(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0126396
(43) 공개일자 2018년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/564* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54326 (2013.01)
G01N 33/564 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0056542
(22) 출원일자 2018년05월17일
심사청구일자 2018년05월17일
(30) 우선권주장
1020170061247 2017년05월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
강주헌
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
권세용
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
이민석
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

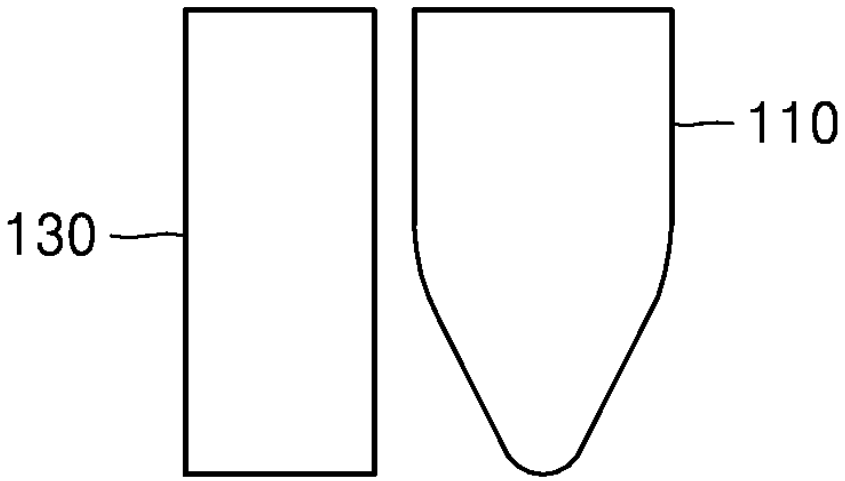
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **자성 입자를 이용한 면역세포의 평가 장치**

(57) 요 약

본 발명의 실시예들은 자성 입자를 이용한 면역세포의 평가 장치에 관한 것이다. 일 양상에 따른 장치에 의하면, 활성화된 면역세포가 내포 작용을 통해 자성 입자와 상호작용하는 현상을 이용하여, 자기장을 인가하여 자성 입자와 상호작용한 자성 입자-면역세포 복합체를 수집함으로써 빠른 시간 내에 효과적으로 활성화된 면역세포를 분리하는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2.180295.01
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	차세대바이오의료기기플랫폼기술개발 사업
연구과제명	병원성 미생물의 자기영동 분리 및 FISH 분석을 위한 바이오유체 소자 개발
기 여 율	1/1
주관기관	울산과학기술원
연구기간	2018.03.30 ~ 2019.01.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치에 있어서,

면역세포를 포함하는 시료 및 자성 입자를 담기 위한 챔버;

상기 챔버 주변에 자기장을 인가할 수 있도록 배치된 자기장 형성부를 포함하고,

상기 시료 내 포함된 면역세포 중 활성화된 면역세포가 자성 입자와 상호작용하여 자성 입자-면역세포 복합체를 형성하고, 상기 자기장 형성부에 의해 형성된 자기장 주변에 자성 입자-면역세포 복합체를 수집하기 위한 것인 활성화된 면역세포 분리용 장치.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 챔버의 일측 단부에 연결된 주입구;를 더 포함하는 것인 장치.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 챔버의 타측 단부에 연결된 배출구;를 더 포함하는 것인 장치.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 자성 입자-면역세포 복합체를 검출하기 위한 검출부를 더 포함하는 것인 장치.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 챔버가 튜브, 채널, 드랍렛(droplet) 및 웰로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인 장치.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 자기장 형성부는 적어도 하나 이상의 자석을 포함하는 것인 장치.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 시료는 개체로부터 분리된 혈액, 소변, 대변, 타액, 림프액, 뇌척수액, 활액, 낭종액(cystic fluid), 복수, 간질액, 및 안구액(ocular fluid)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 장치.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 자성입자는 1 ㎚ 내지 30 ㎛의 직경을 갖는 것인 장치.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 주입구는 복수개이고, 복수개의 주입구가 챔버의 일측 단부에 연결되며,

상기 챔버는 분리부를 더 포함하고,

상기 자기장 형성부는 챔버의 일측에 자기장을 인가할 수 있도록 배치된 것인 장치.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명의 실시예들은 자성 입자를 이용한 면역세포의 평가 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역세포는 유기체 (예컨대, 포유류, 조류, 어류 등의 동물)의 생체의 면역계에서 면역원 (예컨대, 외래 면역원 및/또는 내재적 면역원)을 특이적 인식/결합, 비특이적 결합, 또는 내포 작용 (endocytosis)을 하는 세포를 지칭한다.

[0003] 면역세포는 직접적인 세포 간 접촉 또는 미생물에서 유래되는 수용성 분자 및 숙주의 손상된 세포에서 유래하는 물질 등을 인지하여 면역계를 활성화시킨다. 면역세포에는 이들에 대한 수용체가 존재하여 이들 분자를 인지하면 사이토카인과 인터페론 및 케모카인을 생성하여 면역 반응을 일으킨다. 따라서, 면역세포의 활성화를 이용해 다양한 감염성 질환, 또는 면역 관련 질환을 진단할 수 있는 가능성이 있다.

[0004] 한편, 종래 감염성 질환을 진단하기 위해서는 감염의 원인인 미생물을 검출하기 위해 세포배양법 또는 유전자 검출법을 사용하거나, 면역 관련 질환을 진단하기 위해서는 혈액 내 항체가 존재하는지 검출하였다. 그러나, 이들 방법은 시간이 하루 이상으로 오래 걸리고 비용이 많이 소요되며 그 과정이 복잡한 문제가 있다.

[0005] 따라서, 빠른 시간 내에 저비용으로 간편하게 면역세포의 활성화를 평가하는 장치, 이를 통해 다양한 감염성 질환이나 면역 관련 질환, 또는 면역 이상을 진단하는 장치를 연구할 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 면역세포는 유기체 (예컨대, 포유류, 조류, 어류 등의 동물)의 생체의 면역계에서 면역원 (예컨대, 외래 면역원 및/또는 내재적 면역원)을 특이적 인식/결합, 비특이적 결합, 또는 내포 작용 (endocytosis)을 하는 세포를 지칭한다.

[0007] 면역세포는 직접적인 세포 간 접촉 또는 미생물에서 유래되는 수용성 분자 및 숙주의 손상된 세포에서 유래하는 물질 등을 인지하여 면역계를 활성화시킨다. 면역세포에는 이들에 대한 수용체가 존재하여 이들 분자를 인지하면 사이토카인과 인터페론 및 케모카인을 생성하여 면역 반응을 일으킨다. 따라서, 면역세포의 활성화를 이용해 다양한 감염성 질환, 또는 면역 관련 질환을 진단할 수 있는 가능성이 있다.

[0008] 한편, 종래 감염성 질환을 진단하기 위해서는 감염의 원인인 미생물을 검출하기 위해 세포배양법 또는 유전자 검출법을 사용하거나, 면역 관련 질환을 진단하기 위해서는 혈액 내 항체가 존재하는지 검출하였다. 그러나, 이들 방법은 시간이 하루 이상으로 오래 걸리고 비용이 많이 소요되며 그 과정이 복잡한 문제가 있다.

[0009] 따라서, 빠른 시간 내에 저비용으로 간편하게 면역세포의 활성화를 평가하는 장치, 이를 통해 다양한 감염성 질환이나 면역 관련 질환, 또는 면역 이상을 진단하는 장치를 연구할 필요성이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치에 있어서, 면역세포를 포함하는 시료 및 자성 입자를 담기 위한 챔버; 및 상기 챔버 주변에 자기장을 인가할 수 있도록 배치된 자기장 형성부를 포함하고, 상기 시료 내 포함된 면역세포 중 활성화된 면역세포가 자성 입자와 상호작용하여 자성 입자-면역세포 복합체를 형성하고, 상기 자기장 형성부에 의해 형성된 자기장 주변에 자성 입자-면역세포 복합체를 수집하기 위한 것인 활성화된 면역세포 분리용 장치를 제공한다.

[0011] 상기 장치는, 챔버의 일측 단부에 연결된 주입구;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0012] 상기 장치는, 챔버의 타측 단부에 연결된 배출구;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0013] 상기 장치는, 자성 입자-면역세포 복합체를 검출하기 위한 검출부;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0014] 상기 챔버는 튜브, 채널, 웰, 및 드랍렛으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0015] 상기 자기장 형성부는 적어도 하나 이상의 자석을 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0016] 일 양상에 따른 장치에 의하면, 활성화된 면역세포가 내포 작용을 통해 자성 입자와 상호작용하는 현상을 이용하여, 자기장을 인가하여 자성 입자와 상호작용한 자성 입자-면역세포 복합체를 수집함으로써 빠른 시간 내에

효과적으로 활성화된 면역세포를 분리하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 일 실시예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치를 도식화하여 나타낸 도면이다.

도 2는 일 실시예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치를 도식화하여 나타낸 도면이다.

도 3은 일 실시예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치를 도식화하여 나타낸 도면이다.

도 4는 일 실시예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치를 도식화하여 나타낸 도면이다.

도 5는 일 실시예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치를 통해, 인 비트로에서 대조군(healthy sample)과 *E.coli*로 감염된 혈액(infection model)에서 활성화된 면역세포를 분리한 결과이다.

도 6은 일 실시예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치를 통해, 인 비보에서 대조군에서 활성화된 면역세포를 분리한 결과이다.

도 7은 실시예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치를 통해, 인 비보에서 감염된 랫트에서 활성화된 면역세포를 분리한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 일 양상은 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치에 있어서, 면역세포를 포함하는 시료 및 자성 입자를 담기 위한 챔버; 및 상기 챔버 주변에 자기장을 인가할 수 있도록 배치된 자기장 형성부를 포함하고, 상기 시료 내 포함된 면역세포 중 활성화된 면역세포가 자성 입자와 상호작용하여 자성 입자-면역세포 복합체를 형성하고, 상기 자기장 형성부에 의해 형성된 자기장 주변에 자성 입자-면역세포 복합체를 수집하기 위한 것인 활성화된 면역세포 분리용 장치를 제공한다.

[0019] 본 명세서에서 "활성화된 면역세포 (activated immune cells)"는 감염 또는 면역 반응과 같은 원인에 의해 자성 입자와 상호작용하여 자성 입자-면역세포 복합체를 형성할 수 있는 면역세포를 지칭할 수 있다. 상기 "상호작용"은 면역세포의 내포 작용 (endocytosis)에 의해 자성 입자가 면역세포의 내부 또는 외부에 부착, 유입, 함입, 또는 봉입되는 현상을 지칭한다. 상기 내포 작용은 식균 작용 (phagocytosis), 또는 음세포 작용 (pinocytosis)을 포함하는 것으로, 세포가 물질(단백질과 같은 분자)을 밖으로부터 안으로 세포막을 이용하여 삼키는 작용을 지칭한다.

[0020] 본 명세서에서 "면역세포 (immune cells)"는 유기체 (예컨대, 포유류, 조류, 어류 등의 동물)의 생체의 면역계에서 면역원 (예컨대, 외래 면역원 및/또는 내재적 면역원)을 특이적 인식/결합, 비특이적 결합, 또는 식균 작용을 하는 모든 세포일 수 있다. 구체적으로, 상기 면역세포는 호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 림프구, 쿠퍼 세포, 소교세포 (microglia), 폐포의 대식세포, 결합조직의 대식세포 (Hystocyte), 또는 수지상세포와 같은 대식세포, 비만세포, B세포, T세포, 자연살해세포(natural killer: NK cell), 면역세포 유래 세포주, 및 줄기세포 유래 면역세포로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 상기 "면역세포 유래 세포주"는 면역세포에서 유래한 세포주를 지칭하고, 상기 "줄기세포 유래 면역세포"는 줄기세포로부터 당업계에 공지된 기술에 의해 분화된 면역세포를 지칭한다.

[0021] 상기 면역세포는 검출 가능한 표지 물질로 표지된 것일 수 있다. 상기 표지 물질은 통상적인 방법으로 검출 가능한 모든 물질 (소분자 화합물 또는 단백질 또는 폴리/올리고 펩타이드 등) 일 수 있으며, 예컨대, 형광 물질, 발광 물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 "시료(sample)"는 생체 시료일 수 있다. 상기 생체 시료는 사람을 포함하는 포유동물로부터 단리된 체액 (예를 들어, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 객담 또는 소변), 기관, 조직, 분획, 및 세포일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 생체 시료로부터의 추출물, 예를 들어, 생물학적 유체 (예를 들어, 혈액 또는 소변)으로부터의 항체, 단백질 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 면역세포를 포함하는 것이라면 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 혈액, 소변, 대변, 타액, 림프액, 뇌척수액, 활액, 낭종액(cystic fluid), 복수, 간질액, 또는 안구액(ocular fluid)을 포함할 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 "자성 입자(magnetic particles)"는 자성을 가지고 있으며, 세포에 독성을 주지 않고 세포에 의하여 용이하게 흡수될 수 있는 입자이면 어느 것이나 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 자성 입자는 철(Fe), 니켈(Ni), 코발트(Co), 망간(Mn), 비스무스(Bi), 아연(Zn), 스트론튬(Sr), 란타넘(La), 세륨(Ce), 프라세오디

뮴(Pr), 네오디뮴(Nd), 프로메튬(Pm), 사마륨(Sm), 유로퓸(Eu), 가돌리늄(Gd), 테르븀(Tb), 디스프로슘(Dy), 홀뮴(Ho), 에르븀(Er), 툴륨(Tm), 이테르븀(Yb), 루테늄(Lu), 구리(Cu), 은(Ag), 금(Au), 카드뮴(Cd), 수은(Hg), 알루미늄(Al), 갈륨(Ga), 인듐(In), 탈륨(Tl), 칼슘(Ca), 바륨(Ba), 라듐(Ra), 백금(Pt), 및 납(Pd)으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 자성 원소를 포함할 수 있다.

[0024] 상기 자성 입자는 산화되거나 표면 개질된 것일 수 있다. 구체적으로, 철은 산화되어 산화철 형태일 수 있다. 상기 표면 개질은 금속에 의한 표면 개질, 카르복시기나 아민기와 같은 작용기에 의한 표면 개질, 스트렙타비딘, 아비딘, 면역글로불린류, 만노오스 결합 렉틴 (mannose binding lectin), C 반응성 단백질 (C-reactive protein: CRP)을 포함하는 옵소닌(opsonin), 보체 단백질과 같은 단백질에 의한 표면 개질, 탄수화물에 의한 표면 개질, 폴리머에 의한 표면 개질, 지질에 의한 표면 개질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 개질에 의해 자성 입자가 안정화될 수 있다. 또한, 상기 개질에 의해 자성 입자와 활성화된 면역세포의 상호작용이 향상될 수 있다.

[0025] 상기 자성 입자는 공지된 방법을 통해 제조해서 사용할 수 있고, 상업적으로 구입해서 사용할 수도 있다.

[0026] 상기 자성 입자는 그대로 사용되거나 적절한 용매 (예컨대, 버퍼 (PBS, saline, Tris-buffered saline 등) 등)에 분산 또는 현탁된 상태로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 상기 자성 입자는 작은 입자 크기를 가짐으로써 개별 입자가 단일자기구역을 갖게 되고, 이로 인해 외부 자기장이 존재 시에만 자성의 특성을 갖는 초상자성(superparamagnetism)을 나타낸다. 초상자성을 나타내는 자성 입자는 외부 자기장 인가에 의해 간단하고 빠르게 분리될 수 있다. 자기장 인가에 의한 자성 입자의 분리는 pH, 온도, 이온 등과 같은 주변 환경에 영향을 받지 않으므로 안정성 및 민감성이 우수하다.

[0028] 상기 자성 입자는 면역세포와 상호작용, 예컨대 부착, 유입, 함입, 또는 봉입될 수 있는 입자 크기를 갖고 자성을 띠는 모든 입자들 중에서 선택될 수 있다. 예컨대, 상기 자성 입자는 평균 입경이 약 1nm 내지 약 30000nm, 약 10nm 내지 약 30000nm, 약 50nm 내지 약 30000nm, 약 100nm 내지 약 30000nm, 약 200nm 내지 약 30000nm, 약 300nm 내지 약 30000nm, 약 400nm 내지 약 30000nm, 약 500nm 내지 약 30000nm, 약 1nm 내지 약 20000nm, 약 10nm 내지 약 20000nm, 약 50nm 내지 약 20000nm, 약 100nm 내지 약 20000nm, 약 200nm 내지 약 20000nm, 약 300nm 내지 약 20000nm, 약 400nm 내지 약 20000nm, 약 500nm 내지 약 20000nm, 약 1nm 내지 약 10000nm, 약 10nm 내지 약 10000nm, 약 50nm 내지 약 10000nm, 약 100nm 내지 약 10000nm, 약 200nm 내지 약 10000nm, 약 300nm 내지 약 10000nm, 약 400nm 내지 약 10000nm, 약 500nm 내지 약 10000nm, 약 약 1nm 내지 약 5000nm, 약 10nm 내지 약 5000nm, 약 50nm 내지 약 5000nm, 약 100nm 내지 약 5000nm, 약 200nm 내지 약 5000nm, 약 300nm 내지 약 5000nm, 약 400nm 내지 약 5000nm, 약 500nm 내지 약 5000nm, 1nm 내지 약 1000nm, 약 10nm 내지 약 1000nm, 약 50nm 내지 약 1000nm, 약 100nm 내지 약 1000nm, 약 200nm 내지 약 1000nm, 약 300nm 내지 약 1000nm, 약 400nm 내지 약 1000nm, 약 500nm 내지 약 1000nm, 약 1nm 내지 약 500nm, 약 10nm 내지 약 500nm, 약 50nm 내지 약 500nm, 약 100nm 내지 약 500nm, 약 200nm 내지 약 500nm, 약 300nm 내지 약 500nm, 또는 약 400nm 내지 약 500nm인 자성 입자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 이하 첨부된 도면을 참조하면서 오로지 예시를 위한 실시예에 의해 발명을 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 발명의 권리 범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 상세한 설명 및 실시예로부터 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 "구성된다" 또는 "포함한다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 여러 구성 요소들, 또는 여러 단계들을 반드시 모두 포함하는 것으로 해석되지 않아야 하며, 그 중 일부 구성 요소들 또는 일부 단계들은 포함되지 않을 수도 있고, 또는 추가적인 구성 요소 또는 단계들을 더 포함할 수 있는 것으로 해석되어야 한다.

[0031] 또한, 본 명세서에 기재된 "...부", "...모듈" 등의 용어는 적어도 하나의 기능이나 동작을 처리하는 단위를 의미한다.

[0032] 또한, 본 실시예들에서 사용되는 "제1" 또는 "제2" 등과 같이 서수를 포함하는 용어는 다양한 대상들을 설명하는데 사용할 수 있지만, 상기 대상들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 상기 용어들은 하나의 대상을 다른 대상과 구별하는 목적으로만 사용된다.

[0033] 도 1은 일 실시예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치(1)를 나타내는 도면이다.

[0034] 도 1을 참조하면, 활성화된 면역세포 분리용 장치(1)는 챔버(110); 및 자기장 형성부(130)를 포함할 수 있다.

[0035] 챔버는 실험에서 실험 대상이 위치하는 공간을 포함하는 장치를 의미한다. 챔버는 활성화된 면역세포 분리용 장치의 평가 대상인 시료 및 자성 입자가 배치되어 있을 수 있다. 챔버 내의 공간은 세포가 배양 또는 유지될 수 있도록 하는 온도, 습도, 빛, 기체의 조성 등의 환경조건이 유지될 수 있다.

[0036] 상기 챔버는 시료 및 자성 입자를 담거나 시료 및 자성 입자가 이동할 수 있는 형태라면 어떤 것에도 제한되지 않으나, 튜브, 채널, 웰, 드랍렛(droplet), 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 "채널"은 유체가 이동하는 통로를 의미하며, 예를 들면 평면 흐름 경로를 따라 연장되는 채널(예를 들면, 꾸불꾸불하거나 스파이럴(spiral) 평면 패턴의 채널), 비평면 흐름 경로(예를 들면, 나선형의(helical) 3차원적 채널), 또는 미세유체채널 (Microfluidic Channel)일 수 있다.

[0038] 자기장 형성부는 자기장을 인가하는 임의의 하드웨어 또는 전기회로일 수 있다. 예를 들어, 상기 자기장 형성부는 적어도 하나 이상의 자석을 포함할 수 있고, 상기 자석은 전자기 유도에 의한 전자석, 영구 자석 등의 자석을 포함할 수 있다. 상기 자석은 챔버 주변에 자기장을 인가할 수 있도록, 예를 들어, 챔버의 일측, 예컨대 위, 아래, 또는 측면에 배치되거나, 직렬, 병렬, 원형, 교대 배열 (alternative array) 등 다양한 배열로 배치될 수 있다.

[0039] 일 구현예에서, 시료에 포함된 면역세포에는, 감염이나 면역 반응에 의해서 활성화된 면역세포와 활성화되지 않은 면역세포가 존재한다. 이러한 상황에서, 챔버에 담기기 전이나 후에 면역세포를 포함하는 시료 및 자성 입자가 반응하여, 활성화된 면역세포가 내포 작용에 의해 자성 입자와 상호작용하고, 그 결과 자성 입자-면역세포 복합체를 형성한다. 형성된 자성 입자-면역세포 복합체는 이에 포함된 자성 입자 때문에 자기장 형성부에 의해 형성된 자기장에 의해 챔버 주변에 모이게 되므로, 활성화된 면역세포를 빠른 시간 내에 간단하고 효과적으로 분리할 수 있다.

[0040] 도 2를 참조하면, 활성화된 면역세포 분리용 장치(1)는 주입구(120); 또는 배출구(140);를 더 포함할 수 있다.

[0041] 주입구는 상기 시료 및 자성 입자를 챔버로 이동시키기 위한 장치를 의미한다. 주입구는 상기 챔버의 일측 단부에 연결된 것일 수 있다. 또한, 주입구는 복수개, 예를 들어 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상일 수 있다. 또는, 상기 주입구는 챔버의 일부분일 수 있다.

[0042] 상기 주입구는 상기 챔버의 일측 단부에 연결된 것일 수 있다.

[0043] 배출구는 시료 내 포함된 면역세포 중 활성화된 면역세포가 자성 입자와 상호작용하여 형성한 자성 입자-면역세포 복합체를 제외한 나머지 시료, 자성 입자, 또는 면역세포를 배출하는 장치이다. 배출구를 통해 자성 입자-면역세포 복합체를 제외한 나머지 시료가 배출되고, 주입구를 통해 시료 및 자성 입자를 지속적으로 주입하면, 다량의 시료에 포함된 활성화된 면역세포를 효과적으로 수집할 수 있다.

[0044] 상기 배출구는 상기 챔버의 타측 단부에 연결된 것일 수 있다.도 3은 일 실시예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치(1)를 나타내는 도면이다.

[0045] 도 3을 참조하면, 활성화된 면역세포 분리용 장치(1)는 주입구(120), 챔버(110), 자기장 형성부(130), 및 검출부(150)를 포함할 수 있다.

[0046] 검출부는 자기장에 의해 수집, 고정된 자성 입자-면역세포 복합체를 검출하기 위한 장치이다. 상기 검출은 자성 입자-면역세포 복합체에 포함된 예를 들어, 면역세포가 형광 물질과 같은 검출 가능한 표지 물질로 표지된 경우 검출부는 형광 물질을 검출하기 위한 형광현미경을 포함할 수 있다.

[0047] 일 구현예에서, 시료에 포함된 면역세포에는, 감염이나 면역 반응에 의해서 활성화된 면역세포와 활성화되지 않은 면역세포가 존재한다. 이러한 상황에서, 챔버에 담기기 전에 면역세포를 포함하는 시료 및 자성 입자가 반응하여, 활성화된 면역세포가 내포 작용에 의해 자성 입자와 상호작용하고, 그 결과 자성 입자-면역세포 복합체를 형성한다. 형성된 자성 입자-면역세포 복합체는 이에 포함된 자성 입자 때문에 중력방향으로 챔버의 아래 혹은 위에 자기장을 형성한다면, 자기장 형성부에 의해 형성된 자기장에 의해 챔버의 아래쪽이나 위쪽으로 모이게 된다. 만약 자기장 형성부가 챔버의 위쪽에 존재한다면, 자성 입자-면역세포 복합체는 챔버의 위쪽으로 떠올라, 챔버 아래쪽에 가라앉은 비활성화된 면역세포의 수를 형광현미경 등과 같은 검출부로 측정하고 전체 면역세포 수와 비교하여 역으로 활성화된 면역세포의 수를 계산할 수 있다.

[0048] 도 4는 일 실시예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치를 나타내는 도면이다.

[0049] 도 4를 참조하면, 활성화된 면역세포 분리용 장치(4)는 챔버(410), 분리부(411), 제1 주입구(421) 및 제2 주입구(422)를 포함하는 주입구, 및 자기장 형성부(430)를 포함할 수 있다.

[0050] 또한, 상기 장치는 복수개의 배출구를 포함할 수 있다.

[0051] 챔버(410), 자기장 형성부(430)는 도 1의 챔버(110), 자기장 형성부(130)와 동일한 기능을 수행하므로 중복되는 설명은 생략한다.

[0052] 제1 주입구 및 제2 주입구는 챔버의 일측 단부에 연결될 수 있다. 제1 주입구, 또는 제2 주입구에는 시료, 시료와 유사한 성분으로 구성된 시료 유사체, 예컨대 시료의 희석액, 자성 입자, 또는 이의 혼합물이 각각 주입될 수 있다.

[0053] 분리부는 상기 주입구로 주입된 시료 및 자성 입자의 혼합물로부터 자성 입자-면역세포 복합체를 분리해내기 위한 장치이다. 또한, 상기 분리부는 주입구가 복수개일 경우, 1개의 챔버 내에서 복수개의 분리부 각각으로부터 주입된 물질을 분리하기 위한 장치이다.

[0054] 또한, 상기 분리부는 채널 어레이 (channel array) 구조를 가질 수 있다. 상기 구조를 가짐으로써 주입구에서 배출구 방향의 유속에 자성 입자-면역세포 복합체가 영향을 덜 받으며, 자기장 방향으로의 힘에만 영향을 받게 하여 효과적으로 자성입자-면역세포 복합체를 제한된 길이의 분리부에서 분리해낼 수 있다.

[0055] 자기장 형성부는 챔버의 일측에 자기장을 인가할 수 있도록 배치될 수 있다.

[0056] 일 구현예에서, 제1 주입구를 통해 시료의 희석액이 주입되고, 제2 주입구를 통해 시료 및 자성 입자가 주입된다. 상기 제1 주입구 및 제2 주입구는 챔버의 일측 단부에 연결되어 있으므로, 제1 주입구를 통해 주입된 시료의 희석액과 제2 주입구를 통해 주입된 시료 및 자성 입자는 분리부를 경계로 하여 하나의 챔버 내에 담겨있거나 이동할 수 있다. 여기서, 챔버의 일측, 구체적으로, 제1 주입구를 통해 주입된 시료의 희석액이 담겨진 챔버 주변에 자기장을 인가할 수 있도록 자기장 형성부가 배치된다면, 제2 주입구를 통해 주입된 시료 및 자성 입자 내에서 형성된 자성 입자-면역세포 복합체가 분리부에 포함된 채널 어레이를 통하여 자기장 주변으로 모일 수 있다. 여기서, 분리부에 포함된 채널 어레이 없이도 본 기능을 수행할 수 있다. 희석액과 시료는 배출구쪽으로 계속 흐르므로 시료는 자기장과 먼 방향의 배출구로 빠져나가게 되고, 시료에 포함되어 있던 자성 입자-면역세포 복합체만 희석액쪽으로 끌려나와 자기장과 가까운 배출구쪽으로 빠져나올 수 있게 된다. 따라서, 별도의 장치 없이도 자성 입자-면역세포 복합체를 시료에서 분리하여 용이하게 수집할 수 있다.

[0058] **실시예 1: 인 비트로(*in vitro*) 혈액 모델에서 활성화된 면역세포 검출**

[0059] 도 1에 나타낸 바와 같은 일 구현예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치의 효과를 평가하였다. 구체적으로, *E.coli*의 감염에 의해 활성화된 면역세포를 자성 입자를 이용해 검출할 수 있는지 확인하기 위해서, 인 비트로에서, 혈액과 *E.coli*를 혼합하여 면역세포를 활성화시키고, 활성화된 면역세포와 상호작용한 자성 입자를 검출함으로써 혈액 내 면역세포의 활성화 정도를 평가할 수 있는지 다음과 같이 실험하였다.

[0060] 400g의 수컷 랫트(Wistar rat)의 꼬리에서 채혈한 전혈에 각각 10^4, 10^6, 10^8 CFU/mL로 *E. coli*를 주입하여 인 비트로 감염된 혈액 모델을 제조하였다. 상기 혈액 모델에 200 nm 지름의 자성 입자(03122, Ademtech, France)를 표면에 Mannose-binding lectin (10405-HNAS, Sino Biological Inc., China)을 고정한 후, 본 입자를 상기 감염혈액 모델에 0.2 mg/mL의 농도; calcium chloride를 5 mM의 농도; 로 섞고 37℃에서 20분 동안 반응시켰다.

[0061] 반응 후, 혈액 모델에서 10 μL를 채취하여 세포분석기(cytometer)에 넣고 세포의 수를 측정하였다. 세포의 수를 측정한 후, ACK lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, USA): 감염된 혈액 모델 = 10:1 비율로 섞은 후 1% (w/v) DAPI(D9542, Sigma-Aldrich, USA), 및 1%의 tween 20과 혼합하고 30분 동안 반응시켜 면역세포, 예를 들어 백혈구를 염색하였다.

[0062] 자성입자를 섞은 전혈을 1.5 mL EP 튜브에 넣은 후 한쪽 면을 자석에 대고 20분간 자기장을 인가시켰다. 구체적으로는, 혈액 모델이 자석에 고정된 상태에서, 식염수(saline)로 EP 튜브 안에 있는 혈액을 2번 세척한 후 상기와 같은 방법으로 DAPI로 백혈구에 대한 염색을 수행하였다. 염색 후, 고정된 자석을 제거하고 EP 튜브 안쪽에

자석이 있던 면에 유도된 자성입자 및 자성입자를 함유한 백혈구를 식염수에 잘 풀어주고 이 중 10 μL를 세포 분석기에 넣어 세포의 수를 측정하였다.

[0063] 대조군으로는 *E.coli*를 섞지 않은 혈액을 사용하였고, 대조군과 감염된 혈액 모델을 형광현미경으로 촬영한 사진을 도 5에 나타내었다.

[0064] 도 5에 나타낸 바와 같이, 대조군 (healthy sample)과 비교하여 감염된 혈액 모델 (infection model)에서 염색된 면역세포의 수가 유의적으로 증가하였음을 확인하였다.

[0065] 또한, 10^4 CFU/mL의 *E. coli*로 감염된 혈액 모델의 경우 대조군 대비 약 1.45%의 면역세포가 자성 입자를 더 함유하여 자기장에 의해 자석쪽으로 끌려왔고, 10^6 CFU/mL의 *E. coli*로 감염된 혈액 모델의 경우 대조군 대비 약 6.5%의 면역세포가 더 자석쪽으로 끌려왔고, 10^8 CFU/mL의 *E. coli*로 감염된 혈액 모델의 경우 대조군 대비 약 57.10%의 면역세포가 더 자석쪽으로 끌려오는 것을 확인하였다.

[0066] 따라서, 감염시킨 *E. coli*의 농도와 비례하여 혈액 내의 면역 입자가 활성화되었고, 활성화된 면역세포의 식균작용에 의해 더 많은 수의 면역세포가 자성 입자를 포함하므로, 상기 장치에 의해 활성화된 면역세포를 분리할 수 있다.

[0068] **실시예 2: 인 비보(*in vivo*) 랫트 모델에서 활성화된 면역세포 검출**

[0069] 도 3에 나타낸 바와 같은 일 구현예에 따른 활성화된 면역세포를 분리하기 위한 장치의 효과를 평가하였다. 감염된 랫트에서 면역세포의 활성화를 검출할 수 있는지 확인하기 위해서, 랫트에 *E.coli*를 주입하여 면역세포를 활성화시키고, 활성화된 면역세포와 상호작용한 자성 입자를 검출함으로써 면역 활성화 정도를 평가할 수 있는지 다음과 같이 수행하였다.

[0070] 10^7 CFU/mL의 *E. coli*를 1mL의 식염수에 넣어 준비하고 400 g의 수컷 랫트 (Wistar rat)에 복강 주입하여 감염된 랫트 모델을 제조하였다. 4 시간 뒤 꼬리 채혈로 전혈을 획득하였고 200 nm 지름의 자성입자 표면에 Mannose binding lectin을 표면에 고정한 후, 본 입자를 상기 감염혈액 모델에 0.2 mg/mL의 농도; calcium chloride를 5 mM의 농도; 로 전혈과 섞고 37° C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 후, 혈액 내의 면역세포를 측정하기 위해, ACK lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)에 Cell tracker (Molecular Probes Life technologies, USA) 5 μM 을 넣고 20분 동안 면역세포를 형광염색하였다. 형광염색 후, 혈액을 가만히 두어 면역 입자를 가라앉혀 가라앉은 면역세포를 형광현미경으로 검출하였다.

[0071] 검출 후, 자석으로 자기장을 인가하여 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 분리하고 남은 면역세포를 가라앉혀 형광현미경으로 검출하였다 (ImageJ, USA). 대조군으로는, *E.coli*를 랫트에 주입하기 전에 채혈한 전혈을 사용하였다. 대조군에 대한 실험 결과를 도 6에, 감염된 랫트 모델에 대한 실험 결과를 도 7에 나타내었다.

[0072] 도 6은 대조군 랫트의 경우, 혈액을 자성 입자와 접촉시키기 전의 면역세포(좌) 및 자성 입자와 접촉하여 상호작용한 면역세포를 제외한 나머지 면역세포(우)의 사진이다.

[0073] 도 7은 *E.coli*로 감염된 랫트의 경우, 혈액을 자성 입자와 접촉시키기 전의 면역세포(좌) 및 자성 입자와 접촉하여 상호작용한 면역세포를 제외한 나머지 면역세포(우)의 사진이다.

[0074] 도 6에 나타낸 바와 같이, 대조군에서는 자성 입자와 접촉시키기 전과 후에 면역세포의 수가 변함이 없었다.

[0075] 도 7에 나타낸 바와 같이, 감염된 랫트에서는 자성 입자와 접촉시킨 후 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 제외한 나머지 면역세포가 유의적으로 감소하였음을 확인하였다 (자성 입자와 접촉시키기 전의 면역세포에 비해 약 24%의 자성 입자가 자성 입자와 반응).

[0076] 따라서, 감염된 랫트의 경우, *E.coli*에 의해 혈액 내 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포의 활발한 식균작용에 의해 면역세포와 상호작용한 자성 입자가 증가하였으므로, 본 발명의 장치가 인 비보에서 활성화된 면역세포를 분리할 수 있음을 확인하였다.

부호의 설명

[0077] 110: 챔버 120: 주입구

130: 자기장 형성부 140: 배출구

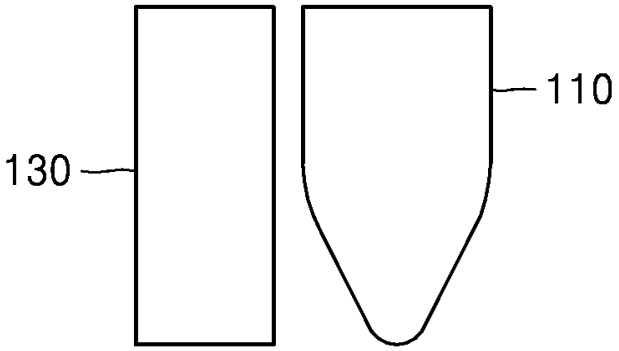
150: 검출부 410: 챔버

411: 분리부 421: 제1 주입구

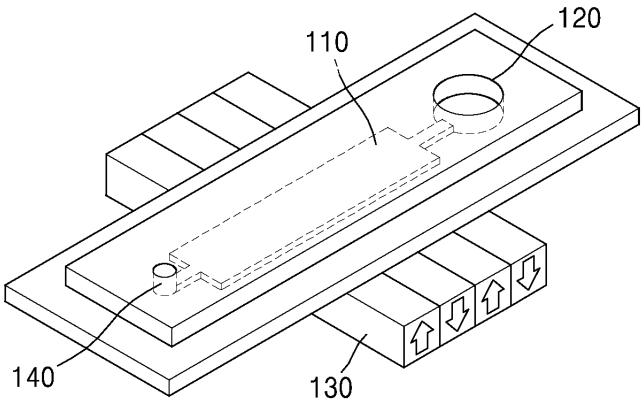
422: 제2 주입구 430: 자기장 형성부

도면

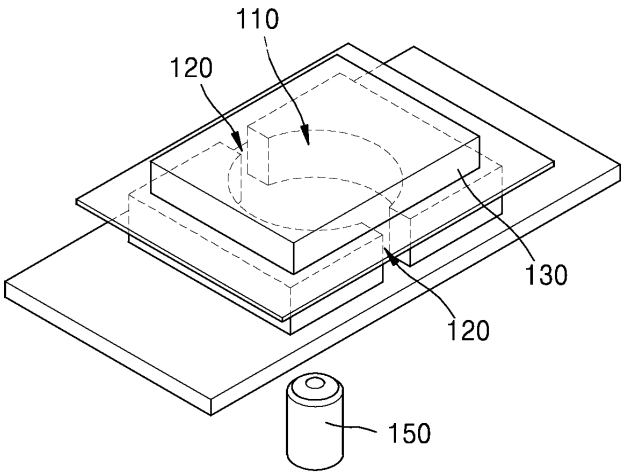
도면1



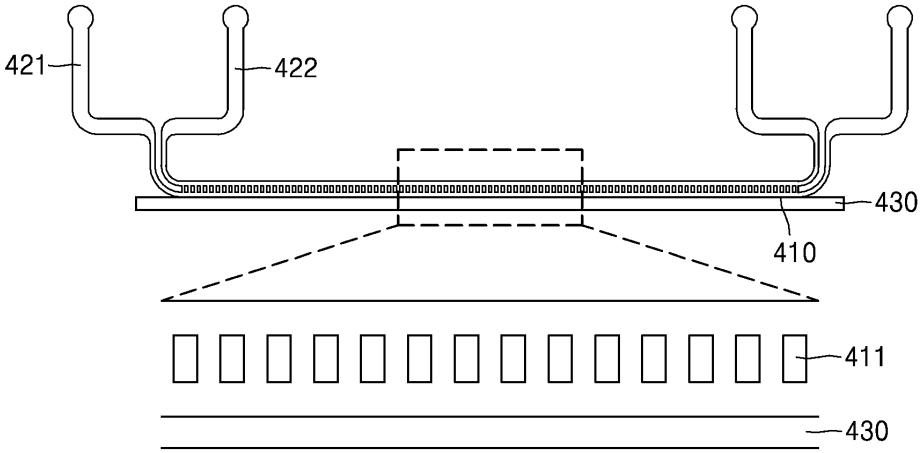
도면2



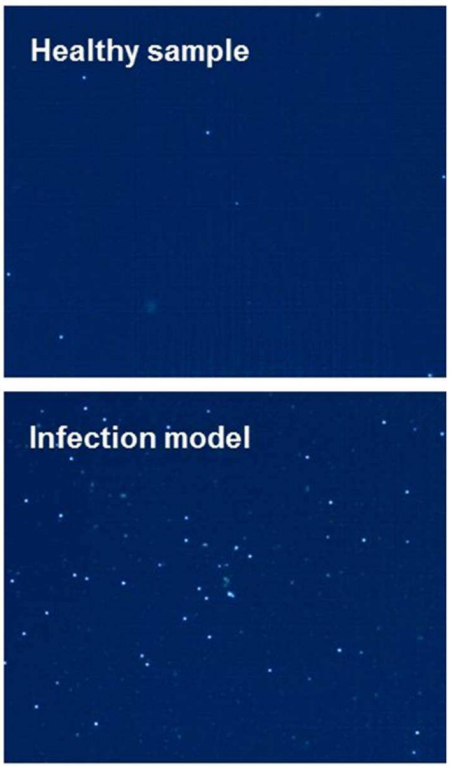
도면3



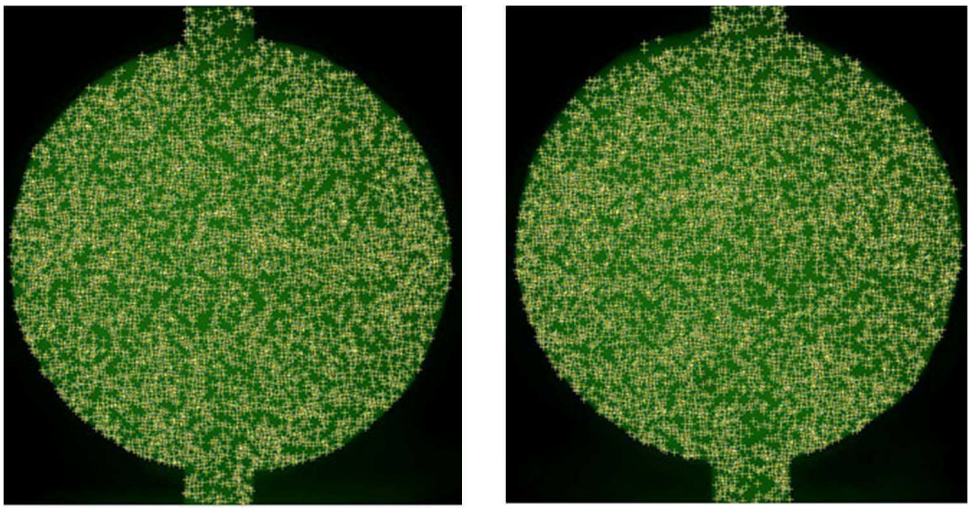
도면4



도면5



도면6



도면7

