

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 6월 25일 (25.06.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/130713 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/071 (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/018219

(22) 국제출원일: 2019년 12월 20일 (20.12.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0166267 2018년 12월 20일 (20.12.2018) KR

(71) 출원인: 한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 김은미 (KIM, Eun-Mi); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 김기석 (KIM, Ki-Suk); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 이향애 (LEE, Hyang-Ae); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).

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

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

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

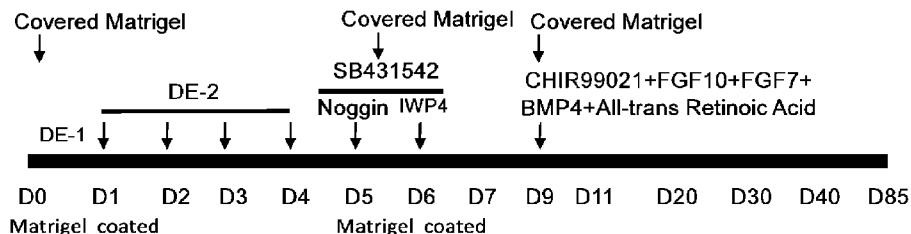
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR FABRICATION OF THREE-DIMENSIONAL LUNG ORGANOID COMPRISING HUMAN STEM CELL-DERIVED ALVEOLAR MACROPHAGE

(54) 발명의 명칭: 인간 줄기세포 유래 폐포 대식세포를 포함하는 3차원 폐 오가노이드의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for fabrication of a three-dimensional lung organoid comprising human stem cell-derived alveolar macrophages. Specifically, a lung organoid is fabricated by co-culturing cells not expressing the definitive endoderm marker CRCX4 according to a fabrication method of the present disclosure. The lung organoid comprises type 1 and type 2 alveolar epithelial cells as well as alveolar macrophages and realizes infectious or inflammatory responses unlike conventional lung organoids that contain no immune cells and as such, can be advantageously used in studying mechanisms of related lung diseases, excavating biomarkers, developing therapeutic agents, and so on.

(57) 요약서: 본 발명은 인간 줄기세포 유래 폐포 대식세포를 포함하는 3차원 폐 오가노이드의 제조방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 완전 내배엽 세포의 마커인 CRCX4를 발현하지 않는 세포를 함께 분화시켜, 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 폐 오가노이드는 제1형 및 제2형 폐포 상피세포를 포함하는 동시에 폐포 대식세포를 포함하므로, 기존의 면역세포를 포함하지 못하는 폐 오가노이드와 달리 감염 또는 염증 반응을 구현하여 관련 폐 질환의 기전 연구, 바이오마커 발굴, 치료제 개발 등에 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2020/130713 A1

명세서

발명의 명칭: 인간 줄기세포 유래 폐포 대식세포를 포함하는 3차원 폐 오가노이드의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 인간 줄기세포 유래 폐포 대식세포를 포함하는 3차원 폐 오가노이드의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 최근 미세먼지가 국민이 안전과 건강을 위협하는 중요한 환경 현안으로 떠오른 가운데 지속적으로 미세먼지 오염도가 증가되고 있는 추세이며, 그 체감 수치는 더욱 높아지고 있다. 미세먼지는 입자크기에 따라 지름이 10 μm 이하인 경우 PM10, 5 μm 이하인 경우 PM5, 2.5 μm 이하인 경우 PM2.5, 1 μm 이하인 경우 PM1로 구분되며, 지름이 2.5 μm 이하인 경우를 '초미세먼지'라고 부른다. 최근 연구에 따르면 미세먼지에 노출시킨 랫드 모델에서 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD), 폐 염증, 폐기종(emphysema), 기도 개형(airway remodeling) 등이 보고되었으며, 특히 초미세먼지에 장기간 노출된 사람의 폐기능이 감소되었음을 규명한 연구가 계속적으로 보고되어 왔다(Fang He *et al.*, Scientific Report, 7: 45666, 2017; Mary B. Rice *et al.*, All AJRCCM, 191(6): 656-664, 2015; Zwozdziak *et al.*, Environ Sci Pollut Res Int, 23(23): 23892-23901, 2016; 및 Yu-Fei Xing *et al.*, J Thorac Dis, 1: E69-E74, 2016). 현재 미세먼지에 대한 측정장비 개발, 필터 개발 및 미세먼지 저감 기술에 대한 연구가 진행되어 오고 있으나, 미세먼지의 인체 위해성 평가법 개발 및 병리 기전에 대한 연구가 부족한 실정이다.
- [4] 또한, 2000년대 초반부터 피해 사례가 보고되기 시작하여 2012년 이후 사용이 금지된 가습기 살균제는 원인미상의 폐 손상 질환을 유발하는 것으로 보고되었다. 질병관리본부의 역학 조사 결과, 가습기 살균제에 의한 원인미상의 중증 폐 질환 환자들은 병리 소견상 괴사성 세기관지염, 급격히 진행되는 불응성 저산소증, 스테로이드 및 면역억제제에 대한 무반응 등의 특성을 나타내는 것으로 확인되었다. 상기와 같은 중증 폐 질환 소견이 발견되지 않은 낮은 단계의 피해자들 또한 약 4,800명이 넘는 것으로 확인되었으며, 아직까지도 많은 환자들이 가습기 살균제 피해로 고통받고 있다고 보고되고 있다. 그러나, 가습기 살균제 피해자들에게서 나타난 폐섬유화(lung fibrosis)는 동물모델을 활용한 기전 연구가 진행되어 왔으나, 현재까지 뚜렷한 치료제가 개발되지 못하고 있는 실정이다.
- [5] 상기와 같이 미세먼지 및 가습기 살균제 등 환경 유해 인자에 노출된 환자들에 대한 정확한 폐 질환 진단을 바탕으로 폐 질환 환자의 치료 및 관리가 요구되고

있으며, 이를 위하여 이미징 기반 폐 질환 평가, 진단 기술 개발은 물론, 폐 질환의 발병 기전 연구를 통한 마커 발굴 등이 필요하다. 현재, 폐섬유화 모델의 경우 동물 모델이 주로 사용되고 있으나, 인간과 동물간의 생리적 특성 차이로 인한 면역반응 및 약물의 약리작용 결과가 상이할 수 있으며, 폐섬유화 질환 특이적 바이오마커의 부재로 인하여 정확한 발병기전 연구에 제약이 따르고 있다.

- [6] 세포를 이용한 연구로는 환경 유해 인자에 노출된 인간의 일차(primary) 배양 폐 세포를 이용한 연구가 가장 이상적이거나, 인간 일차 배양 폐 조직 또는 세포를 확보하는데 어려움이 있고, 장기간 배양이 어려워 불멸화한 세포주 등을 이용하여 연구가 진행되고 있다. 그러나, 이러한 세포주들은 일차 배양 세포의 생리학적 특성을 정확히 반영하지 못하고, 정상 핵형(karyotype)을 유지하는 비율이 현저히 낮으며, 한 종류의 세포로 이루어져 있어, 다양한 세포들이 3차원 형태를 유지하고 있는 인간 폐 조직의 특징을 정확히 모사할 수 없는 한계가 존재한다.
- [7] 한편, 오가노이드란 줄기세포를 3차원적으로 배양하거나 응집 또는 재조합하여 만든 장기 특이적 세포 집합체로 자기 재생(self-renewal)이 가능하며 '미니 장기' 또는 '유사 장기'라고도 불린다. 오가노이드는 실제 장기와 유사한 형태로 분자 신호 조절 등과 같은 동물 모델에서는 구현하기 힘든 연구를 *in vitro* 상에서 구현할 수 있어 기초 연구에 매우 유용함은 물론, 인간의 발생과정, 질환 모델 확립, 의약품 유효성 평가 스크리닝, 의약품 독성 평가 플랫폼 개발, 세포치료제 개발 등 다양한 분야에 매우 유용하게 사용될 수 있는 기술이다.
- [8] 현재 다양한 오가노이드 확립을 위한 연구가 진행되어 오고 있으며, 폐 오가노이드도 개발되어 있다. 폐 오가노이드 제조 방법 관련 종래기술로는 hPSC로부터 폐 오가노이드를 제조할 수 있는 방법을 개시한 Development, 144: 986-997, 2017 및 Nature cell biology, 19(5): 542-549, 2017이 있다.
- [9] 그러나 현재까지 알려진 폐 오가노이드는 폐포 대식세포를 포함하고 있지 않아 감염 또는 염증 반응을 구현하기 어려운 한계가 존재한다. 폐포 대식세포는 폐포 안에 존재하는 대식세포(Alveolar macrophage)로서 그 유래가 골수가 아닌 yolk sac으로부터 분화된다는 보고가 있으며, 실제로 골수 유래 대식세포와 크게 다를 뿐만 아니라, 인간의 폐포 대식세포의 마커도 골수 유래 대식세포와 마커가 상이하다. 폐 오가노이드 배양 시스템에 폐포 대식세포가 존재하지 않으면 감염이나 염증반응을 구현하기가 어려운 한계가 있다. 이와 같은 한계를 극복하기 위하여 인간의 폐포 대식세포와 유사한 세포를 제작하는 방법으로, *in vitro*에서 분화시킨 대식세포를 인간화된 쥐의 폐 조직에 이식하여 폐포 대식세포와 유사한 세포로의 성숙을 유도하는 방법이 개시된 바 있으나(Happle, C., et al. (2017). Induced pluripotent stem cell derived macrophages differentiate into AM like cells in the lungs of humanized PAP mice. Paediatric Bronchology.), 현재까지 성숙한 인간 폐포 대식세포가 포함된 폐 오가노이드를 제작할 수 있는

방법은 알려진 바가 없다.

- [10] 이에, 본 발명자들은 매트릭젤에 hPSC를 overlay하여 2D 방법으로 분화시켰으며, 분화 4 내지 5일째에 CXCR4를 발현하지 않는 중내배엽 세포(mesoendoderm)를 포함해야만 폐포 대식세포를 포함한 폐 오가노이드를 제조할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명의 목적은 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법 및 이에 따라 제조된 폐 오가노이드를 제공하는 것이다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 줄기세포를 완전 내배엽(definitive endoderm, DE) 세포 및 중내배엽(mesoendoderm) 세포를 포함하도록 분화시키는 단계;
- [15] 2) 상기 단계 1)의 완전 내배엽 세포 및 중내배엽 세포를 2차원 배양용기에서 배양하여 전방 전장 내배엽(anterior foregut endoderm, AFE) 세포로 분화시키는 단계;
- [16] 3) 상기 단계 2)의 AFE 세포를 2차원 배양용기에서 배양하는 단계; 및
- [17] 4) 상기 단계 3)의 배양된 세포를 3차원 배양용기에서 배양하는 단계;
- [18] 를 포함하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법을 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 상기 폐 오가노이드의 제조방법에 의해 제조된 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드를 제공한다.
- [20]

발명의 효과

- [21] 본 발명은 완전 내배엽 세포의 마커인 CXCR4를 발현하지 않는 세포를 함께 분화시켜, 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 폐 오가노이드는 제1형 및 제2형 폐포 상피세포를 포함하는 동시에 폐포 대식세포를 포함하므로, 기존의 면역세포를 포함하지 못하는 폐 오가노이드와 달리 감염 또는 염증 반응을 구현하여 관련 폐 질환의 기전 연구, 바이오마커 발굴, 치료제 개발 등에 유용하게 사용될 수 있다.

[22]

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1a는 인간 전분화능 줄기세포로부터 분화 기간에 따른 폐 오가노이드의 제조방법 모식도를 나타낸 것이다.
- [24] 도 1b는 2차원 배양 세포의 분화 기간에 따른 세포 형태 사진을 나타낸 도이다.

- [25] 도 1c는 분화 20일차에 3차원 배양으로 변경한 세포의 분화 기간에 따른 세포 형태 사진을 나타낸 도이다.
- [26] 도 2a는 분화 시작 후 4일째의 분화세포 마커의 유세포 분석기(FACS) 분석 결과를 나타낸 것으로, CXCR4가 음성을 나타내는 세포가 전체 세포의 20 내지 30% 존재함을 확인한 도이다.
- [27] 도 2b는 분화 시작 후 4일째의 분화세포 마커의 유세포 분석기(FACS) 분석 결과를 나타낸 것으로, CXCR4가 음성을 나타내는 세포의 20.99%에서 중내배엽 세포의 마커인 EpCAM과 CD56의 발현 정도를 확인한 도이다.
- [28] 도 3은 분화 기간 및 3차원 배양 유무에 따른 폐포 세포 특이적 유전자 발현 정도를 측정한 정량적 중합효소 연쇄반응(quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 결과 그래프이다.
- [29] 도 4a는 분화 10일차의 폐포 세포 특이적 유전자(EpCAM, c-Kit, CXCR4, Pro-surfactant protein C 및 CD90) 발현 정도를 측정한 FACS(fluorescence-activated cell sorting) 분석 결과 그래프를 나타낸 도이다.
- [30] 도 4b는 분화 20일차의 폐포 세포 특이적 유전자(EpCAM, c-Kit, CXCR4, Pro-surfactant protein C 및 CD90) 발현 정도를 측정한 FACS(fluorescence-activated cell sorting) 분석 결과 그래프를 나타낸 도이다.
- [31] 도 4c는 2차원 배양을 유지한 분화 30일차 세포의 폐포 세포 특이적 유전자(EpCAM, c-Kit, CXCR4, Pro-surfactant protein C 및 CD90) 발현 정도를 측정한 FACS(fluorescence-activated cell sorting) 분석 결과 그래프를 나타낸 도이다.
- [32] 도 4d는 분화 20일차에 3차원 배양으로 변경한 분화 30일차 세포의 폐포 세포 특이적 유전자(EpCAM, c-Kit, CXCR4, Pro-surfactant protein C 및 CD90) 발현 정도를 측정한 FACS(fluorescence-activated cell sorting) 분석 결과 그래프를 나타낸 도이다.
- [33] 도 5a는 3차원 폐 오가노이드의 가지 구조를 포함하는 폐포 구조 사진을 나타낸 도이다.
- [34] 도 5b는 3차원 폐 오가노이드의 가지 구조 단면의 벌집모양 구조 사진을 나타낸 도이다.
- [35] 도 5c는 3차원 폐 오가노이드의 폐포 세포 특이적 단백질 발현을 확인한 면역형광염색 사진이다.
- [36] 도 5d는 폐포 특이적 라멜라체(lamellar body)를 포함하는 3차원 폐 오가노이드의 투과전자현미경(transmission electron microscopy, TEM) 사진이다.
- [37] 도 6a는 3차원 폐 오가노이드의 분화 30일차의 폐포 대식세포 특이적 단백질의 발현을 확인한 FACS 결과 그래프이다.
- [38] 도 6b는 분화 60일차의 폐포 대식세포 특이적 단백질의 발현을 확인한 FACS 결과 그래프이다.
- [39] 도 6c는 분화 1년차의 폐포 대식세포 특이적 단백질의 발현을 확인한 FACS

결과 그래프이다.

- [40] 도 7a는 1차 항체 없이 2차 항체만을 이용하여 사용된 항체의 비특이적 반응이 없음을 확인한 사진이다.
- [41] 도 7b는 제2형 폐포 세포 마커인 pro-surfactant protein C 염색 사진을 나타낸 도이다.
- [42] 도 7c는 제1형 폐포 세포 마커인 PDPN 염색 사진을 나타낸 도이다.
- [43] 도 7d는 폐포 대식세포 마커인 CD68 염색 사진을 나타낸 도이다.
- [44] 도 8a는 분화 10개월차 3차원 폐 오가노이드에 대한 외관 사진을 나타낸 것이다.
- [45] 도 8b는 분화 10개월차 3차원 폐 오가노이드의 H&E 염색 사진이다.
- [46] 도 9는 분화 85일차 3차원 폐 오가노이드의 A 타입, B 타입 및 M 타입 형태 사진이다.
- [47] 도 10a는 분화 85일차 3차원 폐 오가노이드의 A 타입, B 타입 및 M 타입 형태에 따른 호흡기계 발달 관련 유전자들의 RNA 서열분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [48] 도 10b는 분화 85일차 3차원 폐 오가노이드의 A 타입, B 타입 및 M 타입 형태에 따른 대식세포 관련 유전자들의 RNA 서열분석 결과를 나타낸 것으로, 대식세포 관련 유전자(CD68)의 발현이 폐 오가노이드에서 강하게 나타남을 확인한 도이다.

[49]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [50] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [51] 본 발명은 1) 줄기세포를 완전 내배엽(definitive endoderm, DE) 세포 및 중내배엽(mesoendoderm) 세포를 포함하도록 분화시키는 단계;
- [52] 2) 상기 단계 1)의 완전 내배엽 세포 및 중내배엽 세포를 2차원 배양용기에서 배양하여 전방 전장 내배엽(anterior foregut endoderm, AFE) 세포로 분화시키는 단계;
- [53] 3) 상기 단계 2)의 AFE 세포를 2차원 배양용기에서 배양하는 단계; 및
- [54] 4) 상기 단계 3)의 배양된 세포를 3차원 배양용기에서 배양하는 단계;
- [55] 를 포함하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법을 제공한다.
- [56] 상기 줄기세포는 배아 줄기세포(embryonic stem cell), 역분화 줄기세포(induced pluripotent stem cell) 또는 성체 줄기세포(adult stem cell)일 수 있고, 인간 유래인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [57] 상기 완전 내배엽 세포는 전체 세포 중 50 내지 90% 함유될 수 있고, 구체적으로 50 내지 80% 함유될 수 있으며, 더 구체적으로는 70 내지 80% 함유될 수 있다.
- [58] 상기 중내배엽 세포는 완전 내배엽 세포의 마커인 CXCR4(C-X-C chemokine

receptor type 4)를 발현하지 않는 세포들 중 10 내지 40% 함유될 수 있고, 구체적으로 10 내지 30% 함유될 수 있으며, 더 구체적으로는 15 내지 25% 함유될 수 있다.

[59]

[60] 상기 분화는 세포의 미세환경 모사를 위해 매트릭셀이 코팅된 배양용기에서 줄기세포를 분화시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 피브로넥틴(fibronectin) 또는 라미닌(laminin)이 코팅된 배양용기가 사용될 수 있다.

[61] 상기 단계 1)의 분화는 2 내지 6일 동안, 바람직하게는 3 내지 6일 동안 또는 더 바람직하게는 4 내지 6일 동안 수행될 수 있다.

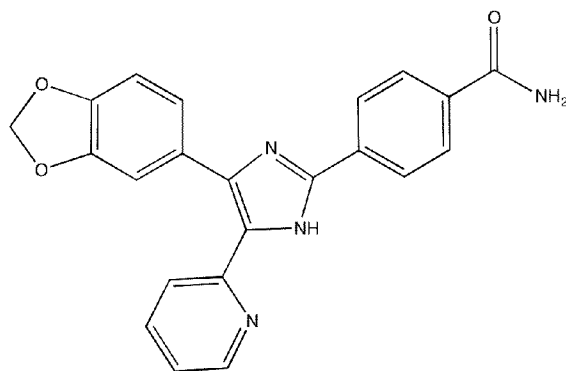
[62]

[63] 상기 단계 2)의 배양은 전방화(anteriorization) 배지에서 이루어진다.

[64] 상기 전방화 배지는 TGF- β (transforming growth factor beta) 신호전달 경로 억제제 및 Wnt 신호전달 경로 억제제를 포함하고, 이를 이용하여 전방 전장 내배엽 세포로 분화시킬 수 있고, 구체적으로 상기 TGF- β 신호전달 경로 억제제는 SB431542 및 Noggin일 수 있고, Wnt 신호전달 경로 억제제는 IWP-2, IWP-3 또는 IWP-4일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[65] 상기 SB431542는 하기 화학식으로 표시되고, 상기 배지에 8 내지 20 μ M 바람직하게는 8 내지 15 μ M 또는 더 바람직하게는 5 내지 15 μ M로 포함될 수 있다.

[66]



[67] 상기 Noggin은 상기 배지에 50 내지 150 ng/ml, 바람직하게는 80 내지 150 ng/ml 또는 더 바람직하게는 80 내지 120 ng/ml로 포함될 수 있다.

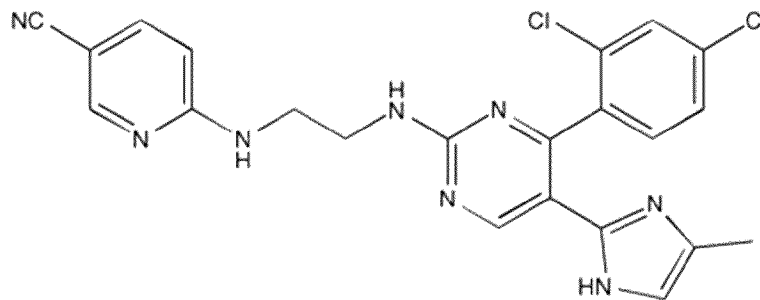
[68] 상기 IWP-2(Inhibitor of Wnt production-2), IWP-3(Inhibitor of Wnt production-3) 또는 IWP-4(Inhibitor of Wnt production-4)는 상기 배지에 0.2 내지 2 μ M, 바람직하게는 0.5 내지 2 μ M 또는 더 바람직하게는 0.8 내지 2 μ M로 포함될 수 있다.

[69]

[70] 상기 단계 3)의 배양은 매트릭셀이 포함된 LO(Lung Organoid formation) 배지에서 이루어진다.

- [71] 또한, 상기 LO 배지는 GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta) 억제제, 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor, FGF), 폐 분지형태 증식 억제제 및 폐포 재생 활성화제를 포함하는 배지를 이용하여 포함하며, 구체적으로 상기 GSK-3 β 억제제는 CHIR 99021, 섬유아세포 성장 인자는 FGF10 및 FGF7/KGF(keratinocyte growth factor), 폐 분지형태 증식 억제제는 골형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP), 폐포 재생 활성화제는 all-trans retinoic acid일 수 있고, 상기 골형성 단백질은 보다 구체적으로 BMP4일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [72] 상기 CHIR 99021은 하기 화학식의 구조를 가지고, 상기 배지에 0.5 내지 10 μ M, 바람직하게는 0.8 내지 10 μ M 또는 더 바람직하게는 1.5 내지 10 μ M로 포함될 수 있다.

[73]



- [74] 상기 FGF10(Fibroblast Growth Factor 10)은 상기 배지에 8 내지 20 μ M, 바람직하게는 8 내지 15 μ M 또는 더 바람직하게는 5 내지 15 μ M로 포함될 수 있다.
- [75] 상기 FGF7/KGF(Fibroblast growth factor 7/keratinocyte growth factor)는 상기 배지에 8 내지 20 ng/ml, 바람직하게는 8 내지 15 ng/ml 또는 더 바람직하게는 5 내지 15 ng/ml로 포함될 수 있다.
- [76] 상기 BMP4(Bone morphogenetic protein 4)는 상기 배지에 8 내지 20 ng/ml, 바람직하게는 8 내지 15 ng/ml 또는 더 바람직하게는 5 내지 15 ng/ml로 포함될 수 있다.
- [77] 상기 all-trans retinoic acid는 상기 배지에 20 내지 80 nM, 바람직하게는 30 내지 80 nM 또는 더 바람직하게는 40 내지 80 nM로 포함될 수 있다.
- [78]
- [79] 상기 단계 4)의 배양은 매트릭셀이 포함되지 않은 LO(Lung Organoid formation) 배지에서 이루어진다.
- [80]
- [81] 상기 단계 2)의 2차원 배양 용기에서의 배양은 분화 3 내지 7일차 바람직하게는 분화 4 내지 6일차, 더 바람직하게는 분화 4 내지 5일차부터 시작하여 1 내지 7일 동안, 1 내지 5일 동안 또는 1 내지 4일 동안 수행될 수 있다.
- [82] 상기 단계 3)의 2차원 배양 용기에서의 배양은 분화 5 내지 15일차

바람직하게는 분화 6 내지 12일차, 더 바람직하게는 분화 7 내지 10일차부터 시작하여 5 내지 20일 동안, 7 내지 15일 동안 또는 10 내지 14일 동안 수행될 수 있다.

- [83] 상기 3차원 용기에서의 배양은 분화 15 내지 25일차 바람직하게는 분화 18 내지 23일차, 더 바람직하게는 분화 19 내지 21일차부터 시작하여 10일 내지 1년 동안, 15일 내지 6개월 동안 또는 20일 내지 30일 동안 수행될 수 있다.

[84]

- [85] 또한, 본 발명은 상기 폐 오가노이드의 제조방법에 의해 제조된 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드를 제공한다.

[86]

- [87] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 인간 전분화능 줄기세포(human pluripotent stem cell, hPSC)를 DE 세포 및 중내배엽 세포를 포함하도록 분화시키고, 이를 매트릭셀이 코팅된 배양용기에서 매트릭셀이 포함된 전분화 배지를 이용하여 AFE 세포로 분화시키고, 분화 20일차에 이를 3차원 배양용기로 옮겨 매트릭셀이 포함되지 않은 LO 배지를 이용하여 배양함으로써 폐 오가노이드를 제조하였다(도 1a 참조).

- [88] 제조한 폐 오가노이드를 20일차에 3차원 배양으로 변경한 세포의 경우 그렇지 않은 경우에 다발 모양의 세포 집합체를 형성하는 것에 비하여 3차원의 구형의 모양을 형성하는 것을 확인하여 3차원 배양이 꼭 필요함을 확인하였다(도 1b 및 도 1c).

- [89] 또한, 본 발명자들은 줄기세포를 완전 내배엽 세포의 마커인 CXCR4를 발현하는 세포가 70 내지 80%의 비율을 차지할 때까지 배양한 후, CXCR4를 발현하지 않는 세포들 중 중내배엽 세포의 마커인 EpCAM(-) CD56(+)를 발현하는 세포가 약 20% 포함하여야 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드를 제조할 수 있음을 확인하였다(도 2a 및 도 2b 참조).

- [90] 또한, 본 발명자들은 폐 조직 특이적 유전자의 발현이 분화 20일차 이후 3차원 배양으로 변경한 폐 오가노이드의 경우에 가장 높음을 확인하였다(도 3).

- [91] 또한, 본 발명자들은 분화 30일차의 폐 오가노이드에서 폐포 상피세포 마커, 제1형 폐포 상피세포 마커, 제2형 폐포 상피세포마커, 등이 발현됨을 확인하였다(도 4a 내지 도 4d).

- [92] 또한, 본 발명자들은 제조한 폐 오가노이드가 인간의 폐 모양처럼 가지구조를 형성하고, 폐포모양을 형성함(도 5a), 인간의 폐포 구조와 유사하게 얇은 막을 이루는 세포로 둘러싸인 벌집과 같은 구조로 이루어져 있음을 확인하였으며(도 5b), 폐포 세포 특이적 단백질을 발현하는 것과(도 5c), 폐포 특이적 라멜라체가 형성된 것을 관찰하였다(도 5d).

- [93] 또한, 본 발명자들은 분화 30일, 60일 및 1년차의 폐 오가노이드에서 폐포 대식세포 특이적인 마커가 발현하는 것을 확인하여 제조한 폐 오가노이드 내에 폐포 대식세포가 존재함을 확인하였다(도 6a 내지 도 6c).

- [94] 또한, 본 발명자들은 분화 70일차의 폐 오가노이드에서 제2형 폐포 상피세포 마커인 pro-surfactant protein c가 발현됨과(도 7b), 제1형 폐포 상피세포 마커인 PDPN이 발현되는 것과(도 7c), 폐포 대식세포의 마커인 CD68이 발현되는 것(도 7d)을 확인하여, 본 발명의 폐 오가노이드는 제1형 및 제2형 폐포 상피세포 뿐만 아니라 폐포 대식세포도 포함하는 것을 확인하였다.
- [95] 또한, 본 발명자들은 분화 10개월차의 폐 오가노이드에서 인간의 폐포 구조와 유사한 얇은 막으로 둘러싸인 내강 및 얇은 막을 형성하는 상피세포가 존재함을 확인하였다(도 8a 및 도 8b 참조).
- [96] 또한, 본 발명자들은 제조한 폐 오가노이드의 형태에 따른 유전자 발현 패턴을 확인하고, 투명한 폐포 형태를 나타내는 A 타입 폐 오가노이드에서 폐포 대식세포 관련 유전자인 CD68의 발현이 강하게 나타나는 것을 확인하여, 제조한 폐 오가노이드가 폐포 대식세포를 포함하는 것을 확인하였다(도 9, 도 10a 및 도 10b 참조).
- [97]
- [98] 따라서, 본 발명에 따른 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드는 기존의 면역세포를 포함하지 못하는 폐 오가노이드와 달리 감염 또는 염증 반응을 구현하여 관련 폐 질환의 기전 연구, 바이오마커 발굴, 치료제 개발 등에 유용하게 사용될 수 있다.

[99]

발명의 실시를 위한 형태

- [100] 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [101] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [102]
- [103] <실시예 1> 3차원 폐 오가노이드의 제조
- [104] <1-1> 플레이트의 코팅
- [105] 세포 외 미세환경을 모사할 수 있는 매트릭젤(Matrigel) 매트릭스(Matrix)(Matrigel-hESC qualified Matrix, Cat. #. 354277, Corning, 미국)를 차가운 DMEM/F12 배지(Cat. #. 11330-032, Gibco, 미국)를 이용하여 200배 희석한 후(최종 매트릭젤 농도: 250 내지 290 $\mu\text{l}/500\text{ml}$), 4-웰 플레이트에 웰 당 400 μl 로 넣어 5% 이산화탄소가 유지되는 37°C의 인큐베이터에서 1 시간 동안 코팅하였다.
- [106]
- [107] <1-2> 분화 -1일차
- [108] 먼저, 세포 배양용 플레이트에 웰당 10 μg 의 비트로넥틴 XF(Vitronectin XF, Cat#.07180, Stem cell technologies)를 첨가하여, 플레이트의 웰을 코팅하였다.

코팅된 플레이트에 인간 만능 줄기세포인 H9 세포주(Wicell, WA09-FD)를 웰당 2ml의 TeSR™-E8™ 배지(Cat#.05940, Stem cell technologies)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하여 준비하였다. 이때, 계대배양 기간 동안에는 배지를 매일 교체하였다.

- [109] 배양된 H9 세포(WiCell, 미국)의 배양액을 제거한 후, 0.5 mM EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)를 웰 당 1 ml씩 넣고 5% CO₂가 유지되는 37°C의 배양기에서 5 내지 7분간 반응시켰다. 이후, EDTA를 제거하고 ROCK(Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) 억제제(Y-27632, Cat. #. 04-0012-02, Stemgent, 미국)가 10 µM로 첨가된 줄기세포 배양액(TeSR™-E8™ medium)을 웰 당 1 ml씩 넣고 파이프팅하여 세포를 수득하였다. 수득한 세포를 계수한 후 ROCK 억제제 10 µM 및 매트릭셀(200배 희석)이 첨가된 mTeSR™-1 배지(Cat. #. 5850, STEMCELL Technologies, 캐나다)에 희석하고, 실시예 1-1에서 코팅한 6-웰 플레이트에 1.25×10^5 개/웰로 시딩(seeding)하여 배양을 시작하였다.

[110]

[111] <1-3> 분화 0일차

- [112] 배지를 제거하고, DPBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)로 세척한 후, 하기 표 1의 조성을 가지는 DE-1 배지(DE basal medium)를 웰 당 2 ml씩 넣어 24시간 동안 배양하였다.

[113] [표1]

DE-1 배지의 조성(10ml)
DMEM/F12 (9.597 ml)
1× N2 supplement(Cat. #. 17502048, Gibco) (100µl)
1× B27 supplement(Cat. #. 17504-044, Gibco) (200µl)
1×P/S(Penicillin/streptomycin) (Cat. #. 15140-122, Gibco) (100 µl)
50 ng/ml Activin A (Cat. #.338-AC, R&D system, 100µl/ml stock) (5µl)
0.5mM sodium butyrate(Cat. #. 303410, Sigma , 1M stock) (5µl)
3 µM CHIR 99021(Cat. #. S1263, Selleckchem, 10mM stock) (3µl)

[114]

[115] <1-4> 분화 1 내지 3일 또는 4일차-줄기세포를 완전 내배엽 세포(definitive endoderm, DE) 및 중내배엽 세포(mesoendoderm)를 포함하도록 분화

- [116] 배지를 제거하고, 하기 표 2의 조성을 가지는 DE-2 배지를 웰 당 2 ml씩 넣어 24시간 동안 배양하고, 24시간 마다 배지를 교체해 주었다. 분화를 시작한지 4일 또는 5일에 DE(완전 내배엽 세포)의 마커인 CXCR4가 70 내지 80% 발현된 것을 확인하면, 하기 실시예 1-5의 단계를 진행한다.

[117] [표2]

DE-2 배지의 조성(10ml)
DMEM/F12 (9.587 ml)
1× N2 supplement(Cat. #. 17502048, Gibco) (100 μ l)
1× B27 supplement(Cat. #. 17504-044, Gibco) (200 μ l)
1× P/S(Penicillin/streptomycin) (Cat. #. 15140-122, Gibco) (100 μ l)
50 ng/ml Activin A (Cat. #.338-AC, R&D system, 100 μ l/ml stock) (5 μ l)
0.5mM sodium butyrate(Cat. #. 303410, Sigma , 1M stock) (1 μ l)

[118]

[119] <1-5> 분화 4일 또는 5일차-완전 내배엽 세포(definitive endodrem, DE) 및 중내배엽 세포(mesoendoderm)를 전방 전장 내배엽 세포(anterior foregut endoderm)로 분화

[120] 배지를 제거하고, DPBS로 세척한 후, 세포의 해리에 사용되는 재조합 효소인 TrypLE™ Express(Gibco, Cat#:12604013)를 넣어 3 내지 5분 동안 배양하였다. 이후, TrypLE™ Express를 제거하고, DPBS를 넣어 세포를 모아 1,300 rpm에서 5분간 원심분리 후, DPBS를 제거하고, 매트릭셀이 포함된 전방화(anteriorization)-1 배지(표 3) 1 ml를 넣어 현탁시켰다. 상기 세포를 계수한 후 전방화-1 배지로 희석하여 실시예 1-1에서 코팅한 6웰 플레이트에 5 내지 9 × 10⁵개/웰로 시딩하고, 24시간 동안 배양하였다.

[121]

[122] [표3]

전방화-1 배지의 조성 (5ml)
DMEM/F12 (4.790 ml)
1× N2 supplement(Cat. #. 17502048, Gibco) (50 μ l)
1× B27 supplement(Cat. #. 17504-044, Gibco) (100 μ l)
1× P/S(Penicillin/Streptomycin) (Cat. #. 15140-122, Gibco) (50 μ l)
100 ng/ml Noggin(Cat. #. 120-10C, Peprotech, 100 μ g/ml stock) (5 μ l)
10 μ M SB431542(Cat. #. S1067, Selleckchem, 10mM stock) (5 μ l)
1/200 매트릭셀

[123]

[124] <1-6> 분화 6일차-완전 내배엽 세포(definitive endodrem, DE) 및 중내배엽 세포(mesoendoderm)를 전방 전장 내배엽 세포(anterior foregut endoderm)로 분화

[125] 배지를 제거하고, 매트릭셀이 포함된 전방화-2 배지(표 4)를 웰 당 2 ml씩 넣어 48시간 동안 배양하였다.

[126]

[127] [표4]

전방화-2 배지의 조성 (5ml)
DMEM/F12 (4.8 ml)
1× N2 supplement(Cat. #. 17502048, Gibco) (50 μ l)
1× B27 supplement(Cat. #. 17504-044, Gibco) (100 μ l)
1× P/S(Penicillin/Streptomycin)(Cat. #. 15140-122, Gibco) (5 μ l)
1 μ M IWP-4(Cat. #. 04-0036, Stemgent, 1mM stock) (5 μ l)
10 μ M SB431542(Cat. #. S1067, Selleckchem, 10mM stock) (5 μ l)
1/200 매트릭셀

[128]

[129] <1-7> 분화 8 내지 20일차

[130] 배지를 제거하고, 매트릭셀이 포함된 폐 오가노이드 형성 배지(Lung organoid formation (LO) medium, 표 5)를 웰 당 2 ml씩 넣어 배양하였고, 2일 마다 기존 배지의 반을 새로운 배지로 교체하였다.

[131]

[132] [표5]

LO 배지의 조성 (50ml)
DMEM/F12 (47.965 ml)
1× N2 supplement(Cat. #. 17502048, Gibco) (500 μ l)
1× B27 supplement(Cat. #. 17504-044, Gibco) (1ml)
1× P/S(Penicillin/Streptomycin) (5 ml)
3 μ M CHIR 99021(Cat. #. S1263, Selleckchem, 10mM stock) (15 μ l)
10 ng/ml FGF10(Cat. #. 100-26, Peprotech, 100 μ g/ml stock) (5 μ l)
10 ng/ml FGF7/KGF(Cat. #. 100-19, Peprotech, 100 μ g/ml stock) (5 μ l)
10 ng/ml BMP4(Cat. #. 120-05, Peprotech, 100 μ g/ml stock) (5 μ l)
50 nM All-trans Retinoic acid(Cat. #. 0695, R&D Systems, 500 μ M stock) (5 μ l)
1/200 매트릭셀

[133]

[134] <1-8> 분화 20일차 및 그 이후: 3차원 배양

- [135] Day 20에 세포를 모아 저 부착 플레이트(low attachment plate)에 옮겨 상기 표 3의 LO 배지의 조성 중 매트릭셀만이 포함되지 않은 LO 배지로 배양하였다. 배양 기간 동안 2일마다 기존 배지의 반을 새로운 배지로 교체하였다. 상기 3차원 배양 과정을 통하여 최종적으로 3차원 폐 오가노이드를 형성하였다.
- [136]
- [137] <실험예 1> 2차원 배양 및 분화 20일차 이후 3차원 배양의 세포 형태 확인
- [138] hPSC 세포의 분화 과정에서 20일차 이후에도 계속해서 2차원 배양한 경우와 20일차 이후에 3차원 배양으로 변경한 경우의 세포 형태를 사진을 찍어 관찰하였다.
- [139] 구체적으로, 분화 0일차, 1일차, 5일차, 6일차, 7일차, 9일차 및 13일차의 세포 사진, 2차원 배양을 지속한 경우의 분화 26일차, 30일차 및 33일차의 세포 사진, 및 분화 20일차에 3차원 배양으로 변경한 경우의 분화 32일차, 35일차, 52일차, 65일차 및 85일차의 세포 사진을 현미경으로 찍고, 세포 모양을 관찰하였다.
- [140] 그 결과, 33일차까지 2차원 배양법으로 분화시킨 경우, 다발 모양의 세포 집합체가 관찰된 반면, 분화 20일차에 3차원 배양법으로 변경한 후 매트릭셀이 없는 상태로 분화시킨 세포들은 3차원인 구형으로 실제 폐포 세포의 형태와 유사한 모양으로 분화되었음을 확인하였다(도 1b 및 1c).
- [141]
- [142] <실험예 2> 분화 4일 또는 5일차의 CXCR4 마커 발현 확인 및 중내배엽(mesoendoderm) 세포의 마커 발현 확인
- [143] 분화 4일 또는 5일째가 되어 완전내배엽(DE)의 마커인 CXCR4를 발현하는 세포의 비율이 70 내지 80%가 되었을 때 세포 표면에 CXCR4, EpCAM, CD56을 염색하고 유세포 분석기로 분화 정도를 분석하였다.
- [144] 구체적으로, 분화 4일 또는 5일째 세포의 배지를 제거하고, DPBS로 세척한 후, TrypLETM Express를 넣어 3 내지 5분 동안 배양하였다. 이후, TrypLETM Express를 제거하고, DPBS를 넣어 세포를 모아 1,300 rpm에서 5분간 원심분리 후, DPBS를 제거하고, FACS 완충용액에 현탁하였다. 1×10^4 내지 1×10^5 개의 세포에 항체(CXCR4, cat. #. 551510, BD pharmigen; EpCAM, Cat. #. 324204, Biolegend; CD56, Cat. #. 555518, BD pharmigen)를 각각 $2 \mu\text{l}$ 씩 넣고 실온에서 15분 내지 20분 반응시킨다. 그 후 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 새로운 FACS 완충용액 1ml를 첨가하고, 동일한 과정을 두 번 반복하였다. 마지막 원심분리 이후, 상층액을 제거하고 새로운 FACS 완충용액을 넣어준 다음 펠렛을 잘 풀어준다. 4% 파라포름알데하이드 $300 \mu\text{l}$ 넣어준 다음 잘 교반하여 유세포 분석기(Cytoflex, Beckman Coulter)를 분석을 수행하였다.
- [145] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, 완전내배엽(DE)의 마커인 CXCR4를 발현하는 세포의 비율이 70 내지 80%가 되었을 때, CXCR4를 발현하지 않는(CXCR4-)세포들 중 EpCAM-CD56+ 세포가 15 내지 25% 존재함을

확인하였다(도 2b). 이는 기존 다른 논문에서 CXCR4를 발현하는 (CXCR4+) 세포만을 분리 (FACS sorting)하여 오가노이드를 제작한 반면, 본 발명에서 제작한 오가노이드에는 분화 4-5일째에서 중내배엽(EpCAM-CD56+)세포를 포함하는 CXCR4- 와 CXCR4+ 세포 전체를 분화시켰다.

[146]

[147] <실험예 3> 본 발명의 3차원 폐 오가노이드의 폐 조직 특이적 유전자 발현 확인

[148] 본 발명의 3차원 폐 오가노이드의 폐 조직 특이적 유전자 발현 정도를 분화 기간 및 3차원 배양 유무에 따라 비교하기 위하여, 정량적 중합효소 연쇄반응(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)을 수행하였다.

[149] 구체적으로, 실시예 1의 3차원 폐 오가노이드 제조 과정 중 분화 0일차, 5일차 및 20일차의 세포, 분화 20일차 이후 2차원 배양을 지속한 분화 30일차의 세포, 및 분화 20일차 이후 3차원 배양으로 변경한 분화 30일차의 폐 오가노이드로부터 각각 RNA를 분리하였다. 각 RNA로부터 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)를 cDNA 합성 키트(Primescript 1 strand cDNA synthesis kit, Cat. #. 6110A, TAKARA, 일본)를 사용하여 합성한 후, 하기 표 6의 프라이머들을 및 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(Power SYBR Green PCR Master Mix, Cat. #. 4367659, Applied Biosystems, 미국)를 이용하여 qPCR을 수행하였다(StepOnePlus, Applied Biosystems). qPCR 반응은 95°C에서 10분, 95°C에서 15초 및 60°C에서 1분 과정을 40번 반복하고 마지막으로 95°C에서 15초, 60°C에서 1분 및 95°C에서 15초로 설정하여 수행하였다.

[150]

[151] [표6]

프라이머명	서열(5'→3')	서열번호
hNkx2.1 forward	CGGCATGAACATGAGCGGCAT	1
hNkx2.1 reverse	GCCGACAGGTACTTCTGTTGCTTG	2
hP63 forward	CCTATAACACAGACCACGCGCAGAA	3
hP63 reverse	GTGATGGAGAGAGAGCATCGAAG	4
hSox9 forward	GTACCCGCACTTGCACAAC	5
hSox9 reverse	TCTCGCTCTCGTTCAGAAGTC	6
hMucin5AC forward	GCACCAACGACAGGAAGGATGAG	7
hMucin5AC reverse	CACGTTCCAGAGCCGGACAT	8
hHOPX forward	GCCTTTCCGAGGAGGAGAC	9
hHOPX reverse	TCTGTGACGGATCTGCACTC	10
hSFTPA forward	GTGCGAAGTGAAGGACGTTTGTGT	11
hSFTPA reverse	TTTGAGACCATCTCTCCCGTCCC	12

- [152] 그 결과, 폐 조직 특이적 유전자인 NKX2.1, P63, Sox9, Mucin 5Ac, HOPX 및 SFTPA의 발현이 분화 20일차 이후 3차원 배양으로 변경한 분화 30일차의 폐 오가노이드에서 가장 높게 나타났다(도 3). 이는 본 발명에 따른 폐 오가노이드가 실제 폐 조직과 매우 유사한 특성을 나타냄을 제시한다.
- [153]
- [154] <실험예 4> 본 발명의 3차원 폐 오가노이드의 폐 조직 특이적 단백질 발현 확인
- [155] 본 발명의 3차원 폐 오가노이드의 폐 조직 특이적 단백질 발현 정도를 분화 기간 및 3차원 배양 유무에 따라 비교하기 위하여, FACS(fluorescence-activated cell sorting) 분석을 수행하였다.
- [156] 구체적으로, 실시예 1의 분화 10일차, 20일차 및 분화 20일차 이후 2차원 배양을 유지한 분화 30일차의 세포는 각각 TrypLE™ Express 시약(Cat. #. 12604013, Gibco) 1 ml을 첨가하고 상온에서 5분간 반응시킨 후, FACS 버퍼(5% FBS, 0.1% sodium azide in DPBS)로 세척하였고, 분화 20일차에 3차원 배양으로 변경한 분화 30일차의 폐 오가노이드에는 10 mg/ml의 제2형 콜라게나아제(collagenase type II, STEMCELL TECHNOLOGIES)를 첨가하고 37°C에서 20분씩 3번 반응시킨 후, FACS 버퍼로 세척하였다. 이후, FACS 기기(FACS Aria II, Becton Dickinson and Company, 미국)를 이용하여 FACS 분석을 수행하였다.
- [157] 그 결과, 분화 10일차 세포에서는 분화 초기에 발현되는 마커인 EpCAM, c-Kit, CXCR4, Pro-surfactant protein C 및 CD90의 발현이 높게 나타난 반면, 이들 마커의 발현은 분화가 진행될수록 감소하였고, 분화 20일차에 3차원 배양으로 변경한 분화 30일차의 폐 오가노이드에서 폐 조직 특이적 단백질인 Sox9(폐포 상피세포 마커), PDPN(제1형 폐포 상피세포 마커), Mucin(goblet cell 마커), Surfactant protein C(제2형 폐포 상피세포 마커) 및 P63(basal cell 마커) 등이 발현됨을 확인하였다(도 4).
- [158]
- [159] <실험예 5> 본 발명의 3차원 폐 오가노이드의 폐포 구조 유사 형태 확인
- [160] 본 발명의 3차원 폐 오가노이드가 실제 인간의 폐 구조와 유사한 정도를 하기 실험들을 통한 형태 분석으로 확인하였다.
- [161]
- [162] <5-1> 3차원 폐 오가노이드의 폐포 구조 확인
- [163] 본 발명의 3차원 폐 오가노이드의 폐포 구조 유사 형태를 현미경으로 관찰하여 확인하였다.
- [164] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 분화 20일차의 배양 세포를 매트릭젤과 1:1의 부피 비로 혼합하여 트랜스-웰(trans-well)의 내부 챔버(inner chamber)에 시딩하여 배양하고, 배양된 폐 오가노이드를 현미경으로 관찰하였다.
- [165] 그 결과, 매트릭젤 안에서 폐 오가노이드는 인간의 폐 모양처럼 가지형 형성(branching)하고 폐포 모양을 형성함을 확인하였다(도 5a).
- [166]

[167] <5-2> 3차원 폐 오가노이드의 폐포 구조 단면 확인

[168] 실험예 5-1의 3차원 폐 오가노이드의 가지 구조의 단면을 확인하고자, DAPI 염색을 수행하였다.

[169] 구체적으로, 실험예 4-1의 3차원 폐 오가노이드를 4%

파라포름알데히드(paraformaldehyde, PFA)로 고정시킨 후, 동결절편

포매제(FSC22 Clear Frozen section compound, Cat. #. 3801480, Leica Biosystems, 독일)를 넣은 동결절편 몰드에 올려놓은 후, 다시 동결절편 포매제로 덮어준

다음 -20°C에서 동결시켰다. 동결된 시료를 동결 마이크로톰(microtome)을

이용하여 8 μ m 두께의 절편으로 만든 후, 슬라이드에 올려 건조시켰다. 이후, DAPI 염색 시약(NucBlue™ Fixed Cell Stein Ready Probes™ reagent, Cat. #. R37606, Invitrogen, 미국) 한 방울을 1 ml의 PBS에 희석한 희석액 200 μ l를 폐 오가노이드

[170] 시료 위에 올리고, 5분간 반응시킨 후, 현미경으로 사진을 찍어 관찰하였다. 그 결과, 3차원 폐 오가노이드는 인간의 폐포 구조와 유사하게 얇은 막을 이루는 세포로 둘러싸인 벌집과 같은 구조로 이루어져 있음을 확인하였다(도 5b).

[171]

[172] <5-3> 3차원 폐 오가노이드의 폐포 세포 특이적 단백질 발현 확인

[173] 실험예 5-1의 3차원 폐 오가노이드의 폐포 세포 특이적 단백질 발현을 면역형광염색(immunofluorescence)으로 확인하였다.

[174] 구체적으로, 실험예 5-1의 3차원 폐 오가노이드를 4% PFA로 고정시킨 후, PBS로 세척하고, 0.5% 트리톤 X-100 용액(Triton X-100 in PBS)으로 5분간 투과화(permeabilization)한 후, 0.1% 트리톤 X-100 용액으로 3번 세척하였다.

0.1% 트리톤 X-100 용액에 용해시킨 2% BSA(bovine serum albumin) 용액에 항-surfactant protein B 항체(Cat. #. sc-133143, Santa Cruz Biotechnology, 미국) 및 항-Sox9 항체(Cat. #. ab185966, abcam, 영국)를 희석하여 상기 시료와 4°C에서 18 내지 24시간 동안 반응시켰다. 이후, 0.1% 트리톤 X-100 용액으로 3번 세척한 후, 2차 항체와 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 세척한 후, DAPI로 염색하고, 현미경으로 사진을 찍어 관찰하였다.

[175] 그 결과, 본 발명의 3차원 폐 오가노이드는 폐포 세포 특이적 단백질인 surfactant protein B 및 Sox9을 발현함을 확인하였다(도 5c).

[176]

[177] <5-4> 3차원 폐 오가노이드의 투과전자현미경(transmission electron microscopy, TEM) 사진 확인

[178] 실험예 5-1의 3차원 폐 오가노이드의 구조를 TEM 사진을 찍어 관찰하였다.

[179] 그 결과, 본 발명의 3차원 폐 오가노이드에 폐포 특이적 라멜라체(lamellar body)가 관찰되었다(도 5d).

[180]

[181] <실험예 6> 본 발명의 3차원 폐 오가노이드 내의 폐포 대식세포 확인 (1)

- [182] 본 발명의 3차원 폐 오가노이드 내에 폐포 대식세포가 분화되었는지 여부를 FACS 분석으로 확인하였다.
- [183] 구체적으로, 실시예 1에서 분화 30일차, 60일차 및 1년차의 3차원 폐 오가노이드에서 인간 폐포 대식세포 마커인 HLA-DR, CD11b, CD11c, CD68, CD64 및 CD206에 대한 각 항체(anti-hHLA-DR-PE, Cat. #. 556644, BD Pharmingen, 미국; anti-hCD11b-PerCP-Cy5.5, Cat. #. 301418, Biolegend, 미국; anti-hCD11c-PE-Cy7, Cat. #. 561356, BD Pharmingen; anti-hCD68-FITC, Cat. #. 333806, Biolegend; anti-hCD64-APC, Cat. #. 305014, Biolegend; 및 anti-hCD206-APC/Cy7, Cat. #. 321120, Biolegend)를 이용하여 상기 실험예 3에 기재된 것과 동일한 방법으로 FACS 분석을 수행하였다.
- [184] 그 결과, 제조한 3차원 폐 오가노이드에서 인간 폐포 대식세포 마커의 발현을 확인하여, 분화 30일차, 60일차 및 1년차의 3차원 폐 오가노이드에서 분화된 폐포 대식세포가 존재함을 확인하였다(도 6).
- [185]
- [186] <실험예 7> 본 발명의 3차원 폐 오가노이드 내의 폐포 대식세포 확인 (2)
- [187] 본 발명의 3차원 폐 오가노이드 내에 폐포 대식세포가 분화되었는지 여부를 면역형광염색으로 확인하였다
- [188] 구체적으로, 분화 70일차의 폐 오가노이드를 실험예 5-3에 기재된 것과 동일한 방법으로 면역형광염색을 수행하였다. 제2형 폐포 세포 마커인 pro-surfactant protein C에 대한 1차 항체(anti-pro-surfactant protein C rabbit antibody, Cat. #. 400879, abcam) 및 폐포 대식세포 마커인 CD68에 대한 1차 항체(anti-hCD68 mouse antibody, Cat. #. ab201340, abcam)로 이중 염색(double staining)을 한 후, 세척한 다음 형광 2차 항체인 Alexa Fluor 488 항-토끼 항체(Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG, Cat. #. A11034, Invitrogen) 및 Alexa Fluor 647 항-마우스 항체(Alexa Fluor 647 anti-mouse IgG, Cat. #. A21236, Invitrogen)와 반응시키고, 공초점 현미경(confocal microscope)으로 사진을 찍어 관찰하였다. 또한, 제1형 폐포 상피세포 마커인 PDPN에 대한 1차 항체(anti-PDPN rabbit antibody, Cat. #. sc-59347, Santa Cruz Biotechnology)와 반응시키고, 세척 후 Alexa Fluor 488 항-토끼 항체와 반응시켜 공초점 현미경으로 사진을 찍어 관찰하였다. 또한, 폐포 대식세포 마커인 CD68에 대한 1차 항체(anti-hCD68 mouse antibody, Cat. #. ab201340, abcam)와 반응시키고, 세척 후 Alexa Fluor 488 항-토끼 항체와 반응시켜 공초점 현미경으로 사진을 찍어 관찰하였다.
- [189] 그 결과, 본 발명의 3차원 폐 오가노이드에서 제2형 폐포 상피세포의 마커인 Pro-surfactant protein C, 폐포 대식세포 마커인 CD68, 제1형 폐포 상피세포 마커인 PDPN의 발현을 확인하여, 제1형 및 제2형 폐포 상피세포도 발현됨과 동시에 폐포 대식세포도 발현됨을 확인하였다(도 7a 내지 도 7d).
- [190]
- [191] <실험예 8> 분화 10개월차의 3차원 폐 오가노이드의 형태 및 구조 확인

- [192] 분화 10개월차의 3차원 폐 오가노이드의 형태를 현미경으로 사진을 찍어 관찰하고, H&E(hematoxylin and eosin) 염색을 수행하여 확인하였다.
- [193] 구체적으로, 실시예 1의 3차원 폐 오가노이드를 분화 10개월차까지 배양하여 일반 현미경으로 사진을 찍어 관찰하였다. 또한, H&E 염색을 수행하기 위하여, 상기 3차원 폐 오가노이드를 4% PFA로 고정하고, PBS로 세척한 후, 70%, 90%, 95% 및 100% 알코올을 이용하여 순차적으로 탈수과정을 거친 후, 자일렌(xylene)으로 세척하고 파라핀으로 포매하였다. 파라핀으로 포매한 절편을 슬라이드에 부착하여 H&E 염색을 수행하고, 현미경으로 사진을 찍어 관찰하였다.
- [194] 그 결과, 분화 10개월차의 3차원 폐 오가노이드에 인간의 폐포 구조와 유사한 얇은 막으로 둘러싸인 내강 및 얇은 막을 형성하는 상피세포가 존재함을 확인하였다(도 8a 내지 도 8b).
- [195]
- [196] <실험예 9> 3차원 폐 오가노이드 중 형태에 따른 유전자 발현 패턴 확인
- [197] 본 발명에 따른 3차원 폐 오가노이드 중 형태에 따른 유전자 발현 패턴을 RNA 서열분석(RNA sequencing)으로 확인하였다.
- [198] 구체적으로, 실시예 1의 3차원 폐 오가노이드의 분화 85일차에 육안으로 뚜렷이 구분되는 3가지 형태에 따라 M 타입(multi-lineage, 동그란 구 형태), B 타입(brochioalveolar type, 분화하는 가지 형태를 포함하는 형태), 및 A 타입(alveolar type, 투명한 폐포처럼 생긴 형태)의 폐 오가노이드를 선택하여 호흡기계 관련 유전자들 및 대식세포 관련 유전자들의 RNA 서열분석을 수행하였다(respiratory system development related genes, GO #: 0060541).
- [199] 그 결과, M 타입, B 타입 및 A 타입에 따라 유전자 발현 패턴이 다름을 확인하였으며, 특히 대식세포 관련 유전자(CD68)의 발현이 A 타입 폐 오가노이드에서 강하게 나타남을 확인하였다(도 9, 도 10a 및 도 10b).

청구범위

- [청구항 1] 1) 줄기세포를 완전 내배엽(definitive endoderm, DE) 세포 및 중내배엽(mesoendoderm) 세포를 포함하도록 분화시키는 단계;
2) 상기 단계 1)의 완전 내배엽 세포 및 중내배엽 세포를 2차원 배양용기에서 배양하여 전방 전장 내배엽(anterior foregut endoderm, AFE) 세포로 분화시키는 단계;
3) 상기 단계 2)의 AFE 세포를 2차원 배양용기에서 배양하는 단계; 및
4) 상기 단계 3)의 배양된 세포를 3차원 배양용기에서 배양하는 단계;를 포함하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포(embryonic stem cell), 역분화 줄기세포(induced pluripotent stem cell) 또는 성체 줄기세포(adult stem cell)인, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 완전 내배엽 세포는 전체 세포 중 50 내지 90% 함유되는 것인, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 완전 내배엽 세포는 전체 세포 중 50 내지 80% 함유되는 것인, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 완전 내배엽 세포는 전체 세포 중 70 내지 80% 함유되는 것인, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 배양은 전방화(anteriorization) 배지에서 이루어지는 것인, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 전방화 배지는 TGF- β (transforming growth factor beta) 신호전달 경로 억제제 및 Wnt 신호전달 경로 억제제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 TGF- β 신호전달 경로 억제제는 SB431542 또는 Noggin인 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 Wnt 신호전달 경로 억제제는 IWP-2, IWP-3 또는 IWP-4인 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 단계 3)의 배양은 매트릭셀이 포함된 LO(Lung Organoid formation) 배지에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 LO 배지는 GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta)

억제제, 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor, FGF), 폐 분지형태 증식 억제제 및 폐포 재생 활성화제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 GSK-3 β 억제제는 CHIR 99021인 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.

[청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 섬유아세포 성장 인자는 FGF10 및 FGF7/KGF인 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.

[청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 폐 분지형태 증식 억제제는 골형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP)인 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.

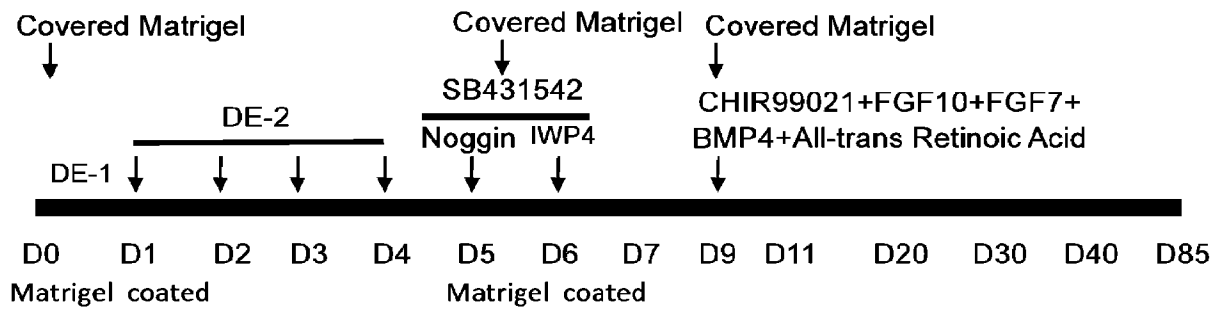
[청구항 15] 제11항에 있어서, 상기 폐포 재생 활성화제는 all-trans retinoic acid인 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.

[청구항 16] 제1항에 있어서, 상기 단계 4)의 배양은 매트릭스가 포함되지 않은 LO(Lung Organoid formation) 배지에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.

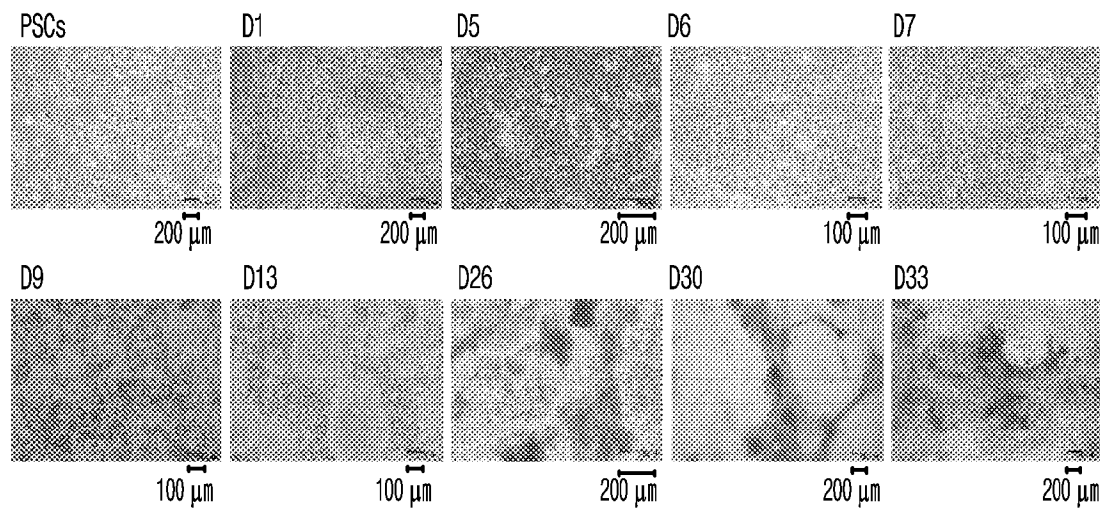
[청구항 17] 제1항에 있어서, 상기 단계 4)의 3차원 배양은 분화 15 내지 25일차부터 수행되는 것을 특징으로 하는, 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드의 제조방법.

[청구항 18] 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 폐 오가노이드의 제조방법에 의해 제조된 폐포 대식세포를 포함하는 폐 오가노이드.

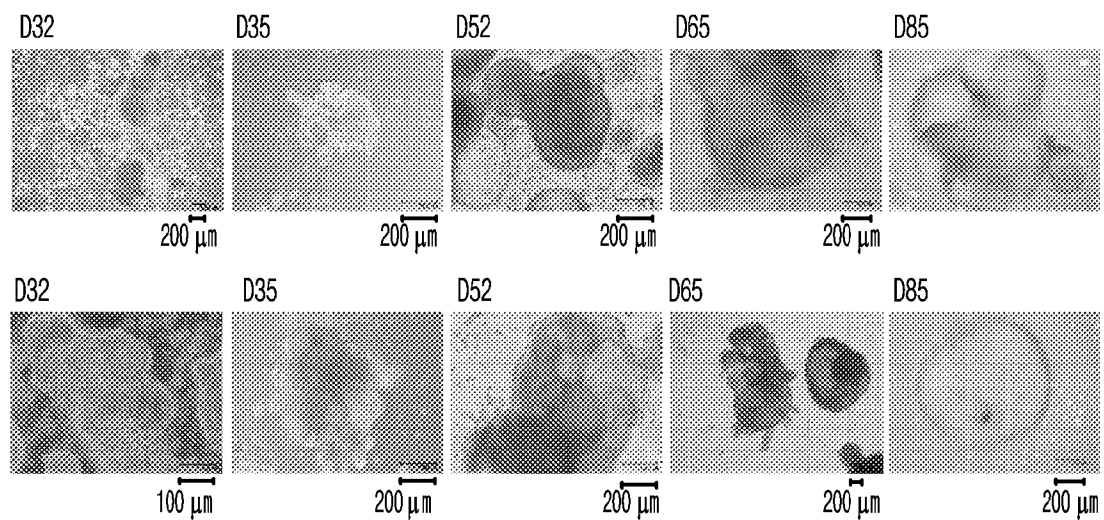
[도 1a]



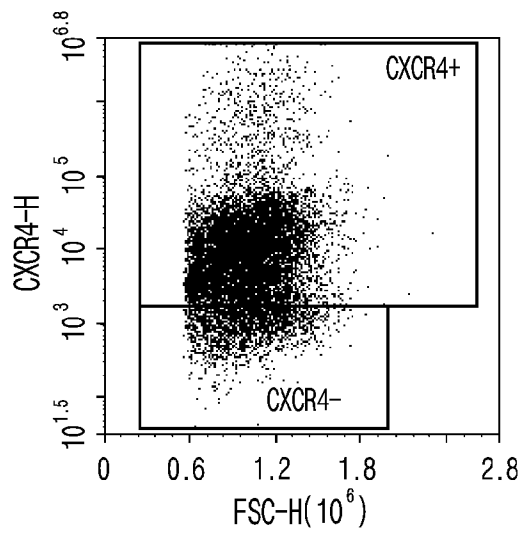
[도 1b]



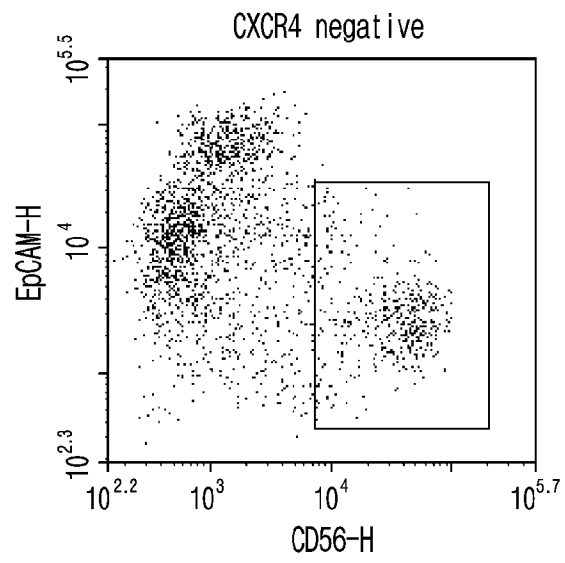
[도 1c]



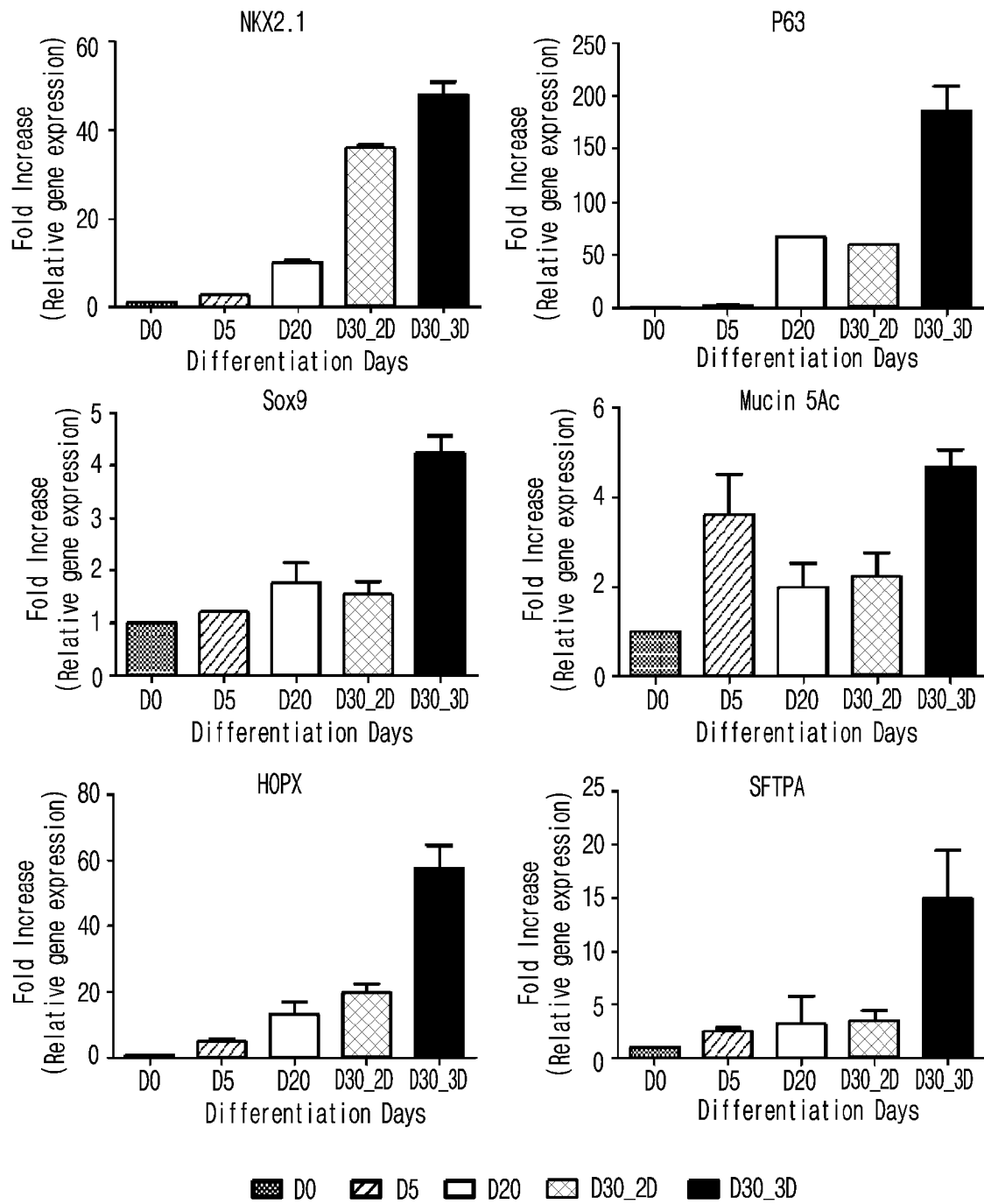
[도2a]



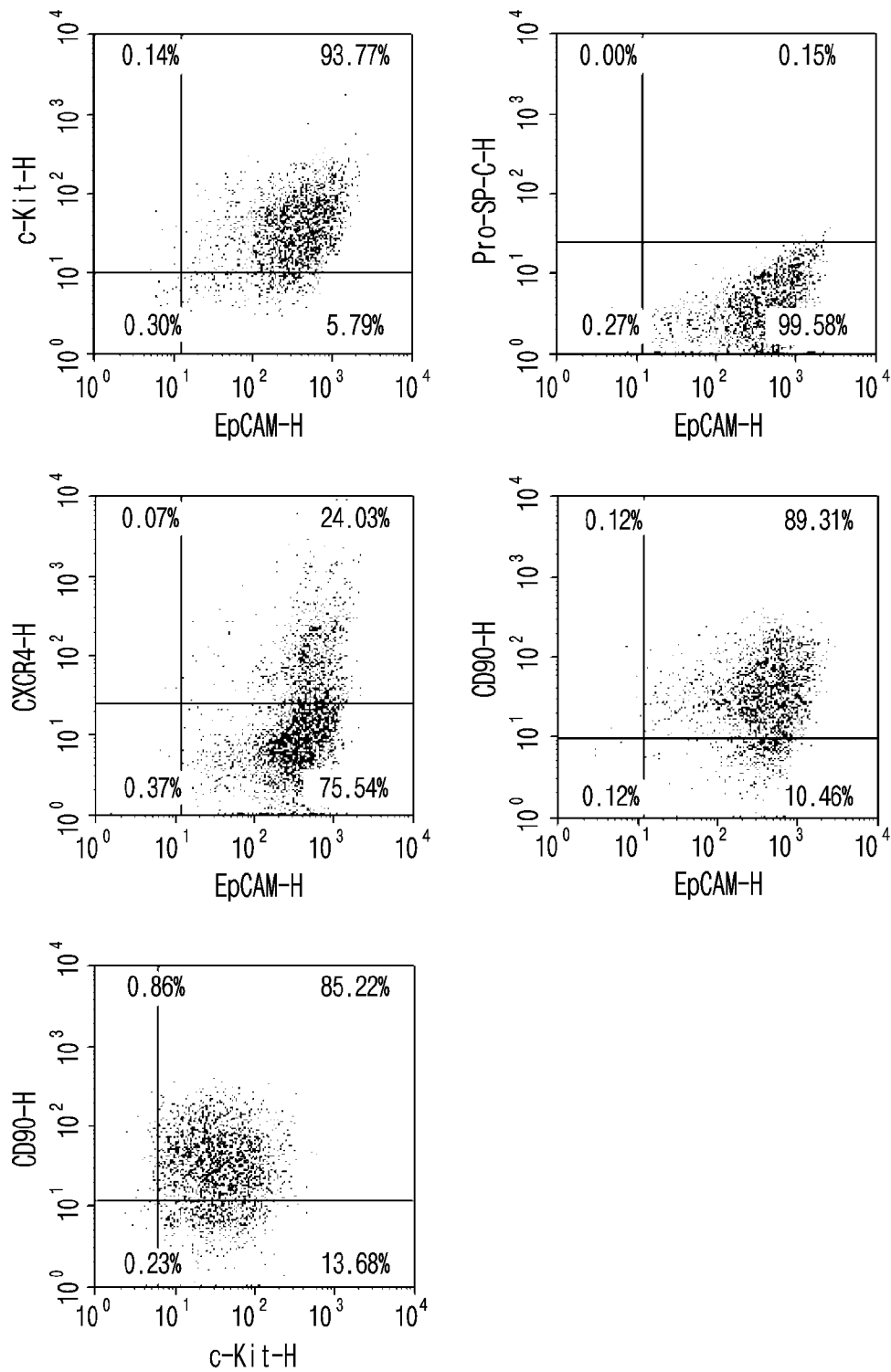
[도2b]



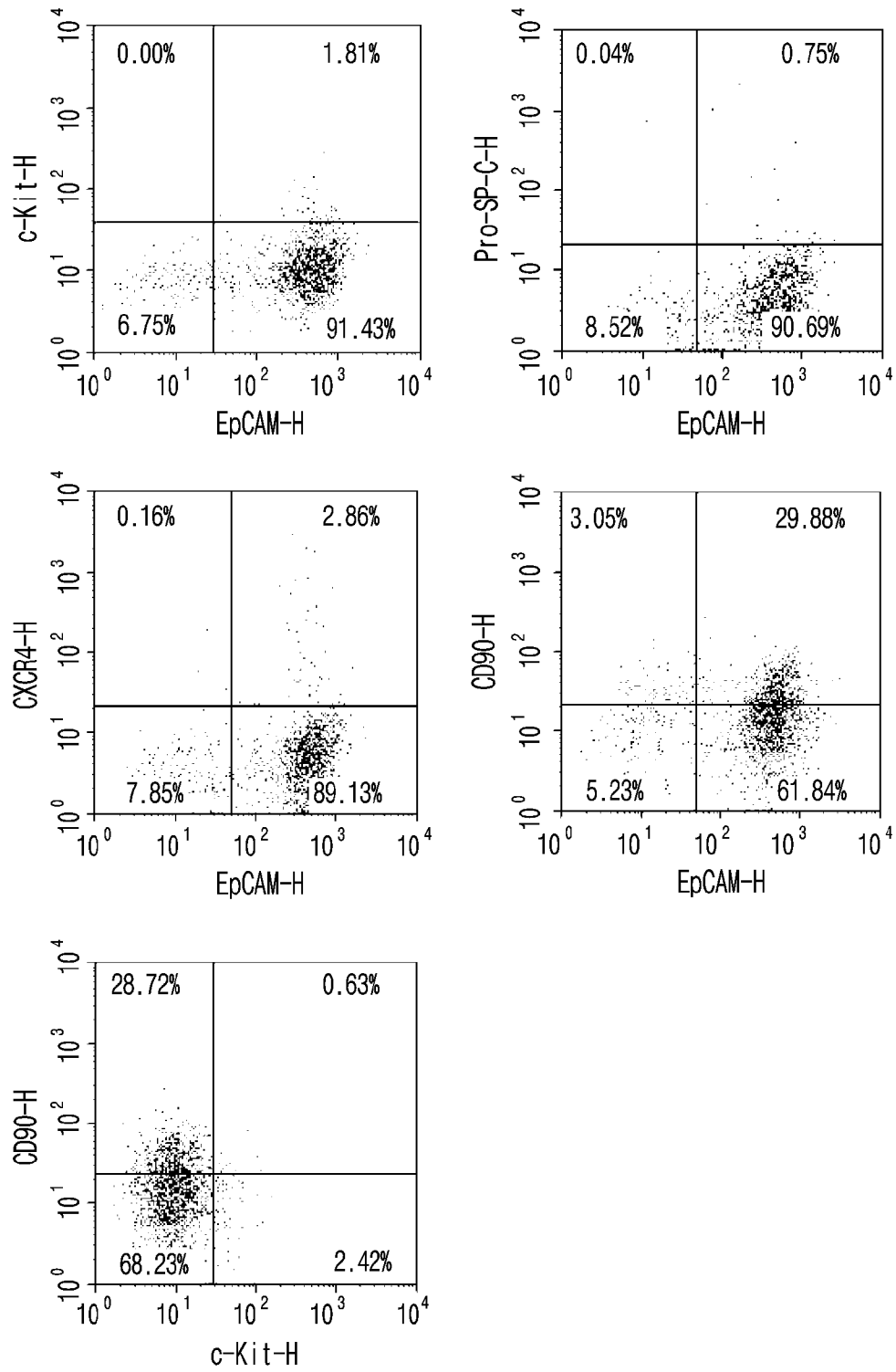
[도3]



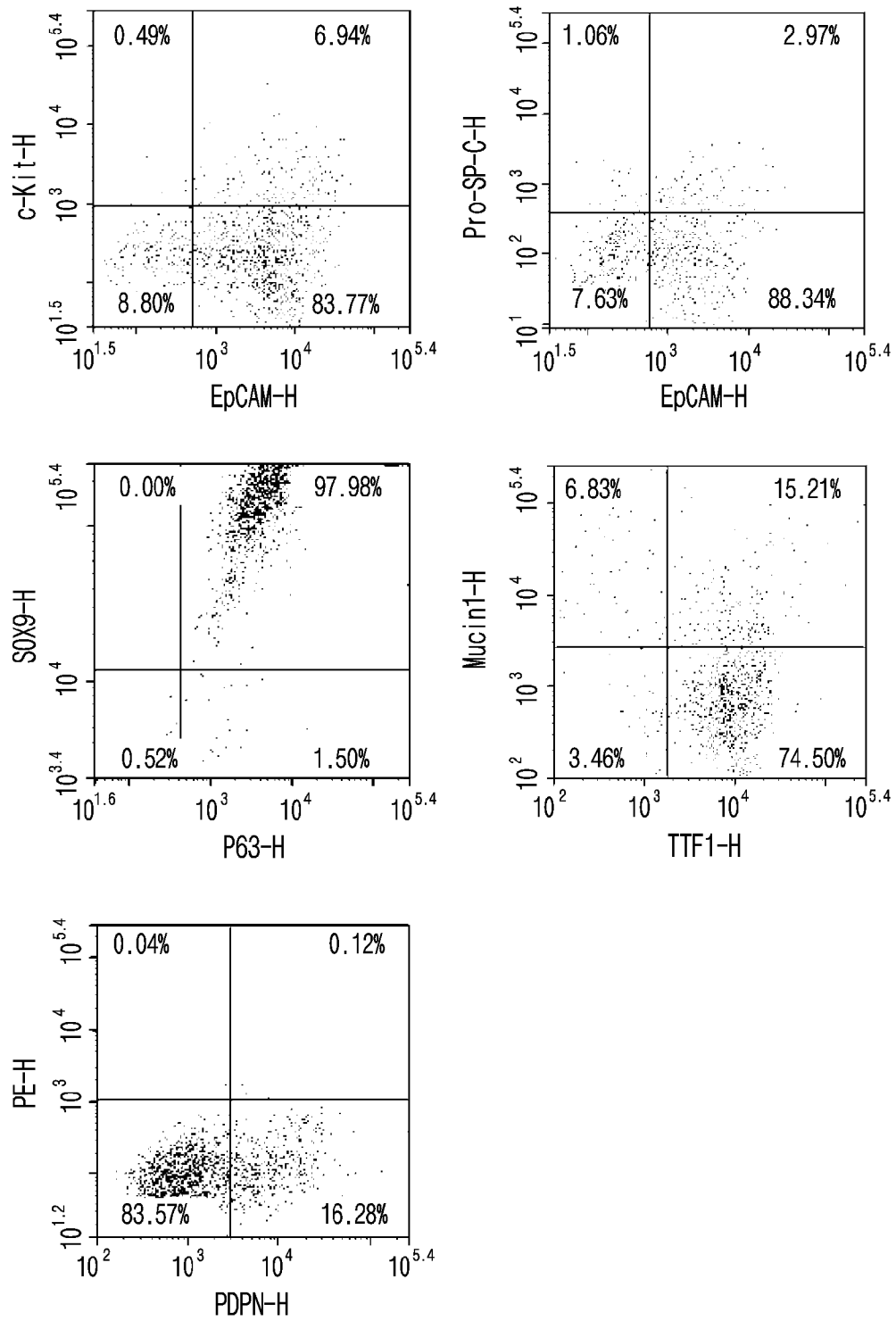
[도4a]



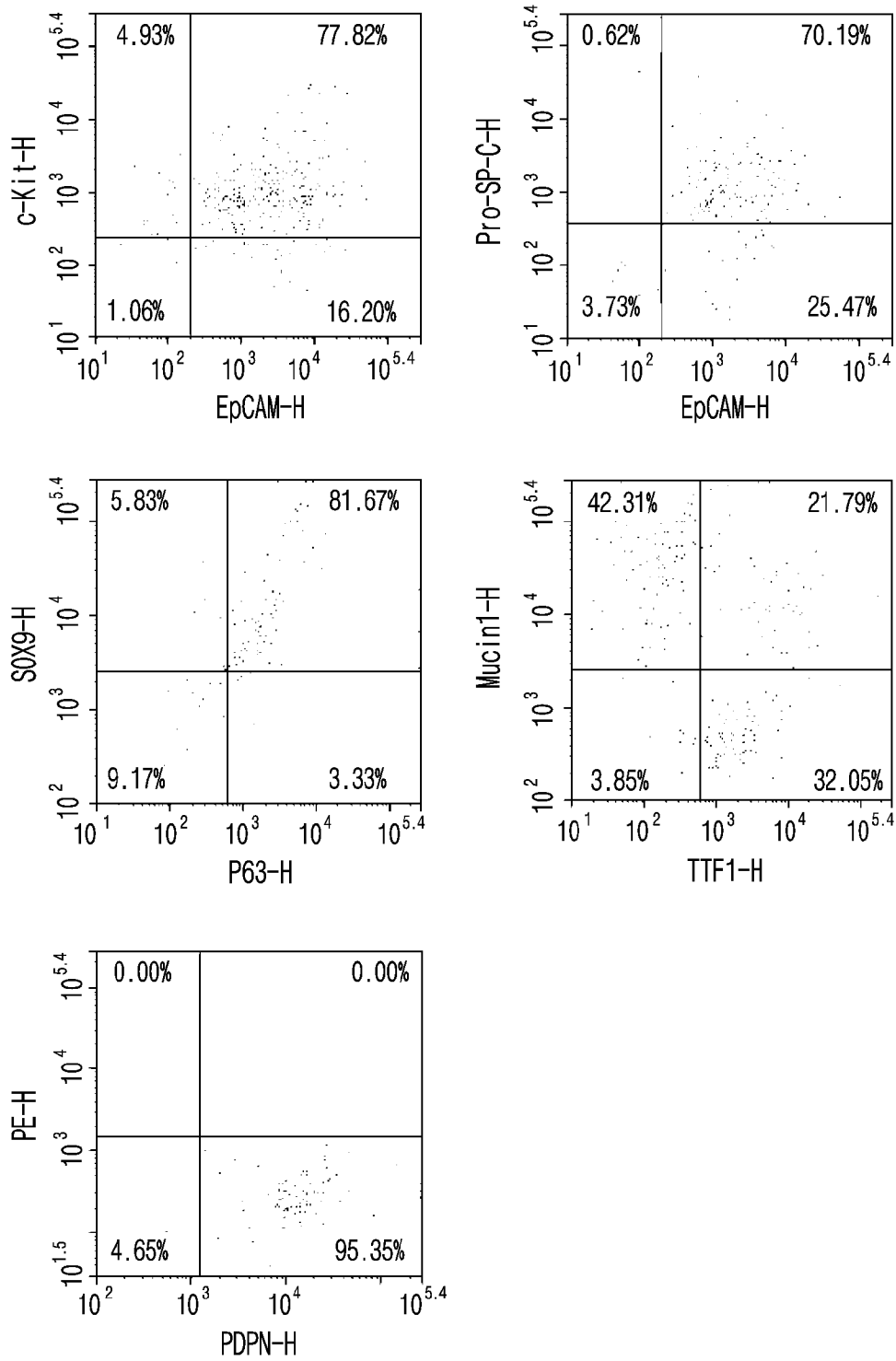
[도4b]



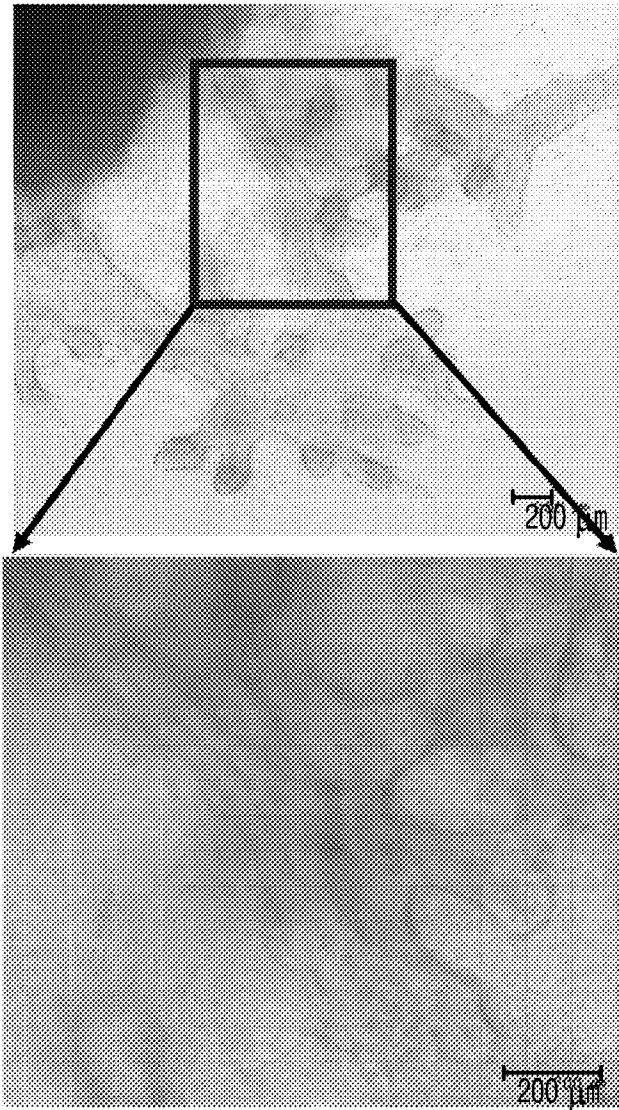
[도4c]



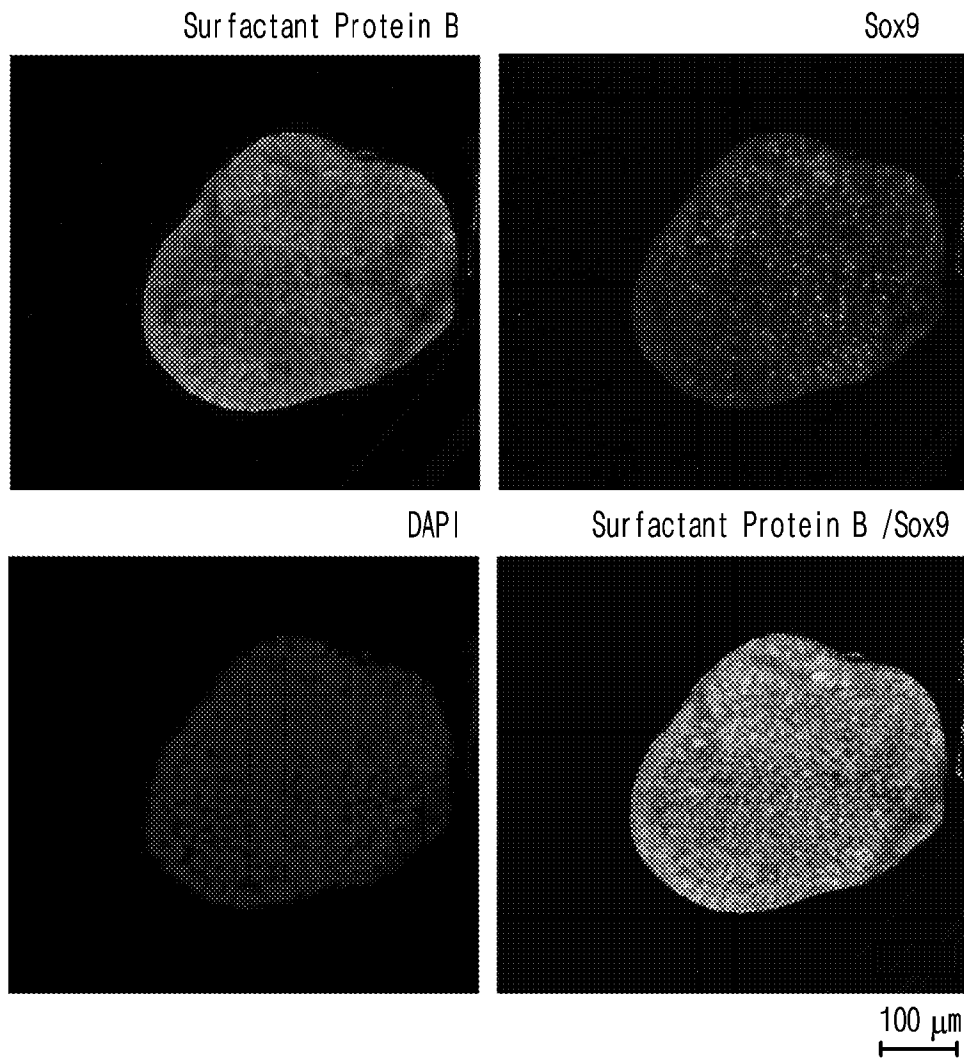
[도4d]



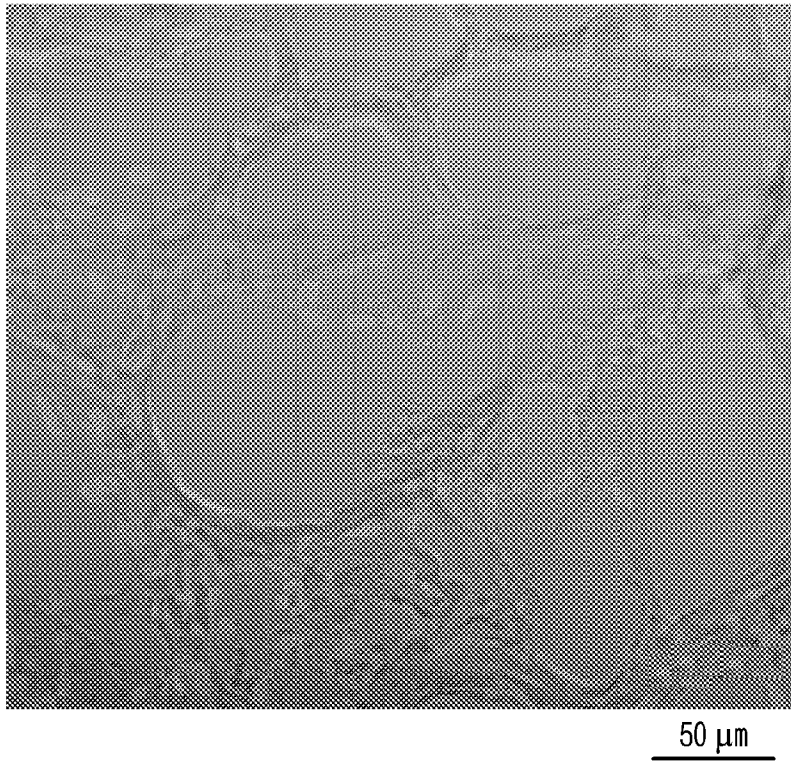
[도5a]



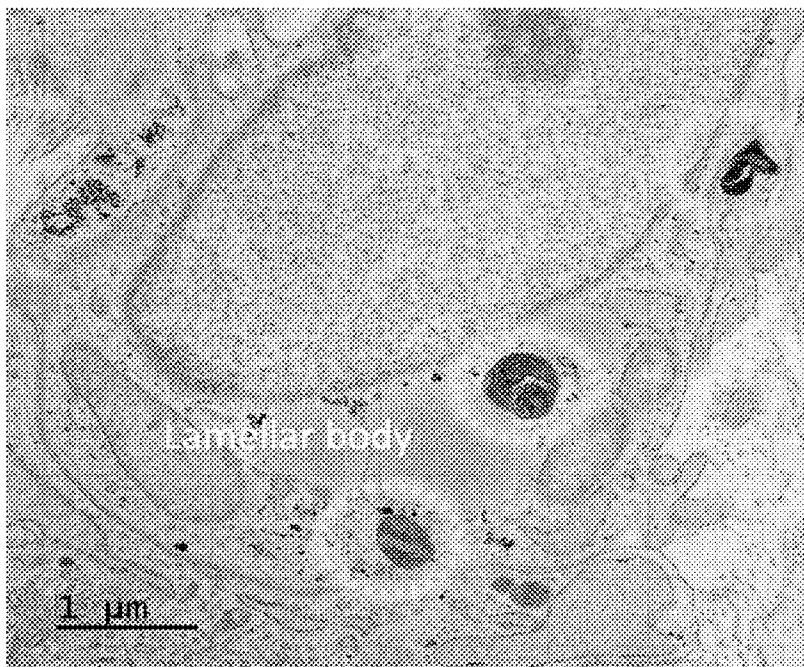
[도5b]



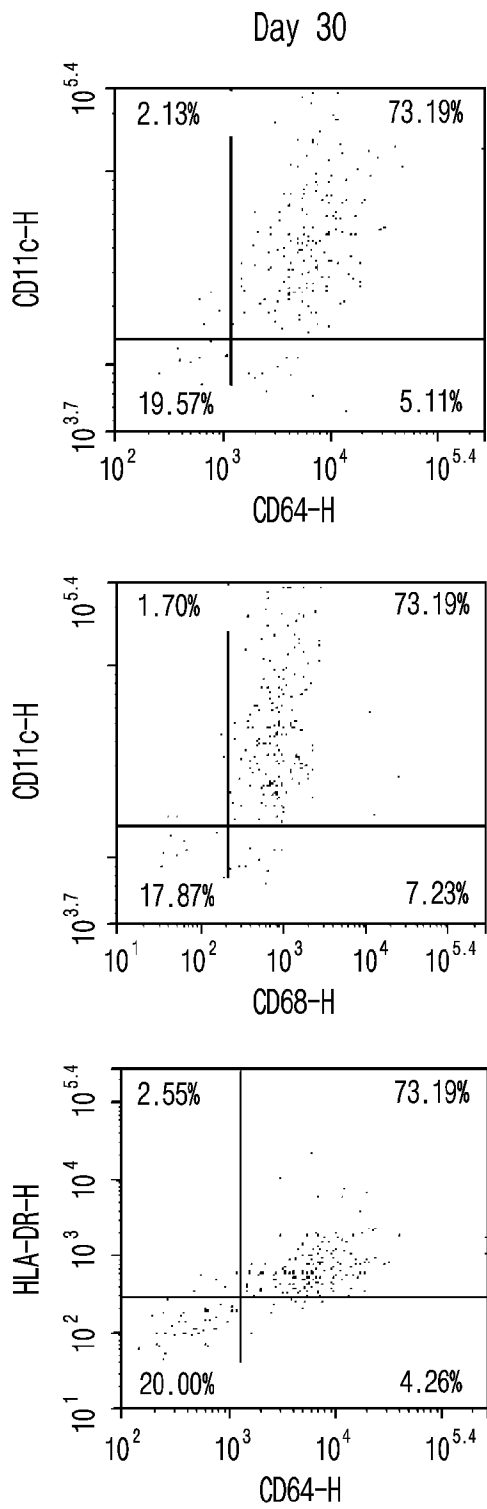
[도5c]



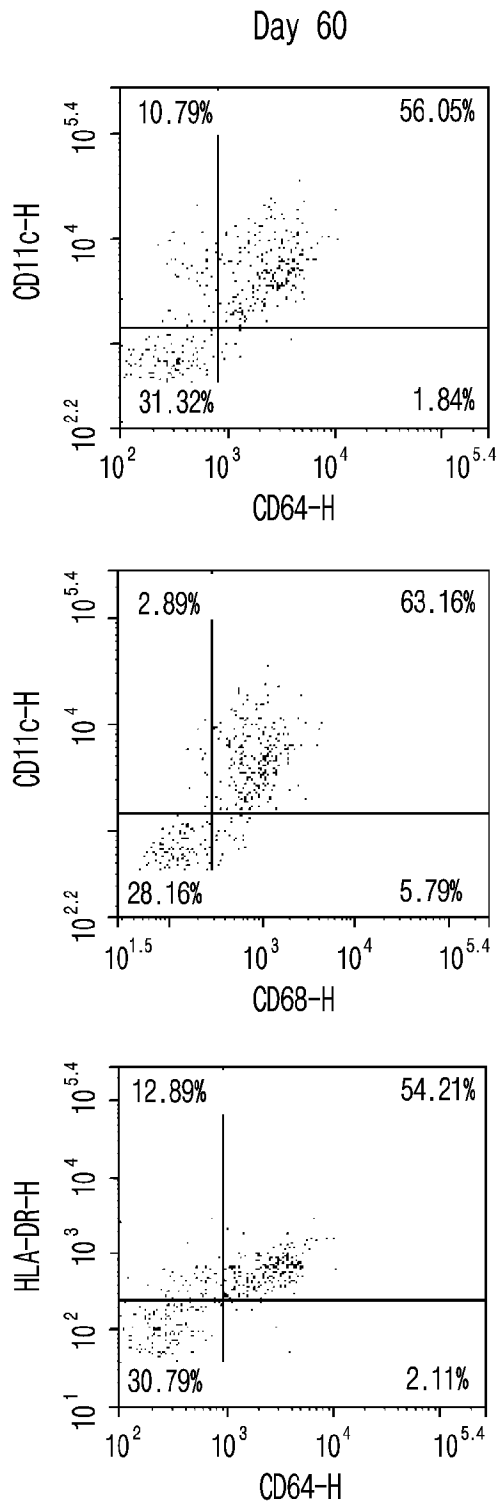
[도5d]



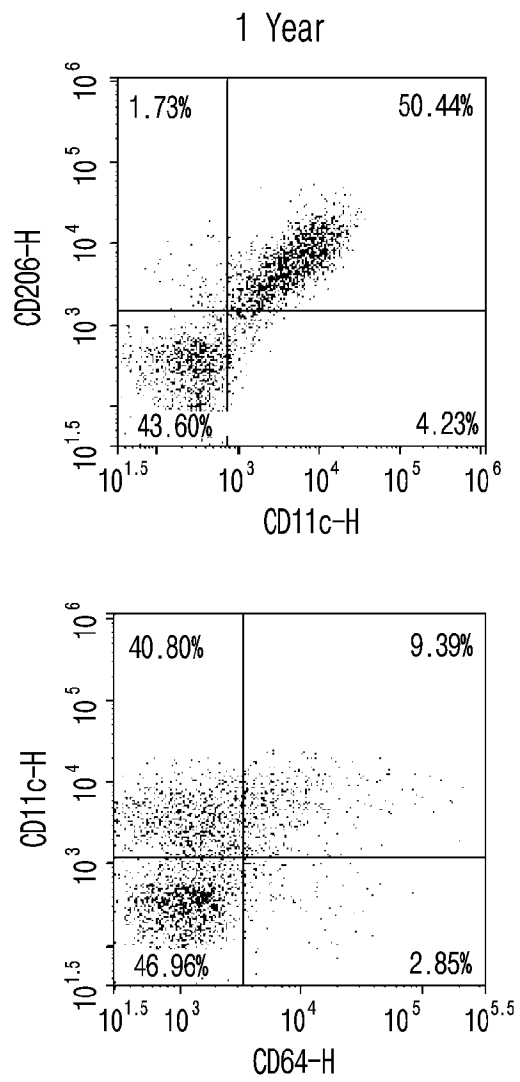
[도6a]



[도6b]

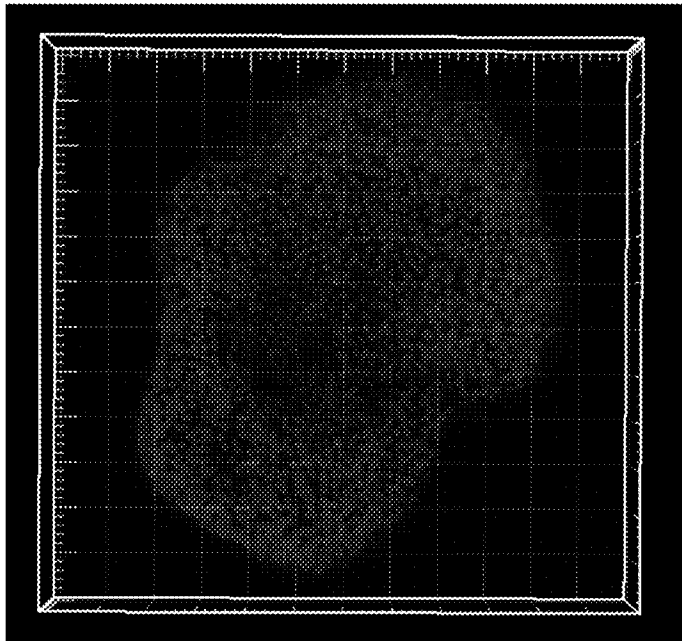


[도6c]



[도7a]

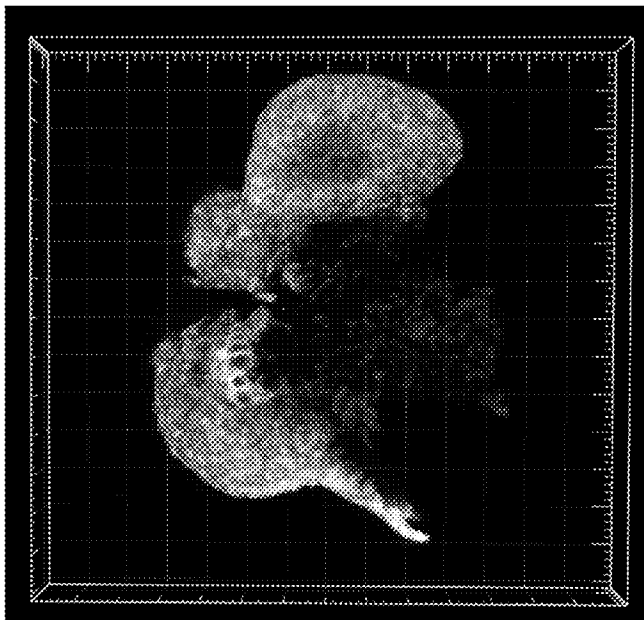
488 Isotype/594 Isotype/DAPI



100 μm

[도7b]

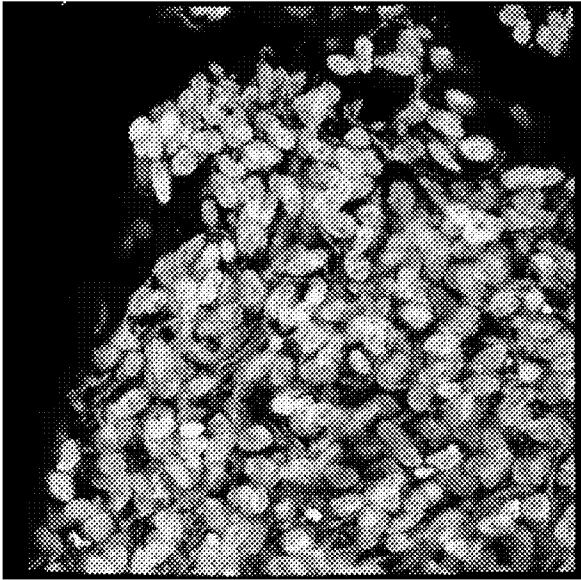
Pro-SPB/CD68/DAPI



100 μm

[도7c]

PDPN/DAP I

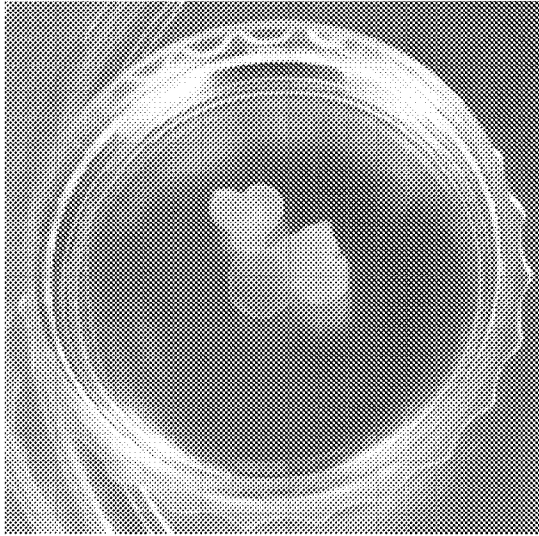


[도7d]

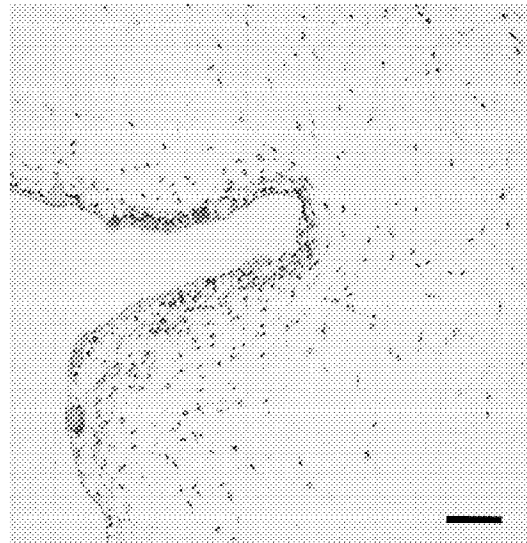
CD68/DAP I

50 μ m

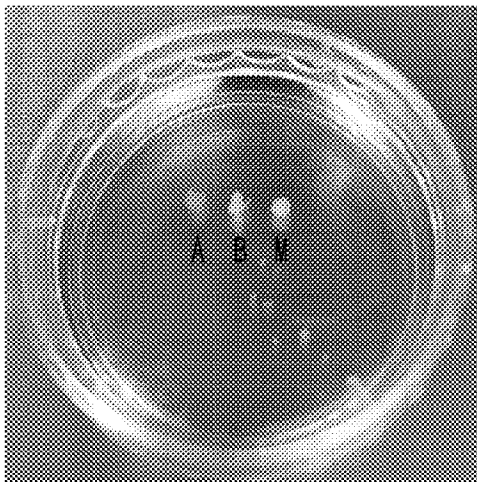
[도8a]



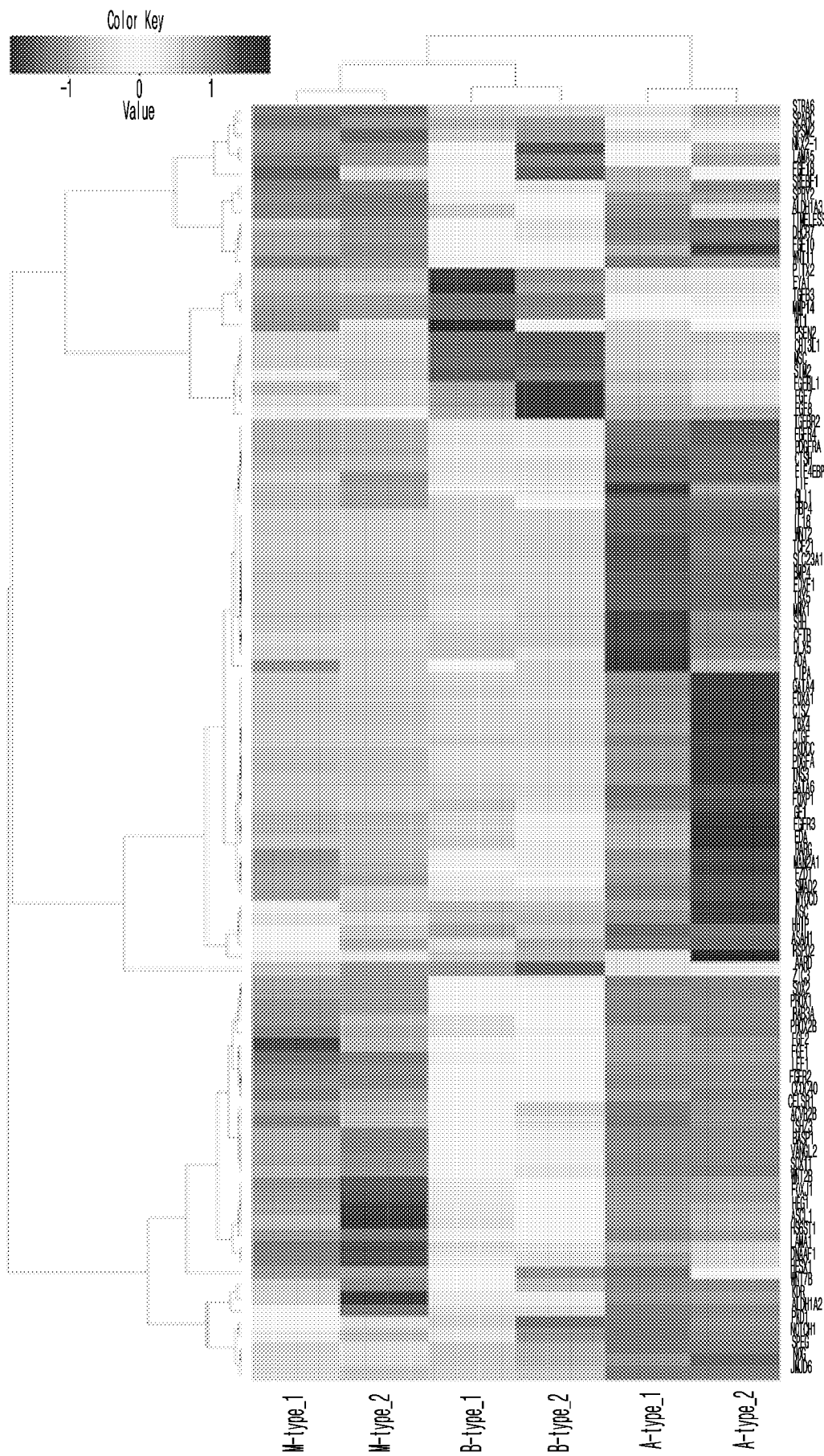
[도8b]



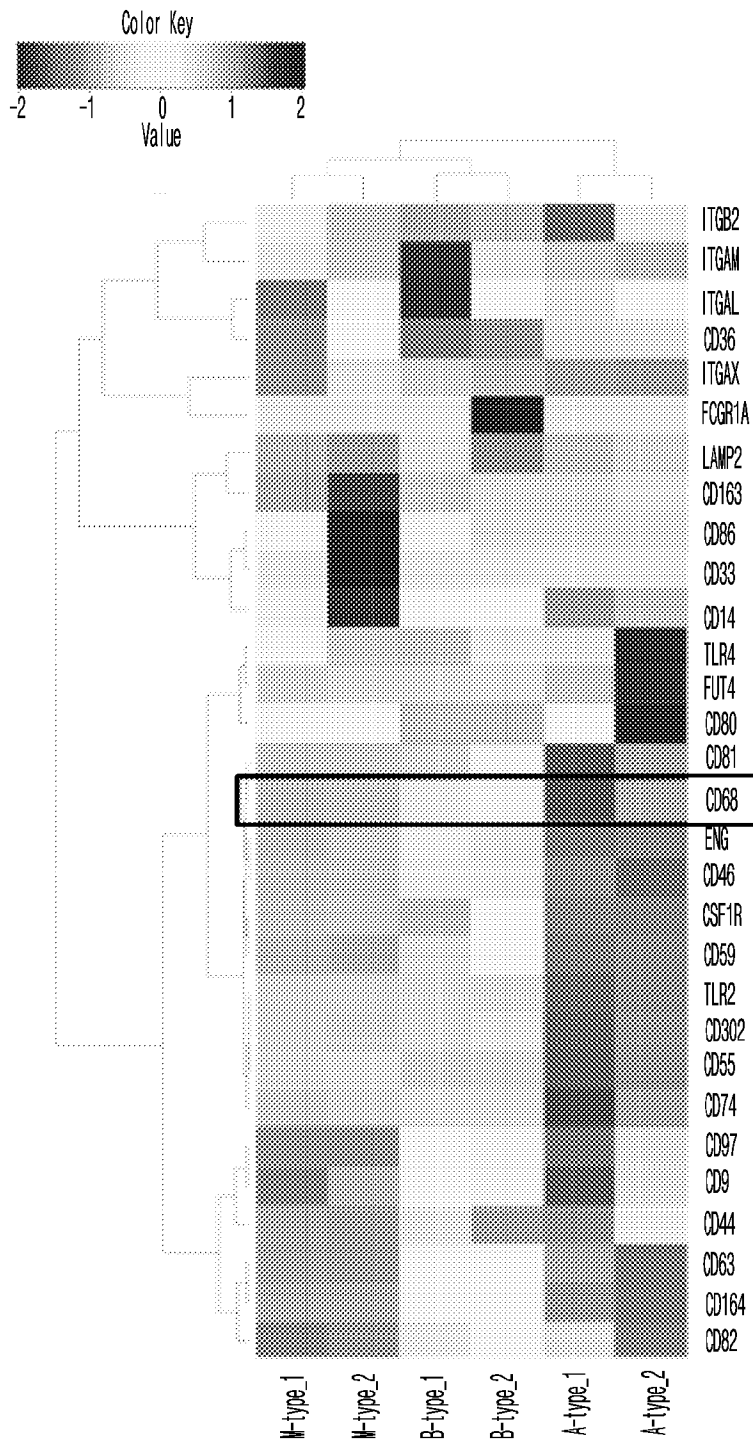
[도9]



[도 10a]



[도 10b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/018219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/071; C12N 5/074

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: definitive endoderm, mesoendoderm, anterior foregut endoderm, lung organoid, pulmonary alveolar macrophage, differentiation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAGRO-LOPEZ, Esmeralda et al. Effects of lung and airway epithelial maturation cocktail on the structure of lung bud organoids. Stem Cell Research & Therapy. 11 July 2018 (Online publication date), vol. 9, Article No. 186, pages 1-6 See pages 1-3, 5; figure 1.	1-18
A	DYE, Briana R et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. eLIFE. 2015, vol. 4, e05098, pages 1-25 See the entire document.	1-18
A	SERRA, Maria et al. Pluripotent stem cell differentiation reveals distinct developmental pathways regulating lung-versus thyroid-lineage specification. Development. 2017, vol. 144, pages 3879-3893 See the entire document.	1-18
A	US 2013-0217005 A1 (SNOECK, Hans-willem et al.) 22 August 2013 See the entire document.	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 APRIL 2020 (06.04.2020)

Date of mailing of the international search report

06 APRIL 2020 (06.04.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/018219

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAM, Albert Q. et al. Rapid and efficient differentiation of human pluripotent stem cells into intermediate mesoderm that forms tubules expressing kidney proximal tubular markers. Journal of the American Society of Nephrology. 2014, vol. 25, pages 1211-1225 See the entire document.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/018219

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0217005 A1	22/08/2013	CN 103068970 A	24/04/2013
		EP 2563908 A1	06/03/2013
		EP 2563908 B1	09/01/2019
		JP 2013-524836 A	20/06/2013
		US 2016-0168535 A1	16/06/2016
		US 9234170 B2	12/01/2016
		US 9719067 B2	01/08/2017
		WO 2011-139628 A1	10/11/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/071(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/071; C12N 5/074

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 완전 내배엽(definitive endoderm), 중내배엽(mesoendoderm), 전방 전장 내배엽(anterior foregut endoderm), 폐 오가노이드(lung organoid), 폐포 대식세포(pulmonary alveolar macrophage), 분화(differentiation)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MAGRO-LOPEZ, ESMERALDA 등, 'Effects of lung and airway epithelial maturation cocktail on the structure of lung bud organoids', Stem Cell Research & Therapy, 2018.07.11(온라인 공개일), 9권, Article No. 186, 페이지 1-6 페이지 1-3, 5; 도면 1 참조.	1-18
A	DYE, BRIANA R 등, 'In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids', eLIFE, 2015, 4권, e05098, 페이지 1-25 전체 문헌 참조.	1-18
A	SERRA, MARIA 등, 'Pluripotent stem cell differentiation reveals distinct developmental pathways regulating lung-versus thyroid-lineage specification', Development, 2017, 144권, 페이지 3879-3893 전체 문헌 참조.	1-18
A	US 2013-0217005 A1 (SNOECK, HANS-WILLEM 등) 2013.08.22 전체 문헌 참조.	1-18

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 04월 06일 (06.04.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 04월 06일 (06.04.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



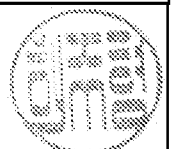
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LAM, ALBERT Q. 등, ‘Rapid and efficient differentiation of human pluripotent stem cells into intermediate mesoderm that forms tubules expressing kidney proximal tubular markers’ , Journal of the American Society of Nephrology, 2014, 25권, 페이지 1211-1225 전체 문헌 참조.	1-18

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2013-0217005 A1

2013/08/22

CN 103068970 A

2013/04/24

EP 2563908 A1

2013/03/06

EP 2563908 B1

2019/01/09

JP 2013-524836 A

2013/06/20

US 2016-0168535 A1

2016/06/16

US 9234170 B2

2016/01/12

US 9719067 B2

2017/08/01

WO 2011-139628 A1

2011/11/10