



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0018709
(43) 공개일자 2019년02월25일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12N 5/074</i> (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12N 5/0696</i> (2013.01)
<i>C12N 2500/25</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7001447</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2017년06월16일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2019년01월16일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2017/038041</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2017/219000
국제공개일자 2017년12월21일</p> <p>(30) 우선권주장
15/184,241 2016년06월16일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
세다르스-신나이 메디칼 센터
미합중국 씨에이 90048-1865 로스앤젤레스 8700베
버리 블레매드</p> <p>(72) 발명자
사린, 드러브
미국 91326 캘리포니아주 포터 란치 크리스탈 리
지 레인 19375
오넬라스, 로렌 에이.
미국 90032 캘리포니아주 로스앤젤레스 라운드 르
라이브 2883
스벤젠, 클리브
미국 90272 캘리포니아주 퍼시픽 팰러세이즈 프렌
즈 스트리트 15242</p> <p>(74) 대리인
양영준, 김영</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **혈액을 유도 만능 줄기세포로 리프로그래밍하기 위한 신규하고 효율적인 방법**

(57) 요약

본 발명에서 기술된 것은 유도 만능 줄기세포 (iPSC)의 생성과 관련된 방법 및 조성물이다. 비-통합 에피솜 플라스미드 벡터(non-integrating episomal plasmid vectors)를 이용한 고 효율, 재현 가능한 리프로그래밍을 수립하기 위해 향상된 기술. 기술된 리프로그래밍 프로토콜을 사용하여, 지속적으로 비-T 세포를 비-T 세포 또는 비-B 세포 공급원으로부터 100%에 가까운 성공률로 리프로그래밍할 수 있다. 추가 이점은 정의된 리프로그래밍 배지 E7의 용도 및 정의된 임상적으로 상용 가능한 기질 재조합 인간 L-521의 사용을 포함한다. 이들 혈액 세포 공급원으로부터 iPSC의 생성은 전체 유전체 레퍼토리의 재현, 유전체 충실도 및 향상된 유전체 안전성을 허용한다.

대표도

도 3



(52) CPC특허분류

C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/60 (2013.01)
C12N 2501/602 (2013.01)
C12N 2501/603 (2013.01)
C12N 2501/604 (2013.01)
C12N 2501/606 (2013.01)
C12N 2501/608 (2013.01)
C12N 2502/02 (2013.01)
C12N 2506/11 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 혈액 세포(blood cell) 유래 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells)를 생성하는 방법:

일정량의 혈액 세포를 제공하고;

일정량의 리프로그래밍(reprogramming) 인자를 혈액 세포에 전달하며; 및

혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 4일 이상 동안 배양하고, 상기에서 리프로그래밍 인자의 전달, 및 리프로그래밍 배지에서의 배양은 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포를 생성하는, 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기에서 일정량의 리프로그래밍 인자의 전달은 뉴클레오펙션(nucleofection)을 포함하는, 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기에서 리프로그래밍 인자는 Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Lin-28, SV40 대형 T 항원("SV40LT"), 및 p53 표적화 p53 표적화 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNAs targeting p53) ("shRNA-p53")로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자를 포함하는, 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기에서 리프로그래밍 인자는 하나 이상의 oriP/EBNA1 유래 벡터에서 암호화되는, 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기에서 하나 이상의 oriP/EBNA1 유래 벡터는 pEP4 E02S ET2K, pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL, 및 pCXWB-EBNA1을 포함하는, 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 리프로그래밍 인자를 혈액 세포에 전달한 후 혈액 세포를 처리된 세포 표면에 플레이팅하고, 혈액 세포를 상기 처리된 세포 배양물 표면 상에서 리프로그래밍 배지로 배양하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기에서 처리된 세포 배양물 표면은 마우스 배아 피더 (mouse embryonic feeders, MEF)의 플레이팅을 포함하는, 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기에서 처리된 세포 배양물 표면은 세포외 기질 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기에서 세포외 기질 단백질은 라미닌(laminin)을 포함하는, 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기에서 라미닌은 L-521을 포함하는, 방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기에서 리프로그래밍 배지는 배아 줄기 세포 (embryonic stem cell, ESC) 배지를 포함하는,

방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기에서 ESC 배지는 염기성 섬유아 세포 성장 인자 (basic fibroblast Growth Factor, bFGF)를 포함하는, 방법.

청구항 13

제 1항에 있어서, 상기에서 리프로그래밍 배지는 E7 배지를 포함하는, 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기에서 리프로그래밍 배지는 L-아스코르브 산(L-Ascorbic Acid), 트랜스페린 (Transferrin), 소듐 비카보네이트(Sodium Bicarbonate), 인슐린(Insulin), 소듐 세레나이트(Sodium Selenite) 및/또는 BFGF를 포함하는 E7 배지를 포함하는, 방법.

청구항 15

제 1항에 있어서, 상기에서 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 배양하는 것은 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 일 동안 수행되는 것인, 방법.

청구항 16

제 1항에 있어서, 상기에서 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 배양하는 것은 적어도 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 31 일 동안 수행되는 것인, 방법.

청구항 17

제 1항의 방법으로 생성된 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포를 포함하는 세포주.

청구항 18

제 1항에 있어서, 상기에서 혈액 세포는 돌연변이 질병(disease mutation)을 가진 대상으로부터 분리되는, 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기에서 돌연변이 질병은 신경 퇴행성 질병, 장애 및/또는 질환과 관련된, 방법.

청구항 20

제 18항에 있어서, 상기에서 돌연변이 질병은 염증성 장 질병(inflammatory bowel disease), 장애, 및/또는 질환과 관련된, 방법.

청구항 21

제 1항에 있어서, 상기에서 혈액 세포는 비 T-세포, 비 B-세포 단핵(mononuclear) 세포인, 방법.

청구항 22

제 1항에 있어서, 상기에서 혈액 세포는 인간 대상으로부터 얻은 샘플인 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기에서 샘플은 전혈인, 방법.

청구항 24

제 22항에서, 상기에서 샘플은 말초 혈액(peripheral blood)인, 방법.

청구항 25

제 22항에 있어서, 상기에서 샘플은 비 T-세포, 비 B-세포 단핵 세포의 분리된 성분인, 방법.

청구항 26

혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포주.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **발명의 분야**

[0002] 본 발명은 혈액 및 말초 혈액으로부터의 유도 만능 줄기세포 (iPSC)의 유래를 포함하는 재생의료(regenerative medicine)와 관련된, 이식 재료의 재생 가능한 공급원을 제공하는 그러한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] **배경**

[0004] 만능 줄기세포 ("pSCs")는 재생의료에 사용하기 위한 치료상의 물질을 생성할 광범위한 기회를 제공할 뿐만 아니라, 질병 개시 및 진행 연구를 위한 귀중한 *체외* 모델도 제공한다. pSC, 유도 만능 줄기세포 ("iPSC")의 한 카테고리는 자기-재생(self-renewal) (즉, 불멸(immortal)) 및 모든 세 배엽(germ layer)으로부터 유래된 세포로의 분화능 (즉, 다능성(pluripotency))의 특징적인 줄기세포 특성을 가진다. 이들 세포들은 성체 세포와 같은 비-배아 공급원 유래 세포의 탈분화(dedifferentiation)를 수반하는 "리프로그래밍"을 통해 얻어질 수 있다. 리프로그래밍 과정은 배아 줄기 세포 ("ESCs")와 같은 다른 유형의 pSCs의 배아 공급원 재료에 비해 윤리적 우려를 배제하는 동시에, 잠재적인 환자-특이적인 면역 부적합을 부여하는 추가적인 이점을 제공한다.

[0005] 견고한 리프로그래밍 기술을 확립하는 것에 더하여, 줄기-세포 재생의료를 위한 치료 목표의 완전한 실현은 재생 가능한 재생 재료의 공급원으로서 제공할 수 있는 숙주 세포 유형의 고려를 추가로 필요로한다. 이상적으로, 세포는 성공적인 리프로그래밍 및 후속 증식에서의 안정성을 위해 필요한 가소성을 가질뿐만 아니라, 분리, 저장, 안정성 및 유지의 용이함과 같은 임상적 측면에서의 이점도 제공할 것이다. 이와 관련하여, 혈액 세포는 이들의 광범위한 의료 진단 용도 및 세포 리프로그래밍을 위한 접근성이 높은 자원임을 고려할 때, 이러한 용도를 위한 매력적인 선택이다. 반면 섬유아세포는 지난 십년 동안 수행된 많은 리프로그래밍 실험에 세포 공급원으로서 광범위하게 사용되어 왔지만, 이 공급원 재료는 지시된 리프로그래밍에 대해 최선의 선택이 아닐 수 있다. 섬유아세포를 수득하기 위한 피부 생검은 실험 전에 수득된 세포의 증식을 필요로하는 침습적, 비-멸균적 과정이다. 가장 중요한 것은, 피부 세포는 UV 조사와 같은 환경적인 공격 때문에 혈액과 같은 체 내 세포들보다 더 많은 돌연변이를 가진다.

[0006] 환자-특이적, 면역적합성 생체 재료 생성의 궁극적인 치료 목표를 고려할 때, 당업계에서 궁극적으로 임상 적용에 적합한 치료 재료의 공급원을 동정하는 것과 함께, 세포를 리프로그래밍하기 위한 견고하고 재현가능한 방법을 수립할 큰 필요성이 있다. 그러한 향상된 방법은 리프로그래밍, 일관적인 복제(reproduction), 유전적으로 안정성을 가지는 세포 생산 및 다양한 세포 유형으로 쉽게 확장될 수 있는 고효율을 가질 필요가 있다.

[0007] 본 발명에 기술된 것은 혈액 샘플 내의 비-T 세포, 비-B 세포 성분으로부터 iPSC의 생성을 포함하는, 비-통합된 에피솜 플라스미드 벡터를 이용한 고효율적인, 재현 가능한 리프로그래밍을 수립하기 위한 향상된 기술이다. 이러한 기술된 시도들은 유전체 및 핵형 안정성에서 우수한 특성을 가진 세포 리프로그래밍을 위한 쉽게 접근 가능한 자원으로서 혈액의 사용을 허용한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] **발명의 요약**

[0009] 본 발명에 기술된 것은 일정량의 혈액 세포를 제공하고, 일정량의 리프로그래밍 인자를 혈액 세포에 전달하며, 및 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 4일 이상 동안 배양하는 것을 포함하고, 상기에서, 리프로그래밍 인자의 전달, 및 리프로그래밍 배지에서의 배양은 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포를 생성하는, 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포를 생성하는 방법이다. 다른 구현예에서, 일정량의 리프로그래밍 인자의 전달은 뉴클레오택션

을 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Lin-28, SV40 대형 T 항원 ("SV40LT"), 및 p53 표적화 짧은 헤어핀 RNA ("shRNA-p53")으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자를 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 하나 이상의 oriP/EBNA1 유래 벡터에서 암호화된다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 oriP/EBNA1 유래 벡터는 pEP4 E02S ET2K, pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL, 및 pCXWB-EBNA1을 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자를 혈액 세포에 전달한 후 혈액 세포를 처리된 세포 표면에 플레이팅하고, 혈액 세포를 상기 처리된 세포 배양물 표면 상에서 리프로그래밍 배지로 배양하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 처리된 세포 배양물 표면은 마우스 배아 피더 (MEF)의 플레이팅을 포함한다. 다른 구현예에서, 처리된 세포 배양물 표면은 세포외 기질 단백질을 포함한다. 다른 구현예에서, 세포외 기질 단백질은 라미닌을 포함한다. 다른 구현예에서, 라미닌은 L-521을 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 배아 줄기 세포 (ESC) 배지를 포함한다. 다른 구현예에서, ESC 배지는 염기성 섬유아 세포 성장 인자 (bFGF)를 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 E7 배지를 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 L-아스코르브 산, 트랜스페린, 소듐 비카보네이트, 인슐린, 소듐 세레나이트 및/또는 bFGF를 포함하는 E7 배지를 포함한다. 다른 구현예에서, 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 배양하는 것은 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 일 동안 수행된다. 다른 구현예에서, 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 배양하는 것은 적어도 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 31 일 동안 수행된다. 본 발명에서 추가로 기술된 것은 상기 언급된 방법으로 생성된 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포를 포함하는 세포주이다. 다른 구현예에서, 혈액 세포는 돌연변이 질병을 가진 대상으로부터 분리된다. 다른 구현예에서, 돌연변이 질병은 신경 퇴행성 질병, 장애 및/또는 질환과 관련된다. 다른 구현예에서, 돌연변이 질병은 염증성 장 질병, 장애, 및/또는 질환과 관련된다. 다른 구현예에서, 혈액 세포는 비 T-세포, 비 B-세포 단핵 세포이다. 다른 구현예에서, 혈액 세포는 인간 대상으로부터 얻은 샘플이다. 다른 구현예에서, 샘플은 전혈이다. 다른 구현예에서, 샘플은 말초 혈액이다. 다른 구현예에서, 샘플은 비 T-세포, 비 B-세포 단핵 세포의 분리된 성분을 포함한다. 본 발명에서 추가로 기술된 것은 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포주이다.

[0010]

본 발명에서 추가로 기술된 것은 일정량의 혈액 세포를 제공하고, 리프로그래밍 인자를 혈액 세포로 전달하며, 혈액 세포를 처리된 세포 배양물 표면 상에 플레이팅하고 및 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 4일 이당 동안 배양하는 것을 포함하며, 상기에서, 리프로그래밍 인자의 전달, 및 리프로그래밍 배지에서의 배양은 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포를 생성하는, 유도 만능 줄기세포를 생성하는 방법이다. 다른 구현예에서, 일정량의 리프로그래밍 인자의 전달은 뉴클레오펙션을 포함하며, 리프로그래밍 인자는 Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Lin-28, SV40 대형 T 항원 ("SV40LT"), 및 p53 표적화 짧은 헤어핀 RNA ("shRNA-p53")로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자를 포함하고, 하나 이상의 oriP/EBNA1 유래 벡터에서 암호화된다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 oriP/EBNA1 유래 벡터는 pEP4 E02S ET2K, pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL, 및 pCXWB-EBNA1을 포함한다. 다른 구현예에서, 처리된 세포 배양물 표면은 마우스 배아 피더 (MEF)의 플레이팅을 포함한다. 다른 구현예에서, 처리된 세포 배양물 표면은 세포외 기질 단백질을 포함한다. 다른 구현예에서, 세포외 기질 단백질은 라미닌을 포함한다. 다른 구현예에서, 라미닌은 L-521을 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 염기성 섬유아 세포 성장 인자 (bFGF)를 포함하는 배아 줄기 세포 (ESC) 배지를 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 L-아스코르브 산, 트랜스페린, 소듐 비카보네이트, 인슐린, 소듐 세레나이트 및/또는 bFGF를 포함하는 E7 배지를 포함한다. 다른 구현예에서, 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 배양하는 것은 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 일 동안 수행된다. 다른 구현예에서, 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 배양하는 것은 적어도 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 31 일 동안 수행된다. 다른 구현예에서, 혈액 세포는 인간 대상으로부터 얻은 샘플이다. 다른 구현예에서, 샘플은 전혈이다. 다른 구현예에서, 샘플은 말초 혈액이다. 다른 구현예에서, 샘플은 비 T-세포, 비 B-세포 단핵 세포의 분리된 성분을 포함한다. 본 발명에서 추가로 기술된 것은 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포주이다.

도면의 간단한 설명

[0011]

도면의 상세한 설명

도 1(A) 내지 도 1(B). 혈액 성분의 분리. 도 1(A) 분리된 성분을 보여주는 개략도. 도 1(B) 분리된 성분의 사진.

도 2(A) 내지 도 2(E). 품질 관리: iPS 세포. 도 2(A) 현미경, 및 다능성 줄기 세포 마커에 대한 염색을 포함하는 생성된 세포에 대한 품질 관리의 다양한 측정이 도시된다. 도 2(B) 줄기 세포의 다능성 묘사. 도 2(C) 핵형 분석. 도 2(D) 다른 세포주들에 대한 다능성 및 계통(lineage) 특이적 마커의 RT-PCR. 도 2(E) 모든 세 배아 계

통으로 분화할 수 있는 만능 줄기세포.

도 3. PBMC 분리 및 동결 보존 과정. 리프로그래밍 및 iPSC의 생성을 위한 공급원으로서 사용된 혈액 세포를 얻기 위한 과정.

도 4. 말초혈액 단핵 세포 (PBMC). PBMC의 집단을 포함하는 혈액의 다양한 성분 및 상대적인 개체군 존재량 (population abundance)의 묘사.

도 5. 혈액으로부터 유래된 iPSC에 대한 T-세포 수용체 클론 분석.

도 6(A) 내지 도 6(B). iPSC 세포주에서 관찰된 염색체 변화를 입증하는 이디오그램은 Cedars-Sinai iPSC Core 이다. 각 색깔의 바는 한 세포주에서 하나의 염색체 변화 발생을 나타낸다. 세포유전학적 변화는 색깔로 코드화된다; 밤색, 일염색체성(monosomy), 전체 염색체의 소실. BC-iPSC는 섬유아세포-유래 iPSC보다 안정한 핵형 유지에 우수하다. 발명자의 실험실에서 섬유아세포-(**도 6(A)**) 및 PBMC-유래 iPSC (**도 6(B)**) 유래 비정상 핵형 개별 염색체 수준의 이디오그램 도. 이디오그램에 나타난 비정상 iPSC 핵형은: 핵형 분석된 총 258개의 fib-iPSC 배양물의 fib-iPSC (n: 59) (**도 6(A)**), 및 핵형 분석된 총 BC-iPSC (n: 106)의 BC-iPSC (n: 4) (**도 6(B)**).

도 7(A) 내지 7(B). 핵형. **도 7(A)** 계대수에 관한 비정상 핵형의 분포. **도 7(B)** 조직 공여자의 나이에 관한 비정상 핵형의 분포; 밤색, 일염색체형, 전체 염색체의 소실.

도 8(A) 내지 8(F). PBMC의 iPSC로의 신뢰 가능한 에피솜 리프로그래밍. **도 8(A):** 에피솜 리프로그래밍 과정 및 PBMC로부터 iPSC 생성의 타임라인을 묘사하는 개략도. **도 8(B):** 두 명의 건강한 지원자로부터 얻고, 하나는 비-T 세포 (03iCTR-NTn1) 리프로그래밍 방법으로 또 다른 하나는 T-세포 (80iCTR-Tn1) 리프로그래밍 방법으로 PBMC로부터 리프로그래밍된 iPSC 콜로니의 명시야 이미지는 높은 핵-대-세포질 비율을 나타내며, 알칼리포스파타아제 양성 및 표면 항원 SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81; 및 핵 다능성 마커 OCT3/4, SOX2 및 NANOG에 대해 면역 양성이다. 스케일 바, 75 μ m. **도 8(C):** PluriTest에 기반한 Microarray Illumina 유전자-칩 및 바이오인포메틱스는 BC-iPSC에서 다능성 수준을 확인한다. **(D):** PBMC- iPSC 세포주는 두 대표 세포주에서 나타난 바와 같이 정상 G-밴드 핵형 분석을 유지하였다. **도 8(E):** 비-T 또는 T-세포 클론성 분석. **도 8(F):** LCL-iPSC 대비 H9 hESC의 POU5F1 (OCT4), SOX2, LIN28, L-MYC, 및 KLF4 발현의 정량적 RT-PCR 분석. **(G)** T 세포수용체 유전자 재배열 분석은 T-세포 방법으로부터 유래된 BC-iPSC에서 발생한 TCRG 유전자 재배열을 검출하는데 사용된 다른 PCR 프라이머 세트를 나타내는 반면, 145-255 bp 범위의 PCR 산물이 비-T 세포 iPSC 클론에서 검출 가능하지 않았다. 양성 클론 대조군이 포함되었다. **도 8(F):** PBMC-iPSC 세포주로부터 유래된 EB의 자발적인 체외 EB 분화와 비교한, 선택된 4 개 유전자 군 (자기-재생/다능성, 외배엽, 내배엽, 및 중간엽) 유래 대표적인 BC-iPSC의 삼-계통 잠재력을 나타내는 TaqMan hPSC Scorecard(Scorecard) 표. **도 8(G):** 동등한 수의 외배엽 (Nkx6.1+/ β_3 -튜블린+ 신경 세포)을 나타내는 대표적인 섬유아세포-유래 (n: 26) 및 PBMC-유래 iPSC (n: 12) 지시된 신경 분화. 스케일 바, 75 μ m. **도 8(H):** 공지된 4p 방법 (T 및 비-T 세포 모두에 대해 n = 7)과 비교했을 때, 5p 방법을 이용한 동결 보존된 PBMC에 대한 높은 iPSC 리프로그래밍 성공률 (T 세포에 대해 n = 28 및 비-T 세포에 대해 n = 13). 리프로그래밍 성공률은 PBMC를 리프로그래밍하는 시도의 총 수 (성공 또는 실패) 10에 대한 비율로서 계산된다. [{T 세포, 5p 대 4p (***) : z-값 = 3.74, 양방 검증(two-tailed) p-값 = 0.00018, 양-비율 z-검정}; {비-T 세포, 4p 대 5p (****) : z-값 = 7.18, 양방 검증 p-값 < 0.0001, 양-비율 z-검정}]. ND: 검출되지 않음.

T 및 비-T 세포 집단 모두에 대한 5p 방법의 리프로그래밍 효율이 4p 방법과 비교했을 때 더 큰 것이 추가로 관찰되었다. 리프로그래밍 효율은 판별되고 기록되고 해동 후에 뉴클레오펙션된 PBMC의 총 수에 대해 정규화된 개별 iPSC 콜로니에 기반한다. [{T 세포, 4p 대 5p (***) : 양방 검증 p-값 = 0.0004, Welch's 교정과 비대응 t-검정}; {비-T 세포, 4p 대 5p (***) : 양방 검증 p-값 < 0.0001, Welch's 교정과 비대응 t-검정}]. ND: 검출되지 않음. **도 8(I) & 도 8(J):** 발명자의 실험실에서 섬유아세포 (상부) 및 PBMC-유래 iPSC (하부) 유래 비정상 핵형의 개별 염색체 수준 이디오그램 묘사. 이디오그램에 나타난 비정상 iPSC 핵형은; 핵형 분석된 총 n = 260 fib-iPSC 배양물의 fib-iPSC (n = 61) (상부), 및 핵형 분석된 총 n = 206 PBMC-iPSC 세포주의 PBMC-iPSC (n = 4) (하부). 분석은 세포 당 최소 20개의 세포에서 염색체 조사를 포함한다. ISCN 2013의 클론성 정의에 일치하는 이상만을 본 원고 데이터 세트에 포함시켰다. 전좌 (네이비 블루 바) 카테고리 위의 글자는 그들이 상응하는 각각의 전좌 이상이 발생한 염색체 위치들 사이에 일치하도록 맞춰졌다. 각 염색체 이디오그램에서 바 너비는 fib-iPSC 및 PBMC-iPSC에 대해 조사된 샘플 수에 비례하여 척도화되었다. 따라서, PBMC-iPSC 세포주에서 발견된 이상을 나타내는 바는 fib-iPSC 세포주에서 발견된 이상을 묘사하는 바의 너비의 1.26 배 (260/206)이다.

도 9(A) 내지 도 9(D): fib-iPSC와 비교하여, BC-iPSC는 연장된 배양에 걸쳐 더욱 안정하다. **도 9(A)** 섬유아세포

포 및 PBMC의 공여자 나이와 상관관계에 있는 iPSC 세포주에서 관찰된 비정상 G-밴드 핵형 분석 퍼센트. **도 9(B)** 리프로그래밍-후 처음 핵형 분석에서 및 연장된 세포 배양에서 측정된 iPSC 세포주에 대한 반복 핵형 분석에서의 비정상 G-밴드 핵형 분석 퍼센트. 점선은 fib-iPSC (오렌지) 및 BC-iPSC (블루)에 대한 전체 평균 핵형 이상 비율을 묘사한다. **도 9(C)** iPSC 계대수와 비교한 fib- 및 PBMC-iPSC 클론 세포주에 대해 평가된 첫 G-밴드 핵형 분석에서 비정상 퍼센트. **도 9(D)** iPSC의 계대 수와 비교한 fib- 및 PBMC-iPSC 클론 세포주에 대해 평가된 두 번째-네 번째 (반복) G-밴드 핵형 분석에서 비정상 퍼센트

도 10(A) 내지 도 10(E): 비교 유전체 혼성화는 BC-iPSC가 fib-iPSC에 비해 상대적으로 작고 더 적은 초미세 세포유전학적 이상을 가지는 것을 확인한다. (도 10(A)-도 10(B)) 각 iPSC 세포주의 부모 세포와 비교했을 때 fib-iPSC (n: 6) 및 PBMC-iPSC (n:7)의 Mb에서 aCGH로 검출된 새로 획득한 증폭 및 결실의 평균 크기. aCGH에 사용된 iPSC 세포주는 비정상 및 정상 G-밴드 핵형 분석 모두를 가졌다. 비정상: fib-iPSC (n: 3) 및 PBMC-iPSC (n: 2). 정상: fib-iPSC (n: 3) 및 PBMC-iPSC (n: 5). **(도 10(C)-도 10(D))** 각 iPSC 세포주의 부모 세포와 비교했을 때 fib-iPSC (n: 6) 및 PBMC-iPSC (n: 7)의 Mb에서 aCGH로 검출된 새로 획득한 증폭 및 결실의 평균 수. **도 10(E)** 발명자의 실험실에서 관찰된 fib- 또는 PBMC-iPSC 세포주에서 관찰된 가장 반복되는 초미세 증폭/결실(amps/dels)의 목록. **도 10(F):** 여기에 표시된 모든 데이터는 Cedars-Sinai의 발명자의 실험실에서 유래된 iPSC 세포주에 기반한다. fib-iPSC는 3p 방법으로 리프로그래밍되었고 PBMC-iPSC는 5p 방법으로 리프로그래밍되었다. 섬유아세포 및 PBMC의 공여자 나이와 상관관계가 있는 iPSC 세포주에서 관찰된 비정상 G-밴드 핵형 분석 퍼센트. [fib-iPSC, 공여자 나이 군 21-40 대 0-20 또는 51-60 또는 41-50 또는 61-90: 유의하지 않은 (ns), 양-비율 z-검정}. fib-iPSC: n = 10/63 (0-20), n = 17/50 (21-40), n = 4/28 (41-50), n = 10/41 (51-60), n = 7/29 (61-90). [fib-iPSC 대 PBMC-iPSC - 나이 군 0-20: ns; 나이 군 21-40 (**): z-값 = 2.9, 양방 검증 p-값 = 0.003; 나이 군 41-50 (*): z-값 = 2.4, 양방 검증 p-값 = 0.015; 나이 군 51-60 (***): z-값 = 3.5, 양방 검증 p30 값 = 0.0005; 나이 군 61-90 (****): z-값 = 4.02, 양방 검증 p-값 < 0.0001; 양-비율 z-검정}. PBMC-iPSC: n = 2/34 (0-20), n = 0/19 (21-40), n = 0/39 (41-50), n = 1/56 (51-60), n = 0/62 (61-90). ND: 검출되지 않음. 리프로그래밍-후 첫 핵형 분석 및 연장된 세포 배양에서 평가된 iPSC 세포주에 대한 반복 핵형 분석에서 비정상 G-밴드 핵형 분석 퍼센트. 점선은 fib-iPSC (블랙) 및 PBMC-1 iPSC (그레이)에 대한 전체 평균 핵형 이상 비율을 나타낸다. [1st 핵형 분석, fib-iPSC 대 PBMC-iPSC (****): z-값 = 5.59, 양방 검증 p-값 < 0.0001, 양-비율 z-검정]; {반복 (2nd-4th) 핵형 분석, fib-iPSC 대 PBMC-iPSC (***): z-값 = 3.72, 양방 검증 p-값 = 0.0002, 양-비율 z-검정}; {fib-iPSC 및 PBMC-iPSC, 양-비율 z-검정에 의해 유의하지 않은 것으로 검정된 1st 대 반복 핵형 분석}. fib-iPSC: n = 46/205 (1st 핵형 분석) 및 n = 15/55 (반복 핵형 분석). PBMC-iPSC: n = 2/143 (1st 핵형 분석) 및 n = 2/63 (반복 핵형 분석). iPSC의 계대수와 비교한 fib- 및 PBMC-iPSC 클론 세포주에 대해 평가된 첫 G-밴드 핵형 분석에서 비정상 퍼센트. [fib-iPSC 대 PBMC-iPSC - 계대 1-8 (****): z-값 = 4.31, 양방 검증 p-값 < 0.0001; 계대 9-23 (***): z-값 = 3.21, 양방 검증 p-값 = 0.001; 양-비율 z-검정}. fib-iPSC: n = 20/102 (계대 1-8) 및 n = 12 26/103 (계대 9-23). PBMC-iPSC: n = 1/99 (계대 1-8) 및 n = 1/42 (계대 9-23). iPSC의 계대수와 비교한 fib- 및 PBMC-iPSC 클론 세포주에 대해 평가된 두 번째 - 네 번째 (반복) G-밴드 핵형 분석에서 비정상 퍼센트. [fib-iPSC 대 PBMC-iPSC - 낮은 계대 1-14: ns, z-값 = 1.53, 양방 검증 p-값 = 0.12; 양-비율 z-검정}. [fib-iPSC 대 PBMC-iPSC - 높은 계대 ≥ 15 (**): z-값 = 2.61, 양방 검증 p17 값 = 0.009; 양-비율 z-검정}. fib-iPSC: n = 7/12 (낮은 계대 1-14) 및 n = 8/43 (높은 계대 ≥ 15). PBMC-iPSC: n = 0/2 (낮은 계대 1-14) 및 n = 2/61 (높은 계대 ≥ 15). ND: 검출되지 않음. **도 10(G):** 각 iPSC 세포주의 부모 세포와 비교했을 때, fib-iPSC (n = 6) 및 PBMC-iPSC (n = 8)의 Mb에서 aCGH로 검출된 새로 획득한 증폭 및 결실 (amps/dels)의 평균 크기. [fib-iPSC 대 PBMC-iPSC (**): 양방 검증 p-값 = 0.0015, 비대응 t-검정}. aCGH 증폭/결실 크기 분석에 사용된 iPSC 세포주는 비정상 및 정상 G-밴드 핵형 모두를 가졌다. 비정상: fib-iPSC (n = 3) 및 PBMC-iPSC (n = 2). 정상: fib-iPSC (n = 3) 및 PBMC-iPSC (n = 6). 각 iPSC 세포주의 부모 세포와 비교했을 때, fib-iPSC (n = 6) 및 PBMC-iPSC (n = 8)의 Mb에서 aCGH로 검출된 새로 획득한 증폭 및 결실의 평균 수. [fib-iPSC 대 PBMC-iPSC (*): 양방 검증 p-값 = 0.0369, 비대응 t-검정}. 정상 핵형: fib-iPSC (n = 3) 및 PBMC3 iPSC (n = 6)뿐만 아니라, 비정상 핵형: fib iPSC (n = 3) 및 PBMC-iPSC (n = 2)을 가진 새로운 증폭/결실의 숫자 분석에 사용된 iPSC 세포주. 발명자의 실험실에서 관찰된 iPSC 세포주에서 관찰된 가장 반복된 초미세 증폭/결실 목록. **도 10(H):** G-밴드 핵형 분석으로 관찰된 개별 염색체 수준에서의 섬유아세포-유래 iPSC (fib-iPSC)에서 상이한 핵형 이상의 빈도. Rearr. - 전좌, 역위 및 번이를 포함하는 구조적 재배열. 그레이로 음영 처리된 세포는 fib-iPSC 배양에서 핵형 이상이 전혀 관찰되지 않은 염색체를 묘사한다. 오렌지 색으로 음영 처리된 세포는 각각의 전체 염색체 이상 카테고리에 대한 가장 높은 순위 (상위 3)의 염색체의 획득, 소실 또는 구조적 재배열을 포함

하는 핵형 이상 퍼센트를 나타낸다.

도 11(A) 내지 도 11(C): BC-iPSC의 전이유전자-없는 상태. 도 11(A) BC-iPSC의 유전체 DNA에서 분석을 이용한 플라스미드-기반 *EBNA* 유전자 발현의 부재. **도 11 (B):** 내재성 *POU5F1 (OCT4)*, *SOX2*, *LIN28*, *L-MYC*, 및 *KLF4* 발현 (코딩 DNA 서열, CDS) 을 검출하는 프라이머를 이용한 정량적 RT-PCR 분석으로 측정된 상대적으로 정규화된 유전자 발현. **도 11 (C)** iPSC 세포주에서 검출 불가능한 플라스미드-유래 발현 (P1a)뿐만 아니라.

도 12(A) 내지 도 12(B): 림프아구성 세포주 (LCL)-iPSC 및 상피 세포-유래 iPSC의 염색체 이디오그램. 발명자들의 실험실에서 LCL-유래 **도 12(A)** 및 상피-유래 iPSC **도 12(B)** 유래 비정상 핵형의 개별 염색체 수준 이디오그램 묘사. 이디오그램에 나타난 비정상 iPSC 핵형은; 핵형 분석된 총 60개의 LCL-iPSC 배양물의 LCL-iPSC (n: 15) (**도 12(A)**), 및 핵형 분석된 총 BC-iPSC (n: 26)의 상피-iPSC (n: 7) (**도 12(B)**) .

도 13(A) 내지 도 13(B). PBMC-유래 iPSC의 삼-계통 잠재력. 발명자들의 실험실에서 생성된 PBMC-유래 iPSC의 대표적인 의 삼-계통 잠재력을 나타내는 TaqMan hPSC Scorecard 표. **도 13(A):** 4 개의 군 (자기-재생/다능성, 외배엽, 내배엽, 및 중배엽)에서 선택된 유전자의 발현이 각각 **도 13(B):** iPSC 단계 후 14-18일 사이의 PBMC-iPSC 세포주로부터 유래된 배아체(embryoid body, EB)의 자발적 체외 분화와 비교되었다. 자기-재생에 대한 음성 점수는 EB의 분화 단계를 반영하는 반면, 각각의 3 배엽의 양성 점수는 PBMC-유래 iPSC 세포주의 상대적으로 동등한 유도된 분화 없이 외배엽, 중배엽 및 내배엽을 생성하는 경향을 나타낸다.

도 14(A) 내지 도 14(C). 에피솜 플라스미드로 리프로그래밍한 PBMC-iPSC는 무-전이유전자이다. 도 14(A): PBMC-iPSC의 유전체 DNA에서 플라스미드-기반 *EBNA1* 유전자 존재의 부재. **도 14(B)** 및 **도 14(C):** PBMC-iPSC 세포주에서 검출 불가능한 플라스미드-유래 발현 (P1a)뿐만 아니라, 내재성 *POU5F1 (OCT4)*, *SOX2*, *LIN28*, *L-MYC*, 및 *KLF4* 발현 (코딩 DNA 서열, CDS)도 검출하는 프라이머를 이용한 정량적 RT-PCR 분석으로 측정된 상대적으로 정규화된 유전자 발현.

도 15(A) 내지 도 15(B). 5p 방법으로 리프로그래밍된 PBMC-iPSC는 SV40LT 유전자 통합 및 발현이 없다. 도 15(A), PBMC-iPSC, H9-hESC, 통합된 iPSC 세포주 대조군 및 양성 대조군 (5p로 PBMC에 30일 동안 뉴클레오펙션된)로부터 분리된 유전체 및 에피솜 DNA에서 플라스미드-기반 *EBNA1* 및 *SV40LT* 유전자 존재의 부재. **도 15(B):** *EBNA1*, *SV40LT* 및 *GAPDH*를 검출하는 프라이머를 이용하여 동일한 세포주에서 정량적 RT-PCR 분석으로 측정된 유전자 발현. 양성 대조군을 뉴클레오펙션한 것과 비교했을 때, *SV40LT* 유전자 발현은 리프로그래밍된 PBMC-iPSC 세포주에서 검출 불가능하다. 32 PCR 사이클이 모든 프라이머 세트에 적용되었다.

도 16(A) 내지 도 16(B). 림프아구성 세포주 (LCL)-iPSC 및 상피 세포-유래 iPSC의 염색체 이디오그램. 발명자들의 실험실에서 **도 16(A):** LCL-유래 (상부) 및 **도 16(B):** 상피-유래 iPSC (하부) 유래 비정상 핵형의 개별 염색체 수준의 이디오그램 묘사. 이디오그램에 나타난 비정상 iPSC 핵형은; 핵형 분석된 총 60개의 LCL-iPSC 배양물의 LCL-iPSC (n=15) (상부) , 및 핵형 분석된 총 PBMC-iPSC (n = 26)의 상피-iPSC (n = 7) (하부).

도 17. p53 분석. 체세포 변이 (오직 iPSC 클론에서만 나타나는 것이 조정된 및 보정된 GATK 툴킷 및 생성된 MuTect 패키지에서 생성된 서열 파일 (.bam)을 이용하여 식별되었다. 패키지는 쌍을 이룬 정상 (이 경우 혈액 유래 DNA) 및 체세포(somatic) (이 경우 iPSC 클론 DNA) 샘플로부터 처리된 시퀀싱 판독을 받아들이고 낮은 품질의 서열을 가진 판독을 제외하고, 그 후 추가적인 품질 관리 단계가 변이를 생식계열 또는 체세포로 식별하기 전에 체세포 샘플에서만 발생한 변이 판별을 위해 베이시안 분류기(Bayesian classifier)를 적용한다. 판별된 변이는 그 후 집단에서 식별된 공통 변이의 큰 SNP 데이터베이스 (dbSNP)로 주석이 달아졌다.

도 18(A) 내지 도 18(B). 섬유아세포에서 3P, 5P 방법을 이용한 리프로그래밍 기술의 추가적인 특성화. 도 18(A) 뉴클레오펙션 후 22일 **도 18(B)** 뉴클레오펙션 후 28일

도 19(A) 내지 도 19(B). 섬유아세포에서 3P, 5P 방법을 이용한 리프로그래밍 기술의 추가적인 특성화. 도 19(A) AP 염색 - 3 플라스미드 조건 **도 19(B)** AP 염색 - 5 플라스미드 조건.

도 20. G-밴드 핵형 분석으로 관찰된 섬유아세포-유래 iPSC (fib-iPSC)에서 개별 염색체 수준의 상이한 핵형 이상의 빈도. 전좌, 역위 및 변이를 포함하는 구조적 재배열. 그레이로 음영 처리된 세포는 fib-iPSC 배양물에서 핵형 이상이 전혀 관찰되지 않는 염색체를 묘사한다. 오렌지 색으로 음영 처리된 세포는 각각의 전체 염색체 이상 카테고리에 대한 가장 높은 순위 (상위 3)의 염색체의 획득, 소실 또는 구조적 재배열을 포함하는 핵형 이상 퍼센트를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명에 인용된 모든 참고 문헌은 그 전체가 완전히 설명된 것처럼 참고 문헌으로 인용된다. 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에서 사용된 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 자명한 것과 동일한 의미를 가진다. Allen *et al.*, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 22nd ed., Pharmaceutical Press (September 15, 2012); Hornyak *et al.*, *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*, CRC Press (2008); Singleton and Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 3rd ed., revised ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); Smith, *March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 7th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); Singleton, *Dictionary of DNA and Genome Technology* 3rd ed., Wiley-Blackwell (November 28, 2012); and Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012), provide one skilled in the art with a general guide to many of the terms used in the present application. For references on how to prepare antibodies, see Greenfield, *Antibodies A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Köhler and Milstein, *Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7):511-9; Queen and Selick, *Humanized immunoglobulins*, U. S. Patent No. 5,585,089 (1996 Dec); and Riechmann *et al.*, *Reshaping human antibodies for therapy*, Nature 1988 Mar 24, 332(6162):323-7.
- [0013] 통상의 기술자는 본 발명의 실시예에 사용될 수 있는, 본 발명에 기술된 것과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 재료를 인식할 것이다. 실제로, 본 발명은 기술된 방법 및 재료를 결코 제한하지 않는다. 본 발명의 목적을 위해, 하기의 용어가 하기에 정의된다.
- [0014] 하기의 본 발명의 설명 및 청구항 전반에 사용된 바와 같이, "a," "an," 및 "the"의 의미는 문맥상 명확히 달리 지시하지 않는 한, 복수형을 포함한다. 또한, 본 발명의 설명에 사용된 바와 같이, "in"의 의미는 문맥상 명확히 달리 지시하지 않는 한, "in" 및 "on"을 포함한다.
- [0015] 기술한 바와 같이, 환자-특이적 유도 만능 줄기세포 ("iPSC")는 질병 발병과 관련된 메커니즘을 밝히기 위한 질병 모델화, 약물 스크리닝, 및 궁극적으로 재생의료 치료제를 포함하는, 많은 적용에서 큰 가능성을 지닌다. 인간 iPSC의 유용성은 품질 유지, 유전체 무결성(integrity) 및 안정성에 달려있다. 다수의 실험실에서 장-기간 배양시 다양한 조직 공급원 유래 인간 iPSC 세포주에서 ~10-25% 비율의 핵형 이상(karyotype abnormality)을 가진 반복되는 유전체 이상(genomic aberration)이 나타났다.
- [0016] hiPSC 세포주의 유전체 무결성 및 안정성을 유지하는 것은 신뢰할 수 있는 질병 모델화 및 재생 치료로서 줄기세포의 안전한 임상 적용에 필수적이다. 체세포 리프로그래밍 동안 및/또는 hiPSC의 유지, 증식 및 장기적인 배양 동안 발생하는 이상 세포유전학적 오류는 *체외* 질병 모델화 또는, 더욱 결정적으로, 재생의료를 위한 iPSC의 *체내* 유용성의 정확성에 영향을 미칠 것이다. 특히 여러 연구에서 염색체 이수체(aneuploidy), 전좌, 중복 및 결실, 및 iPSC에서의 점돌연변이를 보고한 것을 고려해볼 때, 임상적 용도에서 iPSC는 암-관련 유전체 이상으로부터 자유롭다. 정상 hESC의 악성 유사체인 고도의 이수체 인간 배아 암종(embryonal carcinoma, **EC**) 줄기세포는 일반적으로 염색체 12의 짧은 팔(arm)의 증폭된 영역 및 염색체 1, 17 및 X의 획득(gain)을 함유한다.
- [0017] 초기, 중기 또는 후기 계대 수(passage number)의 차이를 가진 증가된 아-염색체(sub-chromosomal) 복제수 변이 (copy number variations, CNV), 종양-억제 유전자와 관련된 결실, 및 종양유전자의 중복이 iPSC에서 모두 보고되었다. 이러한 연구의 대부분에서, iPSC 세포주에서의 유전체 이상이 리프로그래밍 방법의 통합으로 인해 생성되었다. 그러나, 현재까지, 많은 수의 섬유아세포- 또는 혈액- 유래 hiPSC 세포주에 특이적인 반복적 아-염색체 이상에 대한 체계적이고 잘-통제된 (유사한 리프로그래밍 및 줄기 세포 배양 방법) 보고가 기술되지 않았다. 본 발명자들은 인간 iPSC 세포주를 생산하고, 특성화하고 분화하는 대규모의 경험을 가진 iPSC 코어 시설을 개발하였다. 이 바이오-저장소는 현재 세포주 당 다수의 클론 (2-6)을 가진 160개 이상의 잘-특성화된 개별 공여자 인간 iPSC 세포주를 가진다. iPSC 코어는 섬유아세포, 말초혈액 단핵세포, 불멸화 림프아구성 세포주 및 일차 상피 세포로부터 유래한, 여러 계대(passage)에 걸쳐서 유래된 450개의 독립적인 iPSC 배양액의 코어에서 유래된 hiPSC의 유전체 안정성을 체계적으로 모니터링 했다.
- [0018] 리프로그래밍에 흔히 사용되는 세포의 개시 공급원은 피부 생검으로부터 분리된 피부 섬유아세포이다. 그러나, 기술한 바와 같이, 피부 편치 생검 유래 iPSC는 더욱 침습적이고, 리프로그래밍에 앞서 장기적인 2-3주간의 증

식 배양 기간이 필요하다. 가장 중요한 것은, UV 광선에 상피의 노출과 관련된 돌연변이의 수가 많아서 피부 유래 iPSC의 안전에 대한 우려가 커지고 있다. 일반적인 섬유아세포 세포 공급원에 대한 문제점은 리프로그래밍을 위해 쉽게 접근 가능한 환자 조직의 공급원으로서 이용될 수 있는 말초 혈액으로 회피할 수 있다. 말초 혈액은 가장 접근하기 쉬운 성인 조직이며 혈액 은행에 이미 저장된 수많은 냉동 샘플에 대한 접근을 허용한다. 또한, 많은 저장소가 특정 유전자형을 가진 말초 또는 림프아구 혈액을 저장한다.

[0019] 혈액은 임상 진단에서 널리 사용되듯이, 표준화되고 피부 생검보다 외상이 적은 덜 침습적인 수집 방법을 수반 하기에, iPSC 유도에 대한 유리한 대안으로 보인다. 말초 혈액 (PB)의 주요 성분은 적혈구 및 혈소판이다. 백혈구는 PB에서 $3.6-11 \times 10^6/\text{ml}$ 농도로 존재하는 유핵 세포이다. PB에서 성숙 T 세포 및 일차 전구 세포는 확립된 방법을 이용하여 쉽게 증식될 수 있으며 이들은 리프로그래밍에 가장 성공적으로-사용된 공급원 중 하나이다. T 세포는 PB (20-30%)에서 과립구 다음으로 가장 풍부한 세포이며 T 세포는 IL-2 및 항-CD3/CD28 마이크로비드로 쉽게 증식될 수 있다. T 세포의 다능성 리프로그래밍은 면역 치료를 위해 노화된(aged) T 세포의 대체물을 개발하기 위해 여러 시도들을 이용한 많은 실험실에 의해 보고되었다. 그러나, 성숙한 T 세포는 체세포 재조합(somatic recombination) 후에 단일 T 세포 수용체 (TCR)을 가지며 T 세포 목록(repertoire)을 무제한의 가능성으로 재생성하는 능력을 잃는다.

[0020] 여기서 본 발명자들은 말초혈액 단핵 혈액 세포(peripheral mononuclear blood cells, PBMC)를 포함하는 혈액 세포 (BC)를 iPSC (BC-iPSC)로 효율적으로 리프로그래밍하는 신뢰할 수 있는 프로토콜을 개발하였으며 이들 iPSC 세포주가 공공 저장소 또는 영역 병원으로부터 얻은 이들의 섬유아세포 유래 iPSC (Fib-iPSC) 세포주에 비해 세포유전학적 안정성 면에서 우수한 것을 나타낸다. 본 발명자들은 림프성 T 세포 및 골수성 비-T 세포 집단 모두로부터 BC-iPSC를 유도하기 위한 방법 및 세포유전학적 안정성을 기술한다. 본 발명자들은 비-통합 방법을 이용하여 PBMC로부터 생성된 hiPSC 세포주가 통합 방법에 의해 생성된 것들보다 훨씬 낮은 유전체 이상 발생 빈도(incidence)를 가지는 것을 발견했다. 동일한 체세포 유래 두 fib-iPSC 및 BC-iPSC는 비슷한 수의 다수의 신규(*de novo*) CNV를 함유했다. 본 발명자들의 결과는 갓 분리된 인간 PBMC는 에피솜 플라스미드를 이용하여 더 큰 세포유전학적 안정성을 가진 다능성으로 정확히 리프로그래밍될 수 있다는 것을 나타낸다. 이와 같이, PBMC가 획득한 유전체 이상의 임의의 효과를 최소화하기 위한 iPSC 리프로그래밍에 선호되는 체세포 공급원이어야 하며, 추가로, 재생의료에 이상적인 세포 공급원으로서 고려되어야 한다.

[0021] 성숙 T 또는 B 세포와 대조적으로, 혈액 전구 세포의 대체 공급원은 무손상 유전체(intact genome)를 함유한다. 또한, 이들은 골수성 세포 또는 적혈구의 증식(proliferation)에 적합한 배양 조건에서 증식될 수 있다. 혈액 줄기/전구 세포는 표면 마커 CD34를 발현하고 줄기세포 적소(stem cell niche)에 존재한다. 그러나, 오직 약 1%의 줄기/전구 세포만이 매일 순환에 들어가고, 그 결과로 오직 PB 중 0.01-0.1%의 세포만이 CD34+ 세포이다. 이 집단은 자성-활성화 세포 분류 (magnetic-activated cell sorting, MACS)에 의해 농축될 수 있거나 며칠 동안의 MNC의 배양이 CD34+ 세포를 5-20% 순도로 증식시키는 것에 의존적일 수 있고, 이는 추가적인 정제 없이 리프로그래밍에 사용될 수 있다.

[0022] 다른 유핵 말초 혈액 세포는 과립구 (대부분 호중구), 단핵구, T 림프구, B 림프구 및 소수의 전구 세포를 포함한다. 이들 혈액의 구성에 초점을 맞추는 것은 파쇄 버퍼를 이용한 적혈구 및 혈소판을 감소시킨 후 여러번 원심분리함으로써 달성될 수 있다. 적혈구 및 과립구 둘 다를 감소시키기 위해 피콜-기울기 원심분리(Ficoll gradient centrifugation)도 사용될 수 있으며, 이는 단핵구 세포(MNC)의 농후를 초래한다. 이런 배경에 반하여, 외인성으로 발현된 인자를 이용한 리프로그래밍은 주지의 사실로서 비효율적이고 다능성을 달성하기 위해 다중 세포 주기를 필요로 한다. 이와 같이, 일차 과립구, 단핵구 및 B 림프구는 이들 세포를 증식시키기 위한 신뢰할 수 있는 프로토콜이 없기 때문에 리프로그래밍되기 가장 어려운 세포들 중 하나이다. 이 분야에서 일차적인 성공은 생체 외(*ex vivo*) 배양에서 쉽게 증식될 수 있고 따라서 다능성으로 리프로그래밍될 수 있는 엠스타인-바 바이러스 불멸화된 림프아구성 B 세포를 포함한다.

[0023] 상기 관점에서, 큰 관심의 대상은 혈액의 비-T 세포 성분의 리프로그래밍이다. 기존의 기술은 대체로 분리된 말초혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 이 집단을 리프로그래밍하는 것이 불가능하다. 더 구체적으로, PBMC는 둥근 핵을 가지는 임의의 말초 혈액 세포이다. 이는 림프구 (T 세포, B 세포, NK 세포), 단핵구, 수지상 세포를 포함한다. 림프구는 소형 (5-10 μm) 및 중형 (10-18 μm)이며 PBMC의 70-90%를 차지한다. 이들 세포들 중, 70 - 85%는 CD3+ T 세포 (PBMC의 40 -70%), CD4 헬퍼(Helper) T 세포 (PBMC의 25-60%)이며, 일반적으로 CD4 대 CD8의 비율은 2:1이고, CD8 "세포 독성" 구획(compartment) T 세포 (PBMC의 5-30%)이다. 남은 구획은 5 - 20%의 B 세포 (PBMC의 15%까지) 및 5 - 20%의 NK 세포 (PBMC의 15%까지)를 포함한다. 단핵구는 16-25 μm 이고 PBMC의 10-

30%이다 (단핵구). 수지상 세포: PBMC의 1-2%.

- [0024] 여기서, 본 발명자들은 새 (증식되지 않은) 말초혈액 단핵 세포 (PBMC)를 iPSC (PBMC-iPSC)로 리프로그래밍하기 위한 새롭고 신뢰가능한 비통합 에피솜 플라스미드 리프로그래밍 방법을 기술한다. 본 발명자들은 본 방법을 이용해 생산된 PBMC-iPSC가 오직 1.9% 이상 비율의 우수한 염색체-수준의 핵형 안정성을 가지며, 아-염색체 신규 복제수 변화가 거의 없게 나타내는 것을 보여준다. 그에 반해서, 미리-증식된 피부 섬유아세포 (fib-iPSC), 림프아구성 세포주(LCL-iPSC) 또는 상피 세포 (epi-iPSC)로부터 유래된 에피솜 리프로그래밍된 iPSC 세포주는 10배 이상 큰 핵형 불안정성 (23-27%)을 나타낸다. 이 발견은 비 증식된 PBMC로부터 리프로그래밍되고 본 발명에 기술된 방법으로 유지된 iPSC가 우수한 세포유전학적 안정성 및 최소한의 유전체 이상을 가지는 것을 보여주며, 이는 이 방법이 iPSC 연구 및 치료적 임상 적용에 바람직한 방법일 수 있음을 제시한다.
- [0025] 이러한 기술된 시도들은 그렇지 않으면 돌연변이 또는 구조적 변화의 다른 형태가 그 안에 유도된 치료 물질이 될 환경적 공격을 피하면서, 유전체 및 핵형 안정성에서 우수한 특성을 가진 세포 리프로그래밍을 위한 쉽게 접근 가능한 자원으로서의 말초 혈액의 사용을 허용한다.
- [0026] 기술한 바와 같이, 본 발명자들은 진혈 및 말초 혈액을 포함하는 혈액 세포로부터 iPSC의 생성함으로써 본 발명에 "BC-iPSC"로 기술된 리프로그래밍된 다능성 세포를 초래하는 것을 포함하는, 비-통합된 에피솜 플라스미드 벡터를 이용한 향상된 고 효율적이고 재현 가능한 리프로그래밍을 기술을 확립하였다.
- [0027] 일반적으로, 비-통합적인 리프로그래밍 스펠(span)을 위한 다양한 시도들은 적어도 하기 범주에 속한다: 1) 통합-결합 바이러스 전달, 2) 에피솜 전달, 3) 직접 RNA 전달, 4) 직접 단백질 전달 및 5) 화학적 유도. 본 발명에서 추가로 기술된 바와 같이, 에피솜 또는 유사한 벡터가 감염 또는 복제-가능(replication-competent) 바이러스를 야기하기에 충분한 바이러스 유전체를 충분히 암호화하지 않기 때문에, 에피솜 벡터의 채택은 이의 생산에 사용된 벡터가 실질적으로 없는 iPSC의 생성을 허용한다. 동시에, 이들 벡터는 개시 숙주 체세포에서 제한된 수준의 자가-복제능을 가진다. 이 자가-복제능은 표적 숙주 세포에서 탈분화 과정이 개시되도록 하는데 유리할 것이 자명한 일정 수준의 지속적인 발현을 제공한다.
- [0028] 이들 기준을 만족하는 플라스미드 벡터의 일례는 제한된 자가-복제가 가능하고 포유류 세포에서 기능하는 것으로 알려진 Epstein Barr oriP/Nuclear Antigen-1 ("EBNA1") 조합을 포함한다. 엡스타인-바 바이러스 유래의 두 요소, oriP 및 EBNA1를 함유하기 때문에, EBNA1 단백질과 바이러스 레플리콘(replicon) 영역 oriP의 결합이 포유류 세포에서 플라스미드의 상대적으로 장기적인 에피솜 존재를 유지한다. oriP/EBNA1 벡터의 이 특정 특징은 통합(integration)-없는 iPSC의 생성에 이상적이다.
- [0029] 더 구체적으로, oriP/EBNA1 벡터에 암호화된 리프로그래밍 인자의 지속적인 발현은 다수의 세포 분열 주기에 걸쳐서 발생한다. 여러 세포 분열에 걸친 리프로그래밍 인자의 충분히 높은 수준은 오직 한 번의 감염 후에도 성공적인 리프로그래밍이 가능하게 한다. 리프로그래밍 인자의 지속적인 발현이 초기 프로그래밍 단계 동안 유리할 것이 자명한 반면, 비제한적인 구성적 발현은 리프로그래밍 과정의 후속 단계를 방해할 것이다. 예를 들어, 리프로그래밍 인자의 약화되지 않은 발현은 숙주 세포의 후속 성장, 발달, 및 운명 예정화(fate specification)에 간섭할 것이다.
- [0030] 동시에, 에피솜의 작은 부분이 세포 주기마다 소실되기 때문에, 결과적으로 리프로그래밍 인자 전이유전자(transgene)가 제거되는 추가적인 이점이 있다. 이 것은 숙주 세포 유전체 및 에피솜 자가-복제의 비대칭적 복제능에 기인하며, 세대당 약 0.5%의 벡터가 소실되는 것으로 추정된다. 증식에 따른 각 세포 분열 동안 플라스미드의 점진적인 고갈이 불가피하여 통합-없는 iPSC 집단으로 이어진다. oriP/EBNA1 상의 리프로그래밍 인자 발현의 지속적인, 그러나 종국의 중단은 리프로그래밍 과정의 다른 단계에 대한 요구와 매우 일치하며 전이인자(transposon) 및 제거 가능한 폴리시트론성(polycistronic) 렌티바이러스 벡터 요소의 이용을 통해 시도되는 것과 같은 리프로그래밍 인자의 제거를 위한 추가적인 조작 단계에 대한 요구를 배제한다. oriP/EBNA1가 다른 리프로그래밍 연구에서 적용되어 왔으나, 보고된 효율은 매우 낮으며 (겨우 뉴클레오펙션된 세포 백만개 당 3 내지 6개의 콜로니), 이는 부분적으로 다수의 리프로그래밍 인자들을 암호화하는 큰 플라스미드 (예를 들어, 12kb 이상)에 의존하기 때문에, 트랜스펙션 효율에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다.
- [0031] 벡터 설계에서 이런 선택에 더하여, 문헌에서 시행된 리프로그래밍 인자의 특정 조합은 다양하였다. 언급된 바와 같이, 사용된 리프로그래밍 인자는 다능성-관련 유전자들 Oct-4, Sox-2, Lin-28, Nanog, Sall4, Fbx-15 및 Utf-1을 포함한다. 종래에 이들 인자들은 보통 발달 초기 동안 발현되고 주입-전 배아 및 주입-후 배아의 내부 세포괴(inner cell mass)를 적절히 구성할 세포의 하위 집합의 다능성 잠재력 유지에 수반된다고 이해되었다.

이들의 이소성 발현은 숙주 세포 내에서 휴지 상태인 내재성 코어 다능성 프로그램을 개시 및 전파하는 배아-유사 전사 캐스케이드의 수립을 허용하는 것으로 믿어진다. Tert, Klf-4, c-Myc, SV40 대형 T 항원 ("SV40LT") 및 p53 표적화 짧은 헤어핀 RNA ("shRNA-p53")과 같은 다른 특정 리프로그래밍 결정 요인이 적용되었다. 이들 결정 요인은 그들 자체로 역가-결정 인자가 아닐 수 있으나, 리프로그래밍에 이점을 제공하는 것으로 보고되었다. 예를 들어, TERT 및 SV40LT는 세포 증식을 향상시켜 리프로그래밍 동안 생존을 촉진하고, p53을 표적화하는 짧은 헤어핀과 같은 다른 것들은 노화 및 세포자멸 메커니즘과 같은 리프로그래밍 장벽을 억제 또는 제거하는 것으로 이해된다. 각각의 경우에, 리프로그래밍의 속도 및 효율 모두에서 증가가 관찰된다. 또한, 마이크로 RNA ("miRNAs") 또한 다능성 및 리프로그래밍에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, miR-290 클러스터 유래 일부 miRNA들이 리프로그래밍 연구에 적용되어 왔다. 예를 들어, 다능성-관련 유전자들과 함께 miR-291-3p, miR-294 또는 miR-295의 섬유아세포로의 도입도 리프로그래밍 효율을 증가시킨다고 보고되었다.

[0032] 통상의 기술 분야의 다양한 벡터 및 리프로그래밍 인자가 세포에서 리프로그래밍 수립이 가능한 다수의 성분을 나타내는 것으로 보이지만, 성공적인 리프로그래밍이 확립되기 위해 필요한 화학량론적인 발현 수준을 고려하면 고도의 복잡성이 발생한다. 예를 들어, 보고에 의하면, 체세포 리프로그래밍 효율이 Oct-4 및 Sox2가 단일 벡터 상에서 1:1의 비율로 단일 전사체에 암호화될 때 두 인자를 별개의 벡터 상으로 전달하는 것에 비해 4배 높다. 후자의 경우 더 적게 제어된 두 인자의 흡수 비율을 야기하여, 리프로그래밍 효율에 부정적인 영향을 끼친다. 이러한 장애물들을 해결하기 위한 한 시도는 전이유전자(들)의 상류가 전사 프로모터에서 원위에 있다면, 내부 리보솜유입점(internal ribosome entry site) ("IRES")의 봉입(inclusion)과 같은 폴리스이트론성 벡터를 사용하는 것이다. 이 기구는 하나 이상의 전이유전자가 단일 리프로그래밍 벡터에 제공되는 것을 허용하며, 복수의 전이유전자에 대한 더욱 세밀한 수준의 전사적 조절을 부여하기 위해 다양한 유도 가능한 또는 구성적인 프로모터들이 발현 카세트로서 함께 조합될 수 있다. 이러한 더욱 구체적인 수준의 조절이 리프로그래밍 과정을 상당히 도울 수 있으며, 벡터 상의 별개의 발현 카세트가 별개의 프로모터의 조절하에 준하여 설계될 수 있다.

[0033] 단일, 또는 적은 수의 벡터를 통해 그런 인자를 제공하는 것에 이점이 있더라도, 최종 벡터 사이즈에 대한 상위 사이즈 제한이 존재하며, 이는 이들의 표적 숙주 세포로의 전달을 촉진하려는 시도를 방해할 수 있다. 예를 들어, 폴리스이트론성 벡터의 사용에 대한 초기 보고는 리프로그래밍의 종종 세포의 1% 미만, 더욱 대표적으로, 0.1% 미만으로 발생하는 극도로 저조한 효율로 유명하다. 이들 장애물은, 부분적으로, 큰 컨스트럭트에 대해 약한 내성을 가지는 특정 표적 숙주 세포 (예를 들어, 섬유아세포), 또는 숙주 세포에 의한 IRES 부위의 비효율적 처리에 기인한다. 게다가, 벡터 발현 카세트에서의 인자의 위치 선정은 이의 화학량론적 및 일시적 발현 모두에 영향을 미쳐, 리프로그래밍 효율에 영향을 미치는 추가적인 변수를 제공한다. 따라서, 일부 개선된 기술은 각각의 하나 이상의 리프로그래밍 인자를 다양한 발현 카세트에서 암호화하는 다수의 벡터에 의존한다. 이러한 설계 하에서, 전달할 특정 벡터의 양의 변경하는 것은 표적 세포에서 발현 수준을 조절하기 위한 거칠지만, 상대적으로 간단한 경로를 제공한다.

[0034] 본 발명에서 설명한 기술의 추가적인 이점은 ESC 배지 및/또는 E7 배지의 사용을 포함하는, 리프로그래밍 과정을 위한 정의된 배지 조건의 사용이다. 리프로그래밍 과정을 자극하기 위해 특정 첨가물 (예를 들어, L-아스코르브 산, 트랜스페린, 소듐 비카보네이트, 인슐린, 소듐 세레나이트 및/또는 bFGF)이 존재할 수 있으나, 혈청 또는 동물적 성분은 사용되지 않는다. 일부 경우에, 리프로그래밍이 일어날 화학적 및/또는 대기압 (atmospheric) 조건을 변경하는 것이 더 유리할 수 있다. 예를 들어, 주입-전 배이는 혈관이 없고 저산소 (골수 줄기-세포 적소와 유사하게)이기 때문에, 21% O₂의 대기압 대신 5% O₂의 저산소 조건 하에서 리프로그래밍하는 것이 리프로그래밍 효율을 증가시킬 기회를 더 제공할 수 있다. 유사하게, 화학적 유도 기술, 다른 리프로그래밍 연구에서 널리 사용되어 온 특히 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase, HDAC), 분자 억제제, 발프로산(valproic acid, VPA)이 리프로그래밍과 조합되어 사용되었다. 동시에, MAPK 카이네이즈 (MEK)-ERK ("MEK") 억제제 PD0325901, 전환 성장 인자 베타(transforming growth factor beta) ("TGF-β") 타입 I 수용체 ALK4, ALK5 및 ALK7 억제제 SB431542 및 글리코젠 합성 효소 카이네이즈(glycogen synthase kinase)-3 ("GSK3") 억제제 CHIR99021와 같은 다른 소분자들이 자기-재생을 지속하기 위해 다른 경로 (예를 들어, MAPK 카이네이즈 (MEK)-ERK 경로의 억제)의 조절과 결부된 분화-유도 경로 (예를 들어, BMP 신호전달)의 활성화에 적용되어 왔다. Y-27632 및 티아조비빈(티아조비빈) ("Tzv")과 같은 Rho-관련 코일드-코일-함유 단백질 카이네이즈(Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase) ("ROCK") 억제제와 같은 다른 소분자들이 pSC의 생존 촉진 및 특히 단일-세포 해리시 세포 사멸에 대한 취약성의 감소를 위해 적용되어 왔다.

[0035] 리프로그래밍을 위한 전달 벡터의 선택, 리프로그래밍 인자 조합 및 조건 외에, 추가적인 변경은 리프로그래밍을 위한 표적 숙주 세포의 성질이 고려되어야 한다. 현재까지, 섬유아세포, 위 및 간 세포 배양, 인간 각질 세

포, 지방 세포, 및 동결 인간 단핵구를 포함하는 다양한 세포가 리프로그래밍을 위한 공급원으로서 제공되었다. 명백히, 많은 조직 공급원에 걸쳐 탈분화를 위한 광범위하고 강력한 잠재력이 있다. 그렇지만, 공여 세포 유형에 따라 리프로그래밍이 다른 효율 및 동역학으로 달성되는 것이 널리 자명하다. 섬유아세포가 리프로그래밍 연구에서 가장 대중화된 세포 유형으로 남아있지만, Oct-4, Sox-2, Klf-4 및 c-Myc로 변환된 인간 일차 각질세포들과 같은 다른 유형의 세포가 100배 더 효율적이고 두-배 더 빠르게 리프로그래밍되는 것으로 보고되었다. 또한, 신경 전구 세포는 Oct-4만을 필요로하는 반면, 제대혈 세포와 같은 일부 다른 유형의 세포는 탈분화가 유지되도록 Oct-4 및 Sox-2와 같은 리프로그래밍 인자의 하위 집합만을 필요로할 수 있다. 특정 이론에 구속되지 않고, 특정 숙주 세포의 리프로그래밍 효율 및/또는 리프로그래밍 인자 요건에서의 차이는 리프로그래밍을 더 잘 할 수 있는 특정 리프로그래밍 인자 및/또는 고유한 후생적 상태의 높은 내재성 수준에 기인한다고 믿어진다.

[0036] 이러한 많은 다른 공급원이 iPSC의 생성을 위한 연구들에서 사용되었지만, 세포 리프로그래밍을 위한 거의 무제한적인 자원으로서의 편의 및 특성 때문에 말초 혈액 (PB) 유래 단핵 세포 (MNC)가 숙주 세포 후보로서 매우 매력적이다. 특히 PB 세포는 섬유아세포와 같은 다른 공급원 (예를 들어, 피부 생검)으로부터의 분리에 비해 상대적으로 분리가 쉽다 (예를 들어, 채혈). 이들 세포들은 리프로그래밍에 앞서 수고로운 배양 및 증식을 필요로하지 않음으로써, 리프로그래밍 iPSC가 얻어질 수 있는 전체 시간이 감소시킨다.

[0037] 성공적인 리프로그래밍 후에, 클론 선별로 다능성 줄기세포주를 생성한다. 이상적으로, 그러한 세포는 필수 형태 (즉, 조밀한 콜로니, 높은 핵 대 세포질 비율 및 두드러진 핵), 배양에서 무제한 증식에 대한 자기-재생능 (즉, 불멸화), 및 모든 세 배엽 (예를 들어, 내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로 분화할 수 있는 능력을 가진다. 세포의 특정한 집단의 다능성을 특징짓기 위한 추가적인 기술은 세 배엽 모두에 특유한 세포 또는 조직을 포함하는 테라토마의 형성을 위한, 중증합병형 면역결핍(severe combined immunodeficient) ("SCID") 마우스와 같은 면역손상된 동물로의 주입을 포함한다.

[0038] 상기의 예로서, 약, 뉴클레오펙션 당 5×10^6 개의 세포의 PBMC가 Amaxa Nucleofector 2D 기기 상의 V-024 프로그램과 Amaxa Human T-cell Nucleofector® Kit를 이용하여 플라스미드 혼합물 4p 또는 플라스미드 5p로 뉴클레오펙션되었다. 그 후 약 1×10^6 개의 세포가 미토마이신(mitomycin) 처리된 마우스 배아 피더 (MEF) 층으로 덮힌 또는 10 µg/ml의 라미닌-521 (L-521;BioLamina)으로 코팅된 6-웰 플레이트의 웰에 분주되었다. 7 인자: OCT4, SOX2, KLF4, LMYC, LIN28, SV40LT 및 p53 shRNA 를 발현하는 각 에피솜 플라스미드 (Addgene) (pEP4 E02S ET2K, pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLEhUL, pCXLE-hSK, 및 pCXLE-EBNA1). 이 방법은 외인성으로 도입된 유전자가 통합되지 않고 대신에 일시적 방식으로 에피솜에 발현되기 때문에 바이러스 형질도입보다 현저한 이점을 가진다. 세포는 2 mL의 αβ T-세포 배지 (30U/ml IL-2 및 5ul/웰의 Dynabeads Human T-activator CD3/CD28로 보충된 X-vivo10) 또는 비 T-세포 배지 (10% FBS, 10ng/ml IL-3, 10ng/ml IL-6, 10ng/ml G-CSF 및 10ng/ml GM-CSF로 보충된 αMEM)에 플레이팅되었다. 뉴클레오펙션 2일 후 이전 배지의 흡입 없이 5 ng/ml의 bFGF (MEF 조건) 또는 E7 배지 (L-521 조건)를 함유하는 영양류 ESC 배지 (ReproCell)를 동일한 양으로 웰에 추가하였다. 4일 차부터, 각 웰에서 배지를 부드럽게 흡입하였고 적절한 새 리프로그래밍 배지 2ml을 각 웰에 추가하였다. 배지는 격일로 교체되었다. 뉴클레오펙션 약 18일 후, 각 조건의 모든 웰에서 개별 콜로니가 관찰되었다. 뉴클레오펙션 약 25일 후, 개별 콜로니가 분리되었고 적절한 기질 및 배지를 함유하는 12-웰 플레이트의 1 웰로 서브클로닝되었다. 이들 뉴클레오펙션된 세포들은 피더-독립적인 BD Matrigel™ 성장 인자-감소된 Matrix (Corning/BD Biosciences, #354230) 상에 플레이팅되었다. 리프로그래밍 과정 동안 모든 배양은 20% O₂에서 유지되었다. ES/iPSC-유사 형태를 가진 개별 PBMC-iPSC 콜로니가 25-32일 사이에 나타났고 최상의 형태가 기계적으로 분리되고, 새 Matrigel™ Matrix를 채운 12-웰 플레이트로 옮겨졌으며, mTeSR®1 배지에서 유지되었다. 추가 분석을 위해 iPSC 클론을 추가로 증식하고 스케일업하였다. 모든 섬유아세포는 기술된 바와 같이 3p 리프로그래밍 플라스미드 혼합물로 리프로그래밍되었다.

[0039] 본 발명에서 기술된 것은 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포 ("BC-iPSC")의 조성물이다. 특정 구현예에서, 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포의 조성물은 일정량의 혈액 세포를 제공하고, 일정량의 리프로그래밍 인자를 혈액 세포로 전달하고, 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 4일 이상 배양함으로써 생성된 세포를 포함하며, 상기에서 리프로그래밍 인자의 전달, 및 배양은 혈액 세포 유래 유도 만능 줄기세포를 생성한다. 특정 구현예에서, 혈액 세포는 T-세포이다. 다른 구현예에서, 혈액 세포는 비-T 세포이다. 다른 구현예에서, 혈액 세포는 예를 들어, 말초혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하는 단핵 세포 (MNC)이다. 다른 구현예에서, 세포는 일차 과립구, 단핵구 및 B 림프구이다.

[0040] 특정 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Lin-28, SV40 대형 T 항원 ("SV40LT"), 및 p53 표적화 짧은 헤어핀 RNA ("shRNA-p53")이다. 다른 구현예에서, 이들 리프로그래밍 인자는 pEP4 E02S ET2K, pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL 및 pCXWB-EBNA1을 포함하는 벡터의 조합에서 암호화된다. 이는, 예를 들어, 약 0.5 - 1.0 ug의 pCXLE-hOCT3/4-shp53, 0.5 - 1.0 ug의 pCXLE-hSK, 0.5 - 1.0 ug의 pCXLE-UL, 약 0.25 - 0.75 ug의 pCXWB-EBNA1 및 0.5 - 1.0 ug의 pEP4 E02S ET2K를 이용하는 것을 포함한다. 이는, 예를 들어, 0.83ug의 pCXLE-hOCT3/4-shp53, 0.83ug의 pCXLE-hSK, 0.83ug의 pCXLE-UL, 0.5ug의 pCXWB-EBNA1 및 0.83 ug의 pEP4 E02S ET2K를 이용하는 것을 포함하며, 상기에서 SV40LT (pEP4 E02S ET2K에 암호화된) 및 EBNA-1 (pCXWB-EBNA1에 암호화된)의 화학량론적 비율은 말초혈액 단핵 세포를 포함하는 혈액의 비-T 세포 성분의 리프로그래밍을 지원한다. 다른 특정 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 PD0325901, CHIR99021, HA-100, 및 A-83-01을 포함한다. 다른 구현예에서, 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 배양하는 것은 4-30일 동안 수행된다. 다양한 구현예에서, 일정량의 리프로그래밍 인자의 전달 후에 혈액 세포는 처리된 세포 배양물 표면 상에 플레이팅된다. 다양한 구현예에서, 처리는 마우스 배아 섬유아세포와 같은 지지 세포의 플레이팅을 포함한다. 다른 구현예에서, 처리는 세포의 기질 단백질로 코팅하는 것을 포함한다. 다양한 구현예에서, 세포의 기질 단백질은 라미닌을 포함한다.

[0041] 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 세포주로서 연속 계대가 가능하다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 유전체 안정성을 가진다. 유전체 안정성은 통상의 기술 분야에 공지된 다양한 기술로 확인될 수 있다. 예를 들어, G-밴드 핵형 분석이 유전체 안정성이 결여된 비정상 세포를 동정할 수 있으며, 상기 비정상 세포는 약 10% 이상의 모자이크현상(mosaicism), 또는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 Mb보다 큰 하나 이상의 균형 전좌(balanced translocation)를 가진다. 또한, 유전체 안정성은 예를 들어, 섬유아세포와 같은 비-혈액 세포 공급원 유래 iPSC와 BC-iPSC를 비교하는 비교 유전체 혼성화(comparative genomic hybridization, aCGH) 마이크로어레이를 이용하여 측정될 수 있다. 유전체 안정성은 복제수 변이 (CNV), 중복/결실, 및 불균형 전좌를 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 평균 크기 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 Mb 이내의 증폭 및 결실을 나타낸다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 평균 크기 약 20-30 Mb 이내의 증폭 및 결실을 나타낸다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 평균 크기 약 30-40 Mb 이내의 증폭 및 결실을 나타낸다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 평균 크기 약 40-50 Mb 이내의 증폭 및 결실을 나타낸다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC에서 획득한 신규 증폭 및 결실의 평균 수는 약 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만이다. 예를 들어, fib-iPSC에서 신규 증폭 및 결실은 PBMC-iPSC에서보다 2-배 이상 많다.

[0042] 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 또한 하나 이상의 하기: Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Lin-28, SV40LT, shRNA-p53, nanog, Sall4, Fbx-15, Utf-1, Tert, 또는 miR-291-3p, miR-294 또는 miR-295와 같은 Mir-290 클러스터 마이크로 RNA를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 벡터에 의해 암호화된다. 다른 구현예에서, 벡터는 예를 들어, 비-통합 에피솜 벡터, 미니서클 벡터, 플라스미드, 레트로바이러스 (통합 및 비-통합) 및/또는 통상의 기술자에게 공지된 다른 유전적 요소일 수 있다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 하나 이상의 oriP/EBNA1 유래 벡터에 의해 암호화된다. 다른 구현예에서, 벡터는 하나 이상의 리프로그래밍 인자를 암호화하며, 벡터의 조합이 하나 이상의 Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Lin-28, SV40LT, shRNA-p53, nanog, Sall4, Fbx-15, Utf-1, Tert, 또는 miR-291-3p, miR-294 또는 miR-295와 같은 Mir-290 클러스터 마이크로 RNA를 전달하는데 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, oriP/EBNA1은 pCXLE-hUL, pCXLE-hSK, pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pEP4 E02S T2K 및 pCXWB-EBNA1과 같은 다수의 리프로그래밍 인자의 벡터 조합을 암호화할 수 있는 에피솜 벡터이다.

[0043] 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 그 중에서도 뉴클레오펙션, 트랜스펙션(transfection), 형질 도입(transduction), 전기세포융합(electrofusion), 전기천공법(electroporation), 미세주입법(microinjection), 세포 융합(cell fusion)와 같은 통상의 기술 분야에 공지된 기술로 전달된다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 RNA, 선형 DNA, 펩타이드 또는 단백질, 또는 다능성 줄기 세포의 세포 추출물로 제공된다.

[0044] 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 배아 줄기 세포 (ESC) 배지이다. 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 bFGF를 포함한다. 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 E7 배지이다. 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 E7 배지는 L-아스코르브 산, 트랜스페린, 소듐 비카보네이트, 인슐린, 소듐 세레나이트 및/또는 bFGF를 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 하나 이상의 화학 유도 소분자를 포함한다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 화학 유도 소분자는 PD0325901, CHIR99021, HA-100, A-83-01, 발프로산 (VPA), SB431542, Y-27632 또는 티아조비딘 ("Tzv")을 포함한다. 다른 구현예에서, BC를 리프로그래밍 배지에서 배양하는 것은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30일 이

상 동안 수행된다.

- [0045] 특정 구현예에서, BC-iPSC는 대상으로부터 사전에 예를 들어 대상으로부터 혈액 샘플을 채혈함으로써 분리한 혈액 세포로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 혈액 세포는 돌연변이 질병을 가진 대상으로부터 분리된다. 예를 들어, 임의의 수의 상염색체 우성(autosomal dominant), 열성(recessive), 반성(sex-linked) 돌연변이와 같은 돌연변이를 가진 대상이 상기 돌연변이를 가진 BC-iPSC를 생성하기 위한 혈액 세포의 공급원이 될 수 있다. 다른 구현예에서, 돌연변이 질병은 신경 퇴행성 질병, 장애 및/또는 질환과 관련된다. 다른 구현예에서, 돌연변이 질병은 염증성 장 질병, 장애, 및/또는 질환과 관련된다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 만능 줄기세포의 특성을 가진다. 만능 줄기세포의 일부 예시적인 특성은 통상의 기술자에 의해 인식되고 인정받은 특성들 중에서, *체외* 또는 *체내*로 면역 결핍 동물로 주입되었을 때 모든 세 배엽 (외배엽, 내배엽, 중배엽) 세포로의 분화, Oct-4, Sox-2, nanog, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA4와 같은 다능성 마커의 발현, 높은 수준의 알칼리포스파타아제 ("AP") 발현, 배양시 무한정 증식을 포함한다.
- [0046] 다른 구현예는 상기 기술된 방법으로 생성된 일정량의 혈액 세포 유래된 유도 만능 줄기세포 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 포함한다.
- [0047] 또한, 본 발명에 기술된 것은 일정량의 세포를 제공하고, 일정량의 리프로그래밍 인자를 세포로 전달하며, 세포를 리프로그래밍 배지에서 4일 이상 배양하고, 상기에서 리프로그래밍 인자를 전달하고, 배양하는 것은 유도 만능 줄기세포를 생성하는 것을 포함하는, 유도 만능 줄기세포를 생성하기 위한 효율적인 방법이다. 특정 구현예에서, 세포는 일차 배양 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 혈액 세포 (BC)이다. 특정 구현예에서, 혈액 세포는 T-세포이다. 다른 구현예에서, 혈액 세포는 비-T 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 예를 들어 말초혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하는 단핵 세포 (MNC)이다. 다른 구현예에서, 세포는 일차 과립구, 단핵구 및 B 림프구이다.
- [0048] 특정 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Lin-28, SV40 대형 T 항원 ("SV40LT"), 및 p53 표적화 짧은 헤어핀 RNA ("shRNA-p53")이다. 다른 구현예에서, 이들 리프로그래밍 인자는 pEP4 E02S ET2K, pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL 및 pCXWB-EBNA1을 포함하는 벡터의 조합에서 암호화된다. 이는, 예를 들어, 약 0.5 - 1.0 ug의 pCXLE-hOCT3/4-shp53, 0.5 - 1.0 ug의 pCXLE-hSK, 0.5 - 1.0 ug의 pCXLE-UL, 약 0.25 - 0.75 ug의 pCXWB-EBNA1 및 0.5 - 1.0 ug의 pEP4 E02S ET2K를 이용하는 것을 포함한다. 이는, 예를 들어, 0.83ug의 pCXLE-hOCT3/4-shp53, 0.83ug의 pCXLE-hSK, 0.83ug의 pCXLE-UL, 0.5ug의 pCXWB-EBNA1 및 0.83 ug의 pEP4 E02S ET2K를 이용하는 것을 포함하며, 상기에서 SV40LT (pEP4 E02S ET2K에 암호화된) 및 EBNA-1 (pCXWB-EBNA1에 암호화된)의 화학량론적 비율은 말초혈액 단핵 세포를 포함하는 혈액의 비-T 세포 성분의 리프로그래밍을 지원한다. 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 배아 줄기 세포 (ESC) 배지이다. 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 bFGF를 포함한다. 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 E7 배지이다. 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 E7 배지는 L-아스코르브 산, 트랜스페린, 소듐 비카보네이트, 인슐린, 소듐 세레나이트 및/또는 bFGF를 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 하나 이상의 화학 유도 소분자(small chemical induction molecule)를 포함한다. 다른 특정 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 PDO325901, CHIR99021, HA-100, 및 A-83-01을 포함한다. 다른 구현예에서, 혈액 세포를 리프로그래밍 배지에서 배양하는 것은 4-30일 동안 수행된다.
- [0049] 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 세포주로서 연속 계대가 가능하다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 유전체 안정성을 가진다. 유전체 안정성은 통상의 기술 분야에 공지된 다양한 기술로 확인될 수 있다. 예를 들어, G-밴드 핵형 분석이 유전체 안정성이 결여된 비정상 세포를 동정할 수 있으며, 상기 비정상 세포는 약 10% 이상의 모자이크현상(mosaicism), 또는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 Mb보다 큰 하나 이상의 균형 전좌(balanced translocation)를 가진다. 또한, 유전체 안정성은 예를 들어, 섬유아세포와 같은 비-혈액 세포 공급원 유래 iPSC와 BC-iPSC를 비교하는 비교 유전체 혼성화(comparative genomic hybridization, aCGH) 마이크로레이를 이용하여 측정될 수 있다. 유전체 안정성은 복제수 변이 (CNV), 중복/결실, 및 불균형 전좌를 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 평균 크기 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 Mb 이내의 증폭 및 결실을 나타낸다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 평균 크기 약 20-30 Mb 이내의 증폭 및 결실을 나타낸다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 평균 크기 약 30-40 Mb 이내의 증폭 및 결실을 나타낸다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC는 평균 크기 약 40-50 Mb 이내의 증폭 및 결실을 나타낸다. 다양한 구현예에서, BC-iPSC에서 획득한 신규 증폭 및 결실의 평균 수는 약 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만이다. 예를 들어, fib-iPSC에서 신규 증폭 및 결실은 PBMC-iPSC에서보다 2-배 이상 많다. 다양한 구현예에서, 방법은 세포주로서 연속적으로 계대되었을 때 4-8, 9-13, 13-17, 17-21, 21-25, 또는 29 또는 그 이상의 계대에 걸쳐 총괄적으로 약

20%, 15%, 10%, 5% 또는 그 미만의 비정상 핵형을 나타내는 iPSC 세포주를 생산한다.

[0050] 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 또한 하나 이상의 하기: Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Lin-28, SV40LT, shRNA-p53, nanog, Sall4, Fbx-15, Utf-1, Tert, 또는 miR-291-3p, miR-294 또는 miR-295와 같은 Mir-290 클러스터 마이크로 RNA를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 벡터에 의해 암호화된다. 다른 구현예에서, 벡터는 예를 들어, 비-통합 에피솜 벡터, 미니서클 벡터, 플라스미드, 레트로바이러스 (통합 및 비-통합) 및/또는 통상의 기술자에게 공지된 다른 유전적 요소일 수 있다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 하나 이상의 oriP/EBNA1 유래 벡터에 의해 암호화된다. 다른 구현예에서, 벡터는 하나 이상의 리프로그래밍 인자를 암호화하며, 벡터의 조합이 하나 이상의 Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Lin-28, SV40LT, shRNA-p53, nanog, Sall4, Fbx-15, Utf-1, Tert, 또는 miR-291-3p, miR-294 또는 miR-295와 같은 Mir-290 클러스터 마이크로 RNA를 전달하는데 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, oriP/EBNA1은 pCXLE-hUL, pCXLE-hSK, pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pEP4 E02S T2K 및 pCXWB-EBNA1과 같은 다수의 리프로그래밍 인자의 벡터 조합을 암호화할 수 있는 에피솜 벡터이다.

[0051] 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 그 중에서도 뉴클레오펙션, 트랜스펙션(transfection), 형질 도입(transduction), 전기세포융합(electrofusion), 전기천공법(electroporation), 미세주입법(microinjection), 세포 융합(cell fusion)와 같은 통상의 기술 분야에 공지된 기술로 전달된다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 인자는 RNA, 선형 DNA, 펩타이드 또는 단백질, 또는 다능성 줄기 세포의 세포 추출물로 제공된다. 특정 구현예에서, 리프로그래밍 인자의 전달 전에 세포는 나산염나트륨(sodium butyrate)으로 처리된다. 다른 구현예에서, 세포를 추가 배양 전에 조직 배양물 표면 상에서 1, 2, 3, 4일, 또는 그 이상 동안 인큐베이션하였다. 이는 예를 들어, 매트릭셀 코팅된 조직 배양물 표면 상에서의 인큐베이션을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 조건은 5% O₂와 같은 대기압 21% O₂ 미만인 표준-산소 조건의 적용을 포함한다.

[0052] 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 배아 줄기 세포 (ESC) 배지이다. 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 bFGF를 포함한다. 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 E7 배지이다. 다양한 구현예에서, 리프로그래밍 E7 배지는 L-아스코르브 산, 트랜스페린, 소듐 비카보네이트, 인슐린, 소듐 세레나이트 및/또는 bFGF를 포함한다. 다른 구현예에서, 리프로그래밍 배지는 하나 이상의 화학 유도 소분자를 포함한다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 화학 유도 소분자는 PD0325901, CHIR99021, HA-100, A-83-01, 발프로산 (VPA), SB431542, Y-27632 또는 티아조비딘 ("Tzv")를 포함한다. 다른 구현예에서, BC를 리프로그래밍 배지에서 배양하는 것은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30일 이상 동안 수행된다.

[0053] 리프로그래밍의 효율은 통상의 기술자에게 쉽게 이해되는 많은 기술들 중 하나로 쉽게 확인될 수 있다. 예를 들어, 효율은 리프로그래밍 인자의 한 세트를 받는 공여 세포의 수 및 생성된 리프로그래밍된 콜로니의 수 사이의 비율로 기술될 수 있다. GFP와 같은 리포터 유전자가 리프로그래밍 인자를 암호화하는 벡터에 포함된 경우 리프로그래밍 인자를 받는 공여 세포 수의 측정이 직접적으로 수행될 수 있다. 또는, 전달 효율의 간접적 측정이 리프로그래밍 인자 벡터를 전달하는 한 쌍의 샘플에서 전달 효율을 측정하기 위한 프록시로서 리포터 유전자를 암호화하는 벡터의 트랜스펙션에 의해 제공될 수 있다. 또한, 생성된 리프로그래밍된 콜로니의 수는, 예를 들어, 알칼리포스파타아제 (AP)-양성 클론, 전사 인자 Oct 또는 Nanog의 내재성 발현을 가진 콜로니, 또는 Tra-1-60와 같은 표면 마커의 항체 염색과 같은 하나 이상의 배아 줄기세포-유사 다능성 특징의 출현을 관찰함으로써 측정될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 효율은 유도 만능 줄기세포 생성의 동역학으로 기술될 수 있다. 예를 들어, 효율은 세포주로서 연속적으로 계대되었을 때 4-8, 9-13, 13-17, 17-21, 21-25, 또는 29 또는 그 이상의 계대에 걸쳐 총괄적으로 약 20%, 15%, 10%, 5% 또는 그 미만의 비정상 핵형을 나타내는 iPSC 세포주를 생산하는 방법을 포함하는, 정상 핵형의 세포주 생산을 포함할 수 있다.

[0054] 실시예 1

[0055] 혈액에 대한 일반적 iPSC 리프로그래밍 프로토콜

[0056] 일반적으로, 리프로그래밍 방법은 다음의 단계들을 수반한다. 동결된 말초혈액 단핵 세포 (PBMC), 또는 새롭게 분리된 PBMC가 사용될 수 있다. 처리된 세포 배양물 표면(Treated cell culture surfaces)은 해동되거나 또는 새롭게 분리된 PBMC의 플레이팅에 사용될 수 있다. 이는, 예를 들어, 마우스 배아 피더 (MEF) 또는 세포외기질 라미닌 L-521A으로 처리된 세포 배양물 표면을 포함한다. 다능성 인자의 조합을 인코딩하는, 발현 플라스미드 혼합물이 제공된다. 플라스미드가 예를 들어, 뉴클레오펙션을 이용하여 PBMC로 도입되었고, 그 후 처리된 세포 배양물 표면에 놓여진다. 2일간의 배양 후, 리프로그래밍 배지가 도입되며, 콜로니가 형성될 때까지 보충된

다.

- [0057] 실시예 2
- [0058] 말초 혈액 수집 및 리프로그래밍을 위한 최소 과정
- [0059] 발명자들은 인간 또는 포유류 말초 혈액(PB)의 새롭게 수집되거나 상업적인 공급원으로부터 림프구를 분리하는 과정을 확립했다. 그러한 샘플들의 수집 및 수송에 선호되는 포맷(format)은 CPT튜브이다. 이 포맷은 공급자가 수송 이전에 진공채혈관(vacutainer)을 원심분리하여 적혈구를 플라즈마성분으로부터 분리하는것을 허용한다. 프로토콜은 CPT튜브의 플라즈마 층으로부터 PBMC를 분리하는것을 제공한다.
- [0060] 선택적 테스트: 진공채혈관을 열기 전, HIV, B형 및 C형 간염, 및 매독을 포함한, 몇몇의 질병상태 테스트들이 수행될 수 있다. 후자의 테스트들의 결과는 수집일로부터 1-3 근무일 안에 제공되어야 한다. 양성 결과가 있다면, 샘플(들)은 적절히 폐기되어야 하며, 샘플들을 처리하는데 사용된 모든 실험실 장비들은 오염제거된다.
- [0061] 실시예 3
- [0062] 수집 절차
- [0063] (1) 적혈구 및 혈소판은 컨테이너를 사용해 고갈된다. 구연산 나트륨이 포함된 BD Vacutainer® CPT™ Tube 은 상온 (18-25℃) 에 보관되어야 하며 환자 신원 확인을 위해 적절히 레이블이 부착되어야 한다. CPT 진공채혈관에 70% 아이소프로판올/에탄올을 가볍게 뿌리고, 알코올을 제거.
- [0064] (2) 채혈은 샘플당 3개의 8ml CPT 튜브에 BD Vacutainer® Evacuated Blood Collection Tubes를 위한 표준 테크닉을 사용해 이루어진다. 채혈 후, 튜브는 원심분리 전까지 수직으로 세워져 상온에 보관된다. 혈액 샘플들은 최상의 결과를 위해 채혈 2시간 이내에 원심분리 되어야 한다.
- [0065] (3) 튜브/혈액샘플은 상온(18-25℃)에서 수평로터(swing-out head)로 최소 20분 (최대 30분)간 1500에서 1800 RCF (Relative Centrifugal Force)로 원심분리 된다.
- [0066] (4) CPT 튜브에 담긴 혈액의 경우 24시간 이내에 리프로그래밍을 수행된다: 원심분리 후, 단핵 세포 및 혈소는 플라즈마 층 아래의 회백색 층 안에 존재할 것이다 (도 1 참조). 분리된 단핵세포를 회복하는 대안적 절차는 열지 않은 BD Vacutainer® CPT™ 튜브를 부드럽게 5에서 10회 뒤집어서 세포들을 플라즈마에 재부유시키는 것이다. 이것이 원심분리 후 최대 24시간 동안 분리된 샘플을 저장 또는 운반하는데 선호되는 방법이다.
- [0067] 실시예 4
- [0068] 중요한 변수
- [0069] 온도: 분리의 원칙은 밀도 구배에 의존하고, 성분들의 밀도는 온도에 따라 변화하기에, 분리시의 시스템의 온도는 18-25℃ 사이로 통제되어야 한다.
- [0070] 원심분리: 분리의 원칙은 형성된 인자들의 분리 배지를 통한 움직임에 의존하기에, "RCF" 는 1500 RCF 에서 1800 RCF 사이로 통제되어야 한다. 원심분리의 시간은 최소 20분은 되어야 한다 (문제해결 섹션에 적혀있듯, 일부 검체는 최적의 분리를 위해 최대 30분을 필요로 할 수 있다). BD Vacutainer® CPT™ 튜브를 최대 30분간 원심분리 하는 것은 단핵세포 층의 적혈구 오염을 감소시키는 효과가 있다. 30분 이상의 원심분리는 거의 아무런 추가적인 효과가 없다. BD Vacutainer® CPT™ 튜브는 단핵세포 "밴드" 또는 층이 교란되지 않았다면 재-원심분리될 수 있다.
- [0071] 시간: 혈액 샘플들은 채혈 후 2시간 내에 원심분리 또는 분리 되어야 한다. 분리된 단핵세포층의 적혈구 오염은 샘플 분리의 지연에 따라 증가한다. 단핵세포 회수는 원심분리 이전의 시간 지연에 따라 감소하며, 24시간 후에는 약 40% 단핵세포 회수까지 떨어진다. 내용물(플라즈마 층)을 적절하게 레이블이 달린 50 mL 튜브에 붓는다.
- [0072] 실시예 5
- [0073] 리프로그래밍 절차 재료 및 공급원
- [0074] iPSC형성을 위한 분리된 전혈 샘플(말초혈액 단핵 세포 - PBMC)의 리프로그래밍 절차가 기술되었다. 사용된 재료들은 아래 표 1 - 4에 묘사된 다음의 것들을 포함한다: 멸균된 1.5 mL 에펜도르프 튜브; 멸균된 피펫 팁 (1000ul, 200ul, 10ul); Amaxa Nucleofector™ 2b Device (Lonza); 인간 T-세포 Nucleofector Kit (Lonza, Cat #VPA-1002); 준비된 MEF 6-well TC 플레이트 또는 L-521 코팅된 플레이트; 0.22um SteriFlip (선택적); 영

장류 ESC 배지 또는 E7 배지.

[0075] 사용된 리프로그래밍 플라스미드는 (1) pCXLE-hOCT3/4-shp53; (2) pCXLE-hSK; (3) pCXLE-UL; (4) pCXWB-EBNA1; (5) pEP4 E02S ET2K를 포함한다.

[0076] **표 1- αβT-세포 배지**

품목	농도
X-vivo10	
IL-2	30U/ml
Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (뉴클레오펙션 후에 추가될)	5ul/웰

[0077]

[0078] **표 2- 비-T 세포 배지**

품목	농도
αMEM	
FBS	10%
IL-3	10ng/ml
IL-6	10ng/ml
G-CSF	10ng/ml
GM-CSF	10ng/ml

[0079]

[0080] **표 3- MEF 배지 (선택적)**

품목	농도
DMEM	
FBS	10%
NEAA	1%
GlutaMax	1%

[0081]

[0082] **표 4- 제조된 영양류 ESC 배지 (선택적)**

품목	농도
영양류 ESC 배지	
bFGF	5 ng/ml

[0083]

[0084] **표 5- 제조된 E7 배지 (선택적)**

품목	농도
DMEM/F12	
L-아스코르브산	64ug/ml
트랜스페린	10.7ug/ml
소듐 비카보네이트	543ug/ml
인슐린	19.4ug/ml
소듐 세레나이트	14ng/ml
bFGF	100ng/ml

[0085]

[0086] **실시예 6**

[0087] **리프로그래밍 절차**

[0088] **-1일 - 플레이트 준비**

[0089] **MEF 플레이트** - 1. 6-웰 플레이트의 각 웰을 1 ml의 0.1% 젤라틴으로 코팅한다. 2. 플레이트를 37°C에서 최소 1 시간동안 인큐베이션한다. 3. LN2 탱크로부터 동결된 MEF 바이알을 수득한다. 4. 바이알을 수조에서 부드럽게 8 자 형태로 움직여 해동시킨다. 5. 해동된 세포를 15mL 코니칼 튜브로 수집. 6. 부피가 10mL이 되도록 서서히

MEF배지를 추가한다. 7. 튜브/MEF를 상온 (18-25℃)에서 1000 에서 1200 RPM (Relative Centrifugal Force) 으로 5분간 원심분리한다. 8. 세포들이 도는 동안, 6-웰 플레이트로부터 젤라틴을 흡입하고 각각의 웰에 1mL의 MEF 배지를 추가한다. 9. 원심분리가 정지되면, 코니칼을 꺼내 세포 펠릿을 교란하지 않게 상층액을 흡입한다. 10. 약 50,000 세포/ml이 얻어지도록 세포 펠릿을 충분한 MEF배지에 재부유시킨다. 11. 각각의 웰에 1mL의 세포 /MEF 배지 혼합물 추가한다. 12. MEF의 균일한 분포를 확실하게 하기 위해 플레이트를 와류한 후 하룻밤 동안 인큐베이터에 둔다. 13. L-521을 10ug/ml이 되도록 한개의 100ug/ml L-521 1mL바이알을 녹여 내용물을 9mL 멸균된 PBS에 추가해 준비한다. 14. 혼합물을 0.22um 필터 또는 SteriFlip을 통해 여과. 15. 1mL의 10ug/ml L-521 혼합물을 6-웰 플레이트의 각각의 웰에 추가한다. 16. 플레이트를 파라필름으로 포장 후 37℃ 인큐베이터에 2시간 동안 둔다. 17. 플레이트를 인큐베이터에서 제거해 4℃ 냉장고에 둔다.

[0090] **0일 - 냉동된 PBMC의 세포 준비**

[0091] 18. 각각 5e6개의 세포가 들어있는 2개의 냉동된 PBMC 바이알을 수조에서 "8자" 운동으로 작은 얼음 공이 남을 때 까지 해동한다. 19. 각각의 튜브의 내용물을 두개의 서로 다른 멸균된 15mL 코니칼 튜브에 수집 및 코니칼 튜브들을 튜브 1과 2로 레이블한다. 20. 멸균된 PBS를 각각의 튜브에 부피가 10mL 이 되도록 추가한다. 튜브들을 5회 뒤집어 세포들을 혼합한다. 21. 15분간 1000 RPM 에서 원심분리. 22. 25단계로 진행한다.

[0092] **새롭게 분리된 PBMC의 세포 준비**

[0093] 23. 새롭게 분리된 PBMC를 2개의 멸균된 15mL 코니칼에 각각 3e6개씩 넣음. 24. 19에서 22 단계 수행한다.

[0094] **리프로그래밍**

[0095] **L-521 로 코팅된 플레이트 사용시, 플레이트가 상온과 최소 1시간동안 평형을 이루도록 허용한다.** 25. 프로토콜에 따라 1.5mL 에펜도르프 튜브에 Lonza 뉴클레오펙션 수용액을 준비한다 (뉴클레오펙션 수용액 82ul + 반응 당 18ul 보충물). 튜브를 NS로 레이블한다.

[0096] **참조: 각각의 반응은 두번씩 수행된다; 한번은 T-세포 조건을 위해 및 한번은 비 T-세포 조건을 위해. 모든 반응을 위한 NS 마스터 혼합을 준비해도 좋다.**

[0097] 26. 1.5mL에펜도르프 튜브에, **각각의 반응을 위해** 다음과 같이 발현 플라스미드 혼합물 3.83ug을 준비한다:

[0098] i. pCXLE-hOCT3/4-shp53: 0.83ug

[0099] ii. pCXLE-hSK : 0.83ug

[0100] iii. pCXLE-UL: 0.83ug

[0101] iv. pCXWB-EBNA1: 0.5ug

[0102] v. pEP4 E02S ET2K: 0.83ug

[0103] 27. 6mL의 T-세포 배지로 15mL 코니칼을 준비한다. 28. 6mL의 비 T-세포 배지로 15mL 코니칼을 준비한다. 29. 세포를 포함한 15mL코니칼 중 하나에서 상층액을 흡입한다. 30. 세포 펠릿을 떨어뜨리기 위해 부드럽게 가볍게 친다. 31. 세포 펠릿에 NS 혼합물 100ul을 추가한 후 3-4회 부드럽게 피펫팅한다. 32. NS/세포 혼합물의 총 부피를 플라스미드 혼합물이 포함된 1.5mL 에펜도르프 튜브에 옮기고 3-4 회 피펫팅하여 혼합한다. 33. NS/세포/플라스미드 혼합물의 총 부피를 Lonza T-세포 키트에 제공된 유리 큐벳으로 옮긴다. 34. 큐벳을 Amax nucleofector에 넣고 V-024 프로그램을 실행한다. 35. Lonza T-세포 키트에 제공된 플라스틱 피펫 팁을 사용해, 소량의 T-세포 배지를 유리 큐벳에 옮긴 후 큐벳의 모든 내용물을 T-세포 배지 6mL이 포함된 15mL 코니칼로 옮긴다. 36. 세포가 포함된 두 번째 15mL 코니칼에 29 - 34 단계를 반복하고, 37 단계로 진행한다.

[0104] 37. Lonza T-세포 키트에 제공된 플라스틱 피펫 팁을 사용해, 소량의 비 T-세포 배지를 유리 큐벳에 옮긴 후 큐벳의 모든 내용물을 비 T-세포 배지 6mL이 포함된 15mL 코니칼로 옮긴다.

[0105] **플레이팅(Plate Down)**

[0106] **MEF/ 영양류 ESC 조건**

[0107] 38. 각각의 웰에서 MEF 배지 제거한다. 39. 1mL의 멸균된 PBS로 각각의 웰을 헹굼. 40. 35 단계의 15mL 코니칼의 전체 내용물을 상부 3 웰에 각각 2mL씩 더함으로써 옮긴다. 41. Dynabeads Human T-activator CD3/CD28를 각 웰에 5ul씩 추가한다. 42. 37 단계의 15mL 코니칼의 전체 내용물을 하부 3 웰에 각각 2mL씩 더함으로써 옮긴다.

다. 43. 플레이트를 37°C 인큐베이터에 넣는다.

[0108] **L-521/ E7 조건**

[0109] 44. 각 웰에서 L-521 흡입한다. 45. 35 단계의 15mL 코니칼의 전체 내용물을 상부 3 웰에 각각 2mL씩 더함으로 써 옮긴다. 46. Dynabeads Human T-activator CD3/CD28를 각 웰에 5uL씩 추가한다. 47. 37 단계의 15mL 코니칼의 전체 내용물을 하부 3 웰에 각각 2mL씩 더함으로써 옮긴다. 48. 플레이트를 37°C 인큐베이터에 넣는다.

[0110] **2일**

[0111] 49. 뉴클레오펙션 후 2일에, 2ml 의 적절한 리프로그래밍 배지 (영장류 ESC + bFGF or E7) 를 각각의 웰에 추가 한다. **웰에서 무엇도 흡입하지 말것.**

[0112] **4-25+일**

[0113] 50. 4일부터, 각각의 웰로부터 부드럽게 배지를 흡입하고 2ml의 새로운 리프로그래밍 배지를 각각의 웰에 추가 한다. **이는 매일 수행될 것이다.**

[0114] **25+일**

[0115] 51. 폴드(pulled) 유리 피펫을 사용해, 개별 콜로니를 분리하고 단독 콜로니를 적절한 기질을 포함한 12 웰 디쉬의 한 웰로 옮긴다.

[0116] **실시예 7**

[0117] 다양한 품질 관리 분석이 만능 줄기세포의 적절한 형성을 확인하기 위해 수행될 수 있다. pSC 형성의 바람직한 특징들을 예측하는 시험들의 예들이 표 1에 제시되었다.

[0118] **표 1- iPSC QC 분석**

테스트	분석/키트	결과
마이코플라스마 테스트	MycAlert - Lonza	음성
알칼리포스파타아제 (AP) 염색	알칼리성 포스파타아제 염색 키트 II - Stemgent	양성
다능성 마커 - Oct, SSEA4, Nanog, Tra-1-60, Tra-1-81 에 대한 면역세포화학 (ICC)	ICC 염색	양성
켜진(turned on) 내재성 다능성 유전자 - OCT4, SOX2, LIN28, KLF4, L-myc	qPCR	양성 유전자 발현
외인성 유전자 존재 결핍	qPCR	음성 유전자 발현
G-밴드 핵형 분석	N/A	정상 인간 핵형
일루미나(Illumina) 유전자-칩 발현 및 바이오인포메틱스 분석	다능성 시험	다능성 점수 >20, 세 점수 <1.6
EB 형질 및 삼-계통(Tri-lineage) 유전자 발현	TaqMan iPSC 스코어 카드 - Life Technologies	내배엽, 외배엽 및 중배엽에 대해 양성
짧은 반복 서열 (Short tandem repeat, STR) 프로파일 및 중간 오염 테스트	Cell Check 9 - IDEXX	샘플의 유전적 프로파일이 부모 유전자 프로파일과 동일하게 일치한다. 샘플들은 인간 기원이고 포유류 종간이 아님이 확인되었다. 오염이 감지된다.
T-세포 클론형성능(Clonality) 분석 (전혈 유래 iPSC 세포주에 대해)	TCRB + TCRG T-세포 클론성 Assay™ Gel 디터민 - Invivoscribe	클론 TCR 베타 유전자 재배열의 존재 (T-세포) 또는 결핍 (비 T-세포)

[0119] **실시예 8**

[0120] **알칼리포스파타아제 염색**

[0121] BC-iPSC의 특성화를 위해, 알칼리포스파타아제 염색이 알칼리포스파타아제 염색 키트 II (Stemgent, Cat no. 00-0055)를 생산자의 지시에 따라 수행될 수 있다.

[0122] **실시예 9**

[0123] **면역조직/세포화학**

- [0125] BC-iPSC의 추가적 특성화를 위해, BC-iPSC 또는 분화된 세포가 유리 커버슬립 또는 광학-바닥 96 웰 플레이트 (Thermo, # 165305)에 플레이팅 된 후 4% 파라포름알데하이드로 고정될 수 있다. 장 오가노이드들은 4% 파라포름알데하이드로 고정한 후, 30% 수크로스로 옮겨져, HistoPrep (Thermo Fisher Scientific)에 임베딩된 후, 20 μ m 섹션으로 잘릴 수 있다. 모든 세포들은 0.1% Triton X-100 이 들어있는 5 - 10 % 염소 또는 당나귀 혈청으로 블로킹 되고 일차 항체와 상온에서 3시간 또는 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션 된다. 세포들은 그 후 행귀지고 종 특이적 AF488 또는 AF594 키뉴게이트 된 이차 항체와 인큐베이션한 후 핵을 대조 염색 하기 위해 Hoechst 33258 (0.5 μ g/ml; Sigma) 와 인큐베이션된다.
- [0126] 면역세포화학 및 면역블로팅에 적절한 항체들은 다음을 포함한다: (항원, 희석, 카탈로그 번호, 아이소타입 및 생산자로 나열) SSEA4, 1:250, MAB4304, mIgG3, Millipore; TRA-1-60, 1:250, 09-0010, IgM, Stemgent; TRA-1-81, 1:250, 09-0011, mIgM, Stemgent; OCT4, 1:250, 09-0023, Rabbit IgG, Stemgent; NANOG, 1:250, 09-0020, Rabbit IgG, Stemgent; SOX2, 1:500, AB5603, Rabbit IgG, Millipore; TuJ1 (β 3-tubulin), 1:1000, T8535, mIgG2b, Sigma; CDX2, 1:500, NBP1-40553, IgG, Novus; FABP2, 1:500, AF3078, IgG, R & D systems; Collagen Type 1, 1:500, 600-401-103-0.1, Rabbit Rockland; CD73, 1:500, 550257, mIgG1, BD Pharmingen; NKX6.1, 1:100 F55A10, mIgG1, DSHB Iowa; HB9, 1:25, 81.5C10, mIgG1, DSHB Iowa; ISEL1, 1:250, AF1837, Goat IgG, R & D systems; SMI32, 1:1000, SMI-32R, mIgG1, Covance; CHAT, 1:250, AB144P, Goat IgG, Millipore; SMN, 1:250, 610647, mIgG1, BD Biosciences; Cox-IV, 1:1000, 4850s, Rabbit Cell signaling; GAPDH, 1:1000, ab9484, mIgG2b, Abcam.
- [0127] *실시예 10*
- [0128] *유세포분석법*
- [0129] 추가적인 특성화는 유세포분석법을 포함할 수 있다. 구체적으로, BC-iPSC가 Accutase (Millipore, #SCR005)를 사용해 단일 세포 부유로 분리 된다. iPSC의 표면 염색은 SSEA4 (R&D Systems, FAB1435A)을 사용해 수행된다.
- [0130] 세포들은 그 후, 고정되고 투과성으로 만들어져 세포내에서 Oct3/4 (BD Pharmingen, 560186) 가 염색되었다. 추천되는 아이소타입들이 항체 추천 (R&D Systems, FABIC007 및 BD Pharmingen, 562547)에 의거해 사용되었다. 모든 샘플들은 BD FACSDiva 소프트웨어를 사용하는 BD LSRFortessa 유세포분석기를 사용해 분석되었다. 모든 이미지는 FloJo 소프트웨어를 사용해 형성되었다..
- [0131] *실시예 11*
- [0132] *핵형*
- [0133] 핵형 분석은 또한 다음과 같이 수행될 수 있다. 인간 BC-iPSC Colcemid (100 ng/mL; Life Technologies)에서 30분 간 37°C에서 인큐베이션되고 TrypLE를 사용해 10분 간 분해된다. 이들은 인산염 완충 식염수 (PBS)로 세척 되고 저장액 5mL (물 400mL 중의 1g KCl, 1g Na 시트레이트)에서 30분 간 37°C에서 인큐베이션될 수 있다. 세포들은 1500 RPM에서 2.5분간 원심분리 되고 고정액 (메탄올:아세트산, 3:1)에 상온에서 5분 간 재부유될 수 있다. 이는 2회 반복되며, 최종적으로 세포들은 500 μ l 고정용액에 재부유되어 G-밴드 핵형 분석을 위해 Cedars-Sinai Clinical Cytogenetics Core에 넘겨질 수 있다.
- [0134] *실시예 12*
- [0135] *PluriTest*
- [0136] PluriTest는 다능성의 강건한 측정을 제공한다. 총 RNA 는 RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 사용해 분리된 후 Human HT-12 v4 Expression BeadChip Kit (Illumina)로 분석될 수 있다. 미가공 데이터 파일 (idat file)은 이후 PluriTest 위젯 온라인 (www.pluritest.org)에 업로드 되었다.
- [0137] *실시예 13*
- [0138] *정량적 RT-PCR*
- [0139] RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 이용하여 총 RNA가 분리되었고, 1 ug의 RNA가 전사 시스템 (Promega)을 이용한 cDNA를 만드는데 사용되었다. QRT-PCR이 특정한 프라이머 서열 (표2)들을 사용해 표준조건 하에서 수행되었다. "CDS" 는 총 내재적 유전자 만의 발현의 코딩 서열 측정된 발현을 위해 디자인된 프라이머를 나타내는 반면, "PIa"는 플라스미드 전이유전자 발현 만을 위해 디자인된 프라이머들을 나타낸다. 데이터는 평균 \pm SEM으로 나

타난다.

[0140] 표 2- qRT-PCR 프라이머 서열

유전자 명칭	정방향 프라이머	역방향 프라이머
OCT3/4 CDS	ccccagggccccattttgggtacc (서열번호 1)	acctcagtttgaatgcatgggagagc (서열번호 2)
OCT3/4 Pla	cattcaactgaggtaagggg (서열번호 3)	tagcgtaaaaggagcaacatag (서열번호 4)
SOX2 CDS	ttcacatgtcccagcactaccaga (서열번호 5)	tcacatgtgtgagagggcagtgctg (서열번호 6)
SOX2 Pla	ttcacatgtcccagcactaccaga (서열번호 7)	ttgtttgacaggagcgacaat (서열번호 8)
KLF4 CDS	accctccttctgcccgatcaga (서열번호 9)	ttggtaatggagcggcggacttg (서열번호 10)
KLF4 Pla	ccacctccttacacatgaaga (서열번호 11)	tagcgtaaaaggagcaacatag (서열번호 12)
LMYC CDS	gcgaaccaagaccaggcctgctcc (서열번호 13)	cagggggtctgctgcaccgtgatg (서열번호 14)
LMYC Pla	ggctgagaagaggatggctac (서열번호 15)	ttgtttgacaggagcgacaat (서열번호 16)
LIN28 CDS	agccataggtgacctatgtccgc (서열번호 17)	tcaattctgtcctccggagcaggtagg (서열번호 18)
LIN28 Pla	agccataggtgacctatgtccgc (서열번호 19)	tagcgtaaaaggagcaacatag (서열번호 20)
RPL13A	cctggaggagaagaggaaaga (서열번호 21)	ttgaggacctctgttatattg (서열번호 22)
B2M	tgctgtctccatgtttgatgt (서열번호 23)	tctctctccccaccttaag (서열번호 24)
EBNA1	atcagggcccaagacatagaga (서열번호 25)	gccaatgcaactggacgtt (서열번호 26)
EBNA 2	catagaagaagaaggatgaaga (서열번호 27)	gtagggattcgagggaattactga (서열번호 28)
LMP1	atggaacacgaccttgaga (서열번호 29)	tgagcaggatgaggtctagg (서열번호 30)
BZLF1	cacctcaacctggagacaat (서열번호 31)	tgaagcaggcgtggttcaa (서열번호 32)
OriP	tcgggggtgttagagacaac (서열번호 33)	ttcacgagggttagtgaacc (서열번호 34)
GAPDH	accacagtccatgcccacac (서열번호 35)	tccaccacctgttgctgta (서열번호 36)
TDGF	tccttctacggacggaactg (서열번호 37)	agaaatgcctgaggaaagca (서열번호 38)
NCAM1	gattcctctccaccctcac (서열번호 39)	caatattctgcctggcctggatg (서열번호 40)
HAND1	ccacacctcagagccatt (서열번호 41)	cacccaccacaaaacctt (서열번호 42)
MSX1	cgagaggacccgtggatgcagag (서열번호 43)	ggcggccatctcagcttccag (서열번호 44)
AFP	gaatgctgcaactgaccagctggaac (서열번호 45)	tggcattcaagagggtttcagctgga (서열번호 46)
SMN PCR-RFLP	ctatcatgtggctgcct (서열번호 47)	ctacaacaccttctcacag (서열번호 48)

[0141]

[0142] 실시예 14

[0143] PBMC vs. 섬유아세포-유래 iPSC 세포주의 세포유전학적 안정성

[0144] 표 3A- PBMC의 세포유전학적 안정성

BC-iPSC		
설명	수	이상 %
총 iPSC 세포주	90	3.3%
총 이상(비정상)	3	
*비-클론 이상(aberration)을 포함한 총계	3	3.3%

[0145]

[0146] 표 3B- PBMC의 세포유전학적 안정성

섬유아세포-iPSC		
설명	수	이상 %
총 iPSC 세포주	242	25.6%
총 이상	62	
*비-클론 이상을 포함한 총계	17	7.0%

[0148] 실시예 15

[0149] PBMC vs. 섬유아세포-유래 iPSC 세포주 어레이 CGH의 세포유전학적 안정성

[0150] 표 4A- PBMC의 세포유전학적 안정성

BC-iPSC	
설명	수
총 iPSC 세포주	7
신규* amp/dels	4
평균 신규 amp/dels	0.6
계대 당 신규 amp/dels	0.036

[0151]

[0152] 표 4B- PBMC의 세포유전학적 안정성

섬유아세포-iPSC	
설명	수
총 iPSC 세포주	6
신규 amp/dels	19
평균 신규 amp/dels	3.2
계대 당 신규* amp/dels	0.136

[0153]

[0154] * 부모 공여자 조직 aCGH 프로파일과 비교할 때 신규 또는 결실은 리프로그래밍 및/또는 각각의 iPSC 세포주의 증식 동안 새롭게 획득한 증폭 또는 결실이다.

[0155] 특정한 세포주를 포함해, BC-iPSC의 우수한 특성을 입증하는 다양한 결과들이 보여진다. MEF에 대한 말초혈액 단핵 세포 (PBMC) 에 기반한 에피솜 리프로그래밍의 높은 성공률이 표 5에 보여진다. 섬유아세포-유래 iPSC에서 G-밴드 핵형 분석으로 관찰된 개별 염색체 단계에서 서로 다른 종류의 핵형 이상 빈도 Rearr. - 재배열; Inv. - 역위; Der. - 번이가 표6에 보여진다. 정의된 E7리프로그래밍 배지에서의 인간 재조합 라미닌 521에 대한 혈액 기반한 리프로그래밍의 성공률이 표7에 보여진다. 매트릭셀 기질과 정의된 E7리프로그래밍 배지에서의 혈액 기반한 에피솜 리프로그래밍의 성공의 부재가 표8에 보여진다.

[0156] 표 5- MEF 상에서 말초혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 에피솜 리프로그래밍(episomal reprogramming)의 높은 성공률.

주	조건	생(fresh)/동결	개시 세포 수	플라스미드	중-T	선발된	효율		중-NT		선발된-NT	
							효율	성공률	효율	성공률	효율	성공률
02CTR	MEF/PESC	생	3.00E+06	4P	22	22	7.33E-04	1	3	3	1.00E-06	1
03CTR	MEF/PESC	생	3.00E+06	4P	9	9	3.00E-04	1	8	8	2.67E-06	1
03CTR	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	4P	5	5	1.00E-04	1	0	0	0.00E+00	0
14hALS-	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	21	21	4.20E-04	1	2	2	4.00E-07	1
80CTR-#2	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	10	10	2.00E-04	1	0	0	0.00E+00	0
51hALS-	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	12	8	2.40E-04	1	2	2	4.00E-07	1
89hALS-	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	15	15	3.00E-04	1	14	14	2.80E-06	1
138hALS-	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	5	5	1.00E-04	1	0	0	0.00E+00	0
152hALS	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	7	7	1.40E-04	1	0	0	0.00E+00	0
07IASD	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	18	18	3.60E-04	1	12	12	2.40E-06	1
53hALS-80DIAV	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	9	8	1.80E-04	1	15	13	3.00E-06	1
134hALS-C9	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	8	8	1.60E-04	1	12	12	2.40E-06	1
58hALS-C9	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	4	4	8.00E-05	1	2	2	4.00E-07	1
37hALS-C9	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	0	0	0.00E+00	0	NP	NP		
79CTR	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	0	0	0.00E+00	0	NP	NP		
98hALS-	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	6	6	1.20E-04	1	3	3	6.00E-07	1
700CTR-	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	12	12	2.40E-04	1	9	9	1.80E-06	1
012IASD	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	12	12	2.40E-04	1	1	1	2.00E-07	1
776C1N6	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	12	12	2.40E-04	1	5	5	1.00E-06	1
013CTR	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			12	12	2.40E-06	1
770C1N6	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	12	12	2.40E-04	1	12	12	2.40E-06	1
013CTR	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			12	12	2.40E-06	1
XH7CTR	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			12	12	2.40E-06	1
WP3CTR	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			12	12	2.40E-06	1
FP5CTR	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			1	1	2.00E-07	1
702GAN	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			12	12	2.40E-06	1
H16fNDh-xx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			12	12	2.40E-06	1
3616GAN-xx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
012fGAN-xx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
2EVPALS-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
7YXhALS-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			4	4	8.00E-07	1
9XZALS-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			2	2	4.00E-07	1
6MBhALS-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
5XVDALS-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
7MhALS-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
0IGZALS-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	5	1.20E-06	1
9ZZALS-xx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
7AF6ALS-xx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			9	7	1.80E-06	1
2UNhALS-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
1DGfALS-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			7	7	1.40E-06	1
9GXDAL-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
2FNhALS-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
6PYDAL-ixx	MEF/PESC	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP			6	6	1.20E-06	1
평균							2.20E-04	90.00%			1.40E-04	90.24%

[0157]

[0158]

[0159]

[0160]

[0161]

[0162]

NP: 수행되지 않음

T: T 세포리프로그래밍 방법

NT: 비-T 세포 리프로그래밍 방법

4P/5P: 4 또는 5 플라스미드상의 리프로그래밍 인자

표 6- 상이한 유형의 핵형 이상의 빈도

염색체	이상 %						랭크			
	총	획득	소실	재배열(Re arr.)	역위(Inv.)	변이(Der.)	총	획득	소실	재배열
chr1	11.8%	15.8%	0.0%	13.9%	0.0%	0.0%	2	2	8	1
chr2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	21	13	8	16
chr3	4.9%	5.3%	7.7%	2.8%	0.0%	0.0%	9	6	3	11
chr4	2.1%	0.0%	0.0%	8.3%	0.0%	0.0%	12	13	8	4
chr5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	21	13	8	16
chr6	6.9%	10.5%	0.0%	5.6%	0.0%	0.0%	6	4	8	7
chr7	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	21	13	8	16
chr8	4.2%	5.3%	0.0%	5.6%	0.0%	0.0%	10	6	8	7
chr9	2.1%	0.0%	0.0%	8.3%	0.0%	0.0%	12	13	8	4
chr10	0.7%	0.0%	0.0%	2.8%	0.0%	0.0%	19	13	8	11
chr11	6.9%	13.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	6	3	8	16
chr12	11.1%	21.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3	1	8	16
chr13	13.2%	7.9%	7.7%	13.9%	100.0%	100.0%	1	5	3	1
chr14	5.6%	5.3%	0.0%	11.1%	0.0%	0.0%	8	6	8	3
chr15	3.5%	2.6%	7.7%	2.8%	0.0%	0.0%	11	11	3	11
chr16	1.4%	2.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	15	11	8	16
chr17	1.4%	0.0%	7.7%	0.0%	0.0%	0.0%	15	13	3	16
chr18	1.4%	0.0%	7.7%	0.0%	0.0%	0.0%	15	13	3	16
chr19	1.4%	0.0%	0.0%	5.6%	0.0%	0.0%	15	13	8	7
chr20	2.1%	0.0%	0.0%	8.3%	0.0%	0.0%	12	13	8	4
chr21	8.3%	5.3%	23.1%	5.6%	0.0%	0.0%	5	6	2	7
chr22	0.7%	0.0%	0.0%	2.8%	0.0%	0.0%	19	13	8	11
chrX	10.4%	5.3%	38.5%	2.8%	0.0%	0.0%	4	6	1	11

[0163]

[0164] 표 7- 인간 재조합 라미닌 521에 대한 혈액-기반 리프로그래밍의 성공률

02iCTR	MEF/PESC	생	3.00E+06	4P	22	22	7.33E-04	1	3	3	1.00E-06	1
02iCTR	L521/E7	생	3.00E+06	4P	3	3	1.00E-04	1	1	1	3.33E-05	1
03iCTR	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	19	12	3.80E-04	1	34	12	6.80E-04	1
14isALS-	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	4P	0	0	0.00E+00	0	0	0	0.00E+00	0
80iCTR-	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	4	4	8.00E-05	1	0	0	0.00E+00	0
80iCTR-#2	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP	NP		0	0	0.00E+00	0
89iALS-	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	49	15	9.80E-04	1	0	0	0.00E+00	0
138iALS-	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	4P	0	0	0.00E+00	0	0	0	0.00E+00	0
07iCTR-	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	49	16	9.80E-04	1	102	18	2.04E-03	1
179iCTR-	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP	NP		1	1	2.00E-05	1
201iCTR-	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	6	6	1.20E-04	1	4	4	8.00E-05	1
202iCTR-	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	0	0	0.00E+00	0	4	4	8.00E-05	1
206iCTR	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	5	5	1.00E-04	1	NP	NP	NP	
166isALS	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	5	5	1.00E-04	1	NP	NP	NP	
276iCTR	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	12	12	2.40E-04	1	36	12	7.20E-04	1
6PYDiALS-ixx	L521/E7	동결 보존된	5.00E+06	5P	NP	NP	NP		6	6	1.20E-04	1
평균							2.57E-04	75.00%			2.90E-04	61.54%

[0165] NP: 수행되지 않음

[0167] T: T 세포리프로그래밍 방법

[0168] NT: 비-T 세포 리프로그래밍 방법

[0169] 4P/5P: 4 또는 5 플라스미드 상의 리프로그래밍 인자

[0170] 표 8- 매트릭셀 기질 상에서의 혈액-기반 에피솜 리프로그래밍의 상대적인 성공 기여

CS02iCTR	MG/LCL RM	생	3.00E+06	4p	0	0	0.00E+00	0	0	0	0.00E+00	0
CS03iCTR	MG/E7	동결	5.00E+06	4p	0	0	0.00E+00	0	0	0	0.00E+00	0
6PYDiALS	2[MG]/E7	동결	5.00E+06	5p	NP	NP			0	0	0.00E+00	0
평균							2.57E-04	75.00%			2.90E-04	61.54%

[0171] NP: 수행되지 않음

[0173] T: T 세포리프로그래밍 방법

[0174] NT: 비-T 세포 리프로그래밍 방법

[0175] 4P/5P: 4 또는 5 플라스미드 상의 리프로그래밍 인자

[0176] 실시예 16

[0177] 채혈한 혈액으로부터 분리한 PBMC는 신뢰성있게 iPSC로 리프로그래밍된다.

[0178] 저렴하고 비교적 쉽게 사용할 수 있기 때문에, 피부 생검으로부터 얻어진 피부 섬유아세포는 iPSC 리프로그래밍 재료의 가장 흔한 공급원이었다. 그러나, 채혈에 비해, 피부 편칭 생검은 3-4mm의 크기이며 국소 마취를 필요로 하는 종종 고통스러운 절차이다. 피부생검 유래의 섬유아세포에 비해, 혈액은 병원 내원시 환자 조직의 더욱 접근 가능한 원천이며, 따라서, 환자와 임상의 모두에게 더 선호되는 iPSC 리프로그래밍을 위한 공급원 조직의 선택지이다. 말초혈액으로부터 동원된 CD34⁺ 세포를 포함해, 다양한 인간 혈액 리프로그래밍 방법들이 혼성의 효율성과 함께 보고되었다 (ref). 제대혈에서 분리되지 않는 한, CD34⁺ 세포는 G-CSF동원을 며칠간 진행하고 있는 환자의 말초혈액 또는 골수로부터 대개 분리된다. 리프로그래밍을 위한 충분한 세포수를 생성하기 위해, 분리된 CD34⁺ 전구 세포는 배양액에서 복잡하고 값비싼 프로토콜로 농축되고 증식될 필요가 있다. 발명자들은 에피솜 리프로그래밍 플라스미드를 사용하여 이전의 세포 증식 또는 CD34⁺ 세포 분리 없이 말초혈액 채혈로부터 새롭게 분리된 PBMC를 리프로그래밍 하는데 성공했다. 그러한 접근은 환자의 생-검체를 수집한 시간으로부터 엄격히 성격 규정된 iPSC를 생성하기까지 환자의 리프로그래밍된 iPSC를 얻는데에 가장 빠르고 가장 비용 대비 효과적인

접근을 제공한다.

- [0179] iPSC "미래-보장(future-proofing)"을 가능하게 하는, 환자 채혈로부터 훨씬 이후 날짜의 iPSC 세포주 생성 뿐만 아니라 다수의 대상으로부터 큰 코호트의 PBMC를 동시에 리프로그래밍 하는 것은 생존 가능한 세포를 신뢰 가능하게 회복할 PBMC 동결 보존 단계를 필요로 한다. 추가적으로, 이 절차는 대표적인 환자들로부터 잘 동결 보존된 PBMC의 선택적 코호트가 더 거대한 유전형-표현형 정보가 사용 가능하게 되면 iPSC로 전환될 수 있기 때문에, 융통성있다. 그러나, 다수의 개인으로부터의 동결 보존된 PBMC가 *POU5F1*, *SOX2*, *KLF4*, *LIN28*, *L-MYC*, *p53* shRNA를 발현하는 에피솜 플라스미드를 가지는 iPSC로 리프로그래밍 되었을 때, 발명자들은 PBMC 세포 종류, ECM 기질 및 배지에 상관없이 심지어 35 - 40 일 이후에도 식별할 수 있는 iPSC 클론을 분리하는데 유의 미한 변동성을 관찰했다. T 리프로그래밍 방법은 오직 33%의 PBMC 샘플들에서 성공적이었던 반면, 동결보존된 PBMC에 사용된 비-T 방법은 어떠한 클론 iPSC 세포주도 결과로 도출하지 않았다 (데이터 미도시).
- [0180] 중요하게, 발명자들의 손에서 PBMC 리프로그래밍의 신뢰성은 발명자들이 (a) PBMC 세포 사멸을 최소화 하고 리 프로그래밍 인자 플라스미드 발현을 유지하기 위해 SV40 대형 T 항원 (SV40LT) 및 EBNA-1을 포함하는 특정한 화학량론적인 두 개의 추가적 에피솜 플라스미드 및 (b) 뉴클리오팩션된 PBMC의 높은 표면 부착을 증진하기 위 한 정의된 리프로그래밍 배지 (도 8A)를 사용했을 때 유의미하게 향상되었다. 이 새로운 프로토콜은 뉴클레오펙 션 이후 25 - 35 일 이후 기계적으로 분리되고 스케일 업될 수 있는 다수의 부착성 PBMC-iPSC 클론의 성공적이 고 효율적인 생성으로 귀결되었다 (도 8A). 중요하게, 영향을 받지 않은 대조군 또는 질병을 앓고 있는 환자들 로부터의 다수의 개별적 동결보존된 PBMC 리프로그래밍의 성공률은 마우스 배아 섬유아세포 피더 (MEF)에서 T 세포 방법의 경우 90%였고 비-T 세포 방법의 경우 83% 였다 (표 5). T 세포- iPSC에 의해 부과된 제한과 PBMC- 유래 비-T 세포 리프로그래밍의 낮은 효율성을 감안할 때, 이 방법은 비-T 세포 유래의 BC-iPSC 리프로그래밍의 신뢰할 만한 방법으로 귀결되었다.
- [0181] 발명자들은 다음으로 이 새로운 프로토콜이 더 임상적으로 상용 가능한 리프로그래밍 방법을 사용할 때 또한 순 응 하는지 (amenable) 테스트했다. 제조합 인간 라미닌 521 기질 및 화학적으로 정의된 리프로그래밍 배지의 사 용은, 각각 75% 및 58% 의 약간 낮은 성공률이긴 그러나, 성공적인 PBMC-리프로그래밍으로 귀결되었다.
- [0182] T-세포 및 비-T 세포 방법의 평균 리프로그래밍 효율은 각각 $2.2 \times 10^{-4} \%$ 및 $1.6 \times 10^{-6} \%$ 였다 (표5). 모든 PBMC-iPSC 세포주들은 긴밀하게 패킹된 콜로니, 높은 세포 핵-세포질 비율, 견고한 알칼리포스파타아제 활동, 및 다능성 항원들의 발현을 포함하는 전형적인 PSC 특징들을 보였다 (도 8B). BC-iPSC는, PBMC-iPSC 전사 프로 파일이 잘 확립된 hESCs 및 fib-iPSC와 유사하나, 분화된 섬유아세포 및 신경 전구 세포에서는 아닌 것을 입증 하는, PluriTest 분석으로 결정된 품질 관리 지표를 통과했다 (도 8C). PBMC-iPSC는 정상 G-밴드 핵형을 유지했 으며 T 세포 수용체 (TCR)- β 및 γ , 유전자 재배열/클론 분석을 이용하여 PBMC유래의 T 세포 또는 비-T 세포 클론 유도체인지 확인되었다 (도 8E). BC-iPSC 삼계통(trilineage) 잠재력은 자발적 배아체 형성 및 TaqMan Scorecard 분석을 통한 배엽 특이적 유전자 발현 프로파일의 측정으로 보여진다 (도 8F). BC-iPSC의 "풋프린트- 없는" ("footprint-free") 상태는 RT-qPCR 을 사용한 내재성 다능성 유전자의 발현과 외인성 리프로그래밍 전이 유전자의 부재로 입증되었다 (도 11A). EBNA 플라스미드 연관된 지연 요소는 궁극적으로 확립된 BC-iPSC에서 제 거되었다 (도 11B).
- [0183] 실시예 17
- [0184] BC-iPSC는 fib-iPSC과 비교해 동등한 신경 분화능을 가진다
- [0185] iPSC는, 공급원 조직에 무관하게, 원래의 세포 공급원과 연관된 유전자 발현 및 후생유전학적 프로파일을 궁극 적으로 잃어버린다고 보고되어 왔다. 그러나, 혈액 유래 iPSC가 섬유아세포-유래 iPSC 만큼 다양한 세포 유형으 로 효율적으로 분화할 수 있는지는, 아마도 혈액-원천의 iPSC의 더 강력한 후생유전학적 기억의 보유 때문에, 여전히 불분명하다. 발명자들은 이를 모두 중간엽 기원인, 혈액 또는 섬유아세포-유래 iPSC를, 외배엽과 같이 다른 배엽으로 분화하도록 지시함으로써 해결했다. 구체적으로, 발명자들은, 환자와 건강한 자원자 모두에게서 얻어진, 다수의 섬유아세포 (n=26)와 PBMC (n=8) 세포주로부터 신경 외배엽 분화를 수행했다. 신경 외배엽 마 커 TUBB3 (β_3 -튜블린(tubulin)) 및 NKX6.1의 면역세포화학과 이 후의 세포 수를 기반으로, 신경 분화가 섬유아 세포와 BC-iPSC에서 비슷한 효율로 일어나는 것이 나타났으며 (도 8G), 이는 BC-iPSC의 유용성을 증명한다.
- [0186] 실시예 18
- [0187] BC-iPSC는 fib-iPSC와 비교해 현저하게 더 안정적인 핵형을 유지한다

- [0188] 반복되는 염색체 이상이 많은 숫자의 hESC세포주에 대해 보고되었다. 소수의 보고는 hiPSC 세포주들의 공통적 염색체 이상을 연대순으로 기록했으나, 그것들은 공급원 조직, 리프로그래밍 방법 및 세포 배양 방법들의 변동성에 대해 치밀하게 설명하지 않았다. 발명자들이 아는 한, 섬유아세포 및 혈액에서 유래된 iPSC 간의 빈도를 비교하는 세포유전학적 분석을 묘사하는 체계적인 연구는 없었다. 지난 6년간 연구자들은, 339개의 독립적 클론 iPSC 세포주를 포함한, 104명의 섬유아세포 또는 PBMC공여자들로부터 유래된 iPSC 세포주들에 대해 통상적인 세포 유전학적 분석을 수행했다. 평가된 모든 섬유아세포 및 혈액-유래 iPSC는 비슷한 비-통합 에피솜 리프로그래밍 및 표준 피더-없는 매트리지엘/mTeSR 세포 배양 방법을 이용해 리프로그래밍되었다.
- [0189] iPSC코어에서 유래한 fib-iPSC 및 BC-iPSC 는 그들의 리프로그래밍 방법, 다능성 및 분화의 측면에서 서로 유사하나, 두 공급원 세포 유형간의 세포유전학적 안정성에 대한 초기의 현저한 차이의 관찰은 대규모 비교 분석에 대한 필요를 자극했다. 많은 연구소들과 줄기 세포 저장소들은 세포 중기들과 Giemsa 염색을 통한 G-밴드 핵형 분석을 사용해 PSC에서의 세포 유전학적 변화에 대한 통상적인 품질 관리를 수행한다. 이 방법은 5%의 비정상 세포의 신뢰있는 판별이 쉽게 이루어지는 비정상 세포의 작은 부분 집단을 쉽게 판별할 수 있으며, 그러므로 모자이크 현상 (>10%)과 낮은 해상도의 균형 전좌 (>5-10 Mb)의 검출을 가능하게 한다.
- [0190] 발명자들은 공급원 섬유아세포 및 PBMC가 다수의 연구소 또는 공공 저장소에서 수집된 364개의 인간 iPSC 배양에 핵형 분석을 수행했다. 발명자들의 데이터는 fib-iPSC 및 BC-iPSC에서 염색체 이상의 발생 빈도의 주목할만한 차이를 드러냈다. 비정상 핵형을 수반하는 클론 이상은, 78명의 고유한 공여자 유래의, 클론 독립적인 인간 fib-iPSC 258개 중 59개에서 (22.9%) 에서 관찰되었다 (도 6). 이와는 극명한 대조를 보이며, 32명의 고유한 공여자 유래의 106개의 클론 인간 PBMC-iPSC 배양 중 4개 (3.8%) 만이 낮은 빈도의 이상을 보였다. 염색체의 이디오그램과 개략도에 자명하듯, 반복되는 이상들이 BC-iPSC 에 비해 fib-iPSC에서 훨씬 높은 수준으로 나타났다 (도 6). 실제로, 이러한 주목할 만한 세포 유전학적 안정성은, 림프아구성 세포주 (25%) 및 일차 상피 세포 (27%)를 포함하는 다른 세포 기원으로부터 리프로그래밍 된 iPSC는 비슷한 높은 핵형 이상 비율을 갖고 있기에, PBMC 에 고유하다 (도 12).
- [0191] fib-iPSC에서 가장 흔한 핵형 이상은 염색체 13 (13.2%), 1 (11.8%), 12 (11.1%) 및 X (10.4%)에서 관찰되었다 (표 6). 그 보다 좁은 범위의 핵형 변화 또한 염색체 21, 11 및 6에서 빈도의 내림차순으로 관찰되었다. 이수체들 중에서, 염색체 획득 (삼 염색체 또는 중복)은 12 (21.1%), 1 (15.8%), 11 (13.2%) 및 6 (10.5%)에서 가장 흔하게 관찰되었으며, 염색체 손실은 X염색체 (38.5%) 및 21 (23.1%)에서 관찰되었다. fib-iPSC에서 전좌 재배열은염색체 1 및 13 (13.9%) 및 14(11.1%)에서 또한 관찰되었다. BC-iPSC는 14 (삼 염색체) 또는 18 (중복)에서 염색체 획득을 나타내는 세포주를 하나씩 갖고 있었다. 나머지 두 PBMC-iPSC 세포주들은 드문 이상을 나타냈다: 46,XY,t(7;14)(q34;q11.2) 전좌 및 19% 세포에서 46,X,del(X)(q22q26) 모자이크 결실 (표 6).
- [0192] *실시예 19*
- [0193] *Fib- 및 BC-iPSC 핵형 분포는 공여자의 나이보다는 계대수와 관련된다*
- [0194] 혈액과 다르게, 피부는 잠재적 태양 손상과 같은 외부 환경 요소에 노출되며 생김 유래한 섬유아세포는 리프로그래밍 이전에 배양에서의 추가적 노화와 유사한 일정 정도의 증식을 필요로 한다. 이에 따라, 발명자들은 공여자의 나이가 fib-iPSC의 세포유전학적 불안정성에 영향을 미치는 기여 인자일 것이라 상정했다. 그러나, fib-iPSC의 세포유전자적 이상의 빈도의 측면에서, 발명자들은 공여자들의 나이와 유의미한 경향이나 상관관계를 관찰하지 못했다 (도 9A). 과연, G밴드 핵형 분석에 의하면, 가장 높은 퍼센트의 핵형 이상 (31.9%)은 21-40 나이군의 섬유아세포-iPSC에서 관찰되었다.
- [0195] 만능 줄기세포는 높은 증식성을 갖고 있다. 그리하여, 발명자들은 다음으로 fib- 및 BC-iPSC 가 배양에서 시간이 지남에 따라 잘 지내는지 및 증가하는 계대 횟수가 세포 유전학적 이상을 축적할 더 높은 경향으로 유도되는지를 분석하려 시도했다. 약 21.6%의 섬유아세포-유래 iPSC가, 전형적으로 4-23 계대 사이인, iPSC 생성 후 첫 G-밴드 핵형 분석 평가에서 비정상 핵형 (> 1/20클론 이상을 가지는 세포)을 갖고 있는 것으로 관찰되었다. 극명히 대조적으로, 오직 2.8%의 BC-iPSC만이 첫 평가에서 비정상 핵형을 갖고 있었다. 비정상 핵형을 갖고 있는 모든 iPSC 세포주는 더이상 배양되거나 평가되지 않았다. 따라서, 첫 번째 핵형 분석에서 세포유전학적으로 정상인 것으로 판별된 iPSC세포주에 대해서만 2 번째 내지 4 번째 반복 핵형 분석이 평가되었다. 이 분석은 우리로 하여금 fib-iPSC가 BC-iPSC에 비해 정상적 iPSC 생성 후에도 (그들의 첫 G-밴드 핵형 분석 평가 때) 지속적인 배양 및 계대시 내재적 세포유전학적 불안정성을 갖고 있는지 결정하는 것을 가능하게 했다. G-밴드 핵형 분석은 더 큰 비율의 fib-iPSC (27.8%)가 첫 핵형 분석에 비해 반복 핵형 분석시 비정상 핵형을 획득함을 보이는 반면 (P < 0.001, Bonferroni 사후 테스트와 양방향 ANOVA), BC-iPSC의 비정상 핵형의 퍼센트는 첫 핵형 분석

과 반복 핵형 분석 사이에 어떠한 유의미한 차이도 보이지 않았다 (도9B). Fib-iPSC의 세포유전학적 불안정성의 기원을 분석시, 가장 높은 비율의 비정상 핵형 (첫 또는 반복)은 iPSC 세포주 생애의10-23계대 사이에 나타나는 것으로 보이며, 이는 전형적으로 어떠한 세포주던 간에 가장 많은 양의 iPSC 증식이 일어나는 때이다. iPSC 증식은 대체로 특성화 및 세포 banking이 이 계대 수 주변에 동시에 일어나기 때문에 계대 10-23에 증가한다. 그럼에도 불구하고, 이는 fib- 또는 BC-iPSC 모두에게 비슷한 과정이지만, PBMC-유래 세포는 연장된 배양 또는 증식에 따른 비정상 핵형에 대한 증가된 기질을 보이지 않는다.

[0196] 실시예 20

[0197] BC-iPSC는 초미세(submicroscopic) 증폭 및 결실을 덜 획득한다

[0198] G-밴드 핵형 분석은 일반적으로 fib-iPSC 배양에서 관찰되는 균형 전좌, 역위, <20% 배양 모자이크현상, 유전체 획득 또는 소실의 염색체 위치를 검출할 수 있는 이점을 가진다 (도 6 및 표 5). 그러나, G-밴드 핵형 분석이 초미세 유전체 이상 (<5Mb)을 검출할 수 없기 때문에, 본 발명자들은 fib-iPSC 및 PBMC-iPSC 세포주의 하위 집합에서 비교 유전체 혼성화 (aCGH) 마이크로어레이를 수행하기로 결정했다. aCGH가 균형 전좌, 역위 및 < 20% 배양 모자이크현상을 검출할 수 없지만, 이는 iPSC 세포주에서 더 작은 사이즈의 유전체 획득(genomic gain) 및 소실, 복제수 변이 (CNV), 중복/결실, 및 불균형 전좌를 검출하는데 좋은 지원 방법이다. 본 발명자들은 부모 섬유아세포 또는 PBMC 공급원 생-검체와 비교하여 iPSC에서 획득한 임의의 신규 증폭 또는 결실 분석하고 기록했다. 본 분석에서는 건강한 개체에서 관찰된 유전체 변이를 함유하는 유전체 변이 데이터베이스(Database of Genomic Variants, DGV)에 대해 교차 참조시 이들이 정상 CNV가 아닐 때, iPSC에서 신규하게 획득된 증폭 및 결실만이 고려되었다.

[0199] 비정상 및 정상 G-밴드 핵형을 가진 iPSC 세포주를 포함하여, aCGH로 검출된 증폭 및 결실의 평균 사이즈는 fib-iPSC가 44 Mb로 PBMC-iPSC 세포주의 2.1 Mb보다 현저히 컸으며 (도 10A), 우세(preponderance)는 비정상 핵형을 가진 fib-iPSC 세포주 때문이었다 (도 10B). 정상 핵형을 가진 iPSC 세포주들 사이의 사이즈 비교 분석을 분리하면, 신규한 증폭/결실이 fib-iPSC 세포주에서 평균 2.31 Mb 및 PBMC-iPSC 세포주에서 평균 2 Mb이다. 이 데이터를 뒷받침하면서, fib-iPSC (3.7)에서 획득한 총 신규 증폭/결실의 평균 수는 BC-iPSC (1.8)에서보다 2-배 이상이었다. 정상 G-밴드 핵형을 가진 것으로 결정된 iPSC 세포주에서도, 새로운 증폭/결실의 수는 BC-iPSC의 1.8에 비해 fib-iPSC에서 3.3로 더 컸다. aCGH로 검출된 fib- 또는 PBMC-iPSC 세포주에서 가장 일반적으로 획득한 초미세 (0.8-1.5 Mb) 신규 증폭 또는 결실은 염색체 7q31.32의 증폭 또는 염색체 10q15.2-q25.1, 16p11.2, 21p11.2-p11.1의 결실이었다 (도 10E).

[0200] 여기에서 본 발명자들은 다능성 인자를 발현하는 에피솜 플라스미드를 이용한 새롭고 더욱 신뢰 가능한 혈액의 비-T 세포 성분의 리프로그래밍 방법을 보고한다. 기술된 리프로그래밍 프로토콜을 이용하여, 비-T 세포 또는 비-B 세포 공급원으로부터 비-T 세포를 지속적으로 100% 성공에 가깝게 리프로그래밍할 수 있다. 추가적인 이점은 정의된 리프로그래밍 배지 E7의 이용 및 정의된 임상적으로 상용 가능한 제조합 인간 L-521 기질을 포함한다. 섬유아세포 유래 iPSC ("fib-iPSC")와 동일한 특징을 나타낸 혈액 세포-유래 iPSC ("BC-iPSC")는 유전자형을 보유하고, 정상 다능성 프로파일을 나타내며, 및 모든 세 배엽의 세포 유형으로 쉽게 분화한다. 환자 혈액 샘플로부터 iPSC를 신뢰 가능하게 유도하는 이 방법은 신속하게 환자-특이적 세포주를 포함하는 새로운 인간 iPSC 세포주를 생성하는 것을 용이하게 하므로, 질병 모델화를 위한 막대한 생물자원, 약물 전달, 및 재생의료 용도를 제공한다.

[0201] 실시예 21

[0202] 추가적인 특성화 연구

[0203] G-밴드 핵형 분석. 인간 iPSC를 Colcemid (100 ng/mL; Life Technologies)에서 30분 동안 37°C에서 인큐베이션한 후 TrypLE를 이용하여 10분 동안 분리하였다. 그 후 이들을 인산염완충식염수 (PBS)로 세척하고 5mL의 저장액 (물 400mL 중의 1g KCl, 1g Na 시트레이트)에서 30분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 세포를 1500 RPM에서 2.5분 동안 원심분리하고 상온에서 5분 동안 고정액 (메탄올: 아세트산, 3:1)에 재부유하였다. 이 과정은 2회 반복되었고, 최종적으로 세포를 고정액 500 µl에 재부유하였으며 G-밴드 핵형 분석을 위해 Cedars-Sinai Clinical Cytogenetics Core에 제출하였다. 분석은 배양액 당 최소 20개의 세포에서의 염색체 감사를 포함한다. 클론성(clonality)의 ISCN 2013 정의에 부합하는 이상만을 본 원고 데이터 세트4에 포함시켰다. 모든 정상 및 비정상 핵형은 표 형식으로 표기하였다. 염색체 이디오그램(ideogram)은 그 후 염색체 이디오그램을 따라 임의의 유전체 간격(genomic interval)과 관련된 데이터를 플로팅하는 IdeoViz package를 이용하여 표를 R

Bioconductor (프로그래밍 언어)에 이입함으로써 생성되었다. 이 패키지는 오픈 소스 Bioconductor 웹사이트에서 이용 가능하다. 염색체 재배열의 빈도를 정확히 반영하기 위해, 각각의 이디오그램에 대한 바 너비가 검사된 샘플 수에 비례하여 조정되었다. 이와 같이, PBMC 세트보다 2.16배 큰 샘플 세트에서 발견된 이상 수를 묘사하는 섬유아세포 이디오그램을 설명하기 위해 PBMC-iPSC 세포주에서 발견된 이상을 나타내는 바는 fib-iPSC 세포주에서 발견된 이상을 도시하는 바의 너비의 2.16 배이다. 염색체 전좌 (남색 바) 카테고리 위의 글씨가 염색체 위치와 전좌 이상이 발생된 곳 사이에 해당하도록 매치한다.

[0204] 어레이 비교 유전체 혼성화 (Array Comparative Genomic Hybridization, aCGH)로 복제수 변이. 어레이 CGH는 불균형 구조 및 염색체 수적 변화를 고-처리능으로 검출하기 위한 고-해상도의 핵형 분석 솔루션이다. 고 품질의 유전체 DNA가 일차 피부 섬유아세포로 또는 PBMC 및 그들의 리프로그래밍된 iPSC로부터 분리하였다. 유전체 DNA의 품질은 UV spec. (NanoVue), 형광계(fluorometer) (Qubit) 및 아가로즈 겔 분석(Agarose Gel analysis)으로 결정된다. 샘플은 인간 줄기세포 및 암 세포주에 적합한 Cell Line Genetics (Madison, WI)의 Agilent 60K Standard aCGH 플랫폼을 이용하여 CNV에 대해 분석되었다. iPSC 세포주의 그들의 부모 공여 기원 세포와의 비교는 표시된 유전자좌에 대한 새로운 복제-수 변이 (획득/증폭 또는 소실/결실)를 도출했다.

[0205] TCRG 체인 재배열 분석. MasterPure DNA Purification Kit (Epicenter Biotechnologies)를 이용하여 유전체 DNA (350ng)를 모든 세포주로부터 획득하였다. 배아 줄기 세포주 (H9)이 음성 대조군으로 사용되었다. IgH 유전자의 중쇄 유전자좌의 세 프레임워크 영역을 인식하는 프라이머 세트가 InVivoScribe Technologies (Cat no.11010010, San Diego, CA)로부터 획득되었고 PCR이 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었다. 에피솜 플라스미드 관련 유전자 분석. 유전체 DNA (400ng)를 모든 세포주로부터 획득하였고 배아 줄기 세포주 (H9)를 음성 대조군으로 사용하였다. 하우스키핑 유전자로서 사용된 GAPDH와 함께 EBNA-1를 인식하는 프라이머가 본 연구에 포함되었다. PCR은 95°C로 30초, 60°C로 30 초, 및 72°C로 30로 35 사이클 동안 수행되었다.

[0206] iPSC로부터 신경 분화. 인간 섬유아세포- 및 PBMC-ipsc를 매트릭젤-코팅된 6-웰 플레이트에 분주하였다. iPSC는 분화 시작 전에 보통의 유지 조건 하에서 거의 함유까지 성장되었다. 다음 날 신경 분화가 LDN193189 (0.2 μM, Cayman), SB431542 (10 μM, Cayman) 및 CHIR99021 (3 μM, Cayman)를 이용한 이중 SMAD 및 GSK-3베타 억제에 의한 신경외배엽 분화 의해 개시되었으며, 이 처리는 비필수아미노산 (NEAA; 1%), B27 (2%), 및 N2 (1%)를 함유하는 Iscove's modified Dulbecco's 배지 (IMDM) / F12 (1:1) 배지에서 6일 동안 수행된다. 6일 후에 분화 세포를 어큐테이즈(acutase)를 37°C에서 5분 동안 처리함으로써 부드럽게 들어올렸다. 그 뒤에 7.5 X 10⁵ 밀도의 세포를 0.1 μM의 올-트랜스 레티놀산(all-trans retinoic acid) 및 1 μM의 소닉 헤지호그 작용제(sonic hedgehog agonist, SAG)를 첨가한 상기 신경 분화 배지에서 6-웰 플레이트에 두거나 1 X 10⁴ 세포를 96-웰 플레이트에 분주하였다. 새 배지를 격일로 바꿔주었다. 분화 12일차에 배지를 NEAA (1%), B27 (2%), N2 (1%), 화합물 E (0.1 μM; Calbiochem), DAPT (2.5 μM; Cayman), 레티놀산 (0.5 μM) 올-트랜스, SAG (0.1 μM), 아스코르브 산 (200 ng/ml), 디부틸릴 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(dibutyl cyclic adenosine monophosphate) (1 μM), 뇌-유래 신경영양 인자 (10 ng/ml), 및 교질 세포주-유래 신경영양 인자 (10 ng/ml)로 보충된 분화 말기 (IMDM) / F12 (1:1) 배지로 바꿔주었다. 분화 뉴런은 분화 18일차에 고정되었고 분석되었다.

[0207] 실시예 22

[0208] 혈액으로부터 분리된 동결 보존된 PBMC는 iPSC로 신뢰 가능하게 리프로그래밍된다

[0209] 인간 iPSC는 갓 분리된 비-증식된 PBMC와 에피솜 플라스미드로부터 생성될 수 있다. 그러나, 동결 보존된 PBMC를 iPSC로 리프로그래밍하는 것에 대한 설명이 없다. 발명자들이 POU5F1, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC, 및 TP53 shRNA (4p 방법으로 불리는)를 발현하는 에피솜 플라스미드로 여러 개체 유래 동결 보존된 PBMC를 iPSC로 리프로그래밍했을 때, 발명자들은 실패하거나 35-40일 후에조차 인식 가능한 iPSC 클론의 분리에서 상당한 가변성이 관찰되었다. 전혈로부터 iPSC를 생성하기 위한 다른 시도는 리프로그래밍을 위한 상당한 세포 수를 생성하기 위해서는, 분리된 CD34+ 전구 세포가 복잡하고 비싼 프로토콜로 배양되어 농축되고 증식되어야 한다는 것을 보여주었다. 이는 이 과정을 단순화하고 리프로그래밍 전에 체세포의 증식을 피할 필요성이 있음을 강조했다. 이 체세포 공급원이 다수의 대상 코호트로부터 가장 빠르고 가장 비용-효과적인 공정을 제공하기 때문에 대신에 본 발명자들은 iPSC로 리프로그래밍하기 위해 비-증식된 PBMC를 분리 및 동결 보존하였다. 4p 방법을 사용하면, T 리프로그래밍 프로토콜이 오직 PBMC 샘플의 14.3%만이 성공적인 반면, 동결 보존된 PBMC에 대한 비-T 프로토콜은 어떤 클론 iPSC 세포주도 생성하지 않았다.

[0210] PBMC 리프로그래밍의 효율을 증가시키기 위해, 본 발명자들은 (a) 5p 방법이라 불리는, PBMC 세포 사멸을 최소

화하기 위한 특정 화학량론의 SV40 대형 T 항원 (SV40LT)을 함유하는 추가적인 에피솜 플라스미드, 및 (b) 뉴클레오핵션된 PBMC의 고 표면 부착을 촉진하기 위한 정의된 E7 리프로그래밍 배지를 사용하였다. 이 새로운 프로토콜은 뉴클레오핵션 25-35일 후 이내에 증식을 위해 기계적으로 분리되고 스케일 업될 수 있는 다수의 부착 PBMC-iPSC 클론의 성공적이고 효율적인 생성으로 귀결되었다. 중요하게, 영향을 받지 않은 대조군 또는 질병에 걸린 환자 유래 다수의 동결 보존된 대상의 PBMC의 리프로그래밍에서 성공률 및 효율은 4p 방법을 이용했을 때 0 내지 15%인 것에 비해, 5p 방법을 이용하면 T 세포에 대해 85% 및 비-T 세포에 대해 92%로 현저히 컸다. 상업적 배지 (영장류 ESC 배지; PESC)에서 마우스 배아 섬유아세포 피더 (MEF)에 대한 PBMC 리프로그래밍은 T 및 비-T 세포 유형 모두에서 89-95%에 가까운 우수한 리프로그래밍 효율을 나타냈다. 발명자들은 다음으로 이 5p 리프로그래밍 프로토콜이 임상적으로 상용 가능한 iPSC-기반 세포 치료에 요구될 수 있기 때문에, 생체이물 (xenobiotic)-없는 성분과 순응하는지를 테스트했다. 재조합 인간 라미닌 521 기질 및 화학적으로 정의된 리프로그래밍 1 배지 (E7)21의 이용은 또한 각각 80% 및 64%의 성공적인 T- 및 비-T 세포 리프로그래밍을 야기하였다. 총괄적으로, 이들 결과는 4p 방법과 비교했을 때 5p 방법이 현저하게 향상된 PBMC (T 및 비-T 세포 모두)의 리프로그래밍 성공 및 효율을 나타내며, 동결 보존된 PBMC의 신뢰 가능한 리프로그래밍에 대한 가치있는 프로토콜을 제공한다. 각각의 PBMC-iPSC 세포주는 두 명의 건강한 지원자의 PBMC (비-T 세포 공급원 03iCTR10 NTn1 및 T-세포 공급원 80iCTR-Tn1) 유래 리프로그래밍된 대표적인 iPSC 콜로니에서 모두에서 명확한, 긴밀하게 패킹된 콜로니, 높은 세포 핵-세포질 비율, 강건한 알칼리포스파타아제 활성, 및 다수의 다능성 항원의 발현을 포함하는 전형적인 PSC 특징을 나타냈다. PBMC-iPSC는 PBMC-iPSC 전사 프로파일이 잘 수립된 hESC 및 fib-iPSC와 유사하나, 분화된 섬유아세포 및 신경 전구 세포에서는 아닌 것을 입증하는, PluriTest 분석으로 결정된 다능성 품질 관리 지표를 통과하였다. PBMC-iPSC는 정상 G-밴드 핵형을 유지했으며 T 세포 수용체 (TCR)- β 및 γ , 유전자 재배열/클론 분석을 이용하여 PBMC 유래의 T 세포 또는 비-T 세포 클론 유도체인지 확인되었다. PBMC-iPSC의 삼-계통 잠재력이 자발적 배아체 형성 및 TaqMan Scorecard 분석을 통한 배엽 특이적 유전자 발현 프로파일의 측정으로 입증되었다. PBMC iPSC의 전이유전자-없는 유전체 상태는 (1) EBNA플라스미드-연관 지연 요소(EBNA plasmid-related latency element)가 확립된 PBMC-iPSC로부터 궁극적으로 제거되었는지 및 유전체 DNA에서 검출되지 않았는지 입증; 및 (2) RT-qPCR를 이용한내재성 다능성 유전자의 발현 및 임의의 외인성 리프로그래밍 전이유전자의 부재로 확인되었다. 추가적으로, 5p 리프로그래밍 각테일의 성분인 SV40LT 인자는 유전체 DNA 수준에서 검출할 수 없었으며 리프로그래밍된 PBMC-iPSC 세포주에서 발현되지 않았다.

[0211] 실시예 23

[0212] PBMC-iPSC는 Fib-iPSC와 동등한 신경 분화를 가진다

[0213] 많은 초기 보고서들은 새롭게 리프로그래밍된 iPSC가 이들의 부모 공여 세포 유형의 일부 후생유전학적 기억을 유지한다고 제안한 반면, 최근 보고들은 공급원 조직과 상관없이 hiPSC가 궁극적으로 증식 후에 이들의 근원 세포 공급원과 관련된 유전자 발현 및 후생유전학적 프로파일의 대부분을 잃는다고 제안한다. 그러나, 혈액 유래된 iPSC가 섬유아세포-유래 iPSC만큼 다양한 세포 유형으로 효율적으로 분화할 수 있는지는, 아마도 혈액-원천의 iPSC의 다른 공여 세포에 비해 더 강력한 후생유전학적 기억의 보유 때문에, 여전히 불분명하다. 발명자들은 이를 모두 중간엽 기원인 혈액 또는 섬유아세포-유래 iPSC를 다른 외배엽으로, 즉, 신경 외배엽으로 분화하도록 지시함으로써 해결했다. 구체적으로, 발명자들은, 환자와 건강한 대상 모두의, 다수의 섬유아세포 (n=26)와 PBMC (n=26) 세포주로부터 신경 외배엽 분화를 수행했다. 신경 외배엽 마커 TUBB3 (β_3 -튜블린) 및 NKX6.1의 면역세포화학 및 이 후의 정량은 신경 분화가 fib-iPSC 및 PBMC-iPSC 사이에서 유사한 효율로 발생하는 것을 입증했으며, 이는 추가로 PBMC iPSC의 유용성을 증명한다. 5p로 리프로그래밍된 PBMC-iPSC는 이전에 hESC 세포주에 대해 기술된 핵형 반복 염색체 이상 (Karyotype Recurrent chromosomal abnormalities)을 더욱 현저히 안정적으로 유지한다. 일부 보고는 hiPSC 세포주들의 공통적 염색체 이상을 연대순으로 기록했으나, 그것들은 공급원 조직, 리프로그래밍 방법 및 세포 배양 방법들의 변동성에 대해 치밀하게 설명하지 않았다. 발명자들이 아는 한, 섬유아세포 및 혈액에서 유래된 iPSC 간의 빈도를 비교하는 세포유전학적 분석을 묘사하는 체계적인 연구는 없었다. 발명자들은 16개의 섬유아세포 (77) 또는 PBMC (94)의 171개의 고유한 공여자로부터 유래한 iPSC 세포주에 대해 면밀한 세포유전학적 분석을 수행하였다. 공여자 당 다수의 클론 세포주를 이용하여, 이는 348 개의 독립적인 섬유아세포 (205) 또는 PBMC (143) iPSC 세포주 클론 유래 핵형을 포함하였다. 평가된 모든 섬유아세포, 림프아구성 세포주, 상피 및 혈액-유래 iPSC는 유사한 비-통합 에피솜 리프로그래밍 방법을 이용하여 리프로그래밍되었다. 본 발명에서 보고된 섬유아세포 및 PBMC-리프로그래밍 간의 주요한 차이는 사용된 리프로그래밍 인자 플라스미드의 수이다: 3p31 섬유아세포 및 PBMC에 대해 4p 또는 5p. 성공적인 리프로그래밍 후, 본 발명에서 분석되고 보고된 모든 iPSC 세포주는 피더-없는 Matrigel®/mTeSR1™ 세포 배양 방법을 이용하여 유지되

있으며 기계적 StemPro® EZPassge™ 툴을 이용하여 계대 배양되었다. 이들 세포주의 유전적 안정성을 확립하기 위해, 발명자들은 다수의 랩 또는 공공 보관소들로부터 수집된 섬유아세포 (260), PBMC (206), 상피 세포 (26) 및 림프아구성 세포주(60) 공급원으로부터 유래한 552개의 인간 iPSC 배양물에 대해 우선 G-밴드 핵형 분석을 수행하였다. 발명자들의 데이터는 PBMC iPSC에서 주목할만하게 낮은 발생 빈도의 염색체 이상을 드러낸다. 클론 이상을 가진 비정상 핵형이, 77개의 고유한 공여자들로부터 유래한 클론적으로 독립적인 인간 fib-iPSC 세포주 유래 260개 중 61개 배양물 (23.5%)에서 관찰되었다. 전형적으로, 섬유아세포는 리프로그래밍에 앞서 9-10 계대 동안 증식되었다. 극명히 대조적으로, 94개의 고유한 공여자들로부터 유래된 클론 인간 PBMC-iPSC 세포주의 206개 배양물 중 오직 4개 (1.9%)에서만 임의의 핵형 이상이 나타났다. 관찰된 4가지의 이상도 빈도가 낮았다. 염색체 이디오그램 도식으로부터 fib-iPSC에서 반복되는 이상이 PBMC-iPSC보다 현저히 큰 수준으로 나타난 것이 자명하다. 실제로, 림프아구성 세포주 (25%; 60개 중 15개 비정상) 및 일차 상피 세포 (27%; 26개 중 5개 비정상)를 포함하는 다른 세포 기원으로부터 리프로그래밍된 iPSC가 섬유아세포에서 보인 것들과 비슷한 높은 핵형 이상 비율을 갖고 있기 때문에, 이러한 주목할만한 세포유전학적 안정성이 새로운 5p 방법으로 리프로그래밍된 PBMC에 고유하다. fib-iPSC에서 가장 흔한 핵형 이상은 염색체 13 (14.9%), 1 (11.7%), 12 (9.6%) 및 X (8.5%)에서 관찰되었다. 그 보다 좁은 범위의 핵형 변화 또한 염색체 21, 11 및 6에서 관찰되었다. 흥미롭게, fib-iPSC에서 핵형 이상은 염색체 2, 5 및 7에서 전혀 검출되지 않았다. 이수체들 중에서, 염색체 획득 (삼염색체 (trisomy) 또는 중복)은 12 (20.0%), 1 (15.0%) 및 13 (12.5%)에서 가장 흔하게 관찰되었으며, 염색체 손실은 X염색체 (38.5%) 및 21 (23.1%)에서 관찰되었다. fib-iPSC에서 전좌, 역위 및 변이 염색체를 포함하는 구조적 재배열은 염색체 13 (22.0%), 1 (12.2%) 및 14 (9.8%)에서 반복되었다. 극명히 대조적으로, 분석된 178개의 iPSC 유래 오직 두 개의 PBMC-iPSC 세포주만이 14 (삼염색체) 또는 18 (중복)에서 염색체 획득을 나타냈다. 다른 두 PBMC-iPSC 세포주들은 드문 이상을 나타냈다: 전좌 46,XY,t(7;14)(q34;q11.2) 및 19% 세포에서 모자이크 결실 46,X,del(X)(q22q26).

[0214] 실시예 24

[0215] PBMC-iPSC의 향상된 핵형 안정성은 공여자 나이 및 계대수에 의존적이다

[0216] 혈액과 다르게, 피부는 잠재적 태양 손상과 같은 외부 환경 요소에 노출되며 생김 유래한 섬유아세포는 리프로그래밍 이전에 배양에서의 추가적 노화와 유사한 일정 정도의 증식을 필요로 한다. 이에 따라, 발명자들은 공여자의 나이가 fib-iPSC의 세포유전학적 불안정성에 영향을 미치는 기여 인자일 것이라 상정했다. G27 밴드 핵형 분석이 이 가능성 측정에 사용되었다. fib-iPSC에서 공여자의 나이 증가와 세포유전학적 이상 빈도 사이의 명확한 경향 및 상관 관계가 없었다. 그러나, 결과는 모든 공여자 나이 군에서 PBMC-iPSC가 fib-iPSC보다 훨씬 큰 핵형 안정성을 가지는 것을 확인했다. 0-20 나이 사이의 공여자 군을 제외하고, PBMC-iPSC가 21-90 나이 사이의 모든 공여자 군에서 fib-iPSC 보다 현저하게 더 안정적이었다. 배양에서 iPSC의 증식이 어떻게 유전적 안정성에 영향을 미칠 수 있는지를 확립하기 위해, 발명자들은 다음으로 시간에 따른 fib- 및 PBMC-iPSC를 분석하였다. 전형적으로 1-23 계대 사이인, iPSC 생성 후 이들의 첫 G-밴드 핵형 분석에서 약 22.4%의 섬유아세포-유래 iPSC가 비정상 핵형 (> 1/20 클론 이상을 가지는 세포)을 가지는 것으로 관찰되었다. 극명히 대조적으로, PBMC-유래 iPSC의 오직 1.4%만이 이들의 첫 평가에서 비정상 핵형을 가졌다 ($p < 0.0001$). 첫 핵형 분석에서 비정상 핵형을 갖고 있는 모든 iPSC 세포주는 더 이상 배양되거나 평가되지 않았다. 그와 같이, iPSC 세포주의 2 번째 내지 4 번째 반복 핵형 분석이 처음에 이들의 첫 번째 핵형 분석에서 세포유전학적으로 정상인 것으로 판별된 세포주에 대해서만 평가되었다. 초기 핵형 분석 부분과 비교했을 때, 반복적인 핵형 분석시 배양물에서 비정상 핵형을 획득하는 fib-iPSC (27.3%)의 부분이 더 커지고 PBMC-iPSC보다 현저히 커지는 경향이 있었다 ($p < 0.001$). 두 드러지게, PBMC-iPSC에서 비정상 핵형 퍼센트는 처음 및 반복 핵형 분석 간에 유의미한 차이를 나타내지 않았다. fib-iPSC에서 세포유전학적 불안정성의 기원 분석시, 가장 높은 비율의 비정상 핵형 (처음 또는 반복)이 iPSC 세포주 생애의 1-23의 계대 동안 발생했다. 이 계대 범위는 특성화와 세포 बैं킹이 이 계대 번호들과 동시에 일어나기에 전형적으로 가장 많은 양의 iPSC 증식이 주어진 임의의 세포주에 대해 발생할 때이다. 그럼에도 불구하고, 이는 fib- 또는 PBMC-iPSC 모두에 대해 유사한 과정이지만, 결정적으로, 발명자들의 새로운 방법에 의한 PBMC-유래 세포 리프로그래밍은 PBMC-유래 세포는 연장된 배양 또는 증식에 따른 비정상 핵형에 대한 증가된 기질을 보이지 않는다. G-밴드 핵형 분석이 초미세 유전체 이상 (<5Mb)을 검출 불가능하기 때문에, PBMC-iPSC는 초미세 증폭 및 결실을 덜 획득하므로, 다음으로 어레이 비교 유전체 혼성화 (aCGH) 마이크로어레이가 다음으로 fib-iPSC 및 PBMC-iPSC 세포주의 하위집단에 대해 수행되었다. aCGH이 균형 전좌, 역위 및 < 20% 배양물 모자이크 현상을 검출할 수 없지만, iPSC 세포주 11,30,32,33에서 더 작은 사이즈의 유전체 획득 및 소실, 복제수 변이 (CNV), 중복/결실, 및 불균형 전좌를 검출하기에 좋은 지원 방법이다. 발명자들은 부모 섬유아

세포 또는 PBMC 공급원 생-검체와 비교시 iPSC에서 획득한 임의의 신규 증폭 또는 결실을 분석 및 보고하였다. 이 분석에서, 건강한 개체에서 관찰된 유전체 변이를 함유하는 유전체 변이 데이터베이스에 대해 교차 참조시 정상 CNV이 아닐 때, iPSC에서 새롭게 획득한 이들 증폭 및 결실만이 고려되었다.

[0217] iPSC 세포주와 비정상 및 정상 G-밴드 핵형 분석을 포함하여, aCGH로 검출된 증폭 및 결실 (amps/deIs)의 평균 사이즈는 fib-iPSC 세포주에서 44 Mb로 PBMC-iPSC 세포주에서의 2.1 Mb에 비해 현저히 컸으며, 우세는 비정상 핵형을 가진 fib-iPSC 세포주 때문이었다. 정상 핵형을 가진 iPSC 세포주들 사이의 사이즈 비교 분석을 분리하면, 신규한 증폭/결실이 fib-iPSC 세포주에서 평균 2.31 Mb 및 PBMC-iPSC 세포주에서 평균 2 Mb이다. 이 데이터를 뒷받침하면서, fib-iPSC (3.7)에서 획득한 총 신규 증폭/결실의 평균 수는 PBMC-iPSC (1.8)에서보다 현저히 컸다 (2-배). 정상 G-밴드 핵형을 가진 것으로 결정된 iPSC 세포주에서도, 새로운 증폭/결실의 수는 PBMC-iPSC의 1.8에 비해 fib-iPSC에서 3.3로 더 컸다. ACGH로 검출된 가장 일반적으로 획득한 초미세 (0.8-1.5 Mb) 신규 증폭 또는 결실은 염색체 7q31.32의 증폭 또는 염색체 10q15.2-q25.1, 16p11.2, 및 21p11.2-p11.1의 결실이었다. 총괄적으로, 이 데이터는 PBMC를 리프로그래밍하는 이 새로운 방법이 염색체 이상의 획득에 관련하여 임의의 다른 공개된 방법에 비해 더욱 안정된 인간 iPSC를 유발하는 것을 입증한다.

[0218] 실시예 25

[0219] 5p 방법의 추가적인 특성화

[0220] 표 9- iPSC로 리프로그래밍된 PBMC에 대한 더 큰 n

섬유아세포-유래 iPSC	수	비정상 %
배양물/핵형의 총 수	261	23.37%
비정상 총 수	61	

PBMC-유래 iPSC	수	비정상 %
세포주의 총 수	409	3.42%
비정상 총 수	14	

[0221]

[0222] 발명자들은 발명자들의 방법으로 리프로그래밍 된 PBMC-iPSC 세포주들에 p53 (TP53)이 존재하는지 여부를 확인하기 위한 추가적인 분석을 수행했다. 이 세포주들은 정의된 E7 배지안에서 L521 기질로 리프로그래밍 되었다.

[0223] 발명자들은 다수의 iPSC세포주들에 대해 광범위한 분석을 수행했다. 전체 유전자 분석 (준비중인 또 다른 원고의 주제) 결과, 발명자들은 어떠한 변종(SNPs 또는 In-dels)도 iPSC 세포주들의 TP53유전자 엑손(코딩 영역)에서 유전체 수준에서 판별되지 않았다.

[0224] 전체 유전자 시퀀싱이 750ng의 유전체 DNA와 Illumina TruSeq PCR free library 준비 키트를 사용해 생산자의 지시 (Illumina, San Diego, CA)에 따라 수행되었다. 라이브러리 품질은BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)에 의해 확인되었으며 라이브러리들은 최소 40x 판독 깊이로 Fulgent Therapeutics, Temple City, CA.에 위치한 Illumina Hi-Seq10X에서 시퀀싱 되었다. 샘플 당 평균 >4억 6천만 개의 판독이 생성되었다. Fastq 파일들이 빌드hg38의 참조 유전체와 Burroughs-Wheeler aligner 에서 BWA-mem 알고리즘을 사용해, 각각의 샘플과 4억 판독 이상이 성공적으로 정렬되어 유전체 전체에 걸쳐 평균 43x의 판독 깊이를 제공하며 정렬되었다.

[0225] 이 파이프라인을 사용하여, 발명자들은 iPSC 세포주 또는 그들의 클론에서 TP53의 코딩 영역 (엑손)에서 어떠한 변이 (SNP 또는 In-dels)도 판별하지 못했다. 다수의 분석된 iPSC 세포주들과 그들의 클론 유도체들 중에서, 다수의 인트론성 신규 SNP가 하나의 공여자 iPSC 세포주로부터 유도된 세 iPSC 클론 중 둘에서 검출되었다; TP53의 단일한 (및 드문) 이소폼의 인트론 1 rs12940247 (hg38 chr17:7,664,385 G/A). 이 공통의 SNP는, 백인 샘플로 이루어진 참조 인구집단에서 마이너 대립유전자 (G) 빈도 0.403을 가지며, 분석된 전체 집단중 최소36%에서 발견되었다 (공여자iPSC 세포주는 백인 공여자로부터 유래함). 이 공통의 변종은 어떠한 기능과도 연루되거나, 변종의 암에 대한 잠재적 영향을 배정하는데 사용되는 전형적인 임상 주석 데이터베이스 (CiVIC, ClinVar, COSMIC Cancer Consensus)에 주석이 달리지 않았다. Gene Tissue Expression (GTEX) 데이터세트에 이 변종이 건강한 조직에서 TP53 발현 수준의 조절자로 기능한다는 증거 또한 없다. 변종 rs12940247은 (PBMC로부터 유도된, 림프아구성 세포주 GM12878를 포함하는) 1단(Tier) 세포주의 어떠한 조절 장치(features)와도 교차하지 않는다. 발명자들은 또한 Illumina Omni2.5M 유전형분석 어레이를 사용해 이 샘플들을 특징지었다. 전체 유전자

시퀀싱 결과와 마찬가지로 iPSC 클론에서 생식계열 (혈액) 샘플의 유전자형과 조화를 이루지 못하는 변이는 검출되지 않았으며, 이 유전자좌에 걸친 복제수 변이는 판별되지 않았다.

[0226] 표 10- 비-코딩 공통 변이 rs12940247가 공여자 CS-002 유래 두 클론에서 신규한 사건으로 관찰된다.

	샘플	대립유전자 A를 가진 (%) 부분 판독	대립유전자 G를 가진 (%) 부분 판독	유전자형
혈액	CS-002 (혈액)	57/57 (100)	0/57 (0)	AA
iPSC-클론 1	CS02iCTR-NTn3	29/46 (63)	16/46 (35)	AG
iPSC-클론 2	CS02iCTR-NTn4	49/51 (96)	2/51 (4)	AA
iPSC-클론 3	CS02iCTR-Tn11	39/51 (76)	12/51 (24)	AG

[0227]

[0228] TP53의 한 이소폼의 인트론 6의 SNP의 위치는 그레이 선으로 표시되었다. TP53의 이소폼들은 GENCODE v24 Comprehensive에서 블랙 (Protein Data bank의 대응되는 엔트리가 있는 특성들) 또는 다크 블루 (RefSeq 또는 SwissProt으로부터의 리뷰되거나 검증된 전사)로 나타낸다. 아래의 유전자 주석들은 전사, 활성 프로모터 (이들 중 어느것도 플로팅된 유전체 간격에서 관찰되지 않음) 및 활성 인핸서 (트랙 3 및 4, 이들 또한 어느 것도 플로팅된 유전체 간격에서 관찰되지 않음)를 보여주는 네 개의 트랙들이다. 일부 포이즈드(poised) 조절 요소들이 HUVEC 세포의 TP53 유전자 자체(gene body)에서 관찰 (H3K4me1의 ChIP-Seq으로부터의 시그널의 농축을 보여주는 블루 피크로 표시)되었다. 공여자 iPSC로부터의 두 클론들에게서 신규로 발생하는 논-코딩 변종들이 TP53에 대한 임의의 조절기능이 있다는 증거는 없다.

[0229] 간략한 방법론: 생식계열 변이 판정(Germline variant calling)이 생식계열 변이 판정의 모범 용례(Best Practices)를 사용하는Genome Analysis Toolkit (GATK)으로 수행되었다. 간략하게, 정렬된 시퀀스들은 판독의 5' 말단의 시퀀스로 (하나의 DNA 단편으로부터 유래하며, 샘플 준비 중 또는 시퀀싱 과정 중 클러스터 증폭을 사용해 생성되는) 중복(duplicate) 판독을 판별하기 위해 Picard로 전처리 되었다. 염기 품질 점수는 변종들이 판별되기 전 유전자형 판정 정확성을 개선하기 위해 In-dels 주변으로 국지적 유전체 재정렬한 후 재조정되었다. 판정된 단일 염기 다형성 (SNPs) 및 In-dels은 이후 합동 유전체분석 모듈에서 변종 판독을 높은 신뢰수준으로 생성하기 한 변종 판독을 재조정 하는데 사용되었다.

[0230] 결론적으로, 다수의 iPSC 세포주들에 대한 매우 자세하며 광범위한 분석 및 SNP 및 WGS 수준에서의 클론들에 기반하여, 발명자들은 TP53유전자에서 그것의 정상적인 제어를 불능화할 어떠한 코딩 돌연변이도 검출하지 못했다.

[0231] 표 11- 비-코딩 공통 변이 rs12940247가 공여자 CS-002 유래 두 클론에서 신규한 사건으로 관찰된다.

세포주	세포 계수 시작	3P 조건	리프로그래밍 효율-3P	5P 조건	리프로그래밍 효율-5P
1WP3	100,000 세포 /웰	~140 콜로니	0.047	~528 콜로니	0.176
8PF5	100,000 세포 /웰	~92 콜로니	0.031	~269 콜로니	0.090
9XH7	100,000 세포 /웰	~106 콜로니	0.035	~356 콜로니	0.119

[0232]

[0233] 실시예 26

[0234] 논의

[0235] 본 연구에서, 발명자들은 새로운 방법으로 비-확장되고 동결보존된 PBMC (PBMC-iPSC)로부터 유래된 인간 iPSC가 피부 섬유아세포 배양, LCL, 상피 세포, 및 지방 세포를 포함하는 리프로그래밍 이전에 세포 확장을 필요로하는

다른 체세포로부터 생성된 iPSC에 비해 세포유전학적으로 주목할 만큼 안정적인임을 보였다. 5p 방법으로 리프로그래밍 된 이들 PBMC-iPSC 또한 다른 연구소에서 유래한 hESCs 및 iPSC와 같은 역사적으로 보고된 다른 다능성 줄기 세포주들에 비해 증진된 안정성 비율을 갖는다. 200명이 넘는 고유한 공여자들로부터의 다양한 종류의 세포의 에피솜 플라스미드 리프로그래밍, 동일한 줄기세포 유지 절차, 다능성 성격 규정, 및 핵형 분석을 수반하는 본 연구 전체는 발명자들의 연구실과 Cytogenetics Core에서 수행되었다. 발명자들은 배지와 기질에 상관 없이, 림프성 T 세포 및 골수성 비-T 세포군 모두 신뢰성있게 리프로그래밍된, 발명자들의 연구실에서 생성된 200개가 넘는 개별적 클론 PBMC-iPSC 세포주들을 체계적으로 분석했다. 나아가, 발명자들은 생체이물-없는(xeno-free) 재조합 인간 L521 기질 및 정의된 리프로그래밍 배지에서 안정적인 PBMC-iPSC의 창조를 증명했다. 가장 중요한 것은, 장기 배양시에도 5p 방법으로 리프로그래밍 된 PBMC-iPSC는 핵형 안정성을 유지한다는 것이다. 종합적으로, 개선된 기술과 PBMC같은 비-확장된 세포 공급원의 조합은 임상적으로 상용 가능한 리프로그래밍 방법과 많은 수의 환자 샘플에 대한 손쉬운 접근을 모두 제시한다.

[0236] 염색체 1, 12, 13 및 X의 이수체 및 재배열은 발명자들의 연구실에서 에피솜 리프로그래밍으로 생성된 fib-iPSC에서 가장 흔하게 관찰된 이상이다. 반면 이러한 이상들은 발명자들이 생성하고 분석한 어떠한 PBMC-iPSC에서도 절대 검출되지 않았다. fib-iPSC에서 관찰된 이러한 변화들 중 일부는 염색체 12의 팔이 짧고, 염색체 1, 17 및 X에 획득 또는 소실이 있는, 그들의 악성 인간 배아 암종 (EC) 줄기세포 대응물과 비슷한, 인간 ESCs에서 발견되는 반복적인 이상과 유사하다. aCGH 마이크로어레이를 사용했을 때, PBMC-iPSC는 fib-iPSC에 비해 반 수의 신규 CNV를 보였다. 이 신규 CNV들은 hiPSC와 이들 각각의 부모 섬유아세포 또는 PBMC와 공유되지 않았으며 리프로그래밍 또는 iPSC 확장시에 획득된 것이다. fib-iPSC의 CNV에서 염색체 변화의 평균 염기쌍 크기 역시 PBMC-iPSC세포주들에 비해 훨씬 컸으며, 이는 이 새로운 리프로그래밍 방법의 안정성을 더욱 지지하는 것이다.

[0237] 증가된 핵형 이상, 코딩 돌연변이, 및 작은 유전체적 변경은 과거에 iPSC에서 보고되었으며, 이는 리프로그래밍 절차 자체의 돌연변이유발적 결과를 반영하는 것으로 보인다. 그러나, 이러한 보고된 유전체 이상의 대부분은 피부 섬유아세포에서 통합적인 레트로바이러스 및 렌티바이러스 리프로그래밍 방법들을 사용해 형성된 iPSC 세포주에서 조사된 것이다. 다른 비통합적 및 낮은-계대 iPSC를 위한 렌티 바이러스 리프로그래밍 방법을 비교하는 이수체 비율 및 CNV가 묘사되었다. 이 데이터들은 주로 공여 세포의 기원에 따라 분리되기도, PBMC와 같이 비-확장된 세포에서 얻어지지도 않은, 확장된 섬유아세포 배양들로부터 유도된 iPSC의 이상 비율을 포함하나, 그들은 에피솜 및 통합적 리프로그래밍 방법을 사용한 낮은-계대 iPSC에서 12-13% 가량의 이수체 비율을 보고했다. 산소 분압, 성장 보충제, 성장 인자, 계대 기술, 동결 보존 및 세포가 그 위에서 자라는 세포의 기질을 포함하는, 다양한 인자들이 iPSC의 장기 배양 및 확장 중 유전적 안정성에 영향을 줄 수 있다. 선술한 인자들을 가정 할 때 iPSC 배양 기술의 연구소간의 차이가 종종 존재한다; 그러나, 이 인자들은 본 발명자들의 연구에서는 엄격하게 통제되었다. The Progenitor Cell Biology Consortium (www.synapse.org)은 발달 및 종양 발생에서 공여자 세포주 안정성, 리프로그래밍 기술, 및 기원 세포의 결과로써의 유전자 발현과 CNV사이의 상관관계를 판별했다. 그러나, 핵형 이상 및 세포주 안정성은 변 연구에서 기원 세포 및 그들의 이전의 세포 확장 이력으로 구별되지 않았으며, 오직 작은 수의 비정상적 fib-iPSC 만이 분석되었다.

[0238] iPSC의 메틸화 및 전사 프로파일은 혈액 및 기원 섬유아세포 세포에 기반해 구분되지만, 그들은 체세포 후생유전학적 기억 프로파일에 직접적으로 귀속될 수는 없었다. 이 군은 또한 통합적 리프로그래밍 방법을 사용해 생성된 세포주에서 더 높은 수준의 CNV에의 경향을 관찰했다. 최근에, 또 다른 군은 다른 어떠한 부모 조직 또는 더 많은 이상 DNA 메틸화를 가진 그들의 iPSC와 비교했을 때 그들의 메틸화 프로파일에서 (더 많은 과-메틸화 상태) 혈액 세포 및 유도된 iPSC는 진짜 hiPSC 및 ESC와 훨씬 가까움을 밝혔으며, 이는, 성인 PBMC 또는 계대 혈과 같은, 이전에 조직-배양에서 확장되지 않은 세포군이 리프로그래밍 및 iPSC 단계에서 세포유전학적 안정성의 유지를 위한 더 선호되는 선택지 일 수 있다는 발명자들의 주장을 지지하는 것이다.

[0239] 피부 섬유아세포, LCL, 상피세포, 및 지방 줄기세포와 같은 확장된 체세포 유형들로부터 형성된 iPSC에 비해 비-확장된 PBMC로부터 유도된 iPSC의 유전적 안정성에 근원이 되는 메카니즘은 아마도 다 요인적일 것이다. 첫째, 골수 적소는 신체의 거의 모든 다른 세포 유형들 보다 (BNID 101940) 혈액의 더 잦은 회전(turnover) (PBMC 계통의 대부분의 세포에서 1-5일)이 가능하게 한다. 그러므로, 숙주 혈액은 몇 달에서 년에 걸쳐 재생하는 상주 피부 섬유아세포, 상피세포 또는 지방세포에 비해 훨씬 덜 "노화"되었다고 간주될 수 있다. 특히, 공여자-유래 피부 섬유아세포, LCL, 상피세포 및 지방세포의 리프로그래밍은 조직-배양에서 유의미한 기간의 생체 외 체세포 확장을 필요로 한다. 이 인자들은 증가된 조직 배양-연관된 스트레스와 노화를 가진 시작 세포 풀(pool)로 귀결될 수 있고, 따라서 감소된 DNA 복구능에 취약하도록 만들어질 수 있다. 그러므로, 이전에 확장된 체세포는 어느정도의 이질성 및 내재적 유전자형 불안정성을 갖고 시작 할 수 있으며, 낮은-수준의 모자이크 형

성은 리프로그래밍 이전의 대규모의 이중의 세포 배양에서의 통상적인 G-밴드 핵형 분석에는 검출되지 않은 채로 남아있을 수 또한 있다. 결과적으로, fib-iPSC, LCL-iPSC 또는 상피-iPSC 세포주는 낮은 수준의 핵형 이상이 유의미한 클론 증식 및 확장에 의해 확대되어 분리될 수 있다. 이 위험은 발명자들의 방법에서는 분리된PBMC가 어떠한 이전의 세포 확장 없이 분리 직후에 리프로그래밍 개시되므로 회피될 수 있다. 마지막으로, PBMC 5p 리프로그래밍 프로토콜은 리프로그래밍 인자 중 하나인 SV40LT가 PBMC 세포 사멸을 최소화하며 표면 부착을 증진하는 추가적인 에피솜 플라스미드를 포함하고, 이 또한 스트레스가 많은 세포 리프로그래밍기에 PBMC 안정성을 향상시킬 수 있다. 리프로그래밍 인자 콕테일의 하나의 성분으로써 SV40LT의 사용은 전이유전자가 에피솜 플라스미드 리프로그래밍으로부터 유도된 iPSC 세포주들의 유전체에 통합되지 않으므로 비-형질도입적임이 과거에 보여졌으며, 이 또한 발명자들의 데이터로 지지되는 것이다. 섬유아세포와 같이 미리-확장된 체세포 유형이 5p 프로토콜로 리프로그래밍 된다면 더 높은 유전적 안정성을 획득하는 것이 가능하나, 발명자들은 미리-증식된 세포와 비증식된 PBMC사이에서 리프로그래밍에서의 이 단일한 차이가 핵형 안정성에서의 방대한 차이들을 완전히 설명하지는 못한다고 느낀다. 중요한 것은, 추가적인 인자들을 제외하고, 모든 미리-확장된 세포 유형들 및 비확장된 혈액-유래 iPSC는 유사한 비-통합적 에피솜 리프로그래밍 방법을 사용해 리프로그래밍되었으며 동일한 피더-없는 Matrigel®/mTeSR1™ 세포 배양 및 수동 StemPro® EZPassage™ 도구로 유지되었다. 그럼에도 불구하고, 만약 발명자들의 새로운 5p 프로토콜이 비-확장된 PBMC를 넘어 추가적인 세포 유형의 리프로그래밍을 용이하게 했다면, 그것은 이 분야의 대단한 발전일 것이며, 진행 중인 연구가 최적화된 프로토콜을 사용한 섬유아세포 리프로그래밍을 평가된다. RIKEN 기관에 의해 후원된 나이-관련된 시력 감퇴를 치료하기 위한 최초의 자가 인간 iPSC 임상시험은 환자의 원래의 섬유아세포에서는 검출되지 않았던 단일 뉴클레오타이드 변이(single nucleotide variations, SNV) 및 CNV가 환자 iPSC 세포주에서 검출되었기 때문에 유예되었다. CNV들은 모두 단일-유전자 결설이었으나, SNV들 중 하나는 암-관련된 체세포 돌연변이 데이터베이스에서 과거에 관별되었다. 이는 안정적 핵형이 인간 iPSC의 임상 적용의 성공에 가장 중요함을 강조한다. 추가로, 예측적 독성학 및 치료법 발견을 위한 대량 신속 약물 스크리닝을 위한 iPSC 및 유도체들의 스케일-업은 상당한 세포 안정성을 갖고 있는 iPSC 공급원을 필요로 한다. 비-증식된 PBMC에서의 이 최적의 리프로그래밍 방법은 획득된 유전체 이상의 효과를 최소화 할 것이다. 이와 함께, 이 결과들은 리프로그래밍 이전의 전-배양의 시기와 품질 뿐만 아니라 리프로그래밍 기술을 최적화가 iPSC 세포주의 장기적 안정성에 중요함을 강조한다. 이 데이터는 iPSC 질병 모델화 연구들의 더 높은 재현 가능성을 도울 뿐만 아니라, 임상 및 연구 발견 적용을 위한 iPSC-유래 세포 생산물의 안전성을 개선하는데 도움을 줄 것이다.

- [0240] 상기 기술된 다양한 방법 및 기술은 본 발명을 수행하는 다수의 방법을 제공한다. 물론, 기술된 모든 목표 또는 이점이 본 발명에서 기술된 임의의 특정 구현예에 따라 달성될 수 있는 것이 아님이 이해된다. 따라서, 예를 들어, 통상의 기술자는 본 발명에서 교시 또는 제시될 수 있는 다른 목적 또는 이점을 달성할 필요 없이 방법이 본 발명에 교시된 이점 또는 이점의 균을 달성하거나 최적화하는 방식으로 수행될 수 있음을 인식할 것이다. 다양한 유리한 및 분리한 대안이 본 발명에서 언급된다. 일부 바람직한 구현예가 특정하게 하나, 또 다른, 또는 여러 유리한 특성을 포함하는 반면, 다른 구현예는 특정하게 하나, 또 다른, 또는 여러 불리한 특성을 제외하는 반면, 다른 구현예는 특정하게 하나, 또 다른, 또는 여러 유리한 특성의 제외를 통해 본 발명의 불리한 특성을 완화시키는 것이 이해된다.
- [0241] 또한, 통상의 기술자는 다른 구현예로부터 다양한 특성의 적용을 인식할 것이다. 유사하게, 각각의 그런 요소, 특성 또는 단계와 공지된 다른 균등물뿐만 아니라, 상기 논의된 다양한 요소, 특성 및 단계는 본 발명에 기술된 원리에 따른 방법을 수행하기 위해 통상의 기술자에 의해 혼합 및 일치될 수 있다. 다양한 요소, 특성, 및 단계들 중 일부는 다양한 구현예에 특정하게 포함될 것이며 다른 것들은 특정하게 제외될 것이다.
- [0242] 본 발명이 특정 구현예 및 실시예의 문맥상에서 기술되었지만, 발명의 구현예가 특정하게 기술된 구현예를 넘어 다른 대안적인 구현예 및/또는 이의 용도 및 변형 및 균등물로 확장된다는 것이 통상의 기술자에게 이해될 것이다.
- [0243] 많은 변형 및 대안적인 요소가 본 발명의 구현예에 기술되었다. 여전히 추가적인 변형 및 대안 요소가 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 이들 변형들 중에는 제한 없이, 혈액 세포, 혈액의 세포 성분, 이로부터 유래된 만능 줄기세포, 혈액 세포 유래 만능 줄기세포 유도과 관련된 기술 및 조성물, 분화 기술 및 조성물, 그런 세포와 관련된 바이오마커, 및 본 발명의 교시를 통해 생성된 산물의 특정 용도가 있다. 본 발명의 다양한 구현예는 임의의 이들 변형 또는 요소를 특정하게 포함되거나 제외할 수 있다.
- [0244] 일부 구현예에서, 본 발명의 특정 구현예를 기술 및 청구하는데 사용된 성분, 농도, 반응 조건 등과 같은 특성

의 양을 나타내는 숫자는 어떤 경우에는 "약"이라는 용어로 변형된 것으로 이해된다. 따라서, 일부 구현예에서, 서면 기술 및 첨부된 청구 범위에 설명된 수치 변수는 특정 구현예에 의해 획득하고자 하는 원하는 특성에 따라 다를 수 있는 근사치이다. 일부 구현예에서, 수치 변수는 보고된 유효 숫자 자릿수를 고려하고 일반적인 반올림 기법을 적용하여 해석되어야 한다. 본 발명의 일부 구현예의 넓은 범위를 설명하는 수치 범위 및 변수가 근사치임에도 불구하고, 특정 실시예에서 설명된 수치 값은 실행 가능한 한 정확하게 보고된다. 본 발명의 일부 구현예에서 제시된 수치 값은 이들 각각의 테스트 측정에서 발견된 표준 편차로부터 필연적으로 야기되는 특정 오차를 함유할 수 있다.

[0245] 일부 구현예에서, 본 발명의 특정 구현예를 기술하는 문맥 (특히, 하기의 청구 범위의 특정 맥락에서)에서 사용된 용어 "a" 및 "an" 및 "the" 및 유사한 언급은 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 본 발명에서 값의 범위의 열거는 단지 범위 내에 속하는 각각의 개별 값을 개별적으로 말하는 약식 방법으로서 제공하기 위한 것이다. 본 발명에서 달리 제시되지 않는 한, 각 개별 값은 본 발명에 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 통합된다. 본 발명에 기술된 모든 방법은 본 발명에서 달리 제시하지 않는 한 또는 문맥상 명백히 반박하지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 임의의 용도 및 모든 실시예, 또는 본 발명의 특정 구현예에 대해 제공된 예시적인 언어 (예를 들어, "와 같이")는 단지 본 발명은 더 잘 설명하기 위한 것이며 달리 청구된 본 발명의 범위에 제한을 두는 것이 아니다. 본 명세서에서 어떠한 언어도 본 발명의 실시예 필수적인 임의의 비-청구된 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0246] 본 발명에 기술된 본 발명의 대안적인 요소 또는 구현예의 군은 제한으로 해석되어서는 안된다. 각 군의 구성원은 개별적으로 또는 군의 다른 구성원과 또는 본 발명에 기재된 다른 요소와 임의의 조합으로 언급되거나 청구될 수 있다. 군의 하나 이상의 구성원은 편의 및/또는 특허성의 이유로 군에 포함되거나 군으로부터 삭제될 수 있다. 그러한 임의의 포함 또는 삭제가 발생했을 때, 명세서는 변형된 군을 함유하는 것으로 간주되므로 첨부된 청구항에서 사용된 모든 마쿠시 군의 서면 기술을 수행한다.

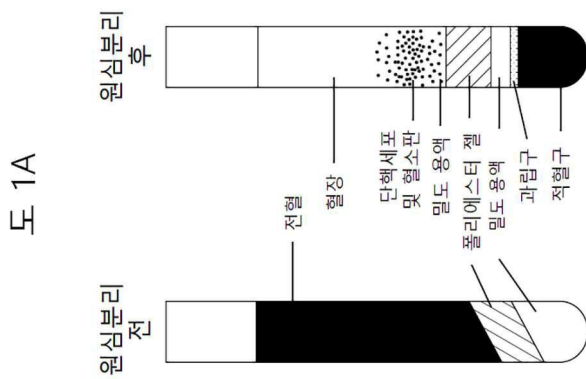
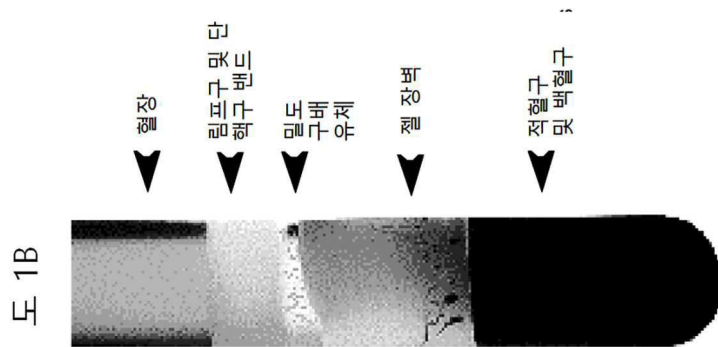
[0247] 본 발명을 수행하기 위해 발명자들에게 공지된 최상의 모드를 포함하는 본 발명의 바람직한 구현예가 여기에 기술된다. 이들 바람직한 구현예에 대한 변형이 전술한 설명을 읽음으로써 통상의 기술자에게 명백해질 것이다. 통상의 기술자가 그러한 변형을 적절히 사용할 수 있고, 본 발명이 본 발명에 구체적으로 기술된 것과 다르게 실시될 수 있음이 고려된다. 따라서, 본 발명의 많은 구현예는 준거법에 의해 허용하는 바와 같이 여기에 첨부된 청구항에서 인용된 주제의 모든 변형 및 균등물을 포함한다. 더욱이, 달리 나타내지 않는 한 또는 문맥상 명백히 반박하지 않는 한 이의 모든 가능한 변형에서 상기-기재된 요소의 임의의 조합이 본 발명에 포함된다.

[0248] 또한, 본 명세서 전반에 걸쳐 특허 및 인쇄 간행물에 대한 많은 참고 문헌이 만들어졌다. 각각의 상기 인용된 참고 문헌들 및 인쇄된 간행물들은 이들 전체가 참조로서 개별적으로 본 발명에 통합된다

[0249] 마지막으로, 본 발명에 기술된 본 발명의 구현예가 본 발명의 원리를 설명하는 것으로 이해된다. 사용될 수 있는 다른 변형은 본 발명의 범위 내에 있을 수 있다. 따라서, 제한적이지 않은 예로서, 본 발명의 대체 구성이 본 발명의 교시에 따라 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 구현예는 도시되고 기술된 바와 같이 정확하게 제한되지 않는다.

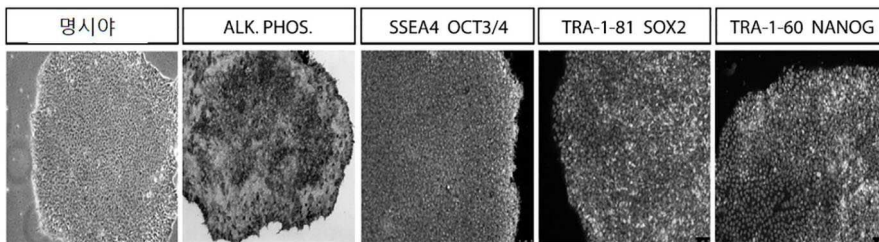
도면

도면1

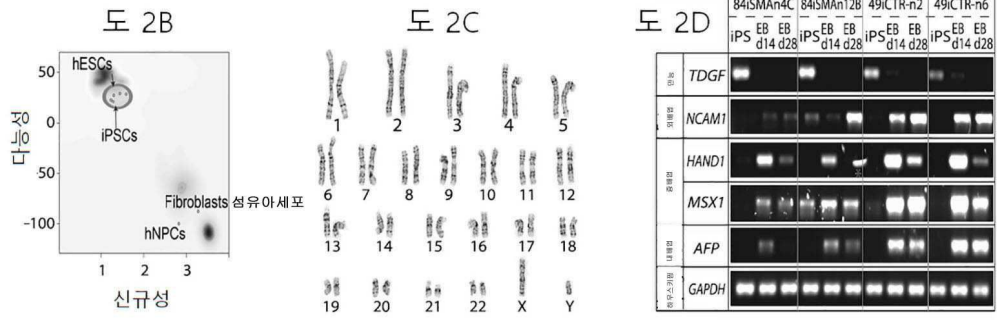


도면2a

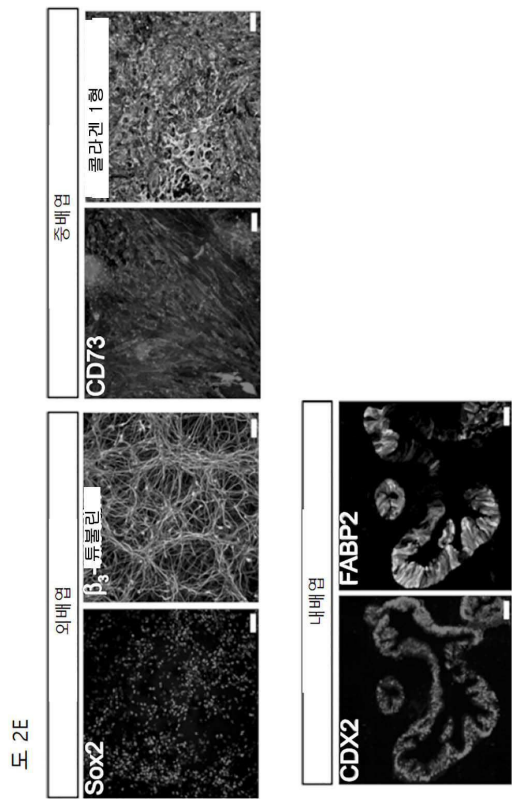
도 2A



도면2bcd



도면2e

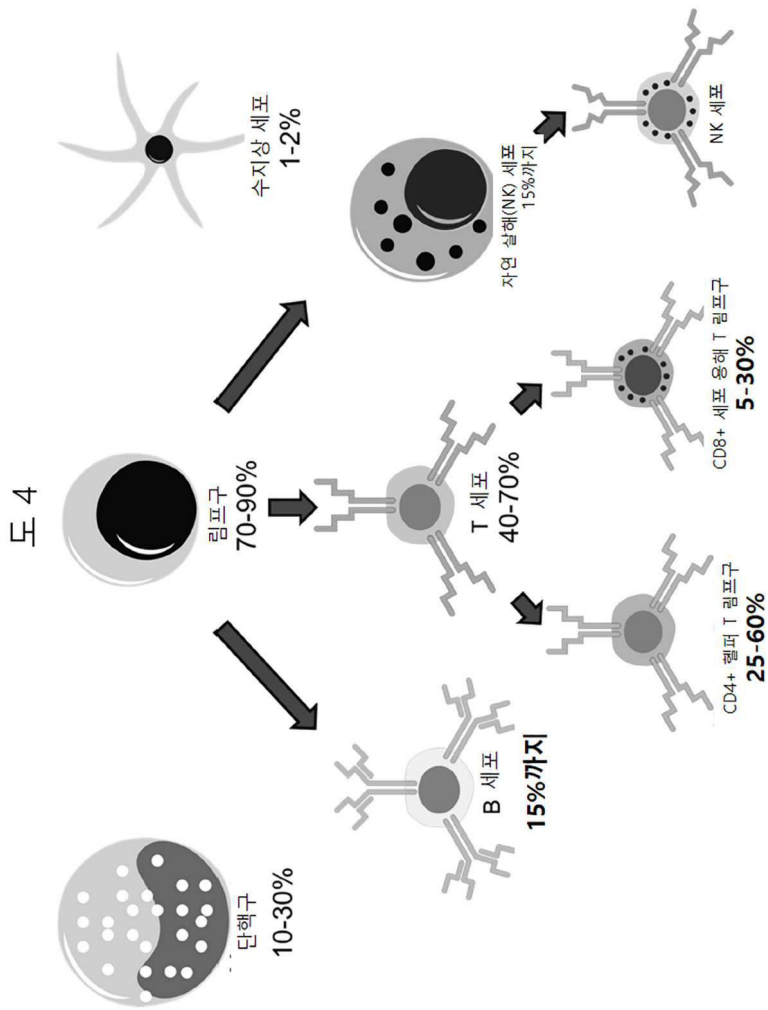


도면3

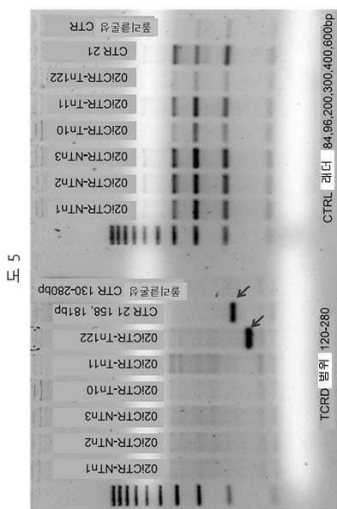
도 3



도면4

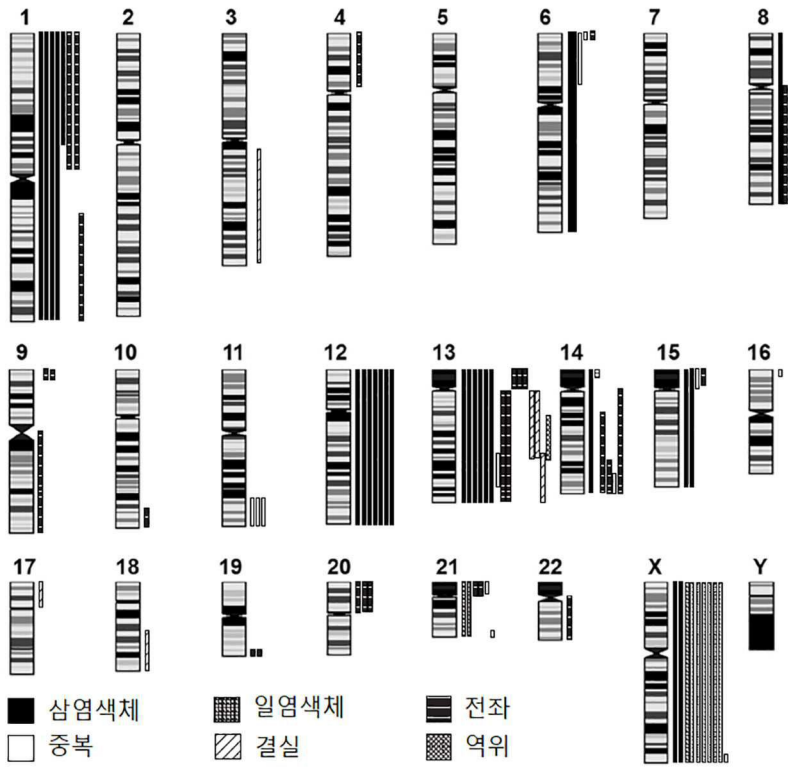


도면5



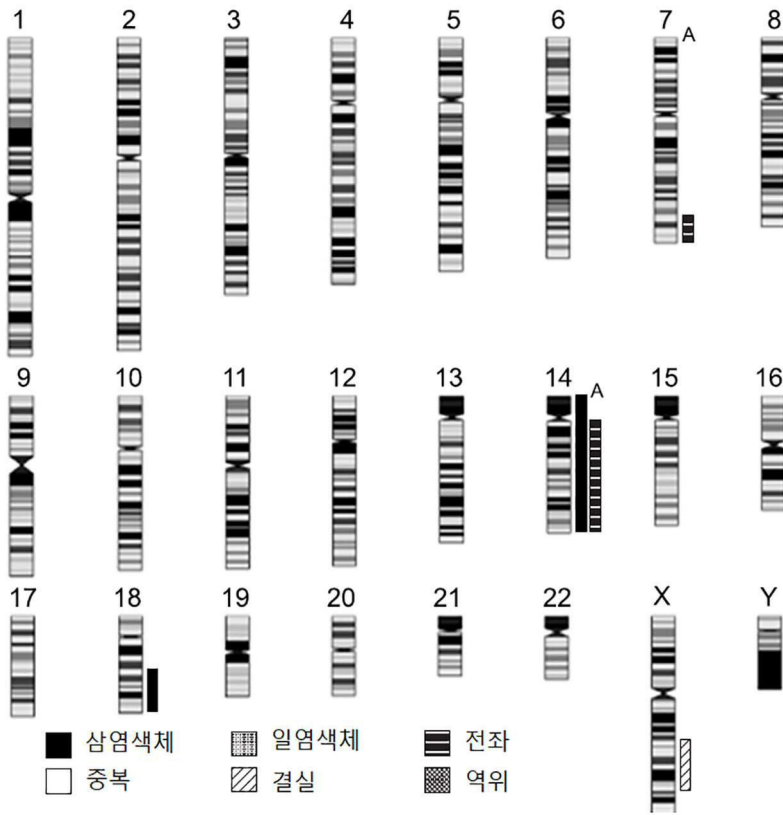
도면6a

도 6A

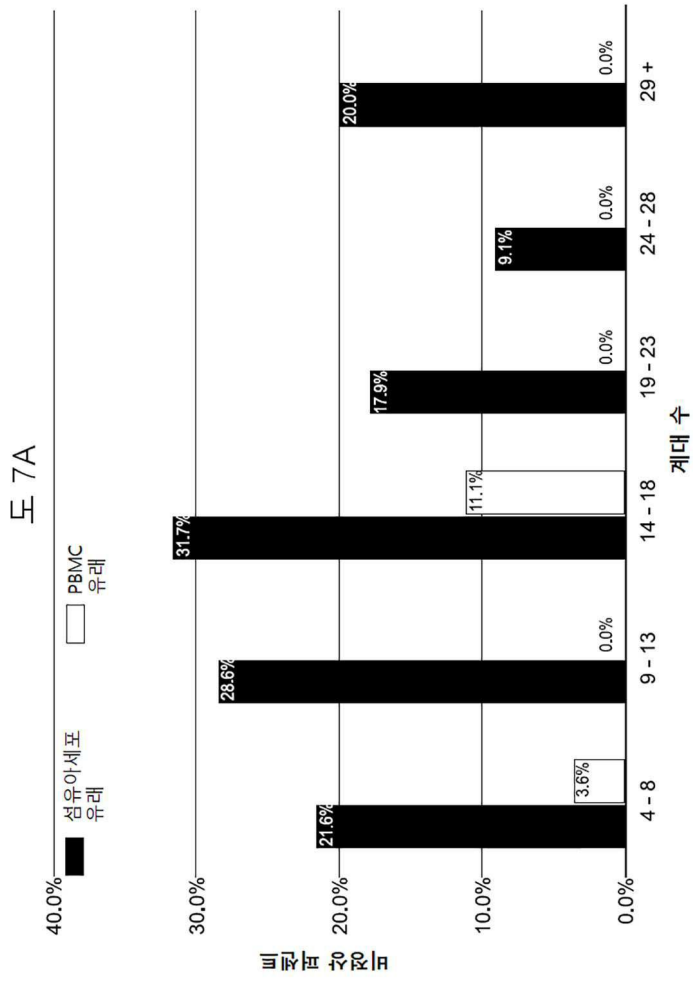


도면6b

도 6B

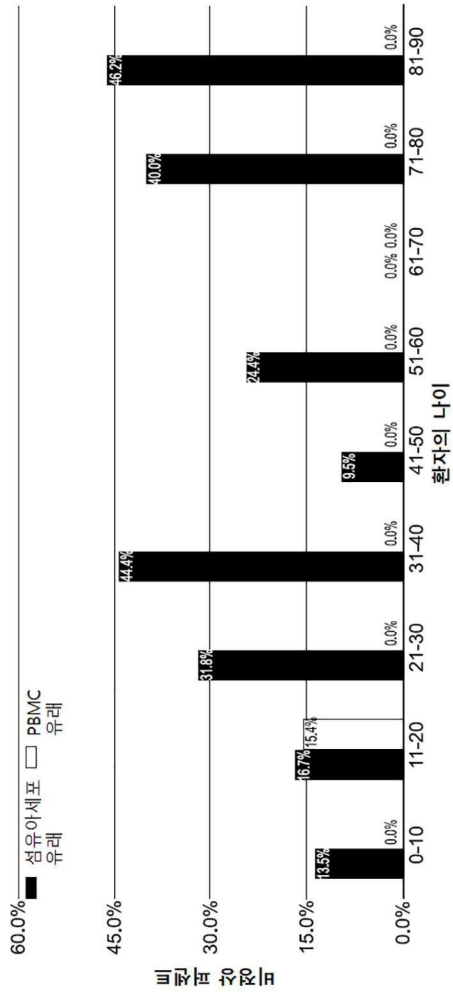


도면7a

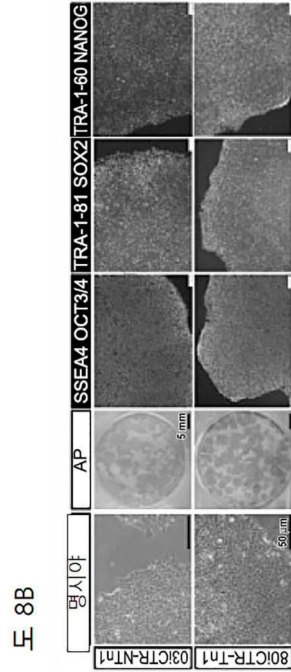
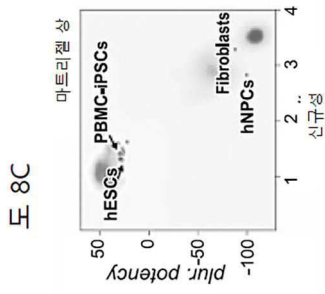
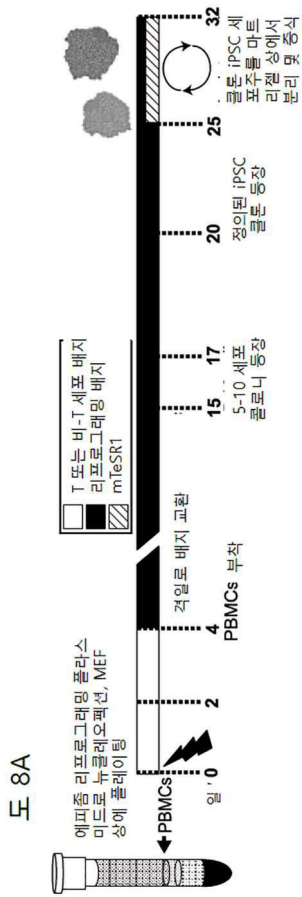


도면7b

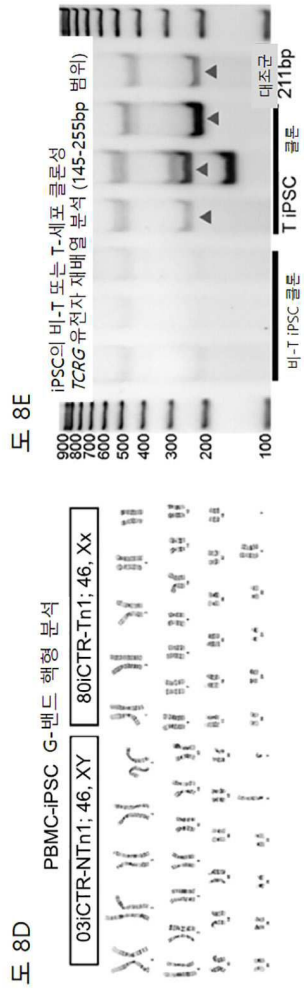
도 7B



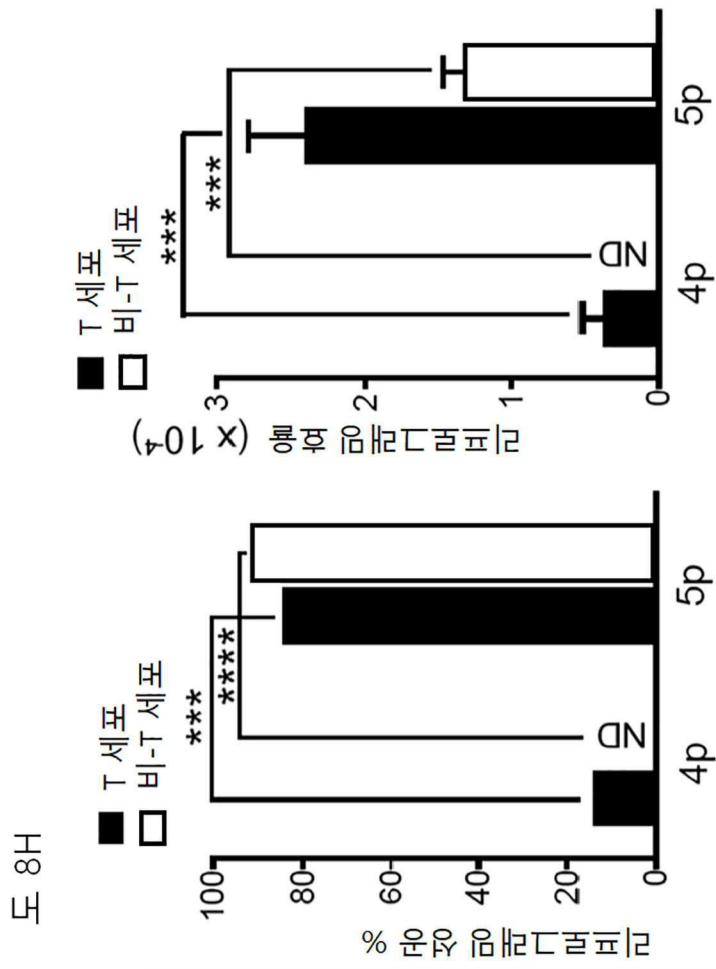
도면8abc



도면8de

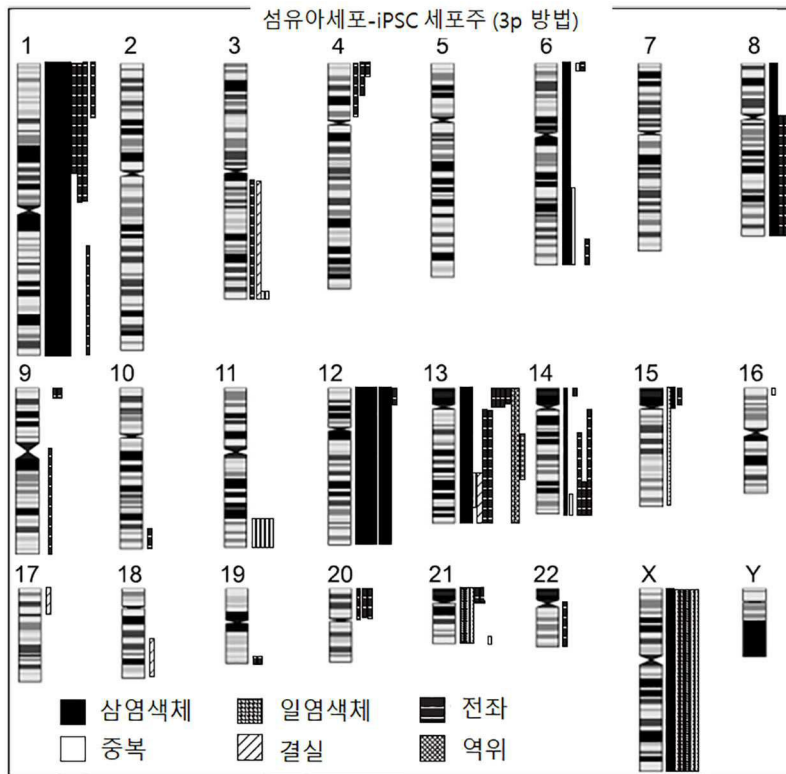


도면8h



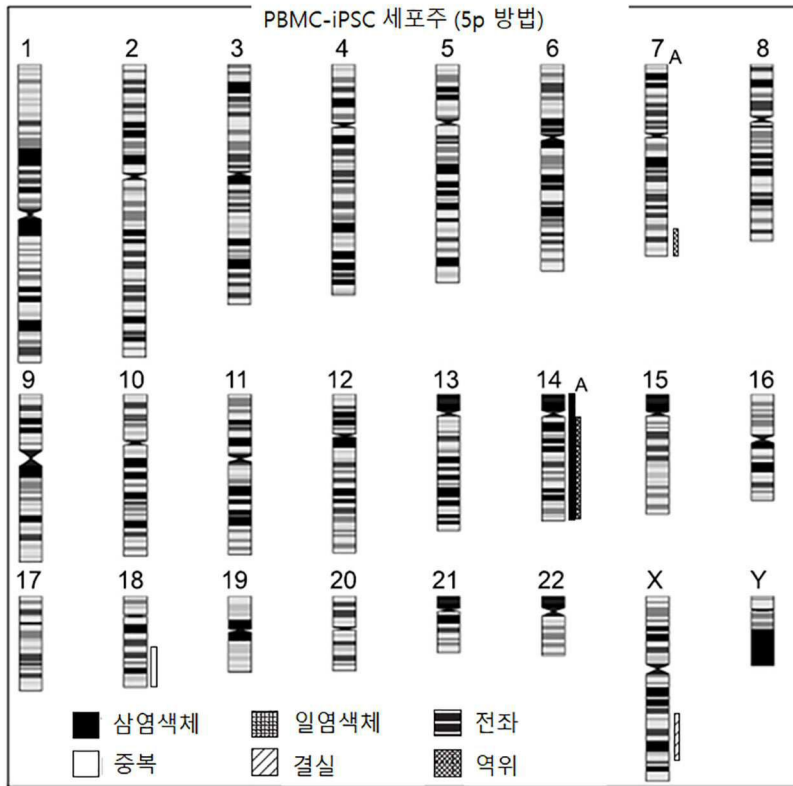
도면8i

도 8i

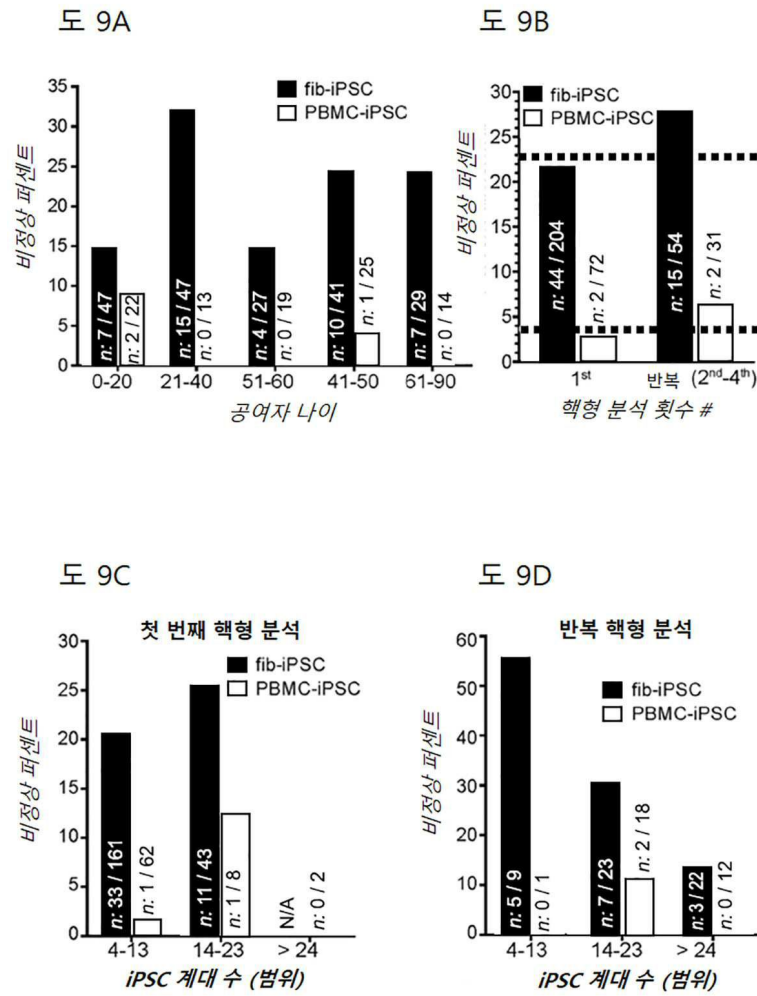


도면8j

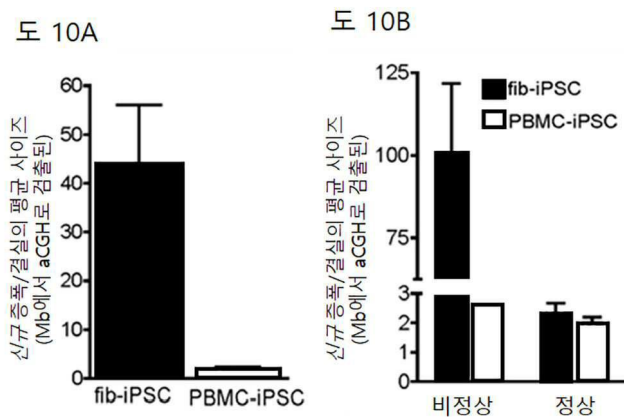
도 8J



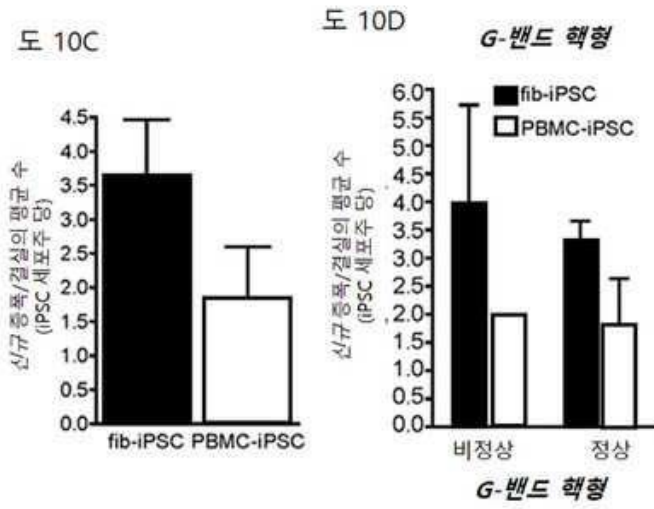
도면9



도면10ab



도면10cd

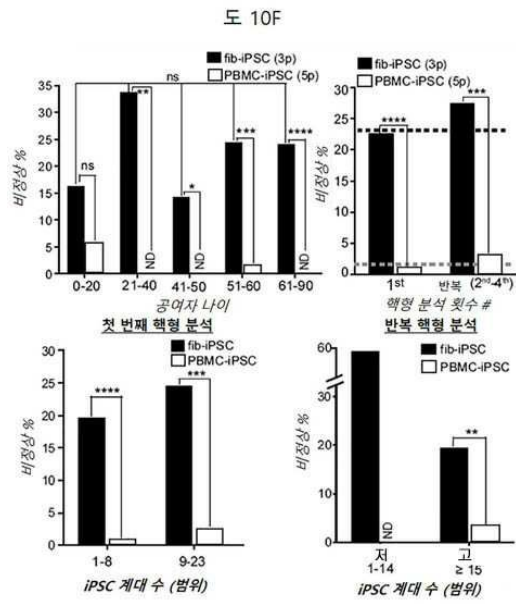


도면10e

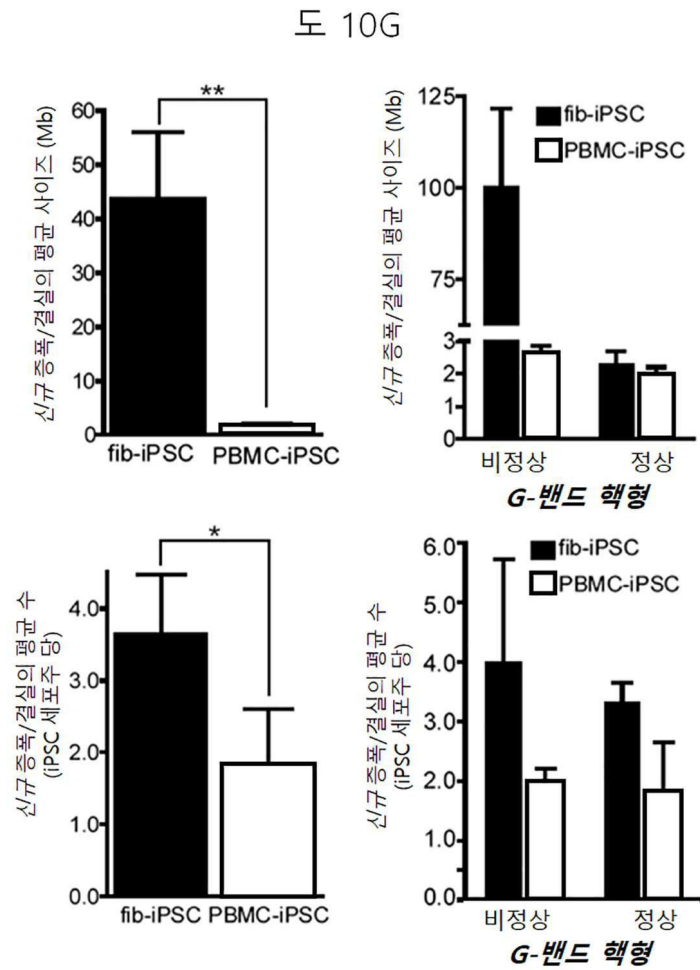
도 10E

Chr. Amp/Del	개시-종결 (bp)	크기 (Mb)	Chr. 밴드	유전자
7 Amp	121,471,771-122,678,877	1.2-1.5	q31.32	PTPRE1, AASS, CADPS2, TAS2R16, FEZF1, LOC154860, RNF133, RNF148
10 Del	3,335,606-4,720,135	1.2-1.4	q15.2-q15.1	KLF6, LOC100216001, LOC336868
16 Del	32,624,578-33,604,468	0.8-1.0	p11.2	TP53TG3, TP53TG3B, LOC63650, SLC6A10P, LO, C390705
21 Del	9,832,836-10,944,060	1.1	p11.2 p11.1	TPTE, LOC100132288

도면10f



도면10g

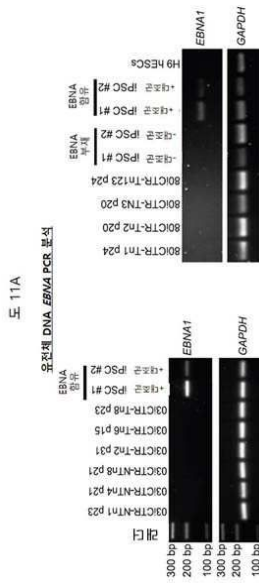


도면10h

도 10H

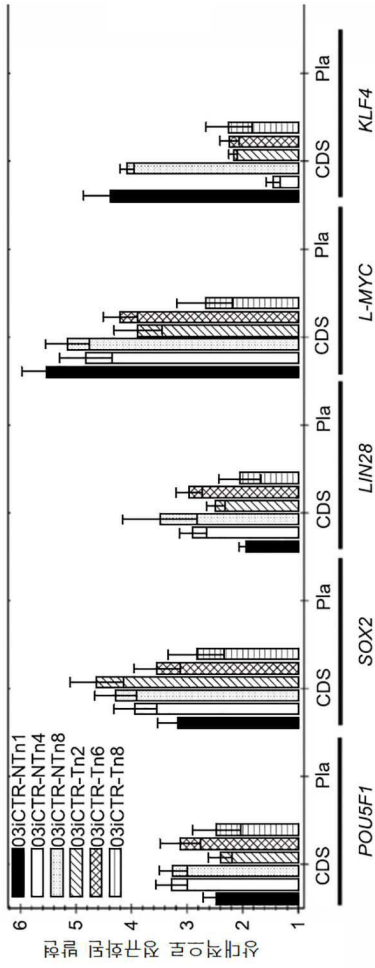
염색체	Fib-iPSC에서의 이상 %				순위			
	중계	획득	소실	재배열	중계	획득	소실	재배열
chr1	11.7%	15.0%	0.0%	12.2%	2	2	8	2
chr2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	21	14	8	17
chr3	4.3%	5.0%	7.7%	2.4%	9	6	3	11
chr4	3.2%	0.0%	0.0%	7.3%	12	14	8	4
chr5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	21	14	8	17
chr6	6.4%	10.0%	0.0%	4.9%	6	4	8	7
chr7	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	21	14	8	17
chr8	4.3%	5.0%	0.0%	4.9%	9	6	8	7
chr9	4.3%	2.5%	0.0%	7.3%	9	11	8	4
chr10	1.1%	0.0%	0.0%	2.4%	16	14	8	11
chr11	5.3%	12.5%	0.0%	0.0%	8	3	8	17
chr12	9.6%	20.0%	0.0%	2.4%	3	1	8	11
chr13	14.9%	10.0%	7.7%	22.0%	1	4	3	1
chr14	6.4%	5.0%	0.0%	9.8%	6	6	8	3
chr15	3.2%	2.5%	7.7%	2.4%	12	11	3	11
chr16	1.1%	2.5%	0.0%	0.0%	16	11	8	17
chr17	1.1%	0.0%	7.7%	0.0%	16	14	3	17
chr18	1.1%	0.0%	7.7%	0.0%	16	14	3	17
chr19	2.1%	0.0%	0.0%	4.9%	15	14	8	7
chr20	3.2%	0.0%	0.0%	7.3%	12	14	8	4
chr21	7.4%	5.0%	23.1%	4.9%	5	6	2	7
chr22	1.1%	0.0%	0.0%	2.4%	16	14	8	11
chrX	8.5%	5.0%	38.5%	2.4%	4	6	1	11

도면11a

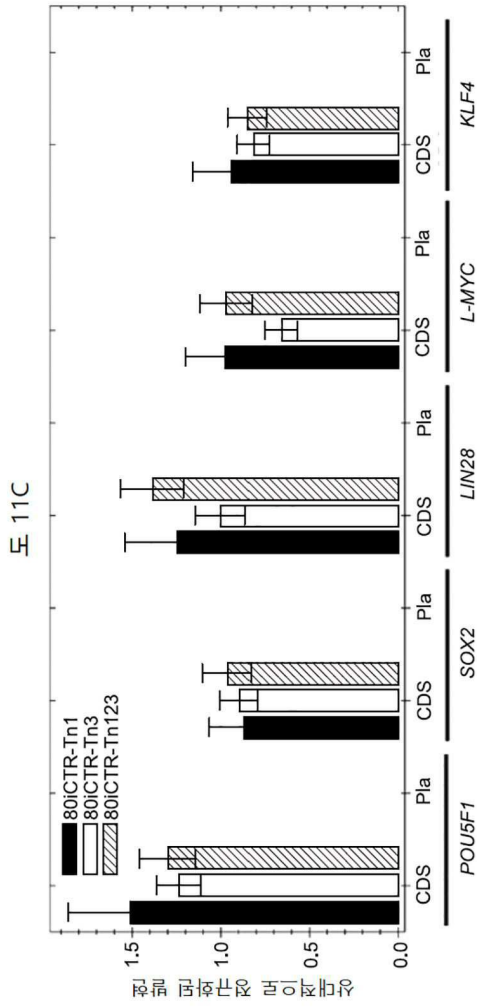


도면11b

도 11B

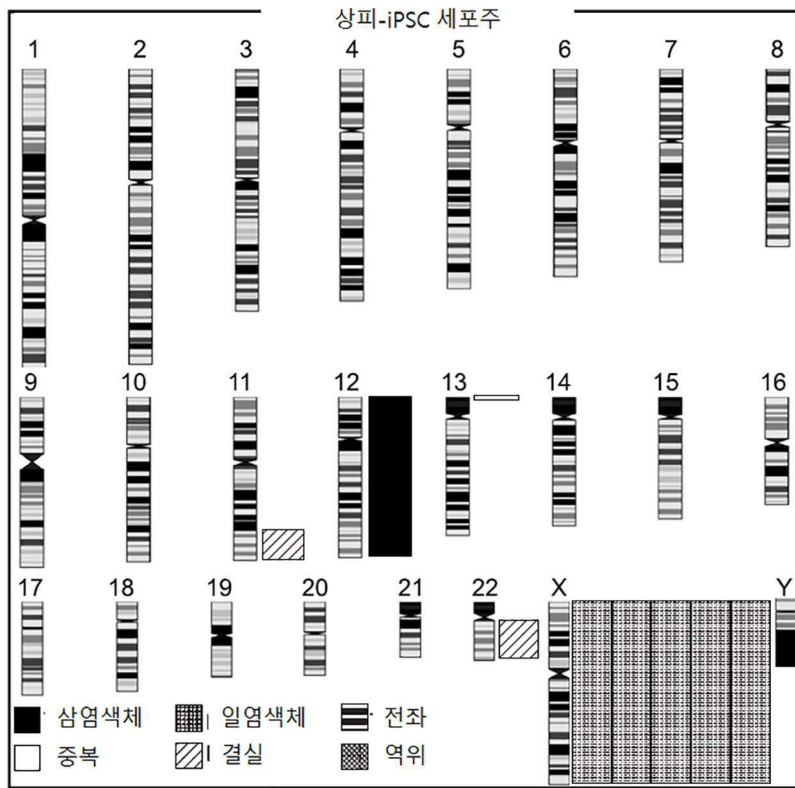


도면11c



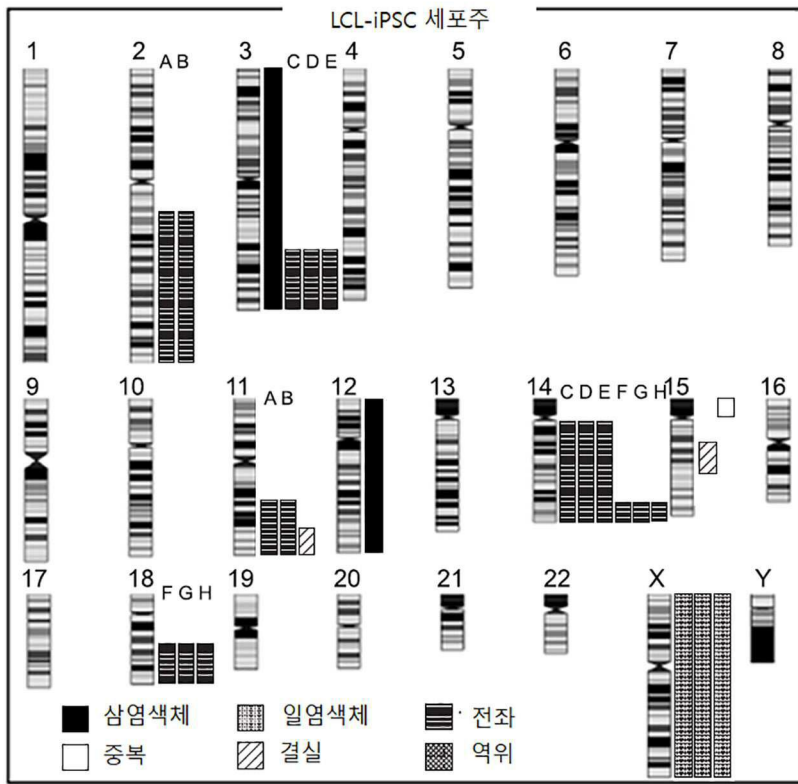
도면12a

도 12A



도면12b

도 12B



도면13a

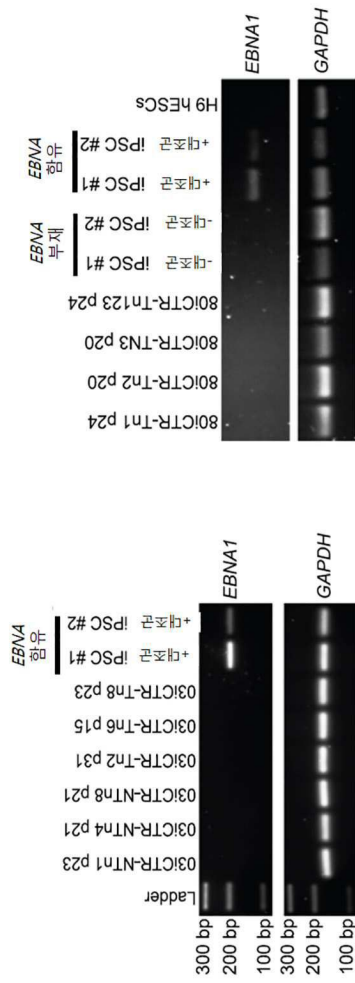
도 13A

샘플 이름	자기-재생	외배염	중배염	내배염
03ICTR-NTn1	5.05	1.81	4.76	2.28
80ICTR-Tn1	6.55	1.85	2.29	1.10

참조 표준에 대한 유전자 발현	상향 조절
$x > 1.5$	$x < -1.5$
$1.0 < x \leq 1.5$	$-1.5 \leq x < -1.0$
$0.5 < x \leq 1.0$	$-1.0 \leq x < -0.5$
$-0.5 \leq x \leq 0.5$	$-0.5 \leq x \leq 0.5$

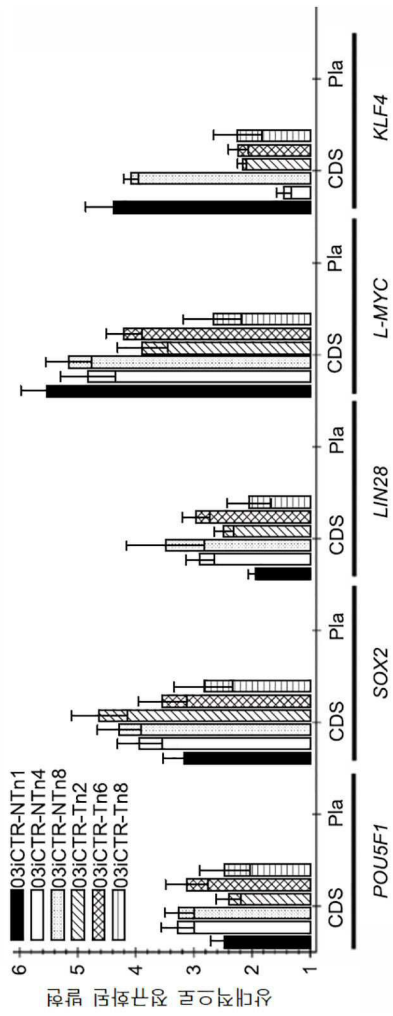
도면14a

도 14A

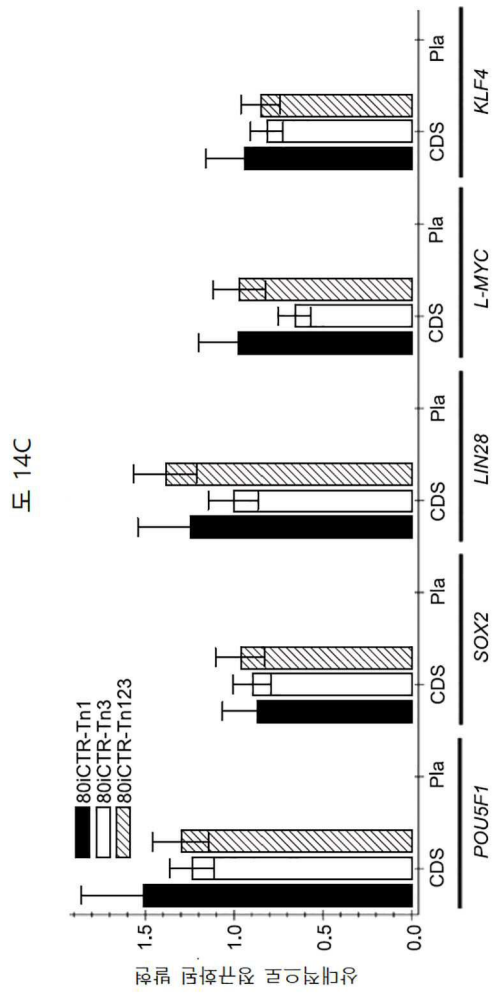


도면14b

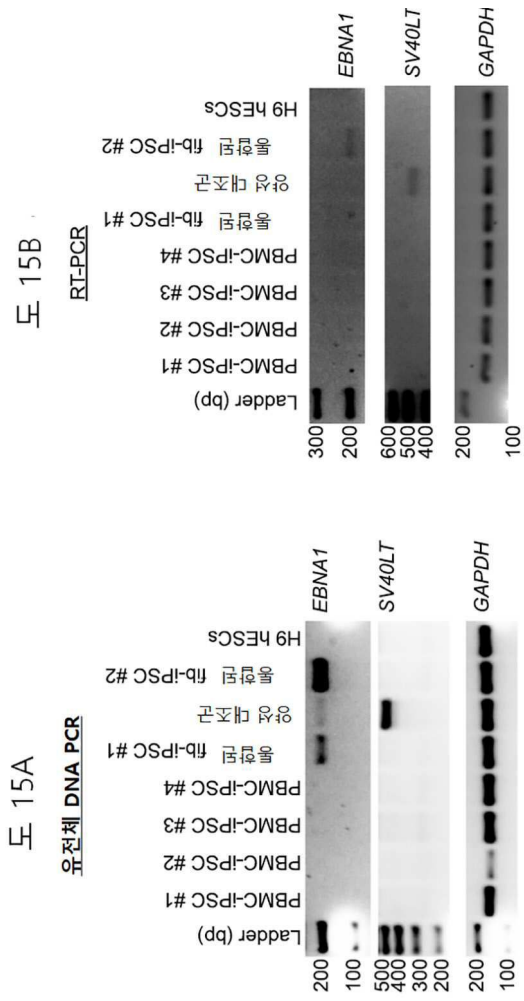
도 14B



도면14c

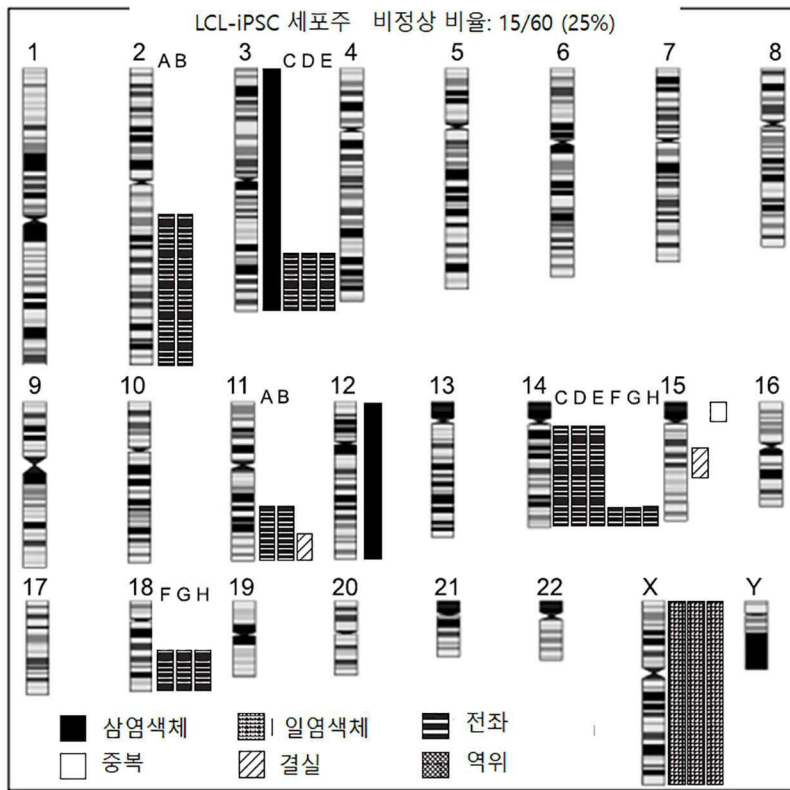


도면15



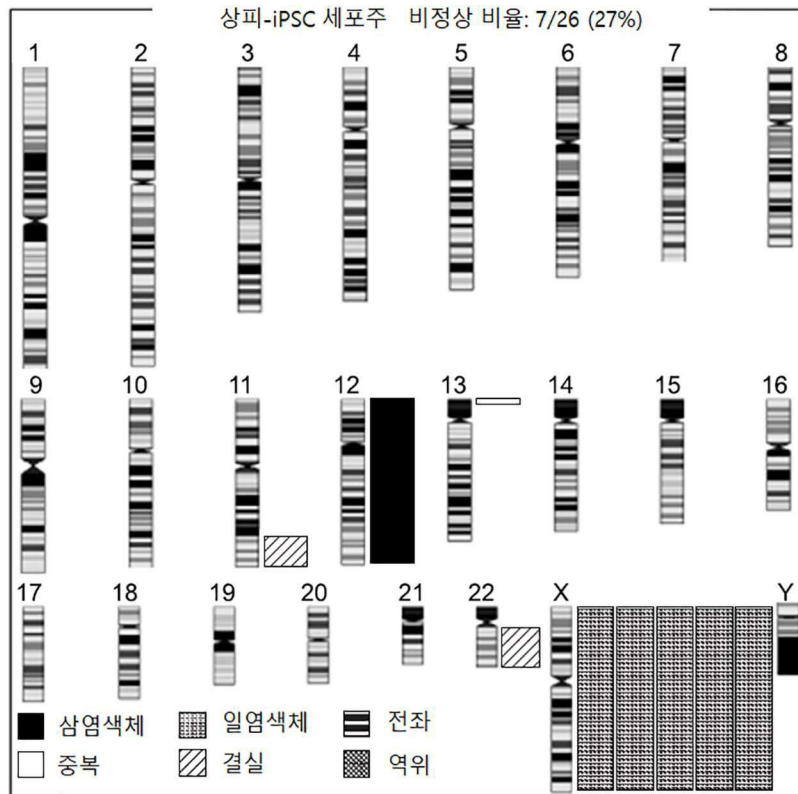
도면16a

도 16A



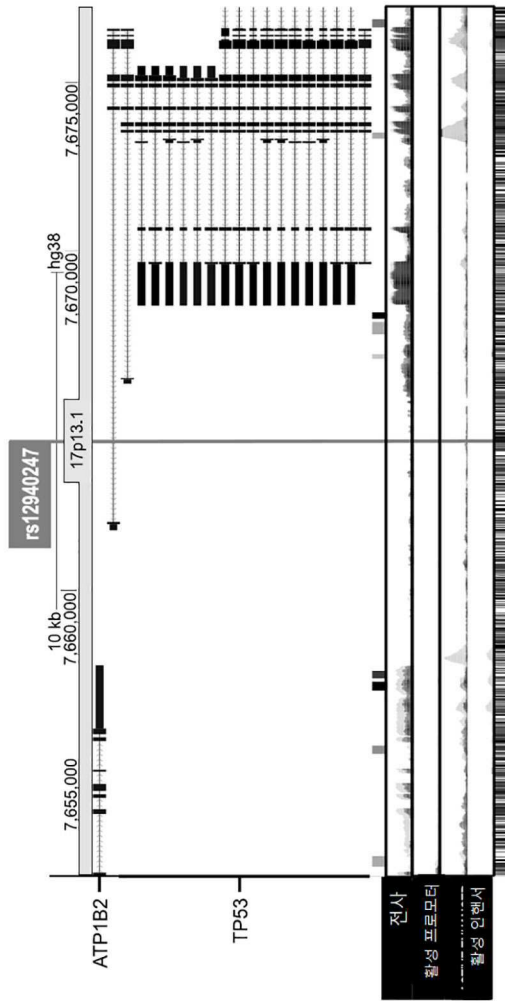
도면16b

도 16B



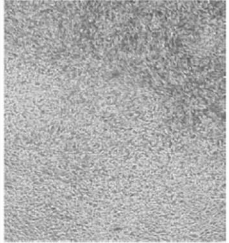
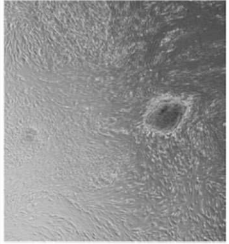
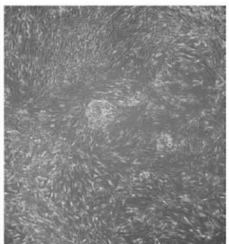
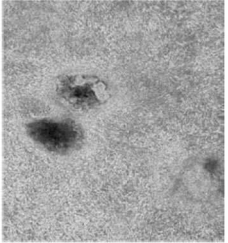

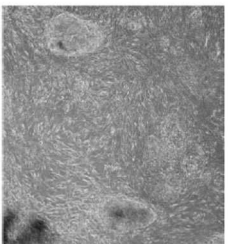
도면17

도 17



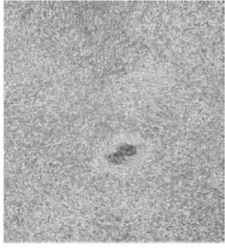
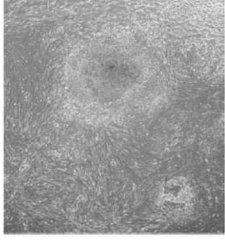
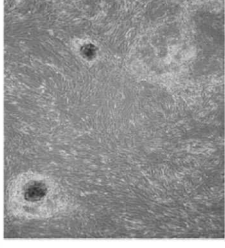
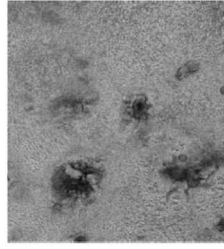
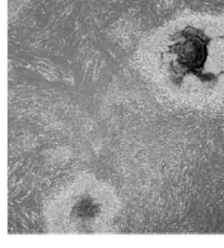
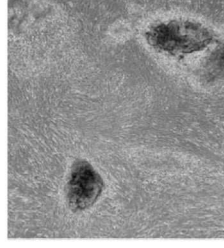
도면18a

도 18A

조건	1WP3	8PF5	9XH7
3 플라스미드			
5 플라스미드			

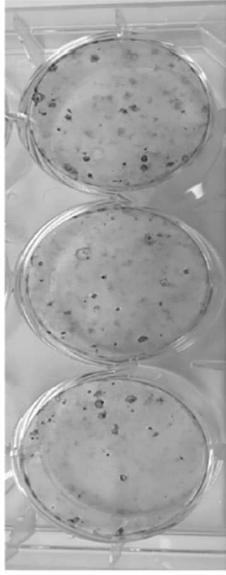
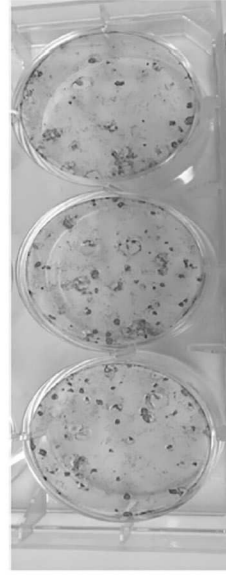
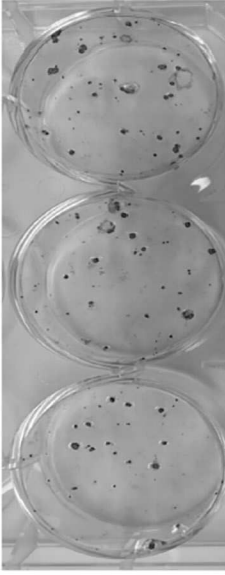
도면18b

도 18B

조건	1WP3	8PF5	9XH7
3 플라스미드			
5 플라스미드			

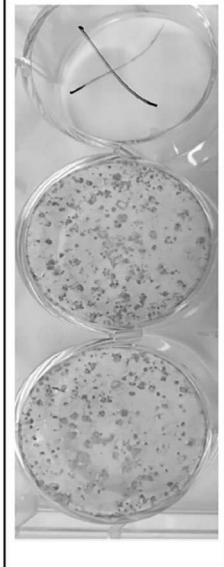
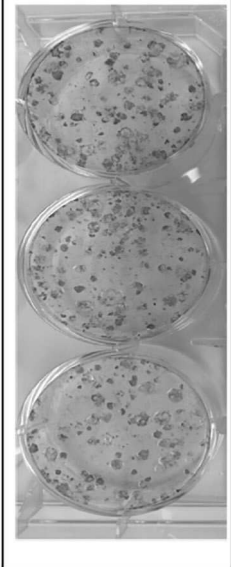
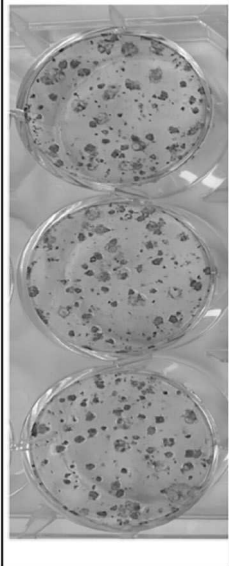
도면19a

도 19A

1WP3		~140 콜로니
8PF5		~92 콜로니
9XH7		~106 콜로니

도면19b

도 19B

1WP3*		~528 콜로니 (웰 1 및 2의 평균에 기반하 여 측정된 소 실 웰에서의 콜로니 ~176)
8PF5		~269 콜로니
9XH7		~356 콜로니

*한 웰에
서 MEF
를 들어
냄

도면20

도 20

플라스미드 혼합물 (3p)¹

플라스미드	리프로그래밍 인자	수량
pCXLE-hOCT3/4-shp53	OCT3/4 (POU5F1), shRNA to TP53	0.83 µg
pCXLE-hSK	SOX2, KLF4	0.83 µg
pCXLE-UL	LIN28, L-MYC	0.83 µg

플라스미드 혼합물 (4p)³

플라스미드	리프로그래밍 인자	수량
pCXLE-hOCT3/4-shp53	OCT3/4 (POU5F1), shRNA to TP53	0.83 µg
pCXLE-hSK	SOX2, KLF4	0.83 µg
pCXLE-UL	LIN28, L-MYC	0.83 µg
pCXLE-EBNA1	EBNA1	0.5 µg

플라스미드 혼합물 (5p)

플라스미드	리프로그래밍 인자	수량
pCXLE-hOCT3/4-shp53	OCT3/4 (POU5F1), shRNA to TP53	0.83 µg
pCXLE-hSK	SOX2, KLF4	0.83 µg
pCXLE-UL	LIN28, L-MYC	0.83 µg
pCXLE-EBNA1	EBNA1	0.5 µg
pEP4 E02S ET2K	OCT3/4 (POU5F1), SOX2, SV40LT, KLF4	0.83 µg

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER

SAREEN, Dhruv

ORNELAS, Loren A.

SVENDSEN, Clive

<120> A NOVEL AND EFFICIENT METHOD FOR REPROGRAMMING BLOOD TO INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

<130> 065472-000598W000

<150> 15/184,241

<151> 2016-06-16

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 ccccagggcc ccattttggt acc 23

<210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 acctcagttt gaatgcatgg gagagc 26

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 cattcaaact gaggtaaggg 20

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 tagcgtaaaa ggagcaacat ag 22

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 ttcacatgtc ccagcactac caga 24

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6	
tcacatgtgt gagaggggca gtgtgc	26
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 7	
ttcacatgtc ccagcactac caga	24
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 8	
tttgtttgac aggagcgaca at	22
<210> 9	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 9	
accatcctt cctgcccgat caga	24
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 10	
ttggtaatgg agcggcggga cttg	24
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 11	
ccacctcgcc ttacacatga aga	23
<210> 12	
<211> 22	

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 tagcgtaaaa ggagcaacat ag 22
 <210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

 gcgaacccaa gaccaggcc tgctcc 26
 <210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 caggggtct gctgcaccg tgatg 25
 <210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 ggctgagaag aggatggcta c 21
 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 tttgttgac aggagcgaca at 22

 <210> 17
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

agccatatgg tagcctcatg tccgc 25
 <210> 18
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 tcaattctgt gcctccggga gcaggtagg 30
 <210> 19
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 agccatatgg tagcctcatg tccgc 25
 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 tagcgtaaaa ggagcaacat ag 22
 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 cctggaggag aagaggaaag a 21
 <210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 ttgaggacct ctgtgtatTT g 21
 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <400> 23
 tgctgtctcc atgtttgatg t 21

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 tctctgctcc ccacctctaa g 21

<210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 atcaggcca agacatagag a 21

<210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 gccaatgcaa ctiggacgtt 20

<210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 27

catagaagaa gaagaggatg aaga 24

<210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 gtagggattc gaggaatta ctga 24

<210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 atggaacacg accttgaga 19
 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 tgagcaggat gaggtctagg 20

 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 cacctcaacc tggagacaat 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 tgaagcaggc gtggtttcaa 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 tcgggggtgt tagagacaac 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 34	
ttccacgagg gtagtgaacc	20
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 35	
accacagtcc atgcatcac	20
<210> 36	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 36	
tccaccacc tgttgctgta	20
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 37	
tccttctacg gacggaactg	20
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 38	
agaaatgcct gaggaaagca	20
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 39	
gattcctcct ccaccctcac	20
<210> 40	

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 caatattctg cctggcctgg atg 23
 <210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 41

 ccacacccac tcagagccat t 21
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 caccaccacca ccaaacctt 20
 <210> 43
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 cgagaggacc ccgtggatgc agag 24
 <210> 44
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 ggcggccatc ttcagcttct ccag 24

 <210> 45
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 gaatgctgca aactgaccac gctggaac 28
 <210> 46
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 tggcattcaa gagggttttc agtctgga 28
 <210> 47
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 ctatcatgct ggctgcct 18
 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 48

 ctacaacacc cttctcacag 20