

청구범위

- [청구항 1] i) 체세포를 배양하는 단계;
 ii) 유도만능줄기세포 제조를 위해 하이드로젤이 포함되지 않은 3차원 세포배양 플레이트를 준비하는 단계;
 iii) 상기 배양된 체세포를 상기 하이드로젤이 포함되지 않은 3차원 세포배양 플레이트에서 유도만능줄기세포로 리프로그래밍시켜서 유도만능줄기세포를 제조하는 단계;
 iv) 상기 유도만능줄기세포를 상기 iii)의 3차원 세포배양 플레이트에서 분리하는 단계;
 v) 뇌 오가노이드 형성을 위해 하이드로젤이 코팅되지 않은 3차원 세포배양 플레이트를 준비하는 단계; 및
 vi) 상기 분리된 유도만능줄기세포를 하이드로젤이 포함되지 않은 3차원 세포배양 플레이트에서 배양하여 뇌 오가노이드를 형성하는 단계;
 를 포함하는, 뇌 오가노이드 제조방법으로,
 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,
 뇌 오가노이드 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 뇌 오가노이드 형성 단계는,
 상기 유도만능줄기세포를 배아체(embryonic body)로 만든 후에,
 상기 응집된 유도만능줄기세포에 신경상피세포(neuroepithelial) 유도 배지를 첨가하여 신경상피세포를 유도하고;
 신경외배엽(neuroectodermal) 분화 배지를 첨가하여 신경상피세포로부터 신경외배엽조직으로 분화시키고;
 상기 신경외배엽조직에 신경상피 버드 유도 배지를 첨가하여 신경상피 버드를 증식시키고;
 상기 증식된 신경상피 버드에 뇌 조직 유도 배지를 첨가하여 뇌 조직을 형성시키는 단계를 포함하는 것인, 뇌 오가노이드 제조방법.

- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 하이드로젤은 세포외 기질 기반 하이드로젤인, 증식방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 세포외 기질 기반 하이드로젤은 매트릭스인, 증식방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 뇌 오가노이드 크기는 0.8 내지 1.3 mm인 뇌 오가노이드 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 뇌 오가노이드는 1 mm 이하인, 뇌 오가노이드 제조방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 서브 웰은 오목부를 향하여 테이퍼지도록 경사면이 형성되고,
상기 서브 웰(120)의 상단 직경은 3.0 내지 4.5 mm 범위이고,
상기 오목부(121) 상단의 직경은 0.45 내지 1.5 mm 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 뇌 오가노이드 제조방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 메인 웰의 개별 부피는 100 내지 300 μl 범위이며,
상기 오목부의 개별 부피는 20 내지 50 μl 범위이고,
상기 메인 웰과 오목부의 개별 부피비는 평균 1:0.1 내지 0.5 인 것을
특징으로 하는 뇌 오가노이드 제조방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 메인 웰은, 단턱과 서브 웰 사이에 공간부를 포함하고,
상기 공간부의 높이(a_h)는 평균 2.0 내지 3.0 mm 범위이며,
상기 서브 웰의 높이(b_h)는 평균 1.0 내지 2.0 mm 범위이고,
상기 공간부와 서브 웰의 높이비($a_h:b_h$)는 1:0.3 내지 1 범위인 것을
특징으로 하는 뇌 오가노이드 제조방법.