



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월06일

(11) 등록번호 10-2236427

(24) 등록일자 2021년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 1/02 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A01N 1/0221 (2013.01)

A01N 1/0284 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0066789

(22) 출원일자 2019년06월05일

심사청구일자 2019년06월05일

(65) 공개번호 10-2020-0140064

(43) 공개일자 2020년12월15일

(56) 선행기술조사문헌

WO2017010544 A1*

WO2018218344 A1*

KR1020180023640 A

KR1020170027831 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

주식회사 마이크로바이오틱스

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 221호(신촌동, 연세대학교의과대학 임상의학연구센터)

(72) 발명자

박철순

충청북도 충주시 신호5길 1

용동은

서울특별시 강남구 언주로30길 13, 대림아크로빌 A705

(74) 대리인

이재영

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 이경철

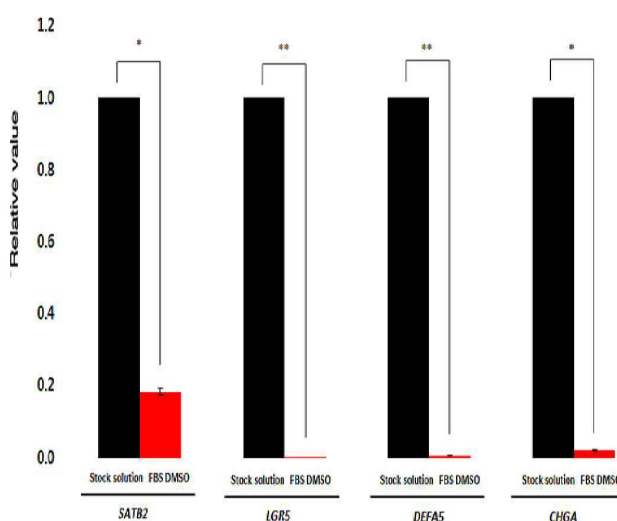
(54) 발명의 명칭 오가노이드의 동결 보존용 조성물

(57) 요약

본 발명은 오가노이드의 장기간 냉동 동결을 가능하게 하는 동결 보존용 조성물과 이를 이용한 오가노이드의 동결 보존 방법에 관한 것이다.

본 발명의 동결 보존용 조성물을 이용하는 경우 오가노이드를 장기간 동결 보존 후 해동 시 세포 생존율을 높게 유지할 수 있고, 오가노이드의 형태학적 또는 생물학적 특성이 그대로 유지될 수 있다. 따라서, 본 발명에 적용된 고효율 냉동동결보존법은 오가노이드 기반 치료(organoid-based therapy)에 필수적인 많은 양의 세포를 제공함으로써 효과적인 장 질환과 손상 치료에 적용에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0697 (2013.01)

C12N 2501/105 (2013.01)

C12N 2501/11 (2013.01)

C12N 2501/115 (2013.01)

C12N 2501/155 (2013.01)

C12N 2501/415 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

골 형성 단백질(Bone morphogenetic protein, BMP); Wnt 신호 활성화자(Wnt signaling activator); 및 성장 인자(growth factor)를 포함하고,

상기 골 형성 단백질은 BMP4이고,

상기 Wnt 신호 활성화자는 CHIR99021이며,

상기 성장 인자는 상피세포 성장 인자(epidermal growth factor; EGF) 및 인슐린-유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1; IGF-1)를 포함하는, 오가노이드의 동결 보존용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 동결 보존용 조성물은 소 태아 혈청(Fetal bovine serum; FBS)을 더 포함하는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 동결 보존용 조성물은 용매를 더 포함하는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 골 형성 단백질은 1 내지 50 ng/ml의 양으로 포함되는, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 Wnt 신호 활성화자는 0.1 내지 10 μ M의 양으로 포함되는, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 성장 인자는 100 내지 1500 ng/ml의 양으로 포함되는, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 골 형성 단백질과 상기 성장 인자는 1: 10 내지 100의 중량비의 양으로 포함되는, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 오가노이드는 다분화성 줄기세포로부터 유래한 오가노이드 (PSC-derived organiod), 또는 성체 줄기세포로부터 유래한 오가노이드 (adSC-derived organoid)인, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 오가노이드는 위 오가노이드, 소장 오가노이드, 대장 오가노이드, 간 오가노이드, 갑상선 오가노이드, 폐 오가노이드, 또는 뇌 오가노이드인, 조성물.

청구항 13

제1항 및 제5항 내지 제12항 중 어느 한 항의 동결 보존용 조성물을 이용한 오가노이드의 동결 보존 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 동결 보존 방법은 상기 동결 보존용 조성물에 오가노이드를 첨가하는 단계; 및 상기 오가노이드를 동결 보존하는 단계를 포함하는, 동결 보존 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 오가노이드의 장기간 냉동 동결을 가능하게 하는 동결 보존용 조성물과 이를 이용한 오가노이드의 동결 보존 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오가노이드(organoid)는 장기 유사체로서, 줄기세포나 장기 기원세포로부터 분리한 세포를 3D 배양을 통해 다시 응집·재조합하여 만든 조직 또는 기관의 형태와 기능 모두를 재현하는 작은 배양체를 의미한다. 이러한 오가노이드는 기관 또는 조직을 구성하는 여러 특이적 세포 집단들을 포함하고 있고, 실제 조직 또는 기관과 유사한 형태 및 구조적 조직화가 이루어져 있으며, 각 기관이 가지는 특수한 기능을 재현할 수 있다. 오가노이드는 공통적인 일련의 과정에 의해 형성되는데, 기능이 같은 세포들끼리 뭉쳐 적절한 위치로 배치되며, 세포들의 구획이 분리된 후에는 더욱 세부적인 분화가 일어난다. 이를 계통 특성화(lineage specification)라고 하며, 실제 기능을 수행할 수 있도록 전구체가 완전한 성체 세포로 분화되는 것이다.

[0003] 효과적인 오가노이드 대량 배양 기술의 개발은 다양한 응용 분야로 접목되어 질병 모델링, 약물 효력 테스트, 장기 대체 치료법(organ replacement) 등에 활용될 수 있다. 오가노이드는 맞춤형 의료(personalized medicine)의 강력한 모델로, 2차원에서 만든 세포 조직보다 신약의 안전성과 효능을 시험하는데 더욱 효과적이며, 환자 또는 개인별로 가장 적절한 약물을 선택하도록 도와줄 수 있을 것으로 기대되고 있다. 또한, 치료 용도로 활용되어 질환으로 손상되거나 제대로 발달하지 못한 장기에 오가노이드를 이식해 상태를 개선할 수 있다. 이러한 오가노이드의 제작 기술은 이론적으로는 줄기세포만으로 거의 모든 종류의 장기를 제작 가능한 것으로 알려져 있고, 따라서 다양한 질병에 이용 가능할 것으로 기대되어 최근 재생의학 분야에서 관련 연구가 더욱 활발해지는 추세이다.

[0004] 이에 장 질병 및 장 손상에 대한 오가노이드 기반 치료(organoid-based therapy)를 위한 많은 양의 세포 획득을 가능하게 하는 효율적인 장기 냉동 동결보존법 (long-term cryopreservation)이 필요함에도 이에 대한 연구는 아직 미흡한 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 일 목적은 오가노이드의 장기간 냉동 동결을 가능하게 하는 동결 보존용 조성물을 제공하고자 한다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에서 제공하는 보존용 조성물을 이용하여 오가노이드의 동결 보존 방법을 제공하고자 한다.
- [0007] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 골 형성 단백질(Bone morphogenetic protein, BMP); Wnt 신호 활성화자(Wnt signaling activator); 및 성장 인자(growth factor) 중 적어도 하나를 포함하는, 오가노이드의 동결 보존용 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명에서 상기 "오가노이드(Organoid)"는 줄기세포나 장기 기원 세포로부터 분리한 세포를 3D 배양법으로 다시 응집·재조합하여 만들어진 세포 집합체를 의미하는 것으로, 서스펜션 세포 배양물로부터 형성된 오가노이드 또는 세포 클러스터를 포함할 수 있다. 상기 오가노이드는 소형 유사 장기, 장기 유사체, 유사 장기로도 명명될 수 있다. 상기 오가노이드는 구체적으로 기관 또는 조직을 구성하는 여러 종류의 세포들 중 하나 이상의 세포 종류를 포함하며, 조직 또는 기관의 형태와 기능을 재현할 수 있어야 한다.
- [0010] 본 발명에서 상기 골 형성 단백질로는 BMP 패밀리를 포함하는 한 구체적인 종류를 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들어 BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP9 및 BMP10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 BMP4일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0011] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성화자는 CHIR99021, BIO((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime), BIO-아세톡심((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-acetoxime), 3F8(5-Ethyl-7,8-dimethoxy-H-pyrrolo[3,4-c]isoquinoline-1,3(2H)-dione), A070722(1-(7-Methoxyquinoiin-4-yl)-3-[6-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea), AR-A014418(N-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-N'-(5-nitro-2-thiazolyl)urea), SB216763(3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione), SB415286(3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione), TC-G24(N-(3-Chloro-4-methylphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyl)phenyl]-5-benzofuranyl]-1,3,4-oxadiazole) 및 TWS119(3-[[6-(3-Aminophenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]oxyphenol ditrifluoroacetate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 CHIR99021일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0012] 본 발명에서 상기 성장 인자는 염기성 섬유아세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor; bFGF), 상피세포 성장 인자(epidermal growth factor; EGF) 및 인슐린-유사 성장 인자-1(Insulin-like growth factor-1; IGF-1)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 상피세포 성장 인자 및 인슐린-유사 성장 인자-1 중 적어도 하나를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 본 발명의 동결 보존용 조성물은 소 태아 혈청(Fetal bovine serum; FBS)을 더 포함할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 동결 보존용 조성물은 용매를 더 포함할 수 있다. 이때 상기 용매는 디메틸 술폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO), 글리세롤(glycerol), 1,2-프로판-디올(1,2-propane-diol), 메탄올(methanol), 글루코스(glucose), 프롤린(proline) 및 에틸렌 글리콜(ethylene glycol; EG)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 디메틸 술폭사이드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명에서 상기 골 형성 단백질은 1 내지 50 ng/ml, 1 내지 30 ng/ml, 5 내지 20 ng/ml 또는 5 내지 15 ng/ml의 양으로 포함될 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성화자는 0.1 내지 10 μ M, 0.5 내지 8 μ M, 1 내지 5 μ M 또는 2 내지 4 μ M의 양으로 포함될 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 성장 인자는 100 내지 1500 ng/ml, 100 내지 1000 ng/ml, 300 내지 800 ng/ml 또는 500 내지 700 ng/ml의 양으로 포함될 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 소 태아 혈청은 1 내지 20 중량%, 5 내지 15 중량% 또는 8 내지 12 중량%의 양으로 포함될 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 골 형성 단백질과 상기 성장 인자는 1: 10 내지 100, 1: 20 내지 80, 또는 1: 30 내지 70의

중량비의 양으로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0020] 단, 본 발명의 동결 보존용 조성물은 섬유아세포 성장 인자 4(Fibroblast growth factor 4; FGF-4)를 포함하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명에서 상기 오가노이드는 다분화성 줄기세포로부터 유래한 오가노이드 (PSC-derived organoid), 또는 성체 줄기세포로부터 유래한 오가노이드 (adSC-derived organoid)일 수 있다. 상기 다분화성 줄기세포는 배아줄기세포 또는 역분화 줄기세포일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 오가노이드는 예를 들면, 위 오가노이드, 소장 오가노이드, 대장 오가노이드, 간 오가노이드, 갑상선 오가노이드, 폐 오가노이드, 또는 뇌 오가노이드 등일 수 있고, 바람직하게는 대장 오가노이드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 오가노이드의 동결 보존용 조성물을 이용한 오가노이드의 동결 보존 방법에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 동결 보존 방법은 본 발명의 동결 보존용 조성물에 오가노이드를 첨가하는 단계; 및 상기 오가노이드를 동결 보존하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 동결 보존은 -70℃ 내지 -90℃의 온도에서, 6 시간 내지 72 시간 동안 1차로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 또한, 본 발명에서 상기 동결 보존은 -150℃ 이하, 바람직하게는 -150 내지 -300℃, 또는 -196 내지 -300℃의 온도에서, 6 시간 내지 24 개월, 바람직하게는 1 개월 내지 24 개월 동안 2차로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에서 상기 오가노이드는 다분화성 줄기세포로부터 유래한 오가노이드 (PSC-derived organoid), 또는 성체 줄기세포로부터 유래한 오가노이드 (adSC-derived organoid)일 수 있다. 상기 다분화성 줄기세포는 배아줄기세포 또는 역분화 줄기세포일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 상기 오가노이드는 예를 들면, 위 오가노이드, 소장 오가노이드, 대장 오가노이드, 간 오가노이드, 갑상선 오가노이드, 폐 오가노이드, 또는 뇌 오가노이드 등일 수 있고, 바람직하게는 대장 오가노이드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 동결 보존용 조성물을 이용하는 경우 오가노이드를 장기간 동결 보존 후 해동 시 세포 생존율을 높게 유지할 수 있고, 오가노이드의 형태학적 또는 생물학적 특성이 그대로 유지될 수 있다. 따라서, 본 발명에 적용된 고효율 냉동 동결 보존법은 오가노이드 기반 치료(organoid-based therapy)에 필수적인 많은 양의 세포를 제공함으로써 효과적인 장 질병과 손상 치료에 적용에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 본 발명의 실시예 1에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물 또는 비교예 1의 동결 보존용 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 SATB2, LGR5, DEFA5 및 CHGA의 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 1의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 제조예 1의 조성물을 이용한 결과를 나타내고, 오른쪽 열은 비교예 1의 조성물을 이용한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 1에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물 또는 비교예 1의 동결 보존용 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 MUC2 및 VIL의 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 2의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 제조예 1의 조성물을 이용한 결과를 나타내고, 오른쪽 열은 비교예 1의 조성물을 이용한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예 2에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물 또는 비교예 2의 동결 보존용 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 SATB2 및 LGR5의 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 3의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 제조예 1의 조성물을 이용한 결과를 나타내고, 오른쪽 열은 비교예 2의 조성물을 이용한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 실시예 3에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물 또는 비교예 3의 동결 보존용 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 SATB2, MUC3 및 VIL의 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 4의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 비교예 3의 조성물을 이용한 결과를 나타내고, 오른쪽 열은 제조예 1의 조성물을 이용한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 실시예 3에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물 또는 비교예 3의 동결 보존용 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 LGR5 및 DEFA5의 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 5의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 비교예 3의 조성물을 이용한 결과를 나타내고, 오른쪽 열은 제조예 1의 조성물을 이용한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 실시예 3에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물 또는 비교예 3의 동결 보존용 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 CHGA의 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 6의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 비교예 3의 조성물을 이용한 결과를 나타내고, 오른쪽 열은 제조예 1의 조성물을 이용한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 실시예 4에서 대장 오가노이드의 동결 건조 전(before stock)과, 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물 또는 비교예 2의 동결 보존용 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동한 후(after stock) 대장 오가노이드를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 실시예 5에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 면역 형광 염색을 이용하여 CHGA 마커의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 실시예 5에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 면역 형광 염색을 이용하여 DEFA5 마커의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 실시예 5에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 면역 형광 염색을 이용하여 MUC4 마커의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 실시예 5에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 면역 형광 염색을 이용하여 SATB2 마커의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 실시예 5에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 면역 형광 염색을 이용하여 VIL 마커의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 실시예 6에서 본 발명에 따른 동결 보존용 조성물인 제조예 1의 조성물 또는 비교예 1, 2 및 4의 동결 건조용 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존한 뒤 해동 및 배양한 후 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0034] 실시예

[0036] [제조예 1] 오가노이드의 동결 보존용 조성물의 제조

[0037] 오가노이드의 동결 보존용 조성물의 제조하기 위하여 소 태아 혈청(FBS)을 10 중량%로 포함하는 DMSO에, IGF-1 500 ng/ml를 첨가하고, BMP4 10 ng/ml, EGF 100 ng/ml 및 CHIR-99021 3 μ M을 첨가하였다.

[0039] [비교예 1] 오가노이드의 동결 보존용 조성물의 제조

[0040] 본 발명에 따른 오가노이드의 동결 보존용 조성물의 효과를 비교하기 위하여, 비교예 1로서 소 태아 혈청(FBS)을 10 중량%로 포함하는 DMSO를 동결 보존용 조성물로 준비하였다.

- [0042] [비교예 2] 오가노이드의 동결 보존용 조성물의 제조
- [0043] 본 발명에 따른 오가노이드의 동결 보존용 조성물의 효과를 비교하기 위하여, 비교예 2로서 소 태아 혈청(FBS)을 10 중량%로 포함하는 DMSO에 Y-27632 10 μ M을 첨가하여 동결 보존용 조성물로 준비하였다.
- [0045] [비교예 3] 오가노이드의 동결 보존용 조성물의 제조
- [0046] 본 발명에 따른 오가노이드의 동결 보존용 조성물에 FGF-4 500ug/ml를 추가로 첨가하여 동결 보존용 조성물로 준비하였다.
- [0048] [비교예 4] 오가노이드의 동결 보존용 조성물의 제조
- [0049] 오가노이드의 동결 보존용 조성물의 제조하기 위하여 소 태아 혈청(FBS)을 10 중량%로 포함하는 DMSO에, BMP4 10 ng/ml, EGF 100 ng/ml 및 CHIR-99021 3 μ M을 첨가하여 동결 보존용 조성물을 준비하였다.
- [0051] [실시예 1]
- [0052] 대장 오가노이드(Intestinal Organoid)를 1ml의 제조예 1 또는 비교예 1의 동결 보존용 조성물을 넣어 동결보존 용기에 담고 이를 동결 저장장치(freezing container)로 옮긴 후, -80℃에서 18시간 이상 보관하였다. 이후, 상기 오가노이드가 포함된 동결보존용기를 액체질소탱크에 담가 1개월 이상 장기 보존하였다. 장기간 냉동보존된 오가노이드를 해동시켜 배양하기 위해서 각각을 37℃ 항온수조에서 해동 후, BMP4, EGF, CHIR99021 및 B27 보충제를 포함하는 DMEM F/12 배양 배지 2ml를 첨가하여 조심스럽게 세정하였다. 원심분리를 통해서, 오가노이드를 분리하고, 이를 Matrigel® Matrix (Corning)에 넣어준 후 분주하고 상기 배양 배지를 첨가하여 배양하였다. 이렇게 배양된 오가노이드에서 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 qRT-PCR을 통해 대장 특이적 마커인 SATB2와, 그 외의 상피 세포 또는 대장 성체 줄기세포의 마커인 LGR5, DEFA5, CHGA, MUC2 및 VIL의 mRNA의 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 1 및 2에 나타내었다.

표 1

유전자	정방향	역방향
SATB2	CCA CCT TCC CAG CTT GAT T	TTA GCC AGC TGG TGG AGA CT
LGR5	CAG GGT CTT CAC CTC CTA CC	TGG GAA TGT ATG TCA GAG CG
DEFA5	ACC CAG AAG CAG TCT GGG GAA GA	GGT GGC TCT TGC CTG AGA ACC TGA
CHGA	CGG TTT TGA AGA TGA ACT CTC AG	GCT CTT CCA CCG CCT CTT
MUC2	TGT AGG CAT CGC TCT TCT CA	GAC ACC ATC TAC CTC ACC CG
VIL	TAG CTG TGG TTG TAA AGC AGT ACC	GGT ATC ATC TTT CTG AAG GAA TAG G

- [0056] 도 1 및 2에서 보는 바와 같이, 소 태아 혈청(FBS)만을 포함하는 DMSO를 동결 보존용 조성물로 사용한 경우 오가노이드의 장기간 냉동 보존 후 해동 및 배양되었을 때 대장 특이적 마커인 SATB2와, 그 외의 상피 세포 또는 대장 성체 줄기세포의 마커인 LGR5, DEFA5, CHGA, MUC2 및 VIL가 거의 발현되지 않는 것을 볼 수 있었으나, 본 발명에 따르는 동결 보존용 조성물을 사용한 경우 장기간 냉동 보존 후 해동 및 배양된 오가노이드에서 상기 SATB2, LGR5, DEFA5, CHGA, MUC2 및 VIL의 마커의 발현이 매우 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다.
- [0058] [실시예 2]
- [0059] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, 비교예로 비교예 1 대신 비교예 2의 동결 보존용 조성물을 사용하였다. 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존 후 해동 및 배양한 뒤 상기 표 1의 프라이머를 이용하여 SATB2 및 LGR5 마커의 mRNA의 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0060] 도 3에서 보는 바와 같이, 대장 오가노이드의 장기간 냉동 보존 시 비교예 2의 소 태아 혈청(FBS)을 포함하는 DMSO에 Y-27632를 첨가한 동결 보존용 조성물을 사용한 경우와 비교하여 본 발명에 따르는 동결 보존용 조성물을 사용한 경우 해동 및 배양된 오가노이드에서 대장 특이적 마커인 SATB2와 대장의 상피세포를 지속 갱신해주는 마커인 LGR5의 발현이 현저히 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다.
- [0062] [실시예 3]
- [0063] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, 비교예로 비교예 1 대신 비교예 3의 동결 보존용 조성물을 사용하였다. 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존 후 해동 및 배양한 뒤 상기 표 1 및 하기 표 2의 프라이머를 이용하여 qRT-PCR을 통해 SATB2, MUC3, VIL, LGR5, DEFA5 및 CHGA 마커의 mRNA의 발현 수준을 측정하여 그 결

과를 도 4 내지 6에 나타내었다.

표 2

[0065]

유전자	정방향	역방향
MUC3	CCT CAT TGC AAA CTT CAC TC	AGC CCA CAT TTT CTG TAC TG

[0067]

도 4 내지 6에서 보는 바와 같이, 대장 오가노이드의 장기간 동결 보존 시 FGF-4를 포함하지 않는 본 발명에 따르는 동결 보존용 조성물을 사용한 경우 해동 및 배양되었을 때 SATB2, MUC3, VIL, LGR5, DEFA5 및 CHGA의 마커가 모두 매우 높은 수준으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 그런데 대장 오가노이드의 배양에 도움을 준다고 알려진 성분인 FGF-4를 본 발명에 따르는 동결 보존용 조성물에 첨가하여 사용하자 대장 오가노이드의 해동 및 배양 시 SATB2, MUC3, VIL, LGR5, DEFA5 및 CHGA 마커가 모두 거의 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0069]

[실시예 4]

[0070]

상기 실시예 2와 동일한 방법으로 실험을 수행하되, 대장 오가노이드의 동결 건조 전, 그리고 장기간 냉동 보존 후 해동한 뒤 상기 대장 오가노이드를 현미경으로 관찰하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0071]

도 7에서 보는 바와 같이, 비교예 2의 동결 보존용 조성물을 이용하여 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존시킨 뒤 해동한 경우에는 상피 세포의 구조가 동결 건조 이전에 비하여 약화되었지만, 본 발명에 따르는 동결 보존용 조성물을 사용하여 상기 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존시킨 경우 해동하여도 대장 오가노이드의 구조에 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 이는 앞선 실시예 2에서와 같이 대장 오가노이드의 장기간 동결 보존 시 본 발명에 따르는 동결 보존용 조성물을 사용한 경우 비교예 2의 동결 보존용 조성물을 사용한 경우와 비교할 때 상기 대장 오가노이드의 해동 후 대장 특이적 마커인 SATB2와 대장의 상피세포를 지속 갱신해주는 마커인 LGR5의 발현이 현저히 높게 나타난 결과에 의한 것임을 알 수 있다.

[0073]

[실시예 5]

[0074]

상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제조예 1의 동결 보존용 조성물을 넣어 대장오가노이드의 장기간 냉동 보존 후 해동된 대장 오가노이드를 매트릭셀에 3차원 배양 후 7일 뒤 면역형광염색을 하기 위하여 매트릭셀에서 꺼내 1X PBS가 담긴 새로운 24웰 플레이트에 옮겨 넣고 1X PBS를 제거하였다. 이후 4% PFA를 포함하는 PBS(PH7.0 to 7.2)를 웰(well)에 충분히 잠기도록 넣어준 후 상온에서 10분 간 방치하였다. 0.5% BSA 및 0.1% Triton X100를 포함하는 PBS로 10분에 1회씩 총 3회 흔들어 주었다. 이후 상기 대장 오가노이드의 상피 세포의 분포(population)를 확인해 보고자 0.5% BSA 및 0.1% Triton X100를 포함하는 PBS에 CHGA(Entero endocrine cell), DEFA5 (Paneth cell), Muc4 (Goblet cell), SATB2 (Colon specific marker) 및 VIL (Enterocyte cell)에 특이적인 1차 항체를 넣고 4 ℃에서 밤새 배양하였다. 0.5% BSA 및 0.1% Triton X100를 포함하는 PBS에 texas-red를 1:500 비율로 희석하여 300 ul를 넣은 뒤 빛을 차단한 상태로 2차 항체를 4 ℃에서 밤새 배양하였다. 0.5% BSA 및 0.1% Triton X100를 포함하는 PBS 10분에 1회씩 총 3회 흔들어 주며 세척하였다. 탈 이온수 혹은 디메틸 포름 아이드를 첨가하여 14.3mM(5mg/ml) DAPI 원액을 만든 뒤 100ul PBS에 14.3mM DAPI 저장용액 2.1ul를 넣어 300mM DAPI 중간희석액을 만든 후 PBS로 1:1000으로 희석하여 넣어준 후 10분간 빛을 차단한 상태에서 상온에서 10분간 방치하였다. 이후 1X PBS로 10분간 1회씩 총 3회 흔들어 주며 세척하고, 형광현미경으로 관찰 및 촬영하여 그 결과를 도 8 내지 12에 나타내었다.

[0075]

도 8 내지 12에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따르는 동결 보존용 조성물을 사용하여 상기 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존시킨 경우 해동 및 배양한 대장 오가노이드에서 CHGA(Entero endocrine cell), DEFA5 (Paneth cell), Muc4 (Goblet cell), SATB2 (Colon specific marker) 및 VIL (Enterocyte cell)가 모두 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0077]

[실시예 6]

[0078]

상기 실시예 1과 동일한 방법으로 제조예 1 및 비교예 1, 2 및 4의 동결 보존용 조성물을 넣어 대장오가노이드의 장기간 냉동 보존 후 해동한 뒤 수회 피펫팅(pipetting)으로 단일 세포를 만들어 트리판 블루 염색(Trypan Blue staining)을 수행하고, 세포 계수기를 통해 세포 생존율을 분석하여 그 결과를 도 13에 나타내었다. 단, 본 실험은 총 3회 반복측정후 평균값을 %로 나타내었다.

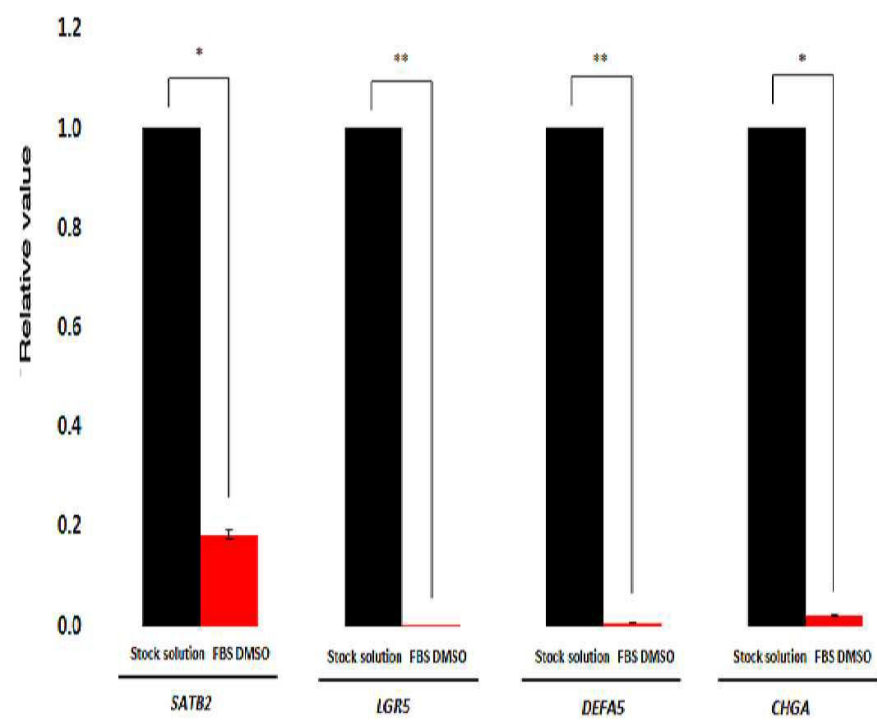
[0079]

도 13에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따르는 동결 보존용 조성물을 사용하여 상기 대장 오가노이드를 장기간 냉동 보존시킨 뒤 해동 및 배양한 경우, 비교예 1, 2 및 4의 동결 보존용 조성물을 사용한 경우와 비교하여 대

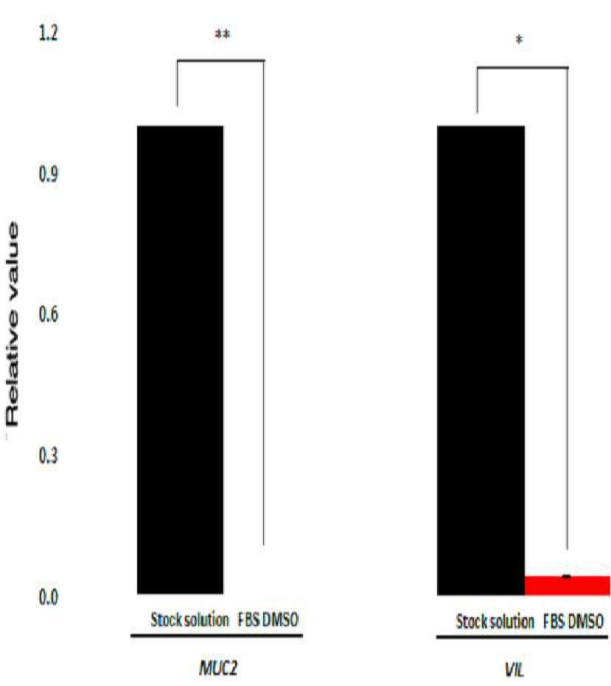
장 오가노이드의 세포 생존율이 현저히 높은 것을 확인할 수 있었다.

도면

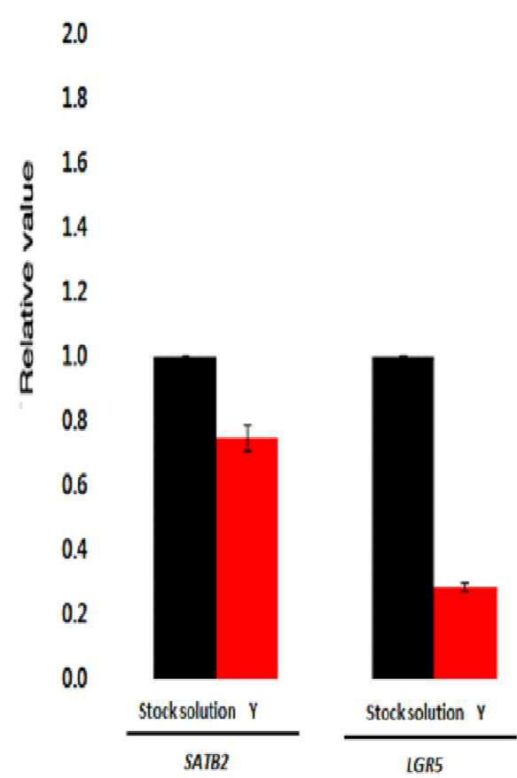
도면1



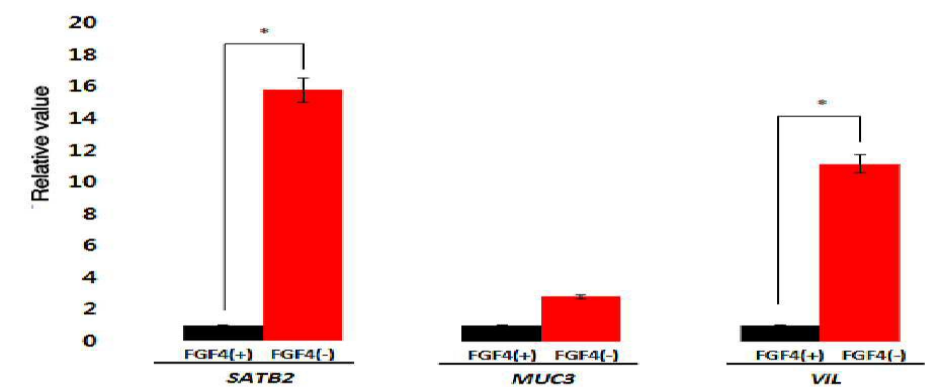
도면2



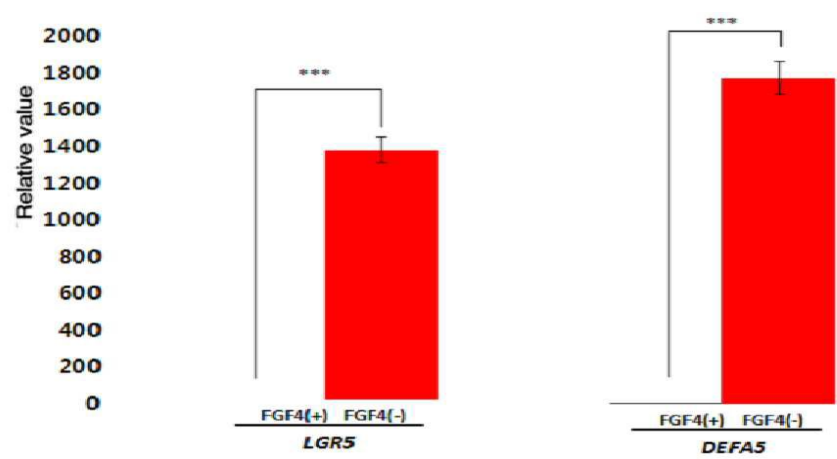
도면3



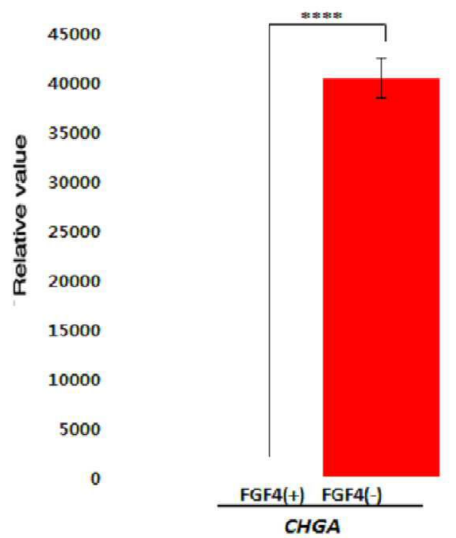
도면4



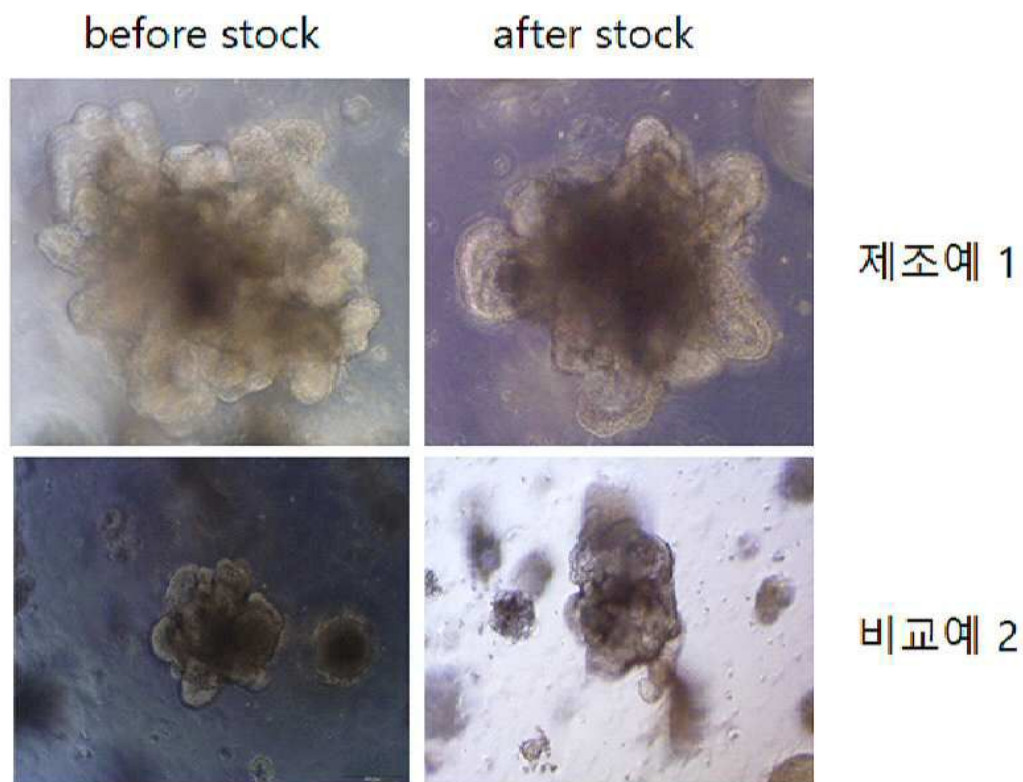
도면5



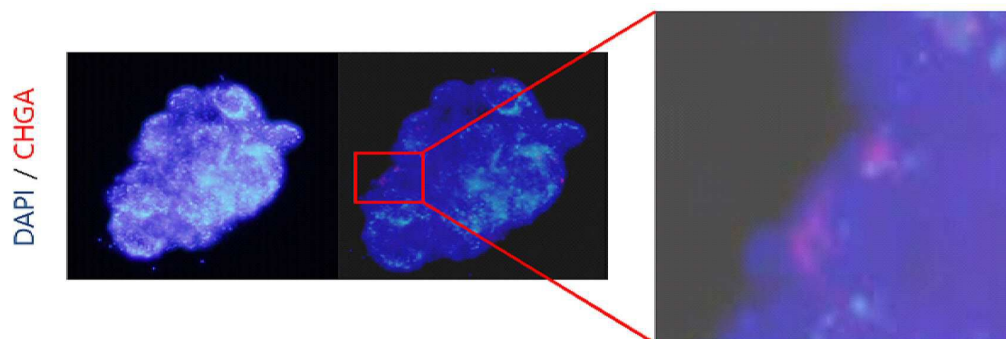
도면6



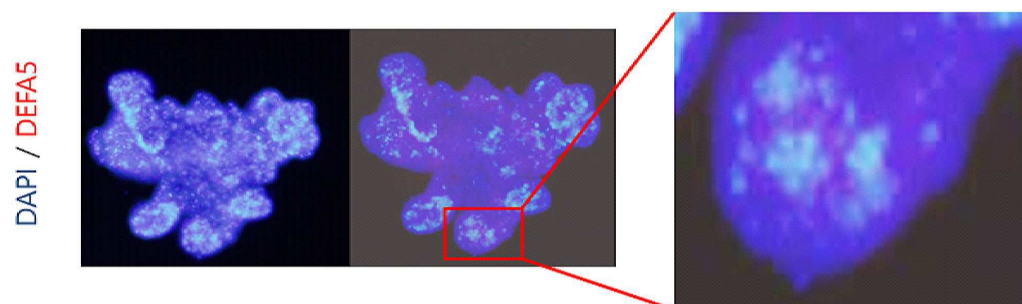
도면7



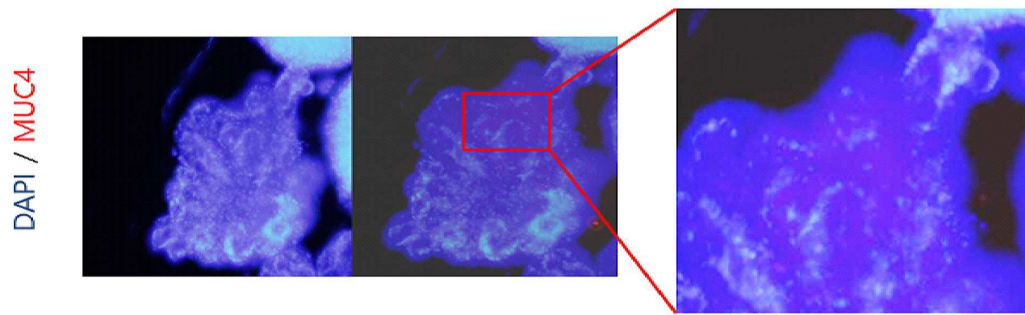
도면8



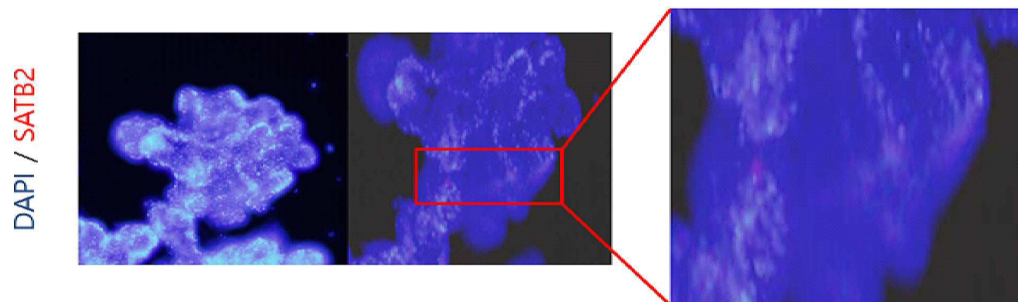
도면9



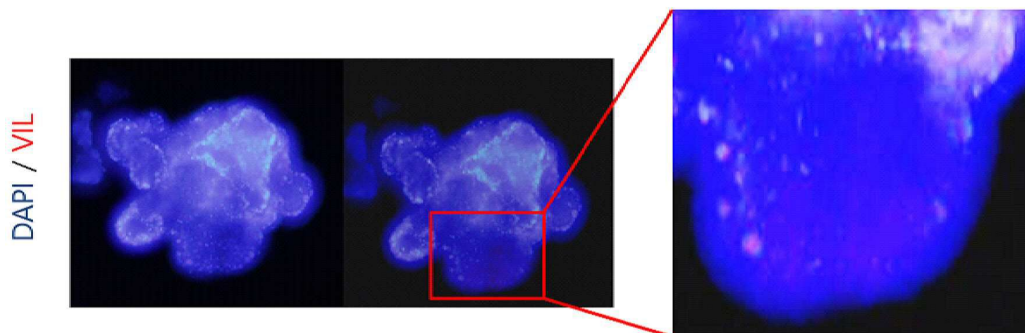
도면10



도면11



도면12



도면13

