

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0140436

(43) 공개일자 2022년10월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 5/0793* (2010.01) *C12M 1/12* (2006.01)  
*C12M 3/00* (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)  
*C12N 5/071* (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 5/062* (2013.01)  
*C12M 21/08* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0044086  
 (22) 출원일자 2022년04월08일  
 심사청구일자 2022년04월08일
- (30) 우선권주장  
 1020210046634 2021년04월09일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
 고려대학교 산학협력단  
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자  
 박일호  
 서울특별시 서초구 신반포로 270 (반포동, 반포자이아파트)
- 박주후  
 서울특별시 구로구 구로동로 148 고려대부속구로병원  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 특허법인 무한

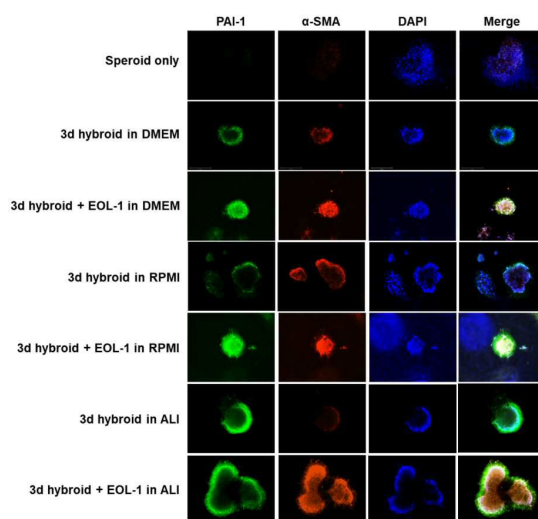
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 만성 상기도 염증성질환 모델용 3차원 하이브리드 세포배양시스템

## (57) 요약

본 발명은 만성 상기도 염증성 질환의 모델링을 위한 3D 하이브리드 세포 배양시스템에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 비강 상피세포를 ALI 배양하고, 비강 섬유아세포를 3D 스펜로이드 배양한 후 두 세포집합체를 공배양하여 얻어지는 하이브리드 세포 배양시스템에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 염증세포 등의 추가로 상기도 염증성 질환을 구현할 수 있어 질환 모델링 및 약물 스크리닝에 효과적으로 이용될 수 있다.

## 대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

**C12M 25/14** (2013.01)

**C12N 5/0062** (2013.01)

**C12N 5/0697** (2013.01)

**C12N 2501/20** (2013.01)

**C12N 2533/54** (2013.01)

(72) 발명자

**양현우**

서울특별시 구로구 구로동로 148 고려대부속구로병원

**신재민**

서울특별시 구로구 구로동로 148 고려대부속구로병원

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

비강 상피세포를 공기-액체 계면에서 배양하는 제1층; 및

상기 제1층 하부에 위치하며, 비강 섬유아세포를 기질 내에서 스페로이드 형태로 배양하는 제2층; 을 포함하며, 상기 제2층에 염증세포가 첨가되는 것을 특징으로 하는, 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양시스템.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 3차원 하이브리드 세포 배양시스템은 만성 상기도 염증성 질환의 내재형 및 조직학적 특징을 발현하는 것인, 3차원 하이브리드 세포 배양시스템.

#### 청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 만성 상기도 염증성 질환은 (비)부비동염, 축농증, 상악동염, 비염 및 후비루증후군으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 3차원 하이브리드 세포 배양시스템.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 제2층의 상기 기질은 매트릭셀인, 3차원 하이브리드 세포 배양시스템.

#### 청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 제2층 기질의 조성은 DMEM, 10%(v/v) 소태아혈청(FBS) 및 1%(v/v) p/s(penicillin/streptomycin)으로 구성되는, 3차원 하이브리드 세포 배양시스템.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 제2층에 첨가되는 상기 염증세포는 호산구, 호중구, 호중구립프구, 대식세포, EOL-1, THP-1 및 HL-60 중 어느 하나 이상인, 3차원 하이브리드 배양시스템.

#### 청구항 7

(a) 대상체의 비강으로부터 비강 상피세포와 비강 섬유아세포를 수득하는 단계;

(b) 상기 비강 상피세포를 공기-액체 계면상(Air-liquid interface)에서 2차원 배양하는 단계;

(c) 상기 비강 섬유아세포를 기질내에서 스페로이드 형태로 3차원 배양하는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계에서 배양된 비강섬유아세포 스페로이드에 염증세포를 추가하여 상기 (b)단계에서 배양된 비강상피 세포의 상부에 적층하고 공배양하는 단계;

를 포함하는, 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양방법.

#### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 만성 상기도 염증성질환은 비부비동염, 축농증, 상악동염, 비염, 후비루증후군으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양방법.

#### 청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 (b) 단계는, 상기 비강 상피세포를 분비세포, 섬모세포 및 기저세포로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양방법.

#### 청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 (c) 단계의 상기 기질은 매트릭셀인, 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양시스템을 준비하는 단계; 및

상기 세포 배양시스템에서 배양된 세포에 만성 상기도 염증성 질환 치료제 후보 물질을 접촉시키는 단계; 및

상기 후보 물질 중 상기 세포에서의 염증반응을 감소시키는 후보물질을 치료제로 선정하는 단계;

를 포함하는 만성 상기도 염증성 질환 치료제 스크리닝 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 만성비부비동염의 조직학적 및 내재적 특징을 구현하여 세포별 특징을 확인할 수 있는 세포 배양 시스템에 관한 것으로 보다 구체적으로는 3D 스페로이드 배양방법과 공기-액체 계면 배양방법을 융합하여 하이브리드 배양시스템을 확립하고, 염증성 세포를 추가하여 만성비부비동염 환자의 조직과 유사한 실험모델을 제공하는 시스템에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0003] 부비동이란 코 주위의 얼굴 뼈 속에 있는 빈 공간을 말한다. 이 공간들은 작은 구멍(자연공)을 통해 코 속과 연결되어 있고, 이를 통해 부비동 내의 공기의 환기 및 분비물의 배설이 이루어진다. 부비동염(축농증)이란 자연공이 막혀서 부비동이 제대로 환기 및 배설되지 않아 이차적으로 부비동에 염증이 발생하고, 농성 분비물이 고이면서 염증이 심해지는 상태를 말한다. 질병의 기간이 4주 미만일 경우에는 급성 부비동염, 3개월 이상 지속될 경우에는 만성 부비동염으로 정의한다.

[0004] 과거 부비동염의 진단은 부비동염 증상 확인과 함께 비강검사를 통해 누런 코(농, pus)의 배출을 확인하거나, 폴립(물혹)이 있는지 확인하여 이루어지고 있다. 또한 단순 부비동촬영을 통해 부비동 안에 액체가 있거나 뿌영게 흐려져 있는 모습, 또는 점막이 두꺼워진 징후 등으로 비부비동의 염증을 확인할 수 있다. 단순촬영에서 정

확한 결과를 얻을 수 없거나 수술 예정인 경우에는 보다 정확한 진단을 위해 CT촬영을 하게 된다.

- [0005] 현재는 염증성 사이토카인을 기반으로 한 내재형에 기반하여 만성 부비동염을 구분하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 하지만 이런 많은 시도에도 불구하고 수많은 원인에 의하여 발생하는 부비동염의 특성상 내재형이 명확하게 분류되지 않는다.
- [0006] 기존의 실험방법은 대부분 2D 단층 세포배양을 이용하였고, 최근에는 공기-액체 계면(Air-liquid interface, ALI) 배양 또는 오가노이드(organoid) 배양방법을 이용하여 만성비부비동염의 기전을 밝히고자 하고 있다. 2D 단층 세포배양 방법은 실험비용이 저렴하고 배양방법이 쉽지만 실제 세포가 자라나는 환경과 다르다는 단점이 있다. 3D 오가노이드 배양 방법은 줄기세포를 이용한 방법으로 생리학적으로 더 유사성이 높고 다양한 세포간의 특징을 확인할 수 있으나, 실험에 시간과 비용이 많이 들며 실험이 어려워 재현성이 떨어져 실험에 어려움을 겪을 수 있다.
- [0007] 이에 본 발명자들은 2D 단층 및 공기-액체 계면 배양방법과 3D 오가노이드 배양방법의 장점을 결합한 새로운 3차원 하이브리드 세포 배양시스템을 구상하여 발명으로 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 비강 상피세포를 공기-액체 계면에서 배양하는 제1층; 및 상기 제1층 하부에 위치하며, 비강 섬유아세포를 기질 내에서 스펜로이드 형태로 배양하는 제2층; 을 포함하며, 상기 제2층에 염증세포가 첨가되는 것을 특징으로 하는, 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양시스템을 제공하고자 하는 것이다.
- [0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 비강 상피세포를 공기-액체 계면에서 배양하는 제1층; 및 상기 제1층 하부에 위치하며, 비강 섬유아세포를 기질 내에서 스펜로이드 형태로 배양하는 제2층; 을 포함하며, 상기 제2층에 염증세포가 첨가되는 것을 특징으로 하는, 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양시스템을 제공한다.
- [0013] 일 측에 따르면, 상기 3차원 하이브리드 배양시스템은 만성 상기도 염증성질환의 내재형 및 조직학적 특징을 발현하는 것일 수 있다.
- [0014] 일 측에 따르면, 상기 만성 상기도 염증성질환은 (비)부비동염, 축농증, 상악동염, 비염 및 후비루증후군으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0015] 일 측에 따르면, 상기 제2층의 상기 기질은 매트릭젤일 수 있다.
- [0016] 일 측에 따르면, 상기 제2층 기질의 조성은 DMEM, 10%(v/v) 소태아혈청(FBS) 및 1%(v/v) p/s(penicillin/streptomycin)으로 구성될 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 제2층에 첨가되는 상기 염증세포는 호산구, 호중구, 호중구립프구, 대식세포, EOL-1, THP-1 및 HL-60 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면,
- [0019] (a) 대상체의 비강으로부터 비강 상피세포와 비강 섬유아세포를 수득하는 단계;
- [0020] (b) 상기 비강 상피세포를 공기-액체 계면상(Air-liquid interface)에서 2차원 배양하는 단계;
- [0021] (c) 상기 비강 섬유아세포를 기질내에서 스펜로이드 형태로 3차원 배양하는 단계; 및
- [0022] (d) 상기 (c) 단계에서 배양된 비강섬유아세포 스펜로이드에 염증세포를 추가하여 상기 (b)단계에서 배양된 비

강상피 세포의 상부에 적층하고 공배양하는 단계;

- [0023] 를 포함하는, 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양방법이 제공된다.
- [0024] 일 측에 따르면, 상기 만성 상기도 염증성질환은 비부비동염, 축농증, 상악동염, 비염, 후비루증후군, 만성기관지염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0025] 일 측에 따르면, 상기 (b) 단계는, 상기 비강 상피세포를 분비세포, 섬모세포 및 기저세포로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 세포로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0026] 일 측에 따르면, 상기 (c) 단계의 상기 기질은 매트릭젤일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 실시예에 따르면,
- [0028] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양시스템을 준비하는 단계;
- [0029] 상기 세포 배양시스템에서 배양된 세포에 만성 상기도 염증성 질환 치료제 후보 물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0030] 상기 후보 물질 중 상기 세포에서의 염증반응을 감소시키는 후보물질을 선정하는 단계;
- [0031] 를 포함하는 만성 상기도 염증성 질환 치료제 스크리닝 방법이 제공된다.

### 발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따르면, ALI 배양방법과 3D 스페로이드 배양방법을 융합한 하이브리드 배양 시스템을 이용함으로써, 기존 배양방법의 단점을 해결하고, 다양한 내재형을 구현할 수 있어 세포별 특징 및 내재형별 특징을 파악하여 만성 상기도 질환 모델링 및 약물 스크리닝에 광범위하게 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 본 발명의 일부인 3D 스페로이드 배양방법에 따른 세포를 나타낸 것이다.
- 도 2는 형성된 비강 섬유아세포를 TGF- $\beta$ 1에 노출시켜 각 인자의 발현을 형광이미지로 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일부인 ALI 배양된 비강 상피세포의 광학 현미경 사진이다.
- 도 4는 비강 상피세포에 TGF- $\beta$ 1를 노출시켰을 때의 형광이미지를 나타낸 것이다.
- 도 5는 염증유발인자에 노출시 3D 스페로이드 배양된 세포와 공배양되었는지 여부에 따른 각 인자의 발현정도를 나타낸 것이다.
- 도 6은 염증유발인자에 노출시 3D 스페로이드 배양된 세포와 공배양되었는지 여부에 따른 각 인자의 발현정도를 형광이미지로 나타낸 것이다.
- 도 7은 비강 섬유아세포만을 배양했을 때와 비강 상피세포를 함께 배양하였을 때 염증유발인자 노출시의 각 인자의 발현을 형광이미지로 나타낸 것이다.
- 도 8은 비강 섬유아세포 스페로이드에 염증세포를 추가하여 특성을 확인한 것이다.
- 도 9는 배양시스템을 다양하게 구성하는 경우의 인자발현을 형광이미지로 나타낸 것이다.
- 도 10은 비강 상피세포층에서 세포를 채취하여 mRNA 발현을 나타낸 것이다.
- 도 11은 본 발명의 3D 배양시스템 상부의 ALI 배양되는 비강 상피세포층에서 세포를 채취하여 mRNA 발현을 나타낸 것이다.
- 도 12는 본 발명의 3D 하이브리드 배양 시스템의 하부에서 배양되는 비강 섬유아세포 스페로이드에서 PAI-1 및 사이토카인의 발현을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 비강 상피세포를 공기-액체 계면에서 배양하는 제1층; 및 상기 제1층 하부에 위치하며, 비강 섬유아세포를 기질 내에서 스페로이드 형태로 배양하는 제2층; 을 포함하며, 상기 제2층에 염증세포가 첨가되는 것을 특징으로 하는, 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양시스템이 제공된다.
- [0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 “3차원 하이브리드 세포 배양시스템”이란, 2차원 배양된 세포와 3차원 배양된 세포를 접촉시켜 상호작용할 수 있도록 배양하는 세포배양 시스템을 의미한다. 보다 구체적으로, 상기 3차원 하이브리드 세포 배양시스템은 2차원 공기-액체 계면(ALI) 배양된 세포와 3차원 스페로이드 배양된 세포를 접촉시켜 배양하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 비강 상피세포를 2차원 공기-액체 계면 배양하고, 비강 섬유아세포를 3차원 스페로이드 배양하여 비강 상피세포를 비강 섬유아세포의 상부에 위치시켜 배양시킬 수 있다.
- [0038] 상기 “3D 스페로이드 배양”이란 세포가 3차원의 모든 방향으로 성장할 수 있도록 하여 구체 형태의 세포집합체를 만들어낼 수 있는 모든 배양방법을 말하며, 바람직하게는 50%(v/v) 마트리젤, DMEM, 10%(v/v) FBS 및 1%(v/v) p/s(penicillin/streptomycin) 배지에서 배양될 수 있다.
- [0039] 일 측에 따르면, 상기 비강 상피세포 및 상기 비강 섬유아세포는 대상체의 비강 점막조직에서 유래하는 것일 수 있다. 상기 대상체는 만성 상기도 염증성 질환을 보유한 대상체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특히, 본 발명에 따르면 정상대상체 비강조직 유래의 세포로부터 배양한 배양시스템에서도 염증세포의 추가로 염증성 질환을 모델링할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0040] 일 측에 따르면, 상기 3차원 하이브리드 배양시스템은 상기 대상체의 만성 상기도 염증성질환의 내재형 및 조직학적 특징을 발현하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로는, 염증세포가 추가된 하이브리드 배양 시스템에서, PAI-1 및 사이토카인을 단일 배양 시스템에서보다 높게 발현할 수 있다. 염증성 질환의 내재적 특징의 발현은 본 발명의 염증성질환 모델링 및 약물스크리닝 효과를 뒷받침한다.
- [0041] 일 측에 따르면, 상기 만성 상기도 염증성질환은 (비)부비동염, 축농증, 상악동염, 비염 및 후비루증후군으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0042] 일 측에 따르면, 상기 제2층의 상기 기질은 마트리젤일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 제2층 기질의 조성은 DMEM, 10%(v/v) 소태아혈청(FBS) 및 1%(v/v) p/s(penicillin/streptomycin)으로 구성될 수 있다.
- [0043] 일 측에 따르면, 상기 제2층에 첨가되는 상기 염증세포는 호산구, 호중구, 호중구립프구, 대식세포, EOL-1, THP-1 및 HL-60 중 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 염증세포의 추가로 인하여 정상 대상체 유래 세포로부터 배양하더라도 염증성질환의 내재형을 발현할 수 있음을 실시예 5 내지 6에서 확인하였다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면,
- [0045] (a) 대상체의 비강으로부터 비강 상피세포와 비강 섬유아세포를 수득하는 단계;
- [0046] (b) 상기 비강 상피세포를 공기-액체 계면상(Air-liquid interface)에서 2차원 배양하는 단계;
- [0047] (c) 상기 비강 섬유아세포를 기질내에서 스페로이드 형태로 3차원 배양하는 단계; 및
- [0048] (d) 상기 (c) 단계에서 배양된 비강섬유아세포 스페로이드에 염증세포를 추가하여 상기 (b)단계에서 배양된 비강상피 세포의 상부에 적층하고 공배양하는 단계;
- [0049] 를 포함하는, 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양방법이 제공된다.
- [0050] 상기 적층은 바람직하게는 챔버의 상하부를 나누어 상부에 ALI 배양된 비강 상피세포를, 하부에 스페로이드 배양된 비강 섬유아세포를 각각 위치시키는 것 또는 스페로이드 배양된 비강 섬유아세포 배지를 고형화시켜 그 상부에 직접적으로 ALI 배양된 비강 상피세포를 위치시키는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 일 측에 따르면, 상기 만성 상기도 염증성질환은 (비)부비동염, 축농증, 상악동염, 비염 및 후비루증후군으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0052] 일 측에 따르면, 상기 (b) 단계는, 상기 비강 상피세포를 분비세포, 섬모세포 및 기저세포로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 세포로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0053] 일 측에 따르면, 상기 (c) 단계의 상기 기질은 마트리젤일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 다른 실시예에 따르면,

- [0055] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 만성 상기도 염증성 질환 모델용 3차원 하이브리드 세포 배양시스템을 준비하는 단계;
- [0056] 상기 세포 배양시스템에서 배양된 세포에 만성 상기도 염증성 질환 치료제 후보 물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0057] 상기 후보 물질 중 상기 세포에서의 염증반응을 감소시키는 후보물질을 선정하는 단계;
- [0058] 를 포함하는 만성 상기도 염증성 질환 치료제 스크리닝 방법이 제공된다.
- [0059] 상기 3차원 하이브리드 세포 배양 시스템의 상기 대상체는 만성 상기도 염증성 질환을 보유하지 않은 정상대상체일 수 있으며, 본 발명에 따르면 정상 대상체 세포 유래 세포배양시스템에서도 염증성 인자의 추가로 인하여 염증성 질환을 구현할 수 있고, 이를 약물스크리닝에 이용할 수 있다. 그러나 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니며, 편의에 따라 만성 상기도 염증성 질환을 보유한 대상체로부터 세포를 수득할 수 있고, 이와 같이 수행되는 경우 대상체 맞춤형 약물 스크리닝이 가능할 수 있다.
- [0060] 상기 염증반응의 감소는 바람직하게는 본 발명의 3D 하이브리드 세포 배양 시스템이 나타내는 염증성질환의 표현인자의 감소일 수 있으며, 특정한 단백질 또는 마커로 제한되지 않는다.
- [0062] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0064] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0066] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0068] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0070] 실시예 1. 비강 섬유아세포 스페로이드의 제작 및 특성확인
- [0071] 만성 비부비동염 환자의 코 점막 조직에서 섬유아세포를 분리하여 배양하였다. 50%(v/v)의 고농도 매트릭젤/DMEM 배양액을 고형화 시킨 후, 배양한 섬유아세포를 포함하는 5%(v/v)의 저농도 매트릭젤/DMEM 배양액을 올려놓았다. 2주간 배양하여 구체형태의 스페로이드(spheroid)를 형성하는 것을 확인하여 도 1에 나타내었다.
- [0072] 형성된 비강 섬유아세포 스페로이드의 특성을 확인하기 위하여 TGF- $\beta$ 1에 노출시켜 근섬유아세포(myofibroblast)로 분화하는 성질을 확인하였다. 실험결과는 도 2에 나타내었으며, 세포외기질 중 하나로 알려진 피브로넥틴(fibronectin)과 근섬유아세포의 마커로 알려진  $\alpha$ -SMA를 확인한 결과 대조군에 비해 모두 증가하는 것이 확인되어 스페로이드로 분화된 후에도 비강 섬유아세포의 특성을 가짐을 확인하였다.

[0074] 실시예 2. 공기-액체 계면 배양

[0075] 만성 비부비동염 환자의 코 점막조직에서 상피세포를 분리하여 배양하였다. 배양한 상피세포를 기도 상피세포 기저 배지(airway epithelial cell basal media)에 섞어 0.4  $\mu$ m 공극(pore)을 보유한 트랜스웰(trasnwell)의 상부 챔버(upper chamber)에 옮겨 3일간 배양하였다. 배양한 상피세포를 ALI(Air-Liquid Interface) 배양액으로 바꾸어 각각 분비세포, 섬모세포 및 기저세포로 분화를 유도하였다. 배양된 세포에서 섬모가 관찰되며 배양된 세포에서 밀착연접(tight junction) 중 하나인 E-카데린(cadherin)이 형성됨을 확인하였다. 또한, TGF- $\beta$ 1 노출시 E-카데린이 감소함을 확인하여 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0077] 실시예 3. 3D 하이브리드 배양시스템 구축

[0078] 상기 실시예 1의 비강 섬유아세포 스페로이드의 상부에 상기 실시예 2의 섬유아세포 스페로이드가 배양되어있는 플레이트와 웰(well) 크기가 같은 비강상피세포층이있는 트랜스웰 챔버를 위치시켰다. 구체적으로, 상부 챔버에 상기 실시예 2의 비강상피세포를 배양하고, 하부챔버에 상기 실시예 1의 비강 섬유아세포 스페로이드를 위치시켜 비접촉 공배양(indrect co-culture)을 하였다.

[0080] 실시예 4. 3D 하이브리드 배양시스템의 특성확인

[0081] 상기 실시예 3에서 제조된 3D 하이브리드 배양시스템의 특성을 확인하기 위하여 사이토카인 어레이(cytokine array)를 진행하였다. 염증유발인자인 LPS(Lipopolysaccharide)에 노출되었을 때를 대조군과 비교하여 도 5에 나타내었다. 도면에서 나타나듯이, LPS 노출시에 엔도글린, 안지오텐신, IGFBP-3, FGF-19, BAFF 및 G-CSF의 인자들의 활성 정도가 비강 상피세포만 배양했을 때 보다 비강 섬유아세포 스페로이드와 함께 배양하였을 때 더 높아짐을 확인할 수 있었다.

[0082] 같은 방식으로 비강 상피세포만을 배양했을 때와 비강 섬유아세포 스페로이드를 함께 배양하는 경우 각각 LPS 노출시의 상피 밀착연접 단백질로 알려진 Zo-1, 섬모세포의 마커로 알려진  $\alpha$ -튜불린 및 DAPI의 발현정도를 형광이미지로 도 6에 나타내었다. 섬유아세포가 존재하고 있을 때 Zo-1 및  $\alpha$ -튜불린의 발현이 증가되어있어 섬유아세포의 존재에 의해 상피세포의 분화가 더욱 잘 진행되었음을 확인하였다. 또한 LPS에 의해 Zo-1 및  $\alpha$ -튜불린이 감소되는것으로 염증유도 환경에서 반응이 더욱 잘 일어나고 있음을 확인할 수 있었다.

[0084] 반대로, 비강 섬유아세포만을 배양했을 때와 비강 상피세포를 함께 배양하였을 때 각각 LPS 노출시의 피브로넥틴,  $\alpha$ -SMA 및 DAPI의 발현을 형광이미지로 도 7에 나타내었다. 도면에서 나타나는 바와 같이, 본 발명의 공배양 시스템에 의하는 경우 LPS 노출시 상기 인자들의 더 높은 발현을 보여주었고, 비강 섬유아세포를 비강 상피세포와 함께 배양하였을 때, 섬유아세포의 특성을 더 잘 발현함을 확인하였다.

[0086] 실시예 5. 염증세포 추가시의 특성확인

[0087] 상기 실시예 3에서 제작한 3D 하이브리드 배양시스템의 비강 섬유아세포 스페로이드에 인간 호산구성 세포주 EOL-1을 섬유아세포 스페로이드를 포함한 매트릭셀의 윗부분, 비강 상피세포가 포함된 트랜스웰 챔버의 하부에 추가하여 특성을 확인하였다. 특히, EOL-1이 추가되는 스페로이드의 배양 배지 구성을 섬유아세포의 배양배지(DMEM), EOL-1의 배양배지(RPMI 1640), ALI 분화배지를 각각 사용하여 실험을 달리하였으며, 이를 도 8에 나타내었다.

[0088] 도 8을 참조하면, 비강 상피세포 ALI 단독배양시 보다 본 발명의 하이브리드 배양을 하는 경우 전체적으로 PAI-1(Plasminogen activator inhibitor-1) 및 사이토카인의 농도가 높게 발현되었으며, 염증세포 중 하나인 EOL-1 세포를 추가하였을 때 PAI-1 및 사이토카인의 농도가 EOL-1 세포가 없는 하이브리드 배양보다 증가되어 있어 염증성 질환 모델링에 직접 이용될 수 있는 가능성을 보여주었다. 섬유아세포의 배양배지(DMEM), EOL-1의 배양배지(RPMI 1640), ALI 분화배지를 비교하였을 때 RPMI 배지에서 PAI-1과 사이토카인의 농도의 증가가 가장 높았다. 따라서 RPMI 배지를 이용하였을 때 최적화된 결과를 확인할 수 있다.

[0089] 도 9는 상기 실시예 3의 하이브리드 배양시스템에 EOL-1을 섬유아세포의 배양배지(DMEM), EOL-1의 배양배지

(RPMI 1640), ALI 분화배지에 추가한 후 섬유아세포 스페로이드에서  $\alpha$ -SMA와 PAI-1의 발현을 형광이미지로 나타낸 것이다. 도면의 제1행은 비강 섬유아세포 스페로이드만 사용하는 경우, 제2행은 DMEM 배지에서 배양된 비강 섬유아세포 스페로이드와 ALI 배양된 비강상피세포를 함께 배양한 경우, 제3행은 상기 제2행의 구성에 EOL-1이 추가되는 경우, 제4행은 RPMI 1640 배지에서 배양된 비강 섬유아세포 스페로이드와 ALI 배양된 비강상피세포를 함께 배양한 경우, 제5행은 상기 제4행의 구성에 EOL-1이 추가되는 경우, 제6행은 ALI 배양배지로 비강 섬유아세포 스페로이드와 비강상피세포를 배양하는 경우 및 제7행은 상기 제6행의 구성에 EOL-1이 추가되는 경우이다. 도면에서 확인할 수 있듯이, 같은 배양배지에서 EOL-1의 유무에 따른 발현의 차이를 확인시, RPMI 1640 배지로 배양을 하였을 때 발현의 차이가 가장 확연하였다. 따라서 RPMI 1640 배지가 하이브리드 배양시스템에서 비강 섬유아세포 스페로이드를 확인하는데 가장 최적화된 배지임을 확인할 수 있었다.

[0091] 실시예 6. 표면 ALI층의 mRNA발현 확인

[0092] 본 발명의 상기 3D 하이브리드 배양 시스템 중 상부의 ALI 배양되는 비강 상피세포층에서 세포를 채취하여 mRNA 발현을 확인하여 이를 도 10에 나타내었다. 같은 배지끼리 EOL-1의 유무에 따른 발현의 차이를 확인하였을 때 RPMI 1640 배지에서 EOL-1의 유무에 따른 PAI-1 및 사이토카인의 발현의 차이가 가장 많이 나는 것을 확인할 수 있다. 따라서 ALI 배양된 비강 상피세포에서도 RPMI 1640 배지에서 가장 최적화된 결과를 확인할 수 있다.

[0094] 실시예 7. 약물스크리닝

[0095] 본 발명의 상기 3D 하이브리드 배양 시스템 중 상부의 ALI 배양되는 비강 상피세포층에서 세포를 채취하여 mRNA 발현을 확인하여 이를 도 11에 나타내었다. EOL-1이 추가된 3D 하이브리드 배양 시스템의 배지부분에 스테로이드 약물중 하나인 텍사메타손을 처리하였다. 분화전 EOL-1, 뷰티르산(butyric acid)으로 분화시킨 EOL-1 및 IL-3 + IL-5 + GM-CSF로 분화 및 활성화시킨 EOL-1을 추가한 후 ALI 배양되는 비강 상피세포층에서 PAI-1 및 사이토카인의 발현을 확인하였다. 뷰티르산으로 분화시킨 EOL-1 및 IL-3 + IL-5 + GM-CSF로 분화 및 활성화시킨 EOL-1에서 유의하게 PAI-1 및 사이토카인이 증가하였으며, 텍사메타손에 의해 PAI-1 및 사이토카인의 발현이 억제됨을 확인하였다. 만성비부비동염의 치료제로 사용되고 있는 텍사메타손이 3D 하이브리드 배양시스템을 통해서도 효능이 입증됨을 확인하였다.

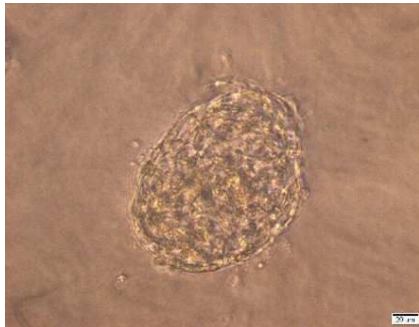
[0096] 본 발명의 상기 3D 하이브리드 배양 시스템 중 비강 섬유아세포 스페로이드에서 PAI-1 및 사이토카인의 발현을 확인하여 이를 도 12에 나타내었다. 비강 상피세포의 결과와 마찬가지로 뷰티르산으로 분화시킨 EOL-1 및 IL-3 + IL-5 + GM-CSF로 분화 및 활성화시킨 EOL-1에서 유의하게 PAI-1 및 사이토카인의 단백질 농도가 증가하였으며 텍사메타손에 의해 유의하게 억제됨을 확인하였다. 비강 상피세포에서도 텍사메타손의 효능을 확인할 수 있었으며 이 결과를 통해, 본 발명의 3D 하이브리드 배양 시스템은 염증 질환 치료제 선별을 위한 약물 스크리닝에 적용될 수 있음을 알 수 있다.

[0098] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

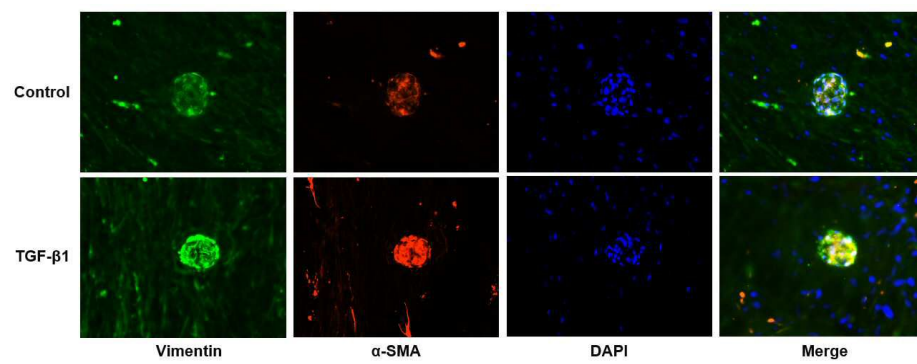
[0099] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

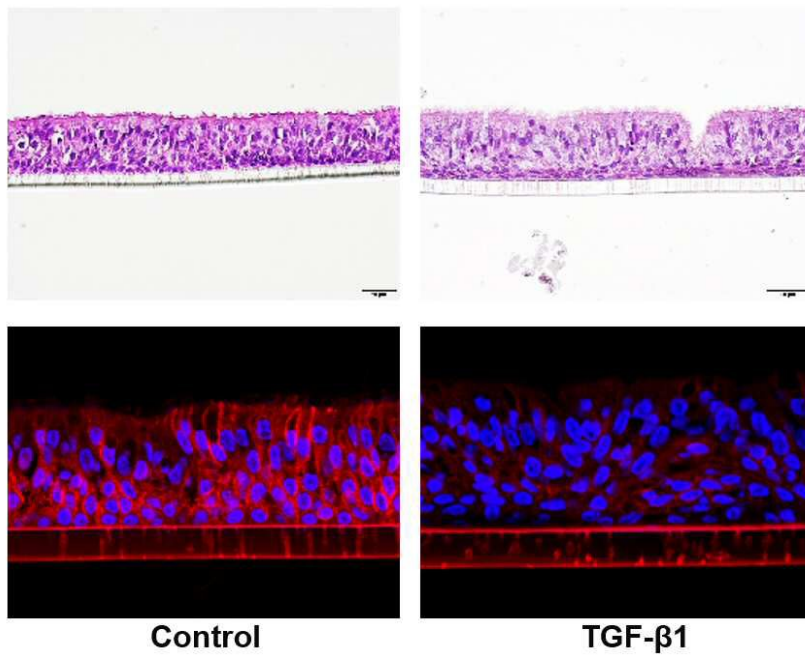
도면1



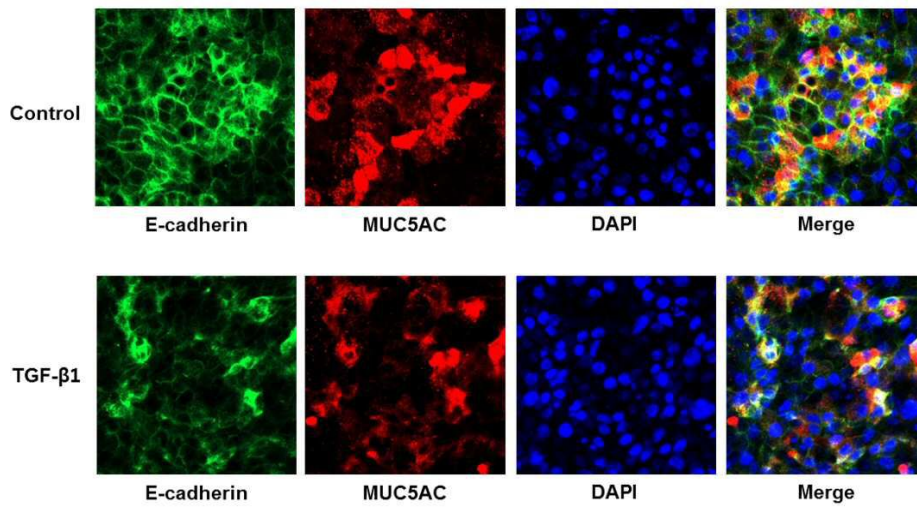
도면2



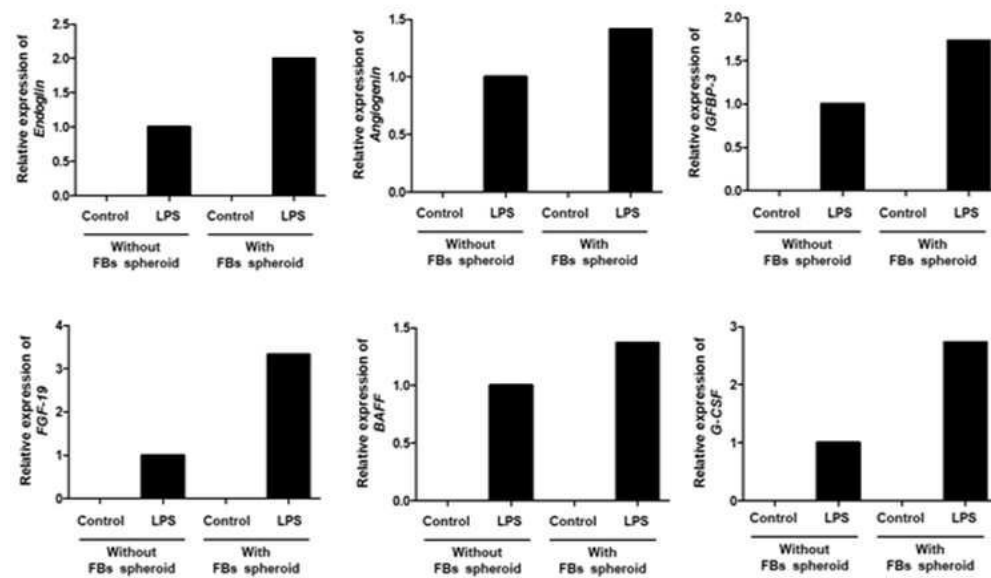
도면3



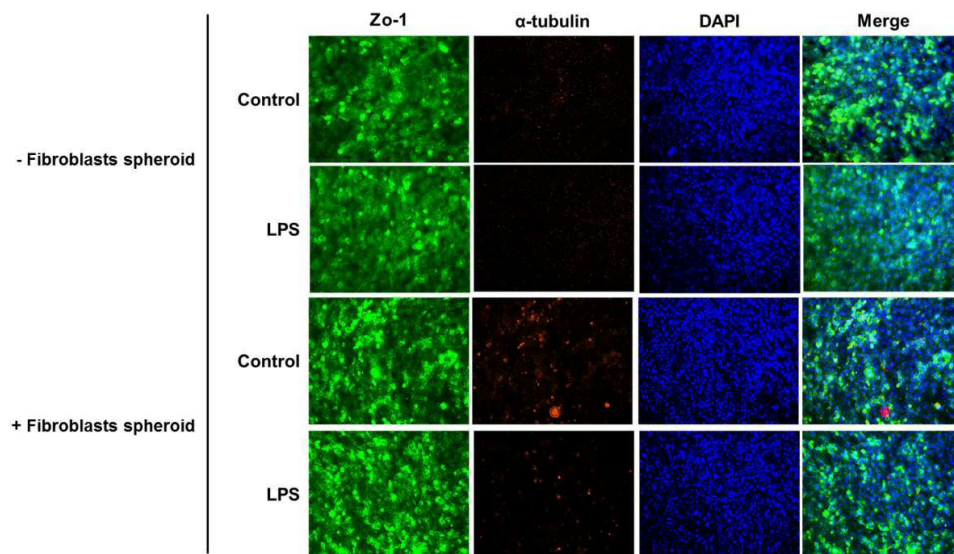
도면4



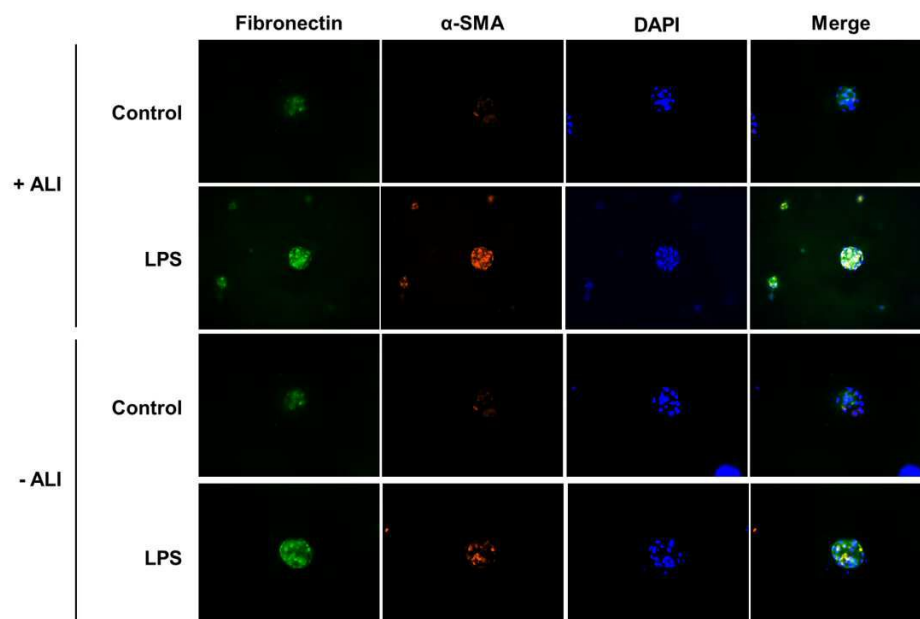
도면5



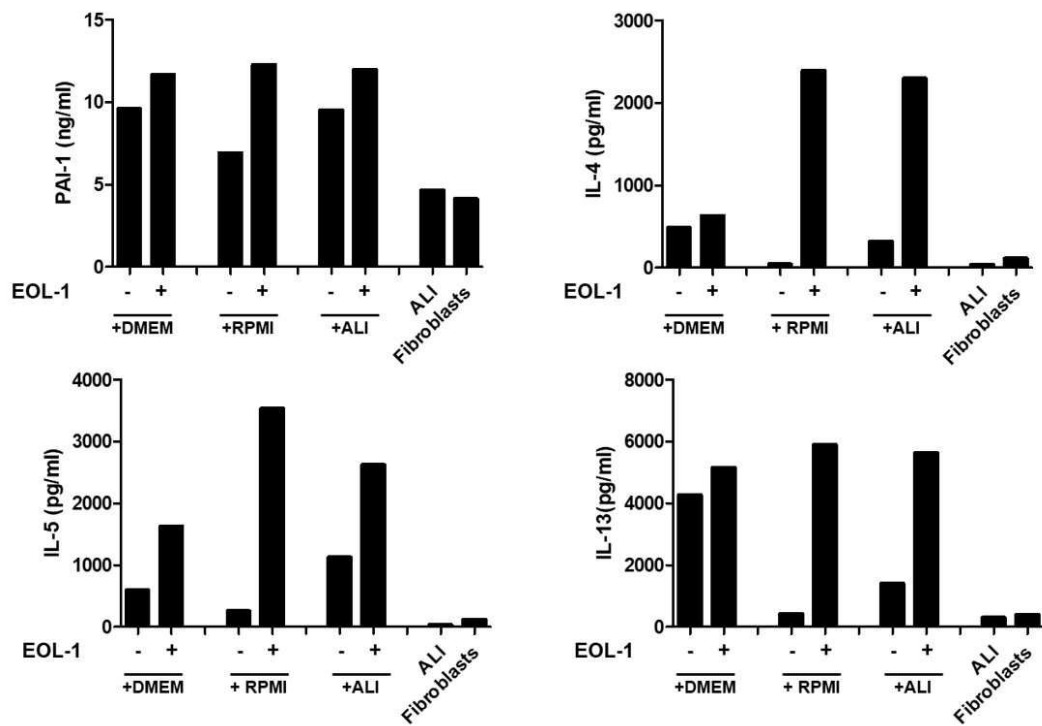
도면6



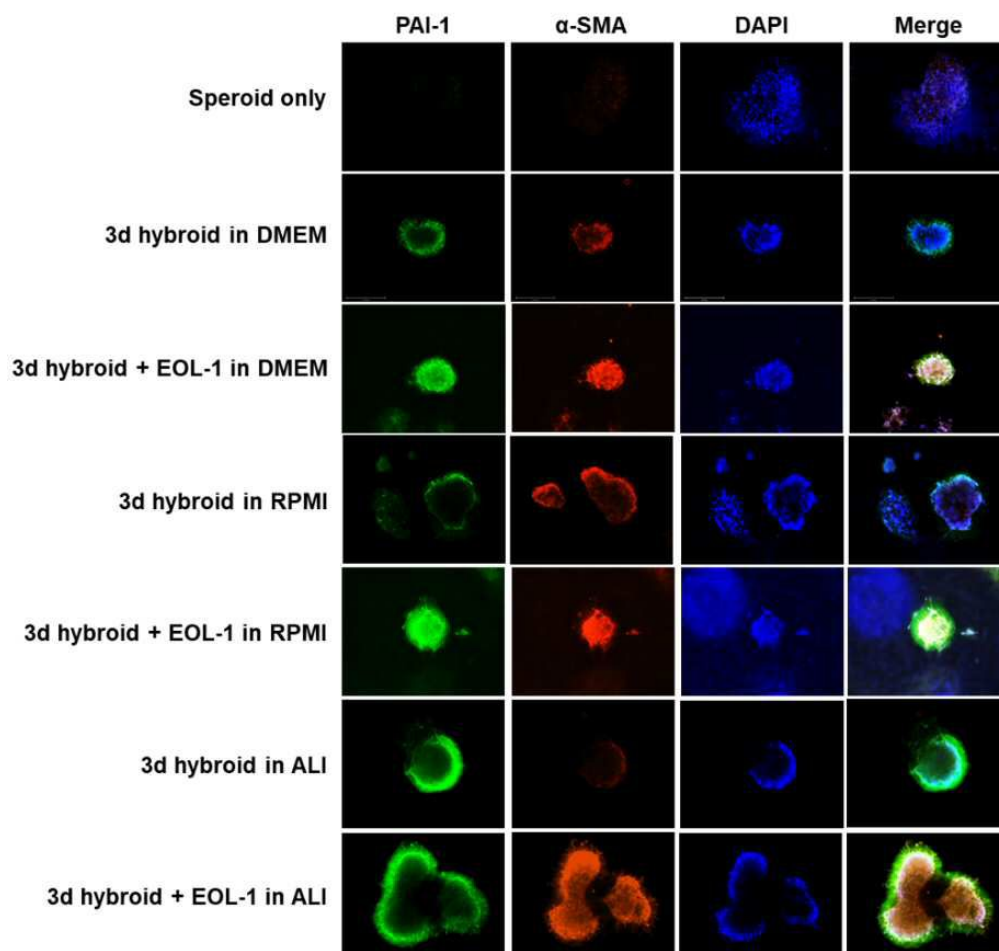
도면7



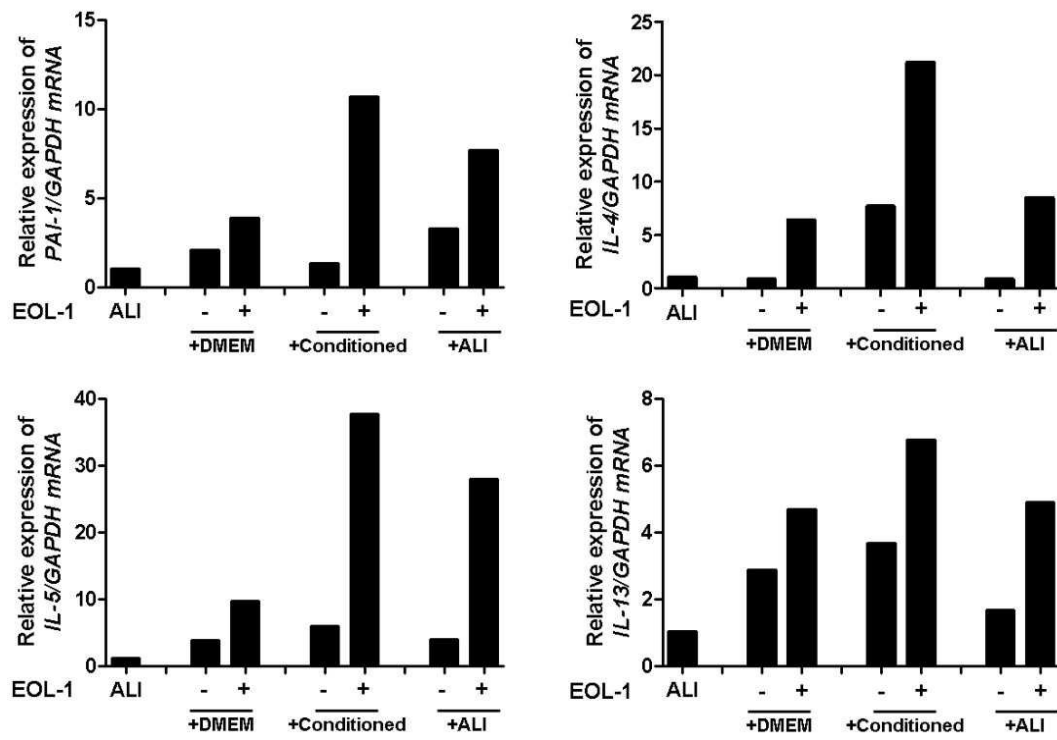
도면8



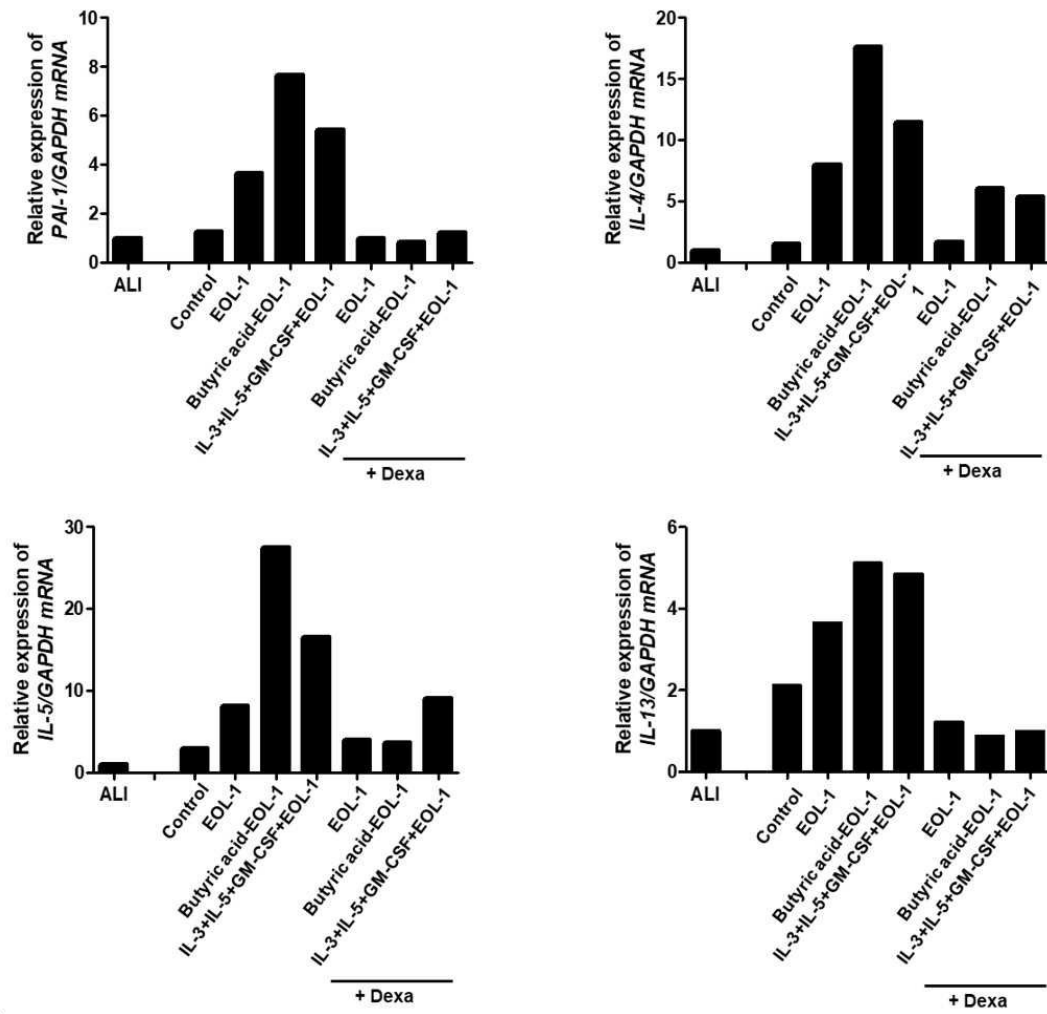
도면9



도면10



도면11



도면12

