(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0108865
(43) 공개일자 2021년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12M 1/32 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5011 (2013.01)
C12M 21/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0160643
(22) 출원일자 2020년11월26일
심사청구일자 2020년11월26일
(30) 우선권주장
1020200022912 2020년02월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 넥스트앤바이오
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동,서울대학교,신관105-2동433비호)
(72) 발명자
정석
서울특별시 마포구 월드컵로3길 14 202동 801호 (합정동,마포한강2차푸르지오)
정용훈
서울특별시 성북구 동소문로2길 55-4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 다해

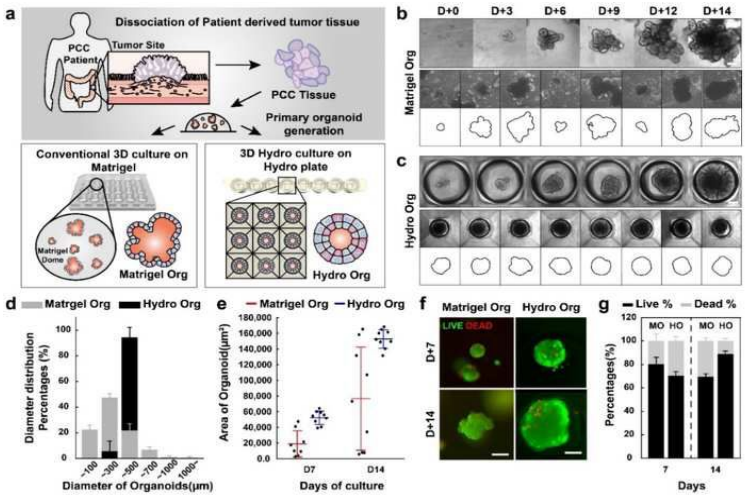
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **환자 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법**

(57) 요 약

본 발명은 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도12



(52) CPC특허분류
C12M 23/12 (2013.01)
C12M 23/38 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
(72) 발명자
오현직
경기도 하남시 덕풍북로 257 서하빌딩, 7
최동희
서울특별시 동대문구 무학로49길 22
양지훈
서울특별시 용산구 장문로45바길 1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711085192
과제번호 2017R1C1B2008399
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 신진연구자지원-신진연구
연구과제명 오가노이드 기술 기반 뇌 질환 환자 맞춤형 초고밀도 분석 플레이트 개발
기 여 율 1/4
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711083009
과제번호 2017R1A2B3007701
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (이공)중견연구자지원(5억초과)
연구과제명 3차원 종양미세환경이 통합된 환자종양모사시스템 개발과 종양 치료전략 연구
기 여 율 1/4
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415162054
과제번호 10067796
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
연구사업명 산업기술혁신사업
연구과제명 한국인 5대 고위험 암의 유전체-임상정보 통합 오가노이드 바이오뱅크 시스템 확립과 정밀의학 응용 플랫폼 개발
기 여 율 1/4
과제수행기관명 서울아산병원
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415169697
과제번호 20009853
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
연구사업명 3D생체조직칩기반신약개발플랫폼구축사업(R&D)
연구과제명 췌장 질환 모델을 위한 고효율 3D 오가노이드 온어 칩 시스템의 개발
기 여 율 1/4
과제수행기관명 (주)넥스트앤바이오
연구기간 2020.04.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

질병을 가진 대상체(subject)로부터 질병 조직을 분리하는 단계;

상기 질병 조직을 유전자 변이별로 분류하는 단계;

상기 분류된 질병 조직에서 세포를 분리하는 단계;

상기 분리된 세포를 3차원 세포배양 플레이트에서 질병 오가노이드로 배양하는 단계:

상기 배양된 질병 오가노이드에 약물을 처리하는 단계; 및

상기 질병 오가노이드의 활성을 측정하는 단계;를 포함하는

질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법으로,

상기 질병 오가노이드 배양 단계에서, 상기 3차원 세포배양 플레이트는 세포외 기질 기반 하이드로젤을 0 내지 2 부피% 포함하고,

상기 3차원 세포배양 플레이트는,

복수개의 메인 웰(main well)과, 메인 웰의 각각 하부에 형성되어 세포 배양액이 주입되며, 바닥면에 오목부를 포함하는 복수개의 서브 웰(sub well)을 포함하는 웰 플레이트(well plate); 및 웰 플레이트를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터;를 포함하며,

상기 대용량의 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터는, 웰 플레이트의 하단과 서로 착탈 가능하도록 고정수단이 구비된 베이스와 웰 플레이트의 상부에 위치하여, 베이스와 결합되는 커버를 포함하고, 상기 메인 웰은 소정부위 테이퍼지도록 단턱이 형성되며, 상기 단턱은 메인 웰의 벽을 기준으로 10 내지 60° 범위의 경사각(Θ)을 갖는 세포배양 플레이트인,

질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포외 기질 기반 하이드로젤은 매트리젤인, 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포는 암세포이고,

상기 배양기간은 1 내지 14일인, 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 서브 웰은 오목부를 향하여 테이퍼지도록 경사면이 형성되는 것을 특징으로 하는 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 서브 웰은 오목부를 향하여 테이퍼지도록 경사면이 형성되고,

상기 서브 웰(120)의 상단 직경은 3.0 내지 4.5 ㎜ 범위이고,

상기 오목부(121) 상단의 직경은 0.45 내지 1.5 ㎜ 범위이며,

상기 서브 웰과 오목부의 경사면(Θ_2)은 40 내지 50° 범위이고,

상기 서브 웰의 직경과 오목부의 직경에 대한 길이 비가 1:0.1 내지 0.5 범위인 것을 특징으로 하는 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 메인 웰의 개별 부피는 100 내지 300 ㎕ 범위이며,

상기 오목부의 개별 부피는 20 내지 50 ㎕ 범위이고,

상기 메인 웰과 오목부의 개별 부피비는 평균 1 : 0.1 내지 0.5 인 것을 특징으로 하는 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 메인 웰은, 단턱과 서브 웰 사이에 공간부를 포함하고,

상기 공간부의 높이(a_h)는 평균 2.0 내지 3.0 ㎜ 범위이며,

상기 서브 웰의 높이(b_h)는 평균 1.0 내지 2.0 ㎜ 범위이고,

상기 공간부와 서브 웰의 높이비(a_h:b_h)는 1:0.3 내지 1 범위인 것을 특징으로 하는 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 약물은 하나의 약물이거나 두 개 이상의 약물인, 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 오가노이드의 활성은 상기 오가노이드의 생존력(viability)인 것인, 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 질병 오가노이드의 활성을 측정하는 단계 이후에,

상기 약물을 처리한 후에 상기 질병 오가노이드의 활성이 상기 약물 처리 전과 비교하여 떨어진 경우, 상기 약물의 효과가 있는 것으로 판단하여 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물로 선택하는 단계를 더 추가하는 것인,

질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 약물이 두 개 이상인 경우,

상기 두 개 이상의 약물을 처리한 후에 상기 질병 오가노이드의 활성이 각각의 약물을 단독 처리한 경우와 비교하여 떨어진 경우, 상기 두 개 이상의 약물을 병용 처리한 경우 효과가 있는 것으로 판단하여 질병을 가진 대상체 맞춤형 병용 약물로 선택하는 단계를 더 추가하는 것인,

질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 질병 오가노이드의 활성을 측정하는 단계 이후에,

상기 약물의 IC50값을 도출하여 약물의 용량을 결정하는 단계를 더 추가하는 것인,

질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 질병은 암인, 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 암은 대장암, 폐암, 위암, 췌장암, 신장암, 뇌종양, 난소암, 피부암, 전립선암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 섬유육종, 자궁육종 또는 혈액암인, 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 약물은 항암제인, 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 항암제는 세포독성항암제, 면역항암제, 표적치료 항암제, 대사항암제 및 항암신약 치료제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항암제인, 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 환자 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명에 따라 배양된 오가노이드를 이용하여 질병을 가진 대상체 개별 맞춤형 약물 선택을 위한 정보를 제공하는 방법에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 오가노이드(organoid)는 '장기유사체' 또는 '유사장기'라고도 부르는데, 줄기세포나 장기 기원 세포로부터 분리한 세포를 3차원 배양법으로 다시 응집, 재조합하여 제조된 장기 특이적 세포 집합체이다. 오가노이드는 모델로 하는 장기의 특이적 세포를 포함하고, 장기가 지닌 특정 기능을 재현하며, 실제 장기와 유사한 형태로 공간적 조직화가 가능하다. 환자유래 종양 오가노이드(patient-derived tumor organoid)는 환자의 암세포 및 암조직의 특성을 그대로 나타내며 또한 환자 암조직의 유전적 변이 특성을 재현할 수 있다고 보고되었다.

[0004] 오가노이드는 세포 치료, 생체조직공학, 신약개발, 독성학 그리고, 정밀의료분야까지 이용될 수 있다. 오가노이드 활용도를 높이기 위해서는 많은 양의 비교가능한 정량적 오가노이드 및 그 분석방법이 필요하다. 그러나 아직까지 오가노이드를 정량적으로 배양하는 방법이 없다. 그 이유는 오가노이드를 키우는 요소 중 가장 중요한 요소인 매트리젤을 바닥에 돔 모양으로 굳힌 후 그 안에서 오가노이드를 키우기 때문에, 오가노이드가 제각각으로 자라게 된다.

[0005] 또한, 이렇게 매트리젤 안에서 자란 오가노이드들은 3차원 지지체 안에서 서로 겹쳐 자랄 수 도 있기 때문에 한계가 명확하다.

[0006] 또한 최근에는 초기 약물 발견 프로그램 및 독성 스크린에 사용하기 위해 훨씬 더 안정하고 생리적인 환자 유래 오가노이드와 결합한 초고속 스크리닝(high-throughput screening) 기술이 개발되고 있다.

[0007] 대한민국 등록특허 제10-1756901호(특허문헌 1)에는 3차원의 조직세포를 배양 가능한 세포배양 칩에 대해서 개시되어 있다. 상기 특허문헌 1의 세포배양 칩은 제1 배양부, 제2 배양부 및 제3 배양부를 각각 층별로 형성하고, 각 층별로 세포의 성장 진행 정도를 확인할 수 있다. 그러나, 특허문헌 1의 세포배양 칩은 오가노이드를 고수율로 수득할 수 없는 문제점이 있다.

[0008] 또한 세포 배양시 배양액을 교체하는 피펫팅 작업을 하는 경우가 있는데, 3차원 세포배양이 가능한 corning spheroid microplate의 경우, 세포 배양 중인 스페로이드 또는 오가노이드가 영향을 받아서, 피펫팅 작업시 빨려 올라가거나, 위치 변화 등이 발생하는 경우가 있어, 세포 배양 환경에 좋지 못한 문제가 있다.

[0009] 오가노이드는 동물 모델을 만들기 어려운 인간 질병을 낮은 비용으로 고용량 테스트 할 수 있는 이점이 있다. 그러나 거의 모든 경우에 기존의 3차원 (Matrigel organoid, MOs) 배양은 일반적으로 평탄면에 고착된 방울인 벌크 부피의 매트리젤(Matrigel쩨)에 세포를 내장시켜 수행하기 때문에, 배양된 MOs가 제멋대로 배열되고 생리적으로도 불규칙하다. 이러한 배양 방법은 실험실에서 수많은 통찰력있는 연구를 가능하게 했지만 고용량 스크리닝에 중요한 한계가 있다: 확장성, 일관성, 균일성, 오가노이드 생산 및 다세포 상호 작용의 재현성. 특히, 매트리젤 오가노이드는 고형화된 매트리젤에 내장된 구조이므로 초점 면에서 시공간의 차이가 발생하고 매트리젤 돔의 외부에서 내부로 물질 전달이 정확하게 이루어지지 않아서 독성 스크리닝 및 고용량 테스트시 부정확한 정량화를 초래한다.

[0010] 조직 수준의 복잡성과 관련하여, 종양은 암세포 및 내피 세포, 침윤성 면역 세포, 간질 세포 및 복잡한 세포외 기질 (ECM) 네트워크와 서로 다른 세포 유형을 포함하는 이질적인 세포 집단이다. 이 종양 이질성은 서로 다른 환자의 암 (종양 간 이질성)과 단일 종양 (종양 내 이질성) 사이에 위치한다. 후자는 세포 표면 마커 표현형의

다양성, (후생)유전적 이상, 성장 속도, 세포 사멸 및 암에 의해 유발된 질병의 진행 및 치료 실패의 다른 특징을 포함한다. 최근 관찰에 따르면 단일 종양에는 핵형, 암 줄기 및 화학 요법에 대한 민감성과 관련하여 서로 다른 하위 클론이 포함되어 있음을 보여준다. 더욱이, 이 이질성의 본질은 주어진 종양 세포의 서브 클론 및/또는 종양 미세환경과의 상호 작용을 통해 가역적으로 획득될 수 있다고 보고되었으며, 이는 종양 세포의 세포 상호 작용과 미세 환경이 모두 암 치료에 중요한 요인으로 작용할 수 있음을 시사한다.

[0011] 그러나 MOs의 클론 다양성과 약물 반응과 관련된 기능 사이의 특정 관계는 배양된 MOs의 무작위 전시 및 생리적 불규칙성으로 인해 제대로 이해되지 않고 있다. 이러한 한계를 개선하기 위해, 확장 가능한 균일 오가노이드 배양 및 스크리닝 플랫폼인 하이드로 플레이트(Hydro Plate)를 개발하였다.

[0013] 이에 본 발명자들은 세포외 기질 기반 하이드로젤(예, 매트리젤)을 사용하지 않거나 사용을 최소화하면서 균일한 크기를 가지는 오가노이드에 대한 연구를 계속하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-1756901호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보를 제공하기 위한 것이다.

[0017] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 다음을 포함하는

[0021] 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법을 제공한다:

[0022] 질병을 가진 대상체(subject)로부터 질병 조직을 분리하는 단계;

[0023] 상기 질병 조직을 유전자 변이별로 분류하는 단계;

[0024] 상기 분류된 질병 조직에서 세포를 분리하는 단계;

[0025] 상기 분리된 세포를 3차원 세포배양 플레이트에서 질병 오가노이드로 배양하는 단계:

[0026] 상기 배양된 질병 오가노이드에 약물을 처리하는 단계; 및

[0027] 상기 질병 오가노이드의 활성을 측정하는 단계;를 포함하는

[0028] 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물 선택을 위한 정보 제공 방법으로,

[0029] 상기 질병 오가노이드 배양 단계에서, 상기 3차원 세포배양 플레이트는 세포외 기질 기반 하이드로젤을 0 내지 2 부피% 포함하고,

[0030] 상기 3차원 세포배양 플레이트는,

[0031] 복수개의 메인 웰(main well)과, 메인 웰의 각각 하부에 형성되어 세포 배양액이 주입되며, 바닥면에 오목부를 포함하는 복수개의 서브 웰(sub well)을 포함하는 웰 플레이트(well plate); 및 웰 플레이트를 지지하는 대용량

고속 HCS(High contents screening)용 커넥터;를 포함하며,

[0032] 상기 대용량의 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터는, 웰 플레이트의 하단과 서로 착탈 가능하도록 고정수단이 구비된 베이스와 웰 플레이트의 상부에 위치하여, 베이스와 결합되는 커버를 포함하고, 상기 메인 웰은 소정부위 테이퍼지도록 단턱이 형성되며, 상기 단턱은 메인 웰의 벽을 기준으로 10 내지 60° 범위의 경사각(Θ)을 갖는 세포배양 플레이트.

[0033] 상기 대상체(subject)는 모든 동물을 포함하여, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0034] 상기 "질병 조직"이랑 질병이 발생한 조직을 말하며, 조직 또는 기관에서 분리된 것을 말한다.

[0035] 상기 질병 조직을 유전자 변이별로 분리하는 단계는, 질병을 가진 대상체에서 분리한 질병 조직을 이 기술분야에 널리 알려진 유전자 검사 방법으로 검사하여 질병을 유발하는 유전자의 변이를 알아낸 다음 이를 변이별로 분리하는 단계이다.

[0036] 예를 들면, 암유발 돌연변이 유전자로 알려진 KRAS, TP53, PIK3C 등에 변이가 일어난 경우 변이로 분류할 수 있다. 또 다른 예로는, MSI(microsatellite instability, 초위성체 불안정성) 라고 하여 하이/로우(high/low) 변이가 존재한다. 이러한 변이의 경우 DNA의 미스매치 복구 시스템이 제대로 작동하지 않으면서, 잘못 전사된 DNA가 제거되지 않고 계속하여 분열 복제하며 질병(예를 들면, 암)으로 변이하게 된다. 이처럼 다양한 변이들이 암에 존재하며, 이러한 변이들을 모두 타겟하는 약물들이 존재하지 않아, 계속된 발전이 필요하며, 또한 각 질환별, 예을 들면 대장암의 유전자 변이별로 조직을 분류할 수 있다.

[0037] 상기 분류된 질병 조직에서 단일 세포를 분리하고 이를 본 발명에 따른 3차원 세포배양 플레이트에서 질병 오가노이드로 배양할 수 있다. 본 발명에서 "질병 오가노이드"란, 질병을 가진 대상체 조직에서 분리해서 키운 오가노이드를 의미한다.

[0039] 상기 세포외 기질 기반 하이드로젤은 매트리젤(Matrigel, 제품명)일 수 있다.

[0040] 상기 세포는 암세포일 수 있다.

[0041] 상기 세포는 단일세포 일 수 있다.

[0042] 상기 세포는 암을 가진 대상체로 조직 또는 이미 만들어진 오가노이드에서 분리하여 얻을 수 있다. 조직을 세포화하여 단일세포로 분리하는 방법은 공지된 기술이므로 구체적인 설명은 생략한다.

[0043] 상기 세포 배양 기간은 1 내지 14일이 바람직하다

[0044] 상기 오가노이드의 크기는 직경 300-500 um일 수 있다.

[0045] 본 발명에서 제조되는 오가노이드의 크기는 300-500 um 범위인데, 이는 암 질환에 특히 최적화된 크기이다.

[0046] 본 발명의 "3차원 세포배양 플레이트"는 오가노이드 배양에 최적화된 플레이트로, 이하에서 자세히 설명한다. 이하에서 "3차원 세포배양 플레이트"는 "하이드로 플레이트"라고 기술되기도 하며, 이 하이드로 플레이트에서 배양된 오가노이드는 "하이드로 오가노이드(Hydro Organoids)" 또는 "HO" 또는 "HOs"로 기술된다. 또한 이의 대조군으로 매트리젤 기반 플레이트는 "매트리젤 플레이트"로 기술되고 (기존에 사용되는 기본 24웰 플레이트) 이 매트리젤 플레이트에서 배양된 오가노이드는 "매트리젤 오가노이드(Matrigel Organiods)" 또는 "MO" 또는 "MOs"로 기술된다.

[0048] 이하에서 자세히 설명하겠지만, 본 발명의 3차원 세포배양 플레이트를 이용하면 환자 유래 질병 오가노이드를 대량생산 할 수 있다.

[0049] 상기 3차원 세포배양 플레이트의 서브 웰은 오목부를 향하여 테이퍼지도록 경사면이 형성되고, 상기 서브 웰(120)의 상단 직경은 3.0 내지 4.5 ㎜ 범위이고, 상기 오목부(121) 상단의 직경은 0.45 내지 1.5 ㎜ 범위이며, 상기 서브 웰과 오목부의 경사면(Θ_2)은 40 내지 50° 범위이고, 상기 서브 웰의 직경과 오목부의 직경에 대한 길이 비가 1:0.1 내지 0.5 범위일 수있다.

[0050] 상기 3차원 세포배양 플레이트의 상기 메인 웰의 개별 부피는 100 내지 300 ㎕ 범위이며, 상기 오목부의 개별

부피는 20 내지 50 ㎕ 범위이고, 상기 메인 웰과 오목부의 개별 부피비는 평균 1 : 0.1 내지 0.5일 수 있다.

[0051] 상기 메인 웰은, 단턱과 서브 웰 사이에 공간부를 포함하고, 상기 공간부의 높이(a_h)는 평균 2.0 내지 3.0 ㎜ 범위이며, 상기 서브 웰의 높이(b_h)는 평균 1.0 내지 2.0 ㎜ 범위이고, 상기 공간부와 서브 웰의 높이비(a_h:b_h)는 1:0.3 내지 1 범위일 수 있다.

[0052] 상기 세포는 상기 세포배양 플레이트에 100 내지 300 cells/well로 시딩될 수 있다.

[0054] 본 발명의 구체예에서, 상기 약물은 하나의 약물이거나 두 개 이상의 약물일 수 있다.

[0055] 상기 오가노이드의 활성은 상기 오가노이드의 생존력(viability)을 의미하는 것일 수 있다.

[0057] 상기 질병 오가노이드의 활성을 측정하는 단계 이후에,

[0058] 상기 약물을 처리한 후에 상기 질병 오가노이드의 활성이 상기 약물 처리 전과 비교하여 떨어진 경우, 상기 약물의 효과가 있는 것으로 판단하여 질병을 가진 대상체 맞춤형 약물로 선택하는 단계를 더 추가할 수 있다.

[0059] 상기 약물이 두 개 이상인 경우,

[0060] 상기 두 개 이상의 약물을 처리한 후에 상기 질병 오가노이드의 활성이 각각의 약물을 단독 처리한 경우와 비교하여 떨어진 경우, 상기 두 개 이상의 약물을 병용 처리한 경우 효과가 있는 것으로 판단하여 질병을 가진 대상체 맞춤형 병용 약물로 선택하는 단계를 더 추가할 수 있다.

[0061] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 질병 오가노이드의 활성을 측정하는 단계 이후에, 상기 약물의 IC50값을 도출하여 약물의 용량을 결정하는 단계를 더 추가할 수 있다.

[0062] IC50이란, 약물이 투여되었을 때 세포의 활성도(enzyme/protein activity)가 절반으로 떨어지는 순간의 최대 농도(maximal concentration)을 가리킨다. 이를 통해 치료에 효과적인 약물 용량을 알아 낼 수 있다.

[0063] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 질병은 암일 수 있고, 구체적으로 상기 암은 대장암, 폐암, 위암, 췌장암, 신장암, 뇌종양, 난소암, 피부암, 전립선암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 섬유육종, 자궁육종 또는 혈액암일 수 있으나 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.

[0064] 또한 상기 약물은 항암제일 수 있고, 구체적으로 세포독성항암제, 면역항암제, 표적치료 항암제, 대사항암제 및 항암신약 치료제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.

[0066] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0067] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다.

[0068] 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0069] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.

[0070] 본 발명에서, "포함한다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0072] 일반적으로 오가노이드를 배양할 때 세포외 기질의 역할을 제공하기 위해 하이드로겔을 사용한다. 예를 들면,

메트리젤을 세포배양 플레이트 바닥에 돔 모양으로 굳힌 후 그 안에서 오가노이드를 키우게 되는데, 오가노이드가 크기와 모양이 제각각으로 자라게 되며, 그로 인해 기능이 제각각으로 자라서 표준화가 어려운 문제점이 있다.

[0073] 본 발명은 세포외 기질 기반 하이드로젤을 포함하지 않거나 최소한의 양을 포함한 3차원 세포배양 플레이트를 이용하여 오가노이드를 제조한다. 본 발명의 3차원 세포배양 플레이트에 대한 구체적인 설명은 다음과 같다.

[0075] 본 발명은 일 실시예에서 다음을 포함하는 3차원 세포배양 플레이트를 이용한다:

[0076] 복수개의 메인 웰(main well)과, 메인 웰의 각각 하부에 형성되어 세포 배양액이 주입되며, 바닥면에 오목부를 포함하는 복수개의 서브 웰(sub well)을 포함하는 웰 플레이트(well plate); 및

[0077] 웰 플레이트를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터;를 포함하며,

[0078] 상기 대용량의 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터는, 웰 플레이트의 하단과 서로 착탈 가능하도록 고정수단이 구비된 베이스와 웰 플레이트의 상부에 위치하여, 베이스와 결합되는 커버를 포함하며,

[0079] 상기 메인 웰은 소정부위 테이퍼지도록 단턱이 형성되며, 상기 단턱은 메인 웰의 벽을 기준으로 10 내지 60° 범위의 경사각(Θ)을 갖는 세포배양 플레이트.

[0081] 종래의 96 웰 플레이트의 경우, 고수율의 약물 효능 평가를 위해서는 실험 및 분석을 수차례 이상 진행하여야 하므로, 시간 및 비용이 많이 소요되는 문제가 있었다. 아울러, 세포 배양시 배양액을 교체하는 피펫팅 작업을 수행하는 경우가 종종 있는데, 종래의 코닝 스페로이드 마이크로플레이트(corning spheroid microplate)의 경우에는 세포 배양 중인 스페로이드 또는 오가노이드가 영향을 받아서, 피펫팅 작업시 스페로이드 또는 오가노이드가 빨려 올라가거나, 위치 변화 등이 발생하는 경우가 있어, 세포 배양 환경에 좋지 못한 문제가 있었다.

[0082] 따라서, 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 웰 플레이트 내에 형성된 복수개의 메인 웰 내에 복수개의 서브 웰을 포함시켜 고수율의 스페로이드/오가노이드 제작이 가능할 수 있으며, 플레이트를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터를 포함시켜, 대용량의 고속이미지 촬영시 공차를 줄여 웰 플레이트 내의 이미지를 균일하게 촬영할 수 있는 세포배양 플레이트를 제공한다. 나아가, 메인 웰의 탄턱에 의하여, 배양되는 세포는 미디어 교체시 피펫팅 작업에 의한 영향을 최소화할 수 있는 세포배양 플레이트를 제공한다.

[0084] 이하, 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하도록 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0085] 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0087] 도 1(a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 정면도이며, 도 1(b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 단면도이며, 도 2는 본 발명의 일 실실예에 따른 세포배양 플레이트에 형성된 메인 웰을 상세하게 나타낸 도면이고, 도 3은 본 발명의 일 실실예에 따른 세포배양 플레이트의 웰 플레이트, 베이스 및 커버를 보여주는 도면이다((a) 커버, (b) 베이스, (c) 마이크로 플레이트 및 베이스의 고정수단).

[0088] 이하, 도 1 내지 도 3을 참조하여 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트를 상세히 설명한다.

[0090] 도 1 내지 3 도시된 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트(10)는 복수개의 메인 웰(main well, 110)과, 메인 웰(110)의 각각 하부에 형성되어 세포 배양액이 주입되며, 바닥면에 오목부(121)를 포함하

는 복수개의 서브 웰(sub well, 120)을 포함하는 웰 플레이트(well plate, 100); 및 웰 플레이트(100)를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터(200)를 포함하여 구성된다.

[0091] 먼저, 도 1과 도 2를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 웰 플레이트(100)를 상세히 설명하도록 한다.

[0092] 상기 웰 플레이트(100)는 몰드를 통해 플라스틱 사출 성형된 플레이트 형상으로 만들어 진다. 이와 같이 플라스틱 사출을 위한 몰드 제작을 위해 미세 기계가공을 사용하여 생산단가를 낮추고, 쉽게 크기를 확대할 수 있도록 메인 웰(110)은 웰(well) 구조물로서 반복적인 패턴을 갖는다. 따라서, 세포의 대량 생산이 용이하며, 사용자의 요구에 맞추어 다양한 크기로 변형하여 사용이 가능하다.

[0093] 상기 메인 웰(110)은 웰 플레이트(100)에 복수개 형성되며, 각각의 메인 웰(110)은 단턱(101)을 포함한다. 상기 단턱(101)은 메인 웰(110)의 소정부위에 형성되는 것으로, 보다 상세하게는 상기 단턱(101)은 메인 웰(110)의 전체 길이의 1/3 내지 1/2 위치에 형성될 수 있으며, 상기 단턱(101)은 메인 웰(110)의 하단으로부터 1/3 내지 1/2 위치에 형성될 수 있다.

[0094] 종래에 마이크로 플레이트에서 세포 배양시에는 배양액을 교체하는 피펫팅 작업을 하는 경우가 있는데, 이러한 경우, 세포 배양 중인 스페로이드 또는 오가노이드가 영향을 받아서, 피펫팅 작업시 스페로이드 또는 오가노이드가 빨려 올라가거나, 위치 변화 등이 발생하는 경우가 있어, 세포 배양 환경에 좋지 못한 문제가 있었으나, 상기 단턱(101)은 이러한 문제를 방지하기 위함이다.

[0095] 상기 단턱(101)은 피펫이 적용되는 공간일 수 있으며, 구체적으로, 메인 웰(110)의 벽을 기준으로 10 내지 60° 범위의 경사각(Θ)을 가질 수 있다. 또는, 20 내지 50° 범위의 경사각을 가질 수 있으며, 바람직하게는 30 내지 45° 범위의 경사각을 가질 수 있다. 만일, 상기 단턱(101)의 경사각이 10° 미만인 경우에는 메인 웰(110) 내에 경사각이 너무 작아 피펫을 적용할 수 있는 공간이 충분하지 않아, 메인 웰(110) 내의 배양액을 흡입할 때, 피펫이 서브 웰(120) 안쪽으로 미끄러져 스페로이드 또는 오가노이드가 빨려 올라가거나, 위치 변화 등이 발생할 수 있다. 아울러, 상기 경사각(Θ)이 60° 를 초과하는 경우에는 피펫을 적용할 수 있는 공간은 마련되나, 단턱(101)의 경사각이 너무 커서 배양액을 충분히 흡입하기 어려울 수 있으며, 서브 웰(120)에 세포를 시딩 할 때, 세포가 모든 서브 웰(120)에 들어가지 않고, 단턱(101)에 시딩되는 문제가 발생할 수 있다. 따라서, 상술한 범위의 경사각을 갖는 것이 바람직하다.

[0096] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 메인 웰(110)은 단턱(101)과 후술하게 되는 서브 웰(120) 사이에 공간부(130)를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 공간부(130)는 배양액이 주입되는 공간으로, 서브 웰(120) 내부의 세포들이 동일한 배양액을 공유할 수 있는 공간이다.

[0097] 보다 구체적으로, 공간부(130)의 높이(a_h)는 평균 2.0 내지 3.0 ㎜ 범위일 수 있으며, 또는 2.2 내지 2.8 ㎜ 범위일 수 있으며, 또는 평균 2.3 내지 2.7 ㎜ 범위일 수 있다. 아울러, 서브 웰(120)의 높이(b_h)는 평균 1.0 내지 2.0 ㎜ 범위일 수 있으며, 또는 평균 1.2 내지 1.8 ㎜ 범위일 수 있다.

[0098] 예를 들면, 상기 공간부(130)의 높이(a_h)는 평균 2.5 ㎜ 이며, 서브 웰 의 높이(b_h)는 평균 1.5 ㎜ 일 수 있다.

[0099] 이때, 상기 공간부와 서브 웰(120)의 높이비(a_h:b_h)는 1:0.3 내지 1 범위일 수 있으며, 보다 상세하게 공간부와 서브 웰(120)의 높이비(a_h:b_h)는 1:0.4 내지 0.9 또는 1: 0.5 내지 0.8 일 수 있다. 만일, 서브 웰(120)의 높이가 공간부의 높이 대비 1:0.3 미만일 경우에는 서브 웰(120)의 미디어를 교환 시, 조금의 힘으로도 내부에서 배양 중인 세포들이 튀어나올 수 있으며, 서브 웰(120)의 높이가 공간부의 높이 대비 1:1을 초과하는 경우에는 세포에 필요한 배양액이 충분하게 변환되지 않아, 세포의 죽음을 유발할 수 있다. 따라서, 공간부(130)와 서브 웰(120)은 상술한 높이 범위와 높이비율을 갖는 것이 바람직하다.

[0101] 다음으로, 서브 웰(120)은 메인 웰(110)의 각각 하부에 형성되는 것으로, 바닥면에 오목부(121)를 포함한다. 특정 양태로서, 상기 서브 웰(120)은 메인 웰(110)의 하부에 복수개를 포함할 수 있다.

[0102] 메인 웰(110)의 하부에 포함되는 서브 웰(120)은 각각의 크기와 모양이 동일하고, 이에 따라 균일한 조건의 오가노이드를 생성할 수 있다.

[0103] 상기 서브 웰(120)은 오목부(121)를 향하여 테이퍼지도록 경사면이 형성될 수 있다. 구체적으로, 상기 서브 웰(120)의 상단부는 수직 방향을 기준으로 하강할수록 수평 넓이가 줄어들 수 있다. 예를 들면, 상기 서브 웰

(120)의 상단부는 역피라미드 형상으로 이루어질 수 있다. 도시된 실시예에서는 서브 웰(120)의 상단부가 피라미드 형상이나, 깔대기 형상과 같이, 수직 방향으로 하강할 수록 수평의 넓이가 줄어드는 형상으로 구성될 수 있다.

[0104] 특히, 상기 서브 웰(120)은 크기와 모양이 동일하도록 복수개를 포함함으로써, 상기 세포배양 플레이트는 균일한 조건에서 대량의 스페로이드 또는 오가노이드를 생성할 수 있다.

[0105] 특정 양태로서, 하나의 메인 웰(110)에는 동일한 크기의 서브 웰(120)을 4 내지 25개를 포함할 수 있으며, 전체 마이크로 플레이트(100)에는 96 내지 1,728 개의 서브 웰(120)을 포함할 수 있다. 이에 따라, 동일하고, 정밀하게 사이즈 컨트롤이 가능하다. 따라서 크기와 모양이 균일한, 즉 표준형 오가노이드를 대량 생산 할 수 있다.

[0106] 아울러, 서브 웰(120)은 오목부(121)를 포함하며, 상기 오목부의 하단에는 상기 오목부(121)는 3D 스페로이드 또는 오가노이드가 배양될 수 있도록 공간이 형성된다. 구체적으로, 상기 오목부(121)는 'U'자 형태, 'V' 자 형태 또는 'Ш'자 형태일 수 있으며, 예를 들면, 상기 오목부(121)는 'U'자 형태일 수 있다.

[0107] 상기 서브 웰(120)의 상단 직경은 3.0 내지 4.5 ㎜ 범위일 수 있으며, 또는 3.5 내지 4.3 ㎜ 일 수 있으며, 또는 평균 4 ㎜ 일 수 있다. 아울러, 오목부(121) 상단의 직경은 0.45 내지 1.5 ㎜ 일 수 있으며, 또는 0.5 내지 1.0 ㎜ 또는 평균 0.5 ㎜ 일 수 있다.

[0108] 아울러, 상기 서브 웰(120)의 직경과 오목부(121)의 직경에 대한 길이 비가 1:0.1 내지 0.5 범위일 수 있으며, 바람직하게는 상기 서브 웰(120)의 직경과 오목부(121)의 직경에 대한 길이 비는 1: 0.12 일 수 있다.

[0109] 상기 오목부(121)의 상단 직경이 서브 웰(120)의 상단 직경(1) 대비 0.1 미만인 경우에 오목부(121)의 세포 배양 공간을 충분히 마련하지 못해 배양액 교체시에, 조금마한 힘으로도 세포들이 빠져 나오는 문제가 발생할 수 있으며, 오목부(121)의 상단 직경이 서브 웰(120)의 상단 직경(1) 대비 0.5을 초과하는 경우, 세포에게 필요한 충분한 배양액을 교체하지 못하여 안정적으로 배양하기 어려운 문제가 발생할 수 있다.

[0110] 한편, 메인 웰의 벽을 기준으로 서브 웰(120)과 오목부(121)의 경사면은 40 내지 50° 의 경사각(Θ_2)을 가질 수 있으며, 42 내지 48° 범위의 경사각(Θ_2), 43 내지 47° 범위의 경사각(Θ_2), 또는 평균 45° 의 경사각(Θ_2)을 가질 수 있다.

[0111] 상술한 서브 웰(120)은 100 cells/well 이하의 세포배양이 가능할 수 있으며, 100 cells/well 이하의 세포를 시딩 하였을 때, 오가노이드 크기를 안정적으로 제어할 수 있는 이점이 있다.

[0112] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 메인 웰(110)의 개별 부피는 100 내지 300 ㎕ 범위이며, 오목부(121)의 개별 부피는 20 내지 50 ㎕ 범위이고, 상기 메인 웰(110)과 오목부(121)의 개별 부피비는 평균 1 : 0.07 내지 0.5 인 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 상기 일 실시예에 따른 메인 웰(110)의 개별 부피는 250 내지 300 ㎕ 범위이며, 상기 오목부의 개별 부피는 25 내지 35 ㎕ 범위일 수 있으며, 상기 메인 웰(110)과 오목부(121)의 개별 부피비는 평균 1 : 0.11 일 수 있다.

[0113] 구체적으로, 메인 웰(110)의 개별 부피가 100 ㎕ 미만인 경우, 세포 배양시 충분한 배양액을 수용할 수 없는 문제가 발생할 수 있으며, 300 ㎕ 를 초과하는 경우에는 배양 효율이 떨어질 수 있다.

[0114] 아울러, 오목부(121)는 실질적인 세포가 배양되는 공간으로, 그 부피가 20 ㎕ 미만인 경우에는 세포 배양 공간이 충분하지 않아 세포들이 빠져 나오는 문제가 발생할 수 있으며, 50 ㎕ 를 초과하는 경우 세포 등을 안정적으로 배양하기 어려운 문제가 발생할 수 있다. 따라서, 상기 메인 웰(110)과 오목부(121)는 상술한 범위의 부피를 갖는 것이 바람직하다.

[0115] 상기 언급한 본 발명의 세포배양 플레이트의 구성으로 인해, 하이드로젤(매트리젤)을 포함하지 않거나 2 부피% 미만으로 포함해도, 오가노이드를 잘 형성할 수 있다.

[0116] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트(10)는 웰 플레이트(100)를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터(200)를 포함한다. 여기서, 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터(200)라 함은 HCS(High contents screening) 시스템에 안착되는 커넥터(200)를 의미하는 것으로, 구체적으로, 상기 커넥터(200)는 본 발명에서는 베이스(210)와 커버(220)를 의미할 수 있다.

[0117] 보다 구체적으로, 상기 대용량의 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터는, 웰 플레이트(100)의 하단과 서로 착탈 가능하도록 고정수단(140, 240)이 구비된 베이스(210)와 웰 플레이트(100)의 상부에 위치하여, 베이

스(210)와 결합되는 커버(220)를 포함한다. 그리고, 상기 베이스(210)의 상단 및 웰 플레이트(100)의 하단은 서로 착탈 가능하도록 고정이 가능한 고정수단(140, 240)을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0118] 이때, 상기 베이스는, 웰 플레이트(100)를 지지하기 위한 철(凸)부(240)를 포함하며, 상기 웰 플레이트(100)는 베이스(210)의 철부(240)에 대향되는 요(凹)부(140)를 포함할 수 있다. 상기 고정수단에 의해서 웰 플레이트(100)가 고정되어 스크리닝시 이미지가 균일하게 촬영될 수 있다.

[0119] 상기 베이스는, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스타이렌, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리아미드, 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리우레탄, 폴리카보네이트, 폴리염화비닐리덴, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리에테르에테르케톤 또는 폴리에테르이미드 소재로 이루어질 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.

[0120] 상기 웰 플레이트는, 폴리디메틸실리콘, 고지방 변성 실리콘, 메틸클로로페닐 실리콘, 알킬변성실리콘, 메틸페닐실리콘, 실리콘폴리에스터, 또는 아미노변성실리콘 소재로 이루어질 수 있으나 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.

[0122] 보통 동물을 이용한 전임상 실험은 수개월이 걸린다. 그러나 본 발명은 앞서 언급한 하이드로 플레이트에서 배양한 하이드로 오가노이드를 이용하여 이 시간을 획기적으로 단축할 수 있다. 구체적으로, 하이드로 플레이트에서 배양한, 유전자 변이를 알고 있는 환자 유래 질병 오가노이드를 이용하여 환자 맞춤형으로 최적의 약물을 찾아 줄 수 있으며, 기간은 2-3 주 밖에 걸리지 않는다.

[0123] 예를 들면, 대장암의 경우 대장 타입 별로 사용하는 약물이 다르다. 일반적인 타입의 경우, 5-FU, 옥살리플라틴(Oxaliplatin) 등 단일 치료제를 적용하는 경우도 있고, FOLFOX(Irinocan+cetubximeb)와 같은 합성약물을 처리하기도 한다. 앞서 설명한 변이인 MSI 타입의 경우, Xelox(Capecitabine + Oxaliplatin)를, 그리고 KRAS 변이의 경우, RO5126766; IDF-11774; 및 azd3965를 이용한다.

[0124] 본 발명에 따른 일 실시예에서는, 각 대장암 조직의 RNA 발현을 시퀀싱을 통해 유전자 수준(genomic level)에서 분석한 후, 이를 바탕으로 발견된 돌연변이들을 분류하여 돌연변이를 바탕으로 오가노이드화 된 대장암 오가노이드에 처리할 후보 약물군들을 빠른 기간에 정확하게 결정할 수 있었다. 또한 대장암 오가노이드에 실제 이러한 후보 약물들을 처리하여 어떠한 약물이 가장 효과가 좋은지 판단할 수 있었다.

발명의 효과

[0126] 본 발명의 오가노이드 제조방법은 매트리젤 사용을 최소화할 수 있기에 경제적이다. 또한 본 발명에 따른 오가노이드 제조방법은 질병 오가노이드를 대량 생산하는 효과를 제공한다.

[0127] 본 발명을 통하여, 대용량 약물 스크리닝 진행 시, 기존과 달리 서로 비교가능한 균일한 사이즈로 오가노이드가 형성되기 때문에, 약물의 효과 및 정량적 분석이 가능해진다. 이를 통해, 각 변형 유전자 특이에 적합한 약물을 선택해 낼 수 있고, 좀 더 효과적인 약물 치료가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0129] 도 1(a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 정면도이며, 도 1(b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 단면도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트에 형성된 메인 웰을 상세하게 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실실예에 따른 세포배양 플레이트의 웰 플레이트, 베이스 및 커버를 보여주는 도면이다((a) 커버, (b) 베이스, (c) 마이크로 플레이트 및 베이스의 고정수단).

도 4는 실시예 1 및 비교예 1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 도면이다((a) 실시예 1, (b) 비교예 1).

도 5(a)는 본 발명의 일 실시예에 따라 매트리젤을 2 부피%로 포함한 것과 매트리젤을 사용하지 않은 오가노이드 배양 결과이고, (b)는 면역형광염색 결과이다.

도 6(a)는 실시예 1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진이며, 도 6(b)는 실시예 1에서 배양한 오가노이드

의 면적을 나타내는 그래프이다.

도 7(a)는 비교예 1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진이고, 도 7(b) 는 비교예 1에서 배양한 오가노이드의 면적을 나타내는 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 대장암 세포를 14일 간 배양하였을 때의 이미징 결과(왼쪽)와 오가노이드 크기 분포(오른쪽)를 보여준다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 대장암 세포를 14일간 배양한 오가노이드 염색 이미지(왼쪽) 및 오가노이드 생존율(오른쪽)을 보여준다.

도 10은 실시예 1 내지 3의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진과 그래프이다(100 cell/well-실시예 1, 200 cell/well-실시예 2, 300 cell/well-실시예 3).

도 11은 하이드로 오가노이드 배양 플레이트를 이용한 플랫폼 개발 모식도이다. (a) 오가노이드 배양을위한 U 자형 마이크로 웰 스트립 플랫폼 설계 (하이드로 플레이트). 왼쪽 상단; 단일 U 자형 마이크로 웰 스트립의 상단 및 측면도, 오른쪽 상단; U 자형 마이크로 웰 스트립 용 96 웰 플레이트. 스케일 바, 9mm. 바닥; 스트립의 마이크로 웰에 오가노이드 형성의 시간 과정 도식. 스트립의 단일 U 자형 웰은 9 개의 마이크로 웰로 구성되며 스트립은 96 웰 플레이트에 삽입될 수 있다. 스케일 바, 9mm. (b) 오가노이드 생성의 흐름도. (cd) 플랫폼 유래 오가노이드를 보여주는 대표적인 명시야 이미지(Matrigel Org; Matrigel-embedded organoid, Hydro Org; Hydrogel-based organoid). 스케일 바, (c)는 200㎛, (d)는 500㎛. (e) 하이드로 오가노이드에서 KRT20, F-액틴, 뮤신 2, 크로모그라닌 A, 리소자임 , E- 캐드헤린 및 β-카테닌의 발현을 보여주는 대표적인 면역 형광 이미지 . 하부 패널은 상부 패널의 삽입물에 대한 큰 확대 이미지, 핵 카운터 염색 (파란색); 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), 스케일 바, 상단은 100㎛, 하단은 50㎛.

도 12는 본 발명의 하이드로 플레이트에서 일관되고 표준화된 오가노이드 생성을 보여주는 데이터이다. (a) 오가노이드 생성의 개략도. 1 차 오가노이드는 전통적인 매트리젤 돔에 있는 환자 유래 대장 암 조직에서 확립되었다. 오가노이드는 단일 세포로 해리되고 각각 매트리젤, 100 % 또는 2 %를 포함하는 배양 배지에서 매트리젤 내장 또는 하이드로겔 플랫폼에서 생성되었다. (b, c) (b) 매트리젤 및 (c) Hydro 배양 플랫폼에서 생성된 오가노이드의 시간 경과 이미지. 스케일 바, 100㎛. 플랫폼에서 파생된 오가노이드의 개별 형태 (상단 패널) 및 해당 그림 (하단 패널). Matrigel Org; Matrigel-embedded organoid, Hydro Org; Hydrogel-based organoid. (d) 직경 분포에 대한 정량적 측정 및 (e) 생성된 오가노이드의 평균 면적 (평균 ± sdm, n = 9). (f) 대표적인 형광 현미경 이미지 및 (g) 생성된 오가노이드의 생존력. 오가노이드는 각 플랫폼에 플레이팅된 후 7 일 및 14 일에 라이브/ 데드 분석 염료로 염색되었다. 오가노이드 당 살아있는 세포와 죽은 세포의 상대적 비율이 분석되었다. (평균 ± SEM, n = 6). 스케일 바, 200㎛.

도 13은 하이드로-오가노이드에서 세포 내 구성의 특성을 보여주는 것이다. (a) KRT20, 크로모그라닌 A, LGR5, β-카테닌 , CD44, 뮤신 2, 리소자임 및 F-액틴에 대한 전체 마운트 공 초점 이미지 . 스케일 바, MO의 경우 50㎛, HO의 경우 100㎛. (b-c) 각 플랫폼 유래 오가노이드에서 암 줄기 세포 하위 집합에 대한 정량화. (b) 표시된 오가노이드에서 대표적인 암 줄기세포 마커의 발현을 보여주는 히스토그램 플롯. (c) 표시된 오가노이드에서 CD44 + EpCAM + CD166 + CD133 + LGR5 + 세포에 대한 대표적인 밀도 플롯 게이팅. 빨간 상자; 오가노이드 당 각 하위 집합의 상대적인 총 백분율. (d) 각 오가노이드에서 ki67 (증식 마커), LGR5, β- 카테닌 (줄기세포 마커), Sox9, Chromogranin A 및 Villin (분화 마커)의 상대적 발현 수준 . 메트리젤 오가노이드 (MO, n = 3)와 비교한 하이드로 오가노이드 (HO , n = 3) 에서 각 표시된 유전자의 폴드 발현은 RQ-PCR에 의해 결정되었다 (3 회 실험, * $p < 0.05$, ns , $p > 0.05$). .

도 14는 전임상 약물 스크리닝 모델로서 환자 유래 하이드로 오가노이드의 평가 방법을 나타낸 것이다. (a) 실험 워크 플로의 계획. (b) 1 차 CRC 요법에 대한 IC_{50} 값 과 함께 용량-반응 곡선. 확립된 하이드로 오가노이드를 비히클 (DMSO), 독시플루리딘(Doxifluridine) , 옥살리플라틴(Oxaliplatin) 또는 독시플루리딘과 옥살리플라틴의 조합으로 6 일 동안, 2일에 한번씩 총 3번 약물을 처리하고 약물 반응에 대한 CCK8 분석으로 측정하였다 (평균 ± sem). (c) 약물 처리된 하이드로 오가노이드에서 ki67 (증식 마커) 및 caspase 3 (아폽토시스 마커)의 상대적 발현 수준. RQ-PCR에 의해 결정된 바와 같이 DMSO- 처리 그룹의 수준에 대한 지시 된 약물-처리 그룹에서의 발현의 배수 변화가 표시됨 PCR (mean ± s.d.m. n.s. $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<=0.001$). (d-f) XELOX 조합 (Capecitabine + Oxaliplatin) 에 대한 전임상 근거 요약. (d) 옥살리플라틴 또는 XELOX 조합으로 처리된 하이드로 오가노이드의 대표적인 명시야 이미지. 스케일 바, 500㎛ (e) 카

페시타빈(capecitabine) 과 옥살리플라틴 (XELOX) 의 병용 효과 . 각 조건에서 표시된 농도에 대해 반응률 개선 비율을 분석하였다(평균 ± s.d.m.). (f) 기존 동물 실험 모델을 대체하기 위하여, 실제 동물 실험에서 측정되었던 TP(thymidine phosphorylase) 발현도를 똑같이 하이드로 오가노이드에서 측정하여 얼마나 유사한지 확인하였다. 이는 옥살리플라틴을 처리 할 시, 더 많은 TP가 오가노이드 대장암에서 발현되며, 이는 좀 더 많은 독시플루리딘을 5-FU로 치환시켜 혼합 약물의 효과를 극대화 할 수 있다. 따라서 옥살리플라틴- 처리된 하이드로 오가노이드 에서 TP(thymidine phosphorylase) 발현은 효소 결합 면역 흡착 분석에 의해 측정되었으며, 인간 TP에 특이적인 단일 클론 항체를 사용하였다 (평균 ± sdm . ns . P > 0.05, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <= 0.001).

도 15는 환자 유래 매트리젤 오가노이드와 비교한 환자 유래 하이드로 오가노이드의 차별화된 약물 민감도이다. (a) 실험의 개략도. 하나의 모 오가노이드로부터 확립된 매트리젤 또는 하이드로 오가노이드를 비히클(DMSO), 독시플루리딘 , 옥살리플라틴 또는 독시플루리딘과 옥살리플라틴의 조합으로 격일 로 6 일 동안 처리했다. (bc) 표시된 조건 하에서 (b) 매트리젤 또는 (c) 하이드로 오가노이드의 대표적인 라이브/ 데드 이미지. 오가노이드는 약물 치료 후 6 일에 라이브 / 데드 분석 염료로 염색되었다다. 스케일 바, MO의 경우 500μm, HO의 경우 250μm. (d-f) 각 플랫폼 유래 오가노이드에서 병용 요법 (Doxifluridine + Oxaliplatin)에 대한 약물 감도 및 재현성의 비교 분석. 약물 반응에 대해 CCK8 분석을 사용하여 3 개의 독립적 인 실험 배치를 분석하였다. 병용 요법으로 치료 6 일 후 (d) 매트리젤 또는 (e) 하이드로 오가노이드의 상대적 용량-반응 곡선 (평균 ± sdm .). (f) 실험 당 IC_{50} 값을 보여주는 그래프. 실험 당 상대적인 폴드 차이는 약물 반응의 재현성을 나타낸다. (IC50 값은 삼중으로 분석된 각 조건의 평균 ± SD임) .

도 16은 환자 유래 하이드로 및 매트리젤 오가노이드의 전사체 비교 결과이다. (a) 정규화 된 값 (log2 기반)에 대해 Z- 점수를 사용하는 계층적 클러스터링을 위한 히트 맵. fc≥ & p <0.05를 만족하는 유전자 892 개. HO; 하이드로 오가노이드, MO; 매트리젤 오가노이드. (b) MDS (Multidimensional Scaling) 플롯. (c) 피어슨 계수. (d) 매트리젤 오가노이드와 비교한 하이드로 오가노이드의 총 상향 또는 하향 유전자 수 (fc≥ & p <0.05) (e-f) 매트리젤 또는 하이드로 오가노이드에서 차별적으로 발현된 유전자의 상위 15 개 농축 GO 용어. (G- I) 매트리젤 또는 하이드로 오가 노이드에서 차별적으로 발현된 유전자, ECM 수용체 상호 작용, 부착 접합부 및 기저 전사 인자 유전자 세트의 유전자 세트 농축 분석. y 축은 농축 스코어(enrichment score, ES) 를 나타내고 x 축에는 유전자 세트로 표시되는 유전자 (수직 검은색 선)이다. 녹색 선은 ES와 유전자의 지점을 연결한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0130] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0132] **[실시예]**

[0133] **실험 방법**

[0134] **1: 오가노이드 제조**

[0135] 대장암 오가노이드를 플레이트에서 피펫팅으로 배양배지 1ml 과 함께 15ml 튜브에 넣고, 2000rpm에서 3분간 원심분리 후 상등액을 제거한 다음, PBS 세척 과정을 한번 진행하고 똑같이 2000rpm에 3분간 원심분리 하였다. 이후, acuutase로 7분간 처리를 하여 단일세포로 완전하게 분리시켰다. 이 단일세포를 세포배양 플레이트의 서브웰에 약 100 cells/well씩 시딩 하였으며, 총 14일 동안 배양하여 오가노이드를 제조하였다. 이때, 배양액은 DMEM/F12 기반의 배양액이며, 해당 배양액 안에는 B27, N2, GlutaMAX, penicillin streptomycin, Nictoiamide, N-acetyl, gastrin, A-83-01, EGF, noggin, R-spondin1, WNT3A 들어가며, 배양 조건은 매트리젤을 함유하지 않거나 또는 2 부피% 함유한 조건에서 오가노이드를 제조하였다.

[0136] 오가노이드 확립 (표 1) 및 생물학적 분석에 사용된 모든 샘플은 연세대학교 세브란스 병원 (IRB # 0000-0003-0180-8565)에서 얻었다. 이 연구는 두 기관의 윤리위원회의 승인을 받았다. 내시경 생검 또는 수술로 절

제된 표본에서 정상(healthy) 및 신생물(neoplasm) 대장 조직(colonic tissue)을 얻었다. 인체 조직은 조직 샘플과 함께 K-RAS, N-RAS, MSI(microsatellite instability), MSS(microsatellite stable) 등의 유전자 변이 여부 정보도 같이 확보하였다.

[0137] [표 1]

[0138]

Name	Sex	Age	Type	Differentiation	K-RAS	N-RAS	MSI
0306	F	35	Adeno	Poor	WT	WT	High
PCC#2	M	60	Adeno	Mild	WT	G12D	MSS
PCC#6	F	63	Adeno	Mild	G13D	WT	MSS
PCC#9	M	75	Adeno	Poor	WT	WT	MSS

[0140] **2: 하이드로 플레이트 준비 및 HO 배양**

[0141] 실리콘 기반 소재 (LUMISIL886, Barkers)로 만들어진 본 발명의 하이드로 플레이트는 Lee & Lee Hightech (한국 부천)에서 제조되었다. 멸균 및 기포 제거 후, 하이드로 플레이트를 PBS (A9418, Sigma Aldrich) 중 10 % BSA로 12 시간 동안 사전 코팅하여 서브웰 바닥의 낮은 부착을 개선했다. 마지막으로, 효소로 해리된 단일세포를 2 % 매트리젤을 포함하는 완전 배양 배지로 서브 웰당 100 개 세포 의 밀도로 접종 하여 현탁 배양을 가능하게 했다.

[0143] **3: 오가노이드 크기 및 개수 측정**

[0144] 오가노이드의 크기 분석은 Image J 프로그램을 이용하였다. 구체적으로 위상 이미지에서 관심 영역을 선택하고 Image J 프로그램으로 역가(threshold)를 적용하여 필요 없는 부분은 흰색으로 덮어쓰고 제대로 그려지지 않은 부분은 검은색으로 채운다. 외곽을 이용하여 검은색으로 채워진 역가가 적용된 면적을 구하였다.

[0146] **4: 약물 스크리닝**

[0147] 오가노이드는 매트리젤에서 수확하고 TrypLE (ROCKi로 보충됨) 및 기계적 분산을 사용하여 단일 세포로 해리되었다. 세포 현탁액을 2 % Matrigel / 98 % 완전 배지에 재현탁시켰다. 96웰 하이드로 플레이트의 웰당 100 개의 세포를 시딩하고 7 일 동안 성장시켰다. 독시플루리딘(Doxifluridine) (S2045, Selleckchem), 옥살리플라틴 (Oxaliplatin) (S1224, Selleckchem) 및 XELOX (Doxifluridine과 Oxaliplatin의 조합) 또는 비히클 (DMSO) 대조군의 농도 희석 시리즈를 2 일 마다 오가노이드 배양에 적용했다. 오가 노이드의 약물 반응을 분석하기 위해 CCK-8 분석 (CK04, Dojindo) 및 라이브 / 데드 염색 (L3224, Invitrogen)을 사용하여 처리 6 일 후 제조업체의 지침에 따라 세포 생존력을 분석했다. 데이터 분석 및 IC50 값 결정은 GraphPad Prism (버전 8.0.1)으로 수행되었다.

[0149] **5: 생존력(Viability) 분석(라이브 / 데드 염색 및 CCK-8 분석)**

[0150] 라이브/ 데드 염색을 위해, 오가노이드를 50 mM calcein-AM 및 25 mg / mL EthD-1(ethidium homodimer-1; Molecular Probes, USA)와 함께 40 분 동안 37℃에서 배양하고 그 다음 공초점 현미경(Olympus, Japan)으로 이미지화했다. Calcein-AM (녹색, 살아있는 세포용) 또는 EthD-1 (빨간색, 죽은 세포용) 신호를 ImageJ 소프트웨어 (NIH, Bethesda)로 정량화했다(NIH, Bethesda, MD, USA). 또한 WST tetrazolium salt 방법 (CCK-8, CK04, Dojindo)을 이용하여 오가노이드의 생존율을 정량적으로 분석하였다. 약물 처리 후 표시된 시점에서 CCK-8 기질 용액에 의한 반응은 마이크로 플레이트 리더 (Thermo Fisher, USA)를 사용하여 450nm에서 측정되었고 용량-반응 곡선으로 나타내었다.

[0151]

[0152] **6: 면역형광 염색 및 유세포 분석**

[0153] 면역형광염색을 통하여 오가노이드의 줄기세포인 LGR5를 염색하여 확인하였다. 먼저 본발명에 따른 표준형 오가노이드를 4% 파라포름알데히드 용액에서 상온에 1시간 보관 후 PBS로 염색하였다. 그 후, 15% 수크로스에서 하루, 30% 수크로스에서 하루를 냉장보관 후, 액체질소를 이용하여 동결 블럭(cryo-block)을 만들었다. 만들어진 동결 블럭을 이용해, 10um 두께로 섹션을 진행, 잘린 단면을 슬라이드 글래스에 붙였다. tritonX 0.1%를 10분간 처리 후 PBS로 2번 세척하였다. 3% BSA로 1시간동안 상온에서 보관 후, 2번의 PBS 워싱 후에 LGR5 면역염색을 실시하였다. 이후, 마운팅 용액을 넣어 형광 현미경으로 측정하였다.

[0154] 도 9의 경우, 배양된 표준형 오가노이드를 꺼내어, Live/Dead 형광 염색을 진행한다. 형광염색의 경우, Calcein 1mM은 1ml 당 2ul, EtdH-1 2mM은 1ml당 1ul로 30-60분 인큐베이터에 보관 후, 형광현미경으로 측정하도록 한다.

[0156] IF 염색을 위해, 오가노이드를 실온에서 30 분 동안 4 % 파라포름알데히드(PFA)에 고정하고, 투과화하고, 차단 용액(6 % BSA + 0.2 % Triton X-100 + 0.01 % Sodium Azide in PBS),으로 차단했다. 그 다음 1 차 항체 및 형광단이 결합된 2 차 항체 (표 2)로 실온에서 48 시간 동안 염색했다. 핵은 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Invitrogen)로 대조 염색하고 이미지는 공초점 현미경 (Olympu s, Japan) 으로 얻었다. 전체 마운트 염색의 경우, 오가노이드를 PBST로 헹구고 클리어링 용액 (증류수 중 UREA 25 % + 수크로스 65 %)에 담가 RI 값을 조정하고 앞에서 설명한대로 항체로 염색했다. 유세포 분석을 위해, 효소로 해리된 단일 세포를 2 % FBS 및 ROCKi (HF 2-i 버퍼)를 포함하는 HBSS에 재현탁 하고, 형광단 결합 항체 (표 2)로 얼음 위에서 30 분 동안 라벨링하였다. 비특이적 라벨링을 식별하기 위해 적절히 매치된 이소타입 (isotype) 컨트롤도 사용되었다. 7-AAD가 있는 HF 2-i 완충액에 재현탁한 후, FACSVerse 유세포 분석기 (BD Biosciences)를 사용하여 세포를 분석했습니다. FlowJo 소프트웨어 (Tree Star, Ashland, OR, USA)를 사용하여 데이터를 평가했다.

[0157] [표 2]

[0158]

Primary antibody	Company	Catalog number	Reactivity	host
Cytokeratin 20	Abcam	Ab76126	Rat, Goat, Human, Pig, Mouse	Rabbit
LGR5	Invitrogen	MA5-25644	Human, Mouse	Mouse
Mucin2	Santa Cruz	SC-515032	Human	Mouse
CD44	Abcam	Ab6124	Human	Mouse
Chromogranin A	Santa Cruz	SC-393941	Human	Mouse
Lysozyme	Abcam	AB108508	Mouse, Human	Mouse
Beta-Catenin	Abcam	AB32572	Human, Mouse, Rat	Rabbit
E-cadherin	Abcam	Ab1416	Human, Rat	Mouse

[0160] **7: ELISA**

[0161] 티미딘 포스포릴라제(thymidine phosphorylase) 단백질은 제조사의 지침에 따라 인간 TP ELISA 키트 (EKU07660, Biomatik)를 사용하여 측정되었다.

[0162]

[0163] **8: RNA 준비, 정량적 RT-PCR 및 RNA-seq 분석**

[0164] 총 mRNA는 RNeasy Plus Mini Kits (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 오가노이드에서 분리되었고, 제조업체의 프로토콜에 따라 cDNA 키트 (4387406, Applied Biosystems)에서 RNA를 사용하여 역전사되었다. 그런 다음 표 3에 나열된 프라이머를 사용하여 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)로 정량 PCR을 수행하였다. $\ddot{A}_{CT}$ 값은, $\ddot{A}\ddot{A}_{Ct}$는 비히클 처리 오가노이드에 정규화 값으로 주어진, 하우스 키핑 유전자 GAPDH로 정규화되었고, 상대적 발현 값은 최종적으로 $2(\ddot{A}\ddot{A}_{C(T)})$ 방법을 사용하여 결정하였다. 전체 전사체 시퀀싱에 의한 유전자 발현 분석을 위해 TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation 가이드에 따라 오가노이드의 RNA 라이브러리를 준비했다. 정렬된 판독은 HTSeq-count를 사용하여 정량화되었다 (Anders et al.,

2015). 차별적으로 발현된 유전자, 폴드 비율, p-값 및 오류 발견 비율은 각 피험자에 대한 edgeR 알고리즘에 의해 확인되었다. 강화된 KEGG 경로는 GSEA-P에 의해 확인되었다.

[0165] [표 3]

[0166]

Qrt-PCR Primer	정방향	역방향
GapDH	aacagcgacacccatcctc (서열번호 1)	cataccaggaaatgagcttgacaa (서열번호 2)
LGR5	ttccccaggccccttcaac (서열번호 3)	cactgctgcgatgaccccaa (서열번호 4)
Chromogranin A	acactttccaagcccagccc (서열번호 5)	agagcctccgaccgaccttt (서열번호 6)
Villin	gctgaggtcacaagccccaa (서열번호 7)	gcagagaaggcagctggagt (서열번호 8)
Beta Catenin	tgtggtcacctgtgcagctg (서열번호 9)	tgcttcttggtgtcggctgg (서열번호 10)
KI67	agctgactctgccactaagc (서열번호 11)	gtccagctgtagtgcccaat (서열번호 12)
SOX9	atgaagatgccgacgagca (서열번호 13)	tcctcgctctccttcttcagat (서열번호 14)

[0168] 9: 통계 분석

[0169] 모든 정량 데이터는 최소 3 회 이상의 독립적인 반복을 통해 평균 ± SEM으로 표시되며 각 실험의 샘플 크기 "n"은 각 그림의 범례에 표시된다. 통계 분석에서 모든 p 값은 Prism 7 Student 's t-test를 사용하여 일원 분산 분석에 의해 계산되었다 (NS : 중요하지 않은 차이, *p <0.05, ** p <0.01 및 *** p <0.001).

[0171] 실시예 1.

[0172] 상기 실험방법 1에서 언급한 방법으로 오가노이드를 제조하였다. 매트리젤을 배양액에 2 부피% 함유한 조건(실시예 1-1)과 매트리젤을 넣지 않은 조건(실시예 1-2)에서 오가노이드를 제조하였다.

[0174] 실시예 2.

[0175] 세포를 서브 웰에 약 200 cells/well 에 시딩한 것을 제외하곤, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 세포를 배양하였다.

[0177] 실시예 3.

[0178] 세포를 서브 웰에 약 300 cells/well 에 시딩한 것을 제외하곤, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 세포를 배양하였다.

[0180] **<비교예>**

[0181] 비교예 1.

[0182] 기존에 널리 쓰이는 방식인 메트리젤 내부에 오가노이드를 배양하고, 고속대량 이미징을 진행하였다. 다만, 비교예에서는 통상적으로 사용하는 세포배양 플레이트인, 96 웰플레이트를 사용하였으며, 매트리젤 내에 세포를 시딩하여 오가노이드를 제작하였다.

[0184] **<실험예>**

[0185] 실험예 1. 오가노이드 이미지 분석

[0186] 실시예 1-1과 비교예 1에서 배양한 세포를 촬영 하였으며, 세포구의 크기를 비교하였다. 스페로이드를 자동화 플레이트 기기에서 이미징을 진행하며, 이때 자동으로 기기가 초점을 잡아 진행하도록 한다. 이미지의 크기 분석은 imageJ 라는 프로그램의 매크로 프로그램을 이용하여 진행하였다.

[0187] 그리고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4는 실시예 1-1 및 비교예 1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 도면이다((a) 실시예 1-1, (b) 비교예 1)

[0188] 도 4를 참조하면, 실시예 1-1의 경우에는 본 발명의 세포배양 플레이트에 배양한 세포의 직경이 거의 균일한 것을 확인하였다. 구체적으로, 세포를 각각의 서브 웰에 평균 100 cell/well씩 시딩하였을 경우, 비교분석 가능한 균일한 오가노이드를 제작할 수 있었다. 이때, 오가노이드 크기에 대한 오차범위는 20 ㎛ 내외였다. 이를 통해 본 발명에 따른 오가노이드 배양 방법을 이용하면 표준 오가노이드 제조가 가능함을 알 수 있다.

[0189] 반면, 종래의 웰 플레이트를 사용한 비교예 1의 경우 세포구의 크기가 상이하게 형성됨을 확인할 수 있었다. 이는 하나의 매트레젤의 돔(dome) 형태 안에서 여러 개의 세포가 자라기 때문에 생성된 오가노이드 크기의 오차범위가 150 ㎛ 이상의 편차가 나타나고 겹쳐 자라기도 하여 균일한 고속대량 이미징 및 실험이 불가능하였다.

[0190] 본 발명의 베이스 및 웰 플레이트가 서로 고정하기 위하여 각각 철(凸)부와 요(凹)부를 포함하는데, 상기 철부와 요부가 서로 결합되어 베이스가 웰 플레이트를 단단하게 고정할 수 있어, 웰 플레이트 내의 이미지를 균일하게 촬영할 수 있음을 보여준다.

[0191] 반면, 비교예 1에서 배양한 오가노이드의 크기 및 형상이 균일하지 않음을 볼 수 있다. 이는 플레이트 베이스가 없을 경우, 이미징의 초점편차가 커지기 때문에 이미지의 분석이 힘들어지는 것으로 보인다.

[0192] 또한 도 5(a) 보면, 매트리젤을 함유하지 않아도 본 발명의 세포배양 플레이트를 이용하면 오가노이드 형성이 잘 이루어짐을 확인하였다.

[0193] 도 5(b)는 배양한 오가노이드가 성공적으로 형성되었는지 확인하기 위하여 대장암 오가노이드의 형성에 가장 중요한 마커인 LGR5를 염색하여 발현정도 확인한 것이다. 또한 F-actin 염색을 진행하여 형성된 저농도 매트리젤 또는 메트리젤을 사용하지 않는 그룹의 대장암 오가노이드 안에 colon-specific structure가 존재를 확인하였다.

[0195] 실험예 2. 오가노이드 제작

[0196] 실시예 1-1과 비교예 1에서 배양한 세포를 고속대량 이미징하였다.

[0197] 실시예 1-1과 비교예 1에서 제조한 오가노이드는 자동화 플레이트 기기에서 이미징을 진행하였으며, 이때 자동으로 기기가 초점을 잡아 진행하도록 하였다. 이미지의 크기 분석은 imageJ 라는 프로그램의 매크로 프로그램을 이용하여 진행하였다.

[0198] 그리고, 그 결과를 도 6과 도 7에 나타내었다.

[0199] 도 6(a)는 실시예 1-1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진이며, 도 6(b)는 실시예 1에서 일정 기간 동안 배양한 오가노이드의 면적을 나타내는 그래프이며, 도 7(a)는 비교예 1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진이고, 도 7(b) 는 비교예 1에서 일정 기간 동안 배양한 오가노이드의 면적을 나타내는 그래프이다.

[0200] 도 6을 참조하면, 실시예 1-1에서 제조한 오가노이드를 자동 이미지 할 경우에 이미징 높이가 균일하여 큰 오차 없이 이미징이 가능하고, 이로 인해 실제 면적을 측정하였을 때 오차범위가 매우 적은 것을 확인할 수 있다.

[0201] 특히, 본 발명의 세포배양 플레이트를 이용하여 오가노이드를 배양하는 경우, 오가노이드가 균일한 크기로 배양된다. 즉, 표준화가 가능하다. 표준화의 결과, 이미지 측정시 초점이 자동으로 잡히며 커넥터 구조에 의해서 측정 높이에 대한 편차를 최소화하게 되었다. 이에 따라, 스크리닝 이미지 측정시 편차가 20 ㎛ 내외로 아주 적게 나타난다.

[0202] 도 7을 참조하면, 비교예 1의 경우, 오가노이드가 서로 겹치게 자라는 것을 확인할 수 있으며, 오가노이드의 크기와 분포 위치가 서로 달라 표준화가 불가능함을 알 수 있다. 그러므로 스크리닝 이미지 측정시 오차범위가 최대 150 ㎛로 내외로 크게 나타나고 있다.

[0203] 이는 종래 방법으로 오가노이드를 배양하게 되면, 오가노이드가 메트리젤 내에서 랜덤으로 자라기 때문에, 원하는 오가노이드를 균일하게 배양하기 힘들며, 또한 측정 높이도 가변적이라서 오가노이드 스크리닝 이미징에 적용하기가 어려운 한계가 있음. 따라서 일정 기간 동안 배양된 오가노이드의 면적을 분석해보면 편차가 매우 크게 나타나는 것으로 판단된다.

[0204] 도 8의 경우, 전체 만들어진 표준형 오가노이드에서, Image J 프로그램을 이용해 각각의 오가노이드의 지름을 측정하였다. 총 864개의 웰을 고속대량이미징을 진행하였고, 이를 ImageJ로 각각 분석을 하여 균일한 지름이 나오는 것을 확인하였다.

[0205] 도 8은 실시예 1-1의 대장암 세포를 14일 간 배양하였을 때의 이미징 결과와 오가노이드 크기를 보여준다. 오가노이드 크기가 300-50 um로 균일하여 표준 오가노이드 제작이 가능함을 알 수 있다.

[0206] 도 9는 실시예 1-1 및 1-2에 따른 오가노이드를 시간 경과에 따라 보여주는 이미지 사진(왼쪽)과 실시예 1-1에 따른 오가노이드 생존율이다(오른쪽). 도9의 경우, 배양된 오가노이드를 Live/Dead 염색을 진행하여, 실제 배양된 오가노이드가 얼마나 유지되는지 확인하였다. 먼저 배양된 표준형 오가노이드를 PBS로 세척한 후, accutase로 10분 가량 인큐베이션 진행한다. 후에 단일 세포로 조각내어, Live/Dead 시약인 Calcein과 EtdH-1를 인큐베이터에서 약 30-60분 가량 보관 후, 형광현미경으로 Live/Dead 를 각각 얼마만큼 존재하는지 확인한 것이다.

[0207] 도 9를 통해 매트리젤이 없어도 오가노이드 형성이 매우 잘 일어남을 알 수 있으며, 14일 동안 배양하는 경우 오가노이드 생존율이 매우 높음을 알 수 있다.

[0208] 도 10은 실시예 1-1, 2, 및 3의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진으로, 도 10(a)는 실시예 1-1, 2, 및 3에서 대장암 세포를 14일 간 배양하였을 때의 이미징 결과를 보여준다((a) 실시예 1-1, (b) 실시예 2, (c) 실시예 3).

[0209] 도 10(a)를 참조하면, 세포를 각각의 서브 웰에 평균 100 cells/well씩 시딩하였을 경우, 비교분석 가능한 균일한 오가노이드를 제작할 수 있었다(오차범위: 20 ㎛ 내외).

[0210] 도 10(b)는 실시예 1-1, 2 및 3의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 그래프로, 도 10(b)는실시예 1-1, 2 및 3에서 대장암 세포를 7일 또는 14일 간 배양하였을 때의 결과를 보여준다((a) 실시예 1-1, (b) 실시예 2, (c) 실시예 3).

[0211] 도 10(b)를 참조하면, 세포를 평균 100 cells/well 평균 14일 배양하였을 때, 가장 바람직한 오가노이드를 제작할 수 있음을 보여준다. 즉, 평균 100cells/well 이하의 세포를 14일 배양하였을 때, 최적의 오가노이드가 분화 및 생장할 수 있을 것으로 보인다. 반면, 서브웰에 시딩하는 세포를 늘리고, 배양일 수를 줄일 경우에는 오가노이드 성능이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

[0212] 참고로, 도 10(b 의 점선은 본 발명의 세포배양 플레이트의 서브웰의 최대 공간을 의미하는 것으로, 세포를 배양할 수 있는 공간을 의미한다. 이는 평균 100 cells/well 이하의 세포를 배양할 수 있을 것으로 판단된다.

[0214] 실험예 3. 환자 맞춤형 약물 스크리닝

[0215] 3.1 대장암의 조직적 복잡성을 요약하여 보여주는 균일한 하이드로 오가노이드

[0216] 실험방법 1 및 2에 기재된 내용에 따라 하이드로 플레이트를 이용하여 환자 유래 대장암 오가노이드(HOs)를 준비하였다. 본 발명에 따른 하이드로 플레이트는 각 웰(직경 6.3 mm)에 9 개의 서브웰 (500 ㎛ 직경)을 가지고 기존 96 웰 플레이트 포맷에 적합하다(11a). 8 개의 웰이 하나의 스트립을 형성하고 총 12 개의 스트립이 완전한 하이드로 플레이트를 형성한다. 864 개의 HOs를 동시에 생성할 수 있으며, 플레이트에 삽입된 스트립의 수는 임의의 수의 오가노이드 생산을 충족하도록 조정할 수 있다. 하나의 서브웰에, 2 % 매트리젤이 포함된 완전 배양 배지를 사용하여 단일 세포를 시드하고 응집시켜 현탁 배양하였다(11b). 웰 내에 있는 9개의 서브웰도 동일한 배양 조건을 가진다. 특히, 하이드로 플레이트는 자가 조직화된 형태로 균일한 HOs(크기 및 형태)를 지속적으로 만드는데, 서브웰에서 다세포 상호 작용을 재현하는 것이다(도 11c-e).

[0217] 하이드로 오가노이드(HOs)의 형태학적 및 조직학적 특성을 매트리젤 오가노이드(MOs)와 비교하기 위해 외과적으로 절제된 대장암 (CRC) 조직을 개별 세포 또는 세포 클러스터로 분리하고 매트리젤에 내장하고 일차 모 오가노이드로 확립했다 (도 12a). 각 서브웰에있는 100 개의 세포는 배양 3 일째에 하나의 덩어리로 응집되고 전체 배양의 14 일 동안 계속 성장했다 (도 12b). 흥미롭게도 웰 사이 및 웰 내에서 넓은 형태학적 및 직경 변이를 보인 MO와 달리, HO는 생존력에 큰 차이가 없이(도 12c-e) 비교적 균일하고 균질했다(도 12f-g).

[0218] 낮은 매트리젤 농도, 대류 및 확산 수송 및 하이드로 플레이트의 다세포 상호 작용이 오가노이드의 세포 및 기능적 특성에 영향을 미칠 수 있기 때문에, CRC MOs 및 HOs의 발생 단계와 특징을 조직학적으로 분석했다 (도 13a, b, d). 뮤신을 발현하는 미분화 모 오가노이드의 조직학적 특성은 두 오가노이드 모두에서 매우 보존되어 있다. 그러나 CD44 + EpCAM +, CD44 + EpCAM + CD166 + CD133 + 및 CD44 + EpCAM + CD166 + CD133 + LGR5 + 세포와 같은 암 줄기 세포 하위 집합은 MO에서보다 HO에서 더 높았다. (도 13c). 이러한 바이오 마커 발현은 본 발명의 하이드로 플레이트가 오가노이드에서 암 줄기 세포의 확장 또는 유지를 향상시킬 수 있음을 보여준다.

[0220] 3.2 전임상 암 약물 스크리닝을 위한 일관되고 재현 가능한 플랫폼으로서의 하이드로 오가노이드

[0221] 약물 스크리닝을 위한 HOs의 잠재력을 입증하기 위해 CRC HOs를 다양한 농도의 3 가지 약물, 독시플루리딘 (Doxifluridine) (converted from capecitabine in liver), 옥살리플라틴(Oxaliplatin) 및 이들의 병용에 6 일 동안 노출했다 (2 일 간격으로 3 회 치료). 용량-반응 곡선 및 IC50(half-maximum inhibitory concentration) 값을 분석하기 위해 라이브 / 데드 이미징 및 CCK-8 분석을 적용했다 (도 14). HOs는 각 약물 치료에 대해 0.03 μM에서 0.07 μM 사이로 정의된 윈도우에서 명백한 독성을 나타냈다 (도 14b, c). 옥살리플라틴 단독에 비해 병용 요법 (XELOX, Capecitabine + Oxaliplatin)에 의한 상승 효과는, 환자 유래 이종 이식편 (PDX)에서 보고 된 바와 같이(Jim Cassidy et. al., Journal of Clinical Oncology, Volume 22, Issue 11), 티미딘 인산화효소 (TP) 발현을 유도하는 메커니즘을 통해 나타났다 (도 14d-f). 구체적으로, 약물 스크리닝을위한 HOs의 효과와 정확성은 MOs와의 비교 스크리닝을 통해 확인되었다 (도 15). 특히 약물 치료 후 HOs의 수축 및 세포 사멸에 대한 명확한 시각화가 감지되었다 (도 15b, c). 흥미롭게도 HOs는 MOs보다 동일한 약물에 더 민감하게 반응했으며 HOs를 사용한 실험의 IC 값은 지속적으로 측정되어 세 번의 실험을 반복하는 동안 높은 재현성을 보여주었다 (도 15d-f).

[0223] 3.3 하이드로 오가노이드의 뚜렷한 유전자 발현 패턴

[0224] MO와 HO의 분자적 특징은 RNA-seq 분석에 의해 특성화되고 비교되었다. 892 개의 유전자 (DEG, fc≥2, p <0.05)가 차별적으로 발현되었으며, 두 오가노이드는 상향 및 하향 조절된 유전자의 계층 적 클러스터링에 따라 두 개의 별개의 하위 트리로 분류되었다(각각 625, 267, 도 16a-d). 주성분 분석을 통한 편향되지 않은 전사체 분석은 두 개의 오가노이드가 별개이지만 밀접하게 연결되어 있음을 보여주었다(도 16b-c). 주성분 분석을 통한 편향되지 않은 전사체 분석은 두 개의 오가노이드가 별개이지만 밀접하게 연결되어 있음을 보여주었다 (도 16b-c). ECM 수용체 상호 작용 및 접착 접합에 관련된 유전자의 발현은 MOs에서 고도로 하향 조절되었다 (도 16e-i). 즉, 이러한 결과는 HOs가 약물에 매우 민감함을 보여준다.

[0226] 오가노이드, 줄기세포 유래 장기 모방 다세포 시스템은 최근 약물 발견 및 재생 의학과 같은 생물의학 응용 분야의 중요한 전임상 모델로 강조되었다. 필연적으로, 오가노이드의 대규모 배양은 산업 및 임상 적용을 위한 전제 조건이 되었다. 그러나 ECM 하이드로겔 (예: Matrigel 쩨)에 단일세포 또는 클러스터를 삽입하는 것에 의존하는 현재의 오가노이드 배양 시스템은 오가노이드 생성의 정밀하고 표준화 된 제어뿐만 아니라 진정한 생체 내 기능 (종양 내 이질성)을 달성하는 데 한계가 있다. 결과적으로 문제 해결의 필요성을 충족시키기 위해 배양 기술이 개발되었지만 배양 기술 간의 근본적인 생물학적 차이는 밝혀지지 않았다. 본 발명에서는 균일한 HOs를 배양하기 위해 96 웰 플레이트 호환 하이드로 플레이트를 개발했다. 하이드로 플레이트에서 HOs의 생성은 기존의, 매트리젤 배양과 달리, 개별 종양 세포의 이질적인 집단에 의해 응집체로 동기화되고 매트리젤이 없거나 매트리젤 함량이 낮은 조건에서 배양된다. 이 방법은 세포 응집체의 크기, 기하학적 구조 및 미세 환경을 제한하여 HOs의 초기 조건을 제어하고, 균일하고 균질한 오가노이드 형성을 유도했다. HOs는 전임상 모델로서 MOs와 기능적으로 유사하지만, 암세포의 전사체 및 세포 내 조성 측면에서 다르며 오가노이드 특성 및 치료 반응성에 차등적으로 기여한다.

[0228] MOs와 HOs 이러한 세포 및 기능적 차이가 발생하는 이유로 생각해 볼 수 있는 기본 메커니즘은 다음과 같다. 첫 번째 주요 매개 변수는 HOs의 ECM 역학이다.

[0229] HO 배양 배지에는 오가노이드 형성 및 복잡한 형태 형성을 지원하기위한 최소 환경으로 2 % 매트리젤이 보충될 수 있다. 이 최소 환경은 ECM 역학 (강성에 의한 기계적 변환)에 크게 의존하는 구조의 형성을 제한할 수 있지만 약물의 질량 전달 동역학을 허용한다. 이는 동일한 약물에 대한 MOs보다 HOs의 약물 민감도가 증가한 결과와 일치한다. 기하학 및 세포 밀도는 또한 HOs의 기능적 차이에 기여할 수 있다. 하이드로 플레이트의 기하학적 제어는 HOs 내에서 성장한 세포에 대한 생물물리학 적 및 생화학적 신호의 정확한 시공간적 조절을 가능하게 하여 분자적 및 기능적으로 균일하고 재현 가능한 오가노이드 및 형태를 만들 수 있다. 이 가능성은 세 번의 반복 시험으로 HOs의 일정하고 재현 가능한 IC 값에 의해 확인된다. 더욱이 HOs와 같은 줄기세포 기반 응집체에서 표면

과 중앙에 위치한 세포는 세포-세포와 세포 -ECM 상호 작용, 기계적 장력, 세포 골격 재배열, 내인성 및 외인성 분자의 확산 구배 (즉, 산소 구배)에 기인한 서로 다른 물리적 파라미터에 노출되고, 차례로 약물 반응성과 같은 기능과 관련된 세포의 분화 및 유지에 영향을 준다.

[0230] 실제로, 본 발명에서는 비교 전사체 분석을 통해 ECM 수용체 상호 작용 및 HOs에서 접착 접합과 관련된 유전자 발현의 증가와 분화 및 발생과 관련된 유전자의 감소를 관찰했다. 또한 유세포 분석을 통해 두 가지 오가노이드 (HOs 및 MOs)에서 암 줄기 세포 하위 집합의 정량적 차이를 관찰했다. 이러한 결과는 HOs에서 기하학과 생물학적 효과의 기능적 상관 관계를 간접적으로 나타낸다.

[0231] 요약하면, 본 발명은 생물학적 연구 및 고용량 분석에 적용하기 위한 또 다른 유형의 확장가능한 오가노이드 배양 방법을 보여준다. 이러한 결과는 오가노이드 배양 유형 및 방법이 뚜렷한 특성, 화학 저항성 및 분석 정확도에 영향을 미칠 수 있다는 것을 보여준다.

[0232] 본 발명의 오가노이드 배양 방법을 이용하면, 환자 맞춤형 질병 오가노이드를 제작하여 정확한 약물 스크리닝이 가능하다. 따라서 본 발명은 동물모델을 이용하지 않고도 전임상 단계에서 정확하게 약물 정보를 제공해 준다.

[0234] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 이 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

부호의 설명

[0236] 100: 웰 플레이트

101: 단턱 110: 메인 웰

120: 서브 웰 121: 오목부

130: 공간부 140: 요부

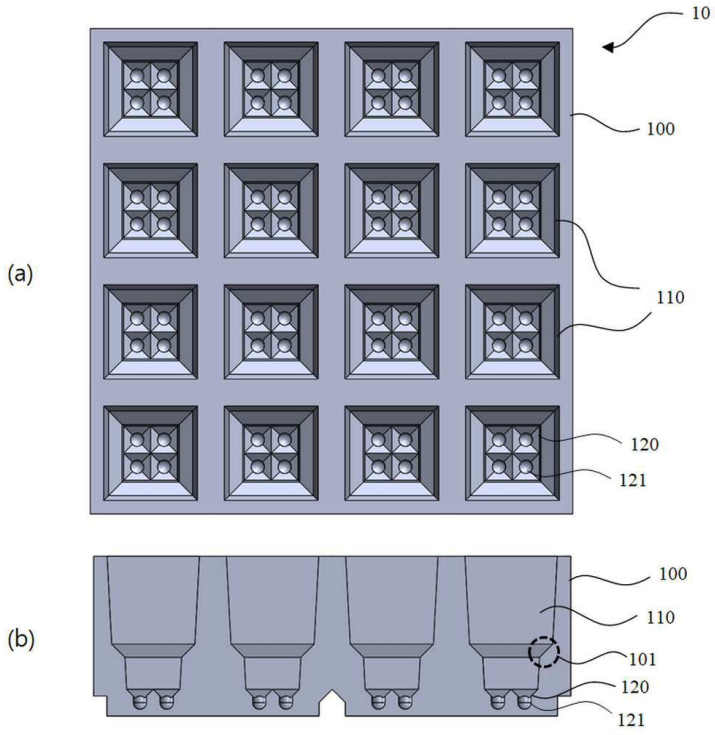
200: 대용량의 고속 HCS용 커넥터

210: 베이스 220: 커버

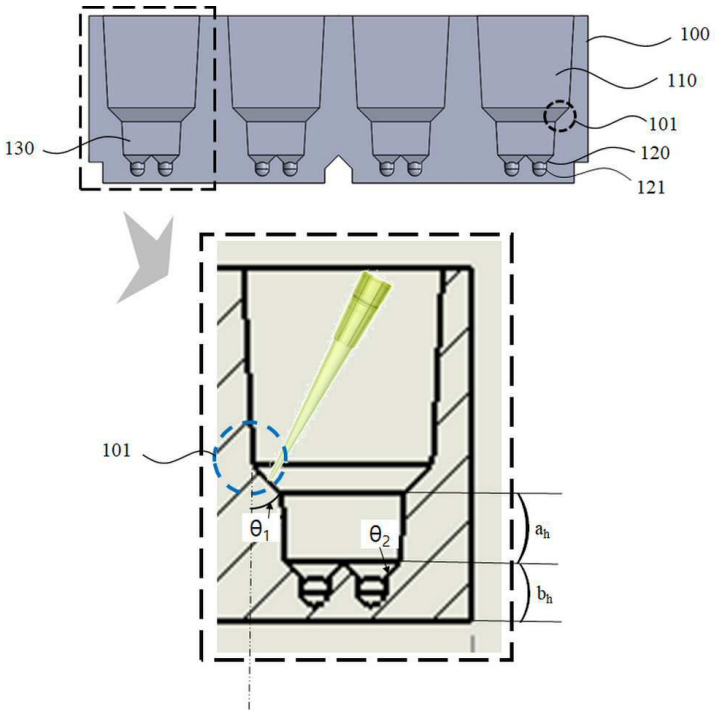
240: 철부

도면

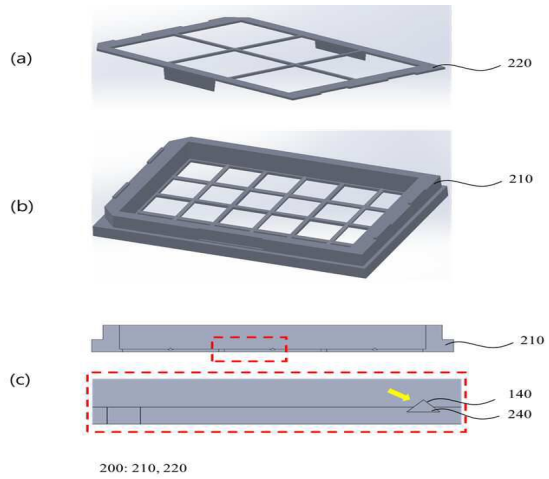
도면1


(a)
10
100
110
120
121
(b)
100
110
101
120
121

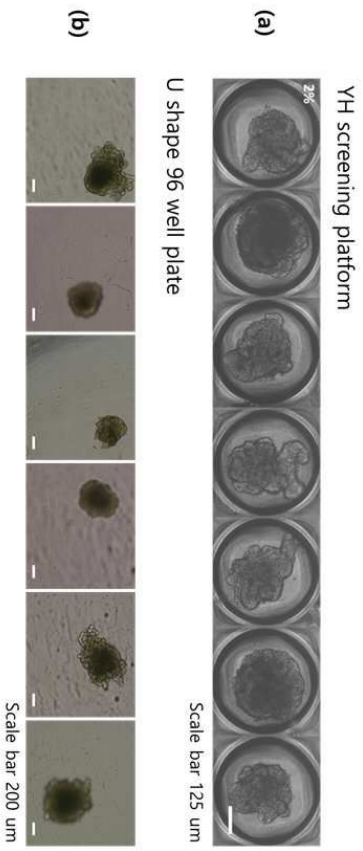
도면2


130
100
110
101
120
121
101
θ1
θ2
ah
bh

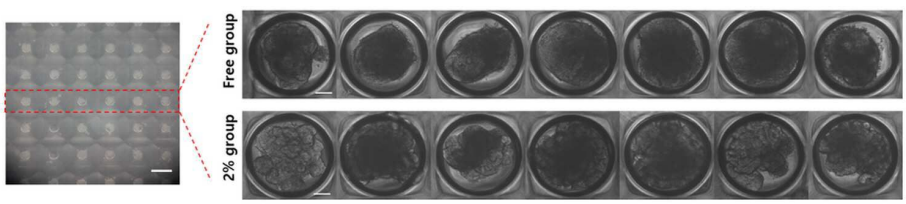
도면3


(a)
220
(b)
210
(c)
210
140
240
200: 210, 220

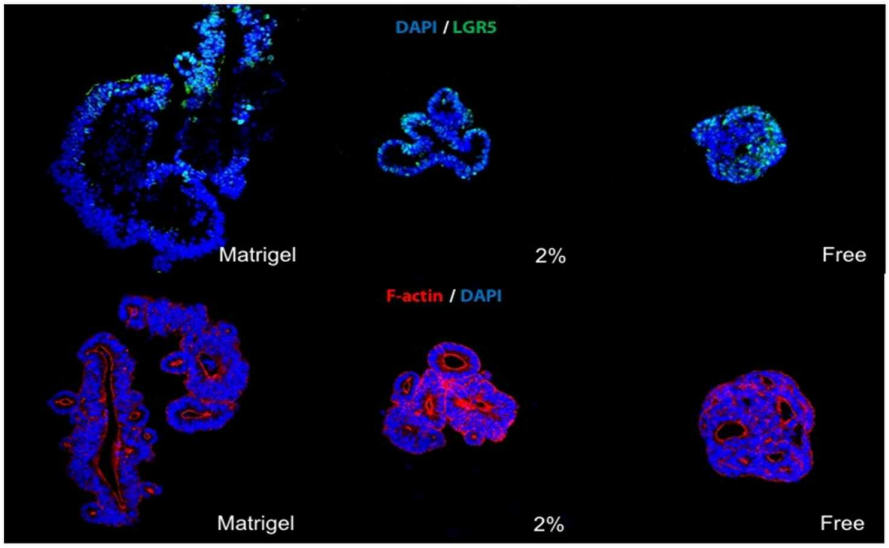
도면4


(b)
(a)
U shape 96 well plate
YH screening platform
2%
Scale bar 200 um
Scale bar 125 um

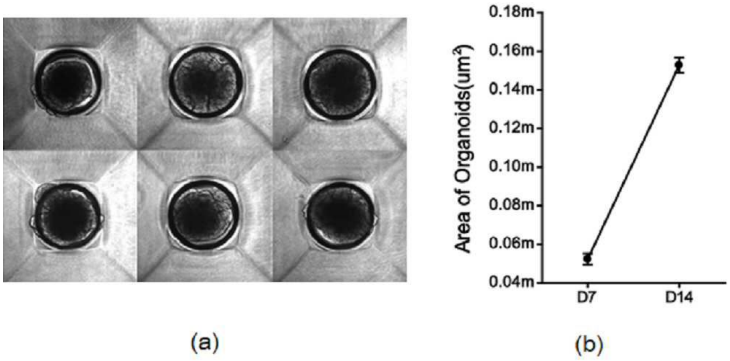
도면5a


Free group
2% group

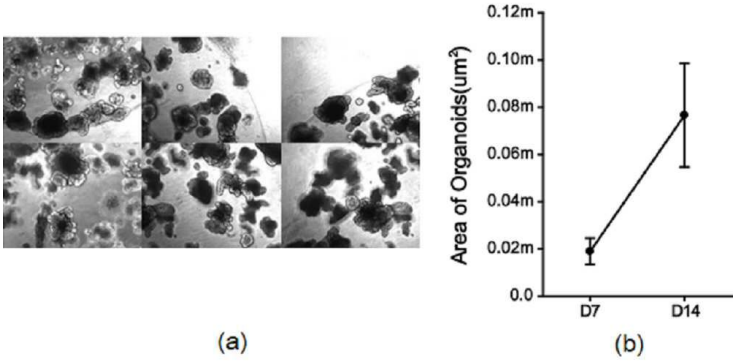
도면5b


DAPI / LGR5
Matrigel
2%
Free
F-actin / DAPI
Matrigel
2%
Free

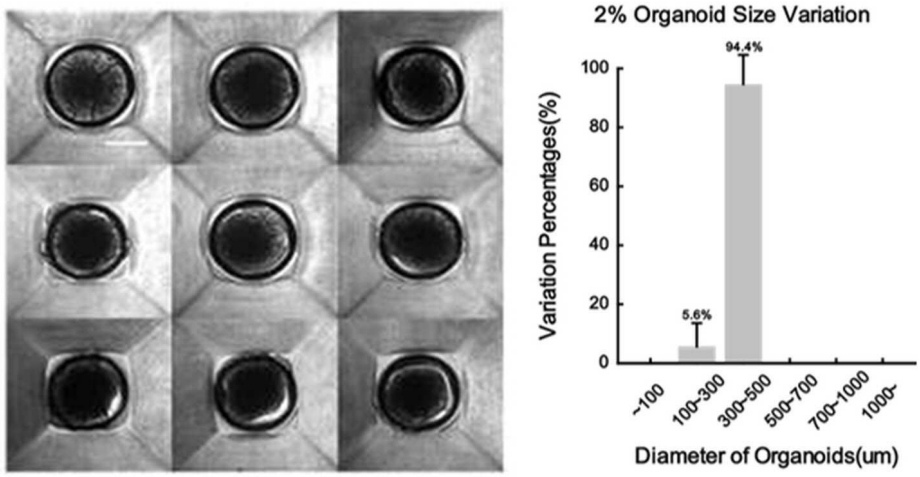
도면6


0.18m
0.16m
0.14m
0.12m
0.10m
0.08m
0.06m
0.04m
Area of Organoids(um²)
D7
D14
(a)
(b)

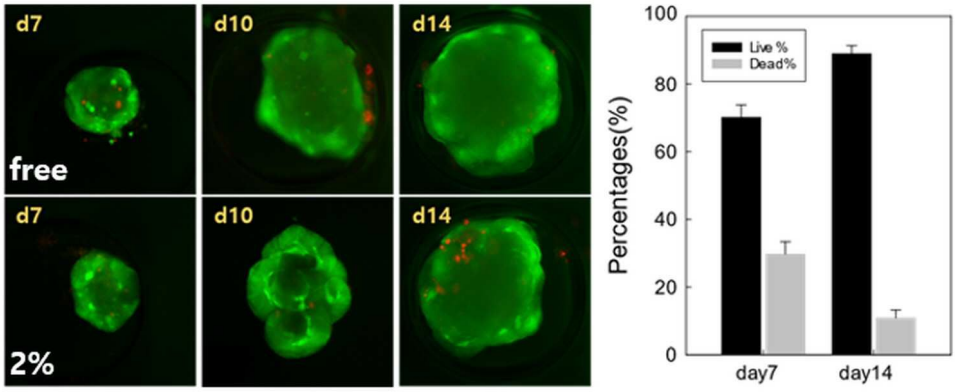
도면7


0.12m
0.10m
0.08m
0.06m
0.04m
0.02m
0.0
Area of Organoids(um²)
D7
D14
(a)
(b)

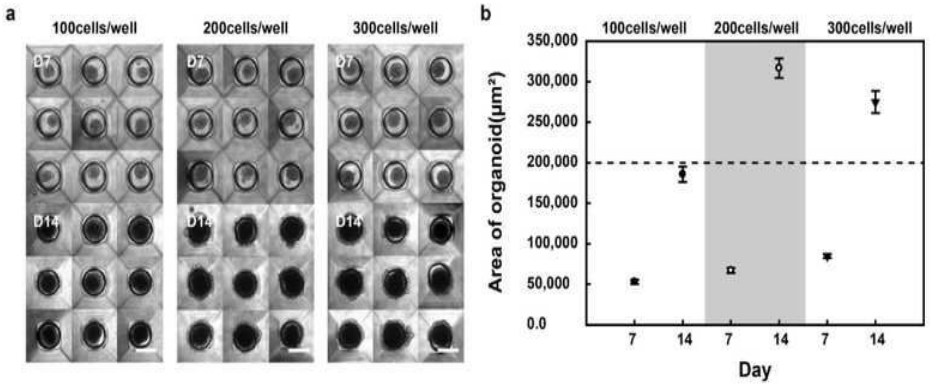
도면8


2% Organoid Size Variation
Variation Percentages(%)
100
80
60
40
20
0
94.4%
5.6%
~100
100~300
300~500
500~700
700~1000
1000~
Diameter of Organoids(um)

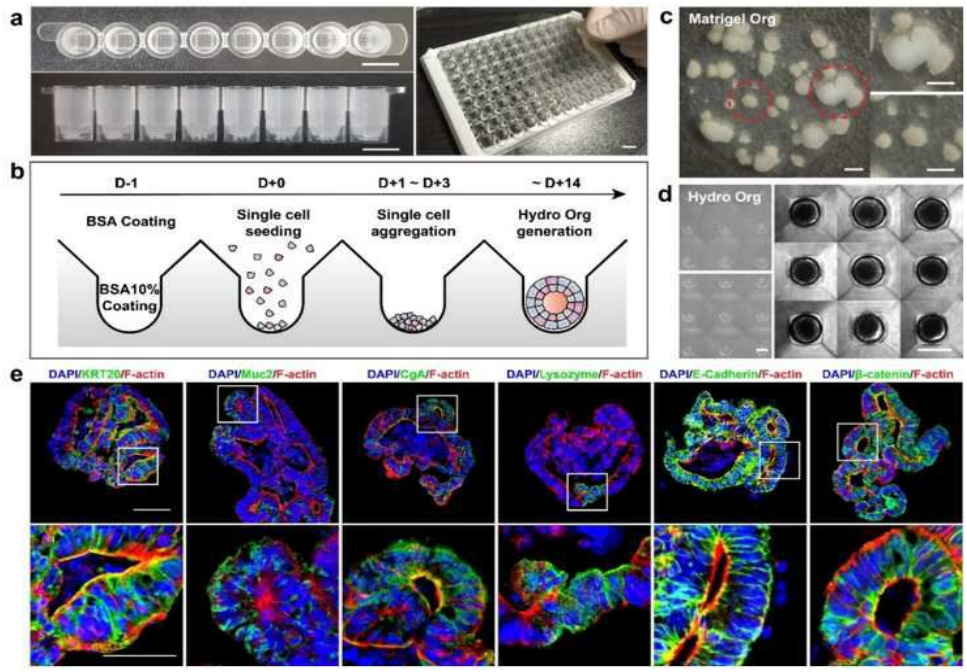
도면9


d7
d10
d14
free
d7
d10
d14
2%
Percentages(%)
100
80
60
40
20
0
Live %
Dead%
day7
day14

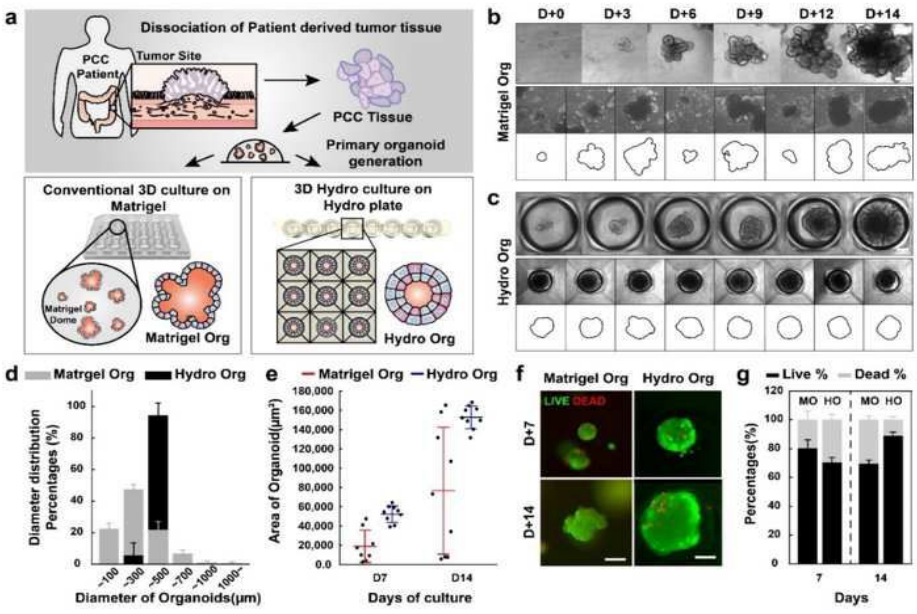
도면10


a
100cells/well
200cells/well
300cells/well
D7
D14
b
100cells/well
200cells/well
300cells/well
Area of organoid(μm²)
350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0.0
7
14
7
14
7
14
Day

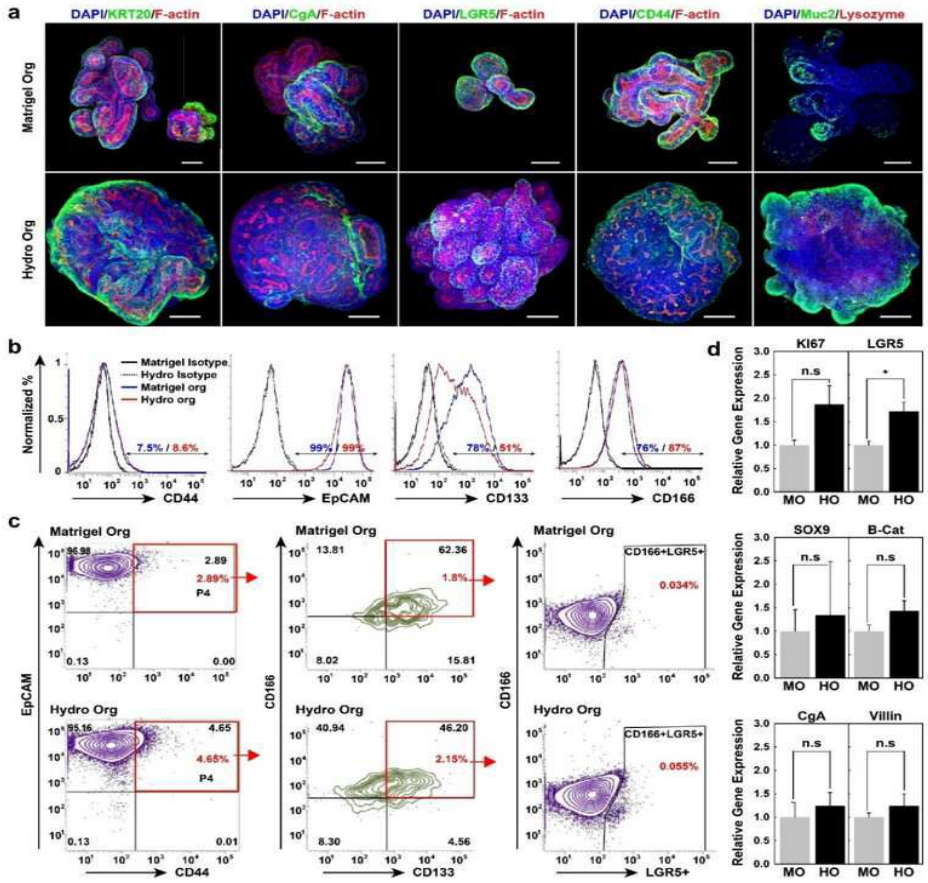
도면11


a
b
D-1
D+0
D+1 ~ D+3
~ D+14
BSA Coating
Single cell seeding
Single cell aggregation
Hydro Org generation
BSA10% Coating
c
Matrigel Org
d
Hydro Org
e
DAPI/KRT20/F-actin
DAPI/Muc2/F-actin
DAPI/CgA/F-actin
DAPI/Lysozyme/F-actin
DAPI/E-Cadherin/F-actin
DAPI/β-catenin/F-actin

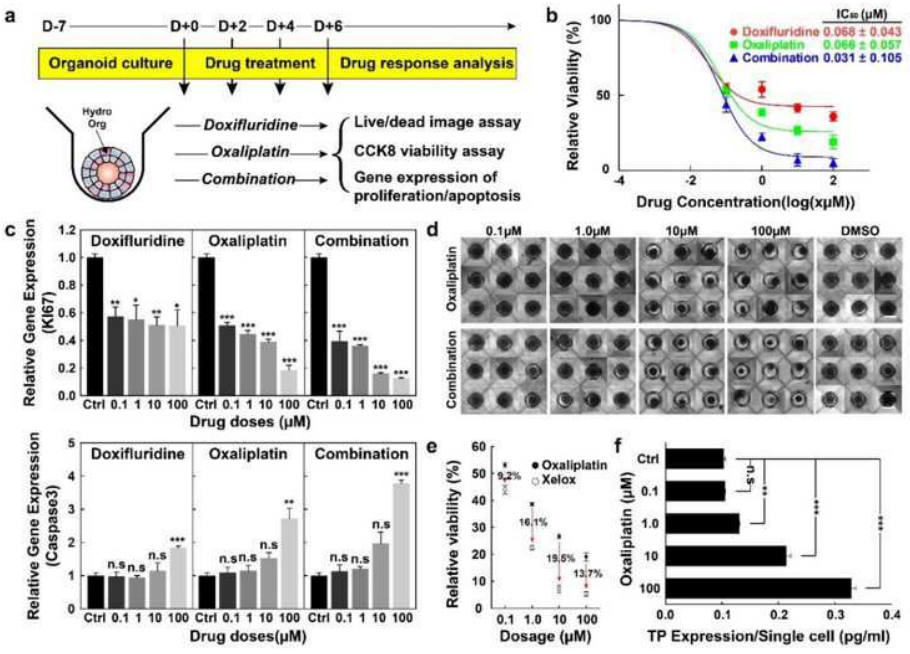
도면12


a
Dissociation of Patient derived tumor tissue
PCC Patient
Tumor Site
PCC Tissue
Primary organoid generation
Conventional 3D culture on Matrigel
Matrigel Dome
Matrigel Org
3D Hydro culture on Hydro plate
Hydro Org
b
D+0
D+3
D+6
D+9
D+12
D+14
Matrigel Org
c
Hydro Org
d
Matrgel Org
Hydro Org
Diameter distribution Percentages (%)
Diameter of Organoids(μm)
e
Matrigel Org
Hydro Org
Area of Organoid(μm²)
D7
D14
Days of culture
f
Matrigel Org
Hydro Org
LIVE DEAD
D+7
D+14
g
Live %
Dead %
MO HO
MO HO
Percentages(%)
7
14
Days

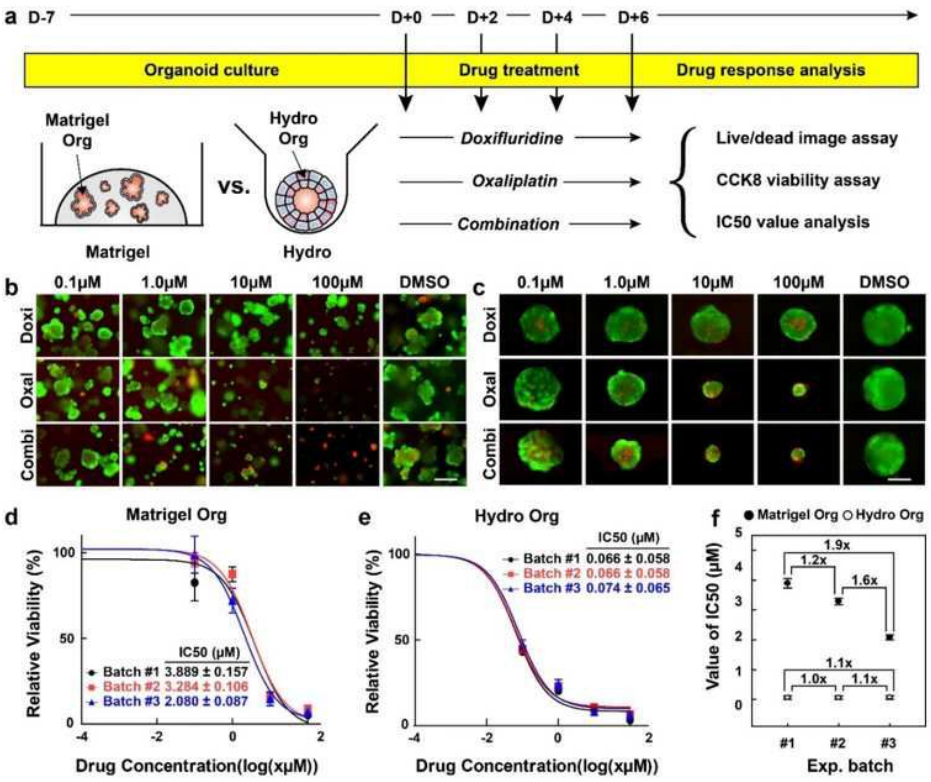
도면13


a
DAPI/KRT20/F-actin
DAPI/CgA/F-actin
DAPI/LGR5/F-actin
DAPI/CD44/F-actin
DAPI/Muc2/Lysozyme
Matrigel Org
Hydro Org
b
Matrigel Isotype
Hydro Isotype
Matrigel org
Hydro org
Normalized %
7.5% / 8.6%
99% / 99%
78% / 51%
76% / 87%
CD44
EpCAM
CD133
CD166
d
KI67
LGR5
SOX9
B-Cat
CgA
Villin
Relative Gene Expression
n.s
MO
HO
c
Matrigel Org
Hydro Org
EpCAM
CD166
CD44
CD133
LGR5+
2.89%
P4
4.65%
1.8%
2.15%
CD166+LGR5+
0.034%
0.055%

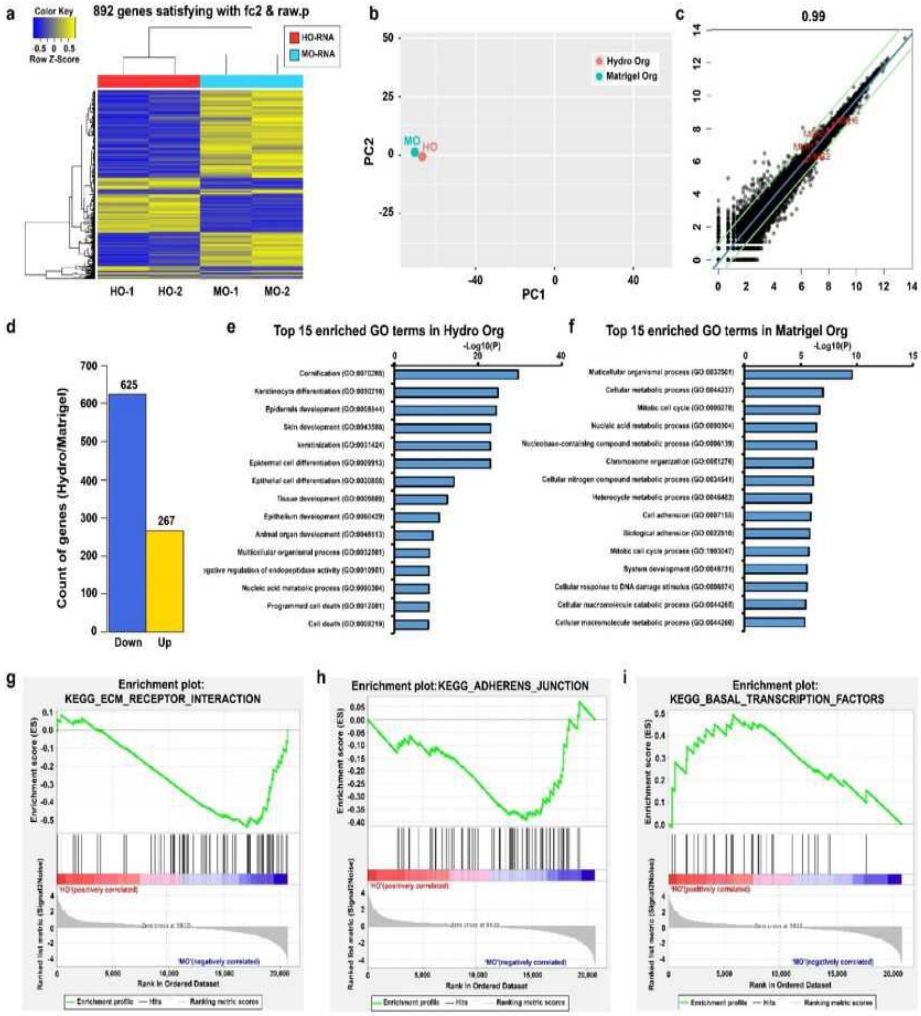
도면14


a
D-7
D+0
D+2
D+4
D+6
Organoid culture
Drug treatment
Drug response analysis
Hydro Org
Doxifluridine
Oxaliplatin
Combination
Live/dead image assay
CCK8 viability assay
Gene expression of proliferation/apoptosis
b
Relative Viability (%)
IC50 (μM)
Doxifluridine 0.068 ± 0.043
Oxaliplatin 0.068 ± 0.057
Combination 0.031 ± 0.105
Drug Concentration(log(xμM))
c
Relative Gene Expression (KI67)
Drug doses (μM)
Relative Gene Expression (Caspase3)
d
0.1μM
1.0μM
10μM
100μM
DMSO
e
Relative viability (%)
Oxaliplatin
Xelox
Dosage (μM)
f
Oxaliplatin (μM)
TP Expression/Single cell (pg/ml)

도면15


a
D-7
D+0
D+2
D+4
D+6
Organoid culture
Drug treatment
Drug response analysis
Matrigel Org
Hydro Org
vs.
Matrigel
Hydro
Doxifluridine
Oxaliplatin
Combination
Live/dead image assay
CCK8 viability assay
IC50 value analysis
b
c
0.1μM
1.0μM
10μM
100μM
DMSO
Doxi
Oxal
Combi
d
Matrigel Org
Relative Viability (%)
IC50 (μM)
Batch #1 3.889 ± 0.157
Batch #2 3.284 ± 0.106
Batch #3 2.080 ± 0.087
Drug Concentration(log(xμM))
e
Hydro Org
IC50 (μM)
Batch #1 0.066 ± 0.058
Batch #2 0.066 ± 0.058
Batch #3 0.074 ± 0.065
f
Matrigel Org
Hydro Org
Value of IC50 (μM)
1.9x
1.2x
1.6x
1.1x
1.0x
1.1x
#1
#2
#3
Exp. batch

도면16



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

Next & Bio Inc.

<120> Method of providing information for patient-specific drug selection

<130> DHP20-188P

<150> KR 20/0022912

<151> 2020-02-25

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GapDH forward primer

<400> 1

aacagcgaca cccatcctc 19

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GapDH reverse primer

<400> 2

cataccagga aatgagcttg acaa 24

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LGR5 forward primer

<400> 3

ttccccaggc cccttcaac 19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LGR5 reverse primer

<400> 4

cactgctgcg atgaccccaa 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chromogranin A forward primer

<400> 5

acactttcca agcccagccc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chromogranin A reverse primer

<400> 6

agagcctccg accgaccttt 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Villin forward primer

<400> 7

gctgaggtca caagccccaa 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Villin reverse primer

<400> 8

gcagagaagg cagctggagt 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta Catenin forward primer

<400> 9

tgtggtcacc tgtgcagctg 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta Catenin reverse primer

<400> 10

tgcttcttgg tgtcggctgg 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KI67 forward primer

<400> 11

agctgactct gccactaagc 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KI67 reverse primer

<400> 12

gtccagctgt agtgcccaat 20

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOX9 forward primer

<400> 13

atgaagatgc cgacgagca 19

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOX9 reverse primer

<400> 14

tcctcgctct ccttcttcag at 22