

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 2일 (02.01.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/005012 A1

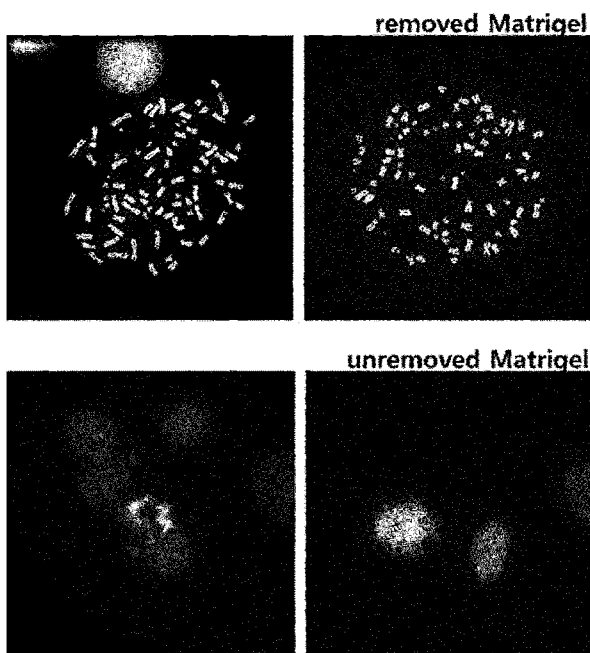
- (51) 국제특허분류: *C12N 5/071* (2010.01) *C12N 5/09* (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/007894
- (22) 국제출원일: 2019년 6월 28일 (28.06.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0075990 2018년 6월 29일 (29.06.2018) KR
10-2019-0076937 2019년 6월 27일 (27.06.2019) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이현숙 (LEE, Hyun Sook); 06552 서울시 서초구 방배중앙로 204, 704호 (방배동), Seoul (KR). 박지호 (PARK, Jiho); 08742 서울시 관악구 행운2길 56 로템오피스텔 501호, Seoul (KR). 이수현 (LEE, Su Hyun); 42269 대구시 수성구 달구벌대로637길 21 누리타운 115-511, Daegu (KR). 김성수 (KIM, Sung Soo); 17066 경기도 용인시 기흥구 기흥역로58번길 78 기흥역더샵 102동 904호, Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 이재영 (LEE, Jae Young); 06151 서울시 강남구 테헤란로43길 14 청수빌딩 7층, 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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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).

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING HUMAN-DERIVED THREE-DIMENSIONAL ORGANOID BY NON-SURGICAL METHOD

(54) 발명의 명칭: 비수술적 방법에 의한 인간유래 3차원 오거노이드의 제조 방법

[도7]



(57) Abstract: Provided are a three-dimensional organoid obtained by in vitro culture of human organ tissue obtained by a non-surgical method, a producing method thereof, a culturing method thereof, and a use for genetic information analysis, karyotype analysis, drug effect validation, and/or drug screening of the organoid obtained as described above.

(57) 요약서: 비수술적 방법으로 획득한 인간의 장기 조직을 체외에서 배양하여 얻어진 3차원의 오거노이드(organoid), 그 제조 방법, 이의 배양하는 방법, 상기와 같이 얻어진 오거노이드의 유전정보 분석, 핵형 분석, 약물 효과 검증, 및/또는 약물 스크리닝을 위한 용도가 제공된다.

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 비수술적 방법에 의한 인간유래 3차원 오거노이드의 제조 방법

기술분야

- [1] 비수술적 방법으로 수득한 인간의 장기 조직을 체외에서 배양하여 얻어진 3차원의 오거노이드(organoid), 그 제조 방법, 이의 배양하는 방법, 상기와 같이 얻어진 오거노이드의 유전정보 분석, 핵형 분석, 약물 효과 검증, 및/또는 약물 스크리닝을 위한 용도가 제공된다. 또한 본 발명은 암을 비롯한 다양한 질환에 대해서 초기 진단이 가능하도록 한다. 즉, 종래의 약물 스크리닝을 이용한 방법보다 질환의 진단을 빠르게 할 수 있을 것으로 기대된다.

[2]

배경기술

- [3] 기존의 장기 유래 오거노이드 배양법으로서 수술시 적출되는 암조직을 이용하여 3차원 배양하는 기술이 제시된 바 있다. 그러나, 췌장암과 같은 일부 암의 경우 환자의 절반 이상은 수술이 불가능한 상황으로, 기존 방법과 같이 수술시 적출된 조직을 이용해서 암 모사 오거노이드를 활용한 질환 모델을 만들 수 있는 가능성이 매우 희박하다.
- [4] 이에 반해 내시경 초음파 유도하의 세침흡입술과 같은 비수술적 방법을 활용하는 것은 질병의 진행 정도와 상관없이 적용할 수 있는 방법으로, 기존의 수술적 방법에 의하는 경우와 비교하여 훨씬 더 넓은 확장성을 가진다.
- [5] 그러나 비수술적 방법으로 얻은 조직 샘플로 3차원 오거노이드를 만드는 데에는 몇몇 문제점이 존재한다. 우선, 비수술적 방법으로 얻어지는 조직 샘플은 수술시 얻어지는 샘플 보다 양적으로 매우 적으므로, 3차원 오거노이드 배양의 성공확률이 떨어진다는 점을 들 수 있다. 이는 미세조직을 효율적으로 분해하되, 성체줄기세포군의 성장에 저해가 되지 않는 적절한 해리조건확립이 되지 않기 때문으로 여겨진다. 또한, 최적의 배양조건이 제공되지 않을 경우 장기간 배양이 이루어지지 않을 수 있다는 문제가 있다.
- [6] 상기 문제점들을 극복하기 위해서, 비수술적으로 얻어진 조직으로부터 효율적으로 오거노이드를 제작하고 장기간 배양이 가능하게 하는 기술의 개발이 필요하다. 아울러, 실제 환자에게 맞춤형 의료 제공, 및 암을 비롯한 질환에 대한 초기 진단이 가능하도록 하는 기술적 발판이 되기 위해서는 장기 배양된 3차원 오거노이드의 면역 염색 및 핵형 분석을 보다 효율적으로 할 수 있는 기술 개발이 요구된다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 상기와 같은 종래의 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 비수술적 방법으로 얻어지는 조직으로부터 인간유래 3차원 오거노이드를 제조하는 방법 및 상기 제조된 3차원 오거노이드로부터 매트릭셀 제거하는 단계를 추가로 포함하여 면역 염색과 핵형 분석하는 방법에 관한 것이다.
- [9] 오거노이드를 응용한 이러한 실험기법은 기존 병리학적 관독으로, 혹은 조직 검사 시 채취한 환부의 DNA 염기서열 분석 등의 방법으로는 확인할 수 없었던 암 및 질병의 초기 단계를 확인 가능하게 하여 암 및 질병의 초기 진단방법으로써 의미가 크다.
- [10] 이러한 삼차원 오거노이드를 이용한 응용연구는 세포들이 실제로 삼차원적으로 존재하는 *in vivo* 상황을 반영하여 실제 환자에게 맞춤형 의료를 제공하는 발판이 될 것이다.
- [11] 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.
- [12]
- [13] 일 예는 비수술적 방법으로 얻은 생체 조직으로부터 3차원 오거노이드를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 생체 조직은 포유 동물, 예컨대, 인간으로부터 분리된 장기 조직일 수 있다. 상기 비수술적 방법은 세침흡인(Fine needle aspiration) 등일 수 있다.
- [14] 다른 예는, 상기 방법으로 제조된 3차원 오거노이드를 제공한다.
- [15] 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 포함하는 약물 효과 검증용 조성물을 제공한다. 다른 예는 상기 3차원 오거노이드에 약물을 처리하는 단계를 포함하는, 약물 효과 검증 방법 또는 약물 반응성 검증에 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [16] 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 포함하는 약물 스크리닝용 조성물을 제공한다. 다른 예는 상기 3차원 오거노이드에 후보 물질을 처리하는 단계를 포함하는, 약물 스크리닝 방법을 제공한다.
- [17] 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 포함하는 유전정보 분석 또는 핵형 분석용 조성물을 제공한다. 다른 예는 상기 3차원 오거노이드의 유전 정보 또는 핵형을 측정하는 단계를 포함하는 유전정보 분석 또는 핵형 분석 방법을 제공한다.
- [18] 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 포함하는 조직 또는 장기 재생용 조성물을 제공한다.
- [19] 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 배양하는 단계를 포함하는, 생체 외에서 조직 또는 장기를 생산 또는 재생하는 방법을 제공한다.

[20]

과제 해결 수단

- [21] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [22] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [23]
- [24] 췌장, 소장, 위 등과 같은 장기에는 표피세포에 Lgr5 마커를 발현하는 성체줄기세포군이 존재함이 밝혀져 있다. 이러한 성체줄기세포군의 배양은 세포내의 특정 신호전달체계 (Wnt, EGFR, 및/또는 SMAD 등)를 활성화시키는 배지를 이용한다. 본 명세서에서는 이러한 성체줄기세포군을 선택적으로 배양시킬 수 있는 배지를 기반으로, 비수술적 방법인 내시경 유도하의 세침흡인술을 이용해 얻은 샘플을 체외의 3차원 환경에서 선택적으로 배양함으로써 3차원 오거노이드(organoid)를 제조하는 기술을 제공한다. 이러한 3차원 환경은 매트릭셀(Matrigel)과 같은 세포외기질(extracellular matrix; ECM)을 모사하는 세포외기질모사체에 의해 제공될 수 있다.
- [25] 보다 구체적으로, 상기의 세포외기질모사체는 하이드로젤(hydrogel)이나 기공을 가진 멤브레인(porous membrane) 등의 다공성 매질일 수 있다. 상기 다공성 매질이란 처음에 액상이었다가 다양한 조건에 의해서 고형화될 수 있는 것으로, 그 조건은 온도, 빛, pH, 압력, 진동 등을 포함한다. 예를 들어 고온에서 액상인 다공성 매질이 저온에서 겔화될 수 있다. 또한 상기 하이드로젤은 천연 또는 합성 고분자 물질일 수 있으며, 콜라겐(collagen), 피브린(fibrin), 아가로스(agarose), 한천(agar), 매트릭셀(matrigel), 알지네이트(alginate), 젤라틴(gelatin) 등인 것이 바람직하고, 매트릭셀(matrigel)인 것이 가장 바람직하다. 상기 매트릭셀은 인위적으로 합성된 세포외기질로써 상업적으로 판매되는 것이며, 라미닌, 콜라겐 타입 IV, 헤파린 황산염 프로테오글리칸 및 엔탁틴/니도젠을 포함하여 구성되나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [26]
- [27] 본 발명에 있어서, 오거노이드는 “생체외 조직체 구조물”의 일례로서 이해될

수 있다. 상기의 “생체외 조직체 구조물”이란 줄기세포나 장기세포에서 분리한 세포를 배양하거나 재조합해서 만든 배양체로서, 생체외에서 조직의 형태를 유지하는 구조체를 의미하며, 인공 장기, 바이오 장기, 미니장기, 오가노이드, 스페로이드, 구상체, 및 배아체를 포괄하는 의미로 사용된다.

[28]

[29] 본 명세서에서 제공되는 오가노이드 제조 기술에서, 성체줄기세포는 세포외기질모사체와 같은 3차원 환경 조성 물질 내부에 함입된 채로 배양되며, 이러한 배양법은 기존에 2차원적 세포배양과는 달리, 핵형 변화가 극히 적고 자발적인 암화과정(transformation)이 없는 것을 특징으로 한다. 본 명세서에서 제공되는 3차원 오가노이드 배양 또는 제조 기술은, 비수술적 방법으로 얻어진 미량의 조직 샘플로부터, 기존의 세포 배양법 (예컨대 2차원 세포 배양법)과 비교하여 생체 (예컨대, 인체) 내의 장기에 대한 모사성이 높고 핵형변화가 극히 적으면서 자발적인 암화과정이 없는 3차원 오가노이드를 생체 외에서 얻을 수 있는 것을 특징으로 한다. 이와 같은 특성에 의하여, 상기 3차원 오가노이드는 조직 샘플의 제공자의 유전적 정보를 비교적 정확하게 대변할 수 있고, 이를 이용하여 조직 샘플 제공자 개개인의 세포학적 특징을 분석하고 약물반응성을 검증을 통한 맞춤형 치료의 기반이 되는 세포 플랫폼을 제공할 수 있으며, 향후 줄기세포를 이용한 조직재생, 장기모사와 같은 재생의학 등의 다양한 분야에 유용하게 적용될 수 있다. 또한 조직 검사체 보다 환부를 더 근접하게 대변하는 오가노이드의 유전적 정보와 오가노이드에 적용될 실험방법들을 통한 조직 샘플 제공자 개개인의 세포학적 특징을 분석하여 빠른 초기 진단에 활용이 가능할 수 있다.

[30] 또한, 본 명세서에서 제공되는 3차원 오가노이드 제조 기술에서 사용되는 생체(인체)로부터 유래한 조직 샘플은 비수술적 방법으로 얻어진 조직, 예컨대, 내시경 유래 조직일 수 있으며, 이러한 내시경 유래 조직은, 수술적 방법으로 얻어지는 경우와 달리, 환자의 임상병리적 검사 및/또는 진단과 동시에 채취가 이루어질 수 있으므로, 환자의 유전적, 조직학적 정보를 잘 반영하는 오가노이드 플랫폼을 신속하게 구축할 수 있다는 이점을 제공한다. 이와 같은 내시경 유래 오가노이드를 이용하여 유래 환자의 유전체분석, 핵형분석, 약물스크리닝 기법을 확립함으로써 환자 개개인에 맞는 효율적인 진단 및 치료법을 비교적 짧은 시간에 제공할 수 있는 맞춤형 의료의 기반 플랫폼으로 활용이 가능하다.

[31] 또한, 본 명세서에서 제공되는 3차원 오가노이드 제조에 사용되는 오가노이드 배양 기술은 장기간 배양이 가능하도록 하는 이점도 갖는다.

[32] 본 명세서에 사용된 바로서, 오가노이드는 성체줄기세포(adult stem cell, ASC), 배아줄기세포(embryonic stem cell, ESC), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 등으로부터 자가 재생 및 자가 조직화를 통해 형성된 3차원 세포집합체를 의미한다. 세포를 3차원 배양법으로 다시 응집 재조합하여 생체 환경과 유사하게 조성함으로써, 2D 배양법으로 배양된 2D 세포주의 한계를

극복하여 생체의 생리활성기능을 유사하게 재현할 수 있어서, 질병 모델링, 약물 스크리닝 등에 적용 가능하다.

[33] 본 발명의 일 예는 비수술적 방법으로 얻은 생체 조직으로부터 3차원 오거노이드를 제조하는 방법을 제공한다.

[34] 구체적으로, 상기 방법은

[35] (1) 비수술적 방법으로 환자로부터 분리된 조직 샘플을 해리하는 단계;

[36] (2) 해리된 조직 샘플로부터 성체줄기세포를 포함하는 세포 펠렛을 분리하는 단계; 및

[37] (3) 상기 세포 펠렛을 생체 기질 물질과 함께 배양하는 단계

[38] 를 포함할 수 있다.

[39] 상기 비수술적 방법은 비교적 큰 부위의 절개 및/또는 장기의 전부 또는 일부 절제를 수반하지 않는 방법으로 소량의 조직 시료를 얻는 모든 비침습적 방법 (예컨대, 주사기 또는 바늘 등의 직경 0.1mm 내지 2mm의 미세침으로 조직을 얻는 방법들) 중에서 선택될 수 있으며, 예컨대, 세침흡인(Fine needle aspiration (FNA); FNB (Fine Needle Biopsy), FNAB(Fine Needle Aspiration Biopsy) 등으로도 칭해짐) 등과 유사한 의미로 사용될 수 있음)일 수 있다. 상기 세침흡인은 내시경으로 가이드 하는 것을 수반하는 내시경초음파유도하-세침흡인(EUS-FNA, Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration)일 수 있다. 상기 세침흡입에 사용되는 미세침은 외경(outer diameter: OD)이 0.2mm 내지 2mm, 0.2mm 내지 1.75mm, 0.2mm 내지 1.5mm, 0.2mm 내지 1.25mm, 0.2mm 내지 1mm, 0.2mm 내지 0.75mm, 0.2mm 내지 0.5mm, 0.2mm 내지 0.4mm, 0.2mm 내지 0.3mm, 0.3mm 내지 2mm, 0.3mm 내지 1.75mm, 0.3mm 내지 1.5mm, 0.3mm 내지 1.25mm, 0.3mm 내지 1mm, 0.3mm 내지 0.75mm, 0.3mm 내지 0.5mm, 0.3mm 내지 0.4mm, 0.4mm 내지 2mm, 0.4mm 내지 1.75mm, 0.4mm 내지 1.5mm, 0.4mm 내지 1.25mm, 0.4mm 내지 1mm, 0.4mm 내지 0.75mm, 0.4mm 내지 0.5mm, 0.5mm 내지 2mm, 0.5mm 내지 1.75mm, 0.5mm 내지 1.5mm, 0.5mm 내지 1.25mm, 0.5mm 내지 1mm, 또는 0.5mm 내지 0.75mm, 내경 (inner diameter: ID)이 0.1 내지 1.75mm, 0.1 내지 1.5mm, 0.1 내지 1.25mm, 0.1 내지 1mm, 0.1 내지 0.75mm, 0.1 내지 0.5mm, 0.1 내지 0.4mm, 0.1 내지 0.3mm, 0.1 내지 0.2mm, 0.15 내지 1.75mm, 0.15 내지 1.5mm, 0.15 내지 1.25mm, 0.15 내지 1mm, 0.15 내지 0.75mm, 0.15 내지 0.5mm, 0.15 내지 0.4mm, 0.15 내지 0.3mm, 0.15 내지 0.2mm, 0.2 내지 1.75mm, 0.2 내지 1.5mm, 0.2 내지 1.25mm, 0.2 내지 1mm, 0.2 내지 0.75mm, 0.2 내지 0.5mm, 0.2 내지 0.4mm, 또는 0.2 내지 0.3mm일 수 있다(단, 외경>내경). 일 구체예에서 상기 미세침은 19G (OD: 1.07mm, ID: 0.69mm), 22G (OD: 0.72mm, ID: 0.41mm), 또는 25G (OD: 0.51mm, ID: 0.26mm)의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[40] 상기 환자는 포유 동물, 예컨대, 인간일 수 있으며, 질병의 진단, 약물 효능 예측 및/또는 검증, 핵형 또는 유전자 정보의 분석을 필요로 하거나, 질병(예컨대, 암

등)을 갖는 포유 동물, 예컨대, 인간일 수 있다.

- [41] 상기 조직 샘플은 상기 환자의 생체 내의 조직으로부터 유래하고 생체로부터 분리된 모든 조직 샘플일 수 있다. 상기 조직은 환자의 장기, 예컨대, 췌장, 소장, 위, 식도 등에서 선택된 장기의 조직일 수 있으며, 상기 환자가 질병을 갖는 경우, 상기 조직은 질병 부위(환부)의 조직 또는 환부를 포함하는 장기의 조직일 수 있다. 다른 예에서, 상기 조직은 정상 조직, 예컨대, 환자 유래의 정상 장기 조직 또는 질병이 있는 장기의 경우 환부 이외 부위의 정상 조직일 수 있다.

- [42] 상기 해리하는 단계는 조직 샘플에 해리 용액을 처리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 해리 용액은, HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) 또는 DMEM 배지 (예컨대, Advanced DMEM/F-12 media(Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12) 등) 등의 용액 (예컨대, 1ml 내지 10ml, 1ml 내지 5ml, 3ml 내지 10ml, 또는 3 내지 5ml의 양으로 사용), ROCK (rho-associated protein kinase) 억제제 (예컨대, Y-27632 (UPAC name: (1R,4r)-4-((R)-1-aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)cyclohexanecarboxamide; Cas number: 146986-50-7) (예컨대, 1 내지 50 μ M, 1 내지 40 μ M, 1 내지 30 μ M, 1 내지 20 μ M, 1 내지 15 μ M, 1 내지 12.5 μ M, 2.5 내지 50 μ M, 2.5 내지 40 μ M, 2.5 내지 30 μ M, 2.5 내지 20 μ M, 2.5 내지 15 μ M, 2.5 내지 12.5 μ M, 5 내지 50 μ M, 5 내지 40 μ M, 5 내지 30 μ M, 5 내지 20 μ M, 5 내지 15 μ M, 5 내지 12.5 μ M, 7.5 내지 50 μ M, 7.5 내지 40 μ M, 7.5 내지 30 μ M, 7.5 내지 20 μ M, 7.5 내지 15 μ M, 7.5 내지 12.5 μ M, 또는 8 내지 12 μ M), 콜라게나아제 (예컨대, 콜라게나아제 P) (예컨대, 0.1mg/ml 내지 5mg/ml, 0.1mg/ml 내지 3mg/ml, 0.5mg/ml 내지 5mg/ml, 0.5mg/ml 내지 5mg/ml, 0.5mg/ml 내지 2mg/ml, 또는 0.8mg/ml 내지 1.5mg/ml), DNase(예컨대, DNase 1) (예컨대, 0.01mg/ml 내지 1mg/ml, 0.01mg/ml 내지 0.5mg/ml, 0.01mg/ml 내지 0.2mg/ml, 0.05mg/ml 내지 1mg/ml, 0.05mg/ml 내지 0.5mg/ml, 0.05mg/ml 내지 0.2mg/ml, 또는 0.08mg/ml 내지 0.15mg/ml), 디스파아제 (dispase) (예컨대, 0.1mg/ml 내지 5mg/ml, 0.1mg/ml 내지 3mg/ml, 0.5mg/ml 내지 5mg/ml, 0.5mg/ml 내지 5mg/ml, 0.5mg/ml 내지 2mg/ml, 또는 0.8mg/ml 내지 1.5mg/ml) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[43]

- [44] 일 예에서, 상기 해리 용액은 조직 (V_{pan} = 약 1.08mg/mm³)에 대하여 0.5 내지 5 ml, 0.5 내지 4 ml, 0.5 내지 3 ml, 1 내지 5 ml, 1 내지 4 ml, 또는 1 내지 3ml의 양으로 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 조직의 양에 따라 적절히 조절하여 사용할 수 있다. 이 때, 조직의 해리를 보다 용이하게 하기 위하여, 물리적 해리 (예컨대, 회전시키거나, 가위 또는 나이프 등으로 잘게 절단하는 단계 등)를 해리 용액 처리와 동시에 또는 순서에 관계없이 순차적으로 수행할 수 있다. 회전시키는 단계를 수행하는 경우, 회전 속도는 대략 100 내지 300 rpm, 100 내지 250 rpm, 100 내지 225 rpm, 100 내지 200 rpm, 125 내지 300 rpm, 125 내지 250 rpm, 125 내지 225 rpm, 125 내지 200 rpm, 150 내지 300 rpm, 150 내지

250 rpm, 150 내지 225 rpm, 또는 150 내지 200 rpm일 수 있다.

- [45] 상기 해리시키는 단계는 대략 1 내지 60분, 1 내지 50분, 1 내지 40분, 1 내지 30분, 10 내지 60분, 10 내지 50분, 10 내지 40분, 10 내지 30분, 15 내지 60분, 15 내지 50분, 15 내지 40분, 또는 15 내지 30분 동안 수행될 수 있으며, 온도 조건은 특별한 제한은 없지만 생체내 온도와 유사한 범위, 예컨대, 30 내지 40°C, 30 내지 38°C, 32 내지 40°C, 32 내지 38°C, 34 내지 40°C, 34 내지 38°C, 36 내지 40°C, 또는 36 내지 38°C 정도에서 수행할 수 있다.
- [46] 상기 (2) 해리된 조직 샘플로부터 줄기세포 (예컨대, 상피줄기세포 등의 성체줄기세포)를 포함하는 세포 펠렛을 분리하는 단계는 상기 해리된 조직을 원심분리하여 상층액을 제거하거나 및/또는 펠렛을 취하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 원심분리는 800 내지 1500 rpm, 800 내지 1200 rpm, 1000 내지 1500 rpm, 또는 1000 내지 1200 rpm의 속도로 2 내지 6°C (예컨대 4°C)에서 15분 내지 1시간 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 샘플의 양, 성상 등에 따라서 적절하게 조절하여 진행할 수 있다.
- [47] 상기 (3) 세포 펠렛을 생체 기질 물질과 함께 배양하는 단계에 있어서, 상기 생체 기질 물질은 매트리젤(Matrigel), 세포외기질 (Extracellular matrix; ECM), 기저막 추출물 (Basement Membrane Extract; BME), 히알루론산 (hyaluronic acid) 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 매트리젤은 엥겔브레스트 홀름 스웜(Engelbreth-Holm-Swarm; EHS) 마우스 육종 세포에서 분비되는 젤라틴 유사 단백질 혼합물을 의미한다. 상기 세포외기질은 세포에서 합성되고 세포외에 분비, 축적된 분자들을 포함하는 생체 고분자의 집합체로서, 콜라겐, 엘라스틴 등의 섬유성 단백질, 글리코사미노글리칸 등의 복합 단백질, 피브로넥틴, 라미닌 등의 세포 부착성 단백질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [48] 상기 배양은 통상적인 세포 배양 조건, 예컨대, 35 내지 38°C 및 3 내지 12% CO₂ 조건에서 진행될 수 있다. 또한, 상기 배양 기간은, 계대 배양 전까지 1 내지 14일, 1 내지 10일, 1 내지 7일, 3 내지 14일, 3 내지 10일 또는 3 내지 7일 동안 수행할 수 있으며, 그 이후, 1 계대 당 1 내지 14일, 1 내지 10일, 1 내지 7일, 3 내지 14일, 3 내지 10일 또는 3 내지 7일씩 계대배양을 1회 또는 2회 이상 반복하여 최대 12개월, 9개월, 또는 6개월까지 지속적으로 배양하는 것도 가능하다. 상기 배양에 사용되는 배지는 DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12), 페니실린/스트렙토마이신, HEPES(Hank's Balanced Salt Solution), GlutaMAX, N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine), 조건배지 (예컨대, Rspo1-conditioned medium), 니코틴아미드(nicotinamide), 가스트린 (예컨대, 가스트린 I), 성장인자 (예컨대, EGF, FGF 등), 노킨, 노킨-조건배지 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [49] 일 실시예에 있어서, 상기 배양하는 단계는 상기 배지에 섬유아세포 또는

섬유아세포의 배양물을 첨가하거나, 섬유아세포 또는 섬유아세포의 배양물을 포함하는 배양 배지로 배지를 교체하여 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 섬유아세포는 인간 등의 영장류 또는 마우스 등의 설치류 유래 섬유아세포일 수 있으며, 예컨대, 폐 조직 유래 섬유아세포 (예컨대, MRC5, MRC5-htert 세포주 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 상기 배양물은 상기 섬유아세포를 통상의 배지에 배양한 세포-포함 또는 무-세포 배양물을 포함하는 것일 수 있다. 배양 단계에서 섬유아세포 또는 섬유아세포의 배양물을 첨가하여 함께 배양함으로써, 오거노이드의 배양 기간을 2주일 이상, 3주일 이상, 1개월 이상, 1.5개월 이상, 2개월 이상, 3개월 이상, 4개월 이상, 5개월 이상, 또는 6개월 이상으로 증가시킬 수 있어서, 장기간 배양이 가능해진다.

- [50] 상기 배양하는 단계 이후에, (4) 생성된 오거노이드를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 분리하는 단계는 평균 직경이 0.1mm 이상, 0.25mm 이상, 0.5mm 이상, 0.75mm 이상, 1mm 이상, 또는 1.25mm 이상, 1.5mm 이상, 1.75mm 이상 또는 2mm 이상인 3차원 오거노이드를 분리하는 단계를 포함할 수 있다 (오거노이드 평균 직경의 상한값은 배양 기간에 따라서 다양하며, 대략 15mm, 12.5mm, 10mm, 7.5mm, 5mm, 또는 2.5mm일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다).
- [51] 다른 예는, 상기 방법으로 제조된 3차원 오거노이드를 제공한다. 상기 3차원 오거노이드는 환자 (예컨대, 인간)으로부터 비수술적으로 얻어진 장기 조직 유래이고, 평균 직경이 0.1mm 이상, 0.25mm 이상, 0.5mm 이상, 0.75mm 이상, 1mm 이상, 또는 1.25mm 이상, 1.5mm 이상, 1.75mm 이상 또는 2mm 이상 (평균 직경의 상한값은 대략 15mm, 12.5mm, 10mm, 7.5mm, 5mm, 또는 2.5mm일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아님)인 것일 수 있다. 상기 3차원 오거노이드는 장기 조직을 제공한 환자의 생체내 장기와 유사하거나, 및/또는 핵형 변화가 극히 적거나, 및/또는 자발적 암화가 일어나지 않는 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 일 구체예에서, 상기 3차원 오거노이드는 2주일 이상, 3주일 이상, 1개월 이상, 1.5개월 이상, 2개월 이상, 3개월 이상, 4개월 이상, 5개월 이상, 또는 6개월 이상 동안 장기배양 가능한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [52] 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 포함하는 약물 효과 예측 또는 검증용 조성물 또는 약물 효과 예측 또는 검증용 키트를 제공한다. 다른 예는 상기 3차원 오거노이드에 약물을 처리하는 단계를 포함하는, 약물 효과 예측 또는 검증 방법 (또는 약물 반응성 예측 또는 검증에 정보를 제공하는 방법)을 제공한다.
- [53] 상기 약물 효과는 약물이 달성하고자 하는 생체 작용을 의미하는 것으로, 상기 목적하는 질병 (예컨대, 암 등)의 경감, 완화, 치료 등의 효과를 의미할 수 있고, 상기 질병이 암인 경우, 상기 약물 효과는 암의 감소, 제거, 진행 또는 전이 억제 등을 의미하는 것일 수 있다.
- [54] 상기 약물 효과 예측 또는 검증 방법에 있어서, 상기 약물은 목적하는 질병에 대한 효과를 예측 또는 검증하고자 하는 모든 약물 (예컨대, 목적하는 질병이

암인 경우 상기 약물은 항암제) 중에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 상기 오거노이드는 상기 약물이 목적으로 하는 질병의 환부(질병 부위) 조직에서 유래한 것 (예컨대, 목적하는 질병이 암인 경우 암 조직에서 유래한 오거노이드)일 수 있다.

- [55] 상기 약물 효과 예측 또는 검증 방법에서, 상기 3차원 오거노이드에 약물을 처리하는 단계는, 오거노이드가 약물과 반응하기에 용이하도록 하기 위하여, 오거노이드를 물리적으로 절단 (dissociation; 예컨대 1000um 이하, 750um 이하, 500um 이하, 100um 이하, 75um 이하, 50um 이하, 또는 25um 이하)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [56] 상기 오거노이드에 약물 처리시 그 크기(질량) 및/또는 개수가 감소한 경우, 상기 약물이 상기 오거노이드가 유래한 환자에서 목적하는 질병에 효과를 발휘하는 것으로 결정 (또는 판단)할 수 있다. 따라서, 상기 약물 효과 예측 또는 검증 방법은, 상기 약물을 처리하는 단계 이후에, 약물 처리된 오거노이드의 크기 및/또는 개수를 측정하여, 상기 약물이 처리되지 않은 오거노이드와 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 이를 위하여, 상기 비교하는 단계는, 상기 약물이 처리되지 않은 오거노이드의 크기 및/또는 개수를 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 이 단계는 약물 처리된 오거노이드의 크기 및/또는 개수를 측정하는 단계와 동시에 또는 순서에 상관없이 순차적으로 수행될 수 있다. 상기 약물이 처리되지 않은 오거노이드는 상기 약물 처리 전의 오거노이드 또는 오거노이드 중 일부에 약물을 처리하고 남은 일부의 오거노이드일 수 있다. 또한, 상기 약물 효과 예측 또는 검증 방법에서, 상기 비교하는 단계 이후에, 상기 약물이 처리된 오거노이드의 크기 및/또는 개수가 상기 약물이 처리되지 않은 오거노이드와 비교하여 감소한 경우, 상기 약물이 상기 환자에서 목적하는 질병의 치료에 효과가 있는 것으로 결정 (또는 판단)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [57] 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 포함하는 약물 스크리닝용 조성물을 제공한다. 다른 예는, 상기 3차원 오거노이드에 후보 물질을 처리하는 단계를 포함하는, 약물 스크리닝 방법을 제공한다.
- [58] 상기 약물 스크리닝 방법에서, 상기 3차원 오거노이드에 후보 물질을 처리하는 단계는, 오거노이드가 후보 물질과 반응하기에 용이하도록 하기 위하여, 오거노이드를 물리적으로 절단 (dissociation; 예컨대 1000um 이하, 750um 이하, 500um 이하, 100um 이하, 75um 이하, 50um 이하, 또는 25um 이하)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [59] 상기 약물 스크리닝 방법에 있어서, 스크리닝하고자 하는 약물은 목적하는 질병에 대한 치료 효과를 갖는 약물 (예컨대, 목적하는 질병이 암인 경우 상기 약물은 항암제)일 수 있으며, 상기 오거노이드는 상기 스크리닝하고자 하는 약물이 목적으로 하는 질병의 환부(질병 부위) 조직 (예컨대, 목적하는 질병이 암인 경우 암 조직에서 유래한 오거노이드)에서 유래한 것일 수 있다.

- [60] 상기 후보 물질은 모든 생체 활성 물질 중에서 선택될 수 있으며, 예컨대, 생체활성의 소분자 화합물 (small molecular chemical), 펩타이드, 단백질 (예컨대, 항체, 기타 단백질 약물 등), 핵산분자, 추출물 (예컨대, 동물 또는 식물 추출물) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 약물 스크리닝 방법은 목적하는 질병에 대하여 치료 효과를 갖는 약물을 스크리닝하기 위한 것일 수 있다.
- [61] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 오거노이드에 후보 물질 처리시 그 크기 (또는 부피, 이하 '크기'는 부피를 포함하는 의미로 사용됨) 및/또는 개수가 감소한 경우, 상기 후보 물질은 목적하는 질환 (예컨대, 암)에 효과가 있는 약물로 결정 (또는 판단)할 수 있다. 따라서, 상기 스크리닝 방법은, 상기 후보 물질을 처리하는 단계 이후에, 후보 물질 처리된 오거노이드의 크기 및/또는 개수를 측정하여, 상기 후보 물질이 처리되지 않은 오거노이드와 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 이를 위하여, 상기 비교하는 단계는, 상기 후보 물질이 처리되지 않은 오거노이드의 크기 및/또는 개수를 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 이 단계는 후보 물질 처리된 오거노이드의 크기 및/또는 개수를 측정하는 단계와 동시에 또는 순서에 상관없이 순차적으로 수행될 수 있다. 상기 후보 물질이 처리되지 않은 오거노이드는 상기 후보 물질 처리 전의 오거노이드 또는 오거노이드 중 일부에 후보 물질을 처리하고 남은 일부의 오거노이드일 수 있다. 또한, 상기 스크리닝 방법은, 상기 비교하는 단계 이후에, 상기 후보 물질이 처리된 오거노이드의 크기 및/또는 개수가 상기 후보 물질이 처리되지 않은 오거노이드와 비교하여 감소한 경우, 상기 약물을 목적하는 질병 (예컨대, 암)에 효과가 있는 후보 약물로 결정 (또는 판단)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [62] 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 포함하는 유전정보 분석 또는 핵형 분석용 조성물 또는 키트를 제공한다. 다른 예는 상기 3차원 오거노이드의 유전 정보 또는 핵형을 측정하는 단계를 포함하는 유전정보 분석 또는 핵형 분석 방법을 제공한다. 상기 3차원 오거노이드의 유전 정보 또는 핵형을 측정하는 단계는 상기 오거노이드로부터 핵산 (DNA 및/또는 RNA)를 추출하여 통상적인 방법 (예컨대, WGS 등)으로 유전 정보 (유전자 또는 유전체 서열 등)을 분석하는 단계, 및/또는 상기 오거노이드를 면역형광염색법 등으로 가시화시키는 단계 등과 같은 통상적인 유전 정보 분석 또는 핵형 분석 단계를 포함할 수 있다.
- [63] 상기와 같은 유전정보 분석 및/또는 핵형 분석을 통하여, 상기 오거노이드가 유래한 환자 또는 장기의 병리적 상태를 진단할 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 예는 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 포함하는, 상기 오거노이드가 유래한 환자의 질병의 진단용 조성물 또는 키트를 제공한다. 다른 예는 상기 3차원 오거노이드에 대하여 형태학적 분석, 조직학적 분석, 및/또는 유전학적 분석 (통상의 방법으로 유전 정보 또는 핵형 측정 등)을 수행하는 단계를 포함하는, 질병의 진단 방법 또는 질병의 진단에 정보를 제공하는 단계를 제공한다. 상기 질병은 상기 오거노이드가 유래한 장기의 형태학적 이상, 조직학적 이상,

및/또는 유전학적 이상과 관련된 질병(예컨대, 암)일 수 있다.

[64] 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 포함하는 조직 또는 장기 생산 또는 재생용 조성물을 제공한다. 다른 예는 상기 3차원 오거노이드를 배양하는 단계를 포함하는, 생체 외에서 조직 또는 장기를 생산 또는 재생하는 방법을 제공한다.

[65] 상기 3차원 오거노이드가 정상 조직, 예컨대, 환자의 정상 장기 조직 또는 질병이 있는 장기의 환부 이외 부위의 정상 조직으로부터 유래한 것인 경우, 이로부터 생산 또는 재생되는 조직 또는 장기는 질병 또는 병적 증상을 갖지 않는 정상 조직 또는 장기일 수 있다. 이와 같이 정상 조직 유래의 3차원 오거노이드로부터 생산 또는 재생된 조직 또는 장기는 생체 이식용으로 사용될 수 있다.

[66] 상기 3차원 오거노이드가 질병 조직, 예컨대, 환자의 장기의 환부 조직일 경우, 이로부터 생산 또는 재생되는 조직 또는 장기는 상기 질병을 모델링할 수 있는 조직 또는 장기일 수 있다. 이와 같이 질병 조직 유래의 3차원 오거노이드로부터 생산 또는 재생된 조직 또는 장기는 질병 모델링에 사용될 수 있다.

[67]

[68] 본 발명의 일 구체예에서, (a) 개체로부터 분리된 세포를 하이드로겔과 혼합하여 생체외 조직체 구조물로 배양하는 단계; 및, (b) 상기 생체외 조직체 구조물로부터 하이드로겔을 제거하는 단계;를 포함하는 생체외 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법을 제공하고, 상기 하이드로겔이란 콜라젠, 피브린, 아가로즈, 한천, 매트리지, 알지네이트, 젤라틴, 세포외기질(extracellular matrix), 또는 히알루론산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함한 것을 특징으로 하는 생체외 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법을 제공하며, 상기 하이드로겔은 매트리지인 것을 특징으로 하는 생체외 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법을 제공하며, 상기 생체외 조직체 구조물은 인공 장기, 바이오 장기, 미니장기, 오가노이드, 스펜도이드, 구상체, 및 배아체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 생체외 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법을 제공하며, 상기 바이오마커는 세포 내에서 발현되는 핵산, 단백질, 당, 또는 지질에 특이적으로 결합하는 항체, 항원, 앵타머, 수용체, 리간드, 효소 기질, 효소저해제, 효소 보조인자, 및 효소로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 생체외 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법을 제공하며, 상기 바이오마커는 세포 내에서 발현되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 생체외 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법을 제공하며, 상기 항체는 2일 내지 8일 처리하는 것을 특징으로 하는 생체외 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법을 제공한다.

[69]

[70] 본 발명의 다른 구체예에서, (a) 개체로부터 분리된 세포를 하이드로겔과

혼합하여 생체외 조직체 구조물로 배양하는 단계; 및, (b) 상기 생체외 조직체 구조물로부터 하이드로겔을 제거하는 단계;를 포함하는 생체외 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 방법을 제공하고, 상기 (a)단계 이후에 생체외 조직체 구조물에 콜세마이드 200 내지 400ng/mL를 처리하는 단계를 추가로 포함하는 생체외 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 방법을 제공하며, 상기 하이드로겔이란 콜라젠, 피브린, 아가로스, 한천, 매트리젤, 알지네이트, 젤라틴, 세포외기질(extracellular matrix), 또는 히알루론산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함한 것을 특징으로 하는 생체외 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 방법을 제공하며, 상기 하이드로겔은 매트리젤인 것을 특징으로 하는 생체외 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법을 제공하며, 상기 생체외 조직체 구조물은 인공 장기, 바이오 장기, 미니장기, 오가노이드, 스펜도이드, 구상체, 및 배아체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 생체외 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 방법을 제공하며, 상기 핵형 확인은 염색체의 질적 이상, 또는 수적 이상을 확인하는 것을 특징으로 하는 생체외 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 방법을 제공한다.

[71]

[72] 본 발명의 또 다른 구체예에서, (a) 비수술적 방법으로 개체로부터 분리된 조직을 수득하는 단계; (b) 상기 조직으로부터 분리된 세포를 하이드로겔과 혼합하여 생체외 조직체 구조물로 배양하는 단계; (c) 상기 생체외 조직체 구조물로부터 하이드로겔을 제거하는 단계; 및, (d) 하이드로겔 제거된 생체외 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 단계;를 포함하는 조직의 질환 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[73]

[74] 본 발명의 또 다른 구체예에서, (a) 비수술적 방법으로 개체로부터 분리된 조직을 수득하는 단계; (b) 상기 조직으로부터 분리된 세포를 하이드로겔과 혼합하여 생체외 조직체 구조물로 배양하는 단계; (c) 상기 생체외 조직체 구조물로부터 하이드로겔을 제거하는 단계; 및, (d) 하이드로겔 제거된 생체외 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 단계;를 포함하는 조직의 질환 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[75] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

[76]

발명의 효과

[77] 본 명세서에 제공된 제조 방법에 따라서 비수술적 방법으로 얻어진 환자 유래 3차원 오가노이드는 조직 샘플의 제공자의 유전적 정보를 비교적 정확하게 대변할 수 있고, 이를 이용하여 조직 샘플 제공자 개개인의 세포학적 특징을 분석하여 초기 진단에 활용될 수 있으며, 약물반응성을 검증을 통한 맞춤형치료의 기반이 되는 세포 플랫폼을 제공할 수 있고, 향후 줄기세포를

이용한 조직재생, 장기모사와 같은 재생의학 분야 등 다양한 분야에 범용적으로 적용될 수 있다.

[78]

도면의 간단한 설명

[79]

도 1a 및 1b는 일 실시예에 따른 인체 장기 샘플로부터의 3차원 오가노이드 배양을 통하여 동결보관 및 조직은행구축, 유전체 분석, 핵형분석, 3차원 이미징, 약물 반응성 검증 및 조직재생에 이르는 다양한 기술을 유도할 수 있음을 예시하는 시스템적 다이어그램이다.

[80]

도 2는 일 실시예에 따른 세침흡인 방법으로 인체 장기 샘플로부터 수득한 세포의 배양 방법 및 그에 따른 세포의 경시적 변화를 보인 모식도이다.

[81]

도 3은 일 실시예에 따른 3차원 오가노이드를 DAPI, 튜블린, 팔로이딘(Phalloidin)으로 표지한 3D 형광면역 이미지이다.

[82]

도 4는 일 실시예에 따른 각 정상세포 혹은 비정상 텔로미어(Telomere-Sister Chromatid Exchange)를 가진 3차원 오가노이드의 텔로미어를 표지하기 위하여 DAPI, TTAGGG, CCCTAA의 표지를 이용한 형광동소보합법(Fluorescence In Situ Hybridization; FISH) 실험의 결과를 보인 형광이미지 및 그래프이다.

[83]

도 5a 및 5b는 일 실시예에 따른 인체 장기 샘플 유래 오가노이드로부터 DNA 및 RNA를 추출하여 유전체 분석을 수행한 결과를 보여준다.

[84]

도 6a는 일 실시예에 따른 인체 장기 샘플 유래 오가노이드로부터 매트릭셀을 제거하는 단계를 거친 후 1차 항체 3일, 2차 항체 3일 처리 후 면역 염색한 결과를 보여준다.

[85]

도 6b는 일 실시예에 따른 인체 장기 샘플 유래 오가노이드로부터 매트릭셀을 제거하지 않은 채 1차 항체 3일, 2차 항체 3일 처리 후 면역 염색한 결과를 보여준다.

[86]

도 6c는 일 실시예에 따른 인체 장기 샘플 유래 오가노이드로부터 매트릭셀을 제거하지 않은 채 항체 처리 시간을 1차는 하루, 2차는 3시간 항체 처리한 후 면역 염색한 결과를 보여준다.

[87]

도 7은 일 실시예에 따른 인체 장기 샘플 유래 오가노이드로부터 매트릭셀을 제거하는 단계를 거친 후 핵형 분석한 결과와 매트릭셀을 제거하지 않은 채로 핵형 분석한 결과를 보여준다.

[88]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[89]

본 발명은 종래의 기술상의 한계점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 보다 효율적인 암 및 질병의 초기 진단을 위한 것이다. 본 발명은 비수술적 방법으로 얻어지는 조직으로 제조된 3차원 오가노이드로부터 매트릭셀 제거하는 단계를 추가로 진행함으로써 면역 염색과 핵형 분석시 최적화된 결과를 제공한다. 또한, 오가노이드를 응용한 이러한 실험기법은 기존 병리학적 판독으로, 혹은 조직

검사 시 채취한 환부의 DNA 염기서열 분석 등의 방법으로는 확인할 수 없었던 암 및 질병의 초기 단계를 확인 가능하게 한다.

[90]

[91]

발명의 실시를 위한 형태

[92] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 하나, 이는 예시적인 것에 불과할 뿐 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 아래 기재된 실시예들은 발명의 본질적인 요지를 벗어나지 않는 범위에서 변형될 수 있음은 당 업자들에게 있어 자명하다.

[93]

[94] 실시예 1. 인체 장기로부터 수득한 세포의 3차원 오가노이드의 배양

[95] 췌장암환자의 췌장으로부터 세침흡인(Fine needle aspiration) 방법(19G, 22G, 또는 25G의 침 사용)으로 수득한 장기 조직 샘플 ($V_{pan}=1.08\text{mg/mm}^3$)을 Y-27632 10 μM 및 콜라게나아제(collagenase) (Roche) 1mg/ml, 디스페이즈(dispase) (Sigma Aldrich) 1mg/ml, 및 DNA 분해효소(DNase) (Sigma Aldrich) 0.1ml/ml 가 첨가된 HBSS(Hank's Buffered Saline Solution) 3ml를 해리 용액으로 양으로 사용하여 15~30 분의 시간 동안 37°C의 온도하에서 로테이터에서 180rpm의 속도로 세포용해(lysis)한 후, 상기 세포용해 단계를 통해 수득한 세포는 원심분리하고 PBS(Phosphate Buffer Saline)를 이용하여 1회 세척하였다. 상기에서 얻은 세척된 세포는 세포의 수에 따라 양이 조절된 매트릭젤(Corning)에 세포 파종(seeding)하여 3차원 오가노이드로 배양하였다(도 1 및 도 2 참조).

[96]

[97] 실시예 2. 3차원 오가노이드의 핵형분석

[98] 상기 실시예 1에서 얻어진 3차원 오가노이드를 구성하는 세포들의 유사분열을 막기 위하여 콜세미드(colcemide, 100ng/mL)를 2 내지 12시간 동안 처리하여 세포주기를 억류하였다. 상기 세포주기가 억류된 세포들이 접종되어 있는 매트릭젤을 용해하기 위하여 액체 배양액을 버리고, 디스페이즈(Dispase) 및 트립신 (Trypsin)이 첨가된 용액을 매트릭젤 위의 세포에 첨가한 후 피펫팅을 20회하여 매트릭젤을 파편화하고 PBS로 세척하였다. 상기 세척된 세포 펠렛(pellet)은 바람직하게는 트립신:PBS=1:1 (w/w)의 비율로 한 용액에 부유시키고 가시적 펠렛이 소멸하여 모든 세포가 분리되기까지 5분 간격으로 피펫팅하여 단일 세포 부유액을 수득하였다. 상기 수득한 단일 세포들은 0.56%(w/v)의 KCl 저장성용액에 다시 부유시키고 37°C의 물에서 20분간 온도를 맞춘 후, 메탄올: 아세트산=3:1의 배합비(v/v)로 혼합한 용액 1mL를 첨가하여 고정(fix)시켰다. 상기 고정된 세포들은 15mL의 원뿔형 튜브를 이용하여 원심분리 후 KCl 용액을 제거한 후 상기 고정용액 5~6mL을 첨가하고, -20°C에서 냉동 보관하였다. 고정된 세포를 슬라이드상에서 티트린 후 펼쳐진 염색체

(chromosome)에 대하여, 텔로미어 부분을 형광으로 표지한 후, 핵형분석을 수행하였고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[99]

[100] 실시예 3: 인체 장기로부터 수득한 세포의 3차원 오가노이드의 배양

[101] 비수술적 방법인 세침흡인(Fine needle aspiration) 방법으로 췌장암환자의 췌장에서부터 채취된 조직 샘플에 콜라게나아제(collagenase) (Roche) 1mg/ml 및 DNA 분해효소(DNase) (Sigma Aldrich) 0.1ml/ml가 배합된 HBSS를 해리용액 3ml를 해리 용액으로 사용하여, 37°C 온도하에서 로테이터 180rpm 속도로 30분 동안 해리하였다.

[102] 상기 해리 단계를 거친 조직은 PBS(Phosphate-Buffered Saline)을 사용하여 1회 세척 후, 세척된 세포수에 따라 양을 조절한 기질모사체인 매트릭젤에 심고 화학적으로 정의된 액체 배지에 함께 보관하여 세포를 배양하였다. 이 때 사용된 배지 조성은 다음과 같다:

[103] DMEM/F-12(Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12; Thermo Fisher Scientific)에 1%(vol/vol) 페니실린/스트렙토마이신, 10mM HEPES, 1% GlutaMAX, 1:50 B27 첨가물(Gibco), 1 mM N-아세틸시스테인, 5%(vol/vol) Rspo1 포함된 배양액(Hans Clevers lab), 10 mM 니코틴아마이드, 10 nM 재조합형 인간[Leu15]-가스트린 I(Sigma Aldrich), 50 ng/ml 재조합형 마우스 EGF(Peptron), 100 ng/ml 재조합형 인간FGF10(Peptron), 25 ng/ml 재조합형 인간 노킨(Peptron) 또는 5%(vol/vol) 노킨-포함 배양액(Hans Clevers lab), 및 10uM Y-27632.

[104] 장기 배양을 위해 MRC5

(CCL-171)(<https://www.atcc.org/products/all/CCL-171.aspx>)에 hTERT 유전자를 도입해 활성화된 텔로머레이스를 발현하도록 하여 지속적으로 분열가능하도록 한 (immortalized) MRC5-htert 세포주를 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Thermo fisher scientific)에 1%(vol/vol) 페니실린/스트렙토마이신, 10%(vol/vol) Fetal Bovine Serum (Gibco)가 포함된 배양액에서 2일간 배양한 뒤, 계대를 하면서 인간 췌장 오가노이드 배양액으로 바꾸어 2일간 더 배양하고, 이 배양액을 모아서, 오가노이드 장기배양을 위한 배양액으로 사용하였다. 인간 췌장 오가노이드 배양액의 조성은 다음과 같다.

[105] DMEM/F-12(Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12; Thermo Fisher Scientific)에 1%(vol/vol) penicillin/streptomycin, 10mM HEPES, 1% GlutaMAX, 1:50 B27 첨가물(Gibco), 1 mM N-아세틸시스테인, 5%(vol/vol) Rspo1- 포함된 배양액(Hans Clevers lab), 10 mM 니코틴아마이드, 10 nM 재조합형 인간[Leu15]-가스트린 I(Sigma Aldrich), 50 ng/ml 재조합형 마우스 EGF(Peptron), 100 ng/ml 재조합형 인간 FGF10(Peptron), 25 ng/ml 재조합형 인간 노킨(Peptron) 또는 5%(vol/vol) 노킨-포함 배지(Hans Clevers lab), 및 10uM Y-27632.

[106] 배양된 오가노이드의 일부를 단일세포 수준으로 분해한 후, 넥아웃 세럼(Thermo scientific) 80%(v/v), DMEM/F12 10%(v/v), 및 DMSO 10%(w/v)를

포함하는 용액에 넣고 동결 보관하였으며, 필요시 해동 및 재배양하였다.

[107] 상기 얻어진 오거노이드는 하기와 같은 분석에 적용될 수 있다:

[108] 배양되는 오거노이드의 형태를 훼손하지 않은 채로, 매트리젤을 제거하는 단계를 거친 후 4% 파라포름알데히드로 고정하고, DAPI로 핵을 염색하고, 튜블린과 팔로이딘(phalloidin)을 면역형광염색법으로 염색한 후 공초점현미경(conforcal microscopy)등을 이용하여 3차원 오거노이드 이미징을 구현하였다. (도 3 참조)

[109] 매트리젤속에서 자라는 사람 오거노이드에서 매트리젤을 제거한 뒤 이로부터 통상적인 방법으로 지놈 DNA와 RNA를 추출하여 유전체 분석을 실시하였다(도 5a 및 5b 참조).

[110] 채장암 유래 3차원 오거노이드를 작은 단위(22um 이하)로 분획(dissociation)한 후 세포배양이 가능한 미세한 공간(well)에 나눠 채장암 환자에 반응성이 좋은 약물을 선별하였다.

[111] 정상채장조직에서 유래한 오거노이드를 선별한 후 이를 이용한 정상채장조직을 구현하였다.

[112]

[113] 실시예 4: 3차원 오거노이드의 면역염색

[114] 12개 웰 플레이트(well plate)에서 유지되고 있는 오거노이드로부터 배양액(media)을 제거한 후, 리커버리 솔루션(354253, Corning, 1ml/well)을 사용하여 매트리젤(Matrigel)을 20분 내지 1시간 동안 제거하는 단계를 거쳤다. 매트리젤이 제거된 오거노이드를 15ml 코니칼 튜브에 옮긴 후 얼음 위에서(4°C) PBS(Phosphate Buffer Saline)을 이용하여 3회 세척하였다. 상기에서 세척된 구형 형태를 유지한 오거노이드를 파이펫을 사용하여 2ml 바이알로 옮긴 후 4% PFA(paraformaldehyde)를 채워 1시간 동안 얼음 위에서 고정시켰다. 이 때 최종 농도가 4%가 되도록 처음 30분 동안 10분 간격으로 총 3번 4% PFA를 바꿔주었다. 상온에서 3회 세척한 후 1% Triton X-100을 PBS에 녹여 (1%PBS-T) 1시간 동안 상온에서 침투를 진행하였다. 이 때 최종 농도가 1%가 되도록 처음 30분 동안 10분 간격으로 총 3번 1% PBS-T를 바꿔주었다.

[115] 상기 세포를 0.2% PBS-T로 2번 세척한 후, 블로킹 버퍼(3% BSA in 0.2% PBS-T)를 처리하여 30분동안 상온에 두었다. 이후 1차 항체를 추가한 블로킹 버퍼를 세포가 들어가 있는 2ml 바이알에 400ul를 넣고, 3일간 상온에 두었다. 상기 세포를 0.2% PBS-T로 3번 세척한 후, 2차 항체를 추가한 블로킹 버퍼를 1차 항체와 마찬가지로 400ul를 넣고 3일간 상온에 두었다. 0.2% PBS-T로 3번 세척한 후, 5mg/ml DAPI를 1:5000 내지 1:10000으로 PBS에 희석한 후 이를 상온에 3 내지 12시간 두었다. 0.2% PBS-T로 다시 3번 세척한 후 8개의 웰 글래스 버텀 챔버로 옮긴 후, 봉입제(vectashield)를 넣고 공초점현미경(conforcal microscopy)을 이용하여 3차원 오거노이드 이미징을 구현하였다(도 6a 참조).

[116] 매트리젤 제거로 인한 면역 염색 효과의 현저성을 비교확인하기 위하여

매트리젤을 제거하지 않은 오거노이드로 추가 실험을 수행하였다.

[117] [표1]

	제조예 1	제조예 2	제조예 3
1차 항체 처리시간	3일	3일	1일
2차 항체 처리시간	3일	3일	3시간
매트리젤	제거	존속	존속

[118] 상기 표 1의 제조예 2와 3의 경우는 종래의 면역염색 방법으로 매트리젤이 있는 상태에서 항체 처리시간만을 달리하였다. 상기 제조예 1의 결과를 도 6a에, 제조예 2의 결과를 도 6b에, 제조예 3의 결과를 도 6c에 나타내었다. 매트리젤을 제거하지 않은 오거노이드(제조예 2)를 상기 표 1의 제조예 1과 동일한 항체 처리 조건(1차 항체 3일/2차 항체 3일) 하에 추가적으로 실험한 결과, 제조예 1과는 대조적으로 면역염색이 되지 않았음을 뚜렷하게 확인할 수 있었다(도 6b 참조). 항체 시간 요인이 면역염색에 영향을 주는지 여부를 확인하기 위하여 매트리젤을 제거하지 않고 1차 항체 하루, 2차 항체 3시간(제조예 3)으로 항체 처리 시간을 상대적으로 짧게 하여 실험하였을 때에도 제조예 2의 결과와 마찬가지로 핵 내 단백질이 전혀 염색되지 않았으며, 오거노이드 바깥부분에 비특이적으로 염색된 포시(foci)만을 확인할 수 있었다(도 6c 참조). 도 6을 참조하면 매트릭스를 제거함과 동시에 항체처리시간을 길게 할 때 현저하게 효과적으로 염색되는 결과가 도출된다는 것을 알 수 있다.

[119]

[120] 실시예 5: 3차원 오가노이드의 핵형분석

[121] 3차원 오가노이드에 콜세마이드(200ng/ml 내지 400ng/mL)를 12 내지 16시간 동안 처리하여 세포 주기를 정지시켰다. 12개의 웰 플레이트에서 유지되고 있는 오거노이드에서 배양액을 제거한 후, 리커버리 솔루션(354253, Corning, 1ml/well)을 사용하여 매트릭스를 30분 동안 제거하였다. 상기 세포를 4°C PBS로 2회 세척하였다. 이를 원심분리기를 이용하여 세포 펠렛(pellet)을 모은 후, TrypLE (ThermoFisher 사 제품) 1ml에 재부유(resuspend) 하였다. 다시 풀어진 세포를 12개의 웰 플레이트에 옮겨 37°C에서 1 내지 2분을 두고 피펫팅(pipetting)한 후, 현미경으로 확인하여 단일 세포임을 확인하고 15ml 코니칼 튜브에 옮겨 PBS로 2회 세척하였다. 수득한 단일 세포들은 0.56%(w/v)의 염화칼륨(KCl) 저장성용액에 재부유 시킨 후, 37°C의 물에서 20분이 지난 뒤 고정액(메탄올: 아세트산=3:1)을 1mL를 첨가하여 천천히 섞어 주었다. 이를 원심 분리한 후에 상층액을 버리고, 다시 고정액 10ml를 추가하는 과정을 3회 반복하였다. 상기 고정된 세포들은 15mL의 원뿔형 튜브를 이용하여 원심분리 후 KCl 용액을 제거한 후 상기 고정용액 5 내지 6mL를 첨가하고, -20°C에서 냉동 보관하였다. 고정된 세포를 슬라이드상에서 터트린 후 펼쳐진

염색체(chromosome)에 대하여, 텔로미어 부분을 형광으로 표지한 후 핵형 분석을 수행하였으며, 이때의 핵형 분석 결과는 도 7의 상단 사진을 통해 확인할 수 있다. 매트리젤을 제거함으로써 핵형을 선명하게 볼 수 있었다.

- [122] 매트리젤 제거로 인한 핵형 분석 효과의 현저성을 비교확인하기 위하여 매트리젤을 제거하지 않은 오거노이드로 추가 실험을 시행하였다. 그 결과를 도 7의 하단 사진에 나타내었다. 도 7을 참조하면, 핵형이 나오지 않은 결과를 확인할 수 있다. 이러한 실험을 통하여 핵형 분석시 실시예 4에서와 마찬가지로 매트리젤의 제거 유무에 따른 현저한 차이가 있음을 확인할 수 있다. 본 발명이 종래 오거노이드 핵형분석시 사용된 방법과 차별화되는 특징이다.

[123]

- [124] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 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.

[125]

산업상 이용가능성

- [126] 본 발명은 종래의 기술상 한계점을 극복하고, 보다 효과적인 암 및 질병의 초기진단을 위한 것이다. 실제 환자에게 맞춤형 의료 제공, 및 암을 비롯한 질환에 대한 초기 진단이 가능하도록 하는 기술적 발판이 되기 위해서는 장기 배양된 3차원 오거노이드의 면역 염색 및 핵형 분석을 보다 효율적으로 할 수 있는 기술 개발이 요구된다. 본 발명의 오거노이드를 응용한 이러한 실험기법은 기존 병리학적 판독으로, 혹은 조직 검사 시 채취한 환부의 DNA 염기서열 분석 등의 방법으로는 확인할 수 없었던 암 및 질병의 초기 단계를 확인 가능하게 한다. 이러한 삼차원 오거노이드를 이용한 응용연구는 세포들이 실제로 삼차원적으로 존재하는 *in vivo* 상황을 반영하여 실제 환자에게 맞춤형 의료를 제공하는 발판이 될 것이다.

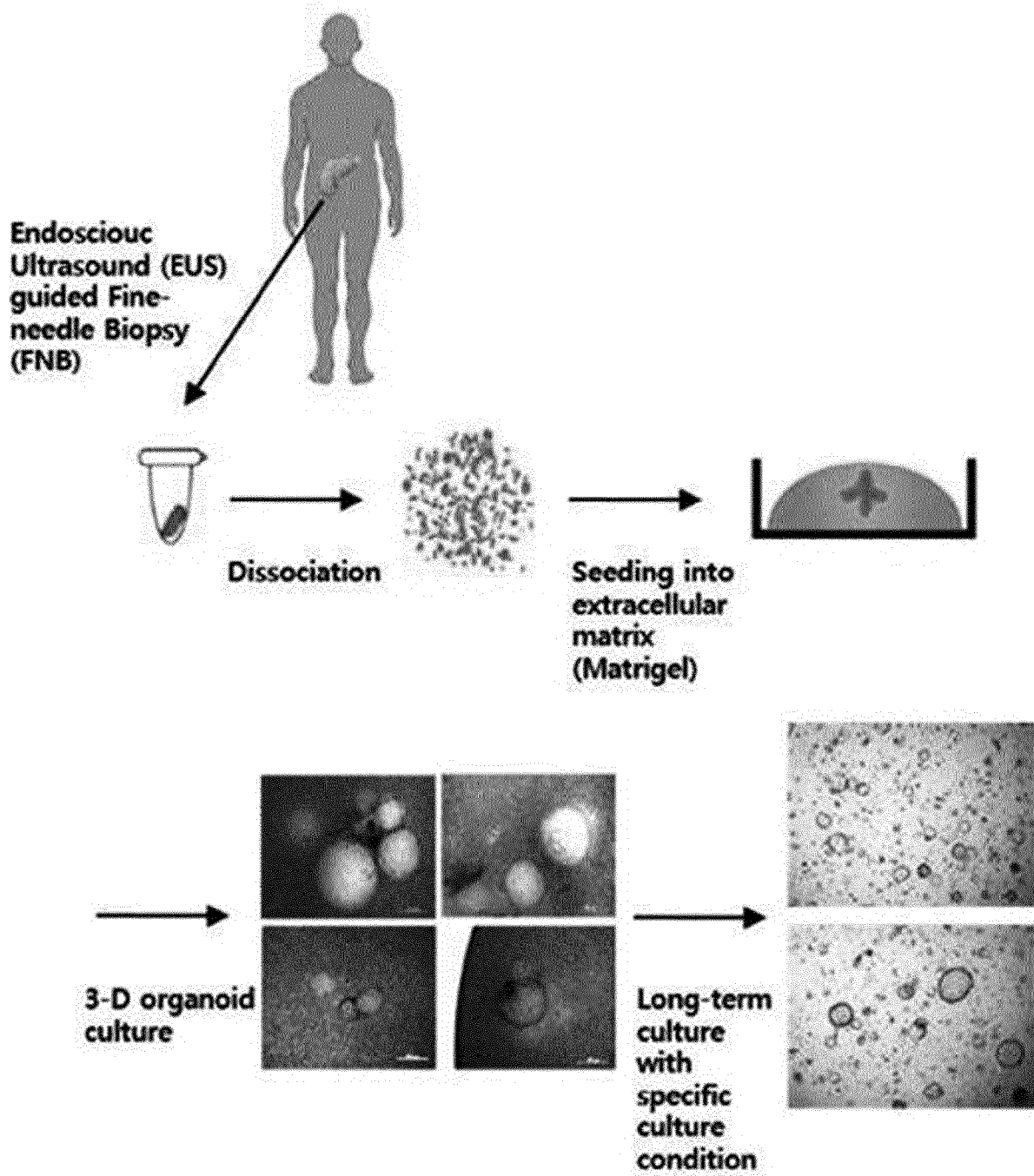
[127]

청구범위

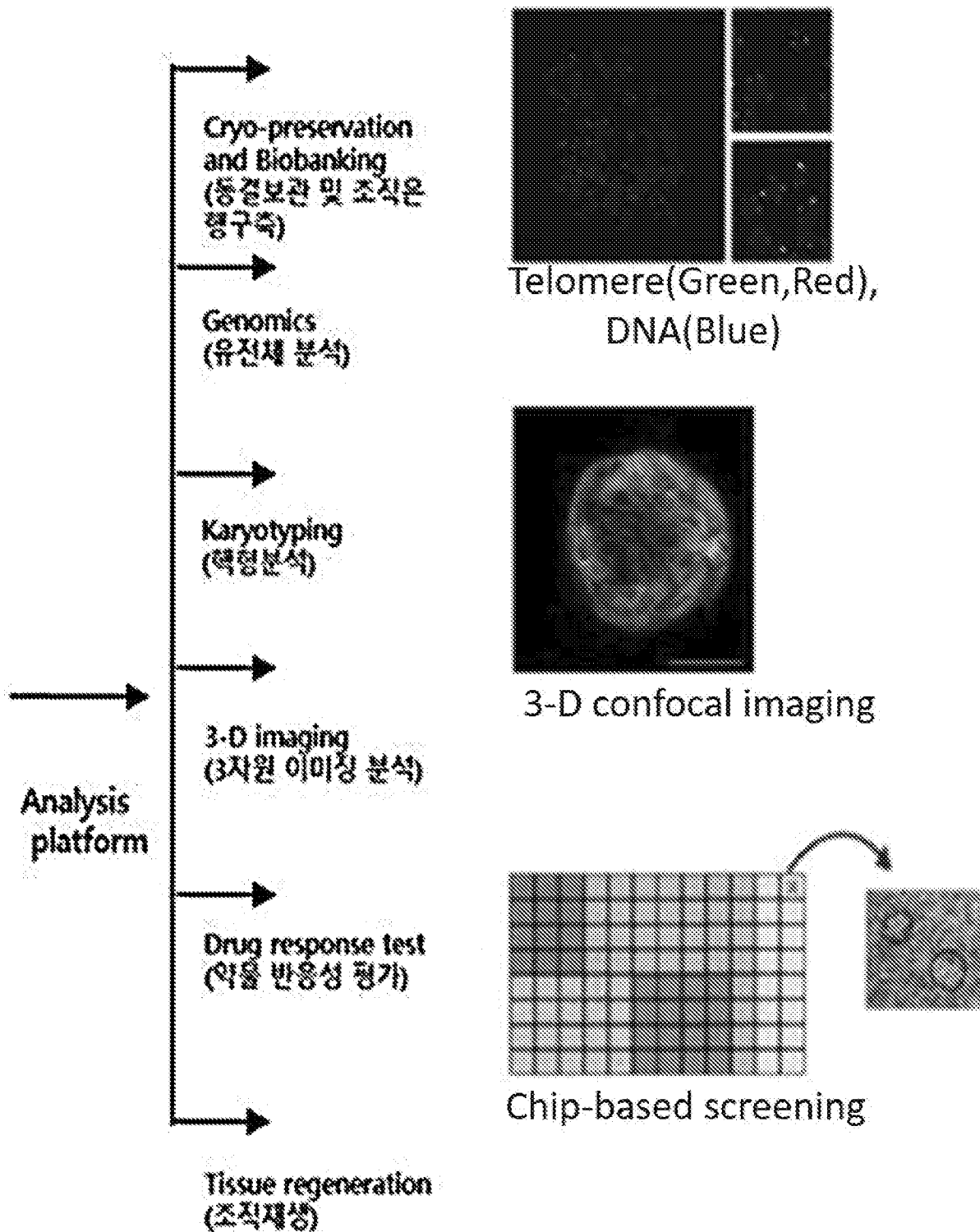
- [청구항 1] (a) 개체로부터 분리된 세포를 하이드로겔과 혼합하여 생체의 조직체 구조물로 배양하는 단계; 및,
(b) 상기 생체의 조직체 구조물로부터 하이드로겔을 제거하는 단계;를 포함하는, 생체의 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 하이드로겔은 콜라젠, 피브린, 아가로스, 한천, 매트릭셀, 알지네이트, 젤라틴, 세포외기질(extracellular matrix), 또는 히알루론산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함한 것을 특징으로 하는, 생체의 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,
상기 하이드로겔은 매트릭셀인 것을 특징으로 하는, 생체의 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 생체의 조직체 구조물은 인공 장기, 바이오 장기, 미니장기, 오가노이드, 스펜로이드, 구상체, 및 배아체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 생체의 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서,
상기 바이오마커는 세포 내에서 발현되는 핵산, 단백질, 당, 또는 지질에 특이적으로 결합하는 항체, 항원, 앵타머, 수용체, 리간드, 효소 기질, 효소저해제, 효소 보조인자, 및 효소로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 생체의 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 바이오마커는 세포 내에서 발현되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 생체의 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서,
상기 항체는 2일 내지 8일 처리하는 것을 특징으로 하는, 생체의 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법.
- [청구항 8] (a) 개체로부터 분리된 세포를 하이드로겔과 혼합하여 생체의 조직체 구조물로 배양하는 단계; 및,
(b) 상기 생체의 조직체 구조물로부터 하이드로겔을 제거하는 단계;를 포함하는, 생체의 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 방법.

- [청구항 9] 제 8항에 있어서,
상기 (a)단계 이후에 생체의 조직체 구조물에 콜세마이드 200 내지 400ng/mL를 처리하는 단계;를 추가로 포함하는, 생체의 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 방법.
- [청구항 10] 제 8항에 있어서,
상기 하이드로겔은 콜라젠, 피브린, 아가로스, 한천, 매트리지, 알지네이트, 젤라틴, 세포외기질(extracellular matrix), 또는 히알루론산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함한 것을 특징으로 하는, 생체의 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 방법.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서,
상기 하이드로겔은 매트리지인 것을 특징으로 하는, 생체의 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 방법.
- [청구항 12] 제 8항에 있어서,
상기 생체의 조직체 구조물은 인공 장기, 바이오 장기, 미니장기, 오가노이드, 스페로이드, 구상체, 및 배아체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 생체의 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 방법.
- [청구항 13] 제 8항에 있어서,
상기 핵형 확인은 염색체의 질적 이상, 또는 수적 이상을 확인하는 것을 특징으로 하는, 생체의 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 방법.
- [청구항 14] (a) 비수술적 방법으로 개체로부터 분리된 조직을 획득하는 단계;
(b) 상기 조직으로부터 분리된 세포를 하이드로겔과 혼합하여 생체의 조직체 구조물로 배양하는 단계;
(c) 상기 생체의 조직체 구조물로부터 하이드로겔을 제거하는 단계; 및,
(d) 하이드로겔 제거된 생체의 조직체 구조물에서 바이오 마커의 발현을 확인하는 단계;를 포함하는, 조직의 질환 진단에 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 15] (a) 비수술적 방법으로 개체로부터 분리된 조직을 획득하는 단계;
(b) 상기 조직으로부터 분리된 세포를 하이드로겔과 혼합하여 생체의 조직체 구조물로 배양하는 단계;
(c) 상기 생체의 조직체 구조물로부터 하이드로겔을 제거하는 단계; 및,
(d) 하이드로겔 제거된 생체의 조직체 구조물에서 핵형을 확인하는 단계;를 포함하는, 조직의 질환 진단에 정보를 제공하는 방법.

[도 1a]



[도 1b]



[도2]

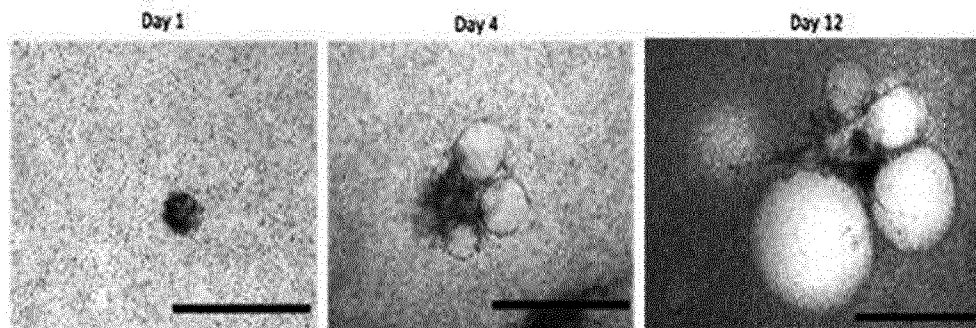


1. FNA biopsy soaked in normal saline is delivered on ice

2. After discarding saline, quickly mince the biopsy with fine blade

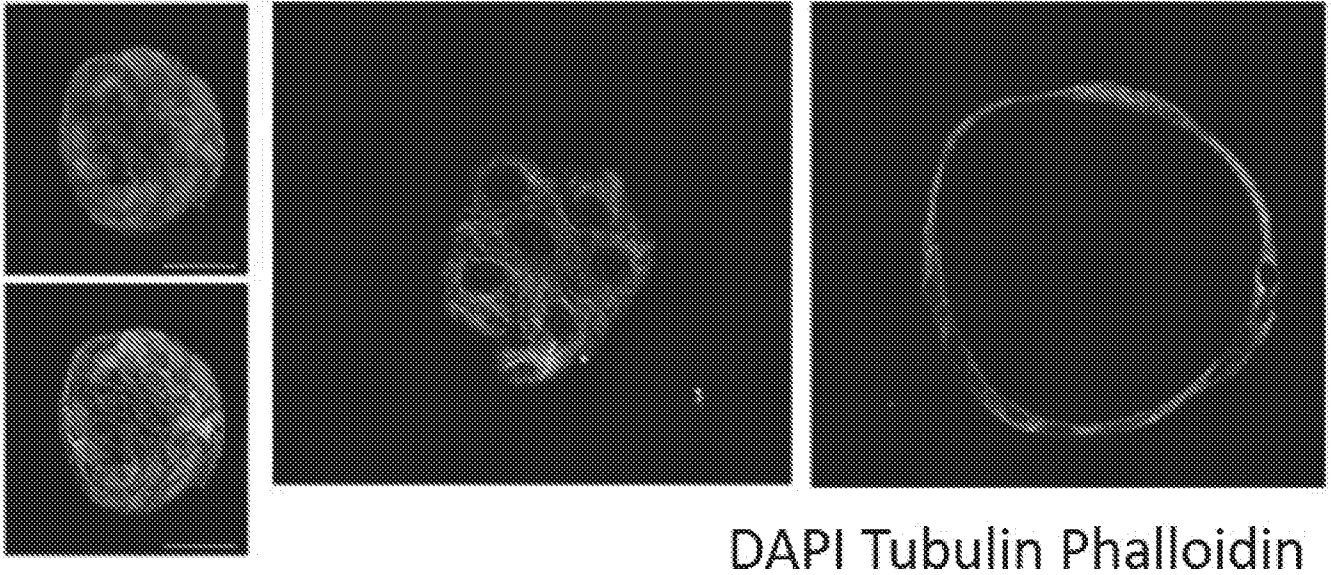
3. Minced tissue is transferred to collagenase/Dnase solution in HBSS

4. Wash dissociation solution and collect the cells by centrifugation. Mix cells with Matrigel and solidify. Finally, fill liquid media with growth factors.

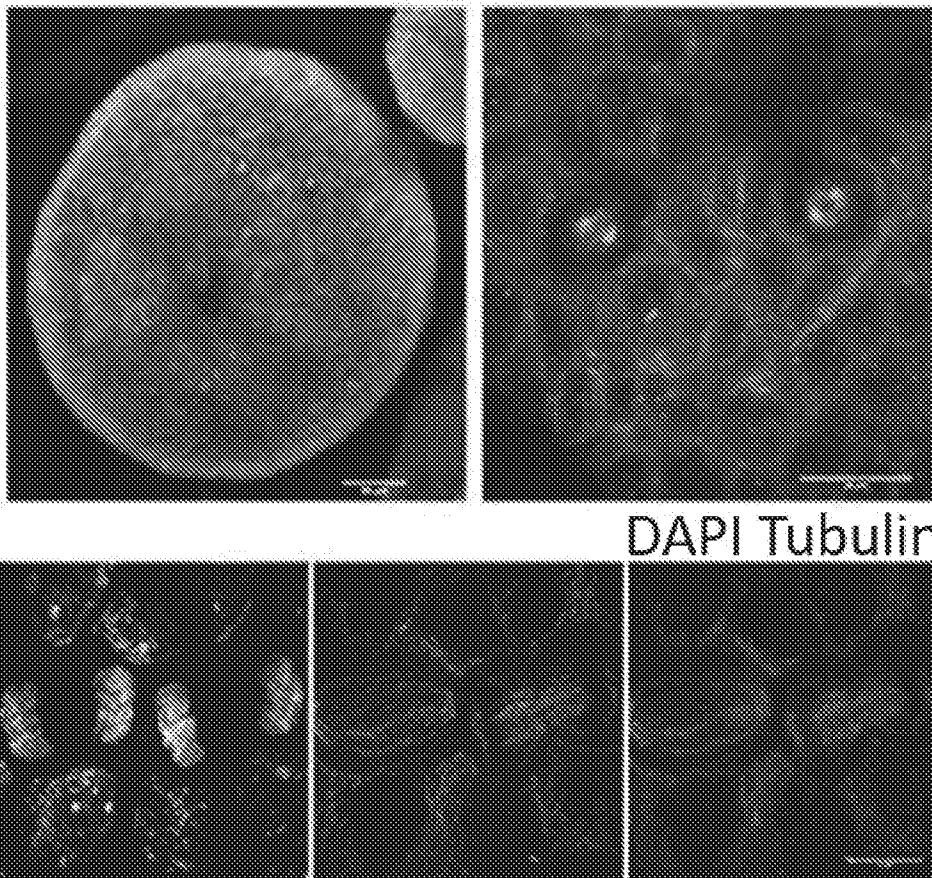


[도3]

3-D confocal imaging of human organoid



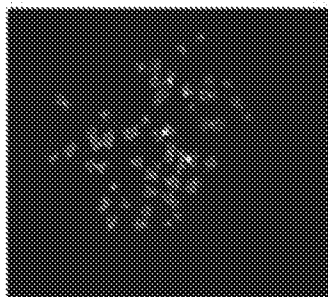
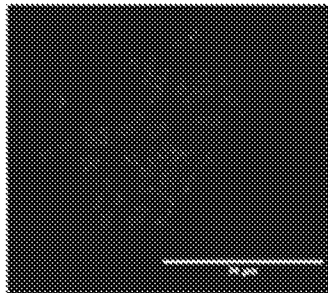
Immunofluorescence assay of human organoids



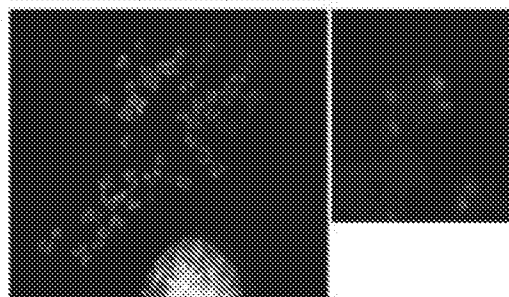
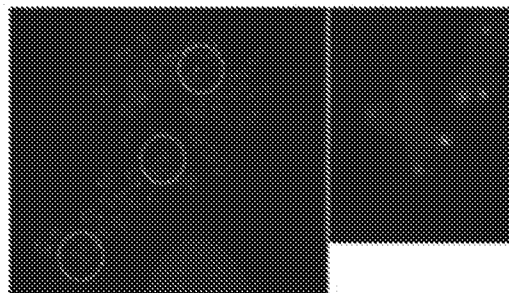
[도4]

FISH (Fluorescence in situ hybridization) with telomeric probe

DAPI TTAGGG CCCTAA

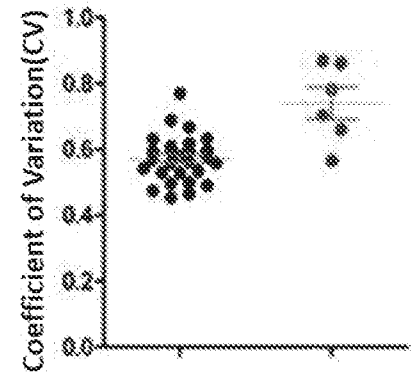


Normal Karyotype

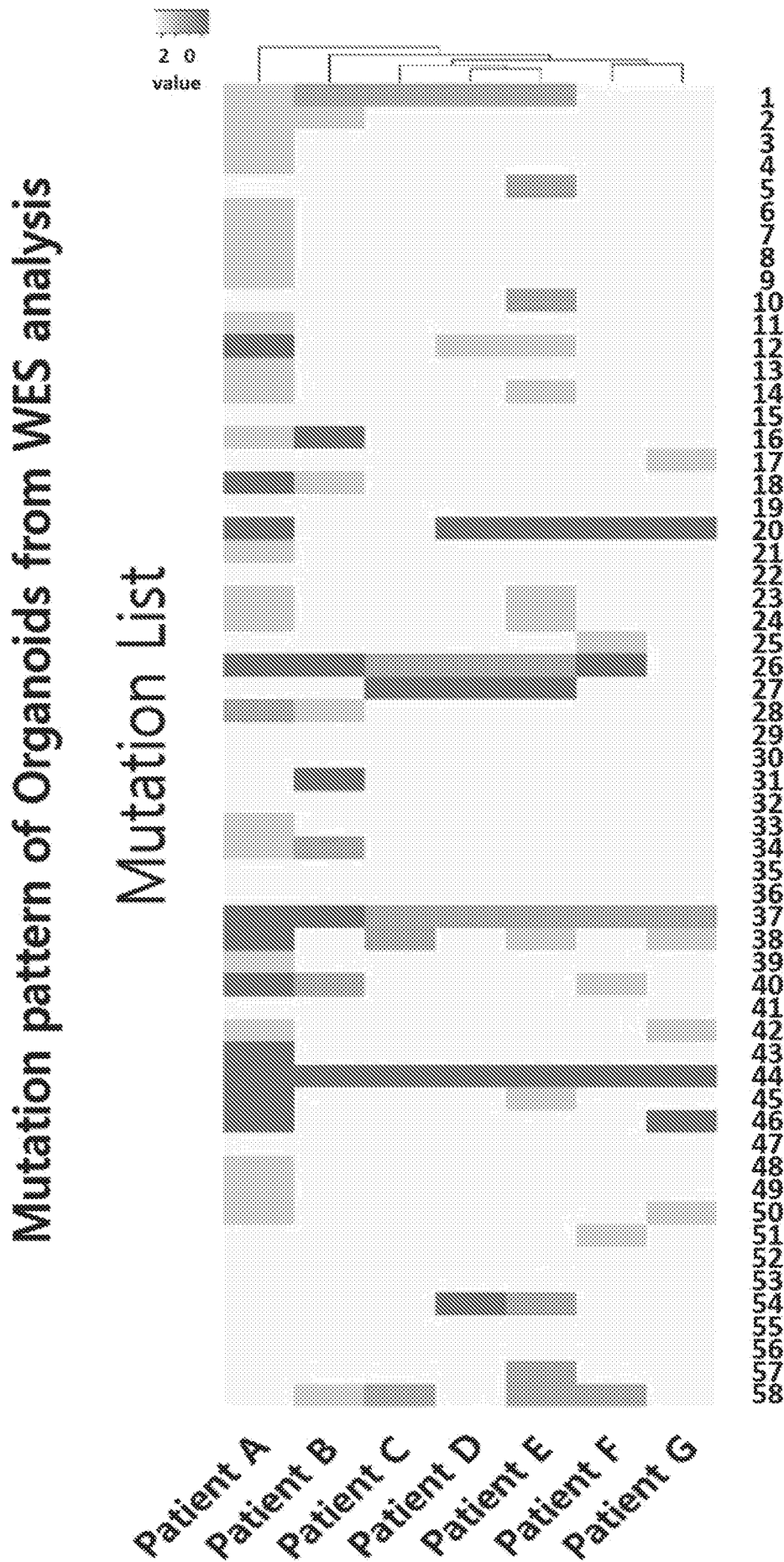


Cell with abnormal telomere (Telomere-Sister Chromatid Exchange)

Heterogeneity of telomere length

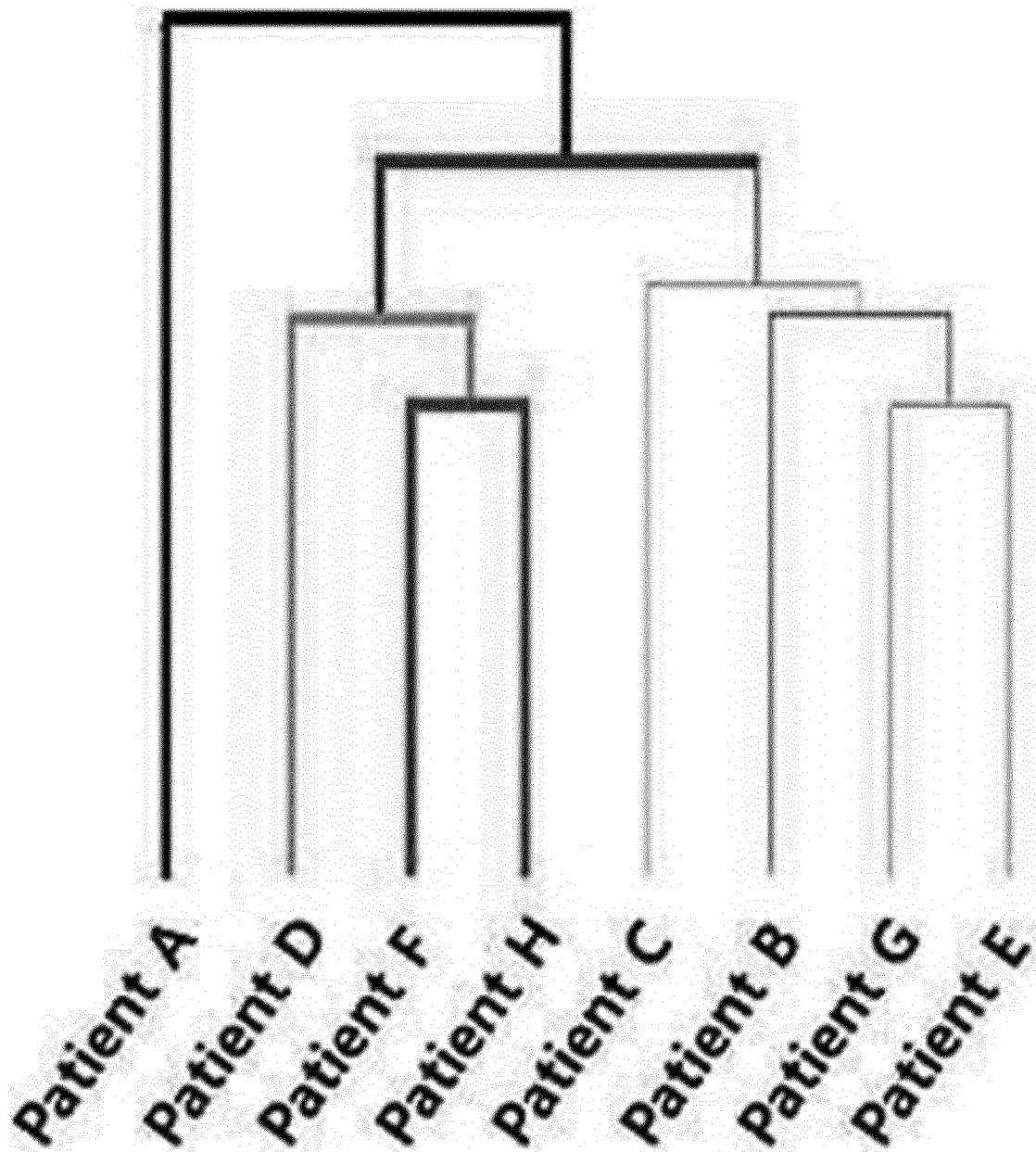
normal cells
Cells with T-SCE

[도 5a]

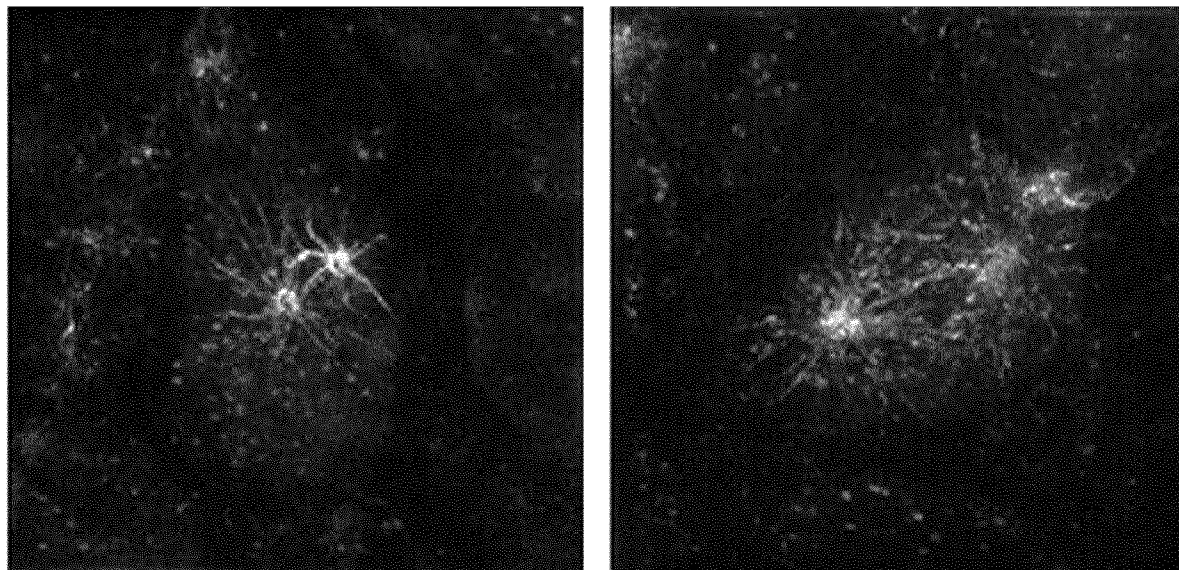


[도5b]

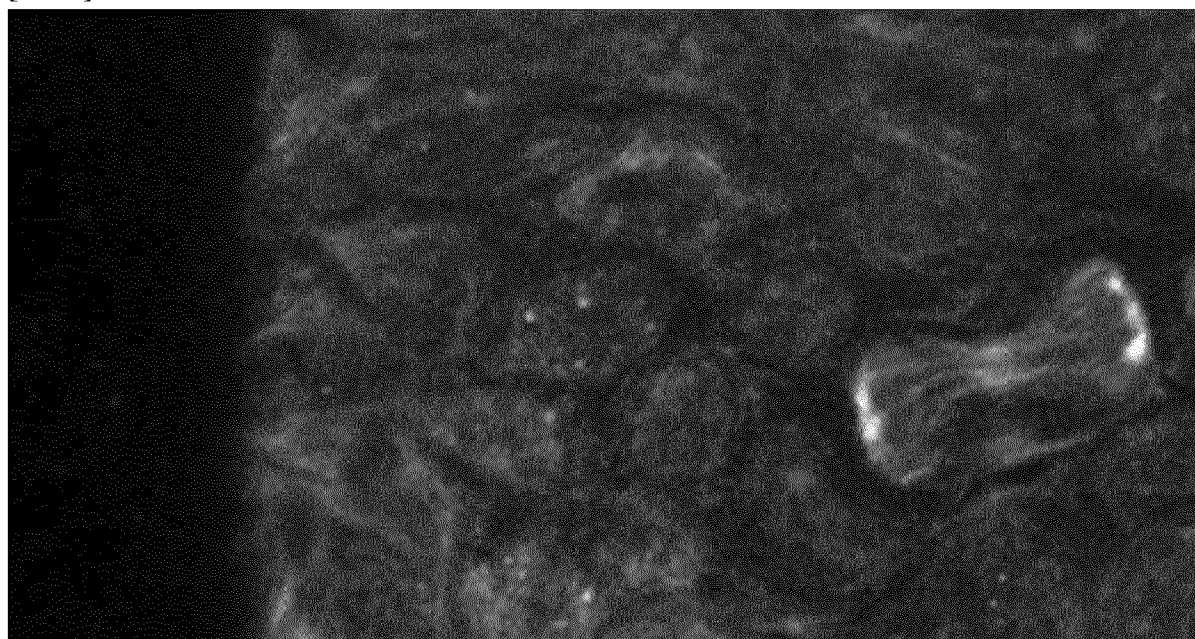
Dendrogram of organoids from RNA sequencing



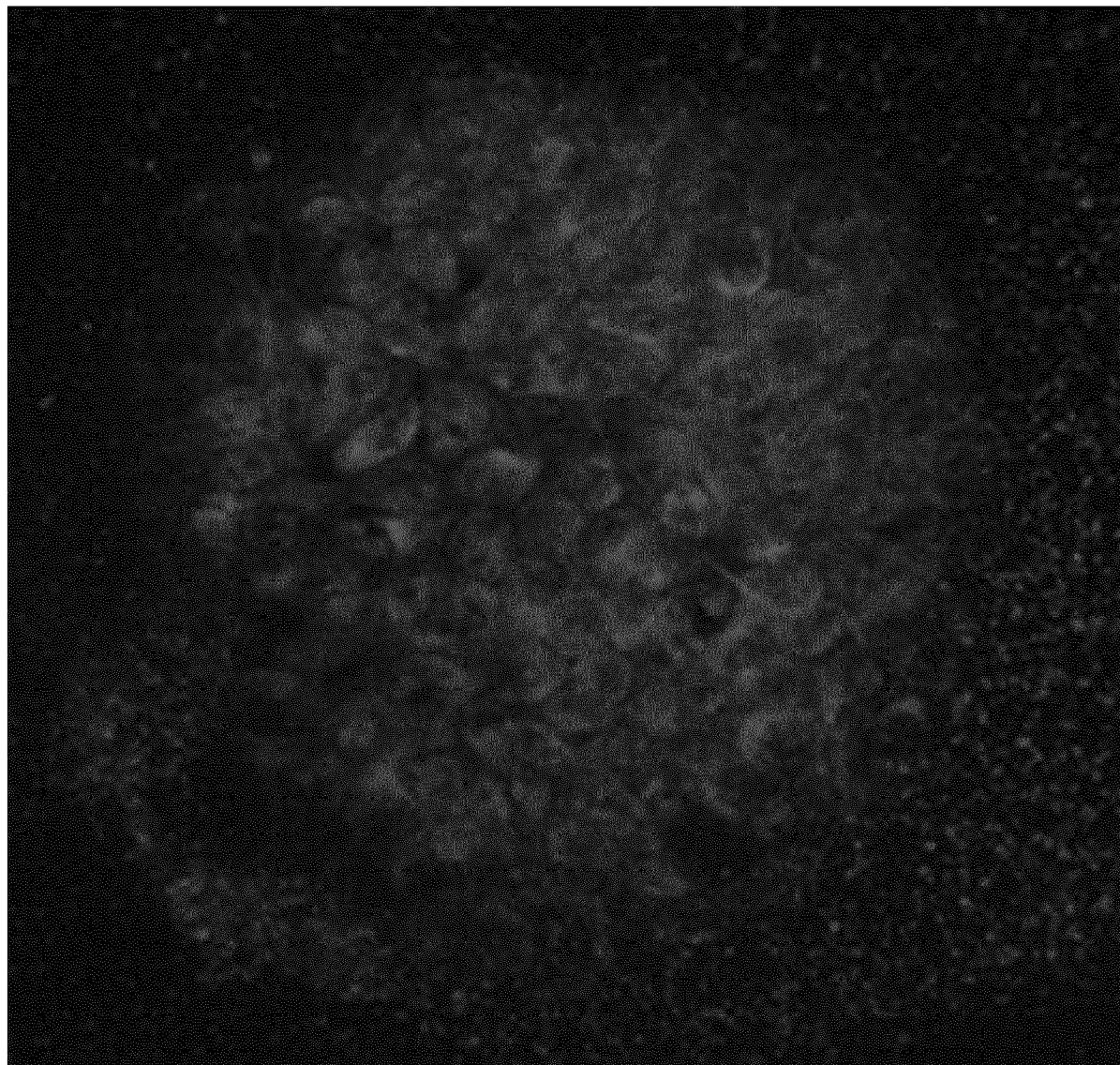
[도6a]

DAPI α -Tubulin Crest

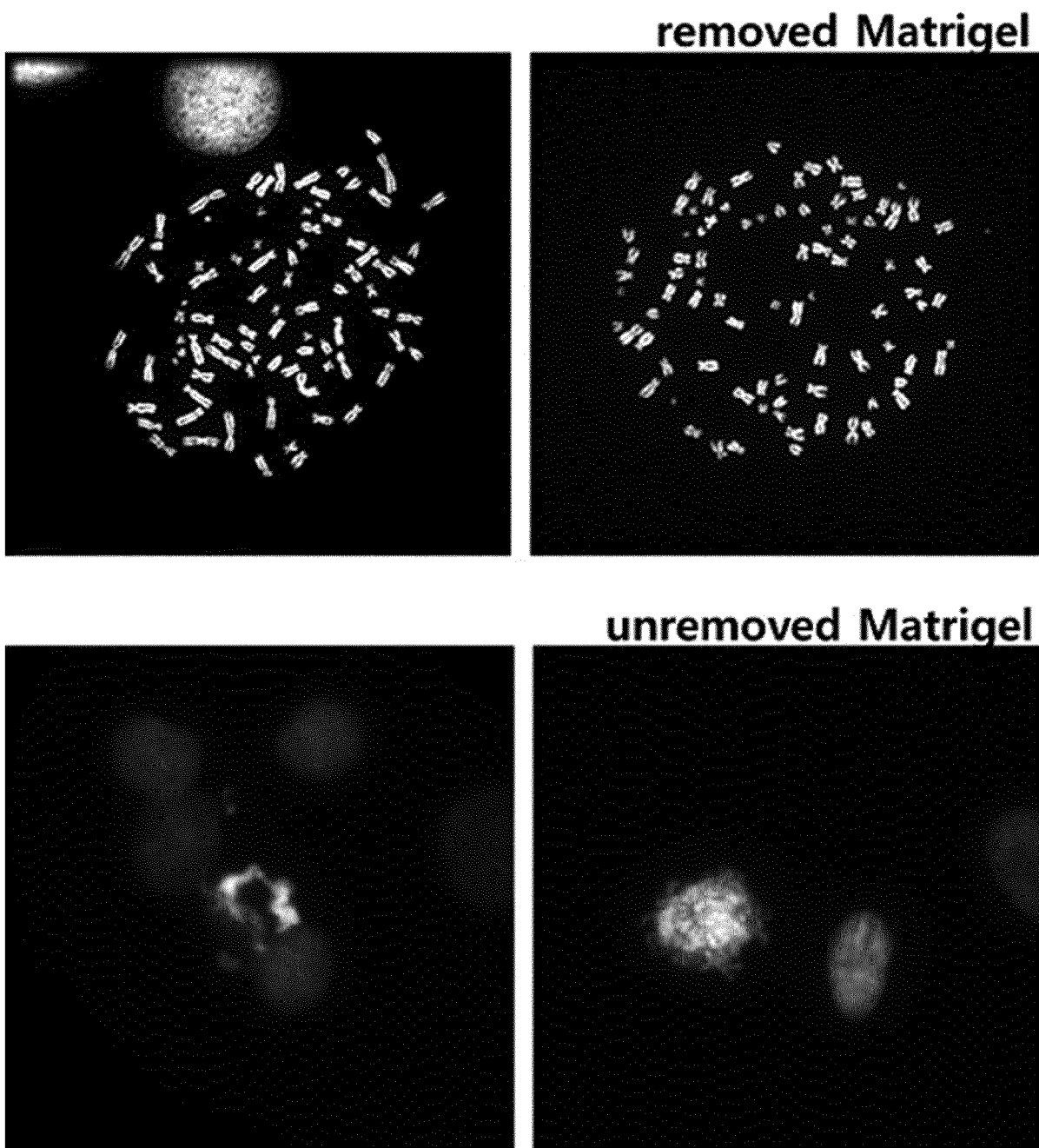
[도6b]



[도6c]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/007894

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i, C12N 5/09(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/071; A61K 35/407; C12N 5/00; G01N 33/50; C12N 5/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: organoid, biomarker, matrigel, diagnosis, karyotyping

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017-0191030 A1 (KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN) 06 July 2017 See paragraphs [0190], [0234], [0515], [0565], [0570], [0579]; and claim 35.	1-15
X	BOJ, Sylvia F. et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. Cell. 2015, vol. 160, pages 324-338 See pages 325, 330; Experimental procedures section; and figure 4.	1-15
X	NIKOLIC, Marko Z et al. Human embryonic lung epithelial tips are multipotent progenitors that can be expanded in vitro as long-term self-renewing organoids. eLIFE. 2017, vol. 6, e26575, pages 1-33 See abstract; and pages 2, 19, 26.	1-15
X	WO 2017-048193 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (A*STAR)) 23 March 2017 See paragraphs [0006], [0316]; and claims 151-153.	1-7, 14
PX	KR 10-2018-0136410 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 24 December 2018 See paragraphs [0018], [0034], [0042], [0048], [0050], [0053].	1-8, 10-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 OCTOBER 2019 (18.10.2019)

Date of mailing of the international search report

18 OCTOBER 2019 (18.10.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/007894

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2017-0191030 A1	06/07/2017	AU 2015-261380 A1 CA 2949171 A1 EP 3143126 A1 WO 2015-173425 A1	15/12/2016 19/11/2015 22/03/2017 19/11/2015
WO 2017-048193 A1	23/03/2017	EP 3350313 A1 US 2018-0258400 A1	25/07/2018 13/09/2018
KR 10-2018-0136410 A	24/12/2018	KR 10-1956552 B1 KR 10-2019-0025880 A WO 2018-230970 A1	11/03/2019 12/03/2019 20/12/2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/071(2010.01)i, C12N 5/09(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/071; A61K 35/407; C12N 5/00; G01N 33/50; C12N 5/09

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 오거노이드(organoid), 바이오마커(biomarker), 매트릭젤(matrigel), 진단(diagnosis), 핵형분석(karyotyping)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2017-0191030 A1 (KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN) 2017.07.06 단락 [0190], [0234], [0515], [0565], [0570], [0579]; 및 청구항 35 참조.	1-15
X	BOJ, SYLVIA F. 등, 'Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer', Cell, 2015, 160권, 페이지 324-338 페이지 325, 330; Experimental procedures section; 및 도면 4 참조.	1-15
X	NIKOLIC, MARKO Z 등, 'Human embryonic lung epithelial tips are multipotent progenitors that can be expanded in vitro as long-term self-renewing organoids', eLIFE, 2017, 6권, e26575, 페이지 1-33 요약; 및 페이지 2, 19, 26 참조.	1-15
X	WO 2017-048193 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (A*STAR)) 2017.03.23 단락 [0006], [0316]; 및 청구항 151-153 참조.	1-7, 14
PX	KR 10-2018-0136410 A (서울대학교산학협력단) 2018.12.24 단락 [0018], [0034], [0042], [0048], [0050], [0053] 참조.	1-8, 10-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 10월 18일 (18.10.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 10월 18일 (18.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

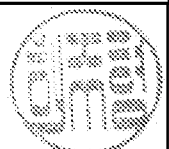
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2017-0191030 A1	2017/07/06	AU 2015-261380 A1 CA 2949171 A1 EP 3143126 A1 WO 2015-173425 A1	2016/12/15 2015/11/19 2017/03/22 2015/11/19
WO 2017-048193 A1	2017/03/23	EP 3350313 A1 US 2018-0258400 A1	2018/07/25 2018/09/13
KR 10-2018-0136410 A	2018/12/24	KR 10-1956552 B1 KR 10-2019-0025880 A WO 2018-230970 A1	2019/03/11 2019/03/12 2018/12/20