(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0151722
(43) 공개일자 2023년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0062 (2013.01)
C12N 5/0657 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0051421
(22) 출원일자 2022년04월26일
심사청구일자 2022년04월26일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
정기석
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)
이상우
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

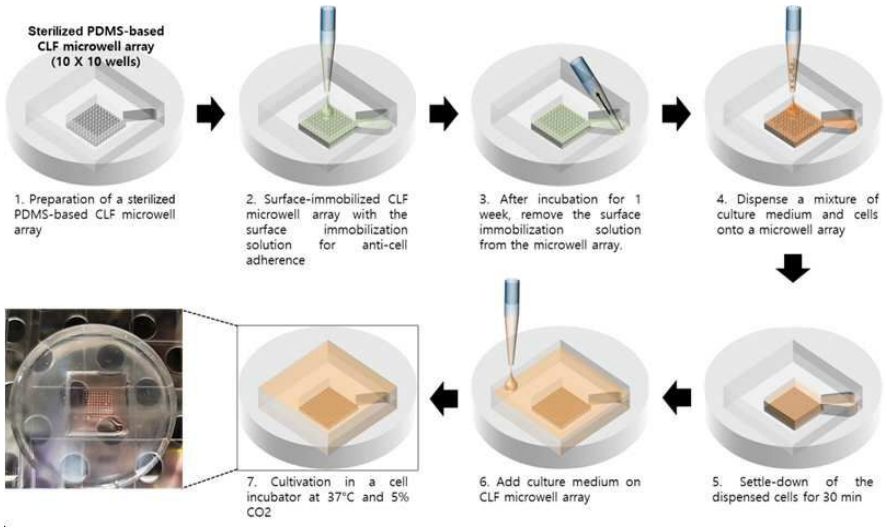
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **세포의 3차원 배양을 이용한 3차원 세포 집합체 제조 방법**

(57) 요 약

세포의 3차원 배양을 이용한 3차원 세포 집합체 제조 방법에 관한 것으로, 일 양상에 따른 세포집합체 제조방법에 의하면, 균일한 크기의 세포집합체를 대량으로 배양할 수 있는 효과가 있다. 또한, 세포집합체를 장기 배양하는 경우 발생하는 문제점, 예를 들면, 세포집합체가 배양용기의 바닥 등에 부착하는 등의 문제점을 효과적으로 방지할 수 있어 한달 이상의 장기배양이 가능하며, 세포배양 기질 없이도 세포집합체의 형성 및 성장이 가능한 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 5/0671 (2013.01)
C12N 5/0677 (2013.01)
C12N 2535/10 (2013.01)
C12N 2537/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465034391
과제번호 HR21C0198020021
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원육성(R&D)
연구과제명 체외환자 모델의 데이터 기반 분류를 통한 인공지능형 약물 반응 예측 기술 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 (재)아산사회복지재단
연구기간 2021.07.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1015888
과제번호 NRF-2022M3A9H1015888
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발사업
연구과제명 심실형 심장오가노이드의 배양/성숙과 효능/독성 평가용 표준 멀티 웰 어레이 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 (재)아산사회복지재단
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

배양용기의 표면에 세포 부착을 방지하기 위한 물질을 처리하는 단계;

상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질이 처리된 배양용기를 12 시간 내지 10 일 동안 보관한 후, 배양용기에서 세포 부착을 방지하기 위한 물질을 제거하는 단계; 및

상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질이 제거된 배양용기에서 세포를 배양하여 세포집합체를 형성하는 단계를 포함하는 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 배양용기는 표면이 산소-플라즈마(oxygen-plasma)로 처리된 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 배양용기는 오목한 바닥면을 포함하는 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질이 처리된 배양용기를 보관하는 기간은 4 일 내지 10 일인 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질이 처리된 배양용기를 보관하는 기간은 4 일 내지 7 일인 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 배양용기는 세포외 기질을 포함하지 않는 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 배양 기간은 1 일 내지 40 일인 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 세포집합체는 간 세포집합체 또는 심장 세포집합체인 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 세포는 부유배양을 통해 배양되는 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 세포는 분화능을 갖는 세포인 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 세포를 배양하는 단계는, 상기 세포가 계통-제한된 전구세포 또는 완전히 분화된 체세포로 분화되는 단계를 포함하는 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 계통-제한된 전구세포는 췌장 내배엽 전구세포, 췌장 내분비 전구세포, 간엽성 전구 세포, 간모세포, 근육 전구 세포, 아세포 또는 신경 전구 세포인 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

상기 체세포는 내분비 분비 세포, 췌장 베타 세포, 상피 세포, 내배엽 세포, 대식세포, 간세포, 심장의 심근세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포 또는 면역계 세포인 것인, 세포집합체를 제조하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 세포의 3차원 배양을 이용한 3차원 세포 집합체 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 오가노이드(organoid)는 '장기유사체' 또는 '유사장기'라고도 부르며, 줄기세포나 장기 기원 세포로부터 분리한 세포를 3차원 배양법으로 배양 또는 재응집과 재조합하여 제조된 장기 특이적 세포 집합체이다.

[0003] 오가노이드는 줄기세포 기반의 3차원 조직으로 뇌와 같은 장기의 경우 배양액상에 부착되지 않는 상태에서 성장시킬 수 있으며, 장기간 배양을 하는 경우 지속적으로 배양접시의 바닥 또는 주위와 부착되지 않도록 유지할 필요가 있다.

[0004] 이러한 오가노이드는 환자유래 줄기세포 또는 유도만능 줄기세포를 이용하여서 주로 제작하고 있으며, 환자유래 조직을 이용하는 경우는 암 조직이나, 성체줄기세포를 이용한다. 이 경우, 통상적으로 마트리겔 드롭플렛(matrigel droplet) 내에서 배양하나, 세포외 기질인 마트리겔을 사용하는 경우, 오가노이드가 크기와 모양이 일정하게 형성되지 않으며, 이에 따라 오가노이드의 기능 또한 일정하게 형성되지 않아, 표준화가 어렵다는 문제점이 있다.

[0005] 유도만능 줄기세포는 거의 모든 장기 오가노이드를 형성할 수 있다는 보고들이 발표되고 있으나, 한달 이상의 장기배양이 요구되는 경우 기존의 방법은 대량 배양에 용이하지 못하다는 한계를 가지고 있다. 또한, 일정한 크기의 오가노이드 형성에 어려움이 있어, 약물의 독성평가나 인공간과 같이 인공장기로 사용하는데 제한을 받아왔다.

[0006] 따라서, 조직재생 및 바이오 인공장기 산업에 있어서, 동일한 크기의 오가노이드를 장기간 대량 배양할 수 있는 기술이 요구되는 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 이를 바탕으로 연구를 수행하던 중, 세포 부착 방지 용액의 처리 시간에 따라 세포집합체의 안정적인 장기배양이 가능하며, 세포외 기질인 마트리겔을 사용하지 않으면서도 환자유래 세포집합체를 안정적으로 제조할 수 있음을 발견하고 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 공개특허 10-2019-0018306

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 일 양상은 배양용기의 표면에 세포 부착을 방지하기 위한 물질을 처리하는 단계; 상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질이 처리된 배양용기를 12 시간 내지 10 일 동안 보관한 후, 배양용기에서 세포 부착을 방지하기 위한 물질을 제거하는 단계; 및 상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질이 제거된 배양용기에서 세포를 배양하여 세포집합체를 형성하는 단계를 포함하는 세포집합체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 배양용기의 표면에 세포 부착을 방지하기 위한 물질을 처리하는 단계; 상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질이 처리된 배양용기를 12 시간 내지 10 일 동안 보관한 후, 배양용기에서 세포 부착을 방지하기 위한 물질을 제거하는 단계; 및 상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질이 제거된 배양용기에서 세포를 배양하여 세포집합체를 형성하는 단계를 포함하는 세포집합체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 명세서에서 용어, "배양용기"는 통상 세포 배양이나 생화학 실험 등에 사용하는 세포 배양용 플레이트 등을 의미하나 이에 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 디시, 플라스크, 멀티 웰 플레이트 등을 포함한다.

[0012] 상기 배양용기는 세포를 3차원 형태 또는 스페로이드(spheroid) 형태로 응집 및 배양하기 위해 오목한 바닥면을 포함할 수 있다. 예를 들면, 배양용기의 세로 단면의 형상이 U 자형(U shape), V 자형(V shape) 또는 평평한 바닥일 수 있다.

[0013] 본 명세서에서 용어, "세포 부착을 방지하기 위한 물질"은 세포집합체를 제조 또는 배양하는 동안, 배양 기구에 부착되는 것을 방지하기 위해 첨가해주는 물질을 의미한다. 상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질의 처리를 통해 세포집합체를 효과적으로 부유배양 할 수 있다. 상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질은 계면활성제, 전해질, 고분자 또는 양친성 공중합체일 수 있으며, 이를 배양용기에 처리함에 따라, 배양용기의 소수성을 감소시키고, 친수성을 증가시킬 수 있다.

[0014] 일 구체예에 있어서, 상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질은 메틸 메타크릴레이트계 폴리에틸렌글리콜(methyl methacrylate-based polyethylene glycol; PMMA-b-PEG) 용액, 또는 Anti-Adherence Rinsing Solution(STEMCELL, Technologies)일 수 있다.

[0015] 일 구체예에 있어서, 상기 세포는 정상세포 또는 암세포일 수 있으며, 상기 세포는 정상 조직, 암 조직 또는 이미 만들어진 세포집합체에서 분리하여 얻을 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 용어, "암 세포"는 암 환자로부터 채취한 세포로, "종양 세포"와 상호 교환적으로 사용 가능하다. 상기 "암"은 전형적으로 비정상적 또는 제어되지 않은 세포 성장의 특징을 가지는, 동물에서의 생리학적 상태를 의미한다. 암은 예를 들어, 전이, 정상적으로 기능하는 주변 세포에 대한 간섭, 비정상 레벨에서 사이토카인(cytokine) 또는 다른 분비 산물의 방출, 염증성 또는 면역학적 반응의 억제 또는 증대, 종양 형성(neoplasia), 전암(premalignant), 악성 종양(malignancy), 주위 또는 거리가 있는 조직 또는 기관, 예를 들어 림프절 침범(invasion) 등과 연관될 수 있다.

[0017] 일 구체예에서 상기 암은 혈액암 또는 고형암일 수 있으며, 상기 고형암은 간암, 유방암, 대장암, 두경부암, 폐암, 위암, 피부암, 결장암, 전립선암, 방광암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 피부암, 직장암, 항문암, 요도암, 난소암, 식도암 및 췌장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 명세서에서 용어, "세포집합체"또는 "3차원 세포집합체"는 2 이상의 세포가 밀집된 상태를 말하며, 조직 상태일 수도 있고, 다세포 상태일 수도 있다. 각각의 세포집합체는 조직 자체 또는 일부, 또는 다세포의 집합체로

존재할 수 있으며, 기질 세포로부터 분화된 세포 유사-조직체를 포함할 수 있다. 상기 세포집합체는 오가노이드(organoid)를 포함하며, 세포집합체를 구성하는 세포는 장기나 조직을 구성하는 기능 세포, 이의 미분화 세포, 이의 전구세포, 혈관 세포, 간엽계 세포, 또는 이들의 혼합일 수 있다.

[0019] 상기 혈관세포는 혈관 조직으로부터 분리한 것일 수 있지만, 이에 한정되지 않고, 전능성 혹은 다능성을 갖는 세포로부터 분화 유도된 것일 수 있다. 또한, 상기 간엽계 세포는 간엽계 세포에 대한 분화 운명이 결정되어 있지만, 아직 간엽계 세포로 분화되어 있지 않은 세포도 포함할 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 용어, "3차원(three-dimensional)"은 2차원이 아닌 기하학적인 3개의 파라미터(예를 들어, 깊이, 넓이, 높이 또는 X, Y, Z 축) 모델을 갖는 입체를 의미할 수 있다. 따라서 일 구체예에 따른 세포집합체는 3차원 배양, 즉 배양 용기에서 탈착되어 부유상태로 배양되어 세포가 증식함에 따라 입체적으로 구형, 시트(sheet) 또는 그와 유사한 3차원의 형태(예를 들어, 유사조직체)를 갖는 세포집합체를 의미할 수 있다. 또한, 3차원 세포집합체는 일반적인 세포집합체와 같이 세포의 단일 층으로 형성된 세포집합체가 아닌, 세포의 다층 또는 구형 등으로 형성된 것인 세포집합체를 의미할 수 있다. 또한, 일 구체예에 따른 세포집합체는 조직공학기술로 인공적인 3차원 다공성 세포외기질, 예를 들어, 시트, 하이드로겔, 막, 스캐폴드 등과 같은 합성 고분자 또는 천연 고분자 지지체를 사용할 필요 없이, 그 자체로서 3차원 세포집합체가 형성되는 것을 의미할 수 있다. 상기 조직공학기술은 세포가 아닌 매트릭스가 3차원인 것으로 일 구체예에 따른 3차원 세포집합체와는 구별된다. 상기 세포집합체는 직경이 300 ㎛ 이상, 예를 들어, 300 내지 2,000 ㎛, 400 내지 1,500 ㎛, 500 내지 1,000 ㎛, 500 내지 900 ㎛ 또는 700 내지 900 ㎛일 수 있다.

[0021] 본 명세서에서 용어, "오가노이드(organoid)"는 3차원의 입체구조를 가지는 세포를 의미하며, 동물 등에서 수집, 취득하지 않은 인공적인 배양 과정을 통해 제조한 신체 장기와 유사한 모델을 의미한다. 이를 구성하는 세포의 유래는 제한되지 않는다. 2차원 배양과는 달리, 3차원 세포 배양은 체외에서 세포가 모든 방향으로 성장할 수 있는 바, 상기 오가노이드는 생체 내에서 상호작용하고 있는 장기를 유사하게 모사하여 질병의 치료제 개발 등에 이용될 수 있다.

[0022] 상기 세포집합체는 간 세포집합체, 심장 세포집합체, 위 세포집합체, 뇌 세포집합체, 장관 세포집합체, 혀 세포집합체, 폐 세포집합체, 갑상선 세포집합체, 흉선 세포집합체, 췌장 세포집합체, 상피 세포집합체, 신장 세포집합체, 전립선 세포집합체, 고환 세포집합체, 배아 세포집합체, 배반포 유사 세포집합체, 또는 망막 세포집합체일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0023] 일 구체예에 있어서, 상기 세포집합체는 심장 세포집합체인 것일 수 있다. 상기 심장 세포집합체는 인간 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCc) 유래 심장 세포집합체일 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)"는 다능성이 없는 체세포에 역분화를 일으키는 특정 유전자를 도입한 후 만들어진 전분화능 줄기세포를 의미한다. 상기 유도만능 줄기세포는 역분화 줄기세포라고도 명명할 수 있다. 또한, 상기 체세포는 성인 개체의 피부 세포 등을 포함하여 다양한 종류의 세포일 수 있다.

[0025] 일 구체예에 있어서, 상기 세포집합체는 간 세포집합체인 것일 수 있다. 상기 간 세포집합체는 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체 또는 인간 간암 세포집합체일 수 있다.

[0026] 일 구체예에 있어서, 상기 배양용기는 표면이 산소-플라즈마(oxygen-plasma)로 처리된 것일 수 있다. 상기 산소 플라즈마 처리는 당업계에서 일반적으로 사용되는 방식, 예를 들면 CCP(capacitively coupled plasma) 방식 등을 이용하여 수행할 수 있다.

[0027] 일 구체예에 있어서, 상기 세포 부착을 방지하기 위한 물질이 처리된 배양용기를 보관하는 기간은 12 시간 내지 10 일, 예를 들면, 1 일 내지 10 일, 1 일 내지 9 일, 1 일 내지 8 일, 1 일 내지 7 일, 1 일 내지 6 일, 1 일 내지 5 일, 1 일 내지 4 일, 2 일 내지 10 일, 2 일 내지 9 일, 2 일 내지 8 일, 2 일 내지 7 일, 2 일 내지 6 일, 2 일 내지 5 일, 2 일 내지 4 일, 3 일 내지 10 일, 3 일 내지 9 일, 3 일 내지 8 일, 3 일 내지 7 일, 3 일 내지 6 일, 3 일 내지 5 일, 3 일 내지 4 일, 4 일 내지 10 일, 4 일 내지 9 일, 4 일 내지 8 일, 4 일 내지 7 일, 4 일 내지 6 일, 4 일 내지 5 일, 5 일 내지 10 일, 5 일 내지 9 일, 5 일 내지 8 일, 5 일 내지 7 일, 5 일 내지 6 일, 6 일 내지 10 일, 6 일 내지 9 일, 6 일 내지 8 일, 6 일 내지 7 일, 7 일 내지 10 일, 7 일 내지 9 일, 7 일 내지 8 일, 8 일 내지 10 일, 8 일 내지 9 일, 또는 9 일 내지 10 일 수 있다.

[0028] 상기 보관은 35 ℃ 내지 40 ℃, 예를 들면, 35 ℃ 내지 39 ℃, 35 ℃ 내지 38 ℃, 35 ℃ 내지 37 ℃, 35 ℃ 내지 36 ℃, 36 ℃ 내지 40 ℃, 36 ℃ 내지 39 ℃, 36 ℃ 내지 38 ℃, 36 ℃ 내지 37 ℃, 37 ℃ 내지 40 ℃, 37

℃ 내지 39 ℃, 또는 37 ℃ 내지 38 ℃의 조건으로 세포 배양기에서 보관할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 일 구체예에 있어서, 상기 배양용기는 세포외 기질(extracellular matrix) 또는 이의 유사체를 포함하지 않는 것일 수 있다. 예를 들면, 마트리겔(matrigel)을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[0030] 본 명세서에서 용어, "세포외 기질의 유사체"는 세포 외 거대분자들의 3차원적 네트워크로 구성된 세포외 기질과 유사한 구성을 가지는 혼합물로서, 천연의 세포외 기질과 동일하거나 유사한 생물학적 기능을 하는 인공 또는 천연의 단백질 혼합물을 의미한다.

[0031] 본 명세서에서 용어 "실질적으로 포함하지 않다(substantially does not comprise)" 또는 "포함하지 않다(does not comprise)"는 세포외기질이 조성물의 물성, 활성, 또는 약리적 활성에 영향을 미치지 않을 정도로 포함되거나 전혀 포함되지 않는 것을 의미한다. 예를 들면, 세포외기질이 배양용기 대비 0.02 부피% 이하, 0.01 부피% 이하 또는 0.005 부피% 이하로 포함되는 것이나, 전혀 포함되지 않는 것을 포함할 수 있다.

[0032] 일 구체예에 있어서, 상기 세포는 부유배양을 통해 배양하는 것일 수 있다.

[0033] 본 명세서에서 용어, "부유배양(suspension culture)"은 세포가 어떠한 표면에 부착되지 않고 배지 중에 떠 있는 상태로 배양되는 것을 의미한다. 이때, 일정 수의 세포가 서로 응집되면서 증식할 수 있다.

[0034] 상기 배양에 적합한 배지는 줄기세포의 배양 및/또는 분화에 통상적으로 사용되는 배지로서 혈청 혹은 무혈청을 함유한 것이면 어느 것이나 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 DMEM(Dulbeco's modified eagle medium), Ham's F12, 이들의 혼합물 등에 혈청을 첨가한 배지를 사용할 수 있다.

[0035] 상기 배양은 30 ℃ 내지 40 ℃, 예를 들어, 35 ℃ 내지 38 ℃의 온도 조건에서 배양할 수 있다.

[0036] 상기 세포 배양 기간은 1 일 내지 40 일, 예를 들면, 1 일 내지 39 일, 1 일 내지 38 일, 1 일 내지 37 일, 1 일 내지 36 일, 1 일 내지 35 일, 1 일 내지 34 일, 1 일 내지 33 일, 1 일 내지 32 일, 1 일 내지 31 일, 1 일 내지 30 일, 5 일 내지 40 일, 5 일 내지 39 일, 5 일 내지 38 일, 5 일 내지 37 일, 5 일 내지 36 일, 5 일 내지 35 일, 5 일 내지 34 일, 5 일 내지 33 일, 5 일 내지 32 일, 5 일 내지 31 일, 5 일 내지 30 일, 10 일 내지 40 일, 10 일 내지 39 일, 10 일 내지 38 일, 10 일 내지 37 일, 10 일 내지 36 일, 10 일 내지 35 일, 10 일 내지 34 일, 10 일 내지 33 일, 10 일 내지 32 일, 10 일 내지 31 일, 10 일 내지 30 일, 15 일 내지 40 일, 15 일 내지 39 일, 15 일 내지 38 일, 15 일 내지 37 일, 15 일 내지 36 일, 15 일 내지 35 일, 15 일 내지 34 일, 15 일 내지 33 일, 15 일 내지 32 일, 15 일 내지 31 일, 15 일 내지 30 일, 20 일 내지 40 일, 20 일 내지 39 일, 20 일 내지 38 일, 20 일 내지 37 일, 20 일 내지 36 일, 20 일 내지 35 일, 20 일 내지 34 일, 20 일 내지 33 일, 20 일 내지 32 일, 20 일 내지 31 일, 20 일 내지 30 일, 25 일 내지 40 일, 25 일 내지 39 일, 25 일 내지 38 일, 25 일 내지 37 일, 25 일 내지 36 일, 25 일 내지 35 일, 25 일 내지 34 일, 25 일 내지 33 일, 25 일 내지 32 일, 25 일 내지 31 일, 25 일 내지 30 일, 30 일 내지 40 일, 30 일 내지 39 일, 30 일 내지 38 일, 30 일 내지 37 일, 30 일 내지 36 일, 30 일 내지 35 일, 30 일 내지 34 일, 30 일 내지 33 일, 30 일 내지 32 일, 또는 30 일 내지 31 일일 수 있다.

[0037] 일 구체예에 있어서, 상기 세포 배양 기간은 적어도 31 일 이상, 예를 들면, 적어도 32 일 이상, 적어도 33 일 이상, 적어도 34 일 이상, 적어도 35 일 이상, 적어도 36 일 이상, 적어도 37 일 이상, 또는 적어도 38 일 이상일 수 있다.

[0038] 상기 세포는 분화능을 갖는 세포인 것일 수 있다.

[0039] 본 명세서에서 용어, "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화되는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위해 형태나 기능이 변해가는 것을 의미한다.

[0040] 본 명세서에서 용어, "분화능"은 분화할 수 있는 능력을 의미하며, "분화능을 갖는 세포"는 생체를 구성하는 조직이나 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는 세포를 의미한다. 상기 분화능을 갖는 세포는 분화 능력에 따라, 다능성 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell) 또는 단분화능 줄기세포(unipotent stem cell) 일 수 있다.

[0041] 상기 다능성 줄기세포는, 그 자체로는 개체가 될 수 없지만 생체를 구성하는 모든 조직이나 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는 세포를 의미하며, 다능성 줄기세포는, 배아줄기세포(Embryonic stem cell; ES cells) 또는 유도만능 줄기세포일 수 있다. 상기 다분화능 줄기세포는 복수종의 조직이나 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는

세포를 의미하며, 다분화능 줄기세포는 간엽계 줄기세포, 조혈계 줄기세포, 신경계 줄기세포, 골수 줄기세포, 생식 줄기세포 등의 체성 줄기세포일 수 있다. 또한, 상기 단분화능 줄기세포는 특정한 조직이나 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는 세포를 의미한다.

[0042] 일 구체예에 있어서, 상기 세포를 배양하는 단계는, 상기 세포가 계통-제한된 전구세포 또는 완전히 분화된 체세포로 분화되는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0043] 상기 계통-제한된 전구세포는 췌장 내배엽 전구세포, 췌장 내분비 전구세포, 간엽성 전구 세포, 간모세포, 근육 전구 세포, 아세포 또는 신경 전구 세포일 수 있다.

[0044] 상기 체세포는 내분비 분비 세포, 췌장 베타 세포, 상피 세포, 내배엽 세포, 대식세포, 간세포, 심장의 심근세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포 또는 면역계 세포일 수 있다.

발명의 효과

[0045] 일 양상에 따른 세포집합체 제조방법에 의하면, 균일한 크기의 세포집합체를 대량으로 배양할 수 있는 효과가 있다. 또한, 세포집합체를 장기 배양하는 경우 발생하는 문제점, 예를 들면, 세포집합체가 배양용기의 바닥 등에 부착하는 등의 문제점을 효과적으로 방지할 수 있어 한달 이상의 장기배양이 가능하며, 세포배양 기질 없이도 세포집합체의 형성 및 성장이 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 세포 부착을 방지하기 위한 용액이 처리된 마이크로 웰 어레이를 통한 세포집합체 제조 방법의 모식도이다.

도 2는 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 처리한 마이크로 웰 어레이에서 다세포 종양 구체의 성장 및 형태 유지를 관찰한 이미지이다.

도 3은 4 % BSA로 표면 처리된 마이크로 웰 어레이에서 다세포 종양 구체의 성장 및 형태 유지를 관찰한 이미지이다.

도 4는 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 처리하는 시간을 달리하여 제조된 각 마이크로 웰 어레이에서, 다세포 종양 구체를 장기배양한 결과를 비교한 이미지이다.

도 5는 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 처리하는 시간을 달리하여 제조된 각 마이크로 웰 어레이에서, 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체를 장기배양한 결과를 비교한 이미지이다.

도 6은 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 처리하는 시간을 달리하여 제조된 각 마이크로 웰 어레이에서, 인간 간암 세포집합체를 장기배양한 결과를 비교한 이미지이다.

도 7은 인간 유도만능 줄기세포 유래 3차원 심장 세포집합체에서 심근세포의 발현 여부를 확인한 이미지이다.

도 8은 환자 유래 간 세포집합체의 세포 응집 및 증식을 나타낸 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **실시예 1. 세포 부착을 방지하기 위한 용액이 처리된 마이크로 웰 어레이 제조, 및 이를 통한 세포집합체의 제조 및 배양**

[0050] 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 처리한 마이크로 웰 어레이를 제조하고, 상기 마이크로 웰 어레이를 이용하여 세포집합체를 배양하였다.

[0051] 보다 구체적으로, 우선 폴리디메틸실록산(Polydimethylsiloxane; PDMS)을 기반으로 하는 세포 손실 없는 마이크로 웰 어레이를 멸균한 뒤, 상기 멸균된 마이크로 웰 어레이 표면을 산소-플라즈마로 처리하였다. 그리고 산소-플라즈마로 처리된 마이크로 웰 어레이에 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 분주하였다. 상기 세포 부착을 방지하기 위한 용액으로는 Anti-Adherence Rinsing Solution(STEMCELL, Technologies)를 사용하였다. 그 후, 상

기 마이크로 웰 어레이를 7 일 동안 37 ℃의 조건으로 세포 배양기에서 보관한 뒤, 마이크로 웰 어레이에 처리된 Anti-Adherence Rinsing Solution을 제거하였다.

[0052] 그 뒤, 3차원 체외모델을 위한 세포가 포함된 배양액을 상기 마이크로 웰 어레이에 분주하고, 분주 된 세포가 각 마이크로 웰의 바닥으로 분할 시딩이 될 수 있도록 37 ℃의 조건으로 5 % 세포배양기에서 30 분 동안 배양하였다. 그 후, 세포가 각 마이크로 웰로 분할 시딩이 된 것을 확인한 뒤 배양액을 추가하고, 시딩된 세포가 3차원 체외모델을 형성할 수 있도록 37 ℃의 조건으로 5 % 세포배양기에서 배양하여 세포집합체를 제조 및 배양하였다.

[0054] 도 1은 세포 부착 방지 용액이 처리된 마이크로 웰 어레이를 통한 세포집합체 제조 방법의 모식도이다.

[0056] **실험예 1. 세포 부착을 방지하기 위한 용액의 처리 여부에 따른 다세포 종양 구체(multicellular tumor spheroids; MCTs)의 장기배양**

[0057] 상기 실시예 1에 따라 Anti-Adherence Rinsing Solution이 제거된 마이크로 웰 어레이에 암세포 및 섬유아세포를 1 : 1 또는 1 : 2의 비율(암세포 : 섬유아세포)로 섞어 시딩하고 37 ℃의 조건으로 5 % 세포배양기에서 30 분 동안 배양하였다. 그 후, 세포가 각 마이크로 웰로 분할 시딩이 된 것을 확인한 뒤 배양액을 추가하고, 시딩된 세포가 3차원 체외모델을 형성할 수 있도록 37 ℃의 조건으로 5 % 세포배양기에서 35일 동안 배양하였다.

[0058] 이에 대한 대조군으로, 4 % 소 혈청 알부민(Bovine Serum Albumin; BSA)로 표면이 코팅된 마이크로 웰 어레이를 사용하여 상기와 같은 암세포 및 섬유아세포를 1 : 1 또는 1 : 2의 비율(암세포 : 섬유아세포)로 섞어 시딩한 후, 상기 세포를 배양하여 부유 배양 여부를 관찰하였다. 그리고 그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0060] 도 2는 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 처리한 마이크로 웰 어레이에서 다세포 종양 구체의 성장 및 형태 유지를 관찰한 이미지이다.

[0061] 도 3은 4 % BSA로 표면 처리된 마이크로 웰 어레이에서 다세포 종양 구체의 성장 및 형태 유지를 관찰한 이미지이다.

[0062] 도 2에 나타낸 바와 같이, 배양 시작 후 약 21 일까지 다세포 종양 구체의 성장 및 형태가 안정적으로 유지됨을 확인하였다. 또한, 35 일의 배양 기간 동안 다세포 종양 구체가 마이크로 웰 어레이 표면에 부착하는 현상이 관찰되지 않아, 안정적인 부유배양이 가능함을 확인하였다.

[0063] 도 3에 나타낸 바와 같이, 배양 시작 후 약 3 일까지 다세포 종양 구체의 성장 및 형태가 유지됨을 확인하였으나, 배양 시작 후 약 6 일 경에는 마이크로 웰 어레이 표면에 다세포 종양 구체가 부착되는 현상이 관측되는 것을 확인하였다. 이는 4 % BSA 용액을 통한 표면 처리 방법은 다세포 종양 구체의 안정적인 장기 배양에 적합하지 않음을 의미한다.

[0065] **실험예 2. 세포 부착을 방지하기 위한 용액의 처리 시간에 따른 다세포 종양 구체의 장기배양 비교**

[0066] 세포 부착을 방지하기 위한 용액의 처리 시간에 따른 장기배양 효과를 확인하기 위해, 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 각 1 일, 3일, 및 5 일 처리한 마이크로 웰 어레이를 사용하여 다세포 종양 구체를 배양하였다.

[0067] 보다 구체적으로, 상기 실시예 1에 따라 산소-플라즈마로 처리된 마이크로 웰 어레이에 Anti-Adherence Rinsing Solution을 분주하였다. 그리고 상기 마이크로 웰 어레이를 37 ℃의 조건으로 세포 배양기에서 보관한 뒤(각 1 일, 3 일, 및 5 일), 마이크로 웰 어레이에 처리된 Anti-Adherence Rinsing Solution을 제거하였다. 그 뒤, 암세포 및 섬유아세포를 1 : 1 또는 1 : 2의 비율(암세포 : 섬유아세포)로 섞어 시딩하고 37 ℃의 조건으로 5 % 세포배양기에서 30 분 동안 배양하였다. 그 후, 세포가 각 마이크로 웰로 분할 시딩이 된 것을 확인한 뒤 배양액을 추가하고, 시딩된 세포가 3차원 체외모델을 형성할 수 있도록 37 ℃의 조건으로 5 % 세포배양기에서 38 일 동안 배양하였다. 그리고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0069] 도 4는 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 처리하는 시간을 달리하여 제조된 각 마이크로 웰 어레이에서, 다세포 종양 구체를 장기배양한 결과를 비교한 이미지이다.

[0070] 도 4에 나타낸 바와 같이, 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 1 일 동안 처리한 경우, 배양 시작 후 약 2 주까지 다세포 종양 구체의 부착 현상이 관측되지 않아 다세포 종양 구체의 안정적인 장기배양이 가능함을 확인하였다. 단, 약 2 주 후부터 마이크로 웰 어레이 내벽에 다세포 종양 구체가 부착되는 현상이 관찰되었다.

[0071] 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 3 일 동안 처리한 경우에는 다세포 종양 구체의 부착 현상이 관측되지는 않았으나, 배양 시작 후 약 21 일부터 마이크로 웰 어레이 바닥 표면 처리된 코팅이 벗겨지는 현상이 발생함을 확인하였다.

[0072] 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 5 일 동안 처리한 경우에는 38 일의 장기배양 동안 다세포 종양 구체의 부착 현상이 관측되지 않아, 다세포 종양 구체의 안정적인 장기배양이 가능함을 확인하였다.

[0074] **실험예 3. 세포 부착을 방지하기 위한 용액의 처리 시간에 따른 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체의 장기배양 비교**

[0075] 세포 부착을 방지하기 위한 용액의 처리 시간에 따른 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체의 장기배양 효과를 확인하기 위해, 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 각 1 일, 3 일, 및 5 일 처리한 마이크로 웰 어레이를 사용하여 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체를 배양하였다.

[0076] 보다 구체적으로, 상기 실시예 1에 따라 산소-플라즈마로 처리된 마이크로 웰 어레이에 Anti-Adherence Rinsing Solution을 분주하였다. 그리고 상기 마이크로 웰 어레이를 37 ℃의 조건으로 세포 배양기에서 보관한 뒤(각 1 일, 3 일, 및 5 일), 마이크로 웰 어레이에 처리된 Anti-Adherence Rinsing Solution을 제거하였다. 그 뒤, 인간 유도만능 줄기세포를 시딩하고 37 ℃의 조건으로 5 % 세포배양기에서 30 분 동안 배양하였다. 그 후, 세포가 각 마이크로 웰로 분할 시딩이 된 것을 확인한 뒤 배양액을 추가하고, 시딩된 세포가 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체를 형성할 수 있도록 37 ℃의 조건으로 5 % 세포배양기에서 38 일 동안 배양하였다. 그리고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0078] 도 5는 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 처리하는 시간을 달리하여 제조된 각 마이크로 웰 어레이에서, 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체를 장기배양한 결과를 비교한 이미지이다.

[0079] 도 5에 나타낸 바와 같이, 세포 부착을 방지하기 위한 용액의 처리 기간과 무관하게 모든 세포가 응집되어 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체가 형성됨을 확인하였다.

[0080] 또한, 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 1 일 동안 처리한 경우, 배양 시작 후 약 20 일까지는 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체의 부착 현상이 관측되지 않아 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체의 안정적인 장기배양이 가능함을 확인하였다. 그러나, 약 21 일 이후부터 마이크로 웰 어레이 내벽에 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체가 부착되는 현상이 관찰되었다.

[0081] 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 3 일 동안 처리한 경우에도, 배양 시작 후 약 20 일까지는 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체의 부착 현상이 관측되지 않아 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체의 안정적인 장기배양이 가능함을 확인하였다. 그러나, 약 21 일 이후부터 마이크로 웰 어레이 내벽에 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체가 부착되는 현상이 관찰되었다.

[0082] 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 5 일 동안 처리한 경우에는 38 일의 장기배양 기간 동안 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체의 부착 현상이 관측되지 않아, 인간 유도만능 줄기세포 유래 간 세포집합체의 안정적인 장기배양이 가능함을 확인하였다.

[0084] **실험예 4. 세포 부착을 방지하기 위한 용액의 처리 시간에 따른 인간 간암 세포집합체의 장기배양 비교**

[0085] 세포 부착을 방지하기 위한 용액의 처리 시간에 따른 인간 간암 세포집합체의 배양 효과를 확인하기 위해, 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 각 1 일, 3 일, 및 5 일 처리한 마이크로 웰 어레이를 사용하여 인간 간암 세포집합체를 배양하였다.

[0086] 상기 실시예 1에 따라 산소-플라즈마로 처리된 마이크로 웰 어레이에 Anti-Adherence Rinsing Solution을 분주하였다. 그리고 상기 마이크로 웰 어레이를 37 ℃의 조건으로 세포 배양기에서 보관한 뒤(각 1 일, 3 일, 및 5 일), 마이크로 웰 어레이에 처리된 Anti-Adherence Rinsing Solution을 제거하였다. 그 뒤, 인간 간암 세포를 시딩하고 37 ℃의 조건으로 5 % 세포배양기에서 30 분 동안 배양하였다. 그 후, 세포가 각 마이크로 웰로 분할 시딩이 된 것을 확인한 뒤 배양액을 추가하고, 시딩된 세포가 인간 간암 세포집합체를 형성할 수 있도록 37 ℃의 조건으로 5 % 세포배양기에서 38 일 동안 배양하였다. 그리고 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0088] 도 6은 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 처리하는 시간을 달리하여 제조된 각 마이크로 웰 어레이에서, 인간 간암 세포집합체를 장기배양한 결과를 비교한 이미지이다.

[0089] 도 6에 나타낸 바와 같이, 세포 부착을 방지하기 위한 용액의 처리 기간과 무관하게 모든 세포가 응집되어 인간 간암 세포집합체가 형성됨을 확인하였다.

[0090] 또한, 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 1 일 동안 처리한 경우, 배양 시작 후 약 2 주까지는 인간 간암 세포집합체의 부착 현상이 관측되지 않아 인간 간암 세포집합체의 안정적인 장기배양이 가능함을 확인하였다. 그러나, 약 2 주 이후부터 마이크로 웰 어레이 내벽에 인간 간암 세포집합체가 부착되는 현상이 관찰되었다.

[0091] 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 3 일 동안 처리한 경우에도, 배양 시작 후 약 2 주까지는 인간 간암 세포집합체의 부착 현상이 관측되지 않아 인간 간암 세포집합체의 안정적인 장기배양이 가능함을 확인하였다. 그러나, 약 2 주 이후부터 마이크로 웰 어레이 내벽에 인간 간암 세포집합체가 부착되는 현상이 관찰되었다.

[0092] 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 5 일 동안 처리한 경우에는 31 일의 장기배양 기간 동안 인간 간암 세포집합체의 부착 현상이 관측되지 않아, 인간 간암 세포집합체의 안정적인 장기배양이 가능함을 확인하였다.

[0094] **실험예 5. 인간 유도만능 줄기세포 유래 3차원 심장 세포집합체의 형성 확인**

[0095] 상기 실시예 1을 통해 인간 유도만능 줄기세포 유래 3차원 심장 세포집합체를 형성한 후, 상기 세포집합체의 심근세포의 발현 여부를 면역형광염색을 통해 확인하고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0097] 도 7은 인간 유도만능 줄기세포 유래 3차원 심장 세포집합체에서 심근세포의 발현 여부를 확인한 이미지이다.

[0098] 도 7에 나타낸 바와 같이, 인간 유도만능 줄기세포는 마이크로 웰 어레이에서 3차원 형태를 가지며, 지름이 약 800 ㎛인 심장 세포집합체를 안정적으로 형성함을 확인하였다. 또한, 심근세포에 대한 표지자로서 알파-액티닌(alpha-actinin; α-actinin)을 뚜렷하게 발현하는 것을 확인하였다.

[0099] 이는 인간 유도만능 줄기세포 유래 심장 세포집합체가 효과적으로 형성됨을 의미한다. 또한, 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 7 일 동안 처리한 마이크로 웰 어레이에서 줄기세포를 장기배양함으로써, 상기 유도만능 줄기세포를 3 차원 기능성 체외모델로 분화 및 형성할 수 있음을 의미한다.

[0101] **실험예 6. 환자 유래 간 세포집합체의 형성 확인**

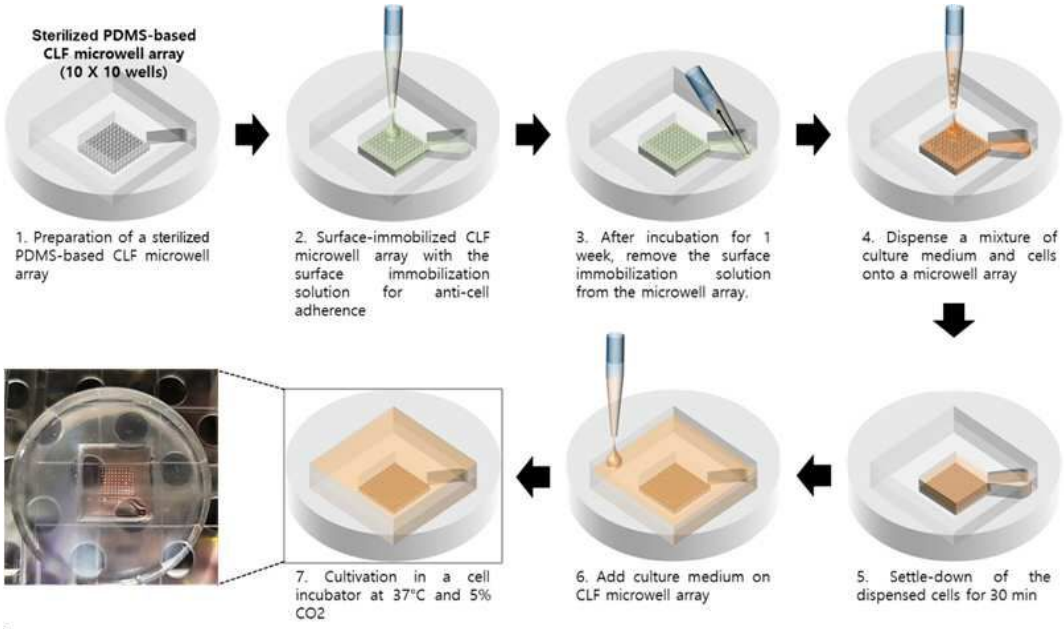
[0102] 상기 실시예 1을 통해 환자 유래 간 세포집합체를 형성한 후, 상기 세포집합체의 배양 기간 동안 세포의 응집 및 증식을 확인하고, 이를 도 8에 나타내었다.

[0104] 도 8은 환자 유래 간 세포집합체의 세포 응집 및 증식을 나타낸 이미지이다.

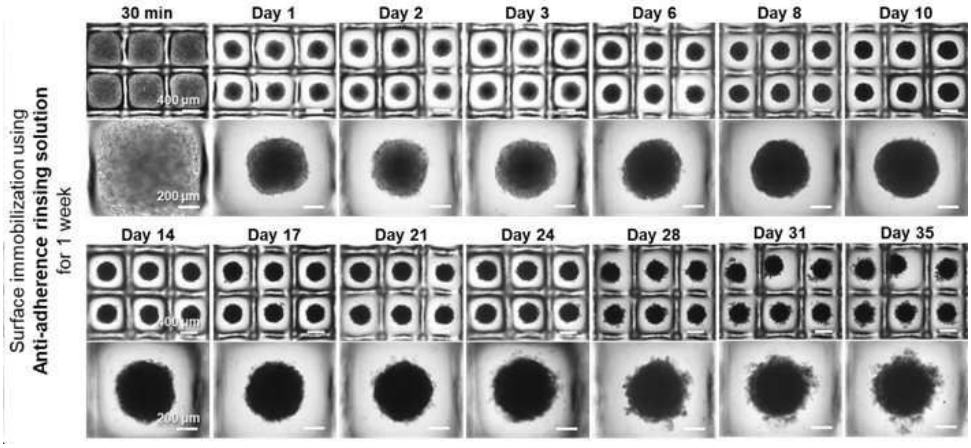
[0105] 도 8에 나타낸 바와 같이, 7 일의 배양 기간 동안, 낭성(cystic) 형태의 세포집합체가 형성되어 환자 유래 간 세포집합체가 안정적으로 성장함을 확인하였다. 또한, 세포 부착을 방지하기 위한 용액을 7 일 동안 처리한 마이크로 웰 어레이를 통해 배양하는 경우, 마트리겔(matrigel)과 같은 세포배양 기질의 부재에도 환자 유래 간 세포집합체의 형성 및 성장이 안정적으로 이루어짐을 확인하였다.

도면

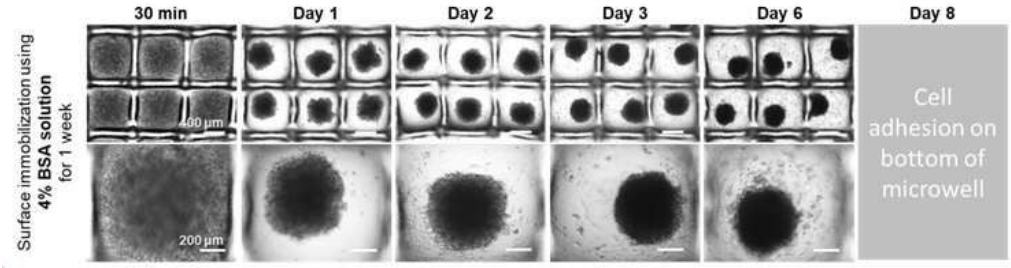
도면1



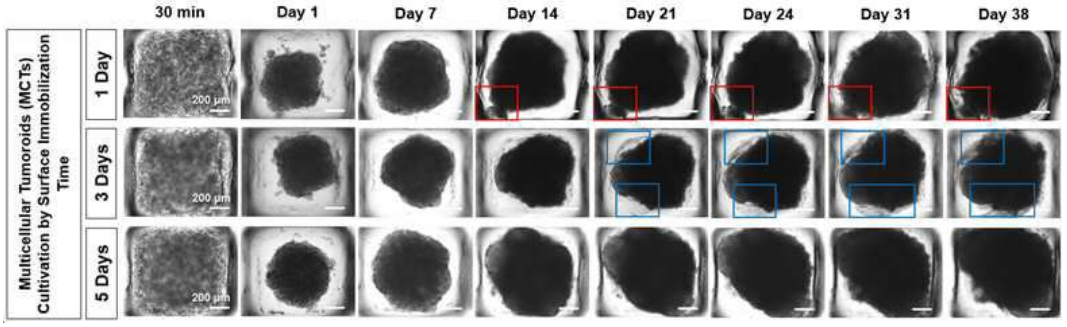
도면2



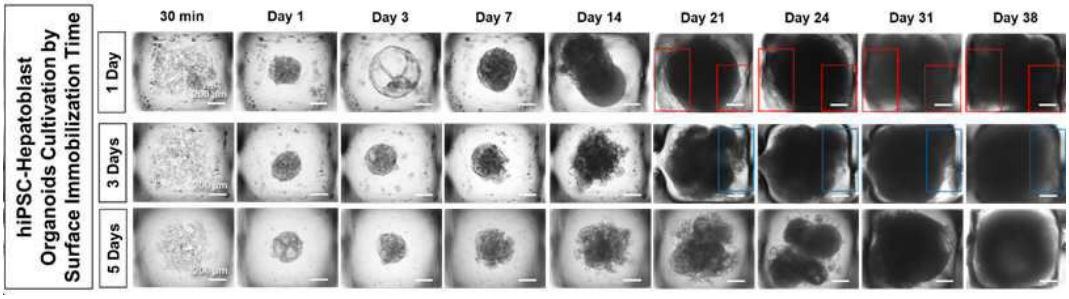
도면3



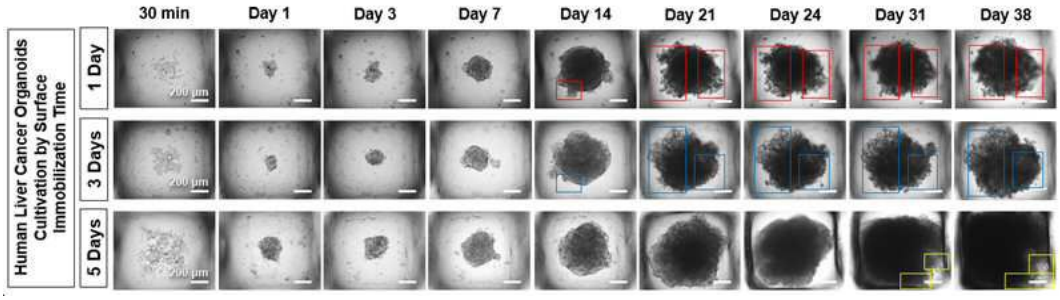
도면4



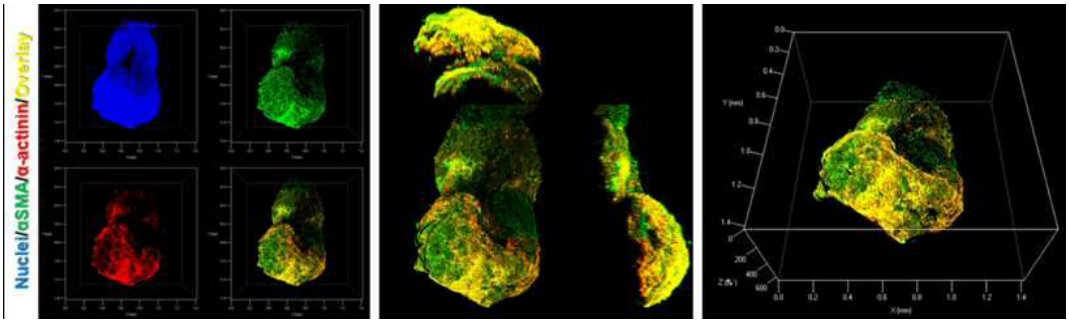
도면5



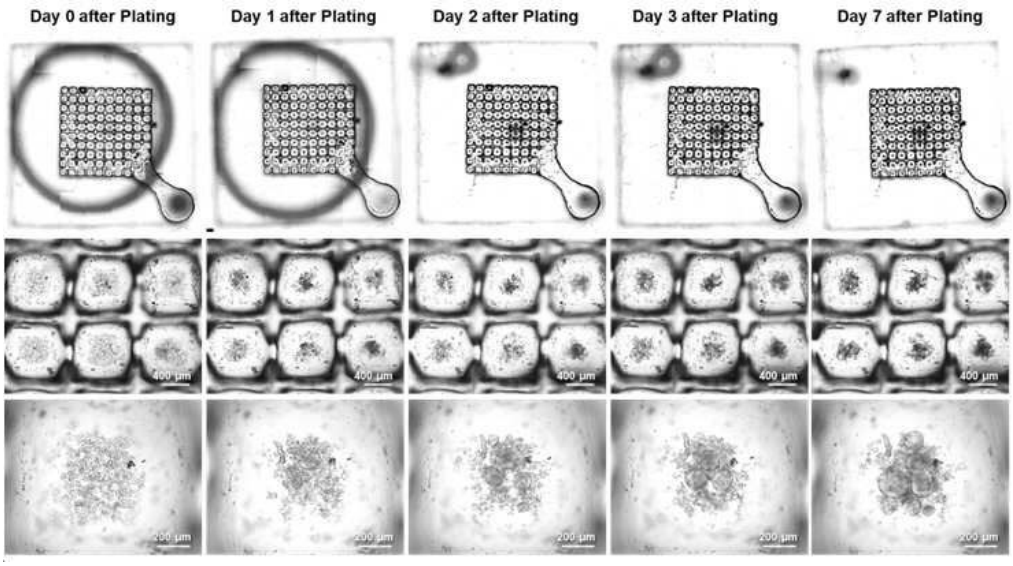
도면6



도면7



도면8


Day 0 after Plating
Day 1 after Plating
Day 2 after Plating
Day 3 after Plating
Day 7 after Plating
400 μm
200 μm