

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 5월 30일 (30.05.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/112170 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/00 (2006.01)

[KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/019174

(72) 발명자: 임성갑 (IM, Sung Gap); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 손미영 (SON, Mi Young); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권오만 (KWON, Ohman); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 박성현 (PARK, Seong Hyeon); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 이은정 (LEE, Eunjung); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 이하나 (LEE, Hana); 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(22) 국제출원일:

2023년 11월 24일 (24.11.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0158842 2022년 11월 24일 (24.11.2022) KR

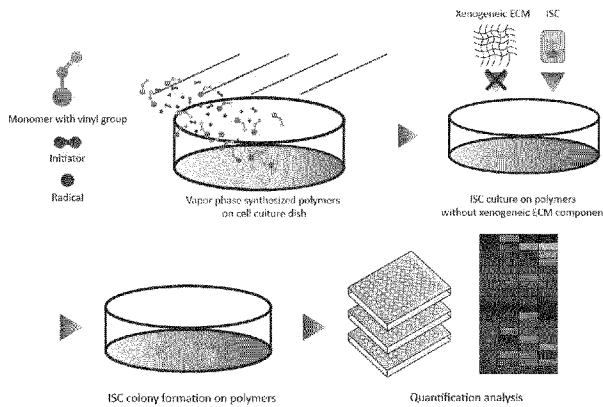
(71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

(74) 대리인: 김정교 등 (KIM, Kyeongkyo et al.); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로70길 13, 2층, 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,

(54) Title: METHOD FOR NON-XENOGENEIC CULTURING OF INTESTINAL STEM CELLS ON SURFACE COATED WITH THIN FILM

(54) 발명의 명칭: 박막 코팅된 표면 위에서 장 줄기세포를 무이종 배양하는 법



(57) Abstract: The present invention relates to a culture method for non-xenogeneic culturing of intestinal stem cells on a culture dish coated with a polymeric thin film, which does not include xenogeneic components such as Matrigel, and a use thereof. The method for culturing intestinal stem cells according to the present invention enables easy and rapid cultivation of homogeneous cells, enables mass-cultivation of cells at a low cost, and eliminates the risk of xenogeneic infection by culturing cells in a non-xenogeneic culture environment, thereby enabling the development of cell therapeutics that can actually be transplanted in practice. Another advantage is that cells can be cultured in a state in which cellular characteristics are maintained even during organ subculture and cryopreservation. Furthermore, the method for producing intestinal epithelial cells, according to the present invention, enables intestinal organoid-derived intestinal stem cells cultured in a non-xenogeneic culture environment to differentiate into intestinal epithelial cells in the same non-xenogeneic culture environment.

(57) 요약서: 본 발명은 마트릭젤과 같은 이종 성분 포함 없이 고분자 박막으로 코팅된 배양 접시 위에서 장 줄기세포를 무이종 배양하기 위한 배양 방법 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 장 줄기세포 배양 방법을 통해 쉽고 빠르게 균질한 세포를 배양할 수 있고, 낮은 가격으로 대량의 세포를 배양할 수 있으며, 무이종 배양 환경에서 세포를 배양함으로써 이종 감염의 위험성을 제거하여 실제 이식이 가능한 세포치료제의 개발이 가능하다. 또한, 장기의 계대 배양 및 동결 보존 등에서도 세포 특성을 유지한 상태로 배양 가능하다는 장점을 가진다. 또한, 본 발명에 따른 장 상피세포 제조 방법을 통해 무이종 배양 환경에서 배양한 장 오가노이드 유래 장 줄기세포를 동일한 무이종 배양 환경에서 장 상피세포로 분화시킬 수 있다.



CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,  
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,  
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,  
KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,  
MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,  
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,  
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

### 발명의 명칭: 박막 코팅된 표면 위에 장 줄기세포를 무이종 배양하는 법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 매트릭젤과 같은 이종 성분 포함 없이 고분자 박막으로 코팅된 배양 접시 위에서 장 줄기세포를 무이종 배양하기 위한 배양 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 장 오가노이드는 세포치료제로 활용되어 장 질환으로 손상되거나 제대로 발달하지 못한 장에 오가노이드를 이식해 환부를 재생시킬 수 있는 재생치료제로 각광받고 있다. 장 오가노이드는 재생의 핵심성분인 장 줄기세포를 포함하여 다양한 세포로 구성되어 있으며, 환부에 생착하여 손상된 조직을 효율적으로 재생하는 것으로 확인되어 치료제로 개발 가능성이 계속 커지는 추세이다.
- [3] 최근 장 조직이 손상된 모델에 사람의 장 오가노이드를 이식하여 손상된 장 조직이 재생되는 현상을 여러 그룹에서 반복적으로 확인한 바가 있으며, 이식된 장 오가노이드는 실제 장 조직의 구조와 기능을 높은 수준으로 재생할 수 있는 것으로 확인되었다.
- [4] 하지만, 장 오가노이드가 실제 세포치료제로 활용되기 위해서는 균질한 성능을 가진 장 줄기세포를 포함하고 있어야 하고, 장 줄기세포의 비율이 일정하게 유지되는 상태의 장 오가노이드를 대량 배양할 수 있어야 하고, 중간 교차 감염의 위험성을 줄이기 위해 무이종 세포 배양이 가능한 배양 시스템의 개발이 필요하다.
- [5] 또한, 생체 내에서의 장 줄기세포의 활용도와 더불어, 실험실 수준에서 성능이 우수한 장 줄기세포로부터 분화 과정을 통해 다양한 장 세포 타입을 포함하고 있는 장 상피세포 모델의 확보를 위해 위와 같은 배양 시스템에 관한 니즈가 지속적으로 커지고 있다.
- [6] 현재 장 오가노이드는 동물에게 이식된 육종으로부터 생산된 세포외기질을 분리하여 생산한 매트릭젤(Matrigel)을 이용한 3차원 배양법을 통해 배양되고 있으며, 배치 간 차이가 심하여 균질성이 낮고, 대량 배양이 어렵고, 배양 비용이 높은 단점이 있다. 뿐만 아니라 이종으로부터 추출되어 이종 감염을 일으킬 위험성이 있어 세포치료제 개발의 걸림돌로 작용하고 있다.
- [7] 이에 따라, 이종 감염의 위험이 없고, 균질한 장 줄기세포를 대량 배양할 수 있으며, 낮은 생산 비용을 통해 치료제의 원가를 절감할 수 있는 장 줄기세포 배양 방법의 개발이 필요한 상황이다.
- [8] 이러한 배경 하에 본 발명자들은 배양 접시의 표면을 고분자 코팅하여 장 오가노이드 유래 장 줄기세포를 2차원 배양 환경에서 쉽고 빠르게 무이종 배양할 수

있는 배양 방법 및 이와 관련된 다양한 활용 용도에 대해 확인하여 발명을 완성하였다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막을 포함하는 배양 기관에서 장 줄기세포를 배양하는 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막을 포함하는 배양 기관에서 배양한 장 줄기세포로부터 장 상피세포를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제 해결 수단

- [11] 하기에서는 중복되는 내용의 혼잡을 방지하기 위하여, 중복되는 내용의 기재를 생략하고자 한다. 즉, 하기의 내용만으로 발명의 내용이 한정되는 것은 아니고, 전체적인 발명의 내용에 따라 발명의 내용이 해석되어야 할 것이다.
- [12] 본 발명은 iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막을 포함하는 배양 기관에서 장 줄기세포를 배양하는 방법을 제공한다.
- [13] 상기 장 줄기세포를 배양하는 방법은 아래의 단계를 거쳐 수행된다:
- [14] (1) iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막을 포함하는 배양 기관을 제공하는 단계; 및
- [15] (2) 상기 배양 기관에 Wnt 신호 전달 경로 활성화제, Wnt 작용물질, TGF-베타 억제제, BMP 억제제, 및 수용체 타이로신 키나아제 리간드를 포함하는 배양 배지를 넣고 장 줄기세포를 2차원 배양하는 단계.
- [16] 본 발명에서 "iCVD (initiated chemical vapor deposition) 공정"이란, 개시제 (initiator)와 단량체(monomer)를 기화하여 기체상에서 고분자 반응이 이루어지도록 함으로써 고분자 박막을 코팅하는 공정을 의미한다. 구체적으로, 해당 공정에서는 고온의 필라멘트에 의해 개시제가 분해되어 자유 라디칼(free radical)이 형성되고, 이에 의해 단량체가 활성화되어 연쇄 중합반응이 일어난다. 이를 통해 불필요한 부차적 반응 없이 단량체의 작용기를 그대로 보존한 상태로 고분자 박막을 코팅할 수 있다.
- [17] 즉, iCVD 공정은 화학 기상 증착 공정인 바, 용매, 특히 유기 용매를 사용하지 않고 기상 조건에서 단량체와 개시제로 목적하는 고분자 박막을 증착시킬 수 있어, 하부에 기관을 포함하는 경우라도 용매로 인한 기관의 손상 우려를 배제할 수 있고, 잔류물이 남지 않아 고순도 박막을 수득할 수 있다.
- [18] 상기 개시제(initiator)는 iCVD 공정에서 단량체가 고분자를 형성할 수 있도록 첫 반응의 활성화를 유도하는 물질로, 단량체가 열분해되는 온도보다 낮은 온도에서 열분해되어 자유 라디칼을 형성할 수 있는 물질이 바람직하다. 개시제의 열분해에 의해 자유 라디칼이 형성되면 자유 라디칼이 단량체를 활성화시켜 이후 주변 단량체들의 중합을 유도하게 되고, 이 반응이 계속되어 유기 고분자 박



막을 형성하게 된다. 예컨대 개시제는 TBPO(*tert*-Butyl peroxide) 또는 벤조페논(benzophenone)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. TBPO는 약 110°C의 끓는점을 갖는 휘발성 물질로서 150°C 전후에서 열분해를 하는 물질이다. 한편 개시제 부가량은 통상의 중합반응에 필요한 양으로 당업계에 공지되어 있는 양을 첨가할 수 있으며, 예를 들어 0.5 내지 5mol%로 첨가될 수 있으나, 상기 범위에 한정되지 않고 상기 범위보다 많거나 적을 수 있다.

[19] 본 발명에서 "단량체(monomer)"란 유기 고분자 박막 형성을 위해 사용될 수 있는 단위체를 의미하고, 화학 기상 증착 공정에서 휘발성을 가지며, 개시제에 의해 활성화될 수 있는 물질이다. 상기 단량체는 감압 및 승온 상태에서 기화될 수 있다.

[20] 상기 단량체(monomer)는 DMAEMA(2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate), DMAPMA(Dimethylaminopropyl methacrylamide), DEAEMA(2-(Diethylamino)ethyl methacrylate), TBAEMA(2-*tert*-Butylaminoethyl methacrylate), DMAEA(2-(Dimethylamino)ethyl acrylate), GMA(Glycidyl methacrylate), EGDMA(Ethylene glycol dimethacrylate), VBC(Vinyl benzyl chloride), CHMA(Cyclohexyl methacrylate), V4D4(2,4,6,8-Tetramethyl-2,4,6,8-tetravinylcyclotetra siloxane) 및 BMA(Benzyl methacrylate)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 화합물일 수 있다. 바람직하게는 EGDMA(Ethylene glycol dimethacrylate) 또는 CHMA(Cyclohexyl methacrylate)일 수 있다.

[21] 상기 iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막은 예를 들어 하기로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다:

[22] pDMAEMA(poly(2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate)), pDMAPMA(poly(Dimethylaminopropyl methacrylamide)), pDEAEMA(poly(2-(Diethylamino)ethyl methacrylate)), pTBAEMA(poly(2-*tert*-Butylaminoethyl methacrylate)), pDMAEA(poly(2-(Dimethylamino)ethyl acrylate)), pGMA(poly(Glycidyl methacrylate)), p(GMA-co-DMAEMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))), p(GMA-co-DMAPMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-dimethylaminopropyl methacrylamide)), p(GMA-co-DEAEMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(diethylamino)ethyl methacrylate))), p(GMA-co-TBAEMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(2-*tert*-butylaminoethyl methacrylate))), p(GMA-co-DMAEA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl acrylate))), pEGDMA(poly(Ethylene glycol dimethacrylate)), p(EGDMA-co-DMAEMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))), p(EGDMA-co-DMAPMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-dimethylaminopropyl methacrylamide)), p(EGDMA-co-DEAEMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(diethylamino)ethyl methacrylate))), p(EGDMA-co-TBAEMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(2-*tert*-butylaminoethyl methacrylate))), p(EGDMA-co-DMAEA)(poly(Ethyle

ne glycol dimethacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl acrylate))), pVBC(poly(Vinyl benzyl chloride)), p(VBC-co-DMAEMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))), p(VBC-co-DMAPMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-dimethylaminopropyl methacrylamide)), p(VBC-co-DEAEMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(diethylamino)ethyl methacrylate))), p(VBC-co-TBAEMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(2-tert-butylaminoethyl methacrylate))), p(VBC-co-DMAEA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(2-(dimethylamino)ethyl acrylate))), pCHMA(poly(Cyclohexyl methacrylate)), pV4D4(poly(2,4,6,8-Tetramethyl-2,4,6,8-tetravinylcyclotetra siloxane)) 및 pBMA(poly(Benzyl methacrylate)).

- [23] 보다 바람직하게 pEGDMA(poly(Ethylene glycol dimethacrylate)) 또는 pCHMA(poly(Cyclohexyl methacrylate))일 수 있다. 상기 pEGDMA(poly(Ethylene glycol dimethacrylate)) 또는 pCHMA(poly(Cyclohexyl methacrylate))는 iCVD 공정에 의해 우수한 표면 접촉각 수준 및 표면 균질도 등을 나타내는 장점을 가진다.
- [24] 예를 들어, 상기 iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막은 물에 대한 접촉각 (water contact angle)이 10~45° 범위, 보다 바람직하게 15~35° 범위일 수 있다.
- [25] 또한, endotoxin 성분 없이 배양 조건을 제공할 수 있다는 점에 추가적인 장점을 가진다.
- [26] 이에 따라 장 줄기세포 배양에 있어서 장 줄기세포의 생착률을 높여주고 마트릭셀 환경과 유사한 수준으로 장 줄기세포의 특성을 나타내는 장 줄기세포의 배양 조건을 제공한다.
- [27] 이러한 iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막은 배양 기관 위에 코팅된 것일 수 있다.
- [28] iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막을 포함하는 배양 기관을 제공하는 방법은 배양 기관에 단량체 및 개시제를 공급하는 단계; 일정한 압력 하에서 열을 주입하고 상기 개시제를 열분해하여 자유 라디칼(free radical)을 형성하는 단계; 및 상기 자유 라디칼을 이용하여 상기 단량체를 활성화시킴으로써 상기 단량체들을 연쇄중합반응시켜 형성된 고분자를 생체모방형 박막으로 기관 위에 증착시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [29] 보다 바람직하게 iCVD 공정 후 플라즈마 처리를 더 포함할 수 있다.
- [30] 예를 들어, iCVD 공정을 통해 고분자 박막이 코팅된 후 5 내지 100 W 하에서 1 내지 200초 동안, 보다 바람직하게는 10 내지 20 W 하에서 5 내지 20초 동안 플라즈마 처리를 배양 기관에 제공하는 것일 수 있다.
- [31] 이를 통하여 배양 기관의 표면 접촉각 수준 및 표면 균질도를 조절하여 장 줄기세포의 배양에 보다 더 바람직한 배양 기관을 제공할 수 있다.
- [32] 상기 배양 기관은 유리, 금속, 금속 산화물, 섬유, 종이 및 플라스틱으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 플라스틱은 폴리에틸렌 (polyethylene, PE), 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리스티렌(polystyrene,

PS), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리아미드(polyamides, PA), 폴리에스터(polyester, PES), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC), 폴리우레탄(polyurethanes, PU), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리염화비닐리덴(polyvinylidene chloride, PVDC), 폴리테트라플루오르에틸(polytetrafluoroethylene, PTFE), 폴리에테르에테르케톤(polyetheretherketone, PEEK) 및 폴리에테르이미드(polyetherimide, PEI)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [33] 본 발명에서 "줄기세포"는 미분화 상태의 세포로 증식을 계속하는 능력, 즉 자기복제능력을 가지고 있으며, 조직 또는 장기를 구성하는 다양한 타입의 특정 세포로 분화할 수 있는 분화능을 갖는 세포를 의미한다. 보다 구체적으로 "장 줄기세포"는 장 상피조직으로부터 유래된 미분화세포로 자기복제능력을 가지고 있으며, 장 상피에 존재하는 다양한 타입의 특정 세포로 분화할 수 있는 분화능을 갖는 세포를 의미한다.
- [34] 장 줄기세포로부터 예를 들어 장 줄기세포, 장 전구체 세포, 장 상피세포, 장 배상세포, 장 내분비세포, 파네스 세포 등으로의 분화가 가능하다.
- [35] 필요에 따라, 본 발명에 따른 배양 조건은 장 줄기세포, 장 전구체 세포, 장 상피세포, 장 배상세포, 장 내분비세포, 파네스 세포의 배양에도 적합하고 이들의 적용에 활용 가능하다.
- [36] 장 줄기세포는 보다 구체적으로 LGR5 양성의 특성을 나타낸다.
- [37] 장 줄기세포는 성체 유래 장줄기세포 또는 hPSC(human pluripotent stem cells)로부터 유래된 장 오가노이드 유래 장 줄기세포일 수 있다.
- [38] 보다 구체적으로, EPHB3, CD44, SOX9 및 MKI67의 양성 발현 특성을 더 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [39] 보다 구체적으로, hESC(human embryonic stem cells), hiPSC(human induced pluripotent stem cells)를 포함하는 hPSC(human pluripotent stem cells)로부터 유래된 장 오가노이드 유래 장 줄기세포일 수 있다.
- [40] 본 발명에 따른 장 줄기세포를 배양하는 방법은 상기 장 줄기세포의 특성을 나타내는 세포들의 배양에 바람직한 배양 조건을 제공한다. 보다 구체적으로, hESC(human embryonic stem cells), hiPSC(human induced pluripotent stem cells)를 포함하는 hPSC(human pluripotent stem cells)로부터 유래된 장 오가노이드 유래 장 줄기세포의 배양에 바람직한 환경을 제공한다.
- [41] 본 발명에서 "배양 배지"란, 세포 생존능을 유지하고 증식을 지원해주는 영양소를 함유하는 세포 집단의 유지 또는 세포 집단의 배양을 위한 배지를 의미한다.
- [42] 본 발명에 사용되는 배양 배지는 기본 배지를 포함한다. 상기 기본 배지는 동물 또는 인간 세포의 배양에 적합한 임의의 기본 배지이다.
- [43] 상기 기본 배지는 전형적으로 배양된 세포의 유지를 지지하는데 필요한 다수의 성분들을 함유한다. 적합한 성분들의 조합은 하기의 내용을 고려하여 숙련가에

의해 쉽게 제형화될 수 있다. 또한, 일반적인 표준 세포 배양 성분, 예를 들어, 아미노산, 비타민, 지질 보충제, 무기염, 탄소 에너지원, 및 완충제를 포함하는 영양 용액을 포함한다.

- [44] 상기 기본 배지는 상업적으로 입수될 수 있으며, 비제한적으로 Dulbecco's Modified Eagles Media (DMEM), Minimum Essential Media (MEM), KnockOut-DMEM (KO-DMEM), Glasgow's Minimum Essential Media (G-MEM), Basal Medium Eagle (BME), DMEM/Ham's F12, Advanced DMEM/Ham's F12, Iscove's Modified Dulbecco's Media 및 Minimum Essential Media (MEM), Ham's F-10, Ham's F-12, 배지 199, RPMI 1640 배지, 및 KnockOut Serum replacement XenoFree medium를 포함한다. 예를 들어, 상기 기본 배지는 DMEM/F12, Advanced DMEM/F12 및/또는 RPMI 1640 배지일 수 있다.
- [45] 필요에 따라, 무혈청 배양에 대해 최적화되고 이미 인슐린을 포함하는 Advanced DMEM/F12 또는 Advanced RPMI가 사용된다.
- [46] 본 발명에 사용되는 배양 배지는 장 줄기세포를 배양하기 위해 제공되는 것으로서, Wnt 신호 전달 경로 활성화제, Wnt 작용물질, TGF-베타 억제제, BMP 억제제, 및 수용체 타이로신 키나아제 리간드를 필수적으로 포함한다.
- [47] 상기 Wnt 신호 전달 경로 활성화제는 Wnt/베타-카테닌의 표적이 증가되도록 Wnt/베타-카테닌 경로를 활성화하는 물질을 의미하며, Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 및 Wnt16 중 하나일 수 있다. 바람직하게는 Wnt3a일 수 있다. 보다 바람직하게 약 50 내지 300ng/ml Wnt3a를 사용하는 것일 수 있다.
- [48] 상기 Wnt 작용물질은 바람직하게 R-스폰딘 1, R-스폰딘 2, R-스폰딘 3 또는 R-스폰딘 4 또는 이들의 유도체일 수 있다. 상기 배양 배지에 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 600 ng/ml, 700 ng/ml, 800 ng/ml, 900 ng/ml, 1 ug/ml, 1.5 ug/ml 또는 2 ug/ml 이상의 농도로 포함될 수 있다. 바람직하게는 R-스폰딘 1일 수 있다. 보다 바람직하게 대략 50 내지 800 ng/ml의 R-스폰딘 1을 포함할 수 있다.
- [49] 상기 TGF-베�타 억제제는 TGF-베타 수용체의 기능을 억제하는 임의의 물질, 예를 들어, 단백질, 펩티드, 소분자이며, A83-01, SB-431542, SB-505124, SB-525334, SD-208, LY-36494 및 SJN-2511일 수 있다. 바람직하게 A83-01일 수 있다. 보다 바람직하게 100 nM 내지 1,000 nM의 A83-01일 수 있다.
- [50] 상기 BMP 억제제는 BMP 분자에 결합하여 복합체를 형성하는 작용제이다. 상기 억제제는 BMP 수용체에 결합하고 BMP 리간드의 수용체와의 결합을 방지하는 작용제, 예를 들어 상기 수용체에 결합하는 항체일 수 있다. BMP 억제제는 단백질 또는 소분자일 수 있으며 천연, 변형 및/또는 부분적으로 또는 전적으로 합성일 수 있다. BMP 억제제는 노긴(Noggin), Dorsomorphin, DMH1, 또는 LDN-193189일 수 있다. 바람직하게는 노긴일 수 있다. 보다 바람직하게 약 10 ng/ml 내지 150 ng/ml의 노긴을 포함할 수 있다.

- [51] 상기 수용체 타이로신 키나아제 리간드는 상피 성장 인자(EGF), 형질전환 성장인자-알파(TGF-알파), 기본 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 뇌-유래된 신경영양 인자(BDNF), 간세포 성장 인자(HGF), 뉴레굴린 1(NRG1) 및 각질세포 성장 인자(KGF)로 이루어진 성장 인자 중에서 선택된 분열촉진성 성장 인자이다. 바람직하게는 EGF이다. EGF는 다양한 배양된 외배엽 및 중배엽 세포에 대한 효능 있는 분열촉진인자이며, 생체 내 및 시험관 내에서 특정한 세포 및 세포 배양물 중의 일부 섬유아세포의 분화에 충분한 효과를 갖는다. 바람직한 농도는 10, 20, 25, 30, 40, 45, 또는 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 600 ng/ml, 700 ng/ml 이상이다. 보다 바람직한 농도는 50 ng/ml 이상 300 ng/ml 이하이다.
- [52] 상술한 필수적 조성 이외에도, 본 발명의 배양 배지는 p38 키나아제 억제제, Prostaglandin E2, N-acetylcysteine, Gastrin, B27 및 Nicotinamide로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 추가적인 성분을 더 포함할 수 있다. 또한, 배양 초기 ROCK 억제제, Notch 활성화제 또는 이들 모두를 배양 배지에 더 포함할 수 있다.
- [53] 상기 p38 키나아제 억제제는 전사 인자 및 기타 키나아제를 인산화 및 활성화시키는 역할을 하는 p38 키나아제의 활성을 억제하며, 예를 들어, SB202190, SB203580, SB239063, SB706504, BIR796, JX401, EO1428, RWJ67657, SCIO469, VX745, TAK715, ML3403, DBM1285, 또는 PH797804일 수 있다. 바람직하게는 SB202190일 수 있다. 보다 바람직하게 5  $\mu$ M 내지 50  $\mu$ M의 SB202190일 수 있다.
- [54] 상기 Prostaglandin E2, N-acetylcysteine, Gastrin, B27 및 Nicotinamide는 배양 효율 및 수명을 개선시키고 세포의 증식을 조절하며 DNA의 안정성 등을 돕기 위해 필요에 따라 추가될 수 있다.
- [55] 상기 B27은 하기 목록 중에서 선택된 성분들 중 하나 이상을 포함하는 제네릭 제형으로 대체될 수 있다: 비오틴, 콜레스테롤, 리놀레산, 리놀렌산, 프로세스테론, 푸트레신, 레티닐 아세테이트, 나트륨 셀레나이트, 트리-요오도티로닌(T3), DL-알파토코페롤(비타민 E), 알부민, 인슐린 및 트랜스페린.
- [56] 상기 ROCK(Rho-associated protein kinase) 억제제는 Rho(Rho A, Rho B 및 Rho C)에 대한 표적 단백질로서 작용을 하는 세린/트레오닌 키나아제의 활성을 억제하는 역할을 하며, 바람직하게는 R-(+)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexane carboxamide dihydrochloride monohydrate (Y-27632)일 수 있다.
- [57] 상기 Notch 활성화제는 Notch 경로 기능을 활성화하는 단백질 또는 소분자 화합물을 의미하며, 바람직하게는 Jagged-1 (JAG 1)일 수 있다.
- [58] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 (2) 상기 배양 기판에 Wnt 신호 전달 경로 활성화제, Wnt 작용물질, TGF-베타 억제제, BMP 억제제, 및 수용체 타이로신 키나아제 리간드를 포함하는 배양 배지를 넣고 장 줄기세포를 2차원 배양하는 단계는, Wnt3a, R-스폰딘 1, A-83-01, 노긴, 및 EGF를 포함하는 배양 배지에서 장 줄기세포를 2차원 배양하는 것일 수 있다.

- [59] 보다 구체적으로, SB202190, Prostaglandin E2, N-acetylcysteine, Gastrin, B27 및 Nicotinamide로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 추가적인 성분을 더 포함할 수 있다.
- [60] 또한, 배양 초기, 예를 들어 장 줄기세포를 위 배양기관에 처리하고 난 직후, 1일, 2일, 3일, 4일, 또는 5일 동안 ROCK 억제제, Notch 활성화제 또는 이들 모두를 배양 배지에 더 포함할 수 있다.
- [61] 본 발명에 따른 장 줄기세포의 배양은 이에 한정되지 않으나, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 또는 10일, 2주, 3주 또는 그 이상으로 진행될 수 있으며, 필요에 따라 계대 배양을 수행할 수 있다.
- [62] 또한, 필요에 따라 동결 조건 하에서 세포를 동결하거나 해동하여 사용할 수 있다.
- [63] 이러한 장기의 계대 배양 조건 및/또는 동결과 해동 조건 하에서도 세포의 특성이 유지되며 배양이 진행될 수 있다.
- [64] 본 발명은 iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막을 포함하는 배양 기관에서 배양한 장 줄기세포로부터 장 상피세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [65] 상기 장 상피세포를 제조하는 방법은 아래의 단계를 거쳐 수행된다:
- [66] (1) iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막을 포함하는 배양 기관을 제공하는 단계;
- [67] (2) 상기 배양 기관에 Wnt 신호 전달 경로 활성화제, Wnt 작용물질, TGF-베타 억제제, BMP 억제제, 및 수용체 타이로신 키나아제 리간드를 포함하는 배양 배지를 넣고 장 줄기세포를 2차원 배양하는 단계; 및
- [68] (3) 상기 (2) 단계를 통해 배양된 장 줄기세포를, 상기 배양 기관에 Wnt 작용물질, p38 키나아제 억제제, 수용체 타이로신 키나아제 리간드, Prostaglandin E2 및 Nicotinamide를 포함하는 분화 배지를 넣고 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 통해 분화시키는 단계.
- [69] 상기 (2) 단계의 배양 배지는 상술한 Wnt 신호 전달 경로 활성화제, Wnt 작용물질, TGF-베타 억제제, BMP 억제제, p38 키나아제 억제제 및 수용체 타이로신 키나아제 리간드에 대한 기제를 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기제를 생략한다.
- [70] 또한, 앞서 (1) 단계에서 언급된 고분자 박막, iCVD 공정 및 플라즈마 처리 등에 대한 사항은 위 언급된 기제를 포함하여, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기제를 생략한다.
- [71] 본 발명에서 "분화 배지"란, 분화되지 않은 줄기세포를 배지 중에서 배양하였을 때 분화된 세포의 특징들 중 일부 또는 모두를 가지는 세포로 발생되도록 하는 세포 성장 배지를 의미하며, 기본 배지를 포함한다.
- [72] 본 발명에서 "공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법"이란, 부분적으로 개방된 배양 용기 또는 배지로 부분적으로 충전된 배양 용기에서 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예컨대 세포 또는 오가노이드의 표면을 공

기에 노출시키는 것일 수 있다. 편의상 "공기"로 지칭하였지만, 본 발명은 주위 환경에서 발견되는 조성 및 기체의 혼합물로 한정되지는 않는다. 구체적으로, 본 발명은 주위 환경과 다른 조성을 갖는, 예를 들어, 특정 성분에 대해 농축된 혼합물 또는 특정 성분이 고갈되거나 제거된 혼합물을 포함하는 기체 혼합물을 고려하고 포함한다.

[73] 세포를 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface)에서 배양하는 경우, 세포가 다공성 기재의 상부측에서 공기와 접촉하고, 바닥측에서 세포 배양 배지와 접촉하도록 하여 세포를 다공성 기재 상에서 배양할 수 있다. 예를 들어, 충분한 용적의 배지를, 이 배지가 다공성 기재 상에 존재하는 세포의 바닥면과 접촉하지만 이 세포를 봉입하거나 액침시키지 않도록 다공성 기재(예를 들어, 필터 인서트(filter insert))를 함유하는 배양 용기의 바닥에 첨가할 수 있다. 적합한 다공성 기재는 세포의 성장 및 분화에 악영향을 주지 않는 임의의 물질로 형성시킬 수 있다. 예시적 다공성 기재는 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET), 폴리에스테르 또는 폴리카보네이트와 같은 중합체로 제조된다. 적합한 다공성 기재는 코팅되거나 코팅되지 않을 수 있다. 상업적으로 입수가능한 세포외 기질의 예는 세포외 기질 단백질(인비트로젠) 및 엔젤브레쓰-홀름-스웜(EHS) 마우스 육종 세포로부터의 기저막 제제(예를 들어 컬트렉스(Cultrex)(등록상표) 기저막 추출물(트레비젠 인코포레이티드(Trevigen, Inc.), I형 콜라겐(인비트로젠), 비트로젤(VitroGel)(등록상표)(TheWell Bioscience Inc.) 또는 매트리지엘(Matrigel)(상표)(BD 바이오사이언시즈)) 등으로 코팅될 수 있다. 바람직하게, 매트리지엘로 코팅될 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서, 기재의 공극률은 세포 생존성을 유지시키고 세포의 분화를 촉진하기에 충분해야 한다. 적합한 기재는 약 0.3 내지 약 3.0  $\mu\text{m}$ , 약 0.3 내지 약 2.0  $\mu\text{m}$ , 약 0.3 내지 약 1.0  $\mu\text{m}$ , 약 0.3 내지 약 0.8  $\mu\text{m}$ , 약 0.3 내지 약 0.6  $\mu\text{m}$ , 약 0.3 내지 약 0.5  $\mu\text{m}$ , 약 0.5 내지 약 3.0  $\mu\text{m}$ , 약 0.6 내지 약 3.0  $\mu\text{m}$ , 약 0.8 내지 약 3.0  $\mu\text{m}$ , 약 1.0 내지 약 3.0  $\mu\text{m}$ , 약 2.0  $\mu\text{m}$  내지 약 3.0  $\mu\text{m}$ , 바람직하게는 약 0.4  $\mu\text{m}$ 의 기공 크기 및 약 5천만개 내지 약 1억 2천만개 기공/ $\text{cm}^2$ , 약 6천만개 내지 약 1억 1천만개 기공/ $\text{cm}^2$ , 약 7천만개 내지 약 1억개 기공/ $\text{cm}^2$ , 바람직하게는 약 8천만개 내지 약 1억개 기공/ $\text{cm}^2$ , 약 9천만개 내지 약 1억개 기공/ $\text{cm}^2$ , 보다 바람직하게는 약 1억개 기공/ $\text{cm}^2$ 의 기공 밀도를 갖는 필터 인서트를 포함한다.

[74] 배지는 매일 또는 격일로 교체하거나 재생시키는 것이 유리할 수 있다. 다공성 기재의 상부에서 성장한 세포는 일반적으로 단일 세포가 아니며, 오히려 이 세포들은 시트(sheet)의 형태이거나 세포의 응집체 클러스터 (aggregate cluster)로서 존재한다. 공기-액체 계면에서 배양된 세포는 배지에 액침된 세포에 비해서 훨씬 더 높은 산소 분압(oxygen tension)을 경험할 수 있다.

[75] 이러한 장 상피세포의 제조 방법에 따라 제조된 장 상피세포는 장 줄기세포의 특성인 LGR5 양성 특성을 나타낼 수 있으며, 줄기세포 성숙화에 따른 OLFM4, ASCL2를 포함하는 성숙화 마커 양성 특성을 나타낼 수 있다. VIL1, KRT20, FABP1, LCT, SI 양성 특성을 나타낼 수 있으며, 장 배상세포의 특성으

로 MUC2, 장 내분비세포의 특성으로 CHGA, 파네스 세포의 특성으로 LYZ의 발현 특성을 나타낸다.

- [76] 본 발명에 따른 장 상피세포의 제조는 이에 한정되지 않으나, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 또는 10일, 2주, 3주 또는 그 이상으로 진행될 수 있다.
- [77] 본 발명에 따른 상기 장 줄기세포 또는 장 상피세포는 치료제로의 활용 가능성이 있다.
- [78] 이에 본 발명은 상기 장 줄기세포 및/또는 장 상피세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [79] 본 발명은 상기 장 줄기세포 및/또는 장 상피세포를 포함하는 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [80] 본 발명은 상기 장 줄기세포 및/또는 장 상피세포를 포함하는 장 이식 보조용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명에서 상기 장 줄기 세포의 투여가 필요한 다양한 질환에 대해 단독 또는 기타의 성분과 병용하여 활용할 수 있다. 특히, 세포 또는 조직의 기능을 복원시키기 위한 생체공학 기술로서 치료 목적으로 활용가능하다. 예를 들어, 상기 약학 조성물은 이식 재료로 활용 가능하며 각종 장 질환의 치료에 적용할 수 있다. 특히, 장애를 입은 (기능부전을 포함함) 장관 조직의 재생·재건용의 재료로서 이용이 고려될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 조직 치료제일 수 있다.
- [81] 본 발명은 장 질환을 앓고 있거나 장질환의 발병 위험에 처한 환자의 치료 방법을 제공한다. 장 질환은 장누수 증후군, 단장 증후군, 과민성 장증후군, 크론병, 궤양성 대장염, 장형 베체트병, 감염성 장염, 허혈성 장질환 및 방사선 장염로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [82] 본 발명은 또한 치료 방법에서 사용하기 위한, 본 발명의 방법에 의해 수득 가능한 또는 수득된 세포 또는 세포 집단을 제공한다. 특히, 본 발명은 장 질환을 앓고 있거나 장 질환의 발병 위험에 처한 환자의 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 방법에 의해 수득 가능한 또는 수득된 세포 또는 세포 집단을 제공한다. 일 실시형태에서, 치료 방법은 본 발명의 방법에 의해 수득 가능한 또는 수득된 세포를 환자에게 이식하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 치료 방법은 만능 줄기세포를 예를 들어 본 명세서에서 기재한 바와 같이 장 오가노이드로 제조한 후 이로부터 제조된 장 줄기세포 및/또는 장 상피세포를 환자에게 이식하는 단계를 포함한다.
- [83] 환자는 포유동물, 바람직하게는 인간이다. 일 실시형태에서, 세포는 분산된 세포로서 이식될 수 있거나, 생체적합성 분해성 중합체 지지체, 다공성 비분해성 장치로 제공되거나 또는 캡슐화되어 숙주 면역 반응으로부터 보호될 수 있다. 세포는 수용자의 적절한 부위에 이식될 수 있다.
- [84] 생체내 이식된 세포의 추가 분화, 생존 또는 활성을 향상시키기 위하여, 성장 인자, 항산화제 또는 소염제와 같은 추가의 인자를 세포 투여 전에, 세포 투여와 동시에, 또는 세포 투여 후에 투여할 수 있다.



- [85] 이식에 사용되는 세포의 양은 환자의 상태 및 치료법에 대한 반응을 비롯한 다양한 많은 인자에 의존하며, 당업자에 의해 결정될 수 있다. 일 실시형태에서, 치료 방법은 세포를 이식 전에 3차원 지지체에 혼입하는 것을 추가로 포함한다. 세포는 환자 내로 이식되기 전에 시험관내에서 상기의 지지체 상에서 유지될 수 있다. 대안적으로, 세포를 함유한 지지체는 추가의 시험관내 배양 없이 환자에서 직접 이식될 수 있다. 지지체에는 이식된 세포의 생존과 기능을 촉진하는 적어도 하나의 약제학적 제제가 임의로 혼입될 수 있다.
- [86] 이러한 이식에 있어서는 장 줄기세포는 피브린, 라미닌, 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 알지네이트, 히알루론산, 덱스트란, 폴리락트산, 폴리글리콜산(poly(glycolic acid), PGA), 폴리(락트산-co-글리콜산)(poly(lacticoglycolic acid), PLGA), 폴리-ε-(카프로락톤), 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스테르, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌글리콜, 폴리우레탄, 폴리아크릴산, 폴리-N-이소프로필아크릴아마이드, 폴리(에틸렌옥사이드)-폴리(프로필렌옥사이드)-폴리(에틸렌옥사이드) 공중합체, 이들의 공중합체, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 생분해성 지지체와 함께 이식에 활용될 수 있다.
- [87] 즉, 위 이식 재료의 대상이 되는 세포는 그대로, 혹은 앞서 언급된 지지체에 포매되어 이식에 활용될 수 있다. 또한, 세포의 보호를 목적으로 하여 디메틸설폭시드(DMSO) 등을 추가할 수 있고, 세균의 혼입을 저지하는 것을 목적으로 하여 항생 물질 등을 추가할 수 있고, 세포의 활성화, 증식 또는 분화 유도 등을 목적으로 하여 각종 성분(비타민류, 사이토카인, 성장 인자, 스테로이드 등)을 본 발명의 이식 재료에 추가할 수도 있다.
- [88] 본 발명에서 예방은 상기 조성물의 투여로 장질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 치료는 상기 조성물의 투여로 장질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [89] 본 발명의 조성물은 1 ml 당  $1.0 \times 10^5$ 개 내지  $1.0 \times 10^{10}$ 개, 바람직하게는  $1.0 \times 10^6$ 개 내지  $1.0 \times 10^9$ 개의 세포를 포함할 수 있다.
- [90] 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 액제, 현탁액 등 다양한 제형으로 제제화될 수 있다.
- [91] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제, 이식제 등이 바람직하다. 또한, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 중간염 기질 세포 및 이를 이식받을 수혜자에 대해 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제로는 이에 한정되지 않으나, 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있다. 이외에도, 예를 들어, 주사제의 경우에는 보존

제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등을, 국소투여용 제제의 경우에는 기제 (base), 부형제, 유효제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [92] 본 발명의 조성물은 동결되지 않은 채 사용되거나 차후 사용을 위해 동결될 수 있다. 동결되어야 할 경우, 표준 냉동보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, 에피라이프 (Epilife®) 세포 동결 배지 (Cascade Biologics))가 동결 전 세포 집단에 첨가될 수 있다.
- [93] 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은  $5 \times 10^5 \sim 10^8/60\text{kg}$  성인 또는,  $5 \times 10^5 \sim 10^8/1\text{회}$  로 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [94] 본 발명은 또한 장 질환 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 장 줄기세포 및/또는 장 상피세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [95] 본 발명은 또한 장 질환 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어 상기 장 줄기세포 및/또는 장 상피세포의 용도를 제공한다.
- [96] 상기 장 줄기세포 및/또는 장 상피세포를 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 장질환의 치료 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [97] 본 발명에 따른 장 줄기세포 배양 방법을 통해 쉽고 빠르게 균질한 세포를 배양할 수 있고, 낮은 가격으로 대량의 세포를 배양할 수 있으며, 무이종 배양 환경에서 세포를 배양함으로써 이종 감염의 위험성을 제거하여 실제 이식이 가능한 세포치료제의 개발이 가능하다. 또한, 장기의 계대 배양 및 동결 보존 등에서도 세포 특성을 유지한 상태로 배양 가능하다는 장점을 가진다.
- [98] 또한, 본 발명에 따른 장 상피세포 제조 방법을 통해 무이종 배양 환경에서 배양한 장 오가노이드 유래 장 줄기세포를 동일한 무이종 배양 환경에서 장 상피세포로 분화시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [99] 도 1은 매트릭셀을 대체할 수 있는 최적의 박막 코팅을 찾기 위해 실시한 고분자 스크리닝 방법의 모식도이다.
- [100] 도 2는 최적의 박막 코팅을 찾기 위한 고분자 스크리닝에 사용된 고분자들의 화학 구조이다.

- [101] 도 3은 다양한 고분자 중합체로 박막 코팅된 배양 접시 위에서 장 줄기세포의 생착률을 확인하였을 때 매트리지젤이 코팅된 배양 접시보다 좋은 성능을 보이는 고분자 중합체가 없음을 보여주는 결과이다.
- [102] 도 4는 장 줄기세포의 부착능과 생착률을 높이기 위해 플라즈마를 처리하여 고분자 중합체로 박막 코팅된 배양 접시의 표면의 물리/화학적 특성 및 습윤도를 조절한 결과를 나타내는 도이다.
- [103] (a) 플라즈마가 처리된 고분자 중합체 박막의 말단 기능을 FT-IR spectrum 분석을 통해 확인한 결과를 보여주는 도이다.
- [104] (b) 플라즈마가 처리된 고분자 중합체 박막 코팅된 배양 접시의 습윤도를 water contact angle의 차이를 통해 확인한 도이다.
- [105] 도 5는 고분자 중합체로 박막 코팅된 배양 접시에 플라즈마를 처리하여 습윤성을 높여주었을 때 장 줄기세포의 부착능과 생착률이 증가하는 것을 보여주는 결과이다.
- [106] (a) 플라즈마가 처리된 고분자 중합체 박막 코팅된 배양 접시에 생착된 장 줄기세포의 형태를 보여주는 도이다.
- [107] (b) 플라즈마가 처리된 고분자 중합체 박막 코팅된 배양 접시에 생착된 장 줄기세포의 콜로니의 사이즈를 Crystal violet (CV) 염색을 통해 확인한 도이다.
- [108] (c) (b)에서 Crystal violet (CV) 염색을 통해 확인한 콜로니의 사이즈를 Image J 프로그램을 이용하여 표면적을 계산한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [109] 도 6은 도 5에서 가장 좋은 성능을 보여준 2종의 고분자 중합체로 박막 코팅된 배양 접시 위에서 장 줄기세포의 계대 배양 및 세포 증식이 가능함을 나타내는 결과이다.
- [110] (a) 2종의 고분자 중합체(pEGDMA, pCHMA) 박막 코팅된 배양 접시에서 배양한 장 줄기세포의 passage 0, 1 또는 2의 세포 형태를 보여주는 도이다.
- [111] (b) 2종의 고분자 중합체(pEGDMA, pCHMA) 박막 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포를 배양하였을 때 passage에 따라 세포의 증식률을 나타내는 그래프이다.
- [112] 도 7은 고분자 중합체(pEGDMA) 박막 코팅된 배양 접시에 15W 세기의 플라즈마를 시간 별로 처리해 주었을 때 표면 에너지와 두께의 변화에 따른 장 줄기세포의 부착능 및 생착률의 변화를 보여주는 결과이다.
- [113] (a) 고분자 중합체(pEGDMA) 박막 코팅된 배양 접시에 15W 세기의 플라즈마를 시간 별 처리에 따른 배양 접시의 표면에너지와 박막의 두께의 변화를 보여주는 그래프이다.
- [114] (b) 고분자 중합체(pEGDMA) 박막 코팅된 배양 접시에 15W 세기의 플라즈마를 시간 별로 처리하였을 때 생착된 장 줄기세포의 세포 형태를 보여주는 도이다.
- [115] (c) 고분자 중합체(pEGDMA) 박막 코팅된 배양 접시에 15W 세기의 플라즈마를 시간 별로 처리하였을 때 생착된 장 줄기세포의 콜로니 사이즈를 Crystal violet (CV) 염색을 통해 보여주는 도이다.

- [116] (d) (c)에서 Crystal violet (CV) 염색을 통해 확인한 콜로니의 사이즈를 Image J 프로그램을 이용하여 표면적을 계산한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [117] 도 8은 고분자 중합체(pEGDMA) 박막 코팅된 배양 접시에 10초 동안 서로 다른 세기의 플라즈마를 처리해 주었을 때 표면 에너지와 두께의 변화에 따른 장 줄기 세포의 부착능 및 생착률의 변화를 보여주는 결과이다.
- [118] (a) 고분자 중합체(pEGDMA) 박막 코팅된 배양 접시에 10초 동안 0, 3, 5, 15, 50, 100W 세기의 플라즈마 처리에 따른 배양 접시의 표면에너지와 박막의 두께의 변화를 보여주는 그래프이다.
- [119] (b) 고분자 중합체(pEGDMA) 박막 코팅된 배양 접시에 10초 동안 0, 3, 5, 15, 50, 100W 세기의 플라즈마를 처리하였을 때 생착된 장 줄기세포의 세포 형태를 보여주는 도이다.
- [120] (c) 고분자 중합체(pEGDMA) 박막 코팅된 배양 접시에 10초 동안 0, 3, 5, 15, 50, 100W 세기의 플라즈마를 처리하였을 때 생착된 장 줄기세포의 콜로니 사이즈를 Crystal violet (CV) 염색을 통해 보여주는 도이다.
- [121] (d) (c)에서 Crystal violet (CV) 염색을 통해 확인한 콜로니의 사이즈를 Image J 프로그램을 이용하여 표면적을 계산한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [122] 도 9는 일반 배양 접시 (TCPS 또는 Bare wafer), 고분자 (pEGDMA) 박막이 코팅된 배양 접시, 고분자 (pEGDMA) 박막이 코팅 후 최적화된 조건의 플라즈마를 처리한 배양 접시의 물리적 특성에 변화가 없으며 배치에 따른 차이가 없으며 2년 간의 보관이 가능함을 보여주는 결과이다.
- [123] (a) 일반 배양 접시 (TCPS), 고분자 (pEGDMA) 박막이 코팅된 배양 접시, 고분자 (EGDMA) 박막이 코팅 후 최적화된 조건의 플라즈마를 처리한 배양 접시의 외관 및 투명도에 차이가 전혀 없는 것을 보여주는 결과이다.
- [124] (b) 일반 배양 접시 (Bare wafer), 고분자 (pEGDMA) 박막이 코팅된 배양 접시, 고분자 (pEGDMA) 박막이 코팅된 후 최적화된 조건의 플라즈마를 처리한 배양 접시의 water contact angle을 보여주는 결과이다.
- [125] (c) 고분자 (pEGDMA) 박막이 코팅된 배양 접시에 최적의 조건 (15W, 10초)으로 plasma 처리 시 표면의 균질도와 평균 높이 (Rq)를 원자간력 현미경(atomic force microscopy; AFM)을 이용하여 측정한 결과이다.
- [126] (d) 고분자 중합체 (pEGDMA) 박막을 3가지 batch로 제작하였을 시 표면의 균일도와 평균 높이 (Rq)를 원자간력 현미경(atomic force microscopy; AFM)을 이용하여 측정한 결과이다.
- [127] (e) (d)에서 제작된 3가지 batch의 고분자 중합체 (pEGDMA) 박막이 코팅된 배양 접시에서 생착된 장 줄기세포의 콜로니를 Crystal violet (CV) 염색을 통해 보여주는 도이다.
- [128] (f) (e)에서 Crystal violet (CV) 염색을 통해 확인한 콜로니의 사이즈를 Image J 프로그램을 이용하여 표면적을 계산한 결과를 나타내는 그래프이다.

- [129] (g) 매트릭셀이 코팅된 배양 접시, 고분자 (pEGDMA) 박막이 코팅된 배양 접시, 2년간 보관된 고분자 (pEGDMA) 박막이 코팅된 배양에서 생착된 장 줄기세포의 세포 형태를 보여주는 도이다.
- [130] (h) (g)에서 배양한 장 줄기세포에 대해 WST-1 assay를 진행하여 2년간 보관된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시 위에서도 장 줄기세포의 세포생장능(cell proliferation)이 매트릭셀이 코팅된 배양 접시 및 고분자 (pEGDMA) 박막이 코팅된 배양 접시와 비슷한 수준임을 보여주는 결과이다.
- [131] 도 10은 FT-IR을 이용해 EGDMA 단량체, EGDMA 중합체 (pEGDMA), 플라즈마 처리된 EGDMA 중합체 박막의 화학적 특성 분석 결과를 보여주는 도이다.
- [132] (a) EGDMA 단량체, EGDMA 중합체 (pEGDMA) 표면의 화학적 특성을 분석한 결과 중합체 형성 시 vinyl group ( $C=C$ ,  $1650-1620\text{ cm}^{-1}$ ) 양이 줄어드는 것을 확인한 결과이다.
- [133] (b) pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시 표면에 플라즈마를 처리하기 전, 후의 화학적 특성을 분석한 결과 화학적 결합에 차이가 없음을 확인한 결과이다.
- [134] 도 11은 XPS를 이용해 EGDMA 단량체, EGDMA 중합체 (pEGDMA), 플라즈마 처리된 EGDMA 중합체 박막의 화학적 특성 분석 결과를 보여주는 도이다.
- [135] (a) pEGDMA 박막이 코팅된 표면을 구성하는 원자의 종류를 광전자 분광법 (X-ray photoelectron spectroscopy; XPS)을 이용해 분석한 결과이다.
- [136] (b) pEGDMA 박막에 플라즈마 처리 후 표면을 구성하는 원자의 종류를 광전자 분광법 (X-ray photoelectron spectroscopy; XPS)을 이용해 분석한 결과이다.
- [137] (c) (a)와 (b)에서 검출한 탄소, 산소, 질소 원자의 조성을 정리하여 나타낸 도표이다.
- [138] (d) (a)에서 분석한 결과를  $C1s$ 의 고해상도 스캔 (deconvoluted high resolution scan)을 통해 표면의 화학적 결합의 종류와 조성을 분석한 결과이다.
- [139] (e) (b)에서 분석한 결과를  $C1s$ 의 고해상도 스캔 (deconvoluted high resolution scan)을 통해 표면의 화학적 결합의 종류와 조성을 분석한 결과이다.
- [140] (f) (d)와 (e)에서 분석한 화학적 결합의 종류와 조성을 정리하여 나타낸 도표이다.
- [141] 도 12는 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시 위에서 장 줄기세포 배양 시 일반 배양 접시 (Bare)보다 우수하며 매트릭셀이 코팅된 배양 접시와 비슷한 효율로 배양이 가능함을 보여주는 결과이다.
- [142] (a) 화학 기상 증착 (iCVD) 공정을 이용하여 최적화된 pEGDMA 박막을 배양 접시에 코팅하고 장 줄기세포 배양하는 과정의 모식도이다.
- [143] (b) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시 위에서 장 줄기세포 배양 시 세포 부착 및 성장이 일반 배양 접시 (bare)보다 우수하며 매트릭셀이 코팅된 배양 접시와 비슷한 수준임을 세포 형태 분석을 통해 보여주는 결과이다.

- [144] (c) WST-1 assay를 이용해 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시 위에서 장 줄기세포의 세포생장능(cell proliferation)이 일반 배양 접시 (Bare)보다 우수하며 매트릭셀이 코팅된 배양 접시와 비슷한 수준임을 보여주는 결과이다.
- [145] (d) Crystal violet (CV) 염색을 이용해 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시 위에서 장 줄기세포 배양 효율이 일반 배양 접시 (Bare)보다 우수하며 매트릭셀이 코팅된 배양 접시와 비슷한 수준임을 보여주는 결과이다.
- [146] (e) (d)의 콜로니 면적을 정량화하여 측정하였을 때 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시 위에서 장 줄기세포 콜로니 면적이 일반 배양 접시 (Bare)보다 우수하며 매트릭셀이 코팅된 배양 접시와 비슷한 수준임을 보여주는 결과이다.
- [147] (f) LIVE/DEAD 염색을 이용해 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시와 매트릭셀이 코팅된 배양접시에서 배양된 장 줄기세포의 생존율을 확인한 결과이다.
- [148] (g) (f)에서 확인한 결과를 정량 분석한 결과 두 조건 모두에서 100%의 생존율을 나타내는 것을 확인한 결과이다.
- [149] 도 13은 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시 위에서 장 줄기세포 배양 시 높은 증식 속도, 장기 계대 배양 및 동결 보관이 가능한 것을 보여주는 도이다.
- [150] (a) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시 위에서 장 줄기세포의 높은 증식 속도, 장기 계대 배양 및 동결 보관이 가능하다는 것을 보여주는 모식도이다.
- [151] (b) 매트릭셀이 코팅된 표면에서 장 줄기세포를 배양 시 계대배양시 세포 수의 증가 양상 및 이론적인 수치와 유사하게 증식이 됨을 확인한 결과이다.
- [152] (c) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 표면에서 장 줄기세포를 배양 시 계대배양시 세포 수의 증가 양상 및 이론적인 수치와 유사하게 증식이 됨을 확인한 결과이다.
- [153] (d) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 표면에서 장 줄기세포를 연속 계대배양 시에 passage 30까지 배양이 가능한 것을 세포 형태 분석을 통해 확인한 결과이다.
- [154] (e) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에 동결 보관된 장 줄기세포를 해동하여 주입할 시 매트릭셀이 코팅된 배양 접시에서와 비슷한 효율로 세포의 생착 및 생장이 가능한 것을 세포 형태 분석을 통해 확인한 결과이다.
- [155] (f) 세포 수 측정 분석을 이용해 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시와 매트릭셀이 코팅된 배양접시에 해동한 장 줄기세포 주입시 부착하여 생장한 장 줄기세포 효율에 차이가 없음을 보여주는 결과이다.
- [156] (g) 세포 생장능 분석을 이용해 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시와 매트릭셀이 코팅된 배양접시에 해동한 장 줄기세포 주입시 부착하여 생장한 장 줄기세포 효율에 차이가 없음을 보여주는 결과이다.
- [157] (h) 세포 수 측정 분석을 이용해 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시와 매트릭셀이 코팅된 배양접시에 3년 이상 장기 보관한 후에 해동한 장 줄기세포 주입시 부착하여 생장한 장 줄기세포 효율에 차이가 없음을 보여주는 결과이다.

- [158] (i) 세포 성장능 분석을 이용해 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시와 매트릭셀이 코팅된 배양접시에 3년 이상 장기 보관한 후에 해동한 장 줄기세포 주입시 부착하여 성장한 장 줄기세포 효율에 차이가 없음을 보여주는 결과이다.
- [159] 도 14은 최적화된 pEGDMA 박막의 endotoxin level과 macrophage의 TNF- $\alpha$  분비량이 작음을 보여주는 도이다.
- [160] (a) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시 표면의 endotoxin의 양이 FDA 기준량에 비해 낮은 것을 보여주는 도이다.
- [161] (b) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시 표면에서 macrophage의 TNF- $\alpha$  분비량이 낮은 것을 보여주는 도이다.
- [162] 도 15는 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭셀이 코팅된 배양 접시 위에서 장 줄기세포 배양 시 유전적 특성 차이 없이 배양이 가능함을 나타내는 도이다.
- [163] (a) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭셀이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포 배양 시 전사체(transcriptome) 수준에서 발현의 차이가 없음을 볼케이노 플롯(volcano plot)으로 나타낸 결과이다.
- [164] (b) (a)의 결과를 MDS (Multi-dimensional scaling) 그래프로 나타내었을 때, 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭셀이 코팅된 배양 접시에서 배양한 장 줄기세포가 비슷한 위치에 잘 묶이는 것을 나타낸 결과이다.
- [165] (c) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭셀이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포 배양 시 장 줄기세포 단백질체(proteome) 수준에서 발현의 차이가 없음을 볼케이노 플롯(volcano plot)으로 나타낸 결과이다.
- [166] (d) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭셀이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포 배양 시 장 줄기세포 마커 유전자들의 발현에 변화가 없음을 qPCR 유전자 발현 분석법을 통해 확인한 결과이다.
- [167] (e) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭셀이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포의 계대 배양 시 장 줄기세포 마커 유전자들의 발현에 변화가 없음을 qPCR 유전자 발현 분석법을 통해 확인한 결과이다.
- [168] (f) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭셀이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포 배양 시 장 줄기세포 마커 단백질들의 발현이 90%가 넘음을 세포자동해석 분리장치 (Fluorescence activated cell sorter; FACS) 를 통해 확인한 결과이다.
- [169] (g) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭셀이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포 배양 시 장 줄기세포 마커 단백질들의 발현에 변화가 없음을 면역형광염색을 통해 확인한 결과이다.
- [170] 도 16은 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 인간 배아줄기세포 유래 장 줄기세포 배양 시 역분화 줄기세포 유래 장 줄기세포와 마찬가지로 매트릭셀이 코팅된 배양 접시에서와 동일한 효율로 배양이 가능함을 보여주는 도이다.

- [171] (a) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시 위에서 배아줄기세포 유래 장 줄기세포 배양 시 매트릭셀이 코팅된 배양 접시와 비슷한 수준으로 세포 부착 및 성장, 계대 배양이 가능한 것을 세포 형태 분석을 통해 보여주는 결과이다.
- [172] (b) LIVE/DEAD 염색을 이용해 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시와 매트릭셀이 코팅된 배양접시에서 배양된 배아줄기세포 유래 장 줄기세포의 생존율을 확인한 결과이다.
- [173] (c) (b)의 LIVE/DEAD 염색 결과를 그래프로 정량화한 결과이다.
- [174] (d) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭셀이 코팅된 배양 접시에서 배아줄기세포 유래 장 줄기세포 배양 시 장 줄기세포 마커 유전자들의 발현에 변화가 없음을 passage 2, 8에 대해서 qPCR 유전자 발현 분석법을 통해 확인한 결과이다.
- [175] 도 17은 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트와 비슷한 효율로 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시킬 수 있음을 나타내는 도이다.
- [176] (a) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시키기 위한 분화법에 대한 모식도이다.
- [177] (b) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트와 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 이용하여 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시킨 후 0일, 2일, 4일, 6일, 8일 차에 세포의 형태를 분석한 결과이다.
- [178] (c) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트와 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 이용하여 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시킨 후 0일, 4일, 8일된 세포와 인간 소장 마커 유전자 발현을 qPCR을 이용해 분석한 결과이다.
- [179] (d) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트와 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 이용하여 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시킨 후 0일, 4일, 8일된 세포의 단면의 모양과 마커 단백질의 발현 여부를 H&E 염색과 면역형광염색을 통해 분석한 결과이다.
- [180] (e) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트와 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 이용하여 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시킨 후 2일, 4일, 6일, 8일된 세포의 표피세포 피부저항(transsepithelial electric resistance, TEER) 측정을 통해 장 상피세포의 기능성을 분석한 결과이다.
- [181] 도 18은 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트와 비슷한 효율로 인간 배아줄기세포 유래 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시킬 수 있음을 나타내는 도이다.



- [182] (a) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트와 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 이용하여 배아줄기세포 유래 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시킨 후 2일, 6일, 8일, 10일 차에 세포의 형태를 분석한 결과이다.
- [183] (b) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트와 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 이용하여 배아줄기세포 유래 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시킨 후 8일된 세포의 단면의 모양과 마커 단백질의 발현 여부를 H&E 염색과 면역형광염색을 통해 분석한 결과이다.
- [184] (c) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트와 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 이용하여 배아줄기세포 유래 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시킨 후 8일된 세포의 마커 유전자 발현을 qPCR을 이용해 분석한 결과이다.
- [185] (d) 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트와 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 이용하여 배아줄기세포 유래 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시킨 후 8일된 세포의 표피세포 피부저항(trans epithelial electric resistance, TEER) 측정을 통해 장 상피세포의 기능성을 분석한 결과이다.
- [186] 도 19는 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 배양된 장 줄기세포를 EDTA 유도 장 상피 손상 모델 마우스 대장에 이식한 결과이다.
- [187] (a) 면역결핍마우스 기반 EDTA 유도 장 상피 손상 모델에 Fibrin 이식제 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식하고 적출 및 분석하는 과정을 나타낸 모식도이다.
- [188] (b) 이식전 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포의 형태를 보여주는 도이다.
- [189] (c) 면역결핍마우스 기반 EDTA 유도 장 상피 손상 모델의 이식 전 (Day 0)과 Fibrin 이식제 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식한 후 14일차에 대장내시경을 관찰한 결과이다.
- [190] (d) 면역결핍마우스 기반 EDTA 유도 장 상피 손상 모델에 Fibrin 이식제 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식한 후 14일차에 대장 적출 시 대장 주변 주요 장기 (위, 간, 신장, 비장, 소장)에서 비정상적인 조직 또는 형태가 나타나지 않았음을 보여주는 결과이다.
- [191] (e) Fibrin 이식제 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식한 후 14일차에 적출한 대장 조직 절편의 조직학적 분석을 나타낸 도이다. H&E를 통한 조직학적 분석으로 장 줄기세포 이식군의 Crypt depth가 높아지고, AB-PAS 염색을 통한 Goblet cell의 뮤신 분비능이 회복되었음을 확인한 결과이다.
- [192] (f) Fibrin 단독 이식 그룹 (n=246 crypts) 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식한 그룹 (n=303 crypts)의 Crypt depth를 Image J 프로그램을 통해 정량 평가 한 그래프 (n≥3 mice of each group) 이다.

- [193] (g) Fibrin 이식제 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식한 후 14일차에 적출한 대장 조직 절편에서 인간 특이적 ECAD 항체 (hECAD)의 면역형광염색을 통해 인간 장 줄기세포가 쥐의 대장에 생착되었음을 보여주는 결과이다.
- [194] 도 20은 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 배양된 장 줄기세포를 DSS 유도 염증성 장질환 마우스의 대장에 이식한 결과이다.
- [195] (a) 면역결핍마우스 기반 DSS 유도 대장염 모델에 Fibrin 이식제 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식하고 적출 및 분석하는 모식도이다.
- [196] (b) 이식전 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포의 형태를 보여주는 도이다.
- [197] (c) 면역결핍마우스 기반 DSS 유도 대장염 모델의 이식 전 (Day 0)과 Fibrin 이식제 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식한 후 14일, 28일차에 대장내시경을 관찰한 결과이다.
- [198] (d) Fibrin 이식제 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식한 후 28일차에 적출한 대장 조직 절편의 조직학적 분석을 나타낸 도이다. H&E를 통한 조직학적 분석으로 장 줄기세포 이식군의 상피 회복 및 Crypt depth가 높아지고, AB-PAS 염색을 통한 Goblet cell의 뮤신 분비능이 회복되었음을 확인한 결과이다.
- [199] (e) Fibrin 단독 이식 그룹 (n=228 crypts) 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식한 그룹 (n=714 crypts)의 Crypt depth를 Image J 프로그램을 통해 정량 평가 한 그래프 (n≥3 mice of each group) 이다.
- [200] (f) Fibrin 이식제 또는 pEGDMA 박막에서 배양된 장 줄기세포와 함께 이식한 후 28일차에 적출한 대장 조직 절편에서 인간 특이적 ECAD 항체 (hECAD)의 면역형광염색을 통해 인간 장 줄기세포가 쥐의 대장에 생착되었음을 보여주는 결과이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [201] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [202] 실례 1. 화학 기상 증착법(iCVD)을 이용한 고분자 박막 코팅
- [203] iCVD 반응기(Daeki Hi-tech Co. Ltd.)에 세포 배양 접시를 넣고, 고분자 (pEGDMA) 단량체와 개시제(tert-Butyl peroxide, TBPO)를 진공상태의 iCVD 반응기 내부로 주입하였다. 주입된 개시제가 140°C의 필라멘트를 만나면 활성화가 되어 배양 접시 표면에 위치한 단량체들의 결합을 촉진시켜 배양 접시 표면에 박막을 형성시킨다. 플라즈마 챔버에 배양 접시를 넣고 압력을 10 mTorr 이하로 낮춰 주고, 5 sccm N<sub>2</sub> 가스를 주입하여 분자의 흐름을 조절해주었다. 이후 표면의 최적화를 위해 low-pressure radio frequency(RF) plasma system(Daeki Hi-tech Co. Ltd.)의 챔버에 15W의 파워로 10초 간 플라즈마를 처리해 주었다.

- [204] 상기 방법과 동일하게 고분자의 종류만을 변경하면서 iCVD 공정을 통한 고분자 박막 제조를 수행하였다.
- [205] 실험예 2. 고분자 박막 코팅된 표면의 물리화학적 특성 분석법
- [206] 고분자 박막 코팅된 표면의 표면 에너지를 측정하기 위해 2 $\mu$ l의 deionized(DI) water droplet을 떨어뜨린 후 contact angle analyzer(phoenix 150, Surface Electro Optics, Inc.)를 이용하여 contact angle을 측정하였고, 표면의 거칠기는 Atomic force microscope(AFM), NX-10(Park Systems)를 이용하여 측정하였다. pEGDMA 중합체는 Alpha Fourier-transform infrared red spectrometer (Bruker)를 이용한 FT-IR spectroscopy로 분석하였다. pEGDMA 박막의 화학적 조성은 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, K-alpha, Thermo VG Scientific, Inc.)를 이용하여 분석하였다.
- [207] 실험예 3. 세포 배양 및 iPSC 제조
- [208] hESC(human embryonic stem cells), hiPSC(human induced pluripotent stem cells)를 포함하는 hPSC(human pluripotent stem cells)를 공지된 방법(Molecular carcinogenesis 55, 387-396 (2016), Proteomics 15, 2220-2229 (2015))으로 배양하였다. 비삽입형-hiPSC를 공지된 방법에 따라 Episomal iPSC 리프로그래밍 벡터(Cat. No. A14703. Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 전기천공법(electroporation)으로 트랜스펙션시켜서 리프로그래밍 하였다.
- [209] 전기천공 5일 후, 섬유아세포를 마트리젤(Matrigel)(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)-코팅된 6-웰 플레이트에  $1 \times 10^5$ 개/웰로 플레이팅하고, E8 배지(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)로 배양하였다. 3주 후, hiPSC 콜로니를 선택하고, 계대 배양 및 추후 특징 설정을 위해 세포 수를 증대시켰다.
- [210] 실험예 4. 미성숙 장 오가노이드(Cont-hIO) 제조를 위한 hPSCs의 장 오가노이드(hIO)로의 분화
- [211] 인간 장 오가노이드(hIOs)를 공지된 방법(Nature 470, 105-109 (2011))을 이용하여 제조하였다. 완전한 내배엽을 유도하기 위해, hPSC를 마트리젤 또는 ECMatrix™-511로 코팅된 디쉬에 플레이팅하고, 0%, 0.2% 및 2%농도의 정제된 태아 소 혈청(dFBS, HyClone, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 갖는 RPMI 1640 배지에서 3일 동안 100ng/ml Activin A(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)로 처리하였다. 또한, 3D 후장(hindgut) 스페로이드로 분화시키기 위해, 500ng/ml FGF4(R&D Systems) 및 3 $\mu$ M CHIR99021(TOCRIS)를 2% dFBS가 포함된 RPMI 1640 배지와 함께 4~6일 동안 처리하였다. 후장으로 유도한 4일부터, 스페로이드는 마트리젤(Matrigel, BD Biosciences)에 삽입하고, 1X B27(Invitrogen), 200~250ng/ml R-Spondin 1(R&D Systems), 100ng/ml EGF(R&D Systems) 및 40~50ng/ml Noggin(R&D Systems)이 포함된 hIO 배지(2 mM L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin, 및 15 mM HEPES buffer in Advanced DMEM F12)에서 배양하고, 10~14일에 한 번씩 계대 배양하였다.
- [212] 실험예 5. 장 오가노이드로부터 장 줄기세포를 분리 배양하는 법

- [213] hIO를 매트릭셀 돔으로부터 수거한 후 생리식염수를 이용하여 2-3회 세척을 실시하였다. 이후 PBS를 모두 제거하고, hIO pellet에 trypsin-EDTA (TE)를 37°C water bath에서 5분가량 처리하여 단일 세포로 분리하고, hIO basal 배지를 추가하여 희석하였다. 원심분리기로 수급한 세포를 pEGDMA가 코팅된 배양 접시 위에 1X B27(Invitrogen), 200ng/ml R-Spondin 1(R&D Systems), 100ng/ml EGF (R&D Systems), 80ng/ml Noggin(R&D Systems), 10nM [Leu15]-Gastrin I(Sigma-aldrich), 100ng/ml human recombinant WNT3A(R&D Systems), 500nM A-83-01(Tocris), 10uM SB202190(Sigma-aldrich), 2.5uM Prostaglandin E2(Sigma-aldrich), 1mM N-acetylcysteine(Sigma-aldrich), 10mM Nicotinamide(Sigma-aldrich)이 포함된 장 줄기세포 배양 배지(2 mM L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin, 및 15 mM HEPES buffer in Advanced DMEM F12)에서 배양하고, 7~10일에 한 번씩 계대 배양하였다. 계대 배양 시 처음 2일 동안은 장 줄기세포 배양 배지에 1uM Jagged-1(Anaspec) 및 2.5uM Y-27632(Tocris)를 추가하여 주었다.
- [214] 실험예 6. 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 이용한 장 상피세포 분화법
- [215] 7-80%의 밀집도로 증식한 장 줄기세포를 PBS를 이용하여 1-2회 세척해준 후 TE를 37°C 인큐베이터에서 5-7분가량 처리하였다. 단일 세포로 분리된 장 줄기세포를 수거한 후 hIO 기본 배지를 이용하여 희석하였다. 원심분리를 이용해 세포를 모아준 후 상층액을 제거하고, 장 줄기세포 배양 배지를 추가하여 충분히 섞은 후 CountessIII cell counter(Thermo Scientific. Inc.)를 이용하여 세포의 수를 측정하였다. 1% Matrigel로 코팅된 12-Transwell plate (Corning)의 insert에  $2.5-3.5 \times 10^5$ 의 세포를 넣어준 후 인큐베이터에서 배양하였다. 세포 밀집도가 100%에 도달한 후 상층부의 배양배지를 모두 제거하고, 하층부의 배지를 200ng/ml R-Spondin 1(R&D Systems), 100ng/ml EGF (R&D Systems), 2.5uM Prostaglandin E2(Sigma-aldrich), 10uM SB202190(Sigma-aldrich), 10mM Nicotinamide(Sigma-aldrich)이 포함된 분화 배지(2 mM L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin, and 15 mM HEPES buffer in Advanced DMEM F12)로 교체하였다. 이후 2일에 한 번씩 상층부의 표면을 PBS 또는 hIO 기본 배지를 이용해 세척하고, 하층부를 새로운 분화 배지로 교체해주며 8-12일가량 배양하였다.
- [216] 실험예 7. 세포 생존율 측정법
- [217] 1% Matrigel 또는 고분자(pEGDMA) 박막이 코팅된 배양 접시에서 배양된 장 줄기세포의 생존율을 측정하기 위해 생존한 세포와 죽은 세포를 구별하여 염색할 수 있는 kit(LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, Invitrogen)를 사용하였다. 생존한 세포를 calcein-AM으로 염색하고, 죽은 세포를 ethidium homodimer-1으로 염색하였다. 염색된 세포를 형광 현미경(Nikon)을 통해 관찰하였다.
- [218] 실험예 8. 세포 성장률 측정법

- [219] 1% Matrigel 또는 고분자(pEGDMA) 박막이 코팅된 배양 접시에  $10 \times 10^3$  개의 세포를 플레이팅한 후 7일간 배양하였다. 이후 배양 배지를 제거한 후 well 당 10 $\mu$ l의 WST-1 cell proliferation reagent(Roche)를 포함한 100 $\mu$ l의 새로운 배지를 넣어 주었다. 3시간가량 배양한 후 microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여 440nm의 흡광도에서 측정하였다.
- [220] **실험예 9. Crystal Violet (CV) 염색법**
- [221] 장 줄기세포와 분화된 장 상피세포를 4% 파라포름알데하이드(PFA)로 고정시키고, 0.02%의 crystal violet solution (Sigma-aldrich)으로 상온에서 10분 간 염색해 주었다. 이후 멸균수로 3회 세척 후 이미지를 획득하였다. 장 줄기세포 콜로니 크기는 Image J software(National Institute of Health)를 이용하여 분석하였다.
- [222] **실험예 10. 실시간 세포 이미징(Live Cell Imaging)**
- [223] 장 줄기세포의 표면 부착능 및 콜로니 형성능을 확인하기 위해 광학현미경 (Lumascop 620, Etaluma)를 이용하여 실시간 이미지를 레코딩하였다. 녹화된 이미지는 Adobe premiere pro 2020 프로그램을 이용하여 비디오로 제작해주었다.
- [224] **실험예 11. 정량적 실시간 RT-PCR(qRT-PCR)**
- [225] 전체 RNA는 RNeasy 키트 (Qiagen)를 이용해 세포로부터 추출하였고 Superscript III cDNA 합성 키트(Invitrogen)를 이용해 역전사 시켰다. qRT-PCR은 7500 Fast Real-time PCR 시스템 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 공지된 방법으로 수행하였다 (Cho et al., Oncotarget 6, 23837-23844, 2015). 모든 실험들은 3번 반복했고, 각 타겟 유전자의 CT 값은 제조사가 제공한 소프트웨어를 이용해 계산하였다. 사용된 프라이머의 염기서열은 표 1과 같다.
- [226] [표1]

| Gene         | 프라이머 (Forward)              | 서열<br>번호 | 프라이머 (Reverse)             | 서열<br>번호 |
|--------------|-----------------------------|----------|----------------------------|----------|
| <i>GAPDH</i> | GAAGGTGAAGGTCG<br>GAGTC     | 1        | GAAGATGGTGATGGGATT<br>TC   | 2        |
| <i>LGR5</i>  | CCTGCTTGACTTTGA<br>GGAAGACC | 3        | CCAGCCATCAAGCAGGTG<br>TTCA | 4        |
| <i>EPHB3</i> | TCGTGGTCATCGCTA<br>TCGTCT   | 5        | AAACTCCCGAACAGCCTC<br>ATT  | 6        |
| <i>MKI67</i> | TGACCCTGATGAGAA<br>AGCTCAA  | 7        | CCCTGAGCAACACTGTCT<br>TTT  | 8        |
| <i>SOX9</i>  | GTACCCGCACTTGCA<br>CAAC     | 9        | TCTCGCTCTCGTTCAGAAG<br>TC  | 10       |
| <i>CD44</i>  | CCAGAAGGAACAGT<br>GGTTTGGC  | 11       | ACTGTCCTCTGGGCTTGGT<br>GTT | 12       |

|      |                           |    |                          |    |
|------|---------------------------|----|--------------------------|----|
| LYZ  | AAAACCCCAGGAGC<br>AGTTAAT | 13 | CAACCCTCTTTGCACAAG<br>CT | 14 |
| VILI | AGCCAGATCACTGCT<br>GAGGT  | 15 | TGGACAGGTGTTCTCCTT<br>C  | 16 |
| MUC2 | TGTAGGCATCGCTCT<br>TCTCA  | 17 | GACACCATCTACCTCACC<br>CG | 18 |
| CHGA | TGACCTCAACGATGC<br>ATTTC  | 19 | CTGTCCTGGCTCTTCTGCT<br>C | 20 |

[227] **실험예 12. 장 상피 손상 모델(EDTA-induced intestinal epithelial injury model)**

[228] EDTA로 유도된 장 상피 손상 모델은 공지된 방법(*Cell Stem Cell* 22(2):171-176 (2018))을 이용하여 제작되었다. NSG 또는 NIG 마우스 (수컷, 6-12주령)는 금식하지 않고 표준 식단을 먹었으며, 12시간 낮/밤 주기 하에 일정한 온도(20-22°C)에서 유지하였다. 250-500 mg/kg Tribromoethanol (Avertin)의 복강 주사로 마취시켰다. 장 내 내용물을 제거하기 위하여 마우스의 결장에 얇은 카테터를 삽입하여 PBS로 세척하였다. 이후, 항문 가장 자리, 직장의 손상을 위하여 50°C 250mM EDTA/PBS 200  $\mu$ l를 2분간 천천히 장내 주입하였다. EDTA/PBS 노출 2분 후, 장 내 (lumen)을 PBS로 1분간 세척하였다. 이후 부드러운 치간 브러시가 장착된 전동 칫솔(EW-DL22, EW0945, Panasonic Holdings Corp., Japan)을 사용하여 1분간 상피 찰과상을 생성하였다. 이때, 브러시 헤드는 결장에 1.5 cm 삽입하여 장 상피 표면을 원형으로 긁어내고, 1분 후 브러시를 PBS에 세척 시 분리된 Crypt가 관찰되면 성공 여부를 확인할 수 있다. 이후, 장 내를 PBS로 다시 세척하였다.

[229] **실험예 13. 염증성 장질환 모델(DSS-induced colitis model)**

[230] NSG 또는 NIG 마우스 (수컷, 6-12주령)는 금식하지 않고, 표준 식단을 먹이고, 12시가 낮/밤 주기 일정한 온도(20-22°C)에서 유지하였다. DSS 유도 대장염 모델은 5~7일간 5%(w/v) DSS(36-50 kDa; MP Biomedicals, Hampton, NH, USA)가 포함된 음용수를 투여하였다. 소화 기관 내 DSS를 제거하기 위하여 음용수를 3일간 투여하여 이식을 준비하였다. DSS 유도 염증성 장 모델은 질병활성지수(Disease activity index, DAI) 평가를 위하여 매일 체중, 대변 일관성, 출혈 매개변수를 측정하여 증상 발생 여부를 판단하였다.

[231] **실험예 14. 장 내 이식(Colonic transplantation)**

[232] 이종 이식을 위해 장 줄기세포는 이식 전 TrypLE로 세포를 해리한 후, Advanced DMEM/F12로 세척 후, Fibrin에 현탁되었다. 100  $\mu$ l 현탁액에는  $1\sim 2 \times 10^6$  세포가 포함되어 있다. 이식 전, 금식하지 않고, 표준 식단을 먹었으며, 250-500 mg/kg Tribromoethanol(Avertin)을 복강 주사로 마취시켰다. 장 내 내용물을 제거하기 위하여 마우스의 결장에 얇은 카테터를 삽입하여 PBS로 세척하였다. 200  $\mu$ l 파이펫, 부드러운 카테터, 또는 내시경 카테터를 사용하여 질환이 유발된 마우스의 결장 내강에 Fibrin 또는 장 줄기세포를 주입하였다. 각 관찰 시기에, 마우스를 인

도적으로 안락사시키고 이종이식편을 분석용으로 분리하였다. 결장 조직의 이종이식편 확인을 위하여, 도립형광해부현미경 (SZX16, Olympus) 또는 Axiovert 200M 현미경 (Carl Zeiss, Gottingen, Germany)를 사용하여 관찰하였다.

[233] **실험예 15. 대장내시경(Colonoscopy)**

[234] 장 내 염증도 및 환경을 확인하기 위해 내시경 전 Avertin 복강 주사로 마취하였다. 장 내 내용물 제거를 위해 마우스 결장을 얇은 카테터를 삽입하여 PBS로 세척하였다. 에어펌프를 이용한 의료용 가스 주입과 견고한 HOPKINS 망원경(Karl Storz)의 내시경을 직장에 조심스럽게 삽입하여 내시경 이미지가 기록되었다.

[235] **실험예 16. 세포 및 조직 면역형광검사**

[236] 공지된 방법에 따라 면역형광검사를 수행하였다 (Kwak et al., Biochemical and biophysical research communications 457, 554-560, 2015). 구체적으로, 장 줄기세포와 분화된 장 상피세포, 이식 후 적출된 결장 조직을 4% 파라포름알데하이드(PFA)로 고정시키고, 0.1% 트리톤 X-100을 함유하는 PBS로 투과시켰다.

[237] 분화된 장 상피세포 또는 적출된 결장 조직을 수크로오스로 동결 보호한 뒤, Insert well의 membrane을 절단하여 최적 절단 온도(OCT) 화합물(Sakura Finetek, Tokyo, Japan)에 수직으로 넣은 후 동결시켰다. 이후, -20°C에서 크라이오스탯 마이크로톰을 사용하여 냉동 절편을 10 $\mu$ m로 절단하고, 면역형광검사를 위해 0.1% 트리톤 X-100을 함유하는 PBS로 투과시켰다.

[238] 이후, 4% BSA로 블로킹 후 세포를 4°C에서 하룻밤 동안 1차 항체와 반응시켰다. 그리고 나서, 상온에서 1시간 동안 2차 항체와 반응시켰다. 사용된 일차 항체는 표 2와 같다. DAPI는 핵을 시각화하기 위해 추가하였다. 슬라이드는 EVOS FL Auto2 (ThermoFisher)와 Axiovert 200M 현미경 (Carl Zeiss, Gottingen, Germany) 또는 형광 현미경(IX51, Olympus, Japan)을 통해 관찰하였다.

[239] [표2]

| 항체                  | Catalog. No. | 회사                | 희석           |
|---------------------|--------------|-------------------|--------------|
| anti-Ki67           | MAB9260      | Millipore         | 1:100        |
| anti-CD44           | ab6124       | abcam             | 5 $\mu$ g/mL |
| anti-SOX9           | AF3075       | R&D systems       | 5 $\mu$ g/ml |
| anti-Lysozyme       | ab76784      | abcam             | 1:200        |
| anti-Villin         | sc-58897     | Santa Cruz        | 1:50         |
| anti-Mucin2         | sc-7314      | Santa Cruz        | 1:50         |
| anti-Chromogranin A | MA5-14536    | Thermo Scientific | 1:100        |
| anti-E-cadherin     | AF648        | R&D systems       | 1:200        |
| anti-E-Cadherin     | Ab1416       | abcam             | 1:100        |

[240] **실험예 17. RNA 시퀀싱 및 RNA 정량**

[241] RNA 염기순서 결정과 정량을 위해 우선 RNA 샘플은 Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Biotechnologies, Palo Alto, USA)을 통해 RNA Integrity Number (RIN) 값이 7.5 이상으로 준비되었으며, mRNA 라이브러리는 Illumina TruSeq 키트를 통해 준비되었다. Illumina HiSeq2500 machines (Illumina, San Diego, CA, USA)을 통해 시퀀싱을 수행하였다. FastQC package를 통해 시퀀싱 품질을 결정하고, 트림된 길이(trimmed read length)가 50염기 이하는 제외하였다. 그 후 HISAT2 (v2.0.5)를 통해 맵핑을 수행하였고, 인간 유전체 정보는 hg19를 활용하였다. Cuffquant와 Cuffnorm (Cufflinks v2.2.1)를 통해 샘플간 차별적으로 발현된 유전자 (DEG: differentially expressed gene)를 분석하였다.

[242] **실험예 18. 생물정보학적 분석**

[243] 생물정보학적 분석은 IPA 분석 소프트웨어(Ingenuity systems, Redwood City, CA, USA), PANTHER(Protein ANALYSIS THrough Evolutionary Relationships, <http://www.pantherdb.org>) 데이터베이스 및 DAVID 생물정보학 리소스 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)를 사용하여 진행하였다. 기능적으로 그룹화된 유전자 온톨로지(GO)/경로는 ClueGO plug-in (Version 2.2.5, <http://apps.cytoscape.org/apps/cluego>)와 함께 사이토스케이프 소프트웨어 플랫폼(Cytoscape software platform, version 3.3.0, [http://www.cytoscape.org/what\\_is\\_cytoscape.html](http://www.cytoscape.org/what_is_cytoscape.html))을 사용하여 분석하였다.

[244] **실험예 19. 조직학적(Hematoxylin&Eosin, H&E) 염색 실험**

[245] 조직병리학적 분석을 위해 장 상피세포를 수크로오스로 동결 보호한 뒤, Insert well의 membrane 절단하여 최적 절단 온도(OCT) 화합물(Sakura Finetek, Tokyo, Japan)에 수직으로 넣은 후 동결시켰다. 또는 이식 후 적출한 결장 조직을 동일한 방법으로 수크로오스 동결 보호한 뒤, OCT 화합물에 넣어 동결시켰다. 이 후, -20°C에서 크라이오스탯 마이크로톰을 사용하여 냉동 절편을 10 $\mu$ m로 절단하고, 슬라이드 글라스에 접착시킨 후, 공지된 방법에 따라 H&E 염색을 진행하였다. 슬라이드는 광학 현미경(BX53F, Olympus, Japan)을 통해 관찰하였다. 결장 조직의 Crypt depth는 Image J software(National Institute of Health)를 이용하여 분석하였다.

[246] **실험예 20. 통계 분석(Statistical analysis)**

[247] 모든 결과는 평균에 대한 평균 $\pm$ 표준오차(s.e.m)로 표현되며, 모든 실험은 최소 3회 반복되었다. P값은 양측 t-검정 또는 단측 ANOVA를 사용하여 결정하였다. Crypt depth의 길이 분석은 Welch's t-검정(Welch's t-test)으로 결정하였다. 통계적 유의성에 대한 모든 분석은 달리 명시하지 않는 한 대조군과 비교하여 계산하였다.

[248] **실험예 21. 염증성 사이토카인 (TNF- $\alpha$ ) 분비 분석 실험**

[249] 대한민국 세포주 은행에서 구입한 RAW 264.7 mouse macrophage에서 분비되는 염증성 사이토카인 (TNF- $\alpha$ ) 분비를 측정하여 면역원성을 평가하였다. Mouse TNF-alpha quantikine ELISA kit (R&D systems) 을 사용하였으며 제조업체가 제시



한 절차를 따랐다. 간략히, RAW264.6 macrophage는  $3.5 \times 10^6$  cells/mL의 밀도로 배양되었으며, 12시간 후에 배지를 수확하여 ELISA kit를 사용하여 테스트를 진행하였다.  $5 \mu\text{g/mL}$ 의 리포폴리사카라이드 (LPS)를 배지에 추가한 macrophage는 양성 대조군으로 사용하였다.

[250] 실시예 1. 매트릭셀을 대체할 수 있는 최적의 고분자 발굴을 위한 스크리닝

[251] 장 줄기세포 배양을 위해 매트릭셀을 대체할 수 있는 고분자를 찾기 위해 고분자 라이브러리를 이용해 최적의 박막을 찾기 위한 스크리닝 방법을 구축하였다 (도 1). 이를 위해 말단의 기능성 그룹이 서로 다른 고분자를 이용하여 배양 접시의 표면을 박막 코팅해 주었다 (도 2). 다양한 고분자 중합체로 박막 코팅된 배양 접시 위에 장 줄기세포를 주입하고 4일간 배양한 후 세포의 생착을 확인해 보았을 때 매트릭셀 코팅된 배양 접시 위에 생착된 세포의 수에 비해 나은 성능을 보이는 고분자 중합체를 찾기 어려웠다 (도 3). 이후 장 줄기세포의 표면 부착능과 생착률을 증가시키기 위해 고분자 중합체 박막이 코팅된 배양접시에 플라즈마를 처리해 주었고, 이로 인해 배양접시 표면의 특성이 바뀐 것을 water contact angle 측정에 따른 습윤성 변화를 통해 확인하였다 (도 4). 이후 플라즈마가 처리된 고분자 중합체 박막 표면 위에 장 줄기세포를 주입하였을 때 세포의 부착능 및 생착률이 증가한 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[252] 실시예 2. 고분자 박막이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포의 계대 배양 및 세포 증식률

[253] 플라즈마 처리된 고분자 중합체 박막 표면에 장 줄기세포의 생착이 가능하다는 것을 확인하였고, 여러 고분자 중합체 박막 중에서 pEGDMA와 pCHMA로 박막 코팅한 후 플라즈마를 처리해 주었을 때 장 줄기세포의 생착률이 가장 높은 것을 확인하였다. 이후 두 종류의 고분자 박막이 코팅된 배양 접시 상에서 장 줄기세포의 계대 배양 및 세포 증식이 가능한지 확인해 보았고, 그 결과 장 줄기세포의 안정적으로 계대 배양이 가능하고, 빠른 세포증식이 가능한 것을 확인하였으며, pEGDMA 박막 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포의 배양 효율이 더 높은 것 또한 확인할 수 있었다 (도 6).

[254] 실시예 3. pEGDMA 박막 코팅 최적화를 위한 플라즈마 처리 조건 검증

[255] pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에 장 줄기세포의 생착을 최대화하기 위해 플라즈마 처리에 따른 표면 개질을 최적화하고자 하였다. 우선 동일한 세기 (15W)의 플라즈마의 처리 시간에 따른 장 줄기세포의 생착률을 확인해 본 결과 10초 이상 처리해 주었을 때 장 줄기세포의 생착이 최대화되는 것을 확인하였다 (도 7). 그리고, 동일한 시간(10초)동안 서로 다른 세기의 플라즈마를 pEGDMA 박막 표면에 처리해 주었을 때 약 15W의 세기로 처리한 pEGDMA 박막 표면에서 장 줄기세포 생착률이 최대화되는 것을 확인하였다 (도 8). 이를 통해 pEGDMA 박막 표면 개질에 최적화된 플라즈마 처리 조건은 15W, 10초 간 처리하는 것임을 확인한 결과이다.

[256] 실시예 4. 플라즈마가 처리된 pEGDMA 박막 표면의 특성 검증

- [257] 앞서 pEGDMA 박막에 15W 세기의 플라즈마를 10초 간 처리해 주었을 때 장 줄기세포의 생착률이 최대화되는 것을 확인하였으므로, 이번에는 해당 조건에서 pEGDMA 표면의 특성이 어떻게 변화하는지 알아보기 위한 실험을 실시하였다. pEGDMA 박막 코팅 후, pEGDMA 박막에 플라즈마 처리하였을 때 배양 접시의 형태와 투명도에는 아무런 차이가 없는 것을 확인하였고 (도 9(a)), 표면의 습윤도를 측정하기 위해 water contact angle 측정 시 pEGDMA 박막 코팅 전  $62.34^\circ$ , pEGDMA 박막 코팅 후  $68.54^\circ$ , 플라즈마 처리된 pEGDMA 박막에서  $27.07^\circ$ 의 water contact angle을 나타내었다 (도 9(b)). 또한, 원자간력 현미경(atomic force microscopy; AFM)을 이용하여 표면 균질도를 측정해 보았을 때 pEGDMA 박막 코팅된 배양 접시에 플라즈마를 처리하기 전, 후 모두 표면이 균질한 것을 확인할 수 있었다 (도 9(c)). 3개의 batch에서 제작된 pEGDMA 박막에서 원자간력 현미경(atomic force microscopy; AFM)을 이용하여 표면 균질도를 측정해 보았을 때 표면이 모두 균질한 것을 확인하였다 (도 9(d)). 또한, 장 줄기세포 생착도 3개의 batch에서 균일하게 잘 났을 Crystal violet 분석과 imageJ를 통한 정량 평가를 통해 확인할 수 있었다 (도 9(e) 및 도 9(f)). 추가적으로, 2년간 장기적으로 보관한 pEGDMA 박막 코팅된 배양 접시에서도 장 줄기세포가 잘 생착하고 세포생장성이 떨어지지 않음을 이미지와 WST-1 assay를 통해 확인할 수 있었다 (도 9(g) 및 도 9(h)).
- [258] 실시예 5. FT-IR을 이용한 플라즈마 처리에 따른 pEGDMA 박막 표면의 화학적 특성 검증
- [259] pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에 플라즈마 처리 후 물리적 특성에 차이가 없는 것을 확인하였으므로 화학적 특성에 차이가 있는지 확인하고자 실험을 수행하였다. Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)을 이용해 표면의 화학적 특성을 분석한 결과 EGDMA 단량체에 비해 중합체 (pEGDMA) 형성 시 vinyl peak ( $C=C$ ,  $1650-1620\text{ cm}^{-1}$ )이 감소하는 것을 확인하였고 (도 10(a)), 플라즈마를 처리해 주었을 때는 pEGDMA 박막 표면의 화학적 결합에 큰 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다 (도 10(b)).
- [260] 실시예 6. XPS를 이용한 플라즈마 처리에 따른 pEGDMA 박막 표면의 화학적 특성 검증
- [261] X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)를 이용해 pEGDMA 박막 코팅된 배양 접시의 플라즈마 처리 전과 후 표면의 화학적 특성을 분석한 결과, 플라즈마 처리 시 표면의 산소 원자가 증가하는 반면 탄소 원자가 감소하는 것과 나이트로젠 플라즈마 처리에 의해 나이트로젠 원자의 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 11(a) 내지 도 11(c)). 또한,  $C1s$ 의 고해상도 스캔 (deconvoluted high resolution scan)을 통해서도 탄소 원자 간의 결합( $-C^*H_3-$ ,  $-C-C^*H_2-$ )이 줄고 산소 원자와의 결합( $-C^*(CH_3)-CO-O-$ ,  $-CH_2-C^*H-O-$ ,  $-O-C^*=O$ )이 증가된 결과를 확인할 수 있었다 (도 11(d) 내지 도 11(f)).

[262] 실시예 7. 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서의 장 줄기세포 배양 및 특성 분석

[263] 매트릭젤 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포를 배양했을 때와 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포를 배양할 경우 (도 12(a)), 배양 효율을 상대비교하기 위한 실험을 수행하였다. 우선 아무 처리가 되지 않은 배양 접시(Bare), 1% 매트릭젤이 코팅된 배양접시, pEGDMA 박막 코팅된 배양 접시에 장 줄기세포를 주입하고 1주일 간 배양한 후 장 줄기세포의 생착률과 생장률을 비교 분석하였다. pEGDMA 박막 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포를 배양한 경우, 매트릭젤 코팅된 배양 접시의 생착률과 생장률과는 차이가 없었지만, 아무 처리가 되지 않은 배양 접시보다는 높은 생착률과 생장률을 나타내었다 (도 12(b) 및 도 12(c)). 또한, 생착한 세포의 콜로니 사이즈를 비교 분석하기 위해 Crystal violet (CV) 염색을 실시하였을 때, 매트릭젤 코팅된 배양 접시와는 콜로니 사이즈에 차이가 없었지만, 아무 처리가 되지 않은 배양 접시보다는 훨씬 큰 사이즈의 콜로니가 자라는 것을 확인할 수 있었다 (도 12(d) 및 도 12(e)). 마지막으로 배양 접시 위에서 붙어 자라는 장 줄기세포의 생존율을 확인하기 위해 LIVE/DEAD 염색을 통해 세포의 생존율을 확인해 보았을 때 매트릭젤 코팅된 배양 접시와 pEGDMA 박막 코팅된 배양 접시 위에서 배양된 장 줄기세포 모두 100%의 생존율을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (도 12(f) 및 도 12(g)).

[264] 실시예 8. 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포의 장기 배양 및 동결보관법 확인

[265] 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포를 배양할 시 매트릭젤 코팅된 배양 접시에서 배양할 경우와 비슷한 효율로 장 줄기세포 배양이 가능한 것을 확인하였다. 따라서, 장 줄기세포를 장기간 안정적으로 배양할 수 있는지 확인하기 위해 계대 배양을 수행하며 세포의 생장률을 확인해 보았고, 장 줄기세포의 동결 보관이 가능한지도 확인해 보았다 (도 13(a)). 이를 확인하기 위해 매트릭젤 코팅된 배양 접시와 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 연속적인 계대 배양을 실시하며 세포의 형태와 생장률을 비교 분석해 보았다. 30회 이상 계대 배양(>6개월) 하였을 때 상기 두 배양 접시에서 배양한 장 줄기세포의 형태 및 생장률에 차이가 없는 것을 확인하였으며, 30회 이상 계대 배양을 진행하여도 생존율이 낮아지지 않는 것을 확인할 수 있었다 (도 13(b) 내지 도 13(d)). 또한, 동결 보관된 장 줄기세포를 해동한 후 각각 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭젤 코팅된 배양 접시에 주입해 주었을 때, 세포가 안정적으로 부착되어 생장하였으며 형성된 콜로니의 크기에 차이가 없는 것을 확인함으로써 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시 배양한 장 줄기세포가 동결 보관 가능하다는 것을 확인하였다 (도 13(e) 내지 도 13(g)). 3년 이상 장기 보관한 장 줄기세포를 해동하여 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 배양하고 세포 부착 효율과 생장능을 확인하였다 (도 13(h) 및 도 13(i)). 부가적으로, pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시의 표면의 endotoxin의 양을 측정하였을 때 FDA 기준량보다 낮은 것을

확인하여 세포를 안전하게 배양할 수 있음을 확인하였다 (도 14(a)). 마지막으로, RAW 264.7 macrophage 세포가 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시의 표면에서 염증성 사이토카인을 분비하는지 측정하였을 때 TCPS와 유사하게 낮은 수치임을 확인하였다 (도 14(b)). 따라서, pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시는 매트릭스 젤 코팅을 대체할 수 있으며 장 줄기세포의 배양에 적합한 재료임을 확인하였다.

[266] 실시예 9. 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 배양한 장 줄기세포의 유전자적 특성 분석

[267] 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 장 줄기세포를 배양할 시 매트릭스 젤 코팅된 배양 접시에서 배양할 경우와 유전자 수준에서 발현량 및 특성에 차이가 있는지 살펴보았다. RNA-seq과 Mass spectrometry 기술을 이용하여 전사체와 단백체 분석을 해보았을 때 전사체와 단백체 수준에서 발현의 차이를 보인 유전자가 거의 없는 것을 통해 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시와 매트릭스 젤이 코팅된 배양 접시에서 배양된 장 줄기세포의 특성이 유사한 것을 확인할 수 있었다 (도 15(a) 내지 도 15(c)). 뿐만 아니라 장 줄기세포 특이적 마커 유전자의 발현을 qPCR, 면역형광염색, 세포자동해석 분리장치를 통해 확인한 결과, 마커 유전자의 발현에 차이가 없음을 검증하였다 (도 15(d), 도 15(f) 및 도 15(g)). 추가적으로, 계대 배양한 경우에도 장 줄기세포 특이적 마커 유전자의 발현을 qPCR로 확인한 결과, 마커 유전자의 발현에 차이가 없는 것을 한 번 더 검증하였다 (도 15(e)).

[268] 실시예 10. 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 배양한 인간 배아 줄기세포 유래 장 줄기세포의 유전자적 특성 분석

[269] 본 기술의 범용성을 확인하기 위해 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 인간 배아줄기세포 유래 장 줄기세포를 배양하여 배양 안정성 및 유전자 발현 특성을 분석하였다. 그 결과, 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시에서 인간 배아줄기세포 유래 장 줄기세포의 안정적인 계대 배양이 가능함을 확인하였으며 (도 16(a)), 해당 장 줄기세포가 매트릭스 젤 코팅된 배양 접시에서 배양된 장 줄기세포와 마찬가지로 100%의 생존율을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (도 16(b) 및 도 16(c)). 뿐만 아니라 장 줄기세포 마커 유전자의 발현을 qPCR을 통해 확인한 결과, 여러 passage에서 마커 유전자의 발현에 차이가 없는 것을 확인하였다 (도 16(d)).

[270] 실시예 11. 최적화된 pEGDMA 박막 코팅된 트랜스웰 플레이트를 이용한 장 줄기세포의 장 상피세포 분화법 개발

[271] 장 줄기세포의 분화능을 검증하기 위해 최적화된 pEGDMA가 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 공기-액체 계면 배양법을 이용하여 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시켜 주었다 (도 17(a)). 트랜스웰 플레이트의 상단부만 공기중에 노출시켜 분화를 유도하였을 때, 장 줄기세포가 장 상피세포로 분화되었으며 날짜가 지남에 따라 융모(villus)와 유사한 구조가 생성되는 것을 확인하였고, 매트릭스 젤이 코팅된 트랜스웰에서 분화시킨 장 상피세포와 비교해 보았을 때 세포의 형태적 차

이가 없음을 확인할 수 있었다 (도 17(b)). 마커 유전자 발현, 면역형광염색 및 조직염색 분석을 실시한 결과, 마커 유전자 및 단백질의 발현량이 매트릭셀 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 분화시켰을 때와 비교하여 차이가 없음을 확인할 수 있었다 (도 17(c) 및 도 17(d)). 마지막으로 분화된 장 상피세포의 기능성을 검증하기 위해 표피세포 피부저항(transsepithelial electric resistance, TEER)을 측정해 보았을 때  $290 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$  정도 값을 나타내었으며, 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 분화시켰을 때와 차이가 없음을 확인할 수 있었다 (도 17(e)). 따라서, 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 배양 접시는 매트릭셀 코팅을 대체할 수 있으며 장 줄기세포의 배양 뿐 아니라 장 상피세포로의 분화에 적합한 재료임을 확인하였다.

[272] **실시예 12. 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅된 트랜스웰 플레이트를 이용한 인간 배아줄기세포 유래 장 줄기세포의 장 상피세포 분화법 개발**

[273] 본 기술의 범용성을 확인하기 위해 최적화된 pEGDMA가 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 공기-액체 계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 이용하여 인간 배아줄기세포 유래 장 줄기세포를 장 상피세포로 분화시켰다. 트랜스웰 플레이트의 상단부만 공기중에 노출시켜 분화를 유도하였을 때, 인간 배아줄기세포 유래 장 줄기세포 또한 장 상피세포로 분화되어 융모(villus)와 유사한 구조가 생성되는 것을 확인하였고, 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰에서 분화시킨 장 상피세포와 비교해 보았을 때 세포의 형태적 차이가 없음을 확인하였다 (도 18(a)). 또한, 마커 유전자 발현 및 면역형광염색 및 조직염색 분석을 실시한 결과, 마커 유전자 및 단백질의 발현량이 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 분화시켰을 때와 비교하여 차이가 없음을 확인할 수 있었다 (도 18(b) 및 도 18(c)). 마지막으로 분화된 장 상피세포의 기능성을 검증하기 위해 표피세포 피부저항(transsepithelial electric resistance, TEER)을 측정해본 결과,  $125 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$  정도 값을 나타내었으며, 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰 플레이트에서 분화시켰을 때와 차이가 없음을 확인할 수 있었다 (도 18(d)).

[274] **실시예 13. 최적화된 pEGDMA 박막이 코팅 배양접시에서 배양된 장 줄기세포의 다양한 장 손상 모델 내 이식 및 생착능 확인**

[275] pEGDMA 박막이 코팅된 배양접시에서 배양한 장 줄기세포 (도 19(b))의 마우스 내 이식 및 생착능을 검증하기 위하여 EDTA 유도 장 상피 손상 면역결핍마우스를 준비하였다. 이식제로 fibrin을 채택하여 fibrin 이식군(대조군) 및 장 줄기세포 이식군(pEGDMA-ISC)을 장 상피손상 모델에 이식하였다 (도 19(a)). 실험동물용 대장내시경을 통해 상피 손상 직후 상피 손상 정도를 확인하고 이식을 진행하였을 때, 이식 14일 후 장 줄기세포 이식군에서 조직 손상 또는 발적이 없음을 확인하였다 (도 19(c) 및 도 19(d)). 이중이식편 결장 부위 조직학적 염색(H&E)을 통해서도 fibrin 이식군에 비해, pEGDMA 박막 코팅 위에서 배양한 장 줄기세포를 이식한 그룹이 Crypt depth와 형성(복원)률이 유의적으로 높으며, 특히, 기능적으로

Mucin의 분비가 활발한 것을 확인하였다 (도 19(e) 및 도19(f)). 또한, 이식받는 마우스 결장내 전반적인 패턴을 확인하기 위해 longitudinal section의 조직학적 염색을 수행하여, Fibrin 이식군에 비해 장 줄기세포 이식군의 이중이식편에서 이식 및 재구성이 되었음을 재검증하였다 (도 19(e)). human-특이적 항체(hECAD)를 통해 이중이식편 장 줄기세포가 여전히 결장 내 위치하여 생착되었음을 보여주었다 (도 19(g)).

- [276] 또한, pEGDMA 박막 코팅된 배양접시에서 자란 장 줄기세포 (도 20(b))가 염증성 장질환 모델에서도 이식이 가능한지 확인하기 위하여 DSS 유도 대장염 면역 결핍마우스를 준비하였다. 장 상피 손상 모델에 적용한 것과 동일하게 fibrin을 이식제로 채택하고, 질병활성도 측정을 통해, 대장염의 표현형이 나타나는 마우스 모델에 fibrin 또는 장 줄기세포를 이식하였다 (도 20(a)). 대장내시경을 통해 이식 전 염증도를 확인하고, 이식 14일, 28일 후 대장 내 환경을 관찰하였다. 이식 14일 차에 fibrin 단독 이식군에 비해 장 줄기세포 이식군에서 빠르게 염증이 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 이식 28일 차에 장 상피가 복원된 것을 확인하였다 (도 20(c)). 이식 28일 차 longitudinal section을 수행한 이중이식편 결장의 조직학적 분석을 통해 Fibrin에 비해 장 줄기세포 이식군의 장 상피의 Crypt 구조 회복이 빠르며, crypt depth도 유의적으로 증가하는 것을 보여주었다 (도 20(d) 및 도 20(e)). AB-PAS 염색을 통해 뮤신 분비능도 fibrin 이식군에 비해 증가하였음을 확인하였다 (도 20(d)). Human-특이적 항체(hECAD)를 통해 이중이식편 장 줄기세포가 결장 내 생착되어 구조를 이루고 있음을 검증하였다 (도 20(f)).

## 청구범위

- [청구항 1] (1) iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막을 포함하는 배양 기판을 제공하는 단계; 및  
(2) 상기 배양 기판에 Wnt 신호 전달 경로 활성화제, Wnt 작용물질, TGF-베타 억제제, BMP 억제제, 및 수용체 타이로신 키나아제 리간드를 포함하는 배양 배지를 넣고 장 줄기세포를 2차원 배양하는 단계; 를 포함하는 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막은 pDMAEMA(poly(2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate)), pDMPMA(poly(Dimethylaminopropyl methacrylamide)), pDEAEMA(poly(2-(Diethylamino)ethyl methacrylate)), pTBAEMA(poly(2-tert-Butylaminoethyl methacrylate)), pDMAEA(poly(2-(Dimethylamino)ethyl acrylate)), pGMA(poly(Glycidyl methacrylate)), p(GMA-co-DMAEMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))), p(GMA-co-DMPMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-dimethylaminopropyl methacrylamide)), p(GMA-co-DEAEMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(diethylamino)ethyl methacrylate))), p(GMA-co-TBAEMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(2-tert-butylaminoethyl methacrylate))), p(GMA-co-DMAEA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl acrylate))), pEGDMA(poly(Ethylene glycol dimethacrylate)), p(EGDMA-co-DMAEMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))), p(EGDMA-co-DMPMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-dimethylaminopropyl methacrylamide)), p(EGDMA-co-DEAEMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(diethylamino)ethyl methacrylate))), p(EGDMA-co-TBAEMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(2-tert-butylaminoethyl methacrylate))), p(EGDMA-co-DMAEA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl acrylate))), pVBC(poly(Vinyl benzyl chloride)), p(VBC-co-DMAEMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))), p(VBC-co-DMPMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-dimethylaminopropyl methacrylamide)), p(VBC-co-DEAEMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(diethylamino)ethyl methacrylate))), p(VBC-co-TBAEMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(2-tert-butylaminoethyl methacrylate))), p(VBC-co-DMAEA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(2-(dimethylamino)ethyl acrylate))), pCHMA(poly(Cyclohexyl methacrylate)), pV4D4(poly(2,4,6,8-Tetramethyl-2,4,6,8-tetravinylcyclotetra siloxane)) 및 pBMA(poly(Benzyl methacrylate)) 중 어느 하나로 이루어진 것인, 장 줄기세포의 배양 방법.

- [청구항 3] 제2항에 있어서, iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막은 pEGDMA(poly(Ethylene glycol dimethacrylate)) 또는 pCHMA(poly(Cyclohexyl methacrylate))인, 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막은 물에 대한 접촉각이 10~45° 범위인, 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 배양 기관은 10 내지 20 W 하에서 5 내지 20초 동안 플라즈마 처리를 통해 제조된 것인, 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, Wnt 신호 전달 경로 활성화제는 Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 및 Wnt16로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, Wnt 작용물질은 R-스폰딘 1, R-스폰딘 2, R-스폰딘 3 또는 R-스폰딘 4인, 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, TGF-베타 억제제는 A83-01, SB-431542, SB-505124, SB-525334, SD-208, LY-36494 및 SJN-2511로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, BMP 억제제는 노긴(Noggin), Dorsomorphin, DMH1, 또는 LDN-193189인, 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 수용체 타이로신 키나아제 리간드는 상피 성장 인자(EGF), 형질전환 성장인자-알파(TGF-알파), 기본 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 뇌-유래된 신경영양 인자(BDNF), 뉴레쿨린 1(NRG1), 간세포 성장 인자(HGF) 및 각질세포 성장 인자(KGF)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 배양 배지는 p38 키나아제 억제제, Prostaglandin E2, N-acetylcysteine, Gastrin, B27 및 Nicotinamide로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 추가적인 성분을 더 포함하는 것인, 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 배양 배지는 배양 초기 ROCK 억제제, Notch 활성화제 또는 이들 모두를 더 포함하는 것인, 장 줄기세포의 배양 방법.
- [청구항 13] (1) iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막을 포함하는 배양 기관을 제공하는 단계;  
 (2) 상기 배양 기관에 Wnt 신호 전달 경로 활성화제, Wnt 작용물질, TGF-베타 억제제, BMP 억제제, 및 수용체 타이로신 키나아제 리간드를 포함하는 배양 배지를 넣고 장 줄기세포를 2차원 배양하는 단계; 및  
 (3) 상기 (2) 단계를 통해 배양된 장 줄기세포를, 상기 배양 기관에 Wnt 작용물질, p38 키나아제 억제제, 수용체 타이로신 키나아제 리간드, Prostaglandin E2 및 Nicotinamide를 포함하는 분화 배지를 넣고 공기-액체

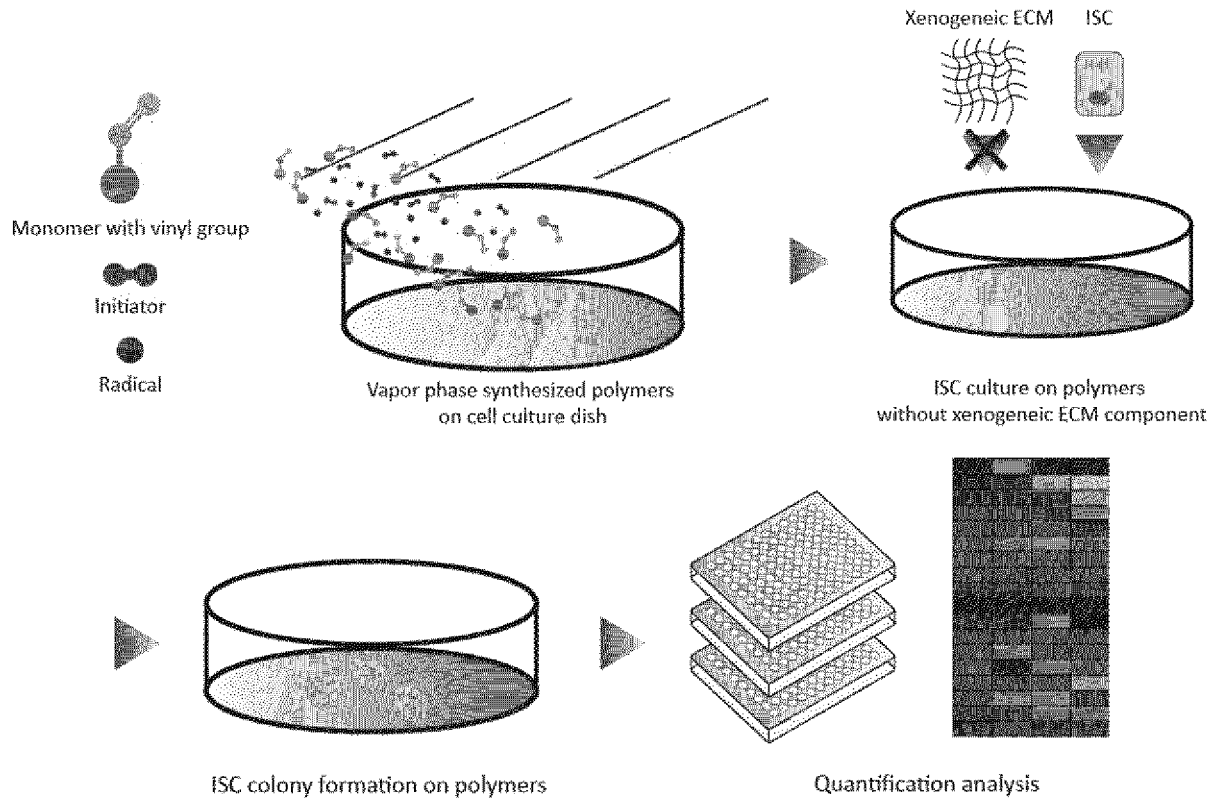


계면(Air-Liquid Interface) 배양법을 통해 분화시키는 단계; 를 포함하는 장 상피세포의 제조 방법.

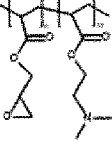
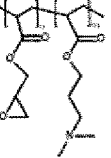
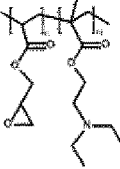
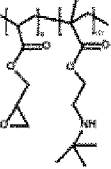
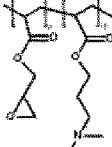
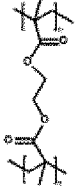
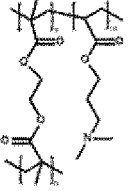
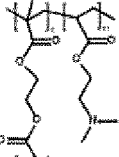
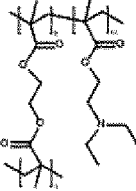
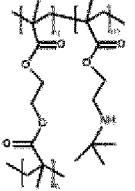
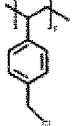
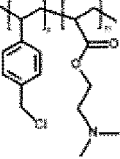
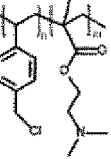
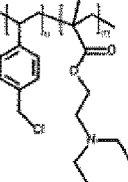
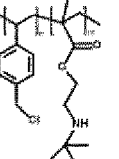
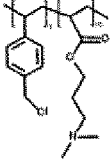
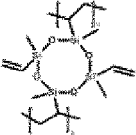
- [청구항 14] 제13항에 있어서, iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막은 pDMAEMA(poly(2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate)), pDMPMA(poly(Dimethylaminopropyl methacrylamide)), pDEAEMA(poly(2-(Diethylamino)ethyl methacrylate)), pTBAEMA(poly(2-tert-Butylaminoethyl methacrylate)), pDMAEA(poly(2-(Dimethylamino)ethyl acrylate)), pGMA(poly(Glycidyl methacrylate)), p(GMA-co-DMAEMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))), p(GMA-co-DMPMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-dimethylaminopropyl methacrylamide)), p(GMA-co-DEAEMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(diethylamino)ethyl methacrylate))), p(GMA-co-TBAEMA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(2-tert-butylaminoethyl methacrylate))), p(GMA-co-DMAEA)(poly(Glycidyl methacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl acrylate))), pEGDMA(poly(Ethylene glycol dimethacrylate)), p(EGDMA-co-DMAEMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))), p(EGDMA-co-DMPMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-dimethylaminopropyl methacrylamide)), p(EGDMA-co-DEAEMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(diethylamino)ethyl methacrylate))), p(EGDMA-co-TBAEMA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(2-tert-butylaminoethyl methacrylate))), p(EGDMA-co-DMAEA)(poly(Ethylene glycol dimethacrylate-co-(2-(dimethylamino)ethyl acrylate))), pVBC(poly(Vinyl benzyl chloride)), p(VBC-co-DMAEMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))), p(VBC-co-DMPMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-dimethylaminopropyl methacrylamide)), p(VBC-co-DEAEMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(diethylamino)ethyl methacrylate))), p(VBC-co-TBAEMA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(2-tert-butylaminoethyl methacrylate))), p(VBC-co-DMAEA)(poly(Vinyl benzyl chloride-co-(2-(dimethylamino)ethyl acrylate))), pCHMA(poly(Cyclohexyl methacrylate)), pV4D4(poly(2,4,6,8-Tetramethyl-2,4,6,8-tetravinylcyclotetra siloxane)) 및 pBMA(poly(Benzyl methacrylate)) 중 어느 하나로 이루어진 것인, 장 상피세포의 제조 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막은 pEGDMA(poly(Ethylene glycol dimethacrylate)) 또는 pCHMA(poly(Cyclohexyl methacrylate))인, 장 상피세포의 제조 방법.
- [청구항 16] 제13항에 있어서, iCVD 공정을 통해 제조된 고분자 박막은 물에 대한 접촉각이 10~45° 범위인, 장 상피세포의 제조 방법.

- [청구항 17] 제13항에 있어서, 상기 배양 기판은 10 내지 20 W 하에서 5 내지 20초 동안 플라즈마 처리를 통해 제조된 것인, 장 상피세포의 제조 방법.
- [청구항 18] 제13항에 있어서, 상기 (2) 단계의 Wnt 신호 전달 경로 활성화제는 Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 및 Wnt16로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 장 상피세포의 제조 방법.
- [청구항 19] 제13항에 있어서, Wnt 작용물질은 R-스폰딘 1, R-스폰딘 2, R-스폰딘 3 또는 R-스폰딘 4인, 장 상피세포의 제조 방법.
- [청구항 20] 제13항에 있어서, 상기 (2) 단계의 TGF-베타 억제제는 A83-01, SB-431542, SB-505124, SB-525334, SD-208, LY-36494 및 SJN-2511로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 장 상피세포의 제조 방법.
- [청구항 21] 제13항에 있어서, 상기 (2) 단계의 BMP 억제제는 노긴(Noggin), Dorsomorphin, DMH1, 또는 LDN-193189인, 장 상피세포의 제조 방법.
- [청구항 22] 제13항에 있어서, p38 키나아제 억제제는 SB202190, SB203580, SB239063, SB706504, BIR796, JX401, EO1428, RWJ67657, SCIO469, VX745, TAK715, ML3403, DBM1285, 또는 PH797804로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 장 상피세포의 제조 방법.
- [청구항 23] 제13항에 있어서, 수용체 타이로신 키나아제 리간드는 상피 성장 인자(EGF), 형질전환 성장인자-알파(TGF-알파), 기본 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 뇌-유래된 신경영양 인자(BDNF), 뉴레쿨린 1(NRG1), 간세포 성장 인자(HGF) 및 각질세포 성장 인자(KGF)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 장 상피세포의 제조 방법.
- [청구항 24] 제13항에 있어서, 상기 (2) 단계의 배양 배지는 Prostaglandin E2, N-acetylcysteine, Gastrin, B27 및 Nicotinamide로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 추가적인 성분을 더 포함하는 것인, 장 상피세포의 제조 방법.
- [청구항 25] 제13항에 있어서, 상기 (2) 단계의 배양 배지는 배양 초기 ROCK 억제제, Notch 활성화제 또는 이들 모두를 더 포함하는 것인, 장 상피세포의 제조 방법.

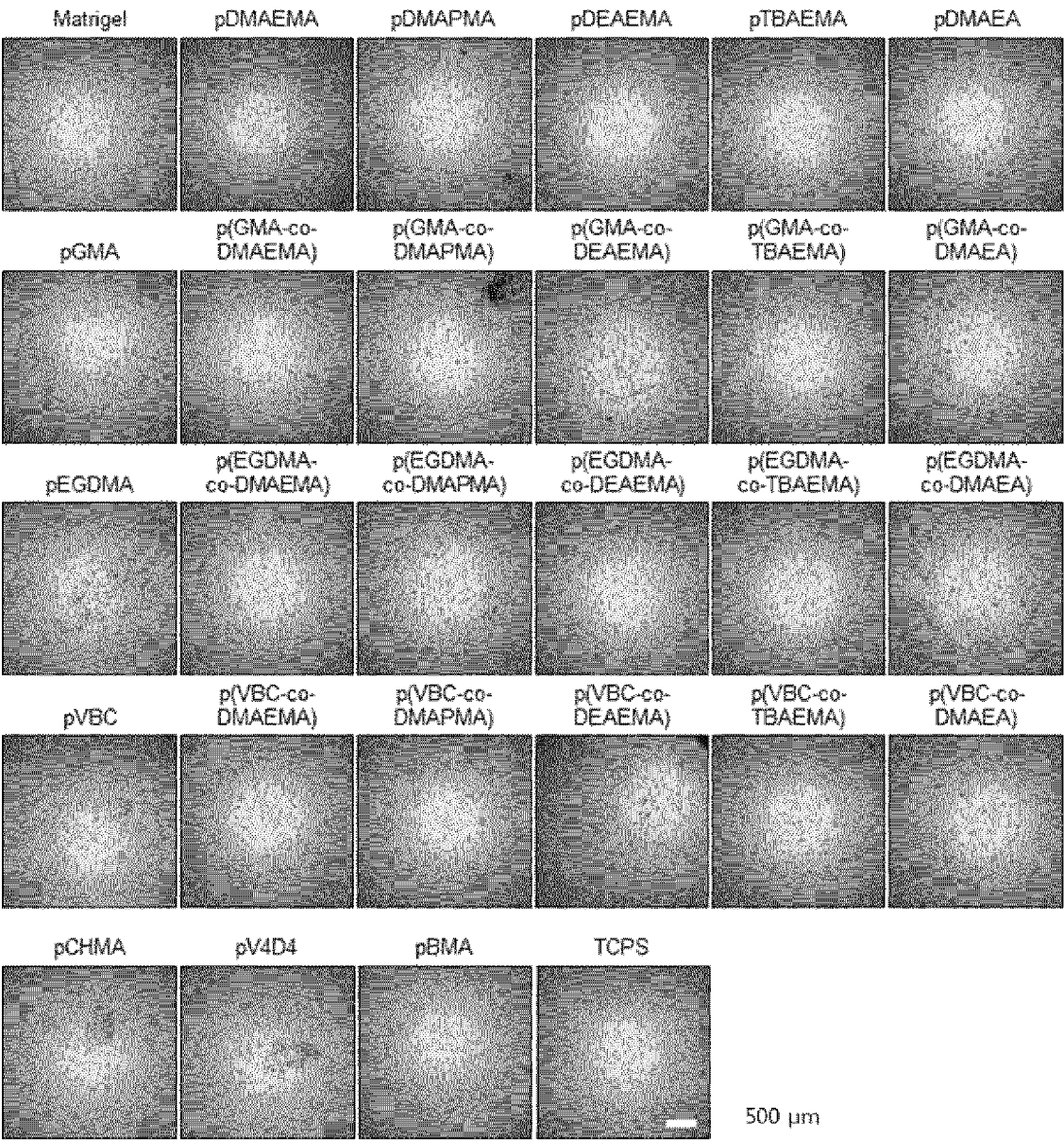
[도 1]



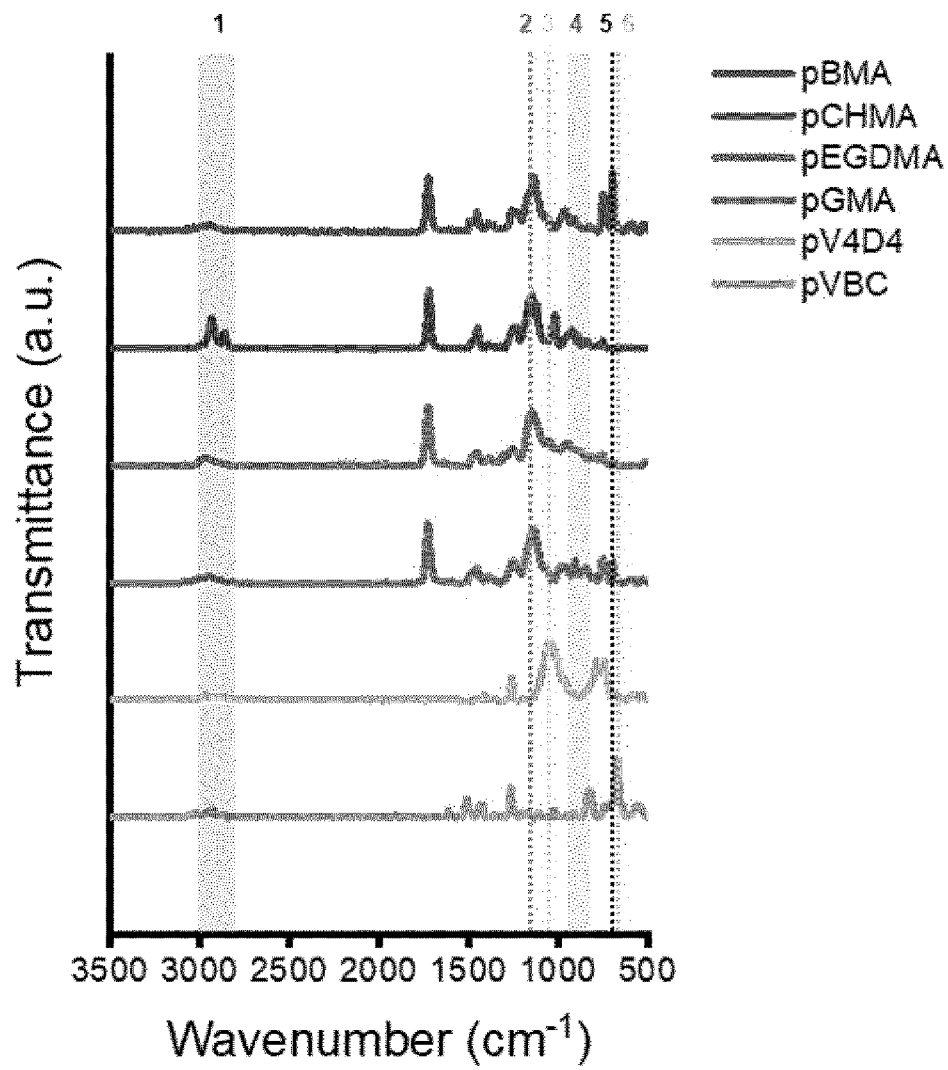
[도2]

|                                                                                     |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                       |                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                     | pDMAEMA                                                                             | pDAPMA                                                                              | pDEAEMA                                                                             | pTBAEMA                                                                               | pDMAEA                                                                                |
|                                                                                     |    |    |    |    |    |
| pGMA                                                                                | p(GMA-co-DMAEMA)                                                                    | p(GMA-co-DAPMA)                                                                     | p(GMA-co-DEAEMA)                                                                    | p(GMA-co-TBAEMA)                                                                      | p(GMA-co-DMAEA)                                                                       |
|    |    |    |    |    |    |
| pEGDMA                                                                              | p(EGDMA-co-DMAEMA)                                                                  | p(EGDMA-co-DAPMA)                                                                   | p(EGDMA-co-DEAEMA)                                                                  | p(EGDMA-co-TBAEMA)                                                                    | p(EGDMA-co-DMAEA)                                                                     |
|   |   |    |   |   |    |
| pVBC                                                                                | p(VBC-co-DMAEMA)                                                                    | p(VBC-co-DAPMA)                                                                     | p(VBC-co-DEAEMA)                                                                    | p(VBC-co-TBAEMA)                                                                      | p(VBC-co-DMAEA)                                                                       |
|  |  |  |  |  |  |
| pCHMA                                                                               | pV4D4                                                                               | pBMA                                                                                |                                                                                     |                                                                                       |                                                                                       |
|  |  |  |                                                                                     |                                                                                       |                                                                                       |

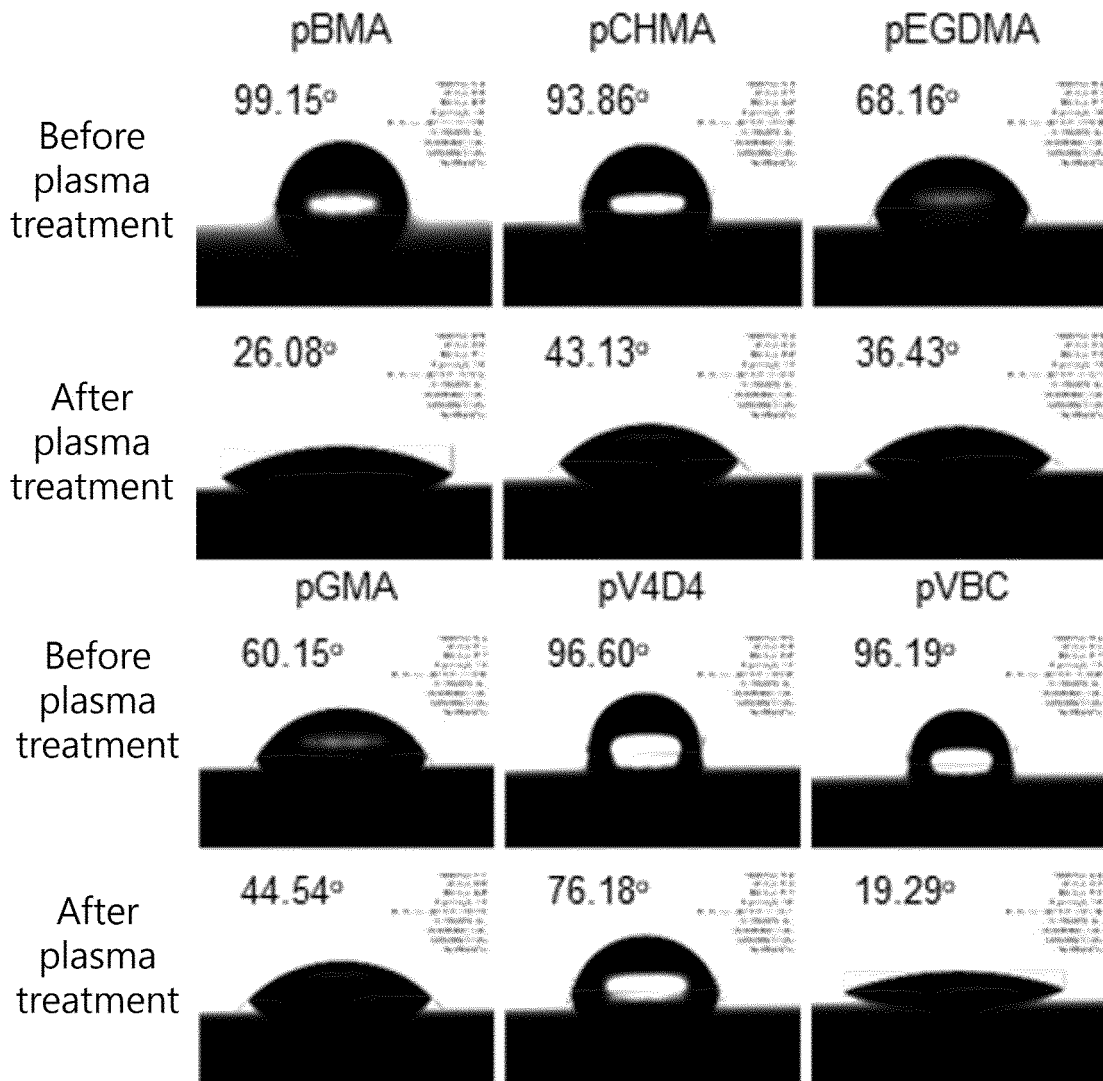
[도3]



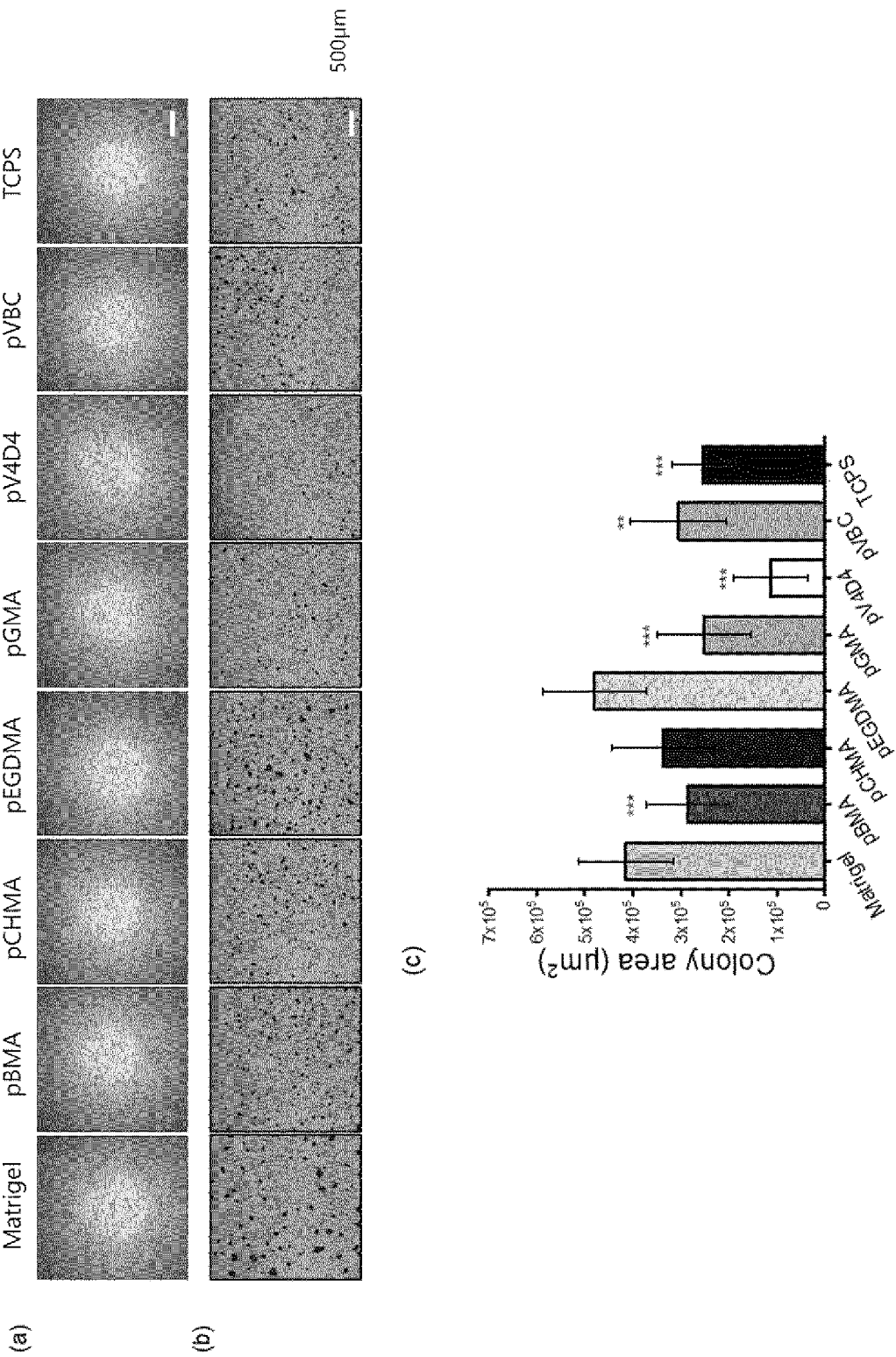
[도4a]



[도4b]

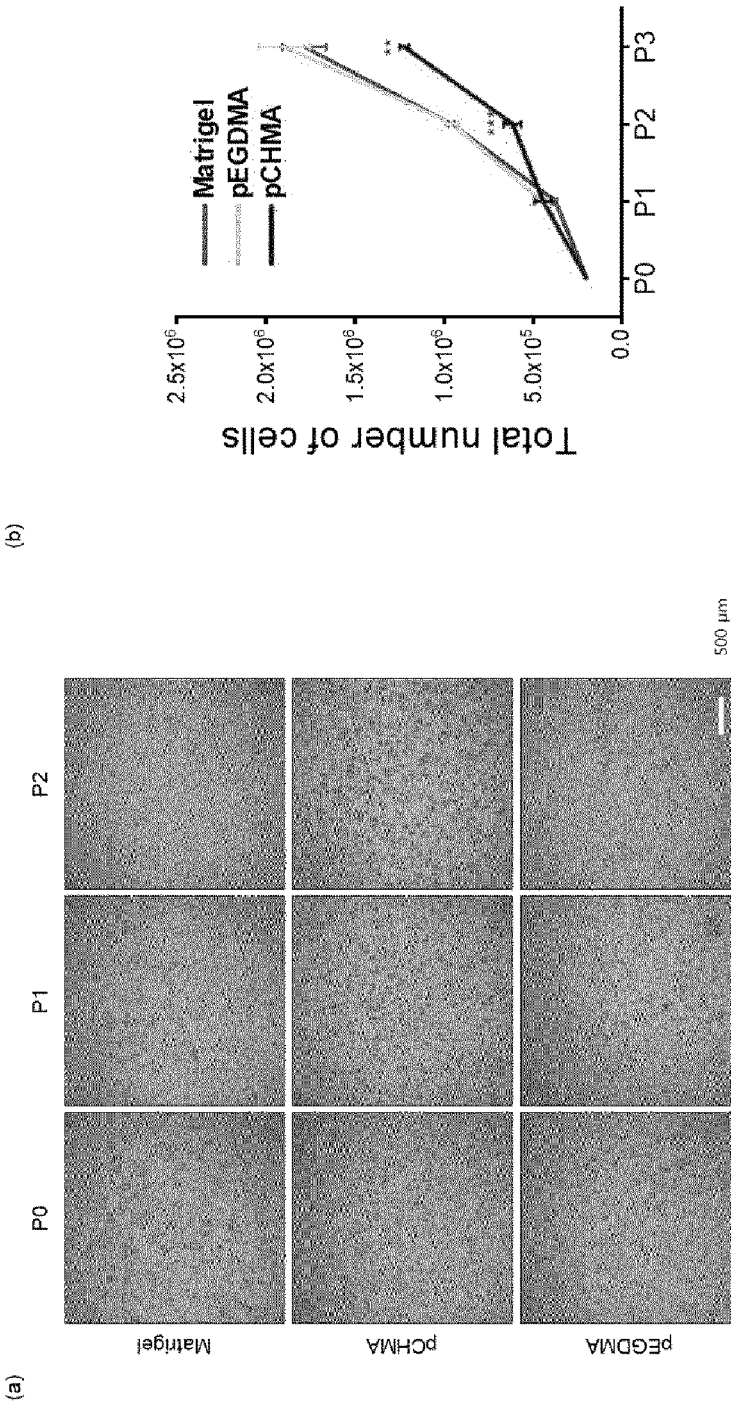


[도5]

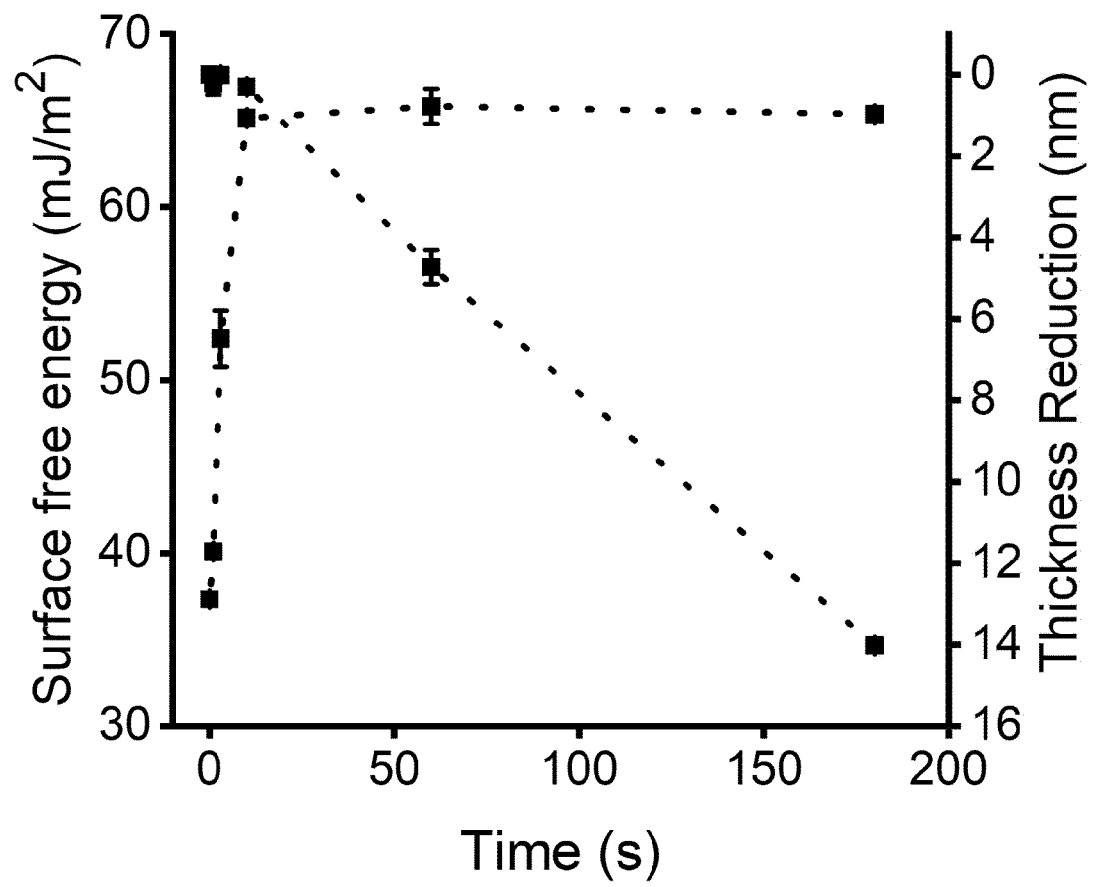




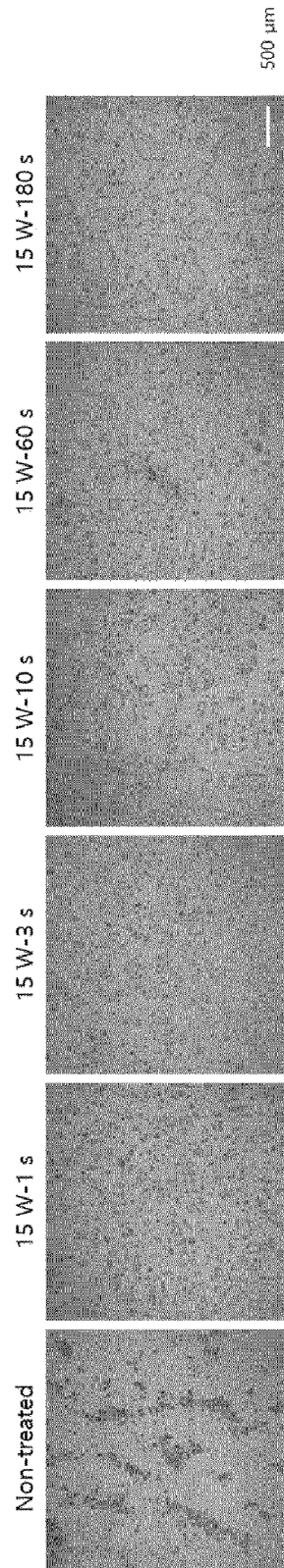
[도6]



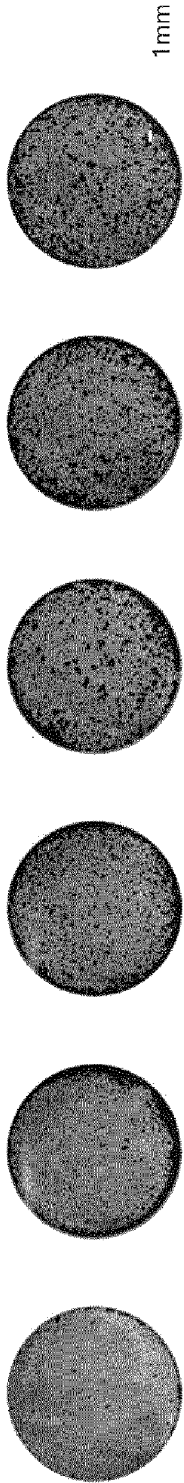
[도7a]



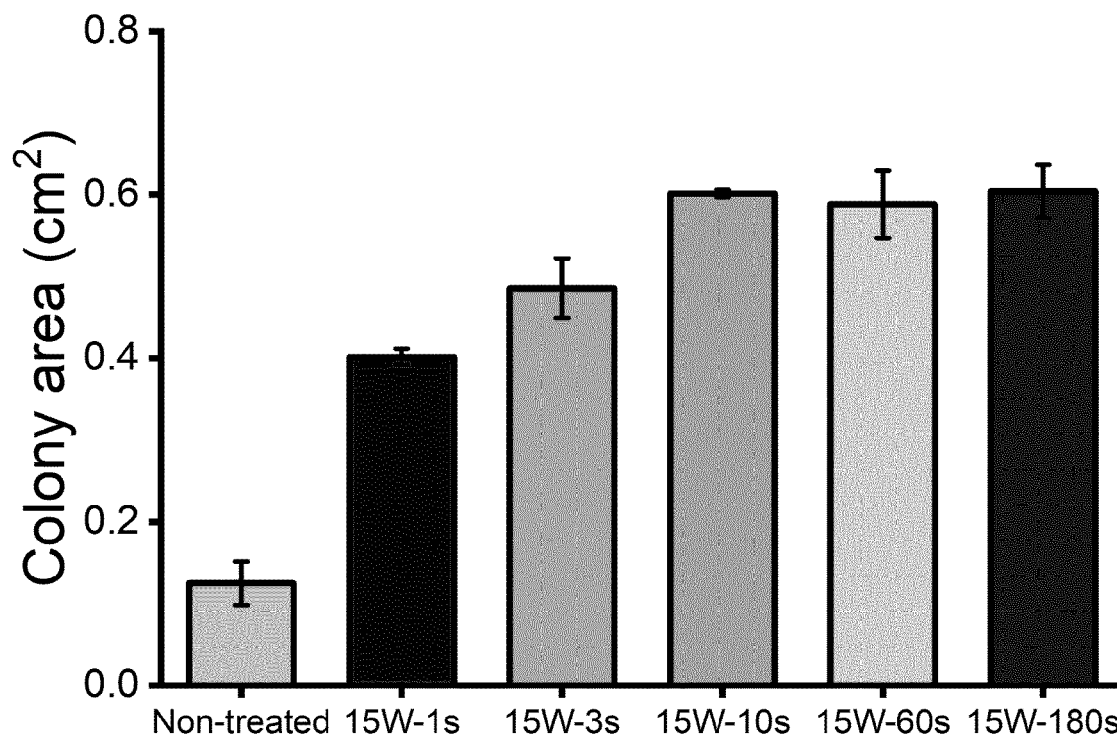
[도 7b]



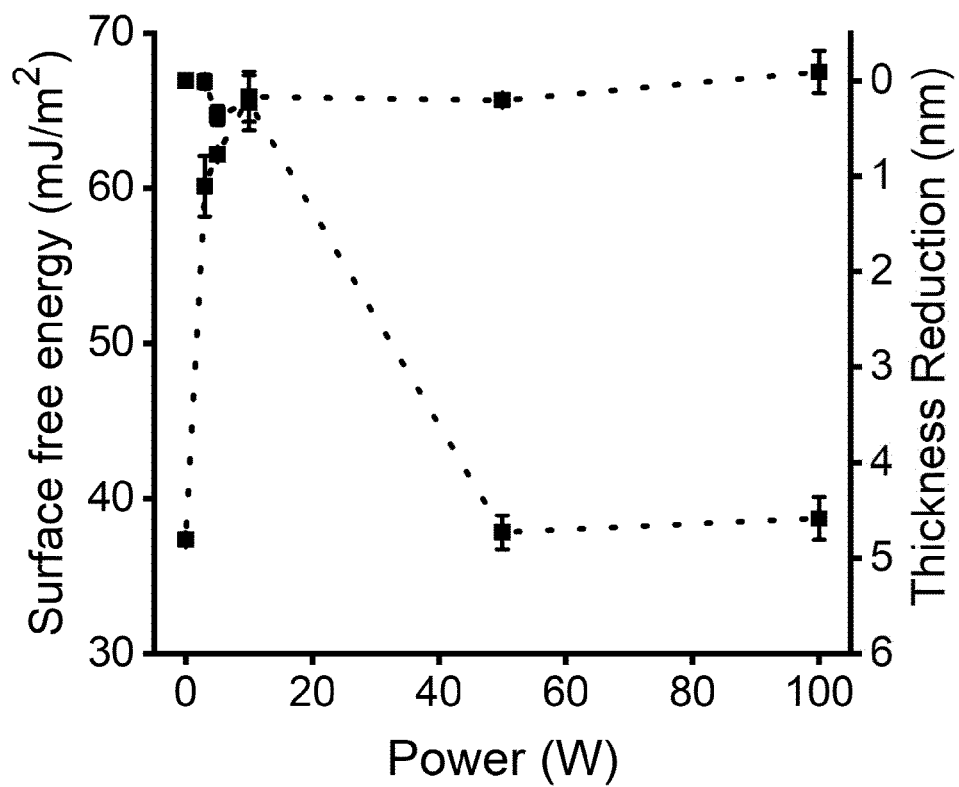
[도7c]



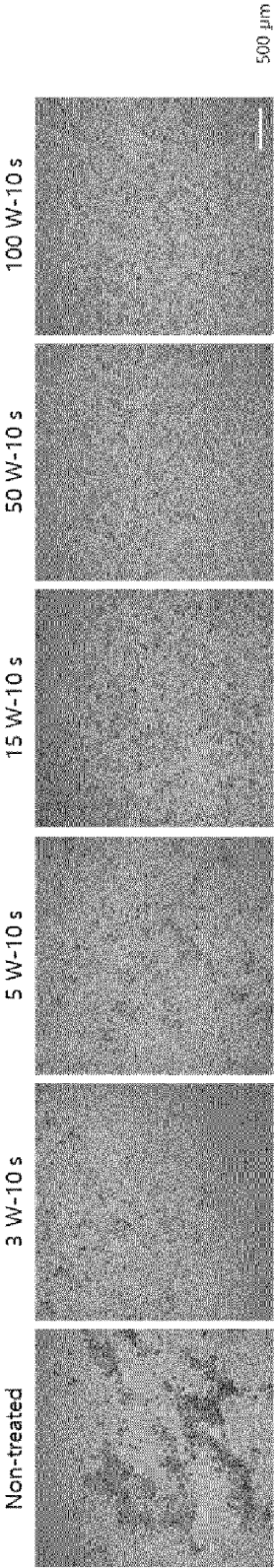
[도7d]



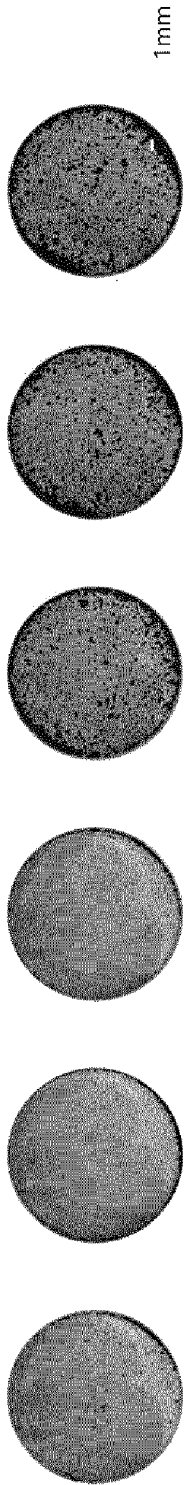
[도8a]



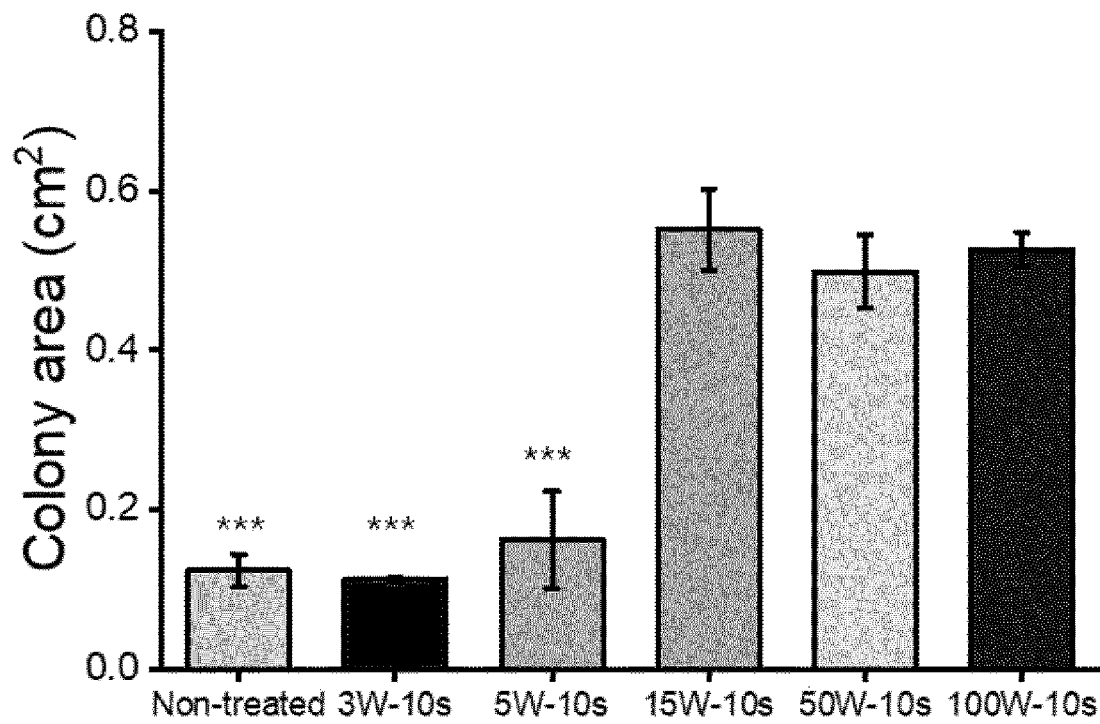
[도8b]



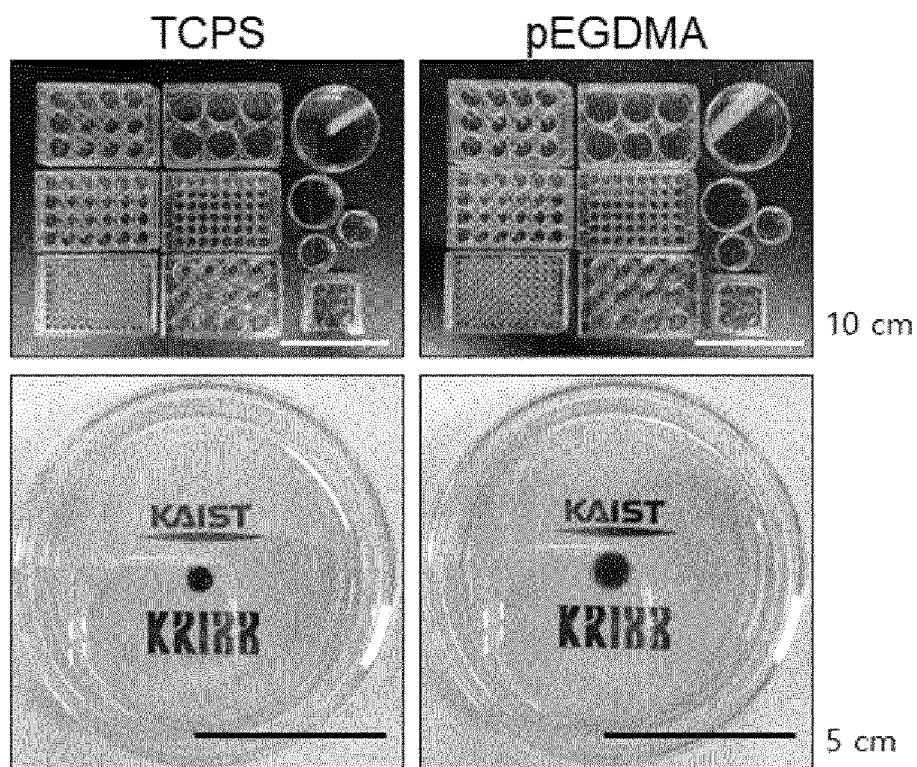
[도8c]



[도8d]

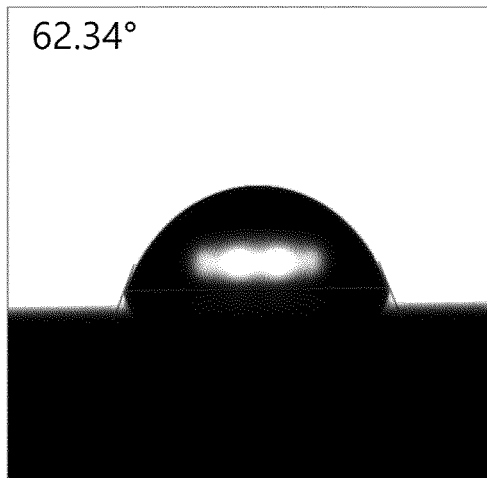


[도9a]

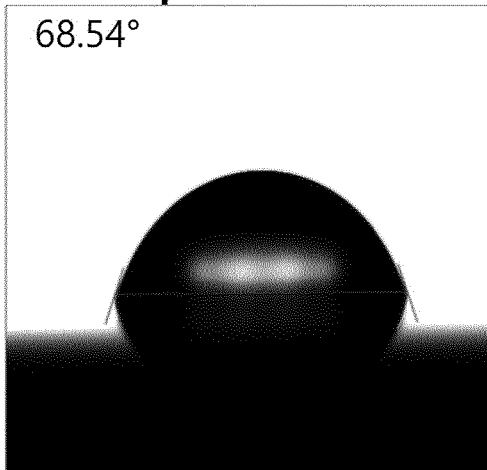




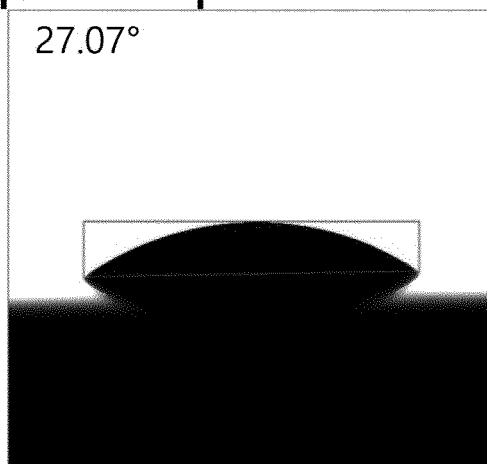
[도 9b]

**Bare water**

Average Angle : 63.79  
Left Angle : 63.84  
Right Angle : 63.74  
Drop Volume[uL] : 6.79  
Rec. DateTime : 2022-05-20 12:46:42.795  
Rec. Position[mm] : (0,0)  
Rec. Temperature[C] : 20.0  
Syringe Temp,[C] : 20.0  
Rec. Tilt[degree] : 0

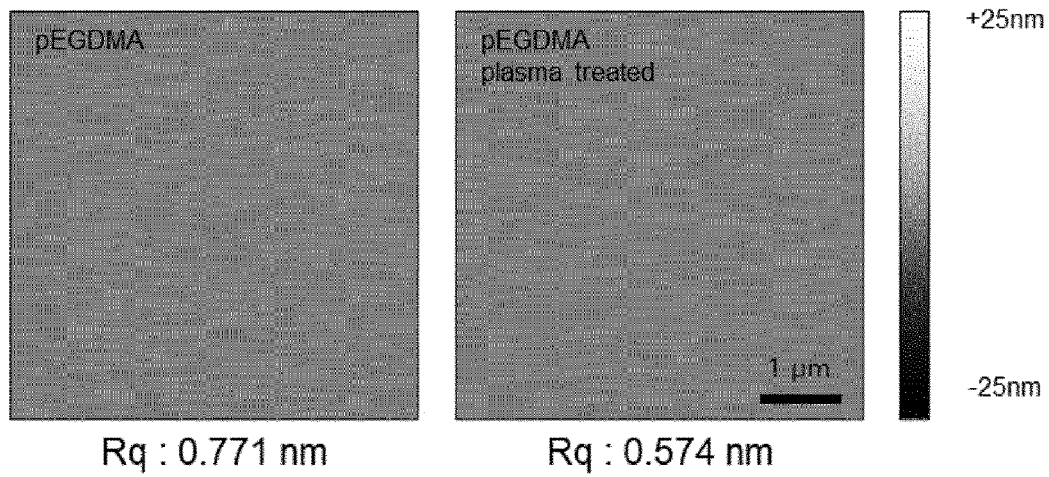
**pEGDMA**

Average Angle : 68.54  
Left Angle : 68.55  
Right Angle : 68.52  
Drop Volume[uL] : 6.90  
Rec. DateTime : 2022-05-20 12:41:23.971  
Rec. Position[mm] : (0,0)  
Rec. Temperature[C] : 20.0  
Syringe Temp,[C] : 20.0  
Rec. Tilt[degree] : 0

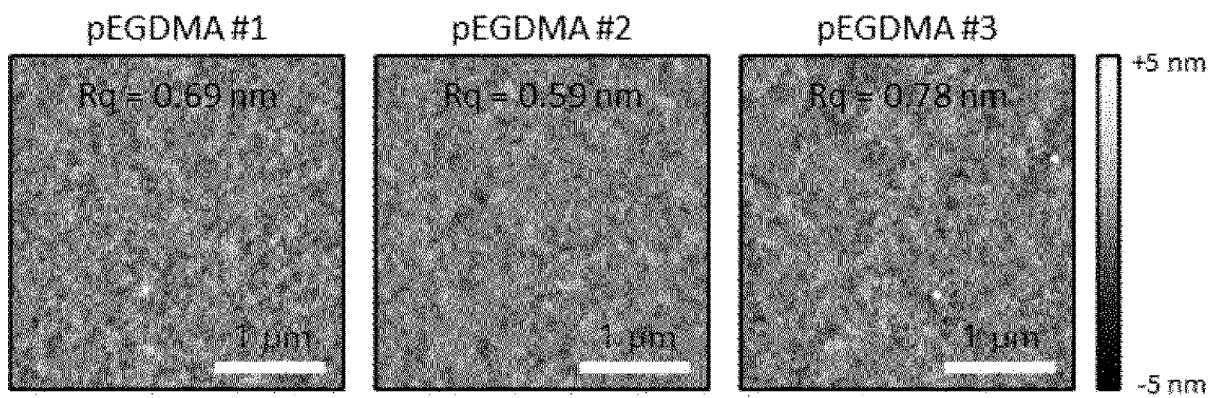
**pEGDMA plasma treated**

Average Angle : 27.07  
Left Angle : 26.07  
Right Angle : 28.06  
Drop Volume[uL] : 5.90  
Rec. DateTime : 2022-05-20 12:43:47.919  
Rec. Position[mm] : (0,0)  
Rec. Temperature[C] : 20.0  
Syringe Temp,[C] : 20.0  
Rec. Tilt[degree] : 0

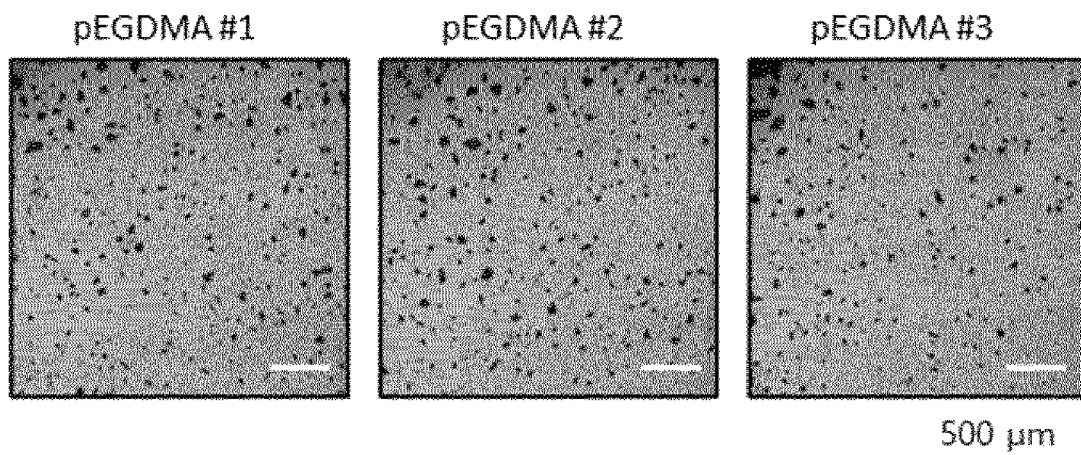
[도9c]



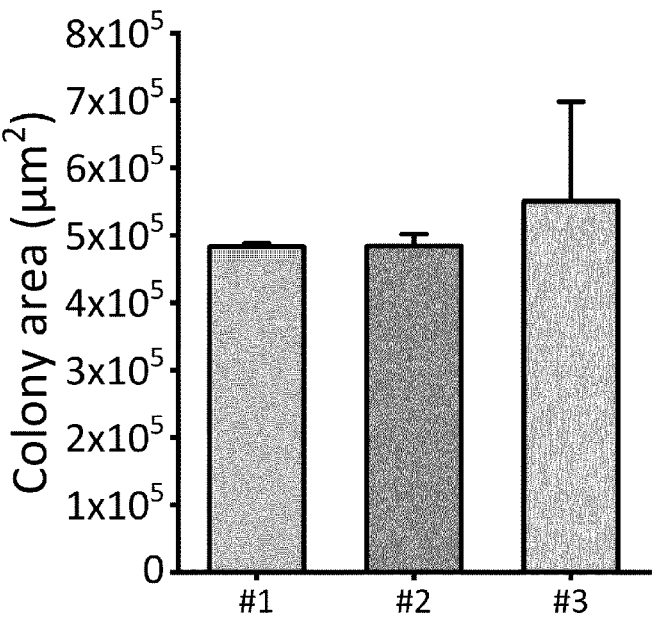
[도9d]



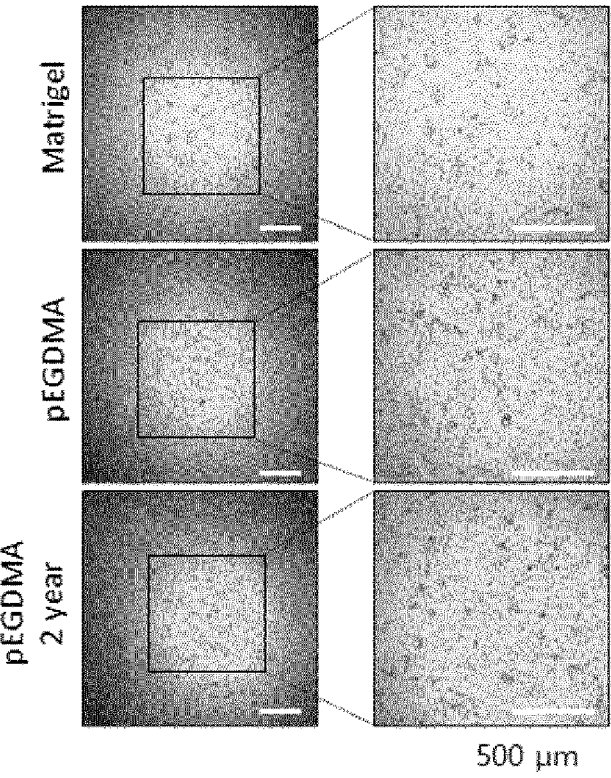
[도9e]



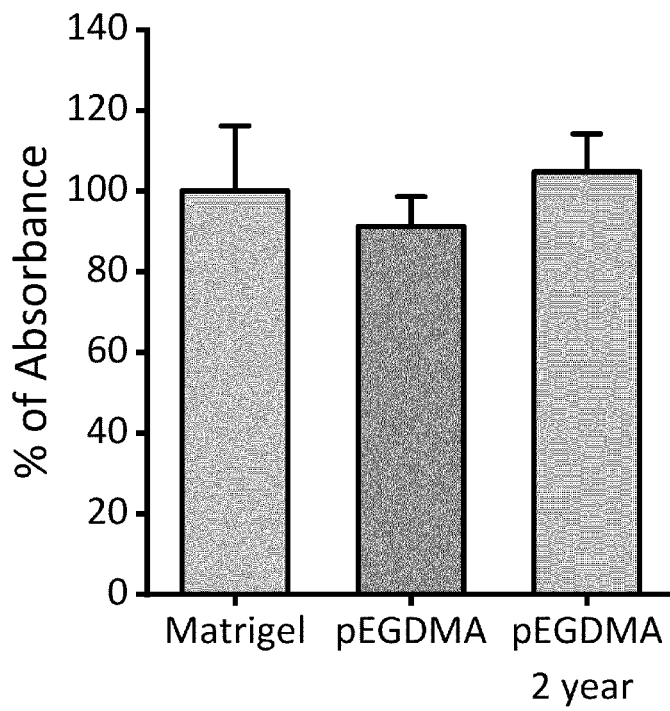
[도9f]



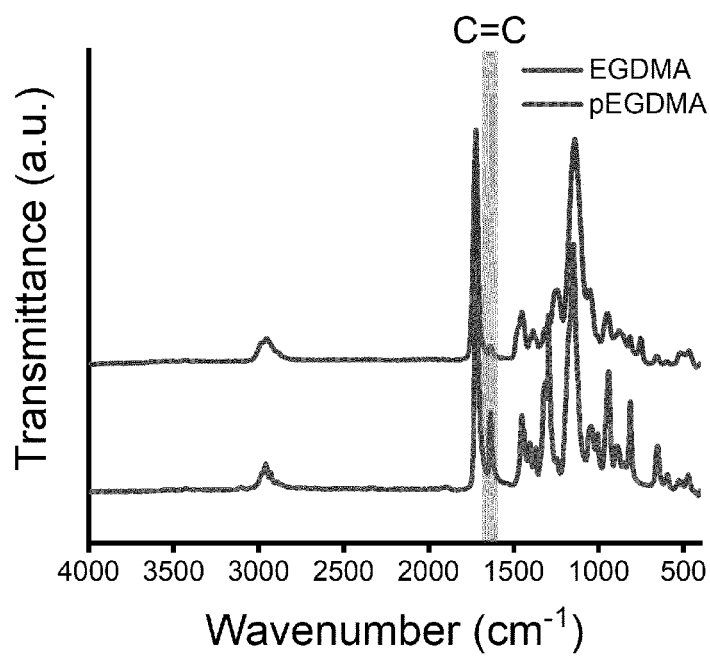
[도9g]



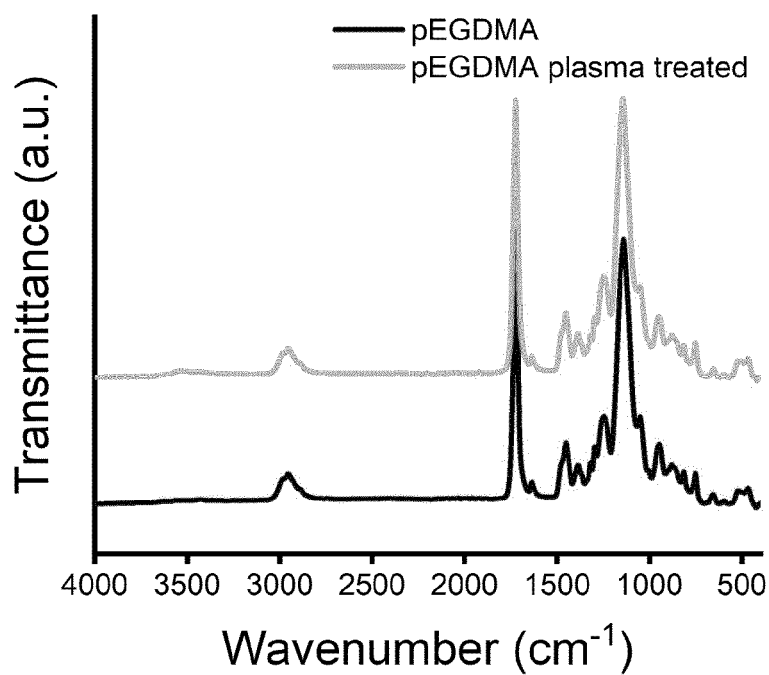
[도9h]



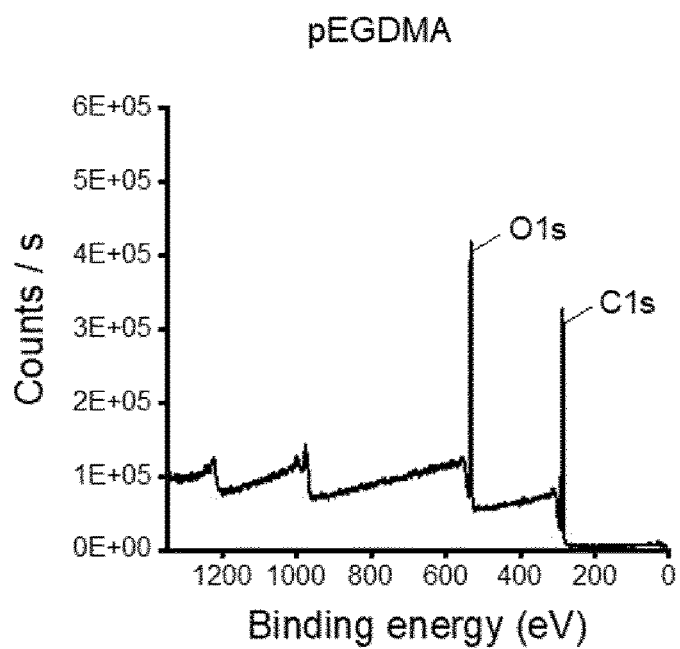
[도10a]



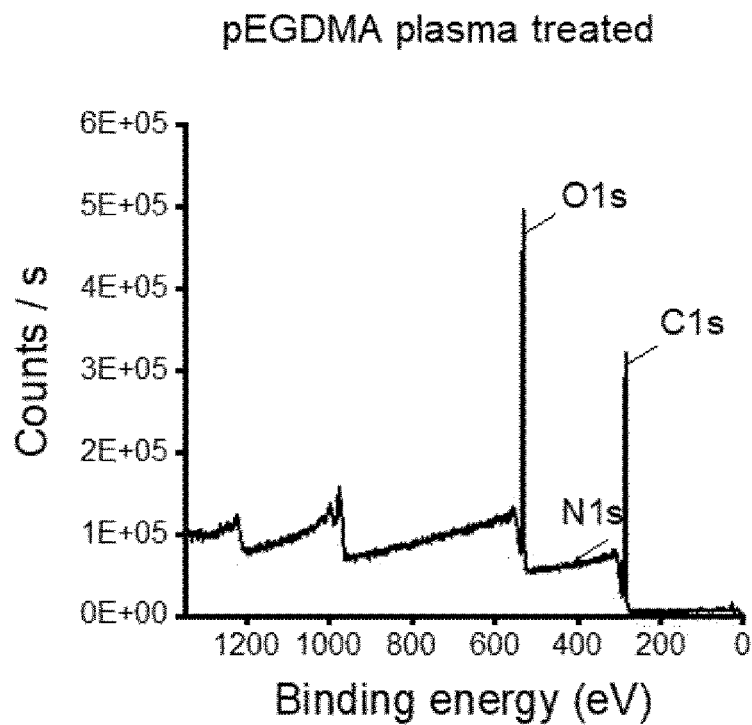
[도10b]



[도11a]



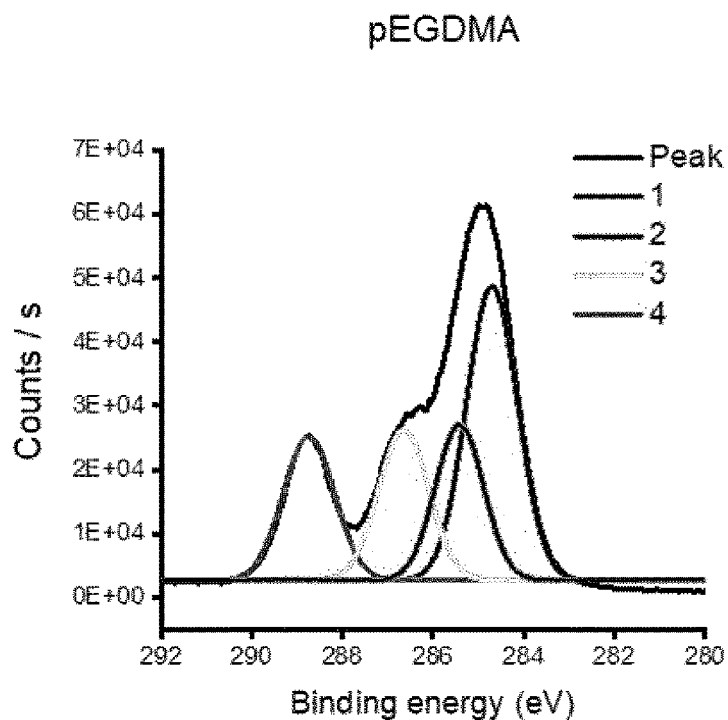
[도11b]



[도11c]

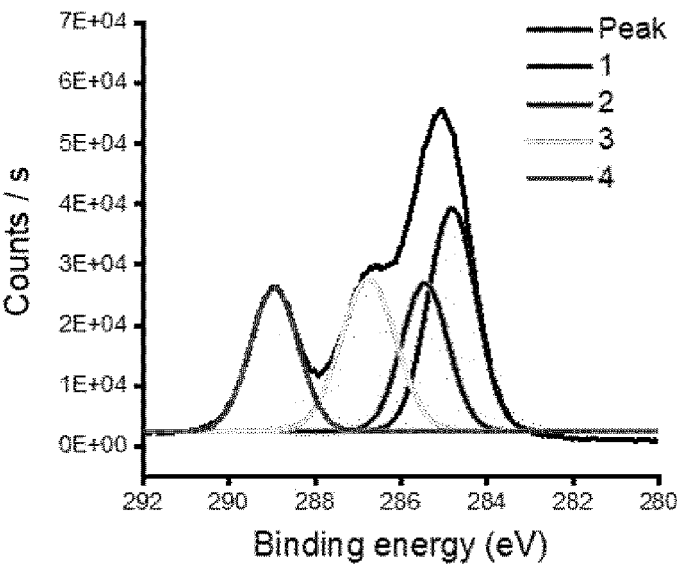
| Atomic (%) | pEGDMA | pEGDMA plasma treated |
|------------|--------|-----------------------|
| Carbon     | 72.11  | 67.69                 |
| Oxygen     | 27.89  | 31.98                 |
| Nitrogen   | 0      | 0.33                  |

[도11d]



[도11e]

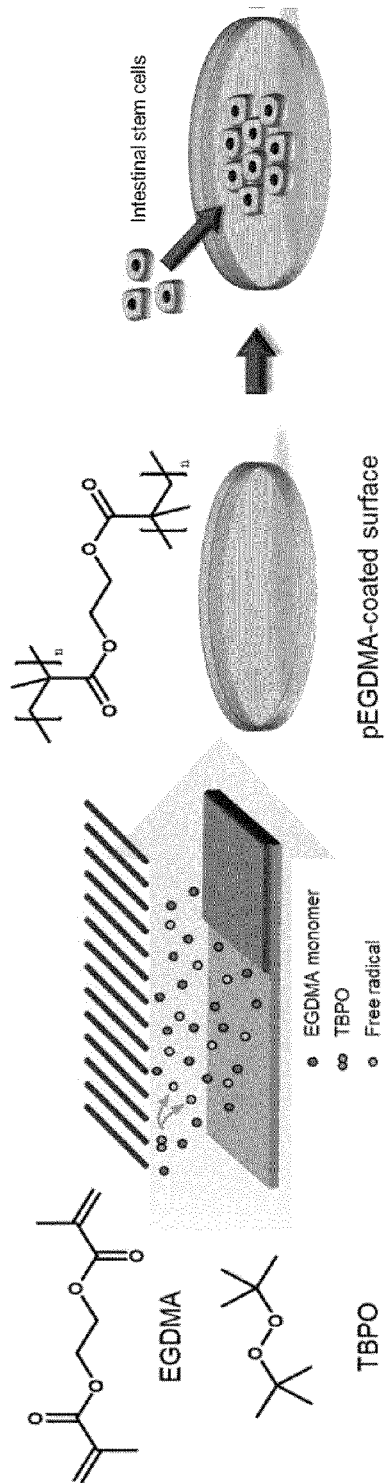
pEGDMA plasma treated



[도11f]

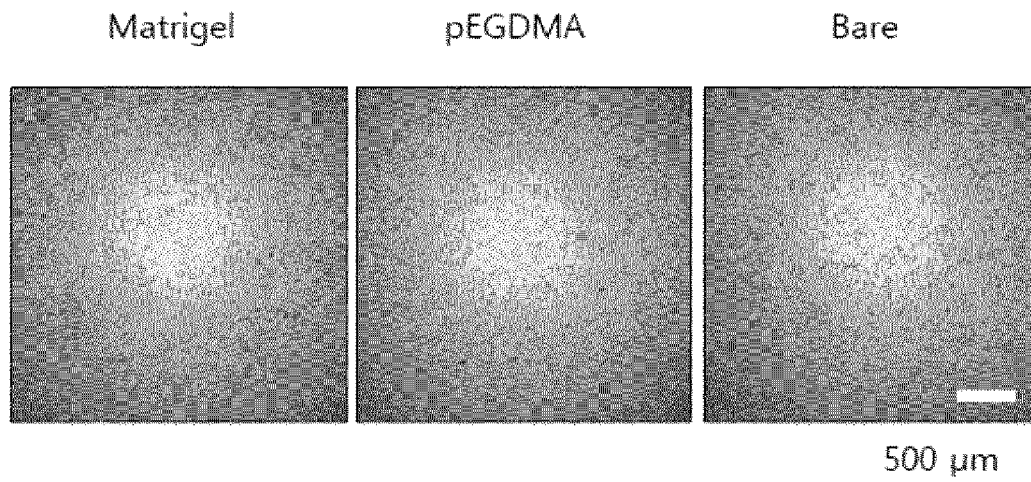
|                                                | Theoretical         |          | pEGDMA              |          | pEGDMA plasma treated |          |
|------------------------------------------------|---------------------|----------|---------------------|----------|-----------------------|----------|
|                                                | Binding energy (eV) | Area (%) | Binding energy (eV) | Area (%) | Binding energy (eV)   | Area (%) |
| 1. -C*H <sub>3</sub> , -C-C*H <sub>2</sub> -C- | 285.0               | 40.0     | 284.7               | 40.1     | 284.7                 | 32.7     |
| 2. -C*(CH <sub>3</sub> )-CO-O-                 | 285.7               | 20.0     | 285.4               | 20.1     | 285.4                 | 20.9     |
| 3. -CH <sub>2</sub> -C*H-O-                    | 286.6               | 20.0     | 286.7               | 20.1     | 286.7                 | 25.4     |
| 4. -O-C*=O                                     | 288.9               | 20.0     | 288.7               | 19.8     | 288.7                 | 21.1     |

[도 12a]

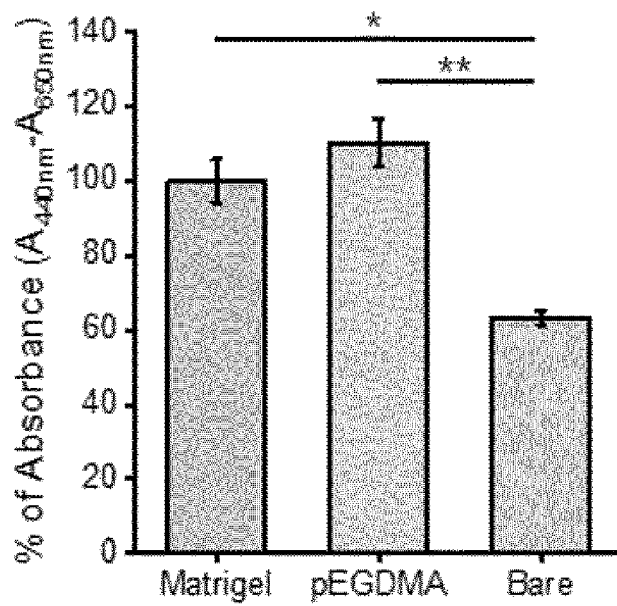




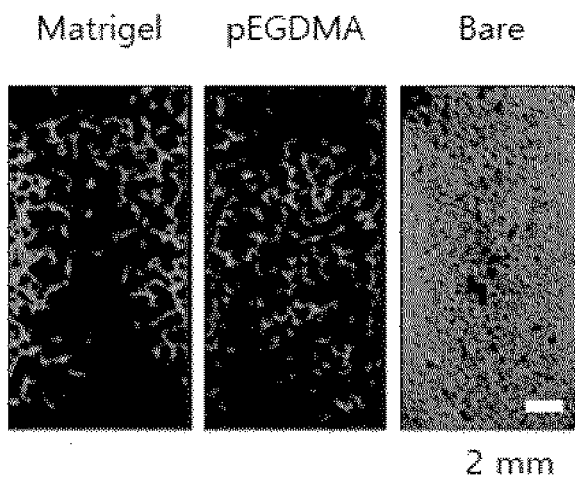
[도 12b]



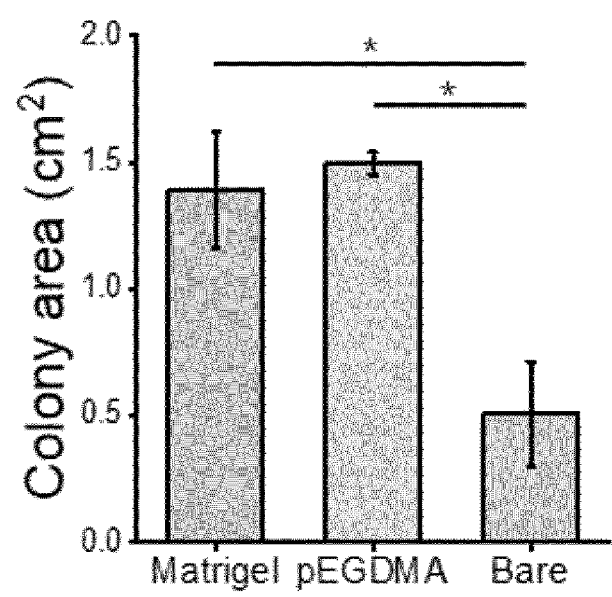
[도 12c]



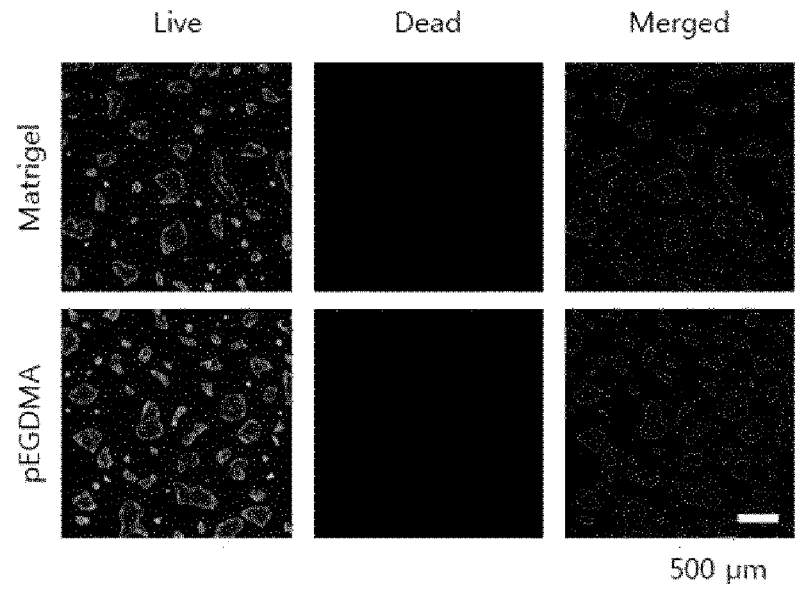
[도 12d]



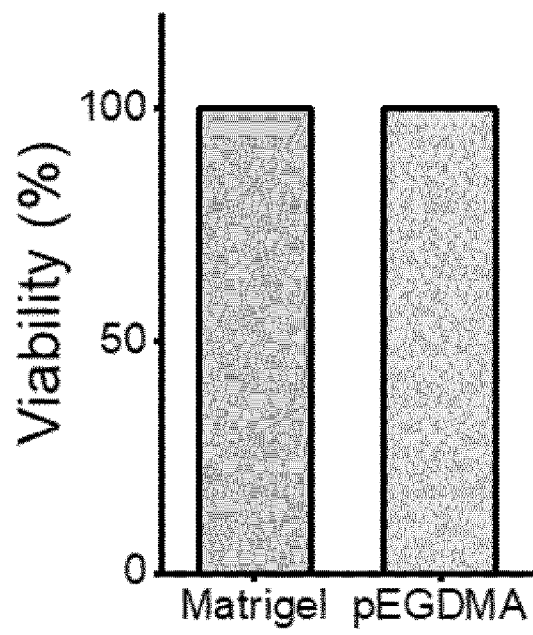
[도 12e]



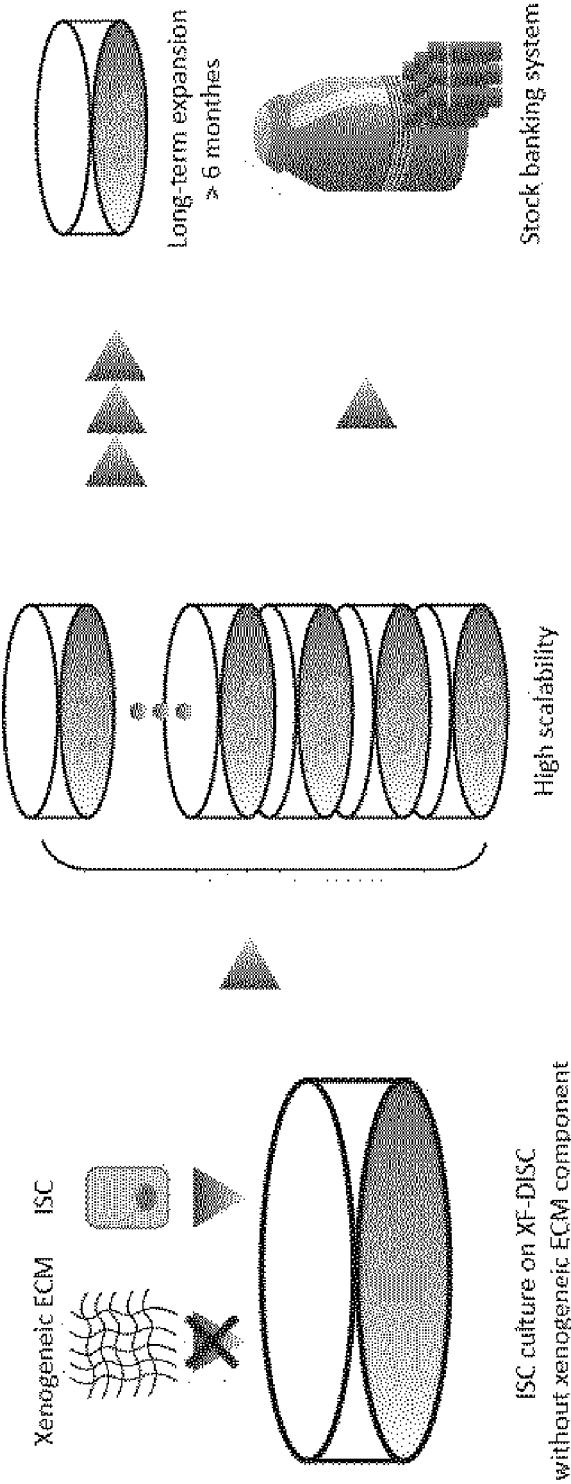
[도 12f]



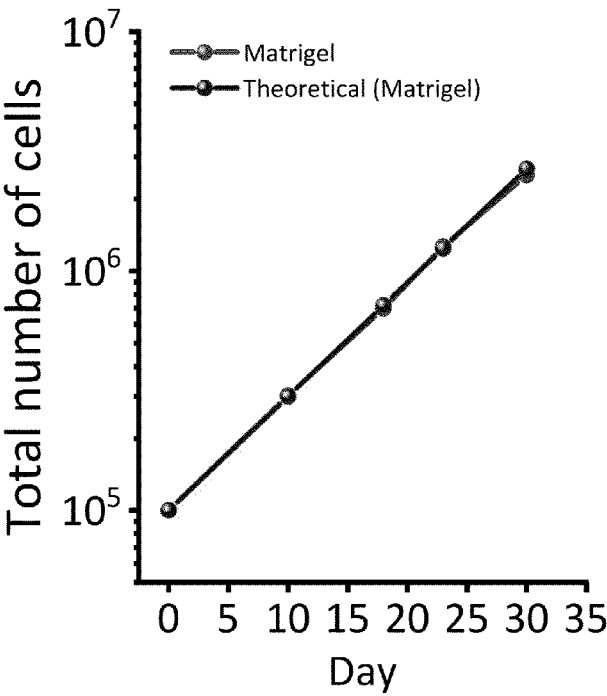
[도 12g]



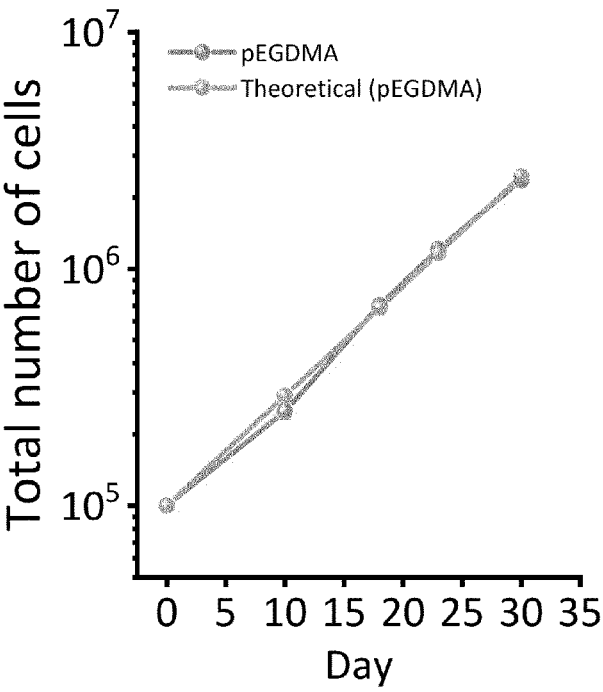
[도 13a]



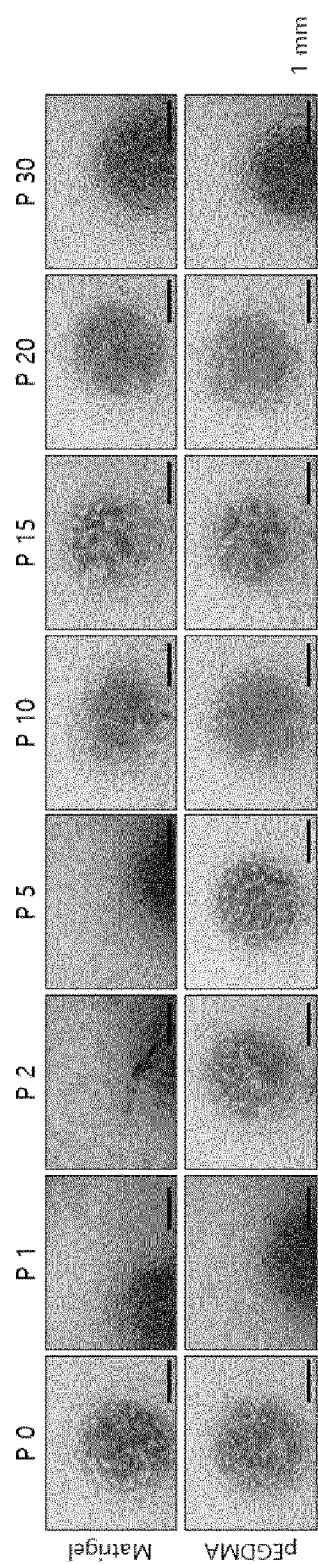
[도 13b]



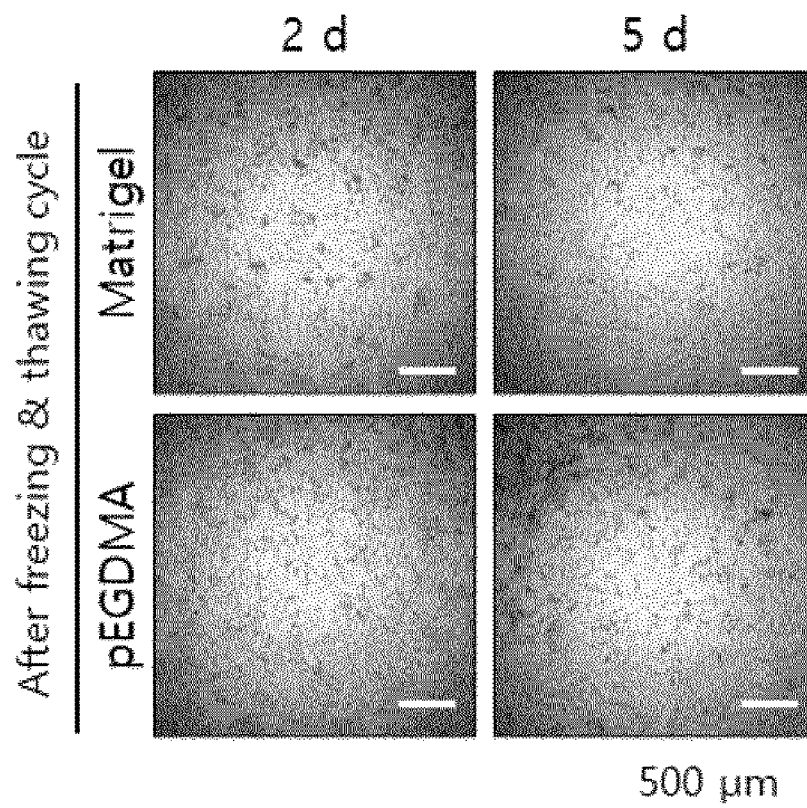
[도 13c]



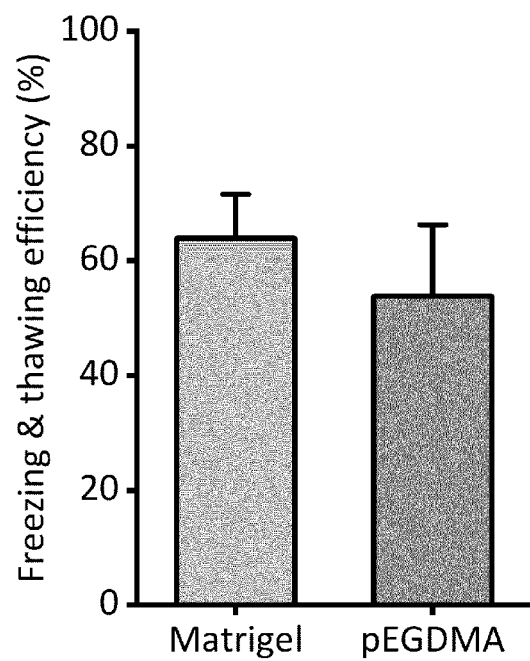
[도 13d]



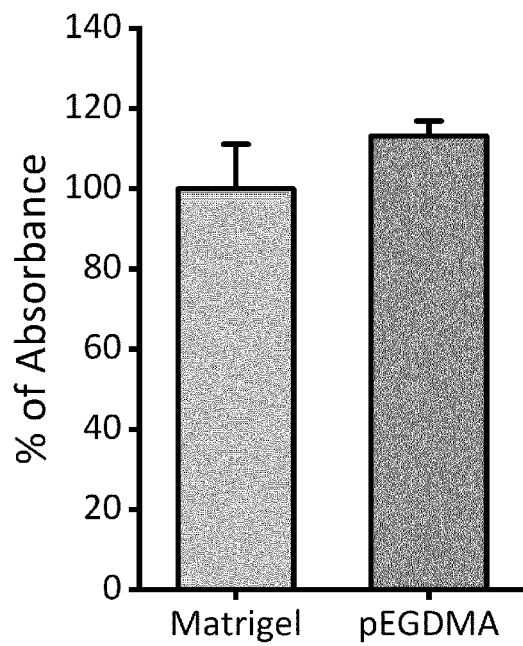
[도13e]



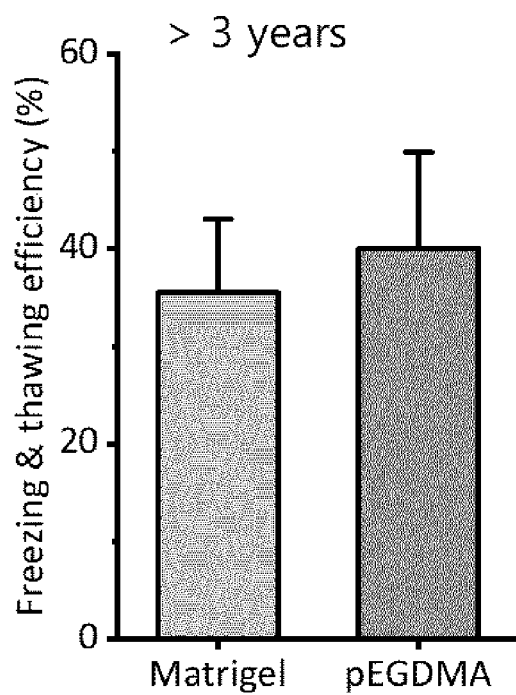
[도13f]



[도13g]

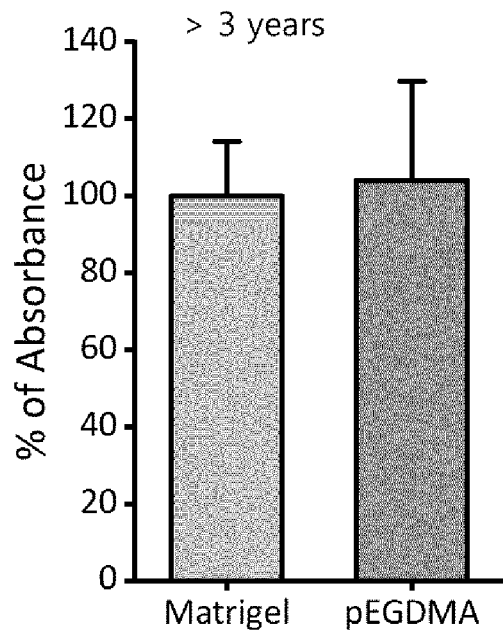


[도13h]

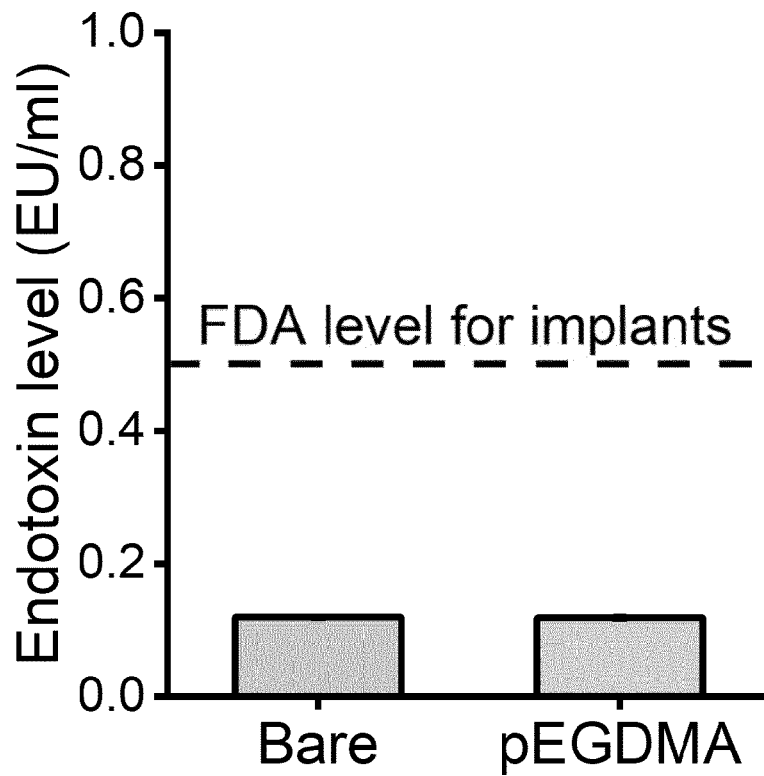




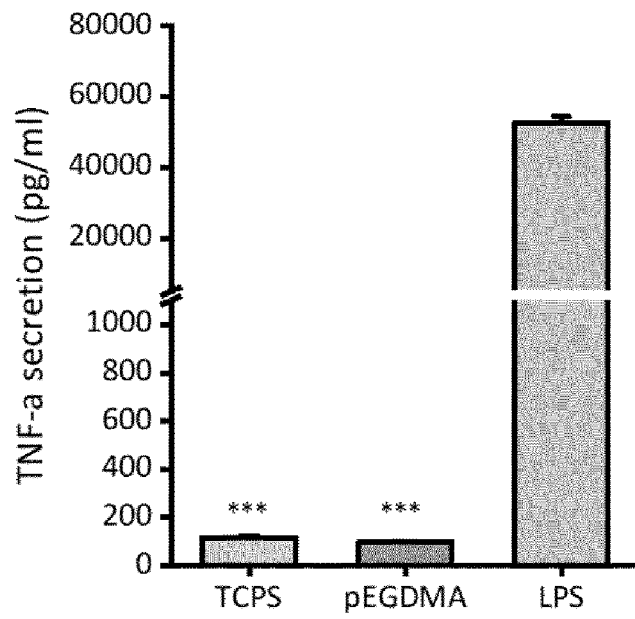
[도 13i]



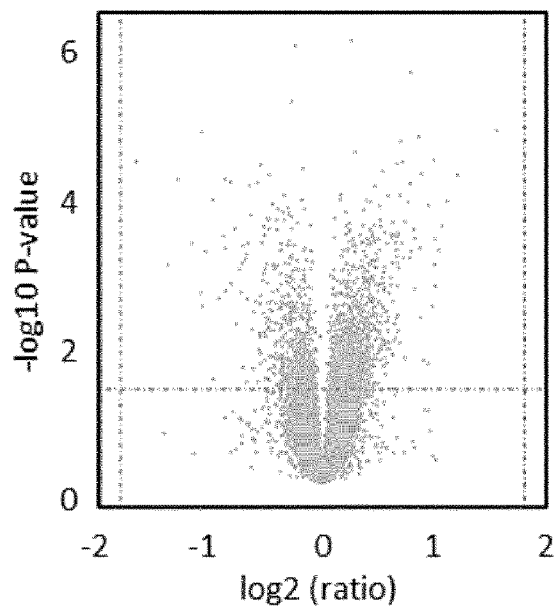
[도 14a]



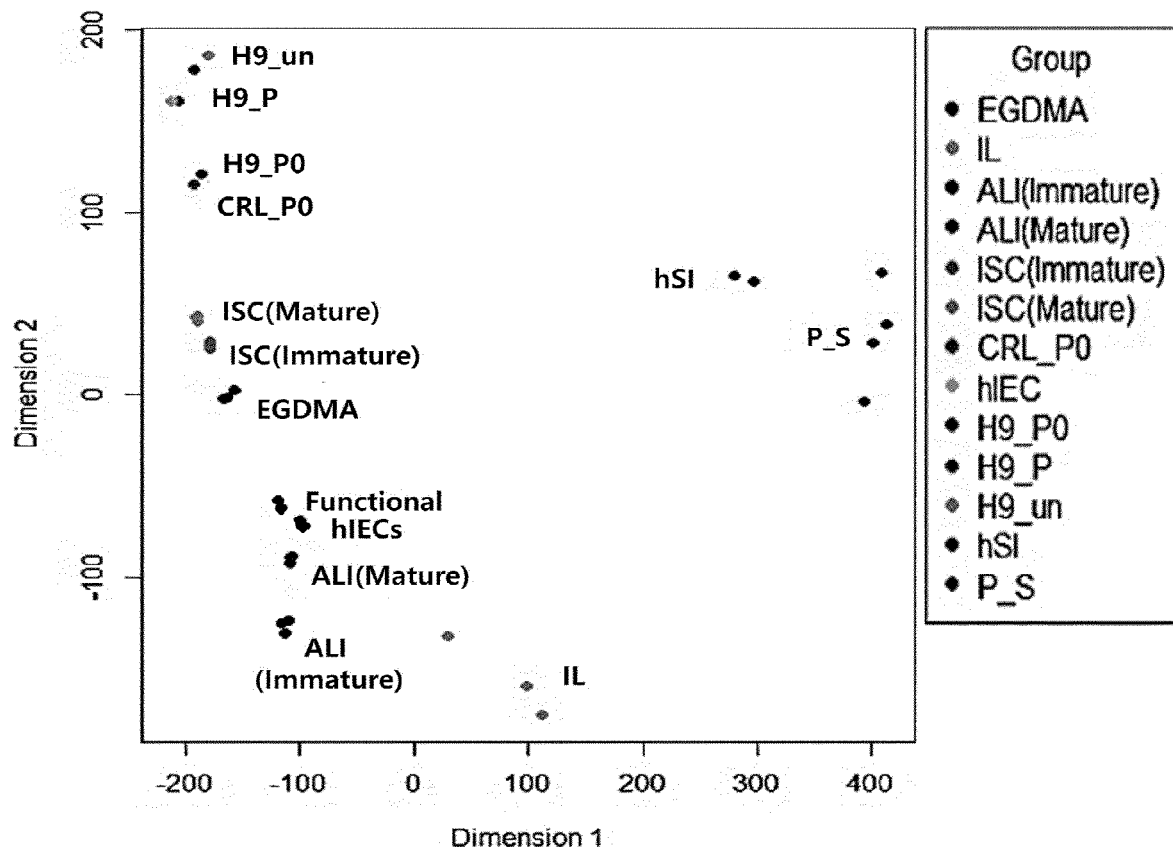
[도14b]



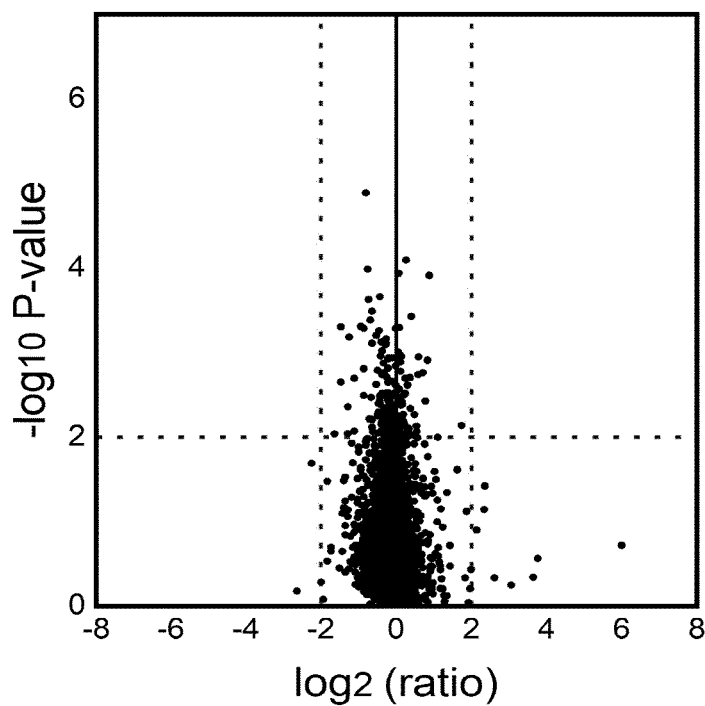
[도15a]



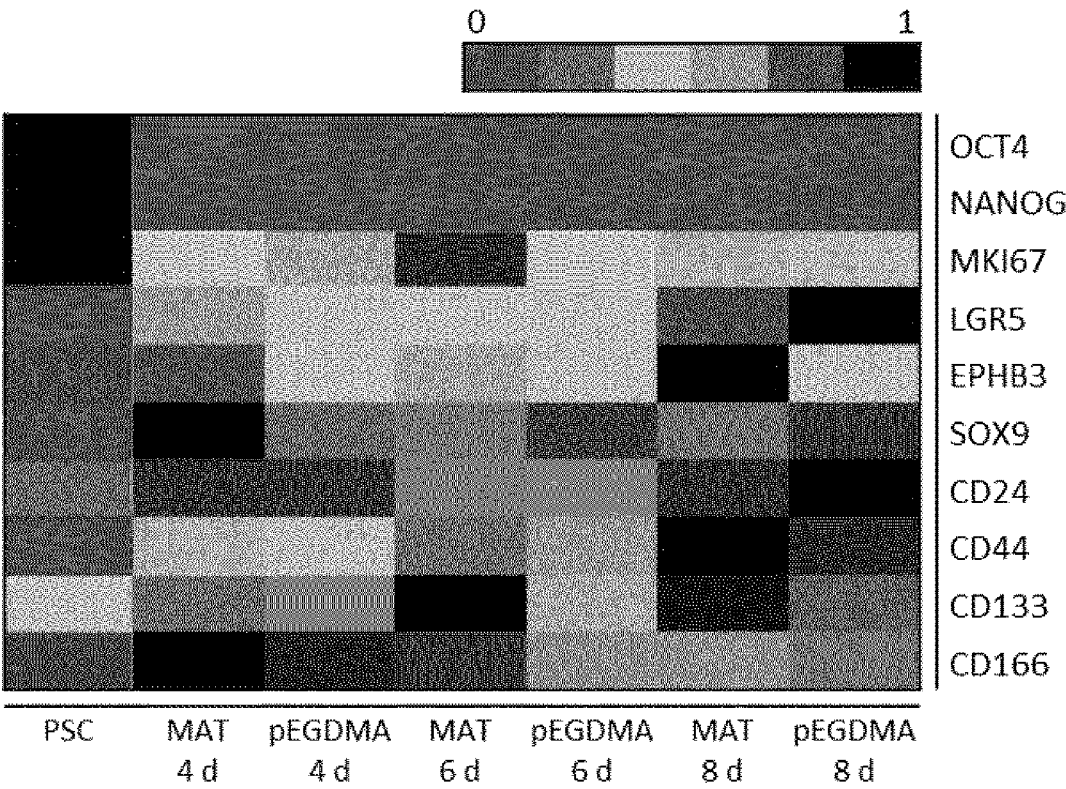
[도15b]



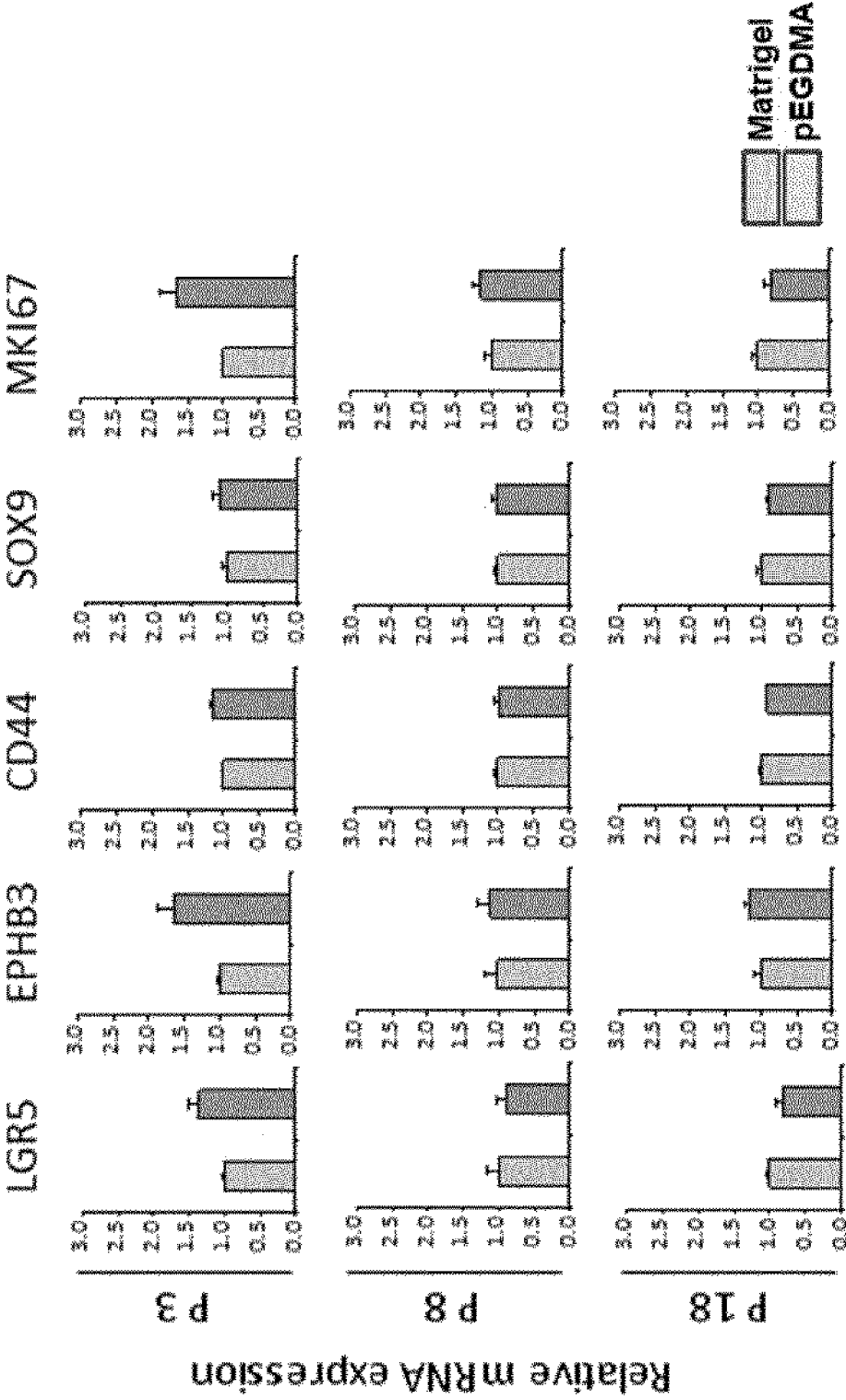
[도15c]



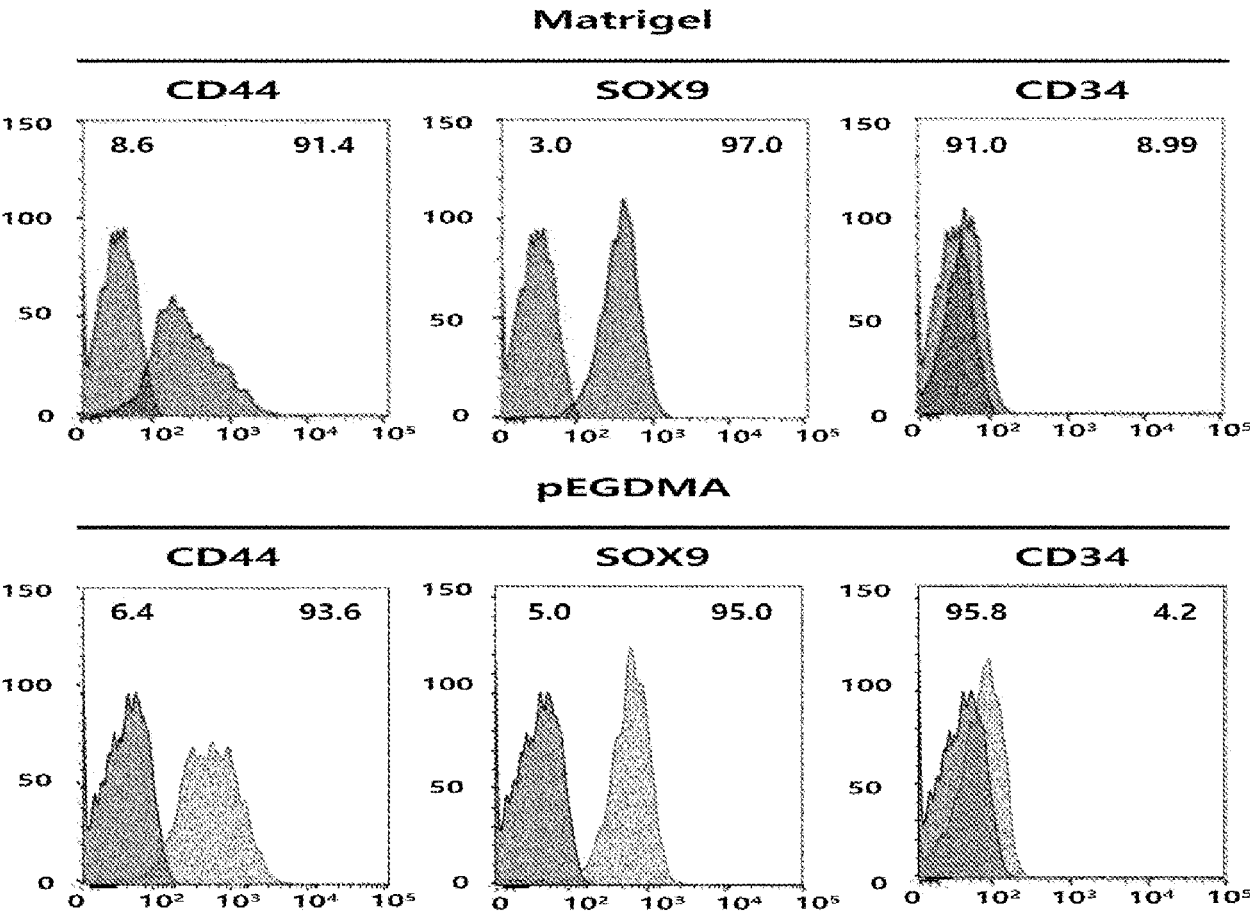
[도 15d]



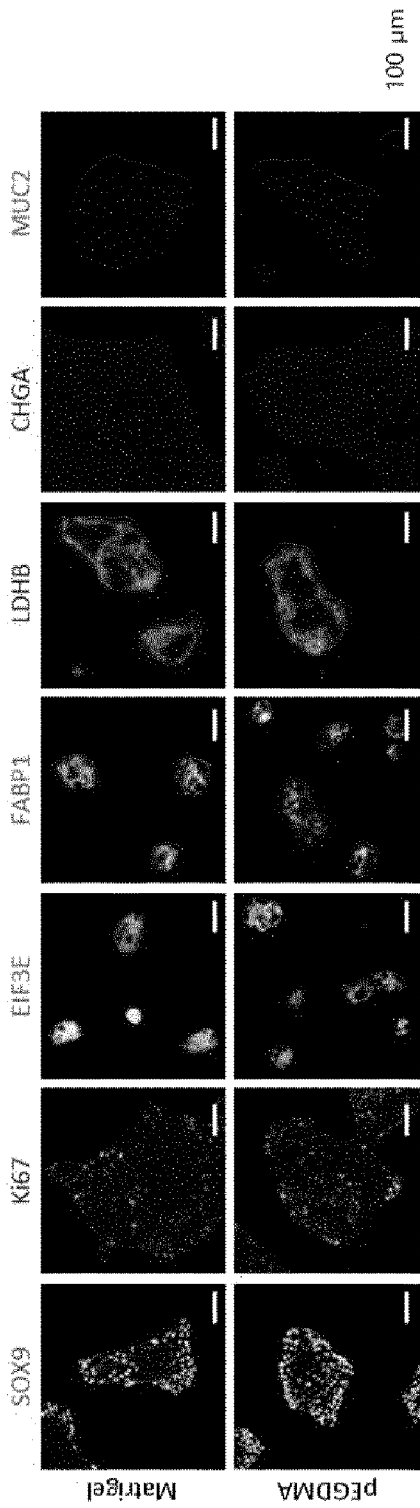
[도 15e]



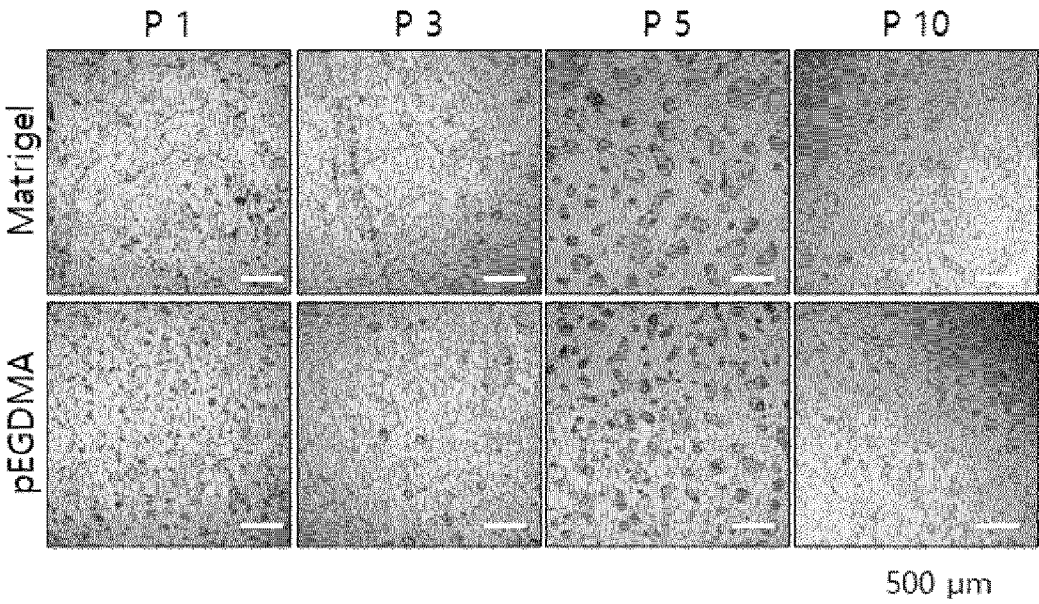
[도15f]



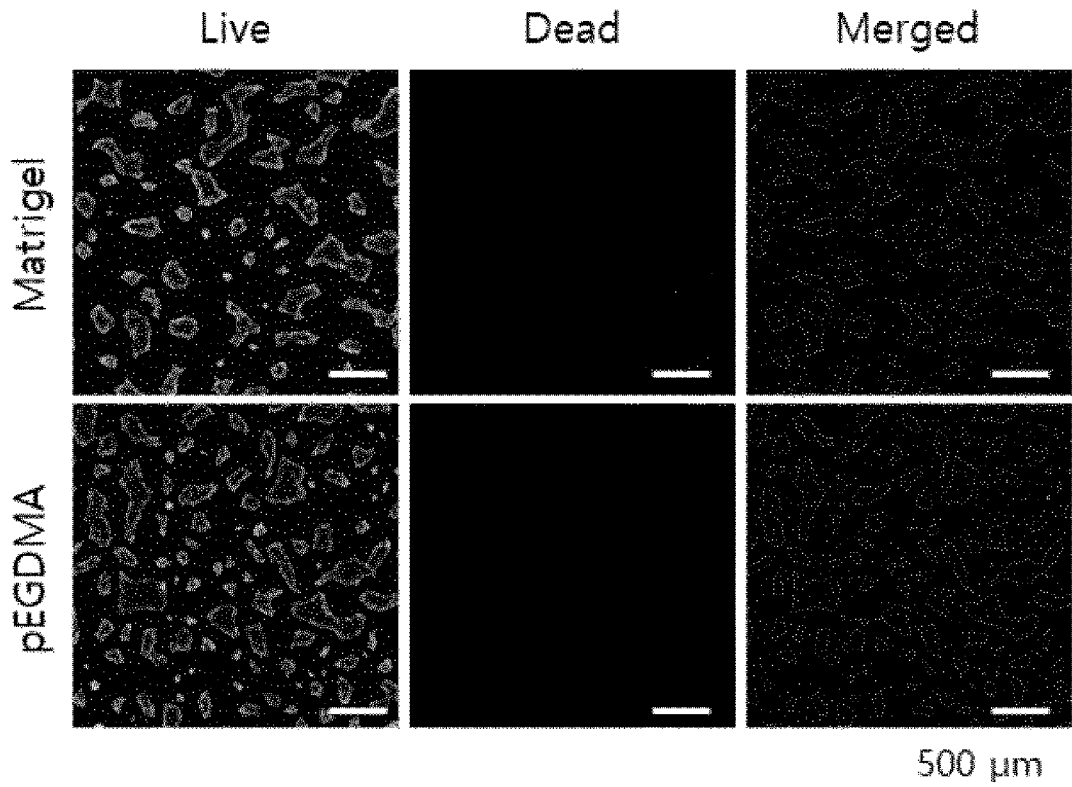
[도 15g]



[도16a]

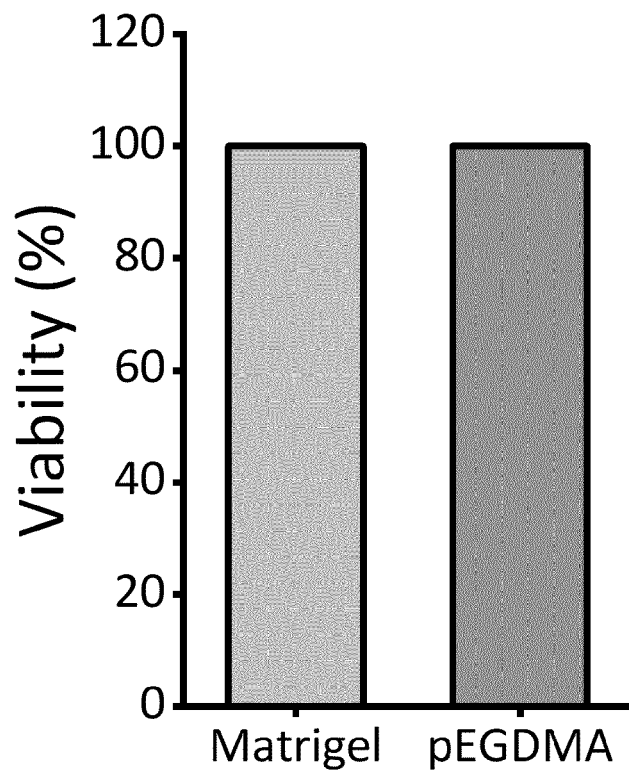


[도16b]

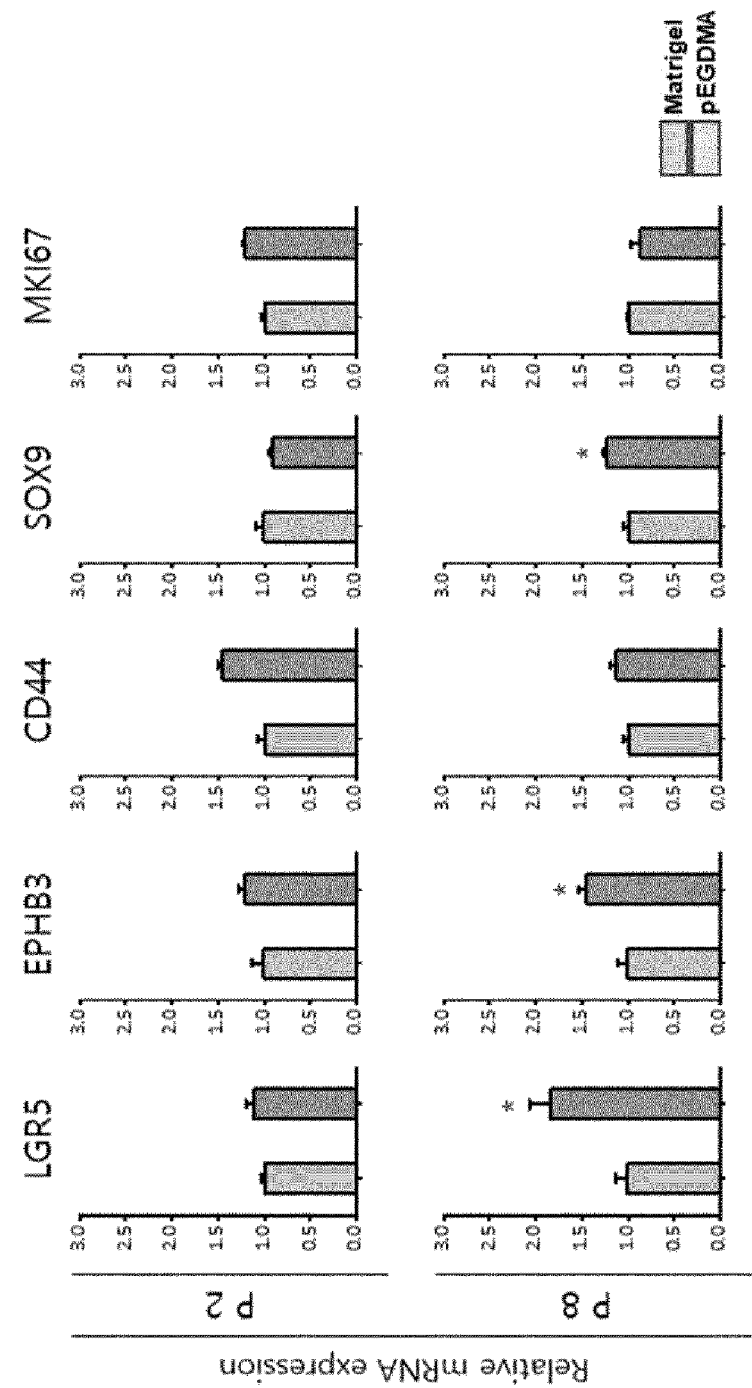




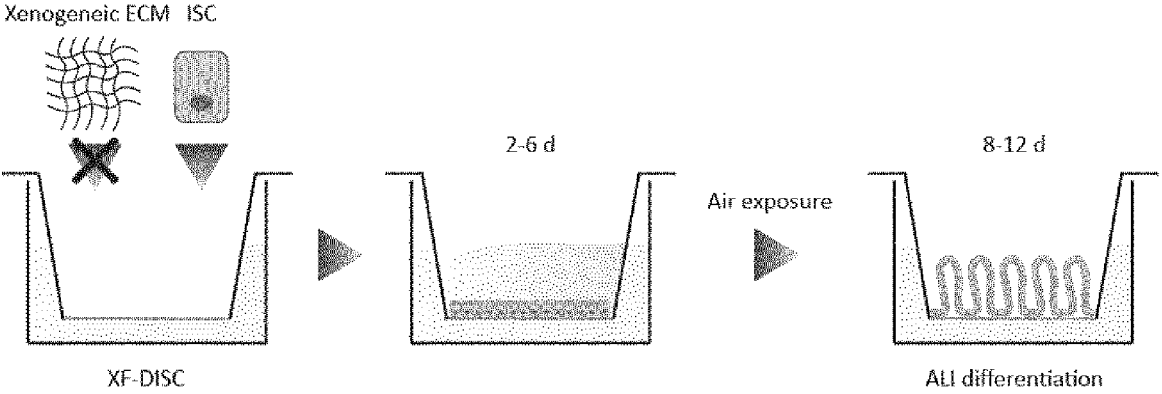
[도 16c]



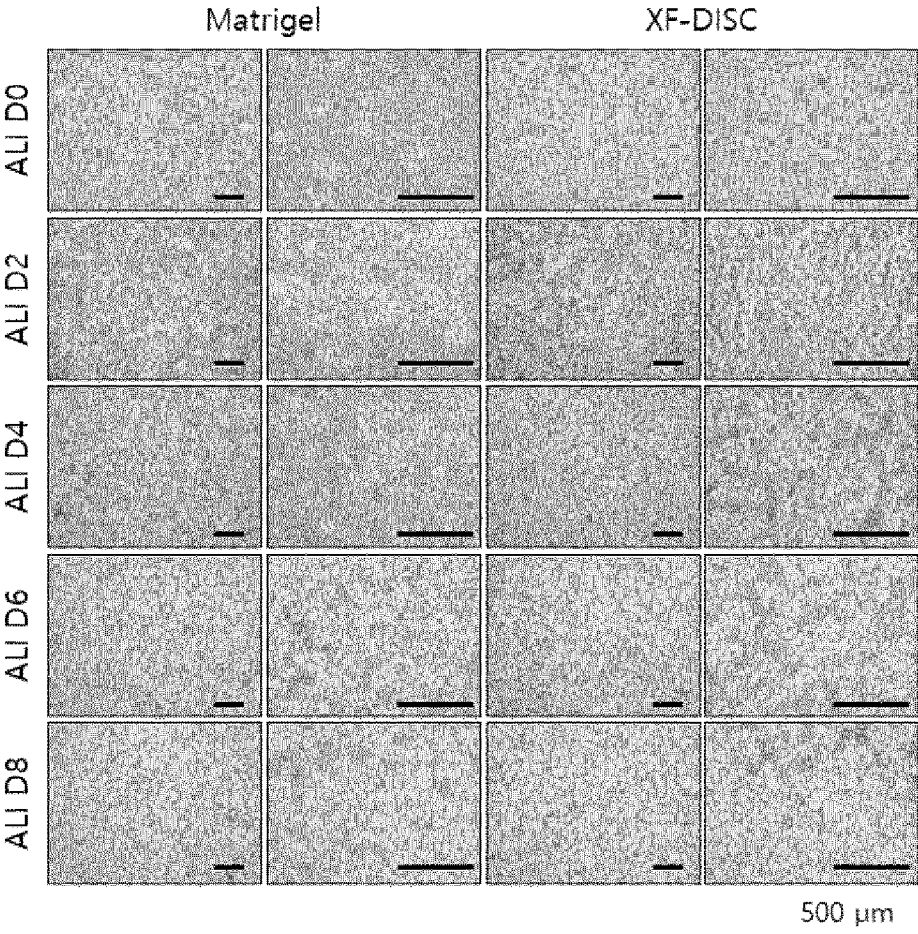
[도16d]



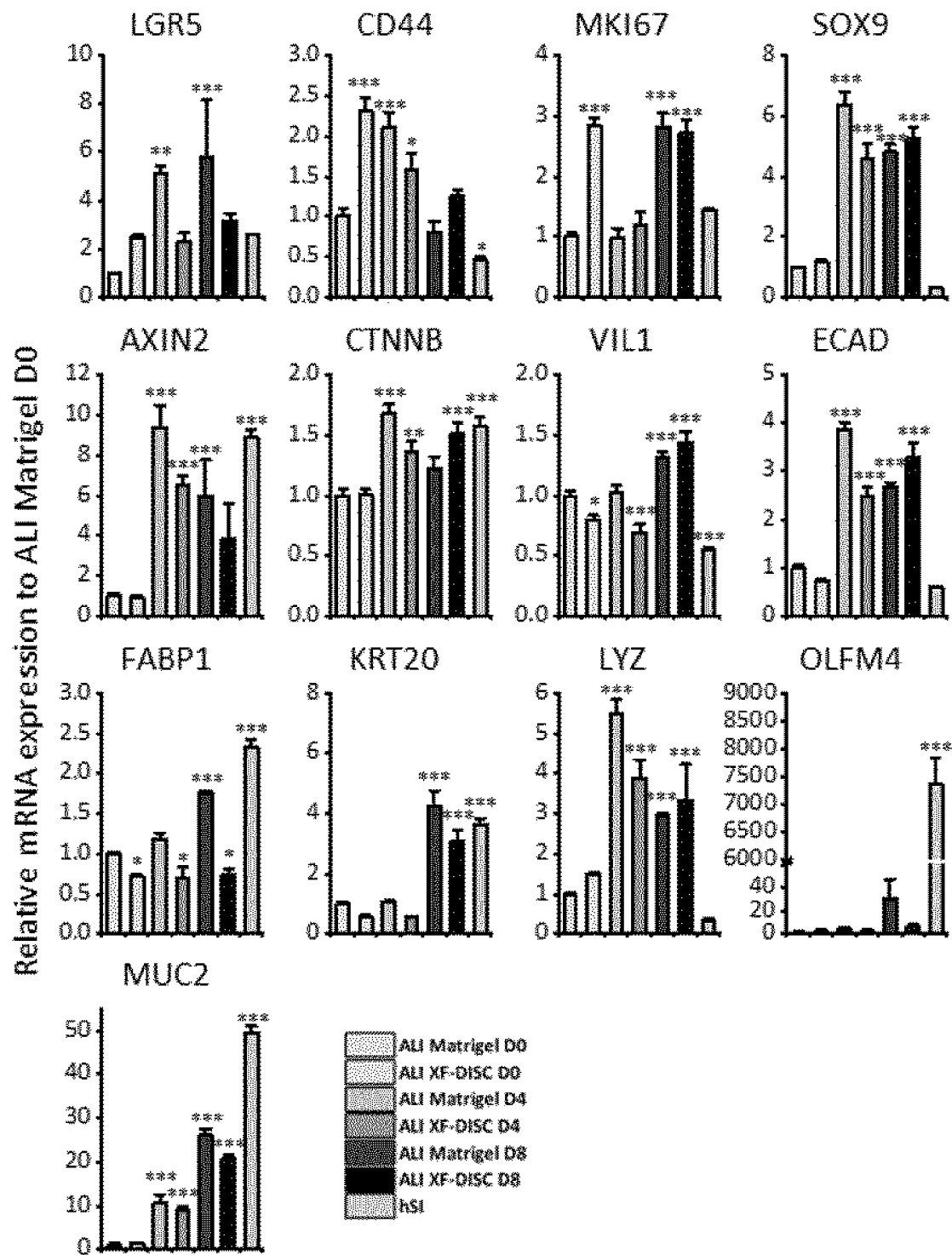
[도17a]



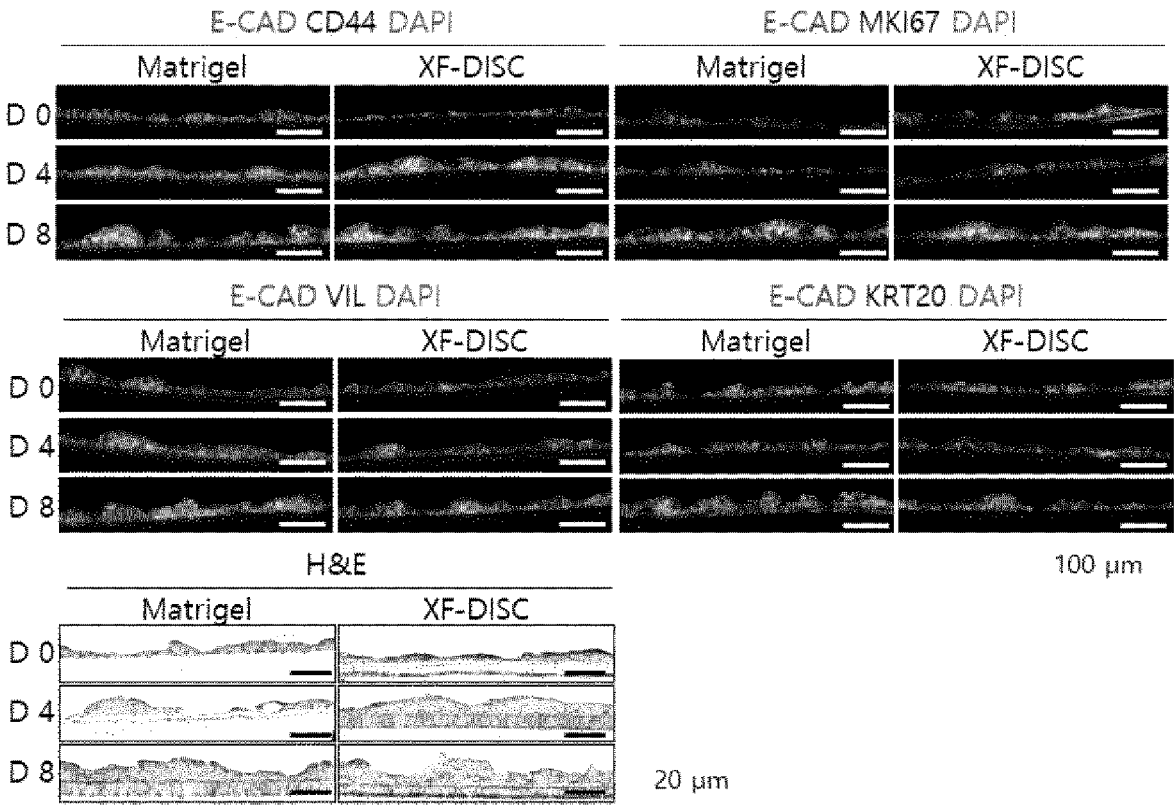
[도17b]



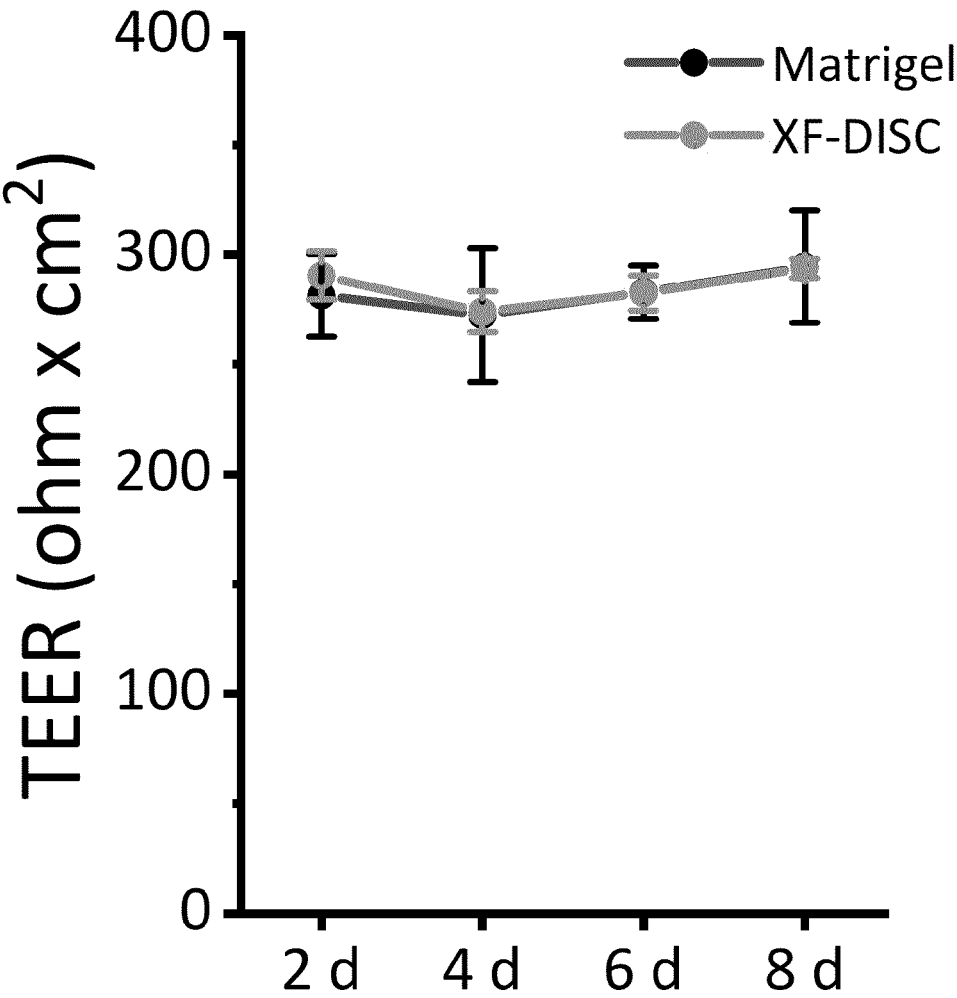
[도17c]



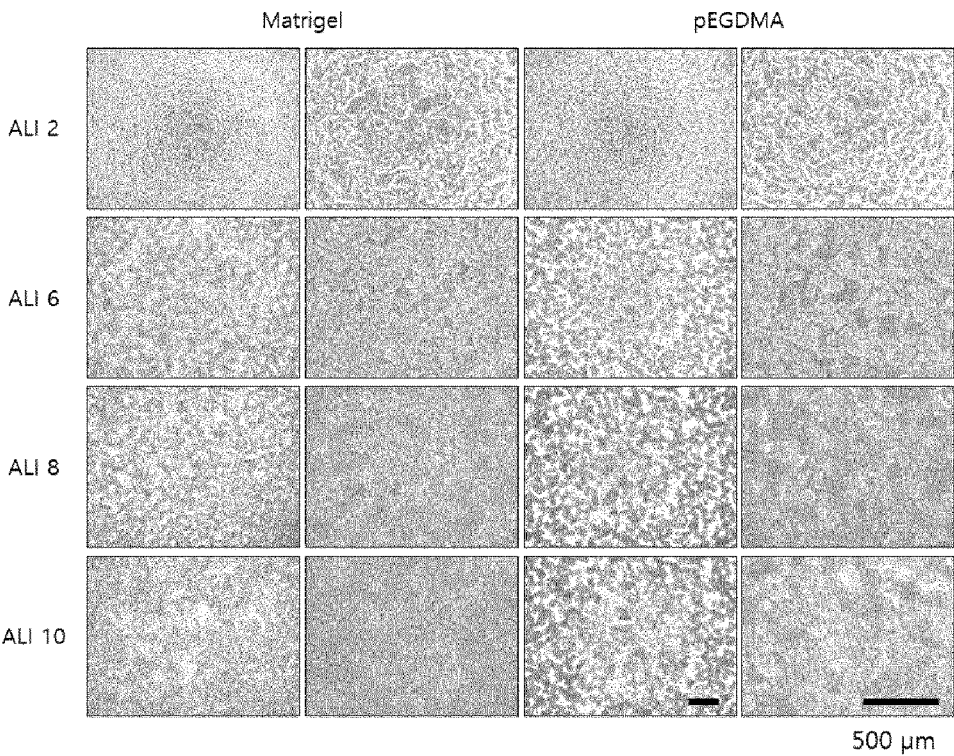
[도 17d]



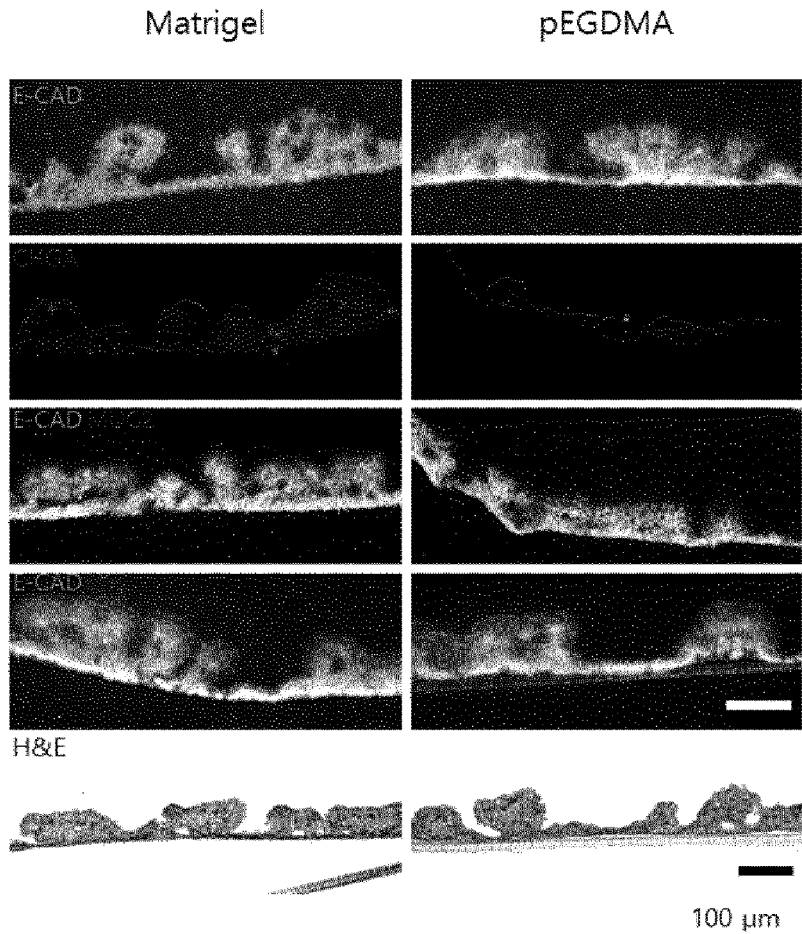
[도 17e]



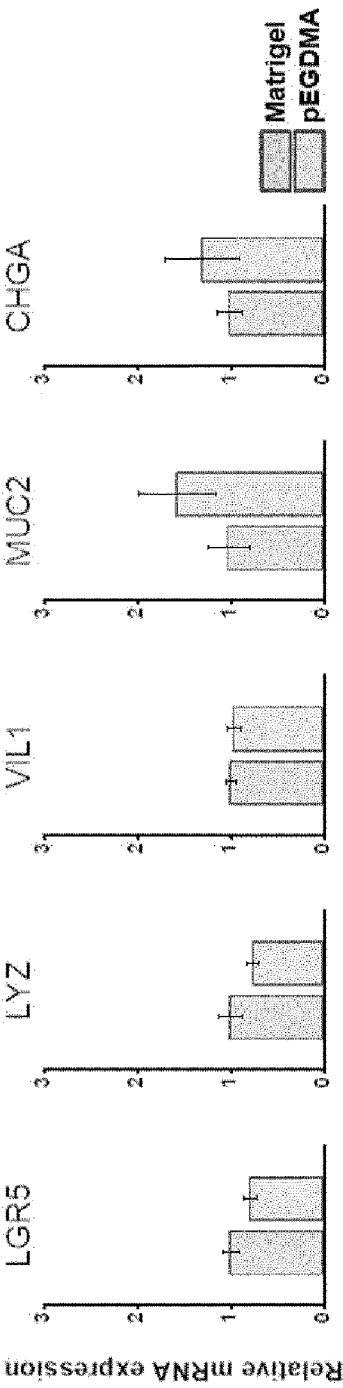
[도18a]



[도18b]

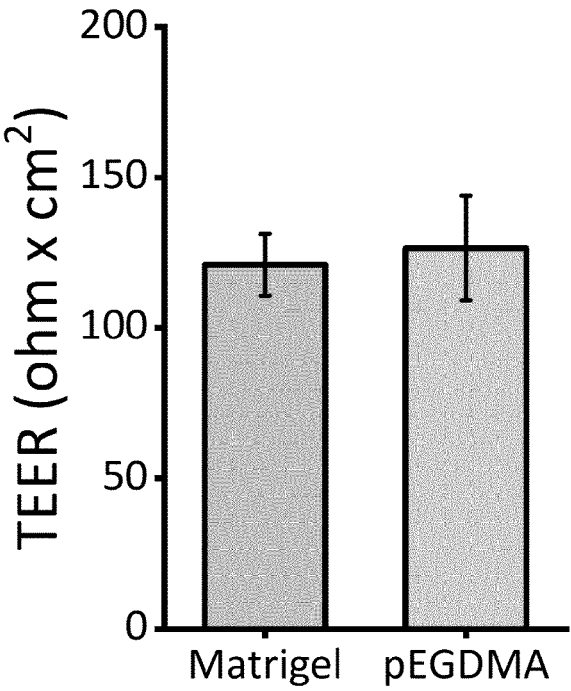


[도18c]

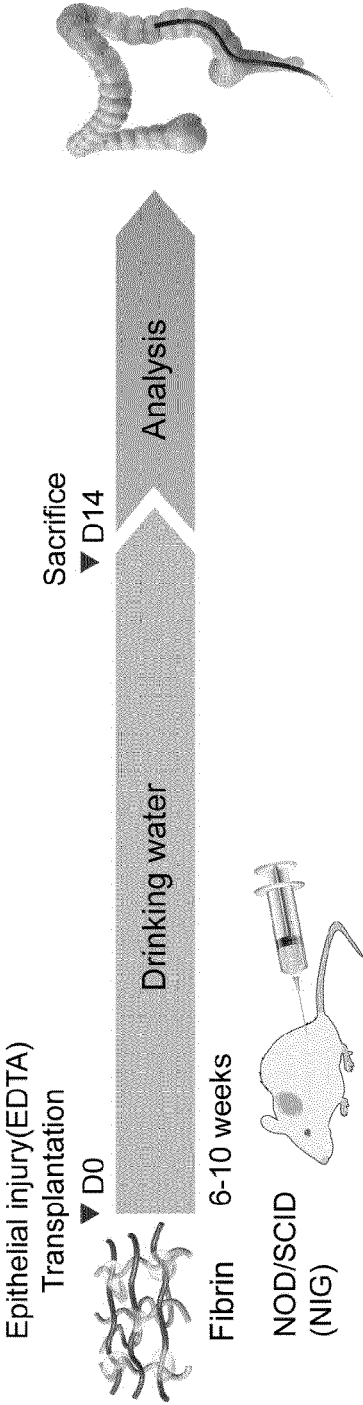




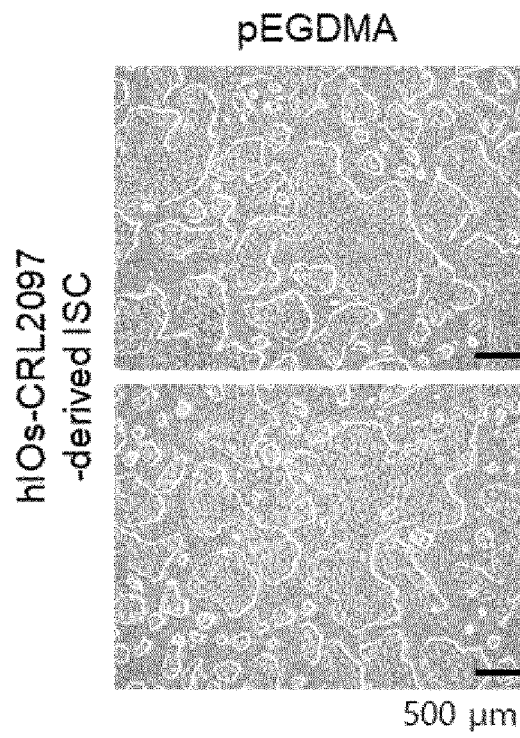
[도18d]



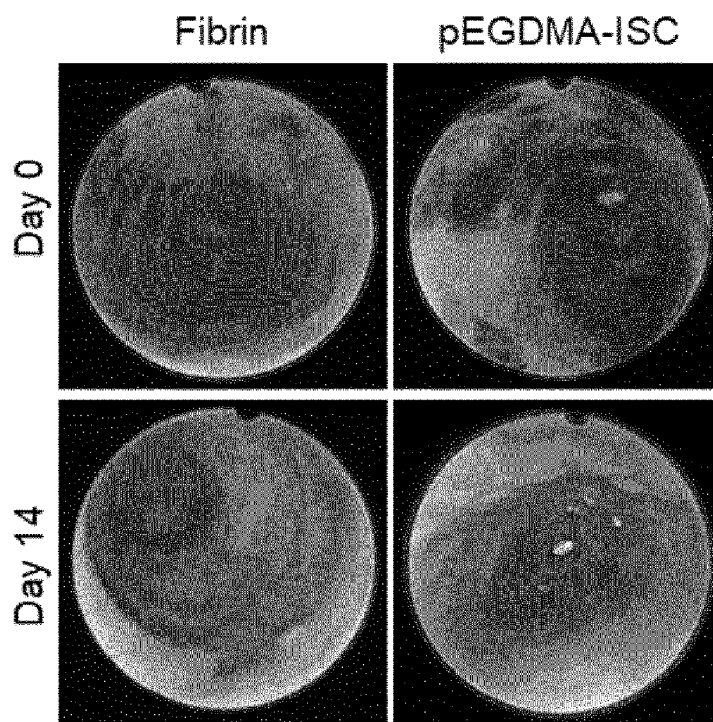
[도 19a]



[도 19b]

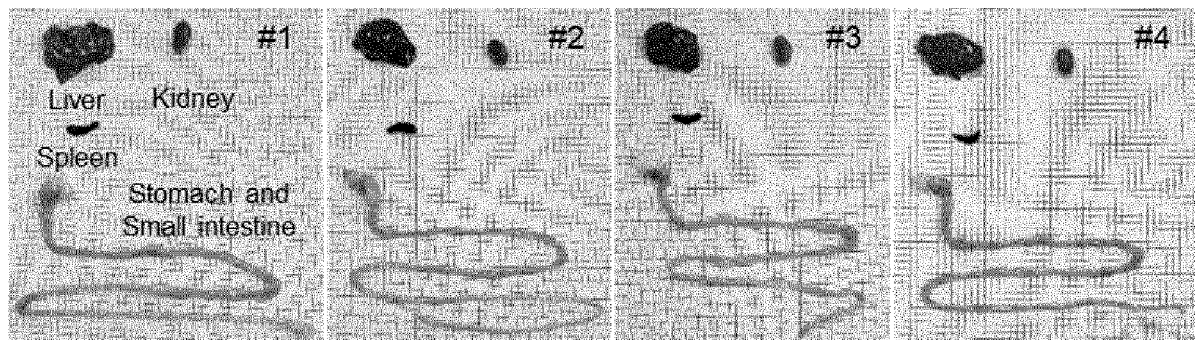


[도 19c]

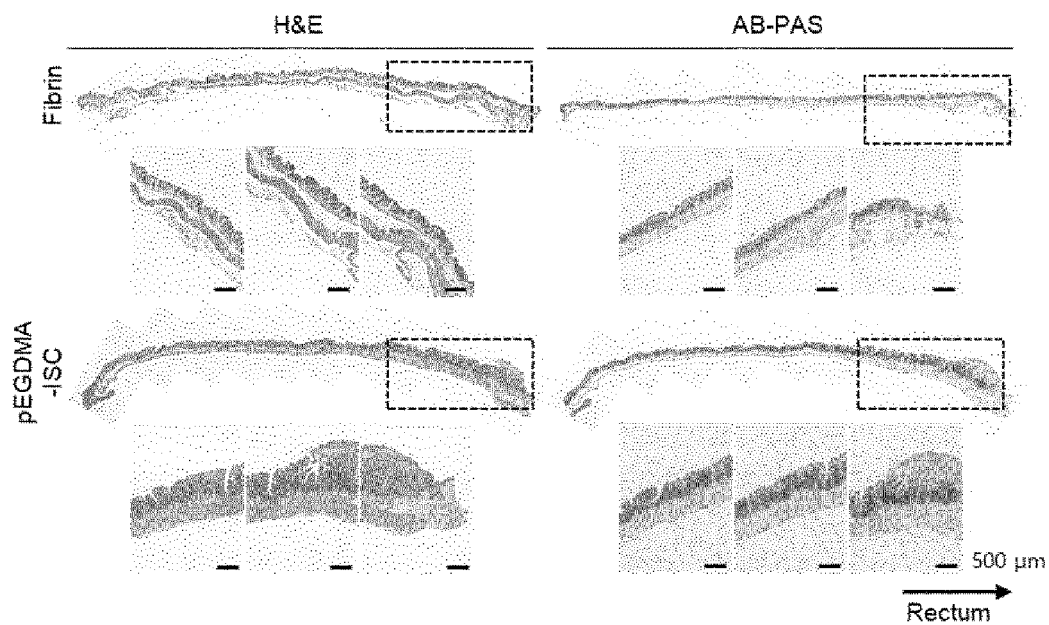


[도19d]

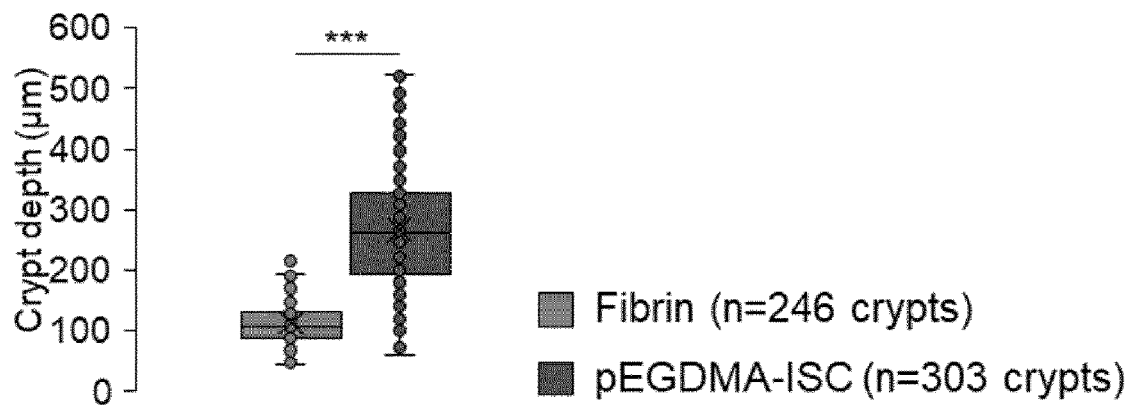
pEGDMA-ISC



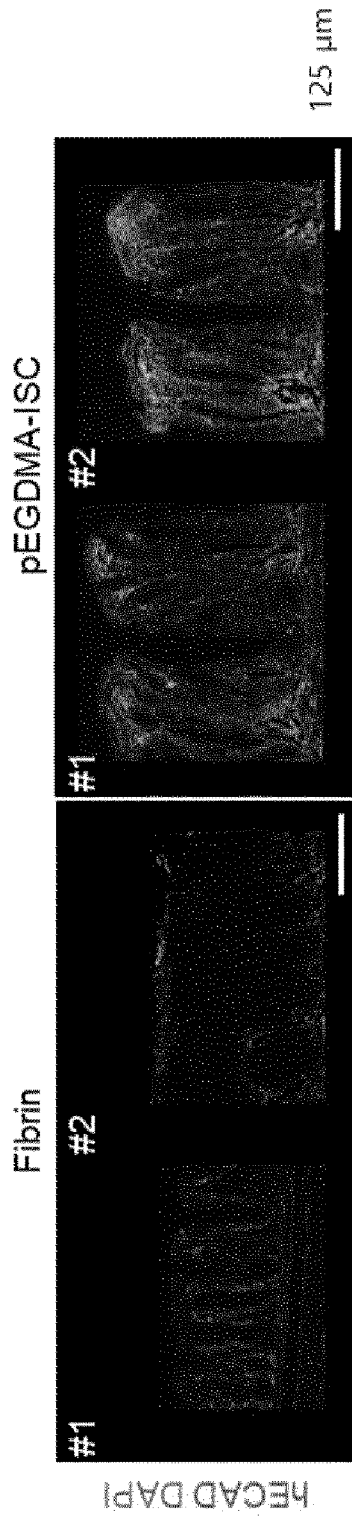
[도19e]



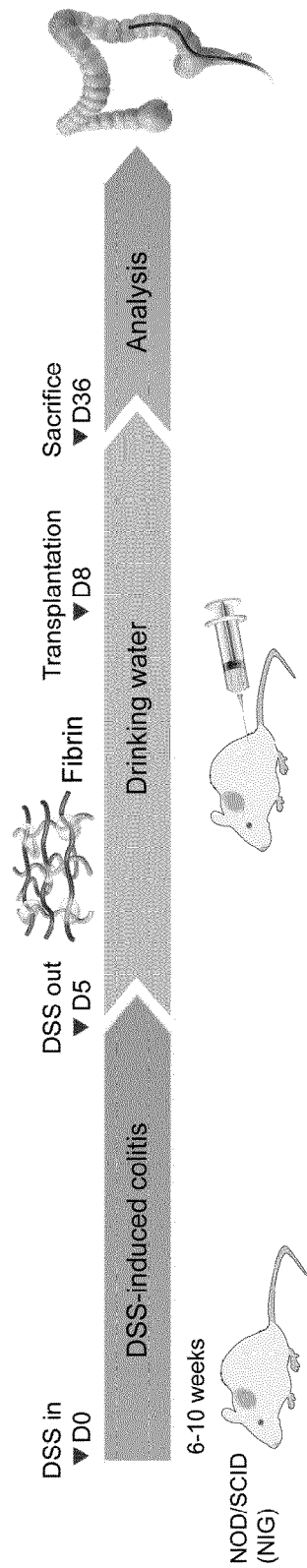
[도19f]



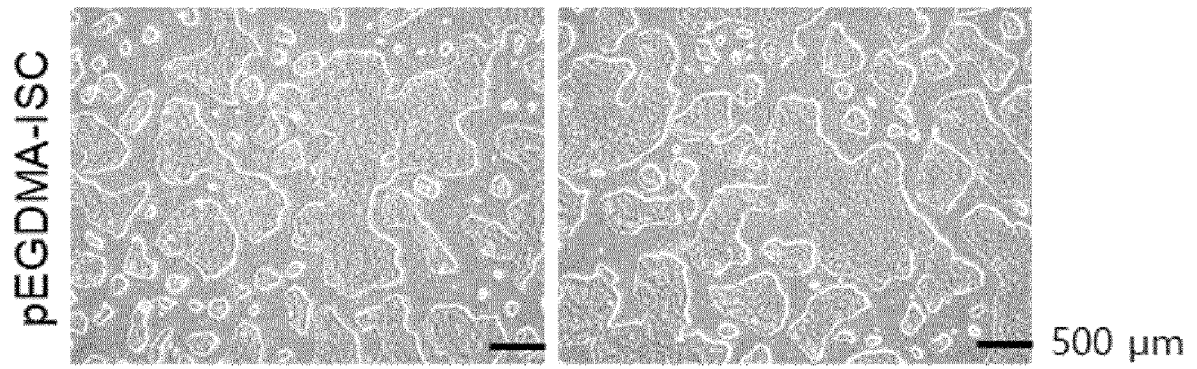
[도 19g]



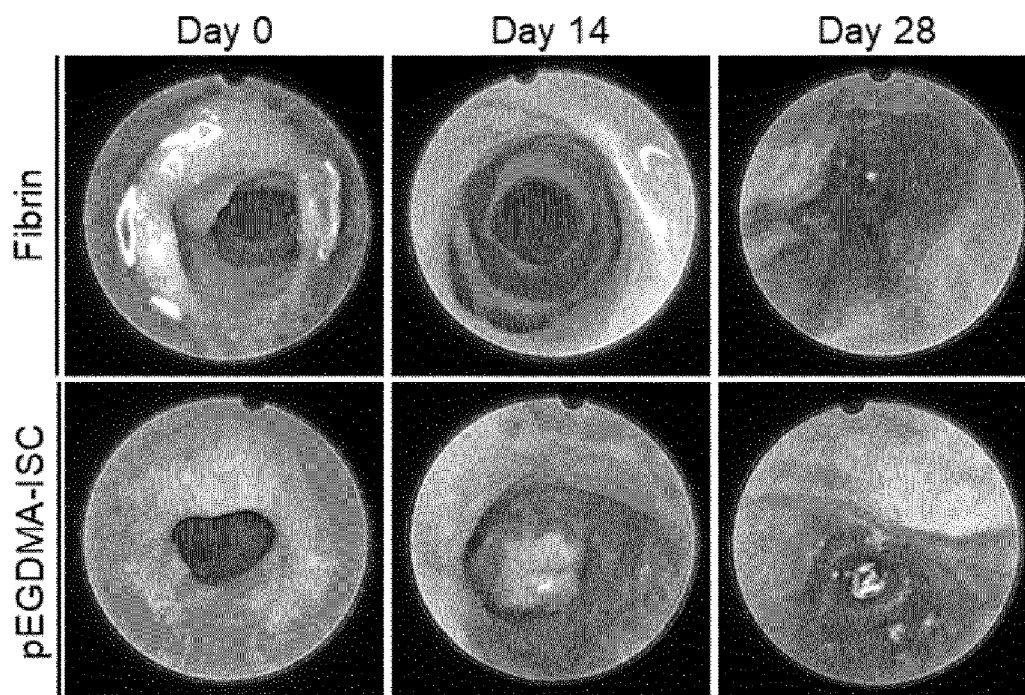
[도20a]



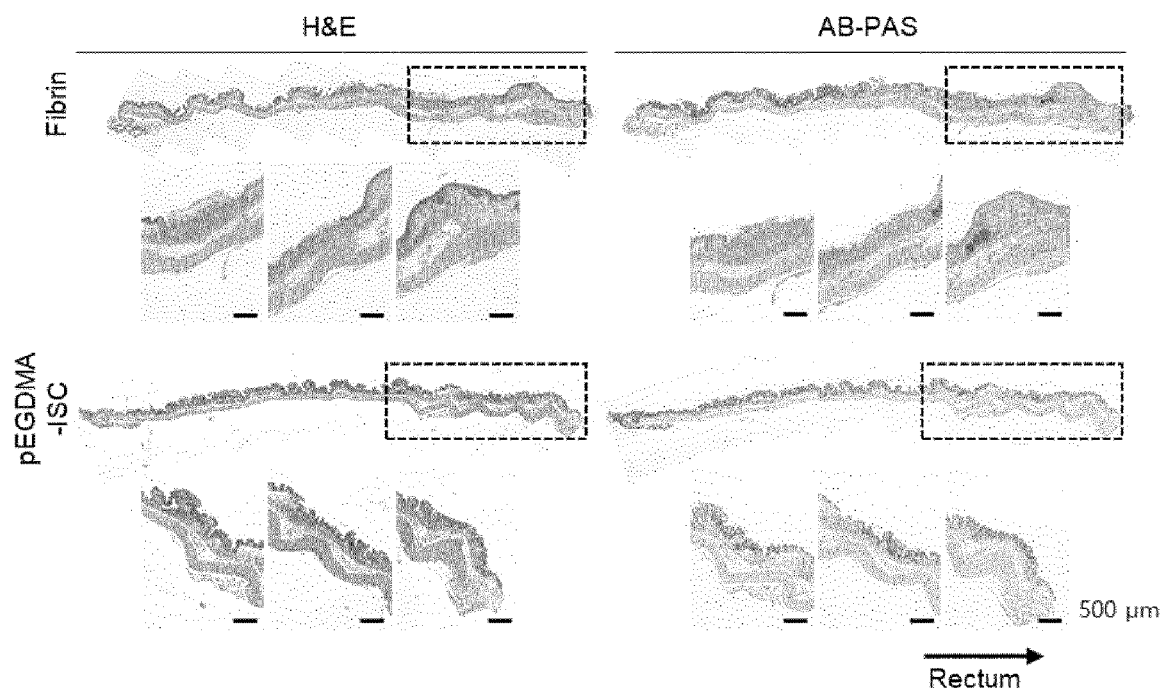
[도20b]



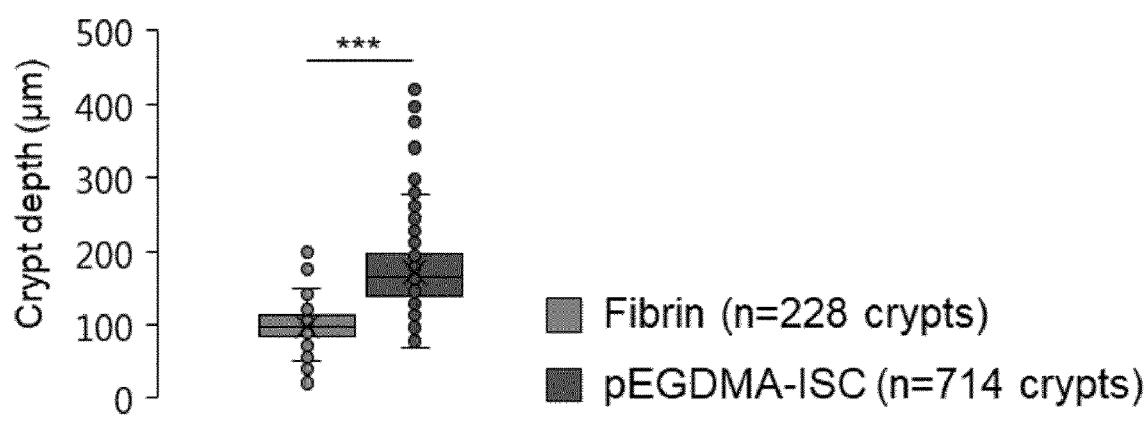
[도20c]



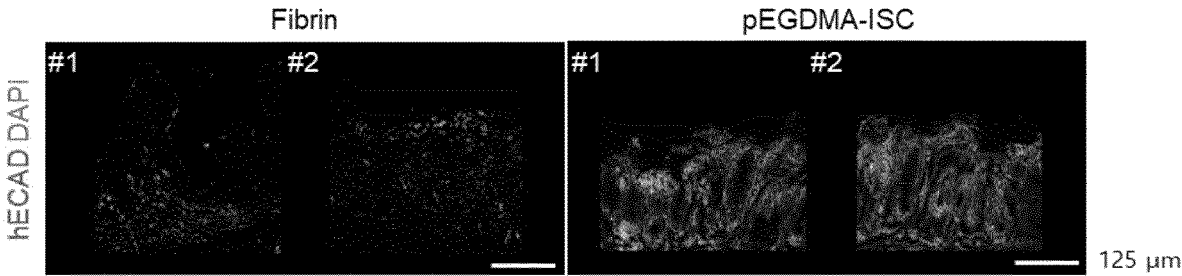
[도20d]



[도20e]



[도20f]





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/019174

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/00(2006.01)i</b><br><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                     |                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12N 5/071(2010.01); A61K 35/38(2006.01); A61L 27/38(2006.01); A61P 1/00(2006.01); C08L 33/06(2006.01);<br>C12M 1/00(2006.01); C12M 1/06(2006.01); C12M 1/12(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/074(2010.01);<br>G01N 33/50(2006.01)<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Korean utility models and applications for utility models: IPC as above<br>Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 장 오가노이드(intestinal organoids), 세포 치료제(cell therapy), 장 줄기세포(intestinal stem cells), 장 상피세포(intestinal epithelial cells), 마트리젤(matrigel), 개시제를 이용한 화학 기상 증착(initiated chemical vapor deposition, iCVD), 공기-액체 계면 배양(air-liquid interface culture)                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                     |                                                                            |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                     |                                                                            |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                  | Relevant to claim No.                                                      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | KR 10-1969115 B1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 16 April 2019 (2019-04-16)<br>See claim 12; and paragraphs [0001], [0051], [0063], [0064], [0075] and [0076]. | 1-25                                                                       |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | KR 10-2167396 B1 (KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN) 21 October 2020 (2020-10-21)<br>See claims 1-7; and paragraphs [0014], [0118] and [0147]-[0153].              | 1-25                                                                       |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | US 10704026 B2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 07 July 2020 (2020-07-07)<br>See paragraphs [0008], [0052], [0062] and [0063]; and figure 1.        | 13-25                                                                      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | US 2021-0395661 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 23 December 2021 (2021-12-23)<br>See claims 1-11.                                                              | 1-25                                                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                     |                                                                            |
| * Special categories of cited documents:<br>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>“D” document cited by the applicant in the international application<br>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>“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)<br>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>“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<br>“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<br>“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<br>“&” document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                     |                                                                            |
| Date of the actual completion of the international search<br><b>05 March 2024</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                     | Date of mailing of the international search report<br><b>05 March 2024</b> |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br><b>Korean Intellectual Property Office<br/>         Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208</b><br>Facsimile No. +82-42-481-8578                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                     | Authorized officer<br><br><br>Telephone No.                                |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2023/019174**

| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> |                                                                                                                                           |                       |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                     | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                        | Relevant to claim No. |
| A                                             | WO 2022-098052 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)<br>12 May 2022 (2022-05-12)<br>See claims 1-10.              | 1-25                  |
| A                                             | KR 10-2019-0028443 A (KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN) 18<br>March 2019 (2019-03-18)<br>See abstract; and claims 1-19. | 1-25                  |
| A                                             | WO 2021-261540 A1 (FUJIFILM CORPORATION et al.) 30 December 2021 (2021-12-30)<br>See abstract; and paragraphs [0051]-[0057].              | 1-25                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2023/019174**

| Patent document<br>cited in search report |                 |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |                 |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-----------------|----|--------------------------------------|-------------------------|-----------------|----|--------------------------------------|
| KR                                        | 10-1969115      | B1 | 16 April 2019                        | KR                      | 10-1969115      | B1 | 16 April 2019                        |
| KR                                        | 10-2167396      | B1 | 21 October 2020                      | KR                      | 10-1904224      | B1 | 04 October 2018                      |
|                                           |                 |    |                                      | KR                      | 10-2012-0003855 | A  | 11 January 2012                      |
|                                           |                 |    |                                      | KR                      | 10-2013-0138729 | A  | 19 December 2013                     |
|                                           |                 |    |                                      | KR                      | 10-2019-0087650 | A  | 24 July 2019                         |
|                                           |                 |    |                                      | KR                      | 10-2020-0120956 | A  | 22 October 2020                      |
|                                           |                 |    |                                      | KR                      | 10-2023-0037058 | A  | 15 March 2023                        |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 10947510        | B2 | 16 March 2021                        |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 11034935        | B2 | 15 June 2021                         |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2012-0028355    | A1 | 02 February 2012                     |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2012-0196312    | A1 | 02 August 2012                       |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2013-0189327    | A1 | 25 July 2013                         |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2014-0243227    | A1 | 28 August 2014                       |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2014-0256037    | A1 | 11 September 2014                    |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2018-0066233    | A1 | 08 March 2018                        |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 8642339         | B2 | 04 February 2014                     |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 9752124         | B2 | 05 September 2017                    |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 9765301         | B2 | 19 September 2017                    |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2010-090513     | A3 | 25 November 2010                     |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2012-014076     | A3 | 07 September 2012                    |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2012-168930     | A3 | 11 April 2013                        |
| US                                        | 10704026        | B2 | 07 July 2020                         | US                      | 2010-0047853    | A1 | 25 February 2010                     |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2015-0344849    | A1 | 03 December 2015                     |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 9464275         | B2 | 11 October 2016                      |
| US                                        | 2021-0395661    | A1 | 23 December 2021                     | CA                      | 3112220         | A1 | 22 May 2020                          |
|                                           |                 |    |                                      | EP                      | 3880785         | A1 | 22 September 2021                    |
|                                           |                 |    |                                      | EP                      | 3880785         | A4 | 24 August 2022                       |
|                                           |                 |    |                                      | JP                      | 2022-511375     | A  | 31 January 2022                      |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2020-102682     | A1 | 22 May 2020                          |
| WO                                        | 2022-098052     | A1 | 12 May 2022                          | EP                      | 4240827         | A1 | 13 September 2023                    |
|                                           |                 |    |                                      | KR                      | 10-2023-0095121 | A  | 28 June 2023                         |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2022-0135949    | A1 | 05 May 2022                          |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2022-0135950    | A1 | 05 May 2022                          |
| KR                                        | 10-2019-0028443 | A  | 18 March 2019                        | AU                      | 2017-281406     | B2 | 14 July 2022                         |
|                                           |                 |    |                                      | BR                      | 112018076554    | A2 | 02 April 2019                        |
|                                           |                 |    |                                      | CA                      | 3030098         | A1 | 28 December 2017                     |
|                                           |                 |    |                                      | CN                      | 109844098       | A  | 04 June 2019                         |
|                                           |                 |    |                                      | EP                      | 3472302         | A1 | 24 April 2019                        |
|                                           |                 |    |                                      | IL                      | 263854          | D0 | 03 February 2019                     |
|                                           |                 |    |                                      | JP                      | 2019-527068     | A  | 26 September 2019                    |
|                                           |                 |    |                                      | JP                      | 2022-068302     | A  | 09 May 2022                          |
|                                           |                 |    |                                      | KR                      | 10-2023-0004913 | A  | 06 January 2023                      |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2021-0047618    | A1 | 18 February 2021                     |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2017-220586     | A1 | 28 December 2017                     |
| WO                                        | 2021-261540     | A1 | 30 December 2021                     | CN                      | 115768874       | A  | 07 March 2023                        |
|                                           |                 |    |                                      | EP                      | 4174170         | A1 | 03 May 2023                          |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2023-0126568    | A1 | 27 April 2023                        |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2021-261540     | A1 | 30 December 2021                     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                        |                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b><br>C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/00(2006.01)i                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                        |                                        |
| <b>B. 조사된 분야</b><br>조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)<br>C12N 5/071(2010.01); A61K 35/38(2006.01); A61L 27/38(2006.01); A61P 1/00(2006.01); C08L 33/06(2006.01); C12M 1/00(2006.01); C12M 1/06(2006.01); C12M 1/12(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/074(2010.01); G01N 33/50(2006.01)<br>조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌<br>한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))<br>eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 장 오가노이드(intestinal organoids), 세포 치료제(cell therapy), 장 줄기세포(intestinal stem cells), 장 상피세포(intestinal epithelial cells), 매트릭젤(matrigel), 개시제를 이용한 화학 기상 증착(initiated chemical vapor deposition, iCVD), 공기-액체 계면 배양(air-liquid interface culture) |                                                                                                                                        |                                        |
| <b>C. 관련 문헌</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                        |                                        |
| 카테고리*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                             | 관련 청구항                                 |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | KR 10-1969115 B1 (한국과학기술원) 2019.04.16<br>청구항 12; 및 단락 [0001], [0051], [0063], [0064], [0075], [0076]                                   | 1-25                                   |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | KR 10-2167396 B1 (코닌클리츠케 네덜란드제 아카데미 반 벤테샤펜) 2020.10.21<br>청구항 1-7; 및 단락 [0014], [0118], [0147]-[0153]                                  | 1-25                                   |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | US 10704026 B2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2020.07.07<br>단락 [0008], [0052], [0062], [0063]; 및 도 1 | 13-25                                  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | US 2021-0395661 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 2021.12.23<br>청구항 1-11                                            | 1-25                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                        |                                        |
| <b>* 인용된 문헌의 특별 카테고리:</b><br>“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌<br>“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌<br>“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌<br>“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌<br>“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌<br>“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌<br>“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌<br>“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.<br>“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.<br>“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌                                                                                                                                   |                                                                                                                                        |                                        |
| 국제조사의 실제 완료일<br>2024년03월05일(05.03.2024)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                        | 국제조사보고서 발송일<br>2024년03월05일(05.03.2024) |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소<br>대한민국 특허청<br>(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)<br>팩스 번호 +82-42-481-8578                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                        | 심사관<br>김태운<br>전화번호 +82-42-481-3326     |

C. 관련 문헌

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                          | 관련 청구항 |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| A     | WO 2022-098052 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 2022.05.12<br>청구항 1-10 | 1-25   |
| A     | KR 10-2019-0028443 A (코닌클리즈케 네덜란드세 아카데미 반 베텐사펜) 2019.03.18<br>요약; 및 청구항 1-19                        | 1-25   |
| A     | WO 2021-261540 A1 (FUJIFILM CORPORATION 등) 2021.12.30<br>요약; 및 단락 [0051]-[0057]                     | 1-25   |

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌               | 공개일        |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|
| KR 10-1969115 B1      | 2019/04/16 | KR 10-1969115 B1     | 2019/04/16 |
| KR 10-2167396 B1      | 2020/10/21 | KR 10-1904224 B1     | 2018/10/04 |
|                       |            | KR 10-2012-0003855 A | 2012/01/11 |
|                       |            | KR 10-2013-0138729 A | 2013/12/19 |
|                       |            | KR 10-2019-0087650 A | 2019/07/24 |
|                       |            | KR 10-2020-0120956 A | 2020/10/22 |
|                       |            | KR 10-2023-0037058 A | 2023/03/15 |
|                       |            | US 10947510 B2       | 2021/03/16 |
|                       |            | US 11034935 B2       | 2021/06/15 |
|                       |            | US 2012-0028355 A1   | 2012/02/02 |
|                       |            | US 2012-0196312 A1   | 2012/08/02 |
|                       |            | US 2013-0189327 A1   | 2013/07/25 |
|                       |            | US 2014-0243227 A1   | 2014/08/28 |
|                       |            | US 2014-0256037 A1   | 2014/09/11 |
|                       |            | US 2018-0066233 A1   | 2018/03/08 |
|                       |            | US 8642339 B2        | 2014/02/04 |
|                       |            | US 9752124 B2        | 2017/09/05 |
|                       |            | US 9765301 B2        | 2017/09/19 |
|                       |            | WO 2010-090513 A3    | 2010/11/25 |
|                       |            | WO 2012-014076 A3    | 2012/09/07 |
|                       |            | WO 2012-168930 A3    | 2013/04/11 |
| US 10704026 B2        | 2020/07/07 | US 2010-0047853 A1   | 2010/02/25 |
|                       |            | US 2015-0344849 A1   | 2015/12/03 |
|                       |            | US 9464275 B2        | 2016/10/11 |
| US 2021-0395661 A1    | 2021/12/23 | CA 3112220 A1        | 2020/05/22 |
|                       |            | EP 3880785 A1        | 2021/09/22 |
|                       |            | EP 3880785 A4        | 2022/08/24 |
|                       |            | JP 2022-511375 A     | 2022/01/31 |
|                       |            | WO 2020-102682 A1    | 2020/05/22 |
| WO 2022-098052 A1     | 2022/05/12 | EP 4240827 A1        | 2023/09/13 |
|                       |            | KR 10-2023-0095121 A | 2023/06/28 |
|                       |            | US 2022-0135949 A1   | 2022/05/05 |
|                       |            | US 2022-0135950 A1   | 2022/05/05 |
| KR 10-2019-0028443 A  | 2019/03/18 | AU 2017-281406 B2    | 2022/07/14 |
|                       |            | BR 112018076554 A2   | 2019/04/02 |
|                       |            | CA 3030098 A1        | 2017/12/28 |
|                       |            | CN 109844098 A       | 2019/06/04 |
|                       |            | EP 3472302 A1        | 2019/04/24 |
|                       |            | IL 263854 D0         | 2019/02/03 |
|                       |            | JP 2019-527068 A     | 2019/09/26 |
|                       |            | JP 2022-068302 A     | 2022/05/09 |
|                       |            | KR 10-2023-0004913 A | 2023/01/06 |
|                       |            | US 2021-0047618 A1   | 2021/02/18 |
|                       |            | WO 2017-220586 A1    | 2017/12/28 |
| WO 2021-261540 A1     | 2021/12/30 | CN 115768874 A       | 2023/03/07 |
|                       |            | EP 4174170 A1        | 2023/05/03 |
|                       |            | US 2023-0126568 A1   | 2023/04/27 |
|                       |            | WO 2021-261540 A1    | 2021/12/30 |