

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12N 5/00  
C12N 5/02  
C12N 15/00

(11) 공개번호 10-2005-0096974  
(43) 공개일자 2005년10월06일

(21) 출원번호 10-2005-7014427

(22) 출원일자 2005년08월05일

번역문 제출일자 2005년08월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/003581

(87) 국제공개번호 WO 2004/072251

국제출원일자 2004년02월06일

국제공개일자 2004년08월26일

(30) 우선권주장 60/445,606 2003년02월07일 미국(US)

(71) 출원인 위스콘신 얼럼나이 리서어치 화운데이션  
미국 위스콘신주 53705 매디슨시 월넛 스트리트 614

(72) 발명자 좌카, 토마스 피.  
미국 위스콘신주 53705, 매디슨, 유니버시티 하우스 17  
툼슨, 제임스 에이.  
미국 위스콘신주 53705, 매디슨, 레젠트 스트리트 1807

(74) 대리인 김성기  
김진희

심사청구 : 없음

(54) 인간 줄기 세포의 지시된 유전적 변형

요약

인간 배아 줄기 세포를 전기침공과 상동성 재조합의 조합에 의해 유전적으로 형질전환시킬 수 있다. 이러한 기술은 줄기 세포의 계통에 표적화된 삽입 또는 결실의 생성을 가능케 한다. 이러한 능력은 소정의 특이적 계통의 표적 세포 유형으로 분화되는 자손 세포들 집단의 생성을 가능케 한다.

대표도

도 1

색인어

인간 배아 줄기 세포

명세서

기술분야

## 관련 출원의 상호 참조

본 출원은 2003년 2월 7일 제출된 미국 가특허 출원 제60/445,606호의 우선권을 주장한 것이다.

## 정부 지원 연구 또는 개발에 관한 언급

본 발명은 정부기관: NIH RR15376에 의해 수상된 미국 정부 지원으로 이루어졌다. 미국은 본 발명에 대한 특정 권리를 가진다.

## 배경기술

줄기 세포는 시험관내 배양으로 유지되며, 성체의 여러 상이한 분화된 세포 유형으로 분화될 수 있는 세포이다. 인간 배아 줄기 세포는 원래 인간 배아로부터 기원한 줄기 세포의 분류로, 배양시 무한히 증식할 수 있다. 인간 배아 줄기 세포는 명백한 만능성(pluripotent) 및 분화전능성(totipotent)을 가지는데, 만능성이란 이들이 인체의 여러 세포 유형으로 분화될 수 있음을 의미하며, 분화전능성이란 발생된 인체에 존재하는 모든 세포 유형으로 분화될 수 있음을 의미한다.

만능성 배아 줄기 세포는 인간이 아닌 수많은 다른 동물종에서도 개발되었다. 예컨대, 쥐과 줄기 세포에 대해 여러 과학적 연구가 수행되어 왔다. 특정 종에 대한 줄기 세포 배양을 개시하고 유지하는 기술이 알려지면서, 그 종의 줄기 세포를 사용하여 그 종의 유전학을 연구하는 것이 가능하게 되었다. 현재 줄기 세포를 다양한 방식으로 조작하여 연구되어질 동물 종의 유전학에 관한 유용한 정보들을 수집하는 것이 가능하다. 예컨대, 하나의 또는 다른 특이적 천연 쥐과 유전자를 불활성화 또는 "넉아웃(knock-out)"시킨, 쥐과 줄기 세포의 배양으로 시작된, 기술이 지난 수십년에 걸쳐 개발되어 왔다. 쥐과 줄기 세포가 성체 마우스로 성공적 및 윤리적으로 발생될 수 있기 때문에, 이러한 기술은 넉아웃 마우스의 각각의 개별적인 개체가 직접적인 유전자 조작에 의해 "넉아웃"되거나 결함이 있는 단일 유전자를 가지는, "넉아웃" 마우스 개체를 생성하는 것을 가능케 한다. 이러한 넉아웃 마우스는 특정 조건하에서만 발생할 수 있거나 용이하게 구별될 수 있는 하나 이상의 속성이 비정상적이기 때문에, 이 넉아웃 마우스는 종종 넉아웃된 유전자의 기능을 밝혀준다. 넉아웃 마우스 기술은 일반적으로 포유류 유전자의 기능을 밝히는데 중요한 기여를 하였다.

인간 배아 줄기 세포가 다양한 기술에 의해 형질감염될 수 있다는 것은 앞서 보고되었다. 공개된 PCT 특허 출원 WO 02/061033은 이러한 연구의 일부를 서술하고 있다. 이 공개된 특허 출원에서, 에틸렌이민 중합체를 포함하는, 양이온성 중합체에 기초한 형질감염 방법을 사용하는 경우 가장 풍부한 유전자 발현 활성을 얻을 수 있음이 보고되었다. 이 연구진에 따르면 다른 기술들은 덜 효과적이어서 바람직하지 않음이 밝혀졌다. 이 연구에는 배양시 인간 세포에서 발현되도록 구성된 외인성 유전자 발현 벡터를 사용하였다. 이 공개된 출원에서는 줄기 세포에서 천연 인간 유전자를 발현시키거나 이의 유전학을 변경시키려는 노력은 보고된 바 없다.

## 발명의 상세한 설명

### 본 발명의 개요

본 발명은 배양중 인간 배아 줄기 세포의 게놈 특이적 표적화된 자리에서 지시된 상동성 재조합 현상을 발생시켜, 세포 내에 표적화된 유전적 형질전환을 가지는 인간 줄기 세포를 생성하는 방법을 개발한 것으로 요약된다. 유전적 형질전환은 넉아웃될 수 있으며(특정 유전자의 기능이 파괴됨), 넉인(knock-in)될 수 있다(특정 유전자의 기능이 개선되거나 또는 증가되거나 또는 특정 자극시 일어나도록 함).

또한, 본 발명은 배양중 인간 줄기 세포의 인간 게놈의 표적화된 위치에 유전적 구성체를 삽입하는 융통성 있는 표적화된 방법을 개발한 것으로 요약된다. 이 방법은 구성체의 삽입을 위해 자리 지시된 상동성 재조합 기술을 전기침공(electroporation)과 조합한다.

본 발명은 배양중 인간 줄기 세포의 게놈에 지시된 삽입 또는 파괴를 가능케 하여, 인간 유전자의 기본적인 기능을 조사하는 새로운 강력한 도구를 제공해준다. 이러한 기술은 또한 줄기 세포를 특이적으로 선택된 자손 세포 유형으로 분화시키는데 사용되어, 인간 세포의 기본적인 발생 생물학 연구를 가능하게 할 수 있다.

또한, 본 발명은 인간 배아 줄기 세포로부터 임의의 선택된 계통의 세포를 분리하는 방법에 관한 것이다. 유전자를 이 계통의 특이적 위치로 삽입함으로써, 소정의 계통 또는 분화 상태에 있는 세포의 콜로니를 스트리닝하는 것이 가능하게 되어, 소정의 계통 또는 분화 상태에 있는 세포의 분리가 가능하다.

또한, 본 발명은 일반적으로 소정의 계통의 세포를 분리하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 정의된 계통의 세포를 분리할 수 있기 때문에, 그 계통의 세포의 분자 마커를 특징분석하고, 이 마커를 사용하여 다른 세포와의 혼합된 집단으로부터 그 계통의 세포를 분리하는 것이 가능하다.

본 발명의 다른 목적, 이점 및 특징은 첨부된 도면과 함께 이하 발명의 상세한 설명으로부터 보다 명확할 것이다.

## 본 발명의 상세한 설명

본 발명은 상동성 재조합 현상에 기초한 기술을 통해, 영장류 및 인간 배아 줄기(ES) 세포에서 표적화된 유전적 형질전환을 일으키는 것이 가능하다는 것과 이를 실제로 수행한 최초의 것임을 밝힌다. 인간 ES 세포에서의 표적화된 유전적 형질전환이라는 이러한 수단이 사용가능하게 됨으로써, 계통 또는 분화 특이적 유전적 요소를 세포에 삽입하여, 특이적 소정의 계통 또는 분화 상태에 있는 세포의 분리가 가능해졌다. 즉, 이는 ES 세포에서 유래된 세포들의 혼합된 집단으로부터 정의된 계통 또는 분화 상태에 있는 세포를 분리 또는 독립시키는 일반적인 방법의 개발을 가능케 한다.

### 표적화된 유전자 송달

유전적 구성체를 ES 세포의 계놈에 무작위 송달하는 것과 반대되는, 표적화를 위해서는 상동성 재조합에 의존하여 송달을 표적화하는 것이 요구된다. 인간 ES 세포에서 상동성 재조합 현상을 일으키고 확인하기 위해서는, 상동성 재조합 현상이 일어난 세포를 확인하고 회수하기에 효과적인 형질감염 기술이 요구된다. 상동성 재조합 현상은 이따금 낮은 빈도로 일어날 수 있기 때문에, 많은 수의 세포들이 합당한 효율로 편리하게 형질감염될 수 있도록, 상대적으로 고효율의 형질감염 방법이 요구된다. 쥐과 줄기 세포에서 유전적 형질전환을 일으키는데 사용되는 방법, 즉, 넉아웃 마우스를 생성하는데 사용되는 이러한 기술이 인간 배아 줄기 세포에서 충분히 합당한 효율로 수행됨이 증명되지 않았기 때문에, 새로운 형질감염 기술의 개발이 요구되었다. 쥐과 배아 줄기 세포에 사용되던 전기침공 프로토콜이 인간 배아 줄기 세포에서는 잘 작동되지 않았기 때문에, 인간 배아 줄기 세포에서 고도로 안정적인 형질감염 효율을 얻기는 어려웠다. 명백히 낮은 효율을 가지고 있음에도 불구하고 시도된, 리포좀에 기초한 기술을 이용하여 여러 연구진들은 인간 ES 세포를 형질전환시키고자 시도하였다. 본 명세서에서 서술하고자 하는 것은 상동성 재조합을 변형된 전기침공 기술과 조합하여 사용하는 성공적인 유전자 표적화 방법론에 관한 것으로서, 이러한 조합 사용이 합당한 효율로 인간 배아 세포주의 지시된 유전적 형질전환을 얻는데 효과적임을 증명하였다.

이하 서술할 방법의 2가지 중요한 속성은 전기침공을 사용하여 유전적 구성체를 ES 세포에 도입하고, 상동성 재조합을 사용하여 유전적 구성체를 ES 세포의 계놈상의 소정의 표적 위치에 도입시키는 것이다. 이하 서술할 변형된 전기침공 기술의 사용은 ES 세포를 합당한 효율로 외부 DNA로 형질감염시켜준다. 이 기술은 쥐과 배아 줄기 세포에 사용되는 기술에서 변형된 것으로, 쥐과 기술로 얻을 수 있는 결과보다 인간 및 영장류 ES 세포에서의 결과가 더 뛰어나다. 상동성 재조합과 조합된 전기침공은 인간 ES 세포에서 사용되어, 살아있는 인간 ES 세포에서 지시된 또는 표적화된 유전자 삽입을 얻을 수 있다. 상동성 재조합 현상은 외부 DNA의 삽입 자리를 조절할 수 있어, 천연 유전자의 표적화된 조작을 가능하게 하고 원치않는 유전자의 삽입을 피할 수 있다는 점에서, 무작위 유전자 삽입에 비해 구별되는 이점을 제공해준다.

본 명세서에 서술된 방법이 유용하려면, 유전적 구성체가 상동성 아암(arm)과 송달되는 유전적 삽입체를 포함해야만 한다. 3' 및 5' 상동성 아암과 같은 2개의 상동성 아암이 존재해야만 한다. 이 3' 및 5' 상동성 아암 단편 또는 영역은 유전적 삽입체가 삽입되는 계놈상의 위치의 3' 및 5' 영역 상의 천연 계놈 DNA 서열과 동일한 서열로 구성된다. 이러한 방식으로, 천연 세포 과정에 의해, 3' 및 5' 상동성 아암은 계놈내 표적 자리에서 대응되는 천연 DNA 단편과 재조합되어, 이 계놈에 송달되는 유전적 삽입체를 전달시키고, 3' 및 5' 천연 계놈 단편 사이에 존재하는 천연 DNA를 제거시킨다. 이 과정은 천연 세포 인자를 사용하여 일어나나, 빈도가 낮다.

본 명세서에 서술한 기술에 의해 인간 ES 세포로 형질감염되는 유전적 구성체내의 송달되는 유전적 삽입체는 ES 세포에서 유전자 산물을 발현하도록 의도된 유전적 삽입체이거나, 또는 유전자 산물을 생산하지 않도록 의도된 유전적 삽입체일 수 있다. ES 세포주에서 선택된 천연 유전자가 침묵상태이거나(silenced) 또는 파괴되어진 세포주를 생산해야 하는 경우라면, 이는 "넉아웃" 유전적 구성체를 제조하여 수행될 수 있다. 이 반대로, 송달되는 유전적 삽입체가 필수적으로 DNA가 아니어야만 한다면, 넉아웃 삽입은 간단히 유전자 산물을 암호화하지 않는 DNA 서열인 것이 바람직하다.

유전적 삽입체가 유전자 산물을 생산하도록 의도된 경우, 유전적 삽입체는 ES 세포에서 유전자 산물을 발현할 수 있는 구성이어야 한다. 이 대안법을 때때로 "넉인" 접근법이라고 언급하는데, 유전자 산물을 생산하는 구성된 유전적 삽입체가 세포내에 존재하는 유전적 서열로 치환된 것이다. 유전자 산물은 전형적으로 단백질일 수 있으나, RNA(간섭(interfering) RNA 및 안티센스 RNA 포함)와 같은 다른 유전자 산물의 생산도 포함된다. 유전자 산물을 생산하기 위해, 유전적 삽입체는 전형적으로 프로모터 서열, 유전자 산물의 암호화 서열 및 전사 종결 서열을 포함하는 발현 카세트일 것이며, 이 모두는 ES 세포에서 효율적이고 전체 과정 수행에 적절하도록 선택된다.

본 명세서에 서술한 기술은 배양중 영양류 및 인간 ES 세포로부터 제조된 계승 세포(successor cell) 배양물 또는 집단에서 여러 종류의 표적화된 유전적 형질전환을 얻는데 일반적으로 유용하다. 언급한 바와 같이, 이러한 기술은 "넉아웃" 또는 "넉인" 줄기 세포 배양물을 제조하는 데 사용될 수 있다. 넉아웃 세포에서, 특정 표적화된 천연 유전자의 기능은 이러한 세포의 계승에서 파괴되거나 억제되어, 이 유전자의 결여가 ES 세포와 이의 자손의 생존력, 건강, 발생 또는 분화에 미치는 영향을 연구한다. 이는 대체되는 서열과 동일한 단백질이나 뉴클레오티드를 발현하지 않는 유전적 서열로 상동성 재조합시켜 천연 유전적 서열을 대체함으로써 수행된다. 쥐과 줄기 세포의 넉아웃 줄기 세포 배양물은 마우스에서 여러 유전자의 유전자 기능을 확인하는데 매우 효과적인, 소위 "넉아웃 마우스"로 배양될 수 있다. 넉아웃 ES 세포주는 ES 세포의 미분화된 상태에 책임있는 유전자를 확인하고, 분화 과정을 활성화하는 유전자의 기능을 확인하고 연구하는데 사용될 수 있다. 넉아웃 세포는 약물 시험 연구에도 또한 유용할 수 있다.

또한, 넉인 대안체는 유전자 발현과 분화 과정을 연구하는 강력한 도구로 제공되며, 초기 ES 세포로부터 직접 분화된 세포의 배양물을 생성하는 능력을 제공한다. 이를 위해서는, 유전적 삽입체내의 발현 카세트가 유전적 구성체내에 프로모터 뒤에 위치하는, 스크린가능한 마커 유전자 또는 선별가능한 마커 유전자 암호화 서열의 발현을 이끄는 프로모터를 포함하는 것이 바람직하다. 이 프로모터는 발현 카세트가 형질전환된 ES 세포가 이후 선택된 세포 계통으로 분화되는 경우, 스크린가능한 또는 선별가능한 마커의 발현을 이끄는 조직 특이적 프로모터이다. 예컨대, 프로모터가 심장근육세포(cardiomyocyte) 또는 심장 세포에 특이적인 경우, 프로모터는 심장근육세포로 분화되는, ES 유도된 세포에서만 이와 연관된 유전자 발현을 이끄는 활성이 있을 것이다. 조직 특이적 프로모터에 의해 초래된 유전자가 선별가능한 마커인 경우, 이 유전자를 소정의 분화가 일어난 세포를 선별하는데 사용할 수 있다. 대안적인 전략은 어떠한 종류의 프로모터도 없이 유전자 발현 구성체를 제조하고, 소정의 상태의 계통 또는 분화 상태에 특이적인 세포에서 천연 프로모터 활성에 의해서만 유전적 구성체가 발현되는 자리에서, ES 세포의 계승에 구성체를 삽입한다. 이 프로모터 활성은 세포가 소정의 분화 계통에 있는 경우에만 활성이 있는 프로모터이도록 선택될 것이다. 다시 말해, 스크린가능한 마커 또는 선별가능한 마커 유전자 암호화 서열은 배양물내 다른 세포들로부터 선택된 분화 상태를 가지는 세포를 구별시키는데 유용하다. 스크린가능한 마커 유전자는 살아있는 세포에서 발현이 관찰될 수 있으나, 비형질전환된 세포를 죽이는데 사용될 수는 없는 유전자, 예컨대, 녹색 형광성 단백질(GFP) 또는 루시페라아제일 것이다. 스크린가능한 마커 유전자는 가시적인 세포 선별 기술, 예컨대, 형광성 세포 분류 기술을 통해, 마커를 발현하는 형질전환된 세포를 확인하는데 사용된다. 선별가능한 마커는 선별가능한 마커를 가지지 않은 세포에 치명적인 선별제에 대한 내성, 예컨대, 항생제 내성을 부여하는 유전자일 것이다. 선별가능한 마커는 삽입된 유전자 구성체를 발현하는 세포를 배양물에서 선별하는 선별제와 함께 사용된다.

상동성 재조합을 사용하여 인간 및 영양류 ES 세포의 계승내 특이적 위치로 유전적 구성체의 송달을 표적화하는 능력은 이러한 세포에서 천연 유전자를 억제시키고 외부 유전자를 발현시키는데 유전적으로 유용하다. 예컨대, 본 명세서에 서술된 기술을 사용하여, 넉아웃 ES 세포 집단을 생성하는 기술의 개발은 이의 천연 주된 조직적합성(major histocompatibility, MHC) 유전자가 불활성인 ES 세포주의 생성을 가능케 한다. 필수적으로, 인간 MHC 유전자 기능은 넉아웃될 수 있다. 이와 같은 양식으로 형질전환된 세포는 MHC 시스템을 사용하여 이의 세포 표면에 항원을 표시하지 못할 것이다. MHC 기능이 결여된 EC 세포는 이식된 숙주에서 면역 반응이나 거부를 초래하지 않기 때문에, 이식가능한 세포나 조직을 개발하는 후보 세포주일 수 있다.

전기침공을 사용하기 이전에, 본 발명자는 인간 ES 세포의 형질감염을 매개하는 화학제 사용을 조사했었다. 이러한 노력은 만족스러운 결과를 얻지 못했다. 본 발명자는 또한 전형적인 마우스 ES 세포에 대해 전기침공 프로토콜을 사용하였으나(예컨대, 220 V, 960 μF에서의 전기침공, 인산 완충된 염수(PBS)의 전기침공 매질 사용), 결과는 10<sup>-7</sup> 이하의 안정한 형질감염률이었다. 인간 ES 세포에서 실험한 형질전환 빈도는 너무 낮아서 인간 ES 세포에서 상동성 재조합 현상 연구를 수행할 수 없었다. 인간 ES 세포가 마우스 ES 세포보다 현저하게 크기 때문에, 전기침공 과정의 변수를 다양하게 하고자 하는 시도를 하였다. 또한, 정상적인 현 배양 기술로는 단지 약 1%의 개별적인 인간 ES 세포만이 살아남아 저밀도로 배양되는 경우 콜로니를 형성하게 해주기 때문에, 본 발명자는 인간 ES 세포를 개별적인 세포로서가 아니라 덩어리로 전기침공하여, 결과 세포를 고밀도로 도말하였다. 또한, 본 발명자는 쥐과 세포의 프로토콜에 사용되던, 인산 완충된 염수(PBS)

대신 등장성의 단백질-풍부 매질(표준 ES 세포 배양 매질) 중에서 실온에서 세포를 전기침공하였다. 이러한 프로토콜을 이용한 인간 ES 세포로의 G418-내성 형질감염률은 마우스 ES 세포용 표준 프로토콜을 사용하여 인간 ES 세포에 형질감염했을 때 관찰되는 형질감염률보다 100배(또는 그 이상) 높은 것이었다.

배양물중 세포에 유전적 구성체를 삽입한 후, 이후 동일한 삽입체를 제거하는 것도 가능하다. 예컨대, 본 명세서에 서술한대로 유전적 구성체를 삽입하여 GFP 마커 유전자를 사용하여 ES 세포로부터 분화된 세포 집단을 확인한 경우에는, 일단 분화된 세포 집단이 생성되면, 분화된 세포로 실험이나 과정이 수행되는 경우 GFP간의 상호작용을 피하기 위해, 세포로부터 마커 유전자를 결실시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 표적화된 결실은 이미 잘려지도록 되어있는 ES 세포에 원래 삽입되어 있는 유전적 구성체내 메카니즘을 제공함으로써 가장 용이하게 얻어질 수 있다. 예컨대, Cre/Lox 유전적 요소가 사용될 수 있다. Lox 자리를 ES 세포에 형질감염된 유전적 구성체에 포함시킬 수 있다. 그 후, 분화된 세포로부터 구성체를 제거하고자 하는 경우, Cre 제제를 세포에 첨가하여 삽입체를 세포에서 결실시킬 수 있다. 다른 유사한 시스템을 사용할 수도 있다.

인간 ES 세포에 유전적 구성체의 표적화된 송달을 위해 본 명세서에 서술된 기술은 이전에 가능했던 것보다 직접적으로, 배아 및 미분화 세포의 기본적인 분자 생물학에 기초하여 연구를 수행한 것이다. 이제, 배양중인 인간 배아 줄기 세포에 표적화된 유전자 변화를 도입할 수 있다, 예컨대, 천연 유전자상의 표적화된 유전자 삽입 또는 점 돌연변이를 만들 수 있다. 이러한 기술들은 또한 선택된 계통 또는 분화 상태에 있는 세포의 분리된 집단을 형성할 수 있게 해주며, 이에 대해서는 다음에 서술할 것이다.

### 계통 정체

본 명세서에 서술된 유전적 조작 기술은 영장류 및 인간 ES 세포를 특이적인 소정의 발생 계통으로 분화시키는데 사용될 수 있다. 인간 ES 세포로부터 일반적으로 분화된 세포를 얻기 위해서, 일반적으로 배양중 ES 세포를 강제적으로 분화시키는 것이 필요하지는 않다. 실제로, 영장류 및 인간 ES 세포는, 이들이 서로 현저하게 접촉하는 경우라면, 자발적으로 덩어리로 뭉쳐지기 시작하여 분화 과정이 시작될 것이다. 미분화된 상태로 배양물중 ES 세포를 유지하기 위해서는 분화가 바람직할 때까지 ES 세포 배양물을 미분화된 형태로 유지하기 위해, 분화를 저해하는 활성이 요구된다. 여기에 포함되는 지시된 분화 과정을 위해서는, ES 세포를 형질감염 과정이 수행될 때까지 미분화된 상태로 유지시킨다. 형질감염 이후, 형질감염된 ES 세포를 분화되도록 한다. 분화 과정은 일반적으로 여러 상이한 분화된 세포 유형이나 계통의 분화된 자손 승계 세포로 ES 세포를 발생시키는 것을 포함할 것이다. 유전적 조작 없이도, 분화 과정은 승계 세포의 한 종류 또는 다른 종류의 승계 세포의 발생에 유리하도록 조작될 수 있으나, 이러한 과정은 고도로 조절되지 않는다. 고도로 조절되지 않는다는 것은 배양 조건이 특정 계통이나 유형의 분화된 자손 세포에 바람직하도록 조작되는 경우에 다른 세포 유형도 배양중에 발생될 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 분화 과정이 특정 세포 계통에 바람직하게 된 경우에도, 분화 과정에는 전형적으로 ES 세포가 여러 승계 세포 유형으로 분화되는 것도 포함될 것이다. 분화 이전에 ES 세포에 도입된 유전적 구성체가 스크린가능하거나 선별가능한 마커를 포함하는 경우, 및 유전적 구성체가 소정의 계통이나 분화 상태에 있는 세포에서만 발현되는 경우, 마커 유전자나 선별가능한 유전자의 발현은 흥미있는 분화된 자손 세포를 확인하는데 사용될 수 있다. 하나의 예로서, 녹색 형광성 단백질(GFP)의 마커 유전자가 사용되는 경우, 및 마커 유전자가 소정의 분화된 세포 유형에서 GFP 유전자만의 발현을 활성화시키는 프로모터에 의해 초래되는 경우, 분화 이후 소정의 분화된 세포는 광학 세포 분류 기술(예, 형광성 활성화된 세포 분류(fluorescence activated cell sorting) 또는 FACS)에 의해 확인되어 소정의 분화된 승계 세포 유형의 세포 집단을 형성시킬 수 있다. 따라서, ES 세포의 계통에 유전적 구성체를 자리 지시 삽입할 수 있는 능력은 또한 지시된 양식으로 분화된 세포 집단의 발생을 가능케 한다.

소정의 계통의 세포를 스크리닝하고 검출하는 능력은 소정의 계통의 세포 배양물의 분리를 가능케 한다. 예컨대, GFP 유전자를 스크리닝가능한 마커로 사용하여, GFP 유전자를 소정의 세포 계통에 특이적인 프로모터의 조절하에 ES 세포에 도입하였다. 그 후, ES 세포를 분화시키고, 바람직하게는 그 계통으로의 분화에 유리한 조건하에서 분화시킨다. 그 후, 형광성 세포 분류 장치를 GFP 유전자의 발현에 따른 형광성에 대해 세포를 분류하는데 사용한다. GFP 단백질의 발현에 대해 선별된 세포의 집단은 계통에 대해 분리될 것이다. 분리에 의해 배양물내 세포의 전부가 소정의 계통이 되었음을 의미하는 것은 아니다. 주어진 세포 분류 기술의 효율 및 유전자 발현 수치 및 다른 생물학적 영향을 고려할 때, 분리된 집단내 일부 세포는 소정의 계통이 아닐 수 있다. 그러나, 실제 수치에서, 세포 배양물은 계통에 대해 분리될 것이며, ES 세포에서 유래된 분리된 특이적 계통의 분리된 세포 배양물은 수행 가능하다. 계통이 미분화된 세포일 수 있음을 주의해야 하며, 이러한 기술은 반복적으로 선별된 미분화된 세포를 미분화된 세포를 분리된 집단을 유지시키는데 사용할 수 있다.

실제로, 이하 서술된 실시예 중 하나로, 이 전체적인 유전적 삽입 기술을 미분화된 ES 세포에 대해 활성있는 마커를 생성하는데 사용될 수 있다. 소정의 분화 유형의 세포를 선별하기 위해 마커 시스템을 고려하는 경우, 미분화가 분화의 유형으로 고려될 수 있다. 이하 실시예는 ES 세포의 계통상에 Oct4 유전자 자리에 삽입된 프로모터가 없는 유전적 구성체를 사용

한다. Oct4 유전자는 미분화된 세포에서만 발현되는 전사 인자 패밀리의 구성원이다. 또한, 유전적 구성체는 항생제 내성과 형광성 스크리닝이 유전적 구성체를 포함하는 세포를 확인하는데 사용될 수 있도록, 선별가능한 마커 유전자(네오마이신 내성)를 포함한다. 이하 서술된 방법을 사용하여 얻어진 형질감염 효율은 다른 방법에 의해 얻어진 효율보다 높다. 선형화된 벡터로  $1.5 \times 10^7$ 개의 세포에 대해 수행된 형질감염 방법 결과 103개의 약물 내성 세포 콜로니를 얻었다. 콜로니의 PCR 분석 결과 28개의 콜로니 또는 28%가 소정의 상동성 재조합 현상에 대해 양성이었음이 밝혀졌다. 더 긴 3' 상동성 아암을 가지는 다른 벡터를 사용하면, 이 비는 거의 40%로 증가할 수 있다. 구성적인(constitutive) 프로모터를 사용한 경우의 안정적인 형질감염 비율 테스트 결과 안정한 형질감염된 클론과 상동성 재조합 현상간의 비율이 26:1임을 밝혔다.

서술된 실험적 연구의 다른 부분은 히포산틴 포스포리보실트랜스퍼라아제 유전자 *HPRT*를 표적화하는 것이다. *HPRT* 유전자는 X 염색체 상에 위치하여, 이 유전자를 파괴시키는 단일 상동성 재조합 현상은 XY 세포에서 완전한 기능의 소실을 초래한다. 인간의 경우, 이 유전자의 돌연변이는 신경 질환인, 레시나이현(Lesch-Nyhan) 증후군을 가지는 환자에서 발견된다. *HPRT* 활성화에 결함이 있는 세포는 6-티오구아닌(또한, 2-아미노, 6 머캅토피린으로도 언급)(6-TG)(Sigma cat. No. A4660)에 대한 내성에 기초하여 선별될 수 있으므로, 상동성 재조합 현상의 빈도를 직접 평가할 수 있다. 이러한 성질은 *HPRT* 유전자를 마우스 세포에서 상동성 재조합 기술의 초기 개발에 사용되게 하였다(Doetschman, *Nature* 330, 576-578 (1987)). 본 명세서에 사용된 *HPRT*-표적화된 벡터는 인간 *HPRT* 유전자의 엑손 7의 5'쪽의 쇼트 상동성 아암(1.9 kb) 및 엑손 9의 3'쪽에 롱 상동성 아암(10 kb)을 포함하며, 도 2에 나타낸 바와 같이. 재조합은 이 유전자의 마지막 3개의 엑손의 영역을 결실시킨다. 네오마이신 내성 카세트(NEO)는 2개의 상동성 아암간에 삽입되며, 3' 상동성 아암의 말단에 티미딘-키나아제(TK) 유전자를 첨가하였다.

계통 분화에 특이적인 마커의 다른 예에 대해서는 이하 서술한 실험적 연구에서 밝혀졌다. 티로신 히드록실라아제에 대한 유전자를 도파민활성(dopaminergic neuron) 뉴런에 대한 마커로 사용하였다. 다른 유형의 계통에 대한 다른 마커도 본 발명의 방법에 포함된다.

ES 세포 유래의 분화된 세포의 승계 계통에 초기에 분리된 배양물을 이용하는 것은 다른 유사한 배양물을 제조하기 위해 세포 집단을 유전적으로 스크리닝하는 기술의 개발을 가능케 한다. 본 명세서에 서술한대로 초기에 분리된 배양물은 삽입된 유전적 구성체에 대해 형질전환된 것이며, 형질전환된 것이 아닌 ES 세포 배양물로부터 유래된 자손 세포들과 유사한 분리된 집단을 생성하는 것이 바람직하다. 이는 다음과 같이 수행된다. 특정 계통에 있는 세포들의 초기에 분리된 집단을 생성한 후, 이 배양물의 세포를 그 계통의 세포에 특이적인 여러 세포 마커의 특징을 분석하는 프로파일링 단계를 수행한다. 이는 임의의 여러 방법으로 수행될 수 있으나, 현재 이를 수행하는 가장 효과적인 방법은 cDNA 마이크로어레이(microarray) 유전자 발현 분석 및 유전자 발현의 시리얼 분석(SAGE)에 의한 것이다. 이러한 분석의 결과는 특이적 계통과 관련되는 세포의 특징인 유전자 셋트를 확인시켜 준다. 유전자 셋트에 관한 정보를 가지고, 세포 표면 마커를 발현하는 하나 이상의 유전자(및 바람직하게는 3 또는 4개의 유전자)를 유전자들 중에서 선별할 수 있다. 이러한 세포 표면 마커의 발현은 그 후 계통에 대한 분화 테스트로 사용될 수 있다. ES 세포의 새로운 비-형질전환된 배양물은 소정의 자손 계통에 대해 치우치거나 치우치지 않고 분화될 수 있다. 그 후, 세포 표면 마커는 소정의 계통으로 분화된 세포를 분리하기 위해 세포 혼합물로 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 따라서, 소정의 자손 계통에 있는 세포의 분리된 집단을 생성하는 것은 세포내에 유전적 구성체가 삽입되어 있는지 여부와 관계없이, 본 명세서에 서술된 방법에 의해 유전적으로 가능하다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 이하 실시예에서 사용한 OCT4 유전적 구성체의 유전자 삽입 자리를 나타낸다.

도 2는 *HPRT*-표적화된 유전자 벡터를 천연 유전자에 비교하여 도식적으로 나타낸다.

도 3은 인간 TH 유전자의 유전자 표적화 벡터의 구성을 나타낸다.

도 4는 인간 ES 세포에서 TH 유전자의 삽입을 위한 유전적 구성체의 벡터 조작을 나타낸다.

### 실시예

#### *Oct4* 유전자의 표적화

유전자 표적화 벡터는 IRES-EGFP, IRES-NEO, 및 시미안(simian) 바이러스 폴리아테닐화 서열(약 3.2 킬로베이스(kb))을 인간 Oct4 유전자 *POU1F1*의 5번째 엑손의 3' 비번역 영역에 삽입하여 구성하였다. 이 카세트를 3' 영역의 6.3 kb



상동성 아암과 1.6 kb(대안적인 표적화 벡터에서는 6.5 kb) 상동성 아암에 의해 5' 방향으로 플랭킹하였다(도 1A). 이 카세트를 Oct4 유전자의 위치 31392에 삽입하였다(유전자 어세션 번호 AC006047). 롱 아암은 25054-31392의 서열을 포함한다(유전자 어세션 번호 AC006047). 쇼트 아암은 31392-32970의 서열을 포함한다(유전자 어세션 번호 AC006047). 대안적인 표적화 벡터에서, 쇼트 아암은 더 긴 상동성 영역으로 치환된다(AC006047의 31392-32970 + 유전자 어세션 번호 AC004195의 2387-7337). 으로 치환된다. 동질유전자형의 상동성 DNA는 장거리 게놈 PCR로 얻고, 서브클로닝하였다. 모든 게놈 단편들 및 카세트를 pBluescript SK II의 다중 클로닝 자리에 클로닝하였다. H1.1 인간 배아 줄기(ES) 세포는 20% Gibco 낙아웃 혈청 대체물, 1 mM 글루타민, 0.1 mM b-머캅토에탄올(Sigma), 1% 비필수 아미노산 스톱(Gibco) 및 4 ng/ml 인간 기본 섬유아세포 성장 인자(Invitrogen)가 보충된, 80% 둘베코 변형된 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, 무(無)-피루베이트, 고-글루코즈 제제; Invitrogen)로 구성되는 인간 ES 세포 배지를 사용하여 배양하였다. 전기침공 1주일 이전, 세포를 매트릭셀(matrigel, Becton Dickinson)이 코팅된 10 cm 디쉬에 도말하고, 4 ng/ml 기본 섬유아세포 성장 인자가 보충된, 쥐과 배아 섬유아세포에 적합한 배지로 배양하였다. 전기침공을 위해, 세포를 콜라게나아제 IV(1 mg/ml, Invitrogen)로 7분 동안 37°C에서 처리하여 회수하고, 배지로 세척하고, 0.5 ml의 배양 배지(1.5-3.0 x 10<sup>7</sup> 세포)에 재현탁하였다. 전기침공 직전에, 40 mg의 선형화된 표적화 벡터 DNA가 함유된, 0.3 ml의 인산 완충된 염수(PBS, Invitrogen)를 첨가하였다. 그 후, 세포를 BioRad Gene Pulser II(0.4 cm 간격 큐벳)를 사용하여 실온에서 단일 320 V, 200 µF에 노출하였다. 세포를 10분 동안 실온에서 배양하고, 매트릭셀 상에 고밀도로 도말하였다. G418 선별(50 mg/ml, Invitrogen)은 전기침공 48시간 후에 시작하였다. 1주 후, G418 농도를 2배로 하였다. 3주 후, 생존한 콜로니를 3' 상동성 영역의 바로 하류에 위치한 POU5F1 유전자에 특이적인 프라이머 및 NEO 카세트에 특이적인 프라이머를 사용하여, PCR에 의해 개별적으로 분석하였다. PCR 양성 클론을 BamHI로 분해된 DNA와 표적화 구성체의 바깥 프로브를 사용하여 서던 블롯 분석으로 재스크리닝 하였다.

### 유동 세포계측법(Flow cytometry)

유동 세포계측법 이전에, ES 세포 분화는 매트릭셀상의 비적합화된 배지에서 5일 동안 세포를 배양하여 유도하였다. ES 세포를 트립신/EDTA로 처리하고, PBS로 세척하였다(둘 다 Invitrogen). 죽은 세포는 앞- 및 측면-스캐터 게이팅(forward-and side-scatter gating)으로 분석에서 배제시켰다. 샘플을 FACScan(Becton Dickinson) 유동 세포계측기 및 Cellquest 소프트웨어(Becton Dickinson)를 사용하여 분석하였다. 각 샘플에 대해 최소 50,000번의 이벤트가 요구되었다.

G418 항생제를 사용한 선별과 GFP 발현에 대해 유동 세포계측법을 조합 사용하여, 미분화된 세포를 미분화된 세포와 부분적으로 분화된 세포의 혼합물을 포함하는 배양물로부터 분리하였다. 그 후, 미분화된 세포를 cDNA 마이크로어레이를 사용하여 분석하였다. 미분화된 세포의 상태를 나타내주는 CD124, CD113, FGF-R, c-Kit, 및 BMP4-R을 비롯한, 여러 유전자들의 발현을 확인하였다. 이러한 마커들은 인간 ES 세포와 연관되어 있음이 앞서 확인되지 않았었다.

다음으로, 확인된 마커들의 항체를 생성한다. 이 항체들은 혼합된 세포 집단에서 미분화된 세포를 친화도 분리하는데 사용되어, 미분화된 세포의 분리된 배양물을 유지시켜 준다.

### HPRT 유전자의 표적화

#### HPRT 낙아웃

이전의 실험들은 인간 ES 세포의 경우, 최상의 화학 시약이 약 10<sup>-5</sup>의 안정하고, 약물-선별가능한 형질감염률을 낸다고 제안했었다. 전기침공 기술을 사용하면 마우스 ES 세포의 경우는 더 낮은 효율을 나타내었다. 본 발명자는 2가지의 화학적 형질감염 시약인, ExGen 500™ 및 FuGene-6™을 인간 ES 세포의 HPRT 좌위에서의 상동성 재조합 현상의 매개체로 시험하였다. G418 및 갠사이클로비어-내성 클론을 2가지의 형질전환 시약을 사용하여 얻었으며, 결과 클론 중 어떤 것도 6-TG 내성을 가지지 않았는데, 이는 클론 중 어떤 것도 상동성 재조합이 일어나지 않았음을 의미한다. 이러한 결과는 지질 및 양이온성 시약을 사용한 형질감염이 다른 포유류 세포 유형에서는 비능률적인 상동성 재조합을 초래하고, 물리적인 DNA 도입 수단이 상동성 재조합 현상에 유전적으로 보다 도움이 된다는 관찰과 일치하는 것이다.

유전자-표적화 벡터는 TK 프로모터 조절하에 NEO-내성 카세트에 의해 HPRT 유전자의 마지막 3개의 엑손(엑손 7, 8 및 9)을 치환하여 구성하였다. 이 카세트는 3' 영역의 1.9 kb 상동성 아암과 10 kb 상동성 아암에 의해 5' 방향으로 플랭킹된다(도 2). 동질유전자형 상동성 DNA는 장거리 게놈 PCR로 얻었으며, 서브클로닝하였다. H1.1의 인간 ES 세포주는 표준 hES 세포 배양 방법론을 사용하여 배양하였다. 전기침공 1주 전에, 세포를 매트릭셀™에 도말하고, 섬유아세포에 적합한 배지에서 배양하였다. 클론을 손상되지 않은 덩어리(intact clump)로 제거하기 위해, 인간 ES 세포 배양물을 콜라게나

아제 IV(1 mg/ml, Invitrogen)로 7분 동안 처리하고, 배지로 세척하고, 0.5 ml의 배양 배지( $1.5-3.0 \times 10^7$  세포)에 재현탁하였다. 전기침공 직전에, 40  $\mu$ g의 선형화된 표적화 벡터 DNA가 함유된, 0.3 ml의 인산 완충된 염수(PBS, Invitrogen)를 첨가하였다. 전술한 전기침공 변수들을 사용하여(표준 ES 배지, 덩어리내 ES 세포), 인간 ES 세포를 BioRad Gene Pulser II(0.4 cm 간격 큐벳)를 사용하여 실온에서 단일 320 V, 200  $\mu$ F에 노출하였다. 세포를 10분 동안 실온에서 배양하고, 마트리젤 상에 고밀도로 도말하였다(하나의 10 cm 배양 디쉬). G418 선별(50 mg/ml, Invitrogen)은 전기침공 48시간 후에 시작하였다. 1주 후, G418 농도를 2배로 하고, 6-TG 선별(1 mM, Sigma)을 시작하였다. 3주 후, 생존한 콜로니를 5' 상동성 영역의 바로 상류에 위치한 *HPRT* 유전자에 특이적인 프라이머 및 NEO 카세트에 특이적인 프라이머를 사용하여, PCR에 의해 개별적으로 분석하였다. PCR 양성 클론을 PstI으로 분해된 DNA와 NEO 카세트의 3' 프로브를 사용하여 서던 블롯 분석으로 재스크리닝 하였다(도 2).

이러한 분석의 결과는 선형화된 *HPRT*-표적화된 벡터로  $10^7$ 개의 세포를 형질감염한 후, 350개의 G418-내성 클론을 얻었다는 것이다. 이들 중, 50개는 갠사이클로비어-내성이며, 이들 중 7개는 또한 6-TG 내성인데, 이는 성공적인 상동성 재조합을 제안해준다. 폴리머라제 사슬 반응(PCR) 및 서던 블롯팅은 상동성 재조합이 모든 6-TG 내성 클론에 발생하였음을 확인해준다.

화학 시약 및 전기침공을 사용한 성공적인 형질전환률을 이하 표 1에 요약하였다.

표 1.

양성 및 음성 선별 및 *HPRT* 유전자 좌위에서 표적화된 이벤트에 의해 얻어진 콜로니의 수( $1.5 \times 10^7$ 개의 전기침공된 인간 ES 세포)

선별 과정	ExGen 500	Fugene 500	전기침공
G418	130	261	350
G418 및 갠사이클로비어	35	61	50
G418 및 6-TG	0	0	7

### 도파민활성 뉴런(Dopaminergic neuron)

티로신 히드록실라아제(TH)는 도파민 합성에 있어 속도 제한 효소이며, 도파민활성 뉴런에 사용되는 가장 통상적인 마커 중 하나이다. TH가 중뇌 도파민활성 뉴런에 특이적이지 않기 때문에, FGF8 및 소닉 헤지호그(sonic hedgehog)를 사용하는 현재의 ES 세포 분화 프로토콜은 중뇌 복면부에 고도로 풍부한 TH-양성 뉴런을 생산한다. 그러나, 이러한 과정은 다른 세포 유형과 혼합된 TH-양성 도파민활성 세포를 생산한다. 따라서, 본 발명자는 이 혼합된 세포 집단으로부터 인간 ES 세포에서 유래된 도파민활성 뉴런을 분리하기 위한 마커로서, TH를 사용하기로 결정하였다.

TH 및 EGFP 모두의 발현을 얻기 위해, 본 발명자는 IRES-EGFP 레포터 유전자 카세트를 TH 유전자의 마지막 엑손의 3' UTR 영역에 도입한 유전자-표적화 벡터를 구성하였다. 이하 상세히 나타낸 모든 추가적인 위치는 DNA 서열 L15440(유전자 어세션 번호 307071)의 TH 유전자의 종결 코돈의 위치에 대해 나타낸 것이다. IRES-EGFP 카세트(Clontech) 및 loxP-PGK-NEO 카세트(H. J. Fehling가 제공, University of Uhn, Germany)는 종결 코돈의 5' 영역의 쇼트 상동성 아암(정확히 1227개 염기쌍) 및 종결 코돈의 3' 영역의 롱 상동성 아암(정확히 7955개 염기쌍)으로 플랭킹된다. 첫번째 클로닝 단계에서, 이 2개의 상동성 DNA 아암을 원거리 PCR(Roche Long Distance PCR kit)을 사용하여 증폭하고, pGEM-Teasy 벡터(Promega)에 서브클로닝 하였다. 다음 클로닝 단계에서, 쇼트 아암(pT-TH-SA)을 SalI 및 XhoI의 제한 효소를 사용하여 잘라내고, pTH-AA의 SalI 자리에 클로닝 하였다. 이러한 조작은 도 3에 나타내었다.

다음 클로닝 단계에서, 서브클로닝된 롱 아암을 NotI을 사용하여 pT-TH-LA에서 잘라내고, NotI 자리를 사용하여 pTH-AB에 클로닝 하였다. 롱 아암 다음에는 티미딘 키나아제(TK)를 암호화하는 유전자가 위치하며, 이 유전자는 무작위 통합되어진, 안정한, 형질감염된 클론의 음성 선별을 위한 것이다. 롱 상동성 아암과 IRES-EGFP 카세트 사이에, 본 발명자는 2개의 loxP 자리 사이에 끼워져 있는 PGK-유도 NEO 내성 카세트를 클로닝 하였다. 도 4 및 5는 유전자 표적화 벡터의 중요한 요소들을 나타낸다. 전술한대로 전기침공한 후, 본 발명자는 양성 선별 마커 NEO에 대해 G418로 및 음성 선별 마커 TK에 대해 갠사이클로비어로 각각 이중 선별한 후에, 5개의 상동성 재조합 클론을 얻었으며, PCR과 서던 블롯으로 확인하였다.



본 실험에서의 양성 선별 마커는 PGK 프로모터 하에 있는 NEO 카세트이었다. 이 카세트가 녹인 세포주에는 여전히 존재하기 때문에, 이 카세트는 TH 유전자 자체와 IRES-EGFP 레포터 유전자의 발현 수치를 변화시킬 수 있다. 그러므로, 이러한 선별 카세트를 결실시키는 것이 표준으로 고려된다. 이렇게 하기 위해, 본 발명자는 2개의 TH-EGFP 녹인 세포주를 EF1A 프로모터 하에 조절되는 파아지 레코미니아제 Cre를 함유하는 플라스미드로 일시적으로 형질감염시켰다. Cre의 cDNA를 IRES-EGFP 카세트가 뒤따라 위치한다. 이 플라스미드로의 일시적 형질감염 이후, Cre 과다-발현 세포는 EGFP 발현에 의해 용이하게 확인할 수 있다. 이러한 EGFP-양성 세포를 형광성 활성화된 세포 분류(FACS)로 분리하였다. 개별적인 클론을 2개의 loxP 자리의 성공적인 재조합에 대해 분석하고, NEO 카세트가 삭제된 2개의 클론을 확인하였다.

본 발명자는 인간 ES 세포를 뉴런으로 분화시키기 위해 배아체(embryoid body)를 사용하였다. 배아체 형성 및 뉴런 분화는 과학 문헌 및 특허 문헌에 이미 서술된 방법에 따라 수행하였다. 인간 ES 세포 콜로니는 디스파아제(0.1 mg/ml)에 30분 동안 노출시켜 손상되지 않은 상태로 플라스크에서 해리시켰다. 이 콜로니를 세척하고, bFGF가 결여된 ES 세포 배지에 재현탁하고, 4일 동안 현탁 배양하였다. 배양물에 매일 피딩하고, 부착된 덩어리를 조심스럽게 제거하였다. 결과 배아체를 bFGF(4 ng/ml)의 존재하에, 인슐린(25 mg/ml), 트랜스페린(100 mg/ml), 프로그스테론(20 NM), 푸트레스신(60 mM), 아셀렌산나트륨(30 mM), 및 헤파린(2 mg/ml)이 보충된 DMEMF12가 담긴 새 플라스크에 도말하고, 부착시켰다. 분화된 배아체(Eb)를 8-10일 동안 추가 배양하고, 뉴런 로제트 세포(neural rosette cell)를 주변 평면 세포들로부터 0.1 mg/ml 디스파아제에 노출시켜 분리하였다. 결과 회수된 뉴런 로제트 세포를 FGF2(20 ng/ml), FGF8(100 ng/ml) 및 소닉 헤지호그(400 ng/ml)의 존재하에 추가적으로 배양하여, 중뇌 복면 도파민활성 뉴런 분화를 유도하였다. 본 발명자는 세포를 회수하고, EGFP-양성 세포의 수를 FACS로 결정하고, 세포의 형태를 형광 현미경하에 관찰하였다.

녹인 세포주는 적절한 분화 프로토콜로 분화될 것이며, 각각 세포주에 대한 최대 GFP 발현 시점에서, 세포를 FACS로 GFP 형광성 강도에 기초하여 분류하였다. 분류된 GFP-양성 및 GFP-음성 세포는 특이적 단백질(TH)에 대한 웨스턴 블롯으로 분석될 것이다. 이 집단의 RNA를 유전자 발현 프로파일에 대해 회수하고, 특이적 세포 표면 단백질을 확인할 것이다(cDNA 마이크로어레이 및 SAGE).

**(57) 청구의 범위**

**청구항 1.**

인간 배아 줄기(ES) 세포의 표적화된 변형을 수행하는 방법으로서,

상동성 재조합이 유전적 구성체와 줄기 세포 계능의 선택된 영역간에 일어나도록, ES 세포의 계능 내 한 쌍의 선택된 영역과 상동성을 가지는 말단 영역을 가지고, 외부 유전자를 포함하는, 유전적 구성체의 카피를 얻는 단계;

상기 유전적 구성체의 카피를 배양중 줄기 세포로 전기침공(electroporation)하는 단계; 및

상기 유전적 구성체를 포함하는 세포를 확인하는 단계

를 포함하는 것인 방법.

**청구항 2.**

제1항에 있어서, 유전적 구성체가 마커 유전자를 포함하는 것인 방법.

**청구항 3.**

제2항에 있어서, 유전적 구성체 내 마커 유전자상에 프로모터가 존재하지 않아, 유전적 구성체가 ES 세포의 계능내 위치로 삽입되어, 마커 유전자가 소정의 분화 상태에 있는 세포에서만 발현되는 것인 방법.

**청구항 4.**

제2항에 있어서, 유전적 구성체 내 마커 유전자의 발현을 이끄는 조직 특이적 프로모터가 존재하여, 조직 특이적 프로모터가 소정의 분화 상태에 있는 세포에서만 활성이 있는 것인 방법.

### 청구항 5.

인간 배아 줄기 세포로부터 유래된 배양중 인간 세포로서, 배양중 인간 세포에서 발현되는 유전자의 기능을 녀아웃시키는 삽입된 유전적 구성체를 세포의 게놈에 포함하는 것인 인간 세포.

### 청구항 6.

인간 배아 줄기 세포로부터 유래된 배양중 인간 세포로서, 배양중 인간 세포에 존재하는 천연 유전자에 돌연변이를 도입시키는 삽입된 유전적 구성체를 세포의 게놈에 포함하는 것인 인간 세포.

### 청구항 7.

인간 배아 줄기(ES) 세포의 배양물로부터 정의된 계통의 세포를 분리하는 방법으로서,

상동성 재조합이 유전적 구성체와 줄기 세포 게놈의 선택된 영역간에 일어나도록, ES 세포의 게놈내 한 쌍의 선택된 영역과 상동성을 가지는 말단 영역을 가지는, 유전적 구성체의 카피를 얻는 단계로서, 상기 유전적 구성체는 정의된 계통의 세포에서만 발현되는 마커 유전자를 포함하는 것인 단계;

상기 유전적 구성체의 카피를 배양중 줄기 세포로 전기침공하는 단계; 및

상기 유전적 구성체 내 마커 유전자를 발현하는 세포를 확인하고, 다른 세포들로부터 이 세포를 분리하는 단계를 포함하는 것인 방법.

### 청구항 8.

제7항에 있어서, 마커 유전자가 소정의 계통의 세포에서만 유전자를 발현시키는 활성을 가지는 프로모터를 포함하는 것인 방법.

### 청구항 9.

제7항에 있어서, 전기침공 단계 이후, ES 세포를 분화시키는 것인 방법.

### 청구항 10.

제7항에 있어서, 마커 유전자가 형광성 유전자 산물을 발현하며, 확인 및 분리 단계가 형광성 활성화된 세포 분류 (fluorescence activated cell sorting)에 의해 수행되는 것인 방법.

### 청구항 11.

인간 ES 세포에서 유래되고 소정의 계통의 세포에 대해 제7항의 방법에 의해 분리되어진 분화된 인간 세포의 배양물.

**청구항 12.**

인간 배아 줄기(ES) 세포에서 유래되어진 정의된 계통의 세포를 분리하는 방법으로서,

제6항의 방법에 의해 정의된 계통의 세포를 분리하는 단계;

상기 분리된 세포의 유전자 발현 패턴을 분석하여, 상기 정의된 계통의 특징이 되는 정의된 계통의 세포에서 발현되는 유전자를 확인하는 단계;

비-형질전환된 ES 세포를 배양하여, ES 세포의 분화를 개시시키는 단계; 및

상기 분석 단계에서 확인된 유전자의 발현에 기초하여, 상기 정의된 계통의 세포를 분리하는 단계

를 포함하는 것인 방법.

**청구항 13.**

제12항에 있어서, 상기 정의된 계통이 미분화된 세포이며, 상기 확인된 유전자가 세포 인자 CD124, CD113, FGF-R, c-Kit, 및 BMP-4에 대한 유전자를 포함하고, 상기 분리 단계가 CD124, CD113, FGF-R, c-Kit, 및 BMP-4로 구성되는 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 발현에 대해 세포를 테스트함으로써 수행되는 것인 방법.

**청구항 14.**

인간 배아 줄기 세포에서 유래된 배양중 인간 세포로서, 인간 세포가 소정의 분화 상태에 있는 경우에만 삽입된 유전자가 발현되는 삽입된 유전적 구성체를 세포의 게놈에 포함하는 것인 배양중 인간 세포.

**청구항 15.**

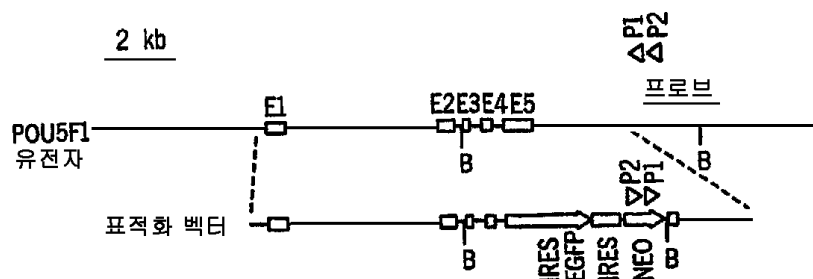
제14항에 있어서, 소정의 분화 상태가 미분화된 상태인 것인 배양중 인간 세포.

**청구항 16.**

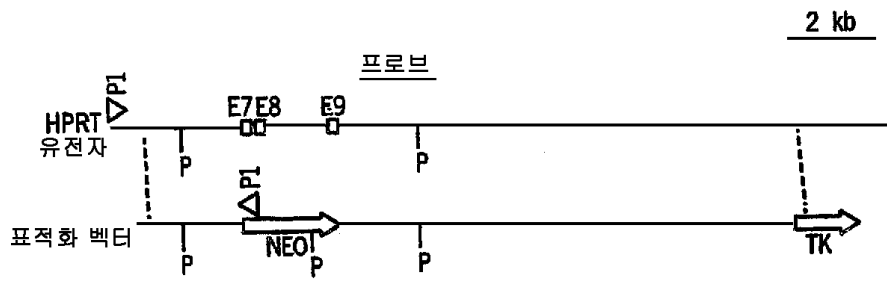
제14항에 있어서, 유전자가 유전자의 발현이 시각적으로 관찰될 수 있는 마커 유전자인 것인 배양중 인간 세포.

**도면**

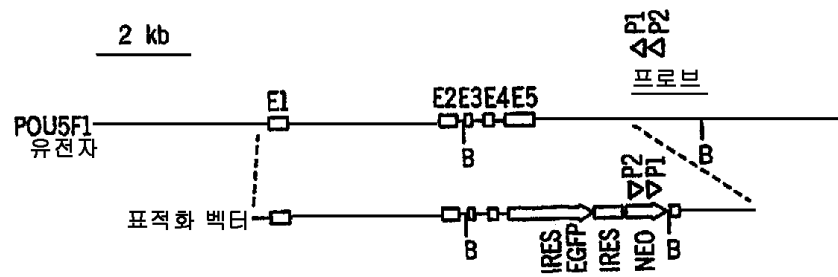
도면1



도면2



도면3



도면4

