



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0125477
(43) 공개일자 2024년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) G01N 30/72 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5008 (2013.01)
G01N 30/72 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0019889
(22) 출원일자 2024년02월08일
심사청구일자 2024년02월08일
(30) 우선권주장
1020230018223 2023년02월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김준곤
서울특별시 서초구 서운로 104, 204동 1802호
채수연
서울특별시 동대문구 왕산로19바길 16
(74) 대리인
정은열, 김태훈

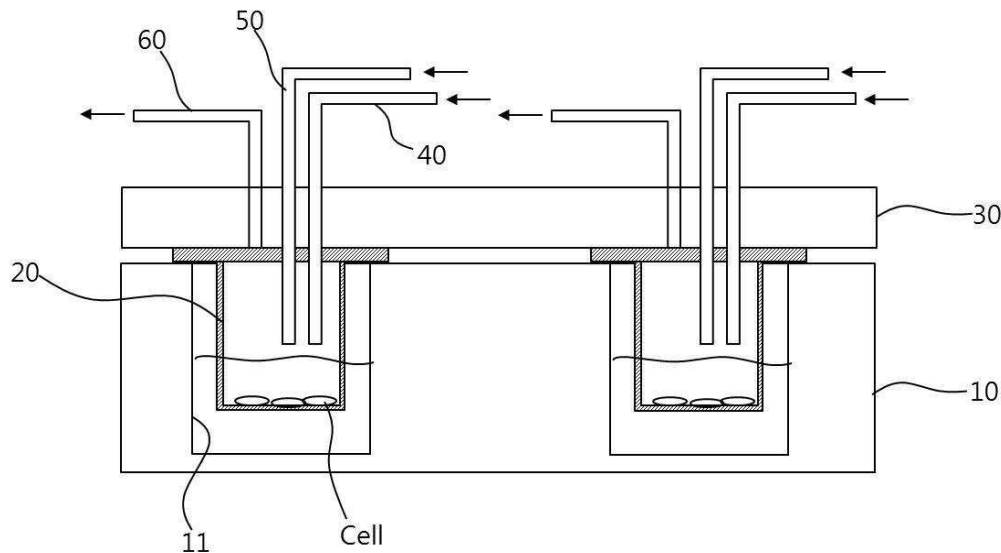
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 약동학 모사 플랫폼 및 이를 이용한 약효 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 약동학 모사 플랫폼 및 이를 이용한 약효 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼은 상면에 함몰된 다수의 웰(well, 11)을 구비하는 웰 플레이트(10), 웰(11)에 삽입되되, 외면이 웰(11)의 내면과 서로 이격되며, 내부에 세포가 도입되고, 약물 및 배지가 주입되며, 주입된 약물과 배지가 혼합된 용액을 웰(11)이 내면을 향해 투과시키는 인서트(20), 인서트(20)가 삽입된 웰 플레이트(10)의 상면을 커버하는 커버 플레이트(30), 커버 플레이트(30)를 관통하여, 인서트(20)의 내부에 약물을 주입하는 약물 주입관(40), 커버 플레이트(30)를 관통하여, 인서트(20)의 내부에 배지를 주입하는 배지 주입관(50), 및 커버 플레이트(30)를 관통하여, 인서트(20)의 외면과 웰(11)의 내면 사이의 공간으로 투과된 용액을 외부로 배출하는 용액 배출관(60)을 포함한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345358412
과제번호	2020R1A6C103A027
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국기초과학지원연구원
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	공동연구활성화지원과제(3차원 신경모세포종 고형암 모델에서의 질량 분석법 기반
면역치료 저항 및 약물 민감성 분석법 개발)	
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

상면에 함몰된 다수의 웰(well)을 구비하는 웰 플레이트;

상기 웰에 삽입되며, 외면이 상기 웰의 내면과 서로 이격되며, 내부에 세포가 도입되고, 약물 및 배지가 주입되며, 주입된 상기 약물과 상기 배지가 혼합된 용액을 상기 웰의 내면을 향해 투과시키는 인서트;

상기 인서트가 삽입된 상기 웰 플레이트의 상면을 커버하는 커버 플레이트;

상기 커버 플레이트를 관통하여, 상기 인서트의 내부에 약물을 주입하는 약물 주입관;

상기 커버 플레이트를 관통하여, 상기 인서트의 내부에 배지를 주입하는 배지 주입관; 및

상기 커버 플레이트를 관통하여, 상기 인서트의 외면과 상기 웰의 내면 사이의 공간으로 투과된 상기 용액을 외부로 배출하는 용액 배출관;을 포함하는 약동학 모사 플랫폼.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 인서트는,

상단이 개방된 중공관 형태로 형성된 본체; 및

상기 본체의 상단에서 좌우를 향해 돌출되어, 상기 웰의 상단 개구부 중 일 영역을 폐쇄하며 상기 웰 플레이트의 상면에 걸쳐지는 날개;를 포함하는 약동학 모사 플랫폼.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 본체의 전부 또는 일부가,

상기 용액을 투과시키는 멤브레인으로 이루어진 약동학 모사 플랫폼.

청구항 4

청구항 2에 있어서,

상기 용액 배출관은,

상기 날개에 의해 폐쇄되지 않은 상기 웰의 상단 개구부 영역을 통과하여, 상기 인서트의 외면과 상기 웰의 내면 사이의 공간에 배치되는 약동학 모사 플랫폼.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 따른 약동학 모사 플랫폼을 이용하여, 상기 약동학 모사 플랫폼에 주입된 약물을 스크리닝하는 약효 스크리닝 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 약동학 모사 플랫폼에서 배양된 세포에 대해, 질량분석기를 이용하여 상기 세포 내부의 상기 약물 양을 정량 분석하는 단계;를 포함하는 약효 스크리닝 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 약동학 모사 플랫폼에서 배양된 세포에 대해, 상기 약물의 독성평가를 수행하는 단계;를 포함하는 약효 스크리닝 방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서,

상기 약동학 모사 플랫폼에서 배양된 세포에 대해, 질량분석기를 이용하여 상기 세포 내부의 상기 약물 양을 정량 분석하고, 상기 약물의 독성평가를 수행하는 단계; 및

상기 약물 정량 분석 결과, 및 상기 약물의 독성평가에 따른 세포 생존율 분석 결과를 기반으로 정량적 약역학-세포 생존율 연계 스크리닝을 수행하는 단계;를 포함하는 약효 스크리닝 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 약동학 모사 플랫폼 및 이를 이용한 약효 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 체내의 약물 동태를 모방하는 플랫폼 기술, 및 이를 이용하여 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 약물이 체내에 유입되게 되면 크게 흡수(adsorption), 분포(distribution), 대사(metabolism), 배설(excretion)의 단계를 거쳐 배출된다. 흡수 단계(absorption phase)동안 혈중 약물농도가 증가하여 최고 농도(C_{max})에 도달하게 되며, 대사와 방출 과정에 의하여 농도가 다시 감소하는 과정(Elimination phase)을 거치게 된다. 이러한 과정들 속에서 약물의 혈중농도는 시간에 따라 변화하게 된다. 미세유체시스템은 유체가 흐르는 경로의 면적을 달리하거나, 독립된 약물 투입구를 활용함으로써 서로 다른 약물의 동역학적 특성을 각각 반영할 수 있다. 이러한 성질들이 약물의 대사 또는 혈관의 모방이 가능하다는 점에서 시스템 바이오 분야에서 주목받고 있다(T.J.Maguire, et al., Curr. Drug. Metab. 2009, 10 1192-1199.;Petreus, T., et al., Commun. Biol. 2021, 4, 1001). 미세유체시스템은 유체의 이송, 혼합, 분리 등의 제어가 가능하다는 점을 이용하여 세포외기질, 암 미세환경 등의 종양의 미세 환경 시스템을 모사하는 데 빈번히 사용된다. 하지만 미세유체를 다루어야한다는 어려움과, 질량분석법을 통한 정량, 정석, 바이오마커 발굴이 어렵다는 한계를 지니고 있다.

[0004] 여기서 질량 분석법이란 시료를 이온화한 뒤 수집하여, 그 개개의 이온을 질량과 전하의 비(mass to charge ratio, m/z)에 따라 분리, 검출해서 각 m/z에 따른 이온들의 양을 측정하는 방법이다. 복잡한 시료에서 원하는 이온을 분리, 검출할 수 있다는 점에서 질량분석기는 정량 분석에 매우 효과적이고 유용한 툴이며 생명, 의학, 재료 및 고분자 화학 분야에서 널리 활용되고 있다.

[0005] 암은 여전히 전세계적으로 발병률이 높은 질병으로, 치료가 어려운 중증 질환으로 알려져 있다. 암의 치료에 가장 큰 어려움은 암세포의 이질성으로부터 기인한다. 암세포의 다양한 유전적 변이에 의하여 종양세포 뿐만 아니라 같은 암 종의 환자 간에도 이질성이 발생하게 된다. 이러한 이질성에 의해 세포 군집 간에 상이한 세포증식,

대사, 전이능이 발생하게 되며, 항암 치료로 인한 완전 관해 도달을 어렵게 하는 요인으로 작용하게 된다. 이러한 이질성을 고려하여, 환자 개개인에게 맞는 치료법을 도입하고자 하는 맞춤형치료가 연구되어오고 있다. 맞춤형치료법은 환자의 임상데이터, 그리고 단백질, 유전체와 같은 생물정보학 연구를 통한 바이오마커 등을 이용하여 환자를 분류하고 그에 최적합한 치료법을 도입하는 치료법이다.

[0006] 여기서, 환자를 분류하는데 중요한 역할을 하는 유전체와 단백질 연구는 대부분 실험실 수준에서 진행되게 된다. 실험실 수준에서의 연구들을 통하여 과학적인 근거, 즉 바이오마커를 발굴하게 되고 이를 맞춤형치료에 접목시켜 치료학적인 발전을 도모하게 된다. 따라서 실험실 수준에서 사용하게 되는 세포 모델이 환자와의 연관성이 높을수록 신뢰성 있는 바이오마커 발굴이 가능해지게 된다. 현재 약물 관련 실험에서 많이 사용되고 있는 기법은 2차원 세포를 정지 되어있는 일정 농도의 약물에 노출시키는 형식의 방법이다. 즉, 세포는 일정 기간동안 동일한 농도의 약물에 노출되어 있게 된다. 하지만, 실제 체내에서의 약물의 거동은 시간에 따라 변화하게 된다. 이러한 이유는, 약물의 동학에 의해서 나타나게 된다. 흡수(adsorption), 분포(distribution), 대사(metabolism), 배설(excretion)의 단계에 의해 체내 약물 농도가 변하게 된다. 세포는 약물의 농도에 따라서 변화를 나타내는 경우가 많다. 즉, 약물의 동학에 의해서 약물의 역학이 나타나게 된다. 따라서 실험실 수준에서 사용되는 모델이 실제 체내와 더 유사한 결과를 얻기 위해서는 약동학이 도입된 약물 스크리닝이 진행 되어야한다.

[0007] 미세유체시스템을 이용하여 약동학을 도입한 연구들이 보고된 바 있다. 하지만 미세유체를 다루야 한다는 어려움과, 질량분석을 통한 정량, 정성, 바이오마커 발굴이 어렵다는 한계를 지니고 있다. 따라서 이전 스크리닝 방법에서의 한계를 극복하기 위해 새로운 기술이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일 측면은 간단한 설비를 사용하여 체내의 약물의 동태를 모방함과 동시에 질량분석기를 이용한 정성, 정량분석이 가능한 약동학 모사 플랫폼을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 측면은 상기 약동학 모사 플랫폼을 활용하여 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼은 상면에 함몰된 다수의 웰(well)을 구비하는 웰 플레이트; 상기 웰에 삽입되되, 외면이 상기 웰의 내면과 서로 이격되며, 내부에 세포가 도입되고, 약물 및 배지가 주입되며, 주입된 상기 약물과 상기 배지가 혼합된 용액을 상기 웰의 내면을 향해 투과시키는 인서트; 상기 인서트가 삽입된 상기 웰 플레이트의 상면을 커버하는 커버 플레이트; 상기 커버 플레이트를 관통하여, 상기 인서트의 내부에 약물을 주입하는 약물 주입관; 상기 커버 플레이트를 관통하여, 상기 인서트의 내부에 배지를 주입하는 배지 주입관; 및 상기 커버 플레이트를 관통하여, 상기 인서트의 외면과 상기 웰의 내면 사이의 공간으로 투과된 상기 용액을 외부로 배출하는 용액 배출관;을 포함한다.

[0013] 또한, 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼에 있어서, 상기 인서트는, 상단이 개방된 중공관 형태로 형성된 본체; 및 상기 본체의 상단에서 좌우를 향해 돌출되어, 상기 웰의 상단 개구부 중 일 영역을 폐쇄하며 상기 웰 플레이트의 상면에 걸쳐지는 날개;를 포함할 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼에 있어서, 상기 본체의 전부 또는 일부가, 상기 용액을 투과시키는 멤브레인으로 이루어질 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼에 있어서, 상기 용액 배출관은, 상기 날개에 의해 폐쇄되지 않은 상기 웰의 상단 개구부 영역을 통과하여, 상기 인서트의 외면과 상기 웰의 내면 사이의 공간에 배치될 수 있다.

[0016] 한편, 본 발명에 따른 약효 스크리닝 방법은 상기 약동학 모사 플랫폼을 이용하여, 상기 약동학 모사 플랫폼에 주입된 약물을 스크리닝한다.

- [0017] 또한, 본 발명에 따른 약효 스크리닝 방법에 있어서, 상기 약동학 모사 플랫폼에서 배양된 세포에 대해, 질량분석기를 이용하여 상기 세포 내부의 상기 약물 양을 정량 분석하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명에 따른 약효 스크리닝 방법에 있어서, 상기 약동학 모사 플랫폼에서 배양된 세포에 대해, 상기 약물의 독성평가를 수행하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명에 따른 약효 스크리닝 방법에 있어서, 상기 약동학 모사 플랫폼에서 배양된 세포에 대해, 질량분석기를 이용하여 상기 세포 내부의 상기 약물 양을 정량 분석하고, 상기 약물의 독성평가를 수행하는 단계; 및 상기 약물 정량 분석 결과, 및 상기 약물의 독성평가에 따른 세포 생존율 분석 결과를 기반으로 정량적 약역학-세포 생존율 연계 스크리닝을 수행하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.
- [0022] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼에 의하면, 매우 간단하게 체내 약물의 동태를 모방할 수 있고, 이를 이용하여 약역학 스크리닝과 질량분석기를 활용한 정량 분석적 약역학 스크리닝, 새로운 연계 스크리닝법을 수행할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼은 유체흐름시스템을 플레이트 장비에 적용하였음에도, 세포가 시스템 외부로 유출되지 않고, 내부에 안정적으로 존재한다. 또한, 세포에 균일하게 약물이 전달됨은 물론, 약동학을 도입함으로써, 시간에 따른 약물 변화를 모사할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼을 이용하여 실제 세포에 약물 스크리닝을 진행하는 경우 기존의 방식에 비해 유의미하고 정확한 반응성을 확인할 수 있으며, 기존의 현상만을 관찰하던 방식들과 달리, 세포생존평가에서 더 나아가 질량분석기를 이용한 정량분석을 진행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼의 단면도이다.
- 도 2는 도 1에 도시된 인서트, 약물 주입관, 배지 주입관, 및 용액 배출관의 배치관계를 설명하는 도면이다.
- 도 3은 실시예 1에 따른 약동학 모사 플랫폼의 설계 및 결합 상태를 설명하는 도면이다.
- 도 4는 실시예 1에 따른 약동학 모사 플랫폼의 구동 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 5는 실시예 2에 따른 2차원 세포에서 세포 생존율 기반 약역학 스크리닝 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 실시예 2에 따른 3차원 세포에서 세포 생존율 기반 약역학 스크리닝 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 실시예 3에 따른 질량분석 기반 정량 약역학 스크리닝 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 실시예 4에 따른 정량적 약역학-세포 생존율 연계 스크리닝 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.

- [0030] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.
- [0032] 도 1은 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼의 단면도이고, 도 2는 도 1에 도시된 인서트, 약물 주입관, 배지 주입관, 및 용액 배출관의 배치관계를 설명하는 도면이다.
- [0033] 도 1 내지 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼은 상면에 함몰된 다수의 웰(well, 11)을 구비하는 웰 플레이트(10), 웰(11)에 삽입되며, 외면이 웰(11)의 내면과 서로 이격되며, 내부에 세포가 도입되고, 약물 및 배지가 주입되며, 주입된 약물과 배지가 혼합된 용액을 웰(11)이 내면을 향해 투과시키는 인서트(20), 인서트(20)가 삽입된 웰 플레이트(10)의 상면을 커버하는 커버 플레이트(30), 커버 플레이트(30)를 관통하여, 인서트(20)의 내부에 약물을 주입하는 약물 주입관(40), 커버 플레이트(30)를 관통하여, 인서트(20)의 내부에 배지를 주입하는 배지 주입관(50), 및 커버 플레이트(30)를 관통하여, 인서트(20)의 외면과 웰(11)의 내면 사이의 공간으로 투과된 용액을 외부로 배출하는 용액 배출관(60)을 포함한다.
- [0034] 본 발명에 따른 약동학 모사 플랫폼은 체내의 약물 동태를 모방하는 장치에 관한 것으로서, 구체적으로 웰 플레이트(10), 인서트(20), 커버 플레이트(30), 약물 주입관(40), 배지 주입관(50), 및 용액 배출관(60)을 포함한다.
- [0036] 웰 플레이트(10)는 상면에 다수의 웰(11)(well)을 구비하는 플레이트(plate)이다. 웰(11)은 웰 플레이트(10)의 상면으로부터 함몰된 형태로서, 웰 플레이트(10)의 상면에 걸쳐 다수 개가 배열된다.
- [0038] 인서트(20)는 다수의 웰(11)에 각각 삽입되어 세포를 배양하는 용기이다. 이러한 인서트(20)는 상단이 개방되고 내부에 공간을 구비하는 용기 형태로서, 웰(11)에 일대일로 삽입될 수 있도록 형성된다. 인서트(20)가 웰(11)에 삽입되는 경우에, 웰(11)에 삽입된 인서트(20)의 외면은 웰(11)의 내면과 서로 이격되어, 그 인서트(20)의 외면과 웰(11)의 내면 사이에 공간이 형성된다. 인서트(20)의 내부에는 세포가 도입되고, 약물 및 배지가 주입되어, 세포가 배양되면서 약물에 의해 반응한다.
- [0039] 한편, 인서트(20)는 내부에 주입된 약물과 배지가 혼합된 용액을 투과시키는 투과성 영역을 구비할 수 있다. 따라서, 상기 용액은 인서트(20)의 내부에서부터 웰(11)의 내면을 향해 투과되어, 인서트(20)의 외면과 웰(11)이 내면 사이의 공간에 저장된다.
- [0040] 구체적으로, 인서트(20)는 본체(21), 및 날개(22)를 포함할 수 있다. 본체(21)는 상단이 개방된 중공관 형태로 형성되고, 웰(11)의 내부로 삽입된다. 날개(22)는 본체(21)의 상단에서 좌우를 향해 돌출된 부재 영역으로, 웰(11)의 상단 개구부 중 일 영역을 폐쇄하며, 웰 플레이트(10)의 상면에 걸쳐진다. 즉, 날개(22)에 의해 본체(21)가 웰(11)의 내부에 고정된다. 여기서, 본체(21)의 전부 또는 일부가 상기 용액을 투과시키는 멤브레인으로 이루어질 수 있다.
- [0042] 커버 플레이트(30)는 웰 플레이트(10)의 상면을 커버하는 부재이다. 커버 플레이트(30)가 웰 플레이트(10)를 커버할 때에, 인서트(20)는 웰 플레이트(10)의 웰(11)에 삽입 배치된 상태이다. 이러한 커버 플레이트(30)는 인서트(20)의 내부에 있는 용액이 건조되는 것을 방지하고, 인서트(20) 내부로 오염물질이 유입되는 것을 차단한다.
- [0044] 약물 주입관(40)은 인서트(20)의 내부에 약물을 주입하는 관이다. 약물 주입관(40)은 커버 플레이트(30)를 관통하여 인서트(20)의 내부와 연통된다. 따라서, 약물 주입관(40)을 통해 공급되는 약물은 인서트(20)의 내부로 주입될 수 있다.
- [0046] 배지 주입관(50)은 인서트(20)의 내부에 배지를 주입하는 관이다. 배지 주입관(50)도 커버 플레이트(30)를 관통하여 인서트(20)의 내부로 연통되기 때문에, 배지 주입관(50)을 통해 인서트(20)의 내부로 배지를 주입할 수 있다.

- [0048] 용액 배출관(60)은 커버 플레이트(30)를 관통하여, 인서트(20)의 외면과 웰(11)의 내면 사이의 공간과 연통된다. 따라서, 인서트(20)를 투과하여 인서트(20)의 외면과 웰(11)의 내면 사이에 저장된 용액을 외부로 배출할 수 있다.
- [0049] 일례로, 상기 본체(21)와 날개(22)를 구비하는 인서트(20)가 웰(11)에 삽입 배치된 경우, 용액 배출관(60)은 날개(22)에 의해 폐쇄되지 않은 웰(11)의 상단 개구부 영역을 통과하여, 인서트(20)의 외면과 웰(11)의 내면 사이의 공간에 배치됨으로써, 인서트(20)의 외면과 웰(11)의 내면 사이에 저장된 용액을 외부로 배출할 수 있다.
- [0051] 여기서, 약물 주입관(40), 배지 주입관(50), 및 용액 배출관(60) 중 적어도 어느 하나 이상을 통해, 약물, 배지를 주입하고, 용액을 배출하기 위해서, 펌프 시스템이 도입될 수 있다.
- [0053] 이하에서는 본 발명에 따른 약효 스크리닝 방법에 대해 설명한다. 본 발명에 따른 약효 스크리닝 방법은 전술한 약동학 모사 플랫폼을 활용하는 방법으로서, 약동학 모사 플랫폼에 관한 내용은 생략하거나 간단하게만 기술한다.
- [0054] 본 발명에 따른 약효 스크리닝 방법은 전술한 약동학 모사 플랫폼에 주입된 약물을 스크리닝한다.
- [0055] 여기서, 약동학 모사 플랫폼에서 배양된 세포에 대해, 질량분석기를 이용하여 세포 내부의 약물 양을 정량 분석할 수 있다. 이를 통해, 실제 세포 내 약물 유효량 대비 약효에 대한 약물 스크리닝을 수행할 수 있다.
- [0056] 또한, 약동학 모사 플랫폼에서 배양된 세포에 대해, 약물의 독성평가를 수행할 수 있다. 이는 세포 생존율을 기반으로 하는 약역학 스크리닝 방법이다.
- [0057] 나아가, 본 발명에 따른 약효 스크리닝 방법은 약동학 모사 플랫폼에서 배양된 세포에 대해, 질량분석기를 이용하여 세포 내부의 약물 양을 정량 분석하고, 약물의 독성평가를 수행한 다음에, 이에 따른 약물 정량 분석 결과, 및 약물의 독성평가에 따른 세포 생존율 분석 결과를 기반으로 정량적 약역학-세포 생존율 연계 스크리닝을 수행할 수 있다. 여기서, 세포 내부의 약물 양을 정량 분석하는 과정과 약물 독성평가 과정의 순서는 무방하고, 동시에 이루어질 수도 있다.
- [0059] [실시예]
- [0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0062] **실시예 1. 약동학 모사 플랫폼(Artificial Circulatory System for Tumoroid, ACT) 구축**
- [0063] 본 발명은 누구나 손쉽게 사용이 가능하며 질량분석기를 사용할 수 있을 만큼의 시료 확보가 가능한 시스템 구축을 목표로 하였기에, 시스템 디자인은 상용화 되어 있는 웰 플레이트 사용이 가능하게끔 디자인을 진행하였다. 도 3은 실시예 1에 따른 약동학 모사 플랫폼의 설계 및 결합 상태를 설명하는 도면이다. 도 3을 참고로, 상업적으로 구매할 수 있는 웰 플레이트에 세포를 도입한 인서트를 체결한 다음, 전산이용설계(CAD)-3D 모델링 후 레진 3D 프린터(Zortrax, Inspire)로 출력한 커버를 웰 플레이트 커버로 사용하는 디자인을 진행하였다. 레진은 그래피 사의 바이오 레진을 사용하였다(Graphy, SG-100). 세포에 직접적으로 배지와 약물 전달이 가능하면서, 세포의 유출을 막기 위한 설계를 위하여, 커버에 3개의 홀을 천공하였다. 3개의 홀 중 2개는 인서트 내부와 통하고, 나머지 1개는 인서트의 바깥쪽에 있는 웰의 개구부와 통하도록 하였다. 인서트 내부와 통하는 2개의 홀로 약물과 배지가 주입되게 되고, 인서트 바깥 위치에 존재하는 홀로는 용액이 배출되도록 플랫폼 설계를 진행하였다.
- [0064] 도 4는 실시예 1에 따른 약동학 모사 플랫폼의 구동 결과를 나타내는 도면이다. 실제로 세포가 인서트 내부에만

존재하는지 확인하는 실험을 진행한 결과, 72시간 동안 세포가 안정적으로 인서트 내부에만 존재하는 것을 확인할 수 있었다(도 4의 A 참조). 전산 유체역학 시뮬레이션을 진행하여, 주입되는 배지, 약물 용액이 인서트와 웰 내부에 고르게 퍼지는지 시뮬레이션을 통한 확인을 진행하였다. 시뮬레이션은 콤포스 멀티피직스(COMSOL Multiphysics 6.0)를 사용하였으며, 고정 회전자(Frozen rotor)와 농축된 종의 이동(Transport of Diluted Species)를 함께 활용하여 일정 주기로 반복 운동하는 well 내부에서 약물의 확산 운동을 예측하였다. 해당 모델은 다중 물리 현상 중 혼합 모듈(Mixer Module)을 활용하여 연계된 물리 현상으로 계산이 실행되었다. 시뮬레이션 결과, 속도크기가 웰 내에 큰 차이 없이 균일하게 분배된 것을 확인하였다. 아래 [수학식 1]과 같이 픽의 확산법칙(Fick's law)에 따르면 확산 유량은 밀도의 변화 속도에 비례한다.

[수학식 1]

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

(여기서, C는 물질의 농도, t는 시간, x는 거리임.)

따라서, 속도가 일정하게 분배된 웰 내에 주입된 약물은 빠른 시간 내에 균일하게 확산될 것으로 예측 가능하다. 이를 통해 인서트에 안정적으로 존재하는 세포들이 균일하게 배지, 약물을 전달받을 수 있는 플랫폼임을 확인하였다.

본 시스템에 약동학을 도입하기 위하여 약동학 시뮬레이션을 통한 시간대별 약물의 농도 플랏을 얻는 작업을 진행하였다. 약물은 토포테칸(Topotecan)을 이용하여 시뮬레이션을 진행하였으며, 약동학 시뮬레이션을 위한 약동학 매개변수는 노바티스 사(1996년 승인, 2018년 수정 버전 처방 정보본)의 처방 정보를 사용하였다. 정맥 주사를 한다는 가정하에 1-구획 모델로 진행하였으며, 개별 시뮬레이션(individual simulation)으로 진행하였다. 기존의 약물 스크리닝법(w/o ACT)과 본 플랫폼을 활용한 스크리닝법에서의 차이점을 관찰하기 위해서는 모든 조건에서 총 시간 동안 세포가 동일한 양의 약물에 노출되어야 한다. 따라서 w/o ACT에서 1c50 그래프의 적분값과 시뮬레이션을 통해 얻어진 약동학 그래프의 적분값이 동일해지도록 정규화 작업을 하였다(도 4의 B 참조). 정규화된 약동학 그래프대로 시간에 따라 약물의 양을 본 플랫폼에 도입시킨 뒤, 내부에 있는 약물의 양을 정량해본 결과, 도입한 양과 비슷한 수준으로 재현되는 것을 확인하였다(도 4의 C 참조). 상위 결과들을 통하여 본 발명에 따른 플랫폼은 세포를 안정적으로 유지할 수 있으며, 약동학을 모사하여 세포에 균일하게 약물을 전달할 수 있는 시스템임을 확인하였다.

실시예 2. 세포 생존율 기반 약역학 스크리닝

상기 확인된 플랫폼과 기존의 약물 스크리닝 법을 이용하여 실제 세포에 약물을 도입하여 약물 독성평가를 진행하였다. 2차원 A549 폐암 세포주를 사용하였으며 실험조건은 본 플랫폼이 없는 조건(w/o ACT)과 본 플랫폼 상에서 약동학이 없는 조건(ACT (w/o PK)), 48시간 동안 약물을 주입하는 약동학이 도입된 조건(ACT (48h infuse, 1cycle)) 3가지로 실험을 진행하였다. 도 5는 실시예 2에 따른 2차원 세포에서 세포 생존율 기반 약역학 스크리닝 결과를 나타낸 것으로, 도 5의 A 내지 C를 참고로 w/o ACT의 경우 세포의 지속적인 사멸이 나타난 반면, 약동학이 도입되지 않은 ACT (w/o PK)에서는 사멸이 미비하였고 약동학이 도입된 경우(ACT (48h infuse, 1cycle)) 사멸하지 않는 것을 확인하였다. 이 차이가 유체 흐름의 유무에 따라 변화가 보였으며, 약동학을 도입함에 따라 세포의 사멸이 증가하는 차이가 나타나는 것을 볼 수 있었다. 약물의 주입이 멈춘 후의 세포의 거동을 살펴보기 위하여 72시간 이후 약물의 주입을 멈추고 24시간 동안 배지만 세포에 주입해준 후(휴지기) 세포의 성장률을 측정하였다(도 5의 D 참조). w/o ACT 조건에서는 34%로 가장 많은 사멸이 계속 일어나는 반면, ACT (w/o PK)에서는 10% 감소를 보였고, ACT (48h infuse, 1cycle) 경우 40%의 세포 성장을 보였다. 결론적으로, 유체 흐름과 약동학 유무에 따라서 세포 손상율과 복구율에 차이를 보였다.

3차원 세포에서도 상기 비슷한 차이가 확인되는지 살펴보았다. 도 6은 실시예 2에 따른 3차원 세포에서 세포 생존율 기반 약역학 스크리닝 결과를 나타낸 것이다. 실험 조건은 유체 흐름에 따른 변화와 약동학에 따른 변화를 살펴보기 위하여 본 플랫폼을 도입하지 않는 조건(w/o ACT)과 약동학이 없는 조건에서의 본 시스템(ACT (w/o PK)), 48시간(ACT (48h infuse, 1cycle)), 12시간(ACT (12h infuse, 3cycle)) 동안 약물을 주입할 시의 약동학을 도입한 조건에서의 본 시스템에서 실험을 진행하였다. 2차원 세포와 마찬가지로 w/o ACT 경우보다 ACT (w/o PK)의 경우 세포의 사멸이 저하되는 차이가 발생함을 확인할 수 있었다. 또한, ACT 시스템 조건에서도 약동학의

유무, 약동학의 차이에 따라서 약역학에 차이가 발생함을 볼 수 있었다. 48시간동안 약물을 주입할 경우(ACT (48h infuse, 3cycle)) 24시간까지 진행되던 세포 사멸이 48-72시간까지는 저해됨을 볼 수 있으며, 12시간 동안 약물을 주입할 시(ACT (12h infuse, 3cycle)) 약물의 독성이 가장 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 3차원 세포도 마찬가지로 약물의 주입이 멈춘 후(휴지기) 세포의 거동을 살펴본 결과, 약동학 없는 조건 (ACT (w/o PK))과 48시간 동안 약물을 주입하는 조건(ACT (48h infuse, 1cycle))에서는 18% 정도 세포가 다시 살아나는 양상을 보였고, 12시간 동안 약물을 주입한 약동학 조건(ACT (12h infuse, 3cycle))에서는 가장 큰 변화인 25% 살아나는 양상을 보였다. 약동학에 따라 세포 손상에 차이가 발생함을 알 수 있었으며, 더 많은 세포 손상을 받은 조건에서 큰 복구 양상을 띄는 것을 확인할 수 있었다. 2차원 세포와 마찬가지로 유체 흐름, 약동학 유무에 따라서 세포 손상율과 복구율에 차이를 보였다.

[0075] 실시예 3. 질량분석 기반 정량 약역학 스크리닝

[0076] 기 사용되어 오던 약물 스크리닝 방법의 경우 상기 기재된 세포 생존율 평가에 그치는 방법들이었다. 약동학이 도입된 약물 스크리닝 방법들의 경우도 마찬가지이다. 본 발명은 이러한 한계를 넘어, 유체 흐름을 이용한 약동학 모사 플랫폼을 발명함과 동시에, 이를 기반으로 질량분석기를 이용하여 세포 내부의 약물 양을 정량 분석함으로써 실제 세포내 약물 유효량 대비 약효에 대한 약물 스크리닝 방법을 제시한다.

[0077] 도 7은 실시예 3에 따른 질량분석 기반 정량 약역학 스크리닝 결과를 나타낸 것이다. 먼저 2차원 세포에서 정량 분석을 진행하였으며, ACT (w/o PK) 조건에서 w/o ACT에서보다 많은 양의 약물이 검출되는 것을 확인하였다. 이는 단순확산에 의한 약물전달이 본 시스템에서는 유속에 의한 전달로 진행되면서 확산에 의한 물질 전달의 한계를 넘어 약물의 유입양이 증가한 것으로 볼 수 있다. 또한, 더 많은 양의 약물이 존재함에도 세포의 사멸 정도는 비슷하다는 점과, 휴지기 이후 ACT (w/o PK) 조건에서 세포가 더 많은 양의 약물을 배출한다는 점에서 ACT (w/o PK) 조건에서의 세포가 약물에 대한 저항성이 커지는 것을 볼 수 있다. ACT (48h infuse, 1cycle)의 경우, 약물의 양이 가장 적고 변화가 가장 미미한 것을 볼 수 있다. 이는 약동학이 도입되었을 경우, 세포가 약물에 노출되는 시간이 짧기 때문에 세포 내부의 약물의 양이 적게 나타났을 것이라 유추할 수 있다. 또한, 짧은 시간동안 고농도의 약물이 주입되어도 유입되는 양이 많이 증가하지 않음을 볼 수 있다. 마찬가지로 휴지기 이후 적은 양이지만 약물이 유출되는 것을 볼 수 있다. 즉, w/o ACT 조건보다 ACT (w/o PK)에서 약물의 전달이 용이하여 세포 내부로 유입되는 약물의 양이 증가하나, 세포 생존율을 고려하였을 때 내성 기작이 발현하여 세포의 사멸이 저해됨을 볼 수 있다. 휴지기 이후 약물 유출과 연관된 내성 기작이 활성화되어 세포의 사멸이 저해되었음을 확인하였다. ACT (48h infuse, 1cycle)의 경우, 짧은 시간 도입된 고농도에 의한 효과는 크지 않음을 확인하였다. 다른 조건들 대비 적은 양의 약물로 독성을 크게 내고 있으며, 휴지기 이후 약물의 양의 변화가 미비함에도 세포의 생장이 다시 활발히 증가하는 것을 통해 세포 증식 관련 기작이 휴지기 이전부터 활성화되어 있음을 유추해볼 수 있다.

[0078] 3차원 세포의 경우, 세포 생존율 기반 약역학 스크리닝 조건과 동일하게 ACT 시스템을 도입하지 않는 조건(w/o ACT)과 약동학이 없는 조건에서의 ACT 시스템(ACT (w/o PK)), 48시간(ACT (48h infuse, 1cycle)), 12시간(ACT (12h infuse, 3cycle)) 동안 약물을 주입할 시의 약동학을 도입한 조건에서의 ACT 시스템에서 실험을 진행하였다. 2차원 세포와 달리, w/o ACT 조건에서 세포 내 가장 많은 약물 유입을 보였으며, ACT (w/o PK), ACT (48h infuse, 1cycle)에서는 시간에 따라 약물의 배출이 발생하는 것을 확인하였다. 이는 2차원 세포와 마찬가지로, 세포 내부에서 약물 유출과 관련된 저항성이 발현되고 있다는 결과를 얻을 수 있다. 반면, 세포 생존율이 가장 낮았던 ACT (12h infuse, 3cycle) 조건에서는 시간에 따라 세포 내부의 약물의 양이 증가함을 볼 수 있다. 즉, 72시간까지는 유입된 약물에 의하여 세포의 사멸이 발생하나 휴지기 이후 증가된 약물에 대한 내성에 의하여 세포의 사멸이 저해되는 것으로 볼 수 있다.

[0080] 실시예 4. 정량적 약역학-세포 생존율 연계 스크리닝

[0081] 세포 생존율 결과와 세포 내 약물 정량 결과들을 바탕으로 정량적 약역학-세포 생존율 연계 스크리닝을 진행하였다. 도 8은 실시예 4에 따른 정량적 약역학-세포 생존율 연계 스크리닝 결과를 나타낸 것이다.

[0082] 변수는 시간, 세포내 약물의 양, 세포 생존율이며, 실질적 데이터 해석에는 세포 내 약물의 양-세포생존율 함수가 사용되게 된다. 2차원 세포의 경우, w/o ACT에서 초기부터 많은 약물 유입에 의한 독성이 확인된다(도 8A, 8A-1 참조). 또한, 시간에 따라 생존율 감소 정도가 완만해진다는 점에서 독성이 감소하고 있음을 확인할 수 있

다. ACT (w/o PK)의 경우도 초기부터 많은 약물 유입에 의한 독성이 확인된다(도 8A, 8A-2 참조). 시간에 따라 생존율이 급격히 감소한다는 점에서 독성이 유지되고 있음을 확인할 수 있다. 반면, ACT (48h infuse, 1cycle)의 경우 초기 적은 양의 약물 유입에 의한 독성이 확인된다(도 8A, 8A-3 참조). 또한, 시간에 따라 생존율 감소 정도가 완만해진다는 점에서 독성이 감소하고 있음을 확인할 수 있다.

[0083] 3차원 세포의 경우, w/o ACT 조건에서 2차원과 마찬가지로의 결과를 보였으며(도 8B-1 참조), 시간대별 유입되는 약물대비 생존율 감소는 더딘 것을 볼 수 있다(도 8B 참조). 반면, 2차원 세포와 달리 ACT 시스템을 사용할 경우, 매우 소량의 약물 유입이 발생함을 확인할 수 있다. ACT(w/o PK) 조건에서는 적은 양이지만 초기부터 유출에 의한 약물 저항성을 보이고 있으며(도 8B-2 참조), ACT (48h infuse, 1cycle)의 조건에서도 시간이 지남에 따라 유출에 의한 저항성이 발생함을 발견하였다(도 8B-3 참조). 반면, ACT (48h infuse, 1cycle) 조건에서 적은 양의 약물 유입으로 생존율이 크게 감소함을 확인할 수 있다(도 8B 참조). 또한 시간이 지남에 따라 약물의 유입이 다시 발생함을 보인다(도 8B-4 참조).

[0084] 상술한 실시예를 통해 본 발명에 따른 플랫폼이 세포를 안정적으로 유지할 수 있으며, 약동학을 모사하여 세포에 균일하게 약물을 전달할 수 있는 시스템임을 확인하였다. 또한 기 시행되어 오던 약역학 스크리닝 방식과 본 발명에 따른 플랫폼을 이용하여 약동학을 도입하였을 시 유체흐름과 약동학의 유무에 따라 약역학에서 차이가 발생함을 발견하였다. 뿐만 아니라, 질량분석 기반 정량 분석이 가능한 플랫폼을 통한 세포 내부의 약물의 정량 분석과 세포 생존율 기반 약역학 시크리닝 연계분석을 통하여 단순한 물리적 요인에 의한 약효 저해인지 생물학적인 변화에 의한 약효 저해인지에 대한 근본적 약역학 스크리닝 법을 발명하였다.

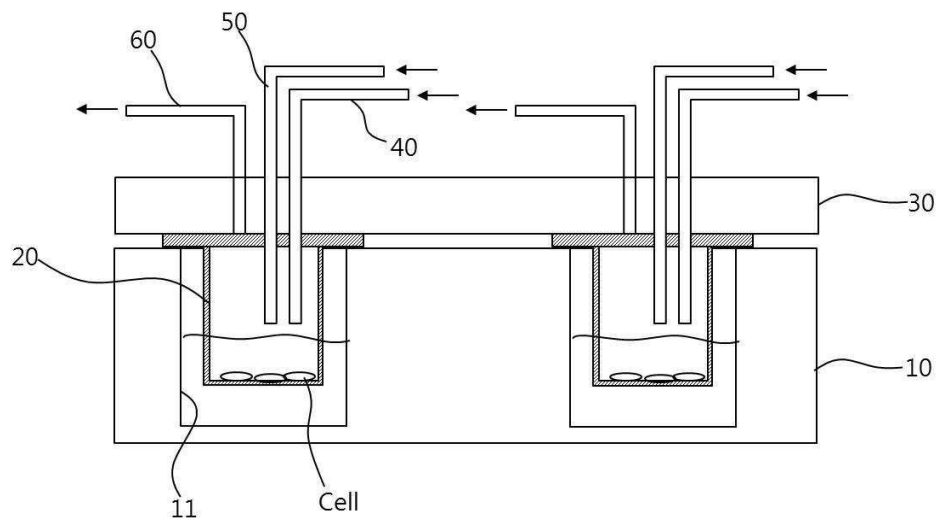
[0086] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

부호의 설명

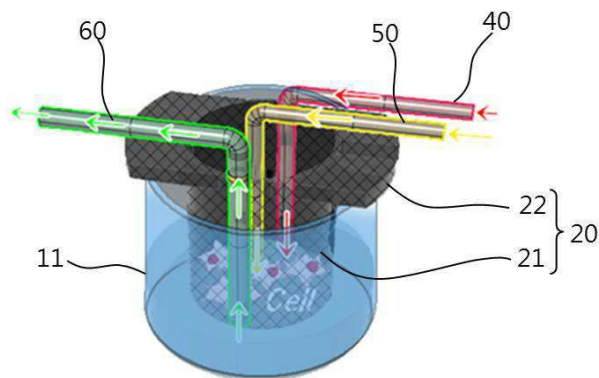
[0088] 10: 웰 플레이트 11: 웰
20: 인서트 21: 본체
22: 날개 30: 커버 플레이트
40: 약물 주입관 50: 배지 주입관
60: 용액 배출관

도면

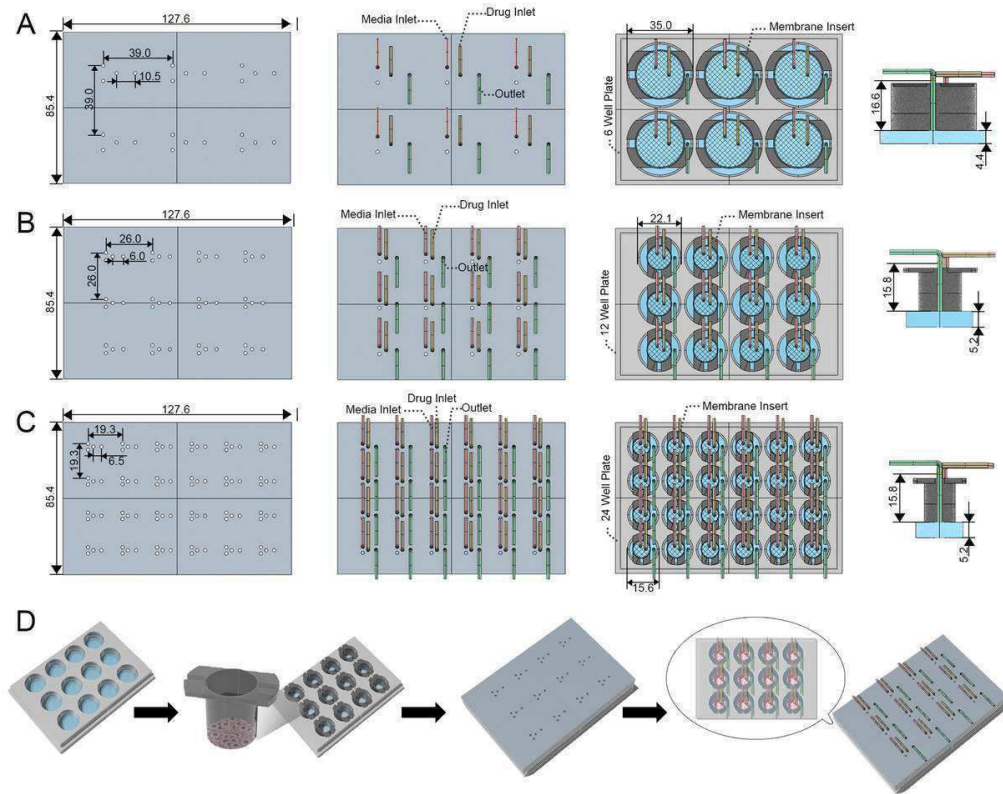
도면1



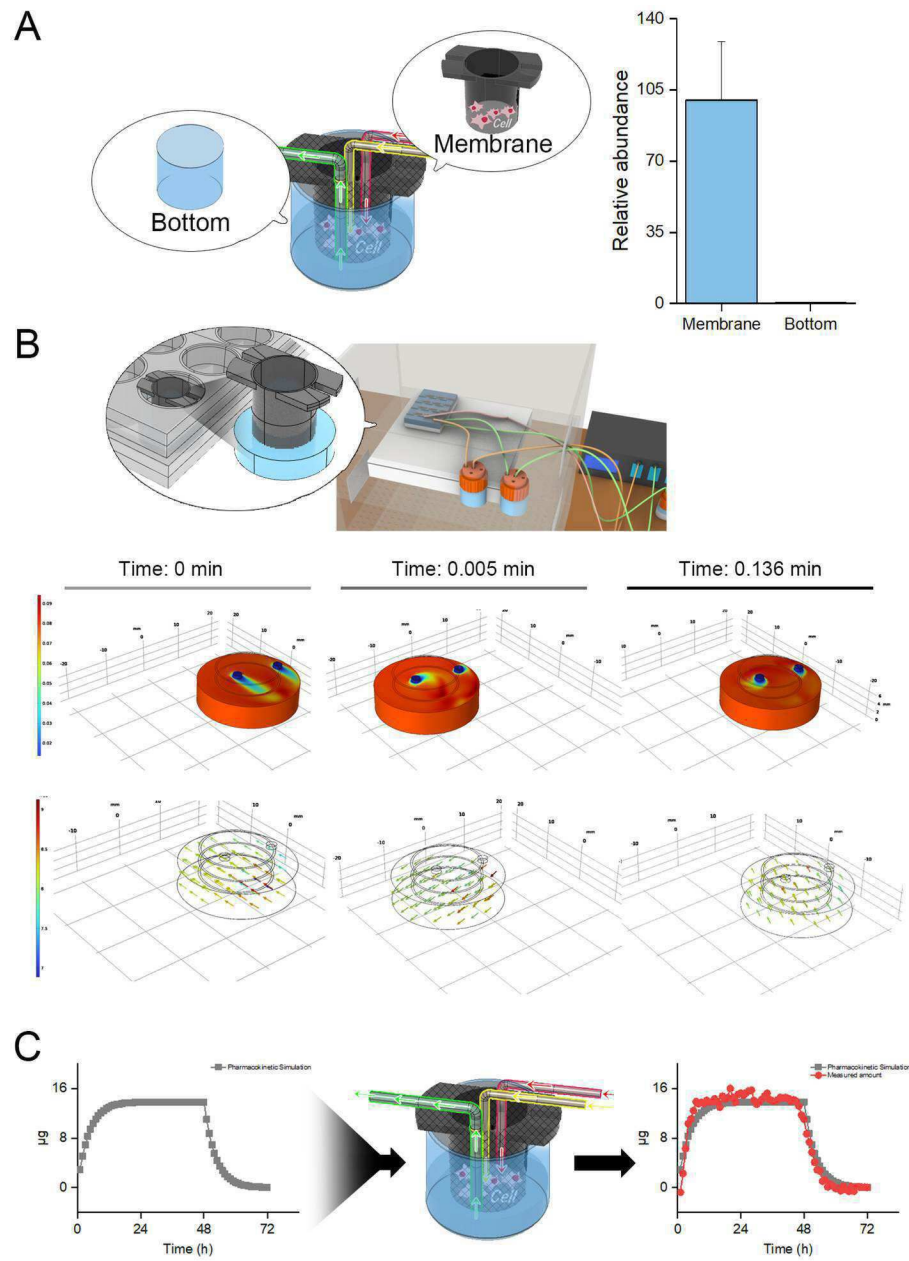
도면2



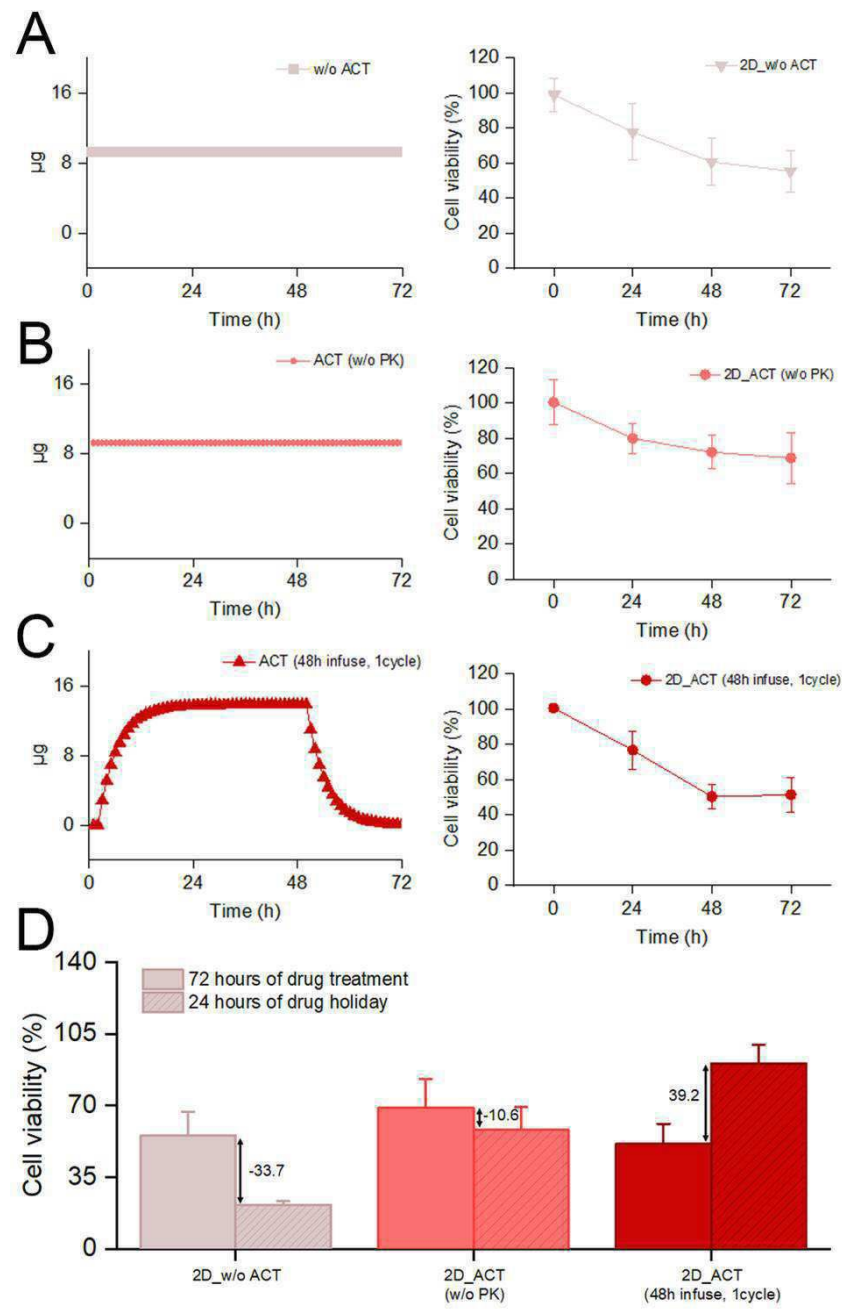
도면3



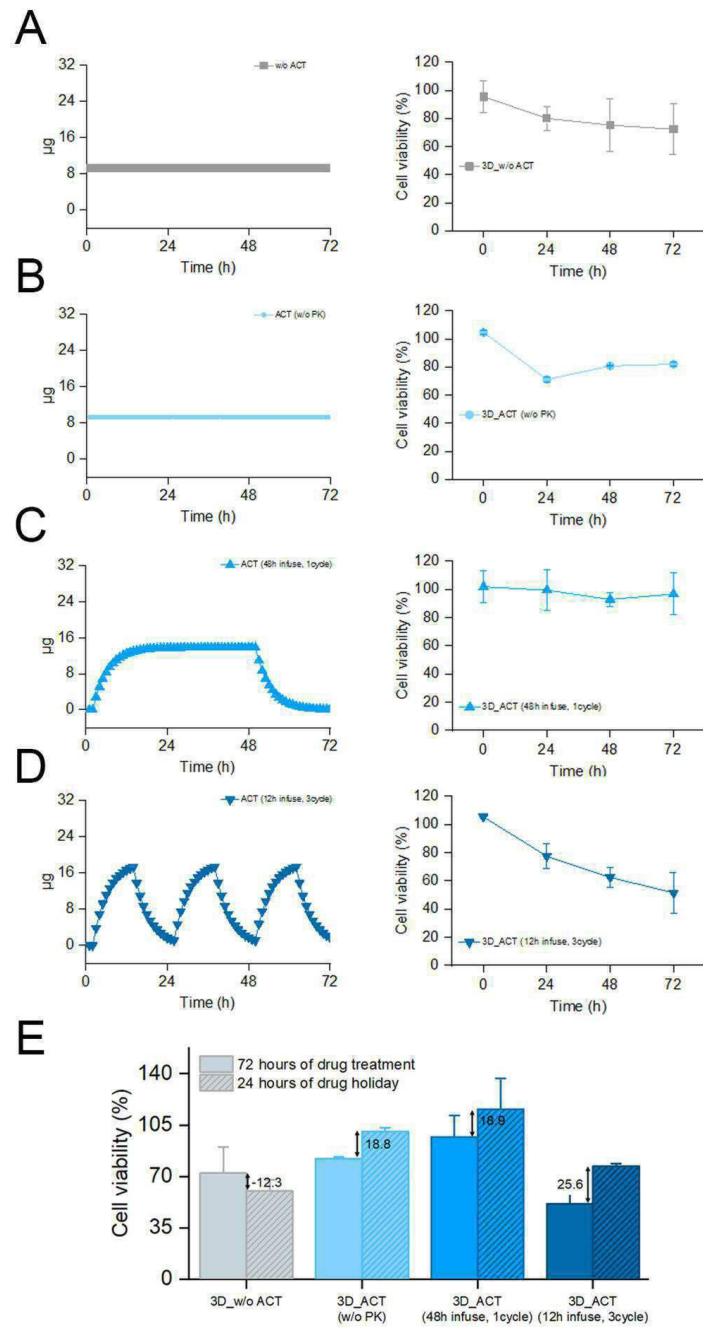
도면4



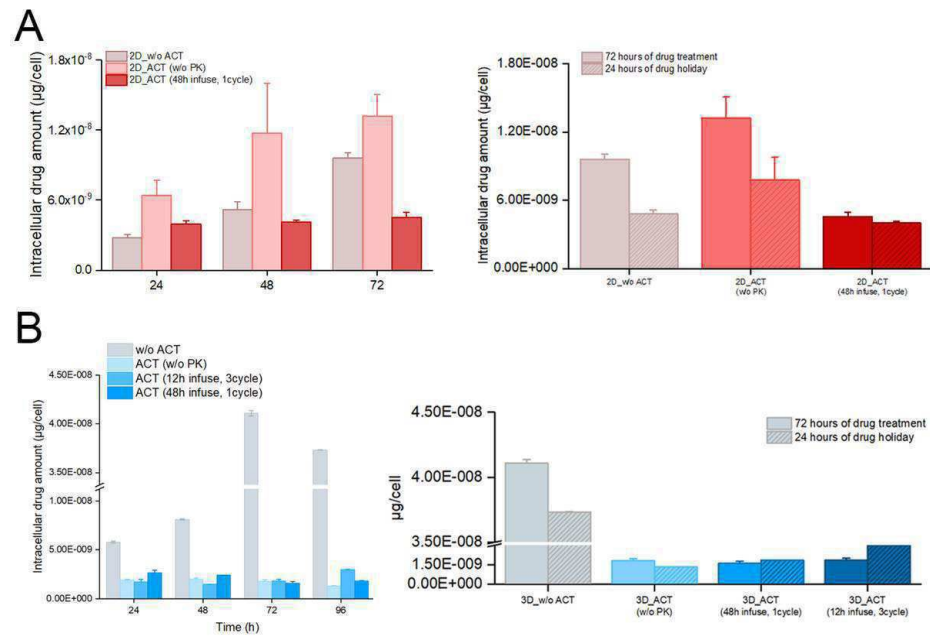
도면5



도면6



도면7



도면8

