(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월24일
(11) 등록번호 10-2304167
(24) 등록일자 2021년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 15/14 (2006.01) *G01N 1/30* (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01) *B82Y 30/00* (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 15/1459 (2013.01)
G01N 1/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7010816(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년08월15일
심사청구일자 2021년05월06일
(85) 번역문제출일자 2021년04월12일
(65) 공개번호 10-2021-0043736
(43) 공개일자 2021년04월21일
(62) 원출원 특허 10-2016-7006938
원출원일자(국제) 2014년08월15일
심사청구일자 2019년08월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/051343
(87) 국제공개번호 WO 2015/023982
국제공개일자 2015년02월19일
(30) 우선권주장
61/866,972 2013년08월16일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Highly selective biomechanical separation of cancer...(Bill K. Line, BIOMICROFLUIDICS 7, 034114, 2013)
KR100760309 B1
WO2013059343 A1

(73) 특허권자
메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77
(72) 발명자
셰레이, 아르먼, 알.
미국, 메사추세츠 02144, 소머빌, 하이엔드 에비뉴 333
아달스테인슨, 빅토르, 에이.
미국, 펜실베이니아 19348, 케넷 스퀘어, 펜 힐 로드 23
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 36 항 심사관 : 인치현

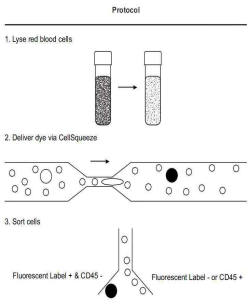
(54) 발명의 명칭 **세포로의 선택적 물질 전달**

(57) 요 약

세포의 물리적 성질을 기반으로 세포를 분리 또는 식별하는 것은 세포 현탁액을 제공하는 것; 상기 세포 현탁액을 협착부를 포함하는 미세 유체 채널을 통하여 통과시키는 것; 및, 상기 세포 현탁액 용액을 화합물과 접촉시키는 것을 포함한다. 이 협착부는 상대적으로 더 작은 세포와 비교해서 상대적으로 더 큰 세포를 우선적으로 변형

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3a



하기 위해 크기화 될 수 있다.

(52) CPC특허분류
B82Y 30/00 (2013.01)
G01N 2015/1006 (2013.01)

(72) 발명자
조, 나현
미국, 뉴저지 07624, 클로스터, 칼슨 코드 93
랭거, 로버트, 에스.
미국, 메사추세츠 02459, 뉴톤, 몬트베일 로드 98
러브, 제이. 크리스토퍼
미국, 메사추세츠 02143, 소머빌, 유닛 2, 서머 스트리트 227
젠슨, 클래브스, 에프.
미국, 메사추세츠 02421, 렉싱턴, 아웃룩 드라이브 103

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 세포의 물리적 성질 (physical property)을 기반으로 화합물을 세포에 전달하는 방법:

제 1 세포 군과 제 2 세포 군을 포함하는 세포 현탁액을 제공하는 단계, 상기 제 1 세포 군은 상기 제 2 세포 군과 상이한 크기, 직경 및/또는 막 강성을 갖는 것이고;

협착부 (constriction)를 포함하는 미세 유체 채널 (microfluidic channel) 을 통하여 상기 세포 현탁액을 통과시키는 단계, 상기 협착부는 상기 상기 제 2 세포 군 보다 제 1 세포 군에 더 많은 양의 화합물을 전달하기 위해서 크기 조절 된 (being sized) 것으로, 여기서 협착부를 통한 통과는 상기 제 1 세포 군을 변형시켜서 미세유체 채널을 통과하는 상기 세포 현탁액 중 상기 제 2 세포 군의 세포와 비교해서 상기 제 1 세포 군의 변형된 세포로 상기 화합물이 더 많은 양으로 전달되도록 하는 것이며;

상기 세포 현탁액을 화합물과 접촉시켜, 제 2 세포 군 보다 제 1 세포 군에 더 많은 양의 상기 화합물을 전달하는 단계,

상기 제 2 세포 군과 비교해서 적어도 10% 이상의 화합물이 제 1 세포 군으로 전달되는 것.

청구항 2

제1항에서,

상기 제 1 세포 군은 제 2 세포 군과 상이한 평균 크기를 갖는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 협착부는 상기 화합물이 전달되는 세포 현탁액 중의 세포의 크기보다 작은 직경을 갖는 것인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 협착부는 제 1 세포 군의 가장 작은 세포 또는 제 2 세포 군의 가장 작은 세포의 크기 보다 작은 직경을 갖는 것인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 협착부는 제 1 세포 군의 가장 큰 세포 또는 제 2 세포 군의 가장 큰 세포의 크기 보다 작은 직경을 갖는 것인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 현탁액을 상기 협착부를 포함하는 미세 유체 채널을 통과시키기 전 및/또는 통과한 후에 상기 세포 현탁액을 화합물과 접촉시키는 것인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 현탁액은 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 세포 현탁액은 두 개 이상의 상이한 직경을 갖는 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 현탁액은 적혈구-감소된 말초 혈액 세포의 집단 (erythrocyte-depleted population of perpheral blood cells)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제 1 세포 군 및/또는 제 2 세포 군은 종양 세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 적혈구로 이루어진 군에서 선택된 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제 1 세포 군은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 말초 혈액 단핵 세포는 백혈구 (leukocyte)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 백혈구는 호중구 (neutrophil), 호산구 (eosinophil), 호염기구 (basophil), 림프구 (lymphocyte), 단핵구 (monocyte), 대식세포(macrophage) 및 수지상 세포(dendritic cell)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 백혈구는 림프구인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 림프구는 B세포, T세포 및 NK세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제 1 세포 군은 순환 종양 세포 (circulating tumor cell)를 포함하고 상기 제 2 세포 군은 백혈구를 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 0.5 kDa 내지 5 MDa의 분자량 (molecular mass)을 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 3 kDa 내지 10 MDa의 분자량 (molecular mass)을 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 단백질, 핵산, 검출 가능한 마커, 활성 바이오분자 및 독소 (toxin)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 자성 입자, 형광 입자, 형광 염료, 형광 단백질, 형관 단백질을 코팅하는 핵산, 발광 효소 (luciferase), 또는 세포 사멸을 유도하는 화합물을 포함하는 것인, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 현탁액은 전혈 (whole blood)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 현탁액은 종양을 포함할 위험이 있거나 또는 종양을 포함한다고 진단된 대상체 (subject)의 전혈을 포함하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 종양은 흑색종 (melanoma), 대장암 (colon cancer), 전립선암 (prostate cancer), 폐암 (lung cancer), 췌장암 (pancreatic cancer), 유방암 (breast cancer), 간암 (liver cancer), 뇌종양 (brain cancer) 또는 혈액암 (blood cancer)인, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 협착부는 다음을 포함하는 것인, 방법:

(a) 너비 (width) 4 ㎛ - 10 ㎛, 및/또는

(b) 길이 (length) 1 ㎛ - 100 ㎛, 및/또는

(c) 상기 미세 유체 채널은 연속하는 1 - 10개의 협착부를 포함하는 것.

청구항 25

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 협착부를 통과하는 세포의 속도는 10 ㎜/s 내지 10 m/s인, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 미세 유체 채널의 협착부 따라서 상기 세포 현탁액이 지나가게 (drive) 하기 위하여 상기 세포 현탁액에 압력을 가하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 검출 가능한 마커를 포함하는 것인, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

검출 가능한 마커의 전달에 기초하여 세포 현탁액에서 세포를 분류하여 제 1 세포 군을 분리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 29

제27항에 있어서,

세포 현탁액의 세포를 항체로 태깅(tagging)하고 검출 가능한 마커 및/또는 항체 태깅(tagging)의 흡수에 기초하여 세포 현탁액에서 세포를 분류하여 제 1 세포 군을 분리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 항체는 제 1 세포 군 상의 표적에 결합하고, 상기 세포는 검출 가능한 마커의 존재 및 항체 태그의 존재에 의해 분류되는 것인, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

제1 세포 군은 종양 세포를 포함하고 상기 항체는 종양 세포 선택적 항체인, 방법.

청구항 32

제29항에 있어서,

상기 항체는 제 2 세포 군 상의 표적에 결합하고, 세포는 검출 가능한 마커의 존재 및 항체 태그의 부재에 의해 분류되며, 상기 항체는 혈액 세포(blood cell) 선택적 항체인, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서,

상기 제 2 세포 군은 혈액 세포를 포함하고 상기 항체는 혈액 세포(blood cell) 선택적 항체인, 방법.

청구항 34

제1항에 있어서,

제 1 세포 군은 제 2 세포 군과 상대적으로 상이한 막 강성을 갖는 것인, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서,

상기 제 1 세포 군은 제 2 세포 군보다 더 높은 막 강성을 갖는 것인, 방법.

청구항 36

제1항에 있어서,

상기 제 1 세포 군 및/또는 제 2 세포 군은 종양 세포, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 적혈구로 이루어진 군에서 선택된 세포를 포함하고;

상기 제 1 세포 군은 제 2 세포 군과 상대적으로 상이한 직경을 가지며;

상기 협착부는 화합물이 전달되는 세포 현탁액의 제 1 세포 군의 세포의 직경보다 더 작은 직경을 가지고;

상기 협착부는 너비 4 ㎛ - 10 ㎛, 길이 1 ㎛ - 100 ㎛, 및 연속하는 1 - 10개의 협착부를 가지며; 및

상기 화합물은 0.5kDa 내지 5MDa의 분자량을 갖는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포로의 크기-선택적 물질 전달에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 물질의 세포 내 전달은 도전이다. 나노입자, 전장 (electrical fields), 기공-형성 화합물 등에 의존한 현재 사용되는 기술은 특정 세포 유형에 일부 물질을 전달하는 것이 가능하지만 종종 타겟 세포의 물리적 성질에 대한 구분없는 방식으로 물질을 전달할 수 있다. 표적 세포의 물리적 성질에 의존한 선택적 전달 방법의 개발에 의하여, 연구, 진단 또는 치료적 적용을 위해 전달 활성에서 더욱 잘 조절 (control) 할 수 있다. 예를 들어, 순환 종양 세포 (Circulating tumor cells, CTCs)는 혈류에서 발견되고, 종양의 전이 (metastasis) 또는 신체에서 먼 부위로 암의 확산을 가능하게 한다고 여겨지는 종양세포이다. 암에 의하여 사망한 사람의 거의 90%는 전이 (metastasis) 때문이다. CTC의 식별 및 특징화 (characterization)는 전이성 암을 이해, 치료 또는 예방하는데 열쇠가 될 수 있다. 게다가 이러한 세포는 주위의 혈액 세포와 비교하여 상이한 물리적 성질을 갖는 것으로 알려져 있다.

발명의 내용

[0003] 관련 출원

[0004] 본 출원은 2013년 8월 16일 제출된 미국 예비출원 61/866,972호에 대한 우선권을 주장하고, 그 모든 내용은 참고문헌으로 본 특허출원에 명확하게 포함된다.

[0005] 정부 지원

[0006] 본 발명은 국립보건원 (National Institutes of Health)에 의하여 수여된 R01GM101420-01A1, 국립보건원 (National Institutes of Health)에 의하여 수여된 RC1 EB011187-02, 국립 암 연구소 (National Cancer Institute)에 의하여 수여된 P30-CA-14051, 및 국립 과학 재단 (the National Science Foundation)에 의하여 수여된 GRFP 최초 수여 번호 #1122374에 의한 정부 지원으로 만들어졌다. 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.

[0007] 발명의 요약

[0008] 본 발명은 크기, 부피, 직경, 세포질 점성 (cytosol viscosity) 또는 막 강성과 같은 세포의 물리적 성질을 기반으로 하나 이상의 세포에 물질을 선택적으로 전달하기 위한 장치, 시스템 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 물질은 세포 크기 의존적인 방법으로 전달될 수 있다. 상이한 크기의 세포를 포함하는 세포 현탁액은 타겟 전달 물질 (예를 들어, 염료, 단백질, 핵산 등)의 존재 하에서 장치를 따라 지나가게 될 수 있고, 이러한 물질은 집단 내에서 더 큰 세포로 선택적으로 전달될 수 있다. 상기 정보에서 전달 기작은 더 큰 세포의 세포막의 선택적 손상에 따르는데, 더 큰 세포는 채널 협착부에서 변형되는 반면 작은 세포는 막 손상을 일으킬 정도로 변형되지 않기 때문이다.

[0009] 일 구현예에서, 비-종양 세포와 구분하여 종양 세포를 라벨링하는 것이 달성될 수 있다. 세포는 형광 염료 또는 다른 검출 가능한 마커를 이용한 크기 선택적 태깅을 위해 장치를 따라서 흘려보내 진다. 혹은, 이러한 세포는 암세포와 혈구 (대부분의 혈구는 CD45+)를 더욱 대조시키기 위하여 항체 (예를 들어 종양 세포 선택적 항체, 예를 들어 CD45에 대한 항체)를 이용하여 염색된다. 시료는 예를 들어 표준 형광-활성 세포 분류기 (fluorescence-activated cell sorter, FACS)와 같은 세포분류기를 통하여 흘려보내진다.

[0010] 일 구현예에서, 세포 사이클 기반 세포의 라벨링은 집단 내에서 분열 상태에 가까운 세포가 분열 중인 세포보다

크기 때문에 성취될 수 있다. 집단 내에서 더 큰 세포 (bigger cell)로의 염료의 전달은 세포 사이클의 마지막 단계에 있는 개별 세포를 식별하는데 사용될 수 있다.

[0011] 일 구현예에서, 림프종 세포는 주위의 혈구 (blood cell)보다 종종 더 커서 따라서 세포 내 독소 (intercellular toxin)가 주위의 건강한 혈구가 아닌 림프종 세포로 전달될 수 있기 때문에 혈액암 (예, 림프종)을 위한 치료법은 성취될 수 있고. 이는 병에 걸린 세포의 선택적 사멸을 유도할 수 있다.

[0012] 태그 된 세포는 형광 또는 자성 정제 기술을 이용하여 분리될 수 있다. 유세포분석기 (flow cytometry) 또는 로봇 매니퓰레이터 (robotic manipulator)를 이용한 마이크로어레이는 형광을 기반으로 세포를 선택하는데 사용될 수 있지만, 자성 컬럼 (magnetic column), 미세유체 자성 분리 시스템 (microfluidic magnetic separation system) 또는 자성 스위퍼 (magnetic sweeper)는 자성적으로 태그된 입자를 분리하는데 사용될 수 있다.

[0013] 세포는 상대적인 크기 또는 직경을 기반으로 식별될 수 있다. 따라서, 상대적으로 더 큰 세포 (larger cell)는 선택적으로 또는 우선적으로 마커를 차지한다. 그 이유는, 더 큰 세포 (bigger cell)에서 세포막 손상의 정도가 상대적으로 더 심하고, 즉, 더 큰 세포는 더 작은 세포 (smaller cell)와 비교해서 더 심한 정도로 변형되기 때문이다. 더 큰 세포의 막 손상의 정도가 더 심하기 때문에, 적어도 10%, 25%, 50%, 2-폴드 (fold), 5-폴드 (fold), 10-폴드 (fold), 100-폴드 (fold) 또는 그 이상의 페이로드 분자는 더 작은 세포와 비교해서 더 큰 세포의 내부 (세포질)로 접근한다. 이러한 방법으로 검출 가능한 마커의 흡수 및 그 다음 마커의 흡수 마커에 근거한 분류의 결과로서, 종양세포의 순도 (purity) 는 말초혈액에서 순도의 수준 (level)과 비교해서 100배; 1,000배; 그리고 10,000배 또는 그 이상까지 향상된다. 순도는 종양 세포에 의하여 발현/과발현된다고 알려진 마커를(에) 표적으로 하는/결합하는 항체에 의하여 측정된다. 혹은, 혈구에 의하여 발현/과발현되지만 종양세포에 의해서는 발현되지 않는 마커에 대한 항체 (CD45가 그 예 이다.). 어느 하나의 처리방법은 관심 있는 세포를 선별하기 위하여 증가된 대비를 제공하는데 도움을 준다.

[0014] 높은 크기-태그 형광과 낮은 CD45 형광을 갖는 시료는 후보/ 잠재적 CTC로서 캡쳐된다. FACS 결과값은 본질적으로 상대적이다. "높은 (high)" 신호는 기선 대조 신호 (baseline control signal) 위로 최소 1 디케이드 (10배 더 높은 수준)의 형광 강도이고, 그리고 "낮은 (low)"은 양성 대조 집단 (positive control)아래로 1 디케이드 (decade) 이다.

[0015] 본 발명의 장치와 방법은 환자-유래 혈액 시료에서 1-1,000만 개의 백혈구 당 약 1 또는 그 이상 (2, 5, 10, 100, 1,000 또는 그 이상)의 CTC를 식별 및/또는 분리하는 방법의 오랫동안 지속된 문제에 대한 해결책을 제공한다. 예를 들어, 암 환자에서 혈액 1 ml 당 1 CTC는 임상적으로 유의미하다. 따라서, 순환 종양 세포를 분리 또는 식별하기 위한 방법은 세포 현탁액을 제공하는 단계; 협착부를 포함하는 미세 유체 채널을 통하여 상기 용액을 통과시키고, 상기 협착부는 백혈구와 비교하여 순환 종양 세포를 더 우선적으로 변형시키기 위해 크기 조절되는 것인 단계; 상기 협착부를 따라서 상기 세포 현탁액을 통과시키는 단계; 및 검출 가능한 마커를 갖는 용액과 세포 현탁액을 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 현탁액은 협착부를 포함하는 미세 유체 채널을 따라서 통과될 수 있고, 상기 협착부는 다른 그룹의 세포보다 상대적으로 상이한 물리적 성질을 갖는 그룹의 세포에 화합물을 우선적으로 전달하기 위하여 크기 조절된 것이다. 상기 물리적 성질은 세포 크기, 직경, 세포질 점성, 및/또는 막 강성 (예를 들어, 더 강한 성질의 세포는 덜 강한 성질의 세포보다 더욱 느리게 특수 미세채널 (micro channel)을 통과하는 전송 시간 분석에 의하여 측정되는 것, 예를 들어, Sharei et al., 2012, Anal. Chem. 84(15):6438-6443; Cross et al., 2007, Nature Nanotechnology 2:780-783에 기재된 바와 같이). 상기 접촉 (contact)은 변형 처리 후에 일어날 수 있다. 또는 물질은 변형 처리 전에 세포와 함께 사전 혼합될 수 있다. CTC와 백혈구는 모두 변형된다; 그러나 더 큰 세포는 더 심한 정도로 변형되고, 그러므로 분자는 이러한 세포에 선택적으로 전달되고, 그렇게 함으로써 그들을 치료 또는 태깅한다.

[0016] 예를 들어, 상기 마커는 검출 가능하게 표지된, 예를 들어 형광성 또는 자기 (자성)로 표지된 물질, 염료 또는 입자와 같은 물질을 포함한다. 상기 염료 또는 입자는 종양 특이적일 필요는 없다. 혹은, 그들은 종양 세포에 구분하여 결합 (예를 들어, 비-종양 세포와 비교해서 적어도 20%, 50%, 2배, 5배, 또는 그 이상) 한다. 그러나 본 방법의 특징 (specificity)은 종양세포는 백혈구보다 약간 더 크고 본 장치가 매우 크기 선택적이라는 발견에 근거한다. 이러한 크기 차이는 종양 유형 (tumor type)에 따라 결정된다. 예를 들어, 종양 세포는 백혈구보다 일반적으로 50% - 400% 더 큰다. 그러므로 전달 물질은 세포의 크기-특이적 변형을 통해 태그 되기 충분한 큰 세포로 우선적으로 들어간다. 전달된 태그는 그 다음 차례로 CTC를 식별하기 위하여 검출된다.

[0017] 일 예로, 상기 현탁액은 전혈 (whole blood)을 포함한다. 혹은, 상기 세포 현탁액은 혈액 외의 생리 식염수 (physiological saline solution)에서 세포의 혼합물이다. 특히, 상기 세포 현탁액은 종양을 포함한다고 진단되

거나 그러한 위험이 있는 대상체 (subject)의 전혈을 포함한다. 예를 들어, 상기 환자는 흑색종 (melanoma), 대장 (colon), 전립선 (prostate), 유방 (breast), 간 (liver), 폐 (lung), 췌장 (pancreatic), 뇌 (brain) 또는 혈액 (blood)의 전이성 질환 (metastatic disease)을 갖는다고 의심되는, 갖는 것으로 진단된, 또는 갖는다고 의심되거나 진단된다. CTC는 환자에서 전이성 질환이 발생하기 전에 존재할 수 있다. 그러므로 CTC의 조기 검출은 전이성 질환 발생으로 진행 가능한 환자를 조기에 식별하는 것을 나타내기 때문에, 이러한 조기 검출은 임상적으로 중요하다.

[0018] 혹은, 장치를 통해 세포를 통과시키기 전에 전처리 단계로 적혈구 용해가 수행된다.

[0019] 상기 장치는 비-종양 세포 (예를 들어, 정상 적혈구 또는 백혈구)로부터 종양 세포를 구분하는 물리적 파라미터 (physical parameter)에 의하여 특징 된다. 예를 들어, 상기 협착부는 너비 (width) 4 ㎛ - 10 ㎛, 길이 1 ㎛ - 100 ㎛, 및 일련의 (in series) 1 - 10 협착부를 포함한다. 세포의 예상 속도는 10 mm/s에서 10 m/s 일 수 있다. 장치를 통하여 세포 현탁액을 밀거나 나아가게 하기 위해, 상기 방법은 세포에 압력을 가하는 것을 더 포함할 수 있다. 압력은 장치를 따라서 세포 현탁액이 진행되게 하기 위해 사용되며, 그리고 협착 지점을 따른 통과는 세포를 변형시키고, 막 손상을 일으키며, 그렇게 하여 전달하는 것이다.

[0020] 상기 방법은 검출 가능한 화합물을 종양으로 도입하는 것과 관련 있다. 그러므로, 상기 세포 현탁액은 페이로드 (payload)를 포함하고 또는 상기 방법은 상기 세포 현탁액이 협착부를 통과한 다음에 일정 시간 동안 페이로드를 포함하는 용액에서 상기 세포 현탁액을 인큐베이션하는 단계를 더 포함한다. 예를 들어, 상기 페이로드는 나노입자와 같은 자성 입자 (magnetic particle), 양자점 (quantum dot)과 같은 형광 입자 (fluorescent particle) 또는 탄소 나노튜브 (carbon nanotube), 또는 형광 염료 (fluorescent dye) 또는 단백질 (protein), 또는 형광 단백질을 코드하는 유전 물질 (DNA 또는 RNA) 또는 검출 가능하게 하는 다른 화합물 (예를 들어, 발광 효소 (luciferase))을 포함한다. 혹은 검출 및 세포의 동시 조작을 가능하게 하기 위해서 앞서 언급된 물질의 조합이 전달될 수 있다. 예를 들어, 분류를 가능하게 하기 위해 형광 입자가 전달되고, 그리고 후속 종양 세포 (subsequent tumor cell) 생존을 가능하게 하고, 이의 성장과 배양된 전이성 세포의 추가적인 연구를 가능하게 하는 증식 후 분류를 활성화하기 위해 DNA, RNA 또는 단백질이 동시 전달될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 비-종양 세포로부터 종양 세포를 구분하는 것, 루멘 (lumen) 모양을 형성 (define)하는 미세유체 채널을 포함하는 것, 및 완충액에 현탁된 종양 세포가 그것을 따라서 통과할 수 있고, 비-종양 세포와 비교하여 협착 되도록 구성된 미세 유체 시스템이다. 비 종양 세포는 어느 정도 변형될 수 있다; 그러나, 중요한 것은 비-종양 세포는 더 작은 그들의 상대적인 크기 때문에, 막 손상 (membrane disruption)이 초래되기 충분한 정도로 변성되지 않은 반면에 종양 세포는 세포막 손상을 일으키기 충분하게 변형된다는 것이다. 더 작은 세포의 세포막은 손상되지 않거나, 또는 더 큰 세포보다 덜 손상되었는데, 예를 들어, 어떤 경우, 더 작은 세포와 더 큰 세포 모두 교란 (disrupted) 되지만, 더 작은 세포는 더 큰 세포보다 더 적은 물질을 받는다. 상기 미세유체 채널은 세포-변형하는 협착부를 포함하고, 상기 협착부의 직경 (diameter)은 세포의 직경 (diameter)의 함수이다. 상기 협착부는 비-종양 세포와 비교해서 종양 세포를 우선적으로 변형하기 위하여 크기가 조절된다. 이러한 우선적 변형은 선택적으로 비-종양 세포에 대비해서 종양 세포로 타겟 물질의 전달이 가능하게 하기 위하여 설계된다. 선택적 전달은 유세포 분석기 (FACS), 미세조작 (micromanipulation), 자성 분류 (magnetic separation), 세포 배양 (cell culture)과 같은 분류/농축 방법 (sorting/enrichment method)을 통하여 목적하는 종양 세포 집단을 모으는 것을 가능하게 한다.

[0022] 상기 방법은 생리학적 온도 (예를 들어, 상온 37 ℃, 예를 들어 20 ℃, 또는 혹은, 0-4 ℃)에서 수행된다. 경우에 따라, 막의 회복을 지연시킴으로써 더 나은 전달 성능을 얻을 수 있고, 세포의 세포 내 이입 활성 (endocytotic activity)을 감소시킴으로써 엔도시토시스로부터 환경요인을 최소화하기 때문에 후자의 온도가 바람직하다. 위에서 기재한 바와 같이, 상기 세포 현탁액은 전혈 또는 인산 완충 염 (phosphate buffers saline, PBS) 또는 전달 버퍼로서 조직 배양 배지와 같은 생리학적 완충액 내의 어느 포유류 세포 현탁액이다. 일 예로, 조직 배양 배지에서 Ca 또는 Mg의 감소 효과로 인해 PBS가 바람직하다.

[0023] 일 측면에서, 세포의 물리적 성질을 기반으로 세포를 분리 또는 식별하는 것은 세포 현탁액을 제공하는 것; 협착부를 포함하는 미세 유체 채널을 통해서 상기 현탁액을 통과시키는 것; 상기 협착부를 통하여 상기 세포 현탁액을 통과시키는 것; 및 상기 세포 현탁 용액을 화합물과 접촉하는 것을 포함한다. 상기 협착부는 상대적으로 더 작은 세포와 비교해서 상대적으로 더 큰 세포를 우선적으로 변형하기 위해 크기가 조절 될 수 있다.

[0024] 다른 측면에서, 비-종양 세포와 종양세포를 구별하기 위한 미세 유체 시스템은 루멘을 형성 (define)하고, 그리고 완충액에 현탁된 종양세포가 미세 유체 채널을 따라서 통과될 수 있고, 비-종양 세포에 비해서 협착 되도록

구성된 미세 유체 채널을 포함할 수 있다. 상기 미세 유체 채널은 세포 변형 협착부를 포함할 수 있다. 협착부의 직경은 세포의 직경의 함수 일 수 있다.

[0025] 다음의 특징들 중 하나 이상이 포함될 수 있다. 예를 들어, 물리적 성질은 크기 및 직경 중 하나 이상 일 수 있다. 상기 세포 현탁액은 다음의 하나 이상을 포함할 수 있다: 말초 혈액 세포 (peripheral blood cell); 및 상이한 물리적 성질을 갖는 적어도 두 개의 상이한 세포 타입. 상기 세포 현탁액은 적혈구-감소된 말초 혈액 세포의 집단 (erythrocyte-depleted population of peripheral blood cell)을 포함할 수 있다. 상기 더 큰 세포 (larger cell)은 순환 종양 세포를 포함할 수 있고, 더 작은 세포 (smaller cell)는 백혈구 (leukocyte)를 포함할 수 있다. 상기 화합물은 0.5 kDA 내지 5 MDa의 분자량 (molecular mass)을 포함할 수 있다. 상기 화합물은 3 kDA 내지 10 kDa의 분자량을 포함할 수 있다. 상기 화합물은 검출 가능한 마커 (예를 들어, 양자점, 시아닌 (cyanine), 플루오레세인 (fluorescein), 로다민 (rhodamine) 및 플루오레세인이소티오시안산염 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 또는 테트라메틸로다민 이소티오시안산염 (Tetramethylrhodamine isothiocyanate, TRITC) 또는 NHS-로다민 (NHS-Rhodamine), 플루오레세인-5-말레인이미드 (fluorescein-5-maleimide) 및 알렉사 플로오르 (Alexa Fluors)와 같은 말레인이미드 활성화 형광단 (maleimide activated fluorophore)) 활성 바이오분자 (active biomolecule), 및/또는 타겟 세포를 선택적으로 죽이기 위한 독소 (예를 들어, 슈도모나스 외독소 (Pseudomonas exotoxin), 디프테리아 독소 (Diphtheria toxin), 및 리신 (ricin), 카스파제 단백질 (caspase protein), 필수적인 세포 기능을 방해하는 항체 (예를 들어, 튜불린 (tubulin)에 대한 항체))를 포함할 수 있다. 상기 화합물은 세포 기능 (예를 들어, 전사 인자, siRNA, DNA, mRNA, 항체, 저분자 약물 (small molecule drug)) 에 영향을 줄 수 있고, 및/또는 세포 사멸을 유도할 수 있다. 상기 화합물은 세포가 상기 협착부를 따라서 통과한 후에 상기 세포로 들어갈 수 있다. 상기 현탁액은 전혈을 포함할 수 있다. 상기 현탁액은 종양을 포함한다고 진단된 또는 그런 위험이 있는 대상체의 전혈을 포함할 수 있다. 상기 종양은 흑색종 (melanoma), 대장암 (colon cancer), 전립선암 (prostate cancer), 폐암 (lung cancer), 췌장암 (pancreatic cancer), 유방암 (breast cancer), 간암 (liver cancer), 뇌종양 (brain cancer) 또는 혈액암 (blood cancer)을 포함할 수 있다. 상기 협착부는 너비 (width) 4 ㎛ - 10 ㎛, 길이 1 ㎛ - 100 ㎛, 일련의 1-10 협착부를 포함할 수 있다. 협착부를 통과 (traverse)하는 세포의 속도는 10 mm/s 내지 10 m/s 을 포함할 수 있다. 상기 미세 유체 채널의 협착부를 따라서 세포를 보내기 위해 세포 현탁액에 압력이 적용될 수 있다.

[0026] 상기 세포 현탁액은 페이로드를 포함할 수 있고, 또는 상기 세포 현탁액은 협착부를 따라 통과한 후에 일정 시간 동안 페이로드를 포함하는 용액에서 인큐베이트 될 수 있다. 상기 페이로드는 자성 입자 (magnetic particle), 양자점 (quantum dot)과 같은 형광 입자 (fluorescent particle) 또는 탄소 나노튜브 (carbon nanotube), 또는 형광 염료 (fluorescent dye) 또는 단백질 (protein), 또는 형광 단백질을 코드하는 유전 물질 (DNA 또는 RNA), 검출을 가능하게 하는 다른 화합물 (예를 들어 발광효소 (luciferase))을 포함할 수 있다. 상기 협착부는 비-종양 세포보다 종양 세포를 우선적으로 변형하기 위하여 크기가 조절될 수 있다.

[0027] 본 발명의 이러한 및 기타 능력은, 본 발명 그 자체와 마찬가지로, 다음의 도면, 상세한 설명 및 특허청구범위의 검토 후 더욱 잘 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 빠른 기계적 변형 (rapid mechanical deformation)에 의한 순환 종양 세포 (CTCs)의 크기 선택적 태깅에 대한 시스템의 도이다.

도 2는 미세 유체 플랫폼의 크기 선택적 전달과 CD45 항체 염색법의 결합은 독립적으로 각각 독립적인 기술보다 더 나은 정도 이상의 샘플 농축 인자 (enrichment factor)를 만들어 낸다는 것을 보여주는 막대 그래프이다.

도 3a는 세포 라벨링 (cell labeling)의 개략도이다. 적혈구 (RBCs)는 eBioscience RBC 용해 완충액 (RBC lysis buffer, Cat. No. 00-4333)과 같은 표준 적혈구 용해 시약 (standard erythrocyte lysis reagent)을 이용한 적혈구 용해에 의하여 전혈로부터 제거되었다. 그 결과 협착 채널 미세 유체 장치 (constriction channel microfluidics device)를 따라서 흘려보내진 현탁액 결과물은 형광 염료 (및 혹은 다른 화합물)와 함께 인큐베이션 되었다. 상기 현탁액은 그 다음 CD45 표지되었고, 형광 염료로 표지된 비-CD45+ 세포를 모으기 위해 형광-활성 세포 분류 (fluorescence-activated cell sorter, FACS) 기기로 처리되었다.

도 3b는 PBMC (50psi에서 30-6 칩 (chip)), HT-29 (50psi에서 30-6 칩 (chip)), SK-MEL-5 (50psi에서 10-7 칩 (chip)), 및 PANC-1 (50psi에서 10-7 칩 (chip))에 대한 세포스퀴즈 (CellSqueez) 장치에 의하여 전달된 3 kDa 덱스트란 컨쥬게이트된 케스케이드 블루의 일련의 유세포분석 플롯 (flow cytometry plot) 이다.

도 3c는 일련의 Panc-1 종양 세포 (Panc-1 tumor cell)와 혈구 (blood cell)의 투과광 (transmitted light) 및 형광 현미경 사진이다. pre-전달 세포는 주위의 세포 내 섭취 (background endocytosis)를 교정하기 위하여 염료의 존재 하에서 인큐베이션 되었다. post-전달 사진은 염료의 지속 (retention)과 전달한 다음에 세포의 부착능과 성장능을 입증하기 위하여 전달 24시간 후에 촬영되었다. 큰 혈구 또한 프로세스 동안 라벨화 될 수 있음에도 불구하고, 이러한 데이터는 종양 세포의 선택적 라벨링을 보여준다.

도 4는 림프종 세포 vs. 건강한 PBMC에 대한 염료의 선택적 전달을 보여주는PBMC와 림프종 혼합물 (lymphoma mixture)에서 백분률 PBMC 대 PBMC 전달의 플롯이다. 현탁액이 수치상 99.9% 건강한 PBMC일 때에도, 일부 실시에서 8배까지 전달의 특이성이 성취될 수 있다. 다른 실시에서 더 큰 특이성이 달성될 수 있다.

도 5a는 전혈 (40 세포/ml) 속에 섞이고 CD45 카운터 스테인 (CD45 counter stain, APC)로 처리된 테트라메틸로다민 덱스트란-표지된 Panc-1-GFP 세포의 플롯이다.

도 5b는 PANC-1 GFP 태깅이 GFP 형광 기반으로 독립적으로 확인될 수 있는 방법을 보여주는 GFP vs. CD45의 FACS 플롯이다. P5 게이트는 후보 CTC를 분류하기 위한 기초로 사용될 수 있고, P4는 PANC-1 GFP 세포의 정체 (identity)를 확인하는데 사용된다. 녹색 점은 정확한 점이고 (P4 & P5), 붉은색 점은 거짓양성 (P5 만), 파란색 점은 놓친 것 (P4 만) 이다.

도 5c는 췌장 관 선암종 (pancreatic ductal adenocarcinoma)을 확인한 HTB1760의 초기 종양(HTB1760's primary tumor)의 조직병리학 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 순환 종양 세포 (CTC)는 혈류에서 발견되는 종양 세포이고, 멀리 떨어진 기관 (organ)으로의 암 전파 (dissemination)에 원인이 되는 것으로 여겨진다. CTC는 암환자에 대한 최소 침습의 (minimally-invasive), "액상 생체검사 (liquid biopsy)"로 여겨지고, 환자 결과와 치료 효과에 대한 예후 지표로서 유용하다. 이러한 단일 세포의 종합적인 특성은 전이성 전파, 치료 내성 (treatment resistance), 및 종양 생물학 (tumor biology)의 더 나은 이해를 제공한다.

[0030] 전형적인 인간 적혈구 (erythrocyte)는 약 6.2-8.2 ㎛의 원판 직경, 가장 두꺼운 부분에서 두께 2-2.5 ㎛, 그리고 중심에서 최소 두께 0.8-1 ㎛을 갖고, 대부분의 다른 인간 세포보다 훨씬 작다. 백혈구 (하얀 혈구, white blood cell)는 호중구 (neutrophil, 직경 12-14 ㎛), 호산구 (eosinophil, 직경 12-17 ㎛), 호염기구 (basophils, 직경 14-16 ㎛), 림프구 (lymphocytes, 휴지기 동안 평균 직경 6-9 ㎛, 활성화 동안 직경 10-14 ㎛), 및 단핵구 (monocytes, 직경이 20 ㎛까지 일 수 있는 백혈구 중 가장 큰 타입)를 포함한다. 도 1에 나타낸 바와 같이, CTC와 혈액 세포 (hematologic cell) 사이의 크기차이는 일반적으로 순환하고 있는 혈액 (CTC~9-20 ㎛; RBC~8 ㎛ 원반모양(discoid); 백혈구~7-12 ㎛) 안에서 CTC를 다른 세포로부터 구별하는 것을 가능하게 한다. 도 1을 보라. 항체 (또는 이들의 세포-특이적 단편) 또는 다른 종양 세포 특이적 리간드를 이용한 다음의 종양 세포 특이적 라벨링은 본 방법의 선택성 (selectivity)을 증가시켰다.

[0031] CTC는 혈류에 10^6-10^7 단핵세포 (mononuclear cell) 중에서 하나 존재하기 때문에, 고감도 농축 기술 (high-sensitivity enrichment technique)은 혈구와 CTC의 면역학적 또는 형태학적 차이점에 의존하여 사용된다. 면역학적 접근법은 종종 상피 세포 표면 마커 (epithelial cell surface marker, EpCAM 같은)와 종양-특이적 단백질 (tumor-specific proteins, Her2-neu, MUC I/MUC2, CEA (carcinoembryonic antigen), mammaglobulin, 및 alpha-fetoprotein과 같은)을 타겟으로 하거나, 또는 CD45+ 세포를 감소시키는 것을 목적으로 한다. 미세필터 (microfilter), 밀도-차등 분리 (density-gradient separations) 그리고 미세 유체 플랫폼 (microfluidics platform)은 형태학 기반 방법 (morphology-based method)의 예이다. 이러한 접근방법 모두 내재하는 편향 (inhereny bias)을 가지고, 낮은 농축 효과로 어려움을 겪으며, 그리고 상당한 수의 CTC는 표면 항원을 하향조절 하고 다양한 형태적 특징을 보일 것이다. CTC의 일부가 전이에 책임이 있고, 또는 신뢰할 만한 예후 마커라는 것이 여전히 만이 알려지지 않았기 때문에 기술분야에서 이러한 편향은 상당한 이의 (challenge)를 갖는다. 따라서, 대부분의 임상적 후보를 검사하기 위하여 모든 후보 CTC 아형 (sub-type)의 고순도 분리를 보장할 수 있는 기술을 개발하는 것이 중요하다. 여기에 기재된 장치 및 방법은 관심있는 CTC 아형의 분리 및 열거 (enumeration)를 가능하게 한다.

[0032] 결합된 농축 방법은 더 적은 편향 (bias)과 조정 가능한 파라미터를 기반으로 순수한 CTC를 태그하거나 분리하기 위하여 면역학적 및 형태학적-기반의 처리방법 모두를 통합한다. 상기 방법은 미세 유체 세포 내 전달 (도

1)과 전혈로부터 순환 종양 세포의 강력한, 고 민감성 정제 (high sensitivity purification)를 달성하기 위한 항체 염색 (도 2)을 결합하고, 너비 (width) 4 ㎛-10 ㎛, 길이 1 ㎛-100 ㎛, 그리고 일련의 1-10 협착부를 포함한다. 세포의 추정 속도는 10 mm/s - 10 m/s 일 수 있다. 상기 특정 장비 파라미터 선택은 표적 종양 세포 타입에 의하여 결정, 예를 들어 흑색종 환자 vs. 대장암 환자를 위한 CTC를 선택하는데는 다른 장치 설계가 사용, 된다. 종양 세포 크기/직경의 예로; 흑색종 ~15㎛, 대장암 ~ 11 ㎛, 및 췌장암 ~ 15㎛.

[0033] 이러한 처리방법에서, 빠른 기계적 변형 전달 시스템은 종양 세포로 형광, 자성 (magnetic) 및/또는 다른 구별되는 물질 (distinguishing material)을 선택적으로 전달하기 위하여 많은 CTC와 그 주변 혈구의 내재적 크기 차이를 이용한다. 상기 과정에서, 항체-기반 형광 및 자성 태깅은 후보 CTC와 주변 혈구의 대비를 향상시키기 위하여 사용된다. CTC 분리를 위해 크기-기반 및 면역적 접근을 특유의 방법으로 조합함으로써, 이 기술은 분석을 위해 환자 샘플에서 후보 종양 세포의 비-편향된 분리 (non-biased isolation)를 위한 유용성 (utility)을 증명하였다. 일 실시예에서, 더 작은 그리고 더 큰 세포 모두 변형되지만, 더 작은 세포의 막은 막이 손상되는 지점까지 변형되지 않는다. 예를 들어, 전혈 (여기서 가장 건강한 백혈구 세포는 ~8 ㎛ 크기)에서 15 ㎛ 종양 세포에 선택적으로 전달하기 위해, 너비 6 ㎛의 협착부가 사용될 수 있다. 이러한 협착부는 두 세포 유형 모두 변형할 것이지만, 8 ㎛ 혈액 세포가 아니라 15 ㎛ 종양세포의 세포막을 매우 우선적으로 교란 (disrupt)할 것이다.

[0034] 임상적/번역 관련성 (Clinical/Translation Relevance)

[0035] CTC는 저항의 기작 (mechanism)을 이해하고, 표적 치료의 선택을 안내하기 위하여 종양 생검 (tumor biopsy)을 위한 대안 (surrogate)으로 분석되고 있다. 치료 전 및 후에 CTC의 수 (number)와 조성 (composition)의 측정은 치료 효과와 예후 (prognosis)를 가리킨다. 이러한 처리방법은 세포 크기와 표면 항원을 기반으로 CTC의 태깅을 위하여 튼튼한, 높은-처리율의, 일회용 장치를 활용한다. 게다가, 다양한 거대분자를 전달하는 능력은 또한 분자 프로브 (항체, 양자점, 탄소나노튜브, 및 분자 비콘 (molecular beacon)과 같은)를 전달할 수 있게 하고, 이러한 분자 프로브는 세포 내 환경에 반응하고 이렇게 하여 표적 세포의 세포 내 성질에 대한 더 많은 정보를 제공한다. 이러한 복합적 처리방법은 오로지 면역학적 또는 형태학적 분리에만 의존한 다른 방법에 의하여 놓치고 있었던 CTC 집단을 농축할 수 있는 강력한 플랫폼을 제공한다. 이러한 기술은 환자의 CTC를 분리하는데 유용하다.

[0036] 실시예 1 (Example 1)

[0037] 전혈 또는 다른 세포 현탁액은 비표지된 및/또는 항체-코팅된 자성 비드 모두를 이용하여 처리된다. 이러한 세포는 그 다음 희귀 세포 (rare cell)를 위한 고성능 (high-fidelity), 자성의 농축 시스템을 이용하여 분리된다. 나노웰 (nanowell) 기술은 또한 고순도 분리를 달성하기 위해 84,672 서브나노리터 웰의 엘라스토머릭 어레이 (elastomeric array)로부터 관심있는 단일 세포를 자동기계 장치적으로-검색하고 이미지화 하는 방법으로 사용될 것이다.

[0038] 다양한 표현형의 단일의, 살아있는, 순종의 (pure), 온전한 (intact) CTC를 얻는 것은 즉각적인 임상적 그리고 번역적 관련성에 대하여 유전적 수준에서 기능적 수준까지 숙주의 특성화를 가능하게 한다. 이러한 방법은 감소된 편향 (bias)과 함께, 다양한 CTC의 매우 민감하고 특이적인 농축을 허용한다.

[0039] 실시예 2

[0040] 자성 나노입자는 종양 세포주 & PBMC에 전달된다. EpCAM-발현 상피 암세포주 (예를 들어, HT-29, LNCaP, 및 SK-BR-3)에 나노입자 전달은 인간 혈액 유래 대량의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 현탁액과 비교된다.

[0041] 폴리에틸렌 글리콜 (polyethylene glycol, PEG)로 표면 코팅된 10 nm 산화철 나노입자 (iron-oxide nanoparticle)는 전혈과 혼합된 종양 세포로 전달되고, 상기에 기재된 세포 분리 시스템을 이용하여 태그된 세포의 혼합물이 처리된다. 예를 들어, 미세 유체 전달 시스템은 세포막에서 일시적인 기공을 형성하기 위해 급성 기계적 세포의 변형을 유도하는데 사용되었다 (도 1). 상기 접근방법은 다양한 유형의 세포로 단백질, RNA, DNA 및 나노입자를 포함하는 물질의 범위를 전달하는 능력을 입증하고, 전혈, 종종 미세 유체 시스템에 대하여 문제를 일으키는 배지를 대상으로 한다.

[0042] 모델 분자로서 예시의 태깅 분자, 예를 들어, 3 kDA 및 70 kDA, 형광-표지된 덱스트란 고분자는 크기에만 기반하여 PBMC와 두 개의 다른 암 세포주를 구별하는데 사용되었다. 그 결과는 또한 전혈에서 종양 세포에 자성 입자의 선택적인 전달을 위한 시스템의 유용성을 나타낸다. PEG 코팅된 산화철 입자는 대장암 (예를 들어, 세포주 HT-29에 의하여 예시된 바와 같이)을 자성적으로 태그하는데 사용된다. 또한, 농축은 나노 입자 흡수를 직접적

으로 측정하기 위하여 산화철 나노입자 표면에 FITC의 접합을 이용하여 수행된다.

[0043] PEG 코팅된 10 nm 산화철 나노입자는 세포 현탁액으로 전달되고, 상기 세포 현탁액은 개별적으로 전혈과 혼합되고 CTC (예를 들어, 환자-유래 혈액 시료) 또는 세포주 HT-29, LNCaP, 및 SK-BR-3 세포를 포함한다고 의심되는 또는 포함하는 것으로 알려진 것이다. 그 다음 예를 들면 높은 정확도 자성 분리기를 이용하여 태그된 세포의 혼합물의 결과물이 정제된다. 상기 분리기는 높은 산화철 함량을 갖는 모ㄷ델 CTC와 덜 효과적으로 표지된 PBMC를 정확하게 구별한다. 선택적으로, 적혈구는 처리, 증가 된 나노 입자 농도, 변경된 그들의 크기 또는 여러 번의 처리 단계를 포함하는 것의 사전에 용해된다.

[0044] 실시예 3

[0045] 결합된 면역학 및 형태 기반 방법은 다음에 따라 수행된다. 장치를 이용한 세포 크기-기반 처리 후에, 세포는 항체 또는 형광 표지된 항-CD45 항체와 같은 다른 종양세포 특이적 리간드로 처리된다. 세 가지 분리 방법의 민감도 (sensitivity)와 특이도 (specifity)는 비교되었다:: 1) 장치 만 2) 항-CD45 항체만 3) 장치+항-CD45 항체. 형태학적 태깅 (장치) + 면역학적 태깅 (예를 들어, 항-CD45 항체)은 각각의 개별 기술에 비해 우수한 민감도 (및 특이도)를 보여주는 것이 확인되었다 (도 2). 예를 들어, 항-CD45 항체에 비해서 민감도에서 2-5x 증가 및/또는 특이도에서 2-5x 증가가 관찰된다. 정도 (order of magnitude) 이상의 농축인자가 관찰되었다 (도 2).

[0046] 실시예 4

[0047] 일 실시예 에서, 장치는 실리콘 및 유리로 부터 제조된다. 혹은, 상기 장치는 실리콘 (silicone), PDMS, 폴리카보네이트 (polycarbonate), 아크릴 (acrylic), 폴리프로필렌 (polypropylene), 폴리스티렌 (polystyrene)과 같은 고분자로 제조된다. 어느 장치는 멸균 (열 또는 감마선)되고, 일회용이다. 장치의 성능은 물질 및 파라미터를 이용하여 다양한 세포 유형에 대하여 검증된다. 예를 들어, PEG 코팅된 양자점 (범위 10-50 nm 크기)을 이용한 유체 속도 (100 mm/s-10,000 mm/s)의 범위에서 성능은 나노입자의 전달 효과 및 세포 활성여부를 결정하기 위하여 사용된다. 장치의 예시는 본 발명에서 인용문헌으로 포함되는 PCT/US2012/060646에 기재되어 있다.

[0048] 장점 (Advantage)

[0049] 종래의 처리방법과 비교했을 때 본 방법은 다음의 장점이 있다. 항체-기반 방법에 비해서, 본 처리방법은 대부분의 암 유형에 대해 일반화할 수 있고 어느 특정 세포 표면 마커에 독립적인 비-편향 분리 방법을 제공한다. 상기 장치 및 방법은 기존의 마커에 의하여 분리될 수 없는 CTC의 식별을 수행함으로써, 현저한 진단 및 예후적 의미를 갖는다.

[0050] 기존의 크기-기반 분리방법에 비하여, 본 명세서에 기재된 상기 장치 및 방법은 매우 높은 처리량 (throughput)을 제공하고, 특정 크기 범위의 CTC를 포착하기 위하여 "W"를 변화하여 조정한다 (도 1). 예를 들어, 너비 (width) 6 ㎛ 협착부는 대장암 세포를 캡쳐하는데 적합한 반면, 너비 (width) 7 ㎛ 및 8 ㎛는 췌장암 및 흑생종 세포를 각각 캡쳐하는데 적합하다. 게다가, 기존 기술과는 달리, 이 시스템은 분리 민감도를 향상시키기 위해 및/또는 CTC의 일부의 멀티-파라미터 분리를 가능하게하기 위해 항체-기반 기술과 결합 된다 (예를 들어, 특정 크기의 CTC + 표면 마커를 분리함으로써).

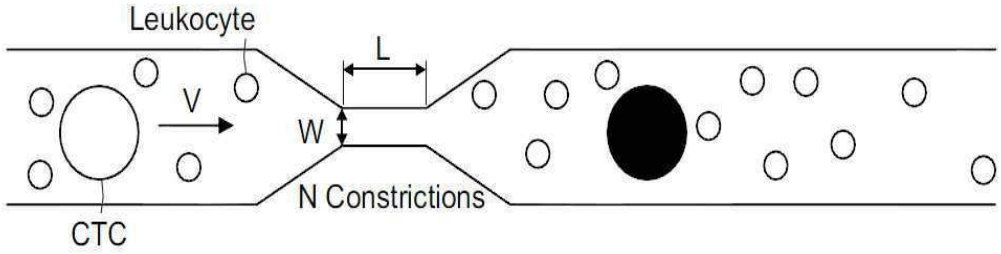
[0051] 다양한 암 유형에서 CTC의 효과적이고, 강력한 분리를 가능하게 함으로써 이 기술은 암과의 싸움에서 중요한 플랫폼이 될 것이다. 이 기술의 예후적 및 진단적 잠재력은 암의 진행에서 중요한 새로운 유전자의 식별을 가능하게 하고, 따라서 신규한 치료제의 개발을 가능하게 할 수 있다. 또한, 더욱 정확한 환자의 예상 수명의 예측 및 치료 효과를 제공할 수있다.

[0052] 본 명세서에 기재된 CTC 분리 방법은 고 농축 계수 (factor)/회수율 및 조절가능한 바이어스 (특정 마커 vs. 특정 크기)를 수득하기 위해 면역 및 크기 기반 분리를 결합한다.

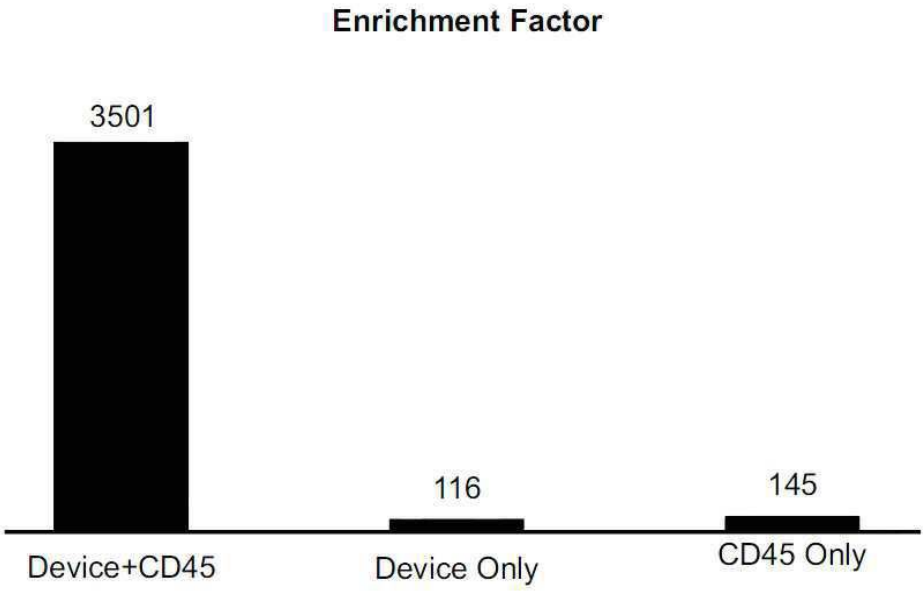
[0053] 상기 설명에서 약간의 변형에 대하여 기재했음에도 불구하고, 다른 변형은 가능하다. 예를 들어, 상기의 구현예는 개시된 특징의 다양한 조합 및 서브조합 및/또는 상기 개시된 여러 특징의 조합 및 서브조합이 될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 기재된 로직의 흐름은 목적하는 결과를 달성하기 위하여 설명된 특별한 순서 또는 순차적인 순서가 요구되지 않는다. 다른 측면은 다음의 청구범위 내에 있다.

도면

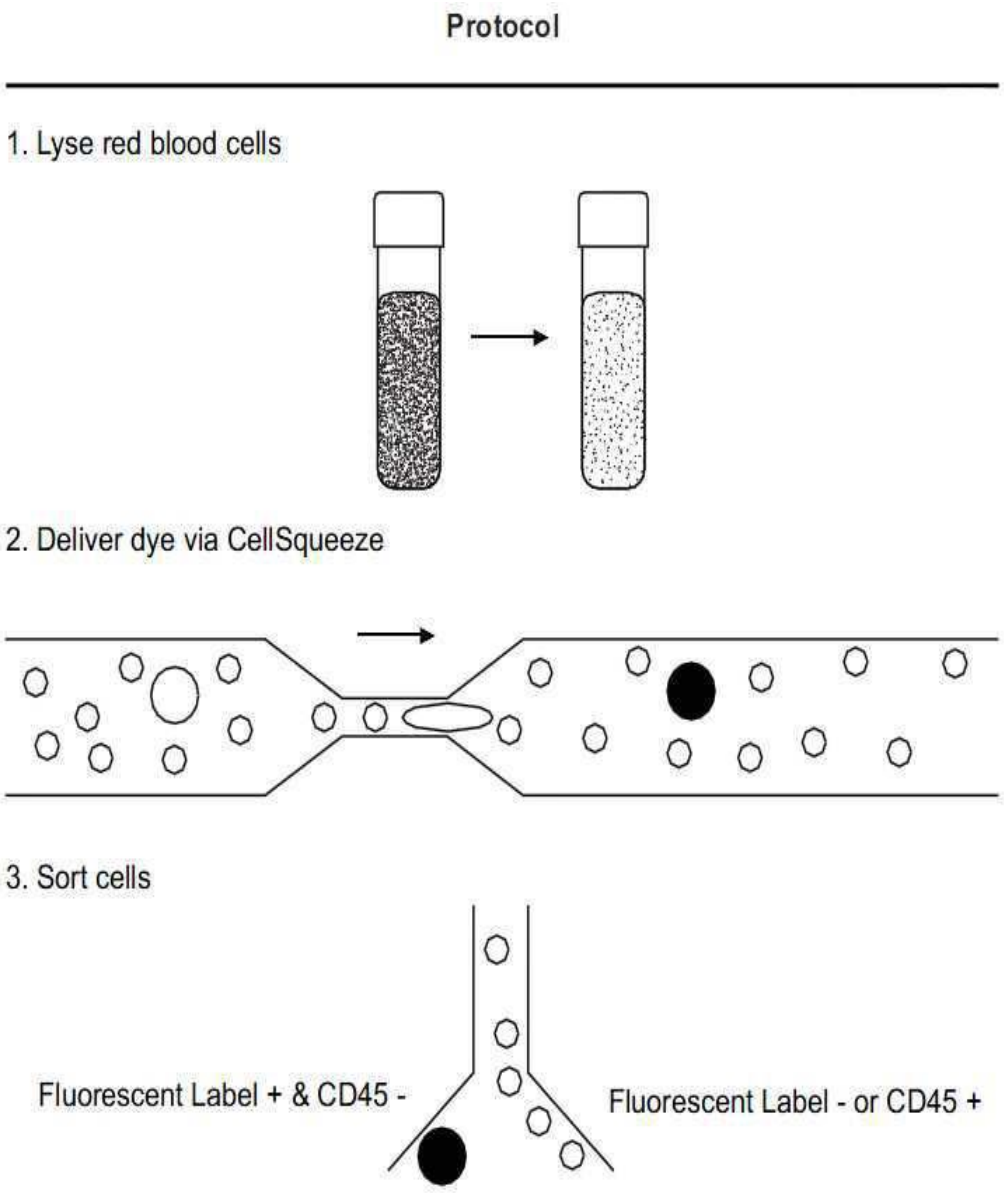
도면1


Leukocyte
L
V
W
N Constrictions
CTC

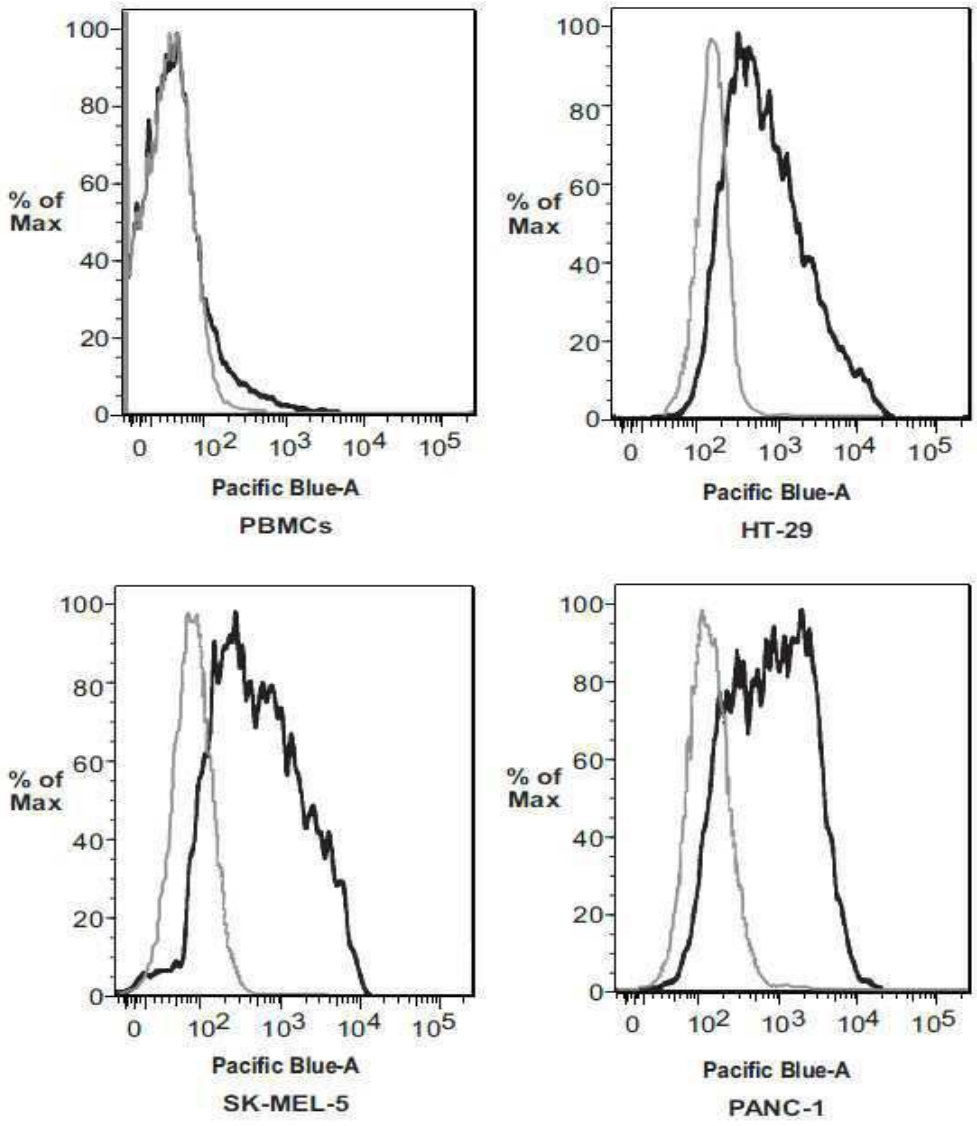
도면2


Enrichment Factor
3501
116
145
Device+CD45
Device Only
CD45 Only

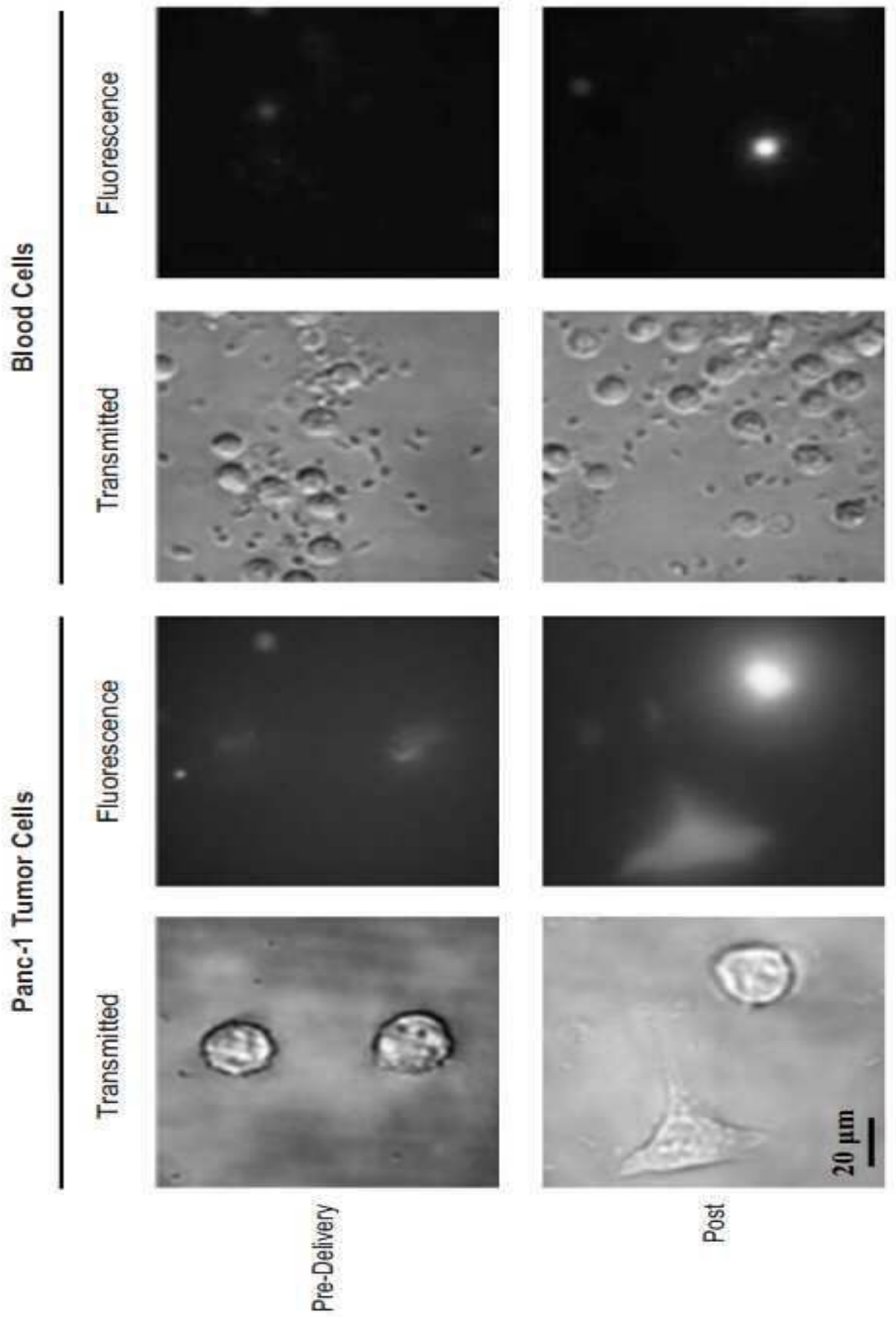
도면3a


Protocol
1. Lyse red blood cells
2. Deliver dye via CellSqueeze
3. Sort cells
Fluorescent Label + & CD45 -
Fluorescent Label - or CD45 +

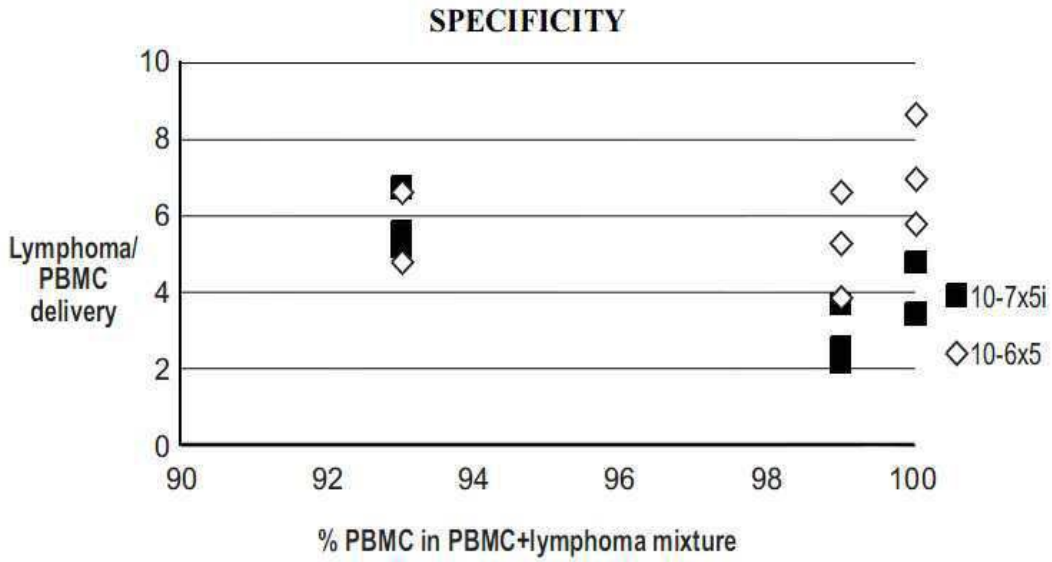
도면3b



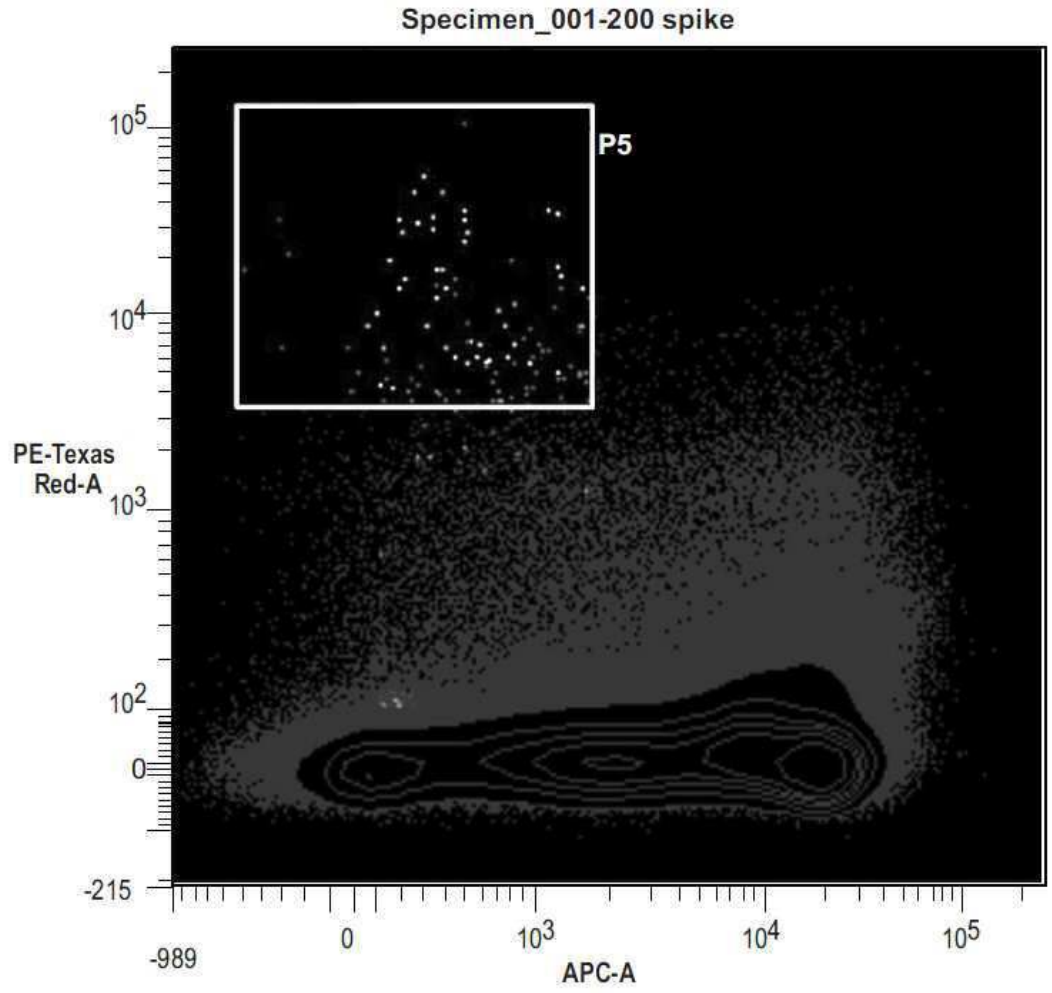
도면3c


Blood Cells
Panc-1 Tumor Cells
Fluorescence
Transmitted
Fluorescence
Transmitted
Pre-Delivery
Post
20 µm

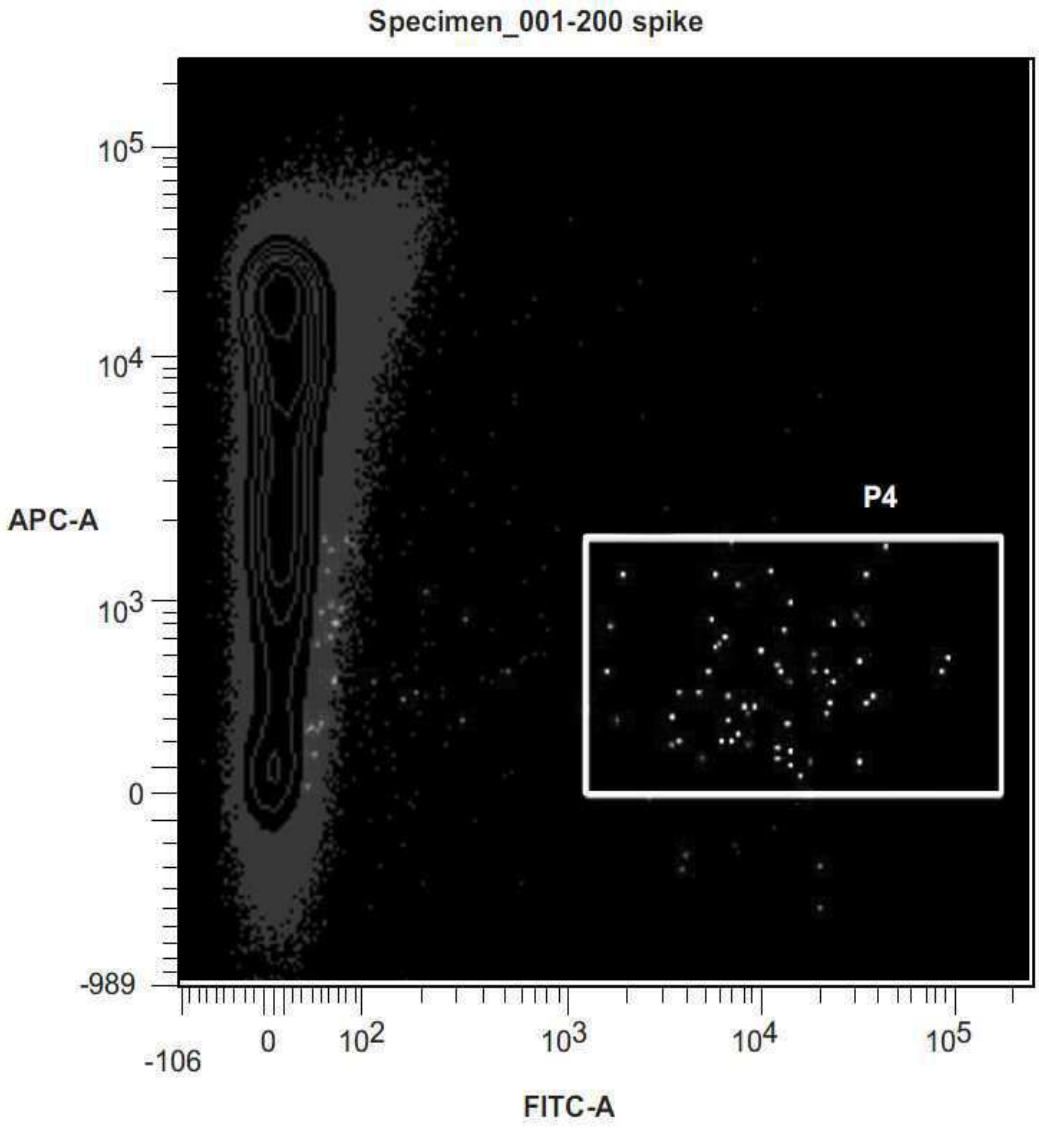
도면4


SPECIFICITY
Lymphoma/ PBMC delivery
10
8
6
4
2
0
90
92
94
96
98
100
10-7x5i
10-6x5
% PBMC in PBMC+lymphoma mixture

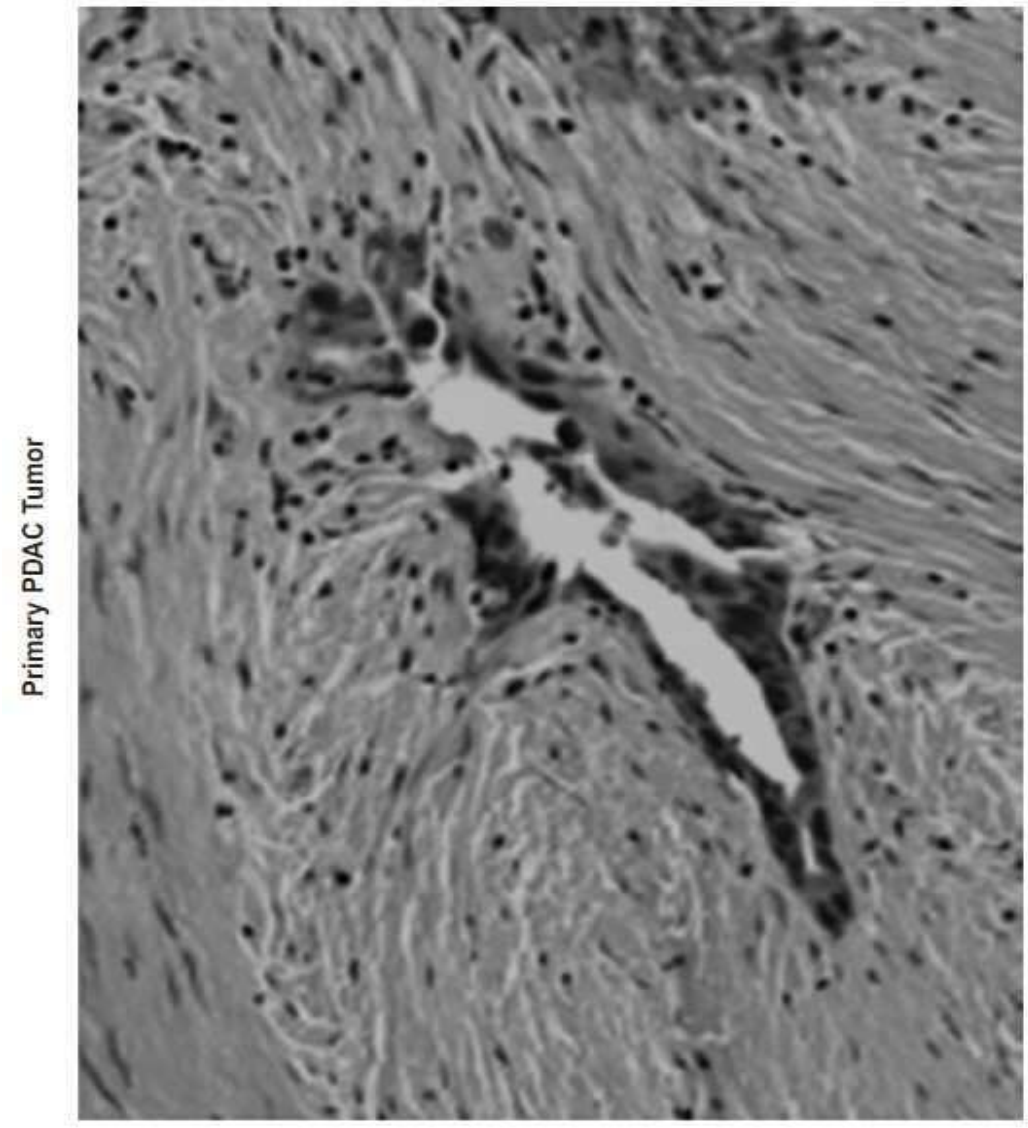
도면5a


Specimen_001-200 spike
P5
PE-Texas Red-A
10^5
10^4
10^3
10^2
0
-215
-989
0
10^3
10^4
10^5
APC-A

도면5b


Specimen_001-200 spike
P4
APC-A
FITC-A
10^5
10^4
10^3
0
-989
-106
0
10^2
10^3
10^4
10^5

도면5c



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 32

【변경전】

제29항에 있어서,

상기 상체는 제 2 세포 군 상의 표적에 결합하고, 세포는 검출 가능한 마커의 존재 및 항체 태그의 부재에 의해 분류되며, 상기 항체는 혈액 세포(blood cell) 선택적 항체인, 방법.

【변경후】

제29항에 있어서,

상기 항체는 제 2 세포 군 상의 표적에 결합하고, 세포는 검출 가능한 마커의 존재 및 항체 태그의 부재에 의해 분류되며, 상기 항체는 혈액 세포(blood cell) 선택적 항체인, 방법.