



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0125336

(43) 공개일자 2015년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 1/12 (2006.01) C12N 5/09 (2010.01)

C12Q 1/24 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0052538

(22) 출원일자 2014년04월30일

심사청구일자 2014년04월30일

(71) 출원인

국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

조윤경

울산 울주군 범서읍 대리로 15-15, 703동 305호(구영우미린2차아파트)

이영림

대구 수성구 지범로 290, 105동 1602호(범물동, 미진아파트)

(74) 대리인

유미특허법인

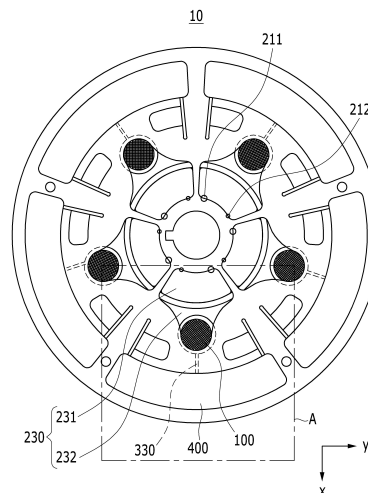
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **회소 세포 분리장치, 회소 세포 분리 방법 및 이를 이용한 회소 세포 검출 방법**

(57) 요약

본 발명은 생체 시료를 여과할 수 있는 여과막과, 여과막의 상부에 위치하고, 생체 시료의 주입을 위한 제1 주입구가 형성된 제1 몸체 및 제1 몸체의 하측에 위치하고, 여과막이 부착되는 제2 몸체를 포함하되, 제1 몸체와 제2 몸체는 중심을 기준으로 회전 가능하도록 디스크 형상의 구조체로 형성되고, 여과막은 제2 몸체의 중심으로부터 반경방향으로 이격되어 위치하는 회소 세포 분리장치를 제공한다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C1845

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 암조기 진단을 위한 혈액순환종양세포 기반 분자진단 칩 개발

기 여 율 1/1

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2013-11-01~2014-10-31

명세서

청구범위

청구항 1

생체 시료를 여과할 수 있는 여과막;
상기 여과막의 상부에 위치하고, 상기 생체 시료의 주입을 위한 제1 주입구가 형성된 제1 몸체; 및
상기 제1 몸체의 하측에 위치하고, 상기 여과막이 부착되는 제2 몸체;
를 포함하되,
상기 제1 몸체와 상기 제2 몸체는 중심을 기준으로 회전 가능하도록 디스크 형상의 구조체로 형성되고,
상기 여과막은 상기 제2 몸체의 중심으로부터 반경방향으로 이격되어 위치하는 회소 세포 분리장치.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 제1 몸체와 상기 제2 몸체의 접촉부에 형성되고, 상기 여과막과 연결되는 여과물 저장부
를 더 포함하는 회소 세포 분리장치.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 제1 몸체는
일측에 상기 제1 주입구가 관통 형성된 상판; 및
상기 상판의 하부에 결합되는 제1 중판;
을 포함하는 회소 세포 분리장치.

청구항 4

제3항에 있어서,
상기 제1 몸체는
상기 상판과 상기 제1 중판의 접촉부에 형성되고, 일측이 제1 주입구와 연결되고 타측이 상기 여과막과 연결되
는 제1 안내부;
를 포함하는 회소 세포 분리장치.

청구항 5

제4항에 있어서,
상기 상판에 상기 제1 안내부와 연결되는 환기구가 형성된 회소 세포 분리장치.

청구항 6

제4항에 있어서,
상기 제2 몸체는
상기 여과막이 부착되는 제2 중판; 및
상기 제2 중판의 하부에 결합되는 하판;
을 포함하는 회소 세포 분리장치.

청구항 7

제6항에 있어서,
상기 제2 중판 또는 상기 하판에 상기 여과막과 상기 여과물 저장부를 연결하는 제1 유로가 형성된 회소 세포 분리장치.

청구항 8

제7항에 있어서,
상기 제1 주입구는 상기 제1 몸체의 중심과 상기 여과막의 사이에 위치하는 회소 세포 분리장치.

청구항 9

제8항에 있어서,
상기 제1 안내부는,
상기 제1 중판을 관통하고, 상기 제1 몸체의 중심을 기준으로 상기 제1 몸체의 반경 방향으로 폭이 점점 넓어지도록 형성된 제1 부분; 및
상기 제1 중판을 관통하되, 제1 몸체 중심을 기준으로 제1 부분 단부로부터 상기 제1 몸체의 반경 방향으로 폭이 점점 좁아지도록 형성된 제2 부분;
을 포함하는 회소 세포 분리장치.

청구항 10

제8항에 있어서,
상기 제2 중판은 상기 제1 안내부와 접촉부에 관통부가 형성된 회소 세포 분리장치.

청구항 11

제10항에 있어서,
상기 관통부는
상기 제2 중판에 형성된 원형의 제1 홀; 및
상기 제2 중판 하부에 형성되고 상기 제1홀보다 큰 외경을 구비한 동심원 형상으로 형성된 제2 홀을 포함하는 회소 세포 분리장치.

청구항 12

제11항에 있어서,
상기 여과막은 상기 제2 홀의 하측을 통과하여 상기 제2 중판 하부에 부착되는 회소 세포 분리장치.

청구항 13

제12항에 있어서,
상기 제1 안내부는 다수 개가 상기 몸체 중심을 기준으로 방사 방향으로 형성된 회소 세포 분리장치.

청구항 14

제13항에 있어서,
상기 제1 몸체는
상기 상판을 관통하되, 상기 제1 몸체의 중심측에 위치하는 제2 주입구; 및
상기 상판과 상기 제1 중판의 접촉부에 형성되고, 일측이 상기 제2 주입구와 연결되고 타측이 상기 제2 부분과 연결되는 제2 안내부;
를 포함하는 회소 세포 분리장치.

청구항 15

제14항에 있어서,
상기 제2 주입구 및 상기 제2 안내부는 다수 개가 상기 제1 몸체의 중심을 기준으로 방사 방향에 위치하는 회소 세포 분리장치.

청구항 16

제15항에 있어서,
상기 제1 몸체와 상기 제2 몸체의 접촉부에 상기 여과막과 연결되는 검출 용액 저장부가 형성되고,
상기 제2 중판과 상기 하판 사이에 상기 제1유로로부터 분기되고 상기 여과막과 상기 검출 용액 저장부를 연결하는 제2 유로가 형성되는 회소 세포 분리장치.

청구항 17

제16항에 있어서,
상기 제1 유로, 상기 제2 유로, 또는 상기 제1 안내부와 상기 제2 안내부를 연결하는 제3 유로 중 적어도 하나의 유로에는 가역 밸브가 설치되어 상기 여과막으로 유입되는 유량 및 상기 여과막으로부터 배출되는 유량을 조절할 수 있는 회소 세포 분리장치.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 회소 세포 분리장치를 이용한 회소 세포 분리방법에 있어서,
상기 생체 시료를 상기 회소 세포 분리장치 내부로 주입하는 단계;

원심력을 발생시켜 상기 생체 시료를 상기 여과막으로 안내하는 단계; 및
상기 여과막을 통해 상기 생체 시료를 여과시키는 단계;
를 포함하는 회소 세포 분리방법.

청구항 19

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 회소 세포 분리장치를 이용한 회소 세포 검출방법에 있어서,
상기 생체 시료를 상기 회소 세포 분리장치 내부로 주입하는 단계;
원심력을 발생시켜 상기 생체 시료를 상기 여과막으로 안내하는 단계; 및
상기 여과막을 통해 상기 생체 시료를 여과시키는 단계;
여과막의 상부에 분리된 상기 회소 세포를 세척하는 단계;
상기 회소 세포를 염색하는 단계; 및
상기 염색된 회소 세포를 검출하는 단계;
를 포함하는 회소 세포 검출방법.

청구항 20

제19항에 있어서,
상기 염색 단계는 상기 제2 안내부로 염색용 시약을 주입하여 상기 여과막 상에 분리된 상기 회소 세포를 염색하는 것을 포함하는 회소 세포 검출방법.

청구항 21

제20항에 있어서,
상기 검출 단계는 광학 현미경을 이용하여 상기 염색된 회소 세포를 검출하는 것을 포함하는 회소 세포 검출방법.

청구항 22

제16항 또는 제17항에 따른 회소 세포 분리방법에 따라 분리된 회소 세포를 검출하기 위한 회소 세포 검출방법에 있어서,
상기 생체 시료를 상기 회소 세포 분리장치 내부로 주입하는 단계;
원심력을 발생시켜 상기 생체 시료를 상기 여과막으로 안내하는 단계;
상기 여과막을 통해 상기 생체 시료를 여과시키는 단계;
여과막의 상부에 분리된 상기 회소 세포를 세척하는 단계;
상기 회소 세포를 용해시키는 단계; 및
상기 용해된 회소 세포의 유전자를 특이적으로 증폭시키는 유전자 증폭 단계;
를 포함하는 회소 세포 검출방법.

청구항 23

제27항에 있어서,

상기 용해 단계는 상기 제2 안내부로 용해 용액을 주입하여 상기 회소 세포를 용해시키는 것을 포함하는 회소 세포 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 회소 세포 분리장치, 회소 세포 분리 방법 및 이를 이용한 회소 세포 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 질병을 가지고 있는 환자의 생체유체, 특히 혈액 내에는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 혈구 세포뿐만 아니라, 해당 질병의 지표가 될 수 있는 세포를 포함하는 다양한 생체 입자가 존재한다.

[0003] 그 중, 대표적인 예로 혈중 종양 세포(Circulating tumor cell, CTC)를 들 수 있는데, 이는 전이성 암환자의 혈액 내에 분포하는 암세포로, 원발암 조직에서 떨어져 나와 혈류를 따라 이동하다가 다른 조직으로 침투함으로써 암 전이를 유발하는 세포이다. 이와 같은 혈중 종양 세포는 전이암 발생 및 성장의 근원이 되는 요소로서 환자의 암 진행 상태와 관련된 다양한 정보를 제공할 수 있는 바, 암 진단 및 치료 분야에서 종양 마커(Tumor Marker)로 활용 가치가 높은 생체 입자이다.

[0004] 즉, 환자의 혈액 내에 존재하는 혈중 종양 세포의 개수는 암의 진행 정도와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 이를 포획하여 숫자를 세는 것은 종양의 진행 상태를 파악하여 암 치료의 예후를 살피는데 매우 유용하고, 혈중 종양 세포의 개수에 따라 구체적인 치료 방법을 적용할 수 있어, 직접적인 치료 방법 설계에도 큰 도움이 된다. 더 나아가, 포획한 암세포의 DNA 및 RNA 분자 진단을 통해 표적 암세포의 유전자 정보를 얻을 수 있는데, 이를 토대로 한 암 진단은 환자 개개인에게 맞춤형 치료를 제공함으로써 보다 효율적인 암 치료를 가능케 한다.

[0005] 한편, 혈중 종양 세포는 혈구 세포와 비교하였을 때 그 수가 1억 개의 혈구세포 중 한 개의 비율로 매우 희소하다. 따라서 혈중 종양 세포 검침 결과를 암의 진행 정도 또는 암세포의 악성도를 판정하는 지표로 활용하기 위해서는 매우 정교하고 정확한 세포 분리 기술이 요구된다.

[0006] 현재까지는 암 진단검사에 활용할 수 있는 혈중 종양 세포 검출기기 중 미국 식품의약국 (Food and Drug Administration, FDA)의 승인을 받은 제품으로는 Johnson & Johnson 사의 CellSearch®시스템이 유일하다. 이미 여러 그룹에서 CellSearch 시스템을 활용한 임상 실험을 다수 진행하였고, 검출 결과의 신뢰도를 어느 정도 검증받은 바 있다. CellSearch®시스템은 실질적인 포획 과정에 앞서 암세포와 혈구 세포의 밀도 차이로 적혈구를 제거하는 전처리 과정을 거친다. 그 다음, 암세포에 특이적으로 결합하는 EpCAM(Epithelial Cell Adhesion Molecule, 상피세포부착분자) 항체가 코딩된 자성 입자를 시료에 더하여 반응시킴으로써 암세포를 특이적으로 분리해내고, 그 결과를 면역 형광법(Immunofluorescence method)으로 검출한다.

[0007] 이밖에도 이미 여러 그룹에서 마이크로칩(microchip) 기반의 다양한 혈중 종양 세포 검출 플랫폼이 개발되었는데, 상당수의 검출 기술은 Cellsearch®시스템과 같이 거의 모든 암세포에 특이적으로 발현하는 암 표지 항원, 즉, EpCAM에 해당 항체를 반응하여 암세포를 분리한다. 그러나 이와 같이 생화학적 방법에 기반을 두는 암세포 포획 기술은 표적 암세포 자체의 EpCAM 발현량에 따라 포획 효율이 달라지기 때문에, 각기 다른 EpCAM 발현량을 가지고 있는 다양한 종류의 암세포를 고감도로 포획하는 데에는 한계가 있다.

[0008] 상기 언급한 한계점을 극복하기 위하여, 마이크로칩 상에 세포의 물리적 특징에 따른 분리 방법을 접목한 사례도 다수 소개되고 있다. 예를 들어, 암세포와 혈구 세포의 크기 차이로 세포를 포획 및 검출하는 기술과 관련된 대표적인 선행 기술 문헌으로는 미국 공개 특허 제10-2012-0117834호가 있으며, 구체적으로는 표적 생체 입자 또는 세포의 분리를 위한 여과 모듈을 포함한 여과 시스템과 이를 이용한 세포의 여과 방법에 관한 기술이 개시되어 있다.

[0009] 그러나 앞서 소개한 종래의 마이크로칩 기반의 암세포 포획 장치들은 여러 단점을 가지고 있다. 종래의 암세포 포획 장치들은 막힘 방지를 위해 희석된 전혈을 사용하거나, 실질적인 포획 과정에 앞서 전혈에서 혈구를 분리

및 제거하는 정제 과정을 별도로 수행하는데, 이와 같은 전처리 과정에서 표적 암세포의 손실이 발생한다. 또한, 튜빙(tubing) 및 커넥터(connector) 등 마이크로칩의 연결 부위에서 발생하는 불감 부피(dead volume)가 표적 암세포 손실을 야기하기도 한다.

[0010] 뿐만 아니라, 마이크로 칩의 특성상 기기를 구성하는 시료 저장소와 미세 유로의 크기가 수 마이크로(μm) 단위로 매우 작기 때문에 표적 암세포의 분리 과정을 완료하기까지 수 시간 이상의 긴 시간을 필요로 한다.

[0011] 이에 따라 상대적으로 암세포 분리 시간이 수십 분 내외로 짧은 크기 기반의 암세포 분리 장치를 이용할 경우, 결과 분석을 위해 분리 과정에 쓰인 미세 여과막을 장치로부터 해체하는 과정을 거쳐야 하는 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 시료 정제 과정에 의한 표적 암세포의 손실을 최소화하고 표적 세포 분리 시간을 단축할 수 있는 회소 세포 분리장치와, 상기 분리장치 내 일부 구성요소의 해체 없이도 시료로부터 회소 세포를 분리해 내는 회소 세포 분리 방법 및 회소 세포 분리장치 내부에서 상기 분리된 회소 세포를 바로 검출, 분석할 수 있는 회소 세포 검출 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 제1 측면에 따르면, 생체 시료를 여과할 수 있는 여과막; 상기 여과막의 상부에 위치하고, 상기 생체 시료의 주입을 위한 제1 주입구가 형성된 제1 몸체; 및 상기 제1 몸체의 하측에 위치하고, 상기 여과막이 부착되는 제2 몸체를 포함하되, 상기 제1 몸체와 상기 제2 몸체는 중심을 기준으로 회전 가능하도록 디스크 형상의 구조체로 형성되고, 상기 여과막은 상기 제2 몸체의 중심으로부터 반경방향으로 이격되어 위치하는 회소 세포 분리장치가 제공된다.

[0014] 이 때, 상기 제1 몸체와 상기 제2 몸체의 접촉부에 형성되고, 상기 여과막과 연결되는 여과물 저장부를 더 포함할 수 있다.

[0015] 이 때, 상기 제1 몸체는 일측에 상기 제1 주입구가 관통 형성된 상판; 및 상기 상판의 하부에 결합되는 제1 중판을 포함할 수 있다.

[0016] 이 때, 상기 제1 몸체는 상기 상판과 상기 제1 중판의 접촉부에 형성되고, 일측이 제1 주입구와 연결되고 타측이 상기 여과막과 연결되는 제1 안내부를 포함할 수 있다.

[0017] 이 때, 상기 상판에 상기 제1 안내부와 연결되는 환기구가 형성될 수 있다.

[0018] 이 때, 상기 제2 몸체는 상기 여과막이 부착되는 제2 중판; 및 상기 제2 중판의 하부에 결합되는 하판을 포함할 수 있다.

[0019] 이 때, 상기 제2 중판 또는 상기 하판에 상기 여과막과 상기 여과물 저장부를 연결하는 제1 유로가 형성될 수 있다.

[0020] 이 때, 상기 제1 주입구는 상기 제1 몸체의 중심과 상기 여과막의 사이에 위치할 수 있다.

[0021] 이 때, 상기 제1 안내부는, 상기 제1 중판을 관통하고, 상기 제1 몸체의 중심을 기준으로 상기 제1 몸체의 반경방향측으로 폭이 점점 넓어지도록 형성된 제1 부분; 및 상기 제1 중판을 관통하되, 제1 몸체 중심을 기준으로 제1 부분 단부로부터 상기 제1 몸체의 반경 방향으로 폭이 점점 좁아지도록 형성된 제2 부분을 포함할 수 있다.

[0022] 이 때, 상기 제2 중판은 상기 제1 안내부와와의 접촉부에 관통부가 형성될 수 있다.

[0023] 이 때, 상기 관통부는 상기 제2 중판에 형성된 원형의 제1 홀; 및 상기 제2 중판 하부에 형성되고 상기 제1홀보다 큰 외경을 구비한 동심원 형상으로 형성된 제2 홀을 포함할 수 있다.

[0024] 이 때, 상기 여과막은 상기 제2 홀의 하측을 통과하여 상기 제2 중판 하부에 부착될 수 있다.

[0025] 이 때, 상기 제1 안내부는 다수 개가 상기 몸체 중심부 기준으로 방사 방향으로 형성될 수 있다.

[0026] 이 때, 상기 제1 몸체는 상기 상판을 관통하되, 상기 제1 몸체의 중심측에 위치하는 제2 주입구; 및 상기 상판과 상기 제1 중판의 접촉부에 형성되고, 일측이 상기 제2 주입구와 연결되고 타측이 상기 제2 부분과 연결되는

제2 안내부를 포함할 수 있다.

- [0027] 이 때, 상기 제2 주입구 및 상기 제2 안내부는 다수 개가 상기 제1 몸체의 중심을 기준으로 방사 방향에 위치할 수 있다.
- [0028] 이 때, 상기 제1 몸체와 상기 제2 몸체의 접촉부에 상기 여과막과 연결되는 검출 용액 저장부가 형성되고, 이 때, 상기 제2 중판과 상기 하판 사이에 상기 제1유로부터 분기되고 상기 여과막과 상기 검출 용액 저장부를 연결하는 제2 유로가 형성될 수 있다.
- [0029] 이 때, 상기 제1 유로, 상기 제2 유로, 또는 상기 제1 안내부와 상기 제2 안내부를 연결하는 제3 유로 중 적어도 하나의 유로에는 가역 밸브가 설치되어 상기 여과막으로 유입되는 유량 및 상기 여과막으로부터 배출되는 유량을 조절할 수 있다.
- [0030] 한편, 본 발명의 제2 측면에 따른 회소 세포 분리장치를 이용한 회소 세포 분리방법에 있어서, 상기 생체 시료를 상기 회소 세포 분리장치 내부로 주입하는 단계; 원심력을 발생시켜 상기 생체 시료를 상기 여과막으로 안내하는 단계; 및 상기 여과막을 통해 상기 생체 시료를 여과시키는 단계를 포함하는 회소 세포 분리방법이 제공된다.
- [0031] 한편, 본 발명의 제3 측면에 따른 회소 세포 분리장치를 이용한 회소 세포 검출방법에 있어서, 상기 생체 시료를 상기 회소 세포 분리장치 내부로 주입하는 단계; 원심력을 발생시켜 상기 생체 시료를 상기 여과막으로 안내하는 단계; 및 상기 여과막을 통해 상기 생체 시료를 여과시키는 단계; 여과막의 상부에 분리된 상기 회소 세포를 세척하는 단계; 상기 회소 세포를 염색하는 단계; 및 상기 염색된 회소 세포를 검출하는 단계를 포함하는 회소 세포 검출방법이 제공된다.
- [0032] 이 때, 상기 염색 단계는 상기 제2 안내부로 염색용 시약을 주입하여 상기 여과막 상에 분리된 상기 회소 세포를 염색하는 것을 포함할 수 있다.
- [0033] 이 때, 상기 검출 단계는 광학 현미경을 이용하여 상기 염색된 회소 세포를 검출하는 것을 포함할 수 있다.
- [0034] 한편, 본 발명의 제4 측면에 따른 회소 세포 분리방법에 따라 분리된 회소 세포를 검출하기 위한 회소 세포 검출방법에 있어서, 상기 생체 시료를 상기 회소 세포 분리장치 내부로 주입하는 단계; 원심력을 발생시켜 상기 생체 시료를 상기 여과막으로 안내하는 단계; 상기 여과막을 통해 상기 생체 시료를 여과시키는 단계; 여과막의 상부에 분리된 상기 회소 세포를 세척하는 단계; 상기 회소 세포를 용해시키는 단계; 및 상기 용해된 회소 세포의 유전자를 특이적으로 증폭시키는 유전자 증폭 단계를 포함하는 회소 세포 검출방법이 제공된다.
- [0035] 이 때, 상기 용해 단계는 상기 제2 안내부로 용해 용액을 주입하여 상기 회소 세포를 용해시키는 것을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0036] 본 발명의 일 실시예에 따른 회소 세포 분리장치는 생체 시료가 별도의 전처리 없이 바로 몸체 내로 주입될 수 있는 바, 전처리 과정 중 발생하는 생체 시료 내 회소 세포의 손실을 최소화 할 수 있다,
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 회소 세포 분리장치는 중심을 기준으로 회전 가능한 바, 원심력을 이용하여 생체 시료의 여과 시간을 단축시킬 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 회소 세포 분리장치는 회소 세포를 몸체 내에서 바로 염색하거나 회소 세포를 용해시켜 검출 용액의 형태로 제조할 수 있는 바, 몸체를 해체하지 않고도 회소 세포를 검출할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 분해사시도이다.
- 도 2는 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 도 2의 A 부분을 나타낸 확대도이다.
- 도 4는 도 3의 B-B' 부분의 단면도이다.
- 도 5는 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 이용한 회소 세포 분리 방법을 나타낸 흐름도이다.

도 6은 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 생체 시료가 제1 몸체 내로 주입된 상태를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 생체 시료가 여과막에 도달한 상태를 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 생체 시료가 여과막을 통해 여과되는 상태를 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 시료 여과가 완료된 상태를 나타낸 도면이다.

도 10은 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 이용하여 생체 시료를 여과하는 과정을 나타낸 사진이다.

도 11은 본 발명의 제2 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 나타낸 도면이다.

도 12는 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 나타낸 도면이다.

도 13은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 이용한 회소 세포 검출 방법을 나타낸 흐름도이다.

도 14는 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 나타낸 도면이다.

도 15는 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 이용한 회소 세포 검출 방법을 나타낸 흐름도이다.

도 16은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 회전 속도에 따른 암세포 포획률 및 그 순도를 나타낸 그래프이다.

도 17은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 MCF7 유방암세포의 주입 개수에 따른 포획 정도를 나타낸 그래프이다.

도 18은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 1200 rpm의 회전 속도 하에서 전혈 시료의 회석도에 따른 암세포 포획률 및 순도를 나타낸 그래프이다.

도 19는 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치에 폐암 환자군의 전혈 시료 투입 시 검출되는 암세포 수를 7.5mL 전혈 시료 당 암세포 수로 환산한 그래프이다.

도 20은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치에 위암 환자군의 전혈 시료 투입 시 검출되는 암세포 수를 7.5mL 전혈 시료 당 암세포 수로 환산한 그래프이다.

도 21은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 통해 검출된 백혈구 및 암세포의 면역 형광 염색 결과를 나타낸 현미경 사진이다.

도 22는 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 통해 검출된 유방암세포의 크기 분포를 나타낸 그래프이다.

도 23은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 통해 검출된 위암세포의 크기 분포와 위암 세포주의 크기 분포를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 실시예에 대하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 동일 또는 유사한 구성요소에 대해서는 동일한 참조부호를 붙였다.

[0041] 한편, 본 발명에 있어서 "~상에"라 함은 대상부재의 위 또는 아래에 위치함을 의미하는 것이며, 반드시 중력방향을 기준으로 상부에 위치하는 것을 의미하는 것은 아니다.

[0042] 또한, 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 포함한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한, 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있음을 의미한다. 또한, 도면에 나타난 각 구성의 크기 및 두께는 설명의 편의를 위해 임의로 나타낸 것으로, 본 발명이 반드시 도시된 바에 한정되는 것은 아니다.

- [0043] 본 발명에서 생체 시료라 함은 인체나 동, 식물의 혈액, 타액, 소변 등의 유체를 모두 포함하는 것으로, 본 발명에서는 생체 시료로 회소 세포가 포함된 전혈(Whole blood) 시료를, 회소 세포로 혈중 중양 세포를 사용하였으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 도 1은 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 분해사시도이다.
- [0045] 도 1을 참고하면, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)는 생체 시료를 여과할 수 있는 여과막(100)과, 여과막(100)의 상부에 배치되는 제1 몸체(200) 및 여과막(100)이 부착되고, 제1 몸체(200) 하측에 결합되는 제2 몸체(300)를 포함한다.
- [0046] 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 여과막(100)은 전혈 시료 내에 존재하는 혈중 중양 세포를 포획할 수 있도록 미세공의 직경이 5 μm 내지 10 μm 로 형성될 수 있다. 다만, 이는 제2 몸체(300)에 여과막(100)을 부착할 때 발생할 수 있는 오차를 포함한 것으로서 미세공의 직경이 반드시 이에 제한되는 것은 아니며, 분리하고자 하는 회소 세포의 크기에 따라 직경이 다양하게 형성될 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 여과막(100)은 생물학적으로 비활성인 동시에 광학적 투과성을 구비한 소재로 형성될 수 있다. 이를 통해, 상기 여과막(100)을 제2 몸체(300)로부터 분리하지 않고도 광학 검출기를 이용하여 회소 세포를 검출할 수 있다.
- [0048] 한편, 여과막(100)은 상기 제2 몸체(300)와의 접착이 용이하도록 상기 제2 몸체(300)와 동일한 소재로 형성될 수 있다. 예를 들어, 제2 몸체(300) 및 여과막(100)이 모두 폴리카보네이트 소재로 형성된 경우, 제2 몸체(300)와 여과막(100)이 결합될 가장자리 부위에 소량의 아세톤을 투여하여 접착 부위를 화학적으로 용해함으로써 여과막(100)을 제2 몸체(300)에 접착시킬 수 있다. 이에 따라, 제2 몸체(300)에 여과막(100) 설치 시 발생할 수 있는 구김 현상이나 불완전한 설치로 인한 회소 세포의 누설을 방지할 수 있는 효과가 있다.
- [0049] 다만, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 여과막(100)과 제2 몸체(300)간 접착 방법이 반드시 화학적 접착 방법으로 한정되는 것은 아니며, 열 접착(thermal bonding), 자외선 수지 접착(UV resin bonding), 초음파 접착(ultrasonic bonding) 등의 다양한 접착 방식을 통해 여과막(100)이 제2 몸체(300)에 비가역적으로 접착될 수 있다.
- [0050] 한편, 도 1을 다시 참고하면, 제1 몸체(200)와 제2 몸체(300)는 중심을 기준으로 회전 가능하도록 디스크 형상의 구조체로 형성될 수 있다. 즉, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)는 제1 몸체(200)와 제2 몸체(300)가 순차적으로 적층된 디스크 구조체일 수 있다.
- [0051] 이 때, 여과막(100)은 제2 몸체(200)의 중심으로부터 반경방향으로 이격되어 위치할 수 있다.
- [0052] 제1 몸체(200)와 제2 몸체(300)는 도 1에 도시된 바와 같이 동일한 직경을 갖도록 형성될 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)에는 중심부에 회전축이 설치될 수 있도록 도 1에 도시된 바와 같이 제1 몸체(200)와 제2 몸체(300)의 중심을 동시에 관통하는 중공이 형성될 수 있다..
- [0054] 한편, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)는 제1 몸체(200)와 제2 몸체(300) 높이의 합이 10mm 이하로, 제1 몸체(200)와 제2 몸체(300)의 지름이 12mm 이하로 형성되는 소형 디스크 구조체이나, 반드시 이러한 크기에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)는 제1 몸체(200)와 제2 몸체(300)는 표면이 생물학적으로 비활성인 동시에 광학적 투과성을 구비한 소재, 예를 들면 폴리스타이렌(polystyrene, PS), 폴리 디메틸실록산(poly dimethyl siloxane, PDMS), 폴리 메틸메타크릴레이트(poly methacrylate, PMMA), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 폴리카보네이트 (polycarbonate), 폴리실릭 올레핀 (polycyclic olefins), 폴리이미드(polyimide) 폴리우레탄(polyurethanes) 등의 소재일 수 있다.
- [0056] 이를 통해, 제1 몸체(200) 내부로 생체 시료가 주입될 경우 상기 생체 시료가 제1 몸체(200) 및 제2 몸체(300)와 반응하지 않아 생물학적 안정성을 확보할 수 있는 동시에, 분리된 회소 세포를 회소 세포 분리장치(10) 외부로 배출시키지 않고도 광학 검출기를 통해 제1 몸체(200) 및 제2 몸체(300)를 투과하여 검출 가능한 장점이 있다.
- [0057] 도 1을 다시 참고하면, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 제1 몸체(200)는 일측에 생체 시료가 주입될 수 있는 제1 주입구(211)가 형성된 상판(210)과, 상판(210)의 하부에 결합되는 제1 중판(220)을 포함하고, 제2 몸체(300)는 일측에 여과막(100)이 부착되는 제2 중판(310) 및 제2 중판(310) 하부에 결합되는

하판(320)을 포함할 수 있다.

- [0058] 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)는 도 1에 도시된 바와 같이 상판(210)과 제1 중판(220), 제2 중판(310) 및 하판(320)이 순차적으로 적층된 구조체일 수 있다. 이 때, 상기 적층된 판들의 사이마다 접촉층(G)이 도포될 수 있다. 다만, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)가 반드시 이와 같은 네 개의 판이 순차적으로 적층되는 구성이나 상기와 같이 각 층마다 접촉층(G)이 도포되는 구성으로 한정되는 것은 아니다.
- [0059] 한편, 도 1을 다시 참고하면, 상판(210)에는 다수의 홀이, 제1 중판(220) 및 제2 중판(310)에는 다수의 홀 또는 요철부가 형성된다. 이를 통해, 상기 제1 중판(220) 및 제2 중판(310)이 상판(210) 및 하판(320)과 결합되었을 때 회소 세포 분리장치(10) 내부에 생체 시료가 저장되는 공간과 생체 시료가 이동되는 유로가 형성될 수 있다.
- [0060] 도 2는 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 나타낸 도면이고, 도 3은 도 2의 A 부분을 나타낸 확대도이며, 도 4는 도 3의 B-B' 부분을 바라본 단면도이다.
- [0061] 도 2 내지 도 4를 참고하면, 상판(210), 제1 중판(220), 제2 중판(310) 및 하판(320)이 순차적으로 적층된 회소 세포 분리장치(10)가 개시된다. 이 때, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 상판(210)에는 제1 주입구(211) 및 환기구(212)가 형성될 수 있다.
- [0062] 제1 주입구(211)는 도 2와 도 3에 도시된 바와 같이 상판(210)을 관통하여 형성될 수 있다. 이 때, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)는 상기 제1 주입구(211)를 통하여 제1 몸체(200)의 내부로 회소 세포의 분리를 위한 생체 시료가 주입될 수 있다. 또한, 제1 주입구(211)는 도 2에 도시된 바와 같이 다수 개가 제1 몸체(200)의 중심을 기준으로 방사 방향으로 형성될 수 있다. 이를 통해, 제1 몸체(200)의 여러 방향에서 생체 시료의 주입이 가능하다.
- [0063] 한편, 제1 주입구(211)는 도 2에 도시된 바와 같이 제1 몸체(200)의 중심과 여과막(100)의 사이에 위치할 수 있다. 이를 통해, 제1 몸체(200) 및 제2 몸체(300)가 회전할 경우 제1 주입구(211)를 통해 주입된 생체 시료가 원심력을 통해 여과막(100)으로 용이하게 이동할 수 있다.
- [0064] 환기구(212)는 도 2와 도 3에 도시된 바와 같이 상판(210)을 관통하여 형성될 수 있다. 이 때, 환기구(212)는 도 2에 도시된 바와 같이 제1 몸체(200) 상에 제1 주입구(211)와 인접하도록 형성될 수 있다. 이를 통해 제1 주입구(211)로 생체 시료 주입 시, 몸체(200) 내부에 존재하던 공기를 제1 몸체(200) 외부로 원활히 배출시킬 수 있다.
- [0065] 도 2 내지 도 4를 다시 참고하면, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 상판(210)과 제1 중판(220) 사이에는 제1 주입구(211)와 연결되는 제1 안내부(230)가 형성될 수 있다. 제1 안내부(230)는 도 4에 도시된 바와 같이 제1 주입구(211)를 통해 제1 몸체(200) 내부로 주입된 생체 시료를 여과막(100)으로 안내할 수 있다.
- [0066] 한편, 제1 안내부(230)는 제1 중판(220)을 관통하여 형성될 수 있다. 즉, 제1 안내부(230)는 도 4에 도시된 바와 같이 상판(210)과 제2 중판(320) 사이에 형성될 수 있다. 이에 따라, 제1 주입구(211)를 통해 유입된 생체 시료가 제1 안내부(230)에 수용될 수 있다.
- [0067] 또한, 제1 안내부(230)는 도 2에 도시된 바와 같이 제1 주입구(211)를 기준으로 제1 몸체(200) 중심의 반대 방향에 형성될 수 있다. 또한, 제1 안내부(230)는 도 2에 도시된 바와 같이 다수 개가 같이 제1 몸체(200)의 방사 방향으로 형성될 수 있다. 이를 통해, 회소 세포 분리장치(10)의 회전 시 생체 시료가 원심력에 의해 더욱 신속하게 제1 몸체(200)의 반경 방향으로 안내될 수 있다.
- [0068] 한편, 제1 안내부(230)는 제1 부분(231) 및 제2 부분(232)을 포함한다.
- [0069] 제1 부분(231)은 제1 중판(220)을 관통하여 형성된다. 이 때, 제1 부분(231)은 도 2 및 도 3에 도시된 바와 같이 제1 몸체(200)의 중심을 기준으로 상기 제1 몸체(200)의 반경방향으로 폭이 점점 넓어지도록 형성될 수 있다. 이를 통해, 제1 주입구(211)를 거쳐 제1 부분(231)에 유입된 생체 시료의 유체 저항을 최소화시킬 수 있다.
- [0070] 한편, 본 발명의 제1 실시예에 따른 제1 부분(231)은 단면이 도 2에 도시된 바와 같이 제1 몸체(200)의 중심을 기준으로 원호 형상으로 형성되나, 반드시 이러한 형상에 제한되는 것은 아니다.

- [0071] 제2 부분(231)은 제1 중판(220) 관통하여 형성되되, 제1 몸체(200)의 중심을 기준으로 제1 부분(231) 단부로부터 상기 제1 몸체(200)의 반경 방향 외측으로 폭이 점점 좁아지도록 형성될 수 있다. 이를 통해, 제1 부분(231)을 거쳐 제2 부분(232)으로 안내된 생체 시료를 제1 몸체(200)의 중심을 기준으로 제2 부분(232) 단부로 모으기 용이하다.
- [0072] 도 2 내지 도 4를 다시 참고하면, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 제2 중판(310)에는 관통부(311)가 형성될 수 있다.
- [0073] 관통부(311)는 제1 안내부(230)와 접촉하는 제2 중판(310)에 형성될 수 있다. 이 때, 관통부(311)는 도 4에 도시된 바와 같이 제2 부분(232)과 접촉하는 제2 중판(310)에 관통 형성될 수 있다. 이를 통해, 제2 부분(232)으로 안내되어온 생체 시료가 도 4의 화살표 방향을 따라 관통부(311)를 통과하여 하판(320)을 향해 이동할 수 있다.
- [0074] 한편, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 관통부(311)는 제1 홀(311a) 및 제2 홀(311b)을 포함할 수 있다.
- [0075] 제1 홀(311a)은 제2 부분(311b)과 접촉하는 제2 중판(310) 상부에 형성될 수 있다. 이 때, 제1 홀(311a)은 도 2와 도 3에 도시된 바와 같이 단면이 원형으로 형성될 수 있다.
- [0076] 제2 홀(311b)은 제2 중판(310)의 하부에 형성되되, 단면이 도 2와 도 3에 도시된 바와 같이 제1 홀(311a)보다 큰 외경을 구비한 동심원 형상으로 형성될 수 있다.
- [0077] 이 때, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 여과막(100)은 도 1 및 도 4에 도시된 바와 같이 제2 홀(311b) 하측으로 삽입될 수 있도록 제2 홀(311b)에 상응하는 단면으로 형성될 수 있다. 이를 통해, 제2 부분(232)으로부터 안내되어온 생체 시료를 여과시킬 수 있다.
- [0078] 이와 같이 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)는 여과막(100)이 제2 홀(311b)의 하측으로 삽입되어 제2 중판(320)의 하측에 부착됨으로써 여과막(100)으로 유입되는 생체 시료의 양을 최대화할 수 있다. 또한, 도 4에 도시된 바와 같이 여과막(100)과 제2 부분(232) 사이에 단차가 형성되는 바, 여과막(100) 상부에 잔류하는 회소 세포가 여과 중 회소 세포 분리장치(10)의 회전으로 인해 제1 안내부(230)로 역류하는 현상을 방지할 수 있다.
- [0079] 한편, 여과막(100)은 다수 개가 도 2 및 도 3에 도시된 바와 같이 제2 몸체(300)에 방사 방향으로 제2 중판(320)의 하측에 부착될 수 있다. 이를 통해 제1 몸체(200) 내부로 유입된 생체 시료를 분산시켜 각각의 여과막(100) 상에서 회소 세포를 분리해 낼 수 있는 바, 여과 효율성을 향상시킬 수 있다.
- [0080] 도 1 내지 도 4를 참고하면, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)는 제1 몸체(200)와 제2 몸체(300)의 사이에 형성되고, 여과막(100)을 거쳐 여과된 여과물이 저장되는 여과물 저장부(400)를 포함할 수 있다. 이 때, 도 1 및 도 2를 참고하면, 여과물 저장부(400)는 제1 몸체(200)와 제2 몸체(300)의 결합으로 인해 상판(210)과 하판(320) 사이에 형성되는 회소 세포 분리장치(10) 내부의 공간일 수 있으나, 반드시 이러한 구성으로 제한되는 것은 아니다..
- [0081] 한편, 여과물 저장부(400)는 여과막(100)을 기준으로 제1 몸체(200) 중심의 반대방향에 형성된다. 즉, 여과물 저장부(400)는 도 4의 화살표 방향으로 여과막(100)을 통과한 여과물을 수용할 수 있도록 도 4의 B' 방향에 형성된다. 이 때, 여과물 저장부(400)는 도 2에 도시된 바와 같이 다수 개가 회소 세포 분리장치(10) 내부에 원호 형상으로 형성될 수 있다.
- [0082] 이 때, 제1 유로(330)는 도 4에 도시된 바와 같이 제2 중판(310)과 하판(320) 사이에 형성되어 여과막(100)을 통과한 여과물을 여과물 저장부(400)로 공급할 수 있다. 이 때, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 제1 유로(330) 폭과 높이는 여과물이 통과될 수 있되, 여과물이 다시 여과막(100) 방향으로 역류하는 것을 방지할 수 있도록 각각 1mm 이하로 형성되나, 반드시 이러한 수치로 제한되는 것은 아니다.
- [0083] 한편, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)에서 제1 유로(330)는 도 4의 접촉층(G) 중, 제2 중판(310)과 하판(320)을 상호 접촉시키는 접촉층 측에 형성될 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니고, 제2 중판(310)의 하측이나 하판(320)의 상측에 형성되는 구성일 수 있다.
- [0084] 이상에서는 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)의 구성에 대하여 설명하였다. 이하에서는 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)를 이용한 회소 세포 분리 방법을 설명한다.

- [0085] 도 5는 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리 장치를 이용한 회소 세포 분리 방법을 나타낸 흐름도이다.
- [0086] 도 5를 참고하면, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)를 이용한 회소 세포 분리 방법은 생체 시료가 회소 세포 분리장치(10) 내부로 주입되는 단계(S01)와, 원심력을 발생시켜 생체 시료를 여과막(100)으로 안내하는 단계(S02) 및 여과막(100)을 통해 생체 시료를 여과시키는 단계(S03)를 포함할 수 있다.
- [0087] 도 6은 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리 장치의 생체 시료가 몸체 내로 주입된 상태를 나타낸 도면이고, 도 7은 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 생체 시료가 여과막에 도달한 상태를 나타낸 도면이다.
- [0088] 도 8은 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 생체 시료가 여과막을 통해 여과되는 상태를 나타낸 도면이고, 도 9는 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 시료 여과가 완료된 상태를 나타낸 도면이다.
- [0089] 도 5 내지 도 9를 참고하면, 생체 시료 주입 단계(S01)에서는 제1 주입구(211)를 통해 회소 세포 분리 장치(10) 내부로 생체 시료가 주입된다. 이 때, 본 발명의 제1 실시예에서는 생체 시료로 혈중 종양 세포가 포함된 전혈 시료를 사용한 바, 상기 주입된 생체 시료는 도 6에 도시된 바와 같이 제1 안내부(230)에 혈중 종양 세포(2), 백혈구(4) 및 적혈구(6)가 혼합된 상태로 존재하게 된다.
- [0090] 안내 단계(S02)에서는 상기 제1 안내부(230)에 존재하는 회소 세포를 여과막(100)으로 안내하는 과정을 거친다. 이 때, 본 발명의 제1 실시예에서는 생체 시료의 신속한 안내를 위하여 회소 세포 분리장치(10)를 회전시켜 원심력을 발생시킬 수 있다. 상기와 같은 방법에 의해 안내된 생체 시료는 도 7에 도시된 바와 같이 여과막(100) 상부에 위치하게 된다.
- [0091] 여과 단계(S03)에서는 상기 여과막(100) 상부로 안내된 생체 시료가 여과되는 과정을 거친다. 이 때, 비교적 분자 크기가 큰 혈중 종양 세포(2)는 여과막(100) 상부에 잔류하게 되고, 비교적 분자 크기가 작은 백혈구(4) 및 적혈구(6)는 도 8에 도시된 바와 같이 여과막(100)을 통과하여 제1 유로(330)를 따라 여과물 저장부(400)로 이동하게 된다.
- [0092] 한편, 회소 세포 분리장치(10)는 여과 단계(S03)에서 지속적인 회전을 통해 상기 생체 시료의 여과를 촉진시킬 수 있다. 이 때, 본 발명의 제1 실시예에서 회소 세포 분리장치(10)의 회전 속도가 1200 rpm 미만일 경우 제1 유로(330)에 걸리는 유체 저항에 의해 여과물이 여과물 저장부(400)로 이동하기 어렵고, 3600 rpm을 초과할 경우 전혈 시료의 누설이 발생하거나 혈중 종양 세포(2)가 손상될 수 있으므로, 회소 세포 분리장치(10)의 회전 속도는 1200 rpm 내지 3600 rpm 이하인 것이 바람직하다. 다만, 본 발명의 회소 세포 분리장치(10)의 회전 속도가 반드시 도시된 같은 범위로 제한되는 것은 아니며, 주입되는 생체 시료의 종류나 양에 따라 달라질 수 있다.
- [0093] 한편, 여과 단계(S03)가 완료된 후, 여과막(100)의 상부에는 도 9에 도시된 바와 같이 혈중 종양 세포(2)가 잔류하게 되고, 백혈구(4) 및 적혈구(6)는 여과물 저장부(400)에 모두 저장될 수 있다.
- [0094] 도 10은 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 이용하여 생체 시료를 여과하는 과정을 나타낸 사진이다.
- [0095] 본 발명의 제1 실시예에서는 혈중 종양 세포가 포함된 1mL의 전혈 시료를 도 10에 도시된 바와 같이 몸체 내로 주입하였다. 이 때, 상기 전혈 시료는 여과막을 거쳐 여과된다. 이 때, 여과막 상부에는 혈중 종양 세포가 잔류하게 되고, 여과막 하측으로 백혈구 및 적혈구 등의 나머지 전혈 시료가 배출되어 제1 유로를 따라 여과물 저장부로 이동하게 된다. 이 때, 회소 세포 분리장치는 중심을 기준으로 회전하여 전혈 시료의 안내 및 여과 과정을 촉진한다. 그 결과, 전혈 시료로부터 혈중 종양 세포가 전부 분리되기까지 약 15초의 시간이 소요되었다.
- [0096] 이와 같이, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)를 이용한 회소 세포 분리방법은 종래 마이크로칩 기반의 세포 분리장치와 달리 원심력을 이용하여 생체 시료의 안내 시간 및 여과 시간을 모두 단축시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0097] 이하에서는 본 발명의 제2 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10')에 대하여 설명한다. 본 발명의 제2 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10')를 설명함에 있어, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)와 동일한 구성에 대해서는 상세한 설명을 생략한다.
- [0098] 도 11은 본 발명의 제2 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 나타낸 도면이다.
- [0099] 도 11을 참고하면, 본 발명의 제2 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10')는 제1 부분(231')이 제1 몸체(200')

의 중심을 둘러싸는 하나의 원호 형상으로 형성될 수 있다. 이와 같이 본 발명의 제2 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10')는 제1 부분(231')을 통해 내부의 생체 시료 수용량을 증가시킴으로써, 1억 내의 혈구 세포 중 하나의 비율로 회소한 혈중 암 세포의 포획률을 증가시킬 수 있는 효과가 있다.

[0100] 이하에서는 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')에 대하여 설명한다. 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 설명함에 있어, 본 발명의 제1 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10)와 동일한 구성에 대해서는 상세한 설명을 생략한다.

[0101] 도 12는 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 나타낸 도면이다.

[0102] 도 12를 참고하면, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')는 상관을 관통하는 제2 주입구(213'') 및 제1 중관에 형성되는 제2 안내부(240'')를 더 포함한다.

[0103] 제2 주입구(213'')는 도 12에 도시된 바와 같이 제1 몸체(200'')의 중심 측에 위치할 수 있다. 이 때, 제2 주입구(213'')는 다수 개가 제1 몸체(200'') 중심을 기준으로 방사 방향으로 형성될 수 있다. 또한, 제2 주입구(213'')를 통한 유체 주입 시, 몸체 내부의 공기를 배출시킬 수 있도록 제2 주입구(213'') 부근에 환기구(212'')가 배치될 수 있다.

[0104] 제2 안내부(240'')는 도 12에 도시된 바와 같이 일측이 제2 주입구(213'')와 연결되고, 타측이 제2 부분(232'')과 연결될 수 있다. 이 때, 제2 안내부(240'')는 상기 다수의 제2 주입구(213'')에 상응하는 다수 개가 제1 몸체(200'') 중심을 기준으로 방사 방향으로 형성될 수 있다. 또한, 제2 주입구(213'') 및 제2 안내부(240'')는 도 12에 도시된 바와 같이 다수 개가 상기 제1 몸체(200'')의 중심을 기준으로 제1 안내부(230'')의 양 측면에 배치될 수 있다.

[0105] 또한, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 주입장치(10'')의 제2 안내부(240'')는 단면이 제1 부분(231'')에 상응하는 원호 형상으로 형성되나, 반드시 이러한 형상에 제한되는 것은 아니다.

[0106] 한편, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 주입장치(10'')의 제2 주입구(213'') 중 적어도 어느 하나 이상에는 여과막(100'')에 잔류하는 회소 세포를 세척할 수 있도록 세척 용액이 주입되고, 제2 주입구(213'') 중 적어도 어느 하나 이상에는 상기 회소 세포를 염색하는 염색용 시약이 주입될 수 있다. 이 때, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 주입장치(10'')의 세척 용액은 회소 세포를 손상시키지 않으면서 세척을 수행할 수 있는 공지의 버퍼 용액(buffer solution)이나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0107] 이 때, 본 발명에서 염색용 시약이라 함은 회소 세포의 검출을 위한 염색 단계에 사용되는 전처리 시약을 포함하는 것으로, 회소 세포의 고정을 위한 고정 용액, 상기 회소 세포의 침투를 위한 침투 용액 및 회소 세포의 염색 처리를 위한 염색 용액을 포함한다.

[0108] 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')는 도 12를 기준으로 제1 주입구(211'')의 좌측에 형성된 세 개의 제2 주입구에 각각 고정 용액, 침투용액 및 염색용액이 주입되고, 제1 주입구(211'')의 우측에 형성된 제2 주입구(113'')에 세척 용액이 주입되나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0109] 이와 같이, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')는 여과 단계 이후 여과막(100'')에 잔류하는 회소 세포를 세척 및 염색할 수 있는 바, 장치의 해체 없이도 광학 검출기를 이용하여 회소 세포를 바로 검출할 수 있다.

[0110] 한편, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')의 제1 유로(330), 제2 유로(340) 또는 제1 안내부(230)와 제2 안내부(240)를 연결하는 다수의 제3 유로 중 적어도 어느 하나의 유로에는 가역 밸브(500'')가 설치될 수 있다. 이를 통해, 상기 여과막(100'')으로 유입되는 유량 및 상기 여과막(100'')으로부터 배출되는 유량을 조절할 수 있다.

[0111] 이 때, 가역 밸브(500'')는 나사 또는 자석 등을 이용한 공지의 기계 판막(mechanical valve)일 수 있는 바, 가역 밸브 자체에 대한 상세한 설명은 생략한다.

[0112] 한편, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')의 가역 밸브(500'')는 도 12에 도시된 바와 같이 제2 안내부(240'')와 제2 부분(232'')을 연결하는 미세 유로 사이에 설치되어 염색용 시약의 유량을 조절하는 500a'' 밸브 내지 500d'' 밸브, 세척 용액의 유량을 조절하는 500e'' 밸브 내지 500i'' 밸브 및 제1 유로(330'') 일측에 설치되어 여과물 저장부(400'')로 배출되는 여과물 유량을 조절하는 500j'' 밸브를 포함한다.

[0113] 이와 같이 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')는 제1 몸체(200'')와 제2 몸체(300'') 내에

가역 밸브(500'')가 설치되는 바, 회소 세포의 세척 및 염색 과정이 유기적으로 제어될 수 있다.

- [0114] 이하에서는 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포의 검출방법에 대하여 설명하도록 한다.
- [0115] 도 13은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 이용한 회소 세포 검출 방법을 나타낸 흐름도이다.
- [0116] 도 12 및 도 13을 참고하면, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포 검출 방법은 생체 시료가 회소 세포 분리장치(10'') 내부로 주입되는 단계(S11), 회소 세포 분리장치(10'')를 회전시켜 상기 생체 시료를 여과막(100'')으로 안내하는 단계(S12), 상기 여과막(100'')을 통해 생체 시료를 여과시키는 단계(S13), 상기 여과막(100'')에 잔류한 상기 회소 세포를 세척하는 단계(S14), 상기 회소 세포를 염색하는 단계(S15) 및 상기 염색된 회소 세포를 검출하는 단계(S16)를 포함할 수 있다.
- [0117] 생체 시료 주입 단계(S11)에서 생체 시료는 제1 주입구(211'')로 주입된다. 이 때, 생체 시료는 제1 주입구(211'')로부터 제1 부분(231'')으로 이동하게 된다. 이 때, 회소 세포 분리장치(10'')의 회전은 정지된 상태이고, 가역 밸브(500'')는 전부 폐쇄된 상태이다.
- [0118] 안내 단계(S12)에서는 제1 부분(231'')에 존재하는 생체 시료가 제2 부분(232'')으로 안내된다. 이 때, 회소 세포 분리장치(10'')는 1200 rpm 내지 3600 rpm 의 회전속도로 회전할 수 있다. 이를 통해, 제1 부분(231'')에 존재하던 생체 시료가 원심력에 의해 제2 부분(232'')으로 안내되는 것을 촉진할 수 있다. 이 때, 가역 밸브(500'')는 전부 폐쇄된 상태이다.
- [0119] 생체 시료 여과 단계(S13)에서는 제2 부분(232'')으로 안내된 생체 시료가 여과막(100'')을 통해 회소 세포와 여과물로 각각 분리된다. 본 발명에서 회소 세포는 비교적 입자의 크기가 크므로 여과막 상부에 잔류하게 되고, 기타 생체 시료 여과물은 여과막(100'')을 통과하여 제1 유로(330'')를 따라 여과물 저장부(400'')로 이동한다. 이 때, 회소 세포 분리장치(10'')는 1200 rpm 내지 3600 rpm 의 회전속도로 회전하여 생체 시료의 여과를 촉진시킬 수 있다.
- [0120] 또한, 상기 단계에서 가역 밸브(500'') 중 500a'' 내지 500i'' 밸브는 폐쇄된 상태로 유지 한 채 500j'' 밸브만을 개방하여 여과물을 여과물 저장부(400'')로 공급할 수 있다.
- [0121] 회소 세포 세척 단계(S14)에서는 여과 단계(S13)가 종료된 후 여과막(100'') 상부에 잔류하는 회소 세포를 세척 용액을 이용하여 세척하는 과정을 거친다. 이 때, 세척 용액은 도 11의 제1 주입구(211'')를 기준으로 우측 방향에 형성된 하나의 제2 주입구를 통해 제2 안내부(240'')에 수용된다. 이 때, 가역 밸브(500'')는 500e'' 밸브 및 500i'' 밸브만이 개방되어 세척 용액을 여과막(100'')에 공급, 회소 세포를 세척한다. 이후, 회소 세포의 세척이 완료되면 500e'' 밸브 및 500i'' 밸브를 폐쇄하는 동시에 500j'' 밸브를 개방시켜 세척에 사용된 세척 용액을 여과물 저장부(400'')로 이동시킬 수 있다.
- [0122] 회소 세포의 염색 단계(S15)에서는 상기 세척된 회소 세포를 염색용 시약을 이용하여 고정, 침투 및 염색하는 과정을 거친다. 고정 용액, 침투 용액 및 염색 용액은 도 11의 제1 주입구(211'')를 기준으로 좌측 방향에 형성된 세 개의 제2 주입구에 각각 주입된다. 이 때, 고정 용액, 침투 용액, 염색 용액은 도 11에 도시된 바와 같이 세 개의 제2 안내부로 각각 저장될 수 있다. 한편, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포 검출방법에서는 도 11의 제1 주입구(211'')를 기준으로 가장 좌측에 있는 제2 안내부에 고정 용액이,中间的 제2 안내부에는 침투 용액이, 이웃한 제2 안내부에는 염색 용액이 각각 저장되나, 반드시 이러한 저장 위치에 제한되는 것은 아니다.
- [0123] 한편, 가역 밸브(500'')는 500a'' 밸브와 500d'' 밸브만을 개방시켜 여과막(100'')으로 세포 고정 용액을 이송시킨다. 인큐베이션(incubation) 시간을 거쳐 회소 세포를 고정시킨 후, 500a'' 밸브와 500d'' 밸브를 폐쇄하고 500j'' 밸브만을 개방하여 고정에 사용한 고정 용액을 여과물 저장부(400'')로 이동시킨다. 이후, 500j'' 밸브를 폐쇄하고 500f'' 밸브 및 500i'' 밸브만을 개방시켜 고정된 회소 세포를 세척하고, 500f'' 밸브 및 500i'' 밸브를 폐쇄하고 500j'' 밸브만을 개방시켜 세척 용액을 여과물 저장부(101'')로 이동시킨다.
- [0124] 이후 500b'' 밸브와 500d'' 밸브만을 개방시켜 여과막(100'')으로 세포 침투 용액을 이송시킨다. 인큐베이션 시간을 거친 후 500j'' 밸브만을 개방하여 고정 용액을 잔여물 수용 챔버로 이동한다. 그 후, 500g'' 밸브와 500i'' 밸브만을 개방하여 상기한 바와 같은 방법으로 회소 세포를 세척하는 과정을 거친다.
- [0125] 이후, 500c'' 밸브와 500d'' 밸브만을 개방시켜 여과막(100'')으로 세포 염색 용액을 공급한다. 이 때, 회소 세포는 염색 용액에 의해 염색될 수 있다. 염색이 완료되면, 500h'' 밸브와 500i'' 밸브만을 개방하여 상기한 바

와 같은 방법으로 회소 세포를 세척하는 과정을 거친다.

- [0126] 한편, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포 검출방법은 공지된 면역 형광 염색법(immunofluorescence method)을 사용하여 회소 세포를 염색하였으나, 반드시 이러한 방법으로 제한되는 것은 아니다.
- [0127] 회소 세포 검출 단계(S16)에서는 상기 회소 세포 분리장치(10'') 내부에서 염색이 완료된 회소 세포를 장치의 분해 없이 바로 검출하는 과정을 거친다. 이 때, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')의 제1 몸체(200'')와 제2 몸체(300'')는 광학적 투과성을 구비한 소재로 형성되는 바, 회소 세포 분리장치(10'') 내부에 존재하는 염색된 회소 세포를 광학 현미경을 이용하여 바로 검출해낼 수 있다. 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포 검출방법에서는 광학 현미경으로 형광 현미경을 사용하였으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0128] 이와 같이, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포 검출방법은 기존의 마이크로칩 기반의 회소 세포 분리장치와 달리 장치 분해 없이 내부에서 회소 세포를 염색 처리하여 바로 검출할 수 있는 장점이 있다.
- [0129] 이하에서는 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10''')에 대하여 설명한다. 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10''')를 설명함에 있어, 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')와 동일한 구성에 대해서는 상세한 설명을 생략한다.
- [0130] 도 14는 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 나타낸 도면이다.
- [0131] 도 14를 참고하면, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10''') 또한 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')와 동일하게 다수 개의 제2 주입구(213''') 및 제2 안내부(240''')가 제1 몸체(200''')의 중심을 기준으로 방사 방향에 형성된다.
- [0132] 이 때, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10''')의 제2 주입구(213''') 중 적어도 어느 하나 이상에는 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')의 염색용 시약 대신 회소 세포의 용해를 위한 용해 용액이 투입될 수 있다. 즉, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10''')는 회소 세포를 염색하는 대신 회소 세포를 용해하여 검출 용액을 생성할 수 있다.
- [0133] 또한, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10''')는 제1 몸체(200''')와 상기 제2 몸체(300''')의 사이에 상기 여과막(100''')과 연결되는 검출 용액 저장부(600''')가 형성될 수 있다. 즉, 검출 용액 저장부(600''')는 제1 몸체(200''')와 제2 몸체(300''')의 결합에 따라 회소 세포 분리장치(10''')의 내부에 형성된 공간일 수 있다.
- [0134] 이 때, 제2 유로(340''')는 도 12에 도시된 바와 같이 제1 유로(330''')로부터 분기되어 여과막(100''')과 검출 용액 저장부(600''')를 서로 연결할 수 있다. 한편, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10''')의 제2 유로(340''')는 제1 유로(330''')에 상응하는 폭과 길이로 제3 접촉층에 형성되나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0135] 또한, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10''')의 가역 밸브(500''')는 도 14에 도시된 바와 같이 제2 안내부(240''')와 제2 부분(232''')을 연결하는 미세 유로 사이에 설치되어 용해 용액의 유량을 조절하는 500l'''밸브와 500m'''밸브, 세척 용액의 유량을 조절하는 500n'''밸브와 500o'''밸브, 제1 유로(330'') 일측에 설치되어 여과물 저장부(400'')로 배출되는 여과물 유량을 조절하는 500p'''밸브 외에도, 제2 유로(340'') 일측에 설치되어 검출 용액 저장부(600'')로 배출되는 검출 용액의 유량을 조절하는 500q'''밸브를 포함한다.
- [0136] 이와 같이, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10''')는 내부에서 회소 세포를 용해하여 검출 용액을 생성할 수 있는 바, 증합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR), 정량적 증합 효소 연쇄 반응(quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 등과 같이 회소 세포의 유전자증폭이 필요한 경우에도 활용이 가능한 장점이 있다.
- [0137] 이하에서는 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10''')를 이용한 회소 세포의 검출방법에 대하여 설명하도록 한다.
- [0138] 도 15는 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치를 이용한 회소 세포 검출 방법을 나타낸 흐름도이다.

- [0139] 도 14 및 도 15를 참고하면, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포의 검출방법은 생체 시료가 상기 회소 세포 분리장치(10'') 내부로 주입되는 단계(S21), 회소 세포 분리장치(10'')를 회전시켜 생체 시료를 여과막(100'')으로 안내하는 단계(S22), 여과막(100'')을 통해 상기 생체 시료를 여과시키는 단계(S23), 여과막(100'')에 잔류하는 회소 세포를 세척하는 단계(S24), 상기 회소 세포를 용해시키는 단계(S25) 및 용해된 상기 회소 세포의 유전자를 특이적으로 증폭시키는 유전자 증폭 단계(S26)을 포함한다.
- [0140] 이 때, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포의 검출방법을 설명함에 있어서, 회소 세포 주입 단계(S21), 안내 단계(S22) 및 생체 시료 여과 단계(S23)는 상기 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포의 검출방법의 회소 세포 주입 단계(S11), 안내 단계(S12) 및 생체 시료 여과 단계(S13)와 각각 동일한 단계로, 이에 대한 상세한 설명은 생략하도록 한다.
- [0141] 회소 세포 세척 단계(S24)에서는 여과 단계(S23)가 종료된 후 여과막(100'') 상부에 잔류하는 회소 세포를 세척 용액을 이용하여 세척하는 과정을 거친다. 이 때, 세척 용액은 도 14의 제1 주입구(211'')를 기준으로 우측 방향에 형성된 제2 주입구를 통해 제2 안내부에 수용된다. 이 때, 가역 밸브(500'')는 500m''밸브 및 500n''밸브만이 개방되어 세척 용액을 여과막(100'')에 공급, 회소 세포를 세척한다. 이후, 회소 세포의 세척이 완료되면 500m''밸브 및 500n''밸브를 폐쇄하는 동시에 500o''밸브만을 개방시켜 세척에 사용된 세척 용액을 여과물 저장부(400'')로 이동시킬 수 있다.
- [0142] 회소 세포 용해 단계(S25)에서는 상기 세척된 회소 세포에 용해 용액을 공급시켜 회소 세포를 검출 용액의 형태로 용해시킬 수 있다. 이 때, 용해 용액은 도 13의 제1 주입구(211'')를 기준으로 좌측 방향에 형성된 제2 주입구를 통해 제2 안내부에 수용된다. 이 때, 가역 밸브(500'')는 500k''밸브 및 500l''밸브만이 개방되어 용해 용액을 여과막(100'')에 공급, 회소 세포를 용해시킨다. 인큐베이션 시간을 거쳐 회소 세포의 용해가 완료되면 500k''밸브 및 500l''밸브를 폐쇄하는 동시에 500p''밸브만을 개방시켜 용해된 회소 세포 용액을 검출 용액 저장부(600'')로 이동시킬 수 있다.
- [0143] 회소 세포 유전자증폭 단계(S26)에서는 상기 용해된 회소 세포 용액을 검출 용액으로 사용, 상기 검출 용액의 유전자증폭 처리를 거쳐 회소 세포를 검출하는 과정을 거친다. 이 때, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포 검출방법은 유전자증폭 방법으로 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR) 또는 정량적 중합 효소 연쇄 반응 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR)을 제공하나, 반드시 이러한 방법에 제한되는 것은 아니다.
- [0144] 이와 같이, 본 발명의 제4 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포 검출방법은 분리된 회소 세포를 검출 용액의 형태로 형성시킬 수 있는 바, 회소 세포의 분자 진단 등 회소 세포 분리장치(10'') 외부에서 회소 세포의 검출이 필요한 경우에도 장치를 해체하지 않고 회소 세포를 검출할 수 있는 장점이 있다.
- [0145] 이하에서는 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')를 이용한 회소 세포 처리 및 검출에 관한 실험예를 설명하도록 한다.
- [0146] 도 16은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 MCF7 유방암세포의 주입 개수에 따른 포획 정도를 나타낸 그래프이고, 도 17은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 회전 속도에 따른 암세포 포획률 및 그 순도를 나타낸 그래프이며, 도 18은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 시료 시료 희석도에 따른 암세포의 포획률 및 그 순도를 나타낸 그래프이다.
- [0147] 도 16 내지 도 18은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치(10'')의 여과막(100'')상에 잔류한 암세포를 염색한 후, 현미경으로 분리된 암세포의 개수를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [0148] <회소 세포 분리장치를 이용한 회소 세포 분리 및 염색 프로세스>
- [0149] 암세포 염색 과정은 회소 세포 분리장치(10'')의 해체 과정 없이 바로 이루어졌으며, 300 μ L의 4 % 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde, PFA)를 세포 고정 용액으로, 계면활성제가 주성분인 0.1 % 트라이톤 100-X을 세포 침투 용액으로 사용하여 각각 암세포의 고정 및 침투를 수행하였다. 상기 세포 고정 용액 및 세포 침투 용액은 제2 주입부(213'')를 통해 제1 몸체(200'') 내부로 주입되었으며, 장치를 3600rpm으로 0.5초간 회전하여 전혈 시료를 여과막(100'') 상부로 이동시킴으로써 인큐베이션(incubation)을 수행할 수 있었다. 염색 용액 또한 상기 제2 주입부(213'')를 통해 주입하였으며, 염색 용액은 100 ng/mL의 DAPI (핵 염색), 8 μ g/mL의 of Anti-Pan-Cytokeratin-eFluor®615 (암세포 염색), 240 ng/mL of Anti-Cytokeratin- PE (암세포 염색), and 4 μ g/mL

of Human CD45- FITC (백혈구 염색) 의 시약이 각각 같은 비율로 혼합된 용액을 사용하였다.

[0150] 본 실험예에서 혈중 종양 세포의 염색 과정, 유체 상태, 투입된 유체량, 장치의 회전 속도 및 프로세스 시간을 정리하면 표 1과 같다.

표 1

[0151]

순서	염색 과정	유체 상태	유체 부피	회전 속도	시 간	
1	시료 여과	흐름	1 mL	2400 rpm	15초	30 초
2	세척	흐름	1 mL	1200 rpm	15초	
3	Fc 블라킹	정지	300 μ L	-	15초	50.8 분
4	세척	흐름	500 μ L	1200 rpm	15초	
5	고정	정지	300 μ L	-	15초	
6	침투	정지	300 μ L	-	15초	
7	세척	흐름	500 μ L	1200 rpm	15초	
8	염색	정지	300 μ L	-	15초	
9	세척	흐름	500 μ L	1200 rpm	15초	
전체 프로세스 시간: 51.3 분						

[0152] <표적 종양 세포의 세포 농도에 따른 포획률>

[0153] 도 16은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 MCF7 유방암세포의 주입 개수에 따른 포획정도를 나타낸 그래프이다.

[0154] 도 16을 참고하면, 세척 용액에 암세포를 주입하였을 경우, 선형 회귀 분석 (linear regression)에 의한 암세포 포획률은 51%였으며, 전혈 시료에 암세포를 주입하였을 경우, 선형 회귀 분석 (linear regression)에 의한 암세포 포획률은 53%였음을 알 수 있었다. 또한, 두 경우 상관 곡선을 살펴보면, 결정계수 (R-square) 값이 각각 0.97과 0.99를 나타내고 있었다. 이를 통해 세척 용액에 암세포를 주입하였을 경우와 전혈 시료에 암세포를 주입하였을 경우 회소 세포 분리장치(10'')를 통한 암세포 포획률이 약 50%로 유사하다는 것을 알 수 있었다. 이에 따라, 회소 세포 분리장치(10'')가 생체 시료의 종류와 무관하게 회소 세포를 분리해 낼 수 있음을 알 수 있었다.

[0155] <장치 회전 속도에 따른 표적 암세포의 포획률 및 순도>

[0156] 도 17은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 회전 속도에 따른 암세포 포획률 및 그 순도를 나타낸 그래프이다.

[0157] 도 17을 참고하면, 회소 세포 분리장치(10'')의 회전 속도가 1200 rpm일 때의 암세포 포획률 및 순도는 각각 55.2% 와 14.37% 였고, 2200 rpm일 때의 암세포 포획률 및 순도는 각각 43.37% 와 12.39 % 임을 알 수 있었다. 또한 회전 속도가 3600 rpm일 때의 암세포 포획률 및 순도는 각각 49.97% 와 27.34% 임을 알 수 있었다.

[0158] <시료 희석도에 따른 표적 암세포의 포획률 및 순도>

[0159] 도 18은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치의 1200 rpm의 회전 속도 하에서 전혈 시료의 희석도에 따른 암세포 포획률 및 순도를 나타낸 그래프이다. 이 때, 전혈 시료는 1XPBS(phosphate buffered saline) 버퍼 용액에 희석 되었다.

[0160] 도 18을 참고하면, 희석되지 않은 전혈 시료를 주입하였을 때의 암세포 포획률 및 순도는 각각 46.68% 와 29.76% 였고, 전혈 시료를 25% 희석하였을 때의 암세포 포획률 및 순도는 각각 60.31% 와 21.01 % 임을 알 수 있었다. 또한 전혈 시료를 50 % 희석 하였을 때의 암세포 포획률 및 순도는 각각 52.36% 와 23.68% 임을 알 수 있었다.

[0161] <임상 실험 결과>

[0162] 도 19는 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치에 유방암 환자군의 전혈 시료 투입 시 검출되는 암세포 수를 7.5mL 전혈 시료 당 암세포 수로 환산한 그래프이고, 도 20은 본 발명의 제3 실시예에 따른 회소 세포 분리장치에 위암 환자군의 전혈 시료 투입 시 검출되는 암세포 수를 7.5mL 전혈 시료 당 암세포 수로 환산한 그래프이다.

[0163] Cellsearch®시스템에서 사용하는 혈액 부피가 7.5 mL이므로, 본 실험예에서는 상기 시스템과의 대조를 위해 7.5 mL 당 포획된 암세포 개수로 변환하여 분석하였다. 이 때, 도 19 및 도 20을 참고하면 폐암 환자군의 경우 포획된 암세포의 개수가 7.5 mL 당 11.7개 내지 43.8개로 분포했고, 위암 환자군의 경우 포획된 암세포의 개수가 7.5 mL 당 10.4개 내지 60.4개로 분포함을 알 수 있다. 시료 번호 및 암 종류와 더불어, 실제로 분리된 암세포 개수와 주입된 전혈 시료의 부피는 표 2로 정리하였다.

표 2

[0164]

시료 번호	암 종류	스테이지	암세포 개수	전혈 부피	7.5mL당 암세포 개수
L58	폐암	IIA	5	3.2	11.7
L59	폐암	-	0	2.4	0
L60	폐암	IIIB	0	3.6	0
L61	폐암	IV	0	4	0
L62	폐암	IV	4	2.4	12.5
L63	폐암	IIIA	16	4.4	27.3
L64	폐암	I B	-	4.4	-
L65	폐암	I B	5	2.2	14.0
L66	폐암	IV	21	3.6	43.8
L68	폐암	IV	0	3	0
G110	위암	IIIB	0	3.2	0
G111	위암	IIIC	0	4.2	0
G113	위암	IIIC	0	4.2	0
G115	위암	I A	15	3.2	35.2
G118	위암	IIIC	18	4.4	30.7
G119	위암	IV	29	3.6	60.4
G120	위암	IIIC	9	3.6	18.8
G121	위암	IIA	0	3.6	0
G122	위암	IIIB	5	3.6	10.4
G123	위암	I A	0	3.6	0
G124	위암	IIIB	0	4	0
G125	위암	-	0	3.4	0
G126	위암	I A	0	4.2	0

[0165] 도 21은 본 발명의 제3 실시예에 따른 희소 세포 분리장치를 통해 검출된 백혈구 및 암세포의 면역 형광 염색 결과를 나타낸 현미경 사진이다.

[0166] 도 21을 참고하면, 포획된 백혈구와 암세포에서 모두 핵이 존재함을 확인할 수 있었고(도 21의 파란색 염색 부분), 암세포의 경우 시토크라틴(cytokeratin, CK)이 발현됨(도 21의 빨간색 염색 부분)을 확인할 수 있었다. 또한, 백혈구의 경우에는 CD45가 발현됨을 확인할 수 있었다.

[0167] 도 22는 본 발명의 제3 실시예에 따른 희소 세포 분리장치를 통해 검출된 유방암세포의 크기 분포를 나타낸 그래프이고, 도 23은 본 발명의 제3 실시예에 따른 희소 세포 분리장치를 통해 검출된 위암세포의 크기 분포와 위암 세포주의 크기 분포를 비교한 그래프이다.

[0168] 도 22 및 도 23을 참고하면, 유방암 환자에서 포획된 암세포의 경우 크기가 8 μm ~ 22 μm 범위 내에 존재함을 알 수 있었고, 위암 환자에서 포획된 암세포의 경우 9 μm ~ 22 μm 범위 내에 존재함을 확인할 수 있었다.

[0169] 본 발명을 앞서 기재한 바에 따라 실시예를 통해 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되지 않으며 다음에 기재하는 특허청구범위의 개념과 범위를 벗어나지 않는 한, 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것을 본 발명이 속하는 기술 분야에 종사하는 자들은 쉽게 이해할 것이다.

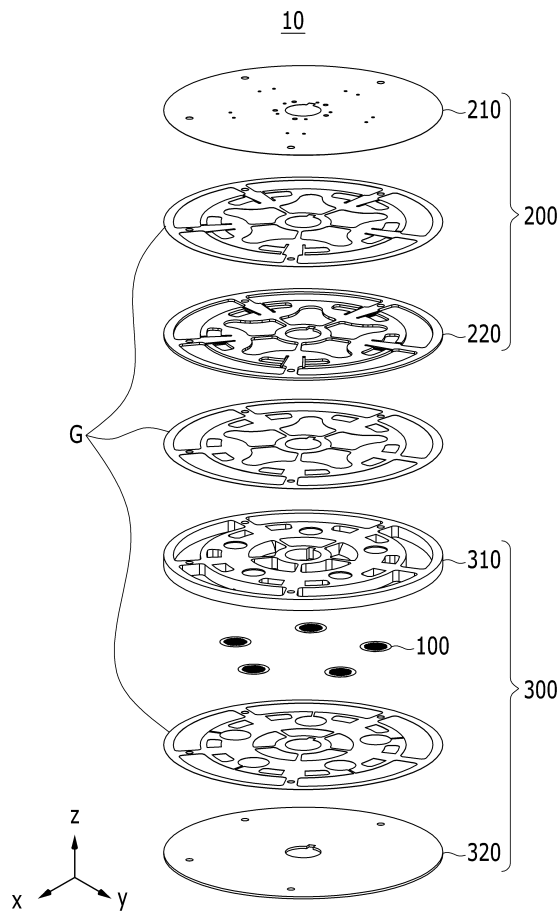
부호의 설명

[0170] 2: 혈중 종양 세포 4: 백혈구
6: 적혈구 10: 희소 세포 분리장치

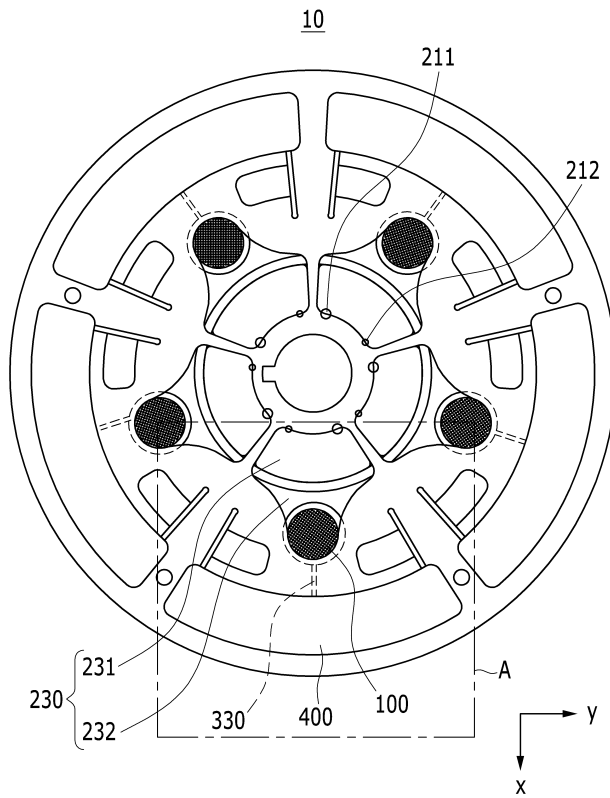
- 100: 여과막 200: 제1 몸체
 210: 상판 211: 제1 주입구
 212: 환기구 213: 제2 주입구
 220: 제1 중판 230: 제1 안내부
 231: 제1 부분 232: 제2 부분
 240: 제2 안내부 300: 제2 몸체
 310: 제2 중판 311: 관통부
 311a: 제1 홀 311b: 제2 홀
 320: 하판 330: 제1 유로
 340: 제2 유로 400: 여과물 저장부
 500: 가역 밸브 600: 검출 용액 저장부

도면

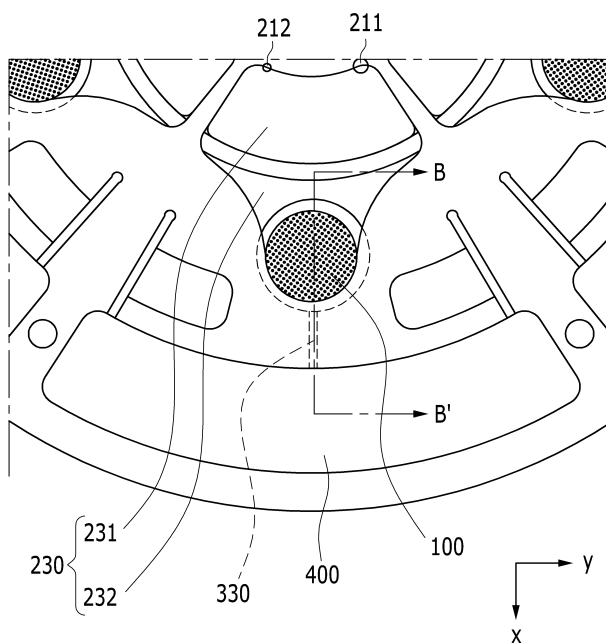
도면1



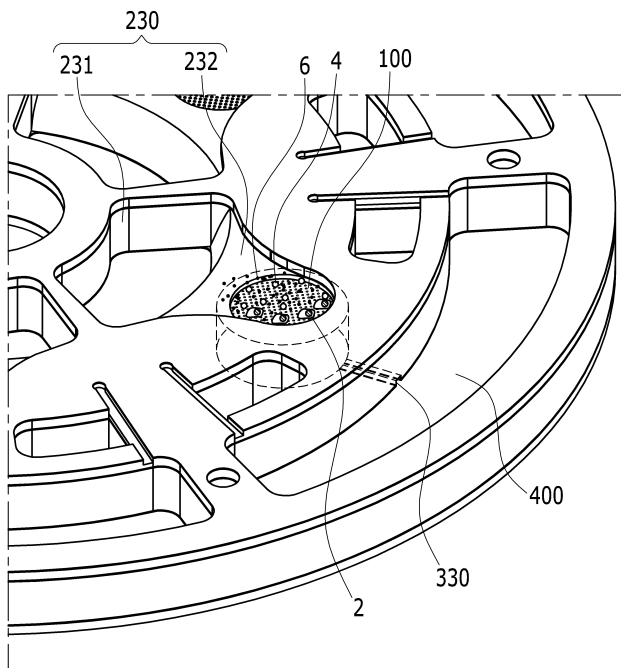
도면2



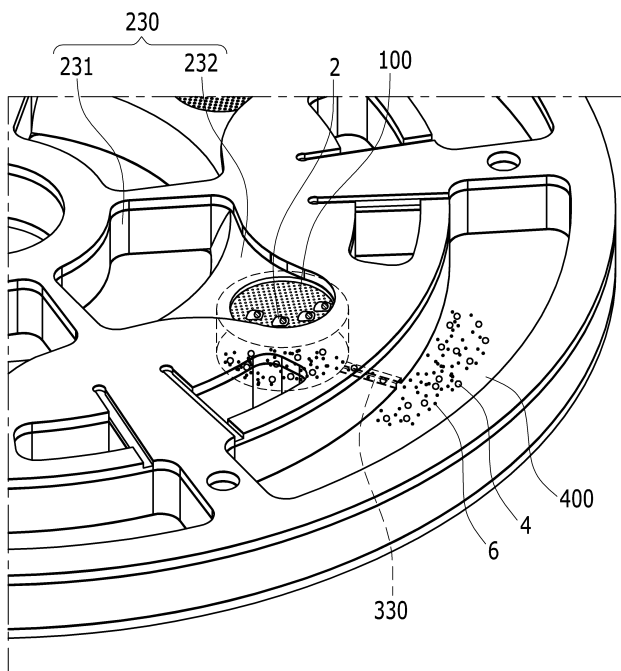
도면3



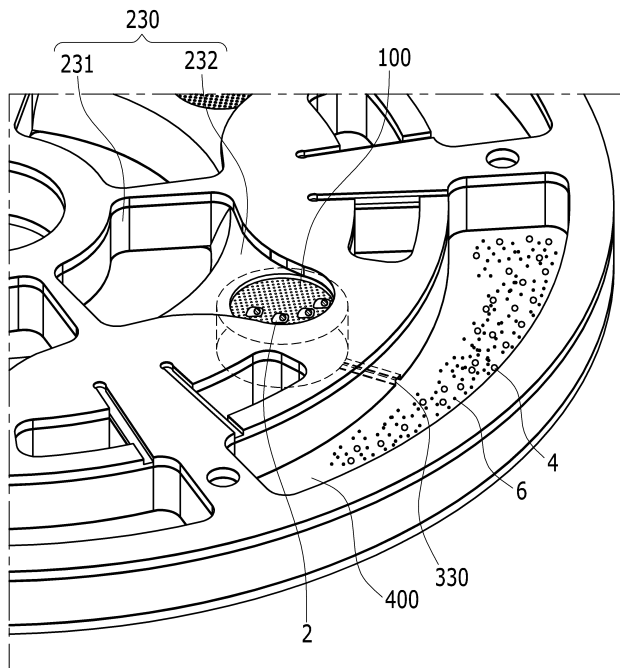
도면6



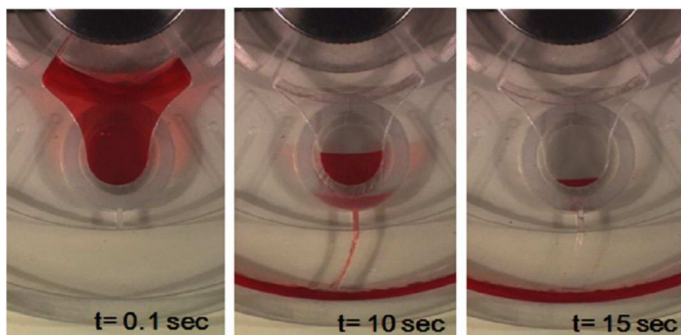
도면7



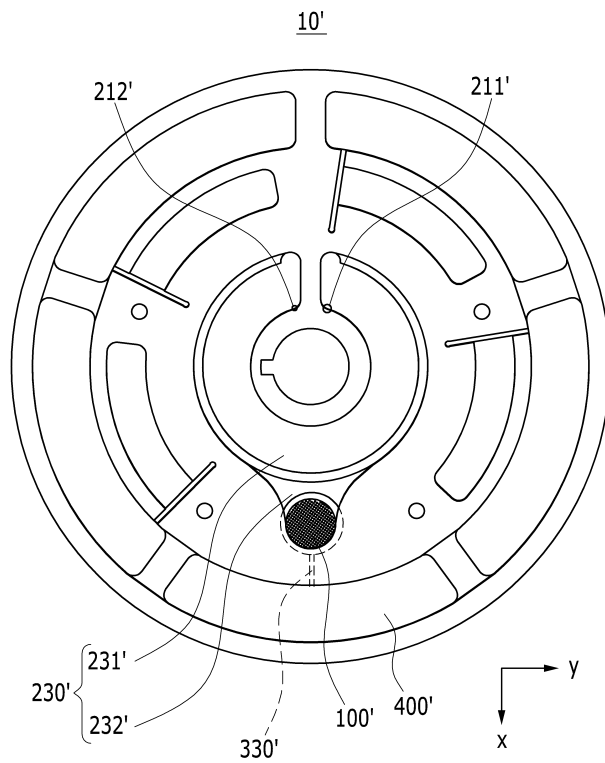
도면8



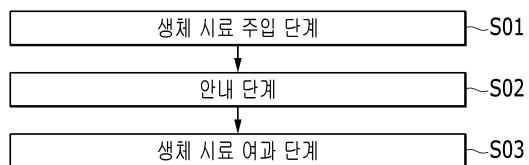
도면9



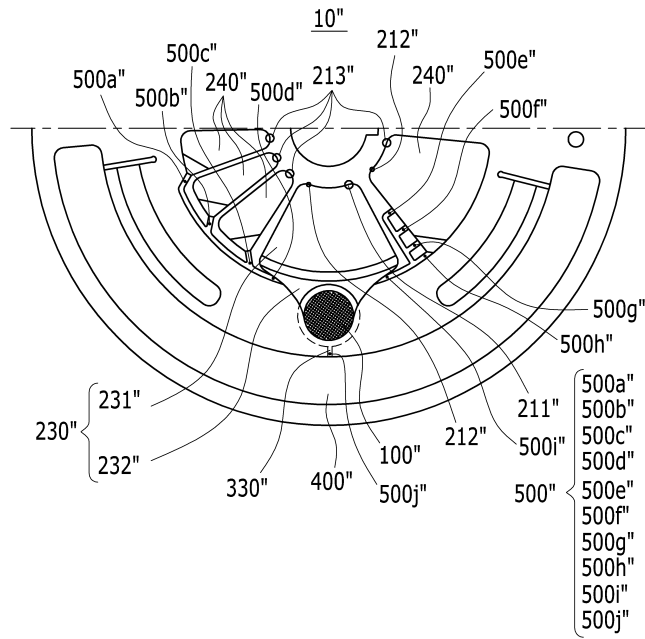
도면10



도면11



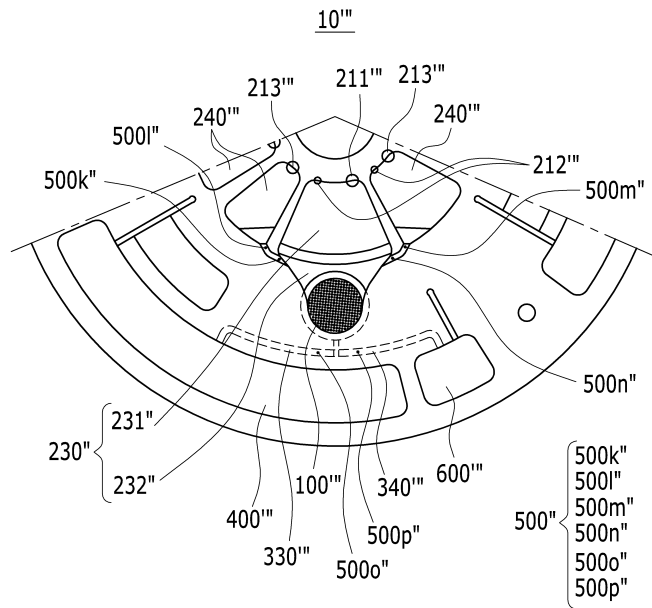
도면12



도면13



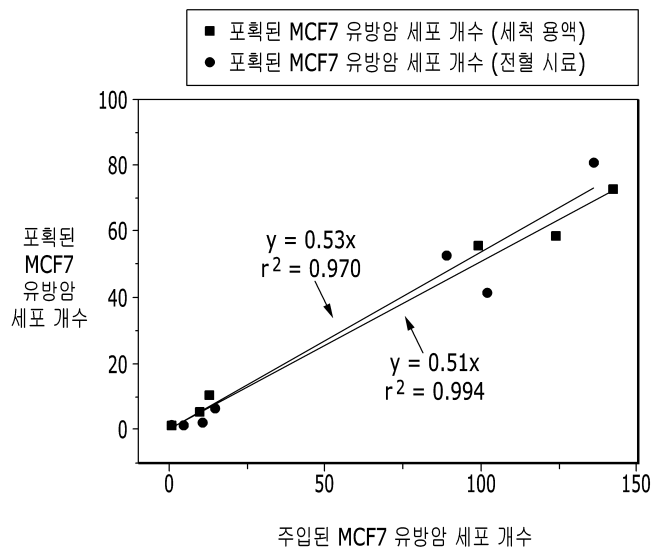
도면14



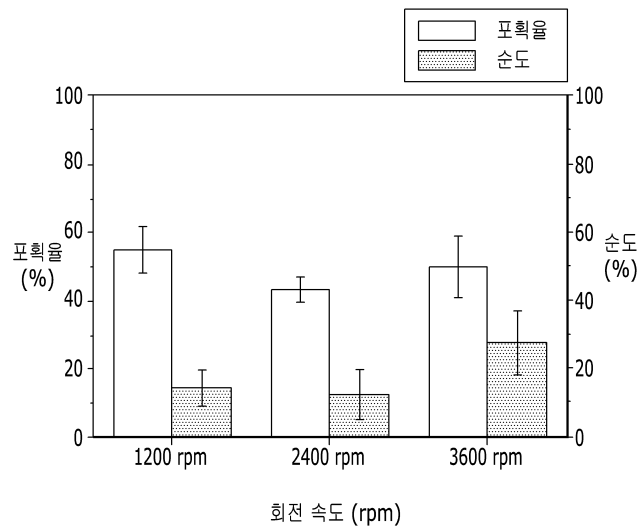
도면15



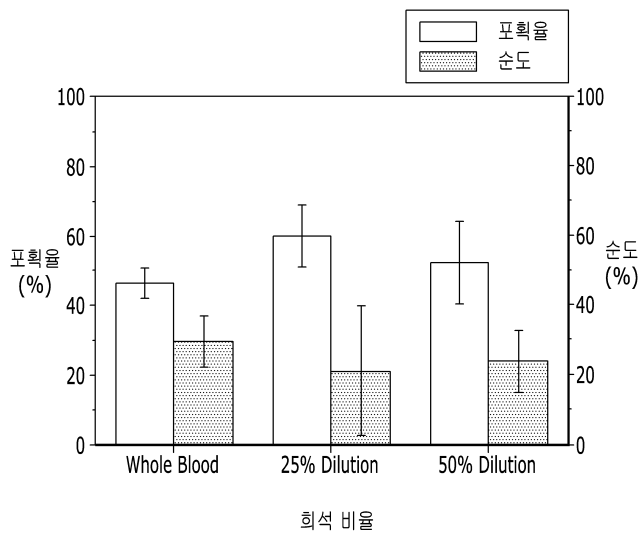
도면16



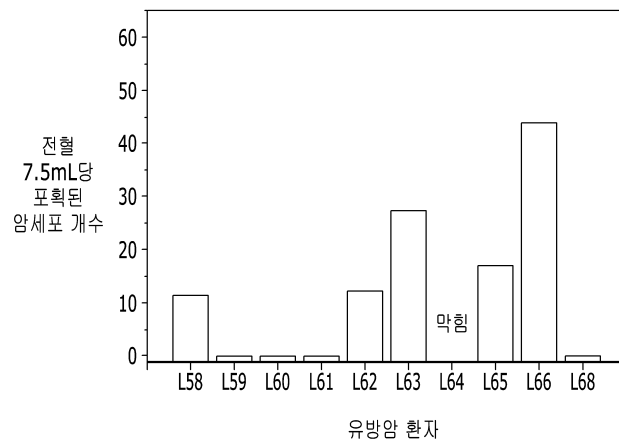
도면17



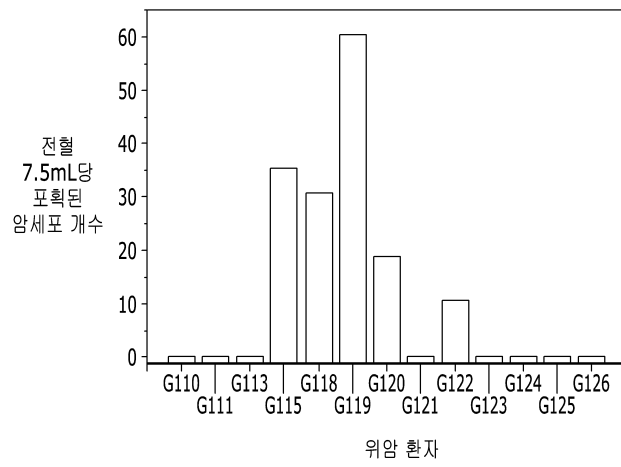
도면18



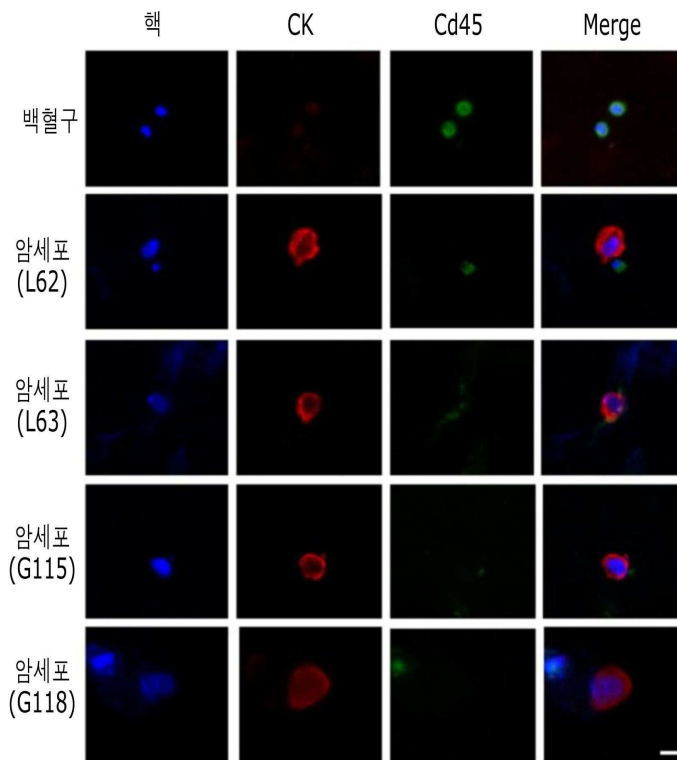
도면19



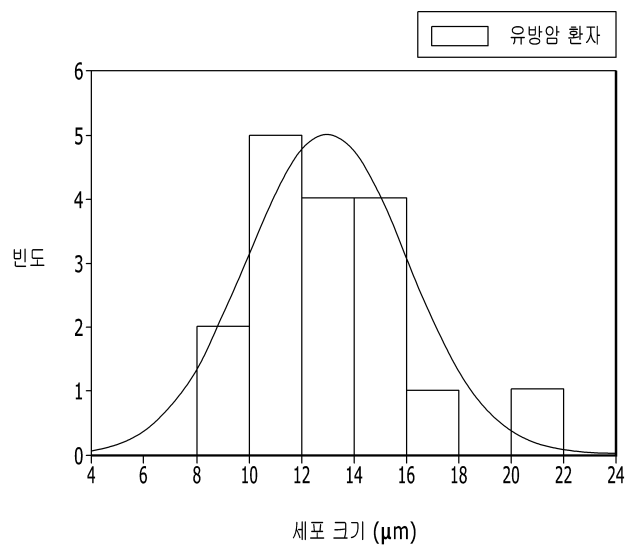
도면20



도면21



도면22



도면23

