



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0071914
(43) 공개일자 2025년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/09 (2010.01) C12N 5/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0693 (2013.01)
C12N 5/0081 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-0062844(분할)
(22) 출원일자 2025년05월14일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2021-0070348
원출원일자 2021년05월31일
심사청구일자 2021년07월08일
(30) 우선권주장
1020200065466 2020년05월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이승진
서울특별시 영등포구 국제금융로 86 (여의도동, 롯데캐슬 아이비) 101동 3303호
김희정
경기도 성남시 분당구 별말로30번길 32, 916동 406호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 혈중암세포의 분리 및 배양방법

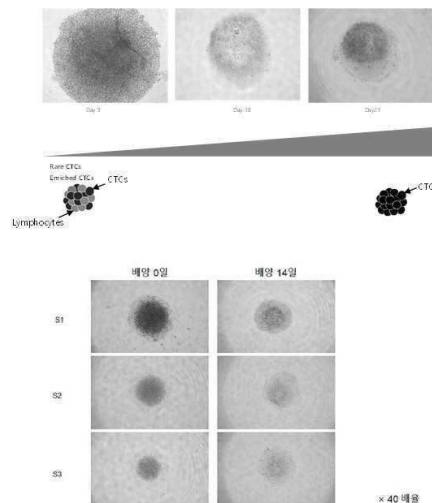
(57) 요약

본 발명은 혈중암세포의 분리 및 배양방법; 및 상기 분리 및 배양방법을 통해 수득한 혈중암세포를 이용하여 폐암을 진단하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 혈중암세포의 분리 및 배양방법에 의할 경우, 3차원 배양을 통하여 혈중암세포의 생존율을 증가시키고, 혈액 내 일반세포의 비율은 감소시킴으로서, 높은 수득율로 혈액 내 미량으로 존재하는 혈중암세포를 수득할 수 있다.

또한, 이러한 방법에 의하여 수득한 혈중암세포를 이용하여 폐암의 진단, 재발 및 전이 예측 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/57423 (2019.01)
G01N 33/57492 (2013.01)
C12N 2501/11 (2013.01)
C12N 2501/33 (2024.08)
C12N 2501/998 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)
C12N 2509/10 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)
G01N 2333/70589 (2013.01)

한민아

서울특별시 마포구 새창로 52 (도화동, 도화동현대
아파트) 111동 402호

(72) 발명자

이지수

충청남도 천안시 서북구 부성6길 11 (두정동, 한성
아파트) 101동 1406호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103746
과제번호	2018M3A9A7054957
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	혈중암세포의 생물학적 특성 규명을 통한 폐암의 재발 및 전이 예측
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 개체의 혈액시료를 수득하는 단계;
- (b) 상기 혈액시료로부터 피콜농도 구배법(Ficoll gradient)에 의해 버피코트(buffy coat)층을 분리 및 수득하여 혈장 및 적혈구를 제거하는 단계;
- (c) 상기 (b)단계에서 수득된 혈액을 3차원 배양시키는 단계; 및
- (d) 상기 배양된 시료로부터 혈중암세포(circulating tumor cells: CTC)를 분리하는 단계를 포함하는, 혈중암세포의 분리 및 배양방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (c)단계의 배양은 EGF(epidermal growth factor), 인슐린(insulin), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 에탄올아민(ethanolamine), 포스포에탄올아민(phosphoethanolamine), BPE(bovine pituitary extract), 트랜스페린(transferrin), 트리요오드티로닌(triiodothyronine), 아셀렌산나트륨(sodium selenite) 및 FBS(fetal bovine serum)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 배지에 의한 것인, 혈중암세포의 분리 및 배양방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (c)단계의 배양은 세포부착억제 배양용기에 1×10^1 내지 1×10^8 cells/200ul의 밀도로 파종하여 배양하는 것인, 혈중암세포의 분리 및 배양방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (c)단계의 배양은 30 내지 40℃의 온도, 1 내지 10% CO₂ 조건에서 1일 내지 21일간 배양하는 것인, 혈중암세포의 분리 및 배양방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (c)단계의 배양은 단핵구세포(PBMC) 수의 감소 대비 혈중암세포의 수의 증가에 따라 3차원 배양된 배양액 내의 단핵구세포 대비 혈중암세포의 비율이 증가하게 되는 것인, 혈중암세포의 분리 및 배양방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (d)단계의 혈중암세포의 분리는 혈중암세포의 표면 마커에 의한 것인, 혈중암세포의 분리 및 배양방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 마커는 상피마커(epithelial markers), 간엽마커(mesenchymal markers), be-ta-

catenin, cadherin-11, GSK-3 beta, MMP2, SUMO2, Twist-1, ZEB1 및 CD45로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 혈중암세포의 분리 및 배양방법.

청구항 8

제1항 내지 7항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 분리 및 배양된 혈중암세포.

청구항 9

제8항의 분리 및 배양된 혈중암세포를 분석하는 단계를 포함하는, 폐암의 진단을 위한 정보의 제공방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 혈중암세포의 분석은 CTC의 수준; 및 eCTC (epithelial CTC), emCTC (epithelial/mesenchymal CTC) 또는 mCTC (mesenchymal CTC)의 수준을 측정하는 방법에 의한 것인, 폐암의 진단을 위한 정보의 제공방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 혈중암세포의 분석은 CTC, eCTC, emCTC, mCTC의 수준을 측정하는 방법에 추가적으로 CTC의 형태학적 분석을 포함하여 이루어지는 것인, 폐암의 진단을 위한 정보의 제공방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 폐암은 소세포폐암, 비소세포암 또는 혼합성 대소세포암인 것인, 폐암의 진단을 위한 정보의 제공방법.

청구항 13

제8항의 분리 및 배양된 혈중암세포를 분석하는 단계를 포함하는, 폐암의 재발 또는 전이를 예측하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈중암세포의 분리 및 배양방법; 및 상기 분리 및 배양방법을 통해 수득한 혈중암세포를 이용하여 폐암을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 혈중암세포 (circulating tumor cells, CTCs)는 일차 종양 (primary tumor cells) 으로부터 분리되어 혈액을 따라 신체를 순환하는 세포로 암이 타 장기로 전이되는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 원발 종양으로의 특성을 지니고 있어 혈중암세포의 검출과 분석은 암의 진단과 치료에 도움을 줄 것으로 예상된다.

[0004] 하지만 혈중암세포는 혈액에 매우 드물게 존재하여 환자의 혈액에서 혈중암세포의 검출과 분석하는 기술 개발은 활발히 진행되고 있다.

[0005] 다만, 기존의 알려진 특이 항체를 이용하는 면역친화도(immunoaffinity) 차이 기반 분리 방법과 혈중암세포와

혈구세포 크기, 밀도, 전기적 특성 등 물리적인 성질의 차이를 이용하는 방법의 경우 혈중암세포의 수득율이 낮다는 문제점이 있었다. 예를 들어, 상피 암세포의 상피세포 접착분자(Epithelial cell adhesion molecule : EpCAM "CD326")에 대한 단클론 항체를 고정화한 자기비드를 이용하고, 시료 중의 CTC의 상피세포 접착분자(EpCAM)을 표적으로서 결합시켜 표지화된 CTC를 검출하는 방법, 자성비드와 광열효과를 이용한 순환종양세포의 포획 방법(국내공개출원 제 10-2013-0010766호)에 대한 연구가 된 바 있다.

[0006] 따라서, 본 발명자들은 환자의 혈액에서 직접 피콜농도구배법(ficoll gradient)을 통하여 분리된 버피코트(buffy coat)를 3차원적인 배양을 통해, 혈액 내에 미량으로 존재하는 혈중암세포를 다른 세포(leukocytes, platelets 등)로부터 분리하여 수득율을 증가시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 개체의 혈액시료로부터 피콜농도 구배법(Ficoll gradient)에 의해 버피코트(buffy coat)층을 분리 및 수득하여 혈장 및 적혈구를 제거하는 단계; 및 3차원 배양 단계; 혈중암세포를 분리하는 단계를 포함하는, 혈중암세포의 분리 및 배양방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 분리 및 배양된 혈중암세포를 분석하는 단계를 포함하는 폐암의 진단을 위한 정보의 제공방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 분리 및 배양된 혈중암세포를 분석하는 단계를 포함하는, 폐암의 재발 또는 전이를 예측하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 개체의 혈액시료로부터 혈장 및 적혈구를 제거하는 단계; 및 3차원 배양 단계; 혈중암세포를 분리하는 단계를 포함하는, 혈중암세포의 분리 및 배양방법을 제공한다.

[0015] 구체적으로, 혈중암세포의 분리 및 배양 방법은

[0016] (a) 개체의 혈액시료를 수득하는 단계;

[0017] (b) 상기 혈액시료로부터 피콜농도 구배법(Ficoll gradient)에 의해 버피코트(buffy coat)층을 분리 및 수득하여 혈장 및 적혈구를 제거하는 단계;

[0018] (c) 상기 (b)단계에서 수득된 혈액을 3차원 배양시키는 단계; 및

[0019] (d) 상기 배양된 시료로부터 혈중암세포(circulating tumor cells: CTC)를 분리하는 단계를 포함하는, 혈중암세포의 분리 및 배양방법.

[0020] 를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 용어, "혈중암세포(circulating tumor cells, CTCs)"또는 순환종양세포는 일차 종양(primary tumor cells) 으로부터 분리되어 혈액을 따라 신체를 순환하는 세포를 의미하는 것으로, 암이 타 장기로 전이되는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0022] 본 발명에 있어서 상기 혈중암세포는 eCTC (epithelial CTC), emCTC (epithelial/mesenchymal CTC) 또는 mCTC (mesenchymal CTC)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 상기 eCTC (epithelial CTC)는 상피세포의 특징을 가지는 CTC, mCTC(mesenchymal CTC)는 간엽세포의 특징을 가지는 CTC, emCTC (epithelial/mesenchymal CTC)는 상기 두 세포의 특징을 모두 가지는 CTC를 의미하는 것 일

수 있다.

- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 혈중암세포의 분리 및 배양방법에 의할 때 3차원 배양을 통하여 혈중암세포의 생존율을 증가시키고, 일반세포 또는 면역세포의 비율은 감소시킴으로서, 높은 수득율로 혈중암세포를 수득할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 분리 및 배양된 혈중암세포 중 eCTC (epithelial CTC), emCTC (epithelial/mesenchymal CTC) 또는 mCTC (mesenchymal CTC)의 정량적 수준의 측정을 통해 폐암의 진단이 가능함을 확인하였으며, 폐암의 전이 및 재발의 예측이 가능함을 확인할 수 있었다.
- [0026] 본 발명의 용어, "개체"는 암이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 양식어류 등을 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 혈액시료로부터 혈장 및 적혈구를 제거하는 단계는 혈액시료를 피콜농도 구배법(Ficoll gradient)에 의해 버피코트(buffy coat)층을 분리 및 수득하는 방법에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니고, 당업계에서 사용될 수 있는 버피코트의 분리 및 수득방법에 의할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 피콜농도구배법에 의해 종전의 사용하였던 면역적 친화도를 이용한 방법 또는 암세포의 혈구세포 크기, 밀도, 전기적 특성 등 물리적 성질의 차이를 이용한 분리방법 대비 비교적 간단한 방법에 의해 혈중암세포의 분리가 가능함을 확인할 수 있었다.
- [0031] 또한, 본 발명에 있어서 상기 (c)단계의 3차원 배양은 EGF(epidermal growth factor), 인슐린(insulin), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 에탄올아민(ethanolamine), 포스포에탄올아민(phosphoethanolamine), BPE(bovine pituitary extract),
- [0032] 트랜스페린(transferrin), 트리요오도티로닌(triiodothyronine), 아셀렌산나트륨(sodium selenite) 및 FBS(fetal bovine serum)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 배지에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니며 통상 세포의 배양에 사용되는 물질을 포함할 수 있음은 자명하다.
- [0033] 상기 배지는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 또는 Keratinocyte-SFM (Keratinocyte serum free medium)을 사용할 수 있고, 다른 예로서, D-media(Gibco)를 사용할 수 있다.
- [0034] 상기 배지는 다양한 종류의 첨가제를 추가로 포함할 수 있는데, 일 예로서, 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염), 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민), 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물), 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β -메르캅토에탄올 등을 첨가제로서 사용할 수 있다. 아울러, 세포의 유착 등을 방지하기 위하여, 항응집제(anti-clumping agent)를 첨가제로서 사용할 수도 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 (c)단계의 배양은 세포부착억제 배양용기에 1×10^1 내지 1×10^8 cells/200ul의 밀도로 파종하여 배양하는 것일 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 (c)단계의 배양조건은 30 내지 40℃의 온도, 1 내지 10% CO₂ 조건에서 1일 내지 21일간 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 배양단계에 추가적으로 계대배양을 통해 사멸된 세포의 조직파편들(debris)를 제거하여 스페로이드(spheroid)내 살아있는 세포의 비율을 증가시켜 혈중암세포의 수득율을 증가시킬 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 배양은 단핵구세포 수의 감소 대비 혈중암세포의 수의 증가에 따라 3차원 배양된 배양액 내의 단핵구세포 대비 혈중암세포의 비율이 증가하게 되는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 용어, "단핵구세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)"는 둥근 핵을 가진 말초 혈액 세포로 림프구(T 세포, B세포, NK세포)와 단핵구로 구성될 수 있으며, 림프구가 PBMC 집단의 대부분을 구성하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에서는 3차원 배양법을 통하여 배양 0일에 비해 배양 14일에 혈중암세포(CTC)의 수가 증가

됨을 확인할 수 있었고, 단핵구세포(PBMC)의 수는 감소하여 배양 0와 14일의 CTC:PBMC 값이 증가됨을 확인할 수 있었다(도 2).

- [0040] 상기 결과로서 혈액 내 미량으로 존재하는 혈중암세포의 생존율을 증가시킬 뿐만 아니라 혈중암세포의 비율 증가로 혈중암세포가 대부분으로 이루어진 3차원 배양된 스페로이드의 수득이 가능함을 확인하였다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 (d)단계의 혈중암세포의 분리는 혈중암세포의 표면 마커에 의할 수 있으며, 상기 마커는 상피마커(epithelial markers), 간엽마커(mesenchymal markers), be-ta-catenin, cadherin-11, GSK-3 beta, MMP2, SUMO2, Twist-1, ZEB1 및 CD45로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 이때, 상기 상피마커는 Collage IV alpha 1, CK(pan-cytokeratin), E-cadherin, Laminin, Desmoflein-3, MUC01 및 Syndecan-1로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 상기 간엽마커는 EpC(EpCAM), VT(vimentin), alpha-SMA, Fibronectin, N-cadherin, Snail, Slug 및 S100A4로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나 이제 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 상기 혈중암세포의 분리 및 배양방법에 의할 경우, 3차원 배양(Spheroid culture)을 통하여 혈중암세포의 생존율을 증가시키고, *ex vivo*에서 배양하기 위한 최적의 세포 배양액을 이용함으로써, 세포를 배양과정을 통해 단핵구세포와 같은 일반세포의 비율은 감소시키고 혈중암세포가 대부분으로 이루어진 스페로이드(spheroid)의 형성이 가능하게 함으로써, 혈중암세포의 수득율을 효과적으로 증가시킬 수 있다는 데에 특징이 있다.
- [0047] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 방법에 의하여 분리 및 배양된 혈중암세포를 제공한다.
- [0049] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 분리 및 배양된 혈중암세포를 분석하는 단계를 포함하는, 폐암의 진단을 위한 정보의 제공방법을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 용어, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0051] 본 발명의 용어, "폐암"은 폐에서 시작되는 암으로써, 대부분은 기관지 안쪽에서 시작되지만 폐의 다른 부분에서도 시작될 수 있다. 먼저 폐에서 전암성 변화가 발생하며 시간에 따라 이러한 전암성 부위가 진행하여 암이 될 수 있는데, 폐암으로 발전하기까지는 수년이 걸리기도 한다. 다른 부위에서 발생하는 암과 마찬가지로 폐암 세포는 폐에서 분리되어 나가 혈관이나 림프관 등을 통해 다른 조직으로 전이될 수 있다. 폐암은 크게 두 종류로 구분되며 서로 다르게 치료된다. 상기 두 가지 종류는 소세포폐암(small cell lung cancer; SCLC)과 비소세포폐암(non-small cell lung cancer; NSCLC)이며, 이 두 가지의 특징을 모두 가진 경우를 혼합성 대소세포암(mixed small cell/large cell cancer)이라 한다.
- [0052] 본 발명에서 상기 폐암은 소세포폐암, 비소세포암 또는 혼합성 대소세포암일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 용어 "소세포폐암"은 전체 폐암의 10 내지 15%를 차지하는 것으로 "귀리세포암종" 또는 "소세포성 미분화암종"이라고도 한다. 흉부 중앙에 위치하는 기관지에서 시작되는 경우가 많다. 암세포는 작지만 빠르게 증식하여 전신으로 전이되어 큰 종양을 형성할 수 있다. 소세포폐암의 경우는 항암제 치료에 반응을 보이는 비율을 나타내는 관해율이 60 내지 80%로 비교적 높고 수술용법의 적용중에 대한 논란이 많아 외과적 수술로 제거하는 경우는 드물고 주로 항암화학요법을 이용하며 방사선 치료를 병용하기도 한다. 그러나, 항암화학요법을 반복적으로 수행하다 보면 암세포가 해당 항암제에 대한 내성을 갖게 되어 약효를 나타내지 못하는 경우가 발생하고 이러한 경우, 다른 약물로 바꾸어 투여하게 된다. 따라서, 불필요한 시행착오를 줄이고 환자에 적합한 약물을 선별하기 위하여 환자 특이적인 약물 스크리닝 방법이 요구된다.

- [0054] 한편, 본 발명의 용어 "비소세포폐암"은 전체 폐암의 80 내지 90%를 차지하는 것으로, 세포의 크기, 모양 및 화학적 구성에 따라 "편평세포암종(squamous cell carcinoma)", "대세포암종(large cell carcinoma)" 또는 "선암종(adenocarcinoma)"의 세 종류로 구분될 수 있다. 먼저, 편평세포암종은 전체 폐암의 약 25 내지 30%에 해당하는 것으로 흡연과 관련있으며, 폐 중간의 기관지 가까이에서 발견되는 경향이 있다. 그리고, 대세포암종은 전체 폐암의 약 10 내지 15%에 해당하는 것으로 폐의 어느 부분에서도 시작될 수 있으며, 성장 및 전이가 빨라 치료하기 어렵다. 마지막으로 선암은 전체 폐암의 약 40%를 차지하는 것으로 일반적으로 폐의 외부에서 발견된다. 상기 비소세포폐암의 치료를 위해서는 수술이 가능한 경우 즉, 초기에는 치료 확률이 높으므로 수술을 시행하여 암조직 및 이와 인접한 전이 가능한 임파선 조직을 절제한다. 필요에 따라, 항암화학요법, 방사선 요법 등을 병용할 수 있다. 수술이 불가능한 경우 항암화학요법을 단독으로 수행하거나 방사선 요법과 병행하여 수행할 수 있다. 초기에 발견하여 수술로 암조직을 제거한 환자에서도 재발 방지를 위해 보조 항암화학요법을 시행할 수 있다. 소세포폐암과 마찬가지로 항암화학요법의 반복적인 수행은 항암제에 대한 내성을 야기하고 다른 약물로 바꾸어야 하는 경우가 발생한다. 따라서, 비소세포폐암의 경우에도 불필요한 시행착오를 줄이고 환자에 적합한 약물을 선별하기 위하여 환자 특이적 약물 스크리닝 방법이 요구된다.
- [0056] 본 발명에서 폐암의 진단을 위한 정보의 제공방법으로서, 상기 분리 및 배양된 혈중암세포의 분석은 CTC의 수준을 측정하는 방법에 의할 수 있고, 이와 더불어 eCTC (epithelial CTC), emCTC (epithelial/mesenchymal CTC) 또는 mCTC (mesenchymal CTC)의 수준을 측정하는 방법에 의할 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명의 목적상, 상기 방법은 상기 각 혈중암세포의 수준을 정량분석한 결과를 폐암 진단과 연관시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0058] 이때, 상기 연관시키는 단계는 상기 각 eCTC (epithelial CTC), emCTC (epithelial/mesenchymal CTC) 또는 mCTC (mesenchymal CTC)의 수준을 정량분석한 결과를 조합하여 수행될 수 있다.
- [0059] 즉, 암은 본래 상피세포의 특징을 가지고 있으나, 암세포는 침윤이나 전이될 때 상피세포로서의 형태나 주위 세포와의 세포접착기능을 상실하고 이동하여 다른 조직 내로 파고드는 능력을 얻는 상피간엽전환(EMT: epithelial-mesenchymal transition)이 생길 수 있으며, 본 발명에서는 이를 이용하여 상기 분리 및 배양된 eCTC, mCTC 또는 emCTC의 정량 분석한 결과로서, 상기 각 CTC의 정량분석한 결과를 조합하여 분석함으로써, 보다 정확하게 폐암의 진단, 전이성 여부를 판별 및 각 단계의 예측이 가능할 수 있다.
- [0060] 이때, 상기 각 CTC의 정량분석한 결과를 조합하여 분석하는 방법으로는 통상적인 통계분석방법을 사용할 수 있으며, 이때 사용될 수 있는 통계분석방법은 폐암을 진단할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는다.
- [0061] 본 발명에서의 일 실시예에서는, 상기 분리 및 배양된 eCTC, mCTC 또는 emCTC의 수준을 정량적 분석하여, 비소세포폐암 전이성 환자에서 eCTC 및 mCTC의 합이 증가하는 경향을 확인할 수 있었고, 각 단계가 증가될 때 마다 CTC가 다량 검출됨을 확인하였다.
- [0062] 또한, 소세포폐암환자 ED 단계의 그룹에서 eCTC 및 mCTC의 합이 증가하는 경향을 확인하여, 본원 방법에 의해 분리 및 배양된 혈중암세포에 의해 폐암의 진단이 가능함을 알 수 있었다.
- [0063] 더불어, 전이성폐암과 비전이성 폐암환자의 구별이 가능하고 각 단계의 구별 또한 가능하여 폐암의 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0065] 본 발명에서 폐암의 진단을 위한 정보의 제공방법은, 상기 CTC, eCTC, emCTC, mCTC의 수준을 측정하는 방법에 추가적으로 CTC의 형태학적 분석을 포함하여 이루어지는 것일 수 있다.
- [0066] 본 발명의 일 실시예에서는, 본원 방법에 의해 분리 및 배양된 CTC의 형태학적 분석을 실시하였으며, 그 결과 CTC의 표면마커 분석을 통한 상기 CTC의 수준의 정량분석과 형태학적 분석의 결과를 병용한 검사법이 폐암의 예후를 예측하는 데 유용함을 확인하였다.
- [0067] 일 구체예로, 상기 형태학적 특성은 세포의 형태, 클러스터(cluster)를 이루는지 여부 또는 분열(mitosis)하는 세포의 수로 판단할 수 있으며, 상기 세포의 형태는 둥근 형태(intact round) 또는 긴 형태(intact elongate d)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 구체적으로, eCTC이면서 둥근형태를 지닌 CTC에서 생존곡선 이하 면적이 0.854로 가장 유용한 검사법으로 확인

되었고, mCTC이면서 둥근형태인 CTC는 0.896, emCTC이면서 둥근형태인 것은 0.833으로 확인되었고, eCTC이면서 cluster를 이루는 CTC의 경우 0.813으로 확인되어 cluster를 이룬 CTC의 수는 예후예측에 유의한 인자로 확인할 수 있었다. 또한, eCTC이면서 분열하는 (mitosis) 세포의 수는 생존곡선 이하 면적이 0.75로 예후 예측에 유의한 인자로 확인할 수 있었고, eCTC 또는 mCTC이면서 긴 형태를 나타내는 CTC의 생존곡선 이하 면적은 0.625로 둥근 형태인 것보다 낮았으나, 0.5이상의 면적을 나타내어 유의한 검사법임을 확인할 수 있었다.

- [0069] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 분리 및 배양된 혈중암세포를 분석하는 단계를 포함하는, 폐암의 재발 또는 전이를 예측하는 방법을 제공한다.
- [0071] 구체적으로, 환자의 혈액으로부터 상기 분리 및 배양방법에 의해 수득된 혈중암세포의 종류 및 수준을 측정하여 폐암의 재발 가능성 또는 전이성 폐암 여부를 예측할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 일 실시예에서 상기 분리 및 배양된 혈중암세포 중 eCTC 및 mCTC의 수준을 정량적 분석한 결과, 상기 두 CTC의 합이 증가하는 경우 폐암의 재발 또는 전이성 폐암으로 예측이 가능함을 확인할 수 있었다.
- [0073] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 분리 및 배양된 혈중암세포의 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 폐암의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0074] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 분리 및 배양된 혈중암세포의 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 폐암의 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0075] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 폐암을 진단하기 위한 상기 분리 및 배양된 혈중암세포의 용도를 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [0078] 본 발명의 혈중암세포의 분리 및 배양방법에 의할 경우, 3차원 배양을 통하여 혈중암세포의 생존율을 증가시키고, 혈액 내 일반세포의 비율은 감소시킴으로서, 높은 수득율로 혈액 내 미량으로 존재하는 혈중암세포를 수득할 수 있다.
- [0079] 또한, 이러한 방법에 의하여 수득한 혈중암세포를 이용하여 폐암의 진단, 재발 및 전이 예측 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0081] 도 1은 본 발명의 방법에 의해 배양된 세포의 사진이다.
- 도 2는 본 발명의 3차원 배양을 통한 혈중암세포(CTC) 및 단핵구세포(PBMC)의 비율을 측정한 결과이다.
- 도 3은 혈중암세포에 대한 모식도이다.
- 도 4는 혈중암세포에 대한 세포사진이다.
- 도 5는 비전이성 및 비전이성 비소세포폐암환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.
- 도 6은 비전이성 및 비전이성 비소세포폐암환자의 폐암환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.
- 도 7은 비전이성 및 비전이성 비소세포폐암환자의 폐암환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.
- 도 8은 비전이성 및 비전이성 비소세포폐암환자의 폐암환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.
- 도 9는 비전이성 및 비전이성 비소세포폐암환자의 폐암환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.
- 도 10은 각 단계별 비소세포폐암 환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.
- 도 11은 각 단계별 비소세포폐암 환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.

도 12는 각 단계별 비소세포암 환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.

도 13은 각 단계별 비소세포암 환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.

도 14는 확장기(extensive disease(ED)) 및 제한기(limited disease (LD)) 소세포암환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.

도 15는 확장기(extensive disease(ED)) 및 제한기(limited disease (LD)) 소세포암환자의 혈중암세포 이미지 분석 결과이다.

도 16는 소세포암환자의 혈중암세포의 수와 형태학적 특징에 따른 생존곡선의 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0084] 실시예 1. 버피코트(buffy coat)의 분리

[0086] 중앙보훈병원으로부터 전달받은 혈액 시료 (10 ml)는 혈액응고 방지하기 위해 항응고제인 EDTA가 포함되어 있는 vacutainer에 수집되었으며, shaker에 올려 flow를 실험 시작 전까지 유지하였다. clean bench로 혈액 시료를 옮겨 두 개의 15ml conical tube에 나눠 담았다. swing bucket rotor가 장착된 tabletop centrifuge를 이용하여 혈장과 혈구로 분리하였다 (500 rpm, 20 분). 분리된 혈장 중 3 ml은 따로 모아 -70℃ deep freezer에 보관하였고 혈장을 제외한 나머지 시료는 2% FBS in DPBS와 1:1로 섞었다. 새로운 15 ml conical tube 2개에 Ficoll-Paque PLUS 용액을 3 ml를 넣고 2% FBS in DPBS와 1:1로 섞인 혈액 시료를 Ficoll-Paque PLUS 용액 위에 섞이지 않도록 서서히 흘려 넣었다. 이 후, swing bucket rotor가 장착된 tabletop centrifuge를 이용하여 buffy coat를 분리하였다 (4000 rpm, 30 분). 2% FBS in DPBS 가 포함된 상등액을 제거하고 buffy coat층을 15 ml conical tube에 옮겼다. 3 ml 2% FBS in DPBS를 추가한 뒤 10 번 pipetting 하였다. 순도 높은 buffy coat를 얻기 위해 5 분간 2000 rpm으로 원심 분리를 하였다. 상등액은 제거하고 pallet에 4 ml serum-free cryopreservation media를 넣은 후 pipetting하여 pallet을 풀었다. 풀어진 세포는 4개의 cryovial에 분주한 뒤 Mr. Frosty™ Freezing Container에 넣어 -70℃ deep freezer에 하루간 보관하였고 LN₂ tank로 이동하여 다음 실험 전까지 장기 보관하였다.

[0088] 실시예 2. 혈중암세포(Circulating tumor cells)의 배양

[0090] LN₂에 보관했던 cryovial를 꺼내어 37℃ water bath에 넣어 빠르게 해동한 뒤, cryovial의 내용물을 15 ml conical tube에 넣어 200 Xg으로 5분 동안 원심 분리하였다. 상등액을 제거한 후 1 ml의 배양액을 넣어 pallet를 풀어준 뒤, Countess™ II automated cell counter을 이용하여 PBMCs의 수를 측정하였다. 9 ml의 혈중암세포 배양액을 첨가한 뒤 pipetting 하여 suspension 상태로 만들었다. 96 wells ultra-low attachment plate에 well 당 200 μl씩 균일하게 파종한 뒤, 37℃, 5% CO₂ incubator에서 14 일간 배양하였다. 배양 7 일 후, 1 ml pipette을 이용하여 96 wells ultra-low attachment plate에 파종된 cell과 media를 모두 수득한 뒤 200 Xg으로 5분 동안 원심 분리하였다. 상등액을 제거한 후 9.6 ml의 배양액을 넣어 suspension 상태로 만들고 새로운 96 wells ultra-low attachment plate에 well당 200 μl씩 균일하게 계대하였다. 배양 14일 후, 1 ml pipette을 이용하여 96 wells ultra-low attachment plate에 계대한 cell과 media를 모두 수득한 뒤 200 Xg으로 5분 동안 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 pallet에 1 ml serum-free cryopreservation media를 넣어 pallet을 풀었다. cell suspension을 1개의 cryovial에 옮긴 뒤 Mr. Frosty™ Freezing Container에 넣어 -70℃ deep freezer에 하루 동안 보관하였고 LN₂ tank로 이동하여 다음 실험 전까지 장기 보관하였다. 본 배양 실험에서는 세포 배양액 교환을 3일에 1번씩, 주 2회 교체하였다. 그리고 현미경을 이용하여 세포의 배양 과정을 관찰하였

고 배양 0일과 14일은 촬영하여 도 1에 도시하였다.

[0091] 또한, 본 발명의 Ficoll density gradient centrifugation 방법을 이용하여 폐암 환자의 혈액으로부터 세포를 분리한 후, 14일간 배양한 결과를 배양 0일과 14일의 혈중암세포(CTC)와 단핵구세포(PBMC: peripheral blood mononuclear cell)의 비율을 비교하여 CTC의 enrichment 정도를 확인하여 그 결과를 도 2에 도시하였다.

[0092] 상기 배양한 결과 도 1 및 도 2에서 확인할 수 있듯이, 3차원 배양법을 통하여 배양 0일에 비해 배양 14일에 혈중암세포(CTC)의 수가 증가됨을 확인할 수 있었고, 단핵구세포(PBMC)의 수는 감소하여 배양 0와 14일의 CTC:PBMC 값이 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0094] 실시예 3. 면역형광 분석(Immunofluorescence assay)

[0096] 혈중암세포의 성장 변화를 분석하기 위하여 buffy coat 분리 직 후 (배양 0일 차)과 14일에 Immunofluorescence assay를 하였다. 4가지 타입의 혈중암세포는 하기 표 1에 나타난 marker 조합을 이용하여 확인하였다. 하기 표 1의 CK는 pan-cytokeratin, EpC는 EpCAM, VT는 vimentin을 나타낸다.

표 1

Table 2. Definitions of eCTC, mCTC, and emCTC..

CTC types		CK	EpC	VT	DAPI	CD45
Epithelial CTC	eCTC (CK ⁺)	+	-	-	+	-
	eCTC (EpC ⁺)	-	+	-	+	-
Mesenchymal CTC	mCTC (VT ⁺)	-	-	+	+	-
Epithelial-Mesenchymal CTC	emCTC (EpC ⁺ , VT ⁺)	-	+	+	+	-

[0097]

[0098] 배양 2시간 후와 배양 14일에 96 wells ultra-low attachment plate 중 12 well에 파종된 cell과 media를 수득하여 200 Xg으로 5분 동안 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 pallet에 2.4 ml의 10% FBS in PBS를 넣어 pipetting하여 suspension 상태로 만들었다. 4개의 SuperfrostTM Plus glass slides에 Hettich cytospin chambers와 cytospin reservoir를 고정하여 한 구당 200 μ l씩 cell suspension을 넣었다. SuperfrostTM Plus glass slides에 세포를 부착하기 위해 Hettich Rotofix 32A Benchtop Centrifuge을 이용하여 1400 rpm으로 10분간 cytospin하였다. 부착된 세포 위에 100 μ l PBS와 1:1로 희석된 BD cytofixTM fixation buffer를 추가하였다. 10 분 후, 300 μ l의 PBST (0.01% Tween 20 in PBS)로 3번 반복 세척하였다. EpC+CD45, VT+CD45, EpC+VT의 조합의 glass slide에 200 μ l의 blocking buffer (10% FBS and 5% BSA in PBST)를 CK+CD45의 glass slide에는 200 μ l의 blocking and permeabilization buffer (0.2% Triton X-100, 10% FBS and 5% BSA in PBST)를 이용하여 1시간 동안 상온에서 blocking을 하였다. 300 μ l의 PBST로 3번 반복 세척한 후, 1시간 동안 상온에서 conjugated primary 항체와 incubation 하였다. 300 μ l의 PBST로 3번 반복 세척한 후, glass slide에 DAPI mounting medium 떨어뜨리고 microscope cover glass를 덮었다. 다음 날, microscope cover glass가 움직이지 않도록 투명 메니큐어로 고정한 후 fluorescence 현미경을 이용하여 세포를 관찰하였다. 표 2는 Conjugated primary항체의 희석 비율을 나타낸 것이다.

표 2

Green (FITC or Alexa-488)		Red (Alexa-594)	
CK	1:100	CD45	1:40
EpC	1:40	CD45	1:40
VT	1:40	CD45	1:40
VT	1:40	EpC	1:40

[0099]

[0101] 실시예 4. 혈중암세포의 판별 방법

[0103] Buffy coat 분리 직 후 (배양 0일 차) 와 배양 14일 후 각각 현미경을 이용하여 혈중암세포 이미지 (배율: X200)를 확보하였으며, 이를 활용하여 혈중암세포를 면역학적 방법으로 분석하여 혈중암세포의 유무를 판별하였다 (혈중암세포 표면 marker: EpCAM, Vimentin, Pan-cytokeratin - positive; leukocyte 표면마커: CD45 - negative).

[0105] 실시예 5. 혈중암세포 이미지 분석 및 통계처리

[0107] 폐암환자의 임상 정보 (암 환자의 재발/전이 등의 정보, CRF, clinical research form)와 위 판별 방법으로 확보된 혈중암세포 이미지 기반 세포 정보를 통계학적으로 비교 분석하였다. 사용된 혈중암세포 이미지는 전체 환자의 혈액 정보가 아니므로 통계적인 분석 방법을 도입하여 이를 비율적으로 보정하였으며, 각각의 환자의 샘플 별로 혈중암세포의 표면마커 및 형태에 따라 데이터를 분류하였다. 취득한 데이터를 활용한 혈중암세포 정보와 임상 정보의 결과를 바탕으로 연계 분석하여 재발 및 전이와의 관련성을 규명하였다. 예외적으로 임상 정보 중 환자의 유전체 변이 정보가 포함되어 있는 경우, 별도의 set으로 분류하여 개별 분석하였다. 상기 분석 결과는 도 5 내지 15에 도시하였다.

[0109] 도 5는 비소세포폐암(NSCLC) 비전이성 (M0: 평균, 122.2; 중앙값, 115.2) 환자의 총 CTC 수는 전이성 비소세포 폐암 환자 (M1: 평균, 385.1; 중앙값, 115.2)에 비해 더 낮음을 확인한 결과이다(결과는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차 (SEM)로 표시하였다). 통계적 유의성은 비모수 테스트 (두 그룹 간의 비교를 위한 Mann-whitney u 테스트)를 사용하여 결정되었고 차이는 p 값 <0.05 , <0.01 또는 <0.001 에서 유의한 것으로 간주하였다. 도 6은 전이성 및 비전이성 환자에서 eCTC 및 mCTC의 수를 비교한 결과 상기 도 5와 일치하는 경향임을 확인하였다.

[0111] 또한, 도 7 에서 볼 수 있듯이, 비소세포폐암(Non-small-cell lung carcinoma) 환자의 혈액에서 수득된 혈중암세포의 검출 결과, 비전이성 대비 전이성 환자에서 eCTC 및 mCTC의 합계가 급격하게 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0112] 또한, 전이성 환자와 비전이성 환자 간의 EMT CTC 하위 유형 분포를 비교하기 위해 총 CTC에서 각 하위 유형의 수를 분석한 결과로, 18명의 전이성 환자와 31명의 비전이성 환자를 포함하여 총 CTC가 있는 사례를 분석에 포함시켰다. EMT 분류에서 eCTC (EpC +) 및 mCTC의 평균은 비전이성 그룹에서 각각 49.7 및 46.25인 반면 eCTC (EpC +)와 mCTC의 평균은 전이성 그룹에서 각각 236.4와 137.96 로 확인하였다.

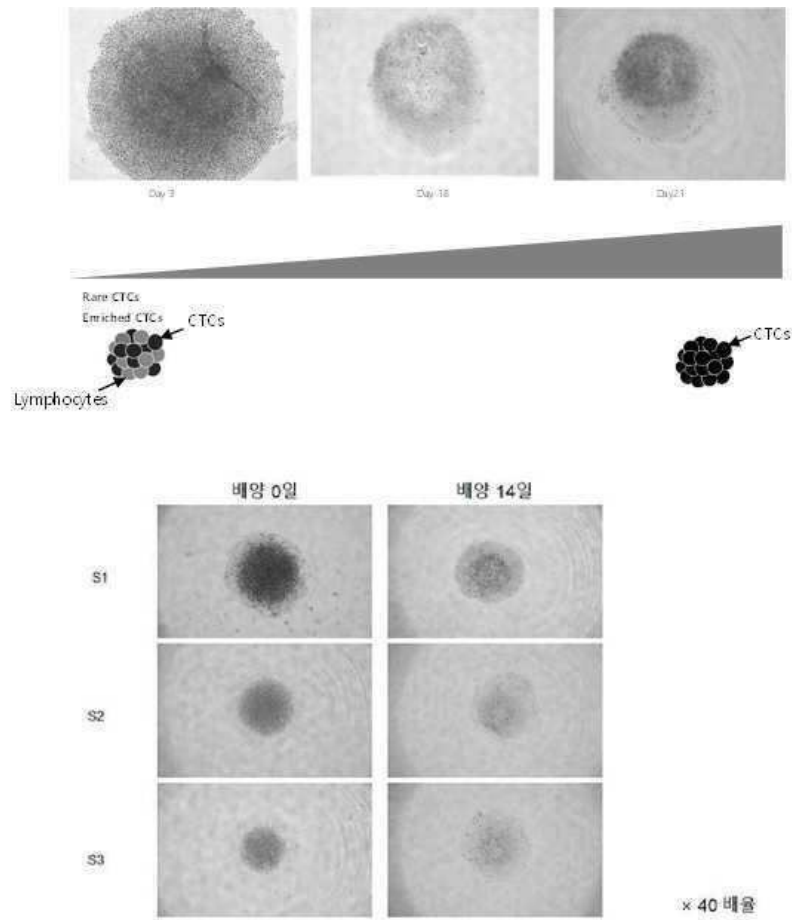
[0114] 도 8 역시 상기 도 7과 유사한 결과를 보여주는 것으로 eCTC 및 mCTC의 합계 및 총 CTC 를 전이성 및 비전이성

환자에서 비교한 것이고, 도 9은 총 CTC 를 전이성 및 비전이성 환자에서 비교한 결과이다.

- [0115] 도 10은 비소세포폐암 환자의 각 단계마다 양성 CTC와의 상관 관계를 나타낸 것으로, 단계 I, II, III 및 IV에 따른 NSCLC 환자의 평균 검출 감도는 혈액 4ml 당 96.7, 105.6, 180.6 및 385.1로 확인되었다. 도 11 내지 13는 비소세포폐암 환자의 각 단계마다 검출된 총 CTC, eCTC 및 mCTC를 나타낸 것이다.
- [0116] 도 14 및 15은 소세포암(Small- Cell Lung Cancer(SCLC))환자에서 확장기(extensive disease(ED)) 및 제한기(limited disease (LD))간의 CTC를 검출한 결과이다.
- [0117] 도 15에서 총 CTC 수는 중앙값이 6.4 (범위, 1.6-11.2; $p = 0.0051$)인 LD 환자보다 중앙값 124.0 (범위, 1.6-184.0)을 보인 ED SCLC 환자에서 더 높음을 확인하였고, LD와 ED 단계 환자 사이의 EMT CTC 하위 유형 분포를 비교하기 위해 총 CTC에서 각 하위 유형의 수를 분석한 결과, 6 명의 LD 단계 환자와 4 명의 ED 단계 환자를 포함하여 총 CTC가 있는 사례를 분석에 포함시켰다. 그 결과, EMT 분류에서 eCTC (EpC +) 및 mCTC의 평균은 LD 단계 그룹에서 각각 3.2 및 12.8 반면 eCTC (EpC +) 및 mCTC의 평균은 ED 단계 그룹에서 각각 227.2 및 176로 증가됨을 확인할 수 있었다.
- [0118] 도 16에서 emCTC, eCTC, mitotic emCTC, mitotic mCTC, apoptotic eCTC, intact-elongated eCTC, intact-elongated eCTC, intact-round emCTC, intact-round mCTC, intact-round eCTC의 민감도와 특이도를 계산하여 생존곡선을 그리고 곡선 아래면적이 가장 큰 intact-round CTC, emCTC 순으로 검사법이 유용함을 확인할 수 있었다.
- [0119] 구체적으로, eCTC이면서 둥근 형태를 지닌 CTC에서 생존곡선 이하 면적이 0.854로 가장 유용한 검사법임을 확인하였고, mCTC이면서 둥근 형태인 CTC는 0.896, emCTC이면서 둥근 형태인 것은 0.833으로 확인하였다. eCTC이면서 cluster를 이루는 CTC의 경우 0.813으로 확인되어 cluster를 이룬 CTC의 수는 예후예측에 유의한 인자로 확인할 수 있었다.
- [0120] eCTC이면서 분열하는 (mitosis) 세포의 수는 생존곡선 이하 면적이 0.75로 예후 예측에 유의한 인자로 확인할 수 있었으며, eCTC 또는 mCTC이면서 긴 형태를 나타내는 CTC의 생존곡선 이하 면적은 0.625로 둥근 형태인 것보다 낮았으나, 0.5이상의 면적을 나타내어 이 또한 유의한 검사법으로 확인할 수 있었다.
- [0122] 즉, 상기의 결과들로부터 비소세포폐암의 경우 전이성 환자에서 eCTC 및 mCTC의 합이 증가하는 경향을 확인할 수 있었고, 각 단계가 증가될 때 마다 CTC가 다량 검출됨을 확인하였다.
- [0123] 또한, 소세포폐암환자 또한 ED 단계 그룹에서 eCTC 및 mCTC의 합이 증가하는 경향을 확인하여, 본원 방법에 의해 분리 및 배양된 CTC에 의해 폐암의 진단이 가능함을 알 수 있다.
- [0124] 더불어, 전이성폐암과 비전이성 폐암환자의 구별이 가능하고 각 단계의 구별 또한 가능하여 폐암의 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0125] 또한, 본원 방법에 의해 분리 및 배양된 CTC의 형태학적 분석을 실시하였으며, 그 결과 CTC의 표면마커에 의한 정량적 수치 분석과 더불어 형태학적 분석의 결과를 병용한 검사법이 폐암의 예후를 예측하는 데 유용함을 확인하였다.
- [0127] 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 실시 예들은 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.

도면

도면1



도면2

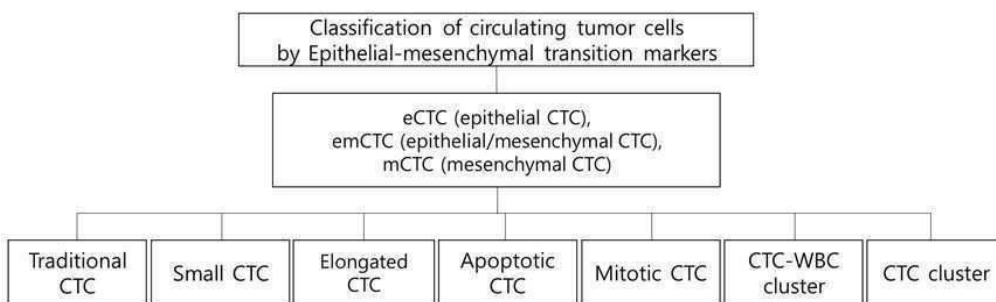
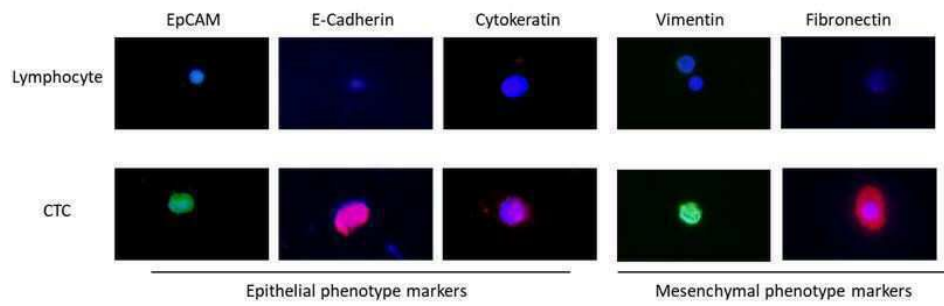
Sample No	배양 0일			배양 14일			Fold changes
	CTC*	PBMC*	CTC : PBMC	CTC*	PBMC*	CTC : PBMC	
1	38	1.60×10^6	$1 : 4.15 \times 10^4$	51	1.88×10^4	$1 : 3.67 \times 10^2$	112.92
2	11	1.11×10^6	$1 : 9.93 \times 10^4$	10	1.25×10^4	$1 : 1.30 \times 10^3$	76.13
3	3	5.68×10^5	$1 : 1.77 \times 10^4$	6	3.1×10^3	$1 : 4.86 \times 10^2$	365.22

*혈액 1 ml당 발견된 세포 수

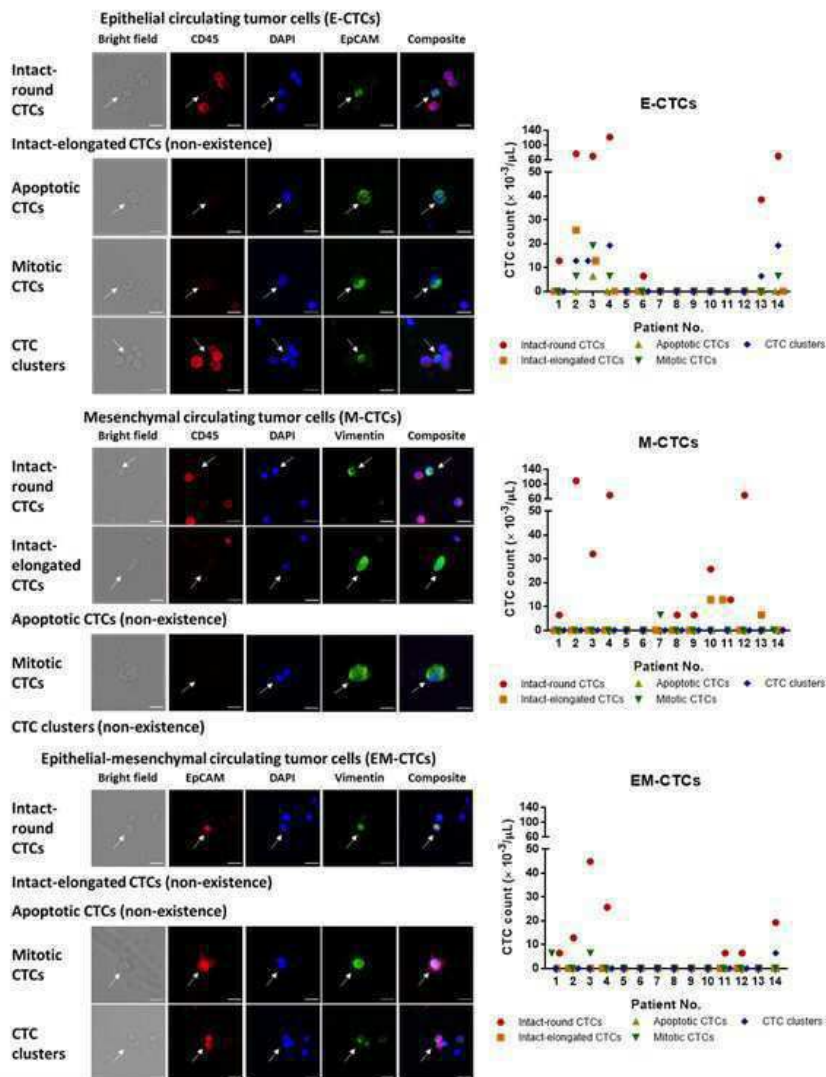
CTC: circulating tumor cell

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

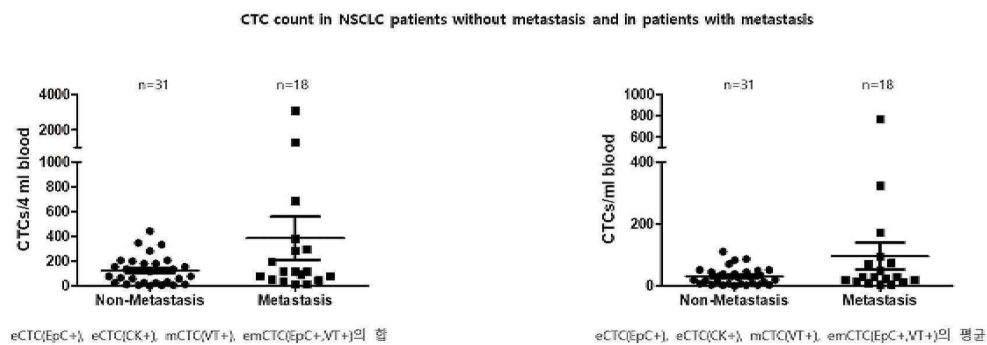
도면3



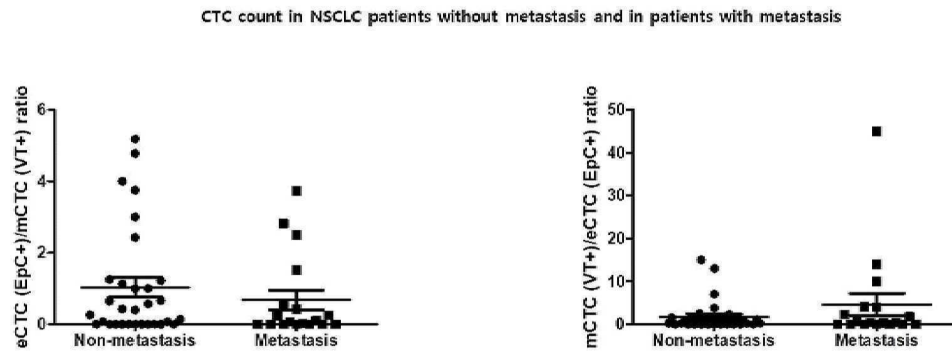
도면4



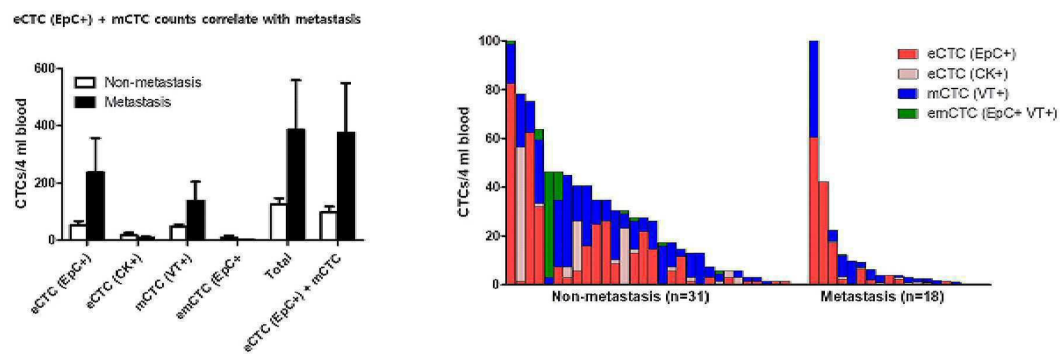
도면5



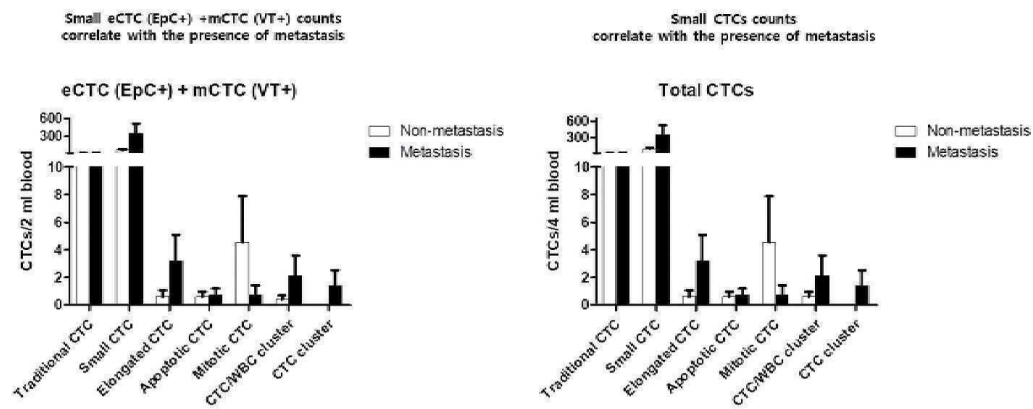
도면6



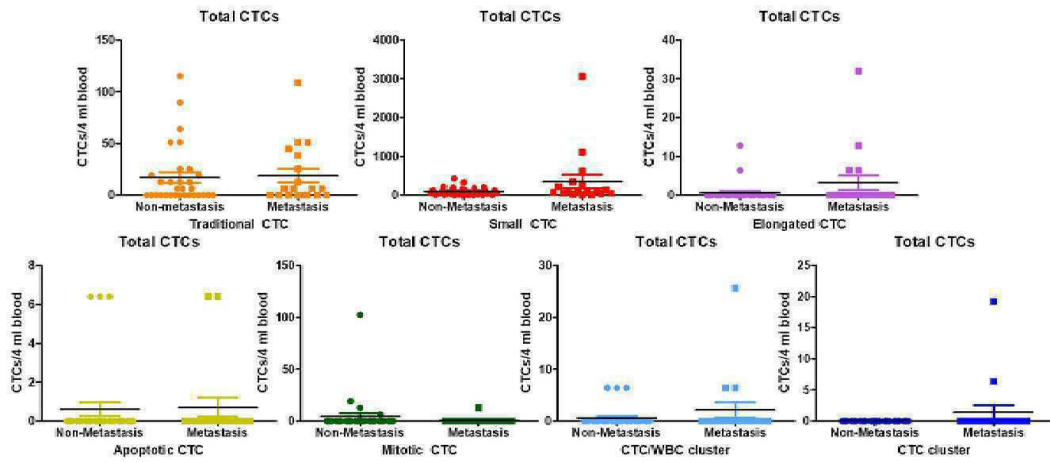
도면7



도면8

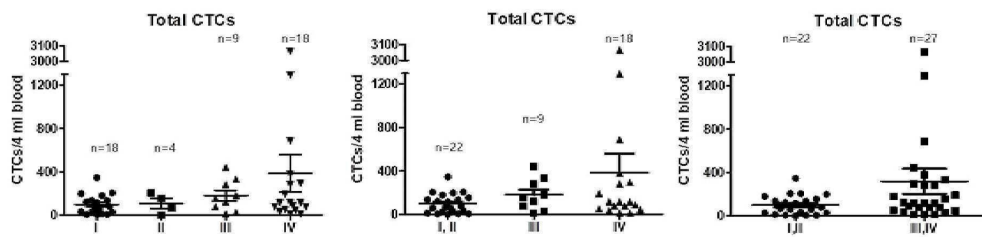


도면9

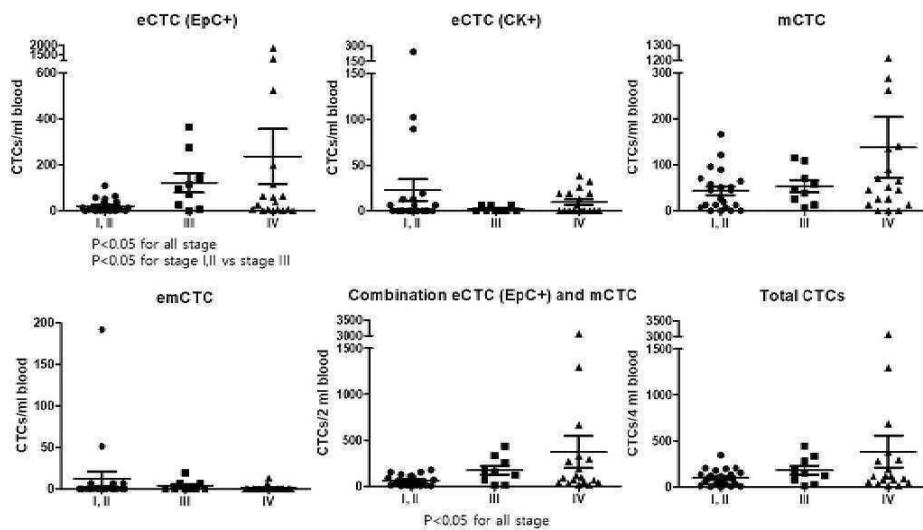


도면10

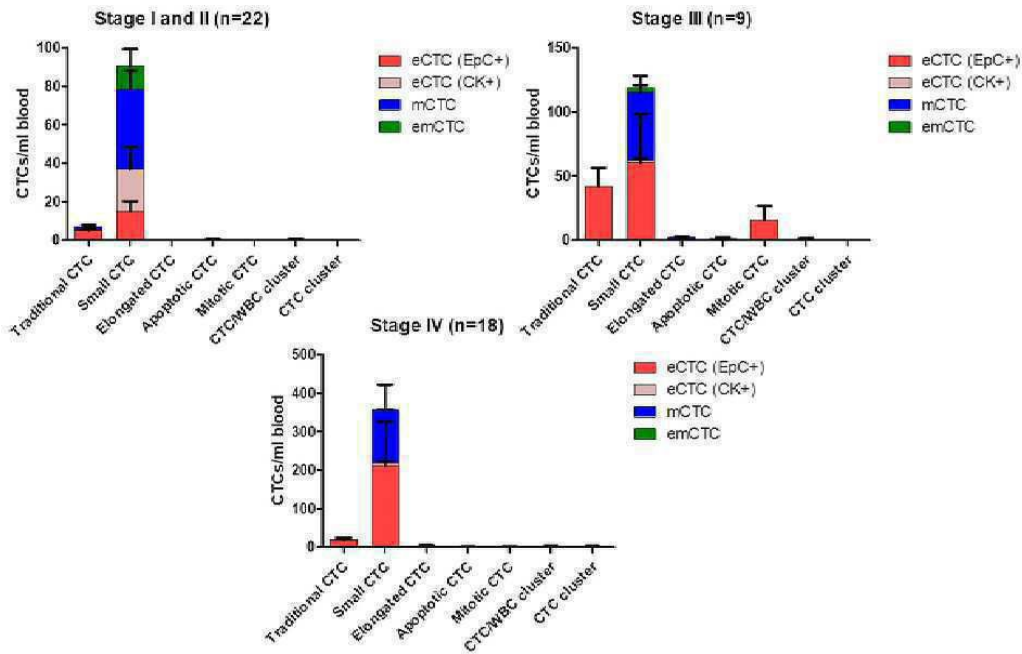
Analysis of CTC detection on NSCLC patients classified by different stages



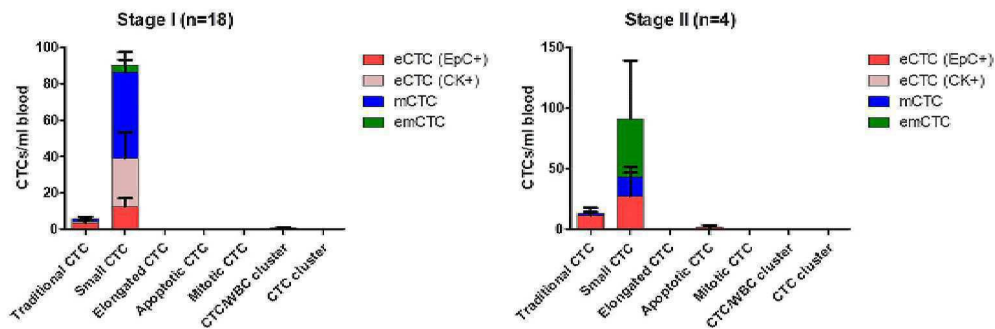
도면11



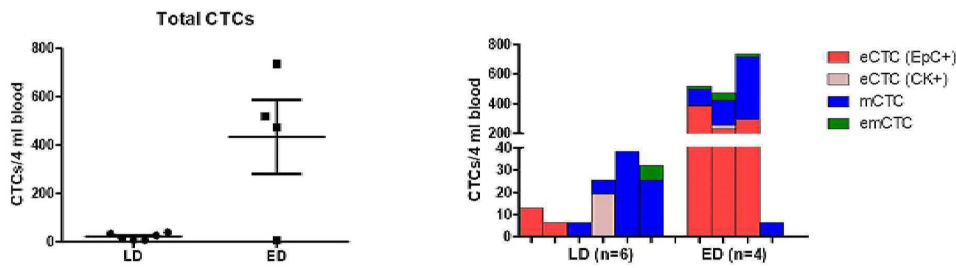
도면12



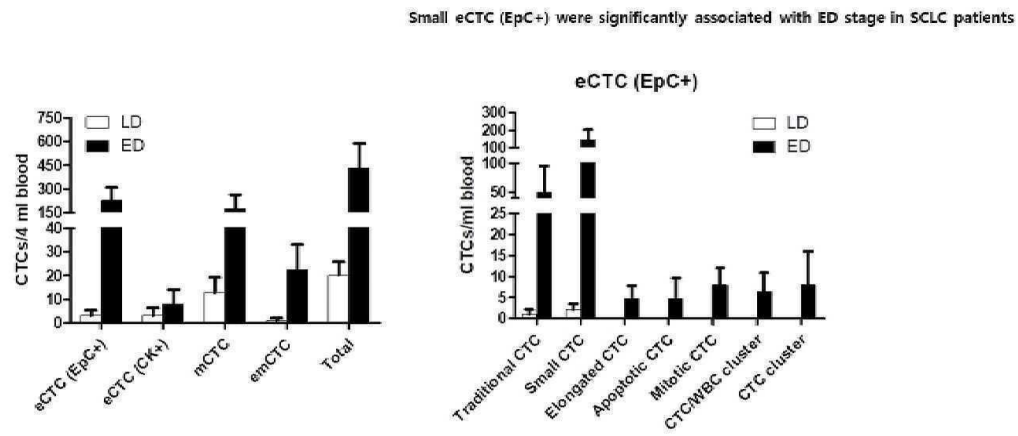
도면13



도면14



도면15



도면16

