, 현행 기술에서는 표적화된 통합이 여전히 관례적이지 않고(Bode et al., 2000b), 종래 대안인 랜덤 통합이 유도 만능 줄기 세포에서 예상할 수 없는 결과를 나타내는 삽입 돌연변이유발을 초래할 수 있다. 이와 같은 이유로 인해, 전이유전자의 발현은 통합 부위의 염색질 상황에 의존적이기 때문에 제어할 수 없다(Baer et al., 2000). 높은 발현 수준은 오로지 유리한 게놈 유전자좌에서 달성할 수 있지만, 고도 발현 부위로의 통합이 유도 만능 줄기 세포의 치명적인 세포 기능을 방해할 위험이 존재한다.

[0104] 또한, DNA 메틸화에 의해 동반되는 과정에서 전이유전자를 하향조절하여 작용하는 이종 DNA에 대한 세포 방어 기전의 존재에 대한 증거가 증가하고 있다(Bingham, 1997, Garrick et al., 1998). 또한, 바이러스 성분은 세포를 형질전환시키기 위해 다른 인자와 함께 작용할 수 있다. 다수의 바이러스 유전자로부터 연속적인 발현에 동반하여, 세포 내에서 바이러스 게놈의 적어도 일부의 지속은 세포 형질전환을 유발할 수 있다. 이러한 유전자는 세포의 시그널링 경로를 방해하여 세포의 관찰되는 표현형적 변화를 유발하고, 결과적으로 바이러스에게 유리한 세포 분열 증가를 나타내는 형질전환된 세포가 산출된다.

[0105] 따라서, 특정 양태로, 본 발명은 종래 방법에 사용된 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 등에서 유래되는 외인성 유전 요소가 본질적으로 없는 유도 만능 줄기 세포 및 다른 목적한 세포 종류를 발생시키는 방법을 개발한다. 이러한 방법은 염색체외 복제성 벡터 또는 에피솜적 복제 가능한 벡터를 이용한다. 다수의 DNA 바이러스, 예컨대 아데노바이러스, 시미안 공포형성 바이러스 40(SV40) 또는 소 유두종 바이러스(BPV) 또는 출아성 효모 ARS(자가 복제 서열)-함유 플라스미드는 포유동물에서 염색체외 또는 에피솜적으로 복제한다. 이러한 에피솜성 플라스미드는 통합 벡터와 관련된 상기 모든 단점들이 본질적으로 없지만(Bode et al., 2001), 유도 만능 줄기 세포의 발생용으로 공공연하게 개시된 적은 없다. 또한, 앞에서 정의한 엡스타인 바 바이러스(EBV) 또는 이를 포함하는 림프영양성 헤르페스 바이러스계는 염색체외에서 복제할 수 있고 체세포로 재프로그래밍 유전자의 전

달을 도울 수 있다. 이러한 바이러스의 복제 기원 또는 ARS 요소는 특성이 잘 규명되어 있지만, 본 발명 전에 분화 세포의 재프로그래밍에 대해 공개된 적은 결코 없다.

[0106] 예를 들어, 본 발명에 사용된 플라스미드-기반 접근법은 이하에 상세하게 설명되는 임상 세팅에서 시스템의 취급 용이성을 저해하지 않고 EBV 요소-기반 시스템의 성공적인 복제 및 유지에 필요한 확고한 인자를 이끌어낸다. 이러한 필수 EBV 요소는 *oriP* 및 *EBNA-1* 또는 이들의 변형체 또는 기능적 등가물이다. 이러한 시스템의 추가 장점은 상기 외인성 요소가 세포로 도입된 후 시간이 경과함에 따라 상실되어, 최종적으로 상기 요소들이 본질적으로 없는 자기-지속적 iPS 세포를 초래한다는 것이다.

A. 엡스타인-바 바이러스

[0108] 사람 헤르페스바이러스 4(HHV-4)라고도 불리는 엡스타인-바 바이러스(EBV)는 헤르페스 패밀리의 바이러스(헤르페스 단순 바이러스 및 사이토메갈로바이러스를 포함함)이고, 사람에서 가장 일반적인 바이러스 중 하나이다. EBV는 자신의 게놈을 염색체외에서 유지하고 효과적인 복제 및 유지를 위해 숙주 세포 기구와 협동하여 작업하고(Lindner and Sugden, 2007), 효과적인 복제와 유지는 세포 분열 동안 세포 내에서 복제 및 잔존에 필수적인 2가지 특징에만 좌우된다(Yates et al. 1985; Yates et al. 1984). *oriP*라고도 통칭되는 한 인자는 시스로(*in cis*) 존재하고 복제 오리진으로 작용한다. 다른 인자, *EBNA1*는 *oriP* 내의 서열에 결합하여 트랜스로(*in trans*) 기능하여, 플라스미드 DNA의 복제 및 유지를 조장한다. 비제한적 예로, 본 발명자들은 이러한 2가지 특징을 끌어내어 이들을 플라스미드의 상황에서 이용하여 체세포 재프로그래밍에 필요한 유전자가 정기적으로 왕복하여 종래 플라스미드보다 상기 유전자의 복제 및 지속적인 발현을 용이하게 한다.

B. *oriP*

[0110] *oriP*는 DNA 복제가 개시하는 부위 또는 그 부근으로, 반복부의 패밀리(FR; Family of Repeats) 및 이분염색체 대칭(DS; Dyad Symmetry)으로 알려진 2개의 시스-작용성 서열이 1kb 염기쌍 정도 이격되어 구성되어 있다.

[0111] FR은 30bp 반복부의 21개 불완전 카페로 구성되고 20개의 고 친화성 *EBNA1*-결합 부위를 함유한다(도 1). FR은 *EBNA1*이 결합하면, 이들은 함께 최고 10kb 떨어져서 프로모터의 전사 인핸서로서 시스로 작용하고(Reisman and Sugden, 1986; Yates, 1988; Sugden and Warren, 1989; Wysokenski and Yates, 1989; Gahn and Sugden, 1995; Kennedy and Sugden, 2003; Altmann et al., 2006), FR 함유 플라스미드의 핵 잔류 및 충실한 유지에 기여한다 (Langle-Rouault et al., 1998; Kirchmaier and Sugden, 1995; Wang et al., 2006; Nanbo and Sugden, 2007). *oriP* 플라스미드의 효율적 분할은 또한 FR에 기인할 가능성이 있다. 바이러스는 FR에 20개의 *EBNA1* 결합 부위를 유지하도록 진화했지만, 효율적인 플라스미드 유지는 상기 부위를 7개만 필요로 하고, 총 12개 *EBNA1*-결합 부위를 보유하는 3개 DS 카페의 중합체에 의해 재구성될 수 있다(Wysokenski and Yates, 1989).

[0112] 이분염색체 대칭 요소(DS)는 *EBNA1*의 존재 하에 DNA 합성을 개시하는데 충분하고(Aiyar et al., 1998; Yates et al., 2000), 개시는 DS에서 또는 DS 부근에서 일어난다(Gahn and Schildkraut, 1989; Niller et al., 1995). 바이러스 DNA 합성의 종결은 FR에 *EBNA1*이 결합했을 때 이들이 2D 젤 전기영동 관찰 시 복제 포크 장벽(replication fork barrier)으로 기능하기 때문에 FR에서 일어난다고 생각되고 있다(Gahn and Schildkraut, 1989; Ermakova et al., 1996; Wang et al., 2006). DS로부터 DNA 합성의 개시는 세포주기 당 1회로 허용되고 (Adams, 1987; Yates and Guan, 1991), 세포 복제 시스템의 성분들에 의해 조절된다(Chaudhuri et al., 2001; Ritzi et al., 2003; Dhar et al., 2001; Schepers et al., 2001; Zhou et al., 2005; Julien et al., 2004). DS는 FR에서 발견되는 것보다 친화성은 낮지만 4개의 *EBNA1*-결합 부위를 함유한다(Reisman et al., 1985). DS의 토플로지는 4개의 결합 부위가 2쌍의 부위로 배열되게 하는 것으로, 각 쌍 사이에 21bp 중심-중심간 이격 및 쌍을 이루지 않은 두 내부 결합 부위 간에 33bp 중심-중심간 이격을 보유한다(도 1c)(Baer et al., 1984; Rawlins et al., 1985).

[0113] DS에 존재하는 요소들의 기능적 역할은 DS를 비효율적으로 대체할 수 있는 요소로 동정된 *Rep*^{*}라는 EBV 게놈의 다른 영역의 연구를 통해 확인되었다(Kirchmaier and Sugden, 1998). *Rep*^{*}의 8회 중합체화는 복제 지지에 있어서 DS만큼 효율적인 요소를 산출했다(Wang et al., 2006). *Rep*^{*}의 생화학적 해부는 21bp 중심-중심간 이격부가 복제 기능에 중요한 한 쌍의 EBNA1-결합 부위를 동정했다(동일 문헌 참조). *Rep*^{*}의 최소 복제인자는 중합체 내의 모든 인접 서열이 람다 파지 유래의 서열로 교체된 후에도 복제기능이 유지되었기 때문에 EBNA1-결합 부위의 쌍인 것으로 밝혀졌다. DS와 *Rep*^{*}의 비교는 공통적인 기전을 드러냈는데, 이 복제인자들은 한쌍의 적당히 이격된

부위를 통해 세포 복제 기구를 모집하고 만곡시킨 뒤 EBNA1에 결합시켜 DNA 합성의 개시를 지지한다.

[0114] EBV와 무관한 포유동물 세포에서 복제하고 어떤 점에서는 EBV의 Raji 균주 내의 개시 구역과 유사한 것으로 보이는, 다른 염색체의 허가된 플라스미드도 있다. 한스 립스(Hans Lipps)와 동료들은 "핵 스캐폴드/기질 부착 부위"(S/MAR) 및 확고한 전사 단위를 함유하는 플라스미드를 개발 및 연구했다(Piechaczek *et al.*, 1999; Jenke *et al.*, 2004). 이들의 S/MAR은 사람 인터페론-베타 유전자에서 유래되고, A/T가 풍부하고, 핵 기질과 결합하고 낫은 이온 강도에서 또는 슈퍼코일 DNA에 매립되었을 때 우선적인 권출에 의해 조작에 의해 분명해진다(Bode *et al.*, 1992). 이 플라스미드들은 반보존적으로 복제하고, ORC 단백질에 결합하며, 이들의 DNA를 통해 효과적으로 랜덤하게 DNA 합성의 개시를 지지한다(Schaarschmidt *et al.*, 2004). 이 플라스미드들은 중식성 햄스터 및 사람 세포에서 약물 선택없이 효과적으로 유지되고, 돼지 배아에 도입되었을 때 태내 동물의 대부분의 조직에서 GFP의 발현을 지지할 수 있다(Manzini *et al.*, 2006).

C. EBNA1

[0116] 엡스타인 바 핵 항원 1 (EBNA1)은 *oriP* 또는 *Rep**의 FR 및 DS에 결합하여, 각 세포 분열 동안 세포 염색체와 독립적이지만 협력하여 떨 세포로 EBV 플라스미드의 복제 및 충실했 분할을 용이하게 하는 DNA-결합 단백질이다.

[0117] EBNA1의 641개 아미노산(AA)은 돌연변이적 및 결실 분석을 통해 다양한 기능과 관련이 있는 도메인들로 분류되었다(도 2). AA40-89와 AA329-378 사이의 두 영역은 EBNA1이 결합할 때 시스 또는 트랜스로 두 DNA 요소를 결합시킬 수 있고, 이에 따라 결합 영역 1 및 2(LR1, LR2)라 지칭되고 있다(Middleton and Sugden, 1992; Frappier and O'Donnell, 1991; Su *et al.*, 1991; Mackey *et al.*, 1995). 이러한 EBNA1의 도메인과 GFP의 융합은 GFP를 유사분열성 염색체로 돌아오게 한다(Marechal *et al.*, 1999; Kanda *et al.*, 2001). LR1 및 LR2는 복제 시 기능적으로 중복되고; 어떤 하나의 결실은 DNA 복제를 지지할 수 있는 EBNA1 유도체를 생산한다(Mackey and Sugden, 1999; Sears *et al.*, 2004). LR1 및 LR2에는 아르기닌 및 글리신 잔기가 풍부하고 A/T 풍부 DNA에 결합하는 AT-훅(hook) 모티프와 유사하다(Aravind and Landsman, 1998), (Sears *et al.*, 2004). EBNA1의 LR1 및 LR2의 시험관내 분석은 A/T 풍부 DNA에 결합하는 능력을 증명했다(Sears *et al.*, 2004). 이러한 AT-훅 하나를 함유하는 LR1이 EBNA1의 DNA-결합 및 이량체화 도메인에 융합했을 때, 야생형 EBNA1보다는 효율이 훨씬 적지만 *oriP* 플라스미드의 DNA 복제에 충분한 것으로 밝혀졌다(동일 문헌 참조).

[0118] 그러나, LR1 및 LR2는 상이하다. LR1의 C-말단 절반은 N-말단 절반의 반복 Arg-Gly과 다른 아미노산으로 구성되어 있고, 고유 영역 1(UR1)이라 지칭된다. UR1은 FR을 함유하는 형질감염되어 통합된 리포터 DNA로부터 효율적으로 전사를 활성화하는데 EBNA1에 필요하다(Wu *et al.*, 2002; Kennedy and Sugden, 2003; Altmann *et al.*, 2006). 또한, UR1은 EBV에 의해 감염된 B-세포의 효율적인 형질전환에도 필수적이다. 이러한 도메인이 결여된 EBNA1의 유도체가 전체 바이러스의 상황에서 야생형 단백질을 대체할 때, 상기 유도체 바이러스의 형질전환율은 야생형 바이러스의 0.1%이다(Altmann *et al.*, 2006).

[0119] LR2는 EBNA1의 *oriP* 복제 지지에 필요하지 않다(Shire *et al.*, 1999; Mackey and Sugden, 1999; Sears *et al.*, 2004). 또한, EBNA1의 N-말단 절반은 AT-훅 모티프를 함유하는 세포 단백질, 예컨대 HMGA1a로 교체되어 복제 기능을 그대로 유지할 수 있다(Hung *et al.*, 2001; Sears *et al.*, 2003; Altmann *et al.*, 2006). 이러한 발견은, LR1 및 LR2의 AT-훅 활성이 사람 세포에서 *oriP*를 유지하는데 필요할 가능성이 있음을 시사한다.

[0120] EBNA1 잔기의 1/3(AA91-328)은 프로테오좀 분해 및 제사를 억제하여 숙주 면역 반응을 피하는 EBNA1의 능력에 연관된, 글리신-글리신-알라민(GGA) 반복부로 이루어진다(Levitskaya *et al.*, 1995; Levitskaya *et al.*, 1997). 이러한 반복부는 또한 시험관내 및 생체내에서 EBNA1의 해독을 저해하는 것으로 밝혀져 있다(Yin *et al.*, 2003). 하지만, 이 도메인 대부분의 결실은 세포 배양물에서 EBNA1의 기능에 분명한 영향이 없었고, 이 도메인이 하는 역할을 해명하기 어렵게 한다.

[0121] 핵 국재화 시그널(NLS)은 세포의 핵 이입 기구와도 연관이 있는 AA379-386에 의해 암호화된다(Kim *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 1997). LR1 및 LR2의 Arg-Gly 풍부 영역 내의 서열은 또한 이 서열의 고 염기성 함량으로 인해 NLS로도 기능할 수 있다.

[0122] 마지막으로, C-말단(AA458-607)은 EBNA1의 중첩성 DNA-결합 및 이량체화 도메인을 암호화한다. DNA에 결합된 이 도메인의 구조는 X선 결정학에 의해 해석되었고, 유두종바이러스의 E2 단백질의 DNA-결합 도메인과 유사한 것으로 발견되었다(Hegde *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2000; Bochkarev *et al.*, 1996).

[0123] 본 발명의 특정 양태에서, 재프로그래밍 백터는 플라스미드 복제 및 세포 분열 동안 이의 적당한 유지를 지지하는데 유능한 EBNA1의 변형을 암호화하는 단축 서열과 *oriP*를 함유할 것이다. 다양한 세포에서 독성이 증명된 25

개 아미노산 영역의 제거와 야생형 EBNA1의 아미노산 말단 1/3 내의 고도로 반복적인 서열은 *oriP*와 연관된 EBNA1의 트랜스-작용 기능에 없어도 된다(Yates *et al.* 1985; Kennedy *et al.* 2003). 따라서, EBNA1의 단축 형태인 엘타UR1로 알려진 예시적 유도체(이 유도체는 서열번호 4에 의해 암호화된 서열번호 3의 단백질 서열을 보유한다)는 이 플라스미드 기반 시스템 내에서 *oriP*와 나란히 사용될 수 있다. 많은 EBNA1 유도체의 예가 염색체 외 주형으로부터의 전사를 활성화시킬 수 있다(예컨대, 참고인용된 문헌 Kirchmaier and Sugden, 1997, 및 Kennedy and Sugden, 2003 참고).

[0124] 본 발명에 사용된 EBNA-1의 유도체는 상응하는 야생형 폴리펩타이드에 대해 변형된 아미노산 서열을 가진 폴리펩타이드이다. 변형은 EBNA-1 중의 LR1(잔기 약 40번 내지 약 89번)의 고유 영역(잔기 약 65번 내지 약 89번)에 해당하는 영역에서의 적어도 한 아미노산 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함하고, EBNA-1의 다른 잔기, 예컨대 대략 잔기 1번 내지 대략 잔기 40번, 잔기 약 90번 내지 약 328번("Gly-Gly-Ala" 반복 영역), 잔기 약 329번 내지 약 377번(LR2), 잔기 약 379번 내지 약 386번(NLS), 잔기 약 451번 내지 약 608번(DNA 결합 및 이량체화) 또는 잔기 약 609번 내지 약 641번에 상응하는 영역에 있는 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함할 수 있는데, 단 최종 유도체가 목적 성질, 예컨대 이량체화하여 *oriP*에 상응하는 *ori*를 함유하는 DNA에 결합하고, 핵에 국재화하고, 세포독성이 아니고 염색체외로부터의 전사는 활성화하나 통합된 주형으로부터의 전사는 실질적으로 활성화하지 않는 성질을 나타내야 한다. 치환은 L형보다 D형을 이용하는 치환, 뿐만 아니라 다른 공지된 아미노산 유사체, 예컨대 비천연 아미노산, 예컨대 α -이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산 등을 이용하는 치환을 포함한다. 이러한 유사체로는 포스포세린, 포스포트레오닌, 포스포티로신, 하이드록시프롤린, 감마-카르복시글루타메이트; 헤푸르산, 옥타하이드로인돌-2-카르복시산, 스타틴, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복시산, 페니실아민, 오르니틴, 시트룰린, α -메틸-알라닌, 파라-벤조일-페닐알라닌, 페닐글리신, 프로파길글리신, 사르코신, ϵ -N,N,N-트리메틸리신, ϵ -N-아세틸리신, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시리신, 오메가-N-메틸아르기닌 및 다른 유사 아미노산 및 아미노산 및 3급-부틸글리신을 포함한다.

[0125] 보존적 아미노산 치환이 바람직하며, 즉 예컨대 극성 산성 아미노산으로서 아스파르트산-글루탐산; 극성 염기성 아미노산으로서 리신/아르기닌/히스티딘; 비극성 또는 소수성 아미노산으로서 류신/이소류신/메티오닌/발린/알라닌/글리신/프롤린; 극성 또는 비하전성 친수성 아미노산으로서 세린/트레오닌을 포함한다. 또한, 보존적 아미노산 치환은 측쇄을 기반으로 한 그룹화를 포함한다. 예컨대, 지방족 측쇄를 보유하는 아미노산 그룹은 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신이고; 지방족-하이드록실 측쇄를 보유하는 아미노산 그룹은 세린 및 트레오닌이며; 아미드 함유 측쇄를 보유하는 아미노산 그룹은 세린 및 트레오닌이고; 아미드 함유 측쇄를 보유하는 아미노산 그룹은 아스파라긴 및 글루타민이고; 방향족 측쇄를 보유하는 아미노산 그룹은 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판이며; 염기성 측쇄를 보유하는 아미노산 그룹은 리신, 아르기닌 및 히스티딘이고; 황-함유 측쇄를 보유하는 아미노산 그룹은 시스테인 및 메티오닌이다. 예컨대, 류신의 이소류신 또는 발린으로의 대체, 아스파테이트의 글루타메이트로의 대체, 트레오닌의 세린으로의 대체 또는 한 아미노산의 이와 구조적 관련성이 있는 아미노산으로의 유사한 대체가 최종 폴리펩타이드의 성질에 중요한 영향을 미치지 않을 것으로 생각되는 것이 적당하다. 아미노산 변화가 기능적 폴리펩타이드를 초래하는지의 여부는 폴리펩타이드의 특이적 활성을 평가하여 쉽게 측정할 수 있다.

[0126] 본 발명의 범위에 속하는 아미노산 치환은 일반적으로 (a) 치환 영역에서 펩타이드 골격의 구조, (b) 표적 부위에 있는 분자의 하전 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 크기를 유지하는데 미치는 영향이 크게 다르지 않는 치환을 선택하여 달성한다. 자연발생의 잔기는 공통적인 측쇄 성질에 따라 그룹으로 분류한다:

[0127] (1) 소수성 : 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0128] (2) 중성 친수성 : cys, ser, thr;

[0129] (3) 산성 : asp, glu;

[0130] (4) 염기성 : asn, gln, his, lys, arg;

[0131] (5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기 : gly, pro; 및

[0132] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0133] 또한, 본 발명은 비보존적 치환을 보유하는 폴리펩타이드도 계획한다. 비보존적 치환은 전술한 클래스 중 한 클래스의 구성원을 다른 것으로 교환하는 것을 수반한다.

- [0134] 폴리펩타이드의 산 부가 염 또는 폴리펩타이드의 아미노 잔기의 산 부가 염은 폴리펩타이드 또는 아민을 1 당량 이상의 바람직한 무기산 또는 유기산, 예컨대 염산과 접촉시켜 제조할 수 있다. 또한, 폴리펩타이드의 카르복시기의 에스테르는 당업계에 공지된 임의의 상법으로 제조할 수 있다.
- [0135] 유사체는 하나 이상의 웨타이드 결합이 당업계에 공지되고 이하 참고문헌에 상세히 설명되어 있는 방법에 의해 경우에 따라 $--\text{CH}_2\text{NH}-$, $--\text{CH}_2\text{S}-$, $--\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $--\text{CH}=\text{CH}-$ (시스 및 트랜스), $--\text{CH}=\text{CF}-$ (트랜스), $--\text{COCH}_2-$, $--\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, 및 $--\text{CH}_2\text{SO}-$ 로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 결합에 의해 대체된 구조를 포함한다: Spatola, 1983; Spatola, 1983; Morley, 1980; Hudson *et al.*, 1979 ($--\text{CH}_2\text{NH}-$, CH_2CH_2-); Spatola *et al.*, 1986 ($--\text{CH}_2-\text{S}$); Hann, 1982 ($--\text{CH}-\text{CH}-$, 시스 및 트랜스); Almquist *et al.*, 1980 ($--\text{COCH}_2-$); Jennings-White *et al.*, 1982 ($--\text{COCH}_2-$); Szelke *et al.* 유럽특허 EP 45665 ($--\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$); Holladay *et al.*, 1983 ($--\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$); 및 Hruby, 1982 ($--\text{CH}_2\text{S}-$); 각 문헌은 본 발명에 참고인용되고 있다. 특히 바람직한 비펩타이드 결합은 $--\text{CH}_2\text{NH}-$ 이다. 이러한 유사체는 더 큰 화학적 안정성, 증강된 약리학적 성질(반감기, 흡수성, 효력, 효능 등), 변경된 특이성(예: 광범위한 생물학적 활성), 감소된 항원성을 나타내고 경제적으로 제조할 수 있다.
- [0136] **D. 잔기-제거 특징**
- [0137] 중요한 것은 *oriP*-기반 플라스미드의 복제 및 유지가 불완전하고 세포에 도입된 후 처음 2주 이내에 세포로부터 급격히 상실된다는 점이다(세포 분열당 25%); 하지만, 플라스미드를 보유하는 세포들은 덜 빈번하게(세포 분열당 3%) 상실된다(Leight and Sugden, 2001; Nanbo and Sugden, 2007). 플라스미드를 수용한 세포에 대한 선택이 끝나면, 플라스미드는 각 세포 분열 동안 상실되어, 모든 플라스미드는 최종 땀 세포 내에 이전 존재의 발자국을 남김이 없이 경시적으로 제거되었다. 이러한 무발자국(footprintless) 특징은 분화 프로그래밍을 이용하여 iPS 세포 및 다른 목적 세포를 발생시키기 위해 유전자를 전달하는 혈행 바이러스-관련 접근법의 대안으로 *oriP*-기반 시스템에 대한 호소를 기본으로 한다. 또한, 다른 염색체외 벡터도 숙주 세포의 복제 및 증식 동안 상실될 것인 바, 본 발명에 이용할 수도 있다.
- [0138] **V. 벡터 작제 및 전달**
- [0139] 특정 양태에서, 재프로그래밍 또는 분화 프로그래밍 벡터는 전술한 재프로그래밍 인자 또는 분화 프로그래밍 인자를 암호화하는 핵산 서열 외에 추가 요소를 포함하여 세포에서 상기 재프로그래밍 인자를 발현하도록 작제할 수 있다. 이 방법의 신규 특징은 숙주 세포 계놈에 통합되지 않고 복제 발생 동안 상실될 수 있는 염색체외 복제 벡터의 이용이다. 이러한 벡터 성분과 전달 방법의 세부사항은 이하에 개시한다.
- [0140] **A. 벡터**
- [0141] 플라스미드- 또는 리포좀-기반 염색체외 벡터, 예컨대 *oriP*-기반 벡터, 및/또는 EBNA-1의 유도체를 암호화하는 벡터의 이용은 DNA의 큰 단편이 세포로 도입되게 하고, 염색체외에서 유지되어 세포 주기당 1회씩 복제하게 하며, 땀 세포에 효율적으로 분할되게 하여 면역 반응을 실질적으로 유발하지 않는다. 특히, *oriP*-기반 발현 벡터의 복제에 필요한 유일한 바이러스 단백질인 EBNA-1은 MHC 클래스 I 분자에 항원을 제시하는데 필요한 프로세싱을 우회하는 효율적인 기전을 발달시켰기 때문에 세포 면역 반응을 이끌어내지 못한다(Levitskaya *et al.*, 1997). 또한, EBNA-1은 클로닝된 유전자의 발현을 증강시키기 위해 트랜스로 작용하여, 일부 세포주에서는 클로닝된 유전자의 발현을 100배까지 유도할 수 있다(Langle-Rouault *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1997). 마지막으로 이러한 *oriP*-기반 발현 벡터의 제조는 비용이 적게 듈다.
- [0142] 다른 염색체외 벡터로는 다른 림프영양성 헤르페스 바이러스-기반 벡터가 있다. 림프영양성 헤르페스 바이러스는 림프아세포(예: 사람 B 림프아세포)에서 복제하고 천연 생활사의 일부 동안 플라스미드가 되는 헤르페스 바이러스이다. 헤르페스 단순 바이러스(HSV)는 "림프영양성" 헤르페스 바이러스가 아니다. 림프영양성 헤르페스 바이러스의 예로는, EBV, 카포시 육종 헤르페스 바이러스(KSHV); 헤르페스 바이러스 사이미리(HS) 및 마렉병 바이러스(MDV)가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 또한, 에피좀-기반 벡터의 다른 근원, 예컨대 효모 ARS, 아데노바이러스, SV40 또는 BPV도 고려한다.
- [0143] 당업자는 표준 재조합 기술을 통해 벡터를 작제할 채비를 잘 할 수 있다(예컨대, Maniatis *et al.*, 1998 및 Ausubel *et al.*, 1994, 모두 참고인용됨).
- [0144] 또한, 벡터는 유전자 전달 및/또는 유전자 발현을 추가로 조절하고, 또는 다른 방식으로 표적 세포에 유익한 성질을 제공하는 다른 성분 또는 작용기를 포함할 수 있다. 이러한 다른 성분으로는, 예컨대 세포에 대한 결합이

나 표적화에 영향을 미치는 성분(예컨대, 세포-종류 또는 조직-특이적 결합을 매개하는 성분); 세포에 의한 벡터 핵산의 흡수에 영향을 미치는 성분; 흡수 후 세포 내에서 폴리뉴클레오타이드의 국재화에 영향을 미치는 성분(예컨대, 핵 국재화를 매개하는 인자); 및 폴리뉴클레오타이드의 발현에 영향을 미치는 성분을 포함한다.

[0145] 또한, 이러한 성분들은 마커, 예컨대 흡수되어 벡터에 의해 전달된 핵산을 발현하고 있는 세포를 검출하거나 선택하는데 사용될 수 있는 검출성 및/또는 선택 마커를 포함하기도 한다. 이러한 성분들은 벡터의 천연 특징으로 제공될 수 있고(예컨대, 결합 및 흡수를 매개하는 작용기 또는 성분을 보유하는 특정 바이러스 벡터이 이용), 또는 벡터는 이러한 작용기를 제공하도록 변형시킬 수 있다. 이러한 벡터는 다수가 당업계에 공지되어 있고 일반적으로 입수가능하다. 벡터가 숙주 세포에서 유지될 때, 벡터는 자가 구조로서 유사분열 동안 세포에 의해 안정하게 복제되거나, 숙주 세포의 계놈 내에 혼입되거나, 또는 숙주 세포의 핵이나 세포질 내에 유지될 수 있다.

[0146] B. 조절 요소:

[0147] 벡터에 포함된 진핵생물 발현 카세트는 (5'에서 3' 방향으로) 단백질-암호 서열에 작동가능하게 결합된 진핵생물 전사 프로모터, 개재 서열을 포함하는 스플라이스 시그널 및 전사 종결/폴리아데닐화 서열을 함유하는 것이 바람직하다.

[0148] i. 프로모터/인핸서

[0149] "프로모터"는 전사 개시 및 속도가 조절되는 핵산 서열의 한 영역인 조절 서열이다. 이것은 핵산 서열의 특이적 전사를 개시하기 위해 RNA 폴리머라제 및 다른 전사 인자와 같이 조절 단백질 및 분자가 결합할 수 있는 유전 요소를 함유할 수 있다. "작동가능하게 위치된", "작동가능하게 결합된", "조절 하에" 및 "전사 조절 하에"란 어구는 서열의 전사 개시 및/또는 발현을 조절하기 위해 핵산 서열에 대해 정확한 기능적 위치 및/또는 배향으로 존재하는 것을 의미한다.

[0150] 본 발명의 EBNA-1 암호화 벡터에 사용하기에 적합한 프로모터는 EBV or iP-함유 벡터를 안정하게 유지하기 위해 충분한 안정 상태의 EBNA-1 단백질 수준을 생산하도록 EBNA-1 단백질을 암호화하는 발현 카세트의 발현을 유도하는 것이다. 또한, 프로모터는 재프로그래밍 인자를 암호화하는 발현 카세트의 효율적인 발현에도 사용된다.

[0151] 일반적으로, 프로모터는 RNA 합성의 출발 부위의 위치를 정하는 기능을 하는 서열을 포함한다. 가장 잘 알려진 예는 TATA 박스이지만, TATA 박스가 결여된 일부 프로모터, 예컨대 포유동물 말단 테옥시뉴클레오타이드 트랜스 퍼라제 유전자의 프로모터 및 SV40 후기 유전자의 프로모터에서는 출발 부위 자체가 중첩성인 별도의 인자가 개시 위치를 정하는 것을 돋는다. 또 다른 프로모터 인자는 전사 개시 빈도를 조절한다. 일반적으로, 이러한 인자들은 출발 부위로부터 30 내지 110 bp 상류 영역에 위치하지만, 다수의 프로모터가 출발 부위의 하류에도 기능성 요소를 함유하는 것으로 밝혀져 있다. 암호 서열을 프로모터의 "조절 하에" 두기 위해, 전사 관독 프레임의 전사 개시 부위의 5' 말단을 선택 프로모터의 "하류"(즉, 3')에 둔다. "상류" 프로모터는 DNA의 전사를 자극하고 암호화된 RNA의 발현을 촉진한다.

[0152] 프로모터 요소 사이의 간격은, 이 요소들이 서로에 대해 역위되거나 이동할 때 프로모터 기능이 보존될 정도로 흔히 유연하다. tk 프로모터에서, 프로모터 요소 간의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50bp 거리까지 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 각 요소는 협동해서 또는 독립해서 전사를 활성화하는 기능을 할 수 있는 것으로 보인다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성화에 관여하는 시스-작용성 조절 서열을 의미하는 "인핸서"와 함께 사용되거나 함께 사용되지 않을 수 있다.

[0153] 프로모터는 암호화 분절 및/또는 엑손의 상류에 위치한 5' 비암호화 서열을 분리하여 수득할 수 있듯이, 핵산 서열과 자연 결합된 것일 수 있다. 이러한 프로모터는 "내인성"이라 불릴 수 있다. 이와 마찬가지로, 인핸서는 이 서열의 하류 또는 상류에 위치한 핵산 서열과 자연 결합된 것일 수 있다. 대안적으로, 자연 환경에서 핵산 서열과 일반적으로 결합되어 있지 않은 프로모터를 의미하는 재조합 또는 이종 프로모터의 조절 하에 암호화 핵산 분절을 위치시켜 특정한 장점을 수득할 수도 있다. 또한, 재조합 또는 이종 인핸서는 자연 환경에서 핵산 서열과 일반적으로 결합되어 있지 않은 인핸서를 의미한다. 이러한 프로모터 또는 인핸서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 임의의 다른 바이러스, 원핵생물 세포 또는 진핵생물 세포에서 분리한 인핸서, 및 "자연 발생"이 아닌 프로모터 또는 인핸서, 즉 다른 전사 조절 영역의 다른 요소 및/또는 발현을 변경시키는 돌연변이를 함유하는 프로모터 또는 인핸서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 작제에 가장 일반적으로 사용되는 프로모터는 β -락타마제(페니실리나제), 락토스 및 트립토판(trp) 프로모터 시스템을 포함한다. 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 합성 생산하는 것 외에, 서열은 본 명세서에 개시된 조성물과 함께 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술, 예컨대 PCR™을 이용해 생산할 수도 있다(각각 참고인용된 미국 특허 4,683,202 및 5,928,906 참

고). 또한, 핵 외에 소기관, 예컨대 미토콘드리아, 엽록체 등에서 서열의 전사 및/또는 발현을 유도하는 조절 서열도 이용할 수 있다는 것도 고려해야 한다.

[0154] 물론, 발현을 위해 선택한 소기관, 세포 종류, 조직, 기관 또는 유기체에서 DNA 분절의 발현을 효과적으로 유도하는 프로모터 및/또는 인핸서를 이용하는 것이 중요할 것이다. 분자생물학의 당업자는 일반적으로 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서 및 세포 종류 조합의 이용을 알고 있다(예컨대, 참고인용한 Sambrook et al., 1989 참고). 이용된 프로모터는 구성적, 조직-특이적, 유도성, 및/또는 도입된 DNA 분절의 높은 발현 수준을 유도하기에 적당한 조건 하에 유용한 것일 수 있어, 예컨대 재조합 단백질 및/또는 웹타이드의 대량 생산에 유익하다. 프로모터는 이종성 또는 내인성일 수 있다.

[0155] 또한, 임의의 프로모터/인핸서의 조합(예컨대, Eukaryotic Promoter Data Base EPDB, www.epd.isb-sib.ch/에 따라)도 발현을 유도하기 위해 사용할 수 있다. T3, T7 또는 SP6 세포질 발현 시스템의 이용은 다른 가능한 양태이다. 진핵생물 세포는 적당한 세균 폴리미라제가 전달 복합체의 일부로서 또는 추가 유전자 발현 작제물로서 제공된다면 특정 세균 프로모터로부터 세포질 전사를 뒷받침할 수 있다.

[0156] 프로모터의 비제한적 예로는 초기 또는 후기 바이러스 프로모터, 예컨대 SV40 초기 또는 후기 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 초기 프로모터; 진핵생물 세포 프로모터, 예컨대 베타 액틴 프로모터(Ng, S.Y., Nuc. Acid Res. 17: 601-615, 1989, Quitsche et al., J. Biol. Chem. 264: 9539-9545, 1989), GADPH 프로모터(Alexander et al., Proc.Nat.Acad.Sci. USA 85: 5092-5096, 1988, Ercolani et al., J.Biol.Chem. 263: 15335-15341, 1988), 메탈로티오네인 프로모터(Karin et al. Cell 36: 371-379, 1989; Richards et al., Cell 37: 263-272, 1984); 및 연쇄 반응 요소 프로모터, 예컨대 사이클릭 AMP 반응 요소 프로모터(cre), 혈청 반응 요소 프로모터(sre), 포볼 에스테르(phorbol ester) 프로모터(TPA) 및 최소 TATA 박스 부근의 반응 요소 프로모터(tre)를 포함한다. 또한, 사람 성장 호르몬 프로모터 서열(예: Genbank 등록번호 X05244에 기술된 사람 성장호르몬 최소 프로모터, 뉴클레오파이드 283-341), 또는 마우스 유방암 프로모터(ATCC, Cat.No. ATCC 45007에서 입수 가능함)를 사용하는 것도 가능하다. 구체적인 예는 포스포리세레이트 키나제(PGK) 프로모터일 수 있다.

ii. 개시 시그널 및 내부 리보솜 결합 부위

[0157] [0158] 또한, 특정 개시 시그널은 암호화 서열의 효율적인 해독에 필요할 수 있다. 이 시그널들은 ATG 개시 코돈 또는 인접 서열을 포함한다. 외인성 해독 조절 시그널, 예컨대 ATG 개시 코돈도 구비될 필요가 있을 수 있다. 당업자는 이를 쉽게 결정하고 필요한 시그널을 제공할 수 있을 것이다. 개시 코돈은 전 삽입체의 해독을 보장하기 위해 목적한 암호화 서열의 판독 프레임과 "프레임내"에 있어야 한다는 것이 잘 알려져 있다. 외인성 해독 조절 시그널 및 개시 코돈은 천연 또는 합성일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 인핸서 요소의 포함에 의해 증강될 수 있다.

[0159] 본 발명의 특정 양태에서, 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 요소의 이용은 다중유전자 또는 폴리시스트론성 메시지를 만들어내는데 사용된다. IRES 요소는 5' 메틸화된 Cap 의존적 해독의 리보솜 스캐닝 모델을 우회하고 내부 부위에서 해독을 개시할 수 있고(Pelletier and Sonenberg, 1988). 피코나바이러스 패밀리의 두 구성원(마마 및 뇌척수침근염) 유래의 IRES 요소(Pelletier and Sonenberg, 1988) 뿐만 아니라 포유동물 메시지 유래의 IRES(Macejak and Sarnow, 1991)도 기술되어 있다. IRES 요소는 이중 개방 판독 프레임에 결합될 수 있다. 다중 개방 판독 프레임은 각각 IRES에 의해 분리되어 함께 전사하여 폴리시스트론성 메시지를 생성할 수 있다. IRES 요소로 인해, 각 개방 판독 프레임은 효율적 해독을 위해 리보솜에 접근할 수 있다. 다중 유전자는 단일 메시지를 전사하는 단일 프로모터/인핸서에 의해 효율적으로 발현될 수 있다(각각 참고 인용된 미국 특허 5,925,565 및 5,935,819 참고).

iii. 다중 클로닝 부위

[0160] [0161] 벡터는 다중 제한 효소 부위를 함유하는 핵산 영역인 다중 클로닝 부위(MCS)를 포함할 수 있고, 이 부위는 모두 표준 재조합 기술과 관련하여 벡터를 분해하는데 사용될 수 있다(예컨대, Carbonelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, 및 Cocea, 1997, 참고인용됨). "제한 효소 분해"는 핵산 분자 내의 특정 위치에서만 기능하는 효소를 이용한 핵산 분자의 촉매적 절단을 의미한다. 이러한 제한 효소는 대부분 시판되고 있다. 이러한 효소의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 흔히, 벡터는 외인성 서열이 벡터에 연결될 수 있도록 MCS 내에서 절단하는 제한 효소를 이용하여 선형화 또는 단편화한다. "연결"은 서로 인접하거나 인접하지 않을 수 있는 두 핵산 단편 간에 포스포디에스테르 결합을 형성하는 과정을 의미한다. 제한 효소 및 연결 반응을 수반한 기술은 재조합 기

술 분야의 당업자에게 잘 알려져 있다.

iv. 스플라이싱 부위

[0162] 대부분의 전사된 진핵생물 RNA 분자는 원시 전사체로부터 인트론을 제거하기 위해 RNA 스플라이싱을 겪을 것이다. 게놈 진핵생물 서열을 함유하는 벡터는 단백질 발현을 위한 전사체의 적당한 프로세싱을 보장하기 위해 공여체 및/또는 수용체 스플라이싱 부위를 필요로 할 수 있다(예컨대, Chandler et al., 1997, 참고 인용됨).

v. 종결 시그널

[0163] 본 발명의 벡터 또는 작제물은 일반적으로 적어도 하나의 종결 시그널을 포함할 것이다. "종결 시그널" 또는 "종결인자"는 RNA 폴리머라제에 의한 RNA 전사체의 특이적 종결에 관여하는 DNA 서열로 구성되어 있다. 따라서, 특정 양태에서는 RNA 전사체의 생산을 종결하는 종결 시그널도 고려된다. 종결인자는 바람직한 메시지 수준을 달성하기 위해 생체내에 필요할 수 있다.

[0164] 진핵생물 시스템에서, 종결인자 영역은 또한 폴리아데닐화 부위를 노출시키기 위해 새 전사체의 부위-특이적 절단을 허용하는 특정 DNA 서열을 포함할 수 있다. 이것은 전사체의 3' 말단에 약 200 A 잔기(폴리A)의 스트레치를 첨가하도록 특수 내인성 폴리머라제에 신호를 보낸다. 이러한 폴리A 꼬리로 변형된 RNA 분자는 더욱 안정한 것으로 보이고 더욱 효율적으로 해독된다. 따라서, 진핵생물을 수반한 다른 양태에서, 종결인자는 RNA 절단을 위한 시그널을 함유하는 것이 바람직하고, 종결인자 시그널은 메시지의 폴리아데닐화를 촉진하는 것이 더욱 바람직하다. 종결인자 및/또는 폴리아데닐화 부위 인자는 메시지 수준을 증가시키고 카세트로부터 다른 서열로의 해독을 최소화할 수 있다.

[0165] 본 발명에 사용할 수 있는 것으로 고려되는 종결인자로는 당업자에게 공지되거나 본 명세서에 기술된 임의의 공지된 전사 종결인자를 포함하며, 그 예로는 유전자 종결 서열, 예컨대 소 성장호르몬 종결인자, 바이러스 종결 서열, 예컨대 SV40 종결인자를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 특정 양태에서, 종결 시그널은 서열 절두 등으로 인해 전사성 또는 해독성 서열이 결여될 수 있다.

vi. 폴리아데닐화 시그널

[0166] 발현, 특히 진핵생물 발현에서, 전사체의 적당한 폴리아데닐화를 달성하기 위해 폴리아데닐화 시그널을 일반적으로 포함할 것이다. 폴리아데닐화 시그널의 성질은 본 발명의 성공적인 실행에 중요한 것으로 생각되지 않으며, 이러한 모든 서열이 사용될 수 있다. 바람직한 양태로는 다양한 표적 세포에서 잘 기능하는 것으로 알려지고 편리한 SV40 폴리아데닐화 시그널 또는 소 성장호르몬 폴리아데닐화 시그널을 포함한다. 폴리아데닐화는 전사체의 안정성을 증가시키거나 세포질 수송을 용이하게 할 수 있다.

vii. 복제 오리진

[0167] 숙주 세포에서 벡터를 증식시키기 위해서는 하나 이상의 복제 부위의 오리진(종종 "ori"라 불림), 예컨대 전술한 EBV의 or iP에 상응하는 핵산 서열 또는 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인, 분화 프로그래밍에서 유사한 또는 상승된 기능을 가진 유전자조작된 or iP를 함유할 수 있다. 대안적으로, 전술한 다른 염색체외 복제 바이러스의 복제 오리진 또는 자가 복제 서열(ARS)도 이용할 수 있다.

viii. 선택 및 선별성 마커

[0168] 본 발명의 특정 양태에서, 본 발명의 핵산 작제물을 함유하는 세포는 발현 벡터에 마커를 포함시켜 시험관내 또는 생체내에서 동정할 수 있다. 이러한 마커는 세포에 동정성 변화를 부여하여 발현 벡터를 함유하는 세포를 쉽게 동정할 수 있게 한다. 일반적으로, 선택 마커는 선택을 허용하는 성질을 부여하는 것이다. 양성 선택 마커는 마커의 존재가 선택을 허용하는 것이고, 음성 선택 마커는 존재가 선택을 방해하는 것이다. 양성 선택 마커의 예는 약물 내성 마커이다.

[0169] 보통, 약물 선택 마커의 포함은 형질전환체의 클로닝 및 동정을 돋고, 예컨대 네오마이신, 퓨로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티디놀에 대한 내성을 부여하는 유전자가 유용한 선택 마커이다. 상태의 성취를 기초로 한 형질전환체의 구별을 허용하는 표현형을 부여하는 마커 외에도, 비색 분석을 기초로 한 GFP와 같은 선별성 마커를 비롯한 마커의 다른 종류도 고려되어야 한다. 대안적으로, 헤르페스 단순 티미딘 키나제 (tk) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT)와 같은 음성 선택 마커로서의 선별성 효소도 이용할 수 있다. 당업자는 또한 면역학적 마커를 가능하다면 FACS 분석과 함께 이용하는 방법도 알고 있을 것이다. 사용된 마커는 유전자 산물을 암호화하는 핵산과 동시에 발현될 수만 있다면, 중요한 것으로 생각되지 않는다. 선택 및 선

별성 마커의 추가 예는 당업자에게 잘 알려져 있다. 본 발명의 1가지 특징은 분화 프로그래밍 인자가 목적한 변경된 분화 상태의 세포를 달성한 후, 무벡터 세포를 선택하는 선택 및 선별성 마커를 이용한다는 것을 포함한다.

C. 벡터 전달

본 발명을 이용하여 체세포에 재프로그래밍 또는 분화 프로그래밍 벡터를 도입하는 방법은 본 명세서에 기술되거나 당업자에게 공지된 바와 같은 세포의 형질전환을 위한 임의의 적당한 핵산 전달 방법을 이용할 수 있다. 이러한 방법으로는, DNA의 직접 전달, 예컨대 생체외 형질감염(Wilson *et al.*, 1989, Nabel *et al.*, 1989), 주입(미국 특허 5,994,624, 5,981,274, 5,945,100, 5,780,448, 5,736,524, 5,702,932, 5,656,610, 5,589,466 및 5,580,859, 각각 본 명세서에 참고인용됨), 예컨대 미량주입(Harlan and Weintraub, 1985; 미국 특허 5,789,215, 각각 참고인용됨); 전기침투(electroporation)(미국 특허 5,384,253, 참고인용됨; Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984); 인산칼슘 침전법(Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); DEAE-덱스트란의 이용 후 폴리에틸렌 글리콜에 의해(Gopal, 1985); 직접 초음파 부하(Fechheimer *et al.*, 1987); 리포좀 매개 형질감염(Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991) 및 수용체-매개 형질감염(Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988); 미세입자 충격(PCT 출원번호 WO 94/09699 및 95/06128; 미국 특허 5,610,042; 5,322,783 5,563,055, 5,550,318, 5,538,877 및 5,538,880, 각각 참고인용됨); 탄화규소 섬유와 함께 진탕에 의해(Kaeppler *et al.*, 1990; 미국 특허 5,302,523 및 5,464,765, 각각 참고인용됨); 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개 형질전환(미국 특허 5,591,616 및 5,563,055, 각각 참고인용됨); 원형질의 PEG-매개 형질전환(Omirulleh *et al.*, 1993; 미국 특허 4,684,611 및 4,952,500, 각각 참고인용됨); 전조/억제-매개의 DNA 흡수(Potrykus *et al.*, 1985), 및 이러한 방법들의 임의의 조합을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 이와 같은 기술의 적용을 통해 소기관(들), 세포(들), 조직(들) 또는 유기체(들)는 안정하게 또는 일시적으로 형질전환될 수 있다.

i. 리포좀-매개 형질감염

본 발명의 특정 양태에서, 핵산은 리포좀 등과 같은 지질 복합체에 포집될 수 있다. 리포좀은 인지질 이중층 막과 내부 수성 매질을 특징으로 하는 소포 구조이다. 다중 리포좀은 수성 매질에 의해 분리된 다중 지질 층을 보유한다. 이것은 인지질이 과량의 수용액에 혼탁될 때 자발적으로 형성한다. 지질 성분은 폐쇄 구조를 형성하기 전에 자체-재배열을 겪고, 지질 이중층 사이에 물과 용해된 용질을 포집한다(Ghosh and Bachhawat, 1991). 또한, 리포펙타민(Gibco BRL) 또는 슈퍼펙트(Qiagen)과 복합체화된 핵산도 고려된다. 사용된 리포좀의 양은 리포좀의 성질뿐 아니라 사용된 세포에 따라 달라질 수 있고, 예컨대 1 내지 1000만 개의 세포당 약 5 내지 약 20 μg 의 벡터 DNA가 고려될 수 있다.

리포좀 매개의 핵산 전달 및 시험관내 이종 DNA의 발현은 매우 성공적이었다(Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987). 또한, 배양된 병아리 배아, HeLa 및 간암 세포에서 이종 DNA의 리포좀 매개 전달 및 발현의 실현가능성도 증명되었다(Wong *et al.*, 1980).

본 발명의 특정 양태에서, 리포좀은 혈구응집화 바이러스(HVJ)와 복합체화될 수 있다. 이것은 세포막과의 융합을 용이하게 하고 리포좀-캡슐화된 DNA의 세포 진입을 촉진하는 것으로 밝혀져 있다(Kaneda *et al.*, 1989). 다른 양태에서, 리포좀은 핵 비-히스톤 염색체 단백질(HMG-1)과 함께 복합체화되거나 이용될 수 있다(Kato *et al.*, 1991). 또 다른 양태에서, 리포좀은 HVJ 및 HMG-1과 함께 이용되거나 복합체화될 수 있다. 다른 양태에서, 전달 비허클은 리간드 및 리포좀을 포함할 수 있다.

ii. 전기침투

본 발명의 특정 양태에서, 핵산은 전기침투를 통해 소기관, 세포, 조직 또는 유기체 내로 도입된다. 전기침투는 세포와 DNA의 혼탁액을 고전압 방전에 노출시키는 것을 수반한다. 수용체 세포는 기계적 상해에 의해 형질전환에 더욱 민감해질 수 있다. 또한, 사용된 벡터의 양은 사용된 세포의 성질에 따라 달라질 수 있고, 예컨대 1 내지 1000만 개의 세포당 약 5 내지 약 20 μg 의 벡터 DNA가 고려될 수 있다.

전기침투를 이용한 진핵생물 세포의 형질감염은 꽤 성공적이었다. 이런 방식으로 마우스 전구-B 텁프구는 사람 카파-면역글로불린 유전자(Potter *et al.*, 1984)에 의해 형질감염되고 래트 간세포는 클로람페니콜 아세틸트랜스페라제 유전자에 의해 형질감염되었다(Tur-Kaspa *et al.*, 1986).

[0184] **iii. 인산칼슘**

본 발명의 다른 양태에서 핵산은 인산칼슘 침전에 의해 세포로 도입된다. 사람 KB 세포는 이 기술로 아데노바이러스 5 DNA에 의해 형질감염되었다(Graham and Van Der Eb, 1973). 또한, 이 방식으로 마우스 L(A9), 마우스 C127, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 및 HeLa 세포는 네오마이신 마커 유전자에 의해 형질감염되었고(Chen and Okayama, 1987), 래트 간세포는 다양한 마커 유전자에 의해 형질감염되었다 (Rippe *et al.*, 1990).

[0186] **iv. DEAE-덱스트란**

다른 양태에서, 핵산은 폴리에틸렌 글리콜 전에 DEAE-덱스트란을 이용하여 세포 내로 전달된다. 이 방식에서, 리포터 플라스미드는 마우스 골수종 및 적백혈병 세포 내로 도입되었다(Gopal, 1985).

[0188] **v. 초음파 부하**

본 발명의 추가 양태는 직접 초음파 부하에 의한 핵산의 도입을 포함한다. LTK⁻ 섬유아세포는 초음파 부하에 의해 티미딘 키나제 유전자로 형질감염되었다(Fechheimer *et al.*, 1987).

[0190] **vi. 수용체 매개 형질감염**

또한, 핵산은 수용체-매개 전달 비히클에 의해 표적 세포로 전달될 수 있다. 이들은 표적 세포에서 일어날 수용체-매개 세포내이입에 의해 거대분자의 선택적 흡수를 이용한다. 다양한 수용체의 세포 종류-특이적 분포에 비추어, 이 전달 방법은 본 발명에 다른 정도의 특이성을 추가한다.

[0192] 특정 수용체-매개의 유전자 표적화 비히클은 세포 수용체-특이적 리간드와 핵산-결합 제제를 포함한다. 다른 예는 전달될 핵산이 작동가능하게 부착된 세포 수용체-특이적 리간드를 포함한다. 수용체-매개의 유전자 전이에는 여러 리간드가 사용되었고(Wu and Wu, 1987; Wagner *et al.*, 1990; Perales *et al.*, 1994; Myers, EPO 0273085), 이것은 이 기술의 작업유지능을 확립시킨다. 다른 포유동물 세포 종류의 상황에서 특이적 전달에 대해 기술된 바 있다(Wu and Wu, 1993; 참고인용됨). 본 발명의 특정 관점에서, 리간드는 표적 세포 집단에서 특이적으로 발현되는 수용체에 상응하는 것으로 선택될 것이다.

[0193] 다른 양태에서, 세포-특이적 핵산 표적화 비히클의 핵산 전달 비히클 성분은 리포좀과 함께 특이적 결합 리간드를 포함할 수 있다. 전달될 핵산(들)은 리포좀 내에 수용되고, 특이적 결합 리간드는 리포좀 막에 기능적으로 혼입된다. 이에 따라, 리포좀은 표적 세포의 수용체(들)에 특이적으로 결합하여 내용물을 세포로 전달한다. 이러한 시스템은, 예컨대 상피 성장 인자(EGF)가 EGF 수용체의 상향조절을 나타내는 세포에 핵산의 수용체-매개 전달에 사용되는 시스템을 이용할 때 기능적인 것으로 밝혀졌다.

[0194] 또 다른 양태에서, 표적화된 전달 비히클의 핵산 전달 비히클 성분은 리포좀 자체로, 이것은 세포-특이적 결합을 유도하는 하나 이상의 지질 또는 당단백질을 포함하는 것이 바람직하다. 예컨대, 갈락토스-말단 아시알강글리오사이드인 락토실-세라미드는 리포좀에 혼입되었고, 간세포에 의한 인슐린 유전자의 흡수 증가를 유지했다(Nicolau *et al.*, 1987). 본 발명의 조직-특이적 형질전환 작제물은 유사한 방식으로 표적 세포에 특이적으로 전달될 수 있을 것으로 생각된다.

[0195] **vii. 미세입자 충격**

[0196] 미세입자 충격 기술은 적어도 하나의 소기관, 세포, 조직 또는 유기체에 핵산을 도입시키는데 사용될 수 있다 (미국 특허 5,550,318; 미국 특허 5,538,880; 미국 특허 5,610,042; 및 PCT 출원 WO 94/09699; 각각 참고인용됨). 이 방법은 DNA-코팅된 미세입자를 세포막을 뚫어 세포 사멸없이 세포로 들어갈 수 있게 하는 고속으로 가속화하는 능력에 달려있다(Klein *et al.*, 1987). 매우 다양한 미세입자 충격 기술은 당업계에 공지되어 있고, 이 방법들 중 대부분은 본 발명에 적용할 수 있다.

[0197] 이 미세입자 충격에서, 하나 이상의 입자는 적어도 하나의 핵산으로 코팅되어 추진력에 의해 세포 내로 전달될 수 있다. 소립자를 가속화하는 장치는 여러 가지가 개발되었다. 이러한 장치 중 하나는 전류를 발생시켜 결국 구동력을 제공하는 고전압 방전에 의존적이다(Yang *et al.*, 1990). 사용된 미세입자는 텅스텐 또는 금 입자 또는 비드와 같은 생물학적 불활성 물질로 구성되었다. 입자의 예로는 텅스텐, 백금 및 바람직하게는 금으로 구성된 것을 포함한다. 일부 경우에 금속 입자 위에 DNA 침전은 미세입자 충격을 이용해 수용체 세포로 DNA 전달하는데 반드시 필요한 것은 아닐 것으로 생각된다. 하지만, 입자는 DNA로 코팅되기보다 DNA를 함유할 수 있을 것으로 생각된다. DNA-코팅된 입자는 입자 충격을 통한 DNA 전달 수준을 증가시킬 수 있으나, 그 자체가 자발적으

로 필요한 것은 아니다.

[0198] 충격 시, 혼탁액 중의 세포는 필터 또는 고체 배양 배지 위에 놓축된다. 대안적으로, 미성숙 배아 또는 다른 표적 세포는 고체 배양 배지 상에 배열될 수 있다. 충돌되는 세포는 거대입자 정지판 아래에 적당한 거리에 위치한다.

VI. iPS 세포의 선택

[0200] 본 발명의 특정 관점에서, 재프로그래밍 벡터가 체세포에 도입된 후, 세포는 증량을 위해 배양될 것이고(경우에 따라 형질감염된 세포를 놓축하기 위해 양성 선택 또는 선별성 마커와 같은 벡터 요소의 존재에 대해 선택된다), 재프로그래밍 벡터는 이러한 세포에서 재프로그래밍 인자를 발현하고 세포 분열을 따라 복제 및 분할할 것이다. 이와 같이 발현된 재프로그래밍 인자는 자기-지속성 만능 상태를 확립하기 위해 체세포 계놈을 재프로그래밍하고, 그와 동시에 또는 벡터 존재의 양성 선택에 의한 분리 후, 외인성 유전 요소는 점차 상실될 것이다. 이와 같이 유도된 만능 줄기 세포는, 만능 배아 줄기 세포와 실질적으로 동일한 것으로 생각되기 때문에 배아 줄기 세포 특징에 기초하여 상기 체세포 유래의 후손 중에서 선택할 수 있다. 또한, 추가 음성 선택 단계를 이용하여, 재프로그래밍 벡터 DNA의 부재를 검사하거나 선택 마커를 이용해 외인성 유전 요소가 본질적으로 없는 iPS 세포의 선택을 돋거나 촉진할 수 있다.

A. 배아 줄기 세포 특징에 대한 선택

[0202] 이전 연구에서 성공적으로 생성된 iPSC는 자연-분리된 만능 줄기 세포(예컨대, 마우스 및 사람 배아 줄기 세포, 각각 mESC 및 hESC)와 다음과 같은 점에서 매우 유사했고, 이에 따라 자연-분리된 만능 줄기 세포에 대한 iPSC의 동일성, 진위성 및 만능성을 확인했다. 따라서, 본 발명에 개시된 방법에 의해 생성된 유도 만능 줄기 세포는 다음과 같은 배아 줄기 세포 특징 중 하나 이상에 기초하여 선택할 수 있다.

i. 세포의 생물학적 성질

[0204] **형태:** iPSC는 형태상 ESC와 유사하다. 각 세포는 둥근 형태이고, 큰 핵소체와 세포질이 부족할 수 있다. iPSC의 콜로니도 역시 ESC의 콜로니와 유사할 수 있다. 사람 iPSC는 hESC와 유사하게 가장자리가 분명하고, 편평한 치밀하게 충진된 콜로니를 형성하고, 마우스 iPSC는 hESC보다 덜 편평하고 덜 응집된 콜로니인 mESC와 유사한 콜로니를 형성한다.

[0205] **성장 성질:** 줄기 세포가 이의 정의의 일부처럼 자가-재생해야 하기 때문에 배가 시간 및 유사분열 활성은 ESC의 근본이념이다. iPSC는 유사분열적 활성이고, ESC와 동일한 속도로 활성적으로 자가-재생, 증식 및 분열할 수 있다.

[0206] **줄기 세포 마커:** iPSC는 ESC 상에서 발현된 세포 표면의 항원성 마커를 발현할 수 있다. 사람 iPSC는 hESC에 특이적인 마커를 발현했고, 그 예로는 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E 및 Nanog를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 마우스 iPSC는 mESC와 유사하게 SSEA-1을 발현했지만, SSEA-3이나 SSEA-4는 발현하지 않았다.

[0207] **줄기 세포 유전자:** iPSC는 미분화 ESC에서 발현되는 유전자를 발현할 수 있고, 그 예로는 Oct-3/4, Sox-2, Nanog, GDF3, REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4 및 hTERT를 포함한다.

[0208] **텔로머라제 활성:** 텔로머라제는 약 50 세포 분열의 헤이플릭(Hayflick) 한계에 의해 제한되지 않고 세포 분열을 지속하는데 필요하다. hESC는 높은 텔로머라제 활성을 발현하여 자가-재생 및 증식을 지속하고, iPSC 역시 높은 텔로머라제 활성을 나타내고 텔로머라제 단백질 복합체의 필수 성분인 hTERT(사람 텔로머라제 역전사효소)를 발현한다.

[0209] **만능성:** iPSC는 ESC와 유사한 방식으로 완전 분화된 조직으로 분화할 수 있을 것이다.

[0210] **신경 분화:** iPSC는 β III-튜볼린, 티로신 하이드록실라제, AADC, DAT, ChAT, LMX1B 및 MAP2를 발현하는 뉴런으로 분화될 수 있다. 카테콜아민-결합된 효소의 존재는 hESC와 같이 iPSC가 도파민활성 뉴런으로 분화될 수 있다는 것을 시사한다. 줄기 세포-관련 유전자는 분화 후 하향조절될 것이다.

[0211] **심장 분화:** iPSC는 심근세포로 분화하여 자발적으로 박동하기 시작했다. 심근세포는 TnTc, MEF2C, MYL2A, MYHC β 및 NKX2.5를 발현했다. 줄기 세포-관련 유전자는 분화 후 하향조절될 것이다.

[0212] **기형종 형성:** 면역결핍 마우스에 주입된 iPSC는 특정 시간, 예컨대 9주 후에 기형종을 자발적으로 형성할 수 있

다. 기형종은 3개의 배 층, 내배엽, 중배엽 및 외배엽에서 유래되는 조직을 함유하는 다중 직계성의 종양이다; 이것은 다른 종양이 일반적으로 한 종류의 세포만의 종양인 점과 다르다. 기형종 형성은 만능성의 획기적인 검사이다.

[0213] **배상체:** 배양물 중의 hESC는 "배상체"라 불리는 구형의 배아-유사 구조를 자발적으로 형성하고, 이것은 유사분열적 활성이고 분화성인 hESC의 코어와 3개의 배 층 전부에서 완전 분화된 세포의 주변으로 이루어진다. iPSC는 또한 배상체를 형성할 수 있고 주변 분화 세포를 보유할 수 있다.

[0214] **포배 주입:** hESC는 본래 포배의 내세포피(배아모체) 내에 존재하고 배아모체에서 배아로 분화하는 반면, 포배의 외층(영양막)은 배아외 조직으로 분화한다. 중공의 영양막은 생존 배아를 형성할 수 없어 배아모체 내에서 배아 줄기 세포가 분화하여 배아를 형성하는데 필수적이다. 수용체 암컷에게 전달되는 포배를 생성하기 위해 마이크로피펫으로 영양막에 주입한 iPSC는 키메라 생존 마우스 새끼, 즉 iPSC 유도체가 10 내지 90% 정도 전신에 혼입되고 키메라 현상을 나타내는 마우스를 초래할 수 있다.

ii. 후생적 재프로그래밍

[0215] **프로모터 탈메틸화:** 메틸화는 DNA 염기에 메틸 기의 전이, 일반적으로 CpG 부위(인접 사이토신/구아닌 서열)에서 사이토신 분자에의 메틸 기의 전이이다. 유전자의 광범위한 메틸화는 발현 단백질의 활성을 방해하거나 발현을 방해하는 효소를 모집하여 발현을 방해한다. 따라서, 유전자의 메틸화는 전사를 방해하여 효과적으로 사일런싱시킨다. 만능성-관련 유전자의 프로모터, 예컨대 Oct-3/4, Rex1 및 Nanog는 iPSC에서 탈메틸화되어, iPSC에서 이들의 프로모터 활성 및 만능성-관련 유전자의 활성 촉진 및 발현을 나타낸다.

[0216] **히스톤 탈메틸화:** 히스톤은 다양한 염색질-관련 변형을 통해 활성을 초래할 수 있는 DNA 서열에 구조적으로 국재화된 조밀한 단백질이다. Oct-3/4, Sox-2 및 Nanog와 결합된 H3 히스톤은 탈메틸화되어 Oct-3/4, Sox-2 및 Nanog의 발현을 활성화할 수 있다.

B. 잔기 제거 특징의 선택

[0217] 본 발명에서 oriP-기반 플라스미드와 같은 재프로그래밍 벡터는 염색체외에서 복제하고 발생 이후 숙주 세포에서 그 존재가 상실된다. 하지만, 이 과정은 외인성 벡터 요소가 본질적으로 없는 후손 세포의 추가 선택 단계에 의해 촉진될 수 있다. 예를 들어, 후손 세포의 샘플을 추출하여 외인성 벡터 요소의 존재 또는 상실을 당업계에 공지된 바와 같이 검사할 수 있다(Leight and Sugden, Molecular and Cellular Biology, 2001).

[0218] 재프로그래밍 벡터는 추가로 선택 마커, 더 구체적으로 음성 선택 마커, 예컨대 이러한 선택 마커가 본질적으로 없는 후손 세포를 선택하기 위해 티미딘 키나제를 암호화하는 유전자를 함유할 수 있다. 사람 헤르페스 단순 바이러스 티미딘 키나제 1형 유전자(HSVtk)는 포유동물 세포에서 조건 치사 마커로서 작용한다. HSVtk-암호화된 효소는 특정 뉴클레오사이드 유사체(예: 항헤르페스 약물인 강시클로비르)를 인산화할 수 있어, 이들을 독성 NDA 복제 저해제로 변환시킨다. 대체적 또는 상보적 접근법은 RT-PCR, PCR, FISH(형광 원위치 하이브리드화), 유전자 어레이 또는 하이브리드화(예: 서던 블로트)와 같은 상법을 이용하여 후손 세포에서 외인성 유전 요소의 부재를 검사하는 것이다.

VII. iPS 세포의 배양

[0219] 체세포는 개시된 방법을 이용하여 재프로그래밍 벡터의 도입 후, 만능성을 유지하기에 충분한 배지에서 배양될 수 있다. 본 발명에서 발생된 유도 만능 줄기(iPS) 세포의 배양은 미국 특허 출원번호 20070238170 및 미국 특허출원번호 20030211603에 기술된 바와 같이 영장류 만능 줄기 세포, 더 구체적으로 배아 줄기 세포를 배양하기 위해 개발된 다양한 배지 및 기술을 이용할 수 있다.

[0220] 예를 들어, 사람 배아 줄기(hES) 세포와 같이, iPS 세포는 80% DMEM(Gibco #10829-018 또는 #11965-092), 열불 활성화되지 않은 20% 한정 소태아 혈청(FBS), 1% 비필수 아미노산, 1mM L-글루타민 및 0.1mM 베타-мер캅토에탄올에서 유지될 수 있다. 대안적으로, ES 세포는 80% 녹아웃 DMEM(Gibco #10829-018), 20% 혈청 대체물(Gibco #10828-028), 1% 비필수 아미노산, 1mM L-글루타민 및 0.1mM 베타-мер캅토에탄올로 제조된 무혈청 배지에서 유지될 수 있다. 사용 직전, 사람 bFGF는 약 4ng/ml의 최종 농도로 첨가한다(WO 99/20741).

[0221] ES 세포와 같이 iPS 세포는 SSEA-1, SSEA-3 및 SSEA-4에 대한 항체(Developmental Studies Hybridoma Bank, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda Md.), 및 TRA-1-60 및 TRA-1-81에 대한 항체(Andrews et al., in Robertson E, ed. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. IRL Press, 207-246, 1987)를 이용하여 면역조직화학 또는 유세포분석에 의해 동정될 수 있는 특징적인 항원을 보유한다. 배아

줄기 세포의 만능성은 8 내지 12주령의 SCID 수컷 마우스의 뒷다리 근육에 약 0.5 내지 10×10^6 세포를 주입하여 확인할 수 있다. 3개의 배 충 각각의 적어도 하나의 세포 종류에서 나타나는 기형종이 발생한다.

[0225] VIII. 실시예

[0226] 다음 실시예는 본 발명의 바람직한 양태를 입증하기 위한 것이다. 이하 실시예에 개시된 기술은 본 발명의 실시에서 기능이 양호한 것으로 본 발명자에 의해 발견된 기술로서, 본 발명의 실시에 바람직한 방식을 구성하는 것으로 생각되어야 한다는 것을 당업자라면 잘 알고 있을 것이다. 하지만, 당업자는 본 발명의 개시에 비추어 개시된 특정 양태들에 다양한 변화가 이루어질 수 있고 이 역시 본 발명의 취지 및 범위에서 벗어나지 않는 유사하거나 같은 결과를 낳을 수 있음을 알고 있어야 한다.

[0227] 실시예 1 잔기-제거 재프로그래밍 플라스미드의 작제

[0228] 본 발명자들은 EBV 유래의 약 1000개 염기쌍에 의해 이격된 DS와 FR을 포함하는 oriP 서열(Lindner and Sugden, 2007) 및 엘타UR1로 알려진 야생형 EBNA1의 단축형(Kennedy et al. 2003에는 DomNeg2라 지칭되어 있음)을 함유하는 수용체 골격 플라스미드를 작제했다. 이 플라스미드는 현재 엘타UR1의 발현을 최대화하는 인트론 서열을 추가로 함유하는 연장 인자 1a(EL1a) 프로모터에 의해 구동되는 엘타UR1을 발현하도록 작제되어 있다. 이 골격 플라스미드는 현재 하이그로마이신에 대한 내성을 암호화하는 포유동물 세포의 선택 마커를 포함하도록 조립되어 있고; 하지만, 내성 마커의 선택은 플라스미드가 도입될 세포주의 감수성에 따라 유연하다. 마찬가지로, 이 플라스미드는 원핵생물 선택을 위해 약물 내성을 암호화하고, 이 경우 플라스미드는 앰피실린에 대한 내성을 암호화한다.

[0229] 본 발명자들은 전술한 수용체 플라스미드 내에 만능성(즉, iPS 세포)이 되기 위해 세포를 재프로그래밍하는데 기여하고 필요한 유전자를 암호화하는 다수의 카세트를 통합시켰다. 한 카세트는 재프로그래밍 과정에 필수적인 2개의 유전자, Sox-2 및 Oct-4를 암호화했다(도 4). 본 발명자들은 Sox-2 및 Oct-4의 발현을 유도하기 위해 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 즉시-초기 유전자(CMV) 프로모터 또는 SV40 프로모터를 이용할 수 있으나, 이 선택은 발현 효율에 따라 변화될 수 있다. 경우에 따라, 또한 전사체의 발현을 최대화하기 위해 사람 베타-글로빈 유전자 유래의 제2 인트론을 추가로 포함시켰다. 따라서, 두 유전자들은 동일한 전사체에 의해 암호화되었지만, 해독은 Sox-2의 경우 기준 ATG로부터, Oct-4의 경우 뇌척수심근염 바이러스 유래의 내부 리조솜 진입 부위(IRES)로부터 개시될 수 있다. 이와 유사하게, 다른 카세트는 Nanog 및 Lin28을 암호화하는 이중시스트론성 전사체를 암호화하거나 또는 Klf4 및 c-Myc(PGK 프로모터 또는 임의의 다른 적당한 프로모터에 의해 구동됨)를 암호화하고 역시 IRES에 의해 분리된 이중시스트론성 전사체를 암호화했다(도 4). Sox-2, Oct-4, Nanog, Lin28, Klf4, c-Myc, EBNA-1 중 2 이상을 함유하는 이중시스트론성 전사체의 변형체도 사용할 수 있다.

[0230] 시스템은 효율 최적화를 위해 특정 변형이 이루어질 수 있다. 현행 문헌에는 Lin28이 재프로그래밍 과정에 없어도 될 수 있다고 시사하고 있고, 이에 따라 본 발명자들은 이 플라스미드 시스템을 Sox-2, Oct-4 및 Nanog만을 포함하는 것으로 조정할 수 있을 것으로 생각했다. 또한, 선택한 IRES의 종류는 다른 유전자 세트의 상황에서도 기능성인 것으로 입증되었다. 그러나, IRES는 적당한 재프로그래밍에 필요한 발현 수준을 촉진하기에는 부적당한 것으로 입증되고 각각의 재프로그래밍 유전자가 자신의 사람 프로모터에 의해 구동되도록 카세트를 파괴할 수도 있다는 것이 가능하다.

[0231] 이를 정리하면, 마스터 셔틀링 플라스미드 또는 재프로그래밍 플라스미드는 Sox-2, Oct-4, Nanog 및 가능하게는 Lin28을 암호화할 수 있지만(도 5), 이의 복제 및 유지는 oriP 및 엘타UR1의 존재에 의해 촉진될 수 있다. 또한, 이 플라스미드는 티미딘 키나제와 같은 음성 선택 마커 및 녹색 또는 적색 형광 단백질을 암호화하는 서열과 같은 추가 양성 선택 마커를 포함시키는 추가 변형이 이루어질 수도 있다.

[0232] 실시예 2 잔기-제거 재프로그래밍 플라스미드의 용도

[0233] 성공적인 재프로그래밍은 포유동물 세포에 상기 큰(15-20kb) 플라스미드의 효과적인 도입에 좌우될 것이다. 본 발명자들은 현재 사람 섬유아세포에 DNA를 도입하기 위해 친지성-기반 접근법을 이용하고 있지만, 이 접근법은 형질감염되는 세포 종류에 따라 변형될 수도 있다. 예를 들어, 조혈 세포에 DNA 플라스미드를 도입하기 위해 전기침투를 선택할 수 있다. 세포를 적당히 형질감염시킨 후, 본 발명자들은 이 세포를 형질감염 세포에 적당한 배지를 이용한 10cm 배양 접시 상의 매트리겔 또는 방사선조사된 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 층 위에 둘 것이다. 형질감염 후 약 6일 후에 배지는 재프로그래밍 세포용 특수 배지로 바꾸고 매일 내지 격일로 교체할 것이다

(Yu et al., 2007).

[0234] iPS 세포를 발생시키는 당해 방법에 기초하여, 본 발명자들은 형질감염 약 20일 후 줄기 세포를 닮은 콜로니를 선택할 수 있고, 이를 6월 배양판 중의 MEF 또는 매트리겔로 이동시키고 특수 배지를 매일 또는 격일로 공급할 것이다. 충분히 증량이 일어나면, 콜로니는 핵형분류하고 줄기 세포에 특이적인 적당한 마커에 대해 검사할 것이다.

[0235] 본 명세서에 개시되고 권리주장되는 모든 방법은 본 명세서에 의거해서 과도한 실험없이 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물과 방법은 바람직한 양태의 방식으로 기술했지만, 당업자에게는 본 발명의 개념, 취지 및 영역 안에서 본 명세서에 기술된 방법 및 방법의 단계 또는 방법의 단계 순서에 변형이 이루어질 수 있음이 자명한 것이다. 특히, 화학적 및 생리학적 관련이 있는 특정 제제가 본 명세서에 기술된 제제 대신에 사용될 수 있으면서 동일하거나 유사한 결과를 달성할 수 있다는 것도 분명할 것이다. 이와 같은 당업자에게 분명한 유사한 대체 및 변형은 모두 이하 특허청구범위에서 정의되는 본 발명의 취지, 범위 및 개념에 속하는 것으로 간주한다.

참고문헌

[0237] 이하 참고문헌은 예시적 절차를 제공하거나 또는 본 명세서에 제시된 것에 보충적인 다른 세부사항을 제공하는 정도로, 본 발명에 구체적으로 참고인용된 것이다.

미국특허 4,683,202

미국특허 4,684,611

미국특허 4,952,500

미국특허 5,302,523

미국특허 5,384,253

미국특허 5,384,253

미국특허 5,464,765

미국특허 5,538,877

미국특허 5,538,880

미국특허 5,550,318

미국특허 5,580,859

미국특허 5,589,466

미국특허 5,591,616

미국특허 5,610,042

미국특허 5,656,610

미국특허 5,702,932

미국특허 5,736,524

미국특허 5,780,448

미국특허 5,789,215

미국특허 5,925,565

미국특허 5,928,906

미국특허 5,935,819

미국특허 5,945,100

미국특허 5,981,274

미국특허 5,994,624

미국특허출원 20030211603

미국특허출원 20070238170

[0238]

- Adams, *J. Virol.*, 61(5):1743–1746, 1987.
- Aiyar *et al.*, *EMBO J.*, 17(21):6394–6403, 1998.
- Alexander *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5092–5096, 1988.
- Almqvist *et al.*, *Med. Chem.*, 23(12):1392–1398, 1980.
- Altmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(38):14188–14193, 2006.
- Andrews *et al.*, In: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells*, Robertson (Ed.), IRL Press, 207–246, 1987.
- Aravind and Landsman, *Nucleic Acids Res.*, 26(19):4413–4421, 1998.
- Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., MA, 1994.
- Baer *et al.*, *Biochemistry*, 39:7041–7049, 2000.
- Baer *et al.*, *Nature*, 310(5974):207–211, 1984.
- Bingham, *Cell*, 90(3):385–387, 1997.
- Bochkarev *et al.*, *Cell*, 84(5):791–800, 1996.
- Bode *et al.*, *Biol. Chem.*, 381:801–813, 2000b.
- Bode *et al.*, *Gene Ther. Mol. Biol.*, 6:33–46, 2001.
- Bode *et al.*, *Science*, 255(5041):195–197, 1992.
- Boyer *et al.*, *Cell*, 122(6):947–56, 2005.
- Brambrink *et al.*, *Cell Stem Cell*, 7(2):151–159, 2008.
- Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75–82, 1999.
- Chambers *et al.*, *Cell*, 113(5):643–55, 2003.
- Chandler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596–601, 1997.
- Chaudhuri *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(18):10085–10089, 2001.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745–2752, 1987.
- Cocea, *Biotechniques*, 23(5):814–816, 1997.
- Dhar *et al.*, *Cell*, 106(3):287–296, 2001.
- EPO 0273085
- EPO 45665
- Ercolani *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263: 15335–15341, 1988.
- Ermakova *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(51):33009–33017, 1996.
- Evans, *et al.*, In: *Cancer Principles and Practice of Oncology*, DeVita *et al.* (Eds.), Lippincot-Raven, NY, 1054–1087, 1997.
- Fechheimer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463–8467, 1987.
- Fischer *et al.*, *J. Virol.*, 71:5148–5146, 1997.

- Fraleys et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Frappier and O'Donnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(23):10875-10879, 1991.
- Gahn and Schildkraut, *Cell*, 58(3):527-535, 1989.
- Gahn and Sugden, *J. Virol.*, 69(4):2633-2636, 1995.
- Garrick et al., *Nat. Genet.*, 18:56-59, 1998.
- Ghosh and Bachhawat Gopal, 1985
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Hann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, I 307-314, 1982.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- Hegde et al., *Nature*, 359(6395):505-512, 1992.
- Holladay et al., *Tetrahedron Lett.*, 24:4401-4404, 1983.
- Hruby, *Life Sci.*, 31:189-199, 1982.
- Hudson et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 14:177-185, 1979.
- Hung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(4):1865-1870, 2001.
- Jenke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (31), 11322-11327, 2004.
- Jennings-White et al., *Tetrahedron Lett.*, 23:2533, 1982.
- Julien et al., *Virology*, 326(2):317-328, 2004.
- Kaeppler et al., *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- Kanda et al., *Mol. Cell. Biol.*, 21(10):3576-3588, 2001.
- Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin et al., *Cell*, 36:371-379, 1989.
- Kato et al., *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kennedy and Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 23(19):6901-6908, 2003.
- Kennedy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:14269-14274, 2003.
- Kim et al., *J. Biol. Chem.*, 275(40):31245-31254, 2000.
- Kim et al., *Virology*, 239(2):340-351, 1997.
- Kirchmaier and Sugden, *J. Virol.*, 69(2):1280-1283, 1995.
- Kirchmaier and Sugden, *J. Virol.*, 71(3):1766-1775, 1997.
- Kirchmaier and Sugden, *J. Virol.*, 72(6):4657-4666, 1998.
- Klein et al., *Nature*, 327:70-73, 1987.
- Langle-Rouault et al., *J. Virol.*, 72(7):6181-6185, 1998.
- Leight and Sugden, *Mol. Cell Bio.*, 21:4149-61, 2001.
- Levenson et al., *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.

- Levitskaya *et al.*, *Nature*, 375(6533):685–688, 1995.
- Levitskaya *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(23):12616–12621, 1997.
- Lindner and Sugden, *Plasmid*, 58:1-12, 2007.
- Lindner *et al.*, *J. Virol.*, 82(12):5693-702, 2008.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Mackey and Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 19(5):3349–3359, 1999.
- Mackey *et al.*, *J. Virol.*, 69(10):6199–6208, 1995.
- Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- Manzini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(47):17672–17677, 2006.
- Marechal *et al.*, *J. Virol.*, 73(5):4385–4392, 1999.
- Middleton and Sugden, *J. Virol.*, 66(1):489-495, 1992.
- Morley, *Trends Pharm. Sci.*, 463-468, 1980.
- Nabel *et al.*, *Science*, 244(4910):1342-1344, 1989.
- Nanbo and Sugden, *EMBO J.*, 26:4252-62, 2007.
- Ng, *Nuc. Acid Res.*, 17:601-615, 1989.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Niller *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270(21):12864–12868, 1995.
- Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.
- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
- Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- Piechaczek *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 27(2):426-428, 1999.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
- Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Quitsche *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:9539-9545, 1989.
- Rawlins *et al.*, *Cell*, 42((3):859–868, 1985.
- Reisman and Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 6(11):3838-3846, 1986.
- Reisman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5(8):1822–1832, 1985.
- Richards *et al.*, *Cell*, 37:263-272, 1984.
- Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Ritzi *et al.*, *J. Cell Sci.*, 116(Pt 19):3971–3984, 2003.
- Sambrook *et al.*, In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- Schaarschmidt *et al.*, *EMBO J.*, 23(1):191–201, 2004.
- Schepers *et al.*, *EMBO J.*, 20(16):4588-4602, 2001.
- Sears *et al.*, *J. Virol.*, 77(21):11767-11780, 2003.
- Sears *et al.*, *J. Virol.*, 78(21):11487–11505, 2004.
- Shire *et al.*, *J. Virol.*, 73(4):2587–2595, 1999.
- Spatola *et al.*, *Life Sci.*, 38:1243-1249, 1986.
- Spatola, In: *Peptide Backbone Modifications*, 1:3, 1983.
- Spatola, In: *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, Weinstein (Ed.), Marcel Dekker, NY, 267, 1983.
- Stadtfeld *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2:230-240, 2008.
- Su *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(23):10870-19874, 1991.
- Sugden and Warren, *J. Virol.*, 63(6):2644-2649, 1989.
- Takahashi *et al.*, *Cell*, 126(4):663-676, 2006.
- Takahashi *et al.*, *Cell*, 126(4):663-76, 2007.
- Torchia *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10:373-383, 1998.
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9):3410-3414, 1990.
- Wang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 26(3):1124–1134, 2006.
- Wilson *et al.*, *Science*, 244:1344-1346, 1989.
- WO 94/09699
- WO 95/06128
- WO 99/20741
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu and Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Wu *et al.*, *J. Virol.*, 76(5):2480-2490, 2002.
- Wysokenski and Yates, *J. Virol.*, 63(6):2657–2666, 1989.
- Yamanaka *et al.*, *Cell*, 131(5):861-72, 2007.
- Yang and Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.
- Yates and Guan, *J. Virol.*, 65(1):483–488, 1991.
- Yates *et al.*, *J. Virol.*, 74(10):4512–4522, 2000.
- Yates *et al.*, *Nature*, 313:812-815, 1985.
- Yates *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3806-3810, 1984.

[0242]

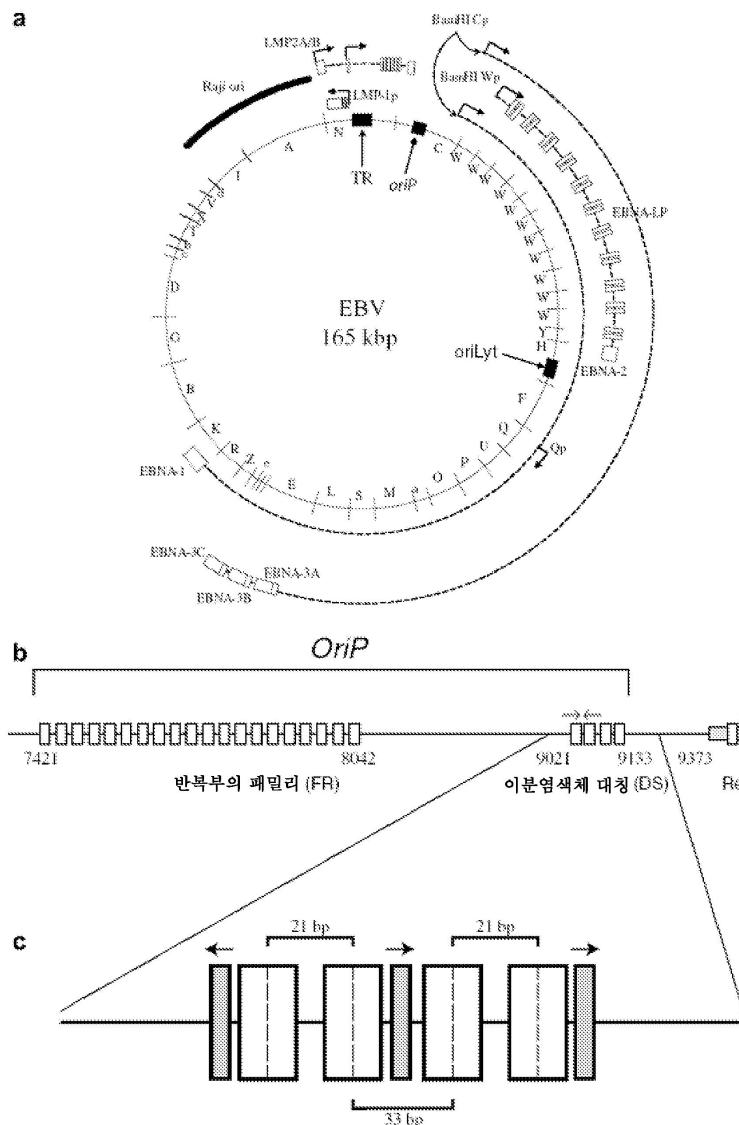
- Yates, *Cancer Cells*, (6)197–205, 1988.
- Yin *et al.*, *Science*, 301(5638):1371–1374, 2003.
- Yu *et al.*, *Science*, 318:1917-1920, 2007.

[0243]

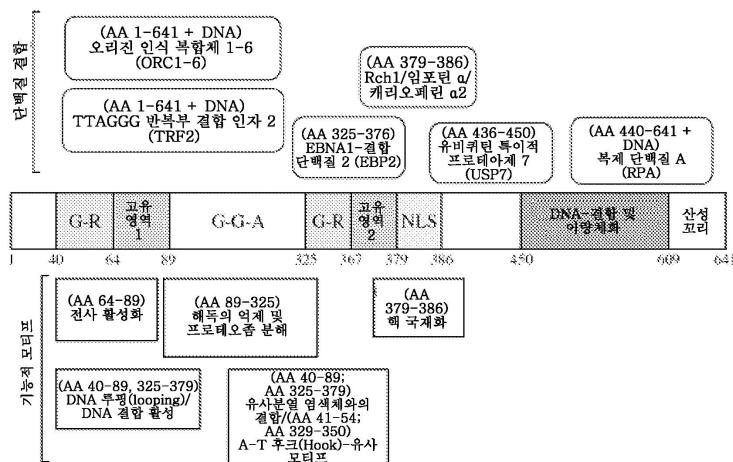
- Zhou *et al.*, *EMBO J.*, 24(7):1406-1417, 2005.

도면

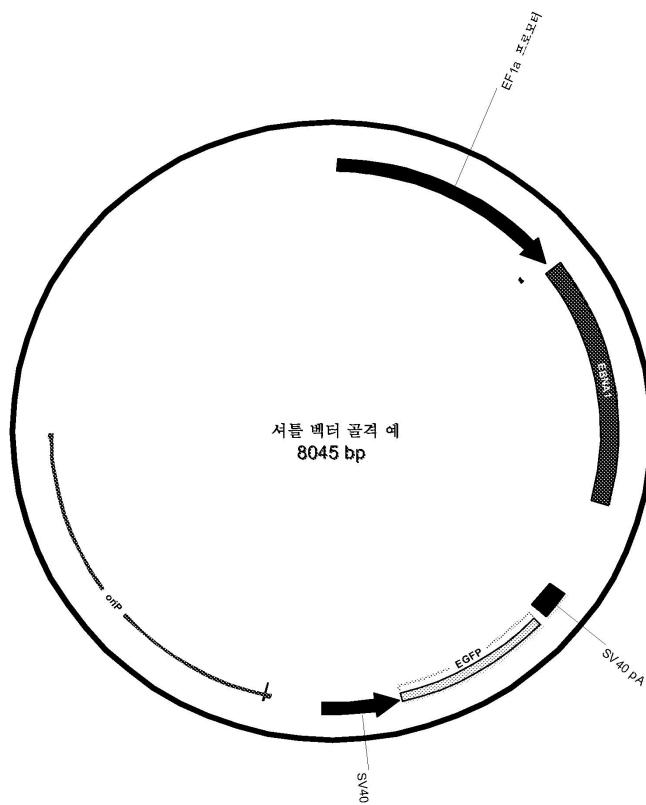
도면1



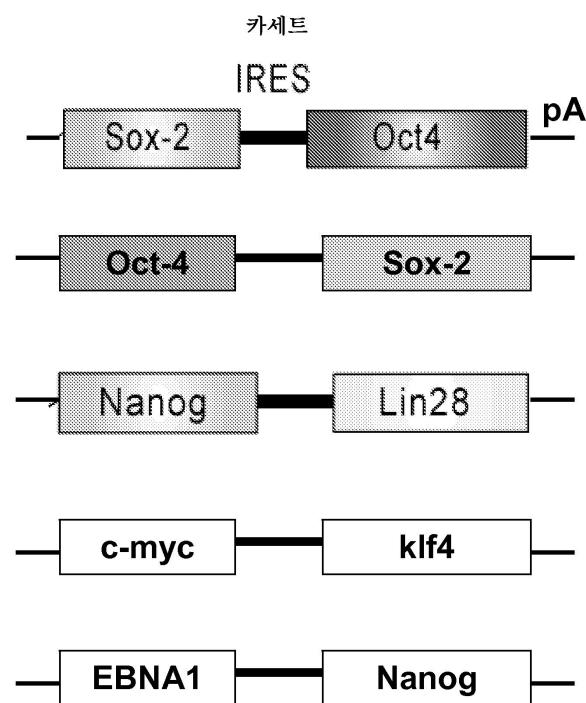
도면2



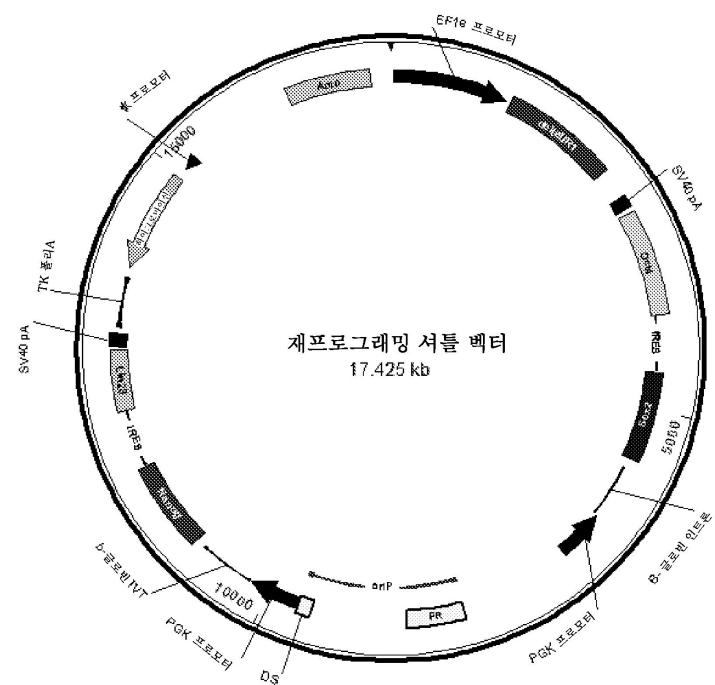
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

<110> Cellular Dynamics International, Inc.

<120> Methods for the production of iPS cells using non-viral approach

<130> CDIN:005WO

<150> US 61/058,858

<151> 2008-06-04

<150> US 61/160,584

<151> 2009-03-16

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 641

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 4

<400> 1

Met Ser Asp Glu Gly Pro Gly Thr Gly Pro Gly Asn Gly Leu Gly Glu

1 5 10 15

Lys Gly Asp Thr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Gln

20 25 30

Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly

35 40 45

Arg Gly Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gly Ser Gly Pro

50 55 60

Arg His Arg Asp Gly Val Arg Arg Pro Gln Lys Arg Pro Ser Cys Ile

65 70 75 80

Gly Cys Lys Gly Thr His Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly

85 90 95

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly

100 105 110

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly

115 120 125

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly

145 150 155 160

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly

165 170 175

Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly

180 185 190

Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly

195 200 205

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala

210 215 220

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala

225 230 235 240

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly

245 250 255

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly

260 265 270

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly

275 280 285

Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly

290 295 300

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly

305 310 315 320

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly

325 330 335

Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly

340 345 350

Arg Arg Gly Arg Gly Arg Glu Arg Ala Arg Gly Gly Ser Arg Glu Arg

355 360 365

Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Glu Lys Arg Pro Arg Ser Pro

370 375 380

Ser Ser Gln Ser Ser Ser Gly Ser Pro Pro Arg Arg Pro Pro Pro

385 390 395 400

Gly Arg Arg Pro Phe Phe His Pro Val Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu

405 410 415

Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro Asp Gly Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly

420	425	430
Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala Asp Asp Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr		
435	440	445
Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp Gly Gly Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp		
450	455	460
Phe Gly Lys His Arg Gly Gln Gly Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn		
465	470	475
Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ser His Val Glu Arg		
485	490	495
Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp Val Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly		
500	505	510
Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile		
515	520	525
Pro Gln Cys Arg Leu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala		
530	535	540
Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Cys		
545	550	555
Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys		
565	570	575
Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn		
580	585	590
Ile Arg Val Thr Val Cys Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro		
595	600	605
Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly		
610	615	620
Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln		
625	630	635
Glu		

<210> 2

<211> 1926

<212> DNA

<213> Human herpesvirus 4

<400> 2

atgtctgacg agggccagg tacaggacct ggaaatggcc taggagagaa gggagacaca	60
tctggaccag aaggctccgg cggcagtgga cctcaaagaa gaggggtga taaccatgga	120
cgaggacggg gaagaggacg aggacgagga ggcggaagac caggagccccc gggcggctca	180
ggatcagggc caagacatag agatggtgtc cggagacccc aaaaacgtcc aagtgtcatt	240
ggctgcaaag ggacccacgg tggAACAGGA gcaggagcag gagcgggagg ggcaggagca	300
ggagggcag gaggcaggagg aggggcagga gcaggaggag gggcaggagg ggcaggagg	360
gcaggagggg caggagcagg aggagggca ggagcaggag gagggcagg agggcagga	420
ggggcaggag caggaggagg ggcaggagca ggaggagggg caggaggggc aggagcagga	480
ggagggcag gaggggcagg aggggcagga gcaggaggag gggcaggagc aggaggagg	540
gcaggagggg caggagcagg aggagggca ggagggcag gagggcagg agcaggagga	600
ggggcaggag caggaggggc aggagggca ggagggcag gaggcaggag ggcaggagca	660
ggaggagggg caggaggggc aggagggca ggagcaggag gggcaggagc aggaggggca	720
ggagcaggag gggcaggagc aggagggca ggagggcag gagcaggagg ggcaggagg	780
gcaggaggcag gagggcagg agggcagga gcaggaggag gggcaggagg ggcaggagca	840
ggaggagggg caggaggggc aggagcagga ggggcaggag gggcaggagc aggaggggca	900
ggagggcag gaggcaggagg ggcaggagg gcaggaggcag gaggaggggc aggagcagga	960
ggggcaggag caggaggtgg aggccgggt cgaggaggca gtggaggccg ggttcgagga	1020
ggtagtggag gccgggtcg aggaggtgt ggaggccgc gggtagagg acgtgaaaga	1080
gccagggggg gaagtctgtga aagagccagg gggagaggc gtggacgtgg agaaaagagg	1140
cccaggagtc ccagtagtca gtcatcatca tccgggtctc caccgcgcag gccccctcca	1200
ggtagaaggc cattttcca ccctgttaggg gaagccgatt atttgaata ccaccaagaa	1260
ggtggcccag atggtaggcc tgacgtgcc cccggcgcga tagagcaggg cccgcagat	1320
gaccaggag aaggcccaag cactggaccc cggggtcagg gtgtatggagg caggcgc当地	1380
aaaggagggt gtttgaaa gcatctgggt caaggagggtt ccaaccgaa atttgagaac	1440
attgcagaag gttaagagc tctcctggct aggagtacg tagaaaggac taccgacgaa	1500
ggaacttggg tcgcgggtgt gttcgatata ggaggtagta agacccctt ttacaaccta	1560
aggcgaggaa ctgccttgc tattccacaa tgtcgctta caccattgag tcgtctcccc	1620
tttgaatgg cccctggacc cggcccacaa cctggccgc taagggagtc cattgtctgt	1680
tatttcatgg tcttttaca aactcatata tttgctgagg tttgaagga tgcgattaag	1740

gaccttgtta tgacaaagcc cgctcctacc tgcaatatca gggtgactgt gtgcagctt 1800

gacgatggag tagatttgcc tccctggttt ccacctatgg tggaaaggcc tgccgcggag 1860

ggtgatgacg gagatgacgg agatgaagga ggtgatggag atgagggta ggaagggcag 1920

gagtga 1926

<210> 3

<211> 392

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 4

<400> 3

Met Ser Asp Glu Gly Pro Gly Thr Gly Pro Gly Asn Gly Leu Gly Glu

1 5 10 15

Lys Gly Asp Thr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Gln

20 25 30

Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly

35 40 45

Arg Gly Gly Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ala

50 55 60

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Arg

65 70 75 80

Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Arg

85 90 95

Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Arg Arg Gly Arg Gly Arg Glu Arg Ala

100 105 110

Arg Gly Gly Ser Arg Glu Arg Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly

115 120 125

Glu Lys Arg Pro Arg Ser Pro Ser Ser Gln Ser Ser Ser Ser Gly Ser

130 135 140

Pro Pro Arg Arg Pro Pro Pro Gly Arg Arg Pro Phe Phe His Pro Val

145 150 155 160

Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro Asp Gly

165 170 175

Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala Asp Asp

180 185 190

Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp Gly Gly

195 200 205

Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp Phe Gly Lys His Arg Gly Gln Gly Gly

210 215 220

Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu

225 230 235 240

Ala Arg Ser His Val Glu Arg Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp Val Ala

245 250 255

Gly Val Phe Val Tyr Gly Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg

260 265 270

Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile Pro Gln Cys Arg Leu Thr Pro Leu Ser

275 280 285

Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro

290 295 300

Leu Arg Glu Ser Ile Val Cys Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His

305 310 315 320

Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr

325 330 335

Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn Ile Arg Val Thr Val Cys Ser Phe Asp

340 345 350

Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala

355 360 365

Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly

370 375 380

Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln Glu

385 390

<210> 4

<211> 1179

<212> DNA

<213> Human herpesvirus 4

<400> 4

atgtctgacg aggggccagg tacaggacct ggaaatggcc taggagagaa gggagacaca	60
tctggaccag aaggctccgg cggcagtgga cctcaaagaa gaggggtga taaccatgga	120
cgaggacggg gaagaggacg aggacgagga ggcggaagac caggagcccc gggcggtca	180
gatcagggg cggcgcagg agcaggagcg ggagggcag gaggcaggagg tggaggccgg	240
ggtcgaggag gcagtggagg cggggtcga ggaggtatg gaggccggg tcgaggaggt	300
agtggaggcc gccgggttag aggacgtgaa agagccaggg gggaaagtgc tgaaagagcc	360
agggggagag gtcgtggacg tggagaaaag aggcccagga gtcccagtag tcagtcatca	420
tcatccgggt ctccaccgcg caggccccct ccaggtagaa gcccattttt ccaccctgta	480
gggaaagccg attatttga ataccacaa gaaggtggcc cagatggtga gcctgacgtg	540
ccccgggag cgatagagca gggcccgca gatgaccag gagaaggccc aagcactgga	600
ccccggggtc aggtgatgg aggcaggcgc aaaaaaggag ggtggtttg aaagcatcgt	660
ggtcaaggag gttccaaccc gaaattttag aacattgcag aagtttaag agctctctg	720
gcttaggagtc acgtagaaag gactaccgac gaaggaactt ggtcgccgg tgtttcgta	780
tatggaggtt gtaagacctc ctttacaac ctaaggcggag gaactgccct tgctattcca	840
caatgtcgtc ttacaccatt gagtcgtctc cccttgaa tggccctgg accccggcca	900
caacctggcc cgctaaggga gtccattgtc tgttattca tggtctttt acaaactcat	960
atatttgcgtg agttttgaa ggatgcgatt aaggacctt gttatgacaaa gcccgtcct	1020
acctgcaata tcagggtgac tgtgtgcagc tttgacgtg gagtagattt gcctccctgg	1080
tttccaccta tggtggaagg ggctgcccgcg gagggtgatg acggagatga cggagatgaa	1140
ggaggtgatg gagatgaggg tgaggaaggg caggagtga	1179