



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0176372
(43) 공개일자 2024년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) A61K 35/36 (2015.01)
A61K 9/70 (2006.01) A61P 1/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0632 (2013.01)
A61K 35/36 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0077056
(22) 출원일자 2023년06월15일
심사청구일자 2023년06월15일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
정용택
서울특별시 서초구 고무래로 35 반포리체아파트 103동 1203호
오수민
서울특별시 은평구 갈현로 111, 1-301
김진우
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교
(74) 대리인
특허법인(유)화우

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 평면화 구강점막 오가노이드 제조방법

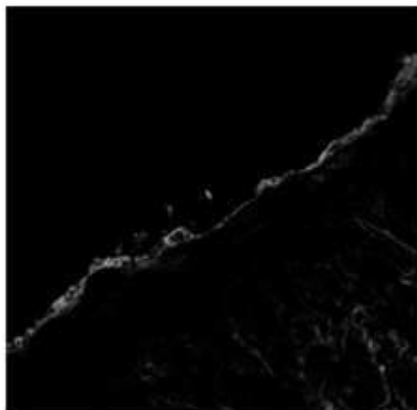
(57) 요약

본 발명은 평면화 구강점막 오가노이드 제조방법, 상기 제조방법으로 제조된 평면화 구강점막 오가노이드, 상기 평면화 구강점막 오가노이드를 포함하는 세포 시트제 및 상기 평면화 구강점막 오가노이드를 유효성분으로 포함하는, 구강점막 질환 예방 또는 치료용 의약품 조성물에 관한 것이다.

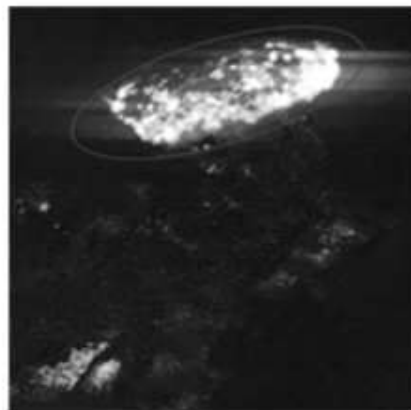
본 발명의 제조방법으로 제조된 평면화 구강점막 오가노이드는 세포 시트제로서 구강병변 부위에 생착하여 구강점막 질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3

(a)



(b)



(52) CPC특허분류

A61K 9/7007 (2013.01)

A61P 1/02 (2018.01)

C12N 2501/11 (2013.01)

C12N 2501/727 (2013.01)

C12N 2509/00 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465040016

과제번호 HH21C0018010123

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 범부처 재생의료기술개발사업

연구과제명 방사선 및 화학적 항암 치료 후 구강내 점막염, 미각상실 환자의 구강 조직 공여 및 세포치료 가능성을 위한 원천기술 및 프로토콜 개발

기 여 율 33/100

과제수행기관명 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465034752

과제번호 21C0712L1-12

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 범부처재생의료기술개발사업단

연구사업명 범부처재생의료기술개발사업

연구과제명 항암 화학 요법 및 방사선 요법에 의한 구강점막괴사질환과 미각소실을 극복할 수 있는 오가노이드 기반 세포치료제 개발

기 여 율 67/100

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2021.08.01 ~ 2024.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는, 평면화 구강점막 오가노이드 제조방법:

- (a) 세포외기질에 포매되어 있는 구강점막 상피세포를 배양하여 구강점막 오가노이드를 함유한 배양물을 수득하는 단계;
- (b) 상기 배양물에서 세포외기질을 제거하는 단계;
- (c) 상기 세포외기질이 제거된 배양물에 효소를 첨가하고 물리적 압력을 가하여 단일세포를 수득하는 단계;
- (d) 상기 단일세포를 함유한 배양물을 원심분리하여 얻은 단일세포펠렛을 배지에 현탁하여 현탁액을 수득하는 단계;
- (e) 상기 현탁액을 배양 용기에 시딩(seeding)하는 단계; 및
- (f) 상기 배양 용기에 성장인자를 포함한 배지를 첨가한 후 배양하여 평면화 구강점막 오가노이드를 수득하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 구강점막 상피세포는 구강점막 조직에 디스파제(dispace) 효소를 처리하여 상피층판을 분리하고, 이로부터 세포를 추출하여 얻어지는 것인, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (a)단계의 배양은 EGF, Y27632 및 A8301을 포함하는 배지에서 배양되는 것인, 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (b)단계에서 상기 배양물에 콜라게나제(collagenase)를 처리하여 세포외기질을 제거하는, 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 콜라게나제를 처리한 후 10분 내지 30분간 37℃에서 인큐베이션하는 단계를 더 포함하는, 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (e) 단계의 현탁액 내 세포가 1×10^4 개 내지 1×10^8 개인, 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 성장인자는 EGF 및 Y27632 중 선택되는 하나 이상인, 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 효소는 트리플(Tryple), 트립신(Trypsin), EDTA 또는 아큐테이즈(Accutase)인, 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 (f)단계의 배양은 5일 내지 15일간 수행하는 것인, 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 (f)단계의 배양은 35℃ 내지 45℃에서 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (f)단계의 배양 이후 20℃ 내지 30℃에서 배양하는 단계를 더 포함하는, 제조방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된, 평면화 구강점막 오가노이드.

청구항 13

제12항의 평면화 구강점막 오가노이드를 포함하는 세포 시트제.

청구항 14

제12항의 평면화 구강점막 오가노이드를 유효성분으로 포함하는, 구강점막 질환 예방 또는 치료용 의약품 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 구강점막 질환은 구내염, 아프타성 구내염, 편평태선, 약물에 의한 접촉성 병소, 천포창 및 점막 유천포창으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인, 의약외품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 평면화 구강점막 오가노이드 제조방법, 상기 제조방법으로 제조된 평면화 구강점막 오가노이드, 상기 평면화 구강점막 오가노이드를 포함하는 세포 시트제 및 상기 평면화 구강점막 오가노이드를 유효성분으로 포함하는, 구강점막 질환 예방 또는 치료용 의약외품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 구강은 인후와 식도로 이어지는 소화관의 첫 부분으로서 구강의 표면은 피부와 비슷하지만 보다 무르고 습한 점막으로 덮여 있다. 이러한 구강점막은 심부 조직을 구강의 환경으로부터 보호하고 기회감염을 일으킬 수 있는 미생물로부터 방어막 역할을 한다.

[0004] 구강점막은 신체의 외부와 내부를 연결하는 위치에 있기 때문에 신체의 내부적 변화와 외부적 자극으로부터 모두 영향을 받게 되어 매우 다양한 질병 상태를 나타낸다. 구강점막의 백색 변화나 어두운 색조로의 변화, 조직 결손 또는 부피 증가와 같은 양상은 관련된 병적 과정을 반영하므로 구강점막질환의 진단에 중요한 단서를 제공한다.

[0005] 현재까지 구강점막 질환을 치료하는 방법은 병변 부위를 보호하여 통증을 줄이고 자연치유를 기다리는 것에 그치며, 종래 구강점막 궤양 치료제 또한 구강패치나 스프레이 등을 이용한 처치제로 증상을 완화하는 것에 불과하다. 따라서, 구강병변을 직접적으로 치료하여 치유시간을 줄이고 통증 및 부작용을 최소화하기 위한 연구가 시급한 실정이다.

[0006] 한편, 종래 2D 배양 기법의 줄기세포 연구는 세포 본연의 성질과 조직 단위의 특성을 잃어버리기 쉽고, 동물모델은 인체의 장기와 생물학적 차이가 있어 조직 재생의 일반화에 부적합하다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 3D 배양기법을 통한 오가노이드 제조가 대두되고 있다.

[0007] 다능성줄기세포 및 성체줄기세포를 세포외기질 유사 매트릭스에 포매하여 3차원으로 배양함으로써 생성할 수 있는 오가노이드는 줄기세포의 분화능을 인공적으로 조작함으로써 모사하고자하는 장기의 세포, 장기의 특이 구조 및 기능 등을 갖는 세포의 집합체이다. 오가노이드 배양법을 활용해 구강점막 주변에 존재하는 구강점막 줄기세포를 배양함으로써 구강점막 오가노이드를 형성할 수 있다. 다만, 오가노이드를 통한 조직 재현에 있어 침샘, 눈물샘 등 내강이 존재하는 기관은 오가노이드화되었을 때 본래의 극성을 잘 형성할 수 있으나, 구강점막, 미뢰와 같은 이장 상피는 내강이 존재하지 않고 정단부(apical) 부위가 생체 외부로 노출되어 있는 구조이므로, 3D 배양을 통한 오가노이드 형성 시 본래 조직과 정반대의 극성을 가지게 된다.

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 구강점막 질환을 치료하기 위한 세포 유래 소재를 제조하는 방법을 예의 연구 노력한 결과, 평면화된 구강점막 오가노이드 제조방법을 확립하고, 이러한 방법으로부터 형성한 세포 시트가 구강점막의 병변 부위에 생착될 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2021-0078704호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 전술한 문제 및 이와 연관된 다른 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명의 일 예시적 목적은 다음의 단계를 포함하는, 평면화 구강점막 오가노이드 제조방법을 제공하는 것이다:
- [0013] (a) 세포외기질에 포매되어 있는 구강점막 상피세포를 배양하여 구강점막 오가노이드를 함유한 배양물을 수득하는 단계;
- [0014] (b) 상기 배양물에서 세포외기질을 제거하는 단계;
- [0015] (c) 상기 세포외기질이 제거된 배양물에 효소를 첨가하고 물리적 압력을 가하여 단일세포를 수득하는 단계;
- [0016] (d) 상기 단일세포를 함유한 배양물을 원심분리하여 얻은 단일세포펠렛을 배지에 현탁하여 현탁액을 수득하는 단계;
- [0017] (e) 상기 현탁액을 배양 용기에 시딩(seeding)하는 단계; 및
- [0018] (f) 상기 배양 용기에 성장인자를 포함한 배지를 첨가한 후 배양하여 평면화 구강점막 오가노이드를 수득하는 단계.
- [0019] 본 발명의 다른 예시적 목적은 상기 제조방법으로 제조된 평면화 구강점막 오가노이드를 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 평면화 구강점막 오가노이드를 포함하는 세포 시트제를 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 평면화 구강점막 오가노이드를 유효성분으로 포함하는, 구강점막 질환 예방 또는 치료용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0023] 본 명세서에 개시된 발명의 기술적 사상에 따라 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 문제점을 해결하기 위한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제는 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0025] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0027] 상기 목적을 달성하기 위한 일 양태로서, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, 평면화 구강점막 오가노이드 제조방법을 제공한다.
- [0028] (a) 세포외기질에 포매되어 있는 구강점막 상피세포를 배양하여 구강점막 오가노이드를 함유한 배양물을 수득하는 단계;
- [0029] (b) 상기 배양물에서 세포외기질을 제거하는 단계;
- [0030] (c) 상기 세포외기질이 제거된 배양물에 효소를 첨가하고 물리적 압력을 가하여 단일세포를 수득하는 단계;
- [0031] (d) 상기 단일세포를 함유한 배양물을 원심분리하여 얻은 단일세포펠렛을 배지에 현탁하여 현탁액을 수득하는 단계;
- [0032] (e) 상기 현탁액을 배양 용기에 시딩(seeding)하는 단계; 및
- [0033] (f) 상기 배양 용기에 성장인자를 포함한 배지를 첨가한 후 배양하여 평면화 구강점막 오가노이드를 수득하는 단계.
- [0034] 본 발명의 용어 "구강점막(oral mucosa)"은 입안 전체를 덮고 있는 점막으로, 치은, 경구개, 구순, 협부(볼), 구강전정, 구강저, 혀, 연구개 및 치조 점막을 포함한다.

- [0035] 본 발명의 용어 "오가노이드(organoid)"는 1차 조직(primary tissue), 조직 하위단위 또는 단일세포(예를 들어 줄기세포)로 구성된 생체 외 3차원 세포 집합체(3D cellular cluster)를 의미한다. 오가노이드는 자가재생(self-renewal) 및 자가조직화(self-organization)가 가능한 특징을 가지며, 본래 조직과 유사한 표현형 및 기능을 구현할 수 있으므로, '소형 유사 장기' 또는 '장기 유사체'로도 명명될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 용어 "평면화 구강점막 오가노이드"는 3D 배양을 통해 형성된 오가노이드가 평면화된 형태로, 평면화를 통해 구강점막 자극부위가 노출된 형태를 확보할 수 있으며, 세포 시트체로서 생체 구강병변에 생착시켜 구강점막 질환의 예방 및 치료에 이용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 용어 "배양"은 생체로부터 분리된 세포, 이들의 2차원 또는 3차원적 집합체, 조직 또는 조직의 일부를 체외에서 증식, 성장, 유지 및 분화시키는 것을 의미한다. 이에, 용어 "배양"은 출발 물질(세포, 조직 또는 조직 유사체)을 이용하여 인공적인 환경 하에서 목적 물질을 수득하는 전 과정을 포괄하는 의미이며, 이에 "배양용 조성물"은 "증식용 조성물", "성장용 조성물", "유지용 조성물" 및 "분화 유도용 조성물"을 모두 포함하는 개념이다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 (a)단계의 배양은 EGF, Y27632 및 A8301을 포함하는 배지에서 배양되는 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 세포외기질은 콜라겐(collagen)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 세포외기질이 콜라겐(collagen)인 경우 상기 배양물에 콜라게나제(collagenase)를 처리하여 세포외기질을 제거할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 일 구현예로, 상기 콜라게나제를 처리한 후 10분 내지 30분, 구체적으로 15분 내지 25분, 더욱 구체적으로 15분 내지 20분간 37℃에서 인큐베이션하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 (e) 단계의 현탁액 내 1×10^4 개 내지 1×10^8 개일 수 있으며, 구체적으로 1×10^5 개 내지 1×10^7 개일 수 있으며, 더욱 구체적으로 1×10^5 개 내지 1×10^6 개 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 성장인자는 EGF 및 Y27632 중 선택되는 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 상기 EGF는 상피 성장인자로 세포 내 신호경로를 조절하여 증식, 분화 및 자가 복제에 영향을 미치며, 배지 조성물 내 EGF의 농도는 구강점막 구성 세포를 효율적으로 증식, 분화시키기 위해 적절히 선택될 수 있다.
- [0045] 상기 Y-27632(디하이드로클로라이드)는 Rho/Rock 신호 경로를 억제하는 화합물로서 하기 화학식 1의 구조를 가지며, 배지 조성물 내 Y-27632의 농도는 구강점막 구성 세포를 효율적으로 증식, 분화시키기 위해 적절히 선택될 수 있다.
- [0046] [화학식 1]
-
- [0047]
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 효소는 세포외기질이 제거된 후 획득한 오가노이드 세포군을 물리적, 화학적으로 단일 세포화 하기위해 사용되는 것으로, 일 예로, 트리플(Tryple), 트립신(Trypsin), EDTA 또는 아큐테이즈(Accutase)일 수 있고, 구체적으로 트리플일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 (f)단계의 배양은 5일 내지 15일간 수행될 수 있고, 구체적으로 5일 내지 12일간 또는 5일 내지 10일간 수행될 수 있으며, 더욱 구체적으로 7일 내지 10일간 수행될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 (f)단계의 배양은 35℃ 내지 45℃에서 수행될 수 있고, 구체적으로 35℃ 내지 38℃에서 수행될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 (f)단계의 배양 이후 20℃ 내지 30℃에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 구체적으로 20℃ 내지 25℃에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 배양 용기의 표면은 N-isopropylacrylamide(PIPAAm)으로 코팅된 것일 수 있다. 37℃ 이상의 온도에서는 상기 코팅 층이 소수성이므로 세포의 부착 및 성장이 가능하나, 32℃ 이하의 온도에서는 코팅 층이 친수성으로 바뀌면서 물과 결합하여 부풀어올라 세포가 용기로부터 탈착될 수 있다.
- [0053] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 평면화 구강점막 오가노이드를 제공한다.
- [0054] 본 발명의 용어 구강점막, 오가노이드, 평면화 구강점막 오가노이드는 전술한 바와 같다.
- [0055] 구체적으로, 본 발명의 실시예에서는, 상기 제조방법으로 평면화 구강점막 오가노이드를 제조한 후 이를 이용한 세포 시트제를 제조하였으며, 면역형광염색을 통해 제조된 세포 시트제가 구강병변 부위에 잘 정착하는 것을 확인하였다.
- [0056] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 평면화 구강점막 오가노이드를 포함하는 세포 시트제를 제공한다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 세포 시트제는 평면화 구강점막 오가노이드를 포함하는 시트 형태로 형성되는 것일 수 있다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 세포 시트제는 구강점막 병변 부위에 부착시켜 구강점막 질환을 예방 또는 치료하는 용도로 사용될 수 있다.
- [0059] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 평면화 구강점막 오가노이드를 유효성분으로 포함하는, 구강점막 질환 예방 또는 치료용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0060] 본 발명의 용어 구강점막, 오가노이드, 평면화 구강점막 오가노이드는 전술한 바와 같다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 구강점막 질환은 구내염, 아프타성 구내염, 편평태선, 약물에 의한 접촉성 병소, 천포창 및 점막 유전포창으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0062] 구체적으로, 본 발명의 의약품 조성물은 구강용 의약품 또는 동물용 의 pharmaceutics를 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 의약품 조성물은 상기 평면화 구강점막 오가노이드 이외에 의약품 조성물에 통상적으로 사용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 연마제, 습윤제, 결합제, 기포제, 감미제, 방부제, 약효성분, 향미제, 색소, 용제, 증백제, 가용화제 또는 pH 조정제를 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 의약품 조성물은 패치, 외용제, 산제, 살균소독제, 치약제, 연고제, 로션제, 물티슈, 스프레이 파스 또는 밴드 등을 예시할 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니며, 의약품의 제제화 방법, 용량, 이용 방법, 구성성분 등은 당해 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명의 의약품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 구강용 의약품으로서 구체적으로는 구강필름, 구강스프레이, 구강용 연고제, 치약, 구강청결제, 껌, 캔디류, 구강용 바니쉬(varnish) 및 잇몸 마사지 크림으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 상기 평면화 구강점막 오가노이드를 구강 내 생착시켜 구강점막 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0066] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 상기 평면화 구강점막 오가노이드의 구강점막 질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0068] 본 발명의 제조방법으로 제조된 평면화 구강점막 오가노이드는 세포 시트제로서 구강병변 부위에 생착하여 구강점막 질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0069] 다만, 본 명세서에 개시된 기술의 일 실시예에 따른 효과는 이상에서 언급한 것들로 제한되지 않으며, 언급하지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0071] 본 명세서에서 인용되는 도면을 보다 충분히 이해하기 위하여 각 도면의 간단한 설명이 제공된다.

도 1은 구강점막 오가노이드 제작 과정을 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 제조방법으로 제조된 평면화 구강점막 오가노이드(세포 시트제)를 확인한 결과이다(a : 업셀 디쉬에 시딩한 직후 세포 모습, b : 7일간 배양 후 형성된 평면화 구강점막 오가노이드, c : 평면화 구강점막 오가노이드를 디쉬에서 탈착하여 실리콘패드에 위치시킨 모습).

도 3은 면역형광염색을 통해 본 발명의 제조방법으로 제조된 평면화 구강점막 오가노이드의 병변부위의 생착을 확인한 결과이다(a: 10 배율, b: 25 배율).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0074] 실시예 1: 구강점막 오가노이드 제조

[0075] 환자의 동의하에 구강점막(혀 및 볼점막)을 채취하여, 생리식염수에 희석한 dispase II 효소(2mg/mL)(Roche, cat #4942078001)를 점막 상피와 상피 하 결합조직의 사이 공간에 주입하여 팽창시키고, 이렇게 팽창된 구강점막 조직을 dispase II 효소 희석액에서 37℃에서 30분 배양하였다. 상피 하 결합조직으로부터 상피층을 박리해 상피층판을 분리하고, 이를 trypsin/EDTA (Gibco, cat #25200072)용액 내부에서 멸균된 수술용 가위, 칼 등의 도구를 이용하여 최대한 작은 면적으로 잘게 잘랐다. 잘게 자른 조직을 37℃에서 30분 배양하였다. 이후, 필터에 연속적인 피펫팅으로 잘게 자른 조직에 압력을 가하여 조직으로부터 세포를 추출하여 단일세포 현탁액을 형성하였다. 이 현탁액을 원심분리를 하여 얻은 세포 펠렛을 적절한 비율로 콜라겐(collagen) 등의 세포 외 기질에 포매하였으며, 기본 배양액(DMEM/F12 + 1x GlutaMax + 1x HEPES + 1x N2 보충액 + 1x B27 보충액 + 1x penicillin/streptomycin)을 기초로 배지 조성물(20% R-spondin 1, 10% Noggin, 50 ng/mL EGF2, 10 μ M Y-27632 (Cayman chemical, cat # Cay10005583-50), A8301(Tocris, cat #2939))을 함유한 배지에서 수일간 배양하였다. 총 7일간 배양하여 오가노이드 세포집합체를 함유한 배양물을 수득하였다.

[0076] 도 1은 인체유래 구강점막 오가노이드 제작 과정을 도시한 것이다.

[0078] 실시예 2: 평면화 구강점막 오가노이드 제조

[0079] 실시예 1에서 수득한 배양물에 콜라게나제(collagenase)를 첨가하고 37℃에서 15 내지 20분 처리하여 세포외기질인 콜라겐을 제거하였다. 이후 배양물에 Tryple(Gibco, cat #12604013)을 첨가하고 5분동안 37℃에 위치시킨 뒤 유리 파이펫을 이용해 연속적인 압력을 5분 이상 가하여 오가노이드를 깨서 단일세포형태로 만들었다. 이후 RCF 45 g, 4℃ 조건에서 4분 30초간 원심분리를 통해 단일세포 펠렛을 수득한 후 37℃로 가열한 배지(기본 배양액(DMEM/F12 + 1x GlutaMax + 1x HEPES + 1x N2 보충액 + 1x B27 보충액 + 1x penicillin/streptomycin)을 기초로 배지 조성물(20% R-spondin 1, 10% Noggin, 50 ng/mL EGF2, 10 μ M Y-27632 (Cayman chemical, cat # Cay10005583-50) 추가)에 첨가된 펠렛을 풀고 1×10^6 개의 세포를 PIPAAm으로 표면이 코팅된 업셀 디쉬(upcell dish)에 시딩(seeding)하였다. 기본 배양액(DMEM/F12 + 1x GlutaMax + 1x HEPES + 1x N2 보충액 + 1x B27 보충액 + 1x penicillin/streptomycin)을 기초로 배지 조성물(20% R-spondin 1, 10% Noggin, 50 ng/mL EGF2, 10 μ M Y-27632 (Cayman chemical, cat # Cay10005583-50))이 첨가된 배지를 3 mL 첨가한 후 3~4일에 한번씩 교체하며 37℃에서 7 내지 10일간 배양하여, 세포 confluency(부착세포로 덮인 배양 접시 표면 백분율)가 90% 이상인 평면화 구강점막 오가노이드(세포 시트제)를 제조하였다(도 2, a : 업셀 디쉬에 시딩한 직후 세포 모습, b : 7 내지 10일간 배양 후 형성된 평면화 구강점막 오가노이드, c : 평면화 구강점막 오가노이드를 디쉬에서 탈착하여 실리콘패드에 위치시킨 모습).

[0080] 이후 배양물이 담긴 디쉬를 20℃ 내지 25℃의 환경으로 옮긴 후 배지를 제거하고 운반용 멤브레인(Thermo, cat #174904)을 올리고, 평면화 오가노이드의 건조를 막기 위해 0.1 mL 배지((DMEM/F12 + 1x GlutaMax + 1x HEPES + 1x N2 보충액 + 1x B27 보충액 + 1x penicillin/streptomycin)를 멤브레인에 뿌려주었다. 10분간 방치하여

세포 시트제가 디쉬에서 탈착되어 멤브레인에 부착된 상태가 되었다. 마이크로포셉을 이용해 멤브레인의 가장자리를 잡고 천천히 시트를 들어올렸다. 멸균된 실리콘 패드 위에 멤브레인을 놓고 배지를 넣어 멤브레인에서 시트를 분리한 뒤, 구강병변에 맞게 세포 시트제 크기를 조절하여 절단하였다. 제작된 세포 시트제를 새 멤브레인 에 다시 부착하여 구강병변 부위로 옮긴 후 수분을 처리하여 세포 시트제가 멤브레인에서 탈착되면서 병변에 생착하도록 하였다. 이후 물기를 제거하고 종래 구강패치제품(큐라텍, TBM(주))을 생착 부위에 부착시켜 세포 시트제가 병변 부위에 생착하는 동안 보호하도록 하였다.

[0082] 실시예 3: 평면화 구강점막 오가노이드의 생착 평가

[0083] 면역형광염색을 통해 실시예 2에서 구강병변 부위에 생착시킨 평면화 구강점막 오가노이드(세포 시트제)가 구강병변에 잘 생착되는지 확인하였다. 구체적으로, 실시예 2에서 생착 부위에 부착시킨 세포 시트제를 4% PFA 용액에 담군 후 10분 실온에 두었다. 이후 0.2% PBST 세척 용액에 담군 후 5분 실온에 두는 방식으로 3번 세척하였다. PBST에 5% 당나귀 세럼(donkey serum)을 첨가하여 블로킹 용액을 제조하여 시트를 담군 후 30간 실온에 두었다. 새 블로킹 용액에 시트의 각질세포를 검출하는 1차 항체를 첨가한 뒤 시트를 넣고 4℃에 24시간 두었다. 이후 0.2% PBST 세척 용액에 담군 후 10분 실온에서 3번 세척하고, 블로킹 용액에 2차 항체를 첨가하고 시트를 넣고 차광하여 실온에 2시간 두었다.

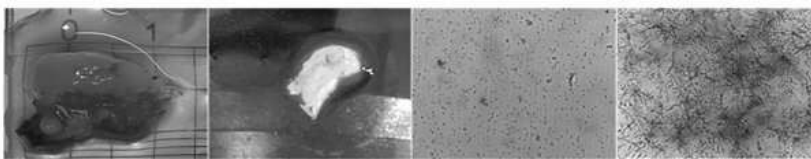
[0084] 세척 후 마이크로포셉을 이용해 시트제를 슬라이드에 펼쳐놓고 마운팅 용액(mounting solution)을 떨어트린 후 커버 슬립으로 덮어준 뒤 공초점 현미경으로 면역형광염색된 시트제를 확인하였다.

[0085] 그 결과, 병변 부위에 세포 시트제가 잘 생착되었음을 확인하였다(도 3, a: 10 배율, b: 25 배율).

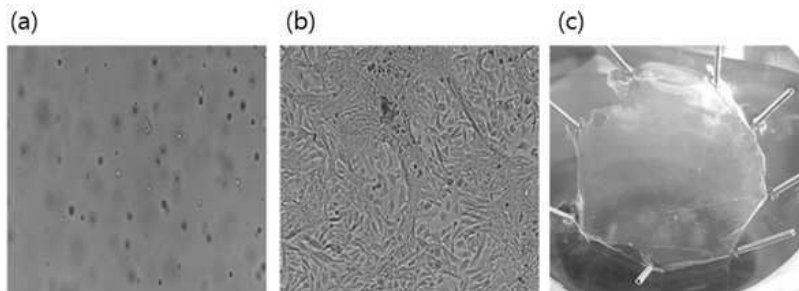
[0087] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

