



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0084708
(43) 공개일자 2020년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/57484 (2013.01)

C12Q 1/6886 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2019-0000891

(22) 출원일자 2019년01월03일

심사청구일자 2019년01월03일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박석인

서울특별시 성북구 낙산길 255, 106동 1305호

이경진

서울특별시 성북구 보문로29길 11 닥터빌 503A호

(74) 대리인

공병욱

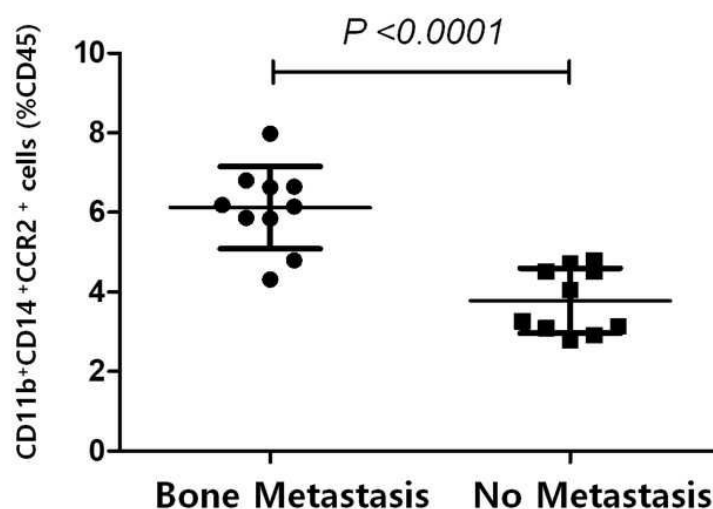
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 암의 골전이 진단용 조성물 및 이를 이용한 암의 골전이 진단방법

(57) 요약

본 발명은 암의 골전이 진단용 조성물, 이를 이용한 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법, 이를 이용한 암의 골전이 치료반응 모니터링을 위한 정보를 제공하는 방법 및 이를 이용한 암의 골전이 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명의 암의 골전이 진단용 조성물은 암의 골전이를 조기에 효과적으로 진단할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 33/56966 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/70553 (2013.01)
G01N 2333/70589 (2013.01)
G01N 2333/70596 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HA17C0040
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	국립암센터
연구사업명	암연구소및국가암관리사업본부연구운영비지원
연구과제명	혈중 순환 조골세포를 이용한 골전이암 예측 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	서울대학교병원
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

CD45 검출제, HLA-DR 검출제 및 CD11b 검출제; 및
CD14 검출제 및 CCR2 검출제, CD14 검출제, CD15 검출제 및 CD33 검출제, 또는 이들 모두;
를 포함하는 암의 골전이 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 검출제는 각각 독립적으로 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질 및 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된 것인, 암의 골전이 진단용 조성물

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 검출제는 각각 독립적으로 리간드, 비드(bead), 방사성 핵종, 효소, 기질, 보조인자, 억제제, 형광물질(fluorescer), 형광단백질, 화학발광물질, 자성 입자, 합텐 및 염료로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 표지로 표지된 것인, 암의 골전이 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 각각의 검출제의 농도는 $5 \text{ ul}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 이상인 것인, 암의 골전이 진단용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 암은 유방암, 전립선암, 간암, 폐암, 방광암, 위암, 자궁암, 대장암, 결장암, 혈액암, 난소암, 이자암, 지라암, 고환암, 흉선암, 뇌암, 식도암, 신장암, 담도암, 난소암, 갑상선암 또는 피부암인 것인, 암의 골전이 진단용 조성물.

청구항 6

하기의 단계를 포함하는 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법:

제1항의 암의 골전이 진단용 조성물을 시료와 접촉시키는 표지 단계; 및

표지된 단핵구 세포를 수득하는 수득 단계; 및

표지된 단핵구 세포를 분석하는 분석 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 시료는 말초혈에서 분리한 단핵구 세포를 포함하고 있는 것인, 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 시료는 단핵구 세포를 2×10^5 개 이상 포함하고 있는 것인, 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 시료는 하기의 단계를 통해 수득하는 것인, 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법:

환자로부터 채취된 혈액을 원심분리하는 제1 원심분리 단계;
 단핵구 세포층 수득 단계;
 단핵구 세포층 세척 단계; 및
 제2 원심분리 단계.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 분석 단계는 하기의 단계를 포함하는 것인, 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법:

단일세포만을 수득하는 단계;
 CD45 양성 세포 군집으로 분류하는 단계;
 HLA-DR 음성 세포 군집만을 재분류하는 단계;
 CD11b 양성 세포 군집만을 재분류하는 단계; 및
 CD14 양성 및 CCR2 양성 세포 군집으로 재분류하는 단계.

청구항 11

하기의 단계를 포함하는 암의 골전이 치료반응 모니터링을 위한 정보를 제공하는 방법.
 제1항의 암의 골전이 진단용 조성물을 시료와 접촉시키는 표지 단계;
 표지된 단핵구 세포를 수득하는 수득 단계; 및
 표지된 단핵구 세포를 분석하는 분석 단계.

청구항 12

하기의 단계를 포함하는 암의 골전이 치료제 스크리닝 방법:
 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계;
 제1항의 암의 골전이 진단용 조성물을 시료에 접촉시키는 표지 단계;
 표지된 단핵구 세포를 수득하는 수득 단계; 및
 표지된 단핵구 세포를 분석하는 분석 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암의 골전이 진단용 조성물, 이를 이용한 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법, 이를 이용한 암의 골전이 치료반응 모니터링을 위한 정보를 제공하는 방법 및 이를 이용한 암의 골전이 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명의 암의 골전이 진단용 조성물은 암의 골전이를 조기에 효율적으로 진단할 수 있다.

배경 기술

[0002] 전이(metastasis)된 암은 치료가 어려우며 환자 삶의 질 저하 및 사망으로 직결되는 중요한 임상 문제이다. 전이가 흔하게 일어나는 장기는 뼈, 폐, 간 등이다. 이 중 특히 뼈에 전이된 악성 종양은 골전이(bone metastasis)라 부르며, 유방암, 전립선암, 폐암, 신장암, 갑상선암 등의 흔한 말기 증상이다. 골전이는 일단 진단이 되면 급격히 예후가 나빠지며, 치료나 수술도 어렵다. 또한, 골전이 진행을 예방하는 방법도 없다.

[0003] 이와 같이 골전이의 치료성과 또는 예후가 나쁜 큰 이유는 현재 골전이 진단이 영상의학 검사 또는 소수의 혈중 골과괴 표지자에 의존하고 있기 때문에, 골전이가 광범위하게 진행된 이후에만 발견이 가능하기 때문이다. 유방암을 예로 들자면, 초기 진단 및 수술, 항암치료 등 이후 5년 추적 관찰 시기에 호르몬 억제 요법과 주기적 골

스캔 (방사선 표지자를 이용한 골전이 영상의학 검사법)을 시행한다. 하지만, 통증이나, 골절, 신경 압박 등의 증상 없이 골 스캔으로 진단되는 경우에도 이미 골파괴가 진행된 상태인 경우가 대부분이며, 결국 예후가 좋지 않다.

[0004] 골전이가 일어나는 과정은 다음과 같다. 원발 종양에서 떨어져 나온 암세포가 혈류를 따라 돌다가 뼈에 도착하며, 이를 파종(seeding)이라 한다. 파종된 암세포는 곧 휴면기 단계에 들어가 수년 또는 수십년을 휴면상태로 존재한다. 이 후, 잘 밝혀지지 않은 어떤 이유로 휴면 상태의 암세포가 활성을 갖게 되고, 세포 분열을 시작하여 임상적 골전이 단계로 진행된다. 휴면기 단계에서는 암세포가 골수 내에만 존재하며, 암세포와 골수세포 간에 상호작용이 일어나지 않는다. 그러나, 미세 골전이 단계에서는 암세포가 주변 골수 세포 및 골세포들과 상호작용을 시작하며, 세포의 증식이 활발히 일어난다. 임상적 골전이 단계에서는 암세포, 파골세포 등에 의해 골조직이 파괴되어 통증, 골절 등의 증상이 발견되는 단계이다.

[0005] 종래 영상의학 검사 또는 골 표지자를 활용한 암의 골전이 진단은 이러한 임상적 골전이 단계에서만 가능하였으며, 이 경우 이미 종양이 진행되어 효과적인 치료가 어렵다. 이는 골 조직의 파괴가 발생된 이후에 진단이 가능하다는 한계 때문이다. 또한, 종래의 검사법들은 골전이 치료제에 대한 치료 반응을 측정할 수 없으며, 신규 개발된 골전이 치료제들의 효능을 스크리닝하기도 어렵다. 이에 따라 미세 골전이 단계에서 골조직이 파괴되기 전에 조기 진단을 통해 골전이 치료의 개시 시점을 앞당길 수 있는, 그리고 골전이 치료제가 효과를 나타내는지 모니터링 할 수 있는, 나아가 골전이 치료제를 스크리닝 할 수 있는 진단용 조성물, 키트 또는 진단을 위한 정보제공 방법의 필요성이 증대되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명의 목적은 암의 골전이 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 골전이 치료반응 모니터링을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 골전이 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 암의 골전이 진단용 조성물, 이를 이용한 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법, 이를 이용한 암의 골전이 치료반응 모니터링을 위한 정보를 제공하는 방법 및 이를 이용한 암의 골전이 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명은 골스캔을 포함한 영상의학적 진단 방법이 아닌, 혈액 검사를 통해 보다 간단하게 골전이 여부를 진단할 수 있으며, 영상의학적 진단 방법에 비해 조기에 진단이 가능하고, 암의 골전이 치료에 대한 예후를 모니터링하여 암의 골전이 환자의 생존율과 삶의 질을 크게 향상시킬 수 있다.

[0011] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0012] 본 발명의 일 양태는 암의 골전이 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 하기의 검출제를 포함하는 것일 수 있다.

[0014] CD45 검출제, HLA-DR 검출제 및 CD11b 검출제; 및

[0015] CD14 검출제 및 CCR2 검출제, 및/또는 CD14 검출제, CD15 검출제 및 CD33 검출제.

[0016] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 CD45 검출제, HLA-DR 검출제, CD11b 검출제, CD14 검출제 및 CCR2 검출제를 포함하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 CD45 검출제, HLA-DR 검출제, CD11b 검출제, CD14 검출제, CD15 검출제 및 CD33 검출제를 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 CD45 검출제, HLA-DR 검출제, CD11b 검출제, CD14 검출제, CCR2 검출제, CD15 검출제 및 CD33 양성 검출제를 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 검출제는 각각 독립적으로 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질 및 폴리펩티드로 이루어진

군에서 선택된 것일 수 있으며, 예를 들어, 항체인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0020] 본 발명의 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 가지는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 항원의 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론항체, 단일클론항체, 전체(whole) 항체 및 항체 단편을 모두 포함한다.
- [0021] 본 발명의 용어, "전체 항체"는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 디설파이드(disulfide) 결합으로 연결되어 있다.
- [0022] 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.
- [0023] 본 발명의 용어, "항체 단편"은 전체 항체의 일부분을 의미하며, 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 포함하며, 예를 들어, Fc 단편, Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 Fc 단편은 Fc 수용체와 같은 세포 표면 수용체와 결합할 수 있는 항체의 말단 부위를 의미하며, 항체의 두 개의 중쇄의 2번 또는 3번째 보존 도메인(constant domain)으로 구성된다.
- [0025] 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다.
- [0026] Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다.
- [0027] F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다.
- [0028] Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다.
- [0029] 이중쇄 Fv(dsFv, disulfidestabilized variable fragment)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(scFv, single chain variable fragment)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역(VH)과 경쇄의 가변 영역(VL)이 공유 결합으로 연결되어 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 검출제는 각각 독립적으로 표지된 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 표지에는 리간드, 비드(bead), 방사성 핵종, 효소, 기질, 보조인자, 억제제, 형광물질(fluorescer), 형광단백질, 화학발광물질, 자성 입자, 합텐 및 염료로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 검출 가능한 표지로 공지된 표지 대부분이 사용될 수 있고, 통상의 기술자라면 발명의 목적에 맞게 적절한 표지를 선택할 수 있다.
- [0032] 상기 리간드는 바이오틴, 아비딘 및 스트렙토아비딘 등인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 효소는 루시페라아제, 퍼옥시다아제 및 베타 갈락토시다아제 등인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 상기 형광물질은 플루오레세인, 쿠마린, 로다민, 피코에리트린 및 설포로다민산 클로라이드(텍사스 레드; Texas red) 등인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 상기 형광단백질은 적색형광단백질(red fluorescent protein; RFP), 증강된 적색 형광 단백질(enhanced red fluorescent protein; ERFP), 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified GFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced GFP), 청색 형광 단백질(Blue fluorescent protein; BFP), 증강된 청색 형광 단백질(eBFP), 시안 형광 단백질(Cyan fluorescent protein; CFP), 증강된 시안 형광 단백질(eCFP), 황색형광단백질(Yellow fluorescent protein; YFP) 및 증강된 황색 형광 단백질(eYFP)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 검출제는 각각의 검출 대상에 특이적인 항체인 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 용어, "검출 대상에 특이적인 항체"는 검출 대상을 항원으로 인식하여 결합하는 항체 또는 그의 단편을 의미한다.
- [0038] 본 발명에 일 구체예에 있어서, 상기 CD45 검출제는 항-CD45 항체인 것일 수 있으며, 예를 들어, CD45 PerPC-

Cy5.5 (BD #564105)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0039] 본 발명에 일 구체예에 있어서, 상기 HLA-DR 검출제는 항-HLA-DR 항체인 것일 수 있으며, 예를 들어, HLA-DR Alexa Fluor® 700 (BD #560743)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에 일 구체예에 있어서, 상기 CD11b 검출제는 항-CD11b 항체인 것일 수 있으며, 예를 들어, CD11b APC (Allophycocyanin) (BD #55019)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명에 일 구체예에 있어서, 상기 CD14 검출제는 항-CD14 항체인 것일 수 있으며, 예를 들어, CD14 APC-Cyanine 7 (APC-Cy 7) (BD #557831)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에 일 구체예에 있어서, 상기 CD15 검출제는 항-CD15 항체인 것일 수 있으며, 예를 들어, CD15 FITC(Fluorescein isothiocyanate) (BD #555401)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에 일 구체예에 있어서, 상기 CD33 검출제는 항-CD33 항체인 것일 수 있으며, 예를 들어, CD33 PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine 7) (BD #333946)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명에 일 구체예에 있어서, 상기 CCR2 검출제는 항-CCR2 항체인 것일 수 있으며, 예를 들어, CCR2 PE (Phycoerythrin) (Biolegend #357206)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 각각의 검출제의 농도는 $5 \text{ ul}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, $5 \text{ ul}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 인 것일 수 있다. 유세포 분석기를 통해 분석 시, 최소 상기 농도는 확보해야 충분한 양을 읽어 유의미한 수치를 얻을 수 있다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 암은 유방암, 전립선암, 간암, 폐암, 방광암, 위암, 자궁암, 대장암, 결장암, 혈액암, 난소암, 이자암, 지라암, 고환암, 흉선암, 뇌암, 식도암, 신장암, 담도암, 난소암, 갑상선암 또는 피부암인 것일 수 있으며, 예를 들어, 유방암 또는 전립선암인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 다른 일 양태는 하기의 단계를 포함하는 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0048] 암의 골전이 진단용 조성물을 시료에 접촉시키는 표지 단계;
- [0049] 표지된 세포를 수득하는 수득 단계; 및
- [0050] 표지된 세포를 분석하는 분석 단계.
- [0051] 상기 암의 골전이 진단용 조성물은 상술한 바와 같다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 환자로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 환자는 임의의 포유류, 예를 들어, 인간 또는 원숭이와 같은 영장류, 마우스(mouse) 또는 랫(rat)과 같은 설치류 일 수 있으며, 특히, 인간인 것일 수 있다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 혈액인 것일 수 있으며, 예를 들어, 말초혈인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 세포를 포함하는 것일 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 단핵구 세포인 것일 수 있으며, 예를 들어, 골수 유래 억제 세포 (Myeloid-Derived Suppressor Cells)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 구체적인 일 예에 있어서, 상기 세포는 말초혈 시료에서 수득한 말초혈 단핵구 세포인 것일 수 있다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 하기의 단계를 통해 수득하는 것일 수 있다:
- [0059] 환자로부터 채취된 혈액을 원심분리하는 제1 원심분리 단계;
- [0060] 단핵구 세포층 수득 단계;
- [0061] 단핵구 세포층 세척 단계; 및
- [0062] 제2 원심분리 단계.
- [0063] 상기 제1 원심분리의 수행 온도는 4 내지 25°C , 4 내지 22°C , 4 내지 19°C , 4 내지 16°C , 4 내지 13°C , 4 내지

10℃, 4 내지 7℃ 또는 4 내지 5℃인 것일 수 있으며, 예를 들어, 4 ℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 또한, 상기 제1 원심분리의 수행 속도는 500 내지 2000 X G, 500 내지 1800 X G, 500 내지 1600 X G, 500 내지 1400 X G, 500 내지 1200 X G, 500 내지 1000 X G, 500 내지 800 X G, 600 내지 2000 X G, 600 내지 1800 X G, 600 내지 1600 X G, 600 내지 1400 X G, 600 내지 1200 X G, 600 내지 1000 X G 또는 600 내지 800 X G인 것일 수 있으며, 예를 들어, 635 X G 인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 또한, 상기 제1 원심분리의 수행 시간은 5 내지 60 분, 5 내지 55 분, 5 내지 50 분, 5 내지 45 분, 5 내지 40 분, 5 내지 35 분, 5 내지 30 분, 5 내지 25 분, 10 내지 60 분, 10 내지 55 분, 10 내지 50 분, 10 내지 45 분, 10 내지 40 분, 10 내지 35 분, 10 내지 30 분, 10 내지 25 분, 15 내지 60 분, 15 내지 55 분, 15 내지 50 분, 15 내지 45 분, 15 내지 40 분, 15 내지 35 분, 15 내지 30 분, 15 내지 25 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 20 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 구체적인 일 예에 있어서, 상기 제1 원심분리는 4 ℃에서 635 X G 속도로 20 분간 수행되는 것일 수 있다.

[0067] 상기 세척은 인산완충용액 (Phosphate buffered saline; PBS), 생리식염수 및 FACS 세척 완충 용액 (우태아혈청 [Fetal Bovine Serum] 또는 우혈청 알부민 [Bovine serum albumin]과 에틸렌다이아민테트라아세트산 [EDTA]를 포함하는 인산완충용액)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것을 이용하여 수행하는 것일 수 있으며, 예를 들어, FACS 세척 완충 용액으로 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] 상기 제2 원심분리의 수행 온도는 4 내지 25℃, 4 내지 22℃, 4 내지 19℃, 4 내지 16℃, 4 내지 13℃, 4 내지 10℃, 4 내지 7℃ 또는 4 내지 5℃인 것일 수 있으며, 4℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 또한, 상기 제2 원심분리의 수행 속도는 500 내지 2000 X G, 500 내지 1800 X G, 500 내지 1600 X G, 500 내지 1400 X G, 500 내지 1200 X G, 500 내지 1000 X G, 500 내지 800 X G, 600 내지 2000 X G, 600 내지 1800 X G, 600 내지 1600 X G, 600 내지 1400 X G, 600 내지 1200 X G, 600 내지 1000 X G 또는 600 내지 800 X G인 것일 수 있으며, 예를 들어, 783 X G 인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 또한, 상기 제2 원심분리의 수행 시간은 1 내지 60 분, 1 내지 55 분, 1 내지 50 분, 1 내지 45 분, 1 내지 40 분, 1 내지 35 분, 1 내지 30 분, 1 내지 25 분, 1 내지 20 분, 1 내지 15 분, 1 내지 10 분, 3 내지 60 분, 3 내지 55 분, 3 내지 50 분, 3 내지 45 분, 3 내지 40 분, 3 내지 35 분, 3 내지 30 분, 3 내지 25 분, 3 내지 20 분, 3 내지 15 분 또는 3 내지 10 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 5 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0071] 본 발명의 구체적인 일 예에 있어서, 상기 제2 원심분리는 4 ℃에서 783 X G 으로 5 분간 수행되는 것일 수 있다.

[0072] 본 발명에 있어서, 상기 표지 단계의 수행 시간은 5 내지 60 분, 5 내지 55 분, 5 내지 50 분, 5 내지 45 분, 5 내지 40 분, 5 내지 35 분, 5 내지 30 분, 5 내지 25 분, 10 내지 60 분, 10 내지 55 분, 10 내지 50 분, 10 내지 45 분, 10 내지 40 분, 10 내지 35 분, 10 내지 30 분, 10 내지 25 분, 15 내지 60 분, 15 내지 55 분, 15 내지 50 분, 15 내지 45 분, 15 내지 40 분, 15 내지 35 분, 15 내지 30 분, 15 내지 25 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 20 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명에 있어서, 상기 표지 단계의 수행 온도는 4 내지 25℃, 4 내지 22℃, 4 내지 19℃, 4 내지 16℃, 4 내지 13℃, 4 내지 10℃, 4 내지 7℃ 또는 4 내지 5℃인 것일 수 있으며, 4℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0074] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 단핵구 세포 2×10^5 개 이상 포함하고 있는 것일 수 있다. 유세포 분석기를 통해 분석 시, 최소 상기 농도는 확보해야 충분한 양을 읽어 유의미한 수치를 얻을 수 있다.

[0075] 본 발명에 있어서, 상기 표지된 단핵구 세포를 수득하는 수득 단계는 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0076] 완충액을 첨가하여 세척하는 단계; 및

[0077] 제3 원심분리 단계.

[0078] 상기 완충액은 인산완충용액 (Phosphate buffered saline; PBS), 생리식염수 및 FACS 세척 완충 용액 (우태아혈청 [Fetal Bovine Serum] 또는 우혈청 알부민 [Bovine serum albumin]과 에틸렌다이아민테트라아세트산

[EDTA]을 포함하는 완충액) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0079] 상기 제3 원심분리의 수행 온도는 4 내지 25℃, 4 내지 22℃, 4 내지 19℃, 4 내지 16℃, 4 내지 13℃, 4 내지 10℃, 4 내지 7℃ 또는 4 내지 5℃인 것일 수 있으며, 4℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0080] 또한, 상기 제3 원심분리의 수행 속도는 400 내지 2000 X G, 400 내지 1800 X G, 400 내지 1600 X G, 400 내지 1400 X G, 400 내지 1200 X G, 400 내지 1000 X G 또는 400 내지 800 X G인 것일 수 있으며, 예를 들어, 441 X G인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0081] 또한, 상기 제3 원심분리의 수행 시간은 1 내지 60 분, 1 내지 55 분, 1 내지 50 분, 1 내지 45 분, 1 내지 40 분, 1 내지 35 분, 1 내지 30 분, 1 내지 25 분, 1 내지 20 분, 1 내지 15 분, 1 내지 10 분, 3 내지 60 분, 3 내지 55 분, 3 내지 50 분, 3 내지 45 분, 3 내지 40 분, 3 내지 35 분, 3 내지 30 분, 3 내지 25 분, 3 내지 20 분, 3 내지 15 분 또는 3 내지 10 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 5 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명의 구체적인 일 예에 있어서, 상기 제3 원심분리는 4 ℃에서 441 X G으로 5 분간 수행되는 것일 수 있다.
- [0083] 본 발명에 있어서, 상기 표지된 단핵구 세포를 분석하는 분석 단계는 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0084] 단일세포만을 수득하는 단계;
- [0085] CD45 양성 세포 군집으로 분류하는 단계;
- [0086] HLA-DR 음성 세포 군집만을 재분류하는 단계;
- [0087] CD11b 양성 세포 군집만을 재분류하는 단계; 및
- [0088] CD14 양성 및 CCR2 양성 세포 군집으로 재분류하는 단계.
- [0089] 본 발명에 있어서 "단일세포(single cell)"는 세포끼리 뭉쳐있지 않고 각각 분리되어 있는 상태의 세포를 의미한다.
- [0090] 상기 분석은 면역크로마토그래피(immunochromatography), 면역조직화학적 염색법(immunohistochemical staining), 효소면역항체법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA), 효소면역분석법(enzyme immunoassay, EIA), 형광면역측정법(fluorescence immunoassay, FIA), 섬광면역측정법(luminescence immunoassay, LIA), 웨스턴 블로팅(Western blotting), 형광 활성화 세포선택장치(fluorescence activated cell sorter, FACS) 및 유세포 분석법(Flow cytometry)을 통해 수행하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 유세포 분석법을 통해 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0091] 본 발명의 용어, "유세포 분석법"은 세포의 수를 세거나, 종류를 분류하거나, 또는 생체 지표를 탐지하는 기술을 의미하며, 형광물질 또는 동위원소로 표지된 세포를 탐지한다.
- [0092] 본 발명의 용어, "면역분석법(immunoassay)"은 항체 또는 면역글로불린을 사용하여 용액 내 고분자의 존재 또는 농도를 측정하는 생화학적 시험방법으로, 예를 들어, 라디오면역측정법(RIA), 효소면역측정법(ELISA), 면역형광법 또는 화학발광물질결합법 등이 있다.
- [0093] 상기 방법을 이용하여 검출제와 결합된 세포의 수를 계수하거나, 농도를 측정하여 세포를 정량할 수 있다.
- [0094] 본 발명에 있어서, 상기 암은 유방암, 전립선암, 간암, 폐암, 방광암, 위암, 자궁암, 대장암, 결장암, 혈액암, 난소암, 이자암, 지라암, 고환암, 흉선암, 뇌암, 식도암, 신장암, 담도암, 난소암, 갑상선암 또는 피부암인 것일 수 있으며, 예를 들어, 유방암 또는 전립선암인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0095] 본 발명의 또 다른 일 양태는 하기의 단계를 포함하는 암의 골전이 치료반응 모니터링을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.
- [0096] 암의 골전이 진단용 조성물을 시료와 접촉시키는 표지 단계;
- [0097] 표지된 단핵구 세포를 수득하는 수득 단계; 및
- [0098] 표지된 단핵구 세포를 분석하는 분석 단계.

- [0099] 상기 암의 골전이 진단용 조성물은 상술한 바와 같다.
- [0100] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 환자로부터 분리된 것일 수 있으며, 예를 들어, 치료 중인 환자인 것일 수 있다.
- [0101] 본 발명에 있어서, 상기 환자는 임의의 포유류, 예를 들어, 인간 또는 원숭이와 같은 영장류, 마우스(mouse) 또는 랫(rat)과 같은 설치류 일 수 있으며, 특히, 인간인 것일 수 있다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 혈액인 것일 수 있으며, 예를 들어, 말초혈인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0103] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 세포를 포함하는 것일 수 있다.
- [0104] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 단핵구 세포인 것일 수 있으며, 예를 들어, 골수 유래 억제 세포 (Myeloid-Derived Suppressor Cells)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0105] 본 발명의 구체적인 일 예에 있어서, 상기 세포는 말초혈 시료에서 수득한 말초혈 단핵구 세포인 것일 수 있다.
- [0106] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 하기의 단계를 통해 수득하는 것 일 수 있다:
- [0107] 환자로부터 채취된 혈액을 원심분리하는 제1 원심분리 단계;
- [0108] 단핵구 세포층 수득 단계;
- [0109] 단핵구 세포층 세척 단계; 및
- [0110] 제2 원심분리 단계.
- [0111] 상기 제1 원심분리의 수행 온도는 4 내지 25℃, 4 내지 22℃, 4 내지 19℃, 4 내지 16℃, 4 내지 13℃, 4 내지 10℃, 4 내지 7℃ 또는 4 내지 5℃인 것일 수 있으며, 예를 들어, 4 ℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0112] 또한, 상기 제1 원심분리의 수행 속도는 500 내지 2000 X G, 500 내지 1800 X G, 500 내지 1600 X G, 500 내지 1400 X G, 500 내지 1200 X G, 500 내지 1000 X G, 500 내지 800 X G, 600 내지 2000 X G, 600 내지 1800 X G, 600 내지 1600 X G, 600 내지 1400 X G, 600 내지 1200 X G, 600 내지 1000 X G 또는 600 내지 800 X G인 것일 수 있으며, 예를 들어, 635 X G 인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0113] 또한, 상기 제1 원심분리의 수행 시간은 5 내지 60 분, 5 내지 55 분, 5 내지 50 분, 5 내지 45 분, 5 내지 40 분, 5 내지 35 분, 5 내지 30 분, 5 내지 25 분, 10 내지 60 분, 10 내지 55 분, 10 내지 50 분, 10 내지 45 분, 10 내지 40 분, 10 내지 35 분, 10 내지 30 분, 10 내지 25 분, 15 내지 60 분, 15 내지 55 분, 15 내지 50 분, 15 내지 45 분, 15 내지 40 분, 15 내지 35 분, 15 내지 30 분, 15 내지 25 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 20 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0114] 구체적인 일 예에 있어서, 상기 제1 원심분리는 4 ℃에서 635 X G 속도로 20 분간 수행되는 것일 수 있다.
- [0115] 상기 세척은 인산완충용액 (Phosphate buffered saline; PBS), 생리식염수 및 FACS 세척 완충 용액 (우태아혈청 [Fetal Bovine Serum] 또는 우혈청 알부민 [Bovine serum albumin]과 에틸렌다이아민테트라아세트산 [EDTA]를 포함하는 인산완충용액)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것을 이용하여 수행하는 것일 수 있으며, 예를 들어, FACS 세척 완충 용액으로 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0116] 상기 제2 원심분리의 수행 온도는 4 내지 25℃, 4 내지 22℃, 4 내지 19℃, 4 내지 16℃, 4 내지 13℃, 4 내지 10℃, 4 내지 7℃ 또는 4 내지 5℃인 것일 수 있으며, 4℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0117] 또한, 상기 제2 원심분리의 수행 속도는 500 내지 2000 X G, 500 내지 1800 X G, 500 내지 1600 X G, 500 내지 1400 X G, 500 내지 1200 X G, 500 내지 1000 X G, 500 내지 800 X G, 600 내지 2000 X G, 600 내지 1800 X G, 600 내지 1600 X G, 600 내지 1400 X G, 600 내지 1200 X G, 600 내지 1000 X G 또는 600 내지 800 X G인 것일 수 있으며, 예를 들어, 783 X G 인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0118] 또한, 상기 제2 원심분리의 수행 시간은 1 내지 60 분, 1 내지 55 분, 1 내지 50 분, 1 내지 45 분, 1 내지 40 분, 1 내지 35 분, 1 내지 30 분, 1 내지 25 분, 1 내지 20 분, 1 내지 15 분, 1 내지 10 분, 3 내지 60 분, 3 내지 55 분, 3 내지 50 분, 3 내지 45 분, 3 내지 40 분, 3 내지 35 분, 3 내지 30 분, 3 내지 25 분, 3 내지 20 분, 3 내지 15 분 또는 3 내지 10 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 5 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는

것은 아니다.

- [0119] 본 발명의 구체적인 일 예에 있어서, 상기 제2 원심분리는 4 °C에서 783 X G 으로 5 분간 수행되는 것일 수 있다.
- [0120] 본 발명에 있어서, 상기 표지 단계의 수행 시간은 5 내지 60 분, 5 내지 55 분, 5 내지 50 분, 5 내지 45 분, 5 내지 40 분, 5 내지 35 분, 5 내지 30 분, 5 내지 25 분, 10 내지 60 분, 10 내지 55 분, 10 내지 50 분, 10 내지 45 분, 10 내지 40 분, 10 내지 35 분, 10 내지 30 분, 10 내지 25 분, 15 내지 60 분, 15 내지 55 분, 15 내지 50 분, 15 내지 45 분, 15 내지 40 분, 15 내지 35 분, 15 내지 30 분, 15 내지 25 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 20 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0121] 본 발명에 있어서, 상기 표지 단계의 수행 온도는 4 내지 25°C, 4 내지 22°C, 4 내지 19°C, 4 내지 16°C, 4 내지 13°C, 4 내지 10°C, 4 내지 7°C 또는 4 내지 5°C인 것일 수 있으며, 4°C인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0122] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 단핵구 세포 2×10^5 개 이상 포함하고 있는 것일 수 있다. 유세포 분석기를 통해 분석 시, 최소 상기 농도는 확보해야 충분한 양을 읽어 유의미한 수치를 얻을 수 있다.
- [0123] 본 발명에 있어서, 상기 표지된 단핵구 세포를 수득하는 수득 단계는 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0124] 완충액을 첨가하여 세척하는 단계; 및
- [0125] 제3 원심분리 단계.
- [0126] 상기 완충액은 인산완충용액 (Phosphate buffered saline; PBS), 생리식염수 및 FACS 세척 완충 용액 (우태아 혈청 [Fetal Bovine Serum] 또는 우혈청 알부민 [Bovine serum albumin]과 에틸렌다이아민테트라아세트산 [EDTA]을 포함하는 완충액) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0127] 상기 제3 원심분리의 수행 온도는 4 내지 25°C, 4 내지 22°C, 4 내지 19°C, 4 내지 16°C, 4 내지 13°C, 4 내지 10°C, 4 내지 7°C 또는 4 내지 5°C인 것일 수 있으며, 4°C인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0128] 또한, 상기 제3 원심분리의 수행 속도는 400 내지 2000 X G, 400 내지 1800 X G, 400 내지 1600 X G, 400 내지 1400 X G, 400 내지 1200 X G, 400 내지 1000 X G 또는 400 내지 800 X G인 것일 수 있으며, 예를 들어, 441 X G인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0129] 또한, 상기 제3 원심분리의 수행 시간은 1 내지 60 분, 1 내지 55 분, 1 내지 50 분, 1 내지 45 분, 1 내지 40 분, 1 내지 35 분, 1 내지 30 분, 1 내지 25 분, 1 내지 20 분, 1 내지 15 분, 1 내지 10 분, 3 내지 60 분, 3 내지 55 분, 3 내지 50 분, 3 내지 45 분, 3 내지 40 분, 3 내지 35 분, 3 내지 30 분, 3 내지 25 분, 3 내지 20 분, 3 내지 15 분 또는 3 내지 10 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 5 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0130] 본 발명의 구체적인 일 예에 있어서, 상기 제3 원심분리는 4 °C에서 441 X G으로 5 분간 수행되는 것일 수 있다.
- [0131] 본 발명에 있어서, 상기 표지된 단핵구 세포를 분석하는 분석 단계는 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0132] 단일세포만을 수득하는 단계;
- [0133] CD45 양성 세포 군집으로 분류하는 단계;
- [0134] HLA-DR 음성 세포 군집만을 재분류하는 단계;
- [0135] CD11b 양성 세포 군집만을 재분류하는 단계; 및
- [0136] CD14 양성 및 CCR2 양성 세포 군집으로 재분류하는 단계.
- [0137] 상기 분석은 면역크로마토그래피(immunochromatography), 면역조직화학적 염색법(immunohistochemical staining), 효소면역항체법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA), 효소면역분석법(enzyme immunoassay, EIA), 형광면역측정법(florescence immunoassay, FIA), 섬광면역측정법(luminescence immunoassay, LIA), 웨스턴 블로팅(Western blotting), 형광 활성화 세포선택장치

(fluorescence activated cell sorter, FACS) 및 유세포 분석법(Flow cytometry)을 통해 수행하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 유세포 분석법을 통해 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0138] 본 발명의 용어, "유세포 분석법"은 세포의 수를 세거나, 종류를 분류하거나, 또는 생체 지표를 탐지하는 기술을 의미하며, 형광물질 또는 동위원소로 표지된 세포를 탐지한다.
- [0139] 본 발명의 용어, "면역분석법(immunoassay)"은 항체 또는 면역글로불린을 사용하여 용액 내 고분자의 존재 또는 농도를 측정하는 생화학적 시험방법으로, 예를 들어, 라디오면역측정법(RIA), 효소면역측정법(ELISA), 면역형광법 또는 화학발광물질결합법 등이 있다.
- [0140] 상기 방법을 이용하여 검출제와 결합된 세포의 수를 계수하거나, 농도를 측정하여 세포를 정량할 수 있다.
- [0141] 본 발명에 있어서, 상기 암은 유방암, 전립선암, 간암, 폐암, 방광암, 위암, 자궁암, 대장암, 결장암, 혈액암, 난소암, 이자암, 지라암, 고환암, 흉선암, 뇌암, 식도암, 신장암, 담도암, 난소암, 갑상선암 또는 피부암인 것일 수 있으며, 예를 들어, 유방암 또는 전립선암인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0143] 본 발명의 또 다른 일 양태는 하기의 단계를 포함하는 암의 골전이 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0144] 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- [0145] 암의 골전이 진단용 조성물을 접촉시키는 표지 단계;
- [0146] 표지된 단핵구 세포를 수득하는 수득 단계; 및
- [0147] 표지된 단핵구 세포를 분석하는 분석 단계.
- [0148] 상기 시험물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩타이드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0149] 상기 시험물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있으며, 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0150] 예를 들어, 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co. (영국), Comgenex (미국), Brandon Associates (미국), Microsource (미국) 및 Sigma-Aldrich (미국)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(미국) 및 MycoSearch (미국)에서 상업적으로 구입 가능하다.
- [0151] 상기 암의 골전이 진단용 조성물은 상술한 바와 같다.
- [0152] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 암이 발현된 세포, 이의 추출물 또는 이의 배양물인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0153] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 환자로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0154] 본 발명에 있어서, 상기 환자는 임의의 포유류, 예를 들어, 인간 또는 원숭이와 같은 영장류, 마우스(mouse) 또는 랫(rat)과 같은 설치류 일 수 있으며, 특히, 인간인 것일 수 있다.
- [0155] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 혈액인 것일 수 있으며, 예를 들어, 말초혈인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0156] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 세포를 포함하는 것일 수 있다.
- [0157] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 단핵구 세포인 것일 수 있으며, 예를 들어, 골수 유래 억제 세포(Myeloid-Derived Suppressor Cells)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0158] 본 발명의 구체적인 일 예에 있어서, 상기 세포는 말초혈 시료에서 수득한 말초혈 단핵구 세포인 것일 수 있다.
- [0159] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 하기의 단계를 통해 수득하는 것일 수 있다:
- [0160] 환자로부터 채취된 혈액, 암이 발현된 세포, 이의 추출물 또는 이의 배양물을 원심분리하는 제1 원심분리 단계;
- [0161] 단핵구 세포층 수득 단계;

- [0162] 단핵구 세포층 세척 단계; 및
- [0163] 제2 원심분리 단계.
- [0164] 상기 제1 원심분리의 수행 온도는 4 내지 25℃, 4 내지 22℃, 4 내지 19℃, 4 내지 16℃, 4 내지 13℃, 4 내지 10℃, 4 내지 7℃ 또는 4 내지 5℃인 것일 수 있으며, 예를 들어, 4℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0165] 또한, 상기 제1 원심분리의 수행 속도는 500 내지 2000 X G, 500 내지 1800 X G, 500 내지 1600 X G, 500 내지 1400 X G, 500 내지 1200 X G, 500 내지 1000 X G, 500 내지 800 X G, 600 내지 2000 X G, 600 내지 1800 X G, 600 내지 1600 X G, 600 내지 1400 X G, 600 내지 1200 X G, 600 내지 1000 X G 또는 600 내지 800 X G인 것일 수 있으며, 예를 들어, 635 X G 인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0166] 또한, 상기 제1 원심분리의 수행 시간은 5 내지 60 분, 5 내지 55 분, 5 내지 50 분, 5 내지 45 분, 5 내지 40 분, 5 내지 35 분, 5 내지 30 분, 5 내지 25 분, 10 내지 60 분, 10 내지 55 분, 10 내지 50 분, 10 내지 45 분, 10 내지 40 분, 10 내지 35 분, 10 내지 30 분, 10 내지 25 분, 15 내지 60 분, 15 내지 55 분, 15 내지 50 분, 15 내지 45 분, 15 내지 40 분, 15 내지 35 분, 15 내지 30 분, 15 내지 25 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 20 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0167] 구체적인 일 예에 있어서, 상기 제1 원심분리는 4℃에서 635 X G 속도로 20 분간 수행되는 것일 수 있다.
- [0168] 상기 세척은 인산완충용액 (Phosphate buffered saline; PBS), 생리식염수 및 FACS 세척 완충 용액 (우태아혈청 [Fetal Bovine Serum] 또는 우혈청 알부민 [Bovine serum albumin]과 에틸렌다이아민테트라아세트산 [EDTA]를 포함하는 인산완충용액)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것을 이용하여 수행하는 것일 수 있으며, 예를 들어, FACS 세척 완충 용액으로 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0169] 상기 제2 원심분리의 수행 온도는 4 내지 25℃, 4 내지 22℃, 4 내지 19℃, 4 내지 16℃, 4 내지 13℃, 4 내지 10℃, 4 내지 7℃ 또는 4 내지 5℃인 것일 수 있으며, 4℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0170] 또한, 상기 제2 원심분리의 수행 속도는 500 내지 2000 X G, 500 내지 1800 X G, 500 내지 1600 X G, 500 내지 1400 X G, 500 내지 1200 X G, 500 내지 1000 X G, 500 내지 800 X G, 600 내지 2000 X G, 600 내지 1800 X G, 600 내지 1600 X G, 600 내지 1400 X G, 600 내지 1200 X G, 600 내지 1000 X G 또는 600 내지 800 X G인 것일 수 있으며, 예를 들어, 783 X G 인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0171] 또한, 상기 제2 원심분리의 수행 시간은 1 내지 60 분, 1 내지 55 분, 1 내지 50 분, 1 내지 45 분, 1 내지 40 분, 1 내지 35 분, 1 내지 30 분, 1 내지 25 분, 1 내지 20 분, 1 내지 15 분, 1 내지 10 분, 3 내지 60 분, 3 내지 55 분, 3 내지 50 분, 3 내지 45 분, 3 내지 40 분, 3 내지 35 분, 3 내지 30 분, 3 내지 25 분, 3 내지 20 분, 3 내지 15 분 또는 3 내지 10 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 5 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0172] 본 발명의 구체적인 일 예에 있어서, 상기 제2 원심분리는 4℃에서 783 X G 으로 5 분간 수행되는 것일 수 있다.
- [0173] 본 발명에 있어서, 상기 표지 단계의 수행 시간은 5 내지 60 분, 5 내지 55 분, 5 내지 50 분, 5 내지 45 분, 5 내지 40 분, 5 내지 35 분, 5 내지 30 분, 5 내지 25 분, 10 내지 60 분, 10 내지 55 분, 10 내지 50 분, 10 내지 45 분, 10 내지 40 분, 10 내지 35 분, 10 내지 30 분, 10 내지 25 분, 15 내지 60 분, 15 내지 55 분, 15 내지 50 분, 15 내지 45 분, 15 내지 40 분, 15 내지 35 분, 15 내지 30 분, 15 내지 25 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 20 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0174] 본 발명에 있어서, 상기 표지 단계의 수행 온도는 4 내지 25℃, 4 내지 22℃, 4 내지 19℃, 4 내지 16℃, 4 내지 13℃, 4 내지 10℃, 4 내지 7℃ 또는 4 내지 5℃인 것일 수 있으며, 4℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0175] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 단핵구 세포 2×10^5 개 이상 포함하고 있는 것일 수 있다. 유세포 분석기를 통해 분석 시, 최소 상기 농도는 확보해야 충분한 양을 읽어 유의미한 수치를 얻을 수 있다.
- [0176] 본 발명에 있어서, 상기 표지된 단핵구 세포를 수득하는 수득 단계는 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0177] 완충액을 첨가하여 세척하는 단계; 및

- [0178] 제3 원심분리 단계.
- [0179] 상기 완충액은 인산완충용액 (Phosphate buffered saline; PBS), 생리식염수 및 FACS 세척 완충 용액 (우태아 혈청 [Fetal Bovine Serum] 또는 우혈청 알부민 [Bovine serum albumin]과 에틸렌다이아민테트라아세트산 [EDTA]을 포함하는 완충액) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0180] 상기 제3 원심분리의 수행 온도는 4 내지 25℃, 4 내지 22℃, 4 내지 19℃, 4 내지 16℃, 4 내지 13℃, 4 내지 10℃, 4 내지 7℃ 또는 4 내지 5℃인 것일 수 있으며, 4℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0181] 또한, 상기 제3 원심분리의 수행 속도는 400 내지 2000 X G, 400 내지 1800 X G, 400 내지 1600 X G, 400 내지 1400 X G, 400 내지 1200 X G, 400 내지 1000 X G 또는 400 내지 800 X G인 것일 수 있으며, 예를 들어, 441 X G인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0182] 또한, 상기 제3 원심분리의 수행 시간은 1 내지 60 분, 1 내지 55 분, 1 내지 50 분, 1 내지 45 분, 1 내지 40 분, 1 내지 35 분, 1 내지 30 분, 1 내지 25 분, 1 내지 20 분, 1 내지 15 분, 1 내지 10 분, 3 내지 60 분, 3 내지 55 분, 3 내지 50 분, 3 내지 45 분, 3 내지 40 분, 3 내지 35 분, 3 내지 30 분, 3 내지 25 분, 3 내지 20 분, 3 내지 15 분 또는 3 내지 10 분인 것일 수 있으며, 예를 들어, 5 분인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0183] 본 발명의 구체적인 일 예에 있어서, 상기 제3 원심분리는 4 ℃에서 441 X G으로 5 분간 수행되는 것일 수 있다.
- [0184] 본 발명에 있어서, 상기 표지된 단핵구 세포를 분석하는 분석 단계는 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0185] 단일세포만을 수득하는 단계;
- [0186] CD45 양성 세포 군집으로 분류하는 단계;
- [0187] HLA-DR 음성 세포 군집만을 재분류하는 단계;
- [0188] CD11b 양성 세포 군집만을 재분류하는 단계; 및
- [0189] CD14 양성 및 CCR2 양성 세포 군집으로 재분류하는 단계.
- [0190] 상기 분석은 면역크로마토그래피(immunochromatography), 면역조직화학적 염색법(immunohistochemical staining), 효소면역항체법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA), 효소면역분석법(enzyme immunoassay, EIA), 형광면역측정법(florescence immunoassay, FIA), 섬광면역측정법(luminescence immunoassay, LIA), 웨스턴 블로팅(Western blotting), 형광 활성화 세포선택장치 (fluorescence activated cell sorter, FACS) 및 유세포 분석법(Flow cytometry)을 통해 수행하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 유세포 분석법을 통해 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0191] 본 발명의 용어, "유세포 분석법"은 세포의 수를 세거나, 종류를 분류하거나, 또는 생체 지표를 탐지하는 기술을 의미하며, 형광물질 또는 동위원소로 표지된 세포를 탐지한다.
- [0192] 본 발명의 용어, "면역분석법(immunoassay)"은 항체 또는 면역글로불린을 사용하여 용액 내 고분자의 존재 또는 농도를 측정하는 생화학적 시험방법으로, 예를 들어, 라디오면역측정법(RIA), 효소면역측정법(ELISA), 면역형광법 또는 화학발광물질결합법 등이 있다.
- [0193] 상기 방법을 이용하여 검출제와 결합된 세포의 수를 계수하거나, 농도를 측정하여 세포를 정량할 수 있다.
- [0194] 본 발명에 있어서, 상기 암은 유방암, 전립선암, 간암, 폐암, 방광암, 위암, 자궁암, 대장암, 결장암, 혈액암, 난소암, 이자암, 지라암, 고환암, 흉선암, 뇌암, 식도암, 신장암, 담도암, 난소암, 갑상선암 또는 피부암인 것일 수 있으며, 예를 들어, 유방암 또는 전립선암인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0195] 본 발명은 암의 골전이 진단용 조성물, 이를 이용한 암의 골전이 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법, 이를 이용한 암의 골전이 치료반응 모니터링을 위한 정보를 제공하는 방법 및 이를 이용한 암의 골전이 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명의 암의 골전이 진단용 조성물은 전신 골스캔 또는 기존의 골전이 진단 혈청 마커보다 효과적으로 암의 골전이를 진단해 낼 수 있어 암의 골전이 조기 진단이 가능하며, 암의 골전이의 치료반

응 모니터링을 통해 환자의 생존율을 크게 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0196] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세골전이 마우스 구축 과정에서의 생체 발광 영상 (Bioluminescence imaging; 이하, BLI)결과 그림이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세골전이 마우스 구축 과정에서의 정상 마우스 뼈조직을 보여주는 사진이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세골전이 마우스 구축 과정에서의 미세골전이 모델 뼈조직을 보여주는 사진이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 암의 골전이 마우스 모델 혈액에서 단핵구성 골수 유래 억제세포 전체 분포 형태를 보여주는 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 암의 골전이 마우스 모델 혈액에서 단핵구성 골수 유래 억제세포의 분포 형태를 보여주는 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 암의 골전이 마우스 모델 혈액에서 CCR2+ 단핵구성 골수 유래 억제세포의 분포 형태를 보여주는 그래프이다.
- 도 7a는 본 발명의 일 실시예에 따른 암환자의 유세포 분석결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 7b는 본 발명의 일 실시예에 따른 암환자의 유세포 분석결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 7c는 본 발명의 일 실시예에 따른 암환자의 유세포 분석결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 암환자 혈액 샘플의 임상 연구 결과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0197] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0199] 실시예 1. 미세 골전이 마우스 모델 구축

- [0200] 기존 골전이 마우스 모델의 한계를 극복하고 이상적인 골전이 동물모델을 확보하기 위해, 미세 골전이 마우스 모델을 구축하였다. 해당 마우스 모델 구축과 관련된 모든 실험을 고려대학교 의과대학 동물실험 윤리위원회의 승인을 거친 후 철저한 규정준수 아래 실시하였다. 상기 동물 모델을 구축하기 위해 Balb/c 계열 마우스를 사용하였으며, 마우스 유래 유방암 세포인 4T1-tdTomato;Luc 세포를 계대배양하고 마우스에 주입할 충분한 세포를 준비하였다.

- [0201] 마우스의 한쪽 넓다리뼈 또는 정강뼈에 암세포를 과종하기 위해 엉덩동맥(iliac artery)을 통해 암세포를 주입하였다. 구체적으로, 산소와 혼합한 2-3% 기화 이소플루란을 이용하여 마우스를 전신 마취한 후, 오른쪽 안쪽 넓다리 피부를 절개하여 넓다리 동맥을 노출시켰다. 해부현미경을 이용하여 혈관을 박리하고, 주사기를 이용하여 혈관 내에 세포를 주입하고 지혈, 봉합하고 보온패드 위에서 마우스를 충분히 회복시켰다. 암세포 주사 후 매주 in vivo 생체발광영상장비 (bioluminescence imaging)를 이용해 주입한 쪽 넓다리 및 정강이 부위 골전이 암 종양 형성 및 성장을 발광세기 (Bioluminescence intensity, ph/s)에 따라 관찰하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

- [0202] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 미세 골전이 마우스 모델 제작을 1차적으로 검증하였다.

- [0203] 그 다음 실질적인 골전이 형성을 확인하기 위해, 마우스를 안락사 시켜 골전이가 형성된 넓다리뼈 및 정강뼈를 분리하여 조직학적 분석을 실시하였다. 뼈조직을 분리 후 엑스선 영상을 통해 골전이 부위를 대략적으로 확인하고, 4% 파라포름알데하이드 용액에 담가 조직을 3일간 고정시킨 후, 뼈에 붙은 근육을 박리하고 0.5 M EDTA 용액에서 탈칼슘화 (Decalcification) 과정을 약 2 주간 진행하였다. 탈칼슘화 과정은 3일에 한번씩 0.5M EDTA 용액을 바꿔주면서 4℃에서 천천히 흔들어주며 진행하였다. 이 후 통상적인 파라핀 포매, 블록 제작 및 미세 절편을 제작하여 슬라이드를 만들고 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 조직 염색을 실시하였다. 종양 성장에 따른 생

체발광, 엑스선 영상 및 조직염색 분석 결과는 도 2 내지 도 3에 나타내었다.

[0204] 도 2 및 도 3에서 확인할 수 있듯이, 정상 마우스 뼈조직은 엑스선 검사 결과 및 조직염색 결과에서 종양형성이 없는 반면, 미세골전이암 모델의 뼈조직에서는 골괴괴 및 다리뼈 내 종양 형성을 확인할 수 있었다. 따라서, 도 1에 이어, 미세 골전이암 모델이 성공적으로 구축됨을 재검증하였다.

[0206] 실시예 2. 미세 골전이 성장에 따른 골수유래 억제세포 분석

[0207] 실시예 1에서 구축한 미세 골전이 마우스 모델에서 암세포 이식 후 주차별 골전이 성장에 따른 골수유래 억제세포를 분석하고자 혈액 시료를 채취하였다. 마우스 모델은 암세포 주입 후 1 주차, 2 주차 및 3 주차로, 1 주차는 총 20 마리, 2주차와 3주차는 각각 10마리씩 마우스 모델을 준비하였다.

[0208] 시료 채취 전, 채혈 시 혈액 응고를 방지하고자 채혈 주사기 내부를 헤파린 용액으로 코팅하였다. 마우스 전신 마취 후 심장 천자를 통해 1 ml 가량의 전혈을 채취하였으며, 채혈 즉시 적혈구 제거를 위해 RBC 용해(lysis) 용액에 넣어 적혈구를 용혈시켰다. 상온에서 15분 가량 방치하여 반응한 후, 441 X G 속도로 5분 원심분리하여 상층액을 제거, 적혈구가 완전히 없어질 때까지 해당 과정을 반복 수행하였고, 깨끗하게 분리된 혈구세포는 FBS가 포함된 완충액에 담아 냉장보관 하였다.

[0209] 상기 혈구세포의 유세포분석을 위해, 준비된 혈구세포 10^6 개를 유세포분석기 전용 튜브에 옮겨 담아 세척하고, CD16/CD32 항체를 첨가한 완충액 200 μ l를 넣어 5분간 방치하여 Fc 블로킹 과정을 수행하였다. 그 다음, 항-viability dye 780 (1 μ l/ 10^6 cells), 항-CD45 (0.25 μ l/ 10^6 cells), 항-CD11b (0.25 μ l/ 10^6 cells), 항-Ly-6G (0.5 μ l/ 10^6 cells), 항-Ly-6C (0.5 μ l/ 10^6 cells), 항-CCR2 (1 μ l/ 10^6 cells) 항체를 첨가 및 30 분간 상온에서 방치하여 염색을 시행하였다.

[0210] 사용한 항체 정보:

[0211] Viability dye 780 APC-Cy7 (Biogems, #6910-00),

[0212] 항-CD45 PE-Cy7 (Biolegend, #103114),

[0213] 항-CD11b FITC (BD, #553310),

[0214] 항-Ly-6G Alexa 647 (BD, #12610),

[0215] 항-Ly-6C Alexa 700 (BD, #562137),

[0216] 항-C-C chemokine Receptor 2 (CCR2) APC (Biolegend, #150604).

[0217] 염색이 완료되면, 4 ml 가량의 완충액을 각 튜브마다 첨가하여 세척한 후 441 X G, 5 분간 원심분리하여 항체를 표지한 단핵구 세포를 얻었으며, 해당 세포는 유세포 분석기 (Beckton-Dickinson 사, FACS Canto II 및 FACS DIVA 소프트웨어)를 이용해 유세포 분석을 수행하였다.

[0218] 분석방법은 가장 먼저 단일세포만을 수득하고, 상기에서 나열한 항체 순으로 세포 군집을 분류하여 분석하였다. 구체적으로, 분류된 단일세포 군집 중 viable 세포 군집으로 분류하여 살아있는 세포만을 선별하고, 이후 CD45+ 세포 군집으로 분류하여 CD11b+ 세포 군집으로 재분류, 이후 순차적으로 Ly-6G- 및 Ly-6C+ 세포 군집 분류하여, 최종적으로 Ly-6C+CCR2+ 세포 군집으로 분류하여 % 값을 분석하여, 그 결과를 도 4 내지 도 6 및 표 1 내지 표 3에 나타내었다.

표 1

CD11b (% CD45)	1주차	2주차	3주차
	78.19	84.05	94.65
	78.05	82.03	94.32
	77.36	80.88	94.08

표 2

Ly-6G ⁻ /Ly-6C ⁺ (% CD45)	1주차	2주차	3주차
	0.44	0.52	0.51
	0.37	0.49	0.49
	0.35	0.44	0.48

표 3

Ly-6C+CCR2 ⁺ on CD45 (%)	1주차	2주차	3주차
	0.43	0.45	0.44
	0.35	0.45	0.41
	0.33	0.39	0.4

도 4 내지 도 6 및 표 1 내지 표 3에서 확인할 수 있듯이, 세포 주입 후 주차가 지나면서 골수유래 억제세포 전체 분포 형태가 점차 증가함을 확인하다. 단핵구성 골수유래 억제세포 및 CCR2⁺ 단핵구성 골수유래 억제세포는 1 주차와 2 및 3 주차를 비교했을 때, 유의미하게 증가함을 확인하였지만, 2 주차와 3 주차 비교에서는 세포수 증가를 확인하지 못하였다. 이는 이미 2주차에 단핵구성 골수유래 억제세포가 최대치 증가되어 있음을 의미한다.

실시에 3. 암환자 혈액샘플에서 말초혈 단핵세포 확보 및 유세포 분석방법 구축

사람 환자에서 말초혈 단핵세포 분석방법을 구축하기 위해 암환자에서 액체 생검을 통해 혈액 시료 확보 및 말초혈 단핵세포를 분리하였다. 환자 혈액 시료는 본 발명의 임상연구 진행을 위해 고려대학교 안암병원 임상연구 센터의 기관윤리위원회 (IRB) 승인 하에 규정에 따라 검체를 받아 수행하였다.

구체적으로, 진단 대상 암환자의 채취된 혈액 시료 8 cc를 헤파린이 코팅되어 있는 전용 튜브에 혈액 응고를 방지한 채 채혈하였다. 그 다음, Ficoll을 이용한 밀도구배 원심분리법을 이용하여, 4℃ 온도에서 635 X G 속도로 20 분간 원심분리를 통해 혈장(plasma), 말초혈 단핵구층 (Peripheral blood mononuclear cells; 이하 PBMC), Ficoll, 적혈구 (RBC) 층 순으로 분리 유도하였다. 분리된 층 중 2번째 층인 PBMC층만을 조심스럽게 분리하여 새 튜브로 옮겨 담은 후, PBS 용액을 추가하여 PBMC를 세척하고, 다시 783 X G 속도로 5 분간 원심분리하여 세척된 PBMC만을 확보하였다.

상기 단핵구 세포를 통해 유세포 분석방법을 구축하기 위해, 항체 염색을 실시하였다. 상기 말초혈액 단핵구세포의 유세포분석을 위해, 준비된 단핵구세포 2x10⁵ 개를 유세포분석기 전용 튜브에 옮겨 담아 준비하였다.

그 다음, 항-CD45 (0.5 ul/2x10⁵ cells), 항-CD14 (0.5 ul/2x10⁵ cells), 항-CD15 (5 ul/2x10⁵ cells), 항-HLA-DR (0.5 ul/2x10⁵ cells), 항-CD33 (1.25 ul/2x10⁵ cells), 항-CD11b (2.5 ul/2x10⁵ cells), 항-CCR2 (1 ul/2x10⁵ cells) 항체를 첨가 및 20 분간 상온에서 방치하여 염색을 시행하였다.

사용한 항체 정보:

항-CD45 PerPC-Cy5.5 (BD #564105),

항-HLA-DR Alexa700 (BD #560743),

항-CD11b APC (BD #55019),

항-CD14 APC-Cy7 (BD #557831),

항-CD15 FITC (BD #555401),

항-CD33 PE-Cy7 (BD #333946),

[0236] 항-CCR2 PE (Biolegend #357206).

[0237] 그 다음, 4 ml 가량 완충액을 첨가하여 세척한 후, 441 X G, 5 분간 원심분리하여 항체를 표지한 단핵구 세포를 얻었고, 상기 실시예 2와 동일한 유세포 분석기(Beckton-Dickinson사, FACS Canto II 또는 Fortessa X-20 장비 및 FACS DIVA 소프트웨어)를 통해 유세포 분석을 수행하였다. 분석은 가장 먼저 단일세포만을 게이팅하여, 해당 군집에서 CD45+ 세포 군집으로 분류하였다. 해당 군집 내에서 HLA-DR- 세포 군집, CD11+ 군집만을 재분류, 여기에서 CD14+와 CCR2+ 세포 군집으로 재분류하여 세포의 개수를 정량하고 CCR2+ 단핵구성 골수유래 억제세포를 분석하였다. 암환자 검체에서 분석한 결과 중 대표 분석 결과를 도 7 및 표 4에 나타내었다.

표 4

Gating	No. of cells	Percentage
Total	267,758	-
Single cells	108,911	-
CD45	50,581	46.4% (Single)
CD11b, HLA-DR-	17,355	34.3% (CD45))
CD14, CCR2	7,447	14.7% (CD45)

[0239] 도 7 및 표 4에서 확인할 수 있듯이, 총 267,758 개의 세포를 분석하여, 이 중 단일세포 108,911 개를 구획한 후 CD45+ 세포를 분류하였으며 (단일 세포 중 46.4%), 순차적으로 CD11b+HLA-DR- 세포 (CD45+ 세포 중 34.3%), 최종적으로 CD14+CCR2+ 세포 (CD45+ 세포 중 14.7%)를 분석하였다. 해당 분석에 대해 현재까지 유방암 환자 및 전립선암 환자 총 696명의 분석을 완료하여 코호트를 구축하였다. 상기 분석에 대해 현재까지 유방암 환자 및 전립선암 환자의 혈액 총 696명의 분석을 완료, 코호트 구축이 완료됨을 확인하였다.

[0241] 실시예 4. 단핵구성 골수유래 억제세포의 임상연구

[0242] 실시예 3에서 구축한 유세포분석 방법을 토대로 암환자의 혈액에 존재하는 단핵구성 골수유래 억제세포를 분석하여 임상적 진단적 가치를 평가하였다. 전체 분석한 세포 수(%)를 골수유래 억제세포 전체 (CD45+CD11b+ 세포), CCR2+ 단핵구성 골수유래 억제세포 (CD14+CCR2+ 세포)에 대해 각각 분석수치를 비교 분석하였다.

[0243] 이와 더불어 해당 암환자의 전이 여부를 조사하여 골전이 환자, 다른 장기 전이 환자, 비전이 환자 그룹으로 분류하고 각 그룹당 세포 수를 비교 분석하였다. 그 중, 골전이 및 다른 장기 전이 환자와 비전이 환자 그룹 간 비교 분석 결과 CCR2+ 단핵구성 골수유래 억제 세포수를 유의미하게 분석함에 따라 임상적 진단 가치를 증명하였다. 해당 결과는 도 8 및 표 5에 나타내었다.

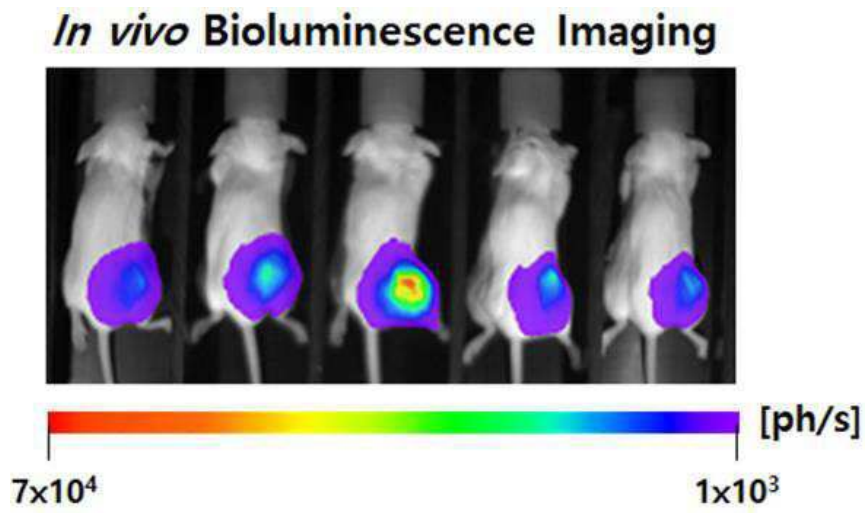
표 5

CCR2+ CD14+ M-MDSC	골전이 환자	전이 없는 환자
	6.63%	4.51%
	6.18%	4.04%
	6.14%	3.26%

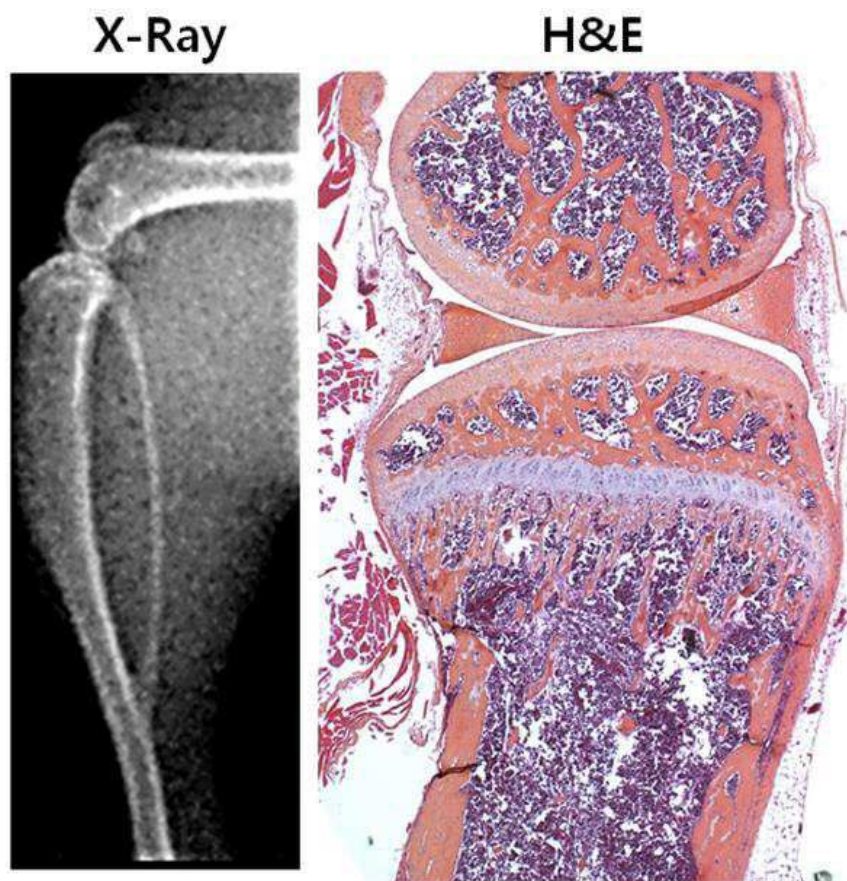
[0246] 도 8 및 표 5에서 확인할 수 있듯이, 전이 그룹과 비전이 그룹을 비교하여 CCR2+ 단핵구성 골수유래 억제세포를 분석한 결과 전이 그룹에서 뚜렷하게 높은 %를 보임에 따라 골 전이 병변에 대한 진단적 가치가 있음을 평가할 수 있었다.

도면

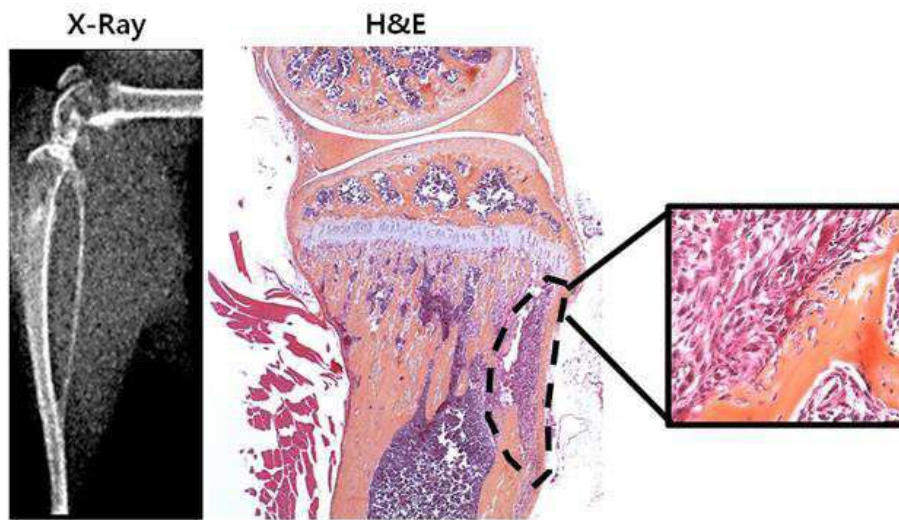
도면1



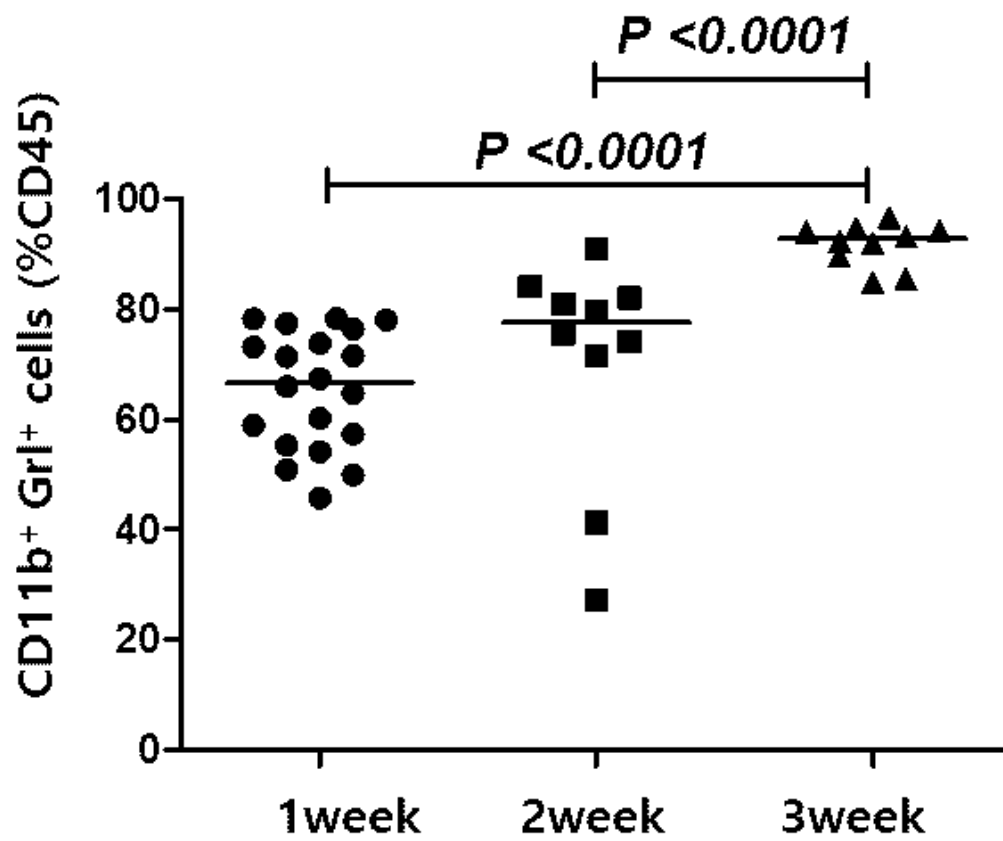
도면2



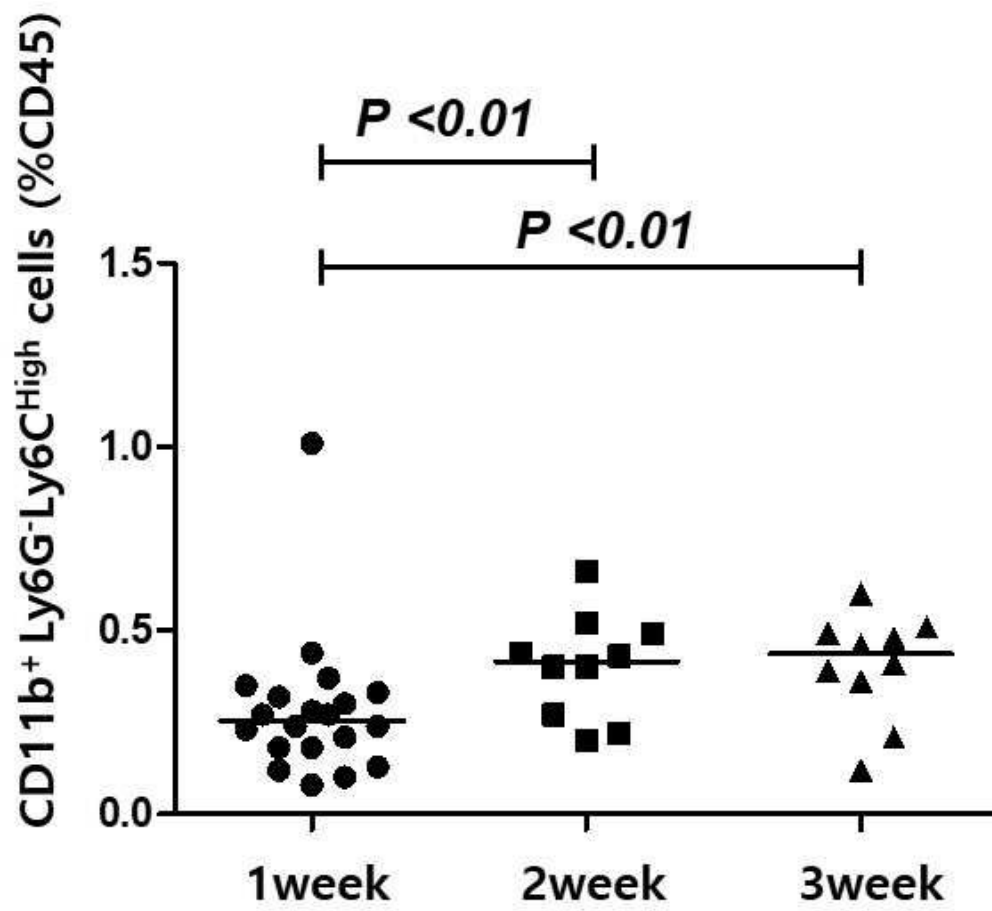
도면3



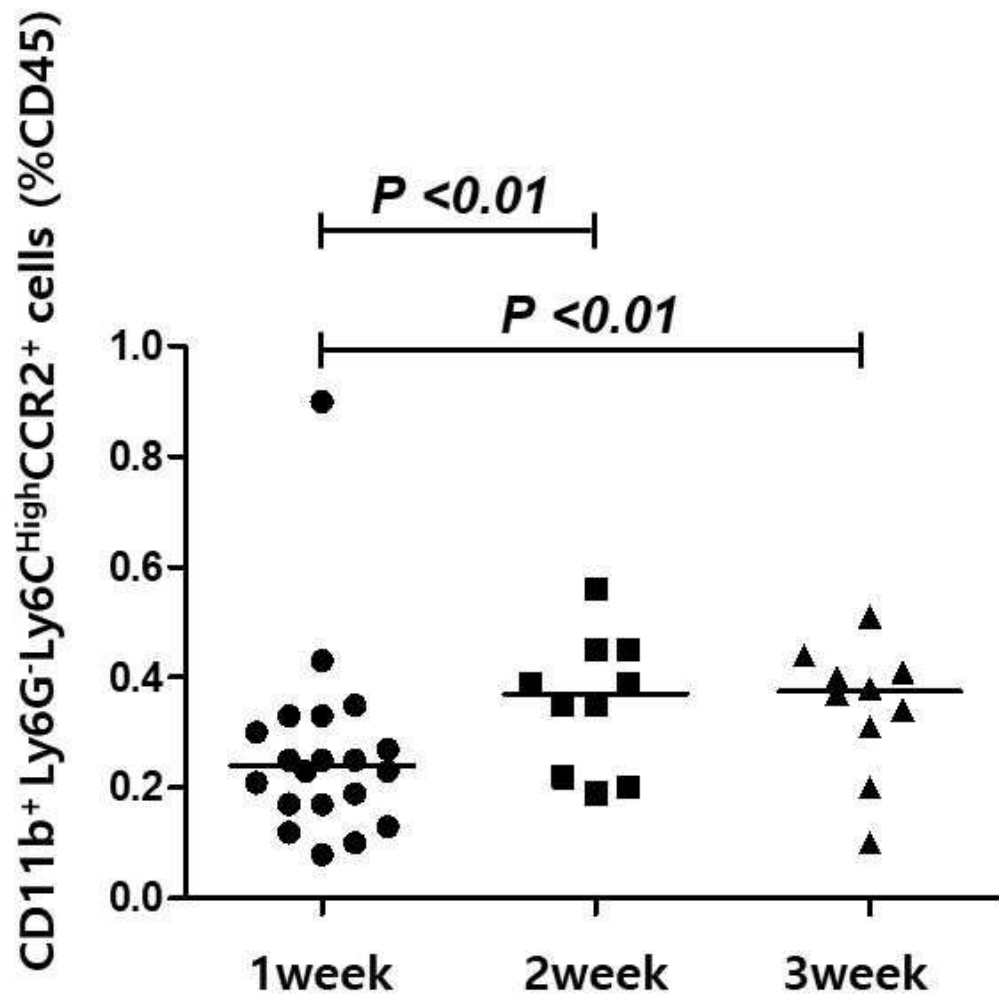
도면4



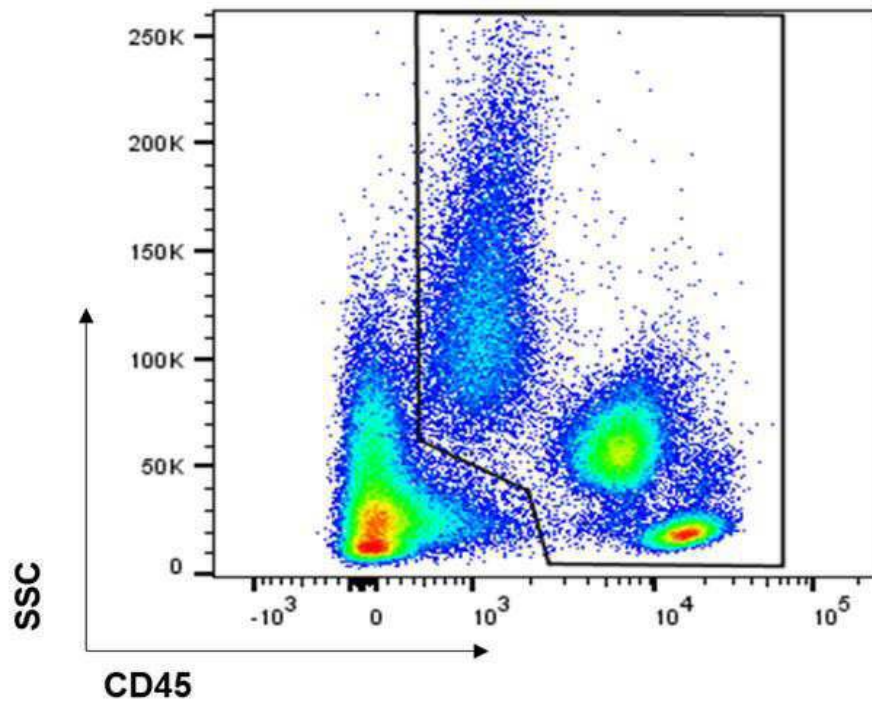
도면5



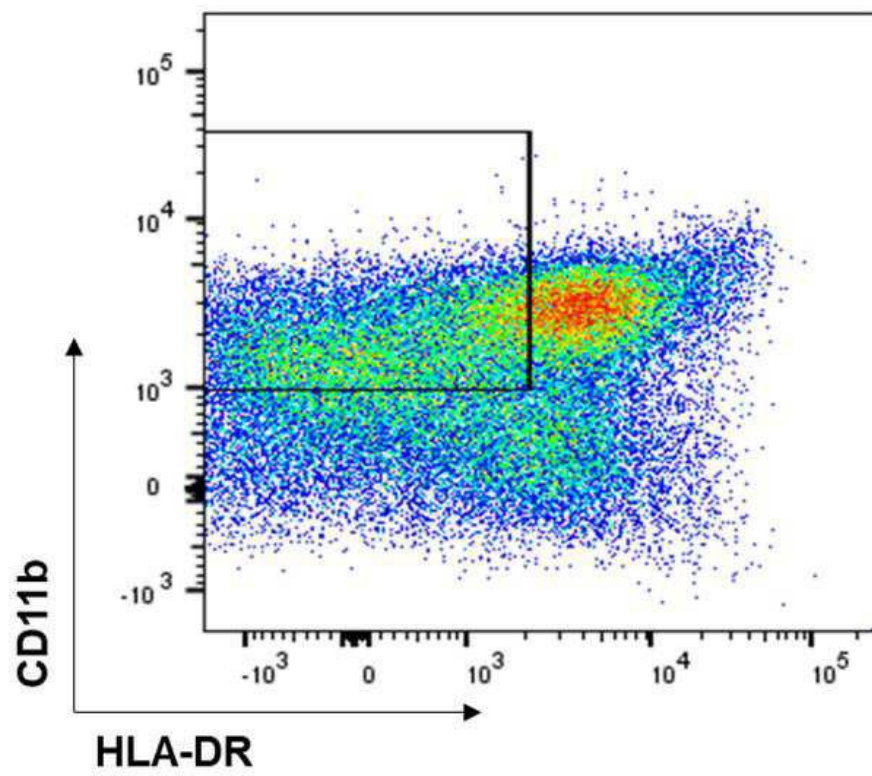
도면6



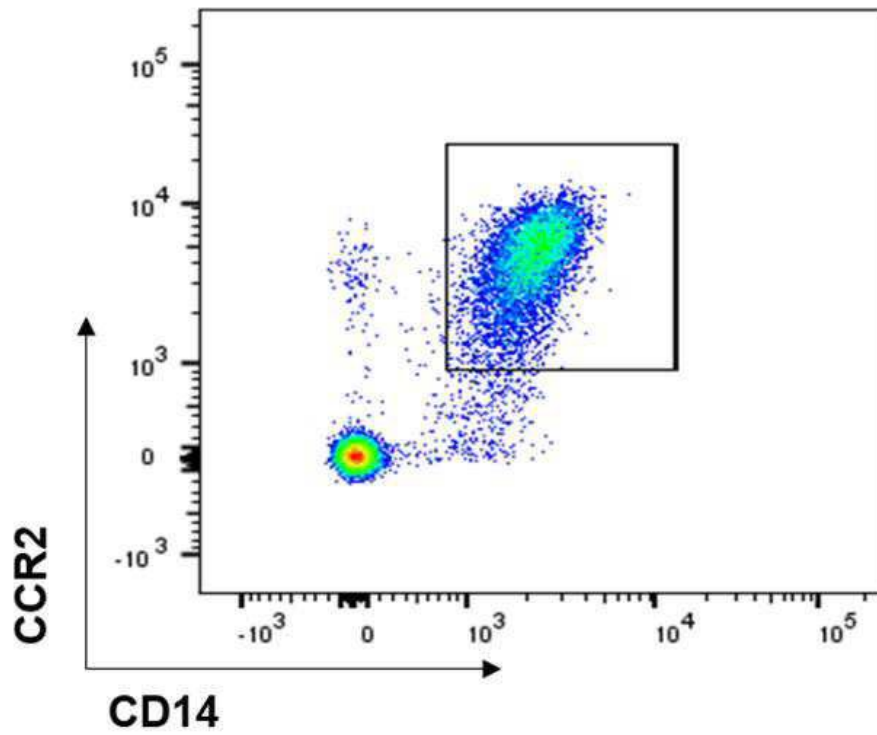
도면7a



도면7b



도면7c



도면8

