(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월04일
(11) 등록번호 10-1661940
(24) 등록일자 2016년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01) *C12N 15/12* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 5/074* (2010.01)
(21) 출원번호 10-2010-7002311
(22) 출원일자(국제) 2009년05월01일
심사청구일자 2014년04월30일
(85) 번역문제출일자 2010년02월01일
(65) 공개번호 10-2011-0015500
(43) 공개일자 2011년02월16일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2009/058873
(87) 국제공개번호 WO 2009/133971
국제공개일자 2009년11월05일
(30) 우선권주장
61/071,508 2008년05월02일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2007069666 A1

(73) 특허권자
고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠
일본 교토후 교토시 사쿄쿠 요시다혼마치 36반치 1
(72) 발명자
야마나카 신야
일본 교토후 교토시 사쿄쿠 쇼고인 가와하라쵸 53 고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠 인스티튜트 포 인테그레이티드 셀 마테리얼 사이언스 센터 포 아이피에스 셀 리서치 앤드 어플리케이션 나이
오키타 게이스케
일본 교토후 교토시 사쿄쿠 쇼고인 가와하라쵸 53 고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠 인스티튜트 포 인테그레이티드 셀 마테리얼 사이언스 센터 포 아이피에스 셀 리서치 앤드 어플리케이션 나이
(74) 대리인
특허법인코리아나

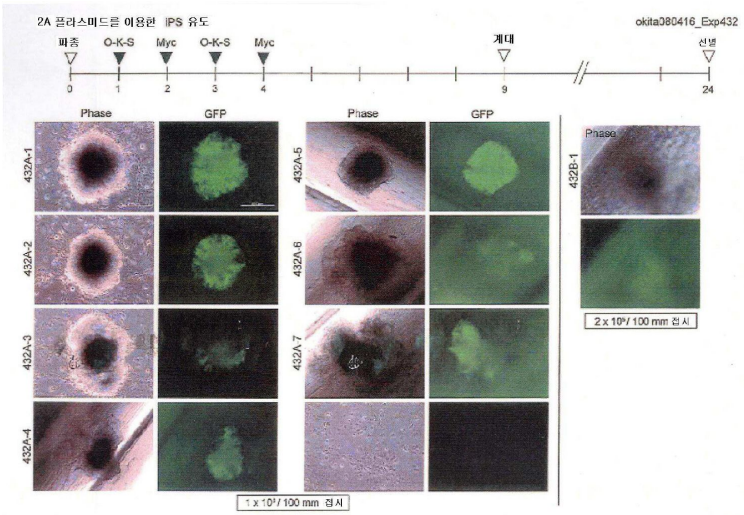
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **핵 초기화 방법**

(57) 요 약

본 발명은 초기화 인자를 인코딩하는 유전자 하나 이상이 포함된 1 종 이상의 비(非)-바이러스성 발현 벡터 (더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터) 를 체세포 내로 도입하는 단계를 포함하는, 유도 만능 줄기 세포의 제조 방법을 제공한다. 유도된 외인성 유전자 중 어떠한 것도 세포 게놈 내로 통합되지 않은 유도 만능 줄기 세포가 또한 제공된다.

대 표 도



(30) 우선권주장
61/136,246 2008년08월21일 미국(US)
61/136,615 2008년09월19일 미국(US)
61/193,363 2008년11월21일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

초기화 인자를 인코딩하는 유전자들을 체세포 내로, 상기 초기화 인자를 인코딩하는 유전자들이 포함된 하나 이상의 플라스미드 벡터를 이용해, 동시에 도입하는 단계를 포함하는, 유도 만능 줄기 세포의 제조 방법으로서,

하나 이상의 도입된 플라스미드 벡터의 전부 또는 일부가 염색체 내로 통합되지 않고,

초기화 인자는

(a) Oct3/4;

(b) Klf1, Klf2, Klf4 및 Klf5 로 이루어진 군으로부터 선택되는 Klf 패밀리 멤버;

(c) Sox1, Sox2, Sox3, Sox15, Sox17 및 Sox18 로 이루어진 군으로부터 선택되는 Sox 패밀리 멤버; 및

(d) c-Myc의 T58A 변이체, c-Myc, N-Myc 및 L-Myc 로 이루어진 군으로부터 선택되는 Myc 패밀리 멤버를 포함하며,

초기화 인자를 인코딩하는 유전자들 중 2 이상이 폴리시스트론 발현을 가능하게 하는 개재 서열을 가진 하나의 플라스미드 벡터에 포함되고,

초기화 인자를 인코딩하는 외인성 유전자가 6 일 이상 동안 세포에서 발현되는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 플라스미드 벡터가 염색체 외부에서 자율 복제할 수 있는 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 체세포 내로 도입되는 플라스미드 벡터의 수가 2 이상인 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제 1 항에 있어서, Klf 패밀리 멤버가 Klf4 이고, Sox 패밀리 멤버가 Sox2 이고, Myc 패밀리 멤버가 c-Myc 인 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 도입을 2 회 이상 반복하여 실시하는 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

제 1 항에 있어서, 개재 서열이 구제역 바이러스 유래의 2A 서열인 방법.

청구항 30

제 1 항에 있어서, Oct3/4, Klf 패밀리 멤버 및 Sox 패밀리 멤버를 인코딩하는 유전자가 하나의 플라스미드 벡터 내에 포함된 방법.

청구항 31

제 12 항에 있어서, c-Myc 를 인코딩하는 유전자가 개별 플라스미드 벡터에 포함된 방법.

청구항 32

제 1 항, 제 2 항, 제 8 항, 제 12 항, 제 14 항 및 제 29 항 내지 제 31 항 중 어느 한 항에 있어서, 체세포가 인간을 비롯한 포유동물의 체세포인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 체세포를 초기화 (reprogramming) 하여 유도 만능 줄기 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 배아 줄기 세포 (ES 세포) 는 인간 또는 마우스 초기 배아로부터 수립되어, 살아있는 유기체에서 발견되는 모든 세포 유형으로 분화될 가능성을 유지한 채로 장기간 동안 배양가능하다. 이러한 특징으로 인해, 인간 ES 세포는 파킨슨병, 소아 당뇨병, 및 백혈병을 비롯한 많은 질병에 대한 세포 이식 요법에 기여할 것으로 기대되고 있다. 그러나, ES 세포 이식은 장기 이식과 마찬가지로 거부반응을 야기하는 문제를 갖고 있다. 또한, 인간 배아를 파괴하여 수립되는 ES 세포의 이용에 대해 윤리적 관점에서 반대하는 사람이 적지 않다.

[0003] 환자의 체세포의 탈분화를 유도하여 ES 세포와 유사한 다능성 및 증식력을 갖는 세포 (본원에서는 이러한 세포를 "유도 만능 줄기 세포" (iPS 세포) 로 언급하며, 간혹 "배아 줄기 세포 유사 세포" 또는 "ES 유사 세포"로 언급함) 를 수립하는 경우, 수립된 세포는 거부반응 및 윤리적 쟁점의 문제를 지니지 않은 이상적인 만능 세포로 유용할 것이다. 최근, iPS 세포를 마우스 및 인간의 분화된 세포로부터 제조할 수 있다는 것이 보고되어, 큰 관심을 불러일으켰다(국제 특허출원 공개공보 제 WO2007/69666 호; Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007; Nature, 451, pp.141-146, 2008).

[0004] 상기 방법들은 모두 복수의 특정 핵 초기화 인자 (예컨대, 문헌 [Cell, 126, pp.1-14, 2006] 에서는, 하기 4 가지의 인자가 사용됨: Oct3/4, Sox2, Klf4, 및 c-Myc) 를 체세포에 도입하여 초기화를 달성하는 단계를 포함하는데, 상기 단계는 상기 핵 초기화 인자들을 인코딩하는 유전자들을 체세포 내로 효율적으로 도입하기 위해 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 (lentivirus) 를 사용하는 것을 수반한다. 그러나, 바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달은 안전성 문제를 수반하므로, 바이러스 벡터를 사용하지 않고 iPS 세포를 제조하는 방법의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] {발명의 개요}

[0006] {기술적 과제}

[0007] 본 발명의 목적은 레트로바이러스와 같은 바이러스 벡터를 사용하지 않고 체세포를 초기화하여 iPS 세포를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] {과제에 대한 해법}

[0009] 본 발명자들은 상기의 과제를 해결하기 위하여 예의 연구를 실시하여, 플라스미드 벡터 등의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 이용하여 초기화 인자들을 인코딩하는 유전자들을 체세포 내로 도입함으로써 iPS 세포를 제조할 수 있으며, 상기 방법에 의해 체세포로부터 안전한 iPS 세포를 수득할 수 있다는 것을 발견하였다. 본 발명은 이러한 발견을 기초로 개발되었다.

[0010] 따라서, 본 발명은, 초기화 인자를 인코딩하는 유전자 하나 이상이 포함된 1 종 이상의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 체세포 내로 도입하는 단계를 포함하는, 유도 만능 줄기 세포의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 바람직한 구현예에서, 본 발명은, 상기 기술한 방법으로서 벡터가 염색체 외부에서 자율 복제할 수 있는 비(非)-바이러스성 발현 벡터인 방법; 및 상기 기술한 방법으로서 벡터가 플라스미드 벡터인 방법을 제공한다.

[0012] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명은, 상기 기술한 방법으로서 초기화 인자를 인코딩하는 유전자가 WO 2005/80598 에 기술된 핵 초기화 인자의 스크리닝 방법으로 선별된 유전자 중 하나 또는 복수의 이러한 유전자의 조합물인 방법; 및 상기 기술한 방법으로서 초기화 인자를 인코딩하는 유전자가 Oct 패밀리 (family) 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, Myc 패밀리 유전자, Lin 패밀리 유전자, 및 Nanog 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 유전자, 바람직하게는 2 종의 유전자의 조합, 더욱 바람직하게는 3 종의 유전자의 조합, 특히 바람직하게는 4 종 이상의 유전자의 조합인 방법을 제공한다.

[0013] 더욱 바람직한 조합은 (a) Oct 패밀리 유전자 및 Sox 패밀리 유전자로 이루어진 2 종의 유전자의 조합; (b) Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자로 이루어진 3 종의 유전자의 조합; (c) Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, 및 Myc 패밀리 유전자로 이루어진 4 종의 유전자의 조합; (d) Oct 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, Lin 패밀리 유전자, 및 Nanog 유전자로 이루어진 4 종의 유전자의 조합; (e) Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, Myc 패밀리 유전자, Lin 패밀리 유전자, 및 Nanog 유전자로 이루어진 6 종의 유전자의 조합; 등이다. 나아가, 상기 조합에 TERT 유전자 및/또는 SV40 Large T 항원 유전자를 포함시키는 것이 또한 바람직하다. 경우에 따라서는, Klf 패밀리 유전자를 제외시키는 것이 바람직하다.

[0014] 이들 중 특히 바람직한 조합은 Oct3/4 및 Sox2 로 이루어진 2 종의 유전자의 조합; Oct3/4, Klf4, 및 Sox2 로 이루어진 3 종의 유전자의 조합; Oct3/4, Klf4, Sox2, 및 c-Myc 로 이루어진 4 종의 유전자의 조합; Oct3/4, Sox2, Lin28, 및 Nanog 로 이루어진 4 종의 유전자의 조합; 및 Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28, 및 Nanog 로 이루어진 6 종의 유전자의 조합이다. 또한, 이들 조합에 TERT 유전자 및/또는 SV40 Large T 항원 유전자를 포함시키는 것이 바람직하다. 경우에 따라서는, Klf4 를 제외시키는 것이 바람직하다.

[0015] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명은 상기 기술한 방법으로서 체세포 내로 도입되는 비(非)-바이러스성 발현 벡터의 종류의 수가 1, 2, 3, 또는 4 인 방법; 상기 기술한 방법으로서 초기화 인자들을 인코딩하는 유전자들이 Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자로 이루어진 3 종의 유전자의 조합이고, 이들 유전자가 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터에 포함된 방법; 상기 기술한 방법으로서 핵 초기화 인자들을 인코딩하는 유전자들이 Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, 및 Myc 패밀리 유전자로 이루어진 4 종의 유전자의 조합이고, 상기 Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자가 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터 내에 포함된 방법; 상기 기술한 방법으로서 상기 Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자가 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터에 포함된 방법; 및 상기 기술한 방법으로서 상기 Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자가 폴리시스트론 (polycistronic) 발현을 가능하게 하는 개재 서열을 가진 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터에 포함된 방법을 제공한다.

[0016] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명은, 상기 기술한 방법으로서 2 종 이상의 상기 기술한 비(非)-바이러스성

발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입하는 방법; 상기 기술한 방법으로서 초기화 인자들을 인코딩하는 유전자가 Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, 및 Myc 패밀리 유전자로 이루어진 4 종의 유전자의 조합이고, 상기 4 종의 유전자 중에서 선택되는 3 종 이하의 유전자가 포함된 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 및 상기 4 종의 유전자 중 나머지 유전자(들)가 포함된 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입하는 방법; 상기 기술한 방법으로서 상기 3 종 이하의 유전자가 Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자이고, 나머지 유전자가 Myc 패밀리 유전자인 방법; 상기 기술한 방법으로서 상기 3 종 이하의 유전자가 Oct3/4, Klf4, 및 Sox2 이고, 나머지 유전자가 c-Myc 인 방법; 및 상기 기술한 방법으로서 상기 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 체세포 내로 도입하는 것을 2 회 이상 반복하여 실시하는 방법을 제공한다.

[0017] 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 상기 기술한 방법으로서 Oct3/4, Klf4, 및 Sox2 를 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 및 c-Myc 를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법; 상기 기술한 방법으로서 Oct3/4, Klf4, 및 Sox2 를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 및 c-Myc 를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법; 상기 기술한 방법으로서 Oct3/4, Klf4, 및 Sox2 를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 폴리시스트론 발현을 가능하게 하는 개재 서열에 결찰하고, 이를 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 내로 삽입하는 방법; 상기 기술한 방법으로서 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입하는 방법; 및 상기 기술한 방법으로서 상기 도입을 2 회 이상 반복하여 실시하는 방법을 제공한다.

또한 상기 기술한 방법으로서 도입되는 하나 이상의 비(非)-바이러스성 발현 벡터의 전부 또는 일부가 실질적으로 상기 염색체 내로 통합되지 않는 방법이 제공된다.

[0018] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명은 상기 기술한 방법으로서 체세포가 인간을 비롯한 포유동물의 체세포, 바람직하게는 인간 또는 마우스 체세포, 특히 바람직하게는 인간 체세포인 방법; 상기 기술한 방법으로서 상기 체세포가 인간 태아 세포 또는 성인에서 유래한 체세포인 방법; 및 상기 기술한 방법으로서 상기 체세포가 환자로부터 채취한 체세포인 방법을 제공한다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기술한 방법으로 수득가능한 유도 만능 줄기 세포를 제공한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명은 또한 도입된 하나 이상의 비(非)-바이러스성 발현 벡터의 전부 또는 일부가 실질적으로 해당 염색체 내로 통합되지 않는 유도 만능 줄기 세포를 제공한다.

[0020] 또한, 상기 기술한 유도 만능 줄기 세포로서 상기 체세포가 인간을 비롯한 포유동물의 체세포, 바람직하게는 인간 또는 마우스 체세포, 특히 바람직하게는 인간 체세포인 유도 만능 줄기 세포; 상기 기술한 유도 만능 줄기 세포로서 상기 체세포가 인간 태아 세포 또는 성인에서 유래한 체세포인 유도 만능 줄기 세포; 및 상기 기술한 유도 만능 줄기 세포로서 상기 체세포가 환자로부터 채취한 체세포인 유도 만능 줄기 세포가 제공된다.

[0021] 또한 본 발명에 의하면, 상기 기술한 유도 만능 줄기 세포의 제조 방법에 사용하기 위한, 초기화 인자를 인코딩하는 유전자 하나 이상이 포함된 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 바람직하게는 플라스미드 벡터가 제공된다.

[0022] 상기 기술한 유도 만능 줄기 세포로부터 유도 및 분화된 체세포도 또한 본 발명에 의해 제공된다.

[0023] 본 발명은 또한, 환자로부터 분리한 체세포를 이용하여 상기 기술한 방법으로 수득한 유도 만능 줄기 세포를 분화 유도하여 수득한 체세포를 상기 환자에 이식하는 단계를 포함하는 줄기 세포 요법을 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 상기 기술한 방법으로 수득한 유도 만능 줄기 세포를 분화 유도하여 수득되는 각종 세포를 이용하여, 화합물, 약물, 유독 물질 등의 생리 활성 및 독성을 평가하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0025] {발명의 유리한 효과}

[0026] 본 발명에 의해 제공되는 유도 만능 줄기 세포는, 레트로바이러스 등의 염색체 내로 통합되는 벡터를 사용하지 않고 제조되어, 상기 유도 만능 줄기 세포를 분화시켜 수득한 체세포 및 조직에서 종양형성 (tumorigenesis) 및 기타의 문제들을 일으키지 않는다는 점에서 유리하다. 본 발명의 바람직한 구현예에서는, 본 발명의 방법으로 제조된 유도 만능 줄기 세포에서, 도입된 하나 이상의 비(非)-바이러스성 발현 벡터의 전부 또는 일부가 에피솜 (episome) 으로 존재하여, 실질적으로 해당 염색체 내로 통합되지 않는다. 따라서, 본 발명의 방법은, 예를 들어, 환자의 체세포로부터, 매우 안전한 유도 만능 줄기 세포를 제조하는 것을 가능하게 하며, 상기 세포를 분화시켜 수득되는 세포 (예컨대, 심근 세포, 인슐린 생성 세포, 또는 신경 세포 등) 는, 심부전, 인슐린 의존성 당뇨병, 파킨슨병 및 척수 손상을 비롯한 넓은 범위의 질병에 대한 줄기 세포 이식 요법에 안전하게 이용

될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1 은 본 발명의 방법에 따른 플라스미드를 이용하여 체세포 (MEF) 를 Oct3/4, Klf4, Sox2, 및 c-Myc 로 트랜스펙션 (transfection) 하는 시간 추이 프로토콜, 7 가지 독립적인 시험의 결과 (좌측 사진, 432A-1 내지 432A-7: 세포 밀도 $1x10^6$ 개 세포/100 mm 접시) 및 또 다른 시험의 결과 (우측 사진, 432B-1: 세포 밀도 $2x10^5$ 개 세포/100 mm 접시) 를 보여준다. 중앙에서 가장 아래의 패널은 대조 결과 (트랜스펙션하지 않은 것) 를 나타낸다. 도 1 에서, Phase 단은 위상차 상 (phase-contrast image) 을 나타내고, GFP 단은 GFP-양성 집락을 나타낸다.

도 2 는 iPS 세포 생성을 위한 발현 플라스미드를 나타낸다. Oct3/4, Klf4, 및 Sox2 를 인코딩하는 3 종의 cDNA 를 이 순서대로 개재 서열인 2A 펩티드를 인코딩하는 서열에 결찰하고, 이를 pCX 플라스미드 내로 삽입하였다(pCX-2A-mOKS). 나아가, c-Myc 의 cDNA 를 pCX 내로 삽입하였다(pCX-c-Myc). 진한 선들은 게놈 내로의 플라스미드 통합을 검출하기 위한 PCR 분석에 사용된 증폭 영역 (도 6) 을 나타낸다.

도 3 은 플라스미드를 이용한 iPS 세포 유도에 대한 시간표를 나타낸다. ▼ 는 각 플라스미드의 트랜스펙션 시점을 가리킨다.

도 4 는 수립된 비(非)-바이러스 매개 iPS 세포의 형태를 보여준다. 상부 패널은 위상차 상을 나타내고, 하부 패널은 GFP-양성 집락 (축척 막대 = 200 μm) 을 나타낸다.

도 5 는, ES 세포로부터 단리한 총 RNA (total RNA) 를 이용하여 수득한 ES 세포 마커, 레트로바이러스를 이용하여 유도한 iPS 세포 (클론 20D-17: Nature, 448, pp.313-317, 2007), 플라스미드를 이용하여 유도한 iPS 세포 (클론 440A-3, 4, 7, 8, 10 및 11; 클론 432A-1), 및 MEF 세포의 유전자 발현에 대한 PCR 분석의 결과를 나타낸다.

도 6 은 PCR 로 플라스미드 통합을 검출한 것을 보여준다. 게놈 DNA 는 C57BL/6 마우스, 레트로바이러스를 이용하여 유도한 iPS 세포 (클론 20D-17), 플라스미드를 이용하여 유도한 iPS 세포 (클론 432A-1; 클론 440A-1 내지 11) 및 MEF 세포로부터 추출하였고, 이를 도 2, 13 및 14 에 나타낸 프라이머를 이용하여 PCR 로 분석하였다. O-1, K 및 M 에 대한 PCR 에서, 내재성 유전자에서 유래한 밴드들은 ◁ 로 표시되어 있고, 통합된 플라스미드로부터 유래한 밴드들은 ◀ 로 표시되어 있다. Fbx15 리포터에 있어서, 아랫쪽의 밴드들은 야생형 대립유전자를 나타내고, 위쪽의 밴드들은 녹-인 (knocked-in) 대립유전자를 나타낸다.

도 7 은 기형종 형성의 결과를 나타낸다. 플라스미드 통합이 일어나지 않은 iPS 세포 (클론 440A-3, -4, 및 -8) 을 누드 마우스에 피하로 이식하였다. 4 주 후, 종양을 절제하고, 헤마톡실린 (hematoxylin) 및 에오신 (eosin) 으로 염색하였다. 위로부터 각각 장관 모양 (gut-like) 상피 조직, 표피 조직, 횡문근, 및 신경 조직에 대한 결과가 나타나 있다(축척 막대 = 50 μm).

도 8 은 통합이 일어나지 않은 iPS 세포 (클론 440A-3 및 -8) 로부터 유래한 키메라 마우스를 나타낸다.

도 9 는 PCR 로 플라스미드의 통합을 검출한 것을 나타낸다. ICR 마우스, iPS 세포 (클론 432A-1), 및 플라스미드를 이용하여 유도한 iPS 세포로부터 유래한 키메라 마우스 (클론 432A-1; 클론 440A-3, 8) 로부터 게놈 DNA 를 추출하고, 도 2 에 나타나 있는 O-1, K 및 M 영역을 PCR 로 증폭하였다. 내재성 유전자로부터 유래한 밴드들은 ◁ 로 표시되어 있고, 통합된 플라스미드로부터 유래한 밴드들은 ◀ 로 표시되어 있다. Nanog 리포터 및 Fbx15 리포터의 존재 또한 PCR 로 검출되었다.

도 10 은 서던 블롯 (Southern blot) 분석에 사용된 탐침 및 제한 효소 인식 부위의 위치를 나타낸다. E 는 EcoRI 를 나타내고, B 는 BamHI 를 나타낸다.

도 11 은 서던 블롯 분석의 결과를 나타낸다. RF8 ES 세포 및 iPS 세포 (클론 440A-3, 4, 7, 8, 10, 및 11; 클론 432A-1) 로부터 게놈 DNA (6 μg) 를 추출하고, 이를 BamHI 및 EcoRI 로 절단하였다. pCX-2A-mOKS 및 pCX-c-Myc 플라스미드 (각각 20 pg) 의 혼합물을 대조로 이용하였다. ◁ 는 내재성 유전자로부터 유래한 밴드들을 나타내고, ◀ 는 염색체 3 상의 Oct3/4 유사유전자 (pseudogene) (추정 크기 2049 bp) 로부터 유래한 밴드를 나타낸다. 화살표는 전이유전자 (transgene) 로부터 유래한 밴드들을 나타낸다. 클론 432A-1 에서 관찰된 다수의 밴드들의 정체가 불명확하지만, 이는 다수의 전이유전자들이 통합된 것을 시사하는 것일 수 있다. GFP 탐침은 Nanog 리포터 대립유전자를 검출하기 위해 사용되었다.

도 12 는 SSLP 분석의 결과를 나타낸다. C57BL/6 마우스, RF8 ES 세포, 통합이 일어나지 않은 iPS 세포 (클론 440A-3 내지 11) 및 MEF 세포로부터의 게놈 DNA (각각 50 ng) 에 대해, SSLP 분석을 실시하였다. 이들 iPS 세포는 5 가지의 MEF 세포 클론 (클론 1, 2, 3, 5, 및 6) 의 혼합물로부터 유래한 것이다.

도 13 및 14 는 실시예 1 내지 3 에서의 PCR 에 사용된 프라이머를 나타낸다.

도 15 는 인간 치수 (dental pulp) 줄기 세포를 본 발명의 방법에 따라 플라스미드를 이용하여 Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28, Nanog 및 SV40 Large T 항원으로 트랜스펙션하는 시간 추이 프로토콜, 및 16 개의 독립적인 iPS 세포 집락을 나타낸다.

도 16 및 17 은 태아 HDF (하기 5 가지 클론: 203A-1 내지 203A-5, 이들 중 203A-4 는 음성 대조로서 선택됨) 로부터 수립된 iPS 세포의 트랜스펙션 후 제 31 일 (도 16) 및 두 번째 계대배양시 (도 17) 의 사진을 나타낸다.

도 18 은 5 가지 iPS 세포 클론 (203A-1 내지 203A-5) 의 게놈-PCR 분석의 결과를 나타낸다.

도 19 및 20 은 인간 치수 줄기 세포로부터 수립된 iPS 세포 (하기 5 가지 클론: 217A-1 내지 -4 및 -6) 의 트랜스펙션 후 제 35 일 (도 19) 및 두번째 계대배양시 (도 20) 의 사진을 나타낸다.

도 21 은 5 가지 iPS 세포 클론 (217A-1 내지 -4 및 -6) 에 대한 게놈-PCR 분석의 결과를 나타낸다.

도 22 및 23 은 어린 여자아이의 HDF (하기 2 가지 클론: 279A-1 및 -2) 로부터 수립된 iPS 세포의 첫번째 전기천공 후 제 35 일의 사진 (도 22) 및 계대 배양 후의 클론 279A-2 의 사진 (도 23; 우측 패널은 좌측 패널의 상자로 표시된 영역에 대한 근접촬영 사진임) 을 보여준다.

도 24 는 전이유전자들이 통합된 것을 증명하는 iPS 세포 클론 279A-2 에 대한 게놈-PCR 분석의 결과를 보여준다.

도 25 는 선별 (집락들은 트랜스펙션 후 제 25 일에 선별됨) 후의 iPS 세포들 (하기 8 가지 클론: 497A-1 내지 A-8) 의 사진을 보여준다. 상부 패널은 위상차 상을 나타내고, 하부 패널은 GFP-양성 집락을 나타낸다.

도 26 은 5 가지 iPS 세포 클론들 (497A-1 내지 A-5) 에 대한 게놈-PCR 분석의 결과를 보여준다. 497A-2 및 497A-5 에서는, 게놈 내로 통합된 외인성 유전자가 없었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명의 방법은 유도 만능 줄기 세포를 제조하도록 의도된 것으로서, 초기화 인자를 인코딩하는 유전자 하나 이상이 포함된 1 종 이상의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 체세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. 상기 비(非)-바이러스성 발현 벡터는 바람직하게는 염색체 외부에서 자율 복제할 수 있는 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 발현 벡터이다.

[0029] 핵 초기화 인자를 규명하는 수단의 예로서는, WO 2005/80598 에 기술된 핵 초기화 인자 스크리닝 방법을 이용할 수 있다. 상기 문헌에 개시된 모든 내용은 참조로서 본원에 포함된다. 당업자는 상기의 공개공보를 참조하여 핵 초기화 인자를 스크리닝할 수 있으며, 이들을 본 발명의 방법에 이용할 수 있다. 또한, 상기 기술한 스크리닝 방법을 변형 또는 변경한 방법을 이용하여 핵 초기화 인자를 규명하는 것도 가능하다.

[0030] 초기화 인자를 인코딩하는 유전자들의 조합의 일부 예는 WO2007/69666 에 개시되어 있다. 상기 문헌에 개시된 모든 내용은 참조로서 본원에 포함된다. 당업자는 상기 언급한 공개공보를 참조하여 본 발명의 방법에 적합하게 사용될 수 있는 유전자를 적절히 선택할 수 있다. 초기화 인자를 인코딩하는 유전자들의 조합의 기타 예는 문헌 [Science, 318, pp.1917-1920, 2007], WO2008/118820 등에 제시되어 있다. 따라서, 당업자는 핵 초기화 인자를 인코딩하는 유전자들의 조합의 다양성을 이해할 수 있고; WO 2005/80598 에 기술된 핵 초기화 인자 스크리닝 방법을 이용하여, WO2007/69666 및 문헌 [Science, 2007 (상기)] 에 기재된 조합 이외의 적절한 유전자들의 조합을 본 발명의 방법에서 이용할 수 있다.

[0031] 초기화 인자를 인코딩하는 바람직한 유전자로는, Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, Myc 패밀리 유전자, Lin 패밀리 유전자, 및 Nanog 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 유전자, 바람직하게는 2 종의 유전자, 더욱 바람직하게는 3 종의 유전자, 및 특히 바람직하게는 4 종의 유전자의 조합을 들 수 있다.

[0032] Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, 및 Myc 패밀리 유전자의 예는 WO2007/69666 에 제

시되어 있다. 유사하게, Lin 패밀리 유전자에 대해서도, 당업자는 마찬가지로 패밀리 유전자를 추출할 수 있다. 예를 들어, Lin 패밀리 유전자의 예로서, Lin28 및 Lin28B 를 들 수 있다.

[0033] 더욱 바람직한 조합으로는, 하기를 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다:

[0034] (a) Oct 패밀리 유전자 및 Sox 패밀리 유전자로 이루어진 2 종의 유전자의 조합;

[0035] (b) Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자로 이루어진 3 종의 유전자의 조합;

[0036] (c) Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, 및 Myc 패밀리 유전자로 이루어진 4 종의 유전자의 조합;

[0037] (d) Oct 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, Lin 패밀리 유전자, 및 Nanog 유전자로 이루어진 4 종의 유전자의 조합;

[0038] (e) Oct 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Myc 패밀리 유전자, Lin 패밀리 유전자, 및 Nanog 유전자로 이루어진 6 종의 유전자의 조합;

[0039] 등.

[0040] 이들 모든 유전자들은 인간을 비롯한 포유동물에 흔히 존재하는 것들이다. 본 발명에서는 임의로 선택된 포유동물 (예컨대, 인간, 마우스, 래트, 소, 양, 말, 원숭이) 로부터 유래한 유전자를 사용할 수 있다. 야생형 유전자 외에, 번역 산물이 수 개 (예컨대, 1 내지 10 개, 바람직하게는 1 내지 6 개, 더욱 바람직하게는 1 내지 4 개, 더욱 바람직하게는 1 내지 3 개, 특히 바람직하게는 1 또는 2 개) 의 치환, 삽입, 및/또는 결실된 아미노산을 가지며, 야생형 유전자 산물과 동일한 기능을 갖는 변이 유전자도 이용가능하다. 예를 들어, c-Myc 유전자로서, 야생형, 안정형 변이를 인코딩하는 유전자 (T58A) 등을 이용할 수 있다. 이는 다른 유전자 산물에 대해서도 동일하다.

[0041] 상기 언급한 유전자에 더하여, 세포 불멸화를 유도하는 인자를 인코딩하는 유전자를 추가로 조합할 수 있다. WO2007/69666 에 개시된 바와 같이, 예를 들어, TERT 유전자, 및 이하의 유전자: SV40 Large T 항원, HPV16 E6, HPV16 E7, 및 Bmi1 로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 유전자를 단독으로 또는 적절하게 조합하여 사용할 수 있다.

[0042] 바람직한 조합의 예로서는 하기를 들 수 있다:

[0043] (f) Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, Myc 패밀리 유전자, 및 TERT 유전자로 이루어진 5 종의 유전자의 조합;

[0044] (g) Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, Myc 패밀리 유전자, 및 SV40 Large T 항원 유전자로 이루어진 5 종의 유전자의 조합;

[0045] (h) Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, Myc 패밀리 유전자, TERT 유전자, 및 SV40 Large T 항원 유전자로 이루어진 6 종의 유전자의 조합; 및

[0046] (i) Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, Myc 패밀리 유전자, Lin 패밀리 유전자, Nanog 유전자, 및 TERT 유전자 또는 SV40 Large T 항원 유전자로 이루어진 7 종의 유전자의 조합.

[0047] 필요에 따라, Klf 패밀리 유전자를 상기 언급한 조합에서 제외시킬 수도 있다.

[0048] 나아가, 상기 언급한 유전자에 더하여, Fbx15, ERas, ECAT15-2, Tcl1, 및 β-카테닌으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 유전자를 조합할 수도 있고/있거나, ECAT1, Esg1, Dnmt3L, ECAT8, Gdf3, Sox15, ECAT15-1, Fthl17, Sall4, Rex1, UTF1, Stella, Stat3, 및 Grb2 로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 유전자를 또한 조합할 수도 있다. 이러한 조합은 WO2007/69666 에 구체적으로 기재되어 있다.

[0049] 이들 유전자 중 1 종 이상이 초기화 대상 체세포에 이미 발현되고 있는 경우에는, 도입할 유전자로부터 해당 유전자(들)를 제외시킬 수 있다. 이들 유전자 중 1 종 이상을 레트로바이러스 등의 염색체 내로 통합되는 벡터를 이용하여 초기화 대상 체세포 내로 도입하는 경우, 나머지 하나 이상의 유전자는 본 발명의 방법에 따라 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 이용하여 도입할 수 있다. 다르게는, 이들 유전자의 유전자 산물 중 1 종 이상을 융합 단백질 또는 핵 미세주입 방법으로 핵 내로 도입하는 경우, 나머지 하나 이상의 유전자는 본 발명의 방법에 따라 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 이용하여 도입할 수 있다.

[0050] 특히 바람직한 유전자 조합은,

[0051] (1) Oct3/4 및 Sox2 로 이루어진 2 종의 유전자의 조합;

[0052] (2) Oct3/4, Klf4, 및 Sox2 로 이루어진 3 종의 유전자의 조합;

[0053] (3) Oct3/4, Klf4, Sox2, 및 c-Myc 로 이루어진 4 종의 유전자의 조합;

[0054] (4) Oct3/4, Sox2, Lin28, 및 Nanog 로 이루어진 4 종의 유전자의 조합;

[0055] (5) Oct3/4, Sox2, c-Myc, TERT, 및 SV40 Large T 항원으로 이루어진 5 종의 유전자의 조합;

[0056] (6) Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, TERT, 및 SV40 Large T 항원으로 이루어진 6 종의 유전자의 조합;

[0057] (7) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Lin28, 및 Nanog 로 이루어진 6 종의 유전자의 조합;

[0058] (8) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Lin28, Nanog, 및 TERT 또는 SV40 Large T 항원으로 이루어진 7 종의 유전자의 조합,

[0059] 등이다.

[0060] 상기 언급한 유전자들에 더하여, 세포 불멸화를 유도하는 인자를 인코딩하는 유전자를 추가로 조합할 수 있다. WO2007/69666 에 개시된 바와 같이, 예를 들어, TERT 유전자, 및 이하의 유전자: HPV16 E6, HPV16 E7, 및 Bmil 로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 유전자를 단독으로 또는 적절히 조합하여 사용할 수 있다.

[0061] Sox2 및 c-Myc, 등을 내재적으로 발현하는 신경 줄기 세포를 체세포 원천으로 사용하여 초기화를 실시하는 경우, Oct3/4 및 Klf4 로 이루어진 2 종의 유전자의 조합, 또는 Oct3/4 및 c-Myc 로 이루어진 2 종의 유전자의 조합 (하기 참조: Nature, 온라인판, 2008 년 6 월 29 일, p1-5 (doi:10.1038/nature07061)) 을 또한 언급할 수 있다.

[0062] 상기 조합 (3), (5), (6), 및 (7) 에서, c-Myc 대신 L-Myc 를 사용할 수 있다.

[0063] 유전자 조합이 상기의 것들에 한정되지 않는다는 것을 유의해야 한다. 부가적으로, 본 발명의 범위에는, 상기 기술한 유전자 중에서 선택된 하나 이상의 유전자를 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 이용하여 체세포 내로 도입하고, 나머지 유전자 또는 유전자 산물은 또 다른 방법으로 상기 체세포 내로 도입하는 방법이 포함된다.

예를 들어, 상기 기술한 유전자 중에서 선택된 하나 이상의 유전자를 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 이용하여 체세포 내로 도입하고, 나머지 유전자를 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 (adeno-associated) 바이러스 벡터, 센다이 (Sendai) 바이러스 벡터 등의 바이러스 벡터를 이용하여 체세포 내로 도입하는 것도 가능하다.

[0064] 초기화 인자를 인코딩하는 2 종 이상의 유전자를 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 이용하여 체세포 내로 도입하는 경우, 상기 도입할 2 종 이상의 유전자 중 일부를 나머지 유전자들의 도입과 상이한 시간에 체세포 내로 도입할 수 있고, 또는 도입할 모든 종류의 유전자를 동시에 체세포 내로 도입할 수도 있다; 그러나, 도입할 모든 유전자를 동시에 체세포 내로 도입하는 것이 바람직하다. 2 종 이상의 유전자를 도입함에 있어서 2 종 이상의 상이한 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 사용하는 경우, 모든 종류의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있는데; 이는 본 발명의 바람직한 구현예를 나타낸다.

[0065] 본 발명의 방법에서, 초기화 인자를 인코딩하는 유전자로서, 예를 들어, Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, 및 Myc 패밀리 유전자로 이루어진 4 종의 유전자의 조합을 사용할 수 있다. Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자로 이루어진 3 종의 유전자의 조합, 또는 상기 언급한 3 종의 유전자 중에서 선택된 2 종의 유전자의 조합 또한 사용가능하다.

[0066] 본 발명의 방법에서, 상기 기술한 4 종, 3 종, 또는 2 종의 유전자를 동시에 체세포 내로 도입하는 것이 바람직하다. 상기 기술한 4 종, 3 종, 또는 2 종의 유전자를 도입하기 위해, 이들 유전자가 모두 포함된 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 사용할 수 있다. 다르게는, 이들 유전자들의 모든 조합이 포함되도록, 몇 가지 종류의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 적절히 조합하여 사용할 수도 있다. 몇 가지 종류의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 사용하는 경우, 바람직하게는 2 또는 3 종, 더욱 바람직하게는 2 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 이들 비(非)-바이러스성 발현 벡터들을 동시에 체세포 내로 도입하는 것이 바람직하다.

[0067] 도입되는 유전자의 수가 4 종을 초과하는 경우, 이들 유전자들의 모든 조합이 포함되도록, 몇 가지 종류의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 적절히 조합할 수 있다. 몇 가지 종류의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 사용하는 경우, 바람직하게는 2 내지 5 종, 더욱 바람직하게는 2 내지 4 종, 더욱 바람직하게는 3 또는 4 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 비(非)-바이러스성 발현 벡터들을 바람직하게는 동시에 체세포 내로 도입한다.

[0068] 바람직한 방법의 예는, Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자를 내포한 하나의 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 및 Myc 패밀리 유전자를 내포한 하나의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 또는 시간차를 두고 체세포 내로 도입하는 방법으로서; 이 방법에서, 상기 2 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 상기 체세포 내로 도입하는 것이 바람직하다. 또 다른 바람직한 구현예에서는, Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, Sox 패밀리 유전자, 및 Myc 패밀리 유전자를 내포한 하나의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법을 이용하는 것도 가능하다.

[0069] 본 발명의 바람직한 구현예에서, Oct3/4, Klf4, Sox2, 및 c-Myc 로 이루어진 4 종의 유전자의 조합, 또는 이들 4 종의 유전자 중에서 선택된 3 종 또는 2 종의 임의로 선택된 조합에서, 바람직하게는 c-Myc 를 포함하지 않은 3 종 또는 2 종의 유전자의 조합을 사용할 수 있다. 이러한 바람직한 구현예를 이하에서 구체적으로 기술하지만, 본 발명의 범위는 이에 결코 제한되지 않는다.

[0070] (a1) Oct3/4, Klf4, Sox2 및 c-Myc 를 내포한 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법.

[0071] (b1) Oct3/4, Klf4, Sox2 및 c-Myc 중에서 선택된 2 종의 유전자를 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 Oct3/4, Klf4, Sox2 및 c-Myc 중에서 선택된 나머지 2 종의 유전자를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법.
바람직하게는, 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있다.

[0072] (c1) Oct3/4, Klf4, Sox2 및 c-Myc 중에서 선택된 3 종의 유전자를 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 Oct3/4, Klf4, Sox2 및 c-Myc 중에서 선택된 나머지 1 종의 유전자를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법.
바람직하게는, 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있다.

[0073] (d1) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 2 종의 유전자를 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 나머지 1 종의 유전자 및 c-Myc 를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법. 바람직하게는, 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있다.

[0074] (e1) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 를 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 c-Myc 를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법. 바람직하게는, 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있다.

[0075] (f1) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 2 종의 유전자를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터에 포함되지 않은 Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중 임의의 하나의 유전자 및 c-Myc 를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법. 더 구체적으로는, (i) Oct3/4 및 Klf4, (ii) Klf4 및 Sox2, 또는 (iii) Oct3/4 및 Sox2 를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 바람직하게는 플라스미드 벡터를 사용할 수 있으며; 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있다.

[0076] (g1) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 c-Myc 를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법. 바람직하게는, 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있다.

[0077] (f1) 또는 (g1) 의 방법은 체세포가 마우스 유래인 경우 바람직하게 이용할 수 있다.

[0078] 상기 (b1) 내지 (f2) 에서, 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터 중 어느 하나에 있어서, 비(非)-바이러스성 발현 벡터 대신에 바이러스 벡터 (예컨대, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 센다이 바이러스 벡터 등) 를 사용할 수 있다.

[0079] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에서는, 상기 (a1) 내지 (f2) 에서, c-Myc 대신에 L-Myc 를 사용할 수 있다.

[0080] 또 다른 바람직한 구현예에서는, Oct3/4, Klf4 및 Sox2 로 이루어진 3 종의 유전자의 조합을 사용할 수 있다. 당해 바람직한 구현예를 이하에서 구체적으로 기술하나, 본 발명의 범위는 결코 이에 한정되지 않는다.

[0081] (a2) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 를 내포한 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법.

[0082] (b2) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법.

[0083] (c2) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 2 종의 유전자를 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 나머지 1 종의 유전자를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법. 바람직하게는, 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있다.

[0084] (d2) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 2 종의 유전자를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터에 포함되지 않은 Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중 임의의 하나의 유전자를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법. 더 구체적으로는, (i) Oct3/4 및 Klf4, (ii) Klf4 및 Sox2, 또는 (iii) Oct3/4 및 Sox2 를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 바람직하게는 플라스미드 벡터를 사용할 수 있고, 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있다.

[0085] (b2) 또는 (d2) 의 방법은 체세포가 마우스 유래인 경우 바람직하게 이용할 수 있다.

[0086] 상기 (c2) 또는 (d2) 에서, 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터 중 어느 하나에 있어서, 비(非)-바이러스 벡터 대신 바이러스 벡터 (예컨대, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 센다이 바이러스 벡터 등) 를 또한 사용할 수 있다.

[0087] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에서는, Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 2 종의 유전자의 조합을 사용할 수 있다. 당해 바람직한 구현예를 이하에서 구체적으로 기술하나, 본 발명의 범위는 결코 이에 한정되지 않는다.

[0088] (a3) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 2 종의 유전자를 내포한 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법.

[0089] (b3) (i) Oct3/4 및 Klf4, (ii) Klf4 및 Sox2, 또는 (iii) Oct3/4 및 Sox2 를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법.

[0090] (c3) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 1 종의 유전자를 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터에 포함되지 않은 Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중 임의의 하나의 유전자를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법. 바람직하게는, 상기 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있다.

[0091] (b3) 의 방법은 체세포가 마우스 유래인 경우 바람직하게 이용할 수 있다.

[0092] 상기 (c3) 에서, 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터 중 어느 하나에 있어서, 비(非)-바이러스 벡터 대신 바이러스 벡터 (예컨대, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 센다이 바이러스 벡터 등) 를 사용할 수 있다.

[0093] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에서는, Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28 및 Nanog 중에서 선택된 6 종의 유전자의 조합을 사용할 수 있다. 당해 바람직한 구현예를 이하에서 구체적으로 기술하나, 본 발명의 범위는 결코 이에 한정되지 않는다.

[0094] (a4) Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 2 종의 유전자를 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 나머지 1 종의 유전자를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 c-Myc, Lin28 및 Nanog 유전자를 내포한 제 3 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법. 바람직하게는, 상기 제 1, 제 2 및 제 3 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 동시에 체세포 내로 도입할 수 있다.

[0095] (b4) (i) Oct3/4 및 Klf4, (ii) Klf4 및 Sox2, (iii) Oct3/4 및 Sox2 또는 (iv) Sox2 및 Klf4 를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 제 1 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, Oct3/4, Klf4 및 Sox2 중에서 선택된 나머지 1 종의 유전자를 내포한 제 2 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터, 및 c-Myc, Lin28 및 Nanog 유전자를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 제 3 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 더욱 바람직하게는 플라스미드 벡터를 체세포 내로 도입하는 방법.

[0096] 상기 언급한 2, 3, 4 또는 6 종의 유전자에 TERT, SV40 Large T 항원, HPV16 E6, HPV16 E7 또는 Bmi1 등의 세포 불멸화를 유도하는 인자를 인코딩하는 유전자를 추가로 조합하는 경우, 이를 바람직하게는 또 다른 비(非)-바이러스성 발현 벡터 내로 편입시킬 수 있다.

[0097] 상기 맥락에서, 복수의 유전자들 (예컨대, Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자) 을 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터에 편입시키는 경우, 이들 유전자를 바람직하게는 폴리시스트론 발현을 가능하게 하는 개재 서열을 가진 비(非)-바이러스성 발현 벡터 내로 삽입할 수 있다. 폴리시스트론 발현을 가능하게 하는 개재 서열을 사용함으로써, 1 종의 비(非)-바이러스성 발현 벡터에 포함된 복수의 유전자들을 더욱 효율적으로 발현시키는 것이 가능하다. 폴리시스트론 발현을 가능하게 하는 유용한 서열로는, 예를 들어, 구제역 바이러스의 2A 서열 (서열번호:61, 간혹 FMDV 2A-자가-가공 (self-processing) 서열로 언급됨) (PLoS ONE 3, e2532, 2008; Stem Cells 25, 1707, 2007), IRES 서열 등을 들 수 있고, 바람직한 것은 상기 2A 서열이다. 더 구체적으로, (i) Oct3/4, Klf4 및 Sox2, (ii) Oct3/4 및 Klf4, (iii) Klf4 및 Sox2, (iv) Oct3/4 및 Sox2, (v) Sox2 및 Klf4 또는 (vi) c-Myc, Lin28 및 Nanog 를 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 내포한 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 구축할 경우, 상기 2A 서열을 상기 유전자들 사이에 삽입하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 또한 2 종 이상의 초기화 인자를 내포한 iPS 세포 유도용 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 제조함에 있어서의 2A 서열의 용도를 제공한다.

[0098] 체세포를 초기화하여 유도 만능 줄기 세포를 제조하는 본 발명의 효과가 달성될 수 있는 한, 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 체세포 내로 도입하는 조작을 반복하는 횟수에는 특별한 제한이 없으며, 트랜스펙션을 1 회 이상의 임의로 선택된 횟수 (예컨대, 1 회 내지 10 회, 1 회 내지 5 회 등) 로 실시할 수 있다. 2 종 이상의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 체세포 내로 도입하는 경우, 상기 모든 종류의 비(非)-바이러스성 발현 벡터들을 동시에 체세포 내로 도입하는 것이 바람직한데; 그러나, 이 경우에 있어서도, 트랜스펙션을 1 회 이상의 임의로 선택된 횟수 (예컨대, 1 회 내지 10 회, 1 회 내지 5 회 등) 로 실시할 수 있으며, 바람직하게는 상기 트랜스펙션을 2 회 이상 (예컨대, 3 회 또는 4 회) 반복하여 실시할 수 있다.

[0099] 트랜스펙션을 2 회 이상 반복하는 경우, 시간 간격으로서는, 12 시간 내지 1 주, 바람직하게는 12 시간 내지 4 일, 예를 들어, 1 일 내지 3 일을 예로 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0100] 본원에서 사용된 바, "유도 만능 줄기 세포 (iPS 세포)"라는 용어는 ES 세포와 유사한 특성을 가진 세포를 지칭하는 것으로, 더 구체적으로는 체세포로부터 초기화된 미분화 세포로서 다능성 및 증식 (자가-재생 (self-renewal)) 능력을 가진 세포를 포함한다. 그러나, 이 용어는 어떠한 의미로도 한정적으로 해석되어서는 안되며, 가장 넓은 의미로 해석되어야 한다는 것을 유의해야 한다. 가상적인 핵 초기화 인자를 이용하여 유도 만능 줄기 세포를 제조하는 방법은 WO2005/80598 에 기술되어 있으며(상기 공개공보에 있어서, ES 유사 세포 (ES-like cell) 라는 용어가 사용됨), 유도 만능 줄기 세포를 분리하는 방법도 구체적으로 기술되어 있다. WO2007/69666 에는 초기화 인자의 구체예 및 이를 이용한 체세포 초기화 방법이 개시되어 있다. 따라서, 본 발명을 구현함에 있어서, 당업자는 이들 간행물들을 참조하는 것이 바람직하다.

[0101] 상기 초기화 인자를 인코딩하는 유전자에 더하여, 바람직하게는 전사에 필요한 조절 서열 (예컨대, 프로모터, 인핸서 (enhancer), 및/또는 종결자 등) 을 상기 비(非)-바이러스성 발현 벡터 내의 상기 유전자에 작동가능하

게 연결한다.

[0102] 프로모터로서는, 체세포에서 전사 활성을 나타내는 DNA 서열을 이용할 수 있는데, 동물종 및 체세포의 종류에 따라 프로모터를 적절히 선택할 수 있다. 포유류 세포에서 발현가능한 유용한 프로모터의 예로서는, 거대세포바이러스 (인간 CMV) 의 IE (immediate early; 조기 발현) 유전자의 프로모터, SV40 의 초기 프로모터, 레트로바이러스의 프로모터, 메탈로티오네인 (metallothionein) 프로모터, 열 충격 (heat shock) 프로모터, SRα 프로모터 등이 있다. 인간 CMV 의 IE 유전자의 인핸서를 프로모터와 함께 사용할 수도 있다. 유용한 프로모터는 CAG 프로모터 (거대세포바이러스 인핸서, 닭 β-액틴 프로모터 및 β-글로빈 유전자 폴리A 신호 부위를 포함함) 이다.

[0103] 상기 비(非)-바이러스성 발현 벡터는, 상기 발현 벡터가 포유류의 체세포에서 자율 복제될 수 있게 하는 DNA 서열을 포함할 수도 있다. 상기 DNA 서열의 예는 SV40 복제 원점이다.

[0104] 상기 비(非)-바이러스성 발현 벡터는 바람직하게는 염색체 외부에서 자율 복제가능한 발현 벡터이며, 상기 비(非)-바이러스성 발현 벡터로서는 염색체에 통합되지 않는 것이 바람직하다. 더욱 바람직한 예로서는 플라스미드 벡터를 들 수 있다. 플라스미드 벡터의 예로서는, 에스케리키아 콜리 (Escherichia coli) 유래의 플라스미드 (pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, 및 pBluescript 등의 ColE-계 플라스미드, 등), 악티노마이세스 (Actinomyces) 유래의 플라스미드 (pIJ486 등), 바실러스 서브틸리스 (Bacillus subtilis) 유래의 플라스미드 (예컨대, pUB110, pSH19 및 기타), 효모 유래의 플라스미드 (YEp13, YEp 24, Ycp50 등) 등, 및 인공 플라스미드 벡터 등을 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0105] 용이하게 입수가능한 비(非)-바이러스성 발현 벡터의 예로서는, pCMV6-XL3 (OriGene Technologies Inc.), EGFP-C1 (Clontech), pGBT-9 (Clontech), pcDNAI (FUNAKOSHI), pcDM8 (FUNAKOSHI), pAGE107 (Cytotechnology, 3,133, 1990), pCDM8 (Nature, 329, 840, 1987), pcDNAI/AmP (Invitrogen), pREP4 (Invitrogen), pAGE103 (J. Blochem., 101, 1307, 1987), pAGE210 등을 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0106] 상기 비(非)-바이러스성 발현 벡터는 필요에 따라 선별 마커를 포함할 수 있다. 선별 마커의 예로서는, 숙주 세포에 결핍된 유전자, 예컨대 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 유전자 또는 스키조사카로마이세스 폼베 (Schizosaccaromyces pombe) TPI 유전자, 및 암피실린, 카나마이신, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 네오마이신, 또는 하이그로마이신 등의 약물에 대해 저항성을 부여하는 유전자를 들 수 있다.

[0107] 체세포 내로 도입된 플라스미드 벡터 등의 비(非)-바이러스성 발현 벡터가 전형적으로는 상기 세포의 게놈 내로 통합되지 않지만, iPS 세포 유도를 위한 선택압 하에서는, 초기화 인자의 안정한 발현에 대한 필요성으로 인해 비(非)-바이러스성 발현 벡터의 통합 효율이 증가된 것을 관찰할 수 있다. 따라서, 관심 대상 iPS 세포를 재생 의학 등에 사용하고자 하는 경우, 상기 비(非)-바이러스성 발현 벡터는 바람직하게는 전이유전자의 제거를 가능하게 하는 서열, 예컨대 loxP 서열 (Chang 등, STEM CELLS 온라인판: 2009 년 2 월 12 일 (doi: 10.1002/stem.39)), 피기백 전위유전자 (piggyback transposon) (Kaji 등, Nature advance online publication, 2009 년 3 월 1 일 (doi:10.1038/nature07864); Woltjen 등, Nature advance online publication, 2009 년 3 월 1 일 (doi:10.1038/nature07863)) 및 프로모터 영역 내 테트라사이클린 반응 요소 (Tet-OnR & Tet-Off R Gene Expression Systems, Clontech) 를 포함할 수 있다.

[0108] 체세포에서 초기화 인자를 발현할 수 있는 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 적절히 구축하기 위해서, 본 발명에서 사용된, 초기화 인자를 인코딩하는 유전자, 프로모터, 인핸서, 및/또는 종결자 등을 결찰하는 방법은 당업자에게 자명하다.

[0109] 초기화 인자를 인코딩하는 2 종 이상의 유전자를 사용하는 경우, 해당 유전자들을 하나의 비(非)-바이러스성 발현 벡터 내에 포함시킬 수 있다. 대안적으로는, 상이한 유전자들이 포함된 2 종 이상의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 사용할 수도 있다. 후자의 경우, 2 종 이상의 유전자가 포함된 하나의 비(非)-바이러스성 발현 벡터 및 상기 유전자들과 상이한 1 종 이상의 유전자가 포함된 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 적절히 조합할 수 있다.

[0110] 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 체세포 내로 도입함에 있어서 당업자에 이용가능한, 동물 세포 내로 발현 벡터를 도입하는 임의의 방법이 이용가능하다. 유용한 방법의 예로서는, FuGENE 6 트랜스펙션 시약 (Roche) 등의 트랜스펙션 시약 이용, 마이크로포레이터 (microporator) 이용, 전기천공 방법, 인산칼슘 방법, 리포펙션 (lipofection) 방법, DEAE-덱스트란-매개 트랜스펙션 방법, 트랜스펙션 방법, 미세주입 (microinjection) 방법, 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법, 등을 들 수 있다. 또한, 뉴클레오펙션 (nucleofection) 을 이용

하여 유전자를 도입할 수도 있다. 이들 방법들을 조합하여 이용할 수도 있다.

[0111] 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 체세포 내로 도입함에 있어서, 해당 발현 벡터를 영양 세포 (feeder cell) 상에서 배양 중인 체세포 내로 도입할 수 있고, 단순히 체세포 내로 도입할 수도 있다. 발현 벡터 도입 효율을 증가시키기 위해서는, 후자의 방법이 경우에 따라 적합하다. 사용되는 영양 세포는 배아 줄기 세포 배양용의 것일 수 있는데; 예를 들어, 14- 내지 15-일령의 마우스 배아로부터의 일차 배양 섬유아세포, STO (섬유아세포 유래 세포주) 등을 미토마이신 C 등의 화학 약품으로 처리하거나 또는 방사선에 노출시킨 것, 등을 사용할 수 있다.

[0112] 비(非)-바이러스성 발현 벡터가 포함된 체세포를 적절한 조건 하에서 배양함으로써, 핵 초기화가 자율적으로 진행되도록 하여, 상기 체세포로부터 유도 만능 줄기 세포를 제조하는 것이 가능하다. 비(非)-바이러스성 발현 벡터가 포함된 체세포를 배양하여 유도 만능 줄기 세포를 수득하는 단계는 통상의 방법과 동일한 방식으로 레트로바이러스를 이용하여 실시가능한데; 예를 들어, 이는 문헌 [Cell, 126, pp.1-14, 2006]; [Cell, 131, pp.1-12, 2007]; 및 [Science, 318, pp.1917-1920, 2007] 등의 간행물에 기술된 바와 같이 하여 달성가능하다.

인간 유도 만능 줄기 세포를 제조함에 있어서, 경우에 따라서는 발현 벡터 도입 후의 세포 배양 밀도를 통상의 동물 세포 배양시의 밀도보다 더 낮은 수준으로 설정하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 세포 배양 접시당 10,000 내지 100,000 개 세포, 바람직하게는 약 50,000 개 세포의 세포 밀도로 배양을 지속하는 것이 바람직하다. 상기 배양을 위해서는, 당업자에 의해 적절히 선택된 임의의 배지가 이용가능한데; 예를 들어, 인간 유도 만능 줄기 세포를 제조함에 있어서는, 경우에 따라서 인간 ES 세포 배양에 적합한 배지를 사용하는 것이 바람직하다. 배지 및 배양 조건에 대한 선택에 관해서는, 상기 언급한 간행물들이 참조에 도움이 된다.

[0113] 생성된 유도 만능 줄기 세포는 미분화 세포 특유의 각종 마커들을 이용하여 동정할 수 있는데; 이러한 동정을 위한 수단 또한 상기 언급한 간행물들에 구체적으로 상세히 기술되어 있다. ES 세포의 미분화 상태 및 다능성을 유지할 수 있게 하는 각종 배지 또는 이러한 특성들을 유지할 수 없게 하는 배지는 당업계에 공지되어 있으며; 적절한 배지들을 조합하여 사용함으로써, 유도 만능 줄기 세포를 효율적으로 분리할 수 있다. 분리된 유도 만능 줄기 세포의 분화 잠재력 및 증식 잠재력은 ES 세포에 대해 통상 사용되는 동정 방법을 이용함으로써 당업자가 용이하게 확인할 수 있다. 생성된 유도 만능 줄기 세포를 적절한 조건 하에서 증식시키면, 유도 만능 줄기 세포의 집락이 수득되는데; 집락의 형상을 기초로 유도 만능 줄기 세포의 존재를 동정하는 것이 가능하다. 예를 들어, 마우스 유도 만능 줄기 세포들은 융기된 (raised) 집락을 형성하는 반면, 인간 유도 만능 줄기 세포는 편평한 (flat) 집락을 형성하며, 이들 집락의 형상은 각각 마우스 ES 세포 및 인간 ES 세포 집락의 형상과 매우 유사하다는 것이 공지되어 있다; 따라서, 당업자는 해당 집락의 형상을 기초로, 생성된 유도 만능 줄기 세포를 동정할 수 있다. ES 세포에서 특이적으로 발현하는 유전자의 프로모터의 하류에 GFP 등의 마커 유전자가 포함된 유전자를 가진 체세포를 이용하여 초기화를 실시하는 경우, 상기 세포가 상기 마커 (GFP) 에 양성인 경우, 유도 만능 줄기 세포를 동정하는 것이 가능하다.

[0114] 본 발명의 방법에 의해 초기화되는 "체세포"는 초기 배아 및 ES 세포 등의 전분화능 (totipotent) 및 만능 세포를 제외한 임의의 세포를 지칭하며, 이에 대한 선택에는 특별한 제한은 없다. 예를 들어, 태아 단계의 체세포뿐 아니라, 신생아의 체세포 및 성체의 체세포도 이용가능하다. 바람직하게는, 인간을 비롯한 포유동물에서 유래한 체세포를 사용한다; 더욱 바람직하게는 인간- 또는 마우스-유래 체세포를 사용한다. 구체적으로, (1) 신경 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 및 치수 줄기 세포 등의 조직 줄기 세포 (체성 줄기 세포), (2) 조직 전구 세포, 또는 (3) 림프구, 상피 세포, 근세포, 섬유아세포 (진피 세포 등), 유모 세포, 간세포, 및 위점막 세포 등의 분화된 세포를 언급할 수 있다. 질병을 치료하기 위해 유도 만능 줄기 세포를 이용하는 경우, 치료 대상 환자 또는 상기 환자의 HLA 와 동일한 유형의 HLA 를 가진 다른 사람으로부터 분리한 체세포를 사용하는 것이 바람직한데; 예를 들어, 질병에 관여하는 체세포 및 질병 치료에 관여하는 체세포 등을 사용할 수 있다.

[0115] 본 발명에서, 유도 만능 줄기 세포 수립의 효율을 증가시키기 위해, 본 발명의 비(非)-바이러스성 발현 벡터를 도입하는 것 외에, 다양한 수립 효율 향상제 (improver) 를 도입 또는 첨가할 수 있다. iPS 세포 수립 효율 향상제의 예로서는, 히스톤 탈아세틸화효소 (HDAC) 저해제 [예컨대, 발프로산 (valproic acid; VPA) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008)), 트리코스타틴 A (trichostatin A), 부티르산나트륨, MC 1293, 및 M344 등의 저분자 저해제, HDAC 에 대한 siRNA 및 shRNA (예컨대, HDAC1 siRNA Smartpool® (Millipore), HDAC1 에 대한 HuSH 29량체 shRNA 구축물 (OriGene) 등) 등의 핵산계 발현 저해제, 등], G9a 히스톤 메틸전이효소 저해제 [예컨대, BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008)) 등의 저분자 저해제, G9a 에 대한 siRNA 및 shRNA

(예컨대, G9a siRNA (인간) (Santa Cruz Biotechnology) 등) 등의 핵산계 발현 저해제 등], L-채널 칼슘 효현제 (예컨대, Bayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008)), UTF1 (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008)), Wnt Signaling (예컨대, 가용성 Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008)), 2i/LIF (2i 는 유사분열물질(mitogen)-활성화 단백질 키나아제 신호전달 및 글리코겐 신타아제 (synthase) 키나아제-3 에 대한 저해제임; PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008)), p53 저해제 (예컨대, p53 에 대한 siRNA 및 shRNA (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008)) 등을 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 상기 핵산계 발현 저해제는 siRNA 또는 shRNA 를 인코딩하는 DNA 를 내포한 발현 벡터의 형태일 수 있다. 이러한 경우, 상기 siRNA 또는 shRNA 를 인코딩하는 DNA 를 초기화 인자들과 함께 본 발명의 비(非)-바이러스성 발현 벡터 내로 삽입할 수 있다.

[0116] 본 발명의 방법으로 제조된 유도 만능 줄기 세포는 이의 이용에 있어서 제한이 없으며, ES 세포의 이용에 대한 모든 유형의 연구 및 조사 및 ES 세포를 이용한 질병의 치료에 있어서, ES 세포 대신 이용가능하다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 의해 환자로부터 채취한 체세포로부터 수득한 유도 만능 줄기 세포를 레티노산, EGF 등의 성장 인자, 또는 글루코코르티코이드 등으로 처리하여, 목적하는 분화된 세포 (예컨대, 신경 세포, 심근 세포, 혈액 세포 등) 를 적절한 조직을 형성하도록 유도할 수 있다. 이렇게 수득한 분화된 세포 또는 조직을 상기 환자에 되돌림으로써, 자가 세포 이식에 의한 줄기 세포 요법을 달성할 수 있다. 본 발명의 유도 만능 줄기 세포의 용도는 상기 기술한 특정 구현예에 한정되지 않는다는 것을 유의해야 한다.

[0117] 본 발명은 또한 상기 기술한 유도 만능 줄기 세포의 제조 방법에 사용하기 위한 비(非)-바이러스성 발현 벡터, 즉, 초기화 인자를 인코딩하는 유전자 하나 이상이 포함된 비(非)-바이러스성 발현 벡터 (바람직하게는 플라스미드 벡터) 를 제공한다. 상기 벡터의 구조는 본 발명의 유도 만능 줄기 세포의 제조 방법의 절에서 상세히 기술된 바와 같다.

[0118] 이의 일례는 Oct 패밀리 유전자, Klf 패밀리 유전자, 및 Sox 패밀리 유전자가 포함된, 바람직하게는 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 포함된 비(非)-바이러스성 발현 벡터이다. 더욱 바람직한 예는 이들 유전자가 포함된 비(非)-바이러스성 발현 벡터로서 폴리시스트론 발현을 가능하게 하는 개재 서열을 가진 것, 특히 바람직하게는 OCT3/4, Klf4 및 Sox 2 가 폴리시스트론 발현을 가능하게 하는 개재 서열, 바람직하게는 FMDV 2A-자가-가공 서열과 함께, 이 순서대로 5' 에서 3' 말단 방향으로 포함된 비(非)-바이러스성 발현 벡터이다.

[0119] 체세포 내로 도입된 플라스미드 벡터 등의 비(非)-바이러스성 발현 벡터는 전형적으로는 상기 세포의 게놈 내로 통합되지 않기 때문에, 바람직한 구현예에서, 본 발명은 전이유전자가 상기 게놈 내로 통합되지 않은 유도 만능 줄기 세포를 제공한다. 이러한 iPS 세포는, 이로부터 분화된 조직 또는 장기에서의 종양형성 및/또는 내재성 유전자의 교란 (예컨대, 파괴 또는 활성화) 을 일으킬 위험을 감소시키기 때문에, 세포 이식 요법 등의 재생의학에 바람직하게 사용가능하다.

[0120] 그러나, iPS 세포 유도를 위한 선택압 하에서는, 초기화 인자의 안정한 발현에 대한 필요성으로 인해 비(非)-바이러스성 발현 벡터의 통합 효율이 증가되는 것을 관찰할 수 있다. 따라서, 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명은 전이유전자가 플라스미드의 형태로 게놈 내에 통합되어 있는 유도 만능 줄기 세포를 제공한다. 이러한 iPS 세포는 레트로바이러스 감염으로 유도한 iPS 세포에 비해, 이로부터 분화된 조직 또는 장기에서의 종양형성을 일으킬 위험을 감소시킬 수 있다. 또한, 상기 전이유전자를 필요에 따라, Cre/loxP 시스템 (Chang 등, 2009 (상기)) 또는 피기백 전위유전자 벡터 및 피기백 전위유전자 (Kaji 등, 2009 (상기); Woltjen 등, 2009 (상기)) 또는 테트라사이클린 의존성 유전자 유도를 이용하여, 게놈으로부터 제거할 수 있다. 플라스미드 벡터 또는 아데노바이러스 벡터를 이용하여 이러한 제거를 위한 Cre 재조합효소 (recombinase) 또는 전위효소 (transposase) 를 상기 iPS 세포 내로 도입 및 발현시킬 수 있다. 테트라사이클린 의존성 유전자 유도를 이용하는 경우, Tet-억제인자 단백질 또는 변이 Tet-억제인자 단백질이 부수적으로 발현된다.

[0121] {실시예}

[0122] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하지만, 하기의 실시예를 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석해서는 안된다.

[0123] {실시예 1}

[0124] 실험계로서 Nanog 리포터를 가진 마우스를 이용하였다(Okita 등 Nature, Vol.448, pp.313-317, 2007). 이들 마우스는, EGFP 및 퓨로마이신 (puromycin) 저항성 유전자를 BACPAC Resources 로부터 구입한 BAC (세균 인공 염색체) 의 Nanog 유전자 좌위 내로 편입시켜 준비하였다. 상기 마우스 Nanog 유전자는 ES 세포 및 초기

배아 등의 만능 세포에서 특이적으로 발현된다. 상기 리포터에 양성인 마우스 iPS 세포는 ES 세포와 거의 동등한 분화 잠재력을 가진 것으로 나타났다. 이들 Nanog 리포터 마우스를 Fbx15 리포터 마우스와 교미시켜 (Tokuzawa 등 Mol Cell Biol, Vol.23, 2699-2708 (2003)), Nanog 리포터 및 Fbx15 리포터를 모두 가진 변이 마우스를 생성하였다.

[0125] 초기화에 사용되는 플라스미드는, pCX-EGFP (오사카 대학교의 Masaru Okabe 박사로부터 제공받은 플라스미드: FEBS Letters, 407, 313-319, 1997) 를 EcoRI 로 처리하고, EGFP 대신, Oct3/4, Sox2, 및 Klf4 (모두 마우스 유래의 유전자) 의 코딩 영역이 Oct3/4, Klf4, 및 Sox2 의 순서로 구제역 바이러스의 2A 서열을 통해 결찰된 구축물을 삽입하여 제조하였다(pCX-2A-mOKS; 도 2). 유사하게, c-Myc 의 코딩 영역이 삽입된 플라스미드를 제조하였다(pCX-c-Myc; 도 2).

[0126] 2A 서열과 Oct3/4, Klf4, 및 Sox2 이 함께 결찰된 구축물을 제조함에 있어서, 먼저, 구제역 바이러스의 2A 서열 (서열번호:61), 상류의 제한 효소 부위 (XbaI 및 BglII), 및 하류의 제한 효소 부위 (BspHI, MfeI 및 PstI) 를 포함한 센스 및 안티센스 올리고뉴클레오티드를 어닐링 (annealing) 하고, 이를 XbaI 및 PstI 로 절단한 pBluescript II KS (-) 벡터 내로 삽입하였다(pBS-2A). 이어서, Oct3/4 또는 Klf4 를 인코딩하는 마우스 cDNA 를 PCR 로 증폭하고, 번역 종결 코돈을 BamHI 부위로 대체하고, 각각의 cDNA 를 pCR2.1 내로 클로닝하였다. 이어서, Oct3/4 및 Klf4 의 cDNA 들을 적절한 제한 효소를 이용하여 pBS-2A 에 결찰하여, pBS-Oct3/4-2A 및 pBS-Klf4-2A 를 생성하였다. 이어서, 적절한 제한 효소를 이용하여 Klf4-2A 를 인 프레임으로 (in frame) pBS-Oct3/4-2A 에 삽입하여, pBS-Oct3/4-2A-Klf4-2A 를 제조하였다. 이어서, 생성된 Oct3/4-2A-Klf4-2A 구축물을, 적절한 제한 효소를 이용하여, 번역 종결 코돈을 가진 Sox2 의 cDNA 에 결찰시켰다. 마지막으로, 2A 서열 및 Oct3/4, Klf4, 및 Sox2 가 함께 결찰된 생성된 Oct3/4-2A-Klf4-2A-Sox2-STOP 구축물을 pCX-EGFP 의 EcoRI 부위 내로 삽입하여, pCX-2A-mOKS 를 제조하였다.

[0127] 상기 언급한 변이 마우스 태아 (수정 후 13.5 일된 것) 로부터 섬유아세포 (MEF) 를 단리하였다. Nanog 유전자가 발현되지 않으면, MEF 는 녹색 형광을 일으키는 EGFP 를 발현하지 않는다. 이러한 이유로, MEF 를, 사전에 0.1% 젤라틴 (Sigma) 으로 코팅한 6-웰 배양 플레이트 (Falcon) 에 웰당 1.3 x 10^5 개 세포로 파종하였다. 사용된 배양 배지는 DMEM/10% FCS (10% 소 태아 혈청이 보충된 DMEM (Nacalai Tesque)) 이었으므로, MEF 를 37℃, 5% CO_2 에서 배양하였다. 다음날, 100 μL 의 Opti-MEM I Reduced-Serum 배지 (Invitrogen) 에 4.5 μL 의 FuGene6 트랜스펙션 시약 (Roche) 을 첨가하고, 상기 배지를 실온에서 5 분간 정치시켰다. 그 후, 1.5 μg 의 발현 벡터 (pCX-2A-mOKS) 를 첨가하고, 배지를 실온에서 15 분간 정치한 후, 상기 배지를 MEF 배양 배지에 첨가하였다. 다음날, 상기 배지를 제거하고, 상기 FuGene6 트랜스펙션 시약을 이용하여 상기 기술한 바와 같이 1.5 μg 의 또 다른 발현 벡터 (pCX-c-Myc) 를 도입하였다.

[0128] 다음날, 상기 배양 배지를 새로운 것 (DMEM/10% FCS) 으로 교체하고, 발현 벡터 (pCX-2A-mOKS) 를 상기 기술한 바와 같이 도입하였다; 그 다음날, 배양 배지를 ES 세포 배양 배지 (15% 소 태아 혈청, 2 mM L-글루타민 (Invitrogen), 100 μM 비(非)-필수 아미노산 (Invitrogen), 100 μM 2-메르캅토에탄올 (Invitrogen), 50 U/mL 페니실린 (Invitrogen) 및 50 mg/mL 스트렙토마이신 (Invitrogen) 이 보충된 DMEM (Nacalai Tesque)) 로 교체하고, 상기 FuGene6 트랜스펙션 시약을 이용하여 상기 기술한 바와 같이 발현 벡터 (pCX-c-Myc) 를 도입하였다.

[0129] 다음날, 상기 배지를 ES 세포 배양 배지로 교체하였다. 파종 후 제 9 일에, 상기 MEF 배양 배지를 제거하고, PBS 2 mL 를 첨가하여 세포를 세정하였다. PBS 를 제거한 후, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen) 를 첨가하고, 37℃에서 약 5 분간 반응을 실시하였다. 세포가 가시화된 후, ES 세포 배양 배지를 첨가하여, 세포를 현탁하고, 1x10^6 (Exp432A) 또는 2x10^5 (Exp432B) 개 세포를, 사전에 영양 세포를 파종한 100 mm 접시에 파종하였다. 사용된 영양 세포는 미토마이신 C 로 처리되어 세포 분열이 종결된 SNL 세포이었다.

[0130] 이어서, 가시적인 집락이 출현할 때까지 상기 ES 세포 배양 배지를 2 일마다 새로운 것으로 교체하였다; 제 17 일 즈음에 집락형성이 시작되었는데, 완전한 집락형성은 제 24 일 즈음에 관찰되었다(도 1). 당해 시간표는 도 1 및 3 의 Exp432 에 요약되어 있다.

[0131] 수득한 세포는 서서히 GFP-양성으로 되어, 마우스 ES 와 구별불가능한 형태를 나타내었고(도 4 의 432A-1), 각종 ES 세포 마커에 대해서도 ES 세포와 유사한 수준으로 양성으로 판정되었으며(도 5 의 iPS-432A-1), 성체 키메라 마우스를 생성하였다. 마우스 iPS 세포 특유의 콜로니 형상 및 GFP-양성의 결과 및 다른 비(非)-분화 마커들에 대해 양성인 결과에 기초하여, 상기 기술한 발현 벡터를 MEF 세포 내로 도입함에 의해, 핵 초기화가

완전히 진행되어 iPS 세포가 생성되었고, 상기 iPS 세포가 증식하여 가시적인 콜로니를 형성한 것으로 결론을 내렸다. 따라서, 이러한 결과들은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스를 사용하지 않고도 iPS 세포를 제조할 수 있다는 것을 보여준 것이었다. PCR 분석에 의해, 상기 기술한 발현 벡터가 숙주 게놈 내로 통합된 것을 검출하였다(도 6 의 iPS-432A-1).

[0132] {실시예 2}

[0133] pCX-2A-mOKS 및 pCX-c-Myc 가 숙주 게놈 내로 통합되는 것을 피하기 위해, 트랜스펙션 프로토콜을 수정하였다.

[0134] 실험 시작 후 제 1, 3, 5, 및 7 일에, pCX-2A-mOKS 및 pCX-c-Myc 를 함께 트랜스펙션시켰다(도 3 의 Exp440). 그 결과로, 다수의 GFP-양성 콜로니를 수득하였고, 형태학상으로 ES 세포와 구별불가능한 세포가 생성되었다(도 4 의 440A-3). 수득된 세포는 ES 세포와 동일한 수준으로 ES 세포 마커를 발현하였다(도 5 의 iPS-440A). 상기 플라스미드 DNA 가 상기 게놈 내로 통합되었는지 조사하기 위해, 상기 플라스미드의 각 부분을 증폭시킬 수 있는 16 개의 PCR 프라이머 세트를 설계하였다(도 2, 13 및 14). 당해 수정된 프로토콜에 의해 수득된 11 개의 GFP-양성 클론들 중 9 개에서, 외인성 DNA 의 증폭이 관찰되지 않았다(도 6). 나아가, 서던 블롯 분석에서도, 이들 클론에서 외인성 유전자의 통합이 검출되지 않았다(도 11). 소형 플라스미드 절편의 존재 가능성을 확실히 배제할 수는 없지만, 상기의 결과들은 이들 iPS 세포에서 숙주 게놈 내로 통합된 pCX-2A-mOKS 및 pCX-c-Myc 플라스미드는 없었다는 것을 보여주었다.

[0135] 상기 통합이 일어나지 않은 iPS 세포가 오염 가능성 있는 Nanog-GFP ES 세포로부터 유래한 것일 가능성을 배제하기 위해, SSLP 분석을 실시하였다. 도 3 의 Exp440 에서는, 5 개의 태아로부터의 MEF 세포를 이용하였다. 당해 SSLP 분석에서, 이들 5 개의 태아는 구별가능하였고, 통합이 일어나지 않은 iPS 세포의 유래가 밝혀졌다(도 12). 당해 분석은 또한 상기 통합이 일어나지 않은 iPS 세포가 129S4 균주에서 유래한 ES 세포와는 상이하다는 것을 보여주었다(도 12).

[0136] {실시예 3}

[0137] 통합이 일어나지 않은 iPS 세포의 다능성을 확인하기 위해, 실시예 2 에 기술된 바와 같이 수득한 iPS 세포를 누드 마우스에 피하로 이식하였다. 처리된 모든 클론 (440A-3, -4, -8 및 -10) 은 종양을 발생시켰는데, 이에는 상기 세 가지 배엽 모두로부터 유래한 세포를 비롯하여, 넓은 범위의 세포 유형이 포함되었다(도 7). 나아가, 통합이 일어나지 않은 iPS 세포를 ICR 마우스 포배에 주사하였다. 털가죽 (coat) 색상으로 판정한 결과, 성체 키메라들은 주사된 모든 클론 (440A-3, -4, -6, -8, -9 및 -10) 으로부터 수득된 것들이었다(도 8). 이들 키메라 마우스에서는, PCR 분석에서 어떠한 전이유전자의 통합도 검출되지 않았다(도 9). 상기 PCR 분석에서, Nanog 및 Fbx15 리포터는 둘 다 상기 키메라들에서 검출되었다(도 9). 통합이 일어나지 않은 iPS 세포가 상기 이중 리포터 마우스로부터 출현한 사실, 및 본 발명자들의 실험실이 이중 리포터 ES 세포를 보유하지 않는다는 사실을 조합하면, 이들 결과들은 상기 키메라들이 오염성 ES 세포로부터라기 보다는, 통합이 일어나지 않은 iPS 세포로부터 유래한 것임을 나타내는 것이었다. 따라서, 이러한 결과들은 통합이 일어나지 않은 iPS 세포가 다능성을 지님을 확증해 주었다.

[0138] 수득한 71 마리의 키메라 마우스 및 이들의 자손에 대한 장기간의 조사에 의해, 레트로바이러스를 이용하여 4 가지 유전자 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) 를 도입하여 제조한 iPS 세포로부터 유래한 키메라 마우스, 및 이들의 자손에서는, 정상 마우스와 비교하여, 사망률이 보다 일찍 증가하기 시작한 반면, 상기 4 가지 유전자의 통합이 일어나지 않은 iPS 세포로부터 유래한 키메라 마우스 및 이의 자손은 정상 마우스와 유사한 생존율 곡선을 나타내는 것이 밝혀졌다.

[0139] 수득한 키메라 마우스 및 야생형 마우스를 교미시켰을 때, F1 마우스가 수득되었는데; 따라서, 통합이 일어나지 않은 iPS 세포는 생식선 (germline) 에 기여하는 것으로 확인되었다(생식선-전이).

[0140] {실시예 4}

[0141] 실험계로 인간 치수 줄기 세포 (클론 명칭; DP31, PCT/JP2008/068320, J.Dent.Res., 87(7):676-681 (2008)) 를 사용하였다. 문헌 [Cell, 131, 861-872 (2007)] 에 기술된 바와 같이 렌티바이러스를 이용하여 상기 DP31 이 마우스 동종숙주역 (ecotropic) 바이러스 수용체 Slc7a1 유전자를 발현하도록 하였다. 이들 세포를 MSCGM 불렛 (bullet) 키트 (Lonza) 를 이용하여 배양하였다.

[0142] pCX-EGFP (오사카 대학교의 Masaru Okabe 박사로부터 제공받음, FEBS Letters, 407, 313-319, 1997) 로부터 실시예 1 과 동일한 방식으로 하여 초기화에 사용된 플라스미드들을 제조하였다. 구체적으로, 상기 pCX-EGFP

를 EcoRI 로 처리하고, SOX2 및 KLF4 의 코딩 영역들이 구제역 바이러스의 2A 서열을 통해 결찰되어 있는 구축물을 EGFP 대신 삽입하여, 이로써 플라스미드 pCX-hSK 를 제조하였다. 마찬가지로, c-Myc, Lin28, 및 Nanog 가 상기 2A 서열을 통해 결찰되어 있는 플라스미드 (pCX-hMLN), OCT3/4 코딩 영역이 삽입되어 있는 플라스미드 (pCX-hOCT3/4), 및 SV40 Large T 항원이 삽입되어 있는 플라스미드 (pCX-SV40LT) 를 제조하였다.

[0143] 100 mm 접시에서 배양한 DP31 을 PBS 로 세정하고, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen) 를 첨가하고, 37℃에서 약 5 분간 반응을 실시하였다. 세포가 가시화된 후, MSCGM 를 첨가하고, 세포를 현탁하고, $6x10^5$ 개 세포를 15 mL 시험관에 회수하였다. 상기 세포를 800 rpm 으로 5 분간 원심분리하고; 상청액을 제거한 후, 발현 플라스미드를 Human Dermal Fibroblast Nucleofector Kit (Amaxa) 를 이용하여 도입하였다. 사용된 플라스미드의 양은, pCX-hOCT3/4 는 0.5 μg, pCX-hSK 는 1.0 μg, pCX-hMLN 은 1.5 μg, 및 pCX-SV40LT 는 0.5 μg 이었다. 상기 처리 후, 세포를 6-웰 플레이트에 파종하였다. MSCGM 으로 10 일간 배양한 후, 세포를 다시 PBS 로 세정하고, 0.25% 트립신/1 mM EDTA (Invitrogen) 를 첨가하고, 37℃에서 약 5 분간 반응을 실시하였다. 세포가 가시화된 후, MSCGM 를 첨가하고, 상기 세포를 현탁하고, $1x10^6$ 개 세포를 사전에 영양 세포를 파종해 둔 100 mm 접시 상에 파종하였다. 사용된 영양 세포는 미토마이신 C 으로 처리되어 세포 분열이 종결된 SNL 세포였다. 그 후, 콜로니가 관찰되기 시작할 때까지, 상기 배지를 2 일마다 새로운 것으로 교체하였다. 사용된 배지는 각각 MSCGM 및 bFGF (4 ng/mL) 로 보충된 등량의 영장류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL) 를 혼합하여 조제한 것이었다. 제 19 일 즈음에 집락형성이 시작되었는데, 이로써 인간 iPS 세포의 수립을 확증하였다(도 15).

[0144] 다음으로, 인간 태아 HDF (Cell applications, INC) 를 상기 기술한 바와 동일한 7 종의 유전자로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 후, 4 ng/ml 재조합 인간 bFGF (WAKO) 로 보충된 영장류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL) 를 이용하여 상기 세포를 배양하였다. MSTO 세포를 영양 세포로 사용하였다. 트랜스펙션 후 제 31 일의 세포 사진 (하기 5 가지 클론: 203A-1 내지 203A-5, 이 중 203A-4 는 음성 대조로 선택됨) 이 도 16 에 나타나 있고, 두번째 계대배양시의 세포 사진이 도 17 에 나타나 있다. 203A-1 내지 203A-3 및 203A-5 클론은 전형적인 ES 세포 유사 형태를 나타내었는데, 이로써 인간 iPS 세포의 수립을 확증하였다.

[0145] 이들 세포를 게놈-PCR 분석에 적용하여, 전이유전자의 게놈 내로의 통합 여부에 대해 조사하였다. 결과는 도 18 에 나타나 있다. 모든 클론들에서, Oct3/4 (pCX-hOCT3/4) 및 c-Myc (pCX-hMLN) 의 통합이 검출되었다. Klf4 (pCX-hSK) 의 통합은 203A-4 를 제외한 클론들에서 검출되었다. SV40LT (pCX-SV40LT) 의 통합은 상기 클론들 중 어떠한 것에서도 검출되지 않았다.

[0146] {실시예 5}

[0147] 실시예 4 에서 사용된 치수 줄기 세포 DP31 을 SV40 Large T 항원 (pCX-hSK, pCX-hMLN, pCX-hOCT3/4) 을 제외한 6 종의 유전자로, 실시예 4 에서와 동일한 방식으로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 후 제 35 일의 세포 사진 (하기 5 가지 클론: 217A-1 내지 -4 및 -6) 이 도 19 에 나타나 있다. 두번째 계대배양시의 세포 사진은 도 20 에 나타나 있다. 모든 클론은 전형적인 ES 세포 유사 형태를 나타내었는데, 이로써 인간 iPS 세포의 수립을 확인하였다.

[0148] 수립된 이들 인간 iPS 세포 클론들 (217A-1 내지 217A-4, 217A-6) 을 게놈-PCR 분석에 적용하였다. 결과는 도 21 에 나타나 있다. 이들 모든 클론들에서, 상기 전이유전자들이 통합된 것으로 나타났다.

[0149] {실시예 6}

[0150] 6 세의 일본 여성 유래의 HDF 세포주 (HDF-120; JCRB) 에서 Slc7a1 유전자를 발현시켰다. 결과적인 세포 (HDF-120-Slc) 를 상기 언급한 6 종의 유전자 및 p53 에 대한 shRNA (shRNA2: 서열번호:62) 로 트랜스펙션하였다(도입된 벡터: pCX-hOCT3/4, pCX-hSK, pCX-hMLN-shp53).

[0151] pCX-hOCT3/4 (0.5 μg), pCX-hSK (1.0 μg), 및 pCX-hMLN-shp53 (1.5 μg) 각각을 마이크로포레이터 (100 μL 팁 (tip), 1600 V, 10 ms, 3 회) 를 이용하여 전기적으로 $6.0 x10^5$ 개의 HDF-120-Slc 세포 내로 도입하였다. 10 일 후, 각 벡터를 동일 조건 하에서 다시 한번 전기적으로 도입하고, 당해 세포를 MSTO (100 mm 접시) 상에 파종하였다. 이들 세포를 제 10 일까지는 DMEM/10% FCS 를 이용하여, 그 후에는 4 ng/ml 재조합 인간 bFGF (WAKO) 가 보충된 영장류 ES 세포 배양 배지 (ReproCELL) 를 이용하여 배양하였다. 상기 첫번째 전기천공 후 제 35 일의 세포 사진이 도 22 에 나타나 있다. 계대 배양 후의 세포 사진은 도 23 에 나타나 있다. 전형적인 ES 세포 유사 형태가 나타났는데, 이로써 인간 iPS 세포의 수립을 확인하였다. 게놈-PCR 분석 결

과, 전이유전자들이 통합된 것으로 나타났다(도 24 에서의 279A-2 레인).

[0152] {실시예 7}

[0153] 4 종의 유전자 Oct3/4, Klf4, Sox2 및 c-Myc 가 개별적으로 포함된 발현 벡터들 (pCX-Oct4, pCX-Sox2, pCX-Klf4, pCX-c-Myc) 을 실시예 2 의 프로토콜에 따라 Nanog 리포터 마우스 유래의 MEF 세포 내로 도입하였다 (Okita 등 Nature, Vol.448, pp.313-317, 2007).

[0154] 먼저, Nanog 리포터 MEF 세포를 젤라틴-코팅 6-웰 플레이트 상에 파종하고($1.3x10^5$ 개 세포/웰), 제 1, 3, 5, 및 7 일에 FuGene6 을 이용하여 pCX-Oct4 (0.37 μg), pCX-Sox2 (0.36 μg), pCX-Klf4 (0.39 μg), 및 pCX-c-Myc (0.38 μg) 각각으로 트랜스펙션하였다. 제 9 일에, $1x10^6$ 개 세포 (1.0) 또는 $0.2x10^6$ 개 세포 (0.2) 를 MSTO-PH 또는 젤라틴 (100-mm 접시) 상에 파종하고, 제 25 일에 콜로니들을 선별하였다. 선별 후의 세포 사진이 도 25 에 나타나 있다. 마우스 iPS 세포 특유의 콜로니 형상 및 GFP-양성 결과가 수득되었는데, 이로써 마우스 iPS 세포의 수립을 확인하였다. 수립된 마우스 iPS 세포 클론들 (497A-1 내지 A-5) 을 게놈-PCR 분석에 적용하였다. 결과는 도 26 에 나타나 있다. 497A-2 및 497A-5 모두 상기 외인성 유전자 중 어떠한 것도 통합되지 않은 iPS 세포인 것으로 나타났다.

[0155] {산업상 이용가능성}

[0156] 본 발명의 방법에 따르면, 예를 들어, 환자의 체세포로부터, 매우 안전한 유도 만능 줄기 세포를 제조하는 것이 가능하다. 유도 만능 줄기 세포를 분화시켜 수득한 세포 (예컨대, 심근 세포, 인슐린 생성 세포, 신경 세포 등) 는 심부전, 인슐린 의존성 당뇨병, 파킨슨병 및 척수 손상을 비롯한 넓은 범위의 질병을 위한 줄기 세포 이식 요법에 안전하게 사용가능하다.

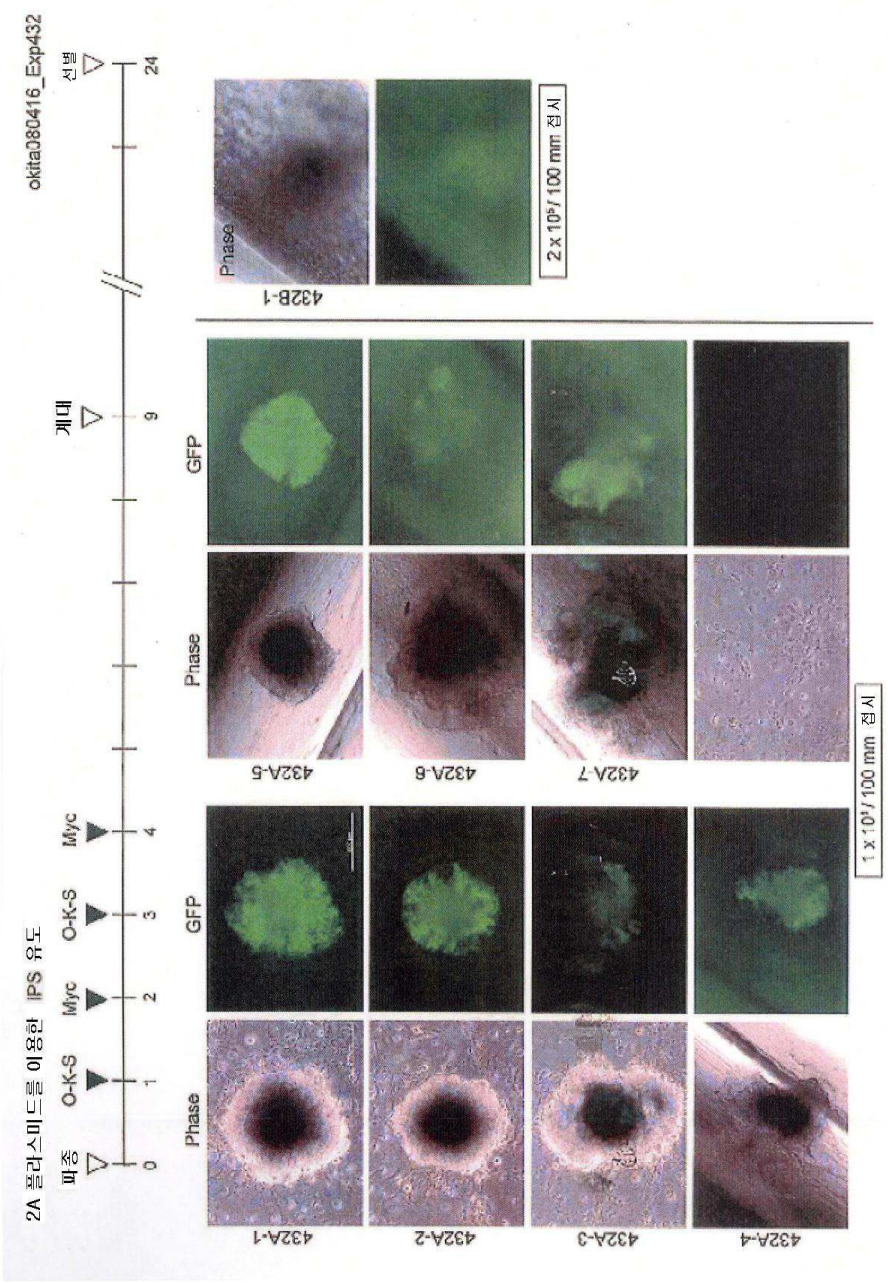
[0157] 본 발명이 바람직한 구현예를 강조하여 기술되었지만, 상기 바람직한 구현예가 변경될 수 있다는 것은 당업자들에게 자명하다. 본 발명은 본 명세서에서 상세히 기술한 것들 외의 방법들에 의해서도 구현될 수 있도록 의도된 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 "특허청구범위"의 요지 및 범위에 포함되는 모든 변경을 포괄한다.

[0158] 특허 및 특허 출원을 포함한, 본원에 인용된 모든 간행물에 개시된 내용은, 본원에 개시된 정도까지, 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

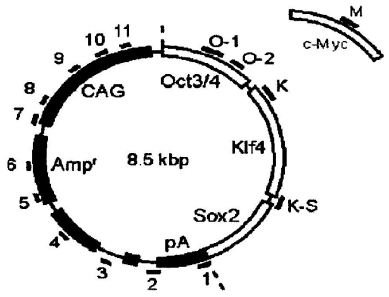
[0159] 본 출원은 U.S. 가특허 출원 제 61/071,508 호, 61/136,246 호, 61/136,615 호 및 61/193,363 호를 기초로 하며, 이들의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

도면

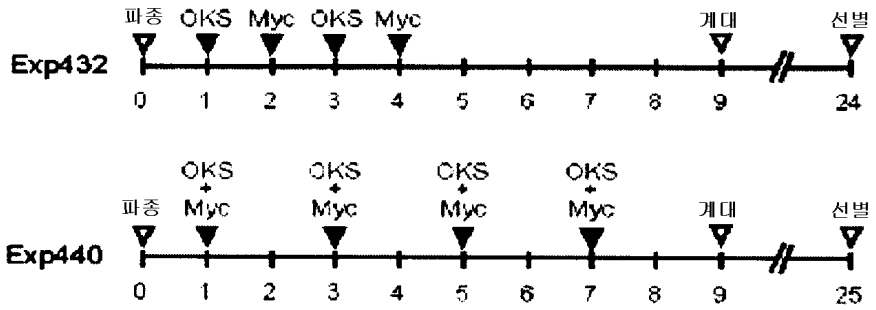
도면1


okita080416_Exp432
2A 플라스미드를 이용한 iPS 유도
파종
O-K-S
Myc
O-K-S
Myc
계대
선별
0
1
2
3
4
9
24
Phase
GFP
Phase
GFP
Phase
2 x 10⁵/ 100 mm 접시
1 x 10⁴/ 100 mm 접시
432B-1
432A-5
432A-6
432A-7
432A-1
432A-2
432A-3
432A-4

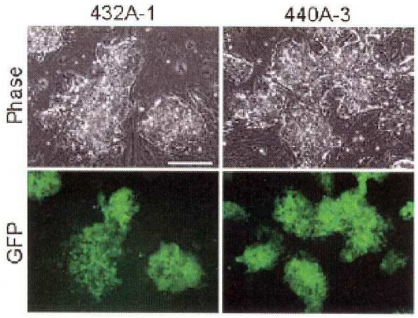
도면2


M
c-Myc
O-1
O-2
K
Oct3/4
Klf4
K-S
Sox2
pA
CAG
Amp'
8.5 kbp
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
1'

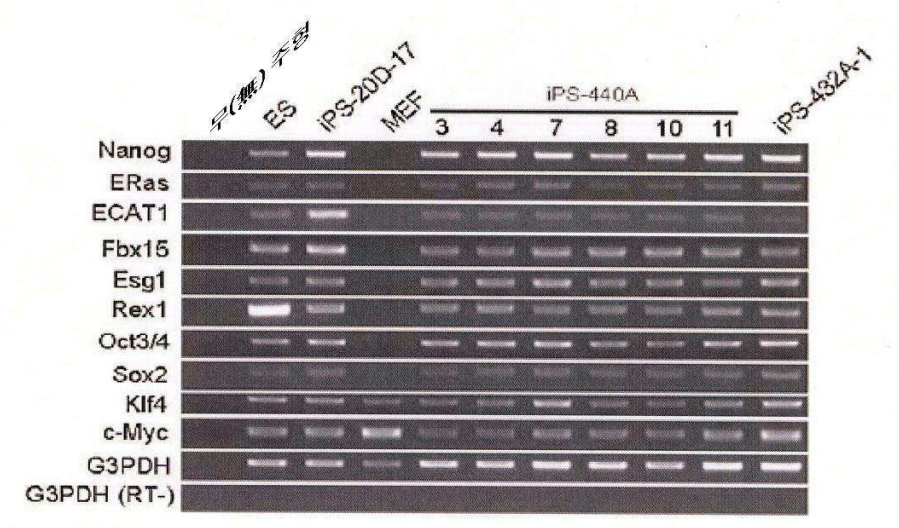
도면3


Exp432
파종
OKS
Myc
OKS
Myc
계대
선별
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
24
Exp440
OKS + Myc
OKS + Myc
OKS + Myc
OKS + Myc
파종
계대
선별
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
25

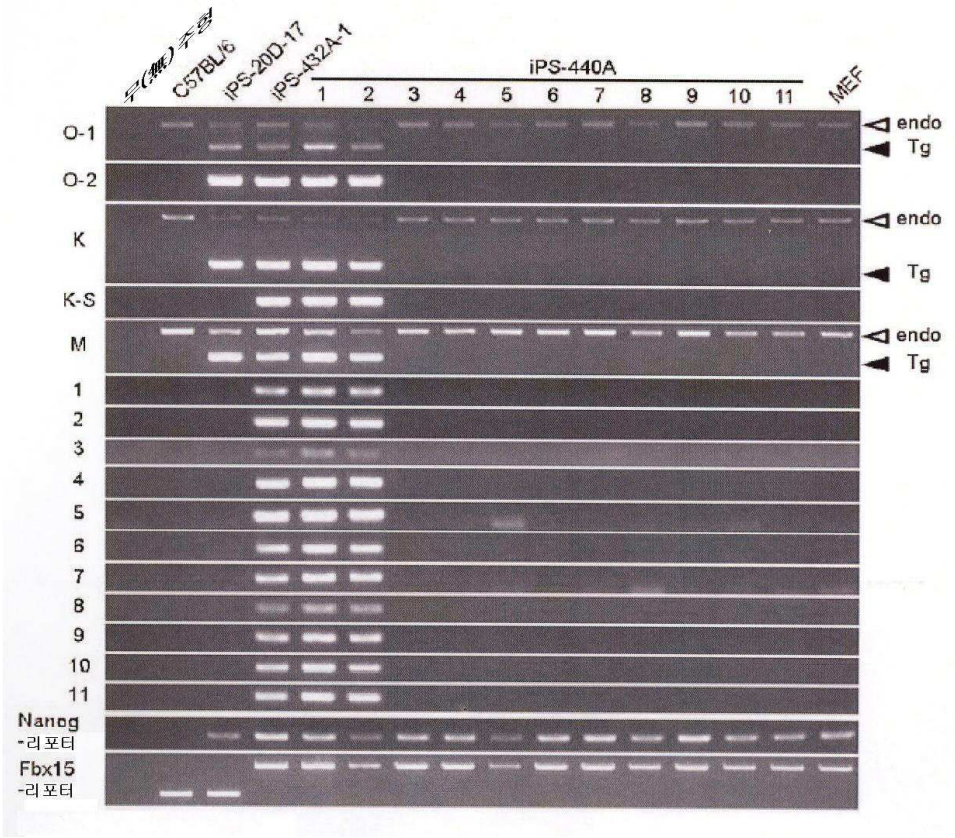
도면4


432A-1
440A-3
Phase
GFP

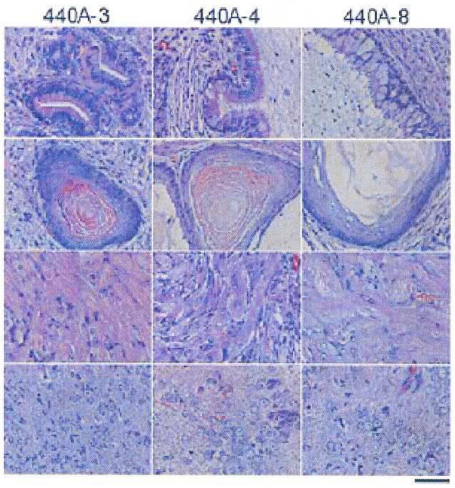
도면5


수정(체) 수정란
ES
iPS-20D-17
MEF
iPS-440A
3
4
7
8
10
11
iPS-432A-1
Nanog
ERas
ECAT1
Fbx15
Esg1
Rex1
Oct3/4
Sox2
Klf4
c-Myc
G3PDH
G3PDH (RT-)

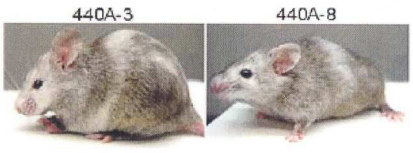
도면6


음(陰)주형
C57BL/6
iPS-20D-17
iPS-432A-1
iPS-440A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
MEF
O-1
O-2
K
K-S
M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
Nanog
-리포터
Fbx15
-리포터
endo
Tg
endo
Tg
endo
Tg

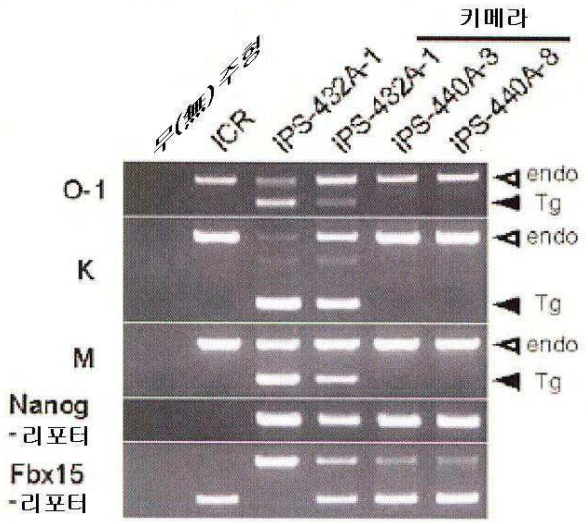
도면7


440A-3
440A-4
440A-8

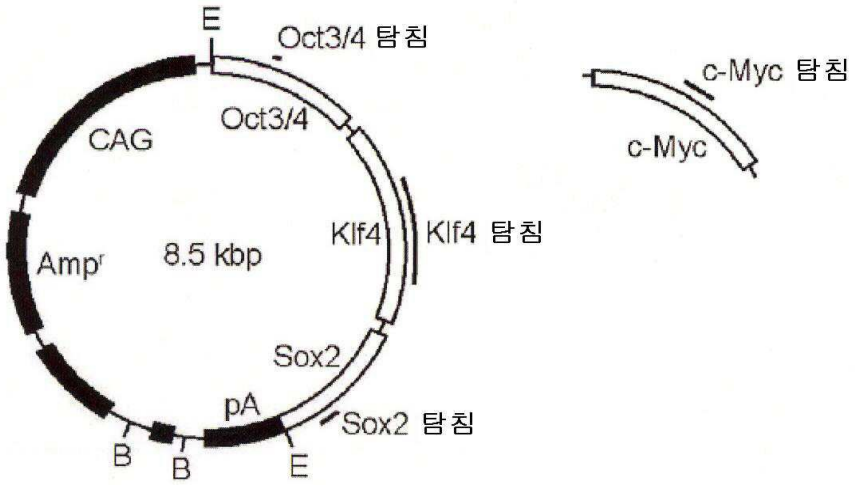
도면8


440A-3
440A-8

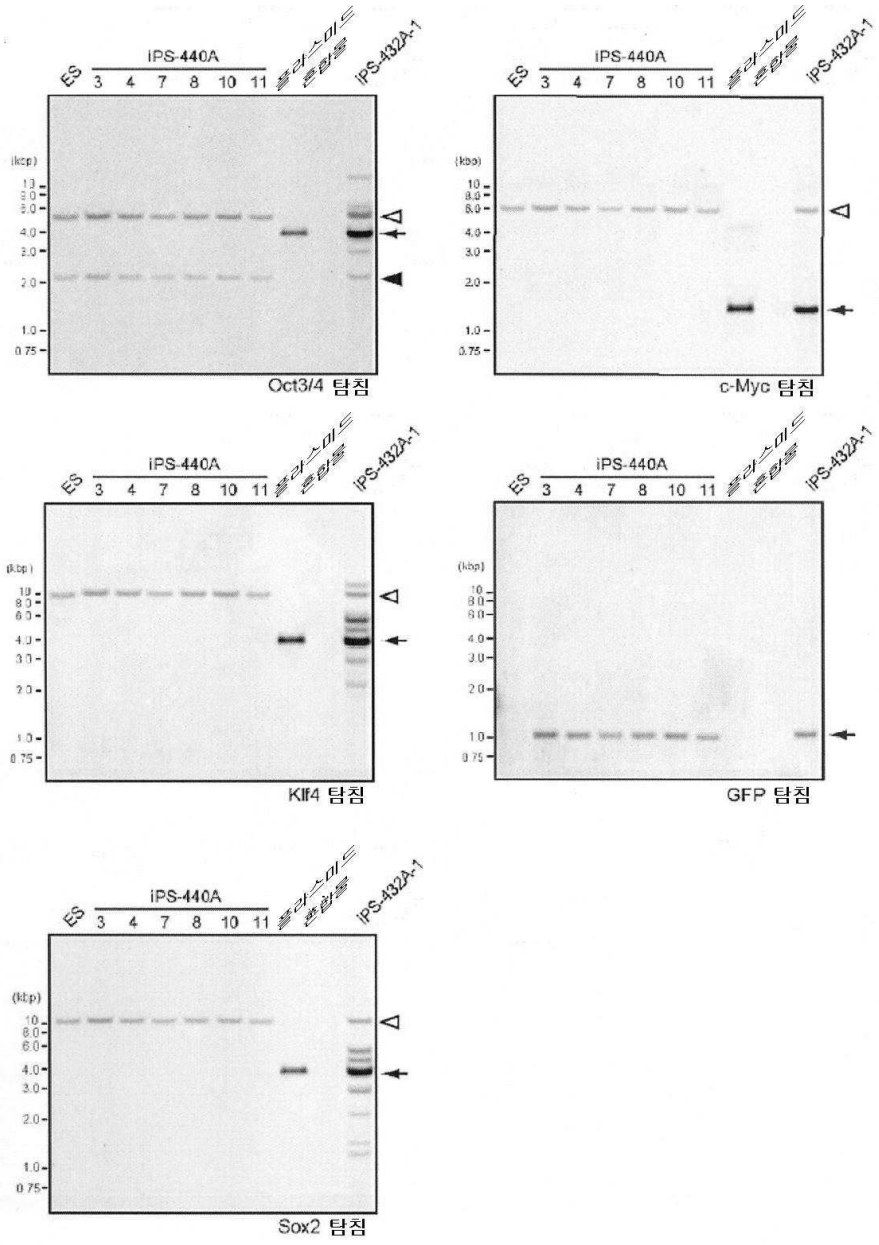
도면9


키메라
수(雌)주형
ICR
iPS-432A-1
iPS-432A-1
iPS-440A-3
iPS-440A-8
O-1
K
M
Nanog
-리포터
Fbx15
-리포터
endo
Tg
endo
Tg
endo
Tg

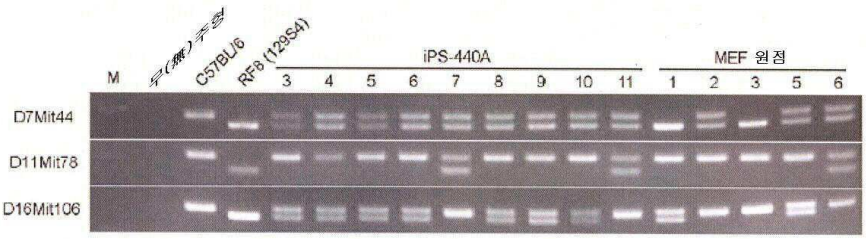
도면10


E
Oct3/4 탐침
Oct3/4
CAG
Klf4
Klf4 탐침
Amp
8.5 kbp
Sox2
pA
Sox2 탐침
B
B
E
c-Myc 탐침
c-Myc

도면11


ES
iPS-440A
3 4 7 8 10 11
플라스미드 only
iPS-432A-1
Oct3/4 탐침
c-Myc 탐침
Klf4 탐침
GFP 탐침
Sox2 탐침

도면12


M
음성(無)주형
C57BL/6
RF8 (129S4)
iPS-440A
3 4 5 6 7 8 9 10 11
MEF 원정
1 2 3 5 6
D7Mit44
D11Mit78
D16Mit106

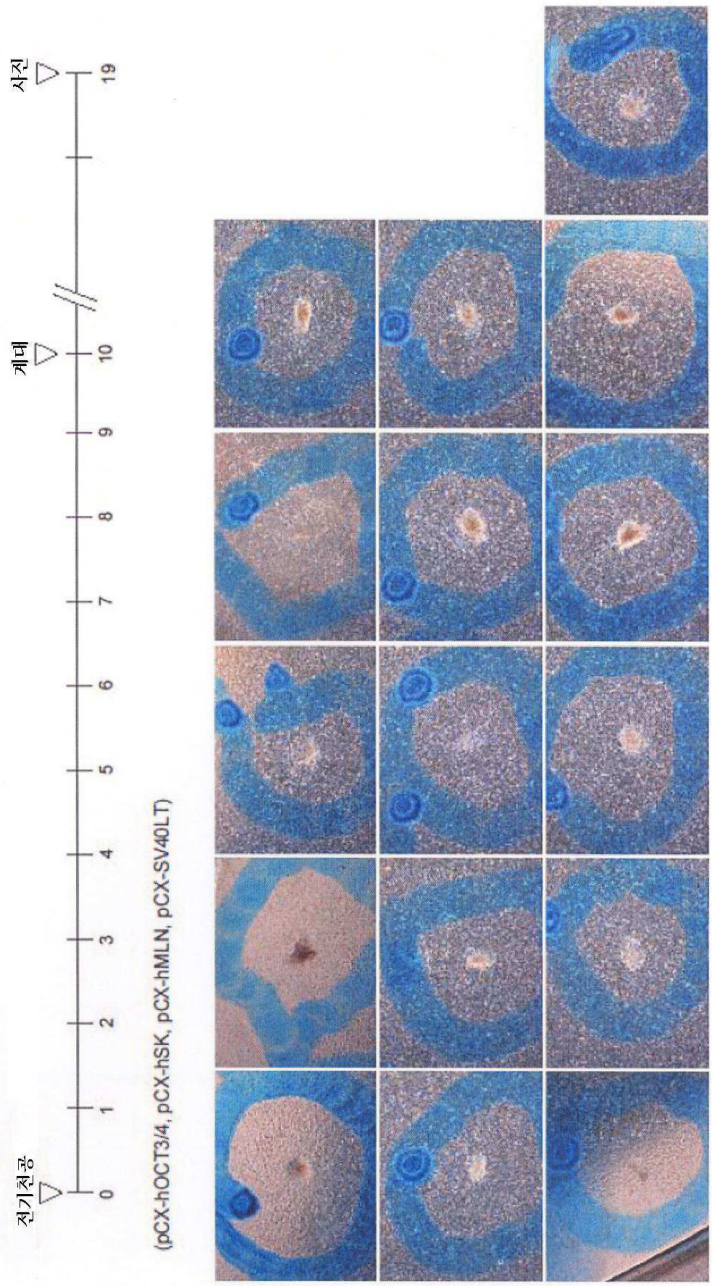
도면13

영역	서열
G3PDH	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA
Nanog	AGG GTC TGC TAC TGA GAT GCT
	CAA CAC CTG GTT TTT CTG CCA CCG
Rex1	ACGAGTGGCAGTTTCTTCTTGGGA
	TATGACTCACTTCCAGGGGGCACT
ECAT1	TGT GGG GCC CTG AAA GGC GAG CTG AGA T
	ATG GGC CGC CAT ACG ACG ACG CTC AAC T
ERas	ACT GCC CCT CAT CAG ACT GCT ACT
	CAC TGC CTT GTA CTC GGG TAG CTG
Fbx15	GTT GGA ATC TGC TTC TAC AG
	CTT CAC CAA GAT TTC CGA TG
Esg1	GAA GTC TGG TTC CTT GGC AGG ATG
	ACT CGA TAC ACT GGC CTA GC
Oct3/4	CTG AGG GCC AGG CAG GAG CAC GAG
	CTG TAG GGA GGG CTT CGG GCA CTT
Sox2	GGT TAC CTC TTC CTC CCA CTC CAG
	TCA CAT GTG CGA CAG GGG CAG
Klf4	CAC CAT GGA CCC GGG CGT GGC TGC CAG AAA
	TTA GGC TGT TCT TTT CCG GGG CCA CGA
c-Myc	CAG AGG AGG AAC GAG CTG AAG CGC
	TTA TGC ACC AGA GTT TCG AAG CTG TTC G
O-1	CGG AAT TCA AGG AGC TAG AAC AGT TTG CC
	CTG AAG GTT CTC ATT GTT GTC G
O-2	GAT CAC TCA CAT CGC CAA TC
	CTG GGA AAG GTG TCC TGT AGC C
K	GCG GGA AGG GAG AAG ACA CTG CGT C
	TAG GAG GGC CGG GTT GTT ACT GCT
K-S	CCT TAC ACA TGA AGA GGC ACT TT
	CAG CTC CGT CTC CAT CAT GTT AT
M	ACA CTC CCC CAA CAC CAG GAC GTT T
	GCT CGC CCA AAT CCT GTA CCT CGT CCG AT
	GAG ATG AGC CCG ACT CCG ACC TCT T
1	AGG TGC AGG CTG CCT ATC
	TTA GCC AGA AGT CAG ATG CTC
2	TGG CGT AAT CAT GGT CAT AG
	GCA ACG CAA TTA ATG TGA GTT AG
3	CTG GAT CCG CTG CAT TAA TGA
	CCG AGC GCA GCG AGT CA

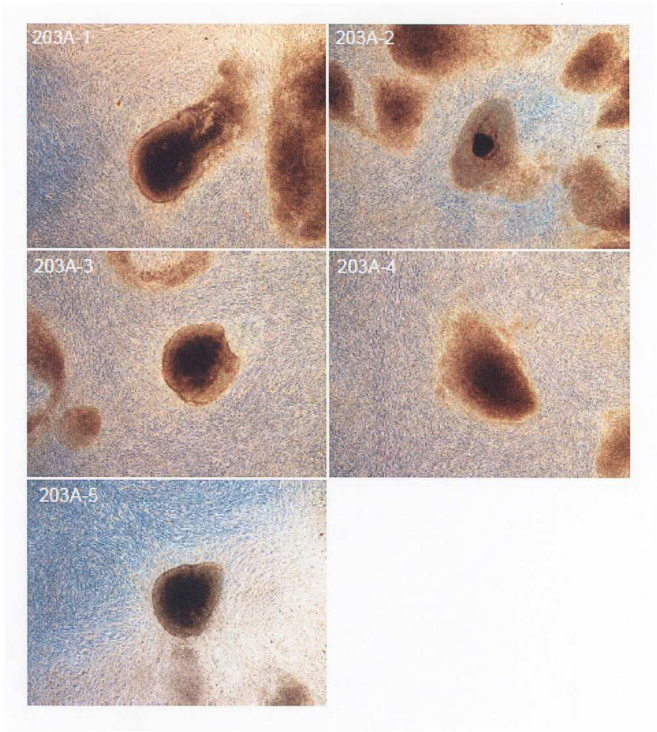
도면14

영역	서열
4	GCC TTA TCC GGT AAC TAT CGT
	GCA CCG CCT ACA TAC CTC
5	AGT TGC CTG ACT CCC CGT CGT G
	GGA GCC GGT GAG CGT GGG TC
6	CCG ATC GTT GTC AGA AGT AAG TTG
	TCA CAG AAA AGC ATC TTA CGG A
7	GAA AAG TGC CAC CTG GTC GAC ATT
	GGG CCA TTT ACC GTA AGT TAT GTA
8	TAT CAT ATG CCA AGT ACG C
	TAG ATG TAC TGC CAA GTA GGA A
9	TCT GAC TGA CCG CGT TAC T
	AGA AAA GAA ACG AGC CGT CAT T
10	GGG GGC TGC GAG GGG AAC AAA
	GCC GGG CCG TGC TCA GCA ACT
11	GCG AGC CGC AGC CAT TGC CTT TTA
	CCC AGA TTT CGG CTC CGC CAG AT
Nanog-리포터	TGG GAT CCC TAT GCT ACT CCG TCG AAG TTC
	CTA GGC AAA CTG TGG GGA CCA GGA AGA C
Fbx15-리포터	TGG TCC AAC ATC TTA TAC ACA GTA ATG A
	GTG GAA CTC CCT TCT AGC CCT CTA TCC C
	AAT GGG CTG ACC GCT TCC TCG TGC TT

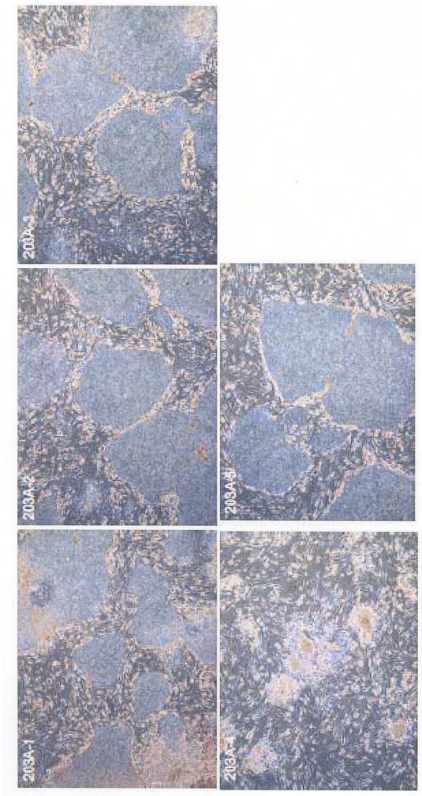
도면15


전기천공
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
캐데
10
사진
19
(pCX-hOCT3/4, pCX-hSK, pCX-hMLN, pCX-SV40LT)

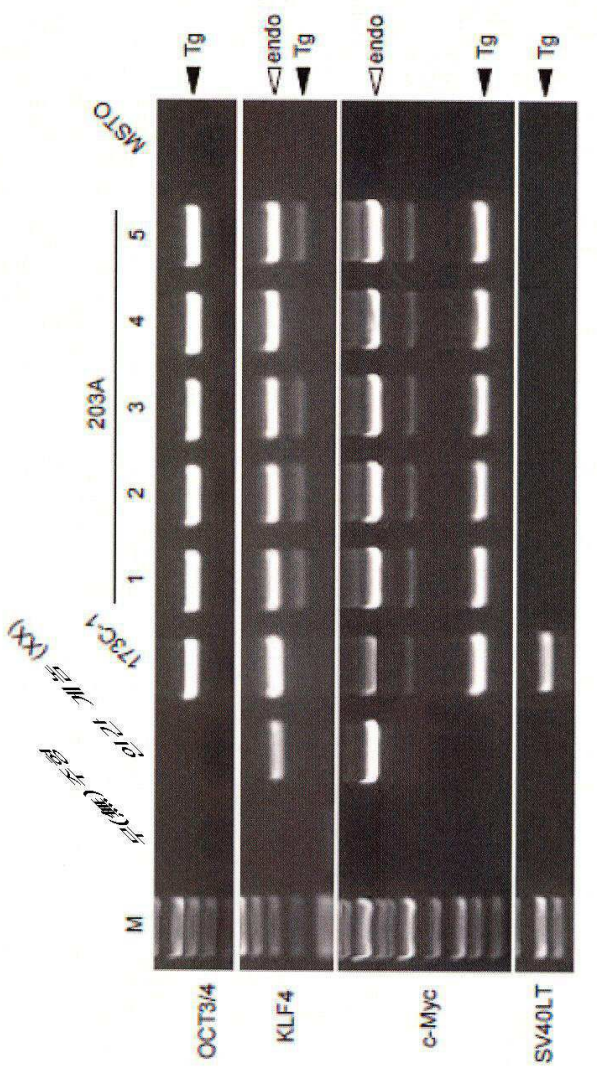
도면16



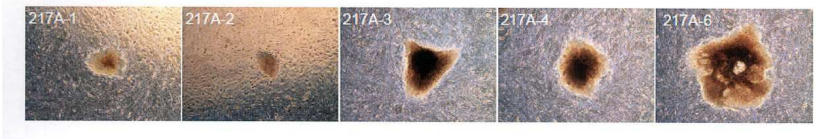
도면17



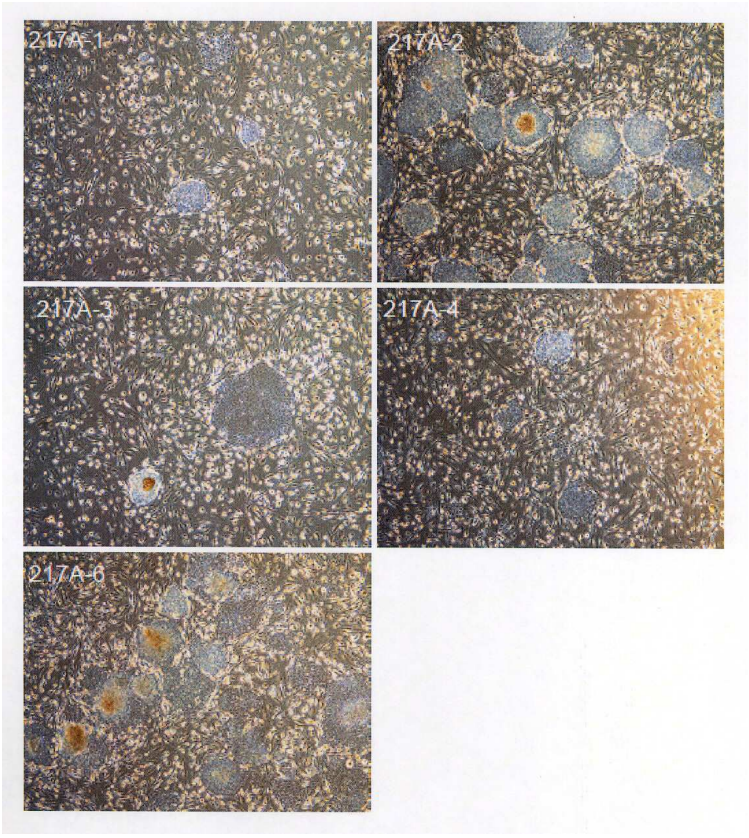
도면18


Tg
endo
Tg
endo
Tg
Tg
MSTO
203A
1
2
3
4
5
173C-1
M
OCT3/4
KLF4
c-Myc
SV40LT

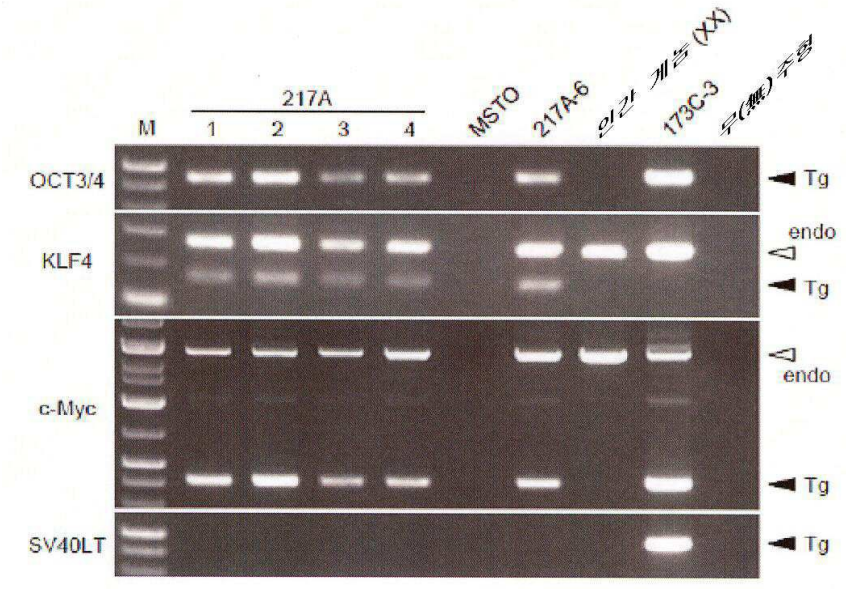
도면19


217A-1
217A-2
217A-3
217A-4
217A-6

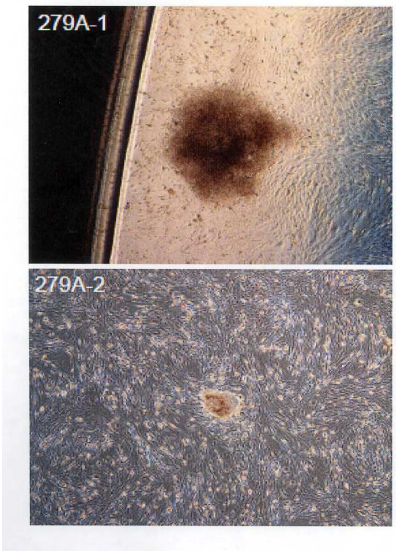
도면20


217A-1
217A-2
217A-3
217A-4
217A-6

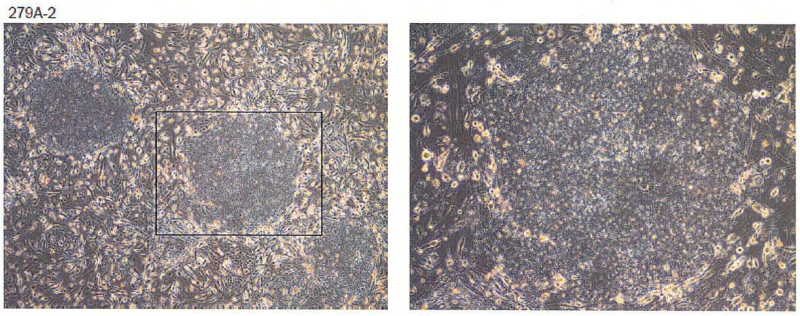
도면21


M
217A
1
2
3
4
MSTO
217A-6
173C-3
OCT3/4
KLF4
c-Myc
SV40LT
Tg
endo
Tg
endo
Tg
Tg

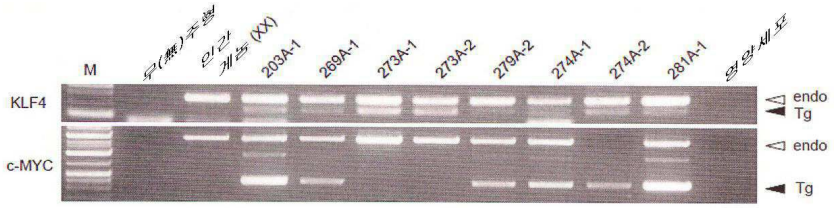
도면22



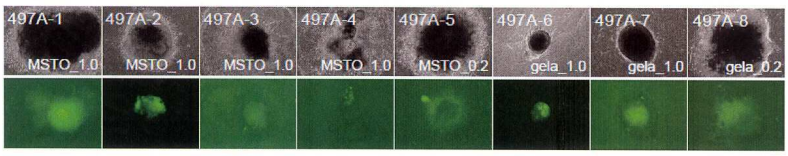
도면23



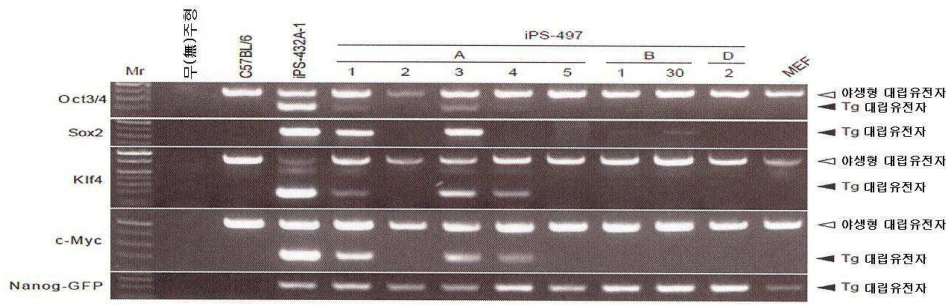
도면24



도면25



도면26



서 열 목 록

<110> Kyoto University

<120> METHOD OF NUCLEAR REPROGRAMMING

<130> 091381

<150> US 61/071,508

<151> 2008-05-02

<150> US 61/136,246

<151> 2008-08-21

<150> US 61/136,615

<151> 2008-09-19

<150> US 61/193,363

<151> 2008-11-21

<160> 62

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for G3PDH

<400> 1

accacagtcc atgccatcac 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for G3PDH

<400> 2

tccaccaccc tgttgctgta 20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Nanog

<400> 3

agggtctgct actgagatgc t 21

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Nanog

<400> 4

caacacctgg tttttctgcc accg 24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Rex1

<400> 5

acgagtggca gtttcttctt ggga 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Rex1

<400> 6

tatgactcac ttccaggggg cact 24

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for ECAT1

<400> 7

tgtggggccc tgaaaggcga gctgagat 28

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for ECAT1

<400> 8

atgggccgcc atacgacgac gctcaact 28

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for ERas

<400> 9

actgcccctc atcagactgc tact 24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for ERas

<400> 10

cactgccttg tactcgggta gctg 24

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Fbx15

<400> 11

gttggaatct gcttctacag 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Fbx15

<400> 12

cttcaccaag atttccgatg 20

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Esg1

<400> 13

gaagtctggt tccttggcag gatg 24

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Esg1

<400> 14

actcgataca ctggcctagc 20

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Oct3/4

<400> 15

ctgagggcca ggcaggagca cgag 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Oct3/4

<400> 16

ctgtagggag ggcttcgggc actt 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Sox2

<400> 17

ggttacctct tcctcccact ccag 24

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Sox2

<400> 18

tcacatgtgc gacaggggca g 21

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Klf4

<400> 19

caccatggac ccgggcgtgg ctgccagaaa 30

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Klf4

<400> 20

ttaggctgtt cttttccggg gccacga 27

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for c-Myc

<400> 21

cagaggagga acgagctgaa gcgc 24

<210> 22

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for c-Myc

<400> 22

ttatgcacca gagtttcgaa gctgttcg 28

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for O-1

<400> 23

cggaattcaa ggagctagaa cagtttgcc 29

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for O-1

<400> 24

ctgaaggttc tcattgttgt cg 22

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for O-2

<400> 25

gatcactcac atcgccaatc 20

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for O-2

<400> 26

ctgggaaagg tgtcctgtag cc 22

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for K

<400> 27

gcgggaaggg agaagacact gcgtc 25

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for K

<400> 28

taggagggcc gggttgttac tgct 24

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for K-S

<400> 29

ccttacacat gaagaggcac ttt 23

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for K-S

<400> 30

cagctccgtc tccatcatgt tat 23

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for M

<400> 31

acactccccc aacaccagga cgttt 25

<210> 32

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for M

<400> 32

gctcgcccaa atcctgtacc tcgtccgat 29

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for M

<400> 33

gagatgagcc cgactccgac ctctt 25

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 1

<400> 34

aggtgcaggc tgcctatc 18

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 1

<400> 35

ttagccagaa gtcagatgct c 21

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 2

<400> 36

tggcgtaatc atggtcatag 20

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 2

<400> 37

gcaacgcaat taatgtgagt tag 23

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 3

<400> 38

ctggatccgc tgcattaatg a 21

<210> 39

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 3

<400> 39

ccgagcgcag cgagtca 17

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 4

<400> 40

gccttatccg gtaactatcg t 21

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 4

<400> 41

gcaccgccta catacctc 18

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 5

<400> 42

agttgcctga ctccccgtcg tg 22

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 5

<400> 43

ggagccggtg agcgtgggtc 20

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 6

<400> 44

ccgatcgttg tcagaagtaa gttg 24

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 6

<400> 45

tcacagaaaa gcatcttacg ga 22

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 7

<400> 46

gaaaagtgcc acctggtcga catt 24

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 7

<400> 47

gggccattta ccgtaagtta tgta 24

<210> 48

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 8

<400> 48

tatcatatgc caagtacgc 19

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 8

<400> 49

tagatgtact gccaagtagg aa 22

<210> 50

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 9

<400> 50

tctgactgac cgcgttact 19

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 9

<400> 51

agaaaagaaa cgagccgtca tt 22

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 10

<400> 52

gggggctgcg aggggaacaa a 21

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 10

<400> 53

gccgggccgt gctcagcaac t 21

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 11

<400> 54

gcgagccgca gccattgcct ttta 24

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for 11

<400> 55

cccagatttc ggctccgcca gat 23

<210> 56

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Nanog-reporter

<400> 56

tgggatccct atgctactcc gtcgaagttc 30

<210> 57

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Nanog-reporter

<400> 57

ctaggcaaac tgtggggacc aggaagac 28

<210> 58

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Fbx15-reporter

<400> 58

tggtccaaca tcttatacac agtaatga 28

<210> 59

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Fbx15-reporter

<400> 59

gtggaactcc cttctagccc tctatccc 28

<210

> 60

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for Fbx15-reporter

<400> 60

aatgggctga ccgcttcctc gtgctt 26

<210> 61

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A sequence

<400> 61

aaaattgtcg ctcctgtcaa acaaactctt aactttgatt tactcaaact ggctggggat 60

gtagaaagca atccaggtcc a 81

<210> 62

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA against p53

<400> 62

gactccagtg gtaatctact gctcgagcag tagattacca ctggagtc 48