

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 3월 16일 (16.03.2023)



WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2023/038436 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/0789 (2010.01)

A01K 67/027 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/013463

(22) 국제출원일:

2022년 9월 7일 (07.09.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0121174 2021년 9월 10일 (10.09.2021) KR

(71) 출원인: 의료법인 성광의료재단 (SUNGKWANG MEDICAL FOUNDATION) [KR/KR]; 06135 서울특별시 강남구 논현로 566, Seoul (KR). 차의과학대학교 산학협력단 (CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 11160 경기도 포천시 해룡로 120, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 강은주 (KANG, Eun Ju); 04595 서울특별시 중구 다산로 32, 8-1606, Seoul (KR). 이연미 (LEE, Yeon-mi); 05270 서울특별시 강동구 구천면로17길 25, 401호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 리엔목특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울특별시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

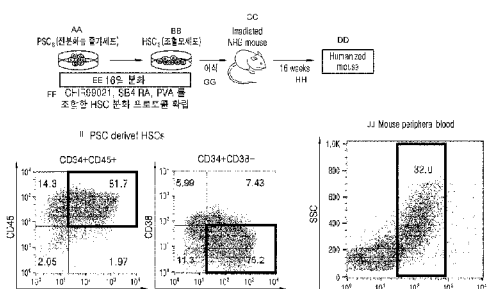
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PREPARING PLURIPOTENT STEM CELL-DERIVED HEMATOPOIETIC STEM CELL AND METHOD FOR CONSTRUCTING HUMANIZED MOUSE MODEL BY USING HEMATOPOIETIC STEM CELL THUS PREPARED

(54) 발명의 명칭: 전분화능 줄기세포 유래 조혈모세포 제조방법 및 상기 제조된 조혈모세포를 이용한 인간화 마우스 모델 제작방법



AA - PSCs (pluripotent stem cells)
BB - HSCs (hematopoietic stem cells)
CC - Implanted NRG mouse
DD - Humanized mouse
EE - Differentiation for 14 days
FF - Establishment of HSC differentiation protocol by combining CHIR99021, ES+RA, and PVA
GG - Implantation
HH - 16 weeks
II - PSC derived HSCs
JJ - Mouse peripheral blood
KK - Human CD34

(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing pluripotent stem cell-derived hematopoietic stem cells and a method for constructing a humanized mouse model by using the prepared hematopoietic stem cells. According to an aspect, the method for preparing hematopoietic stem cells identified an optimal differentiation condition according to a combination of low-molecular-weight compounds and protein growth factors, without gene insertion, and thus can differentiate hematopoietic stem cells from pluripotent stem cells at high yield.

(57) 요약서: 본 발명은 전분화능 줄기세포 유래 조혈모세포 제조방법 및 상기 제조된 조혈모세포를 이용하여 인간화 마우스 모델을 제작하는 방법에 관한 것이다. 일 양상에 따르면 따르면, 상기 조혈모세포 제조방법은 유전자 삽입 없이 저분자 화합물과 단백질 성장인자의 조합에 따른 최적의 분화 조건을 확인하였는 바, 전분화능 줄기세포로부터 조혈모세포를 고효율로 분화시킬 수 있다.

WO 2023/038436 A1

명세서

발명의 명칭: 전분화능 줄기세포 유래 조혈모세포 제조방법 및 상기 제조된 조혈모세포를 이용한 인간화 마우스 모델 제작방법

기술분야

- [1] 본 발명은 전분화능 줄기세포 유래 조혈모세포 제조방법 및 상기 제조된 조혈모세포를 이용하여 인간화 마우스 모델을 제작하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인간을 대상으로 한 질병의 연구는 한계가 있으므로, 인간과 유전적으로 매우 유사하다고 알려진 동물을 이용한 질병 모델이 유용하게 이용되고 있다. 구체적으로, 대상이 되는 질병을 모델 동물에 발병시키고, 다양한 치료제를 적용하여 치료 방법을 탐색한다. 그러나, 동물 질병 모델에서 치료 효과를 갖는 치료제가 인간에게 적용 시에도 동일한 효과를 갖는지 여부는 알 수 없으므로, 동물 질병 모델에서 확인된 치료제를 직접 인간에 적용할 수는 없고 임상 적용까지 여러 단계를 거친다.
- [3] 보다 효과적으로 동물 질병 모델을 이용하기 위해서, 최근에는, 인간의 면역 체계와 유사한 면역 체계를 갖는 인간화된 동물 모델을 구축하기 위한 노력이 활발하게 진행되고 있다. 인간화 동물 모델, 특히 인간화 마우스를 구축하기 위해 면역기능이 결핍된 마우스에 조혈모세포를 이식하는 방법이 이용되었다. 예를 들어, SCID(severe combined immune deficiency) 마우스에 인간의 CD34+ 세포를 이식한 결과 마우스의 모든 조직에서 인간 유래 조혈 모세포가 소량 발현되고 조직적으로 재형성되었다는 것이 확인되었다.
- [4] 조혈모세포는 제대혈에서 유래되며, 주로 골수에서 존재하면서 증식 및 분화를 통해 적혈구, 백혈구, 혈소판 등의 혈액세포를 만들어낼 수 있으며, 줄기세포의 특징인 자가복제능력, 다세포분열능, 다분화잠재능 등을 지니고 있다. 조혈모세포는 안정된 상태에서 하루에 약 4×10^4 개의 혈액세포를 생성할 수 있다. 이러한 조혈모세포는 인간화 동물 모델을 제작하는 데에 사용할 수 있을 뿐만 아니라 급성백혈병, 만성백혈병, 재생불량성 빈혈, 골수이형성 증후군, 다발성 골수종 등의 혈액암 관련 질환, 유방암, 신장암, 난소암 등의 고형암, 불응성 전신성 홍반성 낭창, 불응성 류마티스 관절염 등의 자가 면역 질환 등의 치료에 조혈모세포의 이식 치료가 임상적으로 활성화되어 있다.
- [5] 그러나, 이러한 조혈모세포는 매우 낮은 비율로 존재하기 때문에 분리에 어려운 점이 많으며, 분화 및 증식 조건도 복잡하고 까다롭기 때문에 효과적인 조혈모세포의 분화 및 자가증식 촉진 기술개발이 아직까지 이루어지지 않고 있다.
- [6] 이에, 본 발명자들은 유전자 삽입 없이, 저분자 화합물과 단백질 성장인자의 최적의 조합만으로 전분화능 줄기세포로부터 조혈모세포를 고효율로 분화하여

쉽게 얻어 낼 수 있는 방법을 개발하여 위와 같은 문제점을 해결하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 일 양상은 (A) 전분화능 줄기세포 (pluripotent stem cell, PSC)를 GSK(glycogen synthase kinase) 억제제가 포함된 배지에서 1차 배양하여 중간엽 세포를 얻는 단계; (B) 상기 중간엽 세포를 2차 배양하여 혈관모세포로 유도 또는 분화시키는 단계; (C) 상기 혈관모세포를 3차 배양하여 EHT (Endothelial-to-Hematopoietic Transition) 유도된 혈관모세포를 얻는 단계; 및 (D) 상기 EHT 유도된 혈관모세포를 4차 배양하여 조혈모세포로 유도 또는 분화시키는 단계를 포함하는, 조혈모세포 제조방법을 제공한다.
- [8] 다른 양상은 인간을 제외한 개체에 상기 조혈모세포 제조방법으로 제조된 조혈모세포를 이식 또는 주입하는 단계를 포함하는, 인간화 동물 모델 제작방법을 제공한다.
- [9] 또 다른 양상은 상기 인간화 동물 모델 제작방법으로 제작된, 인간화 동물 모델을 제공한다.

과제 해결 수단

- [10] 일 양상은 (A) 전분화능 줄기세포 (pluripotent stem cell, PSC)를 GSK(glycogen synthase kinase) 억제제가 포함된 배지에서 1차 배양하여 중간엽 세포를 얻는 단계; (B) 상기 중간엽 세포를 2차 배양하여 혈관모세포로 유도 또는 분화시키는 단계; (C) 상기 혈관모세포를 3차 배양하여 EHT (Endothelial-to-Hematopoietic Transition) 유도된 혈관모세포를 얻는 단계; 및 (D) 상기 EHT 유도된 혈관모세포를 4차 배양하여 조혈모세포로 유도 또는 분화시키는 단계를 포함하는, 조혈모세포 제조방법을 제공하는 것이다.
- [11] 본 명세서에서의 용어 "조혈모세포 (Hematopoietic stem cell, HSC)"는 적혈구·백혈구·혈소판을 만드는 미분화된 골수조혈세포의 조상세포를 의미하며, 조혈줄기세포라고도 불린다. 정상인의 골수혈액에는 모든 혈액세포를 만들어낼 수 있는 능력을 지닌 세포 (CD34 양성 세포)가 약 1% 가량 존재하는데 이를 조혈모세포고 한다. 피를 만드는 어머니세포라는 뜻으로 온몸에서 발견되지만 특히 골수에서 대량으로 생산된다. 이 세포로부터 피를 구성하는 세포에 해당하는 적혈구·백혈구·혈소판이 분화되어 만들어진다. 아울러 똑같은 자신을 만들어낼 수 있는 자가복제 기능도 가지고 있으며, 골수의 총 조혈모세포 중 0.05~0.25% 정도를 차지한다. 말초혈액 조혈모세포는 골수에서 유래하며 혈류를 순환하는 조혈모세포로서 자가복제 및 성숙된 세포로 분화하는 성질을 가지고 있다.
- [12] 본 명세서에서의 용어 "전분화능 줄기세포 (pluripotent stem cell, PSC)"는 내배엽, 중배엽, 외배엽을 구성하는 거의 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 줄기세포들을 의미한다. 상기 전분화능 줄기세포는 시험관 내(in vitro) 배양으로

미분화 상태를 유지시킨 상태로 거의 영구적 또는 장기간 세포 증식이 가능하며, 정상적인 염색체형을 나타내고, 적정 조건에서는 3 배엽(외배엽, 중배엽, 및 내배엽)의 모든 세포로 분화가능한 능력을 지니고 있다. 전통적으로는 수정란 유래의 배아조직과 배반포를 통해 얻어지는 배아줄기세포 (embryonic stem cell)가 대표적인 전분화능 줄기세포로 포함된다. 그러나, 배아줄기세포는 공여자와 숙주 사이의 조직적합성 항원의 차이에 따른 면역거부반응 가능성이 있어 이러한 문제를 극복한 유전자 맞춤형 전분화능 줄기세포들이 개발되었다. 그 하나는 체세포와 난자의 핵을 치환한 후 배아에서 얻게 되는 복제배아 줄기세포이고 또 하나는 체세포를 유전자 조작에 의해 거꾸로 역분화 시켜서 배아줄기세포와 거의 동일한 상태의 전분화능 줄기세포로 거꾸로 만든 유도역분화 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)가 있다. 특히, 유도역분화 줄기세포(iPS)는 과거 배아줄기세포나 복제배아줄기세포에서와 같은 생명윤리적 갈등이 없이도, 환자 자신의 체세포로부터 맞춤형 전분화능 줄기세포를 얻을 수 있게 되었다.

- [13] 상기 전분화능 줄기세포는 초기 배아로부터 분리한 배아줄기세포 또는 역분화줄기세포 또는 이의 유사 세포, 및 태아의 원시 생식세포에서 분리한 배아생식세포를 포함하는 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 인간 전분화능 줄기세포일 수 있다.
- [14] 상기 조혈모세포 제조방법은 전분화능 줄기세포 유래 조혈모세포를 제조하는 방법일 수 있으며, 구체적으로 전분화능 줄기세포를 조혈모세포로 유도/분화시키는 방법 또는 전분화능 줄기세포로부터 조혈모세포로의 분화를 증진시키기 위한 방법일 수 있다. 또한, 상기 방법으로 제조된 조혈모세포는 CD34 양성(CD34+) 세포일 수 있으며, 구체적으로 CD34 양성 및 CD45 양성(CD34+ CD45+) 세포일 수 있다.
- [15] 본 명세서에서의 용어 "분화"는 특화되지 않은 세포가 특정 세포로 발달하는 과정을 의미하는 것이며, 특히 줄기세포로부터 특정 세포로 발달하는 과정을 포함한다. 본 발명에서는 분화능을 가지는 세포로서 전분화능 줄기세포를 사용하였고, 상기 전분화능 줄기세포는 중간엽 (중간엽 세포), 혈관모세포를 거쳐 조혈모세포로 분화될 수 있다.
- [16] 상기 방법에 있어서, 상기 (A) 단계는 전분화능 줄기세포를 1차 배양하는 단계로서, 구체적으로 전분화능 줄기세포를 중간엽 (중간엽 세포)로 유도 또는 분화시키는 단계일 수 있다.
- [17] 상기 1차 배양하는 단계는 전분화능 줄기세포를 GSK(glycogen synthase kinase) 억제제를 포함하는 배지에서 배양하는 것일 수 있으며, 상기 배지는 중간엽 분화/유도 배지일 수 있다.
- [18] 본 명세서에서의 용어 "GSK(glycogen synthase kinase) 억제제"는 GSK (glycogen synthase kinase) 신호전달과정에 관여하는 GSK1/2의 업스트림 (upstream) 분자인 GSK1/2를 표적으로 하는 물질들을 의미한다. 상기 GSK 억제제는 CHIR99021,

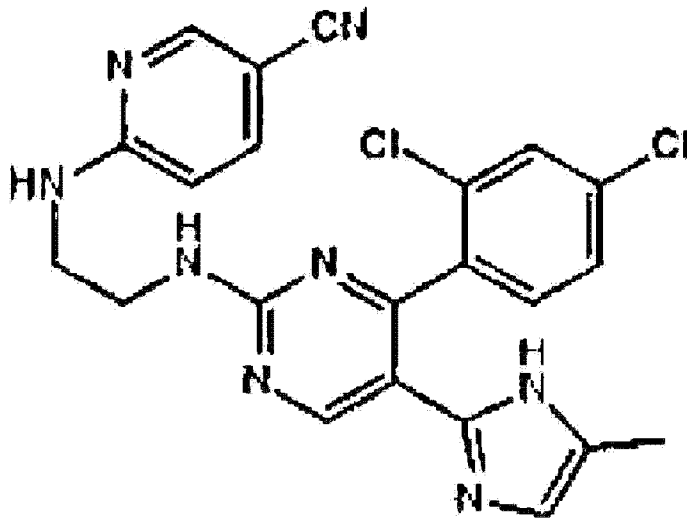
1-azakenpaullone, AZD2858, BIO, ARA014418, Indirubin-3'-monoxime, 5-Iodo-indirubin-3'-monoxime, kenpaullone, SB-415286, SB-216763, Maybridge SEW00923SC, (Z)-5-(2,3-Methylenedioxyphenyl)-imidazolidine-2,4-dione, TWS 119, CHIR98014, SB415286, Tideglusib, LY2090314 및 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 CHIR99021 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 것일 수 있다.

[19] 본 명세서에서의 용어 "CHIR99021

(6-[[2-[[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1H-imidazol-2-yl)-2-pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]-3-pyridinecarbonitrile)"는 GSK(glycogen synthase kinase) 억제제로 GSK 신호전달과정에 관여하는 GSK1/2의 업스트림 분자인 GSK1/2를 표적으로 하는 물질로, 아미노피리미딘(aminopyrimidine)으로 표시될 수 있다. 상기 CHIR99021는 $C_{22}H_{18}Cl_2N_8$ 의 화학식으로 표시되고, 하기의 화학식 1의 구조식으로 표현될 수 있다.

[20] [화학식 1]

[21]



[22] 상기 CHIR99021는 2 내지 8 uM의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 2 내지 8 uM, 2 내지 7.5 uM, 2 내지 7 uM, 2 내지 6.5 uM, 2 내지 6 uM, 2 내지 5.5 uM, 2.5 내지 8 uM, 2.5 내지 7.5 uM, 2.5 내지 7 uM, 2.5 내지 6.5 uM, 2.5 내지 6 uM, 2.5 내지 5.5 uM, 3 내지 8 uM, 3 내지 7.5 uM, 3 내지 7 uM, 3 내지 6.5 uM, 3 내지 6 uM, 3 내지 5.5 uM, 3.5 내지 8 uM, 3.5 내지 7.5 uM, 3.5 내지 7 uM, 3.5 내지 6.5 uM, 3.5 내지 6 uM, 3.5 내지 5.5 uM, 4 내지 8 uM, 4 내지 7.5 uM, 4 내지 7 uM, 4 내지 6.5 uM, 4 내지 6 uM, 4 내지 5.5 uM, 4.5 내지 8 uM, 4.5 내지 7.5 uM, 4.5 내지 7 uM, 4.5 내지 6.5 uM, 4.5 내지 6 uM, 또는 4.5 내지 5.5 uM의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.

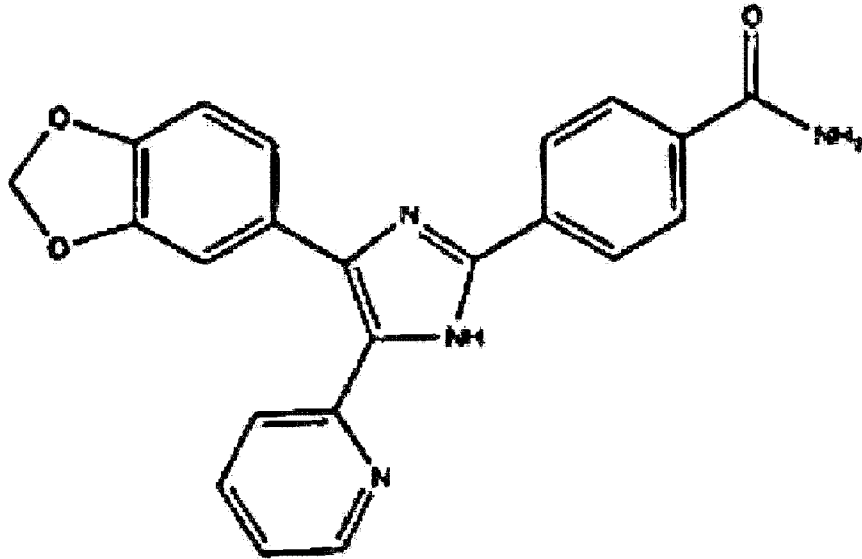
[23] 또한, 상기 1차 배양하는 단계의 배지는 BMP4 및 bFGF를 포함하지 않는 것일 수 있으며, 구체적으로 기본 배양 배지에 GSK 억제제만 단독으로 첨가되는 것일 수 있다.

- [24] 상기 1차 배양하는 단계는 전분화능 줄기세포를 24시간 내지 72시간 동안 배양하는 것일 수 있으며, 구체적으로 24시간 내지 72시간, 24시간 내지 66시간, 24시간 내지 60시간, 24시간 내지 54시간, 30시간 내지 72시간, 30시간 내지 66시간, 30시간 내지 60시간, 30시간 내지 54시간, 36시간 내지 72시간, 36시간 내지 66시간, 36시간 내지 60시간, 36시간 내지 54시간, 42시간 내지 72시간, 42시간 내지 66시간, 42시간 내지 60시간, 또는 42시간 내지 54시간 동안 배양하는 것일 수 있다.
- [25] 상기 방법에 있어서, 상기 (B) 단계는 상기 1차 배양된 세포를 2차 배양하는 단계로서, 구체적으로 전분화능 줄기세포로부터 분화된 중간엽 (중간엽 세포)를 혈관모세포로 유도 또는 분화시키는 단계일 수 있다.
- [26] 본 명세서에서의 용어 "혈관모세포(Hemangioblast)"는 조혈모세포 또는 내피세포로 분화할 수 있는 다능성 전구체 세포이다. 마우스 배아에서 배아 7일째에 난황낭에 혈액 섬이 출현하면 조혈이 시작되는 데, 상기 혈액 섬유로부터 조혈 세포와 혈관 구조가 형성된다. 혈관모세포는 혈액 섬을 형성하는 전구세포이다.
- [27] 상기 2차 배양하는 단계는 1차 배양된 세포 또는 전분화능 줄기세포로부터 분화된 중간엽 (중간엽 세포)를 BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF (Vascular endothelial growth factor) 및 bFGF (basic fibroblast growth factor)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 배지에서 배양하는 것일 수 있으며, 구체적으로 BMP4, VEGF 및 bFGF를 포함하는 배지에서 배양하는 것일 수 있다. 상기 배지는 혈관모세포 분화/유도 배지일 수 있다.
- [28] 상기 BMP4는 20 내지 80 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로, 20 내지 80 ng/ml, 20 내지 75 ng/ml, 20 내지 70 ng/ml, 20 내지 65 ng/ml, 20 내지 60 ng/ml, 20 내지 55 ng/ml, 25 내지 80 ng/ml, 25 내지 75 ng/ml, 25 내지 70 ng/ml, 25 내지 65 ng/ml, 25 내지 60 ng/ml, 25 내지 55 ng/ml, 30 내지 80 ng/ml, 30 내지 75 ng/ml, 30 내지 70 ng/ml, 30 내지 65 ng/ml, 30 내지 60 ng/ml, 30 내지 55 ng/ml, 35 내지 80 ng/ml, 35 내지 75 ng/ml, 35 내지 70 ng/ml, 35 내지 65 ng/ml, 35 내지 60 ng/ml, 35 내지 55 ng/ml, 40 내지 80 ng/ml, 40 내지 75 ng/ml, 40 내지 70 ng/ml, 40 내지 65 ng/ml, 40 내지 60 ng/ml, 40 내지 55 ng/ml, 45 내지 80 ng/ml, 45 내지 75 ng/ml, 45 내지 70 ng/ml, 45 내지 65 ng/ml, 45 내지 60 ng/ml 또는 45 내지 55 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.
- [29] 상기 bFGF는 80 내지 120 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로, 80 내지 120 ng/ml, 80 내지 115 ng/ml, 80 내지 110 ng/ml, 80 내지 105 ng/ml, 85 내지 120 ng/ml, 85 내지 115 ng/ml, 85 내지 110 ng/ml, 85 내지 105 ng/ml, 90 내지 120 ng/ml, 90 내지 115 ng/ml, 90 내지 110 ng/ml, 90 내지 105 ng/ml, 95 내지 120 ng/ml, 95 내지 115 ng/ml, 95 내지 110 ng/ml 또는 95 내지 105 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.
- [30] 상기 VEGF는 20 내지 80 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며,

구체적으로, 20 내지 80 ng/ml, 20 내지 75 ng/ml, 20 내지 70 ng/ml, 20 내지 65 ng/ml, 20 내지 60 ng/ml, 20 내지 55 ng/ml, 25 내지 80 ng/ml, 25 내지 75 ng/ml, 25 내지 70 ng/ml, 25 내지 65 ng/ml, 25 내지 60 ng/ml, 25 내지 55 ng/ml, 30 내지 80 ng/ml, 30 내지 75 ng/ml, 30 내지 70 ng/ml, 30 내지 65 ng/ml, 30 내지 60 ng/ml, 30 내지 55 ng/ml, 35 내지 80 ng/ml, 35 내지 75 ng/ml, 35 내지 70 ng/ml, 35 내지 65 ng/ml, 35 내지 60 ng/ml, 35 내지 55 ng/ml, 40 내지 80 ng/ml, 40 내지 75 ng/ml, 40 내지 70 ng/ml, 40 내지 65 ng/ml, 40 내지 60 ng/ml, 40 내지 55 ng/ml, 45 내지 80 ng/ml, 45 내지 75 ng/ml, 45 내지 70 ng/ml, 45 내지 65 ng/ml, 45 내지 60 ng/ml 또는 45 내지 55 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.

- [31] 상기 2차 배양하는 단계는 24시간 내지 72시간 동안 배양하는 것일 수 있으며, 구체적으로 24시간 내지 72시간, 24시간 내지 66시간, 24시간 내지 60시간, 24시간 내지 54시간, 30시간 내지 72시간, 30시간 내지 66시간, 30시간 내지 60시간, 30시간 내지 54시간, 36시간 내지 72시간, 36시간 내지 66시간, 36시간 내지 60시간, 36시간 내지 54시간, 42시간 내지 72시간, 42시간 내지 66시간, 42시간 내지 60시간, 또는 42시간 내지 54시간 동안 배양하는 것일 수 있다.
- [32] 상기 방법에 있어서, 상기 (C) 단계는 상기 2차 배양된 세포를 3차 배양하는 단계로서, 구체적으로 중간엽 (중간엽 세포)으로부터 분화된 혈관모세포에 EHT (Endothelial-to-Hematopoietic Transition)를 유도시켜 EHT 유도된 혈관모세포를 얻는 단계일 수 있다.
- [33] 본 명세서에서의 용어 "EHT (Endothelial-to-Hematopoietic Transition)"는 내피 특성에서 조혈 특성으로 전이되는 과정으로서, 구체적으로 내피 형질을 나타내는 세포로부터의 조혈 능숙도의 증가를 유도하는 것을 의미한다.
- [34] 상기 3차 배양하는 단계는 2차 배양된 세포 또는 중간엽으로부터 분화된 혈관모세포를 TGF-beta 억제제를 포함하는 배지에서 배양하는 것일 수 있으며, 상기 배지는 EHT 유도 배지일 수 있다.
- [35] 본 명세서에서의 용어 "TGF-beta 억제제"는 TGF-beta와 TGF-beta 수용체 (TGF-betaR) 사이의 상호작용을 억제함으로써 TGF-beta 경로를 억제하는 분자를 의미한다. 상기 TGF-beta 억제제는 SB-431542 (SB4), 갈루니세르티브 (galunisertib), LY2109761, SB525334, SP505124, GW788388, LY364947, RepSox, SD-208, 박토세르티브 (vactosertib), LY3200882, PF-06952229 및 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 SB-431542 (SB4) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 것일 수 있다.
- [36] 본 명세서에서의 용어 "SB-431542 (SB4)"는 TGF-beta 억제제로 알려져 있으며, $C_{22}H_{16}N_4O_3$ 의 화학식으로 표시되고, 하기 화학식 2의 구조식으로 표현될 수 있다.
- [37] [화학식 2]

[38]



- [39] 상기 SB-431542는 7 내지 13 μM 의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 7 내지 13 μM , 7 내지 12.5 μM , 7 내지 12 μM , 7 내지 11.5 μM , 7 내지 11 μM , 7 내지 10.5 μM , 7.5 내지 13 μM , 7.5 내지 12.5 μM , 7.5 내지 12 μM , 7.5 내지 11.5 μM , 7.5 내지 11 μM , 7.5 내지 10.5 μM , 8 내지 13 μM , 8 내지 12.5 μM , 8 내지 12 μM , 8 내지 11.5 μM , 8 내지 11 μM , 8 내지 10.5 μM , 8.5 내지 13 μM , 8.5 내지 12.5 μM , 8.5 내지 12 μM , 8.5 내지 11.5 μM , 8.5 내지 11 μM , 8.5 내지 10.5 μM , 9 내지 13 μM , 9 내지 12.5 μM , 9 내지 12 μM , 9 내지 11.5 μM , 9 내지 11 μM , 9 내지 10.5 μM , 9.5 내지 13 μM , 9.5 내지 12.5 μM , 9.5 내지 12 μM , 9.5 내지 11.5 μM , 9.5 내지 11 μM 또는 9.5 내지 10.5 μM 의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.
- [40] 상기 3차 배양하는 단계의 배지는 레티노산(Retinoic acid, RA) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [41] 상기 레티노산은 0.5 내지 1.5 μM 의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 0.5 내지 1.5 μM , 0.5 내지 1.3 μM , 0.5 내지 1.1 μM , 0.7 내지 1.5 μM , 0.7 내지 1.3 μM , 0.7 내지 1.1 μM , 0.9 내지 1.5 μM , 0.9 내지 1.3 μM 또는 0.9 내지 1.1 μM 의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.
- [42] 상기 3차 배양하는 단계의 배지는 VEGF 및 bFGF으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 VEGF 및 bFGF를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [43] 상기 VEGF 및 bFGF는 각각 20 내지 80 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로, 20 내지 80 ng/ml, 20 내지 75 ng/ml, 20 내지 70 ng/ml, 20 내지 65 ng/ml, 20 내지 60 ng/ml, 20 내지 55 ng/ml, 25 내지 80 ng/ml, 25 내지 75 ng/ml, 25 내지 70 ng/ml, 25 내지 65 ng/ml, 25 내지 60 ng/ml, 25 내지 55 ng/ml, 30 내지 80 ng/ml, 30 내지 75 ng/ml, 30 내지 70 ng/ml, 30 내지 65 ng/ml, 30 내지 60 ng/ml, 30 내지 55 ng/ml, 35 내지 80 ng/ml, 35 내지 75 ng/ml, 35 내지 70 ng/ml, 35 내지 65 ng/ml, 35 내지 60 ng/ml, 35 내지 55 ng/ml, 40 내지 80 ng/ml, 40 내지 75

- ng/ml, 40 내지 70 ng/ml, 40 내지 65 ng/ml, 40 내지 60 ng/ml, 40 내지 55 ng/ml, 45 내지 80 ng/ml, 45 내지 75 ng/ml, 45 내지 70 ng/ml, 45 내지 65 ng/ml, 45 내지 60 ng/ml 또는 45 내지 55 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.
- [44] 상기 3차 배양하는 단계는 12시간 내지 44시간 동안 배양하는 것일 수 있으며, 구체적으로 12시간 내지 44시간, 12시간 내지 40시간, 12시간 내지 36시간, 12시간 내지 32시간, 12시간 내지 28시간, 16시간 내지 44시간, 16시간 내지 40시간, 16시간 내지 36시간, 16시간 내지 32시간, 16시간 내지 28시간, 20시간 내지 44시간, 20시간 내지 40시간, 20시간 내지 36시간, 20시간 내지 32시간 또는 20시간 내지 28시간동안 배양하는 것일 수 있다.
- [45] 상기 방법에 있어서, 상기 (D) 단계는 상기 3차 배양된 세포를 4차 배양하는 단계로서, 혈관모세포 구체적으로는 EHT 유도된 혈관모세포를 조혈모세포로 분화/유도시키는 단계일 수 있다. 상기 분화된 조혈모세포는 CD34+ 조혈모세포일 수 있다.
- [46] 상기 4차 배양하는 단계는 3차 배양된 세포 또는 EHT 유도된 혈관모세포를 PVA (polyvinyl alcohol) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 배지에서 배양하는 것일 수 있다. 상기 배지는 조혈모세포 분화/유도 배지일 수 있다.
- [47] 상기 PVA는 0.01% 내지 0.5% (w/v)의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 0.01 내지 0.5% (w/v), 0.01 내지 0.4% (w/v), 0.01 내지 0.3% (w/v), 0.01 내지 0.2% (w/v), 0.01 내지 0.15% (w/v), 0.03 내지 0.5% (w/v), 0.03 내지 0.4% (w/v), 0.03 내지 0.3% (w/v), 0.03 내지 0.2% (w/v), 0.03 내지 0.15% (w/v), 0.05 내지 0.5% (w/v), 0.05 내지 0.4% (w/v), 0.05 내지 0.3% (w/v), 0.05 내지 0.2% (w/v), 0.05 내지 0.15% (w/v), 0.07 내지 0.5% (w/v), 0.07 내지 0.4% (w/v), 0.07 내지 0.3% (w/v), 0.07 내지 0.2% (w/v), 0.07 내지 0.15% (w/v), 0.09 내지 0.5% (w/v), 0.09 내지 0.4% (w/v), 0.09 내지 0.3% (w/v), 0.09 내지 0.2% (w/v) 또는 0.09 내지 0.15% (w/v)의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.
- [48] 상기 4차 배양하는 단계의 배지는 SCF (Stem cell factor) 및 bFGF으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 SCF 및 bFGF를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [49] 상기 SCF는 20 내지 80 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로, 20 내지 80 ng/ml, 20 내지 75 ng/ml, 20 내지 70 ng/ml, 20 내지 65 ng/ml, 20 내지 60 ng/ml, 20 내지 55 ng/ml, 25 내지 80 ng/ml, 25 내지 75 ng/ml, 25 내지 70 ng/ml, 25 내지 65 ng/ml, 25 내지 60 ng/ml, 25 내지 55 ng/ml, 30 내지 80 ng/ml, 30 내지 75 ng/ml, 30 내지 70 ng/ml, 30 내지 65 ng/ml, 30 내지 60 ng/ml, 30 내지 55 ng/ml, 35 내지 80 ng/ml, 35 내지 75 ng/ml, 35 내지 70 ng/ml, 35 내지 65 ng/ml, 35 내지 60 ng/ml, 35 내지 55 ng/ml, 40 내지 80 ng/ml, 40 내지 75 ng/ml, 40 내지 70 ng/ml, 40 내지 65 ng/ml, 40 내지 60 ng/ml, 40 내지 55 ng/ml, 45 내지 80 ng/ml, 45 내지 75 ng/ml, 45 내지 70 ng/ml, 45 내지 65 ng/ml, 45 내지 60 ng/ml 또는

45 내지 55 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.

- [50] 상기 bFGF는 7 내지 13 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 7 내지 13 ng/ml, 7 내지 12.5 ng/ml, 7 내지 12 ng/ml, 7 내지 11.5 ng/ml, 7 내지 11 ng/ml, 7 내지 10.5 ng/ml, 7.5 내지 13 ng/ml, 7.5 내지 12.5 ng/ml, 7.5 내지 12 ng/ml, 7.5 내지 11.5 ng/ml, 7.5 내지 11 ng/ml, 7.5 내지 10.5 ng/ml, 8 내지 13 ng/ml, 8 내지 12.5 ng/ml, 8 내지 12 ng/ml, 8 내지 11.5 ng/ml, 8 내지 11 ng/ml, 8 내지 10.5 ng/ml, 8.5 내지 13 ng/ml, 8.5 내지 12.5 ng/ml, 8.5 내지 12 ng/ml, 8.5 내지 11.5 ng/ml, 8.5 내지 11 ng/ml, 8.5 내지 10.5 ng/ml, 9 내지 13 ng/ml, 9 내지 12.5 ng/ml, 9 내지 12 ng/ml, 9 내지 11.5 ng/ml, 9 내지 11 ng/ml, 9 내지 10.5 ng/ml, 9.5 내지 13 ng/ml, 9.5 내지 12.5 ng/ml, 9.5 내지 12 ng/ml, 9.5 내지 11.5 ng/ml, 9.5 내지 11 ng/ml 또는 9.5 내지 10.5 ng/ml의 농도로 배지에 포함되는 것일 수 있다.
- [51] 상기 4차 배양하는 단계의 배지는 VEGF, IL-3 및 IL-6으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하지 않는 것일 수 있으며, 구체적으로 VEGF, IL-3 및 IL-6을 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [52] 상기 4차 배양하는 단계는 168시간 내지 360시간 동안 배양하는 것일 수 있으며, 구체적으로 168시간 내지 360시간, 168시간 내지 348시간, 168시간 내지 336시간, 168시간 내지 324시간, 168시간 내지 312시간, 168시간 내지 300시간, 168시간 내지 288시간, 192시간 내지 360시간, 192시간 내지 348시간, 192시간 내지 336시간, 192시간 내지 324시간, 192시간 내지 312시간, 192시간 내지 300시간, 192시간 내지 288시간, 216시간 내지 360시간, 216시간 내지 348시간, 216시간 내지 336시간, 216시간 내지 324시간, 216시간 내지 312시간, 216시간 내지 300시간, 216시간 내지 288시간, 240시간 내지 360시간, 240시간 내지 348시간, 240시간 내지 336시간, 240시간 내지 324시간, 240시간 내지 312시간, 240시간 내지 300시간, 또는 240시간 내지 288시간 동안 배양하는 것일 수 있다.
- [53] 상기 조혈모세포 제조방법은 전분화능 줄기세포로부터 분화된 조혈모세포를 유지하기 위해 배양하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [54] 상기 조혈모세포를 유지하기 위해 배양하는 단계는 분화된 조혈모세포의 생물학적/생리학적 특징을 유지하도록 하는 것으로서, 구체적으로 분화된 조혈모세포의 노화 및 분화를 억제하여 CD34⁺ 포텐셜을 유지하기 위한 것일 수 있다.
- [55] 상기 유지하기 위한 배양은 상기 4차 배양하는 단계의 배지를 이용하는 것일 수 있으며, 1일 내지 20일 동안 배양할 수 있다.
- [56] 상기 방법은 상기 4차 배양된 세포, 구체적으로 전분화능 줄기세포로부터 분화된 조혈모세포를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [57] 상기 조혈모세포 제조방법에서 사용되는 기본 배지로는 당업계에서 줄기세포 배양 및 분화에 적합하다고 알려진 통상적인 배지를 사용할 수 있는데, 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10,

F-12, α -MEM(α -Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Stempro 34-SFM 및 Stempro 34 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[58] 상기 기본 배지에는 첨가제가 보충될 수 있다. 일반적으로, 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β -메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다. 또한, 상기 배지는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 겐타마이신(gentamicin) 또는 이들의 2 이상의 혼합물 등의 항생제를 포함할 수 있다.

[59] 상기 조혈모세포 제조방법은 전분화능 줄기세포를 조혈모세포로 분화시키는 것으로서, 1) 전분화능 줄기세포를 4 내지 6 μ M CHIR99021을 포함하는 배지에서 약 2일간 배양하여 중간엽 (중간엽 세포/중간엽 줄기세포)으로 분화/유도시키는 단계; 2) 분화된 중간엽을 40 내지 60 ng/ml BMP4, 90 내지 100 ng/ml bFGF 및 40 내지 60 ng/ml VEGF를 포함하는 배지에서 약 2일간 배양하여 혈관모세포로 분화/유도시키는 단계; 3) 혈관모세포를 40 내지 60 ng/ml bFGF, 40 내지 60 ng/ml VEGF, 9 내지 11 μ M SB-431542 및 0.8 내지 1.2 μ M 레티노산을 포함하는 배지에서 약 1일간 배양하여 EHT를 유도하는 단계; 및 4) EHT 유도된 혈관모세포를 0.05% 내지 0.15% PVA, 40 내지 60 ng/ml SCF 및 9 내지 11 ng/ml bFGF를 포함하는 배지에서 약 11일간 배양하여 조혈모세포로 분화/유도시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 기본 배양 배지로서 200 μ g/ml 인간 트랜스페린(human Transferrin), 2 mM L-글루타민(L-glutamine), 0.5 mM L-아스코르브산(L-Ascorbic acid), 0.45 mM MTG (1-thioglycerol) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)가 포함된 Stempro 34-SFM (+ stempro supplement) 배지를 사용하는 것일 수 있다.

[60]

[61] 다른 양상은 인간을 제외한 개체에 상기 조혈모세포 제조방법으로 제조된 조혈모세포를 이식 또는 주입하는 단계를 포함하는, 인간화 동물 모델 제작방법을 제공한다. 상기 전술한 내용과 중복되는 내용은 상기 방법에도 공히 적용된다.

[62] 상기 인간화 동물 모델은 영장류, 마우스, 햄스터, 기니피그, 래트, 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으며, 구체적으로 마우스일 수 있다.

[63] 상기 조혈모세포를 이식 또는 주입하는 단계는 상기 방법으로 제조된 전분화능 줄기세포 유래 조혈모세포를 마우스의 꼬리 정맥에 주입하는 것일 수 있으며,

구체적으로 $1-2 \times 10^5$ 개 세포를 주입하는 것일 수 있다.

- [64] 상기 인간을 제외한 개체는 T 세포, B 세포, NK 세포 등의 기능이 완전히 결여되어 면역 결핍이 유도된 개체일 수 있으며, 구체적으로 방사능 처리된 NSG(NOD scid gamma) 마우스일 수 있다.

[65]

- [66] 또 다른 양상은 상기 인간화 동물 모델 제작방법으로 제작된 인간화 동물 모델을 제공한다. 상기 기술한 내용과 중복되는 내용은 상기 동물 모델에도 공히 적용된다.

- [67] 상기 인간화 동물 모델은 영장류, 마우스, 햄스터, 기니피그, 래트, 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으며, 구체적으로 마우스일 수 있다.

발명의 효과

- [68] 일 양상에 따르면, 상기 방법은 유전자 삽입 없이 저분자 화합물과 단백질 성장인자의 조합에 따른 최적의 분화 조건을 확인하였는 바, 전분화능 줄기세포로부터 조혈모세포를 고효율로 분화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [69] 도 1은 본 발명의 신규한 전분화능 줄기세포 유래 조혈모세포 분화 프로토콜을 개략적으로 나타낸 도면이다.
- [70] 도 2는 본 발명의 전분화능 줄기세포 유래 조혈모세포 분화 프로토콜을 구체적으로 기재한 도면이다.
- [71] 도 3은 조혈모세포 유도 단계의 1차 조건을 확립하기 위한 비교실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [72] 도 4는 중간엽 유도 단계의 조건을 확립하기 위한 비교실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [73] 도 5는 EHT 유도 단계의 조건을 확립하기 위한 비교실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [74] 도 6은 조혈모세포 유도 단계의 2차 조건을 확립하기 위한 비교실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [75] 도 7은 본 발명의 방법으로 제조된 조혈모세포를 이용하여 인간화 마우스 모델을 제작하는 과정을 나타낸 도면이다.
- [76] 도 8은 본 발명의 조혈모세포 제조 방법 및 이를 이용한 인간화 마우스 모델 제작 방법을 개략적으로 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [77] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[78]

- [79] 실시예 1: 신규한 인간 전분화능 줄기세포 유래 조혈모세포 분화 프로토콜

- [80] 본 발명은 인간 전분화능 줄기세포를 분화시켜 인간 조혈모세포를 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 조혈모세포를 이용하여 인간화 마우스를 제작하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 1) 중간엽(Mesoderm) 유도/분화 단계, 2) 혈관모세포(Hemangioblast) 유도/분화 단계, 3) EHT (Endothelial-to-Hematopoietic Transition) 유도 단계 및 4) 조혈모세포(Hematopoietic stem cell, HSC) 유도/분화 단계로 구성될 수 있으며, 각각 단계마다 필수적인 저분자 화합물 및/또는 성장인자가 처리될 수 있다 (도 1).
- [81] 상기 인간 조혈모세포를 제조하는 방법의 구체적인 실험은 하기와 같은 방법으로 수행하였다. 먼저, 분리된 인간 전분화능 줄기세포 (human pluripotent stem cell, hPSC)를 stemMACS-iPS brew 배지로 2일간 유지하였다. 분화 기본 배양액은 다음과 같은 조성으로 구성하였다: Stempro 34-SFM (+ stempro sup) + 200 ug/ml 인간 트랜스페린(human Transferrin) + 2 mM L-글루타민(L-glutamine) + 0.5 mM L-아스코르브산(L-Ascorbic acid) + 0.45 mM MTG (1-thioglycerol) + 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin). 상기 분리된 hPSC로부터 중간엽을 유도하기 위해, GSK 억제제의 대표예로서 CHIR99021 (5uM)를 단독으로 약 2일간 처리하였다. 다음으로, 혈관모세포를 유도하기 위해 50 ng/ml BMP4, 50 ng/ml VEGF 및 100 ng/ml bFGF 를 2일 간 처리하였다. 다음으로, 50 ng/ml VEGF, 50 ng/ml bFGF, TGF-beta 억제제의 대표예로서 SB-431542 (10uM) 및 1uM 레티노산(Retinoic acid, RA)을 첨가하여 약 1일동안 배양하고, 약 11일동안 0.1% (w/v) PVA, 50 ng/ml SCF (Stem cell factor) 및 10 ng/ml bFGF를 첨가하여 배양하였다 (도 2).
- [82] 기존에 공개된 대부분의 조혈모세포 분화 관련 기술에서는 hPSC에서 EB (Embryonic body)로 군집을 형성하여 분화 후, 단일 세포 (single cell)로 군집을 해체시키고, CD34+ HSC를 추출하는 식으로 분화를 진행하였으며, 분화 효율을 높이기 위해 유전자 삽입을 시도하였다. 그러나, 본 발명의 HSC 분화 방법은 상기에서 언급한 복잡한 과정 및 유전자 삽입 없이, 저분화 화합물과 단백질 성장인자의 최적의 조합만으로 HSC를 고효율로 분화하고 용이하게 수득할 수 있다는 우수한 효과가 있다.
- [83] 하기에서는, 본 발명의 신규한 조혈모세포 분화 방법을 개발하기 위해, 기존에 공개된 분화 프로토콜과 비교하면서 최적의 조건을 확립하기 위한 실험을 수행하였다.
- [84]
- [85] 실시예 2: 조혈모세포 유도 단계의 1차 조건 확립
- [86] 조혈모세포 유도 단계의 1차 조건을 확립하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [87] 구체적으로, VEGF (Vascular endothelial growth factor)는 기존에 중간엽의 유도와 혈관모세포(HSC의 전구체)를 유도 및 유지하는 역할로 사용될 수 있음이

널리 알려져 있으며, 조혈모세포 유도 기간에 주로 사용되어 왔다. 따라서, 조혈모세포 유도 단계에서 VEGF를 제외할 경우 최종 조혈모세포 생성 효율에 어떠한 영향을 미칠것인지 확인하기 위해, 동일한 조건 (50 ng/ml SCF, 10 ng/ml bFGF, 20 ng/ml IL-3 및 10 ng/ml IL-6)에서 VEGF (10 ng/ml) 유무에 따른 조혈모세포 분화 결과를 확인하였다 (도 3A).

[88] 분화 결과를 확인하기 위해, CD34⁺CD45⁺ 세포의 비율을 확인하기 위해, FACS를 수행하였다. 구체적으로, CD34와 CD45가 둘 다 발현되는 세포를 확인하기 위해 형광 물질인 PE와 PerCP/Cy5.5가 각각 연결되어있는 항-CD34 항체 및 항-CD45 항체를 염색 버퍼 (1% FBS를 포함하는 PBS)에 1:25 비율로 희석하였다. 그런 다음, 항체를 포함하는 각테일로 세포를 4 °C에서 35분간 염색하였다. 그 후 염색 버퍼로 잔여 항체를 씻어낸 후, 다시 염색 버퍼 200 μ l를 첨가하여 유세포 분석기를 통해 분석하였다.

[89] 그 결과, 조혈모세포 유도 단계에서 VEGF를 제외한 경우의 CD34⁺CD45⁺ 세포의 비율이 VEGF를 포함하는 경우와 비교하여 현저히 우수한 것을 확인하였다 (도 3B). 상기 결과를 토대로, 기존에 알려진 것과 다르게 조혈모세포 유도 단계에서 VEGF를 제외하는 것이 현저히 우수한 조혈모세포 분화 효과가 있음을 알 수 있다.

[90]

[91] **실시예 3: 중간엽 유도 단계의 조건 확립**

[92] 중간엽 (중간엽 세포/중간엽 줄기세포) 유도 단계의 조건을 확립하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[93] 구체적으로, 기존 방법에서는 중간엽을 유도하기 위해 BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF 및 CHIR99021를 처리하였었다. 그러나, 상기 조건은 줄기세포를 조혈모세포로 분화시키는 과정의 순서와 배합되지 않는다고 판단되었다. 따라서, 중간엽 유도 단계에서 기존에 처리되던 BMP4 (5 ng/ml) 및 VEGF (50 ng/ml)를 제외하고 GSK 억제제의 대표예로서 CHIR99021만을 처리할 경우의 조혈모세포 분화 효율을 확인하였다 (도 4A).

[94] 그 결과, 중간엽 유도 단계에서 CHIR99021만을 단독으로 처리한 경우의 CD34⁺CD45⁺ 세포의 비율이 BMP4, VEGF 및 CHIR99021를 처리하는 경우와 비교하여 현저히 우수한 것을 확인하였다 (도 4B). 상기 결과를 토대로, 중간엽 유도 단계에서는 BMP4 및 VEGF를 처리하지 않는 것이 현저히 우수한 조혈모세포 분화 효과가 있음을 알 수 있다.

[95]

[96] **실시예 4: EHT 유도 단계의 조건 확립**

[97] EHT (Endothelial-to-Hematopoietic Transition) 유도 단계의 조건을 확립하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[98] 구체적으로, CD34⁺ HSC를 유도하기 위해서는 중간엽 유도 후, 반드시 혈관모세포(Hemangioblast)를 유도하여야 한다. 혈관모세포에서 EHT

(Endothelial-to-Hematopoietic Transition) 유도를 유도함으로서 CD34⁺ HSC로 분화될 수 있는 바, EHT의 효율을 극대화하기 위한 적절한 배양 조건을 확립하는 것이 중요하다.

- [99] 이를 위해, VEGF 및 bFGF (basic fibroblast growth factor) 외에 TGF-beta 억제제의 대표예로서 SB-431542 (SB4)를 다양한 기간동안 처리할 경우의 조혈모세포 분화 효율을 확인하였다 (도 5A). 그 결과, SB4를 24시간 이하로 처리한 경우 CD34⁺CD45⁺ 세포의 비율이 현저히 우수한 것을 확인하였으며, SB4을 장기간 처리한 경우에는 오히려 조혈모세포 분화 효율이 현저히 저하되는 것을 확인하였다 (도 5B). 또한, SB4와 레티노산(Retinoic acid, RA)를 동시에 처리한 경우에는 SB4를 단독으로 처리한 경우보다 조혈모세포 분화 효율이 현저히 증가됨을 확인하였다 (도 5C 및 5D).
- [100] 상기 결과를 토대로, 혈관모세포 유도 후 EHT 유도 단계는 SB4를 약 24시간 정도 처리할 경우 현저히 우수한 조혈모세포 분화 효과가 있음을 알 수 있으며, SB4와 레티노산의 조합은 보다 우수한 조혈모세포 분화 효과를 나타낼 수 있다.
- [101]
- [102] **실시예 5: 조혈모세포 유도 단계의 2차 조건 확립**
- [103] 조혈모세포 유도 단계의 2차 조건을 확립하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [104] 구체적으로, 기존에는 인간 전분화능 줄기세포로부터 분화된 조혈모세포의 CD34⁺ 포텐셜을 유지하기 위한 배양 과정에서 IL-3 및 IL-6가 주로 사용되나, 이는 분화된 조혈모세포의 노화 및 분화를 진행시켜 CD34⁺ 포텐셜 유지 효율이 다소 저하될 수 있다. 따라서, 조혈모세포 유도 단계 및 유지 단계에서 기존에 처리되던 IL-3 및 IL-6 대신 PVA (polyvinyl alcohol)를 처리할 경우의 조혈모세포 분화 유지 효율을 확인하였다 (도 6A).
- [105] 그 결과, 조혈모세포 유도 단계에서 IL-3 및 IL-6를 제외하고 PVA를 처리한 경우, 조혈모세포 분화 효율이 증가할 뿐만 아니라, 분화 후 CD34⁺ 조혈모세포의 유지 효율 또한 현저히 우수함을 확인하였다 (도 6B 및 C). 상기 결과를 토대로, 기존에 알려진 것과 다르게 조혈모세포 유도 단계에서 IL-3 및 IL-6를 제외하고 PVA를 처리하는 것이 현저히 우수한 조혈모세포 분화 및 유지 효과가 있음을 알 수 있다.
- [106]
- [107] **실시예 6: 인간화 마우스 제작**
- [108] 상기 실시예 2 내지 5의 실험 결과를 토대로 실시예 1의 신규한 조혈모세포 분화 프로토콜을 확립하였으며, 상기 방법으로 제작한 조혈모세포를 이용하여 인간화 마우스를 제작하였다.
- [109] 구체적으로, 상기 실시예 1의 방법을 통해 제조된 인간 전분화능 줄기세포 유래 조혈모세포 1-2 x 10⁵개 세포를 방사능 처리된 면역부전 NSG 마우스의 꼬리

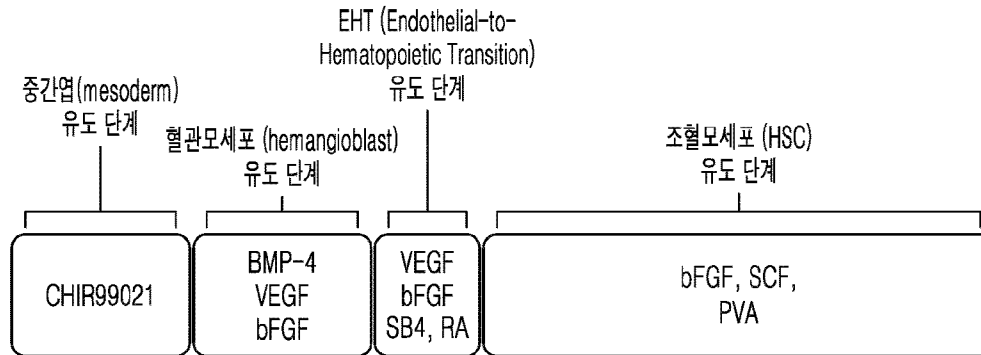
정맥에 주입하였다. 주입 12주 후 마우스의 말초혈액에서 인간 미토콘드리아 유전자 존재 여부를 확인하였으며, 주입 22주 후 마우스의 말초혈액에서 인간 CD45 양성 세포 유무를 확인하였다 (도 7A).

- [110] 상기 마우스의 말초 혈액에서 인간 미토콘드리아 DNA를 검출하기 위해 PCR 반응을 수행하였으며, 구체적으로 중합효소(polymerase)로 2x PCRBIO HS Taq Mix red를 사용하였고, 어닐링(annealing) 온도를 58 °C로 하여 35 사이클로 수행하였다. 그 후, EtBr이 들어간 1% 아가로스 겔에 PCR 반응 생성물을 100v로 20분간 로딩하여 PCR 밴드를 확인하였다. 인간 미토콘드리아 검출을 위해 사용한 primer의 sequence는 다음과 같다.
- [111] Forward: 5'- CAACACTAAAGGACGAACCTGA-3'(서열번호 1)
- [112] Reverse: 5'- TCGTAAGGGGTGGATTTTTC-3'(서열번호 2)
- [113] 그 결과, 주입 12주 후 마우스의 말초혈액에서 인간 미토콘드리아 유전자가 검출되었으며(도 7B), 주입 22주 후에는 마우스의 말초혈액에서 인간 CD45 양성 세포가 25% 이상 존재하는 것을 확인하였다 (도 7C).
- [114] 상기 결과를 토대로 실시예 1의 조혈모세포 분화 프로토콜 방법으로 제조된 조혈모세포가 인간화 동물 모델을 제작하는 데에도 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [115]
- [116] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

청구범위

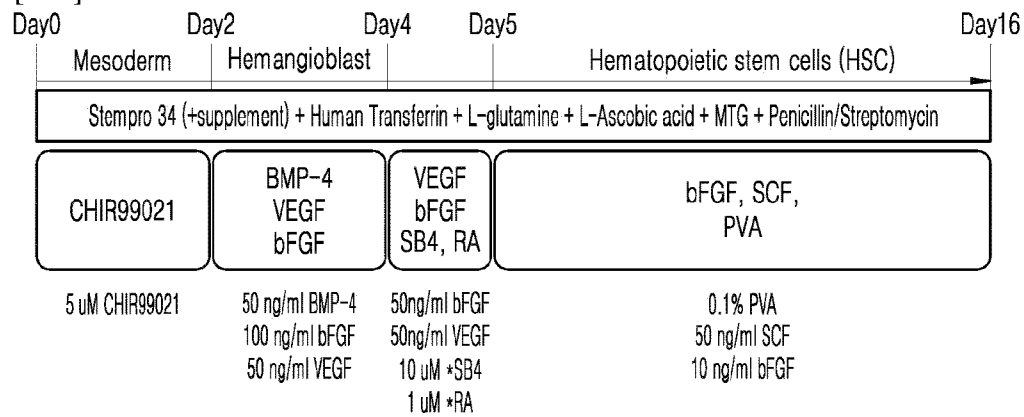
- [청구항 1] (A) 전분화능 줄기세포 (pluripotent stem cell, PSC)를 GSK(glycogen synthase kinase) 억제제가 포함된 배지에서 1차 배양하여 중간엽 세포를 얻는 단계;
(B) 상기 중간엽 세포를 2차 배양하여 혈관모세포로 유도 또는 분화시키는 단계;
(C) 상기 혈관모세포를 3차 배양하여 EHT (Endothelial-to-Hematopoietic Transition) 유도된 혈관모세포를 얻는 단계; 및
(D) 상기 EHT 유도된 혈관모세포를 4차 배양하여 조혈모세포로 유도 또는 분화시키는 단계를 포함하는, 조혈모세포 제조방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 GSK(glycogen synthase kinase) 억제제는 CHIR99021인 것인, 방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 2차 배양은 BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF (Vascular endothelial growth factor) 및 bFGF (basic fibroblast growth factor)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 배지에서 배양하는 것인, 방법.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 3차 배양은 TGF-beta 억제제를 포함하는 배지에서 배양하는 것인, 방법.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서, 상기 TGF-beta 억제제는 SB-431542인 것인, 방법.
- [청구항 6] 청구항 4에 있어서, 상기 3차 배양은 레티노산(Retinoic acid, RA) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 7] 청구항 4에 있어서, 상기 3차 배양은 VEGF 및 bFGF으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 4차 배양은 PVA (polyvinyl alcohol) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 배지에서 배양하는 것인, 방법.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 4차 배양은 SCF 및 bFGF으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는 배지에서 배양하는 것인, 방법.
- [청구항 10] 인간을 제외한 개체에 청구항 1의 방법으로 제조된 조혈모세포를 이식 또는 주입하는 단계를 포함하는, 인간화 동물 모델 제작방법.
- [청구항 11] 청구항 10의 인간화 동물 모델 제작방법으로 제작된, 인간화 동물 모델.

[도1]



* Abbreviation : SB4: SB431542 (TGF-beta inhibitors), RA: Retinoic acid

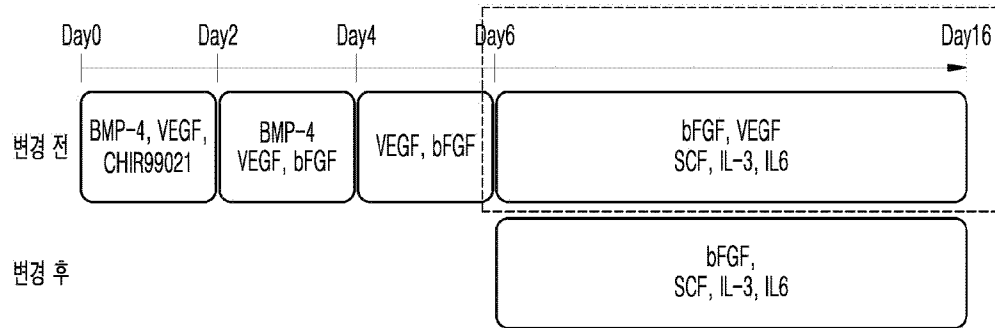
[도2]



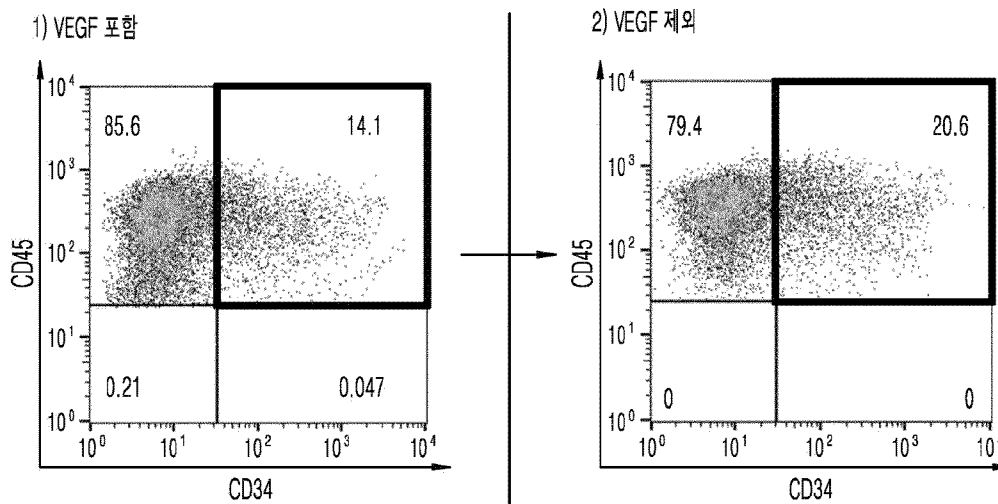
* Abbreviation : SB4: SB431542 (TGF-beta inhibitors), RA: Retinoic acid

[도3]

A

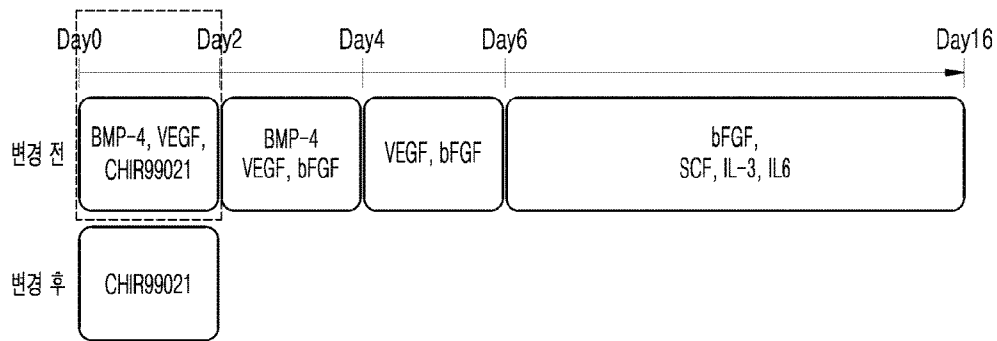


B



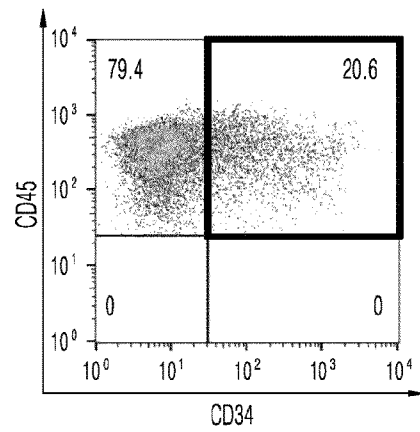
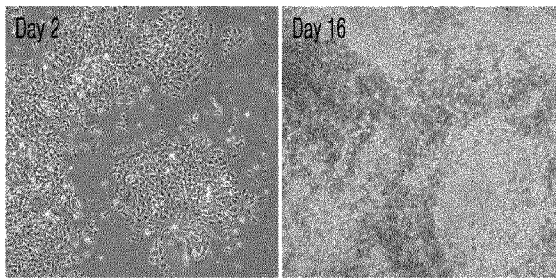
[도4]

A

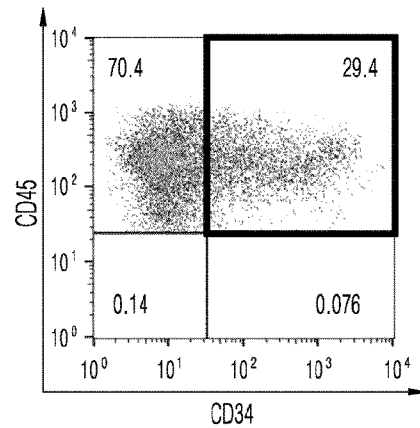
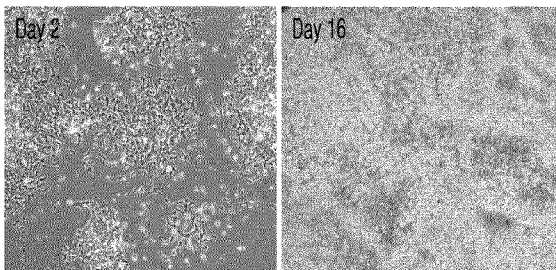


B

변경 전

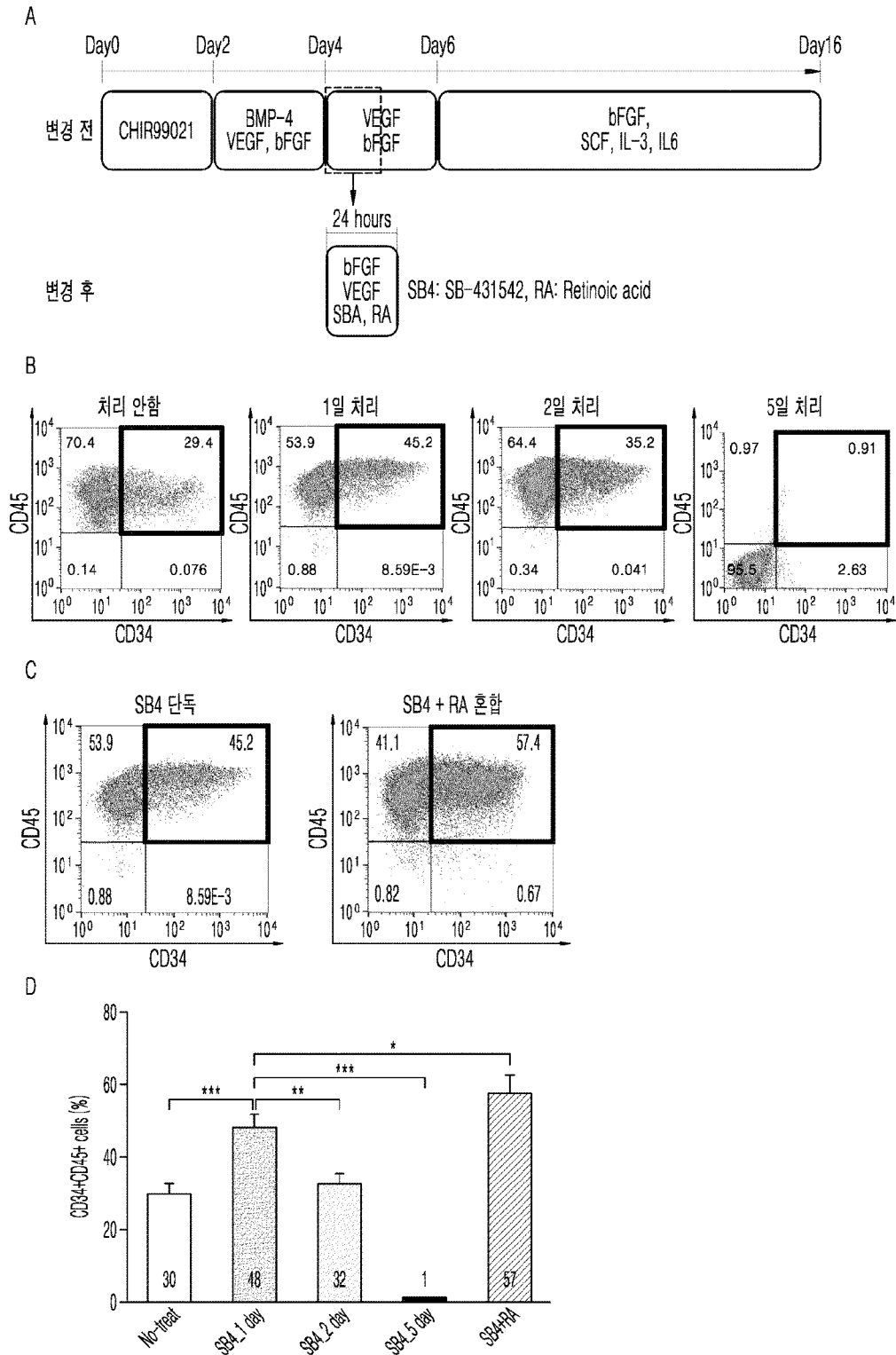


변경 후

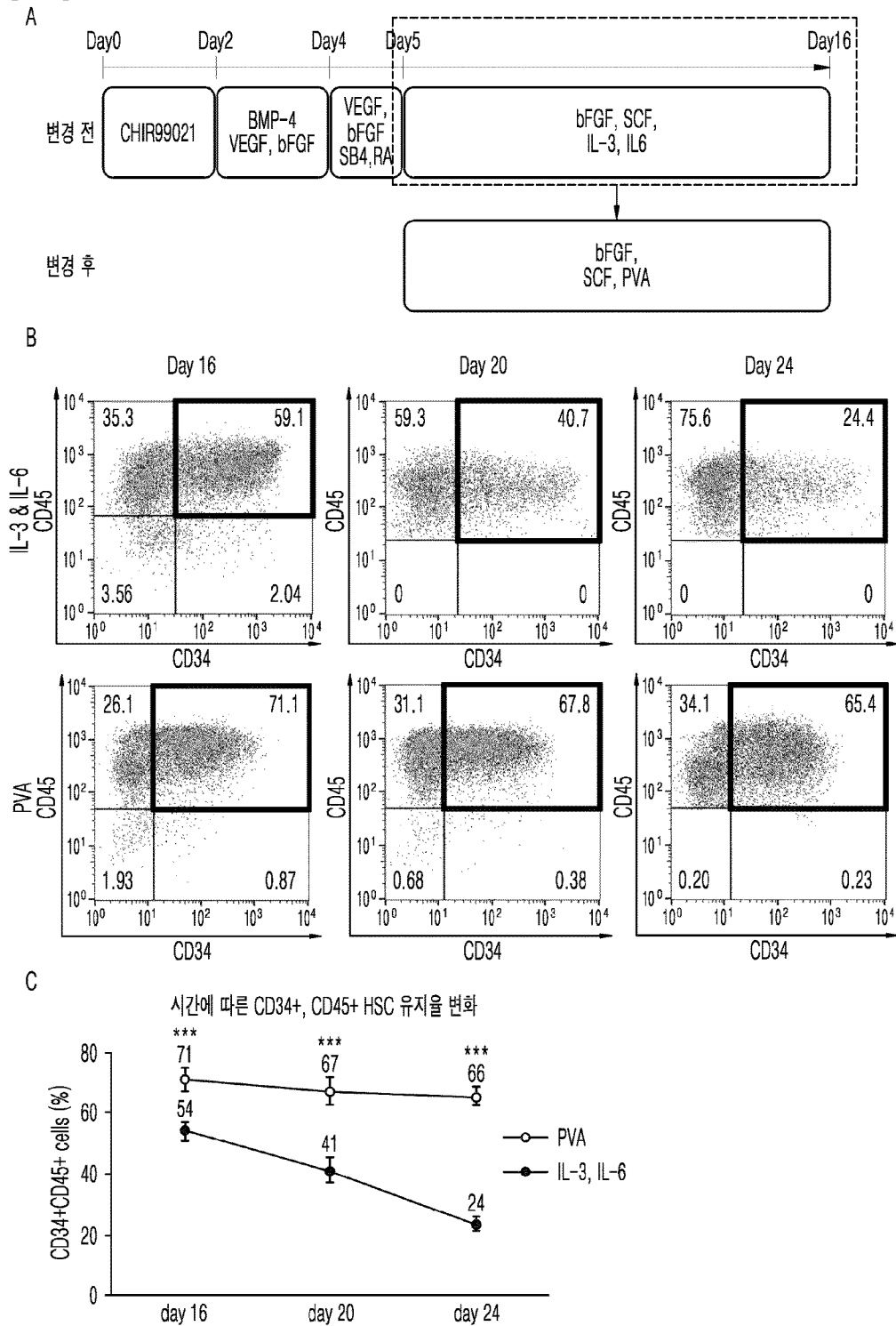


Nikon 광학현미경, 40x

[도5]



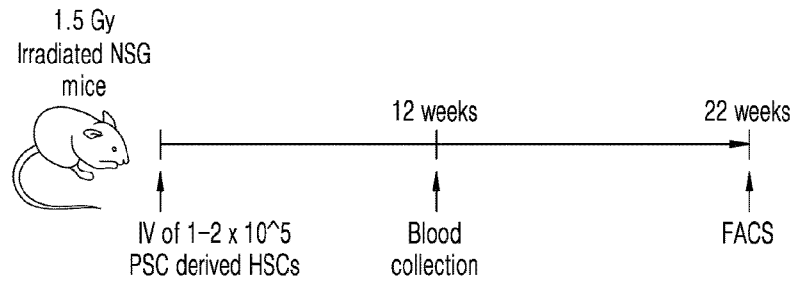
[도6]



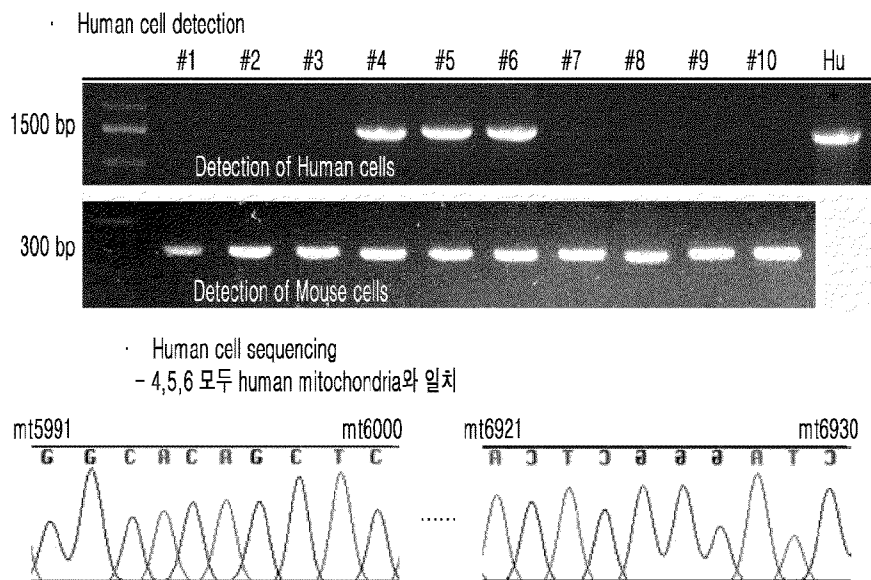
[도7]

A

Production of humanized Mouse

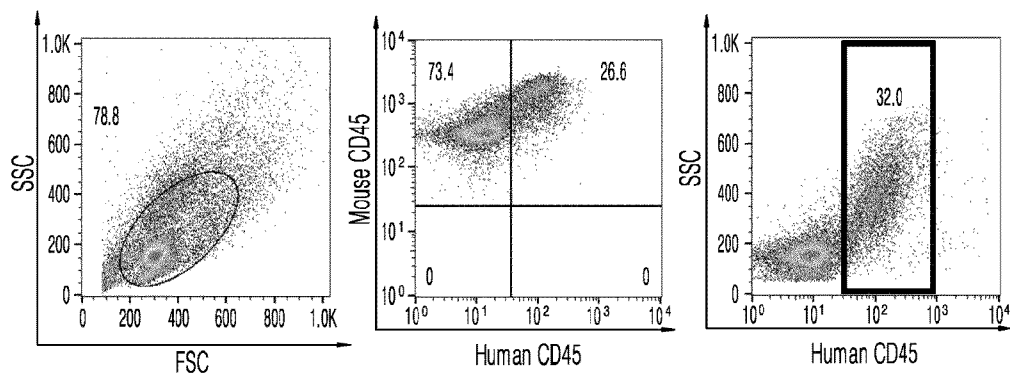


B

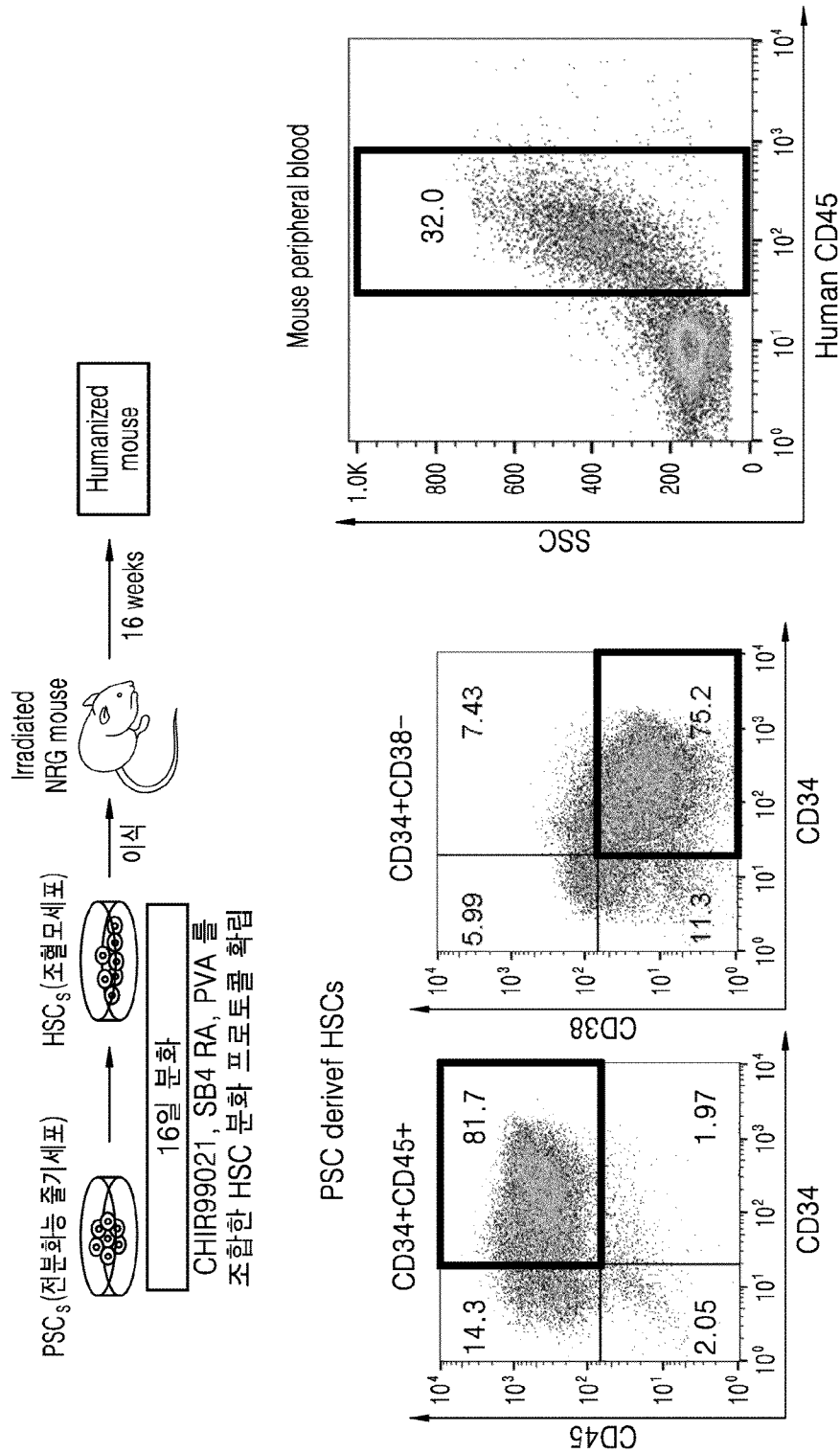


C

in mouse peripheral blood



[도 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/0789(2010.01)i; A01K 67/027(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/0789(2010.01); A61P 43/00(2006.01); A61P 7/00(2006.01); C12N 5/0786(2010.01); C12N 5/0793(2010.01); G01N 33/569(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), GSK 억제제(glycogen synthase kinase inhibitor), 중간엽 세포(mesodermal cell), 혈관모세포(hemangioblast cell), 내피에서 조혈로의 전이(Endothelial-to-Hematopoietic Transition), 조혈모세포(hematopoietic cell), 레티노산(retinoic acid), 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol), 인간화 동물(humanized animal)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020-0080059 A1 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 12 March 2020 (2020-03-12) See paragraphs [0028], [0092]-[0095] and [0108]-[0109]; claims 1, 10 and 13-14; table 1; and figures 1A-1F.	1-5,7,10-11
Y		6,8-9
Y	WANG, Chengyan et al. TGFβ inhibition enhances the generation of hematopoietic progenitors from human ES cell-derived hemogenic endothelial cells using a stepwise strategy. Cell Research. 2012, vol. 22, pp. 194-207. See abstract; pages 197 and 199; and figure 3.	6
Y	WO 2021-049617 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 18 March 2021 (2021-03-18) See claim 1.	8-9
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 December 2022		Date of mailing of the international search report 15 December 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013463**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020-204827 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH et al.) 08 October 2020 (2020-10-08) See entire document.	1-11
A	KR 10-2018-0066263 A (FATE THERAPEUTICS, INC.) 18 June 2018 (2018-06-18) See entire document.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013463

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/013463

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2020-0080059	A1	12 March 2020	EP	3847243	A1	14 July 2021
				JP	2021-535747	A	23 December 2021
				WO	2020-051453	A1	12 March 2020
WO	2021-049617	A1	18 March 2021	CN	114667342	A	24 June 2022
				EP	4029566	A1	20 July 2022
				US	2022-0298479	A1	22 September 2022
				WO	2021-049617	A1	18 March 2021
WO	2020-204827	A1	08 October 2020	CN	113924362	A	11 January 2022
				EP	3947650	A1	09 February 2022
				US	2022-0106563	A1	07 April 2022
KR	10-2018-0066263	A	18 June 2018	CN	108473961	A	31 August 2018
				CN	108473961	B	29 November 2022
				EP	3371301	A1	12 September 2018
				EP	3371301	A4	26 June 2019
				JP	2018-533363	A	15 November 2018
				JP	2022-058480	A	12 April 2022
				US	10858628	B2	08 December 2020
				US	10947505	B2	16 March 2021
				US	11162075	B2	02 November 2021
				US	11162076	B2	02 November 2021
				US	2018-0320137	A1	08 November 2018
				US	2021-0024891	A1	28 January 2021
				US	2021-0062151	A1	04 March 2021
				US	2021-0222126	A1	22 July 2021
				US	2021-0230549	A1	29 July 2021
				WO	2017-078807	A1	11 May 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/0789(2010.01)i; A01K 67/027(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/0789(2010.01); A61P 43/00(2006.01); A61P 7/00(2006.01); C12N 5/0786(2010.01); C12N 5/0793(2010.01); G01N 33/569(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), GSK 억제제(glycogen synthase kinase inhibitor), 중간엽 세포(mesodermal cell), 혈관모세포(hemangioblast cell), 내피에서 조혈로의 전이(Endothelial-to-Hematopoietic Transition), 조혈모세포(hematopoietic cell), 레티노산(retinoic acid), 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol), 인간화 동물(humanized animal)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2020-0080059 A1 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 2020.03.12 단락 [0028], [0092]-[0095], [0108]-[0109]; 청구항 1, 10, 13-14; 표 1; 및 도면 1A-1F 참조.	1-5,7,10-11
Y		6,8-9
Y	WANG, CHENGYAN 등, "TGFβ inhibition enhances the generation of hematopoietic progenitors from human ES cell-derived hemogenic endothelial cells using a stepwise strategy", Cell Research, 2012, 22권, 페이지 194-207 요약; 페이지 197, 199; 및 도면 3 참조.	6
Y	WO 2021-049617 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 2021.03.18 청구항 1 참조.	8-9
A	WO 2020-204827 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH 등) 2020.10.08 전체 문헌 참조.	1-11
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년12월15일(15.12.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년12월15일(15.12.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2018-0066263 A (페이트 세러퓨틱스, 인코포레이티드) 2018.06.18 전체 문헌 참조.	1-11

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2020-0080059 A1	2020/03/12	EP 3847243 A1	2021/07/14
		JP 2021-535747 A	2021/12/23
		WO 2020-051453 A1	2020/03/12
WO 2021-049617 A1	2021/03/18	CN 114667342 A	2022/06/24
		EP 4029566 A1	2022/07/20
		US 2022-0298479 A1	2022/09/22
		WO 2021-049617 A1	2021/03/18
WO 2020-204827 A1	2020/10/08	CN 113924362 A	2022/01/11
		EP 3947650 A1	2022/02/09
		US 2022-0106563 A1	2022/04/07
KR 10-2018-0066263 A	2018/06/18	CN 108473961 A	2018/08/31
		CN 108473961 B	2022/11/29
		EP 3371301 A1	2018/09/12
		EP 3371301 A4	2019/06/26
		JP 2018-533363 A	2018/11/15
		JP 2022-058480 A	2022/04/12
		US 10858628 B2	2020/12/08
		US 10947505 B2	2021/03/16
		US 11162075 B2	2021/11/02
		US 11162076 B2	2021/11/02
		US 2018-0320137 A1	2018/11/08
		US 2021-0024891 A1	2021/01/28
		US 2021-0062151 A1	2021/03/04
		US 2021-0222126 A1	2021/07/22
		US 2021-0230549 A1	2021/07/29
		WO 2017-078807 A1	2017/05/11