

명세서

발명의 명칭: 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 대장암은 결장과 직장에 발생하는 악성종양을 말하는 것으로, 매년 2만 8000명 정도가 새롭게 대장암 진단을 받는다. 다행히 대장암은 정기적으로 내시경 검사만 받으면 조기발견을 통해 90% 이상 치료하며, 5년 생존율이 75%가 넘는다. 그럼에도 발견이 늦어지거나, 적절한 치료가 이루어지지 못한 경우가 많아 국내 암 사망 원인의 3위를 차지하고 있다.
- [3] 대장암을 약물 치료할 경우, 류코보린 (Leucovorin), 5-플루오로우라실 (5-FU), 및 이리노테칸 (Irinotecan)으로 구성된 FOLFIRI 또는 류코보린 (Leucovorin), 5-플루오로우라실 (5-FU), 및 옥살리플라틴 (Oxaliplatin)으로 구성된 FOLFOX를 사용하는 항암치료가 대표적이다. 두 항암치료의 가장 큰 차이는 이리노테칸을 사용하느냐, 옥살리플라틴을 사용하느냐의 차이로, 대장암 환자의 70%가 이리노테칸이 포함된 FOLFIRI에 감수성이 있어, 현재 의료계에서는 FOLFIRI 처치 후 예후에 따라 추가로 FOLFOX를 처치하는 방식으로 치료가 이루어진다.
- [4] 그러나 이 과정 중 예후가 좋지 않은 경우, 암이 더욱 진행되는 경우가 많다. 또한, 비슷한 임상적 특징을 가지고 있고, 같은 병기의 환자라 할지라도 항암 화학요법에 대한 반응은 다양하게 나타나므로, 각 환자에 맞는 항암 치료법을 예측하는 것은 대장암 치료에 중요한 과제이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 일 양상은 Advanced DMEM/F12, L-글루타민, HEPES, 항생제, B27 보충제 (B27 supplement), N2 보충제 (N2 supplement), N-아세틸시스테인 (N-acetylcysteine), 니코티나마이드 (Nicotinamide), 가스트린 (gastrin), 및 EGF로 이루어진 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물을 제공하는 것이다.
- [6] 다른 양상은 대장암 세포, Advanced DMEM/F12, L-글루타민, HEPES, 항생제, B27 보충제 (B27 supplement), N2 보충제 (N2 supplement), N-아세틸시스테인 (N-acetylcysteine), 니코티나마이드 (Nicotinamide), 가스트린 (gastrin), 및 EGF를 구성으로 이루어진 오가노이드를 배양하는 단계; 배양한 오가노이드에 옥살리플라틴을 처리하는 단계; 및 옥살리플라틴을 처리한 오가노이드의 옥살리플라틴에 대한 민감성을 판단하는 단계;를 포함하는 옥살리플라틴 약물 효능을 예측하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 일 양상은 Advanced DMEM/F12, L-글루타민 (L-glutamine), HEPES, 항생제, B27 보충제 (B27 supplement), N2 보충제 (N2 supplement), N-아세틸시스테인 (N-acetylcysteine), 니코티나마이드 (Nicotinamide), 가스트린 (gastrin), 및 EGF로 이루어진 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 일 구체예에 따르면, 상기 항생제는 페니실린 (Penicilin), 스트렙토마이신 (Streptomycin), 또는 프리모신 (Primocin) 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [9] 일 구체예에 따르면, 상기 조성물은 Y-27632, Wnt3a, 또는 노긴 (Noggin) 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다.
- [10] 다른 양상은 대장암 유래 세포, Advanced DMEM/F12, L-글루타민 (L-glutamine), HEPES, 항생제, B27 보충제 (B27 supplement), N2 보충제 (N2 supplement), N-아세틸시스테인 (N-acetylcysteine), 니코티나마이드 (Nicotinamide), 가스트린 (gastrin), 및 EGF를 구성으로 이루어진 오가노이드를 배양하는 단계; 배양한 오가노이드에 옥살리플라틴을 처리하는 단계; 및 옥살리플라틴을 처리한 오가노이드의 옥살리플라틴에 대한 민감성을 판단하는 단계;를 포함하는 옥살리플라틴 약물 효능을 예측하는 방법을 제공하는 것이다.
- [11] 일 구체예에 따르면, 상기 오가노이드를 배양하는 단계에 Y-27632, Wnt3a, 또는 노긴 (Noggin) 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다.
- [12] 일 구체예에 따르면, 상기 옥살리플라틴에 대한 민감성은 IC50, AUC 및 세포 생존율을 확인하므로 판단하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [13] 본 발명에 따른 오가노이드 제조방법, 오가노이드, 및 대장암 환자의 치료 반응성을 예측하는 방법을 사용하면 옥살리플라틴 (Oxaliplatin)에 대한 반응성을 미리 예측할 수 있어 환자에 적합한 약물로 치료할 수 있어, 추가 치료를 줄일 수 있으며, 치료 성공률을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 옥살리플라틴 약물 효능을 예측하기 위한 방법의 과정을 도식화한 것이다.
- [15] 도 2는 3D 세포 배양 후, 항암제인 옥살리플라틴, 5-FU, 이리노테칸, 및 폴리닌산 처리에 따른 세포 생존율을 대장암 세포주에서의 결과와 비교한 데이터이다.
- [16] 도 3은 대장암 세포주인 HCT116 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 HCT116 세포 주의 옥살리플라틴의 저항성을 AUC 수치로 비교한 그래프이다.
- [17] 도 4는 대장암 세포주인 HCT116 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 IC50 수치로 비교한 그래프이다.
- [18] 도 5는 대장암 세포주인 HCT116 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴

의 저항성을 옥살리플라틴 처리 농도에 따른 세포 생존율 수치로 비교한 그래프이다.

- [19] 도 6은 대장암 세포주인 RKO 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 AUC 수치로 비교한 그래프이다.
- [20] 도 7는 대장암 세포주인 RKO 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 IC50 수치로 비교한 그래프이다.
- [21] 도 8는 대장암 세포주인 RKO 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 옥살리플라틴 처리 농도에 따른 세포 생존율 수치로 비교한 그래프이다.
- [22] 도 9은 대장암 세포주인 SW620 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 AUC 수치로 비교한 그래프이다.
- [23] 도 10는 대장암 세포주인 SW620 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 IC50 수치로 비교한 그래프이다.
- [24] 도 11는 대장암 세포주인 SW620 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 옥살리플라틴 처리 농도에 따른 세포 생존율 수치로 비교한 그래프이다.
- [25] 도 12은 대장암 세포주인 LS147T 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 AUC 수치로 비교한 그래프이다.
- [26] 도 13는 대장암 세포주인 LS147T 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 IC50 수치로 비교한 그래프이다.
- [27] 도 14는 대장암 세포주인 LS147T 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 옥살리플라틴 처리 농도에 따른 세포 생존율 수치로 비교한 그래프이다.
- [28] 도 15은 대장암 세포주인 HT29 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 AUC 수치로 비교한 그래프이다.
- [29] 도 16는 대장암 세포주인 HT29 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의

저항성을 옥살리플라틴 처리 농도에 따른 세포 생존율 수치로 비교한 그래프이다.

- [30] 도 17은 대장암 세포주인 HCT15 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 AUC 수치로 비교한 그래프이다.
- [31] 도 18는 대장암 세포주인 HCT15 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 옥살리플라틴 처리 농도에 따른 세포 생존율 수치로 비교한 그래프이다.
- [32] 도 19는 대장암 세포주인 CoLo205 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 AUC 수치로 비교한 그래프이다.
- [33] 도 20는 대장암 세포주인 CoLo205 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 옥살리플라틴 처리 농도에 따른 세포 생존율 수치로 비교한 그래프이다.
- [34] 도 21은 대장암 세포주인 LoVo 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 AUC 수치로 비교한 그래프이다.
- [35] 도 22는 대장암 세포주인 LoVo 세포 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성제 (activator) 포함 유무에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성을 옥살리플라틴 처리 농도에 따른 세포 생존율 수치로 비교한 그래프이다.
- [36] 도 23는 옥살리플라틴에 민감성이 높은 대장암 세포주 (HCT116, RKO, SW620, 및 LS147T) 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성제 (activator) 포함 유무 (EX1 및 EX2)에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성 변화를 AUC 수치로 비교한 그래프이다.
- [37] 도 24는 옥살리플라틴에 민감성이 낮은 대장암 세포주 (HT29, HCT15, CoLo205, 및 LoVo) 기반 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성제 (activator) 포함 유무 (EX1 및 EX2)에 따른 오가노이드의 옥살리플라틴의 저항성 변화를 AUC 수치로 비교한 그래프이다.
- [38] 도 25은 옥살리플라틴에 민감성을 나타내는 HCT-116 대장암 세포주, Ex1의 오가노이드, 및 Ex2의 오가노이드 배양에서 옥살리플라틴, 5-FU, 이리노테칸, 폴리닌 산을 처리하여 약물 반응성을 확인한 데이터이다.
- [39] 도 26은 166T 대장암 환자 오가노이드기반 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성제 (activator) 포함 유무 (EX1 및 EX2)에 따른 배양이 2차원 배양을 했을 경우 (A)와 3차원 배양을 했을 경우 (B) 옥살리플라틴 처리 농도에 따라 세포 생존율이 어떻게 달라지는지를 확인한 데이터이다.

- [40] 도 27은 166T 대장암 환자 오가노이드기반 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 포함 유무 (EX1 및 EX2)에 따른 2차원 배양 및 3차원 배양하여 AUC 수치 및 IC50 값의 변화를 확인하여 비교한 데이터이다.
- [41] 도 28은 오가노이드 배양액에 포함된 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator)를 제외하여 오가노이드 (Ex2)를 생성하였을 때 오가노이드의 특성을 유지하고 있는지 확인하고자 오가노이드 생성 후 5일차에 E-cadherin 및 EpCAM의 발현 정도를 저해제 및 활성화제를 모두 포함하는 기존 오가노이드 (Ex1)의 발현정도와 비교한 데이터이다.
- [42] 도 29는 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 중 어떤 인자가 옥살리플라틴 저항성에 관련되는지 확인하기 위하여 저해제 및 활성화제를 모두 포함하는 오가노이드 배양조건 (Ex1), 모두 포함하지 않는 오가노이드 배양조건 (Ex2), 및 저해제 및 활성화제 중 1개만 포함하고 있는 오가노이드 (Ex2-1 내지 Ex2-6)의 옥살리플라틴에 IC50 값을 비교한 데이터이다.
- [43] 도 30은 저해제 (inhibitor) 및 활성화제 (activator) 중 어떤 인자가 옥살리플라틴 저항성에 관련되는지 확인하기 위하여 저해제 및 활성화제를 모두 포함하는 오가노이드 (Ex1), 모두 포함하지 않는 오가노이드 (Ex2), 및 저해제 및 활성화제 중 1개만 포함하고 있는 오가노이드 (Ex2-1 내지 Ex2-6)의 옥살리플라틴에 AUC 값을 비교한 데이터이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [44] 일 양상은 Advanced DMEM/F12, L-글루타민 (L-glutamine), HEPES, 항생제, B27 보충제 (B27 supplement), N2 보충제 (N2 supplement), N-아세틸시스테인 (N-acetylcysteine), 니코티나마이드 (Nicotinamide), 가스트린 (Gastrin), 및 EGF로 이루어진 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물을 제공하는 것이다.
- [45] 상기 Advanced DMEM/F12는 동물성 세포를 배양하는데 사용되는 기본 배지일 수 있다.
- [46] 상기 L-글루타민은 배지 내에서 단백질 합성 및 주요 에너지원으로 이용되어 세포 농도와 증식 속도에 영향을 주는 것으로, 배지를 구성하는데 필수 성분인 아미노산 중 하나의 성분일 수 있다.
- [47] 상기 HEPES는 배지에서 양쪽 이온성 유기화학적 완충제 역할로, 이산화탄소 농도의 변화에도 불구하고 생리적인 pH를 유지하는 성분일 수 있다.
- [48] 상기 B27 보충제 및 N2 보충제는 배지 내 세포의 분화 및 증식을 촉진시키는 성분일 수 있다.
- [49] 상기 N-아세틸시스테인은 세포 내로 시스테인을 공급하여 항산화 생체분자인 글루타치온의 생합성이 활발히 나타나도록 하여 항산화 효과를 나타내는 성분일 수 있으며, 상기 성분 또한 배지 내 세포의 분화 및 증식을 촉진시키는 성분일 수 있다.

- [50] 상기 니코티나마이드는 세포 배양 보충제로, 세포의 분화에 필요한 성분일 수 있다.
- [51] 상기 가스트린은 상피세포의 유사 분열 인자일 수 있다.
- [52] 상기 EGF는 생리활성단백질로, 세포의 분화에 영향을 미치는 성분일 수 있다.
- [53] 일 구체예에 따르면, 상기 항생제는 페니실린 (Penicilin), 스트렙토마이신 (Streptomycin), 또는 프리모신 (Primocin) 중 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [54] 상기 항생제는 배양하고자 하는 세포만을 선택적으로 배양하기 위하여 사용하는 성분일 수 있다.
- [55] 일 구체예에 따르면, 상기 조성물은 Y-27632, Wnt3a, 또는 노긴 (Noggin) 중 하나 이상을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [56] 상기 Y-27632는 세포 투과성 성분으로, ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) 저해제일 수 있다.
- [57] 상기 Wnt3a는 오가노이드에서 양성 줄기세포의 증식을 유지하는데 필수적인 성분일 수 있다.
- [58] 상기 노긴은 체외에서 분화되지 않는 인간 배아줄기세포의 유지를 위해 필요한 성분일 수 있으며, 단기적으로 세포가 자발적 분화를 하지 않도록 방지하는 성분일 수 있다.
- [59] 상기 옥살리플라틴은 백금 (Platinum) 계열로 분류되는 항암제의 일종으로, DNA의 크로스 링크를 통해 DNA 수선 및 DNA 합성을 억제하는 물질일 수 있다.
- [60] 상기 조성물은 대장암 유래 세포와 함께 배양하므로 옥살리플라틴 약물의 효능을 예측하는 것일 수 있다.
- [61] 상기 대장암은 결장에 생기는 악성 종양을 의미하는 것으로, 예를 들면 대장 내시경 감시 및 생검 (biopsy) 조직에 의해 악성 병리 상태로 분류되는 상태이다.
- [62] 상기 대장암 유래 세포는 선암, 악성 유암종, 평활근육종, 카포시 육종 등에서 유래된 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [63] 상기 대장암 유래 세포는 HCT116, RKO, SW620, LS147T, HT29, HTC15, CoLo205, 및 LoVo 세포주의 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [64] 상기 약물 효능 예측은 환자가 약물 또는 약물 세트에 대해서 질환의 경과 및 결과를 미리 예측하는 행위를 의미한다. 예를 들면, 질환의 치료 후 경과를 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 후 병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것일 수 있으며, 약물 반응성을 예측하는 것일 수 있다.
- [65] 상기 약물 반응성은 개체, 예를 들면 암 질환을 앓고 있는 개체에 대하여 약물로 치료의 유효성의 정도를 지칭한다. 예를 들어, 암 환자의 치료에 관련하여 사용될 때 용어 "증가된 반응성" 또는 "좋은 반응성"은 당해 분야에서 공지된 임의의 방법을 이용하여 측정된 경우 약물의 유효성에서 증가를 의미할 수 있다. 또 다른 예로서, 약물에 대한 암 환자의 반응은 완전 또는 부분 반응으로 특성 규명될 수 있다. 또 다른 예로서, 약물에 대한 암 환자의 증가된 반응성은 전체 생존율,

무질한 생존, 목적 반응 속도, 종양 진행 시간, 무진행 생존 또는 치료 실패까지의 시간으로 규명될 수 있다.

- [66] 상기 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물은 오가노이드로 형성되면서 증가하는 옥살리플라틴에 대한 저항성이 약화된 것으로, 3차원 배양 전 세포의 특성과 유사하게 배양되는 것일 수 있다.
- [67] 일 실시예에 따르면, 상기 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물의 대장암 유래 세포가 옥살리플라틴에 민감성일 때는 옥살리플라틴에 대한 저항성이 감소되어 세포의 AUC 및 IC50 값이 낮게 나오므로 옥살리플라틴에 대한 민감도가 높게 나타났다. 반면, 대장암 유래 세포가 옥살리플라틴에 민감성이 적은 경우, 세포의 AUC 및 IC50 값이 여전히 높게 나오므로 옥살리플라틴에 대한 민감도가 낮다는 것을 확인하였다.
- [68] 일 구체예에 따르면 상기 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물은 오가노이드 형태일 수 있다. 본 명세서 내 용어 "오가노이드 (organoid)"는 3D 입체구조를 갖는 세포를 의미하며, 동물 등에서 수집, 취득하지 않은 인공적인 배양 과정을 통해 제조한 대장암과 유사한 모델을 의미한다. 이를 구성하는 세포의 유래는 제한되지 않는다. 2D 세포 배양과 달리, 3D 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.
- [69] 일 실시예에 따르면, 상기 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물은 2차원 배양에도 유사한 결과가 나타났으나, 3차원 배양인 오가노이드를 제조하였을 때 옥살리플라틴에 대한 저항성이 나타나는 다른 오가노이드 대비 옥살리플라틴의 약물 효능 예측이 용이한 것을 확인하였다.
- [70] 다른 양상은 대장암 유래 세포, Advanced DMEM/F12, L-글루타민 (L-glutamine), HEPES, 항생제, B27 보충제 (B27 supplement), N2 보충제 (N2 supplement), N-아세틸시스테인 (N-acetylcysteine), 니코티나마이드 (Nicotinamide), 가스트린 (gastrin), 및 EGF를 구성으로 이루어진 오가노이드를 배양하는 단계; 배양한 오가노이드에 옥살리플라틴을 처리하는 단계; 및 옥살리플라틴을 처리한 오가노이드의 옥살리플라틴에 대한 민감성을 판단하는 단계;를 포함하는 옥살리플라틴 약물 효능을 예측하는 방법을 제공하는 것이다.
- [71] 상기 대장암, 대장암 유래 세포, Advanced DMEM/F12, L-글루타민 (L-glutamine), HEPES, 항생제, B27 보충제 (B27 supplement), N2 보충제 (N2 supplement), N-아세틸시스테인 (N-acetylcysteine), 니코티나마이드 (Nicotinamide), 가스트린 (gastrin), EGF, 오가노이드, 옥살리플라틴, 약물 효능 예측, 및 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물에 관한 것은 상기에 기재되어있는 내용과 동일하다.
- [72] 일 구체예에 따르면, 상기 오가노이드를 배양하는 단계에 Y-27632, Wnt3a, 또는 노긴 (Noggin) 중 하나 이상을 더 포함하는 것일 수 있다.

- [73] 상기 Y-27632, Wnt3a, 및 노긴 (Noggin)에 관한 것은 상기 기재되어 있는 내용과 동일하다.
- [74] 일 구체예에 따르면, 옥살리플라틴에 대한 민감성은 IC50, AUC 및 세포 생존율을 확인하므로 판단하는 것일 수 있다.
- [75] 상기 배양은 생물체의 조직으로부터 분리된 세포를 배양하는 것을 의미하며, 세포의 종류에 따라 공지된 방법을 따른다. 또한, 상기 배양은 오가노이드를 생성하거나 유지시킬 수 있는 모든 행위를 포함한다.
- [76] 상기 민감성 판단은 판단 방법의 종류를 제한하지 않으며, 공지된 방법에 따라 사용할 수 있다. 예를 들어, 대장암 오가노이드를 이용하여 활성 또는 독성을 검사하는 경우 세포 생존율 확인 방법, 약물대사 활성 측정일 수 있다.
- [77] 예를 들면, 세포가 민감성이 있음을 확인하는 기준은 약물에 대한 세포반응을 100% 라고 가정하여 약물 처리한 후 생존한 세포의 발광 값을 분석하여 정량화된 약물 반응성 수치와 비교할 수 있다.
- [78] 일 실시예에 따르면, 본 발명의 실시예에서 대장암 세포주의 Ex1에서 AUC 평균값은 408.05인 반면, Ex2에서 AUC 평균값은 384.32 였다. 또한, 민감성 대장암 세포주의 경우, Ex1에서 AUC 평균값은 396.08인 반면, Ex2에서 AUC 평균값은 347.78인 것을 확인하였다. 반면, 민감성이 없는 대장암 세포주의 경우, Ex1에서 AUC 평균값은 420.02인 반면, Ex2에서 AUC 평균값은 420.86인 것을 확인하였다. 따라서 EX2의 AUC를 기준으로 384.32이하이거나 또는 Ex2와 Ex1의 차이가 평균인 23.73 이상인 경우를 약물에 민감성이 있다고 판단할 수 있다. 상기 23.73 은 세포주들의 Ex1 평균 AUC에서 Ex2 평균 AUC의 차를 나타내는 것이다.
- [79] 또한, 타논문 [Accuracy of Using a Patient-Derived Tumor Organoid Culture Model to Predict the Response to Chemotherapy Regimens In Stage IV Colorectal Cancer: A Blinded Study, DISEASES OF THE COLON & RECTUM VOLUME 64: 7 (2021)]을 참조하였을 때, IC50가 10uM이하라는 조건을 민감성을 판단에 보조적으로 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [80] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [81]
- [82] **실험예 1. 약물처치를 위한 오가노이드 배양액 제조**
- [83] **1-1. 오가노이드 배양단계**
- [84] 대장암 오가노이드를 제조하기 위하여 Advanced DMEM/F12+++ (이하 'Ad/DF+++')을 사용하였다. Ad/DF+++는 사용 전까지 4°C 냉장 보관하였으며, 세포 세척 시 차가운 상태를 유지하며 사용하였다. Ad/DF 1x (Gibco)와 함께 하기 표 1의 시약을 구성으로 Ad/DF+++ 배양액을 제조하였다.

[85] [표1]

시약	제조사	Cat #	용량
Advanced DMEM/F12	Gibco	12634-028	1x
Glutamax	Gibco	35050-061	1x
HEPES	Gibco	15630-080	1x
Penicillin / Streptomycin	Gibco	15140-122	1x
Primocin	Invivogen	ant-pm-2	100 µg/ml

[86] 상기 시약으로 Ad/DF+++ 배양액을 제조한 후, 메트리젤 (matrigel, Corning #356231)과 Ad/DF+++ 배양액에 현탁한 세포의 비율이 7:3이 되도록 알맞은 양의 메트리젤을 첨가한 후 세포를 적절한 밀도로 저부착 웰 플레이트 (low attachment well plate)에 깔아주었다. 밀도 및 웰 플레이트의 종류와 개수는 각 세포의 특성에 맞춰 결정하였다. 하기 표 2의 조성대로 배양액을 제조하여 3~4일마다 배양액을 교체해 주며 필요한 정도가 될 때까지 배양 (expansion) 하였다.

[87] [표2]

성분	Ex1
Advanced DMEM/F12	1x
Glutamax	1x
HEPES	1x
Penicillin / Streptomycin	1x
Primocin	100 µg/ml
B27 supplement	1x
N2 supplement	1x
N-Acetylcysteine	1 mM
Nicotinamide	10 mM
Gastrin	10 nM
EGF	10 ng/ml
A83-01	500 nM
Y-27632	10 µM
SB 202190	10 µM
Wnt3a	100 ng/ml
R-spondin 1	1 µg/ml
Noggin	100 ng/ml

[88]

[89] 상기와 같이, 오가노이드를 만든 후, 도 1과 같은 순서로 실험을 진행하였다.

[90]

[91] **1-2. Seeding 단계**

[92] 실험에 필요한 만큼 오가노이드가 확장되었다면 메트리젤을 건드리지 않게 유의하며 배양액을 조심스럽게 제거하였다. 차가운 Ad/DF+++ 1ml로 20회정도 파이펫팅(pipeting)하여 세포가 메트리젤로부터 분리될 수 있도록 하였다. 6 웰 플레이트 기준으로 1~4개 웰까지 50 ml 튜브 1개에 모았다. 4개 이상의 웰에서 한 개의 튜브로 세포를 모으게 되면 메트리젤이 제대로 씻기지 않을 수 있기 때문에 여러 개의 튜브에 나눠서 넣었다. 그 후, Ad/DF+++를 20~50ml까지 부어 400g, 4°C에서 3분간 원심분리를 하였다. TrypLE™ Express Enzyme (Gibco, 1264-013) 1~2ml로 풀어 저부착 24 웰 플레이트 (Low-attachment 24 well plate)로 옮긴 후 Y-27632를 10 μ M로 처리하였다. 그 후, 37°C CO₂ 배양기에서 5분간 배양하였다. 20회 정도 파이펫팅 한 후 현미경으로 관찰하여 단세포 (single cell)로 깨졌는지 확인하였으며, 깨지지 않은 경우 다시 CO₂ 배양 및 파이펫팅 과정을 반복하였다. 단세포를 15ml 튜브로 옮긴 후, Ad/DF+++를 10~15ml까지 채운 후 400g, 4°C에서 3분간 원심분리를 하였다. Ad/DF +++로 펠렛 (pellet)을 풀어준 후 세포를 계수 (counting) 하여 필요한 세포 수에 맞게 배양액으로 희석하였다.

[93]

[94] **1-3. 표현형 인자 처리 (Media change 단계)**

[95] 상기 1-2에서 seeding을 하고 12시간이 지난 후, 하기 표 3과 같이 배지를 갈아주고, 배양하여 오가노이드를 제조하였다.

[96] [표3]

성분	Ex1	Ex2
Advanced DMEM/F12	1x	1x
Glutamax	1x	1x
HEPES	1x	1x
Penicillin / Streptomycin	1x	1x
Primocin	100 μ g/ml	100 μ g/ml
B27 supplement	1x	1x
N2 supplement	1x	1x
N-Acetylcysteine	1 mM	1 mM
Nicotinamide	10 mM	10 mM
Gastrin	10 nM	10 nM
EGF	10 ng/ml	10 ng/ml

A83-01	500 nM	-
Y-27632	10 μ M	-
SB 202190	10 μ M	-
Wnt3a	100 ng/ml	-
R-spondin 1	1 μ g/ml	-
Noggin	100 ng/ml	-

[97]

[98] **1-4. 약물처리 및 확인 단계 (Drug treatment 및 Result data)**

[99] 상기 표현형 인자를 처리하고 4시간이 지난 후, 옥살리플라틴 (Oxaliplatin), 5-FU, 이리노테칸 (Irinotecan), 폴리닌 산 (Folinic acid)을 처리하였다. 약물 처리 후, 5일 뒤 ATPlite assay kit (PerkinElmer)를 사용하여 세포 내 ATP 발현을 확인하므로 세포 생존율, IC50, 및 AUC로 데이터로 나타내었다.

[100]

[101] **1-5. 옥살리플라틴에 민감성 판단**

[102] 세포가 민감성이 있음을 확인하는 기준은 약물에 대한 세포반응을 100% 라고 가정하여 약물 처리한 후 생존한 세포의 발광 값을 분석하여 정량화된 약물 반응성 수치와 비교하였다.

[103]

[104] **실시예 1. 옥살리플라틴의 저항성 증가 확인**

[105] 대장암 세포주인 HCT-116와 오가노이드 제작 구성으로 알려져 있는 상기 Ex1 오가노이드 배양액 조건에서 옥살리플라틴, 5-FU, 이리노테칸, 폴리닌 산을 처리하였다.

[106] 그 결과 도 2에서 나타난 바와 같이, 5-FU, 이리노테칸, 폴리닌 산을 처리하였을 때는 대장암 세포주는 오가노이드 배양액 조건에서 약물에 대한 반응이 유사한 결과를 나타내었으나, 옥살리플라틴을 처리하였을 때는 대장암 세포주 대비 Ex1 오가노이드 배양액 조건에서는 세포가 증식되는 것을 확인하므로, 옥살리플라틴 처리시 대장암 세포는 오가노이드 배양액 조건에서 저항성이 증가한다는 점을 확인하였다.

[107]

[108] **실시예 2. 옥살리플라틴에 저항성이 감소하는 오가노이드 확인**

[109] 상기 오가노이드에서 옥살리플라틴에 대한 저항성이 증가하는 요인을 표현형을 변화시키는 활성제(activator) 또는 억제제(inhibitor)에 있다는 가정을 세워 하기 표 4와 같이 활성제 및 억제제를 일부 및 모두 제외시켜 제조한 오가노이드에 옥살리플라틴을 처리하였다.

[110] [표4]

	Ex1	Ex2	Ex3	Ex4
--	------------	------------	------------	------------

Advanced DMEM/F12	1x	1x	1x	1x
Glutamax	1x	1x	1x	1x
HEPES	1x	1x	1x	1x
Penicillin / Streptomycin	1x	1x	1x	1x
Primocin	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
B27 supplement	1x	1x	1x	1x
N2 supplement	1x	1x	1x	1x
N-Acetylcysteine	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Nicotinamide	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Gastrin	10 nM	10 nM	10 nM	10 nM
EGF	10 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml
A83-01	500 nM	-	500 nM	-
Y-27632	10 µM	-	10 µM	-
SB 202190	10 µM	-	10 µM	-
Wnt3a	100 ng/ml	-	-	100 ng/ml
R-spondin 1	1 µg/ml	-	-	1 µg/ml
Noggin	100 ng/ml	-	-	100 ng/ml

[111] 옥살리플라틴에 대한 저항성 감소를 확인하기 위하여, 세포주는 옥살리플라틴에 민감성이 높은 HCT116, RKO, SW620, 및 LS147T 세포주와 옥살리플라틴에 민감성이 낮은 HT29, HTC15, CoLo205, 및 Lovo 세포주를 사용하였다.

[112]

[113] **2-1. HCT116 세포에서 저항성 감소 효과 확인**

[114] 옥살리플라틴에 민감성을 나타내는 HCT116 세포주를 사용하여 상기 표 4와 같이 오가노이드 배양액에서 배양하였다. 배양한 세포주에 Ex1 내지 Ex4과 옥살리플라틴을 처리한 결과, 도 3에서 보이는 바와 같이, 저해제(inhibitor) 또는 활성화제(activator) 인자를 포함하지 않은 Ex3 및 Ex4의 경우 Ex1 보다는 AUC 값이 낮은 결과를 나타내었고, 저해제(inhibitor) 및 활성화제(activator) 인자를 모두 포함하지 않고 제작된 오가노이드 배양조건 Ex2는 Ex1 대비 AUC 값이 현저히 낮아지는 것을 확인하였다. 이것은 옥살리플라틴에 대한 민감도가 증가한 것을 의미하는 것으로, HCT116세포주가 배양조건을 Ex2로 하였을 때 기존 오가노이드 배양조건(Ex1) 대비 옥살리플라틴에 대한 저항성이 증가되는 정도가 감소하는 것을 의미하는 것이다.

- [115] 이를 명확히 비교하고자, HCT116 세포주, 오가노이드 Ex1 및 Ex2에서 옥살리플라틴을 처리한 후 IC50을 확인한 결과, 도 4에서 보이는 바와 같이, 옥살리플라틴에 대한 저항성이 증가된 Ex1 대비 Ex2에서는 HCT116 세포주 IC50값이 유사하게 낮아지는 것을 확인하였다.
- [116] 또한 옥살리플라틴을 농도별로 처리하였을 때, 도 5에서 보이는 바와 같이, 대조군 (McCoy's)인 HCT116 세포와 오가노이드 배양조건 Ex2가 유사하게 세포 생존율이 떨어지는 것을 확인하였다.
- [117]
- [118] **2-2. RKO 세포에서 저항성 감소 효과 확인**
- [119] 옥살리플라틴에 민감성을 나타내는 RKO 세포주를 사용하여 상기 표 4와 같이 오가노이드 배양액에서 배양하였다. RKO 세포주를 기반으로 배양한 세포주에 Ex1 내지 Ex4와 옥살리플라틴을 처리한 결과, 도 6에서 보이는 바와 같이, 활성제 및 저해제를 포함하지 않는 오가노이드 배양조건 Ex2에서 Ex1 대비 가장 많이 AUC 값이 낮아지는 것을 확인하였다.
- [120] 또한, 도 7에서 보이는 바와 같이, IC50 값도 Ex1 대비 Ex2에서 현저히 낮아지는 것을 확인하였다. 도 8에서 보이는 바와 같이, 옥살리플라틴을 농도별로 처리한 결과 대조군인 RKO 세포주 (MEM)이 가장 세포 생존율이 빨리 낮아졌으며, 그 다음 Ex2가 가장 빠르게 낮아지는 것을 확인하였다.
- [121]
- [122] **2-3. SW620 세포에서 저항성 감소 효과 확인**
- [123] 옥살리플라틴에 민감성을 나타내는 SW620 세포주를 사용하여 상기 표 4와 같이 오가노이드 배양액에서 배양하였다. SW620 세포주를 기반으로 배양한 세포주에 Ex1 내지 Ex4와 옥살리플라틴을 처리한 결과, 도 9에서 보이는 바와 같이, 활성제 또는 저해제를 제외한 오가노이드 배양조건 Ex3 및 Ex4는 활성제 및 저해제를 모두 처리한 Ex1과 AUC값에 큰 차이가 없었다. 그러나 활성제 및 저해제를 모두 제외하여 제작한 오가노이드 배양조건 Ex2는 다른 오가노이드 배양조건 대비 AUC 값이 감소한 것을 확인하였다.
- [124] 도 10에서 보이는 바와 같이, IC50 값 또한 옥살리플라틴에 저항성을 나타내는 Ex1 대비 Ex2가 감소하는 것을 확인하였다. 도 11에서 보이는 바와 같이, 세포 생존율 또한 Ex2의 경우, log[oxaliplatin] 값이 1일 때 50%까지 떨어지는 것을 확인하였다.
- [125]
- [126] **2-4. LS147T 세포에서 저항성 감소 효과 확인**
- [127] 옥살리플라틴에 민감성을 나타내는 LS147T 세포주를 사용하여 상기 표 4와 같이 오가노이드 배양액에서 배양하였다. LS147T 세포주를 기반으로 배양한 세포주에 Ex1 내지 Ex4와 옥살리플라틴을 처리한 결과, 도 12에서 보이는 바와 같이, 활성제 또는 저해제를 제외한 오가노이드 배양조건 Ex3 및 Ex4는 활성제 및 저해제를 모두 처리한 Ex1과 AUC값에 차이가 없었다. 그러나 활성제 및 저해제를

모두 제외하여 제작한 오가노이드 배양조건 Ex2는 다른 오가노이드 배양조건 대비 AUC 값이 감소하였으며, LS147 세포주의 AUC 값과 큰 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다.

- [128] IC50 값의 경우, 도 13에서 보이는 바와 같이, Ex2 값이 Ex1 보다 더 높은 값으로 도출되는 것을 확인하였다. 따라서 이 부분을 조금 더 명확히 확인하고자, 도 14에서 보이는 바와 같이, 옥살리플라틴 처리 농도에 따른 세포 생존율을 확인하였으며, Ex2가 가장 LS147 세포주의 변화 그래프와 유사하게 나타나는 것을 확인하였다.

[129]

[130] **2-5. HT29 세포에서 저항성 감소 효과 확인**

- [131] 옥살리플라틴에 민감성을 나타내지 않는 HT29 세포주를 사용하여 상기 표 4와 같이 오가노이드 배양액에서 배양하였다. HT29 세포주를 기반으로 배양한 세포주에 Ex1 내지 Ex4와 옥살리플라틴을 처리한 결과, 도 15에서 보이는 바와 같이, Ex1 내지 Ex3은 유사한 AUC 값을 나타내었으나, Ex4는 Ex1 내지 Ex3보다 약간 낮은 AUC 값을 나타내었다.

- [132] HT29 세포주는 Ex1 내지 Ex4와 옥살리플라틴을 농도별로 처리한 결과, 도 16에서 보이는 바와 같이 배양조건 모두에서 세포 생존율은 떨어지지 않는 것을 확인하였다.

[133]

[134] **2-6. HCT15 세포에서 저항성 감소 효과 확인**

- [135] 옥살리플라틴에 민감성을 나타내지 않는 HCT15 세포주를 사용하여 상기 표 4와 같이 오가노이드 배양액에서 배양하였다. HCT15 세포주를 기반으로 배양한 세포주에 Ex1 내지 Ex4와 옥살리플라틴을 처리한 결과, 도 17에서 보이는 바와 같이, 활성제를 제외시킨 오가노이드 배양조건 Ex2에서 감소하였고 Ex4의 AUC 값도 다른 오가노이드 대비 감소되는 것을 확인하였다.

- [136] 이를 명확히 하고자, 각 오가노이드 및 세포주에 옥살리플라틴을 농도별로 처리하였다. 그 결과 도 18에서 보이는 바와 같이, AUC 값과 유사하게 Ex2 및 Ex4에서 세포 생존율이 log[oxaliplatin] 값이 2일 때 Ex1 및 Ex3 대비 감소하는 경향을 보였으나, 세포 생존율은 50% 이하로는 낮아지지 않는 것을 확인하였다.

[137]

[138] **2-7. CoLo205 세포에서 저항성 감소 효과 확인**

- [139] 옥살리플라틴에 민감성을 나타내지 않는 CoLo205 세포주를 사용하여 상기 표 4와 같이 오가노이드 배양액에서 배양하였다. CoLo205 세포주를 기반으로 배양한 세포주에 Ex1 내지 Ex4에 옥살리플라틴을 처리한 결과, 도 19에서 보이는 바와 같이, 저해제 또는 활성제를 제외하여 제작한 오가노이드 Ex2 내지 Ex4가 Ex1보다 AUC 값이 더 증가되는 것을 확인하였다.

[140] 또한, 도 20에서 보이는 바와 같이, 옥살리플라틴을 농도별로 처리하였을 때 다소 차이는 있었으나, 오가노이드에 포함된 인자와 상관없이 유사한 세포 생존율을 보이는 것을 확인하였다.

[141]

[142] **2-8. LoVo 세포에서 저항성 감소 효과 확인**

[143] 옥살리플라틴에 민감성을 나타내지 않는 LoVo 세포주를 기반으로 오가노이드 배양액에서 배양한 세포주에 Ex1 내지 Ex4에 옥살리플라틴을 처리한 결과, 도 21에서 보이는 바와 같이, 저해제 또는 활성제를 제외하여 제작한 오가노이드 Ex2 내지 Ex4가 Ex1 보다 AUC 값이 더 증가되는 것을 확인하였다.

[144] 또한, 옥살리플라틴의 처리 농도에 따른 세포 생존율을 확인한 결과, 도 22에서 보이는 바와 같이, log [oxaliplatin] 값이 2에 가까워져 오가노이드들의 세포 생존율이 조금 감소하였으나 50% 이하로 감소하지 않는 것을 확인하였다.

[145]

[146] **2-9. 대장암 세포주에서의 Ex1 및 Ex2의 옥살리플라틴 저항성 비교**

[147] 상기 결과들을 가지고 옥살리플라틴에 민감성이 높은 세포주들과 민감성이 낮은 세포주들로 나타내는 결과를 종합하니 도 23, 도 24 및 표 5 내지 표 7과 같은 결과 데이터가 나타났다. 도 23 및 하기 표 5에서 보이는 바와 같이, 옥살리플라틴에 민감성이 높은 세포주의 경우, 저해제와 활성제를 모두 제외한 Ex2에서 Ex1 대비 옥살리플라틴에 대한 민감성이 높아지는 것을 확인하였다. 반면, 옥살리플라틴에 민감성이 낮은 HT29, HTC15, CoLo205, 및 Lovo 세포주의 경우, 도 24 및 표 6에서 보이는 바와 같이, Ex1 및 Ex2에서 옥살리플라틴에 대한 민감성이 차이가 없는 것을 확인하였다. 따라서 저해제 및 활성제를 제외하였을 때, 민감성이 높은 세포주에서는 옥살리플라틴에 대한 저항성이 감소하는 반면, 민감성이 낮은 세포주에서는 옥살리플라틴에 대한 저항성이 변화가 없다는 점을 확인하였다.

[148] 또한, 하기 표 7과 같이 전체적인 세포주의 평균값 차이가 23.73인 것을 확인하므로, 민감성 판단은 전체 세포주의 Ex1 및 Ex2의 평균 AUC 값의 차이를 기준으로 민감성 세포 여부를 판단할 수 있다.

[149] [표5]

Sensitive Cell Line		
normal_AUC	EX1_AUC	EX2_AUC
274.55	396.08	347.78
	EX1-EX2	48.30

[150] [표6]

Resistant Cell Line		
normal_AUC	EX1_AUC	EX2_AUC

391.80	420.02	420.86
	EX1-EX2	-0.85

[151] [표7]

Total Cell Line		
normal_AUC	EX1_AUC	EX2_AUC
330.83	408.05	384.32
	EX1-EX2	23.73

[152] 실시예 3. 대장암 세포주에서 Ex1 및 Ex2의 약물 반응성 변화 비교

[153] 옥살리플라틴에 민감한 대장암 세포주인 HCT-116과 상기 Ex1 및 Ex2 조건의 오가노이드 배양액에 옥살리플라틴, 5-FU, 이리노테칸, 폴리닌 산을 처리하여, 약물 반응성 변화를 비교하였다.

[154] 그 결과, 도 25에서 보이는 바와 같이, 5-FU, 이리노테칸, 및 폴리닌 산을 처리하였을 때는 대장암 세포주는 오가노이드 배양액 조건에서 약물에 대한 반응이 유사한 결과를 나타내었다. 반면, 옥살리플라틴을 처리하였을 때는 대장암 세포주 대비 Ex1 오가노이드 배양액 조건에서는 옥살리플라틴 저항성이 높지만 Ex2에서 저항성이 감소하여 옥살리플라틴의 민감도가 향상된다는 것을 확인하였다.

[155]

[156] 실시예 4. 2D 배양과 3D 배양에 따른 차이 확인

[157] 상기 배지 조성물로 2차원 배양과 3차원 배양에 따른 차이를 확인하기 위하여 166T CoLvM 환자유래오가노이드를 2차원 배양조건과 3차원 배양조건으로 배양하여 확인하였다.

[158] 그 결과 도 26 및 도 27에서 보이는 바와 같이, 2차원 배양에서는 Ex1 배지가 대조군 (CRC)인 세포주와 유사하게 세포 생존율을 나타내었으나, 3차원 배양시에는 대조군 (CRC)인 세포주보다 높은 세포 생존율을 가지므로 옥살리플라틴에 대한 저항성을 나타내는 것을 확인하였다.

[159] 그러나 Ex2의 경우, 세포에 따라 차이가 있었으나, 2차원 배양 및 3차원 배양을 하였을 때 대조군과 유사한 수치로 세포 생존율을 나타내는 것을 확인하였다.

[160]

[161] 실시예 5. 오가노이드 특성 확인

[162] 기존 오가노이드 배양시 필요한 저해제(inhibitor) 및 활성화제(activator)를 제외하여 오가노이드를 제작하였을 때 오가노이드 특성을 유지하고 있는지를 확인하기 위하여, 오가노이드를 제작한 후 5일차에 배양액의 E-cadherin 및 EpCAM 발현을 면역형광법 (E-cadherin (24E10) Rabbit mAb (제조사: Cellsignaling/ 3195S), Alexa Fluor 647 anti-human CD326(EpCAM) Antibody (제조사: Biolegend/324212), Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG (제조사: Invitrogen/A-11008), Hoechst33342 (제조사: Life technologies/H3570) 항체)을 사용하여 확인하였다.

[163] 그 결과 도 28에서 보이는 바와 같이, Ex1과 Ex2에서 E-cadherin 및 EpCAM은 큰 차이가 없는 것을 확인하므로, 5일차까지는 저해제 및 활성화제를 모두 제외하여 제작한 오가노이드도 오가노이드로써의 특성을 유지한다는 것을 확인하였다.

[164]

[165] 실시예 6. 옥살리플라틴에 저항성이 감소하는 인자 확인

[166] 상기 Ex2 오가노이드에서 옥살리플라틴에 대한 저항성이 감소하는 요인을 확인하기 위하여, Ex2 오가노이드 구성에서 표현형을 변화시키는 활성화제(activator) 또는 억제제(inhibitor) 요소를 하나씩 첨가하여 하기 표 8과 같이 오가노이드를 제작한 후, 저항성 증가 여부를 확인하였다.

[167] [표8]

	Ex1	Ex2	Ex2-1	Ex2-2	Ex2-3	Ex2-4	Ex2-5	Ex2-6
Advanced DMEM/ F12	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
Glutamax	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
HEPES	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
Penicillin / Strepto mycin	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
Primocin (μg/ml)	100	100	100	100	100	100	100	100
B27 supplement	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
N2 supplement	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
N-Acetylcysteine (m M)	1	1	1	1	1	1	1	1
Nicotinamide (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10
Gastrin (nM)	10	10	10	10	10	10	10	10
EGF (ng/ml)	10	10	10	10	10	10	10	10
A83-01(nM)	500	-	500	-	-	-	-	-
Y-27632 (μM)	10	-	-	10	-	-	-	-
SB 202190 (μM)	10	-	-	-	10	-	-	-
Wnt3a (μg/ml)	100	-	-	-	-	100	-	-
R-spondin 1 (μg/ml)	1	-	-	-	-	-	1	-
Noggin (ng/ml)	100	-	-	-	-	-	-	100

[168] 그 결과, 도 29 내지 도 30, 및 하기 표 9에서 보이는 바와 같이, Ex2보다 활성화제인 Y-27632, 저해제인 Wnt3a, Noggin 중 하나를 포함하는 Ex2-2, Ex2-4, Ex2-6가

옥살리플라틴을 처리하였을 때 AUC 및 IC₅₀ 값이 세포주인 HCT116 (McCoys, 대조군)와 유사한 값을 나타내는 것을 확인하였다.

[169] [표9]

	1차		2차		3차		평균	
	IC ₅₀ (uM)	AUC	IC ₅₀ (uM)	AUC	IC ₅₀ (uM)	AUC	IC ₅₀ (uM)	AUC
McCoys	24.1	312.3	10.7	278.4	28.8	307.3	21.2	299.3
Ex1	133.0	379.7	98.0	379.9	167.3	390.0	132.8	383.2
Ex2	27.8	319.8	46.1	324.8	40.5	331.7	38.1	325.4
Ex2-1	46.0	328.0	52.2	341.6	81.8	342.0	60.0	337.2
Ex2-2	13.0	284.9	38.4	320.5	16.0	301.0	22.5	302.1
Ex2-3	30.2	306.6	63.4	343.3	18.2	287.0	37.3	312.3
Ex2-4	5.9	258.2	38.8	304.7	26.9	315.9	23.8	292.9
Ex2-5	34.0	317.5	43.0	322.7	103.0	351.6	60.0	330.6
Ex2-6	7.8	264.3	41.4	309.4	22.1	292.6	23.8	288.8

청구범위

- [청구항 1] Advanced DMEM/F12, L-글루타민 (L-glutamine), HEPES, 항생제, B27 보충제 (B27 supplement), N2 보충제 (N2 supplement), N-아세틸시스테인 (N-acetylcysteine), 니코티나마이드 (Nicotinamide), 가스트린 (gastrin), 및 EGF로 이루어진 옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 항생제는 페니실린 (Penicilin), 스트렙토마이신 (Streptomycin), 또는 프리모신 (Primocin) 중 하나 이상을 포함하는 것인,
옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 조성물은 Y-27632, Wnt3a, 또는 노긴 (Noggin) 중 하나 이상을 더 포함하는 것인,
옥살리플라틴 약물 효능 예측용 조성물.
- [청구항 4] 대장암 유래 세포, Advanced DMEM/F12, L-글루타민 (L-glutamine), HEPES, 항생제, B27 보충제 (B27 supplement), N2 보충제 (N2 supplement), N-아세틸시스테인 (N-acetylcysteine), 니코티나마이드 (Nicotinamide), 가스트린 (gastrin), 및 EGF를 구성으로 이루어진 오가노이드를 배양하는 단계;
배양한 오가노이드에 옥살리플라틴을 처리하는 단계; 및
옥살리플라틴을 처리한 오가노이드의 옥살리플라틴에 대한 민감성을 판단하는 단계;를 포함하는 옥살리플라틴 약물 효능을 예측하는 방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 오가노이드를 배양하는 단계에 Y-27632, Wnt3a, 또는 노긴 (Noggin) 중 하나 이상을 더 포함하는 것인,
옥살리플라틴 약물 효능을 예측하는 방법.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서,
옥살리플라틴에 대한 민감성은 IC50, AUC 및 세포 생존율을 확인하므로 판단하는 것인,
옥살리플라틴 약물 효능을 예측하는 방법.