(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0095742
(43) 공개일자 2017년08월23일

(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 10-2017-0019312
(22) 출원일자 2017년02월13일
심사청구일자 2017년02월13일
(30) 우선권주장
1020160017226 2016년02월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김현구
서울특별시 서초구 반포대로39길 63-8, A동 402호 (반포동, 반포서래월드메르디앙라스칼라)
용환석
서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 33동 1103호 (압구정동, 현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 24 항

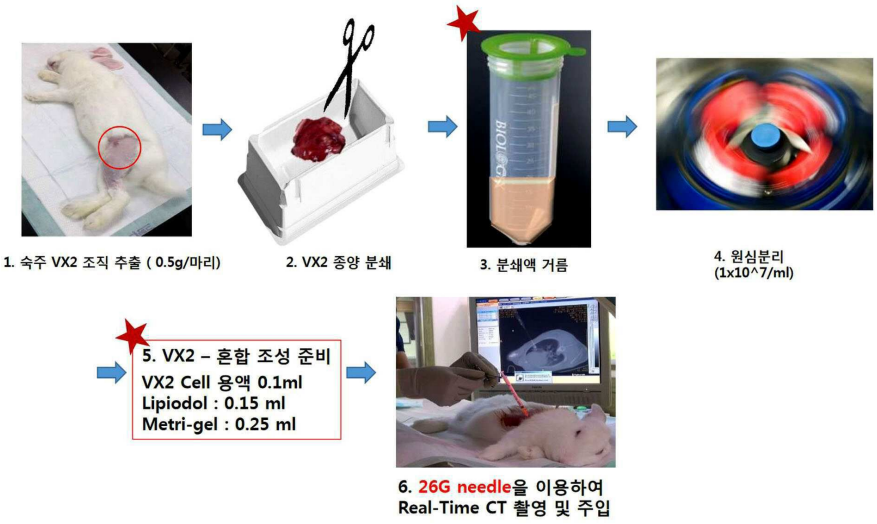
(54) 발명의 명칭 **폐암 동물모델의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 폐암 동물모델의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 폐암 동물모델의 제조방법은 CT를 이용하여 종양 조직의 이식이 성공적인지 실시간으로 확인하는 것이 가능하면서 이식의 성공률도 현저히 높은 동물모델을 제조하는 것이 가능하다. 또한 이식에 따른 부작용이 현저히 줄어들며, 이식 후 빠른 시간 안에 폐암 동물모델을 제조할 수 있는 제조방법을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A01K 2207/30 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0331 (2013.01)

(72) 발명자
퀜 위화
경기도 안양시 동안구 달안로 62, 602동 1701호 (비산동, 샛별한양아파트)
노지윤
인천광역시 부평구 경원대로 1269, 117동 804호 (산곡동, 현대1차아파트)
최병현
서울특별시 구로구 구로동로 148 고려대학교 구로병원 연구동 2층 흉부외과 연구실 (구로동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1A2A2A04005760
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 폐 계면활성제 성분기반 박막층체 모방형 나노입자를 이용한 호흡 항암 치료법 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 실시간 CT로 동물의 폐위치를 확인하는 단계; 및

2) 상기 단계에서 확인된 동물의 폐 위치에, 종양세포 및 증점제 혼합액을 24-30 게이지 바늘로 주사하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 종양세포 및 증점제 혼합액에서 상기 종양세포는 암 조직을 잘게 분쇄한 후 필터링하고, 원심분리하여 제조된 것을 특징으로 하는 폐암 동물세포의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 종양세포의 크기는 100 ㎛ 미만인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 종양세포는 암 세포주이거나 폐암 환자로부터 분리된 폐암 세포인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 암 세포주는 간암 세포주 또는 폐암 세포주인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 암 세포주는 VX2 간암 세포주인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 증점제는 메트리젤(Metrigel) 또는 Cultrex Basemetn Membrane Extract(BME)인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 종양세포 및 증점제 혼합액은 상기 증점제 100 중량부에 대하여 종양세포가 1-500 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 종양세포 및 증점제 혼합액의 점도는 3-25 cps인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 종양세포 및 증점제 혼합액에는 조영제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 조영제는 가도리니움(gadolinium)-DPTA, Gd-DO3A-부트롤(butrol), 바륨, 디아트리조에이트(diatrizoate), 에티오다이즈드 오일(ethiodized oil), 구연산갈륨(gallium citrate), 아이오카민산(iocarmic acid), 아이오세타민산(iocetamic acid), 아이다마이드(iodamide), 아이오디파마이드(iodipamide), 아이오도자민산(iodoxamic acid), 아이오글라미드(iogulamide), 아이오딕사놀(iodixanol), 아이헥솔(iohexol), 아이오파미돌(iopamidol), 아이오파논산(iopanoic acid), 아이오프로에민산(ioproemic acid), 아이오프로마이드(iopromide), 아이오세파민산(iosefamic acid), 아이오세린산(ioseric acid), 아이오술아미드 메글루민(iosulamide meglumine), 아이오세메트산(iosemetic acid), 아이오타술(iotasul), 아이오테트르산(iotetric acid), 아이오타라민산(iothalamic acid), 아이오트록시산(iotroxic acid), 아이오자갈르산(ioxaglic acid), 아이오시트리아온산(ioxitriaoic acid), 아이포데이트(ipodate), 메글루민(meglumine), 메트리자마이드(metrizamide), 메트리조에이트(metrizoate), 프로필리돈(propyliodone) 및 탈로오스 클로라이드(thallous chloride)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 조영제는 상기 종양세포 및 증점제 혼합액 중에서 종양세포 100 중량부를 기준으로 조영제를 1-200 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 동물은 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지 및 염소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 동물은 마우스 또는 렛트인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 마우스는 면역체계가 제거된 누드 마우스 또는 스키드 마우스인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 종양세포 및 증점제 혼합액은 주사기를 사용하여 주사하되,

상기 주사기의 바늘이 상기 CT 촬영 영상의 단면 위치에 그 단면과 평행하는 방향으로 주사되는 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 주사기는 개량 주사기인 것을 특징으로 하고,

상기 개량 주사기는 주사기(100), 주사 바늘(200) 및 채널(300)을 포함하고,

상기 채널(300)은 상기 주사기의 주입구(100)와 상기 주사 바늘(200) 사이에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 채널(300)은 외경(O.D)에 대한 내경(I.D)의 비율(I.D/O.D) 0.2 내지 1인 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법.

청구항 19

폐암 동물모델 제조용 키트에 있어서,

증점제가 보관된 바이알; 및

24-30 게이지 바늘을 갖는 주사기;를 포함하는 폐암 동물모델 제조용 키트.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 주사기는 개량 주사기인 것을 특징으로 하고,

상기 개량 주사기는 주사기(100), 주사 바늘(200) 및 채널(300)을 포함하고,

상기 채널(300)은 상기 주사기의 주입구(100)와 상기 주사 바늘(200) 사이에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델 제조용 키트.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 증점제는 조영제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델의 제조방법. 특징으로 하는 폐암 동물모델 제조용 키트.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 조영제는 상기 증점제와 하나의 바이알에 혼합된 혼합물로 보관된 것을 특징으로 하는 폐암 동물모델 제조용 키트.

청구항 23

1) 제1항에 따라 제조된 폐암 동물모델에 항암제를 투여하는 단계;

2) 상기 1) 단계의 동물에서 폐암 세포의 성장 또는 전이를 측정하여 항암제의 항암 효과를 확인하는 단계;를 포함하는 폐암 동물모델을 이용하여 항암제의 치료 효능을 분석하는 방법.

청구항 24

1) 제1항에 따라 제조된 폐암 동물모델에 항암제 후보 물질을 투여하는 단계; 및

2) 상기 1) 단계의 폐암 동물모델에서 종양 세포의 성장 또는 전이를 측정하여 항암제 후보물질의 항암 효과를 확인하는 단계;를 포함하는 폐암 동물모델을 이용하여 항암제를 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폐암 동물모델의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 간단한 과정을 통해 환자로부터 유래된 폐암 세포를 동물에 주입하여 정위적으로 폐종양이 발생한 폐암 동물모델의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폐암은 일반적으로 원발성 폐암을 의미하며, 원발성 폐암은 폐에서 기원한 악성 종양을 의미한다.

[0003] 폐암에 걸린 환자는 이를 치료하는 과정에서 항암제를 복용하는 것이 필수적으로 수반되어야만 한다. 한편, 이러한 폐암의 발생 원인으로 가장 많이 알려진 것은 흡연으로서, 폐암의 85 %는 흡연에 의한 것으로 보고되고 있다. 일반적으로 흡연은 폐암의 발생 위험을 13 배 가량 증가시키며, 장기간의 간접 흡연은 1.5 배 정도 증가시키는 것으로 알려져 있다. 하지만, 폐암 발생자의 약 15 %는 비흡연자 및 예전부터 전혀 담배를 피운 적 없는 사람에게서 발생한다. 이렇게 흡연 이외에 폐암을 발병시키는 원인으로는 간접 흡연이나, 중금속 노출, 이온화를 하는 방사선, 다환방향족 탄화수소, 폐 섬유증 등이 보고되고 있다. 또한 유전적 요인도 폐암 발생 원인으로서 중요한 관련이 있다. 즉, 폐암을 일으키는 유전적 발병 원인은 환자마다 다양한 양상으로 차이가 있음에도 불구하고, 기존 항암제는 이러한 유전적 발병 원인을 반영하지 못하고 있어 환자마다 적절한 치료가 불가능하다는 문제점이 있었다. 또한 이러한 문제점을 개선하기 위해 폐암 환자의 감수성 검사를 진행한 후 항암제를 처리하고 있기는 하나, 상기 검토한 바와 같이 기존 항암제가 다양한 유전적 발병 원인을 반영하지 못하는 문제점으로 인해 감수성 검사의 실효를 거두지는 못하고 있는 실정이다.

[0004] 이러한 문제점을 해결하고자 환자 맞춤형 항암제를 개발하기 위한 노력이 현재 활발하게 진행 중이며, 이러한 환자 맞춤형 항암제의 평가를 위한 전임상 동물 종양 모델을 제작하기 위한 연구들이 계속 진행 중에 있다. 특히 선행기술 중에는 내시경을 이용하여 토끼 VX2를 토끼 폐에 주입하는 동물모델에 관한 기술 등이 있으나, 토끼 VX2에만 적용 가능하다는 문제, 고형암 형태를 만들어내기 어렵다는 문제, 이식의 정확성이 현저히 떨어진다는 문제 및 각종 부작용의 문제가 여전히 남아 있다.

[0005] 또한 본 발명과 관련된 선행기술문헌으로는 대한민국 공개특허 제10-2014-0133399호(특허문헌 1)가 있으며, 상기 특허문헌 1에는 종양세포의 일차 배양방법 및 이를 이용하여 암 환자의 발병 장기와 동일한 장기에 이식하는 자기자리 이식 동물모델에 관한 기술이 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허 제10-2014-0133399호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 간단한 과정을 통해 정확하게 폐암이 이식된 폐암 동물모델의 제조방법을 제공하는 것으로, 상기 동물모델에 폐암 세포를 이식하여도 부작용이 발생하지 않고, 폐암 세포의 이식 성공율이 현저히 높으면서, 정확한 이식 여부를 실시간으로 확인하는 것이 가능한 폐암 동물모델의 제조방법을 제공하는 것이 목적이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아래 단계를 포함하는 폐암 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0009] 1) 실시간 CT로 동물의 폐위치를 확인하는 단계 및

[0010] 2) 상기 단계에서 확인된 동물의 폐 위치에, 종양세포 및 증점제 혼합액을 24-30 게이지 바늘로 주사하는 단계.

[0011] 또한 본 발명은 다른 목적을 달성하기 위하여, 증점제; 및 24-30 게이지 바 주사기;를 포함하는 폐암 동물모델 제조용 키트를 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 또 다른 목적을 달성하기 위하여 아래 단계를 포함하는 항암제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0013] 1) 상기 제조방법을 통해 제조된 폐암 동물모델에 항암제 후보 물질을 투여하는 단계; 및

[0014] 2) 상기 1)단계의 폐암 동물모델에서 종양 세포의 성장 또는 전이를 측정하여 항암제 후보물질의 치료 효능을 결정하는 단계.

[0015] 또한 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 아래 단계를 포함하는 폐암 환자 맞춤형 항암제 선별방법을 제공한다.

[0016] 1) 실시간 CT로 동물의 폐위치를 확인하는 단계,

[0017] 2) 상기 단계에서 확인된 동물의 폐 위치에, 종양세포 및 증점제 혼합액을 24-30 게이지 바늘로 주사하여 환자 맞춤형 폐암 동물모델을 수득하는 단계,

[0018] 3) 상기 수득된 환자 맞춤형 폐암 동물모델에 항암제를 투여하는 단계 및

[0019] 4) 상기 환자 맞춤형 폐암 동물모델에서 종양 세포의 성장 또는 전이를 측정하여 환자에 따른 항암제의 치료 효능을 결정하는 단계.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 폐암 동물모델의 제조방법은 실시간 CT를 이용하여 종양 세포의 이식이 성공적인지 실시간으로 확인하는 것이 가능하면서 이식의 성공률도 현저히 높은 동물모델을 제조하는 것이 가능하다. 또한 이식에 따른 부작용이 현저히 줄어들며, 이식 후 빠른 시간 안에 폐암 동물모델을 제공하는 것이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 실시예 1의 과정(폐암 동물모델의 제조방법)을 전체적으로 나타내는 개략도이다.

도 2는 실시예 1의 결과를 나타내는 사진이다.

도 3은 실시예 2의 과정을 전체적으로 나타내는 개략도이다.

도 4는 실시예 2에 따른 폐암 동물모델을 가지고 각 항암제의 감수성을 평가한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 실시예 3에 따른 폐암 동물모델에 사용되는 개량 주사기를 촬영한 사진이다.

도 6은 실시예 3에 따른 폐암 동물모델 제조과정을 나타낸 사진이다.

도 7은 실시예 3을 실시하기 전의 정상 동물모델에서의 폐조직(좌측)과 실시예 3에 따라 제조된 폐암 동물모델의 폐 조직(우측)을 촬영한 사진이다.

도 8은 본 발명에 따른 폐암 동물모델 제조용 키트를 도시화한 도면이다.

도 9는 본 발명에 따른 폐암 동물모델 제조용 키트를 이용하여 폐암 동물모델을 제조하는 일 예를 나타낸 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이에 본 발명자들은 종양 이식 성공률이 높은 소형 폐암 동물모델의 제조방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 폐암 동물모델의 제조방법을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0023] 본 발명에서 "이종이식"이란, 종이 다른 동물의 간, 심장, 신장 등 기관, 장기, 조직, 세포 등을 이식하는 방법을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 이종이식은 환자로부터 분리된 폐암 세포를 동물에 이식하는 방법으로 이해될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0024] 본 발명에서 "계대 배양"이란, 세포 또는 조직을 건강한 상태로 지속적으로 장기간 배양하기 위해 주기적으로 세포 또는 조직의 일부를 새로운 배양용기에 옮긴 후 배양배지를 갈아주면서 세포 또는 조직의 대 (代)를 계속 이어서 배양하는 방법을 의미한다. 한정된 공간을 가진 배양용기 내에서 세포 또는 조직 내 세포의 수가 늘어나

면서 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 1 계대 (1 passage, F1)라고 한다. 일반적인 계대 배양에서의 배양용기로는 면역 결핍 마우스의 생체시스템이 이용되며, 이는 이식하기 위한 암 조직을 배양하기 위한 영양체라 할 수 있다. 배양된 암 조직의 계대(passage, 예; F1 → F2) 이식시 새로운 개체의 면역 결핍 마우스가 사용되는 것이 바람직하며, 이를 마우스의 순계 생산을 위한 근교계(형매교배 또는 근친교배 등)와 혼동하는 것은 바람직하지 않다. 계대 배양의 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 기계적 분리 또는 효소적 분리로 수행될 수 있다.

[0025] 이때, 기계적 분리란, 물리적 또는 기계적으로 세포 덩어리로서의 조직을 분리하는 것을 의미하며, 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 블레이드, 조직 분쇄기, 바늘, 피펫팅, embryoid body divider 또는 스크래퍼 중에서 어느 하나 이상을 이용할 수 있다.

[0026] 일반적으로 세포는 생존을 위해 세포의 특성을 변화시키고 강한 생존력을 갖는 세포는 계대 배양시 계속 선택되기 때문에 본래의 종양과 특징이 많이 달라지게 된다. 특히 암세포의 경우 환경인자에 따라 종양세포의 분자적 특징 및 표현형이 쉽게 바뀔 수 있다는 문제점이 있다. 즉, 환자 유래 암조직을 이용한 동물모델에 있어서, 동물모델에 주입하기 전 암세포를 다시 배양하고, 처리하는 전처리단계를 거치게 된다면 상술한 문제점을 피해갈 수 없다는 한계점이 존재한다.

[0027] 본 발명에서는 상기 문제점을 해결하기 위하여, 환자로부터 분리된 폐암 세포를 별도의 처리없이 직접 주입하여 동물로부터 폐암을 유발하기 때문에, 환자 고유의 폐암 상태와 거의 동일한 형태 및 상태를 지닌 동물 모델을 제조할 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 측면은 아래 단계를 포함하는 폐암 동물모델의 제조방법에 관한 것이다.

[0029] 1) 실시간 CT로 동물의 폐위치를 확인하는 단계 및

[0030] 2) 상기 단계에서 확인된 동물의 폐 위치에, 종양세포 및 증점제 혼합액을 24-30 게이지 바늘로 주사하는 단계.

[0031] 우선, 사람을 제외한 동물의 폐를 실시간 CT 촬영 장치로 확인한다. 이때 상기 실시간 CT 촬영 장치는 일반적인 공지의 CT 촬영 장치가 모두 포함될 수 있으나, 바람직하게는 CT Fluoroscopy기능이 있는 CT로서, 일반 CT와 달리 Real time tracking 으로 촬영되는 것일 수 있다.

[0032] 다음, 상기 실시간 CT 촬영 장치로 확인한, 동물의 폐 위치에, 종양세포 및 증점제 혼합액을 24-30 게이지 바늘로 주사하여 폐암 동물모델을 제조한다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 동물은 인간을 제외한 어떠한 동물도 가능하며, 바람직하게는 포유동물로 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지 및 염소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 보다 바람직하게는 면역 결핍 동물이다.

[0034] 구체적으로 상기 동물은 크게 소형(예: 마우스, 래트), 중형(토끼, 기니피그) 또는 대형(돼지, 개) 동물로 분류할 수 있고, 이들 모두 포함될 수 있다. 다만, 상기 중형 또는 대형 동물모델은 외과용 동물모델로 바람직하며, 상기 소형 동물모델은 환자 맞춤형 폐암 동물모델로 제공될 수 있다.

[0035] 상기 "면역 결핍 동물"이란, 암이 발병될 수 있도록 면역시스템을 구성하는 일부 구성요소를 유전자 수준에서 인위적으로 손상시켜서 정상적인 면역시스템이 구현되지 않도록 조작하여 제조된 동물을 의미한다. 상기 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(nonobese diabetic) 마우스, SCID(Severe combined immunodeficiency) 마우스, NOD-SCID 마우스, NOG(NOD/shi-SCID/IL2R null) 마우스 등이 될 수 있다.

[0036] 또한, 상기 동물은 종양이 발생되지 않은 정상 동물을 의미한다.

[0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 종양세포는 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 바람직하게는 암 조직을 잘게 분쇄한 후 이를 필터링하고, 그 후 원심분리하여 수득되는 것일 수 있다. 이러한 과정을 통해 상기 종

양세포는 24-30 게이지의 바늘로 주사하여도 주사 바늘이 막히지 않고 폐암 세포를 이식할 수 있는 100 ㎛ 미만의 크기로 선별하는 것이 바람직하다. 종래 기술은 16-18 게이지인 바늘을 활용하기 때문에 종래 기술에서 사용한 동물모델에 기흉 등의 부작용이 있어 바람직하지 않았으나, 본 발명의 경우 24-30 게이지의 바늘을 활용하여 소형 동물모델을 제조함에도 상기 종래 기술의 부작용이 발생하지 않아 매우 바람직하다. 또한 암 조직의 분쇄는 폐암 세포가 파괴되지 않을 정도로 최대한 잘게 분쇄하는 것이 바람직하다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 종양세포는 암 세포주이거나 폐암 환자로부터 분리된 폐암 세포일 수 있다.

[0039] 본 발명에서 이용되는 암 세포주는 신장암 세포주(예컨대, RENCA), 위암 세포주, 뇌암 세포주, 폐암 세포주, 유방암 세포주, 난소암 세포주, 간암 세포주, 기관지암 세포주, 비인두암 세포주, 후두암 세포주, 췌장암 세포주, 방광암 세포주, 결장암 세포주 및 자궁경부암 세포주로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 가장 바람직하게는 간암 세포주 또는 동일 호흡기관계 세포주인 폐암 세포주일 수 있다. 만일 암 세포주의 수용자로 토끼와 같은 중형 동물이 이용되는 경우에는 간암 세포주인 VX2를 이용하는 것이 가장 바람직하다.

[0040] 상기 종양세포가 폐암 환자로부터 분리된 폐암 세포인 경우, 환자 맞춤형 폐암 동물모델을 제조할 수 있는 것을 큰 특징으로 한다. 일반적으로 폐암 환자로부터 분리된 폐암 세포를 이용하여 동물모델에 주입하기 위해서는 폐암 환자로부터 분리한 폐암 세포를 계대 배양하는 과정이 필수적이였다. 허나 본 발명에서는 상기 폐암 환자로부터 분리된 폐암 세포를 직접 주입하기 때문에, 상기 동물의 폐에 이종이식된 폐암은 계대배양에 의한 영향을 받지 않아, 환자의 폐암과 거의 동일한 상태를 보여 줄 수 있다는 장점을 갖는다.

[0041] 또한, 상기 종양세포가 폐암 환자로부터 분리된 폐암 세포이고, 상기 폐암 세포, 특히 이종의 폐암 세포를 인간을 제외한 동물에 직접 투여하게 될 경우, 통상적인 기계적 분리 과정만 거친 단순한 폐암 세포의 주입만으로는 그 동물 내에서 암종이 발생하지 않으며, 발생하더라도 암의 병기가 매우 느리다는 단점이 존재하였다. 그러나 놀랍게도, 본 발명에 따르면 환자로부터 분리한 폐암 세포를 인간을 제외한 동물에 주사한 경우에도 그 동물 내에서 폐암을 5 내지 20일의 짧은 시간 안에 형성하고 있음을 확인하였다. 이는 CT 촬영장치를 비롯하여, 폐암 환자로부터 분리한 폐암 세포와 조영제를 포함하는 폐암 유발용액의 조합 때문에 본 발명의 방법이 성공적으로 실시된 것이라 볼 수 있다.

[0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 종양세포는 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 바람직하게는 환자로부터 분리된 폐암 조직을 잘게 분쇄한 후 이를 필터링하고, 그 후 원심분리하여 수득되는 것일 수 있다. 이러한 과정을 통해 상기 종양세포는 24-30 게이지의 바늘로 주사하여도 주사 바늘이 막히지 않고 폐암 세포를 이식하는 것이 가능하게 된다. 또한 종래 기술은 16-18 게이지인 바늘을 활용하기 때문에 종래 기술에서 사용한 동물모델인 토끼에 기흉 등의 부작용이 있어 바람직하지 않았으나, 본 발명의 경우 24-30 게이지의 바늘을 활용하여 소형 동물모델을 제조함에도 상기 종래 기술의 부작용이 발생하지 않아 매우 바람직하다. 또한 폐암 조직의 분쇄는 폐암 세포가 파괴되지 않을 정도로 최대한 잘게 분쇄하는 것이 바람직하다.

[0043] 또한 본 발명의 바람직한 다른 구현예에 따르면 상기 폐암 세포는 초기(primary) 종양 세포 또는 구축된(established) 종양 세포일 수 있다.

[0044] 상기 이식되는 폐암 세포의 양은 일반적인 마우스를 기준으로 하여 1×10^4 내지 1×10^7 세포일 수 있다. 이러한 폐암 세포의 수가 10^4 개 미만이거나, 10^7개를 초과하는 경우에는 폐암 동물모델의 이식 성공율이 감소할 수 있다.

[0045] 상기 종양세포 및 증점제의 혼합액을 주사할 때, 사용되는 주사기의 바늘은 상기 CT 촬영 영상의 단면 위치에 그 단면과 평행하는 방향으로 주사하는 것이 바람직하다.

[0046] 상술한 과정을 통해 얻어진 폐암 동물모델은 폐암 환자의 유전적 발병 요인을 정확하게 반영하여 환자의 개인적인 유전적 원인에 맞는 항암제를 스크리닝하는 용도로 사용될 수 있다. 폐암 세포의 특성상 개복수술과정을 통해 침습적으로 폐암세포를 폐에 이식하여 제조된 종래의 폐암 동물모델에 비해, 본 발명에 따른 폐암 동물세포는 주사기를 사용하여, 비침습적으로 폐에 폐암 세포를 직접적으로 이식하기 때문에, 종래 이종이식 폐암 동물모델에 비해 이식 성공률이 높고, 부작용이 거의 없으며, 대형, 중형 동물모델 뿐만 아니라 소형 동물모델(예: 마우스)에도 높은 이식률을 달성할 수 있기 때문에, 인간에 적합하면서 환자의 개별적인 유전적 요인을 보다 정확하게 나타낼 수 있다.

[0047] 상기 증점제로 인해 보다 정확한 위치에 종양 세포를 이식하여 고정하는 것이 가능하게 된다. 이러한 증점제는 바람직하게는 상업용으로 활용되는 메트리젤(Metrigel, 제품명: BD MatrigelTM Basement Membrane Matrix, 5ml

vial) 또는 Cultrex Basemetn Membrane Extract(BME) 일 수 있다.

[0048] 상기 종양세포 및 증점제 혼합액은 상기 증점제 100 중량부에 대하여 종양세포가 1 내지 500 중량부로 포함되는 것일 수 있는데, 바람직하게는 50 내지 350 중량부일 수 있다. 상기 종양세포 및 증점제 혼합액의 혼합 중량 비율이 상기 범위를 만족하여야 상기 종양세포 및 증점제 혼합액의 점도가 3-25 cps, 바람직하게는 5-15 cps를 조건을 충족시킬 수 있다.

[0049] 상기 증점제의 점도는 5-30 cps(바람직하게는 10-20 cps) 일 수 있으며, 이러한 증점제가 상술한 중량부대로 종양세포와 혼합됨으로써, 종양세포 및 증점제 혼합액의 점도가 3-25 cps(바람직하게는 5-15 cps)에 해당할 수 있다. 만일 종양세포 및 증점제 혼합액의 점도가 3 cps 미만이거나, 25 cps를 초과할 경우 24 내지 30 게이지의 바늘을 통해 동물의 폐 위치에 주입하는데 용이하게 주입할 수 있고, 기흉이 생기는 등의 문제점이 발생할 수 있다.

[0050] 상기 종양세포 및 증점제 혼합액은 조영제를 더 포함하는 것일 수 있고, 상기 조영제로는 가도리니움(gadolinium)-DPTA, Gd-DO3A-부트롤(butrol), 바륨, 디아트리조에이트(diatrizoate), 에티오다이즈드 오일(ethiodized oil), 구연산갈륨(gallium citrate), 아이오카민산(iocarmic acid), 아이오세타민산(iocetamic acid), 아이다마이드(iodamide), 아이오디파마이드(iodipamide), 아이오도자민산(iodoxamic acid), 아이오글라미드(iogulamide), 아이오딕사놀(iodixanol), 아이헥솔(iohexol), 아이오파미돌(iopamidol), 아이오파논산(iopanoic acid), 아이오프로에민산(ioproemic acid), 아이오프로마이드(iopromide), 아이오세파민산(iosefamic acid), 아이오세린산(ioseric acid), 아이오술아미드 메글루민(iosulamide meglumine), 아이오세메트산(iosemetic acid), 아이오타술(iotasul), 아이오테트르산(iotetric acid), 아이오타라민산(iothalamic acid), 아이오트록시산(iotroxic acid), 아이오자갈르산(ioxaglic acid), 아이오시트리아온산(ioxitriaoic acid), 아이포데이트(ipodate), 메글루민(meglumine), 메트리자마이드(metrizamide), 메트리조에이트(metrizoate), 프로필리돈(propyliodone) 및 탈로오스 클로라이드(thallous chloride)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상을 사용할 수 있다. 보다 바람직하게는 요오드화 조영제인 아이헥솔(iohexol), 아이오자갈르산(ioxaglic acid) 및 에티오다이즈드 오일(ethiodized oil)일 수 있다.

[0051] 상술한 조영제를 사용할 경우, 실시간 CT를 통해 인간을 제외한 동물의 폐 위치를 정확히 확인할 수 있으므로, 중형 동물을 비롯하여 소형 동물에 대해서도 정위적으로 폐 종양이 발생한 폐암 동물모델의 제조가 가능하다.

[0052] 종래기술에서는 일반적으로 암 세포를 이식한 암 동물모델을 제조할 시, 개복수술을 통해 암 세포를 직접 해당 부위에 이식하거나, 계대 배양 또는 전 배양을 통해 배양된 암 세포를 주입하는 방식으로 이루어져왔다. 이러한 방법은 이식의 정확성 및 성공률이 대단히 낮을 뿐만 아니라 정위적인 이식이 어렵고, 폐암 발생에 인위적 조작이 추가되기 때문에, 이식된 암 세포가 유래한 환자의 특성을 그대로 반영하지 못하는 문제를 가져올 수 있다.

[0053] 이러한 문제점을 해결하고, 이식의 성공률 및 정확도를 높이기 위해, 실시간 CT 촬영 장치와 주사기를 사용함과 동시에 상기 종양세포 및 증점제 혼합액에 조영제(특히 요오드화 조영제)를 포함하였다. 상기 조영제 특히 요오드화 조영제를 사용할 경우 종래 기술과는 달리 주입되는 폐암 세포의 퍼짐 현상이 발생하지 않기 때문에 정확한 이식이 가능하다는 장점이 있다.

[0054] 이와 같이 확립된 폐암 동물모델의 제조방법은 환자로부터 분리된 폐암 세포를 단순 기계적 분리 처리만 거친 후, 동물의 폐에 직접적으로 정확하게 이식할 수 있고, 이러한 간단한 일련의 이식 과정만으로도 동물의 폐에 환자의 폐암 세포를 높은 성공확률로 이식할 수 있을 뿐만 아니라, 동물 내에서 5 내지 20일 이내에 폐암의 발병이 확인된다. 따라서, 환자의 폐암 세포에 대한 치료 또는 예방 효능을 검증할 수 있는 동물모델을 간단한 과정과 빠른 시간 내에 제시할 수 있다.

[0055] 본 발명에 따른 폐암 동물모델 제조방법은 동물모델 제조가 까다로운 소형 동물에 대해서도 높은 정확성과 성공률로 정위적 환자 맞춤형 폐암 동물모델의 제조가 가능하다.

[0056] 상기 요오드화 조영제 중에서 가장 바람직하게 에티오다이즈드 오일(ethiodized oil)을 사용할 수 있다. 상기 에티오디자이드 오일은 포피시드 오일(poppyseed oil)의 지방산(fatty acid) 에틸 에스테르(ethyl esters)를 포함하는 아이오딘으로 구성될 수 있다. 또한 상기 에티오디자이드 오일은 더욱 바람직하게는 상업용으로 활용되는 리피오돌(Lipiodol, 종래에는 눈물샘 누관이 막혔는지를 확인하는데 사용되거나, 또는 간암 등에 색전 효과가 있는 것으로 알려짐)인 것이 이식의 정확성 및 성공률을 보다 높일 수 있으면서 쥐와 같은 소형 동물모델에 보다 적합하게 적용될 수 있어 바람직하다. 한편, 종래 기술처럼 수용성 분산제(예: FDG)를 사용하게 되면, 상기 문제점들 이외에도 이식의 정확성 및 성공률을 조금이나마 높이기 위해 사후 추가되는 공정이 많아져서 번

거롭게 되어 바람직하지 않다.

[0057] 상기 조영제는 상기 종양세포 및 증점제 혼합액 중에서 종양세포 100 중량부를 기준으로 조영제를 1-200 중량부로 포함될 수 있다. 만약 상기 조영제가 상기 종양세포 및 증점제 혼합액 중에서 종양세포 100 중량부를 기준으로 1 중량부 미만으로 포함될 경우 CT 상에서 측정에 문제가 발생할 수 있고, 200 중량부를 초과할 경우 조영제에 의해 혼합액의 점도가 낮아져 종양 형성이 제대로 이루어지지 않거나, 폐에 점착되지 못하고 퍼지게 되는 문제가 발생한다.

[0058] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 종양세포를 동물에 주사할 때, 주사기가 사용될 수 있는데 사용되는 주사기로는 주사 바늘과 주사기가 직접적으로 결합되어 있는 통상적인 주사기라면 특별히 이제 제한되지 않으나, 동물모델 개체의 크기에 상관없이 정확한 삽입과 정량 주입이 가능하고 시야 확보가 용이한 개량 주사기를 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

[0059] 상기 개량 주사기는 주사기의 주입구(100)와 24-30 게이지 바늘(200) 사이에, 채널(300)을 가지고 있고, 보다 구체적으로 상기 채널(300)은 주사기의 주입구(100)와 24-30 게이지 바늘(200)을 연결하여, 주사기로부터 공급되는 종양세포 및 증점제 혼합액을 상기 동물모델의 폐로 투여될 수 있도록, 상기 주사 바늘로 안내하기 위해 상기 주사기의 주입구에 결합되는 것을 특징으로 한다(하기 도 5 참조).

[0060] 상기 채널(300)은 외경(O.D)에 대한 내경(I.D)의 비율(I.D/O.D)이 0.2 내지 1, 바람직하게는 0.3 내지 0.5이다. 상기 범위를 벗어날 경우, 내구성이나 유연성이 약해 주입되는 용액의 압력에 버티질 못하고 찢어지거나 주사기 바늘과 쉽게 분리되는 등의 다양한 문제가 발생할 수 있다.

[0061] 또한, 가장 본 발명에서 사용되는 주사기의 바늘(24-30 게이지)에 빈틈없이 들어맞는 상기 채널(300)의 사이즈는 외경(O.D)이 0.5 내지 0.8 ㎜, 내경(I.D)은 0.25 ㎜일 수 있다. 만약 상기 채널(300)의 내경(I.D)이 0.25 ㎜ 미만일 경우, 채널(300)이 주사기의 바늘보다 얇아지기 때문에 상기 채널과 주사기 바늘의 결합이 제대로 이루어지지 않는 문제가 발생하고, 0.25 ㎜를 초과할 경우 24-30 게이지 바늘이 고정되지 않아 주입되는 혼합액이 외부로 새어나갈 위험이 있다.

[0062] 또한 재질은 세포 조직에 독성을 가지지 않는 물질이면 특별이 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 폴리에틸렌 재질일 수 있다.

[0063] 한편, 상기 제조방법에 의하여 제조된 폐암 동물모델은 폐암 유발용액을 주사한 후 1-4 주(더욱 바람직하게는 2-3 주)의 기간이 경과한 후 상기 동물모델을 이용하여 항암제를 스크리닝하거나 폐암 환자 맞춤형 항암제 선별에 사용하는 것일 수 있다. 이는 종래 기술에 비해 현저히 빠른 속도로 항암제 스크리닝 또는 환자 맞춤형 항암제 선별 과정에 사용할 수 있는 동물모델이 된다. 종래 기술에 따른 동물모델은 주사 후 항암제 스크리닝 과정 등에 제공되는데 3-4 달 정도가 소요되어 본 발명에 의하는 경우보다 항암제 스크리닝 과정에 투입되는데 보다 장기간이 소요된다. 또한 본 발명은 종래 기술에 비해 폐에 고형암의 형태가 더욱 잘 나타나게 되어 바람직하다.

[0064] 또한 본 발명에 따른 폐암 동물모델에서는 폐암 병변 형성이 5 내지 20일 이내로 신속하게 진행되기 때문에, 환자로부터 분리한 폐암 세포를 간단한 처리과정을 통해 동물에 주입한 후, 짧은 시기 이내에 약효 평가를 실시할 수 있다는 장점을 갖는다. 또한 본 발명에 따른 폐암 동물모델은 동일한 방법에 의해 제조될 경우, 재현성이 우수하다는 점을 고려한다면 본 발명에 관한 폐암 동물모델 특히 환자 맞춤형 동물모델에 있어서의 우수성이 인정된다 할 것이다.

[0065] 한편, 상기 동물은 특별한 제한 없이 소형(예: 마우스, 래트), 중형(토끼, 기니피그) 또는 대형(돼지, 개) 동물모델이 모두 포함될 수 있다. 다만, 상기 중형 또는 대형 동물모델은 외과용 동물모델로 바람직할 수 있으며, 상기 소형 동물모델로는 면역 체계가 제거된 누드 마우스 또는 스키드 마우스가 환자 맞춤형 폐암 동물모델 등으로 제공되는데 바람직하다.

[0066] 본 발명에 따른 폐암 동물모델은 앞서 설명한 바와 같이 환자와 동일한 형태 및 유전정보를 갖는 이종 이식 동물모델로, 이를 이용하여 새로운 항암제를 다양한 조건에서 시험할 수 있으며, 짧은 시간에 여러 항암제의 효능을 분석하는데 유용하게 사용될 수 있고, 환자에게 가장 적절한 항암제를 선별할 수 있으므로, 환자의 치료기간

및 치료비용을 절감할 수 있다.

[0067] 본 발명의 다른 측면은 폐암 동물모델 제조용 키트에 있어서, 증점제가 보관된 바이알(10); 및 24-30 게이지 바늘을 갖는 주사기(20);를 포함하는 폐암 동물모델 제조용 키트에 관한 것이다. 이에 대한 구체적인 구성은 도 8에 도시하였고, 상기 키트를 사용하여 폐암 동물모델을 제조하는 일 예는 도 9에 나타내었다.

[0068] 본 발명에서는 언제 어디서나 종양세포를 채취하여, 소형, 중형 등의 어떠한 동물에나 적용할 수 있도록, 증점제가 보관된 바이알과 24-30 게이지 바늘을 갖는 주사기로 구성된 폐암 동물모델 키트를 제공하고자 한다. 폐암 환자로부터 분리한 폐암 세포(100 ㎛ 미만의 세포 크기를 가짐)를 본 발명의 증점제가 보관된 바이알과 24-30 게이지 바늘을 갖는 주사기로 구성된 키트에 적용한 폐암 동물모델 제조 시험에서 모두 같은 결과를 나타내었다.

[0069] 이를 통해, 채취한 종양세포 특히, 폐암 환자로부터 분리한 폐암 세포를 이용하여 바로 환자 맞춤형 폐암 동물모델세포를 제조할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0070] 상기 증점제로 인해 보다 정확한 위치에 종양 세포를 이식하여 고정하는 것이 가능하게 된다. 이러한 증점제는 바람직하게는 상업용으로 활용되는 메트리젤(Metrigel, 제품명: BD MatrigelTM Basement Membrane Matrix, 5ml vial) 또는 Cultrex Basemetn Membrane Extract(BME) 일 수 있다.

[0071] 상기 증점제의 점도는 5-30 cps(바람직하게는 10-20 cps)인 것이 바람직한데, 상기 증점제의 점도가 상기 범위 미만이거나 초과할 경우, 추후 종양세포가 혼합될 경우 최종 혼합액의 점도가 3-25 cps의 범위를 벗어나, 24 내지 30 게이지의 바늘을 통해 동물의 폐 위치에 주입하는데 용이하게 주입할 수 있고, 기흉이 생기는 등의 문제점이 발생할 수 있다.

[0072] 상기 증점제는 조영제를 더 포함할 수 있다. 상기 조영제는 상기 증점제와 별도의 바이알에 보관된 상태로 키트를 구성하거나 상기 증점제와 하나의 바이알에 혼합되어 있는 상태로 키트를 구성할 수 있다. 바람직하게는 상기 조영제는 상기 증점제와 하나의 바이알에 혼합된 상태로 보관하는 것일 수 있다.

[0073] 상기 증점제와 상기 조영제를 하나의 바이알에 혼합된 상태로 보관함하면, 채취한 종양세포를 혼합하고 주사기로 이동시키면서 나타나는 문제점을 차단할 수 있다. 즉 채취한 종양세포를 상기 증점제와 상기 조영제에 각각 혼합하는 동안의 오염이나 세균 감염을 완전히 차단할 수 있다. 또한 채취한 종양세포를 1차 혼합 후 바로 동물에 적용할 수 있어 과정 상의 간소화를 통해 환자 맞춤형 폐암 동물모델 제조를 용이하게 한다.

[0074] 상기 조영제로는 가도리니움(gadolinium)-DPTA, Gd-DO3A-부트롤(butrol), 바륨, 디아트리조에이트(diatrizoate), 에티오다이즈드 오일(ethiodized oil), 구연산갈륨(gallium citrate), 아이오카민산(iocarmic acid), 아이오세타민산(iocetamic acid), 아이다마이드(iodamide), 아이오디파마이드(iodipamide), 아이오도자민산(iodoxamic acid), 아이오글라미드(iogulamide), 아이오딕사놀(iodixanol), 아이헥솔(iohexol), 아이오파미돌(iopamidol), 아이오파논산(iopanoic acid), 아이오프로에민산(ioproemic acid), 아이오프로마이드(iopromide), 아이오세파민산(iosefamic acid), 아이오세린산(ioseric acid), 아이오술아미드 메글루민(iosulamide meglumine), 아이오세메트산(iosemetic acid), 아이오타술(iotasul), 아이오테트르산(iotetric acid), 아이오타라민산(iothalamic acid), 아이오트록시산(iotroxic acid), 아이오자갈르산(ioxaglic acid), 아이오시트리아온산(ioxitriaoic acid), 아이포데이트(ipodate), 메글루민(meglumine), 메트리자마이드(metrizamide), 메트리조에이트(metrizoate), 프로필리돈(propyliodone) 및 탈로오스 클로라이드(thallous chloride)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상을 사용할 수 있다. 보다 바람직하게는 요오드화 조영제인 아이헥솔(iohexol), 아이오자갈르산(ioxaglic acid) 및 에티오다이즈드 오일(ethiodized oil)일 수 있다.

[0075] 상술한 조영제를 사용할 경우, 실시간 CT를 통해 동물의 정확한 폐 위치를 확인하면서 주입할 수 있으므로, 중형 동물을 비롯하여 소형 동물에 대해서도 정위적으로 폐 종양이 발생한 폐암 동물모델을 제조할 수 있게되는 장점을 갖게된다.

[0076] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 주사기(20)는 24-30 게이지의 주사 바늘과 주사기가 직접적으로 결합되어 있는 통상적인 주사기라면 특별히 이제 제한되지 않으나, 동물모델 개체의 크기에 상관없이 정확한 삽입과 정량 주입이 가능하고 시야 확보가 용이한 개량 주사기를 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

[0077] 상기 개량 주사기는 주사기의 주입구(100)와 24-30 게이지 바늘(200) 사이에, 채널(300)을 가지고 있고, 보다 구체적으로 상기 채널(300)은 주사기의 주입구(100)와 24-30 게이지 바늘(200)을 연결하여, 주사기로부터 공급

되는 종양세포 및 증점제 혼합액을 상기 동물모델의 폐로 투여될 수 있도록, 상기 주사 바늘로 안내하기 위해 상기 주사기의 주입구에 결합되는 것을 특징으로 한다(하기 도 5 참조).

[0078] 상기 채널(300)은 외경(O.D)에 대한 내경(I.D)의 비율(I.D/O.D)이 0.2 내지 1, 바람직하게는 0.3 내지 0.5이다. 상기 범위를 벗어날 경우, 내구성이나 유연성이 약해 주입되는 용액의 압력에 버티질 못하고 찢어지거나 주사기 바늘과 쉽게 분리되는 등의 다양한 문제가 발생할 수 있다.

[0079] 또한, 가장 본 발명에서 사용되는 주사기의 바늘(24-30 게이지)에 빈틈없이 들어맞는 상기 채널(300)의 사이즈는 외경(O.D)이 0.5 내지 0.8 ㎜, 내경(I.D)은 0.25 ㎜일 수 있다. 만약 상기 채널(300)의 내경(I.D)이 0.25 ㎜ 미만일 경우, 채널(300)이 주사기의 바늘보다 얇아지기 때문에 상기 채널과 주사기 바늘의 결합이 제대로 이루어지지 않는 문제가 발생하고, 0.25 ㎜를 초과할 경우 24-30 게이지 바늘이 고정되지 않아 주입되는 혼합액이 외부로 새어나갈 위험이 있다.

[0080] 또한 재질은 세포 조직에 독성을 가지지 않는 물질이면 특별이 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 폴리에틸렌 재질일 수 있다.

[0081] 본 발명의 또 다른 측면은 아래 단계를 포함하는 폐암 동물모델을 이용하여 항암제의 치료 효능을 분석하는 방법에 관한 것이다.

[0082] 1) 상기 폐암 동물모델 제조방법을 통해 제조된 폐암 동물모델에 항암제를 투여하는 단계;

[0083] 2) 상기 1) 단계의 동물에서 폐암 세포의 성장 또는 전이를 측정하여 항암제의 항암 효과를 확인하는 단계.

[0084] 우선, 1) 상기 폐암 동물모델에 항암제를 투여한다. 상기 폐암 동물모델은 앞서 설명한 폐암 동물모델 제조방법으로 제조된 것일 수 있다.

[0085] 상기 단계에서 폐암이 유발된 동물의 정맥에 항암제를 투여할 수 있고, 일예로 상기 폐암이 유발된 동물이 마우스인 경우 꼬리 정맥에 항암제를 투여할 수 있으나, 특별히 이에 한정되지 않는다.

[0086] 다음 2) 상기 1) 단계의 동물에서 폐암 세포의 성장 또는 전이를 측정하여 항암제의 항암 효과를 확인한다. 폐암 관련 유전자의 발현 정도 또는 미세 혈관 밀도를 측정하여 항암제의 치료 효능을 분석할 수 있고, 폐암 세포의 성장 또는 전이를 육안으로 관찰하여 치료 효능을 분석할 수 있다. 이때, 폐암 세포로의 성장을 관찰하기 위하여 캘리퍼스와 같은 도구를 이용하여 측정할 수 있다.

[0087] 구체적으로 상기 폐암 동물모델에서 폐암 세포의 추가적인 성장이 억제되었거나, 전이가 억제된 경우에는, 사용한 항암제에 대해 항암 효과가 있다고 확인할 수 있다. 상기 폐암 세포의 성장을 측정할 경우, 항암제의 치료 효능을 수치화하여 정량적으로 파악할 수 있다. 통상 항암제 투여 종료 후에 폐암 세포의 크기를 측정하고, 그것을 항암제 비투여군 또는 항암제 투여 전의 폐암 세포의 크기와 비교하는 방법을 이용하여 항암제의 치료 효과를 정량화 할 수 있다. 또한, 본 발명에 의하면 상기와 같이 폐암 세포의 크기를 계측하는 것 이외에도, ① 항암제 투여 회수를 일정하게 하여 치료까지의 시간을 측정한다, ② 치유될 때까지 항암제를 일정 간격으로 투여한 회수를 구하는 등과 같은 방법에 의해서도 항암제 효과의 강도를 평가할 수 있다.

[0088] 항암제를 임상 수준에서 실시하기 위하여, 우선 동물모델에서 상기 항암제의 효능과 안정성이 확인되어야 하는데, 본 발명은 이러한 동물모델-기초 시험을 환자별로 가능하게 한다. 본 발명에 따른 상기 폐암 동물모델은 폐암 환자로부터 분리한 폐암 세포의 이종이식을 통해 제조된 것으로서, 환자에 따라 적절히 가장 적절한 후보자 항암제를 선별할 수 있다.

[0089] 평가 대상이 되는 항암제는 폐암 동물모델에 국소적으로 투여될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 즉 어떠한 투여 경로의 항암제도 선별할 수 있다. 비경구적 및 경구적으로 투여되는 함암제도 선별할 수 있다. 항암제의 투여량은 약제의 성질, 투여 대상의 종류, 연령이나 체중 등의 조건을 기초로 종합적으로 판단하여, 최적의 양을 적절하게 결정해야 하며 특별히 한정되지 않는다.

[0090] 투여 시기나 투여 회수 등의 투여 조건은 약제의 성질, 시험 및 평가 목적 등에 따라 적절하게 최적이 되도록 설정하면 되며 특별히 제한되지 않는다. 예컨대, 투여 시기에 대해서는 폐암 동물모델을 제작한 직후 또는 환자와 동일한 상태까지 병변을 발생시킨 직후부터 30분 마다 수회 투여한 후, 그 다음 1시간 마다 수회 투여하고, 그때마다 증상의 변화를 관찰, 평가하는 방법이 많이 이용된다. 투여 회수에 대해서는 항암제의 성질에 따라 다르고, 1회 이상 수회가 될 수도 있다.

[0091] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계를 포함하는 폐암 동물모델을 이용하여 항암제를 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0092] 1) 상기 폐암 동물모델 제조방법을 통해 제조된 폐암 동물모델에 항암제 후보 물질을 투여하는 단계; 및

[0093] 2) 상기 1) 단계의 폐암 동물모델에서 폐암 세포의 성장 또는 전이를 측정하여 항암제 후보물질의 치료 효능을 결정하는 단계.

[0094] 상기 1) 단계는 폐암이 유발된 동물에 항암제 후보물질을 투여하는 단계이다. 상기 폐암 동물모델은 앞서 설명한 폐암 동물모델 제조방법으로 제조된 것일 수 있다.

[0095] 폐암이 유발된 동물의 정맥에 항암제를 투여할 수 있고, 일예로 상기 폐암이 유발된 동물이 마우스인 경우 꼬리 정맥에 항암제를 투여할 수 있으나, 특별히 이에 한정되지 않는다.

[0096] 상기 "항암제 후보물질"이란 폐암 동물모델에서 폐암 세포의 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 구입가능하다. 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.

[0097] 상기 2) 단계는 항암제 후보물질의 항암 효과를 확인하는 단계이다. 폐암 관련 유전자의 발현 정도 또는 미세혈관 밀도를 측정하여 항암제의 치료 효능을 분석할 수 있고, 폐암 세포의 성장 또는 전이를 육안으로 관찰하여 치료 효능을 분석할 수 있다. 이때, 폐암 세포로의 성장을 관찰하기 위하여 캘리퍼스와 같은 도구를 이용하여 측정할 수 있다. 상기 관련 유전자는 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0098] 구체적으로 상기 폐암 동물모델에서 폐암 세포의 추가적인 성장이 억제되었거나, 전이가 억제된 경우에는, 사용한 항암제 후보물질에 대해 항암 효과가 있다고 확인할 수 있다. 상기 폐암 세포의 성장을 측정할 경우, 항암제 후보물질의 치료 효능을 수치화하여 정량적으로 파악할 수 있다. 통상 항암제 후보물질의 투여 종료 후에 폐암 세포의 크기를 측정하고, 그것을 항암제 후보물질 비투여군 또는 항암제 후보물질 투여 전의 폐암 세포의 크기와 비교하는 방법을 이용하여 항암제 후보물질의 치료 효과를 정량화 할 수 있다. 또한, 본 발명에 의하면 상기와 같이 폐암 세포의 크기를 계측하는 것 이외에도, ① 항암제 후보물질의 투여 회수를 일정하게 하여 치료까지의 시간을 측정한다, ② 치유될 때까지 항암제 후보물질을 일정 간격으로 투여한 회수를 구하는 등과 같은 방법에 의해서도 항암제 효과의 강도를 평가할 수 있다.

[0099] 항암제를 임상 수준에서 실시하기 위하여, 우선 동물모델에서 상기 항암제 후보물질의 효능과 안정성이 확인되어야 하는데, 본 발명은 이러한 동물모델-기초 시험을 환자별로 가능하게 한다. 본 발명에 따른 상기 폐암 동물모델은 폐암 환자로부터 분리한 폐암 세포의 이종이식을 통해 제조된 것으로서, 환자에 따라 적절히 가장 적절한 항암제를 스크리닝할 수 있다.

[0100] 평가 대상이 되는 항암제 후보물질은 폐암 동물모델에 국소적으로 투여될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 즉 어떠한 투여 경로의 항암제 후보물질도 선별할 수 있다. 비경구적 및 경구적으로 투여되는 항암제 후보물질도 선별할 수 있다. 항암제 후보물질의 투여량은 약제의 성질, 투여 대상의 종류, 연령이나 체중 등의 조건을 기초로 종합적으로 판단하여, 최적의 양을 적절하게 결정해야 하며 특별히 한정되지 않는다.

[0101] 투여 시기나 투여 회수 등의 투여 조건은 항암제 후보물질의 성질, 시험 및 평가 목적 등에 따라 적절하게 최적이 되도록 설정하면 되며 특별히 제한되지 않는다. 예컨대, 투여 시기에 대해서는 폐암 동물모델을 제작한 직후 또는 환자와 동일한 상태까지 병변을 발생시킨 직후부터 30분 마다 수회 투여한 후, 그 다음 1시간 마다 수회 투여하고, 그때마다 증상의 변화를 관찰, 평가하는 방법이 많이 이용된다. 투여 회수에 대해서는 항암제의 성질에 따라 다르고, 1회 이상 수회가 될 수도 있다.

[0102] 이러한 과정을 통해 유전적 원인 등을 반영하여 환자 개인에 적합한 항암제를 선별하여 치료할 수 있다.

[0103] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0104] **실시예**

[0105] **<실시예 1: 토끼 폐암 동물모델의 제조>**

[0106] 토끼의 VX2 종양 조직을 추출하였으며, 이를 잘게 분쇄하였다. 이를 분쇄액을 통해 거른 후, 원심분리기를 통해 원심분리하여 토끼의 종양세포를 수득하였다. 그리고 상기 토끼로부터 수득한 종양세포 0.1 ㎖, 리피오돌 0.15 ㎖ 및 메트리젤 0.25 ㎖를 혼합한 용액을 토끼의 폐에 26 게이지의 바늘을 가진 주사기를 이용하여 주사하였다. 이때 실시간 CT 촬영 장치(본 실시예에 사용된 CT는 CT Fluoroscopy 기능이 있는 CT로서, Real time tracking이 가능함)에서 촬영하는 영상의 임의의 단면과 일치하는 방향으로 레이져를 조사하였으며, 이렇게 조사되는 레이져에 토끼의 폐를 레이져와 일직선이 되게 고정하였다. 그리고 레이져의 조사 방향과 일치하게 주사 바늘을 고정시킨 상태에서 토끼의 폐에 상기 폐암 종양 조직 혼합액을 주사하였다. 한편, 주사 과정에서 실시간 CT 촬영 장치를 통해 실시간으로 전송되는 화면을 통해 레이저와 주사 바늘이 폐에 수직인 방향으로 일치되는 것을 확인하면서 정교하게 주사하였다. 하기 도 1은 본 참고예의 전체적인 과정을 나타내는 개략도이며, 하기 도 2는 본 참고예의 방법을 이용하여 토끼 VX2 종양 세포를 토끼의 폐에 이식한 결과를 나타내는 사진이다.

[0107] **<실시예 2: 마우스 폐암 동물모델의 제조>**

[0108] 고려대학교 구로병원에 입원 중인 폐암 환자로부터 폐암 조직을 추출하였다. 그리고 이를 종양 세포가 파괴되지 않을 정도로 잘게 분쇄하였다. 이렇게 분쇄된 종양 세포를 100㎛의 cell strainer로 필터링 하여 걸러내었으며, 2500 rpm(바람직하게는 100-5000 rpm) 속도로 3분(바람직하게는 1-10 분) 동안 원심분리기를 이용하여 최종적으로 폐암 종양세포를 획득하였다. 이렇게 획득한 폐암 종양 세포용액(폐암 세포 수득물 0.1 ㎖)을 리피오돌(Lipiodol, 0.1 ㎖) 및 메트리젤(Metri-gel, 0.2 ㎖)과 혼합하여 폐암 종양 조직 혼합액을 제조하였다.

[0109] 이렇게 제조된 폐암 종양 조직 혼합액을 26 게이지의 바늘을 가진 주사기를 이용하여 쥐의 폐에 주사하였다. 이때 실시간 CT 촬영 장치(본 실시예에 사용된 CT는 CT Fluoroscopy 기능이 있는 CT로서, Real time tracking이 가능함)에서 촬영하는 영상의 임의의 단면과 일치하는 방향으로 레이져를 조사하였으며, 이렇게 조사되는 레이져에 쥐의 폐를 레이져와 일직선이 되게 고정하였다. 그리고 레이져의 조사 방향과 일치하게 주사 바늘을 고정시킨 상태에서 쥐의 폐에 상기 폐암 종양 조직 혼합액을 주사하였다. 한편, 주사 과정에서 실시간 CT 촬영 장치를 통해 실시간으로 전송되는 화면을 통해 레이저와 주사 바늘이 폐에 수직인 방향으로 일치되는 것을 확인하면서 정교하게 주사하였다. 이렇게 주사를 완료하여 최종 폐암 동물모델을 제조하였다(하기 도 3은 상기 과정의 전체적인 개략도임).

[0110] 이렇게 제조된 폐암 동물모델은 2 주가 경과한 후에 항암제 후보 물질을 투여하여 각 환자별 맞춤형 항암제를 스크리닝하였다.

[0111] **<실시예 3>: 마우스 폐암 동물모델의 제조>**

[0112] 루이스 폐암(Lewis Lung Cancer ; LLC) 세포 5×10^{6} cells/㎖(종양 세포 용액 0.035 ㎖)를 리피오돌(Lipiodol, 0.005 ㎖) 및 메트리젤(Metri-gel, 0.01 ㎖)과 혼합하여 폐암 종양 조직 혼합액(total 0.05 ㎖)을 제조하였다.

[0113] 일반적인 0.5 cc 주사기를 사용할 경우 소형 폐암 동물모델의 폐에 주입하는 과정에 있어서 정량 주입 및 시야 확보 면에서 어려움이 있으므로, 이를 개선하기 위하여 개량 주사기를 사용하였다.

[0114] 상기 개량 주사기는 0.5 cc 주사기의 주입구와 29 게이지 바늘 사이에, 0.25 ㎜의 I.D와 0.61 ㎜의 O.D를 갖는 폴리에틸렌 재질의 제1 채널(튜브)이 연결되어 있는 것으로, 이렇게 제조된 폐암 종양 조직 혼합액을 상기 개량 주사기를 이용하여 쥐의 폐에 주사하였다(하기 도 5는 개량 주사기의 전체적인 개략도임).

[0115] 이때 실시간 CT 촬영 장치(본 실시예에 사용된 CT는 CT Fluoroscopy 기능이 있는 CT로서, Real time tracking이 가능함)에서 촬영하는 영상의 임의의 단면과 일치하는 방향으로 레이져를 조사하였으며, 이렇게 조사되는 레이져에 쥐의 폐를 레이져와 일직선이 되게 고정하였다. 그리고 개량 주사기의 바늘을 마이크로 핀셋(micro-forcep)을 이용하여 레이져의 조사 방향과 일치하도록 개량 주사기의 바늘을 정확하게 고정시킨 상태에서 쥐의 폐에 상기 폐암 종양 조직 혼합액을 주사하였다. 한편, 주사 과정에서 실시간 CT 촬영 장치를 통해 실시간으로 전송되는 화면을 통해 레이저와 주사 바늘이 폐에 수직인 방향으로 일치되는 것을 확인하면서 정교하고 정확하게 주사하였다. 이렇게 주사를 완료하여 최종 폐암 동물모델을 제조하였다(하기 도 6은 상기 과정의 전체적인 개략도임).

[0116] 이렇게 제조된 폐암 동물모델은 2 주가 경과한 후, 폐암 병변이 발생하였는지를, 정상군(폐암 종양 조직 혼합액을 투여하기 전의 정상 동물모델에서의 폐조직)과 비교하였다.

[0117] **비교예**

[0118] 상기 실시예의 폐암 환자에게서 추출한 폐암 조직을 Cell 라인 배양을 통한 일반적인 방법으로 항암제를 스크리닝하였다.

[0119] **실험예**

[0120] **<폐암 동물모델의 항암제 감수성 평가>**

[0121] 상기 실시예 2에 따른 폐암 동물모델을 가지고 각 항암제의 감수성을 평가하는 검사를 실시하였다. 즉, 동일한 환자에게서 수득한 폐암 종양 조직을 가지고 실시예 2에 따라 10 개의 폐암 동물모델을 제조한 후, 각 폐암 동물모델에 각 항암제를 투여하고 이에 대한 감수성을 측정하는 방식으로 진행하였으며, 이의 결과는 하기 표 1 및 도 4에 나타내었다. 하기 도 4에서는 막대 그래프가 높아질수록 사용된 약제의 암조직에 대한 감수성이 높음을 의미한다. 하기 표 1 및 도 4에서 확인할 수 있는 바와 마찬가지로 8 번 항암제를 처리한 폐암 동물모델이 가장 감수성이 높은 결과를 보임을 확인할 수 있으며, 기타 1 번 또는 4 번 항암제의 경우에도 높은 감수성을 보임을 확인할 수 있었다. 한편, 하기 표 1에서 TAX는 Taxol, CBP는 Carboplatin, CDDP는 Cisplatin, GEM은 Gemcitabine의 약어이다.

표 1

[0122]

No.	Drugs	Inhibition Rate
1	TAX/CBP	80%
2	TAX/CBP	73%
3	TAX/CBP	77%
4	TAX/CBP	80%
5	GEM/CDDP	61%
6	GEM/CDDP	55%
7	GEM/CDDP	57%
8	GEM/CDDP	86%

[0123] **<실험예 3으로부터 제조된 폐암 동물모델의 폐암 병변 확인>**

[0124] 상기 실시예 3에 따라 제조된 폐암 동물모델로부터 폐암 병변 발생 유무를 확인하고자 실시예 3을 실시하기 전의 정상 동물모델에서의 폐조직과 실시예 3에 따라 제조된 폐암 동물모델의 폐 조직을 비교하였으며, 이의 결과

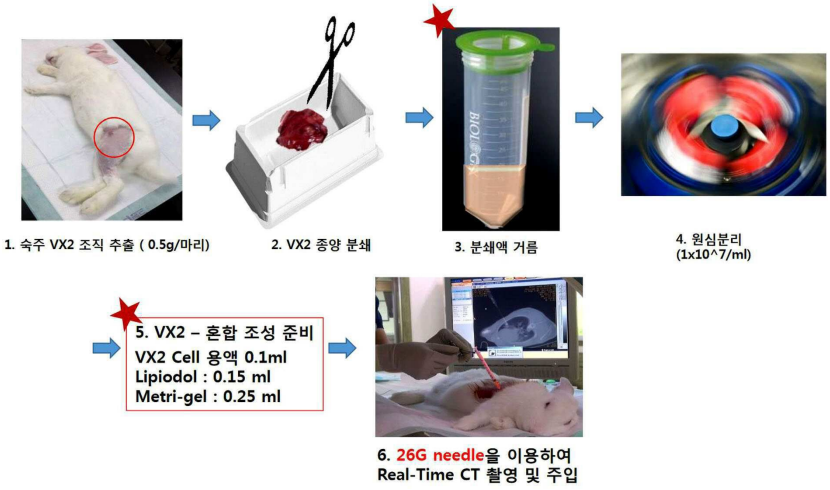
는 하기 도 7에 나타내었다.

[0125] 하기 도 7에 나타난 바와 같이 루이스 폐암 세포를 소형 동물모델인 쥐에 주입한 결과, 정상 동물모델에서의 폐 조직과 달리 폐암 병변이 발생한 것을 확인할 수 있었다(우측 사진 노란 화살표 참조). 즉 본 발명에 따라 제조할 경우, 소형 동물의 경우에도 비침습적인 과정을 통해, 투여된 폐암 조직으로 발병한 폐암 병변을 갖는 폐암 동물모델을 확립할 수 있음을 확인하였다.

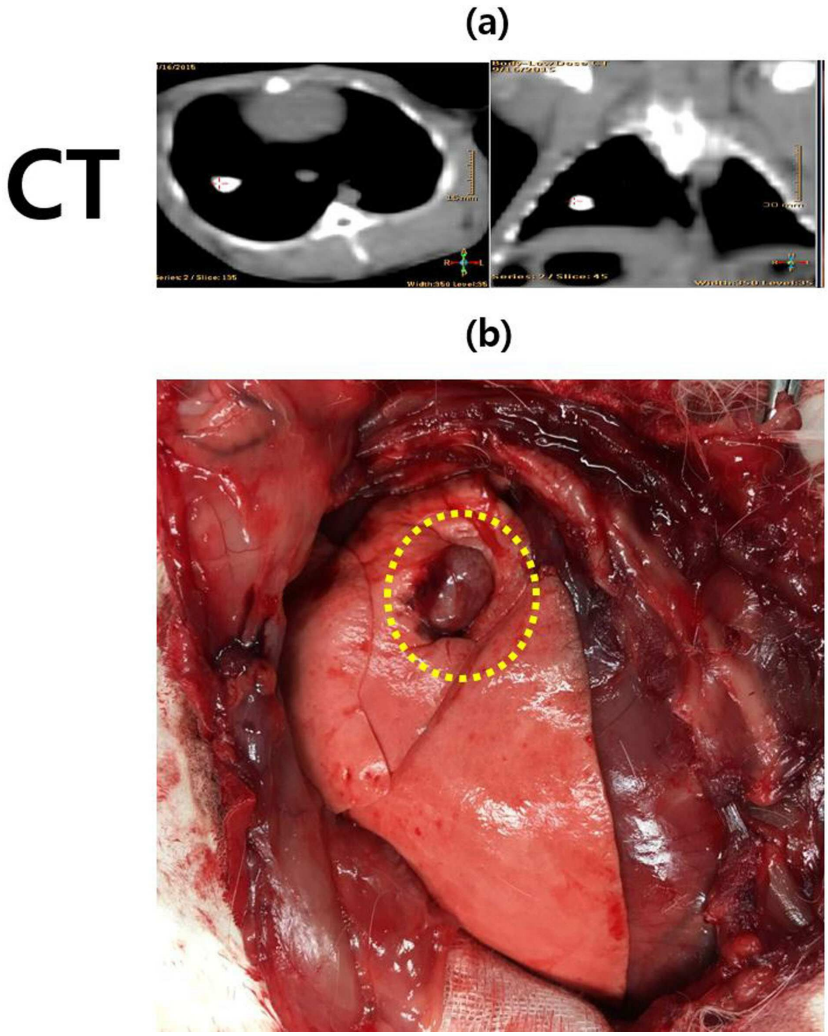
[0126] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

도면

도면1



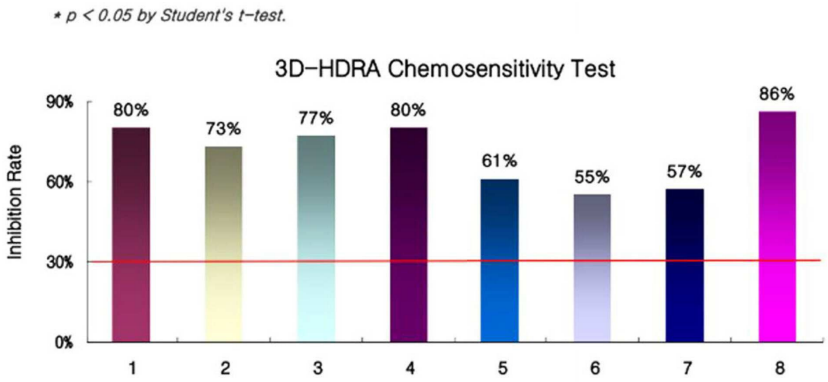
도면2


(a)
CT
(b)

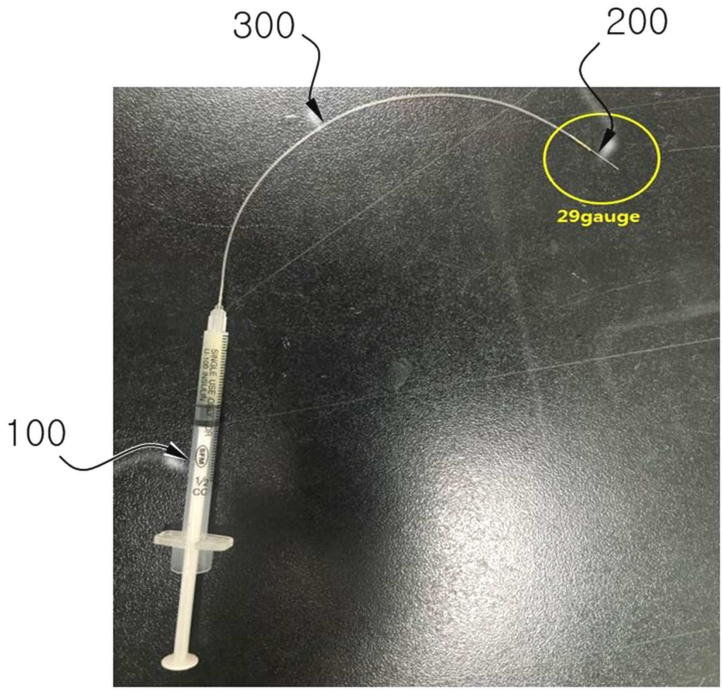
도면3


1. 암환자 조직 추출
2. 2~3mm 절제
3. 분쇄액 거름
4. 종양 세포 획득
5. 폐암 종양 조직 혼합액 준비
종양 Cell 용액 0.1ml
Lipiodol : 0.1 ml
Metri-gel : 0.2 ml
환자와 동일한 조직 종양 조건에서
다양한 항암제 감수성 검사 가능

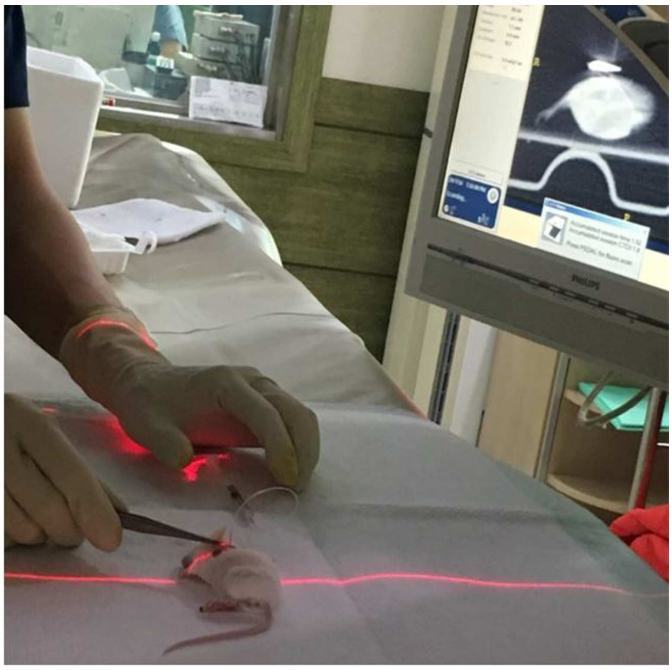
도면4


* p < 0.05 by Student's t-test.
3D-HDRA Chemosensitivity Test
Inhibition Rate
90%
60%
30%
0%
80%
73%
77%
80%
61%
55%
57%
86%
1
2
3
4
5
6
7
8

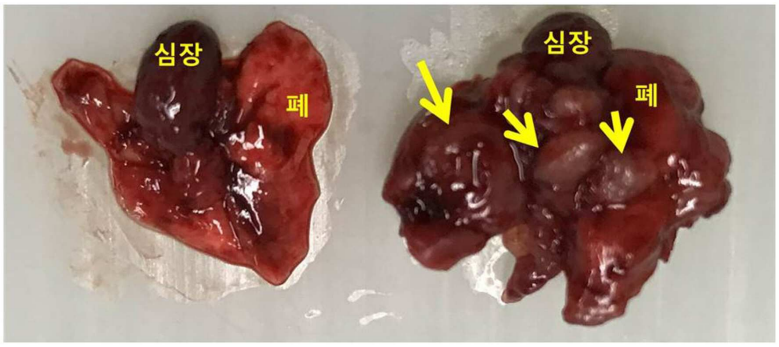
도면5


300
200
29gauge
100

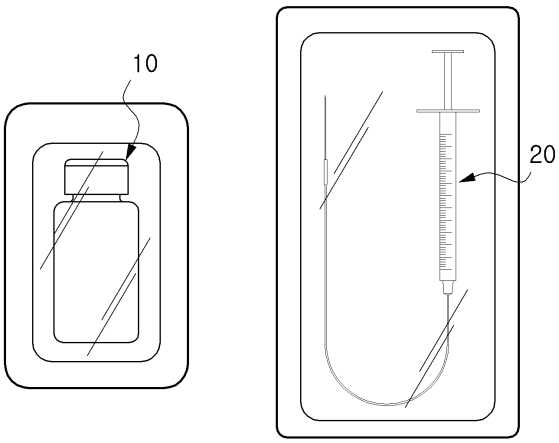
도면6



도면7



도면8



도면9

