



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월20일

(11) 등록번호 10-2205179

(24) 등록일자 2021년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/09 (2010.01) *C12N 5/071* (2010.01)
G01N 33/50 (2017.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 5/0693 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2019-0072806
 (22) 출원일자 2019년06월19일
 심사청구일자 2019년06월19일
 (65) 공개번호 10-2020-0144761
 (43) 공개일자 2020년12월30일
 (56) 선행기술조사문헌
 Cell Stem Cell, vol.23, pp.882~897(2018)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
 (72) 발명자
 정재호
 서울특별시 강남구 삼성로 150, 103동 808호(대치동, 한보미도맨션)
 최윤영
 경기도 고양시 일산동구 숲속마을로 68, 607동 1602호(풍동, 숲속마을6단지아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 이재영

전체 청구항 수 : 총 5 항

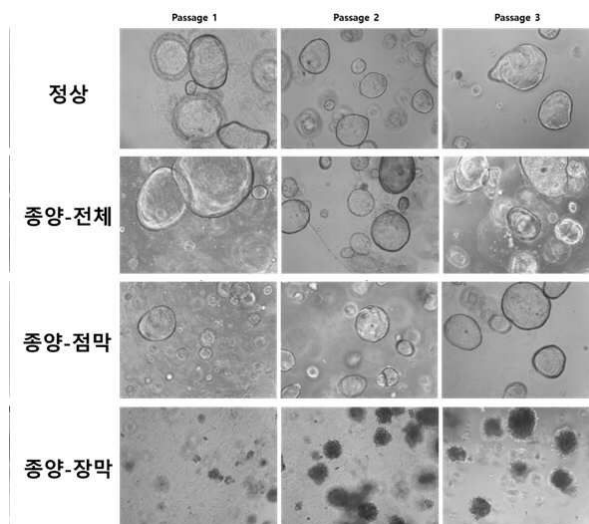
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 위암 오가노이드의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 위암 오가노이드의 제조 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 위암 오가노이드의 제조 방법은 정상 조직의 오염도가 가장 낮은 장막으로부터 수득된 조직을 이용하기 때문에, 제작된 위암 오가노이드의 순도가 매우 높아 위암이 발생한 개체에서 정상 조직과는 다른 암 조직의 특징만을 모방할 수 있다. 나아가, 이와 같이 순도가 높은 위암 오가노이드를 이용하여 암 치료제 등을 스크리닝하는 경우에는 정상 조직에 의한 간섭 효과가 적어 치료 효율이 높은 치료제만을 매우 효과적으로 선별해낼 수 있다는 장점이 존재한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/5017 (2013.01)

G01N 33/5088 (2013.01)

C12N 2503/02 (2013.01)

C12N 2503/04 (2013.01)

(72) 발명자

이재은

경기도 고양시 일산서구 탄중로 523, 202동 605호

임주연

서울특별시 서대문구 세무서길 80(홍제동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2B2016286

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 PDX 마우스코호트 구축 및 항암 맞춤치료 기술 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C2162

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명

연구사업명 첨단의료기술개발사업

연구과제명 호발암 난치성분자아형의 융합 유전체 정보 기반 표적치료제 타겟 발굴 및 임상적용 시스템 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.12.01 ~ 2018.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

위의 장막에 암조직을 포함하는 개체로부터 유래된 암조직을 이용한 위암 오가노이드의 제조 방법으로,

- a) 잘게 잘려진 위의 장막(Serosa)으로부터 유래된 암조직에서 세포를 해리(Dissociation)시키는 단계;
- b) 해리된 조직에서 샘(Gland)을 분리한 뒤, 파쇄하는 단계; 및
- c) 상기 파쇄된 샘을 다공성 매질과 혼합하여 분주하는 단계;를 포함하고,

상기 a) 단계에서 암조직에서 세포를 해리시키는 단계는 기질 단백질 분해 효소(matrix metalloproteinases; MMPs)를 이용하며,

상기 기질 단백질 분해 효소는 MMP 1인 것이고,

상기 기질 단백질 분해 효소는 2 mg/ml 내지 5 mg/ml의 농도인 것인, 위암 오가노이드의 제조 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 b) 단계에서 파쇄된 샘을 50 내지 300 μm 의 포어 사이즈를 갖는 메쉬를 이용하여 여과하는 과정을 더 포함하는, 위암 오가노이드의 제조 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1항 및 제 3항 중 어느 한 항의 제조 방법에 의해 제조된 위암 오가노이드.

청구항 9

- a) 제 8항의 오가노이드에 후보물질을 처리하는 단계; 및
- b) 후보물질에 의해 오가노이드에 존재하는 암 세포를 관찰하는 단계를 포함하는, 위암 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 b) 단계에서, 암 세포의 크기가 감소 또는 유지되거나, 이동이 억제되는 경우에 상기 후보물질을 위암 치료제로 선별하는 것인, 위암 치료제를 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 위암 오가노이드의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2005년 질병으로 사망한 총 65,479명 중에서, 전체 사망자의 26.7 %가 암으로 사망하였다. 암으로 인한 사망 중, 인구 10만명당 28.4명(21.1 %)이 폐암이었으며, 다음으로는 22.6명(16.8 %)이 위암, 22.5명(16.7 %)이 간암 및 12.5명(9.3 %)이 대장암에 해당하였다. 1996년부터 2006년까지 위암으로 인한 사망률의 추이를 분석한 결과 지난 10년간 위암이 차지하는 암 사망률은 24 %에서 16 %로 점점 줄어들고 있으나, 이는 위암의 조기 진단이 증가함에 따른 현상이므로 여전히 위암에 대한 위험이 존재한다.

[0003] 한편, 고령화로 인해 국내외 위암 발생 환자 수가 급격하게 증가되고 있어 환자 맞춤형 항암 치료 등을 통해 암을 극복하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 특히, 표적 치료제의 경우에는 말기 위암 환자의 항암제에 대한 치료 효율을 현저하게 높일 수 있기 때문에 항암제에 대한 부작용을 최소화시킬 수 있을 뿐만 아니라, 치료제에 대한 위 암세포의 반응성을 세포신호전달을 통해 예측할 수 있다는 측면에서 그 임상적 유용성이 매우 높다.

[0004] 그러나, 일차 환자 표본들로부터 제작된 암 세포주들의 경우, 환자 샘플에서 세포주를 확립하는 것이 매우 비효율적일 뿐만 아니라, 이차원 배양에 대한 적응과 선택 과정 중에서 세포주들은 유전적 변이가 발생되어 유전적 이질성(Heterogeneity)이 사라질 수 있다는 한계점이 존재한다. 나아가, 상기 암 세포주들의 경우 표준으로 사용될 수 있는 조직 내 다른 기질 구성성분들이 결핍되어 있다는 한계점 역시 존재한다.

[0005] 한편, 임상 전 단계에서 환자에 암 치료제의 민감도를 검사할 수 있는 HRDA(Histoculture drug response assay)의 경우, 적은 양의 조직만을 사용하기 때문에 다양한 항암제에 대한 민감도 확인이 어렵고, 테스트가 한 번만 가능하기 때문에 주요한 암조직의 손실이 크다는 한계점이 존재한다.

[0006] 또한, 암 세포주 또는 암 환자에서 유래된 암 세포를 동물 모델에 이식하는 방법(Patient-derived tumor xenograft, PDX)의 경우, 세포 기반 모델에 비하여 종양 조직의 생물학적인 특성을 더 잘 모방한다는 장점이 존재하지만, 비용, 시간 및 자원이 많이 소모되며, 생명윤리의 문제점 등으로 인한 한계점이 존재한다.

[0007] 이러한 한계점들을 극복하기 위하여 줄기세포 또는 장기세포에서 분리된 세포를 배양하거나 재조합하여 제작된 오가노이드(생체 외 조직체 구조물)가 개발되고 있다. 이러한 오가노이드의 경우, 환자를 대신하여 오가노이드에 먼저 시험 치료를 시행하고, 그 결과를 바탕으로 개별 환자별로 유용한 치료 효과를 보이는 항암제를 선택할 수 있다는 장점이 존재하나, 기존의 방식은 그 구조물 제조 성공률이 매우 낮다는 한계점이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 목적은 위암 오가노이드의 제조 방법; 및 상기 제조 방법에 의해 제조된 위암 오가노이드를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 위암 오가노이드를 이용하는 암 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 구현 예에서는 위암 오가노이드의 제조 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 상기 제조 방법은 a) 잘게 잘려진 정상; 또는 암 조직에서 세포를 해리(Dissociation)시키는 단계;

b) 해리된 조직에서 샘(Gland)을 분리한 뒤, 파쇄하는 단계; 및 c) 상기 파쇄된 샘을 다공성 매질과 혼합하여 분주하는 단계;를 포함한다.

[0013] 본 발명의 상기 b) 단계에서 파쇄된 샘을 원심분리하는 과정을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 상기 "오가노이드"란, 줄기세포나 장기세포에서 분리된 세포를 시험관 내(*In vitro*)에서 재조합하여 만들어진 배양물로서, 시험관 내에서 조직의 형태를 유지할 수 있는 구조체를 의미하며, 인공 장기, 바이오 장기, 미니장기, 스펜도이드, 구상체, 또는 배아체 등과 동일한 의미로서 해석이 가능하다.

[0015] 본 발명의 상기 "정상 또는 암 조직"이란, 환자를 유익하게 하고자 하는 목적으로 절개술이 필요한 경우, 절개술을 시행한 뒤 폐기되는 정상 또는 암 조직으로부터 유래된 조직의 절편을 의미한다.

[0016] 본 발명의 상기 암 조직은 위의 벽을 이루고 있는 다양한 층(layer), 예를 들면 점막(Mucosa), 근육층(Muscle) 및 장막(Serosa) 중에서, 바람직하게는 장막으로부터 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일반적으로 초기 위암의 경우 점막에 발생되며, 위암이 진행될수록 점막에 국한적으리 위치하던 암 세포가 근육 및 장막으로 침투될 수 있다. 이에, 상기 장막으로부터 유래된 암 조직을 사용하는 경우에는 점막 또는 근육 층에 존재하는 암 세포를 이용하는 경우와 비교하여, 정상 세포의 오염도를 현저하게 낮춤으로써, 순도가 현저하게 높은 위암 오가노이드를 제작할 수 있다.

[0017] 본 발명의 상기 제조 방법은 상기 b) 단계에서 파쇄된 샘을 50 내지 300 μm 의 포어 사이즈를 갖는 메쉬를 이용하여 여과하는 과정을 더 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 메쉬의 포어 사이즈는 80 내지 200 μm , 또는 90 내지 150 μm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 메쉬의 포어 사이즈가 50 μm 미만인 경우에는 파쇄된 샘이 충분히 여과될 수 없고, 300 μm 초과인 경우에는 샘 이외의 불순물이 여과될 수 없다. 이와 같이, 메쉬를 이용하여 여과하는 과정을 더 포함하는 경우에는 오가노이드를 제작하기 위한 샘이 단일 세포화되도록 하여 위암 오가노이드를 더욱 효과적으로 제작할 수 있다.

[0018] 본 발명의 상기 제조 방법은 상기 a) 단계에서 암 조직에서 세포를 해리시키는 단계는 기질 단백질 분해 효소(matrix metalloproteinases; MMPs)를 이용하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 상기 암 조직에서 세포를 해리시키는 단계는 암 조직에 기질 단백질 분해 효소를 처리하고 5분 내지 20분 동안 배양하는 것일 수 있다. 바람직하게는 10분 동안 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배양 시간이 5분 미만이거나, 20분을 초과하는 경우에는 암 조직에서 세포를 충분히 해리시킬 수 없다.

[0020] 본 발명의 상기 "기질 단백질 분해 효소"란, 세포외 기질(Extracellular matrix, ECM)과 기저막 분해에 관여하는 효소군으로서, 구조와 기능에 따라 예를 들면, 콜라게나제(Collagenase), 스트로멜리신(Stromelysin), 젤라티나제(gelatinase), 막-타입 MMP(membrane-type MMP; MT-MMP) 등일 수 있다. 바람직하게는 상기 기질 단백질 분해 효소는 MMP 1(콜라게나제 1), MMP 8(콜라게나제 2) 및 MMP 13(콜라게나제 3)일 수 있고, 더욱 바람직하게는 MMP 1 α (콜라게나제 1 α)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이와 같이, 기질 단백질 분해 효소로서 MMP 1, 8 및 13에 해당하는 콜라게나제를 사용하는 경우에는 다른 기질 단백질 분해 효소를 사용하는 경우와 비교하여 암 조직으로부터 샘을 높은 순도 및 효율로 분리해낼 수 있다.

[0021] 본 발명의 상기 기질 단백질 분해 효소는 2 mg/ml 내지 5 mg/ml의 농도로 사용되는 것일 수 있다. 상기 기질 단백질 분해 효소가 2 mg/ml 미만이거나, 5 mg/ml 초과인 경우에는 위암 조직으로부터 샘이 충분히 분리되지 않아 순도 높은 위암 오가노이드를 제작할 수 없다.

[0022] 본 발명의 상기 제조 방법은 상기 a) 단계에서 정상 조직에서 세포를 해리시키는 단계는 EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid) 완충액을 이용하는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 상기 정상 조직에서 세포를 해리시키는 단계는 정상 조직에 EDTA를 처리하고 5분 내지 20분 동안 배양하는 것일 수 있다. 바람직하게는 10분 동안 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배양 시간이 5분 미만이거나, 20분을 초과하는 경우에는 정상 조직에서 세포를 충분히 해리시킬 수 없을 뿐만 아니라, 정상 조직을 불필요하게 훼손시킬 수 있다.

[0024] 본 발명의 상기 제조 방법에서 정상 조직과 암 조직에서 세포를 해리시키는 물질을 다르게 사용함으로써, 조직으로부터 샘을 최대한 많은 수준으로 분리해낼 수 있을 뿐만 아니라, 세포 파괴 및 사멸(apoptosis)와 같은 조

직의 불필요한 손상을 최소화할 수 있다.

- [0025] 본 발명의 상기 "다공성 매질"이란, 최초에는 액상 상태로 존재하나 다양한 조건, 예를 들면 온도, 빛, pH, 압력 및 진동 등에 의하여 그 성상이 고정화될 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 상기 다공성 매질은 하이드로겔(Hydrogel) 또는 기공을 갖는 멤브레인(Porous membrane) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 상기 하이드로겔은 콜라겐(Collagen), 피브린(Fibrin), 아가로스(Agarose), 한천(Agar), 마트리젤(Matrigel), 알지네이트(Alginate) 및 젤라틴(Gelatin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 마트리젤일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 마트리젤은 라미닌, 타입 IV 콜라겐, 헤파린 황산염, 프로테오글리칸 및 엔탁틴/니도겐 등이 포함되도록 인위적으로 합성된 세포 외기질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 다른 구현 예에서는 본 발명의 상기 제조방법에 의해 제조된 위암 오가노이드를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 상기 오가노이드는 본 발명의 상기 제조 방법에 따라 제조되기 때문에, 정상 세포 등의 오염도가 현저하게 낮아 순도가 높은 위암 오가노이드를 제작할 수 있다는 장점이 존재한다.
- [0030] 본 발명의 위암 오가노이드에서, 정상 조직, 암 조직, 장막 등과 관련된 내용은 상기 위암 오가노이드의 제조방법에 기재된 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 위암 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 상기 스크리닝하는 방법은 a) 본 발명의 상기 위암 오가노이드에 후보물질을 처리하는 단계; 및 b) 후보물질에 의해 오가노이드에 존재하는 암 세포를 관찰하는 단계를 포함한다.
- [0034] 본 발명의 상기 b) 단계에서, 암 세포의 크기가 감소 또는 유지되거나, 이동이 억제되는 경우에 상기 후보물질을 위암 치료제로 선별할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상기 "스크리닝"이란, 다양한 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적하는 특정한 성질을 갖는 물질만을 특이적으로 선별해내는 것을 의미한다.
- [0036] 본 발명의 상기 "전이"란, 암 세포가 원발장기를 떠나 다른 장기로 이동되는 것으로서, 원발장기에 위치하는 원발 암이 직접 주위 장기로 침윤하는 것과, 혈관이나 림프관을 따라 원격으로 전이되는 것을 모두 포함한다. 본 발명의 목적상 위암 오가노이드에서 암 세포의 이동이 억제되는 경우에는 전이 억제에 사용될 수 있는 위암 치료제로 선별할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 상기 "후보물질"이란, 암 조직의 성장 또는 전이에 대해 억제 활성을 갖는 것으로 예상되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 화합물, 펩티드, 단백질, 항체 및 천연 추출물 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 상기 후보물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(Spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries) 등을 통해 얻을 수 있다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명의 위암 오가노이드의 제조 방법은 정상 조직의 오염도가 가장 낮은 장막으로부터 수득된 조직을 이용하기 때문에, 제작된 위암 오가노이드의 순도가 매우 높아 위암이 발생한 개체에서 정상 조직과는 다른 암 조직의 특징만을 모방할 수 있다. 나아가, 이와 같이 순도가 높은 위암 오가노이드를 이용하여 암 치료제 등을 스크리닝하는 경우에는 정상 조직에 의한 간섭 효과가 적어 치료 효율이 높은 치료제만을 매우 효과적으로 선별해낼 수 있다는 장점이 존재한다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 위 벽의 구조에서 위암 조직이 수득되는 위치를 모식도로 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에서 오가노이드의 계대 수에 따른 형태(Morphology)를 현미경을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 콜라게나제 1a의 농도에 따라 제작된 오가노이드의 형태를 현미경을 통해

확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 오가노이드의 형태를 현미경 및 H&E(Hematoxylin and eosin) 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

[준비예] 위암 조직 및 오가노이드 배양액 준비

한국 연세세브란스병원에서 절제술을 받은 환자로부터 하기 표 1의 특징을 지닌 위암 조직을 도 1에서와 같이 전체(Whole), 점막(Mucosa) 또는 장막(Serosa)에서 얻었다. 또한, 상기 절제술을 받은 환자에서 암이 발생된 주변에 존재하는 정상 조직을 얻었다. 오가노이드 배양액의 경우에는 하기 표 2의 조성의 성분들이 포함될 수 있도록 준비하였다.

표 1

구분	특징
나이	85
성별	여성
크기	90 mm
보만(Borrmann) 타입	III형(Ulceration with invasion of wall)
위치	Lower body
TNM 단계	IV(cytology positive)
조직학(Histology)	관상선종(Tubular adenoma) Poorly differentiation with signet ring cell component
로렌(Lauren) 분류	혼합 타입(Mixed type)

표 2

	성분명	용제	스탁 농도	최종 농도
컨디션 배지 (conditioned media)	WNT3A CM	-	-	-
	R-sondin CM	-	-	-
성장인자	게스트린(Gastrin)	1 % BSA/PBS	100 μ M = 210 μ g/ml	1 nM
	EGF(Epithelial growth factor)	1 % BSA/PBS	500 μ g/ml	50 ng/ml
	FGF10(fibroblast growth factor 10)	1 % BSA/PBS	100 μ g/ml	200 ng/ml
세포신호전달 억제제	TGF β 억제제 A-83-01	DMSO(Dimethyl sulfoxide)	25 mM = 10.54 mg/ml	2 μ M
	노긴(Noggin)	1 % BSA/PBS	100 μ g/ml	100 ng/ml
	ROCK(Rho kinase) 억제제	D.W(Distilled water)	1000 X	10 μ M
항산화제	N-아세틸시스테인(N-Acetylcysteine)	D.W	500 mM = 81.6 mg/ml	1 mM
기저 배지 (Basal media)	HEPES	-	-	-
	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	-	-	-
	글루타맥스(GlutaMAX)	-	200 mM	2 mM
	항생제(Antibiotic-Antimycotic; AA)	-	100 X	1 X
	프리노신(Prinocin)	-	-	-
기타	Advanced DMEM/F12	-	-	-
	니코틴아미드(Nicotinamide)	D.W	1 M	10 mM

B27(Vitamin A 불포함)	-	50 X	1 X
--------------------	---	------	-----

[0052] **[실시예 1] 오가노이드 제조 및 배양**

[0053] 상기 준비예에서 얻은 위암 조직 또는 정상 조직을 차가운 PBS(Phosphate-buffered saline)에 수회 세척하고, 3 ~ 4 mm 크기로 잘게 잘랐다. 그런 다음, 하기 표 3에서와 같이 절제된 조직의 부위 및 타입에 따라 해리 용액을 넣고 37 °C에서 10분간 배양한 뒤, 1200 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 침전물을 수득하였다. 이후, 슬라이드 글라스(Slide glass) 위에 상기 조직 침전물을 올리고 커버글라스를 덮은 뒤에 손으로 압박하여 샘(Gland)을 분리하였다. 이렇게 분리된 샘을 DMEM 배지가 포함된 50 ml 튜브에 담고, 20 ~ 25회 정도 파이프팅을 수행하여 물리적으로 파쇄하였다. 100 μ m 포어 사이즈(Pore size)를 갖는 나일론 메쉬를 이용하여 상기 파쇄된 샘을 여과하고, 1200 rpm으로 5분 동안 추가로 원심분리한 뒤 샘 침전물을 수득하였다. 그런 다음, 1 ml의 DMEM/F12 배양배지를 이용하여 샘 침전물을 희석하고, 50 μ l에 포함되어 있는 샘의 개수를 측정하였다. 20 μ l의 매트릭젤에 100 ~ 200개의 샘이 포함되도록 희석된 샘 침전물을 혼합하고 500 g에서 5분 동안 원심분리한 뒤 상층액을 제거하였다. 이후, 20 μ l의 새로운 매트릭젤을 이용하여 샘 침전물을 희석한 뒤에 48 웰 플레이트에 동일한 양으로 분주하였다.

표 3

해리 용액	조직 종류		농도
EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)	정상		10 mM
콜라게나제 (Collagenase 1a)	암	전체(Whole)	1.5 mg/ml
			3 mg/ml
		점막	1.5 mg/ml
			3 mg/ml
		장막	1.5 mg/ml
			3 mg/ml

[0057] 이렇게 제조된 정상 또는 위암 오가노이드는 모두 상기 준비예에 기재되어 있는 배양 배지에서 37 °C, 5 %의 CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0059] **[실시예 2] 오가노이드 계대 배양에 따른 형태 확인**

[0060] 상기 실시예 1에서 제조된 오가노이드를 배양하면서, 1 계대(passage 1), 2 계대(passage 2) 및 3 계대(passage 3) 때에 현미경으로 형태를 관찰하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0061] 도 2에서 보는 바와 같이, 전체(종양-전체) 및 점막(종양-점막) 으로부터 얻은 조직을 이용하여 오가노이드를 제조한 경우에는 1 계대부터 3 계대까지 배양하면서 정상 조직과 유사한 정도의 기질이 형성되는 반면, 장막(종양-장막) 으로부터 얻은 조직을 이용하여 오가노이드를 제조한 경우에는 1 계대부터 3 계대까지 배양하면서 정상 조직 으로부터 제조된 오가노이드(정상)와는 상이하게 기질 안이 확인되지 않는 검은 색의 형태가 관찰되었으며, 정상 조직 으로부터 제조된 오가노이드에서 보여지는 형태는 전혀 관찰되지 않았다.

[0062] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 오가노이드의 제조 방법의 경우 정상 조직의 오염도가 적어 암 조직의 특성만을 나타낼 수 있을 뿐만 아니라, 계대가 지속되는 경우에도 그 초기의 특성을 지속적으로 유지할 수 있음을 알 수 있다.

[0064] **[실시예 3] 콜라게나제 농도에 따른 오가노이드의 형태 확인**

[0065] 상기 실시예 1에서, 1.5 mg/ml 또는 3 mg/ml의 콜라게나제 1a를 사용하여 제조된 오가노이드를 0 계대(passage 0) 및 2 계대(passage 2) 때에 현미경으로 형태를 관찰하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0066] 도 3에서 보는 바와 같이, 1.5 mg/ml의 콜라게나제 1a를 사용한 경우와 비교하여 3 mg/ml의 콜라게나제 1a를 사용하였을 때, 장막(종양-장막) 으로부터 얻은 조직을 이용하여 제조된 오가노이드의 수확률이 현저하게 높았다. 반면, 전체(종양-전체) 및 점막(종양-점막) 으로부터 얻은 조직을 이용하여 제조된 오가노이드의 경우에는 수확률에 큰 변화가 존재하지 않았을 뿐만 아니라, 정상 조직의 오염이 여전히 존재하였다.

[0067] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 오가노이드의 제조 방법의 경우 저농도의 콜라게나제를 사용한 경우와 비교하

여, 고농도의 콜라게나제를 사용하였을 때, 정상 조직의 오염이 현저하게 적을 뿐만 아니라 최종적으로 얻어지는 종양 오가노이드의 수확률을 현저하게 높일 수 있음을 알 수 있다.

[실시예 4] 유래된 조직 위치에 따른 오가노이드 형태 확인

상기 실시예 1에서 제조된 오가노이드의 형태를 현미경으로 확인하고, H&E 염색을 수행하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

상기 H&E(Hematoxylin and Eosin) 염색을 수행하기 위해 상기 실시예 1에서 제조된 오가노이드를 20 μ m의 두께로 절편화 한 뒤, PBS로 5분 동안 세척하였다. 그런 다음, 통상의 공지된 방법에 따라 H&E 염색을 수행하였다.

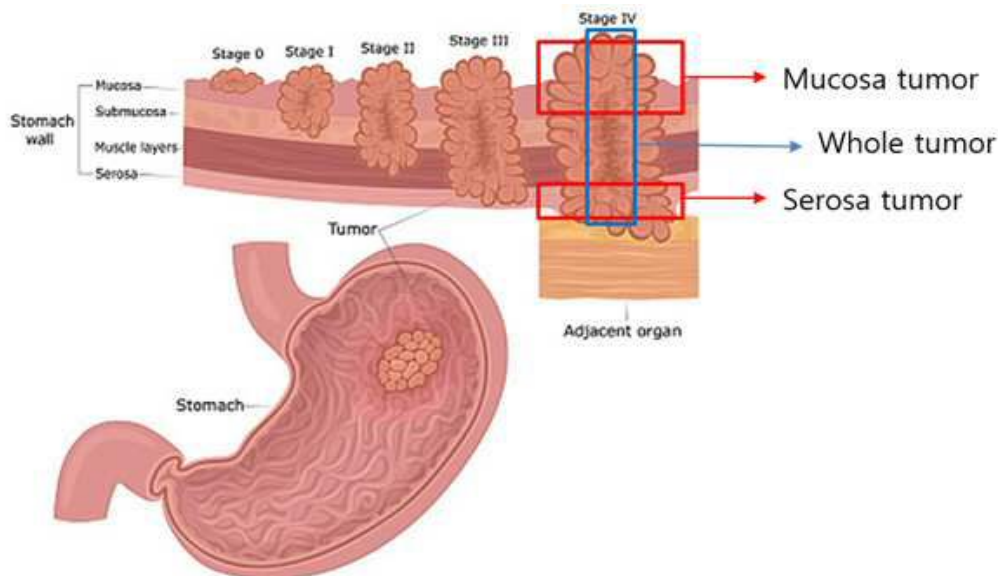
도 4에서 보는 바와 같이, 전체(종양-전체)로부터 얻은 조직을 이용하여 오가노이드를 제조한 경우에는 그 내부 조직에 정상 조직으로부터 제조된 오가노이드와 유사한 정도로 기질이 형성되어 있었다. 반면, 장막(종양-장막)으로부터 얻은 조직을 이용하여 오가노이드를 제조한 경우에는 그 내부 조직에 기질이 정상적으로 형성되어 있지 않았다. 나아가, 점막(종양-점막)으로부터 얻은 조직을 이용하여 오가노이드를 제조한 경우에는 그 내부가 정상과 종양에서 보여지는 형태가 혼합되어 존재하는 것을 확인하였다.

상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 오가노이드의 제조 방법의 경우 기존의 점막이나 전체로부터 얻은 조직을 이용하는 경우와 비교하여 순도가 매우 높은 위암 오가노이드를 제조할 수 있음을 알 수 있다.

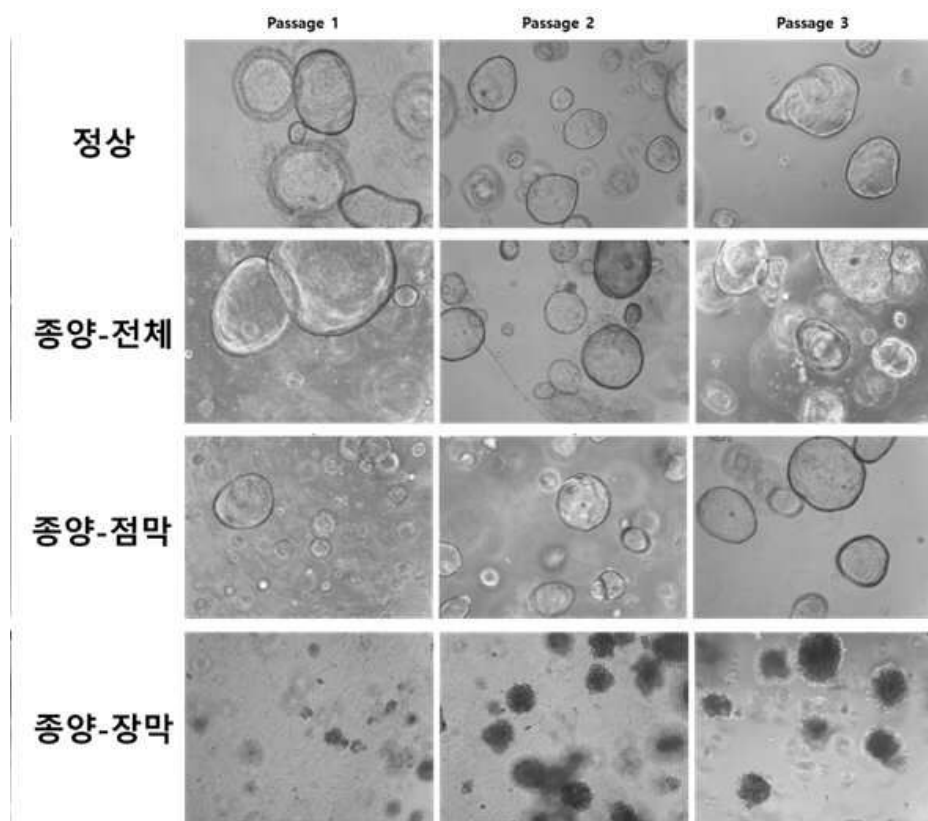
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

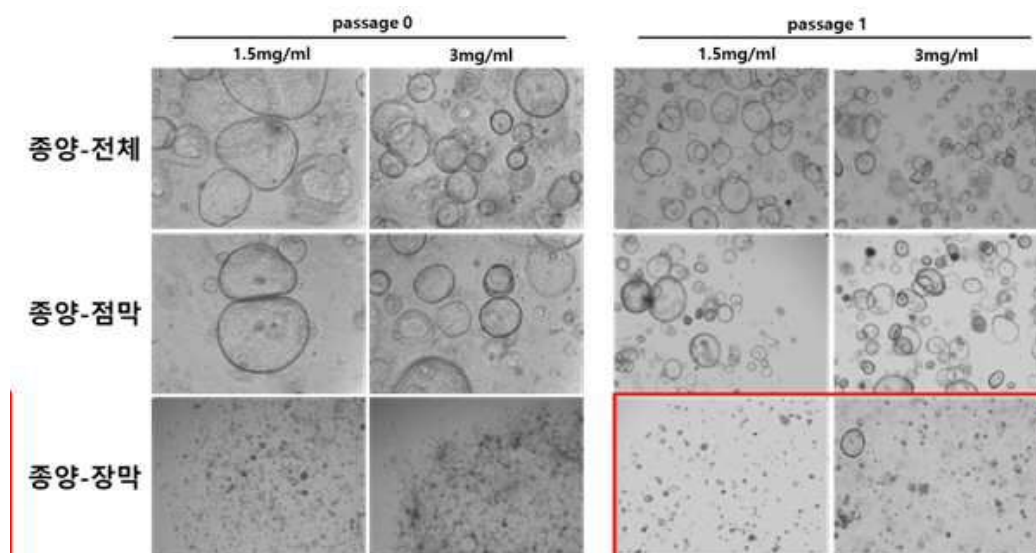
도면1



도면2



도면3



도면4

