



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0097183  
(43) 공개일자 2008년11월04일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.<br/><i>C12N 5/00</i> (2006.01) <i>C12N 5/02</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7017366</p> <p>(22) 출원일자 2008년07월16일<br/>심사청구일자 없음<br/>번역문제출일자 2008년07월16일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2006/047954<br/>국제출원일자 2006년12월15일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/075440<br/>국제공개일자 2007년07월05일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>60/751,127 2005년12월16일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>웨이센탈 래리 마크<br/>미국 캘리포니아 92649 헌팅톤 비치 코트니 라인 17031</p> <p>(72) 발명자<br/>웨이센탈 래리 마크<br/>미국 캘리포니아 92649 헌팅톤 비치 코트니 라인 17031</p> <p>(74) 대리인<br/>박장원</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 20 항

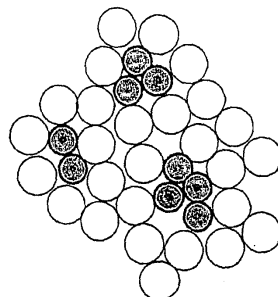
**(54) 내피 세포를 함유하는 미소응집체**

**(57) 요약**

생체검사된 조직내에 포함된 세포들의 천연 환경물을 혼합한 미소응집체는 미소응집체 내 포함된 세포 유형의 생존능력에 다양한 처리 효과를 평가하고 예측하는데 사용된다.

**대표도 - 도1A**

마이크로클러스터 내의 세포



CD31 세포질 염색은 암 미세클러스터 내의 미세모세관 세포들의 형태학적 동정을 확인하였다

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

최소한 생존가능한 내피세포들 및 천연적으로(native) 주위의 생존가능한 비내피세포들로 구성되고, 현미경 관찰에 적절한 표면에 나타나는 분리된 미소응집체.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 내피세포들은 모세혈관 내피세포들인 것인 미소응집체.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 주위 세포들은 종양세포들인 것인 미소응집체.

### 청구항 4

잘게잘라진 생검 시료를 일련의 원심분리 단계들을 수행하도록 하는 것으로, 여기에서 상기 각각의 단계들에서 시료는 50-500xg의 힘으로 수행하고, 그리고나서 즉시 1xg로 회복하도록하는 것,

그리하여 클러스터 펠릿과 상청액을 얻는 것,

상청액을 제거하는 것, 그리고

펠릿을 재현탁시키는 것을 포함하고;

상기 일련의 원심분리 단계들을 분리된 미소응집체가 형성될 때까지 반복되는 것인, 제1항의 미소응집체를 제조하는 방법.

### 청구항 5

미소응집체 내 세포 생존능력 상에 처리제 효과를 측정하는 방법으로,

최소한 생존가능한 내피 세포들 및 천연적으로 주위의 생존가능한 비내피세포들로 구성된 최소한 하나의 미소응집체를 포함하는 조성물과 처리제(treatment)를 접촉하는 것과 상기 미소응집체 내 생존능력 상에 상기 처리제 효과를 현미경적 관찰에 의해 관찰하는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 조성물은 상기 미소응집체의 배양물인 것인 방법.

### 청구항 7

제5항에 있어서, 상기 방법은 현미경적 관찰을 위한 표면에 상기 미소응집체를 침전시키는 것을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 8

제5항에 있어서, 상기 관찰단계는 살아있는 세포들에 의해 배제되는 제1 지시자(indicator)를 추가하고, 미세집합체 내 존재하는 임의의 세포들에 의해 상기 지시자의 흡수를 관찰하는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 9

제7항에 있어서, 상기 관찰단계는 살아있는 세포들에 의해 배제되는 제1 지시자(indicator)를 추가하고, 미세집합체 내 존재하는 임의의 세포들에 의해 상기 지시자의 흡수를 관찰하는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 10

제6항에 있어서, 상기 제1 지시자는 미소응집체의 상기 배양물에 추가되는 것인 방법.

### 청구항 11

제7항에 있어서, 상기 제1 지시자는 현미경적 관찰에 적절한 표면에 상기 미소응집체에 추가되는 것인 방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 살아있는 세포들에 의해 배제되는 것이 아닌 제2 지시자로 미소응집체를 처리하는 것을 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 13**

제11항에 있어서, 살아있는 세포들에 의해 배제되는 것이 아닌 제2 지시자로 미소응집체를 처리하는 것을 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 제2 지시자는 현미경적 관찰에 적절한 표면에 나타나는 미소응집체에 추가되는 것인 방법.

**청구항 15**

제8항에 있어서, 상기 제1 지시자는 패스트 그린 (fast green)인 것인 방법.

**청구항 16**

제12항에 있어서, 상기 제1 지시자는 패스트 그린이고, 상기 제2 지시자는 헤마틴/에오신(H/E)인 것인 방법.

**청구항 17**

제5항에 있어서, 미소응집체 내 주위 세포들은 중앙세포들이나 것인 방법.

**청구항 18**

제5항에 있어서, 미소응집체 내 주위 세포들은 정상세포들이나 것인 방법.

**청구항 19**

내피세포들의 사멸을 특이적으로 초래하는 작용제를 동정하는 방법으로,

최소한 생존가능한 내피세포들 및 천연적으로 주위의 생존가능한 비내피세포들로 구성된 미소응집체를 후보작용제로 처리하는 것;

상기 작용제가 효과를 발휘하도록 충분한 시간을 주는 것;

생존가능한 세포들로부터 배제된 제1 염색으로 미소응집체를 처리하는 것; 및

미소응집체의 세포들에 의해 상기 염색의 흡수 또는 흡수의 결여를 관찰하는 것을 포함하고, 이것에 의해 미소응집체의 주위 세포들이 아닌 미소응집체의 내피세포들 내에 상기 염색의 흡수를 초래하는 작용제가 내피세포들의 사멸을 특이적으로 초래하는 작용제로 동정되는 것인 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 관찰 단계 전에, 제2 염색 용액으로 상기 미소응집체를 처리하는 것을 포함하고, 상기 용액은 상기 제1 염색의 더 큰 가시성(visibility)을 초래하는 것인 방법.

**명세서**

**기술 분야**

<1> **관련 출원**

<2> 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)에 의거하여, 2005년 12월 16일 출원된 미국 가출원 제60/751,127호를 우선권으로서 주장한다. 상기 출원의 내용은 본원에 참조로서 인용된다.

<3> **기술 분야**

<4> 본 발명은 천연(native) 구조를 유지하는 미소응집체(microaggregate)에서 모세혈관 조직의 생존능력

(viability)에 대한 연구, 더욱 구체적으로는, 상기 미소응집체에서 모세혈관 조직의 성장 및/또는 증식을 파괴, 분해, 또는 촉진하는 방법에 대한 연구에 관한 것이다. 본 발명은 특히, 암의 치료를 위한 후보자 약물, 특히 신생 혈관의 성장을 특이적이고 직접적으로 억제하는 것들의 효과를 측정하는 데 유용하다.

**배경 기술**

- <5> 조직(정상 및 종양(neoplastic))의 크기가 증가할 때는, 이들은 성장을 유지하기 위한 영양분을 공급받기 위해서 모세혈관의 형성(혈관신생)을 필요로 한다. 이러한 모세혈관의 구성분에는 거의 대부분 내피 세포가 포함되지만, 또한 관련된 중배엽 세포(mesenchymal cells), 섬유아세포, 평활근세포(smooth muscle cells), 및 페리사이트(pericytes)가 포함되어 있다. 혈관 신생은 상처 회복과 같은 정상적인 과정에서 중요하기도 하지만, 암, 건선, 당뇨병, 류마티스성 관절염, 및 노화성 반점 퇴화(age-related macular degeneration)와 같은 질병에서도 중요하다.
- <6> 정상적인 조직 및 병든 조직 모두에서 인 비트로(*in vitro*)에서 모세혈관을 연구하기 위해서는 개선된 방법이 요구된다. 현재 공지되어 있는 방법의 개요는, Staton, *et al.*, "Current Methods for Assaying Angiogenesis *in vitro* and *in vivo* " *Int J Exp Path* (2004) 85:233-248에 제공되어 있다. 인 비보(*In vivo*) 모델은 유용하지만 다소 불편하다. 인 비트로 모델은 덜 불편하지만, 더욱 인공적이고 신뢰성이 낮다.
- <7> 특히, 암의 모세혈관을 표적으로 하는, 항암 약물 및 기타 치료제의 활성을 예측하기 위해서는 개선된 방법이 요구된다. 예를 들어, 베바시주맵 (bevacizumab, Avastin<sup>®</sup>)은 암의 모세혈관을 표적으로 하는 FDA의 승인을 받은 항암 약물이다. Avastin<sup>®</sup>의 총비용은 10개월의 치료 기간 동안에 40,000달러 이상이 들지만, 환자 중 비교적 적은 퍼센트(%)만이 실질적인 혜택을 받고 있다. Ince, *et al.*, "Association of k-ras, b-raf, and p53 Status with the Treatment Effect of 베바시주맵," *J Natl Cancer Inst* (2005) 97:981-989에서 기술된 바와 같이, 이러한 치료에 환자가 가장 잘 반응할 것을 예측할 수 있는 바이오마커(biomarker)의 동정이 가장 핵심적인 사항이다.
- <8> 인 비트로에서 가장 흔히 사용되는 방법은 내피 세포를 분리하고 배양하는 것을 포함한다. 일단 세포가 배양이 되면, 약물의 효과(또는 다른 교란(perturbations))의 효과를, 다양한 세포 증식 및/또는 세포 사멸 종점(endpoint)을 사용하여 연구할 수 있다. 세포 증식 종점의 예는, 방사성 티민 도입, 세포 계수, BrdU 도입, 및 콜로니 형성을 포함한다. 세포 사멸 종점의 예는, 세포내 ATP의 측정, 미토콘드리아 MTT의 감소, 플루오레신 디아세테이트의 대사 및 세포내 트랩핑( 및 이의 손실), 염료 배출에 의한 세포막 온전성(integrity)의 손실, 및 세포사멸(apoptosis)의 더욱 특이적인 측정, 예컨대 TUNEL 분석 또는 캐스파제 발현을 포함한다. 일부 경우에, 미리 분리해 둔 내피 세포를, 미리 분리해둔 다른 세포와 함께 배양하고, 상이한 세포 집단에 대한 약물의 차별적인 효과를 연구하기도 하였다.
- <9> 다른 인 비트로 방법은 기관 배양(organ culture)을 근거로 한다. 예를 들면, Staton 등의 상기 문헌을 참조하면 된다. 여기에는 래트의 대동맥환(rat aortic ring), 병아리의 대동맥환(chick aortic arch), 돼지의 경동맥(porcine carotid artery), 태반 정맥 디스크(placental vein disk), 및 새끼 마우스 뼈 이식편(fetal mouse bone explant)이 포함된다.
- <10> 세포 배양 분석은 분명한 단점을 가지고 있다. 첫번째로, 이들은 생존가능한 내피 세포의 분리 및 배양에 의존하므로, 신선한 인간 암의 경우에 특히, 문제될 수 있다. 일단 분리되고 배양되면, 이들은 천연의 미소환경으로부터 제거되고, 암 세포(또는 정상 조직의 경우에는 정상 세포)에 의해 방출되는 인자가 존재하지 않게 된다. 분리된 암 세포(또는 정상 세포)는, 원칙적으로는 공동 배양(co-cultured)될 수 있지만, 이것은 인 비보에서 존재하는 공간적인 관계 및 세포-세포 상호작용에는 적당하지 않을 수 있다. 기존의 기관 배양액은 유사한 제한을 지닐 수 있는데, 즉 Staton 등의 상기 문헌에서 기술된 바와 같이, "암 세포에 의해 방출되는 다수의 상이한 인자와, 암 세포 자체가 존재하지 않아서, 암 성장에 관여하는 모세혈관 환경이 실제적으로 구현되지 않는 모델"이라는 점에서 그러하다. 이에 관해서는 또한 Auerbach, *et al.*, "Angiogenesis assays: problems pitfalls," *Cancer Metastasis Rev.* (2000) 19:167-172를 참조하라.
- <11> 비-세포 배양, 비-조직 배양의 특징을 가지는, 베바시주맵의 효과를 연구 및 예측하기 위한 방법은, 상기의 Ince, *et al.*, *J Natl Cancer Inst* (2005)에 기술되어 있다. Ince는 베바시주맵의 치료 효과와, k-ras, b-raf, 및 p53 상태를 연관시키는 시도를 하였지만, 이들은 "베바시주맵 치료에 더욱 잘 반응하는 경향이 있었던 전이성 직장결장암 환자의 하위 그룹을 동정할 수 없다"고 결론내렸다. 이들의 검토에 따르면, Ince 등은, "현재까

지, 소수의 연구들만이 임상적으로 항혈관신생 치료에 더 잘 반응하는 경향이 있는 환자를 예측하는데 있어 바이오마커의 잠재적인 능력을 측정하였다"고 하였고, 임상적인 혜택이 있을 것으로 예측되는 마커는 아직 발견하지 못했다고 하였다. 상기 저자들은 "모든 혈관신생 조절자의 효과를 개괄하는 바이오마커는 단일 성장 인자 또는 단일 유도 경로의 분석보다 더욱 더 환자의 결과를 잘 예측할 수 있다"고 제안하기는 하였지만, 이러한 목적을 위한 인 비트로 방법을 제안하지는 않았다. 대신에, 이들은 환자 자신들이 자신의 결과를 예측하기 위한 실험 모델로서 사용되는 진행중인 연구 중에 있음을 지적한 바 있다.

<12> 이러한 연구에서, 베바시주맵 (및/또는 기타 치료제)을 시험 중인 환자에게 투여하고, 그 다음에 "초기" 치료 효과를 외부 진단 스캐닝(예를 들면, MRI) 및/또는 치료 후 암 생검법(biopsies)을 통하여, 치료효과의 조직병리검사를 수행함으로써 측정한다(예를 들면, Willett, *et al.*, *Nature Med* (2004) 10: 145-147). 이러한 접근법은, 값비싼 치료 비용과, 궁극적으로 비효과적인 치료제의 잠재적인 독성에 환자가 노출되는 것, 및 진단 연구에 드는 비용(예를 들면, MRI) 등을 포함한 명백한 다수의 단점을 지니고 있다. 이러한 연구들은 또한, 인 비트로 방법으로 가능하기 때문에, 환자에 대하여 위험 없이 동시에 다른 여러가지 치료법과 함께 시험할 수 있게 하는 능력이 결여되어 있다.

<13> 이와 같이 명백하게, 인간 암 모세혈관을 연구하기 위한 인 비트로 모델이 유용하지 않다는 점은, 암 모세혈관을 표적으로 하는 신규의, 더욱 효과적인 치료법을 동정하고 개발하는 데 있어서는 장애물이 되어 왔다.

**발명의 상세한 설명**

<18> **본 발명의 개시**

<19> 본 발명의 조성물 및 방법은 화학적, 생물학적, 및/또는 물리적 처리에 반응한, 생검된 종양 또는 정상 조직으로부터 분리된 세포의 미소응집체의 모세혈관에서의 변화, 예를 들면 생존율 변화를 감지 및/또는 정량할 수 있다. 치료제는 일반적으로는 분리해 둔 미소응집체에 투여되는데, 이는 미소응집체가 인 비보 환경에 대한 모방체(mimic)이기 때문이다. 또한, 이들 분리체를 인 비보에서 투여된 치료제의 결과를 측정하기 위하여 사용하는 것도 가끔 유용하다.

<20> 관찰된 모세혈관 및 기타의 세포내 변화는, 시험된 치료제의 인 비보 활성을 예측하기 위한 시험으로서 기여하고, 이에 따라, 본 발명의 방법은, 내피 세포에 대한 특이적인 효과를 감지할 수 있게 해 주면서, 주위 세포(surrounding cell)에 대한 동시 또는 병행하여 투여된 치료제의 효과도 관찰할 수 있게 해 준다. 즉, 특정한 약물은 내피 세포 및 주위 세포 모두에 영향을 줄 수 있다.

<21> 이들 방법은, 신규의 치료제 또는 연구중인 치료제를 발견 및/또는 개발하는 것을 돕기 위해 사용될 수 있다.

<22> 그러므로, 하나의 측면에서, 본 발명은 적어도 생존가능한 내피 세포 및 천연적으로 주위의(surrounding) 생존 가능한 비-내피 세포를 포함하는, 분리된 미소응집체에 관한 것으로서, 이때 상기 미소응집체는 현미경으로 관찰하기에 적합한 표면에 배치되는 미소응집체에 관한 것이다. 미소응집체는 생검 조직으로부터 제조되며, 생검이 수득되는 조직(종양 또는 정상)의 마이크로코즘(microcosm)를 나타낸다. 생존가능한 내피 세포는 그러므로 암 세포(암의 경우), 정상 조직 세포, 연결 조직 세포, 염증 세포 및 기타의 본래 관련된 세포를 포함할 수 있는, 천연적 구조(native configuration)로 존재한다. 내피 세포는 내피 세포와, 모세혈관의 구성 성분인 기타의 세포를 포함하여, 모세혈관 그 자체의 완전한 조각(intact segment)을 포함할 수 있다. 미소응집체는 수십개 내지 수백, 수천개 세포를 함유할 수 있다.

<23> 미소응집체는 표준 조직 및/또는 기관 배양 장치, 적당한 영양분 및 보충제를 함유하는 표준 조직 및/또는 기관 배양 배지에서 수시간 내지 수일, 수주 동안 배양될 수 있다. 배양은, 미소응집체에 함유된 내피 세포 및 주위 세포 모두에 대한 여러가지 치료제 또는 인자 또는 프로토콜의 효과를 측정하기 위한 기회를 제공한다.

<24> 다른 측면에서, 본 발명은 현미경으로 관찰하기에 적합한 표면 위에 침전시킬 수 있는, 적어도 하나의 생존가능한 내피 세포 및 천연적으로 주위의(surrounding) 생존가능한 비-내피세포를 포함하는 분리된 미소응집체를 제조하기 위한 방법에 관한 것이다. 이 방법은 잘려진 생검 샘플을 여러 회 원심분리하는 것을 포함하는데, 이를 본원에서는 "퀵스핀(quickspin)"이라고 부른다. 이에 대해서는 아래에서 더욱 자세히 기술한다. 각 단계에서, 샘플을 50-500 x g의 중력으로 원심분리한 다음에, 1 x g 로 즉시 되돌려, 세포 클러스터 펠릿(pellet)과 상층액을 얻는다. 상층액을 제거한 다음에, 펠릿을 재현탁시키고, 적당한 분리된 미소응집체가 형성될 때까지 절차를 반복한다.

<25> 미소응집체는 선택적으로는 상기에 기술된 바와 같이 배양될 수 있거나, 현미경 표면 위에 즉시 침전시킬 수 있

다. 또는 달리, 미소응집체의 최초 제조물은 생존가능한 세포로부터 배제된 지시자(indicator) 염료로 처리될 수 있거나, 배양 도중에, 또는 배양 후에, 어떤 경우에는 표면에 미소응집체를 침전시키기 전에 염료처리를 수행할 수 있다. 또는 달리 대안으로서, 표면에 침착시키는 것을 수행한 다음에, 상기의 지시자 염료를 적용할 수도 있다.

<26> 바람직한 측면에서, 본 발명은 후보자 제제로 상지에서 제조된 바와 같은 분리된 미소응집체를 처리하는 것, 제제가 효과를 실행하기에 충분한 시간 동안 방치하는 것, 생존가능한 세포로부터 배제된 제1 지시자(first indicator)로 미소응집체를 처리하는 것 및 미소응집체내의 세포에 의한 지시자의 흡수 또는 흡수의 부제를 관찰하여, 주위 세포를 제외한 내피 세포내의 상기 지시자의 흡수를 달성하는 제제를 내피 세포의 사멸을 특이적으로 달성하는 제제로서 동정하는 것을 포함하는, 내피 세포의 사멸을 특이적으로 달성하는 제제를 동정하기 위한 방법을 제공한다.

<27> 본 발명의 여러가지 다른 측면은 하기의 상세한 설명으로부터 명백히 이해할 수 있을 것이다.

<28> **본 발명의 실시 태양**

<29> 본 발명은, 하나의 측면에서, 천연적 (native) 환경을 모방하는(mimic) 미소응집체내에서 생존가능한 조직의 모세혈관을 연구하기 위한 방법에 관한 것이다. 이 방법은 생검 조직으로부터 세포의 미소응집체 또는 클러스터를 분리하는 것을 포함한다.

<30> 이러한 클러스터는 암 세포(암의 경우), 정상 조직 세포, 연결 조직 세포, 염증 세포, 및 일부의 경우 내피 세포 및 모세혈관 구성분인 기타의 세포를 함유하는 모세혈관의 완전한 조각(intact segment)을 포함하여, 생검이 수득된, 조직(암 또는 정상)의 마이크로코스미(microcosm)을 나타낸다. 클러스터는 수십개 내지 수백, 수천개의 세포를 함유할 수 있다. 그 이후에 클러스터는 표준 조직 및/또는 기관 배양 장치, 표준 조직 및/또는 기관 배양 배지(적당한 영양분 및 보충제 함유)에서, 수시간 내지 수일, 수주의 기간 동안에 배양될 수 있다. 세포는 생검 전(즉, 환자내부에서), 생검후 세포 배양 전, 또는 배양 기간 동안에, 모세혈관 및/또는 모세혈관의 구성 성분에 대한 잠재적인 효과를 가질 것이 예측되는 다양한 처리에 노출될 수 있다. 처리는 모세혈관 및/또는 구성 세포의 생존 및/또는 증식에, 상처를 주거나 사멸시키거나, 또는 이를 촉진하거나 향상시킬 수 있다.

<31> 이러한 처리 후에, 미소응집체내의 세포의 존재 및/또는 생존능력을, 비-생존가능 세포를 레이블링(label)하는 제1 지시자 물질 또는 염료를 첨가함으로써(예를 들면, 패스트 그린(fast green) 염료, 플루오레신 디아세테이트(fluorescein diacetate) 등, 또한 원하는 경우, (예를 들어 세포질(cytologic) 또는 면역조직(histologic) 염색, 예컨대 H/E와 같은 생존가능한 세포를 레이블링하는) 제 2 지시자를 첨가함으로써, 측정할 수 있다. 클러스터를 현미경 슬라이드와 같은 표면에 침전 또는 침착시키는 것, 예를 들어, 이에 국한되는 것은 아니지만 사이토원심분리(cyto centrifugation)를 1회 이상의 염색을 수행하기 전 또는 그 후에 수행한다. 원하는 경우에, 제1 지시자의 첨가는 생략할 수 있다. 원하는 경우에, 제3 지시자(예를 들면, CD31과 같은 항원에 면역화학 염색)를 첨가하여, 클러스터내의 특이적인 세포의 동정을 돕도록 할 수 있다. 이어서 표면을 검사하여, 세포의 상태를 측정한다.

<32> 본 발명의 내용인 미소응집체의 특징은, 도 1A-1C에 간략히 나타내었다. 각 경우에 있어서, 세포의 마이크로클러스터는 본원에 기술된 바와 같이, 생검 조직으로부터 제조되었다. 도 1A를 보면, 내피 세포는 CD31로 염색함으로써 존재하는 것을 확인하였고, 이들 세포는 열린 원과 같이 보이는 공존하는 세포로 둘러싸여 있고, 이는 진한색으로 표현되어 있다. 도 1A-1C의 설명을 보면, 의도한 처리는, 항-VEGF 약물에 노출시키는 것이다. 도 1B는 아무런 처리도 하지 않은 음성 대조군을 나타내고 있으며, 보이는 바와 같이, 이 클러스터는 사멸한 세포로부터 배제된 것이 아닌, 생존한 세포로부터 배제된 염료에 노출된 경우에, 외관상의 변화는 발생하지 않았는데 그 이유는 세포가 손상을 입지 않았기 때문이다. 하지만, 도 1C에서, 클러스터가 항-VEGF 약물에 노출되었을 때, 약물은 내피 세포에 흡수되었고, 이에 따라 내피 세포는 약물에 의해 영향을 받은 것으로 확인되었다. 열린 원으로서 나타내어지는 주위 세포들은 염료를 흡수하지 않았고 변화없이 유지되었다.

<33> 그러므로, 제시된 바와 같이 클러스터를 제조함으로써, 개개의 내피 세포의, 대표적으로 사용된 항-VEGF 약물에 대한 반응을 제시하는 능력이 증명되었다.

<34> 그러므로, 하나의 측면에서, 본 발명의 방법은 모세혈관과 관련된 세포에 끼어 있는(interlaced) 세포 미소응집체를 분리하는 단계, 및 세포 마이크로클러스터의 일반적으로 더욱 넓은 부위를 포함하는, 비-모세혈관 관련된 세포와 대조적으로, 모세혈관과 관련된 세포에서 선택적인 변화를 인식할 수 있는 지시자 방법을 활용하는 단계를 포함한다.

- <35> 본 발명은, "퀵스핀"을 사용하여 생검 세포로부터 미소응집체를 분리;
- <36> 현미경 슬라이드와 같은 표면에 미소응집체를 전달;
- <37> 패스트 그린 염색 및/또는 H/E와 같은 염료로 미소응집체를 염색; 및
- <38> 모세혈관과 관련된 세포 및/또는 주위 세포의 생존능력에 대해 점수매기기;
- <39> 를 포함하는 방법을 사용하여, 종양 및/또는 정상 조직에서 유래된 세포 미소응집체 예비-배양 및/또는 후-배양 액에서 모세혈관 생존능력의 검출을 허용한다.
- <40> 염색은 표면에 전달하기 전 또는 그 후에 수행할 수 있다.
- <41> 배양 기간 동안에, 세포는 모세혈관 및/또는 모세혈관의 구성 세포 및/또는 주위 세포에 대해 잠재적인 영향을 미칠 것으로 예측되는 여러가지 처리에 노출될 수 있다. 처리에 대해서는, 해당 관찰 세포에 상처를 주거나 사멸시키는 연구를 할 수 있거나, 처리에 대해서는, 모세혈관 및/또는 구성 세포의 생존 및/또는 증식을 촉진하거나 향상시키는 연구를 할 수 있다.
- <42> 더욱 자세히 설명하면, 이러한 처리 후에, 미소응집체내의 세포의 존재 및/또는 생존능력은 먼저 비생존 세포에 대해 선택적으로 표지하는 제 1 지시자 물질(예를 들면, 패스트 그린 염료, 플루오레신 디아세테이트 등)을 첨가한 다음에, 현미경 슬라이드 상에 마이크로클러스터를 침강 또는 침착시킨 후(예를 들면, 대표적인 방법으로서 사이토원심분리(cyto centrifugation), 그러나 이에 국한되는 것은 아님), 유리한 경우, 상기 슬라이드 상의 클러스터를 제2 지시자에 노출시키는 것(예를 들면, 세포질(cytologic) 또는 조직(histologic) 염색, 예컨대 헤마톡실린/에오신)에 의해 측정할 수 있다. 이러한 지시자는 생존 세포에 의해 배제되지 않고, 제1 지시자가 더 잘 보이도록 해 주는 반대 염색약으로서 작용한다. 그렇지 않으면, 제1 지시자는 클러스터를 침착시킨 후에 첨가할 수도 있다. 또한, 원하는 경우, 제1 지시자 물질의 첨가는 생략할 수도 있다. 또한, 원하는 경우, 제3 지시자 물질(예를 들면, CD31과 같은 항원에 대한 면역화학 염색)을 첨가하여, 클러스터내의 특이적인 세포의 동정을 돕도록 할 수 있다. 상기의 절차 후에는, 표면을 현미경으로 검사하고, 모세혈관 및/또는 그 외의 주위 세포의 상태를 측정하고, 점수매기기하고, 그리고/또는 "수동" 방식으로 정량하는데, 즉 숙련된 검사자 및/또는 이미지 분석기와 같은 장치를 사용하여 정량한다. 모세혈관내의 세포에 대한 효과 외에도, 클러스터내의 기타 세포(예를 들면, 암 세포)에 대한 약물 효과를 동시에 또는 그 후에(metachronously) 검사할 수도 있다.
- <43> 정상 조직 및 암 조직 중 어느 하나, 또는 둘 모두를 본 발명의 방법으로 시험하고, 약물 또는 기타의 처리에 대해서는 모세혈관 관련된 세포 대(versus) 클러스터내에 존재하는 기타 세포에 대해 차별적으로 측정할 수 있다.
- <44> 여러가지 세포의 생존능력은 세포 배양 기간 없이, 생검 직후 측정할 수도 있다. 모세혈관 및 기타의 세포 생존능력은 예를 들면, 치료를 전혀 하지 않은 환자에서, 또는 생검 전에 어느 정도 임상 치료를 받은 환자(바늘 또는 기타의 생검 장치로 수행된 것)에서 측정할 수 있다.
- <45> 본원에 사용된 "처리"는 미소응집체의 환경에서 시행된 임의의 의도적인 변화를 일컫는다. 가장 흔하게는, 처리란 화학치료용 약물과 같은 약학적 제제를 미소응집체의 배양액에 첨가하는 것을 말한다. 하지만, 기타의 처리에는 온도 변화, pH 변화, 보충되는 영양분 변화와 같은 배양 조건 및 조성 변화, 또는 소형 분자 또는 펩타이드와 같은 각종 화학 성분의 조성 변화도 포함된다. 처리에는 또한 케모카인 또는 임의의 기타의 고의적으로 적용된 프로토콜의 포함도 포함될 수 있다.
- <46> 본원에 사용된 "미소응집체(microaggregate)"는 본원에서 시험된 세포의 천연적 환경을 효과적으로 모방하는 세포의 그룹을 일컫는다. 하나의 구체예에서, 내피 세포에 대한 치료의 효과가 그 시험 대상이다. 이 경우에, 미소응집체는 적어도 내피 세포, 및 상기 세포의 천연적 환경을 대신하는 주위환경을 제공하기 위해 충분한 주위 세포를 포함할 것이다. 이론적으로, 단 하나의 내피 세포와 이의 주위 세포가 포함될 것이다. 본 발명에서, "미소응집체", "마이크로클러스터" 및 "클러스터"는 호환하여 사용된다.

<47> **제조 A**

<48> **암 및/또는 정상 조직 표본**

- <49> 신선한 생검 또는 흡입액(aspirate)을 암환자 또는 기타 질병을 가진 환자 또는 정상적인 수여자로부터 수득하였다.

- <50> 표본은 전형적으로는 참여하는 병원의 조직병리실험실을 통해, 또는 일부 경우에는 수술실 또는 외과의로부터 직접 본 발명의 방법을 수행하도록 하였다. 고정암 표본(고정액이나 냉동처리에 노출되지 않은 것)을 냉장 수송 배지(CO<sub>2</sub>-독립적 배지, InvitroGen/GIBCO, Grand Island, NY, 페니실린/스트렙토마이신, 암포테리신(amphotericin) B, 인슐린/셀레늄/트랜스페린, 및 10% 저(low) 엔도톡신(endotoxin), 가열하여 불활성화시킨 송아지 혈청이 보충된 것)배지에 넣는다. 이어서 표본을, -20℃에서 냉동된 "블루 아이스(blue ice)" 350 gm 블록을 함유하는 튼튼한(sturdy) Styrofoam® 운반용 박스에 배치한다. 이들은 특급 익일 오전 서비스나, 지역 배송 쿠리어(courier)를 통해 운반된다. 액체 표본은 세포 클러스터를 잘 현탁시키기 위해서 혼합한 다음에 멸균 500 ml 폴리프로필렌 수송용 병에 담는다. 시험되는 액체 1 ml당 10-15 유닛의 헤파린 설페이트를 첨가한다.
- <51> 참여한 병원으로부터 공식적인 조직검사 보고서 사본도 송부받아 두어야 한다.

**실시예**

- <52> 하기의 실시예는 본 발명을 설명하고자 제시되는 것이며 본 발명의 범위를 국한시키고자 하는 의도는 없다.

**실시예 1**

**암 세포 미소음집체의 분리**

- <53>
- <54>
- <55> 고정암을 고품질 만곡형 외과용 가위(high quality curved surgical scissors)를 사용하여 1 mm 이하로(표준 1 회용 10 ml 피펫으로 흡입되기에 충분히 작은 크기) 잘랐다. 상기 암이 수송될 수 있는 배지를, 조직 분쇄액으로부터의 상층액과 함께 보관한다. 가위로 잘게 자른 암 조각을 항생제와 10% 송아지 혈청을 함유하는 RPMI-1640에서 콜라게나아제/DNase로 분해한다(digested). 표본을 교반 플레이트 위에서 플라스틱으로 코팅된 마그네틱 교반 막대(bar)로 부드럽게 혼합하면서, 50 ml 1회용 폴리프로필렌 원심분리 튜브에서 분해시킨다.
- <56> 완전한 분해가 이루어질 때까지, 보통은 1-3 g의 표본에 대해 약 2-3시간 동안 표본을 완전히 혼합한다. 사이토스핀(cytospin) 슬라이드를 모든 세포 분획에 대해 준비하고(수송 배지, 조직 분쇄액으로부터의 상층액, 및 효소 분해물), 이미 기술되어 있는 바와 같이(Weisenthal, *et al.*, "A Novel Dye Exclusion Method for Testing *in vitro* Chemosensitivity of Human Tumors," *Cancer Res.* (1983) 43:749-757), 패스트 그린-H/E로 염색한다.
- <57> 액체 표본은 전체를 원심분리 하여 표본 내의 모든 세포를 모은다. 이어서 세포를 상기의 RPMI-1640-계 배지에서 재현탁시키고 사이토스핀을 상기에 기술된 바와 같이 제조한다.
- <58> 잘게 잘린 분해된 조직에 존재하는 마이크로클러스터의 혼합물을 함유하는 배지에는 단구(single cell), 정상 세포, 적혈구, 사멸된 세포, 및 "퀵스핀"으로 인한 잔여물(debris)과 함께, 생존가능한 미소음집체가 풍부하다. 퀵스핀은, 50-500 xg의 원심분리를 단순히 반복하는 것으로 이루어지는데, 여기에서 원심분리 튜브는 먼저 손으로 흔들어 적당히 혼합한 다음에, 표준의 실온, 예비 원심분리기에 배치한 후, 원하는 속도(경험적인 시도에 의해 각 원심분리에 대해 결정된 값)로 가속화한 다음에, 원심분리기가 원하는 속도에 도달하면 바로 원심분리기를 끄고 정지할 때까지 두는 것으로 구성된다. 각 퀵스핀 후에는, 상층액을 추출하고 보관하는 반면에, 세포 클러스터 펠렛은 모아서 재현탁시켜 원심분리 단계를 반복한다.
- <59> 이러한 과정은, 생존가능한 세포의 90%가 세포 클러스터로 함유되는 분획이 얻어질 때까지, 재현탁된 세포 클러스터의 사이토스핀을 제조함으로써 관찰한다. 만일 이러한 목표를 달성하기가 어려운 경우라면, 클러스터내의 세포의 가능한 가장 높은 %를 함유하는 분획을 모으면 된다.
- <60> 세포 클러스터의 농축액은, 사이토스핀 세포내 "디스크(disk)"("스팟(spot)")의 대략 25% 영역이 선택색(생존가능) 암 세포 클러스터를 구성하고, 75%가 빈 공간을 구성하도록 조정한다. 이 세포 농도는 매우 중요한데, 과다 플레이팅(overplating) 및 과소플레이팅(underplating)은 인위적인 약물 내성 및 민감성을 유발할 수 있고, 그리고/또는 이어지는 배양 도중에 세포 클러스터의 생존율에 악영향을 미칠 수 있기 때문이다. 분석 조건은 표준화되어야 하는데, 이는 이러한 분석 결과를 하기에 기술하는 바와 같은 여러가지 비교 분석으로 비교하기 때문이다.
- <61> 결과를 정규화(normalize)하기 위하여, "0일(day zero)" 슬라이드를 제조하였는데, 이는 분석을 시작하는 날에 처리에 노출시키지 않은 세포의 조건을 말하는 것이었고, 음성대조군(노출시키지 않은 세포)의 "배양 종점(end culture)" 슬라이드도 제조하였다. 처리와는 상관없는 인자의 효과를 산출해내기 위해서, 0일 및 배양 종점 슬라이드도 (1) 클러스터내의 총 생존가능한 암 세포(또는 기타의 해당 세포)의 %(단구와는 반대); (2) 세포 클러



스터의 평균 밀도(여기에서, "느슨한(loose)" 클러스터는 사이토스핀 원심분리 후에 세포 간에 투명한 공간을 가지는 것이고, "중간(medium)" 클러스터는 2차원 외관으로 납작해지지만(flattened), 세포 간의 투명한 공간은 함유하지 않는 클러스터를 말하며, "타이트(tight)" 클러스터는 사이토스핀 원심분리 후 3차원 외관을 유지하는 클러스터를 말한다) 및 (3) 육안 마이크로미터(ocular micrometer)를 사용하여 측정되는 세포 클러스터의 평균 2차원 넓이를 계산하는 데 사용하였다. 이러한 인자들은, 처리 능력이 해당 세포에 미치는 영향이므로, 결과를 비교할 때 산정될 수 있어야 한다. 거대분자, 예컨대 항체가 더욱 쉽게 투과될 수 있도록 하기 위하여는, "타이트" 배양액을 더 느슨하게 하는 것이 유리할 수 있다. 이것은 히알루로니다아제(hyaluronidase)와 같은 효소를 분해액에 첨가함으로써 달성할 수 있다. 이러한 클러스터 측정 외에도, 배양 시작일(0시간 또는 "0일")의 생존 가능 세포 수와 비교하여, 배양 중점일의 생존가능 세포수의 비를 측정하기 위하여 슬라이드를 점수매기기(score) 할 수도 있다.

<62>

**실시예 2**

<63>

**배양/처리 단계**

<64>

약물의 효과와 같은 처리의 효과를 시험하기 위하여, 세포 클러스터 현탁액을 10%(부피/부피) 약물 용액이나 비히클 대조군(가장 전형적으로는 0.9% NaCl)과 함께 혼합한다. 배양액에 대해 플레이팅된 세포 현탁액/약물 용액 (또는 비히클)의 최종 용적은 0.12 ml이다. 배양은 폴리프로필렌 소재의, 둥근 바닥의, 96-웰 배양 접시에서, 37 °C의 습한 조건에서 표준 배양 기간 동안 이루어진다.

<65>

저장(stock) 용액은 일반적으로 10회에 소기의 농도로 제조되고, 1회에 사용하기에 적합한 0.5 ml 원뿔형 폴리프로필렌 튜브에 분취하여, 이를 사용하기 전에는 -70°C로 냉동시켜 둔다. 일부의 약물은 제조업자의 지시에 따라서 냉장 온도로 보관한다.

<66>

세포를 각각의 약물에 대한 인덱스 농도(index concentration)로 배양하고, 원하는 경우에는 인덱스 농도를 희석시킨 것으로 배양하는데, 여기에서 인덱스 농도란 경험적으로 사용되는 또는 문헌으로부터 결정된 농도를 말한다. 음성 대조군은 일반적으로는 0.9% NaCl, 및/또는 해당 약물이 용해되는 비히클로 구성된다. 암 샘플에 대해서는, 양성 대조군은 100 µg/ml의 시스플라틴과 1 µg의 안귀딘(anguidine)(국립암연구소로부터 수득한 것)으로 제공된다. 96-웰 플레이트를 복제한 것(replicate)을 시험한다.

<67>

**실시예 3**

<68>

**인 시투 미세모세혈관 생존력 분석 (In Situ Microcapillary Viability Assay, ISMCVA)**

<69>

배양 4일째, 알라마 블루(Alamar Blue) 염색 용액 (Trek Diagnostic Systems, Westlake, OH) 0.010ml는 96웰 배양접시 내 모든 배양 웰에 추가된다. 4시간 후, 570nm 및 600nm에서 흡광도는 표준마이크로플레이트 리더(Dynatech)로 기록된다. 600에서 흡광도는 570에서의 흡광도로부터 제하고(substract), 양성대조군(고농도 시스플라틴/안구이딘(anguidine)) 웰들 내 상응하는 해독(reading)은 각각의 약물-노출된 웰의 해독으로부터 제한다. 그렇게 측정된 각각 수치는 음성(비히클) 대조군 웰들(0.9% NaCl)로부터의 상응하는 수치들에 의해 또한 제하여진 양성 대조군 해독값들과 함께 나뉘진다. 상기 결과는 약물 유도된 세포 사멸(cell death)(배양에서 모든 세포들을 위해, 서로 다른 세포 군집들 사이의 구분이 아닌) 그대로의(상대적으로 민감하지 않은) 표시이고, 이것은 그림에도 불구하고, 마이크로플레이트 웰들이 정확히-표지된 ISMCVA 사이토스핀(cytospin) 슬라이드 상에서 회전하여 다운된 것이라는 사실은 보장하기 위한 추가적인 품질 조절에 유용하다. 분석 사이토스핀 슬라이드는 이전에 기재된(Weisenthal, et al., supra(1983)) 바와 같이, 아세트알데히드-고정된 덕(duck) 적혈구의 첨가와 함께 (Weisenthal, et al., "Comparison of Dye Exclusion Assays with a Clonogenic Assay in the Determination of Drug-Induced Cytotoxicity," Cancer Res(1983) 43: 258-264) 제조되고, 본 분석(assay)에서, 사이토스핀 세포적 "디스크(disk)들"("스팟들")의 균일성을 측정하기 위한 품질 조절로써 처음으로 이용된다. 후-배양 슬라이드들은 다음과 같이 세포 사멸을 측정하기 위해 주관적으로(subjectively) 기록된다:

<70>

슬라이드들은 먼저 어떤 세포들 및 클러스터들이 종양 세포들인지, 그리고 그렇지않다면, 그것들이 정상 세포들인지 표준 세포병리학적(cytopathologic) 기준을 이용하여 측정하기 위해 조사된다. 특별한 주의는 추정상의 모세혈관 관련된 세포들이 주어지고, 이것은 전형적으로 클러스터들을 통해 산재되고, 이것은 실험과 경험으로 작은 것일 수 있고, 유사한 외형의 하나 이상의 다른 세포들에 가까이 근접하여 자주 각진 세포들이다. 이러한 세포들은 꽤 자주 다소 과염색(hyperchromatic)된다.

<71>

패스트(fast) 그린으로 염색되는 ISMCVA 사이토스핀 슬라이드 "디스크들"과 H/E는 그리고나서 40x 확대로 처음

으로 기록된다. 슬라이드는 대량으로 생존가능하고, 잘 보존된 형태를 가지는 세포 클러스터들을 동정하기 위해 스캔된다. 세포 클러스터들은 이상적으로 최소한 20개의 비모세혈관 세포들이다.

<72> 음성 대조군 (0.9% NaCl 비히클) 슬라이드들은 어떻게 슬라이드들이 약물 효과의 완전한 부재에서 나타나는지 측정(정신적으로)하기 위해 스캔된다. 잘 보존된 음성 대조군 세포 클러스터들은 상대적으로 일정한 형태를 암시하기 위해 "플레인 팬케익(plain pancake)"으로 언급될 수 있다. 약물 노출된 배양물들은 잘 보존된 대량 생존가능한 세포 클러스터들을 선택하기 위해 조사된다. 낮은 파워하에서, 만약 다양한 옅은 블루-그린 염색 영역이 존재한다면, 미소응집체는 "플레인 팬케익" (만약 그것이 대략 일정한 형태라면) 대 "블루베리 팬케익"인지에 관하여 점수화되고, 이것은 높은 파워상에서, 죽은 (패스트 그린 염색된) 모세혈관-관련된 세포들과 일치하는 것으로 나타난다. 소망한다면, 추가적인 슬라이드들은 제조되고, 내피 세포들에 상당히 특이적인 CD31 항원을 위한 염색을 비롯한 모세혈관 관련된 세포들을 특이적으로 동정할 수 있는 면역세포화학적 방법으로 염색된다.

<73> 만약, 시험 배양에서 "블루베리 팬케익" 효과가 대조군 배양에서 나타나는 것보다 크게 관찰되면, 이 효과는 주관적이지만 예컨대, "1+ 블루베리들," "4+ 블루베리들" 등과 같은 표준화된 등급 비율을 이용하여 점수화될 수 있다. 또 다르게, 현미경 대안렌즈 격자는 흥미있는 세포 클러스터들 상에 얹어놓을 수 있고, 격자 유닛당 "블루베리들"의 수는 핸드 탈리 카운터(hand tally counter)의 도움으로 셀 수 있다. "블루베리들"은 자동화된 이미지 분석 시스템들을 이용하여 또한 점수화될 수 있다.

<74> **실시에 4**

<75> **난소암**

<76> 인간 난소암의 표본상에서 수행되는 연구에서, 실시에 1 내지 3에 기재된 바와 같이, 배양 시작시에, 미소응집체 (비점착성 세포들에 반대로써) 내 총 종양 세포들의 중간(median) 퍼센트는 80이었고, 배양 결과시에 중간값은 85였다. 중간 세포 클러스터 2차원 영역은 배양 시작에서 870 마이크론 제곱(microns squared)이고, 배양 결과시에 2300 마이크론 제곱(microns squared)이었다. 세포 배양 시작에, 모든 표본의 10은 완전히 비점착성 단일 세포들로 구성되고, 배양 결과시 이것이 1% 남았다. 미소응집체를 포함하는 표본에서, 세포 배양물의 초기에 점수화된 바와 같이, 이들의 17%는 우세하게 "느슨한(loose)" 클러스터들 (위에서 규정된)을, 78%는 우세하게, "중간-밀집된" 클러스터들을, 그리고 4%는 우세하게 "타이트(tight)" 클러스터들을 포함하였다. 세포 배양의 결과에서 주어진 밀도에서 세포 클러스터들을 가지는 상응하는 퍼센트는 25%는 우세하게 "느슨한", 69%는 "중간-밀집된", 및 6%는 "타이트" 것이었다.

<77> **실시에 5**

<78> **정상 폐**

<79> 인간 폐 생검은 외과적 가위로 기계적으로 잘게 잘라졌고, 그 다음으로, 콜라게나제/DNase로 절단되었다. 다양한 세포 분획들이 패스트 그린(fast green)으로 염색되었고, 사이토원심분리되었고, 실시에 1에 기재된 바와 같이, 헤마토자일린/에오신 (H/E)으로 카운터염색되었다. 나타난 바와 같이, 생존가능한 세포는 핑크(pink)에서 레드(red)로 (H/E로) 염색되는 반면, 죽은 세포들은 블루(blue)에서 그린(패스트 그린으로)으로 염색되었다. 아세트알데히드-고정된 덕(duck) 적혈구들(블루-그린 타원적혈구(elliptocyte))은 내부 표준으로써 나타난다. 도 2A에 나타난 바와 같이, 40x 확대에서, 효소 분해물(digestate)은 주로 비점착성 단일 세포들과 혼합된 비생존가능한 (블루 그린으로 염색된) 세포들, 파이버들 및 잔해물들을 포함하고, 또한, 다양한 크기들의 (원래 40x 확대) 3차원 세포 클러스터들 몇몇을 포함한다. 도 2A에 나타난 제조로부터의 3차원 미세클러스터들은 실시에 1에 기재된 바와 같이, 250x에서 다중 "퀵스핀"으로 풍부(enrich)해진다. 그리고나서, 작은 부피로 농축되고, 그리고나서 사이토원심분리 및 패스트 그린 H/E 염색을 거친다. 결과로써 나오는 미소응집체는 40x 확대로 도 2B에 나타나있고, 200X 확대로 도 2C에 나타나 있고, 400x 확대로 도 2D에 나타나 있다.

<80> **실시에 6**

<81> **신경 내분비 종양**

<82> 인간 신경내분비의 (폐 카르시노이드) 종양은 생체검사되고, 분해되고, 미세클러스터들이 풍부하고, 실시에 1 내지 3에 기재된 바와 같이 일반적으로 베바시주맙의 존재 또는 부재에서 96시간동안 배양되었다. 미세클러스터들은 패스트 그린 (사이토원심분리 전에)으로 염색되었고, H/E (사이토원심분리후)로 카운터염색되었다. 상기 기재된 바와 같이, 생존가능한 세포들은 핑크(pink)에서 레드(red)로 (H/E로) 염색되는 반면, 죽은 세포들은 블

루(blue)에서 그린(패스트 그린으로)으로 염색되었고, 아세트알데히드-고정된 오리 적혈구(블루-글리 타원적혈구)는 내부 표준으로써 나타난다. 종양 세포들은 크고, 패일 핑크(pale pink) 염색 세포들이고, 모세혈관 관련된 세포들 (대부분 내피세포들)은 좀더 작고, 좀더 밀집된 레드-핑크 염색된 세포들이고 자주 날카롭게 모가나 있다. 도 3A 및 4A는 각각 100x 및 200x 확대에서 모세혈관성 관련된 세포들 및 대부분 생존가능한 종양 세포들과 함께 대조군 배양물로부터의 미세클러스터들을 나타낸다. 도 3C 및 4C는 도 3A 및 4A의 모세혈관 관련된 세포들로 어노테이트된(annotated) 형태들이고, 식별 쉽게하기 위해 원으로 표시하였다. 도 3B 및 4B는 각각 100x 및 200x 확대에서 베바시주맙 노출된 세포들로부터의 미세 클러스터들을 나타낸 것이고, 도 3C 및 3D는 그 어노테이트된 형태들을 나타낸 것이다. 나타난 바와 같이, 종양 세포들은 살아있는 채로 남아있고 (핑크로 염색된), 반면 대부분 모세혈관 연관된 세포들은 죽었다 (블루-그린 염색된).

<83> 베바시주맙은 모세혈관 세포들을 포함한 세포상에서 직접적인 효과를 가지는 것은 아니지만 미세클러스터들내 종양 세포들에 의해 국부적으로 생산되는 혈관 내피 성장 인자(VEGF)와 복합체를 형성하는 것으로 알려져있다. VEGF는 베바시주맙-반응성 종양들 내 내피세포들의 생존 및 증식에 필요하다. 이러한 결과는 VEGF의 연속적인 존재는 모세혈관 관련된 세포들의 생존을 유지하기 위해 필요하다는 것을 나타낸다. 베바시주맙을 가지고 배양 내에 VEGF를 막는 것은 VEGF-의존성 모세혈관 관련된 세포들의 사멸을 가져온다. 베바시주맙에 반응하는 "블루 베리 팬케익" 클러스터들을 형성하는 종양들은 베바시주맙으로 임상적인 화학치료법에 반응하는 높은 가능성을 가지는 반면, "블루베리 팬케익" 클러스터들을 형성하지 않는 종양들은 반응의 낮은 가능성을 가진다. 기재된 분석 시스템은 미세모세혈관에 저항성있는 베바시주맙에 대하여 작용할 치료법의 형태들을 발견하는데 또한 사용될 수 있다.

<84>

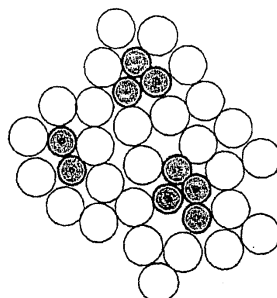
**도면의 간단한 설명**

- <14> 도 1A-1C는 본 발명의 미소응집체의 개요도이다.
- <15> 도 2A-2D는 본 발명의 미소응집체를 제조하는 여러가지 단계의 현미경 사진이다.
- <16> 도3A-3D는 베바시주맙으로 처리하지 않았거나, 또는 처리한, 본 발명의 미소응집체의 100배 확대 현미경 사진이다.
- <17> 도 4A-4D는 도 3A-3D에 제시된 바와 동일한 미소응집체의 사진으로서 200배 확대한 것이다.

**도면**

**도면1A**

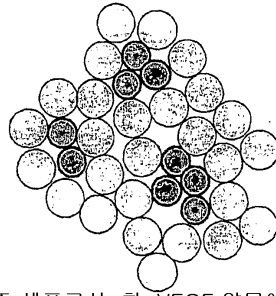
마이크로클러스터 내의 세포



CD31 세포질 염색은 암 미세클러스터 내의 미세모세관 세포들의 형태학적 동정을 확인하였다

도면1B

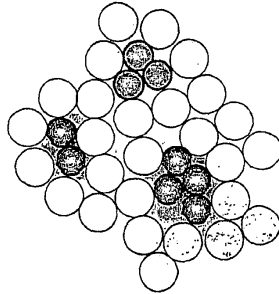
음성 대조군



배양액 중의 생존 세포로서, 항-VEGF 약물에 노출되지 않은 것. 손상받지 않은 미세모세관 세포의 그대로인 멤브레인은 바이탈 다이(vital dye)를 배제하였다- 가시화 염색하지 않은것.

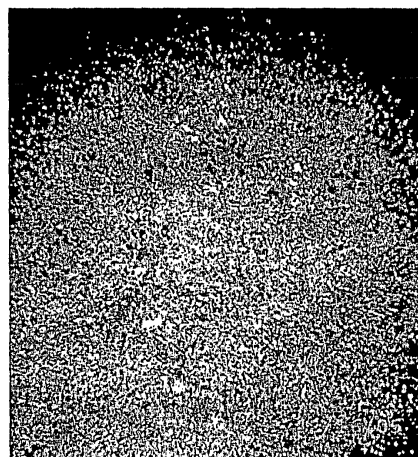
도면1C

약물 노출  
(배바시주맙)



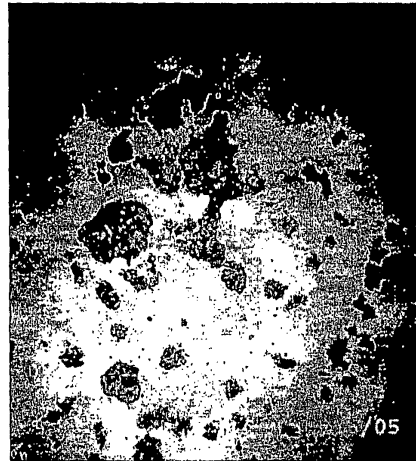
사멸/염색 미세모세관 세포의 누출성 멤브레인은 바이탈 다이를 받아들이고, 이는 알콜에 의한 반대 염색 동안에 주위 공간으로 흘러나왔다. 암세포는 항-VEGF 약물에 의해 손상되지 않는다.

도면2A



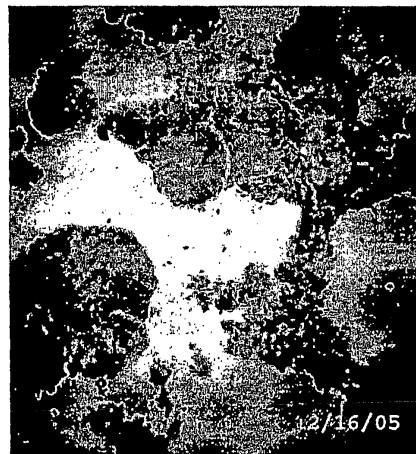
40x

도면2B



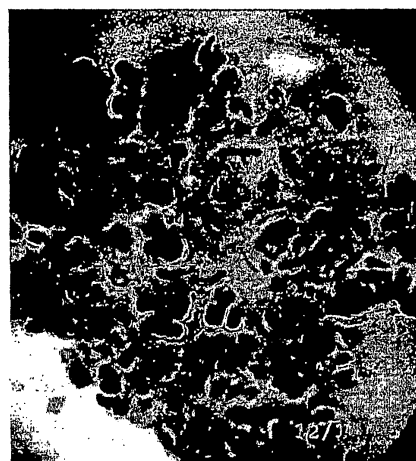
40x

도면2C



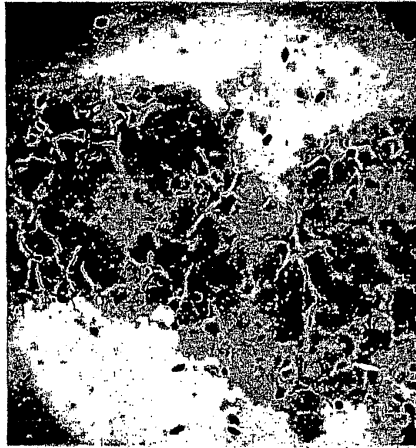
200x

도면2D



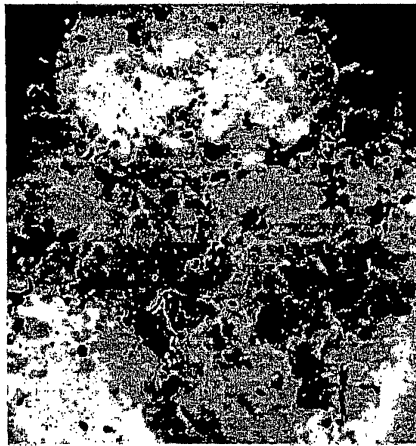
400x

도면3A



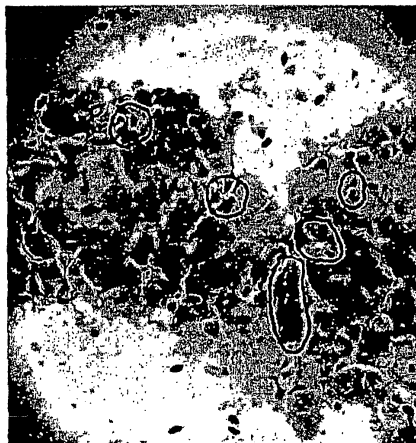
대조군 100x

도면3B



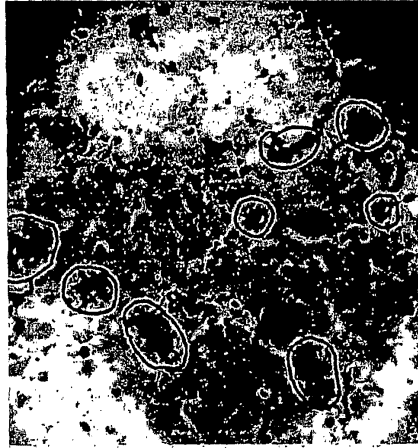
베바시주맴 100x

도면3C



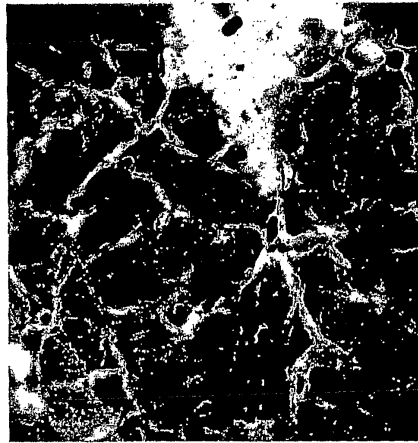
대조군 100x (Annotated)

도면3D



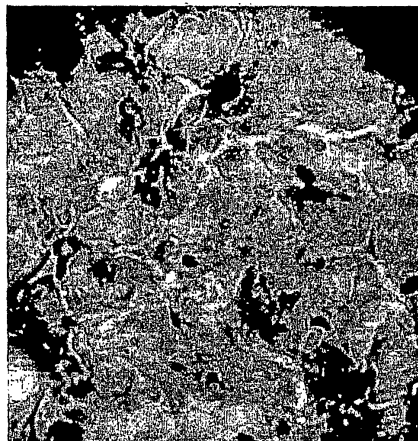
베바시주맙 100x (Annotated)

도면4A



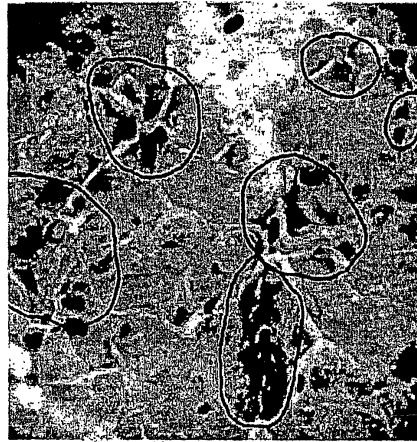
대조군 200x

도면4B



베바시주맙 200x

도면4C



대조군 200x (Annotated)

도면4D



베바시쥬알 200x (Annotated)