(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 6 월 6 일 (06.06.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/117455 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/071 (2010.01) *A61L 27/36* (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/011678

(22) 국제출원일: 2023 년 8 월 8 일 (08.08.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0161808 2022 년 11 월 28 일 (28.11.2022) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 임도선 (**LIM, Do-Sun**); 06670 서울특별시 강남구 선릉로 206, 101동 204호, Seoul (KR). 노지민 (**NOH, Ji-Min**); 01182 서울특별시 강북구 솔매로 22가길 66, 201호, Seoul (KR).

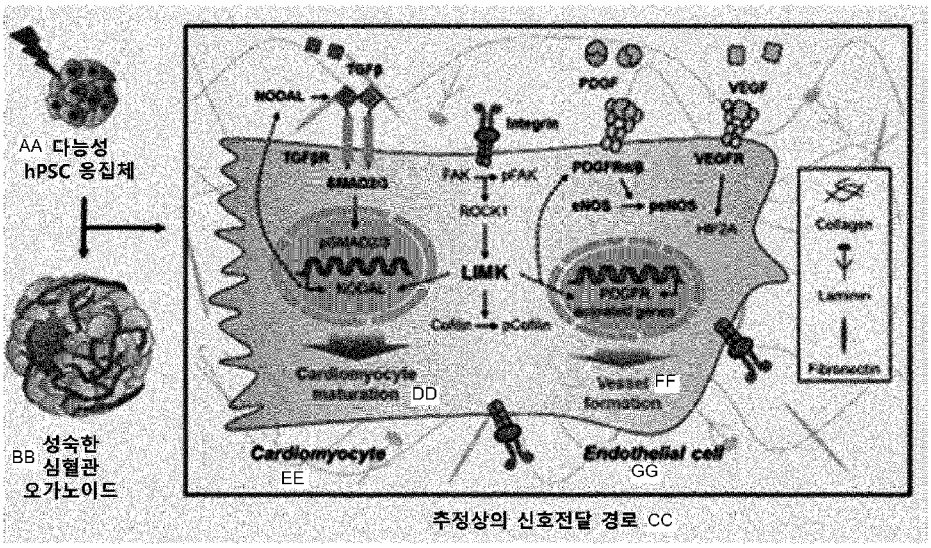
(74) 대리인: 위병갑 (**WIE, Byoung-Gap**); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

(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, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM,

(54) **Title:** COMPOSITION FOR PROMOTING MATURATION OF CARDIOVASCULAR ORGANOIDS

(54) **발명의 명칭:** 심혈관 오가노이드 성숙 촉진용 조성물



AA ... Pluripotent hPSC aggregate
BB ... Mature cardiovascular organoid
CC ... Putative signaling pathway
DD ... Cardiomyocyte maturation
EE ... Cardiomyocyte
FF ... Vessel formation
GG ... Endothelial cell

(57) **Abstract:** The present invention relates to a composition for maturing cardiovascular organoids, and use thereof. It has been identified in the present invention that LIMK promotes the maturation of cardiomyocytes in immature cardiovascular organoids, and promotes the formation of a blood vessel network such that vascularized mature ventricular type cardiovascular organoids are prepared, and thus the present invention can be used as a composition for maturing cardiovascular organoids, and mature cardiovascular organoids prepared using same can be effectively used in artificial hearts, disease modeling, drug screening, toxicity evaluation of new drugs, and the like.

WO 2024/117455 A1

[다음 쪽 계속]

KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

(57) 요약서: 본 발명은 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에서 LIMK가 미성숙된 심혈관 오가노이드에서 심근세포의 성숙을 촉진하고, 혈관 네트워크 형성을 촉진하여 혈관화된 성숙한 심실타입 심혈관 오가노이드가 제조되는 것을 확인하였으므로, 이를 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물로 이용할 수 있으며, 이를 이용하여 제조한 성숙된 심혈관 오가노이드는 인공 심장, 질환 모델링, 약물 스크리닝, 신약 독성평가 등에 유용하게 활용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 심혈관 오가노이드 성숙 촉진용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 허혈성 심장질환은 전세계적으로 매우 높은 유병률을 보이고 있으며, 단일질환 전체 사망원인 중 1위를 차지하고 있다. 한국 역시 사회·경제적인 발전과 서구화된 생활습관으로 인하여 허혈성 심장질환 환자들이 급증하고 있다. 더욱이 중증의 말기 심부전 환자의 경우, 심장이식술이나 기계적 좌심실 보조장치 이외에는 완치법이 없는 실정이다. 하지만 공여장기의 부족, 장기확보의 어려움, 높은 사망률 및 고가의 치료비용 등의 문제점을 가지고 있다.

[3] 인체의 손상된 조직을 재건하기 위한 이식방법에는 이종이식, 동종이식, 자가이식이 있다. 이종이식은 면역 부적합성 및 레트로바이러스를 포함하는 인수공통 병원체 전달의 문제를 갖는다. 또한, 동종이식은 제공자의 면역거부 및 이용 불가능성의 문제를 가지며, 자가이식은 필요한 양만큼의 적절한 조직을 얻기 어려우며 환자에 대한 외상의 증가의 문제를 가진다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 인공 대체물이나 세포를 배양하여 조직화시킨 것을 그대로 이식하려고 하는 기술이 주목받고 있다. 여러 종류의 세포로 분화할 수 있는 미분화 세포인 인간 다능성 줄기세포는 심근세포로 분화 가능하며, 2차원 배양 시스템에서 생성된 인간 다능성 줄기세포 유래 심근세포에 관한 많은 연구를 진행하고 있다. 이러한 인간 다능성 줄기세포 유래 심근세포는 심장발달, 약물 스크리닝, 질병 모델링 및 심장 회복 연구에 광범위하게 사용될 수 있다. 하지만, 기존 2차원 배양 시스템으로부터 생성된 인간 다능성 줄기세포 유래 심근세포는 배아 또는 태아 단계와 유사한 구조적 및 기능적으로 미성숙한 특성을 나타내기 때문에 성숙한 성인 심근세포와 달리 질병 모델링, 약물 스크리닝 및 심장 독성을 위한 활용에 한계점을 갖고 있다. 2004년 순수한 세포 자체를 이용하여 제작한 셀 시트(cell sheet)를 이용한 망막 재생에 관한 연구가 New England journal of Medicine에 발표된 뒤 조직공학 분야에서 세포만을 이용한 3차원 인공조직에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 조직공학 분야에서 최근 인공 조직보다 주목받고 있는 것이 인공 장기 또는 미니 장기라고 불리는 오가노이드(organoid)이다. 현재 생체 내 여러 장기의 줄기세포에서 유래하는 다양한 종류의 오가노이드 모델이 구축되어 있으며, 재생의학이나 세포치료제로써 오가노이드에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 오가노이드는 줄기세포로부터 발생 및 분화를 통하여 형성된 3차원 세포 구조체로서, 해당 장기의 구조적, 기능적 특성을 재현하는 소형 장기 모사체이다. 오가노이드는 3차원 세포 구조체로서 조직을 구성하고 있는 다양한 세포로 구성되어 있고 세포외 기질(ECM, extracellular matrix), 세포 유형 및 가용

성 인자를 포함하는 미세 환경을 제공해 주어 기존의 2차원 배양 시스템보다 우수한 심장 조직을 형성할 수 있다는 점에서 최근에 주목받고 있다. 따라서, 기초 생물학 연구 분야에서부터 신약개발, 질병 모델링, 재생 치료 등 다양한 응용 연구 분야에 이르기까지 폭넓게 활용되고 있다. 자가조직화는 외부의 압력 없이, 세포 간의 상호작용을 통해 스스로 조직화를 만들어내는 현상을 말한다.

[4] 심장발달 과정은 줄기세포로부터 심혈관 전구 세포로의 분화를 거쳐 첫 번째 및 두 번째 심장 필드, 심장 루핑(looping heart) 및 챔버 형성(chamber formation)을 거쳐 자가조직화한다. 심장 오가노이드는 자가조직화 능력이 있어 생체 내 심장을 모방하여 효과적으로 생성되나, 산소 및 영양소 분포를 촉진하는 혈관 네트워크 형성이 부족하므로 배양 배지에 의존 및 장기간 배양이 불가능하고, 생체 내 장기를 구현하기 어렵다. 따라서, 성숙화된 혈관 네트워크를 포함하는 오가노이드를 확립하기 위해서 많은 연구자는 혈관내피세포를 공배양하거나, 외인성 혈관 유도 인자를 처리하여 혈관을 포함하는 오가노이드를 확립하였다. 하지만, 신체 내 자가조직화를 구현하기 위해서는 혈관내피세포를 공배양하거나, 외인성 혈관 유도 인자를 처리하지 않고 인간 다능성 줄기세포로부터 심장을 구성하는 다양한 세포로의 동시 분화를 유도하는 것이 심장발생 및 심장조직을 모사하는 것에 중요하다. 배아 발생 과정 동안 수정란으로부터 외배엽(ectoderm), 내배엽(endoderm) 및 중배엽(mesoderm)을 포함하는 삼배엽(three germ layer)으로 분화 과정을 거쳐 기관형성 과정동안 모든 세포와 기관을 형성하게 된다. 이러한 삼배엽 중에서 심장과 혈관은 중배엽에 속한다. 따라서, 혈관 네트워크를 포함하는 심장 오가노이드 형성을 위해서는 인간 다능성 줄기세포로부터 중배엽으로의 효율적인 분화 유도가 중요하다. 종래의 연구에서는 심혈관 오가노이드를 생성할 때 세포 응집체의 크기가 중요한 매개변수라고 보고하였다. 세포 응집체는 심혈관 오가노이드로 유도하기 전에 세포 응집체의 크기 (200 μm - 450 μm)를 최적화하기 위해 일반적으로 4 - 7일 동안 배양하였다. 그러나 배양 기간이 길어질수록 인간 다능성 줄기세포 마커 (OCT4, NANOG 및 SOX2)의 발현은 점진적으로 감소하는 반면, 삼배엽 마커의 발현은 증가하였다. 즉, 세포 응집체의 장기간 배양은 특정 세포 유형에 대한 외부 자극 없이 삼배엽으로의 자발적 분화를 유도할 수 있으며, 이러한 자발적인 삼배엽으로의 분화는 외배엽과 내배엽으로의 분화를 억제시키는 반면, 중배엽 계통으로의 특이적인 분화 유도를 통해 생성되는 심혈관 오가노이드의 고효율 제작을 방해하는 요인이 될 수 있다.

[5] 인간 다능성 줄기세포를 이용하여 심근세포 및 심근 모사조직의 형성을 시도한 많은 연구가 있었으나, 현재까지 구조적, 기능적으로 미성숙 상태에 머물러 있어 성인에서 발병하는 질환 모델링에 사용하기엔 적합하지 않고, 대부분의 심혈관 질환은 성인이 되거나 노화가 진행된 후 발병되기 때문에, 성체 심근세포와 형태적 및 기능적으로 유사한 성숙 심근세포를 포함한 심장 오가노이드를 개발하기 위해서는 고도로 성숙된 심근세포 및 심장 오가노이드가 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명의 목적은 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물을 제공하는 것이다.

[7] 또한, 본 발명의 목적은 심혈관 오가노이드 이식용 지지체 조성물을 제공하는 것이다.

[8] 또한, 본 발명의 목적은 *in vitro*에서 성숙된 심혈관 오가노이드를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[9] 또한, 본 발명의 목적은 *in vitro*에서 미성숙 심혈관 오가노이드를 성숙시키는 방법을 제공하는 것이다.

[10] 또한, 본 발명의 목적은 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물의 심혈관 오가노이드 성숙 용도를 제공하는 것이다.

[11] 또한, 본 발명의 목적은 성숙된 심혈관 오가노이드의 인공 심장으로 사용하기 위한 용도를 제공하는 것이다.

[12] 아울러, 본 발명의 목적은 심혈관 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[13] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 LIMK(LIM Kinase) 단백질, LIMK 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, LIMK 단백질 발현 촉진제 또는 LIMK 단백질 활성화제를 유효성분으로 포함하는 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물을 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 심혈관 오가노이드 이식용 지지체 조성물을 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 *in vitro*에서 성숙된 심혈관 오가노이드를 제조하는 방법을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 *in vitro*에서 미성숙 심혈관 오가노이드를 성숙시키는 방법을 제공한다.

[17] 또한, 본 발명은 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물의 심혈관 오가노이드 성숙 용도를 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 성숙된 심혈관 오가노이드의 인공 심장으로 사용하기 위한 용도를 제공한다.

[19] 아울러, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 성숙된 심혈관 오가노이드를 심혈관 질환에 걸린 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 심혈관 질환의 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[20] 본 발명에 따르면, LIMK가 미성숙된 심혈관 오가노이드에서 심근세포의 성숙을 촉진하고, 혈관 네트워크 형성을 촉진하여 혈관화된 성숙한 심실타입 심혈관 오가노이드가 제조되는 것을 확인하였으므로, 이를 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물로 이용할 수 있으며, 이를 이용하여 제조한 성숙된 심혈관 오가노이드는

인공 심장, 질환 모델링, 약물 스크리닝, 신약 독성평가 등에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 인간 다능성 줄기세포 유래 심혈관 오가노이드를 제작시 세포 응집체 형성을 위한 최적 세포 분주 밀도를 확인한 도이다.

[22] 도 2는 심혈관 오가노이드를 제작시 세포 응집체의 줄기능 및 분화능을 확인한 도이다.

[23] 도 3은 심혈관 오가노이드를 크기별로 나눈 뒤 이의 형태학적 특성을 확인한 도이다.

[24] 도 4는 상대적으로 줄기능이 높은 2일간 배양된 세포 응집체에서 분화된 CO (H-CO) 및 줄기능이 낮은 5일간 배양된 세포 응집체에서 분화된 CO (L-CO)의 분화 효율 및 심근세포 타입을 확인한 도이다.

[25] 도 5는 H-CO 및 L-CO의 챔버 형성을 확인한 도이다.

[26] 도 6 및 7은 H-CO 및 L-CO의 구조적 및 대사적 성숙도를 확인한 도이다.

[27] 도 8은 H-CO 및 L-CO의 심근세포 사이의 접합부를 확인한 도이다.

[28] 도 9 내지 12는 H-CO 및 L-CO의 기능적 성숙도 및 심근세포 타입별 활동전위를 분석한 도이다.

[29] 도 13은 H-CO 및 L-CO의 혈관 네트워크 형성을 확인한 도이다.

[30] 도 14는 섬유아세포의 생성을 면역형광염색법 및 유전자 발현분석 결과를 나타낸 도이다.

[31] 도 15 및 16은 H-CO 및 L-CO의 혈관 성숙도를 확인한 도이다.

[32] 도 17 및 18은 심혈관 오가노이드의 심근세포 성숙 및 혈관 네트워크 형성에 관여하는 유전자 신호 기전 경로를 분석한 도이다.

[33] 도 19는 H-CO 및 L-CO의 심실/심근 성숙 및 혈관 생성 분화 기전을 분석한 결과이다.

[34] 도 20은 LIMK/Cofilin 신호 경로 억제를 통한 CO에서 CM 성숙도 및 혈관 생성을 확인한 도이다.

[35] 도 21은 유도 만능 줄기세포 유래 CO를 제작한 뒤 이의 특성을 분석한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[36] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[37] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또

는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[38] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[39] 일 측면에서, 본 발명은 LIMK(LIM Kinase) 단백질, LIMK 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, LIMK 단백질 발현 촉진제 또는 LIMK 단백질 활성화제를 유효성분으로 포함하는 심혈관 오가노이드(cardiovascular organoids, CO) 성숙용 조성물에 관한 것이다.

[40] 일 구현예에서, 발현 촉진제는 LIMK 유전자의 발현을 증가시키는 전사인자일 수 있다.

[41] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 심근세포의 성숙을 촉진시킬 수 있으며, 심근세포의 구조적 성숙 및 기능적 성숙을 촉진시킬 수 있고, 구조적 성숙은 고도화/조직화된 삽입된 디스크와 미토콘드리아의 성숙을 포함하고, 기능적 성숙은 심실 타입 박동특성과 활동전위를 가지는 것일 수 있다.

[42] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 혈관 네트워크 형성을 촉진시킬 수 있으며, 혈관 네트워크는 혈관내피세포, 혈관주변세포, 혈관평활근세포 및 기저막 세포를 포함할 수 있다.

[43] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 심혈관 오가노이드에서 cTnT, MLC2v, MLC2a 또는 JPH2의 유전자 및 단백질 발현을 미성숙 심혈관 오가노이드에 비해 증가시킬 수 있다.

[44] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 심혈관 오가노이드에서 PDGFRβ, αSMA 또는 vWF의 유전자 및 단백질 발현을 미성숙 심혈관 오가노이드에 비해 증가시킬 수 있다.

[45] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 인간 다능성 줄기세포 유래 미성숙 심혈관 오가노이드의 *in vitro* 성숙을 촉진시킬 수 있다.

[46] 일 구현예에서, 인간 다능성 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells, ESCs) 또는 유도 만능 줄기세포 (induced pluripotent stem cells, iPSCs, 역분화 줄기세포)일 수 있다.

[47] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물 처리에 의해 성숙된 심혈관 오가노이드는 미성숙 심혈관 오가노이드에 비해 CD31, vWF, EFNB2, EPHB4, PROX1, PDGFRα, PDGFRβ, CALPONIN1, COL1A, COL3A1, COL4A1, COL4A2, α-SMA, LAMA5, LAMB1, ITGA3, ITGB1, ITGB3, ITGB4, PITX1, PITX3, FGFR4, LaminA, FN1,

ROCK1, LIMK1, pFAK, pPDGFRα, pLIMK, pCofilin, VEGFR2, pVEGFR2 또는 peNOS의 발현이 증가될 수 있다.

[48] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물 처리에 의해 성숙된 심혈관 오가노이드는 혈관화된 성숙된 심실타입 심혈관 오가노이드일 수 있다.

[49] 본 발명의 일 실시예에서 인간 다능성 줄기세포 유래 세포 응집체의 줄기능이 높을수록 심혈관 오가노이드의 심근 성숙 및 혈관 네트워크 형성이 우수한 것을 확인하였다. 구체적으로, 인간 다능성 줄기세포의 높은 줄기능을 유지하고 있는 세포 응집체로부터 생성된 심혈관 오가노이드 (H-CO, COs generated from CAs with high stemness)가 낮은 줄기능을 갖는 세포 응집체에서 생성된 심혈관 오가노이드 (L-CO, COs generated from CAs with low stemness)에 비해 심실타입으로의 분화, 구조적, 대사적 및 기능적 성숙도가 더 높은 심근세포와 혈관내피세포, 혈관주변세포, 평활근세포 및 기저막을 포함하는 성숙한 혈관 네트워크를 형성함을 확인하였다. 아울러, 이와 같은 성숙한 심근세포 및 혈관을 포함하는 심혈관 오가노이드의 생성에 LIMK가 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다.

[50] 본 발명에서 용어, "벡터"는 숙주 세포에 삽입되어 숙주 세포 게놈과 재조합되고 이에 삽입되거나, 또는 에피좀으로서 자발적으로 복제하는 컴피턴트 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 핵산을 의미한다. 이러한 벡터로는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 등이 있다.

[51] 본 명세서에 기재된 "LIMK 단백질 발현 촉진제"는 LIMK 단백질의 발현을 증진시키는 물질을 의미한다. 상기 LIMK 단백질의 발현 촉진제는 LIMK의 발현을 전사(transcription) 수준 또는 단백질 수준에서 증진시키는 물질을 모두 포함한다.

[52] 본 명세서에 기재된 "LIMK 단백질 활성화제"는 LIMK 단백질과 직접 상호작용하거나 간접적으로 작용하여 LIMK 단백질의 활성을 양성적으로 조절하는 물질을 의미한다. 예를 들면, 상기 LIMK 단백질의 활성화제는 LIMK 단백질과 결합하여 LIMK 단백질의 활성을 강화하는 물질일 수 있다.

[53] 본 발명에서 용어, "만능 줄기세포(pluripotent stem cell, PSC)"는 몸을 구성하는 어떠한 형태의 세포로도 유도 분화가 가능한 줄기세포를 의미하며, 만능 줄기세포에는 배아줄기세포(embryonic stem cells, ESCs)와 유도 만능 줄기세포 (induced pluripotent stem cells, iPSCs, 역분화 줄기세포)가 포함된다. 구체적으로, 배아줄기세포는 착상 이전 단계에 배반포(blastocyst)의 내부 세포 덩어리(inner cell mass)로부터 유도된다. 유도된 세포는 특정한 환경에서 유지되며, 무제한적인 배양 및 다능성 분화가 가능하다. 나아가, 유도 만능 줄기세포는 신체 체세포로부터 역분화되어 만들어지는 다능성 분화 세포를 의미할 수 있으며, 세포 융합, 핵치환, 다분화성 조절 인자의 과발현과 같은 재프로그래밍(reprograming)이라는 과정을 통해 체세포를 배아 줄기세포와 매우 유사한 상태로 만들어줌으로써 형성된다. 나아가, 만능 줄기세포는 배아 줄기세포 및 유도 만능 줄기세포에 제한되는 것은 아니며, 분화 다능성 및 자기 복제능을 겸비한 세포를 모두포함할 수

있다. 그러나, 바람직하게 만능 줄기세포는 포유동물의 세포, 더욱 바람직하게는 인간 유래의 만능 줄기세포일 수 있다.

[54] 본 발명에서 용어, "오가노이드 (organoid)"는 줄기세포를 이용해 최소 기능을 할 수 있도록 만든 '미니 유사 장기'로서, 3차원 구조로 만들어져 실험실에서도 실제 신체 기관과 비슷한 환경을 만들 수 있는 것이 특징이다. 즉, "오가노이드 (organoid)"는 3D 입체구조를 가지는 세포를 의미하며, 동물 등에서 수집, 취득하지 않은 인공적인 배양 과정을 통하여 제조한 신경, 장 등의 장기와 유사한 모델을 의미한다. 이를 구성하는 세포의 유래는 제한되지 않는다. 상기 오가노이드 (organoid)는 세포의 성장 과정에서 주변 환경과 상호 작용하도록 허용되는 환경을 가질 수 있다. 2D 배양과는 달리, 3D 세포 배양은 체외에서 세포가 모든 방향으로 성장할 수 있다. 이에 따라 본 발명에서 3D 오가노이드는 실제로 생체 내에서 상호 작용을 하고 있는 장기를 거의 완벽히 모사하여, 질병의 치료제 개발 및 등을 관찰할 수 있는 훌륭한 모델이 될 수 있다.

[55] 본 발명에서 용어, "분화"는 세포가 분열하여 증식하며 전체 개체가 성장하는 동안에 세포의 구조나 기능이 특수화되는 현상을 의미한다. 즉, 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어지는 역할을 수행하기 위해 적합한 형태 및 기능으로 변하는 과정을 말하며, 예를 들어, 만능 줄기세포가 외배엽, 중배엽 및 내배엽 세포로 변하는 과정뿐 아니라 전구세포가 특정 분화형질을 발현하게 되는 것도 모두 분화에 포함될 수 있다.

[56] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물을 포함하는 심혈관 오가노이드 이식용 지지체 조성물에 관한 것이다.

[57] 일 구현예에서, 본 발명의 지지체 조성물에서 미성숙 심혈관 오가노이드를 성숙시킬 수 있다.

[58] 일 측면에서, 본 발명은 a) 인간 다능성 줄기세포를 분주 및 배양하여 세포 응집체(CA, cell aggregate)를 형성하는 단계; b) 세포 응집체를 분화시켜 심혈관 오가노이드를 제조하는 단계; 및 c) 심혈관 오가노이드에 본 발명의 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는, *in vitro*에서 성숙된 심혈관 오가노이드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[59] 일 구현예에서, 단계 a)의 배양은 1 내지 6일 동안 수행될 수 있다.

[60] 일 구현예에서, 단계 b)에서 세포 응집체는: Rho kinase 억제제가 포함된 E8 배양액에서 배양하는 단계; GSK-3 억제제 포함된 RPMI1640, B27 및 인슐린을 포함하는 배양액에서 배양하는 단계; 및 IWP2 처리하고 배양하는 단계를 포함하는 방법으로 심혈관 오가노이드로 분화될 수 있다.

[61] 일 구현예에서, 성숙된 심혈관 오가노이드는 혈관화된 성숙한 심실타입 심혈관 오가노이드일 수 있다.

[62] 일 측면에서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 성숙된 심혈관 오가노이드에 관한 것이다.

[63] 일 측면에서, 본 발명은 인간 다능성 줄기세포 유래의 미성숙 심혈관 오가노이드에 제 1항의 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는, *in vitro*에서 미성숙 심혈관 오가노이드를 성숙시키는 방법에 관한 것이다.

[64] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 LIMK 단백질, LIMK 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, LIMK 단백질 발현 촉진제 또는 LIMK 단백질 활성화제의 심혈관 오가노이드 성숙 용도에 관한 것이다.

[65] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 성숙된 심혈관 오가노이드의 인공 심장으로 사용하기 위한 용도에 관한 것이다.

[66] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 성숙된 심혈관 오가노이드를 심혈관 질환에 걸린 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 심혈관 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[67] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[68] **실시예 1. 심혈관 오가노이드 생성을 위한 최적 세포 분주 밀도 결정**

[69] 인간 다능성 줄기세포 유래 심혈관 오가노이드 제조를 위한 세포 응집체를 형성 최적 조건을 결정하기 위해, 세포 분주 밀도를 확인하였다. 구체적으로, 서로 다른 수의 인간 배아 줄기세포 (각각 0.25, 0.5, 1, 2, 3 및 4×10^6개)를 메타크릴레이트 코팅된 6-웰 배양 플레이트의 각 웰에 분주하였다. 그 결과, 2 내지 3×10^6개의 분주 밀도는 응집체끼리 집합되는 현상을 확인하였으며, 0.25 내지 0.5×10^6개의 분주 밀도는 응집체가 잘 형성되지 않는 것을 확인하였다 (도 1). 따라서, 심혈관 오가노이드(cardiovascular organoids, CO) 제조시 세포 응집체 형성을 위한 최적 세포 분주 밀도를 1×10^5개/cm^2로 결정하였다.

[70] **실시예 2. 인간 다능성 줄기세포 유래 심혈관 오가노이드 제조**

[71] 2-1. CO 제조 및 줄기능 및 삼배엽으로의 자발적인 분화 확인

[72] 매트리젤(matrigel)과 DMEM/F12를 1:100의 부피비를 이루도록 혼합한 뒤, 세포 배양 플레이트에 처리하여 상온의 조건 하에서 최소 한 시간 이상 코팅한 후, 코팅된 세포 배양 플레이트에 인간 배아 줄기세포를 Essential 8™배지를 이용하여 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하고, 세포가 플레이트에서 60% 정도 자랐을 때 계대배양하였다. 계대배양 첫날에는 Thiazovivin을 2 μM 농도로 첨가하여 세포 생존율을 증가시켰다. 계대배양 동안에는 배지를 매일 교체하였다. 이 후, 배양된 상기 인간 배아 줄기세포를 Accutase를 이용하여 단일세포로 분리하였다. 이를 상기 실시예 1에서 최적 세포 분주 밀도로 확인된 1×10^5개/cm^2의 밀도로 메타크릴레이트 코팅된 6-웰 배양 플레이트에 분주한 뒤, 1일부터 5일 동안 Essential 8™ 배지에서 배양하여 세포 응집체를 형성하고 (배양 첫날에는 Thiazovivin를 2 μM 농도로 첨가하여 세포 생존율을 증가시킴), 세포 응집체

의 CO로의 분화 유도를 위해, RPMI/B27 마이너스 인슐린 배지에서 GSK3β 억제제인 6 μM CHIR99021를 첨가하여 48시간 동안 처리하였다. 분화유도 2일에는 WNT 억제제인 RPMI/B27 마이너스 인슐린 배지에서 2 μM IWP2를 첨가하여 48시간 동안 처리하였다. 분화유도 4일 및 5일에 RPMI/B27 마이너스 인슐린 배지로 교체하였다. 분화유도 7일에는 RPM/B27 마이너스 비타민 A로 배지를 교체한 후 같은 배지로 2일 간격으로 교체하여 배양함으로써 심혈관 오가노이드를 제조하였다. 이 때, 세포 응집체가 형성되는 기간 동안 줄기능 및 삼배엽으로의 자발적인 분화를 확인하기 위해, 세포 응집체의 형태 변화, 직경의 변화 및 세포 수 변화를 관찰하였다 (도 2a). 또한, 세포 계통 마커의 유전자 발현 패턴을 조사하였다.

[73] 그 결과, 배양 1 - 5일 차의 세포 응집체의 평균 직경은 각각 32.6 및 72.1, 102.2, 135.2 및 156.2 μm로 나타나, 시간 경과에 따라 평균 직경이 증가하는 것을 확인하였다 (도 2b). 또한, 세포 계통 마커의 유전자 발현 패턴을 조사한 결과, 다능성 마커 (OCT4 및 NANOG)는 시간이 지남에 따라 점차 감소하였고, 외배엽 마커 (OTX 및 ZIC), 중배엽 마커 (MESP1 및 T) 및 내배엽 마커 (CXCR4 및 AFP)는 증가하는 것을 확인하였다 (도 2c). 또한, 면역형광염색법을 통하여 외배엽 마커 (NESTIN), 중배엽 마커 (T, MIXL1 및 VEGFR2) 및 내배엽 마커 (FOXA2)가 증가하는 것을 확인하였다 (도 2d). 아울러, 2일 및 5일간 배양된 세포 응집체의 세포 수는 각각 166.6 및 418.1개임을 확인하였다 (도 2e 내지 f).

[74] 2-2. 균일한 크기의 심혈관 오가노이드 선별

[75] 상기 실시예 2-1의 분화유도 7일 및 11일에 심혈관 오가노이드를 메시(mesh) 크기 100 μm와 200 μm의 스트레이너를 사용하여 < 100 μm, 100 - 200 μm 및 > 200 μm의 크기로 선별하여 군을 나눈 뒤 각각 30일까지 배양하여 특성을 확인하였다 (도 3a). 그 결과, 배양 7일째에 < 100 μm, 100 - 200 μm 및 > 200 μm의 각 군의 CO의 평균 직경은 각각 80.1 μm, 152.4 μm 및 279.7 μm로 나타났으며, 평균 개수는 각각 22.1, 42.0 및 6.8개로 나타났다 (도 3b 및 c). 배양 30일째, 박동하는 인간 배아 줄기세포 유래 심혈관 오가노이드의 각 군 (< 100 μm, 100 - 200 μm 및 > 200 μm)의 평균 백분율은 각각 27.5%, 65.0% 및 7.5%로 나타났다 (도 3d).

[76] 2-3. 심혈관 오가노이드의 분화 효율, 심근세포 타입 및 특성 확인

[77] 상기 실시예 2-1에서 상대적으로 줄기능이 높은 2일간 배양된 세포 응집체 및 줄기능이 낮은 5일간 배양된 세포 응집체를 통해 각각 분화된 인간 다능성 줄기세포 유래 심혈관 오가노이드 (100 - 200 μm 크기로 선별한 심혈관 오가노이드)를 각각 H-CO (초기 세포 응집체 유래 CO) 및 L-CO (후기 세포 응집체 유래 CO)라고 명명하고, 이의 분화 효율, 심근 타입 및 구조를 확인하였다 (도 4a 및 b). H-CO 및 L-CO의 평균 박동 백분율을 분화 10일부터 30일까지 조사한 결과, 점차 비율이 증가하는 것으로 나타났으며, 분화 10일 및 15일에 L-CO보다 H-CO의 박동율이 더 높은 것으로 나타났고, 분화 20일 및 30일에는 유사한 것으로 나타났다 (도 4c). 또한, 중합효소연쇄반응, 웨스턴블롯 및 면역형광염색법으로 H-CO

및 L-CO의 심근세포의 타입을 확인한 결과, H-CO에서 심실타입 심근세포 마커인 MLC2v 및 심방타입 심근세포 마커인 MLC2a의 발현이 증가하였으나, L-CO에서는 노달타입 심근세포 마커인 TBX18의 발현이 증가하는 것으로 나타나 (도 4d 내지 f), H-CO가 주로 심실 유사 및 심방 유사 심근세포로 구성되고, L-CO는 노달타입의 심근세포로 구성된 것을 알 수 있다. 아울러, 심장의 특이적 구조인 챔버의 형성을 확인한 결과, H-CO가 L-CO에 비해서 마이크로 챔버의 형성이 증가하는 것으로 나타났다 (도 5a 및 b).

[78] 이를 통해, 인간 다능성 줄기세포 유래 심장 발생 및 심장 조직 모사 마이크로 심실타입의 심혈관 오가노이드를 제조한 것을 확인할 수 있었다.

[79] **실시예 3. CO의 구조적 및 대사적 성숙도 확인**

[80] 상기 실시예 2에서 제조한 성숙 심실타입의 심혈관 오가노이드의 구조적 성숙도를 평가하기 위해, 30일째에 투과전자현미경을 통해서 근절(sarcomere) 및 미토콘드리아의 미세 구조를 조사하였다. 그 결과, H-CO에서 L-CO에 비해 더 뚜렷한 Z-선(Z-line), 배열된 미토콘드리아 및 조직화된 근절이 관찰되었고, H-CO에서 근절의 평균 길이 (1.6 μm 대 1.1 μm) 및 너비(1.4 μm 대 0.6 μm)가 L-CO에 비해 증가하는 것으로 나타났다 (도 6a 내지 c 및 도 7). 또한, 심장 수축 및 이온 채널 신호전달을 담당하는 T-세관(T-tubule) 형성은 L-CO에 비해 H-CO에서 더 증가한 것으로 나타났다 (도 6a). 또한, 면역형광염색법을 이용하여 $CAV3^+$ 및 $JPH2^+$인 심근이 L-CO보다 H-CO에서 더 균일하고 높게 발현되었으며. cTnT, cTnI, CAV3 및 JPH2의 유전자 및 단백질 발현은 L-CO보다 H-CO에서 현저하게 높게 나타났다 (도 6d 내지 f). 또한, 대사 에너지를 조절하는 미토콘드리아의 성숙도를 평가를 위해 투과전자현미경을 이용하여 미토콘드리아의 구조를 확인한 결과, L-CO에 비해 H-CO에서 미토콘드리아의 구조가 더 발달한 것으로 나타났으며 (도 6g), 미토콘드리아의 수, 크기 및 크리스타(crista) 형성이 H-CO에서 L-CO에 비해유의적으로 더 증가한 것으로 나타났다 (도 6h 내지 j). 미토콘드리아의 활성을 확인하기 위하여 미토트래커(mitotracker) 활성을 분석한 결과, L-CO에 비해 H-CO에서 더 증가함을 확인하였다 (도 6k 및 j). 또한, 미토콘드리아 함량을 정량화하기 위해 중합효소연쇄반응을 통해 미토콘드리아 DNA(mtDNA)와 핵 DNA(nDNA)의 비율을 분석하였다. mtDNA/nDNA의 비율이 L-CO에 비해 H-CO에서 높게 나타났다 (도 6m). H-CO 및 L-CO에서 대사 활성 마커의 발현을 중합효소연쇄반응 및 웨스턴 블롯을 통해 비교 분석한 결과, 대사 활성 마커인 PGC1α, CPT1β 및 TFAM 발현이 H-CO에서 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (도 6n 및 o).

[81] 이를 통해, 본 발명의 체내 심장 발생 모사 전략을 통해 구축한 심혈관 오가노이드가 미토콘드리아의 구조적 및 기능적으로 성숙하고 조직화 및 배열된 근육조직이 형성된 것을 확인하였다.

[82] **실시예 4. CO의 기능적 성숙도, 심근세포 타입별 활동전위 분석 및 심근세포 사이의 접합부 확인**

[83] 상기 실시예 2에서 제조한 심혈관 오가노이드의 기능적 평가를 위해, 심장 박동성 평가 및 전기생리적 반응성 평가를 진행하고 이미징 분석 및 그래프 분석을 수행한 결과, H-CO는 L-CO에 비해 박동 패턴이 크고 느린 반면, L-CO는 박동 패턴이 작고, 빠른 것으로 나타났다 (도 9a 및 b, 도 10, 및 도 11). 또한, H-CO에서 최대 박동 사이의 기간(peak to peak duration) 및 박동지속기간(contraction relaxation duration)이 증가하는 것을 확인하였다 (도 9d 및 e). 반면, 분당 심근세포 박동수(beat per minute)는 L-CO에서 증가하는 것을 확인하였다 (도 9c). 또한, H-CO는 모두 심실세포 타입의 심근세포로 분화한 반면, L-CO는 심실타입(ventricular-like), 심방타입(atrial-like) 및 노달타입(nodal-like)의 심근세포가 모두 포함되어 있는 것으로 나타났다 (도 9i). 아울러, H-CO는 L-CO에 비해 진동수가 낮고, 심장 조기 박동이 높은 것을 확인하였다 (도 9f 내지 h, 및 도 12). 또한, CM의 기능적 성숙도를 평가하기 위해 Ca^{2+} 지시약 Fluo-4 AM을 사용하여 H-CO 및 L-CO에서 Ca^{2+}을 측정한 결과, Flo-4 AM 형광 강도가 L-CO보다 H-CO에서 상당히 더 높다는 것을 확인하였으며 (도 9j), 이는 H-CO가 L-CO보다 기능적으로 더 성숙했음을 나타낸다 (도 9k). 아울러, L-CO와 달리 H-CO에서 부착연접(adherence junction), 간극연접(gap junction) 및 데스 모솜(desmosome)을 포함하는 고도화/조직화된 삽입된 디스크(intercalated disc)가 확인되었다 (도 8). 면역형광염색법 분석을 통해 갭 접합 마커인 Cx43의 발현을 확인한 결과, Cx43가 H-CO에서는 심근세포 접합부에서 고르게 발현되는 반면, L-CO에서는 부분적으로 발현되는 것을 확인하였고 (도 9l), Cx43의 유전자 및 단백질의 발현 또한 H-CO에서 L-CO보다 증가하는 것으로 나타났다 (도 9m 및 n).

[84] 이를 통해, 본 발명의 체내 심장 발생 모사 방법을 통해 구축한 심혈관 오가노이드가 기능적으로도 성숙한 심실타입으로의 분화와 조직화 및 배열된 근육조직이 형성된 것을 확인하였다.

[85] **실시예 5. CO의 혈관 네트워크 형성 평가**

[86] 상기 실시예 2에서 제조한 심혈관 오가노이드의 혈관 네트워크 형성을 평가하기 위해, 구조적 분석 및 혈관 관련 유전자 발현을 확인하였다. 그 결과, TIE2 및 CD117은 L-CO에서 더 증가한 반면, CD31, vWF, 및 혈관 타입별 유형 마커인 EFNB2, EPHB4 및 PROX1은 L-CO에 비해 H-CO에서 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (도 13a 내지 c). 또한, 면역형광염색법을 통해 H-CO에서 cTnT 및 CD31의 발현이 L-CO에 비해 증가하는 것을 확인하였고, 정량적 평가를 통해 혈관 면적, 접합 밀도 및 평균 혈관 길이도 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (도 13d 내지 g). 또한, H-CO에서 $CD31^+$ 및 vWF^+의 공동 발현된 부분이 증가하는 것이 관찰되었고, 혈관내피세포의 끝세포(tip cell) 및 발현 혈관 신생(sprouting angiogenesis)을 포함한 복잡한 혈관 네트워크가 형성된 것을 확인하였다 (도 13h 및 i). 또한, 면역형광염색법 및 투과전자현미경을 통해 H-CO에서 혈관 내강(lumen)이 생성되었음을 확인하였다 (도 13j 및 k). 아울러, 심근세포 및 혈

관내피세포를 제외한 심장을 구성하는 세포 중 하나인 섬유아세포의 생성을 면역형광염색법 및 유전자 발현분석을 통해 확인한 결과, H-CO 및 L-CO에서는 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 14).

[87] **실시예 6. CO의 혈관 성숙도 평가**

[88] 상기 실시예 2에서 제조한 심혈관 오가노이드의 혈관 성숙도를 평가하기 위해, 혈관을 구성하는 다양한 세포의 형성을 평가한 결과, CD31의 발현이 나타나는 주변부로 혈관주변세포 마커인 PDGFRβ 및 혈관평활근세포 마커인 αSMA가 발현되는 것을 확인하였다 (도 15a 및 b, 및 도 16). 또한, 투과전자현미경을 통해 혈관의 내강 형성, 밀착연접 및 기저막으로 형성된 층이 확인되었다 (도 15c). 아울러, H-CO 및 L-CO의 혈관화 관련 유전자 및 단백질의 발현을 비교 분석한 결과, PDGFRβ, CALPONIN1, COL4A1, COL4A2 및 α-SMA의 발현이 L-CO에 비해 H-CO에서 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (도 15d 및 e).

[89] 이를 통해, 혈관내피세포를 공배양 하거나, 외인성 혈관 유도 인자를 처리하지 않고 심장 발생을 모사하는 본 발명의 자가조립화 심장 모사 방법을 통해 혈관화된 심장 오가노이드를 제조할 수 있음을 확인하였다.

[90] **실시예 7. 마이크로 심혈관 오가노이드의 심실 성숙 및 혈관 생성 분화 기전 분석**

[91] 본 발명의 심혈관 오가노이드의 심근세포 성숙 및 혈관 네트워크 형성에 관여하는 유전자 신호 기전 경로를 확인하기 위해, H-CO 및 L-CO의 분화유도 후 5일, 15일 및 25일에 관련 전사체를 분석하고 (도 17a 및 b), 히트맵(heatmap) 분석을 통하여 심장으로의 특이적으로 분화됨을 확인하였다 (도 18). GO 분석 결과, 심실세포 성숙에 관여하는 유전자 및 혈관 네트워크 형성과 관련된 유전자의 발현이 증가하는 것으로 나타났다 (도 17c). 또한, 히트맵(heatmap) 분석 결과, 심실, 심근 및 심장의 구조적 성숙, 대사적 성숙, 심장세포 접합, 심장 전도 및 칼슘 채널 활성, 혈관 발달, 혈관 형태 형성, 및 혈관 내강화가 15일 및 25일에 H-CO에서 L-CO보다 증가하는 것으로 나타났다 (도 17d 및 e). 또한, GO(gene ontology) 분석을 통해 심근 성숙 및 혈관 생성의 주요 신호 기전 경로 분석한 결과, 세포외 기질, 인테그린 신호 경로, 국소부착, TGFβ에 대한 반응 및 혈관 신생에 대한 유전자 신호 기전 경로가 H-CO에서 L-CO에 비해 증가하는 것으로 나타난 반면 (도 17f), 신경계 발달, 세포 주기 및 DNA 복제에 대한 유전자 신호 기전 경로는 감소되는 것으로 나타났다 (도 17g). 또한, 히트맵을 통해 분석된 주요 유전자 신호 기전 경로의 관련 유전자 발현은 15일 및 25일에 H-CO에서 L-CO에 비해 증가하는 것으로 나타났다 (도 17h). 또한, 유전자 네트워크 분석(network analysis)을 통해 심실세포 성숙과 혈관 네트워크 형성 사이에 세포외 기질, 인테그린, 국소부착, TGFβ 신호 전달 및 혈관 신생의 분자 네트워크가 공유됨을 확인하였다 (도 17i). 이에, 해당 신호 경로를 RNA-Seq 및 중합효소연쇄반응 분석을 통해 해당 신호 경로를 추가로 검증한 결과, RNA-Seq 결과에서, 세포외 기질 유전자, 인테그린 유전자, TGFβ 신호전달 및 혈관 신생 유전자의 발현이 15일 및 25일에 H-CO가 L-CO에 비해 증

가하였으며 (도 17a), RNA-Seq 분석을 통해 선별된 유전자 중 세포외 기질 유전자 (COL3A1, LAMA5, LAMB1), 인테그린 유전자(ITGA3), TGFβ 신호전달 경로 유전자 (PITX1 및 PITX3) 및 혈관 신생 유전자 (FGFR4)가 L-CO에 비해 H-CO에서 증가하는 것을 중합효소연쇄반응 분석을 통해 확인하였다 (도 19b).

[92] **실시예 8. CO에서 심근 성숙 및 혈관 네트워크 형성 관련 신호 기전 분석**

[93] 상기 실시예 7에서 전사체 프로파일링을 통해 선별한 유전자의 단백질 발현을 웨스턴블롯을 통하여 검증하였다. 그 결과, 세포외 기질 관련 단백질 (COL1A, LaminA 및 FN1) 및 인테그린 관련 단백질 (ITGB1, ITGB3 및 ITGB4)은 15일 및 25일에 L-CO에 비해 H-CO에서 현저하게 증가하였으며 (도 19c), Rho 관련 단백질 키나아제인 ROCK1, pFAK 및 LIMK1 발현이 L-CO에 비해 H-CO에서 15일 및 25일에 증가하였다. 반면, pLIMK는 25일째에만 증가하는 것으로 나타났다. 또한, pCofilin은 L-CO에 비해 H-CO에서 15일 및 25일째 모두 증가했지만, pRAC 및 pMLC는 차이가 없는 것을 확인하였다 (도 19d). 이러한 결과는 세포외 기질-인테그린을 통한 ROCK1-pFAK-pLIMK-pCofilin 경로의 활성화가 심근세포의 성숙에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 또한, TGFβ 슈퍼패밀리(superfamily)에 속하며 포유류의 심장 발달에서 좌우 비대칭을 조절하는 것으로 알려진 LEFTY 및 NODAL 신호의 좌-우 신호 경로의 다운스트림인 PITX2는 H-CO와 L-CO에서 발현 차이가 없는 것으로 나타났으며, pSMAD1/5는 검출되지 않았다 (도 19e). 또한, 전사체 프로파일링 분석을 통해 선별한 혈관 네트워크 형성에 관여하는 신호전달 경로 유전자를 웨스턴블롯으로 분석한 결과, 15일 및 25일에 H-CO에서 PDGFRα, PDGFRβ, VEGFR2, pPDGFRα, pVEGFR2 및 peNOS 발현이 L-CO에 비해 증가하였다. 또한, HIF2A 발현은 25일에 증가하였다 (도 19f).

[94] **실시예 9. LIMK/Cofilin 신호전달 경로 억제를 통한 CO에서 CM 성숙도 및 혈관 생성 평가**

[95] 상기 실시예 8에서 LIMK/Cofilin 신호전달 경로가 유의하게 활성화되었기 때문에 CM 성숙 및 혈관 형성에서 LIMK/Cofilin 신호전달 경로의 역할을 평가하기 위해, 분화 11일에 H-CO를 대조군인 DMSO 또는 LIMK(LIM Kinase) 억제제인 LIMKi3로 각각 처리하고 15일에 qRT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 그 결과, pLIMK, LIMK 및 pCofilin 발현이 LIMKi3 처리군에서 감소하는 것으로 나타났고 (도 20a), CM 성숙 관련 유전자 cTnT, MLC2v, MLC2a 및 JPH2의 유전자 및 단백질 발현 수준이 LIMKi3 처리된 H-CO에서 감소하였다 (도 20b 및 c). 또한, 혈관 형성 관련 유전자인 PDGFRβαSMA 및 vWF의 발현 수준이 감소하였다 (도 20d). 이러한 결과는 LIMK/Cofilin 신호가 H-CO에서 CM 성숙 및 혈관형성에 관여한다는 것을 나타낸다. 또한, LIMKi3로 처리된 H-CO에서 ECM-인테그린 상호작용, LEFTY-NODAL, pPDGFRα, pPDGFRβpVEGFR 및 peNOS 신호 전달 경로가 영향을 받는지 여부를 확인한 결과, COL4A2, LAMA2, LAMC1, LAMC3, ITGB3 및 ITGA7의 유전자 발현 수준은 LIMKi3 처리된 H-CO에서 유의하게 감소하였으며, ECM 유전자 (COL1A1, Laminin 및 FN1)의 단백질 발현은 LIMKi 처

리된 H-CO에서 감소하였다 (도 20g). NODAL은 LIMKi3 처리군에서 감소한 반면, LEFTY의 단백질 수준은 DMSO 대조군에 비해 LIMKi3 처리군에서 증가하였고, SMAD2 및 SMAD3의 인산화는 LIMKi3 처리군에서 증가한 것으로 나타났다 (도 20h). 또한, PDGFRα, pPDGFRα 및 pPDGFRβ의 단백질 발현 수준은 LIMKi3 처리된 H-CO에서 감소하였고, peNOS는 DMSO 대조군에 비해 LIMKi3 처리군에서 하향 조절된 반면, VEGFR2, pVEGFR2 및 HIF2A는 LIMKi3 처리군과 DMSO 대조군 간에 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 20i).

[96] 결론적으로, LIMK/Cofilin 신호가 세포외 기질-인테그린 상호작용, TGFβ신호 경로 (NODAL, pSMAD2 및 pSMAD3) 및 혈관 형성 경로 (PDGFRα, pPDGFRα, pPDGFRβ 및 peNOS)와 함께 활성화되고, 특히, LIMK가 혈관화된 심장 오가노이드에서 심근세포의 성숙 및 혈관 네트워크 형성을 촉진하는 역할을 하는 것을 확인하였다.

[97] **실시예 10. 유도 만능 줄기세포 유래 CO 제조 및 분석**

[98] 본 발명의 심혈관 오가노이드의 구축법이 인간 배아 줄기세포뿐만 아니라, 인간유도 만능 줄기세포에서도 동일한 심혈관 오가노이드를 생성하는지 확인하기 위해, 인간 유도 만능 줄기세포를 이용하여 상기 실시예 2의 방법으로 심혈관 오가노이드를 제조하고 심근세포, 혈관내피세포 및 섬유아세포와 같은 심장 구성 세포로의 분화 및 성숙도를 분석하고, H-CO와 L-CO를 형광면역염색법을 통하여 MLC2v+, CD31+ 및 FSP-1+의 세포 비율을 조사하였다.

[99] 그 결과, $MLC2v^+$ 심근세포 및 $CD31^+$ 혈관내피세포의 비율은 L-CO보다 H-CO에서 증가한 반면, FSP-1+ 섬유아세포의 비율은 H-CO 및 L-CO에서 유사한 것으로 나타났다 (도 21a). 또한, MLC2v 및 MLC2a의 발현은 L-CO보다 H-CO에서 증가하였으며, TBX18 발현은 L-CO에 비해 H-CO에서 증가하였다 (도 21b). 또한, cTnT, cTnI, CAV3, JPH2, CPT1β 및 Cx43와 같은 심장 분화, 성숙 및 대사 관련 유전자의 발현이 L-CO에 비해 H-CO에서 증가된 것을 확인하였다 (도 21c 내지 e). 또한, CD31, vWF, PDGFRβ, αSMA 및 COL4A1 등 혈관 네트워크 형성을 위한 유전자의 발현이 L-CO에 비해 H-CO에서 증가된 것을 확인하였다 (도 21f). FSP-1의 발현은 H-CO와 L-CO에서 차이가 없었다 (도 21g). 따라서 본 발명에서 확립한 성숙한 심혈관 오가노이드 분화 프로토콜이 인간 배아 줄기세포뿐만이 아니라, 인간 유도 만능 줄기세포에도 보편적으로 적용 가능함을 확인하였다.

[100] 상기 실시예들을 통해, 본 발명에서는 ROCK-pFAK-pLIMK-pCofilin, LEFTY-NODAL, pPDGFRα, pPDGFRβ, pVEGFR 및 peNOS 신호전달 경로가 세포외 기질-인테그린 상호작용에 의해 활성화되어 인간 다능성 줄기세포 유래 혈관화된 심장 오가노이드에서 심근세포의 성숙 및 혈관 네트워크 형성을 유도하며, LIMK가 세포외 매트릭스-인테그린 경로를 통해 성숙한 심혈관 오가노이드의 생성을 촉진하는 것을 확인하였다 (도 20j).

청구범위

[청구항 1] LIMK(LIM Kinase) 단백질, LIMK 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, LIMK 단백질 발현 촉진제 또는 LIMK 단백질 활성화제를 유효성분으로 포함하는 심혈관 오가노이드(cardiovascular organoids, CO) 성숙용 조성물.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 심근세포의 성숙을 촉진하는, 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물.

[청구항 3] 제 1항에 있어서, 혈관 네트워크 형성을 촉진하는, 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물.

[청구항 4] 제 1항에 있어서, cTnT, MLC2v, MLC2a 또는 JPH2의 유전자 및 단백질 발현을 증가시키는, 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물.

[청구항 5] 제 1항에 있어서, PDGFRβ, αSMA 또는 vWF의 유전자 및 단백질 발현을 증가시키는, 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물.

[청구항 6] 제 1항에 있어서, 인간 다능성 줄기세포 유래 미성숙(immature) 심혈관 오가노이드의 *in vitro* 성숙을 촉진하는, 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물.

[청구항 7] 제 6항에 있어서, 인간 다능성 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cells, ESCs) 또는 유도 만능 줄기세포 (induced pluripotent stem cells, iPSCs, 역분화 줄기세포)인, 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물.

[청구항 8] 제 1항의 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물을 포함하는 심혈관 오가노이드 이식용 지지체 조성물.

[청구항 9] 제 8항에 있어서, 지지체 조성물에서 미성숙 심혈관 오가노이드를 성숙시키는, 심혈관 오가노이드 이식용 지지체 조성물.

[청구항 10] a) 인간 다능성 줄기세포를 분주 및 배양하여 세포 응집체를 형성하는 단계;

b) 세포 응집체를 분화시켜 심혈관 오가노이드를 제조하는 단계; 및

c) 심혈관 오가노이드에 제 1항의 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는, *in vitro*에서 성숙된 심혈관 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 11] 제 10항에 있어서, 단계 b)에서 세포 응집체는:

i) Rho kinase 억제제가 포함된 E8 배양액에서 배양하는 단계;

ii) GSK-3 억제제 포함된 RPMI1640, B27 및 인슐린을 포함하는 배양액에서 배양하는 단계; 및

iii) IWP2 처리하고 배양하는 단계를 포함하는 방법으로 심혈관 오가노이드로 분화되는, *in vitro*에서 성숙된 심혈관 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 12] 제 10항에 있어서, 성숙된 심혈관 오가노이드는 혈관화된 성숙한 심실타입 심혈관 오가노이드인, *in vitro*에서 성숙된 심혈관 오가노이드를 제조하는 방법.

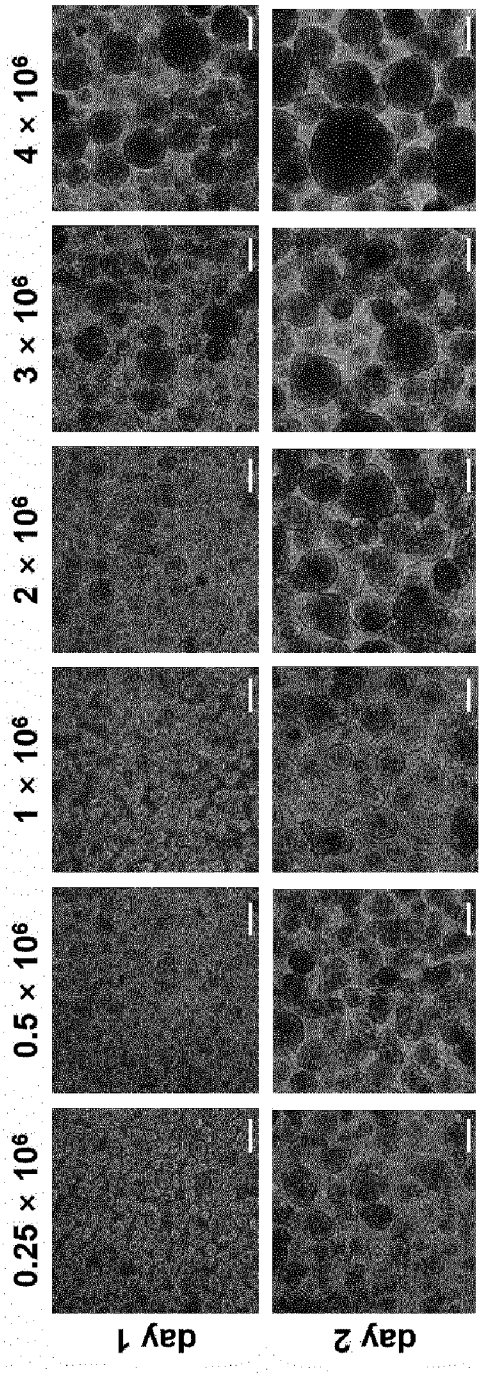
[청구항 13] 인간 다능성 줄기세포 유래의 미성숙 심혈관 오가노이드에 제 1항의 심혈관 오가노이드 성숙용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는, *in vitro*에서 미성숙 심혈관 오가노이드를 성숙시키는 방법.

[청구항 14] LIMK 단백질, LIMK 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, LIMK 단백질 발현 촉진제 또는 LIMK 단백질 활성화제의 심혈관 오가노이드 성숙 용도.

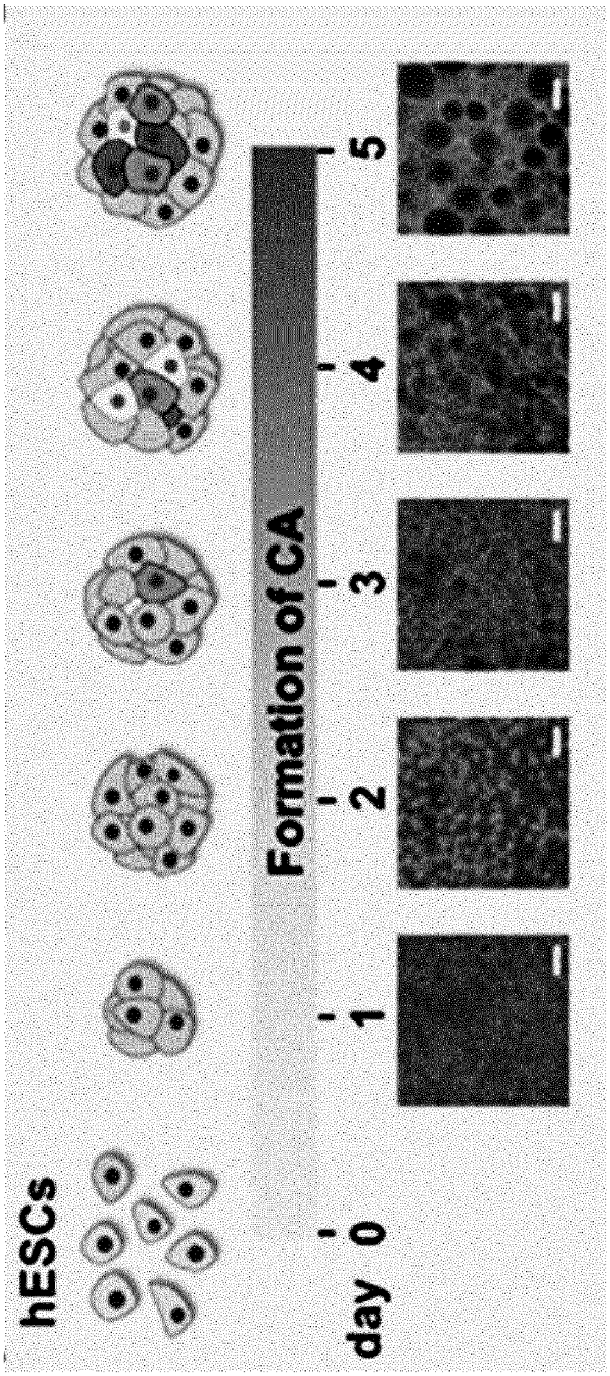
[청구항 15] 인공 심장으로 사용하기 위한, 제 10항의 방법으로 제조된 성숙된 심혈관 오가노이드의 용도.

[청구항 16] 제 10항의 방법으로 제조된 성숙된 심혈관 오가노이드를 심혈관 질환에 걸린 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 심혈관 질환의 치료 방법.

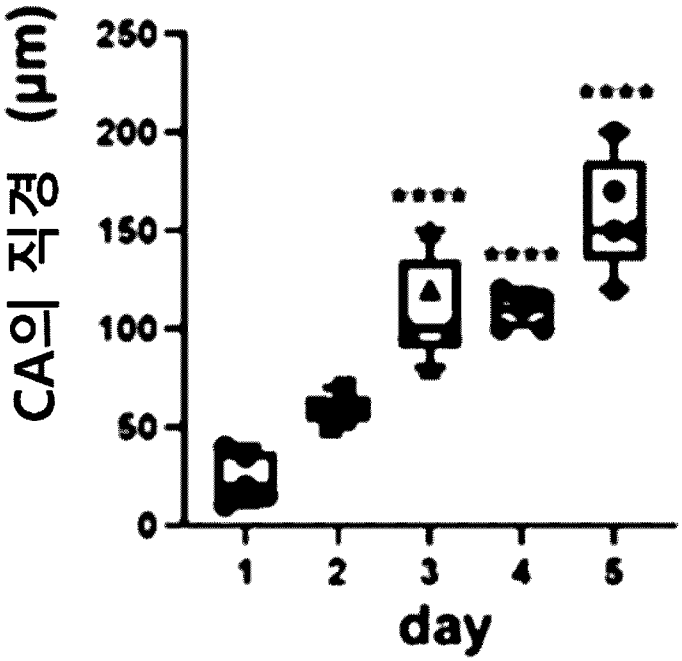
[도1]



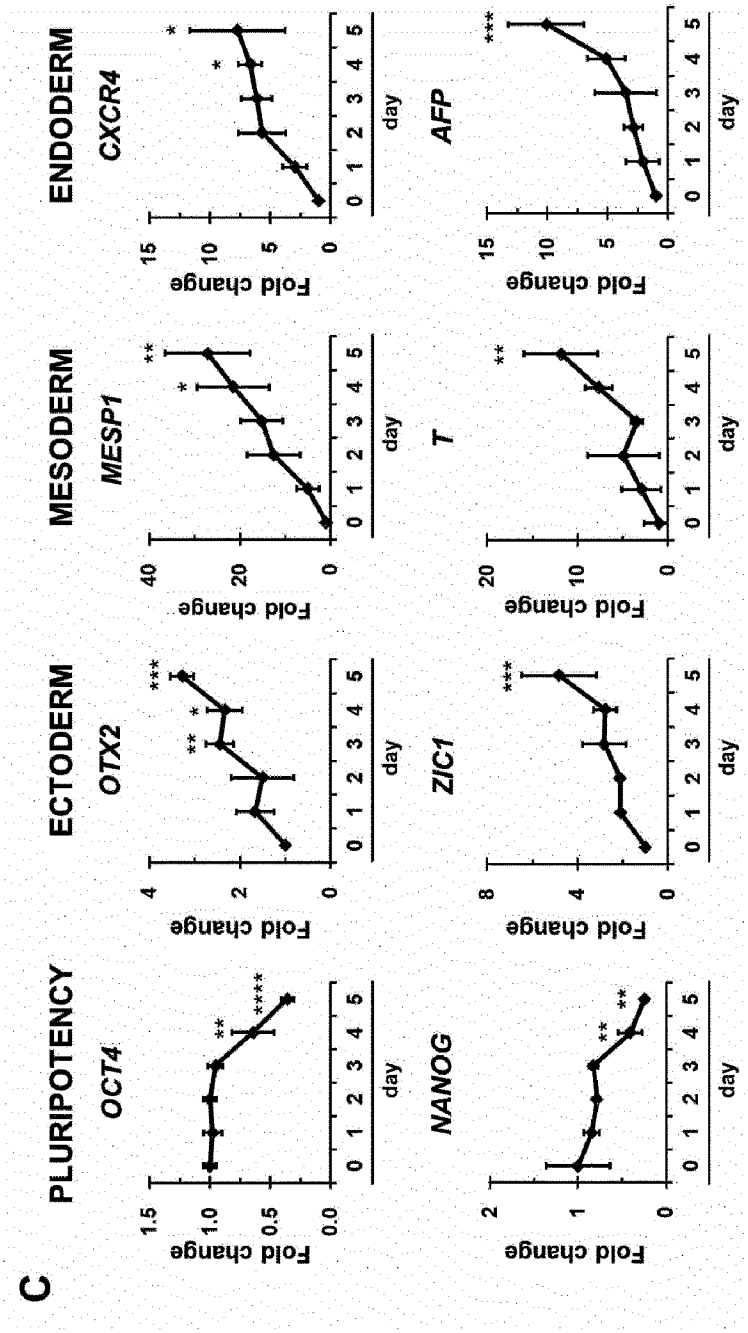
[도2a]



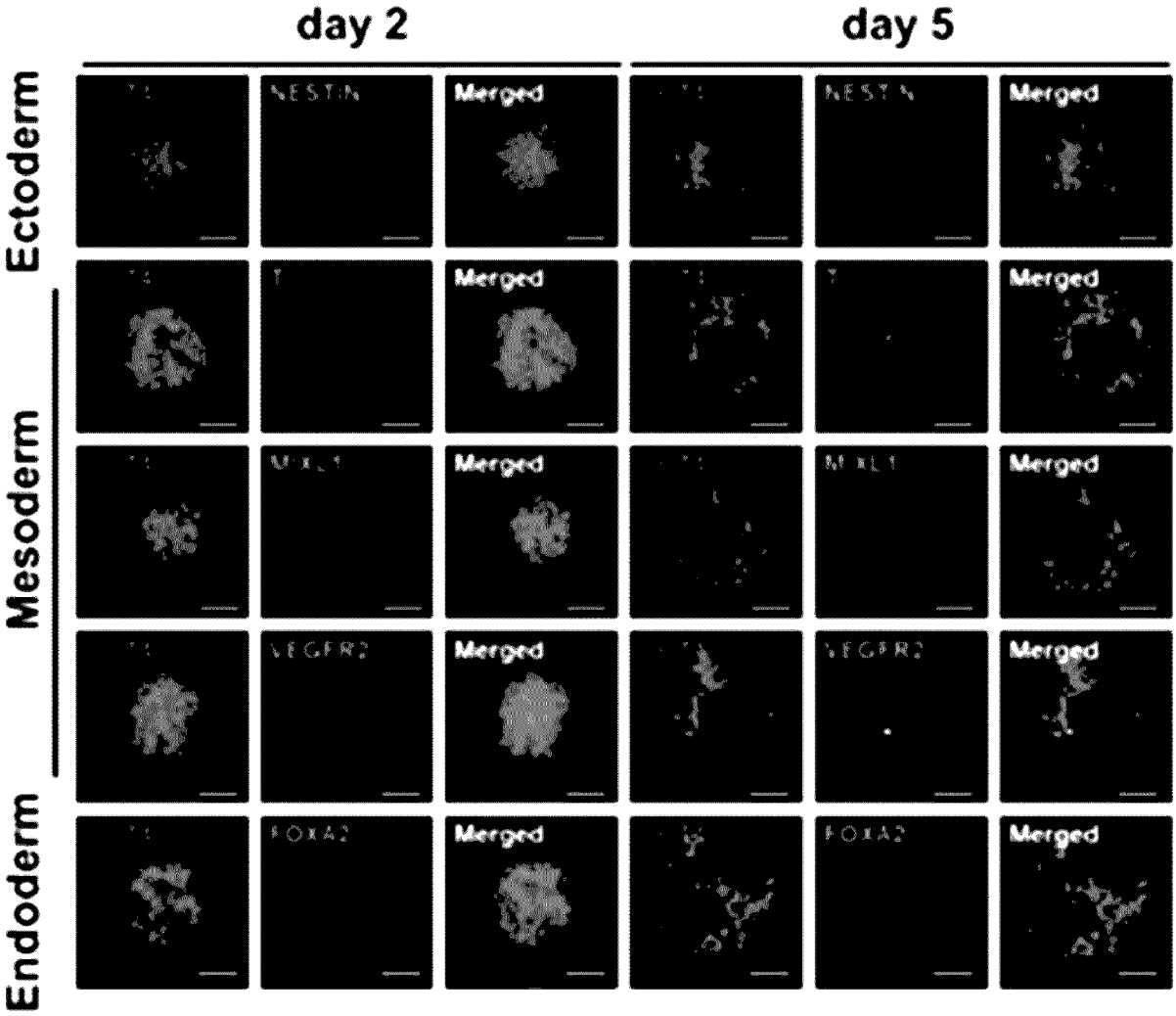
[도2b]



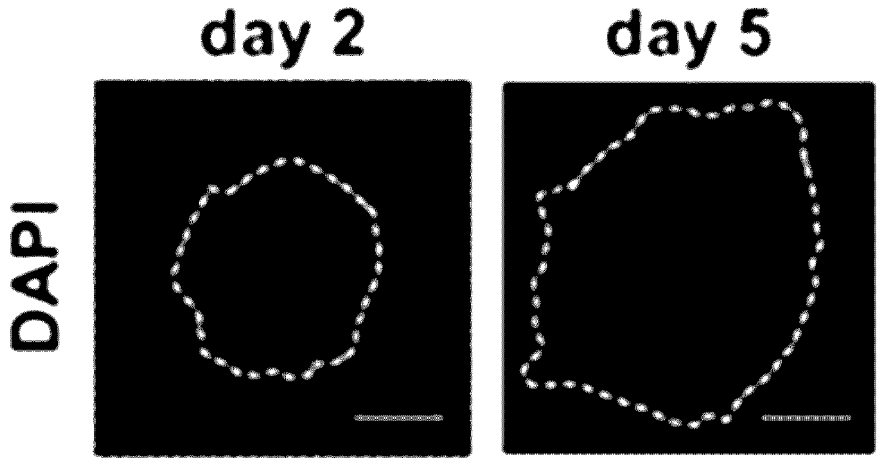
[도2c]


C
PLURIPOTENCY
ECTODERM
MESODERM
ENDODERM
OCT4
OTX2
MESP1
CXCR4
NANOG
ZIC1
T
AFP
Fold change
day

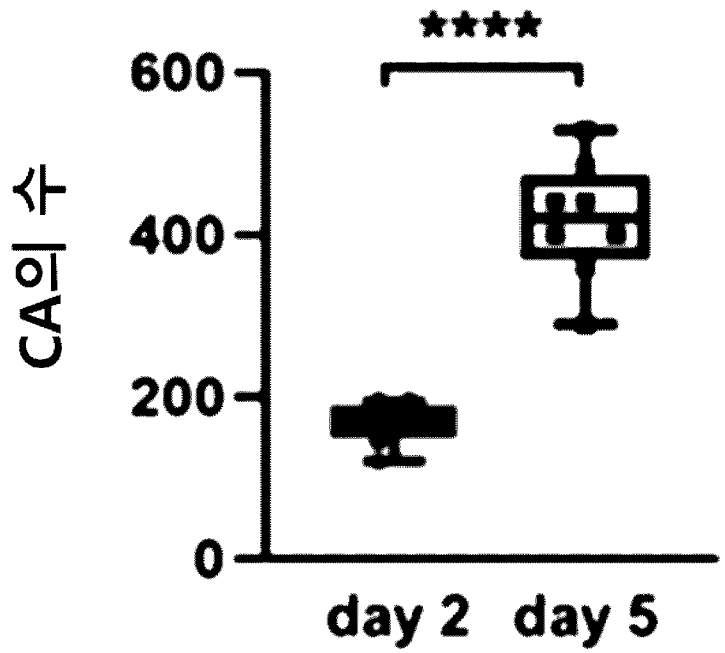
[도2d]


day 2
day 5
Ectoderm
Mesoderm
Endoderm
NESTIN
Merged
VEGFR2
FOXA2

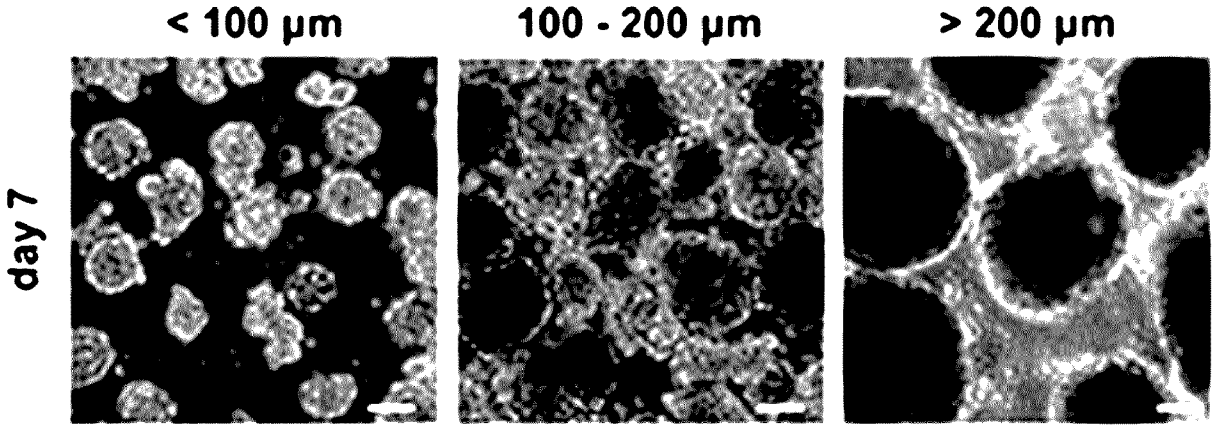
[도2e]


day 2
day 5
DAPI

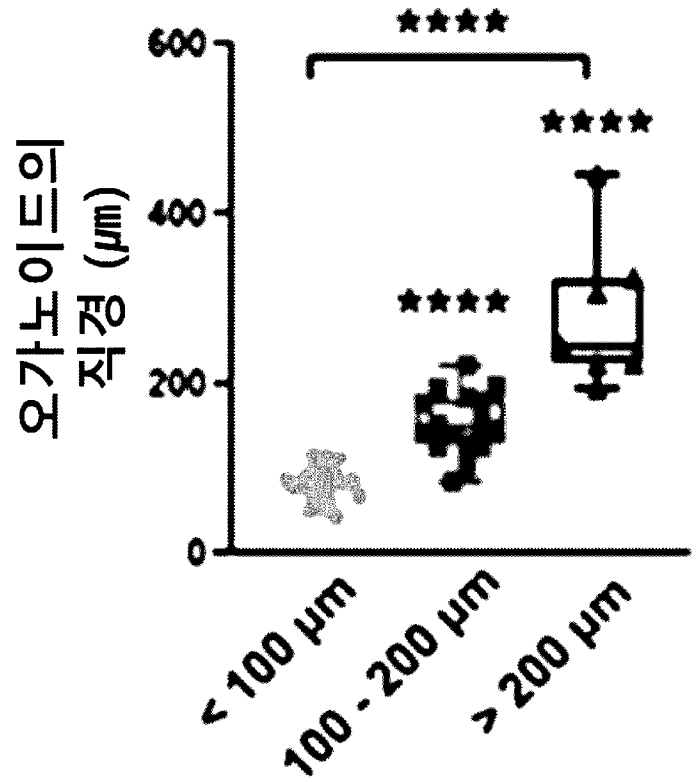
[도2f]



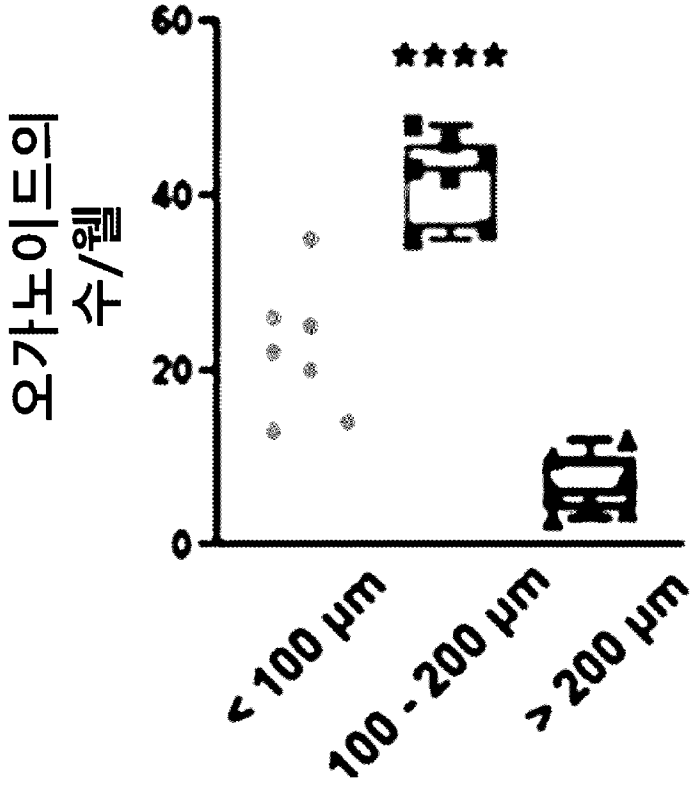
[도3a]



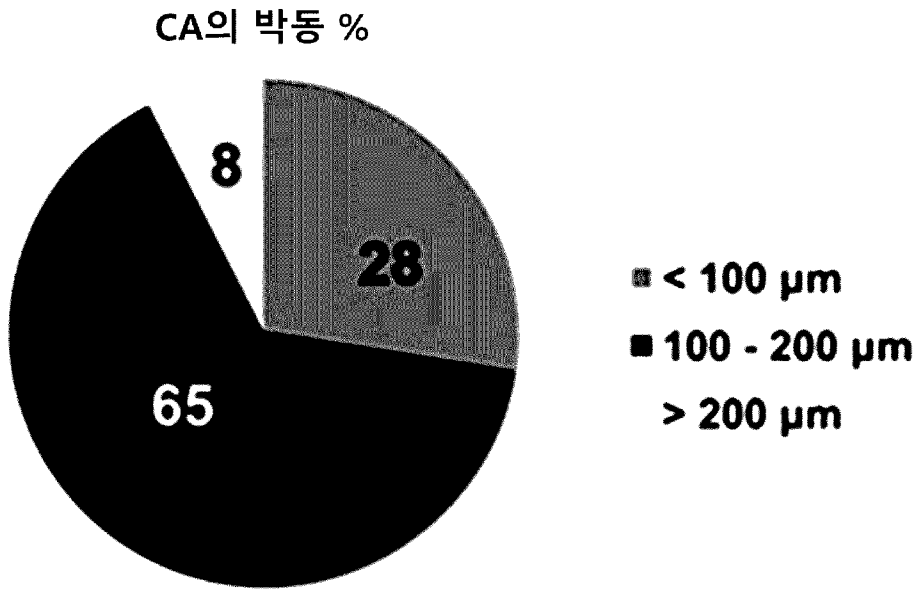
[도3b]


오가노이드의 직경 (μm)
600
400
200
0
****
****
****
< 100 μm
100 - 200 μm
> 200 μm

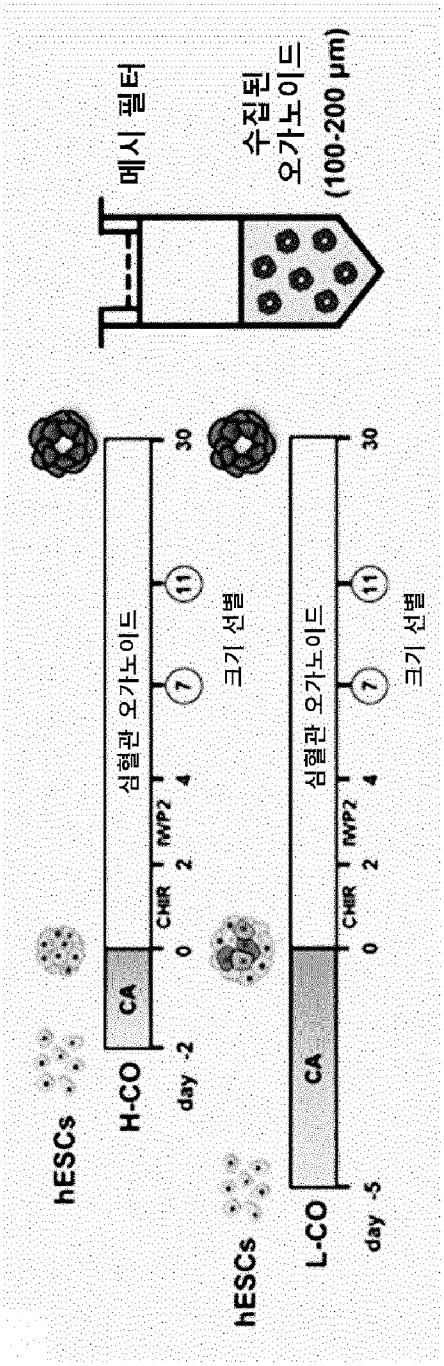
[도3c]


오가노이드의 수/웰
60
40
20
0
****
< 100 μm
100 - 200 μm
> 200 μm

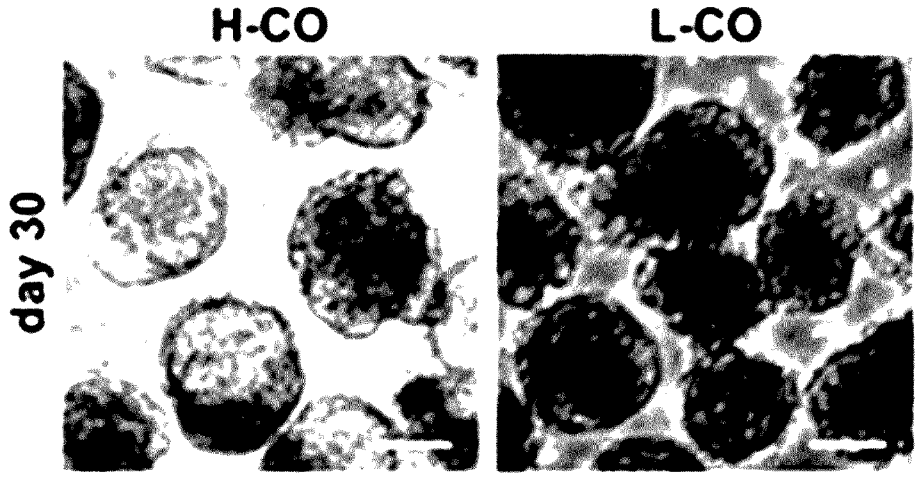
[도3d]



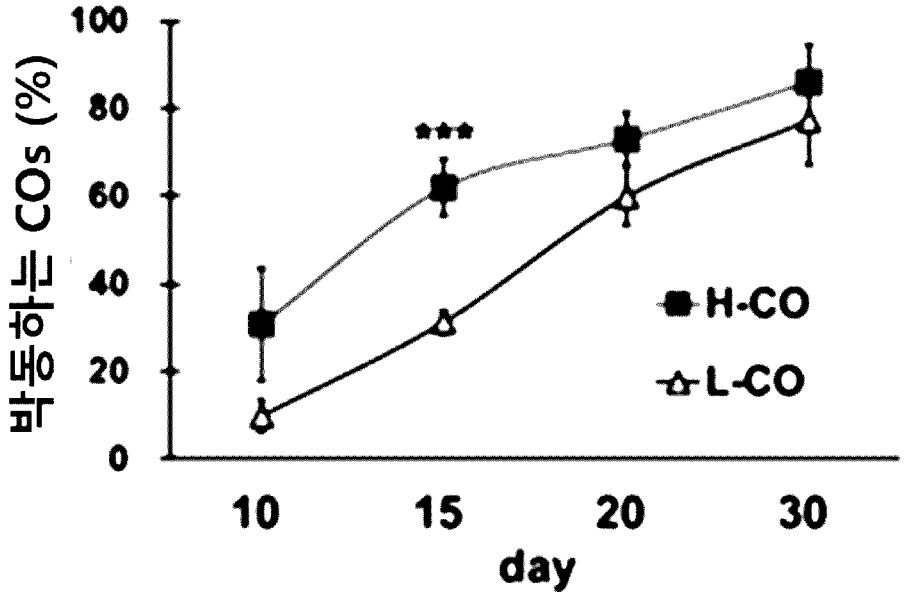
[도4a]


메시 필터
수집된
오가노이드
(100-200 μm)
hESCs
H-CO
CA
day -2
0
CHIR
2
IWP2
4
7
11
30
심혈관 오가노이드
크기 선별
hESCs
L-CO
CA
day -5
0
CHIR
2
IWP2
4
7
11
30
심혈관 오가노이드
크기 선별

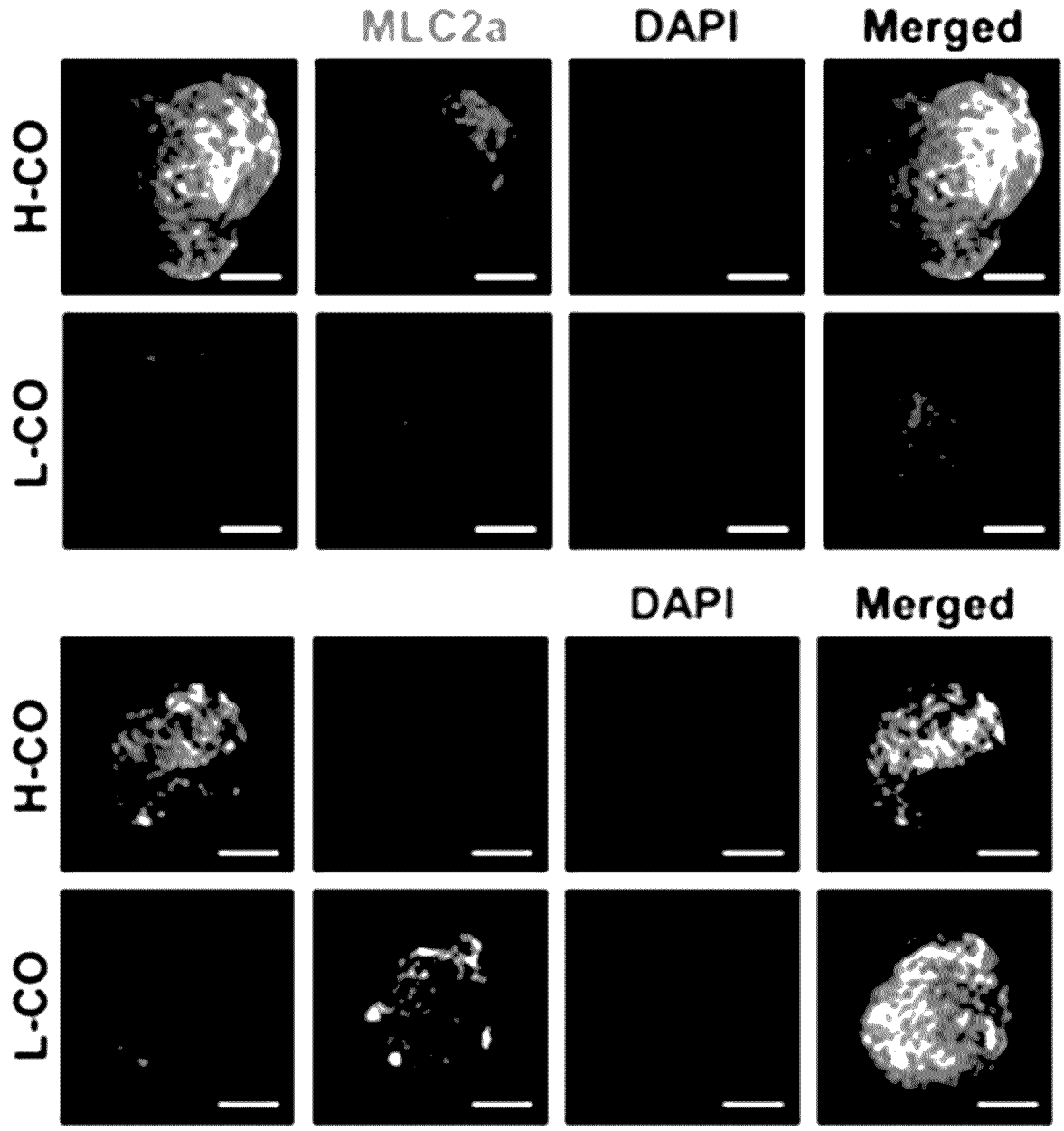
[도4b]


H-CO
L-CO
day 30

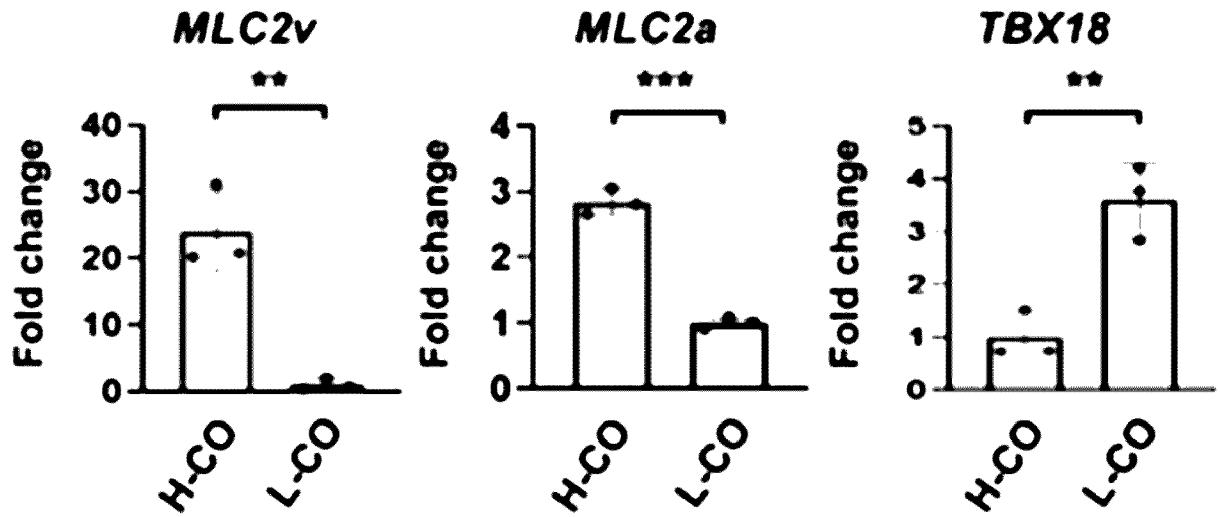
[도4c]



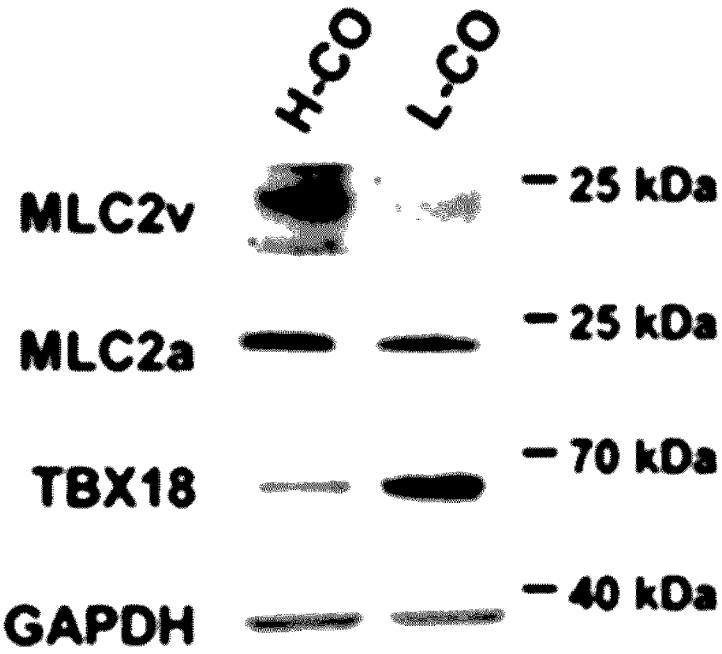
[도4d]


MLC2a
DAPI
Merged
H-CO
L-CO
DAPI
Merged
H-CO
L-CO

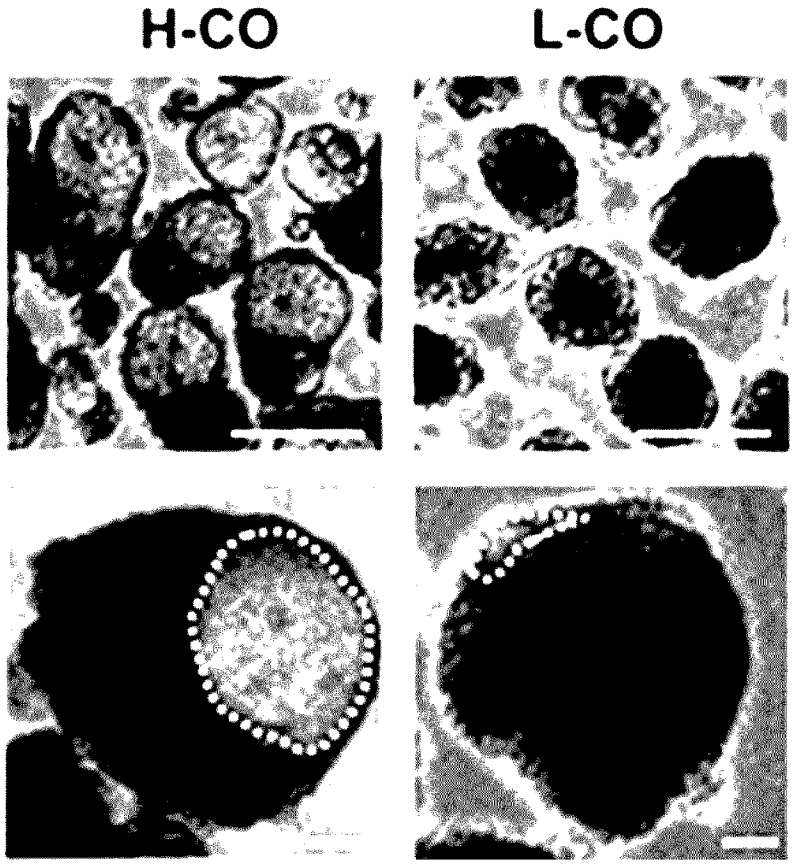
[도4e]


MLC2v
**
Fold change
40
30
20
10
0
H-CO
L-CO
MLC2a
***
Fold change
4
3
2
1
0
H-CO
L-CO
TBX18
**
Fold change
5
4
3
2
1
0
H-CO
L-CO

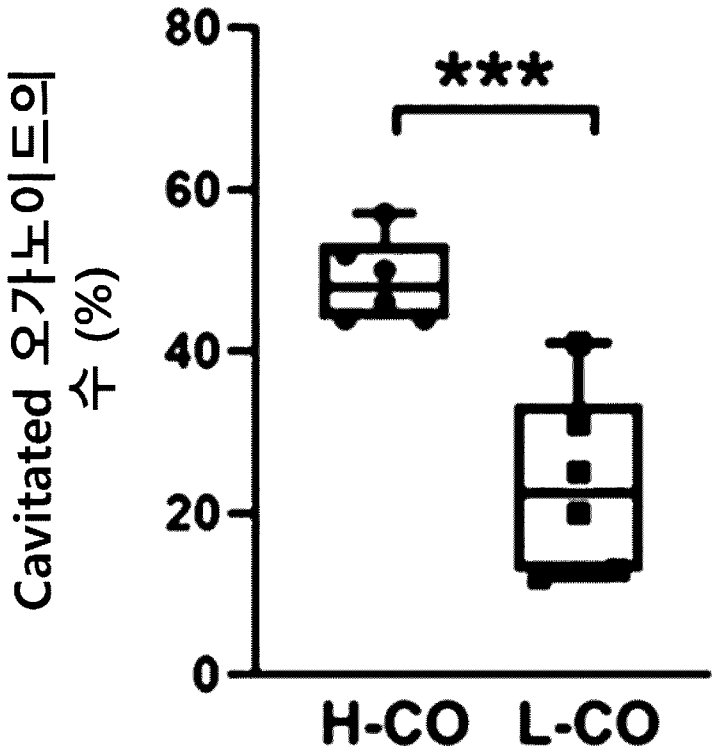
[도4f]


H-CO
L-CO
MLC2v
25 kDa
MLC2a
25 kDa
TBX18
70 kDa
GAPDH
40 kDa

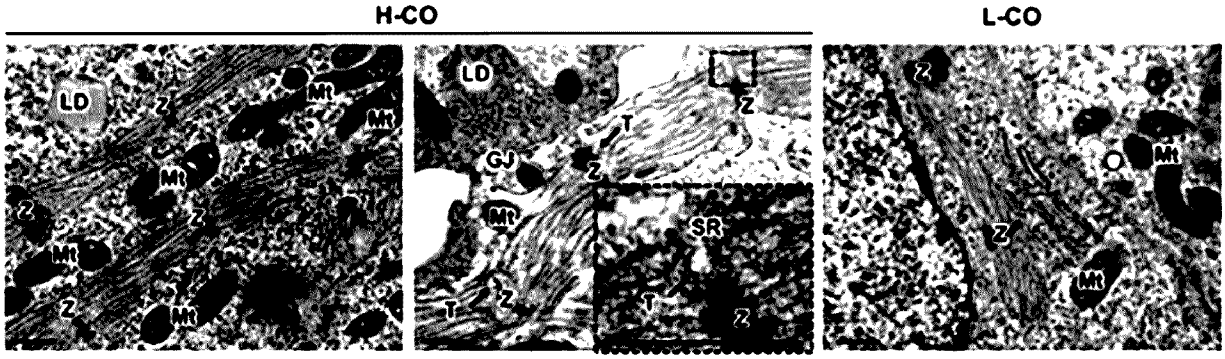
[도5a]


H-CO
L-CO

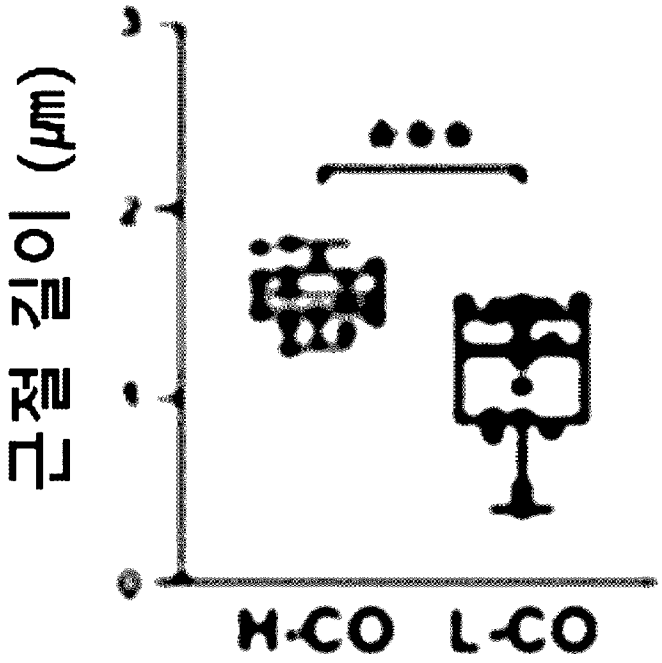
[도5b]



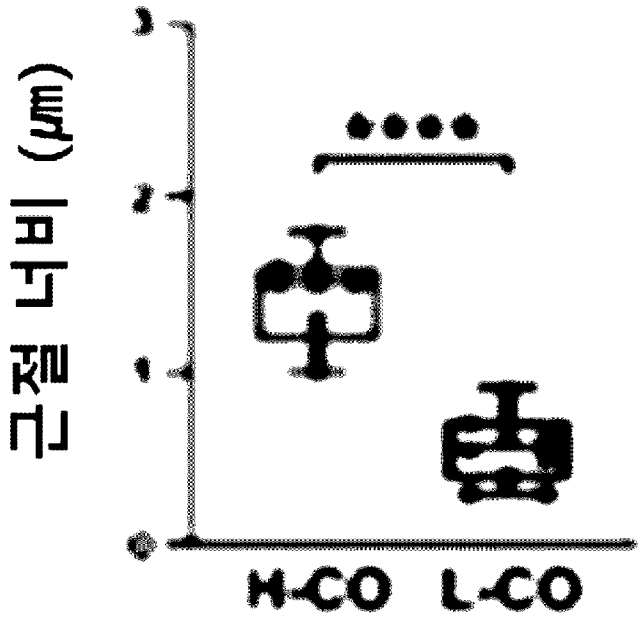
[도6a]



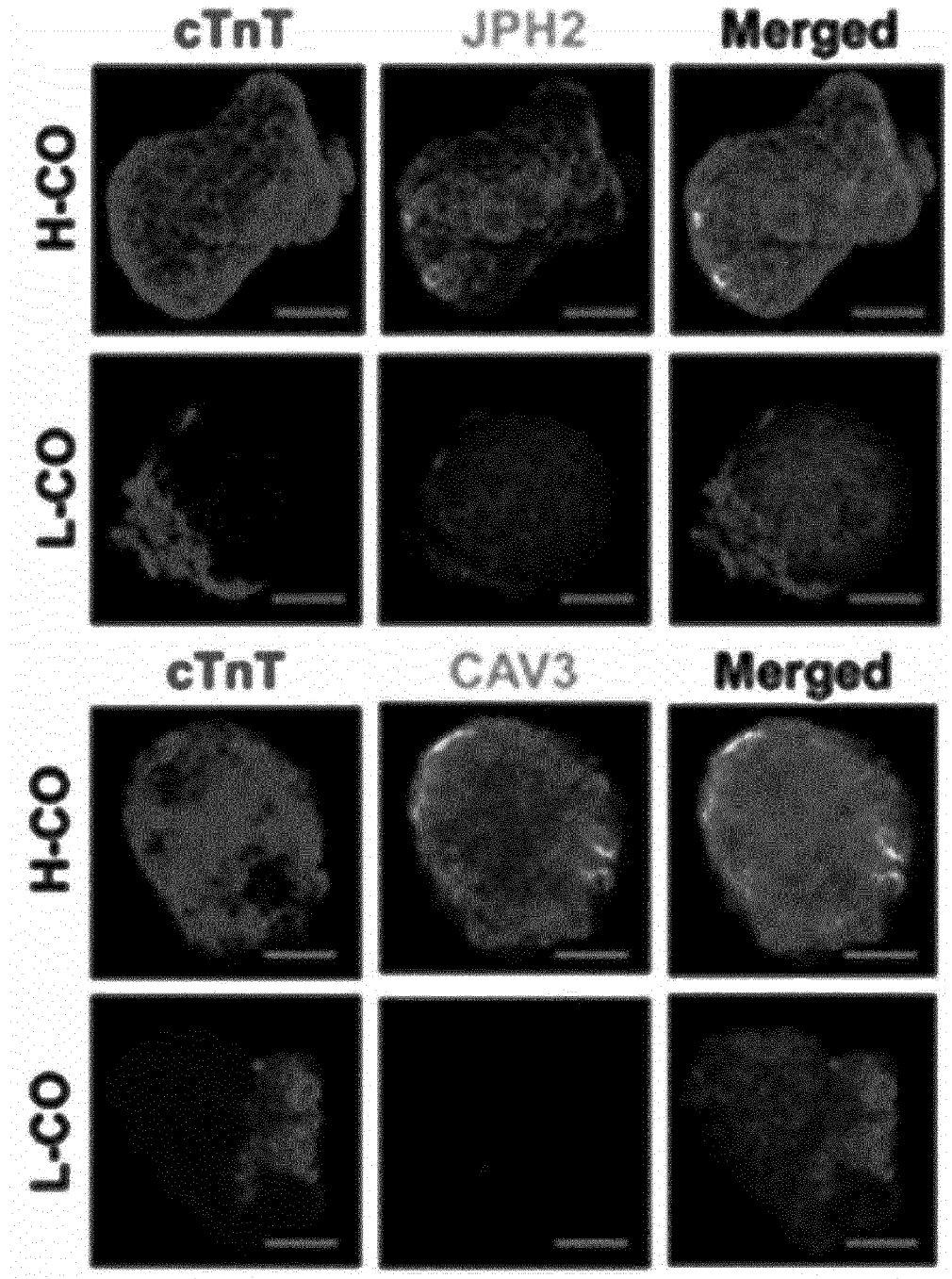
[도6b]



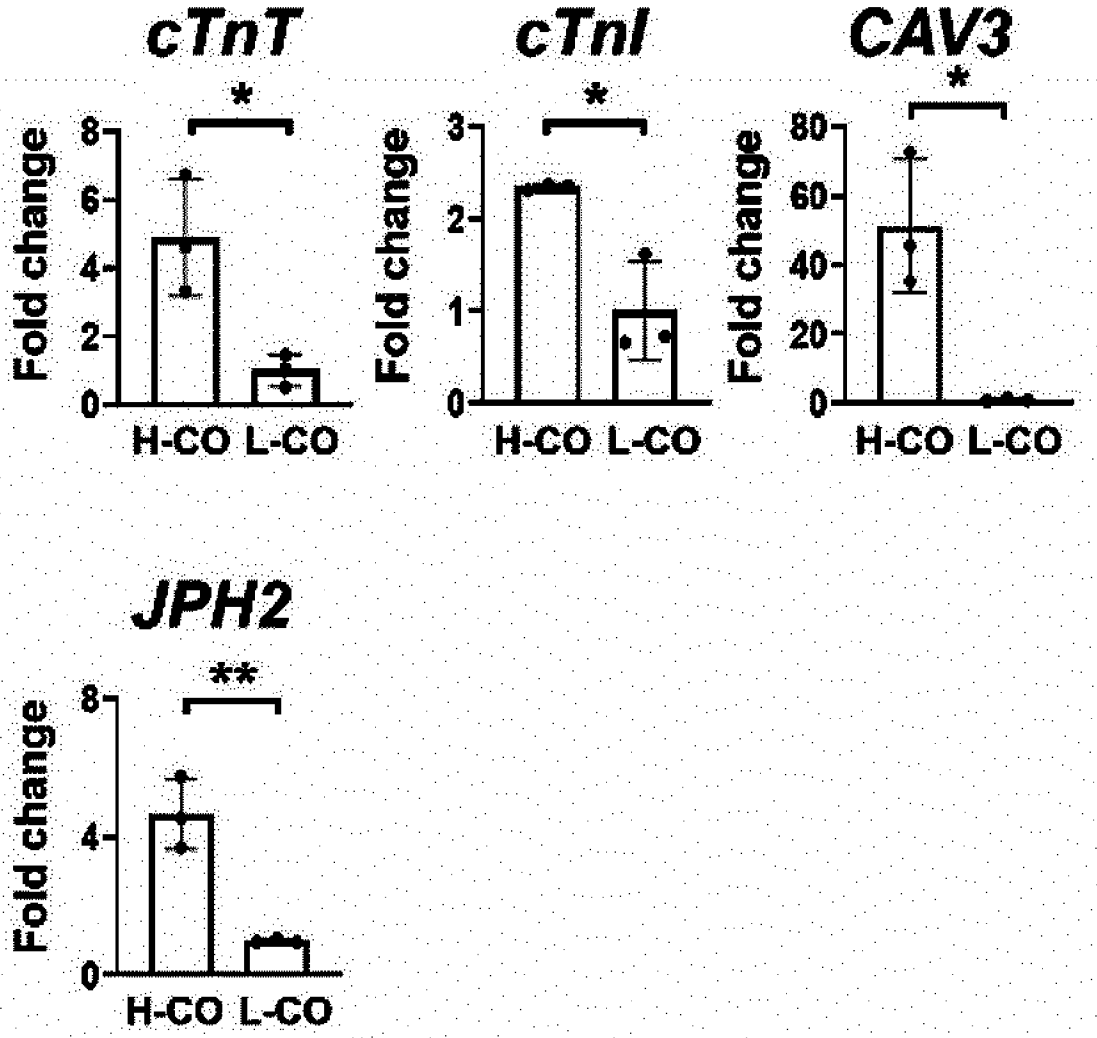
[도6c]



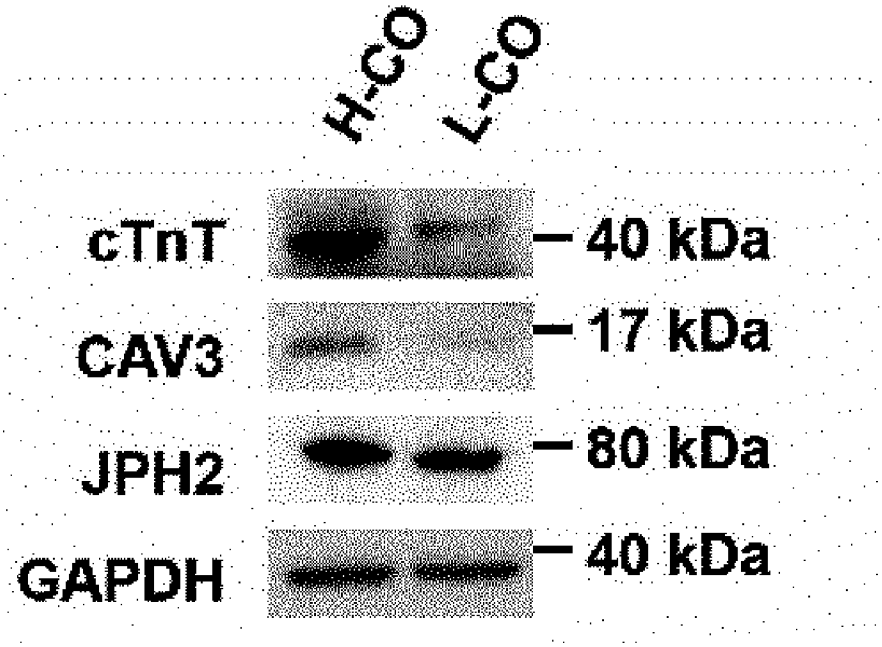
[도6d]



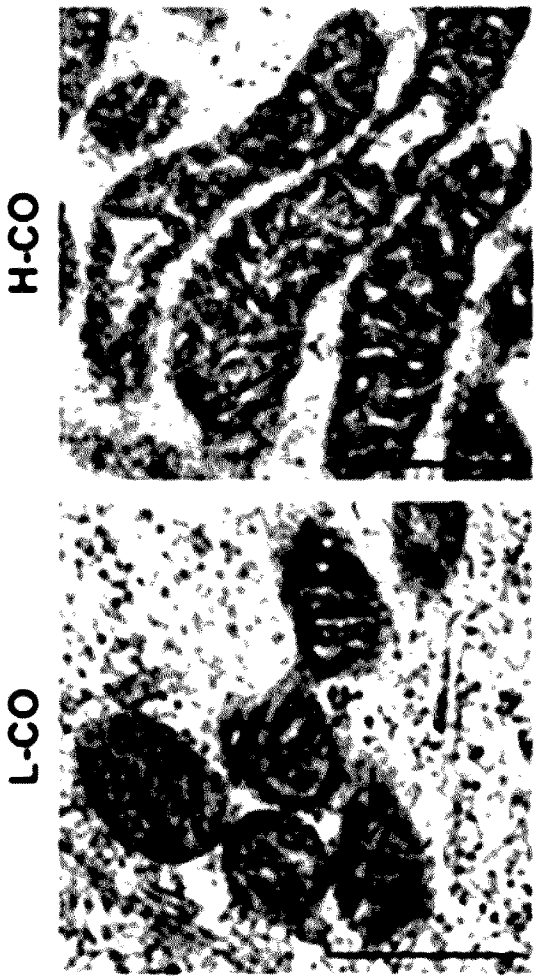
[도6e]


cTnT
cTnI
CAV3
JPH2
Fold change
H-CO
L-CO
*
**

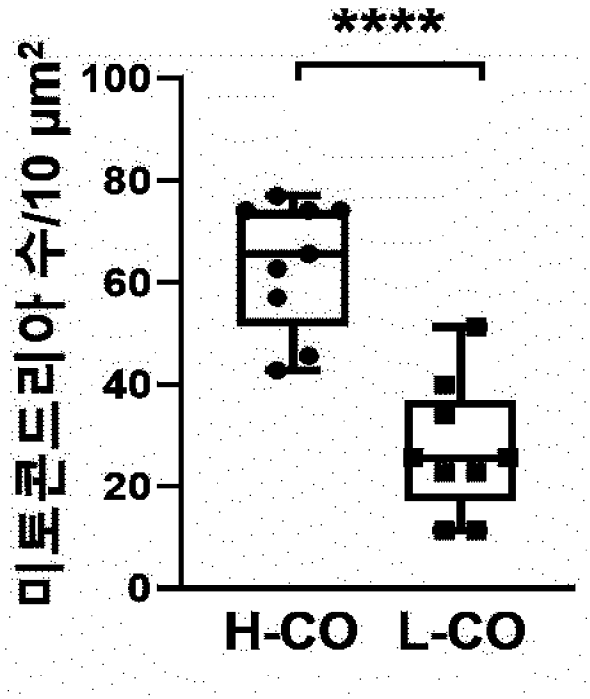
[도6f]


H-CO
L-CO
cTnT
CAV3
JPH2
GAPDH
40 kDa
17 kDa
80 kDa
40 kDa

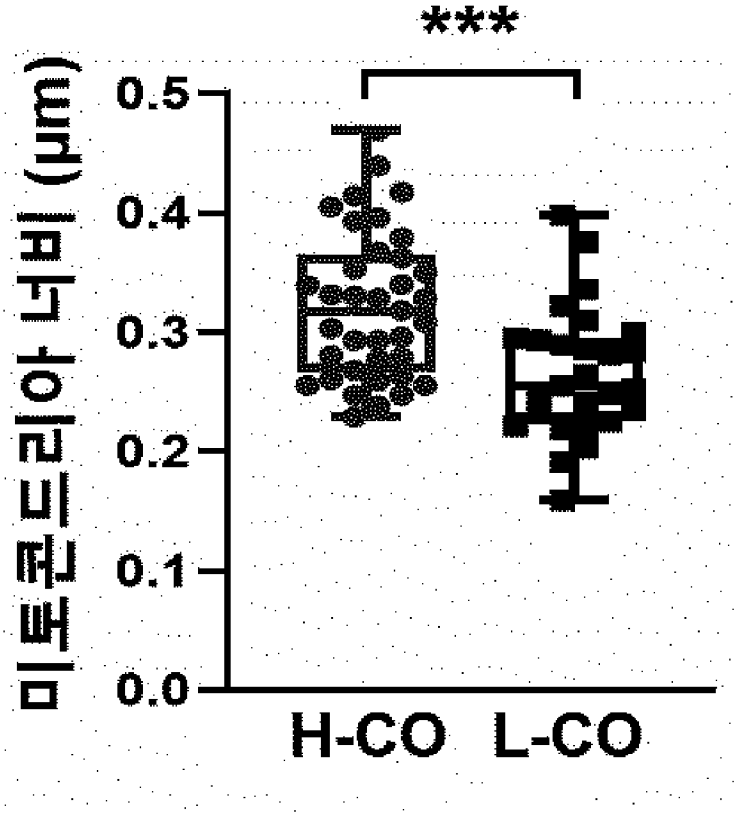
[도6g]



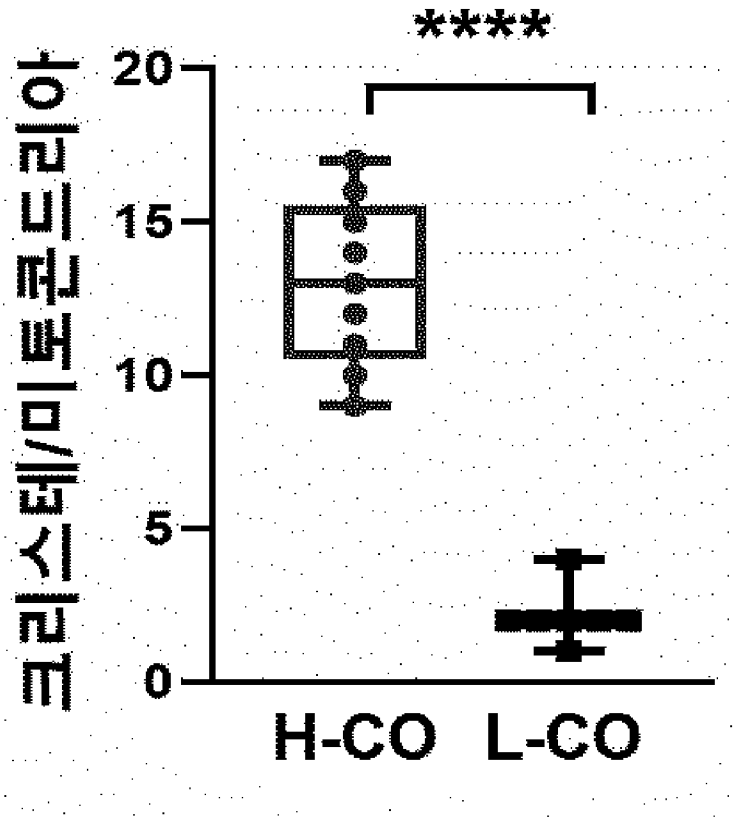
[도6h]



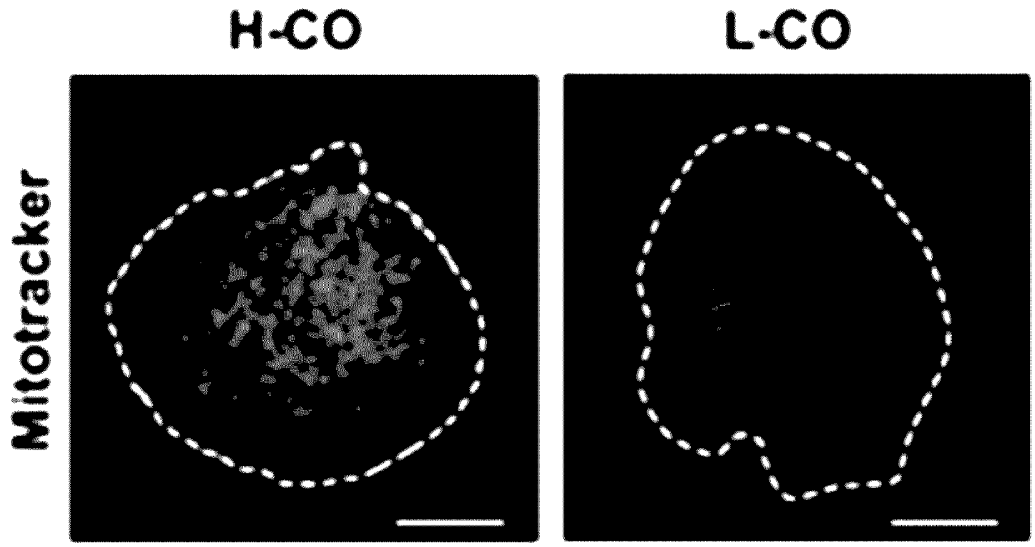
[도6i]


***
미토콘드리아 너비 (μm)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
H-CO
L-CO

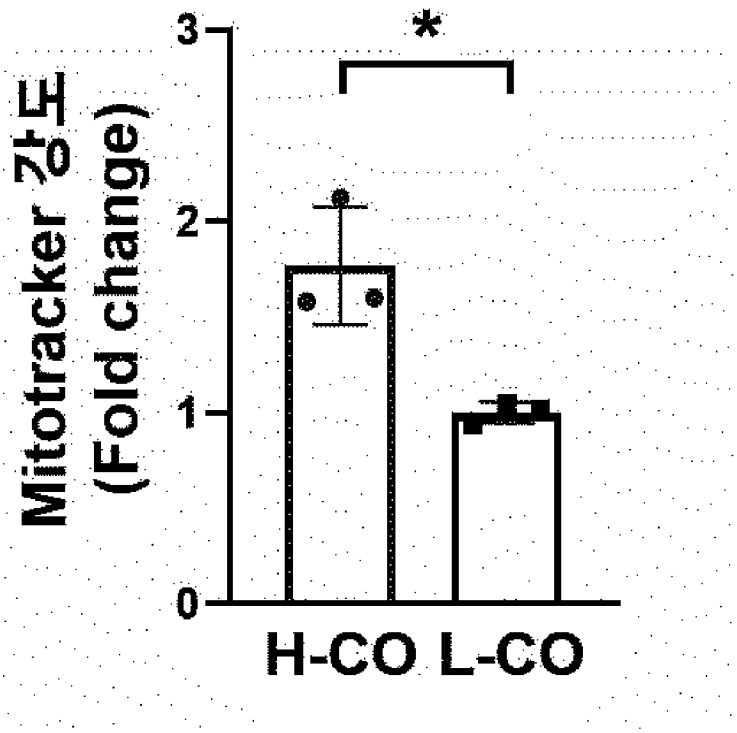
[도6j]


****
크리스테/미토콘드리아
20
15
10
5
0
H-CO
L-CO

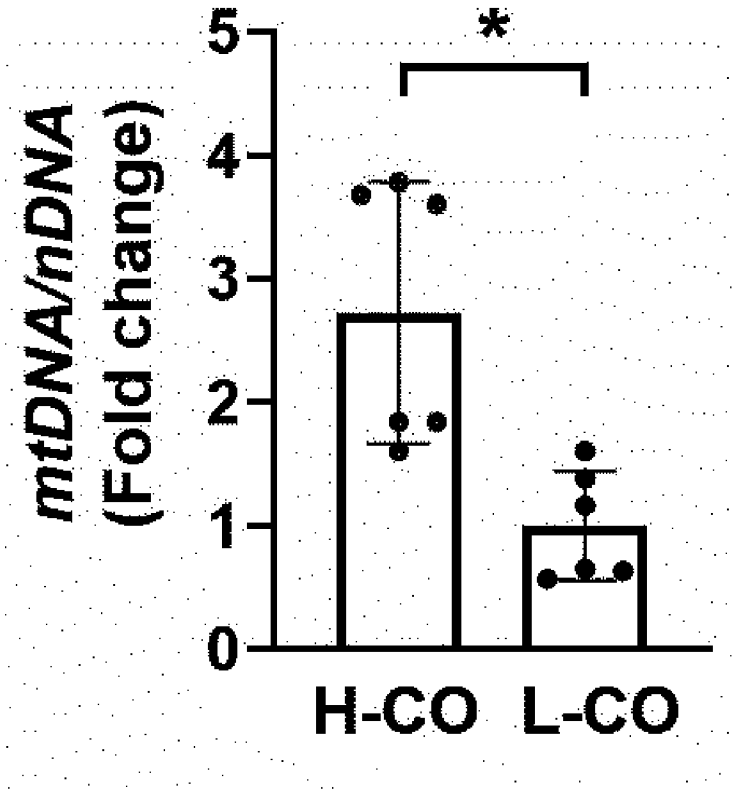
[도6k]


H-CO
L-CO
Mitotracker

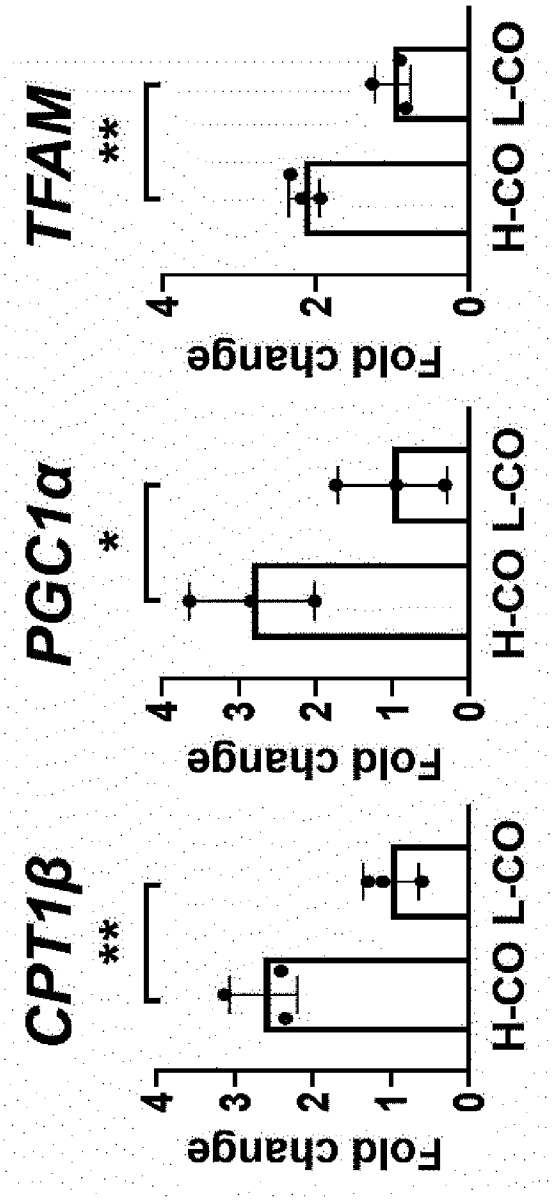
[도6l]


*
3
2
1
0
Mitotracker 강도
(Fold change)
H-CO L-CO

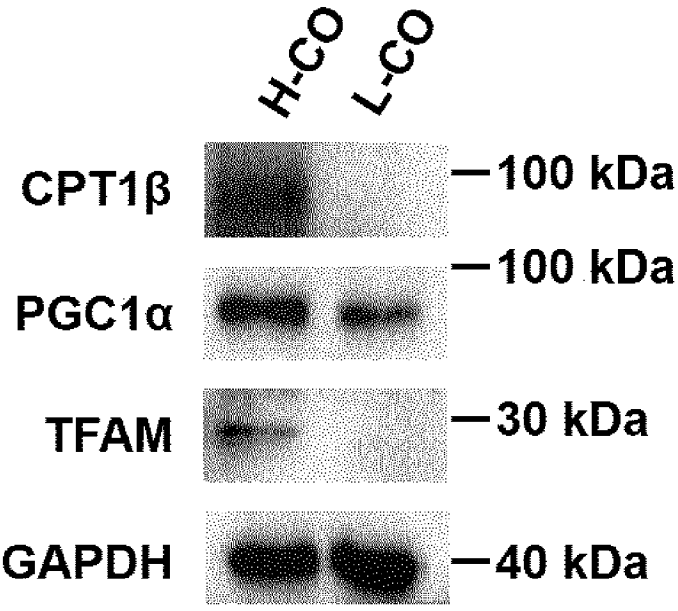
[도6m]



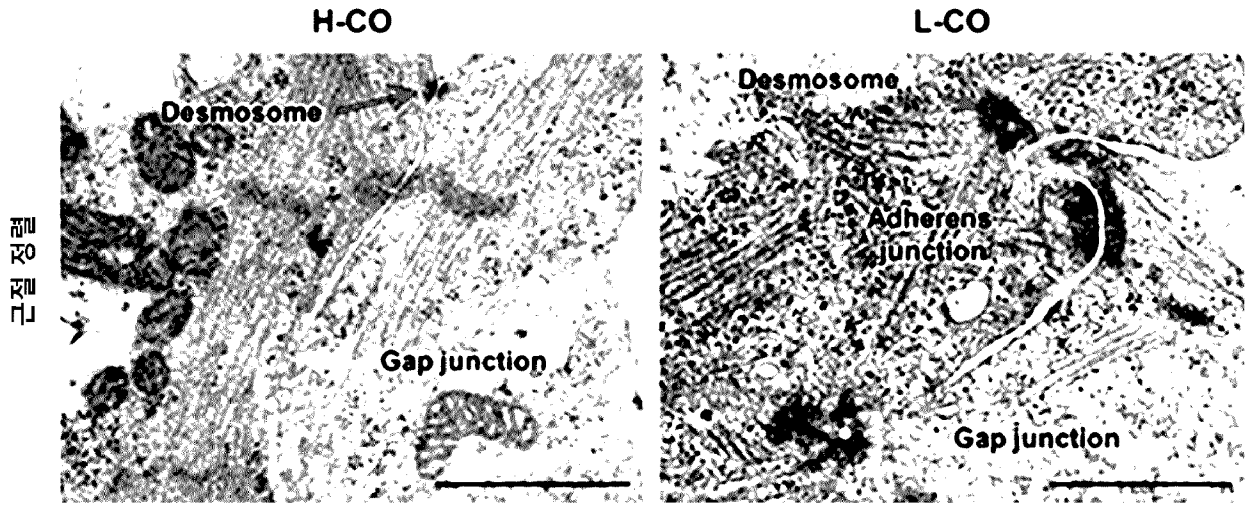
[도6n]


TFAM
**
Fold change
0
2
4
H-CO L-CO
PGC1α
*
Fold change
0
1
2
3
4
H-CO L-CO
CPT1β
**
Fold change
0
1
2
3
4
H-CO L-CO

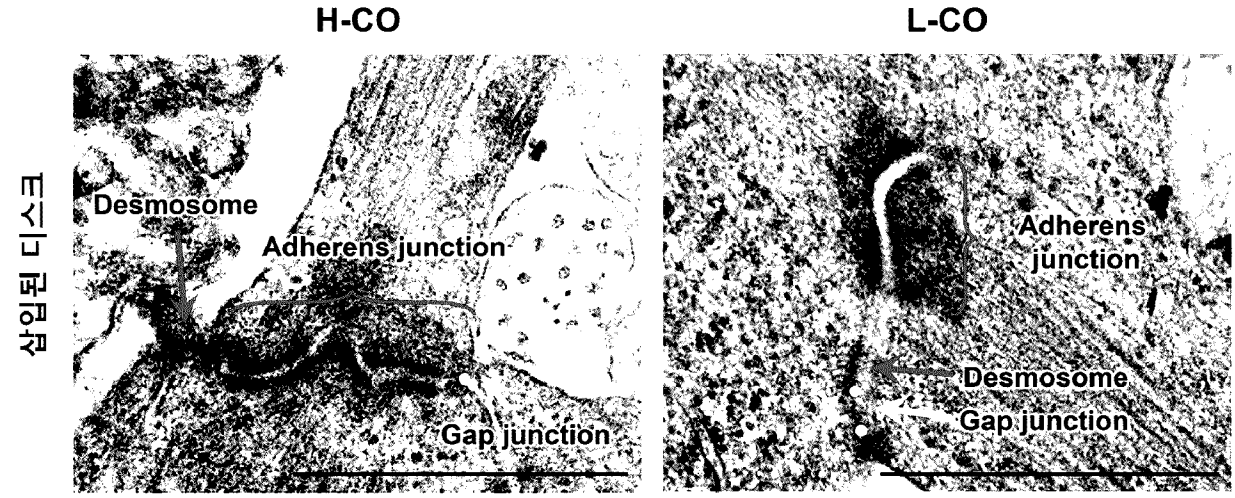
[도6o]


H-CO
L-CO
CPT1β
100 kDa
PGC1α
100 kDa
TFAM
30 kDa
GAPDH
40 kDa

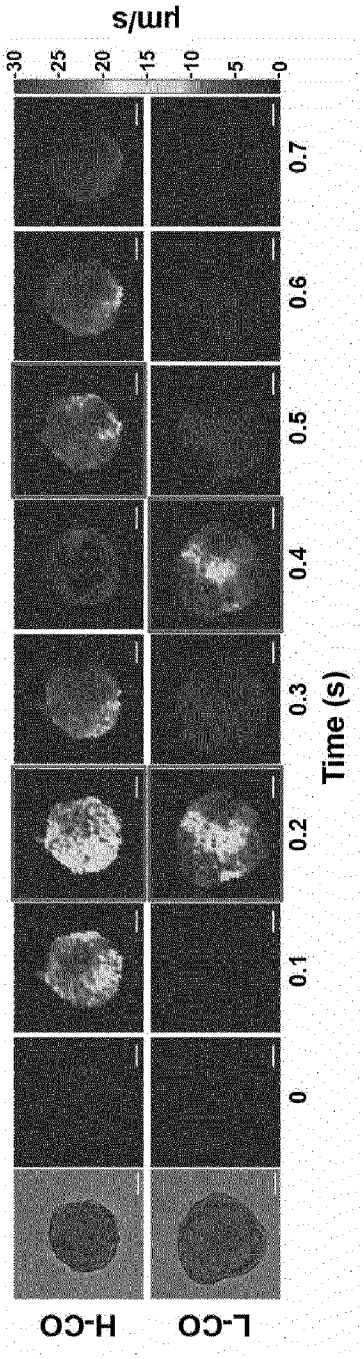
[도7]


H-CO
L-CO
근절 정렬
Desmosome
Gap junction
Desmosome
Adherens junction
Gap junction

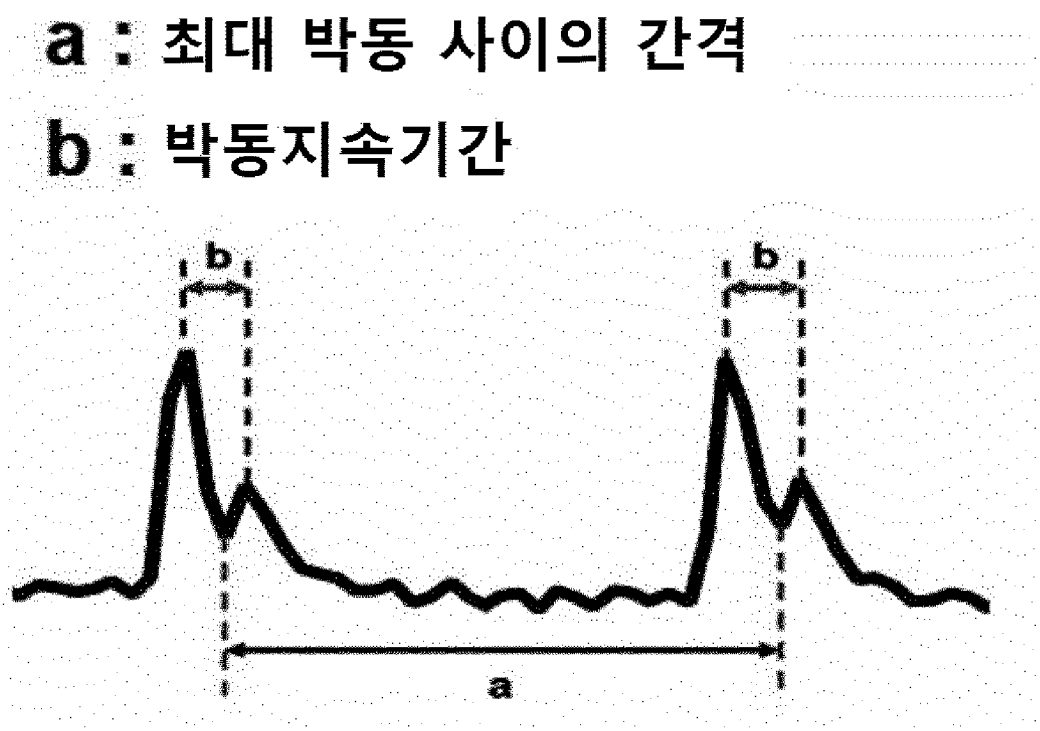
[도8]


H-CO
L-CO
삽입된 디스크
Desmosome
Adherens junction
Gap junction
Adherens junction
Desmosome
Gap junction

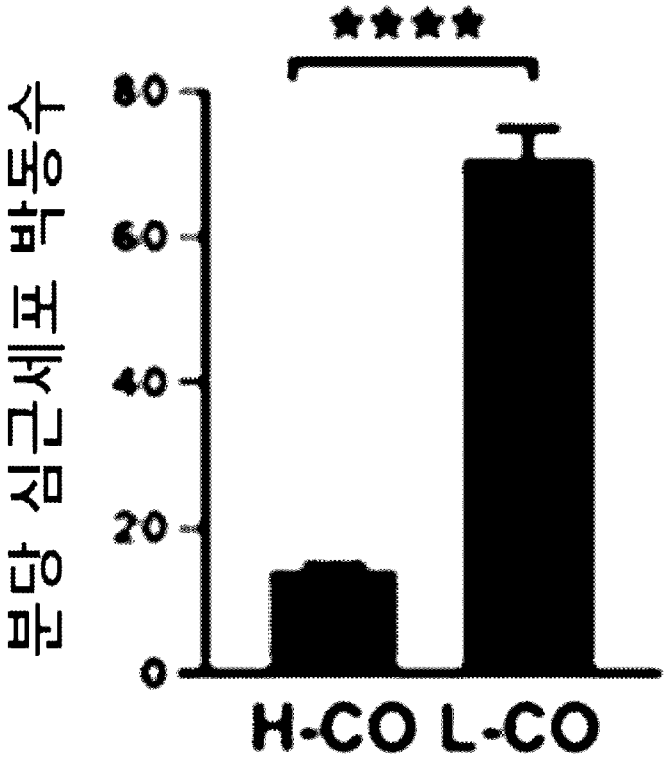
[도9a]



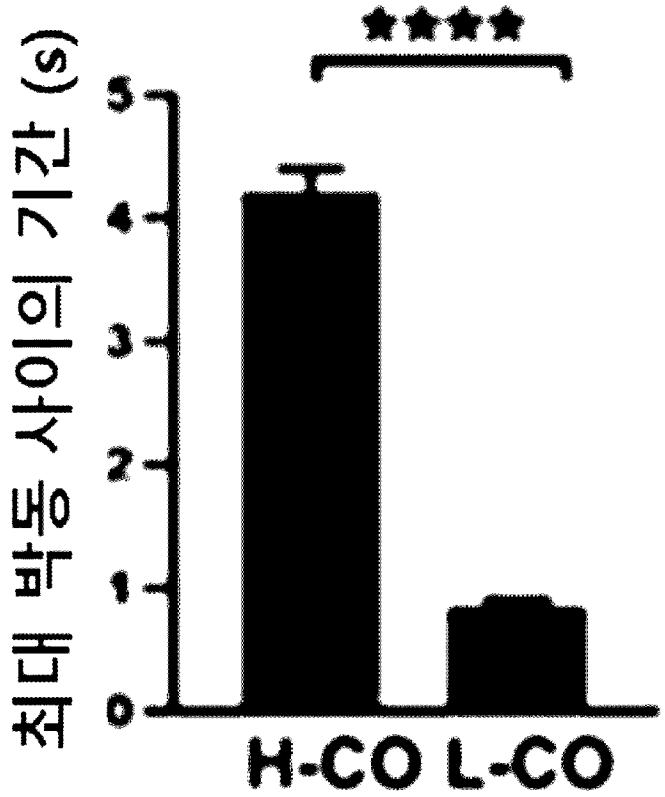
[도9b]



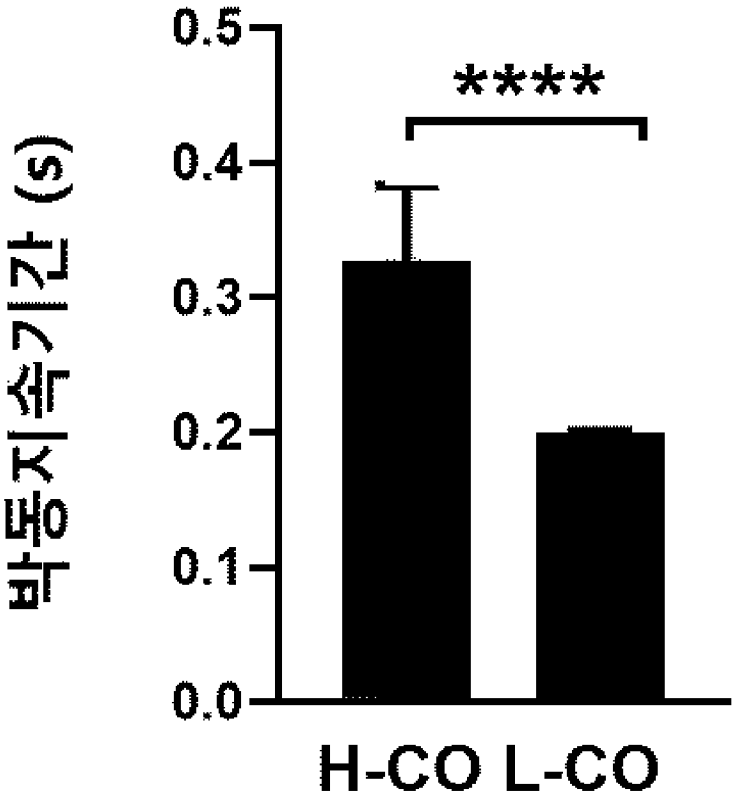
[도9c]



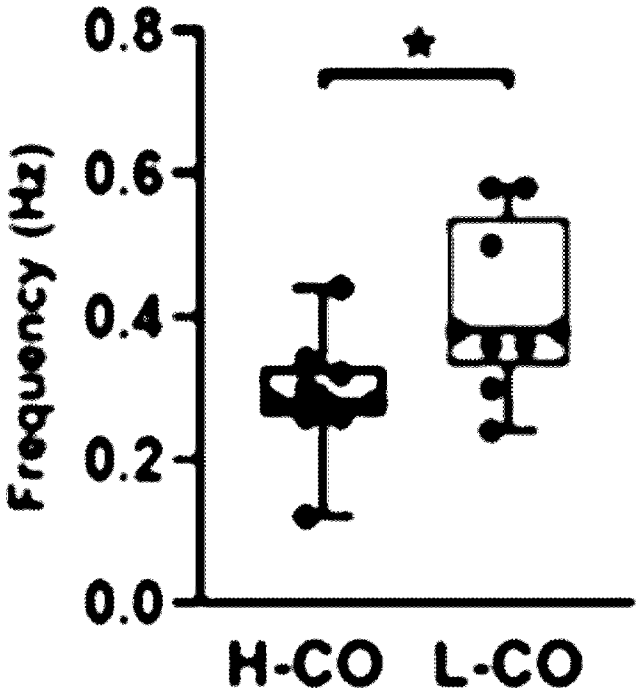
[도9d]



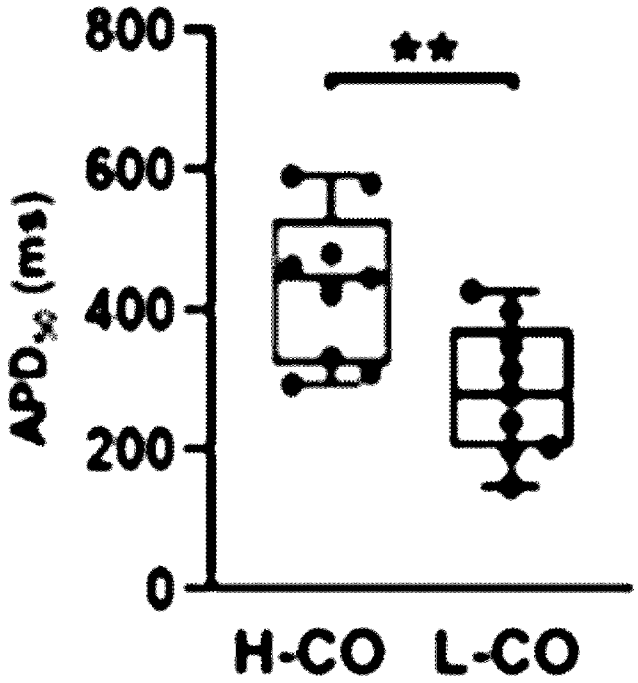
[도9e]



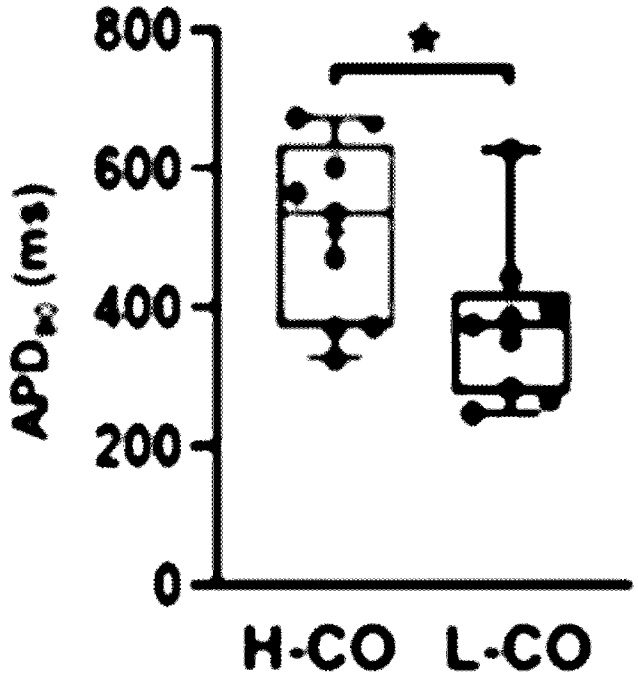
[도9f]


0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Frequency (Hz)
*
H-CO
L-CO

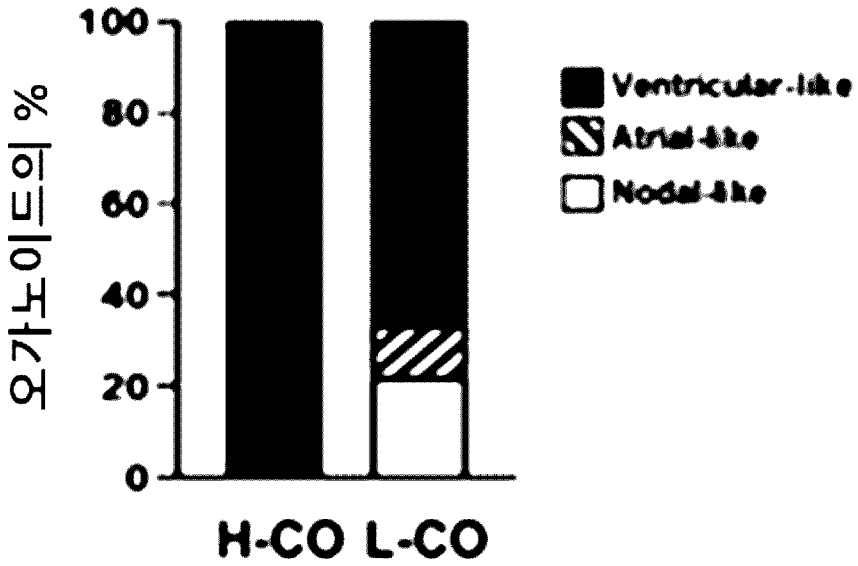
[도9g]


800
600
400
200
0
APD90 (ms)
**
H-CO
L-CO

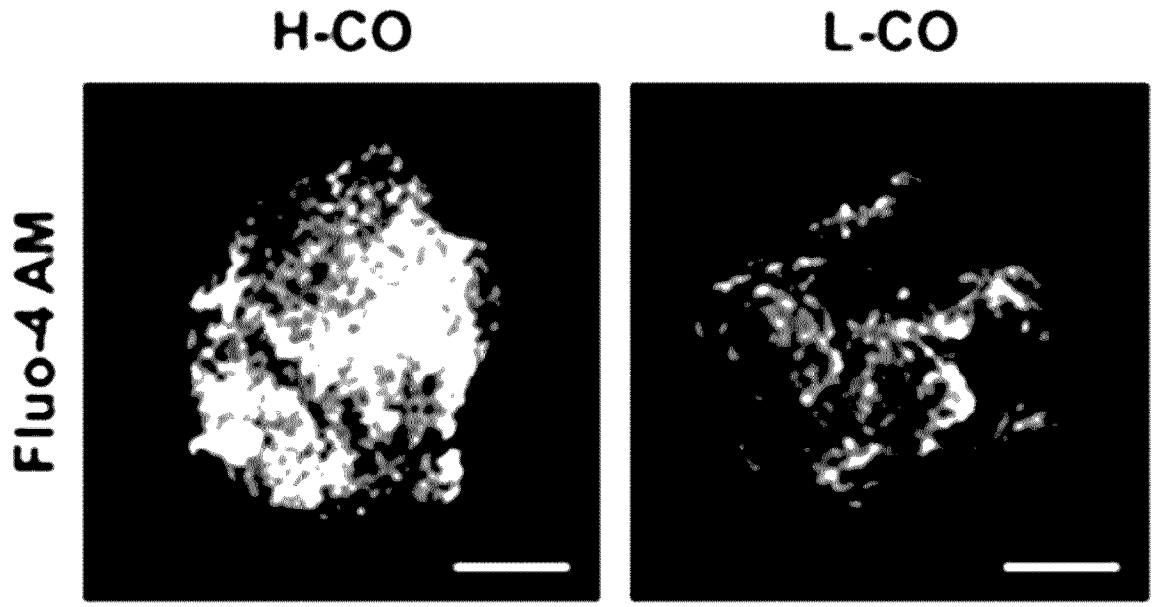
[도9h]



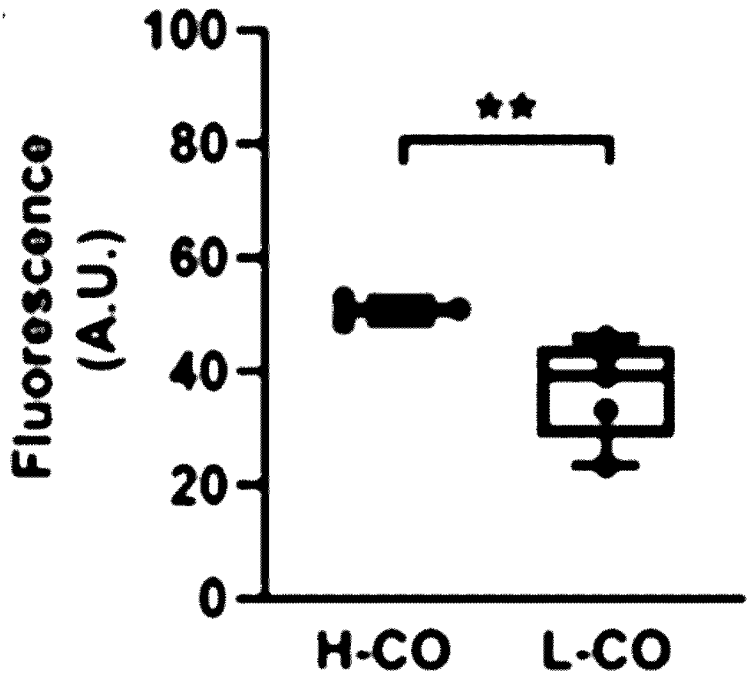
[도9i]



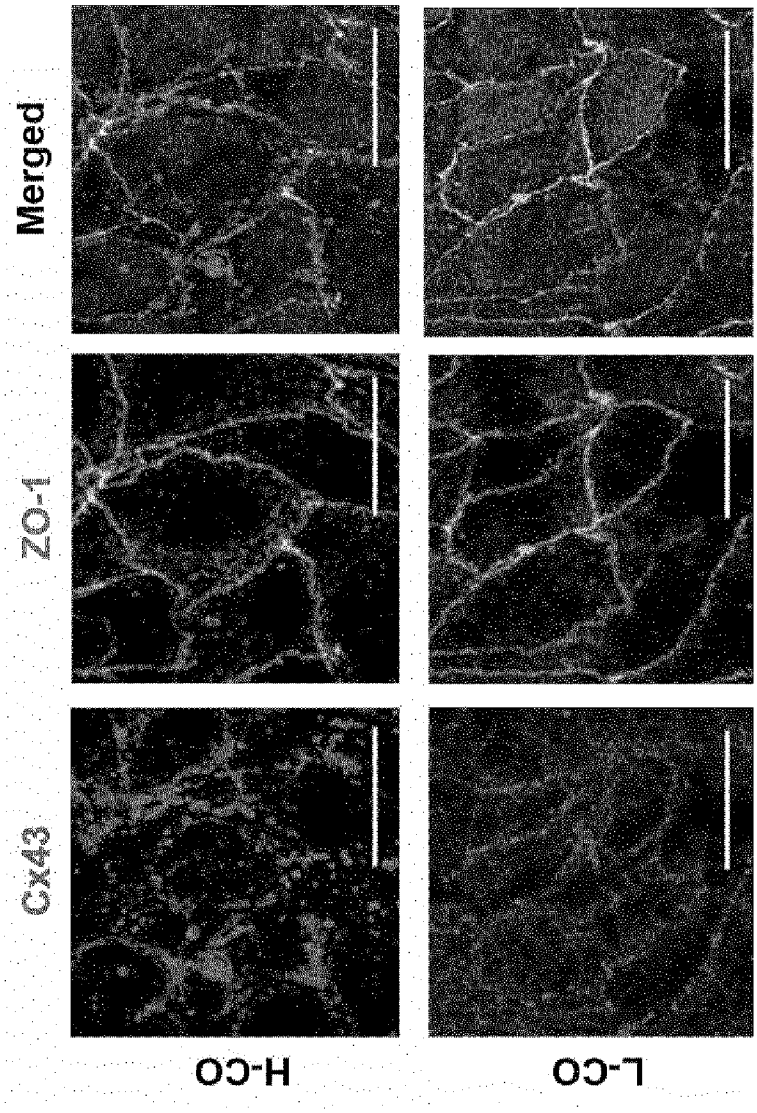
[도9j]



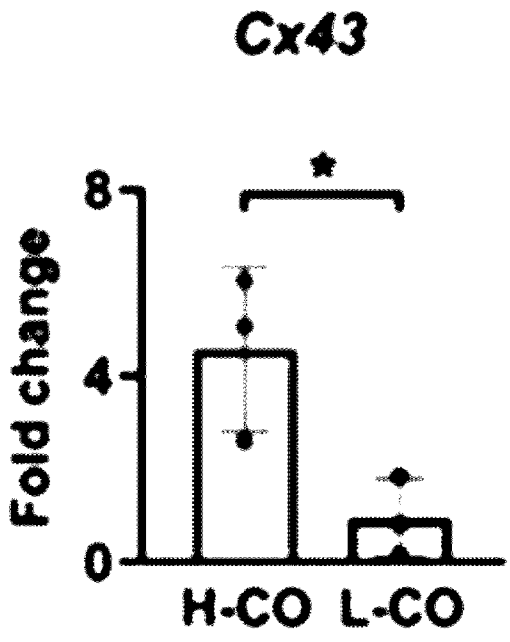
[도9k]



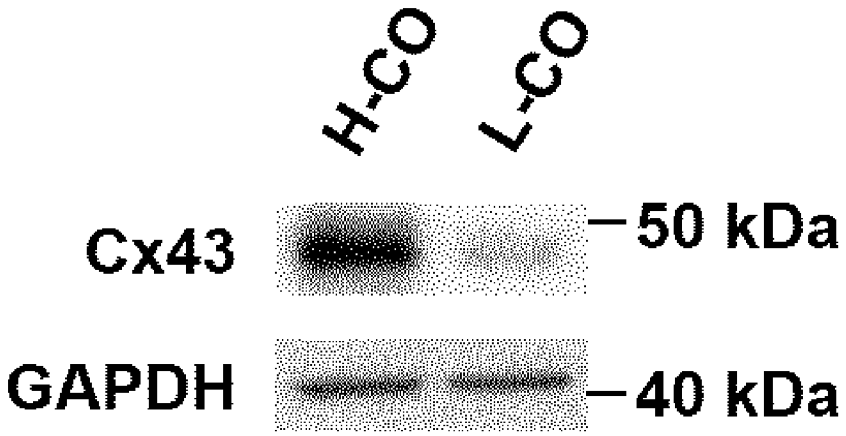
[도9l]



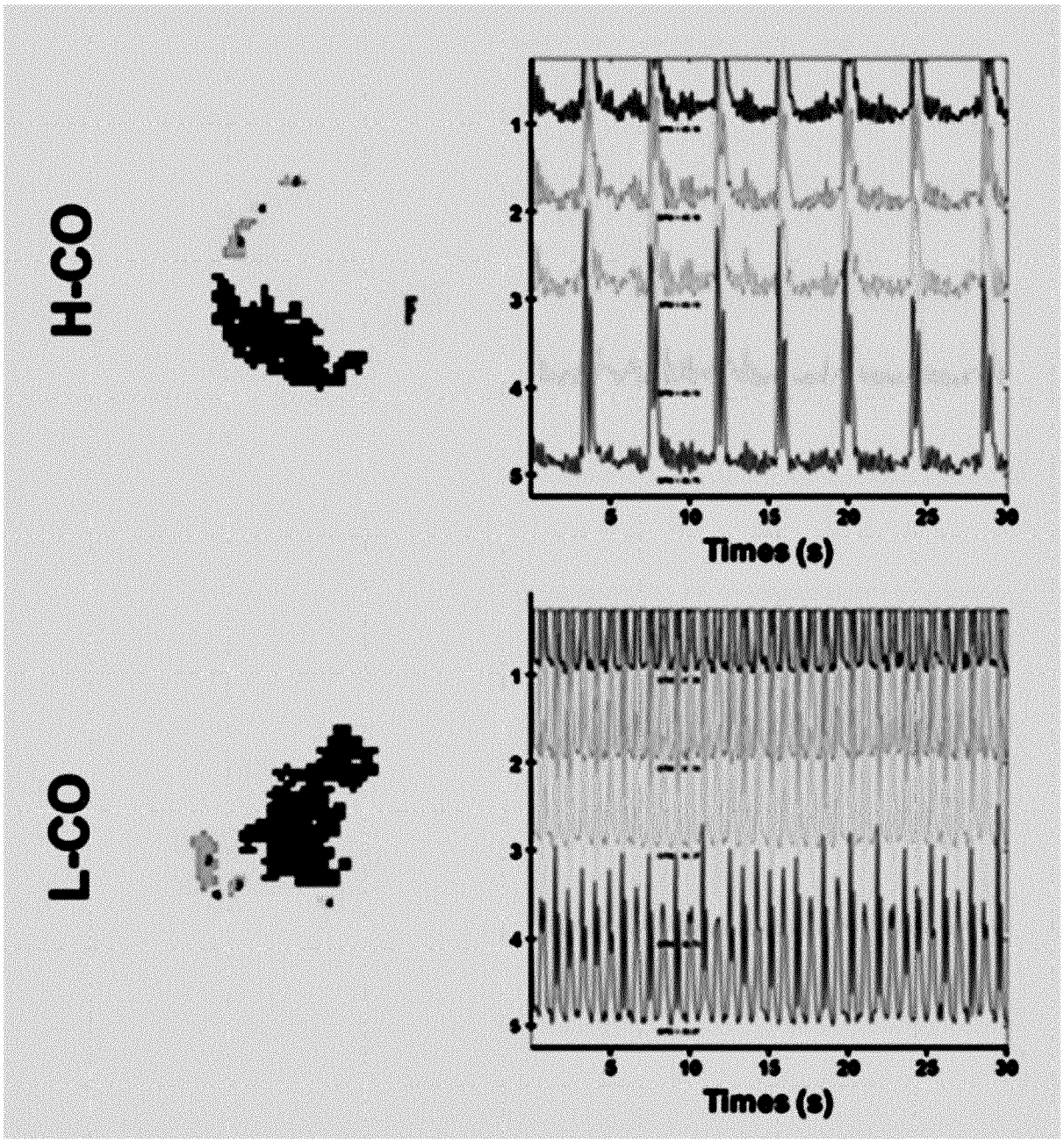
[도9m]



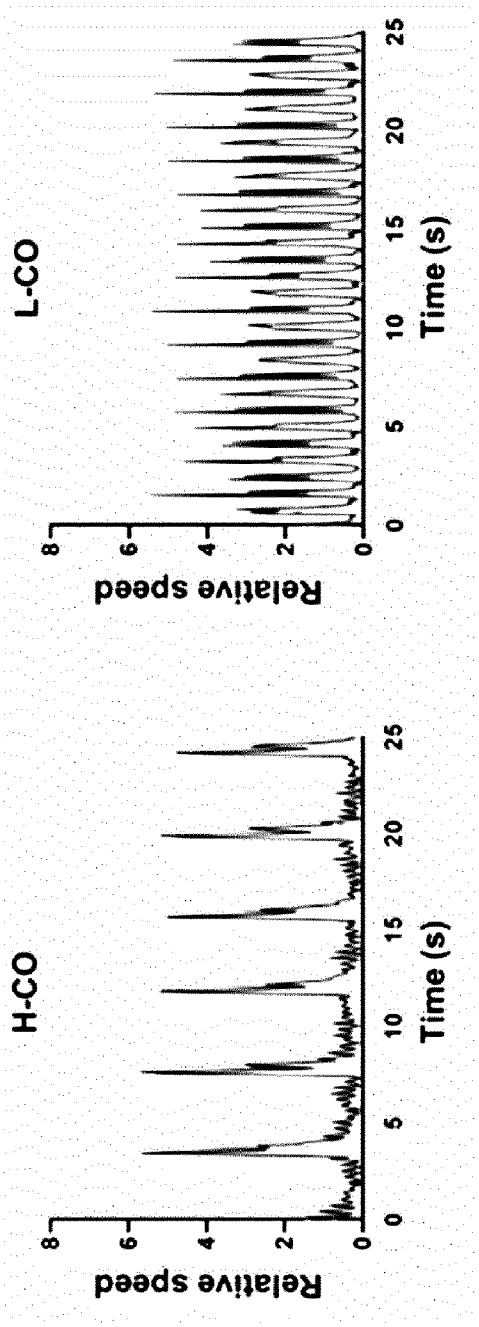
[도9n]



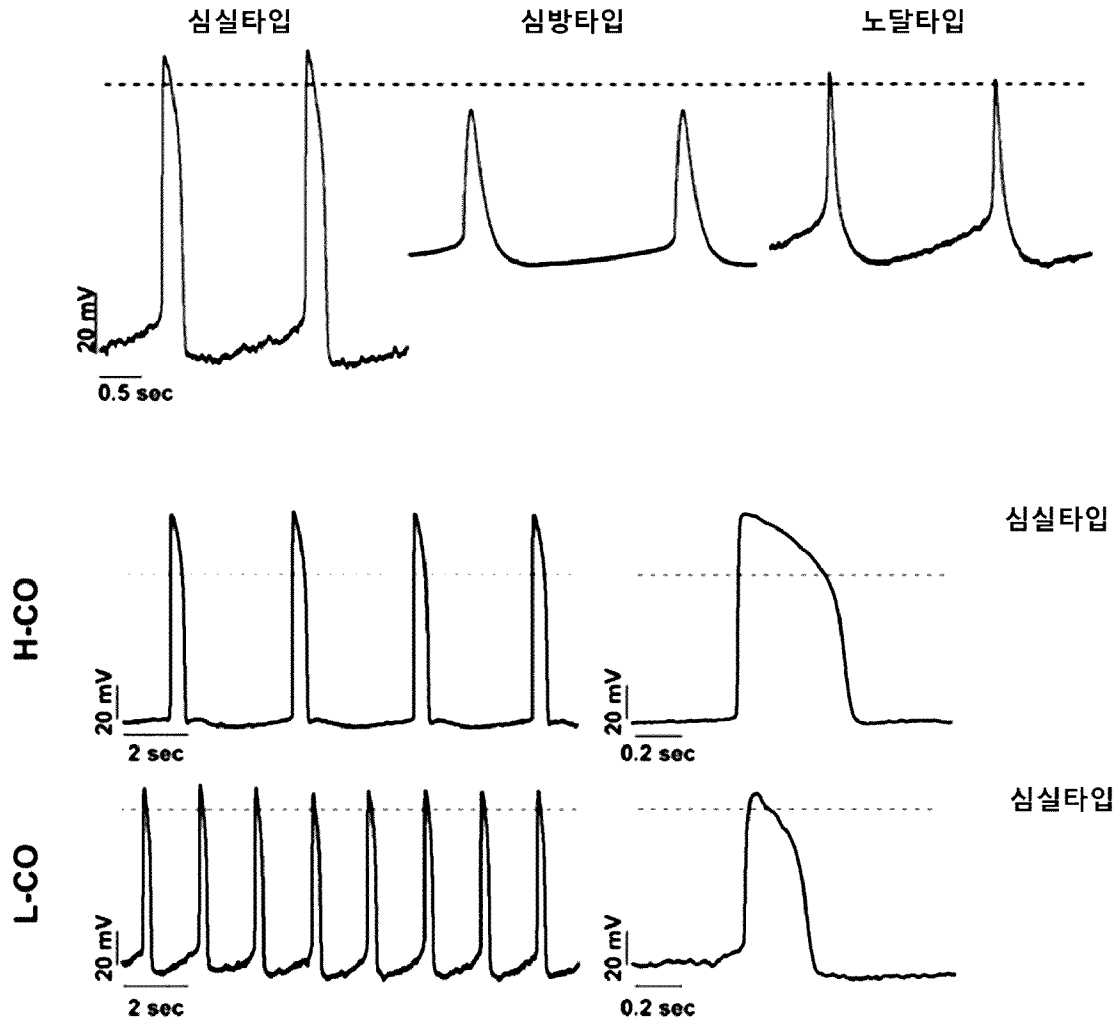
[도10]



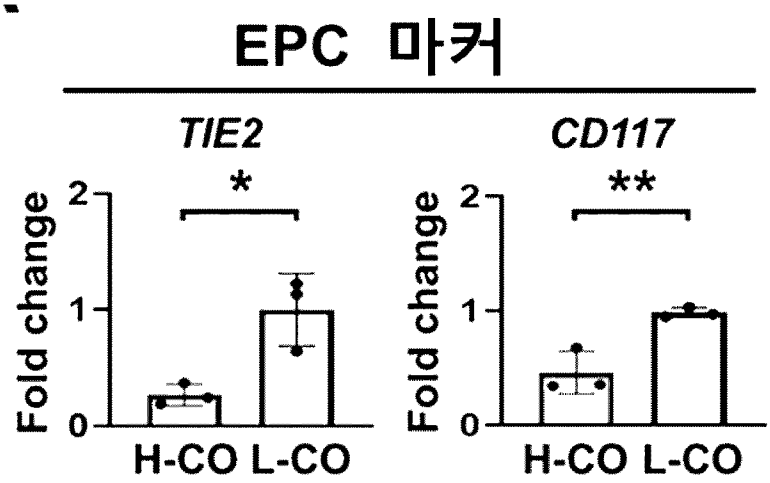
[도11]



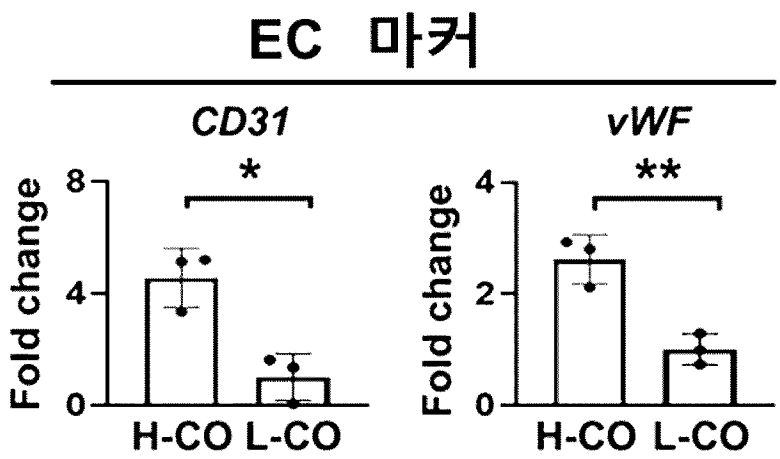
[도12]


심실타입
심방타입
노달타입
20 mV
0.5 sec
H-CO
L-CO
20 mV
2 sec
0.2 sec
심실타입
심실타입

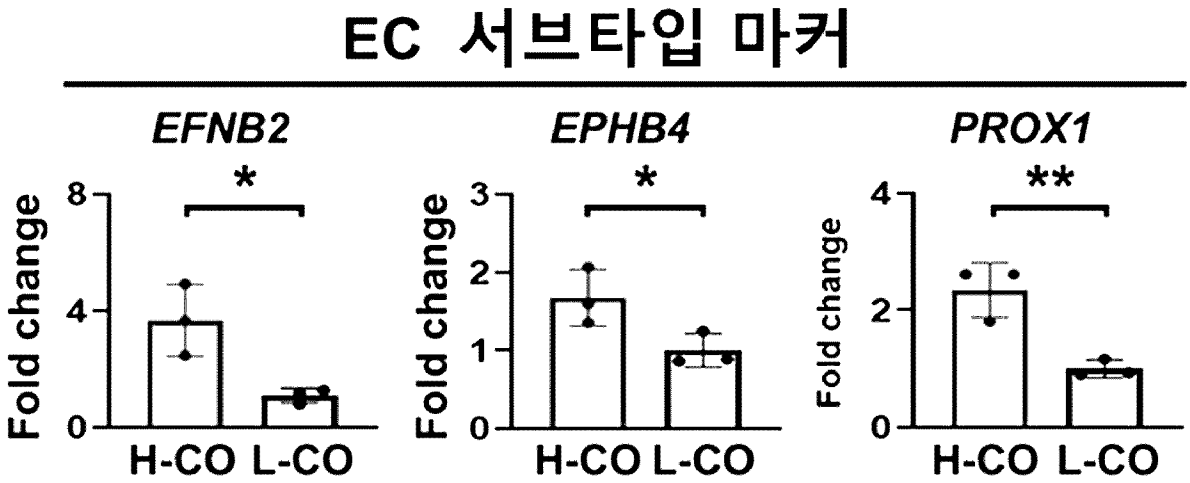
[도13a]


EPC 마커
TIE2
CD117
*
**
Fold change
2
1
0
H-CO L-CO

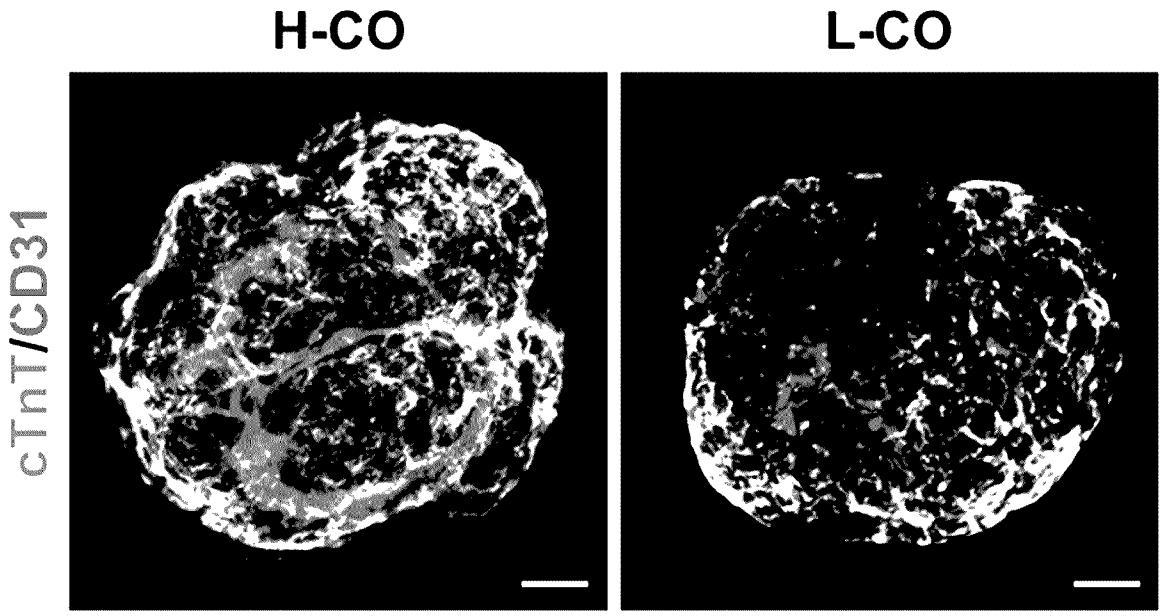
[도13b]



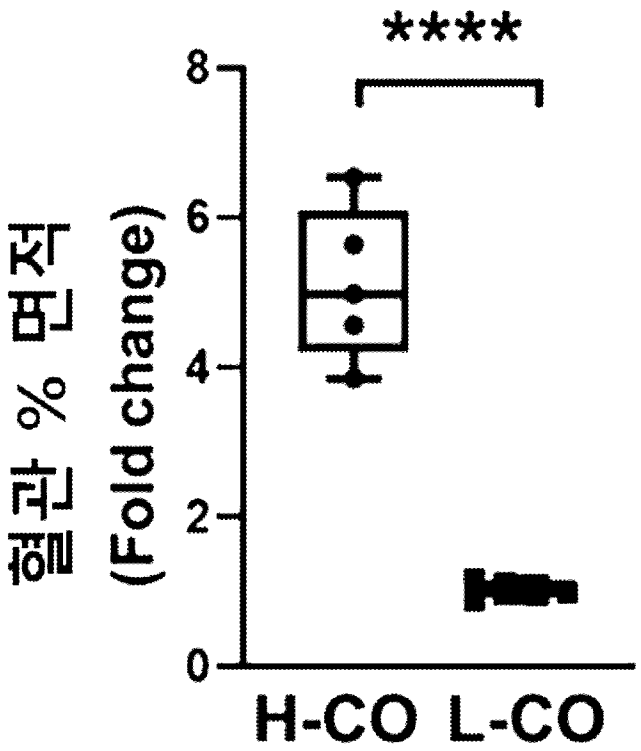
[도13c]



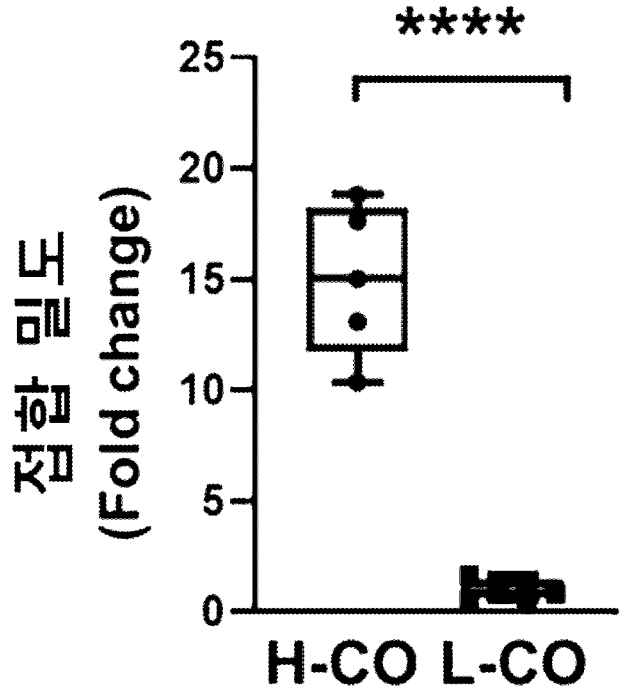
[도13d]



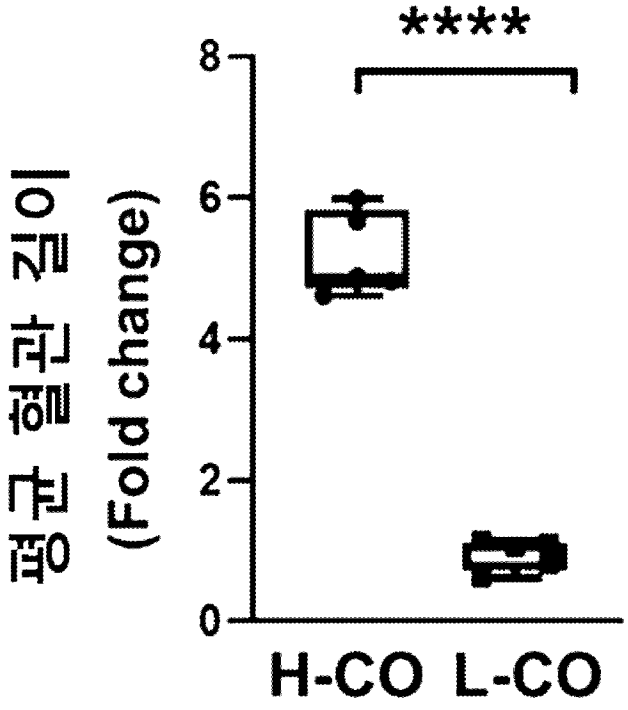
[도13e]


****
혈관 % 면적
(Fold change)
8
6
4
2
0
H-CO
L-CO

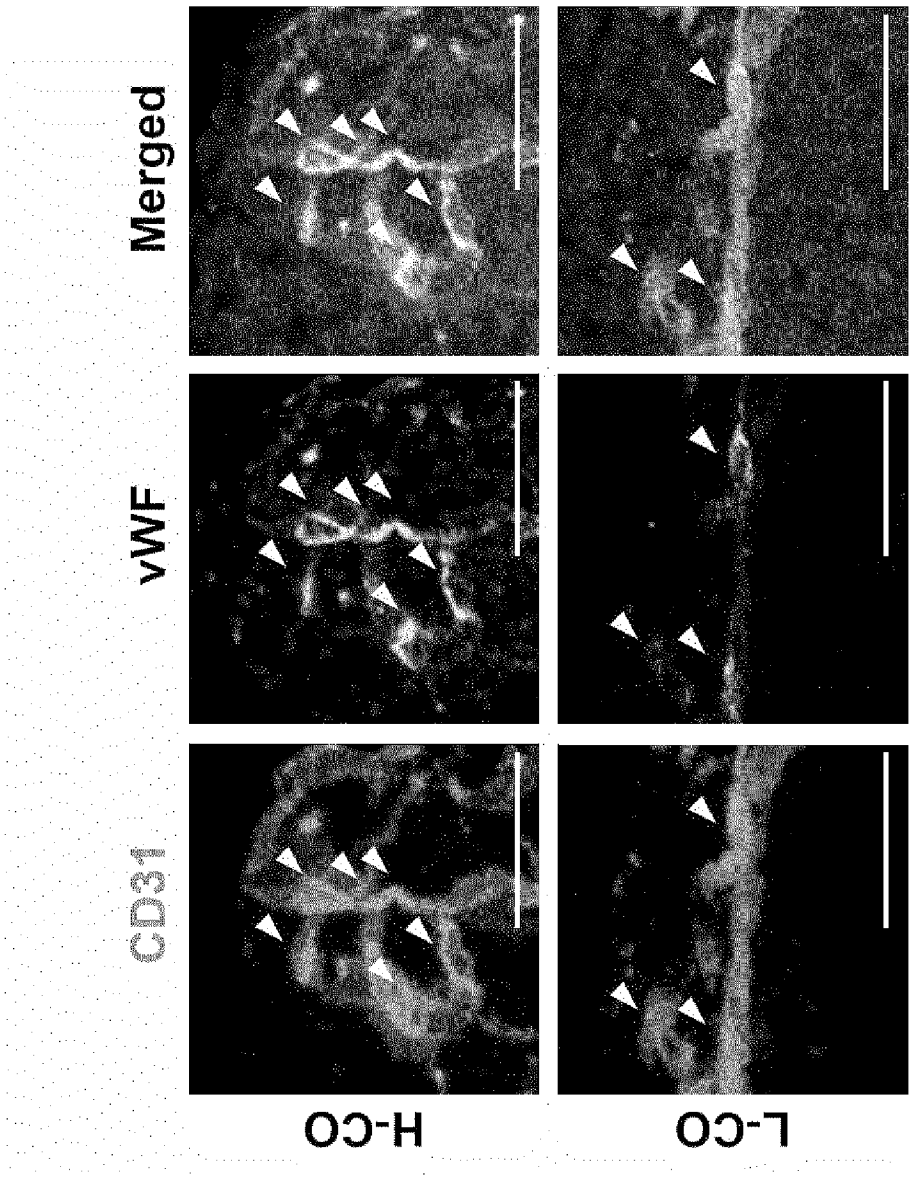
[도13f]


****
접합 밀도
(Fold change)
25
20
15
10
5
0
H-CO
L-CO

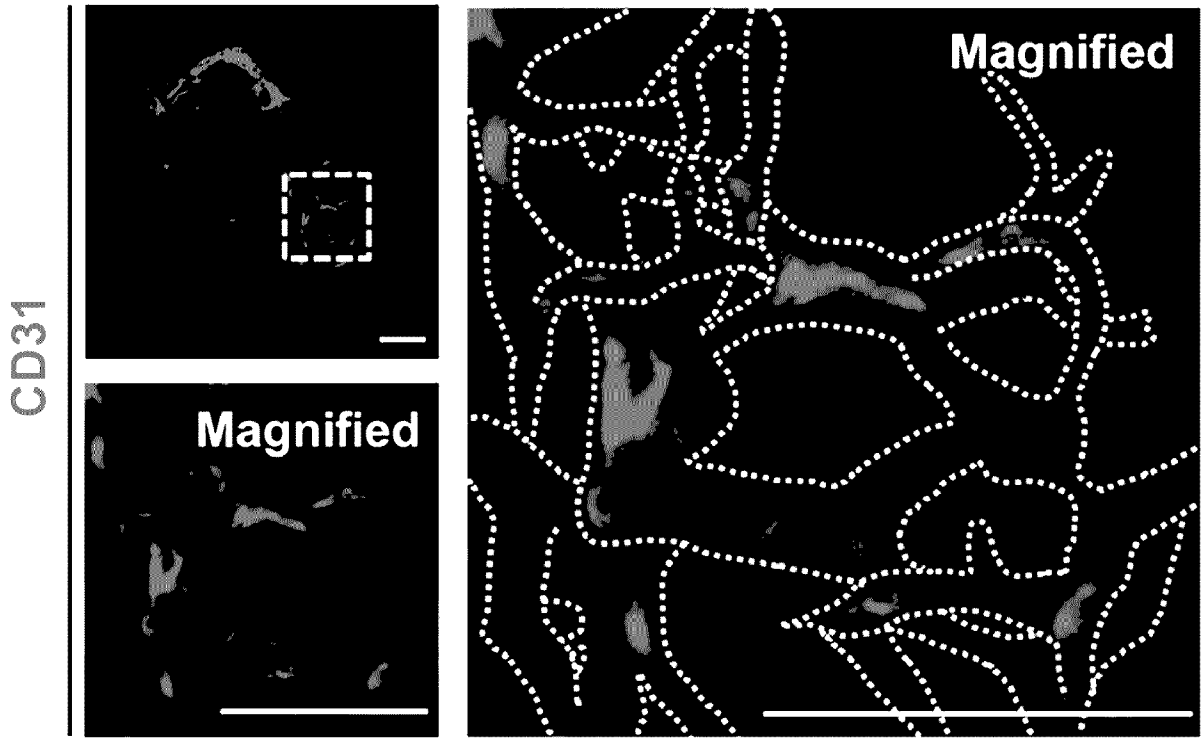
[도13g]



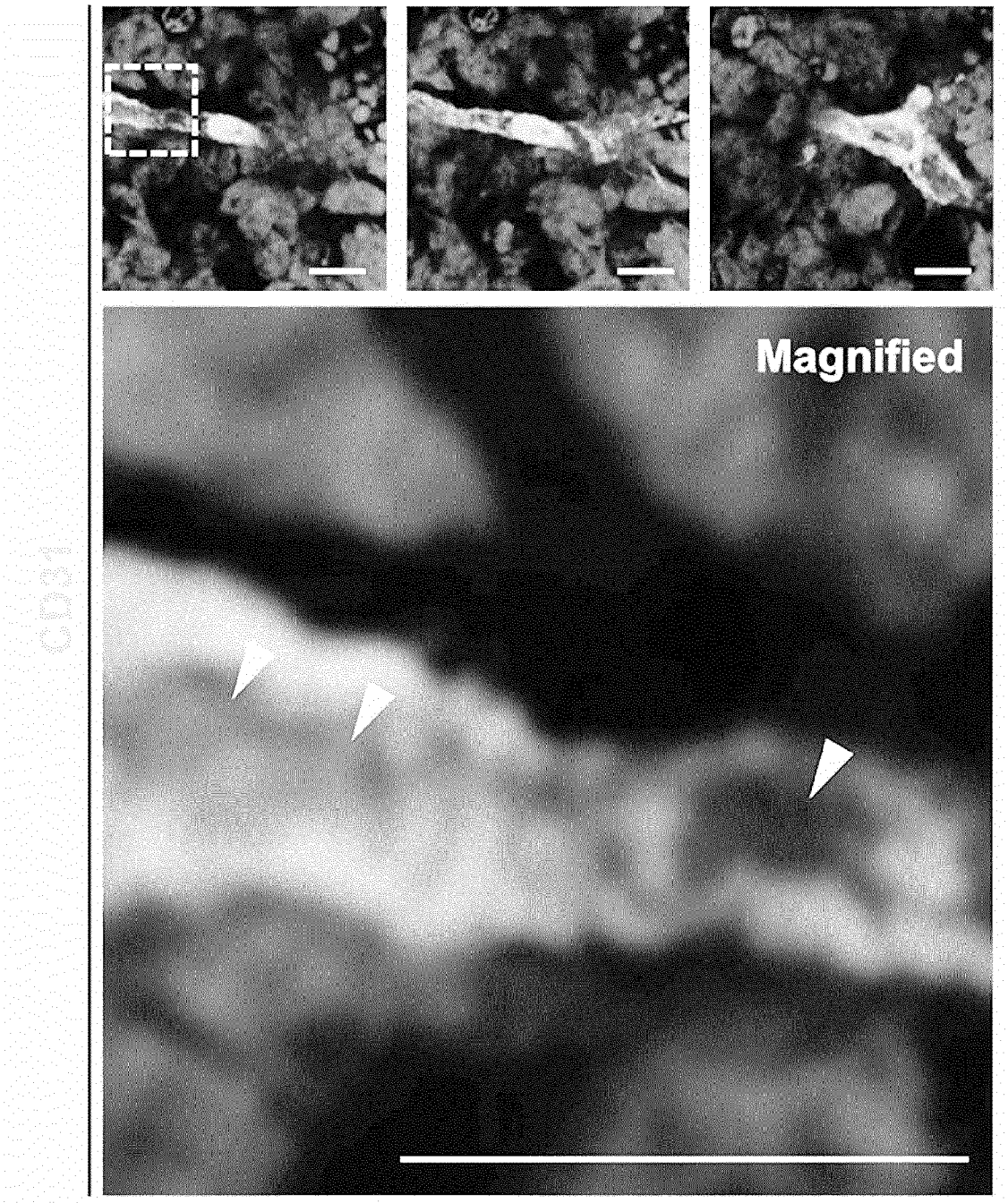
[도13h]



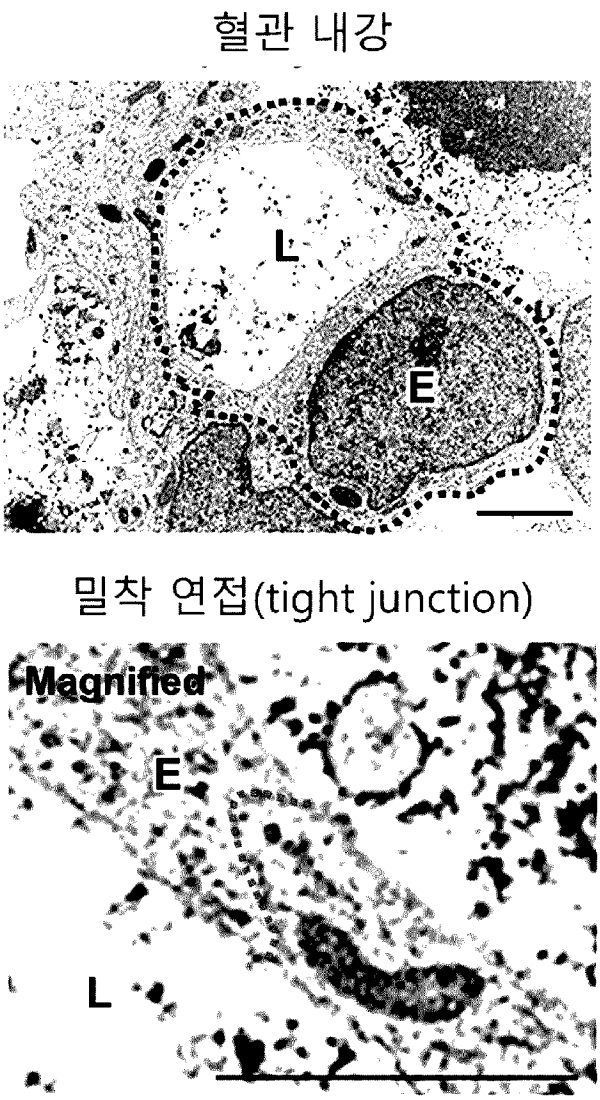
[도13i]



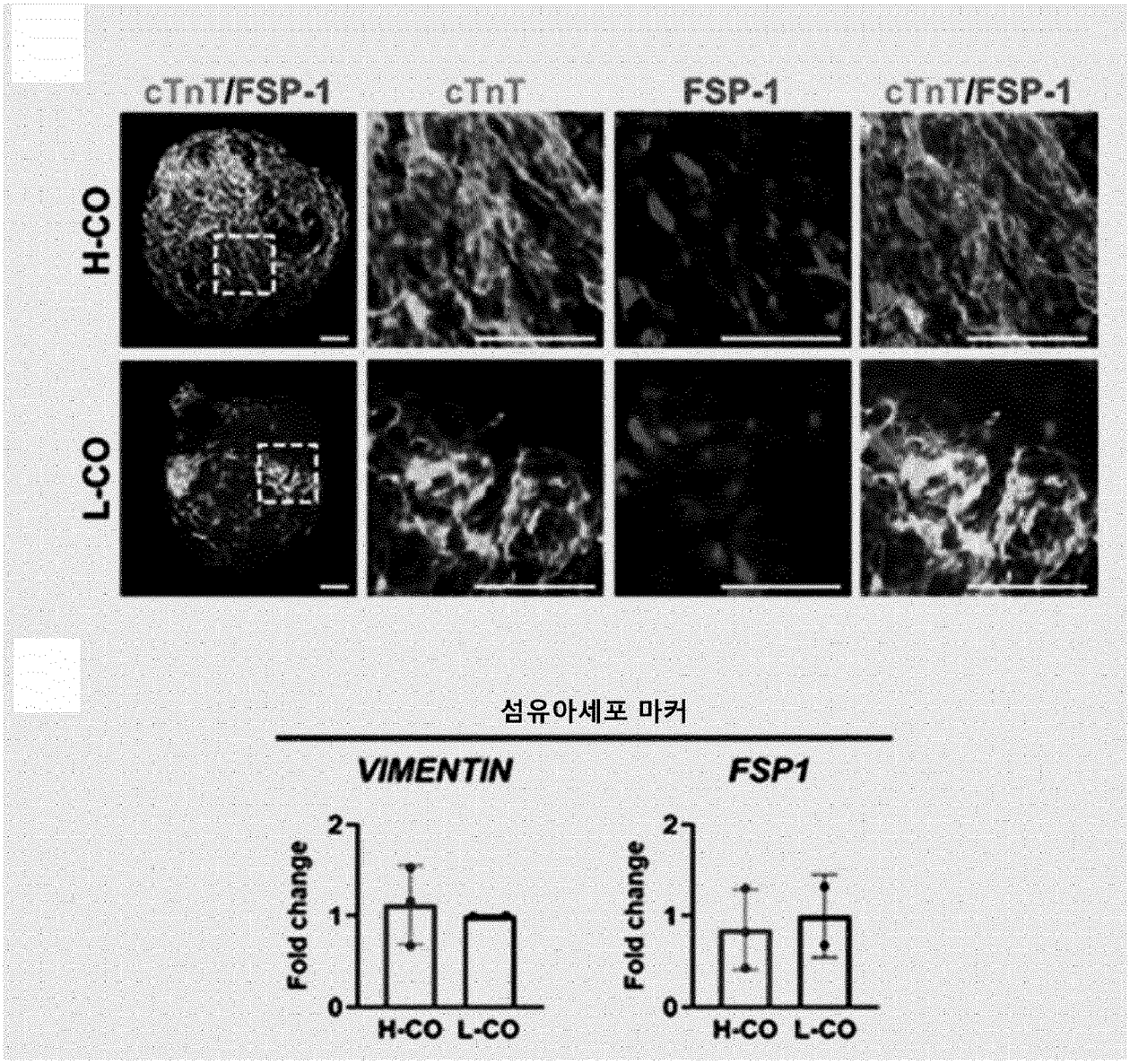
[도13j]



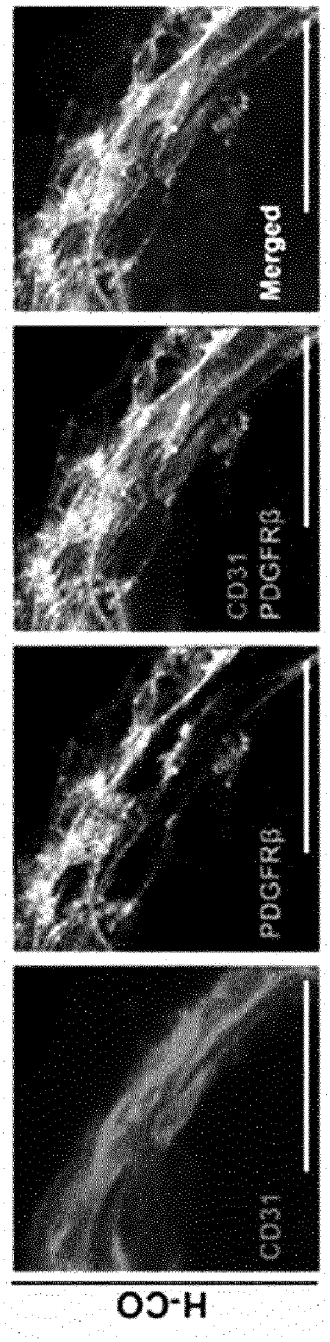
[도13k]



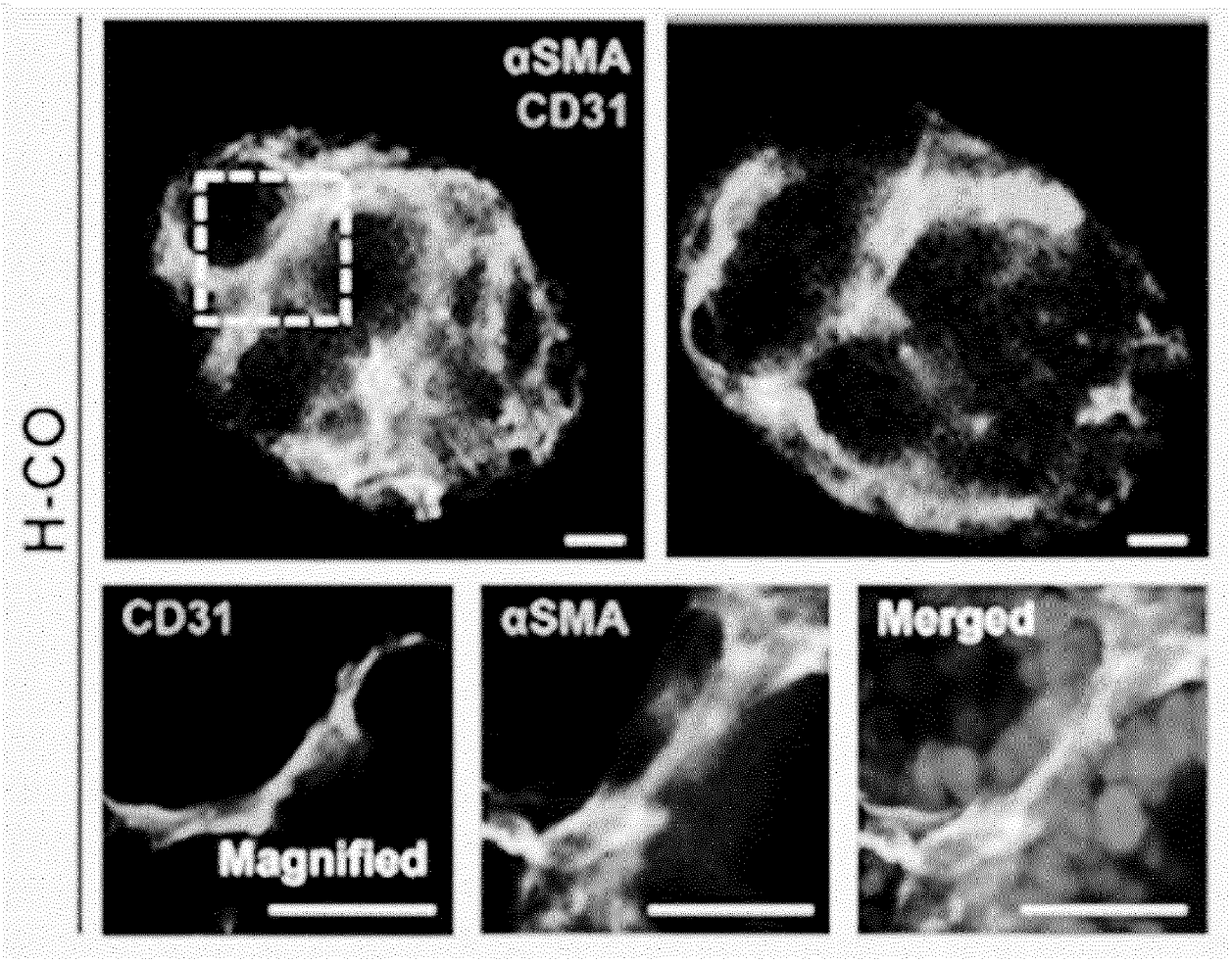
[도14]


cTnT/FSP-1
cTnT
FSP-1
cTnT/FSP-1
H-CO
L-CO
섬유아세포 마커
VIMENTIN
FSP1
Fold change
2
1
0
H-CO
L-CO
Fold change
2
1
0
H-CO
L-CO

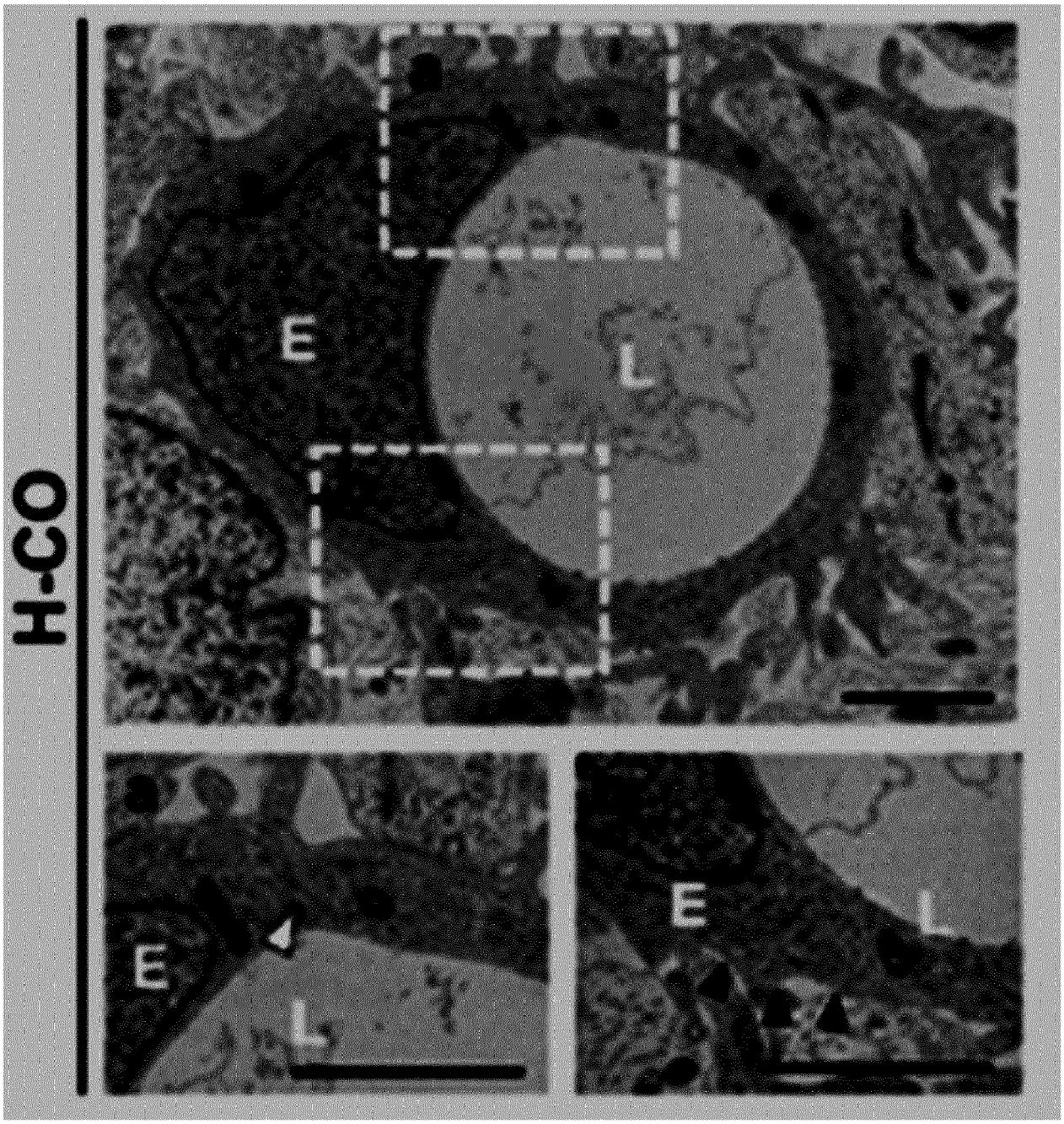
[도15a]



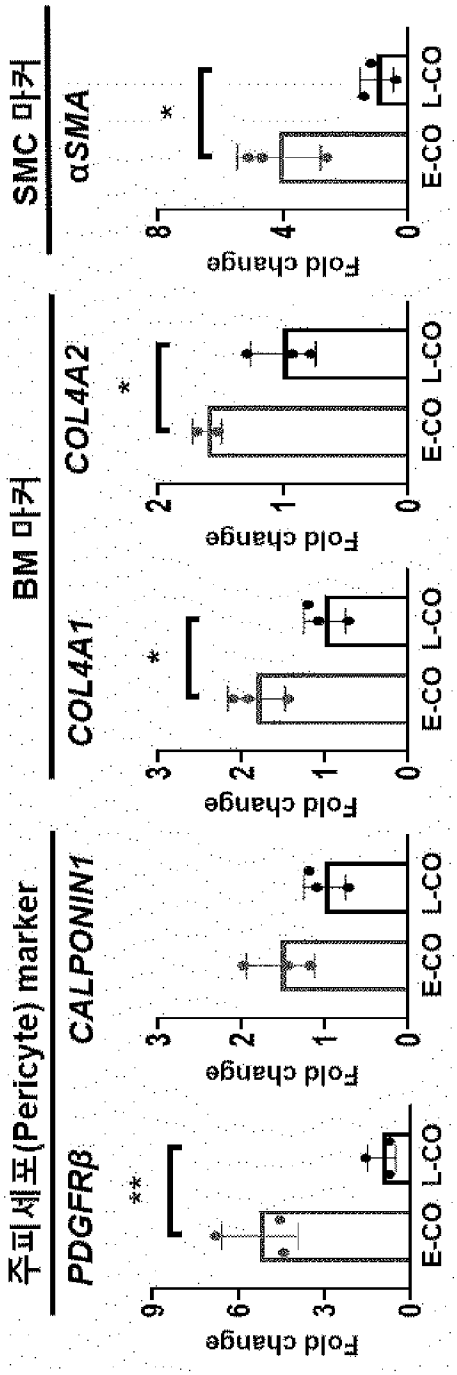
[도15b]



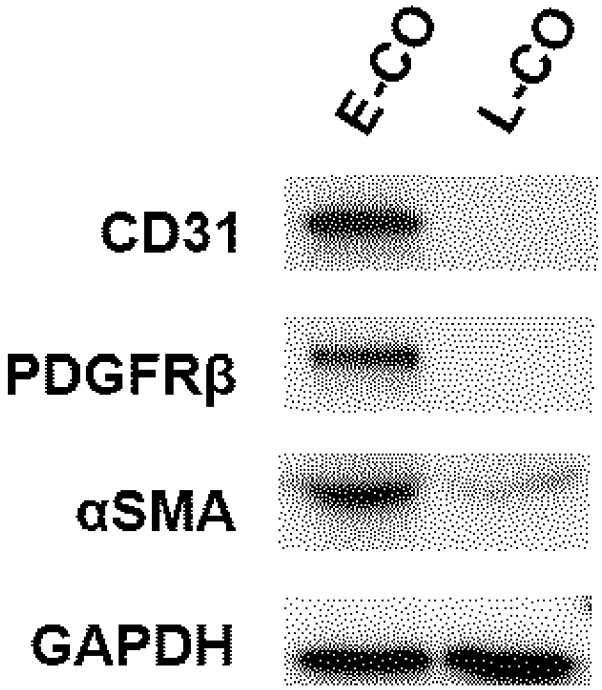
[도15c]



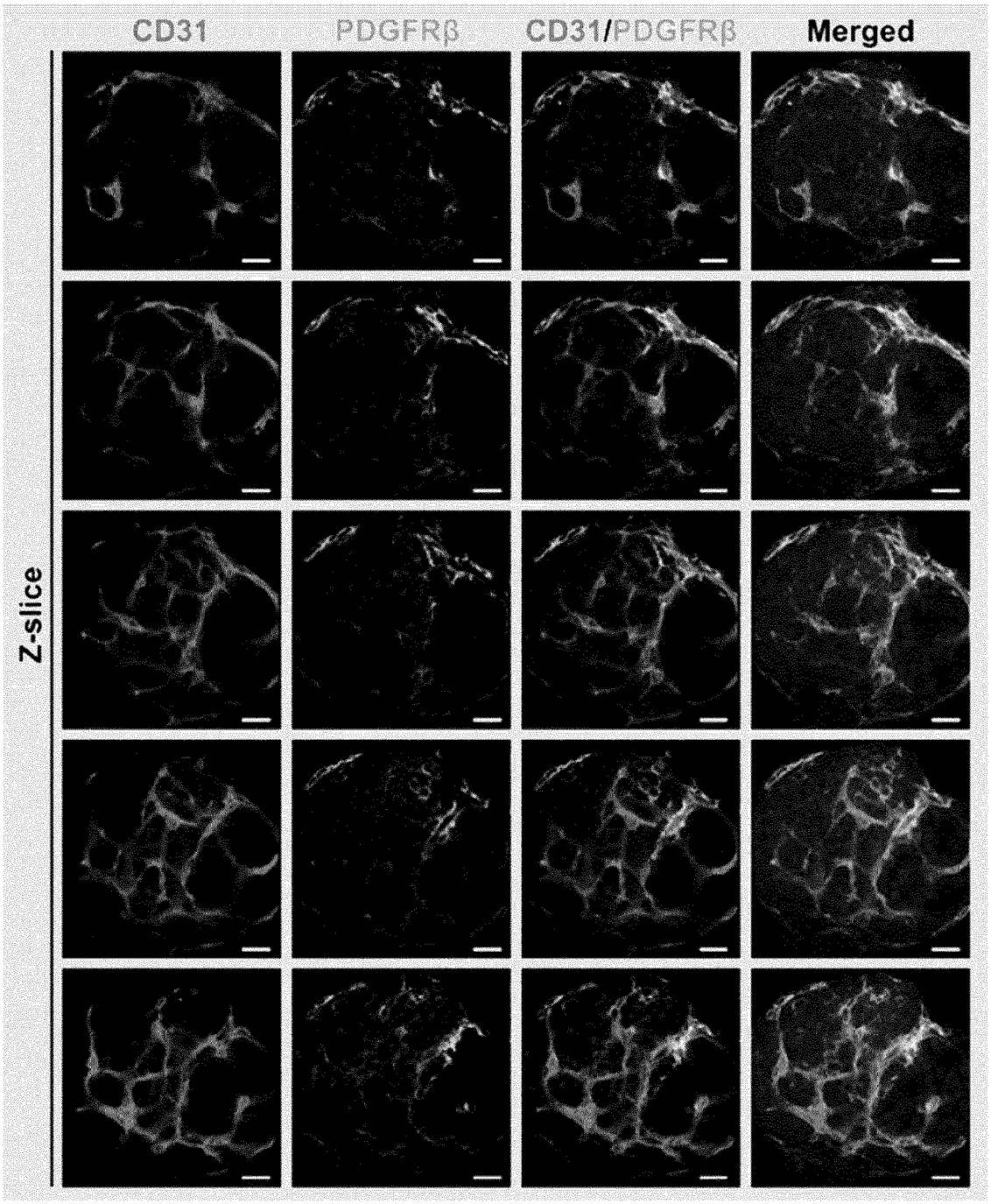
[도15d]


주피세포(Pericyte) marker
PDGFRβ
CALPONIN1
BM 마커
COL4A1
COL4A2
SMC 마커
αSMA
Fold change
E-CO
L-CO
**
*

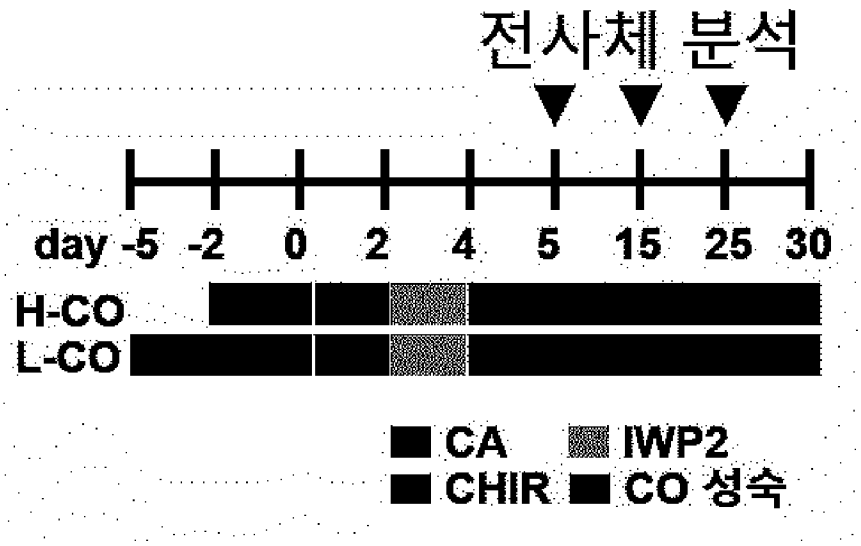
[도15e]



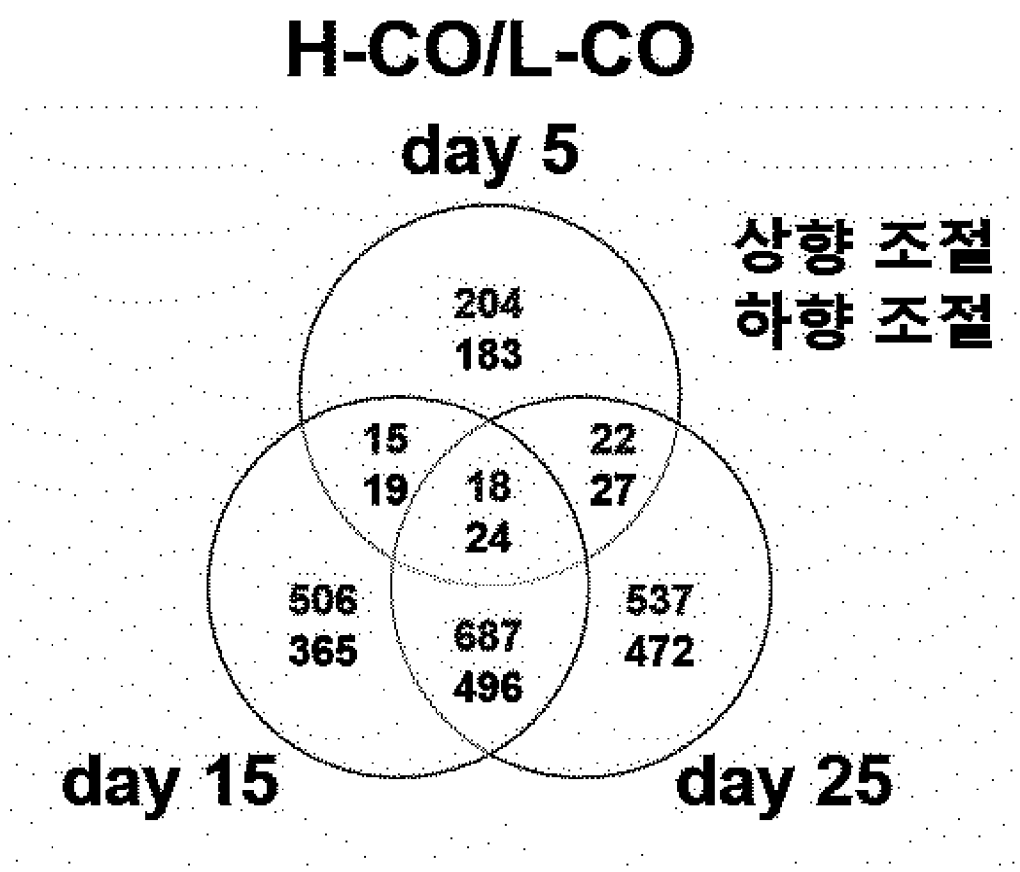
[도16]



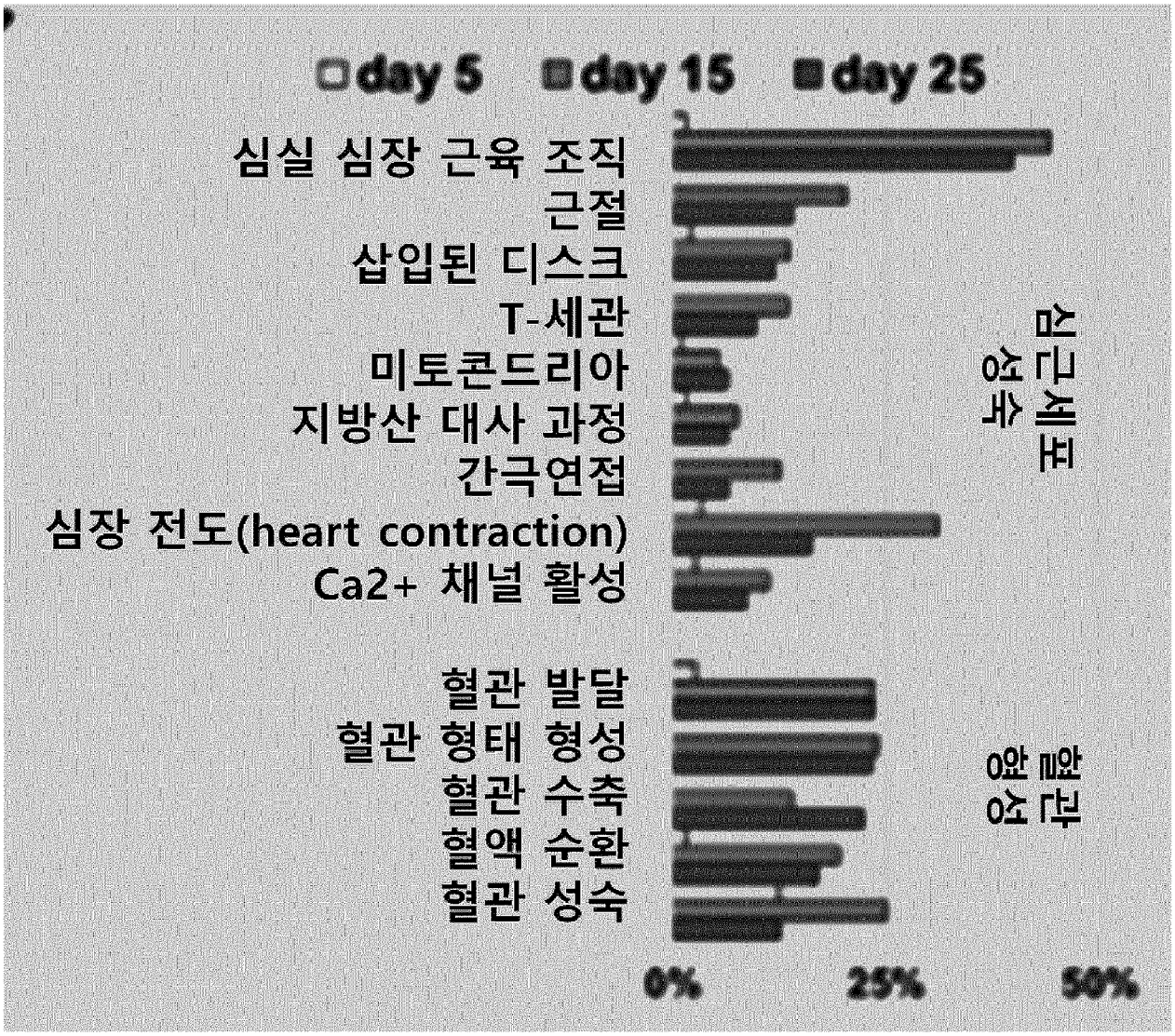
[도17a]


전사체 분석
day -5 -2 0 2 4 5 15 25 30
H-CO
L-CO
CA
IWP2
CHIR
CO 성숙

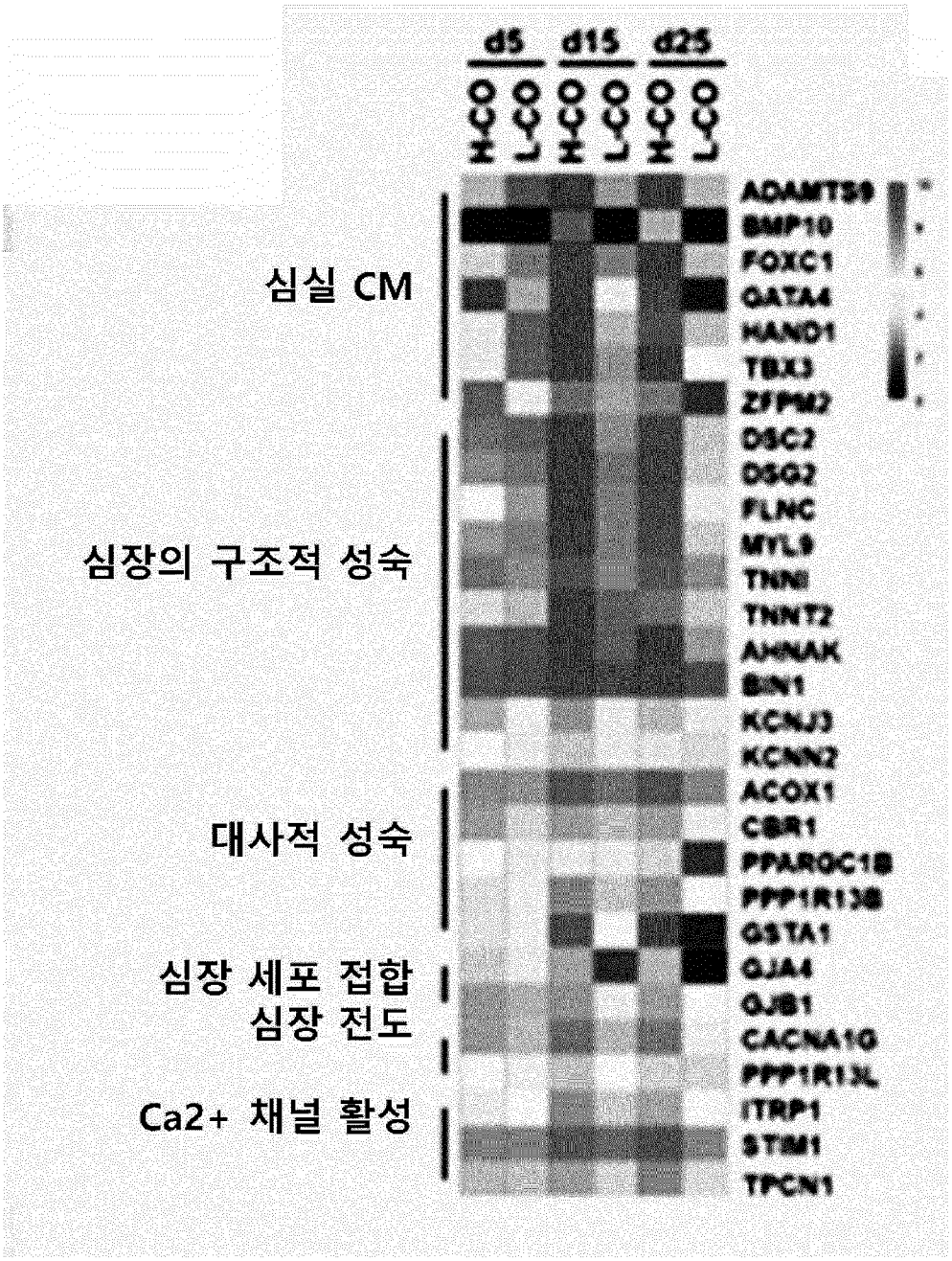
[도17b]


H-CO/L-CO
day 5
상향 조절
하향 조절
204
183
15
19
18
24
22
27
506
365
687
496
537
472
day 15
day 25

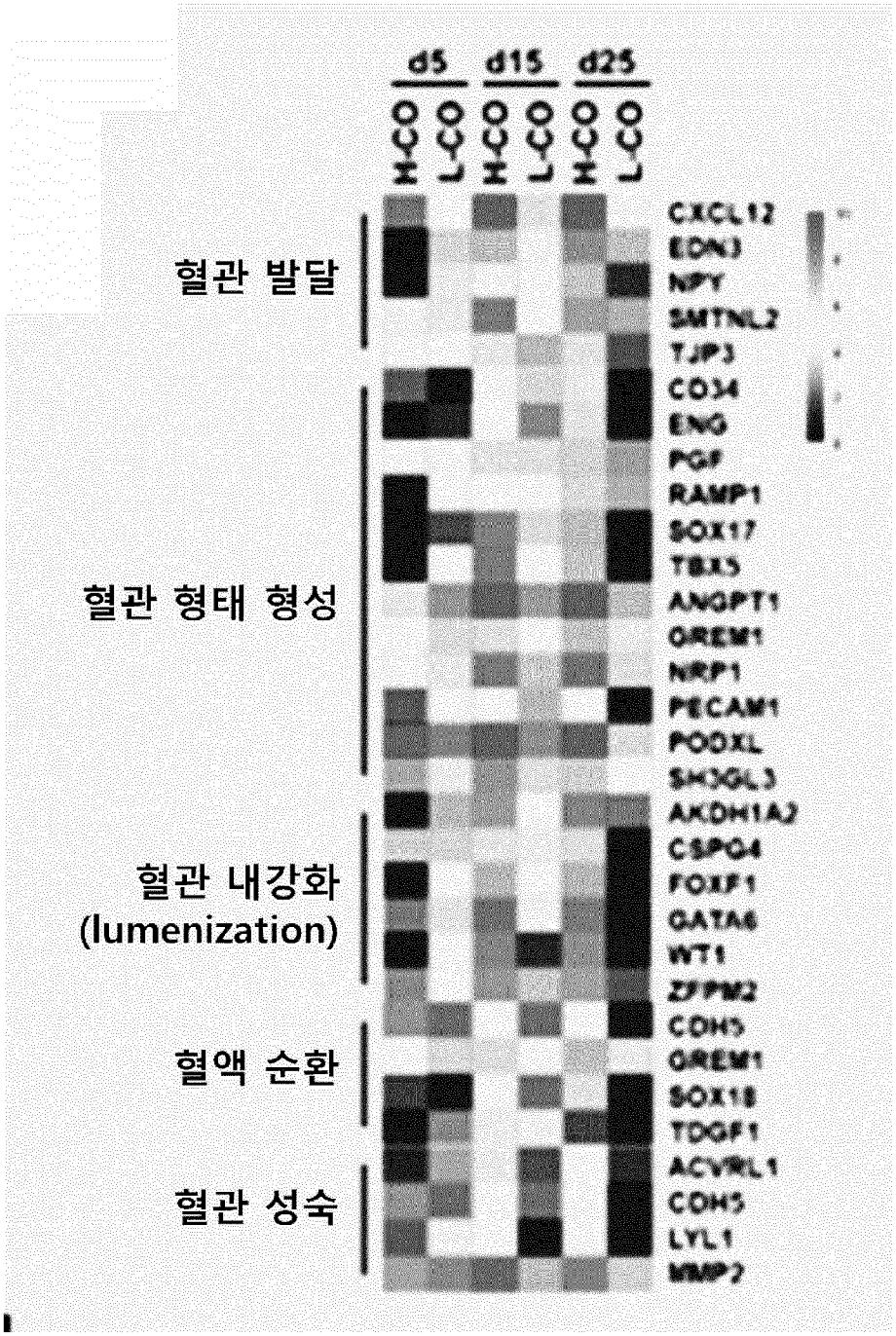
[도17c]


day 5
day 15
day 25
심실 심장 근육 조직
근절
삽입된 디스크
T-세관
미토콘드리아
지방산 대사 과정
간극연결
심장 전도(heart contraction)
Ca2+ 채널 활성
혈관 발달
혈관 형태 형성
혈관 수축
혈액 순환
혈관 성숙
0%
25%
50%

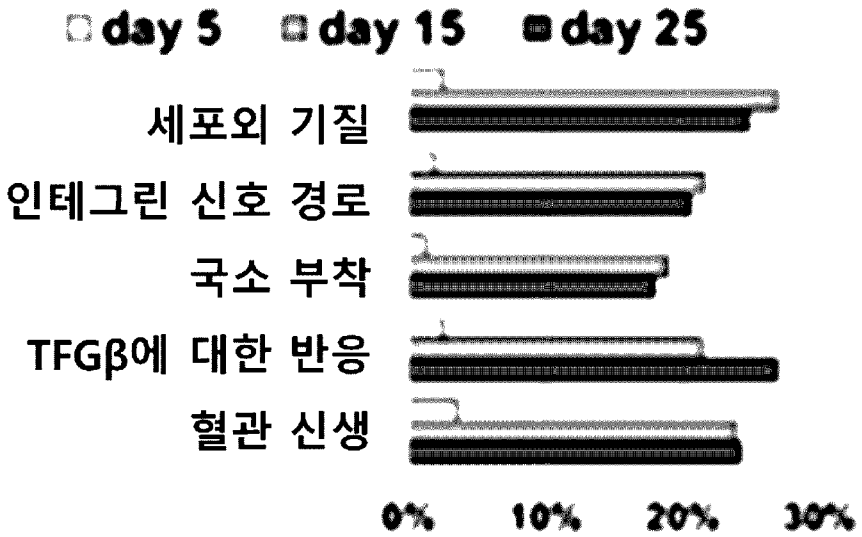
[도17d]


d5
d15
d25
심실 CM
심장의 구조적 성숙
대사적 성숙
심장 세포 접합
심장 전도
Ca2+ 채널 활성
ADAMTS9
BMP10
FOXC1
GATA4
HAND1
TBX3
ZFPM2
DSC2
DSG2
FLNC
MYL9
TNNI
TNNT2
AHNAK
BIN1
KCNJ3
KCNN2
ACOX1
CBR1
PPARGC1B
PPP1R13B
GSTA1
GJA4
GJB1
CACNA1G
PPP1R13L
ITRP1
STIM1
TPCN1

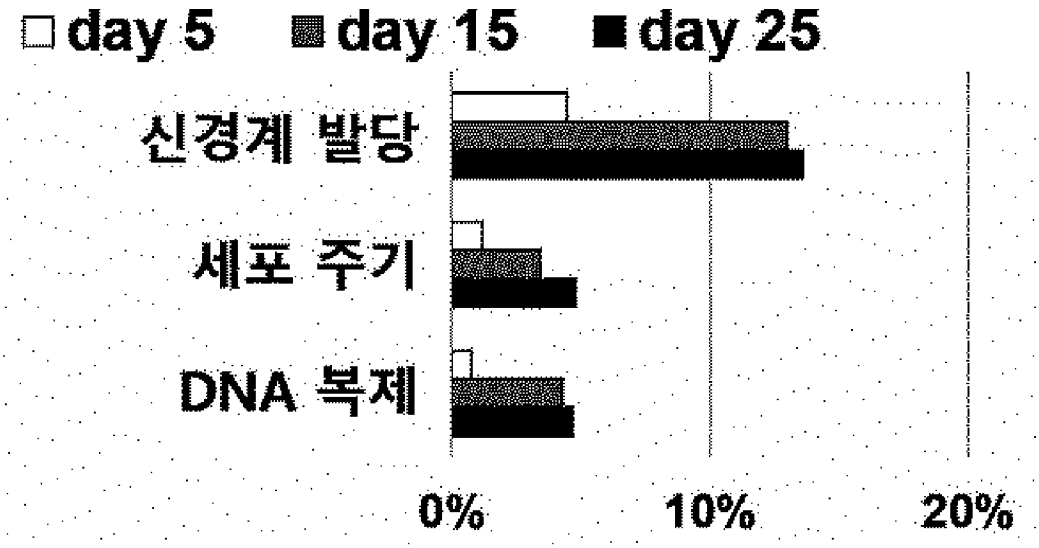
[도17e]


d5
d15
d25
혈관 발달
혈관 형태 형성
혈관 내강화
(lumenization)
혈액 순환
혈관 성숙
CXCL12
EDN1
NPY
SMTNL2
TJP3
CD34
ENG
PGF
RAMP1
SOX17
TBX3
ANGPT1
GREM1
NRP1
PECAM1
PODXL
SH3GL3
AKDH1A2
CSPG4
FOXF1
GATA6
WT1
ZFPM2
CDH5
GREM1
SOX18
TDGF1
ACVRL1
CDH5
LYL1
MMP2

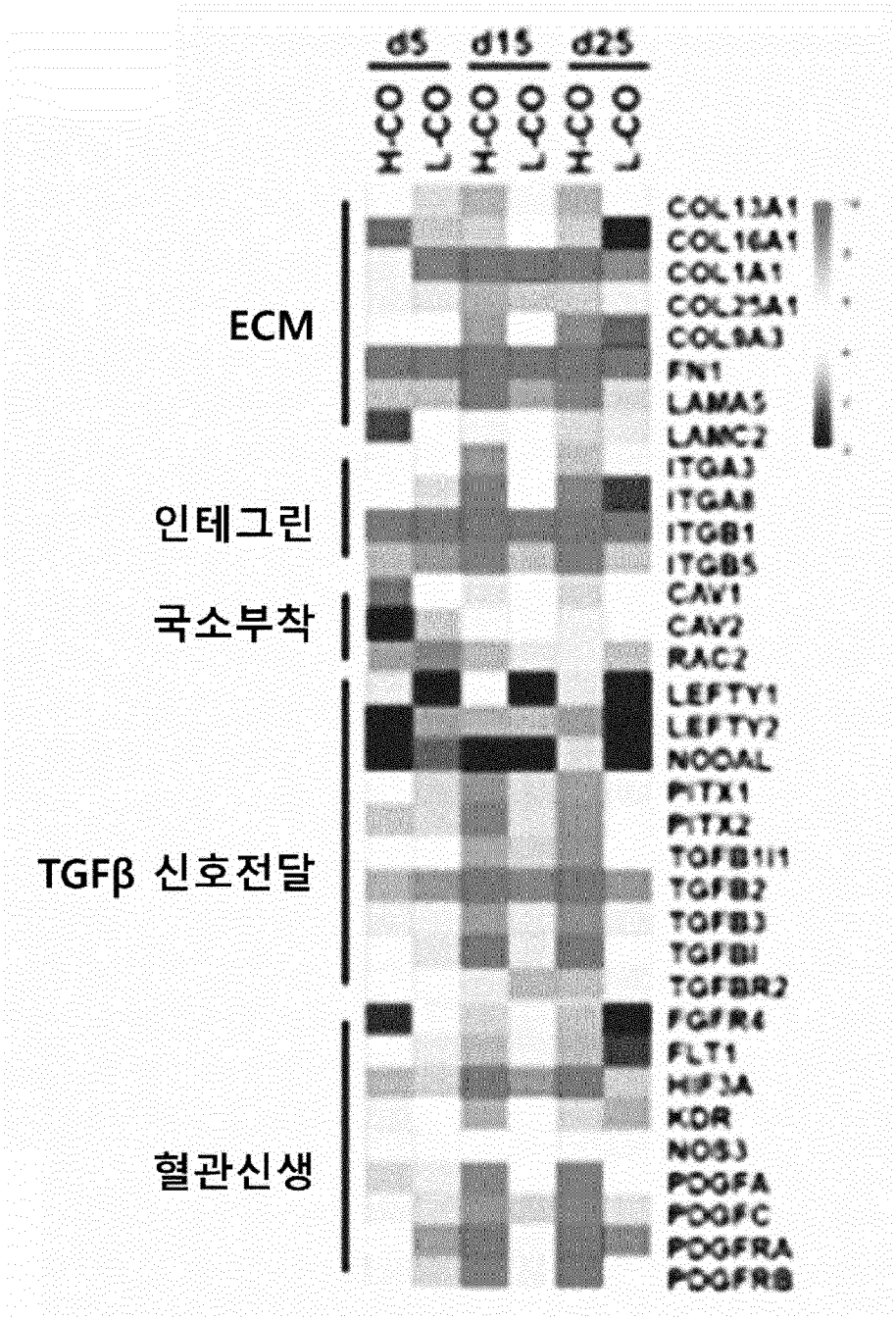
[도17f]


day 5
day 15
day 25
세포외 기질
인테그린 신호 경로
국소 부착
TFGβ에 대한 반응
혈관 신생
0%
10%
20%
30%

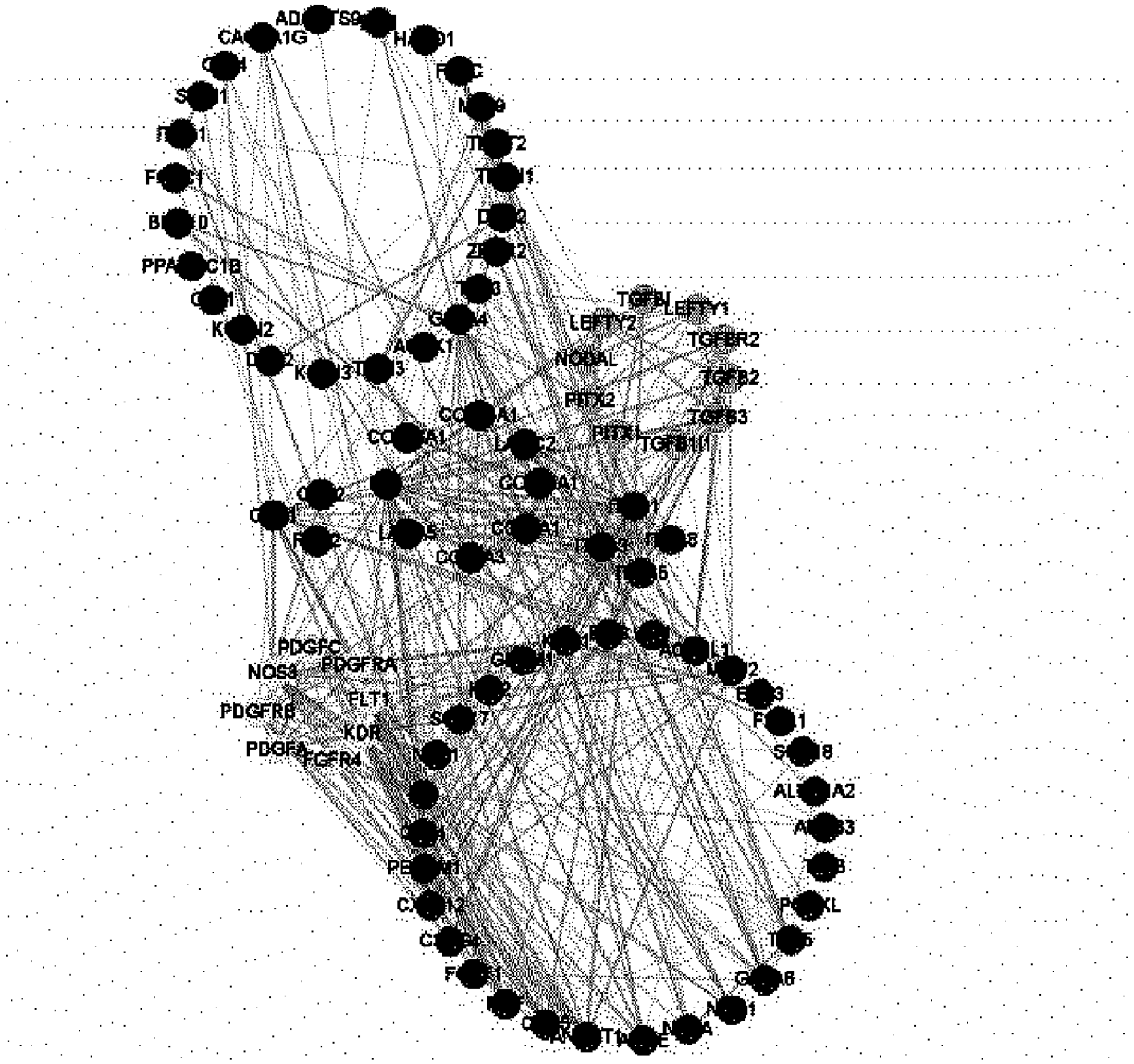
[도17g]


day 5
day 15
day 25
신경계 발당
세포 주기
DNA 복제
0%
10%
20%

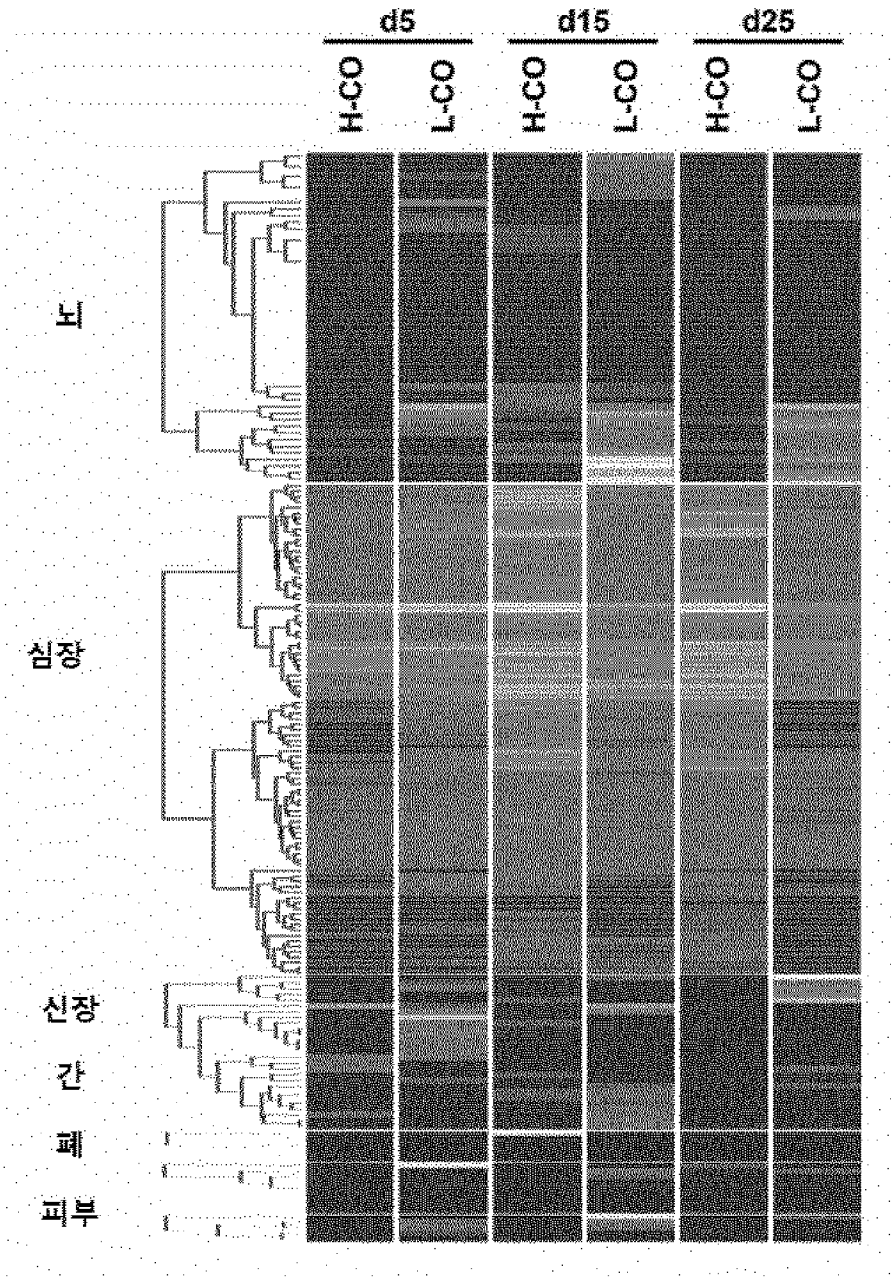
[도17h]


d5
d15
d25
ECM
인테그린
국소부착
TGFβ 신호전달
혈관신생
COL13A1
COL16A1
COL1A1
COL25A1
COL8A1
FN1
LAMA5
LAMC2
ITGA1
ITGA8
ITGB1
ITGB5
CAV1
CAV2
RAC2
LEFTY1
LEFTY2
NODAL
PITX1
PITX2
TGFB1I1
TGFB2
TGFB3
TGFBI
TGFBR2
FGFR4
FLT1
HIF1A
KDR
NOS3
PDGFA
PDGFC
PDGFRA
PDGFRB

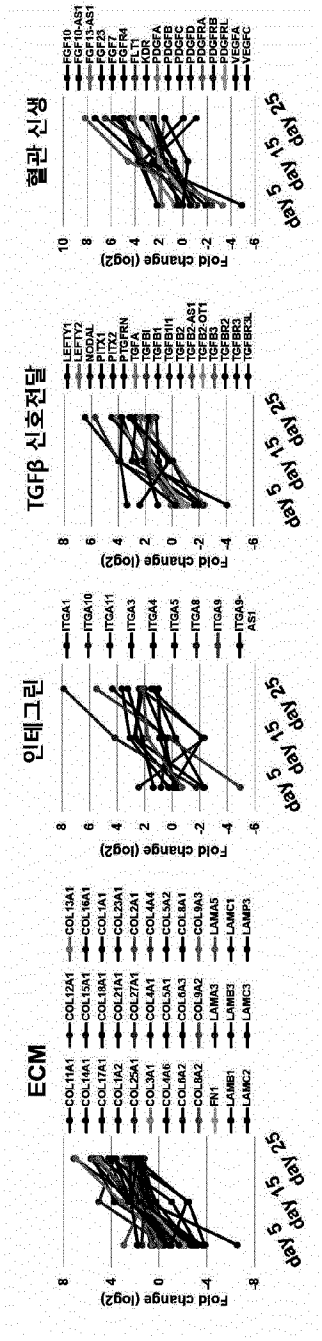
[도17i]


TGFB1
LEFTY1
LEFTY2
TGFBR2
NODAL
TGFB2
PITX2
TGFB3
PITX1
TGFB1I1
PDGFC
PDGFRA
NOS3
FLT1
PDGFRB
KDR
PDGFA
FGFR4

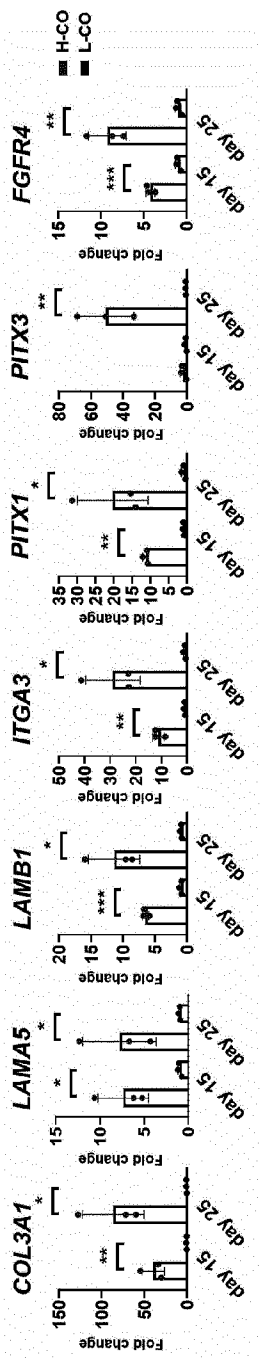
[도18]



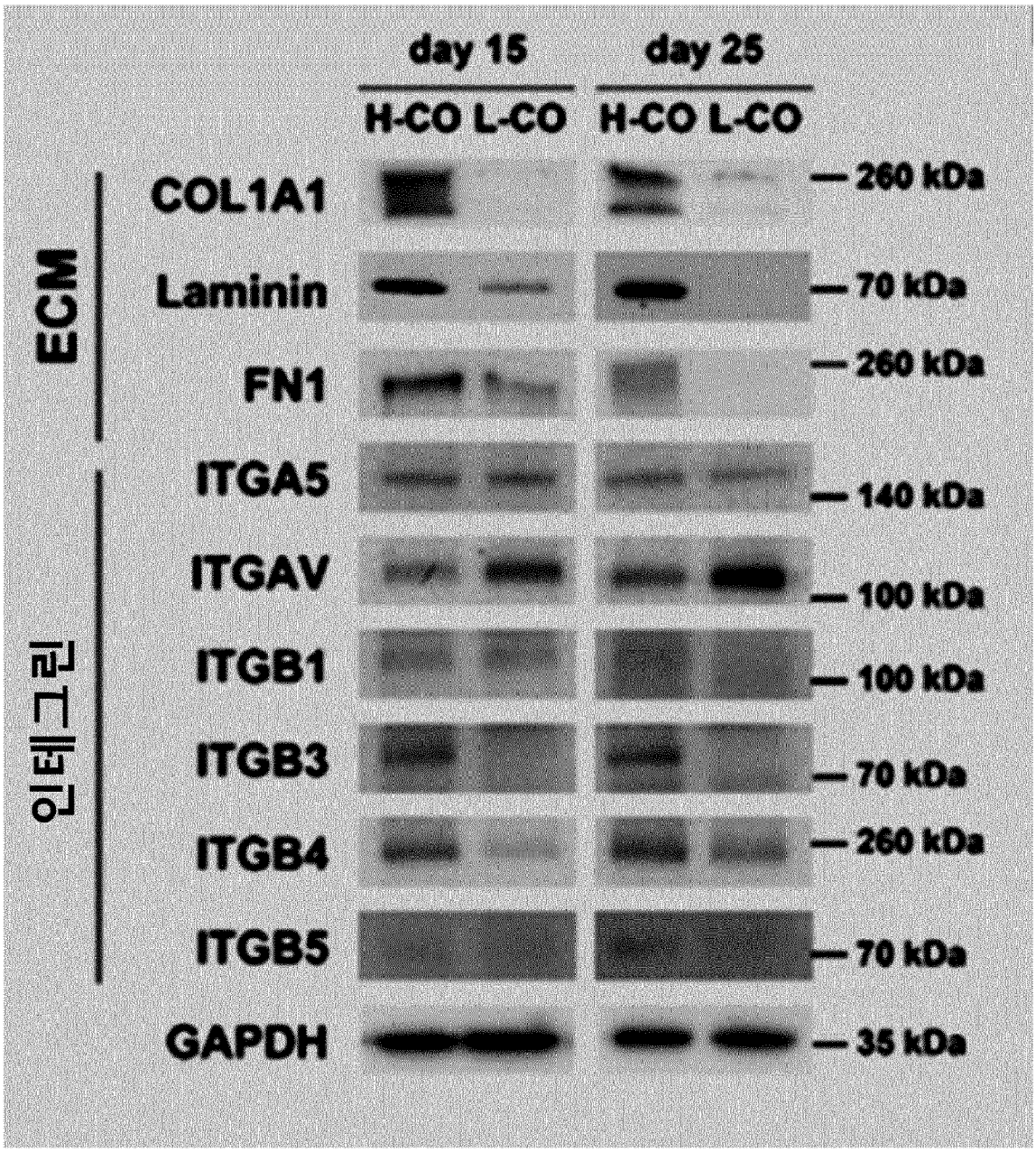
[도19a]



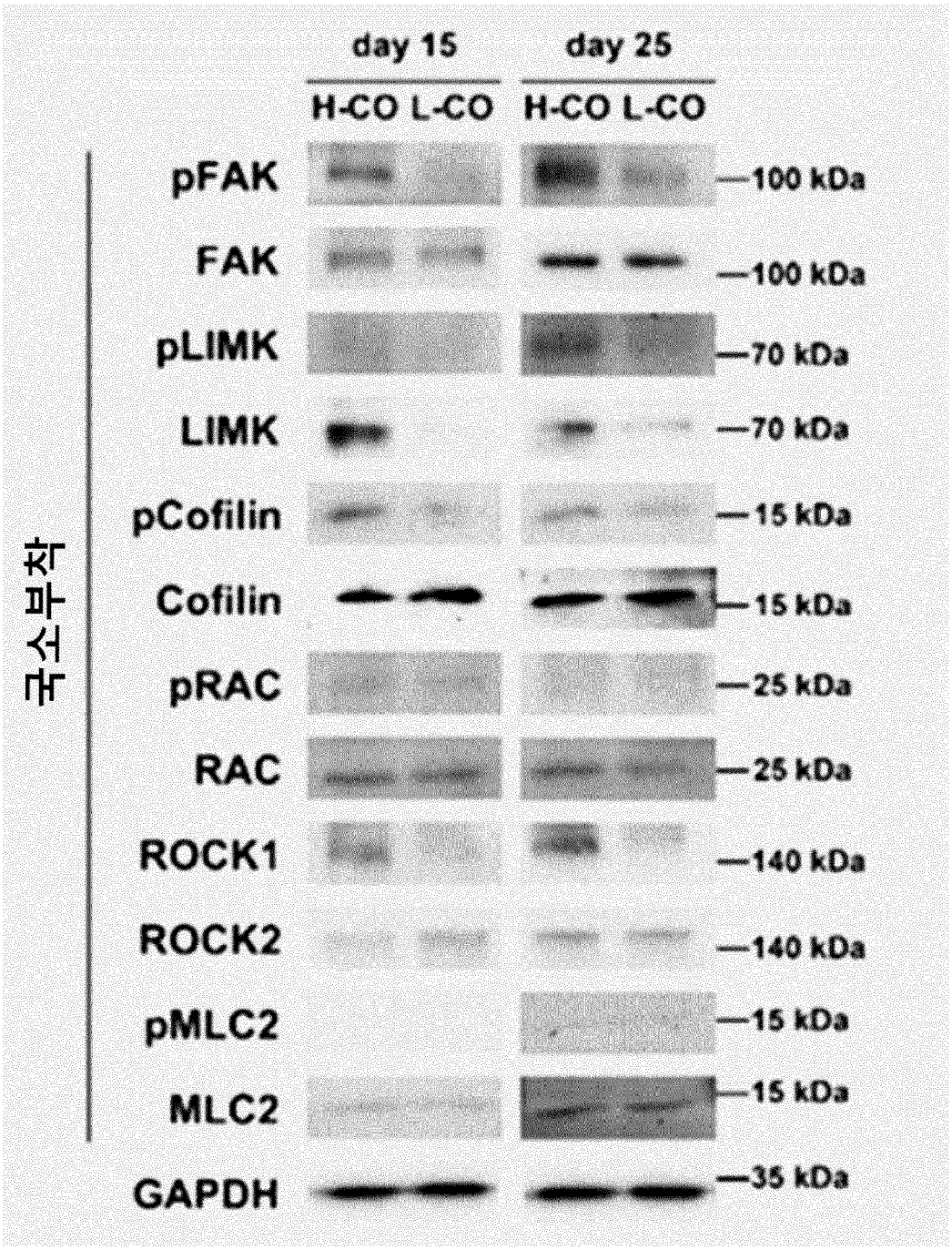
[도19b]


H-CO
L-CO
FGFR4
PITX3
PITX1
ITGA3
LAMB1
LAMA5
COL3A1
Fold change
day 15
day 25

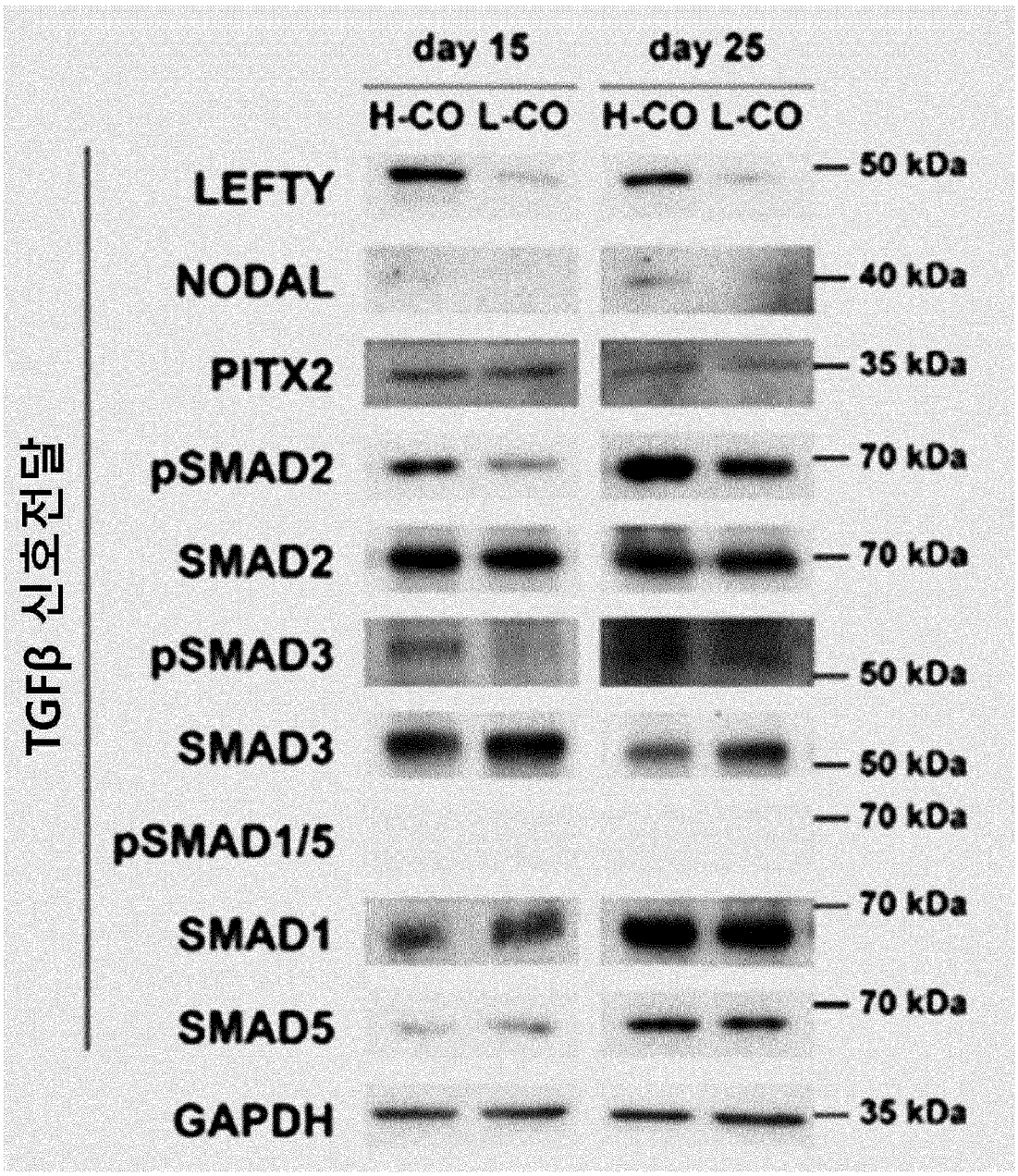
[도19c]


day 15
day 25
H-CO L-CO H-CO L-CO
ECM
인테그린
COL1A1
Laminin
FN1
ITGA5
ITGAV
ITGB1
ITGB3
ITGB4
ITGB5
GAPDH
260 kDa
70 kDa
260 kDa
140 kDa
100 kDa
100 kDa
70 kDa
260 kDa
70 kDa
35 kDa

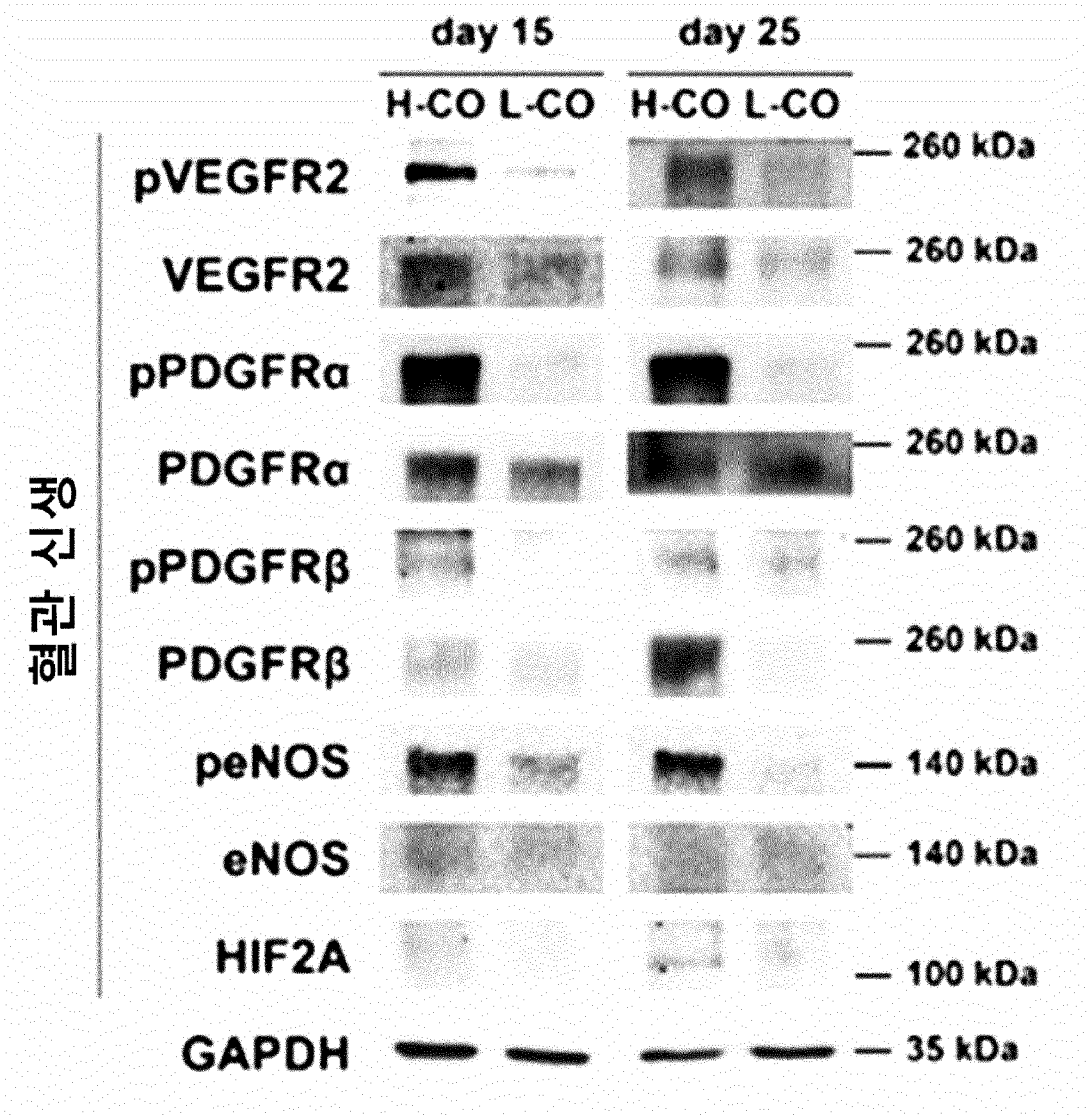
[도19d]


day 15
day 25
H-CO L-CO
H-CO L-CO
pFAK
FAK
pLIMK
LIMK
pCofilin
Cofilin
pRAC
RAC
ROCK1
ROCK2
pMLC2
MLC2
GAPDH
100 kDa
100 kDa
70 kDa
70 kDa
15 kDa
15 kDa
25 kDa
25 kDa
140 kDa
140 kDa
15 kDa
15 kDa
35 kDa
근소포체

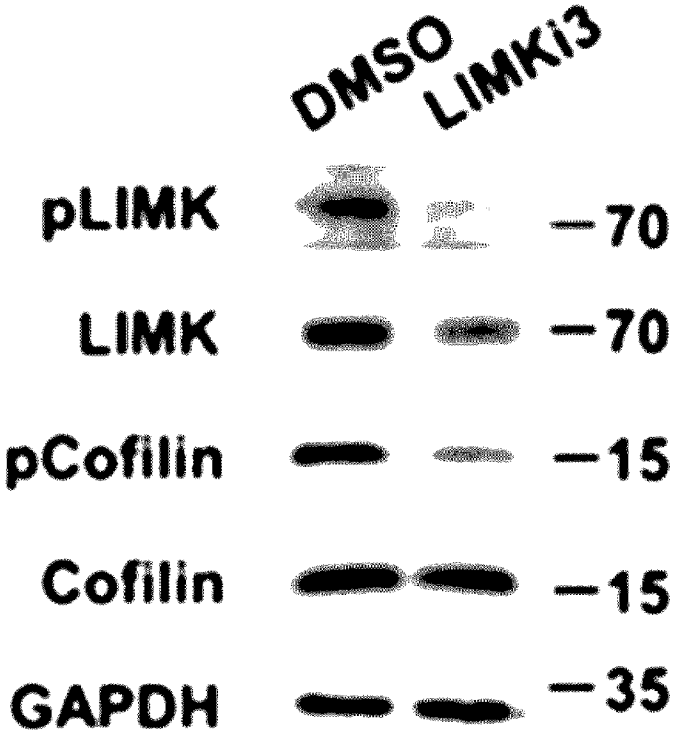
[도19e]


day 15
day 25
H-CO L-CO
H-CO L-CO
TGFβ 신호전달
LEFTY
NODAL
PITX2
pSMAD2
SMAD2
pSMAD3
SMAD3
pSMAD1/5
SMAD1
SMAD5
GAPDH
50 kDa
40 kDa
35 kDa
70 kDa
70 kDa
50 kDa
50 kDa
70 kDa
70 kDa
70 kDa
35 kDa

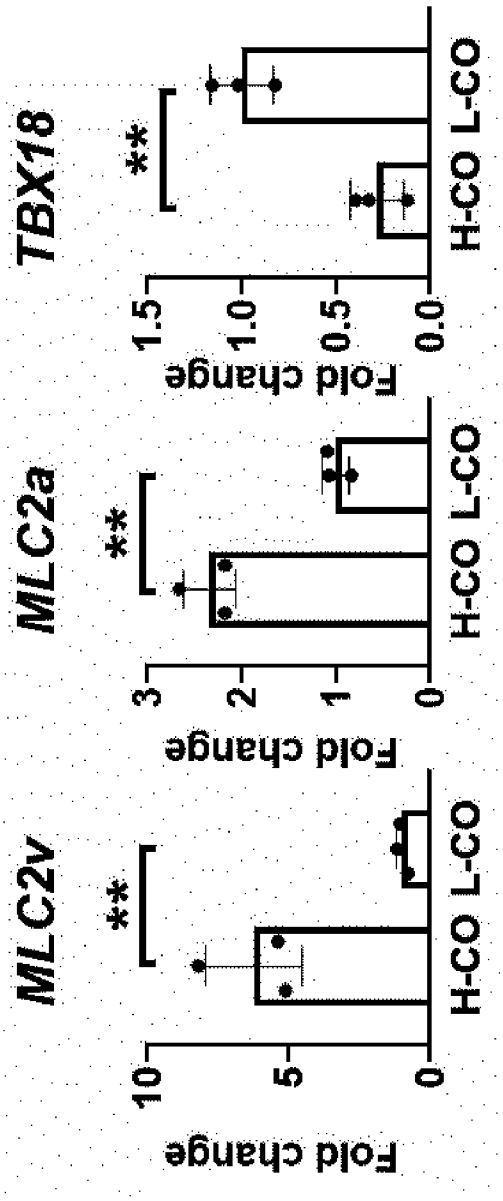
[도19f]


day 15
day 25
H-CO L-CO
H-CO L-CO
pVEGFR2
VEGFR2
pPDGFRα
PDGFRα
pPDGFRβ
PDGFRβ
peNOS
eNOS
HIF2A
GAPDH
260 kDa
260 kDa
260 kDa
260 kDa
260 kDa
260 kDa
140 kDa
140 kDa
100 kDa
35 kDa
혈관 신생

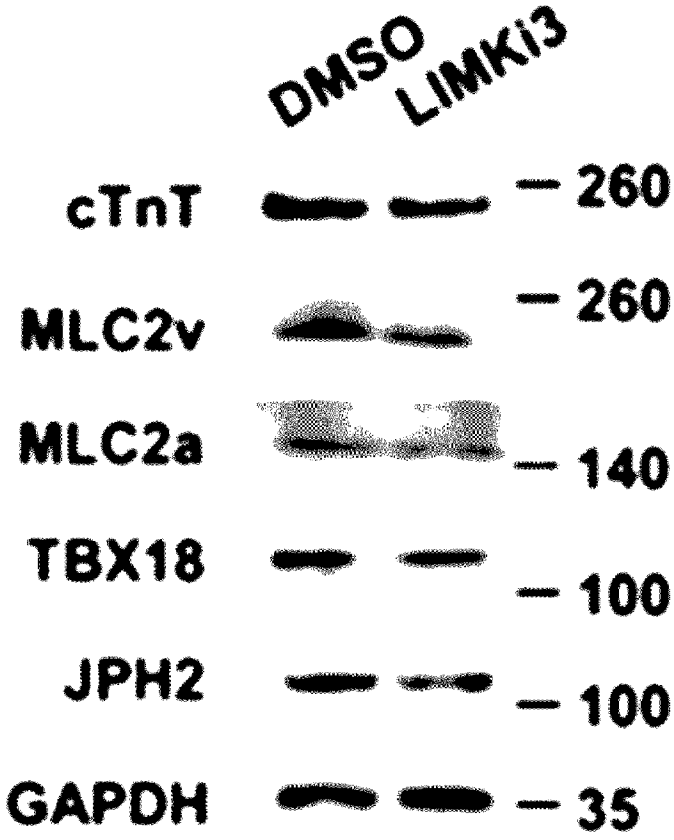
[도20a]



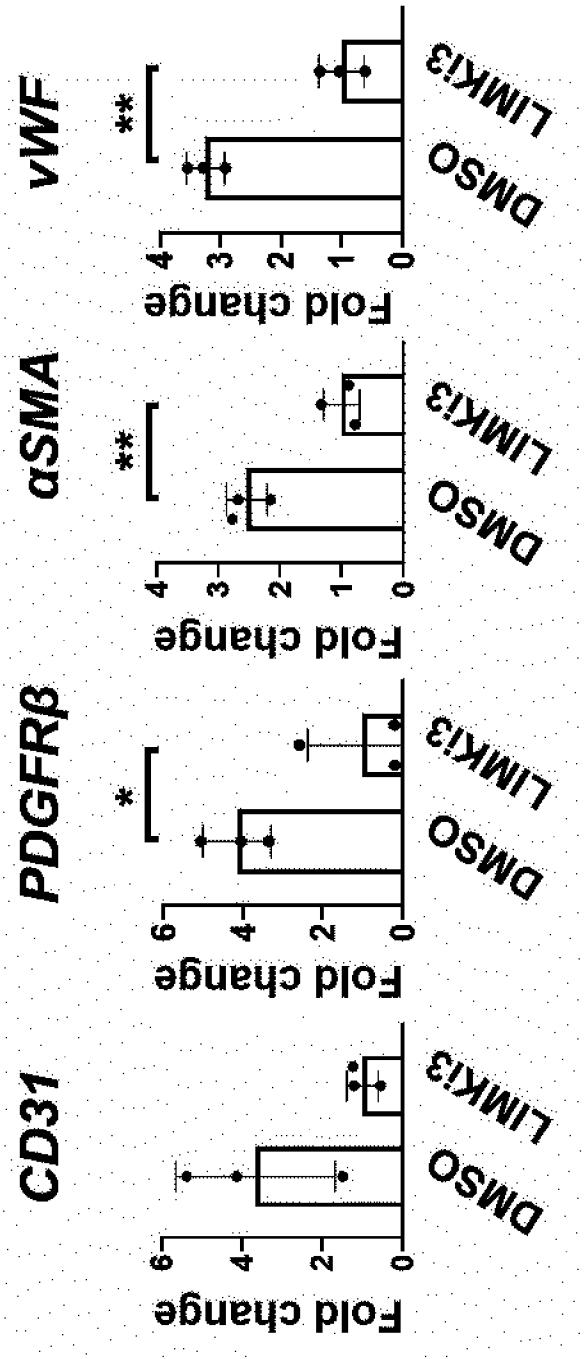
[도20b]


TBX18
**
Fold change
1.5
1.0
0.5
0.0
H-CO L-CO
MLC2a
**
Fold change
3
2
1
0
H-CO L-CO
MLC2V
**
Fold change
10
5
0
H-CO L-CO

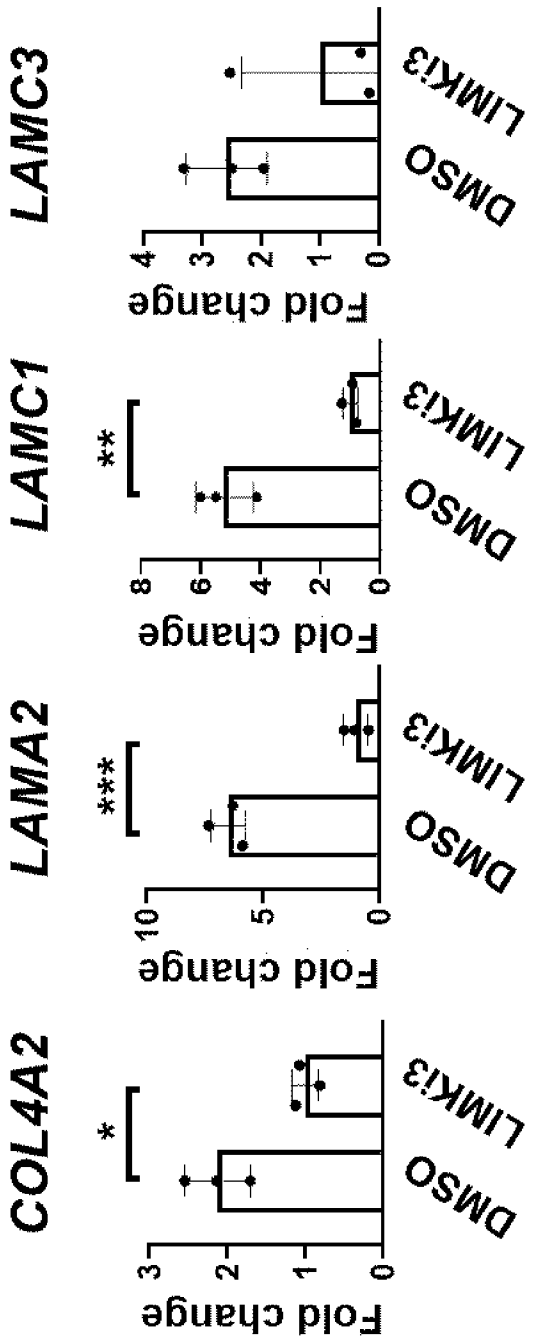
[도20c]


DMSO
LIMKi3
cTnT
260
MLC2v
260
MLC2a
140
TBX18
100
JPH2
100
GAPDH
35

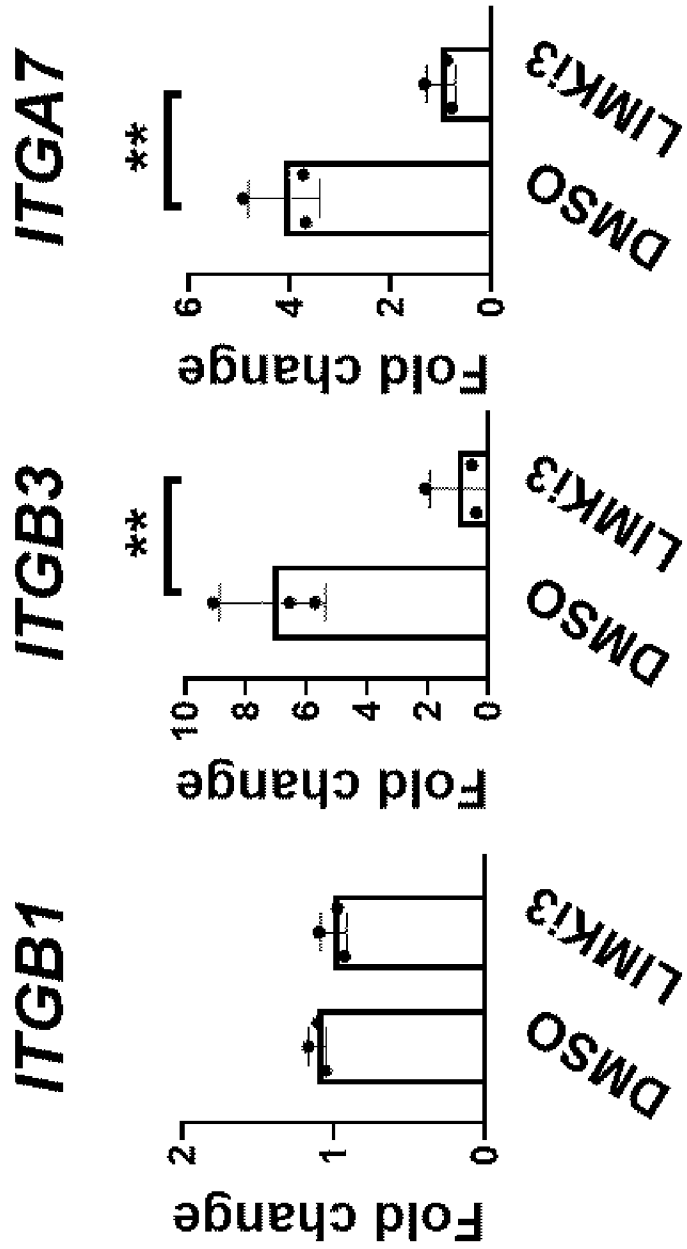
[도20d]



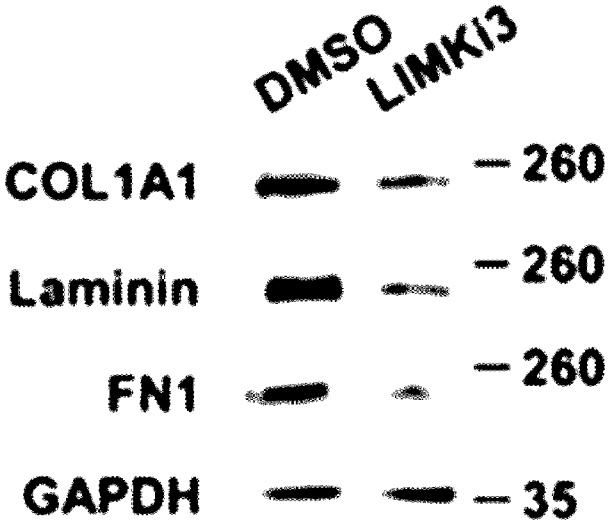
[도20e]


LAMC3
Fold change
0
1
2
3
4
DMSO
LIMKi3
LAMC1
**
Fold change
0
2
4
6
8
DMSO
LIMKi3
LAMA2
***
Fold change
0
5
10
DMSO
LIMKi3
COL4A2
*
Fold change
0
1
2
3
DMSO
LIMKi3

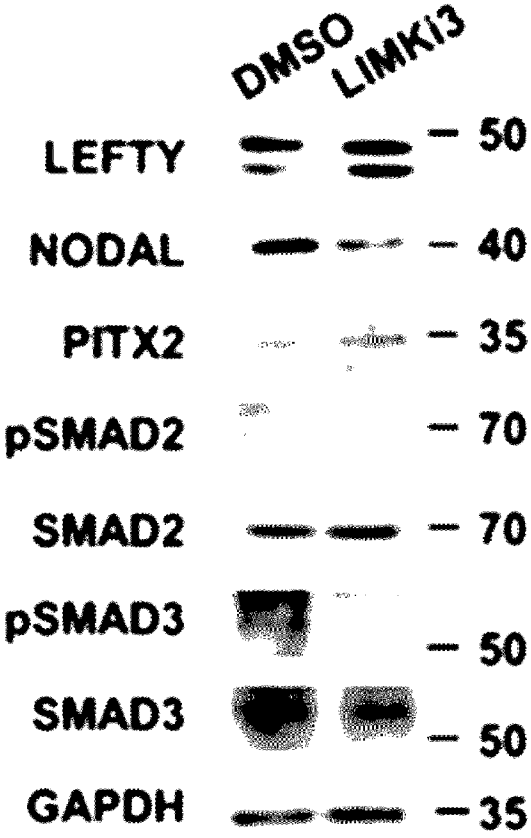
[도20f]


ITGA7
**
DMSO
LIMKi3
Fold change
0
2
4
6
ITGB3
**
DMSO
LIMKi3
Fold change
0
2
4
6
8
10
ITGB1
DMSO
LIMKi3
Fold change
0
1
2

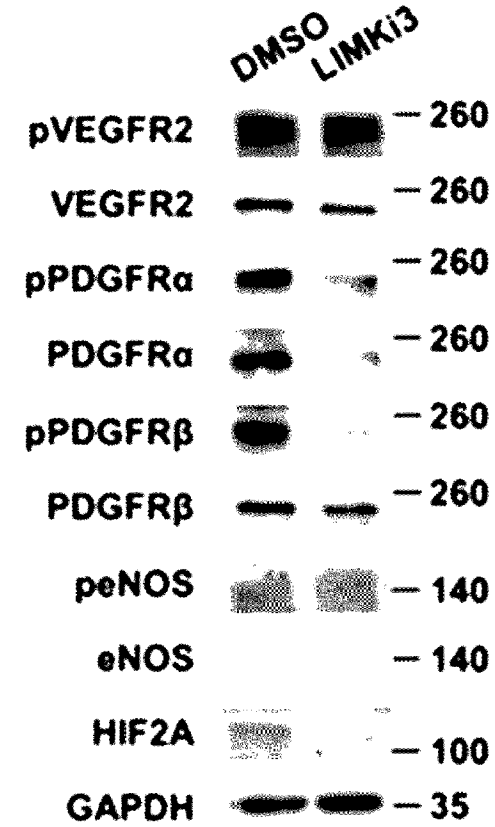
[도20g]


DMSO
LIMKi3
COL1A1
260
Laminin
260
FN1
260
GAPDH
35

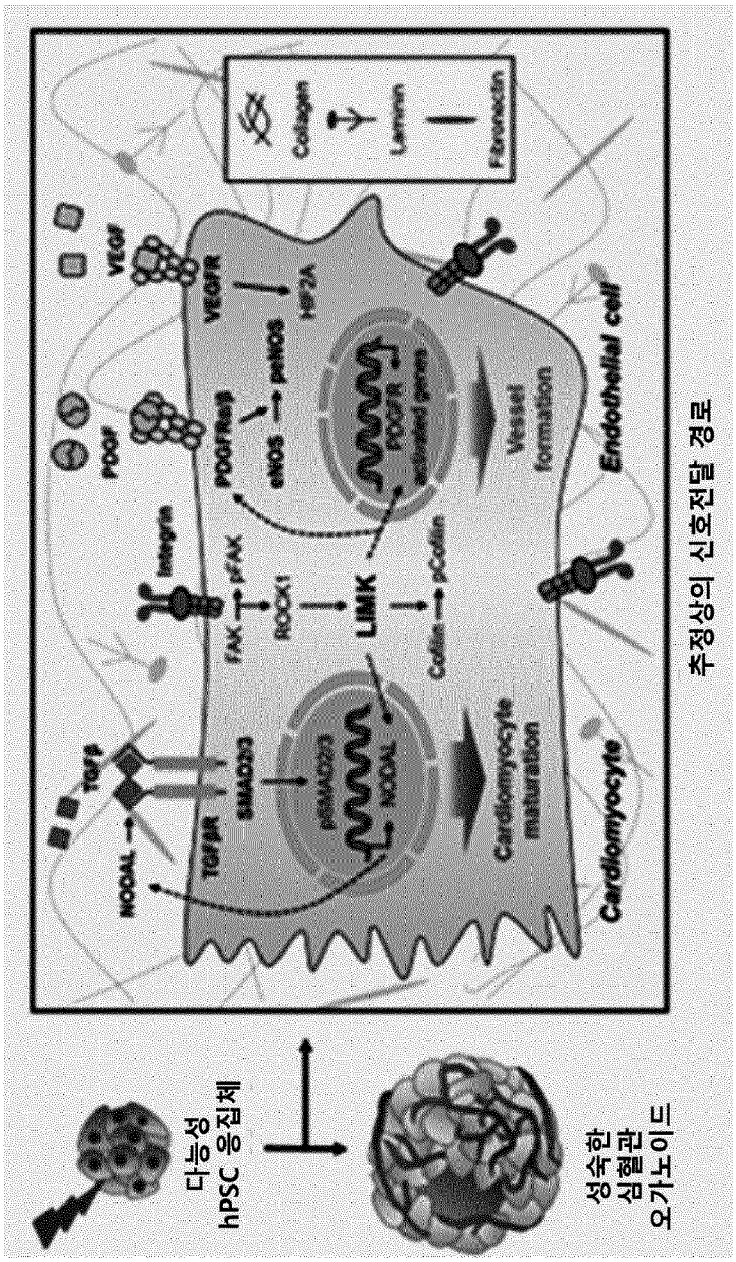
[도20h]


DMSO
LIMKi3
LEFTY
NODAL
PITX2
pSMAD2
SMAD2
pSMAD3
SMAD3
GAPDH
50
40
35
70
70
50
50
35

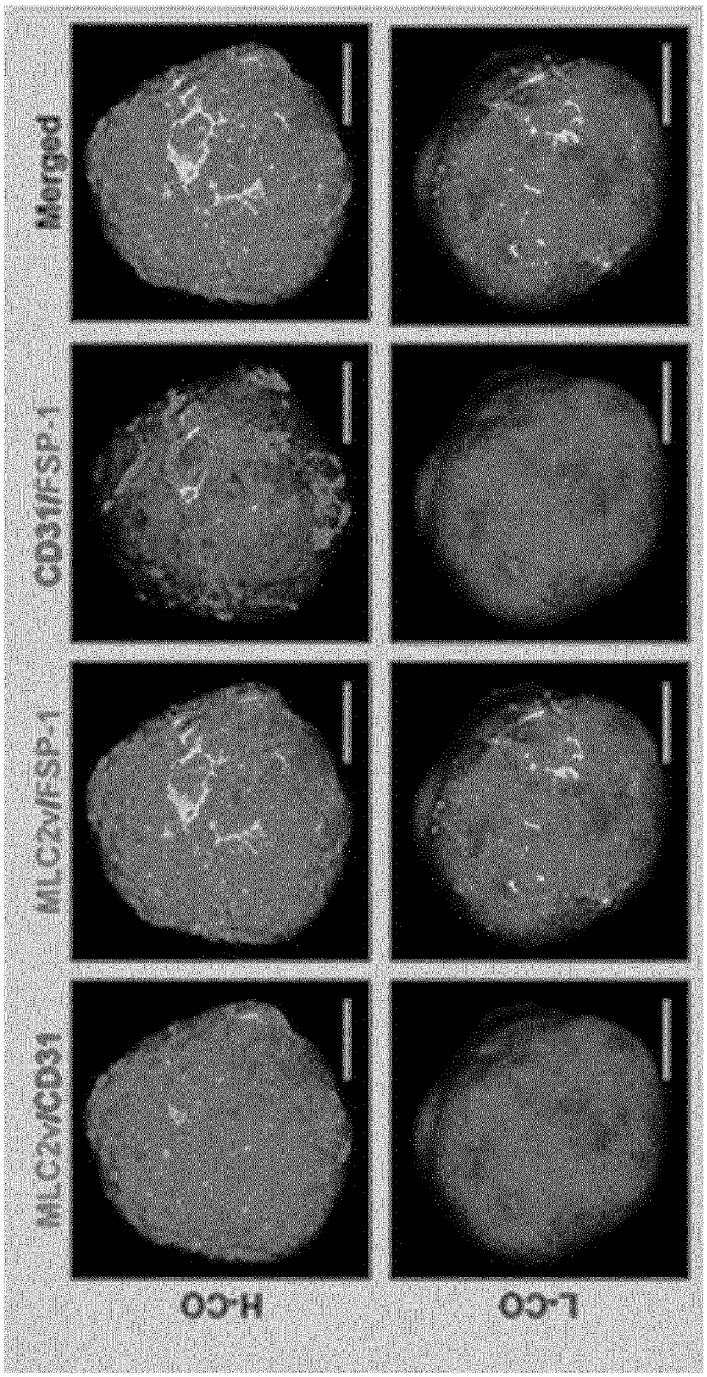
[도20i]


DMSO
LIMKi3
pVEGFR2
VEGFR2
pPDGFRα
PDGFRα
pPDGFRβ
PDGFRβ
peNOS
eNOS
HIF2A
GAPDH
260
260
260
260
260
260
140
140
100
35

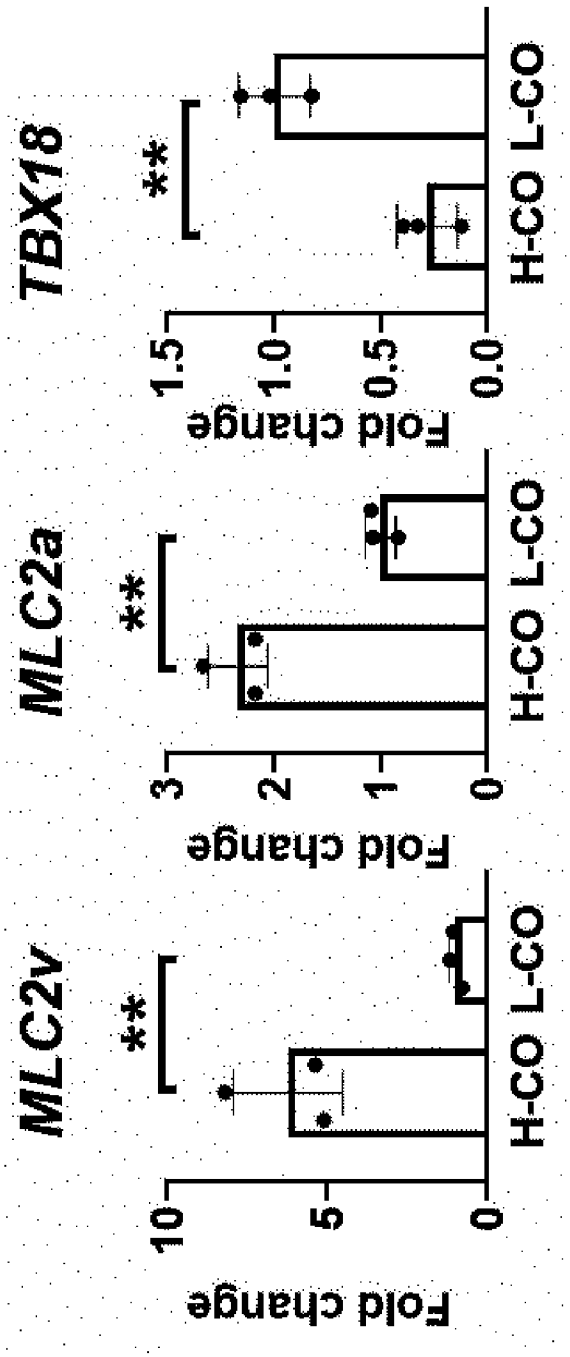
[도20j]


다능성
hPSC 응집체
성숙한
심혈관
오가노이드
추정상의 신호전달 경로
Cardiomyocyte
Endothelial cell
Cardiomyocyte maturation
Vessel formation
NODAL
TGFβ
TGFβR
SMAD2/3
pSMAD2/3
NODAL
FAK
pFAK
ROCK1
LIMK
Cofilin
pCofilin
Integrin
PDGF
PDGFRαβ
eNOS
peNOS
VEGF
VEGFR
HIF2A
PDGFR activated genes
Collagen
Lamnin
Fibronectin

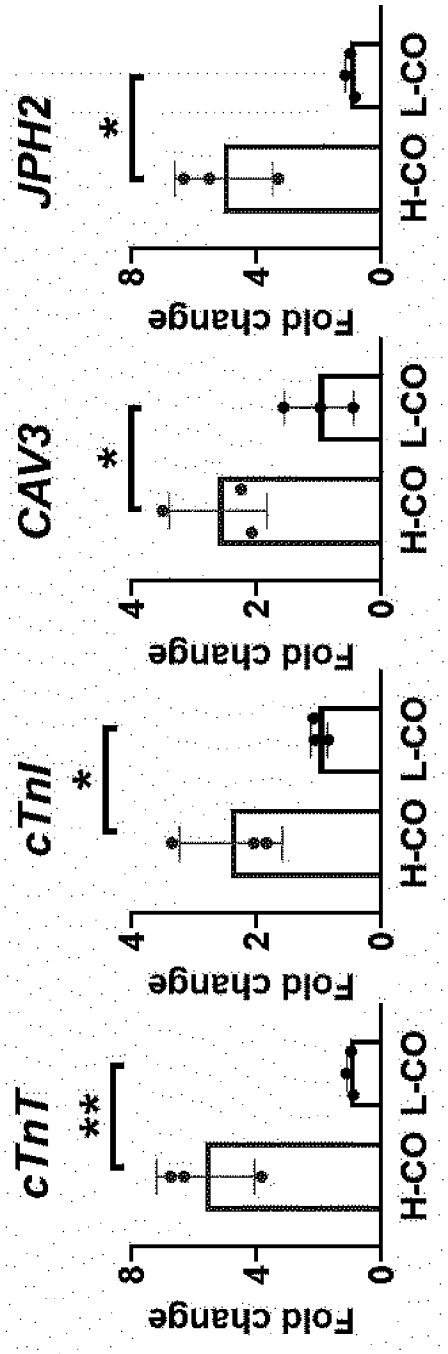
[도21a]



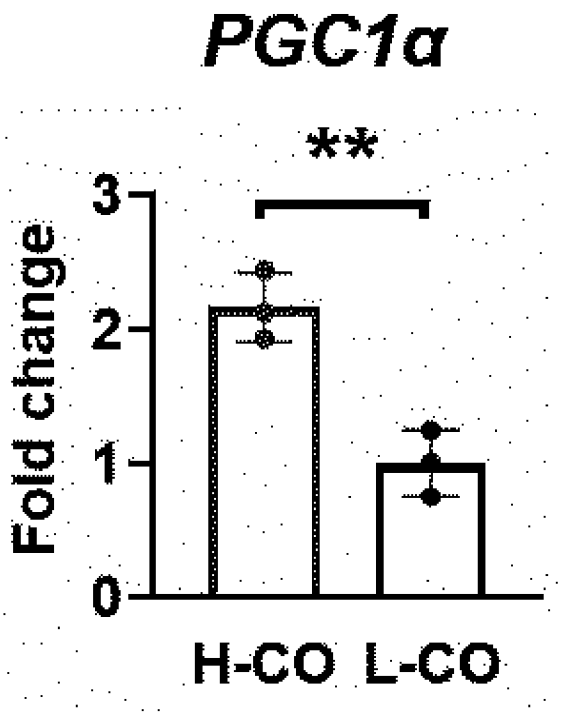
[도21b]


MLC2v
**
Fold change
10
5
0
H-CO L-CO
MLC2a
**
Fold change
3
2
1
0
H-CO L-CO
TBX18
**
Fold change
1.5
1.0
0.5
0.0
H-CO L-CO

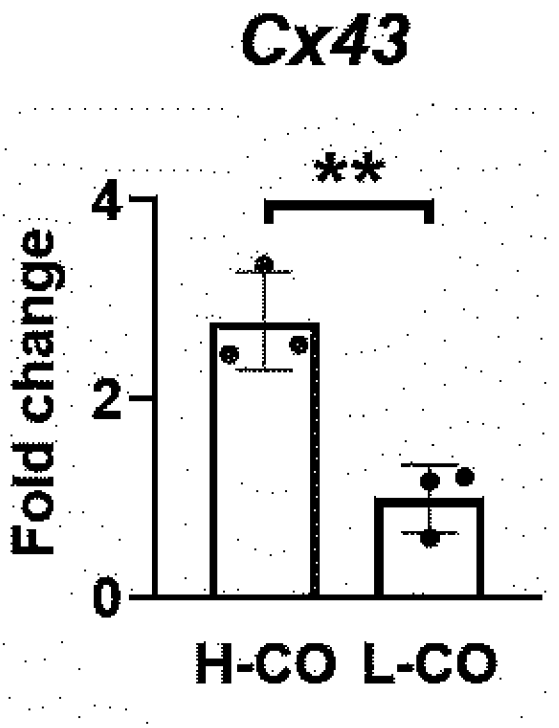
[도21c]


cTnT
**
Fold change
8
4
0
H-CO L-CO
cTnI
*
Fold change
4
2
0
H-CO L-CO
CAV3
*
Fold change
4
2
0
H-CO L-CO
JPH2
*
Fold change
8
4
0
H-CO L-CO

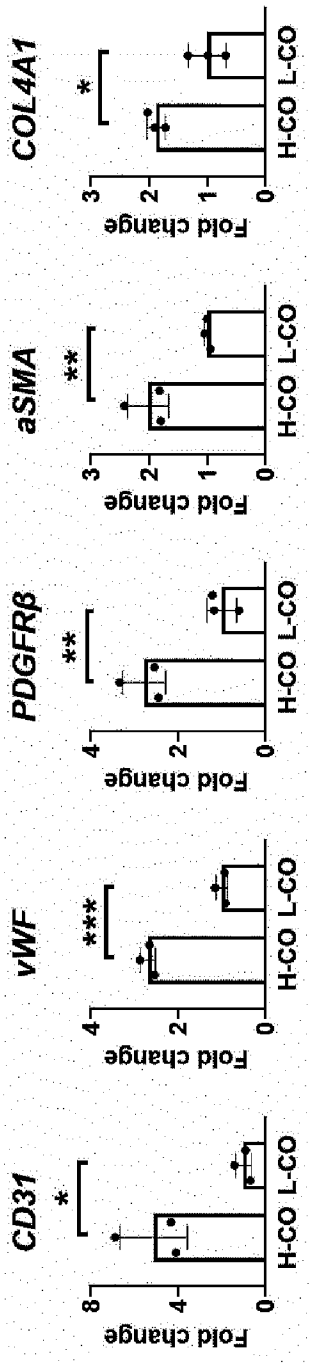
[도21d]



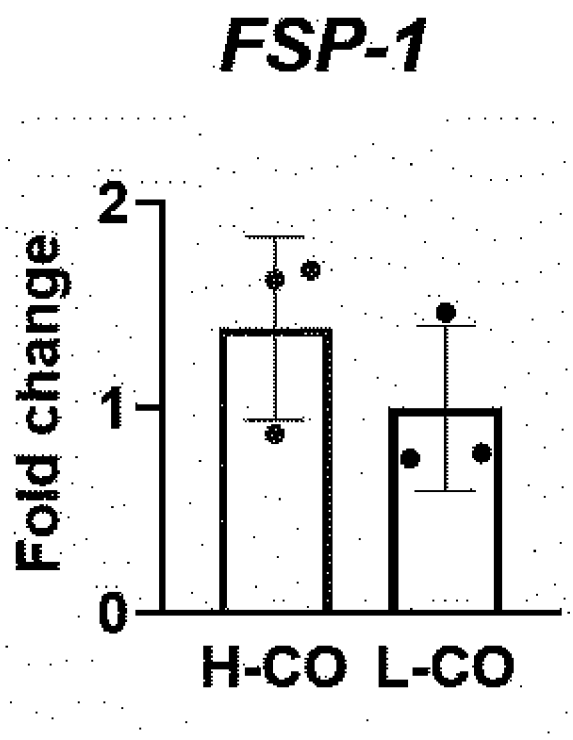
[도21e]



[도21f]


CD31
*
Fold change
0
4
8
H-CO
L-CO
vWF
***
Fold change
0
2
4
H-CO
L-CO
PDGFRβ
**
Fold change
0
2
4
H-CO
L-CO
aSMA
**
Fold change
0
1
2
3
H-CO
L-CO
COL4A1
*
Fold change
0
1
2
3
H-CO
L-CO

[도21g]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/011678

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i; **C12N 5/077**(2010.01)i; **A61L 27/36**(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 5/071(2010.01); A61K 38/17(2006.01); A61L 27/00(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/077(2010.01); F21V 33/00(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: LIMK(LIM kinase), 심혈관 오가노이드(cardiovascular organoids, CO), 성숙(mature)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SONG, Myeong-Hwa et al. LEFTY-PITX2 signaling pathway is critical for generation of mature and ventricular cardiac organoids in human pluripotent stem cell-derived cardiac mesoderm cells. Biomaterials. 2021, vol. 278, 121133, pp. 1-19. See abstract; pages 2, 11 and 15; and figures 1 and 7.	1-15
A	KR 10-2022-0153170 A (NEXEL CO., LTD.) 18 November 2022 (2022-11-18) See entire document.	1-15
A	US 2020-0011523 A1 (PROPAGENIX INC.) 09 January 2020 (2020-01-09) See entire document.	1-15
A	US 2021-0189351 A1 (PROPAGENIX INC.) 24 June 2021 (2021-06-24) See entire document.	1-15
A	JP 2007-528756 A (NAKAMURA, Norimasa) 18 October 2007 (2007-10-18) See entire document.	1-15

☐ 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	Date of mailing of the international search report
08 November 2023	**09 November 2023**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/011678

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 16 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/011678

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2022-0153170 A	18 November 2022	CN 116249767 A	09 June 2023
		JP 2023-536130 A	23 August 2023
		US 2023-0295576 A1	21 September 2023
		WO 2022-239959 A1	17 November 2022
US 2020-0011523 A1	09 January 2020	CN 107636149 A	26 January 2018
		EP 3277799 A1	07 February 2018
		EP 3277799 B1	23 September 2020
		EP 3347450 A1	18 July 2018
		EP 3347450 B1	17 March 2021
		EP 3822339 A1	19 May 2021
		EP 3892717 A1	13 October 2021
		EP 3892718 A1	13 October 2021
		JP 2018-512890 A	24 May 2018
		JP 2018-532389 A	08 November 2018
		JP 2020-120686 A	13 August 2020
		JP 6869231 B2	12 May 2021
		JP 6964068 B2	10 November 2021
		KR 10-2017-0134634 A	06 December 2017
		US 10066201 B2	04 September 2018
		US 10100285 B2	16 October 2018
		US 10119121 B2	06 November 2018
		US 10514163 B2	24 December 2019
		US 10711250 B2	14 July 2020
		US 11060715 B2	13 July 2021
		US 2017-0029779 A1	02 February 2017
		US 2017-0029780 A1	02 February 2017
		US 2017-0073635 A1	16 March 2017
		US 2018-0002669 A1	04 January 2018
		US 2018-0051258 A1	22 February 2018
		US 2018-0208900 A1	26 July 2018
		US 2019-0041052 A1	07 February 2019
		US 2021-0032602 A1	04 February 2021
		US 9790471 B2	17 October 2017
		US 9963680 B2	08 May 2018
		WO 2016-161192 A1	06 October 2016
		WO 2017-044454 A1	16 March 2017
US 2021-0189351 A1	24 June 2021	CA 3107502 A1	27 February 2020
		EP 3841195 A1	30 June 2021
		WO 2020-041065 A1	27 February 2020
JP 2007-528756 A	18 October 2007	EP 1651756 A1	03 May 2006
		EP 1651756 B1	24 November 2010
		JP 4522994 B2	11 August 2010
		US 2008-0004713 A1	03 January 2008
		US 2016-0256608 A1	08 September 2016
		US 9370606 B2	21 June 2016
		US 9694107 B2	04 July 2017
		WO 2005-012512 A1	10 February 2005
		WO 2007-083504 A1	26 July 2007

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/011678

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/071(2010.01)i; **C12N 5/077**(2010.01)i; **A61L 27/36**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/071(2010.01); A61K 38/17(2006.01); A61L 27/00(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/077(2010.01); F21V 33/00(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: LIMK(LIM kinase), 심혈관 오가노이드(cardiovascular organoids, CO), 성숙(mature)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SONG, MYEONG-HWA 등, "LEFTY-PITX2 signaling pathway is critical for generation of mature and ventricular cardiac organoids in human pluripotent stem cell-derived cardiac mesoderm cells", Biomaterials, 2021, 278권, 121133, 페이지 1-19 요약; 페이지 2, 11, 15; 및 도면 1, 7 참조.	1-15
A	KR 10-2022-0153170 A ((주) 넥셀) 2022.11.18 전체 문헌 참조.	1-15
A	US 2020-0011523 A1 (PROPAGENIX INC.) 2020.01.09 전체 문헌 참조.	1-15
A	US 2021-0189351 A1 (PROPAGENIX INC.) 2021.06.24 전체 문헌 참조.	1-15
A	JP 2007-528756 A (NAKAMURA, NORIMASA) 2007.10.18 전체 문헌 참조.	1-15

☐ 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 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2023년11월08일(08.11.2023)	**2023년11월09일(09.11.2023)**

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**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/011678

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **16**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 16은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/011678

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0153170 A	2022/11/18	CN 116249767 A	2023/06/09
		JP 2023-536130 A	2023/08/23
		US 2023-0295576 A1	2023/09/21
		WO 2022-239959 A1	2022/11/17
US 2020-0011523 A1	2020/01/09	CN 107636149 A	2018/01/26
		EP 3277799 A1	2018/02/07
		EP 3277799 B1	2020/09/23
		EP 3347450 A1	2018/07/18
		EP 3347450 B1	2021/03/17
		EP 3822339 A1	2021/05/19
		EP 3892717 A1	2021/10/13
		EP 3892718 A1	2021/10/13
		JP 2018-512890 A	2018/05/24
		JP 2018-532389 A	2018/11/08
		JP 2020-120686 A	2020/08/13
		JP 6869231 B2	2021/05/12
		JP 6964068 B2	2021/11/10
		KR 10-2017-0134634 A	2017/12/06
		US 10066201 B2	2018/09/04
		US 10100285 B2	2018/10/16
		US 10119121 B2	2018/11/06
		US 10514163 B2	2019/12/24
		US 10711250 B2	2020/07/14
		US 11060715 B2	2021/07/13
		US 2017-0029779 A1	2017/02/02
		US 2017-0029780 A1	2017/02/02
		US 2017-0073635 A1	2017/03/16
		US 2018-0002669 A1	2018/01/04
		US 2018-0051258 A1	2018/02/22
		US 2018-0208900 A1	2018/07/26
		US 2019-0041052 A1	2019/02/07
		US 2021-0032602 A1	2021/02/04
		US 9790471 B2	2017/10/17
		US 9963680 B2	2018/05/08
		WO 2016-161192 A1	2016/10/06
		WO 2017-044454 A1	2017/03/16
US 2021-0189351 A1	2021/06/24	CA 3107502 A1	2020/02/27
		EP 3841195 A1	2021/06/30
		WO 2020-041065 A1	2020/02/27
JP 2007-528756 A	2007/10/18	EP 1651756 A1	2006/05/03
		EP 1651756 B1	2010/11/24
		JP 4522994 B2	2010/08/11
		US 2008-0004713 A1	2008/01/03
		US 2016-0256608 A1	2016/09/08
		US 9370606 B2	2016/06/21
		US 9694107 B2	2017/07/04
		WO 2005-012512 A1	2005/02/10
		WO 2007-083504 A1	2007/07/26