



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월09일
(11) 등록번호 10-2600397
(24) 등록일자 2023년11월06일

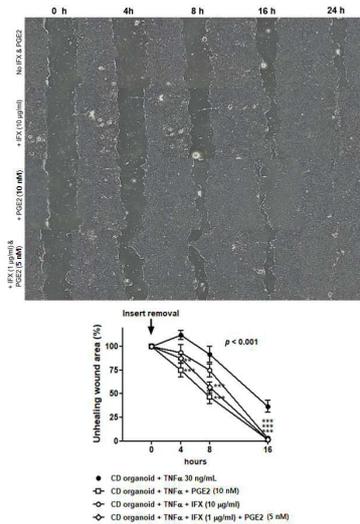
- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/5575 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 31/5575 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0089998(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2023년07월11일
심사청구일자 2023년07월11일</p> <p>(65) 공개번호 10-2023-0108251</p> <p>(43) 공개일자 2023년07월18일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2021-0019099
원출원일자 2021년02월10일
심사청구일자 2021년02월10일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
US20200369761 A1
(뒷면에 계속)</p> <p>전체 청구항 수 : 총 2 항</p> | <p>(73) 특허권자
사회복지법인 삼성생명공익재단
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)</p> <p>(72) 발명자
홍성노
서울특별시 강남구 일원로 81 삼성서울병원
이찬수
서울특별시 강남구 일원로 81 삼성서울병원</p> <p>(74) 대리인
박혁</p> |
|---|--|
- 심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 **중양 괴사 인자 억제제 및 PGE2를 포함하는 염증성장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 손상된 장 점막의 재생 또는 회복을 유도하는 중양 괴사 인자 억제제 및 프로스타글란딘 E2를 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 중양 괴사 인자 억제제 및 프로스타글란딘 E2를 유효성분으로 포함함으로써 손상된 장의 점막 형성 및 점막 치유 능력을 향상시켜 염증성 장질환을 치료하는데 활용될 수 있다.

대표도 - 도22



(52) CPC특허분류
A61P 29/00 (2023.02)

(56) 선행기술조사문헌
 EBioMedicine 36: 497-507. doi:
 10.1016/j.ebiom.2018.08.040 (2018.09.03.) 1부
 대한류마티스학회지 제11권 제4호 제307면 내지
 제315면(2004) 1부.*
 KR1020180072644 A
 US10792360 B1
 KR1020060022631 A
 KR1020090093302 A

EMBO J. 36(1): 5-24 (2016.10.24. 공개)*
 J. Crohns Colitis 10(8): 989-997(2016.02.19.
 공개)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110867
과제번호	2019R1A2C2010404
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	염증성장질환에서 장줄기세포의 분화 및 재생 능력을환자 유래 오가노이드를 이용하
여 분석하고 점막 치유촉진	물질 발굴하여 임상에 적용하기 위한 연구
기 여 율	70/100
과제수행기관명	삼성서울병원
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345312878
과제번호	2019R111A1A01062205
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	NOD2 유전자가 장점막 손상 후 장점막 재생에 미치는역할과 염증성장질환 발병에 기
여하는 기전에 대한연구	
기 여 율	30/100
과제수행기관명	성균관대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

공지에외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

프로스타글란딘 E2 5 nM 내지 10 nM를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 약학 조성물은 손상된 장 점막 형성 및 점막 치유 능력을 향상시키는 것인 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 약학 조성물은 LGR5 발현 장 줄기세포의 증식을 유도하는 것인 약학 조성물.

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 손상된 장 점막의 재생 또는 회복을 유도하는 종양 괴사 인자 억제제 및 프로스타글란딘 E2를 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 염증성 장질환(inflammatory bowel disease)은 주요 소화기 질환으로 미국의 경우 2015년 전체 성인의 1.3% (약 3백만 명)이 앓고 있을 정도로 흔하며, 환자가 많지 않은 것으로 알려진 우리나라를 포함한 아시아에서도 환자수가 지속적으로 증가하고 있다. 염증성 장질환은 모든 연령층에서 발생할 수 있지만 15 ~ 35세의 젊은 층에서 호발 하며 평생 동안 완치되지 않기 때문에 질병의 고통과 의료비 부담이 클 뿐만 아니라 성장 장애 및 사회경제적 활동의 제한으로 노동력 상실 등 간접적 사회경제적 손실이 추산할 수 없을 정도로 크다. 염증성 장질환은 장관 내 비정상적인 만성 염증이 호전과 재발을 반복하는 질환으로, 궤양성 대장염과 크론병이 대표적이며 명확한 발병기전은 밝혀져 있지 않았다. 하지만, 현재까지의 연구를 종합하면 유전적 소인에 있는 환자에서 장 점막의 장벽 기능(barrier function)에 이상이 생기면서 장내 미생물 등에 대한 점막 면역 체계가 교란되어 항진되면서 만성 염증이 진행되는 것으로 알려져 있다. 따라서 지금까지 염증성 장질환의 치료는 항진된 점막의 면역 체계를 억제하는 치료에 초점을 맞추어 개발되고 있다.

[0004] 전통적인 염증성 장질환의 치료 방법은 항진된 장점막의 면역 기능을 조절하기 위해 5-ASA, 스테로이드, 면역조절제를 사용한다. 하지만, 많은 염증성 장질환 환자가 전통적인 치료만으로 증상 조절이 되지 않아 더 강력한 면역 억제 치료제인 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor alpha, TNF α)를 저해하는 TNF α 억제제(inhibitor)를 필요로 한다. 종양 괴사 인자는 염증성 사이토카인으로 활성화된 대식세포, 보조 T 세포, 자연살해세포 등에서 분비되는 염증 매개 물질로, 염증성 장질환 병태 생리에 중심적인 역할을 하는 물질이다.

- [0005] TNF α 억제제는 염증성 장질환 치료에 획기적인 향상을 가져와 전통적인 치료 방법에 반응이 없는 환자의 70 ~ 80%에서 증상 호전을 유도하지만, 시간이 지나면서 처음 관해(remission)가 유도된 환자의 1/2 가량에서는 다시 증상이 재발하는 반응 손실(loss of response)이 발생하게 된다. 최근 다양한 생물학적 제제가 개발되고 있지만, 이러한 약물들도 환자의 약 40 ~ 60%에서만 추가적인 반응을 보일 뿐이다.
- [0006] TNF α 억제제의 치료에 대한 경험이 축적되면서 TNF α 억제제로 치료받은 환자 중 반응 소실 없이 장기간 치료 효과가 유지되는 경우는 장 점막의 궤양이 치유되어 손상된 부위에 정상 상피가 재생되는 점막 치유(mucosal healing)가 도달된 경우로 밝혀졌다. 즉, 점막 치유가 이루어진 경우에는 재발 없이 장기간 안정적으로 관해 상태가 유지되기 때문에 최근에는 염증성 장질환에서 치료 목표를 증상 호전이 아닌 점막 치유를 설정하고 있다. 그러나 TNF α 억제제로 인해 점막 치유되는 경우는 전체 염증성 장질환 환자 중 20 ~ 30%에 불과하므로, 현재 최선의 치료로 간주되는 TNF α 억제제가 염증성 장질환 치료 목표인 점막 치유에 도달하기 위한 완전한 해결책으로 제시될 수 없는 실정이다. 또한, TNF α 억제제는 생물학적 제제로 고가이며, 감염, 피부 질환, 종양 등의 발생과 같은 합병증 위험을 증가시킬 수 있다.
- [0007] 이러한 이유는 TNF α 억제제의 약리 작용을 보면 이해할 수 있다. TNF α 억제제의 약물 작용 기전은 염증성 사이토카인을 중화해 TNF α 기능을 억제하고, TNF α로 인해 유도되는 염증성 신호 전달 경로를 비활성화하고, TNF α를 분비하는 염증세포를 세포자기사멸(apoptosis)로 유도하는 것으로, TNF α 억제제는 직접적으로 장 점막의 상피세포 재생을 실질적으로 촉진하지는 않는다. 즉, 염증성 장질환에서의 현재 치료는 염증 물질과 면역 세포를 타겟(target)으로 하여 5-ASA, 스테로이드, 면역억제제와 같은 전통적인 치료제와 TNF α 억제제를 이용할 뿐 장 점막의 상피세포를 타겟으로 하고 있지 않는다. 현재의 치료가 점막 치유를 획득하기 어려운 이유로 생각된다. 즉, 염증성 장질환 치료에서 염증 조절 치료제는 효과적이지만, 대부분의 환자에서 점막 치유를 획득하기에는 부족하므로 점막 치유를 촉진하는 물질을 발굴하는 것은 중요하다.
- [0008] 장 점막 상피의 재생과 치유는 장 줄기세포의 재생과 분화에 의해 이루어진다. 최근 연구에 따르면, 염증성 장질환 환자의 장 상피세포 유래 오가노이드의 장 줄기세포는 정상인 유래 오가노이드와 차이가 있음이 보고되었다. 또한, 이온화 방사선 치료를 받은 염증성 환자의 경우 장 손상이 더 심한 것이 보고되고 있는데 간접적으로 염증성 장질환 환자의 장 줄기세포가 손상에 취약함을 의미하고 있다. 실제 임상에서는 염증성 장질환 환자는 상처 치유가 잘 되지 않아 수술 후 문합부 누출이 많은 것으로 보고되고 있다. 염증성 장질환에서는 줄기세포의 기능 이상으로 인해 상처 재생 능력 자체에 손상이 있을 수 있다. 따라서, 염증성 장질환 환자에서 점막의 재생 능력에 장애가 있는지 평가가 필요하고, 만일 재생 능력이 떨어져 있다면 점막 재생 능력을 향상시킬 수 있는 물질을 발굴하여 단독 혹은 기존의 치료에 병합하여 치료 효과를 평가해야 한다. 하지만, 연구 방법론적인 제약으로 인해 기존에 이러한 연구가 진행되지 못하였다. 임상 연구를 진행하는 것은 실제 환자에게 중대한 위해를 가해야 하는 윤리적 문제로 인해 시행이 불가능하다. 실험실 연구로는 세포주(cell line)을 이용한 연구와 동물 연구를 통해 시도해 볼 수 있지만, 세포주는 돌연변이를 가지는 암세포 유래된 단일 세포로 구성되어 있어서 여러 세포로 구성된 장 상피를 재현할 수 없고, 동물 실험은 인간이 아닌 염증성 장질환이 발생하지 않는 동물에서의 생체 변화로 실제 인간의 특징적인 반응을 재현하는데 제약이 있다. 최근 확립된 인간 장 오가노이드(intestinal organoid)는 장 상피를 구성하는 모든 세포로 구성되며 움-움모 구조를 재현할 수 있으며, 실제 환자 유래 세포를 사용하여 환자의 특징을 구현할 수 있다는 장점이 있다.
- [0009] 본 발명은 환자와 정상인 유래 장 오가노이드를 이용하여 종양 괴사 인자 억제제 및 프로스타글란딘 E2를 포함하는 약학 조성물을 염증성 장질환 치료에 사용하는 것에 대한 관한 연구 결과에 의한 것이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Julian Panes, et al. Crohn's Disease. Drugs. 2007 Vol. 67, No. 17, 2511-2537.
- (비특허문헌 0002) Peter Suenaert, M.D., et al. Anti-Tumor Necrosis Factor Treatment Restores the Gut Barrier in Crohn's Disease. The American Journal of Gastroenterology. 2002 Vol. 97, No. 8, 2000-2004.
- (비특허문헌 0003) Giulia Roda, et al. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. Clinical and Translational Gastroenterology. 2016 Vol. 7, No. 1, e135.
- (비특허문헌 0004) Kohei Suzuki, et al. Single cell analysis of Crohn's disease patient-derived small intestinal organoids reveals disease activity-dependent modification of stem cell properties. Journal

of Gastroenterology. 2018 Vol. 53, No. 9, 1035-1047.

(비특허문헌 0005) Metcalfe C, et al. Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration. Cell Stem Cell. 2014 Vol. 14, No. 2, 149-159.

(비특허문헌 0006) Torres J, et al. Crohn's disease. Lancet. 2017 Vol. 389, No. 10080, 1741-1755.

(비특허문헌 0007) Kim J, et al. Human organoids: model systems for human biology and medicine. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2020 Vol. 21, No. 10, 571-584.

(비특허문헌 0008) Sato T, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature. 2009 Vol. 459, No. 7244, 262-265.

(비특허문헌 0009) Sato T, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. Gastroenterology. 2011 Vol. 141, No. 5, 1762-1772.

(비특허문헌 0010) Fernandes SR, et al. Proactive Infliximab Drug Monitoring Is Superior to Conventional Management in Inflammatory Bowel Disease. Inflammatory Bowel Diseases. 2020 Vol. 26, No. 2, 263-270.

(비특허문헌 0011) Suzuki K, et al. Single cell analysis of Crohn's disease patient-derived small intestinal organoids reveals disease activity-dependent modification of stem cell properties. Journal of Gastroenterology. 2018 Vol. 53, No. 9, 1035-1047.

(비특허문헌 0012) Khaloian S, et al. Mitochondrial impairment drives intestinal stem cell transition into dysfunctional Paneth cells predicting Crohn's disease recurrence. Gut 2020 Vol. 69, No. 11, 1939-1951.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 염증성 장질환 환자에서 장 상피의 재생 능력을 향상시키기 위해 종양 괴사 인자 억제제 및 프로스타글란딘 E2를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 염증성 장질환을 예방 또는 치료하기 위한 제제를 개발하기 위해 연구한 결과, 크론병 환자의 장 상피세포에서 유래된 장 오가노이드를 이용하여 염증을 유발하는 TNF α가 크론병 환자의 장 상피세포 재생 능력 및 생존에 부정적인 영향을 미치며, LGR5 발현 장 줄기세포를 감소시키는 것을 확인하였고, TNF α 억제제와 함께 프로스타글란딘 E2를 처리할 경우 TNF α 억제제 단독 처리한 경우에 비해 장 점막 형성 및 장 점막 치유 능력이 개선되어 크론병 치료 효과를 향상시킬 수 있다는 것을 확인함으로써 TNF α 억제제 및 PGE2를 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 본 발명을 완성하였다.

[0015] 본 발명의 일 양상은 종양 괴사 인자 억제제 및 프로스타글란딘 E2를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에서 사용된 "염증성 장질환"은 장관 내 비정상적인 만성 염증이 호전과 재발을 반복하는 질환을 의미하는 것으로, 궤양성 대장염(ulcerative colitis)과 크론병(Crohn's disease)을 포함한다.

[0017] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 염증성 장질환은 크론병인 것일 수 있다.

[0018] 본 발명에서 사용된 "예방"은 상기 조성물의 투여로 염증성 장질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여로 염증성 장질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[0019] 본 발명에서 사용된 "종양 괴사 인자"는 염증반응과 관련된 세포 신호전달 단백질로서 급성기 반응을 유도하는 사이토카인을 의미하며, 종양 괴사 인자 α(TNF α)와 림포독소(lymphotoxin)라 불리는 종양 괴사 인자

β (TNF β)로 구분된다. 본 발명에서는 종양 괴사 인자와 종양 괴사 인자 α 가 혼용될 수 있으며, 이때 종양 괴사 인자는 종양 괴사 인자 α 를 의미한다.

- [0020] 본 발명에서 사용된 "종양 괴사 인자 억제제(TNF α inhibitor)"는 종양 괴사 인자의 생리학적 반응을 억제하는 물질로, 체내에서 종양 괴사 인자의 활성 또는 기능을 억제하는 것을 의미한다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 종양 괴사 인자 억제제는 종양 괴사 인자에 특이적으로 결합하는 항체, 융합 단백질 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0022] 상기 항체(antibody)는 종양 괴사 인자를 인식하는 단일클론항체 또는 다클론항체일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 인플리시맙(infliximab), 아달리무맙(adalimumab), 세르톨리주맙 페골(certolizumab pegol), 골리무맙 (golimumab) 및 에타네르셉트(etanercept)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0024] 상기 융합 단백질(fusion protein)은 서로 다른 2개 이상의 단백질 또는 동종의 단백질이 결합된 형태로 만들어진 새로운 단백질로 키메라(chimera) 단백질이라고도 하며, 예를 들면, 인위적인 조작을 통해 생산되는 종양 괴사 인자와 결합하는 수용체일 수 있다.
- [0025] 상기 화합물은 자연에서 유래되거나 합성된 화합물일 수 있으며, 예를 들면, 커큐민(curcumin), 카테킨류(catechins), 칸나비디올(Cannabidiol) 등일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 사용된 "프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2, PGE2)"는 체내 다양한 곳에서 생산되며 다양한 생리 약리작용을 하는 활성 지질 화합물을 의미하며, 일반적으로 염증의 초기 단계에서 국소적인 혈관 확장 및 호중구, 대식세포, 비만세포 등 면역세포의 활성화를 촉진하는 염증 활성 매개체로 작용할 뿐만 아니라 면역 억제성 IL-10의 유도를 촉진하고 여러 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)의 생산 또는 분비를 억제하여 비특이적 염증을 제한하기도 한다. 본 발명에서는 프로스타글란딘 E2 또는 이의 유도체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 이러한 TNF α 억제제 및 프로스타글란딘 E2를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 염증으로 인해 손상된 장 점막이 재형성되거나 장 점막 치유 능력이 향상될 수 있도록 돕는 역할을 한다.
- [0028] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 약학 조성물은 손상된 장 점막 형성 및 점막 치유 능력을 향상시키는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 크론병 환자에서 유래된 장 오가노이드에 TNF α 를 처리하면, 정상인 유래 오가노이드에 비해 오가노이드 재형성률, 세포 증식 및 상처 치유 능력이 감소하고 세포 사멸이 증가함을 확인하였다. 이러한 현상은 크론병에서 TNF α 처리시 LGR5 발현 줄기세포의 증식 장애로 인한 것으로 설명된다. TNF α 저해제인 인플리시맙은 TNF α 의 작용을 억제하여 TNF α 로 인해 유도되는 장 오가노이드 세포의 반응이 발생하는 것을 억제한다. 인플리시맙은 투여 용량에 따라 TNF α 에 의한 장 상피 오가노이드의 세포 반응을 억제하는 정도가 다르게 나타났다. 실제 임상에서도 인플리시맙의 치료적 약물 농도(therapeutic drug monitoring)에 따라 약효에 차이가 있다. 기존 연구에서는 3 ~ 10 μ g/mL를 치료적 혈중 농도로 권고하고 있다. 본 연구에서는 배지에 저농도 (1 μ g/mL)와 고농도 (10 μ g/mL)로 인플리시맙의 농도를 설정하여 TNF α 에 의한 장 상피 오가노이드의 세포 반응 억제 및 재생능력의 회복을 확인하였다. 크론병 유래 장 오가노이드에서 저농도 (1 μ g/mL)의 인플리시맙은 TNF α 로 유도되는 오가노이드 재형성률을 완전히 회복시키지 못하였다. 고농도의 인플리시맙 (10 μ g/mL)을 처리한 경우는 오가노이드 재형성률, 세포 증식 및 상처 치유 능력을 정상 정도로 회복시킬 수 있었다. 인플리시맙의 약리 작용 기전을 토대로 예상된 것처럼 인플리시맙의 처리는 LGR5 발현 줄기세포의 증식 향상시키지 못하였다. 실제 임상에서 많은 환자에서 인플리시맙의 농도를 적절한 치료적 약물 농도 수준으로 유지하기 어려운 경우가 발생하게 된다. 본 연구는 이러한 상황에서 장 점막 상피의 재생을 촉진시켜 저농도의 인플리시맙의 불완전한 TNF α 유도 상피세포 반응을 회복할 수 있음을 확인하였다. TNF α 가 처리된 크론병 환자 유래 장 오가노이드에 TNF α 억제제로서 저농도의 인플리시맙 (1 μ g/mL)에 PGE2를 추가로 처리한 경우에는 고농도의 인플리시맙 (10 μ g/mL)을 처리한 경우와 유사하게 오가노이드 재형성률, 세포 증식 및 상처 치유 능력을 향상시켰다.
- [0030] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 약학 조성물은 LGR5 발현 장 줄기세포의 증식을 유도하는 것일 수 있다.
- [0031] 여기서, LGR5는 빠르게 분화하고 성장하는 장 줄기세포에서 발현되는 마커(marker)이다. 일반적인 줄기세포는 자가재생(self-renewal)과 분화(differentiation) 능력을 모두 갖고 있지만 빠르게 분화하는 능력 (rapidly

recycling)을 갖지는 않으므로, LGR5를 발현하는 장 줄기세포는 장 점막세포의 재생 또는 증식과 높은 관련성을 갖는다.

- [0032] 본 발명의 일 실시예에 따르면, LGR5 발현 장 줄기세포는 정상인에서 유래된 장 오가노이드에 TNF α 를 처리하면 증가하는 반면, 크론병 환자에서 유래된 장 오가노이드에 TNF α 처리에 반응하여 증가하지 않음을 확인하였다.
- [0033] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 약학 조성물은 프로스타글란딘 E2 : 종양 괴사 인자 억제제 = 1 : 100 ~ 10,000의 중량비로 포함하는 것일 수 있다.
- [0034] 보다 구체적으로는, 프로스타글란딘 E2와 종양 괴사 인자 억제제의 비율이 1 : 100 ~ 10,000, 1 : 100 ~ 8,000, 1 : 100 ~ 6,000, 1 : 100 ~ 4,000, 1 : 200 ~ 10,000, 1 : 200 ~ 8,000, 1 : 200 ~ 6,000, 1 : 200 ~ 4,000, 1 : 400 ~ 10,000, 1 : 400 ~ 8,000, 1 : 400 ~ 6,000, 또는 1 : 400 ~ 4,000의 중량비일 수 있다.
- [0035] 이때 종양 괴사 인자 억제제의 농도가 상기 하한치 미만인 경우에는 TNF α 에 의한 병리적 작용 억제, 장 점막 형성 및 점막 치유 능력 향상, LGR5 발현 장 줄기세포의 증식 효과를 기대할 수 없으며, 상기 상한치 초과인 경우에는 상기 효과에 있어서 큰 차이가 없으며 치료 비용이 높아져 환자에게 경제적 부담이 커질 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 따르면, TNF α 가 처리된 크론병 환자에서 유래된 장 오가노이드에 인플리시맵 1 $\mu\text{g/mL}$ 및 PGE2 5 nM (약 1.75 ng/mL)를 처리하면 인플리시맵 10 $\mu\text{g/mL}$ 또는 PGE2 10 nM (약 3.5 ng/mL)를 단독 처리한 경우와 유사한 수준으로 오가노이드 재형성을 및 세포 생존이 유지되는 것을 확인하였다.
- [0037] 이러한 약학 조성물은 TNF α 억제제 및 프로스타글란딘 E2를 유효성분으로 포함하며, 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 단일 약제로 TNF α 에 대한 항체와 프로스타글란딘 E2가 결합된 형태로 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0038] 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로, 락토오스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 약학 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 오일, 식물성 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.
- [0040] 상기 약학 조성물의 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 수 있다. 예를 들면, 1일 0.001 내지 1000 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg, 또는 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 또한, 상기 약학 조성물은 쥐, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 상기 약학 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 않고, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 상기 비경구 투여 방식으로는 예를 들면, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등이 포함되며, 상기 약학적 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명에 따른 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 종양 괴사 인자 억제제 및 프로스타글란딘 E2를 유효성분으로 포함함으로써 손상된 장의 점막 형성 및 점막 치유 능력을 향상시켜 염증성 장질환을 치료하는데

활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 정상인 및 크론병 환자 유래 장 오가노이드의 구축 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 계대 배양된 (P1 ~ P20) 정상인 및 크론병 환자 유래 장 오가노이드를 광학 현미경으로 관찰한 결과로, (B)는 H&E 염색된 것이다 (막대바 = 200 μ m).

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 오가노이드의 배양 및 분화 과정을 나타낸 모식도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 세포 형태 및 오가노이드 재형성을 분석 결과이다 (막대바 = 200 μ m).

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 MTT 분석 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 EdU 분석 결과이다 (막대바 = 50 μ m).

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 상처 치유 분석 결과이다 (막대바 = 4 mm).

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 TUNEL 염색 결과이다 (막대바 = 50 μ m).

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 CC3 및 TUNEL 염색 결과이다 (막대바 = 50 μ m).

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 (A) 히트맵 분석 및 (B) PCA 분석 결과이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 상피세포 관련 마커에 대한 히트맵 분석 결과이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 상피세포 관련 마커에 대한 RPKM 값을 (A) paired T test 및 (B) Wilcoxon rank sum test로 분석한 결과이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 LGR5+ 세포수를 확인한 결과이다 (막대바 = 25 μ m).

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 단일세포 RNA 시퀀싱 UMAP 플롯 결과이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 단일세포 RNA 시퀀싱으로 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 상피세포 관련 마커의 RNA 발현을 히트맵으로 분석한 결과이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 단일세포 RNA 시퀀싱으로 TNF α 가 처리된 정상인 및 크론병 유래 오가노이드의 TNF α 의 신호 전달 관련 마커의 RNA 발현을 히트맵으로 분석한 결과이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 유래 오가노이드에서의 인플리시맵 처리에 따른 (a) 세포 형태, (b) 오가노이드 재형성을 및 (c) MTT 분석 분석 결과이다 (막대바 = 200 μ m).

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 유래 오가노이드에서의 PGE2 처리에 따른 (a) 세포 형태, (b) 오가노이드 재형성을 및 (c) MTT 분석 결과이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 정상인 유래 오가노이드에서의 인플리시맵과 PGE2 처리에 따른 (a) 세포 형태 및 (b) 오가노이드 재형성을 분석 결과이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 크론병 환자 유래 오가노이드에서의 인플리시맵과 PGE2 처리에 따른 세포 형태와 오가노이드 재형성을 분석 결과이다.

도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α 가 처리된 크론병 환자 유래 오가노이드에서의 인플리시맵 및 PGE2

처리에 따른 MTT 분석 결과이다.

도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α가 처리된 크론병 환자 유래 오가노이드에서의 인플리시맙 및 PGE2 처리에 따른 상처 치유 분석 결과이다.

도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α가 처리된 크론병 유래 오가노이드에서의 인플리시맙 및 PGE2 처리에 따른 LGR5에 대한 qPCR 결과이다.

도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNF α가 처리된 크론병 유래 오가노이드에서의 인플리시맙 및 PGE2 처리에 따른 LGR5에 대한 FACS 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0048] **실험예 1. 장 오가노이드 형성**

[0049] 정상인과 크론병 환자로부터 장 점막세포를 채취하여 장 오가노이드(organoid)를 구축하였다 (도 1 참조).

[0051] **1-1. 검체 채취**

[0052] 장 오가노이드(intestinal organoid)를 형성하기 위하여, 2016년 11월부터 2018년 12월까지 한국 삼성서울병원 (Samsung Medical Center)에서 염증성 장질환이 없는 경우를 정상인으로 정의하여 정상인과 크론병 환자를 대상으로 단일풍선소장내시경(single-balloon enteroscopy) 하여 생검 포셉(forcep)으로 장 조직을 획득하였다. 공장(jejunum) (트라이즈 인대(ligamentum of Treitz)로부터 떨어진 100 ~ 150 cm 지점), 회장(ileum)에서 정상으로 보이는 점막에서 최소 4개의 생검 검체를 채취하였다. 크론병 환자들은 치료지침에 따라 진단을 받은 환자들로, 궤양(ulcer)으로부터 적어도 5 cm 떨어진 곳에서 조직검사를 수행하였다. 이 연구는 삼성서울병원의 기관 윤리위원회의 승인을 받았으며 (IRB No. 2016-02-022), 생검 검체는 사전 동의를 받았다.

[0054] **1-2. 창자움 분리**

[0055] 내시경 생검 검체로부터 창자움(intestinal crypt)을 분리하기 위하여 기존 문헌을 참고하여 수행하였다 (Lei NY, et al. *PLoS One*. 2014;9(1); Lahar N, et al. *PLoS One*. 2011;6(11); Khalil HA, et al. *PLoS One*. 2019;14(5)). 내시경 생검 검체는 10 mM EDTA (ThermoFisher)과 1 mM DTT (ThermoFisher)를 포함하는 PBS에 담겨 4°C, 50 rpm의 로커(rocker)에서 30분간 배양되었다. 융모(villi)와 조직과편(debris)을 포함하는 상층액을 제거하였다. 창자움은 새로운 PBS를 첨가하여 십이지장 검체와 공장 검체의 경우 30초, 회장 검체의 경우 60초, 대장 검체의 경우 120초 동안 볼텍싱(vortexing)한 후 수득하였다. 창자움을 포함하는 상층액을 수집하여 70 μm의 세포 스트레이너(strainer) (Corning)를 통해 여과하였다. 이러한 과정을 3회 반복하였다. 각 분획(fraction)을 합쳐 4°C, 200 Xg에서 2분간 원심분리하였고, 펠렛을 기본 배지(basal medium) (DMEM/F12 (ThermoFisher)에 antibiotic-antimycotic solution (ThermoFisher), HEPES (ThermoFisher) 10 mmol/L, GlutaMAX (ThermoFisher), 1XN2 (ThermoFisher), 1XB27 (ThermoFisher) 및 N-acetylcysteine (Sigma-Aldrich) 1 mmol/L를 포함함)에 현탁하였다. 현탁액을 4°C, 200 Xg에서 2분간 원심분리한 후 펠렛을 기본 배지에 현탁하였다.

[0057] **1-3. 3차원 창자움 배양**

[0058] 3차원 창자움 배양은 기존 문헌을 참고하여 수행되었다 (Lei NY, et al. *PLoS One*. 2014;9(1); Lahar N, et al. *PLoS One*. 2011;6(11); Khalil HA, et al. *PLoS One*. 2019;14(5)). 분리된 창자움은 3회의 회전(spin)을 통해 펠렛화하였고, 얼음 위에서 차갑게 유지된 매트릭스(Matrigel) (Corning)로 재현탁하여 37°C의 배양기에서 데워진 48웰(well) 배양 플레이트 (Corning)에 돔형태로 위치시켰다. 37°C의 배양기에서 15분간 배양 후 유지 배지 (50% Wnt3a-conditioned medium (ATCC#CRL-2647) 및 50% 2X 기본 배지에 recombinant human epidermal growth factor (Sigma-Aldrich) 50 ng/mL, recombinant human noggin (R&D Systems) 100 ng/mL, recombinant human R-spondin 1 (PeproTech) 500 ng/mL, 10 mM nicotinamide (Sigma-Aldrich), 10 μM p160ROCK inhibitor (Y27632, selleckchem), 10 μM p38 MAP kinase inhibitor (SB202190, Sigma-Aldrich) 및 10 nM Prostaglandin E2 (Cayman Chemical)를 포함) 250 μL를 처음 2일간 첨가하였다. 2.5 μM GSK3 inhibitor (CHIR99021, Stemgent)는 처음 2일간만 첨가하였다.

[0060] **1-4. 오가노이드 계대배양 및 유지**

[0061] 7일간 배양 후, 매트릭셀에 담긴 오르가노이드는 피펫팅을 이용하여 기계적으로 흐트러뜨려졌다. 분리된 오가노이드는 10 mL의 기본 배지로 세척하고 4℃, 200 Xg로 30초간 원심분리하였다. 펠렛은 세포 분리 완충액(cell dissociation buffer) (ThermoFisher) 2 mL에 재현탁하여 37℃의 수조(water bath)에서 5분간 배양하였다. 세포 펠렛을 매트릭셀로 재현탁하여 48웰 배양 플레이트 (Corning)에 분주하였다. 37℃에서 15분간 배양한 후 유지 배지 250 μL를 추가하였다. 배지는 이틀에 한 번씩 바뀌주었고, 배양 7 ~ 12일 사이에 1 : 2 ~ 1 : 4로 계대배양 하였다.

[0063] **1-5. 창자음 분화**

[0064] 오가노이드는 형태에 따라 스페로이드(spheroid)와 엔테로이드(enteroid)로 분류할 수 있다. 스페로이드는 분화되지 않은 세포의 단일 층으로 구성된 얇은 벽을 가진 둥글고 타원형 모양의 오르가노이드를 의미한다. 엔테로이드는 측면을 따라 버딩(budding)을 형성하며, 분화된 세포 및 분화되지 않은 세포를 포함한 장 상피세포의 모든 구성요소로 구성된 오가노이드를 의미한다. 4 ~ 6 세대 후 유지 배지에 있는 대부분의 오가노이드들은 균일한 스페로이드를 형성하여 오랫동안 안정적으로 세대가 넘어갈 수 있었다. 스페로이드를 엔테로이드로 분화시키기 위해 분화 배지 (유지 배지에서 Wnt3A conditional medium, SB202190, nicotinamide 및 PGE2를 포함하지 않음)에서 배양하였다. 분화 배지는 이틀에 한 번씩 바뀌주었고, 엔테로이드는 계대 후 7 ~ 12일간 배양 후 실험에 사용되었다 (도 1 참조).

[0065] 배양된 오가노이드는 H&E 염색 또는 광학 현미경을 이용하여 관찰되었다.

[0066] 그 결과, 도 2를 참조하면, 정상인 및 크론병 환자 유래 오가노이드는 모두 20세대 이상 배양 가능한 것으로 나타났다. 특히, 크론병 환자 유래 오가노이드는 1 ~ 5번째 계대 배양 (P1 ~ P5)에서 정상인 유래 오가노이드에 비해 형태가 균일하지 않고 잘 자라지 않는 것처럼 보였으나, 6번째 계대 배양 이후로 (P6 ~ P20) 정상인 유래 오가노이드와 세포 형태적 차이가 없는 것으로 나타났다.

[0068] 이후 실험에서는 5명의 염증성 장질환이 없는 정상인 (염증성 장질환이나 장관 염증이 없는 환자) 유래 오가노이드와 5명의 크론병 환자 유래 오가노이드를 이용하여 수행하였다. 도 3를 참조하면, 환자 또는 정상인 유래 오가노이드의 계대 배양 D0에서는 유지 배지를 이용하여 배양하여 줄기세포 및 미분화 세포를 증가를 유도하고 D2부터 격일로 분화 배지를 이용하여 배양하여 미분화 세포의 분화를 유도하였다. TNF α의 효과를 평가하기 위해서 D2부터 매일 TNF α 30 ng/mL을 공급하였다. D9~10에서 배양 후 오가노이드 재형성률, MTT, EdU, 및 조직학적 실험을 진행하였다. 세포의 형태학적 변화가 뚜렷하기 2 ~ 4일 전에 세포내 mRNA의 변화가 발생할 것으로 생각되어 D6 오가노이드에서는 RNA를 추출하여 RNA 시퀀싱을 실시하였고, 단일 세포 RNA 시퀀싱을 실시하였다.

[0070] **실험예 2. 장 오가노이드를 이용한 점막 재생 능력 평가**

[0071] **2-1. 오가노이드 재형성 분석(Organoid reconstitution assay)**

[0072] 정상인과 크론병 환자로부터 얻은 창자음의 오가노이드 형성 능력을 평가하기 위하여, 각각에서 얻은 창자음 100개를 유지 배지에 매트릭셀 25 μL로 분주하였다. 배양 배지는 이틀에 한 번씩 바뀌주었다. 웰(well)당 살아있는(viable) 오르가노이드와 엔테로이드는 현미경 (CK40, Olympus)으로 계산되었다. 오르가노이드 형성률은 창자음 100개당 이용 가능한 오르가노이드의 비율로 계산되었다. 4일째 오가노이드 개수와 10일째 오가노이드 개수를 세어 오가노이드 재형성률을 계산하였다. 통계 분석은 Bonferroni's multiple comparison test를 이용한 ANOVA로 분석되었다 (* p<0.05, ** p<0.01 및 *** p<0.001).

[0073] 그 결과, 도 4를 참조하면, 10일간 분화 배지에 배양된 정상인 및 크론병 환자 유래 오가노이드에서는 TNF α가 처리된 경우가 TNF α가 처리되지 않은 경우에 비해 오가노이드 재형성률이 감소한 것으로 나타났다. TNF α가 처리되지 않은 경우에는 공장과 회장에서 모두 정상인과 크론병 환자 간의 오가노이드 재형성률 차이가 없는 반면, TNF α가 처리된 경우에는 공장과 회장에서 모두 크론병 환자 유래 오가노이드의 재형성률이 정상인 유래 오가노이드에 비해 감소한 것으로 나타났다.

[0075] **2-2. MTT 분석**

[0076] 오가노이드의 세포 생존을 평가하기 위하여, 배양 플레이트의 각 웰에 500 μg/ml 농도의 MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich)를 포함하는 기본 배지 100 μL를 첨가하고 37℃에서 2시간 배양하였다. 배지를 제거하고 매트릭셀을 녹이기 위해 2% SDS(Sodium Dodecyl Sulfate) 용액 10 μL를 첨가하고 다시 2시간 배양한다. 여기에 Detergent Reagent 100 μL를 첨가한 후 오가

노이드를 다시 1시간 배양하고 562 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 통계 분석은 Bonferroni's multiple comparison test를 이용한 ANOVA로 분석되었다 (* p<0.05, ** p<0.01 및 *** p<0.001).

[0077] 그 결과, 도 5를 참조하면, TNF α가 처리된 오가노이드에서는 공장과 회장에서 모두 TNF α가 처리되지 않은 오가노이드에 비해 세포 생존이 감소한 것으로 나타났다.

[0079] **2-3. EdU 분석**

[0080] 오가노이드의 세포 증식을 평가하기 위하여, 각 오가노이드를 EdU(5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine) (Abcam) 10 μM을 포함하는 배양 배지에서 2시간 동안 배양 후, 차가운 4% 파라포름알데히드 (Biosesang)로 고정시켰다. Click-iT™ EdU Alexa Fluor® 488 imaging kit (ThermoFisher)를 사용하여 DNA 내 EDU 혼성(incorporation)을 검출하였다. 콘포칼(confocal) 현미경 (LSM 800, Carl Zeiss)을 이용하여 오가노이드의 EDU 양성(+) 세포 수를 계산하였다. 통계 분석은 Bonferroni's multiple comparison test를 이용한 ANOVA로 분석되었다 (* p<0.05 및 *** p<0.001).

[0081] 그 결과, 도 6을 참조하면, EDU+ 세포는 창자움을 의미하는 오가노이드의 싹(bud)에 위치하며, TNF α가 처리되지 않은 오가노이드에서는 TNF α가 처리된 오가노이드에 비해 EDU+ 세포수가 증가한 것으로 나타났다. TNF α가 처리되지 않은 경우에는 정상인과 크론병 환자 유래 오가노이드 간의 EDU+ 세포 수 차이가 없는 반면, TNF α가 처리된 경우에는 크론병 환자 유래 오가노이드의 재형성률이 정상인 유래 오가노이드에 비해 감소한 것으로 나타났다.

[0083] **2-4. 2차원 인간 장 오가노이드 배양 및 상처 치유 분석**

[0084] 매트릭스 코팅을 위하여, 24웰 플레이트는 기본 배지로 5%의 농도로 희석된 매트릭셀 500 μL에 의해 37°C에서 1시간 코팅되었다. 2차원 배양을 위하여, TrypLE Express (ThermoFisher)를 사용하여 3차원 배양된 오가노이드를 단일세포(single cell)로 분리하였다. 분리된 세포들을 기본 배지로 재현탁하여 매트릭셀로 코팅된 웰에 각각 분주하였다.

[0085] 상처 치유 분석(Wound healing assay)을 위하여, 5 X 10⁴ 세포를 CytoSelect™ 24-Well Wound Healing Assay 삽입물(insert) (Cell Biolabs)이 담긴 24웰 플레이트에 분주하였다. 2차원 오가노이드 단일층(monolayer)은 가득찬 상태 (confluency)가 될 때까지 유지 배지에서 배양되었다. 이후 삽입물을 조심스럽게 제거하여 지름 0.9mm의 상처를 내고 각 웰마다 새로운 분화 배지 500 μL를 첨가하였다. 이후, 상처 부위에 세포가 차는 것을 0, 4, 8, 16 및 24시간째 위상차 현미경(phase contrast microscopy)을 통해 관찰하였다. 각 시간에 측정된 치유되지 않은 상처 부위(non-healed wound area)는 세 개의 다른 부위에서 측정되었다. 통계 분석은 Bonferroni's multiple comparison test를 이용한 ANOVA로 분석되었다 (* p<0.05, ** p<0.01 및 *** p<0.001).

[0086] 그 결과, 도 7을 참조하면, TNF α가 처리된 정상인 유래 오가노이드에서는 16시간째 이후로 상처 부위가 회복되어 치유되지 않은 상처 부위가 감소한 것으로 나타났다. 반면, TNF α가 처리된 크론병 환자 유래 오가노이드에서는 시간이 지나더라도 치유되지 않은 상처 부위의 유의미한 감소가 나타나지 않아, 상처 치유 능력이 저하된 것을 확인할 수 있었다.

[0088] **2-5. CC3 및 TUNEL에 대한 이중 면역형광법(double immunofluorescence)**

[0089] TNF α에 의한 세포 사멸은 아포토시스(apoptosis) 또는 네크로토시스(necroptosis)를 통해 발생한다. CC3(cleaved caspase-3)는 아포토시스가 발생한 세포를 검출할 수 있는 마커이며, TUNEL 염색은 세포 사멸로 인해 단편화(fragmentation)된 DNA를 검출할 수 있어 아포토시스 또는 네크로토시스가 발생한 세포를 검출할 수 있다. 따라서 CC3+, TUNEL+ 세포는 아포토시스가 발생한 세포이며, CC3-, TUNEL+ 세포는 네크로토시스가 발생한 세포이다.

[0090] CC3 염색에서는 CC3에 대한 1차 토끼 항체와 Alexa 594 형광색소 (적색 형광)가 결합된 염소 항-토끼 2차 항체를 사용하였다. TUNEL 염색에서는 CC3 염색에서 동일한 박편에 대해 *In Situ* Cell Death Detection Kit (Merck)를 사용한 후 플루오레세인(fluorescein)으로 표지된 dUTP (녹색 형광)를 사용하였다. DAPI는 세포 내 DNA를 염색하는데 사용되었다. 통계 분석은 Bonferroni's multiple comparison test를 이용한 ANOVA로 분석되었다 (***) p<0.001).

[0091] 그 결과, 도 8 및 9를 참조하면, TNF α가 처리되지 않은 오가노이드에서는 CC3+ 또는 TUNEL+ 세포가 거의 관찰되지 않았다. 반면, TNF α가 처리된 오가노이드에서는 CC3-, TUNEL+ 및 CC3+, TUNEL+ 세포의 수가 증가한 것으로

로 나타났으며, 특히 크론병 유래 오가노이드에서 그 세포수가 많은 것으로 나타나 네크로토시스가 정상인 유래 오가노이드에 비해 더 활발히 일어나고 있음을 확인할 수 있었다.

[0093] 이러한 결과는 TNF α 가 크론병 환자의 장 상피세포 재생 능력 및 생존에 부정적인 영향을 미친다는 것을 시사한다.

[0095] **실험예 3. 장 오가노이드를 이용한 세포 기능 이상 확인**

[0096] **3-1. RNA 시퀀싱(sequencing) 및 데이터 분석**

[0097] 정상인 및 크론병 유래 오가노이드에 대하여 각각 TNF α 처리군 (n=3), TNF α 미처리군 (n=3)을 구분하여 분화 배지에서 배양한 후 6일째 각 오가노이드에서 RNA를 추출하여 RNA 시퀀싱을 수행하고 히트맵(heatmap)과 PCA 분석을 수행하였다.

[0098] RNA 시퀀싱은 RNA > 10 μ g 및 RIN(RNA integrity number) > 8인 총 RNA 시료를 사용하여 수행되었다. 전체 전사체 시퀀싱을 위한 라이브러리는 TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina)를 사용하여 구성되었다. 역전사 반응은 2 μ g의 분리된 총 RNA, 폴리(dT) 프라이머, SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen 또는 Life Technologies)로 수행되었다. 간략하게는, RNA 시퀀싱 라이브러리는 상보적 DNA 증폭, 말단 복구(end repair), 3' 말단 아데닐화, 어댑터 부착(adapter ligation) 및 증폭을 통해 준비되었다. 라이브러리 품질과 농도는 각각 BioAnalyzer와 Qubit systems (Agilent)을 사용하여 측정되었다. 전사체(transcriptome) 라이브러리는 TruSeq Rapid PE Cluster Kit와 TruSeq Rapid SBS Kit (Illumina)의 100-bp paired-end mode를 사용하여 시퀀싱되었다.

[0099] FASTQ 형식 파일의 관독(read)은 기본 매개변수(default parameter)를 갖는 TopHat version 2.0.6을 사용하여 hg19 human reference genome에 대해 맵핑되었다 (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>). 유전자에 맵핑된 원본 관독 카운트(Raw read count)는 HTSeq version 0.6.0 (<https://htseq.readthedocs.io/>)의 BAM 형식 파일을 사용하여 측정하여 전사 풍부함(transcript abundance)을 정량화하였다. 코딩 유전자를 선택하였고, 원본 관독 카운트를 RPKM(Reads Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads) 및 TMM(Trimmed Mean of M-values)으로 정규화하였다. RNA 시퀀싱 실험의 차등 발현 분석(Differential expression analysis)은 edgeR (version 3.28.1)을 사용하여 수행되었다. TNF α 에 대한 반응에서 차등적으로 발현된 유전자는 FDR(false discovery rate) 보정을 가진 paired *t*-test를 사용하여 선택되었다.

[0100] 그 결과, 도 10을 참조하면, 정상인 및 크론병 환자 유래 오가노이드에 관계없이 TNF α 처리 여부에 따라 유전자 발현 차이가 나타났다.

[0102] 추가로, 상피세포 계통에서 특이적으로 발현하는 마커 (epithelial cell lineage-specific marker)의 발현을 이용하여 TNF α 처리 여부에 따른 정상인 및 크론병 환자 유래 오가노이드 간의 차이를 분석하였다.

[0103] 그 결과, 도 11을 참조하면, TNF α 가 처리된 오가노이드에서는 소장세포(enterocyte), 술잔세포(goblet cell), 파네트 세포(Paneth cell)와 같은 분화 세포의 마커 발현이 감소하고 장 줄기세포의 마커 발현이 증가한 것으로 나타났다. 특히 크론병 환자 유래 오가노이드에서는 장 줄기세포 마커 중 LGR5의 감소가 더 뚜렷하게 나타났다.

[0105] 정상인 및 크론병 유래 오가노이드에서 TNF α 처리 여부에 따른 RPKM 값의 변화를 분석하였다.

[0106] 그 결과, 도 12의 (a)를 참조하면, RPKM 값의 변화를 paired T test로 통계 분석한 경우, TNF α 가 처리된 오가노이드에서는 TNF α 가 처리되지 않은 오가노이드에 비해 LGR5와 같은 장 줄기세포 마커의 발현이 증가한 반면, 장세포 마커 (VIL1), 술잔세포 마커 (TFF3) 및 파네트 세포 마커 (CD24)의 발현이 감소한 것으로 나타났다.

[0107] 도 12의 (b)를 참조하면, RPKM 값의 변화를 Wilcoxon rank sum test로 통계 분석한 경우, 크론병 유래 오가노이드에서는 LGR5와 CD24 발현이 유의미하게 감소한 반면, VIL1, TFF3, CHGA 의 발현은 차이가 없는 것으로 나타났다.

[0109] **3-2. 면역조직화학(Immunohistochemistry, IHC)**

[0110] 배양 배지를 제거한 후 오가노이드를 PBS로 세척하고 차가운 4% 파라포름알데히드로 실온에서 30분간 고정하였다. 고정된 오가노이드는 PBS로 세척되어 HistoGel (ThermoFisher)에 포매되었다. HistoGel 블록은 파라핀 포매에 사용되었고, 조직학적 검사 및 IHC를 위해 박편화되었다. 헤마토실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색된 박편(section)을 이용하여 조직평가를 실시했다. 시트레이트 완충액(citrate buffer)을 이용한 열 유도 에피토프 회수(heat-induced epitope retrieval) 후 IHC는 다음과 같은 항체로 수행되었다: cleaved caspase-3

(Asp175, 1:200 dilution, Cell Signaling.), E-cadherin (1:100 dilution, Abcam) 및 LGR5 (1:400 dilution, Abcam). TNF α 처리군 (n=10)과 TNF α 미처리군 (n=10)에서 오가노이드 당 LGR5+ 세포 수를 계산하였고, 통계 분석은 Bonferroni's multiple comparison test를 이용한 ANOVA로 분석되었다 (***) p<0.001).

[0111] 그 결과, 도 13을 참조하면, TNF α 가 처리된 오가노이드에서는 TNF α 가 처리되지 않은 오가노이드에 비해 LGR5+ 세포가 증가한 것으로 나타났다. 그러나, TNF α 가 처리된 경우에는 크론병 환자 유래 오가노이드가 정상인 유래 오가노이드에 비해 LGR5+ 세포 수가 감소한 것으로 나타났다.

[0113] **3-3. 단일세포 RNA 시퀀싱 및 분석**

[0114] 정상인 및 크론병 유래 오가노이드에 대하여 각각 TNF α 처리군 (n=1), TNF α 미처리군 (n=1)을 구분하여 분화 배지에서 배양한 후 6일째 각 오가노이드에서 단일세포로 분리하고, RNA를 추출하여 RNA 시퀀싱을 수행하였다. 차별적으로 발현하는 유전자를 클러스터링(clustering)하여 14개의 클러스터로 구분한 후 UMAP 플롯(Uniform Manifold Approximation and Projection plot)을 작성하였다.

[0115] 간략하게는, 10X 크롬(Chromium) 라이브러리는 제조사의 프로토콜 (10X Genomics, Flugenton)에 따라 10,000 개의 세포를 대상으로 준비되었다. 제조사의 지침에 따라, Chromium Single Cell 3' Reagent Kit v3를 사용하여 바코드화된 시퀀싱 라이브러리가 생성되었고, HiSeq X Ten system에서 시퀀싱되었다. 판독은 human reference genome (CGCh38)에 맞춰 Cell Ranger 3.1.0 pipeline (10X Genomics)을 사용하여 처리되었다. Cell Ranger pipeline으로부터 얻은 원본 유전자 발현 매트릭스는 Seurat v3.1.4를 사용하여 정규화되었으며, 유전자 > 200개, 유전자 < 6,000개, UMI 수(count) 중 미토콘드리아 유전자 발현 < 30%에 따라 필터링되었다. 필터링된 세포에서 유전자 발현 매트릭스는 세포당 총 UMI 수로 정규화되었고 자연 로그 스케일(natural log scale)로 변환되었다. 독립 시료를 병합하기 위하여, Seurat에서 'FindIntegrationAnchors'와 'IntegrateData'를 사용하고 배치 효과(batch effect)를 보정하였다. 주성분(principal component)의 수는 'RunPCA'에 이어 'ElbowPlot'을 사용하여 추정되었고, 차원 감소(dimensionality reduction)는 'RunUMAP'를 사용하여 수행되었다.

[0116] 그 결과, 도 14를 참조하면, 정상인 유래 오가노이드에서는 TNF α 가 처리되지 않은 경우 클러스터 2, 3, 5, 9, 10이 특이적으로 발현한 반면, TNF α 가 처리된 경우 클러스터 8이 특이적으로 발현한 것으로 나타났다. 반면, 크론병 환자 유래 오가노이드에서는 TNF α 가 처리된 경우 클러스터 1, 11, 12가 특이적으로 발현한 것으로 나타났다.

[0118] 추가로, 상피세포 계통에서 특이적으로 발현하는 마커 (epithelial cell lineage-specific marker)의 발현을 이용하여 TNF α 처리 여부에 따른 정상인과 크론병 환자 유래 오가노이드 간의 평균 RNA 발현 차이를 히트맵으로 분석하였다.

[0119] 그 결과, 도 15를 참조하면, TNF α 가 처리되지 않은 오가노이드에서는 분화 세포 관련 마커의 발현이 증가한 반면, TNF α 가 처리된 오가노이드에서는 줄기세포나 전구세포(progenitor) 관련 마커의 발현이 증가한 것으로 나타났다. 흥미롭게도, TNF α 가 처리된 경우에는 클러스터 8의 LGR5+ 발현이 정상인 유래 오가노이드에서 증가한 반면, 크론병 환자 유래 오가노이드에서 미미한 수준인 것으로 나타났다.

[0121] 이러한 결과는 크론병 환자에서 나타나는 점막 재생 능력 저하가 LGR5+ 세포 감소와 관련 있음을 시사한다. 추정되는 감소의 원인은 LGR5+ 활동성 장 줄기세포(active intestinal stem cell) 자체의 기능 이상일 수도 있지만, BMI1+, DLL1+, MEX3A 등의 발현의 특징을 보이는 예비 줄기세포 (reserve intestinal stem cell)가 TNF α 에 의한 세포사멸을 보상하기 위해 LGR5+ 줄기세포로 역분화(dedifferentiation)되는 것의 장애일 수도 있다. 또는, 줄기세포의 니치 (stem cell niche)를 구성하는 파네트 세포의 감소가 LGR5+ 줄기세포 감소를 유도하는 것일 수도 있다.

[0123] 도 16를 참조하면, LGR5+ 세포가 존재하는 클러스터 8에서는 TNFSF1B (TNFR2) 및 NF- κ B의 유전자 발현이 증가하였으며, 특히 PTGS2 (Cox2) 및 PTGES의 발현이 증가하였다. Cox2-PTGES는 신호 경로를 통해 PGE2의 생성을 증가시킬 것으로 예상된다. PGE2는 기존 연구에서 EP2 수용체를 통해서 LGR5의 발현을 증가시키고 LGR5+ 줄기세포의 재생과 생존을 촉진하는 것이 보고되었다. 따라서, PGE2는 TNF α 로 손상된 장 오가노이드에서 LGR5+ 줄기세포의 재생과 생존을 촉진하여 장 점막 재생을 촉진할 것으로 기대할 수 있다.

[0125] **실례 4. PGE2 및 인플리시맵 병용에 의한 장 점막 재생 확인**

[0126] PGE2 및/또는 TNF α 억제제 처리에 따른 정상인 및 크론병 환자 유래 장 오가노이드의 점막 재생 능력 변화를

비교하기 위하여, 오가노이드 재형성 분석, MTT 분석 및 상처 치유 분석을 수행하였고, 장 오가노이드의 LGR5 발현 세포 변화를 확인하기 위하여, FACS 분석을 수행하였다.

[0127] TNF α 억제제로는 항 TNF α 항체인 인플리시맵(infliximab, IFX)을 사용하였다.

[0129] **4-1. 정상인 유래 오가노이드에서 인플리시맵과 PGE2의 효과**

[0130] 정상 장 상피세포에서 TNF α 로 인한 변화가 인플리시맵과 PGE2, 또는 인플리시맵과 PGE2 병용에 따라 회복되는지를 오가노이드 재형성 분석 및 MTT 분석을 이용하여 평가하였다.

[0131] 정상인 유래 오가노이드를 2일간 유지 배지에서 배양하여 안정된 수의 오가노이드를 획득한 후 2일마다 분화 배지로 교체하였다. 각 실험군에 따라 인간 재조합 TNF α 와 PGE2 (Cayman chemical company) 또는 인플리시맵을 매일 배양 배지에 첨가하였다. 4일째 오가노이드 개수와 10일째 오가노이드 개수를 비교하여 오가노이드 재형성률을 계산하였다.

[0132] 세포 생존을 평가하기 위하여, 실험에 2에서와 동일한 방법으로 MTT 분석을 수행하였다. 통계 분석은 Bonferroni's multiple comparison test를 이용한 ANOVA로 분석되었다 (* p<0.05, ** p<0.01 및 *** p<0.001).

[0133] PGE2와 인플리시맵의 농도에 따른 오가노이드 재형성률 및 세포 생존 변화를 확인하였다. 도 17을 참조하면, 정상인 유래 오가노이드에 TNF α 0, 30, 100 ng/mL을 처리함과 동시에 인플리시맵 0, 1, 10, 20 μ g/mL를 처리하여 오가노이드 재형성률, MTT 분석을 실시하였다. 그 결과, TNF α 의 농도 의존적으로 오가노이드 재형성률이 감소하고 세포 생존도 감소하였다. TNF α 30 ng/mL을 처리한 정상인 유래 장 오가노이드에서 인플리시맵의 농도가 증가할수록 오가노이드 재형성률과 세포 생존은 회복되어서, 인플리시맵 10, 20 μ g/mL을 동시에 처리한 경우가 TNF α 를 처리하지 않은 경우와 유사하고 인플리시맵을 투여하지 않은 경우에 비해서는 의미 있게 회복되었다. TNF α 100 ng/mL을 처리한 정상인 유래 장 오가노이드에서도 인플리시맵의 농도가 증가할수록 오가노이드 재형성률과 세포 생존은 회복되어서, 인플리시맵 20 μ g/mL을 동시에 처리한 경우가 TNF α 를 처리하지 않은 경우와 유사하고 인플리시맵을 투여하지 않은 경우에 비해서는 의미 있게 회복되었다.

[0134] 도 18을 참조하면, 정상인 유래 오가노이드에서 TNF α 0, 30, 100 ng/mL을 처리함과 동시에 PGE2 0, 5, 10 nM을 처리하여, 오가노이드 재형성률, MTT 분석을 실시하였다. 그 결과, TNF α 30 ng/mL을 처리한 정상인 유래 장 오가노이드에서 PGE2의 농도가 증가할수록 오가노이드 재형성률과 세포 생존은 회복되어서, PGE2 10 nM을 동시에 처리한 경우가 TNF α 를 처리하지 않은 경우와 유사하고 PGE2를 투여하지 않은 경우에 비해서는 의미 있게 회복되었다. TNF α 100 ng/mL을 처리한 정상인 유래 장 오가노이드에서도 PGE2의 농도가 증가할수록 오가노이드 재형성률과 세포 생존은 회복되어서, PGE2 10 nM을 동시에 처리한 경우가 PGE2를 투여하지 않은 경우에 비해서는 의미 있게 향상되었다.

[0135] 도 19를 참조하면, 정상인 유래 오가노이드에서 TNF α 0, 30, 100 ng/mL을 처리함과 동시에 다양한 농도의 인플리시맵 (저농도 = 1 μ g/mL, 치료적 약물 농도 = 5 μ g/mL, 고농도 = 10 μ g/mL)과 PGE2 (저농도 = 5 nM, 고농도 = 10 nM)를 처리하여 오가노이드 재형성률을 분석하였다. 그 결과, 고농도의 인플리시맵이나 PGE2를 처리한 경우에서 오가노이드 재형성률의 회복은 예상대로 향상되었으며, TNF α 30, 100 ng/mL을 처리한 정상인 유래 장 오가노이드에 저농도의 인플리시맵 (1 μ g/mL)과 저농도의 PGE2 (5 nM)을 병합 처리한 경우도 정상인 유래 오가노이드의 재형성률을 회복시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0137] **4-2. 크론병 유래 오가노이드에서 인플리시맵과 PGE2의 효과**

[0138] 도 20 및 21은 크론병 환자 유래 오가노이드를 대상으로 TNF α 처리에 대한 인플리시맵과 PGE2의 오가노이드 재형성률 및 세포 생존 변화를 확인한 결과이다. 실제 인플리시맵 치료가 필요하거나 잠재적인 PGE2의 치료가 필요한 경우는 크론병 환자로, 정상인 유래 오가노이드에서 얻은 정보를 바탕으로 장 상피 재생 능력이 감소된 크론병 유래 오가노이드에서 효과를 평가하였다.

[0139] 크론병 환자 유래 장 오가노이드에 인간 재조합 TNF α 30, 100 ng/mL을 처리하였을 때 농도 의존적으로 크론병 환자 유래 장 오가노이드 재형성률 감소하고 세포 사멸은 증가하였다. 고농도의 인플리시맵 (10 μ g/mL)과 고농도의 PGE2 (10 nM) 처리는 TNF α 30, 100 ng/mL을 처리한 크론병 환자 유래 오가노이드의 재형성률과 세포 생존을 TNF α 를 처리하지 않는 정상 오가노이드와 유사한 수준으로 회복시켰다. TNF α 와 함께 저농도의 인플리시맵 (1 μ g/mL) 및 PGE2 (5 nM)가 처리된 경우에는 고농도의 인플리시맵 또는 PGE2가 처리된 경우와 유사한 수준으로 크론병 환자 유래 장 오가노이드 재형성률과 세포 생존이 유지되는 것으로 나타났다.

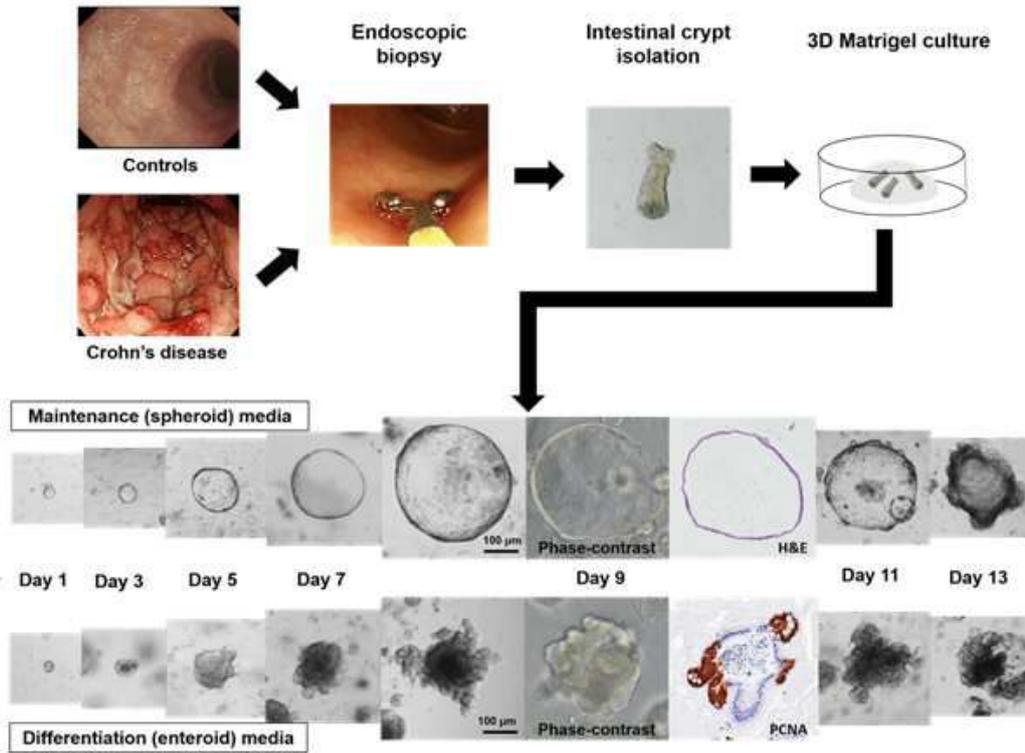
- [0141] 또한, 실험에 7에서와 동일한 방법으로 상처 치유 분석을 수행하였다.
- [0142] 크론병 환자 유래 오가이드에 대해 각 실험군에 따라 인간 재조합 TNF α 30 ng/mL, PGE2 5, 10 nM, 인플리시맙 1, 10 μ g/mL를 매일 배양 배지에 첨가하였다. 통계 분석은 Bonferroni's multiple comparison test를 이용한 ANOVA로 분석되었다 (** p<0.01 및 *** p<0.001).
- [0143] 그 결과, 도 22을 참조하면, TNF α 와 함께 고농도의 인플리시맙 또는 PGE2가 처리된 경우에는 TNF α 만 처리된 경우에 비해 상처 부위가 16시간 이후로 회복되어 치유되지 않은 상처 부위가 감소된 것으로 나타났다. 또한, TNF α 와 함께 저농도의 인플리시맙 및 PGE2가 처리된 경우에는 고농도의 인플리시맙 또는 PGE2가 처리된 경우와 유사하게 상처 부위가 16시간 이후로 회복되어 치유되지 않은 상처 부위가 감소된 것으로 나타났다. 따라서, 저농도의 인플리시맙 및 PGE2 병용이 TNF α 에 의해 감소된 상처 회복 능력을 향상하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0144] 이러한 결과는 PGE2가 TNF α 억제제는 TNF α 에 의해 유도된 장 상피 재생 능력이 감소된 크론병 유래 오가노이드의 장 점막 치유 능력 감소를 개선할 수 있음을 시사하며, 저농도의 TNF α 억제제와 PGE2의 병용이 크론병 치료 효과를 향상시키는데 유용할 것으로 기대할 수 있다.
- [0146] **4-3. 실시간 qPCR(Real-Time Quantitative reverse transcription-PCR)**
- [0147] 크론병 환자 유래 오가이드에 대해 각 실험군에 따라 인간 재조합 TNF α 0, 30, 100 ng/mL, PGE2 0, 5, 10 nM, 인플리시맙 0, 1, 10 μ g/mL를 매일 배양 배지에 첨가하였다.
- [0148] RNeasy Mini Kit (QIAGEN)를 사용하여 장 오가노이드로부터 총 RNA를 추출하였다. 원스텝(One-step) qPCR은 One Step PrimeScriptTM III RT-qPCR Mix (Takara)와 함께 다음과 같은 프라이머를 사용하여 수행되었다: LGR5 프라이머 (정방향: 5'-aactttggcattgtggaagg-3', 역방향: 5'-acacattggggtaggaaca-3'). 통계 분석은 Bonferroni's multiple comparison test를 이용한 ANOVA로 분석되었다 (* p<0.05 및 *** p<0.001).
- [0149] 그 결과, 도 23을 참조하면, TNF α 와 함께 고농도의 인플리시맙이 처리된 경우에는 TNF α 농도에 따른 LGR5 발현 차이가 없는 반면, TNF α 와 함께 고농도의 PGE2가 처리된 경우에는 LGR5 발현이 증가한 것으로 나타났다. 또한, TNF α 와 함께 저농도의 인플리시맙 및 PGE2가 처리된 경우에는 고농도의 PGE2가 처리된 경우와 유사하게 LGR5 발현이 증가한 것으로 나타났다.
- [0151] **4-4. FACS 분석**
- [0152] 크론병 환자 유래 오가이드에 대해 각 실험군에 따라 인간 재조합 TNF α 30 ng/mL, PGE2 5, 10 nM, 인플리시맙 1, 10 μ g/mL를 매일 배양 배지에 첨가하였다.
- [0153] 오가노이드로부터 단일세포(single cell) 현탁액을 준비하기 위하여, 오가노이드들을 TrypLE Express와 함께 37 $^{\circ}$ C의 수조에서 30분간 배양하였다. 이후, 세포들을 기본 배지로 세척하여 40 μ m의 세포 스트레이너를 통해 여과하여 수집하였다. 마커를 검출하기 위한 유세포 분석(Flow cytometry)은 1×10^5 세포를 사용하여 수행되었다. 세포는 FACS 완충액에서 30분간 인간 Lgr5/GPR49 항체 (R&D Systems)와 배양되었다. 결합되지 않은 항체를 씻어내고 세포들을 Alexa Fluor 488-결합 항-마우스 IgG 2차 항체 (ThermoFisher)로 30분간 배양하였다. 이후, 세포를 세척하여 FACS 완충액에 재현탁하고, LGR5+ ISC 세포수 (population)를 측정하기 위하여 FACS Aria III instrument (BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.
- [0154] 그 결과, 도 24를 참조하면, TNF α 와 함께 고농도의 인플리시맙이 처리된 경우에는 TNF α 가 처리된 경우와 LGR5 발현 차이가 없는 반면, TNF α 와 함께 고농도의 PGE2가 처리된 경우에는 LGR5 발현이 증가한 것으로 나타났다. 또한, TNF α 와 함께 저농도의 인플리시맙 및 PGE2가 처리된 경우에는 고농도의 PGE2가 처리된 경우와 유사하게 LGR5 발현이 증가한 것으로 나타났다.
- [0156] 결과를 종합하면, 고농도의 PGE2는 크론병 환자의 장에서 LGR5 발현 세포의 증식을 유도함으로써 장 점막 형성 및 점막 치유 능력을 향상시킬 수 있었다. 저농도의 TNF α 억제제 및 PGE2를 병용할 경우 TNF α 억제제의 농도 낮아서 TNF α 의 영향을 완전히 차단하지 못하여 발생하는 점막 치유에 대한 악영향을 PGE2의 LGR5 발현 장 줄기 세포의 증식을 유도하여 장 점막 형성 및 점막 치유 능력을 정상적인 경우 정도까지 향상시킬 수 있었다.
- [0157] TNF α 억제제는 고가로 의료 비용을 위해서는 사용량을 줄이는 것이 요구되며, 항 TNF α 억제제 항체 발생 등으로 인해 체내에서 적정 TNF α 억제제 치료 약물 농도를 유지 못하는 경우가 종종 발생하는 경우가 많이 존재하다. 즉, TNF α 억제제 사용량 감소 및 TNF α 억제제의 치료 농도 유지를 못하는 경우 PGE2 병합 요법은 크론병 치료에 효과적으로 사용될 수 있겠다.

[0159]

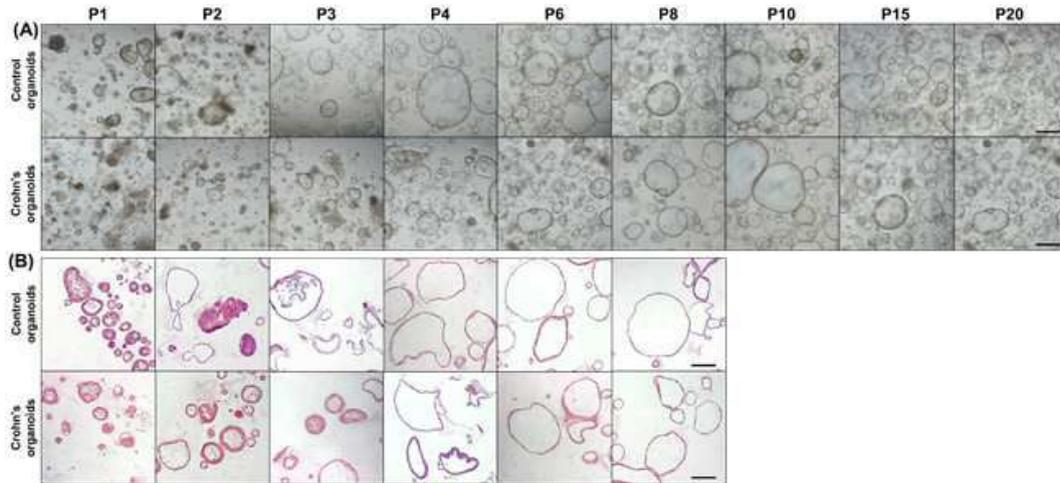
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

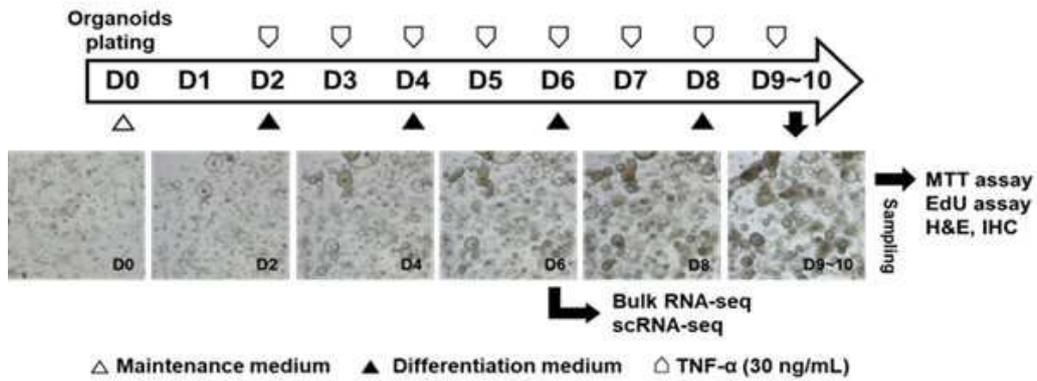
도면1



도면2

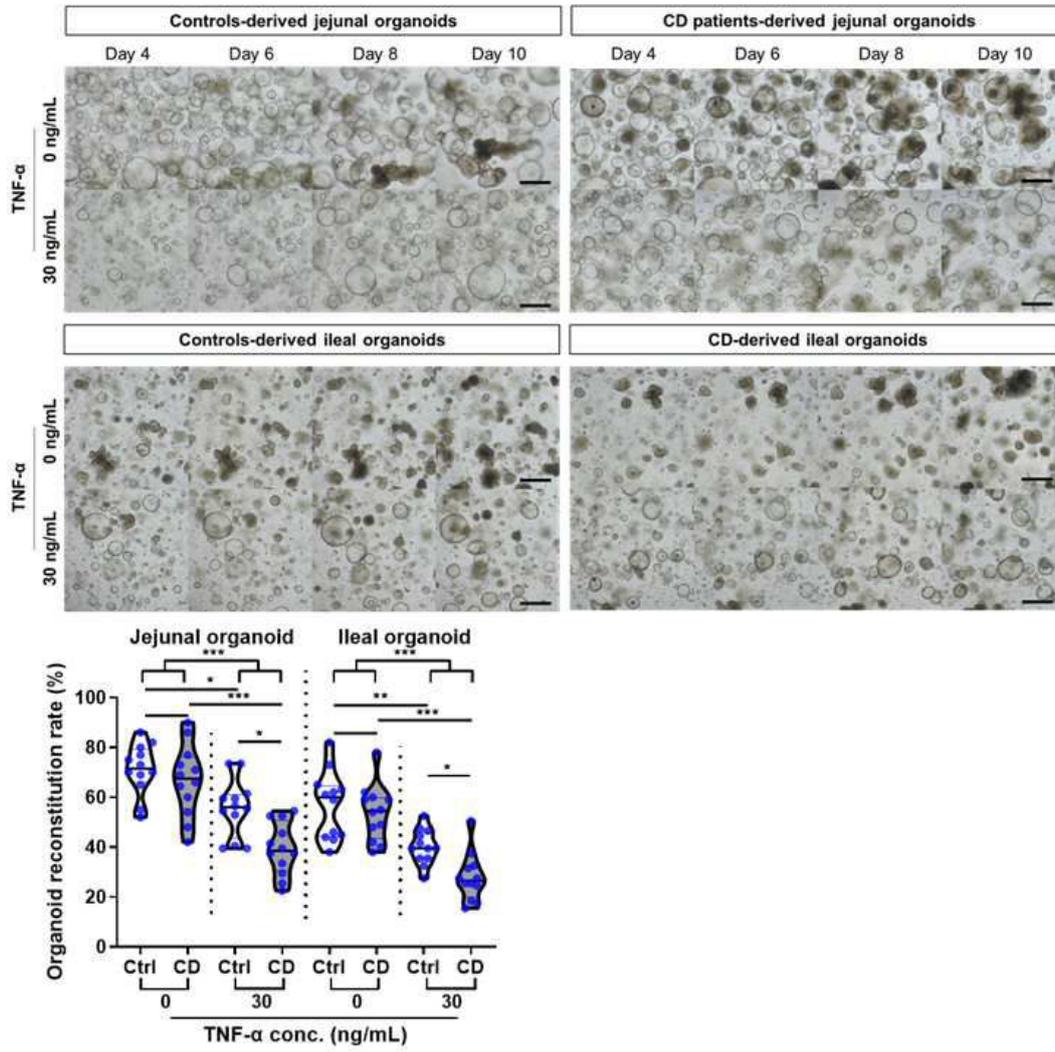


도면3

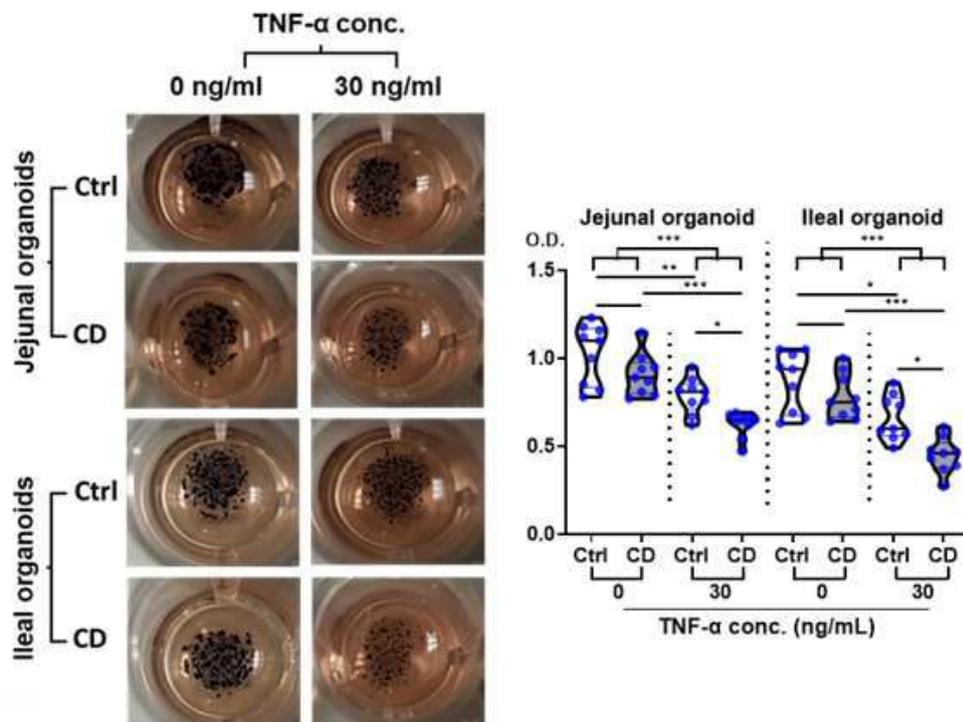


MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; EdU, 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine; H & E, Hematoxylin and Eosin Stain; IHC, Immunohistochemistry; RNA-seq, RNA sequencing; scRNA-seq, single-cell RNA sequencing

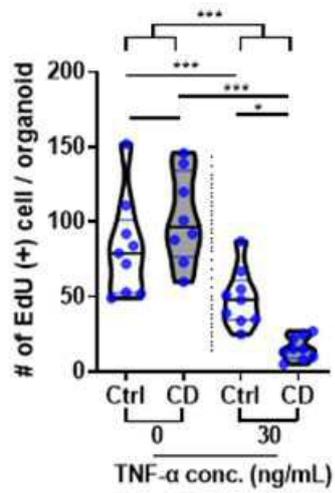
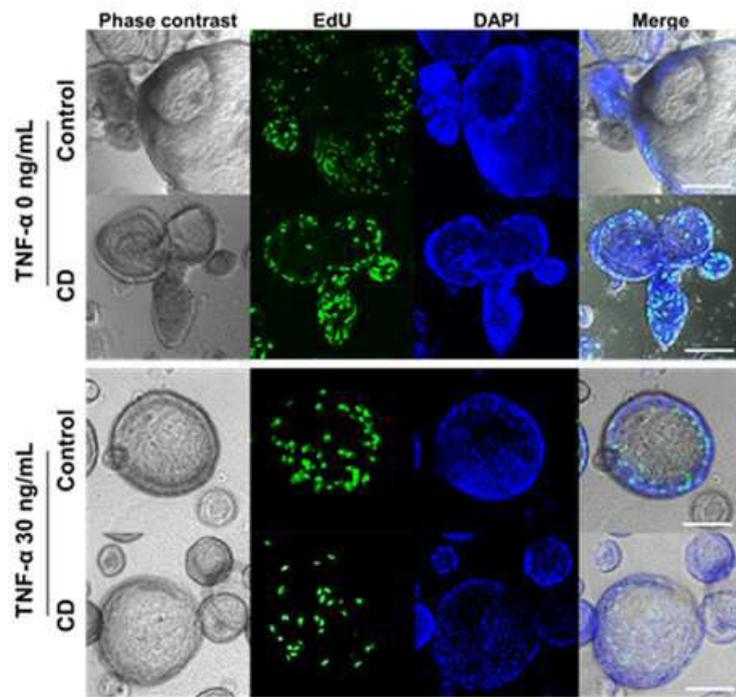
도면4



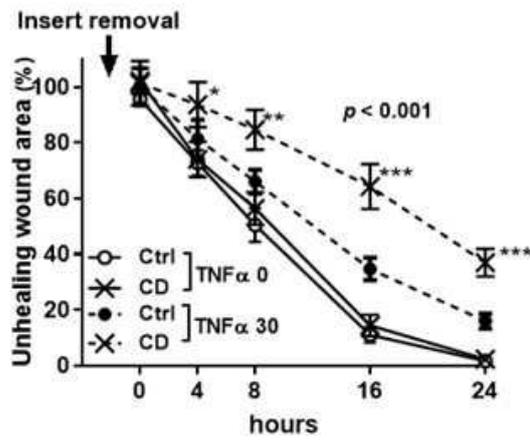
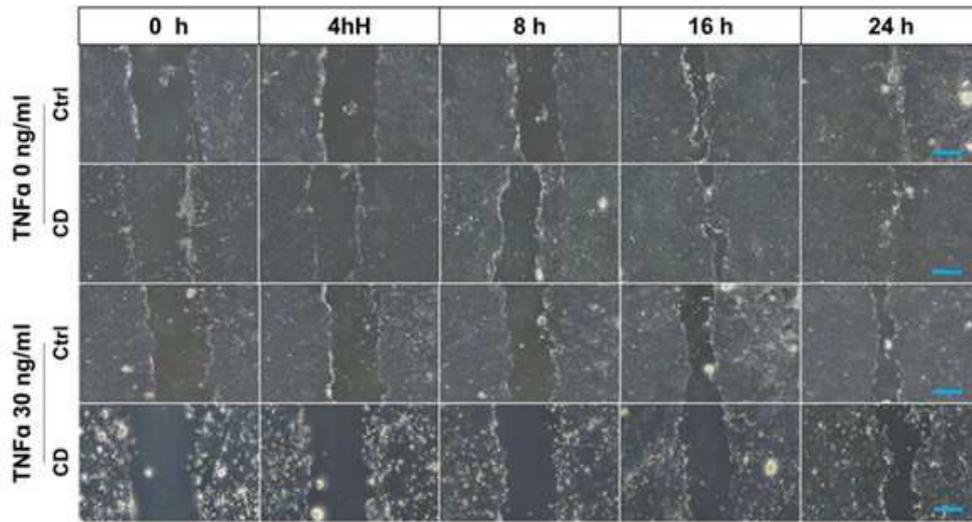
도면5



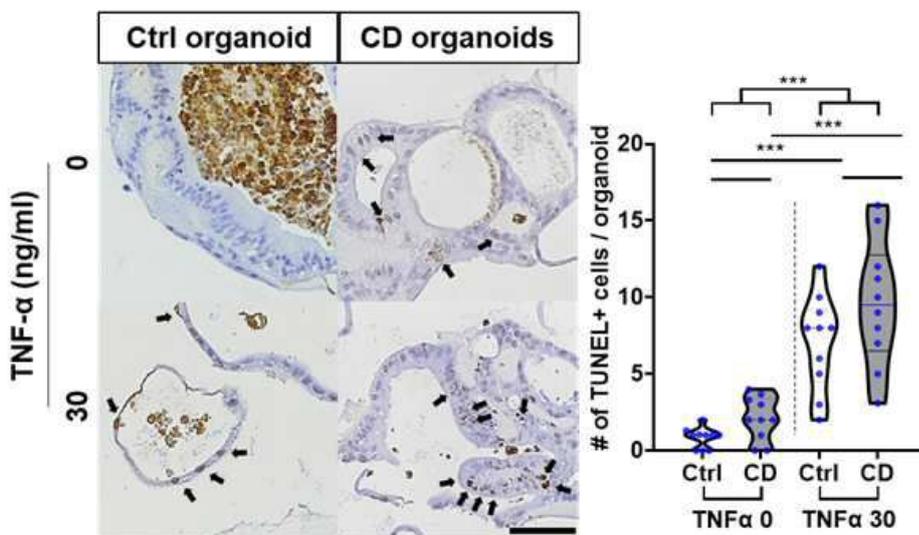
도면6



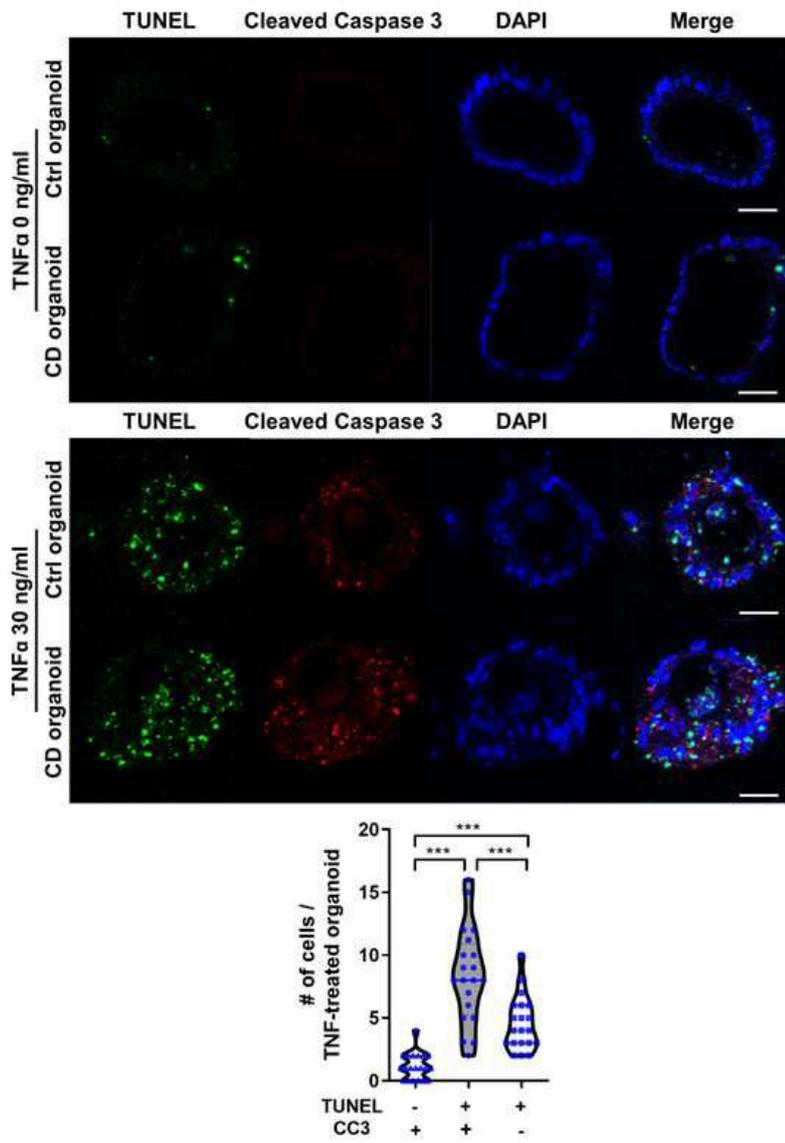
도면7



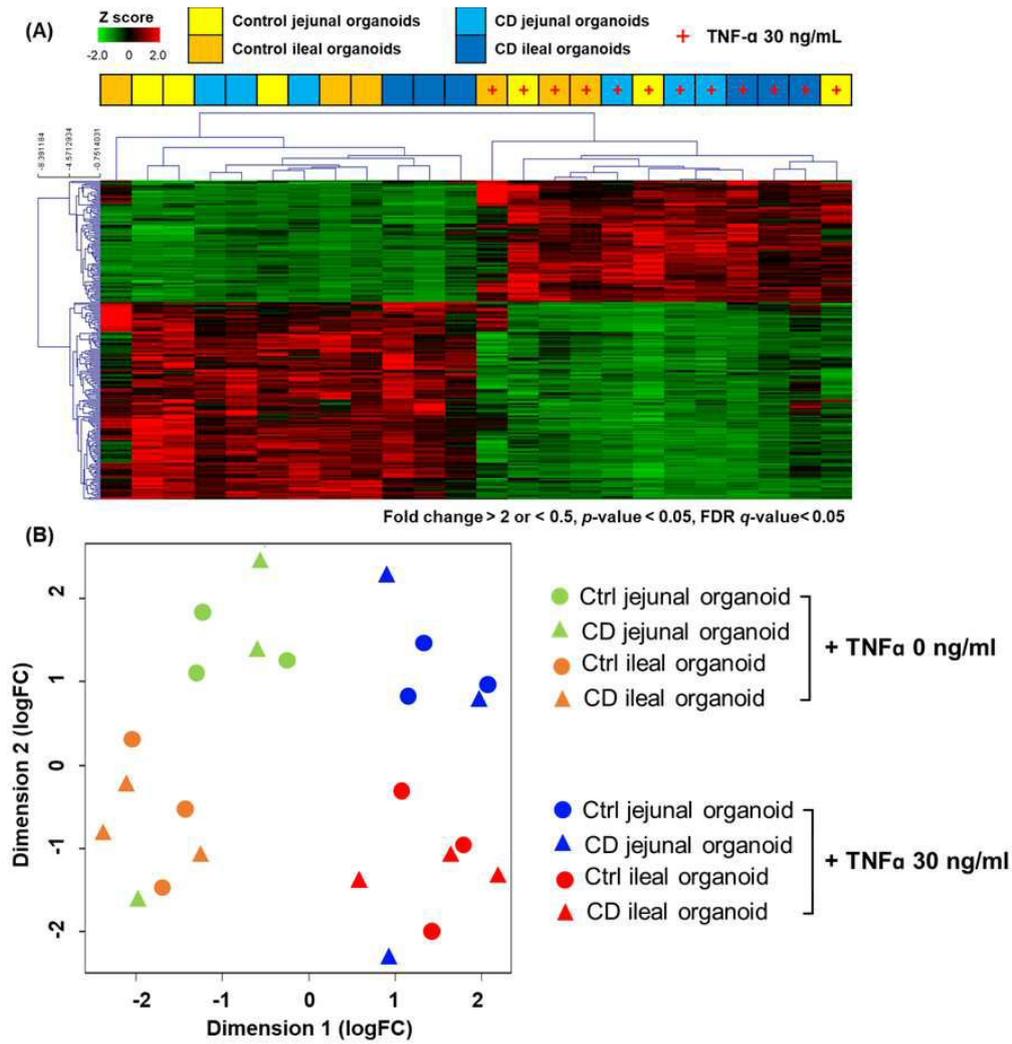
도면8



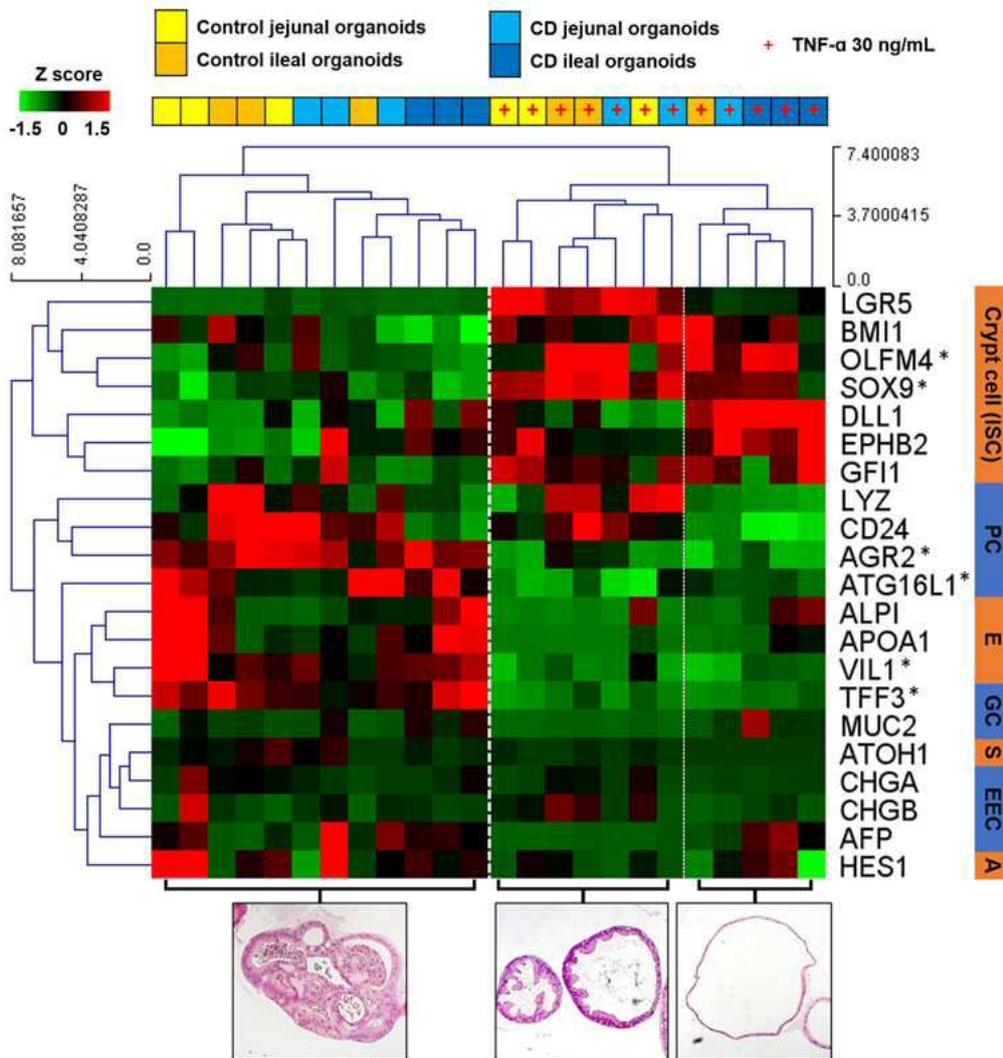
도면9



도면10

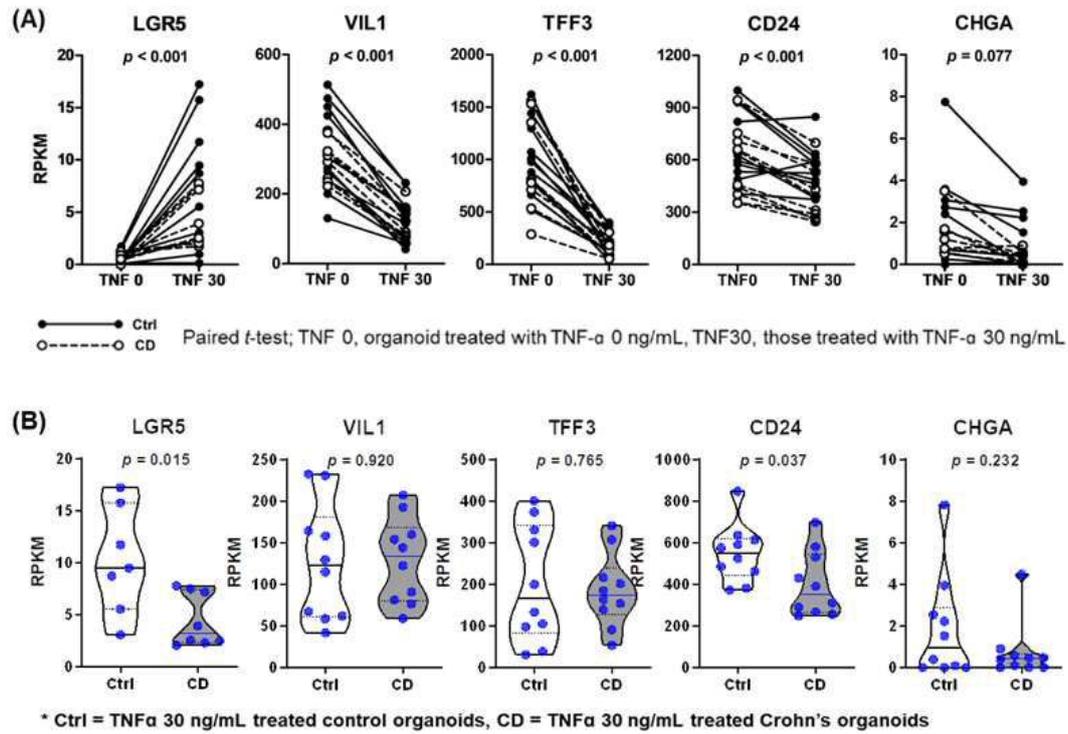


도면11

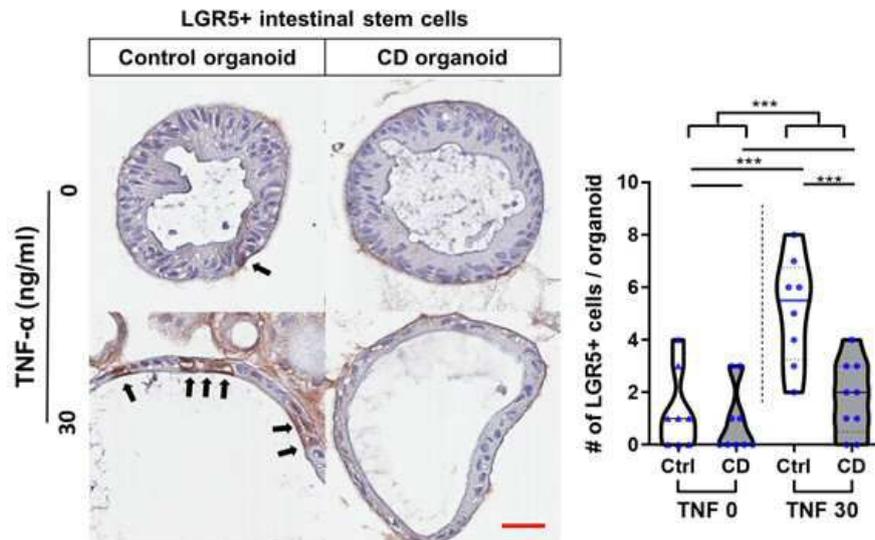


ISC, intestinal stem cell; A, absorptive precursor cell; E, enterocyte; S, secretory precursor cell; GC, goblet cell; PC, Paneth cell; EEC, enteroendocrine cell; * p -value < 0.05, q -value < 0.05

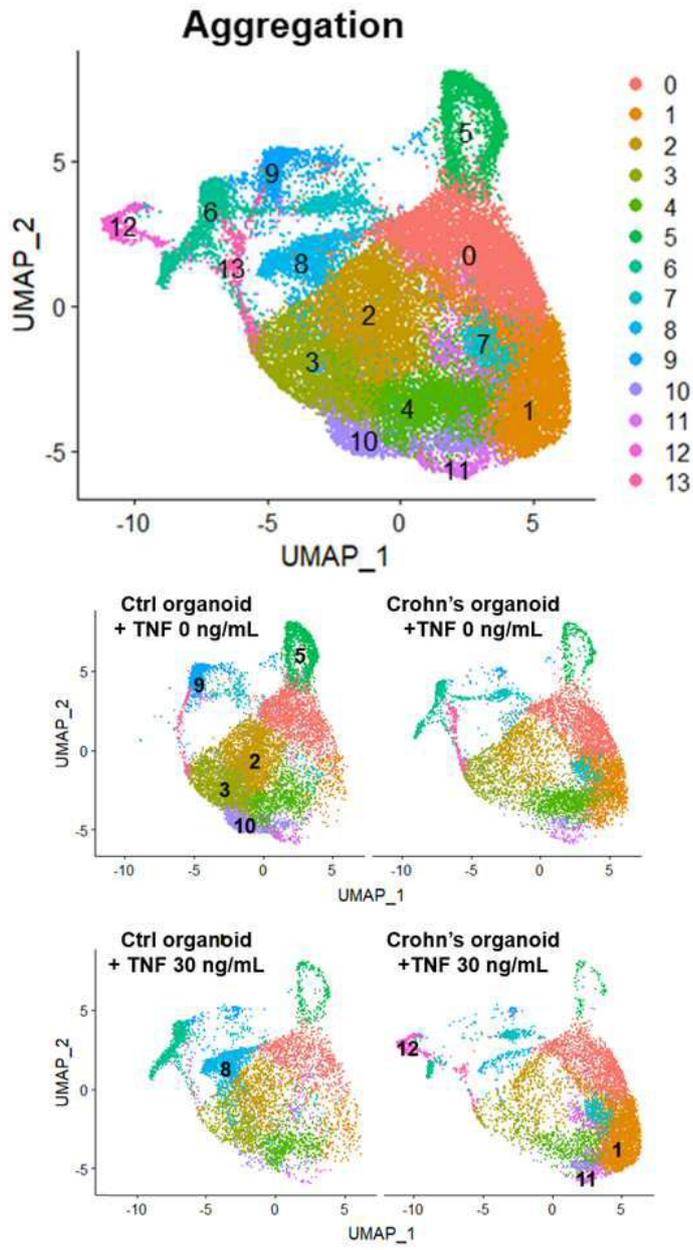
도면12



도면13



도면14



도면15

Min Median Max

TNF α conc (ng/ml)		TNF α 0 ng/ml					TNF α 30 ng/ml			
Organoid type		Ctrl					Ctrl	CD		
Cell Cluster		5	9	3	2	10	8	12	1	11
LGR5+ ISC		0.016	0.002	0.005	0.005	0.016	0.682	0.097	0.066	0.058
rISC	BMI1	0.137	0.138	0.100	0.116	0.182	0.154	0.264	0.271	0.251
	DLL1	0.001	0.000	0.001	0.001	0.003	0.000	0.000	0.003	0.001
	MEX3A	0.011	0.000	0.001	0.002	0.015	0.001	0.007	0.073	0.044
	HOPX	0.003	0.003	0.014	0.022	0.000	0.002	0.000	0.003	0.002
Prog	GFI1	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.002	0.001
	SPDEF	0.062	0.032	0.007	0.025	0.033	0.004	0.027	0.085	0.033
	HES1	2.108	1.332	0.534	1.130	1.084	1.378	2.567	1.706	1.789
EC	VIL1	1.852	2.455	4.314	2.616	2.798	1.616	0.692	0.440	0.988
	ALPI	0.021	0.182	0.899	0.017	0.091	0.011	0.030	0.002	0.008
	APOA1	0.273	2.837	16.862	0.198	0.747	0.016	1.218	0.098	0.123
	APOA4	1.048	11.589	52.926	0.625	5.249	0.046	1.881	0.141	0.473
	APOC3	0.249	2.610	17.929	0.146	0.763	0.027	1.487	0.078	0.114
	SI	0.122	0.671	2.487	0.766	0.716	0.843	0.430	0.020	0.140
GC	MUC2	0.004	0.038	0.002	0.025	0.032	0.001	0.000	0.001	0.003
	TFF3	31.348	114.30	84.921	89.686	46.349	34.743	17.960	40.587	31.965
	CLCA1	0.000	0.040	0.001	0.048	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000
	AGR2	20.735	22.718	15.680	22.041	10.233	5.188	4.949	4.321	6.347
	KLF4	0.397	0.461	0.812	0.493	0.702	0.142	0.346	0.222	0.403
PC	LYZ	28.436	39.196	24.341	41.314	19.836	150.08	25.892	17.003	28.679
	ATG16L1	0.139	0.191	0.166	0.154	0.394	0.079	0.198	0.168	0.147
	REG3G	0.048	0.358	0.075	0.076	0.119	0.005	0.000	0.004	0.027
EEC	CHGA	0.001	0.057	0.003	0.001	0.010	0.000	0.000	0.002	0.000
	SYP	0.023	0.024	0.011	0.010	0.018	0.016	0.022	0.006	0.007

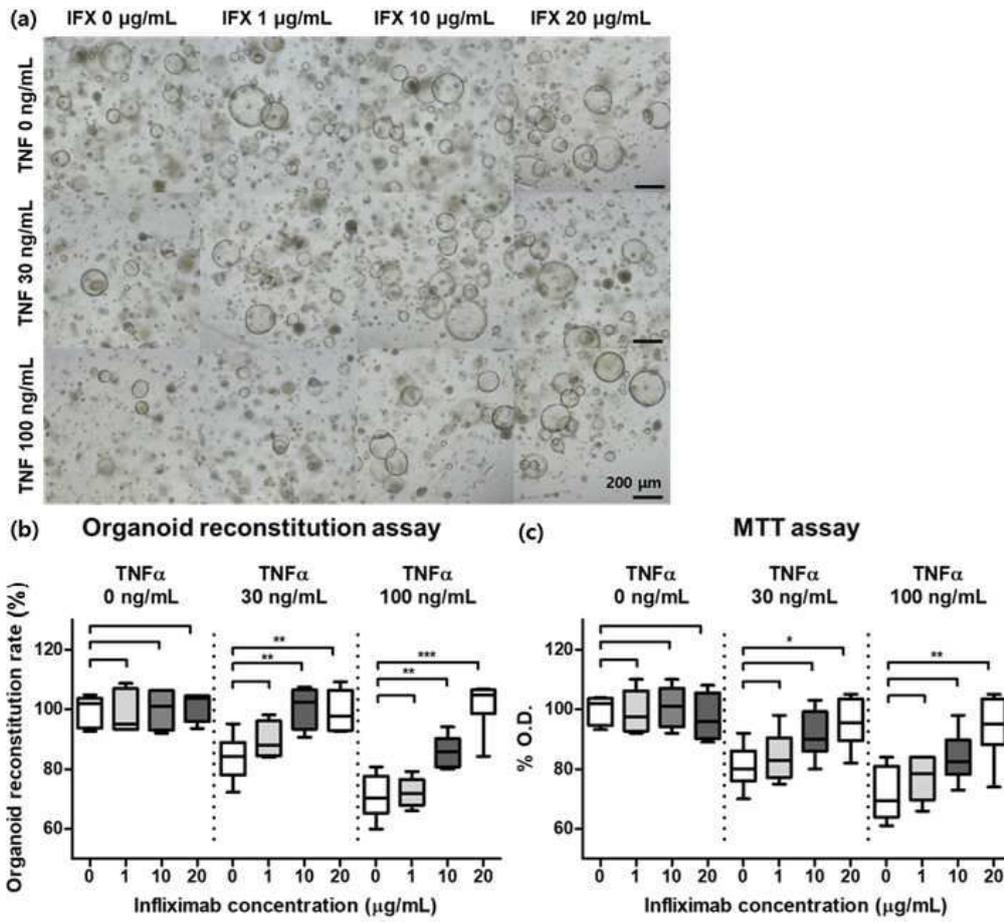
Ctrl, control; CD, Crohn's disease; ISC, intestinal stem cell; Prog, progenitor; EC, enterocyte; GC, goblet cell; PC, Paneth cell; EEC, enteroendocrine cell.

도면16

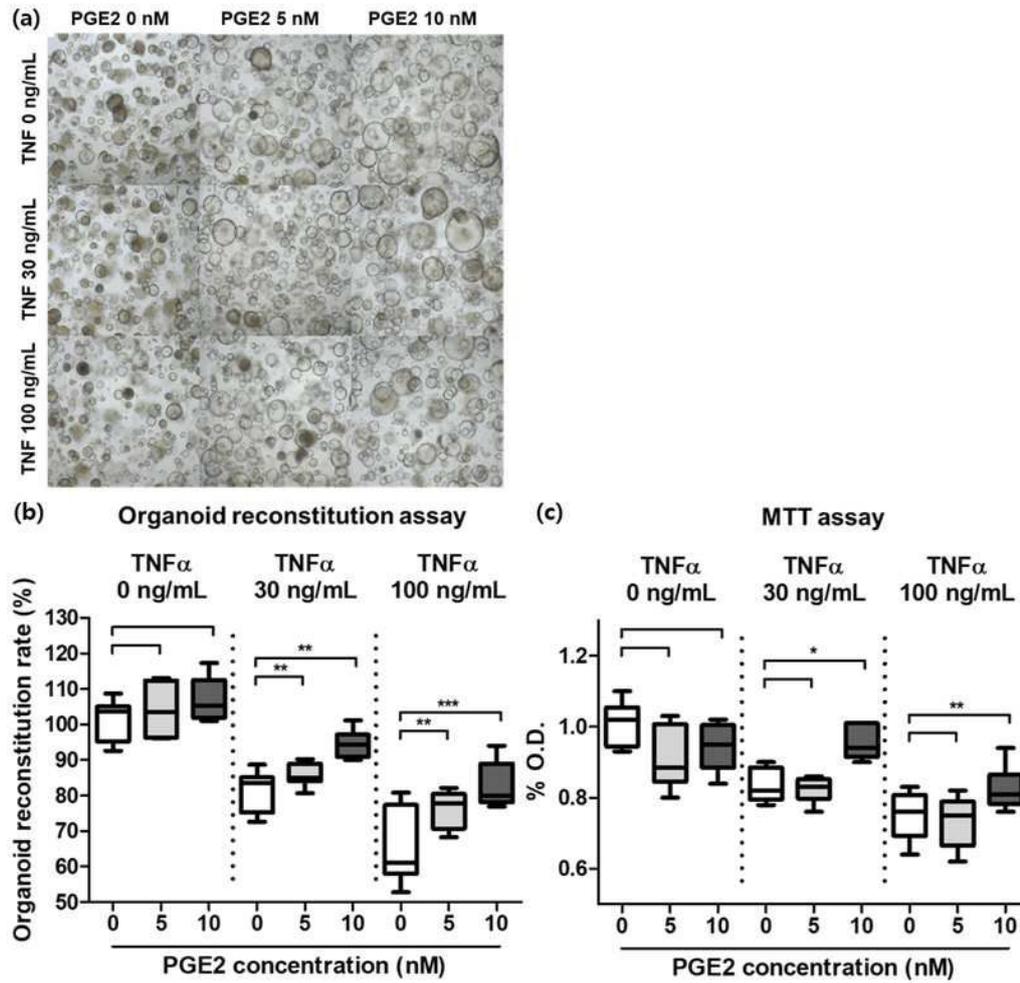
Min Median Max

Organoid type		TNF α 0 ng/ml					TNF α 30 ng/ml								
Cell Cluster		Ctrl					Ctrl	CD			0	6	7	4	13
		5	9	3	2	10	8	12	1	11					
TNFR1:TNFR2		2.708	7.120	7.284	4.266	6.809	1.623	6.032	12.253	4.948	2.970	3.532	6.657	7.678	5.961
TNFRSF1A (TNFR1)		0.475	0.772	1.826	0.792	1.124	0.544	0.850	0.692	0.818	0.481	0.775	0.701	0.966	1.445
TNFRSF1B (TNFR2)		0.175	0.108	0.251	0.186	0.165	0.335	0.141	0.056	0.165	0.162	0.220	0.105	0.126	0.242
TNFR1 Complex I	TRADD	0.214	0.390	0.303	0.323	0.294	0.451	0.420	0.347	0.454	0.297	0.458	0.247	0.377	0.233
	TRAF2	0.127	0.122	0.095	0.098	0.138	0.197	0.425	0.161	0.187	0.112	0.446	0.156	0.143	0.188
	TRAF5	0.061	0.023	0.020	0.035	0.109	0.091	0.268	0.103	0.132	0.067	0.253	0.119	0.042	0.063
	BIRC2	0.350	0.437	0.631	0.485	0.860	0.649	1.171	0.887	1.068	0.458	0.955	0.843	0.763	0.531
Apop-tosis	FADD	0.200	0.162	0.122	0.165	0.141	0.105	0.217	0.231	0.206	0.180	0.144	0.240	0.182	0.184
	RIPK1	0.106	0.137	0.176	0.122	0.244	0.122	0.203	0.128	0.177	0.098	0.189	0.166	0.155	0.162
	CASP8	0.166	0.186	0.138	0.122	0.195	0.128	0.151	0.099	0.171	0.110	0.261	0.081	0.121	0.169
Necrop-tosis	CYLD	0.103	0.137	0.112	0.103	0.216	0.322	0.557	0.319	0.401	0.149	0.331	0.270	0.207	0.215
	RIPK3	0.075	0.24	0.321	0.154	0.277	0.107	0.222	0.088	0.188	0.078	0.214	0.045	0.173	0.287
	MLKL	0.091	0.099	0.043	0.065	0.117	0.111	0.071	0.034	0.108	0.069	0.107	0.019	0.066	0.006
	DNM1L	0.414	0.285	0.206	0.248	0.371	0.303	0.595	0.433	0.439	0.346	0.476	0.384	0.322	0.173
NF-κB	NFKB1	0.474	0.303	0.306	0.403	0.529	1.05	0.652	0.653	0.783	0.483	0.786	0.797	0.500	0.270
	NFKB2	0.144	0.312	0.317	0.271	0.458	0.90	0.646	0.257	0.551	0.251	1.004	0.163	0.336	0.226
	RELA	0.293	0.421	0.366	0.328	0.409	0.316	0.418	0.524	0.610	0.345	0.408	0.537	0.561	0.296
Cox-PGE	PTGS1(Cox1)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.014	0.024	0.007	0.001	0.001	0.000	0.003	0.000	0.000
	PTGS2(Cox2)	0.015	0.000	0.020	0.028	0.019	0.215	0.028	0.024	0.037	0.022	0.067	0.030	0.035	0.000
	PTGES	0.007	0.001	0.002	0.002	0.005	0.046	0.000	0.014	0.019	0.006	0.030	0.012	0.029	0.019

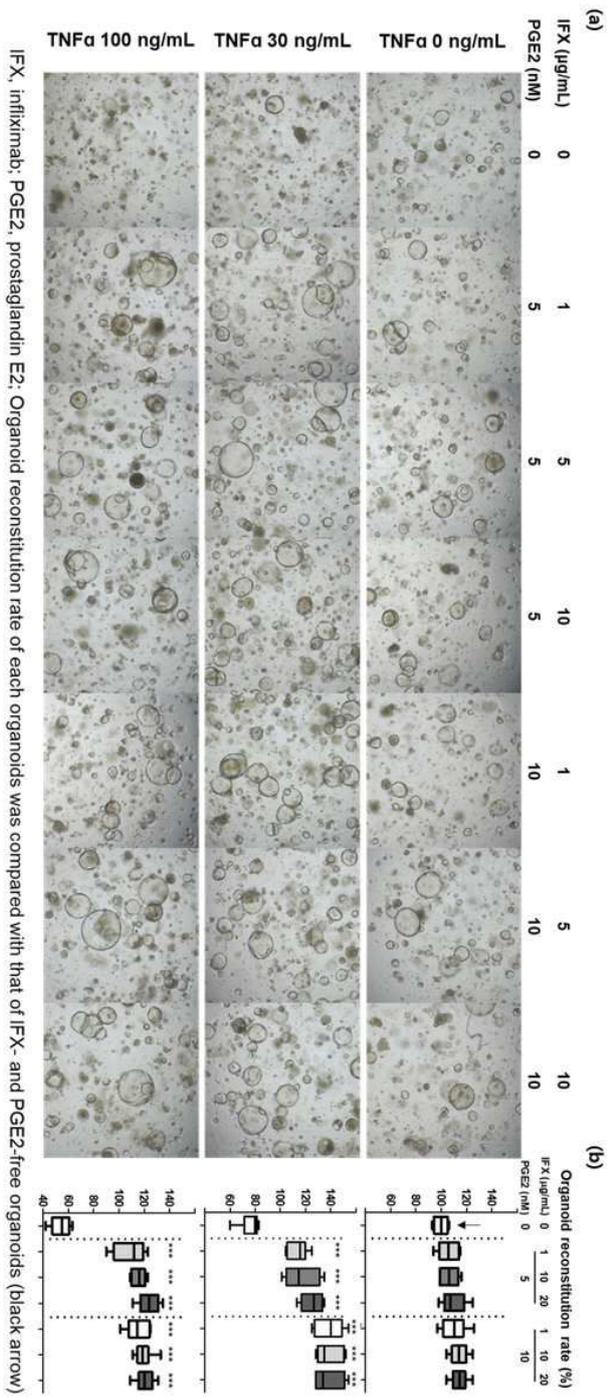
도면17



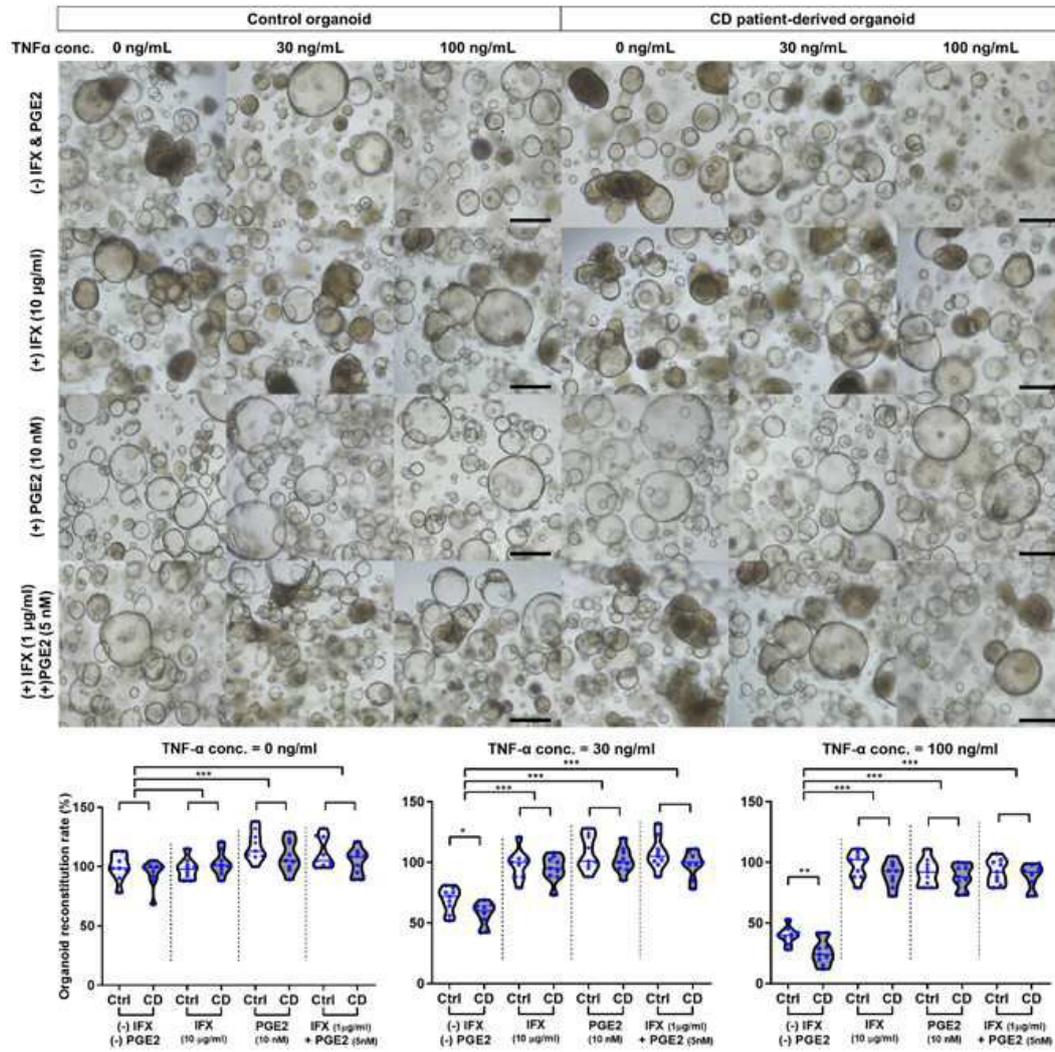
도면18



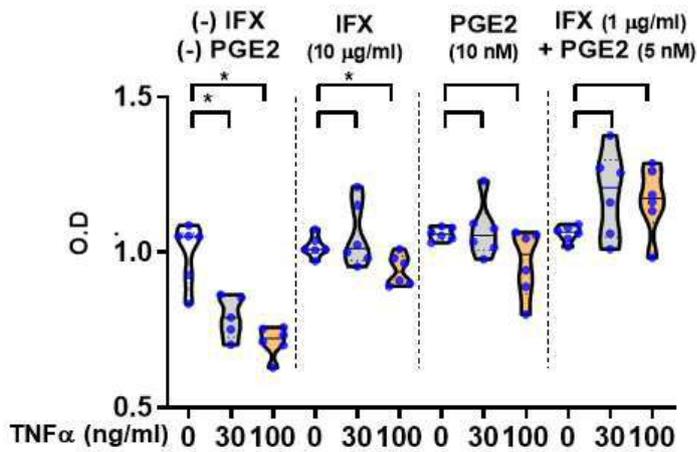
도면19



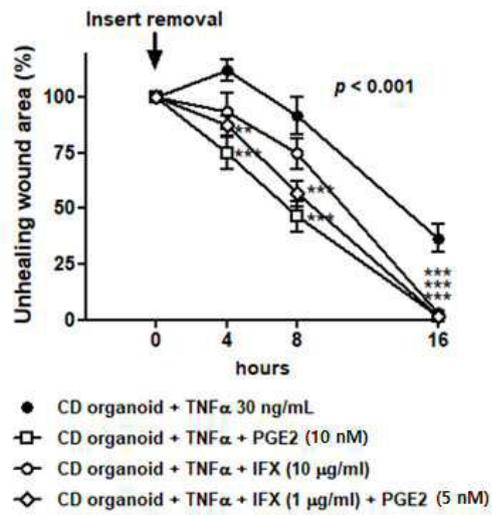
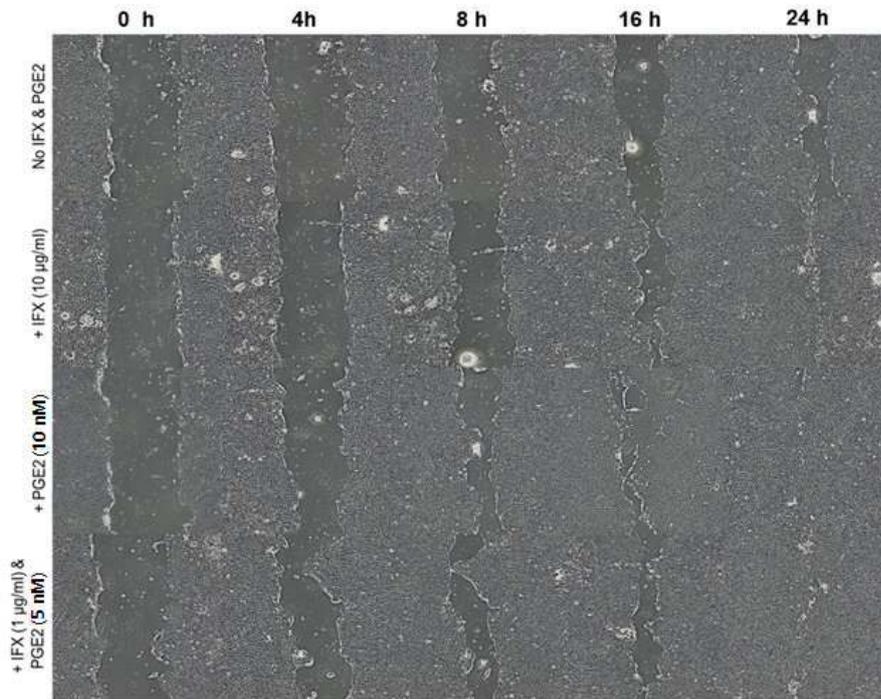
도면20



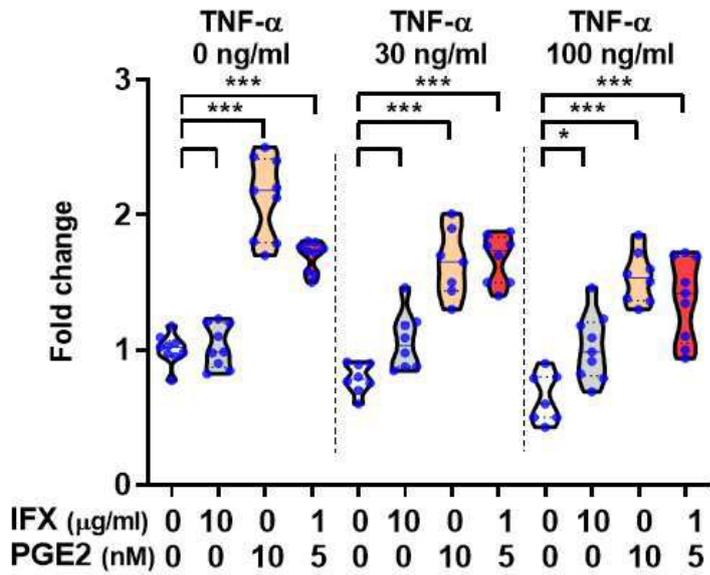
도면21



도면22



도면23



도면24

