



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0018306
(43) 공개일자 2019년02월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/09 (2010.01) A01K 67/027 (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0693 (2013.01)
A01K 67/027 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0103121
- (22) 출원일자 2017년08월14일
심사청구일자 2017년08월14일

- (71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
- (72) 발명자
장세진
경기도 성남시 분당구 야탑로 124, 605동 704호(야탑동, 탑마을벽산아파트)
김민서
서울 송파구 백제고분로27길 31-12, 302호(삼전동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 17 항

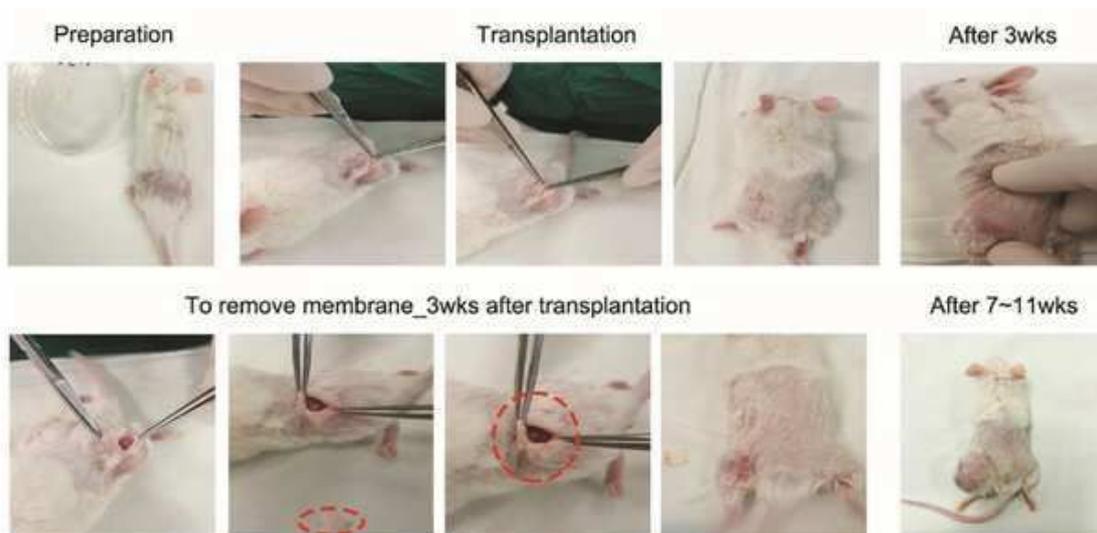
(54) 발명의 명칭 **3차원 폐암 오가노이드 배양 방법 및 이를 이용한 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법 및 이를 이용한 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법, 상기 방법으로 제조된 폐암 오가노이드, 상기 폐암 오가노이드 배양용 배지 조성물, 암 오가노이드를 이용한 이종이식 동물모델의 제조

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



방법, 상기 방법으로 제조된 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델, 상기 동물모델을 이용한 항암제의 치료 효능 분석 방법 및 항암제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법 및 이를 이용한 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조 방법은 암 환자로부터 채취한 암 조직을 3차원 오가노이드로 배양할 수 있고, 환자의 조직과 조직학적 특성을 유지함과 동시에 3차원 형태를 보존하면서 배양 및 이식할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 환자 유래 이종이식 동물모델 제조 방법은 종래 방법에 비해 적은 양의 오가노이드 세포를 이용하여 빠른 시간에 동물모델을 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 동물모델의 제조 방법은 암 이종이식 성공률이 높을 뿐만 아니라 특정 암 환자의 연구와 가장 적절한 항암제 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

- G01N 33/5088 (2013.01)
- A01K 2207/12 (2013.01)
- A01K 2267/0331 (2013.01)
- C12N 2501/11 (2013.01)
- C12N 2501/113 (2013.01)
- C12N 2501/115 (2013.01)
- C12N 2501/50 (2013.01)
- C12N 2533/50 (2013.01)

오주희

경기 안성시 공도읍 만가대길 57-17

(72) 발명자

서영아

서울 송파구 풍성로24길 42, 307동 1506호(풍남동, 현대리버빌)

문혜민

서울 성동구 성수이로7가길 16, 드림힐 1동 705호 (성수동2가)

- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 10067796
 부처명 산업통상자원부
 연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
 연구사업명 포스트게놈다부처유전체사업(산업부)
 연구과제명 한국인 5대 고위험 암의 유전체-임상정보 통합 오가노이드 바이오뱅크 시스템 확립과 정밀
 의학 응용 플랫폼 개발
 기 여 율 35/100
 주관기관 서울아산병원
 연구기간 2016.10.01 ~ 2020.09.30
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 10067407
 부처명 산업통상자원부
 연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
 연구사업명 산업기술혁신사업
 연구과제명 환자유래 오가노이드 기반 고속/고용량 투명화 시스템과 3차원 이미징 시스템의 개발
 기 여 율 35/100
 주관기관 (주)로고스바이오시스템스
 연구기간 2016.09.01 ~ 2021.08.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2018042382
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공분야기초연구사업
 연구과제명 환자유래 폐암 오가노이드를 이용한 원발성 섬모가 매개하는 신호전달 경로의 발암 연관성
 연구
 기 여 율 20/100
 주관기관 서울아산병원
 연구기간 2018.06.01 ~ 2020.05.31
- 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2016-0877
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 리서치펠로우사업
 연구과제명 폐암 환자 유래 오가노이드 모델을 이용한 암 형성과 이질성에 대한 기전 연구
 기 여 율 10/100
 주관기관 울산대학교 산학협력단
 연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31
-

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 폐암 환자로부터 분리된 폐암 조직을 세포화시킨 후 세포화된 폐암 세포와 세포배양 기질을 함께 배양하여 폐암 오가노이드를 수득하는 단계;
- (b) 상기 수득한 오가노이드에 효소를 처리한 후 반응시키는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계 후 상기 폐암 오가노이드에 세포배양 기질을 첨가하여 3차원 폐암 오가노이드를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포배양 기질은 매트릭겔(matrigel)인 것을 특징으로 하는 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계의 배양은 B27 보충물, N2 보충물, 인간 상피세포성장인자, 인간 섬유아세포성장인자 및 ROCK 저해제를 포함하는 배지 조성물을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계의 오가노이드 배양 후, 배양 플레이트에서 세포배양 기질을 제거하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 배양은 B27 보충물, N2 보충물, 인간 상피세포성장인자 및 인간 섬유아세포성장인자를 포함하는 배양 배지 조성물을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 폐암 오가노이드.

청구항 7

B27 보충물, N2 보충물, 인간 상피세포성장인자 및 인간 섬유아세포성장인자를 포함하는 배양 배지 조성물을 포함하는 폐암 오가노이드 배양용 배지 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 조성물은 ROCK 저해제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 오가노이드 배양용 배지 조성물.

청구항 9

(a) 암 환자로부터 분리된 암 조직을 세포화시킨 후 세포화된 암 세포와 세포배양 기질을 함께 배양하여 암 오가노이드를 수득하는 단계;

(b) 상기 수득한 오가노이드에 효소를 처리한 후 반응시키는 단계;

(c) 상기 (b) 단계 후 상기 암 오가노이드에 세포배양 기질을 첨가하여 3차원 암 오가노이드를 배양하는 단계;

(d) 상기 암 오가노이드에서 세포배양 기질을 제거하는 단계;

(e) 상기 세포배양 기질이 제거된 오가노이드를 멤브레인(membrane)에 감싼 후 굳히는 단계; 및

(f) 대상 동물에 상기 (e) 단계의 암 오가노이드를 이식하는 단계를 포함하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 세포배양 기질은 매트릭셀(matrigel)인 것을 특징으로 하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 멤브레인은 생체적합성 또는 생분해성 멤브레인인 것을 특징으로 하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 멤브레인은 셀룰로오스 또는 콜라겐인 것을 특징으로 하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델의 제조방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 대상 동물은 면역결핍 마우스인 것을 특징으로 하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델의 제조방법

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 암 오가노이드 이식 후 오가노이드를 감싸고 있는 멤브레인을 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델의 제조방법.

청구항 15

제9항 내지 제14항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델.

청구항 16

- (a) 제15항의 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델에 항암제를 투여하는 단계; 및
- (b) 상기 동물모델에서 암 세포의 성장 또는 전이를 분석하여 항암제의 치료 효능을 결정하는 단계를 포함하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델을 이용한 항암제의 치료 효능 분석 방법.

청구항 17

- (a) 제15항의 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델에 항암제 후보 물질을 투여하는 단계; 및
- (b) 상기 동물모델에서 암 세포의 성장 또는 전이를 분석하여 항암제 후보물질의 치료 효능을 결정하는 단계를 포함하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델을 이용한 항암제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법 및 이를 이용한 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법, 상기 방법으로 제조된 폐암 오가노이드, 상기 폐암 오가노이드 배양용 배지 조성물, 암 오가노이드를 이용한 이종이식 동물모델의 제조 방법, 상기 방법으로 제조된 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델, 상기 동물모델을 이용한 항암제의 치료 효능 분석 방법 및 항암제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암 연구에서는 환자의 특성을 잘 나타내는 암 모델이 중요하다. 지금까지 *in vitro*에서 주로 이용되었던 암 모델은 암 세포주이다. 암 세포주는 환자의 암 조직에서 유래한 암세포를 2차원 배양으로 적응시켜 만든 모델로, 실험적으로 다루기 쉬울 뿐만 아니라, 한꺼번에 많은 유전적, 약물학적 스크리닝을 하기에 적합하다는 장점이 있다. 그러나, 암 조직에서 암 세포로 구축되는 성공률이 저조하며, 환자 유래 암세포를 긴 시간 동안 2차원 계대배양한 결과, 환자의 암에서 나타나는 이질성이나 돌연변이와 같은 조직학적 구조들에서 발생할 수 있는 특성이 사라지므로, 이질성을 잃은 세포주를 이용하여 면역결핍 쥐에 주입하여 암 모델을 만들더라도 원래 환자의 특성을 나타낼 수 없다는 문제점이 있다.

[0004] 암세포주의 이러한 단점을 보완하는 모델로서, *in vivo*를 기반으로 하는 환자 유래 암 이식모델(PDX: patient-derived xenograft)이 개발되었다. PDX 모델은 환자의 암 조직 일부를 직접적으로 면역결핍 쥐에 이식하는 방법을 사용한다. 상기 모델에서는 환자 암 조직에서 나타나는 구조, 전이 및 다양한 유전자 발현이 잘 나타날 뿐만 아니라, 임상에서의 약물 반응성을 미리 예측할 수 있는 모델로 평가된다. 그러나, PDX 모델을 성공시키는데 짧게는 2개월에서 길게는 6개월의 시간이 소요된다는 단점이 있다. 특히, 폐암의 경우, 대장암과 비교하여 PDX 모델의 성공률은 매우 저조하며(20% 미만) 기간 또한 10개월 이상이 소요되므로, PDX 모델은 환자 맞춤형 항암제를 테스트하는 목적으로서 적합하지 못하다는 관정을 받았다. 뿐만 아니라, 상기 PDX 모델은 이종간의 오염이

발생하는 단점이 있으며, 특정 환자의 암 모델 유지 및 이용을 위하여 여러 계대를 거쳐 배양하면서, 본래 인간의 조직 환경을 점점 잃게 되는 문제가 나타났다.

- [0005] 대한민국 등록특허 제10-1674468호에서는 암 환자로부터 암 조직을 분리하여 일차 배양 및 증식한 후, 일정량의 암 세포주를 면역결핍 마우스에 주입하여 고유의 환자와 동일한 형태 및 유전정보를 지닌 동물모델을 제작한 바 있다.
- [0006] 그러나, 폐암 환자로부터 암 조직을 분리하여 3차원 오가노이드를 배양한 후, 상기 오가노이드의 구조적 형태를 유지하면서, 면역결핍 마우스에 이식하여 제작된 이종이식 동물모델에 대한 보고는 현재까지 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로서, (a) 폐암 환자로부터 분리된 폐암 조직을 세포화시킨 후 세포화된 폐암 세포와 세포배양 기질을 함께 배양하여 폐암 오가노이드를 수득하는 단계, (b) 상기 수득한 오가노이드에 효소를 처리한 후 반응시키는 단계 및 (c) 상기 (b) 단계 후 상기 폐암 오가노이드에 세포배양 기질을 첨가하여 3차원 폐암 오가노이드를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 배양 방법에 의해 제조된 폐암 오가노이드를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 B27 보충물, N2 보충물, 인간 상피세포성장인자 및 인간 섬유아세포성장인자를 포함하는 배양 배지 조성물을 포함하는 폐암 오가노이드 배양용 배지 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 암 환자로부터 분리된 암 조직의 세포화를 통해 얻은 암 세포에 세포배양 기질을 처리한 후 오가노이드를 배양하는 단계, (b) 상기 배양한 오가노이드에 효소를 처리한 후 반응시키는 단계, (c) 세포배양 기질이 첨가된 플레이트에 상기 효소 처리한 오가노이드를 배양하여 3차원 암 오가노이드를 배양하는 단계, (d) 상기 암 오가노이드에서 세포배양 기질을 제거하는 단계, (e) 상기 세포배양 기질이 제거된 오가노이드를 멤브레인(membrane)에 감싼 후 굳히는 단계 및 (f) 대상 동물에 상기 (e) 단계의 암 오가노이드를 이식하는 단계를 포함하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델에 항암제를 투여하는 단계 및 (b) 상기 동물모델에서 암 세포의 성장 또는 전이를 분석하여 항암제의 치료 효능을 결정하는 단계를 포함하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델을 이용한 항암제의 치료 효능 분석 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델에 항암제 후보 물질을 투여하는 단계 및 (b) 상기 동물모델에서 암 세포의 성장 또는 전이를 분석하여 항암제 후보물질의 치료 효능을 결정하는 단계를 포함하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델을 이용한 항암제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명자들은 환자로부터 분리한 폐암 조직 일부를 세포화하여 3차원 조직구조 형태인 오가노이드로 배양하고, 상기 오가노이드의 3차원 구조를 유지하면서, 마우스에 직접 이식한 환자 유래 이종이식 동물모델에서, 암의 조직학적 특성이 유지됨을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0018] 본 명세서 내 "폐암 조직" 및 "폐암 세포"는 "종양 조직" 및 "종양 세포"와 동일한 개념으로 사용된다.

- [0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명의 일 양태는 (a) 폐암 환자로부터 분리된 폐암 조직을 세포화시킨 후 세포화된 폐암 세포와 세포배양 기질을 함께 배양하여 폐암 오가노이드를 수득하는 단계, (b) 상기 수득한 오가노이드에 효소를 처리한 후 반응시키는 단계 및 (c) 상기 (b) 단계 후 상기 폐암 오가노이드에 세포배양 기질을 첨가하여 3차원 폐암 오가노이드를 배양하는 단계를 포함하는 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법을 제공한다.
- [0023] 먼저, 본 발명에 따른 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법은 폐암 환자로부터 분리된 폐암 조직을 세포화시킨 후 세포화된 폐암 세포와 세포배양 기질을 함께 배양하여 폐암 오가노이드를 수득하는 단계[(a) 단계]를 포함한다.
- [0024] 본 발명의 상기 폐암 세포는 공지된 프로토콜에 따라 폐암 환자로부터 분리한 폐암 조직의 세포화를 통해 얻을 수 있다.
- [0025] 본 발명의 상기 세포배양 기질은 바람직하게 기질은 매트리지겔(matrigel)일 수 있으나, 오가노이드 배양을 위해 당업계에 사용되는 세포배양 기질이라면 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 본 명세서의 용어 "매트리젤"은 EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스의 육종세포에서 추출된 단백질 복합체로서 (BD Bioscience사의 제품명), 라미닌(laminin), 콜라겐(collagen), 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparin sulfate proteoglycan)과 같은 세포외 매트릭스(extracellular matrix, ECM)와 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 상피세포 성장인자(epiderma growth factor, EGF), 인슐린 성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 형질전환 성장인자-베타(transforming growth factor-beta, TGF-β), 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)와 같은 성장인자를 함유한다. 매트리지겔을 이루고 있는 복합체는 많은 조직에서 발견되는 복잡한 세포외 환경을 제공함으로써, 세포배양을 위한 기질로 이용되고 있다.
- [0027] 본 발명의 상기 오가노이드 배양 단계는 B27 보충물, N2 보충물, 인간 상피세포성장인자(hEGF, human Epidermal Growth Factor), 인간 섬유아세포성장인자(hFGF, human Fibroblast Growth Factor) 및 ROCK 저해제(Rho-associated protein kinase inhibitor)를 포함하는 배지 조성물을 이용하여 배양할 수 있다.
- [0029] 다음으로, 본 발명에 따른 배양 방법은 상기 수득한 오가노이드에 효소를 처리한 후, 반응시키는 단계[(b) 단계]를 포함한다.
- [0030] 구체적으로, 상기 효소는 3차원 구조의 오가노이드를 계대(passage)하기 위해 미세 구조를 가지는 오가노이드 또는 단일 세포로 분리하기 위한 것으로서, 트립신을 포함하는 시약을 사용할 수 있다. 바람직하게 Trypsin/EDTA 또는 TrypLE™ Express를 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 이 때, 상기 효소로서, Trypsin/EDTA를 사용하는 경우 반응 시간은 10 내지 15분인 것이 바람직하며, TrypLE™ Express를 사용하는 경우, 반응 시간은 15 내지 20분인 것이 바람직하다. 반응 시간이 상기 범위 미만인 경우, 3차원 구조의 오가노이드가 미세 구조를 가지는 오가노이드 또는 단일 세포로 분리되지 않는 문제점이 있고, 상기 범위를 초과하는 경우, 3차원 구조의 오가노이드가 모두 단일 세포로 분리되거나 예측하지 못한 세포 손상이 발생할 수 있다는 문제점이 있다.
- [0032] 본 발명의 일실시예에 있어서 상기 효소 처리 단계 이전에 오가노이드 배양 플레이트에서 세포배양 기질을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이 때, 상기 분리 단계는 원심분리를 수행함으로써 세포배양 기질에서 오가노이드를 탈락시키는 방법을 사용할 수 있으며, 상기 세포배양 기질로부터 분리된 오가노이드는 중력에 의해 침전되므로 쉽게 층 분리가 가능하다.
- [0034] 마지막으로, 본 발명에 따른 배양 방법은 상기 폐암 오가노이드에 세포배양 기질을 첨가하여 3차원 폐암 오가노이드를 배양하는 단계[(c) 단계]를 포함한다.
- [0035] 구체적으로, 상기 배양 단계는 세포배양 기질이 첨가된 웰 플레이트에 각 웰에 상기 오가노이드를 분주한 후, 세포가 3차원 형태로 형성될 때까지 배양할 수 있다. 상기 오가노이드는 웰 당 10 내지 100 μl씩 분주할 수 있으며, 20 내지 70 μl씩 분주하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 이 때, 상기 분주되는 오가노이드의

양이 상기 범위 미만인 경우, 점적(droppin) 당 세포 수가 과다해져 세포배양 기질에서 세포가 탈락하거나 3차원 구조 형성이 어렵다는 문제점이 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 점적 당 세포 수가 충분하지 못하기 때문에 세포가 제대로 성장하지 못한다는 문제점이 있다.

- [0036] 또한, 본 발명의 상기 오가노이드는 7 내지 21일 동안 3차원 구조가 형성될 때까지 배양할 수 있으며, 14 내지 18일 동안 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 이때, 배양 기간이 상기 범위 미만인 경우, 세포가 이식 가능한 정도로 충분한 크기의 오가노이드로 성장하지 못한다는 문제점이 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 장기간 배양으로 인한 세포 노화가 발생할 수 있다는 문제점이 있다.
- [0037] 또한, 본 발명에 있어서 상기 오가노이드의 3차원 형태는 구(sphere) 형태로 형성되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 일실시예에 있어서 상기 오가노이드의 배양 단계는 B27 보충물, N2 보충물, 인간 상피세포성장인자 및 인간 섬유아세포성장인자를 포함하는 폐암 오가노이드 배양용 배지 조성물에서 수행될 수 있다. 상기 배지 조성물은 ROCK 저해제를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 본 발명의 다른 일 양태는 상기 방법에 의해 제조된 폐암 오가노이드를 제공한다.
- [0041] 본 명세서 내 "오가노이드"는 줄기세포나 장기세포에서 분리한 세포를 배양하거나 재조합해서 만든 미니장기로서, 본 발명에서는 폐암 환자로부터 분리한 조직을 세포화한 후, 본 발명에 따른 배지 조성물을 이용하여 배양함으로써, 환자 유래 폐암 오가노이드를 제조하였다.
- [0042] 따라서, 본 발명에 따른 폐암 오가노이드는 폐암 환자로부터 채취한 암 조직 일부를 3차원 배양한 것으로서, 구축된 환자 유래 폐암 오가노이드 라인을 보관하거나, 지속적으로 배양하여 대량 제작할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 일 양태는 B27 보충물, N2 보충물, 인간 상피세포성장인자 및 인간 섬유아세포성장인자를 포함하는 배양 배지 조성물을 포함하는 폐암 오가노이드 배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [0045] 구체적으로 상기 배양 배지는 DMEM/F12, MEME(Minimum Essential Media Eagle), Alpha MEM(MEM, Alpha Modification), BME(Basal Media Eagle), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Media), F-12 Nutrient Mixture(Ham's F12), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Media), M199(Media 199), McCoy's 5A Media 또는 MCDB Media일 수 있으며, 바람직하게는 DMEM/F12 배지일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 본 발명의 상기 배양 배지는 ROCK 저해제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 ROCK 저해제로 Y-27632((1R,4r)-4-((R)-1-aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)cyclohexanecarboxamide)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 상기 배양 배지는 추가적으로 항생제를 포함할 수 있다. 이때, 상기 항생제의 예로서 페니실린(Penicillin), 스트렙토마이신(Streptomycin), P/S(Penicillin/Streptomycin), 암피실린(ampicillin) 또는 세팔로스포린(cephalosporin)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 일 양태는 (a) 암 환자로부터 분리된 암 조직을 세포화시킨 후 세포화된 암 세포와 세포배양 기질을 함께 배양하여 암 오가노이드를 수득하는 단계, (b) 상기 수득한 오가노이드에 효소를 처리한 후 반응시키는 단계, (c) 상기 (b) 단계 후 상기 암 오가노이드에 세포배양 기질을 첨가하여 3차원 암 오가노이드를 배양하는 단계, (d) 상기 암 오가노이드에서 세포배양 기질을 제거하는 단계, (e) 상기 세포배양 기질이 제거된 오가노이드를 멤브레인(membrane)에 감싼 후 굳히는 단계 및 (f) 대상 동물에 상기 (e) 단계의 암 오가노이드를 이식하는 단계를 포함하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델의 제조 방법을 제공한다.
- [0050] 본 발명에 따른 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델의 제조 방법을 도 1에 나타내었다.
- [0052] 먼저, 본 발명에 따른 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델의 제조 방법은 상기 본 발명의 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법에 따라, 암 환자로부터 분리된 암 조직을 세포화시킨 후 세포화된 암 세포와 세포배양 기질을 함께 배양하여 암 오가노이드를 수득하는 단계, 상기 수득한 오가노이드에 효소를 처리한 후 반응시키는 단계 및 상기 암 오가노이드에 세포배양 기질을 첨가하여 3차원 암 오가노이드를 배양하는 단계[(a) 내지 (c)

단계]를 포함한다.

- [0053] 상기 3차원 암 오가노이드 제조 방법의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
- [0055] 다음으로, 본 발명에 따른 이종이식 동물모델의 제조 방법은 상기 암 오가노이드에서 세포배양 기질을 제거하는 단계[(d) 단계]를 포함한다. 상기 세포배양 기질은 매트릭젤(matrigel)일 수 있으며, 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
- [0057] 다음으로, 본 발명에 따른 이종이식 동물모델의 제조 방법은 상기 세포배양 기질이 제거된 오가노이드를 멤브레인(membrane)에 감싼 후 굳히는 단계[(e) 단계]를 포함한다.
- [0058] 구체적으로, 본 발명의 상기 멤브레인은 생체적합성 또는 생분해성일 수 있다. 본 명세서 내 "생체적합성 물질"은 실질적으로 인체에 독성이 없고 화학적으로 불활성이며 면역원성이 없는 물질을 의미하고, 본 명세서 내 "생분해성 물질"은 생체 내에서 체액 또는 미생물 등에 의해서 분해될 수 있는 물질을 의미하며, 본 발명의 제조 방법에 있어서 상기 멤브레인은 동물에 이식한 후 암 오가노이드의 3차원 형태를 유지시켜주는 역할을 한다.
- [0059] 이 때, 생체적합성 또는 생분해성 물질로는 히알루론산, 폴리에스테르, 폴리하이드록시알카노에이트(PHAs), 폴리(α -하이드록시엑시드), 폴리(β -하이드록시엑시드), 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-발러레이트; PHBV), 폴리(3-하이드록시프로피오네이트; PHP), 폴리(3-하이드록시헥사노에이트; PHH), 폴리(4-하이드록시엑시드), 폴리(4-하이드록시부티레이트), 폴리(4-하이드록시발러레이트), 폴리(4-하이드록시헥사노에이트), 폴리(에스테르 아미드), 폴리카프로락톤, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리(락타이드-co-글리콜라이드; PLGA), 폴리디옥사논, 폴리오르토에스테르, 폴리에테르에스테르, 폴리언하이드라이드, 폴리(글리콜산-co-트리메틸렌 카보네이트), 폴리포스포에스테르, 폴리포스포에스테르 우레탄, 폴리(아미노산), 폴리사이아노아크릴레이트, 폴리(트리메틸렌 카보네이트), 폴리(이미노카보네이트), 폴리(타이로신 카보네이트), 폴리카보네이트, 폴리(타이로신 아릴레이트), 폴리알킬렌 옥살레이트, 폴리포스파젠스, PHA-PEG, 에틸렌 비닐 알코올 코폴리머(EVOH), 폴리우레탄, 실리콘, 폴리에스테르, 폴리올레핀, 폴리이소부틸렌과 에틸렌-알파올레핀 공중합체, 스티렌-이소브틸렌-스티렌 트리블록 공중합체, 아크릴 중합체 및 공중합체, 비닐 할라이드 중합체 및 공중합체, 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 에테르, 폴리비닐 메틸 에테르, 폴리비닐리덴 할라이드, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리비닐리덴 클로라이드, 폴리플루오로알켄, 폴리퍼플루오로알켄, 폴리아크릴로니트릴, 폴리비닐 케톤, 폴리비닐 아로마틱스, 폴리스틸렌, 폴리비닐 에스테르, 폴리비닐 아세테이트, 에틸렌-메틸 메타크릴레이트 공중합체, 아크릴로니트릴-스티렌 공중합체, ABS 수지와 에틸렌-비닐 아세테이트 공중합체, 폴리아마이드, 알키드 수지, 폴리옥시메틸렌, 폴리이미드, 폴리에테르, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리아크릴산-co-말레산, 키토산, 텍스트란, 셀룰로오스, 헤파린, 알기네이트, 이눌린, 녹말 또는 글리코젠을 사용할 수 있고, 히알루론산, 폴리에스테르, 폴리하이드록시알카노에이트(PHAs), 폴리(α -하이드록시엑시드), 폴리(β -하이드록시엑시드), 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-발러레이트; PHBV), 폴리(3-하이드록시프로피오네이트; PHP), 폴리(3-하이드록시헥사노에이트; PHH), 폴리(4-하이드록시엑시드), 폴리(4-하이드록시부티레이트), 폴리(4-하이드록시발러레이트), 폴리(4-하이드록시헥사노에이트), 폴리(에스테르 아미드), 폴리카프로락톤, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리(락타이드-co-글리콜라이드; PLGA), 폴리디옥사논, 폴리오르토에스테르, 폴리에테르에스테르, 폴리언하이드라이드, 폴리(글리콜산-co-트리메틸렌 카보네이트), 폴리포스포에스테르, 폴리포스포에스테르우레탄, 폴리(아미노산), 폴리사이아노아크릴레이트, 폴리(트리메틸렌 카보네이트), 폴리(이미노카보네이트), 폴리(타이로신 카보네이트), 폴리카보네이트, 폴리(타이로신 아릴레이트), 폴리알킬렌 옥살레이트, 폴리포스파젠스, PHA-PEG, 키토산, 텍스트란, 셀룰로오스, 헤파린, 알기네이트, 이눌린, 녹말 또는 글리코젠을 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0060] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서 상기 멤브레인은 셀룰로오스 또는 콜라겐일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0062] 마지막으로, 본 발명에 따른 이종이식 동물모델의 제조 방법은 대상 동물에 상기 멤브레인으로 고정시킨 암 오가노이드를 이식하는 단계[(f) 단계]를 포함한다.
- [0063] 본 발명의 일실시예에 있어서 상기 대상 동물은 마우스일 수 있으며, 바람직하게는 면역결핍 마우스일 수 있으

나, 이에 한정되지 않는다.

- [0064] 본 발명의 일실시예에 있어서 상기 암 오가노이드 이식 단계 후에 오가노이드를 감싸고 있는 멤브레인을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0065] 상기 멤브레인이 셀룰로오스 멤브레인인 경우, 대상 동물에 오가노이드를 이식한 후, 2 ~ 5주 후에 오가노이드를 감싸고 있는 멤브레인을 제거할 수 있다. 바람직하게는 이식 후, 3주 후에 멤브레인 제거를 수행하는 것 좋으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 오가노이드가 생체에 잔존하는 기간이 상기 범위 미만인 경우, 오가노이드가 대상 동물의 표피에 안착할 수 있는 충분한 기간이 되지 못한다는 문제점이 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 염증반응이 일어나는 문제점이 있다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상기 이종이식 동물모델의 제조 방법에 따라 제조된 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델을 제공한다.
- [0068] 본 발명에 따른 이종이식 동물모델은 환자의 암 조직에 특징적인 조직학적 특성이 유지될 수 있으며, 종래 환자 유래 암 이식모델의 문제점으로 지적되었던 낮은 생체 이식률, 이식 소요 시간이 오래 걸리는 점, 이식에 상대적으로 많은 양의 암 조직이 필요한 점 등의 문제점을 보완하였는바, 특정 환자의 암 동향을 연구하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 또 다른 일 양태는 (a) 상기 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델에 항암제를 투여하는 단계 및 (b) 상기 동물모델에서 암 세포의 성장 또는 전이를 분석하여 항암제의 치료 효능을 결정하는 단계를 포함하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델을 이용한 항암제의 치료 효능 분석 방법을 제공한다.
- [0071] 먼저, 본 발명에 따른 분석 방법은 본 발명의 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델에 항암제를 투여하는 단계[(a) 단계]를 포함한다. 구체적으로, 암이 유발된 동물에 항암제를 투여하는 방법은, 마우스를 이용하는 경우, 암이 유발된 마우스의 꼬리 정맥에 항암제를 투여하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0072] 다음으로, 본 발명에 따른 분석 방법은 상기 항암제를 투여한 동물모델에서 암 세포의 성장 또는 전이를 분석하여 항암제의 치료 효능을 결정하는 단계[(b) 단계]를 포함한다. 구체적으로, 항암제의 치료 효능은 암의 종류에 따라 관련 유전자의 발현 정도 또는 미세 혈관 밀도를 측정하여 항암제의 치료 효능을 분석할 수 있으며, 암 세포의 성장 또는 전이는 육안으로 관찰하거나 또는 캘리퍼스와 같은 도구를 이용하여 측정할 수 있다. 따라서, 암 세포의 추가적인 성장 또는 전이가 억제되는 경우, 분석대상의 항암제는 항암제로서 효능을 갖는다고 결정할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 일 양태는 (a) 상기 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델에 항암제 후보 물질을 투여하는 단계 및 (b) 상기 동물모델에서 암 세포의 성장 또는 전이를 분석하여 항암제 후보물질의 치료 효능을 결정하는 단계를 포함하는 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델을 이용한 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0075] 본 명세서 내 "항암제 후보물질"이란 종양세포의 성장 또는 전이에 대하여 억제 활성을 가지는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 화학물질, 펩타이드, 단백질, 항체 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 후보물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)이다. 후보물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입가능하다. 후보물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, 1-비드 1-화합물 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994;

Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있는 방법을 이용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0076] 먼저, 본 발명에 따른 스크리닝 방법은 상기 환자 유래 암 오가노이드 이종이식 동물모델에 항암제 후보 물질을 투여하는 단계[(a) 단계]를 포함한다. 구체적으로, 암이 유발된 동물에 항암제 후보 물질을 투여하는 방법은, 마우스를 이용하는 경우, 암이 유발된 마우스의 꼬리 정맥에 항암제를 투여하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0077] 다음으로, 본 발명에 따른 스크리닝 방법은 상기 항암제 후보 물질을 투여한 동물모델에서 암 세포의 성장 또는 전이를 분석하여 항암제 후보물질의 치료 효능을 결정하는 단계[(b) 단계]를 포함한다. 구체적으로, 항암제의 치료 효능은 암의 종류에 따라 관련 유전자의 발현 정도 또는 미세 혈관 밀도를 측정하여 항암제의 치료 효능을 분석할 수 있으며, 암 세포의 성장 또는 전이는 육안으로 관찰하거나 또는 캘리퍼스와 같은 도구를 이용하여 측정할 수 있다. 따라서, 암 세포의 추가적인 성장 또는 전이가 억제되는 경우, 분석대상의 항암제는 항암제로서 효능을 갖는다고 결정할 수 있다.

발명의 효과

[0079] 본 발명에 따른 3차원 폐암 오가노이드 배양 방법 및 이를 이용한 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조 방법은 암 환자로부터 채취한 암 조직을 3차원 오가노이드로 배양할 수 있고, 환자의 조직과 조직학적 특성을 유지함과 동시에 3차원 형태를 보존하면서 배양 및 이식할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 환자 유래 이종이식 동물모델 제조 방법은 종래 방법에 비해 적은 양의 오가노이드 세포를 이용하여 빠른 시간에 동물모델을 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 동물모델의 제조 방법은 암 이종이식 성공률이 높을 뿐만 아니라 특정 암 환자의 연구와 가장 적절한 항암제 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0081] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 환자 유래 폐암 오가노이드를 면역결핍 마우스에 이식하는 과정을 나타내는 사진이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 배양된 오가노이드를 나타내는 사진이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 이종이식 동물모델에 대한 조직형태학적 분석 결과를 나타낸 사진이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 이종이식 동물모델에 대한 조직형태학적 분석 결과를 나타낸 사진이다.

도 5는 본 발명의 일실시예 및 비교예에 따라 제조된 이종이식 동물모델에서 종양 형성을 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0084] [준비예]

[0085] 대한민국 서울 아산병원의 IRB(Institutional Review Board) 및 ACC(Institutional Review Board and Animal Care Committee)로부터 승인을 받아 실험을 진행하였다. 7명의 폐암 환자의 수술 진행 중 절제된 조직으로부터 인간 폐암 시료를 수득하였다.

[0087] [실시예]

[0088] **실시예 1. 환자 유래 폐암 세포의 오가노이드 3차 배양**

[0090] **1-1) 환자 유래 폐암 조직의 세포화**

[0091] 상기 준비예의 시료를 공지된 프로토콜에 따라 세포화하였다. 구체적으로, 준비예의 시료를 페트리 디쉬(petri dish)에 놓고 수술 나이프를 이용하여 암 조직 부분만을 정리하였다. 암 조직을 1 ~ 2 mm로 자른 후, 15 ml 코니칼 튜브(conical tube)로 옮기고 세척 용액(DMEM media + 0.1% BSA)으로 3 ~ 4회 강하게 피펫팅(pipetting)하였다. 중력에 의해 조직이 가라 앉도록 그대로 1분 동안 유지한 후, 상층액을 제거하였다. 조직이 깨끗해질 때까지 상기 세척 단계를 3 ~ 4회 반복하여 실시하였다.

[0092] 이후, 조직과 동량의 소화 용액(digestion solution)을 넣고 37°C 회전 배양기(rotator incubation)에서 40 ~ 60분간 반응시켰다. 20분 경과 후, 현미경(40 ~ 100 배율)으로 단일 세포 또는 세포 클러스터가 잘 보이는지 확인한 후, 반응시간을 결정하였다. 세척 용액을 넣어 세척 한 후, 상층액은 새로운 튜브로 옮기고, 남은 조직은 추가 소화 반응 시켰다. 4°C에서 1200 rpm으로 5분 간 원심분리한 후, 상층액을 제거하는 단계를 2회 반복하여 실시하였다.

[0093] 상기 소화 용액은 통상의 방법으로 제조된 콜라게나아제 용액(collagenase solution)을 사용하였으며, 장 세포, 위 세포, 폐 세포에는 콜라게나아제 II(Collagenase II, #Thermo 17101015)를 간 세포에는 콜라게나아제 D(Collagenase D, #Roche 1108858001)를 사용하였다.

[0095] **1-2) 폐암 세포의 오가노이드 배양**

[0096] 상기 실시예 1-1)에서 상층액을 제거하고 남은 펠릿(pellet)을 재부유(resuspending)시킨 후, 100 μm 체로 걸러 주었다. 걸러진 용액을 600 rpm으로 3분 간 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다. 상층액을 제거하고 남은 펠릿을 50 μl 배양 배지(culture media)로 재부유시킨 후, 매트릭겔(BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 100 μl을 더 첨가하여 재부유시켰다. 이후, 6웰 플레이트(well plate)의 각 웰에 상기 재부유시킨 세포 배양액 150 μl를 돔 모양이 형성되도록 분주하였다. 이때, 조직의 양이 많은 경우, 상기 제시한 매트릭겔의 양을 2 ~ 3배 증량하여 부유시킨 후, 각 웰에 150 μl씩 돔 모양으로 분주할 수 있다.

[0097] 상기 세포 돔이 분주된 플레이트를 37°C 배양기에서 10 ~ 15분 동안 굳힌 후, 2 ~ 3ml 폐암 오가노이드 배지에 세포 돔이 충분히 잠길 정도로 넣어 배양하였다. 본 발명의 폐암 오가노이드 배지 조성은 하기 [표 1]에 나타난 바와 같다.

표 1

[0099]

조성물	Stock Conc.	Final Conc.
DMEM/F-12		
B27	50 x	1 x
N2	50 x	1 x
hEGF		50 ng/mL
hFGF		520 ng/mL
Y-27632	100 mM	10 μM
P/S	100 x	1 x

[0101] 본 발명의 실시예에 따라 배양한 폐암 오가노이드의 현미경 관찰 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 배양된 폐암 오가노이드는 각각 폐 선암(adenosquamous cell carcinoma), 편평상피암(squamous cell carcinoma), 및 소세포폐암(small cell lung cancer; SCLC)으로 분류될 수 있는 조직형태학적 특징을 나타내며, 바람직하게 성장한 것을 알 수 있었다.

[0103] **실시예 2. 오가노이드의 분리 및 효소 분해(enzymatic dissociation)**

[0105] **2-1) 오가노이드 분리**

[0106] 상기 실시예 1-2)에서 배양한 폐암 오가노이드 배지를 항온수조(water bath)에 넣고 데운 후, 6웰 플레이트의 각 웰 내 배지를 제거하였다. 이후, 차가운 PBS 500 μ l를 각 웰에 넣어주고, 오가노이드가 들어있는 매트릭셀을 플레이트에서 떼어냈다. 이후, 매트릭셀/PBS 혼합물을 15 ml 코니칼 튜브로 옮겨서 오가노이드를 분리하였다.

[0108] **2-2) 효소 분해(enzymatic dissociation)**

[0109] 상기 실시예 2-1)에서 분리된 오가노이드를 4℃에서 250 xg로 3분 간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. PBS로 재부유시킨 후 4℃에서 250 xg로 10분 간 다시 원심분리하여, 오가노이드와 매트릭셀 층을 분리하였다. 상층액 및 매트릭셀을 제거한 후, 6웰 플레이트 중 3웰에는 1000 ~ 2000 ml Trypsin/EDTA를 넣고, 회전 배양기에서 10 ~ 15분 간 반응시켰다. 나머지 3웰에는 TrypLE™ Express를 넣고 회전 배양기에서 15 ~ 20분 간 반응시켰다. 이때, 상기 효소 반응 시간은 탭핑(tapping)하면서 오가노이드가 잘 분리(dissociation)되었는지 관찰하면서 조절할 수 있다.

[0110] 다음으로 10% FBS가 첨가된 배지 7 ml를 첨가하여 잘 섞어준 후, 4℃에서 600 rpm으로 3분 간 원심분리하여, 상층액을 제거하였다. 펠렛의 크기에 따라 폐암 오가노이드 배지와 적당량의 매트릭셀을 섞어 준 후, 24 웰 플레이트의 각 웰 당 돔 형태로 분주하였다. 이때, 24 웰 플레이트의 3 웰 기준으로, 50 μ l 폐암 오가노이드 배지로 펠렛을 재부유 시킨 후, 매트릭셀 100 μ l를 더 첨가하여 재부유시켰으며, 1웰 당 50 μ l씩 돔 모양으로 분주하였다. 이후 37℃ 배양기에서 5 ~ 15분 동안 굳힌 다음 500 μ l씩 폐암 오가노이드 배지에 담아 배양하였다.

[0112] **실시예 3. 환자 유래 3차원 폐암 오가노이드 세포를 이용한 이종이식 마우스 모델의 제조**

[0114] **3-1) 오가노이드 조직형태학적 분석**

[0115] 상기 실시예 2-2)의 24웰 플레이트 중 3 ~ 4개의 웰 내 배지를 제거하고, 차가운 PBS 500 μ l을 각 웰에 넣어, 오가노이드가 들어있는 매트릭셀을 플레이트에서 떼어내었다. 이후, 매트릭셀/PBS 혼합물을 15 ml 코니칼 튜브로 옮기고, 4℃에서 250 xg로 3분 간 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 튜브에 PBS를 넣고 재 부유시킨 후, 4℃에서 250 xg로 10분 간 원심분리하여 오가노이드와 매트릭셀 층을 분리하였다. 분리된 매트릭셀 층과 상층액을 완벽하게 제거하였다.

[0116] 상기 원심분리를 통해 매트릭셀과 상층액을 완전히 제거한 오가노이드에 에탄올이 함유된 고정액을 첨가하여 4℃에서 1 ~ 2일 동안 고정시켰다. 고정된 오가노이드를 PBS로 세척한 후 다시 100% 에탄올을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 고정시킨 후 PBS로 세척하고 2% 아가로스겔과 극소량의 염색약을 첨가하여 굳혔다. 굳어진 아가로스/오가노이드 시료를 렌즈 페이퍼에 감싼 후 조직 카세트에 넣고 56℃ 파라핀을 이용하여 PE(paraffin embedded) 블록을 만들었다. 상기 블록을 4 μ m로 절단하고, H&M(Hematoxylin & Eosin)으로 염색하여 현미경으로 관찰하였으며, 그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다. WHO 폐암 분류 기준에 따라 조직형태학적, 병리학적 진단을 수행하였고, 각 시료의 폐암을 편평상피암(squamous cell carcinoma), 폐 선암(adenosquamous cell carcinoma), 대세포폐암(large cell carcinoma) 또는 소세포폐암(small cell lung cancer; SCLC)으로 분류하였다. 분석 결과 오가노이드 조직이 환자의 조직과 조직형태학적으로 일치하는 경우를 선별하여 마우스 이식에 사용하였다.

[0118] **3-2) 오가노이드 준비**

[0119] 상기 실시예 2-2)의 배양된 폐암 오가노이드로부터 상기 실시예 3-1)와 같은 방법으로 매트릭셀을 완전히 분리한 후 이종이식을 위한 오가노이드를 준비하였다.

[0120] 구체적으로, 24웰 플레이트 중 3 ~ 4개의 웰 내 배지를 제거하고, 차가운 PBS 500 μ l을 각 웰에 넣어, 오가노이드가 들어있는 매트릭셀을 플레이트에서 떼어내었다. 이후, 매트릭셀/PBS 혼합물을 15 ml 코니칼 튜브로

옮기고, 4°C에서 250 xg로 3분 간 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 튜브에 PBS를 넣고 재 부유시킨 후, 4°C에서 250 xg로 10분 간 원심분리하여 오가노이드와 매트릭셀 층을 분리하였다. 분리된 매트릭셀 층과 상층액을 완벽하게 제거하였다.

[0121] 상기 펠렛에 배지 10 μ l 및 매트릭셀 40 μ l을 넣고, 블루팁으로 오가노이드가 함유된 매트릭셀 용액을 멤브레인 위에 올려주었다. 이 때, 멤브레인은 수용성 셀룰로오스(cellulose) 멤브레인 또는 생분해성 멤브레인을 사용하며, 멤브레인은 가로 세로 각각 3 ~ 5 mm 정도의 정사각형 모양이 바람직하다. 오가노이드를 올린 멤브레인은 37°C 인큐베이터에서 10분 동안 굳혔다.

[0123] **3-3) 마우스에 이식**

[0124] 6 내지 8주령의 NOD-SCID 마우스(Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA)를 졸레틸(Zoletil, Virvac laboratories BP 27-06511 carros, France) 40 mg/kg 및 럼폰(Rompun, Bayer, South Korea) 5 mg/kg 마취제를 혼합하여 마취시키고, 표피(epidermis) 부분만이 노출되도록 절제하였다. 이후, 절제된 부분을 잘 들어 상기 실시예 3-2)에서 준비한 오가노이드의 멤브레인 바닥 부분이 마우스의 진피(dermis)를 향하도록 위치를 잡고 깊숙이 넣어준 후, 봉합하였다. 3주 동안 멤브레인의 위치가 보이는지 확인하였다가, 3주 후 이식된 셀룰로오스 멤브레인을 제거하고, 폐암이 마우스 내에서 자랄 때까지 12 ~ 14주 동안 유지하였으며, 7 ~ 11주 경과 후, 육안으로 암이 확인되었다.

[0125] 12 ~ 14주 동안 생성된 암 조직은 상기 3-2)와 같은 방법으로 조직형태학적 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었으며, 환자와 이종이식 동물(OR-PDX)의 조직형태학적 결과가 동일한 형태를 보였을 때 이식에 성공하였다고 집계하였다.

[0127] **[비교예]**

[0128] **비교예 1. 환자 유래 폐암 조직으로부터 폐암 세포 일차배양 및 이종이식 동물모델의 제조**

[0130] 상기 준비예의 시료를 가위로 절제하고, 1 mg/mL의 타입IV 콜라게나아제(Sigma Chemical Co. st. Louis, MO, USA)가 포함된 DMEM/F12 배지를 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. 이 후, 조직을 DMEM/F12에 0.1% BSA가 함유된 세척 용액으로 세척한 후, 폐암 오가노이드 배지를 이용하여 콜라겐 코팅이 되어 있는 플라스틱 디쉬에서 폐암 세포의 일차배양을 수행하였다. 그 후 배지를 교체하여 5 ~ 14일 동안 배양한 후, 계대 세포를 수득하여 일차배양 폐암 세포를 수득하였다.

[0131] 상기 일차 배양 폐암 세포주를 6 ~ 8주령의 NOD-SCID 마우스(Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA)에 이식하였다.

[0132] 보다 구체적으로, 1×10^6 의 환자 유래 일차 배양 종양 세포들을 100 μ l 매트릭셀(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에서 재부유시켰고, 이를 NOD/SCID 마우스 등 피하층(subcutaneous layer of back)에 주입하였다. 종양 크기가 1 cm³을 넘었을 때인 3 ~ 4개월 후에, 졸레틸(Virbac, Virvac laboratories BP 27-06511 carros, France; 40mg/kg) 및 럼폰(Bayer, South Korea; 5mg/kg)을 혼합하여 마우스의 복막 내 주입(intra-peritoneal injection)으로 마취시킨 후, 종양을 수술적으로 잘라내어 이식 성공여부를 확인하였다.

[0133] 같은 마우스의 서로 다른 부위에 상기 실시예의 오가노이드 이식 방법(OR-PDX)과 비교예 1의 일차배양 세포 이식 방법(PCC-PDX)으로 이식한 후 종양 조직의 성장 여부를 육안으로 확인할 수 있었다. 도 5에 나타낸 바와 같이 OR-PDX 방법을 사용한 경우(왼쪽)는 모두 성공하였으나, PCC-PDX의 경우 SJJ-15L-29 및 SJJ-15L-43 시료에 대해서만 성공하였다.

[0135] **비교예 2. 환자 유래 폐암 조직을 이용한 이종이식 동물모델의 제조**

[0137] 수술 시 환자에서 적출된 조직을 수득하여, 페트리 디쉬(petri dish)에서 수술 나이프를 이용하여 암 조직 부분

만을 정리하였다. 암 조직을 1 ~ 2 mm로 자른 후, 15 ml 코니칼 튜브로 옮기고 DMEM/F12에 0.1% BSA가 함유된 세척 용액으로 3 ~ 4회 강하게 피펫팅하였다. 중력에 의해 조직이 가라 앉도록 그대로 1분 동안 유지한 후, 상층액을 제거하였다. 조직이 깨끗해질 때까지 상기 세척 단계를 3 ~ 4회 반복하여 실시하였다. 잘라진 암 조각 중 3 ~ 4 조각을 이식에 사용하였다.

[0138] 상기 준비된 암 조직을 6 ~ 8주령의 NOD/SCID 마우스(Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA)에 이식하였다.

[0139] 보다 구체적으로, NOD/SCID 마우스의 표피를 절제하여 3 ~ 4 조각의 암 조직을 한꺼번에 넣어준 후 봉합하였다. 3 ~ 4개월 후에 상기와 같이 졸레틸 및 림폰을 혼합 주사하여 마취시킨 후, 종양을 수술적으로 잘라내어 이식 성공여부를 확인하였다.

[0141] **[실험예] 조직형태학적 분석을 통한 이종이식모델의 성공 여부 확인**

[0143] 본 발명의 오가노이드 이식 방법(실시예, OR-PDX)에 따른 이식 효과를 확인하기 위하여, 본 발명의 모델과 종래 일차배양 세포 주입법(비교예 1, PCC-PDX) 및 환자 유래 폐암 조직의 직접 이식법(비교예 2, Tissue-PDX)으로 각각 제조한 이종이식 마우스 모델의 조직을 형태학적으로 비교 분석하였다.

[0144] 구체적으로, 7종의 폐암 세포 시료를 상기 실시예 및 비교예의 방법으로 면역결핍마우스에 이식한 후, 3 ~ 4개월 동안 이식된 세포가 자랄 때까지 기다렸다. 그 후, 이식된 종양 조직을 수술적으로 잘라내어 차가운 2% 포름알데히드에 4시간 동안 고정시키고, 56℃ 파라핀에 끼워 넣었다. PE 블록을 4 μm로 절단하고, H&E로 염색하였다. WHO 폐암 분류에 따라 병리학적 진단을 수행하였고, 환자와 이종이식 동물(OR-PDX, PCC-PDX 또는 Tissue-PDX)의 조직형태학적 결과가 동일한 형태를 보였을 때 이식에 성공하였다고 집계하였다.

[0145] 7개의 조직 시료를 서로 다른 방법으로 마우스에 이식한 결과를 하기 [표 2]에 나타내었고, 각각의 시료에 대한 조직형태학적 관찰 결과 중 일부를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

표 2

Sample	OR-PDX (실시예)	PCC-PDX (비교예 1)	Tissue-PDX (비교예 2)
SJJ-15L13	0	X	X
SJJ-15L21	0	X	X
SJJ-15L28	0	X	X
SJJ-15L29	0	0	0
SJJ-15L42	0	X	0
SJJ-15L43	0	0	X
SJJ-15L51	0	X	X

[0149] (OR-PDX: 본 발명의 일실시예에 따라 폐암 오가노이드를 3차원 이식한 이종이식동물, PCC-PDX: 본 발명의 비교예 1에 따라 일차배양 폐암 세포를 이용한 이종이식동물, Tissue-PDX: 본 발명의 비교예 2에 따라 환자 폐암 조직을 직접 이식한 이종이식동물)

[0151] 상기 [표 2]에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 오가노이드 이식 방법(OR-PDX)을 이용한 경우 7종 시료 모두 이식에 성공하였으나, PCC-PDX와 Tissue-PDX는 각각 2종 시료에 대해서만 이식에 성공하였다. 비교적 이식이 용이한 SJJ-15L29 시료의 경우 세 가지 방법 모두 조직 이식에 성공하였으나, 이식이 어려운 4종의 시료는 OR-PDX 방식에서만 성공한 것을 확인할 수 있었다.

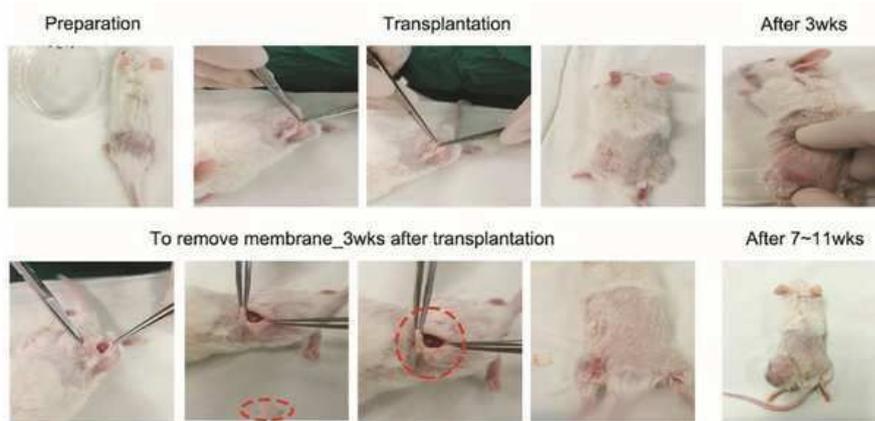
[0152] 따라서, 본 발명에 따른 이종이식모델의 제조 방법은 기존의 조직 이식 방법에 비하여 이식 성공률을 현저히 상

승시킬 수 있음을 알 수 있다.

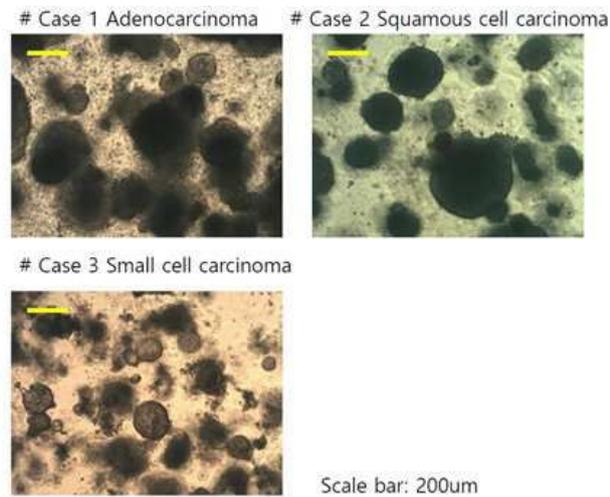
[0154] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

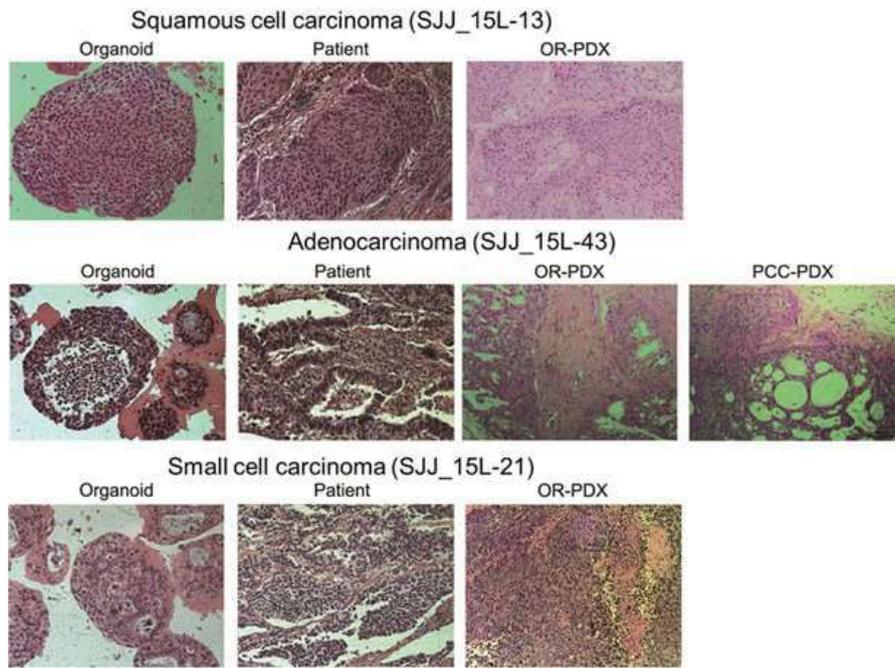
도면1



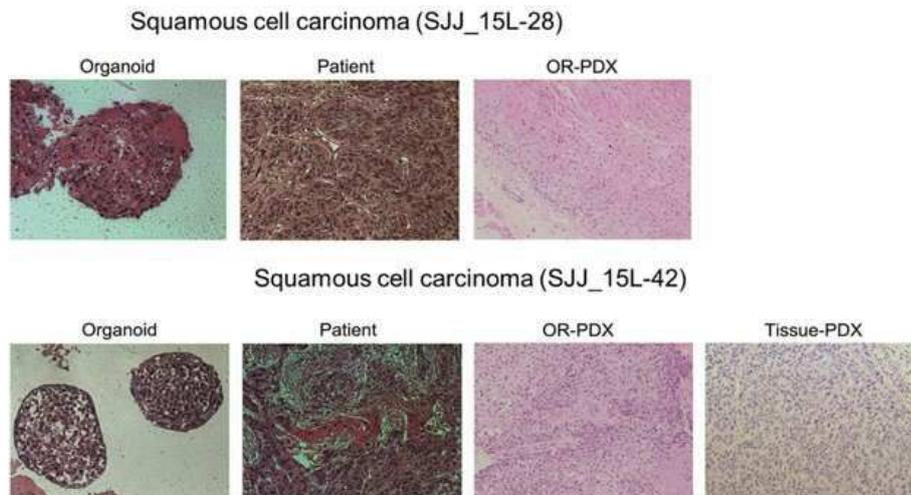
도면2



도면3



도면4



도면5

