



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월11일

(11) 등록번호 10-2226485

(24) 등록일자 2021년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류
A01K 67/0271 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0066300

(22) 출원일자 2017년05월29일

심사청구일자 2018년12월17일

(65) 공개번호 10-2018-0130326

(43) 공개일자 2018년12월07일

(56) 선행기술조사문헌

Ryu JM 등, Breast vol.33
pp.109-116(2017.03.30. 공개)*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

박형석

서울특별시 서대문구 연세로 50-1(신촌동)

손주혁

서울특별시 서대문구 연세로 50-1(신촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재영

전체 청구항 수 : 총 9 항

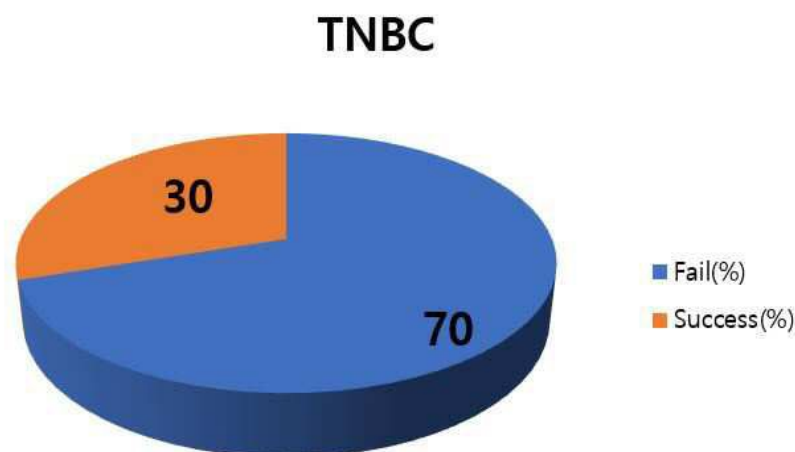
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 유방암 환자 종양 유래 이중이식 모델의 제조방법

(57) 요약

본 발명의 목적은 유방암(Leu1780Pro mutant) 환자 유래의 유방암 조직을 면역 결핍 마우스에 이식한 유방암 환자 유래 종양조직 이중이식 동물 모델 및 유방암 환자 유래 종양조직 이중이식 동물 모델의 제조방법을 제공하는 것이다. 또한, 상기한 동물모델을 이용하여 유방암 환자 맞춤형 유방암 치료제 선택을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 유방암 환자 유래 종양조직 이중이식 동물 모델은 한국인 특이적 유방암 환자에서의 암과 유전적, 생리적 및 환경적 특성이 동일한 조건을 제공할 수 있으므로, 유방암 환자의 표적 항암제 후보물질 스크리닝 및 유방암 치료에 큰 활용이 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01K 2207/12 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0331 (2013.01)

(72) 발명자

김승일

서울특별시 서대문구 연세로 50-1(신촌동)

이정동

서울특별시 서대문구 연세로 50-1(신촌동)

(56) 선행기술조사문헌

Tentler JJ 등, Nat RevClin Oncol. vol.9 no.6
pp.338-350(2012.06.30. 공개)*

JP2013094160 A

KR101309902 B1

Cancer Metastasis Rev. vol.35 no.4
pp.547-573(2016.12.31. 공개)

PLoS One vol.9 no.2 e89595(2014.02.28)

Russell JS 등 Mol Cancer vol.13
no.177(2014.07.22)

J Neurooncol. vol.93 no.2

pp.165-174(2009.06.30)

KR1020180019645 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1D1A1B03934564

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 삼중 음성 유방암 생식선 돌연변이 다중 유전자 패널 개발 및 HORMAD1 과발현 분석

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

유방암 환자로부터 분리된 유방암 조직 절편을 면역결핍 마우스의 피하에 이식하여 생성하는, 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델로서,

상기 유방암은 유방암 돌연변이인 BRCA1 유전자의 돌연변이를 포함하는 유방암이고,

상기 BRCA1 유전자의 돌연변이는 rs80357474 돌연변이를 포함하는 것이며,

상기 유방암 환자는 수술 전 보조요법을 받은 삼중음성유방암 환자인, 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델.

청구항 2

삭제

청구항 3

(a) 유방암 환자로부터 분리된 유방암 조직을 절편으로 나누는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 유방암 조직 절편을 F1 세대 면역결핍 마우스의 피하에 이식하는 단계;를 포함하는 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조방법으로서,

상기 유방암은 유방암 돌연변이인 BRCA1 유전자의 돌연변이를 포함하고,

상기 BRCA1 유전자의 돌연변이는 rs80357474 돌연변이를 포함하는 것이며,

상기 유방암 환자는 수술 전 보조요법을 받은 삼중음성유방암 환자인, 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 면역결핍 마우스는 NOG(NOD-SCID/IL-2R γ null)인, 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

상기 제조방법은 이식된 유방암 조직을 획득하여 새로운 면역결핍 마우스의 피하에 재이식하는 단계를 추가로 포함하는, 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 3 항에 있어서,

상기 제조방법은 (b) 단계 이후에 F1 세대 NOG(NOD-SCID/IL-2R γ null) 마우스의 피하에 이식된 유방암 조직 절편이 1500mm³의 크기까지 성장하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 1500mm³의 크기까지 성장한 유방암 조직 절편을 F2 세대에 이식하는 단계를 추가로 포함하며, F2 세대 NOG(NOD-SCID/IL-2R γ null) 마우스의 피하에 이식된 유방암 조직 절편이 1500mm³의 크기까지 성장하는 단계를 추가로 포함하며, F2 세대 NOG(NOD-SCID/IL-2R γ null) 마우스의 피하에 이식된 유방암 조직 절편이 1500mm³의 크기까지 성장하는 단계를 추가로 포함하는, 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조방법.

청구항 8

제 3 항에 있어서,

상기 (a) 단계는 엠포테리신 B, 페니실린, 스트렙토마이신 및 젠타마이신으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 화합물로 처리하는 단계를 추가로 포함하는, 유방암 환자 유래 이중이식 동물모델의 제조방법.

청구항 9

제 3 항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 유방암 조직으로부터 적혈구를 제거하는 단계를 추가로 포함하는, 유방암 환자 유래 이중이식 동물모델의 제조방법.

청구항 10

(a) 제 1 항의 동물모델에 유방암 치료제를 처리하는 단계; 및

(b) 상기 유방암 치료제에 의하여 유방암 조직의 크기가 감소하거나 유방암 전이가 억제되었을 경우에 항암 후보물질을 상기 목적하는 유방암 환자의 유방암 치료제로 선택하는, 유방암 환자 맞춤형 유방암 치료제 선택을 위한 정보제공 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 유방암 치료제는 DNA, siRNA, 펩타이드, 단백질, 항체, 천연 추출물, 브루시안틴(bruceantin), 퍼빌레인(pervilleine), 베툴린산(betulinic acid), β -라파콘(β -lapachone), CDDO(2-cyano-3,12-dioxoooleana-1,9-dien-28-oic acid), CB-Ph, 오보바톨, CB-Pic, Obo-Rd, 트라스투주맙 및 라파티닙으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 유방암 환자 맞춤형 유방암 치료제 선택을 위한 정보제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유방암 돌연변이(Leu1780Pro mutant)를 이용한 유방암 환자 종양 유래 이중이식 모델의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 유방암은 유방에 발생한 암 세포로 이루어진 종괴를 의미하며, 일반적으로 유방의 유관과 유엽에서 발생하는 암을 일컫는다. 정상 유방조직은 유선과 유선조직을 지지하는 지방, 결합조직, 림프관으로 이루어진다. 유선조직은 유즙을 생성하는 유엽, 유엽과 유두를 연결하는 유관으로 구성된다. 유방암은 유방 구성조직 어디에서든 발생할 수 있어 다른 암에 비해 종류가 다양하다. 유방암 대부분은 유관과 유엽에 있는 세포, 그 중에서도 유관의 상피세포에서 기원한다. 유방암도 다른 암과 마찬가지로 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우 혈류와 림프관을 따라 전신으로 전이되어 심각한 결과를 초래한다.

[0004] 2014년 국제암보고서에 따르면 암은 고소득 국가일수록 그 발생률이 높으며, 한국은 북미, 서유럽과 함께 고소득 국가로 분류되어 암발생률이 높은 국가로 분류되고 있다. 유방암은 특히 전세계적으로 그 발생률이 빠르게 증가하고 있는 질환으로서 2008년에 비해 2012년에는 그 발생률이 20% 증가하였다. 따라서 유방암의 정확한 진단 및 치료에 대한 개발이 필요한 실정이다.

[0005] 유방암 치료는 발생 연령, 병기, 암의 병리학적 특성, 환자의 심리상태 등을 고려하여 수술, 방사선 치료, 항암 화학요법, 내분비 치료, 표적 치료 등 적절한 치료법을 적용하게 된다. 이중, 항암화학요법으로 치료하기 위해, 최근 여러 제약회사와 연구소들에서 환자 암조직을 이용한 PDX 모델(patient-derived xenograft model)의 개발이 활발하게 이루어지고 있다(국내 특허 출원 2015-0008019). 상기 모델은 화학적 민감도를 in vivo 상에서 평가하기에 적절하고, 여러 항암제 중에서 환자 개개인에 맞는 가장 적합한 치료제를 선택할 수 있는 좋은 전임상 모델이다. 그러나 아직은 한국인 특이적인 유방암 환자로부터 유래된 PDX 모델의 개발은 미비한 상황이다.

[0006] 따라서, 본 발명자들은 유방암 환자들로부터 분리된 한국인 특이적인 유방암 돌연변이를 가진 유방암 조직을 쥐에 이식하여 항암화학요법을 위한 PDX 동물 모델을 제작하는 방법에 대하여 연구한 결과 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 유방암 환자들로부터 획득된 한국인 특이적인 유방암 돌연변이(Leu1780Pro mutant)에 의한 유방암 조직을 쥐에 이식하여 항암화학요법을 위한 동물 모델을 제작하는 방법을 제공하는 것이다. 또한, 이를 이용하여 표적 항암제 후보물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 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 구체예는 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.

[0014] 본 명세서에 있어서 "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 신생물이라고도 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 유전 인자, 면역학적 요인 등이 있으며, 외적 요인으로는 화학물질, 방사선, 바이러스 등이 있다. 암의 발생에 관련되는 유전자에는 종양형성유전자(oncogenes)와 종양억제유전자(tumor suppressor genes)가 있는데, 이들 사이의 균형이 위에서 설명한 내적 혹은 외적 용인들에 의해 무너질 때 암이 발생하게 된다.

[0015] 본 명세서에 있어서 유방암은 인간 및 기타 포유류 질환으로서, 인간에서 가장 많은 사례는 여성이지만, 남성에서도 때때로 유방암이 발생할 수 있다. 또한, 유방암은 유방암의 임상적 진단을 의미하며, 유방암의 모든 특정한 서브표현형을 포함한다. 예를 들어, 상기 유방암은 유방 관내상피암(DCIS; Ductal Carcinoma In Situ), 미세 침윤성 관내상피암, 침윤성 유방암(IDC; Invasive Ductal Carcinoma), 수질암종, 침윤성 소엽암종, 관형성암종, 점액암종, 염증성 유방암, 유방상피내암종, 남성 유방암, 유방의 엽상종양, 재발 및 전이 유방암 또는 이들의 조합일 수 있다. 유방암은 그 진행에 따라 0기, 1기, 2기, 3기 및 4기로 구분된다. 유방암의 병기는 종양의 크기, 액와부 림프절 전이여부 및 목의 림프절 전이를 포함한 뼈, 폐 간 등의 전신 전이여부로 결정되는데, 상기 세 가지가 예후를 결정하는 중요한 인자이다. 유방암 0기는 비침윤성 유방암(상피내암)으로, 암세포가 상피 내에 국한된 경우를 말하며, 유방암 1기는 종양 크기가 2cm 이하이면서 림프절 등으로 전이가 없는 경우로, 암세포가 상피뿐만 아니라 주위 유방조직에 침범한 예를 말한다. 유방암 1기는 암 진행에서 초기 단계이므로 재발과 전이가 적어 생존율이 매우 높다. 유방암 2기는 종양 크기가 2~5cm이면서 심하지 않은 림프절 전이가 있는 경우 또는 림프절 전이는 없지만 종양 크기가 5cm 초과인 경우를 말하며, 유방암 3기는 종양 크기가 5cm 이하이지만 림프절 전이가 심한 경우 또는 종양 크기가 5cm 초과로 크고 림프절 전이가 있는 경우를 말한다. 유방암 4기는 말기로도 불리며, 뼈, 뼈, 간 등의 전신 전이가 있는 경우를 말한다. 유방암에는 모든 공격성 유방암 및 암 서브타입, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니지만 3중 음성 유방암, 2등급 유방암, 3등급 유방암, 림프절 양성(LN+) 유방암, HER2 양성(HER2+) 유방암 및 ER 양성(ER+) 유방암이 포함된다.

[0016] 본 명세서에 있어서 "암 조직 절편"이란, 인체에 유익하고자 하는 목적으로 암 환자의 암 절개술이 필요한 경우

에, 절개술 시행 후 폐기되는 암 조직으로부터 수득되는 절편을 총칭한다. 상기 암 조직 절편을 이용하여 암 환자의 인체에 유익하고자 하는 목적 하에 특정 암 조직에 대한 맞춤형 치료제 개발을 할 수 있다.

[0017] 본 명세서에 있어서 "전이"란, 암세포가 원발장기를 떠나 다른 장기로 가는 것이다. 암이 신체의 다른 부분으로 퍼지는 것은 크게 원발암에서 암 조직이 성장하여 직접적으로 주위장기를 침윤하는 것과 멀리 있는 다른 장기로 혈관이나 림프관을 따라 원격전이를 하는 것으로 나눈다. 전이는 암 발생과 관련된 유전자의 발현 억제 또는 상기 유전자의 단백질 활성 억제를 통해 조절될 수 있다.

[0018] 본 명세서에 있어서 "신생 혈관"이란, 혈관 내피세포가 증식하고 재구성되어 기존에 존재하는 혈관 네트워크로부터 새로운 혈관을 형성하는 세포 현상을 의미한다. 암세포가 증식 및 성장하기 위해서는 산소와 영양을 공급하는 새로운 혈관이 필요하므로, 신생혈관의 억제를 통해서 암의 증식 및 전이 억제를 유도할 수 있다.

[0019] 본 명세서에 있어서 "이종이식"이란, 종이 다른 동물의 간, 심장, 신장 등의 기관, 장기, 조직, 세포 등을 이식하는 방법을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 이종이식은 환자로부터 분리된 암세포를 면역결핍 동물에 이식하는 방법으로 이해될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0020] 본 명세서에 있어서 "면역 결핍 마우스"란, 암이 발병될 수 있도록 면역시스템을 구성하는 일부 구성요소를 유전자 수준에서 인위적으로 손상시켜서 정상적인 면역시스템이 구현되지 않도록 조작하여 제조된 동물모델을 의미한다. 상기 면역 결핍 마우스를 포함하는 면역 결핍 동물로는 신경계가 형성된 동물을 사용할 수 있는데, 바람직하게는 면역 결핍 포유동물을 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 면역 결핍되도록 조작된 마우스, 랫트, 햄스터, 기니어피그 등의 면역 결핍 설치류가 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 누드 마우스, NOD(non-obese diabetic) 마우스, SCID(Severe combined immunodeficiency) 마우스, NOD-SCID 마우스, NOG(NOD/shi-SCID/IL2R γ null) 마우스 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0021] 본 명세서에 있어서 "환자 유래 이종이식 동물(patient-derived xenograft, PDX)"이란, 환자 유래 암세포 또는 암 조직을 면역결핍 동물에 이종이식하여 제작된 암 환자 맞춤형 동물모델로서, 암 환자에서의 암과 형태학적 환경이 동일 또는 유사하고, 유전학적 환경이 동일 또는 유사하며, 암의 마커 단백질의 발현특성이 동일하여, 암 환자의 유전적, 생리적 및 환경적 특성을 그대로 반영한 조건을 제공할 수 있다. 따라서, 환자 유래 이종이식 동물모델에서 항암 효과가 있다고 판단된 항암제 후보물질을 암세포 또는 암 조직을 제공한 암 환자에게 투여하면, 이들 항암제 후보물질을 환자에게 직접 투여하여 스크리닝한 것과 동일한 결과를 확인할 수 있으므로, 상기 환자 유래 이종이식 동물 모델을 이용하면 항암제가 실제로 환자에게 적절한 효과를 나타낼 수 있는지에 대하여 확인할 수 있다는 장점을 가진다.

[0022] 본 명세서에 있어서, "이식" 또는 "이식 배양"이란, 세포 또는 조직을 건강한 상태로 지속적으로 장기간 배양하기 위해 주기적으로 세포 또는 조직의 일부를 새로운 배양용기에 옮긴 후 배양 배지를 갈아주면서 세포 또는 조직의 대(代)를 계속 이어서 배양하는 방법을 의미한다. 한정된 공간을 가진 배양용기 내에서 세포 또는 조직 내 세포의 수가 늘어나면서 일정시간이 지나면 증식 영양분이 소비되거나 오염 물질이 쌓여 세포가 자연히 죽게 되므로, 건강한 세포의 수를 늘리기 위한 방법으로 사용되며, 통상적으로 한 차례 배지(배양용기)를 교체하는 것 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 1세대 이식(1 passage, F1)라고 한다. 본 발명의 목적상 배양용기는 면역 결핍 마우스의 생체시스템이며, 이는 이식된 환자 유래 암 조직을 배양하기 위한 영양체이다. 배양된 암 조직을 이식할 때(passage, 예; F1→F2), 새로운 개체의 면역 결핍 마우스가 사용되는 것이 바람직하며, 이를 마우스의 순계 생산을 위한 근교계(형매교배 또는 근친교배 등)와 혼동하는 것은 바람직하지 않다. 이식 배양의 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 기계적 분리 또는 효소적 분리로 수행될 수 있다.

[0023] 본 명세서에 있어서 "기계적 방법" 또는 "기계적 분해 방법"이란, 물리적 또는 기계적으로 세포 덩어리로서의 조직을 분리하는 것을 의미하며, 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 블레이드(blade), 조직 분쇄기(tissue chopper), 바늘(needle), 피펫팅(pipetting), EBD(embryoid body divider) 또는 스크래퍼(scrapper)를 이용하여 분리하는 것일 수 있다.

[0024] 본 명세서에 있어서 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 진단은 암의 발병 유무 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, 대변 등) 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 한정되는 것은 아니다.

[0025] 본 명세서에 있어서 "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, 암 발병 및 암 전이 의심 개체에 유방암 치료용 후보 물질의 투여 후 암의 증식이 억제되거나, 암이 사멸되는 경우, 후보 물질을 암 치료제로 결정하는 암 치료제의 스크리닝 방법이다. 분자생물학적 어썰이(assay), 디지털 이미징, 세포학적 및 조직학적 검사와 같은 수단적 방법들이 유방암 발병 병소 또는 유방암 세포 전이 의심 조직에 대한 치료 효과를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0026] 본 명세서에 있어서 "항암제 후보물질"이란, 종양조직의 성장 또는 전이에 대하여 억제 활성을 가지는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 물질을 의미한다. 상기 물질은 이미 알려져 있는 항암제일 수도 있고, 미지의 물질일 수도 있다. 또한, 상기 후보물질은 화합물질, DNA, siRNA, 펩타이드, 단백질, 항체, 천연 추출물 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 후보물질은 단일 화합물 또는 화합물들을 병용하는 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 패러렐 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. 예를 들면, 항암 후보물질은 브루시안틴(bruceantin), 퍼빌레인(pervilleine), 베틀린산(betulinic acid), β -라파콘(β -lapachone), CDDO(2-cyano-3,12-dioxoooleana-1,9-dien-28-oic acid), CB-Ph, 오보바톨, CB-Pic, Obo-Rd 등을 들 수 있다.

[0027] 본 명세서에 있어서 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 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, 복강내 투여, 경막내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 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 0.1mg/kg~10mg/kg, 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체일 경우 0.1mg/kg~10mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 투여간격은 1일 1회 내지 12회일 수 있으며, 1일 12회 투여할 경우에는 2시간마다 1회씩 투여할 수 있다. 또한, 단독 또는 당업계에 공지된 다른 치료법 예를 들어 화학요법제, 방사선 및 수술과 같이 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), 수지상세포들, 말초혈액 단핵구 세포들, 또는 골수세포들을 환자 또는 적당한 공여자로부터 얻어서 본 면역 조성물로 생체 외에서 활성화된 후 그 환자에게 투여될 수도 있다.

- [0029] 본 발명은 유방암 환자로부터 분리된 유방암 조직 절편을 면역결핍 마우스의 피하에 이식하여 생성하는, 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델로서, 상기 유방암은 유방암 돌연변이인, Leu1780Pro 돌연변이(rs80357474)를 포함하는 유방암인 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 유방암 환자는 TNBC 상태 또는 Neo-TNBC 상태이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 유방암은 바람직하게는 유방암 돌연변이(Leu1780Pro mutant)를 포함하는 유방암이나, 한국인 특이적인 돌연변이를 포함하는 유방암이라면 제한이 없다.
- [0032] 또한, 본 발명은 (a) 유방암 환자로부터 분리된 유방암 조직을 절편으로 나누는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 유방암 조직 절편을 F1 세대 면역결핍 마우스의 피하에 이식하는 단계를 포함하는, 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조방법으로서, 상기 유방암은 유방암 돌연변이인, Leu1780Pro 돌연변이(rs80357474)를 포함하는 유방암인 유방암 환자 유래 이종이식 동물모델의 제조방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 면역결핍 마우스는 NOG(NOD-SCID/IL-2R γ null)이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 제조방법은 이식된 유방암 조직을 획득하여 새로운 면역결핍 마우스의 피하에 재이식하는 단계를 추가로 포함한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 유방암 환자는 TNBC 상태 또는 Neo-TNBC 상태이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, F1 세대 NOG(NOD-SCID/IL-2R γ null) 마우스의 피하에 이식된 유방암 조직 절편이 1500mm³의 크기까지 성장하는 단계를 추가로 포함하고, F2 세대 NOG(NOD-SCID/IL-2R γ null) 마우스의 피하에 이식된 유방암 조직 절편이 1500mm³의 크기까지 성장하는 단계를 추가로 포함하며, F2 세대 NOG(NOD-SCID/IL-2R γ null) 마우스의 피하에 이식된 유방암 조직 절편이 1500mm³의 크기까지 성장하는 단계를 추가로 포함한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 (a) 단계는 엠포테리신 B, 페니실린, 스트렙토마이신 및 젠타마이신으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 화합물로 처리하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 화합물은 페니실린, 스트렙토마이신 및 젠타마이신 등과 같은 항생제로 항균 처리하는 물질일 수 있고, 엠포테리신 B와 같은 항진균 처리하는 물질일 수 있다. 상기한 물질들 이외에 항생제 또는 항진균 물질을 추가할 수도 있다. 일반적으로 사용되는 항생제 또는 항진균 물질이라면, 제한되지 않는다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 (a) 단계에서 유방암 조직으로부터 적혈구를 제거하는 단계를 추가로 포함한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 유방암은 바람직하게는 유방암 돌연변이(Leu1780Pro mutant)를 포함하는 유방암이나, 한국인 특이적인 돌연변이를 포함하는 유방암이라면 제한이 없다.
- [0035] 또한, 본 발명은 (a) 상기한 동물모델에 항암 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 유방암 치료제에 의하여 유방암 조직의 크기가 감소하거나 유방암 전이가 억제되었을 경우에 항암 후보물질을 상기 목적하는 유방암 환자의 유방암 치료제로 선택하는, 유방암 환자 맞춤형 유방암 치료제 선택을 위한 정보제공 방법으로서, 상기 유방암은 유방암 돌연변이인, Leu1780Pro 돌연변이(rs80357474)를 포함하는 유방암인, 유방암 환자 맞춤형 유방암 치료제 선택을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 유방암 치료제는 DNA, siRNA, 펩타이드, 단백질, 항체, 천연 추출물, 브루시안틴(bruceantin), 퍼빌레인(pervilleine), 베틀린산(betulinic acid), β -라파콘(β -lapachone), CDDO(2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid), CB-Ph, 오보바톨, CB-Pic, Obo-Rd, 트라스투주맙 및 라파티닙으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 유방암 치료제는 바람직하게는 트라스투주맙 또는 라파티닙으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 유방암은 바람직하게는 유방암 돌연변이(Leu1780Pro mutant)를 포함하는 유방암이나, 한국인 특이적인 돌연변이를 포함하는 유방암이라면 제한이 없다.
- [0038] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명은 유방암 돌연변이(Leu1780Pro mutant)를 이용하여 성공률 높은 유방암 환자 종양 유래 이종이식 동물모델의 제조방법을 제공한다. 또한, 이를 통해 제작된 한국인 특이성을 지닌 유방암 환자 종양조직의 이종이식된 동물 모델을 제공한다. 따라서, 환자 유래 종양조직의 이종이식 동물 모델은 암 환자에서의 암과 유전적, 생리적 및 환경적 특성이 동일한 조건을 제공할 수 있다. 환자 유래 이종이식 동물 모델은 면역기능이 결핍되어 있어, 인체 유래 이종이식을 효율적으로 수행할 수 있다. 또한, 본 발명의 유방암 환자 종양 유래 이종이식 동물 모델은 인 비모에서 종양의 생성, 전이, 증식 등을 연구하기 위한 우수한 동물 모델로서, 종양 치료제 조성물의 효율적인 스크리닝 및 생체 내 항암제 감수성 검사를 통한 유방암 환자 개개인의 맞춤형 치료전략의 수립

에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042]

도 1은 PDX model 중 TNBC 환자의 F3 이상 구축 성공률과 실패율을 나타내는 그래프이다.

도 2는 PDX model 중 Neo-TNBC 환자의 F3 이상 구축 성공률과 실패율을 나타내는 그래프이다.

도 3은 유방암 돌연변이(Leu1780Pro mutant)에서의 대조군, 카보플라틴, 올라파립 처리에 대한 시간에 따른 종양 크기를 나타내는 그래프이다.

도 4는 일반적인 유방암 돌연변이(BRCA1 wild type)에서의 대조군, 카보플라틴, 올라파립 처리에 대한 시간에 따른 종양 크기를 나타내는 그래프이다.

도 5는 유방암 돌연변이(Leu1780Pro mutant)에서의 대조군, 카보플라틴, 올라파립 처리에 대하여 종양 크기를 비교하는 사진이다.

도 6은 일반적인 유방암 돌연변이(BRCA1 wild type)에서의 대조군, 카보플라틴, 올라파립 처리에 대하여 종양 크기를 비교하는 사진이다.

도 7은 유방암 돌연변이(Leu1780Pro mutant)에서의 시간에 따른 대조군 및 처리군들의 종양 크기를 나타내는 그래프이다.

도 8은 일반적인 유방암 돌연변이(BRCA1 wild type)에서의 시간에 따른 대조군 및 처리군들의 종양 크기를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043]

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.

[0045]

실시예 1. 유방암 돌연변이(Leu1780Pro mutant) 확인

[0046]

이 연구에는 2008년 1월부터 2016년 1월까지 연세대학교 암 센터에서 BRCA1/2 생식계열 변화 상태를 평가한 HBOC(유전성 유방난소 종양, hereditary breast and ovarian cancer)의 임상 특징 중 적어도 하나 이상이 포함된 745명이 포함되었다. 상기 HBOC의 임상 특징은 i) 유방암 및/또는 난소암과 관련된 1기 또는 2기 중 적어도 하나, ii) 40세 이전에 진단받은 유방암, iii) 양측 유방암, iv) 유방암 및 동시성 또는 후시성 난소암, 및 v) 상피성 난소암을 들 수 있다. 745명에는 유방 종양 596명, 난소 종양 124명, 유방암과 난소 종양 25명이 포함되었다. 의료 연구 프로토콜과 윤리에 관한 헬싱키 선언(World Medical Association Association of Helsinki)이 연구 기간 동안에 유지되었다. 이 연구에 참여한 모든 사람들은 국립 암 센터 기관 심사위원회(IRB No. NCCNCS 13717)의 승인을 받은 정보에 근거한 동의서에 서명하였다.

[0047]

말초 혈액으로부터 환자 게놈 DNA를 추출한 후, BRCA1 및 BRCA2 유전자의 전체 코딩 영역 및 엑손-인트론 경계(± 20 염기쌍)를 생거 시퀀싱(Sanger sequencing)으로 분석하였다. 분석에 사용된 표준 시퀀스는 BRCA1의 경우 NM_007294.3이고 BRCA2의 경우 NM_000059.3이다. 변이 기술법은 Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen>)의 명명 체계를 준수하였다. 변이는 원래 3-단계 체계에 의해 보고되고, 질병 유발 돌연변이 또는 VUS로 보고된 변이는 이하에 설명된 바와 같이 ACMG 지침에 따라 추가로 평가되고 재분류되었다.

[0048]

한국 표준 게놈 DB(KRGDB, <http://152.99.75.168/KRGDB/>)에서 622명, Theragen Etx Bio Institute(수원, 경기도, 한국) 실험실 데이터베이스로부터 692명을 포함한 1,314명의 한국인으로부터 대립 유전자를 검색하였다. 유방암 환자의 BRCA1 유전자에서 BRCT 영역의 류신에 대한 프롤린의 아미노산 치환(Leu1780Pro)을 유발하는 미스센스 변이 c.5339T>C(p.Leu1780Pro; rs80357474)가 검출되었다. 충분한 수의 관련 인구 자료를 사용하여 변이를 효율적으로 분류하고, BRCA1 Leu1780Pro 변이를 한국인 환자에서 가능한 병원성 창궐 돌연변이로 확인하였다(박지수 외, CANCER RESEARCH AND TREATMENT(CRT), <https://doi.org/10.4143/crt.2016.433>).

[0049]

본원에서 이용되는 유전자 발현 수준은 핵산, 예컨대 RNA, mRNA, cDNA 및 단백질을 포함하는 발현된 유전자 또는 유전자 산물의 절대량 또는 상대량일 수 있다.

- [0051] **1-1. 환자 정보**
- [0052] 2013년 12월 24일부터 2016년 10월 26일까지 등록된 환자를 대상으로 실험하였다. 또한, 본 연구는 기관 검토 위원회의 승인 하에 수행하였다. 환자군 포함기준으로 조직학적 평가에 의한 일차 IDC 및 ALN 전이, 임상 병기에 대한 수술전 FDG PET/CT, 및 PET의 FWHM(full-width at half maximum)에 기초한 병적 크기로 1cm 이상의 종양크기를 확인하였다. 환자들의 평균 나이는 50.5 ± 10.5 년(범위: 30-76년)이었다.
- [0054] **1-2. 환자 유래 이종이식 동물(PDX) 제작**
- [0055] 수술 후 얻은 암조직은 3 종류의 항생제(페니실린, 스트렙토마이신 및 젠타마이신)와 항진균제(엠포테리신 B)가 들어 있는 배지에 넣는다. 종양조직을 PBS에 세척 후 3mm^3 정도의 작은 절편으로 자른다. 작게 자른 절편을 5-10개를 모아 NOD-SCID 마우스 또는 IL-2 R γ null(NOG) 마우스(F1 세대)의 등쪽 피하에 이식한다. 이후, 종양의 크기는 베니어 칼리퍼(vernier calipers)를 사용하여 일주일에 두 차례 측정한다. 피하에 이식한 종양의 크기가 약 1500mm^3 에 도달하면, 마우스를 희생하여 종양을 획득하고 $5 \sim 10\text{mm}^3$ 크기의 절편으로 자른 후 새로운 NOD-SCID 마우스 또는 IL-2 R γ null(NOG) 마우스(F2 세대)에 재이식한다. 나머지 절편들은 추후 조직학적 분석 및 유전체 분석을 위해 저장한다. 같은 방식으로 F3, F4, F5 세대까지 이식을 진행하여 종양조직이 이식된 마우스의 개체 수를 증가시킨다.
- [0057] **실시예 2. 환자 유래 이종이식 동물(PDX)의 특징 확인**
- [0058] **2-1. 제 1세대(F1) PDX 모델**
- [0059] NOD-SCID 마우스 또는 IL-2 R γ null(NOG) 마우스를 준비한다. 환자 유래 유방암 조직을 유선 지방 패드에서 생착하였다. 6개월까지 종양의 성장이 없는 마우스는 희생시키고, 종양의 크기가 1500mm^3 까지 자라면, 다시 암 조직을 수거하여 다음 세대로 이식하였다.
- [0061] **2-2. 제 2세대(F2) PDX 모델**
- [0062] NOD-SCID 마우스 또는 IL-2 R γ null(NOG) 마우스에 제 1세대에서 수거된 암 조직을 재이식하여 F2 세대 PDX 모델을 제조하였고, 이식된 종양의 크기가 1500mm^3 까지 자라면, F3 세대로 재이식하였다.
- [0063]
- [0064] **2-3. 제 3세대(F3) PDX 모델**
- [0065] F3 세대의 NOD-SCID 마우스 또는 IL-2 R γ null(NOG) 마우스에서는 이식 후 종양의 크기가 1500mm^3 까지 자라면, 희생시켜 냉동보존(cryo-preservation)을 실시하였다. F3 세대까지 넘어간 경우, 이를 구축 성공 모델로 간주하였다.
- [0067] **all subtype**
- [0068] All subtype 섹션에 포함되는 유방암에는 모든 침윤성 유방암 및 유방암 아형(subtype), 예컨대 이에 제한되는 것은 아니지만, 루미날(luminal) 아형, HER2 아형, 삼중음성(TNBC) 아형을 포함한다.
- [0070] **TNBC(Triple Negative Breast Cancer)**
- [0071] 본원에서 이용되는, "3중 음성 유방암"(TNBC)은 종종 에스트로젠 수용체(ER) 단백질, 프로게스테론 수용체(PR) 단백질 및 HER2 단백질의 발현이 없거나 유의미하게 감소된 공격성 유방암 서브타입인 환자로부터 채취한 유방암 조직 절편의 유전자 상태를 말한다. TNBC 및 다른 공격성 유방암은 전형적으로 HER2-유도 요법, 예컨대 트라스투주맙 또는 라파티닙을 포함하는 유방암 치료에 대해 이용가능한 가장 유효한 일부 요법 및 내분비 요법, 예컨대 타목시펜 및 아로마타아제 저해제에 비감수성이다.
- [0073] **Neo-TNBC**
- [0074] 3중 음성 유방암을 앓는 환자로부터 유방암 조직 절편을 채취하기 전에, 수술전 보조요법(Neoadjuvant status)을 처리한 TNBC 유방암 환자군을 의미한다. 본원에서 이용되는 수술전 보조요법의 예로서는, 근치적절제술, 함암화학요법, 방사선치료, 면역세포치료법, 감시림프절 생검 및/또는 액와림프절 절개를 한 유방보존술 또는 변형 방사선 유방절제술 등의 다양한 치료법을 들 수 있다. 화학요법은 도세탁셀로 이어지는 독소루비신 및 사이클로포스파마이드로 구성된 타산-기반의 치료법을 포함할 수 있다. 방사선치료법은 방사선을 유방 및 액와부 또

는 경부 혹은 내유림프절에 조사하는 방법을 말한다. 구체적으로, 수술전 보조요법으로는, 호르몬 치료법 또는 HER2 표적치료제인 트라스투주맙 등을 호르몬 수용체 양성 또는 HER2-양성 원발암 환자들에게 제공하는 경우도 포함할 수 있다. 환자들은 초기 치료 후 적어도 3년 동안 매 6개월마다 병원을 재방문하여 신체검사와 유방 촬영술, 유방 초음파검사, 및 전신 골 스캔 검사를 통상적으로 수행하거나, FDG PET/CT 및 유방 MRI는 초기 치료 후 1년 및 3년에 수행한 경우도 포함할 수 있다. 재발이 의심되는 환자들은 통상적인 영상검사 외에 추가로 정밀검사를 행하였다. 생존 기간은 첫 진단일 혹은 수술일로부터 재발 또는 마지막 follow-up 날짜까지로 셈을 하였다. 재발 없는 생존(RFS; Recurrence-free survival)은 동측 유방 또는 국소적으로 침윤성 재발; 원격 재발; 또는 유방암, 비유방암 원인 또는 선행 연구에서 언급된 미지의 원인으로 인한 사망 없이, 생존한 것으로 정의 하였다. 유방암은 의료 차트에서 보고된 바와 같이 주치의의 평가에 기초하여 재발성 또는 전이성으로 결정되었다.

[0076] 환자 및 수술 견본

[0077] 환자 나이, 종양 크기, 림프절 전이 상태, 조직학적 등급, ER(에스트로겐 수용체) 상태, PR(프로게스테론 수용체) 상태, HER2(인간 상피 성장 인자 수용체 2) 상태, Ki67, 진행 상태, 수술전 보조 요법, 및 유발가능한 질병 등을 포함하는 정보 및 추적 데이터를 포함하는 조직병리학 및 임상 데이터를 기반으로 실험하였다.

[0079] 유방암 진행에 따른 병기 구분

[0080] 암을 병기로 나누는 목적은 질병의 진행과 예후를 평가하고, 치료방법에 따른 결과를 예측하기 위함이다. 유방암의 병기는 유방종괴의 크기(T), 액와(겨드랑이) 림프절 전이 여부(N), 경부(목) 림프절 전이를 포함한 뼈·폐·간 등의 전신 전이 여부(M)에 따라 결정되는데, 이 세 가지(TNM)가 예후를 결정하는 데 중요한 인자이기 때문이다. 유방암의 병기는 TNM에 따라 0기, 1기, 2기, 3기, 4기로 구분된다.

[0082] 종양 크기(T stage)

[0083] 종양 크기(T stage)는 크게 하기와 같이 등급화할 수 있다.

[0084] - T0: 종양의 증거가 없음

[0085] - Tis: 관상피내암 또는 소엽상피내암

[0086] - T1: 종양의 최대 직경이 2cm 이하인 경우

[0087] - T2: 종양의 최대 직경이 2cm 초과, 5cm 이하인 경우

[0088] - T3: 종양의 최대 직경이 5cm 초과하는 경우

[0089] - T4: 종양이 흉벽이나 피부를 침범한 경우

[0091] 림프절 전이

[0092] 림프절 전이 정도에 따른 N 병기를 하기와 같이 등급화할 수 있다.

[0093] - N0: 림프절 전이가 없음

[0094] - N1mi: 림프절의 미세전이

[0095] - N1: 전이된 림프절 개수가 1~3개인 경우

[0096] - N2: 전이된 림프절 개수가 4~9개인 경우

[0097] - N3: 전이된 림프절 개수가 10개 이상인 경우

[0099] 원격전이 여부에 따른 M 병기

[0100] - M0: 원격전이가 없는 경우

[0101] - M1: 유방과 인접장기 외에 원격전이가 있는 경우

[0103] 조직학적 등급

[0104] 악성도가 높은지를 알아보는 유방암의 조직학적 등급은 modified Bloom-Richardson 등급을 사용하며, 이 등급은 종양의 현미경 검사를 통하여 암종 세포의 세관 형성 정도, 핵의 다형성 정도, 유사 분열 정도에 따라 점수를

매겨 합산을 한 후 그 점수에 따라 3등급으로 분류한다. 등급이 높을수록 환자의 예후가 안 좋을 수 있다

표 1

TNM 기준에 따른 유방암의 병기

병기		T	N	M
0 기		Tis	N0	M0
1 기	IA IB	T1	N0	M0
		T0	N1mi	M0
		T1	N1mi	M0
2 기	IIA	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
		T2	N0	M0
	IIB	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
3 기	IIIA	T0	N2	M0
		T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1	M0
		T3	N2	M0
	IIIB	T4	N0	M0
		T4	N1	M0
		T4	N2	M0
	IIIC	Any T	N3	M0
4 기		Any T	Any N	M1

[0106]

[0108] c-erbB-2

[0109] c-erbB-2는 수용체 티로신-단백질 키나아제로서, HER2(인간 상피 세포 성장 인자 수용체 2) 또는 HER2/neu라고도 한다. ERBB2 유전자의 과발현으로도 알려진 증폭은 유방암의 약 15-30%에서 일어난다. 질병 재발의 증가 및 나쁜 예후와 밀접하게 관련되어 있다. 과발현은 또한 난소암, 위암, 폐암, 자궁내막암과 같은 공격적 형태의 자궁암에서 발생하는 것으로 공지되어 있다.

[0111] Ki67

[0112] Ki67 또는 MKI67로도 알려진 항원 Ki-67은 사람에서 MKI67 유전자(단클론 항체 Ki-67로 식별되는 항원)에 의해 코딩되는 단백질이다. Ki-67 단백질은 증식을 위한 세포 마커이고, 세포 증식과 관련이 있다. Ki-67 항원은 세포주기 중 간기(interphase) 동안에 세포핵 내에서만 검출될 수 있지만, 유사 분열에서 대부분의 단백질은 염색체의 표면으로 재배치된다. Ki-67 단백질은 세포주기(G1, S, G2 및 유사 분열)의 모든 활성 단계 동안 존재하지만, 휴지 세포(G0)에는 존재하지 않는다.

[0114] 실시예 3. PDX의 성공률 측정 방법

[0115] 전체 PDX 모델 구축을 위해 61명의 환자의 조직이 사용되었다. 환자의 유방암 조직 절편을 누드 마우스에 이식한 경우, 이종 이식 거부 반응이 나타나거나, 이식된 마우스가 실험 도중에 죽으면, 이를 실패로 판정하였다. 각 유방암 조직 절편의 특성에 따라서 분류하여, 총 개체수 중의 해당 개체수의 백분율로 표기하여, 실패율 및 성공률을 측정하였다. (도 1 및 도 2 참고)

[0117] 통계적 분석

[0118] 대립형질 빈도(allele frequency)와 유전자형 빈도를 구해 단일 염기 다형성을 이용하여 하디-와이버그 평형(Hardy-Weinberg equilibrium; HWE)여부를 확인하였다. p-value<0.05일 때 하디-와이버그 평형이 성립하는 것으로 보았다. Linkage disequilibrium (LD)분석(D')은 Haploview program version 3.2를 사용하였다. 유전자형과 일배체형의 빈도수는 SAS 프로그램(SAS Institute, Cary, NC)을 이용하여 오즈비(Odd ratio; OR), 95% 신뢰구간(95% CI)과 p-value를 구하여 유방암 PDX와의 연관성을 확인하였다. 또한, 본페로니 분석 방법(pc value)으

로 엄격한 다중 분석을 시행하였다. 신뢰구간의 상, 하한값이 1을 포함하지 않고 $p\text{-value} < 0.05$ 일 때, 유방암과의 연관성분석 즉, 위험도 오즈비율이 유의한 것으로 판단한다. 당업계에서 공지된 다양한 방법을 응용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 스튜던트 t-검정(Student's t-test), 카이-스퀘어 검정(Chi-square test) 및 다중 로지스틱 회귀 분석(multiple logistic regression analysis)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0120]

3-1. All subtype에서의 성공률 측정 방법

표 2

		PDX status		p-value
Factors		Fail (%)	Success (%)	
Age (years)	≤60	32 (66.7)	11 (78.6)	0.519
	>60	16 (33.3)	3 (21.4)	
T stage	T1	28 (58.3)	4 (28.6)	0.020
	T2	18 (37.5)	6 (42.9)	
	T3	2 (4.2)	4 (28.6)	
Nodal status	Negative	31 (66.0)	6 (50.0)	0.334
	Positive	16 (34.0)	6 (50.0)	
Histologic grade	I/II	22 (50.0)	1 (7.1)	0.005
	III	22 (50.0)	13 (92.9)	
ER	Negative	43 (89.6)	13 (100.0)	0.575
	Positive	5 (10.4)	0 (0.0)	
PR	Negative	46 (95.8)	13 (100.0)	1.000
	Positive	2 (4.2)	0 (0.0)	
HER2	Negative	41 (89.1)	13 (100.0)	0.576
	Positive	5 (10.9)	0 (0.0)	
Ki67 (%; n = 55)	≤20 (n = 19)	17 (38.6)	2 (18.2)	0.295
	>20 (n = 36)	27 (61.4)	9 (81.8)	

[0121]

[0123]

상기 표 2에 나타나는 바와 같이, all subtype일 경우에, 환자 연령은 60세 초과와 60세 이하의 연령일 경우에 조직으로부터 형성될 때 성공률이 높았다. 본 실험에서는 종양 크기가 T2 또는 T3일 때 성공률이 높았고, T3의 종양 크기일 때가 바람직하다. 림프절 전이 상태는 음성일 때보다 양성일 때 성공률이 더 높은 것으로 나타났다. 조직학적 등급은 I등급 또는 II등급보다는 III등급에서 성공률이 높았다. ER 음성, PR 음성, 또는 c-erbB-2 음성일 경우에 성공률이 높은 것으로 나타났다. Ki67 진단 마커를 사용하여, 고 Ki67 종양(>20)일 때가 저 Ki67 종양(≤20)일 때보다 성공률이 높았다.

[0125]

3-2. TNBC서브타입에 대한 성공률 확인

표 3

		PDX status		
Factors		Fail (%)	Success (%)	p-value
Age (years)	≤60	25 (62.5)	11 (78.6)	0.339
	>60	15 (37.5)	3 (21.4)	
T stage	T1	21 (52.5)	4 (28.6)	0.046
	T2	17 (42.5)	6 (42.9)	
	T3	2 (5.0)	4 (28.6)	
Nodal status	Negative	26 (66.7)	6 (50.0)	0.325
	Positive	13 (33.3)	6 (50.0)	
Histologic grade	I/II	17 (45.9)	1 (7.1)	0.010
	III	20 (54.1)	13 (92.9)	
Ki67 (% , n = 49)	≤20	12 (31.6)	2 (18.2)	0.475
	>20	26 (68.4)	9 (81.8)	

[0126]

[0128]

상기 표 3에 나타나는 바와 같이, TNBC 서브타입일 경우에, 환자 연령은 60세 초과와 60세 이하의 연령일 경우에 조직으로부터 형성될 때 성공률이 높았다. 본 실험에서는 종양 크기가 T1 및 T2인 경우보다 종양 크기가 T3일 때 성공률이 가장 높았다. 림프절 전이 상태는 음성일 때보다는 양성일 때 성공률이 더 높은 것으로 나타났다. 조직학적 등급은 I등급 또는 II등급보다는 III등급에서 성공률이 높았다. Ki67 진단 마커를 사용하여, 고 Ki67 종양(>20)일 때가 저 Ki67 종양(≤20)일 때보다 성공률이 높았다.

[0130]

3-3. Neo-TNBC서브타입에 대한 성공률 확인

표 4

		PDX status		
	Factors	Fail (%)	Success (%)	p-value
Age (years)	≤60	19 (79.2)	9 (90.0)	0.644
	>60	5 (20.8)	1 (10.0)	
T stage	T1	12 (50.0)	2 (20.0)	0.086
	T2	10 (41.7)	4 (40.0)	
	T3	2 (8.3)	4 (40.0)	
Nodal status	Negative	15 (65.2)	3 (33.3)	0.132
	Positive	8 (34.8)	6 (66.7)	
Histologic grade	I/II	14 (66.7)	0 (0.0)	0.004
	III	7 (33.3)	10 (100.0)	
Ki67 (% , n = 31)	≤20 (n = 12)	10 (43.5)	2 (25.0)	0.433
	>20 (n = 19)	13 (56.5)	6 (75.0)	
Neoadjuvant response	Responder	24 (100.0)	4 (40.0)	<0.001
	Non Responder	0 (0.0)	6 (60.0)	
Clinical feature	Not aggressive disease	24 (100.0)	3 (30.0)	<0.001
	Aggressive disease *	0 (0.0)	7 (70.0)	

* Progression disease during preoperative chemotherapy, recurrent, and metastatic disease were considered to be aggressive diseases.

[0131]

[0133]

상기 표 4에 나타나는 바와 같이, Neo-TNBC 서브타입일 경우에, 환자 연령은 60세 초과와 연령의 경우보다는 60세 이하의 연령일 경우에 조직으로부터 형성될 때 성공률이 높았다. 본 실험에서는 종양 크기가 T1 및 T2인 경우보다 종양 크기가 T3일 때 성공률이 가장 높았다. 림프절 전이 상태는 음성일 때보다는 양성일 때 성공률이 더 높은 것으로 나타났다. 조직학적 등급은 I등급 또는 II등급보다는 III등급에서 성공률이 높았다. Ki67 진단 마커를 사용하여, 고 Ki67 종양(>20)일 때가 저 Ki67 종양(≤20)일 때보다 성공률이 높았다. 질환의 진행에 있어서, 반응자보다는 무반응자(non-responder)의 성공률이 보다 높았다.

[0135]

실시예 4. 처리 설정에 따른 PDX 성공률

[0136]

RPMI 1640 media에 1%의 penicillin streptomycin을 첨가한 media를 ice box에 넣어 수술실로 이동한다. 수술실에서 외과 의사 tumor tissue를 떼어내면 이를 media에 담아 동물실험실로 이동한다. PDX 실험에는 6-12 주령의 IL-2 receptor gamma null mouse (NOG mouse)를 사용하며, isoflurane을 이용한 호흡마취를 실시 후 mammary fat pad에 tumor tissue를 이식한다. 이를 F1 mouse라 하며, 최소 6개월 최장 1년 정도를 관찰하며 일 주일에 한 번 caliper를 이용하여 크기를 측정한다(장축*단축²*0.5). tumor size가 1500mm³ 이상이 되면 다음 generation으로 이식을 진행하며, 만약 그렇지 못한 경우 sacrifice를 진행하고 이를 fail로 여긴다. F1에서 성공적으로 자란 경우, tumor를 harvest 한 뒤 일부를 대략 5*5*5(mm) 정도의 size로 chopping하여 다시 mouse mammary fat pad에 이식한다. 이를 F2 mouse라 한다. 남은 tumor tissue의 경우 paraffin block을 제작하고, sequencing을 위해 fresh-frozen 상태로 남겨 놓고, 다시 이식하여 F2 mouse를 만들 수 있게 cryo-preservation을 진행한다. Cryo-preservation의 경우 cell-preservation과 같이 DMSO와 FBS(fetal bovine serum)가 1:9 비율로 섞인 media를 넣어 후 freezing container에 넣어 -70℃의 deep-freezer(온도가 서서히 내려간다. 조직에 damage를 최소화 한다.)에서 하루 동안 보관 후 LN2 tank에 이동하여 보관하게 된다. 다시 stock을 풀어 사용할 경우 PBS나 free media(RPMI1640)를 사용하여 tumor tissue를 충분히 washing 후 mouse에 이식해야 한다. 이후, F2 mouse의 tumor size가 1500mm³ 이상이 되면 F3 mouse에 이식한다. F3까지 구축된 경우 성공적인 PDX model이라 여긴다. 이는 환자를 대신하여 여러 가지 drug screening에 사용될 수 있다. F3 mouse

의 tumor size가 1500mm³ 이상이 되면 더 이상 generation을 넘기지 않고 paraffine block 제작 및 sequencing 용 fresh frozen으로 보관 후 나머지 tumor tissue는 cryo-preservation 진행하여 보관하게 된다. 이렇게 성공적으로 구축된 PDX model의 경우 H&E staining 및 immunohistochemistry를 통해 환자와의 histopathological characteristics의 동일성을 확인하게 된다. IHC의 경우 ER(estrogen receptor), PR(progesterone receptor), HER2(human epithelial receptor 2), Ki67에 대한 staining을 진행한다.

[0138] 실시예 5. 항암제 처리에 따른 PDX 모델에서의 반응

[0139] 유방암 돌연변이 Leu1780Pro가 있는 PDX 모델의 경우, 난소암 치료제인 올라파립(Olaparib, 상품명: Lynparza)에 비하여 카보플라틴(carboplatin, 상품명: Paraplatin)에서 완전 반응(complete response)을 확인할 수 있었다.(도 3 및 도 4 참고) 유방암 돌연변이 Leu1780Pro가 있는 군에서, 각 마우스에 대한 종양 크기의 증가 또는 감소를 퍼센트로 나타낸 그래프이다. 모든 카보플라틴을 처리한 군에서의 종양의 성장이 8일 이후부터 감소하여 sacrifice 전까지 지속적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.(도 5 내지 도 8 참고)

[0141] 상기 실험시 상기 결과에 따라서, 인체유래 이중이식은 충분한 암검체를 획득하기 어려운 암종에 효과적이다. 특히 절제율이 낮은 암종은 생검으로만 검체를 얻을 수 있기 때문에 양질의 바이오데이터를 생산하기 위한 검체 획득을 위한 PDX의 좋은 적응증이 된다. 유방암 중에 한국인에게 민족 특이적으로 발병되는 변이인, 유방암 돌연변이 Leu1780Pro를 포함하는 유방암 등은 본 발명의 NOD-SCID 마우스 또는 IL-2 R γ null(NOG) 마우스를 이용하여 성공률이 높은 PDX가 수행될 수 있다.

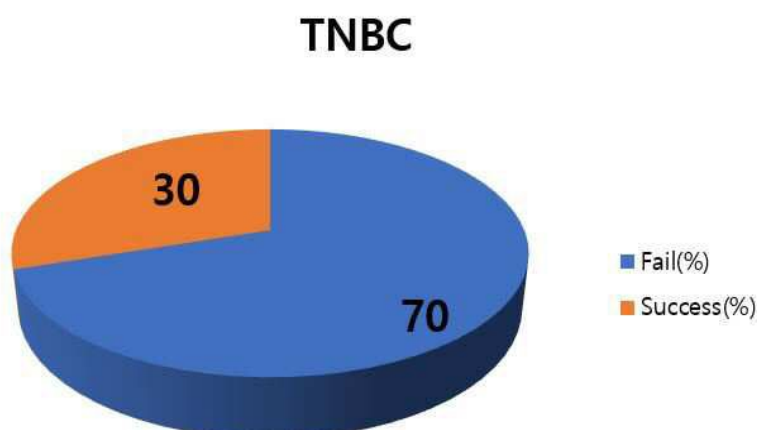
[0142] 내시경초음파 유도하 세침흡인 생검으로 얻은 세포진 조직, 간전이 병소로부터 생검을 통하여 얻은 조직 또는 수술적 절제를 통하여 얻은 조직을 단계적으로 본 발명의 모델에 이식함으로써 인체유래 이중이식을 수행할 수 있으며, 이를 통해 인 비보에서의 종양 연구가 보다 효율적으로 이루어질 수 있다.

[0143] 따라서, 상기 동물 모델에서 항암 효과가 있다고 판단된 항암제 후보물질을 암세포 또는 암 조직 제공 암 환자에게 처리하면, 이들 항암제 후보물질을 환자에게 처리한 것과 동일한 효과를 확인할 수 있으므로, 암 환자의 표적 항암제 후보물질 스크리닝 및 암 치료에 큰 활용이 기대된다.

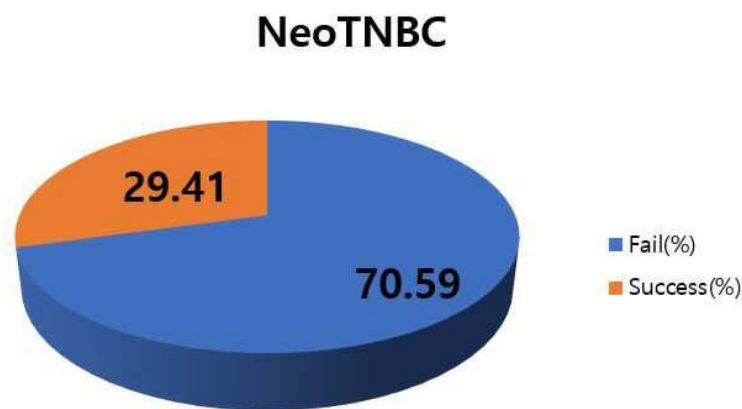
[0144] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

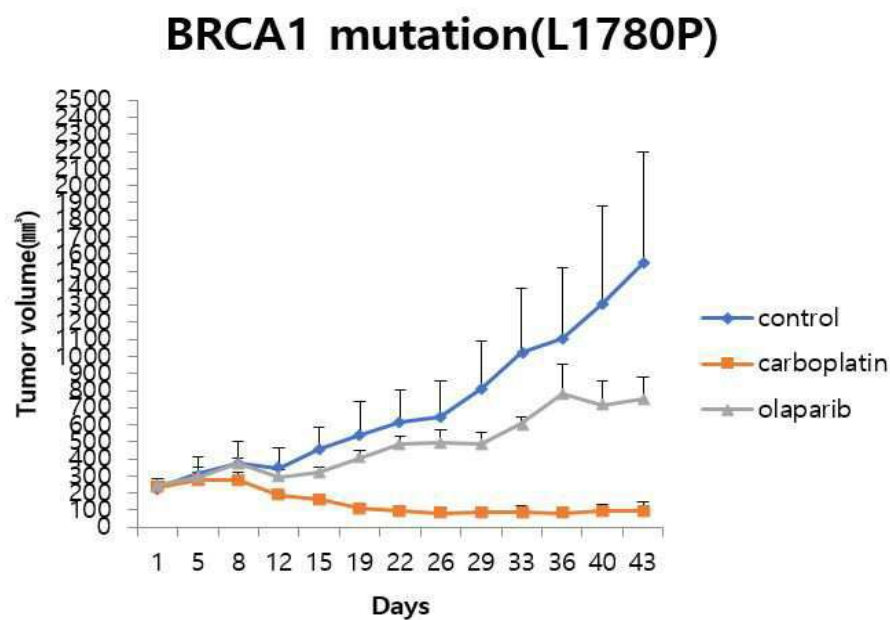
도면1



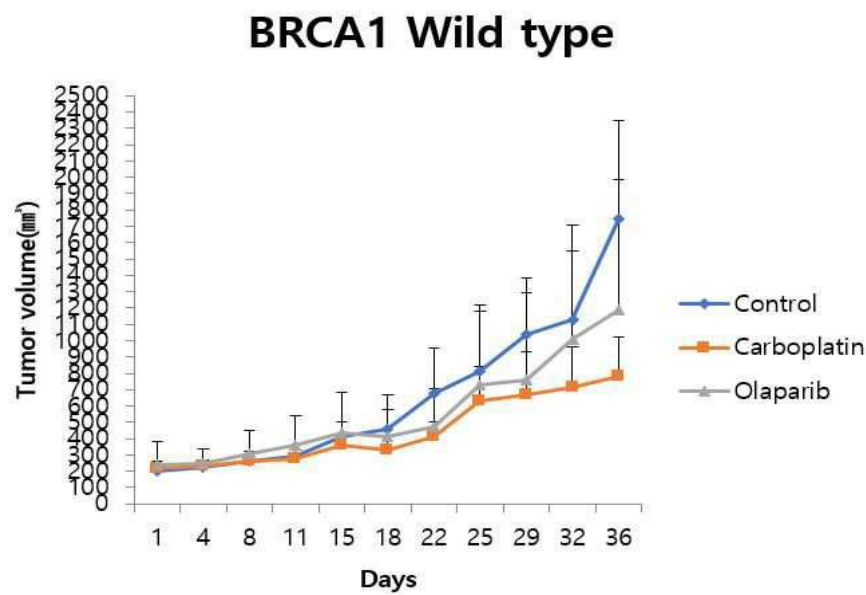
도면2



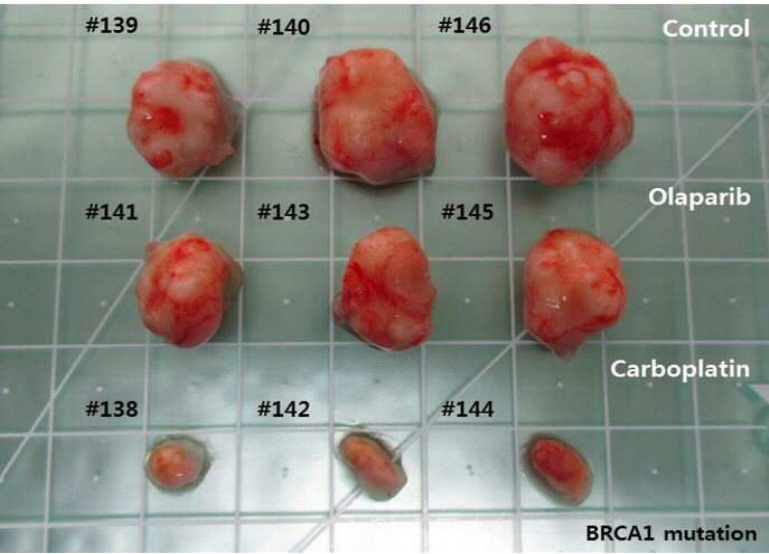
도면3



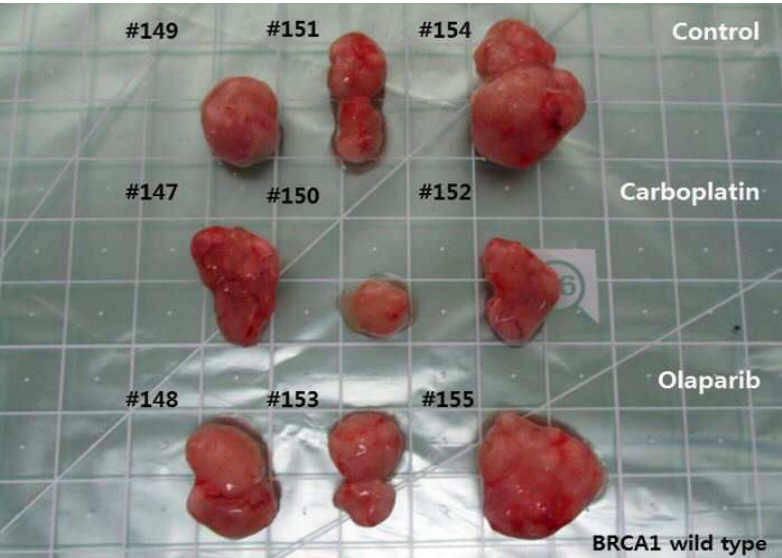
도면4



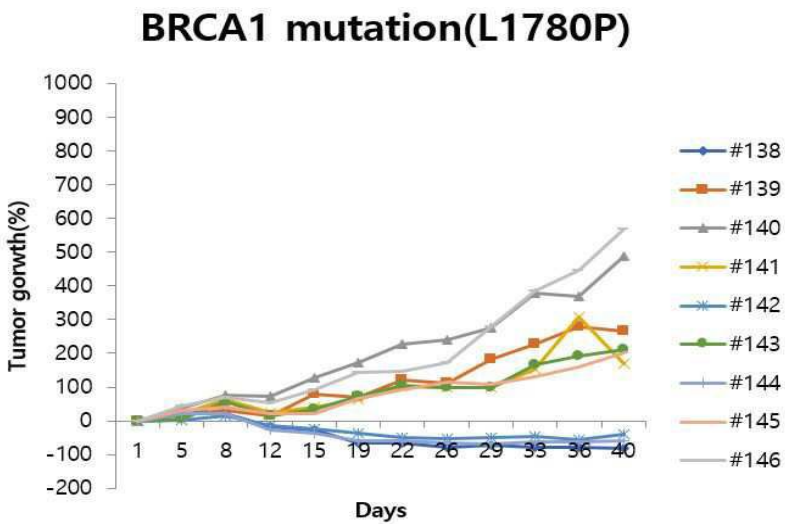
도면5



도면6



도면7



도면8

