



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0117170
(43) 공개일자 2022년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/09 (2010.01) C12N 5/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0693 (2013.01)
C12N 5/0068 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0019833
(22) 출원일자 2022년02월16일
심사청구일자 2022년02월16일
(30) 우선권주장
1020210020489 2021년02월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
남은지
서울특별시 강남구 학동로88길 5, 3-206
설향숙
경기도 남양주시 다산순환로 300
최은혜
서울특별시 관악구 신림로 225
(74) 대리인
파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 12 항

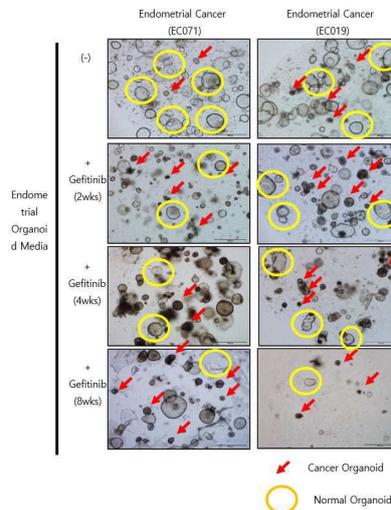
(54) 발명의 명칭 고순도의 암 오가노이드, 및 이의 제조방법

(57) 요약

암 환자의 약물 반응성 예측을 위해서 암 오가노이드는 체내 암 조직을 환경을 그대로 구현되는 것이 바람직하나, 오가노이드 배양시 암 오가노이드 이외에 정상 오가노이드가 난입 및 과증식하여 암 오가노이드의 성장을 저해하는 문제점이 있었다.

본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위해 고안된 것으로, 정상 세포에 의해 오염되지 않은 순수한 암 오가노이드, 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 제조방법에 의한 암 오가노이드는 체내 암 환경을 그대로 구현하여 환자 맞춤형 정밀치료를 가능하게 하므로, 암 환자의 예후 증진 등 의학 분야에서 크게 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/5011 (2013.01)

C12N 2501/06 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711115524
과제번호	2020R1A2B5B01002371
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	부인암 오가노이드 구축 및 개인 맞춤치료 모델 개발
기여율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 개체로부터 분리된 암 조직으로부터 세포를 해리시키는 단계;
- (b) 원심분리 후 수득된 세포 결집체(pellet)를 다공성 매질과 혼합하여 과중하는 단계; 및,
- (c) 정상 세포의 성장을 억제하는 단계;를 포함하는 배양액으로 배양하는 단계;를 포함하는, 암 오가노이드의 제조 방법.

청구항 2

- 제 1항에 있어서,
상기 (a)단계에서의 해리는 콜라게나아제로 수행하는 것인, 방법.

청구항 3

- 제 1항에 있어서,
상기 (b)단계에서의 다공성 매질은 하이드로젤, 또는 멤브레인인 것인, 방법.

청구항 4

- 제 3항에 있어서,
상기 하이드로젤은 콜라젠(collagen), 피브린(fibrin), 아가로즈(agarose), 한천(agar), 매트릭젤(matrigel), 알지네이트(alginate), 및, 젤라틴(gelatin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 방법.

청구항 5

- 제 1항에 있어서,
상기 (c)단계에서의 정상 세포 성장 억제는 항암제로 수행하는 것인, 방법.

청구항 6

- 제 5항에 있어서,
상기 항암제는 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine kinase Inhibitor; EGFR-TKI)인 것인, 방법.

청구항 7

- 제 5항에 있어서,

상기 항암제는 제피티닙(gefitinib), 또는 에를로티닙(Erlotinib)인 것인, 방법.

청구항 8

항암제를 포함하는, 암 오가노이드 배양용 배양액.

청구항 9

항암제 처리된 암 오가노이드.

청구항 10

- (a) 제 9항의 암 오가노이드에 항암 후보물질을 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 항암 후보물질에 의하여 조직의 크기가 감소하거나 유지되는 경우에 후보물질을 암 치료제로 결정하는 단계를 포함하는, 항암 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 11

- (a) 제 9항의 암 오가노이드에 항암 후보물질을 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 항암 후보물질에 의하여 암 조직의 크기가 감소하거나 유지되는 경우에 후보물질을 목적하는 환자의 암 치료제로 선택하는 단계를 포함하는, 환자 맞춤형 암 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 암 치료방법의 선택은 화학적 요법, 방사선 요법, 외과적 요법, 면역세포치료법, 또는 이들의 조합인 것인, 환자 맞춤형 암 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고순도의 암 오가노이드, 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 고령화로 인해 암 환자가 급격히 증가하고 있어, 환자맞춤형 항암치료를 통해 암을 극복하고자 하는 연구가 경쟁적으로 수행되고 있다. 특히, 표적치료제는 말기암 환자의 항암제에 대한 반응률을 획기적으로 높이면서 항암제 부작용을 최소화할 수 있을 뿐만 아니라 치료제에 대한 암의 반응을 분자신호로 예측할 수 있다는 측면에서 환자 맞춤형 항암치료 연구의 핵심이라 할 수 있다. 그러나, 환자맞춤형 표적치료제를 실제로 환자에게 투여하기 전 반응을 시험하기 위한 오가노이드의 개발은 한계가 많은 실정이다.

[0004] 암 환자의 약물 반응성 예측을 위해서 암 오가노이드는 체내 암 조직을 환경을 그대로 구현되는 것이 바람직하나, 암 오가노이드 제조를 위하여 환자로부터 암 조직을 적출하는 과정에서 주변부의 정상 세포가 함께 채취된다. 이로써 오가노이드 배양시 암 오가노이드 이외에 정상 오가노이드가 난입 및 과증식하여 암 오가노이드의 성장을 저해하게 된다. 이를 억제하기 위하여 종래 기술은 현미경 하에서 정상 오가노이드와 암 오가노이드를 인위적으로 분리, 배양하는 것이었으나, 이는 오가노이드 자체의 손실이 크고, 완벽하게 분리되지 않는 어려움

이 있었다.

[0005] 따라서 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위한 것으로, 암 오가노이드 제조 시 정상 세포만을 선택적으로 성장 억제시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 정상 세포에 의해 오염되지 않은 순수한 암 오가노이드의 제조가 가능하므로, 암 환자의 예후 증진 등 의학 분야에서 크게 이용될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 종래의 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 고순도의 암 오가노이드, 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0012] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0013] 본 발명의 일 구체예에서 "암"이란, 제어되지 않은 세포성장으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포성장에 의해 종양이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투하고 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 하는 것을 말한다. 학문적으로는 신생물이라고 명명되기도 한다. 암은 수술, 방사선 및 화학요법으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고 환자에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환으로, 암의 발생요인으로는 여러 가지가 있으나, 내적 요인과 외적 요인으로 구분한다. 정상세포가 어떠한 기전을 거쳐 암세포로 형질전환이 되는지에 대해서는 정확하게 규명되지 않았으나, 상당수의 암이 환경요인 등 외적인자에 의해 영향을 받아 발생하는 것으로 알려져 있다. 내적 요인으로는 유전인자, 면역학적 요인 등이 있으며, 외적 요인으로는 화학물질, 방사선, 바이러스 등이 있다. 일반적으로 암세포는 정상 세포와는 다른 유전적 특징을 나타내는데, 암의 발생에 관련되는 유전자를 종양형성유전자(oncogenes)라 하고, 종양 발달을 억제하는 유전자를 종양억제유전자(tumor suppressor genes)라 한다. 암은 종양형성유전자와 종양억제유전자 사이의 균형이 위에서 설명한 내적 혹은 외적 용인들에 의해 무너질 때 발생한다. 구체적으로, 종양형성유전자가 과발현되거나, 또는 종양억제유전자가 돌연변이 등으로 기능을 수행하지 못할 때 암이 발생한다. 대표적인 종양형성유전자에는 c-myc(Proto-oncogene bHLH transcription factor), c-src(Proto-oncogene tyrosine-protein kinase), NOTCH(Notch Receptor), FGFR(Fibroblast Growth Factor Receptor), EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor) 등이 있으며, 대표적인 종양억제유전자에는 TGF- β (transforming growth factor-beta), TP53(tumor protein p53) 등이 있다. 암은 그 발생 부위에 따라 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양,

1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구분할 수 있고, 본 발명의 암은 바람직하게는 여성암(유방암, 자궁경부암, 난소암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암종, 갑상선암, 부갑상선암)인 것이나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 일 구체예에서 "암 조직"이란, 암 환자에 있어서 인체에 유익하고자 하는 목적으로 암 절개술이 필요한 경우에, 절개술 또는 세침의 방법으로 인체로부터 분리된 검사 또는 폐기 목적의 암세포 집합을 의미한다. 상기 암 조직은 암 환자의 인체에 유익하고자 하는 목적 하에 특정 암 조직에 대한 오가노이드 제작, 및 맞춤형 치료제 개발을 위해 이용될 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구체예에서 "전이"란, 암세포가 원발장기를 떠나 다른 장기로 가는 것이다. 암이 신체의 다른 부분으로 퍼지는 것은 크게 원발암에서 암조직이 성장하여 직접적으로 주위장기를 침윤하는 것과, 멀리 있는 다른 장기로 혈관이나 림프관을 따라 원격전이를 하는 것으로 나눈다. 암 고유의 성질에 따라 전이 속도나 양상이 달라질 수 있으며, 전이 발생과 관련된 유전자의 발현 억제 또는 상기 유전자의 단백질 활성 억제를 통해 조절될 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구체예에서 "오가노이드"란, 줄기세포나 장기세포에서 분리한 세포를 배양하거나 재조합해서 만든 배양체로서, 생체외에서 조직의 형태를 유지하는 구조체를 의미하며, 인공 장기, 바이오 장기, 미니장기, 스페로이드, 구상체, 또는 배아체와 동일한 의미로 해석 가능하다. 상기 오가노이드를 제조하기 위한 기원 세포가 암 조직으로부터 채취된 경우에, 상기 오가노이드는 암 오가노이드인 것이며, 암세포로 구성됨을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 일 구체예에서 "다공성 매질"이란, 처음에 액상이었다가 다양한 조건에 의해서 고형화될 수 있는 것으로, 그 조건은 온도, 빛, pH, 압력, 진동 등을 포함한다. 예를 들어 고온에서 액상인 다공성 매질이 저온에서 겔화될 수 있다. 다공성 매질은 하이드로젤(hydrogel)이나 기공을 가진 멤브레인(porous membrane) 등의 재질일 수 있다. 상기 하이드로젤은 천연 또는 합성 고분자 물질일 수 있다. 상기 하이드로젤은 콜라겐(collagen), 피브린(fibrin), 아가로스(agarose), 한천(agar), 매트릭젤(matrigel), 알지네이트(alginate), 젤라틴(gelatin) 등을 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 구체예에서 "매트릭젤"이란, 인위적으로 합성된 세포외기질로써 상업적으로 판매되는 것이며, 라미닌, 콜라겐 타입 IV, 헤파린 황산염 프로테오글리칸 및 엔탁틴/니도겐을 포함하여 구성되나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에서 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 진단은 암의 발병 유무, 진행 상태, 및 전이 여부를 확인하는 것이다. 암 발병 또는 전이 의심 환자로부터의 조직의 육안적 또는 세포학적 확인으로 암을 진단할 수 있으며, 암 발병 또는 전이 의심 조직의 검체(임상적으로는 세포, 혈액, 수액, 흉수, 복수, 관절액, 농(膿), 분비액, 담, 인두점액, 요(尿), 담즙, 대변등) 내에 포함되어 있는 암 대응 항체를 이용하는 방법, 상기 검체 내 암 관련 단백질을 직접 검출하는 방법 또는 암 관련 단백질을 코딩하는 핵산을 직접 검출하는 방법으로 암을 진단할 수 있다. 항원-항체 결합 또는 암 관련 단백질을 직접 검출하는 방법을 이용한 진단적 수단으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 암 관련 단백질을 코딩하는 핵산을 직접 검출하는 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase

protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0027] 본 발명의 일 구체예에서 "스크리닝"이란, 여러 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적으로 하는 어떤 특정한 성질을 갖는 물질을 특정한 조작 또는 평가 방법으로 선별하는 것이다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 스크리닝은, 본 발명에 의한 암 오가노이드에 항암 후보물질을 처리하고 상기 항암 후보물질에 의하여 암 조직의 크기가 감소하거나 전이가 억제됐을 경우에 후보물질을 암 치료제 또는 암 전이 억제제로 결정하는 것이다.
- [0029] 본 발명의 일 구체예에서 "항암제 후보물질"이란, 종양조직의 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 구입 가능하나, 이에 한정하는 것은 아니다. 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 있다.
- [0030] 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 있다.
- [0031] 현재 항암 후보물질은 생화학적인 작용 기전에 따라 하기 6개의 범주로 구분하고 있다.
- [0032] (1) 알킬화제(alkylating agents): 어떤 화합물에 알킬기 R-CH₂를 도입할 능력을 갖춘, 반응성이 대단히 높은 물질로 세포에 작용시키면 대부분은 DNA의 구아닌의 N7과 반응하여 DNA구조를 변형시키고, 사슬절단[鎖切斷]을 일으켜 항암효과 및 세포독효과를 나타낸다. 여기에 속하는 약물로는, ① 나이트로젠머스터드계(系): 나이트로젠머스터드·클로람부실·멜팔란·사이클로포스파마이드 등 ② 에틸렌이민계: 싸이오테파 ③ 알킬설포네이트계: 부셀판 ④ 트리아진계·하이드라진계: DTIC(다카바진)·프로카바진 ⑤ 나이트로소요소계: BCNU, CCNU, 메틸-CCNU 등이 있다.
- [0033] (2) 대사길항제(代謝拮抗劑: antimetabolites): 이 군(群)에 속하는 약물은 암세포의 증식에 필요한 대사과정을 저해하는 작용을 가진 것으로 ① 엽산유도체: 메소트렉세이트(MTX) ② 퓨린 유도체: 6-메르캅토피린(6-MP), 6-싸이오구아닌 ③ 피리미딘 유도체: 5-플루오로우라실, 시타라빈 등이 있다.
- [0034] (3) 항생물질(抗生物質: antibiotics): 세균에서 생산되는 항생물질 가운데 항암작용을 나타내는 것으로는 아드리아마이신, 다우노루비신, 블레오마이신, 미토마이신-C, 악티노마이신-D 등이 있다.
- [0035] (4) 유사분열억제제(有絲分裂抑制劑: vinca alkaloid): 이들 약물은 분열시기 특이성 약물로서 유사분열 시기 중 중기(metaphase)에서 세포분열을 중지시킨다. 빈크리스틴, 빈블라스틴, VP-16-213 및 VM-26이 있다.
- [0036] (5) 호르몬제: 어떤 종류의 암은 호르몬을 투여함으로써 치료효과를 볼 수 있는데, 남성호르몬을 사용하는 경우는 유방암, 여성호르몬은 전립선암, 프로게스테론은 자궁내막암에 효과가 있으며, 부신피질호르몬은 급성림프성 백혈병이나 림프종(腫)의 치료에 사용하고 있고, 유방암에 대해서는 항여성 호르몬제인 타목시펜이 쓰이고 있다.
- [0037] (6) 기타: 시스플라틴, L-아스파라지네이스, o,p-DDD 등이 있다. 이상과 같이 현재 암치료에 사용되고 있는 항암제는 40여 종으로서 각각의 약제마다 그 항암범위에는 큰 차이가 있다.

[0039] 본 발명의 일 구체예에서 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 투여의 유효량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 상기 치료용 약학조성물을 1회 50ml~500ml의 양으로 체내에 투여 가능하며, 화합물일 경우 0.1ng/kg-10mg/kg, 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg-10mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 투여간격은 1일 1회 내지 12회일 수 있으며, 1일 12회 투여할 경우에는 2시간마다 1회씩 투여할 수 있다. 또한 항체 또는 siRNA를 포함한 항암 목적의 펩타이드 또는 핵산들은 목적하고자 하는 암의 치료를 위해 단독 또는 당업계에 공지된 다른 치료법 예를 들어 화학요법제, 방사선 및 수술과 같이 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 펩타이드 및 핵산들은 면역 반응을 증진하기 위하여 고안된 다른 치료, 예를 들어 당업계에 주지된 것과 같은 어쥬번트 또는 사이토카인(또는 사이토카인을 코딩하는 핵산)과 혼합하여 투여될 수 있다. 바이오리스틱(biolistic) 전달 또는 생체 외(ex vivo) 처리와 같은 다른 표준 전달 방법들이 사용될 수도 있다. 생체 외 처리에서 예를 들어 항원제시 세포들(APCs), 수지상 세포들, 말초혈액 단핵구 세포들, 또는 골수세포들을 환자 또는 적당한 공여자로부터 얻어서 본 면역 조성물로 생체 외에서 활성화된 후 그 환자에게 투여될 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 구체예에서, (a) 개체로부터 분리된 암 조직으로부터 세포를 해리시키는 단계; (b) 원심분리 후 수득된 세포 결집체(pellet)를 다공성 매질과 혼합하여 파종하는 단계; 및, (c) 정상 세포의 성장을 억제하는 단계;를 포함하는 배양액으로 배양하는 단계;를 포함하는 암 오가노이드의 제조 방법을 제공하고, 상기 (a)단계에서의 해리는 콜라게나아제로 수행하는 것인 암 오가노이드의 제조 방법을 제공하며, 상기 (b)단계에서의 다공성 매질은 하이드로젤, 또는 멤브레인인 것인 암 오가노이드의 제조 방법을 제공하며, 상기 하이드로젤은 콜라겐(collagen), 피브린(fibrin), 아가로스(agarose), 한천(agar), 매트릭젤(matrigel), 알지네이트(alginate), 및 젤라틴(gelatin)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인 암 오가노이드의 제조 방법을 제공하며, 상기 (c)단계에서의 정상 세포 성장 억제는 항암제로 수행하는 것인 암 오가노이드의 제조 방법을 제공하며, 상기 항암제는 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine kinase Inhibitor; EGFR-TKI)인 것인 암 오가노이드의 제조 방법을 제공하며, 상기 항암제는 제피티닙(gefitinib), 또는 에를로티닙(Erlotinib)인 것인 암 오가노이드의 제조 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명의 다른 구체예에서, 항암제를 포함하는 암 오가노이드 배양용 배양액을 제공하고, 상기 항암제는 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine kinase Inhibitor; EGFR-TKI)인 것인 암 오가노이드 배양용 배양액을 제공하며, 상기 항암제는 제피티닙(gefitinib), 또는 에를로티닙(Erlotinib)인 것인 암 오가노이드 배양용 배양액을 제공한다.

[0045] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 항암제 처리된 암 오가노이드를 제공하고, 상기 항암제는 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine kinase Inhibitor; EGFR-TKI)인 것인 암 오가노이드를 제공하며, 상기 항암제는 제피티닙(gefitinib), 또는 에를로티닙(Erlotinib)인 것인 암 오가노이드를 제공한다.

[0047] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 항암제 처리된 암 오가노이드에 항암 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 항암 후보물질에 의하여 조직의 크기가 감소하거나 유지되는 경우에 후보물질을 암 치료제로 결정하는 단계를 포함하는 항암 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하고, 상기 항암제는 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine kinase Inhibitor; EGFR-TKI)인 것인 항암 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하며, 상기 항암제는 제피티닙(gefitinib), 또는 에를로티닙(Erlotinib)인 것인 항암 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0049] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 항암제 처리된 암 오가노이드에 항암 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 항암 후보물질에 의하여 암 조직의 크기가 감소하거나 유지되는 경우에 후보물질을 목적하는 환자의 암 치료제로 선택하는 단계를 포함하는 환자 맞춤형 암 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법을 제공하고, 상기 암 치료방법의 선택은 화학적 요법, 방사선 요법, 외과적 요법, 면역세포치료법, 또는 이들의 조합인 것인 환자 맞춤형 암 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법을 제공하고, 상기 항암제는 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine kinase Inhibitor; EGFR-TKI)인 것인 환자 맞춤형 암 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법을 제공하며, 상기 항암제는 제피티닙(gefitinib), 또는 에를로티닙(Erlotinib)인 것인 환자 맞춤형 암 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0051] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

발명의 효과

[0053] 본 발명은 암 오가노이드 제조 시 암세포 이외에 정상 세포가 난입 및 과증식하여 암 오가노이드의 성장을 저해하는 종래의 문제를 해결하기 위해 고안된 것으로, 암 오가노이드 제조 시 정상 세포만을 선택적으로 성장 억제시키는 방법에 관한 것이다.

[0054] 본 발명의 제조방법에 의한 고순도의 암 오가노이드는 암 환자의 약물 반응성을 정확하게 예측 가능하므로, 암 환자의 예후 증진 등 의학 분야에서 크게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 암 오가노이드를 EM 배양액에서 계속 배양한 경우, 또는 제피티닙 배양액으로 2주, 4주, 또는 8주 배양한 경우의 오가노이드 제조 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 암 오가노이드를 EM 배양액에서 계속 배양한 경우, 또는 제피티닙 배양액으로 2주, 4주, 또는 8주 배양한 경우의 오가노이드 제조 결과, 및 상기 오가노이드의 H&E 염색 결과를 나타낸 것이다.

도 3 내지 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, EM 배양액에서 A83-01이 제거되고 TGF-β가 첨가된 배양액(A83-01⁻TGFβ⁺), EM 배양액에서 Nutlin이 추가된 배양액(Nutlin⁺), 또는 제피티닙 배양액에서 암 오가노이드 배양 결과를 나타낸 것이다. 도 3 내지 도 5에서 "T"는 암 오가노이드(cancer organoid), "N"은 정상 오가노이드(normal organoid)를 나타낸다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 유전자 변이 분석 대상인 총 195개의 유전자를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 환자 유래의 암 조직 시료에서의 유전자 변이 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, EM 배양액에서 8주 배양된 암 오가노이드에서의 유전자 변이 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른, 제피티닙 배양액에서 8주 배양된 암 오가노이드에서의 유전자 변이 분석 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0059] 정상세포가 성장 억제된 고순도의 암 오가노이드 제조 및 평가

[0060] 환자 유래의 암 조직은 국내 대학병원(연세세브란스병원)으로부터 자궁내막암 환자의 병변 조직을 제공받아 준비하였다(n=61). 암 오가노이드에 대한 대조군은 자궁내막 정상 오가노이드를 제조하여 준비하였다.

[0061] 오가노이드 제조를 위해, 수득된 조직을 RPMI 1640 배양액으로 세척하고, 작은 단위로 분쇄하고, 2mg/ml의 I형 콜라게나아제(collagenase type I) 5ml 넣고 교반 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이후 RPMI1640 20ml로 콜라게나아제를 중화시키고, 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 세포 결집체(pellet)를 수득하였다. 혈액이 혼합되었을 경우, 1ml의 증류수로 세포 결집체를 희석하여 3분간 얼음에서 반응시킨 후, RPMI1640 배양액 9ml를 첨가 후 원심분리하여 세포 결집체를 재수득하였다. 획득된 펠렛을 RPMI1640 배양액 1ml에 희석하여 세포 계수 후, 다시 원심분리하여 세포 결집체를 매트릭스와 혼합하고(15µl/well), 24웰 플레이트에 분주 후 37℃에서 1시간 배양하였다. 이후 맞춤 배양액(complete medium)을 첨가하고 37℃ CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양액은 2-3일 간격으로 신선하게 교체하였다.

[0062] 상기 맞춤 배양액은 EM 배양액을 기본으로 적용하며, 배양 중(보통 3-4일째) 정상 세포의 오염이 확인되는 경우 제피티닙(gefitinib) 배양액으로 교체하였다. 상기 EM 배양액, 및 제피티닙 배양액의 조성을 하기 표 1, 및 표 2에 각각 나타내었다.

표 1

[0063]

Reagent name	Final concentration
ADF (Advanced DMEM/F12, -4℃)	up to 50 mL
Antibiotic-Antimycotic (100X, 100ml)	1%
R-spondin1 conditioned medium (R-spondin CM, stock : 2 µg/mL)	10%
B-27 supplement (50X -20℃) - B	1%
N-2 supplement (100x, 50ml)	1%
L-glutamine (200Mm, 100ml)	2mM
N-acetyl-l-CYSTEIN (5g, in water)	1.25mM
Human EGF (Hegf STOCK : 10ug/ml)	50ng/ml
Nicotinamide -Ni (stock 1M)	10mM
human Noggin - N (stock con. : 100 µg/mL)	100 ng/mL
Human FGF10 -F (stock 100ug/ml)	100ug/ml
Human HGF (stock 500ug/ml)	50ng/ml
Primocin (antimicrobial agent for primary cells), stock 50mg/ml	100ug/ml
A83-01 stock 0.5mM	0.5 µM
ROCK inhibitor (Y-27632, -20℃) (stock con. : 10mM)	10 µM
GlutaMAX supplement (100X, RT)	1X
HEPES buffer solution (1M in H2O, 100 mL, -4℃)	2mM

표 2

[0064]

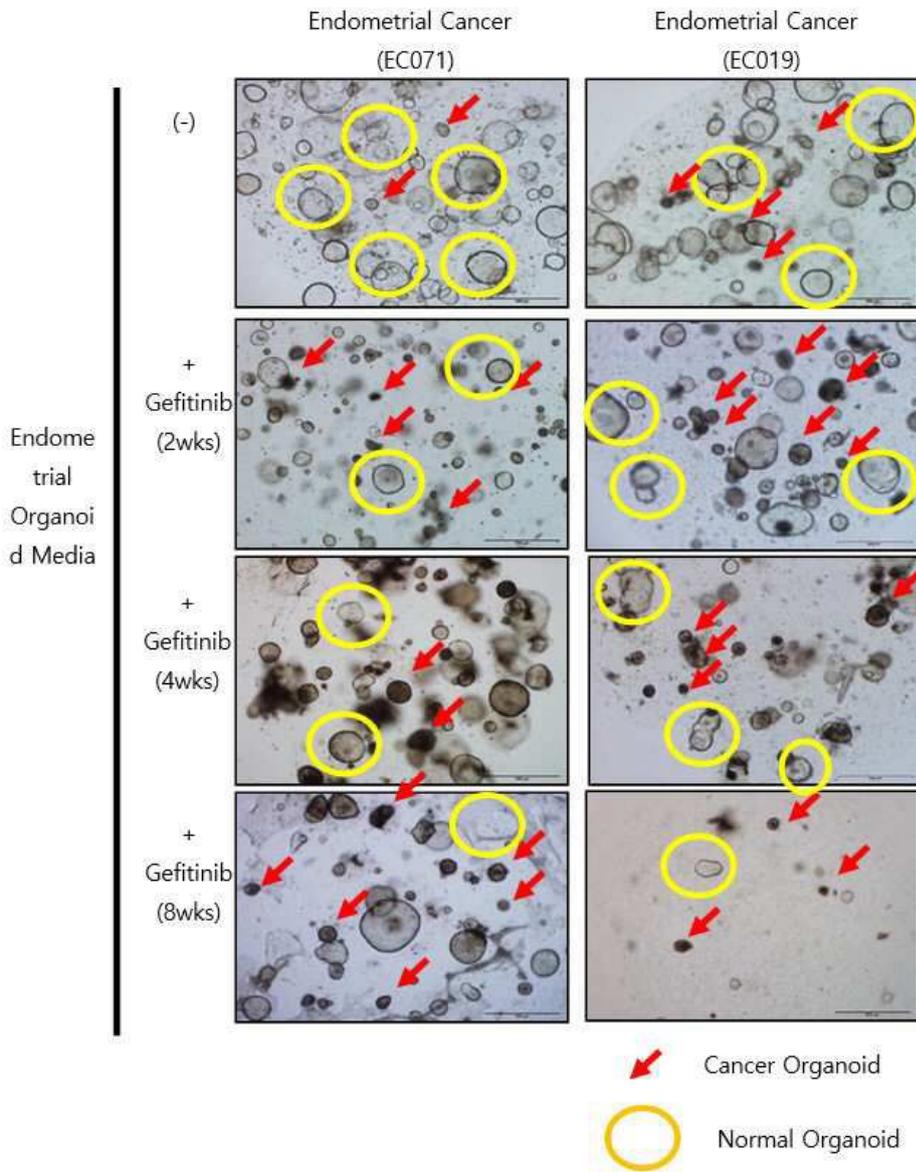
Reagent name	Final concentration
ADF (Advanced DMEM/F12, -4℃)	up to 50 mL
Antibiotic-Antimycotic (100X, 100ml)	1%
R-spondin1 conditioned medium (R-spondin CM, stock : 2 µg/mL)	10%
B-27 supplement (50X -20℃) - B	1%
N-2 supplement (100x, 50ml)	1%
L-glutamine (200Mm, 100ml)	2mM
N-acetyl-l-CYSTEIN (5g, in water)	1.25mM
Nicotinamide -Ni (stock 1M)	10mM
human Noggin - N (stock con. : 100 µg/mL)	100 ng/mL
Gefitinib 10mM	10mM
Human HGF (stock 500ug/ml)	50ng/ml
Primocin (antimicrobial agent for primary cells), stock 50mg/ml	100ug/ml
A83-01 stock 0.5mM	0.5 µM
ROCK inhibitor (Y-27632, -20℃) (stock con. : 10mM)	10 µM

GlutaMAX supplement (100X, RT)	1X
HEPES buffer solution (1M in H ₂ O, 100 mL, -4°C)	2mM

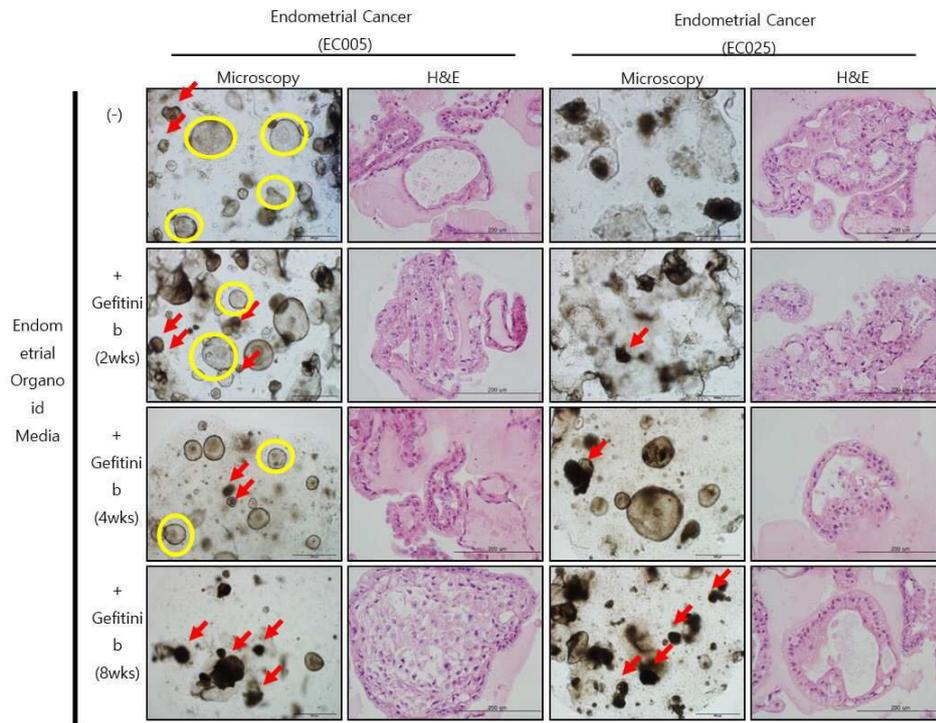
- [0065] 상기 암 오가노이드를 EM 배양액에서 계속 배양한 경우, 또는 제피티닙 배양액으로 2주, 4주, 또는 8주 배양한 경우의 오가노이드 제조 결과를 도 1과 도 2에 나타내었다. 실험 결과, 제피티닙 배양액 2주, 4주 또는 8주 이상 처리하였을 경우, 그의 처리기간에 따라 암 오가노이드의 분포가 비례적으로 증가하는 것을 확인하였다.
- [0066] 또한 상기 EM 배양액에서 A83-01이 제거되고 TGF-β가 첨가된 배양액(A83-01⁺TGFβ), 또는 EM 배양액에서 Nutlin이 추가된 배양액(Nutlin)에서 암 오가노이드를 배양한 경우를 제피티닙 배양액에서 배양한 경우와 비교하여, 그 결과를 도 3 내지 도 5에 나타내었다. 실험 결과, 다양한 케이스에서 공통적으로 제피티닙 배양액에서 암 오가노이드를 배양한 경우에만 계대가 거듭되어도 정상 세포에 의해 오염되지 않은 순수한 암 오가노이드가 배양되는 것을 확인하였다.
- [0067] 추가로 환자 유래의 암 조직 시료, EM 배양액에서 8주 배양된 암 오가노이드, 또는 제피티닙 배양액에서 8주 배양된 암 오가노이드에 대해서 총 195개의 유전자 변이를 확인하였다. 상기 환자 유래의 암 조직 시료, 및 EM 배양액에서 8주 배양된 암 오가노이드에는 암세포와 정상 세포가 혼재된 상태이며, 제피티닙 배양액에서 8주 배양된 암 오가노이드는 순수하게 암세포만 존재하는 상태임을 확인 후 시험을 진행하였다. 상기 분석 대상인 총 195개의 유전자를 도 6에 나타내고, 각 그룹의 분석 결과를 도 7 내지 도 9에 나타내었다. 분석 결과, 분석 대상인 유전자 중에서 IDH2(Isocitrate dehydrogenase[NADP]²), FGFR1(Fibroblast Growth Factor Receptor 1), NOTCH3(Notch Receptor 3), 및 ATM(serine/threonine kinase)은 모든 그룹에서 변이가 확인되었으며, ERBB2(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2)와 RUNX1(runt-related transcription factor 1)은 제피티닙 배양액에서 배양된 암 오가노이드에서만 특이적으로 변이가 확인되었다.
- [0069] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

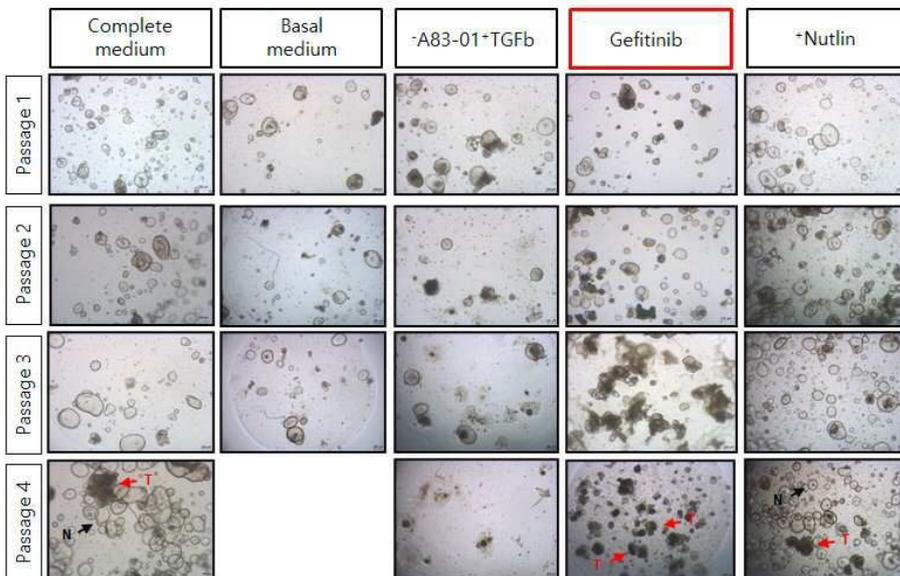


도면2



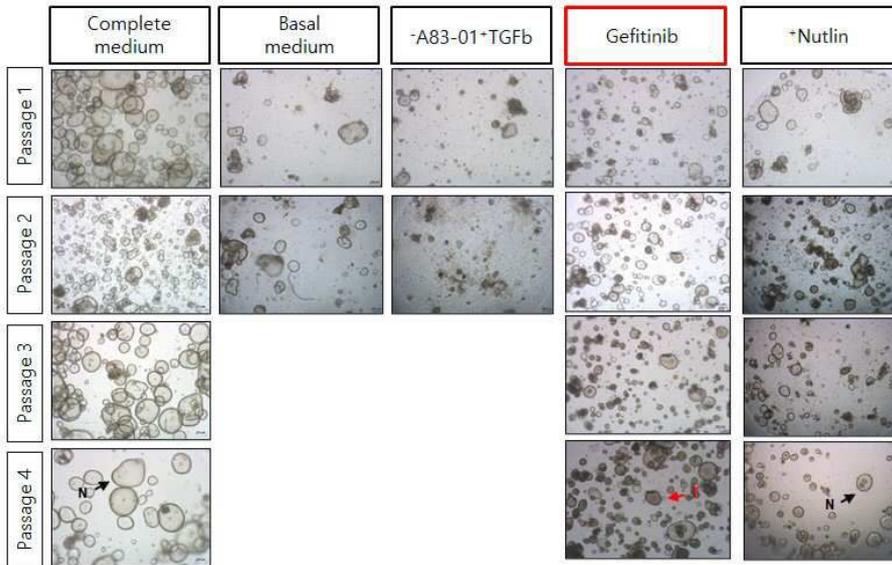
도면3

EC027



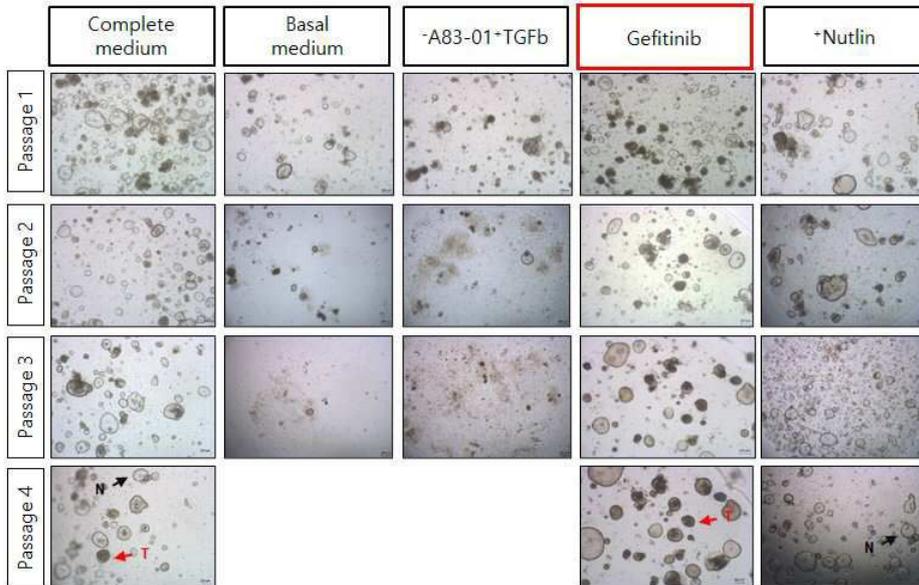
도면4

EC055



도면5

EC095



도면6

Axen™ Cancer Panel 2

SNV / InDel (170 genes)

ABL1, ABL2, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, APC, AR, ARAF, ASXL1, ATM, ATR, AURKA, AURKB, AURKC, AXL, BAP1, BCL2, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD2, BRD3, BRD4, CBFβ, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDH1, CDK12, CDK4, CDK6, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CEBPA, CHEK2, CREBBP, CRKL, CSF1R, CTNNB1, DDR1, DDR2, DNMT3A, DOT1L, EGFR, EPHA3, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC2, ERG, ERRF1, ESR1, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EWSR1, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLCN, FLT1, FLT3, FLT4, FOXL2, GNA11, GNAQ, GNAS, HDAC9, HGF, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, IGF2, JAK1, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KMT2A, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K1, MAP3K4, MAPK1, MAPK3, MAPK8, MCL1, MDM2, MDM4, MED12, MEN1, MET, MTF, MLH1, MPL, MSH2, MSH6, MTOR, MYC, MYCN, MYD88, NF1, NF2, NFKBIA, NFKX2-1, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, NPM1, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUTM1, PDGFβ, PDGFRA, PDGFRβ, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3R1, PIK3R2, POLE, PPARγ, PTCH1, PTEN, RAB35, RAD50, RAF1, RARA, RB1, RET, RHEB, RICTOR, RNF43, ROS1, RSP01, RSP02, RUNX1, SMAD2, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, SYK, TET2, TMPRSS2, TOP2A, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WT1, XPO1, ZNRF3

Fusion (25 genes)

ABL1, AKT3, ALK, BCL2, BRAF, EGFR, ERG, ETV1, EWSR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, JAK2, KMT2A, MYC, NPM1, NTRK1, PDGFRA, PDGFRβ, PPARγ, RAF1, RARA, RET, ROS1, TMPRSS2

도면7

4.1. SNV/INDEL

Gene	Transcript ID (exon no.)	DNA Change Protein Change	AF (%) (Alt/Total)	Exonic Effect	Clinical Significance
PIK3CA	NM_006218 (2/21)	c.113G>A p.Arg38His	5.4 (10/186)	missense variant	Likely pathogenic
BRAF	NM_001374258 (16/20)	c.1862A>G p.Asn621Ser	29.3 (49/167)	missense variant splice variant	Likely pathogenic
IDH2	NM_002168 (2/11)	c.120C>T p.Ala40Ala	49.3 (258/523)	synonymous variant	Likely benign
POLE	NM_006231 (49/49)	c.6766G>A p.Gly2256Arg	2.4 (16/664)	missense variant	Benign/Likely benign
FGFR1	NM_023110 (3/18)	c.304G>A p.Val102Ile	47.6 (241/506)	missense variant	Benign
CREBBP	NM_004380 (17/30)	c.3370-5_3370-4del TT	33.0 (35/106)	splice variant intron variant	Benign
NOTCH3	NM_000435 (33/33)	c.6325C>T p.Arg2109Trp	50.0 (200/400)	missense variant	Uncertain significance
ATM	NM_000051 (42/63)	c.6108T>C p.Tyr2036Tyr	46.4 (85/183)	synonymous variant	Conflicting interpretations of pathogenicity
RB1	NM_000321 (23/27)	c.2393G>A p.Arg798Gln	2.6 (12/465)	missense variant	Conflicting interpretations of pathogenicity

AF ≥ 2% / DP ≥ 100X
AF: Allele Frequency
DP: Depth

4.2. Fusion Gene

Fusion Gene	Breakpoints	Genomic pos.	Cytoband	PR	SR	TR	AF(%)
No Variant							

TR ≥ 3
PR: Paired Read
SR: Split Read
TR: Total Read
AF: Allele Frequency

4.3. Copy Number Alteration (CNA)

Gene	Type	Locus	Copy ratio (log2)	Copy Number
RET	GAIN	10q11.21	1.38829590857	5

GAIN: Copy Number ≥ 5

도면8

4.1. SNV/INDEL

Gene	Transcript ID (exon no.)	DNA Change Protein Change	AF (%) (Alt/Total)	Exonic Effect	Clinical Significance
IDH2	NM_002168 (2/11)	c.120C>T p.Ala40Ala	49.1 (259/528)	synonymous variant	Likely benign
FGFR1	NM_023110 (3/18)	c.304G>A p.Val102Ile	48.6 (328/675)	missense variant	Benign
NOTCH3	NM_000435 (33/33)	c.6325C>T p.Arg2109Trp	56.4 (217/385)	missense variant	Uncertain significance
ATM	NM_000051 (42/63)	c.6108T>C p.Tyr2036Tyr	48.8 (202/414)	synonymous variant	Conflicting interpretations of pathogenicity

AF ≥ 2% / DP ≥ 100X
 AF: Allele Frequency
 DP: Depth

4.2. Fusion Gene

Fusion Gene	Breakpoints	Genomic pos.	Cytoband	PR	SR	TR	AF(%)
No Variant							

TR = 3
 PR: Paired Read
 SR: Split Read
 TR: Total Read
 AF: Allele Frequency

4.3. Copy Number Alteration (CNA)

Gene	Type	Locus	Copy ratio (log2)	Copy Number
No Variant				

GAIN: Copy Number ≥ 5

도면9

4.1. SNV/INDEL

Gene	Transcript ID (exon no.)	DNA Change Protein Change	AF (%) (Alt/Total)	Exonic Effect	Clinical Significance
ERBB2	NM_004448 (20/27)	c.2329G>A p.Val777Met	4.2 (32/763)	missense variant	Likely pathogenic
IDH2	NM_002168 (2/11)	c.120C>T p.Ala40Ala	50.2 (331/660)	synonymous variant	Likely benign
FGFR1	NM_023110 (3/18)	c.304G>A p.Val102Ile	50.6 (447/884)	missense variant	Benign
NOTCH3	NM_000435 (33/33)	c.6325C>T p.Arg2109Trp	51.1 (217/425)	missense variant	Uncertain significance
RUNX1	NM_001754 (9/9)	c.1270T>C p.Ser424Pro	42.7 (64/150)	missense variant	Uncertain significance
ATM	NM_000051 (42/63)	c.6108T>C p.Tyr2036Tyr	49.0 (359/733)	synonymous variant	Conflicting interpretations of pathogenicity

AF ≥ 2% / DP ≥ 100X
 AF: Allele Frequency
 DP: Depth

4.2. Fusion Gene

Fusion Gene	Breakpoints	Genomic pos.	Cytoband	PR	SR	TR	AF(%)
No Variant							

TR ≥ 3
 PR: Paired Read
 SR: Split Read
 TR: Total Read
 AF: Allele Frequency

4.3. Copy Number Alteration (CNA)

Gene	Type	Locus	Copy ratio (log2)	Copy Number
No Variant				

GAIN: Copy Number ≥ 5