



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월08일  
(11) 등록번호 10-2693565  
(24) 등록일자 2024년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/09 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0693 (2013.01)  
G01N 33/5011 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-0165265  
(22) 출원일자 2022년11월30일  
심사청구일자 2022년11월30일  
(65) 공개번호 10-2024-0081223  
(43) 공개일자 2024년06월07일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR102168088 B1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
오가노이드사이언스 주식회사  
경기도 성남시 분당구 판교로 338, 6층(삼평동, 한국전자무역센터)  
(72) 발명자  
김사랑  
경기도 성남시 분당구 판교로 331, 501호  
이보은  
경기도 성남시 분당구 판교로 331, 501호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인아이피센트

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 김정태

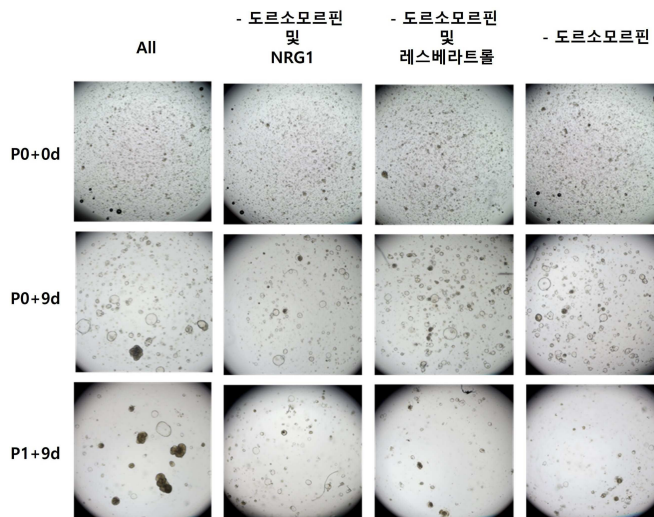
(54) 발명의 명칭 암 오가노이드 제조용 배지 조성물

(57) 요약

본 발명은 암 오가노이드 제조용 배지 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 배지 조성물로 배양하는 단계를 포함하는 암 오가노이드의 제조방법, 및 상기 제조방법으로 제조된 암 오가노이드에 관한 것이다.

본 발명의 암 오가노이드 제조용 배지는 암 오가노이드의 증식을 촉진시키고, 암 오가노이드의 줄기세포능을 유지시킬 수 있다. 따라서, 상기 배지는 품질이 균질한 암 오가노이드를 단시간 내에 많은 양으로 제조하는데 활용될 수 있고, 상기 배지로 제조된 암 오가노이드를 이용하여 암세포 증식/전이 및 항암제 내성 등에 미치는 영향을 직접 관찰할 수도 있으며, 약물 스크리닝 플랫폼의 개발에 활용되어 환자 특이적인 항암제 저항성을 미리 확인하는데 이용될 수 있다. 또한, 약물 처리에 따른 유전자 발현 조절 등을 관찰함으로써 암치료 목적의 분자기전 연구에 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/727 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

(72) 발명자

**양우경**

경기도 성남시 분당구 판교로 331, 501호

**김동현**

경기도 성남시 분당구 판교로 331, 501호

**편다빈**

경기도 성남시 분당구 판교로 331, 501호

**김시나**

경기도 성남시 분당구 판교로 331, 501호

**최우희**

경기도 성남시 분당구 판교로 331, 501호

**신유리**

경기도 성남시 분당구 판교로 331, 501호

**정예림**

경기도 성남시 분당구 판교로 331, 501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465035903
과제번호	HI21C0651010022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질병중심 중개연구사업
연구과제명	고정밀 치료 반응 예측 모델 개발을 위한 폐암 환자 유래 오가노이드 기반 면역항암
제 평가 플랫폼 구축	
기여율	1/1
과제수행기관명	오가노이드사이언스(주)
연구기간	2021.04.01 ~ 2023.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

도르소모르핀(Dorsomorphin)을 포함하는, 암 오가노이드 제조 촉진용 배지 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 대장암, 췌장암, 폐암, 담도암 및 위암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 것인, 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 기본 배지(basal media)를 추가적으로 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 기본 배지는 DMEM, MEM, BME, RPMI1640, F-10, F-12,  $\alpha$ -MEM, GMEM, IMDM, DMEM/F12 또는 어드밴스드(Advanced) DMEM/F12인, 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 NRG1을 추가적으로 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 항산화제를 추가적으로 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 NRG1 및 항산화제를 추가적으로 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 항산화제는 발프로산(Valproic acid), 붕산(Boric acid), 레스베라트롤(Resveratrol), 에다라본(Edaravone) 및 아스코르브산(Ascorbic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인, 조성물.

#### 청구항 9

제1항의 배지 조성물로 개체에서 분리된 암 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 암 오가노이드 제조방법.

#### 청구항 10

제1항의 배지 조성물로 개체에서 분리된 암 세포를 배양하여 암 오가노이드를 제조하는 단계; 및  
상기 암 오가노이드에 항암제를 처리하는 단계;를 포함하는, 항암제 효능 평가 방법.

**청구항 11**

제1항의 배지 조성물로 개체에서 분리된 암 세포를 배양하여 암 오가노이드를 제조하는 단계; 및 상기 암 오가노이드에 항암제 후보물질을 처리하는 단계;를 포함하는, 항암제 스크리닝 방법.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 암 오가노이드 제조용 배지 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 배지 조성물로 배양하는 단계를 포함하는 암 오가노이드의 제조방법, 및 상기 제조방법으로 제조된 암 오가노이드에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 줄기세포는 특유의 분화능력(multi-potency)과 자기재생(self-renewal) 특징을 가지고 있음에 따라, 이를 불치병의 치료, 질병 모델링, 조직 또는 기관의 이식 및 약효 평가 등에 다양하게 활용하기 위한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 특히, 줄기세포를 적절한 3차원 실험관 환경에서 배양하는 경우 생체 내 기관과 유사한 구조 및 조직 특성 갖는 세포 덩어리가 형성된다는 사실이 밝혀졌으며, 이와 같은 세포 덩어리는 오가노이드라 명명된다.

[0004] 오가노이드 제작기술은 이론적으로 줄기세포만으로 거의 모든 종류의 장기를 제작할 수 있기 때문에 다양한 치료제의 약효 평가 또는 스크리닝이나 조직 또는 기관으로의 이식에 활용될 것으로 기대되고 있다. 오가노이드는 2차원에서 만든 세포 조직보다 신약의 안전성과 효능을 시험하는데 더 효과적일 수 있으며, 손상되거나 제대로 발달하지 못한 장기에 이식됨으로써 상태를 개선하는데 활용할 수 있을 것으로 여겨진다. 이에 따라 최근 재생 의학 관점에서도 오가노이드 관련 연구가 더욱 활발해지는 추세에 있으며, 여러 분야에 오가노이드를 널리 이용할 수 있을 것으로 전망되고 있다.

[0005] 그러나, 오가노이드의 제조 및 배양기술은 아직 연구 초기 단계 수준으로, 배지 첨가 물질의 조합 또는 비율을 확립하는 등의 제조 및 배양 방법에 대한 다양한 연구가 수행되어야 할 필요가 있다. 관련하여, 증식 가능한 간 오가노이드 분화용 배지 조성물 및 이를 이용한 간 오가노이드의 제조방법, 뇌 오가노이드 제조 방법 등이 개발된 바 있으나, 각 기관에 맞는 배지 조성물 및 이를 활용한 오가노이드의 제조방법에 대한 개발이 여전히 요구되고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 이에, 본 발명자들은 품질이 균질한 암 오가노이드를 효율적으로 제조하기 위한 다양한 연구를 진행하였다. 그 결과, 다양한 배지 성분 중에서도 암 오가노이드의 증식 촉진 및 줄기세포능 유지를 극대화시킬 수 있는 조합을 확인하였고, 이의 효과를 실험적으로 입증함에 따라 본 발명을 완성하였다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0010] 또한, 본 명세서에서 특별히 정의되지 않은 용어들에 대해서는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것으로 이해되어야 할 것이다. 또한, 문맥상 특별히 정의하지 않은 경우라면, 단수는 복수

를 포함하며, 복수는 단수를 포함한다.

- [0012] 본 발명의 하나의 양태는 도르소모르핀(Dorsomorphin)을 포함하는, 암 오가노이드 제조용 배지 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 배지 조성물은 암 오가노이드의 증식을 촉진하여 단시간 내에 많은 수의 암 오가노이드를 형성시킬 수 있으며, 형성된 암 오가노이드는 줄기세포능(stemness)이 유지되어 균질한 품질이 보장된다. 이에 따라, 본 발명의 배지 조성물은 재생치료제, 약물 스크리닝 등의 다양한 분야에서 적용될 수 있는 암 오가노이드의 제조에 유용하게 활용 가능하다.
- [0014] 본 명세서에서 사용되는 용어, "오가노이드(organoid)"는 3D 입체구조를 가지는 세포덩어리를 의미한다. 동물 등에서 수집, 취득, 채취하지 않고 인공적인 배양 과정을 통하여 제조한 것으로서, 축소되고 단순화된 버전의 기관으로 정의된다. 오가노이드는 장기배양, 동결보존이 가능하고 조작과 관찰이 용이하다는 장점을 가진다. 동시에 불멸화가 필요 없어 그에 따른 세포의 본래 특성이 유지됨은 물론 생체 내에서만 볼 수 있었던 세포의 계층적, 조직학적 구조를 재현함으로써 세포보다 한 단계 높은 차원의 생리현상을 연구할 수 있는 실험 모델이다.
- [0015] 본 명세서에서 사용되는 용어, "암 오가노이드"는 생체 내 암과 동일하거나 유사한 구조, 세포 구성 및 기능을 보유한 오가노이드를 말하며, 암 조직에서 유래한 세포 또는 암 세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 상기 "암 오가노이드"는 "종양 오가노이드" 또는 "튜머로이드"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0016] 상기 암은 대장암, 췌장암, 폐암, 담도암, 위암, 간암, 결장암, 소장암, 뇌암, 뼈암, 흑색종, 유방암, 경화성신증, 자궁암, 자궁경부암, 두경부암, 식도암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 육종, 전립선암, 요도암, 방광암, 혈액암, 백혈병, 림프종, 섬유선종 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명에서, 상기 암 오가노이드는 3계대 이상 배양되거나, 5계대 이상 배양되거나, 또는 10계대 이상 배양되는 것일 수 있다.
- [0018] 본 명세서에서 사용되는 용어, "계대"는 세포 또는 오가노이드를 건강한 상태로 지속적으로 장기간 배양하기 위해 세포의 대를 계속 이어서 배양하는 방법에 있어서, 배양용기를 교체하는 것 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 의미한다. 계대가 증가할수록 많은 수의 오가노이드를 수득할 수 있다. 1계대는 1차례 배양용기를 교체하거나, 또는 1차례 세포군을 나누어 배양하는 것이며, 20계대는 20차례 배양용기를 교체하거나, 또는 20차례 세포군을 나누어 배양하는 것이다. 상기 1계대는 1 내지 10일 동안 수행되는 것일 수 있다. 본 명세서에서, 상기 "계대"는 "세대"와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 사용되는 용어, "도르소모르핀(Dorsomorphin)"은 6-[4-(2-피페리딘-1-일에톡시)페닐]-3-피리딘-4-일피라졸로[1,5-a]피리미딘(6-[4-(2-Piperidin-1-ylethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-ylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine)으로 명명되는 화합물을 의미한다. 상기 화합물은 BMP(Bone Morphogenetic protein) 신호전달의 선택적 억제제로, 배아 발생에 필요한 BMP 신호를 억제하고, 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem cell, hPSC)에서 신경 분화를 현저하게 촉진한다. 또한, 선택적, 가역적 AMPK(adenosine monophosphate-activated protein kinase)로서 기능하여 암 세포주에서 자가포식(autophagy)을 유도한다.
- [0020] 본 발명에서는, 상기 도르소모르핀을 포함하는 배지로 암 오가노이드를 제조하는 경우, 암 오가노이드 증식이 촉진되어 수득할 수 있는 암 오가노이드의 수가 현저히 증가될 뿐만 아니라, 암 오가노이드 증식 속도가 증가되어 단시간 내에 원하는 양의 암 오가노이드를 수득할 수 있게 해준다. 또한, 본 발명에 따라 제조되는 암 오가노이드는 계대배양 횟수가 늘어나거나 장기간 배양되더라도 줄기세포능을 우수한 수준으로 유지할 수 있으므로, 이러한 암 오가노이드를 이용하여 보다 높은 정확도로 항암제의 효능을 평가하거나 항암제를 스크리닝 할 수 있게 된다. 상기 도르소모르핀의 배지 내 포함량은 암, 세포 또는 오가노이드의 종류에 따라 당업계의 기술적 수준에서 용이하게 선택할 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 사용되는 용어, "제조"는 "배양" 또는 "증식"과 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있다. 따라서, 상기 암 오가노이드의 제조용 배지 조성물은 암 오가노이드의 배양용 배지 조성물일 수 있고, 또한 암 오가노이드의 형성용 배지 조성물일 수 있으며, 또한 암 오가노이드의 확장용 배지 조성물일 수 있다. 이때, 상기 "형성"은 암 유래 세포에서 암 오가노이드를 형성하는 것을 의미하며, 암의 고유한 기능을 수행할 수 있도록 기관 또는 조직 특성을 나타내는 것을 의미한다. 또한, 상기 "확장"은 형성된 암 오가노이드의 수를 증가시킴으로써 목적하는 용도로 사용할 수 있는 충분한 양을 수득하기 위한 것을 의미한다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어, "배지"는 인비트로(in vitro)에서 세포 또는 오가노이드의 성장, 생존, 확장 또

는 분화를 가능하게 하는 영양 물질의 혼합물을 의미하며, 당업계에서 사용되는 적절한 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포 또는 오가노이드의 종류에 따라 당업계의 기술적 수준에서 배지의 종류와 배양 조건을 선택할 수 있다. 상기 배지는 탄소원, 질소원 및 미량원소를 포함하는 세포 배양용 기본 배지(basal media)일 수 있으며, 구체적인 예로서, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12,  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -Minimal essential Medium), GMEM (Glasgow's Minimal essential Medium), IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) 또는 어드밴스드(Advanced) DMEM/F12일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0023] 오가노이드는 통상적으로 2종의 배양 배지를 사용하여 제조되어 왔다. 예로서, 대상체로부터 채취한 또는 분리한 세포 또는 조직으로부터 오가노이드를 형성시키고, 크기를 성장시키기 위한 오가노이드 형성 배지가 사용되고, 이어서 상기 형성 배지를 제거한 후에 오가노이드의 수를 증가시키기 위한 오가노이드 확장 배지가 사용되었다. 오가노이드 형성 배지와 확장 배지는 서로 다른 성분으로 구성될 경우, 그 절차가 번거롭고 복잡하며 비용 및 시간이 많이 소요된다는 단점이 있다.
- [0024] 또한, 오가노이드는 그 특성상 배양 조건에 따라 제조 결과가 현저히 달라지는 특징을 갖는다. 배양 조건의 예로서, 배양일, 배양 온도, 배양 배지, 배양 기질 등의 배양 조건이 오가노이드의 특성을 결정하는 중요한 요인이며, 그 중에서도 배지 조건이 줄기세포에 다양한 신호전달 경로를 조절함으로써 오가노이드가 원하는 조직 또는 기관과 유사한 특성을 갖도록 성장시키는데 가장 큰 역할을 수행한다.
- [0025] 본 발명에서는, 생체 내 조직과 형태 및 기능이 동일하거나 매우 유사하고, 특히 증식능 및 줄기세포능이 증가하여 약물의 스크리닝 또는 약효 평가 등에 활용할 수 있는 정도로 충분한 수의 암 오가노이드를 수득할 수 있는 배지 조건은 도르소모르핀을 포함하는 것임을 확인하였다. 나아가, 상기 배양 배지를 사용하는 경우에는 2종류 이상의 배양 배지를 사용하지 않고, 1 종류의 배양 배지만을 사용하여도 대장암 오가노이드의 형성, 성장 및 확장을 성공적으로 유도할 수 있고 그 속도를 증가시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0026] 또한, 본 발명의 암 오가노이드 제조용 배지 조성물은 NRG1을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 사용되는 용어, "NRG1"은 *NRG1* 유전자에 의해 인코딩되는 뉴레귤린1(Neuregulin 1) 단백질을 의미한다. 이의 단백질 서열 등에 대한 정보는 공지된 데이터베이스(NCBI Reference Sequence: NP\_001153467, NP\_001153468, NP\_001153471, NP\_001153473, NP\_001153474) 등을 통해 확인할 수 있다. 상기 NRG1은 본 발명의 배지 조성물에 1 내지 100 nM의 농도, 예를 들어 50 nM의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 또한, 본 발명의 암 오가노이드 제조용 배지 조성물은 항산화제(Antioxidant)를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 항산화제는 바람직하게는 발프로산(Valproic acid), 붕산(Boric acid), 레스베라트롤(Resveratrol), 에다라본(Edaravone) 및 아스코르브산(Ascorbic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이며, 더 바람직하게는 붕산(Boric acid), 레스베라트롤(Resveratrol), 에다라본(Edaravone) 및 아스코르브산(Ascorbic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이다.
- [0029] 상기 도르소모르핀, NRG1 및 항산화제의 입수 경로는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 시판되는 물질을 사용하거나, 당업계에 공지된 방법에 따라 유전자(단백질) 재조합 기술을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 배지 조성물은 암 오가노이드 제조 촉진용 배지 조성물일 수 있다. 또한, 본 발명의 배지 조성물은 암 오가노이드 제조 속도 증가용 배지 조성물일 수 있다. 또한, 본 발명의 배지 조성물은 암 오가노이드 형성, 성장 또는 확장 촉진용 배지 조성물일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 배지 조성물로 개체에서 분리된 암 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 암 오가노이드의 제조방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명에 따른 암 오가노이드의 제조방법에서, 각 용어는 특별히 언급하지 않는 한 상기 암 오가노이드의 제조용 배지 조성물에서 설명한 바와 동일한 의미를 갖는다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 용어, "개체"는 암이 발병된 적이 없는 개체, 발병될 가능성이 있는 개체, 발병된 개체, 또는 발병된 후 완치된 개체를 모두 포함하며, 인간 또는 임의의 비인간 동물 등을 제한 없이 포함할 수 있다. 상기 비인간 동물은 척추동물, 예컨대 영장류, 개, 소, 말, 돼지, 설치류, 예컨대 마우스, 래트, 햄스터, 기니피그 등일 수 있다. 본 명세서에서, 상기 "개체"는 "대상체" 또는 "환자"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

- [0034] 상기 개체에서 분리된 암 세포는 줄기세포를 포함할 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 분리된 암 세포는 암 조직을 절단하는 과정 및 효소 분해 과정을 통해 분리되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 절단은 물리적인 절단 또는 기계적인 절단을 모두 포함하며, 당업계에서 알려진 일반적인 조직의 절단 방법으로 수행될 수 있다. 또한, 상기 효소 분해는 당업계에서 알려진 일반적인 효소 분해 조건으로 수행될 수 있으며, 예로서 디스파아제(dispase) II, DNA 분해효소(DNase) I 및 콜라게나제 (collagenase) II로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 효소를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0036] 또한, 배양일, 배양 온도, 배양 기질 등의 배양 조건은 오가노이드의 배양에 있어서 당업계에서 통상적으로 사용되는 조건으로 수행될 수 있으며, 당업자라면 본 발명의 목적에 맞는 방법을 사용할 수 있을 것이다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 암 오가노이드의 제조방법으로 제조된, 암 오가노이드를 제공한다.
- [0039] 본 발명에 따른 암 오가노이드에서, 각 용어는 특별히 언급하지 않는 한 상기 암 오가노이드 제조용 배지 조성물에서 설명한 바와 동일한 의미를 갖는다.
- [0040] 본 발명에 따른 암 오가노이드는 줄기세포능을 유지하고 있으며, 인간의 대장암과 매우 유사한 조직학적 구성 및 기능을 가지고 있어 종양에 대한 치료제 또는 항암제의 스크리닝 또는 효능 평가 등에 유용하게 활용될 수 있다. 특히, 상기 암 오가노이드가 환자 유래의 세포 또는 조직을 사용하여 제조되는 경우, 환자 특이적인 항암제 내성, 불응성 또는 저항성을 미리 확인하는데 이용될 수 있다. 암 환자는 대부분 잔존 수명이 짧기 때문에 본인에게 가장 효과적인 항암제를 빠른 시간 내에 찾아서 치료받을 필요가 있는데, 이를 위해 최근에는 맞춤형 의료(personalized medicine) 및 정밀의료(precision medicine)가 개발되고 있으며, 본 발명에 따라 특정 환자의 암 조직에서 유래된 암 오가노이드는 매우 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 상기 암 오가노이드를 사용하여 약물 처리에 따른 유전자 발현 조절 등을 관찰함으로써 암치료 목적의 분자기전 연구에 기여할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 암 오가노이드에 항암제를 처리하는 단계를 포함하는, 항암제 효능 평가 방법을 제공한다.
- [0043] 환자 암 조직 유래 암 오가노이드는 실제 암 조직과 매우 유사하여, 인비트로(*in vitro*)에서 환자 고유의 유전형 및 표현형이 잘 유지되는 장점이 있는 바, 종양에 대한 치료제 또는 항암제 저항성을 극복할 수 있는 약효 평가에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0044] 본 명세서에서 사용되는 용어, "항암제 저항성"은 "항암제 내성" 또는 "항암제 불응성"으로도 불리며, 항암제를 이용하여 암 환자를 치료할 때 치료 초기부터 효과가 없거나, 초기에는 효과가 있으나 지속적인 치료 과정에서 효과가 감소 또는 상실되거나, 또는 치료에 대한 반응이 장기간 동안 지속되지 않는 것을 의미한다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 암 오가노이드에 항암제 후보물질을 처리하는 단계를 포함하는, 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0047] 환자 암 조직 유래 암 오가노이드는 실제 암 조직과 매우 유사하여, 인비트로(*in vitro*)에서 환자 고유의 유전형 및 표현형이 잘 유지되는 장점이 있는 바, 항암제 후보물질을 상기 암 오가노이드에 처리한 후, 암 오가노이드의 증식능, 전이능 및 항암제 저항성을 측정함으로써, 상기 암 오가노이드를 항암제 스크리닝 플랫폼에 유용하게 활용할 수 있다.
- [0048] 본 명세서에서 사용되는 용어, "후보물질"은 암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질을 의미한다. 구체적으로, 암세포의 성장, 이동, 전이를 억제 또는 호전시키거나, 또는 암세포의 사멸을 증가시킬 수 있을 것으로 예상되는 물질이면 제한 없이 사용 가능하며, 화합물, 유전자 또는 단백질 등의 치료가능 예상물질을 모두 포함한다.
- [0049] 본 발명에 따른 항암제 효능 평가 방법 또는 항암제 스크리닝 방법에서, 각 용어는 특별히 언급하지 않는 한 상기 암 오가노이드 제조용 배지 조성물에서 설명한 바와 동일한 의미를 갖는다.

**발명의 효과**

- [0051] 본 발명의 암 오가노이드 제조용 배지는 암 오가노이드의 증식을 촉진시키고, 암 오가노이드의 줄기세포능을 유지시킬 수 있다. 따라서, 상기 배지는 품질이 균질한 암 오가노이드를 단시간 내에 많은 양으로 제조하는데 활용될 수 있고, 상기 배지로 제조된 암 오가노이드를 이용하여 암세포 증식/전이 및 항암제 내성 등에 미치는 영향을 직접 관찰할 수도 있으며, 약물 스크리닝 플랫폼의 개발에 활용되어 환자 특이적인 항암제 저항성을 미리

확인하는데 이용될 수 있다. 또한, 약물 처리에 따른 유전자 발현 조절 등을 관찰함으로써 암치료 목적의 분자 기전 연구에 기여할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0053] 도 1은 서로 다른 주요 성분이 포함된 배지로 제조된 암 오가노이드의 모습을 보여주는 이미지이다. "A11"은 도르소모르핀(Dorsomorphin), NRG1 및 레스베라트롤(Resveratrol)을 포함하는 배지, "-도르소모르핀 및 NRG1"은 도르소모르핀 및 NRG1을 제외하고, 레스베라트롤을 포함하는 배지, "-도르소모르핀 및 레스베라트롤"은 도르소모르핀 및 레스베라트롤을 제외하고, NRG1을 포함하는 배지, "-도르소모르핀"은 도르소모르핀을 제외하고, NRG1 및 레스베라트롤을 포함하는 배지를 의미한다. "P0+0d"는 배양 후 0일(day)에 촬영한 사진이고, "P0+9d"는 배양 후 9일에 촬영한 사진이고, "P1+9d"는 배양 시작 후 1번 계대배양한 후 9일에 촬영한 사진이다(하기 도 2에서도 동일함).

도 2는 서로 다른 성분의 배지로 제조된 암 오가노이드의 성장률을 보여주는 그래프이다.

도 3은 주요 성분으로 도르소모르핀, NRG1 및 항산화제를 포함하는 배지에서, 항산화제 유형이 서로 다른 배지로 제조된 암 오가노이드의 모습을 보여주는 이미지이다. "+발프로산"은 항산화제로 발프로산(Valproic acid)을 포함하는 배지, "+붕산"은 항산화제로 붕산(Boric acid)을 포함하는 배지, "+레스베라트롤"은 항산화제로 레스베라트롤을 포함하는 배지, "+에다라본"은 항산화제로 에다라본(Edaravone)을 포함하는 배지, "+아스코르브산"은 항산화제로 아스코르브산(Ascorbic acid)을 포함하는 배지를 의미한다. "P6+0d"는 배양 시작 후 6번 계대배양한 후 0일에 촬영한 사진이고, "P6+3d"는 배양 시작 후 6번 계대배양한 후 3일에 촬영한 사진이고, "P6+10d"는 배양 시작 후 6번 계대배양한 후 10일에 촬영한 사진이다(하기 도 4에서도 동일함).

도 4는 주요 성분으로 도르소모르핀, NRG1 및 항산화제를 포함하는 배지에서, 항산화제 유형이 서로 다른 배지로 제조된 암 오가노이드의 성장률을 보여주는 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다.

[0056] **실시예 1. 배지 조성에 따른 암 오가노이드 배양**

[0057] 암 오가노이드를 배양하기 위한 기본 배지로서 어드밴스드(Advanced) DMEM F/12를 사용하였으며, 여기에 도르소모르핀(Dorsomorphin), NRG1 (Neuregulin 1), 항산화제(Antioxidant)를 선택적으로 사용하였다. 구체적으로 실험군은 다음과 같이 구분하였다.

[0058] (1) "A11": 도르소모르핀, NRG1 및 레스베라트롤 포함

[0059] (2) "-도르소모르핀 및 NRG1": 도르소모르핀 및 NRG1을 제외하고, 레스베라트롤 포함

[0060] (3) "-도르소모르핀 및 레스베라트롤": 도르소모르핀 및 레스베라트롤을 제외하고, NRG1 포함

[0061] (4) "-도르소모르핀": 도르소모르핀을 제외하고, NRG1 및 레스베라트롤 포함

[0062] 상기 (1) 내지 (4) 배지에서 도르소모르핀은 250 nM, NRG1은 50 nM, 레스베라트롤은 100 nM로 사용하였다.

[0063] 이후, 내시경을 통해 채취한 환자의 대장암 조직 또는 수술을 통해 얻은 대장암 조직을 세척액으로 3회 이상 세척하였다. 세척한 대장암 조직에 대하여 37℃, 2시간 동안 콜라게나제(Collagenase) II로 처리하였고, DPBS에 혼합한 0.1 % BSA (bovine serum albumin)를 대장암 조직에 추가로 처리하여 파이펫팅함으로써 대장암 줄기세포가 포함된 크립트(Crypt)를 분리하였다. 분리된 크립트를 70 μm cell strainer에 통과시킨 후, 원심분리하였다. 이후, 상기 수득한 크립트를 세포외 기질(콜라겐 또는 매트릭젤)과 함께 1:1로 혼합하여 3차원 형태로 배양하였고, 상기 배지 (1) 내지 (5)를 사용하여 1계대당 4 내지 9일 동안 3차원 배양하였다. 이후, 각 배지 성분으로 제조된 대장암 오가노이드의 면적을 각각 측정하여 다음과 같은 수식으로 성장률을 분석하였고, 그 결과를 아래 표 1에 나타내었다.

[0064] \*암 오가노이드 성장률 (%) = (배양 후 P0+0d, P0+9d 또는 P1+9d에서의 암 오가노이드 면적)/(배양 후 P0+0d에서의 암 오가노이드 면적) × 100



표 1

배양일	A11	-도르소모르핀 및 NRG1	-도르소모르핀 및 레스베라트롤	-도르소모르핀
P0+0d	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
P0+9d	180(%)	135(%)	216(%)	222(%)
P1+9d	294(%)	121(%)	60(%)	58(%)

[0068] 그 결과, 표 1, 도 1 및 도 2에서 볼 수 있듯이, 도르소모르핀, NRG1 및 레스베라트롤을 포함하는 배지("A11")를 사용하는 경우에는, 배양할수록 오가노이드 성장률이 증가하였다. 반면, 도르소모르핀 및 NRG1을 제외하고, 레스베라트롤을 포함하는 배지 ("-도르소모르핀 및 NRG1"), 도르소모르핀 및 레스베라트롤을 제외하고, NRG1을 포함하는 배지("-도르소모르핀 및 레스베라트롤") 및 도르소모르핀을 포함하지 않는 배지("-도르소모르핀")의 경우, 오가노이드 성장률이 감소하였다.

[0069] 특히, 도르소모르핀을 포함하지 않는 배지("-도르소모르핀")를 사용하는 경우에는 계대가 진행되면서 성장률이 약 4배 이상 급격히 감소하였다.

[0070] 상기 결과는, 암 오가노이드의 증식을 촉진시켜 더 많은 수의 암 오가노이드를 확보하기 위해서는 도르소모르핀이 암 오가노이드 배양용 배지의 필수 성분으로 사용되어야 함을 시사한다.

[0072] **실시예 2. 항산화제 유형에 따른 암 오가노이드 배양**

[0073] 항산화제 유형에 따른 암 오가노이드의 배양 효과를 비교하기 위해 항산화제를 제외한 다른 조건은 동일하게 설정하고, 항산화제의 유형만 선택적으로 사용하여 배지 조성물을 제조하였다.

[0074] 구체적으로, 계대수 "P0" 내지 "P4"까지는 실험을 위한 충분한 수의 암세포를 얻기 위해 암세포를 계속 배양하였다. 이후, 계대수 "P5"부터는 기본 배지로 어드밴스드(Advanced) DMEM F/12를 사용하였으며, 여기에 주요 성분으로 도르소모르핀 및 NRG1를 포함시키고, 항산화제로는 발프로산(Valproic acid), 붕산(Boric acid), 레스베라트롤, 에다라본(Edaravone) 및 아스코르브산(Ascorbic acid)을 선택적으로 사용하였다.

[0075] 구체적으로 실험군은 다음과 같이 구분하였다.

[0076] (1) "+발프로산": 도르소모르핀, NRG1 및 발프로산 포함

[0077] (2) "+붕산": 도르소모르핀, NRG1 및 붕산 포함

[0078] (3) "+레스베라트롤": 도르소모르핀, NRG1 및 레스베라트롤 포함

[0079] (4) "+에다라본": 도르소모르핀, NRG1 및 에다라본 포함

[0080] (5) "+아스코르브산": 도르소모르핀, NRG1 및 아스코르브산 포함

[0081] 상기 배지 (1) 내지 (5)를 사용하여 실시예 1과 동일한 방식으로 대장암 오가노이드를 배양하였으며, 도르소모르핀은 250 nM, NRG1은 50 nM로 사용하였고, 항산화제로 각각 레스베라트롤은 100 nM, 붕산은 1 mM, 에다라본은 50 μM, 발프로산은 1 mM, 아스코르브산은 284 μM로 사용하였다.

[0082] 이후, 각 배지 성분으로 제조된 대장암 오가노이드의 면적을 각각 측정하여 다음과 같은 수식으로 성장률을 분석하였고, 6번 계대배양한 "P6"의 결과를 아래 표 2에 나타내었다.

[0083] \*암 오가노이드 성장률 (%) = (배양 후 P6+0d, P6+3d 또는 P6+10d 에서의 암 오가노이드 면적)/(배양 후 P6+0d 에서의 암 오가노이드 면적) × 100

표 2

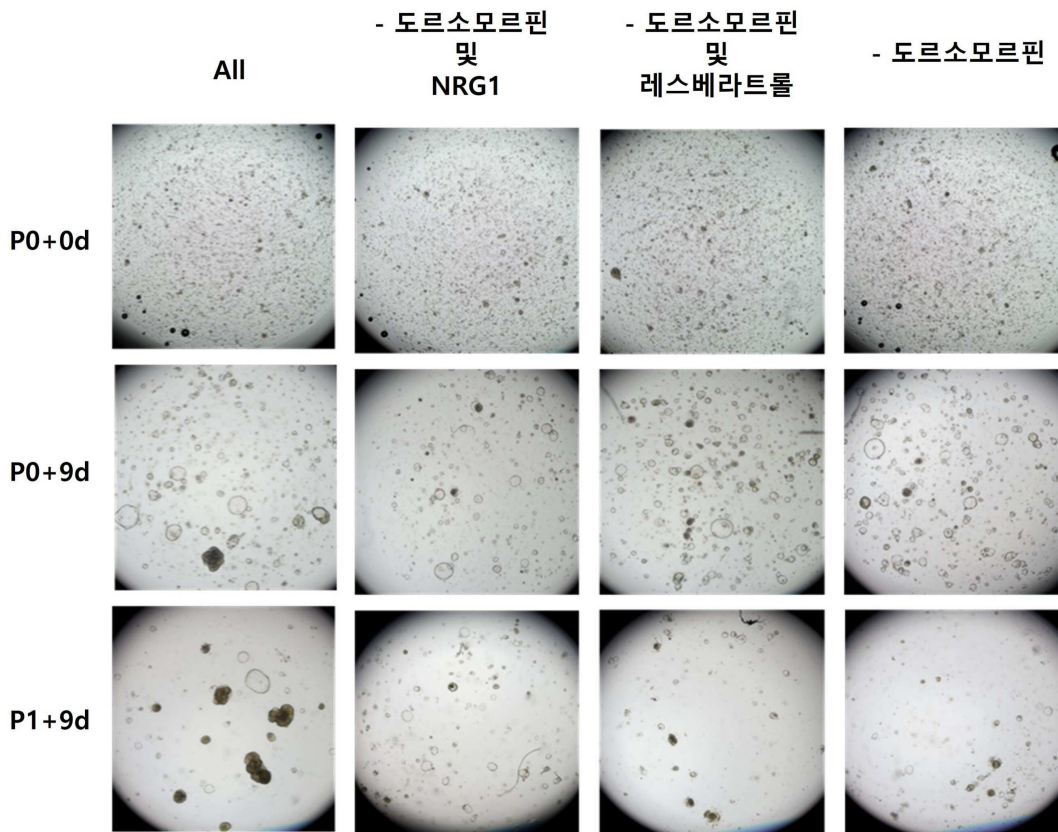
배양일	+발프로산	+붕산	+레스베라트롤	+에다라본	+아스코르브산
P6+0d	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
P6+3d	105(%)	128(%)	112(%)	131(%)	113(%)
P6+10d	262(%)	409(%)	458(%)	456(%)	529(%)

[0085]

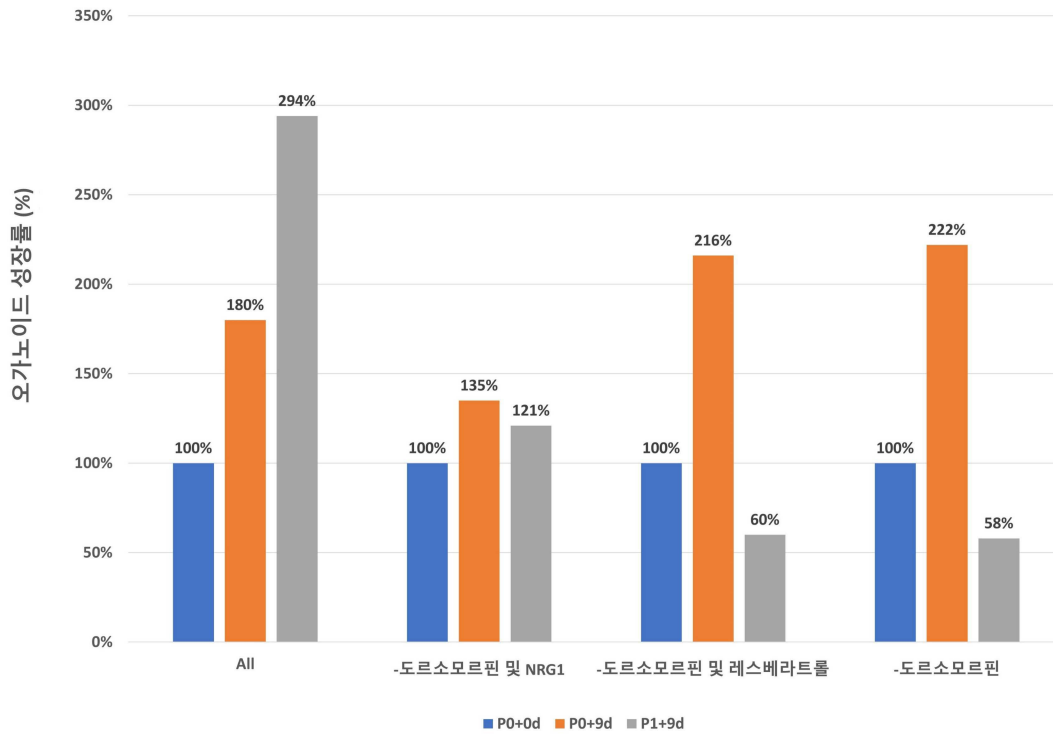
- [0087] 그 결과, 표 2, 도 3 및 도 4에서 볼 수 있듯이, 항산화제의 유형에 따라 오가노이드 성장 속도에 차이가 나타났다. 구체적으로, "P6+3d"에서는 오가노이드 성장률이 유사하게 나타났으나, 배양할수록 성장률 차이가 크게 벌어졌다. 구체적으로, "P6+10d"에서는 "P6+0d"와 비교하였을 때 +발프로산 배지는 약 2.6배, +붕산 배지는 약 4.1배, +레스베라트롤 배지는 약 4.6배, +에다라본 배지는 약 4.6배, +아스코르브산 배지는 약 5.3배의 성장률 증가 효과를 나타내었다.
- [0089] 상기 결과는, 암 오가노이드 증식을 촉진시켜 더 많은 수의 암 오가노이드를 확보하기 위해서는 암 오가노이드 제조용 배지의 유효 성분으로 붕산, 레스베라트롤, 에다라본, 아스코르브산과 같은 항산화제가 포함되어야 함을 시사한다.
- [0091] 이상 실시예 1 및 2의 결과를 종합한 결과, 많은 수의 암 오가노이드를 확보하고, 동시에 제조된 상기 암 오가노이드가 장기간의 배양에도 줄기세포능을 유지하기 위해서는 암 오가노이드 제조용 배지 조성물에는 도르소모르핀이 필수적인 성분으로 포함되어야 함을 알 수 있었다.
- [0092] 또한, 암 오가노이드 증식을 더욱 촉진시키기 위해서는 암 오가노이드 제조용 배지 조성물에 항산화제 또한 포함되어야 함을 알 수 있었다.

**도면**

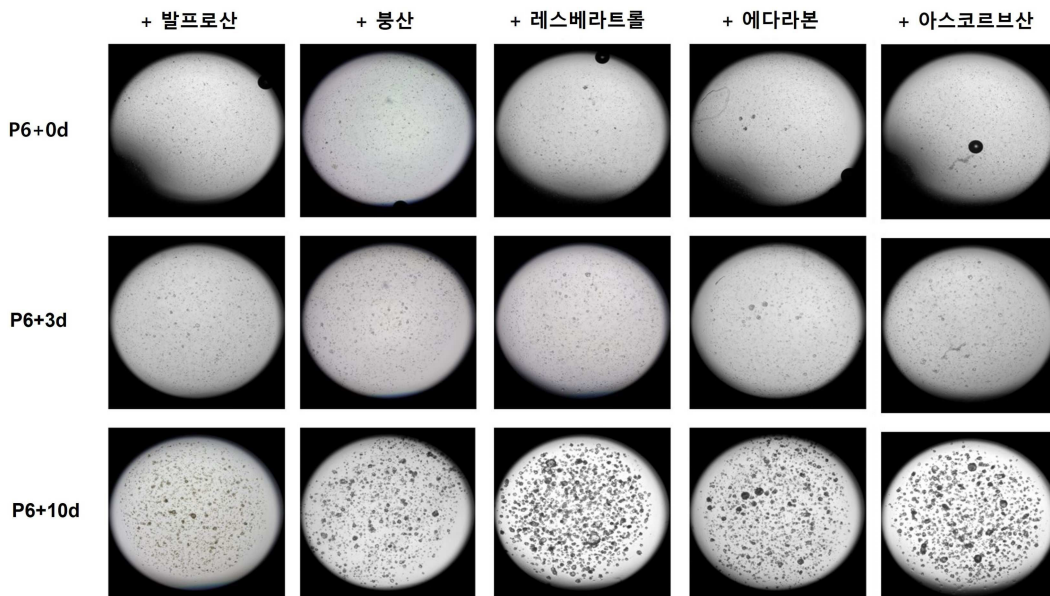
**도면1**



도면2



도면3



도면4

