(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0126395
(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 10-2018-0056541
(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

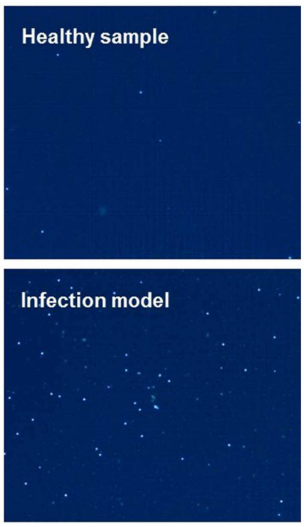
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **자성 입자를 이용한 면역세포의 평가방법**

(57) 요 약

자성 입자를 이용한 면역세포의 평가방법에 관한 것이다. 일 양상에 따른 방법은 자성 입자를 사용하여 면역세포가 자성 입자와 상호작용하는 정도를 측정함으로써 개체의 면역세포의 활성화 정도 또는 면역 관련 질환을 진단, 평가할 수 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

개체로부터 분리된 시료와 자성 입자를 접촉시키는 단계로, 상기 시료가 면역세포를 포함하는 것인 단계;

상기 접촉에 의하여 얻어진 반응물에 자기장을 인가하여 시료 내 포함된 면역세포 중 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 분리하는 단계; 및

상기 분리된 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 검출하는 단계를 포함하는 개체의 면역세포의 활성화 정도를 평가하는 방법.

청구항 2

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

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 면역세포는 호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 림프구, 대식세포, 비만세포, B세포, T세포, 자연살해세포, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 자성 입자는 산화되거나 금속, 작용기, 단백질, 탄수화물, 폴리머, 또는 지질에 의해 표면 개질된 것인 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 접촉시키는 단계는 0℃내지 40℃에서 0.1 초 내지 1시간 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 자기장을 인가하는 단계는 0.1 초 내지 1시간 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 자성 입자와 상호작용한 면역세포는 면역세포의 내포 작용 (endocytosis)에 의해 자성 입자와 상호작용한 것인 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 상기 개체의 면역세포의 활성화 정도를 평가하는 방법은, 상기 검출한 자성 입자와 상호작용한 면역세포(활성화된 면역 세포)의 수준과 시료 내 포함된 면역세포의 수준을 비교하는 단계, 또는 상기 개체로부터 분리된 시료 내 포함된 자성 입자와 상호작용한 면역세포의 수준과 정상 개체로부터 분리된 시료 내 포함된 자성 입자와 상호작용한 면역세포의 수준을 비교하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 9

개체로부터 분리된 시료와 자성 입자를 접촉시키는 단계로, 상기 시료가 면역세포를 포함하는 것인 단계;

상기 접촉에 의하여 얻어진 반응물에 자기장을 인가하여 시료 내 포함된 면역세포 중 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 분리하는 단계; 및

상기 분리된 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 검출하는 단계를 포함하는 면역 관련 질환을 진단하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 자성 입자를 이용한 면역세포의 평가방법에 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 평가하고, 이를 통해 다양한 감염성 질환이나 면역 관련 질환, 또는 면역 이상을 진단하는 방법을 연구할 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 자성 입자와 면역세포의 내포 작용을 이용하여 개체의 면역세포의 활성화 정도를 평가하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은 개체로부터 분리된 시료와 자성 입자를 접촉시키는 단계로, 상기 시료가 면역세포를 포함하는 것인 단계; 상기 접촉에 의하여 얻어진 반응물에 자기장을 인가하여 시료 내 포함된 면역세포 중 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 검출하는 단계를 포함하는 개체의 면역세포의 활성화 정도를 평가하는 방법을 제공한다.

[0008] 상기 개체의 면역세포의 활성화 정도를 평가하는 방법은 개체로부터 분리된 시료와 자성 입자를 접촉시키는 단계로, 상기 시료가 면역세포를 포함하는 것인 단계를 포함한다.

[0009] 상기 개체로부터 분리된 시료에 포함된 면역세포와 자성 입자의 접촉에 의해서 면역세포가 자성 입자와 상호작용할 수 있다.

[0010] 본 명세서에서, 용어 "상호작용"은 면역세포의 내포 작용 (endocytosis)에 의해 자성 입자가 면역세포의 내부 또는 외부에 부착, 유입, 함입, 또는 봉입되는 현상을 지칭한다. 상기 내포 작용은 세포내 섭취로도 지칭되고, 세포가 물질을 섭취하는 현상을 통칭하는 것이며, 구체적으로는 식균 작용 (phagocytosis), 또는 음세포 작용 (pinocytosis)를 포함할 수 있다.

[0011] 내포 작용은 활성화되지 않은 면역세포보다 감염 등에 의해 활성화된 면역세포에 의해 빈번하게 발생한다. 즉, 면역세포의 활성화 정도와 내포 작용의 발생이 비례하고, 상기 자성 입자와 상호작용한 면역세포는 활성화된 면역세포로 평가할 수 있다.

[0012] 예를 들어, 상기 개체로부터 분리된 시료에 포함된 면역세포와 자성 입자를 접촉시키는 단계는 시료와 자성 입자를 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 배양은 혈액 등의 체액이나 면역세포의 배양에 통상적으로 사용되는 배지를 사용하여 통상적인 조건에서 수행될 수 있다.

[0013] 상기 접촉은 면역세포와 자성 입자가 상호작용하기에 충분한 조건에서 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 접촉은 약 0℃ 내지 약 40℃, 약 30℃ 내지 약 40℃, 또는 35℃ 내지 약 40℃에서, 또는 약 0.1초 내지 약 1시간, 약 1초 내지 약 1시간, 약 30초 내지 약 1시간, 또는 약 1분 내지 약 1시간 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 접촉 시간은 일반적으로 면역세포의 활성화를 평가하기 위한 방법에 소요되는

시간보다 적은 시간이므로, 일 양상에 따르면 짧은 시간 내에 면역세포의 활성화 정도를 평가할 수 있다.

[0014] 상기 "개체"는 면역세포의 활성화 정도를 평가하고자 하는 대상을 의미하는 것으로, 인간, 원숭이 등의 영장류, 랫트, 마우스 등의 설치류, 말, 소, 돼지, 양, 염소 등의 우제류, 말과, 개과, 고양이과, 등으로 이루어진 군에서 선택된 포유류, 조류, 어류 등에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0015] 본 명세서에서, 상기 "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.

[0016] 본 명세서에서, 상기 "면역세포"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 내포 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.

[0017] 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.

[0018] 본 명세서에서, 용어 "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), 프라세오디뮴(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.

[0019] 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, C 반응성 단백질 (C-reactive protein: CRP)과 만노오스 결합 렉틴 (mannose binding lectin) 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.

[0020] 상기 자성 입자는 공지된 방법을 통해 제조해서 사용할 수 있고, 상업적으로 구입해서 사용할 수도 있다.

[0021] 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.

[0022] 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.

[0023] 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.

[0024] 상기 개체의 면역세포의 활성화 정도를 평가하는 방법은 상기 접촉에 의하여 얻어진 반응물에 자기장을 인가하여 시료 내 포함된 면역세포 중 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 검출하는 단계를 포함한다.

[0025] 상기 자기장은 통상적인 모든 방법으로 형성될 수 있다. 예를 들어, 전자기 유도에 의한 전자석, 영구 자석 등의 자석 등을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 자석은 하나 이상일 수 있으며, 직렬, 병렬, 원형 등 다양한 배열로 적용될 수 있다. 상기 자기장 인가는 pH, 온도, 이온 등과 같은 주변 환경에 영향을 받지 않으므로 안정성이 우수한 특징이 있다.

[0026] 상기 접촉에 의해서 얻어진 반응물은 자성 입자와 상호작용한 면역세포, 자성 입자와 상호작용하지 않은 면역세포, 자성 입자, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 이러한 반응물에 자기장을 인가함으로써 자성 입자 및 자성 입자와 상호작용한 면역세포가 자기장 주변으로 모이게 되고, 시료 내 포함된 면역세포 중 자성 입자와 상호작용하지 않은 면역세포로부터 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 분리할 수 있다.

[0027] 상기 자기장을 인가하는 단계는 자성 입자 및 자성 입자와 상호작용한 면역세포가 자기장 주변으로 모이기에 충분한 시간 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 자기장을 인가하는 단계는 약 0.1초 내지 약 1시간, 약 1초 내지 약 1시간, 약 30초 내지 약 1시간, 또는 약 1분 내지 약 1시간 동안 수행되는 것일 수 있다. 상기 자기장을 인가하는 시간은 일반적으로 면역세포의 활성화 정도를 평가하는 방법에서 소요되는 시간에 비하여 짧기 때문에, 일 양상에 따르면 짧은 시간 내에 면역세포의 활성화 정도를 평가할 수 있다.

[0028] 상기 검출하는 단계는 분리된 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 검출한다. 일 구현예에서, 상기 면역세포는 검출 가능한 표지 물질로 표지되어 있고, 표지 물질을 검출함으로써 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 검출할 수 있다.

[0029] 상기 개체의 면역세포의 활성화 정도를 평가하는 방법은, 상기 검출한 자성 입자와 상호작용한 면역세포(활성화된 면역 세포)의 수준과 시료 내 포함된 면역세포의 수준을 비교하는 단계, 또는 상기 개체로부터 분리된 시료 내 포함된 자성 입자와 상호작용한 면역세포(활성화된 면역세포)의 수준과 정상 개체로부터 분리된 시료 내 포함된 자성 입자와 상호작용한 면역세포(활성화된 면역세포)의 수준을 비교하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0030] 상기 검출한 자성 입자와 상호작용한 면역세포의 수준과 시료 내 포함된 면역세포의 수준을 비교하는 단계에서, 상기 자성 입자와 상호작용한 면역세포는 활성화된 면역세포이고, 상기 시료 내 포함된 면역세포는 자성 입자와 상호작용한 면역세포 및 자성 입자와 상호작용하지 않은 면역세포를 포함한다. 상기 시료 내 포함된 면역세포의 수준은 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 분리하는 단계 전 임의의 단계에서 검출 가능한 표지 물질에 의해 표지된 면역세포를 검출함으로써 평가할 수 있다. 시료 내 포함된 면역세포의 수준과 검출한 자성 입자와 상호작용한 면역세포의 수준을 비교하는 단계에 의해서, 전체 면역세포 대비 활성화된 면역세포의 비율을 측정할 수 있다. 상기 전체 면역세포 대비 활성화된 면역세포의 비율을 정상 개체에서의 비율과 비교한 결과, 두 개체에서 활성화된 면역세포의 비율이 상이한 경우, 감염성 질환 또는 면역 관련 질환을 앓거나 앓을 위험이 있는 것으로 진단할 수 있다. 예를 들어, 상기 개체에서 전체 면역세포 대비 활성화된 면역세포의 비율이 정상 개체에서 활성화된 면역세포의 비율보다 높은 경우, 상기 개체는 면역 자극 (면역 활성화) 상태, 면역 과잉, 또는 감염성 질환에 노출된 것으로 진단할 수 있다. 예를 들어, 상기 개체에서 전체 면역세포 대비 활성화된 면역세포의 비율이 정상 개체에서 활성화된 면역세포의 비율보다 낮은 경우, 상기 개체는 면역 비활성화, 면역 저하 상태인 것으로 진단할 수 있다.

[0031] 상기 개체로부터 분리된 시료 내 포함된 자성 입자와 상호작용한 면역세포의 수준과 정상 개체로부터 분리된 시료 내 포함된 자성 입자와 상호작용한 면역세포의 수준을 비교하는 단계에서, 자성입자와 상호작용한 면역세포

의 수는 활성화된 면역세포이므로, 평가 대상인 개체의 활성화된 면역세포의 수와 정상 개체의 활성화된 면역세포의 수를 비교할 수 있다.

[0032] 상기 방법에서, "면역세포의 활성화 정도"는 감염 또는 면역 이상에 의해서 면역세포의 내포 작용이 증가되었거나 저하된 정도를 지칭할 수 있다.

[0034] 다른 양상은 개체로부터 분리된 시료와 자성 입자를 접촉시키는 단계로, 상기 시료가 면역세포를 포함하는 것인 단계; 상기 접촉에 의하여 얻어진 반응물에 자기장을 인가하여 시료 내 포함된 면역세포 중 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 자성 입자와 상호작용한 면역세포를 검출하는 단계를 포함하는 면역 관련 질환을 진단하는 방법을 제공한다.

[0035] 상기 각 단계에 대해서는 상술한 바와 같다.

[0036] 상기 방법에서, "면역 관련 질환"은 면역계를 자극하거나 (즉, 면역 활성화 상태 또는 면역 비활성화 상태를 유발하거나), 면역 자극 (면역 활성화), 면역 과잉, 면역 비활성화 또는 면역 저하에 의하여 유발되는 모든 질병일 수 있으며, 예컨대, 바이러스, 세균, 곰팡이 또는 진균 등의 전신성 또는 국부성 감염 (예컨대, 초기 감염, 장기적 감염 등), 염증 (예컨대, 급성 염증 또는 만성 염증), 패혈증, 암, 암전이, 자가면역질환, 심혈관계 질환 (동맥경화, 뇌졸중 등), 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 면역 관련 질환은 앞서 설명한 전신성 또는 국부성 감염, 급성 염증, 패혈증, 자가면역질환, 심혈관계 질환 (동맥경화, 뇌졸중 등) 등의 면역 자극 (면역 활성화) 상태 또는 면역 이상 (즉, 면역 과잉) 상태와 관련 있거나 이에 의하여 유발되는 질병; 또는 장기적 감염, 만성 염증, 암, 암전이 등의 면역 이상 (즉, 면역 비활성화 또는 면역 저하) 상태와 관련 있거나 이에 의하여 유발되는 질병을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0037] 일 양상에 따른 방법은 자성 입자를 사용하여 면역세포가 자성 입자와 상호작용하는 정도를 측정함으로써 개체의 면역세포의 활성화 정도 또는 면역 관련 질환을 진단, 평가할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 인 비트로에서 대조군 및 감염된 혈액 모델에서 활성화된 면역세포를 확인한 현미경 사진이다.

도 2는 대조군 랫트의 경우, 혈액을 자성 입자와 접촉시키기 전의 면역세포(좌) 및 자성 입자와 접촉하여 상호작용한 면역세포를 제외한 나머지 면역세포(우)의 사진이다.

도 3은 *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.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 하나, 이는 예시적인 것에 불과할 뿐 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 아래 기재된 실시예들은 발명의 본질적인 요지를 벗어나지 않는 범위에서 변형될 수 있음은 당 업자들에게 있어 자명하다.

[0041] **실시예 1: 인 비트로(*in vitro*) 혈액 모델에서 활성화된 면역세포 검출**

[0042] **1.1 *E.coli*로 감염된 혈액 모델에서 활성화된 면역세포 검출**

[0043] *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.

[0044] 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. 200 nm 지름의 자성 입자(03122, Ademtech, France) 표면에 만노오스 결합 렉틴 (Mannose-binding lectin, 10405-HNAS, Sino Biological Inc., China)을 고정한 후, 본 입자를 상기

감염혈액 모델에 0.2 mg/mL의 농도; 염화칼슘을 5 mM의 농도; 로 섞고 37℃에서 20분 동안 반응시켰다.

[0045] 자성입자와 반응시킨 감염혈액 일부를 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. 그 후, 10 μL를 채취하여 세포분석기(cytometer)에 넣고 세포의 수를 측정하였다.

[0046] 자성입자와 반응시킨 감염혈액 나머지 일부를 1.5 mL EP 튜브에 넣은 후 한쪽 면을 자석에 대고 20분간 자기장을 인가시켰다. 20분이 지난 후, 혈액 모델이 자석에 고정된 상태에서, 식염수(saline)로 EP 튜브 안에 있는 혈액을 조심스럽게 파이펫팅하여 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 세포분석기에 넣어 세포의 수를 측정하였다.

[0047] 대조군으로는 *E.coli*를 섞지 않은 혈액을 사용하였고, 대조군과 감염된 혈액 모델을 형광현미경으로 촬영한 사진을 도 1에 나타내었다.

[0048] 도 1에 나타낸 바와 같이, 대조군 (healthy sample)과 비교하여 감염된 혈액 모델 (infection model)에서 자성입자와 상호작용하여 자기장에 의해 분리된 면역세포의 수가 유의적으로 증가하였음을 확인하였다.

[0049] 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.

[0050] 따라서, 감염시킨 *E. coli*의 농도와 비례하여 혈액 내의 면역 세포가 활성화되었고, 활성화된 면역세포의 내포작용에 의해 더 많은 수의 면역세포가 자성 입자를 포함하므로, 상기 방법에 의해 감염 정도를 예측할 수 있음을 알 수 있다.

[0052] **1.2 LPS(lipopolysaccharide)로 감염된 혈액 모델에서 활성화된 면역세포 검출**

[0053] LPS의 감염에 의해 활성화된 면역세포를 자성 입자를 이용해 검출할 수 있는지 확인하기 위해서, 혈액에 1 mg/mL의 LPS를 혼합하고, 상기 1.1과 동일한 방법으로 실험하였다.

[0054] 실험 결과, 대조군 대비 약 14.37%의 백혈구가 자석쪽으로 더 끌려오는 현상을 발견하였다.

[0055] 따라서, LPS의 감염에 의해 활성화된 면역세포의 내포 작용에 의해 더 많은 수의 자성 입자가 면역세포와 상호작용하였으므로, 상기 방법에 의해 활성화된 면역세포의 수나 면역세포가 활성화된 정도를 진단할 수 있음을 확인하였다.

[0057] **실시예 2: 인 비보(*in vivo*) 랫트 모델에서 활성화된 면역세포 검출**

[0058] **2.1 *E.coli*로 감염된 랫트 모델에서 활성화된 면역세포 검출**

[0059] 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.

[0060] 10^7 CFU/mL의 *E. coli*를 1mL의 식염수에 넣어 준비하고 400 g의 수컷 랫트 (Wistar rat)에 복강 주입하여 감염된 랫트 모델을 제조하였다. 감염을 하기 전과 감염 후 4 시간 뒤 꼬리 채혈로 전혈을 획득하였고 200 nm 지름의, 만노오스 결합 렉틴이 표면에 고정되어 있는 자성 입자를 0.2 mg/mL의 농도; 염화칼슘을 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 μM을 넣고 20분 동안 면역세포를 형광염색하였다. 형광염색 후, 혈액을 가만히 두어 면역 입자를 가라앉혀 가라앉은 면역세포를 형광현미경으로 검출하였다.

[0061] 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 2에, 감염된 랫트 모델에 대한 실험 결과를 도 3에 나타내었다.

[0062] 도 2는 대조군 랫트의 경우, 혈액을 자성 입자와 접촉시키기 전의 면역세포(좌) 및 자성 입자와 접촉하여 상호작용한 면역세포를 제외한 나머지 면역세포(우)의 사진이다.

[0063] 도 3은 *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.

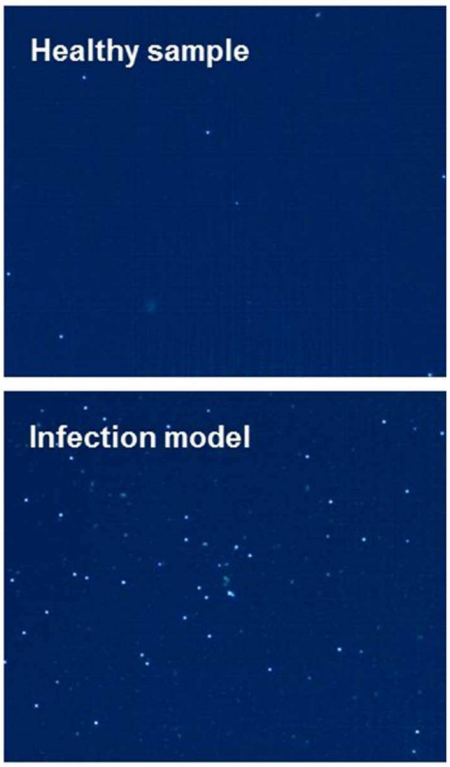
[0064] 도 2에 나타낸 바와 같이, 대조군에서는 자성 입자와 접촉시키기 전과 후에 면역세포의 수가 변함이 없었다.

[0065] 도 3에 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).

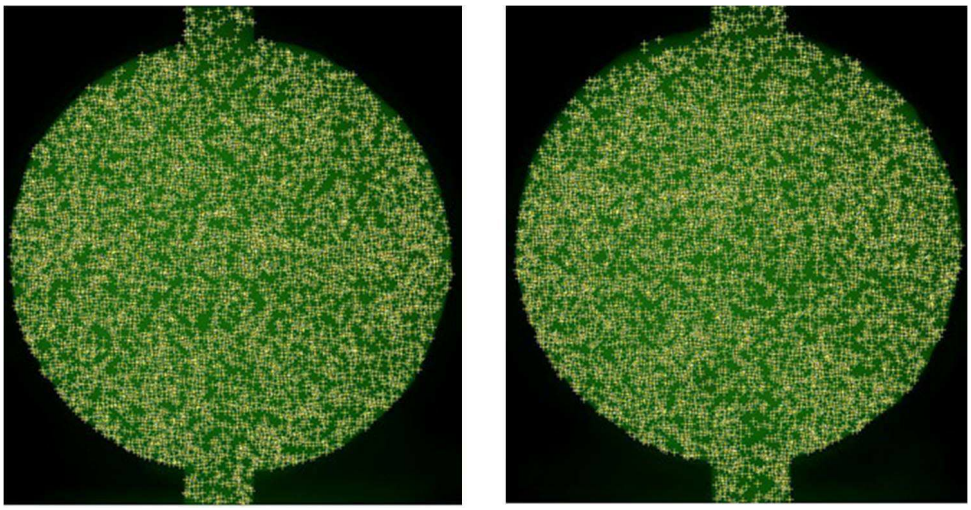
[0066] 따라서, 감염된 랫트의 경우, *E.coli*에 의해 혈액 내 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포의 활발한 내포작용에 의해 면역세포와 상호작용한 자성 입자가 증가하였으므로, 본 발명의 방법이 인 비보에서 면역세포의 활성화 정도를 평가할 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



도면3

