

명세서

발명의 명칭: 환자 맞춤형 교모세포종 동물 모델의 제조방법 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 (a) 환자로부터 분리된 교모세포종 조직을 4 이상의 구획으로 나누고, 각 구획에서 하나 이상의 조각을 수집하는 단계; (b) 상기 수집된 각 조각들의 혼합물을 단일 세포(single cell) 단위로 교모세포종 세포를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 분리된 교모세포종 세포를 함유하는 이식용 시료를 면역 결핍된 마우스의 뇌에 정위적으로 이식하는 단계를 포함하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법; 상기 방법으로 제조된 교모세포종 마우스 모델; 상기 마우스 모델을 이용하여 환자 맞춤형 교모세포종 치료제를 스크리닝하는 방법; 및 상기 마우스 모델을 이용한 환자 맞춤형 교모세포종 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 신경교종(glioma)은 원발성 뇌종양(primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서, 발생빈도가 높고 치료가 어려워서, 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 악성 종양이다. 그중에서도 가장 악성으로 분류되고 있는 교모세포종(glioblastoma, GBM)의 경우, 다른 암과 비교하였을 때 방사선 및 항암제 치료에 대한 저항성이 매우 높아 일단 진단되면 기대 생존기간이 단 1년에 불과하다. 또한 이와 같은 뇌종양의 경우, 뇌혈관 장벽이 있어 치료를 위한 약물의 전달이 쉽지 않다. 특히 상대적으로 뇌신경 생물학에 대한 이해가 부족하여 그에 대한 치료제 개발이 더디게 진행되고 있다. 더욱이, 교모세포종은 다른 뇌종양과 비교해볼 때 공격적 변이(aggressive variant)를 나타내어, 이를 빠른 시일 내에 치료하지 않으면 몇 주 이내에 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 따라서 교모세포종의 치료에는 외과적 처치 이외에 방사선 치료 및 화학약물 치료가 함께 수행되고 있다. 그러나, 이러한 화학약물 치료는 내성 변이주의 발생, 종양줄기세포에 의한 재발 등의 원인으로 인하여 한계에 다다른 상황이므로, 새로운 치료법을 개발하여야 할 필요성이 요구되고 있는 실정이다.
- [4] 최근 시스템 생물학(systems biology) 및 생물정보학 기법(bioinformatics tools)의 비약적 발전에 따라 교모세포종의 발생과 병증의 진행과 관련된 것으로 여겨지는 의미 있는 유전적 결함 및 유전자 발현 패턴들이 보고되고 있다. 그러나, 임상성과를 대표할 수 있는 분자 마커(molecular marker)들의 발굴 성과는 전무한 실정이다. 특히, 유전자 발현 분석이 전사체(transcriptome) 수준에 머물러 있어 실제 암 조직에서의 단백질 발현 정도를 대변하지 못하는 한계가 있다. 이러한 문제점을 해결하는 방안으로서, 교모세포종을 가장 적절하게

모방하는 동물 모델을 사용하는 방법이 모색되고 있다. 이러한 동물모델은 교모세포종의 진전 양상을 연구하는데 활용될 수 있다. 또한, 교모세포종에 대한 새로운 치료 전략의 탐색 및 기존 치료 전략의 적절한 결합에 따른 연구에 활용될 수 있으며, 교모세포종의 치료에 효과를 나타내는 새로운 항종양 물질의 효능 검색에 사용될 수 있을 것으로 예상되고 있다.

- [5] 이에 따라, 누드 마우스와 같이 세포성 면역 기능이 결핍된 모델 동물을 사용하거나, 교모세포종이 유발된 동물모델을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 관련하여, 인간 유래 교모세포종을 이식하여 동물모델을 제조한 예가 있다 (Diao Yi, et al., Cancer Investigation, 29:229-239, 2011, EGFR Gene Overexpression Retained in an Invasive Xenograft Model by Solid Orthotopic Transplantation of Human Glioblastoma Multiforme Into Nude Mice). 상기 논문에서는 환자 유래 교모세포종의 특정 부위(한 부위)의 조각만을 사용하여 제조한 이식용 시료를 이용하여 마우스 모델을 제조하였는바, 실제로 모체 암과 동일한 형태학적, 유전학적, 병리학적 특성을 나타내는 마우스 모델을 제조하는데는 어려움이 있었다. 또한, 종래에는 마우스에 이식하는 이식용 시료를 제조할 때, 환자로부터 수득한 조직에 대한 효소적 분해 수행시 단백질 가수분해효소를 사용하였으나, 이 경우 점성으로 인하여 세포를 단일 세포 단위로 분리하는데 어려움이 있었다. 그리고, 환자로부터 수득한 이식용 시료로부터 적혈구를 제거하기 위하여 통상적으로는 피콜 농도구배 원심분리 방법 ((Ficoll Gradient)이 사용되었으나, 이 경우 혈액 제거 효율이 낮다는 문제점이 있었다.
- [6] 교모세포종이 발병된 환자를 치료하기 위하여는, 환자의 유전적, 생리적 및 환경적 특성을 고려하여야 할뿐만 아니라, 교모세포종의 진행수준에 맞추어, 화학적 요법, 방사선 요법, 외과적 요법, 면역세포치료법 등의 다양한 치료방법을 적용하여야 한다. 그러나, 상술한 동물모델은 이러한 환자의 개인적인 특성을 반영하는 것이 불가능하기 때문에, 상기 동물모델은 치료방법 또는 치료제의 개발에 활용되는 것에 불과하여, 실제 환자 맞춤형 치료에 사용될 수 있는 폭이 적었다. 만일, 환자 각각의 유전학적 및 생리학적 환경조건을 최대한 모사할 수 있는 동물모델을 개발할 수 있다면, 각 환자에 대한 맞춤형 치료를 수행하여 치료 성공율을 대폭 향상시킬 수 있을 것으로 예상되고 있다.
- [7] 이러한 배경 하에 본 발명자들은, 교모세포종 환자의 유전적, 형태학적 및 병리학적 특성을 동일하게 나타내는 교모세포종 마우스 모델을 확립하고자 예의 노력한 결과, 교모세포종 환자로부터 분리된 교모세포종 조직의 여러 부위에서 수집한 교모세포종 조직 조각의 혼합물로부터 제조된 이식용 시료를 마우스 뇌에 정위적으로 이식하는 경우, 모체 암의 유전적, 형태학적 및 병리학적 특성을 동일하게 나타내는 교모세포종 마우스 모델을 확립할 수 있음을 확인하였다. 또한, 이러한 마우스 모델을 확립하기 위한 최적 조건을 개발하여, 본 발명을 완성하였다.

[8]

[9] 발명의 요약

[10]

본 발명은 (a) 환자로부터 분리된 교모세포종 조직을 4 이상의 구획으로 나누고, 각 구획에서 하나 이상의 조각을 수집하는 단계; (b) 상기 수집된 각 조각들의 혼합물을 단일 세포(single cell) 단위로 교모세포종 세포를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 분리된 교모세포종 세포를 함유하는 이식용 시료를 면역 결핍된 마우스의 뇌에 정위적으로 이식하는 단계를 포함하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 교모세포종 마우스 모델, 상기 마우스 모델을 이용하여 교모세포종 치료제를 스크리닝하는 방법, 및 상기 마우스 모델을 이용한 환자 맞춤형 교모세포종 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 교모세포종 마우스 모델은 모체 암의 유전적, 형태학적 및 병리학적 특성을 동일하게 나타내는 바, 안전하고 효과적으로 환자 맞춤형 교모세포종 치료제의 발굴 또는 치료방법의 선택이 가능하여 유용하다.

[11]

도면의 간단한 설명

[12]

도 1은 교모세포종 환자의 임상결과 및 초대 배양된 교모세포종 세포의 실험결과를 나타내는 것이다.

[13]

도 2는 교모세포종의 수술 샘플로부터 유래한, 초대배양 및 정위적 이종이식 동물 모델을 나타내는 도이다. (A) 엄격히 분리된 교모세포종 세포의 NEB 조건에서의 배양, 또는 면역 결핍된 마우스의 뇌에 정위적으로 이식하였으며, PCNA에 대한 면역조직화학 실험 결과를 정위적 이종이식 종양에 대해 나타낸 것이다. 화살표는 PCNA 염색을 통해 표시된, 이식된 암부분을 나타낸 것이다. (B) Fisher의 정확 검정법($p=0.09$)으로 분석한 엄격히 분리된 교모세포종 세포의 *in vitro* 구형 세포 형성 능력(sphere formation)과 *in vivo* 암화 능력(tumorigenicity) 간의 상관관계를 나타낸 그래프이다. (C) *in vivo* 암화 능력을 가지는 교모세포종($n=40$)의 PFS(progressive-free survival) 및 OS(overall survival)를 암화 가능성이 없는 교모세포종의 경우($n=16$)와 Kaplan-Meier 생존 분석법(Kaplan-Meier plots) 및 로그순위 검색법(log rank test)을 이용하여 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

[14]

도 3은 모체 교모세포종(parental GBMs) 및 이의 정위적 이종이식 종양의 형태학적 및 병리학적 특징을 비교한 결과를 나타낸 도로서, 모체 암과 그로부터 만들어진 정위적 이종이식 암의 침윤성(A), 증식 지표(B) 및 미세혈관 강도(C)를 분석하고 비교한 결과를 나타낸 것이다. (A) 모체 암 및 이종이식 암의 침윤성은 MRI 및 병리학적 섹션 각각에서 주요 조직(main mass)의 직경과 전이된 거리를 비교하여 결정하였다. (B) 증식 지표의 경우, Ki-67(모체 암) 또는 PCNA(정위적 이종이식 종양)에 대하여 면역화학 분석하였고, 그 다음 무작위적으로 선택한

100개의 세포 중 양성 세포의 수를 측정하여 계산하였다. 상기 표는 3회 반복 실험의 평균값을 나타내고, 그 평균값은 통계학적 분석에 이용하였다. (C) 미세현관 밀도는 CD31에 대한 면역화학분석법에 의해 분석하였다. 세 개의 현미경 관찰 부위를 200배 해상도로, 무작위적으로 선택하였고, CD31 양성 미세현관의 수를 산출하였다. 세 개의 값의 평균은 통계학적 분석에 이용하였다.

- [15] 도 4는 MRI로 확인한 모체 암의 침윤 정도 및 이에 대응되는 정위적 이종이식된 종양의 침윤도를 나타내는 도이다. 모체 종양의 침윤 정도는 RANO(response assessment in neuro-oncology) 기준에 따라 MRI T2/FLAIR 이미지를 사용하여 분석하였다. 환자 종양의 침윤도는 하기와 같은 기준으로 정의하였다. 0 = "비 침윤(no invasion)", 1(mild) = "침윤 거리(distance of invasion) $< 2 \times$ 종양 덩어리의 직경(diameter of tumor mass)," 2(moderate) = " $2 \times$ 종양 덩어리의 직경(diameter of tumor mass) $<$ 침윤 거리(distance of invasion) $< 3 \times$ 종양 덩어리의 직경(diameter of tumor mass)," 및 3(severe) = " $3 \times$ 종양 덩어리의 직경(diameter of tumor mass) $<$ 침윤 거리(distance of invasion)." 정위적 이종이식 종양의 침윤도는 파라핀 섹션에서 Y="침투 거리(distance of infiltration) $> 2 \times$ 주요 덩어리의 직경(diameter of main mass)"로서 정의하였다. 전이 정도에 따른 대표적인 MRI 및 조직학 결과를 나타내기 위하여, 1(mild), 2(moderate) 또는 3(severe) 침투에 대한 3개의 모체 종양의 MRI 스캔 이미지 및 이에 대응되는 정위적 이종이식 종양의 조직학을 나타내었다.

- [16] 도 5는 모체 종양 및 정위적 이종이식 종양의 분자적 특징을 나타내는 도이다. 짧은 연쇄반복 염기서열(short tandem repeat, STR)(A), 유전체 복사 수 다양성(genomic copy number variation)(B), TP53과 IDH1의 유전적 돌연변이(C) 및 모체 교모세포종의 유전자 발현 패턴(D 및 E)을, 모체암 및 이로부터 유래된 정위적 이종이식 종양과 서로 비교한 것이다. (B) 유전체 복사 수 다양성은 비교 유전체 혼성화 어레이(array-comparative genomic hybridization, aCGH, 왼쪽)으로 분석하였고, 오른쪽에 교모세포종에서 빈번히 변형되는 것으로 보고된 유전자의 유전체 복사 수 다양성을 요약해두었다(Amplified: 회색 컬럼, Deleted: 회색 컬럼). (C) 특이적 돌연변이는 볼드체로 표시하였고, Wt는 원래의 형태를 나타낸 것이다. (D) 58개의 교모세포종 표본의 아형을 근접 모형 예측(Nearest Template Prediction)법을 이용하여 결정한 결과를 나타낸 것이다. (E) 모체 교모세포종 및 이에 대응되는 정위적 이종이식 종양 간의 유전자 산물 발현을 면역조직화학염색법적으로 비교한 결과를 나타내는 것이다.

- [17] 도 6은 모체 암 및 이에 대응되는 정위적 이종이식 암의 치료 반응성에 대한 기능적 비교를 수행한 실험 결과를 나타낸 도이다.

- [18] (A) PC-NS07-448, PC-NS07-464, PC-NS08-578, PC-NS09-780 또는 827로부터 유래된 정위적 이종이식 암은 대조군을 위해 각각 8개, 15개, 9개, 9개 및 4개; 방사선 조사군을 위해 9개, 9개, 10개, 9개 및 4개씩 분배하였다. 그 다음, 방사선 조사군에 대하여 매일 2Gy씩 총 5일간 조사하는, 50%의 생존율을 통과하는 전제

뇌 방사선 조사 치료법을 수행하였다. 전체 생존율(OS)을 계산하면 전체 뇌의 방사선 조사에 의해 생존율이 증가하는 결과를 나타내었다(*, $P < 0.05$, 왼쪽). 정위적 이종이식 암의 생존율 증가는 모체 암의 PFS(오른쪽)와 연관되어 있는 결과를 나타내었다. 오차 막대는 표준편차이다.

- [19] (B) *MGMT* 프로모터의 메틸화 상태는 메틸화 특이적 PCR(왼쪽, M; 메틸화-특이적 프라이머 또는 gDNA의 메틸화된 대조군, UM; 메틸화-특이적 프라이머 또는 메틸화되지 않은 대조군 gDNA)을 수행한 결과로 표시하였다. PC-NS07-464 또는 PC-NS09-559로부터 유래된 정위적 이종이식 암(C; 대조군 각각 9개와 10개의 표본, TMZ; 각각 7개, 9개의 표본)에 TMZ를 처리하였다(매일 65mg/kg, 경구투여). 전체 생존율을 산출하였고, TMZ 화학 치료에 의하여 생존율이 증가하였다. *, $P < 0.05$. (C) PC-NS07-448, PC-NS07-464, PC-NS09-559 또는 PC-NS09-748로부터 유래된 정위적 이종이식 암을, 대조군에 대하여 각각 8, 8, 7, 7개, 베바시주맙치료군에 대하여 각각 9, 11, 7 및 6개로 나누었고, 베바시주맙 치료 군의 경우, 10mg/kg의 양으로 일주일에 두 번 복강 내 주입하였다. 베바시주맙 처리에 의한 이종이식 암의 형태학적인 변화는 H&E 염색과 인간 핵에 대한 면역조직화학분석법으로 분석하였다(아래, PC-NS07-464).
- [20] 도 7은 이종이식 종양에 대한 *in vivo* 전체 뇌 방사선 조사 및 RR(radiation-response) 특징을 나타낸 도이다. (A) PC-NS07-448, PC-NS07-464, PC-NS08-578, PC-NS09-780, 또는 827 유래의 이종이식 종양[대조군의 경우, $n = 8, 15, 9, 9$, 및 4; 방사선 조사 군의 경우, $n = 9, 9, 10, 9$ 및 4]에 대하여 전체 뇌 방사선 조사 치료를 수행하였다(매일 2Gy로 5일간). 방사선 조사가 생존율 기간에 미치는 영향에 대해서는 Kaplan-Meier 플롯 및 log-rank 테스트로 분석하였다. (B) RR 특징은 *in vivo* 방사선 치료를 받은 PC-NS07-448 및 PC-NS07-464 이종이식 종양의 mRNA발현 분석으로 정의하였다(왼쪽). RR 특징에 기초하여, REMBRANDT 데이터 세트의 고 위험 신경교종을 448-유사 그룹 및 464 유사 그룹으로 계통적으로 클러스터하였으며, 448-유사 그룹 및 464-유사 그룹의 고 위험 신경교종 및 교모세포종의 OS는 Kaplan-Meier 플롯 및 log-rank 테스트로 분석하였다.
- [21] 도 8은 암화 특징, 암화 관련 경로, 및 독립적인 데이터 세트에서 임상적 결과와의 연관성을 나타내는 도이다. (A) 10개의 비종양성 교모세포종 및 36개의 종양성 교모세포종 간에 1.5배 이상의 발현의 차이를 보이는 709개 유전자를 행-정규화(row-normalization)한 다음, 히트맵(이차원 그래프)으로 나타내었다. 붉은색은 높은 발현을, 푸른색은 낮은 발현을 각각 나타낸다. 20개의 높게 발현된 유전자를 가지는 그룹은 옆에 명시하였다. (B) Kaplan-Meier 생존률 분석은 REMBRANDT 데이터 세트에서 환자 두 그룹의 누적된 OS를, 암화 특징과 연관하여 암화 또는 비 암화 그룹과 비교하였다. (C) Kaplan-Meier 생존률 분석은 REMBRANDT 데이터 세트에서 환자 두 그룹의 누적된 OS를, PITX2를

상향- 또는 하향-조절하는 각 그룹과 비교하였다. (D) 위험도 비(자연로그 스케일) 및 이의 95% 신뢰 구간을 나타내는 forest plot으로서, 각 위험도 비는 주어진 경로의 산출된 활성 및 REMBRANDT 데이터 세트의 환자의 OS 간의 연관성을 나타낸다. 상위 5개 및 하위 5개는 각각 BIOCARTE에서 대부분 상향조절 및 하향조절된 경로를 나타내며, 각 그룹은 암화 특성과 양성적으로 관련되어 있다.

[22] 도 9는 전 돌연변이(permutation) 분석 및 암화 연관된 경로 및 독립적 데이터 세트의 임상적 결과 간의 관계를 나타내는 도이다.

[23] (A) 500 전 돌연변이 분석으로부터 P 값의 분포를 나타내는 것이다. 각 분석에서 '대조군' 표시는 생성되었고, 각 대조군의 REMBRANDT의 환자 생존을 예측 정도는 로그-랭크 테스트 P 값으로 정량화하였다. 500 로그-랭크 테스트 P 값의 두 가지(채워진 막대)는 원래 특징의 P 값(0.000046)보다 작았으며, 이는 전 돌연변이 분석 P 값을 0.004(= 2/500)로 만들었다.

[24] (B) KEGG-표시된 경로의 Forest 플롯을 나타낸 도이다.

[25] (C) REACTOME-표시된 경로의 Forest 플롯을 나타낸 도이다.

[26] 도 10은 독립적 데이터 세트에서, 전이도 특성 및 이의 임상적 결과와의 관련성을 나타낸 도이다. (A) 마우스 뇌에서 비침윤성인 9개의 교모세포종 및 침윤성인 27개의 교모세포종 간에 서로 다른 발현 양상을 나타내는(1.5배 이상의 변화) 777개의 유전자를 행-정규화한 다음, 히트맵으로 나타낸 도이다. 각 그룹에서 20개의 가장 높은 발현 차이를 나타내는 유전자에 대해서는 플롯 옆에 표시하였다. (B) Kaplan-Meier 플롯으로서, REMBRANDT 데이터 세트의 두 그룹의 환자의 누적된 OS와, 전이성 특성과 양성 또는 음성적으로 관련된 각 그룹과 비교한 결과를 나타낸 것이다.

[27]

[28] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현에

[29] 본 발명의 하나의 목적은 모체 암의 유전적, 형태학적 및 병리학적 특성을 동일하게 나타내는 교모세포종 마우스 모델 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

[30] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따라 제조된 마우스 모델을 이용하여 환자 맞춤형 교모세포종 치료제를 제공하는 것이다.

[31] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따라 제조된 마우스 모델을 이용하여 환자 맞춤형 교모세포종 치료방법의 선택을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[32] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 환자로부터 분리된 교모세포종 조직을 4 이상의 구획으로 나누고, 각 구획에서 하나 이상의 조각을 수집하는 단계; (b) 상기 수집된 각 조각들의 혼합물을 단일 세포(single cell) 단위로 교모세포종 세포를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 분리된 교모세포종 세포를 함유하는 이식용 시료를 면역 결핍된 마우스의 뇌에 정위적으로 이식하는 단계를 포함하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법을 제공한다.

- [33] 본 발명은 또한, 상기 교모세포종 마우스 모델 또는 이로부터 유래된 교모세포종 세포에 치료 후보 물질을 처리하는 단계를 포함하는, 교모세포종 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [34] 본 발명은 또한, (a) 상기 교모세포종 마우스 모델에 교모세포종 후보 치료방법을 수행하는 단계; 및 (b) 상기 후보 치료방법이 수행된 동물모델을 사육하면서 치료효과 및 예후를 확인하는 단계를 포함하는, 환자 맞춤형 교모세포종 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [35]
- [36] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [37]
- [38] 본 발명에서 용어, "교모세포종(glioblastoma, GBM)"은 정상적으로 뇌조직에 풍부하게 존재하고 있는 신경교세포에서 기원한 종양을 의미한다. 구체적으로, 상기 교모세포종은 전체 뇌종양의 12~15%를 차지하고, 뇌 교종의 50~60%를 차지하는 뇌에 발생하는 단일 종양 중 가장 많이 발생하는 종양이다. 또한, 뇌압이 급속히 상승하여 두통(아침에 심함), 메스꺼움(오심), 구토, 경련, 뇌 부종으로 인한 신경기능의 저하, 사지 운동 또는 감각 저하, 얼굴마비, 언어장애, 인지기능 저하, 좌-우 구분장애 등의 다양한 증상을 나타낸다. 이러한 교모세포종을 치료하기 위하여 TMZ(temozolomide)에 기초한 치료법 등이 사용되어 오고 있으나, 같은 교모세포종 환자라 하더라도 유전학적, 병리학적 상태에 차이가 있어 같은 치료법을 적용하더라도 다른 효과를 보일 수 있다. 이에, 치료제의 스크리닝 등에 이용하기 위하여, 환자의 유전학적, 생리학적 및 병리학적 상태를 반영하는 이종이식 교모세포종 마우스 모델의 개발이 요구되었다. 이에 본 발명에서는, 환자의 분리된 교모세포종 조직으로부터 제조한 이식용 시료를 마우스 뇌에 정위적으로 이식하여, 모체 암의 특성을 그대로 나타내는 교모세포종 정위적 이종이식 마우스 모델의 제조방법을 개발한 것이다. 특히, 본 발명에서는, 교모세포종이 유전적으로 동일한 암 세포로 구성된 것이라는 이론하에 암 조직 일부만을 분리하여 마우스 모델을 제조하는 경우, 모체 암의 특성을 제대로 나타내지 못하는 단점을 나타내었기에 이를 극복하기 위하여 교모세포종 조직을 4 이상의 구획으로 나누고, 이로부터 특정 부피의 조직 조각을 혼합하여 이를 이식용 시료로서 제조하는 방법을 최초로 개발하여, 모체 암과 동일한 특성을 갖는 교모세포종 마우스 모델을 제조하였다. 즉, 본 발명자들은 환자의 분리된 교모세포종 조직의 일부분만을 마우스 이식에 사용하기보다는, 환자의 분리된 교모세포종 조직의 각 부분을 모두 섞어 조직의 각 부분이 균질화된 시료를 마우스 이식에 사용하여 환자의 형질을 그대로 반영될 수 있는 이종이식 마우스를 제조하였다. 본 발명자들은

환자의 특성을 반영하는 이러한 정위적 이중이식 마우스를 "아바타 마우스"로 명명하였다.

[39]

[40] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 환자로부터 분리된 교모세포종 조직을 4 이상의 구획으로 나누고, 각 구획에서 하나 이상의 조각을 수집하는 단계; (b) 상기 수집된 각 조각들의 혼합물을 단일 세포(single cell) 단위로 교모세포종 세포를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 분리된 교모세포종 세포를 함유하는 이식용 시료를 면역 결핍된 마우스의 뇌에 정위적으로 이식하는 단계를 포함하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법을 제공한다.

[41] 이러한 교모세포종에 대한 정위적 이중이식 마우스를 제조하는 본 발명의 방법에서, 상기 (a) 단계와 (b) 단계는 환자 맞춤형 교모세포종 마우스 모델을 제조하기 위한 교모세포종 세포를 포함하는 이식용 시료를 제조하는 단계이다.

[42] 본 발명에서 용어, "교모세포종 세포를 포함하는 이식용 시료"는 교모세포종 환자의 분리된 교모세포종 조직으로부터 마우스의 뇌에 이식하기 위하여 제조한 시료로서, 단일 세포 형태의 교모세포종 세포를 포함한다. 상기 시료에 포함된 교모세포종 세포는 바람직하게는 적출된 지 3시간이 도과하지 않은 교모세포종 환자의 분리된 교모세포종 조직으로부터 유래된 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 시료는 조직을 분리한 환자의 교모세포종 암의 특성을 잘 반영할 수 있도록, 분리된 조직의 한 부분이 아닌, 환자로부터 분리된 교모세포종 조직을 4 이상의 구획으로 나누고, 각 구획에서 하나 이상의 조각을 수집하여 제조하는 것이 바람직하다. 이와 같이, 환자로부터 분리된 교모세포종 조직을 4 이상의 구획으로 나누어 각 구획에서 수득한 하나 이상의 조각들의 혼합물로부터 교모세포종 세포를 함유하는 이식용 시료를 사용하여 마우스 모델을 제조하는 경우, 1개의 특정 부위에서만 수득한 조직으로부터 제조한 이식용 시료를 사용하여 마우스 모델을 제조하는 경우와는 달리 환자의 교모세포종 암의 특성을 잘 반영할 수 있다. 따라서, 본 발명에서와 같이, 교모세포종 조직을 4 이상의 구획으로 나누어 여러 구획으로부터 수득한 조각들로부터 이식용 시료를 제조하는 것이 좋다. 이때, 4 이상의 구획에서 수득하기만 하면 모체 암의 유전적, 형태학적 및 병리학적 특성을 동일하게 나타내는 마우스 모델의 제조가 가능하여 그 상한에 제한이 없으나, 구획의 수가 늘어날수록 시간 및 부담이 증가하는바 100 이하의 구획에서 조각들을 수집할 수 있다.

[43] 또한 바람직하게는, 4 이상의 구획에서 1mm^3 내지 8mm^3 의 하나 이상의 조각을 수집하여 사용할 수 있다. 또한 바람직하게는, 상기 (b) 단계에서 수집된 각 조각들의 혼합물의 부피가 환자로부터 분리된 교모세포종 조직 부피의 30 내지 100%의 부피일 수 있다.

[44] 또한, 상기 (b) 단계는 수집된 각 조각들의 혼합물을 단일 세포 형태로 분리하는 단계인데, 이는 상기 각 조각들의 혼합물을 순차적으로 기계적 분해 및 효소적

분해시켜 단일 세포 단위로 분리할 수 있다.

- [45] 상기 기계적 분해 과정은 조직의 기계적 분해에 사용되는 것으로 알려진 당업계에 통상적으로 알려진 기계 등을 이용하여 수행될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 분해기계(dissociator)를 이용하였다. 기계적 분해 과정을 수행한 시료는 다시 효소적 분해 과정을 거칠 수 있다. 이러한 효소적 분해에 사용되는 시약은 단백질 가수분해효소 및 DNA 분해효소를 모두 포함하는 것이 바람직하다. 이와 같은 단백질 가수분해효소의 예로는 파파인, 프로멜라민과 같은 시스테인 가수분해효소 등이 있으며, DNA 분해효소로는 DNase I 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명자들은, 효소적 분해 수행시, 단백질 가수분해효소에 DNA 분해효소를 추가로 포함하는 경우, 상기 균질화 과정을 수행하여 증가한 점성 문제를 해결하는 데 있어 효과적임을 확인하였다. 따라서, 상기 효소적 분해 과정은 단백질 가수분해효소 및 DNA 분해효소를 모두 포함하는 시약으로 수행하는 것이 바람직하다. 상기와 같은 효소적 분해 과정을 거친 시료는 선택적으로 단일 세포 분리 여부를 확인한 다음, 필터화(filtration) 과정을 거칠 수 있다.
- [46] 상기 필터화 과정은 단일 세포의 분리에 적합한 구멍 크기를 가진 필터를 제한없이 이용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 셀 스트레이너를 사용하여 단일 세포 군집(single cell population)을 확보하였다.
- [47] 이와 같이 선택적으로 필터화 과정을 거친, 단일 세포 형태의 교모세포종 세포를 포함하는 시료는, 혈액 제거 과정을 거칠 수 있다. 이와 같은 혈액 제거 과정은 적혈구 세포를 제거하는 당업계의 통상적인 다양한 방법으로 수행될 수 있으나, 퍼콜(Percoll) 농도구배 원심분리로 수행되는 것이 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에서는 피콜(Ficoll) 농도구배 원심분리 방법에 비하여 퍼콜 농도구배 원심분리를 수행하는 것이 혈액 제거 효율이 더 높은 것을 확인하였다.
- [48]
- [49] 상기 (c) 단계는 상기 (b) 단계에서 분리된 교모세포종 세포를 함유하는 이식용 시료를 면역 결핍된 마우스의 뇌에 정위적으로 이식하는 단계이다.
- [50] 본 발명에서 용어, "면역 결핍된 마우스"는 교모세포종이 발병될 수 있도록 면역시스템을 구성하는 일부 구성요소를 유전자 수준에서 인위적으로 손상시켜서 정상적인 면역시스템이 구현되지 않도록 조작하여 제조된 마우스를 의미한다. 상기 면역결핍 마우스로는 신경계가 형성된 마우스를 사용할 수 있는데, 바람직하게는 면역결핍되도록 조작된 마우스가 될 수 있다. 종래에는, 누드 마우스가 주로 사용되었으나, NOG(NOD/SCID Il2rg^{-/-}) 마우스를 이용하여 마우스 모델을 제조하는 경우 그 모델 생성율이 더욱 개선된다는 장점이 있어, 가장 바람직하게는 NOG(NOD/SCID Il2rg^{-/-}) 마우스를 사용할 수 있다.
- [51] 상기 교모세포종 세포를 포함하는 이식용 시료는 면역 결핍된 마우스의 뇌에 정위적으로 이식되는 것이 특징이다.
- [52] 마우스 뇌로의 정위적 이식은 마우스 뇌의 좌측 1.5 내지 2.5mm, 전면부

브라그마로부터 0.5 내지 1.5 mm, 및 경막으로부터 1.8 내지 2.2mm의 깊이로 수행될 수 있다. 이러한 마우스 뇌로 정위적으로 이식하는 본 발명의 방법은, 교모세포종을 마우스 옆구리(flank)로 이식하는 경우에 비하여 모체 암의 특성을 보다 잘 유지시켜줄 수 있는 이점을 지닌다.

- [53] 또한, 마우스 뇌에 정위적으로 상기 (a) 단계의 이식용 시료를 이식할 때, 상기 시료 내에 포함되는 교모세포종 세포의 수는 1×10^5 내지 5×10^5 개인 것이 바람직하며, 특히 5 내지 $15 \mu\text{l}$ 의 부피를 가지는 것이 바람직하다. 세포수가 10^4 이하이거나, 10^6 이상인 경우에는 교모세포종 마우스 질병 모델의 생성율이 감소할 수 있다.
- [54] 이와 같이 이식된 세포가 자라고, 이식 후 몇 주 내지 몇 달 내에 교모세포종이 형성되게 되어, 교모세포종 마우스 질병 모델이 확립된 경우에는 눈으로 관찰 가능할 정도의 몸무게 감소, 빈 호흡(tachypnea), 마비(tachypnea) 또는 기타 이와 연관된 증상이 나타나게 된다. 본 발명의 일 실시예에서는 이종이식된 동물 모델 중에서 체중이 20% 이상 감소된 것을 통하여 질병 모델이 확립된 것을 확인하였다.
- [55]
- [56] 상기와 같은 과정으로 제조된 본 발명의 교모세포종 이종이식 마우스 모델은 모체 암(parental tumor), 즉 상기 이식된 조직이 유래된 환자로부터 발병된 교모세포종과 유전적, 형태학적 및 분자적 특성이 유사한 특징을 지닌다.
- [57] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 교모세포종 마우스 모델을 제공한다.
- [58] 동일한 교모세포종이 발병된 환자라고 할지라도 그 특성이 개별적으로 모두 다르므로 개개의 환자에 따라 치료효과가 다르고 예후가 다를 수 있다. 따라서, 모든 환자에 대하여 동일한 치료방법을 선택하였을 때, 그 효과가 다를 수 있으므로, 다양한 교모세포종의 치료방법 중에서 개개의 환자에 특이적이고 보다 효과적인 치료방법을 선택하거나 새로운 치료방법을 스크리닝할 필요가 있다. 본 발명의 환자 맞춤형 교모세포종 마우스 모델은 이식된 교모세포종 세포가 유래한 환자의 특성을 그대로 반영하므로, 이를 이용하여 그 환자에 적합한 치료방법의 선택을 가져올 수 있다.
- [59] 구체적으로, 본 발명의 마우스 모델의 교모세포종은 이의 모체 암과 침윤성, 증식지수 및 미세혈관 밀도와 같은 형태학적 환경이 동일 또는 유사한 것을 특징으로 한다. 예컨대, EGFR(Epidermal growth factor receptor), CDK2(Cyclin-dependent kinase 2), PDGFRA(Alpha-type platelet-derived growth factor receptor), MDM2(murine double minute), MDM4, MET(met proto-oncogene), CDK6(Cyclin-dependent kinase 6), PIK3CA(phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide), AKT3(RAC-gamma serine/threonine-protein kinase) 등을 코딩하는 유전자가 증폭되는지의 여부 또는 CDKN2A/B(Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B), PTEN(Phosphatase and tensin homolog), CDKN2C(Cyclin-dependent

kinase 4 inhibitor C), RB1(retinoblastoma protein), PARK2(parkinson protein 2), NF1(Neurofibromin 1) 등을 코딩하는 유전자가 결실되는지의 여부와 같은 유전학적 환경이 동일 또는 유사하고; 교모세포종의 마커 단백질로 알려진 MBP(Myelin basic protein), PDGFA(Platelet-derived growth factor subunit A), EGFR, CHI3L1(Chitinase-3-like protein 1), MAP2(Microtubule-associated protein 2), TOP2A(DNA topoisomerase 2-alpha), DLL3(Delta-like 3), SOX2(SRY(sex determining region Y)-box 2), Olig2(Oligodendrocyte transcription factor 2) 등이 동일 또는 유사한 수준으로 발현될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

- [60] 본 발명의 일 실시예에서는, 교모세포종 환자로부터 분리된 조직이 적출된 지 3시간이 도과하기 전에 분리된 조직의 각 부분을 고르게 잘라 전체 암 조직의 각 부분의 세포가 고르게 섞일 수 있도록 하였다. 그 다음, 이를 기계적 분해 및 효소적 분해하여 단일 세포 단위로 분리하였고, 1.0×10^5 내지 2.0×10^5 개의 교모세포종 세포를 포함하고 있는 $10 \mu\text{l}$ 의 HBSS 용액을 마우스의 뇌(뇌의 좌측 2mm, 전면부 브라그마 1mm, 경막으로부터 2mm 깊이)에 이식하였고, 마우스 전체의 몸무게가 20% 이상 감소하면 질병이 발병한 것으로 보아 이를 희생시켰다(실시예 2). 그 다음, 상기와 같이 제조한 환자 맞춤형 교모세포종 마우스 모델의 모체 암과의 유사성을 형태학적 및 병리학적 관점에서 확인하였다. 구체적으로, 전이성, 증식 지표 및 혈관 강도를 확인하였고, 그 결과, 전이성, 증식 지표 및 미세 혈관 강도 모두 모체 암 및 이로부터 유래된 교모세포종이 이식된 마우스 모델 모두 밀접한 연관성을 나타내었다(실험예 2). 또한, 계놈의 유사성을 확인한 결과, 카피수 및 유전적 돌연변이에 대해서도 일치하는 것을 확인하였고(도 5B 및 C), 마이크로어레이를 통한 유전자 발현을 확인한 결과, 모체 암 및 이에 대응되는 이종이식 종양 모두 유전자 발현 특성이 유사한 결과를 나타내었다(도 5E). 본 발명의 마우스 모델은, 모체 암의 형태학적, 병리학적 및 유전학적 특성의 유사성을 그대로 유지하는지 여부를 확인한 다음, 교모세포종 치료법에 대한 반응이 서로 유사한지 여부를 확인하였다. 그 결과, 방사선 치료 및 TMZ에 기초한 화학적 치료법 모두에서 유사한 경향성을 나타내었다(실험예 4). 즉, 상기와 같은 결과는 본 발명의 방법으로 제조한 교모세포종 마우스 모델은 이식된 교모세포종이 유래한 환자의 특성을 충분히 반영하므로, 환자 맞춤형 치료제의 선별 및 치료 방법의 선택 등에 이용할 수 있는 플랫폼으로서 유용성을 가짐을 시사하는 결과이다.

[61]

- [62] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 교모세포종 마우스 모델 또는 이로부터 유래된 교모세포종 세포에 치료 후보 물질을 처리하는 단계를 포함하는, 교모세포종 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

- [63] 이때, 상기 방법은 치료 후보 물질이 처리된 마우스 모델 또는 이로부터 유래된 교모세포종 세포의 치료 효과를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

- [64] 상기 치료 후보 물질의 치료 효과에 대한 확인은, 경구 투여, 정맥 내 투여, 또는

경피 투여와 같은 각 물질에 적합한 방법으로 마우스 내에 투여한 다음, 종양 크기, 전이 정도 및 죽은 세포/살아있는 세포 간의 비율을 측정함으로써 확인할 수 있다. 특히, 본 발명의 교모세포종 마우스 모델 또는 이로부터 유래된 교모세포종 세포는 교모세포종이 유래된 환자의 특성을 반영하므로, 상기 환자에게 적합한 치료제의 선별에 유용하게 이용될 수 있다.

[65] 또한, 상기 방법은 치료 후보 물질이 처리된 마우스 모델의 예후를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 예후는 병세의 진행 또는 회복에 관한 예측을 의미한다. 본 발명에서 상기 예후는 환자에서 발병된 교모세포종을 치료할 수 있는 후보 물질을 마우스에 투여한 후, 이의 진행 상황을 확인하여 상기 후보 물질이 교모세포종을 치료할 수 있는지에 대한 여부를 평가하는 것을 말한다.

[66] 상기와 같이, 본 발명에 따라 제조된 교모세포종 마우스 모델을 이용하면, 동일한 교모세포종을 갖는 환자에 대하여 해당 후보 물질 또는 후보 치료방법 적용시의 병세의 진행이나 회복에 대한 예측이 가능하다.

[67]

[68] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, (a) 상기 교모세포종 마우스 모델에 교모세포종 후보 치료방법을 수행하는 단계; 및 (b) 상기 후보 치료방법이 수행된 동물모델을 사육하면서 치료효과 및 예후를 확인하는 단계를 포함하는, 환자 맞춤형 교모세포종 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[69] 상기 교모세포종 및 마우스 모델에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[70] 본 발명의 정보제공 방법에서, 상기 (a) 단계는 본 발명의 교모세포종 마우스 모델에 교모세포종 후보 치료방법을 수행하는 단계이다.

[71] 상기 후보 치료방법은 목적하는 환자에서 발병된 교모세포종을 치료하기 위한 맞춤형 치료법의 선별에 사용될 수 있는 다양한 치료방법을 의미하는데, 통상적으로 알려진 가능한 모든 교모세포종의 치료방법을 포함할 수 있다. 예를 들어, 화학적 요법, 방사선 요법, 외과적 요법, 면역세포치료법 또는 이들의 조합이 될 수 있다.

[72] 상기 화학적 요법은 통상적으로 알려진 항암활성을 가지는 치료제 후보물질을 환자에게 투여하여 교모세포종을 치료하는 방법을 의미한다. 또한, 상기 방사선 요법은 방사선을 환자에게 처리하여 교모세포종을 치료하는 방법이며, 외과적 요법은 외과수술로서 교모세포종이 발병된 부위를 적출하여 교모세포종을 치료하는 방법이다.

[73] 상기 면역세포치료법은 환자의 혈액에서 추출한 말초혈액단핵세포에서 교모세포종에 공격성을 나타내는 면역세포를 분리하고, 이를 환자에서 분리된 교모세포종 세포와 융합시킨 다음, 환자에게 항암백신의 형태로 다시 투여함으로써, 환자에서 발병한 교모세포종을 치료하는 방법이다. 여기서, 교모세포종에 공격성을 나타내는 면역세포로는 수지상 세포를 사용함이 바람직하나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[74]

[75] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한, 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[76]

[77] 하기 실시예에서는 본 발명에 따른 배지를 이용한 인간 유래 신경줄기세포의 배양만을 예시하였으나, 유래가 다른 성체 줄기세포를 배양하여도 동일한 효과가 있음은 당업자에게 자명하다 할 것이다.

[78]

[79] 실시예 1: 교모세포종(glioblastoma, GBM) 환자 및 상기 환자 유래의 초대배양세포(primary cell)의 배양

[80]

[81] 삼성 의료원(서울, 한국)에서 뇌 종양 제거 수술을 한 58명의 환자로부터 승인을 거쳐, 수술한 종양 샘플과 임상 기록을 수득하였으며, 이에 대한 정보들도 1에 나타내었다. 구체적으로, 도 1에, 교모세포종 환자의 임상 결과 및 상기 환자로부터 유래된 초대배양세포의 실험결과를 각각 나타내었다.

[82]

[83] 이때, 상기 수득한 수술 샘플은 상기 병리학자의 조사를 통하여, 세계보건기구 표준(WHO criteria)을 기초로 교모세포종으로 분류하였다. 선별된 수술 샘플들의 일부를 효소적으로 처리하여 단일 세포로 분리하였고, 분리된 교모세포종 세포들은 "NBE" 조건에서 배양하였다. 구체적으로, N2 및 B27(각 0.5x; 인비트로젠사); 및 bFGF 및 EGF(각 25ng/mL; R&D 시스템)이 추가된 뉴로베이잘(Neurobasal) 배지에 상기 분리된 교모세포종 세포들을 배양하였다. 별법으로, NBE 조건에서 엄격하게 분리된 교모세포종 세포들은, 사용전 10 μ g/mL의 농도에서 라미닌(시그마)이 코팅된 플라스크에서 밤새 부착성 배양이 되도록 하였다.

[84]

[85] 실시예 2: 정위적 이종이식 마우스 모델(orthotropic xenograft mouse model)의 구축

[86]

[87] 동물 실험은 삼성의료원의 윤리위원회의 승인을 받아 '미국 국립보건원의 실험동물 사용과 관리에 대한 가이드라인 및 해설서'(NIH publication no. 80-23)에 적합하게 수행되었으며, 정위적 이종이식 마우스 모델은 하기와 같은 방법으로 제조하였다.

[88]

[89] 정위적 이종이식 마우스 모델의 제조는 크게 1) 교모세포종 환자로부터 분리된

조직으로부터 마우스에 이식할 시료의 제조 단계; 및 2) 마우스 이식 단계로 나누어졌으며, 그 과정은 하기와 같았다.

[90]

[91] (1) 교모세포종 환자로부터 분리된 조직으로부터 균질화된 이식 시료의 제조 단계

[92] 마우스 이식용 시료는 교모세포종 환자로부터 적출 후 2 내지 3시간이 경과하지 않은 신선한 조직을 이용하여 제조하였으며, 그 제조 과정은 하기 표와 같은 순서로 이루어졌다.

[93]

[94] 표 1

[Table 1]

순서	과정
1	조직 균질화
2	암조직 분해(기계적 분해 및 효소적 분해)
3	단일 세포 여과
4	적혈구 세포 제거
5	세포수 및 생존율 계산

[95]

[96] 구체적으로, 환자로부터 분리된 교모세포종 조직을 4 이상의 구획으로 나누고 가위 및 포셉을 사용하여 각 구획에서 1mm³ 내지 8 mm³의 하나 이상의 조각을 수집하였고, 이때 상기 수집된 조각은 분리된 교모세포종 조직 부피의 30 내지 100%의 부피가 되도록 하여 전체 암 조직의 각 부분의 세포가 고르게 섞일 수 있도록 하였다.

[97] 본 발명자들은 본 마우스 모델의 제조 과정 수립 중 이식에 사용되는 조직의 일부 조직만을 사용하여 마우스 모델을 제조하는 경우에 비하여, 전체 암 조직의 각 부분을 고르게 잘라 이를 이식 시료로 제조하는 경우, 본 마우스 모델의 생성율이 증가할 뿐만 아니라, 본래 환자의 교모세포종과의 유전학적, 형태학적, 및 마커 발현 특성의 유사성, 즉 실제 환자의 유전학적 및 생리학적 환경 조건을 최대한 모사할 수 있는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명자들은 분리된 전체 암 조직의 일부분을 사용하지 않고, 각 부분을 고르게 잘라 이를 이식 시료로서 제조하는 상기와 같은 과정을 확립하였다.

[98] 그 다음, 상기 잘라낸 조직을 가위와 포셉을 이용하여 조직을 작게 잘라주었으며, 그 다음, 작게 자른 조직을 튜브에 모두 옮겨서 gentleMACS를 사용하여 민싱(mincing)하였다.

[99]

[100] 상기와 같은 기계적 분해 과정을 거친 후, 효소적 분해 과정을 진행하였다.

효소적 분해 과정은, 파파인 및 DNA 가수분해효소를 포함하는 효소 혼합물과 기계적 분해 과정을 거친 조직 시료를 37°C 인큐베이터에서 반응시키면서 수행하였다. 여기서, 상기 효소 혼합물은 조직 부피 대비 1:1 내지 1:2의 양을 사용하였다.

[101]

[102] 상기와 같은 효소 과정 조건의 확립 과정에서, 본 발명자들은 DNA 분해효소를, 파파인과 함께 사용하는 경우, 점성에 따른 세포 분리의 어려움을 해소할 수 있는 것을 확인하여, 파파인 및 DNA 분해효소를 함께 사용하는 효소적 분해 과정을 확립하였다.

[103]

[104] 상기와 같은 효소적 분해 과정을 거친 후, 여과 과정을 진행하여 단일 세포 군집(single cell population)을 확보하였다. 여과 과정에서는, 세포 스트레이너너 여과를 사용하였다.

[105]

[106] 그 다음, 확보된 단일 세포 군집을 세척한 다음, 적혈구를 제거하기 위하여 퍼콜(percoll) 농도구배 정제 과정을 20,000rpm, 18°C의 조건에서 20분간 진행하였다. 이와 같은 적혈구 제거 과정을 거친 시료의 세포수를 혈구계(Hemocytometer)를 사용하여 측정하였고, 생존율을 확인하였다.

[107]

[108] (2) 균질화된 이식 시료의 정위적 이종이식 단계

[109] 상기 (1)의 과정을 거친 교모세포종 세포를 포함하는 시료를 마우스의 뇌에 정위적으로 이식하였으며, 그 조건은 하기와 같았다.

[110] 구체적으로, 1×10^5 내지 2.0×10^5 개의 세포를 포함하고 있는 $10 \mu\text{l}$ 의 HBSS(Hank's balanced salt solution)를 마우스의 뇌에 주입하였고, 이때 마우스로는 NOG 마우스를 사용하였다. 상기 시료는 뇌의 좌측 2mm, 전면부 브라그마 1mm, 경막으로부터 2mm 깊이로 이식하였다. 본 발명자들은 이종이식 단계에서 마우스의 뇌에 이식하는 세포의 수가 $\sim 10^5$ 개를 미만 또는 초과하는 $\sim 10^4$ 개 또는 $\sim 10^6$ 개이며, 주입하는 부피 또한, $5 \mu\text{l}$ 미만으로 너무 적거나 $50 \mu\text{l}$ 정도로 너무 많은 경우에는 실제 환자를 모사할 수 있는 마우스 모델의 생성율이 저하됨을 확인하여, 상기와 같은 주입 최적 조건을 확립하였다.

[111]

[112] 이렇게 이종이식한 마우스는 마우스의 전체 몸무게가 20% 이상 감소하면 이를 희생시켰고, 뇌는 파라핀 또는 동결 박편 방법을 사용하여 표본으로 제작하였다.

[113]

[114] (3) 종래기술과의 비교

[115] 환자의 유전학적 및 생리학적 환경을 모사할 수 있는 본원 발명의 방법에 따른 교모세포종 마우스 모델의 제조방법의 우수성을 기존의 제조방법(비교예) 및 본원 발명의 방법의 각 단계에 따른 결과를 서로 비교하여 하기 표에

나타내었다.

[116]

[117] 표 2

[Table 2]

순서	과정	비교예(종래기술)	실시예(본원발명)	효과
1	사용 조직의 선택	전체 암 조직 중 일부 조직만 사용	전체 조직을 균질화하여 사용	본원 발명의 방법을 사용한 경우, 교모세포종 마우스 모델의 생성율 개선 및 모체와의 모사 정도 개선
2	암조직 분해(기계적 분해 및 효소적 분해)	효소 처리시, Papain 사용	DNase1 추가하여 사용	본원 발명의 방법을 사용한 경우, 균질화 후 점성증가로 인한 세포 분리 문제 해결
3	단일 세포 여과			
4	적혈구 세포 제거	Ficoll Gradient 사용	Percoll Gradient 사용	본원 발명의 방법을 사용한 경우, 혈액 제거 효율 개선
5	세포수 및 생존율 계산			

6	이식	누드 마우스 사용	NOG 마우스 사용	본원 발명의 방법을 사용한 경우, 마우스 모델 생성을 개선
		5-50 μ l 주입~10 ⁴ , 10 ⁶ 세포수 주입	10 μ l 주입~10 ⁵ 개의 세포 주입	본원 발명의 방법을 사용한 경우, 주입 최적 조건으로 인하여, 마우스 모델 생성을 개선

[118]

[119] 상기와 같이, 본 발명자들은 이식된 조직의 모체 조직(parental tissue)의 유전학적 및 생리학적 특징을 잘 유지하는 이종이식 마우스의 생성율이 현저하게 우수한 방법을 개발하였다.

[120]

[121] 실시예 3: 조직 마이크로 어레이 및 면역조직화학 분석

[122]

[123] 모체 교모세포종과 그로부터 만들어진 정위 이종이식 종양(PC-NS07-464, PC-NS08-493, PC-NS08-532, PC-NS08-559, PC-NS08-608, PC-NS09-626, PC-NS09-630, PC-NS09-633, PC-NS09-660, PC-NS09-690 및 PC-NS09-696)을 대상으로 조직마이크로 어레이 분석을 수행하였다.

[124]

면역조직화학법의 경우, 각 단백질에 특이적 항체(Ki-67, PCNA(DAKO), DLL3(Santa Cruz), SOX2, Olig2, MAP2(Abcam), MBP, PDGFA, EGFR(Santa Cruz), CHI3L1, TOP2A(LifeSpan Bioscience) 및 CD31(DAKO는 이종이식 암에 사용, BD Pharmingen는 모체 암에 사용))를 이용하여 수행하였다.

[125]

[126] 실시예 4: 짧은 연쇄 반복 염기서열(short tandem repeat, STR) 유전자 분석, 비교유전체 보합(array-Comparative Genomic Hybridization, aCGH) 분석 및 TP53과 IDH1에 대한 유전적 돌연변이 분석

[127]

[128] 게노믹 DNA는 QIAamp DNA min kit(QIAGEN)를 이용하여 암 시료로부터 분리하였다. STR 분석을 위하여, 표적 DNA는 AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit(Applied Biosystems)를 사용하여 16 유전자 자리(loci)에 대한 복합적인 PCR로 증폭하였다. PCR 산물은 Internal size standard(GS-500 LIZ, Applied Biosystems)와 함께 혼합하였고, 이를 ABI 3130xL Genetic Analyzer로

전기영동하였다. 전기영동 결과는, supplied allelic ladders(Applied Biosystems)를 사용하여 GeneMapper 4.0 software로 분석하였다.

[129] aCGH는 Agilent Human Whole Genome CGH 244K microarray를 사용하여 수행하였다. *TP53*과 *IDH1*에 유전적 돌연변이 분석을 위해, PCR 반응(40 cycles, 95°C 30초, 58°C 30초 및 72°C 30초의 조건)을 100ng의 gDNA, 200nM 농도의 하기 표 3의 각 프라이머 및 Maxime PCR premix(iNtRON)를 이용하여 수행하였다.

[130]

[131] 표 3

[Table 3]

TP53 및 IDH1의 서열 분석에 사용된 프라이머						
유전자	엑손	정방향 프라이머(5'→3')	서열번호	역방향 프라이머 (5'→3')	서열번호	산물크기
TP53	Exon 5	TTCACTTGTGC CCTGACTT	1	CTGGGCA ACCAGCC CTGTC	2	275bp
TP53	Exon 6	ACCATGAGCGC TGCTCAGAT	3	AGTTGCA AACCAGA CCTCAGG C	4	236bp
TP53	Exon 7	CTTGCCACAGG TCTCCCCAA	5	GAGGCTG GGGCACA GCAGGCC AGTG	6	219bp
TP53	Exon 8	ACTGCCTCTTG CTTCTCTTT	7	AAGTGAA TCTGAGG CATAAC	8	236bp
IDH1	Exon 9	CGGTCTTCAGA GAAGCCAT	9	GCAAAAT CACATTA TTGCCAA C	10	129bp

[132]

[133] PCR 산물은 QIAquick PCR kit로 정제하였고 ABI 3130xl genetic analyzer(Applied Biosystems)에 기초한 BigDye Terminator v1.1 kit(Applied Biosystems)를 사용하여 양방향 서열분석을 수행하였다.

[134]

[135] 실시예 5: 유전자 발현 프로파일 분석

[136]

[137] 유전자 발현 프로파일링은 Affymetrix Human Gene 1.0 ST array를 이용하여 수행하였고, 결과로서 얻어진 CEL 데이터는 Robust Multichip Averaging(RMA) 과정을 통해 표준화하였다. PM(perfect match, 완전 일치)-MM(miss match, 불완전 일치) 차이점 모델은 발현 값을 표현하는데 사용하였다. 탐침 IDs는 GSEA-P 프로그램(Broad Institute 홈페이지에서 다운로드함)을 사용하여 유전자 이름들을 해독하였다.

[138] REMBRANDT(Repository for Molecular Brain Neoplasia Data) 데이터 세트를 위하여, 악성도가 높은 신경교종에 대한 CEL 파일을 홈페이지(<https://caintegrator.nci.nih.gov/rembrandt/>)로부터 매칭 임상 정보 파일(matching clinical information file)과 함께 다운로드하였다. 또한, 상기 CEL 파일은 내부 가공 처리된 CEL 파일로서, 매칭 어레이 주석 파일(for Affymetrix U133 Plus 2.0 array)을 제외하고 사용하였다.

[139] 암유전체 지도구축사업(TCGA) 데이터 세트(Cancer Genome Atlas Research Network, 2008)의 경우, Affymetrix U133A 2.0 array를 사용하여 생성된 556명의 교모세포종 샘플에 대한 유전자 발현 데이터 파일은, 매칭 임상 정보 파일과 함께 공식 홈페이지로부터 다운로드 받았다. 유전자 발현 파일은 레벨 3형으로 이미 가공된 형태로 제공받았다.

[140]

[141] 실시예 6: 교모세포종 아형 예측

[142]

[143] 교모세포종의 아형을 분류하기 위해 사용된 840개의 표지 유전자 가운데, 마이크로 어레이 기초분석을 통해 얻어진 787개의 유전자를 사용하였다. 상기 787개의 유전자는 각 유전자가 나타내는 특정 교모세포종 아형을 나타내는 숫자로 표시하였다(1-전신경계(proneural) 2-신경계(neural), 3-일반계(classical), 4-중간엽계, 및 5-그 외). 상기 표지 유전자 정보 파일 및 58 교모세포종 표본에 대한 유전자 발현 데이터를 포함하는 파일은 Broad Institute 통해 이용 가능한, 근접 모형 예측 모듈(Nearest Template Prediction Module in GenePattern)에 입력하였다. 모든 표본은 의미 있는 통계학적 수치를 가지는, 5개의 카테고리 중 하나로 분류하였다(Bonferroni P value는 0.05이하, bootstrap test로 1000개의 재표본화).

[144]

[145] 실시예 7: 유전자 특성 분석

[146]

[147] 46개의 내부 가공한 교모세포종 표본을 암화 특징 분석에 사용하였다. 상기 46개의 표본 중 종양화 그룹(tumorigenic group, n=36) 및 비종양화

그룹(nontumorigenic group, n=10) 간에서 다르게 발현되는 유전자(1.5배 이상의 차이점)를 규명하였다.

[148] 종양화의 특징은 서로 다르게 발현되는 유전자들로 구성하였으며, 각각을 이와 연관된 아형 및 log2-배 변화에 대한 값을 표시하였다. 이 특징은 근접 모형 예측 모듈(Nearest Template Prediction Module in GenePattern)에 입력하였다. 또한, REMBRANDT 또는 GCT 형식의 TCGA 데이터 셋트를 모듈에 입력하였다. 상기 모듈은 각 데이터 세트에 대한 표본의 분류와 함께 파일로 출력되어 가공처리하였다.

[149] 생존률 분석(Kaplan-Meier plot과 log-rank test)은 R survival package를 사용하여 수행하였다. 전돌연변이(permutation) 분석에서, 원래의 아형의 크기는 유지하면서, 교모세포종 환자들을 종양화 및 비 종양화 아형그룹으로 무작위적으로 재그룹화하였다. "대조군(control)"의 특징은 예후의 예측을 위한 REMBRANDT 데이터세트에서 얻어내고 적용하였다. 섞이지 않은 데이터 세트(P=0.000046)의 원래 P값보다 작은, 결과로 도출된 500 p값(log-rank testfh 부터 얻어진)의 부분을 전 돌연변이 분석의 p값으로 결정하였다.

[150]

[151] 실시예 8: 경로 분석

[152]

[153] (1) 생체 내 암화 관련 경로의 발굴

[154] GSEA-P 프로그램을 사용하여 46개의 내부 기초 분석된 교모세포종 표본의 경로 분석을 수행하였다. 상기 분석에서는, MSigDB v3.0의 유전자 세트, 특히 3개의 주요한 경로 데이터 베이스인 KEGG, REACTOME 및 BIOCARTA에서 유래된 유전자 세트를 분석에 사용하였다. 유전자는 Z 스코어(T-test의 T 스코어로 조절)에 의해 정량화된 유전자 발현 차이 정도를 이용하여 순위를 매기고 가중치를 주었다.

[155] 전 돌연변이 형 변수의 경우, 대체 옵션(유전자_세트)을 디폴트 옵션(표현형) 대신 사용하였다. 이러한 대체 옵션은 보다 관대한 p 값을 나타내는 경향이 있다. 그러나, 디폴트 셋팅은 표본의 수가 적은 경우에는 지나치게 보수적인 의미의 평가를 주며, 대체 셋팅에서유의적절단값을 통과하는 경로의 대부분은 REMBRANDT 데이터 세트의 환자 생존률과 관련하여 예상된 경향을 보였기 때문이다.

[156]

[157] (2) 유전자 발현 데이터세트로부터 경로 활성화의 정량

[158] REMBRANDT 데이터 세트로부터, 발현 값은 "일반화된-유전자"로 나타내었다. 즉, 각 유전자에 대하여 각 샘플의 로그 발현 값을 모든 샘플의 유전자의 평균 로그 발현 값과 상쇄시켰다. 주어진 샘플의 주어진 경로의 활성을 산출하기 위하여, 각 경로 유전자의 상대적인 발현 값을 모든 유전자의 상대적인 발현 값과 비교하였다. KS 스코어(Python Stats package)는 비교를 위해

사용하였다. 이때, 점수는 -1과 1 사이에서 정하였으며, 주어진 샘플의 모든 유전자와 비교하여, 값이 0보다 크면 경로 유전자는 상향조절된 것을 나타내는 것이며, 값이 0보다 작으면 경로 유전자는 하향조절된 것으로 나타내었다.

- [159] R 생존 패키지(R survival package)는 (1) 주어진 경로를 상향 또는 하향 조절하는 샘플의 환자 생존 정도를 계획하고, (2) 두 그룹 간의 생존률의 차이에 대한 통계학적 의미의 평가, 및 (3) 전체 생존률(OS, cox 비례 위험 모형에 의해 산정된 값)을 위한 KS score(경로 활성화 값)의 위험 비율을 계산하기 위해 사용하였다.

[160]

- [161] 실험에 1: *in vitro* 배양 및 정위적 이종이식 종양 모델

- [162] 도 1에 나타난 바와 같이, 59명의 환자로부터 71개의 표본을 수집하였다(11명의 환자로부터 원발성 및 재발성 암을 모두 가진 표본 취득; 1명의 환자로부터 원발성 암이 없는 두 개의 재발성 암 표본 취득).

- [163] 이로부터 정위적 이종이식 종양 모델을 제조하기 위하여, 상기 실시예 2에 기재한 바와 같이, 각각의 표본으로부터 교모세포종(glioblastoma, GBM)을 단일 세포로 분리하였고, 환자로부터 표본을 분리한지 12시간이 도과하기 전에, 이를 면역이 결핍된 NOD/SCID Il2rg^{-/-} (NOG) 쥐의 뇌에 정위적 이식을 수행하였다.

- [164] 이와 동시에, 신선하게 분리된 GBM 세포의 *in vitro* 성장 속도(growth kinetics)를 EGF와 bFGF를 포함하는 무혈청 배지(serum free media)에서 배양하여 결정하였다. 뉴로스피어(neurosphere)와 같은 증식성 세포 성장(clonogenic growth)은 GBM 줄기세포의 자가복제(self renewal)에 대한 *in vivo* 지표자이프로, GBM의 *in vitro* 성장에 대한 판독정보로서, (직경 50 μ m 이상의) 구형 형성능력(sphere formation)을 사용하였다. *in vivo* 암 형성능력(tumorigenicity)은 종양세포 주입 후 12개월 내에 종양의 형성 여부로 결정하였다. 다만, 이용가능한 세포 수가 제한되어 있었기 때문에, *in vivo* 종양 형성능에 대해서는 1개의 표본을, *in vitro* 구형 형성능에 대해서는 21개의 표본을 실험하지 못하였다(도 1).

[165]

- [166] 상기 *in vivo* 종양 형성 실험 및 *in vitro* 단기 배양을 수행하면서, 본 발명자들은 이 두 실험 간의 상관관계를 결정하였다. *in vivo* 이종이식 종양 형성은 70개의 표본 중에서 53개의 경우(75.7%)에서 조직병리학적으로 확인하였으며, 활발한 *in vitro* 구형 형성(sphere formation) 및 지속적인 성장을 유지하는 경우는, 50개의 샘플 중 34개의 케이스(68.0%)에서 확인되었다(도 1 및 도 2A).

- [167] 상기와 같은 결과는, *in vivo* 이종이식 종양과 *in vitro* 배양 간에 긍정적인 관계가 있음을 나타내는 결과이다.

[168]

- [169] 실험에 2: 형태학적과 병리학적 유사점 확인

- [170] 본 발명에서 제조한 교모세포종 이종이식 마우스가 모체 암(parental tumor)의

형태학적 및 병리학적 특징을 정확히 반영한다면, 본 발명의 마우스는 in situ 인간 GBM에 대한 모델 시스템으로서 유용하게 사용될 수 있을 것이므로, 하기에서는 모체 암과 이종이식 종양 간의 형태학적 및 병리학적 유사성을, 전이성(invasiveness), 증식 지표(proliferation index) 및 혈관 강도(vessel intensity), 이 세 가지 관점에서 비교하였다.

[171]

[172] (1) 전이성(도 3A 및 도 4)의 경우, 각 모체 종양의 경우, RANO(response assessment in neuro-oncology) 기준에 따라 MRI T2/FLAIR 이미지를 사용하여 분석하였고, 전이성에 대한 수치값은 암의 직경과 전이 거리를 서로 비교하여 결정하였다(도 1). 흥미롭게도, 환자 MRI 및 이종이식 종양의 전이도를 비교하였을 때, 모체 암의 전이 정도와 이에 대응되는 이종이식 종양 간의 전이도는 매우 밀접한 연관성을 나타내었다($n=42$, Chi-Square test, $23 P=0.029$).

[173] (2) 증식 지표(도 3B)의 경우, 이종이식 종양의 증식 지표와 이들의 모체 암의 증식 지표는 서로 매우 연관성이 높은 결과를 보였다($n=53$, Pearson correlation, $P<0.001$).

[174] (3) 미세 혈관 강도(도 3C)의 경우, 이종이식 종양의 CD31-양성 미세혈관 밀도는 이의 모체 혈관의 미세 혈관 밀도와 밀접한 연관성을 나타내었다($n=53$, Pearson correlation, $P<0.001$).

[175]

[176] 상기와 같은 결과는, 본 발명의 방법으로 제조한 교모세포종 이종이식 마우스 모델이, 모체 암의 형태학적 및 병리학적 상태를 충분히 반영한다는 것을 뒷받침하는 것으로, 상기 마우스 모델을 환자 맞춤형 약물의 스크리닝, 또한 임상 2상에 들어가기 전 약물을 환자에게 직접 적용하기 전에 효능 및 부작용 등을 시험 등에 이용할 수 있음을 시사하는 결과이다.

[177]

[178] 실험에 3: 게놈의 유사성(genomic similarity)

[179] 모체 암과 이로부터 유래된 이종이식 마우스 모델 간의 유사성을 보다 더 검토하기 위하여, 유전체 분석을 수행하였다.

[180] 우선, 각 교모세포종 이종이식이 특정 환자에게 유래된 것임을 확인하기 위하여, STR(short tandem repeat, STR) 유전자형 분석을 수행하여, 각 모체의 암에서 특이적으로 유래된 것임을 확인하였다(도 5A).

[181] 또한, aCGH 및 유전적 돌연변이 분석을 수행하여, 모체 교모세포종(parental GBM)에서 발견된, 카피 수 차이 및 유전적 돌연변이를 포함하는 유전적 변형들이 이에 대응되는 이종이식 종양에서도 일치하는지 여부를 확인하였고, 그 결과 이들 모두가 완벽히 일치되는 것을 확인하였다(도 5B 및 C).

[182]

[183] 최근, 거대 유전체 분석 연구에서 교모세포종의 특정 유전자 발현 특징에 기초하여, 이들을 4 개의 소그룹(전 신경계(Proneural), 신경계(Neural),

일반계(classical) 및 중간엽계(mesenchymal))으로 분류할 수 있음이 알려져 있으므로(Cancer Genome Atlas Research Network, 2008 Nature 455, 1061-1068.; Phillips et al., 2006 Cancer Cell 9, 157-173.; Verhaak et al., 2010 Cancer Cell 17, 98-110.), 본 발명의 라이브러리가 이러한 모든 소그룹 모두를 커버할 수 있는지, 또한, 모체 암의 유전자 발현 특성이 정위적 이종이식 종양에서도 유지되는지 여부를 확인하기 위하여, 글로벌 유전자 발현 프로파일 분석을 수행하였다.

[184]

[185] 구체적으로, 본 발명자들은 58명의 교모세포종 환자수술 표본의 마이크로 어레이(microarray) 유전자 발현 결과가 유용한지에 대하여 분석하였다(도 1). 또한, 모체 암과 그로부터 만들어진 이종이식 암을 포함하는 조직 마이크로 어레이(tissue microarray, TMA)를 수행하였다. 아형을 결정하기 위하여, 아형의 단일 샘플을 기초로 한 결정을 위한 근접 모형 예측 알고리즘(Nearest Template Prediction algorithm (Hoshida, 2010))을 사용하였다. 이는 데이터 세트에서, 18개의 전 신경계, 6개의 신경계, 13개의 일반계, 그리고 19개의 중간엽계 교모세포종을 규명하였다(2개는 결정되지 않았음; 도 1 및 도 5D).

[186]

[187] 조직 마이크로 어레이 부분에서는, 분명한 교모세포종 아형 표지자인 DLL3, SOX 및 Olig2(전 신경계); MBP(신경계); PDGFA 및 EGFR25(전 신경계); CHI3L1, MAP2 및 TOP2A(줄기세포계)에 대하여 면역조직화학적 분석을 연속적으로 수행하였다.

[188] 그 결과, 유전자 발현 분석으로 규명된 아형을 가진 모체 GBM 표본 및 이에 대응되는 이종이식 종양 모두에서, 그에 대응되는 아형 마커 단백질이 우선적으로 검출됨을 확인하였다(도 5E).

[189]

[190] 상기와 같은 결과는, 모체 암 및 이의 정위적 이종이식 마우스 모델이 유전적으로 유사성을 지니고 있음을 시사하는 결과이다.

[191]

[192] 실험에 4: 기능적인 연관성 연구

[193] 상기 실험에 1 내지 4에서는, 모체 암 및 이의 정위적 이종이식 마우스 모델의 유전적, 형태적 및 생리학적 특성의 유사성을 확인하였고, 나아가 본 발명자들은 교모세포종 표준 치료에 대한 환자의 특이적이 반응이 본 발명의 정위적 이종이식 교모세포종 마우스 모델에서도 반복되는지 확인하여 기능적 연관성을 규명하고자 하였다.

[194]

[195] (1) 방사선 치료(radiation therapy)

[196] 방사선 치료에 대한 기능적 연관성을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 원발성 종양 절제 수술 이후 방사선 치료를 받았던 5명의 환자(본 발명의 환자 라이브러리로부터 4명의 환자, 최근 발표된 연구에서 1명의 환자['827', 주당

PFS=128 (Son et al., 2009 Cell Stem Cell 4, 440-452.))를 무작위로 선정하였고, 이종이식 마우스 종양에 대하여, *in vivo* 뇌 전체에 대한 방사선 조사(매일 2Gy씩 5일간)를 수행하였다. PC-NS07-448, PC-NS07-464, PC-NS08-578, PC-NS09-780 및 827 환자에 대한 종양이 이식된 마우스의 생존율을 방사선 치료에 따라 서로 다르게 증가하였고, 그 값은 각각 $21.9 \pm 7.1\%$, $49.8 \pm 14.1\%$, $45.9 \pm 8.6\%$, $23.3 \pm 19.5\%$ 및 $45.0 \pm 5.9\%$ 이었다(도 6A 및 도 7A).

[197] 이때, 생존율의 증가는 모체 암의 PFS와 긍정적인 연관성을 나타내었다(도 6A). 구체적으로, 짧은 PFS를 가지는 모체 암 PC-NS07-448 및 PC-NS09-780 환자로부터 유래된 교모세포종 이종이식 쥐의 경우, 방사선 치료에 따른 성장을 증가시킨 PFS를 가지는 다른 교모세포종에 비하여 현저히 낮은 결과를 나타내었다(도 6A). 이러한 결과로부터, 모체 교모세포종의 방사선 반응을 본 발명의 이종이식 마우스 모델을 이용하여 예측할 수 있음을 알 수 있었다.

[198]

[199] 아울러, 방사선 치료에 대한 서로 다른 반응을 나타내는 것에 대한 임상적 의미를 더욱 규명하기 위하여, 방사선 저항성 PC-NS07-448("448") 및 방사선 민감성 PC-NS07-464("464") 이종이식 종양의 방사선 치료 후 유전자 발현의 변화를 서로 비교하여 "방사선 처리 후 반응(Radio-Response, RR)" 특징을 추론하였고, 그 결과를 하기 표 4 및 도 7B에 나타내었다.

[200]

[201] 표 4

[202]

Term	Count	P value	Fold Enrichment
RR genes (upregulated)			
oxphos (ES: 1.195)			
GO:000302~response to reactive oxygen species	3	0.01	19.326
GO:0007568~aging	3	0.02	13.177
GO:0006879~response to oxidative stress	3	0.042	8.838
GO:0010035~response to inorganic substance	3	0.063	7.07
GO:0033554~cellular response to stress	4	0.102	3.414
GO:0009719~response to endogenous stimulus	3	0.193	3.579
GO:0010033~response to organic substance	3	0.426	2.01
RR genes (downregulated)			
chromatin assembly (ES: 2.147)			
GO:0031497~chromatin assembly	5	0	14.669
GO:0065004~protein-DNA complex assembly	5	0	14.024
GO:0006323~DNA packaging	5	0.001	10.908
GO:0006333~chromatin assembly or disassembly	5	0.001	10.049
GO:0006334~nucleosome assembly	4	0.004	12.155
GO:0034728~nucleosome organization	4	0.005	10.978
GO:0051276~chromosome organization	7	0.01	3.684
GO:0006325~chromatin organization	6	0.015	4.052
GO:0034622~cellular macromolecular complex assembly	5	0.034	4.013
GO:0034621~cellular macromolecular complex subunit organization	5	0.048	3.575
GO:0065003~macromolecular complex assembly	6	0.111	2.303
GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	6	0.136	2.157
development (ES:1.188)			
GO:0008585~female gonad development	3	0.025	11.965
GO:0046545~development of primary female sexual characteristics	3	0.029	11.098
GO:0046660~female sex differentiation	3	0.029	11.098
GO:0008406~gonad development	3	0.069	6.837
GO:0003006~reproductive developmental process	4	0.079	3.897
GO:0048608~reproductive structure development	3	0.084	6.077
GO:0045137~development of primary sexual characteristics	3	0.086	6.029
GO:0007548~sex differentiation	3	0.114	5.071
GO:0048609~reproductive process in a multicellular organism	5	0.117	2.621
GO:0032504~multicellular organism reproduction	5	0.117	2.621
radiation (ES: 1.18)			
GO:0010165~response to X-ray	3	0.001	51.049
GO:0010212~response to ionizing radiation	3	0.022	12.782
GO:0006302~double-strand break repair	3	0.024	12.351
GO:0006259~DNA metabolic process	6	0.044	3.027
GO:0033554~cellular response to stress	6	0.065	2.706
GO:0009314~response to radiation	3	0.179	3.829
GO:0006281~DNA repair	3	0.298	2.696
GO:0009628~response to abiotic stimulus	3	0.415	2.081
GO:0006974~response to DNA damage stimulus	3	0.422	2.053
JNK cascade (ES: 1.055)			
GO:0007254~JNK cascade	3	0.022	12.979
GO:0031098~stress-activated protein kinase signaling pathway	3	0.024	12.155
GO:0033554~cellular response to stress	6	0.065	2.706
GO:0000165~MAPKKK cascade	3	0.157	4.182
GO:0007242~intracellular signaling cascade	8	0.204	1.626
GO:0007243~protein kinase cascade	3	0.418	2.07

[203]

[204]

상기 유전자 발현에 기초하여, REMBRANDT 데이터 세트(n=463, Madhavan et al., 2009 Mol. Cancer Res. 7, 157-167)의 악성 뇌 종양들을 488-유사 그룹(n=267)과 464-유사 그룹(n=196)으로 나누었다(도 7B). 표본을 219개의 4기 교모세포종으로 제한하였을 때, 174 교모세포종 및 45 교모세포종 샘플이 448-유사 그룹 및 464-유사 그룹으로 각각 클러스터되었다. 상기 448-유사 신경교종 및 교모세포종 모두는 464-유사 그룹에 비하여 매우 나쁜 임상적 결과를 나타내었다(도 7B).

이러한 결과를 바탕으로, RR 특성은 임상적 연관성을 가지는 것임을 확인하였다.

[205]

[206] (2) 화학적 치료법(chemotherapy)

[207] 교모세포종 환자는 MGMT 유전자 프로모터의 메틸화 상태에 따라 TMZ에 기초한 화학적 치료법에 대하여 서로 다른 반응을 나타내는 것으로 알려져 있으므로, 본 발명의 이종이식 마우스 모델에서도 서로 다른 반응이 재생산되는지 여부를 확인하였다.

[208] 임상적 관찰에 대한 동의와 함께, MGMT-비메틸화된 PC-NS09-559 환자 유래 이종이식 마우스의 OS($55.7 \pm 38.6\%$, $P < 0.001$, 도 6B)에 비하여, MGMT-메틸화된 PC-NS07-464 환자 유래의 이종이식 마우스의 OS를 연장시키는 결과($148.5 \pm 45.4\%$, 도 6B)를 나타내었다. 이는 임상적 결과와도 일치하였다.

[209]

[210] (3) 표적 치료법(Targeted Therapy)

[211] 교모세포종의 과다 혈관형성 특징에 비추어, 교모세포종의 치료에 있어서 VEGF-중화 항체, 베바시주맵(bevacizumab) 같은 치료제를 이용한 항-신생혈관 생성 치료법이 유용하게 사용될 수 있음이 제안된 바 있다. 그러나, 상기와 같은 항-신생혈관 생성 치료법의 경우, U87MG와 같은 대표적인 교모세포종 세포주를 사용한 동물 모델에서는 치료 효과를 보여주는 반면, 기준 치료 대조군(standard treatment control)의 OS와 비교시, 교모세포종 환자의 OS를 연장시키지는 못하였다. 이에 본 발명자들은 베바시주맵의 항종양 활성을 확인하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[212] 그 결과, PC-NS07-448, PC-NS07-464, PC-NS08-559 또는 PC-NS09-748의 이종이식 마우스의 생존률은 베바시주맵의 처리에도 호전되지 않는 결과를 나타내었다(도 6C). 또한, OS는 호전되지 않았지만, 상기 베바시주맵을 처리한 이종이식 종양은 더욱 전이성이 증가되는 결과를 나타내었다(도 6C). 이러한 형태학적 변화는 베바시주맵을 처리한 인간 교모세포종에서도 관찰되어, 교모세포종 수술 표본으로부터 유래한 이종이식 종양을 임상 결과의 예측에 사용할 수 있음을 제시하였다.

[213]

[214] 실험에 5: *in vivo* 암화 가능성의 유전적인 특징

[215] 상기와 같은 결과는, 초대배양된 교모세포종 세포의 *in vivo* 암화 가능성은 이에 대응되는 환자의 임상적 공격도와 연관성이 있음을 나타내었으므로, 본 발명자들은 암화된 교모세포종($n=36$, 도 1) 및 암화되지 않은 교모세포종($n=10$) 간에 서로 다르게 발현되는 709개의 유전자(1.5배 이상의 발현 차이)의 구성적 특징을 "암화"로 정의하였다(도 8A).

[216] 이러한 구성적 특징을 입증하기 위하여, 이를 두 개의 비의존적인 교모세포종 유전자 발현 분석 데이터 세트, 즉 TCGA와 REMBRANDT에 적용하였다. 근접

모형 예측 알고리즘은 각 교모세포종 환자를 두 그룹, 즉 암화 속성과 양성적으로 연관되어 있거나, 음성적으로 연관되어 있는 지에 대한 예측이 가능케 하였다.

[217] 그 결과, 각 그룹 간의 환자 생존율을 비교했을 때, REMBRANDT 데이터 세트($p < 0.0001$, log rank test)에 대하여 양성 그룹의 경우에는 음성 그룹에 비하여 생존율을 훨씬 낮은 결과를 나타내었다(도 8B).

[218] 또한, 전 돌연변이(permutation) 분석은 이러한 극심한 생존율에 대한 분리 현성이 우연에 의해 일어나지 않는다는 것을 나타내어($P=0.004$), 상기 암화 특징에 대한 유효성을 나타내었다(도 9A). 이러한 통계적으로 유의한 추세는 TCGA 데이터 세트에서 또한 관찰되었다($p=0.019$).

[219]

[220] 서로 다른 암화 가능성 및 임상적 심각성에 대한 생물학적인 기반을 이해하기 위하여, GSEA(Gene Set Enrichment Analysis; Clark and Ma'ayan, 2011 Sci. Signal. 4, tr4; Subramanian et al., 2005 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 15545-15550)를 사용하여 경로분석을 수행하였다.

[221] 그 결과, *in vivo* 암화 가능성을 가지는 교모세포종의 경우, 세포 주기, 텔로미어 유지, 전사, Notch 신호 전달, 또는 Wnt 신호 전달 연관 경로는 상향조절(upregulation)되어 있는 반면, 신경계 또는 면역 기능 연관 경로는 하향조절(downregulation)되어 있음을 확인하였다.

[222] 만일 이들 경로가 교모세포종의 임상 악성도에 미친다면, 상기 경로의 활성을 환자의 생존율 예측에 사용할 수 있을 것이므로, 이를 바탕으로 유전자 발현 프로필에 기초한 각 환자의 경로 활성화를 산출하는 방법을 창안하였다. 구체적으로, 경로 활성화는 -1 내지 1 사이 값으로 정의하였으며, 0보다 값이 크면, 상향 조절된 것으로, 0보다 값이 작으면 하향 조절된 것으로 정의하였다. 만약, PITX2 경로(PITX2는 전사인자, WNT의 하류 조절 작용)의 경로 활성화를 REMBRANDT 데이터 세트의 각 환자에 대하여 계산하였을 때, 상기 경로를 상향조절하는 것은, 낮은 생존율을 보이는 경우에 대응되는 결과를 나타내었다($P=0.002$, log-rank test; 도 8C).

[223]

[224] 또한, Cox 비례 위험 모형(Cox proportional hazard regression)에서는 상기 경로의 높은 활성은 환자의 좋지 않은 생존률과 높은 연관성을 나타냄을 확인하였다($P=0.007$, one-sided Wald test; 도 8D). BIOCARTA(도 8D), KEGG(도 9B) 및 REACTOME(도 9C) 데이터 베이스의 5개의 높은 상향조절 및 하향조절 경로로 확장하여 분석하였고, 그 결과, *in vivo* 암화 가능성을 가지는 교모세포종에서 높게 상향 또는 하향 조절된 경로와 환자의 좋지 않은, 혹은 좋은 환자 생존율과 관계가 있는 것으로 관찰되었다($P < 0.05$ 모든 세 개의 데이터베이스로부터, KS test).

[225]

- [226] 추가로, 본 발명의 데이터 세트에서, 마우스 뇌에서 침윤성 종양(n=29)을 보이는 교모세포종은 비침윤성 교모세포종(n=13) 또는 종양을 형성하지 않는 케이스(n=16)와 비교하였을 때 현저히 나쁜 임상적 결과를 나타내었으므로, 전이성을 보이는 그룹이 보다 악화된 교모세포종에 속하는지 확인하고자 하였다. 이에, 29개의 "전이성(invasive)" 그룹과 13개의 "비전이성(demarcated)" 그룹의 유전자 발현을 비교하였다.
- [227] 그 결과, 777개의 서로 다른 발현을 나타내는 유전자(1.5배 이상 변화)가 "전이성" 특징을 가지는 것으로 확인하였다(도 10). 이러한 특징을 증명하기 위해서, 뇌 종양 데이터를 위한 보고(REMBRANDT) 데이터 세트를 사용하였다. 환자 생존 시간을 두 그룹 간에 비교하였을 때, 전이성 그룹은 비전이성 그룹에 비하여 생존율이 현저히 낮은 결과를 나타내어(p=0.027, log-rank test; 도 10B), 이는 전이성 특징의 임상적 관련 가능성을 제시하였다.
- [228]
- [229] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[230]

산업상 이용가능성

- [231] 본 발명에 따라 제조된 교모세포종 마우스 모델은 교모세포종 환자와 동일한 형태학적 및 유전학적 특성을 나타내는 교모세포종을 발명하는바, 보다 안전하고 효과적인 환자 맞춤형 교모세포종 치료제의 발굴에 활용될 수 있어 유용하다. 구체적으로, 본 발명에 따른 마우스 모델을 이용하면, 후보 치료제에 대한 환자의 반응, 약효, 부작용 정도를 미리 예측할 수 있어, 환자 맞춤형 치료제를 효과적으로 선별할 수 있다. 또한, 상기 환자 맞춤형 교모세포종 동물모델은 임상 시험 결과를 미리 예측하는 전임상 중개 연구에 사용될 수 있으며, 특히 임상 1상 후 임상 2상 전에 상기 모델을 이용하여 환자를 선별하고 약효를 미리 예측할 수 있는 임상 1.5상의 연구 재료로서 활용될 수 있을 것이다.

[232]

서열목록 Free Text

- [233] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] (a) 환자로부터 분리된 교모세포종 조직을 4 이상의 구획으로 나누고, 각 구획에서 하나 이상의 조각을 수집하는 단계;
(b) 상기 수집된 각 조각들의 혼합물을 단일 세포(single cell) 단위로 교모세포종 세포를 분리하는 단계; 및
(c) 상기 (b) 단계에서 분리된 교모세포종 세포를 함유하는 이식용 시료를 면역 결핍된 마우스의 뇌에 정위적으로 이식하는 단계를 포함하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서는 상기 교모세포종 조직의 4 이상의 구획에서 1mm^3 내지 8mm^3 의 하나 이상의 조각을 수집하는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 수집된 각 조각들의 혼합물의 부피는 환자로부터 분리된 교모세포종 조직 부피의 30 내지 100%인 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계와 상기 (c) 단계 사이에 단일 세포 단위로 분리된 시료에서 적혈구를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 적혈구의 제거는 퍼콜(Percoll) 농도구배 원심분리에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 면역 결핍된 마우스의 뇌에 정위적으로 이식되는 이식용 시료는 1×10^5 내지 5×10^5 개의 교모세포종 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 이식용 시료는 5 내지 $15\ \mu\text{l}$ 의 부피를 가지는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계는 상기 수집된 각 조각들의 혼합물을 순차적으로 기계적 분해 및 효소적 분해시켜 단일 세포 단위로 분리하는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 효소적 분해는 단백질 가수분해효소 및 DNA 분해효소를 포함하는 효소 혼합물에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 이식용 시료는 면역 결핍된 마우스 뇌의 좌측 1.5 내지 2.5mm, 전면부 브라그마로부터 0.5 내지 1.5 mm,

- 경막으로부터 1.8 내지 2.2mm의 깊이로 이식되는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 면역 결핍된 마우스는 NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) 마우스인 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 교모세포종 마우스 모델은 상기 환자의 교모세포종과 유전학적 특성 및 형태학적 특성이 동일한 것을 특징으로 하는, 교모세포종 마우스 모델의 제조방법.
- [청구항 13] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 제조된 교모세포종 마우스 모델.
- [청구항 14] 제13항의 교모세포종 마우스 모델 또는 이로부터 유래된 교모세포종 세포에 치료 후보 물질을 처리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 치료제를 스크리닝하는 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 방법은 치료 후보 물질이 처리된 마우스 모델 또는 이로부터 유래된 교모세포종 세포의 치료 효과를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 치료제를 스크리닝하는 방법.
- [청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 방법은 치료 후보 물질이 처리된 마우스 모델의 예후를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 교모세포종 치료제를 스크리닝하는 방법.
- [청구항 17] (a) 제13항의 교모세포종 마우스 모델에 교모세포종 후보 치료방법을 수행하는 단계; 및
(b) 상기 후보 치료방법이 수행된 마우스 모델의 치료효과를 확인하는 단계를 포함하는, 환자 맞춤형 교모세포종 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 후보 치료방법은 화학적 요법, 방사선 요법, 외과적 요법, 면역세포치료법 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는, 환자 맞춤형 교모세포종 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법.
- [청구항 19] 제17항에 있어서, 상기 (b) 단계는 마우스 모델의 예후를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 환자 맞춤형 교모세포종 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법.
- [청구항 20] 제18항에 있어서, 상기 화학적 요법은 교모세포종 치료제 후보물질을 상기 마우스 모델에 처리하는 것을 특징으로 하는, 환자 맞춤형 교모세포종 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법.
- [청구항 21] 제18항에 있어서, 상기 면역세포치료법은 수지상세포 치료법인 것을 특징으로 하는, 환자 맞춤형 교모세포종 치료방법의 선택을 위한 정보제공 방법.