



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월17일  
(11) 등록번호 10-2590084  
(24) 등록일자 2023년10월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/00 (2006.01)  
C12N 5/079 (2010.01) C12N 5/0793 (2010.01)  
G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 5/0697 (2013.01)  
C12N 5/0031 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7037323
- (22) 출원일자(국제) 2018년06월08일  
심사청구일자 2021년03월04일
- (85) 번역문제출일자 2019년12월17일
- (65) 공개번호 10-2020-0017417
- (43) 공개일자 2020년02월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/065204
- (87) 국제공개번호 WO 2018/228948  
국제공개일자 2018년12월20일
- (30) 우선권주장  
17175874.1 2017년06월13일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
17205951.1 2017년12월07일  
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌  
JP2016506244 A\*  
Cell Stem Cell, vol.17, pp.735-747(2015)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
게오르그-아우구스트-우니베시태트 괴팅겐 스티프  
통 외펜틀리헨 레흐츠, 우니베시태츠메디진  
독일 37075 괴팅겐 로베르트-코흐-스트라세 40
- (72) 발명자  
짐머만 볼프람-휴베르투스  
독일 37073 괴팅겐 뷰엘스타라세 17  
자페리오우 마리아 파타피아  
독일 37075 괴팅겐 베르테아우스트라세 6
- (74) 대리인  
특허법인명신, 남완용

전체 청구항 수 : 총 13 항

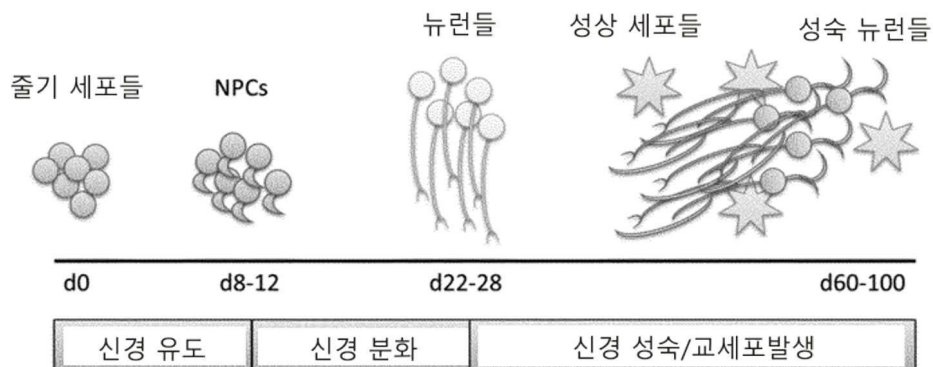
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 생체공학적 뉴런 오르가노이드(BENO) 생산 방법 및 그 사용

(57) 요약

본 발명은 특히 뇌의 신경 조직들의 시험관 3D 모델링 영역에 관한 것이다. 신경 조직의 생리적 측면을 반영하는 신경 조직의 세포 배양 모델들을 개발할 필요가 있다. 본 발명은 기능적 뉴런 망들을 형성하는 생명공학적 뉴런 오르가노이드(orgnoid)(BENO)들을 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 예를 들어, 약물 스크리닝 및 개인 맞춤 의료 영역들에서의 생산된 BENO들의 사용 및 적용에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*C12N 5/0619* (2013.01)

*C12N 5/0622* (2013.01)

*G01N 33/50* (2013.01)

*G01N 33/5005* (2013.01)

*C12N 2501/115* (2013.01)

*C12N 2501/15* (2013.01)

*C12N 2501/42* (2013.01)

*C12N 2501/727* (2013.01)

*C12N 2502/081* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

다능성 줄기 세포(PSC)들로부터 생체공학적 뉴런 오르가노이드(BENO)를 생산하는 방법으로서,

(A) 무혈청 세포 배양 배지에 잠긴 모체에 포매된 PSC들을 배양하는 단계;

(B) Rho-관련 키나아제 억제제(ROCKi) 및 FGF-2를 포함하는 무혈청 세포 배양 배지에서 (A) 단계의 상기 모체 내에서 PSC들을 배양하는 단계;

(C) 신경 발생을 유도하기 위해 레티노산 및 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제들을 포함하는 무혈청 세포 배양 배지에서 (B) 단계의 PSC들 및 모체에서 유래된 형성 BENO를 배양하는 단계;

(D) 간질 세포들의 발생 및 신경 발생을 향상시키기 위해 TGF-beta 및 FGF-2를 포함하는 무혈청 세포 배양 배지에서 (C) 단계의 형성 BENO를 배양하는 단계; 및

(E) 간질 세포들의 발생 및 신경 분화를 향상시키기 위해 TGF-beta 및 하나 이상의 노치 신호화의 억제제를 포함하는 무혈청 세포 배양 배지에서 (D) 단계의 형성 BENO를 배양하는 단계를 포함하며,

상기 모체가 콜라겐을 포함하고,

상기 BENO가 3D 환경 내에서 생산되며, 상기 3D 환경이 최초에 상기 모체에 의해 규정되는, 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

상기 모체가 매트릭셀을 포함하지 않는, 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서,

상기 모체가 매트릭셀 또는 비규정 조성을 갖는 자연 유래의 다른 구성 성분들을 포함하지 않는, 방법.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 모체가 유형 I 콜라겐을 포함하는, 방법.

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 간질 세포들이 교세포들을 포함하는, 방법.

**청구항 7**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 (D) 단계의 배지가 두 개 이상의 SMAD 신호화 억제제들을 포함하며, 상기 SMAD 신호화 억제제들은 노긴 및 SB 431542를 포함하는, 방법.

**청구항 8**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,  
(E) 단계의 상기 노치 신호화의 억제제가 DAPT인, 방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 PSC들은 인간 PSC들인, 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,  
(A) 단계가 -1일차에 수행되고,  
(B) 단계가 -1일차부터 0일차까지 수행되고,  
(C) 단계가 0일차부터 10일차까지 수행되고,  
(D) 단계가 10일차부터 15일차까지 수행되고,  
(E) 단계가 15일차부터 적어도 28일차까지 수행되는, 방법.

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산되는 생체공학적 뉴런 오르가노이드(BENO)로서, 상기 BENO는 콜라겐을 포함하는 모체에 포매되고, 상기 BENO의 뉴런 세포들이 기능적 뉴런 망으로 조직되며, 상기 뉴런 망이 기능적 시냅시스들의 형성, 계층적 망들의 형성, GABA 작동성 망들의 형성 및/또는 뉴런들의 동기화로 특징지어지는, BENO.

**청구항 13**

제12항에 있어서,  
질병 및 약물 중 하나 이상의 스크리닝을 위한 모델로 사용하기 위한, BENO.

**청구항 14**

제13항에 있어서,  
다른 조직 공학 플랫폼과 공동 배양으로 사용하기 위한 BENO.

**청구항 15**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 방법을 수행하기 위한 키트로서,  
콜라겐을 포함하는 모체, ROCKi, FGF-2, 레티노산, 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제들, TGF-beta, 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제들을 포함하는, 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 특히 뇌의 신경 조직들의 시험관 3D 모델링 영역에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 신경 조직들, 특히, 인간의 뇌와 같은 포유류의 뇌에서 유래된 조직들의 시험관 3D 모델링은 복잡한 뉴런 세포

시스템들의 연구를 가능하게 하는 강력한 조직 생체공학 도구의 전형이다. 일반적으로, 3D 세포 배양 시스템들은 각각의 2D 배양 시스템들과 비교할 때, 더 빠른 세포 분화, 더 높은 세포 복잡성 및 수명을 제공한다. 신경 조직들의 시험관 3D 모델링에 대한 유망한 접근법은, 다양한 인간 조직들 및 장기들의 모델링에 사용되어 온, 다능성 줄기 세포(PSC)들의 사용을 수반한다. 예를 들어, 환자의 섬유아세포들을 유도 PSC들로 재프로그래밍 하는 데 사용되는 최근 기술들과 결합하는, 3D 모델링 방법론들의 그러한 이점은 모두, 인간의 다양한 뉴런-기반 질병들의 원인인 근원적 분자 메커니즘들을 설명하는 데 새로운 지평을 제공한다.

[0003] 인간 줄기 세포들의 신경 분화를 포함하는 수많은 프로토콜들이 문헌에 존재한다. 이러한 하나의 방법은, 배양 중 약 8 내지 12일 동안, 이중 SMAD(Sma 및 Mad 관련 족) 신호화(signaling) 경로 억제에 의한 (즉, BMP 및 TGF beta 억제에 의한) 신경외배엽 유도를 포함한다(Chambers, Fasano 외, Nat. Biotechnol., 2009). 이 시점에서, 대다수의 줄기 세포들이 신경 전구 세포(NPC)들로 변형된다. 12일 후에, 몇몇의 프로토콜들(Lancaster and Knoblich, Science, 2014)은 상기 세포들의 다양한 뉴런 세포들 및 교세포들로의 자발적 분화를 허용하는 반면, 다른 프로토콜들(Qian, Nguyen 외, Cell, 2016; Birey Andersen 외, Nature, 2017)은 조직들을 형태화(pattern) 하기 위해 다양한 형태화 인자(patterning factor)들을 적용시키거나, 뉴런 생존을 향상시키기 위해 신경영양 인자들(BDNF, GDNF)을 적용시킨다. 게다가, DAPT에 의한 dbcAMP 첨가 또는 노치(notch) 억제가 이러한 다능성 세포들의 뉴런 분화를 향상시킬 수 있다는 것이 관찰되어 왔다(Crawford and Roelink, Dev. Dyn, 2007; Kriks, Shim 외, Nature, 2011). 신경의 유도 및 분화뿐만 아니라 치료의 시기를 위해서도 사용되는 상기 인자들의 차이들은 이 과정들에 의해 제공되는 분화 능력을 규정한다. 다른 보고에서는, 인간 뇌 오르가노이드(organoid)들이 생쥐 모델들을 이용해서는 쉽게 재현하지 못 하는 질병인 소두증을 위한 모델로서 제작되었다(Lancaster 외, Nature, 2013, Qian, Nguyen 외, Cell, 2016).

[0004] 인간 뉴런 오르가노이드 생성에 있어서의 발전들에도 불구하고, 기존의 뉴런 오르가노이드들의 유용성을 제한하는 수많은 결함들이 여전히 존재한다. 예를 들면, 이미 알려진 방법들은 뉴런 오르가노이드들의 정확한 정의가 부족하며; 따라서, 이러한 오르가노이드들은 보통 높은 표현형 변이성을 나타낸다. 이는 부분적으로, 신경 발생 지지 기질로서 매트리지(Matrigel)의 통상적인 사용에 기인한다.

[0005] 이미 알려진 방법들과 관련된 다른 결점은, 뉴런의 기능성 및 가소성에 대한 모든 연구를 현저히 제한하는, 제작된 오르가노이드들의 뉴런 망 기능 부족이다. 정상 뇌 조직과 비교하여, 이미 알려진 제작된 뉴런 오르가노이드 구조체들의 동떨어진 표현 유사성 때문에, 질병 모델링 및 약물 개발 또한 제한된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 따라서, 제작된 구조체들의 일관성을 가능하게 하기 위해, 화학적으로 규정된 성분들의 사용에 근거하는 뉴런 오르가노이드 생성 방법들이 필요하다. 뿐만 아니라, 의미 있게 자연 신경 구조체들을 모방하기 위해, 기능적 뉴런망을 형성할 수 있는 뉴런 오르가노이드들의 생산이 필요하다.

**과제의 해결 수단**

[0007] 본 발명은 다능성 줄기 세포(PSC)들로부터 생체공학적 뉴런 오르가노이드(BENO)를 생산하는 방법에 관한 것으로서:

- [0008] (A) PSC들의 원천을 제공하는 단계;
- [0009] (B) 세포 배양 배지에 잠긴 모체에 포매된 (A) 단계의 PSC들을 배양하는 단계;
- [0010] (C) Rho-관련 키나아제 억제제(ROCKi) 및 FGF-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 (B) 단계의 상기 모체 내에서 PSC들을 배양하는 단계;
- [0011] (D) 신경 발생을 유도하기 위해 레티노산 및 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제들을 포함하는 세포 배양 배지에서 (C) 단계의 PSC들 및 모체에서 유래된 형성 BENO를 배양하는 단계;
- [0012] (E) 간질 세포들의 발생 및 신경 발생을 향상시키기 위해 TGF-beta 및 FGF-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 (D) 단계의 형성 BENO를 배양하는 단계;
- [0013] (F) 간질 세포들의 발생 및 신경 분화를 향상시키기 위해 TGF-beta 및 하나 이상의 노치(notch) 신호화의 억제제들을 포함하는 세포 배양 배지에서 (E) 단계의 형성 BENO를 배양하는 단계를 포함한다.

- [0014] 일부 실시예들에서는, 상기 모체가 매트릭젤을 포함하지 않는다. 다른 실시예들에서는, 상기 모체가 매트릭젤 또는 비규정 조성을 갖는 자연 유래의 다른 성분들을 포함하지 않는다. 바람직한 실시예에서는, 상기 모체가 콜라겐을 포함한다. 가장 바람직한 실시예에서는, 상기 모체가 유형 I 콜라겐을 포함한다. 일부 실시예들에서는, 상기 모체가 콜라겐이다. 일부 실시예들에서는, 상기 모체가 콜라겐 I이다.
- [0015] 일부 실시예들에서는, 상기 BENO가 3D 환경 내에서 생산된다. 바람직하게, 상기 3D 환경은 상기 모체에 의해 규정된다.
- [0016] 일부 실시예들에서는, 상기 간질 세포들이 교세포들을 포함한다.
- [0017] 일부 실시예들에서는, (D) 단계의 배지가 두 개 이상의 SMAD 신호화 억제제를 포함한다. 바람직하게, 상기 SMAD 신호화 억제제들은 노긴(noggin) 및 SB 431542를 포함한다. 일부 실시예들에서는, 상기 SMAD 신호화 억제제들이 노긴 및 SB 431542이다.
- [0018] 일부 실시예들에서는, (F) 단계의 상기 노치 신호화 억제제가 DAPT이다.
- [0019] 일 실시예에서는, 상기 SMAD 신호화 억제제들이 노긴 및 SB 431542이며, (F) 단계의 상기 노치 신호화 억제제가 DAPT이다.
- [0020] 일부 실시예들에서는, 상기 모체가 0.05mg/ml 및 50mg/ml 사이, 바람직하게는 0.1mg/ml 및 10ml/ml 사이, 더욱 바람직하게는 0.5mg/ml 및 5mg/ml 사이의 농도로, 가장 바람직하게는 1mg/ml의 농도로 사용된 콜라겐이다.
- [0021] 일부 실시예들에서는, 레티노산이 0.01 μM 및 100 μM 사이, 바람직하게는 0.1 μM 및 10 μM 사이, 더욱 바람직하게는 0.5 μM 및 5 μM 사이의 유효한 농도로, 가장 바람직하게는 1 μM의 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, 노긴이 0.1ng/ml 내지 1 μg/ml, 바람직하게는 1ng/ml 내지 500ng/ml, 더욱 바람직하게는 10ng/ml 내지 200ng/ml, 가장 바람직하게는 50ng/ml의 유효한 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, SB 431542가 0.1 μM 내지 1mM, 바람직하게는 1 μM 내지 100 μM, 더욱 바람직하게는 5 μM 및 50 μM 사이, 가장 바람직하게는 10 μM의 유효한 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, TGF-beta가 0.1ng/ml 및 100ng/ml 사이, 바람직하게는 0.3ng/ml 및 30ng/ml 사이, 더욱 바람직하게는 1ng/ml 및 10ng/ml 사이의 유효한 농도로, 가장 바람직하게는 5ng/ml의 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, FGF-2가 0.1ng/ml 및 1 μg/ml, 바람직하게는 1ng/ml 및 100ng/ml 사이, 더욱 바람직하게는 5ng/ml 및 50ng/ml 사이의 유효한 농도로, 가장 바람직하게는 10ng/ml의 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, DAPT가 0.01 μM 및 100 μM 사이, 바람직하게는 0.1 μM 및 10 μM 사이, 더욱 바람직하게는 0.5 μM 및 5 μM 사이의 유효한 농도로, 가장 바람직하게는 2.5 μM의 농도로 사용된다.
- [0022] 일부 실시예들에서는, 레티노산이 0.5 μM 및 5 μM 사이의 농도로 사용되고, 노긴이 10ng/ml 내지 200ng/ml의 농도로 사용되고, SB 431542가 5 μM 및 50 μM 사이의 농도로 사용되고, TGF-beta가 1ng/ml 및 10ng/ml 사이의 농도로 사용되고, FGF-2가 5ng/ml 및 50ng/ml 사이의 농도로 사용되고, DAPT가 0.5 μM 및 5 μM 사이의 농도로 사용된다.
- [0023] 일부 실시예들에서는, 레티노산이 0.5 μM 및 5 μM 사이의 농도로 사용되고, 노긴이 10ng/ml 내지 200ng/ml의 농도로 사용되고, SB 431542가 5 μM 및 50 μM 사이의 농도로 사용되고, TGF-beta가 1ng/ml 및 10ng/ml 사이의 농도로 사용되고, FGF-2가 5ng/ml 및 50ng/ml 사이의 농도로 사용되고, DAPT가 0.5 μM 및 5 μM의 농도로 사용되고, 상기 모체가 0.1mg/ml 및 10mg/ml 사이의 농도로 사용되는 콜라겐이다.
- [0024] 일부 실시예들에서는, 레티노 산이 1 μM의 농도로 사용되고, 노긴이 50ng/ml의 농도로 사용되고, SB 431542가 10 μM의 농도로 사용되고, TGF-beta가 5ng/ml의 농도로 사용되고, FGF-2가 10ng/ml의 농도로 사용되고, DAPT가 2.5 μM의 농도로 사용된다.
- [0025] 일부 실시예들에서는, 레티노 산이 1 μM의 농도로 사용되고, 노긴이 50ng/ml의 농도로 사용되고, SB 431542가 10 μM의 농도로 사용되고, TGF-beta가 5ng/ml의 농도로 사용되고, FGF-2가 10ng/ml의 농도로 사용되고, DAPT가 2.5 μM의 농도로 사용되고, 상기 모체가 0.5mg/ml 및 5mg/ml 사이의 농도로 사용되는 콜라겐이다.
- [0026] 일부 실시예에서는, 상기 PSC들이 동물 세포들이다. 일부 실시예에서는, 상기 PSC들이 포유동물 세포들이다. 일부 실시예에서는, 상기 PSC들이 설치류 (예를 들어, 생쥐 또는 쥐) 또는 인간 세포들이다. 바람직한 실시예들에서는, 상기 PSC들이 인간 PSC들이다. 본 발명의 상기 PSC들은 인간의 생식 계열 유전자 정체성에 대한 변형을 수반하거나, 산업적 또는 상업적 목적을 위해 인간 배아 사용을 수반하는 공정을 사용해 생산되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 상이한 단계들은 다양한 기간 동안 수행된다. 일 실시예에서는, (A) 단계 및 (B) 단계가 -1일에 수행

된다. 일 실시예에서는, (C) 단계가 -1일에서부터 0일까지 수행된다. 일 실시예에서는, (D) 단계가 0일에서부터 8일까지 수행된다. 일 실시예에서는, (E) 단계가 8일에서부터 15일까지 수행된다. 일 실시예에서는, (F) 단계가 15일에서부터 적어도 28일까지 수행된다. 일 실시예에서는, (A) 단계 및 (B) 단계가 -1일에 수행되고, (C) 단계가 -1일에서부터 0일까지 수행된다. 일 실시예에서는, (A) 단계 및 (B) 단계가 -1일에 수행되고, (C) 단계가 -1일에서부터 0일까지 수행되고, (D) 단계가 0일에서부터 8일까지 수행된다. 일 실시예에서는, (A) 단계 및 (B) 단계가 -1일에 수행되고, (C) 단계가 -1일에서부터 0일까지 수행되고, (D) 단계가 0일에서부터 8일까지 수행되고, (E) 단계가 8일에서부터 15일까지 수행된다. 일 실시예에서는, (A) 단계 및 (B) 단계가 -1일에 수행되고, (C) 단계가 -1일에서부터 0일까지 수행되고, (D) 단계가 0일에서부터 8일까지 수행되고, (E) 단계가 8일에서부터 15일까지 수행되고, (F) 단계가 15일에서부터 적어도 28일까지 수행된다. 일 실시예에서는, (A) 단계 및 (B) 단계가 -1일에 수행되고, (C) 단계가 -1일에서부터 0일까지 수행되고, (D) 단계가 0일에서부터 10일까지 수행되고, (E) 단계가 10일에서부터 15일까지 수행되고, (F) 단계가 15일에서부터 적어도 28일까지 수행된다.

[0028] 일 양상에서, 본 발명은 뉴런 오르가노이드들, 예를 들어, 생체공학적 뉴런 오르가노이드(BENO)들을 제공하며, 상기 뉴런 오르가노이드의 뉴런 세포들은 기능적 뉴런망으로 조직되는 것을 특징으로 한다. 일 양상에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 생산된 생체공학적 뉴런 오르가노이드(BENO)들을 제공한다.

[0029] 일부 양상들에서, 본 발명은, 일 질병을 위한 모델로서, 본 발명의 방법들로 생산된 BENO들의 사용을 목적으로 한다. 일부 실시예들에서 본 발명은, 신경 조직과 관련된 일 질병을 위한 모델들로서, 본 발명의 방법들로 생산된 BENO들의 사용을 목적으로 한다. 일부 실시예들에서 본 발명은, 뇌졸중, 뇌 염증 장애들, 신경퇴행성 질병들, 신경염증성 질병들, 외상성 손상, 이온 통로 병증, 그리고 정신 질환들로 구성된 그룹에서 선택된 일 질병을 위한 모델들로서, 본 발명의 방법들로 생산된 BENO들의 사용을 목적으로 한다. 일부 실시예들에서 본 발명은, (파킨슨병, 알츠하이머병과 같은) 신경퇴행성 질병들, 신경염증성 질병들(예를 들어, 다발성 경화증), 외상성 손상(예를 들어, 뇌-수술-유발 손상), 이온 통로 병증(예를 들어, 간질), 그리고 정신 질환들(예를 들어, 자폐증, 정신분열증)로 구성된 그룹에서 선택된 일 질병을 위한 모델들로서, 본 발명의 방법들로 생산된 BENO들의 사용을 목적으로 한다.

[0030] 다른 양상들에서, 본 발명은 일 질병을 위한 모델로서, 본 발명의 방법들로 생산된 BENO들의 사용을 목적으로 하며, 이때 상기 BENO들은 다른 조직 공학 플랫폼과 공동 배양된다. 일부 실시예들에서는, 상기 다른 조직 공학 플랫폼이 EHM(공학적 심근), BSM(생체공학적 골격근)들, ESM(공학적 골격근), ELT(공학적 간 조직), 그리고 ECT(공학적 결합 조직)으로 구성되는 그룹에서 선택된다. 다른 실시예들에서는, 상기 다른 조직 공학 플랫폼이 종양 모델들(예를 들어, 종양 뇌 침입, 전이 확산) 및 백혈구 침투 모델들(예를 들어, 자기면역 질환)으로 구성되는 그룹에서 선택된다.

[0031] 일부 양상들에서, 본 발명은 약물 발견과 같은 약물 스크리닝(drug screening) 및 표출형 약물 스크리닝에 의한 약물 개선에서, 본 발명의 방법들로 생산된 BENO들을 사용하는 것을 목적으로 한다. 이러한 BENO들의 사용은 뇌 및 신경 조직의 보수, 재생, 보호 및 질병 예방을 유도하거나 향상시킬 수 있는 약물들의 발견 및 개선을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0032] 다른 양상들에서, 본 발명은 본 발명의 방법을 실행하기 위한 키트(kit)를 목적으로 한다. 일부 실시예들에서는, 상기 키트가 PSC들, 모체, 적절한 배지들 및 필요한 보충물들(ROCKi, FGF-2, 레티노산, 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제들, TGF-beta 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제들)을 포함한다. 다른 실시예들에서는, 키트가 모체, 적절한 배지들 및 필요한 보충물들(ROCKi, FGF-2, 레티노산, 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제들, TGF-beta 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제들)을 포함한다. 다른 실시예들에서는, 키트가 모체 및 필요한 보충물들(ROCKi, FGF-2, 레티노산, 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제들, TGF-beta 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제들)을 포함한다. 다른 실시예들에서는, 키트가 모체 및 필요한 보충물들(ROCKi, FGF-2, 레티노산, 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제들, TGF-beta 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제들) 중 네 개 이상을 포함한다.

### 발명의 효과

[0033] 본 발명은 잘 규정된 3D 세포 배양 시스템에서 왕성하면서도 재현 가능한 신경 분화를 가능하게 하는 방법들을 제공하며, 게다가 기능적 뉴런망의 형성 및 가소성 특징들에 대한 연구들의 확실한 근거를 제공한다.

[0034] 본 발명의 오르가노이드들은 게다가 약물 개발에 있어서 가치 있는 수단을 제공한다. 예를 들어, 이러한 오르가노이드들은, 시판 후 결과를 예측할 때, 적어도 동물-기반 실험에 대한 필요가 감소하고 임상 시험들에서 필요로 하는 환자의 수가 감소하기 때문에, 임상 전 및 임상 약물 개발 모두와 관련된 통상적으로 과도한 비용을 유

의미하게 감소시킬 수 있다. 또한, 새로운 생물학적 제제(예를 들어, 비암호화 RNA 치료법들) 및 (예를 들어, 크리스퍼(CRISPR)-기반 플랫폼들을 이용하는) 유전자 편집을 인간 모델들에서 효과적으로 시험할 수 있다. 따라서, 본 발명에 의해 제공되는 것과 같은 매우 예측 가능한 인간 오르가노이드 모델들의 이용 가능성으로 인해, 이 영역에서의 빠른 성장들이 득을 보게 된다.

**도면의 간단한 설명**

도 1은 줄기 세포들로부터의 전형적인 신경 분화의 도해이다.

도 2는 이중 SMAD 신호화 경로 억제 하에서 향상된 신경발생이다. 도 2a는 노킨만으로 또는 노킨 및 SB 431542 만으로 처리된 조직들의 IF 분석이다. 신경미세섬유에 대한 항체(FITC-녹색) 및 DAPI(청색)를 포함하는 핵을 이용하여 뉴런들을 시각화 하였다. 막대 그래프는 10 μm를 나타낸다. 전체 조직들로부터 평균 형광 비율의 수량화는 오른쪽 그래프에 제시된다. 도 2b에서는, 뉴런 표지들 PAX6 및 MAP2의 qPCR 분석이, SB 431542 처리 후 두 표지들 모두에서 21배 증가를 보여준다(n=4개 조직/그룹).

도 3에서는, FGF-2가 뉴런 분화를 향상시킨다. 도 3a에서는, 다능성 줄기 세포들의 입력 증가가 BENO 배양 28일차에서 신경미세섬유 스테이닝(staining) 향상으로 이어졌다. 도 3b에서는, FGF-2의 줄기 세포들 및 NPC들에 대한 증식 효과를 보여준다. 신경미세섬유 스테이닝으로 시각화된 바와 같이, 뉴런의 양뿐만 아니라 조직들 내 망복잡성이, 8-15일째에 FGF-2로 처리된 조직들 내에서 더 높다.

도 4에서는, BDNF 및 GDNF 처리에 대한 뉴런의 전사 분석을 보여준다. 10일차에서 28일차까지의 배양 중에 BDNF 및 GDNF 추가 시, PAX6 또는 MAP2 표출 어느 것도 향상되지 않았다. BENO들은 28일째에 분석하였다.

도 5에서는, 노치 억제에 의한 향상된 신경 발생을 보여준다. 15일 내지 28일차의 DAPT 처리가 PAX6 전사의 풍부(abundance)를 증가시켰으며, 따라서, 더 많은 양의 뉴런 수용을 시사했다.

도 6에서는, 상이한 프로토콜들의 신경성 및 교세포 포텐셜의 평가를 보여준다. 도 6a에서는 예시 1의 개별 프로토콜들에서 수행된 처리 방식을 요약한다. 도 6b에서는 BENO 발생의 전사적 시간 경과 분석을 보여준다. OCT4는 줄기 세포 표지로 사용되었고, GFAP는 교세포 표지로 사용되었고, PAX6은 NPC 및 뉴런 표지로 사용되었고, 마지막으로 MAP2, GRIN1 및 GABBR2는 성숙 뉴런 표지로 사용되었다. 데이터는 GAPDH로 정규화되었다. 도 6c에서는, 60일째 BENO들의 온조적표본고정(Whole mount) IF 분석을 보여준다. 신경미세섬유, MAP2, 시냅토파이신 및 GFAP이 뉴런들, 성숙 뉴런들, 시냅시스 및 교세포 각각을 염색하기 위해 사용되었다. 도 6d에서는, 조직의 5개의 영역에서 기록된 칼슘 활성 탐지로 산출된 BENO 활성을 보여준다.

도 7에서는, BENO들 내 신경발생 및 성숙에 대한 RNA 염기서열 데이터를 나타내는, 발달 시간 경과 동안의 RNA 염기서열 분석에 의한 열 지도들을 보여준다. 도 7a에서는, 줄기 세포들의 뉴런 및 교세포로의 분화의 상이한 상태를 묘사하는 표지들을 보여준다. 도 7b에서는, 상이한 뉴런 정체성들의 표지들을 보여준다. 도 7c에서는, 피질 층 표지들을 보여준다. 도 7d에서는, 수용체, 이온 통로, 및 단백질 관련 시냅시스들로서 상이한 성숙 단백질들을 보여준다. Rashi Halder 박사와 A. Fischer 교수(DZNE)와 협력하여 수행하였다.

도 8에서는, BENO들 내에서의 피질 층 발달을 보여준다. TBR2<sup>+</sup> 뇌실밑구역 전구체들이 중심을 이루며 오르가노이드의 중앙에서 주변으로 이동한다. 여기서, CTIP2는 심층 뉴런들을 표시한다.

도 9에서는, BENO들이 억제성 및 흥분성 뉴런들을 포함한다. 도 9a에서는, GABA가 주핵체(perikarya)(중심) 및 GABA 작동성 뉴런(GABAergic neuron)들(주변)의 축삭돌기 내 시냅스 부톤(synaptic bouton)들에서 강하게 표출된다. 도 9b에서는, GABBR2 수용체들이 뉴런 주핵체(중심)에서 표출되는 것이 발견되었다. 도 9c에서는, 도파민 작동성 뉴런들을 표시하는 타이로신 수산화효소(TH)가, GABA 위치 표시와 유사한, 오르가노이드들의 중심 및 주변에서 발견되었다. 도 9d에서는, 시냅토파이신 스테이닝이 오르가노이드 주변에 존재하는 매우 조밀한 시냅스 망을 표시하였다. 신경미세섬유, MAP2 및 DAPI가 축삭돌기들, 성숙 뉴런들 및 핵들 각각을 염색하기 위해 사용되었다. 막대 그래프는 달리 표시된 경우를 제외하고 10 μm이다.

도 10에서는, BENO들 내 뉴런 망 기능이 통합적이고 계층적인 시냅스 기능들을 시사한다. Fura-4 염색 뉴런들이 왼쪽 패널에 나타난다. 상이한 관심 영역(ROI)들의 매트랩(Matlab) 분석이 오른쪽 패널에 나타나는 12개의 상이한 트레이스(trace)들을 표시하였다. GABAR 억제 전에, ROI (2,3), ROI (4,5), ROI (6,7) 및 ROI (11,12)가 동기화 되었다. GABAR 억제는 세포 비동기화로 이어졌고, 10분 동안의 세척으로, 세포들은 다시 동기화 되었다. Guobin Bao 박사와 D. Schild 교수(UMG)와 협력하여 수행하였다.

도 11에서는, NCM 및 NPEM을 포함하는 인큐베이션의 최적 기간을 보여준다. 도 11a에서는, 도해에 표시된 프로토콜들을 이용한 BENO 발생 시, 상대적 PAX6 전사 표출 15일의 qPCR 분석을 보여준다. 도 11b에서는, NCM 이용 BENO 처리의 최대 기간을 규정한다(단계 D). 도해에 표시된 프로토콜들을 이용한 BENO 발생시, 상대적 PAX6 전사 표출 15일의 qPCR 분석을 보여준다. 도 11c에서는, 증식 뉴런 전구체 세포들을 표시하기 위한 PAX6/ki67-양성 세포들의 면역 형광 검사 분석을 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0036] **정의**
- [0037] 여기서 사용된 바와 같은, "오르가노이드"라는 용어는, 적어도 부분적으로, 인간 장기와 같은 장기의 구조 및/또는 기능을 모사하는 3차원 결합체를 형성하는 배양 조직을 지칭한다. 오르가노이드들은, 예를 들어, 3차원(3D) 환경에서 다능성 줄기 세포들로부터 생성될 수 있다. 오르가노이드들을 위한 이런 3D 환경들 중 하나는 회전 타원체 형태의 3D 환경이다. 오르가노이드는 또한 축소되고 간소화된 버전의 장기로 간주될 수 있다.
- [0038] 여기서 사용된 바와 같은, "생체공학적 뉴런 오르가노이드"(BENO)라는 용어는 본 발명의 방법들에 따라 생산된 신경 조직에서 유래된 오르가노이드이다. BENO는 뇌를 포함하는 신경 장기, 또는 예를 들어, 심장 내에 존재하는 신경 조직(예를 들어, 교감 신경계) 및 골격근(예를 들어, 골격 신경근 접합부들의 니코틴 작동성 신경 말단들)과 같은 장기 내에 존재하거나 장기를 제어하는 신경 조직의 축소되고 간소화된 모델로 간주될 수 있다.
- [0039] 여기서 사용된 바와 같은 "형성 BENO"은 BENO로 발달하는 과정에 있는 세포들 및 모체의 구성이다. 형성 BENO는 그 세포 및 모체 재료가 본 발명 방법들의 단계 C를 거쳤으나, 본 발명 방법들의 단계 F를 아직 거치지 않았거나, 단계 F가 아직 완료되지 않은 것을 특징으로 한다.
- [0040] 여기 사용된 바와 같은 "3D 환경"이라는 용어는 모든 3차원 공간으로 연장되는 구조를 나타낸다. 세포 배양의 맥락에서, 3D 환경은, 세포들이 서로에 대해 3차원 공간 안에 배열되는 구조에 해당한다. 3D 환경의 일 예는 구체 배열이다. 세포들이 단일 층에 배열되는, 예를 들어, 세포들 간 공간적 관계의 차원들 중 하나에 차이가 없는 2D 환경은 3D 환경과는 다르다.
- [0041] 여기 사용된 바와 같은 "3D 세포 배양 시스템"이라는 용어는, 적어도 최초로 3D 모체에 의해 규정되는 3D 환경에서의 세포 배양을 지칭한다.
- [0042] 여기 사용된 바와 같은 "다능성 줄기 세포들"(PSC들)이라는 용어는 자가-복제 특성 및 세 개의 배엽(내배엽, 외배엽 및 중배엽)에서 발견되는 세포들로 분화하는 경향을 갖는 세포들이다. PSC들은 미분화된 상태로 존재하며, Oct-3/4, SSEA-4, 및 TRA1-60과 같은 줄기성 인자들의 풍부한 발현, 자가-복제 특성, 및 세 개의 배엽(내배엽, 외배엽 및 중배엽)의 세포들로 분화하는 경향으로 특징지어진다. PSC들은, 여기에 제한되지는 않지만, 유도 다능성 줄기 세포들(iPSC들), 단위 생식 줄기 세포들, 세포핵 전이에 의해 생성되는 줄기 세포들 및 배아 줄기 세포들(ESC들)과 이들의 조합들을 포함하는 많은 원천들로부터 유래될 수 있다. ESC들은 기존 ESC 계열들로부터 유래될 수 있다. 본 발명의 PSC들은 인간의 생식 계열 유전자 정제체에 대한 변형을 수반하거나, 산업적 또는 상업적 목적의 인간 배아 사용을 수반하는 공정을 이용하여 생산되지 않는다. PSC들은 PSC 세포계들을 더 포함한다. 여기 사용된 바와 같은 PSC들의 근원은 특별히 제한되지 않으나, 포유 동물 유래 세포들이 선호되며, 더욱 바람직하게, 세포들은 인간 유래이다.
- [0043] 여기 사용된 바와 같은, "재프로그래밍"이라는 용어는 더욱 특화된 세포 또는 발달의 진보 단계의 다른 형태의 세포가 다능성 세포로 전환될 수 있는 방법들을 지칭한다.
- [0044] 여기 사용된 바와 같은 "분화된 세포"라는 용어는 비특화된 전구체 표출형으로부터 특화된 표출형으로 발달한 세포를 지칭한다. 예를 들어, 배아 세포는 장의 상피 세포 내벽으로 분화될 수 있다. 예를 들어, 분화된 세포들은 태아 또는 살아있는 동물로부터 분리될 수 있다.
- [0045] 여기 사용된 바와 같은 "유도 다능성 줄기 세포들"(iPSC들)은 비-다능성 세포, 전형적으로 성체 체세포에서 인공적으로 파생되는 다능성 줄기 세포의 유형을 지칭한다. 유도 다능성 줄기 세포들은, 예를 들어, 일정 줄기 세포 유전자들 및 단백질들의 발현, 크로마틴 메틸화 패턴들(chromatin methylation patterns), 배가 시간, 배양 체 형성, 기형종 형성, 활성 키메라(viable chimera) 형성, 및 효능 및 분화 가능성에 있어서, 배아 줄기 세포들을 포함하는 자연 다능성 줄기 세포들과, 동일하지 않는 경우, 유사하다고 간주된다.
- [0046] 여기 사용된 바와 같은 "신경 전구 세포들"(NPC들)이라는 용어는, 세포 증식을 거치고, 자신의 정확한 복제들을

재생하고(자가-갱신), 고유하게 분화된 세포들의 세포 자손을 생성하는 능력을 갖는, PSC들로부터 유래된 세포들을 지칭한다. NPC들의 자손은 (뉴런 전구체들 또는 성숙 뉴런들과 같은) 뉴런 세포들이거나, (교세포 전구체들, 성숙 성상 세포들, 또는 성숙 회돌기교세포들과 같은) 교세포들일 수 있다. NPC들은, 예를 들어, 어떤 방식으로 탈분화되거나 재프로그래밍되지 않는 한, 시험관에서 스스로 배양될 때, 보통은 다른 배아 배양들의 자손을 생산하지 않는다. PSC들과 같은 줄기 세포들과 다르게, NPC들은 제한된 증식 능력을 가지며, 따라서 자가-유지 능력을 보이지 않는다.

[0047] 여기 사용된 바와 같은 "매트리젤(Matrigel)"이라는 용어는 엔겔브레스-홀름-스왈 마우스 육종(Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcomas)들(Kleinman 외, 생화학, 1982)로부터 유래된 조성물이다. 매트리지엘은 화학적으로 정확하게 규정되지는 않지만, 일반적으로 라미닌, 콜라겐 IV, 헤파린 황산 프로테오글리칸(heparin sulfate proteoglycan)들, 엔탁틴, 및 성장 인자들을 포함한다. 매트리지엘은 보통 세포 배양용 모체로 사용된다.

[0048] 여기 사용된 바와 같은 "화학적으로 잘 규정된" 또는 "잘 규정된"이라는 용어는 화학적 조성이 충분한 정도의 정확도로 알려진 조성물들을 지칭한다. 예를 들어, 10% 이하, 바람직하게는 5% 이하의 총 함량의 조성물은 화학적으로 특정되지 않거나 조성물의 상이한 표본들 별로 다양하다.

[0049] 여기 사용된 바와 같은 "비규정 조성을 갖는 자연 유래 구성 성분들"은 화학적으로 정확하게 규정되지 않은 자연 원천들(동물, 식물, 균류 및 원생 생물 세포들 또는 바이러스들의 세포들 또는 조직들)로부터 분리된 조성물들과 관련된다. 예를 들어, 10% 이상의 총 함량의 조성물은 특정되지 않거나 조성물의 상이한 표본들 별로 다양할 것임에 틀림없다. "비규정 조성물"을 갖는 자연 유래 구성 성분들의 예시들은 혈청 및 매트리지엘을 포함한다.

[0050] 여기 사용된 바와 같은 "섬유아세포 성장 인자-2"(FGF-2)라는 용어는 섬유아세포 성장 인자군의 일원이다. FGF-2는 FGF2 유전자에 의해 암호화된다. FGF-2는 "기본 섬유아세포 성장 인자(bFGF)"라고 지칭되기도 한다. FGF-2와 bFGF 두 용어는 여기서 서로 바꿔 사용될 수 있다.

[0051] 여기 사용된 바와 같은 "뉴런 망"은 상호 연결된 하나 이상의 뉴런 그룹을 나타낸다. 하나의 뉴런 망 내 뉴런들 간의 연결은 하나의 뉴런으로부터 다른 뉴런(들)로 정보 전달을 가능케 한다. 하나의 뉴런 망 내에서, 뉴런들 간의 연결은 시냅스들을 통해서일 수 있다. 뉴런 망의 존재는 예를 들어 뉴런들의 칼슘 이미징(calcium imaging)의 사용을 통해 쉽게 확인될 수 있다.

[0052] 여기 사용된 바와 같은 "뉴런 망 조직"은 한 그룹의 뉴런들을 하나의 뉴런 망으로 조직하는 것을 지칭한다. 뉴런 망으로서의 뉴런들의 이 조직은 계층적 망을 만들 수 있다.

[0053] 여기 사용된 바와 같은 "기능적 뉴런 망"은 하나의 뉴런으로부터 다른 뉴런으로의 전기 화학적 정보 전달을 표시하는 뉴런 망을 지칭한다. 기능적 뉴런 망들은 기능적 시냅스들의 형성을 필요로 한다. 기능적 뉴런 망들은, 망의 하나 이상의 뉴런의 동기화된 전기적 활성을 포함할 수 있는 망의 활성 패턴들, 또는 뉴런 활성화 또는 억제 패턴들을 포함하는, 망의 뉴런들 간의 기능적 상호 의존성들을 보여주는 패턴들에 의해 특징지어진다. 뉴런 망의 존재는, 예를 들어, 뉴런들의 칼슘 이미징에 의해 확인될 수 있다. 특히, 신호화 분자들에 대한 하나의 뉴런 그룹의 반응 또는 신호화 분자들의 수용체들(예를 들어, GABA 수용체들)의 억제는 기능적 뉴런 망의 존재를 확인시킬 수 있다. 기능적 뉴런 망을 입증하는 일 예는 망 내 뉴런들이 동기화된 칼슘 신호들(예를 들어, 칼슘 스파이크(calcium spike)들)을 보여주고, 뉴런 신호화 분자를 억제하는 수용체 억제제의 추가에 따라 비동기화되며, 그 후 억제제 제거 시 재동기화되는 경우가 있다.

[0054] 여기 사용된 바와 같은 "뉴런 망 기능"은 하나의 뉴런으로부터 다른 뉴런으로의 전기 화학적 정보 전달이다.

[0055] 여기 사용된 바와 같은 "유도"라는 용어는 세포 증식 또는 세포 분화와 같은 특정 생리학적 효과를 개시하고 그리고/또는 향상시키는 것을 의미한다.

[0056] 여기 사용된 바와 같은 "신경발생"은 더 분화될 수 없는 완전히 분화된 신경 세포들을 향한 세포들의 분화 및/또는 증식을 지칭한다. 이와 같이, 신경발생은 PSC들에서 NPC들로의 분화, NPC들의 증식, 더 분화된 신경 세포들, 예를 들어, (뉴런 전구체들 또는 성숙 뉴런들과 같은) 뉴런 세포들로의 NPC들의 분화, 아니면 (교세포 전구체들, 성숙 성상 세포들, 또는 성숙 회돌기교세포들과 같은) 교세포들로의 NPC들의 분화, 또는 더욱 분화된 신경 세포들의 증식을 포함한다.

[0057] 여기 사용된 바와 같은 "신경세포분화"라는 용어는 더 분화될 수 없는 완전히 분화된 신경 세포들을 향한 신경 세포들의 분화를 의미한다. 이와 같이, 신경세포분화는 더 분화된 신경 세포들, 예를 들어, (뉴런 전구체들 또는 성숙 뉴런들과 같은) 뉴런 세포들로의 NPC들의 분화, 아니면 (교세포 전구체들, 성숙 성상 세포들, 또는 성

속 회돌기교세포들과 같은) 교세포들로의 NPC들의 분화, 또는 더 분화된 신경 세포들의 더욱 더 분화된 신경 세포들로의 분화, 예를 들어, 뉴런 전구체들로부터 성숙 뉴런들로의 분화를 포함한다.

[0058] 여기 사용된 바와 같은 "세포들의 모체 내 포매(embedding)"는 세포들의 모체와의 상호작용 및/또는 세포들의 모체 부착을 지칭한다. 이 과정은, 예를 들어, 인테그린(integrin)들을 포함하는 세포 수용체들을 통한, 세포-모체 상호작용에 의해 조절된다.

[0059] 여기 사용된 바와 같은 "모체"라는 용어는 세포들을 포매시키에 적절한 3D 환경을 만들 수 있는 재료를 의미한다. 바람직하게, 본 발명의 모체는 히드로겔(hydrogel) 구조를 형성한다. 예시적인 적절한 모체들은 콜라겐 또는 합성 콜라겐 모사체들을 포함한다.

[0060] 여기 사용된 바와 같은 "히드로겔"은 물을 포함하지만 수용성은 아닌 친수성 중합체들의 망을 지칭한다. 히드로겔 분자들은, 예를 들어, 공유 결합들 또는 이온 결합들 또는 뒤엉킴(entanglement)에 의해 화학적으로 그리고/또는 물리적으로 연결되어, 3D 환경을 형성한다. 히드로겔 망은 천연 또는 합성 중합체 망일 수도 있다.

[0061] 여기 사용된 바와 같은 "간질 세포들"이라는 용어는 뉴런 세포들이 아닌 신경 세포들을 지칭한다. 특히, 예시적 간질 세포들은 교세포 전구체들, 성숙 성상 세포들, 또는 성숙 회돌기교세포들과 같은 교세포들을 포함한다.

[0062] 여기 사용된 바와 같은 "신호화"라는 용어는 하나의 세포 내 또는 두 개 이상이 세포들 간의 정보(신호들) 전달을 지칭한다. 신호화 전달은, (이온들, 신경 전달 물질을 포함하는) 신호화 분자들의 방출을 통해, 또는 그렇지 않으면, 즉각적인 전기 화학적 퍼텐셜(potential)의 변화들을 통해, (인산화, 단백질 분할(protein cleavage)과 같은) 화학적 반응 수단에 의해 일어난다.

[0063] 여기 사용된 바와 같은 "조직 공학 플랫폼"은, 조직, 바람직하게 인간 조직의 구조적 그리고/또는 기능적 특징들을 모사하기 위해 설계된 세포들의 시험관 결합체를 의미한다.

[0064] 여기 사용된 바와 같은 "표현형 약물 스크리닝"이라는 용어는 모델 시스템의 표현형에 대한 효과에 기초한 새롭거나 이미 존재하는 약물들의 적용 가능성의 적격 심사를 지칭한다.

[0065] 여기 사용된 바와 같은 "생체공학" 및 "생체공학적"이라는 용어는 생물학적 시스템들 및 생물학적 시료를 조작하는 방법들을 지칭한다. 생체공학을 위한 예들은 화학 물질들 또는 다른 시료들을 이용하는 분자 복제(molecular cloning), 형질감염(transfection), 형질 도입(transduction), 및 세포들에 대한 영향이 있다.

[0066] 여기 사용된 바와 같은 "질병 모델링"이라는 용어는, 적어도 부분적으로, 질병의 일부 또는 모든 특징들을 모사하는, 질병 용 모델을 생성하는 과정을 지칭한다. 질병 모델들은, 질병에 대한 약물들과 같은 화합물들의 영향 또는 질병의 일부 특징들에 접근하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 질병 모델들은 세포 배양 조직들, 오르가노이드들 및 생쥐 모델들이 있다.

[0067] 여기서 특별히 정의되지 않은 모든 용어들은 생물학 및 의학 분야에서의, 특히, 줄기 세포 및 오르가노이드 연구 영역에서의 관계적 의미에 따라 이해되어야 한다.

[0068] **발명의 원리**

[0069] 본 발명은 복제 가능하고 일관된 제품으로 이어지는, 화학적으로 규정된 조건들 하에서 생체공학적 뉴런 오르가노이드(BENO)들을 생산하는 방법들을 제공한다. 교세포발생을 지원하기 위한, TGF-beta를 포함하는 향상된 신경발생을 위한 레티노산 및 FGF-2가 있는 경우, 계획된 SMAD 및 노치 억제제, 기능적 뉴런 망들의 형성으로 이어지는, 모체 환경 내 신경발생을 위한 생물학적 활동들의 고유 조합을 나타낸다. 본 발명의 예시적인 적절한 일 모체는 콜라겐 히드로겔이다. 본 발명의 시점에서는, 예를 들어, 1990년대에 Kleinman과 동료들에 의해 소개된 이래로 (예를 들어, Jucker 외, *J Neurosci Res.* 1991) 신경발생을 유도한다고 알려진, 매트릭셀 모체와 대조적으로; 그 자체는 신경발생을 유도하지 않는 모체 환경 내에서 규정된 인자들을 이용하여 신경발생 및 교세포 발생이 제어될 수 있는지 예측될 수 없었다.

[0070] 본 발명의 방법들은, 예를 들어 예시 1에 의해 개시되는 바와 같이, 교세포와 같은 간질 세포들을 공동-개발함으로써 지원되는, 확연한 뉴런 망 조직 및 기능을 보여주는 구조를 결과로 얻게 되는, 몇 번의 반복을 통해 개발되었다. 상기 망 조직 및 기능, 예를 들어, 여기 개시되는 뉴런 오르가노이드들의 상이한 뉴런 세포들 간의 기능적 시냅스들(따라서, 예시 5에 기술된 바와 같은 기능적 계층)의 형성은 종래의 오르가노이드 구조들과 비교하여 다수의 이점들을 제공한다. 특히, 여기 개시된 뉴런 오르가노이드들은, 규정된 배양 조건들로 인해 높은 일관성을 보이고, 기능적 뉴런 망들을 포함하도록 생산될 수 있으며, 짧은 기간(예를 들어, PSC들과 모체 혼합

으로부터 29일) 내에 생산될 수 있다.

- [0071] 현재 개시된 본 발명의 방법들은 다수의 실시 단계들을 포함한다. 이 단계들은 다음과 같다:
- [0072] (A) PSC들의 원천을 제공하는 단계;
- [0073] (B) 세포 배양 배지에 잠긴 모체에 포매된, 단계 (A)의 PSC들을 배양하는 단계;
- [0074] (C) Rho-관련 키나아제 억제제(ROCKi)와 FGF-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 단계 (B)의 상기 모체 내 PSC들을 배양하는 단계;
- [0075] (D) 신결발생을 유도하기 위해 레티노산 및 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제를 포함하는 세포 배양 배지에서 단계 (C)의 PSC들 및 모체로부터 유래되는 형성 BENO를 배양하는 단계;
- [0076] (E) 간질 세포들의 발생 및 신경발생을 향상시키기 위해 TGF-beta 및 FGF-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 단계 (D)의 형성 BENO를 배양하는 단계;
- [0077] (F) 간질 세포들의 발생 및 신경분화를 향상시키기 위해 TGF-beta 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제를 포함하는 세포 배양 배지에서 단계 (E)의 형성 BENO를 배양하는 단계.

[0078] **다능성 줄기 세포(PSC)들을 제공하는 단계 (단계 A)**

[0079] 본 발명은 다능성 줄기 세포(PSC)들로부터 생명공학적 뉴런 오르가노이드(BENO)들을 생산하는 것에 관한 것이다. 다능성 줄기 세포들은, 여기에 제한되지는 않지만, (섬유아세포들, 각질형성세포(keratinocyte)들, 골수 유래 세포들 또는 제대혈 유도 세포들과 같은 혈액 유래 세포들을 포함하는 세포 유형들을 재프로그래밍 함으로써 생성될 수 있는) 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)들, 단위 생식 줄기 세포들, 세포핵 전이에 의해 생성되는 줄기 세포들, 및 배아 줄기 세포들 및/또는 이들의 혼합물들을 포함하는 다양한 원천들로부터 얻어질 수 있다. 본 발명의 PSC들은 인간의 생식 계열 유전자 정체성 변형을 수반하거나, 산업적 또는 상업적 목적을 위한 인간 배아 사용을 수반하는 공정으로 생산되지 않는다. 본 발명의 방법들은 또한 PSC 세포계들, 예를 들어, Tibury 외, *Circulation*, 2017에 기술된 iPSC-G1 세포계를 이용해 수행될 수도 있다.

[0080] PSC들은 미분화 상태의 Oct-3/4, SSEA-4, 및 TRA1-60과 같은 줄기성 인자들의 풍부한 발현, 자가-복제 특성, 및 세 개의 배엽(내배엽, 외배엽 및 중배엽)의 세포들로 분화하는 경향에 의해 특징지어진다. 상기 PSC들은 또한 유도 PSC(iPSC)들일 수도 있다.

[0081] 현재 청구된 방법들에서 사용하기 전에, 상기 PSC들은 당해 기술 분야에서 알려진 적절한 조건들 하에서 배양된다. PSC들은, 필요한 경우, 예를 들어, 매트리지와 같은 유지 지원체에서의 성장과 같은, 표준 유지 절차에 따라 배양될 수 있다. PSC들은 당해 기술 분야에서 알려진 모든 적절한 세포 배양 배지에서 성장한다. 예시적인 세포 배양 배지는, 선택적으로, 예를 들어 5 μM 또는 10 μM의 농도의 Rho-관련 단백질 키나아제 억제제를 포함하는, TeSR-E8 Basal medium(Stemcell)이다. PSC들을 위한 예시적인 배양 방법들은 Stover 및 Schwartz, *Methods Mol Biol.* 2011에 보고된다.

[0082] 본 발명을 위한 PSC들의 사용에서, PSC들은 예를 들어 EDTA 처리를 통해 그들의 유지 지원체, 예를 들어, 매트리지에서 분리된다. EDTA는 0.1-10mM, 바람직하게는 0.5mM 및 2mM 사이 농도로 사용될 수 있다. 상기 EDTA 처리는 1-10분 동안, 바람직하게는 4-6분 동안 수행된다. 바람직한 EDTA 처리 조건들은 0.5mM의 EDTA로 5-10분동안 상온에서, 및 2mM의 EDTA로 5-8분동안 상온에서이다.

[0083] **세포 배양 배지에 잠긴 모체 내에 포매된 PSC들을 배양하는 단계 (단계 B)**

[0084] 위에 기술된 제공된 상기 PSC들은 이후, 모체에 의해 규정되는 3D 환경 안으로의 PSC들의 포매를 허용하는, 모체를 이용해 배양된다. 이러한 3D 환경 내의 PSC들의 포매 및 자율형성(self-organization)은 생성될 본 발명의 오르가노이드의 기초를 제공한다. 바람직하게, 상기 세포들은 모체 내에 균질하게 포매되어야 한다.

[0085] 본 발명의 상기 모체는 상기 PSC들 및 PSC들에서 유래된 세포들의 자율형성 및 분화를 용이하게 하는 3D 환경을 구성한다. 상기 모체의 구조는 개별 모체 분자들의 상호작용들, 예를 들어, 단백질-단백질 상호작용들에 의해 안정된다. 가장 바람직하게, 본 발명의 모체는 히드로겔 구조를 형성한다.

[0086] 본 발명의 예시적인 적절한 모체들은 콜라겐들, 콜라겐 모사체들, 알긴산염, 피브린(fibrin), 매트리지, 및 키토산(chitosan)이다. 바람직한 모체들은 콜라겐 및 콜라겐 모사체들이다. 가장 바람직한 모체들은 콜라겐 유형 I에 기초한다. 콜라겐 유형 I에 기초한 모체들은 콜라겐 유형 III과 같은 다른 콜라겐들의 혼적들을 함유할 수

있다. 바람직하게, 콜라겐 유형 I에 기초하는 모체들은 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 100%의 콜라겐 유형 I를 함유한다.

- [0087] 바람직한 일 실시예에서, 본 발명의 상기 모체는 매트리젤을 포함하지 않는다. 더욱 바람직한 실시예들에서, 본 모체는 매트리젤 또는, 하나 이상의 구성 성분들의 규정되지 않은 또는 잘못 규정된 조성을 갖는 자연 유래의 다른 구성 성분들을 포함하지 않는다. 매트리젤과 같은, 규정되지 않은 또는 잘못 규정된 화학 혼합물의 사용은 불가피하게, 생성된 오르가노이드들에 있어 더 큰 표현형 편차들을 초래하기 때문에, 이는 특히 중요하다. 이 의견은 예를 들어 Tiburcy 외, *Circulation*, 2017에 의해 확인되었다. 매트리젤이, 앵겔브레스-홀름-스왈 마우스 육종들로부터 유래된, 라미닌, 콜라겐 IV, 헤파린 황산 프로테오글리칸들, 엔탁틴, 및 성장 인자들을 포함하는 비규정 혼합물이며, 로트-투-로트(lot-to-lot) 구성 성분 비율들이 높은 가변성을 보인다는 것은 잘 알려져 있다(Kleinman 외, *Biochemistry*, 1982).
- [0088] PSC들 및 모체 요소들은 PSC 배양에 적합한 세포 배양 배지에서 혼합된다. 이러한 세포 배양 배지의 예들은 TeSR-E8 Basal medium(Stemcell) 및 StemFlex Medium(Gibco)이다. 상기 세포 배양 배지는 FGF-2 및 ROCKi와 같은 추가 구성 성분들로 보충될 수 있다. 이 구성 성분들은 모체 내 세포 생존 및 증식을 향상시킬 수 있다. 배지의 일 예는 20ng/ml의 FGF-2 및 10 μM의 ROCKi가 보충된 TeSR-E8 Basal medium이다. 상기 세포 배양 배지에 추가될 수 있는 다른 구성 성분들은 DMEM 세포 배양 배지 또는 pH 중화를 위한 NaOH를 포함한다.
- [0089] (콜라겐 모체와 같은) 상기 모체는 효과적인 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, 모체의 농도가 0.05mg/ml 및 50mg/ml 사이이다. 다른 바람직한 실시예들에서는, 모체의 농도가 0.1mg/ml 및 10mg/ml 사이이다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, 모체의 농도가 0.5mg/ml 및 5mg/ml 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 모체의 농도가 1mg/ml이다.
- [0090] 상기 배지와 모체를 포함하는 혼합물에 따라 상기 PSC들의 밀도는  $0.1-10 \times 10^6$  세포/ml의 범위 내일 수 있다. 바람직한 범위는  $0.5-6 \times 10^6$  세포/ml이다. 더욱 바람직한 범위는  $1-4 \times 10^6$  세포/ml이다. 예시적인 적절한 일 값은  $3 \times 10^6$  세포/ml이다.
- [0091] 본 배양 단계는 다음 부분에 개시되는 배양 단계 이전에 수행된다. (상기 PSC들이 모체 안에 포매되는) 이 배양 단계(단계 B)는 세포들이 Rho-관련 키나아제 억제제(ROCKi) 및 FGF-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양되는 배양 단계(단계 C) 전에 수행된다. 단계 B에서 단계 C로의 이행은 통상적으로 기존 세포 배양 배지에 단계 C의 구성 성분들을 추가함으로써 특징지어진다.
- [0092] 일부 실시예들에서는, 이 배양 단계 B가 1분 내지 1일의 기간 동안 수행된다. 바람직한 실시예들에서는, 단계 B가 5분 내지 5시간 동안 수행된다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, 단계 B가 10분 내지 1시간 동안 수행된다. 더더욱 바람직한 실시예들에서는, 단계 B가 15분 내지 30분 동안 수행된다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 단계 B가 20분 동안 수행된다.
- [0093] 단계 B의 시점은 본 발명의 오르가노이드들의 생산과 관련된 본 프로토콜에 의해 "-1일차"라고 지칭한다.
- [0094] 단계 B는 적절한 세포 배양 용기에서 수행된다. 적절한 세포 배양 용기의 일 예는 U자형-바닥과 낮은 부착 특성을 갖는 96-웰 플레이트(96-well plate)이다.
- [0095] 단계 B는 PSC 생존에 적합한 조건들 하에서 수행된다. 예시적인 적절한 조건들은, 예를 들어, 세포 배양 인큐베이터 내에서 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub>이다.
- [0096] **Rho-관련 키나아제 억제제(ROCKi) 및 FGF-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 단계 B의 상기 모체 내 PSC들을 배양하는 단계 (단계 C)**
- [0097] 상기 단계 B의 모체 내 PSC들은 Rho-관련 키나아제 억제제(ROCKi) 및 섬유아세포 성장 인자-2(FGF-2)를 포함하는 배지에서 배양된다.
- [0098] 적절한 ROCKi 이형들은, Feng 외, *J Med Chem.*(2016)에서 검토된 다른 구성 성분들에 더하여, Y27632(Stemgent), Fasudil, Ripasudil, RKI-1447, GSK429286A, Y-30141을 포함한다. 상기 ROCKi는 효과적인 농도로 사용된다. 바람직한 ROCKi는 Y27632이다. 일부 실시예들에서는, Y27632의 농도가 0.1 μM 내지 1mM 사이이다. 바람직한 실시예들에서는, Y27632의 농도가 1 μM 내지 100 μM 사이이다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, Y27632의 농도가 5 μM 내지 50 μM 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, Y27632의 농도가 10 μM이다.

- [0099] (bFGF로도 알려진) FGF-2는 효과적인 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, FGF-2의 농도가 0.1ng/ml 내지 1 μg/ml 사이이다. 바람직한 실시예들에서는, FGF-2의 농도가 1ng/ml 내지 100ng/ml 사이이다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, FGF-2의 농도가 5ng/ml 내지 50ng/ml 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, FGF-2의 농도가 10ng/ml이다. 본 발명은 바람직하게 FGF-2를 사용하지만, 본 발명은, FGF-수용체들에 결합되어 FGF-수용체-매개 신호화를 야기하는 것으로 특징지어지는, FGF-2와 동일하거나 유사한 신호화 활성을 갖는 FGF-2 모사체를 사용하여 수행될 수도 있다. 이러한 활성은 각 FGF-수용체에서 FGF-2의 신호화 활성의 10% 이상이다.
- [0100] 이 배양 단계 C에서는, 상기 PSC들의 배양에 적합한 세포 배양 배지에서 PSC들이 배양된다. 적절한 세포 배양 배지의 예들은 TeSR-E8 Basal medium(Stemcell) 및 StemFlex Medium(Gibco)를 포함한다.
- [0101] 이 배양 단계는 위에 개시된 단계 B 후에 수행된다. 단계 B에서 단계 C로의 이행은 통상적으로 단계 B의 PSC들 및 모체를 포함하는 기존 세포 배양 배지에 단계 C의 구성 성분을 추가함으로써 특징지어진다. 단계 C는 아래에 기술되는 단계 D 전에 수행된다. 단계 C에서 단계 D로의 이행은 상기 세포 배양 배지의 부분적 또는 완전한 교체, 또는 그렇지 않으면, 기존 세포 배양 배지에 단계 D의 구성 성분의 추가를 통해 특징지어진다.
- [0102] 일부 실시예들에서는, 단계 C가 6시간 내지 4일 사이 기간 동안 수행된다. 일부 바람직한 실시예들에서는, 단계 C가 12시간 내지 3일 동안 수행된다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, 단계 C가 1일 내지 2일 동안 수행된다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 단계 C가 1일 동안 수행된다.
- [0103] 단계 C는 오르가노이드들의 생산을 위한 프로토콜의 -1일차에 시작되어야 한다. 그 기간에 따라, 이 단계는 본 프로토콜의 0, 1, 2, 또는 3일차까지 연장될 수 있다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 단계 C가 본 프로토콜의 0일차까지 연장된다.
- [0104] 단계 C는 적절한 세포 배양 용기에서 수행된다. 적절한 세포 배양 용기의 일 예는 U자형-바닥 및 낮은 부착 특성을 갖는 96-웰 플레이트이다. 일반적으로, 상기 세포 배양 용기는 여기 개시된 단계 B 및 C를 수행할 때 교체하지 않는다.
- [0105] 단계 C는 PSC 생존에 적합한 조건들 하에서 수행된다. 예시적인 적절한 조건들은, 예를 들어, 세포 배양 인큐베이터 내에서 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub>를 포함한다.
- [0106] **신경발생을 유도하기 위해 레티노산 및 하나 이상의 SMAD 신호화의 억제제들을 포함하는 세포 배양 배지에서 단계 C의 PSC들 및 모체에서 유래된 형성 BENO들을 배양하는 단계 (단계 D)**
- [0107] 상기 모체 내의 단계 C에 따라 처리된 PSC들은 형성 BENO를 구성한다. 상기 단계 C의 PSC들 및 모체에서 유래된 이 형성 BENO는 레티노산 및 하나 이상의 신호화 경로들의 억제제들을 포함하는 배지에서 배양된다. 이러한 처리는 신경발생을 유도한다.
- [0108] 레티노산은 신호화-활성화 분자로 사용된다. 바람직하게, *all-trans* 레티노산 [(2E,4E,6E,8E)-3,7-디메틸-9-(2,6,6-트리메틸시클로헥센-1-일)노나-2,4,6,8-테트라엔산]이 사용된다. 그러나, 본 발명은, 레티노산 수용체들에 결합되어 레티노산-수용체-매개 신호화를 야기하는 것으로 전형적으로 특징지어지는, *all-trans* 레티노산과 동일하거나 유사한 신호화 활성을 갖는 레티노산 유도체를 사용하여 수행될 수도 있다. 이러한 활성은 *all-trans* 레티노산의 신호화 활성의 10% 이상이다. 레티노산은 효과적인 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, 레티노산의 농도가 0.01 μM 내지 100 μM 사이이다. 바람직한 실시예들에서는, 레티노산의 농도가 0.1 μM 내지 10 μM 사이이다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, 레티노산의 농도가 0.5 μM 내지 5 μM 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 레티노산의 농도가 1 μM 이다.
- [0109] SMAD 억제제들은 Mothers against decapentaplegic homologue(SMAD) 단백질들(예를 들어, SMAD-1 내지 SMAD-9)에 의해 매개되는 신호화를 억제하기 위해 사용된다. SMAD-매개 신호화의 억제는 신경발생을 유도한다. 적절한 SMAD 억제제들은 단백질 노킨, SB 431542(Tocris), 도르소모르핀(dorsomorphin), 및 LDN-193189 (Tocris)을 포함한다. SMAD 억제제들은 효과적인 농도로 사용된다. 예를 들어, 노킨은 0.1ng/ml 내지 1 μg/ml, 바람직하게는 1ng/ml 내지 500ng/ml, 더욱 바람직하게는 10ng/ml 내지 200ng/ml, 가장 바람직하게는 50ng/ml의 농도로 사용될 수 있다. SB 431542는 0.1 μM 내지 1mM, 바람직하게는 1 μM 내지 100 μM, 더욱 바람직하게는 5 μM 내지 50 μM 사이, 가장 바람직하게는 10 μM의 농도로 사용될 수 있다. 하나 이상의 SMAD 억제제의 사용은 신경발생 유도에 긍정적인 영향을 끼칠 수 있다(예시 1). SMAD 억제제들의 바람직한 일 조합은 노킨 및 SB 431542를 포함한다. SMAD 억제제들의 더욱 바람직한 일 조합은 노킨 및 SB 431542로 구성된다. SMAD 억제제들의 가장 바람직한 일 조합은 노킨(50ng/ml) 및 SB 431542(10 μM)으로 구성된다.

- [0110] 형성 BENO들은 PSC 배양에 적합한 모든 세포 배양 배지에서 배양된다. 예시적인 세포 배양 배지는 Stemdiff 뉴런 분화 배지(Stemcell), Neurobasal Medium(Gibco), 및 예시 2에서 사용되는 배지를 포함한다.
- [0111] 개시된 방법들의 단계 D는 통상적으로 단계 C 이후에 수행된다. 단계 C에서 단계 D로의 이행은 상기 세포 배양 배지의 부분적 또는 완전한 교체, 또는 그렇지 않으면, 기존 세포 배양 배지에 단계 D의 구성 성분들을 추가함으로써 특징지어진다. 여기 기술된 바와 같이, 단계 D는 통상적으로 단계 E 전에 수행된다. 단계 D에서 단계 E로의 이행은 상기 세포 배양 배지의 부분적 또는 완전한 교체, 또는 그렇지 않으면, 기존 세포 배양 배지에 단계 E의 구성 성분들을 추가함으로써 특징지어진다.
- [0112] 일부 실시예들에서는, 단계 D가 2일 내지 16일 사이 기간 동안 수행된다. 일부 바람직한 실시예들에서는, 단계 D가 4일 내지 12일 동안 수행된다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, 단계 D가 6일 내지 10일 동안 수행된다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 단계 D가 8일 동안 수행된다. 8일 동안 단계 D를 수행하는 것이 3일 또는 6일과 비교할 때 유리하다는 것이 확인되었다(예시 8 참조). 10일 동안 단계 D를 수행하는 것이 8일보다 더더욱 유리하지만, 반면에 단계 D의 추가적인 연장은 결과를 의미 있게 향상시키지는 않았다(예시 8 참조). 따라서, 특히 바람직한 다른 일 실시예에서는, 단계 D가 8일 이상 동안 또는 10일 동안 이어진다.
- [0113] 이 단계의 수행에 있어서 날짜 "지정"은 이전에 수행되는 단계 B, C, 및 D의 기간에 좌우된다. 일반적으로, 단계 D의 시작점은 0일차와 3일차 사이이다. 단계 D의 종료는 일반적으로 2일차와 19일차 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 단계 D가 0일차로부터 8일차까지 이어진다. 특히 바람직한 다른 일 실시예에서는, 단계 D가 0일차로부터 10일차까지 이어진다.
- [0114] 단계 D는 모든 적절한 세포 배양 용기를 이용해 수행된다. 예시적인 적절한 세포 배양 용기들은 U자형-바닥 및 낮은 부착 특성을 갖는 96-웰 플레이트 또는 6-웰 플레이트 또는, 단일 또는 다수 오르가노이드 배양을 위한, 주문-제작 3D 프린트된 또는 주형 제작된 용기를 포함한다. 세포 배양 용기는 통상적으로 단계 C 및 D 사이에서 교체하지 않는다. 세포 배양 용기는 단계 D를 수행할 때 교체될 수 있다. 이러한 용기 교체의 일 예는 96-웰 플레이트에서 6-웰 플레이트로의 확장이다.
- [0115] 단계 D는 형성 BENO 생존이 가능한 조건들 하에서 수행된다. 예시적인 적절한 조건들은, 예를 들어, 세포 배양 인큐베이터에서 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub>이다.
- [0116] **간질 세포들의 발생 및 신경발생을 향상시키기 위해 TGF-beta 및 FGF-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 단계 D의 형성 BENO를 배양하는 단계 (단계 E)**
- [0117] 단계 D에 따라 제공된 형성 BENO는 형질전환 성장 인자(TGF) 베타 및 섬유아세포 성장 인자-2(FGF-2)를 포함하는 배지에서 배양된다. TGF-beta를 이용한 처리는 간질 세포들의 발생을 향상시키고, FGF-2는 신경발생을 향상시킨다.
- [0118] TGF-beta 처리는 신생 오르가노이드 내에서 간질 세포들의 발생 및 기능성을 향상시킨다. 상기 간질 세포들은 신경 조직의 간질 세포들이다. 예시적인 간질 세포들은 교세포들이다. 본 발명에서 사용되는 TGF-beta는 TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, 또는 이들의 혼합일 수 있다. 본 발명은, TGF-beta 수용체들에 결합되어 TGF-beta-수용체-매개 신호화를 야기하는 것으로 특징지어지는, TGF-beta와 동일하거나 유사한 신호화 활성을 갖는 TGF-beta 모사체를 사용하여 수행될 수도 있다. 이러한 활성은 TGF-beta의 신호화 활성의 10% 이상이다. 바람직하게, 본 발명에서 사용되는 TGF-beta는 TGF-beta 1이다. TGF-beta는 효과적인 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, TGF-beta의 농도가 0.1ng/ml 내지 100ng/ml 사이이다. 바람직한 실시예들에서는, TGF-beta의 농도가 0.3ng/ml 내지 30ng/ml 사이이다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, TGF-beta의 농도가 1ng/ml 내지 10ng/ml 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, TGF-beta의 농도가 5ng/ml이다.
- [0119] (bFGF로도 알려진) FGF-2는 효과적인 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, FGF-2의 농도가 0.1ng/ml 내지 1 μg/ml 사이이다. 일부 바람직한 실시예들에서는, FGF-2의 농도가 1ng/ml 내지 100ng/ml 사이이다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, FGF-2의 농도가 5ng/ml 내지 50ng/ml 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, FGF-2의 농도가 10ng/ml이다. 본 발명은 바람직하게 FGF-2를 사용하지만, 본 발명은, FGF-수용체들에 결합되어 FGF-수용체-매개 신호화를 야기하는 것으로 특징지어지는, FGF-2와 동일하거나 유사한 신호화 활성을 갖는 FGF-2 모사체를 사용하여 수행될 수도 있다. 이러한 활성은 각 FGF-수용체에서 FGF-2의 신호화 활성의 10% 이상이다.
- [0120] 개시된 방법들의 이 단계에서, 상기 형성 BENO는 PSC들을 배양하기에 적합한 세포 배양 배지에서 배양된다. 예시적인 세포 배양 배지는 Stemdiff 뉴런 분화 배지(Stemcell), Neurobasal Medium(Gibco), 및 예시 2에서 사용

되는 배지를 포함한다.

- [0121] 단계 E는 통상적으로 단계 D 후에 수행된다. 단계 D에서 단계 E로의 이행은 상기 세포 배양 배지의 부분적 또는 완전한 교체, 또는 그렇지 않으면, 기존 세포 배양 배지에 단계 E의 구성 성분의 추가를 통해 특징지어진다. 단계 E는 통상적으로 아래에 기술되는 단계 F 전에 수행된다. 단계 E에서 단계 F로의 이행은 상기 세포 배양 배지의 부분적 또는 완전한 교체, 또는 그렇지 않으면, 기존 세포 배양 배지에 단계 F의 구성 성분의 추가를 통해 특징지어진다.
- [0122] 일부 실시예들에서는, 단계 E가 2일 내지 16일 사이 기간 동안 수행된다. 바람직한 실시예들에서는, 단계 E가 4일 내지 12일 동안 수행된다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, 단계 E가 6일 내지 10일 동안 수행된다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 단계 E가 7일 동안 수행된다. 5일 동안 단계 E를 수행하는 것은 7일과 비교할 때 현저히 열등하지 않지만; 역으로, 2일 동안 단계 E를 수행하는 것은 열등한 BENO 축합으로 이어진다는 것이 확인되었다(예시 8 참조). 따라서, 특히 바람직한 다른 일 실시예에서는, 단계 E가 7일 이상 동안 또는 5일 동안 수행된다.
- [0123] 이 단계의 수행에 있어서 날짜 "지정"은 이전에 수행되는 단계 B, C, D 및 E의 기간에 좌우된다. 일반적으로, 단계 E의 시작점은 3일차와 15일차 사이이다. 단계 E의 종료는 5일차와 20일차 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 단계 E가 8일차로부터 15일차까지 이어진다. 특히 바람직한 다른 일 실시예에서는, 단계 E가 10일차로부터 15일차까지 이어진다.
- [0124] 단계 E는 모든 적절한 세포 배양 용기를 이용해 수행된다. 예시적인 적절한 세포 배양 용기들은 6-웰 플레이트 또는, 단일 또는 다수 오르가노이드 배양을 위한, 주문-제작 3D 프린트된 또는 주형 제작된 용기를 포함한다. 세포 배양 용기는 통상적으로 단계 D 및 E 사이에서 교체하지 않는다. 세포 배양 용기는 단계 E를 수행할 때 교체될 수 있다.
- [0125] 단계 E는 형성 BENO 생존이 가능한 조건들 하에서 수행된다. 예시적인 적절한 조건들은, 예를 들어, 세포 배양 인큐베이터에서 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub>이다.
- [0126] **간질 세포들의 발생 및 신경분화를 향상시키기 위해 TGF-beta 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제들을 포함하는 세포 배양 배지에서 단계 E의 형성 BENO를 배양하는 단계 (단계 F)**
- [0127] 단계 E에 따라 제공된 형성 BENO는 형질전환 성장 인자 베타(TGF-beta) 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제를 포함하는 배지에서 배양된다. TGF-beta를 이용한 처리는 간질 세포들의 발생을 향상시키고, 노치 신호화 억제는 신경분화를 향상시킨다.
- [0128] TGF-beta 처리는 신생 오르가노이드 내에서 간질 세포들의 발생 및 기능성을 향상시킨다. 상기 간질 세포들은 신경 조직의 간질 세포들이다. 예시적인 간질 세포들은 교세포들이다. 본 발명에서 사용되는 TGF-beta는 TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, 또는 이들의 혼합일 수 있다. 본 발명은, TGF-beta 수용체들에 결합되어 TGF-beta-수용체-매개 신호화를 야기하는 것으로 특징지어지는, TGF-beta와 동일하거나 유사한 신호화 활성을 갖는 TGF-beta 모사체를 사용하여 수행될 수도 있다. 이러한 활성은 TGF-beta 1의 신호화 활성의 10% 이상이다. TGF-beta는 효과적인 농도로 사용된다. 일부 실시예들에서는, TGF-beta의 농도가 0.1ng/ml 내지 100ng/ml 사이이다. 바람직한 실시예들에서는, TGF-beta의 농도가 0.3ng/ml 내지 30ng/ml 사이이다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, TGF-beta의 농도가 1ng/ml 내지 10ng/ml 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, TGF-beta의 농도가 5ng/ml이다.
- [0129] 노치 신호화 억제제들은 노치 수용체(예를 들어, 노치 1 - 노치 4 수용체들)에 의해 매개되는 세포 신호화를 억제하기 위해 사용된다. 노치 신호화 억제는 신경분화를 향상시킨다. 적절한 노치 신호화 억제제들은 N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-알라닌-2-페닐]글리신-1,1-디메틸에틸 에스테르(DAPT), Compound E(Stem cell technologies), 및 Olsauskas-Kuprys 외, OncoTargets and Therapy, 2013에 기술된 것들과 같은  $\gamma$ -세크레타아제 억제제들을 포함한다. 노치 신호화 억제제들은 효과적인 농도로 사용된다. 본 발명의 바람직한 노치 신호화 억제제는 DAPT이다. 일부 실시예들에서는, DAPT의 농도가 0.01  $\mu$ M 내지 100  $\mu$ M 사이이다. 일부 바람직한 실시예들에서는, DAPT의 농도가 0.1  $\mu$ M 내지 10  $\mu$ M이다. 더욱 바람직한 실시예들에서는 DAPT의 농도가 0.5  $\mu$ M 내지 5  $\mu$ M 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, DAPT의 농도가 2.5  $\mu$ M이다.
- [0130] 개시된 방법들의 이 단계에서, 형성 BENO는 그 배양에 적합한 세포 배양 배지에서 배양된다. 예시적인 세포 배양 배지는 Stemdiff 뉴런 분화 배지(Stemcell), Neurobasal Medium(Gibco), 및 예시 2에서 사용되는 배지를 포

함한다.

- [0131] 단계 F는 통상적으로 단계 E 후에 수행된다. 단계 E에서 단계 F로의 이행은 상기 세포 배양 배지의 부분적 또는 완전한 교체, 또는 그렇지 않으면, 기존 세포 배양 배지에 단계 F의 구성 성분의 추가를 통해 특징지어진다.
- [0132] 일부 실시예들에서는, 단계 F가 5일 내지 95일 사이 기간 동안 수행된다. 바람직한 실시예들에서는, 단계 F가 7일 내지 50일 동안 수행된다. 더욱 바람직한 실시예들에서는, 단계 F가 10일 내지 20일 동안 수행된다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 단계 F가 13일 동안 수행된다.
- [0133] 이 단계의 수행에 있어서 날짜 "지정"은 이전에 수행되는 단계 B, C, D, E 및 F의 기간에 좌우된다. 일반적으로, 단계 F의 시작점은 4일차와 35일차 사이이다. 단계 F의 종료는 9일차와 100일차 사이이다. 가장 바람직한 일 실시예에서는, 단계 F가 15일차로부터 28일차까지 이어진다.
- [0134] 단계 F는 모든 적절한 세포 배양 용기를 이용해 수행된다. 예시적인 적절한 세포 배양 용기는 6-웰 플레이트 또는, 단일 또는 다수 오르가노이드 배양을 위한, 주문-제작 3D 프린트된 또는 주형 제작된 용기를 포함한다. 세포 배양 용기는 통상적으로 단계 E 및 F 사이에서 교체하지 않는다.
- [0135] 단계 F는 형성 BENO 생존에 적절한 조건들 하에서 수행된다. 예시적인 적절한 조건들은, 예를 들어, 세포 배양 인큐베이터에서 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub>이다.

[0136] 여기 개시된 방법들의 단계 F가 완료되면 BENO를 얻게 된다. 단계 F 이후, 상기 BENO는 원하는 BENO의 용도에 따라 적절한 조건 하에서 더 배양되거나 확장될 수 있다. 추가 배양은 상기 BENO의 추가적 특징들의 개발로 이어지며, 그리고/또는 신경발생을 최적화할 수 있다.

[0137] **본 발명의 방법들에 따라 생산된 뉴런 오르가노이드들의 특성 및 이점들**

- [0138] 여기 개시된 방법들로 생산된 뉴런 오르가노이드들(즉, BENO들)은 피질 발달, 신경발생 및 교세포발생을 보인다. 상기 BENO들은 뉴런 세포들과 간질 세포들을 포함한다. (교세포와 같은) 간질 세포들은 개시된 본 방법들을 실행할 때 만들어지는 신경발생-촉진 환경을 제공하는 데 있어 중요하다. 여기 개시되는 규정된 성장 인자들 및 저분자들에 의한, 공존하는 신경발생 및 교세포발생은 인간 뇌의 다세포 복잡성을 효과적으로 재구성한다.
- [0139] 개시된 방법들로 생산된 뉴런 오르가노이드들은 예전에 나타나지 않았던 고유의 특징들을 드러낸다. 예를 들어, 여기 기술된 BENO들은, 기능적 시냅스들의 형성, 계층적 망들의 형성, GABA 작동성 망들의 형성, 및 뉴런들의 동기화 형성을 포함하는 뉴런 기능성에 의해 특징지어지는 기능적 뉴런 망들을 형성한다(예시 5). 이러한 뉴런의 능력들은 종래의 뉴런 오르가노이드들과 비교하여 최소 한 가지의 중요한 이점을 제시한다. 특히, BENO들은 흥분성 및 억제성 뉴런들과 흥분성 및 억제성 뉴런 망들을 포함할 수 있다.

[0140] 게다가, 본 발명의 방법들로 생산된 BENO들은 바람직하게 완전히 규정된 조건들(예를 들어, 무혈청) 하에서 생산된다. 이는, 규정되지 않은 또는 잘못 규정된 화학적 구성 성분들로부터 유래되는 편차들이 제거되기 때문에, 상기 BENO들이 확실하게 복제 가능하다는 것을 의미한다.

[0141] **BENO들의 적용**

[0142] 본 발명의 방법들로 생산된 BENO들은 소위 표현형 약물 스크리닝에 사용될 수 있다. 목표-특정 약물 스크리닝 기법들과는 달리, 표현형 약물 스크리닝은 특정 목표에 대한 후보 분자의 결합에 중점을 두지 않고, 대신에, 목표 분자 표현형에 끼치는 영향에 중점을 둔다. 이러한 표현형 약물 스크리닝의 전제 조건은 연구 질병의 표현형을 모사할 수 있는 적합한 모델의 존재이다. 현재 개시된 BENO들은 신경 조직들과 관련된 다양한 질병들을 연구할 때 이러한 질병 모델을 제공할 수 있다. 본 발명이 약물 스크리닝을 위한 적절한 모델을 제공할 수 있는 질병들은 뇌졸중, 뇌 염증 장애들, (파킨슨병, 알츠하이머병과 같은(예시 6)) 신경퇴행성 질병들, 신경염증성 질병들(예를 들어, 다발성 경화증), 외상성 손상(예를 들어, 뇌-수술-유발 손상), 이온 통로 병증(예를 들어, 간질), 그리고 (자폐증, 정신분열증을 포함하는(예시 7)) 정신 질환들을 포함한다.

[0143] BENO들은 표현형 약물 스크리닝에 의한 발견 및 약물 개선에 사용될 수 있다. 이러한 BENO들의 이용은 뇌 및 신경 조직 내 보수, 재생, 보호 및 질병 예방을 유도하거나 향상시킬 수 있는 약물들의 발견 및 개선을 포함한다.

[0144] 이러한 BENO 모델들에 유용한 PSC들은 건강한 개인들 또는 병을 앓고 있는 환자들로부터 얻을 수 있다. 그렇지 않으면, 다능성 줄기 세포들의 유전자 편집을 적용하여 관심 대상의 모든 유전자 변형 및 후생유전 변형을 창출할 수 있다. 현재 개시된 방법들에 따라 상기 PSC들로부터 BENO 조성들을 생산하고 나면, 상기 BENO들은 높은

예측치로 표현형 조직 스크리닝을 가능케 한다. 보다 높은 성숙도로 인해, 본 발명에 따른 상기 BENO들을 이용하는 신경 조직의 세포 복잡성 및 계층적 망 기능은 종래의 모델들과 비교하여 많은 이점들을 제공한다. 게다가, BENO 생산을 위한 개시된 방법들의 단순성은 높은 처리율의 표현형 스크리닝을 손쉽게 가능하게 한다. 건강한 BENO들 및 질환-모델 BENO들은 모의 질병들(예를 들어, 뇌졸중-유사 손상을 유도하기 위한 저산소증)의 처리를 받을 수 있다. 표현형 판독들은 BENO들 내 특정 세포 유형들에서의 조직 형성, 전기적 연결성, 세포사 및 세포 증식에 대한 영향들을 포함한다. 표현형 약물 스크리닝은 다양한 약물 목표들의 정의 및 검증을 가능하게 할 수 있다. 따라서, 이는, 예를 들어, 재생적, 회복적, 질병 개량적, 또는 보호적인 생물학적 활동을 갖는 화합물들을 확인하기 위한, 차후의 화합물 스트리닝의 기초를 제공한다.

[0145] 현재 개시된 방법들에 따라 생산되는 BENO들은 또한, 예를 들어, 신경 조직 내 전기적 교란들(발작들), 퇴행, 세포사, 또는 다른 세포 이상들을 유발하는 물질의 잠재성을 시험하기 위한 약물 안전성 스크리닝에도 이용될 수 있다.

[0146] 본 발명의 방법들로 생산되는 BENO들은 또한, 예를 들어, 임상 시험들과 병행하여 진행되는 임상 전 시험들에서 약물 관련 작용 양식 연구들에도 이용될 수 있다.

[0147] 본 발명의 방법들로 생산되는 BENO들은 개인 맞춤형 의료 목적들에도 이용될 수 있다. 예를 들어, 환자-유래 iPSC들은 질병들을 모의 실험하고 개인 맞춤 치료들을 시험하는 데 이용될 수 있다. 본 발명의 BENO들은 특히, 예를 들어, 신경퇴행성 질병들 또는 신경염증성 질병들과 같은 신경 조직들과 관련된 질병들에 대한 치료들을 시험하는 데 유용할 수 있다. 모든 가능한 치료 선택 사항들을 상기 기술된 BENO들을 이용하여 탐구하고 시험할 수 있다. 예로, 약물 치료들, 항체들 또는 비번역 RNA들, 유전자 편집과 같은 생물학적 작용제들, 또는 이들의 조합을 들 수 있다.

[0148] BENO들은 또한, 다른 조직 공학 플랫폼들과 BENO들의 공동 배양시 점점 더 정교한 조직 모델들을 생성하는 데 적용될 수도 있다. 일부 실시예들에서는, EHM(공학적 심근) 및 BSM들(생명공학적 골격근)과의 공동 배양이 신경 근 접합부 발달을 연구하는 데 이용될 수 있다. 구체적으로, EHM과 BENO들의 공동 배양은 뉴런과 심박 조율기 또는 뉴런과 심장 근육 세포 상호작용들을 연구하는 데 이용될 수 있다. 그러면 이 모델은 부정맥 발달을 연구하는 데 이용될 수 있다. 다른 실시예들에서는, BENO들이 ESM(공학적 골격근), ELT(공학적 간 조직), 또는 ECT(공학적 결합 조직)과 공동 배양된다. 다른 실시예들에서는, BENO-종양 모델들이 종양-뇌 상호작용들(예를 들어, 종양 뇌 침입, 전이 확산)을 연구하는 데 이용되거나, BENO-백혈구 침투 모델들이 뉴런 염증(예를 들어, 자가면역 질병들)을 연구하는 데 이용된다. 일반적으로 이러한 공동 배양 모델들은 약물 작용 및 상호작용에 대한 병행 다중 장기 스크리닝을 향한 중요한 단계를 제시한다. 공동 배양 모델들은, 예를 들어 개인 맞춤형 치료로서의 효능을 시험하기 위해, 파킨슨병과 같은 질병들 및 다른 신경퇴행성 질병들을 위한 모델로서도 더 이용될 수 있다.

[0149] 본 발명의 상기 BENO들은 또한 과학적 또는 치료상의 목적들을 위해 재생 조직을 제공할 수도 있다. 예를 들어, BENO들은, 약물 또는 (예를 들어, 전기 조절과 같은) 생물물리학적 치료 하에서 회복 및 재생을 연구하기 위해 손상될 수 있다. 그렇지 않으면, BENO들은, 파킨슨병에 대응하기 위한 도파민 생산 및 방출과 같은, 특정 뇌 기능들을 갖도록 구성될 수 있다. 또한, BENO들은 장기들에 연결되거나 활력을 잃은 장기들의 제어(예를 들어, 골격근의 제어)를 가능하게 하는 기계-장기 인터페이스들로서 사용될 수 있다.

[0150] **키트들**

[0151] 본 발명의 키트들은 현재 개시되는 방법들을 실행하기 위한 구성 요소들을 포함한다. 일부 실시예들에서는, 키트가 PSC들, 모체, 적절한 배지들 및 필요한 보충물들(ROCKi, FGF-2, 레티노산, 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제들, TGF-beta, 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제들)을 포함한다. 다른 실시예들에서는, 키트가 모체, 적절한 배지들 및 필요한 보충물들(ROCKi, FGF-2, 레티노산, 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제들, TGF-beta, 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제들)을 포함한다. 다른 실시예들에서는, 키트가 모체 및 필요한 보충물들(ROCKi, FGF-2, 레티노산, 하나 이상의 SMAD 신호화 억제제들, TGF-beta, 및 하나 이상의 노치 신호화 억제제들) 중 4개 이상을 포함한다.

[0152] **예시들**

[0153] BENO들의 생산을 위한 일반적 프로토콜

- [0154] 다음 프로토콜들은 PSC들의 원천으로부터 BENO들을 생성하는 데 유용한 단계들을 제공한다.
- [0155] 재료들
- [0156] 다음 목록의 재료들이 본 예시들에서 실시된 실험들에서 이용되었다.
- [0157] - TeSR™-E8™ 키트, Stemcell Technologies #05940
- [0158] - EDTA 용액 0.5 M, pH 8, AppliChem #A4892.0500
- [0159] - 매트리지젤 (성장 인자 감소), BD Bioscience #354230
- [0160] - Neurobasal-A, Thermofischer # 10888-022
- [0161] - 100X 페니실린/스트렙토마이신 (P/S), Thermofischer #15140-122
- [0162] - 100x 글루타민, Thermofischer #25030-024
- [0163] - FGF-2, Miltenyi Biotech #130-093-841
- [0164] - B27, Thermofischer #17504-044
- [0165] - N2, ThermoScientific #17502-048
- [0166] - DMSO, Sigma, # 276855
- [0167] - 노긴, R&D systems #6057-NG-025
- [0168] - L-아스코르브산 2 인산염 세스키마그네슘 염 수화물(ASC-2-P), Sigma #A8960-5G
- [0169] - all-trans 레티노산, Sigma, R2625-50MG
- [0170] - TGF-beta 1 (TGFB1), Peprotech, #100-21
- [0171] - ROCKi (Y27632), Stemgent, #04-0012
- [0172] - SB 431542, Tocris, #1614
- [0173] - DAPT, Tocris, #2634
- [0174] - 96-웰 플레이트 (U자형 바닥, 낮은 부착성), Sarstedt #83.1837.500
- [0175] - T25 플라스크, Sarstedt #83.3910.002
- [0176] - 6-웰 플레이트, Greiner #657160
- [0177] 모액들 (-20℃)
- [0178] - 제조자 지시에 따라 준비된 10µg/ml의 FGF-2 모액
- [0179] - 제조자 지시에 따라 준비된 250µg/ml의 노긴 모액
- [0180] - 수중의 200mM의 ASC-2-P 모액
- [0181] - 제조자 지시에 따라 준비된 10µg/ml의 TGFB1 모액
- [0182] - DMSO 내의 10mM의 ROCKi 모액
- [0183] - DMSO 내의 10mM의 SB 431542 모액
- [0184] - DMSO 내의 100mM의 DAPT 모액
- [0185] - DMSO 내의 10mM의 레티노산
- [0186] 작업 용액들 (4℃)
- [0187] EDTA 0.5mM 용액
- [0188] NaCl 0.45g을 함유하는, 칼슘/마그네슘-제외 PBS 500ml에 0.5 M EDTA 모액(pH 8.0) 500µl를 추가한다. 멸균 여과(0.22µm), 소분 후 4℃에서 6개월 동안 저장한다.

- [0189] 매트리지젤 1:30 용액
- [0190] 매트리지젤이 중합되는 것을 방지하기 위해, 예냉된 팁(tip)들을 이용하여 얼음처럼 찬 PBS 29ml에 매트리지젤 1ml를 희석시킨다. 용액이 투명하지 않으면, 하룻밤 동안 냉장고에 보관하고 다시 혼합한다.
- [0191] TeSR™-E8™ 배지
- [0192] 제조자의 지시에 따라 준비하고, 1%의 P/S를 추가 한다.
- [0193] 기초 배지
- [0194] 100X 글루타민 1%, 100X P/S 1%, B27 2%, N2 1%, 200 μM ASC-2-P를 보충한
- [0195] Neurobasal-A
- [0196] 신경 수용 배지 (NCM)
- [0197] 50ng/ml의 노긴(10μl)이 보충된 기초 배지(50ml)
- [0198] 일부 실험들에서는, 10 μM SB 431542(50μl), 1 μM RA(5μl)가 사용되었음.
- [0199] 신경 전구체 확장 배지 (NPEM)
- [0200] 10ng/ml의 FGF-2(50μl)가 보충된 기초 배지(50ml)
- [0201] 일부 실험들에서는, 5ng/ml의 TGFβ1이 사용되었음. 일부 실험들에서는, BDNF(20ng/ml) 및 GDNF(10ng/ml)가 사용되었음.
- [0202] 신경 분화 배지 (NDM)
- [0203] 일부 실험들에서는 2.5 μM의 DAPT(1.25μl)가; 일부 실험들에서는 5ng/ml의 TGFβ1(25μl)이; 일부 실험들에서는 2.5 μM의 DAPT(1.25μl) 및 5ng/ml의 TGFβ1(25μl)이 보충된 기초 배지(50ml)
- [0204] 실험 방법들
- [0205] -4일차 (세포들의 준비 모델로 사용되는, 다능성 줄기 세포들의 표준 유지 배양)
- [0206] 매트리지젤 코팅
- [0207] 성장 인자 감소 매트리지젤 1:120을 얼음처럼 찬 PBS에 희석시켰으며, 즉시 플레이트들을 코팅하였다(150μl/cm<sup>2</sup>). 그리고 나서, 코팅된 플레이트들을 최대 2주 동안 냉장고에 보관하였다. 사용 전, 코팅된 플레이트들을 에탄올로 소독하고 37°C에서 30-60분 동안 인큐베이터에 두었다.
- [0208] EDTA 패시징(passaging) (T-25 플라스크용으로 정해진 용량들)
- [0209] 0.5mM EDTA 3ml(120μl/cm<sup>2</sup>)를 추가하기 전에 0.5mM EDTA 2ml(80μl/cm<sup>2</sup>)로 셀들을 두 번 세척했다. 세균들을 상온에서 5-10분 동안 인큐베이션 시켰다. 일부 세포계들은, 매트리지젤에서 성장할 때, 5-8분 동안의 2mM EDTA 처리가 필요할 수 있다. 인큐베이션 후, EDTA 용액을 조심스럽게 흡입하였다. 그리고 나서, 10 μM ROCKi를 함유하는 3ml의 신선한 E8 배양 배지를 세포들에 추가하였고, 뒤이어 5 μM ROCKi를 함유하는 배지 5ml를 담고 있는 적합한 새 플라스크에 도포하였다(50,000/cm<sup>2</sup>). 다음 날, 배지를 ROCKi를 포함하지 않는 배지로 교체하였다.
- [0210] -1일차 (BENO들 주조)
- [0211] 다음은 각 30μl 용량의(피펫팅(pipetting) 비축용으로 20% 용량 추가) 10개의 BENO들을 위한 제조법을 제시한다:
- [0212] 20ng/ml FGF 및 900,000개의 미분화 다능성 줄기 세포들(예를 들어, iPSC-G1계; Tiburcy 외, Circulation, 2017)을 함유하는 10 μM ROCKi로 보완된 E8 배지에, 2X DMEM 50μl, 0.1M NaOH 9.5μl, 및 세포 현탁액 238μl를 포함하는, 콜라겐 유형 I(6.9mg/ml 원액 이용, 최종 농도 1mg/ml) 50μl로 시작한다. 셀들은 위에 기술된 EDTA 인큐베이션에 의해 분리되었다. 그리고 나서, 30μl의 상기 현탁액을 96-웰 플레이트(U자형-바닥, 낮은 부착성)의 한 웰 안으로 피펫팅하고, 콜라겐 경화(동질 세포 포착(homogeneous cell entrapment))를 향상시키기 위해 인큐베이터 내에 37°C에 20분 동안 두었다. 20분 후, 10ng/ml FGF 및 10 μM ROCKi를 포함하는 E8 250μl을 각

웰에 추가하고 인큐베이터에 다시 넣었다.

- [0213] 0, 1 및 2일차 (배지 교체)
- [0214] 배지 200 $\mu$ l를 제거하고 각 웰 당 200 $\mu$ l의 NCM을 추가하였다.
- [0215] 3일차 (배지 교체 및 BENO 이전)
- [0216] 10개의 BENO를 대구경 팁 피펫을 이용하여 NCM 5ml를 포함하는 6-웰 플레이트로 이전시킨다.
- [0217] 6일차 (배지 교체)
- [0218] 배지 4ml를 제거하고 각 웰당 5ml의 신선한 NCM을 추가한다.
- [0219] 8, 10 및 13일차 (배지 교체)
- [0220] 선택된 실험 프로토콜에서 NPEM을 사용하는 경우, 배지 4ml를 제거하고 웰 당 5ml의 신선한 NPEM을 추가한다. NPEM을 사용하지 않는 경우에, 상기 세포들은 기초 배지에 유지된다.
- [0221] 15, 17, 20, 22, 24 및 27일차 (배지 교체)
- [0222] 선택된 실험 프로토콜에서 NPEM을 사용하는 경우, 배지 4ml를 제거하고 웰 당 5ml의 신선한 NPEM을 추가한다. NPEM을 사용하지 않는 경우에, 상기 세포들은 기초 배지에 유지된다. 상기 세포들은 28일차에 감정한다. 만일 배양이 연장되면, 상기 세포들은 기초 배지 내에 유지되며, 이로써 상기 배지는 위에 기술된 바와 같이 2일마다 교체된다.
- [0223] 예시 1: BENO 생산을 위한 프로토콜의 최적화
- [0224] 다음 연구들은 신경 유도, NPC의 양, 및 뉴런 분화를 위한 개시된 프로토콜을 최적화하기 위해 수행되었다. 결과 데이터는 BENO들을 생산하기 위한 최적의 프로토콜 설정을 가능하게 하였다(예시 2).
- [0225] 신경 유도 최적화
- [0226] 최초 시도들에서는, 신경 유도를 끌어내기 위해, 레티노산(RA)의 추가와 함께 (노킨을 사용하여) 단일 SMAD 경로 억제제가 이용되었다. 본 연구에서는, 신경 유도 단계(0-8일차) 동안 노킨 및 SB 431542를 이용한 이중 SMAD 신호화 경로 억제제, 예를 들어, 28일차에서 신경발생을 더 향상시키는지 시험하였다. 따라서, 노킨만을 포함하는 NCM 또는 노킨 및 SB 431542를 포함하는 NCM을 각각 연구하였다. 면역 형광 검사 분석(도 2a) 및 PAX6 및 MAP2의 전사 분석(도 2b)로 입증된 바와 같이, 이중 SMAD 억제제가 명확하게 관찰되어, 성숙 뉴런들의 결과 양에 있어서 유리하였다.
- [0227] NPC 수 증가
- [0228] 조직 주조 시점에서의 개시 투입 다능성 줄기 세포(PSC)들의 양 증가가 현저하게 더 많은 양의 뉴런들로 이어졌다(도 3a). 따라서, 오르가노이드들을 FGF-2로 처리함으로써(8-15일차) 조직 내 신경 전구체 세포(NPC)들의 양을 증가시키는 것이 유리해 보인다. 이는 상기 프로토콜에서 NPEM을 사용하는 것에 해당한다. FGF-2의 사용이 유리한지 시험하기 위해, 두 개의 상이한 시점에서 10ng/ml FGF-2로 조직들(3000개 세포/ $\mu$ l)을 처리하였다: -2일차 내지 0일차(줄기 세포 단계에서의 신경 유도 전) 및 NPC 단계에서 8일차 내지 15일차(도 3b). -2일차 내지 0일차에서의 FGF-2 처리는 비처리 조직들과 비교할 때 어떤 이점도 제공하는 것 같지 않다. 그러나, 8일차 내지 15일차에서 FGF-2를 이용한 세포 처리(즉, NPEM 사용)는 NPC들을 포함하는 세포들의 증식을 현저하게 유도하였고, 이는, 신경미세섬유의 IF 온조직표본고정 스테이닝에 의해 시각화 된 바와 같이(도 3b), 28일차의 더 복잡한 뉴런 망들로 이어졌다. 이중 처리(-2일차 내지 0일차 및 8일차 내지 15일차)는 단일 처리(8일차 내지 15일차)와 비교하여 유리한 것 같지 않았다.
- [0229] 신경 분화 최적화
- [0230] 본 문헌 내 수많은 종래의 프로토콜들은 분화 및 성숙 단계에서 뉴런 생존을 향상시키기 위해 신경영양 인자들 BDNF 및 GDNF를 사용한다. 따라서, 배양 10일차 내지 28일차 동안의 BDNF(20ng/ml) 및 GDNF(10ng/ml) 추가가 28일차까지 더 많은 성숙 뉴런 수로 이어지는지 시험하였다(도 4).
- [0231] 이 결과들은 BDNF 및 GDNF가 뉴런 표지 PAX6 또는 성숙 표지 MAP2의 양을 증가시키지 않는다는 것을 입증한다. 따라서, BDNF 또는 GDNF 처리가 본 프로토콜에 채택되지 않았다. 반면에, 노킨 억제제 DAPT를 NDM(2.5  $\mu$ M, 15일차 내지 28일차)에 추가한 것이 PAX6 전사들의 증가로 이어졌고, 이는 긍정적인 영향을 시사한다(도 5).

[0232] 최적화 실험들

[0233] 최적화의 최종 단계에서, 신경 분화를 위해 가장 효과적인 프로토콜을 확인하기 위해, 다섯 개의 상이한 프로토콜들을 시험하고 비교하였다. 모든 프로토콜들에서, B27 및 N2가 보충된 Neurobasal 배지에서 분화가 수행되었다. hiPS 세포들은, 배아 신경 발생 동안 일어나는 신호화를 모사하기 위해 이중 SMAD 억제제(노진 및 SB 431542) 및 추가 레티노산(RA) 보충 하에서 신경외배엽 유도(0일차 내지 8일차)를 거쳤다. 프로토콜 2에서는, 신경 전구체 세포(NPC)들에서 FGF-2(8일차 내지 15일차)의 증식 효과들을 시험하였다. 프로토콜 3에서는, NPC들의 뉴런 수용(15일차 내지 28일차)에서 노치 억제제 DAPT의 효과를 시험하였다. 프로토콜 4에서는, 교세포들을 위한 TGF-beta 1(8일차 내지 28일차)의 증식 효과들을 시험하였다. 프로토콜 5에서는, 교세포 및 뉴런들의 발달이 동시에 향상될 수 있는지 시험하기 위해, TGF-beta 1 및 DAPT 처리를 결합하였다. 상기 상이한 프로토콜들이 도 6a에서 요약된다.

[0234] 상이한 프로토콜들에 의해 제공되는 신경 및 교세포의 잠재력을 감정하기 위해, -1, 0, 3, 8, 15, 28 및 40일차에 조직들을 수집하였다(3-6개의 조직/시점). 모든 프로토콜에 있어서 8일차까지의 처리는 동일하였기 때문에, 이 시점까지의 조직들은 프로토콜 1에서만 수집하였다. FGF-2 처리(프로토콜 2)는 어느 시점에서든 상이한 지표들의 수준에 현저한 영향을 주지 않았다. 이는 예상 밖의 결과였다. 그러나, DAPT 처리(프로토콜 3 및 5)는 뉴런 지표들 PAX6, MAP2, GRIN1 및 GABBR2의 양을 현저하게 증가시켰다. TGF-beta 1 처리(프로토콜 4 및 5)는 다른 세 개의 프로토콜들과 비교할 때, 더 많은 양의 40일차까지의 교세포 지표 GFAP를 보여 주었다(도 6b). DAPT 처리(프로토콜 3 및 5)가 명백하게 신경발생을 지원하고 있었고, TGF-beta 1은 교세포발생을 지원하는 것 같았으므로, 시간 경과 분석을 프로토콜 3(DAPT) 및 프로토콜 5(DAPT 및 TGF-beta 1)까지 확대하였다. 50일차 및 60일차에, 뉴런 지표들의 출력이 두 프로토콜 모두에서 시간이 지남에 따라 감소하였고, 이는 다른 세포 유형들이 발생할 수 있음을 시사하였으며, 28일차부터는 조직들을 더이상 처리하지 않았으므로, 예상된 결과를 얻었다. 흥미롭게도, GFAP 전사의 10배 증가로 입증된 바와 같이, 프로토콜 5는 명백하게 교세포발생을 지원하였다. 종합하면, 시험한 상이한 프로토콜들의 전사 시간 경과 분석은, 효과적인 신경발생 및 교세포발생을 초래하는 데 있어, 프로토콜 5가 다른 프로토콜들보다 우수함을 시사한다.

[0235] 전사 분석 데이터를 입증하기 위해, 프로토콜 3 및 프로토콜 5를 거친 60일차 조직들을 신경미세섬유에 대한 항체들(뉴런), GFAP(교세포), 시냅토파이신(뉴런 시냅시스) 및 MAP2(성숙 뉴런들)을 이용해 염색하였다(도 6c). 프로토콜 5에서 유래된 조직들은 프로토콜 3에서 유래된 조직들보다 더 많은 교세포를 포함한 반면, 성숙 뉴런의 양은 동일한 것 같았다.

[0236] 교세포의 존재는 뉴런 활성화에 있어 중요하다. 따라서, 프로토콜 5에서 BENO 활성이 향상된다는 최초 가설을 자발적 칼슘 활성을 측정하여 더 탐구하였다. 이것을 체계적인 방식으로 분석하기 위해, 조직들을(n=3/그룹) FURA-4로 염색할 때, 조직 당 다섯 개의 상이한 영역에서 공촛점 이미징을 이용하여, 칼슘 활성을 시각화 하였다(도 6d에 도시). 이 다섯 개 영역 각각에서 관찰된 평균 칼슘 활성이 그래프에 제시된다. TGF-beta 1 및 DAPT 처리(프로토콜 5) 조직들은 칼슘 활성을 보이는 더 많은 수의 조직 영역들을 드러내었다.

[0237] 요약하자면, 전체 데이터가, RA의 존재 시 이중 SMAD 억제에서, FGF-2 처리가 NPC들을 향상시키며, DAPT가 신경발생을 지원하고, TGF-beta가 교세포발생을 지원한다는 결론을 지지하고 있다. 따라서, 최적화된 분화 프로토콜(예시 2)은 상기 인자들 모두를 이용한 처리(도 6a에 지정된 시점들)를 포함한다.

[0238] 예시 2: 인간의 생명공학적 뉴런 오르가노이드(BENO)들을 생성하기 위한 최적 프로토콜

[0239] 다음 연구들은 인간의 생명공학적 뉴런 오르가노이드(BENO)들을 생산하기 위한 최적의 프로토콜을 설정한다.

[0240] 재료들

[0241] 이 실험들에서 사용된 재료들은 예시 1에서 사용된 것과 동일하다.

[0242] 모액들 (-20℃)

[0243] 이 실험들에서 사용된 모액들은 예시 1에서 사용된 것과 동일하다.

[0244] 작업 용액들 (4℃)

[0245] 이 실험들에서 사용된 EDTA 0.5mM 용액, 매트리지젤 1:30 용액, TeSR™-E8™ 배지, 및 기초 배지는 예시 1에서 사용된 것과 동일하다.

- [0246] 신경 수용 배지 (NCM)
- [0247] 10  $\mu$ M SB 431542(50 $\mu$ l), 50ng/ml 노긴(10 $\mu$ l), 및 1  $\mu$ M RA(5 $\mu$ l)이 보충된 기초 배지(50ml).
- [0248] 신경 전구체 확장 배지 (NPEM)
- [0249] 10ng/ml FGF-2(50 $\mu$ l) 및 5ng/ml TGF $\beta$ 1이 보충된 기초 배지(50ml).
- [0250] 신경 분화 배지 (NDM)
- [0251] 2.5  $\mu$ M DAPT(1.25 $\mu$ l) 및 5ng/ml TGF $\beta$ 1(25 $\mu$ l)이 보충된 기초 배지(50ml).
- [0252] **실험 방법들**
- [0253] -4일차 (세포들의 준비를 위한 예시로 사용되는, 다능성 줄기 세포들의 표준 유지 배양)
- [0254] 이 실험들에서 사용된 매트리지 코팅 및 EDTA 패시징(T-25 플라스크 용)은 예시 1에서 사용된 것들과 동일하다.
- [0255] -1일차 (BENO들 주조)
- [0256] 예시 1에서 사용된 프로토콜과 동일
- [0257] 0, 1 및 2일차 (배지 교체)
- [0258] 배지 200 $\mu$ l가 제거되고 웰 당 200 $\mu$ l의 NCM이 추가된다.
- [0259] 3일차 (배지 교체 및 BENO 이전)
- [0260] 10개의 BENO를 대구경 팁 피펫을 이용하여 NCM 5ml를 포함하는 6-웰 플레이트로 이전시킨다.
- [0261] 6일차 (배지 교체)
- [0262] 배지 4ml를 제거하고 각 웰당 5ml의 신선한 NCM을 추가한다.
- [0263] 8, 10 및 13일차 (배지 교체)
- [0264] 배지 4ml를 제거하고 각 웰당 5ml의 신선한 NPEM을 추가한다.
- [0265] 15, 17, 20, 22, 24 및 27일차 (배지 교체)
- [0266] 배지 4ml를 제거하고 각 웰당 5ml의 신선한 NDM을 추가한다. 상기 세포들은 28일차에 감정한다. 만일 배양이 연장되면, 상기 세포들은 기초 배지 내에 유지되며, 이로써 상기 배지는 위에 기술된 바와 같이 2일마다 교체된다.
- [0267] 예시 3: BENO들의 고 처리율 전사체 분석
- [0268] 상이한 시점들(예를 들어, -1, 0, 3, 8, 15, 28, 40, 50 및 60일차)에서 BENO 조직들의 생산 동안 발생하는 세포 유형들을 특징짓기 위해, 상기 셀들에 대해 RNA 염기서열 분석을 실시하였다(시점 당 3-6개의 조직들).
- [0269] 우선, 세포 배양 시간 동안 상기 셀의 분화 상태를 시험하였다. 예상한 바와 같이, -1일차 및 0일차에 줄기 세포 표지들 NANOG 및 POU5F1이 높게 표출되었으나, 신경 유도 시 3일차에는 이 표지들의 표출이 현저하게 감소하였다. 반대로, 줄기 세포 표지인 SOX2 및 NPC 표지도 이 시점들에서는 어떤 감소도 보이지 않고, 다른 신경외 배엽 및 NPC 표지들과 함께 15일차에 최대 표출에 이르렀다. 이 데이터들은 이미 알려진 FGF-2의 증식 효과들과 일치한다. 대부분의 뉴런 구조 표지들(MAP2, MAPT, NFASC, TUBA1A)이 28일차 내지 40일차까지 현저하게 증가하였다. 일단 신경발생이 완료되면, 교세포발생이 시작되었다(50일차 내지 60일차). 방사신경 교세포 표지 PDGFR- $\alpha$  또한, 대부분의 줄기 세포들이 전구체 세포들에 수용되는 시점인 8일차에 강하게 표출되고 있음이 관찰되었다(도 7a).
- [0270] 세포 배양 시 존재하는 상이한 유형의 뉴런 세포들을 특징짓기 위해, 세로토닌 작동성, GABA 작동성, 글루타민 작동성, 도파민 작동성 및 콜린 작동성 뉴런들에서 표출되는 특정 지표들을 연구하였으며, 그 결과들이 도 7b에 도시된다. 이 모든 뉴런 유형들에 대한 지표들이 28일차부터 신경 조직들에 존재하는 것이 발견되었다. 흥미롭게도, 뉴런 구조 전사들이 50일차부터 감소하는 것이 발견되었지만, 개별 뉴런 표지들은 증가하거나 지속되었다. 따라서 이는 세포 성숙이 진행 중임에도 불구하고, 뉴런 분화가 40일차까지 완료될 수 있다는 것을 시사한다.

- [0271] 유사하게, 상이한 피질 층 표지들의 분석을 통해, 오르가노이드들에 세 개 층 모두가 존재함을 밝혀냈다(도 7c).
- [0272] 마지막으로, 분화 프로토콜 동안 BENO들 내에 포함된 뉴런들의 성숙 상태를 조사하기 위해, 뉴런 수용체 표출 (GABA, DOPA, 카이네이트, AMPA, NMDA), 이온 통로 표출( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ) 및 시냅스 단백질 표출(SYN1, SYT4, SYP, SYNPO)을 분석하였다. 이 단백질들에 대한 전사 암호화 표출이 28일차에 증가하고, 60일차까지 안정 상태를 유지하거나 계속 증가하는 것이 관찰되었다. 이 결과는, 40일차까지 분화가 중단되기는 하지만, 분화 프로토콜 종료로 인해 뉴런 성숙 및 교세포 발생이 지속된다는 결론을 지지한다.
- [0273] 예시 4: 온조직표본고정 IF 분석에 의한 전사체 분석 결과들의 입증
- [0274] BENO 모델이 일반 피질 발달을 모방하는지 확인하기 위해, 표지들 CTIP2(V-VI 층 뉴런들), TBR2(뇌실밑구역 전구체 세포들), 및 SOX2(신경 줄기 세포들)을 면역염색법(immunostaining)을 이용해 분석하였다. 40일차에, SOX2 양성 세포들이 검출되지 않았다. 반면에, 피질발생 동안 관찰된 바와 같이, TBR2 세포들 및 CTIP2 세포들이 서로에 대해 동심을 이루며 분포되었다(도 8).
- [0275] IF 분석을 이용하여, BENO들 내 GABA 작동성 개체뉴런들의 강력한 존재가 입증되었다. GABA 작동성 표지 GABA 및 각각의 수용체 GABBR2 모두에 대한 스테이닝(도 9a, 도 9b)을 수행하였다. GABA는 체세포 구획들에서만 아니라 GABA 작동성 뉴런들의 축색 돌기들 내 시냅스 부톤들에서 강하게 표출되었다. GABBR2는 뉴런 주핵체 내에서 표출되는 것이 관찰되었다. 게다가, 정교한 도파민 작동성 망을 TH로 면역염색하여 중뇌의 정체를 표시하였다. GABA와 유사하게, TH가 체세포뿐만 아니라 오르가노이드의 주변부에 연장되는 뉴런 축색 돌기들에서 검출되었다. 마지막으로, 시냅스포아신 스테이닝이 뉴런들에서 시냅스 부톤들의 풍도를 나타냈으며, 이는 기능적 뉴런 망의 존재를 시사한다(도 9d).
- [0276] 예시 5: 뉴런 활성화: GABA 작동성 망
- [0277] 여기(예를 들어, 예시 1-4에) 개시된 데이터는 BENO들이 일반 피질 층 발달을 효과적으로 모사할 수 있으며, 다양한 뉴런들 및 교세포를 더 포함한다는 것을 보여준다. 이후, 뉴런 망들을 확인하는, 칼슘 이미징을 이용하여, 이 생산된 뉴런들의 기능성을 연구하였다.
- [0278] 뉴런 망 활성을 시험하기 위해, BENO들(30일차 내지 60일차)은 (피크로톡신,  $58 \mu M$ ; 사클로펜(saclofen),  $330 \mu M$ ;  $n=3$ 을 이용해 수행된) GABA 작동성 억제 하에서 칼슘 이미징을 거쳤다. GABAR 억제는 이전에 자발적으로 동기화된 뉴런들(네 쌍의 세포들)의 비동기성으로 이어졌다. 억제제 세척 시, 동일 뉴런들이 재동기화되었고, 이는 기능적 GABA 작동성 망의 존재를 시사한다(도 10). 기능적 뉴런 망들은 다른 뉴런 오르가노이드들에서는 발달하지 않으며, 이는, 세포 복잡성을 향상시키기 위한 계획된 통제 분화 프로토콜(예시 2)이 구조적 의미에서만 아니라, 계층적 망 기능과 관련해서도 인간 뇌 발달을 모사한다는 것을 나타낸다.
- [0279] 종합하면, 본 발명의 예시 1-5는, 인간 다능성 줄기 세포들로부터 전기적 활성화 뉴런 망들을 제작하는 새로운 콜라겐-기반, 무혈청, 단계별 통제 분화 방법들을 설득력 있게 입증한다.
- [0280] 예시 6: 뉴런 재생용 모델로서의 BENO들
- [0281] 손상 반응들 및 조직 보수 메커니즘들을 연구하기 위해, BENO들을 손상에 노출시켰다. 극저온-유도, 기계적-유도, 저산소증-유도, 또는 신경독-유도의 전역적 또는 국부적 손상이, 예를 들어,  $N_2$ -냉각 금속 핀, 압착 또는 절개, 산소 0% 임계치 이하에서의 배양뿐만 아니라 글루타민, 도파민, 에탄올, 테트로도톡신, 보툴리누스균 또는 과산화 독소에 노출을 통해 생성될 수 있다. 세포별 반응들(예를 들어, 뉴런들 및 교세포들별)을 포함하는 손상 회복을 구체적으로 연구한다. 예를 들어, 뉴런 증식 유도에 의한 보수 및 재생, 및 예를 들어, 산화 방지제 또는 약학적 조절제들의 적용에 의한 손상으로부터의 보호를 연구한다. BENO들은 뉴런 보호, 보수 및 재생을 포함하는 질병 개량에 대한 새로운 대상들을 확인하고 입증하기 위한 모델 역할을 한다. BENO들은 발달의 상이한 단계들에서, 예를 들어, 증식 뉴런들(예시 2 프로토콜의 15일차, 28일차)로서 그리고 유사분열 후 뉴런들로서(예시 2 프로토콜의 40일차, 60일차) 이용된다.
- [0282] 예시 7: 예를 들어, 정신분열증을 위한 개인 맞춤 질병 모델로서의 BENO들
- [0283] BENO들은, 예를 들어, 재프로그래밍을 통해 환자들로부터 유래되거나, 예를 들어, CRISPR/Cas 또는 TALEN 기술을 이용해 유전적으로 조작된 다능성 줄기 세포들로 만들어진다. 칼슘 활성 평가, 면역형광검사법 분석 또는 전기생리학적 수단(예를 들어, 삽입 전극 측정(impaling electrode measurements), 다중-전극 어레이/장 퍼텐셜

측정(multi-electrode arrays/field potential measurements))을 이용하여 위에 기술된 바와 같이, BENO들은 표현형화 되었다. 동시에, 표현형-유전자형 연관성 연구들을 위해 RNA 서열화 및 프로테오(Proteome) 분석이 수행된다.

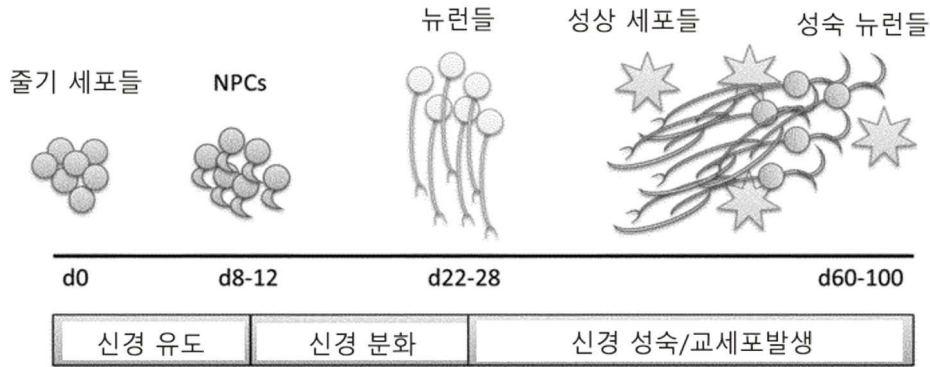
- [0284] BENO들의 사용은 정신분열증의 모델화 측면이다. BENO들은 정신분열증 환자들로부터 얻어진 iPSC 세포들로부터 만들어진다. 이후, 이 환자들로부터 유래된 BENO들을 표현형화 하여 건강한 제어 대상들에 대한 표현형 차이들을 분석한다. 자폐증, 가족성 편마비 및 간질로 고통받는 환자들로부터 유래된 BENO들을 연구하기 위해 다른 연구들이 설계된다.
- [0285] 예시 8: 단계 C 및 D에서의 뉴런 유도 및 확장의 추가 최적화
- [0286] 단계 D 및 E의 최적 기간을 시험하기 위해, 단계 D 및 E의 기간만을 달리하여 예시 2의 프로토콜을 수행하였다(도 11). 이후, 뉴런 수용을 위한 매개변수로서 뉴런 표지 PAX6의 mRNA 표출을 밝힘으로써 각 프로토콜의 결과를 평가하였다.
- [0287] 이 실험들은, 예시 2의 표준 프로토콜, NCM을 포함하는 8일의 인큐베이션(단계 D)이 3일 또는 6일과 같이 더 짧은 인큐베이션 시간보다 우수하다는 것을 보여준다(도 11a). NCM을 포함하는 10일 동안의 인큐베이션은 8일 동안의 인큐베이션보다 약간 높은 PAX6 mRNA 표출을 산출했지만(도 11b), 더 긴 인큐베이션이 PAX6 mRNA 표출을 더 증가시키지는 않았다(도 11b). 이 결과는 10일이 NCM을 포함하는 인큐베이션(단계 D)을 위한 최적의 기간이라는 것을 시사한다.
- [0288] 이 실험들은 또한, 예시 2에서와 같은 7일의 표준과 비교할 때, NPEM을 포함하는 인큐베이션(단계 E)을 2일 또는 5일로 단축하는 것이 PAX6 mRNA 표출에 부정적인 영향을 주지 않는다는 것도 밝혀냈다(도 11a). 상이한 시간 동안 NPEM 인큐베이션을 거치는 BENO들의 추가적인 특성들이 면역형광검사 분석을 통해 연구되었다(도 11c). NPEM 인큐베이션 5일 후에만 BENO들이 왕성한 조직 응축 및 뉴런 증식을 보였기 때문에, 5일간의 최소 NPEM 인큐베이션이 바람직하다는 것이 확인되었다. 이 결과는 5 내지 7일이 NPEM을 포함하는 인큐베이션(단계 E)을 위한 최적의 기간이라는 것을 시사한다.
- [0289] **참고문헌**
- [0290] Birey, Andersen 외, Nature, 2017: "Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids."
- [0291] Chambers, Fasano 외, Nat. Biotechnol., 2009: "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling."
- [0292] Crawford and Roelink, Dev. Dyn., 2007: "The notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling."
- [0293] Feng 외, J Med Chem., 2016: "Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential."
- [0294] Jucker 외, J Neurosci Res. 1991: "Fetal rat septal cells adhere to and extend processes on basement membrane, laminin, and a synthetic peptide from the laminin A chain sequence."
- [0295] Kleinman 외, Biochemistry, 1982: "Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma."
- [0296] Kriks, Shim 외, Nature, 2011: "Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease."
- [0297] Lancaster 외, Nature, 2013: "Cerebral organoids model human brain development and microcephaly."
- [0298] Lancaster and Knoblich, Science, 2014: "Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies."
- [0299] Qian, Nguyen 외, Cell, 2016: "Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure."
- [0300] Stover and Schwartz, Methods Mol Biol. 2011: "Adaptation of Human Pluripotent Stem Cells to Feeder-Free Conditions in Chemically Defined Medium with Enzymatic Single-Cell Passaging."

[0301] Olsauskas-Kuprys 외, OncoTargets and Therapy, 2013: "Gamma secretase inhibitors of Notch signaling."

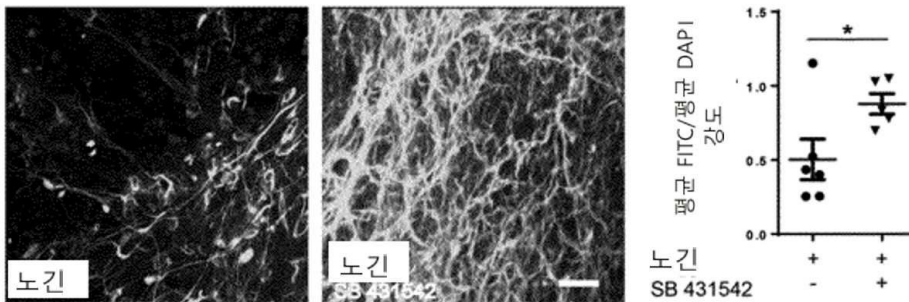
[0302] Tiburcy 외, Circulation, 2017: "Defined Engineered Human Myocardium with Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair."

도면

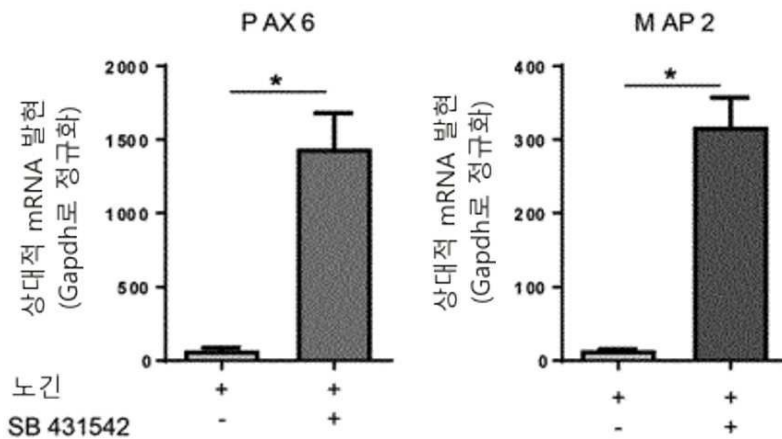
도면1



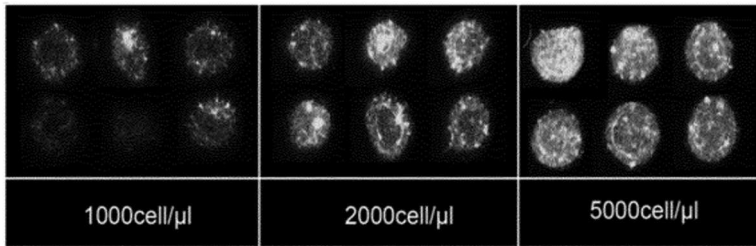
도면2a



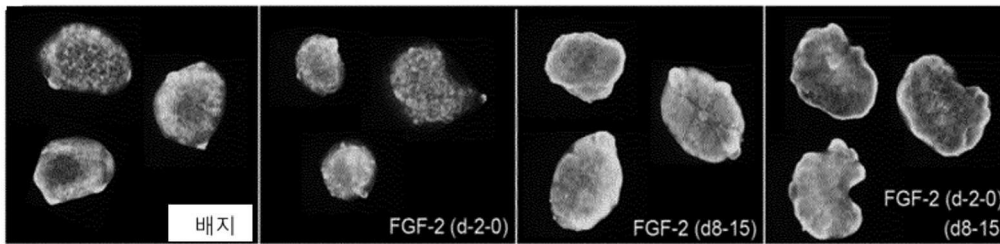
도면2b



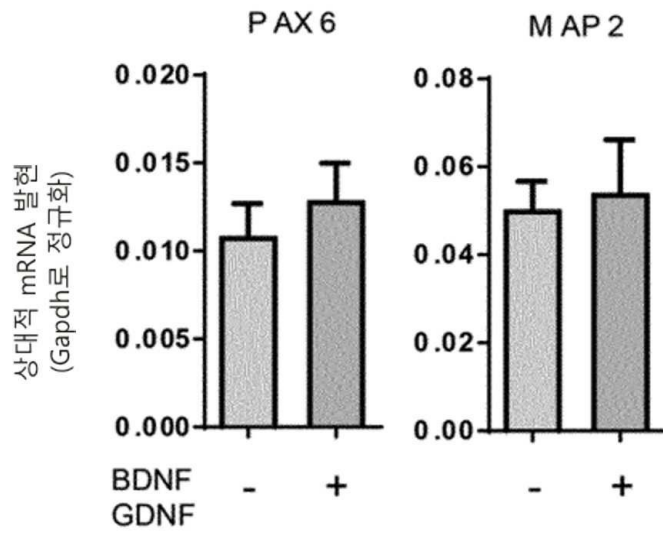
도면3a



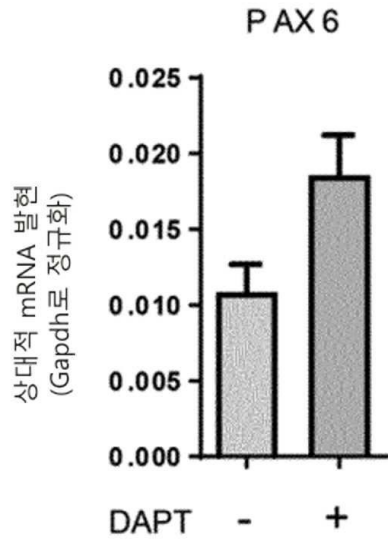
도면3b



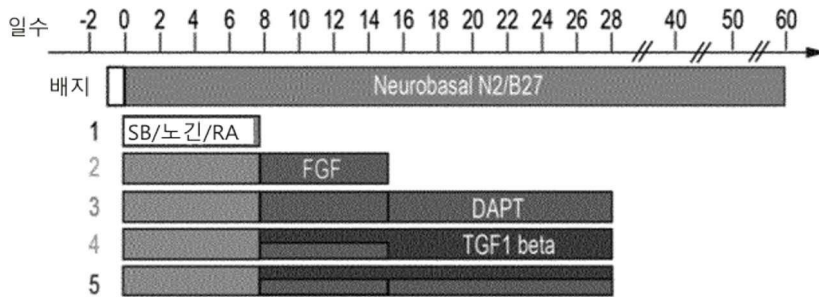
도면4



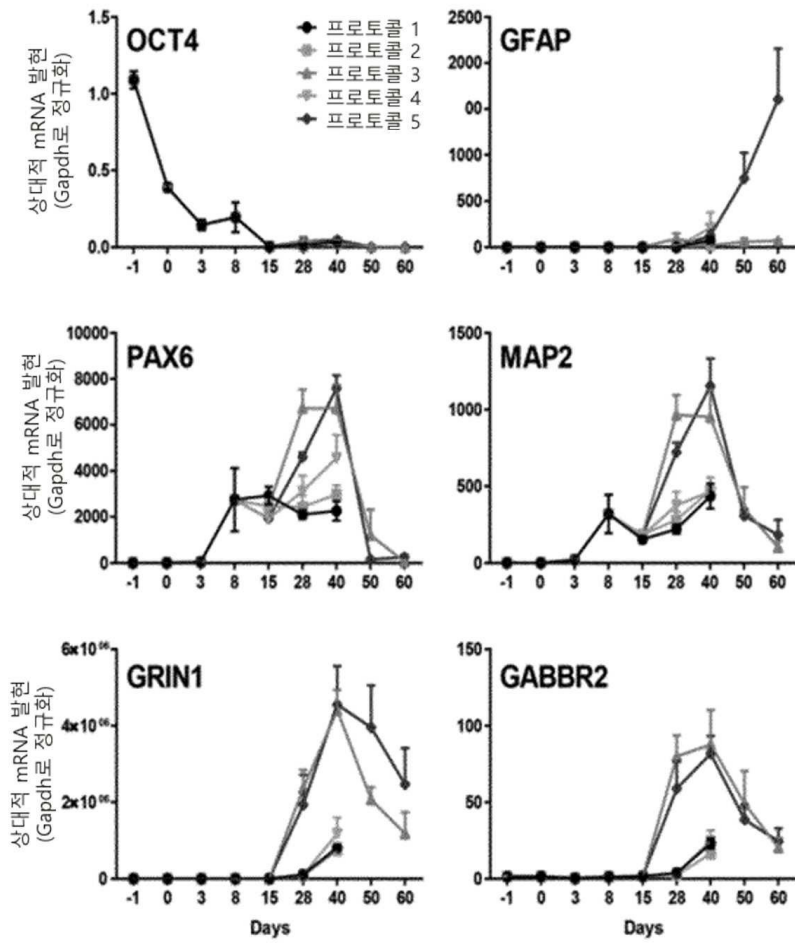
도면5



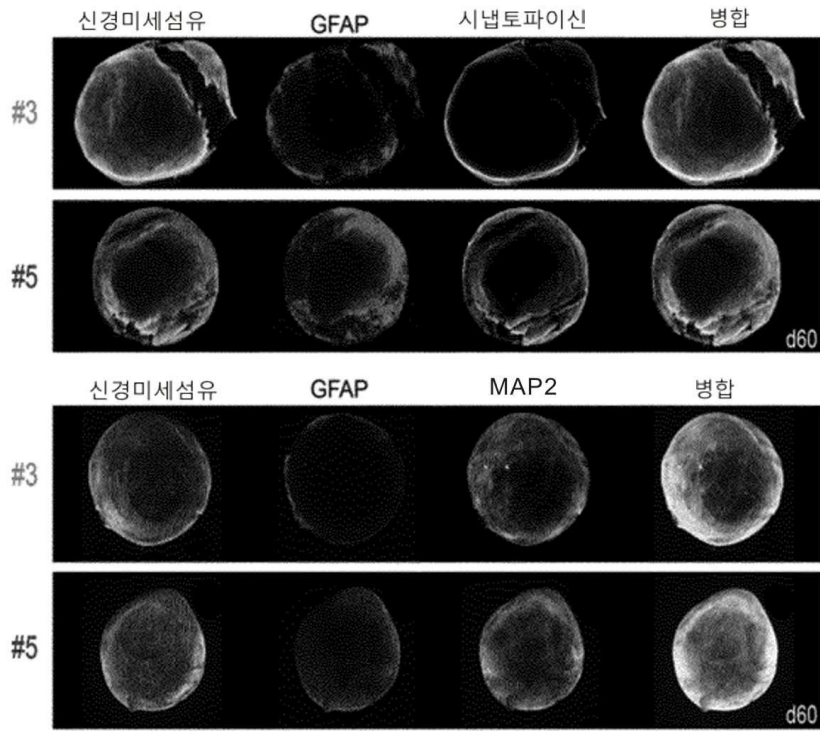
도면6a



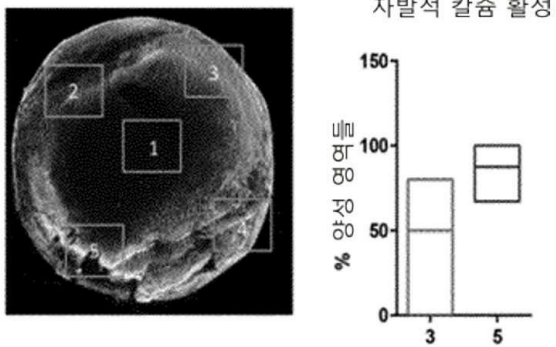
도면6b



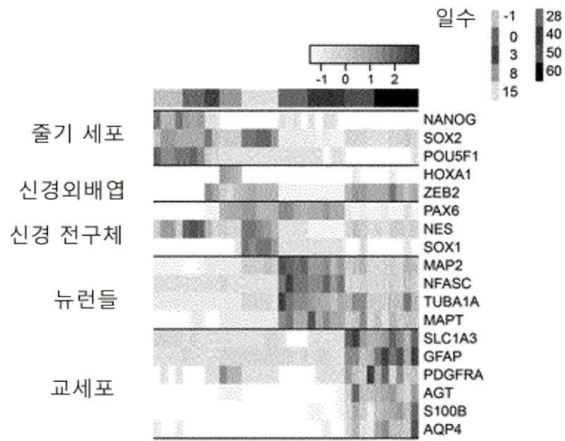
도면6c



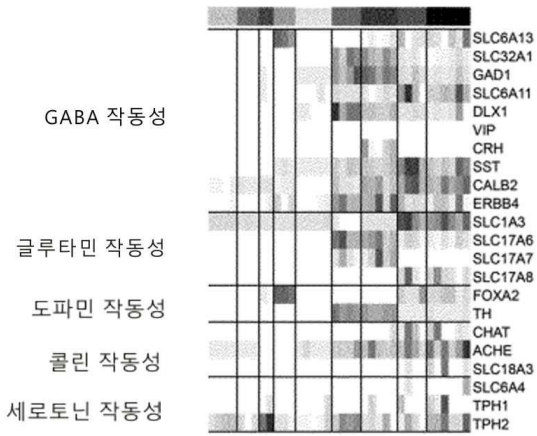
도면6d



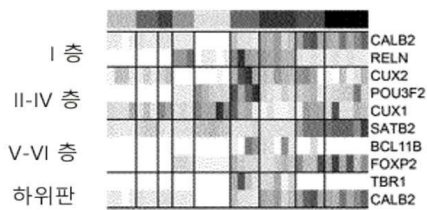
도면7a



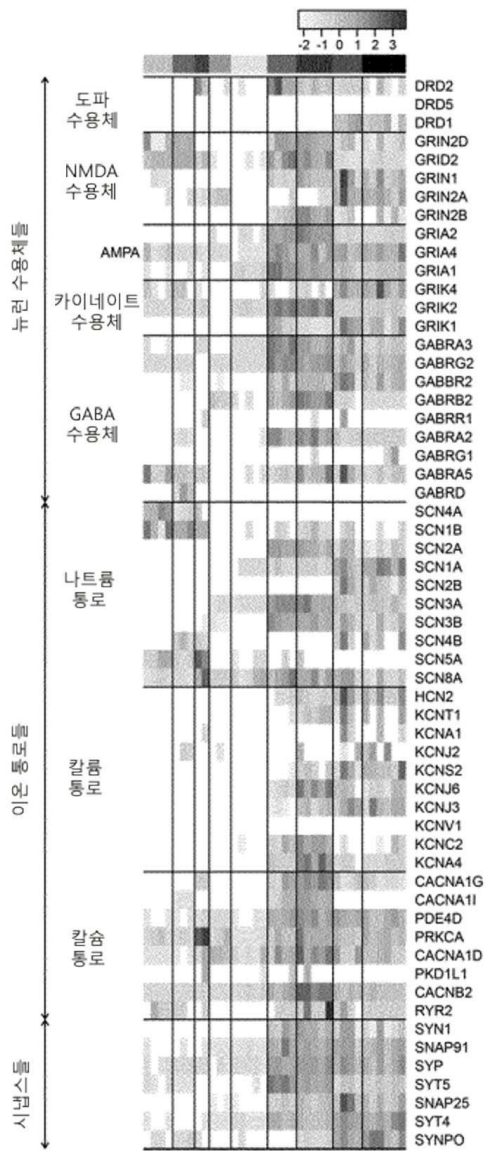
도면7b



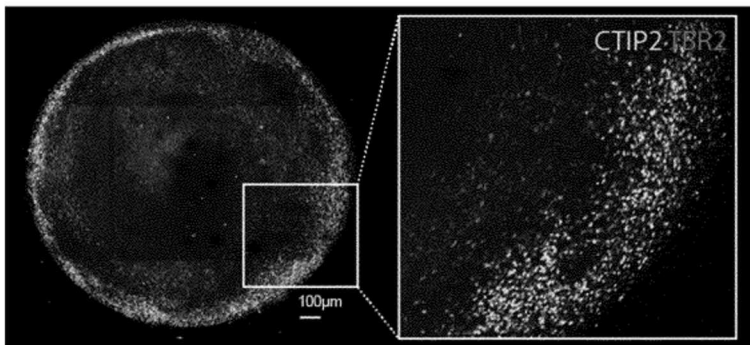
도면7c



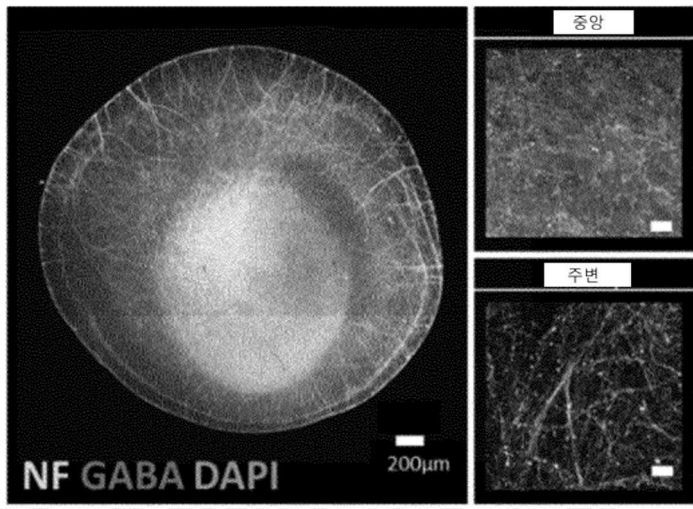
도면7d



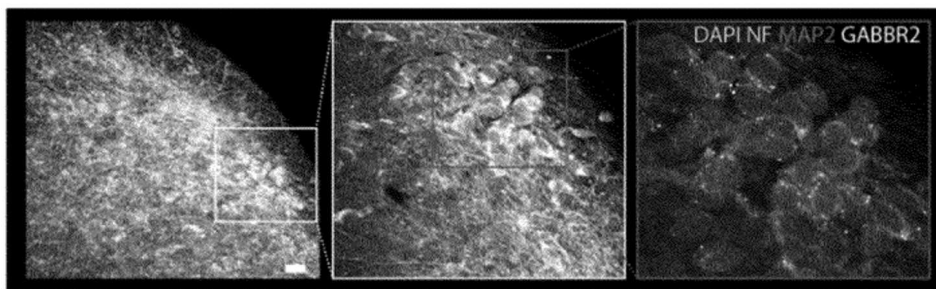
도면8



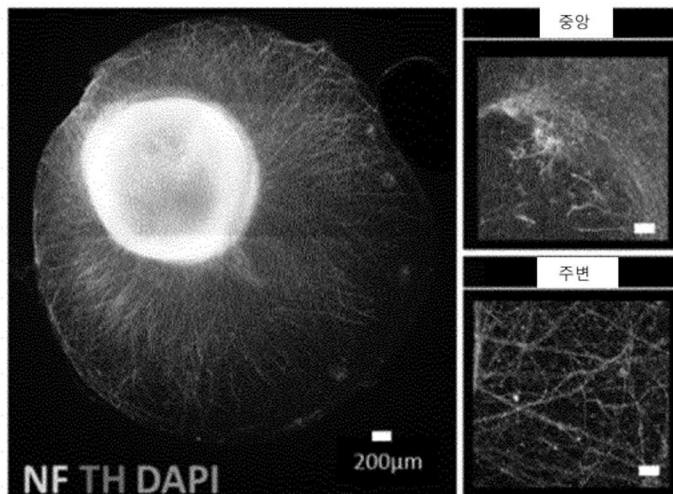
도면9a



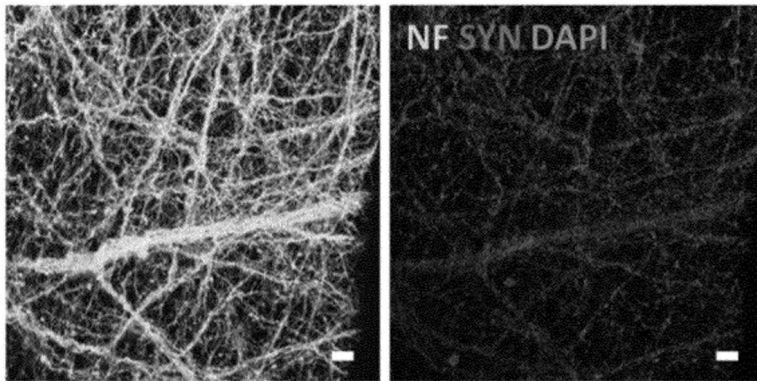
도면9b



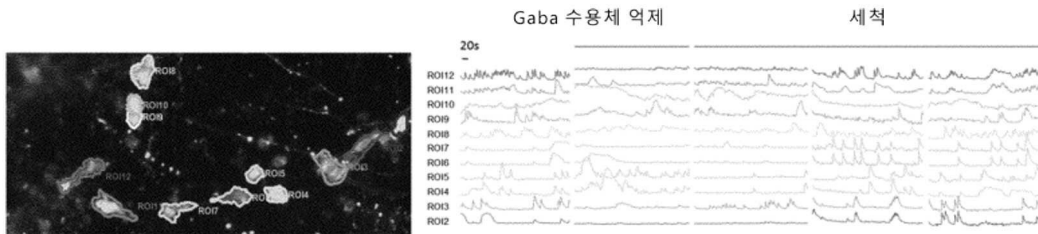
도면9c



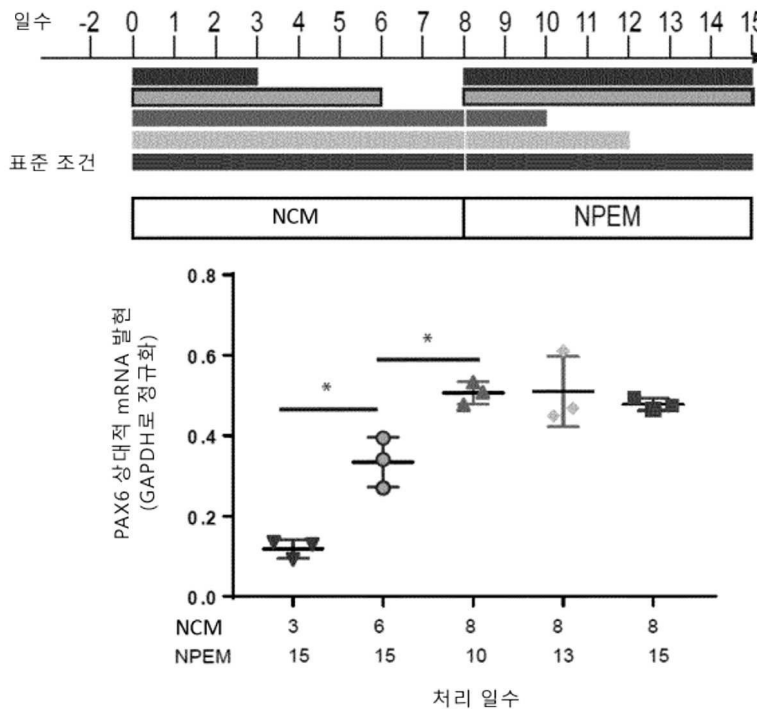
도면9d



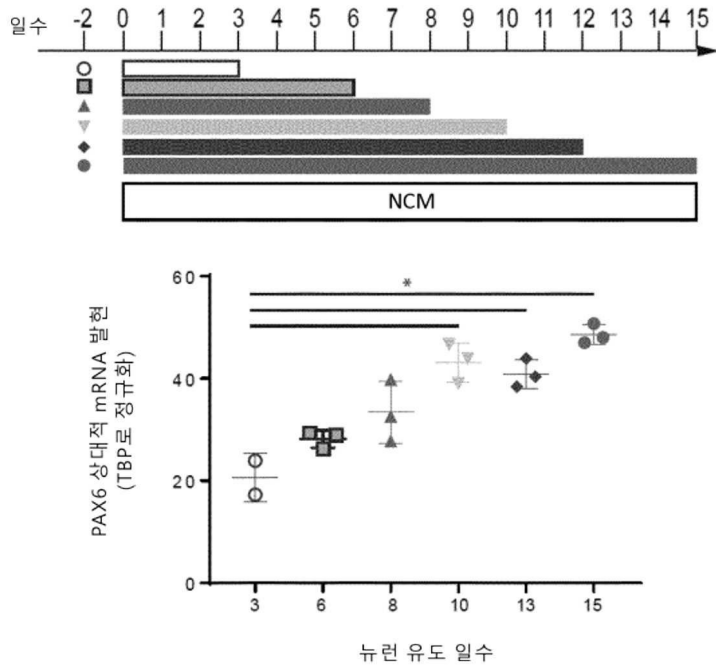
도면10



도면11a



도면11b



도면11c

