



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월09일

(11) 등록번호 10-1685209

(24) 등록일자 2016년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12N 5/074** (2010.01) **C12N 15/12** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
(21) 출원번호 **10-2010-7002641**  
(22) 출원일자(국제) **2009년07월30일**  
심사청구일자 **2014년07월07일**  
(85) 번역문제출일자 **2010년02월05일**  
(65) 공개번호 **10-2011-0036523**  
(43) 공개일자 **2011년04월07일**  
(86) 국제출원번호 **PCT/JP2009/063906**  
(87) 국제공개번호 **WO 2010/013845**  
국제공개일자 **2010년02월04일**  
(30) 우선권주장  
61/084,842 2008년07월30일 미국(US)  
(뒷면에 계속)  
(56) 선행기술조사문헌  
W02006073911 A1\*  
Cell. 131(5):861-872(2007.11.30.)\*  
Mol. Pharmacol. 69(4):1304-1310(2006.04.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠**  
일본 교토후 교토시 사쿄쿠 요시다혼마치 36번지 1  
(72) 발명자  
**야마나카 신야**  
일본 교토후 교토시 사쿄쿠 쇼고인 가와하라쵸 53  
고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠 인스티튜트 포 인티그레이티드 셀-마테리얼 사이언시스 센터 포 아이피에스 셀 리서치 앤드 어플리케이션 나이  
**요시다 요시노리**  
일본 교토후 교토시 사쿄쿠 쇼고인 가와하라쵸 53  
고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠 인스티튜트 포 인티그레이티드 셀-마테리얼 사이언시스 센터 포 아이피에스 셀 리서치 앤드 어플리케이션 나이  
(74) 대리인  
**특허법인코리아나**

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 유성진

(54) 발명의 명칭 **유도된 다능성 줄기 세포의 효율적인 확립 방법**

### (57) 요약

체세포를 그의 핵 초기화 단계에서 저산소 조건 하에 배양하는 것을 포함하는, 유도된 다능성 줄기 세포의 확립 효율을 개선하는 방법을 제공한다.

(30) 우선권주장

61/141,177 2008년12월29일 미국(US)

61/203,931 2008년12월30일 미국(US)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

체세포를 그의 핵 초기화 단계에서 상압에서의 산소 농도가 1% 내지 5% 인 저산소 조건 하에 배양하는 것을 포함하는, 유도된 다능성 줄기 세포의 확립 효율을 개선하는 방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상압에서의 산소 농도가 5% 인 방법.

#### 청구항 4

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 핵 초기화 단계는 핵 초기화 물질과 체세포의 접촉에 의해 수행되고, 핵 초기화 물질은 하기의 물질 또는 그것을 코딩하는 핵산을 포함하는 방법:

- (i) Oct3/4 및 Sox2, 또는
- (ii) Oct3/4 및 Klf4, 또는
- (iii) Oct3/4 및 c-Myc, 또는
- (iv) Oct3/4, Klf4 및 Sox2, 또는
- (v) Oct3/4, Klf4 및 c-Myc, 또는
- (vi) Oct3/4, Klf4, Sox2 및 c-Myc.

#### 청구항 5

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 핵 초기화의 단계에서 효율 개선제로서의 발프로산을 사용하는 추가적인 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 6

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 핵 초기화 물질과의 접촉 후 저산소 조건 하의 체세포 배양을 3 일 초과 동안 수행하는 방법.

#### 청구항 7

하기를 포함하는, 유도된 다능성 줄기 세포의 제조 방법:

a) 체세포의 핵 초기화 물질과의 접촉 단계로서, 이때 핵 초기화 물질은 하기의 물질, 또는 그것을 코딩하는 핵산을 포함하는 단계;

- (i) Oct3/4 및 Sox2, 또는
- (ii) Oct3/4 및 Klf4, 또는
- (iii) Oct3/4 및 c-Myc, 또는
- (iv) Oct3/4, Klf4 및 Sox2, 또는
- (v) Oct3/4, Klf4 및 c-Myc, 또는
- (vi) Oct3/4, Klf4, Sox2 및 c-Myc, 및

b) 상압에서의 산소 농도가 1% 내지 5% 인 저산소 조건 하 체세포의 배양 단계.

## 청구항 8

삭제

## 청구항 9

제 7 항에 있어서, 상압에서의 산소 농도가 5% 인 방법.

## 청구항 10

제 7 항 또는 제 9 항에 있어서, 상기 체세포를 발프로산과 접촉시키는 추가의 단계를 포함하는 방법.

## 청구항 11

제 7 항 또는 제 9 항에 있어서, 핵 초기화 물질과의 접촉 후 저산소 조건 하의 체세포 배양을 3 일 초과 동안 수행하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 유도된 다능성 줄기 (이후, iPS 로 지칭함) 세포의 확립 효율의 개선 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로는, 본 발명은 저산소 조건 하에 체세포를 그의 핵 초기화 단계에서 배양하는 것을 포함하는, iPS 세포의 확립 효율 개선 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 근년에, 마우스 및 인간 iPS 세포가 차례로 확립되었다. Yamanaka 등은 Oct3/4, Sox2, Klf4 및 c-Myc 유전자를 리porter 마우스 유래의 섬유아세포에 도입하고 (여기서, 네오마이신 내성 유전자는 Fbx15 영역으로 녹인 (knocked-in) 됨) 세포로 하여금 그 유전자들을 발현하게 함으로써 iPS 세포를 유도했다 (1,2). Okita 등 (3) 은, 트랜스제닉 마우스를 제조하고 (여기서 녹색 형광 단백질 (GFP) 및 프로마이신 내성 유전자가, 다능성 세포에서 Fbx15 발현보다도 더욱 국소적으로 발현되는 Nanog 의 영역에 통합됨), 상기 마우스로부터 유도된 섬유아세포로 하여금 상기에 언급한 네가지 유전자를 발현하도록 하고, 푸로마이신 내성 GFP-양성 세포를 선별함으로써, 배아 줄기 (ES) 세포에서와 거의 동일한 유전자 발현 및 후생유전학적 개질 프로파일을 나타내는 iPS 세포 (Nanog iPS 세포) 를 확립함에 있어서 성공했다. 유사한 결과가 다른 그룹에서 획득되었다 (4,5). 이후, c-Myc 유전자 이외의 세가지 다른 인자를 이용하여 iPS 세포가 제조될 수 있음이 밝혀졌다 (6).

[0003] 더욱이, Yamanaka 등은 인간 피부 섬유아세포에 마우스에서 사용했던 것과 동일한 상기 네가지 유전자를 도입함으로써 iPS 세포 확립에 성공했다 (1,7). 한편, Thomson 등의 그룹은 Klf4 및 c-Myc 대신에 Nanog 및 Lin28 을 이용하여 인간 iPS 세포를 제조했다 (8,9). Park 등 (10) 은, 네가지 인자 Oct3/4, Sox2, Klf4 및 c-Myc 에 추가하여 인간 세포 불멸화 유전자로 공지되어 있는 TERT 및 SV40 large T 항원을 이용하여 인간 iPS 세포를 제조했다. 이에 따라, 다능성에 있어서 ES 세포에 필적하는 iPS 세포는, 정해진 인자들을 체세포에 도입함으로써 인간 및 마우스의 두 경우 모두에서 제조될 수 있다는 점이 증명되었다.

[0004] 그러나, iPS 세포 확립 효율은 1% 미만으로 낮다. 특히, iPS 세포 확립의 극히 낮은 효율의 문제점은, 이들이, iPS 세포로부터 분화된 조직 및 개체에서 종양생성을 유발하기 쉬운, c-Myc 를 제외한 세가지 인자들 (Oct3/4, Sox2, Klf4) 을 체세포에 도입하여 제조했을 때 나타난다.

[0005] 그러나, 미분화 상태 및 세포의 다능성의 유지 및 저산소 조건 사이의 연합에 대한 일부 보고서가 있다. Ezashi 등 (11) 은 저산소 조건 하에 배양된 인간 ES (hES) 세포에서는 그의 분화성이 억제되었음을 관찰하여, hES 세포의 충분한 다능성을 유지하기 위해 저산소 조건 하의 배양이 필요하다는 점을 시사했다. Covello 등 (12) 은 저산소 조건 하에 초기에 유도되는 전사 조절 인자 (HIF-2a) 가 Oct3/4 의 발현을 유도하고 줄기 세포의 기능 및 분화를 조절할 수 있다는 것을 보여줬다. 더욱이, Grayson 등 (13,14) 은 저산소 조건이 인간 간엽 줄기 세포 (hMSCs) 의 미분화 상태의 유지 및 다능성에 연관되어 있음을 보여줬다. 그러나, 일단 분화된 체세포에서의 핵 초기화 프로세스와 저산소 조건 사이의 관계에 대한 보고서는 없다.

[0006] 인용한 참고문헌:

- [0007] 1. WO 2007/069666 A1
- [0008] 2. Takahashi, K. 및 Yamanaka, S., *Cell*, 126: 663-676 (2006)
- [0009] 3. Okita, K. 등, *Nature*, 448: 313-317 (2007)
- [0010] 4. Wernig, M. 등, *Nature*, 448: 318-324 (2007)
- [0011] 5. Maherali, N. 등, *Cell Stem Cell*, 1: 55-70 (2007)
- [0012] 6. Nakagawa, M. 등, *Nat. Biotechnol.*, 26: 101-106 (2008)
- [0013] 7. Takahashi, K. 등, *Cell*, 131: 861-872 (2007)
- [0014] 8. WO 2008/118820 A2
- [0015] 9. Yu, J. 등, *Science*, 318: 1917-1920 (2007)
- [0016] 10. Park, I.H. 등, *Nature*, 451: 141-146 (2008)
- [0017] 11. Ezashi, T. 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 4783-4788 (2005)
- [0018] 12. Covelio, K.L. 등, *Genes & Dev.*, 20: 557-570 (2006)
- [0019] 13. Grayson, W.L. 등, *J. Cell. Physiol.*, 207: 331-339 (2006)
- [0020] 14. Grayson, W.L. 등, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358: 948-953 (2007)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0021] 본 발명의 목적은 iPS 세포 확립 효율의 개선 수단을 제공하고, 상기 수단을 이용하여 iPS 세포를 효율적으로 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0022] 본 발명의 발명자들은 상기 언급한 목적 달성을 목표로 하여 집중적인 연구를 수행하여, iPS 세포의 확립 효율을 극적으로 개선시키는데 성공하여, 본 발명을 개발하게 되었다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 하기를 제공한다:
- [0024] [1] 체세포를 그의 핵 초기화 단계에서 저산소 조건 하에 배양하는 것을 포함하는, iPS 세포의 확립 효율을 개선하는 방법.
- [0025] [2] 상기 [1] 에 있어서, 상압에서의 산소 농도가 1% 내지 10% 인 방법.
- [0026] [3] 상기 [2] 에 있어서, 상압에서의 산소 농도가 1% 내지 5% 인 방법.
- [0027] [4] 상기 [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 있어서, 핵 초기화 물질이 하기의 물질이거나 또는 그것을 코팅하는 핵 산인 방법:
- [0028] (i) Oct3/4 및 Klf4, 또는
- [0029] (ii) Oct3/4 및 c-Myc, 또는
- [0030] (iii) Oct3/4, Klf4 및 Sox2, 또는
- [0031] (iv) Oct3/4, Klf4 및 c-Myc, 또는
- [0032] (v) Oct3/4, Klf4, Sox2 및 c-Myc.
- [0033] [5] 상기 [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 있어서, 핵 초기화의 단계에서 효율 개선제로서 발프로산을 사용하는 추가적인 단계를 포함하는 방법.
- [0034] [6] 상기 [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 있어서, 핵 초기화 물질과의 접촉 후 저산소 조건 하의 체세포 배양을 3 일 초과 동안 수행하는 방법.

## 발명의 효과

[0035] 핵 초기화 단계에서의 저산소 조건은 iPS 세포 확립의 효율을 현저하게 증가시킬 수 있기 때문에, 그것은, 전통적으로 낮은 iPS 세포 확립 효율과 연관되어 있는 c-Myc 또는 Sox2 를 제외한 세가지 인자들을 수단으로 하는 iPS 세포의 유도에 특히 유용하다. 그것은 또한 두가지 인자 (예를 들어, Oct3/4 및 Klf4; Oct3/4 및 c-Myc) 를 수단으로 하는 iPS 세포의 유도에도 유용하다. c-Myc 는 특히 재활성화될 경우 종양형성을 유발할 것이라는 우려때문에, 두가지 또는 세가지 인자를 이용하여 iPS 세포 확립 효율을 개선하는 것이 iPS 세포를 재생 의학에 적용함에 있어서의 가장 중요한 용도이다. 상기 저산소 조건은 산소 농도 제어를 가능케 하는, 널리 사용되는 CO<sub>2</sub> 인큐베이터를 이용하여 아주 쉽게 만들 수 있으므로, 공이 많이 드는 단계 또는 과학기술적인 요량없이도 iPS 세포를 효율적으로 제조할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0036] 도 1 은 정상 산소 농도 (20%) 및 낮은 산소 농도 (5%) (\*p<0.05) 에서 두가지 유전자 Oct3/4 및 Klf4 를 MEF 에 도입하여 확립한 iPS 세포 콜로니 (GFP-양성 콜로니) 의 갯수를 비교하는 그래프 표시이다.

도 2 는 두가지 유전자 Oct3/4 및 c-Myc 을 MEF 에 도입하여 확립한 iPS 세포 콜로니 (GFP-양성 콜로니) 의 영상을 보여준다 [a) a 위상차 영상; b) GFP-양성 콜로니의 영상].

도 3 은 낮은 산소 농도에서 확립된 iPS 세포 유래의 RNA 를 이용하여 수행한 RT-PCR 의 결과를 나타내는 사진이다. 미분화 상태 Oct3/4(end), Sox2(end), Klf4(end), c-Myc(end), Nanog, Rex1 및 ECAT1 에 대한 마커의 발현 및 도입된 외인성 Oct3/4(Tg) 의 발현을 검사했다. 각각의 레인에 해당하는 시료는 하기와 같다:

- 521AH5-1 및 535AH5-2: 네가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) 를 도입; 세포는 5% 산소 농도에서 배양
- 535AH1-1: 네가지 유전자 도입; 세포는 1% 산소 농도에서 배양
- 535BH5-1 및 521BH5-3: 세가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2) 를 도입; 세포는 5% 산소 농도에서 배양
- 527CH5-1, 527CH5-2 및 547CH5-1: 두가지 유전자 (Oct3/4, Klf4) 를 도입; 세포는 5% 산소 농도에서 배양
- RF8: 대조군 ES 세포
- 20D17: 대조군 Nanog-iPS 세포 [Nature, 448, 313-317(2007)]

각 패널의 우측에 있는 숫자는 PCR 사이클의 횟수를 나타낸다.

도 4 에서 상단 패널은 낮은 산소 농도 (5%) 에서 Oct3/4 및 Klf4 를 이용하여 확립한 iPS 세포 (527CH5-2) 를 면역결핍 마우스에 피하주사하여 형성된 기형종의 사진을 나타낸다. 도 4 에서 하단 패널은 수득한 기형종의 조직학적 염색 영상 (헤마톡실린-에오신 염색) 을 나타낸다 [a): 연골 조직, b): 내배엽 상피 조직, c): 근육 조직, d): 각질화 상피 조직].

도 5 는, 두가지, 세가지 또는 네가지 유전자를 도입하여 낮은 산소 농도 (5%) 에서 확립한 iPS 세포를 ICR 마우스 유래의 배반포에 마이크로인젝션하여 만든 성체 키메라의 2 주령때 찍은 사진이다.

- a): 네가지 유전자를 도입하여 확립한 iPS 세포 (521AH5-1) 로부터 유도된 키메라성 마우스 (수컷)
- b): 세가지 유전자를 도입하여 확립한 iPS 세포 (535BH5-1) 로부터 유도된 키메라성 마우스 (수컷)
- c): 세가지 유전자를 도입하여 확립한 iPS 세포 (535BH5-1) 로부터 유도된 키메라성 마우스 (암컷)
- d): 두가지 유전자의 도입으로 확립된 iPS 세포로부터 유도된 키메라성 마우스 (수컷) (527CH5-1)
- e): 두가지 유전자의 도입으로 확립된 iPS 세포로부터 유도된 키메라성 마우스 (수컷) (527CH5-2)

도 6 는 실시예 7 의 시간 계획표이다.

도 7 은 실시예 7 에서 각종 배양 조건 하에 확립된 iPS 세포의 콜로니 갯수의 그래프 표시이다. "Pre" 는 저산소 조건 하에 예비배양으로 수득된 결과를 나타낸다. "4F", "3F" 및 "Mock" 은 각각 네가지 유전자

(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc), 세가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2), 및 공백터의 도입으로 수득된 결과를 나타낸다.

도 8 은, 실시예 7 에서 감염 제 40 일째에 찍은, 네가지 유전자의 도입으로 수득된 iPS 세포 콜로니 형상의 사진 표시이다. 상단 및 하단 패널은 각각 예비배양없이 저산소 조건 하에 수득한 콜로니 및 예비배양하고 저산소 조건 하에 수득한 것의 영상을 보여준다.

도 9 는, 네가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) 를 도입하고, 감염 후 제 7 일째부터 1, 2 또는 3 주 동안, 또는 감염 후 40 일이 될 때까지 5% 산소 농도에서 배양하여 수득한 iPS 세포 콜로니의 갯수를 정상 산소 농도 (20%) 에서 수득한 것을 비교한 그래프 표시이다. 3 회의 독립적인 실험의 결과를 함께 나타낸다.

도 10 은, 낮은 산소 농도에서 확립된 iPS 세포 유래의 RNA 를 이용하여 수행한 RT-PCR 결과의 사진 표시이다. 미분화 상태 Oct3/4(end), Sox2(end), Klf4(end), c-Myc(end), Nanog, Rex1, GDF1 및 ESG1 에 대한 마커의 발현을 검사했다. 각각의 레인에 해당하는 시료는 하기와 같다:

- 96AH5-2 및 96AH5-3: 네가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) 를 도입; 세포는 감염 후 제 7 일 내지 제 40 일 사이에 5% 산소 농도에서 배양
- 96AH5W3-4, 96AH5W3-5, 96AH5W3-6: 네가지 유전자 도입; 세포는 감염 후 제 7 일부터 시작하여 3 주 동안 5% 산소 농도에서 배양
- 96BH5-1: 세가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2) 도입; 세포는 5% 산소 농도에서 예비배양
- 201B2: 대조군 iPS 세포 (*Cell*, 131, 861-872(2007))

각 패널의 우측의 숫자는 PCR 싸이클의 횟수를 나타낸다.

도 11 은, 인간 ES-형 콜로니의 대표적인 위상차 영상 (a) 및 5% 산소 농도 하에 생성된 확립 iPS 클론의 알칼리성 포스파타아제 염색 (b) 을 나타낸다. 5% 산소 하에 생성된 미분화 인간 iPS 세포의 면역세포학적 염색. Nanog (c), SSEA3 (d), SSEA4 (e).

도 12 는, 인간  $\alpha$ -페토프로틴, 평활근 액틴, bIII-튜블린, GFAP, Desmin 및 Vimentin 에 대한 항체로 염색하여 수득한, 인간의 네가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) 를 도입하고, 출발 세포를 5% 산소 농도 (70AH5-2, 70AH5-6) 에서 배양하여 확립한 iPS 세포가 삼배엽 분화에 대한 잠재성을 보유한다는 것을 확인시켜 주는 결과의 사진 표시이다 [좌측: 위상차 영상; 우측: 면역형광 영상].

도 13 은, SCID 마우스의 고환에 인간의 네가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) 를 도입하고 출발 세포를 5% 산소 농도 (70AH5-2) 에서 배양하여 확립한 인간 iPS 세포를 주사하여 수득한 기형종의 조직학적 염색 영상 (헤마톡실린-에오신 염색) 을 보여준다 [a) 신경 상피 조직, b) 망막 상피 조직, c) 뼈 조직, d) 평활근 조직, e) 내배엽 상피 조직].

도 14 (a) 내지 (d) 는, 네가지 인자를 형질도입한 MEF 로부터의 Nanog-GFP-양성 콜로니를 제 21 일째 (a) 및 제 28 일째 (b) 에 계수한 것을, 세가지 인자를 형질도입한 MEF 로부터의 것을 제 21 일째 (c) 및 제 28 일째 (d) 계수한 것과 비교하는 그래프 제시이다. 도 14 (e) 및 (f) 는 네가지 인자를 형질도입한 MEF (e) 및 세가지 인자를 형질도입한 MEF (f) 로부터의 전체 콜로니 중 GFP-양성 콜로니의 백분율을 제 21 일째에 비교한 그래프 표시이다.

도 15 (a) 는, 발프로산 (VPA) 의 존재 또는 부재 하에 저산소 및 정상 조건 하에 배양한 제 9 일째에 네가지 인자를 형질도입한 MEF 로부터 GFP-양성 세포의 백분율을 비교하는 그래프 표시를 나타낸다. 도 15 (b) 내지 (e) 는 VPA 부재 하의 20% 산소 (b) 및 5% 산소 (c) 하에서, 및 VPA 존재 하의 20% 산소 (d) 및 5% 산소 (e) 하에서 네가지 인자를 형질도입한 MEF 의 대표적인 유세포분석을 보여준다.

도 16 은, 형질도입 후 제 21 일째의 20% 산소 ((a); 상전이, (b); GFP) 및 5% 산소 ((c); 상전이, (d); GFP) 하의 GFP-양성 콜로니의 대표적인 영상이다. 스케일 바는 200  $\mu$ m 를 나타낸다.

도 17 은, 20% 산소 (a) 및 5% 산소 (b) 하에 네가지 인자를 감염시킨 MEF 의 제 21 일째 대표적인 영상, 20% 산소 (c), 및 5% 산소 (d) 하에 세가지 인자를 감염시킨 MEF 의 제 28 일째 대표적인 영상을 보여준다.

도 18 은 527CH5-1 의 핵형 분석을 보여준다.

도 19 는, 아홉토시스성 세포 ES 세포 (RF8) (a) 및 네가지 인자를 형질도입한 MEF (b) 의 백분율을 비교하는 그래프 표시를 보여준다. ES 세포는 웰 당  $1 \times 10^5$  개의 세포 밀도로 STO 세포의 피더층에 시딩하고, 정상산소 또는 저산소 하에 제 1 일부터 제 3 일까지 배양했다. 제 3 일째에, 세포를 아넥신 V-FITC 로 처리하고, 유세포분석에 적용했다. 막대그래프는 아홉토시스성 세포의 백분율을 나타낸다 (아넥신 V-FITC-양성). 네가지 인자를 형질도입한 MEF 는 형질도입 후 제 4 일째에 STO 세포 상에 시딩하고, 저산소 및 정상산소 조건 하에 제 5 일부터 제 9 일까지 배양하고, 세포를 아넥신-V 친화성 검정에 적용했다. 막대그래프는 아홉토시스성 세포의 백분율을 나타낸다. 3 회 실험의 평균 및 표준 편차를 제시한다.

도 20 은, ES 세포 (RF8) (a) 및 네가지 인자 및 mock 로 형질도입한 MEF (b) 의 세포 갯수를 비교하는 그래프 표시를 보여준다. ES 세포는 웰 당  $1 \times 10^5$  개의 세포 밀도로 STO 세포의 피더층 상에 시딩하고, 정상산소 또는 저산소 하에 제 1 일부터 제 3 일까지 배양했다. 제 3 일째에, 세포의 갯수를 계수했다. 막대그래프는 ES 세포의 세포 계수를 나타낸다. 3 회 실험의 평균 및 표준편차를 제시한다. 네가지 인자 및 mock 을 형질도입한 MEF 를 각각 저산소 또는 정상산소 조건 하에 제 1 일부터 제 4 일까지 배양하고, 세포의 갯수를 계수했다. 막대그래프는 세포 계수를 나타낸다. 4 회 실험의 평균 및 표준 편차를 제시한다. \*  $p > 0.05$

도 21 은, 5% 산소 하에 네가지 인자를 형질도입한 MEF 를 20% 산소 하의 것과 비교하는, ES 세포 특이적 유전자 (a) 및 MEF-특이적 유전자 (b) 의 발현 패턴의 산점도를 보여준다. ES 세포 및 MEF 에서 특이적으로 발현되는 유전자를 선별했다 (10 배 이상 차이). 저산소 처리한 네가지 인자로 형질도입한 MEF 에서 상향 및 하향 조절된 유전자는 각각 적색 및 청색으로 나타낸다. 녹색선은 유전자 발현 수준에서 다섯배 변화를 나타낸다.

도 22 는, 정량적 실시간 RT-PCR 에 의한 내재성 Oct3/4 및 Nanog 의 상대적 발현을 보여준다.

도 23 (a) 는, 제 21 일째의 Nanog-GFP-양성 콜로니의 계수를 비교하는 그래프 제시를 보여준다. 3 회 실험의 평균 및 표준 편차를 제시한다. 스케일 바아, 200  $\mu\text{m}$ . \* 는  $p > 0.05$  을 의미한다. 도 23 (b) 내지 (e) 는 20% 산소 ((b); 상전이, (c); GFP) 및 5% 산소 ((d); 상전이, (e); GFP) 하에 유도된 GFP-양성 콜로니의 대표적인 영상을 보여준다.

도 24 (a) 는 제 12 일 째에 piggyBac 위치이동에 의한 핵 초기화 MEF 유래의 Nanog-GFP-양성 콜로니를 각각 계수한 것을 비교하는 그래프 제시를 보여준다. 3 회 실험의 평균 및 표준 편차를 제시한다. \* 및 \*\* 는 각각  $p < 0.01$  및  $p < 0.001$  을 의미한다. 도 24 (b) 내지 (e) 는 20% 산소 ((b); 상전이, (c); GFP) 및 5% 산소 ((d); 상전이, (e); GFP) 하에 유도된 GFP-양성 콜로니의 대표적인 영상을 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 발명의 상세한 설명

[0038] 본 발명은 체세포를 그의 핵 초기화 단계에서 저산소 조건 하에 배양하는 것을 포함하는, iPS 세포 확립의 효율을 개선하는 방법을 제공한다.

[0039] (a) 저산소 조건

[0040] 본원에 사용된 용어 "저산소 조건" 은 세포 배양 동안 상압에서의 산소 농도가 공기 중에서보다 현저히 더 낮음을 의미한다. 구체적으로, 상기 조건에는 일반적인 세포 배양에 널리 이용되는 5-10%  $\text{CO}_2$ /95-90% 공기의 주변 분위기 중의 산소 농도보다 더 낮은 산소 농도가 포함되는데; 예를 들어 주변 분위기 중의 18% 이하의 산소 농도가 적용가능하다. 바람직하게는, 주변 분위기 중의 산소 농도는 15% 이하 (예를 들어, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하 등), 10% 이하 (예를 들어, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하 등), 또는 5% 이하 (예를 들어, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하 등). 주변 분위기 중의 산소 농도는 바람직하게는 0.1% 이상 (예를 들어, 0.2% 이상, 0.3% 이상, 0.4% 이상 등), 0.5% 이상 (예를 들어, 0.6% 이상, 0.7% 이상, 0.8% 이상, 0.9% 이상 등), 또는 1% 이상 (예를 들어, 1.1% 이상, 1.2% 이상, 1.3% 이상, 1.4% 이상 등) 이다.

[0041] 세포 환경에서 저산소 조건을 만드는 것에는 제한이 없다; 적합한 방법들 중 가장 쉬운 것은 세포를 산소 농도를 제어하도록 하는  $\text{CO}_2$  인큐베이터에서 배양하는 것이다. 그러한  $\text{CO}_2$  인큐베이터는 수많은 기기 제조사로부터 시판하여 입수가 가능하다 (예를 들어, Thermo Scientific, Ikemoto Scientific Technology, Juji Field Inc., 및

Wakenyaku Co., Ltd. 에서 제조하는, 저산소 배양을 위한 CO<sub>2</sub> 인큐베이터를 이용할 수 있다).

[0042] 저산소 조건 하에 세포 배양을 시작하는 시기는, 정상 산소 농도 (20%) 에서 수득되는 것과 비교해 iPS 세포 확립의 효율을 개선함에 있어 방해가 되지 않는 한 특별히 제한되지 않는다. 출발 시간은 핵 초기화 물질과 체세포의 접촉 이전 또는 이후일 수 있으며, 그 접촉과 동시일 수 있다. 예를 들어, 핵 초기화 물질과 체세포의 접촉 직후, 또는 접촉 후 일정한 시간 (예를 들어, 1 내지 10 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9) 일) 후 저산소 조건 하에 세포 배양을 시작하는 것이 바람직하다.

[0043] 저산소 조건 하의 세포 배양 기간은, 정상 산소 농도 (20%) 에서 수득되는 것과 비교해 iPS 세포 확립의 효율을 개선함에 있어 방해가 되지 않는 한 특별히 제한되지 않는다; 예시에는, 이에 제한되지 않으나, 3 일 이상, 5 일 이상, 7 일 이상 또는 10 일 이상에서, 50 일 이하, 40 일 이하, 35 일 이하 또는 30 일 이하 가 포함된다. 저산소 조건 하의 세포 배양의 바람직한 기간은 또한 주변 분위기 중의 산소 농도에 좌우되며; 당업자는 사용되는 산소 농도에 따라 세포 배양 기간을 적당히 조정할 수 있다. 예를 들어, 바람직한 기간은 낮은 산소 농도 조건에서의 핵 초기화 세포 중의 ES 세포 특이적 유전자 발현을 정상 산소 조건에서의 것과 비교하여 결정된다. 본 발명의 한 구현예에서, iPS 세포 후보 콜로니를 지표로서의 약물 내성으로 선별할 때, 약물 선별 시작에 의해 저산소 조건으로부터 정상 산소 농도가 회복되는 것이 바람직하다.

[0044] 더욱이, 저산소 조건 하에서의 세포 배양의 바람직한 출발 시간 및 기간은 또한 사용되는 핵 초기화 물질, 정상 산소 농도와 관련한 조건 하에서의 iPS 세포 확립의 효율 및 기타 요인들의 선택에 좌우되어 다양하다. 예를 들어, 세가지 인자 Oct3/4, Klf4 및 Sox2 를 인간 체세포에 도입하는 경우, 세포는 핵 초기화 물질과의 접촉 후 비교적 일찍 (예를 들어, 0 내지 3 일 (예를 들어, 1, 2 일) 시작하여 저산소 조건 하에 3 내지 10 일 (예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8, 9 일) 동안 배양하는 것이 바람직하다.

[0045] (b) 체세포의 공급원

[0046] 포유류 기원 (예를 들어, 마우스, 인간) 의, 생식세포를 제외한 임의의 세포들을 본 발명에서의 iPS 세포 제조를 위한 출발 물질로서 이용할 수 있다. 예시에는, 각질화 상피 세포 (예를 들어, 각질화 표피 세포), 점막 상피 세포 (예를 들어, 혀 표층의 상피 세포), 외분비샘 상피 세포 (예를 들어, 젖샘 세포), 호르몬 분비 세포 (예를 들어, 부신수질), 대사 또는 저장을 위한 세포 (예를 들어, 간세포), 접면을 구성하는 내막 상피 세포 (예를 들어, 타입 I 폐포 세포), 폐쇄관의 내막 상피 세포 (예를 들어, 혈관 내피 세포), 수송 능력을 가진 섬모를 가진 세포 (예를 들어, 기도 상피 세포), 세포외 매트릭스 분비를 위한 세포 (예를 들어, 섬유아세포), 골약성 세포 (예를 들어, 평활근 세포), 혈액 및 면역계의 세포 (예를 들어, T 림프구), 감각 관련 세포 (예를 들어, 섬세포 (bacillary cells)), 자율신경계 신경세포 (예를 들어, 콜린성 신경세포), 감각 기관의 지주세포 및 말초 신경세포 (예를 들어, 위성 세포), 중추 신경계의 신경 세포 및 아교 세포 (예를 들어, 별아교 세포), 색소 세포 (예를 들어, 망막 색소 상피 세포), 그의 전구 세포 (조직 전구 세포) 등이 포함된다. 세포 분화 정도에 대해서는 제한이 없다; 심지어 미분화 전구 세포 (체세포 줄기세포를 포함) 및 최종적으로 분화된 성숙 세포가 본 발명에서 체세포의 공급원으로서 비슷하게 사용될 수 있다. 미분화 전구 세포의 예시에는 조직 줄기 세포 (체세포 줄기 세포), 예컨대 신경 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 간엽 줄기 세포 및 치수 줄기 세포가 포함된다.

[0047] 체세포의 공급원으로서의 포유류의 선택은 특별히 제한되지 않는다; 그러나, 수득한 iPS 세포를 인간에서의 재생 의학에 이용하려면, 이식편 거부 방지의 측면에서, 체세포가 환자 자신의 세포이거나 또는 환자의 것과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 HLA 타입을 가진 또다른 사람 (공여자) 로부터 수집된 세포인 것이 특히 바람직하다. 본원에 사용된 "실질적으로 동일한 HLA 타입" 은, 공여자의 체세포로부터 유도된 iPS 세포의 분화를 유도함으로써 수득되는 이식용 세포가 면역억제제 등을 이용하면서 환자에게 이식했을 때 융합될 수 있을 정도로 환자의 것과 공여자의 HLA 타입이 맞다는 것을 의미한다. 예를 들어, 실질적으로 동일한 HLA 타입에는, 세가지 주요 HLA 인 HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 이 수용자와 일치하는 HLA 타입이 포함된다 (이후, 동일한 의미가 적용됨). 수득한 iPS 세포가 인간에게 투여 (이식) 되지 않지만, 예를 들어 환자의 약물 수용성 또는 부작용을 평가하기 위한 스크리닝을 위한 세포의 공급원으로서 사용되는 경우, 약물 수용성 또는 부작용과 관련한 동일한 유전자적 다형성을 가진 환자 또는 또다른 사람 유래의 체세포를 수집하는 것이 마찬가지로 필요하다.

[0048] (c) 핵 초기화 물질

[0049] 본 발명에서, "핵 초기화 물질" 은, 단백질성 인자 또는 그것을 코딩하는 핵산 (백터에 혼입된 형태 포함) 또는 저분자량 화합물과 같은 임의의 물질로 이루어질 수 있는, 체세포 유래의 iPS 세포를 유도할 수 있는 임의의 물

질(들)을 지칭한다. 핵 초기화 물질이 단백질성 인자 또는 그것을 코딩하는 핵산인 경우, 예를 들어 하기의 조합이 바람직하다 (이후, 단백질성 인자에 대한 명칭만을 나타냄).

- [0050] (1) Oct3/4, Klf4, c-Myc
- [0051] (2) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2 (Sox2 는 Sox1, Sox3, Sox15, Sox17 또는 Sox18 로 대체가능; Klf4 는 Klf1, Klf2 또는 Klf5 로 대체가능; c-Myc 는 T58A (활성 돌연변이), N-Myc, 또는 L-Myc 로 대체가능)
- [0052] (3) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Fbx15, Nanog, Eras, ECAT15-2, Tc11,  $\beta$ -카테닌 (활성 돌연변이 S33Y)
- [0053] (4) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, SV40 Large T
- [0054] (5) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, HPV16 E6
- [0055] (6) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, HPV16 E7
- [0056] (7) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, HPV6 E6, HPV16 E7
- [0057] (8) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, Bmi1
- [0058] [상기 제시한 인자들에 대한 더 많은 정보에 대해서는, WO 2007/069666 참조 (상기 조합 (2) 에서 Sox2 를 Sox18 로 대체하고, Klf4 를 Klf1 또는 Klf5 로 대체하는 것에 대해서는, *Nature Biotechnology*, 26, 101-106 (2008) 참조); 조합 "Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2" 에 대해서는, 또한 *Cell*, 126, 663-676 (2006), *Cell*, 131, 861-872 (2007) 등을 참조; 조합 "Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, hTERT, SV40 Large T" 에 대해서는 또한, *Nature*, 451, 141-146 (2008) 참조]
- [0059] (9) Oct3/4, Klf4, Sox2 [*Nature Biotechnology*, 26, 101-106 (2008) 참조]
- [0060] (10) Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28 [*Science*, 318, 1917-1920 (2007) 참조]
- [0061] (11) Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28, hTERT, SV40 Large T (*Stem Cells*, 26, 1998-2005 (2008) 참조)
- [0062] (12) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28 [*Cell Research* (2008) 600-603 참조]
- [0063] (13) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, SV40 Large T (또한, *Stem Cells*, 26, 1998-2005 (2008) 참조)
- [0064] (14) Oct3/4, Klf4 [또한, *Nature*, 454, 646-650 (2008); *Cell Stem Cell*, 2: 525-528 (2008) 참조]
- [0065] (15) Oct3/4, c-Myc [*Nature*, 454, 646-650 (2008) 참조]
- [0066] (16) Oct3/4, Sox2 [*Nature*, 451, 141-146 (2008), W02008/118820 참조]
- [0067] (17) Oct3/4, Sox2, Nanog (W02008/118820 참조)
- [0068] (18) Oct3/4, Sox2, Lin28 (W02008/118820 참조)
- [0069] (19) Oct3/4, Sox2, c-Myc, Esrrb (본원에서, Essrb 는 Esrrg 로 대체가능; *Nat. Cell Biol.*, 11, 197-203 (2009) 참조)
- [0070] (20) Oct3/4, Sox2, Esrrb (*Nat. Cell Biol.*, 11, 197-203 (2009) 참조)
- [0071] (21) Oct3/4, Klf4, L-Myc
- [0072] (22) Oct3/4, Nanog
- [0073] (23) Oct3/4
- [0074] (24) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28, SV40LT (*Science*, 324: 797-801 (2009) 참조)
- [0075] 상기 (1) 내지 (24) 에서, Oct3/4 대신에, Oct 패밀리의 다른 구성원, 예를 들어 Oct1A, Oct6 등이 또한 사용될 수 있다. Sox2 (또는 Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Sox18) 대신에, Sox 패밀리의 다른 구성원, 예를 들어 Sox7 등이 또한 사용될 수 있다. c-Myc 대신에, Myc 패밀리의 다른 구성원, 예를 들어 L-Myc 등이 사용될 수 있다. Lin28 대신에, Lin 패밀리의 다른 구성원, 예를 들어 Lin28b 등이 또한 사용될 수 있다.
- [0076] 상기 (1) 내지 (24) 에 속하지 않지만, 상기 (1) 내지 (24) 중 임의의 것의 모든 구성원을 포함하며, 추가로 임의의 선택된 기타 물질을 포함하는 임의의 조합이 또한 본 발명에서 "핵 초기화 물질" 의 범주에 포함될 수 있

다. 핵 초기화 중인 체세포가 핵 초기화를 유발하기에 충분한 수준으로 상기 (1) 내지 (24) 중 임의의 한가지의 하나 이상의 구성원들을 내재적으로 발현한다면, 해당하는 하나 이상의 구성원들을 제외한 나머지 구성원들만의 조합도 또한 본 발명에서 "핵 초기화 물질"의 범주에 포함될 수 있다.

[0077] 상기 조합들 중에서, 바람직한 핵 초기화 물질의 예시로서, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28 및 SV40 Large T 로부터 선택되는 하나 이상, 바람직하게는 두가지 이상, 더욱 바람직하게는 세가지 이상이 언급될 수 있다.

[0078] 수득한 iPS 세포가 치료 목적으로 이용되는 경우, 바람직하게는 3 가지 인자 Oct3/4, Sox2 및 Klf4 [상기 조합 (9)] 가 사용된다. 수득한 iPS 세포를 치료 목적으로 이용하지 않는다면 (예를 들어, 약물 발견 스크리닝 등을 위한 연구 수단으로서 이용), 다섯가지 인자 Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2 및 Lin28, 또는 다섯가지 인자 및 Nanog 로 이루어지는 여섯개의 인자 [상기 조합 (12)] 가 바람직하다. 상기 바람직한 조합에서, L-Myc 는 또한 c-Myc 대신 사용될 수 있다.

[0079] 상기 언급한 단백질성 인자의 마우스 및 인간 cDNA 서열에 대한 정보는 WO 2007/069666 (공보에서, Nanog 는 ECAT4 로 기재되어 있다) 에 언급된 NCBI 접근 번호를 참조하여 이용가능하다. Lin28, Lin28b, Esrrb 및 Esrrgd 에 대한 마우스 및 인간 cDNA 서열 정보는 각각 하기의 NCBI 접근 번호를 참조하여 입수가능하다 ); 당업자는 상기 cDNA 를 용이하게 입수할 수 있다.

[0080] 유전자 명칭                      마우스                      인간

[0081] Lin28 NM\_145833 NM\_024674

[0082] Lin28b NM\_001031772 NM\_001004317

[0083]	Esrrb	NM_011934	NM_004452
--------	-------	-----------	-----------

[0084]	Esrrg	NM_011935	NM_001438
--------	-------	-----------	-----------

[0085] 핵 초기화 물질로서의 용도를 위한 단백질성 인자는, 적당한 발현 벡터에 수득한 cDNA 를 삽입하고, 그 벡터를 숙주 세포에 도입하고, 배양된 세포 또는 그의 조건화된 배지로부터의 재조합 단백질성 인자를 회수하여 제조할 수 있다. 한편, 사용한 핵 초기화 물질이 단백질성 인자를 코딩하는 핵산인 경우, 수득한 cDNA 는 바이러스 또는 플라스미드 벡터에 삽입하여 발현 벡터를 구축하고, 그 벡터는 핵 초기화 단계에 적용된다.

[0086] 핵 초기화 물질(들)과 체세포의 접촉은, 상기 물질이 단백질질 인자인 경우 세포를 향한 단백질 이동을 위해 자체로 공지된 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 상기 방법에는, 예를 들어, 단백질 이동 시약을 이용하는 방법, 단백질 이동 도메인 (PTD)- 또는 세포 침투 펩티드 (CPP)- 융합 단백질을 이용하는 방법, 마이크로인젝션 등이 포함된다. 단백질 이동 시약은 시판되어 입수가 가능하며, 양이온성 지질 기재의 것, 예컨대 BioPOTER Protein Delivery Reagent (Genlantis), Pro-Ject<sup>TM</sup> Protein Transfection Reagent (PIERCE), PULSin<sup>TM</sup> delivery reagent (Polyplus-transfection) 및 ProVectin (IMGENEX); 지질 기재의 것, 예컨대 Profect-1 (Targeting Systems); 멤브레인-침투성 펩티드 기재의 것, 예컨대 Penetrain Peptide (Q biogene) 및 Chariot Kit (Active Motif) 등이 포함된다. 이동은 상기 시약에 첨부된 프로토콜에 따라 수행될 수 있으며, 일반적인 과정은 하기에 기재된 바와 같다. 핵 초기화 물질(들)은 적당한 용매 (예를 들어, PBS 또는 HEPES 와 같은 완충용액)로 희석되며, 이동 시약이 첨가되며, 혼합물은 실온에서 약 5 내지 15 분 동안 인큐베이션하여 복합체를 형성하고, 상기 복합체는 배지를 혈청이 없는 배지로 교체한 후 세포에 첨가하고, 세포를 37℃ 에서 한시간 이상 인큐베이션한다. 이후, 배지는 제거하고, 혈청이 포함된 배지로 교체한다. 단백질 이동 시약을 이용하는 구체적인 수단은 WO 2009/073523 또는 WO 2009/032456 에 개시되어 있다.

[0087] 개발된 PTD 에는, 단백질의 세포외 도메인을 이용하는 것, 예컨대 초파리 유래의 AntP, HIV-유도성 TAT (Frankel, A. 등, *Cell* 55, 1189-93 (1988) 또는 Green, M. & Loewenstein, P. M. *Cell* 55, 1179-88 (1988)), 페네트라틴 (Penetratin) (Derossi, D. 등, *J. Biol. Chem.* 269, 10444-50 (1994)), 부포린 (Buforin) II (Park, C. B. 등 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 8245-50 (2000)), 프랜스포르탄 (Transportan) (Pooga, M. 등 *FASEB J.* 12, 67-77 (1998)), MAP (모델 양친매성 펩티드) (Oehlke, J. 등 *Biochim. Biophys. Acta.* 1414, 127-39 (1998)), K-FGF (Lin, Y. Z. 등 *J. Biol. Chem.* 270, 14255-14258 (1995)), Ku70 (Sawada, M. 등 *Nature Cell Biol.* 5, 352-7 (2003)), Prion (Lundberg, P. 등 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 85-90 (2002)), pVEC (Elmqvist, A. 등 *Exp. Cell Res.* 269, 237-44 (2001)), Pep-1 (Morris, M. C. 등 *Nature Biotechnol.* 19, 1173-6 (2001)), Pep-7 (Gao, C. 등 *Bioorg. Med. Chem.* 10, 4057-65 (2002)), SynB1

(Rousselle, C. 등 *Mol. Pharmacol.* 57, 679-86 (2000)), HN-I (Hong, F. D. & Clayman, G L. *Cancer Res.* 60, 6551-6 (2000)), 및 HSV-유도성 VP22 이 포함된다. PTD로부터 유도된 CPP 에는, 폴리아르기닌, 예컨대 11R (*Cell Stem Cell*, 4,381-384 (2009)) 및 9R (*Cell Stem Cell*, 4, 472-476 (2009)) 이 포함된다. 핵 초기화 물질의 cDNA 및 PTD 또는 CPP 서열을 혼입시킨 융합 단백질 발현 벡터를 제조하여 융합 단백질의 재조합 발현을 가능케 하고, 융합 단백질은 이동시에 이용하기 위해 회수한다. 이러한 이동은, 단백질 이동 시약이 첨가되지 않는다는 점을 제외하고는, 상기 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. CPP 를 이용하는 구체적인 수단은 *Cell Stem Cell*, 4:472-6 (2009) 또는 *Cell Stem Cell*, 4:381-4 (2009) 에 개시되어 있다.

[0088] 팁 직경이 약 1  $\mu\text{m}$  인 유리 바늘에 단백질 용액을 위치시켜, 그 용액을 세포에 주입하는 방법인 마이크로인젝션에 의해 단백질을 세포로 이동시킬 수 있다.

[0089] 핵 초기화 유전자의 지연성 과발현은 잠재적으로 발암 위험을 증가시키나; 단백질성 핵 초기화 인자는 트랜스펙션된 세포 중의 단백질분해효소에 의한 분해에 적용되어 점차 사라지기 때문에, 단백질성 인자의 이용은, 수득한 iPS 세포를 치료 목적으로 이용하는 경우와 같이 높은 안전성이 요구되는 경우에 적합하다.

[0090] 그러나, 체세포로의 이동의 용이성을 고려하면, 핵 초기화 물질은 또한 바람직하게는, 인자 그대로 보다는 단백질 인자를 코딩하는 핵산의 형태로 사용될 수 있다. 핵산은 DNA 또는 RNA, 또는 DNA/RNA 키메라일 수 있으며, 이중가닥 또는 단일가닥일 수 있다. 바람직하게는, 핵산은 이중가닥 DNA, 특히 cDNA 이다.

[0091] 핵 초기화 물질의 cDNA 는 숙주 체세포에서 기능할 수 있는 프로모터를 포함하는 적당한 발현 벡터에 삽입된다. 유용한 발현 벡터에는, 예를 들어 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스 및 센다이 바이러스, 동물 세포에서의 발현을 위한 플라스미드 (예를 들어, pAI-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo) 등이 포함된다. 사용되는 벡터의 종류는 수득한 iPS 세포의 의도하는 용도에 따라 적당히 선택할 수 있다.

[0092] 발현 벡터에 사용된 프로모터의 예시에는, EF-알파 프로모터, CAG 프로모터, SR $\alpha$  프로모터, SV40 프로모터, LTR 프로모터, CMV (싸이토메갈로바이러스) 프로모터, RSV (라우스 육종 바이러스) 프로모터, MoMuLV (몰로니 마우스 백혈병 바이러스) LTR, HSV-TK (헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제) 프로모터 등이 포함되며, EF-알파 프로모터, CAG 프로모터, MoMuLV LTR, CMV 프로모터, SR $\alpha$  프로모터 등이 포함된다.

[0093] 발현 벡터는, 프로모터에 추가하여, 필요하다면 인핸서, 폴리아데닐 시그널, 선별가능한 마커 유전자, SV40 복제 기원 등을 포함할 수 있다. 유용한 선별가능한 마커 유전자의 예시에는, 디히드로폴레이트 리덕타아제 유전자, 네오마이신 저항성 유전자, 푸로마이신 저항성 유전자 등이 포함된다.

[0094] 두가지 이상의 핵산이 핵 초기화 물질로서 세포에 도입되는 경우, 핵산은 별도의 벡터에 의해 담지될 수 있으며, 여러가지 핵산이 나란히 합쳐서 폴리시스트로닉 벡터를 수득할 수 있다. 후자의 경우, 효율적인 폴리시스트로닉 발현을 가능하게 하기 위해서, 수족구병 바이러스의 2A 자가절단 펩티드 (*Science*, 322, 949-953, 2008 등 참조), IRES 서열 등, 바람직하게는 2A 서열을 개별 핵산들 사이에 라이게이션시키는 것이 바람직하다.

[0095] 핵 초기화 물질로서의 핵산을 보유하는 발현 벡터는 벡터의 선택에 따라서는 당업자에게 공지된 기술로 세포에 도입될 수 있다. 바이러스 벡터의 경우, 예를 들어 핵산을 포함하는 플라스미드를 적당한 패키지 세포 (예를 들어, Plat-E 세포) 또는 상보적인 세포주 (예를 들어, 293-세포) 에 도입하고, 배양 상청액에서 생산된 바이러스 벡터를 회수하고, 벡터를 바이러스 벡터에 적합한 방법으로 세포에 감염시킨다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터를 이용하는 구체적인 방법은 WO2007/69666, *Cell*, 126, 663-676 (2006) 및 *Cell*, 131, 861-872 (2007) 에 개시되어 있다. 렌티바이러스 벡터를 이용하는 구체적인 방법은 *Science*, 318, 1917-1920 (2007) 에 개시되어 있다. 아데노바이러스 벡터를 이용하는 구체적인 방법은 *Science*, 322, 945-949 (2008) 에 개시되어 있다.

[0096] 상기 논의된 바와 같이, iPS 세포를 치료 목적으로 이용하는 경우, 핵 초기화 유전자의 지연 과발현은 잠재적으로 iPS 세포로부터 분화된 조직 및 장기에서의 발암 위험을 증가시키며; 따라서, 핵 초기화 물질로서의 핵산은 바람직하게는 세포의 염색체에 통합시키지 않고 일시적으로 발현시킨다. 이러한 관점에서, 염색체로의 통합이 드문 아데노바이러스 벡터의 이용이 바람직하다. 아데노바이러스 벡터를 이용하는 구체적인 방법은 *Science*, 322, 945-949 (2008) 에 개시되어 있다. 아데노-연관 바이러스 벡터는 또한 염색체로의 통합 빈도가 낮고, 세포독성 및 면역반응 유도성이 아데노바이러스 벡터보다 더 낮으므로, 이는 또다른 바람직한 벡터로서 언급될 수 있다. 센다이 바이러스 벡터는 염색체 외부에서 안정하게 존재할 수 있고, siRNA 를 이용하여 필요에 따라 분해 및 제거될 수 있으므로, 이것 또한 바람직하게 사용된다. 센다이 바이러스 벡터에 대해서는, *J. Biol.*

*Chem.*, 282, 27383-27391 (2007) 및 JP-3602058 B 에 기재된 것을 이용할 수 있다.

- [0097] 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하는 경우, 심지어 트랜스유전자의 침묵화가 발생한 경우라도, 이는 재활성화되는 것이 가능하며; 따라서 바람직하게는 예를 들어, 필요없어지게 되면 핵 초기화 물질로서의 핵산을 Cre-loxP 시스템을 이용하여 잘라내는 방법을 이용할 수 있다. 즉, 앞서 핵산의 양끝에 loxP 서열을 두어, iPS 세포를 유도한 후, Cre 재조합효소로 하여금 플라스미드 벡터 또는 아데노바이러스 벡터를 이용하는 세포에 작용하도록 해, loxP 서열 사이에 긴 영역을 잘라낼 수 있다. LTR U3 영역의 인핸서-프로모터 서열은 삽입 돌연변이에 의해 그의 부근에서 숙주 유전자를 상향조절할 수 있기 때문에, 서열의 결실 또는 SV40 의 것과 같은 폴리아데닐화 서열을 이용한 서열 치환으로 제조된 3' 자가-불활성화 (SIN) LTR 을 이용하여, 계놈 내에 잔류하는 loxP 서열을 절단하지 않고도, 그의 외부에서 LTR 에 의해 내재 유전자의 발현 조절을 회피하는 것이 더욱 바람직하다. Cre-loxP 시스템 및 SIN LTR 을 이용하는 구체적인 방법은 Chang 등, *Stem Cells*, 27: 1042-1049 (2009) 에 개시되어 있다.
- [0098] 한편, 비(非)바이러스 벡터인 플라스미드 벡터가 리포펙틴법, 리포솜법, 전자천공법, 인산칼슘 공침법, DEAE 텍스트란법, 마이크로인젝션법, 유전자 총 (gene gun) 법을 이용하여 세포에 전해질 수 있다. 플라스미드 벡터를 이용하는 경우에는 또한, 그의 염색체에 대한 통합이 드물고, 트랜스유전자가 세포 내에서 DNase 에 의해 분해 및 제거되므로; iPS 세포가 치료 목적으로 이용되는 경우, 플라스미드 벡터의 이용이 또다른 바람직한 구현 양태일 수 있다. 플라스미드를 벡터로서 이용하는 구체적인 방법은, 예를 들어 *Science*, 322, 949-953 (2008) 등에 기재되어 있다.
- [0099] 또다른 바람직한 비(非)통합 유형 벡터는 에피솜 벡터인데, 이는 염색체 외부에서 자발적으로 복제가능하다. 에피솜 벡터를 이용하는 구체적인 방법은 *Science*, 324, 797-801(2009) 에 개시되어 있다.
- [0100] 아데노바이러스 또는 플라스미드를 이용하는 경우에는 또한, 트랜스유전자는 염색체에 통합될 수 있으므로; 서던 블롯 또는 PCR 로 염색체에 대한 유전자 삽입의 부재를 결국 확인해야 한다. 이러한 이유로, 상기 언급한 Cre-loxP 시스템과 같이, 트랜스유전자가 염색체로 통합된 후 유전자를 제거하는 방법을 이용하는 것이 유리할 수 있다. 또다른 바람직한 양태에서, 트랜스유전자를 트랜스포존을 이용하여 염색체에 통합시킨 후, 트랜스포사아제로 하여금 플라스미드 벡터 또는 아데노바이러스 벡터를 이용하여 세포에 작용하도록 하여 트랜스유전자를 염색체로부터 완전히 제거하는 방법을 이용할 수 있다. 바람직한 트랜스포존의 예시로서, 인시목 곤충으로부터 유도된 트랜스포존인 piggyBac 등을 언급할 수 있다. piggyBac 트랜스포존을 이용하는 구체적인 방법은 Kaji, K. 등, *Nature*, 458: 771-775 (2009) Woltjen 등, *Nature*, 458: 766-770 (2009) 에 개시되어 있다. 또다른 구현예에서, 프로모터 영역 중의 테트라사이클린 응답성 구성원 (Tet-OnR & Tet-Off R Gene Expression Systems, Clontech) 을 트랜스유전자 발현을 위해 이용할 수 있다.
- [0101] 아데노바이러스 또는 비(非)바이러스 발현 벡터를 체세포에 도입하기 위한 취급의 반복 횟수는 특별히 제한되지 않으며, 트랜스펙션은 단번에 또는 선택하는 임의의 횟수로 (예를 들어, 1 회 내지 10 회, 1 회 내지 5 회 등) 수행할 수 있다. 두가지 이상의 아데노바이러스 또는 비바이러스 발현 벡터를 체세포에 도입하는 경우, 바람직하게는 모든 종류의 아데노바이러스 또는 비바이러스 발현 벡터를 동시에 체세포에 도입하나; 그러한 경우일지라도, 트랜스펙션은 단번에 또는 선택하는 임의의 횟수로 (예를 들어, 1 회 내지 10 회, 1 회 내지 5 회 등) 수행할 수 있으며, 바람직하게는 트랜스펙션은 2 회 이상 (예를 들어, 3 회 또는 4 회) 반복하여 수행할 수 있다.
- [0102] 핵 초기화 물질이 저분자량 화합물인 경우, 체세포와 그의 접촉은 해당 물질을 적당한 농도로 수성 또는 비수성 용매에 녹이고, 그 용액을 인간 또는 마우스와 같은 포유류로부터 단리한 체세포의 배양에 적합한 배지[예를 들어, 약 5 내지 20% 소태아 혈청을 함유하는 최소 필수 배지 (MEM), Dulbecco's Modified Eagle 배지 (DMEM), RPMI1640 배지, 199 배지, F12 배지 및 이들의 배합물 등]에 첨가하여, 핵 초기화 물질 농도가 체세포 내에서 핵 초기화를 유발하기에 충분하고 세포독성을 유발하지 않는 범위 내에 있게 하고, 주어진 기간 동안 세포를 배양하여 수행될 수 있다. 핵 초기화 물질 농도는 사용된 핵 초기화 물질의 종류에 좌우되며, 약 0.1 nM 내지 약 100 nM 의 범위에서 적절하게 선택된다. 접촉 기간은, 세포의 핵 초기화를 유발하기에 충분한 한, 특별히 제한되지 않으며; 일반적으로 핵 초기화 물질은 양성 콜로니가 나타날 때까지 배지 중에 공존하도록 할 수 있다.
- [0103] (d) iPS 세포 확립 효율 개선제
- [0104] 근년에, 전통적으로 낮았던 iPS 세포 확립의 효율을 개선하는 각종 물질들이 하나씩 제안되어 왔다. 상기 연

급한 핵 초기화 물질과 함께 체세포를 접촉시킬 때, 상기 확립 효율 개선제들은 iPS 세포 확립의 효율을 더 높일 것으로 예상된다.

[0105] iPS 세포 확립 효율 개선제의 예시에는, 이에 제한되지 않으나, 히스톤 디아세틸라아제 (HDAC) 저해제 [예를 들어, 발프로산 (VPA) (*Nat. Biotechnol.*, 26(7): 795-797 (2008)), 저분자량 저해제, 예컨대 트리코스타틴 A, 나트륨 부티레이트, MC 1293 및 M344, 핵산-기재 발현 저해제, 예컨대 HDAC 에 대한 siRNAs 및 shRNAs (예를 들어, HDAC1 siRNA Smartpool<sup>®</sup> (Millipore), HDAC1 에 대한 HuSH 29mer shRNA 구축물 (OriGene) 등), 등], DNA 메틸트랜스퍼라아제 저해제 (예를 들어, 5'-아자싸이티딘) [*Nat. Biotechnol.*, 26(7): 795-797 (2008)], G9a 히스톤 메틸트랜스퍼라아제 저해제 [예를 들어, 저분자량 저해제, 예컨대 BIX-01294 (*Cell Stem Cell*, 2: 525-528 (2008))], 핵산-기재 발현 저해제, 예컨대 G9a 에 대한 siRNAs 및 shRNA [예를 들어, G9a siRNA (인간) (Santa Cruz Biotechnology) 등] 등], L-채널 칼슘 아고니스트 (예를 들어, Bayk8644) [*Cell Stem Cell*, 3, 568-574 (2008)], p53 저해제 [예를 들어, p53 에 대한 siRNA 및 shRNA (*Cell Stem Cell*, 3, 475-479 (2008))], UTF1 [*Cell Stem Cell*, 3, 475-479 (2008)], Wnt 신호전달 유도제 (예를 들어, 가용성 Wnt3a) [*Cell Stem Cell*, 3, 132-135 (2008)], 2i/LIF [2i 은 미토겐-활성화 단백질 키나아제 신호전달 및 글리코겐 합성효소 키나아제-3 의 저해제이다, *PloS Biology*, 6(10), 2237-2247 (2008)] 등이 포함된다. 상기에 언급한 바와 같이, 핵산-기재 발현 저해제는 siRNA 또는 shRNA 를 코딩하는 DNA 를 보유하는 발현 벡터의 형태일 수 있다.

[0106] 상기 언급한 핵 초기화 물질의 구성성분들 중에서, SV40 large T 등은, 예를 들어, iPS 세포 확립 효율 개선제의 범주에 포함될 수 있는데, 이는 이들이 체세포 핵 초기화에 필수적인 것은 아니고 보조적인 인자인 것으로 여겨지기 때문이다. 핵 초기화에 대한 메카니즘이 불분명한 상황에서, 핵 초기화에 필수적이진 않은 보조적인 인자들이 핵 초기화 물질 또는 iPS 세포 확립 효율 개선제로서 편리하게 여겨질 수 있다. 이에 따라, 체세포 핵 초기화 프로세스가 핵 초기화 물질(들) 및 iPS 세포 확립 효율 개선제(들)의 체세포와의 접촉으로 인한 총체적인 사건으로 간주되기 때문에, 당업자는 핵 초기화 물질과 iPS 세포 확립 효율 개선제를 항상 구분할 필요는 없는 것으로 보인다.

[0107] iPS 세포 확립 효율 개선제와 체세포의 접촉은 각 세가지 경우에 대해 상기 기재된 바와 같이 달성될 수 있다: (a) 개선제가 단백질성 인자임, (b) 개선제가 단백질성 인자를 코딩하는 핵산임, 및 (c) 개선제가 저분자량 화합물임.

[0108] iPS 세포 확립 효율 개선제는 핵 초기화 물질과 동시에 체세포와 접촉시키거나 또는, 체세포로부터의 iPS 세포 확립 효율이 개선제가 부재할 때에 비해 현저하게 개선될 때까지, 임의의 한가지를 먼저 접촉시킬 수 있다. 한 구현예에서, 예를 들어 핵 초기화 물질이 단백질성 인자를 코딩하는 핵산이며, 세포 확립 효율 개선제가 화학물 저해제인 경우, iPS 세포 확립 효율 개선제는 유전자 이동 처리 후 주어진 시간 동안 세포를 배양한 후 배지에 첨가할 수 있는데, 이는 유전자 이동 처리로부터 핵 초기화 물질이 단백질성 인자의 대량 발현까지 걸리는 주어진 시간의 길이와 연관되어 있는 한편, iPS 세포 확립 효율 개선제가 세포에 신속하게 작용하기 때문이다. 또다른 구현예에서, 핵 초기화 물질 및 iPS 세포 확립 효율 개선제는 바이러스 또는 비바이러스 벡터의 형태에 모두 사용되며, 예를 들어 두가지 모두 세포에 동시에 도입될 수 있다.

[0109] 마우스 또는 인간과 같은 포유류로부터 분리된 체세포는 세포 종류에 따라 그의 배양에 적합한 것으로 자체 공지된 배지를 이용하여 예비배양될 수 있다. 상기 배지의 예시에는, 이에 제한되지 않으나, 약 5 내지 20% 소 태아 혈청을 포함하는 최소 필수 배지 (MEM), Dulbecco's Modified Eagle 배지 (DMEM), RPMI1640 배지, 199 배지, F12 배지 및 이들의 배합물 등이 포함된다. 5% 이하의 낮은 혈청 농도에서의 예비배양의 수행으로, iPS 세포 확립의 효율이 개선된다는 보고가 있다 (예를 들어, WO 2009/006997). 예를 들어, 핵 초기화 물질(들)과 iPS 세포 확립 효율 개선제(들)을 접촉시킴에 있어서 트랜스펙션 시약, 예컨대 양이온성 리포솜을 사용하는 경우, 배지를 미리 혈청이 없는 배지로 교체하여 이동 효율 감소를 예방하는 것이 때때로 바람직하다. 핵 초기화 물질(들) (및 iPS 세포 확립 효율 개선제(들)) 을 세포에 접촉시킨 후, 세포는 예를 들어, ES 세포의 배양에 적합한 조건 하에 배양될 수 있다. 마우스 세포의 경우, 배양은 일반 배지에 분화 억제제로서 백혈병 저해 인자 (LIF) 를 첨가하여 수행한다. 한편, 인간 세포의 경우, 기본적인 섬유아세포 성장 인자 (bFGF) 및/또는 줄기세포 인자 (SCF) 를 LIF 대신에 첨가하는 것이 바람직하다. 일반적으로, 세포는 피더 세포로서 방사선 조사 또는 항생제를 처리하여 세포 분열을 종결시킨 마우스 배아 유래 섬유아세포 (MEF) 의 공존 하에 배양한다. 일반적으로, STO 세포 등이 MEF 로서 일반적으로 이용되나, iPS 세포 유도를 위해서는, SNL 세포 [McMahon, A.P. & Bradley, A. *Cell* 62, 1073-085 (1990)] 등이 일반적으로 이용된다. 피더 세포와의 공동배양은 핵 초기화 물질의 접촉 전, 접촉시 또는 접촉 후 (예를 들어, 1 내지 10 일 후) 시작할 수 있다.

- [0110] iPS 세포의 후보 콜로니는 약물 내성 및 리포터 활성을 표식자로서 이용하는 방법 및 형상의 육안 검사를 근거로 하는 방법으로 선별할 수 있다. 전자의 예시로서, 약물 내성 및/또는 리포터 활성에 대해 양성인 콜로니를 재조합 체세포를 이용하여 선별하고, 여기서 약물 내성 유전자 및/또는 리포터 유전자는 다능성 세포에서 특이적으로 많이 발현되는 유전자 (예를 들어, Fbx15, Nanog, Oct3/4 등, 바람직하게는 Nanog 또는 Oct3/4) 의 영역을 표적으로 한다. 상기 재조합 체세포의 예시에는, Fbx15 영역 [Takahashi & Yamanaka, *Cell*, 126, 663-676 (2006)] 에 대해 녹-인 (knocked-in) 된  $\beta$ geo ( $\beta$ -갈락토시다아제 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제의 융합 단백질을 코딩함) 유전자를 가진 MEF, Nanog 영역에 통합된 녹색 형광 단백질 (GFP) 유전자 및 푸로마이신 내성 유전자가 있는 트랜스제닉 마우스 유래의 MEF [Okita 등, *Nature*, 448, 313-317 (2007)] 등이 포함된다. 한편, 형상의 육안 검사를 근거로 하는 후자 방법의 예시에는 Takahashi 등이 *Cell*, 131, 861-872 (2007) 에 기재한 방법이 포함된다. 리포터 세포를 이용하는 방법이 편리하고 효율적이긴 하지만, 안전성의 관점에서, iPS 세포를 인간 치료의 목적으로 제조한 경우 시각적인 검사로 콜로니를 선별하는 것이 바람직하다. 세가지 인자 Oct3/4, Klf4 및 Sox2 를 핵 초기화 물질로 이용하는 경우, 확립된 클론의 갯수는 감소하나, 결과로서 수득되는 콜로니는 대부분 ES 세포에 필적하는 높은 품질의 iPS 세포이므로, 그러한 iPS 세포는 리포터 세포의 이용없이도 효율적으로 확립될 수 있다.
- [0111] iPS 세포로서 선별된 콜로니 세포의 동정은 Nanog (또는 Oct3/4, Fbx15) 리포터 (GFP 양성,  $\beta$ -갈락토시다아제 양성 등) 에 대한 양성 반응 및 선별 마커 (푸로마이신 내성, G418 내성 등) 에 대한 양성 반응 뿐만 아니라, 상기 기재한 바와 같은 시각적으로 확인가능한 ES 세포형 콜로니의 형성에 의해 확인될 수 있다. 그러나, 더 높은 정확성을 위해서, 각종 ES-세포 특이적 유전자의 발현을 분석하고 선별된 세포를 마우스에 이식하고 기형 종 형성을 확인하는 것과 같은 시험을 수행하는 것도 가능하다.
- [0112] 이와 같이 확립한 iPS 세포는 여러가지 목적을 위해 사용할 수 있다. 예를 들어, ES 세포에 대한 보고된 분화 유도 방법을 이용하여, iPS 세포의 각종 세포 (예를 들어, 심근 세포, 혈액 세포, 신경 세포, 혈관 내피 세포, 인슐린 분비 세포 등) 로의 분화를 유도할 수 있다. 따라서, 환자로부터 수집한 체세포를 이용하는 iPS 세포 유도는 자가 이식을 기본으로 하는 줄기세포 요법을 가능하게 하는데, 여기서 iPS 세포는 원하는 세포 (환자의 손상된 장기 세포, 질병에 대해 치료 효과를 가진 세포 등) 로 분화되며, 분화된 세포는 환자에게 이식된다. 환자로부터 수집하는 것이 아니지만 환자와 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 HLA 타입을 가진 다른 사람으로부터 유래한 체세포가 iPS 세포 유도에 이용될 수 있으며, 이는 환자로의 이식을 위한 용도를 위해 원하는 세포로 분화된다. 더욱이, iPS 세포로부터 분화된 기능성 세포 (예를 들어, 간 세포) 는 해당하는 기존의 세포주보다 생체내에서 기능성 세포의 실제 상태를 더 잘 반영하는 것으로 생각되어, 이들은 또한 약제학적 후보 화합물 등의 유효성 및 독성에 대한 시험관내 스크리닝에 적합하게 이용될 수 있다.
- [0113] 본 발명은 하기의 실시예를 수단으로 하여 더욱 상세히 설명될 것이나, 본 발명은 이로 인해 전혀 제한되지 않는다.
- [0114] 실시예
- [0115] 실시예 1: iPS 세포 확립에 대한 저산소 배양 방법의 영향 (1)
- [0116] Nanog 리포터를 가진 마우스를 실험 시스템으로 이용했다. 사용한 Nanog 리포터는 BACPAC Resources 로부터 구입한 BAC (박테리아 인공 염색체) 의 Nanog 영역에 강화 녹색 형광 단백질 (EGFP) 및 푸로마이신 내성 유전자를 삽입하여 제조했다 [Okita K. 등, *Nature* 448, 313-317(2007)]. 마우스 Nanog 유전자는 ES 세포와 같은 다능성 세포 및 초기 배아에서 특이적으로 발현한다. 상기 리포터에 대해 양성으로 되는 마우스 iPS 세포는 분화 잠재성에 있어서 ES 세포와 거의 대등한 것으로 공지되어 있다. 상기 Nanog 리포터를 가진 Nanog 리포터 마우스로부터 수득한 마우스 배아 섬유아세포 (MEF) 및 꼬리 섬유아세포 (TTF) [Okita K. 등, *Nature* 448, 313-317(2007)] 를 레트로바이러스를 이용하여 트랜스펙션하여 iPS 세포를 확립하고, Nanog 리포터 유래의 EGFP 를 발현하는 콜로니를 계수하여 iPS 세포 확립 효율을 평가했다.
- [0117] 핵 초기화에 이용한 레트로바이러스는 각각의 레트로바이러스 발현 벡터 [pMXs-Oct3/4, pMXs-Sox2, pMXs-Klf4, pMXs-cMyc: *Cell*, 126, 663-676 (2006)] 를, 전날 100 mm 배양 디쉬 (Falcon) 당  $2 \times 10^6$  개의 세포가 되도록 넣은 Plat-E 세포 (Morita, S. 등, *Gene Ther.* 7, 1063-1066) 에 도입하여 제조했다. 사용한 배양 배지는, 10% 소태아 혈청을 보충한 DMEM/10% FCS [DMEM (Nacalai Tesque) 였으며, 세포를 5% CO<sub>2</sub> 의 존재 하에 37℃ 에서 배양했다. 벡터 도입을 위해, 27  $\mu$ l 의 FuGene6 트랜스펙션 시약 (Roche) 을 300  $\mu$ l 의 Opti-MEM I 환원된 혈청 배지 (Invitrogen) 에 넣고, 상기 배지를 실온에서 5 분 동안 정치시켰다. 이후, 9  $\mu$ g 의 각각의 벡

터를 첨가하고, 배지를 실온에서 15 분 동안 정치시킨 후, Plat-E 배양액에 첨가했다. 제 2 일째에, Plat-E 배양물 상청액을 신선한 배지로 교체했다. 제 3 일째에, 배양 상청액을 회수하고, 0.45  $\mu\text{m}$  멸균 필터 (Whatman) 를 통해 여과하고, 폴리브렌 (Nacalai Tesque) 을 첨가하여, 4 mg/mL 의 농축물을 수득하고, 이를 바이러스액으로서 이용했다.

[0118] 마우스 배아 섬유아세포 (MEF) 는 Nanog 리포터 마우스의 수정 후 13.5 일째 태아로부터 분리하고, 배지 (DMEM/10% FCS) 를 이용하여 배양했다. 사용한 꼬리 섬유아세포 (TTF) 는 Nanog 리포터 마우스의 꼬리를 가늘게 찢고, 젤라틴으로 코팅한 6-웰 디쉬에 그 조직들을 넣고, 이들을 일차 배양 세포 출발 배지 (Toyobo Life Science Department) 중에서 5 일 동안 배양하고, 추가로 꼬리 조직으로부터 이동한 상기 섬유아세포를 DMEM/10% FCS 배지가 있는 디쉬에서 배양함으로써 수득했다.

[0119] Nanog 유전자를 발현하지 않으며, MEF 및 TTF 는 EGFP 를 발현하지 않고, 녹색 형광을 발광하지 않는다. 푸로마이신 내성 유전자를 발현하지 않을 뿐만 아니라, MEF 및 TTF 에는 항생제 푸로마이신이 잘 듣는다. 마찬가지로, MEF 및 TTF 는 0.1% 젤라틴 (Sigma) 으로 코팅된 6-웰 배양 플레이트 (Falcon) 에 웰 당  $1 \times 10^5$  개의 세포로 넣었다. 사용한 배양 배지는 DMEM/10% FCS 였으며, 세포는 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 에서 배양했다. 이튿날, 각각의 레트로바이러스액을 첨가하여 밤새 감염시켜 유전자를 도입했다.

[0120] 바이러스 감염 후 3 일째에 시작하여, 세포는 LIF-보충 ES 세포 배양 배지 [DMEM (Nacalai Tesque) 에 15% 소태아 혈청, 2 mM L-글루타민 (Invitrogen), 100  $\mu\text{M}$  불필수 아미노산 (Invitrogen), 100  $\mu\text{M}$  2-메르캅토에탄올 (Invitrogen), 50 U/mL 페니실린 (Invitrogen) 및 50  $\mu\text{g/mL}$  스트렙토마이신 (Invitrogen) 을 첨가하여 제조] 를 이용하여 배양했다. 감염 4 일째, MEF 및 TTF 에 대한 배지를 제거하고, 세포는 1 mL 의 PBS 를 첨가하여 세척했다. PBS 를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen) 를 첨가하고, 반응은 37°C 에서 약 5 분 동안 진행시켰다. 세포가 떠오른 후, 이들을 ES 세포 배양 배지 첨가로 현탁시켰다;  $1 \times 10^4$  개의 MEF 세포 (네가지 인자 Oct3/4, Sox2, Klf4 및 c-Myc 를 도입한 경우) 또는  $1 \times 10^5$  개의 MEF 세포 (세가지 인자 Oct3/4, Sox2 및 Klf4 를 도입한 경우) 를, 피더 세포를 미리 넣어둔 100-mm 디쉬에 넣었다. TTF 세포에 대해,  $2 \times 10^4$  개의 TTF 세포 (상기 언급한 네가지 인자를 도입한 경우),  $1 \times 10^5$  개의 TTF 세포 (상기 언급한 세가지 인자를 도입한 경우), 또는  $1.5 \times 10^5$  개의 TTF 세포 (세가지 인자 Oct3/4, Klf4 및 c-Myc 를 도입한 경우) 를 동일한 방식으로 넣었다. 사용한 피더 세포는, 미토마이신 C 로 처리해 세포 분열을 종결시킨 SNL 세포였다 [McMahon, A.P. & Bradley, A. *Cell* 62, 1073-085 (1990)]. 후속하여, 콜로니를 관찰할 수 있을 때까지, 이틀마다 ES 세포 배양 배지를 새로 공급한 것으로 교환했다.

[0121] 감염 5 일째 내지 14 일째 사이에, 세포를 일반 산소 농도 (20%) 또는 낮은 산소 농도 (5%, 1%) 로 설정한 인큐베이터 (Thermo Scientific) 에서 배양했다. 네가지 인자 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) 로 감염시킨 세포에 대해 제 14 일째에 푸로마이신 (1.5  $\mu\text{g/mL}$ ) 을 이용한 선별을 시작했고, 세가지 인자 (Oct3/4, Sox2, Klf4 또는 Oct3/4, Klf4, c-Myc) 로 감염시킨 세포에 대해서는 제 21 일째에 시작했다. 콜로니들은 네가지 인자에 대해서는 대략 제 10 일째에, 세가지 인자에 대해 대략 제 20 일째에 생겼으며, 점차적으로 GFP-양성이 되었다.

[0122] 감염 후 제 21 일 및 제 28 일째에, GFP-양성 콜로니들을 계수했다; 일반 산소 농도 (20%) 에서 배양한 세포와 낮은 산소 농도 (5%, 1%) 에서 배양한 것을 비교했다. MEF 에 대한 결과를 표 1 에 제시한다; TTF 에 대한 결과는 표 2 및 3 에 제시한다. 상기 결과들은 iPS 세포 확립 효율이 저산소 조건 하에서의 세포 배양시 증가한다는 것을 증명한다. 특히, 산소 농도가 5% 일 때, 좋은 결과가 수득되었다 (표 1 내지 3). 세가지 인자 도입의 경우, Oct3/4, Sox2 및 Klf4 의 경우에서 뿐만 아니라, Oct3/4, Klf4 및 c-Myc 의 경우에서도 iPS 세포가 확립될 수 있다는 점을 발견했다 (표 2).

표 1

c-Myc (mL)	Oct3/4 (mL)	Sox2 (mL)	Klf4 (mL)	mock (mL)	다시 넣은 세포수	산소 농도 (%)	가염 후 제 21 일째		가염 후 제 28 일째	
							puro <sup>r</sup>	GFP (+)	puro <sup>r</sup>	GFP (+)
0.5	0.5	0.5	0.5		1x10 <sup>4</sup>	20.0	209	12	다수	94
					1x10 <sup>4</sup>	5.0	1354	290	다수	423
					1x10 <sup>4</sup>	1.0	171	64	다수	199
	0.5	0.5	0.5	0.5	1x10 <sup>5</sup>	20.0	34	9	57	45
					1x10 <sup>5</sup>	5.0	200	144	300	298
					1x10 <sup>5</sup>	1.0	120	38	90	84
				2	1x10 <sup>4</sup>	20.0	0	0	0	0
					1x10 <sup>4</sup>	5.0	0	0	0	0
					1x10 <sup>4</sup>	1.0	0	0	0	0

[0123]

표 2

c-Myc (mL)	Oct3/4 (mL)	Sox2 (mL)	Klf4 (mL)	mock (mL)	다시 넣은 세포수	산소 농도 (%)	간염 후 제 21 일째		간염 후 제 28 일째	
							puro <sup>r</sup>	GFP (+)	puro <sup>r</sup>	GFP (+)
0.5	0.5	0.5	0.5		2x10 <sup>4</sup>	20.0	84	2	102	13
					2x10 <sup>4</sup>	5.0	140	19	210	38
					2x10 <sup>4</sup>	1.0	51	10	59	25
	0.5	0.5	0.5	0.5	1x10 <sup>5</sup>	20.0	0	0	0	0
					1x10 <sup>5</sup>	5.0	2	2	3	3
					1.5x10 <sup>5</sup>	20.0	다수	0	다수	0
0.5	0.5		0.5	0.5	1.5x10 <sup>5</sup>	5.0	다수	0	다수	4
					2x10 <sup>4</sup>	20.0	0	0	0	0
					2x10 <sup>4</sup>	5.0	0	0	0	0
				2	2x10 <sup>4</sup>	1.0	0	0	0	0
					2x10 <sup>4</sup>	1.0	0	0	0	0

[0124]

표 3

c-Myc (mL)	Oct3/4 (mL)	Sox2 (mL)	KLF4 (mL)	mock (mL)	다시 넣은 세포수	산소 농도 (%)	간염 후 제 21 일째		간염 후 제 28 일째	
							puro <sup>F</sup>	GFP (+)	puro <sup>F</sup>	GFP (+)
0.5	0.5	0.5	0.5		2x10 <sup>4</sup>	20.0	646	75	다수	209
					2x10 <sup>4</sup>	5.0	566	261	다수	404
					2x10 <sup>4</sup>	1.0	464	142	다수	251
	0.5	0.5	0.5		1x10 <sup>5</sup>	20.0	26	2	15	12
					1x10 <sup>5</sup>	5.0	64	29	52	51
					1.5x10 <sup>5</sup>	20.0	28	0	다수	0
0.5	0.5		0.5	0.5	1.5x10 <sup>5</sup>	5.0	84	0	다수	0
					2x10 <sup>4</sup>	20.0	0	0	0	0
				2	2x10 <sup>4</sup>	5.0	0	0	0	0
					2x10 <sup>4</sup>	1.0	0	0	0	0

[0125]

[0126]

종합하면, 5% 산소 하에서, 네가지 인자로 형질도입한 MEF로부터 유도된 GFP-양성 콜로니는 정상 산소 조건 하의 것보다 제 21 일째에는 7.4 배, 제 28 일째에는 3.1 배 더 증가했고, 유사하게, 세가지 인자로 형질도입한 MEF로부터의 것은 5% 산소 하에서 제 21 일째에서 20 배, 제 28 일째에는 7.6 배 더 증가했다 (도 14 a), b), c) 및 d)). 더욱이, 저산소 처리는 네가지 또는 세가지 인자로 형질도입한 MEF에서 전체 콜로니에서 GFP-양성 콜로니의 백분율을 증가시켰다 (도 14 e) 및 f)). 저산소 처리 후 유도되는 GFP-양성 콜로니는 형태 및 크기 면에서 정상 산소 조건 하에서 유도된 것과 필적했다 (도 16). 알칼리성 포스파타아제 염색은 5% 산소 하에서의 배양이 양성 알칼리성 포스파타아제 활성을 가진 콜로니의 개체수를 증가시킨다는 것을 보여줬다 (도 17).

[0127]

GFP-양성 세포가 더 일찍 검출되는지 여부를 연구하기 위해, 네가지 인자로 형질도입한 MEF를, 2 mM 발프로산 (VPA)의 존재 또는 부재 하에 20% 산소 또는 5% 산소 하에서 형질도입 후 제 5 일째부터 제 9 일째까지 배양하고, 제 9 일째에 유세포분석에 적용시켰다. 네가지 인자의 레트로바이러스 발현은 형질도입 후 제 9 일째에 0.01%의 세포가 GFP-양성이 되도록 했다. 네가지 인자로 형질도입한 MEF를 저산소로 또는 VPA로 4 일 동안

처리한 것은 GFP-양성 세포의 백분율을 각각 0.40% 및 0.48% 증가시켰다. 더욱이, 저산소와 VPA 의 병용처리 는 GFP-양성 세포의 백분율을 2.28% 까지 증가시켰다. 이러한 데이터는 GFP-양성 세포가 더 일찍 검출될 수 있고, 저산소성 배양이 VPA 와 상승적인 효과를 갖는다는 점을 시사한다 (도 15 a), b), c), d) 및 e)).

[0128] 후속하여, 저산소 배양의 효과를 성인 인간 피부 섬유아세포 (HDF) 를 이용하여 검사했다. 네가지 인자 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) 또는 세가지 인자 (OCT3/4, SOX2, KLF4) 로서, 전부 인간 유래인 것들은, *Cell*, 131, 861-872 (2007) 에 기재된 바와 같이 레트로바이러스를 수단으로 하여 도입되었다. 바이러스 감염 후 제 6 일째에, 세포를 회수하고 피더 세포 위에 다시 넣었다. 사용한 피더 세포는 세포 분열을 종결시키기 위해 미토마이신 C 를 처리한 SNL 세포였다 [McMahon, A.P. & Bradley, A. *Cell* 62, 1073-085 (1990)]. 이튿날, 세포를 4 ng/ml 재조합 인간 bFGF (WAKO) 를 영양류 ES 세포 배양물에 첨가하여 제조한 배지 (ReproCELL) 를 이용한 세포 배양물에 넣었다.

[0129] 감염 제 7 일째와 콜로니 계수일 사이에 (감염 제 24 일째 및 제 32 일째 사이), 세포를 정상 산소 농도 (20%) 또는 낮은 산소 농도 (5%, 1%) 로 설정한 인큐베이터에서 배양했다. 결과는 표 4 에 나타났다. 네가지 인자 를 도입하는 경우, 5% 의 산소 농도에서의 iPS 세포 확립 효율은 정상 산소 농도에 비교했을 때 상승했다. 한편, 산소 농도가 1% 인 경우 또는 세가지 인자를 도입한 경우, 상기 실험에서 시험한, 장기간 저산소 조건에서 의 세포 유지와 결부된 배양 조건 하에서는 iPS 세포가 수득되지 않았다. 이는, 더욱 심한 저산소 조건, 예컨대 1% 의 산소 농도의 이용시 또는, 네가지 인자를 사용하는 것보다 본질적으로 더 낮은 iPS 세포 확립 효율을 제공하는 세가지 인자의 도입시, 저산소 조건 하에서는 더 짧은 세포 배양 기간이 필요할 수 있다는 점을 시사 한다.

표 4

c-Myc (mL)	Oct3/4 (mL)	Sox2 (mL)	Klf4 (mL)	mock (mL)	다시 넣은 세포수	산소 농도 (%)	감염 후 제 24 일째		감염 후 제 32 일째	
							모든 콜로니	ES-양성 세포 콜로니	모든 콜로니	ES-양성 세포 콜로니
1	1	1	1		$1 \times 10^5$	20.0	32	4	68	9
					$1 \times 10^5$	5.0	31	10	56	16
					$1 \times 10^5$	1.0	0	0	3	0
	1	1	1	1	$4 \times 10^5$	20.0	0	0	1	0
					$4 \times 10^5$	5.0	0	0	3	0
					$1 \times 10^5$	20.0	0	0	0	0
				4	$1 \times 10^5$	5.0	0	0	0	0
					$1 \times 10^5$	1.0	0	0	0	0

[0130]

[0131] 실시예 2: iPS 세포 확립에 대한 저산소 배양 방법의 효과 (2)

[0132] 두가지 유전자 Oct3/4 및 단독적인 Klf4 의 도입으로 저산소 배양 방법이 유효한지 여부를 알기 위해 실험을 수행했다. 실험에서는 실시예 1 에서와 동일한 Nanog 리포터 마우스로부터 유래한 MEF 를 사용했다. 실시예 1 과 동일한 방법으로, 레트로바이러스 발현 벡터 (pMXs-Oct3/4, pMXs-Klf4) 를 MEF 에 감염시켰다. 감염 후 제 4 일째,  $1 \times 10^5$  개의 MEF 세포를, 피더 세포를 미리 넣은 100 mm 디쉬에 넣었다. 이후, 이틀마다, ES 세포 배양 배지를 신선한 공급물로 바꿨다.

[0133] 감염 후 제 5 일 내지 제 14 일 사이에, 세포를 일반 산소 농도 (20%) 또는 낮은 산소 농도 (5%) 로 설정한 인큐베이터 (Thermo Scientific) 에서 배양했다. GFP-양성 콜로니를 계수하는 제 28 일이 될 때까지, 약물 선별 없이 배양을 계속했다. 결과를 도 1 에 제시한다. 4 회의 독립적인 실험을 수행했다. 산소 농도가 20% 인 경우, 4 회의 실험 중 콜로니는 단 한번 나타난 반면, 산소 농도가 5% 인 경우, 콜로니가 4 회의 실험 전부에서 나타났다. 도 1 에 제시한 바와 같이, 산소 농도 5% 로 세포를 배양한 곳에서 GFP-양성 콜로니는 20% 산소 농도에 비해 현저하게 증가했으며 (\*p<0.05); 저산소 배양이 iPS 세포 확립 효율 증대에 유효함을 발견했다.

[0134] 저산소 배양 방법이 두가지 유전자 Oct3/4 및 c-Myc 의 이동시 유효한지 여부를 알기 위해 추가 실험을 수행했다. 실험은 Nanog-MEF 을 이용하고 Oct3/4 및 Klf4 를 이용하여 상기 기재된 방법으로 수행했다. 감염 제 5 일 내지 14 일 사이에, 세포는 정상 산소 농도 (20%) 및 낮은 산소 농도 (5%) 로 설정된 인큐베이터 (Thermo

Scientific) 에서 배양했다. GFP-양성 콜로니를 시험하는 제 42 일이 될 때까지 약물 선별없이 배양을 계속했다. 그 결과, 배양을 정상 산소 농도 (20%) 에서 수행하는 경우, GFP-양성 콜로니가 발생하지 않았지만, 배양을 낮은 산소 농도 (5%) 에서 수행한 경우, 콜로니가 발생했다 (도 2). 이러한 발견사실은, iPS 세포 확립 효율이 두가지 유전자 Oct3/4 및 c-Myc 만을 도입하고도 저산소 조건 하에서는 출발 세포 배양으로 개선될 수 있다는 것을 보여준다.

[0135] 실시예 3: 마우스 iPS 세포에서의 미분화 상태에 대한 마커의 발현

[0136] 실시예 1 및 2 에서 확립한 MEF-유도성 iPS 세포에서의 미분화 상태에 대한 마커의 발현을 Rever Tra Ace 키트 (Takara) 를 이용하는 RT-PCR 로 시험했다. 사용했던 프라이머의 서열은 서열 식별 번호: 1 내지 18 로 나타낸다. RT-PCR 의 결과는 도 3 에 제시한다. 낮은 산소 농도 (5%, 1%) 에서의 세포 배양으로 네가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc), 세가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2), 또는 두가지 유전자 (Oct3/4, Klf4) 로 형질도입하여 확립한 iPS 세포는 전부 ES 세포에 특이적으로 발현하는 유전자, 즉, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Rex1 및 ECAT1 을 발현했으며, 발현량은 마우스 ES 세포 (RF8) 및 과거에 네가지 유전자로 확립한 iPS 세포 [20D17: *Nature*, 448, 313-317 (2007)] 의 것과 동등했다. 도입한 Oct3/4 유전자 (Oct3/4(Tg))의 발현이 관찰되지 않았기 때문에, 침묵현상 (silencing) 이 발생한 것이 증명되었다. 이러한 결과를 바탕으로, 저산소 조건 하에 확립한 세포들은 iPS 세포로 동정되었다.

[0137] 실시예 4: 기형종 형성에 대한 확립된 iPS 세포의 잠재성

[0138] Oct3/4 및 Klf4 를 사용하여 낮은 산소 농도 (5%) 에서 확립된 마우스 iPS 세포 (527CH5-2) 로 하여금, *Cell*, 126, 663-676 (2006) 에 기재된 바와 같이 기형종을 형성하도록 했다. 구체적으로,  $1 \times 10^6$  개의 iPS 세포를 면역결핍 마우스에게 피하주사하고; 4 주 후, 발생한 기형종들을 분리해냈다 (도 4 의 상단 패널). 각각의 기형종을 가늘게 찢고, 4% 포름알데히드를 포함하는 PBS(-) 에서 고정시켰다. 파라핀-내입 조직을 얇게 잘라내어 헤마톡실린-에오신으로 염색했다. 결과는 도 4 의 하단 패널에 제시한다. 조직학적으로, 종양은 관찰된 연골 조직, 내배엽 상피 조직, 근육 조직, 및 각질화된 상피 조직과 함께 다수의 여러가지 세포들로 이루어졌다. 이에 따라, iPS 세포의 다능성이 증명되었다.

[0139] 실시예 5: 키메라성 마우스의 제작

[0140] 실시예 1 및 2 에서 낮은 산소 농도 (5%) 에서의 두가지, 세가지 또는 네가지 유전자의 도입으로 확립한 iPS 세포를 ICR 마우스 유래의 배반포로 마이크로인젝션했다. 그 결과, 성체 키메라가 제작되었다. 결과는 도 5 에 제시한다.

[0141] 실시예 6: iPS 세포주의 핵형

[0142] 실시예 1 및 2 에서 저산소 처리 후 유도된 iPS 세포주 (521AH5-1 및 527CH5-1) 의 핵형을 분석했고, 상기 세포주들은 정상 핵형을 나타냈다 (도 8).

[0143] 실시예 7: 인간 iPS 세포 확립에 대한 저산소 배양 기간의 효과

[0144] 인간 iPS 세포 확립의 효율에 있어서 저산소 조건 (5%) 하에서의 세포 배양의 개시 시간 및 기간의 영향을 검사했다. 사용한 체세포는 성체 인간 피부 섬유아세포 (성체 HDF) 였다. 저산소 배양에 대한 시간 계획표는 도 6 에 제시한다. 먼저, HDF 로 하여금, *Cell*, 131, 861-872 (2007) 에 기재된 바와 같이 렌티바이러스를 이용하여 마우스 에코트로픽 바이러스 수용체 Slc7a1 유전자를 발현하도록 했다. 네가지 인자 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) 또는 세가지 인자 (Oct3/4, Sox2, Klf4) 는, 전부 인간으로부터 유래된 것으로, *Cell*, 131, 861-872 (2007) 에 기재된 바와 같이, 레트로바이러스를 수단으로 하여 상기 세포 ( $8 \times 10^5$  세포) 에 도입했다. 바이러스 감염후 제 6 일째에, 세포를 회수하고, 피더 세포 (네가지 유전자 도입의 경우,  $1 \times 10^5$  개의 세포 / 100 mm 디쉬; 세가지 유전자 도입의 경우,  $5 \times 10^5$  개의 세포 / 100 mm 디쉬) 위에 다시 넣었다. 사용한 피더 세포는, 미토마이신 C 를 처리하여 세포 분열을 종결시킨 SNL 세포였다 [McMahon, A.P. & Bradley, A. *Cell* 62, 1073-1085 (1990)]. 이튿날, 4 ng/ml 재조합 인간 bFGF (WAKO) 을 영양류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL) 에 첨가하여 제조한 배지를 이용하여 세포 배양을 시작했다.

[0145] 여섯가지 조건 하에 세포 배양을 계속했다: (1) 감염 후 40 일이 될 때까지 정상 산소 농도 (20%), 또는 감염 제 7 일째부터 낮은 산소 농도로 (5%) 1 주간 (2), 1.5 주간 (3), 2 주간 (4), 또는 3 주간 (5), 이어서 감염 후 40 일이 될 때까지 정상 산소 농도 (20%), 및 (6) 감염 후 제 7 일 내지 제 40 일 사이에 낮은 산소 농도

(5%). 감염시킨 날과 피더 세포 위에 다시 첨가한 날 사이에 세포를 낮은 산소 농도 (5%) 에서 미리 배양하고, 이들을 상기 언급한 임의의 조건 (1) 내지 (6) 하에 더 배양한 결과를 또한 검사했다. 감염 후 제 24 일, 제 32 일 및 제 40 일째에 발생한 iPS 세포 콜로니를 계수했다. 이들 세가지의 계수 결과를 도 7 에 함께 제시한다.

[0146] 네가지 유전자를 도입하여, 상기 기재한 낮은 산소 농도 조건 (2) 내지 (6) 중 임의의 조건 하에 세포를 배양할 경우, iPS 세포 확립 효율은 정상 산소 조건 (20%) 에 비해 더 높았다. 더욱이, 낮은 산소 농도에서의 예비배양으로도, iPS 세포 확립 효율 증가에서 효과가 관찰되었다. 네가지 유전자 도입을 이용한 감염 후 제 40 일째에 수득된 콜로니의 영상을 도 8 에 제시한다.

[0147] 세가지 유전자를 이동시키면서, 낮은 산소 농도에서 예비 배양을 수행한 경우, 정상 산소 농도와 비교해서 더 많은 갯수의 iPS 세포가 확립되었다 (도 7).

[0148] 네가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) 의 도입으로, 상기 기재한 조건 (1), (2), (4), (5) 및 (6) 하에서 3 가지 독립적인 실험을 수행했다. 그 결과는 도 9 에 제시한다. 모든 경우에 있어서, 낮은 산소 농도 (5%) 에서 배양을 수행한 경우, 정상 산소 농도 (20%) 에 비해, iPS 세포 확립 효율은 높아졌다. 특히, 감염 후 제 7 일로부터 2 주 이상 낮은 산소 농도에서 한 세포 배양으로 현저한 효과가 수득되었다.

[0149] 실시예 8: 인간 iPS 세포에서의 미분화 상태에 대한 마커의 발현

[0150] 실시예 7 에서 확립된 성체 HDF-유도성 iPS 세포에서 미분화 상태에 대한 마커의 발현은 Rever Tra Ace 키트 (Takara) 를 이용한 RT-PCR 분석으로 검사했다. 사용한 프라이머의 서열은 서열 식별 번호: 19 내지 36 에 제시하며; RT-PCR 의 결과는 도 10 에 제시한다. 낮은 산소 농도 (5%) 에서의 세포 배양에 의해 네가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) 또는 세가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2) 의 도입으로 확립한 iPS 세포는 전부 ES 세포에서 특이적으로 발현하는 유전자, 즉 Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Rex1, GDF3 및 ESG1 을 발현했으며, 발현량은 과거에 네가지 유전자로 확립한 iPS 세포 [20D17: *Nature*, 448, 313-317 (2007)] 의 것과 동등했다. 이러한 결과를 근거로, 낮은 산소 농도에서 확립한 세포는 iPS 세포로 동정되었다.

[0151] 더욱이, 상기 iPS 세포들은 알칼리성 포스파타아제에 대해 강하게 양성이었으며, 면역조직화적 염색은 iPS 세포 전부가 Nanog, SSEA3 및 SSEA4 를 발현한다는 것을 보여줬다 (도 11).

[0152] 실시예 9: 시험관내 분화 유도

[0153] 네가지 유전자 Oct3/4, Klf4, Sox2 및 c-Myc 의 도입 및 감염 후 제 7 일 내지 제 40 일 사이에 5% 산소 농도에서 출발 세포를 배양하여 확립한 인간 iPS 세포 (70AH5-2, 70AH5-6) 를 로우-바인딩 디쉬 (low-binding dish) 에 넣고, *Cell*, 131, 861-872 (2007) 에 기재된 바와 같이 8 일 동안 배양하여 배아체 (EB) (100 mm 디쉬) 를 형성했다. 8 일 동안 배양시킨 후, 배아체를 내배엽 세포 분화 마커  $\alpha$ -페토프로틴에 대한 항체 (R&D systems), 중배엽 세포 분화 마커 평활근 액틴에 대한 항체 (DAKO), Desmin 에 대한 항체 (NeoMarkers) 및 Vimentin 에 대한 항체 (Santa Cruz), 및 외배엽분화 마커 bIII-튜블린에 대한 항체 (Chemicon) 및 GFAP 에 대한 항체 (DAKO) 을 이용하여 염색했다. 결과는 도 12 에 제시한다. 상기 염색은 상기 마커들의 발현을 확인하고, 확립된 인간 iPS 세포가 삼배엽 분화에 대한 잠재성을 보유한다는 것을 증명했다.

[0154] 실시예 10: 확립된 iPS 세포의 기형종 형성에 대한 잠재성

[0155] 네가지 유전자를 도입하고 5% 산소 농도에서 출발 세포를 배양하여 확립된 인간 iPS 세포 (70AH5-2) 를 기형종 형성 잠재성에 대해 시험했다. 인간 iPS 세포 (70AH5-2) 는 제조함 인간 bFGF (4 ng/ml) 및 Rho 키나아제 저해제 Y-27632 (10  $\mu$ M) 로 보충한 영양류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL) 에서 배양했다. 1 시간 후, 세포를 콜라겐 IV 로 처리하고 수집한 후, 원심분리로 회수하고 Y-27632 (10  $\mu$ M) 을 보충한 DMEM/F12 에 현탁시켰다. 컨플루언트로 된 세포 (100 mm 디쉬) 의 사분의 일을 SCID 마우스의 고환에 주사했다. 9 주 후, 수득한 종양을 잘게 찢어 4% 포르말데히드를 포함하는 PBS(-) 중에 고정시켰다. 파라핀-내입 조직을 얇게 썰고 헤마톡실린-에오신으로 염색했다. 결과는 도 13 에 제시한다. 조직학적으로, 종양은 신경 상피 조직, 망막 상피 조직, 뼈 조직, 평활근 조직 및 내배엽 상피 조직이 관찰되는 여러가지 종류의 세포로 이루어졌다. 이에 따라, iPS 세포의 다능성이 증명되었다.

[0156] 실시예 11: 증식, 생존 및 유전자 발현에 대한 저산소 배양의 효과

[0157] 아넥신 V 를 이용하는 유세포분석은 저산소 배양이 마우스 ES 세포 또는 네가지 인자 형질도입성 MEF 에 대해 보호 효과가 없다는 것을 증명했다 (도 19). 더욱이, 저산소 배양은 마우스 ES 세포의 증식에 대해 효과가 없

다 (도 20 a)). 형질도입 후 제 1 일 내지 제 4 일까지의 저산소 인큐베이션은 mock 형질도입성 MEF 의 증식에 현저한 효과가 없었지만, 네가지 인자 형질도입성 MEF 에 대해서는 현저한 효과가 있었다 (도 20 b)). 핵 초기화 프로세스에서의 세포의 발현 프로파일을 연구하기 위해, 마이크로어레이 분석 및 정량적 실시간 RT-PCR 을 수행했다. 제 1 일 내지 제 4 일까지 저산소 및 정상 조건 하에 배양한, 네가지 인자로 형질도입한 MEF 의 마이크로어레이 분석은, 저산소 처리된 세포에서, 73.2% 의 ES 세포 특이적 유전자 (총 1045 개의 유전자 중 765 개 유전자) 가 상향조절되었으며, 85.8% 의 MEF-특이적 유전자 (총 1142 개의 유전자 중 980 개 유전자) 가 하향조절되었음을 보여줬다 (도 21 a) 및 b)). 더욱이, 정량적 실시간 RT-PCR 분석은 내재성 Oct3/4 및 Nanog 의 발현이 각각, 3 일간의 저산소 처리 후에는 네가지 인자로 형질도입한 MEF 에서 3.4-배 및 2.1 배 증가한다는 것을 증명했다 (도 22 a) 및 b)).

[0158] 저산소가 STO 세포를 자극하여 iPS 세포 생성을 강화할 가능성을 배제하기 위해, iPS 세포의 성장 상황을 STO 세포의 피더층없이 저산소 배양 하에 검사했다. 도 23 은 5% 산소 하에서의 배양이 GFP-양성 콜로니의 갯수를 증가시킨다는 것을 보여줘, 핵 초기화의 저산소성 증강이 STO 세포에 의해 중재되지 않음을 시사했다.

[0159] 실시예 12: 저산소 배양 하에서의 발현 올라스미드 벡터의 일시적 트랜스펙션에 의한 iPS 세포의 확립

[0160] 플라스미드 트랜스펙션을 이용한 iPS 세포의 생성은 선행기술 (Okita, K, 등 Science 322, 949-953, (2008)) 에 기재된 바와 같이 수행했다. 간략하게, Nanog-GFP-IRES-Puror 리포터를 포함하는 MEF 를 6-웰 플레이트에서 웰 당  $1.0 \times 10^5$  세포로 시딩했다 (제 0 일). 제 1 일, 제 3 일, 제 5 일 및 제 7 일째에, 세포를 pCX-OKS-2A 및 pCX-c-Myc 로 트랜스펙션하고, 제 9 일째에 세포를 트립신을 이용하여 수합하고, STO 피더 세포가 있는 100-mm 디쉬에 다시 시딩했다. 제 25 일째에, GFP-양성 콜로니의 갯수를 계수했다. 저산소 처리를 위해, 세포를 5% 산소 하에 제 10 일 부터 제 24 일까지 배양했다.

[0161] 표 5 는 저산소 배양이 GFP-양성 콜로니의 갯수를 2.0-배 증가시킨다는 것을 보여준다.

표 5

실험번호	세포수	O2 농도	GFP (+) 콜로니	전체 콜로니
실험 1	1×10 <sup>6</sup>	20%	3	18
		5%	7	32
실험 2	1×10 <sup>6</sup>	20%	1	2
		5%	2	2
실험 3	1×10 <sup>6</sup>	20%	23	61
		5%	35	62

[0162]

[0163] 실시예 13: 저산소 배양 하에서의 piggybac 트랜스펙션 시스템에 의한 iPS 세포의 확립

[0164] piggyback (PB) 트랜스펙션을 이용한 직접적인 핵 초기화는 선행기술 (Woltjen 등, Nature; 458: 766-70, (2009)) 에 기재된 것에 약간의 변화를 더해 수행했다. 간략하게, Nanog-GFP-IRES-Puror 리포터를 포함하는 MEF 는 6-웰 플레이트에 웰 당 1.0x10<sup>5</sup> 개의 세포를 시딩했다. 24 시간의 배양 후, Eugene HD (Roche, Switzerland) 를, PB-TET-MKOS, PB-CA-rtTA Adv, 및 PB 트랜스포사아제 발현 벡터를 이용한 세포 트랜스펙션에 이용했다. 24 시간 후, 배지를 독시사이클린-포함 배지 (1.5 μg/ml) (제 0 일) 로 교체했다. 세포를 저산소 및 정상 조건 하에 배양하고, GFP-양성 콜로니의 갯수를 제 12 일째에 계수했다. PB-TET-MKOS 및 PB-CA-rtTA adv 를 Addgene (Addgene 플라스미드 20910 및 20959) 로부터 제공받았다. PB 트랜스포사아제 구축물을 pBSII-IFP2-orf (Malcolm J. Fraser, Jr, University of Notre Dame 의 Dr. Malcolm J. Fraser, Jr 로부터 기증받음) 로부터 PCR 로 증폭시키고, CAG-프로모터로 구동되는 발현 벡터 (pCX-EGFP) 에 삽입했다.

[0165] 도 24 는 5 일간 및 10 일간의 저산소 처리가 GFP-양성 콜로니를 각각 2.9-배 및 4.0-배 증가시킨다는 것을 보여준다. 이러한 데이터는 저산소가 piggybac 위치이동 시스템과 같은 비바이러스성 벡터에 의해 iPS 생성의 효율을 증가시킬 수 있다는 점을 시사한다.

[0166] 본 발명은 바람직한 구현예에 주안점을 두어 기재되었지만, 당업자에게는 그러한 바람직한 구현예가 개질될 수 있다는 점이 자명하다. 본 발명은, 본 발명이 본 명세서에 상세하게 기재된 것 이외의 방법으로도 구현될 수

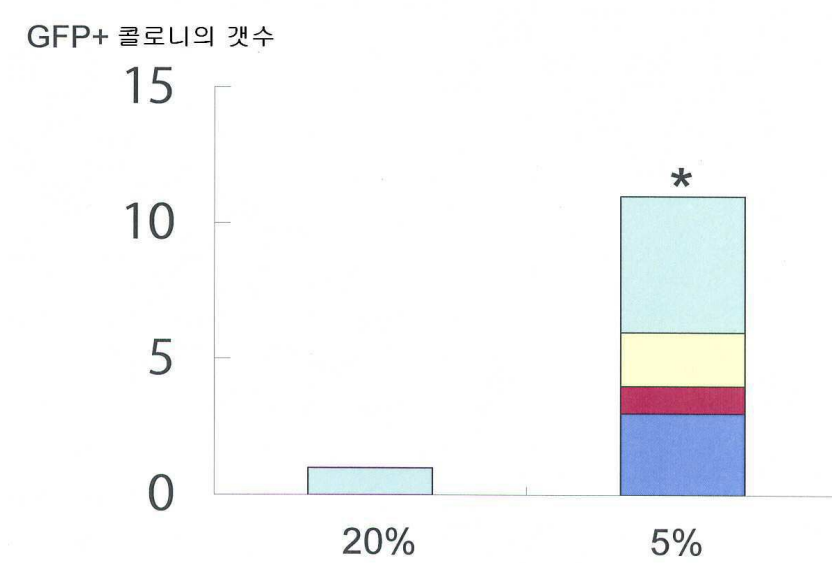
있다는 점을 내포한다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구의 범위의 요지 및 범주에서 포함하는 모든 개질을 포함한다.

[0167] 추가로, 특허 및 특허 출원을 포함하는, 본원에 인용된 임의의 공개문헌에 개시된 내용들은, 그것이 본원에 개시된 정도까지 본원에 전부 참고 문헌으로 포함된다.

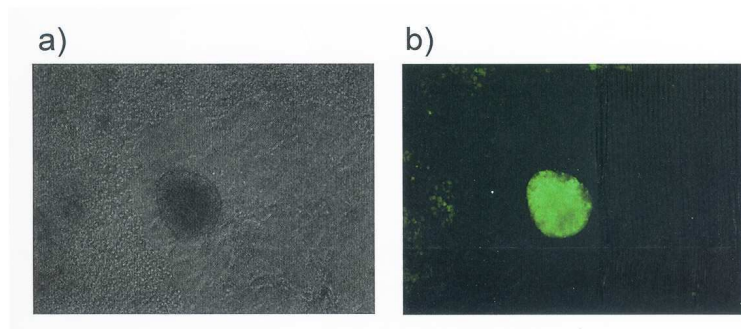
[0168] 본 출원은, 그 내용이 본원에 참고문헌으로 포함되는 U.S. 임시 특허 출원 61/084,842, 61/141,177 및 61/203,931 을 기반으로 한다.

## 도면

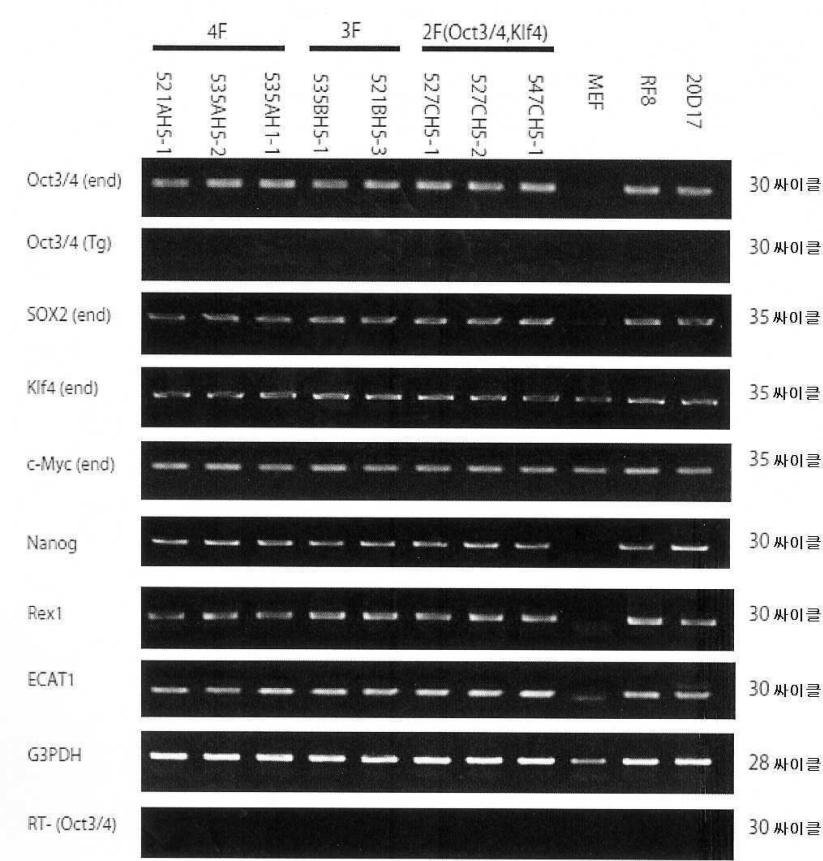
### 도면1



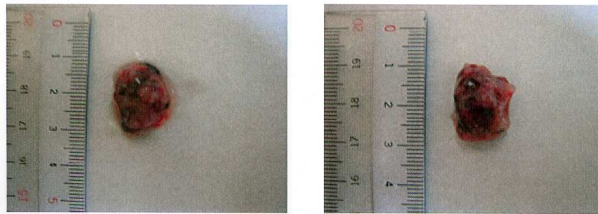
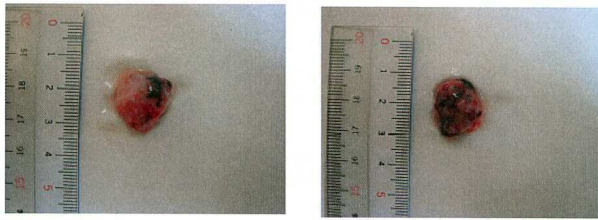
### 도면2



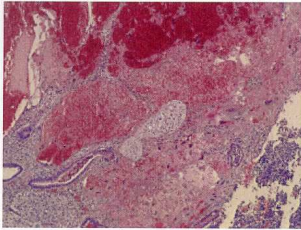
도면3



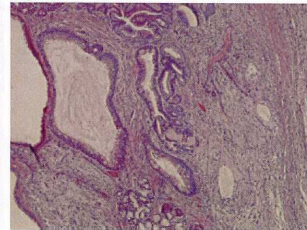
도면4



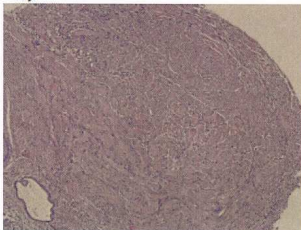
a)



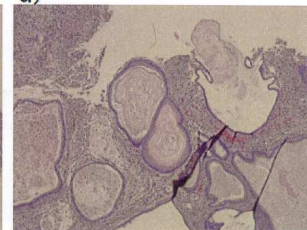
b)



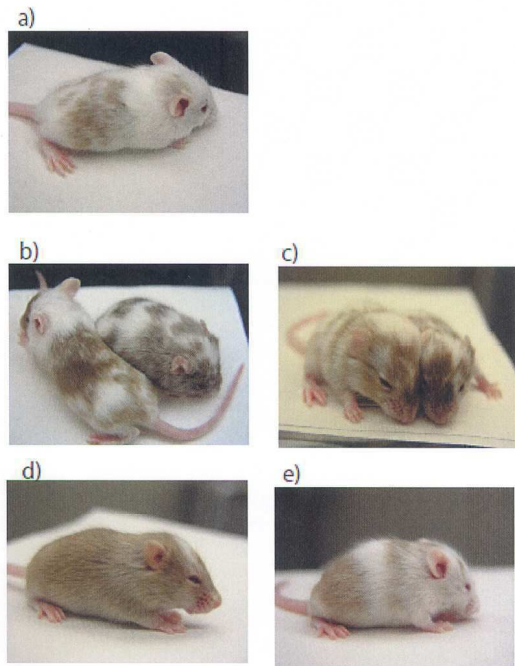
c)



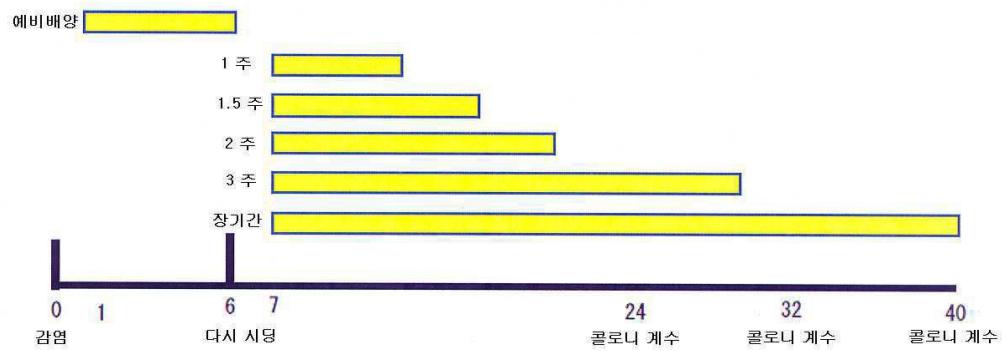
d)



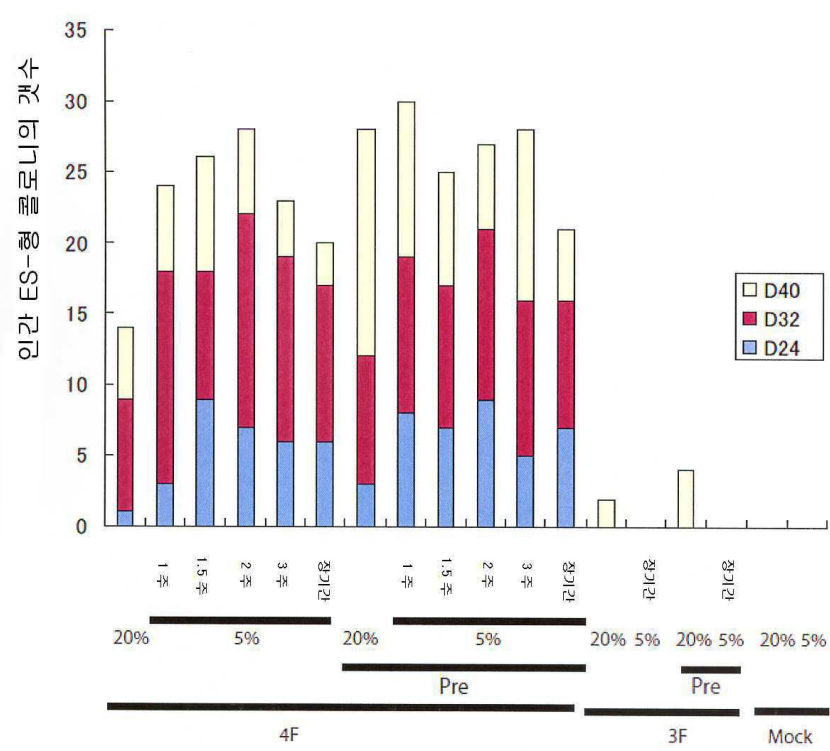
도면5



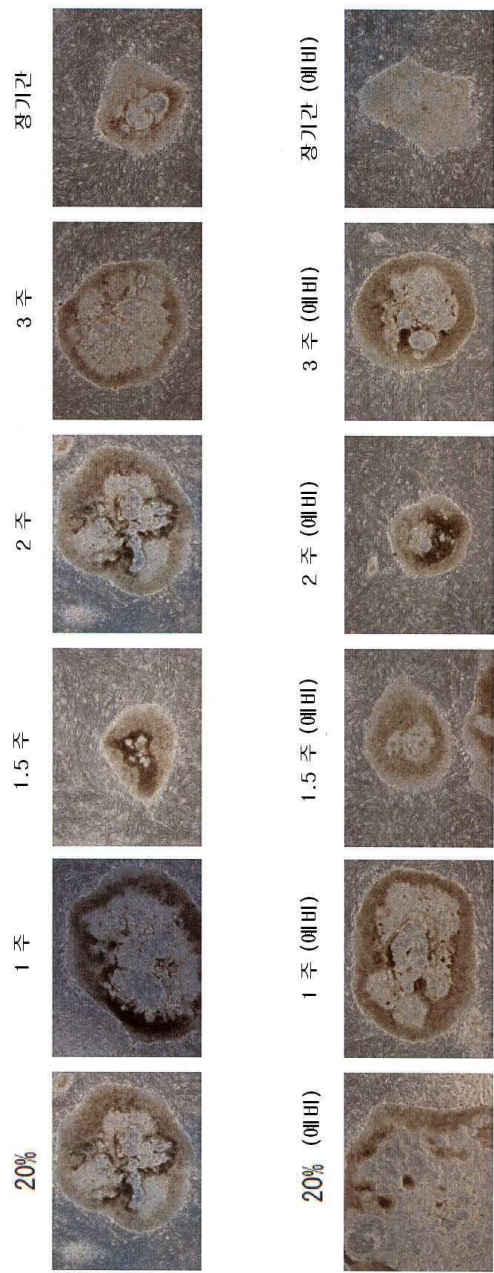
도면6



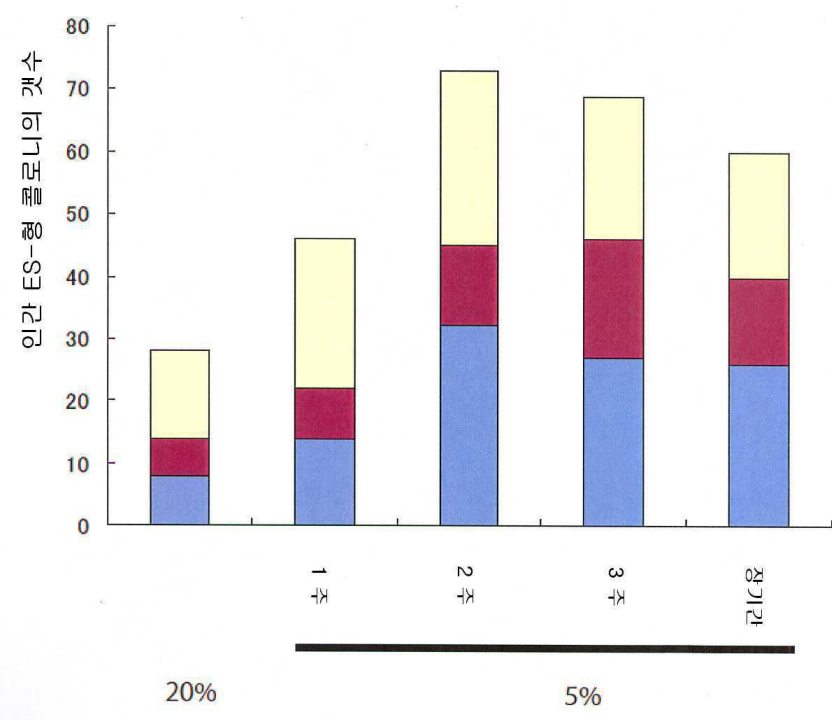
도면7



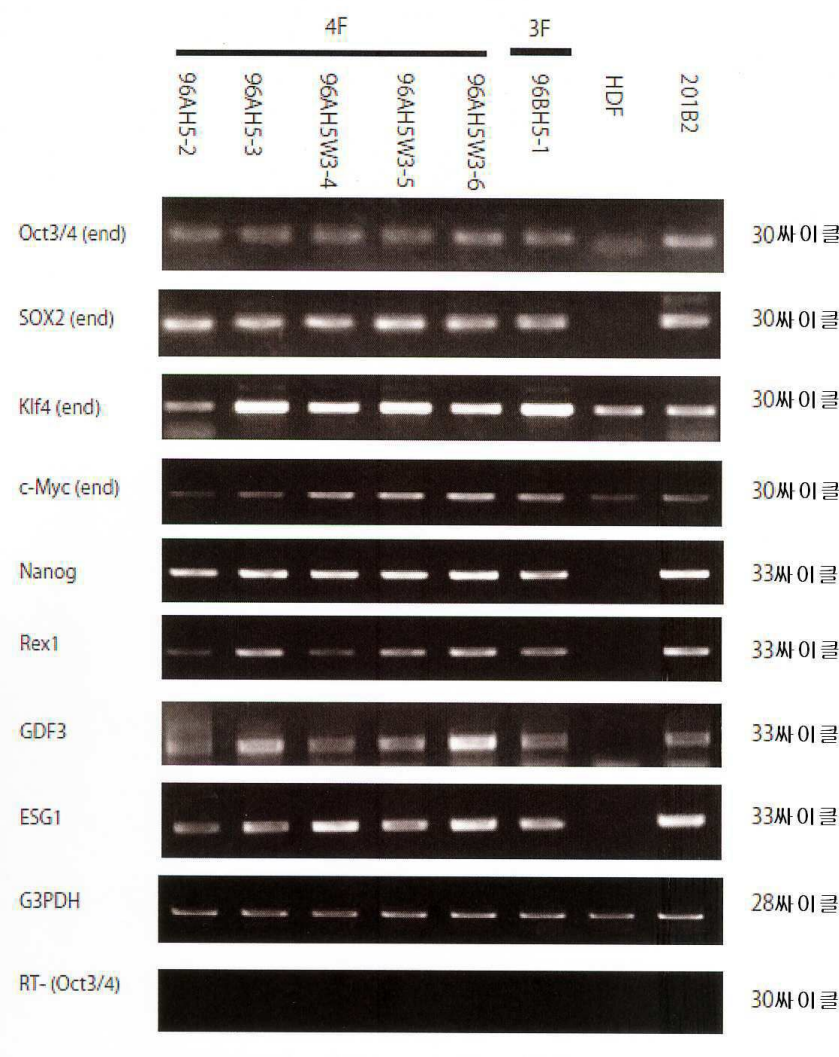
도면8



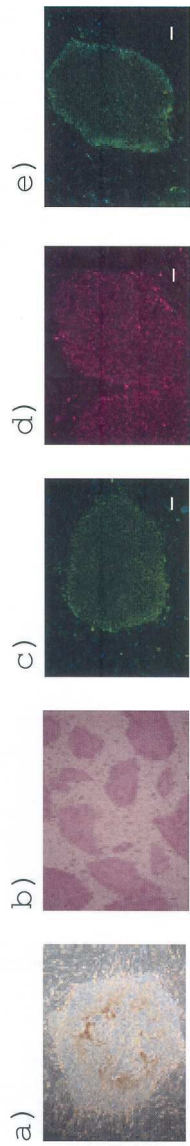
도면9



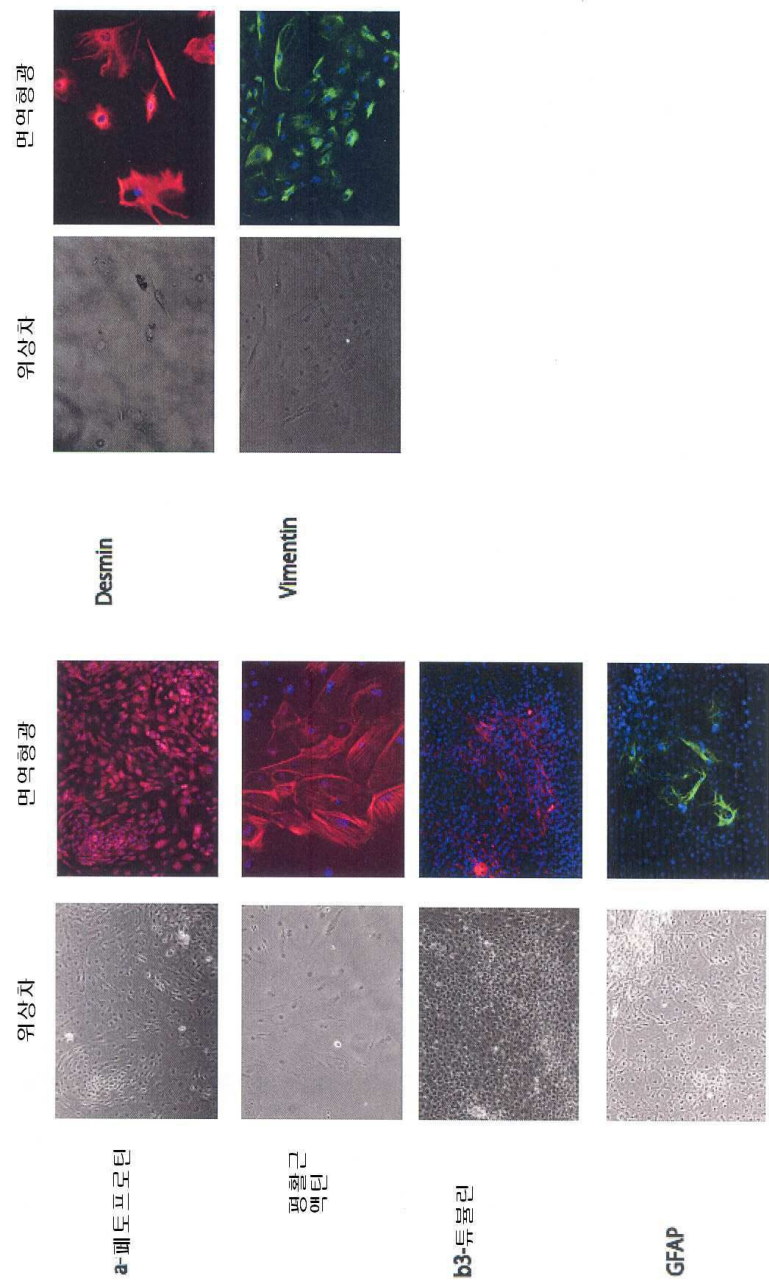
도면10



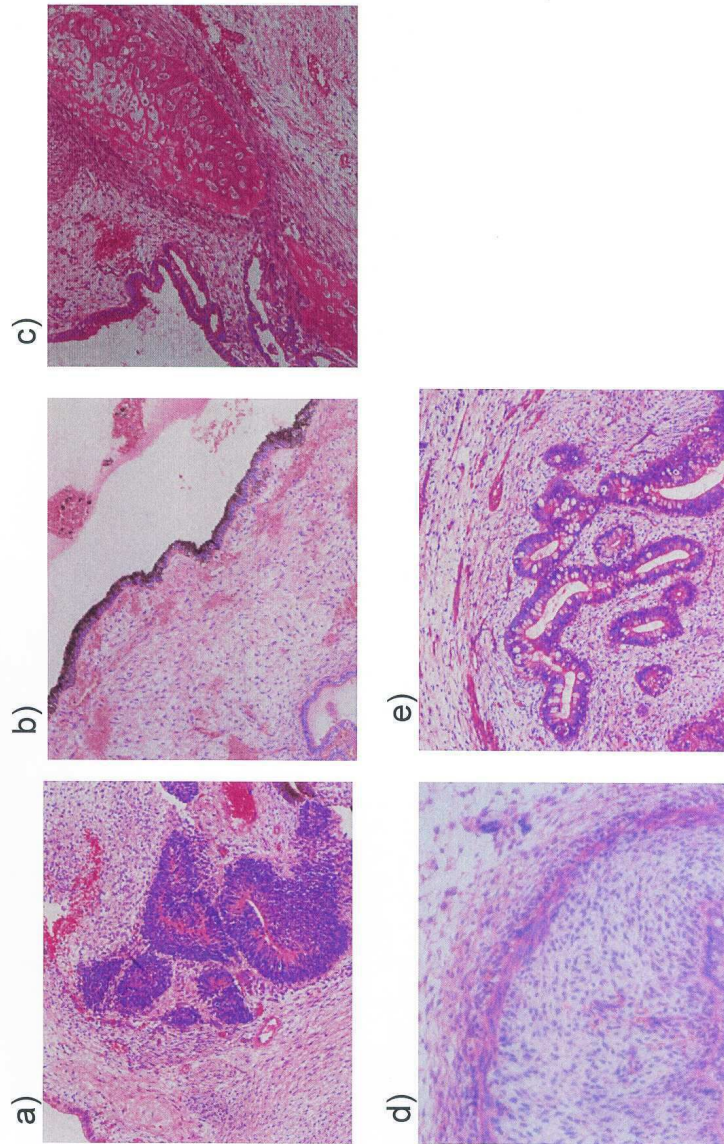
도면11



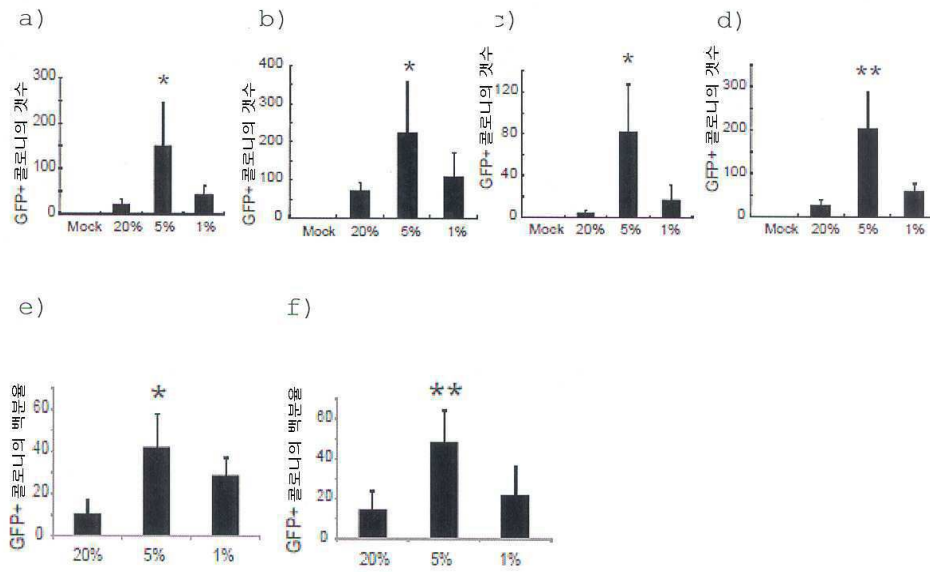
도면12



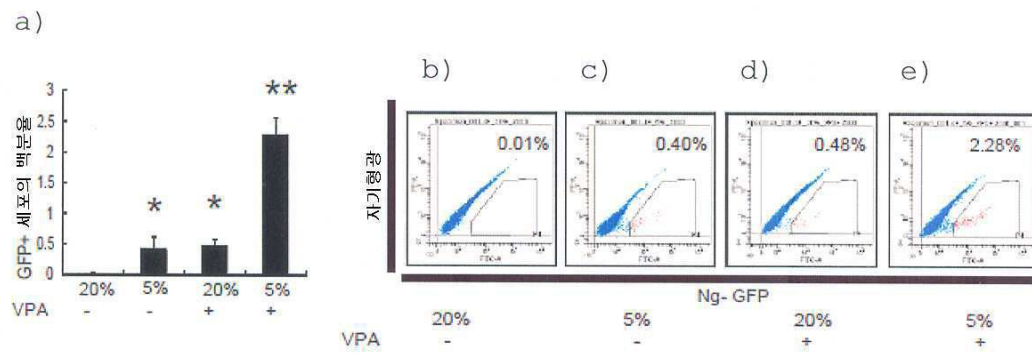
도면13



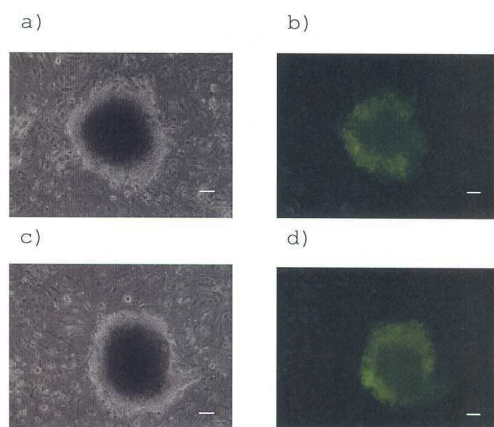
도면14



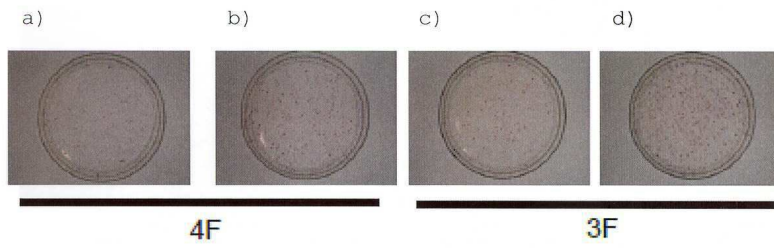
도면15



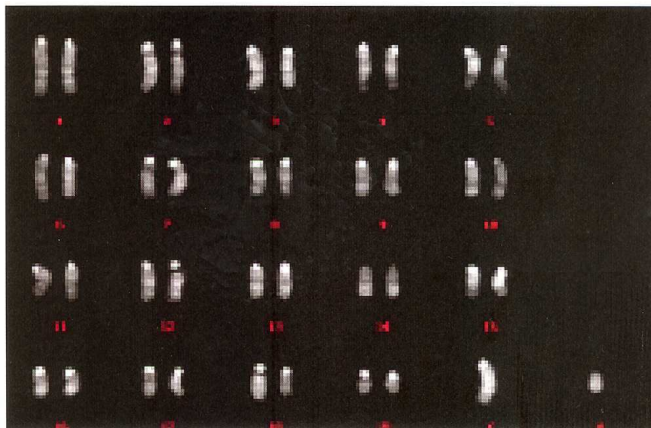
도면16



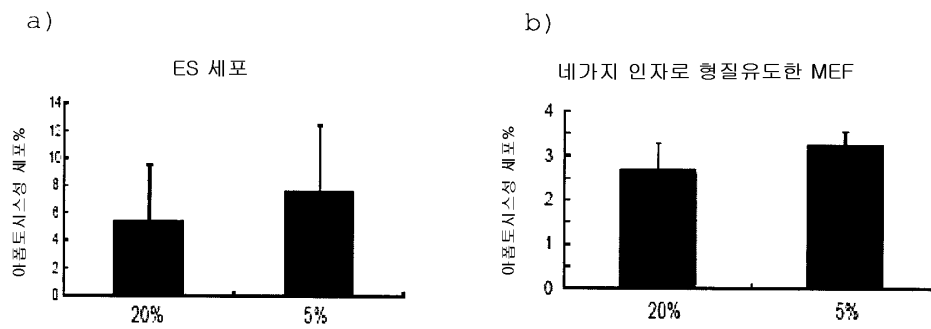
도면17



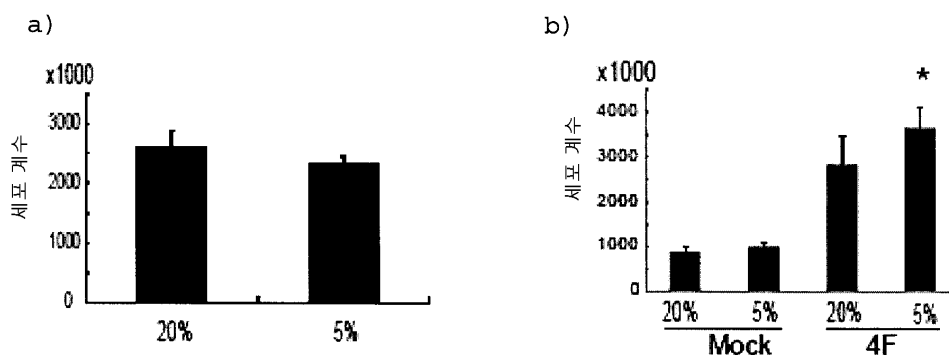
도면18



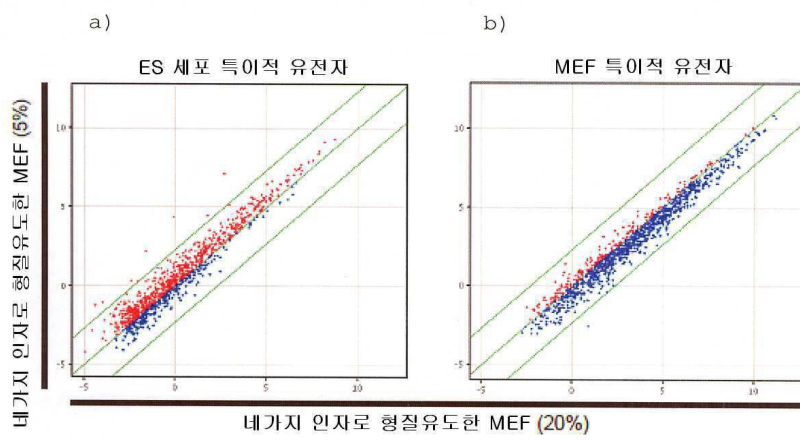
도면19



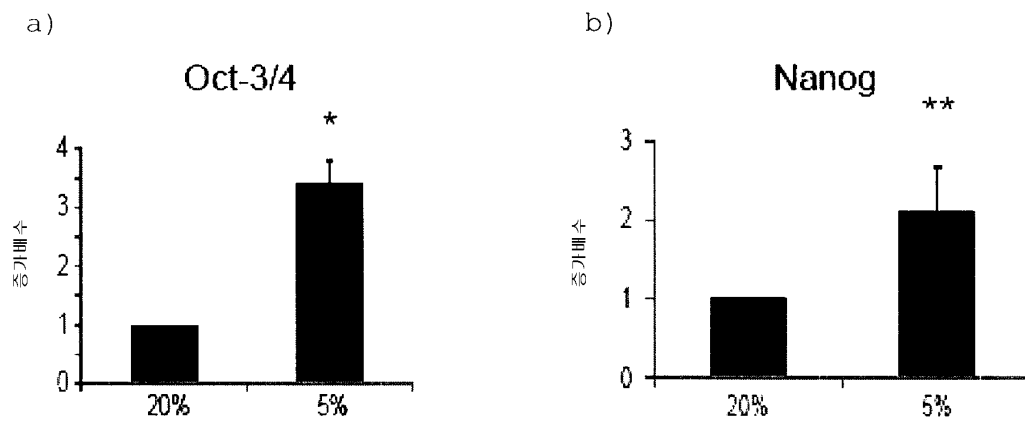
도면20



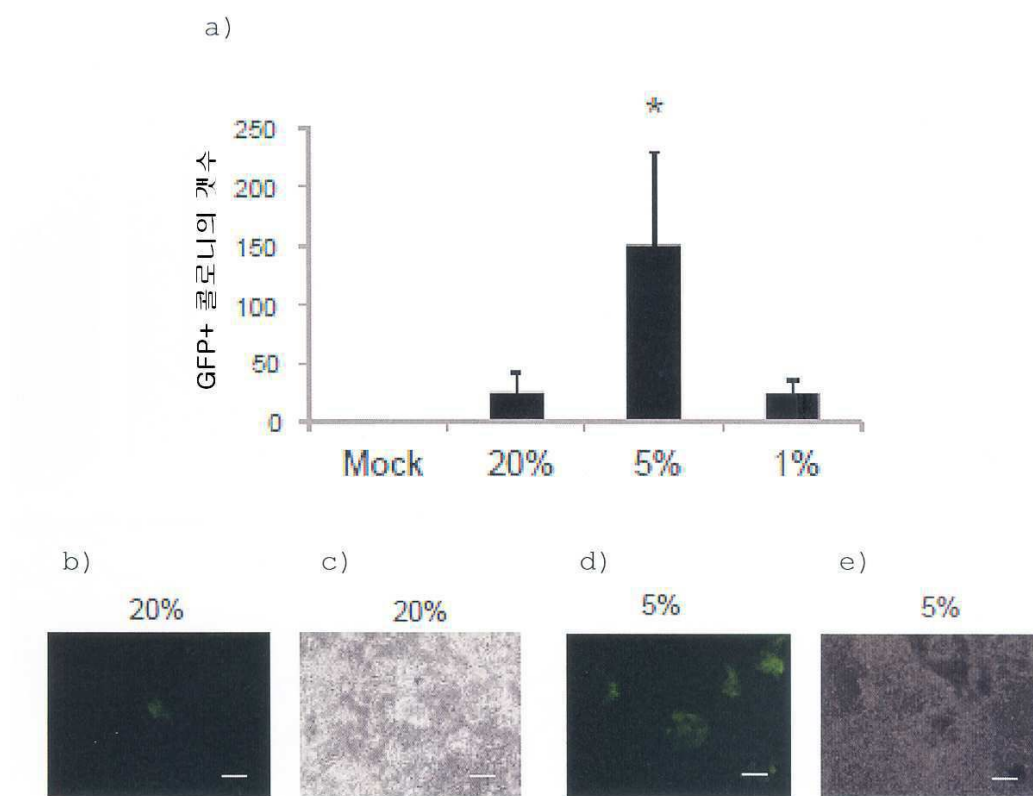
도면21



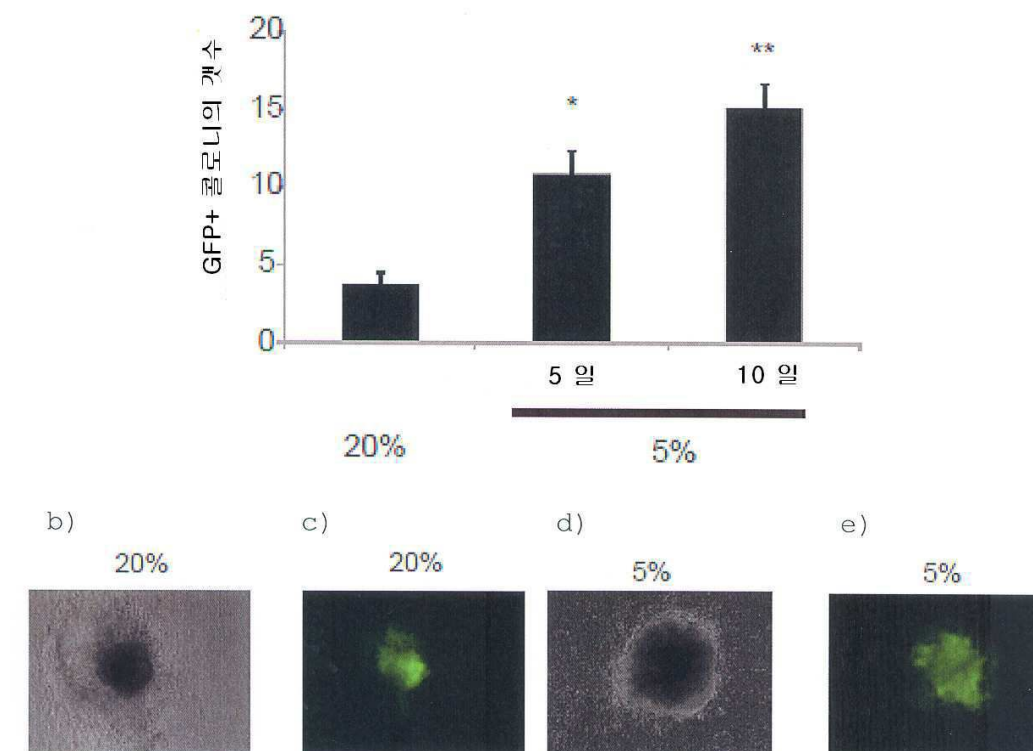
도면22



도면23



도면24



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Kyoto University

<120> METHOD OF EFFICIENTLY ESTABLISHING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

<130> 091416

<150> US 61/084,842

<151> 2008-07-30

<150> US 61/141,177

<151> 2008-12-29

<150> US 61/203,931

<151> 2008-12-30

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer (mouse c-Myc (end))

<400> 1

cagaggagga acgagctgaa gcgc 24

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer (mouse c-Myc (end))

<400> 2

ttatgcacca gagtttcgaa gctgttcg 28

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer (mouse Oct3/4 (end))

<400> 3

tccttccacc aggcctccgg ctc 23

<210> 4

<211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (mouse Oct3/4 (end))  
 <400> 4  
 tgcgggcgga catggggaga tcc 23

<210> 5  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (mouse Sox2 (end))  
 <400> 5  
 tagagctaga ctccgggcga tga 23

<210> 6  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (mouse Sox2 (end))  
 <400> 6  
 ttgccttaaa caagaccacg aaa 23

<210> 7  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (mouse Klf4 (end))  
 <400> 7  
 ccaacttgaa catgcccgga ctt 23

<210> 8  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (mouse Klf4 (end))  
 <400> 8

tctgcttaaa ggcatacttg gga	23
<210> 9	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer (mouse Oct3/4 (Tg))	
<400> 9	
ttgggctaga gaaggatgtg gttc	24
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer (mouse Oct3/4 (Tg))	
<400> 10	
gacatggcct gcccggttat tatt	24
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer (mouse Nanog)	
<400> 11	
agggtctgct actgagatgc t	21
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer (mouse Nanog)	
<400> 12	
caacacctgg tttttctgcc accg	24
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer (mouse Rex1)	

<400> 13  
acgagtgcca gtttcttctt ggga 24

<210> 14  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Primer (mouse Rex1)  
<400> 14  
tatgactcac ttccaggggg cact 24  
<210> 15  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Primer (mouse ECAT1)  
<400> 15  
tgtggggccc tgaaaggcga gctgagat 28  
<210> 16  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Primer (mouse ECAT1)  
<400> 16  
atgggccgcc atacgacgac gctcaact 28  
<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Primer (mouse G3PDH)  
<400> 17  
accacagtcc atgccatcac 20  
<210> 18  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer (mouse G3PDH)

<400> 18

tccaccaccc tgttgctgta 20

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer (human c-Myc (end))

<400> 19

gcgtcctggg aaggagatc cggagc 26

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer (human c-Myc (end))

<400> 20

ttgaggggca tcgtcgcgagg aggctg 26

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer (human Oct3/4 (end))

<400> 21

gacaggggga ggggaggagc tagg 24

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer (human Oct3/4 (end))

<400> 22

cttcctcca accagttgcc ccaaac 26

<210> 23

<211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (human Sox2 (end))  
 <400> 23  
 gggaaatggg aggggtgcaa aagagg 26  
 <210> 24  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (human Sox2 (end))  
 <400> 24  
 ttgcgtgagt gtggatggga ttggtg 26  
 <210> 25  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (human Klf4 (end))  
 <400> 25  
 acgatcgtgg ccccgga aaa ggacc 25  
 <210> 26  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (human Klf4 (end))  
 <400> 26  
 tgattgtagt gctttctggc tgggtcc 28  
 <210> 27  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (human Nanog)  
 <400> 27

cagcccccgat tcttccacca gtccc	25
<210> 28	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer (human Nanog)	
<400> 28	
cggaagattc ccagtcgggt tcacc	25
<210> 29	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer (human GDF3)	
<400> 29	
cttatgctac gtaaaggagc tggg	24
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer (human GDF3)	
<400> 30	
ccaacccagg tcccgaagt t	21
<210> 31	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer (human ESG1)	
<400> 31	
atatcccgcc gtgggtgaaa gttc	24
<210> 32	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Primer (human ESG1)  
 <400> 32  
 actcagccat ggactggagc atcc 24  
 <210> 33  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (human Rex1)  
 <400> 33  
 cagatcctaa acagctcgca gaat 24  
 <210> 34  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (human Rex1)  
 <400> 34  
 gcgtacgcaa attaaagtcc aga 23  
 <210> 35  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (human G3PDH)  
 <400> 35  
 accacagtcc atgcatcac 20  
 <210> 36  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer (human G3PDH)  
 <400> 36  
 tccaccaccc tgttgctgta 20