

명세서

발명의 명칭: 표준형 오가노이드 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 표준형 오가노이드 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 균일한 크기의 오가노이드를 제조하는 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 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.
- [3] 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 둠 모양으로 굳힌 후 그 안에서 오가노이드를 키우기 때문에, 오가노이드가 제각각으로 자라게 된다.
- [4] 또한, 이렇게 매트리젤 안에서 자란 오가노이드들은 3차원 지지체 안에서 서로 겹쳐 자랄 수도 있기 때문에 한계가 명확하다.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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 빨리 올라가거나, 위치 변화 등이 발생하는 경우가 있어, 세포 배양 환경에 좋지 못한 문제가 있다.
- [8] 이에 본 발명자들은 세포외 기질 기반 하이드로젤(예, 매트리젤)을 사용하지

않거나 사용을 최소화하면서 균일한 크기를 가지는 표준형 오가노이드에 대한 연구를 계속하여 본 발명을 완성하였다.

[9] [선행기술문헌]

[10] [특허문헌]

[11] 1. 대한민국 등록특허 제10-1756901호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명의 목적은 표준형 오가노이드 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 크기가 균일하고 각각의 오가노이드의 기능성이 유사한 표준형 오가노이드를 제공하기 위한 것이다.

[14] 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.

과제 해결 수단

[15] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은

[16] 세포를 3차원 세포배양 플레이트에서 배양하여 오가노이드를 형성하는 단계를 포함하는 오가노이드 제조방법으로,

[17] 상기 오가노이드 형성 단계에서, 상기 세포배양 플레이트는 세포외 기질 기반 하이드로젤을 0 내지 2 부피% 포함하고,

[18] 상기 3차원 세포배양 플레이트는,

[19] 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,

[20] 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.

[21] 상기 세포는 정상세포 또는 암세포일 수 있다.

[22] 상기 세포는 단일세포일 수 있다.

[23] 상기 세포는 정상 조직, 암 조직 또는 이미 만들어진 오가노이드에서 분리하여 얻을 수 있다. 조직을 세포화하여 단일세포로 분리하는 방법은 공지된 기술이므로 구체적인 설명은 생략한다.

[24] 상기 세포 배양 기간은 1 내지 14일이 바람직하다

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

[26] 상기 오가노이드의 크기는 직경 300-500 μm 일 수 있다.

- [27] 본 발명에서 용어 "표준형 오가노이드"란, 오가노이드의 크기가 직경 300-500 μm 로 균일한 오가노이드를 말한다.
- [28] 본 발명에서 제조되는 오가노이드의 크기는 300-500 μm 범위인데, 이는 암 질환에 특히 최적화된 크기이다.
- [29] 이하에서 자세히 설명하겠지만, 본 발명의 3차원 세포배양 플레이트를 이용하면 표준형 오가노이드를 대량생산 할 수 있다.
- [30] 상기 3차원 세포배양 플레이트의 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 범위일 수 있다.
- [31] 상기 3차원 세포배양 플레이트의 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 0.5일 수 있다.
- [32] 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 범위일 수 있다.
- [33] 상기 세포는 상기 세포배양 플레이트에 100 내지 300 cells/well로 시딩될 수 있다.
- [34] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [35] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 일반적으로 오가노이드를 배양할 때 세포외 기질의 역할을 제공하기 위해 하이드로젤을 사용한다. 예를 들면, 매트릭젤을 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.

- [40] 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.
- [41] 본 발명은 일 실시예에서 다음을 포함하는 3차원 세포배양 플레이트를 이용한다:
- [42] 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
- [43] 웰 플레이트를 지지하는 대용량 고속 HCS(High contents screening)용 커넥터;를 포함하며,
- [44] 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,
- [45] 상기 메인 웰은 소정부위 테이퍼지도록 단턱이 형성되며, 상기 단턱은 메인 웰의 벽을 기준으로 10 내지 60° 범위의 경사각(θ)을 갖는 세포배양 플레이트.
- [46] 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 *coming spheroid microplate*의 경우에는 세포 배양 중인 스페로이드 또는 오가노이드가 영향을 받아서, 피펫팅 작업시 스페로이드 또는 오가노이드가 빨리 올라가거나, 위치 변화 등이 발생하는 경우가 있어, 세포 배양 환경에 좋지 못한 문제가 있었다.
- [47] 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 단턱에 의하여, 배양되는 세포는 미디어 교체시 피펫팅 작업에 의한 영향을 최소화할 수 있는 세포배양 플레이트를 제공한다.
- [48] 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.

- [49] 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.
- [50] 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 실시예에 따른 세포배양 플레이트에 형성된 메인 웰을 상세하게 나타낸 도면이고, 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 웰 플레이트, 베이스 및 커버를 보여주는 도면이다((a) 커버, (b) 베이스, (c) 마이크로 플레이트 및 베이스의 고정수단).
- [51] 이하, 도 1 내지 도 3을 참조하여 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트를 상세히 설명한다.
- [52] 도 1 내지 도 3에 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 포함하는 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.
- [53] 먼저, 도 1과 도 2를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 웰 플레이트(100)를 상세히 설명하도록 한다.
- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] 종래의 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.
- [57] 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.

- [58] 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.
- [59] 보다 구체적으로, 공간부(130)의 높이(a_h)는 평균 2.0 내지 3.0 mm 범위일 수 있으며, 또는 2.2 내지 2.8 mm 범위일 수 있으며, 또는 평균 2.3 내지 2.7 mm 범위일 수 있다. 아울러, 서브 웰(120)의 높이(b_h)는 평균 1.0 내지 2.0 mm 범위일 수 있으며, 또는 평균 1.2 내지 1.8 mm 범위일 수 있다.
- [60] 예를 들면, 상기 공간부(130)의 높이(a_h)는 평균 2.5 mm 이며, 서브 웰의 높이(b_h)는 평균 1.5 mm 일 수 있다.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 메인 웰(110)의 하부에 포함되는 서브 웰(120)은 각각의 크기와 모양이 동일하고, 이에 따라 균일한 조건의 스페로이드 및 오가노이드를 생성할 수 있다.
- [64] 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 하강할수록 수평의 넓이가 줄어드는 형상으로 구성될 수 있다.

- [65] 특히, 상기 서브 웰(120)은 크기와 모양이 동일하도록 복수개를 포함함으로써, 상기 세포배양 플레이트는 균일한 조건에서 대량의 스페로이드 또는 오가노이드를 생성할 수 있다.
- [66] 특정 양태로서, 하나의 메인 웰(110)에는 동일한 크기의 서브 웰(120)을 4 내지 25개 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.
- [67] 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 'U'자 형태일 수 있으며, 예를 들면, 상기 오목부(121)는 'U'자 형태일 수 있다.
- [68] 상기 서브 웰(120)의 상단 직경은 3.0 내지 4.5 mm 범위일 수 있으며, 또는 3.5 내지 4.3 mm 일 수 있으며, 또는 평균 4 mm 일 수 있다. 아울러, 오목부(121) 상단의 직경은 0.45 내지 1.5 mm 일 수 있으며, 또는 0.5 내지 1.0 mm 또는 평균 0.5 mm 일 수 있다.
- [69] 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.
- [70] 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.
- [71] 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.
- [72] 상술한 서브 웰(120)은 100 내지 1000 cells/well 이하의 세포배양이 가능하며, 안정적으로 스페로이드 크기를 제어할 수 있는 이점이 있다.
- [73] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 메인 웰(110)의 개별 부피는 100 내지 300 μl 범위이며, 오목부(121)의 개별 부피는 20 내지 50 μl 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 μl 범위이며, 상기 오목부의 개별 부피는 25 내지 35 μl 범위일 수 있으며, 상기 메인 웰(110)과 오목부(121)의 개별 부피비는 평균 1:0.11 일 수 있다.

- [74] 구체적으로, 메인 웰(110)의 개별 부피가 100 μl 미만인 경우, 세포 배양시 충분한 배양액을 수용할 수 없는 문제가 발생할 수 있으며, 300 μl 를 초과하는 경우에는 배양 효율이 떨어질 수 있다.
- [75] 아울러, 오목부(121)는 실질적인 세포가 배양되는 공간으로, 그 부피가 20 μl 미만인 경우에는 세포 배양 공간이 충분하지 않아 세포들이 빠져 나오는 문제가 발생할 수 있으며, 50 μl 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.
- [76] 상기 언급한 본 발명의 세포배양 플레이트의 구성으로 인해, 하이드로젤을 포함하지 않아도, 즉 하이드로젤을 세포배양 플레이트에 코팅하지 않아도 세포가 스페로이드 형태로 유지되며, 유도만능줄기세포로의 리프로그래밍이 고효율로 일어나고 리프로그래밍 이후에 지속적으로 그 형태와 기능이 유지된다.
- [77] 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.
- [78] 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, 베이스(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.
- [79] 이때, 상기 베이스는, 웰 플레이트(100)를 지지하기 위한 철부(240)를 포함하며, 상기 웰 플레이트(100)는 베이스(210)의 철부(240)에 대향되는 요부(140)를 포함할 수 있다. 상기 고정수단에 의해서 웰 플레이트(100)가 고정되어 스크리닝시 이미지가 균일하게 촬영될 수 있다.
- [80] 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.
- [81] 상기 웰 플레이트는, 폴리디메틸실리콘, 고지방 변성 실리콘, 메틸클로로페닐 실리콘, 알킬변성실리콘, 메틸페닐실리콘, 실리콘폴리에스터, 또는 아미노변성실리콘 소재로 이루어질 수 있으나 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [82] 본 발명의 오가노이드 제조방법은 매트리젤 사용을 최소화 할 수 있기에 경제적이다. 또한 본 발명에 따른 오가노이드 제조방법은 표준형 오가노이드를 대량 생산하는 효과를 제공한다.
- [83] 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

- [84] 도 1(a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 정면도이며, 도 1(b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 단면도이다.
- [85] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트에 형성된 메인 웰을 상세하게 나타낸 도면이다.
- [86] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양 플레이트의 웰 플레이트, 베이스 및 커버를 보여주는 도면이다((a) 커버, (b) 베이스, (c) 마이크로 플레이트 및 베이스의 고정수단).
- [87] 도 4는 실시예 1 및 비교예 1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 도면이다((a) 실시예 1, (b) 비교예 1).
- [88] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 매트리젤을 2 부피%로 포함한 것과 매트리젤을 사용하지 않은 오가노이드의 배양 결과이다.
- [89] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 매트리젤을 2 부피%로 포함한 것과 매트리젤을 사용하지 않은 오가노이드의 면역형광염색 결과이다.
- [90] 도 7(a)는 실시예 1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진이며, 도 7(b)는 실시예 1에서 배양한 오가노이드의 면적을 나타내는 그래프이다.
- [91] 도 8(a)는 비교예 1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진이고, 도 8(b)는 비교예 1에서 배양한 오가노이드의 면적을 나타내는 그래프이다.
- [92] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 대장암 세포를 14일 간 배양하였을 때의 이미징 결과(왼쪽)와 오가노이드 크기 분포(오른쪽)를 보여준다.
- [93] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 대장암 세포를 14일간 배양한 오가노이드 염색 이미지(왼쪽) 및 오가노이드 생존율(오른쪽)을 보여준다.
- [94] 도 11과 도 12는 실시예 1 내지 3의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진과 그래프이다((a) 실시예 1, (b) 실시예 2, (c) 실시예 3).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [95] 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.

[96] **[실시예]**

[97] **<실험 방법>**

[98] 1: 오가노이드 제조

[99] 기존의 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, acutase 로 7분간 처리를 하여 단일세포로 완전하게 분리시켰다. 이 단일세포를 세포배양 플레이트의 서브 웰에 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, Nictioamide, N-acetyl, gastrin, A-83-01, EGF, noggin, R-spondin1, WNT3A 들어가며, 배양 조건은 매트리젤을 함유하지 않거나 또는 2 부피% 함유한 조건에서 오가노이드를 제조하였다.

[100] 2: 오가노이드 크기 및 개수 측정

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

[102] 3: 면역형광 염색 방법

[103] 면역형광염색을 통하여 오가노이드의 줄기세포인 LGR5를 염색하여 확인하였다. 먼저 본 발명에 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, 10 μ m 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 제1차 항체를 2시간동안 상온에서 유지시킨다. PBS 워싱 후에, 2차 항체를 상온에서 2시간 처리하고, 마운팅 용액을 넣어 형광 현미경으로 측정하였다.

[104] 또 10의 경우, 배양된 표준형 오가노이드를 꺼내어, Live/Dead 형광 염색을 진행한다. 형광염색의 경우, Calcein 1mM은 1ml 당 2 μ l, EtdH-1 2mM은 1ml당 1 μ l로 30-60분 인큐베이터에 보관 후, 형광현미경으로 측정하도록 한다.

[105] **<실시예>**

[106] 실시예 1.

[107] 상기 실험방법 1에서 언급한 방법으로 오가노이드를 제조하였다. 매트리젤을

배양액에 2 부피% 함유한 조건(실시예 1-1)과 매트릭셀을 넣지 않은 조건(실시예 1-2)에서 오가노이드를 제조하였다.

[108] 실시예 2.

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

[110] 실시예 3.

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

[112] 비교예 1.

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

[114] <실험예>

[115] 실험예 1. 오가노이드 이미지 분석

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

[117] 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)

[118] 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 μm 내외였다. 이를 통해 본 발명에 따른 오가노이드 배양 방법을 이용하면 표준 오가노이드 제조가 가능함을 알 수 있다.

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

[120] 본 발명의 베이스 및 웰 플레이트가 서로 고정하기 위하여 각각 철부와 요부를 포함하는데, 상기 철부와 요부가 서로 결합되어 베이스가 웰 플레이트를 단단하게 고정할 수 있어, 웰 플레이트 내의 이미지를 균일하게 촬영할 수 있음을 보여준다.

[121] 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.

- [122] 또한 도 5를 보면, 매트릭셀을 함유하지 않아도 본 발명의 세포배양 플레이트를 이용하면 오가노이드 형성이 잘 이루어짐을 확인하였다.
- [123] 도 6은 배양한 오가노이드가 성공적으로 형성되었는지 확인하기 위하여 대장암 오가노이드의 형성에 가장 중요한 마커인 LGR5를 염색하여 발현정도 확인한 것이다. 또한 F-actin 염색을 진행하여 형성된 저농도 매트릭셀 또는 매트릭셀을 사용하지 않는 그룹의 대장암 오가노이드 안에 colon-specific structure가 존재를 확인하였다.
- [124] 실험예 2. 표준형 오가노이드 제작
- [125] 실시예 1-1과 비교예 1에서 배양한 세포를 고속대량 이미징하였다.
- [126] 실시예 1-1과 비교예 1에서 제조한 오가노이드는 자동화 플레이트 기기에서 이미징을 진행하였으며, 이때 자동으로 기기가 초점을 잡아 진행하도록 하였다. 이미지의 크기 분석은 imageJ 프로그램의 매크로 프로그램을 이용하여 진행하였다.
- [127] 그리고, 그 결과를 도 7과 도 8에 나타내었다.
- [128] 도 7(a)는 실시예 1-1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진이며, 도 7(b)는 실시예 1에서 일정 기간 동안 배양한 오가노이드의 면적을 나타내는 그래프이며, 도 8(a)는 비교예 1의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진이고, 도 8(b)는 비교예 1에서 일정 기간 동안 배양한 오가노이드의 면적을 나타내는 그래프이다.
- [129] 도 7을 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.
- [130] 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 μm 내외로 아주 적게 나타난다.
- [131] 도 8을 참조하면, 비교예 1의 경우, 오가노이드가 서로 겹치게 자라는 것을 확인할 수 있으며, 오가노이드의 크기와 분포 위치가 서로 달라 표준화가 불가능함을 알 수 있었다. 그러므로 스크리닝 이미지 측정시 오차범위가 최대 150 μm 로 내외로 크게 나타났다.
- [132] 이와 같은 결과는, 종래 방법으로 오가노이드를 배양하게 되면, 오가노이드가 매트릭셀 내에서 랜덤으로 자라게되어 원하는 오가노이드를 균일하게 배양하기 힘들며, 또한 측정 높이도 가변적이라서 오가노이드 스크리닝 이미징에 적용하기가 어려운 한계가 있기 때문이다. 따라서 일정 기간 동안 배양된 오가노이드의 면적을 분석해보면 편차가 매우 크게 나타나게 된다.
- [133] 도 9의 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.

- [134] 도 9는 실시예 1-1의 대장암 세포를 14일 간 배양하였을 때의 이미징 결과와 오가노이드 크기를 보여준다. 오가노이드 크기가 300-50 μm 로 균일하여 표준 오가노이드 제작이 가능함을 알 수 있다.
- [135] 도 10은 실시예 1-1 및 1-2에 따른 오가노이드를 시간 경과에 따라 보여주는 이미지 사진(왼쪽)과 실시예 1-1에 따른 오가노이드 생존율이다(오른쪽). 도 10의 경우, 배양된 오가노이드를 Live/Dead 염색을 진행하여, 실제 배양된 오가노이드가 얼마나 유지되는지 확인하였다. 먼저 배양된 표준형 오가노이드를 PBS로 세척한 후, accutase로 10분 가량 인큐베이션을 진행하였다. 그리고 나서, 단일 세포로 조각내어, Live/Dead 시약인 Calcein과 EtdH-1를 인큐베이터에서 약 30-60분 가량 보관 후, C-Chip에 넣어 형광현미경으로 각각 얼마만큼 존재하는지 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [136] 도 10을 통해 매트릭셀이 없어도 오가노이드 형성이 매우 잘 일어남을 알 수 있으며, 14일 동안 배양하는 경우 오가노이드 생존율이 매우 높음을 알 수 있다.
- [137] 도 11은 실시예 1-1, 2, 및 3의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 사진으로, 도 9는 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).
- [138] 도 11(a)를 참조하면, 세포를 각각의 서브 웰에 평균 100 cells/well 씩 시딩하였을 경우, 비교분석 가능한 균일한 오가노이드를 제작할 수 있었다(오차범위: 20 μm 내외).
- [139] 반면, 도 11(b) 및 도 11(c)를 참조하면, 세포를 서브 웰에 100 cells/well 이상 시딩하는 경우, 오가노이드가 상기 서브웰로부터 넘쳐 흘러, 균일하지 않은 오가노이드가 생성되는 것을 확인할 수 있다.
- [140] 도 12는 실시예 1-1, 2 및 3의 고속대량 이미징 결과를 보여주는 그래프로, 도 12는 실시예 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).
- [141] 도 12를 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 성장할 수 있을 것으로 보인다. 반면, 서브웰에 시딩하는 세포를 늘리고, 배양일 수를 줄일 경우에는 오가노이드 성능이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.
- [142] 참고로, 도 12의 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.
- [143] 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.

- [144] 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.

[145] [부호의 설명]

[146] 100: 웰 플레이트

[147] 101: 단턱

[148] 110: 메인 웰

[149] 120: 서브 웰

[150] 121: 오목부

[151] 130: 공간부

[152] 140: 요부

[153] 200: 대용량의 고속 HCS용 커넥터

[154] 210: 베이스

[155] 220: 커버

[156] 240: 철회