(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월18일
(11) 등록번호 10-2625361
(24) 등록일자 2024년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0671 (2013.01)
C12N 2501/119 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7034531
(22) 출원일자(국제) 2018년02월19일
심사청구일자 2021년02월08일
(85) 번역문제출일자 2019년11월22일
(65) 공개번호 10-2020-0015898
(43) 공개일자 2020년02월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/018585
(87) 국제공개번호 WO 2018/226267
국제공개일자 2018년12월13일
(30) 우선권주장
62/517,414 2017년06월09일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
PLOS ONE |
DOI:10.1371/journal.pone.0139345(2015)*
WO2015183920 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
칠드런즈 호스피탈 메디칼 센터
미국 오하이오주 45229-3039 신시내티 버넷 애비뉴 3333
(72) 발명자
다케베 다카노리
미국 오하이오주 45229 신시내티 버넷 애비뉴 3333 내
시노자와 다다히로
미국 오하이오주 45229 신시내티 버넷 애비뉴 3333 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

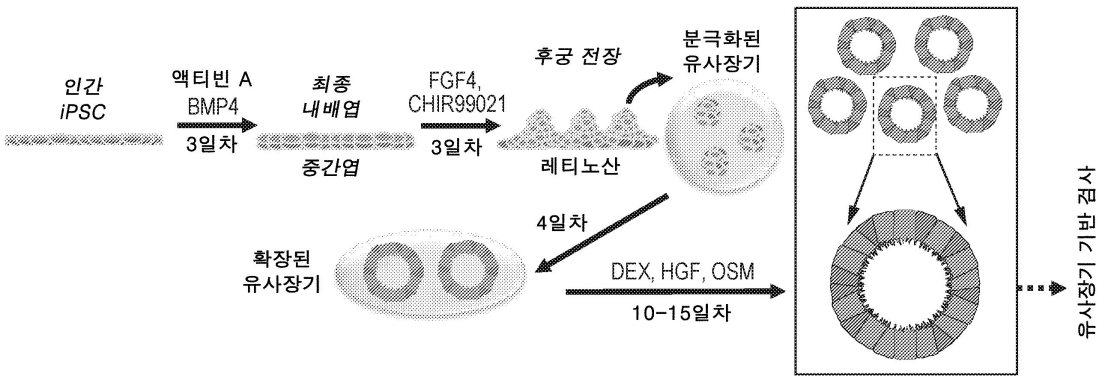
전체 청구항 수 : 총 36 항 심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **간 유사 장기 조성물 및 이를 제조 및 사용하는 방법**

(57) 요 약

iPSC 세포와 같은 전구 세포에서 간 유사 장기의 형성을 유도하는 방법이 개시된다. 개시된 간 유사 장기는 간 기능 부전 및/또는 약물 유발성 간 손상(DILI) 및/또는 약물 독성과 같은 심각한 이상 반응(SAE)에 대한 검사에 사용될 수 있다. 개시된 간 유사 장기는 또한 간 손상을 갖는 개체를 치료하거나, 또는 바람직한 치료제를 식별하기 위해 사용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 2501/12 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/16 (2013.01)
C12N 2501/237 (2013.01)
C12N 2501/385 (2013.01)
C12N 2501/39 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)
C12N 2503/02 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)
(72) 발명자
고이케 히로유키
미국 오하이오주 45229 신시내티 버넷 애비뉴 3333 내
기무라 마사키
미국 오하이오주 45229 신시내티 버넷 애비뉴 3333 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

간 유사장기(organoid)의 형성을 유도하는 방법으로서,

a) 최종 내배엽(DE)을 FGF 경로 활성제 및 Wnt 신호(signaling) 경로 활성제와 1일 내지 3일 동안 접촉시켜, 후궁 전장 회전 타원체(posterior foregut spheroids)를 형성시키는 단계; 및

b) 상기 단계 a의 상기 후궁 전장 회전 타원체를 레티노산(RA)의 존재 하에 1일 내지 5일 동안 배양하여, 상기 간 유사장기를 형성시키는 단계를 포함하고,

상기 간 유사장기는 중간엽 세포를 포함하는 내인성 미세 융모를 포함하는 내강 구조를 포함하고, 상기 내강 구조가 분극화된 간세포 및 기저막으로 둘러싸여 있는 것인, 간 유사장기의 형성을 유도하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법이, 상기 단계 b의 상기 간 유사장기를 간세포 성장 인자, 덱사메타손 및 온코스타틴 M과 함께 적어도 10일 동안 배양하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 최종 내배엽이 다능성 줄기 세포로부터 유래되는 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 다능성 줄기 세포가 배아 줄기 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포(iPCS)인 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 후궁 전장 회전 타원체가 기저막 매트릭스에 내포되는 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 후궁 전장 회전 타원체가 마트리겔에 내포되는 것인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 간 유사장기가 알파-페토 단백질(AFP), 알부민(ALB), 레티놀 결합 단백질(RBP4), 사이토케라틴 19(CK19), 간세포 핵 인자 6(HNF6) 및 시토크롬 P450 3A4(CYP3A4), HNF4a, E-카데린, DAPI 및 상피세포 접착분자(Epcam)을 발현하는 것인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 간 유사장기가 담즙 수송 활성을 갖는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항의 방법에 의해 생성된, 간 유사장기.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 간 유사장기가 기능성 별 모양 세포 및 기능적 쿠퍼 세포(Kupffer cell)를 포함하는 것인, 간 유사장기.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 간 유사장기가 담즙 생성 능력, 담즙 수송 활성, 적어도 50ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 보

체 인자 H 발현, 적어도 40ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 보체 인자 B, 적어도 1,000ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 C3 발현; 적어도 1,000ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 C4 발현, 적어도 1,000ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 피브리노겐 생산 및 적어도 1,000ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 알부민 생산 중 하나 이상을 갖는 것이 특징인 것인, 간 유사장기.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 간 유사장기가 적어도 10,000ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 총 간 단백질 발현을 갖는 것이 특징인 것인, 간 유사장기.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 간 유사장기가 PROX1, RBP4, CYP2C9, CYP3A4, ABCC11, CFH, C3, C5, ALB, FBG, MRP2, ALCAM, CD68, CD34, CD31에서 선택된 하나 이상의 유전자를 발현하는 것인, 간 유사장기.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 간 유사장기가 약물 대사 시토크롬 변이체를 포함하는 것인, 간 유사장기.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 간 유사장기가 CY2C9*2 변이체를 포함하는 것인, 간 유사장기.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 간 유사장기가 염증 세포 또는 염증성 분비 단백질을 포함하지 않는 것인, 간 유사장기.

청구항 17

관심 대상 약물을 제9항의 간 유사장기와 접촉시키는 단계를 포함하는, 간 기능부전 및/또는 약물 유도 간 손상(DILI)을 검사하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 방법이 플루오레세인 디아세테이트(FD)의 흡입 및/또는 유출을 측정하는 단계를 포함하되, 유출 장애가 상기 약물이 간 기능부전 및/또는 약물 유도 간 손상(DILI)을 유발할 가능성이 있음을 나타내는 것인, 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 관심 대상 약물의 독성이 미토콘드리아 막 전위, ROS의 측정, 간 미토콘드리아의 팽창 및 이들의 조합에서 선택된 매개 변수의 측정에 의해 결정되되, 상기 미토콘드리아에 대한 손상이 상기 약물이 간 기능부전 및/또는 약물 유도 간 손상(DILI)을 유발할 수 있음을 나타내는 것인, 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 방법이 유사장기 생존능력을 분석하는 단계를 포함하되, 손상된 유사장기 생존능력 결정은 상기 약물이 간 기능부전 및/또는 약물 유도 간 손상(DILI)을 유발할 수 있음을 나타내는 것인, 방법.

청구항 21

제9항에 있어서, 간 손상을 가진 개체를 치료하는데 사용하기 위한 것인, 간 유사장기.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 간 손상이 대사성 간 질환, 말기 간 질환 또는 이들의 조합에서 선택되는 것인, 간 유사장기.

청구항 23

제9항의 간 유사장기를 후보 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 개체에 대한 바람직한 치료제를 식별하는 방법으로서, 상기 간 유사장기가 관심 대상 iPSC에서 유래된 것인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 관심 대상 iPSC가 상기 개체에서 발견된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것인, 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 관심 대상 iPSC가 상기 개체의 동일한 인종 배경에서 유래되는 것인, 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 관심 대상 iPSC가 상기 개체에서 유래된 것인, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FGF 경로 활성제는 소분자 또는 단백질 FGF 신호 경로 활성제, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, 또는 이들의 조합물로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 28

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Wnt 신호 경로 활성제는 소분자 또는 단백질 Wnt 신호 경로 활성제로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 Wnt 신호 경로 활성제는 Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, 또는 이들의 조합물인, 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 Wnt 신호 경로 활성제는 염화 리튬, 2-아미노-4,6-이치환된 피리미딘 (헤테로) 아릴피리미딘; IQ1; QS11; NSC668036; DCA 베타-카테닌; 2-아미노-4-[3,4-(메틸렌디옥시)-벤질-아미노]-6-(3-메톡시페닐) 피리미딘으로부터 선택된 소분자인, 방법.

청구항 31

제28항에 있어서, 상기 Wnt 신호 경로 활성제는 GSK3 억제제인, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 Wnt 신호 경로 활성제는 CHIR99021인, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 FGF 경로 활성제는 FGF4인, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 FGF4는 200 ng/ml 내지 1000 ng/ml의 농도로 제공되고, 상기 CHIR99021은 1uM 내지 100uM의 농도로 제공되는 것인, 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 FGF4는 500 ng/ml의 농도로 제공되고, 상기 CHIR99021은 3uM의 농도로 제공되고, 상기 RA는 2uM의 농도로 제공되는 것인, 방법.

청구항 36

제28항에 있어서, 상기 Wnt 신호 경로 활성제는 GSK3 억제제가 아닌 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2017년 6월 9일자로 출원된 제62/517,414호의 우선권 및 이익을 주장하며, 각각의 내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 인용된다.

배 경 기 술

[0003] 간은 외인성 화합물의 해독 및 응고뿐만 아니라 지질, 단백질, 암모늄 및 담즙 생성과 같은 생활에 필수적인 여러 대사 기능을 제공하는 중요한 기관이다. 환자의 간을 체외에서 재구성하면 재생 요법, 약물 발견 및 약물 독성 연구 등의 응용 분야를 제공할 수 있다. 간 세포를 이용한 기존의 방법론은 필수적인 해부학 적 구조가 부족하여 제약 산업에 대한 실질적인 사용을 제한하는 매우 불량한 기능성을 나타낸다.

[0004] 제약 회사의 약물 개발로 인해 초기 검사에서 확인된 후보 약물들의 실패로 인해 매년 수십억 달러가 손실되고, 이러한 실패로 인해 약 3분의 1의 약물이 시장에서 퇴출된다(Takebe and Taniguchi, 2014). 후보 약물들의 실패로 인해 환자의 치료 기회가 엄청나게 손실된다. 전임상 연구는 일반적으로 "히트(hit)" 화합물을 확인하기 위한 1 차 유효성 시험으로서 *체외* 평가(*in vitro* evaluation)로 구성되며, 이어서 신진 대사 및 독성의 메커니즘을 평가하기 위한 *체외* 및 *체내* 안전성 시험이 뒤따른다. 이러한 비 능률은 인간에서 약물 유도 간 손상(DILI)을 평가할 때 높은 처리량을 가진 생리학적으로 관련이 있는 전임상 모델이 실질적으로 부족하여 광대한 양의 지속적으로 성장하는 화합물 라이브러리의 평가를 위해 체외 인체 검사 시험 모델을 개발해야 한다는 긴급한 필요성으로 설명될 수 있다.

[0005] 1 차 간세포는 고도로 분화된 대사성 세포 유형이며, 담즙산 분비 경로에서 말초 혈액 순환을 분리하는 미세 비대관 채널을 갖는 모세담관(bile canaliculi) 구조를 형성한다. DILI의 가장 상향적인 측면은 간세포에 의한 약물(또는 이들의 반응성 대사 산물) 해독, 및 다중 약물 내성 관련 단백질(MRP) 수송체와 같은 수송체를 통한 모세담관으로의 배출을 포함한다. 이것은 DILI 병리학을 예측하기 위해 *체내*에서 간세포의 중요한 특성으로서 이러한 고유 조직 구조를 재구성할 필요가 있음을 시사한다. 그러나, 단리된 1차 인간 간세포 또는 간세포 주를 사용하는 현재의 간략화된 배양 모델과 *체내* 생리학 사이에서 약물 독성 프로파일에 상당한 차이가 있어 트로글리타존, 네파조돈 및 톨카폰의 경우와 같이 약물의 변형의 실패 또는 약물 중단을 초래한다(https://livertox.nlm.nih.gov/index.html). 독성학적 특성의 판단은 약물 개발의 필수 단계로서 주로 동물에 의존하는데, 사람과 동물 사이의 생리학에서 현저한 차이로 인하여, 인간 결과의 충실도가 상당히 떨어진다(Leslie et al., 2007; Yang et al., 2014). 또한 매우 드물지만 그럼에도 불구하고 미국에서 급성 간 장애의 약 10-15%를 담당하고 있는 특이성 DILI(IDILI)의 발병은 예측하기가 거의 불가능한다(Kullak-Ublick et al., 2017). 종합적으로 제안된 약물의 해독 및 배출을 테스트하는 화합물을 검사하는 데 효과적인 인간 세포 모델이 필요하다.

[0006] 다능성 줄기 세포(pluripotent stem cell, PSC)로부터의 인간 간세포 분화 방법의 진보적인 발전에도 불구하고, 인간 줄기 세포를 이용한 샤알레(dish)에서의 임상 실험은 여전히 과장된 상태로 남아있다. 효능 및/또는 독성에 대한 약물 검사 외에, 이식을 위한 예를 들어, 정밀성(개인 맞춤 약제)을 위한 가교로서 바이오-인공 간 장치에 사용하기 위한 간 세포 모델이 필요하다. 본 개시는 당 업계에서 전술한 필요성 중 하나 이상을 해결하고자 한다.

발명의 내용

[0007] iPSC 세포와 같은 전구 세포로부터 간 유사 장기(organoid)의 형성을 유도하는 방법이 개시된다. 개시된 간 유사 장기는 간 기능 부전 및/또는 약물 유발성 간 손상(DILI) 및/또는 약물 독성과 같은 심각한 이상 반응(SAE)에 대한 검사에 사용될 수 있다. 개시된 간 유사 장기는 또한 간 손상이 있는 개체를 치료하거나 또는 바람직한 치료제를 식별하는 데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0008] 당업자라면 아래에 설명된 도면은 단지 예시적인 목적을 위한 것임을 이해할 것이다. 도면은 어떤 식으로든 본 교시의 범위를 제한하지 않는다.

본 특허 또는 출원 파일에는 컬러로 실행된 도면이 하나 이상 포함되어 있다. 컬러 도면이 있는 이 특허 또는 특허 출원 간행물의 사본은 요청 및 필요 수수료의 지불 시 사무소가 제공한다.

도 1. 내강 구조를 가진 iPSC로부터 인간의 간 유사 장기의 생성. A. 간 유사 장기의 분화 방법의 개요. B. 인간 간 유사 장기의 위상 대비 영상. C. 유사장기에서의 알부민(ALB), 타입 IV 콜라겐(콜라겐 IV) 및 ZO-1에 대한 면역염색. 핵은 해마톡실린(파란색)으로 염색되었다. 막대, 50μm. D. 미분화 상태의 iPS 세포, 분화 7 일, 11 일, 20 일 및 30 일차의 유사장기 및 간세포(PH)에서의 알파 태아 단백(AFP), 알부민(ALB), 레티놀 결합 단백질 4(RBP4), 사이토 케라틴 19(CK19), 간세포 핵 인자 6(HNF6) 및 시토크롬 P450 3A4(CYP3A4)의 정량적 RT-PCR. 상대적인 발현 값을 미분화 iPSC(AFP, ALB, RBP4 및 CK19) 또는 7 일차 유사장기(HNF6) 또는 11 일차 유사장기(CYP3A4)와 비교하였다. 막대는 평균 ± SD, n = 3을 나타낸다. E. 미분화된 iPS 세포(iPSC), 최종 내배엽(DE), 간 지정 세포(HS), 간 전구세포(HP), iPSC 유래 담관세포(iDC), 정상 인간의 담관세포(NHC), iPSC 유래 후부 연조직(pFG), iPSC 유래 인간 간 유사 장기, 1차 간세포, 태아 간 조직, 간 조직 및 인간 간 우엽에서 RNA 서열 데이터를 기반으로 한 주요 구성 요소 분석. F. 25~30일차 유사장기에서 알부민(ALB, n = 10) 및 피브리노겐(FBG, n = 4)의 분비 수준. 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. G. 25~30 일차 유사장기의 보완 인자 분비 수준. FH: 인자 H, FB: 인자 B. 막대는 평균 ± SEM, n = 5를 나타낸다.

도 2. 인간 iPSC 간 유사 장기에서 담즙산 합성, 흡입 및 배출. A. 단일 유사장기 내에서 다중약물 내성 관련 단백질 2(MRP2)와 담즙 배출 펌프(BSEP)에 대한 면역 염색. 막대, 50μm. B. 미세융모(V) 내강 내 표면을 보여주는 유사장기의 투과 전자 현미경 사진; N: 핵. 막대, 10μm. B. 미분화 iPSCs, 분화 20일차(NTCP) 및 30일차(ABCB11) 유사장기 및 1 차 간세포(PH)에서의 ATP- 결합 카세트, 하위 계열 B 구성원 11(ABCB11) 및 나트륨 타우로콜레이트 동시 수송 폴리펩티드(NTCP)의 정량적 RT-PCR. 상대 발현값을 미분화 iPS 세포(ABCB11) 또는 11일차 유사장기(NTCP)와 비교하였다. 막대는 평균 ± SD, n = 3을 나타낸다. D. 27 일차 유사장기 내 총 담즙산 분비 수준. 막대는 평균 ± SEM, n = 4를 나타낸다. E. 형광 담즙산(CGamF)의 존재 하에 배양 30분 후 유사장기에 의한 담즙산 흡입. F. 4 가지 iPSC 세포주에서 유래된 유사장기 상의 CLF 수송 활성. T, W, 1 및 F는 iPS 세포주의 클론 이름을 나타낸다. 녹색: CLF.

도 3. 보센탄 유도 담즙 정체는 CYP2C9*2 iPSC-간 유사 장기에 특이적이다. A. CYP2C9*2의 rs1799853 및 UGT1A1*6의 rs4148323의 대표적인 대립 유전자 이미지는 각각 보센탄과 이리노테칸에 의한 DILI에 대한 위험 SNP를 보여준다. 이 표는 각 iPS 세포주에서 위험 대립 유전자를 소유하고 있음을 나타낸다. B. 보센탄에 의한 CLF 수송 활동 및 억제 이미지. C. 상이한 4가지 iPS 세포주에서 유래한 개별 유사장기의 CLF 강도 수준. *: p <0.01, **: p <1E-4, *: p <1E-8, Wilcoxon-Mann-Whitney Test. NS: 유의하지 않음. 상자 도에서 상자의 위쪽과 아래쪽은 75 번째와 25 번째 백분위수를 나타내며 가운데 줄은 중간을 나타낸다. 점은 각 유사장기의 데이터를 나타낸다.

도 4. 유사장기를 이용한 고 충실도 약물 유도 담즙 정체 모델. A. 유사장기의 외부에서 내부로 플루오레스세인 디아세테이트 의 유출에 대한 연속 이미지. B. 플루오레세인 디아세테이트 유출 수송의 비교. C. 유사장기로의 플루오레스세인 디아세테이트 유출 수송의 정량화. 실시예 좌측 이미지는 유사장기 내부 및 외부에서의 형광 강도의 정량화된 비율이었다. 오른쪽 그래프는 대조군(DMSO), 사이클로스포린 A(CSA) 및 스트렙토마이신(STP)을 음성 대조군으로 사용한 검증 연구 결과를 나타낸다. 막대는 평균 ± SD를 나타내며, **: p <0.01, n = 4. D. 24 시간 동안 9 가지 훈련 화합물의 처리 후, 플루오레세인 디아세테이트 수송 억제의 이미지. 훈련 화합물 치료 후 수송 억제의 정량화, 막대는 평균 ± SD를 나타낸다, *: p <0.05, **: p <0.01, n = 4~6. 훈련 화합물 치료 후mMP 변화의 정량화, 막대는 평균 ± SD를 나타내며, *: p <0.05, **: p <0.01, n = 4~5. CON: 대조군 샘플, STP: 스트렙토마이신, TOL: 톨카폰, DICLO: 디클로페낙, BOS: 보센탄, CSA: 사이클로스포린 A.

도 5. 고 충실도 약물은 유사장기를 사용하여 미토콘드리아 독성 검사를 유발하였다. A. 9 가지 훈련 화합물 치료 후 TMRM상에서 미토콘드리아 막 전위(MMP) 이미지. 낮은 것: 훈련 화합물 치료 후 수송 억제의 정량화, 막대는 평균 ± 표준 편차를 나타내며, *: p <0.05, **: p <0.01, n = 4~6. C. 훈련 화합물 치료 후mMP 변화의 정량화, 막대는 평균 ± SD를 나타내며, *: p <0.05, **: p <0.01, n = 4~5. CON: 대조군 샘플, STP: 스트렙토마이신, TOL: 톨카폰, DICLO: 디클로페낙, BOS: 보센탄, CSA: 사이클로스포린 A, TRO: 트로글리타존, NEFA: 네파

조돈, ENTA: 엔타카폰, PIO: 피오글리타존. B. Oorts., et al 2016(Oorts et al., 2016)에 언급된 9 가지 훈련 화합물(TC)의 분류. A등급은 생체 내 DILI에 대한 알려진 보고가 있는 TC를 나타내는 반면, B 등급의 화합물들은 약물 유발성 담즙 정체에 대한 보고가 있는 TC이다. 문헌 자료에 근거한 독성의 기전도 제공된다. C 등급 화합물은 일반적으로 DILI에 대해 안전하다고 간주된다. C. 약물 치료 후 72 시간 생존율과 이중 위험 인자, 약물 유도 담즙 정체 가능성 및 미토콘드리아 독성 잠재성 사이의 분석. 담즙 정체증 및 미토콘드리아 독성(Mito-tox) 지수가 도 3의 데이터에서 유도되었다. 원의 크기는 생존력의 크기가 감소함을 나타낸다.

도 6. NAC 노출로 구한 취약한 환경에서 약물 유발 간 손상 모델링. A. 취약한 유사장기 모델에서 약물 유도 세포 독성 평가의 개요. B. 지질 축적에 대한 취약한 모델의 프로파일링(파란색: 핵, 녹색: 지질, 빨간색: F- 악틴). C ROS 생산(파란색: 핵, 녹색: ROS) 및 D. 미토콘드리아 건강(파란색: 핵, 빨간색: 미토콘드리아). 약물 치료 후 24 시간에 유사장기의 이미지. F. 지질 축적-유도 취약한 유사장기 모델에서 생존 가능성 평가. 막대는 평균 ± 표준 편차(SD)를 나타내며, *: p <0.05, n = 5~6. CON: 대조군, STP: 스트렙토 마이신, TRO: 트로글리타존, NAC: N-아세틸 시스테인.

도 7. 독성 예측을 위한 다중 간 유사 장기 기반 검사

도 8. 레티노산 처리 프로토콜의 최적화 A. 레티노산 처리의 타이밍 및 지속 기간에 대한 계획. RA: 레티노산, HCM: 간세포 배양 배지. B. RA 처리의 상이한 지속 기간에서 25일차 유사장기에서의 알부민 분비 수준.

도 9. 20일차 유사장기의 형태학. 20일차 유사장기의 총 수는 305이었다. 내강이 있는 유사장기: 216개, 내강이 없는 유사장기: 89개.

도 10. 유사장기에서 세포의 수를 결정하는 전환 수식. A. 단일 유사장기의 위상 대비 이미지. B. 각 단일 유사장기의 직경과 세포 수. C. 단일 유사장기에서 직경과 세포 수 사이의 상관 관계.

도 11 - 도 4의 보충도. 다수의 PSC 세포주에서 유사장기 생성. 상이한 iPS 세포주(317D6 및 1383D6) 유래 유사장기의 위상 대비 영상 및 알부민 분비 수준.

도 12. 화합물 10 개를 처리 한 후 24 시간 째의 세포 생존력. 지질 축적-유도 취약 유사장기 모델에서 생존력 평가. CON: 대조군 샘플, STP: 스트렙토마이신, TOL: 톨카폰, DICLO: 디클로페낙, AMIO: 아미오다론, BOS: 보센탄, CSA: 사이클로스포린 A, TRO: 트로글리타존, NEFA: 네파조돈, ENTA: 엔타카폰, PIO: 피오글리타존. 막대는 평균 ± SD, n = 4~6을 나타낸다.

도 13. 지질독성 간 유사 장기에서 ROS 생산과 미토콘드리아의 형태학적 변화 A. 지질 축적-유도 취약한 유사장기 모델에서 800㎛ 올레산(OA) 처리로 인한 총 세포에서 ROS를 생성하는 세포 수의 비율. B. 취약한 유사장기 모델에서 유사장기 내 미토콘드리아의 이미지. 빨간색: 미토콘드리아, 자주색: F-액틴, 파란색: 핵. C. 취약한 유사장기 모델에서 미토콘드리아의 수와 크기. 막대는 평균 ± 표준 편차를 나타내며, *: p <0.05, n = 5~6.

도 14. 세포 무-마트리겔 방법(Cell Matrigel-Free Method)의 도식. 유사장기 생성을 위해 마트리겔을 사용하지 않는 간 유사 장기 생성 방법에 대한 도식이 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 달리 언급되지 않는 한, 용어는 관련 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의한 통상적인 사용법에 따라 이해되어야 한다.

[0010] "약" 또는 "대략"이라는 용어는 당업자가 결정한 특정값에 대한 수용 가능한 오차 범위 내에 있음을 의미하며, 이는 값이 어떻게 측정되거나 결정되는지에, 예를 들어, 측정 시스템의 제한에, 부분적으로 달려있다. 예를 들어, "약"은 당업계의 관행에 따라 1 또는 1 초과 표준 편차 내의 범위를 의미할 수 있다. 또는 "약"은 주어진 값의 최대 20%, 최대 10% 또는 최대 5% 또는 최대 1%의 범위를 의미 할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정과 관련하여,이 용어는 값의 1 배 이내, 바람직하게는 5 배 이내, 보다 바람직하게는 2 배 이내를 의미할 수 있다. 특정 값이 출원 및 청구 범위에 기재된 경우, 달리 언급되지 않는 한, 특정 값에 대한 허용 오차 범위 내에서의 "약"의 의미를 가정해야 한다.

[0011] 본 명세서에서 사용되는 "전능 줄기 세포"(전능성 줄기 세포로도 알려짐)는 배아 및 외배엽 세포 유형으로 분화할 수 있는 줄기 세포이다. 그러한 세포는 완전한 생존 가능한 유기체를 구성할 수 있다. 이 세포들은 난자와 정자 세포의 융합으로 만들어진다. 수정 된 난자의 처음 몇 개의 분열에 의해 생산된 세포도 전능(totipotent)이다.

[0012] 본원에서 사용된 "다능성 줄기 세포(PSC)"라는 용어는 신체의 거의 모든 세포 유형으로 분화할 수 있는 임의의 세포, 즉 내배엽(위장 내벽(interior stomach lining), 위장관, 폐), 중배엽(근육, 뼈, 혈액, 비뇨 생식기) 및 외배엽(표피 조직과 신경계)을 포함하는 3 가지 배아층(배아 상피)에서 유래된 세포를 아우른다. PSCs는 이식전 배반포의 내부 세포 대량 세포의 자손이거나 또는 특정 유전자의 발현을 강요함으로써 성 체세포와 같은 비-다능성 세포의 유도를 통해 얻어질 수 있다. 다능성 줄기 세포는 적절한 출처에서 유래 될 수 있다. 다능성 줄기 세포의 출처의 예는 인간, 설치류, 돼지 및 소를 포함하는 포유 동물 공급원을 포함한다.

[0013] 본원에서 사용 된 용어 "유도된 다능성 줄기 세포(iPSCs)"는 일반적으로 iPS 세포로 약칭되며, 특정 유전자의 "강제적" 발현을 유도함으로써, 성숙한 체세포와 같은 정상적으로 비-다능성 세포로부터 인위적으로 유도된 유형의 다능성 줄기 세포를 가리킨다. hiPSC는 인간 iPSC를 가리킨다.

[0014] 본 명세서에서 사용되는 "배아 줄기 세포(ESC)"는 일반적으로 ES 세포로 약칭되며, 다능성이고 초기 단계의 배아인 배반포의 내부 세포 덩어리에서 유래된 세포를 가리킨다. 본 발명의 목적을 위해, 용어 "ESC"는 때로는 배아 생식 세포를 포함하도록 광범위하게 사용된다.

[0015] 본원에 사용된 바와 같이, "전구 세포"라는 용어는 하나 이상의 전구 세포가 자체를 갱신하거나 하나 이상의 특수화된 세포 유형으로 분화하는 능력을 얻는, 본원에 기술된 방법에서 사용될 수 있는 임의의 세포를 아우른다. 일부 구현예에서, 전구 세포는 다능성이거나 다능성이 될 수 있는 능력을 갖는다. 일부 구현예에서, 전구 세포는 다능성을 획득하기 위해 외부 인자(예: 성장 인자)의 처리를 거친다. 일부 구현예에서, 전구 세포는 전능(전능) 줄기 세포; 다능성 줄기 세포(유도되거나 유도되지 않음); 다능성 줄기 세포; 만능 줄기 세포 및 단분화능 줄기 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 전구 세포는 배아, 유아, 어린이 또는 성인으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 전구 세포는 유전자 조작 또는 단백질/펩티드 처리를 통해 다능성이 부여되는 치료 대상 체세포 일 수 있다.

[0016] 발달 생물학에서 세포 분화는 덜 특수화된 세포가 좀 더 특수화 된 세포 유형이 되는 과정이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "지향성 분화"라는 용어는 덜 특수화된 세포가 특정한 특수화된 표적 세포 유형이 되는 과정을 기술한다. 특수화된 표적 세포 유형의 특수성은 초기 세포의 운명을 정의하거나 변경하는 데 사용할 수 있는 모든 적용 가능한 방법에 의해 판단될 수 있다. 예시적인 방법에는, 비제한적으로, 유전 조작, 화학 처리, 단백질 처리 및 핵산 처리가 포함된다.

[0017] 배아 세포 유래 다능성 줄기 세포

[0018] 일부 구현예에서, 한 단계는 다능성이거나 다능성이 되도록 유도 될 수 있는 줄기 세포를 얻는 것이다. 일부 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 초기 포유류 배아의 전능 세포로부터 차례로 유도되어 체외에서 무제한의 미분화 증식이 가능한 배아 줄기 세포로부터 유래된 것이다. 배아 줄기 세포는 초기 단계의 배아인 배반포(blastocyst)의 내부 세포 덩어리에서 유래한 다능성 줄기 세포이다. 배반포에서 배아 줄기 세포를 유도하는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다. 인간 배아 줄기 세포 H9(H9-hESCs)는 본원에 기술된 예시적인 구현예에서 사용되지만, 본원에 기술된 방법 및 시스템은 모든 줄기 세포에 적용 가능하다는 것이 당업자에 의해 이해 될 것이다.

[0019] 본 발명에 따른 구현예에서 사용될 수 있는 추가의 줄기 세포는, 비제한적으로, 국립 줄기 세포 은행(National Stem Cell Bank, NSCB), 캘리포니아, 샌프란시스코 대학(UCSF)의 인간 배아 줄기 세포 연구 센터; Wi 세포 연구소의 WISC 세포 은행; 위스콘신 대학 줄기 세포 및 재생 의학 센터(UW-SCRMC); Novocell, Inc.(San Diego, Calif.); Cellartis AB(예테보리, 스웨덴); ES Cell International Pte Ltd(싱가포르); 이스라엘 공대(Haifa, 이스라엘)에 의해 제공되거나 또는 그들에 의해 관리되는 데이터베이스에 기술된 것들; 프린스턴 대학 및 펜실베니아 대학이 관리하는 줄기 세포 데이터베이스에 제공하는 것들을 포함한다. 본 발명에 따른 구현예에서 사용될 수 있는 예시적인 배아 줄기 세포는, 비제한적으로, SA01(SA001); SA02(SA002); ES01(HES-1); ES02(HES-2); ES03(HES-3); ES04(HES-4); ES05(HES-5); ES06(HES-6); BG01(BGN-01); BG02(BGN-02); BG03(BGN-03); TE03(13); TE04(14); TE06(16); UC01(HSF1); UC06(HSF6); WA01(H1); WA07(H7); WA09(H9); WA13(H13); WA14(H14)를 포함한다.

[0020] 배아 줄기 세포에 대한 자세한 내용은 예를 들어 Thomson et al., 1998, "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts," Science 282(5391):1145-1147; Andrews et al., 2005, "Embryonic stem(ES) cells and embryonal carcinoma(EC) cells: opposite sides of the same coin," Biochem Soc Trans 33:1526-1530; Martin 1980, "Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis,". Science 209(4458):768-776; Evans and Kaufman, 1981, "Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos," Nature 292(5819):

154-156; Klimanskaya et al., 2005, "Human embryonic stem cells derived without feeder cells," Lancet 365(9471): 1636-1641에서 찾아볼 수 있고; 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 통합된다.

[0021] 유도된 다능성 줄기 세포(iPSCs)

[0022] 일부 구현예에서, iPSC는 특정 줄기 세포 - 관련 유전자를 성인 섬유 모세포와 같은 비-다능성 세포로 형질 감염시킴으로써 유도된다. 형질 감염은 전형적으로 레트로 바이러스와 같은 바이러스 벡터를 통해 이루어진다. 형질 감염 유전자는 다른 전사 인자가 유도 효율을 향상시키는 것으로 알려져 있지만, 전사 조절 인자 Oct-3/4(Pouf51)와 Sox2를 포함한다. 3~4 주 후, 소수의 형질 감염된 세포가 다능성 줄기 세포와 형태학적으로 생화학적으로 유사하기 시작하고, 전형적으로 형태학적 선택, 배가된 시간 또는 리포터 유전자 및 항생제 선택을 통해 단리된다. 본 명세서에 사용된 iPSC는, 비제한적으로, 1 세대 iPSC, 마우스의 2 세대 iPSC 및 인간 유도 다능성 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 레트로 바이러스 시스템이 인간 섬유 아세포를 Oct3/4, Sox2, Klf4 및 c-Myc의 4 개의 중요한 유전자를 사용하여 다능성 줄기 세포로 형질 전환시키는데 사용된다. 다른 구현예에서, 렌티 바이러스 시스템이 OCT4, SOX2, NANOG 및 LIN28로 체세포를 형질 전환하는 데 사용된다. iPSCs에서 발현되는 유전자에는, 비제한적으로, Oct-3/4(예: Pou5f1); Sox 유전자 계열의 특정 구성원(예: Sox1, Sox2, Sox3 및 Sox15); Klf 계통의 특정 구성원(Klf1, Klf2, Klf4 및 Klf5); Myc 계통의 특정 구성원(예: C-myc, L-myc 및 N-myc), Nanog 및 LIN28이 포함된다.

[0023] 일부 구현예에서, iPSC를 생성하기 위해 비-바이러스 기반 기술이 이용된다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스가 필요한 4 개의 유전자를 마우스의 피부 및 간세포 DNA로 수송하는 데 사용되어, 배아 줄기 세포와 동일한 세포를 유도할 수 있다. 아데노바이러스는 자신의 유전자를 표적화된 숙주와 결합시키지 않기 때문에, 종양 생성의 위험이 제거된다. 일부 구현예에서, 재 프로그램은 매우 낮은 효율로도 어떤 바이러스 형질감염 시스템 없이 플라스미드를 통해 수행될 수 있다. 다른 구현예에서, 단백질의 직접 전달을 사용하여 iPSC를 생성함으로써, 바이러스 또는 유전적 변형의 필요성이 제거된다. 일부 구현예에서, 마우스 iPSCs의 생성은 유사한 방법론을 사용하여 가능하다: 폴리-아르기닌 앵커를 통해 세포 내로 채널된 특정 단백질로 세포를 반복적으로 처리하는 것이 다능성을 유도하기에 충분했다. 일부 구현예에서, 다능성 유도 유전자의 발현은 저산소 조건 하에서 FGF2로 체세포를 처리함으로써 또한 증가될 수 있다.

[0024] 배아 줄기 세포에 대한 자세한 내용은 예를 들어, Kaji et al., 2009, "Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors," Nature 458:771-775; Woltjen et al., 2009, "piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells," Nature 458:766-770; Okita et al., 2008, "Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors," Science 322(5903):949-953; Stadtfeld et al., 2008, "Induced Pluripotent Stem Cells Generated without Viral Integration," Science 322(5903):945-949; and Zhou et al., 2009, "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins," Cell Stem Cell 4(5):381-384에서 찾을 수 있고; 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 통합된다.

[0025] 일부 구현예에서, 예시적인 iPS 세포주는 iPS-DF19-9; iPS-DF19-9; iPS-DF4-3; iPS-DF6-9; iPS(포피); iPS(IMR90); 및 iPS(IMR90)를 포함한다.

[0026] DE 발달과 관련된 신호 전달 경로의 기능에 대한 자세한 내용은 예를 들어 Zorn and Wells, 2009, "Vertebrate endoderm development and organ formation," Annu Rev Cell Dev Biol 25:221-251; Dessimoz et al., 2006, "FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo," Mech Dev 123:42-55; McLin et al., 2007, "Repression of Wnt/β-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. Development," 134:2207-2217; Wells and Melton, 2000, Development 127:1563-1572; de Santa Barbara et al., 2003, "Development and differentiation of the intestinal epithelium," Cell Mol Life Sci 60(7): 1322-1332에서 찾을 수 있고; 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 통합된다.

[0027] 다능성 세포(예: iPSC 또는 ESC)에서 최종 내배엽을 생산하는 모든 방법은 본원에 설명된 방법에 적용할 수 있다. 다능성 세포(예: iPSC 또는 ESC)에서 최종 내배엽을 생산하는 모든 방법은 본원에 설명된 방법에 적용할 수 있다. 예시적인 방법은 예를 들어 "Methods and systems for converting precursor cells into intestinal tissues through directed differentiation," US9719068B2 to Wells et al., and "Methods and systems for converting precursor cells into gastric tissues through directed differentiation," US20170240866A1, to Wells et al.에 개시되었다. 일부 구현예에서, 다능성 세포는 상실배(morula)로부터 유래된다. 일부

구현예에서, 다능성 줄기 세포는 줄기 세포이다. 이러한 방법에 사용되는 줄기 세포에는, 비제한적으로, 배아 줄기 세포가 포함된다. 배아 줄기 세포는 배아 내 세포 덩어리 또는 배아 생식선에서 유래될 수 있다. 배아 줄기 세포 또는 생식 세포는, 비제한적으로, 인간을 비롯한 다양한 포유 동물 종을 포함하는 다양한 동물 종에서 유래 할 수 있다. 일부 구현예에서, 최종 배아 줄기 세포를 생산하기 위해 인간 배아 줄기 세포가 사용된다. 일부 구현예에서, 최종 배아 줄기 세포를 생산하기 위해 인간 배아 생식 세포가 사용된다. 일부 구현예에서, 최종 내배엽을 생성하기 위해 iPSC가 사용된다. 본 발명에서 사용될 수 있는 DE 세포를 얻거나 생성하기 위한 추가의 방법에는, 비제한적으로, United States Patent No. 7,510,876 to D'Amour et al.; United States Patent No. 7,326,572 to Fisk et al.; Kubo1 et al., 2004, "Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture," Development 131:1651-1662; D'Amour et al., 2005, "Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm," Nature Biotechnology 23:1534-1541; and Ang et al., 1993, "The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins," Development 119:1301-1315에 기술된 것들이 포함된다.

[0028] 출원인은 인간 iPSC를 사용하여 3D 간 구조를 생성하는 방법을 발견했다. 상기 구조는 분극화된 간장 상피, 별 모양의 세포 및 소관 구조를 포함한 미세 간의 구조로 구성된다. 개시된 조성물은 기존 모델과 비교하여 간 기능, 담즙 운반 활성 및 내구성의 개선을 나타낸다. 3D 구조 모델은 약물 검사 테스트 및/또는 약물 독성 검사, 이식, 혈청 단백질 제품 생산 및 맞춤 치료법 개발을 위한 새롭고 강력한 모델로 사용될 수 있다. 하나의 특정 용도에서, 상기 조성물 및 방법은 간 독성에 대해 약물 화합물을 검사하는 데 사용될 수 있다.

[0029] 3D 응집 간세포가 보고되었지만, 개시된 조성물은 알부민 생산(iPSC 유래의 간세포를 사용하는 종래의 최고 표준 모델에 비해 최대 10 배 증가)과 같은 매우 높은 기능 활성을 가지며, 내부 관강 구조로 인한 개선된 산소 및/또는 영양 공급을 허용하는데, 이것은 장기간의 배양(적어도 60 일 이상)과 약물 검사에 유용한 장기적 검사 플랫폼을 허용한다. 개시된 조성물은 또한 알부민과 같은 혈장 생성물(저 알부민 혈증치료를 위한 응고 인자 생성물)의 생산에, 및 인간 iPSC-유도 소형 간 세포가 이식되어 생체 내 장애를 치료할 수 있는 치료차원의 이식에 유용할 수 있다. 마지막으로, 개시된 조성물은 맞춤형 약(치료 맞춤화)에 사용될 수도 있다.

[0030] 일 측면에서, iPSC 세포에서 간 유사 장기의 형성을 유도하는 방법이 개시된다. 상기 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0031] a) iPSC 세포 유래의 최종 내배엽(DE)을 FGF 경로 활성제 및 Wnt 신호 경로 활성제(GSK3 억제제에 의해 활성화될 수 있음)와, 바람직하게는 약 1 일 내지 약 3 일의 기간 동안 후궁 전장 회전 타원체(posterior foregut spheroids)를 형성하기에 충분한 기간 동안, 접촉시키는 단계 및 b) 간 유사 장기를 형성하기에 충분한 기간, 바람직하게는 약 1 내지 약 5 일 동안, 바람직하게는 약 4일 동안 레티노산(RA)의 존재 하에 단계 a에서 수득된 후궁 전장 최전 타원체를 배양하는 단계.

[0032] 섬유 아세포 성장 인자(Fibroblast growth factor, FGF)는 혈관 신생, 상처 치유 및 배아 발육과 관련된 성장 인자 군이다. FGF는 헤파린 결합 단백질이며, 세포 표면과 관련된 헤파란 설페이트 프로테오글리칸과의 상호 작용은 FGF 신호 전달에 필수적인 것으로 나타났다. 적합한 FGF 경로 활성제는 당업자라면 쉽게 이해할 수 있을 것이다. 예시적인 FGF 경로 활성제는, 비제한적으로, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22 및 FGF23으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, FGF 신호 전달 경로와 관련된 세포 구성 요소를 표적으로 하는 siRNA 및/또는 shRNA가 이러한 경로를 활성화 시키는데 사용될 수 있다.

[0033] 일부 구현예에서, DE 배양물은 본원에 기재된 FGF 신호 전달 경로의 하나 이상의 분자로 하기의 농도로 처리된다: 10ng/ml 이상; 20ng/ml 이상; 50ng/ml 이상; 75ng/ml 이상; 100ng/ml 이상; 120ng/ml 이상; 150ng/ml 이상; 200ng/ml 이상; 500ng/ml 이상; 1,000ng/ml 이상; 1,200ng/ml 이상; 1,500ng/ml 이상; 2,000ng/ml 이상; 5,000ng/ml 이상; 7,000ng/ml 이상; 10,000ng/ml 이상; 또는 15,000ng/ml 이상. 일부 구현예에서, 시그널링 분자의 농도는 처리 전 기간에 걸쳐 일정하게 유지된다. 다른 구현예에서, 신호 전달 경로의 분자의 농도는 처리 과정 동안 변화된다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 신호 전달 분자는 DMEM 및 소 태아 혈청(fetal bovine serine, FBS)을 포함하는 배지에 현탁된다. FBS는 2% 이상; 5% 이상; 10% 이상; 15% 이상; 20% 이상; 30% 이상; 또는 50% 이상의 농도일 수 있다. 당업자는 여기에 기술된 연대가, 비제한적으로, FGF 신호 전달 경로의 임의의 분자를 포함하는, 본원에 기재된 신호 경로의 임의의 공지된 분자에, 단독으로 또는 조합하여, 적용 가능하다는 것을 이해할 것이다.

[0034] 적합한 FGF 신호 경로 활성제는 당업자에 의해 용이하게 이해될 것이다. 한 측면에서, FGF 신호 경로 활성제는

소분자 또는 단백질 FGF 신호 경로 활성제, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, 또는 이들의 조합물로부터 선택될 수 있다. WNT 신호 경로 활성제는 소분자 또는 단백질 Wnt 신호 경로 활성제 예컨대 염화 리튬; 2-아미노-4,6-이치환된 피리미딘 (헤테로) 아릴피리미딘; IQ1; QS11; NSC668036; DCA 베타-카테닌; 2-아미노-4-[3,4-(메틸렌디옥시)-벤질-아미노]-6-(3-메톡시페닐) 피리미딘, Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, GSK3 억제제, 바람직하게는 CHIRON, R-스폰딘, 또는 이들의 조합물로부터 선택될 수 있다. 한 측면에서, BMP 활성제는 BMP 경로를 활성화시키는 BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, 소분자, BMP 경로를 활성화시키는 단백질로부터 선택될 수 있고, 하기를 포함할 수 있다: 노긴(Noggin), 도소몰핀(Dorsomorphin), LDN189, DMH-1, 벤트로모핀(ventromophins), 및 이들의 조합물.

[0035] 적합한 GSK3 억제제는 당업자에게 용이하게 이해될 것이다. 예시적인 GSK3 억제제는, 비제한적으로, 예를 들어 GSK3β를 억제하는 Chiron/CHIR99021을 포함한다. 당업자는 개시된 방법을 수행하기에 적합한 GSK3 억제제를 인식할 것이다. GSK3 억제제는 약 1uM 내지 약 100uM, 또는 약 2uM 내지 약 50uM, 또는 약 3uM 내지 약 25uM의 양으로 투여될 수 있다. 당업자라면 적절한 양 및 기간을 쉽게 알 수 있을 것이다. 일부 측면에서, Wnt 및/또는 FGF 신호 경로와 관련된 세포 구성요소를 표적으로 하는 siRNA 및/또는 shRNA가 이러한 경로를 활성화시키는데 사용될 수 있다.

[0036] 일 측면에서, 줄기 세포는 포유류 또는 인간 iPSC 일 수 있다.

[0037] 일 측면에서, 상기 전장 회전 타원체는 예를 들어 상표명 마트리겔로 시판되는 상용 기저막 매트릭스와 같은 기저막 매트릭스에 내포될 수 있다.

[0038] 일 측면에서, 간 유사 장기는 알파 태아 단백(AFP), 알부민(ALB), 레티놀 결합 단백질(RBP4), 사이토 케라틴 19(CK19), 간세포 핵 인자 6(HNF6) 및 사이토크롬 P450 3A4(CYP3A4), HNF4a, E-카데린, DAPI 및 Epcam을 발현할 수 있다는 특징을 가질 수 있다. 이러한 발현은 예를 들어 40 일 내지 50 일째에 발생할 수 있다. 발현 수준은 인간의 간 세포에서 관찰된 수준, 예를 들어 성인 간세포의 수준과 유사할 수 있다.

[0039] 일 측면에서, 간 유사 장기는 담즙 수송 활성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0040] 일 측면에서, 간 유사 장기는 줄기 세포로부터 유도될 수 있고, 내재 된 미세 융모 및 중간엽 세포를 추가로 함유하는 내강 구조를 포함 할 수 있다. 내강 구조는 분극화된(polarized) 간세포와 기저막으로 둘러싸여 있을 수 있다. 간 유사 장기는 기능성 별 모양 세포 및 기능적 쿠퍼 세포를 포함할 수 있다.

[0041] 간 유사 장기는 특정 측면에서 하기 중 하나 이상을 특징으로 갖는다: 담즙 생성 능력, 담즙 운반 활성, 적어도 50ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 보체 인자 H 발현, 적어도 40ng/mL/1xe^{6} 세포 /24 시간의 보체 인자 B, 적어도 1000ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 C3 발현; 적어도 1,000ng/mL/1xe^{6} 세포/25시간의 C4 발현, 적어도 1,000 ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 피브리노겐 생산 및 적어도 1000ng/mL/1xe^{6} 세포/24 시간의 알부민 생산. 일 측면에서, 간 유사 장기는 적어도 10,000ng/ml 1xe ^{6} 세포/24 시간의 총 간 단백질 발현을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 간 유사 장기는 PROX1, RBP4, CYP2C9, CYP3A4, ABCC11, CFH, C3, C5, ALB, FBG, MRP2, ALCAM, CD68, CD34, CD31 중에서 선택된 하나 이상의 유전자를 발현할 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 간 유사 장기는 약물 대사 시토크롬 변이체, 예를 들어 CY2C9*2 변이체를 포함하는 세포를 포함할 수 있다. 간 유사 장기는 US 20160177270에 기재된 것과 같은 혈관계를 포함할 수 있다.

[0042] 일 측면에서, 간 유사 장기는 간 유사 장기가 염증 세포, 예를 들어 T 세포 또는 다른 염증성 분비 단백질을 포함하지 않는다는 특징이 있을 수 있다.

[0043] 일 측면에서, 심각한 이상 반응(SAE)을 검사하는 방법이 개시된다. SAE는 간 기능 부전 및/또는 약물 유도 간 손상(DILI)일 수 있다. 상기 방법은 독성이 관심 대상인 약물을 본 명세서에 기재된 간 유사 장기와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 상기 방법은 플루오레신 디아세테이트(FD)의 흡입 및/또는 유출을 측정하는 단계를 포함할 수 있되, 유출 장애는 상기 약물이 심각한 이상 반응을 유발할 가능성이 있음을 나타낸다. 관심 대상인 약물의 독성은 미토콘드리아 막 잠재력, ROS의 측정, 간 미토콘드리아의 팽창 및 이들의 조합에서 선택된 매개 변수의 측정에 의해 결정될 수 있되, 상기 미토콘드리아에 대한 손상은 상기 약물이 중대한 이상 반응을 유발할 수 있음을 나타낸다. 일 측면에서, 본 방법은 유사장기 생존능을 분석하는 단계를 포함하되, 손

상되거나 감소 된 유사장기 생존능은 관심 대상 약물이 중대한 이상 반응을 유발할 가능성이 있음을 나타낸다.

[0044] 일 측면에서, 간 손상을 갖는 개체를 치료하는 방법이 개시되며, 상기 방법은 본원에 기재된 간 유사 장기를 이를 필요로 하는 개인에게 이식하는 단계를 포함할 수 있다. 간 손상에는 예를 들어 대사성 간 질환, 말기 간 질환 또는 이들의 조합이 포함될 수 있다.

[0045] 일 측면에서, 개체에 대해 바람직한 치료제를 식별하는 방법이 개시된다. 이 측면에서, 상기 방법은 관심 대상 iPSC에서 유래된 간 유사 장기를 후보 화합물과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 관심 대상 iPSC는 상기 개체에서 발견되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하거나, 또는 상기 관심 대상 iPSC가 상기 개인의 동일한 윤리 배경으로부터 도출되거나, 또는 상기 관심 대상 iPSC가 상기 개인에서 유도된다.

[0046] 실시예

[0047] 본 연구에서, 출원인은 담관 세포막을 통해 MRP2에 의해 모세 담관 네트워크로 배출된 플루오레스세인 디아세테이트를 사용하여 담즙 운반 활성을 시험하였다(Tian et al., 2004). 이전에 트로글리타존과 사이클로스포린이 MRP2를 억제한다고 보고된 바 있다(Chang et al., 2013; Lechner et al., 2010). 또한, 유출 수송체 MRP2는 보센탄의 유출을 중재한다(Fahrmayr et al., 2013). 네파조돈에 의한 MRP2 저해는 보고되지 않았지만, 네파조돈에 의한 미토콘드리아 스트레스는, MRP2가 간세포에서 담즙산의 담관 배출에 대한 ATP-의존성 담즙 염 수송체이기 때문에, 담즙 운반 활성의 감소, 플루오레스세인 디아세테이트의 배출과 관련이 있을 수 있다.

[0048] 약물 유발 간 손상(DILI)에 대한 위험 화합물의 전임상 검출이 약물 개발에서 중요한 과제로 남아 있으며, 이 때문에 예측 가능한 인간 시스템의 필요성이 강조된다. 여기에서, 출원인은 유사장기 분해에서 임상 DILI 병리를 분석하기 위한 인간 간 유사 장기(HLO) 모델을 개발했다. 인간 iPSC에서 분화된 HLO는 모세담관 유사 구조에 의해 안쪽 내강을 갖는 분극화된 간세포를 함유하여, 단향성 담즙산 수송 경로를 확립한다. 출원인은 LoT(간 유사 장기 기반의 독성 검사)라 불리는 살아있는 유사장기 영상촬영을 사용하여 DILI를 모델링함으로써 유사장기의 구조적 특징을 활용하였다. LoT는 담즙 정체 및/또는 미토콘드리아 독성에 근거하여 10 개의 시판 약품과 5 개의 다른 기증자로 기능적으로 검증되었다. 보센탄에 의한 담즙 정체는 CYP2C9 불량 대사체 공여자 유도 HLO에 특이적이다. 흥미롭게도 스테로이드성 유사장기는 병원에서 제안된대로 로시글리타존(Rosiglitazone) 독성에 취약했고, 이어서 막대한 유사장기 사망에서 화학 구조가 있었다. 따라서 LoT는 약물 안정성을 분석하는 데 사용할 수 는 고 충실도 유기 분자 모델이며, 추가로 비용효율적인 플랫폼이며 복합 최적화를 용이하게 하고, 기계론적 연구를 제공하며 개인화된 약품 및 항 DILI 치료 검사 응용을 생산한다.

[0049] 제약 업계의 약물 개발로 인해 초기 검사에서 확인된 약물 후보자의 실패로 인해 매년 수십억 달러가 손실되고, 약물의 약 1/3이 시장에서 퇴출된다(Takebe and Taniguchi, 2014). 유망한 효능에도 불구하고, 후보 약물의 실패는 환자의 치료 기회의 엄청난 손실을 초래한다. 전임상 연구는 일반적으로 "히트(hit)"화합물을 확인하기 위한 1 차 유효성 시험으로서 *체외* 평가(*in vitro* evaluation)로 구성되며, 체외 및 체내 신진 대사 및 독성의 메커니즘을 평가하기 위한 안전성 시험이 뒤따른다. 이러한 비 능률은 인간의 약물 유발성 간 손상(DILI)을 평가할 때 생리 학적으로 관련이 있는 전임상 모델이 실질적으로 부족한 것으로 설명될 수 있으며, 따라서 방대한 양의 지속적으로 성장하는 화합물 라이브러리의 평가를 위한 체외 인간 검사 모델을 개발해야 하는 시급한 필요성이 있다.

[0050] 1 차 간세포는 고도로 분극화된 대사성 세포 유형이며, 담즙산 분비 경로에서 말초 혈액 순환을 분리하는 미세 비대관 채널을 갖는 모세담관 구조를 형성한다. DILI의 가장 상향적인 측면은 간세포에 의한 약물(또는 이들의 반응성 대사 산물) 해독 및 다중 약물 내성 단백질(MRP) 수송체와 같은 수송체를 통한 모세담관 으로의 배출을 포함한다. 이것은 DILI 병리학을 예측하기 위해 *체내* 에서 간세포의 중요한 특성으로서 이러한 고유 조직 구조를 재구성할 필요가 있음을 시사한다. 그러나, 단리된 1차 인간 간세포 또는 간세포주를 사용하는 현재의 간략화된 배양 모델과 체내 생리학 사이에서, 약물 독성 프로파일에 상당한 차이가 있기 때문에, 트로글리타존, 네파조돈 및 톨카폰의 경우와 같이 약물의 변형의 실패 또는 약물 중단이 초래된다(https://livertox.nlm.nih.gov/index.html). 독성학적 특성의 판단은 주로 약물 개발의 필수 단계로서 주로 동물에 의존하지만, 사람과 동물 사이의 생리학에서 현저한 차이로 인하여 인간 결과에 대한 충실도가 상당히 부족하다(Leslie et al., 2007; Yang et al., 2014). 또한 매우 드물지만 그럼에도 불구하고 미국에서 급성 간 장애의 약 10~15%를 담당하고있는 특이성 DILI(IDILI)의 발병은 예측하기가 거의 불가능하다(Kullak-Ublick et al., 2017). 총체적으로 약물의 해독 및 배출을 테스트하는 화합물을 선별하기 위해 효과적인 인간 세포 모델이 열렬히 기대된다.

[0051] 다능성 줄기 세포(PSC)에서 유래된 인간 간세포 분화 방법의 점진적인 발전에도 불구하고, 인간 줄기 세포를 이용한 샤알레에서의 임상 실험은 여전히 과장된 상태이다. 어느 정도까지는 이것은 하기를 포함하는 이전의 세포 기반 접근법의 문제점에 의해 설명될 수 있다:(1) 로트 차이 극복,(2) 실험 배치 차이의 최소화,(3) 분석 처리량 증진 및(4) 임상 시험 데이터와의 관련성의 개선. 출원인은 안정적으로 확장할 수 있는 인간 줄기 세포, 즉 iPSC를 사용하여 상대적으로 간단하고 견고한 유사장기 기반 테스트 플랫폼을 개발함으로써 이러한 문제를 해결한다. 출원인은 먼저 인간 PSC를 후부 안구 유사장기로 유도한 다음, 정의된 인자 및 매트릭스를 갖는 분극 배양을 통한 점진적인 간세포 분화를 진행시켰다. 생성된 인간 간 유사 장기는 분극화된 간세포로 둘러싸인 관내(intraluminal) 구조를 가지고 있으며, 단백질 및 담즙산 생산 및 수송 기능을 포함하는 중요한 인간 간세포 기능을 수행할 수 있는 것으로 나타났다. 흥미롭게도, 출원인은 생체 이미지에 기초한 형광 디아세테이트의 흡입 및 배출의 동적 검출이 재현성이 높은 담즙 배출 억제제로 특징 지어진 DILI 약물 배열에 의해 유도된 담즙 정체를 정확하게 모델링한다는 것을 발견했다. 이와 별도로, 미토콘드리아 막 잠재력 평가는 임상 시험으로 확립된 DILI 약물의 전통적인 분류를 반영하여 각각의 화합물에 대한 독립적인 위험 평가를 가능하게 했다. 또한, 출원인은 지질독성 스트레스에 의해 유도된 모델 조건에 접근을 확장하고 반응 산소 종(ROS) 생산을 통해 향상된 DILI 잠재력을 확인했다. 유사장기 기반 생존능 평가는 N-아세틸시스테인에 의한 DILI의 역전을 확인시켜 주었고, 이것은 항 DILI 약물 검사에 대한 출원인의 접근법의 잠재력을 강조했다. 종합해 볼 때, 이와 같은 강력한 검증법, 일명 간 유사 장기 기반 독성 검사(LoT)는 인간의 간 유사 장기에서 최초로 개발된 기능적 판독으로 믿어지며, 진단, 기능 연구, 약물 개발 및 맞춤형 약을 용이하게 할 것이다.

[0052] 결과

[0053] 다중 인간 iPSC에서 분극화된 간 유사 장기의 생성 및 특성 규명

[0054] 출원인은 처음에 인간 iPSC 유래 전장 회전 타원체를 사용하여 새로운 간 유사 장기 분화 방법을 확립했다(Spence et al., 2011)(도 1a). 제1 단계로서, 출원인은 BMP와 액티빈 A를 사용하여 이전에 설명한대로 최종 내배엽으로의 분화를 촉진시켰다(D' Amour et al., 2005). 또한 FGF4와 GSK3 억제제(CHIR99021)를 사용하여 전장 회전 타원체를 유도하고 봉합된 회전 타원체가 관찰되었다. 유사장기는 부드러운 피펫팅에 의해 접시에 플레이팅된 간엽성 세포로 박리 후 마트리겔에 포함되었다. 레티노 산(RA)은 모세담관 및 세관주위 외피의 크기와 복잡성이 증가함에 따라 세포의 분극화를 향상시킨다는 보고가 있다(Falasca et al., 1998). 담즙 수송 모델링에 적합한 분극화된 유사장기를 생성하기 위해, 유사장기를 RA로 처리하였다. 유사장기 생성 방법을 최적화하기 위해, 출원인은 우선 RA 처리 기간을 변경했다. 유사장기의 알부민 분비 수준은 RA 처리 1, 2, 3, 4 및 5 일 동안 D25에서 각각 1160, 1054, 3092, 4709 및 3865ng/ml이었고 4일차 RA 처리 프로토콜은 최고치에 도달하는 경향을 보였다(도 8). 따라서 알부민 분비의 수준에 따라 RA의 지속 기간을 4 일로 설정했다. 형태학적으로 RA 처리 후 약 10 일에 상피 세포로 덮인 300 가지 이상의 유사장기가 성공적으로 생성되었고, 내강(lumenized) 구조를 가진 유사장기의 비율은 71%(216/305)였다(도 1, 패널 B 및 도 9). 면역 조직 화학 분석 결과 알부민은 유사장기의 상피 세포에서 양성이었고, 흥미롭게도 유형 IV 콜라겐은 외면에 국한되어 있고 ZO-1(폐쇄띠, zonula occludens)은 관내 내막을 염색함으로써, 이것은 이들 유사장기가 편광된 특성을 가지고 있음을 시사한다(도 1, 패널 C).

[0055] 정량적 중합 효소 연쇄 반응(quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 분석 결과, 유사장기의 세포가 분화 동안 알파 태아 단백(AFP), 알부민(ALB), 레티놀 결합 단백질 4(RBP4), 사이토케라틴 19(CK 19), 콜란겐 세포 분화를 조절하는 간세포 핵 인자 6(HNF6) 및 시토크롬 P450 3A4(CYP3A4)와 같은 간 마커 유전자의 발현의 유의미한 증가를 보임이 발견되었다(도 1, 패널 D). 그러나 대량 유사장기-유래 RNA에서 추출된 대부분의 간 유전자의 발현 수준은 1차 간세포에서보다 유사장기에서 더 낮았다. 이론적으로 제한하려는 의도는 없지만, 이들 별개의 mRNA 프로파일은 부분적으로 세포의 약 30%가 간질 세포 마커(미공개 관찰)에 의해 확인된 비실질 세포이므로 간질 계통의 존재에 기인한다고 믿어지는데, 이 때문에 유사장기는 1차 간세포보다 *체내* 간 조직에 좀 더 유사하다. 출원인은 RNA 서열(RNA-seq)을 사용하여 포괄적인 유전자 발현 분석을 통해 유사장기를 추가로 분석하였다. 주성분 분석 결과, 유사장기에서의 유전자 발현은 iPSC 유래 담관 세포와 정상 인간 담관세포와 유사하지 않았다(도 1, 패널 E). 또한, ALB, 피브리노겐(Fbg) 및 보체 인자와 같은 간세포 특이적 단백질이 ELISA에 의해 배양 상등액에서 확인되었다(도 1, 패널 FG). 유사장기의 간 기능을 정량하기 위해, 본 출원인은 세포 개수에 의해 표준화된 알부민 분비 수준을 조사하였다(도 10). 알부민의 분비 수준은 2,133ng/일/10^6 세포(도 1, 패널 F)로, 공개된 iPSC의 유래 간세포와 상대적으로, hPSCs의 HLC(150~1000ng/ 일 /10^6 세포)로의 2D 및 3D 분화에서의 다른 실험보다 더 높은 반면(Miki et al., 2011; Song et al., 2015; Song et al., 2009; Vosough

et al., 2013), 1차 간세포는 3 차원 인공 지지체에서 30~40㎍/일/10^6 세포를 생산한다(Davidson et al., 2016; Dvir-Ginzberg et al., 2003). 이러한 결과는 간 유사 장기가 출판된 문헌에서 줄기 세포 유래 간세포와 비교하여 알부민 분비 활성이 합리적인 간세포를 함유하고 있음을 보여 주었다. 중요하게,이 유사장기 생성 방법은, 알부민 분비 능력을 지닌 317D6 및 1383D6 iPS 세포주 모두에서 관내 유사장기가 생성되었기 때문에 다른 PSC 계열에도 재현 가능하며 따라서 적용 가능하다(도 11). 전반적으로, 출원인은 간세포 특성을 갖는 다수의 분극화된 간 유사 장기를 생성하기 위한 프로토콜을 확립하였다.

[0056] 담즙산을 생산하는 인간 iPSC- 간 유사 장기의 미세 해부학적 특성

[0057] 다음으로, 간 유사 장기가 담즙 운반 활성을 갖는지를 시험하기 위해, 본 출원인은 담즙 합성 및 배출 기능에 관련된 주요 단백질을 염색함으로써 유사장기의 특징을 규명하였다. BSEP와 MRP2의 면역형광법 염색은 이러한 단백질이 관내(intraluminal) 영역에 우선적으로 국한되었음을 증명했다(도 2, 패널 A). 모세담관은 가장 작은 간내 분비 채널이고 소관 내강(canalicular lumen)은 인접한 간세포의 반대편 플라즈마 막의 변형된 첨단 영역에 의해 형성된 공간으로 구성된다(Cutrin et al., 1996; Tsukada et al., 1995). 또한, 그것은 단단한 접합 복합체(junction complex)에 의해 구분되고 미세융모는 소관 내강 내부에 위치한다(Tsukada et al., 1995). ZO-1 염색은 간에서 소관 영역을 염색하는 것으로 알려져 있으며, 도 1의 패널 C는 간 접합이 간 유사 장기 내에 위치한다고 제안했다. 투과 전자 현미경으로 관찰 결과, 유사장기는 내강을 향한 미세 융모를 포함하고 있었다(도 2, 패널 B). 이러한 해부학적 특징과 일치하는 qRT-PCR 분석 결과, 유사장기는 ABCB11 및 Na + - 타우로콜레이트 공동-수송 폴리펩티드(NTCP)의 유전자 발현을 보였으나, 그 수준은 1차 간세포보다 유사장기에서 더 낮았다(도 2, 패널 C). 따라서, 유사장기는 단단한 접합부에 의해 내부 내강에서 분리된 분극화된 인간 간세포를 함유하였으며, 이는 *체내* 간 소관(hepatic canaliculi)과 유사한 독특한 미세 해부학적 구조를 반영한다.

[0058] 다음으로, 담즙산(BA) 생산 능력을 판단하기 위해, 출원인은 유사장기 배양물에서 수집된 내강 유체에 ELISA를 수행하였다. 내강 유체의 총 BA 풀 수준은 26.7㎍/일/10^6 세포(200μm의 지름을 갖는 유사장기 약 125μmol/L)(도 2, 패널 D)였고, 놀랍게도, BA 농도는 이전 보고에서 샌드위치 배양에서 유래된 1차 간세포의 농도(배양액 상등액 10μmol/L에서, 약 40 ㎍/일/10^6 세포)에 필적할만 하였다(Ni et al., 2016). 그리하여 유사장기는 단순히 소관과 유사한 형태를 가질 뿐만 아니라, 담즙산 생성과 분비 활성을 가지고 있는데, 이것은 담즙산 수송 경로가 정확하게 구성되어 있음을 시사한다.

[0059] 인간 간 유사 장기에서 담즙산 흡입 및 배출의 동적 시각화

[0060] 담즙산 배출은 담즙의 주요 결정 인자이며, 따라서 이 시스템의 결함은 다양한 간 질환 병리와 관련된 담즙 분비 장애(담즙 정체증)를 유발할 수 있다(Nishida et al., 1991). 간세포의 정점(소관) 막에 위치한 유출 수송 단백질은 약물과 대사 산물을 포함한 많은 내인성 및 외인성 화합물의 간에서의 제거에서 중요한 역할을 한다(Kock and Brouwer, 2012). BSEP와 MRP2는 인간에서 소관 담즙염 수송을 중개한다. 담즙 수송을 위한 중요한 단백질의 긍정적 발현을 입증한 후에, 출원인은 다음으로 유사장기가 담즙산을 그 내강으로 적극적으로 수송할 수 있는지 궁금해했다. 우선, 담즙산의 유사장기로의 흡입(intake)을 확인하기 위해, 출원인은 담즙염 유사체인 콜릴글리실아미드-플루오레세인(CGamF)으로 유사장기에 도전하였다(Mork et al., 2012). CGamF를 외부에서 처리한 후, 유사장기의 내강 내로의 CGamF의 축적이 성공적으로 확인되었다(도 2, 패널 E). 유사하게, 형광 담즙산 콜릴-리실-형광(CLF)은 여러 인간 iPSC 세포주에서 재현될 수 있게 배출되고 유사장기에 축적되는 것으로 밝혀졌다(도 2, 패널 F). 이 분석의 특이성을 판단하기 위해, 출원인은 CREPPR-Cas9에 기초한 유전자 편집 접근법을 사용하여 BSEP 기능이 없는 대립 유전자를 보유하는 iPSC 세포주를 개발하였다. BSEP는 담즙 수송을 담당하고, 이와 일관되게, BSEP-KO iPSC- 유사장기는 부모 대조군 유사장기에 비해 형광 담즙산을 축적하지 못했다. 종합적으로 볼 때, 이들 데이터는 유사장기가 외부로부터 담즙산을 흡입하여 유사장기 내부로 유출하는 능력을 가지고 있음을 시사한다.

[0061] 보센탄은 CYP2C9*2 iPSC-간 유사 장기 특유의 담즙 정체증을 유도했다.

[0062] 유사장기 기반 담즙정체성 표현형(phenotyping) 방법의 임상 관련성을 테스트하기 위해, 출원인은 충실도 문제를 해결하기 위해 출원인의 시스템에 약물유전체학 통찰을 활용하였다. 특히, 잘 알려진 감수성(susceptibility) 유전자 변이종(예: Clin Pharmacol Ther. 2013 Dec;94(6):678-86. doi: 10.1038/clpt.2013.143. Epub 2013 Jul 17. Association of CYP2C9*2 with bosentan-induced liver injury에 설명된 보센탄의 경우 CYP2C9*2)을 지닌 여러 iPSC 세포주가 수집되었고(도 3, 패널 A), 보센탄의 존재 하에서 담즙정체성 가능성을 비교하였다(도 3, 패널 B). 흥미롭게도, 유사장기로의 대한 CLF 배출은 CY2C9*2 운반체 유

사장기에서는 심각하게 손상되었지만, 비-운반체 유사장기에서는 아니었다. 이는 도 3, 패널 C에 도시된 CYP2C9*2의 부재 하의 3가지 상이한 iPSC 유래 유사장기에 나타난, 보센탄에 의해 유도된 담즙 정체에 대한 임상 적 경향과 일치한다. 대조적으로, 이리노테칸 기반 담즙 정체는 CYP2C9*2 iPSC 세포주에 특이적이지 않다. 이러한 결과는 유사장기 기반 담즙 정체성 분석이 인간의 변화의 일부 측면을 예측함을 시사하였다.

[0063] 유사장기에서의 높은 처리량 약물 유도성 담즙 정체증 평가

[0064] 약물에 의해 유발된 DILI에서 담즙 정체증의 중요한 역할을 고려할 때, 출원인은 이 유사장기 모델이 특정 화합물의 존재 하에서 DILI의 병리학을 반영하는지 궁금해했다. CLF와 CGamF는 하기의 몇 가지 문제로 인해 고속 이미징에 적용할 수 없기 때문에 출원인은 여러 가지 화합물을 테스트하기 전에 먼저 높은 처리량 형광 분석을 개발하려고 했다: 1. 배경이 강하기 때문에 수동 세척 공정이 필요함; 2. 신호 강도가 약해서 신중한 획득 설정이 필요함. 대안적으로, 간세포에서 유출 수송의 유용한 마커로 알려진 플루오레스세인 디아세테이트(FD)의 사용(Barth and Schwarz, 1982; Bravo et al., 1998)이 제안되었다. 극성 형광 대사 산물인 플루오레세인은 세포에서 소관 공간(canaliculi space)으로 능동적으로 수송될 때까지 세포에 갇혀 있다(Malinen et al., 2014). FD가 배지를 교환하고 노출을 조정하는 것 없이 수송 능력의 실시간 평가에 사용될 수 있는지를 판단하기 위해, 시간 경과 영상을 이용하여 시간 경과에 따른 간 담체 수송 활동을 더 조사 하였다. 유사장기는 45 분 동안 플루오레스세인 디아세테이트로 인큐베이팅하였고, 처리 후 20 분에 내강 축적이 유사장기 내부에서 관찰되었다(도 4, 패널 A, B). 이 수송 흐름의 반대 방향은 FD를 유사장기에 미세 주입하여 결정되었다. 내강으로의 디아세테이트의 미세 주사 후, 플루오레세인은 내부에 잔류하고, 유사장기 외부에서는 결코 관찰되지 않았다(도 4, 패널 C). 요약하면, 이 FD 기반 평가 모델은 간단한 형광 라이브 이미징 분석을 통해 간 유사 장기에서 단방향 유출 담즙 수송을 평가할 수 있는 높은 처리량 잠재력을 갖고 있다.

[0065] 다음으로, 출원인은 10가지 FDA 승인 의약품의 생존 투약을 평가하여 FD-기반 분석법의 충실도를 확인하고 세포 손상에 의한 2 차적인 장애를 측정했다. 출원인은 허용 가능한 생존능을 가진 9 가지 화합물에 대한 최적의 복용량을 성공적으로 발견하였다. 대조적으로 아미오다론(AMIO)은 시험 범위 내에서 유사장기에 유의하게 독성을 나타냈고, 따라서 AMIO는 추가적인 잠재적 DILI 평가 연구에서 제외되었다(도 12). 출원인은 DILI 메커니즘에 기초한 하기의 3 가지 유형 중 하나로 분류 된 9 개의 훈련 화합물(FDs)을 갖는 FD를 사용하여 유사장기들에서 담즙 정체 가능성을 조사하였다; 담즙 정체가 없는 DILI 화합물(A 등급), 담즙 정체가 있는 DILI 화합물(B 등급) 및 DILI 화합물로 보고되지 않은 화합물(C 등급)(도 4, 패널 D)(Oorts et al., 2016). FD 배출에 대한 억제 가능성을 정량화하기 위해, 본 출원인은 이미지 J에 의해 유사장기 외부와 내부의 형광 강도 비율을 결정함으로써 간단하지만 굳건한 정량화 방법을 개발하였다(도 4, 패널 B). 검증 연구로서, 출원인은 먼저 사이클로스포린 A(CSA)를 사용하여 억제 비율을 평가하는 능력을 확인하였다. FD의 처리 5 분 후, 24 시간 동안 CSA로 처리한 군에서 대조군(DMSO)과 비교하여, 유의미한 감소(대조군에 비해 0.4)가 있었다(도 4, 패널 B). 그런 다음 출원인은 접근 방식의 충실도를 평가하기 위해 여러 농도의 9 개 TC를 선별하였다. 흥미롭게도,이 선별 시스템에서 TC의 처리 24 시간 후, FD의 유출은 임상 관찰과 유사하게 보센탄, CSA, 트로글리타존 및 네파조돈의 B 등급 화합물에서 유의미하게 감소($p < 0.01$ 또는 0.05)하는 반면, 이 억제 효과는 A 등급 및 C 등급 화합물에서 관찰되지 않았다(도 4, 패널 D 상부 이미지 및 도 4, 패널 E). 이러한 결과는 간 조직 모델이 인간 표현형과의 관련성이 높은 약물 개발에서 후보 물질에 대한 담즙 수송 저해능을 분류하는데 유용함을 시사한다.

[0066] 유사장기에서의 미토콘드리아 과부하 평가

[0067] 또한, 미토콘드리아 독성이 DILI 발병과 관련된 여러 메커니즘에서 DILI의 핵심적인 역할을 하기 때문에(Pessayre et al., 2012), 출원인은 미토콘드리아 건강 평가를 조사했다. 이 연구에서는 유사장기에서 미토콘드리아 건강을 조사하기 위해, 미토콘드리아 건강의 직접적인 판독(Li et al., 2014)으로 미토콘드리아 막 잠재성(MMP) 지수를 사용하여 손상되지 않은 세포의mMP를 모니터링했다. 24 시간 동안 TC를 처리 한 후, 톨카폰(2~8 배 변화, $p < 0.01$), 디클로페낙(7~13배 변화, $p < 0.05$ 또는 0.01), CSA(3~7 배 변화, $p < 0.01$) 및 네파조돈(4~42 배 변화, $p < 0.01$)의 처리로mMP의 용량-의존적 증가를 관찰하였다(도 5, 패널 A 하부 이미지와 그래프). 또한, 트로글리타존은 용량 의존성이 관찰되지 않았지만 유사장기에서mMP를 증가시켰다(3~5 배 변화, $p < 0.05$). 반면, 보센탄, 엔타카폰 및 피오글리타존 처리 후,mMP의 증가는 다중 투여에서도 명확하게 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 간 유사장기-기반 독성 검사(LoT)로 명명된 실시간(live) 이미지 기반 분석이 미토콘드리아 독성이 있거나 없는 화합물을 구별함을 보여주었다.

[0068] LoT 시스템에 의한 DILI 화합물의 기계적 분류 재검토

[0069] 인간 DILI의 심각한 발현은 다각적 요인이 있고, 미토콘드리아 및 BSEP 억제와 같은 DILI의 공지된 기전과 특이

적으로 관련된 약물 효능의 조합과 매우 관련이 있다(Aleo et al., 2014). 그러나, 현재 *체외* 기능 모델은 이러한 다각적 요인의 공헌을 평가하기가 어렵다. LoT 시스템에서 다중화된 실시간 기능 판독의 이점을 고려할 때, 출원인은 생존, 담즙 정체 및 미토콘드리아 스트레스 사이의 관계를 분석하려고 시도했다. 참고로, CSA, TRO 및 NEFA와 같은 24 시간에서 이중 작용(담즙 정체 및 미토콘드리아 스트레스)을 하는 약물은 TOL, DICLO 및 BOS에 비해 72 시간에서 세포 생존률을 현저하게 낮추었다. 이 자료는 이전 보고서(Aleo et al., 2014)와 일맥상통하게 이중 독성이 DILI의 심각성과 높은 상관 관계가 있음을 보여주는 임상 데이터에 필적할 만하다(도 5, 패널 B, C). 추가로, 본 출원인은 130μM에서 엔타카폰 처리가 유사장기 생존능을 감소시켰다는 것을 주목했다(24시간에 85%에서 72 시간에 64%로). 엔타카폰은 DILI를 유도하기 위해 혈장 단백질, 주로 알부민에 광범위한 결합을 필요로 한다(Fisher et al., 2002). 그러나, 가능한 방법에 기초하여, 엔타카폰이 간에 독성을 갖는 방법은 아직 명확하지 않다(Oorts et al., 2016). 종합하면, LoT 시스템은 DILI의 주요 기계적 분류를 위한 유익한 인체 모델 시스템이며, 미지의 복잡한 메커니즘을 더 자세히 묘사하기 위한 유용한 테스트 플랫폼이다.

[0070] 인간의 간 유사 장기에서 DILI에 대한 취약성 평가

[0071] DILI 발병률은 종종 다양한 숙주 요인에 의해 복잡해지는 것으로 알려져 있다. 실제로 아세타미노펜과 같은 일부 약물의 간독성 위험이 설치류와 인간 모두에서 비만과 NAFLD로 인해 크게 증가한다는 증거가 증가하고 있다(APAP)(Fromenty, 2013; Michaut et al., 2016). 따라서 무증상 단계에서도 환자와 함께 "취약한"상태에서 DILI 잠재력을 예측하는 것이 중요하다. 본 연구에서, 본 출원인은 불포화 지방산, 올레산(oleic acid)에 대한 공동 노출에 의해 지방 독성 유사장기 모델을 확립하였다(도 6, 패널 A). 유사장기에 올레산 처리 3 일 후, 유사장기에서의 지질 축적은 심했다(도 6, 패널 B). 지방산의 산화는 ATP와 니코틴 아미드 디뉴클레오티드의 고갈을 유도하고 지방 간에서의 DNA 손상을 유도하는 활성 산소 종(ROS)의 중요한 원천이다(Browning and Horton, 2004). 이것과 일치하여, 지질 처리된 유사장기에서 ROS 생성이 관찰되었다(도 6, 패널 C 및 도 13, 패널 A). 또한, 지방산은 공개된 표현형(Zborowski and Wojtczak, 1963)과 유사한 간 미토콘드리아의 대량 팽창을 유도하였다(도 6, 패널 D 및 도 13, 패널 B). 간경변성 미토콘드리아 기능 장애가 쥐 모델에서의 NAFLD의 발달에 선행하기 때문에(Rector et al., 2010), 이러한 결과는 지방 독성 유사장기가 어느 정도 *체내* 지방 간 모델을 모델링한다는 것을 나타낸다.

[0072] 이와 같은 지질독성 유사장기 모델이 ROS 생성이 증가된 취약한 상태임을 확인하면서, 트로글리타존(0~50μM)을 24 시간 동안 처리하고 유사장기에서 세포 생존력을 평가하였다. 트로글리타존 50μm 단독 처리로, 세포 생존율은 24 시간에서 85% 였고 72 시간에서 67%로 감소했다. 그러나 지방 독성 상태에서 트로글리타존을 처리한 결과, 유사장기의 사망으로 인해 유사장기의 거대한 분열이 관찰되었다. 후속 세포 생존 분석 결과가 상기 결과(대조군에 비해 -40%, $p < 0.05$)를 입증합였다(도 6, 패널 E 및 6, 패널 F).

[0073] 다음으로, 출원인은 유사장기가 잠재적인 치료 화합물에 의해 DILI 유사 상태로부터 회복될 수 있는지 여부를 조사하였다. 본 출원인은 항산화제인 N-아세틸시스테인(NAC)을 사용하여 ROS 생성을 억제하였는데, 정맥내NAC가 비-아세타미노펜 관련 급성 간 장애 환자에서 생존율을 향상시키고(Lee et al., 2009), 트로글리타존에 의한 세포 독성을 감소시키기 때문(Rachek et al., 2009)이었다. 예상한 바와 같이, 세포 생존능은 NAC에 의해 상당히 개선되었으며, 이것은 NAC가 취약한 환경에서도 유사장기에서 세포 사멸을 구제했음을 시사한다(도 6, 패널 E 및 6, 패널 F). 대부분의 DILI 사례에서, 유일하게 개입하는 것은 확인된 경우 원인 약물의 제거이다(Polson and Lee, 2005)(Bohan et al., 2001, Navarro and Senior, 2006). 이 LoT 시스템은 DILI 치료를 위한 약물 발견 뿐만 아니라 다중 약물 요법에 연계된 인과 관계 약물을 확인하는 데 유용한 도구일 수 있다.

[0074] 간 기능 부전을 포함한 심각한 이상 반응(SAE)은 임상 개발이나 시판중인 의약품의 퇴출 중 약물 쇠퇴의 주요 원인이다. 특히, DILI는 약물 개발에서 중요한 도전 과제이며, 수송체 활성의 억제에 의해 유발되는 약물 유도 담즙 정체가 주요 원인 중 하나이다. 인간 1차 간세포를 사용하는 샌드위치 배양은 현재 의약품의 최선의 선택이다. 최근 보고는 인간 섬유 아세포의 분화된 세포를 사용하는 간세포 기반 담즙 정체 모델(Ni et al., 2016)의 전망을 보여주었지만, 이러한 분석 플랫폼은 가변적이고 한정된 인간 간세포 출처와 복잡한 정량화 알고리즘의 필요성 때문에 처리량 문제 뿐만 아니라 재현성 과제를 여전히 갖고 있다. 또한, 인간 간암 세포주인 HepaRG 세포 또한 담즙 정체증의 특징을 평가하는데 유용하지만, 그것의 낮은 BSEP(담즙염 유출 펌플, 즉 ABCB11, 담즙산 배출을 위한 중요한 수송체 및 담즙 정체 억제제의 주요 표적) 활성 및 시간 소모적인 분화 절차 때문에 사용이 제한된다(Le Vee et al., 2013). 더욱 중요한 것은 필수 해부학 적 구조가 부족하여 제약 업계에서 실제 사용이 제한된다는 것이다. 대안적으로, 기술된 방법은 시험 화합물의 존재 하에서 실시간 형광 이미징에 의한 담즙 수송 활성을 측정하기 위한 간단하고 굳건하며 고 처리량의 시스템을 가능하게 한다. LoT 분석의 주요 이점은 다음과 같다: 1. 비용 효율성(50개 유사장기 당 12.35 달러, 384개 웰당 94.85 달러), 2. 분

석 처리량(단일 유사장기에서 측정 가능) 및 3. 다른 요인들 간, 예컨대 미토콘드리아 스트레스 간의 상호 작용 분석을 위한 다중화 판독값. 특히, 위에서 언급한 바와 같이, 후향적 연구는 다중 세포 스트레스 잠재력이 DILI의 발병과 연관되어 있음(Aleo et al., 2014)을 보여 주었고, 이중 판독 결과(미토콘드리아 및 담즙 정체성 스트레스)에 따라 세포 생존능이 감소했기 때문에, LoT 분석은 상기 연구와 비슷한 결과를 나타냈다. 산화 스트레스는 세포 사멸에 중요한 역할을 하며 담즙 정체성 간 손상의 발생과 관련이 있다(Serviddio et al., 2004). 소수성 담즙산은 담즙 정체 동안에 세포 내로 축적되고 정상적인 미토콘드리아 전자 수송을 방해하고 호흡 복합체 I 및 III의 활성을 억제하여, 결과적으로 아데노신 3 인산염 합성을 저해(Krahenbuhl et al., 1994)하고, 미토콘드리아 기능불량-유도 세포사멸을 초래한다(Bernardi, 1996). 이러한 발견과 일맥상통하여, 본 출원인의 이러한 이중 판독값의 상관 분석은 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이 담즙 정체 스트레스가 미토콘드리아 스트레스와 비교하여 간 손상에 대한 보다 지배적인 요소임을 나타냈다. 따라서 LoT 시스템은 DILI 메커니즘을 조사하기 위한 모델 시스템으로 사용될 수 있다.

[0075] 또한, 최근에 iPSC 패널의 집합이 확립됨에 따라, 개인의 상이한 감수성에 대한 잠재적인 평가도 또한 기대된다(Inoue et al., 2014). 기존의 *체외* 분석 시스템에서 SAE를 예측하는 것은 일반적으로 개인차에 초점을 맞추지 않지만, SAE는 SAE가 발생하기 쉬운 작은 환자 그룹에서 종종 발생한다(Stevens and Baker, 2009). LoT 시스템을 다양한 집단 iPSC 패널에 적용하면 이전에는 접근이 어려웠던 상이한 SAE감수성이 제공될 것이다. 극히 드문 DILI의 특성에 비추어, 특정 게놈 또는 인종적 요인을 가진 환자 세포의 사용은 현재 알려지지 않은 특이적 DILI 메커니즘을 밝히는데 도움을 줄 것이다. 따라서 LoT는 DILI 잠재력을 최소화하기 위한 필수적인 통찰력을 제공함으로써 제약 산업을 위한 게임 변화 전략의 역할을 할 수 있다(도 7).

[0076] 이 유사장기 모델의 하나의 한계는 면역 반응이 없다는 것이다. 과민 반응으로 인한 면역학적 효과는 특이적 DILI에 대한 하나의 가능한 메커니즘이다. 트로글리타존 유도 세포 독성에 의한 민감성이 간세포주, Huh7 및 THP-1 세포를 사용한 체외 공동 배양 모델을 사용하여 증가되었지만(Edling et al., 2009), 약물의 과민성을 평가하는 제한된 *체외* 모델들이 있다. 따라서 면역 계통에 초점을 맞춤으로써 LoT 플랫폼을 발전시키는 것이 간세포 염증을 평가하는 데 중요할 것이다. 그럼에도 불구하고, LoT 테스트 플랫폼은 다수의 FDA 승인 의약품에 의한 담즙 배출 기능의 억제가 이 분석에서 재현 가능하게 관찰되므로 개별 유사장기로부터 재현 가능하고 대규모인 데이터 세트를 생성하는 데 있어 우수한 것으로 보인다. 담즙 정체가 약물 유발성, 지방 독성, 전염성 및 선천성 조건을 포함한 광범위한 간 질환에 의해 유발(Chatterjee et al., 2014)된다는 것을 고려할 때, 유사장기 기반 LoT 분석은 기계론적 연구 가능성이 있는 다양한 상황에서 간내 담즙 정체를 분석할 뿐만 아니라 DILI 이외의 약물 검사 응용을 위해 유용하다.

[0077] LoT 분석으로 취약한 인간 간 조건 연구

[0078] 비만과 같은 숙주 인자는 DILI의 발병에 유의한 영향을 미치는 것으로 알려져 있지만(Heidari et al., 2014), 복잡한 특성 때문에 임상 환경에서 종종 주인공 대접을 받지 못한다. 비만이나 지방간의 존재로 인해 생체 이물질 및 비독성 화학 물질(*예:* 약물)에 의해 유도된 간 손상에 환자가 취약해질 수 있으며, 이것은 위험 요인이 있는 경우 저용량으로 간 독성이 될 수 있다(Fromenty, 2013). 그럼에도 불구하고, 현재의 임상 시험 시스템은 소수의 생물 마커(ALT, AST) 수준을 갖는 취약한 간 조건 하에서 지원자를 계층화하도록 설계되지 않았다. 수많은 지방증 환자가 투약 전에 검출할 수 있는 바이오 마커가 없는 무증상이기 때문에, 임상 단계에 들어가기 전에 이 취약한 상태에서 결과를 예견하는 것이 중요하다.

[0079] 납 화합물 합성/최적화와 같은 초기 약물 검사 단계에서 이러한 취약한 상태의 독성을 평가하기 위해 LoT 시스템을 발전시키려는 노력과 함께, 출원인은 간 유사 장기에 지질독성 스트레스를 적용하고 항 당뇨병 약물인 트로글리타존의 DILI에 대한 과장된 상승효과를 입증하였다. 사실, 유사장기 시스템은 유사장기의 간세포에 트리글리세라이드 축적에 의해 촉진된 거대한 간 세포 사멸을 보여줌으로써 성공적으로 이 특징을 반영한다. 비만에서 DILI의 메커니즘 중 하나는 글루타티온(GSH)의 감소 수준을 설명 할 수 있다(Michaut et al., 2016). 약물에 의한 산화 스트레스는 특히 GSH 고갈과 미토콘드리아 호흡 사슬의 억제를 통해 여러 기원을 가질 수 있다(Begriche et al., 2011; Pessayre et al., 2010). 이 취약한 모델은 세포 내 GSH 수치의 감소를 반영하고 미토콘드리아 장애를 통한 트로글리타존 유도 산화 스트레스의 악화를 초래할 수 있으며, 이는 NAC를 제공함으로써 개선된다. 무알콜 지방성 간염(NASH)의 유행이 급격히 증가한 것을 감안할 때, 기존 NAFLD를 악화시키거나 급성 간염을 더 자주 유발할 수 있는 약물의 목록이 최소한으로 남아 있다는 것은 주목할 가치가 있다. 또한, *체외* 환원법 시스템은 단리된 숙주 인자가 유사장기에 효과적으로 배치 될 수 있기 때문에 이전에 시험되지 않은 숙주 인자를 연구하기 위해 예기치 않은 창을 제공한다.

[0080] LoT 기반의 정밀 의학

[0081] LoT를 사용하는 최적의 약물 요법의 선택은 맞춤형 약제 관점에서 진료소에 주요 관심사가 될 것이다. 예를 들어 정신병 치료제 선택 시 고려해야 할 전략은 정신병 환자 사이에서 무시 못할 간 질환 발생률에 따라, 간 수용성(hepatic tolerance)을 고려해야 한다; 가능한 DILI 제제의 16%가 신경정신과 약물이다(Dumortier et al., 2002). NASH가 우울증과 같은 심리적 장애를 동반하는 경우가 많으므로 항우울제(삼환계 약물 또는 SSRI), 기분 안정제 및 신경 이완제 치료의 안전한 조합적 선택이 필요하다(Dumortier et al., 2002). 또한 만성 질환의 경우 노화로 인한 증가로 인해 다중 약물 사용(즉, 다약물 사용)은 고령자에게 건강 관리를 제공하는 일반적인 결과이며(Marcum and Gellad, 2012), 이 때문에 DILI가 의심될 때 원인성 약물을 식별하는 일이 상당히 어려워진다. 환자 유래 iPSC-유사장기가 무제한적이고 재현 가능한 원천을 제공함에 따라, LoT는 환자의 DILI 가능성을 계층화하고 맞춤형 관점에서 보다 안전한 약물을 선택하기 위한 정보를 제공하는 패널 역할을 할 수 있다.

[0082] LoT에 기초한 DILI 신약 발견

[0083] 마찬가지로 중요한 것은 LoT 시스템을 사용하는 항DILI 치료 화합물 화면에 대한 잠재적인 사용이다. 다수의 약물은 간과 DILI에 해로운 영향을 미치며, 이것은 주요한 임상적 문제이다. 실제로, 아세타미노펜은 미국에서 DILI의 약 절반을 차지한다(Russo et al., 2004). 예를 들어 개발 도상국과 같은 세계 다른 지역에서는, 결핵 투약과 같은 다른 약물이 DILI의 주요 원인이 될 수 있다(Bell and Chalasani, 2009). 그러나 몇 가지 증상 치료만 가능하다. 여기서, 개념 증명 실험으로서, 출원인은 트로글리타존에 의해 입증된 DILI의 독성 메카니즘에 저항하는 화합물의 치료 효과를 평가하기 위한 유사장기 생존 실험을 확립하였다. NAC가 파라세타몰 과다 복용의 주요 치료 방법이긴 하지만(Makin et al., 1995; Verma and Kaplowitz, 2009), 최근 연구 초점은 비- 파라세타몰 DILI에서 NAC의 사용을 조사하는 쪽으로 옮겨졌다(Chughlay et al., 2016). LoT 시스템은 비-파라세타몰 약물에 의한 DILI에 대한 NAC의 효능을 평가하는 데 유용하다. 더 나아가, 보다 높은 처리량 접근은 체외에서 DILI 유사 증후를 복구하는 더 큰 규모 화합물 라이브러리를 검사하기 위한 강력한 도구로서 역할을 할 것이다. 본원에 기술된 방법들은 임상 DILI 표현형과 관련된 세포 내인성 및 외인성 인자들을 확인하고 연구하는데 사용될 수 있으며, 납 화합물 최적화, 역학 연구, 정밀 의학 및 항 DILI 치료 검사 응용을 용이하게 한다.

[0084] 방법

[0085] **PSC의 유지**

[0086] 이 연구에서 사용된 CYP2C9*2 변이형 인간 iPSC 클론을 갖는 TkDA3는 K. Eto 및 H. Nakauchi에 의해 친절하게 제공되었다. 기타 적합한 세포주에 교토 대학에서 제공된 인간 iPSC 세포주와 Coriell Biorepository에서 구입한 세포주가 포함된다. 이들은 이전에 기술 된 바와 같이 유지되었다(Takahashi et al., 2007). 미분화된 hiPSCs는 mTeSR1 배지(StemCell technologies, Vancouver, Canada)에서 피더(feeder)가 없는 조건에서 유지되었다. 기타 적합한 배지에는 Lonza의 E8, 또는 Aijinomoto Co.의 StemFit이 포함된다. 판이 5% CO_2 /95% 공기의 인큐베이터에서 37℃로 1/30 희석액 마트리겔(Corning Inc., New York, NY, USA)로 코팅되었다. hPSC 유지 보수. 마트리겔 대신, Mippi Co또는 Biolamina Co의 Laminin511 또는 Laminin411이 사용될 수 있다.

[0087] 간 유사 장기**(HLO)의 생산**

[0088] 최종 내배엽 내로의 hiPSCs의 분화는 이전에 기술 된 방법을 여러 가지 변형하여 유도하였다(Spence et al., 2011). 간단히 말해서, HiPSC의 콜로니를 Accutase(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 단리하고, 150000~300000개 세포를 마트리겔 또는 라미닌 코팅 조직 배양 24 웰 플레이트(VWR Scientific Products, West Chester, PA)에 플레이팅하였다. 세포가 고밀도(웰을 덮고있는 세포의 90% 이상)가 될 때, 배지를 1일차에 100ng/ml 액티빈 A(R & D Systems, Minneapolis, MN) 및 50ng/ml의 뼈 형태 형성 단백질 4(BMP4; R & D Systems) 를 함유하는 RPMI 1640 배지(Life Technologies, Carlsbad, CA)로, 2일차에 100ng/mL 액티빈 A 및 0.2% 태아 송아지 혈청(FCS, Thermo Fisher Scientific Inc.)으로, 3일차에 100ng/ml 액티빈 A 및 2% FCS로 변경하였다. 4일차 내지 6 일차 동안, 세포를 500ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자(FGF4; R & D Systems) 및 3μm CHIR99021(Stemgent, Cambridge, MA, USA)을 함유하는 B27(Life Technologies) 및 N2(Gibco, Rockville, MD)를 갖는 고급 DMEM/F12(Thermo Fisher Scientific Inc.)에서 배양하였다. 세포 분화를 위한 배양물은 5% CO_2/95% 공기 분위기에서 37℃로 유지하였고, 배지는 매일 교체하였다. 분화된 최종 내배엽은 7 일차에 판에 새싹을 보였다. 회전 타원체가 마트리겔에 삽입하기에 충분하지 않은 경우, 4일차 내지 6일차 배지를 다시 첨가하고 37℃에서 밤새 배양하였다.

[0089] 간 유사 장기**로의 분화.** DE를 간 유사 장기로 분화하기 위해 세 가지 방법, 즉 "마트리겔 적하법", "마트리겔 샌드위치법 "및 "무-마트리겔 법 "을 사용할 수 있다.

[0090] **마트리겔 적하법**: 7 내지 8일차에 플레이팅된 세포가 있는 최종 내배엽 유사장기를 부드럽게 분주하여 접시에서 분리하였다. 단리된 회전 타원체를 800 rpm에서 3 분간 원심 분리하고, 상등액을 제거한 후, 접시에 100% 마트리겔을 적하하였다. 플레이트를 5% CO_2 /95% 공기 분위기에서 37℃로 5 내지 15 분 동안 두었다. 마트리겔이 고형화 된 후, 고급 DMEM/F12를 B27, N2 및 레티노산(RA; Sigma, St. Louis, MO) 2μm와 함께 1~5 일 동안 첨가하였다. 배지는 격일로 교체하였다. RA 처리 후, 마트리겔 방울 내에 내포된 유사장기를 10ng/ml 간세포 성장 인자(HGF, PeproTech, Rocky Hill, NJ), 0.1μm 덱사메타손(Dex, Sigma) 및 20ng/ml 온코스타틴 M(OSM; R & D Systems)을 함유한 간세포 배양 배지(HCM Lonza, Walkersville, MD)에서 배양하였다. 세포 분화를 위한 배양물은 5% CO_2/95% 공기 분위기에서 37℃ 유지시켰고 배지는 3 일마다 교체하였다. 20~30일차에, 마트리겔 방울에 내포된 유사장기를 모든 분석을 위해 스크래칭과 부드러운 분주에 의해 단리하였다.

[0091] **마트리겔 샌드위치법**: 7~8일차에, 플레이팅된 세포가 있는 최종 내배엽 유사장기를 부드럽게 분주하여 접시에서 분리하였다. 단리된 회전 타원체를 800rpm에서 3 분간 원심 분리하고 상등액을 제거한 후 100% 마트리겔과 섞었다. 동시에, 모든 보충제를 포함한 간세포 배양 배지를 동일한 부피의 100% 마트리겔과 혼합하였다. HCM 및 마트리겔 혼합물을 접시 바닥에 두껍게 코팅(0.3~0.5cm)하고, 37℃, 5% CO_2/95% 공기 분위기에서 15~30분간 두었다. 마트리겔이 응고 된 후, 마트리겔과 혼합된 회전 타원체를 마트리겔로 두껍게 코팅된 판에 시딩하였다. 플레이트를 5% CO_2/95% 공기 분위기에서 37℃로 5 분간 두었다. 고급 DMEM/F12를 B27, N2 및 레티노산(RA, Sigma, St. Louis, MO) 2μM와 함께 1~5일 동안 첨가하였다. 배지는 격일로 교체하였다. RA 처리 후, 마트리겔 방울 내에 내포된 유사장기를 10ng/ml 간세포 성장 인자(HGF, PeproTech, Rocky Hill, NJ), 0.1μm 덱사메타손(Dex, Sigma) 및 20ng/ml 온코스타틴 M(OSM; R & D Systems)을 함유한 간세포 배양 배지(HCM Lonza, Walkersville, MD)에서 배양하였다. 세포 분화를 위한 배양물을 5% CO_2/95% 공기 분위기에서 37℃로 유지 시켰고, 배지는 3 일마다 교체하였다. 20~30일 경, 마트리겔 방울에 내포된 유사장기는 모든 분석을 위해 스크래칭과 부드러운 분주에 의해 분리하였다.

[0092] **무-마트리겔 법:** 7~8일차에 플레이팅된 세포를 가진 최종 내배엽 유사장기를 B27(Life Technologies), N2(Gibco, Rockville, MD) 레티노산(RA; Sigma, St. Louis, MO) 2μm 가 있는 고급 DMEM/F12(Thermo Fisher Scientific Inc.)에서 4일 동안 평면 배양을 계속하였다. 배지를 격일로 교체하였다. 4 일 평면 배양 후, 유사장기는새싹이 생기고 2D 세포는 간세포로 분화한다. 유사장기와 간세포는 모두 60일 이상 동안 10ng/ml의 간세포 성장 인자(HGF, PeproTech, Rocky Hill, NJ), 0.1μM 덱사메타손(Dex, Sigma) 및 20ng/ml 온코스타틴 M(OSM; R & D Systems)을 가진 간세포 배지(HCM Lonza, Walkersville, MD) 하에서 10 일 동안 배양하였다. 유사장기 분석법의 경우, 부동 유사장기를 초저(초저) 부착 멀티웰 플레이트 6 웰 플레이트에 수집하고, 필요할 때마다 후속 분석에 사용할 수 있다. 세포 분화를 위한 배양 물은 5% CO_2/95% 공기 분위기에서 37℃로 유지시켰고, 배지는 3 일마다 교체하였다.

[0093] **H & E 염색 및 면역 조직 화학**

[0094] 간 유사 장기를 마트리겔에서 수집하고, 4% 파라포름알데히드에 고정하고, 파라핀에 내포시켰다. 절편에 H & E와 면역 조직 화학 염색을 시행하였다. 하기 1차 항체를 사용하였다: 항 -인간 알부민 항체(1: 200 희석 abcam, Cambridge, UK), 항 -유형 IV 콜라겐 항체(1: 200 희석 eBioscience, San Diego, CA, USA), 항 -ZO-1 항체(1: 200 희석 BD Transduction Laboratories(San Jose, CA, USA)) 및 항 MRP2 항체(1: 200 희석 Novus Biologicals, Littleton, CO). 염색된 접합 2 차 항체, Alexa Fluor 568- 접합 당나귀 항 토끼 면역 글로불린(IgG; 1: 1000, Invitrogen, A10042)을 실온에서 2 시간 동안 유사장기에 적용 하였다. 핵을 실온에서 10분 동안 10μg/mL Hoechst 33342(Sigma)로 염색 한 후, 유사장기를 세척 완충액으로 3 회 세척하였다. 형광 현미경 또는 명 시야에서 시편을 관찰하였다. 간 유사 장기를 4% 파라포름알데히드에 30 분간 고정시키고 실온에서 2.5% Tween 20(Sigma)를 침투시킨 후, 유사장기를 PBS에서 희석한 하기 1차 항체와 함께 밤새 4℃에서 배양하였다: 다클론 항-BSEP 항체(1: 200 Sigma). Alexa Fluor 568- 접합 당나귀 항 토끼 면역 글로불린(IgG; 1: 500; Invitrogen, A10042)을 실온에서 2 시간 동안 유사장기에 적용하였다. 반응 후, 세포를 세척 완충액(0.5% Triton-X 100 [Sigma] 및 0.5% 소 혈청 알부민 [BSA]를 함유하는 PBS)로 3 회 세척 하였다. 핵을 실온에서 10 분 동안 10μg/mL Hoechst 33342(Sigma)로 염색한 후, 유사장기를 세척 완충액으로 3 회 세척 하였다. 니콘 A1Rsi 역전 공초점 현미경으로 수행된 공초점 이미징 하에 서시편을 관찰하였다.

[0095] **RNA 단리, RT-qPCR**

[0096] RNeasy 미니 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 RNA를 단리하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 RT-PCR(Invitrogen, CA, USA)을 위한 SuperScriptIII First-Strand Sysenthesis Systen을 사용하여 역전사는 수행하였다. QuantStudio 3 Real-Time PCR System(Thermo)에서 TaqMan 유전자 발현 마스터 믹스(Applied Biosystmes)를 사용하여 qPCR를 수행하였다. 각 표적 유전자에 대한 모든 프라이머 및 프로브 정보는 Universal ProbeLibrary Assay 디자인 센터(https://qpcr.probefinder.com/organism.jsp)에서 얻은 것이다.

[0097] **RNA-seq 데이터의 주성분 분석**

[0098] RNA 단리, cDNA 합성, Illumina HiSeq 2500의 염기서열화는 앞서 기술된 바 있다(Asai et al., 2017). TopHat(version 2.0.13)를 사용하여 RNA-Seq 판독 값을 인간 게놈(GRCh37/hg19)에 정렬시켰다. Tophat의 정렬 데이터를 Cufflinks(버전 2.2.1) 어셈블러에 전달하여, 정렬된 RNA-Seq 판독값을 사본으로 어셈블하였다. 주석이 달린 사본을 UCSC 게놈 브라우저(http://genome.ucsc.edu)와 Ensembl 데이터베이스에서 입수하였다. 사본의 풍성함(Transcript abundances)을 FPKM(Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped)에서 측정하였다.

[0099] pHLO의 계보를 비교하기 위해, 출원인은 전처리된 공개 데이터와 함께 사내 RNA-seq 데이터(pFG 및 유사장기)를 다음과 같이 결합 하였다: iPSC, DE, HS, HP, iDH 및 NHC의 사본의 풍성함(Transcript abundances)을 GSE86007(Jalan-Sakrikar et al., 2016)에서 입수하였고; 태아 간 조직 및 성인 간 조직, 태아 간 조직 및 1차 간세포 중 하나를 ENCODE(ENCFF418BVF, ENCFF804QWF, ENCFF965IQH, ENCFF965IJH, ENCFF918SJO, ENCFF367FJJ, ENCFF029IUF, ENCFF280YNO, ENCFF347TXW, ENCFF724CQI, ENCFF624LQL, ENCFF962SOD, ENCFF170AEC)(Consortium, 2012; Sloan et al., 2016) 및 GSE85223(Asai et al., 2017)에서 입수하였다. 가능한 데이터 전처리 후에 모든 데이터 세트가 동일한 유전자 기호를 갖는다면, 유전자를 사용하였다. 출원인은 log2 공간에서 FPKM + 1 및 RPKM + 1 데이터의 양적 표준화를 수행 한 후, 중앙값 발현 수준의 상위 10000 내에서 유전자를 선택하였다. 주요 구성 요소 분석은 R 패키지 FactoMineR(버전 1.35)(Sebastien Le, 2008)을 사용하여 확장된 유전자 발현 수준을 사용함으로써 수행하였다.

[0100] **단백질 분비 분석**

[0101] 유사장기의 알부민, 피브리노겐 및 보체 인자 분비 수준을 측정하기 위해, 초저 부착 96 웰 플레이트(Corning)에서 유사장기의 배양 상등액 200㎕를 수집하였다. 배양 상등액을 수집하여 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 상등액을 제조사의 지시에 따라 인간 알부민 ELISA 정량 세트(Bethyl Laboratories, Inc., TX, USA) 및 피브리노겐(Thermo Fisher Scientific)으로 분석하였다. 보체 인자 분석을 위해 제조자의 지시에 따라 Luminex System(Luminex Corporation, Austin, TX)으로 상등액을 측정하였다. 세포 수에 따른 알부민 생산량을 계산하기 위해, 유사장기 직경에 의한 세포 수의 선형 회귀 방정식을 사용했다. 유사장기 내강 내 총 담즙산 분비량을 측정하기 위해, 미세주입 Nanoject II(Drummond Scientific, Broomall, PA, USA)를 사용하여 유사장기 내부의 액체를 흡입시켰다. 흡입된 유체를 PBS로 희석하고 총 담즙산 ELISA 키트(Antibodies-online, Inc., GA, USA)로 분석하였다. 총 담즙산의 부피를 계산하기 위해 알부민 생산과 동일한 방식으로 선형 회귀 방정식을 사용하여 유사장기의 세포 수를 계산하였고 콜린 산의 분자량을 계산에 사용하고 이전보고에서 부피와 비교 하였다.

[0102] **투과 전자 현미경**

[0103] 투과 전자 현미경 검사를 위해, 간단히 유사장기를 밤새 3% 글루타르알데히드에 고정시키고 0.1M 소듐 카코딜레이트 완충액으로 세척 한 후, 4% 오스뮴 테트록사이드에서 1 시간 동안 배양하였다. 이어서, 이들을 세척한 다음 에탄올 시리즈에서 탈수시킨 다음, 최종적으로 프로필렌 옥사이드/LX112에 내포시켰다. 그런 다음 조직을 절편화하고 2% 우라닐 아세테이트로 염색하고, 이어서 시트르산 납으로 염색하였다. 이미지는 Hitachi 투과 전자 현미경으로 시각화하였다.

[0104] **CGamF 분석**

[0105] 간단히 말해서, 유사장기를(pH 7.4로 조정된) 수송 완충액(118mM NaCl, 23.8mM NaHCO3, 4.83mM KCl, 0.96mM KH2PO4, 1.20mM MgSO4, 12.5mM HEPES, 5mM 글루코스, 1.53mM CaCl2)으로 30분 동안 사전 배양하였다. 다음으로 유사장기를 1 시간 동안 10㎛의 형광 표지된 담즙산(CGamF, Hofmann 박사로부터의 친절한 선물)으로 처리한 후, 유사장기를 PBS로 3 회 세척하였다. 이미지는 형광 현미경 BZ - X710(Keyence, 오사카, 일본) 상에서 포착하였다.

[0106] **담즙 수송 저해 평가**

[0107] 유사장기에서 담즙 수송 활성을 평가하는데 플루오레스세인 디아세테이트를 사용하였다. 25 일 경에 유사장기를 PBS로 씻어 내고 플루오레스세인 디아세테이트를 배지 중 유사장기로 처리하였다. 또한, 수송 방향을 조사하기 위해 Nanoject III(Drummond Scientific)를 사용하여 유사장기에 플루오레스세인 디아세테이트를 주입하였다. 플루오레스세인 디아세테이트의 처리 또는 주사 후, 형광 현미경 BZ-X710(Keyence)상에서 화상을 포착하였다. 다음으로 시험 시스템의 타당성을 확인하기 위해, HCM 중 10 mg/mL 플루오레스세인 디아세테이트(Sigma)를 20μm사이클로스포린 A(CSA; 시그마)와 45분간 첨가하고, 형광현미경 BZ-9000(Keyence)을 사용하여 순차적으로 이미지를 포착하였다. 담즙 수송 저해 평가를 위해 디메틸 술폭시드(DMSO; Sigma), 음성 대조군으로서 스트렙토마이신(STP; Sigma), 톨카폰(Tol; Sigma), 디클로페낙(Diclo: Sigma), 보센탄(BOS; Sigma), CSA, 트로글리타존(Tro; Sigma), 네파도존(Nefa, Sigma), 엔타카폰(Enta; Sigma) 및 피오글리타존(PIO, Sigma)의 처리 후, HCM중 10 mg/mL의 플루오레스세인 디아세테이트를 첨가하였다. 5 분 배양 후, 유사장기를 PBS로 3 회 헹구고, 형광 현미경 BZ-X710을 사용하여 이미지를 순차적으로 포착했다. 분석은 Imagej 1.48k 소프트웨어(Wayne Rasband, NIHR, USA, http://imagej.nih.gov/ij)를 사용하여 유사장기의 외부 및 내부에서의 강도 사이의 비율을 계산하여 수행하였다. 처리 중 밝기 또는 명암 변화를 전체 이미지에 동일하게 적용하였다.

[0108] **미토콘드리아 독성 잠재력 평가**

[0109] 각 배양 조건에서 초저 부착 멀티웰 플레이트 6 웰 플레이트에서 배양 한 후, 유사장기를 집어 Microslide 8 Well Glass Bottom(Ibidi, WI, USA)에 시딩하였다. 미토콘드리아 막 전위(MMP)의 평가를 위해, 24시간 동안 디메틸 술폭시드(DMSO; Sigma), 스트렙토마이신(STP; Sigma), 음성 대조군인 톨카폰(Tol; Sigma), 디클로페낙(Diclo: Sigma), 보센탄(BOS; Sigma), 사이클로스포린 A(CSA, Sigma), 트로글리타존(Tro, Sigma), 네파도존(Nefa, Sigma), 엔타카폰(Enta; Sigma) 및 피오글리타존(PIO, Sigma)의 처리 후, 250nM 테트라메틸로다민, 메틸에스테르, 과염소산염(TMRM; Thermo Fisher Scientific)을 첨가하였다. 30 분 배양 후, 유사장기를 PBS로 3 회 씻어 내고, 이미지를 60x 수침 대물렌즈를 사용하여 Nikon A1 Inverted Confocal Microscope(일본)에서 스캔하였다. TMRM의 면적 및 강도를 IMARIS8(Bitplane AG, Switzerland)에 의해 mMP로 계산하였다. 담즙 정체 및 미토콘드리아 스트레스를 평가하기 위해, 약물의 처리 24 시간 후 Celloid-Glo® 발광 세포 생존 분석(Promega, Mannheim, Germany)을 사용하여 세포 생존력을 측정하였고, 세포의 사멸로 가는 손상 때문에 2차 변화를 방지하기 위한 각 용량에서 생존력을 감소시키지 않았음을 확인하였다.

[0110] **미토콘드리아 및 담즙 정체 스트레스를 가진 유사장기에서 세포 생존 능력의 관계 분석**

[0111] 미토콘드리아 및 담즙 정체증 스트레스와의 세포 생존 능력의 관계를 입증하기 위해, 먼저 다음 공식을 사용하여 지표를 설정하였다. "지표 = -(샘플 값 - 대조 값) x100"은 미토콘드리아 및 담즙 정체 스트레스 분석에서 제공된 값을 기반으로 한다. 미토콘드리아 및 담즙 정체 스트레스와 관련된 세포 손상을 분석하기 위해, 약물 처리 후 72 시간에 유사장기 당 ATP 함량을 CellTiter-Glo® 발광 세포 생존 분석(Promega)을 사용하여 측정했다. 이 데이터는 무료 웹 기반 도구인 Infogr.am(http://infogr.am)을 사용하여, 도 4, 패널 B로 표시하였다.

[0112] **취약한 상태에서 유사장기에서 생존력 평가**

[0113] 실험은 도 5a에 도시된 바와 같이 수행하였다. 마트리겔에서 배제되고 세척된 유사장기는 초저 부착 다중 웰 플레이트 6 웰 플레이트(Corning)에서 3 일 동안 800μm의 올레산으로 처리하였다. 그런 다음, 50μm의 트로글리타존을 50μm의 NAC와 함께 또는 그것 없이 24 시간 동안 처리하였다. 세포 생존력은 CellTiter-Glo® 발광 세포 생존능 분석법(Promega)을 사용하여 수행하였다. 이미지는 형광 현미경 BZ-9000을 사용하여 순차적으로 포착하였다.

[0114] **지질 유도 미토콘드리아 스트레스 평가**

[0115] 각 배양 조건에서 초저 부착 멀티 웰 플레이트 6 웰 플레이트에서 배양 한 후, 20 개의 유사장기를 집어 Microslide 8 Well Glass Bottom(Ibidi, WI, USA) 에 시딩하고, 살아있는 세포 염색을 실시하였다. 하기의 시약 또는 키트를 사용하였다: 지질의 경우 BODIPY® 493/503(Thermo Fisher Scientific), 세포질 골격의 경우 SiR Actin Kit(USA Scientific, FL, USA), ROS의 경우 CellROX® Green Reagent(Fisher Scientific), 미토콘드리아의 경우 TMRM(Thermo Fisher Scientific). 유사장기를 60x 수침 대물렌즈를 사용하여 Nikon A1 Inverted Confocal Microscope(일본)에서 시각화하고 스캔하였다. ROS 생산, 미토콘드리아 크기 및 수는 IMARIS8에 의해 분석하였다.

[0116] **통계**

[0117] 통계적 유의성은 무쌍(unpaired) 스튜던트 t검정 또는 Dunnett의 다중비교 사후검정(post-hoc test)을 이용한 일방ANOVA를 사용하여 결정하였다. P <0.05는 유의한 것으로 간주하였다.

[0118] **참고 문헌**

Aleo, M.D., Luo, Y., Swiss, R., Bonin, P.D., Potter, D.M., and Will, Y. (2014). Human drug-induced liver injury severity is highly associated with dual inhibition of liver mitochondrial function and bile salt export pump. Hepatology 60, 1015-1022.

Asai, A., Aihara, E., Watson, C., Mourya, R., Mizuochi, T., Shivakumar, P., Phelan, K., Mayhew, C., Helmrath, M., Takebe, T., et al. (2017). Paracrine signals regulate human liver organoid maturation from induced pluripotent stem cells. Development 144, 1056-1064.

Barth, C.A., and Schwarz, L.R. (1982). Transcellular transport of fluorescein in hepatocyte monolayers: evidence for functional polarity of cells in culture. Proc Natl Acad Sci U S A 79, 4985-4987.

Begriche, K., Massart, J., Robin, M.A., Borgne-Sanchez, A., and Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. J Hepatol 54, 773-794.

Bell, L.N., and Chalasani, N. (2009). Epidemiology of idiosyncratic drug-induced liver injury. Semin Liver Dis 29, 337-347.

Bernardi, P. (1996). The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. Biochim Biophys Acta 1275, 5-9.

Bohan, T.P., Helton, E., McDonald, I., Konig, S., Gazitt, S., Sugimoto, T., Scheffner, D., Cusmano, L., Li, S., and Koch, G. (2001). Effect of L-carnitine treatment for valproate-induced hepatotoxicity. Neurology 56, 1405-1409.

[0119]

Bravo, P., Bender, V., and Cassio, D. (1998). Efficient in vitro vectorial transport of a fluorescent conjugated bile acid analogue by polarized hepatic hybrid WIF-B and WIF-B9 cells. Hepatology 27, 576-583.

Browning, J.D., and Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J Clin Invest 114, 147-152.

Chang, J.H., Plise, E., Cheong, J., Ho, Q., and Lin, M. (2013). Evaluating the in vitro inhibition of UGT1A1, OATP1B1, OATP1B3, MRP2, and BSEP in predicting drug-induced hyperbilirubinemia. Mol Pharm 10, 3067-3075.

Chatterjee, S., Richert, L., Augustijns, P., and Annaert, P. (2014). Hepatocyte-based in vitro model for assessment of drug-induced cholestasis. Toxicol Appl Pharmacol 274, 124-136.

Chughlay, M.F., Kramer, N., Spearman, C.W., Werfalli, M., and Cohen, K. (2016). N-acetylcysteine for non-paracetamol drug-induced liver injury: a systematic review. Br J Clin Pharmacol 81, 1021-1029.

Consortium, E.P. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature 489, 57-74.

Cutrin, J.C., Cantino, D., Biasi, F., Chiarpotto, E., Salizzoni, M., Andorno, E., Massano, G., Lanfranco, G., Rizzetto, M., Boveris, A., et al. (1996). Reperfusion damage to the bile canaliculi in transplanted human liver. Hepatology 24, 1053-1057.

D'Amour, K.A., Agulnick, A.D., Eliazer, S., Kelly, O.G., Kroon, E., and Baetge, E.E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. Nat Biotechnol 23, 1534-1541.

Davidson, M.D., Ballinger, K.R., and Khetani, S.R. (2016). Long-term exposure to abnormal glucose levels alters drug metabolism pathways and insulin sensitivity in primary human hepatocytes. Sci Rep 6, 28178.

[0120]

Dumortier, G., Cabaret, W., Stamatiadis, L., Saba, G., Benadhira, R., Rocamora, J.F., Aubriot-Delmas, B., Glikman, J., and Januel, D. (2002). [Hepatic tolerance of atypical antipsychotic drugs]. Encephale 28, 542-551.

Dvir-Ginzberg, M., Gamlieli-Bonshtein, I., Agbaria, R., and Cohen, S. (2003). Liver tissue engineering within alginate scaffolds: effects of cell-seeding density on hepatocyte viability, morphology, and function. Tissue Eng 9, 757-766.

Edling, Y., Sivertsson, L.K., Butura, A., Ingelman-Sundberg, M., and Ek, M. (2009). Increased sensitivity for troglitazone-induced cytotoxicity using a human in vitro co-culture model. Toxicol In Vitro 23, 1387-1395.

Fahrmayr, C., Konig, J., Auge, D., Mieth, M., Munch, K., Segrestaa, J., Pfeifer, T., Treiber, A., and Fromm, M. (2013). Phase I and II metabolism and MRP2-mediated export of bosentan in a MDCKII-OATP1B1-CYP3A4-UGT1A1-MRP2 quadruple-transfected cell line. Br J Pharmacol 169, 21-33.

Falasca, L., Favale, A., Serafino, A., Ara, C., and Conti Devirgiliis, L. (1998). The effect of retinoic acid on the re-establishment of differentiated hepatocyte phenotype in primary culture. Cell Tissue Res 293, 337-347.

Fisher, A., Croft-Baker, J., Davis, M., Purcell, P., and McLean, A.J. (2002). Entacapone-induced hepatotoxicity and hepatic dysfunction. Mov Disord 17, 1362-1365; discussion 1397-1400.

Fromenty, B. (2013). Drug-induced liver injury in obesity. J Hepatol 58, 824-826.

Heidari, R., Niknahad, H., Jamshidzadeh, A., and Abdoli, N. (2014). Factors affecting drug-induced liver injury: antithyroid drugs as instances. Clin Mol Hepatol 20, 237-248.

Inoue, H., Nagata, N., Kurokawa, H., and Yamanaka, S. (2014). iPS cells: a game changer for future medicine. EMBO J 33, 409-417.

[0121]

Jalan-Sakrikar, N., De Assuncao, T.M., Lu, J., Almada, L.L., Lomberk, G., Fernandez-Zapico, M.E., Urrutia, R., and Huebert, R.C. (2016). Hedgehog Signaling Overcomes an EZH2-Dependent Epigenetic Barrier to Promote Cholangiocyte Expansion. PLoS One 11, e0168266.

Kock, K., and Brouwer, K.L. (2012). A perspective on efflux transport proteins in the liver. Clin Pharmacol Ther 92, 599-612.

Krahenbuhl, S., Talos, C., Fischer, S., and Reichen, J. (1994). Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. Hepatology 19, 471-479.

Le Vee, M., Noel, G., Jouan, E., Stieger, B., and Fardel, O. (2013). Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. Toxicol In Vitro 27, 1979-1986.

Lechner, C., Reichel, V., Moenning, U., Reichel, A., and Fricker, G. (2010). Development of a fluorescence-based assay for drug interactions with human Multidrug Resistance Related Protein (MRP2; ABCC2) in MDCKII-MRP2 membrane vesicles. Eur J Pharm Biopharm 75, 284-290.

Lee, W.M., Hynan, L.S., Rossaro, L., Fontana, R.J., Stravitz, R.T., Larson, A.M., Davern, T.J., 2nd, Murray, N.G., McCashland, T., Reisch, J.S., et al. (2009). Intravenous N-acetylcysteine improves transplant-free survival in early stage non-acetaminophen acute liver failure. Gastroenterology 137, 856-864, 864 e851.

Leslie, E.M., Watkins, P.B., Kim, R.B., and Brouwer, K.L. (2007). Differential inhibition of rat and human Na+-dependent taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/SLC10A1)by bosentan: a mechanism for species differences in hepatotoxicity. J Pharmacol Exp Ther 321, 1170-1178.

Li, N., Oquendo, E., Capaldi, R.A., Robinson, J.P., He, Y.D., Hamadeh, H.K., Afshari, C.A., Lightfoot-Dunn, R., and Narayanan, P.K. (2014). A systematic

[0122]

assessment of mitochondrial function identified novel signatures for drug-induced mitochondrial disruption in cells. Toxicol Sci 142, 261-273.

Makin, A.J., Wendon, J., and Williams, R. (1995). A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987-1993). Gastroenterology 109, 1907-1916.

Malinen, M.M., Kanninen, L.K., Corlu, A., Isoniemi, H.M., Lou, Y.R., Yliperttula, M.L., and Urtti, A.O. (2014). Differentiation of liver progenitor cell line to functional organotypic cultures in 3D nanofibrillar cellulose and hyaluronan-gelatin hydrogels. Biomaterials 35, 5110-5121.

Marcum, Z.A., and Gellad, W.F. (2012). Medication adherence to multidrug regimens. Clin Geriatr Med 28, 287-300.

Michaut, A., Le Guillou, D., Moreau, C., Bucher, S., McGill, M.R., Martinais, S., Gicquel, T., Morel, I., Robin, M.A., Jaeschke, H., et al. (2016). A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: Application to acetaminophen. Toxicol Appl Pharmacol 292, 40-55.

Miki, T., Ring, A., and Gerlach, J. (2011). Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions. Tissue Eng Part C Methods 17, 557-568.

Mork, L.M., Isaksson, B., Boran, N., Ericzon, B.G., Strom, S., Fischler, B., and Ellis, E. (2012). Comparison of culture media for bile Acid transport studies in primary human hepatocytes. J Clin Exp Hepatol 2, 315-322.

Navarro, V.J., and Senior, J.R. (2006). Drug-related hepatotoxicity. N Engl J Med 354, 731-739.

Ni, X., Gao, Y., Wu, Z., Ma, L., Chen, C., Wang, L., Lin, Y., Hui, L., and Pan, G. (2016). Functional human induced hepatocytes (hiHeps) with bile acid synthesis and transport capacities: A novel in vitro cholestatic model. Sci Rep 6, 38694.

[0123]

Nishida, T., Gatmaitan, Z., Che, M., and Arias, I.M. (1991). Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 6590-6594.

Oorts, M., Baze, A., Bachellier, P., Heyd, B., Zacharias, T., Annaert, P., and Richert, L. (2016). Drug-induced cholestasis risk assessment in sandwich-cultured human hepatocytes. Toxicol In Vitro 34, 179-186.

Pessayre, D., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M.A., Letteron, P., Moreau, R., and Mansouri, A. (2012). Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. Drug Metab Rev 44, 34-87.

Pessayre, D., Mansouri, A., Berson, A., and Fromenty, B. (2010). Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. Handb Exp Pharmacol, 311-365.

Polson, J., and Lee, W.M. (2005). AASLD position paper: the management of acute liver failure. Hepatology 41, 1179-1197.

Rachek, L.I., Yuzefovych, L.V., Ledoux, S.P., Julie, N.L., and Wilson, G.L. (2009). Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol 240, 348-354.

Rector, R.S., Thyfault, J.P., Uptergrove, G.M., Morris, E.M., Naples, S.P., Borengasser, S.J., Mikus, C.R., Laye, M.J., Laughlin, M.H., Booth, F.W., et al. (2010). Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. J Hepatol 52, 727-736.

Russo, M.W., Galanko, J.A., Shrestha, R., Fried, M.W., and Watkins, P. (2004). Liver transplantation for acute liver failure from drug induced liver injury in the United States. Liver Transpl 10, 1018-1023.

[0124]

Sébastien Lê, J.J., François Husson (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. Journal of Statistical Software 25.

Serviddio, G., Pereda, J., Pallardo, F.V., Carretero, J., Borras, C., Cutrin, J., Vendemiale, G., Poli, G., Vina, J., and Sastre, J. (2004). Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. Hepatology 39, 711-720.

Sloan, C.A., Chan, E.T., Davidson, J.M., Malladi, V.S., Strattan, J.S., Hitz, B.C., Gabdank, I., Narayanan, A.K., Ho, M., Lee, B.T., et al. (2016). ENCODE data at the ENCODE portal. Nucleic Acids Res 44, D726-732.

Song, W., Lu, Y.C., Frankel, A.S., An, D., Schwartz, R.E., and Ma, M. (2015). Engraftment of human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes in immunocompetent mice via 3D co-aggregation and encapsulation. Sci Rep 5, 16884.

Song, Z., Cai, J., Liu, Y., Zhao, D., Yong, J., Duo, S., Song, X., Guo, Y., Zhao, Y., Qin, H., et al. (2009). Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. Cell Res 19, 1233-1242.

Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. Nature 470, 105-109.

Stevens, J.L., and Baker, T.K. (2009). The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus. Drug Discov Today 14, 162-167.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861-872.

Takebe, T., and Taniguchi, H. (2014). Human iPSC-derived miniature organs: a tool for drug studies. Clin Pharmacol Ther 96, 310-313.

[0125]

Tian, X., Zamek-Gliszczynski, M.J., Zhang, P., and Brouwer, K.L. (2004). Modulation of multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) and Mrp3 expression and function with small interfering RNA in sandwich-cultured rat hepatocytes. Mol Pharmacol 66, 1004-1010.

Tsukada, N., Ackerley, C.A., and Phillips, M.J. (1995). The structure and organization of the bile canalicular cytoskeleton with special reference to actin and actin-binding proteins. Hepatology 21, 1106-1113.

Verma, S., and Kaplowitz, N. (2009). Diagnosis, management and prevention of drug-induced liver injury. Gut 58, 1555-1564.

Vosough, M., Omidinia, E., Kadivar, M., Shokrgozar, M.A., Pournasr, B., Aghdami, N., and Baharvand, H. (2013). Generation of functional hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells in a scalable suspension culture. Stem Cells Dev 22, 2693-2705.

Yang, K., Woodhead, J.L., Watkins, P.B., Howell, B.A., and Brouwer, K.L. (2014). Systems pharmacology modeling predicts delayed presentation and species differences in bile acid-mediated troglitazone hepatotoxicity. Clin Pharmacol Ther 96, 589-598.

Zborowski, J., and Wojtczak, L. (1963). Induction of Swelling of Liver Mitochondria by Fatty Acids of Various Chain Length. Biochim Biophys Acta 70, 596-598.

[0126]

[0127] 모든 백분율 및 비율은 달리 명시되지 않는 한 중량으로 계산된다.

[0128] 모든 백분율 및 비율은 달리 명시되지 않는 한 총 조성물을 기준으로 계산된다.

[0129] 본 명세서 전반에 걸쳐 주어진 모든 최대 수치 제한은, 마치 보다 낮은 수치 제한이 본 명세서에 명시된 것처럼, 모든 보다 낮은 수치 제한을 포함함이 이해될 것이다. 본 명세서 전반에 걸쳐서 주어진 모든 최소 수치 제한은, 마치 보다 높은 수치 제한이 본 명세서에 명시된 것처럼, 모든 높은 수치 제한을 포함할 것이다. 본 명세서 전체에 주어진 모든 수치 범위는, 마치 보다 좁은 수치 범위가 모두 본원에 명시된 것처럼, 보다 넓은 수치 범위 내에 속하는 모든 더 좁은 수치 범위를 포함할 것이다.

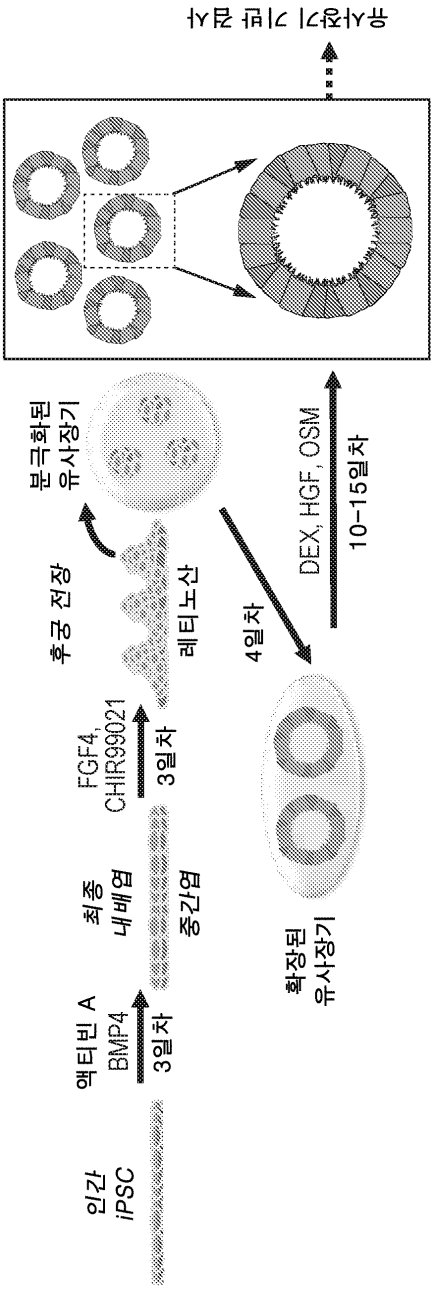
[0130] 본 명세서에 개시된 치수 및 값은 열거된 정확한 수치로 엄격하게 제한되는 것으로 이해되어서는 안된다. 대신, 달리 명시되지 않는 한, 각각의 이러한 치수는 인용된 값과 그 값을 둘러싼 기능적으로 동등한 범위를 모두 의미하는 것이다. 예를 들어, "20㎜"로 개시된 치수는 "약 20mM"를 의미하는 것이다.

[0131] 상호 참조되거나 관련된 특허 또는 출원을 포함하여 여기에 인용 된 모든 문서는, 명시적으로 제외되거나 달리 제한되지 않는 한, 그 전체가 참조로 여기에 통합된다. 어떤 문헌의 인용이 그것이 본원에 개시 또는 청구된 발명에 관한 선행 기술이라거나, 또는 그것이 그 자체로 또는 임의의 다른 참고 문헌과의 임의의 조합으로 그러한 발명을 교시, 제안 또는 공개함을 인정하는 것은 아니다. 또한 이 문서에서 용어의 의미 또는 정의가 참조로 포함된 문서에서 동일한 용어의 의미 또는 정의와 상충한다면, 이 문서의 해당 용어에 지정된 의미 또는 정의가 우선시되어야 한다.

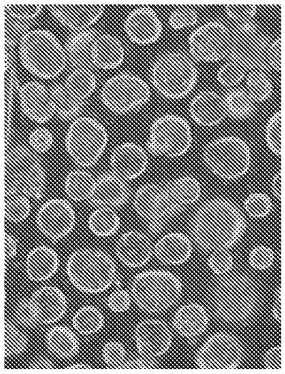
[0132] 본 발명의 특정 구현예가 도시되고 기술되었지만, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 다른 변경 및 수정이 이루어질 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 범위 내에 있는 이러한 모든 변경 및 수정을 첨부된 청구 범위에 포함하고자 한다.

도면

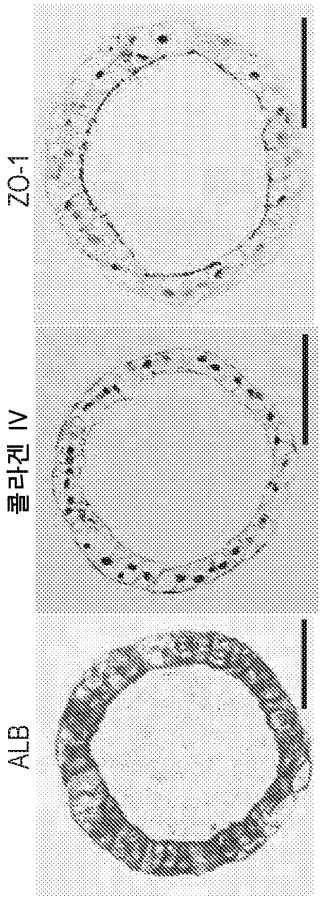
도면1a


유사장기 기반 검사
분극화된 유사장기
후궁 전장
레티노산
FGF4, CHIR99021
3일차
최종 내배엽
중간엽
액티빈 A BMP4
3일차
인간 iPSC
4일차
DEX, HGF, OSM
10-15일차
확장된 유사장기

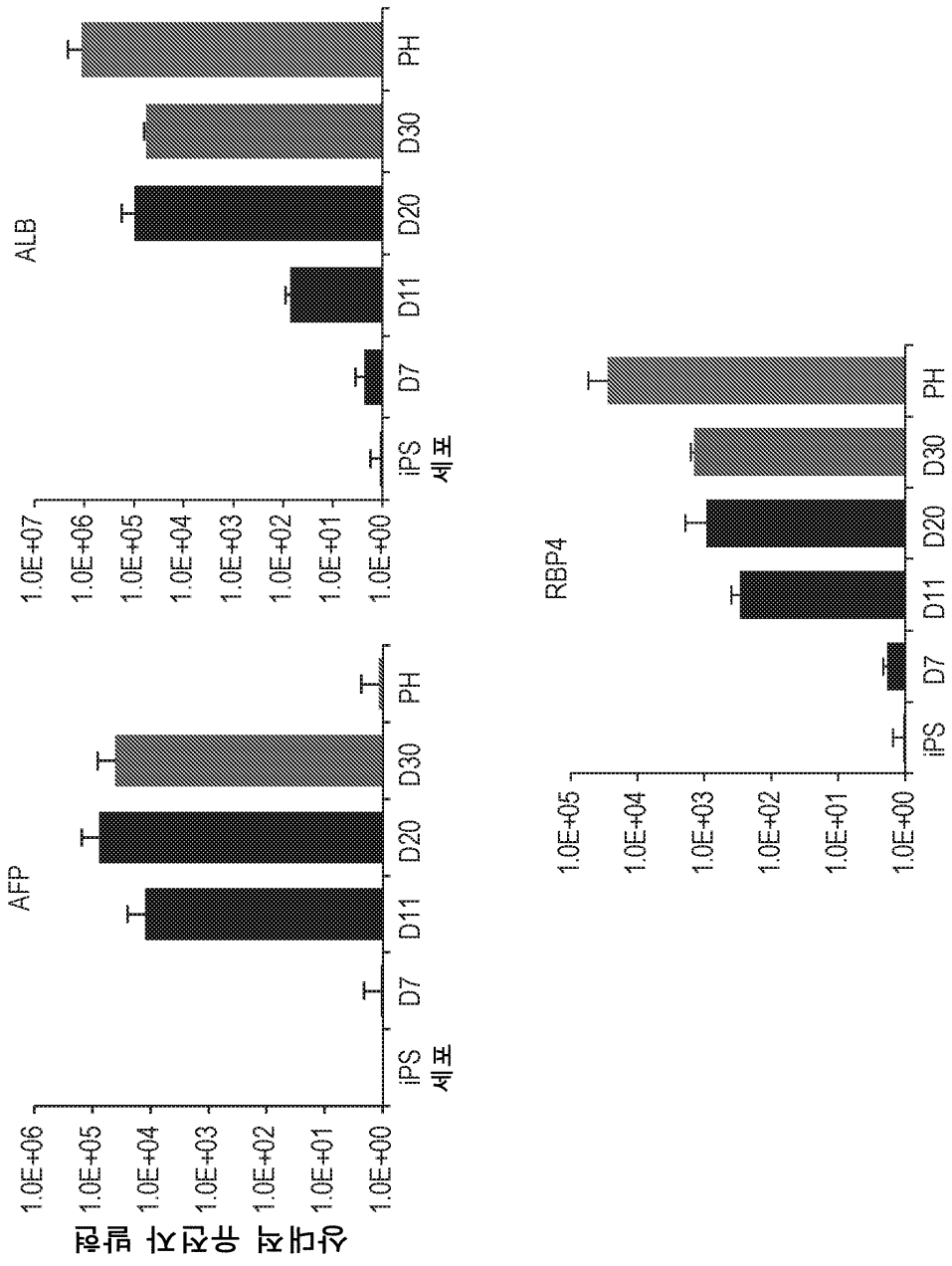
도면1b



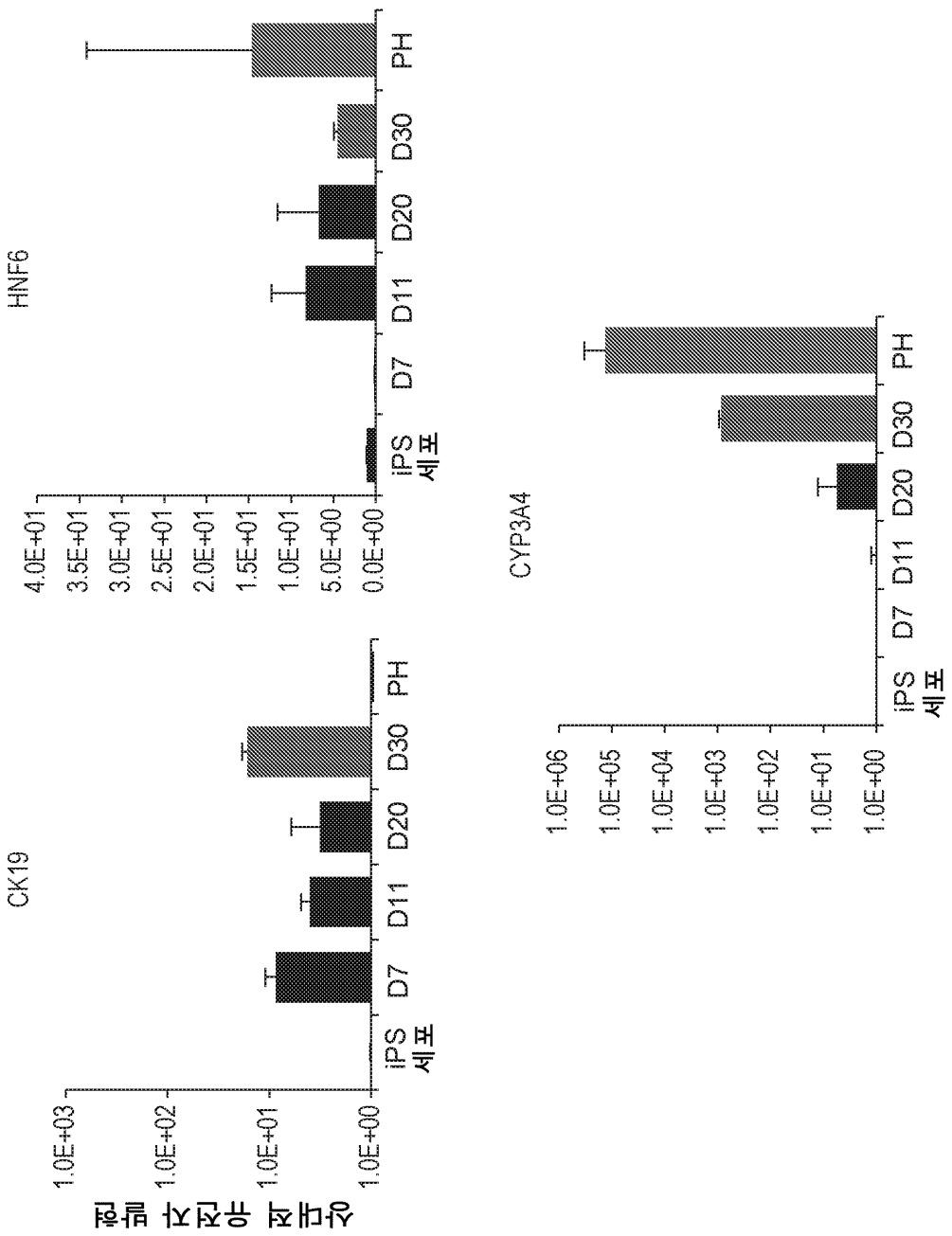
도면1c



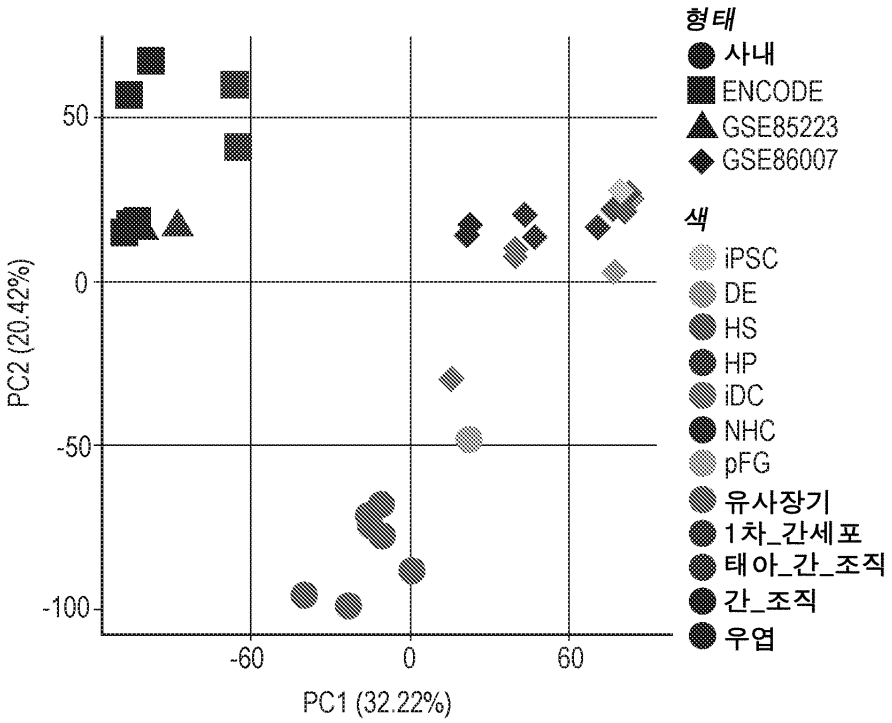
도면1d


AFP
ALB
RBP4
상대적 유전자 발현
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
1.0E+07
iPS
D7
D11
D20
D30
PH
세포

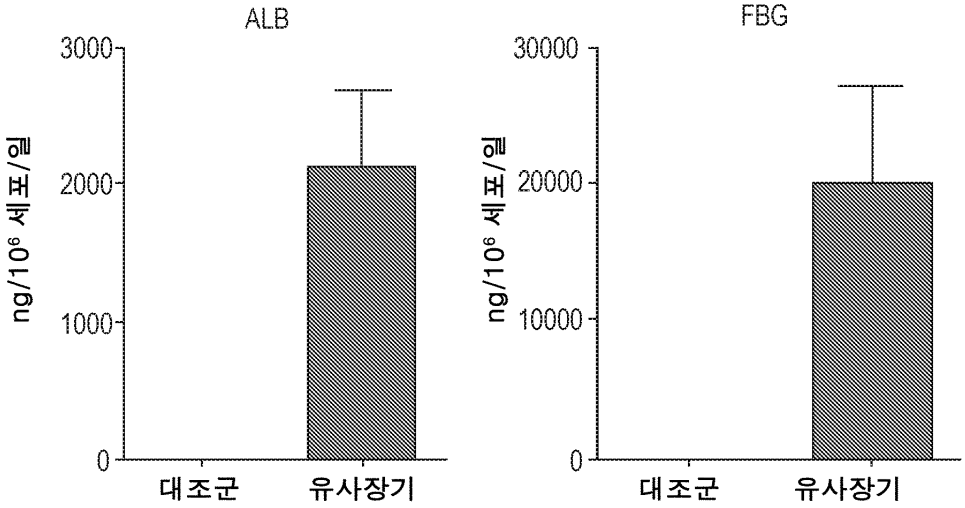
도면1e


CK19
HNF6
CYP3A4
상대적 유전자 발현
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
4.0E+01
3.5E+01
3.0E+01
2.5E+01
2.0E+01
1.5E+01
1.0E+01
5.0E+00
0.0E+00
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
iPS
D7
D11
D20
D30
PH
세포

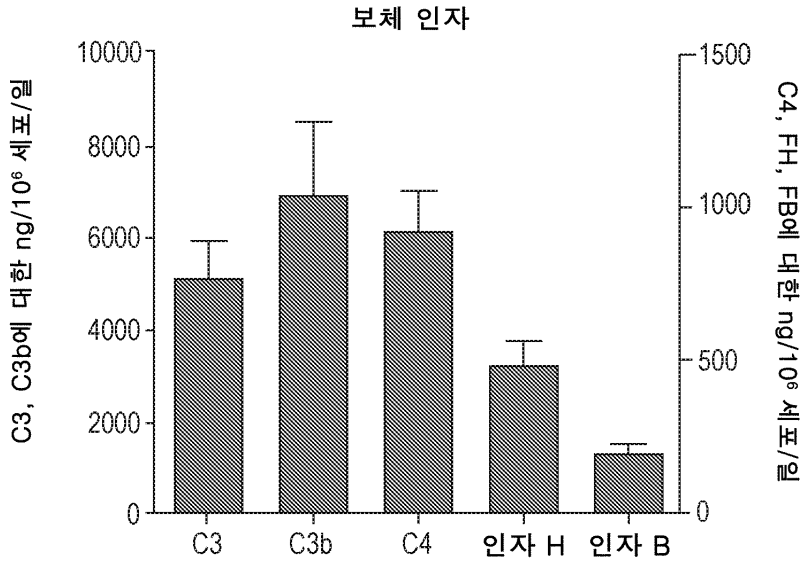
도면1f


형태
사내
ENCODE
GSE85223
GSE86007
색
iPSC
DE
HS
HP
iDC
NHC
pFG
유사장기
1차_간세포
태아_간_조직
간_조직
우엽
PC2 (20.42%)
PC1 (32.22%)
50
0
-50
-100
-60
0
60

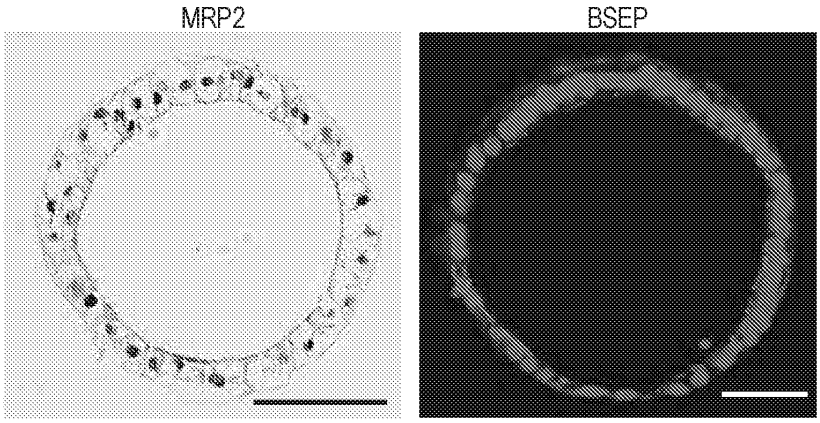
도면1g


ALB
FBG
ng/10⁶ 세포/일
3000
2000
1000
0
30000
20000
10000
대조군
유사장기

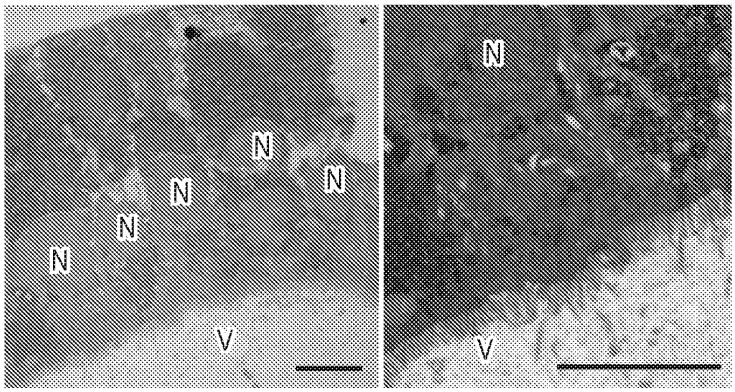
도면1h



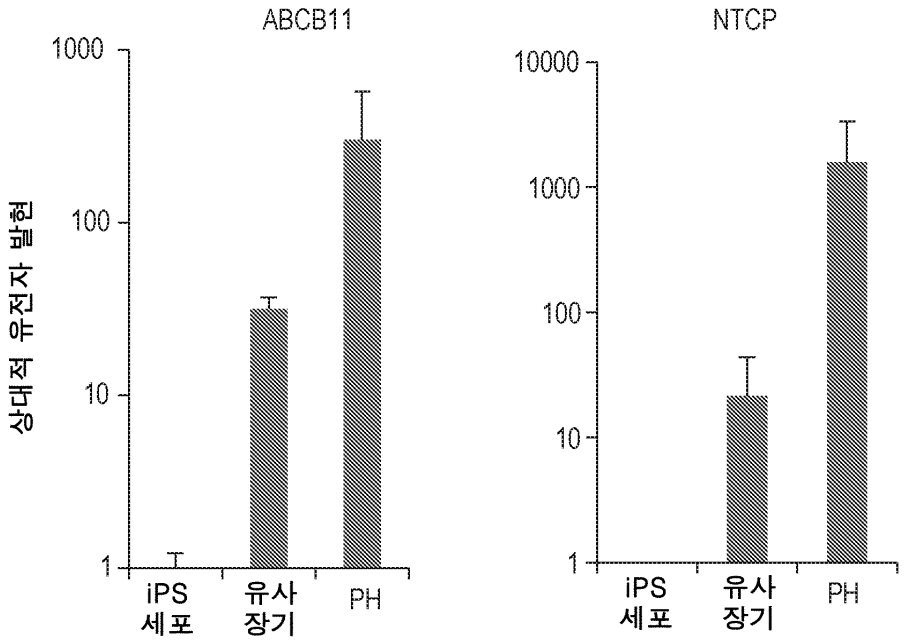
도면2a



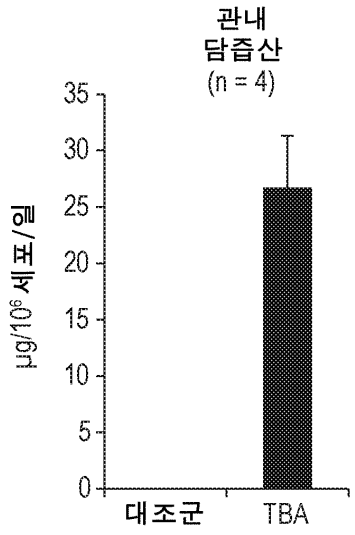
도면2b



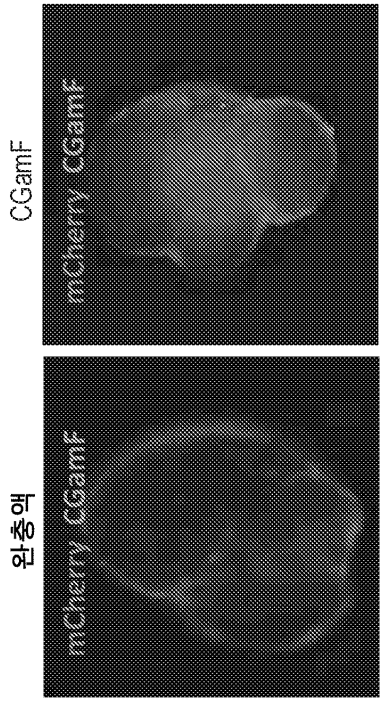
도면2c


ABCB11
NTCP
상대적 유전자 발현
1000
100
10
1
10000
1000
100
10
1
iPS 세포
유사 장기
PH
iPS 세포
유사 장기
PH

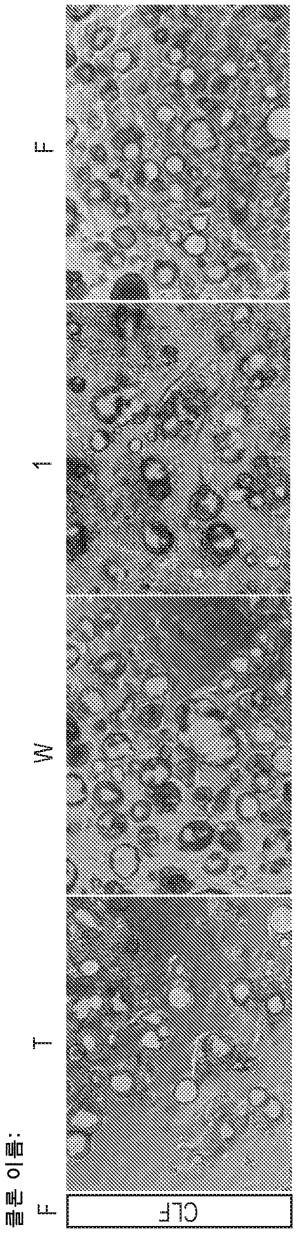
도면2d


관내 담즙산 (n = 4)
μg/10⁶ 세포/일
35
30
25
20
15
10
5
0
대조군
TBA

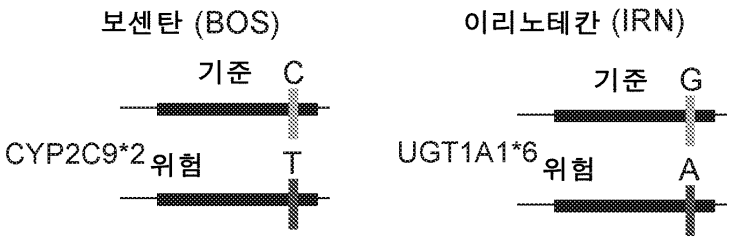
도면2e



도면2f

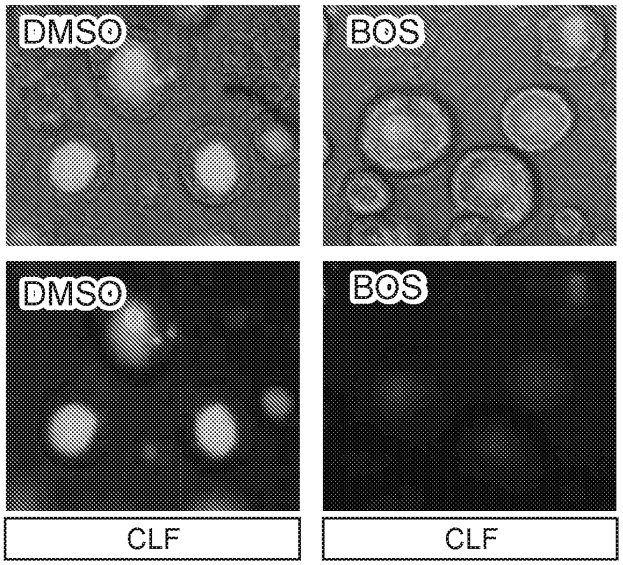


도면3a

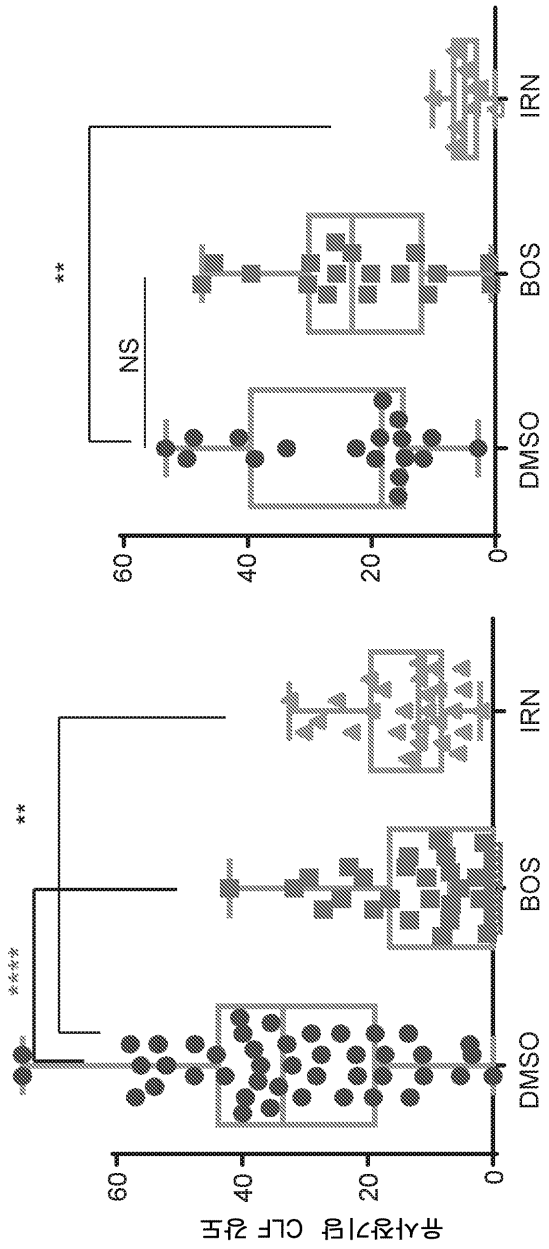


약물	보센탄		이리노테칸	
유전자	CYP2C9*2		UGT1A1*6	
rs ID	rs96702047		rs4148323	
클론 이름	C/C	C/T	G/G	G/A
TkDA	1	1	1	0
H	1	0	1	0
1	1	0	1	0
F	1	0	1	0

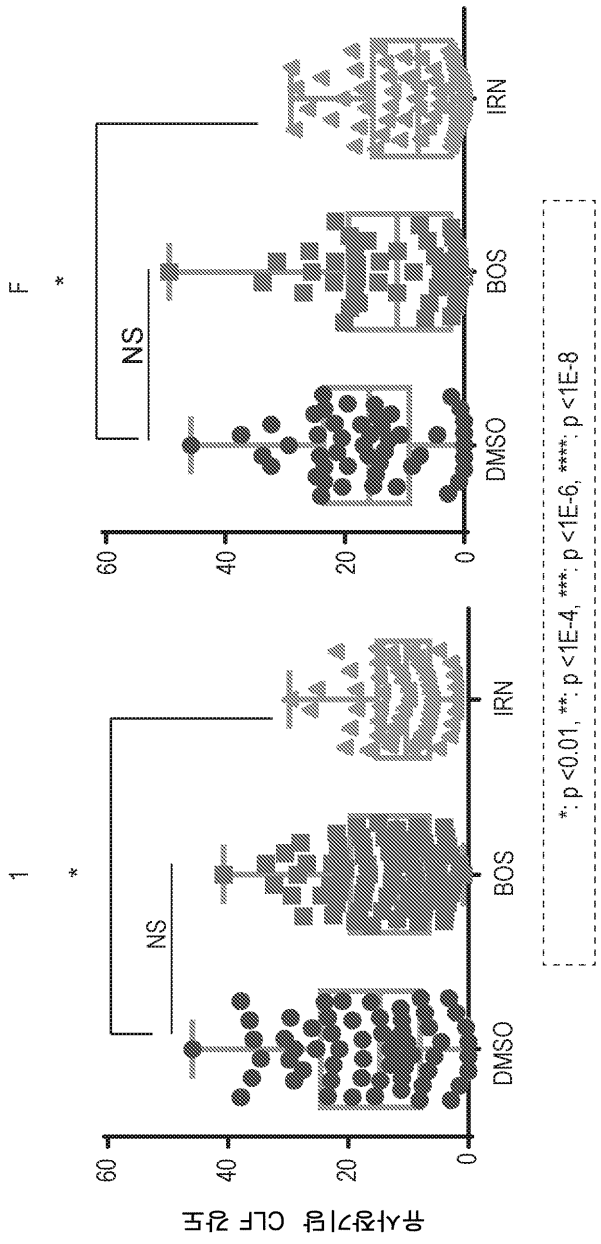
도면3b



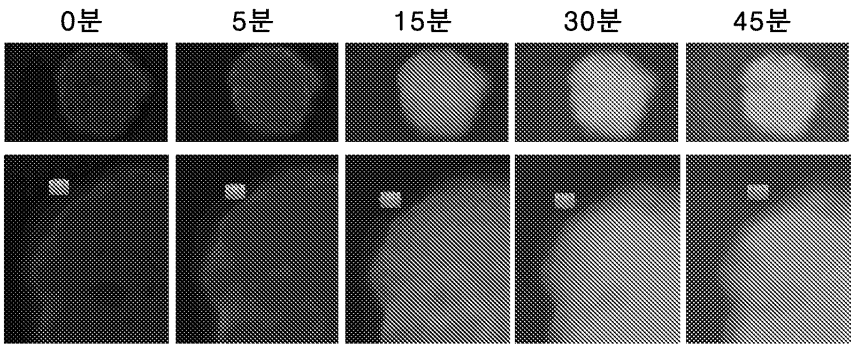
도면3c



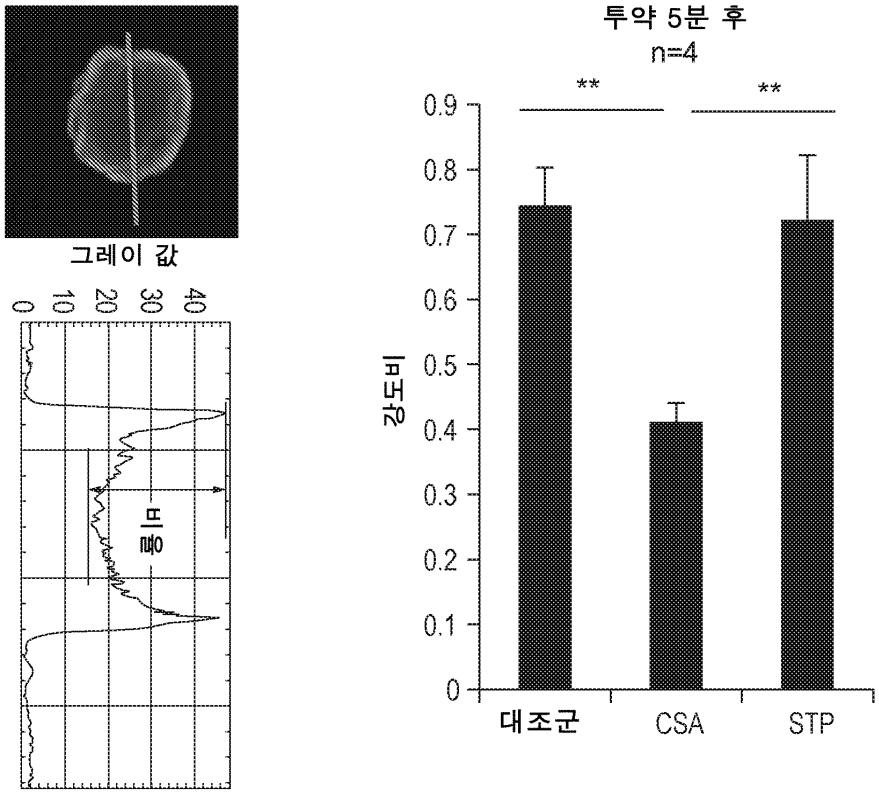
도면3d


유사장기당 CLF 강도
60
40
20
0
DMSO
BOS
IRN
NS
*
1
F
*: p <0.01, **: p <1E-4, ***: p <1E-6, ****: p <1E-8

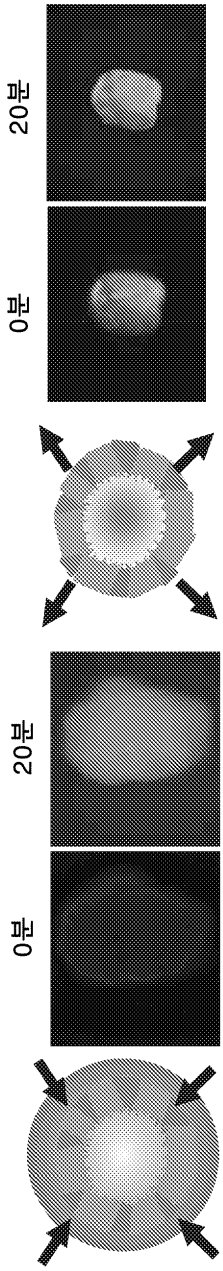
도면4a


0분
5분
15분
30분
45분

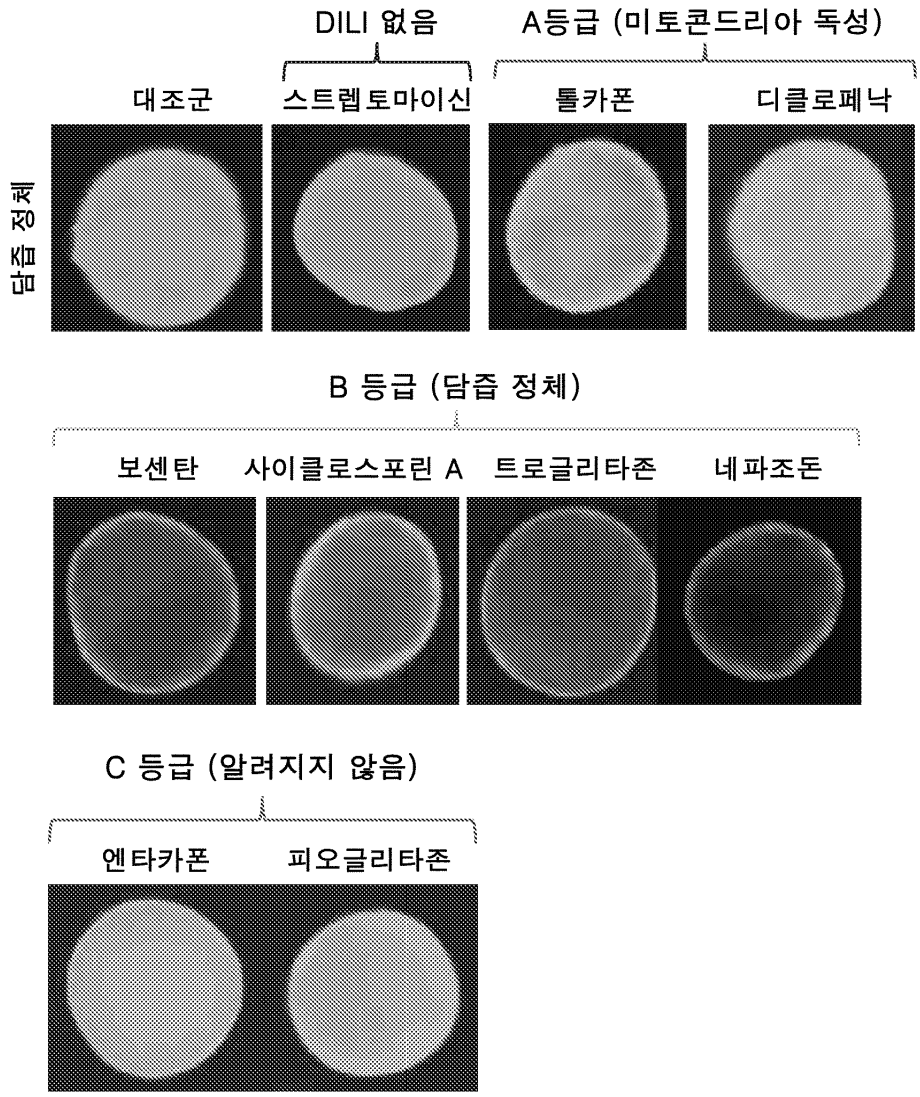
도면4b


그레이 값
0
10
20
30
40
폭
투약 5분 후
n=4
**
**
강도비
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
대조군
CSA
STP

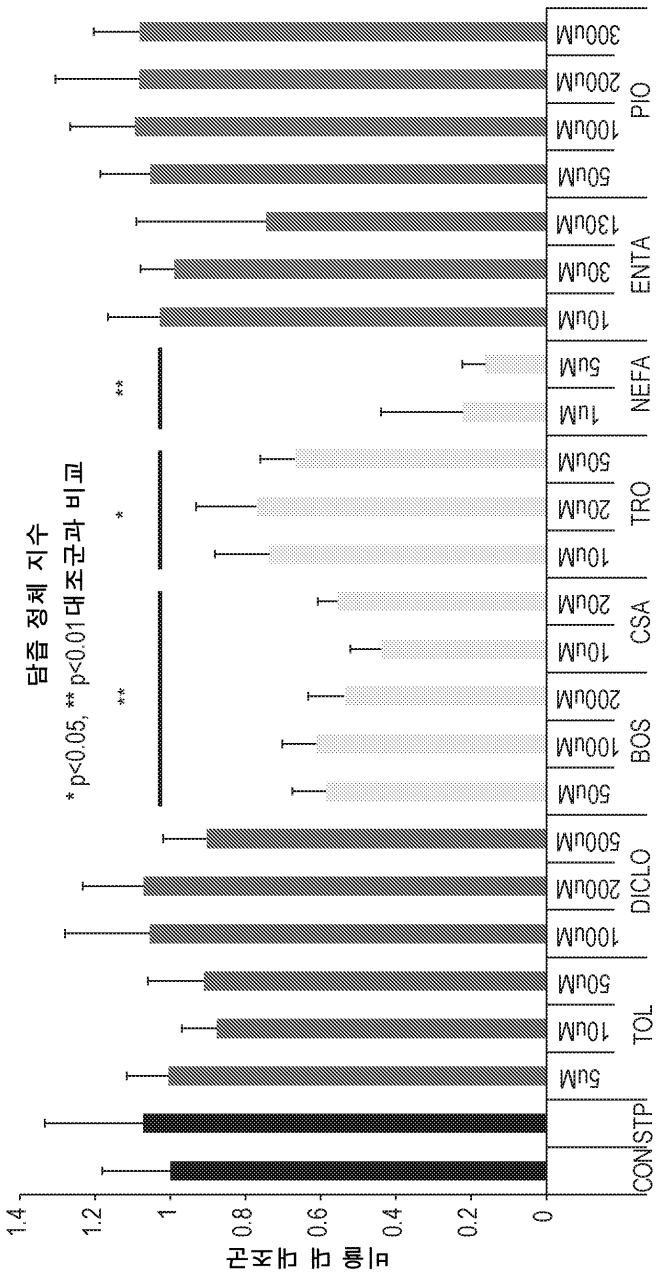
도면4c



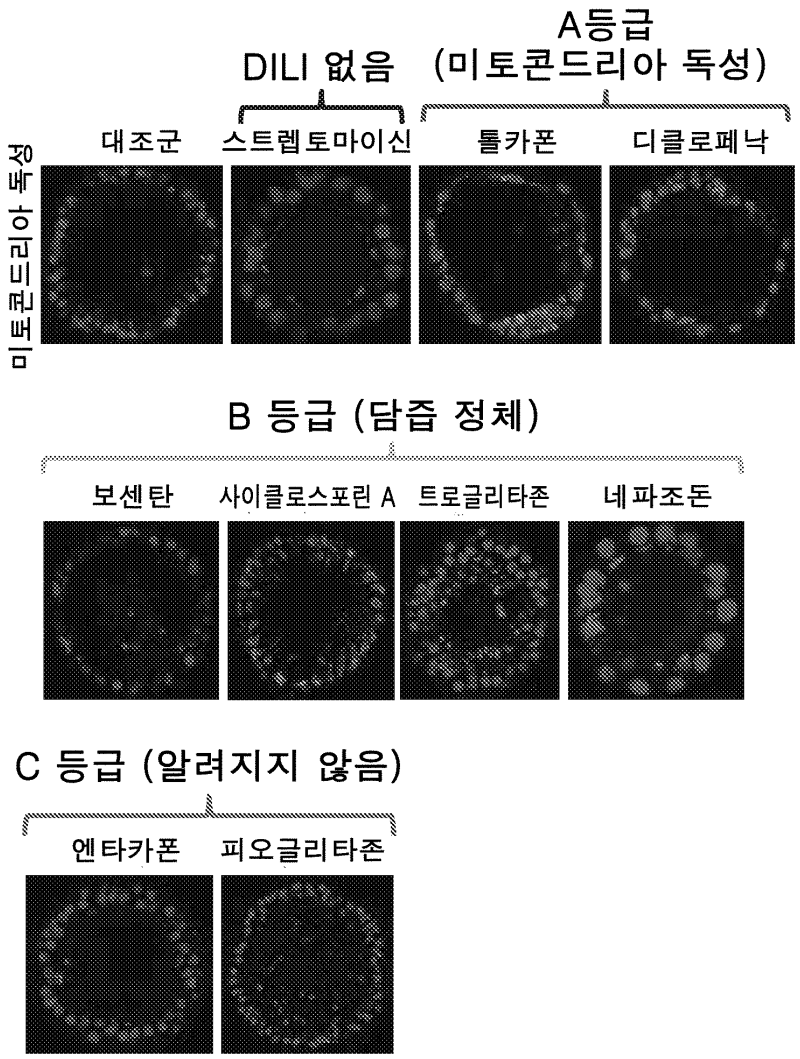
도면4d


DILI 없음
A등급 (미토콘드리아 독성)
대조군
스트렙토마이신
톨카폰
디클로페낙
담즙 정체
B 등급 (담즙 정체)
보센탄
사이클로스포린 A
트로글리타존
네파조돈
C 등급 (알려지지 않음)
엔타카폰
피오글리타존

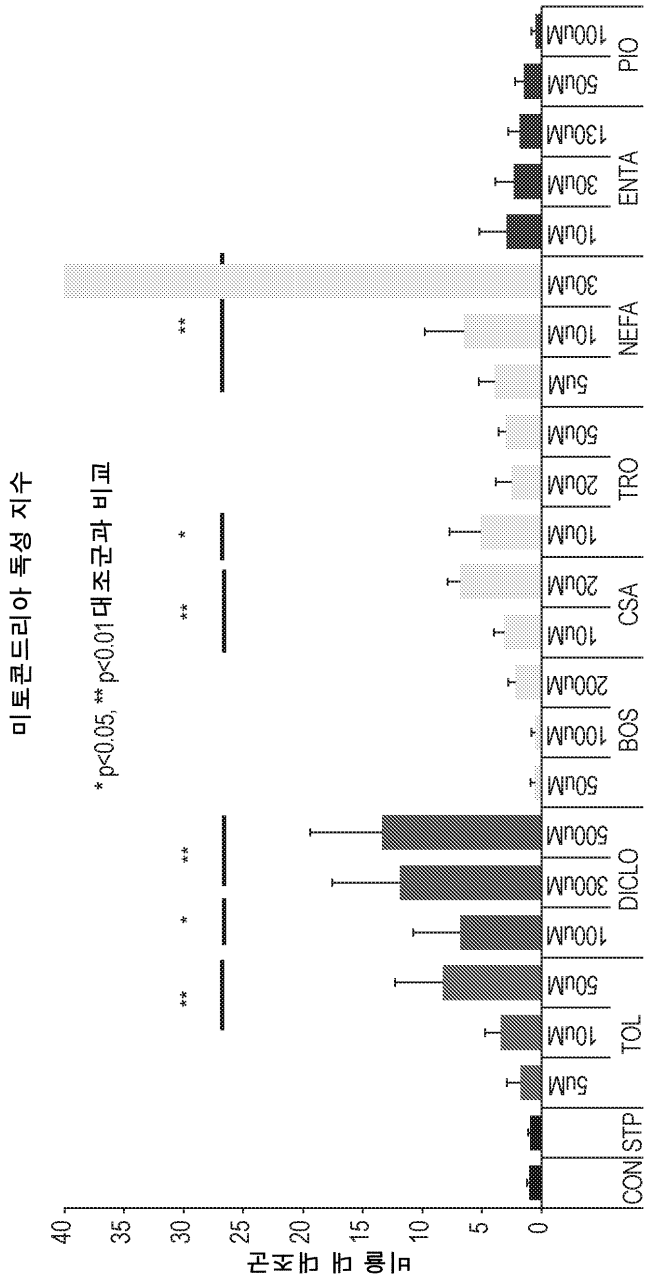
도면4e


담즙 정체 지수
* p<0.05, ** p<0.01대조군과 비교
비율 대 대조군
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
CON
STPI
5uM
10uM
50uM
TOL
100uM
200uM
500uM
DICLO
50uM
100uM
200uM
BOS
10uM
20uM
CSA
10uM
20uM
50uM
TRO
1uM
5uM
NEFA
10uM
30uM
130uM
ENTA
50uM
100uM
200uM
300uM
PIO
**
*
**

도면5a


A등급
DILI 없음
(미토콘드리아 독성)
대조군
스트렙토마이신
톨카폰
디클로페낙
미토콘드리아 독성
B 등급 (담즙 정체)
보센탄
사이클로스포린 A
트로글리타존
네파조돈
C 등급 (알려지지 않음)
엔타카폰
피오글리타존

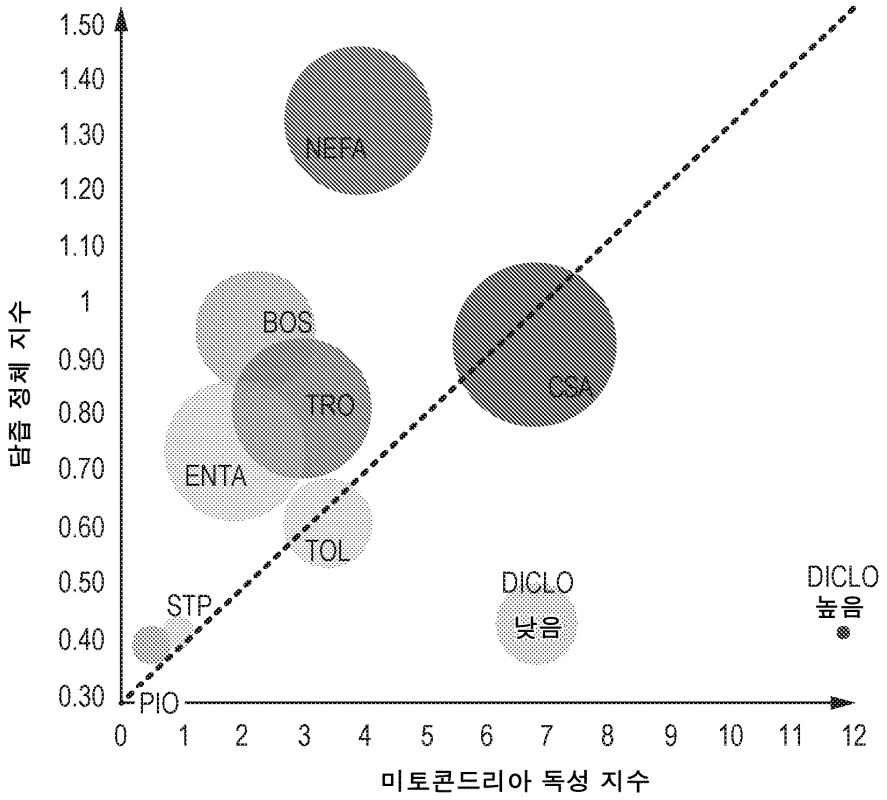
도면5b


미토콘드리아 독성 지수
* p<0.05, ** p<0.01 대조군과 비교
세포 내 ROS 농도
0
5
10
15
20
25
30
35
40
CON
STP
5uM
10uM
TOL
50uM
100uM
300uM
DICLO
500uM
50uM
100uM
BOS
200uM
10uM
20uM
CSA
10uM
20uM
TRO
50uM
5uM
10uM
NEFA
30uM
10uM
30uM
ENTA
130uM
50uM
100uM
PIO

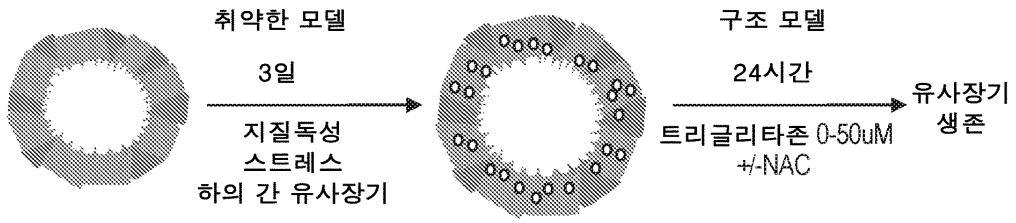
도면5c

등급	화합물	독성 기전
대조군	DMSO	
음성 대조군	스트렙토마이신	
A 등급	디클로페낙	반응성 대사물질; 산화 스트레스; 미토콘드리아 독성; 염증성 면역반응
	톨카폰	미토콘드리아 독성
B 등급	사이클로스포린 A	담즙 정체(담즙산 수송 억제; BSEP 억제); 산화 스트레스; 미토콘드리아 독성
	트로글리타존	담즙 정체(담즙산 수송 억제; BSEP 억제); 미토콘드리아 독성; 반응성 대사물질; 산화 스트레스
	네파조돈	반응성 대사물질; 미토콘드리아 독성; 담즙 정체 (담즙산 수송 억제, BSEP 억제)
	보센탄	담즙 정체, BSEP 억제
C 등급	엔타카폰	(알려지지 않음)/적용 불가
	피오글리타존	(알려지지 않음)/적용 불가

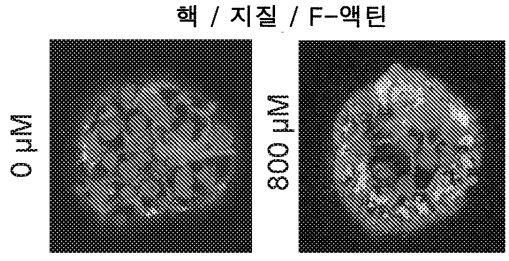
도면5d



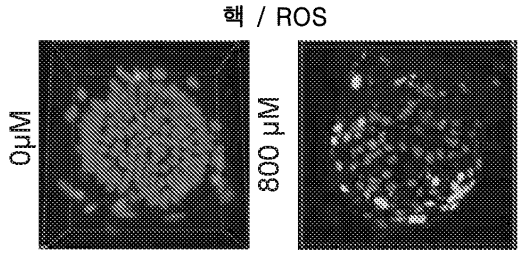
도면6a



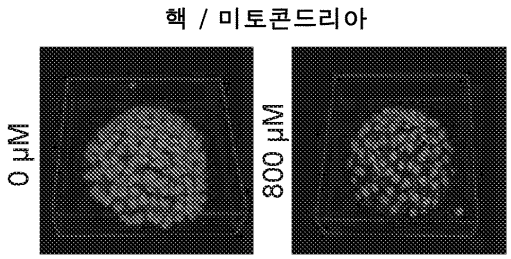
도면6b



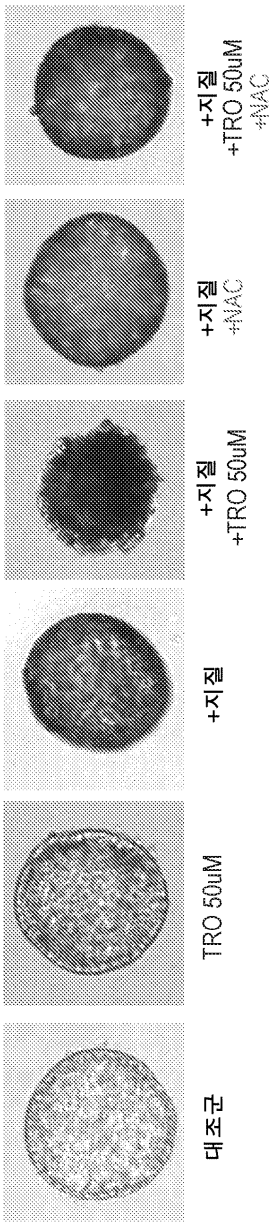
도면6c



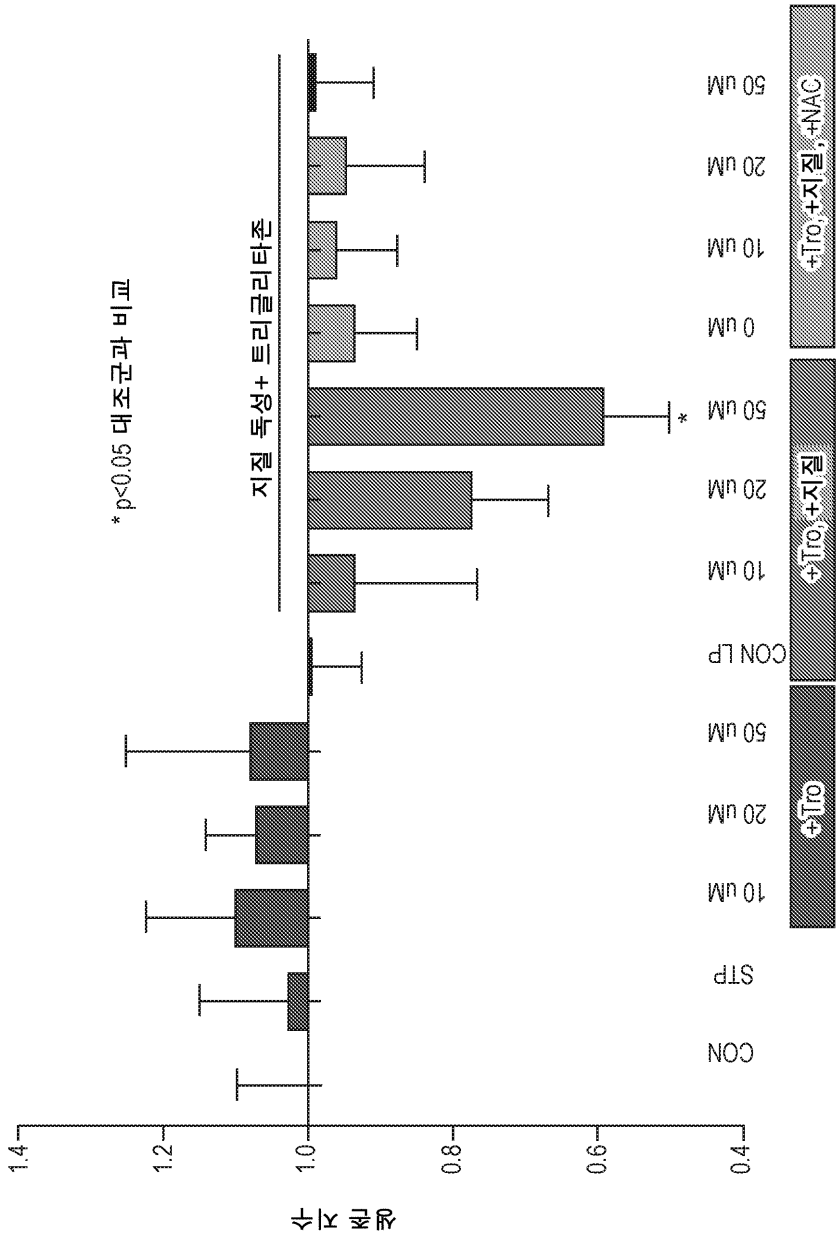
도면6d



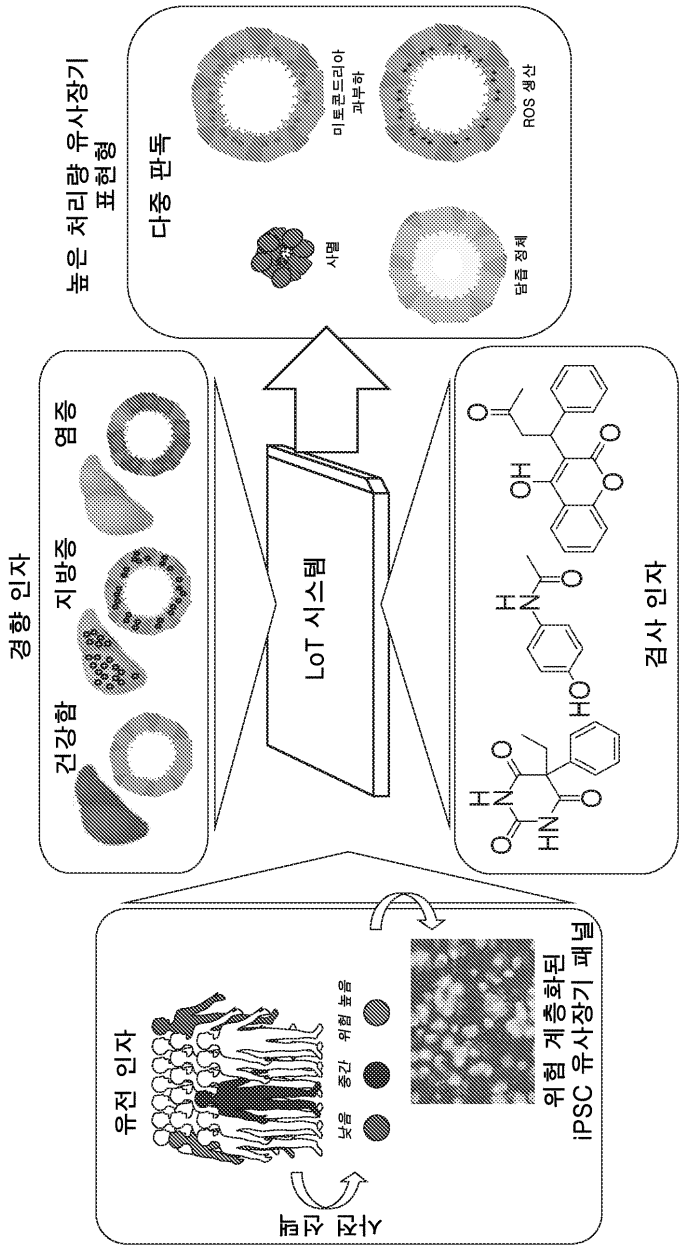
도면6e



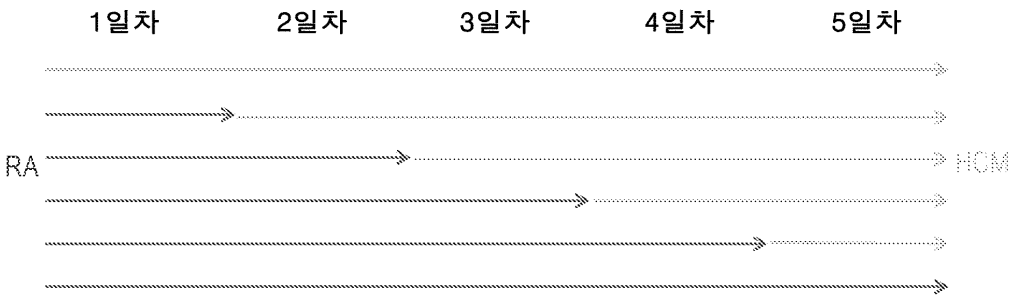
도면6f


생존 지수
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
CON
STP
10 uM
20 uM
50 uM
+Tro
CON LP
10 uM
20 uM
50 uM
+Tro,+지질
0 uM
10 uM
20 uM
50 uM
+Tro,+지질,+NAC
*
지질 독성+ 트리글리타존
* p<0.05 대조군과 비교

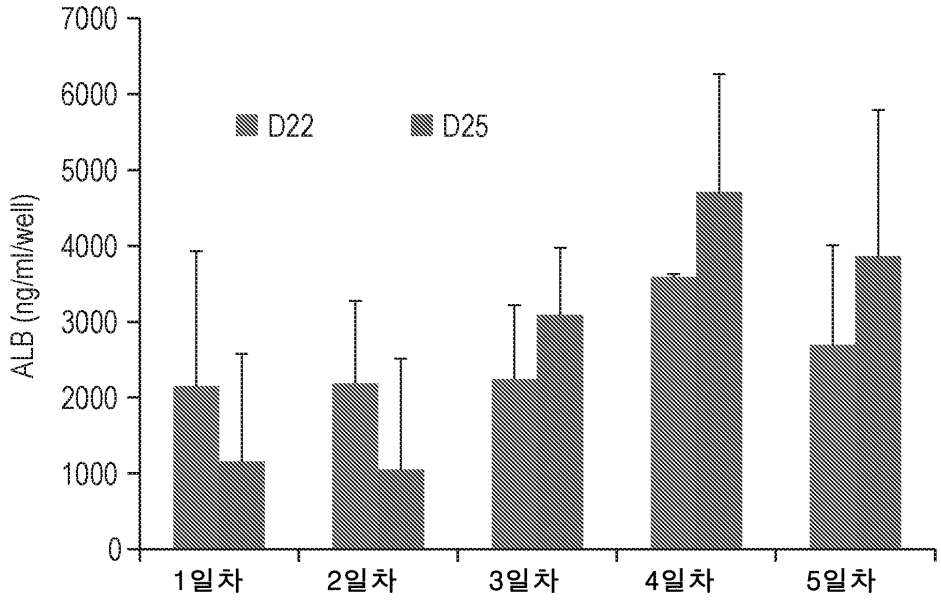
도면7


높은 처리량 유사장기
표현형
다중 판독
미토콘드리아
과부하
ROS 생산
사멸
담즙 정체
경향 인자
염증
지방증
건강함
LoT 시스템
검사 인자
유전 인자
낮음 중간 위험 높음
위험 계층화된
iPSC 유사장기 패널
시판 검사

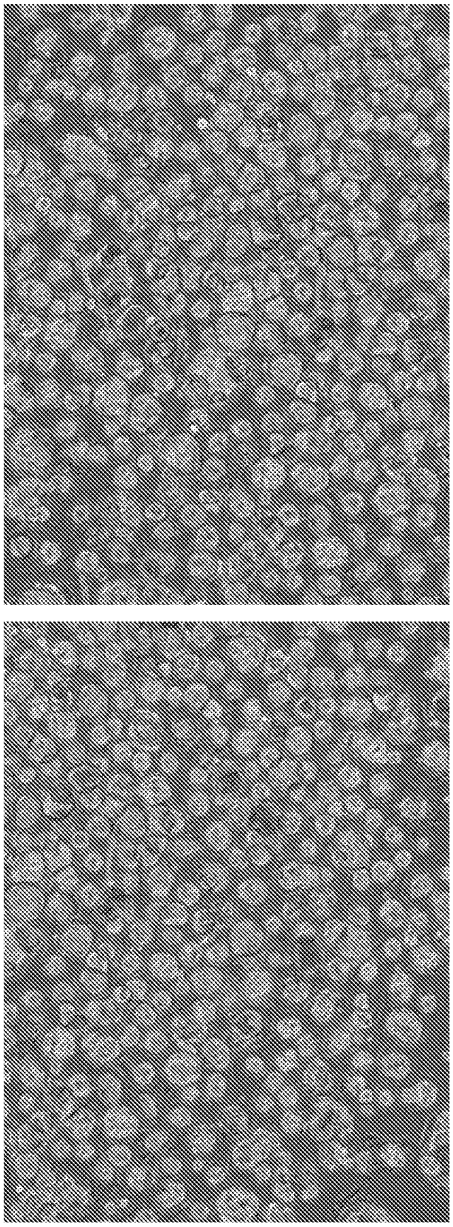
도면8a


1일차
2일차
3일차
4일차
5일차
RA
HCM

도면8b

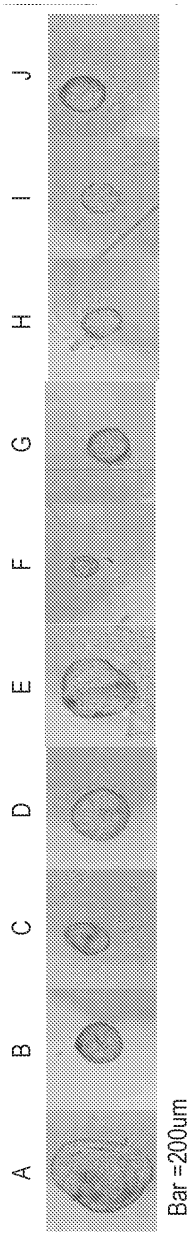

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
ALB (ng/ml/well)
D22
D25
1일차
2일차
3일차
4일차
5일차

도면9

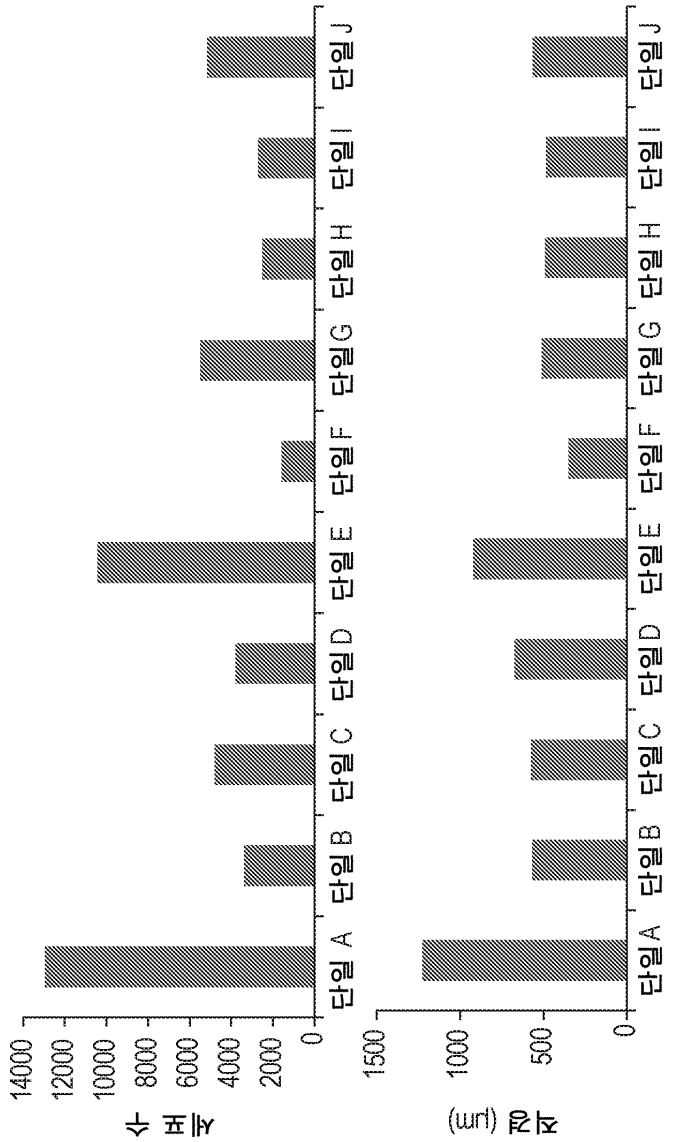


220일차 유사장기의 총 개수는 305이었다. 내강이 있는 유사장기의 총 개수: 216,
내강이 없는 유사장기의 총 개수: 89.

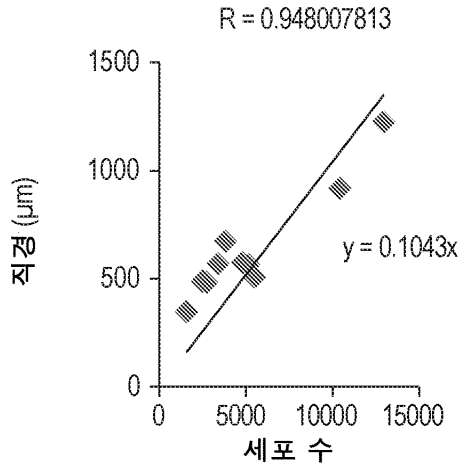
도면10a



도면10b

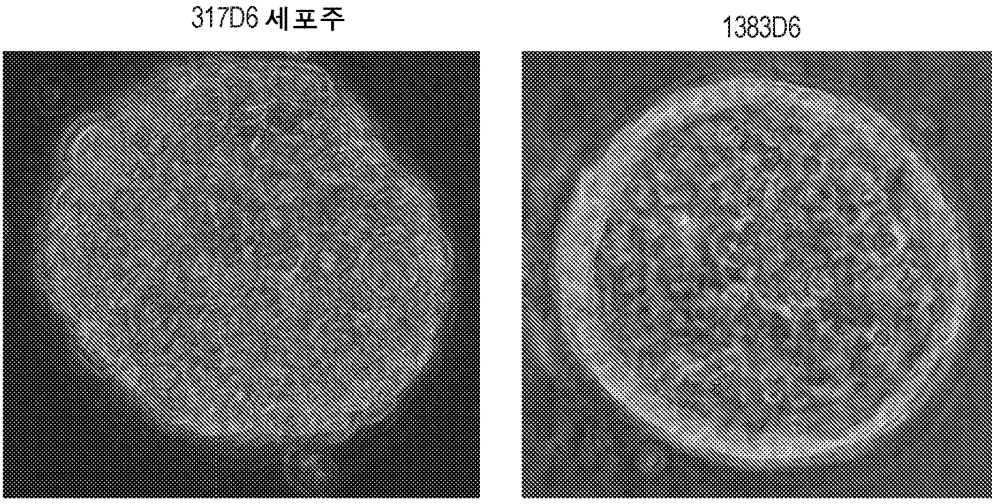

세포 수
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
단일 A
단일 B
단일 C
단일 D
단일 E
단일 F
단일 G
단일 H
단일 I
단일 J
직경 (μm)
1500
1000
500
0
단일 A
단일 B
단일 C
단일 D
단일 E
단일 F
단일 G
단일 H
단일 I
단일 J

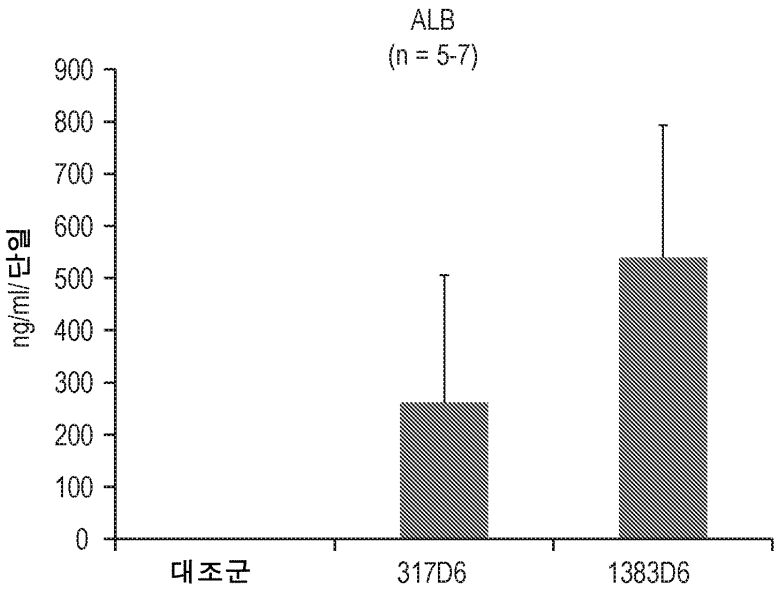
도면10c



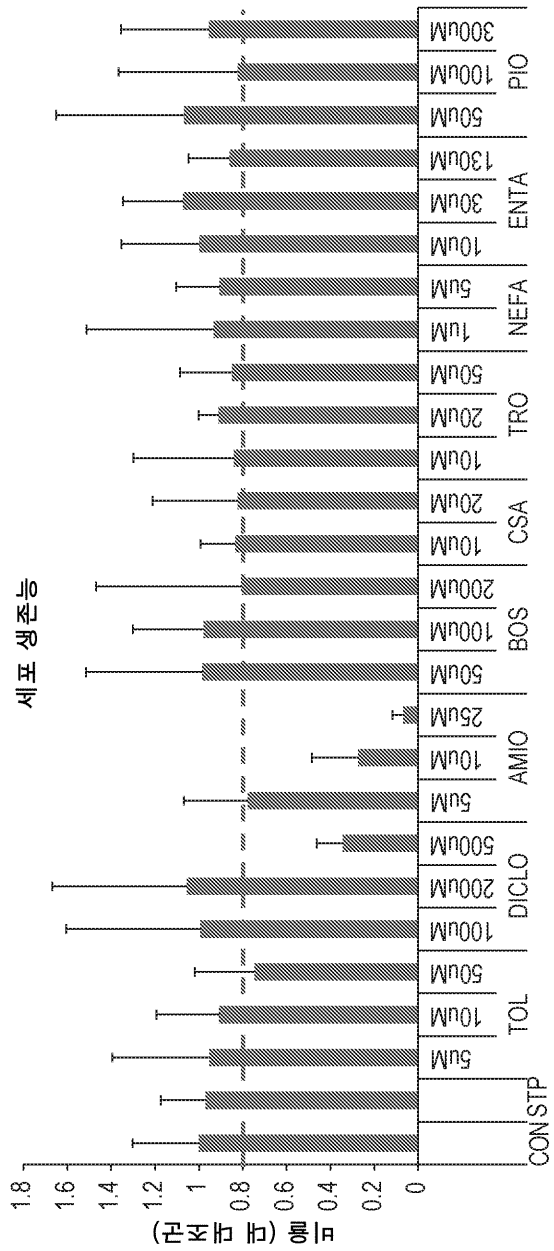
보정 방정식	Y = 0.1043x

도면11

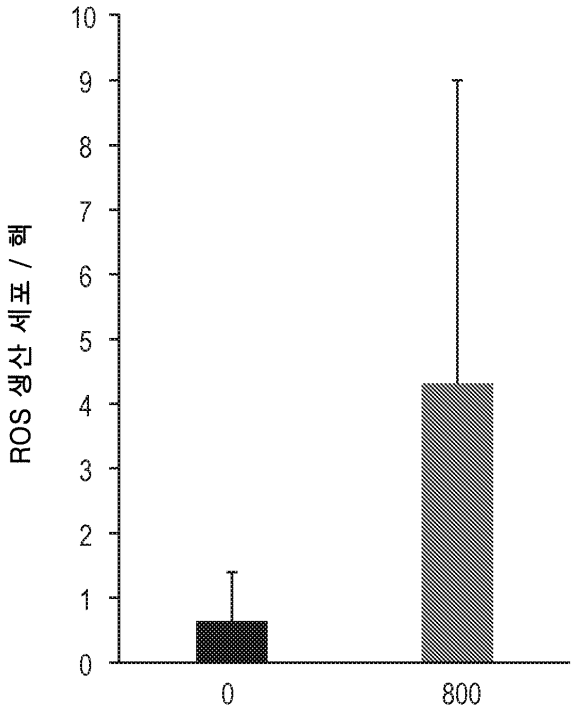

317D6 세포주
1383D6


ALB
(n = 5-7)
ng/ml/단일
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
대조군
317D6
1383D6

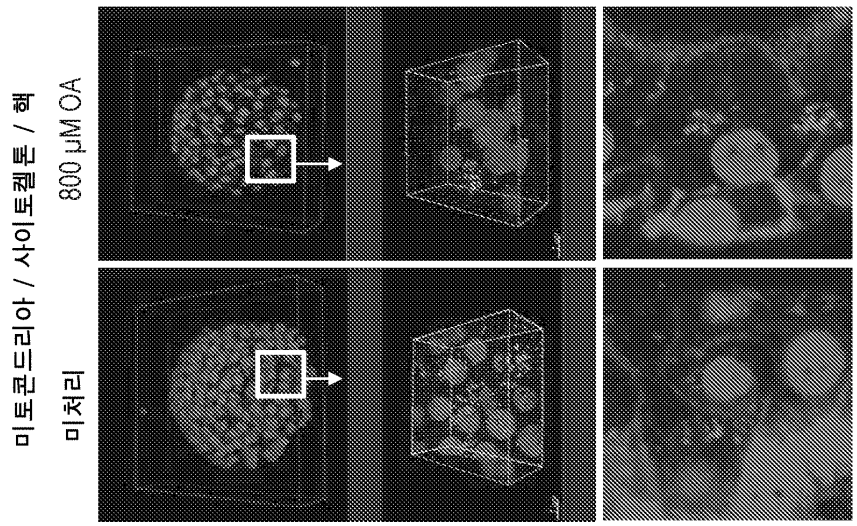
도면12


세포 생존율
비율 (대 대조군)
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
CON
STP
5uM
10uM
50uM
TOL
100uM
200uM
500uM
DICLO
5uM
10uM
25uM
AMIO
50uM
100uM
200uM
BOS
10uM
20uM
CSA
10uM
20uM
TRO
50uM
1uM
5uM
NEFA
10uM
30uM
130uM
ENTA
50uM
100uM
300uM
PIO

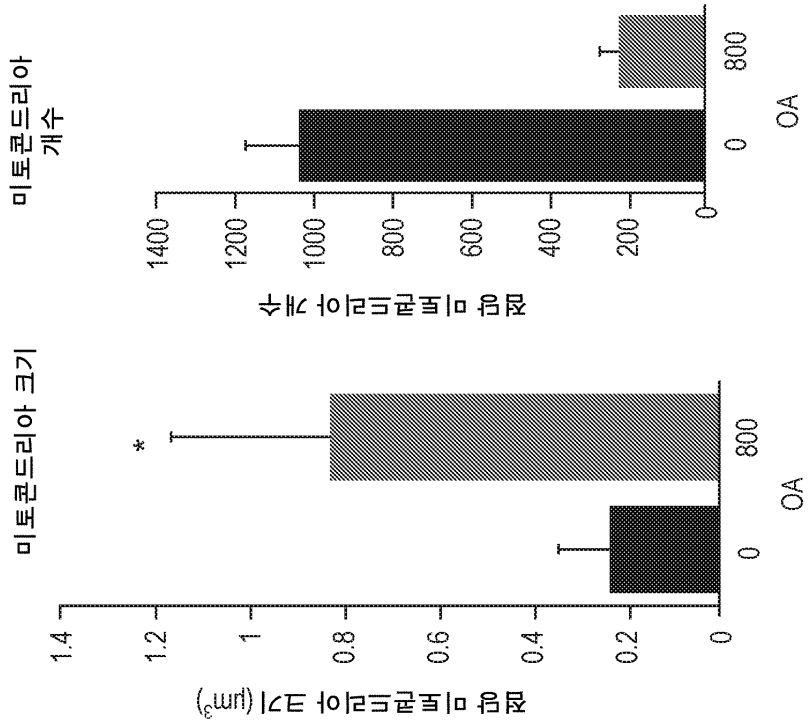
도면13a



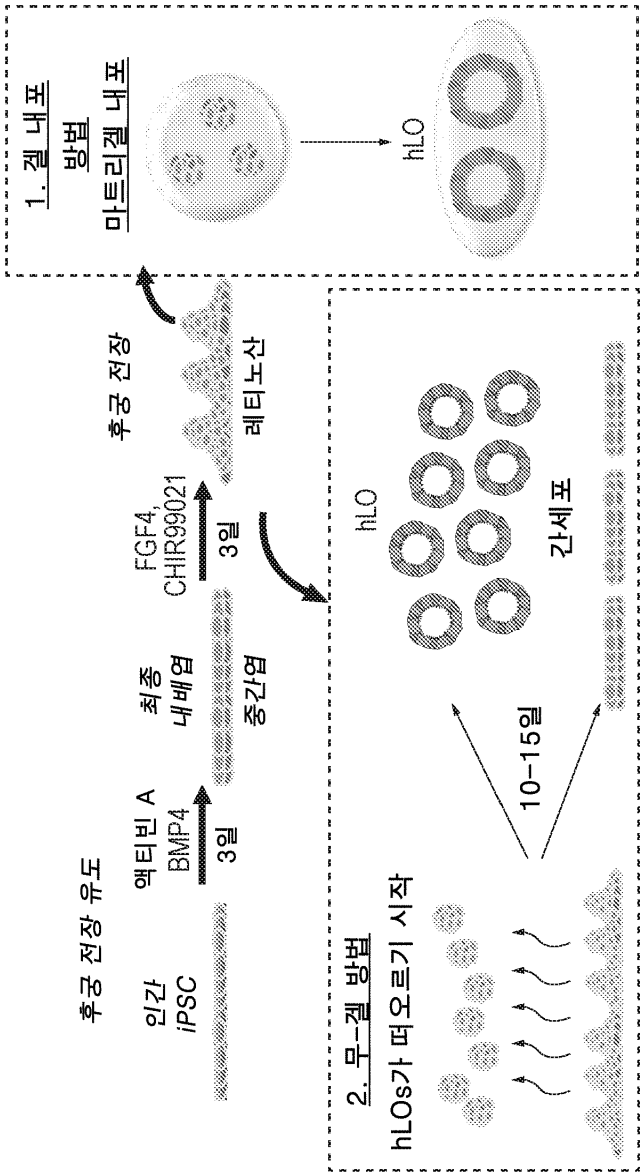
도면13b



도면13c


미토콘드리아
개수
정당 미토콘드리아 개수
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
800
OA
미토콘드리아 크기
정당 미토콘드리아 크기 (μm³)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
0
800
OA

도면14


1. 겔 내포
방법
마트리겔 내포
hLO
후궁 전장
레티노산
3일
FGF4,
CHIR99021
최종
내배엽
중간엽
3일
액티빈 A
BMP4
후궁 전장 유도
인간
iPSC
2. 무-겔 방법
hLOs가 떠오르기 시작
10-15일
간세포
hLO