(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월26일
(11) 등록번호 10-2402451
(24) 등록일자 2022년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *B01L 3/00* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 16/10* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/505 (2013.01)
B01L 3/502738 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7015445(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년03월28일
심사청구일자 2021년05월21일
(85) 번역문제출일자 2021년05월21일
(65) 공개번호 10-2021-0063450
(43) 공개일자 2021년06월01일
(62) 원출원 특허 10-2015-7031147
원출원일자(국제) 2014년03월28일
심사청구일자 2019년02월22일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2014/000304
(87) 국제공개번호 WO 2014/153651
국제공개일자 2014년10월02일
(30) 우선권주장
61/806,329 2013년03월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
Singhal et al., 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2011, pp. 323-325.*
Romanuik et al., Journal of Medical and Biological Engineering, Vol. 31, No. 2, 2011, pp. 121-127.
Lecault et al., Current Opinion in Chemical Biology, Vol. 16(3-4), 2012, pp. 381-390.
US20120015347 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 유니버시티 오브 브리티쉬 콜롬비아
캐나다 브리티쉬 콜롬비아 브이6티 1제트3 밴쿠버 #103-6190 애그로노미 로드 유니버시티 인더스트리 리에이종 오피스
(72) 발명자
리치코바, 마르게타
캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이5피 3더블유1, 밴쿠버, 5512 빅토리아 드라이브
헤이리에스, 케빈 알버트
캐나다, 브리티시 컬럼비아, 밴쿠버, 305-6060 이스트 블러바드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 이민영

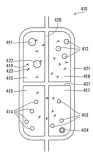
(54) 발명의 명칭 **미세유동 장치 및 분비물의 다세포 검정법에서의 그의 사용 방법**

(57) 요 약

본원에서는 세포외 효과를 발휘하는 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 확인하기 위한 방법 및 장치를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 마이크로 반응기 내에 보유하는 단계로서, 여기서, 마이크로 반응기의 내용물은 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단을 추가

(뒷면에 계속)

대 표 도



로 포함하는 것인 단계, 마이크로 반응기 내에서 세포 집단 및 판독 입자 집단을 인큐베이션시키는 단계, 세포외 효과의 존재에 대하여 세포 집단을 검정하는 단계로서, 여기서, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단이 세포외 효과를 직접 또는 간접적으로 판독하는 것인 단계, 및 검정 단계의 결과에 기초하여 세포 집단내의 하나 이상의 효과기 세포가 판독 입자에 대하여 세포외 효과를 발휘하는지 여부를 측정하는 단계를 포함한다. 세포외 효과가 측정된 경우, 상기 효과를 담당하는 세포 또는 세포들을 측정하는 추가 분석을 위해 세포 집단을 회수한다.

(52) CPC특허분류

B01L 3/502761 (2013.01)

C07K 16/00 (2013.01)

C07K 16/1018 (2013.01)

C07K 16/40 (2013.01)

G01N 33/5052 (2013.01)

G01N 33/54313 (2013.01)

C07K 2317/14 (2013.01)

C07K 2317/21 (2013.01)

C07K 2317/70 (2013.01)

(72) 발명자

잔, 한스

독일, 80805 뮌헨, 안트베르펜 스트라쎄 21

페트리브, 올레

캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이6와이 1더블유1, 리치몬드, 8271 스파이어스 로드

레카울트, 베로니크

캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이6제트 3씨2, 밴쿠버, 306-221 유니온 스트리트

싱할, 아누팜

캐나다, 온타리오 엘5케이 1에이치9, 미시소거, 2038 웨이크로스 크레센트

다 코스타, 다니엘 제이.

캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이6알 2케이8, 밴쿠버, 3844 웨스트 11번

한센, 칼, 엘., 지.

캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이6티 1제트4, 밴쿠버, 6309 라킨 드라이브

넬슨, 브래드

캐나다, 브리티시 컬럼비아, 빅토리아, 312-225 멘지스 스트리트

닐슨, 줄리

캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이8알 6브이5, 빅토리아, 2410 리 애비뉴

리사인고, 캐슬린

캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이3에이치 0이4, 포트 무디, #402-110 브루 스트리트

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포외 효과(extracellular effect)에서의 변화(variation)를 나타내는 세포 집단을 확인하는 방법으로서,

별개의 미세유동 챔버에 복수의 개별 세포 집단을 유지하는 단계로서, 여기서 개별 세포 집단 중 적어도 하나는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하고 별개의 미세유동 챔버의 내용물은 하나 이상의 판독 세포를 포함하는 판독 입자 집단을 추가로 포함하며, 상기 하나 이상의 판독 세포는

(a) ATP 결합 카세트 수송체(ABC 수송체);

(b) G 단백질 결합 수용체(GPCR);

(c) 티로신 키나제 수용체(RTK);

(d) 이온 채널; 또는

(e) 고유 효소 활성을 갖는 수용체,

를 발현하는 것인, 단계,

미세유동 챔버 내에서 개별 세포 집단 및 하나 이상의 판독 세포를 배양하는 단계,

세포외 효과의 존재에 대해 개별 세포 집단을 검정하는 단계로서, 여기서 판독 세포는 세포외 효과의 판독을 제공하는, 단계, 및

검정의 결과에 기초하여, 상기 복수 집단 중의 나머지 세포 집단 중 하나 이상과 비교하여, 세포외 효과에서의 변화를 나타내는 복수의 개별 세포 집단 중에서 하나의 세포 집단을 확인하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포 집단이 2 내지 500개의 세포를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 판독 입자 집단이 표면 상에 ATP 결합 카세트 수송체(ABC 수송체)를 발현하는 판독 세포를 포함하고, 세포외 효과는 ABC 수송체의 길항 작용, ABC 수송체의 효능 작용, 또는 하나 이상의 효과기 세포의 효과기 세포, 또는 하나 이상의 효과기 세포의 효과기 세포에 의해 분비된 분자에 의한 ABC 수송체에 대한 결합인 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 판독 입자 집단이 표면 상에 G 단백질 결합 수용체(GPCR) 또는 가용화된 GPCR을 발현하는 판독 세포를 포함하고, 세포외 효과가 GPCR의 길항 작용, GPCR의 효능 작용, 또는 하나 이상의 효과기 세포의 효과기 세포, 또는 하나 이상의 효과기 세포의 효과기 세포에 의해 분비된 분자에 의한 GPCR에 대한 결합인 것인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, GPCR이 케모카인 수용체, 사이토카인 수용체, 클래스 A GPCR, 클래스 B GPCR, 접착 GPCR, 프리즐드(frizzled) GPCR, 아세틸콜린 수용체, 멜라토닌 수용체, 멜라코르틴 수용체, 모틸린 수용체, 리소인지질(LPA) 수용체, 아데노신 수용체, 아드레노 수용체, 안지오텐신 수용체, 브래디키닌 수용체, 칼시토닌 수용체, 칼슘 감지 수용체, 칸나비노이드 수용체, 케모카인 수용체, 콜레시스토키닌 수용체, 보체 성분(C5AR1) 수용체, 코르티코트로핀 방출 인자 수용체, 도파민 수용체, 내피 분화 유전자 수용체, 엔도텔린 수용체, 포르밀 펩티드-유사 수용체, 갈라닌 수용체, 가스트린 방출 펩티드 수용체, 수용체 그렐린 수용체, 위 억제 폴리펩티드 수용체, 글루카곤 수용체, 고나도트로핀(gonadotropin) 방출 호르몬 수용체, 히스타민 수용체, 키스펩틴(KiSS 1) 수용체, 류코트리엔 수용체, 멜라닌-농축 호르몬 수용체, 멜라노코르틴 수용체, 멜라토닌 수용체, 모티린 수

용체, 신경 펩티드 수용체, 니코틴산, 오피오이드 수용체, 오렉신 수용체, 오르판(orphan) 수용체, 혈소판 활성화 인자 수용체, 프로키네티신 수용체, 프로락틴 방출 펩티드, 프로스타노이드 수용체, 프로테아제 활성화 수용체, P2Y(퓨린성) 수용체, 릴렉신 수용체, 세크레틴 수용체, 세로토닌 수용체, 소마토스타틴 수용체, 타키키닌 수용체, 바소프레신 수용체, 옥시토신 수용체, 혈관활성 장 펩티드(VIP; vasoactive intestinal peptide) 수용체 또는 뇌하수체 아데닐레이트 사이클라제 활성화 폴리펩티드(PACAP) 수용체, 맛(taste) 1 수용체, 대사성 글루타메이트 수용체, 칼슘 감지 수용체, 뇌 특이적 혈관신생 억제자 수용체(1, 2 또는 3), 카드헤린 수용체 또는 에스트로겐 수용체인, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 사이토카인 수용체가 인터루킨(IL)-1α, IL-1β, IL-1RA, IL18, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF), 백혈병 억제자 인자, 온코스타틴 M, 인터페론(IFN)-α, IFN-β, IFN-γ, CD154, 림프독소 베타(LTB), 종양 괴사 인자(TNF)-α, TNF-β, 형질 전환 성장 인자(TGF)-β, 에리트로포이에틴, 거핵 세포 성장 및 발달 인자(MGDF), Fms-관련 티로신 키나아제 3 리간드(Flt-3L), 줄기 세포 인자, 콜로니 자극 인자-1(CSF-1), 대식세포 자극 인자, 4-1BB 리간드, 증식 유도 리간드(APRIL), 분화 클러스터 70(CD70), 분화 클러스터 153(CD153), 분화 클러스터 178(CD178), 글루코코르티코이드 유도 TNF 수용체 리간드(GITRL), CD258, OX40L, CD252, TALL-1 TNF 관련 세포 아폽토시스 유도 리간드(TRAIL), 아폽토시스의 종양 괴사 인자 약한 유도자(TWEAK), TNF-관련 활성화-유도된 사이토카인(TRANCE) 또는 이들의 조합에 대한 수용체인, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 케모카인 수용체가 인터루킨-8 수용체, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CCR11, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7, XCR1(GPR5), 또는 CX3CR1(프랙탈킨)인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 판독 입자 집단이 표면 상에 티로신 키나제 수용체(RTK)를 발현하는 판독 세포를 포함하고, 세포외 효과가 RTK의 길항 작용, RTK의 효능 작용, 또는 하나 이상의 효과기 세포의 효과기 세포, 또는 하나 이상의 효과기 세포의 효과기 세포에 의해 분비되는 분자에 의한 RTK에 대한 결합인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 티로신 키나제 수용체(RTK)가 ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4, 인슐린 수용체, 혈소판 유래 성장 인자 알파 수용체, 혈소판 유래 성장 인자 베타 수용체, 비만/줄기 세포 성장 인자 수용체(SCFR), 콜로니 자극 인자 1 수용체, CD135, 섬유아세포 성장 인자 수용체-1(CD331), 섬유아세포 성장 인자 수용체-2(CD332), 섬유아세포 성장 인자 수용체-3(CD333), 섬유아세포 성장 인자 수용체-4(CD334), 섬유아세포 성장 인자 수용체-6, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 1 수용체, VEGF 2 수용체, VEGF 3 수용체, 간세포 성장 인자 수용체, 트로포미오신 수용체 키나아제(Trk) A, Trk B , Trk C, 에프린(EPH) 수용체 A1, EPH 수용체 A2, EPH 수용체 A3, EPH 수용체 A4, EPH 수용체 A5, EPH 수용체 A6, EPH 수용체 A7, EPH 수용체 A8, EPH 수용체 A9, EPH 수용체 A 10, EPH 수용체 B1, EPH 수용체 B2, EPH 수용체 B3, EPH 수용체 B4, EPH 수용체 B5, EPH 수용체 B6, AXL, RTK 클래스 IX 수용체 패밀리의 구성원, 역형성(anaplastic) 림프종 키나제/백혈구 티로신 키나제(ALK/LTK) 수용체 패밀리의 구성원, RTK 클래스 XI 수용체 패밀리의 구성원, 신경영양성 티로신 키나제, 수용체 관련 1 수용체, 디스코이딘 도메인 수용체, RTK 클래스 XIV 수용체 패밀리의 구성원, RTK 클래스 XV 수용체 패밀리의 구성원, RTK 클래스 XVI 수용체 패밀리의 구성원 또는 근육-특이적 키나제 수용체인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 판독 입자 집단이 표면 상에 이온 채널을 발현하는 판독 세포를 포함하고, 세포외 효과가 이온 채널의 길항 작용, 이온 채널의 효능 작용, 또는 하나 이상의 효과기 세포의 효과기 세포, 또는 하나 이상의 효과기 세포의 효과기 세포에 의해 분비되는 분자에 의한 이온 채널에 대한 결합인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 이온 채널이 GABAA, 글리신 수용체(GlyR), 세로토닌 수용체(5-HT), 니코틴성 아세틸콜린(nAChR), 아연-활성화된 이온 채널, 이온성(ionotropic) 글루타메이트 수용체, AMPA 수용체, 카이나이트 수용체, NMDA 수용체 또는 ATP 게이트 채널인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 판독 입자 집단이 표면 상에 고유 효소 활성을 갖는 수용체를 발현하는 판독 세포를 포함하고, 세포외 효과가 고유 효소 활성을 갖는 수용체의 길항 작용, 고유 효소 활성을 갖는 수용체의 효능 작용, 또는 하나 이상의 효과기 세포 또는 하나 이상의 효과기 세포에 의해 분비되는 분자에 의한 고유 효소 활성을 갖는 수용체에 대한 결합인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 고유 효소 활성을 갖는 수용체가 수용체 티로신 키나제(RTK), 수용체 세린-트레오닌 키나제, 수용체 티로신 포스파타제 또는 수용체 구아닐릴 사이클라제인, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 하나 이상의 세포 집단이 세포외 효과에서의 변화를 나타내는 경우, 상기 방법이 하나 이상의 세포 집단 또는 이의 일부를 회수하여 하나 이상의 회수된 세포 집단을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 회수 단계가 미세모세관으로 세포외 효과에서의 변화를 나타내는 하나 이상의 세포 집단을 포함하는 하나 이상의 미세유동 챔버를 관통하는 단계 및 하나 이상의 미세유동 챔버의 챔버 내용물 또는 이의 일부를 흡인하여 하나 이상의 회수되고 흡인된 세포 집단을 수득하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 하나 이상의 회수된 세포 집단으로부터 유래된 복수의 세포 서브집단을 미세유동 장치의 개별 챔버에 유지하는 단계로서, 여기서 각각의 개별 챔버는 하나 이상의 판독 세포를 포함하는 판독 입자 집단을 포함하며, 상기 하나 이상의 판독 세포는

(a) ATP 결합 카세트 수송체(ABC 수송체);

(b) G 단백질 결합 수용체(GPCR);

(c) 티로신 키나제 수용체(RTK);

(d) 이온 채널; 또는

(e) 고유의 효소 활성을 갖는 수용체,

를 발현하는 것인, 단계,

미세유동 챔버 내에서 개별 세포 서브집단 및 판독 세포를 배양하는 단계,

제2 세포외 효과의 변화에 대해 개별 세포 서브집단을 검정하는 단계로서, 여기서 판독 세포는 제2 세포외 효과의 판독을 제공하는, 단계, 및

검정 단계의 결과에 기초하여, 제2 세포외 효과에서의 변화를 나타내는 복수의 세포 서브집단 중에서 하나 이상의 세포 서브집단을 확인하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2013년 3월 28일 출원된 미국 가출원 시리얼 번호 61/806,329로부터 우선권을 주장하며, 상기 가출원의 개시내용은 그 전문이 모든 목적을 위해 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 본 발명의 배경

[0004] 세포는 생명체의 기본 단위이며, 어떤 두 세포도 동일하지는 않다. 예를 들어, 유전자형, 표현형 및/또는 형태학적 특성상의 차이가 세포 이질성의 원인이 될 수 있다. 실제로, "외관상 동일한" 세포 클론 집단도 집단내 세포들 간에 표현형상의 차이를 보이는 것으로 나타났다. 세포 차이는 박테리아 세포부터 부분적으로 분화된 세포 (예를 들어, 성체 줄기 및 전구 세포) 내지 고도로 분화된 포유동물 세포 (예를 들어, 면역 세포)까지 범위의, 모든 계층의 생명체 간에도 존재한다. 세포 상태, 기능 및 반응상의 차이는 상이한 이력, 상이한 분화 상태, 후생적 변이, 세포 주기 효과, 확률론적 변이, 게놈 서열의 차이, 유전자 발현, 단백질 발현 및 상이한 세포 상호작용 효과를 비롯한 다양한 기전으로부터 발생할 수 있다.

[0005] 발현된 단백질 또는 RNA 측정을 비롯한, 종래의 대량 세포 분석은 전형적으로, 개별 검정당 1,000개 초과의 세포인, 다수의 세포의 평균값을 구함으로써 수행된다. 상기와 같이 세포 집단의 평균을 구하는 것은 세포 집단 내에 존재하는 이질성을 차폐시키고, 집단내 개별 세포의 기본 생물학적 특징들을 모호하게 한다. 이와 같이 평균화된 측정치가 부적절한 경우에 대한 예는 다수 존재한다. 예를 들어, 세포 집단에서 세포 프로세스를 측정하는 것은 동시 발생하지 않을 수도 있는 개별 세포의 반응들에 의해 복잡해질 수 있고, 이로써, 프로세스의 역학적 성질을 모호하게 만든다. 예를 들어, 우성이지만, 표현형상으로는 상이한 세포 서브집단이 존재하면, 집단 측정은 집단 중 세포 대다수의 내부 상태를 잘 반영하지 못하게 될 수도 있다. 예컨대, 문헌 [Altschuler and Wu. (2010). *Cell* 141, pp.559-563]을 참조할 수 있다.

[0006] 독특한 세포 유형의 집단을 분리시키는 현 방법은 대개 달성가능한 집단의 순도에 있어 한정되어 있다. 예를 들어, 농축된 1차 다분화능줄기 세포 집단은 좀처럼 기능적 순도를 50% 초과로 잘 달성하지 못하며, 대개는 순도 10% 미만이며, 이에 상기 세포의 분자 표지는 다른 세포 유형으로부터의 크고, 대개는 압도적인 오염에 의해 모호해진다. 다수의 세포 유형들은 직접적인 접촉을 통해 및 분비된 인자를 통해, 이 둘 모두를 통해서 서로 상호작용하여 생존, 사멸, 분화, 또는 일부 다른 기능을 촉진시키고, 이러한 상호작용은 다수의 세포를 포함하는 혼합물에서 구분하고, 연구하는 것은 어렵다. 추가로, 세포는 그의 게놈 서열 및/또는 세포 상태에 있어 차이가 날 수 있고, 이로써, 발현되는 mRNA 또는 단백질 수준 또는 유형이 달라질 수 있다. 대량 집단에서 분석될 때, 세포 상태가 독특하거나, 또는 관심의 대상이 되는 발현된 mRNA 또는 단백질을 가지는 특정 세포는 그가 비록 산업적 목적을 위해서는 그 가치가 높지만, 집단으로부터 분리시키는 것은 매우 어렵거나, 또는 불가능하다.

[0007] 대량 집단 세포 분석의 결점을 극복하기 위해, 단일 세포 검정법 플랫폼이 개발되었다. 예를 들어, 과거에는 단일 세포를 연구하는 데 미세유동 장치가 사용되었다 (문헌 [Lecault et al. (2012). *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, pp. 381 -390]). 마(Ma) 등 (문헌 [Nat Med, 17, pp. 738-743 (2011)])은 건강한 기증자 미 전이성

흑색종 환자, 둘 모두로부터 수득된 인간 대식세포 및 세포독성 T 림프구 및 세포독성 T 림프구 (CTL)로부터의 다중 사이토카인 (예컨대, IL-10, TNF-β, IFN-γ)을 동시에 측정하는 데 단일의 세포 바코드 칩을 적용하였다. 미세가공된 챔버 어레이 또한 면역화된 인간 및 마우스, 둘 모두로부터의 B 세포 분비 항원 특이 항체를 스크리닝하고, 선별하는 데 사용되었다 (문헌 [Story et al. (2009). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, pp. 17902-17907]; [Jin et al. (2009). Nat. Med. 15, pp. 1088-1092]). 상기 접근법에서는 단일 B 세포를 10,000개의 미세가공된 웰 (깊이 ~10-100 ㎛)을 포함하는 표면 상에 어레이시켰고, 여기서, 웰 표면은 포획 항체로 관능화시켰다. 웰 표면 상의 세포를 3시간 미만의 기간 동안 인큐베이션시킨 후, 표면을 형광 표지화된 항원으로 세척하고, 항원 특이 B 세포를 확인하기 위해 스크리닝하였다. 이어서, 상기 세포로부터의 항체 코딩 유전자를 증폭, 서열분석, 및 클로닝시키기 위해 세포를 미세모세관에 의해 어레이로부터 수동으로 회수하였다.

[0008] 오일 스트림에 의해 분리되어 있는, 서브나노리터의 수성 소적 중에 캡슐화시킴으로써 단일 면역 세포로부터의 분비된 단백질을 분석하는 데 2상 미세유동 장치 또한 적용될 수 있다 (문헌 [Konry et al. (2011). *Biosens. Bioelectron.* 26, pp. 2702-2710]). 상기 소적을 FACS와 유사한 유통식 포맷으로 분석함으로써 단일 세포로부터의 분비된 단백질을 초고속대량으로 검출할 수 있는 기회를 제공할 수 있다. 유중수 에멀젼 또한 미세유동-생성된 아가로스 비드 중에 세포를 공동으로 함께 캡슐화하여 세포 신호 측분비 신호전달을 연구하는 데 사용될 수 있다 (문헌 [Tumarkin et at (2011). *Integr. Biol.* 3, pp. 653-662]). 미세유동 소적 생성 또한 상이한 조성물에 노출된 캡슐화된 단일 세포의 생존능 분석을 가능하게 함으로써 약물 스크리닝 및 개발을 위해 사용되어 왔다 (문헌 [Brouzes et al. (2009). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, pp. 14195-14200]).

[0009] 항체는 감염 및 질환 퇴치를 위해 인간 또는 동물의 면역계에 의해 천연적으로 제조되는 분자이다. 이는 각각이 특이 표적 (예컨대, 단백질, 바이러스, 박테리아)을 인식하고, 그에 결합할 수 있는 능력을 가지는 굉장히 다양한 항체를 생성할 수 있는 면역계의 독특한 능력에 의해 달성된다. 이와 같이 매칭되지 않는 특이성은 또한 항체를 암, 자가 면역 장애, 염증, 신경병, 및 감염을 비롯한 다수의 병증에 대해 임상적으로 승인을 받은 요법과 함께 사용되는, 극도로 강력한 효능이 있고, 부작용이 낮은 약물로 만드는 것이다. 종래 소형 분자 약물과 비교하여, 항체는 우수한 약동학적 성질, 더 적은 부작용, 개선된 내성, 및 임상 시험에서 훨씬 더 높은 성공률 (27% 대 7% (소형 분자의 경우))과 같은 수개의 이점을 제공한다 (문헌 [Reichert (2009). *Mabs 1*, pp. 387-389.]). 이러한 이유에서 항체는 또한 월등히 가장 빨리 성장하고 있는 약물 부류가 되며, 총 세계 시장은 2012년 $50B에 달했고, 매년 9%의 속도로 성장하고 있다 (문헌 [Nelson et al. (2010). *Nat. Rev. Drug Disc.* 9(10), pp. 767-774.])

[0010] 최적의 치료학적 특성을 가지는 항체, 및 특히 표면 수용체를 표적화하는 항체를 발견하는 것이 약물 개발에 있어 여전히 심각한 애로 사항이 되고 있다. 면역화에 대한 반응으로, 동물은 수백만개의 상이한 단일클론 항체 (mAb)를 제조할 수 있다. 각 mAb는 항체 분비 세포 (ASC)로 불리는 단일 세포에 의해 생산되고, 각 ASC는 단 한가지 유형의 mAb를 제조한다. 따라서, 예를 들어, 약물 개발을 목적으로 하는 항체 분석은 단일 세포 분석에 적합하다. 그러나, 심지어 ASC가 대량의 세포 집단 내에서가 아닌 개별적으로 분석되는 경우에도, 단일 ASC는 단지 최소량의 항체만을 생성하기 때문에, 종래의 검정 포맷의 부피로 분석될 때 항체는 너무 묽는 바, 이로 인해 항체는 완전하게 검출불가능해진다. 따라서, 개별 ASC 및 그의 분비된 항체를 연구하는 신규한 방법이 요구된다. 본 발명의 이러한 요구 등을 다룬다.

발명의 내용

[0012] 본 발명의 요약

[0013] 본 발명은 단일 효과기 세포에 기인하는 세포외 효과의 분석을 위한 미세유동 플랫폼을 제공한다. 한 실시양태에서, 효과기 세포는 생물학적 인자, 예를 들어, 항체를 분비하는 세포 (ASC)이다. 추가의 실시양태에서, 효과기 세포의 미세유동 분석은 단일 효과기 세포를 포함하는 세포 집단에서 수행되는 세포외 효과 검정이다.

[0014] 한 측면에서, 세포외 효과가 있는 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 확인하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 마이크로 반응기 내에 보유하는 단계로서, 여기서, 마이크로 반응기의 내용물은 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단을 추가로 포함하는 것인 단계, 마이크로 반응기 내에서 세포 집단 및 하나 이상의 판독 입자를 인큐베이션시키는 단계, 세포외 효과의 존재에 대하여 세포 집단을 검정하는 단계로서, 여기서, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단이 세포외 효과를 직접 또는 간접적으로 판독하는 것인 단계, 및 검정 단계의 결과에 기초하여 세포 집단내의 하나 이상의 효과기 세포가 세포외 효과를 보이는지 여부를 측정하는 단계를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 마이크로 반응기는 미세유동 챔버이다. 추가의 실시양태에서, 미세유동 챔버는 막 밸브를 포함하는 미세유동 구조의 일부이

다.

[0015] 이러한 측면에서, 효과기 세포는 생물학적 인자, 예컨대, 항체를 분비하는 세포이다. 세포외 효과의 존재가 특정 마이크로 반응기 내에서 검출되는 한, 특정 세포외 효과가 있는 특이 효과기 세포 또는 효과기 세포들이 초기에 확인되어야 할 필요는 없다. 즉, 효과가 측정되는 마이크로 반응기 중의 세포 중 일부 또는 그들은 모두 원하는 경우, 세포외 효과를 제공하는 특이 세포 확인을 위해 추가로 특징 규명하기 위하여 회수될 수 있다.

[0016] 한 실시양태에서, 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단이 세포외 효과를 보이는 것으로 측정된 경우, 세포 집단, 또는 그의 일부를 회수하여 회수된 세포 집단을 수득한다. 한 실시양태에서, 회수는 세포외 효과를 보이는 하나 이상의 세포를 포함하는 세포 집단을 포함하는 미세유동 챔버를 미세모세관으로 천공시키는 단계, 및 챔버의 내용물 또는 그의 일부를 흡인하여 회수된 흡인된 세포 집단을 수득하는 단계를 포함한다.

[0017] 한 실시양태에서, 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단이 세포외 효과를 보이는 것으로 측정된 경우, 세포 집단, 또는 그의 일부를 회수하여 회수된 세포 집단을 수득하고, 회수된 세포 집단을 세포 서브집단으로서 추가로 분석한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 회수된 세포 집단으로부터 기원하는 복수 개의 세포 서브집단을 미세유동 장치의 별도의 챔버 내에 보유하는 단계로서, 여기서, 각각의 별도의 챔버들은 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단을 포함하는 것인 단계, 챔버 내에서 개별 세포 서브집단 및 판독 입자 집단를 인큐베이션시키는 단계, 및 제2 세포외 효과의 존재에 대하여 개별 세포 서브집단을 검정하는 단계를 포함한다. 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단은 제2 세포외 효과를 판독하고, 제2 세포외 효과는 회수된 세포 집단에 대하여 측정된 세포외 효과와 동일한 세포외 효과이거나, 또는 상이한 세포외 효과이다. 일단 세포 서브집단을 인큐베이션시키고, 검정하고 나면, 본 방법은 검정 단계의 결과에 기초하여 판독 입자 집단, 또는 그의 서브집단에 대하여 미치는 제2 세포외 효과를 보이는 하나 이상의 세포를 포함하는 복수 개의 것으로부터 세포 서브집단을 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포외 효과의 변화를 보이는 세포 집단을 확인하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 방법은 복수 개의 개별 세포 집단을 별도의 미세유동 챔버 내에 보유하는 단계로서, 여기서, 개별 세포 집단 중 1개 이상은 하나 이상의 효과기 세포를 포함하고, 별도의 미세유동 챔버의 내용물은 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단을 추가로 포함하는 것인 단계, 미세유동 챔버 내에서 개별 세포 집단 및 판독 입자 집단을 인큐베이션시키는 단계, 세포외 효과의 존재에 대하여 개별 세포 집단을 검정하는 단계로서, 여기서, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단이 세포외 효과를 판독하는 것인 단계를 포함한다. 일단 세포 집단을 인큐베이션시키고, 검정하고 나면, 본 방법은 검정 결과에 기초하여 세포외 효과의 변화를 보이는 세포 집단을, 복수 개의 것 중 남은 세포 집단 중 하나 이상의 것과 비교하여 복수 개의 것으로부터 확인하는 단계를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 하나 이상의 효과기 세포는 항체 분비 세포를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 효과기 세포는 형질 세포, B 세포, 형질아세포, 기억 B 세포의 확장을 통해 생성된 세포, 하이브리도마 세포, T 세포, CD8+ T 세포, 및 CD4+ T 세포, 항체를 생산하도록 조작된 재조합 세포, T 세포 수용체를 발현하도록 조작된 재조합 세포, 또는 그의 조합을 포함한다.

[0019] 한 실시양태에서, 세포외 효과, 또는 세포외 효과의 변화를 보이는 하나 이상의 세포 집단을 회수하여 하나 이상의 회수된 세포 집단을 수득한다. 회수는 예를 들어, 미세모세관을 이용하여 수행된다. 일단 하나 이상의 개별 세포 집단을 확인하고, 회수하고 나면, 하나 이상의 개별 세포 집단을 추가로 분석하여 관찰된 세포외 효과의 원인되는 세포 또는 세포들을 측정한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 하나 이상의 회수된 세포 집단으로부터 기원하는 복수 개의 세포 서브집단을 미세유동 장치의 별도의 챔버 내에 보유하는 단계를 포함한다. 각각의 별도의 챔버들은 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단을 포함한다. 개별 세포 서브집단을 챔버 내에서 판독 입자 집단과 인큐베이션시킨다. 개별 세포 서브집단을 제2 세포외 효과의 변화에 대해 검정하고, 여기서, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단은 제2 세포외 효과를 판독한다. 제2 세포외 효과는 회수된 세포 집단에 대해 측정된 세포외 효과와 동일한 세포외 효과이거나, 또는 상이한 세포외 효과이다. 제2 세포외 효과 검정에 기초하여, 제2 세포외 효과의 변화를 보이는 하나 이상의 개별 세포 서브집단을 확인한다. 한 실시양태에서, 이어서, 하나 이상의 개별 세포 서브집단을 추가 분석을 위해 회수한다. 전역에 걸쳐 세포외 효과 검정을 기술한다.

[0020] 한 실시양태에서, 회수된 세포 집단 또는 회수된 세포 서브집단으로부터의 세포는 세포 서브집단 또는 서브집단의 서브집단(sub-subpopulation)으로서 복수 개의 베쓸 내에 보유되고, 각각의 세포 서브집단 또는 세포 서브집단의 서브집단는 개별 배쓸 내에 존재한다. 개별 서브집단 또는 서브집단의 서브집단을 용해시켜 하나 이상의 핵산을 제공하고, 각각의 용해된 세포 서브집단 또는 용해된 세포 서브집단의 서브집단 내의 하나 이상의 핵산

을 증폭시킨다. 추가의 실시양태에서, 하나 이상의 핵산은 항체 유전자를 포함한다.

[0021] 본원에 기술된 방법의 한 실시양태에서, 인큐베이션 단계는 개별 세포 집단 또는 서브집단를 포함하는 각 마이크로 반응기 (예컨대, 미세유동 챔버) 중의 배지를 교환하는 것을 포함한다. 배지 교환을 수행하여 예를 들어, 챔버 중의 세포의 생존능을 유지시키거나, 또는 세포외 효과 검정 수행을 위한 시약을 제공하거나, 또는 일련의 방식으로 다회에 걸친 세포외 효과 검정을 실시한다.

[0022] 한 실시양태에서, 인큐베이션은 세포 집단 또는 세포 서브집단을 복수 개의 보조 입자와 함께 인큐베이션시키는 것을 포함한다. 복수 개의 보조 입자는 예를 들어, 세포외 효과 검정을 위한 추가 시약으로서, 또는 세포 생존능을 유지시키기 위해 제공된다. 한 실시양태에서, 복수 개의 보조 입자로는 스핑고신-1 -포스페이트, 리소포스파티드산, 성장 인자, 사이토카인, 케모카인, 신경 전달 물질, 바이러스 입자, 2차 항체, 형광성 입자, 형광성 기질, 보체 경로 유도 인자, 바이러스 입자 또는 보조 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 보조 세포는 섬유아세포 세포, 자연살해 (NK) 세포, 살해 T 세포, 항원 제시 세포, 수지상 세포, 재조합 세포, 또는 그의 조합이다.

[0023] 한 실시양태에서, 본원에 기술된 방법 및 장치에 의해 측정되는 세포외 효과는 효과기 세포 또는 효과기 세포에 의해 분비되는 분자의 세포 표면 단백질에의 결합, 세포 표면 수용체의 길항작용, 또는 판독 세포 (판독 입자 유형) 상에 존재하는 세포 표면 수용체의 효능 작용이다. 추가의 실시양태에서, 세포 표면 수용체는 수용체 티로신 키나제 (RTK), G 단백질 커플링된 수용체 (GPCR), 수용체 세린-트레오닌 키나제, 수용체 티로신 포스파타제 또는 수용체 구아닐릴 시클라제이다. GPCR은 부류 또는 종에 의해 한정되지 않는다. 예를 들어, 한 실시양태에서, GPCR은 본원 하기 표 3a 또는 3b에 제공되어 있는 GPCR이다.

[0024] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기술된 방법 및 장치에 의해 측정되는 세포외 효과는 효과기 세포, 또는 효과기 세포에 의해 분비되는 분자의 이온 채널에의 결합, 이온 채널의 길항작용, 또는 이온 채널의 효능 작용이다. 한 실시양태에서, 이온 채널은 $GABA_A$, 글리신 (GlyR), 세로토닌 (5-HT), 니코틴성 아세틸콜린 (nAChR), 아연 활성화된 이온 채널, 이온성 글루타메이트, AMPA, 카이나이트, NMDA 수용체 또는 ATP 개폐형 채널이다.

[0025] 세포외 효과가 결합, 효능 작용 또는 세포 표면 수용체의 길항작용 또는 이온 채널일 경우, 한 실시양태에서, 효과는 세포내 cAMP 또는 칼슘 증가, 단백질 리포터 발현, 또는 세포 표면 수용체 또는 이온 채널을 발현하는 판독 세포 내의 단백질 국재 검출에 의해 측정된다.

[0026] 또 다른 실시양태에서, 세포외 효과는 하나 이상의 판독 입자 또는 하나 이상의 보조 입자에의, 하나 이상의 효과기 세포 또는 그의 서브세트에 의해 분비된 분자 사이의 결합 상호작용, 아포프토시스 조절, 세포 증식 조절, 판독 입자의 형태학적 외관상의 변화, 판독 입자내 단백질의 국재화 변화, 판독 입자에 의한 단백질 발현, 판독 입자에 영향을 미치는 데 작동가능한 보조 입자의 중화, 또는 그의 조합이다.

[0027] 일부 실시양태에서, 세포외 효과는 효과기 세포에 의해 분비된 세포 생성물의 효과이다. 세포외 효과는 효과기 세포에 의해 생산된 단백질과 판독 입자 또는 보조 입자 사이의 결합 상호작용이다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 효과기 세포는 항체 분비 세포 (ASC)이고, 판독 또는 보조 입자는 에피토프 또는 항원을 포함한다. 한 실시양태에서, 결합 상호작용은 항원-항체 결합 특이성, 항원-항체 결합 친화성, 및 항원-항체 결합 반응 속도 중 하나 이상의 것의 척도이다. 또 다른 실시양태에서, 효과기 세포는 사이토카인을 분비하는 활성화된 T 세포이고, 판독 입자로는 분비된 사이토카인을 포획하는 하나 이상의 항체를 포함한다.

[0028] 상기 방법 및 장치는 세포가 희귀한지, 예컨대, 집단내 세포 중 1% 미만으로 존재할 수 있는지, 또는 스크리닝 또는 선별되는 세포의 약 1% 내지 약 10%, 또는 약 5% 내지 약 10%로 존재하는지 여부에 대해 스크리닝 또는 선별하는 데 사용될 수 있다.

[0029] 또 다른 측면에서, 본 방법에 의해 발견될 수 있는 기능성 항체 및 수용체를 제공한다. 본 측면의 한 실시양태에서, 세포외 효과의 원인이 되는 효과기 세포의 핵산을 증폭시키고, 서열분석한다. 핵산은 분비된 생체분자 (예컨대, 항체, 또는 그의 단편)를 코딩하는 유전자, 또는 세포 수용체 또는 그의 단편, 예를 들어, T-세포 수용체를 코딩하는 유전자이다. 항체 또는 그의 단편 또는 세포 수용체 또는 그의 단편은 당업계에 공지된 방법에 의해 클로닝되고/거나, 서열분석될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 미세유동 다세포 검정법에 기초하는 단일 효과기 세포 확인 및 선별을 위한 미세유동 접근법의 한 실시양태에 대한 공정 흐름도이다. 단일 세포를 동물로부터 수득하고, 임의적으로 효과기 세포 집단에 대해 농축시

킨다. 고처리량 미세유동 분석법을 사용하여 일부 경우에서는 이질성 세포 집단 중에 존재하는 단일 효과기 세포로부터 분비되는 항체에 대하여 기능성 스크린을 실시한다. 1회 또는 다회에 걸쳐 미세유동 분석법을 수행한 후, 세포를 회수하고, 서열분석 (Vh/Vl) 및 세포주로의 클로닝을 위해 항체 가변 영역 유전자를 증폭시킨다. 본 공정을 위해 하루 동안 100,000개 초과의 세포에 대하여 스크리닝할 수 있고, 1주 후 서열을 회수한다.

도 2는 미세유동 효과기 세포 농축 방법의 한 실시양태에 대한 공정 흐름도이다. 효과기 세포를 먼저 챔버당 25개의 세포인 평균 농도로 적재하고, 인큐베이션시켜 항체의 다중클론 혼합물을 생성한다. 다중클론 혼합물 스크리닝을 사용하여 세포외 효과의 변화 (예컨대, 결합, 친화성, 또는 기능성 활성)를 가진 챔버를 확인한다. 이어서, 40개의 양성 챔버를 회수하여 관심의 대상이 되는 항체를 제조하는 ~4%의 효과기 세포를 포함하는 농축된 집단을 수득한다. 이어서, 농축된 집단의 효과기 세포를 한계 희석으로 제2 어레이에서 분석하여 세포외 효과에 변화가 있는 단일 ASC(들)를 선별한다. 농축에 소요되는시간은 약 4시간이고, 전체 스크리닝 처리량은 1회당 100,000개의 세포이다. 필요할 경우, 농축 공정은 2회 실시될 수 있고, 각 스크린마다 동일하거나, 상이한 특성을 사용할 수 있다.

도 3은 본 발명의 한 실시양태에 따라 표적 판독 입자에 특이적으로 결합할 수 있는 생체분자를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 4는 정상 세포가 아닌 악성 세포에 특이적으로 결합하는 생체분자 (예컨대, 항체)를 생산하는 1 이상의 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 5는 효과기 세포의 서브집단이 또한 판독 세포로서의 역할을 하는 것으로 관능화된 판독 세포에 결합하는 생체분자를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 본 발명의 한 실시양태에 따른 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 6은 항체 사량체의 개략도이다.

도 7은 본 발명의 실시양태에 따라 공지된 생체분자의 결합이 이루어지는 표적 에피토프/분자에 대한 스크리닝 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 8은 본 발명의 한 실시양태에 따라 표적 에피토프/항원에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 9는 세포 용해를 정량화하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 10은 본 발명의 한 실시양태에 따라 표적 에피토프/항원에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 11은 세포 용해를 정량화하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 12는 판독 세포의 성장을 유도하는 생체분자를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 13은 판독 세포가 아포프토시스되도록 자극하는 생체분자를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 14는 판독시 자가포식을 자극하는 생체분자를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 15는 관심의 대상이 되는 사이토카인을 중화시키는 생체분자를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 16은 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스의 능력을 억제시키는 생체분자를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 17은 본 발명의 한 실시양태에 따라 표적 효소의 기능을 억제시키는 생체분자를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 18은 제2 유형의 효과기 세포의 활성화를 유도하는 분자를 보이고, 결국에는 판독 입자에 영향을 미치는 분자를 분비하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 19는 제2 유형의 효과기 세포의 활성화를 유도하는 분자를 분비하고, 결국에는 판독 입자에 영향을 미치는

분자를 분비하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 20은 더 낮은 친화도이기는 하지만 같은 항원에 대한 항체를 분비를 세포를 함유하는 이질성 세포 집단으로부터 고 친화성 항체를 분비하는 1 이상의 효과기 세포의 존재를 검출하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 21은 상이한 에피토프를 보이는 판독 입자가 상이한 광학 특징에 의해 식별가능한 것인, 본 발명에 따라 항원에 대하여 특이성이 증가된 항체를 스크리닝하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 22는 동질성 또는 이질성 효과기 세포 집단 중 생체분자를 분비하는 세포의 존재를 동시에 확인하고, 분자에 의해 영향을 받은 하나 이상의 세포내 화합물을 분석하는 방법에 관한 상면 및 단면 개략도를 보여주는 것이다.

도 23은 다중의 판독 입자 세트에 대하여 효과기 세포가 미치는 세포외 효과를 동시에 평가하는 방법에 관한 상면 개략도이다.

도 24는 인간, 토끼, 마우스, 및 래트 간의 PDGFRα에 대한 세포외 도메인의 정렬이다. (상부) PDGFBB의 이량체와 복합체를 형성하는 2개의 PDGFRβ의 세포외 도메인 (ECD)의 구조를 보여주는 리본 다이어그램 (문헌 [Shim et al. (2010). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, pp. 11307-11312] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). PDGFRα에 대하여 유사한 구조가 기대되지만, 이용불가능하였기 때문에 PDGFRβ을 제시한 것에 주의한다. (하부) 인간, 마우스, 토끼, 래트 간의 PDGFRα에 대한 ECD 정렬. 인간 이소폼으로부터의 변이 영역은 더 옅은 음영 및 "*"로 표시되어 있다. 실질적인 변이는 항체 인식을 위해 이용가능한 에피토프가 다수 존재함을 나타내고, 토끼가 인간과 다른 가장 많은 변이를 가진다.

도 25는 다중층 소프트 리소그래피 미세 유체 공학의 다양한 측면을 보여주는 영상을 제공하는 것이다. (a) MSL에 의해 제작된 밸브의 광학 현미경 사진. 하나는 활성 유체에 대한 "유동 채널" (세로)이고, 하나는 밸브 작동에 대한 제어 채널 (가로)인, 교차하는 두 미세가공된 채널이 밸브 구조를 생성한다. 유동 채널은 얇은 엘라스토머 막에 의해 제어 채널로부터 분리되어 있음으로써 "핀치 밸브"를 생성한다. 제어 채널의 가압은 막을 전향시켜 유동 채널을 차단시킨다. (b) (녹색 및 청색 식용 색소로 충전된) 다중 밸브를 통합하는 장치의 섹션. (c) 총 16,000개의 밸브, 4,000개의 챔버, 및 3,000개 초과의 층-층 상호연결 장치 (화살표 표시)를 가지는, UBC에서 가공된 장치의 섹션. (d) 크기가 페니 정도인 미세유동 장치의 예.

도 26은 본 발명의 한 장치의 개략도이다. (a) 단일의 항체-분비 세포로부터 항체 선별을 위한 미세유동 장치의 구조를 보여주는 개략도. (b) 4,032개의 분석 챔버로 된 어레이. 각 챔버는 인큐베이션 동안 분리되어 있고, 배지는 수분 이내에 교환될 수 있다. (c) 개별 챔버 폐쇄. 세포, 판독 입자 및 시약을 순차적으로 주사하면, 중력에 의해 가라앉는다. 자동 명시야/형광 현미경법을 사용하여 영상화를 실시한다.

도 27은 한 실시양태의 장치 가공 동안 조립된 층의 개략도이다.

도 28. (a) 팽창식 챔버 디자인의 상면도 및 측면도. 챔버는 상부에 더 큰 원형 "립"이 있는, 원형의 기하학적 형태를 가지며, 얇은 막에 의해 분리되어 있는 리세스에 의해 중첩되어 있다. 챔버를 유동 채널로 연결하는 밸브는 실링되고, 세포가 유동 채널에 적재된다. (b) 챔버로의 밸브는 개방되고, 압력을 가하여 챔버를 팽윤시켜 세포를 챔버 상부로 유입시킨다. (c) 밸브를 차단시켜 챔버를 실링하고, 세포는 챔버 바닥으로 하강한다. 채널을 새 배지로 플러싱한다. (d) 밸브를 개방하고, 압력을 해제시켜 챔버를 그의 원 부피로 "수축시킨다." 이 공정을 반복사용하여 배지를 교체하고/거나, 가용성 인자를 첨가할 수 있다.

도 29는 입자를 셀 펜스의 한쪽으로 유도하기 위해 층류를 사용하는 것을 도시한, 본 발명의 실시양태에 따른 셀 펜스를 가지는 미세유동 챔버의 개략도이다.

도 30은 입자를 우선적으로 입구 채널의 한쪽으로 유도하기 위해 챔버 입구의 제한 상류를 사용하는 것을 도시한, 본 발명의 실시양태에 따른 셀 펜스를 가지는 미세유동 챔버의 개략도이다.

도 31은 PDMS 미세유동 장치 가공을 위해 사용되는 실리콘 웨이퍼 기판 상의 포토레지스트로 된 다중 층으로부터 제작된 재사용이 가능한 몰드에 대한 개략도이다.

도 32는 입자 크기에 기초하여 선택적으로 입자를 분리하는 셀 펜스를 사용하는 것을 도시한, 본 발명의 실시양태에 따른 셀 펜스를 가지는 미세유동 챔버의 개략도이다.

도 33은 챔버의 하부 표면 상에, 다중 효과기 및 판독 구역을 정의하는 웰 어레이를 형성하는 일련의 교차 셀

펜스를 가지는 챔버 실시양태의 상면도이다 (챔버 전체 크기는 300 ㎛ x 160 ㎛이다).

도 34는 입자 트랩을 정의하는 일반적으로 원형인 원형부에 의해 연결된 2개의 수직 셀 펜스를 가지는 챔버에 대한 입자 트랩 실시양태 (그리드 피치는 2 ㎛이다)의 도면이다.

도 35는 챔버 내에 특정 크기의 입자를 보유하기 위해 출구에 배치된 미세가공된 구조를 사용하는 것을 도시한, 본 발명의 실시양태에 따른 미세유동 챔버의 개략도이다.

도 36은 챔버 하부의 내장 컵을 포함하는 미세유동 챔버의 측면 개략도이다.

도 37은 효과기 세포 및 판독 입자를 보유하기 위해 구조 요소가 유동 채널 중에 배치되어 있는 본 발명의 실시양태에 따른 챔버의 측면 개략도이다.

도 38은 구조 요소가 크기에 기초하여 입자를 분리하고 보유하기 위해 챔버 내에 순차적으로 배치되어 있는 본 발명의 실시양태에 따른 챔버의 측면 개략도이다.

도 39는 효과기 세포를 판독 입자로부터 분리시키는 데 다공성 막이 사용되는 미세유동 챔버의 일련의 유통식 배열의 상면 개략도이다.

도 40은 효과기 세포를 판독 입자로부터 분리시키는 데 비관능화된 비드 층이 사용되는 미세유동 챔버의 일련의 유통식 배열의 상면 개략도이다.

도 41은 챔버 내에 입자를 배치하기 위해 자기장을 사용하는 것을 도시한, 본 발명의 실시양태에 따른 미세유동 챔버의 개략도이다.

도 42는 자기 입자가 커플링되지 않은 입자에 대해서는 거의 영향을 미치지 않거나, 또는 전혀 영향을 미치지 않으면서, 자기 입자가 커플링된 한 가지 유형의 입자를 챔버 내의 위치로 유도하는 데 자기장을 사용하는, 본 발명의 실시양태에 따라 입자를 분리하는 방법에 관한 개략도이다.

도 43은 판독 입자 (비드)가 판독 구역 내로 용이하게 적재될 수 있도록 챔버가 티핑된, 셀 펜스를 포함하는 챔버 실시양태의 단면도이다.

도 44는 입자를 차별적으로 펜스의 한쪽으로 유도하기 위해 챔버의 회전을 사용하는 것을 도시한, 본 발명의 실시양태에 따른 셀 펜스를 가지는 미세유동 챔버의 개략도이다.

도 45는 효과기 세포 및 판독 입자의 차별적인 밀도를 사용하는, 본 발명의 실시양태에 따라 효과기 세포 및 판독 입자를 분리하는 방법에 관한 개략도이다.

도 46은 챔버 내에 입자를 배치하기 위해 유전체 장을 사용하는 것을 도시한, 본 발명의 실시양태에 따른 일체형 전극을 포함하는 미세유동 챔버의 개략도이다.

도 47은 효과기 세포 및 판독 입자가 별도의 입구를 통해 챔버로 도입되는, 본 발명의 실시양태에 따른 챔버의 상면 개략도를 보여주는 것이다.

도 48은 효과기 구역 서브챔버 및 판독 구역 서브챔버가 서로 유체 소통할 수 있도록 배치되어 있을 수 있는, 본 발명의 실시양태에 따른 복합 챔버의 상면 개략도이다.

도 49는 챔버 천장의 판독 구역에 고정-의존성 판독 세포를 한정시키기 위해 표면 관능화를 사용하고, 챔버의 하부 상에 현탁 효과기 세포를 한정시키기 위해 중력을 사용하는, 효과기 세포 및 판독 입자를 분리하는 방법에 관한 개략도이다.

도 50은 현탁 세포는 중력에 의해 반대쪽으로 분리하면서, 부착성 세포는 오직 한쪽으로만 유지시키기 위해 관능화된 챔버의 상면 개략도이다.

도 51은 그의 표면 상에 상이한 유형의 항체를 보이는 입자를 분리하기 위하여 2가지 유형의 항체로 관능화된 챔버의 상면 개략도이다.

도 52는 각 챔버가 챔버 사이에 배치된 밸브에 의해 그의 이웃 챔버로부터 분리되어 있는 것인, 미세유동 챔버의 일련의 "유통식" 배열의 상면 개략도이다.

도 53은 각 챔버가 "리드" 구조에 의해 이웃 챔버와 공유하는 유동 채널로부터 분리되어 있을 수 있는 것인, 미세유동 챔버의 일련의 "유통식" 배열의 상면 개략도이다.

도 54 및 55는 이웃 챔버가 공통 입구 채널 및 출구 버스 채널을 공유할 수 있는 미세유동 챔버의 병렬, "유통식" 배열의 상면 개략도이다.

도 56은 미세유동 챔버의 병렬 배열에 사용되는 "내장" 충전형 챔버의 상면 및 측면 개략도이다.

도 57은 복합 챔버 기능성을 제공할 수 있는 내장 충전형 챔버의 병렬 배열의 개략도이다.

도 58은 세포 회수용 미세유동 장치의 영상, 및 세포 회수 동안의 영상 순서이다. 상부 (좌측에서 우측 순으로): 챔버내 세포, 챔버 루프를 천공하는 모세관 (가장 좌측에 있는 것), 흡인 이후의 중공 챔버, 및 세포를 튜브에 분배하는 모세관 (가장 우측에 있는 것)인, 세포 회수 동안의 영상 순서의 광학 현미경 사진. 하부 좌측: (*i*) 로봇식 미세조작기 상에 탑재된 미세모세관, (*ii*) 나노리터 유동 흡인/분배용 디지털 공압 장치, (*iii*) X-Y 번역 마운트, (*iv*) 회수 튜브용 마운트가 있는 인큐베이터 인서트, (*v*) 어레이 전역에 걸치 영상 획득을 위한 스캐닝 X-Y 단계, (*vi*) 도립 현미경, (*vii*) 고감도 형광성 영상화를 위한 냉각 하마마츠(Hamamatzu) CCD 카메라, (*viii*) 모세관 작동을 위한 제어 솔레노이드. 우측 하부: 세포 회수를 위해 배치된 모세관을 가진 인큐베이터 인서트 아래에 탑재된 미세유동 장치 폐쇄. (c) 챔버 중 세포 (좌측 상부), 모세관 천공 챔버 루프 (우측 상부), 흡인 후의 중공 챔버 (좌측 하부), 및 튜브 중 세포를 분배하는 모세관 (우측 하부)을 이용한 세포 회수 동안의 영상 순서에 관한 광학 현미경 사진. (d) 세포 회수 수행. 모드 I로 작동시, 분배 이전에 다중 챔버을 흡인한다. 이는 세포의 2 단계 스크리닝 (농축)을 위해, 또는 세포 풀의 회수를 위해 사용된다. 각 챔버로부터의 회수는 대략 3초가 소용된다. 모드 II로 작동시, 단일 챔버 내용물을 흡입하고, 분배한 후, 4회 세척하여 단일 세포 간의 캐리오버가 없도록 한다.

도 59는 주형-교환을 사용하는 단일 세포 HV/LV 접근법의 개략도이다. 단일 세포를 미세원심분리기 튜브 내로 증착시키고, 중쇄 및 경쇄의 불변 영역을 표적화하는 다중화된 유전자-특이 프라이머로부터 cDNA를 생성한다. MMLV 효소의 주형-교환 활성을 사용하여 생성된 cDNA의 3' 단부 상에 주형-교환 올리고의 역 보체를 첨부한다. 중쇄 및 경쇄의 불변 영역에 어닐링되는 다중 프라이머, 및 주형 교환 올리고 카피에 상보적인 범용 프라이머를 사용하는 반-네스티드 PCR을 사용하여 cDNA를 증폭시키고, 각각의 단일 세포 앰플리콘에 특이적인 인덱싱 서열을 도입한다. 이어서, 앰플리콘을 풀링하고, 서열분석한다.

도 60은 전통적인 하이브리도마 접근법의 개략도이다. 면역화된 마우스로부터의 비장세포를 흑색종 세포와 융합시킨다. 효율이 낮을 때, 이 융합물은 mAb를 분비할 수 있고, 배양물 중에서 성장할 수 있는 생존가능한 "하이브리도마"를 생성한다. 하이브리도마 풀을 성장시키고, 검정하여 항원 특이 세포 존재에 대해 검출한 후, 계대배양하고, 기능성 스크리닝에 충분한 mAb를 생성하도록 확장시킨다. 이러한 접근법은 적합한 융합 파트너를 필요로 하고, 토끼에 대한 사유의 하이브리도마 기술로도 개발되었지만, 대개는 마우스 또는 래트를 사용하는 것으로 제한된다. 전형적인 융합물은 100개 미만의 안정한 하이브리도마를 생성하고, 배양 및 계대배양을 위하 ~9주가 요구된다.

도 61은 세포 배양 챔버, 밸브, 및 챔버를 연결하는 채널을 나타내는 표지가 있는 박막 내에 함유되어 있는 미세유동 챔버 어레이의 횡단면을 보여주는 영상이다.

도 62는 도 61에 제시된 미세유동 장치의 챔버의 개략도이다.

도 63은 2,048개로 이루어진 4개의 서브어레이에 배열된 8,192개의 챔버를 가지는 미세유동 장치의 사진이다. 미세유동 챔버 어레이는 두께가 300 ㎛인 엘라스터모 층 내의 삼투 배쓰 저장소하에 직접 위치한다.

도 64는 도 62에 제시된 미세유동 장치의 개략도이다.

도 65는 효과기 세포 및 표적 세포를 분리할 수 있는 미세유동 장치를 개략적으로 도시한 것이다.

도 66은 도 65로부터의 미세유동 장치의 단일 단위 셀을 개략적으로 도시한 것이다.

도 67은 도 66의 세로 파선을 따른 횡단면의 현미경 사진이다.

도 68은 도 66의 가로 파선을 따른 횡단면의 현미경 사진이다.

도 69는 사이토카인 중화 검정법에 대한 실시양태를 보여주는 일련의 개략도이다.

도 70a는 효과기 구역 우측 단부에 제시된 5개의 효과기 세포 (상부) 및 판독 구역 중 4개의 판독 입자 (하부)를 포함하는 챔버 실시양태의 광학 현미경법 영상의 상면도이다.

도 70b는 효과기 구역 우측 단부의 효과기 세포와 관련된 일부 형광, 및 판독 구역 중 4개의 판독 입자와 관련

된 형광을 포함하는, 도 70a에 제시된 챔버 실시양태의 광학 현미경법 영상의 상면도이다.

도 70c는 효과기 구역에 제시된 1개의 효과기 세포 (좌측) 및 판독 구역 중 1개의 판독 입자 (우측)를 포함하는 챔버 실시양태의 광학 현미경법 영상의 상면도이다.

도 70d는 판독 구역의 판독 입자와 관련된 형광을 포함하는, 도 70c에 제시된 챔버 실시양태의 광학 현미경법 영상의 상면도이다.

도 70e는 효과기 구역의 2개의 효과기 세포 (좌측) 및 판독 구역 중 6개의 판독 입자 (우측)를 포함하는 챔버 실시양태의 광학 현미경법 영상의 상면도이다.

도 70f는 판독 구역의 판독 입자와 관련된 일부 형광을 포함하는, 도 70e에 제시된 챔버 실시양태의 광학 현미경법 영상의 상면도이다.

도 71는 항체-분비 세포로부터의 항체의 포획 및 검출에 대한 작업 흐름에 관한 개략도이다.

도 72는 비드 면역포획 검정법 후, 4.5일 동안 클론의 저속 영상화가 수행된 형광성 및 명시야 영상의 일례이다.

도 73은 배치 진탕 플라스크 및 96-다중웰 플레이트에 시딩된 단일 세포와 비교하여 미세유동 어레이 중 CHO 항체-분비 세포의 강력한 세포 배양을 입증한다.

도 74a는 항-리소자임 항체를 분비하는 HyHEL5 하이브리도마 세포가 적재된 미세유동 챔버 (상부 패널) 및 HyHEL5 하이브리도마 세포가 적재되지 않은 미세유동 챔버 (하부 패널)의 광학 현미경 사진이다.

도 74b는 HyHEL5 세포 이외에도, 리소자임에 결합하지 않는 "배경" 항체를 분비하는 4B2 하이브리도마 세포가 그 안으로 적재된, 도 74a에 제시된 챔버의 광학 현미경 사진이다.

도 74c는 형광성 리소자임과 함께 인큐베이션된 이후의, 도 74b에 제시된 챔버의 형광 현미경 사진이다.

도 74d는 형광성 항 IgG 항체와 인큐베이션된 이후의, 도 18c에 제시된 챔버의 형광 현미경 사진이다.

도 74e는 도 74c에 도시된 챔버에 대한 항체 축적의 반응 속도 및 방출을 보여주는 그래프이다.

도 74f는 시간 경과에 따라 기록된 성장 배지 중 단백질 A 및 10 nM 리소자임의 존재하에서 인큐베이션된 HyHEL5 및 4B2 하이브리도마 세포 믹스를 함유하는 600개의 챔버의 형광 그래프이다.

도 75a는 항체 분비 세포는 함유하지만, 관심의 대상이 되는 항원에 대하 항체를 분비하는 세포는 함유하지 않는 챔버 중 신호를 보이지 않는 것의 3개의 대표적인 일례를 보여주는 것이다.

도 75b는 관심의 대상이 되는 항원에 대한 항체를 분비하는 단일 세포가 관심의 대상이 되는 항원에 비특이적인 항체를 분비하는 다중 세포 배경 중에서 검출되지 않는 챔버의 3개의 대표적인 일례를 보여주는 것이다.

도 75c는 관심의 대상이 되는 항원에 대한 항체를 분비하지 않는 하이브리도마 세포만을 함유하는 모든 챔버의 형광성 신호를 나타내는 히스토그램을 보여주는 것이다.

도 75d는 관심의 대상이 되는 항원 (달걀 리소자임)에 대한 항체를 생산하는 HyHEL5 하이브리도마 세포 및 상이한 항원에 대한 항체를 생산하는 DMS-1 하이브리도마 세포의 혼합물을 함유하는 챔버 중 형광성 신호의 히스토그램을 보여주는 것이다.

도 76a는 고정된 K562 세포 상의 인간 CD45에 대한 항체를 분비하는 단일 하이브리도마 세포 (4B2)의 개략도이다. 세포 및 비드를 인큐베이션 이후에 검출 항체로 염색한다.

도 76b는 중공 챔버 및 단일 하이브리도마를 함유하는 챔버에 대한 자동 영상 분석법에 의해 측정되는 판독 세포 및 비드의 평균 형광 강도를 보여주는 것이다.

도 76c (좌측에서부터 우측으로): 단일 하이브리도마 세포를 가지는 챔버. 표적 고정된 K562 세포와 함께 밤새도록 인큐베이션시킨 이후, 및 단백질 A 비드와 함께 2시간 인큐베이션시킨 이후의 같은 챔버 중 항-CD45 항체 염색의 명시야, 형광성 및 합성 영상.

도 77a는 면역화 및 결합 검정법의 개략도이다. 난소암 세포 (TOV21G)로부터의 살아있는 세포로 마우스를 면역화시켰다. 항체-분비 세포를 FACS를 사용하여 확인한 후, 미세유동 장치에 주입하고, CFSE로 염색된 판독 세포 (고정된 것 및 살아있는 TOV21G 세포)와 함께 인큐베이션시켰다. 항체 결합을 2차 표지화된 항체를 사용하여

시각화하였다.

도 77b는 칩 상에 적재된 형질 세포 및 판독 세포 (살아있는 것 및 고정된 것)를 보여주는 것이다. 판독 세포를 식별을 위해 CFSE로 염색한다. 살아있는 세포 및 고정된 세포의 세포 표면 상에의 항체 결합을 2차 표지화된 항체로 시각화한다. 가장 우측에 있는 것은 판독 세포 상에서 신호가 극도로 낮은, 음성 챔버를 보여주는 것이다.

도 78은 (a) 8일 동안 성장시킨 마우스 ASC, 및 (b) 5일 동안 성장시킨 인간 ASC로부터의 ELISPOT에 의한 세포 생존 및 항체-분비를 보여주는 영상이다. 웰당 플레이팅된 세포 개수를 나타낸다.

도 79는 난소 암종 세포로 면역화된 마우스로부터의 ASC 선별을 보여주는 것이다. (b) PE 항-마우스 CD138로 염색된 마우스 비장 세포의 형광 활성화된 세포 분류를 보여주는 플롯. 개폐는 CD138+ 집단을 보여주는 것이다. (b) 비분류된 비장 대조군, CD138- 대조군, 및 CD138+ 집단으로부터의 항체 분비를 보여주는 ELISPOT. 웰당 플레이팅된 세포 개수를 나타낸다. (c) 각 집단에 대하여 플레이팅된 세포당 스팟(%)으로서 ELISPOT 계수를 보여주는 그래프.

도 80은 인플루엔자로 면역화된 토끼로부터의 ASC 선별을 보여주는 것이다. (a) ER-트래커 및 마우스 항-토끼 IgG를 사용한 토끼 PBMC의 형광 활성화된 세포 분류를 보여주는 플롯. 개폐는 $ER^{고}IgG^{저}$ 집단 선별을 보여주는 것이다. (b) 비분류된 PBMC 대조군, $ER^{고}IgG^{저}$ 집단, 및 무세포 대조군으로부터의 항체 분비를 보여주는 ELISPOT. 웰당 플레이팅된 세포 개수가 명시되어 있다. (c) 비분류된 PBMC 대조군 및 $ER^{고}IgG^{저}$ 집단에 대한 플레이팅된 세포당 스팟(%)으로서 ELISPOT 계수를 보여주는 그래프.

도 81a는 농축 이전 항원 특이 양성 챔버로부터의 명시야 (상부) 및 형광성 (하부) 영상의 대표적인 일례를 보여주는 것이다.

도 81b는 밤새도록 배양 및 회수 이후 다중웰 플레이트 중 세포를 보여주는 것이다.

도 81c는 농축 이후 단일 세포 희석액으로 적재된 항원 특이 양성 챔버의 명시야 (상부) 및 형광성 (하부) 영상의 대표적인 일례를 보여주는 것이다.

도 81d는 농축 이전 및 이후 H1N1- 및 H3N2-양성 챔버의 빈도이다.

도 82는 항체를 분비하는 1 이상의 효과기 세포를 포함하는 다중 효과기 세포를 함유하는 챔버 (상부) 및 어느 효과기 세포도 함유하지 않은 또 다른 챔버 (하부)인, 2가지 챔버를 보여주는 광학 현미경법 영상이다. 분비된 항체가 존재할 때, 판독 입자는 응집체를 형성하고 (상부), 항체 분비 효과기 세포의 부재하에서는 분산된 상태 그대로 유지된다 (하부).

도 83은 항체를 분비하는 1 이상의 효과기 세포를 포함하는 다중 효과기 세포를 함유하는 챔버 (상부), 및 어느 효과기 세포도 함유하지 않은 또 다른 챔버 (하부)인, 16g의 두 챔버를 보여주는 형광 현미경법 영상이다. 두 챔버 모두 세포외 효과의 존재를 측정하기 위해 형광 표지된 항-인간 항체로 염색된 판독 입자 (단백질 A 비드)를 함유한다.

도 84a는 도 13에 도시된 실험의 다이어그램이다.

도 84b는 상이한 농도의 표지화된 항체를 가지는 미세유동 챔버의 광학 현미경 사진이다.

도 84c는 친화성이 상이한 항체를 분비하는 단일 하이브리도마 세포 (HyHEL5 및 D1.3)와 함께 인큐베이션시킨 후, 상이한 농도의 표지화된 항원 (달걀 리소자임)에서의 비드 형광성 강도에 관한 그래프이다.

도 84d는 친화성이 상이한 항체를 분비하는 단일 D1.3 및 HyHEL5 세포와 인큐베이션시킨 후, 상이한 농도의 항원 (달걀 리소자임)으로 표지화된 이후의 도 84b의 영상에 상응하는 비드 형광성 강도를 보여주는 그래프이다.

도 85는 분리된 각 챔버를 유지시키는 폐쇄된 밸브하에, 인큐베이션 후 H3N2에 대한 항체를 분비하는 인간 형질 세포를 함유하는 미세유동 어레이의 섹션을 보여주는 것이다.

도 86은 분리 밸브를 사용하지 않고, 챔버는 유동 채널에 의해 연결된 상태로 유지시키면서, 인큐베이션 후 H3N2에 대한 항체를 분비하는 인가 형질 세포를 함유하는 미세유동 어레이의 섹션을 봉주는 것이다.

도 87은 달걀 리소자임에 대한 항체를 생산하는 2개의 단일 일차 마우스 형질 세포에 대한 미세유동 스크리닝에

의해 수득되 친화성 측정에 대해 대한 대표적인 일례를 보여주는 것이다.

도 88은 세척 종료시 챔버에 남아있는 것보다 HyHEL5-양성 챔버 중 남은 비드의 형광 수준이 더 높다는 것을 보여주는 막대 그래프이다.

도 89a는 이질성 세포 집단 (적혈구 및 인간 B 세포)을 함유하는 챔버의 광학 현미경법 일례의 상면도이다.

도 89b는 이질성 세포 집단 판독 입자 집단 (단백질 A 비드)을 함유하는 챔버의 광학 현미경법 일례의 상면도이다.

도 89c는 이질성 집단 중 1 이상의 세포가 인간 IgG 항체를 분비하는 것을 보여주는 챔버의 광학 현미경법 일례의 상면도이다. 항체는 판독 입자에 의해 포획되었고, 이는 다이라이트(Dylight) 594-접합된 항-인간 항체로 염색되었다.

도 89d는 H1N1 항원을 챔버 내로 유동시킨 후, 이질성 세포 집단 및 판독 입자 집단을 포함하는 챔버의 광학 현미경법 일례의 상면도이다.

도 89e는 H1N1 항원을 챔버 내로 유동시킨 후, 판독 입자 집단 (단백질 A 비드)과 함께 이질성 세포 집단의 광학 현미경법 일례의 상면도이다. 항원 특이 염색을 전체 IgG 염색으로부터 차별화하기 위해 H1N1 항원을 다이라이트 488에 접합시켰다.

도 89f는 세포 회수 이후, 챔버의 광학 현미경법 일례의 상면도이다.

도 90은 다중웰 플레이트에서 패쓰헌터® 익스프렉스 CCR4 CHO-K1 β-어레스틴 GPCR 검정법(PathHunter® eXpress CCR4 CHO-K1 β-Arrestin GPCR Assay)을 사용하는 화학발광성 신호전달 검정법의 예를 보여주는 것이다.

도 91은 실험을 나타내는 개략도이다. 인간 지원자를 계절성 플루 백신으로 면역화시켰다. 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)를 회수하고, 유세포 분석법으로 분류하여 형질 세포에 대해 농축시켰다. 세포를 미세유동 장치에 주입하고, H1N1 및 H3N2 특이성에 대하여 검정하였다.

도 92는 단백질 A 비드를 포함하는 챔버 중 단일 인간 형질 세포의 일례이다. 비드 상에 포획된 분비된 항체는 H1N1 및 H3N2 표지화된 항원, 둘 모두에 결합하고, 따라서, 교차 반응성이다. 표지화된 항-인간 IgG를 통해 전체 IgG 분비를 시각화할 수 있다.

도 93은 비드 검정법을 사용하여 인플루엔자에 대한 항체를 생산하는 것으로 (하부 좌측), 및 미세유동 장치에서 밤새도록 인큐베이션시키는 동안 분할된 것으로 (우측 상부) 확인된 일차 인간 항체-분비 세포 (좌측 상부)의 예를 보여주는 것이다.

도 94는 미세유동 장치에서 단일 세포 스크리닝 이후 항체 중쇄 및 경쇄 유전자 특이 PCR 생성물의 사이즈 셀렉트(Size Select)® 2% 아가로스 겔의 사진이다. 래인 i 내지 iv는 각각 샘플 3 내지 6의 중쇄 PCR 증폭 생성물을 보여주는 것이다. 래인 v는 핵산 래더를 보여주는 것이다. 래인 vi 내지 viii은 각각 샘플 3, 5, 및 6의 카파 쇄 PCR 증폭을 보여주는 것이다. 래인 ix는 샘플 4의 람다 쇄 PCR 증폭을 보여주는 것이다.

도 95a는 인플루엔자에 대한 항체를 분비하는 2개의 단일 세포로부터의 중쇄 및 경쇄, 둘 모두의 증폭을 보여주는 겔이다.

도 95b는 H1N1 및 H3N2에 대한 항체를 분비하는 2개의 세포로부터의 가변 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 보여주는 것이다.

도 95c는 H1N1과 H3N2, 둘 모두와 교차 반응하는 재조합 인간 mAb의 기능성 입증이다.

도 96a는 판독 포획 비드 상의 형광성 신호에 의해 검출된, H1N1에 대한 항체를 분비하는 1 이상의 효과기 세포를 함유하는 토끼 형질 세포의 이질성 집단을 포함하는 챔버의 일례를 보여주는 것이다.

도 96b는 판독 포획 비드 상의 형광성 신호에 의해 검출된, H3N2에 대한 항체를 분비하는 1 이상의 효과기 세포를 함유하는 토끼 형질 세포의 이질성 집단을 포함하는 챔버의 일례를 보여주는 것이다.

도 97a는 복수 개의 농축된 토끼 형질 세포가 적재된 4개 챔버의 명시야 영상을 보여주는 것이다.

도 97b는 H1N1 검출 이후, 도 123a의 챔버의 형광성 영상을 보여주는 것이다. 모든 챔버는 H1N1에 대한 항체를

분비하는 세포를 함유하지 않는 음성이다.

도 97c는 H3N2 검출 이후, 도 123c의 챔버의 형광성 영상을 보여주는 것이다. 챔버는 다양한 비드 강도를 보이지만, 그들 모두 양성이고, H3N2에 대한 항체를 분비하는 세포를 1 이상 함유한다.

도 97d는 도 123c의 H3N2-양성 미세유동 챔버로부터의 회수 후, 토끼 세포로부터 증폭된 중쇄 및 경쇄를 보여주는 겔이다.

도 98은 농축을 위해 재주입하기 직전 주입 포트에 달하는 회수된 세포로 적재된 모세관의 영상을 보여주는 것이다.

도 99는 항체 클로닝, 발현, 및 특징 규명에 의한 인간 항체 서열의 입증에 대한 예를 보여주는 것이다.

도 100은 미세유동 장치로부터 회수된 하이브리도마 단일 세포의 RT-PCR 증폭으로부터의 밴드를 보여주는 겔이다.

도 101은 하이브리도마 (D1.3 및 HyHEL5)에 의해 생산된 항-달걀 리소자임 항체의 친화도, 및 미세유동 장치에서 스크리닝된 단일 D1.3 및 HyHEL5 하이브리도마 세포로부터 검색된 서열의 재조합 발현을 비교하는 그래프이다. 항-마우스 항체 포획 비드를 하이브리도마로부터의 세포 상청액, 또는 D1.3 및 HyHEL5 항체를 발현하는 재조합 HEK293 세포와 인큐베이션시키고, 세척하고, 상이한 농도의 표지화된 항원과 인큐베이션시켰다. 형광성 측정치를 최고 항원 농도에서의 최대 비드 강도로 정규화하 재조합식으로제조된 항체의 결합 특성을 입증한다.

도 102는 HEK293 세포 (대조군) 또는 항체 RO5C14를 일시적으로 발현하는 HEK293 세포로부터의 상청액과 함께, 이어서, 표지화된 달걀 리소자임 (10 nM)과 함께 인큐베이션된 비드의 형광성 강도를 보여주는 그래프이다. 신규한 마우스 항체의 달걀 리소자임에의 결합은 미세유동 스크린에서 항체 특이성인 것으로 확인된 일차 마우스 형질 세포로부터 서열 RO5C14를 수득한 후에 확인되었다.

도 103a는 60℃ 내지 40℃ 범위의 RT 온도의 구배를 사용하여 실시예 25에 기술된 방법에 의해 제조된 앰플리콘을 보여주는 PCR 겔 영상이다.

도 103b는 도 103a에 제시된 400 내지 600 bp의 밴드의 생어(Sanger) 서열분석의 결과를 보여주는 것이다. 서열을 정열하였고, D 1.3의 중쇄의 가변 영역 서열과 매칭되는 것으로 확인되었다.

도 104a-c는 차세대 서열분석에 기반한 IgG 레퍼토리의 기능성 해석을 위한 방법을 나타내는 대표적인 개략도이다.

도 105a는 상이한 형광성 강도의 비드를 사용하여 다중화하는 항원 검출에 대한 개략도이다.

도 105b는 미세유동 챔버에 적재된 3가지 유형의 판독 비드에 관한 명시야 영상이다.

도 105c는 미세유동 챔버 중 상이한 강도 및 항원을 가지는 3가지 유형의 판독 비드의 형광성 영상이다.

도 105d는 토끼 항-H1N1 항체 및 2차 항-토끼 항체를 이용하여 검출한 후, 3가지 유형의 판독 비드의 형광성 영상이며, 여기서, 오직 H1N1로만 코팅된 비드 (화살표 표시)가 신호를 나타낸다.

도 105e는 상이한 인플루엔자 균주로 코팅되고, 그의 형광성 강도에 기초하여 구별되는 3가지 유형의 비드에 대한 H1N1 검출 이후의 신호를 보여주는 것이다.

도 106a는 TNF-α 농도의 함수로서 악티노마이신-D 존재하의 L929 세포의 독성 반응을 보여주는 것이다.

도 106b는 TNF-α 및 악티노마이신-D 존재하에 미세유동 장치에서 배양된 L929 세포를 사용하였을 때 아포프토시스 및 괴사 검정법을 보여주는 것이다.

도 107a는 TNFα 기능성 검정법으로부터의 저속 촬영 형광 현미경법 영상을 보여주는 것이다. (a) 상부 패널: TNFα 리간드 부재하에서, 형광 국재화는 세포질에서 이루어진다. 중간 패널: TNFα 리간드 10 ng/mL에 의한 활성화시, 세포질에서 핵으로의 형광 변화가 관찰된다. 하부 패널: TNFα 리간드 10 ng/mL 첨가 이외에도 TNFα 리간드를 중화시키는 항체를 함유하는 세포 상청액의 존재하에서, 형광 국재화는 세포질에서 그대로 유지된다.

도 107b는 핵 형광 국재화를 보이는 활성화된 세포의 빈도를 보여주는 플롯이다. 정량된 세포 개수는 n으로 표시된다.

도 108은 개별 미세유동 챔버에서의 SKBR3 세포 집단의 0일째, 1일째 및 3일째 광학 현미경 사진을 보여주는 것이다. SKBR3 세포는 LC3-GFP 리포터를 포함한다.

도 109 a는 CEF 펩티드에 의한 활성화 후, IFNɣ 포획 비드의 존재하에서 인큐베이션된 말초 혈액 단핵구 세포 집단을 함유하는 챔버의 명시야 영상을 보여주는 것이다.

도 109b는 CEF 펩티드에 의한 활성화 후, IFNɣ를 분비하는 1 이상의 활성화된 T 세포를 함유하는 챔버의 형광성 영상을 보여주는 것이다.

도 109c는 CEF 펩티드에 의한 활성화 후, 5일 동안 배양된 T 세포 클론을 함유하는 챔버의 명시야 영상을 보여주는 것이다.

도 109d는 CEF 펩티드로 자극받은 말초 혈액 단핵구 세포 집단에서 항원 특이 T 세포 개수를 측정하는 데 있어 ELISPOT와 비교하여 미세유동 검정법을 사용하였을 때 감도가 더 높은 것을 보여주는 것이다.

도 110은 세포 생존 PDGFRα 기능성 세포외 효과 검정법으로부터의 3개의 서브어레이로부터의 챔버의 형광 현미경법 영상으로, 이는 T=48시간 동안 (a) 리간드 부재하에서 또는 (b) PDGF-AA 25ng/mL 존재하에서 PDGFRα 및 히스톤 2B-YFP를 발현하는 BaF3 클론에서의 YFP 형광 판독을 보여주는 것이다. 삽도는 개별 미세유동 챔버의 확대도를 보여주는 것이다. 도 110c는 미세유동 장치에서 12, 24, 36 및 48시간 동안 배양 후, 1 이상의 효과기 항체-분비 세포를 함유하는 것, 및 살아있는 판독 세포 집단 (PDGFRα를 과다발현하는 BaF3, 흰색 화살표 표시)과 함께 공동 배양된 농축된 마우스 비장세포 집단 (2개의, 검은색 화살표 표시)의 현미경 사진을 보여주는 것이다.

도 111은 패쓰헌터® 익스프렉스 CCR4 CHO-K1 β-어레스틴 GPCR 리포터 세포를 상이한 농도의 효능제 CCL22와 함께 이어서, 상이한 농도의 기질 C_{12}FDG와 함께 인큐베이션시킨 플레이트 기반 검정법으로부터 수득된 형광성 영상을 보여주는 것이다. GPCR CCR4의 활성화는 β-갈락토시다제 효소의 상보성을 유발하였고, 상기 효소는 최종적으로는 기질을 절단하여 형광성 생성물을 형성하였다.

도 112a는 패쓰헌터® 익스프레스 CCR4 CHO-1 β-어레스틴 GPCR 리포터 세포를 미세유동 장치에 적재하고, C_{12}FDG 기질과 함께 90분 동안 인큐베이션시킨 후, 상이한 농도의 효능제 CCL12와 함께 90분 동안 인큐베이션시킨, 미세유동-기반 GPCR 신호전달 검정법의 명시야 및 형광성 영상을 보여주는 것이다. 효능제에 의한 GPCR CCR4의 활성화는 β-갈락토시다제 효소의 상보성을 유발하였고, 상기 효소는 최종적으로는 기질을 절단하여 형광성 생성물을 형성하였다.

도 112b는 도 112a에 제시된 바와 같이, 기질 C_{12}FDG 및 상이한 농도의 효능제 CCL12와 함께 인큐베이션된 패쓰헌터® 익스프렉스 CCR4 CHO-K1 β-어레스틴 GPCR 리포터 세포의 형광성 강도 측정을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본원에서 사용되는 바, "하나"("a," "an") 및 "그"라는 단수 형태는 문맥상 달리 명확하게 언급하지 않는 한, 복수의 지시 대상도 포함한다. 따라서, 예를 들어, "하나의 것"이라고 언급하는 것은 1 초과의 것을 포함한다. 본원에서 참고 문헌을 인용하는 것은 상기 참고 문헌이 본 발명의 선행 기술임을 인정하는 것이 아니다.

[0033] 본원에서 사용되는 바, "판독"이란 세포외 효과를 기록하는 방법을 의미한다. "판독 입자 집단"은 본원에 기술된 바와 같이, 하나 이상의 판독 입자를 포함할 수 있다.

[0034] 본원에서 사용되는 바, "세포외 효과"란, 세포 증식 증가, 성장 감소, 아포프토시스, 용해, 분화, 감염, 결합 (예컨대, 세포 표면 수용체 또는 에피토프에의 결합), 형태 변화, 신호전달 캐스케이드의 유도 또는 억제, 효소 억제, 바이러스 억제, 사이토카인 억제, 보체 활성화를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 효과기 세포의 세포외에 있는 판독 입자에 대하여 미치는 직접 또는 간접적인 효과이다. 본원에서 제공하는 바, 한 실시양태에서, 세포외 효과는 효과기 세포에 의해 분비된, 관심의 대상이 되는 생체분자의 판독 입자에의 결합이다. 또 다른 실시양태에서, 세포외 효과는 판독 세포 또는 보조 세포의 아포프토시스와 같은 반응이다.

[0035] 본원에서 제공하는 방법은 세포외 효과의 변화를 보이는, 효과기 세포 또는 효과기 세포(들)를 포함하는 세포 집단을 확인하는 데 사용된다. 세포외 효과의 변화는 대조군 (음성 또는 양성 대조군)과 비교한 변화, 또는 하나 이상의 다른 세포 집단과 비교한 비교이다.

[0036] 본원에서 언급하는 바, "이질성 집단"은 특히 입자 또는 세포의 이질성 집단과 관련하여, 상이한 특징을 가지는

2개 이상의 입자 또는 세포를 포함하는 입자 또는 세포 집단을 의미한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 특징은 형태, 크기, 형광성 리포터 유형, 상이한 세포 종, 표현형, 유전자형, 세포 분화 유형, 하나 이상의 발현된 RNA 종의 서열 또는 기능성 특성이다.

[0037] 본원에서 언급하는 바, "서브집단"이란 더 큰 입자 (세포) 집단의 분획을 의미한다. 한 실시양태에서, 세포 집단은 예를 들어, 개별 미세유동 챔버 중 개별 서브집단을 분리함으로써 서브집단으로 나뉜다. 추가로, 개별 서브집단은 예를 들어, 복수 개의 미세유동 챔버 또는 다른 반응 베쓸 중 추가의 서브집단으로 분할될 수 있다. 서브집단은 또한 같은 미세유동 챔버에 위치하는, 더 큰 집단 내의 입자의 분획일 수도 있다. 서브집단은 하나 이상의 입자를 함유하며, 여기서, 복수 개의 입자가 서브집단에 존재하고, 복수 개의 것 내의 개별 입자는 서로 관련하여 동질성 또는 이질성일 수 있다.

[0038] 한 실시양태에서, "셀 리테이너"는 연속적으로 또는 간헐적으로 1 이상의 효과기 구역 및 1 이상의 판독 구역을 정의한다. 리테이너는 구조 요소, 예컨대, 밸브, 셀 펜스, 외부장 또는 장 구배 (예컨대, 중력, 자기, 전자기, 가속도 등)의 배향, 전극 또는 광학 성분 또는 자기 프로브, 세포 부착을 촉진 또는 억제시키는 표면 변형 (예를 들어, 텍스처 형성, 코팅 등)에 의해, 또는 챔버내 용액의 비중에 의해 국소적으로 생성된 장의 배향 및/또는 국재화일 수 있거나, 또는 상기 중 하나 이상의 것의 조합에 의해 달성될 수 있다.

[0039] 본원에서 사용되는 바, "코팅"이란, 챔버 표면에 부착할 수 있는 효과기 세포 또는 판독 입자의 능력을 촉진 또는 억제시키는 챔버 표면에의 임의의 첨가일 수 있다. 코팅제는 하기: 세포; 중합체 브러쉬; 중합체 히드로겔; 자가 조립된 단층 (SAM), 광-그라프트된 분자, 세포 결합 특성을 가진 단백질 또는 단백질 단편 (예를 들어, 액틴, 피브로넥틴, 인테그린, 단백질 A, 단백질 G 등으로부터의 세포 결합 도메인) 중 하나 이상의 것으로부터 선택될 수 있다. 더욱 일반적으로, 아르기닌-글리신-아스파르테이트-(세린) (RGD(들)) 펩티드 서열 모티프가 사용된다. 폴리-L-리신 또한 정전기적 상호작용을 통한 세포 부착을 증진시키기 위한 PDMS; 세포 결합 특성을 가진 인지질, 세포 결합 특성을 가진 콜레스테롤, 세포 결합 특성을 가진 당단백질, 및 세포 결합 특성을 가진 당지질과 함께 중합체 코팅제로서 널리 사용된다. 추가로, 비오티닐화된 생체분자를 사용하는 PDMS 표면 관능화는 간단하고, 고도한 관심의 대상이 되며, 그러나 유연적인 접근법이다. 소 혈청 알부민 (BSA)은 소수성 도메인에 기인하여 소수성 PDMS 표면 상에의 소수성 효과를 통해 쉽게 부착됨으로써 챔버내 스트렙트아비딘 기반 접합체 (단백질, DNA, 중합체, 형광단)의 추가의 직접적인 커플링이 이루어지게 하는 것으로 널리 공지되어 있다. 폴리에틸렌 글리콜 기반 중합체는 그의 생물 부착 특성에 대해서도 또한 공지되어 있으며, 이는 세포 부착을 방해하면서, PDMS 표면 (흡착, 공유 그라프팅) 상에 코팅될 수 있다. 폴리(파라크실렌), 예컨대, 파릴렌 C는 또한 화학 기상 증착 (CDV)을 사용하여 PDMS 표면 상에 증착될 수 있고, 세포 부착을 방해할 수 있다.

[0040] 본원에서 사용되는 바, "분리된"이라는 것은 주어진 챔버가 분석되는 효과기 세포 및/또는 판독 입자가 미세유동 장치의 또 다른 챔버의 입자(들) 또는 생체분자(들)로 실질적으로 오염되지 못하게 하는 환경을 의미한다. 이러한 분리는 예를 들어, 챔버, 또는 복합 챔버의 경우, 챔버 세트를 실링함으로써, 챔버 사이의 유체 소통을 제한함으로써, 또는 챔버 사이의 유체 유동을 한정함으로써 달성될 수 있다.

[0041] 본원에서 사용되는 바, "입구" 또는 "출구"는 유체가 챔버 안으로 및 밖으로 유동할 수 있도록 하는 임의의 입구를 포함한다. 유체 유동은 챔버를 그의 주변 환경으로부터 분리시키기 위해 입구 또는 출구, 또는 그 둘 모두를 통해 한정될 수 있다. 유동을 제어하는 하나 이상의 밸브가 존재할 수 있거나, 유동은 유동을 막는 층 (예를 들어, 제어층 또는 분리층)을 이용하여 입구 및 출구로 이어지는 유체 채널을 한정함으로써 제어될 수 있다. 별법으로, 유동은 유체가 장치를 통과하는 속도에 의해 조절될 수 있다. 입구 또는 출구는 또한 효과기 세포 또는 판독 입자, 또는 분석 동안 필요에 따라 유동으로 운반되는 다른 성분의 전달을 위한 장치로 유체 유동을 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 입구 및 출구는 입구 쪽에서부터 출구 쪽으로 유체가 유동하는 챔버 상단부에 단일 입구에 의해 제공될 수 있다.

[0042] 본원에서 사용되는 바, "자석"은 임의의 강자성 또는 상자성 물질을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "강자성"이란, 자성 물질이 자석으로 끌어 당겨지거나, 또는 그 자체가 자석이 되도록 철, 니켈, 크롬, 또는 코발트 또는 그의 조합 및 각종 합금으로 구성될 수 있는 물질을 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 자성 물질은 강자성 스테인리스 강으로부터 제조될 수 있거나, 또는 희귀토 자석 또는 자기 특성을 가지는 스테인리스 강으로부터 제조될 수 있다. 자석은 또한 전류를 이용하여 동력을 가할 때 자기장을 생성하도록 디자인된 코일 또는 다른 전기 구동식 장치를 사용하여 제공될 수 있다 .

[0043] 본원에서 사용되는 바, "웰 어레이"란 하나 또는 다른 것을 특정 판독 구역 또는 효과기 구역으로 국재화함으로써 (여기서, 구역 (즉, 효과기 또는 판독 구역)은 그 안에 존재하는 입자 유형에 의해 정의될 수 있다) 효과기

세포 및/또는 판독 입자의 이동을 제한할 수 있는 챔버내 구조의 임의의 어레이를 의미한다. 예를 들어, 웰 어레이의 한 실시양태는 일련의 교차 셀 펜스가 챔버 표면 상에 웰 어레이를 형성하는 것으로, 도 33에 제시되어 있다.

[0044] 본원에서 사용되는 바, "입자 트랩"이란, 효과기 세포 또는 판독 입자(들) (비드(들))를 검정 동안 이동을 제한하기 위해 특정 공간 위치로 공간상 한정할 수 있는 구조를 의미한다. "셀 펜스"는 "입자 트랩"의 한 가지 유형이다. 한 실시양태에서, 입자 트랩은 효과기 세포를 한정하는 데 사용되며, 이 경우, 이는 "효과기 세포 트랩"으로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 입자 트랩은 판독 입자를 한정하는 데 사용될 것이며, 이 경우, 이는 경우에 따라 "판독 입자 트랩", 또는 "판독 세포 트랩"으로 지칭될 수 있다. 한 실시양태에서, "입자 트랩"을 통해 트랩된 입자는 고정된 위치를 가질 수 있다. 고정된 위치를 가지는 것은 영상화 및 영상 분석법을 간소화시킬 수 있다. 판독 입자 또는 입자들의 경우에 고정된 위치를 가지는 것은 또한 효과기 세포와 판독 입자 사이의 확산 거리를 제한 또는 제어하는 이점을 가질 수 있다. 고정된 위치를 가지는 것은 또한 효과기 세포와 판독 입자의 상호작용을 막을 수 있다.

[0045] 본원에서 사용되는 바, "텍스처 형성된 표면"은 챔버 표면에의 세포 부착을 촉진시키거나, 또는 감소시키는 임의 유형의 표면 변형일 수 있다. 예를 들어, 범프, 압흔, 조도, 돌출부, 훅, 페그, 웰, 그루브, 리지, 그레인, 위브, 웰, 소수성, 친수성 등의 것 중 하나 이상의 것으로 표면에는 텍스처가 형성될 수 있다.

[0046] 인체는 주어진시간에 수백만 내지 수십억 개의 상이한 유형의 항체를 만드는데, 이들 각각은 "항체 분비 세포" 또는 "ASC"로 불리는 상이한 단일 형질 세포에 의해 제조된 것이다. 각 ASC의 직경은 그의 공급원에 따라 약 7 ㎛ 내지 약 15 ㎛로, 인간 모발 폭의 대략 1/10인 직경이며, 단지 최소량의 항체만을 생성한다. 인체내 수십억 개의 상이한 ASC 중 단지 적합한 극소수만이 치료제로서 사용되는 데 적합한 항체를 제조한다. 종래 포맷의 부피로 분석될 때, 이러한 소량의 항체는 너무 묽기 때문에 완전하게 검출불가능해질 수 있다. 이러한 이유에서, 현재 항체 개발은 각 ASC를 분리시키고, 무한증식 암 세포에 융합시켜 하이브리도마를 생성하고, "성장시켜" 궁극적으로는 측정하는 데 충분할 정도의 항체를 생산할 수 있는 수천 개의 동일한 세포를 생성하는 것을 필요로 한다 (도 60 참조). 예를 들어, 문헌 [McCullough and Spier (1990). Monoclonal Antibodies in Biotechnology: Theoretical and Practical Aspects, Chapter 2, Cambridge University Press] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)를 참조할 수 있다. 이러한 공정은 믿을 수 없을 정도로 비효율적일 뿐만 아니라 (출발 면역 세포 중 99.9%를 손실), 매우 느리고, 고비용인 바, 치료학적 기능 검사 이전 최소 3개월 간의 작업이 요구된다. 그 결과, 최적의 치료학적 특성을 가진 항체 개발이 신약 개발에 있어 주된 미해결 장애물이 된다.

[0047] ASC는 배양물 중에서 직접 확장될 수 없는 최종적으로 분화된 세포이다. 상기 기재된 바와 같은 상기 문제 (예컨대, 하이브리도마 방법, 도 60 참조)를 극복하기 위한 현존 방법은 매우 비효율적이며, 단지 소량의 항체 다양성을 포착할 뿐이다 (전형적으로 <0.1%). 상기 접근법은 또한 설치류를 사용하는 것으로 한정이 되며, 매우 느리고, 고비용인 바, 치료학적 기능 검사 이전 최소 수개월 간의 작업이 요구된다. 하기 설명되는 바와 같이, 본 발명은 공급원과 상관없이, 항체 및 ASC에 대한 직접적인 기능성 검정이 이루어질 수 있도록 함으로써 이러한 한계를 극복한다.

[0048] 다양한 기술이 발달함에 따라 항체 스크리닝 속도 및 처리량이 증가되었지만, 이러한 기술은 정보를 희생시킴으로써 그를 수행하게 된다. 구체적으로, 현존 기술은 결합, 친화성 및 특이성에 기초한 항체 선별로 한정된다. 연구 적용을 위해서는 충분하지만, 다수의 치료학적 적용을 위해서는 단지 표적에 결합하는 것 이상을 수행하는 고 친화성 항체가 요구된다. 치료학적 적용을 위해서는 오히려 원하는 생물학적 반응 (예컨대, 세포 신호전달의 효능제/길항제; 면역 반응 활성화; 아포프토시스 유도; 세포 성장 또는 분화 억제)을 유도하는 항체가 요구된다. 현재, 모든 고처리량 항체 개발 기술은 표적 결합 평가 이후 하류에서 심지어 하이브리도마 접근법과 비교해서도 번거롭고, 고비용이며, 처리량이 낮은 방법을 사용하여 상기 기능성 특징 규명이 수행되는 것을 필요로 한다. 이러한 이유에서, 40여년 전에 개발된 하이브리도마 방법은 치료학적 항체 개발에 있어 여전히 주축을 이루고 있다.

[0049] 한 측면에서, 본 발명은 본원에서 "세포외 효과"로 지칭되는 관심의 대상이 되는 특성에 대하여 세포 집단을 스크리닝하기 위해 소량의 반응 부피 및 대량의 동시 검정 능력을 가진 미세유동 플랫폼을 이용한다. 각 세포 집단은 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함한다. 세포외 효과는 특정 효과로 한정되지 않으며; 오히려, 결합 특성 (특이성, 친화성) 또는 기능성 특성, 예를 들어, 효능 작용 또는 세포 표면 수용체의 길항작용일 수 있다. 한 실시양태에서, 세포외 효과는 특정 효과기 세포의 분비된 생성물이 발휘하는 효과이다.

[0050] 본원에서 제공하는 통합된 미세유동 장치 및 방법은 부분적으로는 소량이 감응성이라는 개념에 기초하며 - 각 장치는 수천 개의 나노리터 부피의 세포 분석 챔버를 포함하며, 각각은 종래 플레이트 기반 검정법에 비해 대략 100,000배 정도 더 소량이다. 이러한 소량의 나노링터 챔버에서, 각 단일 효과기 세포는 수분 이내에 고농도의 분비된 생체분자를 생산한다. 예를 들어, 각각의 단일 ASC는 수분 이내에 고농도의 항체를 생산한다. 한 실시양태에서, 상기 농도의 효과는 특이적인 기능성 특성(들), 예컨대, 세포 표면 수용체 활성의 조절 (예컨대, 효능 작용 또는 길항작용)을 이용하여 단일의 일차 ASC에 의해 생산된 항체를 확인하는 세포 기반 스크리닝 검정법을 실시하는 데 사용된다. 본원에서 제공하는 방법 및 장치와 함께 사용하는 데 쉽게 적합화되는 기능성 검정법은 하기에 상세하게 기술된다. 본원에서 제공하는 스크리닝 방법에서 세포 집단을 포함하는 특정 미세유동 챔버 내에서 세포외 효과의 존재가 검출되는 한, 특정 특성을 가지는 특이적인 효과기 세포 또는 효과기 세포의 서브집단이 확인되어야 할 필요는 없다는 것이 중요하다. 효과가 측정되는 챔버내 세포 중 일부 또는 그 모두는 세포외 효과를 담당하는 특이적인 세포 또는 세포들을 확인하기 위해 추가로 특징 규명하기 위해 회수될 수 있다. 스크리닝 이전에 세포 배양의 필요성을 완전히 제거함으로써, 본원에서 제공하는 단일 세포 접근법은 최초로 단 1일 이내에, 1회 실행당 100,000개 초과의 세포인 처리량으로 임의의 종으로부터 기능성 항체를 직접 선별할 수 있다 (도 1).

[0051] 본원에서 제공하는 미세유동 장치 및 방법은 단일 세포의 세포외 효과, 예를 들어, 단일 ASC에 의해 분비된 항체의 세포외 효과를 평가하는 데 있어 현재 이용가능한 전략법에 비하여 이점을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기술된 장치는 확장 가능하고, 시약 소모량을 감량시킬 수 있고, 처리량을 증가시킴으로써, 그렇지 않았다면 실행 불가능하였거나, 또는 엄두도 못 낼 정도로 고가인 다수의 연구용 단일 세포 검정 플랫폼을 제공한다. 또한, 현재 이용가능한 단일 세포 검정 플랫폼 분석법은 예를 들어, qPCR과 같은 하류 분석법을 위해 요구되는 생성물을 생성하기 위해 종래 튜브에서 수행되는 다중의 세포 처리 및 프로세싱 단계를 필요로 한다. 본원에 기술된 바와 같이 미세유동 세포 처리 및 프로세싱을 포함하는 것은 작은 부피의 구속을 통해 정밀도 및 감응도 또한 개선시킴과 동시에, 처리량 및 비용을 개선시킬 수 있는 중요한 기회를 제공한다.

[0052] 이론으로 제한하고자 하지 않으면서, 정확한 세포 처리 및 조작 (예컨대, 배지 조건의 공간적-시간적 제어)과 함께, 본원에서 제공하는 나노리터 미세유동 챔버에 의해 이루어지는 농도 증진 및 신속한 확산 혼합을 통해 그의 일차 기능으로는 상이한 효과기 단백질, 예컨대, 항체 및 사이토카인의 분비를 포함하는 것인, 효과기 세포, 예컨대, 면역 세포 (예컨대, B 세포, T 세포, 및 대식세포)의 단일 세포 분석이 이루어질 수 있다.

[0053] 본원에 기술된 실시양태는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단으로부터의 분비된 생성물에 대한 다세포 검정법을 수행할 수 있고, 이어서, 후속 분석을 위해 세포 집단을 회수할 수 있는 미세유동 시스템 및 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포 집단은 이질성 세포 집단이다. 즉, 집단 중 2개 이상의 세포는 유전자형, 표현형 또는 일부 다른 특성에서 차이를 보인다. 또한, 세포 집단이 한 장치에서 동시에 검정될 때, 집단 중 2개 이상의 것은 서로에 대해 이질성이다 (예컨대, 세포 개수, 세포 유형 등 상이). 본원에 기술된 검정법에서, 검출 시약으로서의 역할을 하는 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단 (예컨대, 세포 수용체를 발현하는 판독 세포, 판독 비드, 센서, 가용성 효소 등)은 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 및 하나 이상의 효과기 세포로부터의 분비된 생성물에 검출되는 판독 신호 (예컨대, 형광성 신호)에 충분한 농도로 노출된다. 일부 실시양태에서, 판독 신호는 하나 이상의 판독 입자 (예컨대, 판독 세포)에 대하여 미치는 집단내 하나 이상의 효과기 세포에 의해 유도된 생물학적 반응/기능적 효과 (예컨대, 아포프토시스)를 기록한다. 예를 들어, 주어진 ASC로부터 생산된 항체를 위해, ASC 또는 하나 이상의 ASC를 포함하는 세조 집단은 판독 입자(들) 및 임의적으로 보조 검출 시약과 함께 작은 부피 등으로 장치에 격리되고, 검정이 수행된다 (부피가 약 100 pL 내지 약 50 nL, 예컨대, 1 nL 내지 약 5 nL이 챔버). 중요하게는, 한 실시양태에서, 효과기 세포는 희귀 세포이기 때문에, 본원에 기술된 방법에 의해 검정되는 세포 집단 모두가 초기에 효과기 세포를 함유하지는 않을 것이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 단일 장치에서 수천 개의 세포 집단이 검정되는 경우, 챔버 중 단 하나의 분획만이 효과기 세포를 포함할 것이다. 본원에서 제공하는 방법을 통해 효과기 세포를 포함하는 챔버를 확인할 수 있다.

[0054] 본 발명은 앞서 기술된 미세유동 방법과는 다른 접근법을 취한다. 후자의 방법은 개별 챔버 내에 단일 세포의 개수를 최대화시키는 밀도로 단일 세포를 적재하는 접근법을 취한다 (예를 들어, 이 경우, 소적 또는 마이크로웰이 사용된다). 이는 한계 희석에 의해 단일 세포를 분리시킨 후, 단일 세포를 함유하는 챔버 또는 부피의 분획을 분석함으로써 달성된다. 최적의 단일 세포 적재는 웰 1개당 대략 세포 1개인 평균 밀도로 달성되기 때문에 상기 전략법은 처리량의 희생으로 이루어지는 것이다. 유사하게, 상기 방법을 위해 기술된 기하학적 구조를 통해서는 보통 챔버 내에 수개의 세포 그 초과로는 허용되지 않으며, 많은 경우에 있어서는 물리적으로 단지 단

일 세포만을 수용하도록 디자인된다. 처리량 감소 이외에도, 단일 미세유동 챔버 중에서 단일 세포를 단리 및 검정하는 접근법으로부터 다수의 기술상의 도전 과제가 발생하게 된다. 예를 들어, 이질성 집단으로부터 중요한 판독치를 얻는 데 충분한 세포 농도를 달성하는 것, 영양 고갈, 통기 요구, 원치않는 증기 투과 효과, 배지 조건의 불량한 제어, 및 폐기물 제거 요구에 기인하여 개별 세포를 살아있는 상태로 유지시키는 것이 신뢰할 수 있고, 재현가능한 단일 세포 미세유동 검정법을 달성하는 데 있어 중요한 문제를 제기할 수 있다. 세포 성장 억제와 같은 많은 기능성 검정법에서는 효과기 세포 및 판독 세포를 수일 동안 살아있는 상태로 유지시켜야 한다. 그러한 검정법은 마이크로웰 기반 시스템 및 소적에서는 실현불가능하다. 그러나, 본원에서 논의된 바와 같이, 본 발명은 수일 동안 지속되는 검정법을 위한 강인한 플랫폼을 제공한다.

[0055] 본원에 기술된 장치 및 검정법은 하나 이상의 효과기 세포가 개별 세포 집단에 존재하는 것인, 단일 미세유동 챔버에서 수행되는 단일 세포 검정법을 제공한다. 세포 집단은 각 챔버에서 세포외 효과를 발휘할 수 있는 그의 각 능력에 대해 검정되고, 이로써, 앞서 기술된 방법보다 더 높은 전체 처리량을 제공한다. 중요하게는, 단일 효과기 세포의 효과는 더 큰 세포 집단 내에서, 예를 들어, 이질성 세포 집단에서 검출될 수 있다. 단일 미세유동 챔버 내에서 다세포 검정 접근법을 취함으로써, 본원에 기술된 실시양태는 앞서 보고된 처리량의 100배 이상으로 작동될 수 있다. 한 실시양태에서, 또 다른 집단과 비교하여 세포 집단에서 판독 입자에 대한 세포외 효과 또는 세포외 효과의 변화가 확인되고 나면, 세포 집단을 회수하고, 개별 세포 서브집단으로서 추가로 검정하여 (예컨대, 회수된 세포 집단을 한계 희석으로 검정) 집단내 어떤 효과기 세포(들)가 세포외 효과를 담당하는지에 대해 측정한다.

[0056] 단일 세포보다 많은 세포를 수용하도록 디자인된, 당업계에 공지된 방법 및 장치는 예를 들어, 세포를 생존가능한 상태로 유지시키는 것, 관심의 대상이 되는 효과기 세포를 선택적으로 회수할 수 없는 무능력함, 장치내 증발, 압력 가변성, 상호 오염, 영상화 능력을 제한하는 장치 구조 ((예컨대, 상이한 초점면에 입자를 제공함으로써, 해상도 감소), 및 처리량 부족 (WO 2012/072822 및 문헌 [Bocchi et al. (2012)] (상기 문헌들은 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다))과 같은, 본원에 기술된 검정법 유형에 대해 부적합하게 만드는 한계를 가진다.

[0057] 본원에 기술된 실시양태는 부분적으로는, 이질성 세포 집단 중의 개별 미세유동 챔버에 존재하는 관심의 대상이 되는 단일 효과기 세포의 검출을 허용하는 기능적 효과기 세포 검정법 (이는 본원에서 세포외 효과 검정법으로도 지칭된다)에 관한 것이다. 구체적으로, 챔버가 이질성 세포 집단을 함유하고, 집단의 각 세포는 항체를 분비하거나 (즉, 단일 미세유동 챔버 내의 이질성 ASC 집단), 또는 집단 중 세포의 일부 분획만이 항체를 분비할 경우, 단 하나의 효과기 세포 또는 효과기 세포의 서브집단은 판독 입자(들)의 원하는 세포외 효과를 일으키는 항체를 분비함으로써, 본원에 기술된 실시양태는 원하는 세포외 효과를 측정하고, 검출하는 방법을 제공한다. 일단 효과를 보이는 세포 집단을 포함하는 챔버를 확인한 후, 집단을 예를 들어, 세포 집단을 한계 희석으로 서브 집단으로 분할함으로써 하류 분석을 위해 집단을 회수한다. 상기 기술된 바와 같이, 한 실시양태에서, 세포외 효과를 보이는 세포의 하나 이상의 이질성 집단을 회수하고, 한계 희석으로 (예컨대, 검정당 1 내지 약 25개의 세포) 추가로 스크리닝하여 세포외 효과의 원인이 되는 세포가 어느 것인지 측정한다.

[0058] 한 실시양태에서, 미세유동 검정법은 개별 미세유동 챔버 중에 존재하는 복수 개의 세포 집단에 대해 수행함으로써 집단 중 하나의 집단 내의 효과기 세포가 항체, 또는 판독 세포의 성장을 억제시키는 다른 생체분자를 를 분비하는지 여부를 측정할 수 있다. 본 실시양태에서, 심지어, 판독 세포의 성장을 영향을 주지 않는 항체를 분비하는 복수 개의 ASC를 포함하는 이질성 세포 집단의 존재하에서도, 판독 세포 성장은 여전히 동일하게 억제되고, 미세유동 챔버는 원하는 효과기 세포 및 분비 생성물을 함유하는 것으로 확인가능하다. 이어서, 챔버의 내용물은 추가의 미세유동 분석법, 또는 벤치탑 분석법을 위해 예를 들어, 효과기 세포의 한계 희석으로 회수하여 어느 효과기 세포가 효과를 나타내는지 측정할 수 있다. 항체 서열은 또한 당업자에게 공지된 방법에 의해 회수될 수 있다.

[0059] 한 실시양태에서, 본원에 기술된 방법에 의해 신규한 항체가 제공된다. 예를 들어, 하나 이상의 ASC는 본원에 기술된 방법에 의해 확인될 수 있고, 회수될 수 있고, 그의 항체 유전자 서열분석되고, 클로닝될 수 있다.

[0060] 단일 세포가 챔버 1개당 대략 세포 1개인 밀도로 개발 챔버 내로 적재할 경우, 본원에서 제공하는 장치를 통해 1회 실험당 대략 1,000개의 단일 세포 (예컨대, ASC)를 스크리닝할 수 있다. 단일 세포 중 하나 이상은 ASC이거나, 상이한 유형의 효과기 세포일 수 있다. 비록 하이브리도마 방법보다 대략적으로 10배 더 높지만, 수만, 또는 심지어는 수십 만개의 세포를 스크리닝하는 데 많은 경우에서 바람직하다. 본 일례는 ASC를 골밀도로 수득할 수 없을 때 (예컨대, ASC 마커/항체가 이용가능하지 않은 종, 또는 면역 반응이 열악한 경우), 또는 그에

빈번하게 결합하지만, 원하는 특성을 가지는 것인 항체가 과도하게 희귀한 때 (예컨대, 수용체의 차단)를 포함한다. 그러나, 한 실시양태에서, 관심의 대상이 되는 세포외 효과를 보이는 하나 이상의 효과기 세포를 함유하는 세포 집단(들)을 확인한 후, 세포외 효과를 담당하는 개별 효과기 세포(들)의 아이덴티티를 확인하기 위해 세포 집단(들)을 다시, 그러나, 한계 희석로, 예컨대, 개별 미세유동 챔버 중 단일 세포로서, 또는 개별 챔버 중 (제1 스크린과 비교하여) 더 적은 집단으로 분석한다. 2 단계 스크리닝 방법의 한 실시양태는 도 2에 제시되어 있다. 일단 효과기 세포(들)를 확인하고 나면, 그의 유전적 정보를 증폭시키고, 서열분석할 수 있다. 한 실시양태에서, 유전적 정보는 신규 항체 유전자를 포함한다.

[0061] 도 2에 제시된 실시양태에서, 미세유동 어레이에는 챔버 1개당 대략 25개의 세포인 밀도로 적재되고, 이로써, 단일 장치 중 대략 총 100,000개의 세포가 적재된다. 이어서, 챔버를 단리시키고, 인큐베이션시켜 각 챔버 중에서 항체의 독특한 다중클론 혼합물을 생성한다. 이어서, 항체를 원하는 세포외 효과, 예컨대, 항원 결합, 고결합 친화성, 항원 특이성 또는 하나 이상의 기능성 특성을 보이는 챔버를 확인하기 위해 스크리닝한다. 이어서, 각 양성 챔버의 내용물을 회수한다. 한 실시양태에서, 단일 미세모세관을 이용하여 각 집단을 회수하고, 챔버 내용물을 미세모세관에서 풀링하고, 같은 장치 또는 상이한 미세유동 장치에서 한계 희석으로 다시 적재한다. 도 2에 제시된 실시양태에서, 어레이로부터 세포를 챔버 1개당 대략 세포 1개인 밀로 상이한 챔버에 재적재한다. 회수된 집단(들)으로부터의 세포를 같은 세포외 효과에 대해, 또는 상이한 세포외 효과에 대해 재스크리닝한다. 이어서, 제2 어레이로부터의 양성 챔버의 내용물을 회수하여, 예컨대, 차세대 서열분석 및/또는 PCR에 의해 관심의 대상이 되는 항체 서열을 확인한다. 한 실시양태에서, 항체 서열을 서열 분석하고, 클로닝하고, 따라서, 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 방법을 통해 신규한 항체 유전자를 발견할 수 있다.

[0062] 또 다른 실시양태에서, 챔버가 개별적으로 주소 지정될 수 있도록 허용하는 통합된 시스템 미세유동 밸브를 사용하여 세포외 효과를 보이는 세포 집단을 회수한다 (예컨대, 문헌 [Singhal et al. (2010). *Anal. Chem.* 82, pp. 8671-8679] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). 특히, 본 발명은 "어레이 1"의 양성 챔버의 내용물에 대하여 수행된 세포외 효과 검정법의 유형으로 한정되지 않는다 (도 2). 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제2 미세유동 어레이보다는 벤치탑 방법을 통해 "어레이 1"로부터 양성 챔버의 내용을 추가로 검정하는 것이 바람직하다. 벤치탑 방법으로는 예를 들어, RT-PCR 및 차세대 서열분석을 포함한다.

[0063] 본원에 기술된 단일 세포 및 다세포 미세유동 검정법과 관련하여, 본원에서 "챔버"란 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단이 그 안의 세포외 효과, 예를 들어, 기능성 효과 또는 결합 효과에 대하여 검정되는 것을 의미한다. 그러나, 본원에서 제공하는 장치는 수만 개의 챔버를 도입하는 대량의 동시 시스템을 제공한다는 것, 및 본 검정법은 임의적으로 각각이 효과기 세포 또는 복수 개의 효과기 세포를 포함하는 복수 개의 개별 세포 집단에 대하여 챔버 모두 또는 실질적으로 모두, 또는 한 장치 상의 서브어레이 중 챔버 모두에서 동시에 수행된다는 것을 당업계의 숙련가는 이해할 것이다. 일부의 효과기 세포의 희귀성에 기인하여, 미세유동 챔버에 존재할 때, 모든 세포 집단이 효과기 세포를 포함하지는 않을 것이다. 개별적으로 또는 함께 다중 챔버의 주소를 지정하는 유체 구조, 예컨대, 멀티플렉서가 하기에 기술된다.

[0064] 본원에 기술된 실시양태 중 일부는 하기 특징 중 하나 이상의 것을 제공한다:

[0065] 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 작은 부피를 가지는 미세유동 챔버로 적재하고 농축시켜 효과기 세포 생성물을 검정하고, 사용되는 챔버 판독 입자 (판독 비드, 판독 세포 등) 내로 함께 국재화하여 원하는 특성을 가지는 개별 효과기 세포 생성물 (예컨대, 분비된 단백질)의 존재를 검출할 수 있는 능력.

[0066] 종래 배양 방법 또는 앞서 기술된 미세유동 장치를 사용하였을 때 세포 생존 또는 성장이 충분하게 일어나지 못하는 결과를 초래한 것으로 앞서 보고된 바와 있는 농도에서 본원에 기술된 삼투 배쓰에 의해 지원을 받는, 세포 집단의 생존능 및/또는 성장을 유지시킬 수 있는 능력 뿐만 아니라, 개별 세포 주변 배지를 교환할 수 있는 능력.

[0067] 효과기 세포가 건강하지 않은 상태가 되거나, 또는 그의 각 미세유동 챔버보다 더 크게 성장하기 이전에 원하는 효과기 세포 생성물 특성을 측정하는 데 충분한 시간 동안 챔버 내에서 효과기 세포 생성물을 농축시킬 수 있는 능력.

[0068] 미세유동 챔버 내에 세포 집단을 유지시키면서, 배지 내용물을 선택적으로 교환하거나, 검출 시약을 세포 클러스터로 첨가할 수 있다.

[0069] 하나 이상의 미세유동 구조, 수동식 방법 또는 로봇식 방법을 사용하여 선택된 세포 집단을 주소 지정 가능한 방식으로 회수할 수 있는 능력.

[0070] 회수된 세포 집단을, 이질성 집단 중 각 단일 세포로부터의, 또는 이질성 집단 중 각 단일 세포로부터 생성된 클론 또는 복수 개의 클론으로의 효과기 세포 생성물의 분석을 가능하게 2차 더 낮은 저처리량 스크린으로 전달할 수 있는 능력

[0071] 회수된 단일 세포의 이질성 집단으로부터 응집 유전 물질을 직접 분석하고, 상기 정보 또는 유전 물질을 사용하여 관심의 대상이 되는 세포와 관련된 유전자를 확인할 수 있는 능력.

[0072] 일부 실시양태에서, 세포외 효과를 보이는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포의 출발 집단으로부터 세포외 효과를 보이는 효과기 세포에 대해 농축시키는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 출발 세포 집단을 복수 개의 미세유동 챔버에 보유시켜 복수 개의 세포 서브집단을 수득하는 단계를 포함한다. 챔버 1개당 효과기 세포의 평균 개수는 Y개 초과이고, 여기서, 집단 중 세포의 총 개수는 X개 초과이고, 여기서, 집단 중 효과기 세포의 분율의 예상치는 1/X이다. 미세유동 챔버 중 세포 서브집단을 세포외 효과 검정하여 세포외 효과를 보이는 하나 이상의 효과기 세포를 함유하는 하나 이상의 챔버를 확인한다. 이어서, 세포외 효과 검정의 결과에 기초하여, 세포외 효과를 보이는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 것으로서 하나 이상의 챔버를 확인한다. 이어서, 확인된 챔버(들)의 내용을 회수하여 농축된 세포 집단을 수득한다. 효과기 세포에 대하여 농축된 농축된 세포 집단의 효과기 세포의 분율은 1/Y이다. 추가의 실시양태에서, 1/X는 0.05 미만, 또는 0.01 미만, 또는 0.001 미만이다. 세포외 효과는 본언에 기술된 세포외 효과 중 하나 이상의 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 세포의 출발 집단은 항원으로 면역화된, 또는 항원에 노출된 동물로부터 단리된 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC). 또 다른 실시양태에서, 세포의 출발 집단은 항원으로 면역화된, 또는 항원에 노출된 동물로부터 단리된 B-세포 집단이다. 추가의 또 다른 실시양태, 세포의 출발 집단의 공급원은 항원으로 면역화된, 또는 항원에 노출된 동물로부터의 전혈이다.

[0073] 본원에서 제공하는, 한 측면에서, 본 발명의 장치 및 방법은 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 세포외 효과의 존재에 대하여 검정하는 데 사용된다. 또 다른 측면에서, 본원에서 제공하는 장치 및 방법을 통해 다른 세포 집단과 비교하여 세포외 효과의 변화를 보이는 세포 집단을 확인할 수 있다. 이와 관련하여, 복수 개의 개별 세포 집단은 별도의 미세유동 챔버 내에 보유되고, 개별 세포 집단 중 1 이상은 하나 이상의 효과기 세포를 포함하고, 별도의 미세유동 챔버는 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단을 추가로 포함한다. 세포 집단은 세포외 효과의 존재에 대해 검정되고, 여기서, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단이 세포외 효과를 판독한다. 이어서, 복수 개의 것 중 남은 세포 집단 중 하나 이상의 것과 비교하여 세포외 효과의 변화를 보이는 세포 집단이복수 개의 것으로부터 확인될 수 있다. 일단 세포 집단이 세포외 효과의 변화를 보이는 것으로 확인되고 나면, 집단을 회수하고, 한계 희석으로 추가로 검정하여 세포외 효과를 담당하는, 집단 내의 세포 또는 세포들을 확인할 수 있다.

[0074] 본원에서 분석될 수 있는 세포 집단을 특정 유형의 것으로 한정되지 않는다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 마이크로 반응기에서 개별 세포 집단으로 분할된 세포의 출발 집단은 항원으로 면역화된, 또는 항원에 노출된 동물로부터 단리된 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포의 출발 집단은 항원으로 면역화된, 또는 항원에 노출된 인간으로부터 단리된 B-세포이다. 세포의 출발 집단의 공급원은 항원으로 면역화된, 또는 항원에 노출된 동물로부터의 전혈일 수 있다.

[0075] 본원에서 사용되는 바, "효과기 세포"란 세포외 효과를 발휘할 수 있는 능력을 가진 세포를 의미한다. 세포외 효과는 하기에서 상세하게 기술되는 바와 같이, 판독 입자에 대한 직접 또는 간접적인 효과를 이다. 세포외 효과는 효과기 세포, 또는 효과기 세포에 의해 분비되는 분자, 예를 들어 신호전달 분자, 대사산물, 항체, 신경전달 물질, 호르몬, 효소, 사이토카인에 기인한다. 한 실시양태에서, 효과기 세포는 단백질 (예컨대, T 세포 수용체)을 분비하거나, 보이는 세포이다. 본원에 기술된 실시양태에서, 세포외 효과는 판독 입자, 예컨대, 판독 세포 또는 판독 비드, 또는 판독 입자 집단 또는 서브집단을 사용함으로써 특징화된다. 예를 들어, 본원에 기술된 한 실시양태에서, 세포외 효과는 판독 세포 또는 판독 비드에 존재하는 세포 표면 수용체, 이온 채널 또는 ATP 결합 카세트 (ABC) 수송체의 효능 작용 또는 길항 작용이다. 한 실시양태에서, 효과기 세포는 항체 분비 세포 (ASC)이다. 본원에서 사용되는 바, ASC란 항체를 생산학, 분비하는 임의 세포를 의미한다. 형질 세포 (이는 또한 "형질 B 세포," "형질구" 및 "효과기 B 세포"로도 지칭된다)는 최종적으로 분화된 것이고, ASC의 한 유형이다. 본 발명의 목적을 위해 "효과기 세포"로서의 자격이 있는 다른 ASC로는 형질아세포, 기억 B 세포의 확장을 통해 생성된 세포, 재조합 단일클론 항체를 발현하는 세포주, 하이브리도마 세포주를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 효과기 세포는 단백질을 분비하는 세포이다. 효과기 세포로서의 자격이 있는 다른 세포 유형으로는 T 세포 (예컨대, CD8+ T 세포, 및 CD4+ T 세포), 조혈 세포, 인간 및 동물로부터 유래된 세포주, 재조합 세포주, 예컨대, 항체를 생산하도록 조작된 재조합 세포주, T 세포 수용체를 발현하도록 조작된 재조합 세포주

를 포함한다.

[0076] 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 개별 세포 집단을 각 세포 집단이 세포외 효과를 보이거나, 또 다른 개별 세포 집단 또는 그의 복수 개의 것과 비교하여 세포외 효과의 변화를 보이는 효과기 세포를 포함하는지 여부를 측정하기 위해 검정한다. 상기 언급한 바와 같이, 세포 집단을 한 장치에서 동시에 검정할 때, 모든 세포 집단이 효과기 세포를 포함하지는 않을 것이며, 본원에 기술된 방법을 통해 하나 이상의 효과기 세포를 함유하는 세포 집단을 확인할 수 있다. 추가로, 효과기 세포를 포함하는 세포 집단이 다중 효과기 세포를 포함할 필요는 없거나, 또는 단지 효과기 세포만으로 이루어진 집단일 수도 있다. 오히려, 본원에 기술된 실시양태에서는 비-효과기 세포가 집단에 포함된다. 비-효과기 세포가 집단의 다수 또는 소수가 될 수 있다. 효과기 세포를 포함하는 이질성 집단이 다중 효과기 세포를 포함할 필요는 없다. 오히려, 이질성 세포 집단은, 2개의 세포가 서로 이질성인 한, 이질성이다. 세포 집단은 0개의 효과기 세포, 1개의 효과기 세포, 또는 복수 개의 효과기 세포를 포함할 수 있다. 유사하게, 세포 서브집단은 0개의 효과기 세포, 1개의 효과기 세포, 또는 복수 개의 효과기 세포를 포함할 수 있다.

[0077] 한 실시양태에서, 세포외 효과는 항원과의 결합 상호작용, 또는 기능성 효과이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 세포외 효과는 효능 작용 또는 세포 표면 수용체의 길항작용, 효능 작용 또는 이온 채널의 길항작용 또는 효능 작용 또는 ABC 수송체의 길항작용, 아포프토시스 조절, 세포 증식 조절, 판독 입자의 형태학적 외관 변화, 판독 입자 내의 단백질의 위치 변화, 판독 입자에 의해 단백질 발현, 보조 입자의 생물학적 활성의 중화, 효과기 세포에 의해 유도되는 판독 세포의 세포 용해, 효과기 세포에 의해 유도되는 판독 세포의 세포 아포프토시스, 판독 세포의 세포 괴사, 판독 세포에 의한 항체의 내재화, 판독 세포에 의한 보조 입자의 내재화, 효과기 세포에 의한 효소 중화, 가용성 신호전달 분자의 중화, 또는 그의 조합이다.

[0078] 관심의 대상이 되는 표적 (예컨대, 항원)에 결합하는 생체분자 (예컨대, 항체)를 분비하는 효과기 세포의 존재 및 확인은 관심의 대상이 되는 표적에 비특이적인 항체를 분비하는 복수 개의 효과기 세포를 포함하는 이질성 세포 집단 중에 효과기 세포가 존재하는 실시양태에서 쉽게 확인된다. 한 실시양태에서, 이는 먼저 챔버에서 항체를 포획하도록 관능화된 (예를 들어, 단백질 G 또는 단백질 A로 관능화된) 판독 입자(들) (예컨대, 비드) 상에 분비된 항체 집단 모두 또는 실질적으로 모두 포획시키고, 형광 표지화된 항원을 챔버 내로 첨가하고, 입자(들)를 영상화하여 고정화된 항체(들)에의 항원의 결합에 기인하는 형광 증가의 존재 또는 부재를 검출함으로써 개별 미세유동 챔버에서 달성된다. 신뢰가능한 검출을 위해 필요한, 비드 상에 포획되는 항체 최소 개수의 추정치는 단일 세포로부터의 항체 분지를 측정하는 실험을 수행함으로써 수득할 수 있다. 한 실시양태에서, 대략 500개의 세포로 이루어진 이질성 집단 중 단일 ASC로부터 분비되는 항원 특이 항체를 검출할 수 있다. 본 발명의 경우에서, 개별 미세유동 챔버에 존재하는 세포 집단은 약 2 내지 약 500개의 세포, 예를 들어, 약 2 내지 약 250개의 ASC를 포함한다. 상기 언급한 바와 같이, 세포 집단은 효과기 세포 이외의 세포를 함유할 수 있지만, 모든 세포 집단이 효과기 세포를 함유하는 것은 아니다. 이는 특히 종래 농축 프로토콜 (예컨대, FACS)이 같은 실질적으로 순수한 세포 유형으로 이루어진 세포 집단을 수득하기 위해 사용될 수 없는 경우에 실제로 그러하다.

[0079] 이질성 세포 집단과 관련하여, 세포 모두가 서로에 대하여 이질성인 것은 아니되, 단, 서로에 대하여 이질성인 2개 이상의 세포, 예를 들어, 효과기 세포 및 비-효과기 세포가 집단에 존재한다. 이질성 세포 집단은 단지 2개 정도의 세포로도 구성될 수 있다. 세포 집단 또는 세포 서브집단은 단일 세포로 구성될 수 있다. 원칙적으로, 이질성 세포 집단은 본원에서 제공하는 세포외 효과 검정법 중 하나와 같이, 세포외 효과 검정법을 위해 요구되는 지속 기간 동안 생존가능한 상태로 유지될 수 있는 임의 개수의 세포를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 챔버 1개당 1개의 세포 내지 약 500개의 세포이다. 한 실시양태에서, 개별 세포 또는 판독 입자의 영상화가 요구되는 경우, 집단 중 세포의 개수는 챔버 바닥을 커버하는 데에는 불충분하도록 선택되고, 이로써, 영상화되는 세포는 단일층으로 배열되도록 한다. 별법으로, 세포 집단는 챔버 표면을 커버하는 이중층을 형성하기에는 불충분한 개수의 세포를 포함한다.

[0080] 일부 실시양태에서, 보다 큰 세포 집단은 단일 효과기 세포 또는 특정 집단 내의 소수의 효과기 세포로부터 생성되는 효과 검출을 억제시키지 않으면서, 단일 미세유동 챔버 또는 마이크로 반응기 내의 집단에 존재할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 900개, 또는 약 10 내지 약 900개, 또는 약 100 내지 약 900개이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 800개, 또는 약 10 내지 약 800개, 또는 약 100 내지 약 800개이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 700개, 또는 약 10 내지 약 700개, 또는 약 100 내지 약 700개이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 600개, 또는 약 10 내지 약 600개, 또는 약 100 내지 약 600개이다. 또 다른 실시

양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 500개, 또는 약 10 내지 약 500개, 또는 약 100 내지 약 500개이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 400, 또는 약 10 내지 약 400개, 또는 약 100 내지 약 400개이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 300개, 또는 약 10 내지 약 300개, 또는 약 100 내지 약 300개이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 200개, 또는 약 10 내지 약 200개, 또는 약 100 내지 약 200개이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 100개, 또는 약 10 내지 약 100개, 또는 약 50 내지 약 100개이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 90개, 또는 약 10 내지 약 90개, 또는 약 50 내지 약 900이다. 추가의 또 다른 실시양태, 세포 집단 중 세포의 개수는 2 내지 약 80개, 또는 10 내지 약 80개, 또는 2 내지 약 70개, 또는 약 10 내지 약 70개, 또는 약 2 내지 약 60개, 또는 약 10 내지 약 60개, 또는 약 2 내지 약 50개, 또는 약 10 내지 약 50개, 또는 약 2 내지 약 40개, 또는 약 10 내지 약 40개, 또는 2 내지 약 30개, 또는 약 10 내지 약 20개, 또는 2 내지 약 10개이다. 일부 실시양태에서, 세포 집단 중 세포 대다수는 효과기 세포이다.

[0081] 본 발명의 한 측면에서, 본원에서 제공하는 방법에 의해 분석되는 세포 또는 세포 집단으로는 하나 이상의 효과기 세포, 예컨대, 항체 분비 세포 (ASC) 또는 복수 개의 ASC를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 수천 개의 미세유동 챔버 중의 복수 개의 세포 집단으로 분리되고, (즉, 단일 미세유동 챔버 내의) 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 개별 세포 집단은 세포외 효과에 대해 검정된다. 하나 이상의 집단 내의 효과기 세포가 세포외 효과 또는 세포외 효과의 변화를 보인다면, 하나 이상의 개별 세포 집단은 확인되고, 회수된다. 세포외 효과는 사용자에 의해 측정되고, 한 실시양태에서, 세포외 효과는 항원, 세포 표면 수용체, ABC 수송체 또는 이온 채널과의 결합 상호작용이다.

[0082] 비록 본원에서 제공하는 방법이 결합 상호작용, 예컨대, 항원 친화성 및 특이성에 기초하여 (단독의 또는 이질성 집단 내의 것인) 단일 효과기 세포를 확인하는 데 사용될 수 있기는 하지만, 본 발명이 그러한 것으로 제한되는 것은 아니다. 오히려, 한 실시양태에서, 세포 집단을 확인하는 것은 직접적인 기능성 검정법을 실행함으로써 수행된다. 따라서, 본 발명의 한 측면은 먼저 "기능성 항체"를 결합 특성, 예컨대, 항원 표적에 대한 친화성 및 선택성에 대해 스크리닝할 필요 없이, "기능성 항체"를 분비하는, 세포 집단 내의 ASC를 직접적으로 발견할 수 있는 방법 및 장치를 포함한다.

[0083] 이러한 맥락에서, 한 측면에서는 본원의 방법에 의해 발견될 수 있는 기능성 항체 및 수용체를 제공한다. 본 측면의 한 실시양태에서, 세포외 효과를 담당하는 효과기 세포의 핵산을 증폭시키고, 서열분석한다. 핵산은 분비된 생체분자 (예컨대, 항체, 또는 그의 단편)를 코딩하는 유전자, 또는 세포 수용체 또는 그의 단편, 예를 들어, T-세포 수용체를 코딩하는 유전자이다. 당업계에 공지되 방법에 의해 항체 또는 그의 단편 또는 세포 수용체 또는 그의 단편을 클로닝하고/거나, 서열분석할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 방법 및 장치에 의해 발견될 수 있는 기능성 항체를 분비하는 ASC는 표적화된 세포 표면 단백질, 예컨대, 이온 채널 수용체, ABC 수송체, G 단백질 커플링된 수용체 (GPCR), 수용체 티로신 키나제 (RTK) 또는 내인성 효소 활성, 예컨대, 내인성 구아닐레이트 시클라제 활성을 가진 수용체에의 결합에 의해 세포 신호전달을 조절하는 것이다.

[0084] 본 발명의 한 측면에서, 하나 또는 복수 개의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단은 마이크로 반응기, 예컨대, 미세유동 챔버에서 챔버에서 수행되는 세포외 효과 검정의 결과에 기초하여 확인된다. 세포외 효과 또는 세포외 효과의 변화가 마이크로 반응기에서 측정될 경우, 세포 집단은 회수되고, 상기 효과를 담당하는 집단 내의 효과기 세포 또는 효과기 세포들를 측정하기 위해 분석된다 (예컨대, 도 2 참조). 효과기 세포가 항체를 분비하는 실시양태에서, ASC 또는 ASC들에 의해 생산되는 항체를 코딩하는 DNA 서열을 이어서 결정할 수 있고, 이어서, 클로닝할 수 있다. 한 실시양태에서, 항체 DNA 서열을 클로닝하고, 세포주에서 발현시켜 추가 입증 및 임상전 시험을 위한 단일클론 항체의 무한증식 공급원을 제공한다.

[0085] 본원에 기술된 바와 같이, 이질성 세포 집단은 전형적으로 개수 범위가 2 내지 약 1,000개, 또는 2 내지 약 500개, 또는 약 2 내지 약 250개, 또는 약 2 내지 약 100개인, 세포 집단을 포함한다. 이질성 세포 집단은 기본적으로 유전자형, 단백질 발현, mRNA 발현 또는 분화 상태가 다른 2개 이상의 세포를 포함하며, 여기서, 세포 중 1 이상의 것은 효과기 세포인 것인 세포를 기술한다. 특히, 한 실시양태에서, 이질성 세포 집단은 상이한 면역글로불린 유전자를 함유 또는 발현하거나, 면역글로불린 유전자로부터 유도된 상이한 유전자를 함유 또는 발현하거나, T 세포 수용체 유전자로부터 유도된 상이한 유전자를 함유 또는 발현하거나, 상이한 면역글로불린 단백질을 분비하거나, 면역글로불린 단백질로부터 유도된 상이한 단백질을 분비하거나, 상이한 단백질을 분비하거나, 또는 T 세포 수용체 단백질로부터 유도된 상이한 단백질을 발현하는 2개 이상의 효과기 세포 (예컨

대, 약 내지 약 250개의 세포)를 포함한다.

[0086] 한 실시양태에서, 세포 집단은 표적 에피토프에 결합할 수 있는 분자의 라이브러리를 발현하도록 유전적으로 조작된 세포, 관심의 대상이 되는 cDNA 라이브러리로부터 유도된 유전자 또는 유전자 단편을 발현하도록 유전적으로 조작된 세포, 다양한 생물학적 기능에 대한 리포터로 유전적으로 조작된 세포, 무한증식된 세포주 또는 일차 공급원으로부터 유도된 세포로 이루어진 집단을 포함한다. 특히, 한 실시양태에서, 단일 세포로부터 기원하는 클론은 예를 들어, 유전자 침묵화, 분화, 유전자 발현 변경, 형태 변화 등에 기인하여 서로에 대해 이질성을 띤다. 추가로, 무한증식된 세포주 또는 일차 공급원으로부터 유도된 세포는 단일 세포의 동일한 클론이 아니며, 서로에 대해 이질성인 것으로 간주된다. 오히려, 세포의 클론 집단은 단일 세포로부터 기원하는 것이거나, 유전적으로 변화되지 않았거나, RNA가 형질도입되지 않았거나, DNA가 형질도입되지 않았거나, 바이러스로 감염되지 않았거나, 분화되지 않았거나, 또는 다르게는 유의적인 기능적 또는 분자적 방식으로 세포를 다른 세포가 되도록 조작되지 않은 것이다. 단일 세포로부터 유래된 세포이지만, 천연적으로 체성 과돌연변이가 이루어지거나, 또는 (예컨대, 활성화 유도 시티딘 데아미나제의 발현 유도 등에 의해) 체성 과돌연변이가 이루어지도록 조작된 것인 세포는 클론으로 간주되지 않고, 따라서, 이들 세포는 함께 존재할 때 이질성 세포 집단인 것으로 간주된다.

[0087] 전역에 걸쳐 제공하는 바와 같이, 한 측면에서, 예컨대, 원하는 특성을 가지는 생체분자의 분비와 같은 1 이상의 세포외 효과가 있는 효과기 세포를 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단 상에 포함하는 세포 집단 중 하나 이상의 것을 확인하기 위해, 각각은 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 것인 복수 개의 개별 세포 집단을 검정하기 위하 방법 및 장치를 제공한다. 한 실시양태에서, 일단 세포 집단(들)을 확인하고 나면, 선택적으로 회수하여 회수된 세포 집단을 수득한다. 한 실시양태에서, 다중 세포 집단이 확인되는 경우, 이를 회수하고, 풀링하여 회수된 세포 집단을 수득한다. 회수된 세포 집단은 장치에 원래 적재된 출발 세포 집단과 비교하여, 후자의 것과 비교하여 전자의 것이 더 큰 비율로 효과기 세포를 가진다는 점에서 효과기 세포에 대해 농축된 것이다.

[0088] 회수된 세포 집단의 서브집단을 판독 입자 집단에 미치는 제2 세포외 효과의 존재에 대해 검정하며, 여기서, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단은 제2 세포외 효과를 판독한다. 세포외 효과는 확인된 세포 집단에서 검정된 것과 동일한 효과이거나, 또는 상이한 세포외 효과일 수 있다. 추가의 실시양태에서, 확인된 집단의 서브집단은 각각 약 1 내지 약 10개의 세포를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 확인된 집단의 서브집단은 각각 평균적으로 1개의 세포를 포함한다. 이어서, 세포외 효과를 보이는 서브집단 중 하나 이상의 것을 확인하고, 회수하여 회수된 서브집단을 수득하며, 이는 한 실시양태에서, 효과기 세포에 대해 농축된 것이다. 한 실시양태에서, 다중 세포 집단이 확인되는 경우, 이를 회수하고, 풀링하여 회수된 세포 서브집단을 수득한다. 이어서, 회수된 세포 서브집단으로부터의 유전 정보를 분리시키고/거나, 증폭시키고/거나, 서열분석할 수 있다.

[0089] 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 검정될 수 있는 효과기 세포 또는 세포 집단 유형에 의해 한정되지 않는다. 본 발명과 함께 사용하기 위한 효과기 세포 유형의 예는 상기 제공되어 있으며, 임의 종 (예컨대, 인간, 마우스, 토끼 등)으로부터의 일차 항체 분비 세포, 일차 기억 세포 (예컨대, 이는 세포 표면 상에 제시된 IgG, IgM, IgD 또는 다른 면역글로불린을 검정할 수 있거나, 형질 세포로 확장/분화될 수 있다), T-세포, 선별 후, 융합 직후의 하이브리도마 융합물, 하나 이상의 단일클론 항체 (mAb)의 라이브러리로 (안정적으로 또는 일시적으로) 형질감염된 세포주 (예컨대, fab 영역 중 돌연변이체의 라이브러리를 사용하는 확인된 mAb의 친화성 성숙화를 위해, 또는 Fc 영역 중에 돌연변이를 포함하는 확인된 mAb를 사용하는 효과기 기능 최적화를 위해, 또는 인간/동물/라이브러로부터 수득된 증폭된 중쇄 (HC)/경쇄 (LC) 가변 영역으로부터의 HC 및 LC 조합으로 형질감염된 세포주를 위해, 또는 (시너지 효과 등에 대해 특징이 규명되거나, 또는 특징이 규명되지 않은) mAb를 발현하는 세포의 조합을 위해)를 포함한다.

[0090] 형질 세포 (이는 또한 "형질 B 세포," "형질구" 및 "효과기 B 세포"로도 지칭된다)는 최종적으로 분화된 것이며, 본 발명의 장치 및 방법으로 검정될 수 있는 효과기 세포 (ASC)의 한 유형이다. 본 발명의 목적을 위해 "효과기 세포"로서 정량화되는 다른 ASC로는 형질아세포, 기억 B 세포의 확장을 통해 생성된 세포, 재조합 단일클론 항체를 발현하는 세포주, 사이토카인을 분비하는 일차 조혈 세포, T 세포 (예컨대, CD4+ 및 CD8+ T-세포), 그의 표면 상에 단백질 또는 펩티드를 제시하는 수지상 세포, 단백질을 분비하는 재조합 세포주, 하이브리도마 세포주, 항체를 생산하도록 조작된 재조합 세포, T 세포 수용체를 발현하도록 조작된 재조합 세포를 포함한다.

[0091] 본 발명과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 공급원에 의해 한정되지 않으며, 오히려, 인간 또는 다른 포유동물

을 비롯한, 임의의 동물로부터, 또는 별법으로, 시험관내 조직 배양물로부터 유래될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 세포는 직접 분석될 수 있고, 예를 들어, 공급원으로부터의 수거 직후에, 또는 원하는 특성 (예컨대, 특이 항원에 결합하는 항체 분비)을 가지는 집단의 농축 이후에 당업계에 공지된 다양한 프로토콜, 예컨대, 유세포 분석법을 사용함으로써 분석될 수 있다. 한 실시양태에서, 동물 공급원으로부터 수거하기 전, 동물은 1회 이상 면역화된다. 한 실시양태에서, 유세포 분석법은 본원에서 제공하는 장치 중 하나에 적재하기 이전에 효과기 세포에 대해 농축시키는 데 사용되고, 유세포 분석법은 형광 활성화 세포 분류 (FACS)이다. 효과기 세포, 예컨대, ASC에 대해 농축되고, 개별 미세유동 챔버 중에 개별 세포 집단으로서 보유되는 출발 세포 집단이 사용되는 경우, 개별 세포 집단은 완전하게 효과기 세포로 구성될 필요는 없다. 오히려, 다른 세포 유형이 대다수로서 또는 소수로 존재할 수 있다. 추가로, 개별 세포 집단 중 하나 이상의 것은 0개의 효과기 세포를 함유할 수 있다.

[0092] 동물로부터 유래된 ASC를 농축시키는 수개의 방법이 당업자에게 공지되어 있으며, 이는 본원에서 제공하는 방법 및 장치에 의해 분석을 위한 출발 세포 집단을 농축시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, FACS는 표면 마커 $CD19^{+}CD20^{저}CD27^{고}CD38^{고}$를 사용하여 인간 ASC에 대해 농축시키는 데 사용된다 (문헌 [Smith et al. (2009). *Nature Protocols* 4, pp. 372-384] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). 또 다른 실시양태에서, 세포 집단은 표면 마커를 보이는 세포의 자기 면역포획 기반 양성 또는 음성 선별에 의해 농축된다. 또 다른 실시양태에서, 플라크 검정법 (문헌 [Jerne et al. (1963). *Science* 140, p. 405] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)), ELISPOT 검정법 (문헌 [Czerkinsky et al. (1983). *J. Immunol. Methods* 65, pp. 109-121] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다), 소적 검정법 (문헌 [Powel et al. (1990). Bio/Technology 8, pp. 333-337] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)), 세포 표면 형광성 결합된 면역흡착 검정법 (문헌 [Yoshimoto et al. (2013), *Scientific Re포트,* 3, 1191] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)) 또는 세포 표면 친화성 매트릭스 검정법 (문헌 [Manz et al. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, pp. 1921-1925] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다))이 본원에서 제공하는 방법 중 하나를 수행하기 이전에, 또는 본원에서 제공하는 장치 중 하나에 출발 세포 집단을 적재하기 이전에 ASC에 대해 농축시키는 데 사용된다.

[0093] 다양한 실시양태에서, 세포 집단 내의 2개 이상의 효과기 세포는 세포 생성물, 예컨대, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단에 대해 직접 또는 간접적으로 영향을 미치는 항체를 생산하고, 분비한다. 본원에서 제공하는 장치와 관련하여, 장치 상의 모든 챔버가 반드시 세포 집단 및/또는 판독 입자 집단을 포함하여야 하는 것은 아니며, 예컨대, 중공 챔버 또는 부분 충전형 챔버도 존재할 수 있다는 것에 주의한다. 추가로, 전역에 걸쳐 제공하는 바와 같이, 개별 챔버 내의 것은 단지 세포 집단 내의 세포의 서브세트만이, 또는 집단 내에 항체를 생산하고, 분비하는 개별 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 미세유동 챔버 중 세포 집단은 효과기 세포를 포함하지 않는다. 상기 챔버는 각 세포 집단에 대해 1회 이상의 세포외 효과 검정법을 수행함으로써 확인될 수 있다.

[0094] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 보조 입자를 가지는 것이 바람직할 수 있고, 이는 세포 집단 중 하나 이상의 세포의 생존능 및/또는 기능을 지지하기 위해, 또는 세포외 효과 검정을 실행하기 위해 마이크로 반응기, 예컨대, 미세유동 챔버 중에 존재하는 하나 이상의 보조 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 보조 세포, 또는 복수 개의 보조 세포는 섬유아세포 세포, 자연살해 (NK) 세포, 살해 T 세포, 항원 제시 세포, 수지상 세포, 재조합 세포, 또는 그의 조합을 포함한다.

[0095] 한 실시양태에서, 보조 입자 또는 세포, 또는 상기를 포함하는 집단은 세포 집단과 함께 마이크로 반응기, 예컨대, 미세유동 챔버로 전달된다. 다시 말해, 한 실시양태에서, 보조 세포는 미세유동 챔버로 전달되는 세포 집단의 일부이다. 별법으로 또는 추가로, 보조 입자(들) 또는 보조 세포(들)는 효과기 세포 또는 복수 개의 효과기 세포를 포함하는 이질성 세포 집단을 마이크로 반응기 또는 복수 개의 마이크로 반응기 (예컨대, 미세유동 챔버 또는 복수 개의 미세유동 챔버)에 적재하기 이전, 또는 그 이후에 챔버로 전달된다.

[0096] 본원에서 언급하는 바, "보조 입자"란, (i) 효과기 세포의 생존능 및/또는 기능을 지지하거나, (ii) 세포외 효과를 촉진시키거나, (iii) 세포외 효과의 측정을 용이하게 하거나, 또는 (iv) 효과기 세포의 세포외 효과의 검출을 위한 단백질, 단백질 단편, 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는 임의의 입자를 의미한다.

[0097] 보조 입자로는 단백질, 펩티드, 성장 인자, 사이토카인, 신경 전달 물질, 지질, 인지질, 탄수화물, 대사산물, 신호전달 분자, 아미노산, 모노아민, 당단백질, 호르몬, 바이러스 입자 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 보조 입자로는 스핑고신-1-포스페이트, 리소포스파티드산 또는 그

의 조합을 포함한다.

[0098] 한 실시양태에서, 보조 세포의 일례로서, 집단 내의 효과기 세포(들) (예컨대, ASC(들))의 생존능을 증진시키기 위해 (항체를 분비하지 않는) 섬유아세포 세포 집단이 효과기 세포 (예컨대, ASC)에 대해 농축된 세포 집단 내에 포함된다. 또 다른 실시양태에서, NK 세포 집단은, NK 세포가 표적 세포를 그의 표면 상의 항체 결합시 공격하고, 용해시키게 되는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 검정법을 실행하도록 보조 입자로서 첨가될 수 있다. 하나 이상의 세포 집단에서 기능성 세포 검정법이 수행되는 실시양태에서, 하나 이상의 세포 집단 내의 효과기 세포(들)는 미세유동 장치의 챔버 내에 있는 장기간 동안에 생존가능한 상태 그대로 유지되어야 한다는 것을 이해할 것이다. 이를 위해, 한 실시양태에서, 보조 입자 및/또는 보조 세포는 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단의 생존능을 유지시키기 위해 사용된다. 하기 설명되는 바와 같이, 보조 입자, 예컨대, 보조 세포는 또한 단일 판독 세포일 수도 있는, 판독 세포 집단 또는 그의 서브집단의 생존능을 유지시키거나, 또는 증진시키기 위해 사용될 수 있다.

[0099] 본원에 기술된 실시양태의 한 이점은 단일 마이크로 반응기 (예컨대, 미세유동 챔버) 내에서 1 초과의 효과기 세포를 분석함으로써 및/또는 다른 세포의 존재하에서 단일의 또는 수개의 효과기 세포를 분석함으로써 훨씬 더 큰 처리량으로 검정할 수 있고, 이로써, 다르게는 너무 희귀하기 때문에 효율적으로 검출할 수 없는 원하는 효과기 세포를 확인 및 선별할 수 있다는 점이다. 이는 원하는 세포 유형에 대해 농축시키는 방법이 제한되어 있는 경우, 또는 그러한 농축이 예컨대, 검정되는 세포의 생존능을 감소시키는 것과 같은 유해한 영향을 미치는 경우와 같이 많은 경우에서 이롭다. 구축된 본 발명의 한 실시양태는 3,500개의 세포 분석 챔버 어레이를 특징으로 한다. 상기 장치가 챔버당 평균 30개의 세포를 이용하여 작동할 때, 검정의 총 처리량은 1회 실험당 105,000개의 세포이다. 이러한 처리량은 예를 들어, 전체 세포 집단 중 1% 미만으로 존재하는 수십 또는 수백개의 효과기 세포를 선별하는 데 사용될 수 있다.

[0100] 예를 들어, 항체 분비 세포는 표면 마커에 기초하여 농축시킬 필요 없이 확인 및 분리될 수 있다. 면역화 이후에 말초 단핵구 혈액 세포 (PBMC)로부터 분리된 B 세포에서, ASC의 빈도는 0.01% 내지 1%일 수 있다. 장치 1회 작동당 105,000개의 세포인 처리량으로, 추가 정제 없이 수백 갱의 ASC를 직접 선별할 수 있다. ASC의 FACS 정제는 세포 생존능을 감소시킬 수 있는 바, 이는 특히 중요하다. 이는 또한 ASC의 농축을 위해 적절한 시약은 관심의 대상이 되는 숙주 종에 대해 이용가능하지 않을 수도 있다는 이유에서도 중요하다. 사실상, 면역화 후, 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC) 중 항체 분비 세포의 빈도는 0.01 내지 1%일 수 있고, 따라서, 본원에서 제공하는 미세유동 어레이, 예를 들어, 챔버 1개당 세포 30개인 평균 밀도로 적재된 3,500개의 챔버로 이루어진 미세유동 어레이를 사용함으로써 검출가능하다. 따라서, 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)의 분리는 특이적인 포획 시약 없이 임의의 종에 대하여 수행될 수 있는 바, 본 방법 중 일부는 임의의 종으로부터 관심의 대상이 되는 항체를 분비하는 세포를 신속하게 경제적으로 선별할 수 있다.

[0101] 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 방법 및 장치에 의해 인간에서는 ASC를 기저 수준으로부터 확인할 수 있다. 동물을 면역화시킴으로써 대부분의 항원에 대하여 새로운 항체를 생성할 수 있지만, 인간에서는 승인받은 백신을 제외하면 같은 방법이 널리 수행될 수 없다. 그러나, 천연적으로 항원에 노출되었거나, 또는 그의 생명 존속 기간 중 어느 시점에 백신화된 인간은 전형적으로 항원에 대하여 낮은 기저 수준의 항체-분비 세포를 가진다. 본 발명은 다수의 세포로부터 (예컨대, 장치 1회 작동당 100,000개 초과) 극도로 희귀한, 특이 항체를 분비하는 효과기 세포를 확인하고 분리시키는 데 사용될 수 있다. 상기 방법은 예컨대, 자가항체가 존재할 수 있는 암 및 자가면역 질환에 대한 치료제로서의 기능성 항체를 개발하기 위해 본원에서 사용된다.

[0102] 본원 전역에 걸쳐 제공하는 바, 본 발명은 부분적으로 단일 미세유동 챔버에서 대량의 동시 양식으로 수행되는 세포외 효과에 관한 것이다. 검정법은 세포 집단에 존재하는 효과기 세포 또는 복수 개의 그들에 의해 발휘되는 세포외 효과를 측정하고 검출하기 위해 수행된다. 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단은 세포외 효과를 판독한다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법을 통해, 세포외 효과를 발휘하지 않는 최대 약 250개의 세포로 이루어진 배경하에서 예컨대, 원하는 항원에 특이적인 항체 분비와 같은 세포외 효과를 발휘하는 효과기 세포를 함유하는 이질성 세포 집단을 확인할 수 있다.

[0103] 본원에서 사용되는 바, "판독 입자"라는 용어는 기능성 또는 특성을 기록하거나, 또는 검정에서 효과기 세포, 또는 효과기 세포의 생성물, 예컨대, 항체의 세포외 효과 (예컨대, 기능성 또는 특성)를 측정하는 데 사용되는 임의의 입자를 의미하며, 이는 비드 또는 세포, 예컨대, 관능화된 비드 또는 세포를 포함한다. 본원에 기술된 바와 같이, "판독 입자"는 단일 미세유동 챔버 내의 단일 판독 입자 로서, 동질성 또는 이질성인 판독 입자 집단 내에 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 판독 입자는 효과기 세포에 의해 분비되는 하나 이상의 생체분자

(예컨대, 하나 이상의 항체), 또는 용해시 효과기 또는 보조 세포에 의해 유리되는 하나 이상의 생체분자에 결합하도록 관능화되 비드이다. 단일 판독 입자는 하나 이상의 상이한 유형의 생체분자, 예를 들어, 단백질 및/또는 핵산, 또는 하나 이상의 상이한 단일클론 항체를 포획하도록 관능화될 수 있다. 한 실시양태에서, 판독 입자는 항체를 생산 및/또는 분비하는 효과기 세포에 의해 생산되는 항체에 결합할 수 있는 비드 또는 세포이다. 일부 실시양태에서, 효과기 세포는, 예컨대, 집단 내의 한 효과기 세포의 분비 생성물이 효과기 세포의 더 크거나, 또는 상이한 서브집단에 대해 영향을 미치는 경우, 또는 별법으로, 한 효과기 세포의 분비 생성물이 포획물의 판독을 위해 같은 세포 상에서 포획되는 경우의 판독 입자일 수 있다.

[0104] 본원에서 사용되는 바, "판독 세포"는 단일 효과기 세포 또는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 예를 들어, 항체를 분비하는 하나 이상의 효과기 세포의 존재하에서 반응을 나타내는 한 유형의 판독 입자이다. 다양한 실시양태에서, 판독 세포는 분비된 분자에 대해 특이적인 표면 항원 또는 수용체 (예컨대, GPCR 또는 RTK)를 보이는 세포이다. 한 실시양태에서, 분비된 분자의 판독 세포에의 결합이 세포외 효과이다. 판독 세포는 형광 표지화될 수 있고/거나, 결합시 활성화되는 형광성 리포터를 가질 수 있다.

[0105] 상기 기술된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법에 사용되는 세포 집단은 ASC 또는 복수 개의 ASC를 포함하고, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단은 표적 에피토프 또는 복수 개의 표적 에피토프를 나타낸다. 한 실시양태에서, 판독 입자 집단은 특정 에피토프 또는 에피토프들에 의해 항체를 포획하도록 관능화된 비드 집단이다. 별법으로 또는 추가로, 판독 입자 집단은 항체의 Fc 영역에 특이적이며, 따라서, 상이한 에피토프를 가지는 항체들 간의 차이는 구별하지 못한다. 한 실시양태에서, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단은 예를 들어, ELISA 검정법을 수행하기 위해 표적 에피토프를 함유하는 형광에 의해 접합된 분자로 표지화된다. 형광성 기반 항체 및 사이토카인 비드 검정법은 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대, 문헌 [Singhal et al. (2010). Anal. Chem. 82, pp. 8671-8679, Lu분ex® Assays (Life Technologies), BD™ Cytometric Bead Array] (상기의 개시내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)를 참조할 수 있다. 상기 방법은 효과기 세포가 판독 입자에 대하여 세포외 효과를 미치는지 여부를 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0106] 또한, 본원에 기술된 바와 같이, 개별 마이크로 반응기 (예컨대, 미세유동 챔버)는 개별 챔버 내의 시약 교환이 가능하고, 이로써, 챔버 사이의 상호 오염은 제거되거나, 실질적으로 제거되도록 구조화된다. 이를 통해 예를 들어, 항원 및 2차 항체를 교환하여 각각의 결합 복합체를 표지화한 후, 영상화함으로써 단일 챔버에서 다중의 세포외 효과를, 예를 들어, 단일 챔버에서 다중의 항원 결합 효과 및/또는 기능적 효과를 검출할 수 있다. 상기 일련의 검출 실시양태에서, 각 반응은 세척 단계 이후에 일련으로 수행되는 바, 검정법은 같은 형광단을 이용하여 수행될 수 있다. 별법으로, 한 마이크로 반응기 (예컨대, 미세유동 챔버)에서 일련의 방식으로, 또는 동시에 상이한 세포외 효과를 검출하는 데 상이한 형광단이 사용될 수 있다.

[0107] 또 다른 실시양태에서, 판독 입자 집단은 판독 세포 중 적어도 일부가 그의 표면 상에 표적 에피토프를 보이는 판독 세포 집단이다. 한 실시양태에서, 판독 세포 집단, 또는 그의 서브집단은 살아있고, 생존가능한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 판독 세포 집단 또는 그의 서브집단은 고정된 것이다. 상기 논의로부터 이해할 수 있는 바와 같이, 항체 결합이 검정될 경우, "항체 결합"은 효과기 세포 또는 복수 개의 효과기 세포의 세포외 효과인 것으로 간주된다. 항체 결합은 예를 들어, 세포를 하나 이상의 형광 표지화된 2차 항체로 염색함으로써 검출될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 판독 입자 또는 판독 세포 상의 표적 에피토프에 항체가 결합하게 되면, 판독 세포의 사멸, 또는 본원에서 논의되는 바와 같은 일부 다른 판독 세포 반응 (예컨대, 생체분자 분비, 세포 신호 전달 경로의 활성화 또는 억제)이 유발된다.

[0108] 집단내 판독 세포는 예컨대, 특징, 예컨대, 형태, 크기, 표면 부착성, 이동성, 형광성 반응에 의해 구별될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 판독 세포 집단은 판독 세포가 검정법 사용자에 의해 선택된 것과 같은 반응을 보이는지 여부를 측정하기 위해 그의 표면 상에서, 또는 세포내에서 표지화된다. 예를 들어, 세포외 수용체 및 세포내 단백질 및 다른 생체분자를 비롯한 하나 이상의 리포터 세포를 표지화하는 데 칼세인, 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 리포터 (CFSE), GFP/YFP/RFP 리포터가 사용될 수 있다.

[0109] 일부 실시양태에서, 판독 입자 집단은 이질성 판독 입자 집단이고, 이는 이질성 판독 세포 집단일 수 있다. 예를 들어, ASC 또는 복수 개의 ASC가 세포 집단에 존재하는 경우, 집단내 개별 판독 입자는 상이한 표적 에피토프를 보일 수 있거나, 또는 2개의 상이한 세포 수용체 (예컨대, GPCR 또는 RTK 또는 그의 조합)를 보일 수 있다. 따라서, 세포외 효과의 특이성, 예컨대, 표적 에피토프에 대한 항체의 특이성, 또는 특이적인 세포 표면 수용체의 억제를 평가할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 내의 효과기 세포는 ASC이고, 및 판독 입자 집단은 모든 항체 (예컨대, FC 영역 특이)를 비선택적으로 포획하는 이질성 비드 집단, 및 유일한 표적 에피

토프에 대해 특이적인 비드 집단을 포함한다.

[0110] 한 실시양태에서, 보조 입자는 세포외 효과의 측정을 용이하게 하기 위해, 또는 세포외 효과의 판독을 용이하게 하기 위해 제공된다. 전역에 걸쳐 기술되는 바와 같이, 세포외 효과는 효과기 세포 분비 생성물 (예컨대, 항체)에 의해 제시되는 효과를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 자연살해 (NK) 세포는 판독 세포의 용해 측정을 용이하게 하기 위해 보조 입자로서 제공된다. 본 실시양태에서, 세포외 효과로는 효과기 세포에 의해 분비된 항체가 상기 언급된 판독 세포에 결합할 때, 자연살해 (NK) 세포에 의한 특이적인 에피토프 또는 세포 수용체에 결합하는 판독 세포의 용해를 포함한다.

[0111] 일부 실시양태에서, 보조 입자로는 단백질, 단백질 단편, 펩티드, 성장 인자, 사이토카인, 신경 전달 물질 (예컨대, 신경 조절 인자 또는 신경펩티드), 지질, 인지질, 아미노산, 모노아민, 당단백질, 호르몬, 바이러스 입자, 또는 효과기 세포 분비 생성물의 판독 세포에의 결합시 보체 경로를 활성화시키는 데 필요한 인자, 또는 그의 조합을 포함한다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 보조 입자로는 스핑고신-1-포스페이트, 리소포스파티드산 또는 그의 조합이 있다. 항체에 결합하는 판독 세포의 용해를 비롯한, 본원에서 제공하는 장치 및 방법으로 측정가능한 다양한 세포외 효과는 하기에서 상세하게 논의된다.

[0112] 예를 들어, 보조 입자로서 사용될 수 있는 사이토카인으로는 케모카인, 인터페론, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 보조 입자는 판독 세포에 의해 생산된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인은 보조 입자로서 사용되고, 하기 표 1에서 제공하는 사이토카인 중 하나 이상의 것이다. 또 다른 실시양태에서, 하기 사이토카인 중 하나 이상의 것이 보조 입자로서 사용된다: 인터루킨 (IL)-1α, IL-1β, IL-1RA, IL18, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL17, IL-18, IL-19, IL-20, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 백혈병 억제자 인자, 온코스타틴 M, 인터페론 (IFN)-α, IFN-β, IFN-γ, CD154, 림프독소베타 (LTB), 종양 괴사 인자 (TNF)-α, TNF-β, 형질전환 성장 인자 (TGF)-β, 에리트로포이에틴, 거대핵세포 성장 및 발생 인자 (MGDF), Fms-관련 티로신 키나제 3 리간드 (Flt-3L), 줄기 세포 인자, 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1), 대식세포 자극 인자, 4-1BB 리간드, 증식 유도 리간드 (APRIL), 분화 클러스터 70 (CD70), 분화 클러스터 153 (CD153), 분화 클러스터 178 (CD178), 글루코코르티코이드 유도 TNF 수용체 리간드 (GITRL), LIGHT (이는 또한 TNF 리간드 수퍼패밀리 구성원 14, HVEM 리간드, CD258로도 지칭됨), OX40L (이는 또한 CD252로도 지칭되며, CD134에 대한 리간드임), TALL-1, TNF 관련 아폽토시스 유도 리간드(TRAIL), 아폽토시스의 종양 괴사 인자 약한 유도자 (TWEAK), TNF-관련 활성화-유도된 사이토카인 (TRANCE) 또는 그의 조합.

표 1

표 1. 대표적인 사토카인 및 그의 수용체

명칭	동의어(들)	아미노산	염색체	분자량	사토카인 수용체(들)(Da) 및 형태	수용체 위치(들)
인터루킨						
IL-1α	헤마토포이에틴-1	271	2q14	30606	CD121a, CDw121b	2q12, 2q12-q22
IL-1β	이화대사산물	269	2q14	20747	CD121a, CDw121b	2q12,2q12-q22
IL-1RA	IL-1 수용체 길항체	177	2q14.2	20055	CD121a	2q12
IL-18	인터페론-γ유도 인자	193	11q22.2-q22.3	22326	IL-18Rα, β	2q12
공통 g 쇄 (CD132)						
IL-2	T 세포 성장 인자	153	4q26-q27	17628	CD25, 122,132	10p15-p14, 22q13.1, Xq13.1
IL-4	BSF-1	153	5q31.1	17492	CD124,213a13, 132	16p11.2-12.1, X, Xq13.1
IL-7		177	8q12-q13	20186	CD127, 132	5p13, Xq13.1
IL-9	T 세포 성장 인자 P40	144	5q31.1	15909	IL-9R, CD132	Xq28 or Yq12, Xq13.1
IL-13	P600	132	5q31.1	14319	CD213a1, 213a2,	X, Xq13.1-q28,
					CD1243, 132	16p11.2-12.1, Xq13.1
IL-15		162	4q31	18086	IL-15Ra, CD122, 132	10p14-p14, 22q13.1, Xq13.1
공통 b 쇄 (CD131)						
IL-3	다능성 CSF, MCGF	152	5q31.1	17233	CD123, CDw131	Xp22.3 or Yp11.3, 22q13.1
IL-5	BCDF-1	134	5q31.1	15238, 동종이량체	CDw125, 131	3p26-p24, 22q13.1
또한 관련된 것						

[0113]

표 1. 대표적인 사토카인 및 그의 수용체

명칭	동의어(들)	아미노산	염색체	분자량	사토카인 수용체(들)(Da) 및 형태	수용체 위치(들)
GM-CSF	CSF-2	144	5q31.1	16295	CD116, CDw131	Xp22.32 or Yp11.2, 22q13.1
IL-6-유사						
IL-6	IFN-β2, BSF-2	212	7p21	23718	CD126, 130	1q21, 5q11
IL-11	AGIF	199	19q13.3-13.4	21429	IL-11Ra, CD130	9p13, 5q11
또한 관련된 것						
G-CSF	CSF-3	207	17q11.2-q12	21781	CD114	1p35-p34.3
IL-12	NK 세포 자극성 인자	219/328	3p12-p13.2/	24844/37169	CD212	19p13.1, 1p31.2
			5q31.1-q33.1	이종이량체		
LIF	백혈병 억제성 인자	202	22q12.1-q12.2	22008	LIFR, CD130	5p13-p12
OSM	온코스타틴 M	252	22q12.1-q12.2	28484	OSMR, CD130	5p15.2-p12
IL-10-유사						
IL-10	CSIF	178	1q31-q32	20517, 동종이량체	CDw210	11q23
IL-20		176	2q32.2	20437	IL-20Rα, β	?
Others						
IL-14	HMW-BCGF	498	1	54759	IL-14R	?
IL-16	LCF	631	15q24	66694, 동종사량체	CD4	12pter-p12
IL-17	CTLA-8	155	2q31	17504, 동종이량체	CDw217	22q11.1
인터페론						
IFN-α		189	9p22	21781	CD118	21q22.11
IFN-β		187	9p21	22294	CD118	21q22.11
IFN-γ		166	12q14	19348, 동종이량체	CDw119	6q23-q24

[0114]

표 1. 대표적인 사토카인 및 그의 수용체

명칭	동의어(들)	아미노산	염색체	분자량	시토카인 수용체(들)(Da) 및 형태	수용체 위치(들)
TNF						
CD154	CD40L, TRAP	261	Xq26	29273, 동종삼량체	CD40	20q12-q13.2
LT-β		244	6p21.3	25390, 이종삼량체	LTβR	12p13
TNF-α	카켁틴	233	6p21.3	25644, 동종삼량체	CD120a, b	12p13.2, 1p36.3-p36.2
TNF-β	LT-α	205	6p21.3	22297, 이종삼량체	CD120a, b	12p13.2, 1p36.3-p36.2
4-1BBL		254	19p13.3	26624, 삼량체?	CDw137 (4-1BB)	1p36
APRIL	TALL-2	250	17p13.1	27433, 삼량체?	BCMA, TACI	16p13.1, 17p11.2
CD70	CD27L	193	19p13	21146, 삼량체?	CD27	12p13
CD153	CD30L	234	9q33	26017, 삼량체?	CD30	1p36
CD178	FasL	281	1q23	31485, 삼량체?	CD95 (Fas)	10q24.1
GITRL		177	1q23	20307, 삼량체?	GITR	1p36.3
LIGHT		240	16p11.2	26351, 삼량체?	LTbR, HVEM	12p13, 1p36.3-p36.2
OX40L		183	1q25	21050, 삼량체?	OX40	1p36
TALL-1		285	13q32-q34	31222, 삼량체?	BCMA, TACI	16p13.1, 17p11.2
TRAIL	Apo2L	281	3q26	32509, 삼량체?	TRAILR1-4	8p21
TWEAK	Apo3L	249	17p13.3	27216, 삼량체?	Apo3	1p36.2
TRANCE	OPGL	317	13q14	35478, 삼량체?	RANK, OPG	18q22.1, 8q24
TGF-β						
TGF-β1	TGF-β	390	19q13.1	44341, 동종이량체	TGF-βR1	9q22
TGF-β2		414	1q41	47747, 동종이량체	TGF-βR2	3p22

[0115]

표 1. 대표적인 시토카인 및 그의 수용체

명칭	동의어(들)	아미노산	염색체	분자량	시토카인 수용체(들)(Da) 및 형태	수용체 위치(들)
TGF-β3		412	14q24	47328, 동종이량체	TGF-βR3	1p33-p32
기타 헤마토포이에틴 s						
Epo	에리스로포이에틴	193	7q21	21306	EpoR	19p13.3-p13.2
Tpo	MGDF	353	3q26.3-q27	37822	TpoR	1p34
Flt-3L		235	19q13.1	26416	Flt-3	13q12
SCF	줄기 세포 인자, c-kit 리간드	273	12q22	30898, 동종이량체	CD117	4q11-q12
M-CSF	CSF-1	554	1p21-p13	60119, 동종이량체	CD115	5q33-q35
MSP	대식세포 자극 인자, MST-1	711	3p21	80379	CDw136	3p21.3

시토카인, 케모카인 및 그의 수용체로부터 조정. 마담 큐리에 바이오사이언시스 데이터베이스(Madame Curie Bioscience Database). (란데스 바이오사이언시스(Landes Bioscience))

[0116]

[0117] 한 실시양태에서, 보조 입자는 판독 세포의 반응을 자극하는 데 작동가능한 사이토카인, 또는 다른 인자이다. 예를 들어, 판독 세포는 효과기 세포 또는 그의 복수 개의 것과 함께 인큐베이션될 수 있고, 판독 세포에 영향을 미치는 데 작동가능한 사이토카인으로 펄싱될 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 판독 입자에 영향을 미치는 데 작동가능한 사이토카인-분비 세포는 보조 세포로서 챔버에 제공된다. 한 실시양태에서, 효과기 세포 분비 생성물에 의한 분비된 사이토카인의 중화는 사이토카인이 판독 세포에 미치는 예상되는 효과가 없는 것에 의해 검출된다. 또 다른 실시양태에서, 보조 입자가 제공되고, 이는 하나 이상의 판독 세포를 감염시키는 데 작동가능한 바이러스이고, 바이러스 중화는 바이러스에 의한 판독 세포의 감염의 감소로서 검출된다.

[0118] 특히, 및 보조 입자와 관련하여 상기 제공된 논의에 의해 명백화되어야 하는 바와 같이, 본원에서 제공하는 장치 및 방법에 의해 측정가능하고, 검출가능한 세포외 효과는 항체의 표적 에피토프에의 결합으로 한정되지 않는다. 오히려, 한 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같이, 세포외 효과는 기능적 효과이다. 한 실시양태에서, 기능적 효과는 아포프토시스, 세포 증식 조절, 판독 입자의 형태학적 외관상의 변화, 다중 판독 입자의 응집 변화, 판독 입자내 단백질의 국재화 변화, 판독 입자에 의한 단백질 발현, 판독 입자에 의한 단백질 분비, 세포 신호전달 캐스케이드 유발, 효과기 세포에 의해 분비되는 분자의 판독 세포 내재화, 판독 입자에 영향을 미치는

데 작동가능한 보조 입자의 중화이다.

[0119] 일단 세포외 효과가가 세포 집단을 포함하는 마이크로 반응기 (예컨대, 미세유동 챔버)에서 확인되고 나면, 집단을 회수하고, 회수된 세포 집단의 서브집단에 대해 하류 검정법을 수행하여 어느 효과기 세포(들)가 측정된 세포외 효과를 담당하는지를 측정할 수 있다. 한 실시양태에서, 하류 검정법은 미세유동 검정법이다. 추가의 실시양태에서, 하류 검정법은 제1 세포외 효과 검정과 동일한 장치에서 수행된다. 그러나, 또 다른 실시양태에서, 하류 검정법은 상이한 미세유동 장치에서, 또는 비-미세유동 방법을 통해, 예를 들어, 벤치탑 단일 세포 역전사효소 (RT)-PCR 반응을 통해 수행된다. 한 실시양태에서, 확인되고, 회수된 효과기 세포의 항체 유전자 서열을 단리시키고, 클로닝하고, 발현시켜 신규한 기능성 항체를 제공한다.

[0120] 비록 단일 ASC의 기능적 효과도 본원에서 제공하는 방법 및 장치에 의해 측정가능하지만, 친화성, 결합 및 특이성은 또한 효과기 세포의 "효과"로서, 예컨대, 효과기 세포 분비 생성물의 효과로서 측정될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Dierks et al. (2009). *Anal. Biochem.* 386, pp. 30-35] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 의해 제공된 결합 검정법을 본원에서 제공하는 장치에서 사용함으로써 ASC가 특이 표적에 결합하는 항체를 분비하는지 여부를 측정할 수 있다.

[0121] 또 다른 실시양태에서, 세포외 효과는 항원 또는 세포 수용체에 대한 친화성이고, 문헌 [Singhal et al. (2010). *Anal. Chem.* 82, pp. 8671-8679] (상기 문헌은 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다)에 의해 기술된 방법이 세포외 효과를 검정하는 데 사용된다.

[0122] 한 실시양태에서, 다중의 세포외 효과의 동시 분석은 다중 유형의 판독 입자를 사용함으로써 한 마이크로 반응기 (예컨대, 미세유동 챔버)에서 수행된다. 별법으로 또는 추가로, 다중의 기능적 효과의 동시 분석은 2개 이상의 상이한 챔버에서 상이한 판독 입자를 사용함으로써 한 단일 미세유동 장치에서 수행된다.

[0123] 한 실시양태에서, 판독 입자는 가용성 분자로서 존재하거나, 미세유동 챔버 표면에, 또는 챔버의 판독 구역 중 또 다른 물리적 지지체에 테터링되어 있는 효소이다. 한 실시양태에서, 이러한 경우, 판독 입자의 효소 활성을 억제시키는 항체의 결합은 형광성 신호 또는 비색 신호 또는 침전 반응을 비롯한, 효소 활성을 기록하는 신호의 감소에 의해 검출된다.

[0124] 다양한 실시양태에서, 효과기 세포 또는 세포 집단 내의 다중 효과기 세포가 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단에 세포외 효과를 미치는지 여부를 측정하는 것은 세포 집단을 포함하는 미세유동 챔버의 광학 및/또는 형광 현미경법을 포함한다. 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 현미경법에 의한 입자의 영상화를 촉진시키기 위하여 판독 입자 집단을 단일 평면으로 유지시키는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 챔버내 판독 입자 집단은 단일 평면으로 유지되고, 이는 장치 물질, 또는 그의 일부분 (예컨대, 유리 또는 PDMS)를 통해 영상화됨으로써 챔버의 하나, 또는 다수의 고해상도 영상을 생성할 수 있다. 한 실시양태에서, 고해상도 영상은 유사한 광학 장치 (렌즈 및 대물렌즈, 광학 및 대비 기계 장치)가 탑재된 표준 현미경법 포맷을 사용함으로써 달성되는 것과 유사한 영상이다.

[0125] 본 발명의 한 측면에 따라, 세포외 효과의 변화를 보이는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 확인하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 복수 개의 개별 세포 집단을 별도의 마이크로 반응기 (예컨대, 미세유동 챔버) 내에 보유하는 단계로서, 여기서, 개별 세포 집단 중 1개 이상은 하나 이상의 효과기 세포를 포함하고, 별도의 미세유동 챔버의 내용물은 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단을 추가로 포함하는 것인 단계를 포함한다. 마이크로 반응기 내에서 세포 집단 및 판독 입자 집단을 인큐베이션시키고, 세포외 효과의 존재에 대하여 세포 집단을 검정한다. 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단이 세포외 효과를 직접 또는 간접적으로 판독한다. 검정 결과에 기초하여, 복수 개의 세포 집단이 세포외 효과를 보이는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는지 여부를 측정한다.

[0126] 일부 실시양태에서, 개별 세포 집단 및 판독 입자 집단 중 하나 이상은 각각 마이크로 반응기의 "효과기 구역" 및 "판독 구역"에 배치된다. 그러나, 본 발명은 그러한 것으로 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 효과기 구역 및 판독 구역이 사용될 때, 각각은 본질적으로는 그 내부에 배치된 세포 또는 입자의 성질에 의해서 정의된다. 즉, 하나 이상의 효과기 세포는 효과기 구역으로 분리되고, 하나 이상의 판독 입자는 판독 구역으로 분리된다. 효과기 구역은 판독 구역과 유체 소통한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 세포 집단 및 판독 입자가 저밀도로, 예컨대, 챔버 1개당 2개 미만의 효과기 세포 및 판독 입자로 챔버에 제공되는 경우, 판독 입자는 효과기 세포로부터 물리적으로 분리된다. 그러나, 본 발명은 챔버 내에 개별 구역을 이용함으로써 실시될 필요는 없다는 것을 이해할 것이다. 본 명세서에 의해 명백화되어야 하는 바와 같이, 상기와 같은 분리는 본원에 기술

된 세포외 효과 검정법을 수행하는 데 필요한 것은 아니다.

[0127] 세포 집단 및 판독 입자 집단은 (예컨대, 상이한 입구 포트를 통해, 또는 단일 입구 포트를 통해 한 혼합물로) 마이크로 반응기 내로 동시에 적재될 수 있다. 별법으로, 효과기 세포 및 판독 입자는 마이크로 반응기 (예컨대, 미세유동 챔버)에 일련으로 적재된다. 세포 집단은 판독 입자(들)의 챔버에의 적재 이전 (또는 그 이후)에 마이크로 반응기에 제공될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 그러나, 판독 입자 집단 및 세포 집단은 혼합물로서 함께 제공될 수도 있다.

[0128] 본원에 개시된 장치 방법은 예를 들어, 세포외 효과의 변화를 보이는 세포 집단을 복수 개의 것으로부터 확인하기 위해 복수 개의 세포 집단에서 하나 이상의 세포외 효과 검정을 수행하기 위한 강력한 플랫폼을 제공한다. 변화는 세포 집단에 존재하는 하나 이상의 효과기 세포에 기인하는 것일 수 있다. 각 세포 집단은 단일 미세유동 챔버로 한정되고, 장치의 각 챔버에서 수행되는 효과기 세포 검정법은 동일한 것 (예컨대, 모두 세포 독성 검정법, 모두 결합 검정법 등)이거나, 또는 상이한 것 (예컨대, 하나는 결합 검정법, 하나는 아포프토시스 검정법)일 수 있다. 예를 들어, 효과기 세포 검정법을 수행하기 위한 상이한 판독 입자 및 시약을 포함하는, 장치 상의 특이 챔버의 주소 지정 능력을 통해 분석 방법은 다양화될 수 있다.

[0129] 본원에 기술된 미세유동 장치는 복수 개의 챔버를 포함하고, 복수 개의 것은 세포 집단내 임의의 효과기 세포(들)가 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단에 대하여 세포외 효과를 보이는지 여부를 측정하기 위해 세포 집단 및 판독 입자 집단의 하우징을 위한 수용능을 가진다. 판독 입자 집단은 단일 판독 입자로 구성될 수 있다. 하기 제공하는 바와 같이, 본원에서 제공하는 장치는 한 장치 상에서 복수 개의 세포 집단을 검정할 수 있도록, 예를 들어, 세포외 효과의 변화를 보이는 하나 이상의 세포 집단을 확인하기 위해 수백 내지 수천 개의 세포 집단을 한 장치에서 검정하는 것와 같이 디자인되고, 가공된다. 세포 집단 중 적어도 일부는 서로에 대하여 이질성이다. 예를 들어, 변화는 복수 개의 다른 집단에 의해 나타나는 세포외 효과와 비교하여 나타나는 변화이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 복수 개의 세포 집단으로부터 세포 집단(들)을 확인하는 방법을 제공하는 데, 여기서, 선택된 집단(들)은 남은 세포 집단과 비교하여 세포외 효과의 변화를 보이는 것이다. 세포외 효과의 변화는 예를 들어, 남은 복수 개의 것 또는 그의 서브복수 개의 것과 비교하여 챔버 중 하나의 형광 강도의 차이에 의해 검출가능하다.

[0130] 본 발명의 한 측면에 따라, 세포외 효과는 효과기 세포(들)로부터 분비된 하나 이상의 가용성 인자의 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단에의 결합에 의해 유도되는 것인, 세포외 효과의 변화를 보이는 세포 집단을 복수 개의 세포 집단으로부터 확인하는 방법을 제공한다. 판독 입자 집단은 동질성 또는 이질성 집단일 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 방법은 개별 판독 입자 집단을 미세유동 장치의 상이한 챔버 내에 보유하는 단계를 포함한다. 분석되는 판독 입자의 개수는 달라질 수 있고, 이는 상기 개요된 바와 같이 세포 집단에 대한 것과 유사한 고려 사항에 따라 결정될 것이다.

[0131] 개별 판독 입자 집단 및 세포 집단은 본원에서 제공하는 미세유동 장치 중 하나의 단일 챔버에 보유된다. 임의적으로, 챔버는 예를 들어, 챔버 사이의 오염을 최소화시키기 위해 개별 세포 집단 및 판독 입자 집단을 또한 포함하는 미세유동 장치의 다른 챔버로부터 실질적으로 분리되어 있다. 그러나, 본원에서 제공하는 방법을 실시하는 데 있어 반드시 분리가 필요한 것은 아니다. 한 실시양태에서, 분리가 바람직할 경우, 분리는 유체식 분리를 포함하고, 챔버의 유체식 분리는 그를 물리적으로 실링함으로써, 예컨대, 챔버 주변에 밸브를 사용함으로써 달성된다. 그러나, 또 다른 실시양태에서, 분리는 챔버의 물리적 실링 없이, 미세유동 장치의 한 챔버와 또 다른 챔버 사이의 오염을 방해하기 위해 챔버 사이의 유체 소통을 제한함으로써 달성된다.

[0132] 일단 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 및 판독 입자 집단을 각각 포함하는 챔버 또는 복수 개의 챔버를 분리시키고 나면, 챔버 또는 챔버들, 및 구체적으로, 챔버 (또는 챔버들)와 함께 세포 집단을 인큐베이션시킨다. 초기 인큐베이션 단계는 판독 입자 첨가 이전, 및/또는 판독 입자를 세포 집단을 포함하는 챔버에 첨가한 이후에 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0133] 예를 들어, 인큐베이션 단계는 세포 집단을 건강한 상태로 유지시키기 위한 배지 교환 또는 세포 세척 단계를 포함할 수 있다. 인큐베이션은 또한 세포외 효과 검정법을 수행하는 데 사용되는 보조 입자의 첨가를 포함할 수 있다.

[0134] 한 실시양태에서, 인큐베이션 단계는 챔버의 특성 중 하나 이상의 것, 세포 (효과기 세포, 보조 세포 또는 판독 세포) 생존가능성을 유지시키고/거나, 챔버내 세포의 하나 이상의 기능성 특성, 예컨대, 분비, 표면 마커 발현, 유전자 발현, 신호전달 기전 등을 유지시키기 위한 습도, 온도 및/또는 pH를 제어하는 것을 포함한다. 한 실시

양태에서, 인큐베이션 단계는 챔버를 통해 관류 유체를 유동시키는 것을 포함한다. 관류 유체는 특정 챔버 내의 효과기 세포 및/또는 판독 세포의 유형에 따라 선택된다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 관류액은 세포 생존능을 유지시키기 위한, 예컨대, 고갈된 산소를 보충하거나, 폐기 생산물을 제거하기 위한, 또는 세포 상태를 유지시키기 위한, 예컨대, 필수 사이토카인을 보충하기 위한, 또는 원하는 효과를 검정하는 것을 지원하기 위한, 예컨대, 형광성 검출 시약을 첨가하기 위한 것으로 선택된다. 관류는 또한 시약 교환을 위해, 예를 들어, 일련의 방식으로 다중의 세포외 효과를 검정하기 위해 사용될 수 있다.

[0135] 또 다른 실시양태에서, 세포 집단을 인큐베이션시키는 것은 챔버를 통해 관류 유체를 유동시켜 판독 입자 (예컨대, 판독 세포)의 세포 반응을 유도하는 것을 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 인큐베이션 단계는 신호 전달 사이토카인을 포함하는 유체를 세포 집단을 포함하는 챔버에 첨가하는 것을 포함한다. 인큐베이션 단계는 주기적, 연속적, 또는 그의 조합일 수 있다. 예를 들어, 관류 유체를 미세유동 챔버 또는 챔버들에 유동시키는 것은 주기적, 연속적, 또는 그의 조합이다. 한 실시양태에서, 인큐베이션 유체 (예컨대, 관류 유체)의 유동 속도는 통합된 미세유동 마이크로밸브 및 마이크로펌프에 의해 제어된다. 또 다른 실시양태에서, 인큐베이션 액체의 유동은 가압 구동식으로, 예를 들어, 유동을 조절하는 압축 공기, 시린지 펌프, 또는 중력을 사용함으로써 이루어진다.

[0136] 일단 장치내 개별 챔버에 세포 집단 및 판독 입자 집단을 제공하고 나면, 집단내 세포가 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단에 세포외 효과를 나타내는지 아닌지 측정하기 위해 수행된다. 세포 집단에 대해 세포외 효과를 보이는지 여부를 측정한 후, 적절할 경우, 판독 입자 집단 및/또는 그의 서브집단을 조사하여 집단내 세포(들)가 세포외 효과를 보이는지 여부, 또는 다른 세포 집단과 비교할 경우에는 세포외 효과의 변화를 보이는지 여부를 측정하는 방법을 수행한다. 그의 존재 및/또는 변화가 챔버 내에서 검출되는 한, 세포외 효과 또는 그의 변화를 보이는 특이 세포 또는 세포들이 챔버 내에서 확인될 필요는 없다. 한 실시양태에서, 일단 세포 집단이 세포외 효과, 또는 세포외 효과의 변화를 보이는 것으로 확인되고 나면, 세포외 효과 또는 그의 변화를 담당하는 특이 효과기 세포(들)를 확인하기 위한 추가의 특징 규명을 위해 세포 집단을 회수한다. 또 다른 실시양태에서, 일단 세포 집단이 세포외 효과, 또는 세포외 효과의 변화를 보이는 것으로 확인되고 나면, 그를 회수하고, 세포 집단으로부터의 핵산을 증폭시키고, 서열분석한다.

[0137] 한 실시양태에서, 세포외 효과는 효과기 세포에 의해 생산된 단백질(들)과 판독 입자, 예컨대, 비드 또는 세포 사이의 결합 상호작용이다. 한 실시양태에서, 집단내 효과기 세포 중 하나 이상의 것은 항체를 생산하는 세포이고, 및 판독 입자는 표적 에피토프를 가지는 항원을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포외 효과는 항체의 항원에의 결합하고, 변화는 예를 들어, 대조군 챔버 또는 복수 개의 것 중 다른 집단과 비교하여 더 큰 결합이다. 별법으로, 세포외 효과의 변화는 특정 항원에 대한 친화성이 조절된 항체를 분비하는 효과기 세포의 존재이다. 즉, 결합 상호작용은 항원-항체 결합 특이성, 항원-항체 결합 친화성, 및 항원-항체 결합 반응 속도 중 하나 이상의 것의 척도이다. 별법으로 또는 추가로, 세포외 효과는 아포프토시스 조절, 세포 증식 조절, 판독 입자의 형태학적 외관 변화, 판독 입자 내의 단백질의 위치 변화, 판독 입자에 의해 단백질 발현, 보조 입자의 생물학적 활성의 중화, 효과기 세포에 의해 유도된 판독 세포의 세포 용해, 효과기 세포에 의해 유도된 판독 세포의 세포 아포프토시스, 판독 세포 괴사, 항체의 내재화, 보조 입자의 내재화, 효과기 세포에 의한 효소 중화, 가용성 신호전달 분자의 중화 또는 그의 조합이다. 일부 실시양태에서, 판독 입자 중 한 유형은 표적 에피토프를 포함하지 않는 것인, 2개 이상의 상이한 유형의 판독 입자가 챔버에 제공된다.

[0138] 상이한 유형의 판독 입자는 하나 이상의 특징에 의해, 예컨대, 형광 표지화, 다른 수준의 형광 강도, 형태, 크기, 표면 염색, 및 챔버내 위치에 의해 식별될 수 있다.

[0139] 일단 효과기 세포(들)를 포함하는 세포 집단과 인큐베이션시키고 나면, 직접적이든, 또는 간접적이든 간에, 세포 집단 내의 하나 이상의 세포가 하나 이상의 판독 입자에 대해 세포외 효과를 보이는지 여부, 또는 세포외 효과의 변화를 보이는지 여부에 대해 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단을 조사한다. 세포외 효과의 변화에 대해 검정하여 세포 집단을 확인한 후, 하류 분석법을 위해 회수한다. 중요하게는, 본 명세서 전역에 걸쳐 제공하는 바와 같이, 세포외 효과가 특정 마이크로 반응기 (예컨대, 미세유동 챔버) 내에 존재하는 것으로 검출되는 한, 하나 이상의 판독 입자에 대해 특정 세포외 효과를 보이는 특정 효과기 세포(들)를 확인할 필요는 없다.

[0140] 일부 실시양태에서, 세포 집단 내의 하나 이상의 효과기 세포는 정의되 생체분자, 예컨대, 항체를 분비하고, 세포외 효과를 보이는 세포 집단을 검출하기 위해 판독 입자 또는 복수 개의 판독 입자 (예컨대, 판독 세포)에 대한 이들 인자의 세포외 효과를 평가한다. 그러나, 세포외 효과는 분비된 생체분자의 효과로만 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 세포외 효과는 T-세포 수용체의 효과, 예를 들어, 항원에의 결합이다.

[0141] 한 실시양태에서, 판독 입자 집단은 판독 세포의 이질성 집단이고, cDNA 라이브러리를 발현하도록 조작된 판독 세포를 포함하며, 이로써, cDNA 라이브러리는 세포 표면 단백질을 코딩하게 된다. 항체의 상기 세포에의 결합을 사용하여 표적 에피토프에 결합하는 항체를 분비하는 세포를 회수하고, 가능하게는 그를 분석한다.

[0142] 일부 실시양태에서, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단에 미치는 세포외 효과를 측정하는 방법은 하나 이상의 보조 입자를, 효과가 측정되는 챔버에 첨가하는 것을 포함한다. 예를 들어, 항체의 판독 세포에의 결합시 보체를 활성화시키는 데 필요한 1 이상의 인자는 보조 인자로서 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 제공한 바와 같이, 자연살해 세포 또는 그의 복수 개의 것은 보조 세포로서 챔버에 첨가되고, 세포 용해를 측정하고자 하는 경우에 그러하다. 당업자는 사용되는 검정법에 기초하여 어떤 보조 입자가 필요한지를 결정할 수 있을 것이다.

[0143] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 판독 입자가 표적 항원을 보이거나, 또는 그를 발현하는 판독 세포를 포함하는 경우, 자연살해 세포, 그의 복수 개의 것은 측정되는 기능성 효과 (용해)를 촉진시키는 "보조 세포(들)"로서 챔버에 제공된다. 보조 세포는 판독 입자(들) 적재 이전, 또는 판독 입자(들)를 챔버 내로 적잦한 이후에 세포 집단, 판독 입자(들)와 함께 챔버에 제공될 수 있다. 자연살해 세포가 사용되는 실시양태에서, 자연살해 세포는 효과기 세포에 의해 생산되는 항체가 결합되어 있는 하나 이상의 판독 세포를 표적화한다. 따라서, 세포외 효과는 자연살해 세포에 의한 하나 이상의 판독 세포의 용해를 포함할 수 있다. 용해는 생존능 염료, 막 완전성 염료, 형광성 염료의 유리, 효소 검정법 등에 의해 측정될 수 있다.

[0144] 일부 실시양태에서, 세포외 효과는 판독 입자에 영향을 미치는 데 작동가능한 보조 입자 (또는 보조 시약), 예컨대, 1 이상의 판독 세포의 반응을 자극시키는 데 작동가능한 사이토카인 (보조 입자)의 중화이다. 예를 들어, 판독 입자 세포에 영향을 미치는 데 작동가능한 사이토카인-분비 세포가 챔버에 추가로 제공될 수 있다. 효과기 세포에 의한 분비된 사이토카인의 중화는 사이토카인이 판독 세포에 미치는 예상되는 효과, 예컨대 증식이 없는 것에 의해 검출될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 보조 입자는 판독 세포(들)를 감염시키는 데 작동가능한 바이러스이고, 바이러스 중화는 바이러스에 의한 판독 세포의 감염의 감소로서 검출된다.

[0145] 일부 실시양태에서, 한 효과기 세포 유형의 세포외 효과는 상이한 유형의 효과기 세포의 활성화 (예컨대, 항체 또는 사이토카인의 분비)를 유도할 수 있고, 이어서, 이는 1 이상의 판독 세포에서 반응을 유도할 수 있다.

[0146] 본 명세서 전역에 걸쳐 제공하는 바와 같이, 본원에서 제공하는 방법 및 장치는 판독 입자에 대해 세포외 효과의 변화를 보이는 효과기 세포를 확인하는 데 사용된다. 효과기 세포는 미세유동 챔버 중 단일 효과기 세포로서, 또는 단일 챔버 내의 세포 집단으로 존재할 수 있다. 예를 들어, 세포외 효과는 효과기 세포의 분비 생성물의 세포외 효과일 수 있다. 효과기 세포가 더 큰 세포 집단에 존재하는 경우, 세포외 효과는 먼저 세포 집단에 기인하고, 집단을 단리시키고, 단리된 집단의 서브집단을 분석하여 세포외 효과에 대한 세포 기반을 측정한다. 이어서, 세포외 효과를 보이는 서브집단(들)을 단리시키고, 한계 희석으로, 예를 들어, 단일 세포로서 추가로 분석하거나, 또는 핵산 분석을 수행한다. 한 실시양태에서, 단리된 세포 집단의 서브집단은 단일 세포를 포함한다.

[0147] 한 실시양태에서, 세포 집단은 단일클론 항체를 분비하는 ASC를 포함한다. 한 실시양태에서, 판독 비드 기반 검정법은 항체를 분비하지 않는 하가 이상의 추가 세포로 이루어진 배경 중에서 항체를 분비하는 효과기 세포의 존재를 검출하는 데 사용된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 비드 기반 검정법은 관심의 대상되는 표적 에피토프에 결합하지 않는 항체를 분비하는 하나 이상의 추가의 ASC의 존재하에서 그의 항체는 관심의 대상되는 표적 에피토프에 결합하는 것인, ASC를 검출하는 방법에서 사용된다.

[0148] 또 다른 실시양태에서, 표적 세포에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 능력이 평가된다. 도 3을 참조하면, 본 검정법은 1 이상의 효과기 세포 (182) (ASC) 이외에도 2개 이상의 판독 입자, 예컨대, 판독 세포 (181) 및 (186)을 포함한다. 판독 세포 (186)는 그러하지 않지만, 판독 세포 (181)는 그의 표면 상(자연적으로 또는 유전적으로 조작된)에 관심의 대상되는 공지된 표적 에피토프, 즉, 표적 에피토프 (183)을 발현한다. 2가지 유형의 판독 세포 (181) 및 (186)은 식별가능한 형광성 마커, 다른 염료 또는 형태에 의해 그 자신으로부터 및 효과기 세포 (182)로부터 식별가능하다. 효과기 세포 (182)는 판독 세포 (181) 및 (186)와 동일한 챔버 중에서 항체 (184)를 분비한다. 효과기 세포 (182)에 의해 분비된 항체 (184)는 표적 에피토프 (183)를 통해 판독 세포 (181)에 결합하지만, 판독 세포 (186)에는 결합하지 않는다. 2차 항체는 항체 (184)의 판독 세포 (181)에의 선택적 결합을 검출하는 데 사용된다. 이어서, 미세유동 챔버를 영상화하여 항체 (184)가 판독 세포 (181)에 결합하는지 및/또는 판독 세포 (186)가 발생하는지 여부를 측정한다.

[0149] 상기 검정법은 또한 고해상도 현미경법을 사용하여 판독 세포(들) 상에서 또는 그 내부에서 항체 결합의 위치를 평가하는 데 사용될 수 있다. 본 실시양태에서, 판독 입자는 결합 특이성 및/또는 국재화를 평가하기 위해 상이한 방식으로 제조된 (예를 들어, 투과화 및 고정에 의해 제조된) 상이한 입자 유형 (예컨대, 세포 유형) 또는 입자/세포를 포함한다. 예를 들어, 상기 검정법은 살아있는 세포 상의 표적의 천연 입체 구조에 결합하고, 고정된 세포 상의 변성된 형태에 결합하는 항체를 확인하는 데 사용될 수 있다. 별법으로, 상기 검정법은 상이하게 차단된 에피토프를 포함하는 판독 입자의 상이한 집단을 사용하여, 먼저 공지된 에피토프에 대한 항체를 이용하여 분자의 다른 부분을 차단시킴으로써 표적 분자 상의 에피토프의 위치를 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0150] 또 다른 실시양태에서, 개별 집단 중 1 이상이 효과기 세포인 것인, 개별 이질성 판독 입자 집단 (예컨대, 악성 및 정상 세포를 포함하는 판독 세포 집단) 및 개별 세포 집단을 본원에서 제공하는 장치 중 하나의 복수 개의 미세유동 챔버 (예컨대, 1,000개 초과의 챔버)에 제공한다. 예를 들어, 도 4를 참조하면, 판독 세포 집단에서 하나 이상의 악성 판독 세포 (425)에의 결합, 및 건강한판독 세포 (426)에의 결합 부재를 사용하여 예컨대, 집단 중 악성 세포 중 하나 이상의 것에 특이적인 항체 (428)를 생산하는 효과기 세포 (427)와 같은, 관심의 대상이 되는 항체를 생산하는 하나 이상의 효과기 세포를 함유하는 관심의 대상이 되는 세포 집단을 확인할 수 있다. 챔버 내의 2가지 유형의 판독 세포 (425) 및 (426)는 1 이상의 특성, 예를 들어, 형광 표지화, 다양한 수준의 형광 강도, 형태, 크기, 표면 염색 및 미세유동 챔버 중 위치에 의해 식별가능하다. 이어서, 세포를 개별 챔버 내에서 인큐베이션시키고, 영상화하여 챔버 중 하나 이상의 것이 세포외 효과를 발휘하는 세포 집단, 즉, 건강한 판독 세포가 아닌, 악성 판독 세포에 결합하는 항체를 분비하는 ASC를 포함하는지를 측정한다.

[0151] 이어서, 챔버 내에 존재할 경우, 건강한 판독 세포 (426)가 아닌, 악성 판독 세포 (425)에 결합하는 항체를 분비하는 하나 이상의 ASC를 함유하는 세포 집단을 회수하여 챔버내 항체의 서열을 검색하거나, 또는 집단 내의 개별 세포에 대하여 다른 하류 검정법, 예를 들어, 집단 내의 효과기 세포가 원하는 결합 특성을 가지는지 여부를 측정하는 검정법을 수행할 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 방법 중 하나 이상의 것에 의해 발견된 신규한 기능성 항체를 제공하다. 악성 판독 세포 (425) 상의 에피토프는 공지되어 있거나, 또는 공지되지 않은 것일 수 있다. 후자의 경우, 항체에 대한 에피토프는 하기 기술되는 방법에 의해 확인될 수 있다.

[0152] 한 실시양태에서, 단일 세포 유형은 효과기 세포 및 판독 세포, 둘 모두로서 작용할 수 있다. 도 5를 참조하면, 본 검정법은 단일 세포 유형의 세포로 이루어진 이질성 서브집단, 즉, 둘 모두가 예를 들어, 표면 마커에 대한 사량체 항체 (433) 및 관심의 대상이 되는 분자 (432), 또는 비오티닐화된 항체에 결합하는 세포 상의 친화성 매트릭스를 이용하여 그의 표면 상에 관심의 대상이 되는 분자 (432)를 포획하도록 관능화된 것인 효과기 세포 (430) 및 판독 세포 (431)를 이용하여 수행된다. 도 6을 참조하면, 사량체 항체 복합체는 세포에 결합하는 항체 (A) (435), 및 세포로부터 분비된 항체에 결합하는 항체 (B) (436)로 구성되고, 여기서, 항체 A 및 B는 항체 A 및 B의 Fc 부분에 결합하는 두 항체 (437)에 의해 연결된다. 상기 사량체 항체 복합체는 당업계에 기술되어 있고 (문헌 [Lansdorp et al. (1986). European Journal of Immunology 16, pp. 679-683] (상기 문헌은 그 전문이 모드 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다)), 상업적으로 이용가능하다 (스템셀 테크놀러지즈: 캐나다 밴쿠버). 상기 사량체를 이용할 경우, 분비된 항체는 포획되고, 세포 표면 상에 결합되어 효과기 세포 또한 판독 입자로서 작용하게 된다. 일단 세포 표면 상에 결합되고 나면, 항체는 예를 들어, 형광 표지화된 항원의 첨가에 의해서 결합에 대해 검정될 수 있다. 예를 들어, 특이 표적에 결합하는 단일클론 항체를 분비하는 세포를 함유하는 챔버를 확인하고자 하는 경우, 효과기 세포로부터 분비되는 항체는 적절한 포획제를 사용하여 상기 효과기 세포, 및 챔버 중의 다른 것의 표면 상에 포획될 수 있다. 도 5를 참조하면, 효과기 세포 (430)는 또한 판독 세포로서의 기능을 할 수 있고, 즉, 관심의 대상이 되는 분자 (432)를 분비하는 효과기 세포는 판독 세포 (431)보다 더 효율적으로 관심의 대상이 되는 분자를 포획할 수 있다는 것을 이해할 수 있다.

[0153] 한 실시양태에서, 세포외 효과 검정법은 각 챔버에 판독 입자의 이질성 집단 (예컨대, 이질성 판독 세포 집단) 및 실질적으로 동질성 세포 집단을 포함하는 복수 개의 미세유동 챔버 중에서 동시에 수행되고, 여기서, 실질적으로 동질성 집단 내의 개별 효과기 세포들은 각각 동일한 항체를 생산한다. 추가의 실시양태에서, 판독 입자는 효과기 세포에 의해 분비된 항체의 표적 에피토프를 측정할 수 있도록 하기 위해 단백질 또는 단백질 단편의 라이브러리를 발현하도록 유전적으로 조작된 판독 세포이다. 도 7을 참조하면, 본 검정법의 한 실시양태는 항체 (191)를 분비하는 복수 개의 효과기 세포 (190)를 포함한다. 본 검정법은 각각 에피토프 (196), (197), (198), 및 (199)를 보이는 판독 세포 (192), (193), (194), 및 (195)를 포함하는 이질성 판독 세포 집단을 추가로 포함한다. 효과기 세포 (190)는 판독 세포 (192), (193), (194), 및 (195) 쪽으로 확산되는 항체 (191)을 분비한다. 항체 (191)는 표적 에피토프 (198)를 통해 판독 세포 (194)에는 결합하지만, 판독 세포 (192), (193), 또는 (195)에는 결합하지 못한다. 2차 항체를 사용하여 항체 (191)의 판독 세포 (194)에의 선택적 결합

을 검출할 수 있다.

[0154] 이어서, 판독 세포 (194) (또는 또 다른 에피토프)에 결합하는 항체 (191)를 포함하는 세포 집단을 장치로부터 회수할 수 있고, 추가로 검정할 수 있다.

[0155] 한 실시양태에서, 기능성 검정법은 세포 집단 내의 개별 ASC가 표적 세포의 세포 용해을 활성화시키는지, 즉, 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 활성화시키는지 여부를 측정하기 위해 제공된다. ADCC는 세포-매개 면역 방어 기전으로서, 이를 통해 면역계의 효과기 세포는 표적 세포를 용해시키며, 표적 세포의 막-표면 항원은 특이 항체, 즉, 본원에서 제공하는 특정 미세유동 챔버 내의 ASC에 의해 분비되는 항체에 의해 결합된다. 고전적 ADCC는 자연살해 (NK) 세포에 의해 매개된다. 그러나, 대식세포, 호중구 및 호산구 또한 ADCC를 매개할 수 있고, 본원에서는 ADCC 세포외 효과 검정법에서 사용되는 보조 세포로서 제공될 수 있다.

[0156] 본원에서 제공하는 ADCC 검정법의 한 실시양태는 효과기 세포 또는 그의 복수 개의 것을 포함하는 세포 집단, (그의 표면 상에 관심의 대상이 되는 에피토프를 가지는) 판독 세포 집단, 및 보조 세포로서의 NK 세포를 포함한다. 검정법은 세포 집단으로부터의 ASC가 NK 세포가 표적 세포를 공격하고, 그를 용해시키도록 유도하는지를 측정하도록 수행된다. 도 8을 참조하면, 예시된 실시양태는 각각 항체 (202) 및 (203)를 분비하는 ASC (200) 및 (201)를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 예시된 실시양태는 각각 에피토프 (206) 및 (207)를 보이는 판독 세포 (204) 및 (205)를 포함하는 이질성 판독 세포 집단을 추가로 포함한다. ASC (200) 및 (201)는 판독 세포 (204) 및 (205) 쪽으로 확산되는 항체 (202) 및 (203)를 분비한다. 항체 (202)는 표적 에피토프 (207)를 통해 판독 세포 (205)에 결합하지만, 판독 세포 (204)에는 결합하지 않는다. 항체 (203)는 판독 세포 (204) 및 (205) 중 어느 것에도 결합하지 않는다. NK 세포 (208)는 판독 세포 (205)가 항체 (202)에 의해 결합되어 있는 것을 검출하고, 진행되어 판독 세포 (205)를 사멸시키고, 판독 세포 (204)는 단독으로 비결합 상태로 남게 된다.

[0157] 효과기 세포와 판독 세포의 인큐베이션 동안, 또는 그 이후에 NK 세포가 챔버에 첨가될 수 있되, 단, 판독 세포에의 접근을 촉진시키는 방식으로 챔버에 첨가된다면, 이러한 첨가도 가능하다는 것을 당업자는 이해할 것이다. NK 세포는 예를 들어, 말초 혈액 단핵구 세포와 같은 보조 세포의 이질성 집단으로부터의 것일 수 있다. NK 세포는 동물 또는 인간 유래된 세포주로부터의 것일 수 있고, ADCC 활성을 증가시키도록 조작될 수 있다. 본 검정법은 ADCC, 예컨대, 대식세포, 호산구 또는 호중구를 매개할 수 있는 다른 조혈 세포 유형과 함께 수행될 수 있다는 것을 당업자는 추가로 이해할 것이다. 이러한 경우, 대식세포, 호산구 또는 호중구는 본 검정법에서 보조 세포이다. ADCC를 매개할 수 있는 세포 유형은 또한 ADCC 활성을 증가시키도록, 표적 세포에의 항체 결합시 신호를 기록하도록 조작된 동물 또는 인간 유래된 세포주일 수 있다. 후자의 경우, 표적 세포는 보조 입자인 반면, 세포 매개 ADCC는 판독 입자이다.

[0158] ADCC 세포외 효과 검정법은 도 8에 도시된 바와 같이, 단일 효과기 세포, 동질성 세포 집단, 또는 이질성 세포 집단에서 수행될 수 있다. 유사하게, ADCC 검정법은 도 8에 도시된 바와 같이, 단일 판독 세포, 동질성 판독 세포 집단, 또는 이질성 판독 세포 집단에서 수행될 수 있다. 그러나, 많은 경우에서는 판독 세포의 임의적인 사멸로부터 발생되는 위 양성 검출을 피하기 위해 ADCC 검정법을 복수 개의 판독 세포를 이용하여 수행하는 것이 바람직할 수 있다.

[0159] 한 실시양태에서, 세포 용해는 클론원성 검정법에 의해, 막 완전성 염료의 첨가에 의해, 세포내 형광성 분자 손실에 의해 용액 중 세포내 분자의 방출에 의해 정량화된다. 방출된 생체분자는 직접 용액 중에서 측정가능하거나, 또는 측정을 위해 판독 입자 상에 포획된다. 일부 경우에서, 추가의 보조 분자가 첨가될 수 있으며, 예컨대, 산화환원 검정법을 위해 기질, 또는 효소 검정법을 위해 기질이 첨가된다. 도 9를 참조하면, 예를 들어, 제1 생체분자 (502)를 분비하는 효과기 세포 (500), 및 제1 생체분자 (502)를 분비하지 않는 제2 효과기 세포 (501)를 포함하는 세포 집단을 판독 세포 (503) 및 판독 입자 (504)를 포함하는 이질성 판독 입자 집단, 및 보조 입자 (예컨대, 자연살해 세포 (505))의 존재하에서 인큐베이션시킨다. 제1 생체분자 (502)의 판독 세포 (503)에의 결합은 판독 세포 (503)의 용해를 유발하는 자연살해 세포 (505)의 동원을 유도한다. 세포 용해시, 제2 생체분자 (506)는 판독 세포 (503)로부터 방출되고, 예컨대, 분자 (507)을 통해 제2 생체분자 (506)를 포획하도록 관능화된 상이한 유형의 판독 입자인 판독 입자 (504) 상에 포획된다. 한 실시양태에서, 분자 (507)는 단백질, 항체, 효소, 반응성 기 및/또는 핵산이다. 포획된 제2 생체분자 (506)은 판독 세포 (503)에 존재하는 임의의 분자, 단백질, 효소, 탄수화물 또는 핵산일 수 있다. 한 실시양태에서, 제2 생체분자 (506)의 판독 입자 (504)에의 결합은 형광 검정법, 비색 검정법, 생체발광성 검정법, 또는 화학발광성 검정법을 사용하여 정량화된다. 검정법은 판독 입자 (504) 상에서 직접, 또는 주변 용액 중에서 간접적으로 수행되고, 예를 들어, 포

획된 생체분자 (506)가, 기질을 상이한 광학 특성을 가진 생성물로 전환시키는 효소일 경우에 그러하다. 검정법은 본원에서 제공하는 장치 중 하나의 다중 챔버에서 수행됨으로써 챔버 중 임의의 것이 세포 용해를 유도하는 생체분자를 분비하는 효과기 세포를 포함하는지 여부를 측정할 수 있다.

[0160] ADCC 검정법은 당업계에 공지되어 있고, 구성 요소는 상업적으로 이용가능한다. 예를 들어, 유세포 분석용 구아바 세포 독성 키트(Guava Cell Toxicity Kit for Flow Cytometry) (밀리포어(Millipore)), ADCC 리포터 바이오어세키 코어 키트(ADCC Reporter Bioassay Core Kit) (프로메가(Promega)), ADCC 검정법 (진스크립트(GenScript)), 생/사 세포 매개 세포독성 키트(LIVE/DEAD Cell Mediated Cytotoxicity Kit) (라이프 테크놀러지즈(Life Technologies)) 및 DELFIA 세포 독성 검정법이 본원에서 제공하는 장치에서 사용될 수 있다.

[0161] 또 다른 실시양태에서, 세포외 효과 검정법은 보체-의존성 세포독성 (CDC) 검정법이다. 한 CDC 실시양태에서, 고전적 보체 경로를 통해 판독 세포의 용해를 유도하는 데 필요하고/거나, 충분한 가용성 인자의 존재하에서 판독 세포에 결합하는 세포 집단 내의 ASC (또는 ASC의 분비된 항체)의 존재를 확인하는 방법을 제공한다. 따라서, 검정법은 ASC에 의해 분비된 항체가 고전적 보체 경로를 통해 하나 이상의 표적 세포의 용해를 자극시키는지 여부를 측정하고자 하는 것이다.

[0162] CDC 검정법은 1 이상의 효과기 세포 및 1 이상의 판독 세포를 포함하고, 한 CDC 실시양태는 도 10에 도시되어 있다. 실시양태는 효과기 세포 (210), 및 각각 항체 (212) 및 (213)를 분비하는 효과기 세포 (211)를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 예시된 실시양태는 추가로 각각 에피토프 (216) 및 (217)를 보이는 판독 세포 (214) 및 판독 세포 (215)를 포함하는 이질성 판독 세포 집단을 포함한다. 효과기 세포 (210) 및 (211)는 판독 세포 (214) 및 (215) 쪽으로 확산되는 항체 (212) 및 (213)를 분비한다. 항체 (212)는 표적 에피토프 (217)를 통해 판독 세포 (215)에 결합하지만, 판독 세포 (214)에는 결합하지 않는다. 항체 (213)은 판독 세포 (214) 및 (215) 중 어느 하나에도 결합하지 않는다. 보조 입자인 효소 C1 (218), 및 고전적 보체 경로를 통해 세포의 용해를 유도하는 데 필요한 가용성 인자 중 하나는 판독 세포 (215)와 항체 (212)의 복합체에 결합하고, 판독 세포 (214)는 단독으로 비결합 상태로 남게 된다. 효소 C1 (208)의 판독 세포 (215)와 항체 (212)의 복합체에의 결합은 보체 경로 부류를 통해 세포 용해를 유도하는 데 필요한 추가의 가용성 인자를 포함하는 고전적 보체 경로를 일으키고 (제시되지 않음), 판독 세포 (215)는 파열 및 사멸시킨다.

[0163] 판독 세포의 용해를 유도하는 데 필요한 가용성 인자 (즉, 검정법에 필요한 보조 인자)는 판독 세포와 함께 효과기 세포를 인큐베이션시키기 이전, 또는 그 이후에 첨가될 수 있되, 단, 판독 세포에의 접근을 촉진시키는 방식으로 챔버에 첨가된다면, 이러한 첨가도 가능하다. 본원에서 제공하는 CDC 검정법은 도 8에 도시된 바와 같이, 단일 효과기 세포, 동질성 효과기 세포 집단, 또는 이질성 세포 집단에서 수행될 수 있다. 유사하게, CDC 검정법은 도 8에 도시된 바와 같이, 단일 판독 세포, 동질성 판독 세포 집단 또는 이질성 판독 세포 집단을 이용하여 수행될 수 있다. 그러나, 많은 경우에서는 판독 세포의 임의적인 사멸로부터 발생되는 위 양성 검출을 피하기 위해 판독 세포 집단을 이용하여 CDC 검정법을 수행하는 것이 바람직할 수 있다.

[0164] 보체 경로에 의한 세포 용해는 당업자에게 공지된 방법에 따라 정량화된다. 예를 들어, 세포 용해는 클론원성 검정법에 의해, 막 완전성 염료의 첨가에 의해, 세포내 형광성 분자의 손실에 의해, 또는 용액 중 세포내 분자의 방출에 의해 정량화된다. 방출된 생체분자는 용액 중에서 직접 측정되거나, 판독 입자 상에 포획된다. 일부 경우에서, 추가의 보조 분자, 예컨대, 산화환원 검정법을 위한 기질 또는 효소 검정법을 위한 기질이 첨가될 수 있다. 도 11을 참조하면, 예를 들어, 제1 생체분자 (512)를 분비하는 효과기 세포 (510), 및 제1 생체분자 (512)를 분비하지 않는 제2 효과기 세포 (511)를 포함하는 세포 집단을 보조 입자 (515) (예컨대, 보체 단백질)의 존재하에, 하나 이상의 이질성 판독 입자, 예컨대, 판독 세포 (513) 및 판독 입자 (514)의 존재하에서 인큐베이션시킨다. 보조 입자 (515)의 존재하에서 생체분자 (512)의 판독 세포 (513)에의 결합은 판독 세포 (513)의 용해를 유발한다. 세포 용해시, 제2 생체분자 (516)는 판독 세포 (514)로부터 방출되고, 예컨대, 분자 (517)을 통해 제2 생체분자 (516)를 포획하도록 관능화된 제2 유형의 판독 입자인 판독 입자 (514) 상에 포획된다. 분자 (517)는 단백질, 항체, 효소, 반응성 기 및/또는 핵산과 같은 하나 이상의 분자 유형일 수 있다. 포획된 생체분자 (516)은 특정 유형으로 한정되지 않는다. 오히려 포획된 생체분자 (516)는 판독 세포 (513)에 존재하는 임의의 분자, 예컨대, 단백질, 효소, 염료, 탄수화물 또는 핵산일 수 있다. 제2 생체분자 (516)의 판독 입자 (514)에의 결합은 형광 검정법, 비색 검정법, 생체발광성 검정법, 또는 화학발광성 검정법을 사용하여 정량화된다. 검정법은 판독 입자 (514) 상에서 직접, 또는 주변 용액 중에서 간접적으로 수행될 수 있고, 예를 들어, 포획된 생체분자 (516)가, 기질을 상이한 광학 특성을 가진 생성물로 전환시키는 효소일 경우에 그러하다는 것을 이해하여야 한다.

[0165] 또 다른 실시양태에서, 검정법은 단독의 또는 세포 집단 내의 효과기 세포가 세포 성장을 조절하는지를 측정하기 위해 제공된다. 구체적으로, 검정법은 효과기 세포가 판독 세포의 성장률을 조절하는 생체분자, 예컨대, 사이토카인 또는 항체를 분비하는지를 측정하는 데 사용된다. 도 12를 참조하면, 예시된 실시양태는 각각 생체분자 (222) 및 생체분자 (223)를 분비하는 효과기 세포 (220) 및 효과기 세포 (221)를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 예시된 실시양태는 판독 세포 (224)를 포함하는 동질성 판독 세포 집단을 추가로 포함한다. 효과기 세포 (220) 및 효과기 세포 (221)는 생체분자 (222) 및 (223)를 분비하고, 이는 판독 세포 (224) 쪽으로 확산된다. 생체분자 (222)는 판독 세포 (224)에 결합하여, 판독 세포 (224)의 성장를 유도하는 반면 (절취선으로 표시), 생체분자 (223)는 판독 세포 (224)에 결합하지 않는다. 챔버의 현미경 영상화를 사용하여 생체분자에 노출되지 않는 다른 챔버 중의 세포와 비교하여 판독 세포 (224)의 성장을 평가한다.

[0166] 세포 성장 조절 검정법은 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 언급한 바와 같이, 효과기 세포는 희귀하고, 초기에 본원에서 제공하는 장치 중 하나에 적재된 출발 집단 중에서 그에 대해 농축하기가 어렵기 때문에 모든 세포 집단이 효과기 세포를 함유하지는 않을 것이다. 본 발명을 통해 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 확인함으로써 상기 희귀 세포를 확인할 수 있다.

[0167] 세포 성장 조절 검정법은 또한 단일 챔버 중 단일 판독 세포, 또는 이질성 판독 세포 집단을 이용하여 수행될 수 있다. 그러나, 많은 경우에서는 성장률을 더욱 정확하게 측정할 수 있도록 하기 위해 동질성 판독 세포 집단을 이용하여 세포 성장 조절 검정법을 수행하는 것이 바람직할 수 있다.

[0168] 한 실시양태에서, 세포 성장 조절 검정법은 세포 성장을 억제시키는 생체분자를 생산하는 세포에 대해 스크리닝할 수 있도록 적합화된다. 또 다른 실시양태에서, 본 방법은 판독 세포의 증식률을 조절, 즉, 증가 또는 감소시키는 분자를 생산하는 세포에 대해 스크리닝할 수 있도록 적합화된다. 한 실시양태에서, 성장률은 광학 현미경법 영상으로부터의 수동 또는 자동 세포 계수, 형광을 발현하는 세포의 전체 형광 강도, 희석 염료 (예컨대, CFSE)로 표지화된 세포의 평균 형광 강도, 핵 염색법 또는 당업자에게 공지된 일부 다른 방법에 의해 측정된다.

[0169] 증식을 측정하기 위한, 상업적으로 이용가능한 검정법으로는 알라마블루® 세포 생존능 검정법(alamarBlue® Cell Viability Assay), 셀트레이스™ CFSE 세포 증식용 키트 및 셀트레이스™ 바이올렛 세포 증식용 키트 (CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit) (이들 모두 라이프 테크놀러지즈로부터 입수)를 포함하며, 이들은 각각 본원에 기술된 방법 및 장치와 함께 사용될 수 있다.

[0170] 또 다른 실시양태에서, 또 다른 세포, 즉, 판독 세포 또는 보조 세포의 아포프토시스를 유도하는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 선별하기 위해 아포프토시스 기능성 검정법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 아포프토시스의 판독 세포 또는 보조 세포를 유도하는 생체분자, 예컨대, 사이토카인 또는 항체를 분비하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 데 사용된다. 도 13을 참조하면, 예시된 실시양태는 각각 생체분자 (232) 및 생체분자 (233)를 분비하는 효과기 세포 (230) 및 효과기 세포 (231)를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 예시된 실시양태는 판독 세포 (234)를 포함하는 동질성 판독 세포 집단을 추가로 포함한다. 효과기 세포 (230) 및 효과기 세포 (231)는 생체분자 (232) 및 (233)를 분비하고, 이는 판독 세포 (234) 쪽으로 확산된다. 생체분자 (232)는 판독 세포 (234)에 결합하여, 판독 세포 (234)의 아포프토시스를 유도하는 반면, 생체분자 (233)는 판독 세포에 결합하지 않는다. 한 실시양태에서, 잠재적으로는 염료 및 당업계에 공지되어 있는 다른 아포프토시스 마커 (예컨대, 아넥신 5, 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 (TdT)-매개 dUTP 닉 단부 표지화, 미토콘드리아 막 전위 파괴 등)를 포함하는 것을 이용함으로써 챔버에 대한 현미경 영상화를 수행하여 아포프토시스를 평가한다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 프로피디움 아이오다이드 (PI), 생/사® 생존능/세포독성 키트(LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit) (라이프 테크놀러지즈) 또는 생/사® 세포-매개 세포독성 키트(LIVE/DEAD® Cell-Mediated Cytotoxicity Kit) (라이프 테크놀러지즈)와 같은, 상업적으로 이용가능한 염료 또는 키트를 사용하여 아포프토시스보다는 세포 사멸에 대해 측정한다.

[0171] 한 실시양태에서, 아포프토시스 검정법은 단일 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 또는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 아포프토시스 검정법은 단일 판독 세포, 또는 이질성 판독 세포 집단을 이용하여 수행된다. 그러나, 많은 경우에서는 아포프토시스를 더욱 정확하게 측정할 수 있도록 하기 위해 동질성 판독 세포 집단을 이용하여 아포프토시스 검정법을 수행하는 것이 바람직할 수 있다.

[0172] 또 다른 실시양태에서, 본원에서 제공하는 미세유동 장치는 판독 세포의 자가포식을 유도하는 생체분자, 예컨대, 사이토카인 또는 항체를 분비하는 효과기 세포를 선별하는 데 사용된다. 본 방법의 한 실시양태는 도

14에 제시되어 있다. 도 14를 참조하면, 예시된 실시양태는 효과기 세포 (441) 및 효과기 세포 (442)를 포함하는 세포 집단을 포함하고, 여기서, 효과기 세포 (441)는 생체분자 (443)를 분비한다. 예시된 실시양태는 표적 에피토프 (449)를 보이는 제1 판독 세포 (444), 및 표적 에피토프가 없는 제2 유형의 판독 세포 (445)를 포함하는 이질성 판독 세포 집단을 추가로 포함한다. 효과기 세포 (441)는 생체분자 (443)를 분비하고, 이는 제1 유형의 판독 세포 (444) 및 제2 유형의 판독 세포 (445) 쪽으로 확산된다. 생체분자 (443)는 제1 유형의 판독 세포 (444)에 결합하여, 제1 유형의 판독 세포 (444)의 자가포식을 유도하는 반면, 생체분자 (443)는 제2 유형의 판독 세포 (445)에 결합하지 않는다. 한 실시양태에서, 당업계에 공지된 자가포식 리포터로 조작된 세포주를 이용함으로써 챔버에 대한 현미경 영상화를 수행하여 자가포식을 평가한다 (예컨대, 플로우셀렉트™ GFP-LC3 리포터 자가포식 검정용 키트(FlowCellect™ GFP-LC3 Reporter Autophagy Assay Kit) (U2OS) (EMD 밀리포어(EMD Millipore)), 프레모™ 자가포식 탠덤 센서 RFP-GFP-LC3B 키트(Premo™ Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP-LC3B Kit) (라이프 테크놀러지즈)).

[0173] 한 실시양태에서, 자가포식 검정법은 단일 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 또는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 자가포식 검정법은 단일 판독 세포, 또는 이질성 판독 세포 집단, 또는 동질성 판독 세포 집단을 이용하여 수행된다. 한 실시양태에서, 검정법은 동질성 판독 세포 집단을 이용하여 수행된다.

[0174] 또 다른 실시양태에서, 판독 세포에서 반응이 일어나도록 유도하는 공지된 생체분자, 예컨대, 사이토카인의 능력을 방해하는 생체분자, 예컨대, 항체를 분비하는 효과기 세포의 존재를 확인하거나, 또는 그러한 효과기 세포를 선별하는 방법을 제공한다. 반응은 일정 유형으로 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 반응은 세포 사멸, 세포 증식, 리포터 발현, 형태 변화, 또는 본 방법의 사용자에 의해 선택되는 일부 다른 반응으로부터 선택된다. 본 방법의 한 실시양태는 도 15에 제공되어 있다. 도 15를 참조하면, 예시된 실시양태는 각각 생체분자 (242) 및 (243)를 분비하는 효과기 세포 (240) 및 효과기 세포 (241)를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 예시된 실시양태는 판독 세포 (244)를 포함하는 동질성 판독 세포 집단을 추가로 포함한다. 효과기 세포 (240) 및 (241)는 항체 (242) 및 (243)를 분비하고, 이는 챔버 내의 배지로 확산된다. 챔버는, 일반적으로 판독 세포 (244)에 대해 공지된 영향을 미치는 사이토카인 (245)로 펄싱된다. 항체 (242)는 사이토카인 (245)에 결합하여 그가 판독 세포 (244)에 결합하지 못하도록 막는다. 따라서, 예상되는 반응은 관찰되지 않고, 이는 효과기 세포 (240) 및 (241) 중 하나가, 반응이 일어나도록 판독 세포 (244)를 자극시킬 수 있는 사이토카인 (245)의 능력을 중화시킬 수 있는 항체를 분비하는 것임을 나타낸다.

[0175] 한 실시양태에서, 사이토카인 중화 검정법은 판독 세포 상에 존재하는, 사이토카인에 대한 수용체를 표적화하는 생체분자를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 데 사용된다. 본 경우에서, 항체, 예컨대, 항체 (242)의 판독 세포 (244) 상의, 사이토카인 (245)에 대한 수용체 (246)에의 결합은 사이토카인과 수용체의 상호작용을 차단하여 어떤 반응도 자극을 받지는 못할 것이다. 또 다른 실시양태에서, 사이토카인 수용체는 "가용화되거나," 또는 "안정화되고," 이는 예를 들어, 헵타르 스타(Heptares StaR)® 플랫폼을 통해 조작된 사이토카인 수용체이다.

[0176] 한 실시양태에서, 사이토카인에 대한 반응은 세포 사멸, 세포 성장, 형광성 리포터 단백질의 발현, 세포 성분의 국재화, 세포 형태 변화, 이동성, 화학주성, 세포 응집 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 당업계에 공지된 바와 같은, 관련된 신호전달의 현미경적 측정에 의해 확인된다. 한 실시양태에서, 효과기 세포가 있는 챔버의 반응을 효과기 세포가 없는 챔버와 비교하여 반응이 억제되었는지 여부를 측정한다. 반응이 억제되었다면, 추가 분석을 위해 챔버내 효과기 세포를 수거한다.

[0177] 한 실시양태에서, 사이토카인 검정법을 개별 마이크로 반응기 내에서 단일 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 또는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단에 대하여 수행한다. 물론, 본 방법은 복수 개의 마이크로챔버에서 복수 개의 세포 집단에 대하여 동시에 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 사이토카인 검정법은 단일 판독 세포, 또는 이질성 판독 세포 집단을 이용하여 수행된다. 한 실시양태에서, 본 방법은 판독 세포의 자극, 또는 오히려는 그의 결여를 더욱 정확하게 측정할 수 있도록 하기 위해 동질성 판독 세포 집단을 이용하여 수행된다.

[0178] 상기 검정법을 위한 상업적으로 이용가능한 사이토카인-의존성 또는 사이토카인-감응성 세포주의 예로는 TF-1, NR6R-3T3, CTLL-2, L929 세포, A549, HUVEC (인간 제정맥 내피 세포), BaF3, BW5147.G.1.4.OUAR.1, (이들 모두 ATCC로부터 이용가능), 패쓰헌터® CHO 세포 (디스커브Rx(DiscoveRx)) 및 TANGO 세포 (라이프 테크놀러지즈)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일차 세포 (예컨대, 림프구, 단핵구)가 또한 사이토카인 검정법을 위한 판독

세포로서 사용될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0179] 한 실시양태에서, 신호전달 검정법은 판독 세포의 수용체에 대하여 효능제 활성을 가지는 분자 (예컨대, 항체 또는 사이토카인)를 분비하는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 확인하는 데 사용된다. 수용체에의 결합시, 판독 세포 집단에 대한 효과로는 형광성 리포터 발현, 세포내 형광성 리포터 전위, 성장률 변화, 세포 사멸, 형태 변화, 분화, 판독 세포 표면 상에서 발현되는 단백질의 변화 등에 의해 시각화되는, 신호전달 경로의 활성화를 포함할 수 있다.

[0180] 수개의 조작된 리포터 세포주가 상업적으로 이용가능하고, 이는 상기 검정법을 수행하는 데 사용될 수 있다. 그 예로는 패쓰헌터 세포® (디스커브Rx), TANGO™ 세포 (라이프 테크놀러지즈) 및 EGFP 리포터 세포 (써모사이언티픽(ThermoScientific))를 포함한다.

[0181] 한 실시양태에서, 바이러스 중화 검정법은 표적 판독 세포 또는 표적 보조 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스의 능력을 방해하는 생체분자, 예컨대, 항체를 분비하는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 확인하고/거나, 선별하는 데 사용된다. 본 방법의 한 실시양태는 도 16에 제시되어 있다. 도 16을 참조하면, 예시된 실시양태는 생체분자, 예컨대, 각각 항체 (252) 및 (253)를 분비하는 효과기 세포 (250) 및 효과기 세포 (251)를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 예시된 실시양태는 판독 세포 (254)를 포함하는 동질성 판독 세포 집단을 추가로 포함한다. 효과기 세포 (250) 및 (251)는 생체분자, 예컨대, 항체 (252) 및 (253)를 분비하고, 이는 챔버 내의 배지로 확산된다. 챔버는, 일반적으로 판독 세포 (254)를 감염시키는 바이러스 (255) (보조 입자)로 펄싱된다. 항체 (252) 또는 (253)는 바이러스 (255)에 결합함으로써 바이러스가 판독 세포 (254)에 결합하지 못하도록 막는다. 따라서, 예상되는 감염은 관찰되지 않고, 이는 효과기 세포 (250) 또는 (251) 중 하나가 바이러스 (255)를 중화시킬 수 있는 항체를 분비하는 것임을 나타낸다.

[0182] 바이러스 중화 검정법은 또한 판독 세포 상의 바이러스에 대한 수용체에 결합하는 생체분자를 생산하는 효과기 세포의 존재를 확인할 수 있도록 적합화될 수 있다. 본 경우에서, 항체, 예컨대, 항체 (252)의 판독 세포 (254) 상의, 바이러스 (255)에 대한 수용체 (256)에의 결합은 바이러스와 수용체의 상호작용을 차단함에 따라 어떤 감염도 관찰되지는 않을 것이다.

[0183] 바이러스 감염 평가는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 감염 후 판독 세포에 의해 발현되는 형광성 단백질을 포함하도록 조작될 수 있고, 바이러스 감염 동안 상향조절되는 판독 세포 내의 형광성 단백질의 발현, 바이러스 감염 동안 증가되는 판독 입자 상에 포획되고, 측정되는, 판독 세포 또는 보조 세포로부터의 단백질의 분비, 판독 세포 또는 보조 세포의 사멸, 판독 세포 또는 보조 세포의 형태 변화, 및/또는 판독 세포의 응집이 있다.

[0184] 한 실시양태에서, 바이러스 중화 검정법은 개별 마이크로 반응기 내에서 단일 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 또는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 바이러스 중화 검정법은 단일 판독 세포, 또는 이질성 판독 세포 집단을 이용하여 수행된다. 한 실시양태에서, 본 방법은 반응이 이루어지는 판독 세포의 자극, 또는 오히려는 그의 결여를 더욱 정확하게 평가할 수 있도록 하기 위해 동질성 판독 세포 집단을 이용하여 수행된다. 물론, 본 방법은 복수 개의 마이크로챔버에서 복수 개의 세포 집단에 대하여 동시에 수행될 수 있다.

[0185] 예를 들어, 바이러스 중화 검정법을 위한 상업적으로 이용가능한 세포주로는 MDCK 세포 (ATCC)가 있고, CEM-NKR-CCR5 세포 (NIH 지원 시약 프로그램(NIH Aids 시약 Program))는 본원에 기술된 방법 및 장치와 함께 사용될 수 있다.

[0186] 또 다른 실시양태에서, 효소 중화 검정법은 효과기 세포가 표적 효소를 억제시키는 생체분자를 나타내는지 또는 분비하는지 여부를 측정하기 위해 수행된다. 본 발명의 한 실시양태는 도 17에 제공되어 있다. 도 17을 참조하면, 예시된 실시양태는 생체분자, 예컨대, 각각 단백질 (282) 및 (283)을 분비하는 효과기 세포 (280) 및 효과기 세포 (281)를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 예시된 실시양태는 표적 효소 (285)가 그에 접합되어 있는 것인 비드 (284)와 같은 동질성 판독 입자 집단을 추가로 포함한다. 그러나, 또 다른 실시양태에서, 표적 효소 (285)는 장치의 표면에 연결되어 있거나, 또는 가용성이다. 단백질 (282) 및 (283)은 배지를 통해 확산되고, 단백질 (282)은 표적 효소 (285)에 결합하여 그의 활성을 억제시키는 반면, 단백질 (283)은 표적 효소에 결합하지 못한다. 한 실시양태에서, 챔버에 존재하는 기질에 대한 효소 활성, 또는 오히려는 그의 결여를 검출하는 것은 형광성 판독, 비색 판독, 침전 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 당업계에 공지된 방법에 의해 평가된다.

[0187] 또 다른 실시양태에서, 효소 중화 검정법은 개별 챔버마다 단일 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단, 또는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 효소 중화 검정법은 개별 챔버 내의 단일 판독 입자를 이용하여 수행된다. 한 실시양태에서, 효소 중화 검정법은 검정 반응에 변동이 있는 세포 집단을 확인하기 위해 복수 개의 세포 집단에 대해 수행된다.

[0188] 또 다른 실시양태에서, 검정 방법은, 결국에는 판독 입자에 대해 영향을 미치는 분자를 분비하는 것인 제2 유형의 효과기 입자의 활성화를 유도하는 분자를 보이거나, 또는 분비하는 효과기 세포의 존재를 확인하기 위해 제공된다. 따라서, 본 실시양태에서, 세포 집단은 개별 미세유동 챔버로 제공된다. 본 방법의 한 실시양태는 도 18에 제공되어 있다. 도 18을 참조하면, 예시된 실시양태는 상이한 유형의 인접한 효과기 세포, 본 경우에서는, 판독 입자 (464)에 의해 포획되는 또 다른 유형의 분자 (463) (예컨대, 사이토카인, 항체)의 분비를 유도하는 효과기 세포 (462)를 활성화시키는 것인, 그의 표면 상에 분자 (461) (예컨대, 항체, 표면 수용체, 주조직적합성 복합체 분자 등)를 보이는 효과기 세포 (460)를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 본 일례에서, 판독 입자 (464)는 분비된 분자 (463)에 특이적인 항체 (465) 또는 수용체로 관능화된다.

[0189] 또 다른 실시양태에서, 보조 입자에 의해 활성화될 때, 효과기 세포는 표현형, 예컨대, 증식, 생존능, 형태, 이동성 또는 분화에 변화를 보일 수 있다. 본 경우에서, 효과기 세포는 또한 판독 입자이다. 상기 효과는 보조 입자에 의해, 및/또는 활성화된 효과기 세포에 의한 단백질의 자가분비성 분비에 의해 일어날 수 있다.

[0190] 도 19를 참조하면, 예시된 실시양태는 상이한 유형의 제2 효과기 세포, 본 경우에서는 효과기 세포 (472)를 활성화시키는 분자 (471) (예컨대, 항체, 사이토카인 등)를 분비하는 효과기 세포 (470)를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 효과기 세포 (472)는 일단 활성화되고 나면, 판독 입자 (474)에 의해 포획되는 또 다른 유형의 분자 (473) (예컨대, 사이토카인, 항체)를 분비한다. 본 일례에서, 판독 입자 (474)는 분비된 분자 (473)에 특이적인 항체 (475) 또는 수용체로 관능화된다.

[0191] 본원에서 제공하는 바와 같이, 해리 속도가 낮은 단일클론 항체는, 이 또한 같은 항원에 대해 특이적이지만, 해리 속도는 더욱 빠른 단일클론 항체로 이루어진 (같은 챔버 내의) 큰 배경의 존재하에서 검출가능하다. 그러나, 친화성은 또한 본원에서 제공하는 장치 및 방법으로 측정가능하며, 따라서, 결합 속도 또한 측정될 수 있다. 이러한 측정은 광학 시스템의 감도 뿐만 아니라, 포획 시약 (예컨대, 비드)의 결합능에 의존한다. 특이성을 검정하기 위해, 오직 원하는 특이성을 가지는 항체에만 결합하도록 관심의 대상이 되는 에피토프를 제시하도록 포획 시약 (판독 입자)을 디자인할 수 있다.

[0192] 도 20을 참조하면, 예시된 실시양태는 같은 항원에 대하여 특이성을 가지지만, 친화도는 상이한 항체를 분비하는 동질성 세포 집단을 포함한다. 본 검정법은 고 친화성 항체를 생산하는 1 이상의 효과기 세포를 함유하는 집단 내의 효과기 세포를 확인하는 데 사용된다. 효과기 세포 (450) 및 (451)는 표적 에피토프에 대하여 친화도가 낮은 항체 (453) 및 (454)를 분비하는 반면 (제시되지 않음), 효과기 세포 (452)는 표적 에피토프에 대하여 친화도가 높은 항체 (455)를 분비한다. 항체 (453), (454), 및 (455)는 판독 비드 (456)를 포함하는 동질성 판독 입자 집단에 의해 포획된다. 이어서, 모든 항체에 결합하는 형광 표지화된 항원 (제시되지 않음)과 함께 판독 비드를 인큐베이션시킨다. 비-표지화된 항원 (제시되지 않음)으로 세척시, 판독 비드가 그의 표면 상에 고치환성 항체 (455)를 보이는 경우에만, 형광 표지화된 항원이 남게 된다.

[0193] 도 21을 참조하면, 또 다른 예시된 실시양태는 생체분자, 예컨대, 항체 (261)를 분비하는 효과기 세포 (260)를 포함한다. 예시된 실시양태는 광학적으로 식별가능한 판독 입자, 예컨대, 각각 상이한 표적 에피토프 (264) 및 (265)를 보이는 비드 (262) 및 (263)으로 이루어진 이질성 판독 입자 집단을 추가로 포함한다. 항체 (261)는 챔버에서 확산되고, 여기서, (265)가 아닌 에피토프 (264)에 결합한다. 한 실시양태에서, 항체 (261)의 에피토프 (264)에 우선적 결합은 비드 (263)가 아닌 비드 (262)의 형광에 의해 관찰된다.

[0194] 본 예시된 실시양태에서, 비드 (262) 및 (263)은 교차 반응성 평가를 위해 형상에 의해 광학적으로 식별가능하다. 그러나, 판독 입자는 또한 다른 수단, 예컨대, 하나 이상의 특징, 예컨대, 형광 표지화 (상이한 형광 파장), 다른 수준의 형광 강도 (예컨대, 형광 강도, 형태, 크기, 표면 염색 및 미세유동 챔버내 위치가 상이한 스타파이어(Starfire)™ 비드 사용)에 의해서도 또한 식별가능하다.

[0195] 한 실시양태에서, 비드 (262) 및 (263)은 예컨대, 셀 펜스와 같은 별도의 판독 구역으로 분리될 때 광학적으로 식별가능하다. 별법으로, 상이한 색상의 형광단이 판독 비드를 광학적으로 식별하는 데 사용될 수 있다.

[0196] 별법으로, 특이성은 표적 에피토프에 결합하는 것에 대하여 분비된 항체와 경쟁하는 또 다른 항체를 포함함으로

써 측정될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 항원을 보이는 판독 입자에 결합된, 분비된 항체의 존재는 형광 표지화된 2차 항체로 확이된다. 이어서, 상이한 숙주로부터 생성되고, 항원 상의 공지된 표적 에피토프에 결합하는 것으로 공지된 항체와 경쟁하는 비-표지화된 경쟁 항체를 첨가하면, 분비된 항체가 경쟁 항체와 동일한 표적 에피토프에 결합하는 경우에만 분비된 항체의 치환에 기인하여 형광 감소가 일어난다. 별법으로, 특이성은 분비된 항체가 낮은 특이성을 가지는 경우, 표적 에피토프에의 분비된 항체의 결합과 경쟁하는 다양한 항원의 혼합물을 첨가함으로써 측정된다. 별법으로, 특이성은 비드 상에 분비된 항체를 포획한 후, 차별적으로 표지화된 항원을 사용하여 분비된 항체의 결합 특성을 평가함으로써 측정된다.

[0197] 표적 중 하나에 결합하는 항체를 분비하는 2개 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단에 대하여 수행될 때, 본원에 기술된 특이성 측정은 본질적으로 다중클론 측정이다.

[0198] 본 발명의 다양한 실시양태에서, 생체분자를 분비하는 효과기 세포의 존재를 확인하는 방법은 효과기 세포의 하나 이상의 세포내 화합물의 존재 또는 부재를 분석하는 분석법과 커플링된다. 도 22를 참조하면, 관심의 대상이 되는 생체분자 (522) (예컨대, 항체, 또는 사이토카인)를 분비하는 1 이상의 효과기 세포 유형 (520), 및 관심의 대상이 되는 생체분자를 분비하지 않는 또 다른 효과기 세포 유형 (521)을 포함하는 세포 집단을 관심의 대상이 되는 생체분자를 포획하도록 관능화된 판독 입자 (523)를 포함하는 판독 입자 집단의 존재하에서 인큐베이션시킨다. 인큐베이션 기간 후, 효과기 세포 유형 (520) 및 (521)을 포함하는 세포 집단을 용해시켜 집단 중 세포의 세포내 성분을 방출시킨다. 판독 입자 (523)은 또한 관심의 대상이 되는 세포내 생체분자 (524) (예컨대, 핵산, 단백질, 항체 등)를 포획하도록 관능화된다. 세포 용해는 당업자에게 공지되어 있는 상이한 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0199] 한 실시양태에서, 바람직한 결합 특성을 가진 분비된 생체분자로 이루어진 다중클론 혼합물을 확인하는 방법을 제공한다. 검정법은 표적 에피토프, 표적 분자, 표적 세포 유형에 대하여 공지된 친화도를 가지는 항체를 생산하는 효과기 세포의 이질성 혼합물을 이용하여 수행될 수 있다. 이어서, 혼합물 맥락에서의 표적의 결합은 개별 효과기 세포 단독의 맥락에서의 표적의 결합과 비교하여 예를 들어, 혼합물이 효과를 증진시키는지 여부를 측정할 수 있다.

[0200] 본원에 기술된 결합 및/또는 기능성 검정법을 조합한 다기능성 분석법은 다중 판독 구역, 다중 효과기 구역, 다중 판독 입자 유형, 또는 그의 일부 조합을 가짐으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, 관류 단계는 상이한 기능성 실험을 위한 시약을 교환하기 위해 세포외 효과 검정법 사이에 수행될 수 있다.

[0201] 다기능성 검정법의 한 실시양태는 도 23에 제공되어 있다. 도 23을 참조하면, 판독 입자의 3개의 서브세트에 대한 효과기 세포의 세포외 효과를 동시에 평가하는 미세유동 챔버는 일반적으로 (410)으로 제시되어 있다. 미세유동 챔버 (410)는 챔버를 4개의 구역으로 나누는 셀 펜스 (420) 및 (421)를 포함한다. 본 일례에서는 셀 펜스 (420) 및 (421)가 서로 직각인 것으로 도시되어 있지만, 4개의 구역이 생성되는 한, 펜스의 정확한 배치는 달라질 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 또한, 다기능성 검정법을 (일련으로 또는 동시에) 수행하는 데 셀 펜스가 필요한 것은 아님을 당업자는 이해할 것이다. 한 실시양태에서, 상이한 구역이 세포 집단 및 판독 입자 전달과 관련하여 주소 지정 능력이 있는 한, 셀 펜스 이외의 구조를 포함함으로써 구역을 생성할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 다기능성 검정법은 셀 펜스 또는 구조 없이도 수행된다. 오히려, 각 검정법은 상이한 파장에서 빛을 방출하는 형광성 분자를 이용함으로써 챔버에서 동시에 또는 일련으로 수행된다.

[0202] 도 23에 도시된 실시양태에서, 각각 항체 (419) 및 (423)를 분비하는 효과기 세포 (411) 및 (422)는 챔버 (410)의 좌측 상부 구역으로 전달되어 효과기 구역 (415)을 정의한다. 판독 입자 (412), (413), 및 (414)는 나머지 구역으로 전달되어 각각 판독 구역 (416), (417), 및 (418)을 정의한다. 한 실시양태에서, 판독 입자 (412), (413), 및 (414)는 판독 입자의 이질성 집단을 구성한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 판독 입자 (412), 및 (414)는 같은 항원의 상이한 에피토프를 보이는 상이한 크기의 비드이고, 판독 입자 (413)는 자연살해 세포 (424)의 존재하에서 항원을 보이는 세포이다. 따라서, 주어진 에피토프에 선택적으로 결합하여 자연살해 세포에 의한 판독 세포의 사멸을 유도할 수 있는 효과기 세포의 존재 또는 부재는 단일 챔버에서 동시에 평가될 수 있다.

[0203] 별법으로, 판독 입자 (412), (413), 및 (414)는 동일하고, 단일 챔버 중 효과기 세포의 단일 세포에 의해 부여되는 세포외 효과를 다중으로 비의존적으로 측정할 수 있다. 별법으로, 입자 (412), 및 (414)는 식별가능하고, 검정법은 일련을 수행된다.

[0204] 한 실시양태에서, 하나 이상의 세포외 효과의 존재가 분석된다. 효과에 따라, 조합된 세포외 효과의 존재 또는

부재가 바람직할 수 있는지 당업자는 이해할 것이다. 유사하게, 또한 원하는 특성으로는 하나 이상의 유형의 세포외 효과의 존재, 및 상이한 유형의 세포외 효과의 부재를 포함하는 것도 가능하다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 다기능성 검정법은 판독 세포 상의 수용체 에피토프에 결합하지만, 상응하는 신호전달 경로의 활성화를 유도하지 않는 항체를 분비하는 효과기 세포를 확인하는 데 사용된다.

[0205] 한 실시양태에서, 다기능성 검정법은 예를 들어, 상이한 효과기 세포, 또는 효과기 세포의 조합을 상이한 구역으로 도입함으로써 다중 효과기 구역을 포함하는 챔버에서 수행된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 표적 항원에 대해 공지된 친화성을 가지는 항체를 생산하는 상이한 세포 집단은 챔버의 상이한 효과기 구역 내로 도입된다. 이어서, 혼합물 맥락에서의 표적의 결합은 개별 효과기 세포 단독의 맥락에서의 표적의 결합과 비교될 수 있다. 따라서, 다중 효과기 구역을 사용함으로써 단일 챔버에서 다중 조합으로 스크리닝할 수 있다.

[0206] 본원에서 제공하는 검정법의 한 실시양태에서, 판독 입자를 미세유동 챔버에서 세포 집단과 인큐베이션시킨 후, 형광성을 측정하여 집단내 세포가 세포외 효과를 보이는지 여부에 대해 측정한다. 본 실시양태에서, 판독 입자 집단은 형광 표지화되고, 형광 변화는 세포외 효과의 존재 및/또는 크기와 상관 관계가 있다. 판독 입자 집단은 직접 또는 간접적으로 형광 표지화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 명세서 전역에서 제공하는 바와 같이, 보조 입자 (예컨대, 보조 세포들)는 용이한 형광성 판독을 지원하기 위해 챔버에 제공된다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 정확한 영상화 및 형광성 측정이 이루어질 수 있도록 1 초점면으로 판독 입자 및 효과기 세포를 제공하는 검정법을 디자인할 수 있도록 주의를 기울여야 한다.

[0207] 한 실시양태에서, 판독 입자 반응은 자동 고해상도 현미경법을 사용하여 모니터링된다. 예를 들어, 영상화는 액시오버트(Axiovert) 200 (자이스(Zeiss)) 또는 DMIRE2 (레이카(Leica)) 전동 도립 현미경 상에서 20X (0.4 N.A.) 대물렌즈를 사용함으로써 모니터링될 수 있다. 본원에서 제공하는 자동 현미경법을 사용함으로써 대략 30분 경과 후, 1개의 명시야 및 3개의 형광성 채널을 포함하는, 4,000개의 챔버 어레이를 완전하게 영상화할 수 있다. 상기 플랫폼은 문헌 [Lecault *et al*. (2011). *Nature Methods* 8, pp. 581-586] (상기 문헌은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술된 바와 같이, 다양한 칩 디자인으로 적합화될 수 있다. 중요하게는, 본원에서 사용되는 영상화 방법은 세포에 대한 광손상은 최소화시키면서, 효과 양성 챔버에서 충분한 신호를 달성한다.

[0208] 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 효과기 세포 검정법은 장기간 세포 배양으로부터 이익을 얻게 되며, 따라서, 장치에서 유지되는 효과기 세포는 생존가능하고, 건강한 세포여야 한다. 효과기 세포 검정법에서 판독 세포 또는 보조 세포가 사용되는 본 실시양태에서, 상기 세포는 건강한 상태로 유지되어야 하고, 생존가능하며, 건강하여야 한다는 것을 이해할 것이다. 본원에서 제공하는 유체 구조는 효과기 세포 및 판독 세포 생존능을 유지시키기 위해 배지 조건을 주의하여 정확하게 제어할 수 있으며, 이로써, 기능성 검정법이 수행될 수 있다. 예를 들어, 일부 세포 유형은 분비되는 생성물의 축적에 따라 자가분비 또는 측분비 인자를 필요로 한다. 예를 들어, CHO 세포 성장률은 시딩 밀도에 고도로 의존한다. 4 nL 챔버로 단일 CHO 세포를 한정하는 것은 250,000개의 세포/ml의 시딩 밀도에 상응하는 것으로, 이는 종래의 대규모 배양법과 유사하다. 도 73에 제시된 바와 같이, 단일 CHO 세포는 다중웰 플레이트에 플레이팅되었을 때보다 미세유동 장치에서 성장률이 더 높다. 이는 높은 시딩 밀도로 성장하기 때문에, CHO 세포는 수일 동안 관류를 필요로 하지 않을 수 있다. 그러나, 다른 세포 유형, 특히 사이토카인-의존성인 것 (예컨대, ND13 세포, BaF3 세포, 조혈 줄기 세포)는 전형적으로 대규모 배양법에서는 고농도에 도달하지 않고, 사이토카인 고갈을 막기 위해 미세유동 장치에 빈번한 공급을 필요로 할 수 있다. 사이토카인은 배지에 첨가될 수 있거나, 지지 세포에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 골수 유래 기질 세포 및 호산구는 그의 IL-6의 다른 인자의 생산에 기인하여 형질 세포의 생존을 지지하는 것으로 나타났다 (문헌 [Wols *et al.*, (2002), *Journal of Immunology* 169, pp. 4213-21]; [Chu *et al.* (2011), *Nature Immunology*, 2, pp. 151-159] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). 이러한 경우, 관류 빈도는 영양소 고갈은 막으면서, 동시에 측분비 인자는 충분히 축적될 수 있도록 조절될 수 있다.

[0209] 한 측면에서, 본 발명은 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단이 판독 입자 (예컨대, 세포 표면 수용체를 포함하는 세포)에 대해 세포외 효과를 발휘하는지 여부를 측정하는 방법을 제공한다. 효과기 세포는 이질성 세포 집단, 동질성 집단, 또는 단일 세포로 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 효과기 세포는 항체 분비 세포이다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 세포외 특성으로는 판독 입자에 대한 세포외 효과, 예를 들어, 판독 세포에 대한 세포 표면 수용체의 억제, (길항작용) 또는 활성화 (효능 작용) (예컨대, 항체 분비 세포에 의해 분비된 항체의 효능제 및/또는 길항제 특성)를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 세포외 효과는 막횡단 단백질에 대한 효능제 또는 길항제 효과이며, 추가의 실시양태에서, 이는 상기 막횡단 단백질은 G 단백질 커플링된 수용체 (GPCR), 수용체 티로신 키나제 (RTK), 이온 채널 또는 ABC 수송체이다. 추가의 실시양태에서,

수용체는 사이토카인 수용체이다. GPCR 및 RTK 이외의 다른 대사성 수용체에 대한 세포외 효과가 평가될 수 있고, 예를 들어, 구아닐릴 시클라제 수용체에 대한 세포외 효과는 구아닐릴 시클라제 수용체를 발현하는 판독 세포 집단과 세포 집단을 인큐베이션시키면서 평가될 수 있다.

[0210] 판독 세포가 사용되는 실시양태에서, 판독 세포는 살아있는 것이거나, 또는 고정되어 있는 것일 수 있다. 고정된 판독 세포와 관련하여, 한 실시양태에서, 세포외 효과는 고정된 판독 세포의 세포내 단백질에 대한 효과이다. 세포외 효과는 또한 살아있는 것이거나, 또는 고정되어 있는 판독 세포의 세포외 단백질, 또는 살아있는 판독 세포의 분비된 단백질에 대해 측정될 수 있다.

[0211] 또 다른 실시양태에서, 판독 세포는 하기 유형의 세포 수용체 중 하나를 발현하고, 세포외 효과 검정법은 세포 수용체의 결합, 효능 작용 또는 길항작용을 측정한다: 수용체 세린/트레오닌 키나제, 히스티딘-키나제 관련 수용체.

[0212] 특정 수용체 (예컨대, 수용체 세린/트레오닌 키나제, 히스티딘-키나제 관련 수용체 또는 GPCR)가 오르판 수용체인, 즉, 특정 수용체를 활성화시키는 리간드가 공지되어 있지 않은 실시양태에서, 본원에서 제공하는 방법을 통해 오르판 수용체를 발현하는 판독 세포에 대하여 세포외 검정법을 수행하고, 오르판 수용체를 발현하는 판독 세포에 대하여 세포외 효과의 변화를 가지는 효과기 세포를 포함하는 세포 집단 또는 서브집단을 확인함으로써 특정 오르판 수용체에 대한 리간드를 발견할 수 있다.

[0213] 한 실시양태에서, 세포 표면 단백질은 막횡단 이온 채널이다. 추가의 실시양태에서, 이온 채널은 리간드 개폐형 이온 채널이고, 미세유동 검정법에서 측정되는 세포외 효과는 이온 채널 개폐 조절, 예를 들어, 효능제 결합에 의한 이온 채널의 개방, 및/또는 길항제 결합에 의한 이온 채널의 폐쇄/차단이다. 길항제 또는 효능제는 예를 들어, 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 이질성 세포 집단 중 하나 이상의 효과기 세포에 의해 분비되는 생체분자 (예컨대, 항체)일 수 있다. 본원에 기술된 세포외 검정법을 사용하여 Cys-루프 수퍼패밀리 중 리간드 개폐형 이온 채널, 이온성 글루타메이트 수용체, 및/또는 ATP 개폐형 이온 채널을 발현하는 세포에 대한 효과기 세포의 세포외 효과를 측정할 수 있다. 음이온성 cys-루프 이온 개폐형 채널의 구체적인 예로는 $GABA_A$ 수용체 및 글리신 수용체 (GlyR)를 포함한다. 양이온성 cys-루프 이온 개폐형 채널의 구체적인 예로는 세로토닌 (5-HT) 수용체, 니코틴성 아세틸콜린 (nAChR) 및 아연 활성화된 이온 채널을 포함한다. 이온 채널에 대해 효능 작용을 하거나, 또는 길항시킴으로써 효과기 세포가 각 세포에 대해 세포외 효과를 미치는지 여부를 측정하기 위해 상기 언급된 채널 중 하나 이상을 판독 세포에 의해 발현시킬 수 있다. 이온 유입 측정은 전형적으로 단기간에 이루어지고 (즉, 수초), 이는 그의 실행을 위해 정확한 유체 제어를 필요로 한다. 상업적으로 이용가능한 이온 채널 검정법의 예로는 플루오-4-직접 칼슘 검정용 키트(Fluo-4-Direct Calcium Assay Kit) (라이프 테크놀러지즈), FLIPR 막 전위 검정용 키트 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices))를 포함한다. 이온 채널을 발현하는 세포주 또한 상업적으로 이용가능하다 (예컨대, 프리시즌(PrecisION)™ 세포주, EMD 밀리포어).

[0214] 한 실시양태에서, 세포 표면 단백질은 ATP-결합 카세트 (ABC) 수송체이고, 측정되는 세포외 효과는 막을 가로지르는 기질의 수송이다. 판독 입자는 단백질을 발현하는 세포로부터 유래된 막 소낭 (예컨대, 게노멤브레인 ABC 수송체 소낭(GenoMembrane ABC Transporter Vesicles) (라이프 테크놀러지즈))일 수 있고, 이는 비드 상에 고정화될 수 있다. 예를 들어, ABC 수송체는 투과성 당단백질 (다중약물 저항성 단백질)일 수 있고, 효과는 판독 세포 중 칼세인의 형광 강도에 의해 측정될 수 있다. 바이브란트™ 다중약물 저항성 검정용 키트(Vybrant™ Multidrug Resistance Assay Kit) (몰레큘라 프로브(Molecular Probes))가 상기 검정법을 수행하는 데 상업적으로 이용가능하다.

[0215] 세포외 효과는 또한 이온성 글루타메이트 수용체, 예컨대, AMPA 수용체 (GluA 부류), 카이나이트 수용체 (GluK 부류) 또는 NMDA 수용체 (GluN 부류)를 발현하는 판독 세포에 대해 평가될 수 있다. 유사하게, 세포외 효과는 또한 ATP 개폐형 채널 또는 포스파티딜이노시톨 4-5-비스포스페이트 (PIP2)-개폐형 채널을 발현하는 판독 세포에 대해 평가될 수 있다.

[0216] 본 명세서 전역에 걸쳐 제공하는 바와 같이, 본 발명은 세포외 효과의 변화를 보이는 세포 집단을 확인하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 복수 개의 개별 세포 집단을 별도의 미세유동 챔버 내에 보유하는 단계로서, 개별 세포 집단 중 1 이상이 하나 이상의 효과기 세포를 포함하고, 별도의 미세유동 챔버의 내용물이 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단을 추가로 포함하는 것이 단계, 미세유동 챔버 내에서 개별 세포 집단 및 판독 입자 집단을 인큐베이션시키는 단계, 세포외 효과의 존재에 대하여 개별 세포 집단을 검정하는 단계로서, 여기서, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단은 세포외 효과를 판독하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포외 효과는 수용체 티로신 키나제 (RTK)에 대한 효과, 예를 들어, RTK에의 결합, RTK의 길항작

용, 또는 RTK의 효능 작용이다. RTK는 폴리펩티드 성장 인자, 사이토카인 및 호르몬에 대하여 고 친화성 세포 표면 수용체이다. 현재까지, 인간 게놈에서 대략 60개의 수용체 키나제 단백질이 확인되어 있다 (문헌 [Robinson et al. (2000). *Oncogene* 19, pp. 5548-5557] (상기 문헌은 그 전문이 모든 목적을 위해 참조로 포함된다)). RTK는 세포 프로세스를 조절하고, 다수의 암 유형의 발생 및 진행에서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다 (문헌 [Zwick et al. (2001). *Endocr. Relat. Cancer* 8, pp. 161-173] (상기 문헌은 그 전문이 모든 목적을 위해 참조로 포함된다)).

[0217] 세포외 효과가 RTK에 대한 효과인 경우, 본 발명은 특정 RTK 부류 또는 구성원으로 한정되지 않는다. 대략 20개의 상이한 RTK 부류가 확인되었고, 이들 부류 중 어느 하나의 구성원에 대한 세포외 효과는 본원에서 제공하는 방법 및 장치를 이용함으로써 스크리닝될 수 있다. 하기 표 2는 상이한 RTK 부류, 및 각 부류의 대표적인 구성원을 제공하며, 그 각각의 것들은 판독 입자, 예컨대, 판독 세포 또는 소낭에서 발현될 때 본원에서 사용하기 위한 것으로 변형될 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에서는 표 2에 제공된 서브부류 중 하나의 RTK에 대하여 세포외 효과를 보이는 효과기 세포를 포함하는 하나 이상의 집단을 확인하기 위하여 동시에 수행하는 방식으로 복수 개의 세포 집단을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 세포외 효과를 보이는 ASC를 포함하는 하나 이상의 세포 집단을 단리시켜 단리된 세포 집단을 수득하는 단계, 및 추가로, 단리된 서브집단에 대하여 한계 희석으로 하나 이상의 추가의 세포외 효과 검정법을 수행하여 세포외 효과를 보이는 ASC를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 세포외 효과 검정법은 본원에서 제공하는 미세유동 방법을 통해, 또는 벤치탑 검정법을 통해 수행될 수 있다. 별법으로, 일단 세포 집단이 RTK에 대하여 세포외 효과를 보이는 세포를 포함하는 것으로 확인되고 나면, 세포 집단을 회수하고, 용해시키고, 핵산을 증폭시킨다. 추가의 실시양태에서, 핵산은 하나 이상의 항체 유전자이다.

[0218] 한 실시양태에서, 본 발명은 예를 들어, 분비 생성물, 예컨대, 단일클론 항체를 통해 RTK를 길항시키거나, 그에 대해 효능 작용을 하는 (즉, 세포외 효과를 보이는) 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 확인하는 것에 관한 것이다. 효과기 세포는 효과기 세포만 단독으로 존재하거나, 또는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단에 존재한다.

표 2

표 2. RTK 키나제 및 각 부류의 대표 구성원

RTK 부류	대표 구성원	대표 리간드	세포 과정(들)
RTK 부류 I (표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 패밀리, ErbB 패밀리로도 지칭)	• ErbB-1 (표피 성장 인자 수용체)	• 표피 성장 인자 (EGF) • 형질전환 성장 인자 α (TGF-α) • 헤파린-결합 EGF-유사 성장 인자 (HB-EGF) • 암피레귤린 (AREG) • 베타셀룰린 • 에피겐 • 에피레귤린	• 종양 발생에 업루틸 과다발현
	• ErbB-2 (인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2)/분화 클러스터 340 (CD340) / 프로토-온코진 Neu)	• 단일클론 항체 트라스투주맙 (허셉틴)	• 종양 발생 (예, 유방, 난소, 위, 자궁)
	• ErbB-3 (인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER3))	• 뉴레귤린 1 • 증식 관련 단백질 2G4 (PA2G4) (EBP1 또는 ErbB3 결합 단백질 1) • 포스파티딜이노시톨 3 키나제 조절 서브유니트 알파 (PIK3R1) • G 단백질 신호전달 조절 인자 4 (RGP4)	• 증식 및 분화 • 종양형성 (과다발현)
	• ErbB-4 (인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER4))	• 헤파린-결합 EGF-유사 성장 인자 (HB-EGF) • 베타셀룰린 • 에피레귤린 • 뉴레귤린 1 • 뉴레귤린 2 • 뉴레귤린 3 • 뉴레귤린 4	• RTK 돌연변이는 암과 관련되어 있다
RTK 부류 II	• 인슐린 수용체	• 인슐린	• 글루코스 흡수 유도

[0219]

표 2. RTK 키나제 및 각 부류의 대표 구성원

RTK 부류	대표 구성원	대표 리간드	세포 과정(들)
(인슐린 수용체 패밀리)		• 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) / 소마토메딘 C • 인슐린-유사 성장 인자 2 (IGF-2)	
RTK 부류 III (혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 수용체 패밀리)	• PDGFRα • PDGFRβ	• PDGF A/B/C 및 D • PDGF A/B/C 및 D	• 섬유증 • 암
	• 비만/줄기 세포 성장 인자 수용체 (SCFR) / c-Kit / CD117	• 줄기 세포 인자(SCF) / c-kit 리간드 /스틸 인자	• 중양형성 • 세포 생존, 증식, 분화
	• 콜로니 자극 인자 1 수용체 / (CD 115) / 대식세포 콜로니-자극 인자 수용체 (M-CSFR)	• 콜로니 자극 인자 1	• 대식세포의 생산, 분화 및 기능
	• 분화 클러스터 항원 135 (CD 135) / Fms-유사 티로신 키나제 3 (FLT-3)	• Flt3 리간드 (FLT3L)	• 다수의 조혈 전구 세포의 표면 상에서 발현 • 급성 골수성 백혈병에서 돌연변이 • 세포 생존 • 증식 • 분화
RTK 부류 IV (FGF 수용체 패밀리)	• 섬유아세포 성장 인자 수용체-1 (CD331) • 섬유아세포 성장 인자 수용체-2 (CD332) • 섬유아세포 성장 인자 수용체-3 (CD333) • 섬유아세포 성장 인자 수용체-4 (CD334) • 섬유아세포 성장 인자 수용체-6	• 섬유아세포 성장 인자 1-10	• 상처 치유 • 배아 발생 • 혈관신생
RTK 부류 V (VEGF 수용체 패밀리) (선택적 스플라이싱에 의존하는 결합형 또는 가용성 막)	• VEGFR1	• VEGF-A • VEGF-B	• 체세포분열

[0220]

표 2. RTK 키나제 및 각 부류의 대표 구성원

RTK 부류	대표 구성원	대표 리간드	세포 과정(들)
RTK 부류 VI (간세포 성장 인자 수용체 패밀리)	• VEGFR2 • VEGFR3	• VEGF-A • VEGF-C • VEGF-D • VEGF-E • VEGF-C • VEGF-D	• 세포 이동 • 혈관형성 • 혈관신생
	• 간세포 성장 인자 수용체 (GHFR) (MET 또는 MNNG HOS 형질전환 유전자에 의해 코딩).	• 간세포 성장 인자	• 특정 중앙에서 분조절, 혈관신생 유도 • 줄기 세포 및 전구 세포 분화 • 체세포분열, 형태 형성
RTK 부류 VII (Trk 수용체 패밀리)	• 트로포미오신-수용체 키나제 s (Trk) ○ TrkA ○ TrkB ○ TrkC	• 뉴로트로핀 • 신경 성장 인자 (TrkA) • 뇌유래 신경 영양 인자(BDNF) (TrkB) • 뉴로트로핀-3 (NT3) (TrkC)	• 표유동물 신경계에서 시냅스 강도 및 가소성 조절
RTK 부류 VIII (에프린 (Eph) 수용체 패밀리)	• EphA (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) • EphB (1, 2, 3, 4, 5, 6)	• 에프린-A (에프린-A1-5) • 에프린-B (1-4 및 에프린-B6)	• 배아 발생 • 축색 돌기 유도 • 조직 경계 형성 • 면역원성적 지도화 • 세포 이동 • 세포 분화 • 혈관신생 • 암
RTK 부류 IX (AXL 수용체 패밀리)	• 티로신-단백질 키나제 수용체 UFO (AXL)	• 텐신 -유사 C1 도메인 함유포스파타제 (TENC1)	• 유방암 전이의 샘프에서 중배엽으로의 전이 유도성 조절

[0221]

표 2. RTK 키나제 및 각 부류의 대표 구성원

RTK 부류	대표 구성원	대표 리간드	세포 과정(들)
			인자
RTK 부류 X (백혈구 수용체 티로신 키나제 (LTK) 패밀리)	• 백혈구 수용체 티로신 키나제 (*LTK*)	• 안술린 수용체 기질 1 (IRS-1) • Src 상동성 2 도메인 함유 단백질 (Shc) • 포스파티딜이노시톨 3-키나제 조절 서브유니트 알파 (PIK3R1)	• 세포 이동 조절 • 아포프토시스 • 세포 성장 및 분화
RTK 부류 XI (TIE 수용체 패밀리)	• 면역글로불린-유사 및 EGF-유사 도메인 (TIE) 포함 티로신 키나제 1 • TIE 2	• 안지오포이에틴 1 (Tie2 효능제) • 안지오포이에틴 2 (Tie2 길항제) • 안지오포이에틴 3 (Tie2 길항제) • 안지오포이에틴 4 (Tie2 효능제)	• 혈관신생 촉진 • TIE1 은 염증유발성 효과를 가지고, 아테롬성 동맥 경화증에서 중요한 역할을 할 수 있다.(문헌 [Chan et al. (2008). Biochem. Biophys. Res. Commun. 371, pp. 475-479]).
RTK 부류 XII (수용체 티로신 키나제-유사 오르판 수용체 (ROR) 패밀리)	• ROR-1 (신경 영양 티로신 키나제, 수용체-관련 1 (NTRKR1) • ROR-2	• Wnt 리간드 (ROR-2)	• ROR-1 은 중추 신경계에서 신경 돌기 성장을 조절한다.
RTK 부류 XIII (디스코이딘 도메인 수용체 (DDR) 패밀리)	• DDR-1 (CD167a) • DDR-2	• 각종 유형의 콜라겐	• DDR-1 은 유방 종양, 난소 종양, 식도 종양 및 소아 뇌 종양에서 과다발현된다.
RTK 부류 XIV (RET 수용체 패밀리)	• 형질감염 동안재배열된 (RET) 프로토-온코진 • 3 개의 이소폼 (51, 43, 9)	• 신경아교세포-유래신경 영양 인자 (GDNF) 패밀리 리간드	• 히르슈슈프룽병과 관련된 기능 상실 • 각종 유형의 암(예컨대, 갑상샘 수질 암종, 다중 내분비 신생물 2A 형 및 2D 형)과 관련된 기능 획득 돌연변이,
RTK 부류 XV (KLG 수용체 패밀리)	• 티로신-단백질 키나제-유사 7 (*PTK7*) / CCK-4	• 확인된 리간드는 없다	• 발생 • 종양형성 (절단암, 흑색종, 유방암, 급성 골수성 백혈병)

[0222]

표 2. RTK 키나제 및 각 부류의 대표 구성원

RTK 부류	대표 구성원	대표 리간드	세포 표적(들)
RTK 부류 XVI (수용체 티로신 키나제(RYK) 수용체 패밀리 관련)	• RYK 수용체 (선택적 스플라이싱에 기인하는 상이한 이소폼)	• Wnt 리간드	• Wnt 경로 조절 • 혈관신생 • Wnt 신호전달 경로 자극, 예컨대, 축삭 돌기 방향 설정 조절
RTK 부류 XVII (근육-특이 키나제 (MuSK) 수용체 패밀리)	• 근육-특이 키나제 (MuSK) 수용체	• 아그린 (신경-유래 프로테오글리칸)	• 신경근육 접합부 형성

[0223]

[0224] 한 실시양태에서, RTK는 혈소판 유래 성장 인자 수용체 (PDGFR), 예컨대, PDGFRα이다. PDGF는 조합하여 다양한 동종 및 이종이량체를 형성하는 가용성 성장 인자 (A, B, C, 및 D)의 패밀리이다. 상기 이량체는 밀접한 관련이 있는 두 수용체인, 특이성이 상이한 PDGFRα 및 PDGFRβ에 의해 인식된다. 특히, PDGF-α는 PDGFRα에 선택적으로 결합하고, 폐 섬유증, 간경화, 피부경화증, 사구체경화증, 및 심장 섬유증을 비롯한, 섬유성 질화에서 병적 중배엽성 반응을 유도하는 것으로 나타났다 (문헌 [Andrae et al. (2008). *Genes Dev.* 22, pp. 1276-1312] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 마우스에서 PDGFRα의 구성적 활성화는 여러 기관에서 진행성 섬유증을 유도하는 것 또한 입증된 바 있다 (문헌 [Olson et al. (2009). *Dev. Cell* 16, pp. 303-313] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). 따라서, PDGFRα를 억제시키는 요법은, 질환의 최대 40%까지 악화시키는 병증인 섬유증 치료에 대하여 높은 효능을 가지며, 노령화 인구에서는 충족되지 못한 큰 의학적 문제를 나타낸다. 비록 항체 (이마티닙 및 닐로티닙)가 PDGFRα의 억제제로서 조사되기는 하였지만, 이들은 각각 c-kit 및 Flt-3을 비롯한, 다른 중추 RTK에 대하여 유의적인 부정확한 효과를 미치며, 이로써 많은 부작용이 일어나게 된다. 따라서, 이마티닙 및 닐로티닙은 PDGFRα 및 PDGFRβ를 효과적으로 억제시킬 수 있지만, 그의 부작용으로 인해 섬유성 질환을 치료하는 데에는 허용되지 못하고 있으며, 고도로 특이적인 항체 억제

제에 대한 잠재성이 강조되고 있다. 본 발명은 한 실시양태에서, 이마티닙 및 닐로티닙과 비교하여 PDGFRα 특이성이 더 큰 항체를 제공함으로써 상기와 같은 문제를 극복한다.

[0225] PDGFRα는 앞서 섬유증 치료를 위한 표적으로서 확립되었다. 암 치료용으로서, 조기 임상 시험 단계에 진입한 2개의 항-인간 PDGFRα mAb 길항제가 개발 중에 있다 (예컨대, 문헌 [Shah et al., (2010). *Cancer* 116, pp. 1018-1026] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 본원에서 제공하는 방법은 PDGFRα에 결합하는 효과기 세포 분비 생성물의 확인을 촉진시킨다. 추가의 실시양태에서, 분비 생성물은 암 및 섬유증 모델, 둘 모두에서 인간 및 뮤린 PDGFRα, 둘 모두의 활성을 차단시킨다.

[0226] 효과기 세포 분비 생성물이 PDGFRα에 결합하는지 여부를 측정하는 효과기 세포 검정법의 한 실시양태는 생존 및 성장을 위해 사이토카인 IL-3에 엄격하게 의존하지만, 거의 모든 티로신 키나제의 발현 및 활성화를 통해 "IL-3 중독"이 치유될 수 있는 현탁 세포주 (예컨대, 32D 및 Ba/F3)의 사용에 기초한다. 본 접근법은 최초로는 BCR-ABL 융합 온코진을 평가하기 위해 데일리(Dailey) 및 발티모어(Baltimore)에 의해 사용되었고, 소형 분자 티로신 키나제 억제제의 고처리량 스크리닝을 위해 널리 사용되어 왔다 (예컨대, 문헌 [Warmuth et al. (2007). *Curr. Opin. Oncology* 19, pp. 55-60]; [Daley and Baltimore (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, pp. 9312-9316] (상기 문헌은 각각 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 신호전달을 모니터링하기 위해, 어느 수용체도 자연적으로는 발현하지는 않는 뮤린 조혈 세포주인 32D 세포 (판독 세포)에서 PDGFRα 및 PDGFRβ (인간 및 마우스 형태, 둘 모두)를 발현시킨다. 이를 통해 각 경로를 분리시킬 수 있으며, 그렇지 않을 경우, 두 수용체는 대개 공동 발현되기 때문에 분리가 어렵다. 32D 세포에서의 인간 PDGFRα/β의 발현은 기능성 PDGF-유도성 유사 분열 촉진 반응을 일으키는 것으로 앞서 확인된 바 있다 (문헌 [Matsui et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, pp. 8314-8318] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). IL-3의 부재하에서, 32D 세포는 전혀 분열되지 않지만, RTK를 발현하는 세포의 PDGF 자극은 IL-3 요구를 완화시키고, 빠른 유사 분열 촉진 반응을 일으키는 데, 이는 현미경법에 의해 검출가능하다. 한 실시양태에서, 검출가능한 반응은 세포 증식, 형태 변화, 이동성/화학주성 증가, 또는 길항제 존재하의 세포 사멸/아포프토시스이다. 한 실시양태에서, 광학적 다중 방법을 사용하여 본원에서 제공하는 장치 중 하나에서 PDGFRα 및 PDGFRβ 반응, 둘 모두의 억제/활성화를 동시에 측정할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에서 제공하는 장치 중 하나에서 PDGFRα 및 PDGFRβ 반응, 둘 모두의 억제/활성화는 같은 미세유동 챔버에서 일련으로 수행되는 2개의 세포외 검정법에 의해 측정된다.

[0227] 한 실시양태에서, GFP 또는 RFP와 함께 IRES 서열도 또한 포함하는 변형된 pCMV 발현 벡터를 사용하여 인간/마우스 PDGFRα 및 PDGFRβ에 대한 전장의 cDNA (시노 바이오로지칼(Sino Biological))를 32D 세포 (ATCC; CRL-11346)에서 발현시킴으로써 각각이 형광성 영상에 의해 식별가능한 것인 2가지 유형의 "판독 세포"를 제조할 수 있다. 판독 세포를 특징화하여 배지 및 공급 조건을 최적화시키고, PDGF 리간드에 대한 용량 반응을 측정하고, 형태 및 반응의 동적 성질의 특징을 규명한다. 현탁 세포 (예컨대, 32D 또는 Ba/F3) 사용은 단일 세포를 영상 분석법에 의해 쉽게 확인할 수 있고, 또한 부착성 세포보다 (돌출부가) 물리적으로 더 작기 때문에, 컨플루언스에 도달하기 이전에 단일 챔버는 ≥ 100개의 판독 세포를 수용할 수 있다는 이점을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 32D 세포 대신, 32D와 특성이 유사한 것인 또 다른 IL-3 의존성 마우스 세포주인 Ba/F3 세포가 판독 세포로서 사용된다. 32D 및 Ba/F3 세포, 둘 모두는 골수로부터 유래된 것이고, ASC에 대해 최적화된 배지 중에서 잘 성장하고, 이는 또한 ASC를 유지시키는 데 중요한 성장 인자인 IL-6을 분비한다 (예컨대, 문헌 [Cassese et al., (2003). *J. Immunol. 171*, pp. 1684-1690] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다) 참조).

[0228] PDGFR의 역할을 평가하기 위한 임상전 모델이 개발되었다. 구체적으로, 심장 섬유증에 대한 모델 2개를 본원에서 제공한다. 첫번째 것은 허혈성 손상 (이소프로테레놀-유도성 심장 손상; ICD)에 기초하는 것이고, 두번째 것은 관상 동맥 결찰-유도성 심근경색 (MI)에 기반하는 것이다. 손상시, 섬유성 반응은 PDGFRα+/Sca1 + 양성 전구체의 빠른 확장에 의해 개시되며, 이는 손상에 대한 반응으로 일어나는 세포 증식의 50% 초과를 차지하며, 이어서, 상기 자손을 PDGFRα 저/Sea1 저 근섬유아세포를 생산하는 기질로 분화된다. RT-qPCR에 의한 유전자 발현을 통해, Sca1 +) 전구체에서 검출가능하지만, 분화된 집단에서는 실질적으로 상향조절되어 있는 것인, α-평활근 액틴 (αSMA) 및 콜라겐 I형 (ColI)을 비롯한, 섬유성 기질 침착과 관련된 다중 마커의 발현이 입증되었다. 한 실시양태에서, 전구체 확장을 약화시켜 섬유증을 감소시키는 단일클론 항체를 분비하는 효과기 세포를 포함하는 세포 집단이 확인된다. 본 세포외 효과검정법은 2개의 비의존성 마커: Sca1 +/PDGFRα+ 전구체 세포의 조기 증식 및 ColI-유도 GFP를 모니터링함으로써 수행된다. 구체적으로, MI 후, 섬유성 반응은 먼저 PDGFRα +/Sca1 + 전구체에서 GFP 발현에 의해, 이후, 발아성 근섬유아세포 집단에서의 강도 증가를 특징으로 한다.

[0229] 본 발명은 세포외 효과를 보이거나, 또는 복수 개의 것 중 또 다른 집단과 비교하여 세포외 효과의 변화를 보이

는 하나 이상의 세포 집단을 확인하기 위하여 동시에 수행하는 방식으로 복수 개의 세포 집단을 스크리닝하기 위한 방법 및 장치를 제공한다. 확인된 세포 집단은 세포외 효과를 담당하는 하나 이상의 효과기 세포를 포함한다. 예를 들어, 세포외 효과는 GPCR에 대한 세포외 효과, 예컨대, GPCR 결합, 효능 작용 또는 길항작용이다. 본원에 기술된 바와 같이, 세포외 효과는 집단 중 모두 세포, 또는 심지어 다중 세포에 기인할 필요는 없다. 오히려, 효과기 세포가 수십 내지 수백 개의 세포 (예컨대, 약 10 내지 약 500개의 세포, 또는 약 10 내지 약 100개의 세포)를 포함하거나, 또는 약 2 내지 약 100개의 세포, 예컨대, 약 2 내지 약 10개의 세포를 포함하는 이질성 집단에 존재할 때, 본원에서 제공하는 방법을 통해 단일 효과기 세포의 세포외 효과를 검출할 수 있다.

[0230] GPCR은 인간 게놈 중 800개 초과의 구성원을 포함하는 7개의 막횡단 수용체로 이루어진 수퍼패밀리이다. 각 GPCR은 세포의 세포외 면에 위치하는 그의 아미노 말단 및 세포질 쪽으로 대면하는 C-말단 꼬리를 가진다. 세포의 내부에서, GPCR은 이종삼량체 G-단백질에 결합한다. 효능제 결합시, GPCR에서는 입체구조적 변화가 일어나고, 회합된 G-단백질은 활성화된다. 이 중 대략 절반은 후각 수용체이고, 그 나머지는 칼슘 및 대사산물부터 사이토카인 및 신경 전달 물질까지의 범위에 이르는 상이한 리간드 전반에 걸쳐 반응한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 GPCR에 대해 세포외 효과를 보이는 하나 이상의 ASC를 선별하는 방법을 제공한다. 본원에서 GPCR은 한정되지 않는다. 오히려, 임의의 GPCR에 대한 스크리닝 방법은 본 발명에서 사용하기 위한 것으로 변형될 수 있다.

[0231] 천연적으로 특이 GPCR과 회합된 G-단백질 유형은 전달되는 세포 신호전달 캐스케이드를 지시한다. Gq 커플링된 수용체의 경우, 수용체 활성화로부터 발생하는 신호는 세포내 칼슘 수준 증가이다. Gs 커플링된 수용체의 경우, 세포내 cAMP 증가가 관찰된다. 전체 GPCR의 50%를 차지하는 Gi 커플링된 수용체의 경우, 활성화를 통해 cAMP 생산을 억제시킨다. 효과기 세포 특성이 Gi 커플링된 GPCR의 활성화인 실시양태의 경우, 이는 종종 판독 세포(들)를 아데닐 시클라제의 비특이 활성 인자로 자극시키는 것이 필요하다. 한 실시양태에서, 아데닐 시클라제 활성 인자는 포스콜린이다. 따라서, 하나 이상의 효과기 세포에 의해 Gi 커플링된 수용체가 활성화되면, 포스콜린 유도성 cAMP 증가는 억제될 것이다. 따라서, 포스콜린은 본원에서 제공하는 하나 이상의 GPCR 세포외 효과 검정법에서 보조 인자로서 사용될 수 있다.

[0232] 한 실시양태에서, 본 발명은 세포 집단 내의 효과기 세포 (예컨대, ASC)가 GPCR에 대하여 세포외 효과를 보이는지 여부를 측정하기 위한 수단을 제공한다. GPCR은 미세유동 챔버 중 하나 이상의 판독 입자 상에 존재하고, 한 실시양태에서, 세포외 효과는 GPCR에의 결합, 입증되 친화성 또는 특이성, 억제, 또는 활성화이다. GPCR은 안정화된 GPCR, 예컨대, 헵타르 테라픽스(Heptares Therapeutics)의 방법에 의해 제조된 GPCR 중 하나 (안정화된 수용체, 스타 테크놀러지(StaR® technology))일 수 있다. 한 실시양태에서, 효과기 세포 (예컨대, ASC)는 미세유동 챔버 내에 단일 세포로서, 동질성 또는 이질성 세포 집단으로 존재한다. 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 방법 및 장치는 각각이, 하기 표 3a 및/또는 표 3b에 기재된 GPCR 중 하나, 또는 국제 PCT 공개 WO 2004/040000 (그 전문이 참조로 포함된다)에 개시된 GPCR 중 하나에 대해 세포외 효과를 보이는 하나 이상의 항체를 분비하는 하나 이상의 ASC를 포함하는 것인 하나 이상의 세포 집단을 확인하는 데 사용된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, GPCR은 하기 부류: 부류 A, 부류 B, 부류 C, 부착, 프리즐드 중 하나에 속한다.

[0233] 또 다른 실시양태에서, 세포외 효과는 내피 분화, G-단백질-커플링된 (EDG) 수용체에 대한 효과이다. EDG 수용체 패밀리는, 지질 신호전달을 담당하고, 리소포스파티드산 (LPA) 및 스핑고신 1-포스페이트 (S1P)에 결합하는 11개의 GPCR (S1P1-5 및 LPA1-6)을 포함한다. LPA 및 S1P를 통한 신호전달은 건강한 상태 및 질환에서 세포 증식, 면역 세포 활성화, 이주, 침윤, 염증, 및 혈관신생을 비롯한 많은 기능을 조절한다. 상기 패밀리에 대한, 강력하고 특이적인 소형 분자 억제제를 생성하는 데 있어서는 거의 성공을 거두지 못하였으며, 이로써 mAb는 매우 관심의 대상이 되는 대안이 된다. 한 실시양태에서, EDG 수용체는 S1P3 (EDG3), S1PR1 (EDG1)이며, 그 중 후자의 것은 유방암, 림프종, 난소암, 및 흑색종을 비롯한, 여러 유형의 암에서 NF-κB 및 STAT3을 활성화시키고, 면역 세포 수송 및 암 전이에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Milstien and Spiegel (2006). *Cancer Cell* 9, pp. 148-15] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). S1P 리간드를 중화시키는 단일클론 항체 (소넵시주맙)가 최근 진행성 고형 종양의 치료를 위한 것으로 II상 임상에 진입하였다 (NCT00661414). 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 방법 및 장치는 소넵시주맙보다 친화성이 더 큰 항체, 또는 소넵시주맙보다 더 큰 정도로 S1P를 억제시키는 항체를 분비하는 ASC를 확인하고, 단리시키는 데 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 세포외 효과는 the LPA2 (EDG4) 수용체에 대한 효과이다. LPA2는 갑상샘암종, 결장암종, 위암종, 및 유방암종 뿐만 아니라, 다수의 난소 종양에서 과다발현되는데, 이 경우, LPA2는 LPA의 감도 및 유해한 효과에 대한 주요한 기여 인자이다.

[0234] 한 실시양태에서, 세포 집단은 판독 입자에 대해 존재하는 케모카인 수용체에 대해 세포외 효과를 보이는지 여

부에 대해 검정된다. 추가의 실시양태에서, 케모카인 수용체는 퓨신 또는 CD184로도 알려져 있는 C-X-C 케모카인 수용체 4형 (CXCR-4)이다. CXCR4는 C-X-C 모티프 케모카인 12 (CXCL12)로도 알려져 있는, 면역 세포 동원을 위한 강력한 화학주성제인 SDF1α (CXCL12)에 결합한다. DNA 면역화를 사용하여 상기 표적에 대하여 92개의 하이브리도마를 생성하였고, 그 중 75개는 상이한 쇄 사용 빈도 및 에피토프 인식을 보였으며 (문헌 [Genetic Eng and Biotech news, Aug 2013]), 이는 하이브리도마 선별이 단지 소량의 이용가능한 항체 다양성만을 포착한다는 것을 나타낸다. CXCR4/CXCL12 축을 통한 신호전달은 종양 세포 성장, 혈관신생, 세포 생존에서 중심적인 역할을 하고, 간 및 골수와 같은 CXCL12-생산 기관에서 2차 전이의 성장을 매개하는 데 연루되어 있는 것으로 나타났다 (문헌 [Teicher and Fricker (2010). *Clin. Cancer Res*. 16, pp. 2927-2931] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)).

[0235] 또 다른 실시양태에서, 세포 집단은 최근 SDF1α에 결합하는 것으로 밝혀진, 케모카인 수용체 CXCR7에 대하여 효과를 발휘할 수 있는 그의 능력에 대해 스크리닝된다. 정규 G 단백질 커플링을 통해 신호를 전달하는 CXCR4와 달리, CXCR7은 독특하게 β-어레스틴 경로를 통해 신호를 전달한다.

[0236] 또 다른 실시양태에서, GPCR은 프로테아제 활성화된 수용체 (PAR1, PAR3, 및 PAR4)로서, 이는 노출된 N-말단의 트롬빈-매개 절단에 의해 활성화되는 GPCR 부류이고, 섬유증에 관여한다. 추가의 또 다른 실시양태, GPCR은 하기 표 3a 또는 표 3b의 GPCR 중 하나이다.

[0237] 세포외 효과가 GPCR에 대한 효과인 실시양태에서, 본 발명은 특정 GPCR로 한정되지 않는다. 예를 들어, 결합, 활성화 또는 억제를 판독할 수 있도록 조작된 특정 GPCR을 발현하는 세포주는 예를 들어, 라이프 테크놀러지즈 (진블라저(GeneBLAzer)® 및 탱고(Tango)™ 세포주), 디스커브Rx, 시스바이오(Cisbio), 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) 등으로부터 상업적으로 이용가능하고, 본원의 판독 세포로서 사용하기 위해 변형될 수 있다.

[0238] 한 실시양태에서, 하기 수용체 패밀리 중 하나로부터의 GPCR은 본원 하나 이상의 판독 세포 상에서 발현되고, 세포외 효과는 하기 GPCR: 아세틸콜린 수용체, 아데노신 수용체, 아드레노 수용체, 안지오텐신 수용체, 브래디키닌 수용체, 칼시토닌 수용체, 칼슘 감지 수용체, 칸나비노이드 수용체, 케모카인 수용체, 콜레시스토키닌 수용체, 보체 성분 (C5AR1), 코르티코트로핀 방출 인자 수용체, 도파민 수용체, 내피 분화 유전자 수용체, 엔도텔린 수용체, 포르밀 펩티드-유사 수용체, 갈라닌 수용체, 가스트린 방출 펩티드 수용체, 수용체 그렐린 수용체, 위 억제 폴리펩티드 수용체, 글루카곤 수용체, 고나도트로핀 방출 호르몬 수용체, 히스타민 수용체, 키스펩틴 (KiSS1) 수용체, 류코트리엔 수용체, 멜라닌-농축 호르몬 수용체, 멜라노코르틴 수용체, 멜라토닌 수용체, 모틸린 수용체, 신경펩티드 수용체, 니코틴산, 오피오이드 수용체, 오렉신 수용체, 오르판 수용체, 혈소판 활성화 인자 수용체, 프로키네티신 수용체, 프로락틴 방출 펩티드, 프로스타노이드 수용체, 프로테아제 활성화된 수용체, P2Y (퓨린성) 수용체, 릴랙신 수용체, 세크레틴 수용체, 세로토닌 수용체, 소마토스타틴 수용체, 타키키닌 수용체, 바소프레신 수용체, 옥시토신 수용체, 혈관 활성 장 펩티드 (VIP) 수용체 또는 뇌하수체 아데닐레이트 시클라제 활성화 폴리펩티드 (PACAP) 수용체 중 하나 이상의 것과 관련하여 측정된다.

표 3

표 3A. 판독 세포에서의 발현을 위해 변형가능하거나 또는 안정화된 판독 입자의 일부로서의 GPCR

패밀리	인간 유전자 기호	인간 유전자 명칭
칼시토닌 수용체	CALCR	칼시토닌 수용체
칼시토닌 수용체	CALCRL	칼시토닌 수용체-유사
코르티코트로핀-방출 인자 수용체	CRHR1	코르티코트로핀 방출 호르몬 수용체 1
코르티코트로핀-방출 인자 수용체	CRHR2	코르티코트로핀 방출 호르몬 수용체 2
글루카곤 수용체 패밀리	GHRHR	성장 호르몬 방출 호르몬 수용체
글루카곤 수용체 패밀리	GIPR	위 억제성 폴리펩티드 수용체
글루카곤 수용체 패밀리	GLP1R	글루카곤-유사 펩티드 1 수용체
글루카곤 수용체 패밀리	GLP2R	글루카곤-유사 펩티드 2 수용체
글루카곤 수용체 패밀리	GCGR	글루카곤 수용체
글루카곤 수용체 패밀리	SCTR	세크레틴 수용체
부갑상선 호르몬 수용체	PTH1R	부갑상선 호르몬 1 수용체
부갑상선 호르몬 수용체	PTH2R	부갑상선 호르몬 2 수용체
VIP 및 PACAP 수용체	ADCYAP1R1	아데닐레이트 시클라제 활성화 폴리펩티드 1 (뇌하수체) 수용체 I 형
VIP 및 PACAP 수용체	VIPR1	혈관 활성 장 펩티드 수용체 1
VIP 및 PACAP 수용체	VIPR2	혈관 활성 장 펩티드 수용체 2
아데노신	ADORA1	아데노신 A1 수용체
아데노신	ADORA2A	아데노신 A2 수용체
아데노신	ADRB3	아데노신 3 수용체
케모카인	CXCR1	C-X-C 케모카인 수용체 1
케모카인	CXCR2	C-X-C 케모카인 수용체 2
케모카인	CXCR3	C-X-C 케모카인 수용체 3
케모카인	CXCR4	C-X-C 케모카인 수용체 4
케모카인	CXCR5	C-X-C 케모카인 수용체 5

[0239]

표 3A. 판독 세포에서의 발현을 위해 변형가능하거나 또는 안정화된 판독 입자의 일부로서의 GPCR

패밀리	인간 유전자 기호	인간 유전자 명칭
케모카인	CXCR6	C-X-C 케모카인 수용체 6
케모카인	CXCR7	C-X-C 케모카인 수용체 7
케모카인	CCR1	C-C 케모카인 수용체 1 형
케모카인	CCR2	C-C 케모카인 수용체 2 형
케모카인	CCR3	C-C 케모카인 수용체 3 형
케모카인	CCR4	C-C 케모카인 수용체 4 형
케모카인	CCR5	C-C 케모카인 수용체 5 형
케모카인	CCR6	C-C 케모카인 수용체 6 형
케모카인	CCR7	C-C 케모카인 수용체 7 형
케모카인	CMKLR1	케모카인 수용체-유사 1
보체 성분	C5AR1	보체 성분 AR1 수용체
리소인지질 (LPL) 수용체	LPAR1	리소포스파티드산 수용체 1
리소인지질 (LPL) 수용체	LPAR2	리소포스파티드산 수용체 2
리소인지질 (LPL) 수용체	LPAR3	리소포스파티드산 수용체 3
리소인지질 (LPL) 수용체	LPAR4	리소포스파티드산 수용체 4
리소인지질 (LPL) 수용체	LPAR5	리소포스파티드산 수용체 5
리소인지질 (LPL) 수용체	LPAR6	리소포스파티드산 수용체 6
리소인지질 (LPL) 수용체	SIPR1	스핑고신-1-포스페이트 수용체 1
리소인지질 (LPL) 수용체	SIPR2	스핑고신-1-포스페이트 수용체 2
리소인지질 (LPL) 수용체	SIPR3	스핑고신-1-포스페이트 수용체 3
리소인지질 (LPL) 수용체	SIPR4	스핑고신-1-포스페이트 수용체 4
리소인지질 (LPL) 수용체	SIPR5	스핑고신-1-포스페이트 수용체 5

[0240]

표 3B. 판독 세포에서의 발현을 위해 변형가능하거나 또는 안정화된 판독 입자의 일부로서의 GPCR

GPCR (유전자 기호)	리간드(들)
5-히드록시트립타민 1A 수용체 (*HTR1A*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 1B 수용체 (*HTR1B*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 1D 수용체 (*HTR1D*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 1e 수용체 (*HTR1E*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 1F 수용체 (*HTR1F*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 2A 수용체 (*HTR2A*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 2B 수용체 (*HTR2B*)	5-히드록시트립타민

[0241]

표 3B. 판독 세포에서의 발현을 위해 변형가능하거나 또는 안정화된 판독 입자의 일부로서의 GPCR

GPCR (유전자 기호)	**리간드(들)**
5-히드록시트립타민 2C 수용체 (*HTR2C*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 4 수용체 (*HTR4*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 5a 수용체 (*HTR5A*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 5b 수용체 (*HTR5BP*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 6 수용체 (*HTR6*)	5-히드록시트립타민
5-히드록시트립타민 7 수용체 (*HTR7*)	5-히드록시트립타민
아세틸콜린 M1 수용체 (*CHRM1*)	아세틸콜린
아세틸콜린 M2 수용체 (*CHRM2*)	아세틸콜린
아세틸콜린 M3 수용체 (*CHRM3*)	아세틸콜린
아세틸콜린 M4 수용체 (*CHRM4*)	아세틸콜린
아세틸콜린 M5 수용체 (*CHRM5*)	아세틸콜린
아데노신 A1 수용체 (*ADORA1*)	아데노신
아데노신 A2A 수용체 (*ADORA2A*)	아데노신
아데노신 A2B 수용체 (*ADORA2B*)	아데노신
아데노신 A3 수용체 (*ADORA3*)	아데노신
α_{1A}-아드레날린 수용체 (*ADRA1A*)	아드레날린, 노르아드레날린효능제 시라졸린, 데스벤라팍신, 에틸레프린, 메타라미놀, 메톡사민, 미도드린, 나파졸린, 옥시메트라졸린, 페닐에프린, 신에프린, 테트라히드로졸린, 크실로메타졸린길항제 알푸조신, 아로티놀롤, 카르베디롤, 독사조신, 인도라민, 라베타롤, 목시슬레이트, 페녹시벤자민, 펜톨라민, 프라조신, 쿠에티아핀, 리스페리돈, 실로도신, 탐술로신, 테라조신, 톨라졸린, 트리마조신
α_{1B}-아드레날린 수용체 (*ADRA1B*)	아드레날린, 노르아드레날린
α_{1D}-아드레날린 수용체 (*ADRA1D*)	아드레날린
α_{2A}-아드레날린 수용체 (*ADRA2A*)	아드레날린
α_{2B}-아드레날린 수용체 (*ADRA2B*)	아드레날린, 노르아드레날린 효능제 살부타몰, 비톨테롤 메실레이트, 이소프로테로놀, 레보살부타몰, 메타프로테레놀, 포르모테롤, 살메테롤, 테르부탈린, 클렌부테롤, 리토드린길항제 부톡사민, 베타 차단제
α_{2C}-아드레날린 수용체 (*ADRA2C*)	아드레날린, 노르아드레날린
β_1-아드레날린 수용체	아드레날린, 노르아드레날린

[0242]

표 3B. 판독 세포에서의 발현을 위해 변형가능하거나 또는 안정화된 판독 입자의 일부로서의 GPCR

GPCR (유전자 기호)	**리간드(들)**
(*ADRB1*)	니트로사민 4-(메틸니트로사미노)-1-(3-피리딜)-1-부타논 (NNK)효능제 데노파민, 도부타민, 크사모테롤길항제 아세부톨, 아테놀롤, 베탁솔롤, 비소프롤롤,에스몰롤, 메토플롤롤, 네비볼롤, 보르티옥세틴
β_2-아드레날린 수용체(*ADRB2*)	아드레날린
β_3-아드레날린 수용체 (*ADRB3*)	아드레날린
안지오텐신 수용체 1 (AT_1) (*AGTR1*)	안지오텐신 I, 안지오텐신 II, 안지오텐신 III
안지오텐신 수용체 2 (AT_2) (*AGTR2*)	안지오텐신 II, 안지오텐신 III
안지오텐신 수용체 4	안지오텐신 IV (안지오텐신 II 대사산물)
아펠린 수용체 (*APLNR*)	아펠린-13, 아펠린-17, 아펠린-36
담즙산 수용체 (*GPBAR1*)	케노데옥시콜린산, 콜린산, 데옥시콜린산, 리토콜린산
봄베신 수용체 BB_1 (*NMBR*)	가스트린 방출 펩티드, 뉴로메딘 B
봄베신 수용체 BB_2 (*GRPR*)	가스트린 방출 펩티드, 뉴로메딘 B
봄베신 수용체 BB_3 (*BRS3*)	
브래디키닌 수용체 B1	브래디키닌
브래디키닌 수용체 B2	브래디키닌
칼슘 감지 수용체 (CaSR)	칼슘 마그네슘
G-단백질 커플링된 수용체 패밀리 C group 6 member A (*GPRC6A*)	
카나비노이드 CB_1 수용체 (*CNR1*)	2-아라키도노일글리세롤 아난다미드
카나비노이드 CB_2 수용체 (*CNR2*)	2-아라키도노일글리세롤 아난다미드
C-X-C 케모카인 수용체 4 형 (CXCR2)	인터루킨 8 성장-관련 온코진-알파(GRO-α)
C-X-C 케모카인 수용체 4 형 (CXCR4)	간질 세포-유래인자-1 (SDF1)
콜레키스토키닌 A 수용체 (CCKAR 또는 CCK1)	콜레키스토키닌 펩티드 호르몬 (CCK)
콜레키스토키닌 B 수용체 (CCKAR 또는 CCK2)	콜레키스토키닌 펩티드 호르몬 (CCK)

[0243]

표 3B. 관독 세포에서의 발현을 위해 변형가능하거나 또는 안정화된 관독 입자의 일부로서의 GPCR

GPCR (유전자 기호)	**리간드(들)**
	가스트린
콜레키스토키닌 수용체 CCK1 (*CCKAR*)	CCK-33, CCK-4, CCK-8, 가스트린-17
콜레키스토키닌 수용체 CCK2 (*CCKBR*)	CCK-33, CCK-4, CCK-8, 가스트린-17
엔도텔린 수용체 A (ETA)	엔도텔린-1
엔도텔린 수용체 B1 (ETB1)	엔도텔린-1 엔도텔린-3
엔도텔린 수용체 B2 (ETB2)	엔도텔린-1 엔도텔린-3
엔도텔린 수용체 C (ETC)	엔도텔린-1
프리즐드 1 (*FZD1*)	Wnt-1, Wnt-2, Wnt-3a, Wnt-5a, Wnt-7b
프리즐드 2 (*FZD2*)	Wnt-5a
프리즐드 3 (*FZD3*)	Wnt 단백질 리간드
프리즐드 4 (*FZD4*)	Wnt 단백질 리간드
프리즐드 5 (*FZD5*)	Wnt 단백질 리간드
프리즐드 6 (*FZD6*)	Wnt-3a, Wnt-4, Wnt-5a
프리즐드 7 (*FZD7*)	Wnt 단백질 리간드
프리즐드 8 (*FZD8*)	Wnt 단백질 리간드
프리즐드 9 (*FZD9*)	Wnt 단백질 리간드
프리즐드 10 (*FZD10*)	Wnt 단백질 리간드
$GABA_{B1}$ 수용체 $GABA_{B2}$ 수용체 (이종이량체로서 B1 및 B2 조립)	효능제 GABA, 바클로펜, 감마-히드록시부티레이트, 페니부트, 3-아민프로필포스핀산, 레소가베란, SKF-97541, CGP-44532 알로스테릭 조절인자 CGP-7930, BHFF, 펜딜린, BHF-177, BSPP, GS-39783 길항제 2-OH-사클로펜, 사클로펜, 파클로펜, SCH-50911, CGP-35348, CGP-52432, SGS-742, CGP-55845
가스트린 방출 펩티드 수용체 (GRPR)(BB_2로도 지칭).	가스트린 방출 펩티드
G 단백질-커플링된 에스트로겐 수용체 30 (GPR30)	에스트로겐
황체 형성 호르몬/융모성 생식선 자극호르몬 수용체 (LHCGR) (황체화 호르몬 수용체 (LHR) 및 루트로핀/융모성 생식선 자극호르몬 수용체 (LCGR)로도 지칭)	황체 형성 호르몬 융모성 생식선 자극호르몬

[0244]

표 3B. 관독 세포에서의 발현을 위해 변형가능하거나 또는 안정화된 관독 입자의 일부로서의 GPCR

GPCR (유전자 기호)	**리간드(들)**
리소포스파티드산 수용체 1 (LPA1)	리소포스파티드산
리소포스파티드산 수용체 2 (LPA2)	리소포스파티드산
리소포스파티드산 수용체 3 (LPA3)	리소포스파티드산
멜라노코르틴 1 수용체 (MC1R) (멜라닌세포-자극 호르몬 수용체 (MSHR)로도 지칭), 멜라닌-활성화 펩티드 수용체 및 멜라노트로핀 수용체	멜라노코르틴 (뇌하수체 펩티드 호르몬) (부신 피질 자극 호르몬 (ACTH) 및 멜라닌세포-자극 호르몬 (MSH) 포함)
뉴로메딘 B 수용체	뉴로메딘 B
프로스타글란딘 E2 수용체 EP2	프로스타글란딘 E2
프로스타글란딘 E2 수용체 EP4	프로스타글란딘 E2
프로테아제-활성화된 수용체 1	트롬빈
프로테아제-활성화된 수용체 2	트립신
프로테아제-활성화된 수용체 3	트롬빈
프로테아제-활성화된 수용체 4	트롬빈
평활화(Smoothened)	소닉 헤지호그
티로트로핀 수용체 (TSH 수용체)	티로트로핀
대사성 글루타메이트 수용체 1(GRM1)	L-글루탐산
대사성 글루타메이트 수용체 2 (GRM2)	L-글루탐산
대사성 글루타메이트 수용체 3 (GRM3)	L-글루탐산
대사성 글루타메이트 수용체 4 (GRM4)	L-글루탐산
대사성 글루타메이트 수용체 5 (GRM5)	L-글루탐산
대사성 글루타메이트 수용체 6 (GRM6)	L-글루탐산
대사성 글루타메이트 수용체 7 (GRM7)	L-글루탐산
대사성 글루타메이트 수용체 8 (GRM8)	L-글루탐산
G 단백질 커플링된 수용체 56 (GPR56)	
G 단백질 커플링된 수용체 64 (GPR64)	
G 단백질 커플링된 수용체 97 (GPR97)	
G 단백질 커플링된 수용체 98 (GPR98)	
G 단백질 커플링된 수용체 110 (GPR110)	
G 단백질 커플링된 수용체 111 (GPR111)	
G 단백질 커플링된 수용체 112 (GPR112)	
G 단백질 커플링된 수용체 113 (GPR113)	
G 단백질 커플링된 수용체 114 (GPR114)	
G 단백질 커플링된 수용체 115 (GPR115)	
G 단백질 커플링된 수용체 116 (GPR116)	

[0245]

[0246]

표 3B. 판독 세포에서의 발현을 위해 변형가능하거나 또는 안정화된 판독 입자의 일부로서의 GPCR

GPCR (유전자 기호)	**리간드(들)**
G 단백질 커플링된 수용체 123 (GPR123)	
G 단백질 커플링된 수용체 124 (GPR124)	
G 단백질 커플링된 수용체 125 (GPR125)	
G 단백질 커플링된 수용체 126 (GPR126)	
G 단백질 커플링된 수용체 128 (GPR128)	
G 단백질 커플링된 수용체 133 (GPR133)	
G 단백질 커플링된 수용체 144 (GPR144)	
라트로필린 1 (LPHN1)	
라트로필린 2 (LPHN2)	
라트로필린 3 (LPHN3)	

[0247] 한 실시양태에서, 효과기 세포는 하기 표 4에서 제공하는 검정법 중 하나 이상의 것에 의해 GPCR을 발현하는 판독 세포에 대한 세포외 효과에 대해 검정된다. 또 다른 실시양태에서, 판독 입자 집단은 (인테그랄 몰레큘라(Integral Molecular)로부터 이용가능한) 막 추출물로 관능화된 소낭 또는 비드, 또는 안정화된 가용화된 GPCR (예컨대, 헵타르)을 포함한다.

[0248] GPCR은 인산화될 수 있고, 어레스틴으로 명명되는 단백질과 상호작용할 수 있다. 어레스틴 활성화를 측정한 3가지 주요 방법은 (i) 현미경법 (형광 표지화된 어레스틴 (예컨대, GFP 또는 YFP) 사용); (ii) 효소 상보성을 사용하는 것; (iii) 탱고™ 리포터 시스템 (β-락타마제) (프로메가)을 사용하는 것이다. 한 실시양태에서, 탱고™ 리포터 시스템은 판독 세포 또는 복수 개의 판독 세포에 사용된다. 본 기술은 절단가능한 링커를 통해 전사 인자에 연결된 GPCR을 사용한다. 어레스틴은 무능력한(crippled) 프로테아제에 융합된다. 일단 어레스틴이 GPCR에 결합되고 나면, 국소적인 고농도의 프로테아제 및 링커를 통해 링커의 절단이 일어나고, 이로써, 전사 인자가 핵으로 방출됨에 따라 전사는 활성화된다. β-락타마제 검정법은 살아있는 세포에서 수행될 수 있지만, 세포 용해를 필요로 하지 않으며, 6시간 정도로 단기가 동안의 효능제 인큐베이션 이후 영상화될 수 있다.

[0249] 한 실시양태에서, GPCR 신호전달의 길항제 및 효능제를 검출하는 데 일반적으로 사용될 수 있는 β-어레스틴 GPCR 검정법은 GPCR에 결합하는 생체분자를 분비하는 효과기 세포를 확인하기 위해 본원에서 제공하는 방법 및 장치에서 사용된다 (문헌 [Rossi et al. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, pp. 8405-8410] (상기 문헌은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다)). 본 검정법은 현재 디스커브Rx에 의해 상업화된, β-갈락토시다제 (β-Gal) 효소-상보성 기술에 기반한다. GPCR 표적은 β-Gal 효소의 작은 N-말단 단편과 프레임 내에서 융합된다. GPCR 활성화시, β-Gal의 N-말단 서열에 연결된 β-어레스틴을 함유하는 제2 융합 단백질은 GPCR에 결합하게 되고, 이로써, 기능성 β-Gal 효소가 형성된다. 이어서, β-Gal 효소는 비-형광성 기질 디-β-D-갈락토피라노시드 (FDG)를 플루오레세인을 빠르게 전환시킴으로써 크게 증폭시키고, 탁월한 감도를 제공한다. 본 실시양태에서, (GPCR을 포함하는) 판독 세포에는 아세테이트 기의 에스테라제 절단에 의해 세포-불투과성 FDG로 전환되는 세포-투과성 프로기질 (아세틸화된 FDG)가 오프 칩으로 사전 적재된다. 비록 플루오레세인이 살아있는 세포 밖으로 능동적으로 수송되지만, 미세유동 챔버 내에서 본 검정법을 수행함으로써 형광성 생성물은 농축되고, 이로써, 플레이트 기반 검정법에 비하여 현저히 증진된 감도를 얻을 수 있다. 디스커브Rx는 GPCR의 큰 패널들 간에 걸쳐 마이크로웰 포맷으로 사용되는 본 검정 전략법을 입증하였다.

[0250] 한 실시양태에서, 효과기 세포에 의한 GPCR의 활성화는 미세유동 포맷에서 하나 이상의 판독 세포에서의 세포질 칼슘 증가를 검출함으로써 측정된다. 추가의 실시양태에서, 세포질 칼슘 증가는 하나 이상의 칼슘 감수성 염료를 이용함으로써 검출된다. 칼슘 감수성 염료는 칼슘 부재하에서는 낮은 수준의 형광을 보이지만, 일단 칼슘이 결합하고 나면, 형광성 특성은 증가하게 된다. 형광성 신호는 약 1분째에 최고점에 도달하고, 5 내지 10분 창에 걸쳐 검출가능하다. 따라서, 형광성 칼슘을 사용하여 활성을 검출하기 위해서는 검출 및 효능제 첨가가 밀접하게 커플링된다. 이러한 커플링을 달성하기 위해, 효과기 세포를 판독 세포 집단 및 하나 이상의 칼슘 감수성 염료에 동시에 노출시킨다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 칼슘 감수성 염료는 FLIPR™ 칼슘 검정법 (몰레큘라 디바이스(Molecular Device))에 제공되는 것이다.

[0251] 한 실시양태에서, 재조합 발현된 젤리피쉬 발광단백질, 에쿼린은 기능성 GPCR 스크린, 즉, 세포외 효과가 GPCR의 조절인 세포외 효과 검정법에서 사용된다. 에쿼린은 코엘린테라진 유도체 첨가시에 발광성 신호를 발생시키

는 칼슘 감수성 리포터 단백질이다. 미토콘드리아와 관련하여 표적화된 버전의 아포에쿼린과 함께 발현된 GPCR을 포함하는 조작된 세포주는 상업적으로 이용가능하다 (유로스크린(Euroscreen)). 한 실시양태에서, 유로스크린으로부터 이용가능한 세포주 중 하나 이상의 것은 효과기 세포의 세포외 효과, 또는 세포외 효과의 변화를 평하는 방법에서 판독 세포 집단으로서 사용된다.

[0252] 한 실시양태에서, GPCR에 대한 세포외 효과는 판독 세포 집단으로서 GPCR 및 시클릭 뉴클레오티드-개폐형 (CNG) 채널을 발현하는 ACTOne 세포주 (코덱스 바이오솔루션즈(Codex Bio용액s)) 중 하나를 사용함으로써 측정된다. 본 실시양태에서, 세포외 효과 검정법은 외인성 시클릭 뉴클레오티드-개폐형 (CNG) 채널을 함유하는 세포주를 이용함으로써 수행된다. 채널은 cAMP의 상승된 세포내 수준에 의해 활성화되고, 이로써 (대개는 칼슘-반응성 염료에 의해 검출가능한) 이온 유입 및 세포막 탈편광이 일어나며, 이는 형광성 막 전위 (MP) 염료에 의해 검출될 수 있다. ACTOne cAMP 검정법을 통해 형광 마이크로플레이트 판독기를 이용한 세포내 cAMP 변화의 종점 및 동적 측정이 가능해진다.

[0253] 한 실시양태에서, 리포터 유전자 검정법을 사용하여 효과기 세포가 특정 GPCR을 조절하는지 여부를 측정할 수 있다. 본 실시양태에서, GPCR 조절이 평가되는 세포외 효과이다. 한 실시양태에서, 리포터 유전자 검정법은 최소 프로모터의 상류에 배치된 반응성 요소를 활성화시키거나, 또는 억제시킴으로써 최종적으로는 사용자에 의해 선택된 리포터 단백질의 발현을 조절하는 것인 GPCR 2차 메신저, 예컨대, 칼슘 (AP1 또는 NFAT 반응 요소) 또는 cAMP (CRE 반응 요소)에 기초한다. 한 실시양태에서, 리포터의 발현은 GPCR을 통한 신호전달에 의해 활성화되는 전사 인자의 반응 요소에 커플링된다. 예를 들어, 리포터 유전자 발현은 하기 전사 인자 중 하나에 대한 반응 효소에 커플링될 수 있다: ATF2/ATF3/AFT4, CREB, ELK 1/SRF, FOS/JUN, MEF2, GLI, FOXO, STAT3, NFAT, NFκB. 추가의 실시양태에서, 전사 인자는 NFAT이다. 리포터 유전자 검정법은 예를 들어, SA 바이오사이언시즈(SA Biosciences)로부터 상업적으로 이용가능하다.

[0254] 리포터 단백질은 당업계에 공지되어 있고, 이는 예를 들어, β-갈락토시다제, 루시퍼라제 (예컨대, 문헌 [Paguio et al. (2006). "Using Luciferase Reporter Assays to Screen for GPCR Modulators," Cell Notes Issue 16, pp. 22-25]; [Dual-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual #TM058]; [pGL4 Luciferase Reporter Vectors Technical Manual #TM259] (상기 문헌은 각각 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다) 참조), GFP, YFP, CFP, β-락타마제를 포함한다. GPCR 신호전달을 측정하기 위한 리포터 유전자 검정법은 상업적으로 이용가능하고, 이는 본원에 기술된 방법 및 장치에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 라이프 테크놀러지즈로부터의 진블라저® 검정법이 본 발명에 사용하기 위한 것으로 변형될 수 있다.

[0255] 한 실시양태에서, 리포터 세포에서 G 단백질의 과다발현은 cAMP 커플링된 GPCR이 칼슘을 통해 신호전달을 수행할 수 있도록 가압하는 데 수행된다. 이는 커플링 가압으로써 언급된다.

[0256] 한 실시양태에서, Gq 커플링된 세포주는 본원에 기술된 방법에서 판독 세포주로서 사용된다. 한 실시양태에서, Gq 커플링된 세포주는 β-락타마제를 통한 GPCR 신호전달을 기록한다. 예를 들어, 세포 기반 GPCR 리포터 세포주 중 하나로진블라저® (라이프 테크놀러지즈)가 있다. 리포터 세포주는 분열이 정지된 것일 수 있거나, 또는 정상적으로 분열하는 세포를 포함할 수 있다.

[0257] cAMP 반응성 요소-결합 단백질 (CREB)은 상기 언급된 전사 인자이고, 이는 한 실시양태에서, Gs 및/또는 Gi 커플링된 GPCR을 위해 사용된다. 추가의 실시양태에서, 포스콜린은 보조 입자로서 사용된다. CRE 리포터는 SA 바이오사이언시즈로부터의 GFP 발현을 구동시키기 위해 플라스미드 또는 렌티바이러스 형태에서 이용가능하고, 이는 본원에 기술된 방법 및 장치와 함께 사용하기 위해 변형될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, SA 바이오사이언시즈로부터 이용가능한 검정 시스템은 본원에서 판독 세포를 제조하는 데 사용된다 (http://www.sabiosciences.com/reporter_assay_product/HTML/CCS-002G.html). 라이프 테크놀러지즈는 또한 특이 GPCR을 발현하는 CRE-반응성 세포주를 가지며, 이는 본원에 기술된 방법에서 뿐만 아니라, 판독 세포에서 사용될 수 있다.

[0258] 한 실시양태에서, 세포 집단에 존재하는 하나 이상의 효과기 세포는 하나 이상의 판독 세포 내부의 cAMP 수준 증가 또는 감소를 검출함으로써 하나 이상의 판독 세포 상에 존재하는 GPCR을 활성화 또는 길항시킬 수 있는 능력에 대하여 검정된다. ELISA 기반 검정법, 균질 시간 분해 형광 (HTRF) (문헌 [Degorce et al. (2009). Current Chemical Genomics 3, pp. 22-32] (상기 문헌의 개시 내용은 그 전문이 참조로 포함된다) 참조), 및 효소 상보성은 모두 판독 세포 중 cAMP 수준을 측정하는 데 본원에서 제공하는 미세유동 장치 및 검정법과 함께 사용될 수 있다. 시클릭 AMP가 실제로 측정되는 바, 상기 cAMP 검출 방법들은 각각 검출을 위해 cAMP를 유리시키기 위하여 세포 용해를 필요로 한다.

[0259] 전체 세포 중 cAMP를 측정하기 위한 검정법 및 막에서의 아데닐 시클라제 활성을 측정하기 위한 검정법은 상업적으로 이용가능하고 (예컨대, 문헌 [Gabriel et al. (2003). Assay Drug Dev. Technol. 1, pp. 291-303]; [Williams (2004). *Nat. Rev. Drug DISCOV.* 3, pp. 125-135] (상기 문헌은 각각 그 전문이 참조로 포함된다) 참조), 본원에서 제공하는 장치 및 방법에서 사용하기 위해 변형될 수 있다. 즉, 하나 이상의 미세유동 챔버 중 세포 집단은 본 방법에 따라 검정될 수 있다.

[0260] 시스바이오 인터내셔날 (Cisbio International: 프랑스 코돌레)은 시간 분해 형광 공명 에너지 전달 기술에 기초하여 고감도 고처리량의 균질 cAMP 검정법을 개발하였고 (HTRF, 문헌 [Degorce et al. (2009). Current Chemical Genomics 3, pp. 22-32] (상기 문헌의 개시 내용은 그 전문이 참조로 포함된다) 참조), 이는 본원에서 GPCR에 대하여 효과를 보이는 효과기 세포에 대해 스크리닝하는 데 사용될 수 있다. 본 방법은 세포에 의해 생산된 천연 cAMP와 cAMP-표지화된 염료 (cAMP-d2) 사이의 경쟁적 면역검정법이다. cAMP-d2 결합은 크립테이트로 표지화된 MaB 항-cAMP에 의해 시각화된다. 특이 신호 (즉, 에너지 전달)는 샘플 중 cAMP 농도, 이 경우, 효과기 세포 또는 효과기 세포 분비 생성물에 의해 활성화된 판독 세포 중의 cAMP의 양은 반비례한다. cAMP가 측정되는 바, 먼저 판독 세포를 용해시켜 검출을 위해 cAMP를 유리시킨다. 본 검정법은 G_s-(β_2-아드레날린제, 히스타민 H2, 멜라노코르틴 MC_4, CGRP 및 도파민 D_1) 및 $G_i/_o$-커플링된 (히스타민 H_3) 수용체, 둘 모두에 대하여 입증되었다.

[0261] 형광 편광에 기초한 cAMP 검정용 키트는 또한 예컨대, 퍼킨 엘머, 몰레큘라 디바이스 및 GE 헬쓰케어(GE Healthcare)로부터 상업적으로 이용가능하고, 이들은 각각 본원에서 제공하는 방법 및 장치에서 효과기 세포 검정법으로서 사용하기 위해 변형될 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 cAMP 형광 편광 검정법의 결과에 기초하여 효과기 세포 및/또는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 선별하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 효과기 세포가 특정 GPCR을 활성화시키는지 (효능 작용) 또는 억제시키는지 (길항작용) 여부를 측정하는 데 사용된다.

[0262] 한 실시양태에서, 레이저 활성화를 필요로 하는 고감도 비드-기반 화학발광성 검정법인, 퍼킨 엘머로부터의 알파스크린(AlphaScreen)™ cAMP 검정법은 판독 세포에 대해 미치는 효과, 구체적으로, GPCR의 활성화 또는 억제를 보이는 효과기 세포에 대해 스크리닝하는 데 본원에서 제공하는 장치에서 사용된다.

[0263] 디스커브Rx (http://www.discoverx.com)는 형광성 또는 발광성 기질을 사용하는 특허받은 효소 (β-갈락토시다제) 상보성 기술에 기반한, 히트헌터(HitHunter)™로도 불리는 균질 고처리량 cAMP 검정용 키트를 제공한다 (문헌 [Eglen and Singh (2003). *Comb Chem. High Throughput Screen* 6, pp. 381-387]; [Weber *et al.* (2004). *Assay Drug Dev. Technol.* 2, pp. 39-49]; [Englen (2005). *Comb. Chem. High Throughput Screen* 8, pp. 311-318] (상기 문헌은 각각 그 전문이 참조로 포함된다)). 본 검정법은 본원에서 GPCR을 발현하는 판독 세포에 대하여 세포외 효과가 있는 효과기 세포 또는 세포외 효과의 변화를 검출하기 위해 수행될 수 있다.

[0264] GPCR 수용체 활성화 또는 억제로부터 발생되는 세포 이벤트는 또한 판독 세포에 대한 효과기 세포의 특성(들) (예컨대, 활성화 또는 길항시키는 항체 생산 세포의 능력)을 측정하기 위해 검출된다. 예를 들어, Gq 커플링된 수용체의 경우, GPCR이 활성화될 때, Gq 단백질은 활성화되고, 이로써 막 인지질의 포스포리파제 C 절단이 이루어진다. 이러한 절단으로 이노시톨 트리포스페이트 3 (IP3)이 생성된다. 유리 IP3은 소포체 표면의 그의 표적에 결합하여 칼슘 방출을 유발한다. 칼슘은 특정 칼슘 반응성 전사 벡터, 예컨대, 활성화된 T-세포의 핵 인자 (NFAT)를 활성화시킨다. 따라서, NFAT 활성 또는 발현을 모니터링함으로써 판독 세포에서 GPCR의 간접적인 판독이 확립된다. 예컨대, 문헌 [Crabtree and Olson (2002). *Cell* 109, pp. S67-S79] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)을 참조할 수 있다.

[0265] 일단 활성화되고 나면, 전체 GPCR 중 60% 초과는 내재화된다. 태깅된 GPCR을 사용할 경우 (전형적으로 C-말단 GFP 태그를 사용하여 수행), 한 실시양태에서, 수용체의 분포는 리간드의 존재 및 부재하에서 영상화된다. 리간드 자극시, 보통 균일하게 분포된 수용체는 대개 세포내 이입된 반점으로서 출현할 것이다.

표 4

표 4. 본 내용과 함께 사용하기 위한 GPCR 기능성 검정법.

검정법	생물학적 척도	시약 (표준 압자)	기초 이론	종점	주석
유로피옹-GTP™ 결합 (퍼킨 엘머)	막 기반 GPCR 매개구아닌 뉴클레오티드 교환	유로피옹-GTP	유로피옹-표지된 GTP의 수용체 활성화된 G 단백질에의 결합	시간 분해형광	수용체 활성화에 근접, 비형사능성.
알파스크린™ (퍼킨 엘머)	세포 기반 cAMP 축적	cAMP MAb 접합된 수용체 비드, 화학발생광 화합물을 포함하는 스트렙트아비딘-코팅된 공여체 비드, 비오티닐-cAMP	cAMP는 고친화성 스트렙트아비딘-코팅된 공여체 비드에의 결합에 대해 비오티닐-cAMP와 경쟁, 수용체-공여체 비드의 인접성 감소에 기인하여 신호 손실	발광	고감도, 동질성, 자동화로 변형 가능, 광범위한 선형 범위의 검출
형광 편광 (퍼킨 엘머, 몰레큘라 디바이시스, GE 헬스케어)	세포 또는막 기반 cAMP 축적	cAMP MAb, 형광성 cAMP	cAMP는 cAMP MAb 에의 결합에 대해 플루오르-cAMP와 경쟁, 회전 및 편광 감소에 기인하여 신호 손실	형광 편광	동질성, 자동화로 변형 가능
HTRF cAMP (시스바이오)	세포 기반, cAMP 축적	유로크립테이트와, a 접합된 cAMP MAb, 수용체 표지 표지된 cAMP	cAMP는 유로피옹 접합된 cAMP MAb 에의 결합에 대해 수용체-표지화된 cAMP와 경쟁, 유로피옹-수용체 분자 인접성 감소에 기인하여 신호 상실	시간 분해형광	광범위한 선형 범위, 높은 신호 대잡음비, 동질성, 자동화로 변형 가능
히트헌터™ (디스커버 x)	세포 기반, cAMP 축적	cAMP MAb, ED-cAMP (효소 단편 노도-cAMP 접합체) 접합된 펩티드, 수용체 단백질, 용해 완충제	cAMP는 수용체 펩티드 결합과 상계 β-Gal 활성 상보성에 대해 ED-cAM와 경쟁, 효소 상보성 감소에 기인하는 신호 상실	형광 또는 발광	낮은 화합물 간섭, 고감도, 동질성, 자동화로 변형 가능
IP₁™ (시스바이오)	세포 기반 IP₁ 축적	유로피옹 접합된 IP₁ MAb, 수용체 표지화된 IP₁	Loss of signal as IP₁가 유로피옹-MAb 에의 결합에 대해 수용체-표지화된 IP₁와 경쟁함에 따른 신호 상실	시간 분해형광	동질성, 구성적으로 활성을 띠는 Gq-커플링된 GPCR 에 대해 사용가능
FLIPR™ (몰레큘라 디바이시스)	세포 기반, 세포내 칼슘 증가	칼디옹 감수성 염료: 칼디옹-3 증가	세포내 염료가 칼슘에 결합함에 따른 형광	형광	감응성, 동질성, 자동화로 변형 가능

[0266]

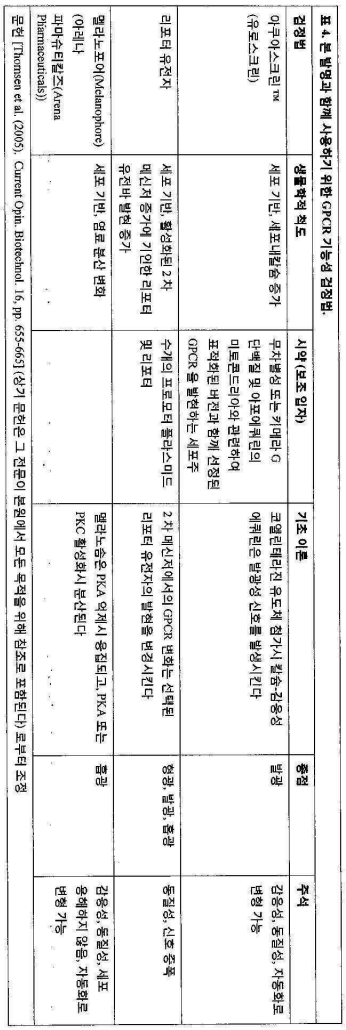


표 4. 글 탐침과 대체 사용하기 위한 GPCR 기능성 검정법.

검정법	생물학적 척도	시약(표준 입자)	기초 이론	출력	주석
아쿠아스크린™ (유로스크린)	세포 기반, 세포내칼슘 증가	무작용성 또는 키메라 G 단백질 및 아포에쿼린의 미토콘드리아와 결합하여 표적화된 버전과 함께 선정된 GPCR를 발현하는 세포주	코엘리테라진 유도체 합가시 칼슘-감응성 에쿼린을 부분적 신호를 복원시킨다.	발광	감응성, 동질성, 자동화로 변형 가능
리포터 유전자	세포 기반, 활성화된 2차 메신저 증가에 기인한 리포터 유전버블체 증가	수개의 프로모터 플러스마드 및 리포터	2차 메신저에서의 GPCR 변화는 선택된 리포터 유전자의 발현을 변경시킨다.	형광, 발광, 흡광	동질성, 신호 증폭
멜라노포어(Melanophore) (어레나 파마슈티컬즈(Arena Pharmaceuticals))	세포 기반, 염료 분산 변화	멜라노승운 PKA 억제시 유전되고, PKA 또는 PKC 활성화시 분산됩니다.		흡광	감응성, 동질성, 세포 융해하지 않음, 자동화로 변형 가능

글원 [Thomsen et al. (2005). Current Opin. Biotechnol. 16, pp. 655-665](상기 문헌은 그 전문이 본원에서 모든 목적을 위해 참조로 포함된다) 로부터 조정

[0267]

[0268] 단일 세포 항체 분비 세포 (ASC)/항체 선별 파이프라인에 대한 작업 흐름에 관한 한 실시양태는 도 1에 제시되어 있다. 본 실시양태에서, 숙주 동물을 표적 항원으로 면역화시키고, 최종 면역화 부스트 후 1주일 경과하였을 때 세포를 비장, 혈액, 림프절 및/또는 골수로부터 수득한다. 이어서, 상기 샘플을 확립된 표면 마커 (이용 가능할 경우)를 사용하거나, 또는 미세유동 농축을 사용하여 유세포 분석법 (예컨대, FACS)에 의해, 또는 자기 비드 정제에 의해 ASC에 대해 농축시킨다. 이어서, 생성된 ASC 농축된 집단을 나노리터 부피의 챔버의 미세유동 어레이에 적재하고, 여기서, 적재 농도는 챔버당 약 1 내지 500개의 세포, 또는 챔버당 약 1 내지 약 250개의 세포인 것으로 선택한다. 사전 농축 단계에 따라, 개별 챔버는 다중 ASC, 단일 ASC 또는 0개의 ASC를 포함할 것이다. 이어서, 마이크로밸브를 폐쇄시켜 챔버를 분리시키고, 인큐베이션시켜 작은 챔부 부피에서 항체가 분비될 수 있도록 한다. ASC는 전형적으로 초당 1,000개의 항체 분자인 속도로 항체를 분비하기 때문에, 본원에서 제공하는 개별 챔버의 부피는 대략 2 nL이고, 3시간 동안 약 10 nM 농도의 각 분비된 단일클론 항체가 제공된다 (각 ASC는 독특한 단일클론 항체를 분비한다). 추가의 실시양태에서, 자동 현미경법 및 실시간 영상 프로세싱을 사용하여 판독되는 영상 기반 효과기 세포 검정법을 수행하기 위해 시약의 전달 및 교환을 위해 통합된 미세유동 장치를 사용한다. 이어서, 원하는 특성 (예컨대, 결합, 특이성, 친화성, 기능)을 가지는 항체를 분비하는 개별 ASC 또는 하나 이상의 ASC를 포함하는 세포 집단을 개별 챔버로부터 회수한다. 이어서, 한계 희석으로 회수된 세포 집단의 추가 분석을 수행한다. 이 경우, 개별 ASC를 챔버에 제공하고, 회수하고, 개별 ASC의 추가 분석 또한 수행할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 추가 분석으로는 서열분석 및 세포주로의 클로닝을 위해 쌍을 이룬 HV 및 LV을 증폭시키는 단일 세포 RT-PCR을 포함한다.

[0269] 또 다른 실시양태에서, 동물을 면역화시키고, 세포를 비장, 혈액, 림프절 및/또는 골수로부터 수득한 후, 세포는 본원에서 제공하는 미세 유동 장치의 개별 챔버 내로 직접 적재되는 출발 집단, 즉, 복수 개의 세포 집단을 구성하며, 여기서, 개별 세포 집단은 각 미세유동 챔버 내에 존재한다. 이어서, 개별 챔버에서 개별 세포 집단

에 대해 세포외 효과 검정법을 수행함으로써 개별 세포 집단 중 임의의 것이 세포외 효과를 담당하는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는지 여부를 측정한다.

[0270] 비록 숙주 동물이 미세유동 분석법 이전에 표적 항원으로 면역화될 수도 있지만, 본 발명은 그로 한정하지 않는다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 세포를 숙주 (인간 포함)로부터의 비장, 림프절 또는 골수로부터 수득한 후, ASC에 대해 농축시킨다. 별법으로, 농축 단계를 수행하지 않고, 세포를 즉, 복수 개의 세포 집단으로서 본원에서 제공하는 장치의 챔버 내로 직접 적재할 수 있고, 여기서, 개별 세포 집단은 각 챔버 내에 존재한다.

[0271] 본원에서 제공하는 방법을 통해 임의의 숙주 종으로부터 항체를 선별할 수 있다. 이는 치료학적 항체 개발에 있어 2가지 중요한 이점을 제공한다. 첫째, 마우스 및 래트 이외의 다른 종에서도 작용을 할 수 있는 능력을 통해 마우스 단백질과 높은 상동성을 가지는 표적에 대한 mAb 뿐만 아니라, 마우스와 교차 반응하는 인간 단백질에 대한 mAb를 선별할 수 있으며, 이로써, 쉽게 접근가능한 임상전 마우스 모델에서 사용될 수 있다. 두번째로, 마우스 면역화는 대개 몇몇 에피토프에 대한 면역우성을 특징으로 하는 반응을 일으켜 생성되는 항체의 다양성은 낮으며; 따라서, 다른 종으로 확장시키는 것은 상이한 에피토프를 인식하는 항체의 다양성을 크기 증가시킨다. 따라서, 본원에 기술된 실시양태에서, 마우스, 래트, 및 토끼가 면역화에 사용되고, 이어서, 상기 면역화된 동물로부터 ASC가 선별된다. 한 실시양태에서, 토끼를 항원으로 면역화시키고, 면역화된 토끼로부터의 ASC를 본원에서 제공하는 방법 및 장치를 이용하여 선별한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 토끼는 유전자 전환을 사용하여 항체 다양성을 더욱 크게 증가시키고, 물리적 크기 (항체 다양성 증가)를 더욱 크게 증가시키고, 인간으로부터의 진화적 거리 (인식되는 에피토프 증가)를 더욱 크게 증가시키는 독특한 친화성 성숙화 기전이라는 이점을 제공한다.

[0272] 한 실시양태에서, 면역화 전략법은 단백질, 세포, 및/또는 DNA 면역화이다. 예를 들어, PDGFRα의 경우, 포유동물 세포주에서의 발현으로부터 수득되거나, 상업적 공급원 (칼릭사르(Calixar))로부터 구입한 세포외 도메인이 동물을 면역화시키는 데 사용된다. 한 실시양태에서, CXCR4의 경우, 상업적 공급원 (인테그랄 몰레큘라(Integral Molecular))로부터 입수한, 천연 입체구조로 GPCR이 고발현되는 나노입자인 바이러스-유사 입자 (VLP) 시료가 사용된다. 세포 기반 면역화는 세포주에서의 전장의 단백질의 과다발현에 의해 수행된다 (예컨대, 마우스/래트의 경우, 32D-PDGFRα 세포, 및 토끼의 경우, 토끼 섬유아세포 세포주 (SIRC 세포); 특정 mAb에 대해 농축시키기 위해 최종 부스트에서 새로운 세포주가 사용되는 프로토콜 포함). 다양한 확립된 DNA 면역화 프로토콜 또한 본 발명과 함께 사용될 수 있도록 변형될 수 있다. DNA 면역화는 1) 단백질을 발현 및 정제할 필요가 없도록 하고, 2) 항원의 천연 입체구조를 보장하며, 3) 다른 세포 막 항원에 대한 비-특이적인 면역 반응의 잠재성을 감소시키고, 4) 표적을 시험 감염시키는 데 효과적인 것으로 입증되었는 바, 복잡한 막 단백질에 대해서는 최선의 방법이 된다 (문헌 [Bates *et al.* (2006). *Biotechniques* 40, pp. 199-208]; [Chambers and Johnston (2003). *Nat. Biotechnol.* 21, pp. 1088-1092]; [Nagata *et al.* (2003). *J. Immunol. Methods* 280, pp. 59-72]; [Chowdhury *et al.* (2001). *J. Immunol Methods* 249, pp. 147-154]; [Surman *et al.* (1998). *J. Immunol. Methods* 214, pp. 51-62]; [Leinonen *et al.* (2004). J. Immunol. Methods 289, pp. 157-167]; [Takatasuka *et al.* (2011). *J. Pharmacol. and Toxicol. Methods* 63, pp. 250-257] (상기 문헌은 각각 그 전문이 참조로 포함된다)). 모든 면역화는 동물 보호 요건 및 확립된 프로토콜에 따라 수행된다.

[0273] 앞서 래트, 마우스, 및 토끼에서 항PDGFRα 항체를 제조하였고, PDGFRα의 세포외 도메인 비교 결과, 실질적인 변이 부위 수개가 나타났다 (도 24). 따라서, 상기 항원으로부터 우수한 면역 반응을 수득할 수 있을 것으로 기대된다. 항-CXCR4 mAb 또한 지질입자 및 DNA 면역화, 둘 모두를 사용하여 앞서 생성되었으며, 이로써, 상기 표적은 우수한 면역 반응을 일으킬 가능성이 있다. 필요할 경우, 본 발명자들은 분자 애주번트로서 (공동 발현되거나, 또는 융합물로서인) GroEl 또는 GM-CSF의 공동 발현을 사용하는 것 뿐만 아니라, 상이한 애주번트 및 면역화 스케줄을 시험하는 것을 조사할 것이다 (문헌 [Takatsuka *et al.* (2011). *J. Pharmacol. and Toxicol. Methods* 63, pp. 250-257]; [Fujimoto *et al.* (2012). *J. Immunol. Methods* 375, pp. 243-251] (상기 문헌은 그 전문이 모든 목적을 위해 참조로 포함된다)).

[0274] 본원에서 제공하는 장치는 다중층 소프트 리소그래피(MSL) 미세 유체 공학에 기반한다 (문헌 [Unger et al. (2000). *Science* 1, pp. 113-116] (상기 문헌은 그 전문이 참조로 포함된다)). MSL은 소량의 반응을 통한 증가된 감도; 높은 확장성 및 병행화; 강인한 세포 배양; 복합 검정법에 필요한 유연성 및 유체 처리 제어; 및 비용 및 시약 소모량의 큰 절감을 제공하는 가공 방법이다.

[0275] 장치 1회 작동당 단리된 효과기 세포의 개수 (즉, 장치의 각 챔버 중 세포의 개수)는 장치상에 적재된 세포 현탁액 중 세포 농도, 세포 현탁액 중 선별되는 특이 효과기 세포의 빈도, 및 장치 상의 챔버의 총 개수의 함수이

다. 최대 40,000개 초과의 효과기 세포 검정용 챔버로 이루어진 어레이를 가진 장치가 고려된다.

[0276] 모든 미세 유체 공학 기술 중에서 MSL은 수천 개의 통합된 마이크로밸브를 가지는 장치를 원형화하는 데 있고, 신속하고, 저렴하다는 점에서 유일한 것이다 (문헌 [Thorsen et el. (2002). *Science* 298, pp. 58-584] (상기 문헌은 그 전문이 참조로 포함된다)). 상기 밸브는 믹서, 연동 펌프 (문헌 [Unger *et al*. (2000). *Science* 7, pp. 113-116]), 및 유동 다중 구조 (문헌 [Thorsen *et el*. (2002). *Science* 298, pp. 58-584]; [Hansen and Quake (2003). *Curr. Opin. Struc. Biol*. 13, pp. 538-544] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다))를 비롯한 고수준의 유동 성분을 구축하는 데 사용될 수 있으며, 이로써, 고수준의 통합 및 칩 상에서의 액체 취급이 가능하다 (문헌 [Hansen *et al*. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, pp. 14431-1436]; [Maerkl and Quake (2007). *Science* 315, pp. 233-237] (상기 문헌은 각각 그 전문이 참조로 포함된다)). (도 25).

[0277] 도 25a는 MSL에 의해 제조된 밸브의 광학 현미경 사진이다. 하나는 활성 유체에 대한 "유동 채널"이고 (세로), 하나는 밸브 작동용 제어 채널인 (가로), 교차하는 두 미세가공된 채널이 밸브 구조를 생성한다. 유동 채널은 얇은 엘라스토머 막에 의해 제어 패널로부터 분리되어 있으며, 이로써, "핀치 밸브"가 생성된다. 제어 채널의 가압으로 막을 편향되어 유동 채널을 차단하게 된다. 도 25b는 (녹색 및 청색 식용 색소로 충전된) 다중 밸브를 통합하는 MSL 장치의 단면을 보여주는 것이다. 도 25c는 총 16,000개의 밸브s, 4,000개의 챔버, 및 3,000개 초과의 층-층 상호연결 장치 (화살표 표시)를 가지는 섹션이다. 도 25d는 페니 크기의 미세유동 장치의 예를 보여주는 것이다. 제시된 장치는 MSL 가공 기술을 예시하기 위한 것이다.

[0278] 한 실시양태에서, 장치의 검정 챔버의 평균 부피는 약 100 pL 내지 약 100 nL이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 효과기 세포의 하나 이상의 특성이 세포 집단을 포함하는 미세유동 챔버 내에서 검정되며, 여기서, 미세유동 챔버의 부피는 약 100 pL, 약 200 pL, 약 300 pL, 약 400 pL, 약 500 pL, 약 600 pL, 약 700 pL, 약 800 pL, 약 900 pL 또는 약 1 nL이다. 또 다른 실시양태에서, 미세유동 챔버의 부피는 약 2 nL이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 중 효과기 세포의 특성을 검정하기 위한 미세유동 챔버의 부피는 약 100 pL 내지 약 100 nL, 약 100 pL 내지 약 50 nL, 약 100 pL 내지 약 10 nL, 약 100 pL 내지 약 1 nL, 약 50 pL 내지 약 100 nL, 약 50 pL 내지 약 50 nL, 약 50 pL 내지 약 10 nL 또는 약 50 pL 내지 약 1 nL이다. 추가로 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 중 효과기 세포의 특성을 검정하기 위한 미세유동 챔버의 부피는 약 10 nL, 약 20 nL, 약 30 nL, 약 40 nL, 약 50 nL, 약 60 nL, 약 70 nL, 약 80 nL, 약 90 nL 또는 약 100 nL이다.

[0279] MSL 가공 공정은 잘 확립된 포토리소그래피 기법 및 마이크로 전자 가공 기술상의 진보를 이용한다. MSL의 제1 단계는 컴퓨터 드래프팅 소프트웨어를 이용하여 유동 및 제어 채널의 디자인을 그리고, 이어서, 고해상도 마스트 상에 인쇄한다. 포토레지스트에 커버링된 실리콘 (Si) 웨이퍼를 자외선에 노출시켜 마스크에 의한 특정 구역을 필터링한다. 포토레지스트의 음 또는 양에 따라, 노출된 (음) 또는 노출되지 않은 (양) 부위는 가교되고, 레지스트는 중합화될 것이다. 중합화되지 않은 레지스트는 현상액 중에서 가용성이고, 이어서, 세척된다. 상이한 포토레지스트를 조합하고, 상이한 속도로 회전식 코팅을 수행함으로써, 실리콘 웨이퍼를 각종의 상이한 형상 및 높이로 패턴화하여 다양한 채널 및 챔버를 정의한다. 이어서, 패턴을 폴리디메틸 실록산 (PDMS)으로 전달하는 몰드로서 웨이퍼를 사용한다. 한 실시양태에서, PDMS를 이용하여 몰딩하기 전, 및 포토레지스트 층을 정의한 후, 몰드를 파릴렌으로 코팅하여 (화학 증착된 폴리(p-크실렌) 중합체 막) 몰딩 동안 PDMS의 부착을 감소시키고, 몰드 내구성을 증진시키고, 작은 피쳐를 복제시킬 수 있다.

[0280] MSL에서, 서로의 상부에 상이한 몰드로부터의 PDMS 캐스트의 상이한 층을 적층하는 것을 이용하여 중첩 "유동" 및 "제어" 층에서 채널을 생성한다. 포팅 프리중합체 성분 및 경화제 성분을 상보적인 화학량론적 비율로 혼합하여 경화시킴으로써 2개 (이상) 층을 함께 결합시킨다. 간단한 미세유동 칩을 생성하기 위해, "두꺼운" 층 (예컨대, 약 200-2,000 ㎛)은 유동층을 포함하는 몰드로부터 캐스팅되고, "얇은" 층 (예컨대, 약 25 내지 약 300 ㎛)은 제어층을 포함하는 몰드로부터 캐스팅된다. 두 층 모두를 부분적으로 경화시킨 후, 유동층을 그의 몰드로부터 벗겨내고, 제어층으로 정렬한다 (육안 검사에 따르면 제어층은 여전히 그의 몰드 상에 존재). 예를 들어, 80℃에서 약 15-60분 동안 제어층 및 유동층을 결합시킨다. 이어서, 이중 슬랩을 제어 몰드로부터 벗겨내고, 입구 및 출구 구멍을 펀치시키고, 이중 슬랩을 PDMS의 블랭크 층 (즉, 구조 피쳐가 없는 평평한 PDMS 층)에 결합시킨다. 결합할 수 있도록 더 많은 시간을 허용한 후, 완성된 장치를 유리 슬라이드 상에 탑재한다. 장치내 유체 유동은, 제어층의 채널 중 유체에 가해지는 압력을 작동시키는 오프 칩 컴퓨터 프로그램가능한 솔레노이드를 이용하여 제어된다. 상기 제어 채널에 압력이 가해지면, 수직으로 중첩된 제어 라인 및 유동 라인 사이의 가요성 막은 유동 채널로 편향되고, 밸브로 유동을 효과적으로 조절한다. 상기 밸브의 상이한 조합을

사용하여 연동식 펌프, 다중 제어 장치를 생성하고, 칩의 다르 구역을 분리시킬 수 있다.

[0281] 유동층과 관련하여, 검정 챔버, 및 검정 챔버로의, 및 검정 챔버로터의 유체 유동을 제어하기 채널은 포토레지스트 층에 의해 정의된다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 포토레지스트 층의 두께는 부분적으로는 회전식 코팅 속도 및 사용을 위해 선택되는 특정 포토레지스트에 의해 조절될 수 있다. 한 실시양태에서, 검정 챔버의 벌크는 Si 웨이퍼 상에 직접 안착되어 있는 SU-8 100 피쳐에 의해 정의된다. 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이, SU-8은 보편적으로 사용되는 에폭시-기반 음성 포토레지스트이다. 별법으로, 당업자에게 공지되어 있는 다른 포토레지스트도 상기 기술된 높이를 가지는 검정 챔버를 정의하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, SU-8 피쳐에 의해 정의되는 바와 같이, 검정 챔버의 높이 및 폭은 각각 50-500 μM 및 50-500 μM이다.

[0282] MSL 가공 기법을 통해 광범위한 장치 밀도, 및 챔버 부피로 가공할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 장치의 경우, 단일 통합된 장치에 약 2,000 내지 약 10,000개의 효과기 세포 분석 챔버가 제공된다. 한 실시양태에서, 효과기 세포 분석 챔버의 평균 부피는 약 1 nL 내지 약 4 nL, 예를 들어, 약 1 nL 내지 약 3 nL, 또는 약 2 nL 내지 약 4 nL이다. 한 실시양태에서, 효과기 세포 분석 챔버는 도 26에 도시되어 있는 바와 같이, 일련의 포맷으로 되어 있다. 일례로, 일련의 포맷으로 연결된 4,032개의 개별 분석 챔버 (평균 부피 2.25 nL)를 포함하는 장치를 통하여 1회 작동당 대략 100,000개의 세포인 스크리닝 처리량을 달성한다 (도 8). 본원에서 제공하는 장치에서 사용되는 통합된 미세유동 밸브를 통해 챔버를 분리시킬 수 있고, 복수 개의 입구, 예를 들어, 2 내지 약 32개의 입구, 2 내지 약 20개의 입구, 2 내지 약 15개의 입구, 2 내지 약 10개의 입구, 또는 2 내지 약 9개의 입구, 또는 2 내지 약 8개의 입구, 또는 2 내지 약 7개의 입구 또는 2 내지 약 6개의 입구로부터 선택되는 시약을 이용하여 프로그램 가능한 방식으로 세척할 수 있다. 밸브 압력을 제어하기 위해 추가의 입구가 제공된다 (도 26).

[0283] 본원에서 제공하는 장치는 세포 및/또는 입자의 중력 기반 고정화를 이용한다. 중력 기반 고정화를 통해 비-부착성 세포 유형을 관류시킬 수 있고, 및 일반적으로는, 완충제 및 시약을 교환시킬 수 있다. 각 챔버는 상부를 통과하는 접근 채널이 있는 입방형의 기하학적 형태를 가진다 (도 26). 예를 들어, 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 챔버의 크기는 50-250 ㎛ x 50-250 ㎛ x 50-250 ㎛; *l* x *w* x *h*, 예컨대, 150 ㎛ x 100 ㎛ x 150 ㎛; *l* x *w* x *h*이다. 적재 동안, 입자, 예컨대, 세포 또는 비드는 유선을 따라 유동하게 되고, 챔버 상부를 통과하지만, 유동이 정지되면, 챔버의 하부로 떨어지게 된다. 층류 프로파일에 기인하여, 유속은 챔버 하부에서는 무시해도 될 정도로 낮다. 이를 통해 챔버 내의 비-부착성 세포 (또는 비드)의 위치는 교란시키지 않으면서, 대류/확산 조합을 통해 챔버 어레이는 관류될 수 있고, 시약 교환이 이루어질 수 있다.

[0284] 중요하게는 본원에서 제공하는 장치를 통해 효과기 세포, 보조 세포 또는 판독 세포인지 그 다양성에 상관없이, 세포를 장기간 배양할 수 있고, 그를 유지시킬 수 있다. 챔버의 미세유동 어레이는 앞서 기술된 바와 같이 예를 들어, 1 mL의 배지와 같은 배지 저장소가 중첩된 PDMS 엘라스토머의 두꺼운 막 (예컨대, 두께 약 150 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 두께 약 200 ㎛, 두께 약 300 ㎛, 두께 약 400 ㎛, 또는 두께 약 500 ㎛) 내에서 가공된다 (문헌 [Lecault et al. (2011). Nature Methods 8, pp. 581-586] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다 for all purposes)). 배지 저장소 (삼투 배쓰)가 세포 챔버에 근접하기 때문에 (기체 투과성 PDMS 물질을 통한) 증발을 효과적으로 차단할 수 있고, 강력한 세포 생존능을 노장할 수 있으며, 생포가 충분히 분화되지 않은 경우, 수일 간에 걸쳐 성장할 수 있도록 할 수 있으며, 이는 ㎕ 부피 포맷과 동일한 성장률 및 세포 반응으로 nL 부피의 것을 장기간 배양시키는 데 중요하다. 도 27은 본원에서 사용된 장치의 층에 대한 개략도를 보여주는 것이다.

[0285] 본원에서 제공하는 장치의 막 디자인을 통해서는 또한 미세모세관으로 상부 막을 천공시킴으로써 임의 챔버로부터 세포를 선택적으로 회수할 수 있다.

[0286] 본원에서 제공하는 장치 구조는, 추가 성분, 예컨대, 보조 입자 또는 세포 신호전달 리간드가 챔버에 첨가될 때, 효과기 세포의 가용성 분비 생성물이 세척되지 않도록 디자인된다. 추가로, 본원에서 제공하는 장치를 통해 장치의 개별 챔버 사이의 분비 생성물 (예컨대, 항체)의 상호 오염이 도입되지 않으면서, 성분을 챔버에 첨가할 수 있다. 챔버가 일련으로 연결되어 있는 실시양태에서, 배지 교환을 위해서는 전체 어레이를 플러싱하여야 한다. 한 실시양태에서, 전체 어레이를 플러싱하게 되면, 각 챔버로부터 항체는 손실되고, 하류 챔버로 상호 오염이 도입된다. 그러나, 분비 생성물이 챔버 표면, 또는 표면에 결합된 판독 입자에 결합한 경우에는, 분비 생성물이 고정화되어 있기 때문에, 분비 생성물의 손실 및/또는 상호 오염은 유의적인 문제가 되지 않는다.

[0287] 한 실시양태에서, 분비 생성물의 손실 및/또는 상호 오염은 도 28a-3에 제시된 바와 같은 "팽창식 챔버" 디자인을 사용함으로써 최소화된다. 각 챔버은 단일 입구를 가지고, 마이크로밸브에 의해 제어되는 짧은 "접근 채

널"을 통해 공통 채널에 연결된다. 각 챔버의 상부에는 박막 (~10 ㎛)에 의해 챔버로부터 분리되어 있는 리세스가 중첩되어 있고, 이로써, 챔버가 가압되었을 때, 유의적 부피 팽창이 일어나게 된다. 한 실시양태에서, 챔버는 2X 부피로, 예컨대, 2 nL 내지 4 nL 또는 1 nL 내지 2 nL 또는 2.5 nL 내지 5 nL로 팽창된다. 또 다른 실시양태에서, 챔버는 가압에 의해 1.5X 부피로, 예컨대, 2 nL 내지 약 3.5 nL 팽창된다. 한 실시양태에서, 입자 (세포 또는 비드)는 챔버를 팽창시켜 입자가 중력하에 안착될 수 있도록 한 후, 챔버를 수축시킴으로써 팽창식 챔버 내로 적재한다. 유사하게, 순차적으로 팽창, 확산식 혼합, 및 수축 공정을 통해 챔버 내용물을 세척하고/거나, 배지를 교환할 수 있다. 이러한 접근법에서는 단지 50% 미만만큼만 희석되기 때문에 분비 생성물이 손실되지 않으면서, 가용성 리간드를 첨가할 수 있다. 팽창식 챔버는 또한 챔버가 일련으로 연결되어 있지 않는 바, 상호 오염의 가능성도 없다. 이러한 단순한 구조를 통해 조밀한 어레이를 통합할 수 있고, 한 실시양태에서, 단지 1 제곱인치 초과 정도인 면적 상에 10,000개의 챔버를 가지는 장치에 적용가능하다.

[0288] 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 미세유동 장치는 관성 효과를 억제시키고, 속도에 의해 지배되는 유동 조건으로 작동된다. 이러한 유체 유동 방식은 낮은 레이놀드 수를 특징으로 한다 ($Re = \rho du/\eta$, 여기서, ρ는 윷 속도이고, d는 채널의 특징적인 길이 스케일이며, u는 특징적인 유동 속도이고, η는 유체 속도이다). Re가 낮을 때, 유체 유동 유선은 예측가능하고, 원하는 효과로 디자인될 수 있다. 도 29 및 30을 참조하면, 예를 들어, 오직 챔버 (41)의 좌측에만 효과기 세포 (40)를 적재하고자 할 경우, 한 실시양태에서, 장치는 효과기 세포를 입구 채널 (43)의 좌측으로 우선적으로 유도하는 챔버의 변류기 (42) (도 30에서)에 의해 형성되는 것과 같은 제한 상류로 디자인된다. 효과기 세포 (40)가 유동하에서 챔버 (41)로 유입되기 때문에, 이는 계속해서 유동의 유선을 따라 챔버 좌측으로 이어지게 되며, 단, 수송 시간은 효과기 입자가 실질적으로 유선을 통과하여 확산되지 않도록 선택된다. 유사하게, 한 실시양태에서, 판독 입자는 입구 채널에 연결된 보조 채널을 사용함으로써 챔버 우측으로 유도하고, 이로써, 판독 입자를 입구 채널 우측에 배치시킨다. 또 다른 실시양태에서, 판독 입자를 출구 채널을 포함하는 챔버에 접근하는 상이한 채널을 통해 도입한다. 챔버내 특이적인 배치가 바람직할 경우, 층류 프로파일 디자인이 입자를 챔버의 특정 구역으로 유도하는 데 있어 큰 유연성을 제공한다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0289] 특정 챔버에서 효과기 세포를 판독 입자로부터 분리하는 것은 또한 구조 요소의 사용을 통해, 장치의 유동 채널 또는 채널들 내의 유동, 확률적 적재, 자기장, 전기장 또는 유전체 장, 중력장 또는 부착에 영향을 주는 미세유동 챔버의 표면에 대한 변형, 및 효과기 세포 및 판독 입자의 상대 부력 조작, 또는 그의 조합에 의해 달성될 수 있다.

[0290] 한 실시양태에서, 효과기 세포 및/또는 판독 세포는 챔버 내의 구조 요소를 사용함으로써 챔버 챔버의 일부 (예컨대, 효과기 구역 또는 판독 구역)로 한정된다.

[0291] 본원에서 사용되는 바, "효과기 구역"은 효과기 세포, 효과기 세포의 집단 (또는 그의 서브집단)이 보유되는 미세유동 챔버의 구역이다.

[0292] 본원에서 사용되는 바, "판독 구역"은 판독 입자가 효과기 세포로부터 분리되어 유지되고, 효과기 세포(들)의 기능이 검출될 수 있는 미세유동 챔버의 구역이다. 예를 들어, "효과기 구역" 및 "판독 구역"이 미세유동 장치의 3차원 구역일 때, 이는 개별 챔버 (예를 들어, 복합 챔버)일 수 있고, 여기서, 챔버는 서로 유체 소통한다.

[0293] 본원에 기술된 바와 같이, 한 실시양태에서, 하나 이상의 구조 요소는 하나 이상의 챔버 내의 효과기 세포 및/또는 판독 입자 분포를 위해서 사용된다. 추가의 실시양태에서, 하나 이상의 구조 요소는 챔버의 정의된 구역, 예컨대, 효과기 구역 및/또는 판독 구역 내에 효과기 세포 및/또는 판독 입자를 보유하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 구조 요소를 사용하는 것은 기능을 유지시키기 위해 장 (중력장, 유전체 장, 자기장 등)을 사용하는 것과 커플링된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 셀 펜스는 특정 챔버 위치에 세포 (효과기 또는 판독)를 포획하기 위해 사용된다. 셀 펜스는 PCT 출원 공개 번호 2012/162779 (상기 출원은 그 전문이 모든 목적을 위해 참조로 포함된다)에 앞서 기술된 바 있다. 본원에서 사용되는 바, "셀 펜스"란 세포 및 판독 입자의 이동을 한정하는 작용을 하지만, 다른 세포 생성물의 이동은 허용할 수 있는, 미세유동 챔버 내의 임의의 구조를 의미한다.

[0294] 셀 펜스가 사용되는 실시양태에서, 각 펜스는 SU-8 100 피쳐 상부에 안치되어 있는 더 얇은 SU-8 2010 피쳐에 의해 정의된다. 상기 구조는 도 31에 개략적으로 도시되어 있다. 셀 펜스 가공에 대해서는 앞서 PCT 출원 공개 번호 2012/162779에 기술된 바 있다 (상기 출원의 개시내용은 그 전문이 참조로 포함된다). 셀 펜스가 효과기 세포, 또는 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 포획하는 데 사용되는 한 실시양태에서, 미세유동 챔버는 예외적으로 최종 단계인 현상 단계를 생략한 표준 프로토콜에 따라 SU-8 100 음성 포토

레지스트 (전형적으로, 높이 160 ㎛)를 사용하여 정의된다. 구체적으로, 사후 노출 베이크 이후에, SU-8 100 포토레지스트와 함께 회전된 Si 웨이퍼를 냉각시킨 후, 포토레지스트를 현상시키는 대신, SU-8 2010을 전형적으로 10-20 ㎛ 높이에서 현상되지 않은 SU-8 100의 상단에서 회전시킨다. SU-8 2010의 두께가 펜스 높이를 결정한다. 각 챔버의 깊이는 두 포토레지스트 층 높이의 조합이었다.

[0295] 대안적인 셀 펜스 실시양태에서, SU-8 100 층을 완전하게 현상시키고, 웨이퍼를 제1층보다 더 높은 SU-8 100의 추가 층으로 코팅하는데 이러한 높이 차이는 펜스의 높이 차가 된다.

[0296] 본원에 기술된 구조 요소는 중력을 사용함으로써 효과기 세포 및 판독 입자를 챔버의 다른 쪽에 유지시킬 수 있다; 이러한 경우, 중력은 챔버 바닥 쪽으로 지향되고, 세포가 펜스 너머로 상승하지 못하도록 방해하는 힘을 제공한다. 미세 입자는 확률론적이 방식으로 펜스 너머로 "확산"될 수 있게 유발하는 브라운 운동의 대상이 될 수 있다는 것에 주의하여야 하여야 한다. 그러나, 입자가 자발적으로 브라운 운동에 의해서 펜스 너머로 상승하게 될 가능성은 볼츠만(Boltzmann) 분포에 의해 결정되며, 이는 볼츠만 인자 $e^{-E/KT}$ (여기서, E는 입자를 펜스 높이와 같은 높이로 상승시킬 수 있는 잠재 에너지이고 (E = 입자 부피 x 입자 밀도와 액체 밀도 사이의 차 x 중력 x 펜스 높이), K는 볼츠만 상수이고, T는 액체 온도이다)에 비례한다. 따라서, 당업자는 입자가 자발적으로 펜스 너머로 "확산"될 가능성인 무시해도 될 정도로 작도로 펜스 높이를 디자인하고, 가공할 수 있다. 펜스를 통과하는 데 필요한 잠재 에너지에 따라 주어진 높이의 펜스는 일부 입자 (예컨대, 비드 또는 세포)에 대해서는 장벽을 제공할 수 있지만, 액체 중 겉보기 질량이 적절하게 낮은 입자에 대해서는 장벽을 제공하지 못할 것이라는 것 또한 당업자는 이해할 것이다. 예를 들어, 높이가 약 20 ㎛이 펜스는 세포가 확산에 의해 자발적으로 통과하지 못하게 할 수 있지만, 본질적으로는 단백질 확산에 대한 장벽은 제공하지 못한다. 한 실시양태에서, 중력은 세포를 유지시키는 구조 요소와 함께 사용된다. 그러나, 다른 힘, 예컨대, 자기 구배력, 유전체력, 원심력, 유동력, 또는 광학력이 유사하게 사용될 수 있다.

[0297] 구조 요소는 또한 기계적 장벽에 통로를 제공함으로써 효과기 세포 또는 판독 입자를 보유하는 데 효과적일 수 있다. 예를 들어, 챔버의 루프의 갭 'd'에 도달하는 펜스 (여기서, 'd'는 모든 효과기 세포 또는 판독 입자의 직경보다 작다)를 사용하는 것은 또 다른 힘을 가할 필요가 없는 장벽으로서의 역할을 한다. 상기 구조는 또한 한 유형은 통과시키지만, 다른 것은 통과시키지 못하도록 갭 'd'를 디자인함으로써 챔버의 다른 쪽에서 효과기 세포 또는 입자를 선택적으로 분할하도록 디자인될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 도 32를 참조하면, 효과기 세포 (120)의 직경 10 ㎛이고, 효과기 세포 및 판독 입자 (121) (직경 1 ㎛)의 혼합물을 (챔버의 루프에 대한 측정된 바) 5 ㎛ 갭을 가지는 펜스 (122)에 의해 다른 한쪽으로부터 분리된 챔버의 한쪽으로 적재한다. 장치를 적절하게 티핑하여, 효과기 세포 (120)는 나머지 한쪽에 그대로 남겨 두고, 1 ㎛ 판독 입자 (121)를 챔버의 다른 쪽으로 이동시킨다. 상기 방식으로 효과기 세포는 챔버의 효과기 구역에 배치되고, 판독 입자는 판독 구역으로 분할된다.

[0298] 챔버 내의 웰은 또한 검정용 시약, 효과기 세포 및/또는 판독 세포를 격리시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 대표적 장치의 기하학적 형태는 도 33 및 34에 제시되어 있다. 한 실시양태에서, 웰 어레이를 가지는 챔버로 디자인되며, 여기서, 작은 웰은 챔버의 하부에서 정의된다 (도 33). 웰은 임의 형상을 가질 수 있고, 그가 디자인되는 효과기 세포 또는 판독 입자와 관련하여 그에 기초하여 디자인된다. 사각형 및 원형 형상의 웰, 둘 모두 본원에 기술된 장치와 함께 사용하기 위해 변형될 수 있으며, 일반적으로, 다각형 형상의 웰이 챔버에서 사용하기 위해 변형될 수 있다. 다양한 원형을 사각형 및 원형 웰 뿐만 아니라, 사각형 및 원형 '포스트'로 가공하였다. 효과기 세포 및 판독 입자를, 챔버 내의 각 웰이 세포 또는 판독 입자의 서브집단을 함유하게 하는 농도로 장치에 적재한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 챔버 내의 각 웰은 1 또는 0개의 효과기 세포를 함유하도록 지정된다. 상기 디자인은 공간적으로 입자/세포를 한정할 수 있다. 개별 "효과기 구역" 및 "판독 구역"이 사용되는 실시양태에서, 효과기 세포는 그가 상주하는 웰을 "효과기 구역"으로서 정의하고, 판독 입자는 그가 상주하는 웰을 "판독 구역"으로서 정의한다.

[0299] 도 34는 본 발명의 장치에서 사용될 수 있는 "비드 트랩" 실시양태를 보여주는 것이다. 본 디자인은 복수 개의 판독 입자 (예컨대, 복수 개의 비드 또는 판독 세포) 또는 세포 집단을 챔버 내의 특정 공간 위치로 한정한다. 상기와 같은 디자인을 통해, 그렇지 않을 경우, 검정하는 동안 이동하는 비드 또는 입자와 관련될 수 있는 문제들은 극복될 수 있고, 이로써, 하류 영상화 및 영상 분석법을 간소화될 수 있다. 판독 입자의 위치를 고정시키는 것은 또한 효과기 세포 및 판독 입자 사이의 확산 거리가 더욱 잘 조정될 수 있기 때문에 이롭다.

[0300] 한 실시양태에서, 비드 트랩 (도 34에서 제시)은 하기와 같이 작동된다: 판독 입자를 챔버에 적재한 후, 이를 중력에 의해 챔버 하부에 안착시키고, 챔버는 우측 상단 코너 쪽으로 티핑된다 (즉, 구역은 수직 셀 펜스에 의

해 폐쇄되고, 일반적으로 원형 입자 트랩은 우측 상단 사분면 쪽으로 개방된다). 판독 입자 또는 입자들이 챔버 하부에 안착된 후, 장치는 (같은 축을 따라) 반대 방향으로 티핑됨으로써 판독 입자 또는 입자들은 챔버 하부를 따라 챔버 중앙의 원형 '트랩' 피쳐로 슬라이딩되거나, 슬라이딩된다. 상기 언급된 바와 같이, 같은 방법 및 장치를 사용하여 효과기 세포를 격리시킬 수 있다.

[0301] 한 실시양태에서, 효과기 세포 및 판독 입자는 하나 이상의 입자 유형 (예컨대, 세포)을 보유하도록 디자인된 미세가공된 구조를 사용하여 챔버내 효과기 구역 및 판독 구역으로 배치된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 효과기 세포 또는 판독 입자의 유동은 입자를 보유하지만, 유동은 통과시키도록 디자인된 미세가공된 컵과 교차하도록 디자인될 수 있다. 상기 구조는 오직 고정된 개수의 입자 또는 세포, 또는 크기 범위가 정의된 입자 또는 세포만을 수용할 수 있도록 디자인될 수 있으며, 이로써, 구조는 상이한 입자 유형에 대하여 선택성을 띠게 된다. 상기 트랩은 실질적으로 챔버에, 또는 챔버의 입구 및 출구에 배치될 수 있다.

[0302] 또 다른 실시양태에서, 도 35를 참조하면, 효과기 세포 (81)는 중력을 이용하여 챔버의 하부에 제공되지만, 판독 입자 (82)는 출구 채널에 가공된 트랩 구조 (84)를 사용하여 챔버의 출구 (83)에 배치된다.

[0303] 본 발명의 한 실시양태에 따라, 판독 입자로부터 효과기 세포를 분리하기 위해 챔버 하부에 (본원에서는 또한 "컵"으로도 지칭되는) 하나 이상의 리세스를 제공한다. 도 36을 참조하면, 예를 들어, 폭이 효과기 세포 (363)의 평균 직경보다는 작지만, 판독 입자 (364)의 직경보다는 큰 내장 컵 (361)을 챔버 (362) 하부에 제공한다. 이러한 입체 형태에서, 판독 입자 (364)는 컵 (361)의 하부로 가라앉게 되고, 효과기 세포 (363)는 컵 입구 위에 유지된다. 일부 실시양태에서, 컵 (361)의 하부는 다공성 막 및 아래의 채널 구조를 통해 접근할 수 있으며, 이는 효과기 세포가 덮고 있는 내장 컵 중의 판독 입자에의 유체 접근을 증가시킨다.

[0304] 한 실시양태에서, 구조 요소는 하나 이상의 입자 또는 세포를 보유하는 유동 채널 또는 챔버에 배치된다. 도 37을 참조하면, 구조 요소 (371) (또는 관능화된 표면 패치 등)는 하나 이상의 효과기 세포 (372) 및/또는 하나 이상의 판독 입자 (373)를 보유하기 위해 유동 채널 (마이크로웰은 반드시 그러한 것은 아니다)에 배치될 수 있다. 예를 들어, 트랩 구조는 특이적인 물리적인 특성 (예컨대, 크기)을 가지는 입자 또는 세포를 보유하도록 디자인될 수 있거나, 비특이적일 수 있다 (효과기 세포 및 판독 입자의 무작위 분포). 밸브 (374)는 인접한 챔버를 분리시키는 데 사용될 수 있다.

[0305] 상기 기술된 디자인 (예컨대, 도 37) 연장선에서, 유동 채널 중의 구조 요소는 서로 매우 인접하게 효과기 세포 및 판독 입자를 보유하도록 디자인된다. 도 38을 참조하면, 한 실시양태에서, 한 단위는 효과기 세포 (382)를 포획하는 효과기 세포 트랩 (381), 및 하나 이상의 판독 입자 (384)를 보유하는 미세구조 (383)를 포함한다. 직경이 세포 트랩의 갭보다 더 작은 판독 입자는 세포 트랩을 통과하고, 효과기 세포 트랩 (331)의 하류에 위치하는 미세구조 (383)에 보유된다. 직경이 효과기 세포 트랩 (381)의 갭 (385)보다 더 작은 효과기 세포는 상기 논의된 바와 같이, 보유된다. 또 다른 실시양태에서, 미세구조는 상이한 유형의 판독 입자 (또는 효과기 세포)의 거리 및 위치가 잘 정의되도록 디자인된다.

[0306] 예컨대, 효과기 세포와 판독 입자 사이의 펜스와 같은 장벽 이외에도, 다공성 막 또한 장벽으로서 작용할 수 있으며, 따라서, 본 발명에 사용하기 위해 변형될 수 있다. 예를 들어, 도 39를 참조하면, 한 실시양태에서, 다공성 막 (391) (이는 또한 확사 채널로도 지칭된다)은 효과기 세포 (395)를 수용하는 효과기 세포 챔버 (392)와, 판독 입자 (394)를 수용하는 판독 입자 챔버 (393) 사이에 가로 배열로 놓이도록 가공된다. 한 실시양태에서, 상기 가로 배열의 다공성 막 (391)은 횡단면이 효과기 세포 또는 판독 입자의 직경보다 더 작은 시브 밸브 또는 유체 채널에 의해 치환된다. 시브 밸브는 앞서 미국 특허 출원 공개 번호 2008/0264863 (상기 출원은 그 전문이 모든 목적을 위해 참조로 포함된다)에서 기술된 바 있다.

[0307] 또 다른 실시양태에서, 다공성 막은 PDMS 층 사이에 세로 배열로 놓이도록 가공된다. 본 실시양태에서, 효과기 구역은 한 PDMS 층에 제공되고, 판독 구역은 제2 PDMS 층에 제공된다. 세로 배열의 이점은 효과기 구역 및 판독 구역 사이의 이격화가 잘 정의된다는 점이다.

[0308] PDMS 장치 내에 도입된 다공성 막은 예를 들어, 문헌 [Aran et al. (2010). Lab Chip 10, pp. 548-552]; [Cheuh et al. (2007). Anal. Chem. 79, pp. 3504-3508](상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에서 모든 목적을 위해 참조로 포함된다)에서와 같이, 앞서 보고된 바 있다. 한 실시양태에서, 다공성 막은 하기 실시양태 중 하나에 따라 가공된다. 또 다른 실시양태에서, PDMS 층은 비혼화성 유체를 PDMS의 비경화 성분에 첨가함으로써 다공성이 된다. 베이킹 단계 동안, 비혼화성 유체는 증발된다. 추가로, 또 다른 실시양태, 경화 후에 PDMS 막을 레이저 어블레이션 또는 또 다른 제거 기법을 사용하여 천공시킨다. 추가의 또 다른 실시양태, PDMS

막을 다공성 막으로 만들기 위해 높이가 막 두께를 초과하는 하나 이상의 미세구조 상에서 캐스팅한다.

[0309] 한 실시양태에서, 하나 이상의 효과기 세포 및/또는 판독 입자를 보유하는 구조는 일시적인 구조이고/거나, 제거가능한 것이다. 한 실시양태에서, 도 40에 도시되어 있는 바와 같이, 판독 입자 (401) (예컨대, 비드)는 시브 밸브 (402) (채널 횡단면 중 일부만을 차단하는 밸브)에 대해 적층된다. 이어서, 비-기능성 비드 (403) 층을 판독 입자 (401)에 대해 적층시켜 장벽을 만든다. 이어서, 효과기 세포 (404)의 층을 제공하고, 비-기능성 비드 (403) 층을에 대해 적층시킨다. 도 40으로부터 알 수 있는 바와 같이, 한 실시양태에서, 효과기 세포 (404)는 피드 채널 (405)을 통해 제공된다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 판독 입자 (401)에 대한 하나 이상의 효과기 세포 (404)의 효과를 측정하는 효과기 세포 검정법은 하부의 버스 채널 (406)을 사용하여 수행된다. 일시적인 구조의 이점은 하나의, 또는 다중의 시브 밸브를 개방함으로써 하부의 버스 채널을 통해 챔버 내용물이 회수가능하고, 일부 실시양태에서, 선택적으로 회수가능하다는 점이다.

[0310] 미세가공된 보유 방법 또는 장 이외에도, 효과기 세포 및/또는 판독 입자를 국재화시키기 위해 히드로겔, 예컨대, 아가로스를 사용을 위하여 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 판독 입자 및/또는 효과기 세포를 액체 아가로스, 예를 들어, 칩 상에 고형화되어 있는 감광성 아가로스에 적재할 수 있다. 이에 따라, 효과기 세포 또는 판독 입자의 이동은 제한되며, 확산 수송은 여전히 허용하면서, 영상화 과정은 간소화할 수 있다. 한 실시양태에서, 아가로스의 재용융시, 선택적 재용융시, 효과기 세포는 본원에서 논의된 미세유동 방법을 사용하여 회수된다. 또 다른 실시양태에서, 고정화된 세포는 미세조작기 또는 로봇식 방법을 사용하여 선택적으로 회수된다.

[0311] 한 실시양태에서, 챔버내의 특정 구역 또는 특정 챔버에 효과기 세포 및 판독 입자를 분리하는 것은 한 실시양태에서, 특정 유도 프로파일, 확률적 적재, 자기장, 전기장 또는 유전체 장, 중력장, 미세유동 챔버의 표면에 대한 변형, 및 효과기 세포 및 판독 입자의 특정의 상대 부력 선택에 의해 달성된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 세포 집단은 자기 입자로 표지화되거나, 또는 판독 입자는 자기성을 때고, 이로써, 자기장을 특정 챔버의 상부 표면에 제공하면, 세포 집단 또는 판독 입자는 위쪽으로 인력을 받아 유인되고, 세포가 자기 방식으로 표지화된 경우에는 판독 입자로부터 떨어지게 되거나, 판독 입자가 자기 방식으로 표지화된 경우에는, 세포 집단이 그렇게 된다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단 및 판독 입자가 인큐베이션되는 유체의 비중은 그의 상대 부력에 기초하는 효과기 세포 및 판독 입자의 분리를 촉진시킬 수 있도록 선택될 수 있다. 특정의 입자 및 세포 분리 방법은 하기에서 더욱 상세하게 논의된다.

[0312] 한 실시양태에서, 효과기 세포 및 판독 입자는 챔버의 하나 이상의 벽을 관능화시킴으로써 챔버 내에 분포된다. 한 실시양태에서, 표면 관능화는 하나 이상의 분자를 챔버 표면에의 그라프트, 공유 결합, 흡착 또는 다르게는 부착에 의해, 또는 챔버 표면의 변형에 의해 수행되며, 이로써, 세포 또는 입자의 챔버 표면에의 부착은 변경된다. 본원에서 사용하기 위한 관능화에 대한 비제한적인 일례로는 단백질의 비특이적인 흡착, 단백질의 화학적 커플링, 중합체의 비특이적인 흡착, 중합체의 정전기적 흡착, 소형 분자의 화학적 커플링, 핵산의 화학적 커플링, 표면 산화 등이 있다. PDMS 표면 관능화는 앞서 기술된 바 있으며, 이러하 방법들은 본원에서 제공하는 장치의 표면을 관능화시키기 위해서 본원에서 사용될 수 있다 (문헌 [예컨대, Zhou et al. (2010). *Electrophoresis* 31, pp. 2-16] (상기 문헌은 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 한 실시양태에서, 본원에 기술된 표면 관능화는 한 유형의 효과기 세포 (예컨대, 세포 집단 중에 존재하는 효과기 세포)에 선택적으로 결합하거나, 또는 한 유형의 판독 입자에 선택적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 표면 관능화는 챔버에 존재하는 모드 판독 입자를 격리시키는 데 사용된다.

[0313] 추가로 또 다른 실시양태에서, 표면 관능화 또는 복수 개의 상이한 표면 관능화는 장치의 챔버 내에서 공간적으로 정의된다. 별법으로, 표면 관능화 또는 복수 개의 표면 관능화는 전체 챔버를 커버한다. 상기 두 실시양태 모두 효과기 세포 또는 판독 입자를 미세유동 챔버 내의 상이한 위치에 분포시키는 데 유용하다. 예를 들어, 전체 챔버가 도입된 모든 유형의 판독 입자에 결합하는 분자로 관능화된 실시양태에서, 입자는 상기 기술된 방법을 사용하여 장치의 상이한 구역으로 유도되고, 여기서, 입자는 표면 상에 고정화된다. 또 다른 실시양태에서, 전체 챔버는 오직 단 하나의 특이 유형의 판독 입자에만 결합하도록 관능화될 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 경우, 모드 입자는 먼저 본원에 기술된 방법 중 하나를 사용하여 한 구역으로 유도되고, 이로써, 입자의 서브세트가 관능화된 구역의 챔버 표면에 부착된 후, 상이한 구역 쪽으로 힘을 가하여 관능화된 표면 또는 포면들에 결합하지 않은 입자만을 대체한다. 추가의 또 다른 실시양태, 장치의 구역 (예컨대, 상이한 챔버 또는 단일 챔버 내의 구역)을 효과기 세포 및/또는 판독 입자의 상이한 서브세트에 선택적으로 결합하는 상이하 분자로 관능화하여, 효과기 세포 및/또는 판독 입자가 실질적으로 전체 챔버 표면가 상호작용할 수 있도록 유도함으로써 상이하 구역에서 상이한 입자 또는 세포 유형을 분할한다. 본원에 기술된 바와 같이, 표면 관능화는 단독으

로, 또는 효과기 세포 및 판독 입자 조작을 위해 본원에 기술된 다른 방법과 함께 조합하여 사용될 수 있는 것으로 한다. 다중 유체 기하학적 구조와 함께 입자 및 세포 격리 방법의 다중의 조합도 가능하다.

[0314] 또 다른 실시양태에서, 효과기 세포 및/또는 판독 입자는 자기장을 사용함으로써 챔버 내에 배치된다. 효과기 세포(들) 및/또는 판독 세포(들)를 자기 방식으로 조작하고, 배치하기 위해, 효과기 세포(들) 및/또는 판독 세포(들)를 먼저 그에 결합하는 자기 입자로 관능화시키거나, 또는 그에 노출시킨다. 한 실시양태에서, 외부에서, 즉, 영구 자석, 전자석, 솔레노이드 코일, 또는 다른 수단을 사용하여 미세유동 장치 외부에서 자석을 사용함으로써 자기장을 발생시킨다. 또 다른 실시양태에서, 도 41을 참조하면, 장치로 통합되어 있거나, 또는 그로부터 분리되어 있는 자석 구조 (90)의해 자기장을 국소적으로 발생시킨다. 한 실시양태에서, 자기장을 상이한 시점에 적용시키고, 한 실시양태에서, 자기장을 입자 적재시에 함께 적용시켜 자기장에 반응하는 효과기 세포 및/또는 판독 입자의 위치에 영향을 준다.

[0315] 생물학적 샘플의 분리 및/또는 정제에 사용되는 상업적으로 이용가능한 비드 또는 나노입자가 본원에서 제공하는 장치 및 방법에서 사용될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 예를 들어, "다이너비드(Dynabead)" (라이프 테크놀러지즈)s는 초상자성이고, 단일 크기이며, 구형인 중합체 입자이고, 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 장치 및 방법에서 판독 입자로서 사용된다. 상이한 표적 에피토프 또는 세포 유형에 특이적으로 결합하는 분자와 접합된 자기 입자는 당업계에 주지되어 있고, 이는 또한 본원에서 제공하는 장치 및 방법에서 사용하기 위해 변형될 수 있다. 비균일한 특성을 가진 자기장이 존재할 때, 상기 자기 입자는 자기장의 구배를 따라 유도되는 힘을 받게 된다. 한 실시양태에서, 이러한 구배력은 챔버 내에 입자를 배치시키는 데 적용된다.

[0316] 도 42에 도시된 실시양태를 참조하면, 구배력은 챔버 내에서 한 서브타입, 즉, 입자 (100)을 우선적으로 유도하기 위해 입자의 서브세트에 힘을 특이적으로 가하기 위해 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 한 실시양태에서, 이러한 구배력은, 입자를 입구 채널의 주어진 위치에 배치시켜 입자가 챔버의 특정 구역에 적재될 수 있도록 하기 위해서 입자가 챔버 내로 유입되기 이전에 적용된다. 또 다른 실시양태에서, 구배력은 입자를 챔버 내로 적재하기 이전, 그 동안, 또는 그 이후에 적용된다.

[0317] 유동력 이외에도, 유동 중의 세포 또는 입자 (예컨대, 효과기 입자 또는 판독 입자)는 외부장의 작용으로부터 유도되는 "최적력(body forces)"을 받게 될 수 있다. 중력장 내에서 본원에서 제공하는 미세유동 장치의 배향을 사용하여 효과기 세포 및 판독 입자를 장치 챔버의 특정 구역으로 유도할 수 있다. 도 43에 도시된 바와 같이, 그러한 방법은 전체 미세유동 장치 및 샘플 홀더를 펜스 축을 따라 물리적으로 기울이고, 각 입자가 중력에 의해 펜스의 어느 쪽으로든 가라앉도록 하는 데 충분한 기간 동안 기다리는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 경사각은 약 30 내지 약 50°, 예를 들어, 약 30° 내지 약 45°이다. 그러나, 상기 각도는 적재되는 세포 또는 입자, 유속, 용액의 점도에 따라 조정될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 상이한 배향으로 장치를 티핑하는 것을 사용함으로써 티핑 시간 및 입자 도입 시간에 따라 입자의 다중 세트를 다중의 상이한 구역으로 유도할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0318] 챔버 내의 입자를 유도하기 위해 중력을 사용하는 것이 다중 단계에서 달성될 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 일례로, 도 44를 참조하면, 장치를 실질적으로 거꾸로 뒤집고, 장치를 티핑함으로써 입자 (51)를 챔버 루프의 한쪽으로 유도한다. 이어서, 장치를 다시 회전시켜 빠르게 정립시켜 장치을 정립시키는 과정 동안 멀리 이동하지 못하게 한다. 이어서, 입자는 챔버 바닥으로 가라앉게 되지만, 펜스 (50)가 존재함에 따라 챔버의 우측에 그대로 남아 있게 된다. 이러한 방식으로, 챔버의 루프 상의 피처를 사용하여 입자 유형을 분리한 후, 챔버 내의 입자의 측면 배치는 실질적으로 바꾸지 않으면서, 입자를 각 챔버의 바닥으로 전달할 수 있다. 상기 기술된 바와 같이 입자를 국재화시키기 위해 장치를 플립핑하는 시간은 부분적으로 입자가 액체를 통해 떨어지는 속도, 및 정확한 배치를 위해 허용될 수 있는 최대 치환에 의존한다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 입자가 액체를 통해 떨어지는 속도는 중력장 방향이고, 이는 당업자에게 공지되어 있는 하기 수학식에 따라 계산될 수 있다:

[0319] $U = V_{입자} * (\rho_{입자} - \rho_{액체}) * g * \gamma^{-1}$.

[0320] (여기서, $V_{입자}$는 입자의 부피를 정의하고, g는 중력 가속도이고, γ는 입자의 항력 계수이다). 구형 입자의 경우, γ은 하기 스톡스 항력 수학식에 의해 충분히 근사값을 구할 수 있다:

[0321] $\gamma_{구형} = 6\pi\eta\gamma$.

[0322] 챔버 내에 입자를 배치시키는 데 중력이 사용되는 본 발명의 일부 실시양태에서, 입자의 유효 크기 및/또는 밀

도는 입자 표면 상에 결합하는 더 작은 입자를 사용함으로써 조작된다. 예를 들어, 효과기 세포를, 효과기 세포에 결합하도록 관능화된 강자성 마이크로비드에 노출시킴으로써 효과기 세포가 훨씬 더 높은 유효 밀도를 가지도록 하고, 약간 더 큰 항력 계수를 가지게 함으로써 그의 전체 효과는 세포가 중력장을 통해 더 빠른 속도로 하강하도록 하는 것이다.

[0323] 본 발명의 범주 내에서, 및 입자를 배치시키기 위해 중력을 사용하는 것과 관련하여, 유체 유동을 유도하기 위해 및 효과기 세포 및 판독 입자를 배치하기 위해 유체 내에 입자의 부력을 사용할 수 있다. 도 45를 참조하면, 예를 들어, 한 실시양태에서, 효과기 세포 (74) 및 판독 입자 (73)는 상이한 밀도를 가지며, 이로써, 효과기 세포 (74)의 밀도는 챔버 (77) 중 액체 밀도보다 크고, 판독 입자의 밀도는 액체의 밀도보다 작으며, 장치는 중력장 내에 배치되고, 이로써, 중력장은 챔버 중에서 루프 (75)로부터 바닥 (76)으로 하향으로 유도되고, 효과기 세포 및 판독 입자는 각각 장치의 바닥 및 루프로 분할됨에 따라 챔버 (77)의 효과기 구역 및 판독 구역으로 정의된다. 한 실시양태에서, 상기 효과는 밀도를 바꾸는 성분을 액체에 첨가함으로써, 및/또는 입자를 변형시킴으로써, 또는 판독 입자 (73) 및 효과기 세포 (74)를 선택함으로써 조절되고, 이로써, 이들은 적절한 밀도차를 가지게 된다. 챔버 내의 배지를 교환함으로써 입자를 분할하는 것이 가역적으로 조절될 수 있다는 것에 주의하여야 한다. 그러한 교환은 본 발명의 범주 내에 포함된다.

[0324] 한 실시양태에서, 효과기 세포 및/또는 판독 입자는 입자에 힘을 부여하는 정전기장 및/또는 유전체 장을 사용함으로써 챔버의 상이한 구역으로 분할된다. 한 실시양태에서, 상기 장은 장치의 외부에서 발생된다. 또 다른 실시양태에서, 정전기장 및/또는 유전체 장은 미세유동 장치 내의 하나 이상의 미세가공된 전극을 사용함으로써 국소적으로 발생된다. 상기 전극은 그 위에 장치가 탑재되는 기판 상의 금속 필름에서 정의될 수 있거나, 장치의 별도의 층으로 통합되거나, 또는 전도성 액체로 미세유동 채널을 충전시킴으로써 정의될 수 있다. 전극의 미세유동 장치 내의 통합에 대한 예는 다수 존재하며, 다양한 기하학적 구조 및 통합 방법은 당업자에게는 자명할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Li *et al*. (2006). *Nano Letters* 6, pp. 815-819] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 개시된 전극은 본 발명과 함께 사용될 수 있도록 변형될 수 있다.

[0325] 한 실시양태에서, 유전체 장은 본원에 기술된 장치 중 하나에 적용되고, 유전체 장은 차별적인 특성을 가지는 입자에 대하여 차별력을 생성하여 차별적인 특성에 의해 입자가 분리될 수 있도록 하는 주파로 디자인된다. 일체형 전극에 의해 발생되는 유전체 장을 사용하여 챔버 내에 효과기 세포 및 판독 입자를 배치시키는 유전체 장 사용에 관한 일례는 도 46에 제시되어 있다. 본 실시양태에서, 효과기 세포 (110)를 장치 상부에 위치하는 입구 채널 (112)을 통해 하부에 펜스 구조 (111)을 가지는 챔버 내로 적재한다. 효과기 세포 (110) 적재시, 전극 (113)을 사용하여 효과기 세포 (110)에 대해 힘을 생성하는 구배로 유전체 장을 발생시킨다. 챔버 한쪽으로 유도하는 상기 힘은 효과기 세포 (110)가 챔버의 효과기 구역 내로 (중력 영향하에) 선택적으로 하강하게 한다. 이어서, 판독 입자, 챔버의 다른 쪽 (판독 구역) 상에 전극을 이용하여 상기 과정을 반복함으로써 판독 입자를 판독 구역 내로 적재할 수 있다. 상기와 같이 유전체 조작은 효과기 세포 및 판독 입자를 분할하고자 하는 목적으로 하는 다양한 공정 또는 입체 형태에서 사용될 수 있는 힘을 제공한다.

[0326] 추가의 또 다른 실시양태, 음파, 예컨대, 음파 정상파는 효과기 세포 및/또는 판독 입자를 포획하고/거나, 배치하고/거나, 보유하는 데 사용된다.

[0327] 추가의 또 다른 실시양태, 효과기 세포 및/또는 판독 입자는 챔버 기하학적 형태 및 적재 밀도의 적절한 디자인에 의해 고효율로 미세유동 챔버의 효과기 구역 및 판독 구역에 확률론적으로 적재되어 있다. 예를 들어, 도 33에는 부피가 대략 2 나노리터인 챔버 하부에 가공된 45개의 마이크로웰로 이루어진 어레이를 가지는 미세유동 챔버가 제시되어 있다. 한 실시양태에서, 효과기 세포 및 판독 입자를 미세유동 챔버의 마이크로웰에 적재하는 것은 상기 기술된 바와 같이 중력을 사용하여 달성된다. 효과기 세포 및 판독 입자의 개수가 충분히 낮게 유지된다면, 두 효과기 세포 및/또는 판독 입자가 미세유동 챔버 내에 같은 마이크로웰에 배치될 확률은 낮다.

[0328] 챔버당 효과기 세포 및 판독 입자의 개수는 판독 입자 및 효과기 세포, 둘 모두를 포함하지 않는 챔버를 가지게 될 확률이 극히 낮도록 선택될 수 있다. 일례로서, 한 실시양태에서, 효과기 세포 및 판독 입자의 농도는 평균적으로 챔버 1개당 각 유형을 3개씩 포함하는 정도로 선택된다. 마이크로웰 내의 입자가 무작위로 분포한다고 가정할 때, 챔버의 주어진 마이크로웰 중 어느 한 유형의 입자를 k개 가질 수 있는 확률은 푸아송 통계(Poisson statistics)에 의해 제공된다:

[0329] P(마이크로웰중 1 초과를 가질 확률) = $\lambda^{k}e-/k!$

[0330] 여기서, λ = 미세유동 챔버의 마이크로웰당 입자의 평균 개수이며, 본 일례에서는 (3 + 3)/45 = 0.133. 따라

서, 본 일례에서 마이크로웰 중 입자를 0 또는 1개 가질 경우의 확률은:

[0331] $P(k=0) = e^{-0.133} = 87.5\%$, 및 P(k=1) = 11.7%이다.

[0332] 따라서, 본 일례에서, 입자를 1개 초과로 가질 확률은 P(k>1)=100%-87.5%-1 1.7% = 0.83%인 것으로 해석된다. 이어서, 주어진 챔버 내에 1개 초과의 입자를 함유하는 마이크로웰이 없을 확률은 하기 이상식 통계에 따라 계산될 수 있다:

[0333] $P(\text{1개 초과의 입자를 가지는 웰이 없을 확률}) = (1-0.0083)^{45} = 69\%$.

[0334] 따라서, 본 일례에서, 챔버 중 대략 70%는 1개 초과의 입자를 가지는 웰은 없을 것이다. 일부 마이크로웰은 1 이상의 마이크로웰 중 1 초과의 입자를 가지는 챔버에서 유용한 측정은 다른 챔버를 사용하는 경우에도 여전히 가능하게 되는 바, 본 분석법은 유용하 챔버의 분율에 대한 하한을 나타낸다는 것을 이해할 것이다.

[0335] 마이크로웰이 1개 초과의 입자는 수용하지 못하는 크기를 가지도록 디자인될 수 있다는 것도 추가로 고려된다. 이러한 경우, 적재 후 장치의 티핑을 사용하여 모든 입자가 장치의 마이크로웰 내에 포함될 수 있도록 할 수 있고, 어떤 마이크로웰도 1개 초과의 입자는 가지지 않도록 할 수 있다. 상이한 효과기 또는 판독 입자를 포함하는 상이한 유형의 입자는 검정법의 디자인에 따라 순차적인 양식으로 또는 함께 적재될 수 있다는 것 또한 이해하여야 한다. 마지막으로, 마이크로웰을 사용함과 동시에, 상기 기하학적 형태는 마이크로웰의 어레이는 다른 챔버로부터 분리되는 능력을 가질 수 있는 작은 챔버 내에 포함되어 있기 때문에, 챔버 분리의 이점을 유지한다는 것도 이해하여야 한다.

[0336] 상기 언급한 바와 같이, 한 실시양태에서, 상기 기술된 방법 중 하나 이상의 것을 조합하여 사용함으로써 미세유동 챔버 중의 효과기 구역 및 판독 구역에 각각 임의적으로 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단으로부터 판독 입자 진단을 분리시킬 수 있다. 추가로, 한 실시양태에서, 상기 기술된 방법 중 하나 이상의 것을 사용함으로써 예를 들어, 미세유동 챔버의 특정 구역 중에서 세포 서브집단을 원 세포 집단으로부터 분리할 수 있거나, 또는 판독 입자의 서브집단을 판독 구역의 집단으로부터 분리할 수 있다.

[0337] 한 실시양태에서, 효과기 세포 및 판독 입자를 공통 입구를 사용하여 챔버로 전달하고, 챔버 내로의 유입시에 분리할 수 있다. 별법으로, 효과기 세포 및 판독 입자를 효과기 구역 및 판독 구역에 대해 특이적인 별도의 입구를 통해 챔버로 도입한다. 도 47을 참조하면, 본 발명의 실시양태에 따른 챔버 (298)가 제시되어 있다. 효과기 세포 (290)를 효과기 세포 입구 (292)를 통해 효과기 구역 (291) 내로 도입시키고, 판독 입자 (293)은 판독 입자 입구(295)를 통해 챔버의 판독 구역 (294) 내로 도입시킨다. 예시된 실시양태에서, 효과기 구역 (291) 및 판독 구역 (294)은 각각의 출구 (296) 및 (297)를 갖지만, 본 발명은 그러한 것으로 한정되지 않는다. 구체적으로 , 또 다른 실시양태에서, 효과기 구역 (291) 및 판독 구역 (294)은 공통 출구를 가진다.

[0338] 또 다른 실시양태에서, 복합 챔버 (즉, 복수 개의 서브챔버를 포함하는 챔버)를 사용하여 효과기 구역 및 판독 구역을 제공한다. 복합 챔버 (300)의 한 실시양태는 도 48에 제시되어 있다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단 (301)은 세포 입구 (304)를 통해 복합 챔버 (300)의 효과기 세포 서브챔버 (303)에 의해 정의되는 효과기 구역 (302)으로 전달된다. 유사하게, 판독 입자 (305)는 판독 입자 입구 (308)를 통해 복합 챔버 (300)의 판독 입자 서브챔버 (307)에 의해 정의되는 판독 구역 (306)으로 전달된다. 예시된 실시양태에서 (도 48), 효과기 세포 서브챔버 (303) 및 판독 입자 서브챔버 (307)는 각각의 출구 (309) 및 (310)을 가진다. 효과기 세포 서브챔버 (303) 및 판독 입자 서브챔버 (307)는 입구 (311)를 통해 유체 소통한다. 한 실시양태에서, 밸브 (312)는 입구가 가역적으로 실링될 수 있도록 입구 (311)에 제공된다.

[0339] 한 실시양태에서, 부착을 사용하여 일부 실시양태에서는 효과기 세포가 파독 입자롭터 분리되도록 한다. 예를 들어, 당업자는 도 49에 제시된 실시양태로 인도된다. 도 49에서, 챔버 (480)는 코팅 용액으로 관능화됨으로써 고정-의존성 판독 세포의 부착이 이루어질 수 있다. 이어서, 챔버를 뒤집어 상부 표며 (482)에 부착될 때까지 고정-의존성 판독 세포 (481)를 적재한다. 이어서, 챔버 (480)를 다시 뒤집어 세포 (483) 현탁액을 적재시켜 중력에 의해 챔버 (480)의 하부 표면 (484)으로 가라 앉도록 하여 세포 집단 및 고정-의존성 판독 세포 (481)가 별도의 효과기 구역 및 판독 구역으로 효과적으로 분리되도록 한다. 한 실시양태에서, 세포 집단은 하나 이상의 효과기 세포를 포함한다.

[0340] 도 50에 도시되어 있는 실시양태에서, 층류를 가진 T 연접부 (533)에 코팅 용액 및 제2 용액 (532), 예컨대, 포스페이트 완충 처리된 염수를 유동시킴으로써 세포 부착을 촉진시키는 코팅 용액 (530)을 챔버 절반부 (531) 내로 도입시킨다. 이어서, 부착성 판독 세포 (534)를 챔버 (531)에 도입하고, 중력 (화살표 표시)에 의해 부착성

코팅 (535)이 있는 쪽으로 유도한다. 부착 기간 후, 비부착 판독 세포 (534)를 챔버 (531)로부터 세척한다. 이어서, 세포 집단 (536)을 챔버 (531)에 적재한다. 세포 집단 (536)은 중력에 의해 챔버 (531)의 반대쪽 (537)에 유지되는 반면, 부착성 판독 세포 (534)는 부착성 코팅 (535)이 있는 쪽에 계속 남아 있게 된다. 한 실시양태에서, 세포 집단은 하나 이상의 효과기 세포를 포함한다.

[0341] 도 51에 도시된 실시양태를 참조하면, 두 용액, 예컨대, 표적 A에 대한 항체 (항-A 항체)를 포함하는 용액 A (540) 및 표적 B에 대한 항체 (항-B 항체)를 포함하는 용액 B (541)을 T 연접부 (543)의 다른 쪽으로부터 챔버 (542)로 적재하고, 관능화된 챔버 (542) 표면을 코팅시킨다 (예컨대, 단백질-A 코팅된 PDMS). 층류를 사용하여, 챔버 (542)의 제1 절반부 (544)는 항-A 항체로 코팅되고, 제2 절반부 (545)는 항-B 항체로 코팅된다. 그의 표면 상에 항원 A를 보이는 제1 입자 (546), 및 그의 표면 상에 항원 B를 보이는 제2 입자 (547)인 상이한 두 유형의 입자를 챔버 (542) 내로 도입한다. 챔버 (542)를 먼저 한쪽으로 기울인 후, 다른 한쪽으로 기울여 일단 입자가 항원을 보이는 항체로 코팅된 섹션에 도달하고 나면, 챔버의 적절한 쪽에 그대로 유지될 수 있도록 함으로써 상기 두 유형의 입자를 분리할 수 있다.

[0342] 한 실시양태에서, 일단 세포 집단 및 판독 입자 또는 판독 입자 집단, 및 임의적으로, 세포 집단에 대한 검정법을 수행하기 위한 추가의 시약(들)을 챔버에 적재하고 나면, 챔버를 미세유동 장치의 하나 이상의 남은 챔버로부터 유체식으로 분리시킨다. 한 실시양태에서, 챔버 분리는 그를 물리적으로 실링함으로써, 예컨대, 하나 이상의 밸브를 사용하여 챔버를 그의 주변 환경으로부터 유체식으로 분리시킴으로써 달성된다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 본원에 기술된 바, 밸브는 "제어 채널"에 의해 제어되고, 제어 채널에 충분한 압력을 가함으로써 특정 밸브를 작동시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 주어진 챔버, 또는 복합 챔버 중 한 서브챔버 (즉, 복수 개의 서브챔버 또는 웰을 포함하는 챔버)의 서브섹션 (예컨대, 효과기 구역 및 판독 구역)은 서브섹션 또는 서브챔버를 물리적으로 실링하여 예컨대, 하나 이상의 밸브를 사용함으로써 서브섹션 및/또는 서브챔버를 유체식으로 분리함으로써 서로 분리된다.

[0343] 또 다른 실시양태에서, 챔버를 그의 주변 환경으로부터 분리하는 것은 챔버를 물리적으로 실링하지 않도록 달성된다. 오히려, 미세유동 장치의 한 챔버와 또 다른 챔버 사이의 유의적인 오염을 막기 위해 챔버 사이의 유체 소통을 제하함으로써 달성된다. 예를 들어, 하나 이상의 밸브를 사용하는 대신, 비혼화성 유체 상, 예컨대, 오일을 사용하여 챔버 입구 및/또는 출구를 차단함으로써 인접한 챔버를 분리시킨다. 별법으로, 특정 챔버 내의 분비된 생성물의 효과 분석을 유의적으로 방해하지 않을 정도로 충분히 느리게 챔버 안으로 및 밖으로의 분자의 확산이 이루어질 수 있도록 하는 입구 및 출구가 있는 챔버를 디자인한다.

[0344] 전역에 걸쳐 다양한 챔버 배열이 기술된다.

[0345] 도 52는 본 발명의 실시양태를 이용한 챔버 구조를 보여주는 것이다. 구조는 밸브 (312) ("제어 채널" 층)에 의해 그의 이웃과 분리되어 있는 각 챔버와 한 종대로 배열되어 있는 ("유동층"에 가공된) 챔버 (311)를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 밸브는 도 53에 도시되어 있는 바와 같이, 각 챔버 ("리드 챔버") 위에 위치하며, 그 결과, 칩 상에서 칼럼 구조보다 더 높은 밀도의 피쳐를 얻을 수 있다. 도 53의 좌측에 도시되어 있는 실시양태에서, 챔버 (321)의 폭은 라운드형 피드 채널 (323) (예컨대, 효과기 세포 및/또는 판독 입자를 전달하는 것)의 폭보다 좁고, 이러한 경우, 밸브 (322)는 챔버 둘레를 실링한다. 본원에서 상세하게 논의되는 바와 같이, 라운드형 채널은 특정 유형의 포토레지스트, 예컨대, 메가포지트 SPR220 시리즈(Megaposit SPR220 Series) (마이크로켐(Microchem)) 및 AZ 40 XT (마이크로케미칼즈(MicroChemicals)) 상에 PDMS를 몰딩함으로써 가공된다. 도 53의 우측에 도시되어 있는 실시양태에서, 챔버 (321) 폭은 피드 채널의 폭을 초과한다. 본 실시양태에서, 챔버는 각 챔버의 입구 및 출구를 동시에 폐쇄시키는 단일 밸브 (322)에 의해 분리된다.

[0346] 중요하게는, 본 발명의 미세유동 장치는 챔버가, 한 챔버의 출구가 인접한 하류 챔버의 입구에 연결되어 있는 종대로 배열되어 있는 것인 "유통식" 모드로 지정되어 있는 일련으로 배열된 챔버로 한정되지 않는다. 오히려, 다수의 상이한 챔버 배열 및 충전 모드가 본원에서 제공되며, 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 챔버는 다중 챔버가 같은 피트 채널을 통해 동시에 지정되도록 동시에 배열된다. 추가의 실시양태에서, 병렬 챔버 어레이는 "내장" 충전 모드 (즉, 챔버는 출구를 포함하지 않는다)로 사용된다.

[0347] 도 54 및 55는 본 발명의 다양한 병렬 챔버 배열 실시양태를 보여주는 것이다. 본 실시양태에서, 챔버 (331) (도 54) 및 챔버 (331) (도 55)의 각 칼럼은 공통 입구 채널 (332) 및 출구 버스 채널 (333)을 공유한다. 이러한 구조에서, 챔버 사이의 상호 오염은 밸브 (334)를 사용하여 막을 수 있다. 도 55는 챔버의 효과기 구역 (335)이 같은 챔버 (331)의 판독 구역 (336)으로부터 유체식으로 분리될 수 있는 실시양태를 보여주는 것이다. 구체적으로 도 55에 도시되어 있는 바와 같이, 한 실시양태에서, 챔버 (331)는 효과기 구역 (335)이 밀봉가능한

채널 (337) (예컨대, 밸브 (337)로 밀봉가능한 것)에 의해 판독 구역 (336)으로부터 분리되어 있는 복합 챔버를 포함한다. 한 실시양태에서, 개별 챔버 사이의 오염은 각 챔버로부터 분비되는 생성물이 장치의 추가 하류에 위치하는 챔버를 통해 수송되지 않는 바, 감소된다. 중요하게는, 피드 채널 중의 시약은 대체될 수 있는 반면, 챔버는 분리된 상태 그대로 유지되고, 일련으로 배열된 챔버에서 발생할 수 있는 구배 효과의 위험은 제거된다.

[0348] 일부 실시양태에서, 예를 들어, 도 56에 도시되어 있는 바와 같이, 밸브에 의해 제어될 수 있는, 챔버와 채널 사이의 단일 연결부는 챔버 내로의 또는 챔버 밖으로의 유동 방향에 의존하여 입구 및 출구, 둘 모두로 작용할 수 있다. 도 56을 참조하면, 챔버 (341)는 밸브 (344)의 제어하에 있는 단일 연결 채널 (343)을 통해 피드 채널 (342)에 연결되어 있다. 이러한 경우, 챔버 벽은 탄성을 띠며, 기체 투과성인 물질로부터 제조된다. 이를 통해 챔버는 챔버 (341) 내의 대기를 PDMS 물질로 가압함으로써 연결 채널 (343)을 통해 "내장" 충전될 수 있다. 상기 구조의 하향도는 도 56의 좌측 하부에 제시되어 있으며, 여기서, 챔버 (341)는 단일 연결 채널 (343)을 통해 피드 채널 (342)에 연결되어 있다. 밸브 (344)는 작동하여 챔버 (341)를 피드 채널 (342)로부터 유체식으로 분리시킬 수 있다. 도 56의 좌측 상부 도면은 같은 구조의 횡단면을 보여주는 것이다.

[0349] 일단 챔버 (341)가 충전되고 나면, 유동은 챔버에 가해지는 압력을 조절하여 챔버 (341)의 부피를 팽창시키거나, 또는 수축시킴으로써 챔버 (341)의 내부로 (도 56, 우측 상부) 또는 외부로 (도 56, 우측 하부) 계속해서 진행될 수 있다. 챔버 부피를 조절하고, 변화시킬 수 있는 능력은 챔버 (341) 내의 입자 (345) (예컨대, 세포)를 검정하는 데 있어 도움이 된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 입자 (345)는 챔버 (341)보다 높은 압력을 피드 채널 (342)에 가함으로써 피드 채널 (342) 내로 이동시킨 후, 밸브 (344)를 개방하여 챔버 (341)로 유도하여 유동이 챔버 (341)로 유입될 수 있도록 함으로써 챔버 (341) 내로 도입된다. 또 다른 실시양태에서, 먼저 밸브 (344)를 개방한 후, 피드 채널 (342)의 압력을 증가시킨다. 일단 챔버 (341) 내부에 존재하게 되면, 입자 (345), 예컨대, 효과기 세포 또는 판독 입자는 중력 효과하에서 챔버 하부로 떨어지게 될 것이다.

[0350] 추가의 실시양태에서, 이어서, 피드 채널 (342)의 압력은 하락하게 되고, 챔버 (341)는 그의 원래의 부피로 돌아가게 되고, 유동은 챔버 밖으로 유도된다. 입자 (345) (예컨대, 효과기 세포 및/또는 판독 입자)가 챔버 (341) 하부에 존재하기 때문에, 이는 실질적으로 유동으로부터 제거되고, 압력 하락시 챔버에 남게 된다. 피드 채널 (342) 압력 조절은 또한 효과기 세포 또는 판독 세포 상과 없이, 세포의 생존능 및 성장을 유지시키기 위해 챔버 (341)에 새 배지를 주기적으로 첨가하는 데 사용될 수 있다. 본 실시양태, 챔버 (341)는 새 배지로 팽창되고, 이는 이미 챔버에 존재하는 배지와 확산에 의해서 혼합된다. 일단 혼합되고 나면, 챔버 (341) 내부의 유체 중 일부는 제거되고, 원하는 경우, 사용자에 의해 상기 과정은 반복된다. 중요하게는, (예컨대, 밸브 (344)의 작동에 의한) 후속되는 배지 첨가 단계 사이에 피드 채널에 대해 폐쇄되어 있는 챔버 (341)로 피드 채널 (342)을 플러싱함으로써 어레이 내의 챔버의 내용물은 챔버 어레이 중의 다른 챔버를 오염시키지 않는다.

[0351] 한 실시양태에서, 이러한 동일의 피드 채널 압력 조절 접근 방법을 이용함으로써 챔버 내의 하나 이상의 판독 입자에 대한 하나 이상의 효과기 세포의 효과를 관찰하고, 측정하는 데 요구되거나, 또는 그에 충분한 시약을 챔버에 첨가할 수 있다. 예를 들어, 그리고, 하기에 상세하게 기술되는 바와 같이, 한 실시양태에서, 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단은 사이토카인을 중화시키는 하나 이상의 효과기 세포의 능력에 대해 검정된다. 이러한 경우, 챔버에 먼저 항체를 분비하는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 세포 집단과 같은 세포 집단을 적재할 수 있다. 항체는 챔버 내에서 사이토카인을 중화시킬 수 있는 그의 능력에 대하여 시험된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 사이토카인 중화 효과는 판독 입자를 챔버에 제공함으로써 측정되며, 여기서, 판독 입자는 사이토카인에 대해 반응성인 세포를 포함하며, 예를 들어, 형광성 단백질의 발현에 의해 측정된다. 한 실시양태에서, 개별 챔버를 먼저 분리시키고, 인큐베이션시켜 충분량의 항체가 축적될 수 있도록 한다. 이어서, 챔버를 팽창시켜 사이토카인을 함유하는 일정 부피의 배지를 챔버에 첨가하여 챔버에 항체를 유지시키면서, 챔버 사이에 상호 오염이 일어나지 않도록 한다. 추가의 실시양태에서, 이어서, 필요에 따라 추가로 부피를 교환하면서, 챔버를 인큐베이션시켜 챔버가 사이토카인을 중화시킬 수 있는 항체를 분비하는 효과기 세포를 함유하는지 여부를 측정한다.

[0352] 상기 전략법은 또한 챔버 부피를 조절하는 기전을 사용하지 않고도 달성될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 챔버는 시약으로 독립적으로 플러싱되고, 장치 상의 다른 챔버로부터 분리될 수 있는 2개의 별도의 구획 (예컨대, 별도의 챔버 또는 개별 챔버 내의 서브챔버 또는 웰)을 가지는 것으로 구축된다. 한 실시양태에서, 배지를 새 배지, 또는 특정 검정법을 위해 필요한 다른 성분/시약을 함유하는 배지로 교환하는 것은 챔버의 한 구획, 예컨대, "시약 구획"을 다른 구획 (여기서, "다른 구획"은 효과기 세포 및 판독 입자를 함유한다)으로부터 분리시키고, 시약 구획을 플러싱한 후, 구획을 재연결하여 확산에 의해, 또는 또 다르 수단에 의해, 예컨대,

두 구획 사이의 펌핑에 의해 혼합될 수 있도록 함으로써 수행된다.

[0353] 본원에서 논의된 바와 같이, 한 실시양태에서, 챔버의 효과기 구역 및 판독 구역은 하나 이상의 밸브를 통해 서로 유체식으로 분리된다. 이러한 구조는 추가로 내장 충전되고, 서로 소통하는 챔버로 확장될 수 있다. 도 57에 도시된 바와 같이, 분리 효과기 구역 (351) 및 판독 구역 (352)은 예컨대, 밸브(353)에 의해 개별적으로 주소를 지정할 수 있다는 이점을 제공하고: 각 구역의 시약은 독립적으로 교환될 수 있고/거나, 검정법은 효과기 세포 및 판독 입자, 둘 모두에서 순차적으로 수행될 수 있다. 도 57에는 채널의 최단부가 도시되어 있지 않다는 점에 주의한다.

[0354] 한 측면에서, 전역에 걸쳐 제공하는 바와 같이, 본 발명은 세포외 효과가 있는 효과기 세포를 포함하는 세포 집단을 확인하는 방법에 관한 것이고, 또 다른 측면에서, 세포외 효과의 변화를 보이는 세포 집단을 확인하는 방법을 제공한다. 일단 세포 집단이 세포외 효과, 또는 세포외 효과 변화를 보이는 것으로 측정되고 나면, 세포 집단, 또는 그의 일부를 회수하여 회수된 세포 집단을 수득한다. 한 실시양태에서, 회수는 세포외 효과를 보이는 하나 이상의 세포를 포함하는 세포 집단을 포함하는 미세유동 챔버를 미세모세관으로 천공시키고, 챔버의 내용물 또는 그의 일부를 흡인하여 회수하여 흡인된 세포 집단을 수득하는 것을 포함한다.

[0355] 한 실시양태에서, 일단 회수하고 나면, 회수된 세포 집단(들)을 추가로 분석하여 예를 들어, 세포외 효과의 변화를 담당하는 단일 효과기 세포 또는 효과기 세포의 서브집단을 회수된 세포 집단으로부터 확인한다. 회수된 세포 집단(들)을 서브집단으로서 한계 희석으로 제2 세포외 효과에 대해 분석할 수 있으며, 여기서, 제2 세포외 효과는 제1 세포외 효과와 동일하거나 또는 상이한 것일 수 있다. 이어서, 제2 세포외 효과를 보이는 세포 서브집단을 추가 분석을 위해, 예를 들어, 미세유동 장치 상에서의 제3 세포외 효과에 대한 추가 분석을 위해, 또는 벤치탑 방법, 예를 들어, RT-PCR 및/또는 차세대 서열분석에 의해 추가 분석을 위해 회수될 수 있다.

[0356] 특정 챔버(들)로부터 하나 이상의 세포를 회수하는 각종의 방법이 본원에서의 사용을 위해 변형될 수 있다.

[0357] 본원에서 제공하는 장치의 PDMS 막 디자인을 통해 미세모세관을 이용하여 상부 막을 천공함으로써 임의의 챔버로부터 세포를 선택적으로 회수할 수 있다. 한 실시양태에서, 챔버로부터 세포 회수는 부분적으로는 문헌 [Lecault et at. (2011). *Nature Methods* 8, pp. 581-586] (상기 문헌은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다)에 기재되어 있는 방법에 기초하여 수행된다. 특정 챔버 상의 막을 미세모세관으로 천공시키고, 세포를 흡입한다 (도 58, 상부). 같은 미세모세관을 사용하여 한 장치 상에서 다중 세포 집단을 회수할 수 있다. 이어서, 회수된 세포를 예를 들어, RT-PCR 분석법과 같은 추가 분석법을 위해 미세원심분리기 튜브에 증착시키거나, 같은 미세유동 장치 또는 상이한 미세유동 장치 상에서 추가의 기능성 검정법을 수행할 수 있다.

[0358] 한 실시양태에서, 일단 확인된 챔버로부터 효과기 세포를 회수하고 나면, 이를 한계 희석으로 (예컨대, 챔버당 단일 세포로, 또는 초기 검정보다 더 작은 규모의 집단으로) 동일한 장치의 상이한 구역에 재도입시켜 즉, 회수된 세포에 대해 또 다른 세포외 검정법을 수행함으로써 (예컨대, 도 2 참조) 어느 효과기 세포(들)가 세포외 효과의 변화의 원인이 되는지 측정한다.

[0359] 한 실시양태에서, 하나 이상의 세포 집단은 미세모세관을 이용하여 세포 집단을 함유하는 집단의 내용을 흡입하여 회수함으로써 회수된 흡인된 세포 집단을 수득할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 회수된 흡인된 세포 집단을 미세모세관을 이용하여 미세유동 장치 내로 재주입하고, 여기서, 미세모세관이 미세유동 장치의 한쪽 벽을 천공한다. 이어서, 미세모세관에 압력을 가하여 회수된 흡입된 세포 집단을 미세유동 장치의 별도의 챔버 내로 유동시키고, 미세모세관을 회수하여 미세유동 구조의 벽이 실질적으로 재-밀봉시킨다.

[0360] 한 실시양태에서, 회수는 자동화되고, 로봇식 미세모세관 장치를 사용하여 이루어진다 (도 58, 하부). 그러나, 회수는 또한 미세모세관을 사용하여 수동식으로 수행될 수도 있다. 본원에서 제공하는 회수 방법을 통해 15분 동안에 걸쳐 100개의 챔버로부터 >95% 효율로 회수를 수행할 수 있다. 별법으로, 회수된 효과기 세포를 제2 장치 내로 도입할 수 있거나, 벤치탑 방법을 통해 분석하여 세포외 효과의 변화를 담당하는 특정 세포(들)의 아이덴티티를 측정할 수 있다.

[0361] 한 실시양태에서, 상기 언급된 바와 같이, 미세모세관은 미세유동 챔버로부터 하나 이상의 세포 집단 (또는 서브집단, 미세유동 농축이 수행되었는지 여부에 따라)을 회수하는 데, 및 챔버의 내용물 또는 그의 일부를 흡입하여 회수된 흡인된 세포 집단을 수득하는 데 사용된다. 하나 이상의 세포 집단 (또는 서브집단) 중 세포는 실질적으로 챔버 내용물을 미세모세관 내로 흡입하여 회수함으로써 회수된 흡인된 세포 집단 (또는 서브집단)을 제공한다. 한 실시양태에서, 미세모세관의 직경은 약 5 ㎛ 내지 약 200 ㎛이다. 추가의 실시양태에서, 미세모

세관의 직경은 약 5 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 또는 약 5 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 또는 약 5 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 또는 약 5 ㎛ 내지 약 75 ㎛, 또는 약 5 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 또는 약 50 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 또는 약 100 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 또는 약 150 ㎛ 내지 약 200 ㎛이다.

[0362] 일부 실시양태에서, 미세모세관은 경사진 팁을 가진다. 일부 실시양태에서, 미세모세관은 타원형, 사각형 또는 원형 횡단면을 가진다. 추가로, 도 58에 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 미세모세관은 현미경 상의 로봇식 미세조작 시스템에 탑재됨으로써 자동 회수 장치를 수득할 수 있다.

[0363] 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 미세모세관은 단일 배럴을 가진다. 그러나, 다른 실시양태에서, 미세모세관은 다중 배럴, 예를 들어, 이중 배럴, 삼중 배럴, 또는 3개 초과의 배럴을 가진다.

[0364] 세포 또는 세포들은 또한 미세유동 밸브를 사용하여 명시된 챔버를 독특하게 주소 지정하고, 유동을 챔버로부터 회수를 위한 출구 포트로 단일 세포 또는 다중 세포를 플러싱할 수 있도록 지정함으로써 선택적으로 회수될 수 있다. 한 실시양태에서, 장치 기판에의 세포 부착은 당업자에게 공지된 방법, 예를 들어, 미세유동 기판을 트립신으로 코팅하거나, 또는 퍼지시킴으로써 최소화할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 관심의 대상이 되는 세포를 포함하는 복수 개의 챔버를 단일 포트를 통해, 예컨대, 유체 유동을 제어하는 주소 지정 가능한 밸브 어레이를 사용함으로써 동시에 회수할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 챔버로부터 관심의 대상이 되지 않는 세포는 먼저 세척에 의해, 또는 용해에 의해 장치로부터 제거한다. 이어서, 관심의 대상이 되는 세포를 포함하는, 장치의 남아있는 내용물은 플러싱하여 원하는 포트로 회수한다.

[0365] 한 실시양태에서, 세포외 효과의 변화를 보이는 효과기 세포를 포함하는 챔버의 내용물은 흡인에 의해, 예를 들어, 적절한 크기 및 형상을 가지도록 가공된 미세모세관을 사용함으로써 장치로부터 회수된다. 일부 실시양태에서, 회수 방법은 관심의 대상이 되는 세포(들)를 포함하는 챔버의 상부를 미세모세관으로 천공시키고, 관심의 대상이 되는 세포(들)를 흡인하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 천공 완료 후, 막을 재밀봉 또는 실질적으로 재밀봉한다. 또 다른 실시양태에서, 세포외 효과의 변화를 보이는 효과기 세포 (예컨대, 하나 이상의 ASC)를 포함하는 챔버의 내용물을 회수하는 것은 먼저 챔버 벽을 절단하여 접근점을 형성한 후, 미세모세관을 사용하여 흡인에 의해 세포를 추출함으로써 수행된다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 세포외 효과를 검정하는 데 사용되는 미세유동 장치는 챔버가 한쪽 벽 상의 물질을 벗겨내면 노출되고, 이로써 개방형 마이크로웰 어레이가 남게 되도록 가공한다. 이어서, 확인된 챔버 (즉, 세포외 효과의 변화를 보이는 효과기 세포를 포함하는 챔버(들))를 그의 각 챔버로부터 흡입한다. 미세유동 웰 내용물을 정확하게 추출할 수 있게 이를 촉진시키기 위하여, 한 실시양태에서, 흡인 도구, 예컨대, 미세모세관 튜브를 로봇식 미세조작기, 또는 수동식 미세조작기 상에 탑재한다 (도 58). 그러나, 다른 실시양태에서, 흡인은 수동식으로 수행될 수 있다.

[0366] 일부 경우에서, 주어진 챔버로부터 세포의 서브세트를 추출하는 것도 바람직하다. 예를 들어, 본원에서 제공하는 방법을 통해 미세유동 챔버의 특정 구역, 예를 들어, 판독 구역 또는 효과기 구역으로부터 세포를 제거를 제거할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에서 제공하는 회수 방법은 일련으로 개별 단일 세포을 흡인하는 것을 포함한다.

[0367] 한 실시양태에서, 하나 이상의 미세유동 챔버로부터 하나 이상의 세포를 회수하는 것은 자기 단리/회수를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 미세유동 챔버를 챔버 내의 하나 이상의 세포에 부착되는 자기 입자 (또는 복수 개의 자기 입자)에 노출시킨다. 부착은 웰(들) 중 단일 세포, 또는 세포 집단의 서브집에 대하여 선택적일 수 있거나, 또는 비선택적일 수 있고, 즉, 자석은 모든 세포에 부착될 수 있다. 이러한 경우, 세포를 미세모세관으로 흡인하는 대신, 자기장 구배를 생성하는 자기 프로브 쪽으로 자기 입자로 표지화된 세포에 대해 인력을 가한다. 한 실시양태에서, 프로브는 자기장을 온/오프함으로써 제거를 위해 세포가 그에 부착될 수 있도록 하고, 이어서, 증착 동안 유리되도록 디자인된다 (이지셉 셀렉션 키트(EasySep Selection Kit), 스템셀 테크놀러지즈(StemCell Technologies)).

[0368] 한 실시양태에서, 챔버로부터 수거된 단일 세포 또는 복수 개의 세포는 추가 분석을 위해 하나 이상의 용기, 예를 들어, 개방형 마이크로웰, 마이크로소적, 튜브, 배양 디쉬, 플레이트, 페트리 디쉬, 효소-결합 면역흡착 스폿 (ELISPOT) 플레이트, 제2 미세유동 장치, 같은 미세유동 장치 (다른 구역) 등의 것 내로 부착된다. 용기 선택은 당업자에 의해 결정되며, 이는 하류 분석법 및/또는 보관 성질에 기초한다.

[0369] 별법으로 또는 단일 세포 또는 복수 개의 세포의 회수 이외에도, 일부 실시양태에서, 세포-유래 생성물 또는 세포내 물질을 관심의 대상이 되는 미세유동 챔버로부터 회수한다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 미세유동 챔버가 세포외 효과의 변화를 보이는 세포를 가지는 것으로 확인된 경우, 챔버로부터 분비 생성물을 하류 분석 (예

컨대, 서열 분석)을 위해 회수한다. 또 다른 실시양태에서, 세포 또는 복수 개의 세포를 미세유동 장치에서, 예컨대, 제1 검정법이 수행된 챔버 내에서 용해시키고, 용해물을 회수한다. 한 실시양태에서, 용해물에 대해 추가로 칩 프로세싱을 수행하여 예를 들어, 세포 또는 복수 개의 세포로부터 단백질, mRNA 또는 DNA을 단리시킨다. 한 실시양태에서, 단일 챔버 내의 세포 또는 복수 개의 세포의 RNA는 미세유동 밸브를 사용하여 세포로부터 RNA를 유리시키는 시약을 사용함으로써 특정 챔버를 통해 플러싱시킴으로써 선택적으로 회수한다. 이어서, 상기 물질을 출구 포트에서 수집한다. 또 다른 실시양태에서, 전체 웰에서 또는 웰의 서브세트에서 세포를 용해 시약을 이용하요 용해시킨 후, 주어진 챔버 또는 챔버 서브세트의 내용을 회수한다. 또 다른 실시양태에서, 관심의 대상이 되는 챔버 또는 관심의 대상이 되는 챔버들 내의 세포를 세포로부터 유리된 RNA를 포획하는 비드의 존재하에서 용해시킨 후, 예를 들어, 세포 회수에 대해 상기 기술된 기법을 사용함으로써 비드를 회수한다. 이러한 경우, RNA는 또한 회수 이전에 또는 그 이전에 폴리머라제 효소를 이용하여 cDNA로 전환될 수 있다. 칩 mRNA 단리, cDA 합성 및 회수 방법에 대한 예는 문헌 [*Anal. Chem* 78 (2006), pp. 3084-3089] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에서 살펴볼 수 있다.

[0370] 관심의 대상이 되는 챔버 또는 챔버들로부터 세포 또는 세포 유래 물질을 회수한 후, 상기 물질 또는 세포를 분석하여 단리물 또는 단일 세포 또는 복수 개의 세포를 확인하거나, 특징 규명한다. 상기 언급한 바와 같이, 추가 분석은 미세유동 검정법 (예컨대, 도 2 참조)을 통해, 또는 벤치탑 검정법을 통해 이루어질 수 있다. 본 발명을 통해 다회에 걸쳐 미세유동 분석법을 수행함으로써 예를 들어, 제2 세포외 효과, 제3 세포외 효과 및/또는 제4 세포외 효과를 보이는 세포 서브집단을 회수된 세포 집단으로부터 확인할 수 있다. 회수된 세포 집단에 대하여 세포외 효과 검정을 반복함으로써, 본 방법의 사용자는 관심의 대상이 되는 기능적 특징, 또는 관심의 대상이 되는 다중 기능적 특징에 대해 고도로 농축된 세포 집단을 수득할 수 있다.

[0371] 한 실시양태에서, 세포외 효과, 또는 세포외 효과의 변화를 보이는 하나 이상의 세포 집단을 회수하여 하나 이상의 회수된 세포 집단을 수득한다. 일단 하나 이상의 개별 세포 집단을 확인하고, 회수하고 나면, 하나 이상의 개별 세포 집단을 추가로 분석하여 관찰된 세포외 효과를 담당하는 세포 또는 세포들을 측정한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 하나 이상의 회수된 세포 집단으로부터 기원하는 복수 개의 세포 서브집단을 미세유동 장치의 별도의 챔버 내에 보유하는 다계를 포함한다. 각각의 별도의 챔버들은 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단을 포함한다. 개별 세포 서브집단을 챔버 내에서 판독 입자 집단과 함께 인큐베이션시킨다. 개별 세포 서브집단을 제2 세포외 효과의 변화에 대하여 검정하고, 여기서, 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단이 제2 세포외 효과를 판독한다. 제2 세포외 효과는 회수된 세포 집단에 대하여 측정된 세포외 효과와 동일한 세포외 효과이거나, 또는 상이한 세포외 효과인 것이다. 제2 세포외 효과 검정에 기초하여, 하나 이상의 개별 세포 서브집단을 제2 세포외 효과 변화를 보이는 것을 확인한다. 한 실시양태에서, 이어서, 하나 이상의 개별 세포 서브집단을 추가 분석을 위해 회수한다. 제2 세포외 효과 검정은 본원에 기술된 세포외 효과 검정 중 하나이다.

[0372] 상기 상세하게 기술되어 있는 바와 같이, 하나 이상의 개별 세포 서브집단을 예를 들어, 미세모세관을 사용하여 회수한다. 한 실시양태에서, 미세모세관을 사용하여 회수된 세포 서브집단을 동일한 미세유동 장치, 또는 상이한 미세유동 장치에 재주입하여 세포외 효과를 보이는 세포 집단에 대하여 추가로 농축시킨다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 회수된 세포 서브집단으로부터 기원하는 복수 개의 세포 서브집단을 미세유동 장치의 별도의 챔버 내에 보유하고, 여기서, 각각의 별도의 챔버들은 하나 이상의 판독 입자를 포함하는 판독 입자 집단을 포함한다. 세포 서브집단을 미세유동 챔버에서 판독 입자 집단과 인큐베이션시키고, 세포 서브집단을 제3 세포외 효과의 존재에 대하여 검정한다. 판독 입자 집단 또는 그의 서브집단이 제3 세포외 효과를 판독한다. 검정 단계의 결과에 기초하여, 세포 서브집단 중 하나 이상의 것 내에 있는 하나 이상의 세포가 제3 세포외 효과를 보이는지 여부를 측정한다. 이어서, 본원에 기술된 바와 같이 하나 이상의 세포 서브집단을 회수할 수 있다.

[0373] 한 실시양태에서, 회수된 세포 집단 또는 회수된 세포 서브집단 또는 복수 개의 세포 집단 또는 서브집단으로부터의 세포를 세포 서브집다으로서 복수 개의 베쓸 내에 보유한다. 세포 서브집단의 서브집단이라는 용어는 이미 회수된 세포 서브집단의 서브집단을 의미하는 것으로 한다. 그러나, 세포 서브집단은 추가의 서브집단으로 분할될 수 있고, "서브집단의 서브집단"이라는 용어를 사용하는 것은 그를 구별짓는 데 필요한 것은 아님을 당업자는 이해할 것이다. 각 세포 서브집단을 개별 배쓸에 존재한다. 개별 서브집단 또는 서브집단의 서브집단을 용해시키고, 각 용해된 세포 서브집단 또는 용해된 세포 서브집단의 서브집단 내의 하나 이상의 핵산을 증폭시킨다. 추가의 실시양태에서, 하나 이상의 핵산은 항체 유전자를 포함한다.

[0374] 세포 성질, 원 스크린 내의 세포의 개수, 분석 의도에 따라, 상기 하류 분석을 위해 미세유동 분석법을 포함하는 수개의 접근법이 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 한 효과기 세포 집단이 한 챔버로부터 회수되거나, 또

는 복수 개의 집단이 다중 챔버로부터 회수되는 경우, 복수 개의 각 세포는 개별 배쓸 (예컨대, 개별 미세유동 챔버)로 분리되고, 분석은 각 효과기 세포에 대해 개별적으로 수행된다. 개별 세포 분석법은 미세유동 분석법 (도 2), 또는 벤치탑 분석법일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 한 효과기 세포 집단이 한 챔버로부터 회수되거나, 또는 복수 개의 집단이 다중 챔버로부터 회수되는 경우, 세포 집단은 같은 미세유동 장치의 별도의 구역으로 (또는 제2 장치로) 재도입되고, 세포는 한계 희석으로, 즉, "세포 서브집단"으로서 분리되고, 예를 들어, 세포는 챔버당 단일 세포인 밀도, 또는 챔버당 약 2 내지 약 10개의 세포인 밀도로 분리되고, 제2 세포외 효과 검정법이 수행된다. 하류 분석법 (미세유동 또는 기타)은 임의 크기의 세포 서브집단, 예를 들어, 초기 세포외 효과 세포 검정법의 것과 같은 크기의 것, 또는 더 작은 크기의 집단, 예컨대, 단일 세포, 2개의 세포, 약 2개의 세포 내지 약 20개의 세포, 약 2개의 세포 내지 약 25개의 세포에 대해 수행될 수 있다. 판독 입자는 세포 서브집단을 포함하는 챔버 내로 도입되고, 제2 세포외 효과 검정법이 수행된다. 세포외 효과의 변화를 보이는 세포 서브집단을 포함하는 챔버의 내용물을 추가 분석을 위해 수거한다. 상기 추가 분석은 (예컨대, 제3 세포외 효과 검정법, 단일 세포 PCR을 수행함으로써 실시되는) 미세유동 분석법, 또는 벤치탑 분석법 (예컨대, PCR, 차세대 서열분석)일 수 있다.

[0375] 한 실시양태에서, 회수된 세포로부터 클론을 수득하기 위해 한계 희석으로 복수 개의 세포를 복수 개의 세포 배양 챔버로 분포시킴으로써 개별 회수된 효과기 세포를 배양물 중에서 확장시킨다. 예를 들어, 항체 라이브러리를 발현하도록 조작된 세포주의 복수 개의 효과기 세포가 관심의 대상이 되는 챔버 또는 챔버들에 존재하는 실시양태에서, 챔버 중에 존재한 단일 효과기 세포를 단리시키기 위하여 챔버 또는 챔버들로부터의 세포에 대해 한계 희석을 수행한다. 이어서, 단일 효과기 세포를 사용하여 각각의 개별 효과기 세포의 클론 집단을 수득한다. 이어서, 하나 이상의 클론 집단을 분석하여 (예컨대, ELISA 또는 기능성 검정법에 의해) 분비된 항체의 특정을 측정함으로써 관심의 대상이 되는 항체를 어느 효과기 세포가 생산하는지에 대해 평가할 수 있다.

[0376] 별법으로 또는 추가로, 세포를 미세유동 챔버로부터 회수하고, 예컨대, 한계 희석에 의해 단리시키고, 확장시켜 관심의 대상이 되는 하나 이상의 유전자, 예컨대, 관심의 대상이 되는 항체를 코딩하는 유전자를 서열분석 또는 증폭 및 정제하는 데 충분한 물질을 수득하였다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 세포를 미세유동 챔버로부터 회수하고, 예컨대, 한계 희석에 의해 단리시키고, 예컨대, 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 또는 역전사효소 (RT)-PCR에 의해 단일-세포 DNA 또는 mRNA를 증폭한 후, 서열분석하여 관심의 대상이 되는 하나 이상의 유전자의 서열을 결정하는 데 사용한다. 추가의 또 다른 실시양태, 관심의 대상이 되는 세포를 하나 이상의 미세유동 챔버로부터 회수하고, 예컨대, 한계 희석에 의해 단리시킨 후, 이어서, 관심의 대상이 되는 유전자의 단일-세포 DNA 또는 mRNA를 증폭한 후, 상기 유전자를 후속 발현 및 분석을 위하여 또 다른 세포 유형으로 클로닝하는 데 사용한다.

[0377] 한 실시양태에서, 회수된 세포 집단(들) 또는 서브집단(들)을 단리시키고, 예를 들어, 그를 동물 내로 주입함으로써 생체내 분석을 위해 사용할 수 있거나, 또는 배양물 중에서 확장시킨 후, 미세유동 장치 상에서 앞서 수행된 하나 이상의 기능성 검정법을 세포에 대해 수행할 수 있다.

[0378] 한 실시양태에서, (예컨대, 제1 또는 제2 미세유동 세포외 효과 검정 후) 세포외 효과의 변화를 보인 세포 집단 또는 서브집단을 회수하고, 세포의 하나 이상의 핵산에 대하여 증폭시킨다. 한 실시양태에서, 증폭은 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 5'-cDNA 단부 급속 증폭 (RACE), 시험관내 전사 또는 전체 트랜스크립톰 증폭 (WTA)에 의해 수행된다. 추가의 실시양태에서, 증폭은 역전사 (RT)-PCR에 의해 수행된다. RT-PCR은 단일 세포, 또는 집단의 복수 개의 세포 상에서 이루어질 수 있다. 비록 단일 세포 RT-PCR이 분석 방법으로는 일반적이기는 하지만, 항체 유전자의 증폭은 다중 유전자 사용 빈도 및 가변성에 기인하여 적지 않은 도전 과제를 제시한다. 단일 세포로부터 항체 유전자를 회수하기 위한 2가지 주요 접근법으로는 축퇴성 프라이머를 사용하여 RT-PCR 및 5'-cDN단부 급속 증폭 (RACE) PCR을 포함한다. 한 실시양태에서, RT-PCR 방법은 유전자 특이 주형 교환 RT에 이어서, 반-네스티드 PCR 및 차세대 앰플리콘 서열분석에 기초한다.

[0379] 세포외 효과의 변화를 보이는 것으로 확인된 효과기 세포를 이용하는 RT-PCR 방법의 한 실시양태는 도 59에 제시되어 있다. 대략도는 주형 교환 역전사 및 다중화된 프라이머를 이용한 단일 세포 HV/LV 접근법을 보여주는 것이다. 본 실시양태, 단일 세포단일 세포를 미세원심분리기 튜브에 증착시키고, 중쇄 및 경쇄의 불변 영역을 표적화하는 다중 유전자-특이 프라이머로부터 cDNA를 생성한다. MMLV 효소의 주형-교환 활성을 사용하여 생성된 cDNA의 3' 단부 상에 주형-교환 올리고의 역 보체를 첨부한다 (문헌 [(Huber et al. 1989). *J. Biol. Chem.* 264, pp. 4669-4678]; [Luo and Taylor (1990). *J. Virology* 64, pp. 4321-4328] (상기 문헌은 각각 그 전문이 모든 목적을 위해 참조로 포함된다)). 중쇄 및 경쇄의 불변 영역에 어닐링되는 다중 프라이머, 및 주형 교환 올리고뉴클레오티드 카피에 상보적인 범용 프라이머를 사용하는 반-네스티드 PCR (일반 3' 프라이머 및 RT 프라

이머 영역 내부에 배치된 다중 네스티드 프라이머)을 사용하여 cDNA를 증폭시키고, 각각의 단일 세포 앰플리콘에 특이적인 인덱싱 서열을 도입한다. 생성된 단일 세포 앰플리콘을 풀링하고, 서열분석한다.

[0380] 일부 경우에서, 미세유동 장치로부터 회수한 후, 회수된 세포 집단을 단일 세포로 추가로 단리시키지 않는다. 예를 들어, 챔버로부터 단리된 복수 개의 세포가 관심의 대상이 되는 항체를 분비하는 (예컨대, 다른 항체(들)를 분비하는 하나 이상의 추가의 세포 집단에 존재한는 것인) 세포를 함유하는 경우, 한 실시양태에서, 일부가 원하는 생성물 (즉, 관심의 대상이 되는 항체)을 생산하는 것인 복수 개의 세포를 배양물 중에서 확장시켜 복수 개의 세포의 클론 집단을 생성한다. 또 다른 실시양태에서, 미세유동 웰로부터 단리된 복수 개의 세포를 (미세유동 장치 상에서 또는 회수 이후에) 용해시킨 후, 풀링된 핵산 집단을 증폭시키고, 서열분석에 의해 분석한다. 이러한 경우, 수득된 서열에 대한 생물학적 정보 분석을 사용하여 가능하게는 다른 공급워으로부터의 정보를 이용함으로써 어느 서열이 관심의 대상이 되는 단백질 (예를 들어, 항체)를 코딩할 가능성이 있는지에 대하 추정할 수 있다. 중요하게는, 본 발명이 제공하는 분석 방법은 회수되는 세포 개수가 제한되어 있기 때문에, 다수의 세포를 분석하는 벌크 분석과 비교하였을 때 현저히 간소화된 것이다. 이러한 세포 개수 제한으로 세포 집단 내에서 게놈 정보의 복잡성은 감소된다.

[0381] 한 실시양태에서, 복수 개의 세포의 증폭된 DNA 서열을 사용하여 당업자에게 공지된 방법에 따라 무한증식된 세포주에서 재조합적으로 발현된 서열 라이브러리를 생성할 수 있다. 이어서, 가능하게는 1차로 클론을 단리시켜 관심의 대상이 되는 유전자를 확인함으로써 상기 세포주를 분석할 수 있다. 일부 경우에, 상기 라이브러리를 사용하여 관심의 대상이 되는 단백질 복합체를 생성하는 유전자 조합에 대해 스크리닝한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 원하는 특성을 가지는 유전자 쌍 형성을 확인하기 위해 관심의 대상이 되는 세포에서 발현되는 유전자는 항체 유전자의 중쇄 및 경쇄, 둘 모두를 포함한다. 원 스크린에서 분석되는 세포의 개수가 적다는 사실에 기인하여 상기 분석법의 복잡성은 크게 감소된다. 예를 들어, 원 스크린에 10개의 세포가 존재할 경우, 항체 중쇄 및 경쇄 쌍 형성은 단지 100개가 가능하다. 그에 반해, 벌크 샘플은 전형적으로 수천 개의 상이한 항체 서열을 가지며, 이에 상응하여 100만 개의 쌍 형성이 가능하다.

[0382] 일부 경우에, 회수된 세포는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 단리될 수 있는 상이한 세포 유형을 함유할 수 있다. 예를 들어, 미세유동 챔버가 항체 분비 세포, 및 항체 분비 세포를 유지시키는 데 사용되는 섬유아세포, 둘 모두를 포함할 경우, 한 실시양태에서, 항체 분비 세포는 친화성 포획 방법을 사용하는 회수 이후에 섬유아세포로부터 분리된다.

[0383] 실시예

[0384] 본 발명은 하기 실시예를 참조로 하여 추가로 예시된다. 그러나, 상기 기술된 실시양태와 같이, 본 실시예는 예시적인 것이며, 어느 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다는 것에 주의하여야 한다.

[0385] 실시예 1 - 미세유동 장치 가공

[0386] 문헌 [Lecault *et al*. (2011). Nature Methods 8, pp. 581-586]에 기술된 프로토콜, 또는 상기 프로토콜의 적합화되 버전 (예컨대, 베이킹 시간 또는 경화 프로토콜이 변형된 것)을 사용하여 미세유동 장치를 가공하여 하부의 유리 슬라이드로부터 상부: 유동 챔버, 제어층, 막, 및 배쓰층을 포함하는 다중층을 수득하였다 (도 27). 장치 횡단면 및 챔버, 유동 채널 및 제어 채널의 상응하는 3D 개략도는 각각 도 61 및 도 62에 제시되어 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 제어 채널이 유동 채널을 횡단하는 경우, 핀치 밸브가 형성되고, 제어 채널을 가압시킴으로써 폐쇄된다. 특정 경우에 배쓰를 폐쇄시키기 위해 커버층을 부가하거나, 예컨대, 도 63의 장치에 제시된 것과 같은, 개방형 배쓰를 위해서는 생략한 채로 방치하였다.

[0387] 실시예 2 - 선별 및 재주입에 의한 세포 농축을 위한 미세유동 장치

[0388] 도 63에 제시된 미세유동 장치를 사용하여 농축을 위한 재주입능이 있는 효과기 세포 (항체 분비 세포) 선별 검정법을 수행하였다. 도 64에 제시된 바와 같이, 장치는 6개의 입구 포트 (1030), 각 입구를 제어하기 위한 6개의 제어 포트 (1031), 4개의 재주입 포트 (그 중 하나가 (1032)이다), 및 단일의 출구 포트 (1033)을 포함한다. 장치는 8192개의 동일한 단위 셀 (그 중 하나는 도 2b 및 도 61에 도시되어 있다)로 이루어진 어레이를 포함한다. 각 단위 셀은 폭 100 ㎛, 길이 160 ㎛, 및 높이 160 ㎛인 챔버를 포함한다. 각 챔버의 부피는 약 2.6 nL이다. 장치는 4개의 서브어레이로 분할되고, 그 중 하나가 (1032)로 표시되어 있다 (도 64). 각 서브어레이는 총 8192개의 단위 셀 중 2048개를 함유한다. 각 서브어레이는 그 자신의 서브어레이 밸브 (1034)를 가지는데, 이를 통해서 각 서브어레이는 다른 서브어레이와는 독립적으로 유체식으로 처리될 수 있다. 각 서브어레이는

단일 재주입 포트 (1035)를 가진다. 재주입 포트는 직경이 약 300 ㎛, 깊이가 약 160 ㎛, 및 부피가 약 11.3 nL인 원형 챔버이다. 시약 또는 입자를 4개의 서브어레이 중 하나 이상의 것으로 주입하기 위해 재주입 포트는 미세모세관에 의해 천공된다.

[0389] 실시예 3 - 효과기 세포 및 판독 세포 분리를 위한 미세유동 장치

[0390] 판독 세포가 효과기 세포로부터 별도의 분리된 챔버 내에 유지될 수 있도록, 및 필요시에는 요구에 따라 상기 챔버의 내용물이 혼합될 수 있도록 미세유동 장치를 디자인하였다. 이러한 구조를 사용하여 효과기 세포 검정법, 예를 들어, 사이토카인 중화 검정법을 수행한다. 상기 구조는 특히 효과기 세포(들)를 포함하는 챔버를 유체로 관류시킬 때, 예를 들어, 장기간 동안에 걸쳐 생존능을 유지시키기 위해 새로운 배양 배지를 제공할 때에 효과기 세포의 분비 생성물 (예컨대, 항체)이 완전하게 세척되지 못하게 막는데 유용하다. 이러한 구조는 또한 세포외 효과 검정을 위해 요구되는 배지 조건에 효과기 세포(들)를 노출시키는 기간을 제한하는 것이 유용할 경우에 (예컨대, 독성 사이토카인이 보조 입자로서 사용될 때) 변형될 수 있다.

[0391] 도 65에 제시되어 있는 바와 같이, 상기 장치는 6개의 입구 포트 (1040), 9개의 제어 포트 (1041) 및 (1042), 2개 출구 포트 (1043) 및 (1044), 및 (각각의 것은 (1045)와 동일하고, 도 66에 더욱 상세하게 도시되어 있는 것인) 396개의 단위 셀로 이루어진 어레이를 구성된다. 각 단위 셀은 2개의 원형 챔버를 포함한다. 각 챔버의 직경은 210 ㎛, 높이는 180 ㎛, 및 부피는 5.6 nL이다. 전형적으로, 상기 챔버 중 하나는 하나 이상의 효과기 세포를 수용하고, 나머지 다른 한 챔버는 판독 세포를 수용한다. 유동 채널은 두 채널을 연결한다. 상기 유동 채널은 "확산 밸브" (1050)로 폐쇄될 수 있다. 확산 밸브 (1050)이 개방되면, 두 챔버의 내용물은 확산을 통해 혼합된다. 확산 밸브 (1050)이 폐쇄되면, 챔버는 서로 분리된다. 두 유동 채널은 장치 내에서 각 단위 셀을 각각의 다른 단위 셀에 일련으로 연결시킨다. 이들 유동 채널 중 하나는 챔버 1을 통해 유동하고, 나머지 다른 하나는 챔버 2를 통해 유동한다. 각 단위 셀의 챔버를 각각의 다른 단위 셀의 챔버와 분리시키기 위해 이들 두 유동 채널은 주요 밸브 1" (1051) 및 주요 밸브 2" (1052)로 폐쇄된다. 상기 두 밸브는 독립적으로 개방 및 폐쇄되고, 이로써 챔버 1 또는 챔버 2의 관류는 독립적으로 이루어질 수 있다. 도 66으로부터 수직면 및 수평면 (점선)에 따른 장치의 횡단면은 각각 도 67 및 도 68에 제시되어 있다.

[0392] 본 장치를 사용하여 수행될 수 있는 사이토카인 중화 기능성 검정 방법의 일례는 도 69에 제시되어 있다. 패널 a는 1 이상의 효과기 세포를 함유하는 상부 챔버, 및 복수 개의 판독 세포를 함유하는 하부 챔버를 보여주는 것이다. 두 챔버 모두, 판독 세포의 생존능을 유지시키는 데 필요한 동일한 농도의 사이토카인을 함유한다. 밸브 모두를 폐쇄시킨다. 폐쇄된 밸브는 음영 처리된 검은색으로 표시되어 있고, 개방된 밸브는 가로 빗금선으로 표시되어 있다. 패널 b는 시간이 경과함에 따라, 1 이상의 효과기 세포가 항체를 분비하였다는 것을 보여주는 것이다. 도시된 바와 같이 특정 경우에, 항체는 그를 중화시키는 효과기 챔버 내의 사이토카인에 결합한다. 패널 c는 확산 밸브 (1050)를 개방하였을 때를 보여주는 것이다. 유리 사이토카인은 하부 챔버로부터 상부 챔버 쪽으로 확산된다. 중화된 사이토카인은 상부 챔버로부터 하부 챔버 쪽으로 확산된다. 패널 d는 각 챔버 내의 유리 사이토카인의 농도와 중화된 사이토카인의 농도가 실질적으로 평형화되도록 충분한 시간이 경과하였음을 보여주는 것이다. 이어서, 모든 밸브를 가동시켜 잠근다. 이때, 판독 세포를 포함하는 하부 챔버 중 사이토카인의 유효 농도는 초기 농도의 약 절반이다. 패널 e는 추가의 사이토카인을 함유하는 새 배지로 효과기 세포를 관류시킨 것을 보여주는 것이다. 환류를 통해 중화된 사이토카인이 상부 챔버로부터 제거되었다. 상기 공정을 매 수시간 마다 반복하여 최종적으로는 완전하게 사이토카인을 고갈시키고, 판독 세포를 사멸시킨다. 다른 경우에서, 사이토카인 중화가 판독 세포에 미치는 효과는 신호전달 경로의 활성화 또는 억제, 성장 정지, 분화 또는 형태 변화를 포함할 수 있다. 이어서, 당업자에게 공지된 방법에 의해 판독 세포에 미치는 효과를 측정한다.

[0393] 실시예 4 - 셀 펜스 챔버 통합

[0394] 단일 효과기 세포 또는 하나 이상의 효과기 세포를 포함하는 이질성 세포 집단의 포획을 위해 셀 펜스를 가진 장치를 하기와 같이 가공하였다.

[0395] 재사용이 가능한 유동 채널 몰드 및 재사용이 가능한 제어 채널로부터 몰딩하여 셀 펜스가 있는 PDMS 장치를 가공하였다. 유동 채널 몰드는 실리콘 웨이퍼 기판 상에 다중의 포토레지스트 층을 포함하였다. 본원에서 사용된 장치 중의 챔버 벌크는 Si 웨이퍼 상에 직접 안착된 SU-8 100 피쳐에 의해 정의되었다. 가공되었을 때, 셀 펜스는 SU-8 100 피쳐 상부에 안착된 더 얇은 SU-8 2010 피쳐에 의해 정의되었다. 이는 도 31에 개략적으로 도시되어 있다.

[0396] 미세유동 챔버 대부분은 예외적으로 최종 단계인 현상 단계를 생략한 표준 프로토콜에 따라 SU-8 100 음성 포토레지스트 (전형적으로, 높이 160 ㎛)를 사용하여 가공하였다. 사후 노출 베이크 이후에 웨이퍼를 냉각시킨 후, SU-8 2010을 10-20 ㎛ 높이에서 현상되지 않은 SU-8 100의 상단에서 회전시켰다. SU-8 2010의 두께가 펜스 높이를 결정지었다. 각 챔버의 깊이는 두 포토레지스트 층 높이의 조합이었다.

[0397] 대안적인 가공 방법으로, SU-8 100 층을 완전하게 현상시킨 후, 웨이퍼를 제1층보다 더 높은 SU-8 100의 추가 층으로 코팅하는데 이러한 높이 차이는 펜스의 높이 차가 된다.

[0398] 이어서, 몰드를 파릴렌으로 코팅하여 (화학 증착된 폴리(p-크실렌) 중합체 막) 몰딩 동안 PDMS의 부착을 감소시키고, 몰드 내구성을 증진시키고, 상기 언급된 파릴렌 코팅으로 제조되지 못한 작은 피쳐를 복제시킬 수 있었다.

[0399] 다수의 원형 장치를 가공하여 실현 가능한 펜스 폭-높이 조합을 결정할 수 있었다. 성공적으로 가공될 수 있는 크기를 결정하기 위해 원형 유동층 몰드를 가공하였다. 상기 몰드는 펜스 폭이 같은 모드 간에 차이가 나는 것인 펜스를 포함하는 다중 챔버로 구성되었다. 또한, 펜스의 높이 및 챔버의 높이는 가공하는 동안 (회전 속도를 조정함으로써) 달라질 수 있다. 원형 몰드는 가공 시험을 위해 단 챔버만을 포함하였다.

[0400] 2개의 포토리소그래피 마스크가 필요하였는데, 하나는 챔버 벌크를 정의하기 위한 것이고 (SU-8 100), 나머지 다른 하나는 펜스를 정의하기 위한 것이었다 (SU-8 2010). 그러나, 두 피쳐 세트 모두를 함유하는 하나의 물리적 마스크가 사용될 수 있다.

[0401] 챔버의 전체 폭 W가 300 ㎛로 고정된 원형 펜스 챔버를 가공하였다. 현존하는 대부분의 장치 상의 챔버의 전형적인 폭은 160 ㎛이다. 먼저, 효과기 구역 및 판독 구역 각각에 대한 별도의 입구 및 출구를 허용하기 위해 상기 챔버의 절반부를 각각 유사한 크기로 만들었다. L은 챔버의 길이이다. X인 각각의 독특한 값을 가지는 경우, L=160 ㎛ (길이)인 3개의 챔버, 및 L=2,000 ㎛인 챔버는 1개 초과로 존재하였다. 길이가 연장된 챔버는 최종 PDMS 몰드가 펜스에 대하여 수직으로 쉽게 절단될 수 있도록 하기 위해 포함시켰으며, 이로써, 횡단면을 영상화할 수 있었다.

[0402] 먼저, 단일 몰드를 가공하고, 챔버 및 펜스 높이로 이루어진 단일 세트에 관한 데이터를 제공하였다. 하기 표에는 원형 몰드의 크기가 요약되어 있다:

표 5

[0403]

원형 몰드 크기 요약	
W (디자인 값)	300 μm
L (디자인 값)	160 / 2000 μm
SU-8 100 높이 (측정치)	160±5 μm
SU-8 2010 높이 (측정치)	17±1 μm

[0404] 하기 6에는 몰드 상에 있고, 성공적으로 가공된 것인 펜스의 폭이 열거되어 있다:

표 6

표 6.

X (펜스 폭) [μm] 디자인 값	X (펜스 폭) [μm] 측정값	PDMS 가공 성공 여부
5.0	측정 불가	실패
7.5	측정 불가	실패
10	18±2	실패
12.5	21±2	실패
15	25±2	실패
17.5	29±2	성공
20	31±2	성공
25	37±2	성공
30	42±2	성공
35	48±2	성공

[0405]

[0406] 상기 표는 실제 펜스 폭이 디자인 값보다 더 크다는 것을 입증하는 것을 보여주는 것이다.

[0407] PDMS 몰딩 후에야 가공 실패가 분명하게 나타났다. 펜스 폭이 더 좁을 경우, 현미경하에 그를 관측함으로써 포토레지스트 몰드의 품질을 측정하기는 어려웠다. 펜스를 구성하는 PDMS는 완전하게 몰드 내에 그대로 유지되거나, 또는 챔버 하부로부터 부분적으로 제거되기 때문에 펜스는 실패를 나타내었다. 예를 들어, 폭이 15 ㎛인 펜스는 실패였다. 상기와 같은 특정 디자인 및 상기 기술된 방법을 사용하여 가공될 수 있는 최소 폭은 17.5 ㎛였다.

[0408] 원형 장치의 PDMS 몰딩 동안 펜스는 대개 챔버 하부로부터 인열되는 것으로 관찰되었다. 이러한 인열은 펜스가 챔버 벽에 맞닥뜨리게 되었을 때 90° 코너에서 시작되는 것으로 나타났다. 90° 코너는 응력 농도이다. 응력 농도를 감소시켜 PMDS 몰딩 능력을 개선시키기 위해 45° 챔버를 포함하도록 디자인을 변형시켰다. 상기 디자인 변형으로 펜스 폭은, 시험 몰등에서 가능하 최대 크기인 7.5 ㎛ 미만인 폭으로 축소될 수 있었다. 펙스 폭을 10 ㎛인 디자인 값으로 축소시켰다. 실제 측정치인 12 ㎛는 원형 몰드에서 달성된 것보다 디자인 값에 훨씬 더 가까웠다.

[0409] 본 실시예에서 펜스는 유동에 대하여 병렬로 진행된다. 그러나, 펜스를 유동에 대하여 수직으로, 또는 유동에 대하여 대각선 방향으로 가공할 수 없다는 어떤 본연적인 이유는 없다. 유사하게, 본 실시예에서 챔버는 대칭형이다. 그러나, 본 발명은 그러한 것으로 한정되지 않는다.

[0410] 셀 펜스, 효과기 구역 및 판독 구역을 가지는 개별 미세유동 챔버에 세포 집단 및 판독 입자를 적재하여 경사 방법을 사용하여 효과기 세포는 효과기 구역으로 또는 판독 입자는 판독 구역으로 유도하였다.

[0411] 도 70a, 70c, 및 70e는 셀 펜스가 있는 미세유동 챔버의 광학 현미경법 영상을 보여주는 것이고, 도 70b, 70d, 및 70f는 형광 현미경으로 관찰된 등가인 챔버를 보여주는 것이다. 판독 구역 중의 비드 (판독 입자)는 효과기 세포 및 효과기 구역으로부터 상대적으로 원거리에 있음에도 불구하고 일반적으로 균일한, 비드 상의 효과기 세포 생성물의 응집을 보여주는 것이다.

[0412] 실시예 5 -항체-분비 효과기 세포의 강력한 미세유동 성장

[0413] 인간 IgG 항체를 생산하는 복수 개의 재조합 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 (효과기 세포)를 2 M 세포/mL인 농도로 미세유동 장치에 적재하였다. 분비된 항체는 2시간 인큐베이션 동안 단백질 A-코팅된 비드 (평균 직경: 4.9 ㎛) 상에 포획되었고, 이후, 토끼 항-인간 IgG (H+L)의 다이라이트 594-접합된 $F(ab')_2$ 단편을 첨가하고, 세척하였다 (도 71). 명시야 및 형광성 영성을 촬영하여 항체 분비 및 포획을 정량화하였다. 이어서, 세포를 장치에서 4.5일 동안 배양하여 클론 집단을 생성하고, 추가 확장을 위해 장치로부터 다량의 항체를 분비하는 클론을 회수하였다.

[0414] 도 72는 항체 검출 효과기 세포 검정법 수행 이후, CHO 클론의 저속 영상화를 보여주는 것이다. 판독 비드는 검은색 화살펴로 식별되어 있고, 세포는 흰색 화살포로 식별되어 있다. 도 73은 진탕 플라스크 (n = 2.5 x 10^5

개의 세포$^{ml-1}$로 시딩된 3중의 3회 실험)에서 배양된 CHO 세포, 96웰 플레이트 중의 단일 세포로서 (n = 3회 실험; 플레이트당 27-36개의 클론) 또는 미세유동 검정에서 (n = 3회 실험; 실험당 50개의 클론 추적)의 성장 곡선 (오차 막대, s.d.)을 보여주는 것이다. 미세유동 어레이에서 확장된 CHO 세포는 배치 진탕 플라스크 배양과 유사하고, 96 다중 웰 플레이트에서 배양된 단일 세포보다는 우수한 성장률을 보였다 (도 73).

[0415] 실시예 6 - 이질성 ASC 집단의 존재하에서 단일 ASC 검출의 감도

[0416] 수학적 모델링을 사용함으로써 비드 개수의 함수로서 및 시간의 함수로서 부피가 4.1 nL인 챔버 내에서 비드 상의 전체 항체 포획률을 측정하였다 (160 μM x 160 μM x 160 μM). 상기 CHO 세포 세포주에 대한 평균 분비율은 벌크 샘플 상에서 대략 초당 300개의 단백질인 것으로 측정되었다. 이러한 분비율은 초당 100 내지 2,000개의 항체를 분비하는 것으로 추정되는 일차 항체 분비 세포로부터의 예상 분비율과 유사하다. 따라서, 상기 측정치에 기초하여 측정한 바, 세포로부터 가장 원거리에 있는 비드는 2시간의 인큐베이션 동안 대략 4,000개의 항체를 포획할 것으로 예상되고, 이는 형광을 통해 검출된다.

[0417] 도 74a 내지 74d에 제시된 일례에서, 관심의 대상이 되는 표적 (항원)은 달걀 흰자 리소자임 (HEL)이다. 장치에 2개의 하이브리도마 세포주, HyHel5 및 4B2로부터 유래된 효과기 세포를 적재하였다. HyHel5 하이브리도마 세포는 HEL에 결합하는 단일클론 항체를 분비하고, 4B2 하이브리도마 세포는 HEL에 결합하지 못하는 단일클론 항체를 분비한다. 도 74a를 참조하면, 상부 패널은 대략 700개의 검정 챔버를 가지는 장치의 챔버 내로 적재된 HyHel5 세포를 보여주는 것이다. HyHel5 세포를 먼저 평균적으로 매 10개의 챔버당 1개인 세포인 밀도로 적재하였다. 하부 패널은 HyHel5 세포가 적재되지 않은 챔버를 보여주는 것이다. 일단 장치에 적재되고 나면, 적재된 HyHel5 세포의 위치를 기록하였다. 도 74b를 참조하면, 4B2 세포는 두 세포주의 평균비로 챔버 내로 적재하여 평균적으로 챔버 1개당 25개의 세포로 적재하였고, 이는 HyHel5 세포 농도의 250배에 상응하였다.

[0418] 이어서, 장치 챔버를 세척하고, 토끼 다중클론 항-마우스 IgG 항체로 관능화된 비드 (판독 입자)를 챔버에 적재하였다. 이어서, 챔버를 분리시키고, 인큐베이션시켜, 상기 챔부 중의 비드 상에, 각 챔버 중 세포에 의해 생성된 항체가 포획되도록 하였다. 도 74c를 참조하면, 형광 표지화된 HEL (10 nM)을 인큐베이션 단계 동안 배지 중에 포함시키고, 형광성 영상을 촬영하여 HyHel5가 결합된 비드를 포함하는 챔버를 확인하고, 비드 상의 HyHel5 항체 축적을 모니터링하였다. 도 74c에서 알 수 있는 바와 같이, 형광은 오직 상부 패널에서만 검출되었는데, 이는 HyHel5를 가지는 챔버는 오직 형광 표지화된 HEL 항원과 인큐베이션되었을 때에만 비드 상에 강력한 형광성 신호를 발생시켰다는 것을 나타낸다. 도 74d를 참조하면, 이어서, 장치를 형광 표지화된 다중클론 항-IgG 항체와 함께 인큐베이션시켜 HyHel5 세포 또는 4B2 세포로부터 분리된, IgG가 결합되어 있는 비드를 포함하는 챔버를 확인하였다. 형광 표지화된 항-IgG 항체에 노출되었을 때, 모든 챔버가 형광성 신호를 발생시켰는데, 이는 상기 두 세포주, 모두로부터의 항체가 모든 챔버에서 포획되었다는 것을 나타내는 것이다. 형광 표지화된 HEL과 함께 인큐베이션시킨 후, 챔버를 표지화된 HEL 항원 부재하에서 배지로 플러싱하고, 영상을 촬영하여 도 74e에 제시된 바와 같은, 챔버 중 HyHel5-HEL 결합의 해리 동적 성질을 모니터링하였다. 도 74f는 단백질 A 비드 및 10 nM 리소자임의 존재하에서 인큐베이션된, 상기 기술된 바와 같은 HyHEL5 및 4B2 하이브리도마 세포 믹스를 함유하는 600개의 챔버의 시간 경과에 따른 형광을 보여주는 것이다. HyHEL5 세포를 함유하는 챔버는 기준선 초과인 그의 형광에 의해 쉽게 식별되었으며, 이는 항원-특이 mAb를 분비하는 희귀 세포를 검출할 수 있는 상기 시스템의 능력을 입증하는 것이다.

[0419] 다른 실시예에서, 달걀 리소자임 (HEL)에 대한 항체를 분비하는 HyHEL5 하이브리도마 세포 집단을 한계 희석으로 미세유동 장치에 적재하였다. 장치를 영상화하여 각 챔버 내의 HyHEL5 세포 존재를 측정하였다. 이어서, HEL에 결합하지 않는 항체를 분비하는 DMS-1 하이브리도마 세포를 같은 어레이에 챔버당 대략 5개의 세포인 평균 농도로 적재하였다. 세포를 판독 항체-포획 비드 (토끼 항-마우스 항체로 코팅된 단백질 A 비드)의 존재하에서 인큐베이션시키고, 리소자임-특이 항체의 분비는 알렉사(Alexa)-488로 표지화된 1 nM 리소자임 용액으로 세척함으로써 측정하였다. HyHeL5 세포 적재 후 수득된 명시야 영상 (상부), DMS-1 세포 및 비드와 함께 인큐베이션시킨 후에 촬영된 명시야 영상 (중간), 및 상응하는 형광성 영상 (하부)은 DMS-1 세포만 (도 75a) 또는 단일 HyHEL5 세포 및 다중 DMS-1 세포로 이루어진 혼합물 (도 75b)을 함유하는 3개의 대표 챔버에 대해 제시된 것이다. 형광 강도 분포는 오직 DMS-1 세포만을 함유하거나 (도 75c), 또는 HyHEL5 세포 및 DMS-1 세포, 둘 모두를 함유하는 (도 75d) 챔버에 대해 제시되어 있다. HyHEL5 집단에서 달걀 리소자임에 대한 항체를 분비하는 세포는 심지어 비-항원 특이 항체를 분비하는다중 DMS-1 세포의 존재하에서도 검출되었다.

[0420] **실시예 7 - 비드-및 세포-기반 결합 검정법을 이용한 단일 세포로부터의 mAb 선별**

[0421] 단일 하이브리도마 효과기 세포 (4B2)를 미세유동 장치의 개별 챔버 내로 적재하고, 비드 기반 및 세포 기반 판

독 결합 검정법, 둘 모두를 사용하여 분비된 항체 (항-인간 CD45에 대한 IgG)의 결합을 측정하였다. 본 실험에서 판독 세포는 내인적으로 인간 CD45 막 수용체를 발현하는 K562 세포였고, 이를 효과기 세포과 구별하기 위해, 고정 이전에 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE)로 염색하였다. 단일 효과기 세포를 장치의 개별 챔버로 제공하고, 복수 개의 판독 K562 세포와 함께 밤새도록 인큐베이션시켰다. 이어서, 효과기 세포를 추가로 2시간 동안 판독 단백질 A 비드와 함께 인큐베이션시킨 후, 분비된 IgG 항-인간 CD45 항체에 결합하는 검출 항체 (형광 표지화된 항-마우스 IgG)로 염색하였다. 이어서, 개별 챔버의 형광을 측정하였다. 실험의 개요는 도 76a에 제시되어 있다.

[0422] 도 76b는 중공 챔버 및 단일 하이브리도마 효과기 세포를 포함하는 챔버에 대한 자동 영상 분석법으로 측정된 판독 세포 및 판독 비드의 평균 형광 강도에 관한 그래프이다. 도 76c (좌측에서 우측으로)는 단일 하이브리도마 세포를 포함하는 단일 챔버를 보여주는 것이다 (좌측 패널). 본 실시예에서 하이브리도마 세포는 밤새도록 분열되었다. 나머지 패널은 표적 고정된 K562 세포와 함께 밤새도록 인큐베이션시킨 이후, 및 (적절한 다중클론 항-마우스 IgG 항체로 표지화된) 단백질 A 비드와 함께 2시간 인큐베이션시킨 이후의 같은 챔버 내의 항-CD45 항체 염색의 형광성 및 합성 영상을 보여주는 것이다. 본 검정법은 살아있는 판독 세포 및/또는 상이한 종의 판독 세포를 사용하여 수행될 수 있도록 변형될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0423] 실시예 8 - 세포 기반 면역화 및 세포 결합 검정법

[0424] 마우스를 인간 난소암 세포주 (TOV21G)로부터의 고정된 세포로 면역화시켰다 (도 77a). 항체 분비 효과기 세포를 FACS를 사용하여 분류한 후, 미세유동 장치에 주입하고, CFSE로 염색된 판독 세포 (고정된 것 및 살아있는 TOV21G 세포)와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 2차 표지화된 항체를 사용하여 항체 결합을 시각화하였다. 도 77b는 본 실험 결과를 보여주는 것이다. 좌측에서부터 우측으로: 칩 상에 적재한 후의 형질 세포 및 판독 세포. 식별을 위해 판독 세포를 CFSE로 염색하였다. 살아있는 세포 및 고정된 세포의 세포 표면 상에의 항체 결합을 2차 표지화된 항체 (항-마우스 IgG)로 시각화하였다. 가장 우측에 있는 것은 판독 세포 상에서 신호가 극도로 낮은, 음성 챔버 (효과기 세포 없음)를 보여주는 것이다.

[0425] 실시예 9 - 세포 생존능 및 분비 유지

[0426] 5-8일 동안 ASC 효과기 세포의 세포 생존능 및 분비를 유지시키기 위하여 조건을 최적화시켰다. 도 78은 완전 IL-6 10 ng/mL를 포함하는 RPMI 중에서, 8일 동안 성장시킨 마우스 ASC (도 78a), 및 5일 동안 성장시킨 인간 ASC (도 78b)로부터의 ELISPOT에 의한 세포 생존 및 항체-분비를 보여주는 것이다.

[0427] 면역화 절차를 위해, 마우스에 달걀 흰자 리소자임 및 Al히드로겔 애주번트 (어큐레이트 케미칼 & 사이언티픽 코포레이션(Accurate Chemical & Scientific Corporation))을 2주 간격으로 3회에 걸쳐 피하로 주사하였다. 인간은 혈액 채취 1주 전에 인플루엔자 백신으로 면역화시켰다. 면역화 절차는 브리티시 컬럼비아 대학교 (University of British Columbia)에 의해 승인받은 프로토콜에 따라 수행하였다. 마우스 비장 세포를 단리시키고, PE 항-마우스 CD138 (BD 파민겐(BD Phar분gen))으로 염색시키고, CD138+ 세포 집단에 대해 FACS에 의하여 분류하였다 (추가 설명은 실시예 10 참조). 인간 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)를 단리시키고, 문헌 [Wrammert *et al.* (2008), *Nature Letters* 453, pp. 667-671] (상기 문헌은 그 전문이 모든 목적을 위해 참조로 포함된다)에 기술되어 있는 바와 같이 마커로 염색하였다.

[0428] 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF) 막-라인 96-웰 마이크로플레이트 (밀리포어)에서 효소-결합-면역스폿 (ELISPOT: Enzyme-Linked-Immunospot) 검정법을 수행하였다. PVDF 막을 70% 에탄올로 미리 습윤시키고, PBS로 세척하였다. 플레이트를 밤새도록 염소 항-마우스 IgG (H+L) (잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch)) 또는 토끼 항-인간 IgG (H+L) (잭슨 이뮤노리서치 항체 (1:1,000/100 ㎕/웰)로 코팅하고, PBS로 3-4회에 걸쳐 세척하였다. 이어서, 세포를 첨가하고, 37℃에서 20h 동안 인큐베이션시켰다. 0.1% 트윈을 함유하는 PBS (PBS-트윈)으로 3-4회 세척하여 세포를 제거하고, 플레이트를 알칼리성 포스파타제-염색 항-마우스 IgG (H+L) (잭슨 이뮤노리서치) (1:1,000/100 ㎕/웰)와 함께 인큐베이션시켰다. PBS-트윈으로 3-4회 세척한 후, 플레이트를 BCIP NBT 발색제 (시그마-알드리치 B6404-100ML)와 함께 인큐베이션시켰다. 직립형 현미경 및 CCD 카메라의 도움으로 스폿을 계산하였다.

[0429] 실시예 10 - 형질 세포 농축 방법

[0430] 항체-분비 세포를 종들에서 공지된 마커를 사용하여, 구체적으로, 마우스에서 CD138 형질 세포 마커를 사용하여 농축시켰다 (도 79). 먼저, 승인받은 동물 보호 프로토콜에 따라 마우스를 1주 간격으로 총 3회에 걸쳐 $5x10^6$ 난소 암종 세포 (TOV-21G)를 복강내로 면역화시켰다. 마우스 비장 세포를 PE 항-마우스 CD138 (BD 파민겐)으로

염색시키고, CD138+, 및 음성 대조군으로서 CD138-에 대하여 FACS에 의해 분류하였다 (도 79a). 분류된 및 비분류된 세포 집단으로부터 실시예 9에 기술된 바와 같이 ELISPOT를 수행하였다 (도 79b). 비분류된 비장 세포와 비교하여 CD138+ 집단으로부터 ASC가 20배 증가한 것이 관찰되었다 (도 79c). 비록 여기서 실행하지는 않았지만, 상업적으로 이용가능한 자기 기반 농축 키트 (예컨대, 스템셀 테크놀러지즈, 밀테니(Miltenyi))를 단독으로, 또는 FACS 분류와 함께 조합하여 사용함으로써 농축을 수행할 수 있다.

[0431] 항체-분비 세포를 또한 토끼에서 ER-트래커(ER-Tracker)™ (라이프 테크놀러지즈)를 사용하여 형질 세포에 대한 확립된 마커가 없는 종으로부터 농축시켰다 (도 80). 승인받은 동물 보호 프로토콜에 따라 토끼를 1주 간격으로 4회에 걸쳐 진피내로 인플루엔자 백신으로 면역화시킨 후, 1주 후 부스팅하고, 혈액을 채취하였다. 토끼 PBMC를 ER-트래커 (라이프 테크놀러지즈), 및 마우스 항-토끼 IgG (잭슨 이뮤노리서치)로 염색하고, $ER^{고}IgG^{저}$ 집단에 대하여 FACS에 의해 분류하였다 (도 80a). ELISPOT를 실시예 9에 기술된 바와 같이 수행하여 $ER^{고}IgG^{저}$ 집단 및 비분류된 PBMC 대조군으로부터 항체 분비를 검출하였다 (도 80b). 비분류된 PBMC와 비교하여 $ER^{고}IgG^{저}$ 집단으로부터 항체 분비가 6개 증가한 것으로 관찰되었다 (도 80c).

[0432] 실시예 11 - 인플루엔자 인간 시스템을 이용한 농축

[0433] 인플루엔자 3가 백신으로 면역화시킨 후 7일 경과하였을 때, 인간 환자의 혈액으로부터 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)를 단리시켰다. 세포를 상업적으로 이용가능한 비드 분리용 키트 (스템 셀 테크놀러지즈(Stem Cell Technologies)) 상에서 CD138 발현에 기초하여 농축시키고, 미세유동 장치에 대략 총 44,000개의 세포에 대하여 챔버당 11개의 세포인 평균 밀도로 적재하였다.(평균적으로 이질성 세포 집단는 11개의 세포를 포함). 세포를 2시간 동안 단백질 A 비드와 함께, 및 상이한 색상의 형광 표지화된 H1N1 및 H3N2와 함께 인큐베이션시켰다. 총 171개의 H1N1-양성 챔버 및 199개의 H3N2-양성 챔버 (도 81a)는 각각 0.39% 및 0.45%의 항원 특이 빈도를 나타내었다. 상기 챔버 중 24개의 챔버의 내용물을 회수하고, 다중웰 플레이트에서 밤새도록 배양한 후 (도 81b), 익날 제2 미세유동 장치에 도입하였다. 농축 후, H1N1-양성, H3N2-양성 챔버의 빈도 (도 81c)는 각각 7% 및 6%였으며, 이는 13- 내지 18-배 농축되었다는 것을 의미한다 (도 81d).

[0434] 실시예 12 - 항체 분비의 지표로서의 비드 응집

[0435] 인간 항체를 분비하는 세포 및 비-항체 분비 세포의 혼합물을 미세유동 장치의 챔버에 적재하였다. 세포를 단백질-A 비드의 존재하에서 2시간 동안 인큐베이션시킨 후, 2차 표지화된 항체를 사용하여 염색하였다. 항체-분비 세포를 함유하는 챔버 내의 비드는 응집체를 형성한 반면 (도 82), 분비된 항체 부재하에서 비드는 분산된 상태 그대로 유지되었다 (도 83).

[0436] 실시예 13 - HEL 특이 하이브리도마에 대한 친화도 측정

[0437] 달걀 리소자임 (HEL)에 대한 친화도가 높은 항체를 생산하는 하이브리도마 효과기 세포 (HyHEL5) 집단을 먼저 한계 희석으로 미세유동 장치에 도입하였다. HyHEL 5 세포를 함유하는 챔버를 확인하기 위해 사진 세트를 촬영한 후, HEL에 대하여 친화도가 낮은 항체를 분비하는 제2 하이브리도마 세포 (D1.3) 집단을 같은 장치에 적재하였다. 제2 사진 세트를 촬영하고, HyHEL5 세포 또는 D1.3 세포를 함유하는 챔버를 확인하였다. 토끼 항-마우스 항체로 코팅된 단백질 A 비드를 챔벙 도입하고, 2시간 동안 세포와 함께 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 기간 종료시, 표지화된 항원을 100 fM 내지 10 nM으로 단계식으로 농도를 증가시키면서 장치에 도입하였다. 도 84a는 본 실험의 다이어그램을 보여주는 것이고, 상이하 농도의 챔버의 현미경 사진은 도 84b에 제시되어 있다. 매 단계마다 비드 형광 강도를 측정하고, 모든 챔버에 대해 배경에 대하여 정규화하였다. HyHEL5를 함유하는 챔버는 친화도 측정에 기반하여 D1.3 세포를 함유하는 것으로부터 구별되었다 (도 84c). 단일 세포 HyHEL5 및 D1.3을 함유하는 대표적인 챔버로부터의 예시적인 곡선 및 상기 동일 챔버로부터의 영상은 각각 도 84d 및 도 84e에 제시되어 있다. HyHel5 및 D1.3 항체에 대한 친화도는 각각 30 pM 및 1.5 nM이다 (문헌 [Singhal et al. (2010), *Anal Chem* 82, pp. 8671-8679] (상기 문헌은 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다)).

[0438] 실시예 14 - 챔버 분리를 이용하거나, 또는 이용하지 않은 항원 특이 세포 확인

[0439] 3가 인플루엔자 백신으로 면역화한 후 1주 경과하였을 때 인간 환자의 혈액으로부터 수득된 PBMC로부터 인간 형질 세포를 농축시켰다. 2개의 상이한 미세유동 장치에 세포를 도입하고, 단백질 A 비드 (판독 비드)의 존재하에 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 한 장치 (도 85)에서는 인큐베이션 동안 밸브를 이용하여 이질성 세포 집단 및 판독 비드를 포함하는 개별 챔버를 서로 분리시켰다. 제2 장치 (도 86)에서는, 밸브를 개방 상태로 남겨 두었다. 표지화된 항원 (H1N1 및 H3N2)을 인큐베이션 기간 종료시 15분 동안 장치에 도입한 후, 챔버를 배지로

세척하였다. 도 85 및 도 86은 각 어레이 섹션으로부터의 복수 개의 챔버를 보여주는 것으로, H3N2-양성 히트는 흰색 화살표로 표시되어 있다. 주요 밸브 분리 부재하에서 (도 86), 주변 챔버에서 배경은 주요 밸브가 폐쇄되어 있는 것 (도 85)보다 더 높았다. 그러나, 항체-캐리오버가 음성 및 양성 챔버 사이의 뚜렷한 구별을 막지는 못했다. 유동 채널의 방향은 검은색 화살표로 표시되어 있다.

[0440] 실시예 15 - 친화도 측정에 기반한 신규한 마우스 항체 분비 세포 선별

[0441] 달걀 리소자임으로 면역화된 마우스의 골수로부터 형질 세포를 단리시켰다. 대략 23,800개의 세포를 미세유동 장치내 6,144개의 챔버를 함유하는 3개의 서브어레이에 분포시켰다 (평균 밀도: 약 4개의 세포/챔버). 세포를 토끼 항-마우스 포획 항체로 코팅된 단백질 A 비드와 함께 2시간 동안 인큐베이션시키고, 10 nM의 표지화된 달걀 리소자임으로 세척하고, 영상화하였다. 117개의 항원-특이 챔버가 확인되었고, 미세모세관을 이용하여 그의 내용물을 회수하고, 2,048개의 챔버를 함유하는 제4 서브어레이에 한계 희석으로 재주입하였다. 재주입된 세포를 토끼 항-마우스 포획 항체로 코팅된 단백질 A 비드와 함께 2시간 동안 인큐베이션시킨 후, 농도를 증가시켜 가면서 표지화된 항원에 노출시켰다. 각 단계마다 영상을 촬영하고, 비드 형광 강도를 측정하였다. 도 87은 친화도가 다른 항체를 분비하는 2개의 단일 세포 (표지화된 Mm20 및 Mm25)로부터 얻은 결합 곡선의 일례를 보여주는 것이다. 상기 세포를 하기와 같이 회수하였다.

[0442] 총 882개의 세포를 함유하는 117개의 챔버는 1개 이상의 항체-분비 세포를 함유하는 것으로서 확인되었다. 미세모세관을 이용하여 117개의 챔버 모두의 내용물을 희수하고, 풀링하고, 도 58에 제시된 회수 로봇을 이용하여 원 장치의 남은 2,048개의 중공 챔버 내로 즉시 재주입하였다. 도 98은 세포를 재주입하기 직전의 주입 포트에 인접해 있는 미세모세관의 사진을 보여주는 것이다. 회수 과정은 총 1시간 35분, 또는 챔버당 49초가 소요되었다. 재주입 후, 총 682개의 세포가 분석 챔버에 존재하였고, 이는 회수된 초기 집단 (882개의 세포)의 77%를 나타내었다.

[0443] 재주입된 세포를 하나 이상의 항체 분비 세포에 대하여 즉시 다시 검정하였다. 38개의 챔버가 1 이상의 항체-분비 세포를 함유하는 것으로 확인되었다 (38/117=32%). 이들 38개의 챔버 중 19개가 단일 세포를 함유하였다 (117개 중 16%). 10개의 대조군 챔버 (세포 무함유 대조군 5개 및 비-분비 5개)와 함께 38개의 챔버 모두의 내용물을 RT-PCR을 위해 회수하였다. 회수 과정은 총 2시간 15분, 또는 챔버당 170초가 소요되었다. 48개의 샘플 중 43개 (90%)에서, 챔버내 모든 세포를 모세관으로 회수하여 시각적으로 확인하였다. 48개의 샘플 중 5개에서, 1 이상의 세포가 챔버 하부에 부착된 것으로 관찰되었고, 이는 회수되지 않았다.

[0444] 하기 서열이 검색되었다.

Mm20 (IGHV1-9*01) IGHD2-4*01, IGHD2-4*01, IGHD2-9*02 IGHJ2*01

중쇄 핵산 서열 (서열 번호 1)

[0445]
ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACT
CCCAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGATATCCTGCAAGGCAACTGGCTACACATTCAGAAACTACTGGATAGAGTG
GATAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGA
AAGTGGTAGTATTAATTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTCACTGC
AGATACATCCTCCAACACAGCCTACTTGCAACTCCGCAGCCTGACATCTGAGGAC
TCTGCCGTCTATTATTGTTTTTATGATAATTACGTTTTTGACTACTGGGGCCAaggca
cCACTctcAC

Mm20 경쇄 아미노산 서열 (서열 번호 2):

MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGPELMKPGASVKISC
KATGYTFRNYWIEWIKQRPGHGLEWIGEILPESGSINYNEKF
KGKATFTADTSSNTAYLQLRSLTSEDSAVYYCFYDNYVFDY
WGQGTTL

Mm20 (IGKV4-59*01) IGKJ5*01 경쇄 핵산 서열 (서열 번호 3):

ATGGATTCTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCGGTCATAC
TATCCAGTGGACAAATTGTTCTCATCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGCATCTCCA
GGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAACTCAAGTTTCAGTTACATGCACT
GGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCA
AACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTA
CTCTCTCACAATTAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGTCAG
CAGTGGAGTAGAAACCCCACGTTCGGTGCtggacCaAGCtGa

Mm20 경쇄 아미노산 서열 (서열 번호 4):

MDSQVQIFSFLLISASVILSSGQIVLIQSPTIMSASPGEKVTM
TCSANSSFSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFS
GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSRNPTFGAGTKL

>Mm25 (IGHV2-9-1*01) IGHD2-3*01 IGHJ3*01 중쇄 핵산 서열 (서열 번호 5):

ATGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGGGAAGGAGTCAGGACCTGGCTTG
GTGGCGCCCTCACAGAGCATGTCCATCATGTGCACTGTCTCTGGGTTTTCATTAA
GCAACTATGGTGTACACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGC
TGGGAGTAATTTGGGCTGGTGGAAACACAAATTATAATTCGGCTCTCATGTCCAG
ACTGAGCATCAGCAAAGACAAGTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAAATGAACCG
TCTGGAAACTGATGACACAGCCATGTACTATCTGTGCCAGTGTAGGATGGTTACC
CCTTGCTTACTGGGCCAAGG

Mm25 중쇄 아미노산 서열 (서열 번호 6):

MQAVVSTQSTGKESGPGLVAPSQSMSIMCTVSGFSLSNYGV
HWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGNTNYNSALMSRLSISKDKS
KSQVFLKMNRLETDDTAMYYLCQCRMVTPCLLGQ

>Mm25 (IGKV6-17*01) IGKJ4*01 경쇄 핵산 서열 (서열 번호 7):

ATGGAGTCACAGATTCAGGTCTTTGTATTCGTGTTTCTCTGGTTGTCTGGTGTTGA
CGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGAC
AGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTATTTCTGTAGCCTGGT
ATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCG
GTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACT
TTCACCATCCGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAAC
ATTATAGTACTCCttTCACGTCGGCTcggGaCAAagTG

[0446]

Mm25 경쇄 아미노산 서열 (서열 번호 8):

MESQIQVFVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI
TCKASQDVSISVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRF
TGSGSGTDFTFTIRSVQAEDLAVYYCQQHYSTPFTSARDKV

[0447]

[0448] 실시예 16- HyHEL5 하이브리도마 세포에 대한 $K_{오프}$ 값

[0449] 본 발명의 실시양태에 따른 미세유동 장치에서 HyHEL5 하이브리도마 (저 $K_{오프}$)의 혼합물 및 D1.3 하이브리도마 (고 $K_{오프}$) 세포의 배경을 스크리닝하였다. 각 챔버에 대한 세척 단계 이후 ($K_{오프}$ 측정을 위한) 항원 방출 이전에 Ab 분비와 관련된 형광 강도 (즉, 비드 상의 형광 축적)에 의해 HyHEL5 하이브리도마가 존재하는 챔버를 검출하였다. 도 88은 HyHEL5-양성 웰 중 비드의 남은 형광 수준이 세척 종료시 나머지 웰 중의 것보다 높다는 것을 나타내는 막대 그래프를 보여주는 것이다.

[0450] 실시예 17 - 특이 항원에 대한 인간에서의 희귀 순환 항체-분비 세포 검출

[0451] 한 실시양태에서, 기초 수준으로 존재하는, 즉, 최근 면역화가 이루어지지 않았거나, 또는 항원으로 감염되었을 때의 극도로 희귀한 세포, 예를 들어 항원 특이 형질 B 세포에 대하여 스크리닝하는 데 본 발명이 사용된다. 도 89a는 건강한 환자로부터의 농축된 B 세포 및 적혈구를 함유하는 이질성 세포 집단을 보여주는 것이다. 본 집단은 판독 비드 입자 상에서의 전체 IgG 염색법에 의해 측정된 바와 같이 1개 이상의 항체 분비 세포를 함유

하였다 (도 89b 및 89c). 추가로, 상기 집단은 항체를 포획한 판독 비드에의 표지화된 H1N1 항원의 결합에 의해 측정된 바와 같이, H1N1에 특이적인 항체를 분비하는 효과기 세포를 1개 이상 함유하였다 (도 89d 및 89e). 총 48,000개의 세포 집단에 대하여 1,600개의 챔버로 이루어진 한 어레이에서 챔버 1개당 약 30개의 세포를 사용하여 전체 스크린을 수행하였다. 이를 통해 0.000625%의 빈도로 존재하는 한 효과기 세포를 검출할 수 있었다. 챔버의 세포를 회수하였고 (도 89f), 효과기 세포로부터의 중쇄 및 경쇄를 증폭시켰다.

[0452] 본 검정법은 또한 예를 들어, 천연 감염 이후, 또는 항원으로 면역화시킨 후 약 1주 경과하였을 때, 더욱 풍부하게 존재하는 세포를 찾는 데 사용될 수 있다.

[0453] 실시예 18 - 세포외 및 세포내 생체분자의 동시 분석

[0454] 세포 신호전달 판독 검정법과 관련하여 세포외 및 세포내 성분 분석을 평가하였다. 베타-갈락토시다제 단편 상보성 (디스커브Rx)과 함께 GPCR CXCR4를 과다발현하도록 조작된 CHO 세포를 사용하여 리간드 CCL22의 수용체에의 결합을 정량하였다. 리간드에 의한 수용체의 활성화를 통해 세포내 베타-갈락토시데이트 상보성이 일어났고, 이어서, 화학발광성 신호를 생성하는 베타-갈락토시데이트 기질의 존재하에서 세포를 용해시킴으로써 측정하였다. 다중웰 플레이트에서 수행된 본 검정법의 예는 도 90에 제시되어 있다. 제조사 (디스커브Rx)가 제공한 프로토콜에 따라 검정법을 수행하였다. 3개의 상이한 농도의 효능제/리간드 CCL2 (100 nM, 1 nM, 0.01 nM)를 세포와 함께 인큐베이션시킨 후, 용해/화학발광성 시약을 첨가하였다. 테칸(Tecan) M200 플레이트 판도기를 사용하여 특정 조건에 상응하는 각 웰로부터 광 강도 화학발광성 신호를 획득하였다.

[0455] 본 검정법은 세포 표면 수용체에 특이적인 길항제 항체를 찾기 위해 세포 결합 검정법 (예컨대, 도 77에 제시된 실험)과 함께 사용될 수 있다. 살아있는, 생존가능한 효과기 세포를 회수하는 것이 바람직할 경우, 미세유동 챔버에서 상기 용해 검정법을 수행하기 위해서는 효과기 세포는 판독 세포(들)로부터 분리되어 있어야 한다. 본 검정법은 장치, 예컨대, 실시예 1 및 2에 제시된 것과 같은 장치에서 수행될 수 있다.

[0456] 실시예 19 - 인간 세포로부터의 항체 스크리닝 및 서열 회수

[0457] 계절성 플루 백신을 받은 환자로부터 면역화 후 7일째에 혈액을 수집하였다 (도 91). 상업적으로 이용가능한 키트 (셉메이트(SepMate), 스템셀 테크놀러지즈)를 이용하여 PBMC를 단리시키고, 문헌 [Wrammert et al. (2008), *Nature Letters*, 453:667-671] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술되어 있는, 마커 기반 FACS를 사용하여 형질 세포를 농축시켰다. 세포를 미세유동 장치 중에 한계 희석으로 적재하고, 단백질 A 미소구 (직경 4.9 ㎛, 뱅 라보라토리즈(Bang Laboratories))와 함께 2시간 동안 인큐베이션시켰다. H1N1 및 H3N2 표지화된 항원 (2개의 상이한 색상: 각각 488 nm 및 594 nm 방출)을 어레이에 도입하고 형질 세포와 함께 15분 동안 인큐베이션시키고, 미세유동 챔버의 내용물을 배지로 세척한 후, 영상화하였다. 항원 특이 항체를 함유하는 챔버를 검출한 후, 표지화된 항-인간 항체 (다이라이트 594)를 장치에 도입하고, 15분 동안 인큐베이션시킨 후, 세척하여 IgG 분비 세포의 전체 빈도를 측정하였다. H1N1 및 H3N2, 둘 모두에 대한 단일 형질 세포 교차 반응성의 예는 도 92에 제시되어 있다. 항원-특이 세포를 즉시 회수하거나, 또는 익일 회수를 위해 미세유동 장치에서 밤새도록 배양하였다. 세포는 여전히 생존가능하였고, 일부 경우에는 분열이 일어났다 (예컨대, 도 93).

[0458] 도 94를 참조하면, H1N1 및/또는 H3N2 (플루 특이), 및 IgG (즉, 항원 비특이)에 대해 양성인 8개의 챔버로부터 세포를 회수하고, 용해시켰다. 용해된 세포로부터의 RNA를 역전사시킨 후, 항체 중쇄 및 경쇄 (카파/람다) 특이 PCR을 수행하였다. 8개의 샘플 중 4개의 샘플이 중쇄 및 경쇄, 둘 모두에 대하여 양성 PCR 증폭을 이루었고 (효율 50%, 100% 쌍 형성), 생성물의 예상 크기는 약 400 bp였고, 즉, 샘플 3 (H1N1 양성), 4 (H1N1/H3N2 양성), 5 (H1N1/H3N2 양성), 및 6 (IgG 양성, 그러나, 항원 비특이)이었다. 핵산 래더는 100 염기쌍 증분을 보여주는 것이다. 상기 정제된 PCR 생성물로부터의 생어 서열분석을 통해 본 서열이 중쇄, 카파 및 람다 인간 면역글로불린에 특이적이라는 것을 확인하였다.

[0459] 도 95를 참조하면, 계절성 플루 백신으로 면역화된 환자로부터 수득된 단일 세포로부터 2개의 인간 mAb (Hs-7 및 Hs-15)의 서열이 증폭되었다. 세포를 헤마글루티닌 서브타입 H1N1 및 H3N2에 대하여 교차 반응성을 가지는 mAb를 분비할 수 있는 그의 능력에 기초하여 미세유동 검정법으로 선별하였다. 본원에 기술된 바와 같이 RT-PCR 및 서열분석에 의해 항체 서열이 검색되었다 (도 95a). 공유되는 유전자 사용, CDR 길이, 및 연접부 서열에 의해 자명해지는 바와 같이, 두 mAb는 같은 클론형에 속한다. 돌연변이 좀 더 옅은 회색으로 표시되어 있다 (도 95b). 항체 서열을 클로닝하고, HEK293 세포에서 발현시켜 그의 결합 특성을 입증하였다. 단백질 A 비드를 3시간 동안 세포 상청액과 인큐베이션시키고, 세척하고, 상이한 농도의, 표지화된 H1N1 또는 H3N2와 함께 인

큐베이션시킨 후, 영상화하여 비드 형광성 강도를 측정하였다. 두 mAb 모두 예상대로 교차-반응하였지만, 단일 세포 측정과 함께, H1N1 및 H3N2에 대하여 상이한 친화도를 가졌다 (도 95c).

[0460]

Hs7 (IGHV4-39*01) IGHD3-3*02 IGHJ3*02 중쇄 핵산 서열 (서열 번호 9):

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCCAGATGGGTCCTGTCTCAGGTGCAG
CTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGTCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGACTCCATCACCAGCAGTACTTACGACTGGGGCTGGATCCGTCAGCCCCCCGGGAAGGGCCT
GGAGTGGATTGGCAATGTCTATTATAGAGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAG
TCACCATATCCGTAGACAGGTCCAGGACCCAGATCTCCCTGAGGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCTG
ACACGGCTCTGTATTTCTGTGCGAGACACCCGAAACGTCTAACGGTTTTTGAAGTGGTCAACGCTT
TTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTTTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCTGCT
GACGAGGCACTGAGGACTG

Hs7 중쇄 아미노산 서열 (서열 번호 10):

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKSSETLSLTCTVSGDSITS
STYDWGWIRQPPGKGLEWIGNVYYRGSTYYNPSLKSRVTISVDRSRTQIS
LRLSSVTAADTALYFCARHPKRLTVFEVVNAFDIWGQGQTMVTVFSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTA

Hs7 (IGLV2-14*01) IGLJ3*02 경쇄 핵산 서열 (서열 번호 11):

ATGGCCTGGGCTCTGCTACTCCTCACCCTCCTCACTCAGGGCACAGGGTCCTGGGCCCAGTCTGCC
CTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGCATCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAATCA
GCAGTGACATTGGTGGTTATAGCTCTGTCTCCTGGTACCAAGCGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAAC
TCATGATCTATGATGTCAATAATCGGCCCTCAGGCATTTCTAATCGCTTCTCTGGTTCCAAGTCTGG
CAACACGGCCTCCCTGGCCATCTCTGGGCTCCAGgctgaGGACGAGGCAGATTATTACTGCAGCTTAT
ATACAAGTATCAACGCTTCCATAGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCC
AAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACA

Hs7 경쇄 아미노산 서열 (서열 번호 12):

MAWALLLLTLLTQGTGSWAQSALTQPASVSASPGQSITISCTGISSDIGGY
SSVSWYQAHPGKAPKLMIYDVNNRPSGISNRFSGSKSGNTASLAISGLQA
EDEADYYCSLYTSINASIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS

Hs15 (IGHV4-39*01) IGHD3-3*01 IGHJ3*02 중쇄 핵산 서열 (서열 번호 13):

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTTCTGCTGGTGGCGGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGCTGCAA
CTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCT
GGTGACTCCATCAGCAGTAGTACTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGAAAGGGGCT
GGAGTGGATTGCCTTTATCTTTTATAGCGGGAGCACCTTCTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGT
CACCGTCTCCGTAGACAGGTCCACGAACCAGTTCTCCCTGAGGCTGAAGTCTGTGACCGCCGCAGA
CACGTCCAGATATTACTGTGCGAGACACCCAAAACGTATCTCGATTTTTGAAGTGGTCAACGCTTT
TGATATCtGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT
CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCTGCTG
ACGAGGCACTGAGGACTG

Hs15 중쇄 아미노산 서열 (서열 번호 14):

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISS
STYYWGWIRQPPGKGLEWIAFIFYSGSTFYNPSLKSRVTVSVDRSTNQFS
LRLKSVTAADTSRYYCARHPKRISIFEVVNAFDIWGQGTMVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTA

>Hs15 (IGLV2-14*01) IGLJ2*01 IGLJ3*01 경쇄 핵산 서열 (서열 번호 15):

ATGGCCTGGACTCTGCTATTCCTCACCCTCCTCACTCAGGGCACAGGGTCCTGGGCCCAGTCTGCC
CTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCACCTGCACTGGAATC
AGCAGTGACGTTGGTGCTTATAATTCTGTCTCCTGGTACCAGGCAGTACCCAGGCAAATCCCCCAAG
CTCATGATTTATGATGTCAGTAATCGGTCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTG
ACAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTTCTTATTTCTGCAGCT
TATATAGAAGCAGCACCACTTCCGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTACGTCAG
CCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCC
ACA

Hs15 경쇄 핵산 서열 (서열 번호 16):

MAWTLLFLTLLTQGTGSWAQSALTQPASVSGSPGQSITITCTGISSDVGA
YNSVSWYQQYPGKSPKLMIYDVSNRSSGVSNRFSGSKSDNTASLTISGLQ
AEDEASYFCSLYRSSTTSVVFGGGTKLTVLRQPKAAPSVTLFPPSS

[0461]

[0462] 실시예 20 - 토끼의 이종성 세포 집단으로부터의 항체 스크리닝 및 서열 회수

[0463] 토끼를 계절성 플루 백신으로 면역화하였다. 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)를 회수하고, 직접 스크리닝하거나, 또는 유세포 분석법으로 분류하여 형질 세포에 대해 농축시켰다. 세포를 미세유동 장치에 주입하고, H1N1 및 H3N2 특이성에 대하여 검정하였다. 형광 기반 검출을 위해 사용되는 단백질 A 코팅된 비드 또한 관찰할 수 있었다. 세포를 비드와 함께 2시간 동안 인큐베이션시킨 후, 형광 표지화된 항원을 15분 동안 도입하고, 배지를 사용하여 비결합 항원을 세척하였다. 도 96a 미 96b는 각각 H1N1- 및 H3N2-양성 챔버의 예를 보여주는 것이다.

[0464] 도 97a는 항원 특이 신호에 대해 스크리닝된 4개의 미세유동 챔버에서의 수개의 토끼 세포의 명시양 영상을 보여주는 것이다. 도 97b는 토끼 항체 생산 세포로부터의 H1N1 항원 특이 항체 스크리닝을 보여주는 것이다. 신

호는 매우 낮았고, 따라서, H1N1 특이 항체를 발현하는 세포는 없는 것으로 보였다. 도 97c는 토끼 항체 생산 세포로부터의 H3N2 항원 특이 항체 결합을 보여주는 것이다. 신호는 챔버마다 가변적이었지만, 모든 챔버는 H3N2 결합에 대해 양성이었다. 자동 로봇 및 미세모세관을 이용하여 미세유동 챔버로부터 세포 회수를 수행한 후, 2% Egel (인비트로겐) 상에서 중쇄 및 경쇄 항체 특이 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 생성물을 전개시켰다. 시험된 4개의 샘플의 경우, 4개의 중쇄 중 3개, 및 4개의 경쇄 중 4개에 대하여 밴드 (약 400/500 bp)를 관찰할 수 있었다 (도 97d). 생어 서열분석 결과, 2개의 중쇄 서열은 토끼 중쇄인 반면 (www.imgt.org), 하나는 다중 피크를 포함하는 것으로 나타났는데, 이는 챔버내 1초과의 세포가 항체 분비 세포일 수 있다는 것을 제안하는 것이다. 4개 중 2개의 경쇄는 토끼 경쇄인 것으로 측정되었고, 나머지 2개는 다중 피크를 보였다. 챔버 1 및 3으로부터의 쌍을 이룬 중쇄 및 경쇄는 이질성 세포 집단으로부터의 단일 효과기 세포의 서열을 측정할 수 있다는 것을 보여주었다. 단일 피크를 가지는 가변 영역에 대하여 회수된 서열은 하기와 같았다:

중쇄 1 (서열 번호 17):

GCTAGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTG
TCAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCAT
AGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGCAATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGGC
TGGAATACATCGGAATCATTAGTAGCAGTGGTATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGA
TTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGACAATCACCGATCTGCAACCTTCAGAC
ACGGGCACCTATTTCTGTGCCAGAGGGTCTCGTTATAGTGCTTTTGGTGCTTTTGATACCTGGGGCC
CAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCAAGCTTNAN

중쇄 3 (서열 번호 18):

TTTGGCTAGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCC
AGTGTCAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACC
TGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGCAATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTAATAATAATGGTGACACATACTACGCGAGCTGGCCGAAAGG
CCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGG
ACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGATCGTGGTAATAGTTATTACTTTGGATTGGACTACTTTAA
CTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCAAGCTTTATAN

경쇄 1 (서열 번호 19):

CTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCTTCGAATTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGG
AGGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTAATAGTTGGTTA
TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACAAGGCATCCAATCTGGCA
TCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGAC
CTGGAGTGTGNCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAAGCNATTATGCTACTAGTAGTGTTGATTAT
NATGCTTTCGGCGGAAGGACCGAGGTGGTGGTCAANACTGCGGCNGTANTANTNNN

경쇄 3 (서열 번호 20):

TGCAGCTAGCCACCATGGACACGAGGGCCCCCATCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCC
AGGTGCCAGGTGTGCCCTTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCA
CAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTGATAGTTGGTTATCCTGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGCAGCGTCCCAGGCTCCTGATCTATTATGCATCCAATCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGT
TCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAATACACTCTCACCATCAGCGGCGTGGAGTGTGCCGATGCT
GCCACTTACTACTGTCAAGAGGGTTATAGTAGTGGTAATGTTGATAATGTTTTCGGCGGAGGGACC
GAGGTGGTGGTCAAAACTGCGNCCGCTATAN

[0465]

[0466] 실시예 21 - 인간 서열로부터의 항체 발현 및 입증

[0467] 리포솜 기반 형질감염을 사용하여 HEK293 세포에서 인간 항-MCP1 항체 발현을 수행하였다. 단백질 A 코팅된 비드 상에서 성장 배지로부터 발현된 항체를 침전시키고, 형광 표지화된 MCP-1 항원에 대하여 시험하였다. 재조합 항체의 친화성을,상업적으로 이용가능한 안정한 CHO 세포주 (ATCC® PTA-5308™)에 의해 제조된 동일 아미노산 서열의 항체와 비교하였다 (도 99).

[0468] 클론 Hu-11K2-3f2-H2. 중쇄 및 경쇄 가변 서열을 합성하고, 각각 pFUSEss-CHIg-hG1 및 pFUSE2-CLIg-hk 발현 벡터로 클로닝하였다.

aMCP1-중쇄 (서열 번호 21):

GAATTCCATGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGA
AGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCCTGACCATCAGCGACACCTACATGCACTGGGTGCGCCAGGCT
CCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCGCCAACGGCAACACCAAGTTCGACCC
CAAGTTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGA
GCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGCGTGTTCGGCTTCTTCGACT
ACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCATCTGCTAGC

aMCP1-경쇄 (서열 번호 22):

ACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTCGTGACG
AATTCAGCCATGGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAG
AGTGACCATCACATGCAAGGCCACCGAGGACATCTACAACCGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATTAGCGGAGCCACCAGCCTGGAAACCGGCGTGCCAAGCAGA
TTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACTACACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTC
GCCACCTACTACTGCCAGCAGTTTTGGAGCGCCCCCTACACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAA
ATCAAGCGTACG

[0469]

[0470] 실시예 22 - 단일 세포로부터의 마우스 서열 회수에 이어 입증을 위한 항체 클로닝 및 발현

[0471] D1.3 및 HyHEL5를 한계 희석으로 미세유동 장치에 순차적으로 적재하였다. 장치에 각 세포 유형을 도입한 후, D1.3 및 HyHEL5 세포의 위치를 기록하기 위해 사진 세트를 촬영하였다. 세포를 토끼 항-마우스 포획 항체로 코팅된 단백질 A 비드 및 10 nM의 표지화된 달걀 리소자임과 함께 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 로봇으로 제어되는 미세모세관을 이용하여 단일 항체-분비 세포를 회수하고, RT-PCR을 위해 튜브로 옮긴 후, 항체 서열을 회수하였다. 음성 대조군으로부터 각 단일 세포 사이에서 대조군 챔버를 회수하였다. 도 100은 2개의 단일 세포로부터의 겔 중쇄 및 경쇄를 보여주는 것으로, 대조군에서는 어떤 신호도 없었다. HyHEL5 (고 친화성) 및 D1.3 (저 친화성) 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 서열을 합성하고, pFUSEss-CHIg-mG1 및 pFUSE2ss-CLIg-mk 발현 벡터로 클로닝하였다. 항체를 HEK293 세포주에서 생산하고, 토끼 항-마우스 항체로 커버링된 단백질 A 코팅된 비드 상에서 포획하였다. 농도를 증가시키면서 형광 표지화된 리소자임을 사용하여 친화성을 시험하였다 (도 101).

D1.3-중쇄 (서열 번호 23):

ATGCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCAC
ATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAACCGGCTATGGTGTAAACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAA
GGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATTTGGGGTGATGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAAT
CCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAC
ACTGATGACACAGCCAGGTACTACTGTGCCAGAGAGAGAGATTATAGGCTTGACTACTGGGGCCA
AGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCTAGC

[0472]

D1.3-경쇄 (서열 번호 24):

ATGGACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCGTCTGTGGGAGAAACTGTCACCATC
ACATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATC
TCCTCAGCTCCTGGTCTATTATACAACAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAG
TGGATCAGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTA
CTGTCAACATTTTTGGAGTACTCCTCGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTCGAG

HyHEL5-중쇄 (서열 번호 25):

ATGGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCAGGGGCCTCAGTGAAGATATC
CTGCAAAGCTTCTGGCTACACATTCAGTGACTACTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGAC
ATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTAGCACTAATTACCATGAGAGATTCA
AGGGCAAGGCCACATTCACTGCAGATACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTG
ACATCTGAAGACTCTGGCGTCTATTACTGCCTCCATGGTAACTACGACTTTGACGGCTGGGGCCAA
GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCTAGC

HyHEL5-경쇄 (서열 번호 26):

ATGGATATCGTTCTCACACAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATG
ACCTGCAGTGCCAGTTCAAGTGTAAATTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACTTCCCCC
AAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGTGGCAGTGGG
TCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGACTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGC
CAACAGTGGGGTCGTAACCCCACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTCGAG

[0473]

[0474] 실시예 23 - 미세유동 스크리닝으로부터 수득된 신규한 마우스 항체 서열의 입증

[0475] 달걀 리소자임으로 면역화된 마우스로부터 비장세포를 단리시키고, 미세유동 장치에서 그의 항체 분비에 대해 스크리닝하였다. 항원 특이 세포 R05C14로부터 서열을 회수하고, 클로닝하고, HEK293 세포에서 발현시켰다. 토끼 항-마우스 항체로 코팅된 단백질 A 비드 상에 항체를 포획시키고, 10 nM 표지화된 달걀 리소자임과 함께 인큐베이션시키고, 형광 강도를 측정하여 항원 결합을 확인하였다 (도 102).

R05C14-중쇄 가변 (서열 번호 27):

TGGAAGGTGGTGCACACTGCTGGACAGGGATCCAGAGTTCCAGGTCACTGTCACTGGCTCAGGGA
AATAGCCCTTGACCAGGCATCCCAGGGTCACCATGGAGTTAGTTTGGGCAGCAGATCCAGGGGCC
AGTGGATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCTTGGCCCCA
GCAGTCCCCGTCCCAGTTTGCACAGTAATATGTGGCTGTGTCCTCAGGAGTCACAGAAATCAACTG
CAGGTAGCACTGGTTCTTGGATGTGTCTCGAGTGATAGAGATTCGACCTTTGAGAGATGGATTGTA
GTAAGTGCTACCACTGTAGCTTATGTACCCCATATACTCAAGTTTGTTCCCTGGGAATTTCCGGATC
CAGCTCCAGTAATCATTGGTGATGGAGTCGCCAGTGACAGAACAGGTGAGGGACAGAGTCTGAGA
AGGTTTCACGAGGCTAGGTCCAGACTCCTGCAGCTGCACCTCGAATTCCCA

R05C14-경쇄 가변 (서열 번호 28):

TTGGTCCCCCCTCCGAACGTGTACGGCCAGTTGTTACTCTGTTGACAGAAATACATTCCAAAATCTT
CAGTCTCCACACTGATGATACTGAGAGTGAAATCCGTCCCTGATCCACTGCCACTGAACCTGGAGG
GGATCCCAGAGATGGACTGGGAAGCATACTTGATGAGAAGCCTTGGAGACTCATGTGATTTTTGTT
GATACCAGTGTAGGTTGTTGCTAATACTTTGGCTGGCCCTGCAGGAAAGACTGACGCTATCTCCTG
GAGTCACAGACAGGGTGTCTGGAGACTGAGTTAGCACAATATCACCTCTGGAGGCTGAAATCCAG
AAAAGCAAAAAA

[0476]

[0477] 실시예 24 - 효과기 세포 항체의 증폭을 위한 서열 회수

[0478] 하기 프로토콜 및 프라이머를 사용하여 마우스, 인간 또는 토끼로부터 항체 서열을 회수하였다.

[0479] 역전사 (RT) 및 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 위한 시약은 하기 표 7에 제공되어 있다.

표 7

표 7.

역전사 (RT) 반응		PCR 반응	
RNAseIn RNAse 억제제	2 U/μL	PCR 완충제	1x
베타인	1M	dNTPs	200 nM each
제 1 str 및 RT 완충제	1x	$MgCl_2$	1 mM
DTT	2.5 mM	효소 (KOD)	0.008 U/uL
MgCl	2 9 mM	범용 TS 프라이머	600 nM
RT 효소 (M-MLV)	1 U/μL	범용 RT 프라이머	500 nM
주형 프라이머 프라이머	1.2 μM	장쇄의 유전자 특이 프라이머	100 nM
RT 프라이머	40 nM each		

[0480]

[0481] 하기 RT-PCR 열적 사이클링 프로토콜은 다음과 같았다:

[0482] RT: 72℃에서 3 분. 42℃에서 90 분. 85℃에서 10 분.

[0483] 가열 출발: 95℃에서 2 분.; 변성: 95℃에서 15 초.; 신장: 72℃에서 15 초.; 어닐링: 하기 온도에서 15 초.: 72℃에서 3 사이클; 70℃에서 3 사이클; 68℃에서 3 사이클; 66℃에서 3 사이클; 64℃에서 3 사이클; 62에서 6 사이클; 60℃에서 20-30 사이클.

[0484] RT-PCR 실험에서 사용된 프라이머는 하기 표 8에 제공되어 있다:

표 8

표 8. 프라이머 목록

명칭	서열	서열 번호
주형 스위칭 프라이머	GCAGTGGTATCAACGCAGAGTACG(r)G(r)G(r)	서열 번호 29
범용 프라이머 TS	GCAGTGGTATCAACGCAGAGTACG	서열 번호 30
범용 프라이머 RT	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAG	서열 번호 31
인간 RT 프라이머 HsRT-01	gtctgaggactg	서열 번호 32
인간 RT 프라이머 HsRT-02	tgctctgtgacac	서열 번호 33
인간 RT 프라이머 HsRT-03	ggtgtacaggtcc	서열 번호 34
인간 RT 프라이머 HsRT-04	cagagaccgtgag	서열 번호 35
인간 RT 프라이머 HsRT-05	tcatgtagtagctgttc	서열 번호 36

[0485]

표 8. 프라이머 목록

명칭	서열	서열 번호
인간 RT 프라이머 HsRT-06	ctcaggactgatgg	서열 번호 37
인간 RT 프라이머 HsRT-07	gagtcctgagtactg	서열 번호 38
인간 RT 프라이머 HsRT-08	gttgttgctttgtttg	서열 번호 39
인간 RT 프라이머 HsRT-09	ttgttgctctgtttg	서열 번호 40
장쇄의 유전자 특이 프라이머 HsN2U_01	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAGACCAGGCAGCCCAGGGC	서열 번호 41
장쇄의 유전자 특이 프라이머 HsN2U_02	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAGCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTGAAGCTCC	서열 번호 42
장쇄의 유전자 특이 프라이머 HsN2U_03	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAGAGCAGGCACACAACAGAGGCAGTTCC	서열 번호 43
장쇄의 유전자 특이 프라이머 HsN2U_04	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAGGCCCAGAGTCACGGAGGTGGCATTG	서열 번호 44
장쇄의 유전자 특이 프라이머 HsN2U_05	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAGGCATGCGACGACCACGTTCCCATCTTG	서열 번호 45
장쇄의 유전자 특이 프라이머 HsN2U_06	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAGGCAGCCAACGGCCACGCTG	서열 번호 46
장쇄의 유전자 특이 프라이머 HsN2U_07	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAGATGCCAGGACCACAGGGCTGTTATCCTTTG	서열 번호 47
장쇄의 유전자 특이 프라이머 HsN2U_08	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAGAGTGTGGCCTTGTTGGCTTGGAGCTC	서열 번호 48
장쇄의 유전자 특이 프라이머 HsN2U_09	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAGACCACGTTCCCATCTGGCTGGGTG	서열 번호 49
RT 마우스 프라이머 MmRT_01	acagtcactgagct	서열 번호 50
RT 마우스 프라이머 MmRT_02	ctttgacaaggcatc	서열 번호 51
RT 마우스 프라이머 MmRT_03	ccacttgacattgatg	서열 번호 52
RT 마우스 프라이머 MmRT_04	ctcttctccacagtg	서열 번호 53
장쇄의 유전자 특이 마우스 프라이머 Mmn2_01	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCagactgcaggagagctgggaaggtgtg	서열 번호 54
장쇄의 유전자 특이 마우스 프라이머 Mmn2_02	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCaggacagctgggaaggtgtgcacac	서열 번호 55
장쇄의 유전자 특이 마우스 프라이머 Mmn2_03	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCtcaagaagcacacgactgaggcacctcc	서열 번호 56
장쇄의 유전자 특이 마우스 프라이머 Mmn2_04	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCttgccttccaggccactgtcacacc	서열 번호 57
장쇄의 유전자 특이 마우스	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCatccagatgtgtcactgcagccagggac	서열 번호 58

[0486]

표 8. 프라이머 목록

명칭	서열	서열 번호
프라이머 Mmn2_05		
장쇄의 유전자 특이 마우스 프라이머 Mmn2_06	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGCAccttccagtc cactgtcaccacacctg	서열 번호 59
RT 토끼 프라이머 OcRT_01	TGAAGCTCTGGAC	서열 번호 60
RT 토끼 프라이머 OcRT_02	CACACTCAGAGGG	서열 번호 61
RT 토끼 프라이머 OcRT_03	TTCCAGCTCACAC	서열 번호 62
RT 토끼 프라이머 OcRT_04	AGGAAGCTGCTG	서열 번호 63
RT 토끼 프라이머 OcRT_05	ACACTGCTCAGC	서열 번호 64
RT 토끼 프라이머 OcRT_06	TCACATTCAGAGGG	서열 번호 65
RT 토끼 프라이머 OcRT_07	GTCTTGTCCACTTTG	서열 번호 66
RT 토끼 프라이머 OcRT_08	CTCTGTTGCTGTTG	서열 번호 67
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgHA1A7-12	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGgatcaggcagcc gacgacc	서열 번호 68
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgKC1	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGgtgggaagatga ggacagtaggtgc	서열 번호 69
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgKC1KC2	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGagatggtgggaa gaggaggacag	서열 번호 70
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgLC4L5L6	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGccttgttgtccttg agttcctcagagg	서열 번호 71
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgA2A6	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGcggatcaggcag ccgatgac	서열 번호 72
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgA4A5	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGcaggtcagcggg aagatgatcg	서열 번호 73
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgLC1C2C3	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGcactgatcagac acaccagggtgg	서열 번호 74
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgG	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGcaccgtggagct gggtgtg	서열 번호 75
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgA3A5	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGgatcaggcagcc ggcgatc	서열 번호 76
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgM	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGggagacgagcg ggtacagagttg	서열 번호 77
장쇄의 토끼 유전자 특이 프라이머 Oc-PCR-IgE	AGACAGTCCTCAGTGCCTCGTCAGtctgcagcagga ggccaag	서열 번호 78

[0487]

[0488] 도 103a는 상기 기술된 바와 같이 제조된 PCR 앰플리콘, 및 60℃ 내지 40℃ 범위의 RT 범위의 구배를 시험하는 것에 관한 현미경 사진을 보여주는 것이다. 주형은하이브리도마 세포 (D1.3)로부터 정제된 200 pg (~10개의 세포 등가물)의 RNA이었다. 가장 우측에 있는 래인은 KOD 폴리머라제를 사용하였을 때의 최적화된 조건을 보여주는 것이다. HV 및 LV 앰플리콘은 450 내지 550 bp인 것으로 예상되며, 여기서, 강력한 밴드가 관찰되었고; 상기 영역은 또한 일부 비특이 생성물도 포함하였다. 도 103b를 참조하면, 400 내지 600 bp로부터의 밴드를 추출하고, 중쇄 상의 불변 영역에 어닐링되는 프라이머를 사용하여 생어 서열분석을 수행하였다. 미량의 것은 cDNA 합성 동안 MMLV에 의해 첨가된 CCC에 의해 연결된, 주형 교환 올리고 및 cDNA 사이의, MMLV에 의해 제조된 연접부를 보였다. 서열을 정열하였고, D 1.3의 중쇄의 가변 영역 서열과 매칭되는 것으로 확인되었다.

[0489] 실시예 25 - 장치로부터 회수된 단일 세포의 NGS 서열분석

[0490] 항체 서열을 검색하는 다른 접근법은 주형-교환 서열분석 및 차세대 서열분석을 조합한 것이다. 도 59를 참조하면, 단일 세포를 미세원심분리기 튜브에 증착시키고, 중쇄 및 경쇄의 불변 영역을 표적화하는 다중 유전자-특이 프라이머로부터 cDNA를 생성한다. MMLV 효소의 주형-교환 활성을 사용하여 생성된 cDNA의 3' 단부 상에 주형-교환 올리고의 역 보체를 첨부한다. 중쇄 및 경쇄의 불변 영역에 어닐링되는 다중 프라이머, 및 주형 교환 올리고뉴클레오티드 카피에 상보적인 범용 프라이머를 사용하는 반-네스티드 PCR을 사용하여 cDNA를 증폭시키고, 각각의 단일 세포 앰플리콘에 특이적인 인덱싱 서열을 도입한다. 이어서, 앰플리콘을 풀링하고, 서열분석하였다.

[0491] 이질성 세포 집단으로부터 서열을 회수하는 또 다른 접근법은 미세유동 단일 세포 항체 분석법을 Ig-Seq와 커플링하는 것이다 (도 104a). 면역화 후, ASC를 동물로부터 수집하고; 분획을 미세유동 장치 상에서 분석하고, 그 나머지는 Ig-Seq를 위한 벌크 앰플리콘 라이브러리의 구축을 위해 사용한다. 미세유동 장치로부터, 총 96개의 인덱싱된 단일 세포 (SC) 라이브러리 및 96개의 인덱싱된 저 다양성 (LD) 라이브러리를 MiSeq 상에서 서열분석하기 위해 풀링한다. 도 104b에 클러스터로 제시된 바와 같이, 벌크 라이브러리 분석을 사용하여 면역 반응에

존재하는 HV 및 LV 클론형을 측정한다. SC 라이브러리는 항원 특이성인 것으로 확인된 가장 풍분하게 존재하는 클론형으로부터 mAb의 쌍을 이룬 HV 및 LV 서열 쌍을 제공한다. LD 라이브러리를 통해 항원 특이성이거나, 또는 항원 비특이성인 HV 및 LV 서열을 추가로 확인할 수 있다. 도 104c에 도시된 바와 같이, 또한 LD 라이브러리를 사용하여 LD 라이브러리 간의 HV 및 LV 서열의 동시 출현에 대한 분석에 의해 쇄 쌍 형성을 추정한다. 도 104b에서 * (항원 특이) 및 × (비특이)으로 표시된 결합 상태, 클론형 쌍 형성의 정렬에 의해 특이 서열에 대한 결합 상태 및 쇄 쌍 형성에 관한 정보를 통해 벌크 샘플을 해석할 수 있다.

[0492] 실시예 26 - 광학적으로 코딩된 비드를 사용하는 다중화된 비드 검정법

[0493] 본 실시예의 다중화된 비드 기반 검정법을 통해 같은 챔버 내의 항체 분비 세포로부터의 수개의 상이한 항원 특이 항체를 측정할 수 있다. 형광 강도 코딩된 비드 (예컨대, 스타파이어 레드(Starfire Red)™ 염료 비드, 뱅즈 라보라토리즈(Bangs Laboratories))를 사용하여 전통적인 술포-NHS (N-히드록시술포숙신이미드)/1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 단백질 커플링 전략법 (피어스(Pierce))을 이용함으로써 상이한 항원 특이 항체를 추적할 수 있다. 이어서, 스타파이어 레드™ (UV 내지 적외선에서 여기, 675 nm에서 최대 방출) 및 항원 특이 형광 신호를 측정하고, 정량화할 수 있다.

[0494] 형광 코딩된 비드의 3개의 서브세트를 함유하는 스타파이어 레드™ 염료 비드 (직경 5.5 ㎛)를 상이한 2012-2013 계절성 플루 특이 항원으로 코팅하였다 (도 105a). (각각 최저 강도 내지 최고 강도의 스타파이어 레드™ 강도를 보이는) 비드를 H1N1 (A/캘리포니아/7/2009 (H1N1) pdm09-유사 균주), H3N2 (A/빅토리아/361/2011 (H3N2)-유사 균주) 및 B 균주 (B/위스콘신/1/2010-유사 균주) 항원 (프로테인 사이언스 코포레이션(Protein Science Corp.))과 커플링시켰다.

[0495] 비드를 1:1:1의 비로 혼합하고, 미세유동 장치에 주입하였다 (도 105b). 스타파이어 레드™ 염료 형광성 측정을 통해 비드의 각 특정의 서브세트의 위치가 밝혀졌고, 항원 특이 항체 결합이 추가로 후속하여 추적될 수 있다 (도 105c). 이어서, 배지 중에 용해된 토끼 항-H1N1 특이 항체 (시노 바이오로지칼)를 400 pg/mL 농도로 장치에서 유동시키고, 45분 동안 인큐베이션시켰다. 다이라이트 488 (잭슨 이뮤노리서치)로 표지화된 항-토끼 IgG를 장치로 전달하고, 형광성 영상화를 수행하였다. H1N1 코팅된 비드 상에서 양성 신호가 뚜렷이 관찰되었고 (최소로 밝은 스타파이어 레드™ 비드, 화살표로 표시) (도 105d), H3N2 및 B 균주 특이 항원으로 표지화된 비드 상에서는 어떤 비특이 결합도 검출되지 않았다 (도 105e).

[0496] 실시예 27 - 미세유동 아포프토시스 효과기 검정

[0497] TNF-α를 중화시키거나, 또는 그의 수용체를 차단하는, 항체 및 그 항체를 생산하는 효과기 세포를 찾기 위한 기능성 세포외 효과 검정법을 수행하였다. 표적 L929 세포 (판독 세포)에 미치는 TNF-α의 효과를 정량화하기 위해, 세포를 $DiOC_{18}$로 염색시키고, 다중웰 플레이트 중 1 ㎍/mL의 악티노마이신-D 및 상이한 농도의 TNF-α의 존재하에서 인큐베이션시켰다. 24시간 후, 세포를 프로피디움 아이오다이드 (PI)로 대조 염색시키고, 현미경하에 $DiOC_{18}$-염색된 세포로부터 PI-염색된 세포의 분획을 계수하여 세포 생존능을 측정하였다. L929 세포에서의 TNF-α의 용량 반응은 도 106a에 제시되어 있다.

[0498] 제2 실험에서, L929 세포를 CFSE로 염색시키고, 미세유동 장치에 적재하고, 10 ㎍/mL of 악티노마이신-D 및 10 ng/mL의 TNF-α의 존재하에서 인큐베이션시키고, 저속 촬영 영상화에 의해 추적하였다 (도 106b).

[0499] 실시예 28 - 미세유동 세포 신호전달 효과기 검정

[0500] TNFα에 대한 항체의 기능-기반 선별을 위해 핵 또는 세포질 형광 국재화에 기반한 TNFα 기능성 검정법이 개발되었다. 사용된 판독 세포주는 앞서 문헌 [Tay et al. (2010). *Nature* 466, pp. 267-71] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술된 바 있다. TNFα-유도 활성화시, 형광 표지화된 NF-κB 전사 인자 서브유니트는 세포질에서 핵으로 수송된다. 도 107a는 TNFα 기능성 검정에 대한 저속 촬영 형광 영상을 보여주는 것이다. TNFα 리간드 부재하에서, 형광 국재화는 세포질에서 이루어진다 (도 107a, 상부 패널). TNFα 리간드 (10 ng/mL)에 의한 활성화시, 세포질에서 핵으로의 형광 변화가 관찰된다 (도 107a, 중간 패널). TNFα 리간드 (10 ng/mL) 이외에도, TNFα 리간드를 중화시키는 항체를 함유하는 세포 상청액의 존재하에서, 형광 국재화는 세포질에서 그대로 유지되는데 도 107a, 하부 패널), 이는 TNFα 리간드가 항체에 의해 효과적으로 중화되었고, 이로써, NFκB 신호전달이 방해되었다는 것을 나타낸다. 각 조건에 대한 활성화된 세포의 분율은 도 107b에 제시되어 있다.

[0501] 실시예 29 - 미세유동 증식 및 자가포식 효과기 세포 검정

[0502] HER2를 과다발현하고, LC3-GFP 자가포식 리포터로 조작된 인간 유방암 세포주 (SBR3)를 미세유동 장치에 적재하고, 3일 동안 배양하여 상기 세포주를 판독 세포로 사용할 수 있는지의 실행 가능성을 측정하였다 (도 108). 개별 SKBR3 세포 집단을 개별 미세유동 챔버에 제공하였다. 명시야 및 형광 저속 촬영 영상화를 통해 시간 경과에 따라 세포 개수가 증가하는 것으로 나타났다 (도 108). 본 결과는 SBR3 세포가, SKBR3 세포의 증식을 차단할 수 있는 효과기 세포의 능력/성향을 측정하는 세포외 효과 검정법에서 판독 세포로서 적합하게 사용될 수 있다는 것을 나타내었다. SKBR3 세포주를 이용함으로써 자가포식을 조절하는 항체에 대해서도 또한 스크리닝을 할 수 있다.

[0503] 실시예 30 - 항원 특이 T 세포 검출 및 회수

[0504] 도 109를 참조로 하여, 인간 환자로부터의 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)를 미세유동 장치에 적재하고, 밤새도록 시토메갈로바이러스, 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스 및 인플루엔자바이러스 (CEF) 펩티드로부터 유래된 바이러스 항원 풀을 10 ng/mL로 자극시켰다. 도 109a는 PBMC 및 인터페론-γ (IFNγ) 포획 비드가 적재된 미세유동 챔버의 명시야 영상을 보여주는 것이다. CEF 펩티드로 자극하였을 때, 활성화된 항원 특이 T 세포에 의해 분비된 IFNγ는 항-IFNγ 항체로 코팅된 관능화된 비드 상에서 포획되었고, 형광 표지화된 2차 항체로 검추되었다. 도 109b는 활성화된 항원 특이 T 세포를 함유하는, 도 109a로부터의 양성 챔버의 형광성 영상이다. 활성화된 세포를 5일 동안 100 U/mL의 인터루킨-2 (IL-2)로 확장시킨 후(도 109c), 이어서, 회수하였다. 비교를 위해 같은 환자로부터의 말초 혈액 단핵구 세포 중 CEF-특이 T 세포의 빈도를 ELISPOT 및 미세유동 비드 검정법에 의해 측정하였다. 고감도의 미세유동 검정법을 통해 ELISPOT보다 더 높은 빈도의 항원 특이 T 세포를 검출할 수 있었다 (도 109d).

[0505] **실시예 31 - 신호전달에 대한 BAF3 PDGFRα 검정**

[0506] PDGFRα에 대한 항체에 대한 기능 기반 선별을 위해 세포 생존 검정법을 생성하였다. 생존 및 성장을 위해 사이토카인 IL-3에 의존하는 BaF3 현탁 세포주를 CMV 프로모터 (오리진(Origene))에 의해 구도되는 인간 PDGFRα으로 천공시키고, 안정하게 발현되는 클론을 생성하였다. Ba/F3 세포에서 과다발현된 PDGFRα가 IL-3 신호전달의 요건을 대신하였다; IL-3 부재하에서 BaF3 세포는 정지하고 사멸된 반면, PDGF 리간드 존재시에는 PDGFRα 신호전달이 상기 세포를 구제함에 따라 세포는 생존하였고, 현미경법에 의해 쉽게 검출되는, 증식, 형태 변화, 및 이동성/화학주성을 비롯한, 유사 분열 촉진 반응이 일어났다. 형광 판독과 같이, BaF3 세포는 또한 세포 핵을 표지화하는 녹색 형광성 단백질 (YFP)에 융합된 히스톤 2B를 안정하게 발현하였다. 도 110은 세포 생존 PDGFRα 기능성 검정 입증을 보여주는 것으로 이는 T=48시간 동안 리간드 부재하에서 또는 PDGF-AA 존재하에서 PDGFRα 및 히스톤 2B-YFP를 발현하는 BaF3 클론을 보여주는 것이다. 리간드 부재하에서, BaF3 세포는 아포프토시스되고, YFP 형광을 잃게 된다 (이는 가능하게는 아포프토시스시 단백질 분해의 결과일 수 있다) (도 110a). PDGF-AA 리간드의 존재하에서는 YFP 형광 판독에 의해 제시되는 바와 같이, 세포 생존 및 성장이 구제된다 (도 110b).

[0507] 상기 검정법을 수행하는 동안 항체-분비 세포가 생존가능한 상태로 유지될 수 있는지 여부를 시험하기 위해, 마우스 비장세포를 형질 세포에 대하여 농축시키고, 미세유동 장치에서 PDGFRα를 과다발하는 BaF3 세포와 함께 공동으로 인큐베이션시켰다. (H2B-YFP를 함유하는) 판독 세포 집단과 효과기 세포 집단을 구별짓기 위해 실험 시작시 명시야 및 형광성 영상을 촬영하였다. IL-3의 존재하에서 세포를 배양하고, 48시간 동안 저속 촬영 영상화에 의해 추적하고, 이 시점에 2시간 인큐베이션을 위하여 항-마우스 항체 포획 비드를 장치에 도입하였다. 다이라이트-594 표지화된 항체를 이용하여 항체-분비 세포를 함유하는 챔버를 확인하였다. 도 110c는 실험 시작시 2개의 비장세포 (검은색 화살표 표시) 및 2개의 판독 세포 (흰색 화살표 표시)를 함유하는 미세유동 챔버의 예를 보여주는 것이다. 48시간의 배양 후 판독 세포는 22개의 세포 증식된 반면, 효과기 세포 집단은 분비 항체를 그대로 유지하였다.

[0508] 실시예 32 - 디스커브Rx 세포를 이용한 리간드에의 GPCR 반응

[0509] 디스커브Rx로부터의 패쓰헌터® β-어레스틴 시스템 (www.discoverx.com)에서, 소형 펩티드를 관심의 대상이 되는 GPCR 표적의 세포내 서열에 융합시키고, 사보적인 펩티드 단편을 또 다른 세포내 단백질 (β-어레스틴)에 융합시킨다. 그의 특이적인 리간드에의 결합 후, GPCR은 β-어레스틴을 동원하여 두 펩티드를 상보적인 되도록 가압하여 기능성 β-갈락토시드제 효소를 제조한다. 종래의 비-미세유동 검정법에서는 세포를 용해시키고, 화학발광성을 생성하는 시약 칵테일을 1회 첨가하여 효소 활성, 및 이에 따른 GPCR에 결합된 리간드의 양을 검출한 후, 전통적인 플레이트 판독기를 사용하여 분석한다.

[0510] 형광성 기반 기질을 사용함으로써 본원에 기술된 미세유동 포맷에 적합하도록 본 검정법을 변형시켰다. 5-도데카노일아미노플루오레세인 디-β-D-갈락토피라노시드 (C_{12}FDG)를 화학적으로 변형시키고, 비-형광성 β-갈락토시다제 기질을 효소 절단 후 형광성이 되도록 변형시켰다. 이는 또한 기질이 세포막 내부로 확산될 수 있도록 하고, 또한 절단 후 세포 내부에 잔류하도록 촉진시키는 친유성 테일을 포함한다.

[0511] CCR4/CCL22 GPCR-효능제 쌍 (패쓰헌터® 익스프레스 CCR4 CHO-1 β-어레스틴 GPCR 검정법)을 C_{12}FDG 기질을 이용하는 검정법을 적합화시키기 위한 일례로서 사용하였다. 세포를 다양한 농도의 기질 및 리간드와 함께 인큐베이션시킨 후, 형광을 사용하여 영상화하였다.

[0512] 적합화된 검정법을 먼저 다중웰 플레이트에서 시험하였다. 세포를 다양한 농도의 C_{12}FDG 기질과 함께 90분 동안 배지 중에서 인큐베이션시켰다. 기질은 세포에서 확산되었고, 절단될 때까지 비형광성인 상태로 유지되었다. 이어서, 리간드/효능제 CCL22를 상이한 농도로 첨가하고, 세포 내부에서 일어나는 상보화를 위해 60분 동안 인큐베이션시켜 β-갈락토시다제를 형성시키고, 기질을 절단시켜 세포 내부에서 형광성 생성물을 생산하였다. 이어서, 형광성 기반 현미경법을 사용하여 특정 조건에 상응하는 각 웰에 대하여 영상화하였다 (도 111).

[0513] 이어서, 세포를 미세유동 장치에 적재하고, 세포 배양 배지 중에서 33 μM C_{12}FDG 기질과 함께 인큐베이션시켰다. 비-형광성 기질이 세포 내부에서 확산되고 축적될 수 있도록 90분 동안 기질 및 세포를 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 종료시 세포를 10분 동안 배지로 세척하였다. 이어서, CCL22 효능제/리간드를 장치의 4개의 상이한 서브어레이 중에 4개의 상이한 농도로 적재하였다 (서브어레이 1: 0.01 nM, 서브어레이 2: 1 nM, 서브어레이 3: 100 nM, 서브어레이 4: 효능제 없음). 이어서, 형광-기반 현미경법을 사용하여 특정 조건에 상응하는 각 챔버에 대하여 영상화하였다 (도 112a). 각 챔버에 대해 영상을 분석하고, 챔버에서 평균 강도를 측정하였다. 배경을 감산하고, 결과를 도 112b에 플롯팅하였다.

[0514] ********

[0515] 본 명세서 전체에 걸쳐 인용된 모든 문헌, 특허, 특허 출원, 공개 문헌, 제품 설명서, 및 프로토콜은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다.

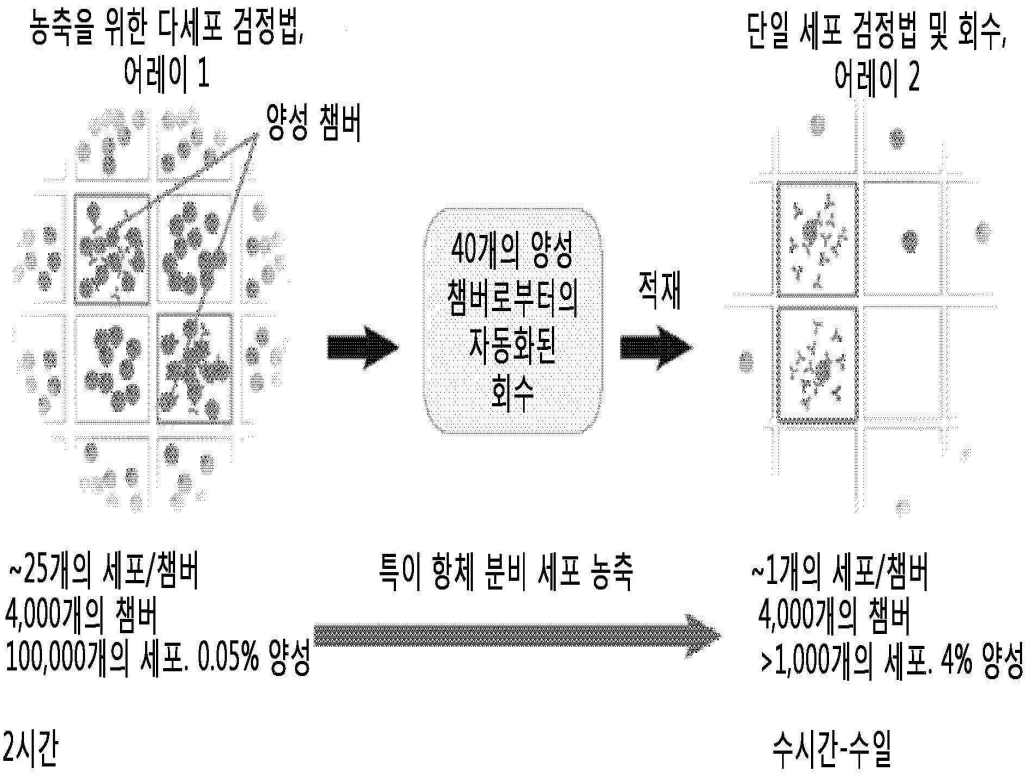
[0516] 본 명세서에서 예시되고, 논의된 실시양태는 오직 본 발명을 제조하고 사용되는 데 있어 최적인 것으로 본 발명자에게 공지되어 있는 방법을 당업자에게 교시하는 것으로만 한다. 상기 교시에 비추어 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명으로부터 벗어남 없이 본 발명의 상기 기술된 실시양태의 수정 및 변형이 이루어질 수 있다. 그러므로, 청구범위 및 그의 등가물의 범주 내에서 본 발명은 구체적으로 기술된 것과 다른 방식으로 실시될 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

도면

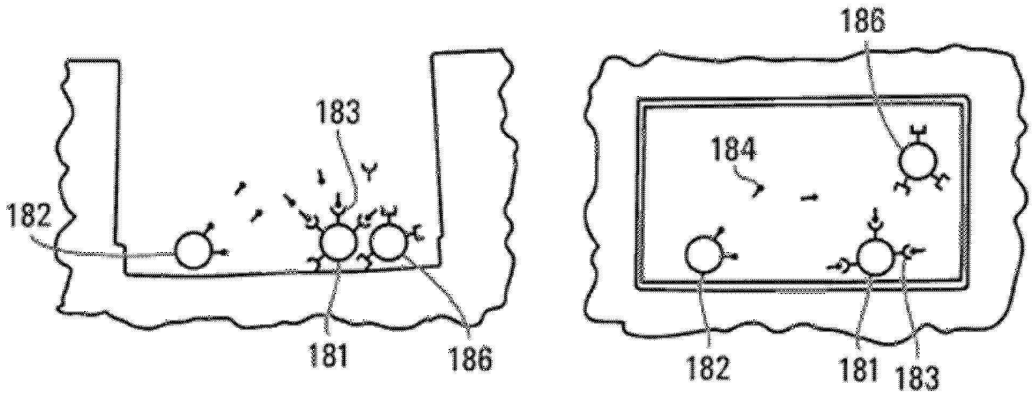
도면1



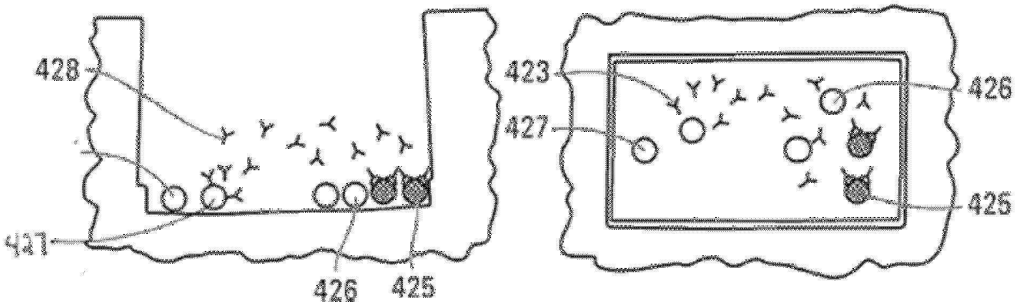
도면2


농축을 위한 다세포 검정법,
어레이 1
양성 챔버
40개의 양성
챔버로부터의
자동화된
회수
적재
단일 세포 검정법 및 회수,
어레이 2
~25개의 세포/챔버
4,000개의 챔버
100,000개의 세포. 0.05% 양성
특이 항체 분비 세포 농축
~1개의 세포/챔버
4,000개의 챔버
>1,000개의 세포. 4% 양성
2시간
수시간-수일

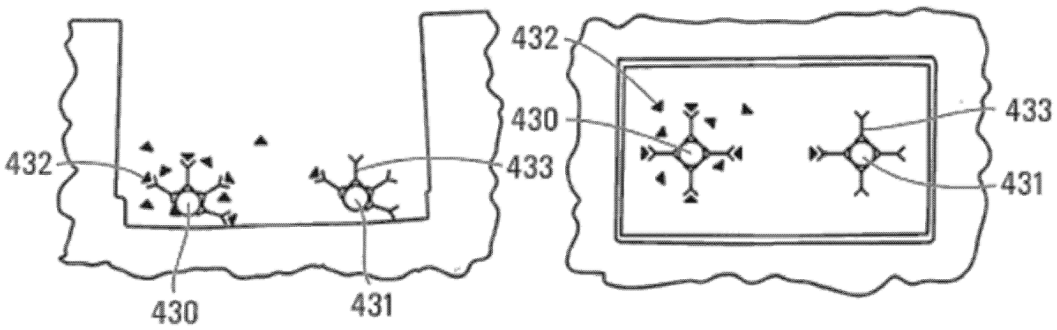
도면3


183
182
181
186
186
184
182
181
183

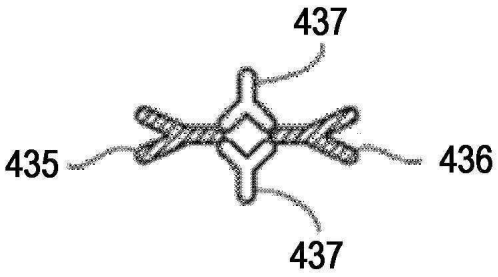
도면4


428
427
426
425
423
427
426
425

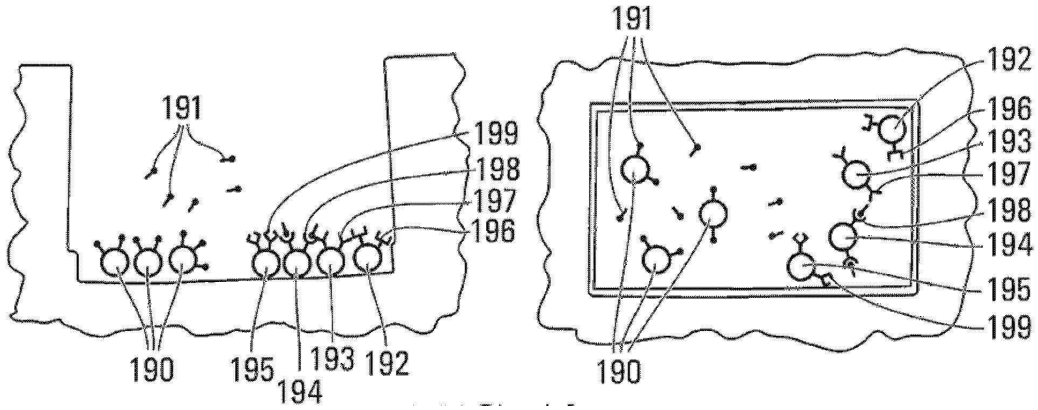
도면5



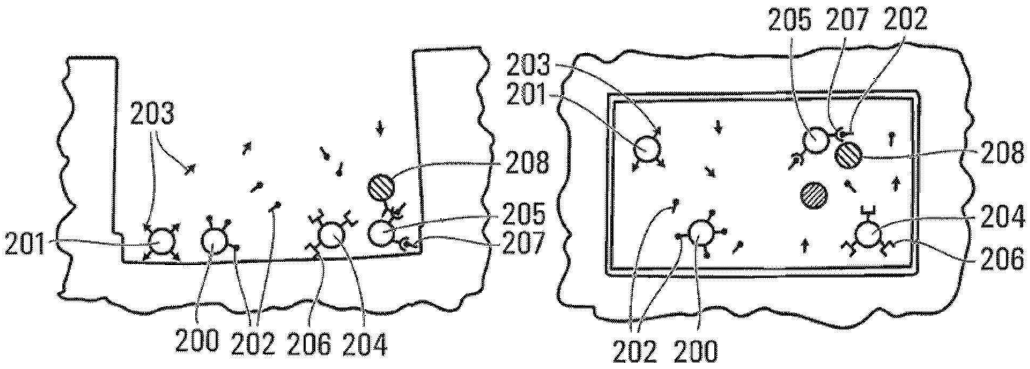
도면6



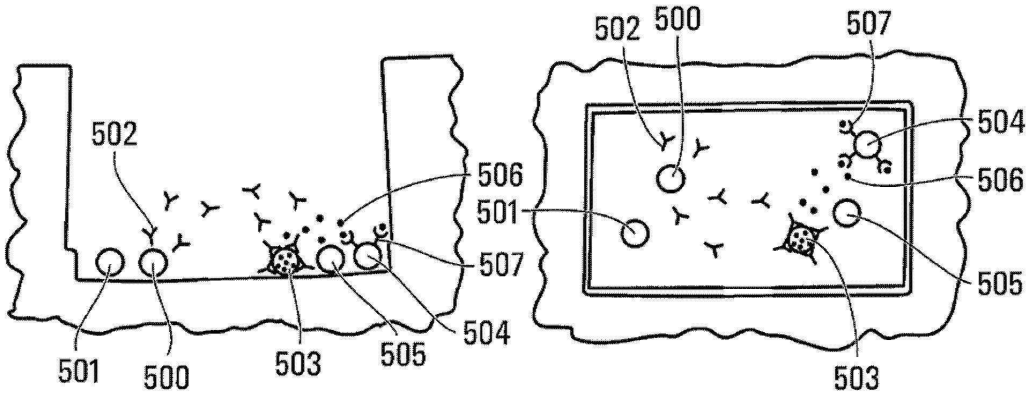
도면7



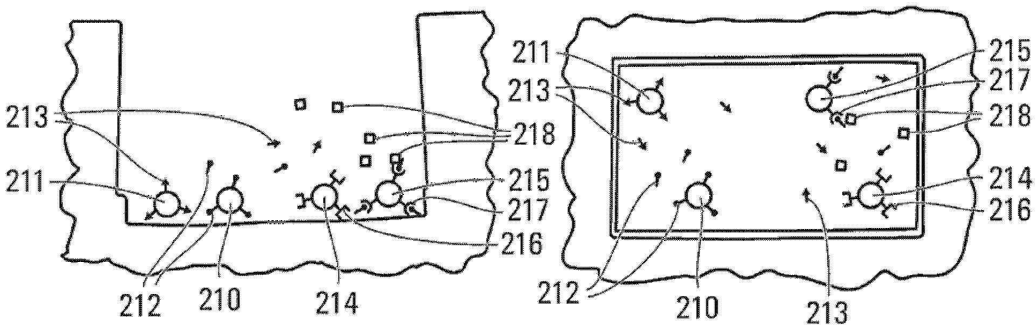
도면8



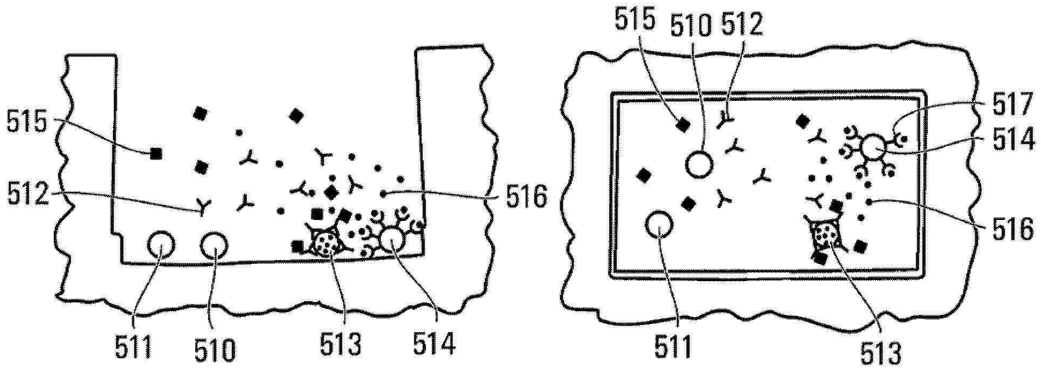
도면9



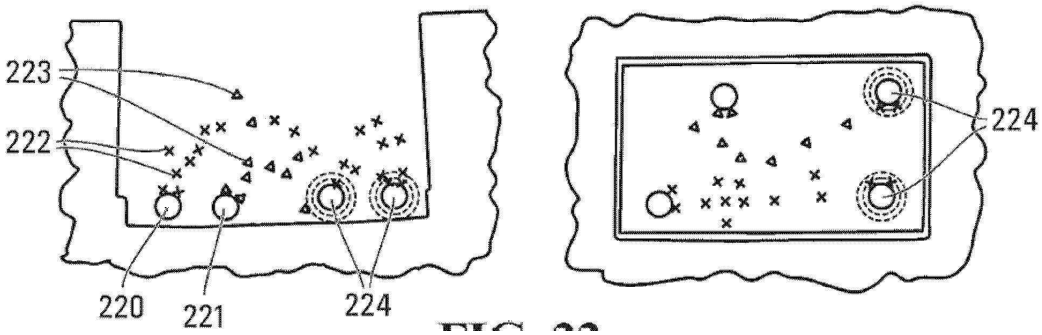
도면10



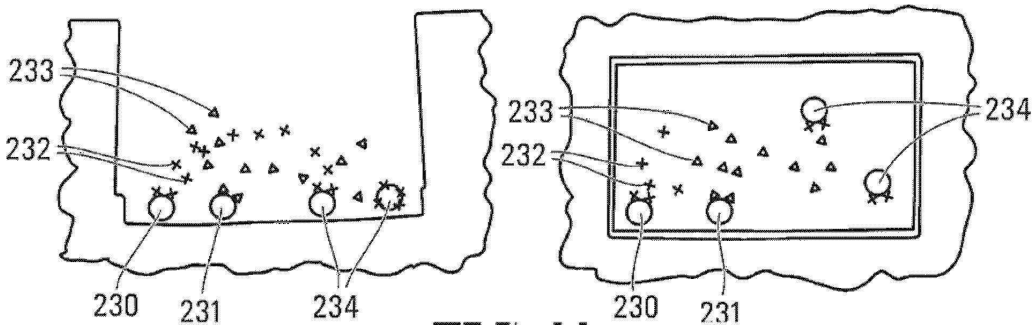
도면11



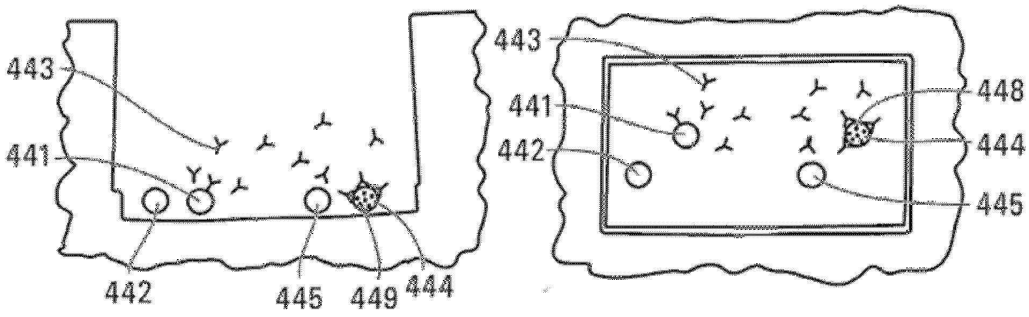
도면12



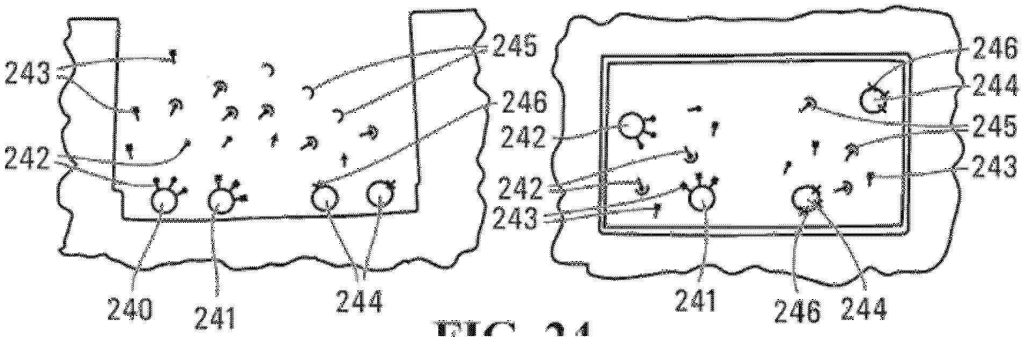
도면13



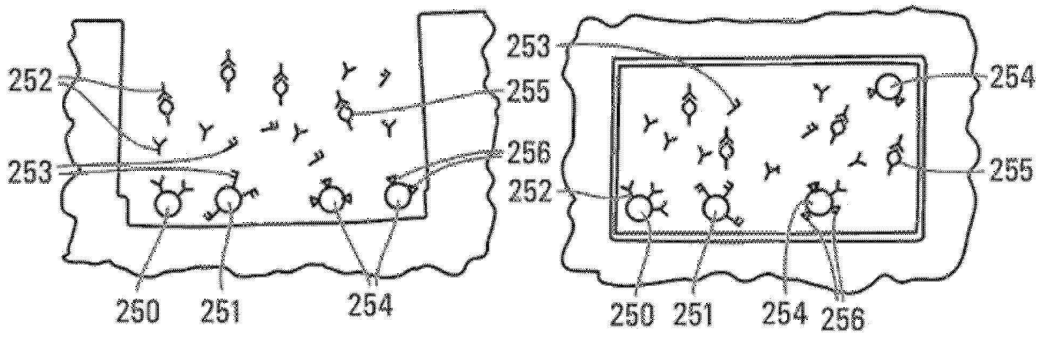
도면14



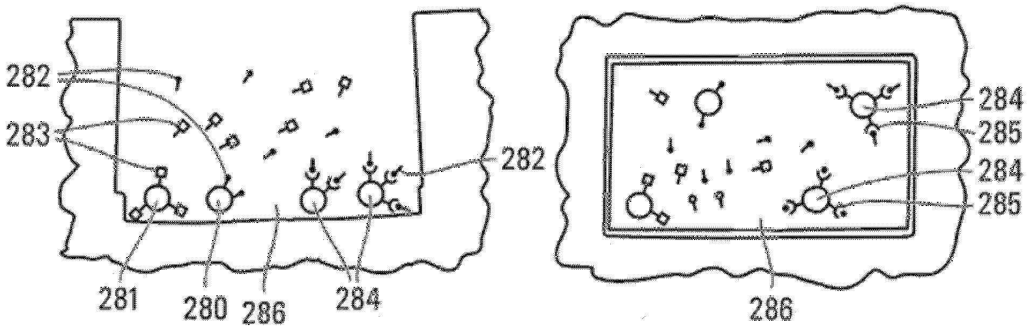
도면15



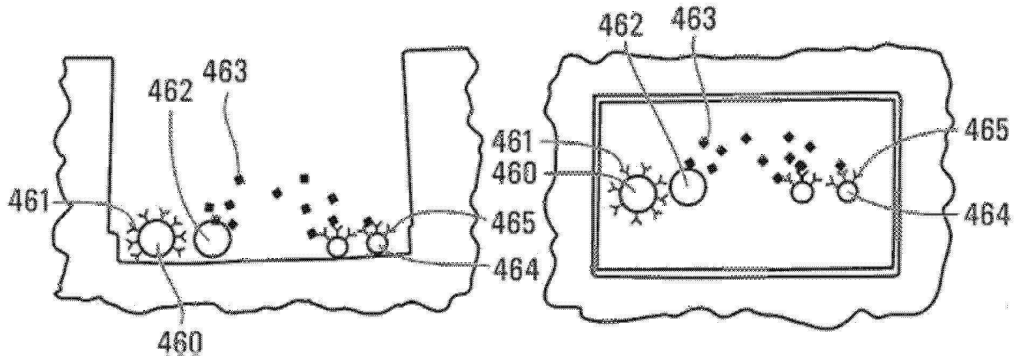
도면16



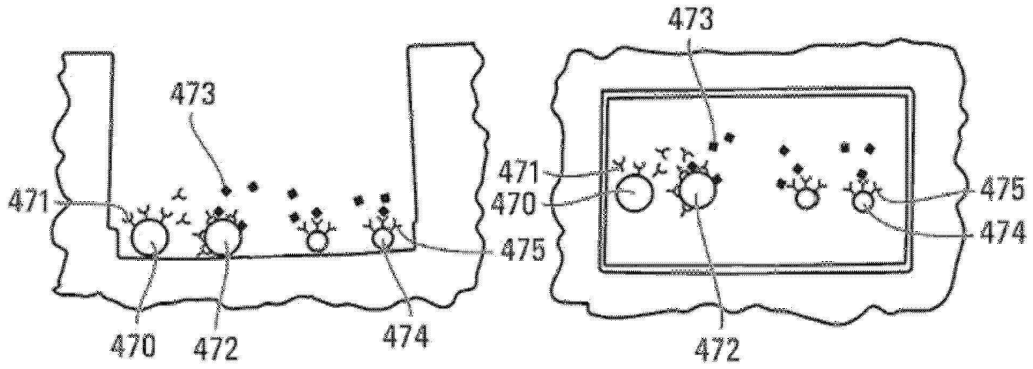
도면17



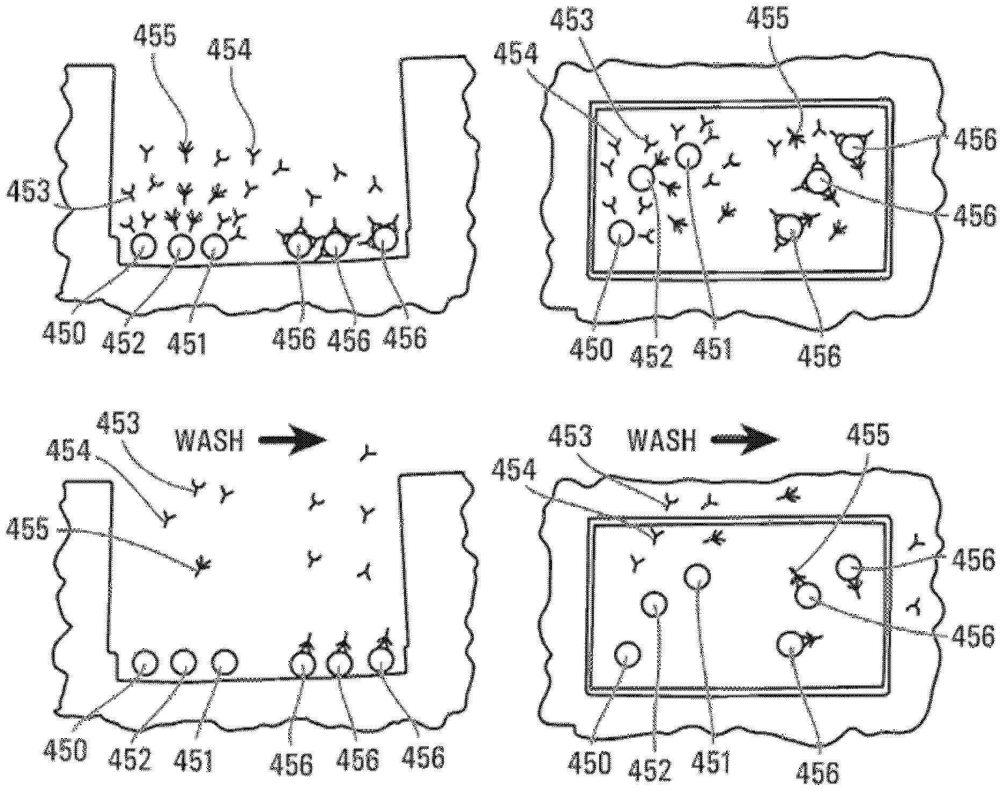
도면18



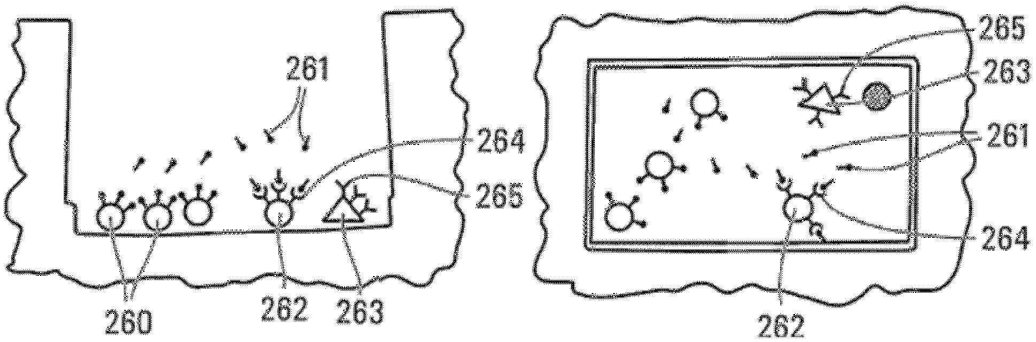
도면19



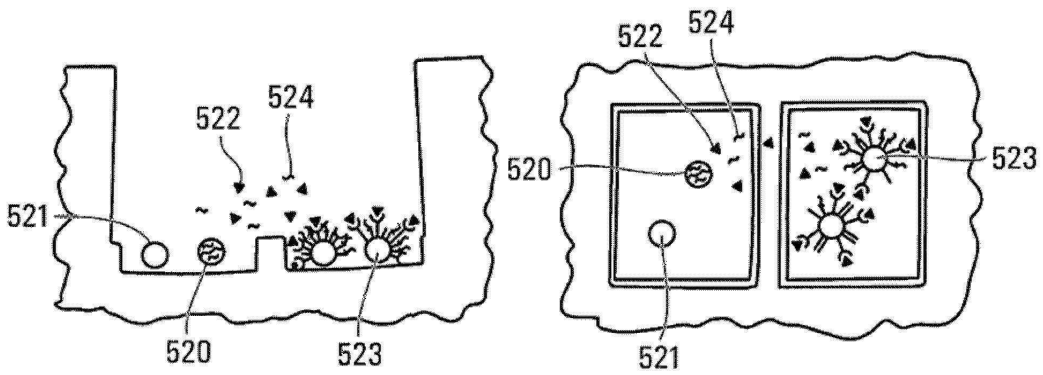
도면20



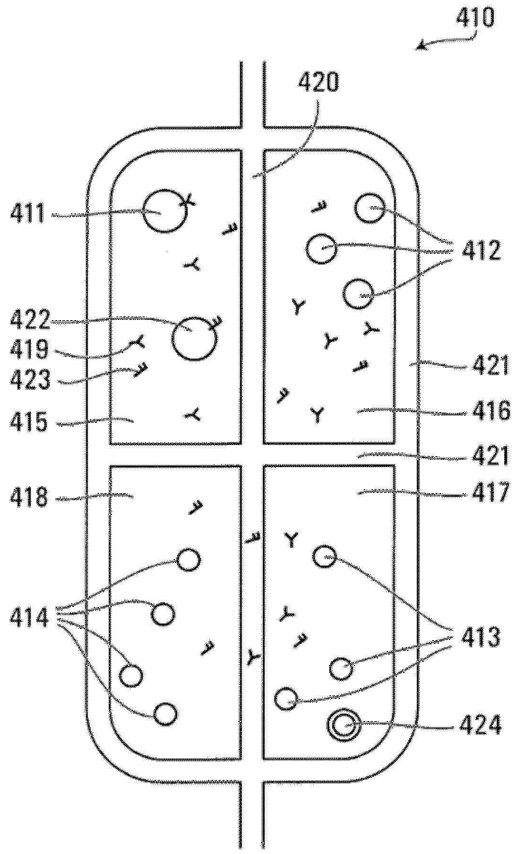
도면21



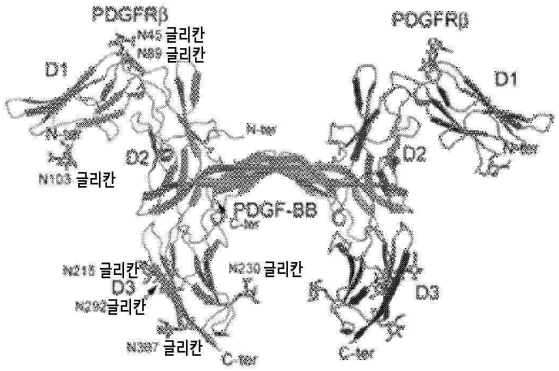
도면22



도면23

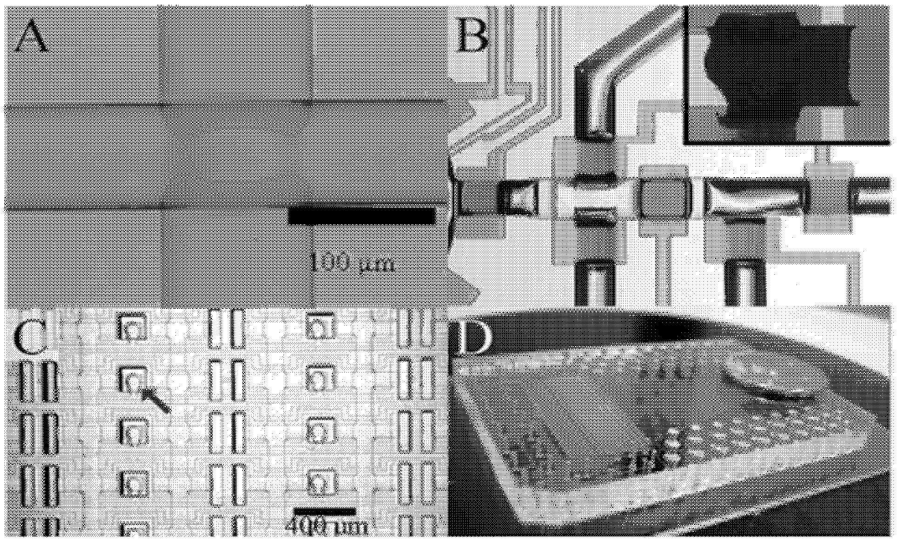


도면24

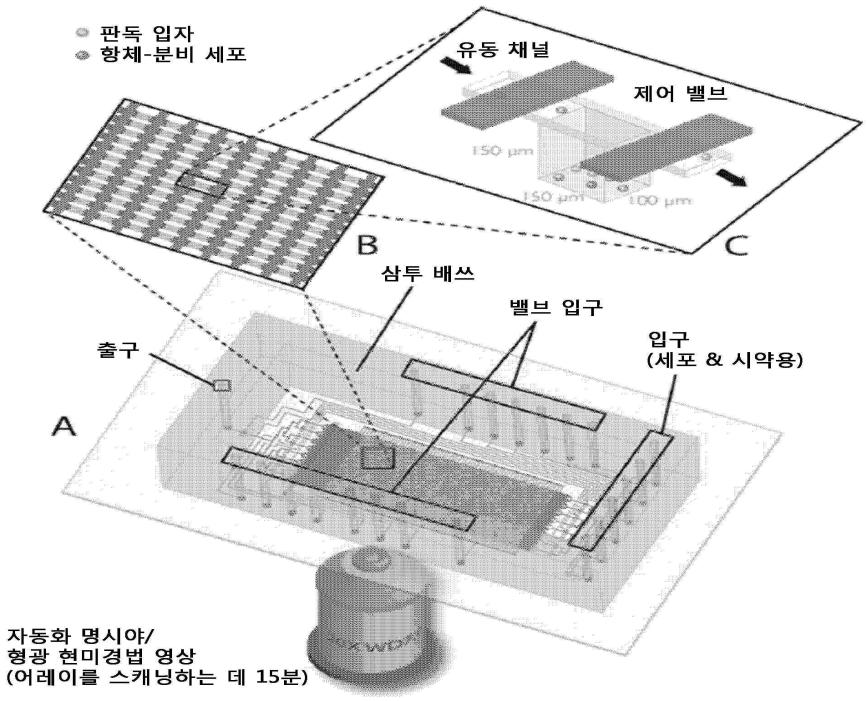

PDGFRβ
N45 글리칸
N89 글리칸
D1
N-ter
N103 글리칸
D2
PDGF-BB
C-ter
N218 글리칸
N230 글리칸
D3
N292글리칸
N387 글리칸
C-ter
PDGFRβ
D1
N-ter
D2
D3
C-ter

```
                                                
```

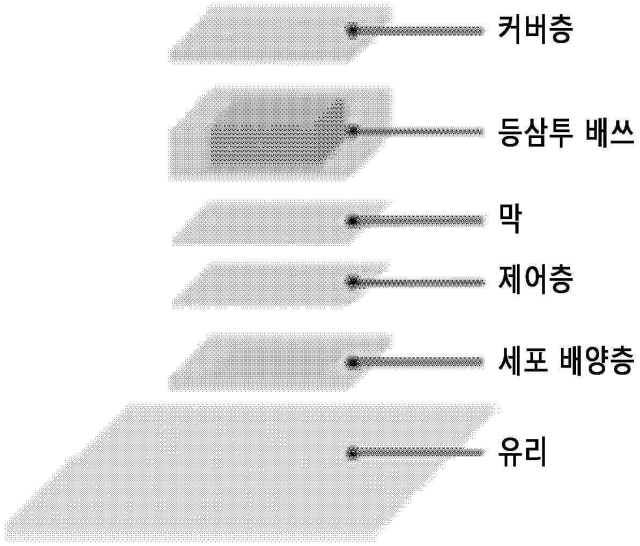
도면25


A
B
100 μm
C
D
400 μm

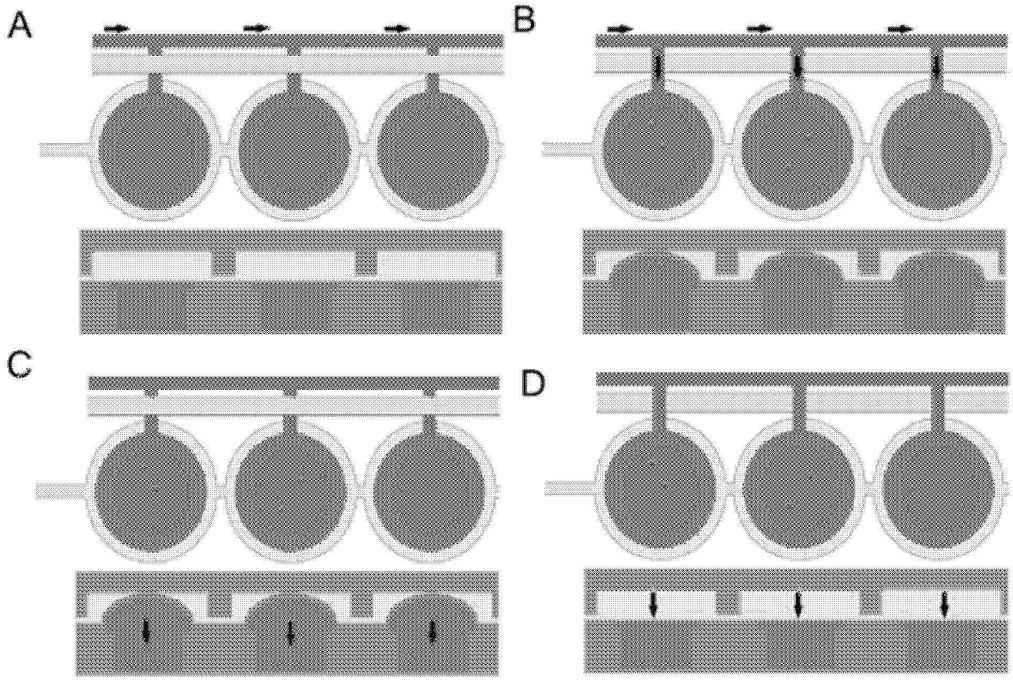
도면26


판독 입자
항체-분비 세포
유동 채널
제어 밸브
150 μm
150 μm
100 μm
B
C
삼투 배쓰
밸브 입구
입구
(세포 & 시약용)
출구
A
자동화 명시야/
형광 현미경법 영상
(어레이를 스캐닝하는 데 15분)

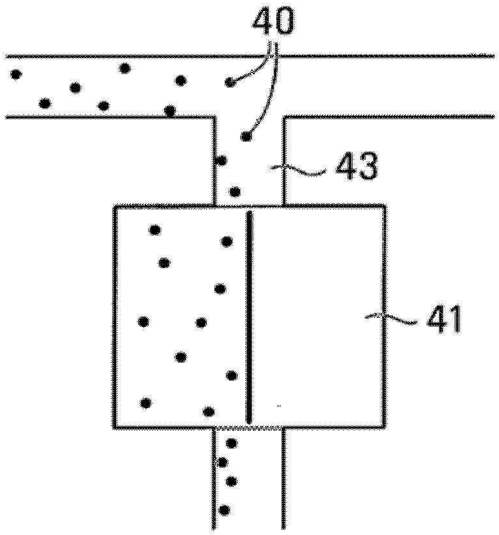
도면27



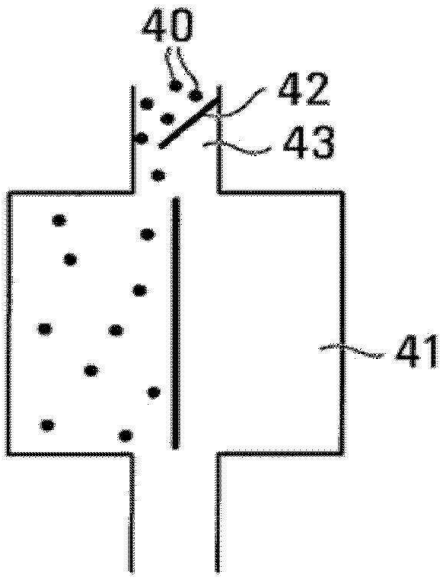
도면28



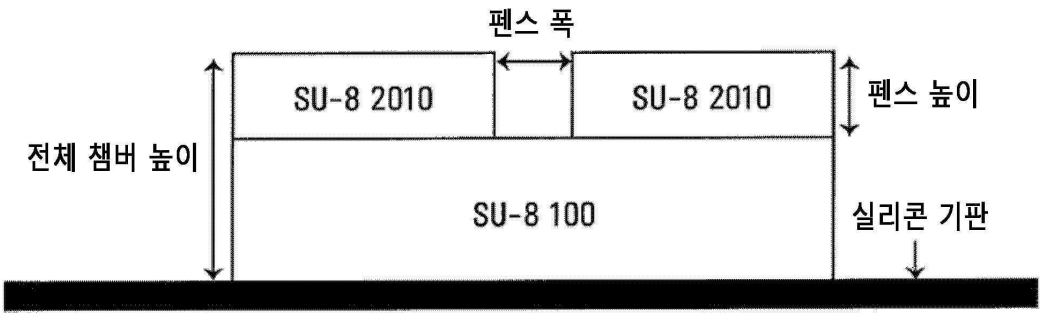
도면29



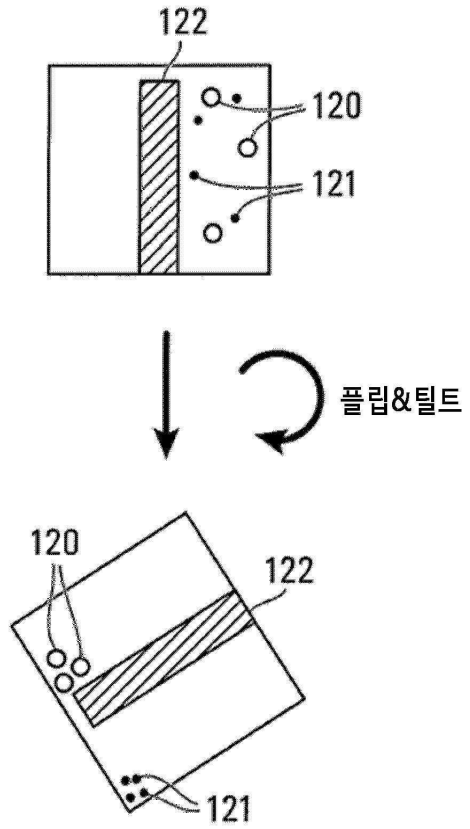
도면30



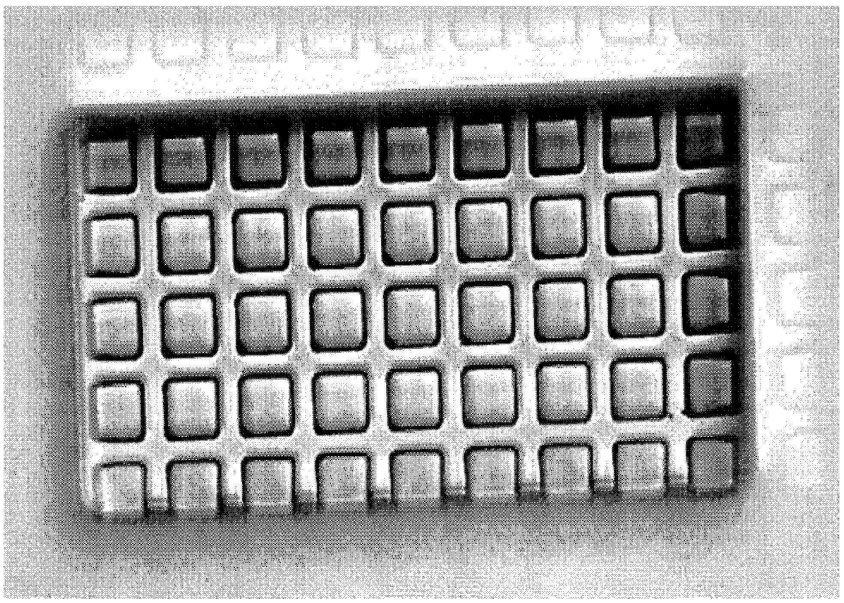
도면31



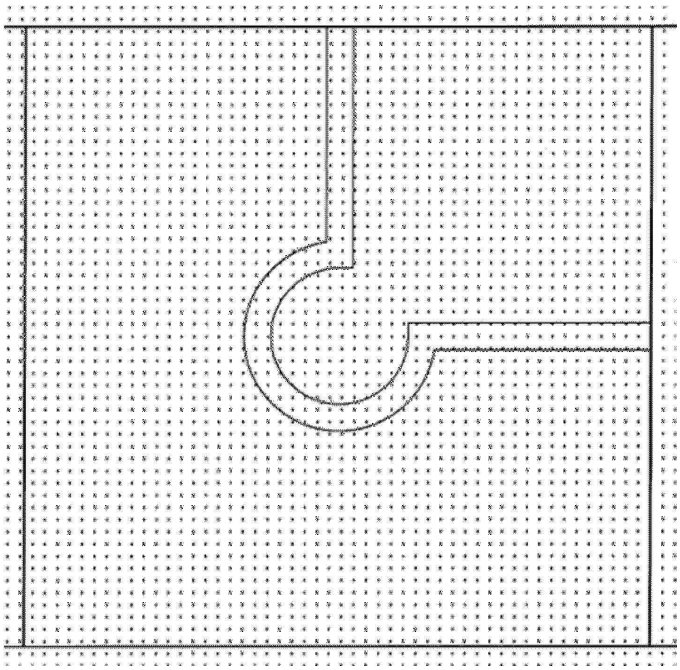
도면32



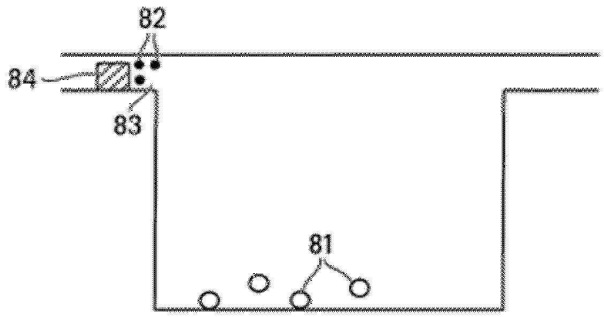
도면33



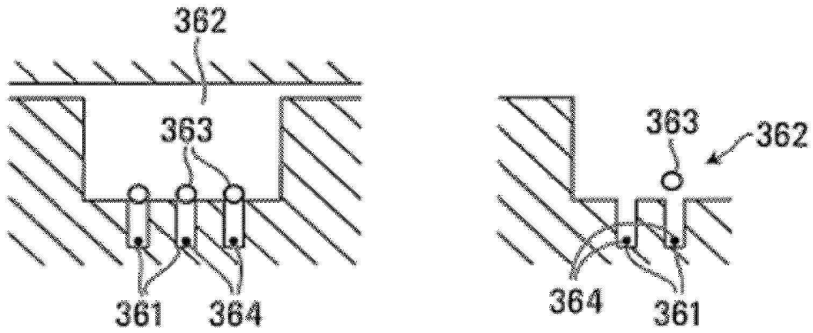
도면34



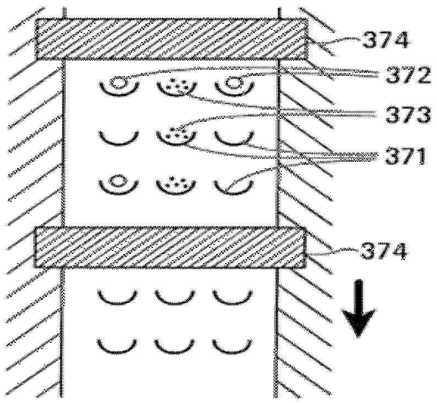
도면35



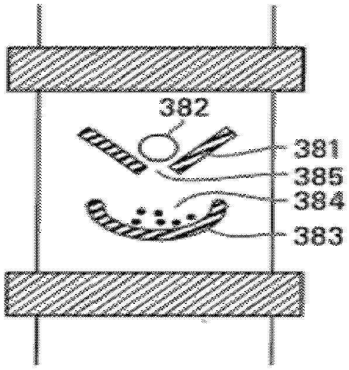
도면36



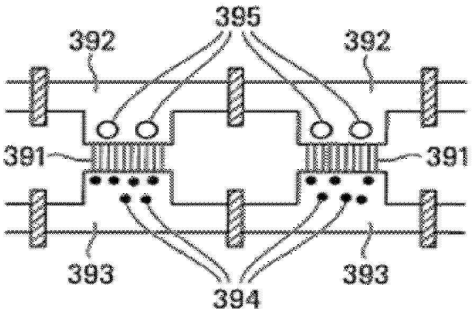
도면37



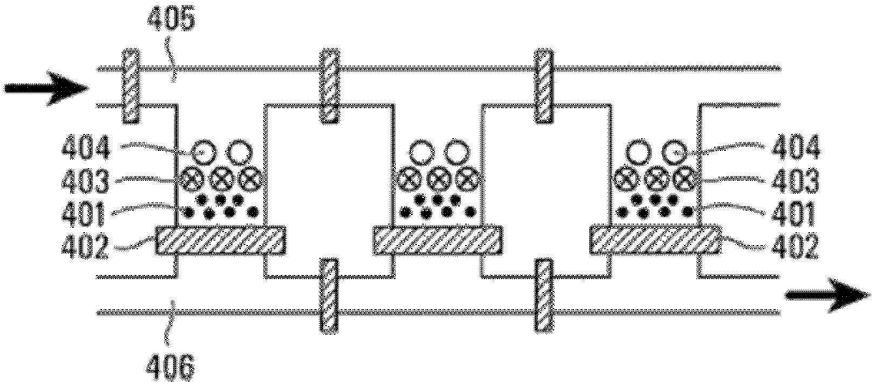
도면38



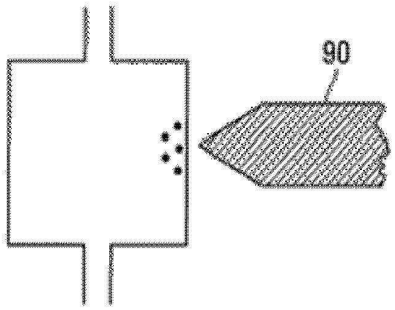
도면39



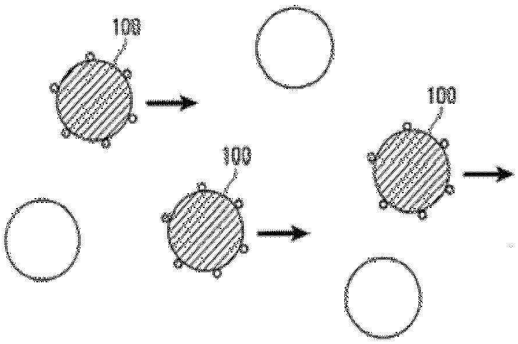
도면40



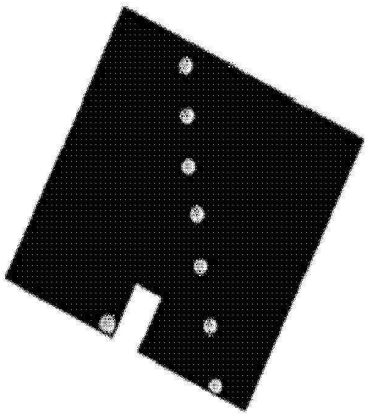
도면41



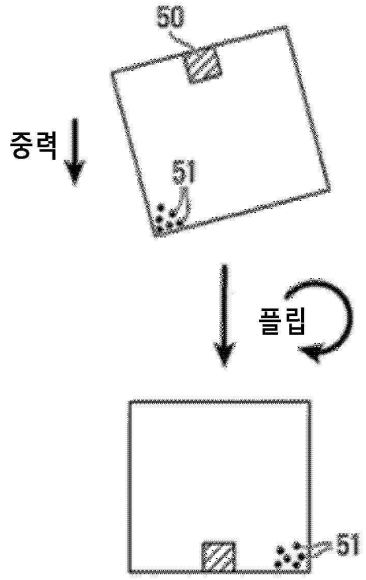
도면42



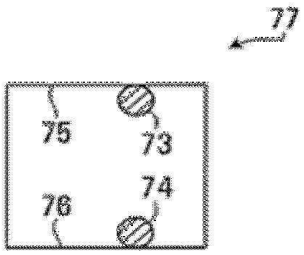
도면43



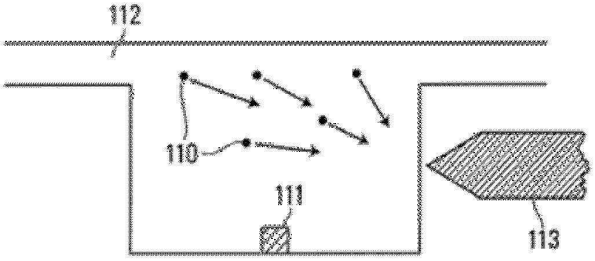
도면44



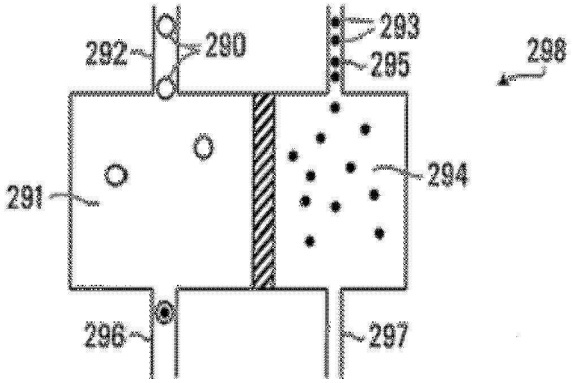
도면45



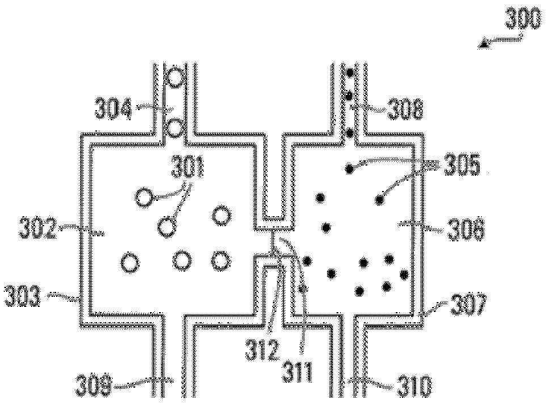
도면46



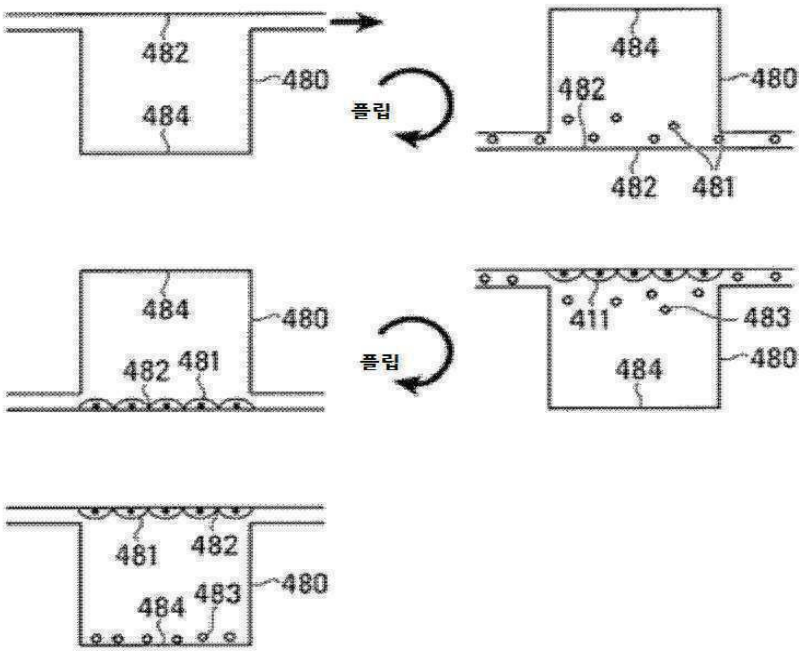
도면47



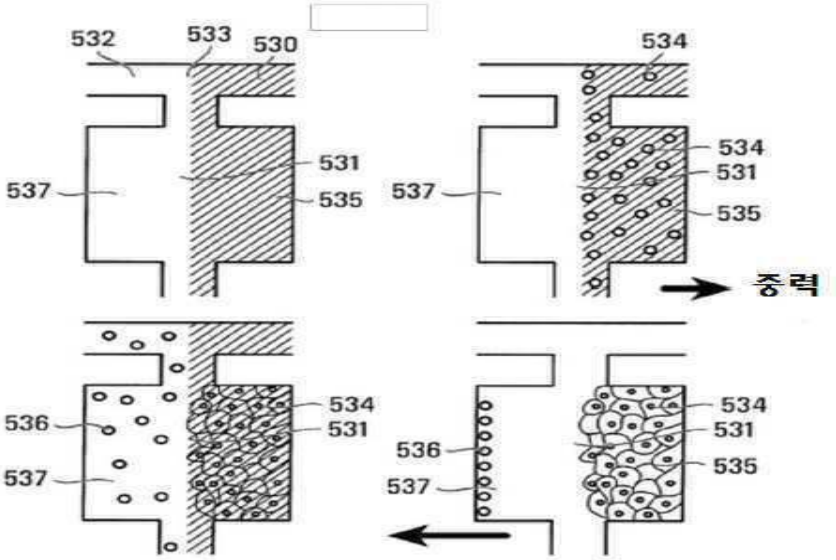
도면48



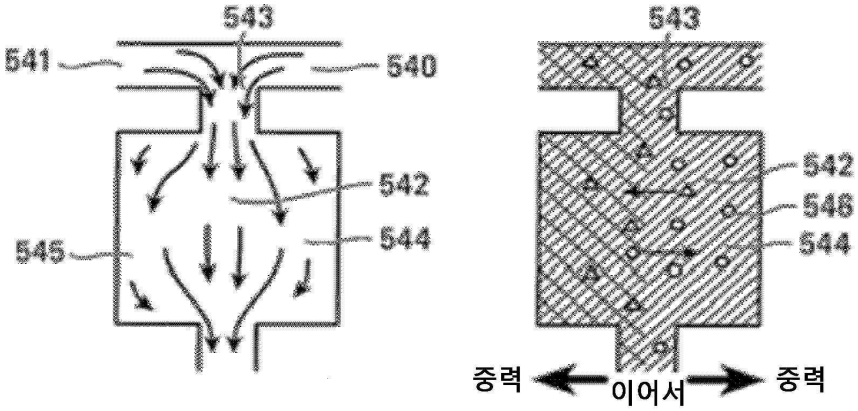
도면49


482
480
484
플립
484
482
480
482
481
484
480
482
481
플립
411
483
484
480
481
482
484
483
480

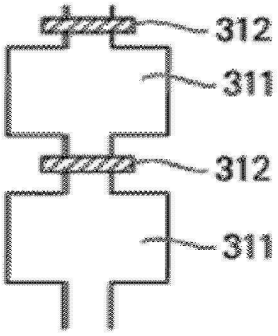
도면50


532
533
530
531
537
535
534
534
531
537
535
중력
536
537
534
531
536
537
534
531
535

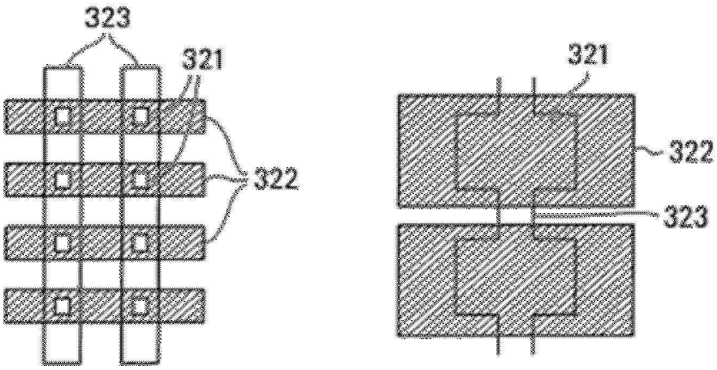
도면51



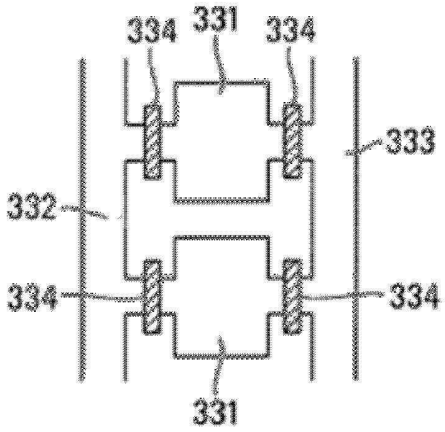
도면52



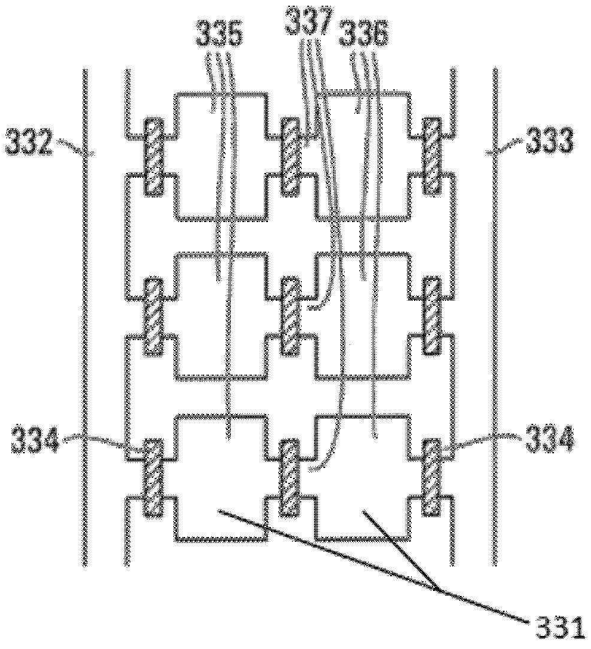
도면53



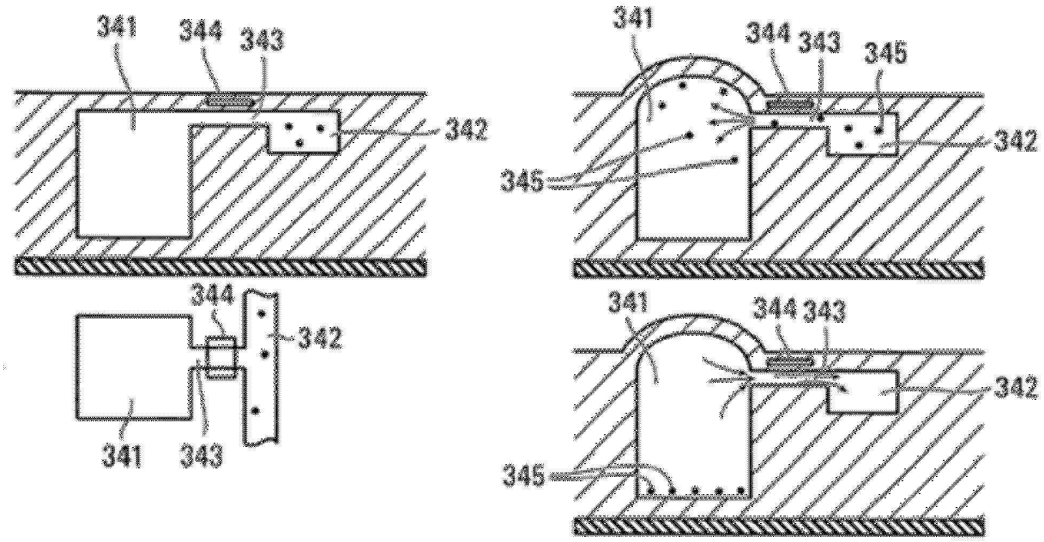
도면54



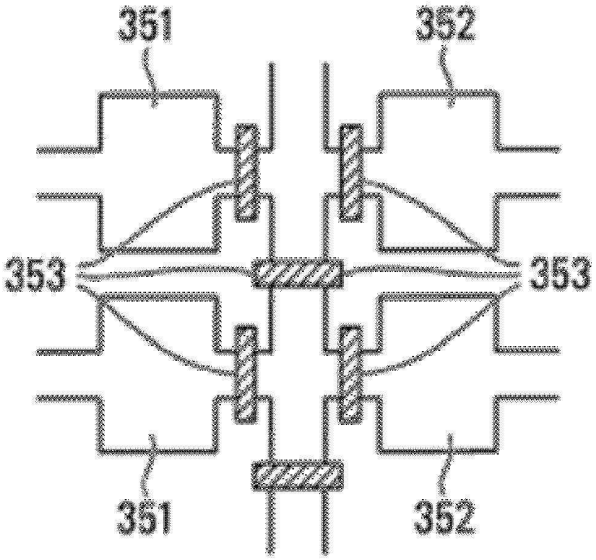
도면55



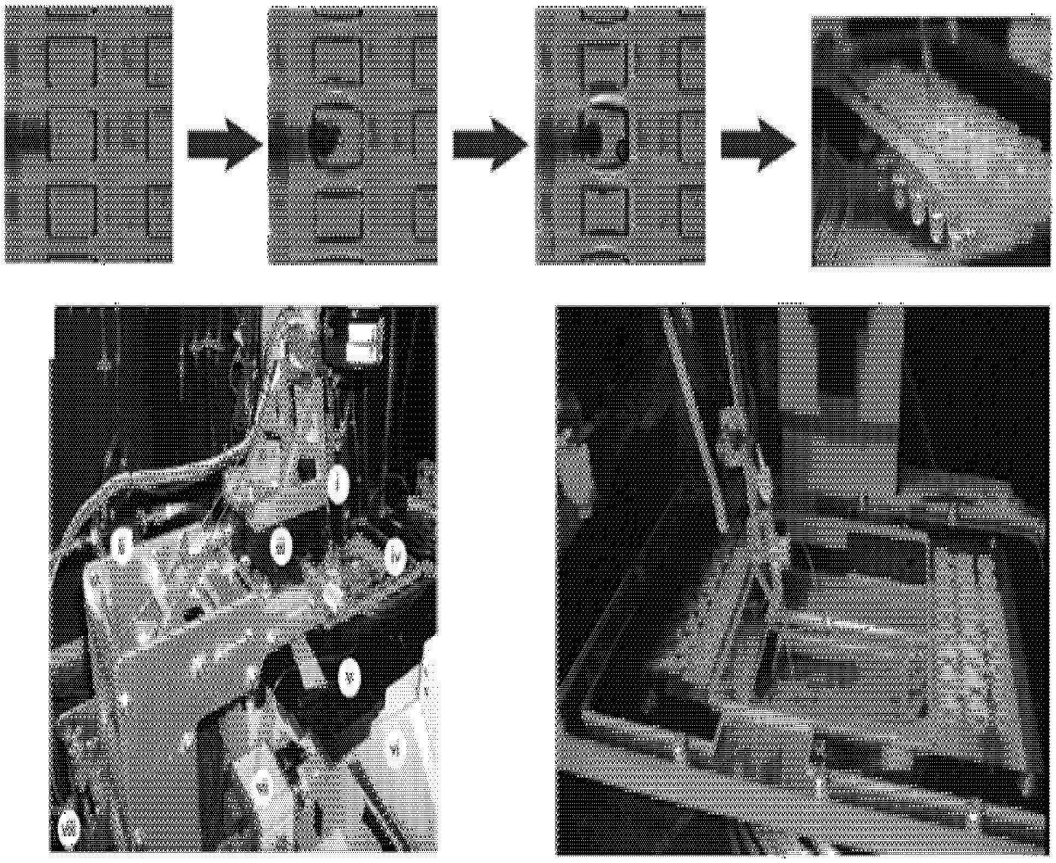
도면56


341
344
343
342
344
342
341
343
341
344
343
345
342
345
341
344
343
342
345

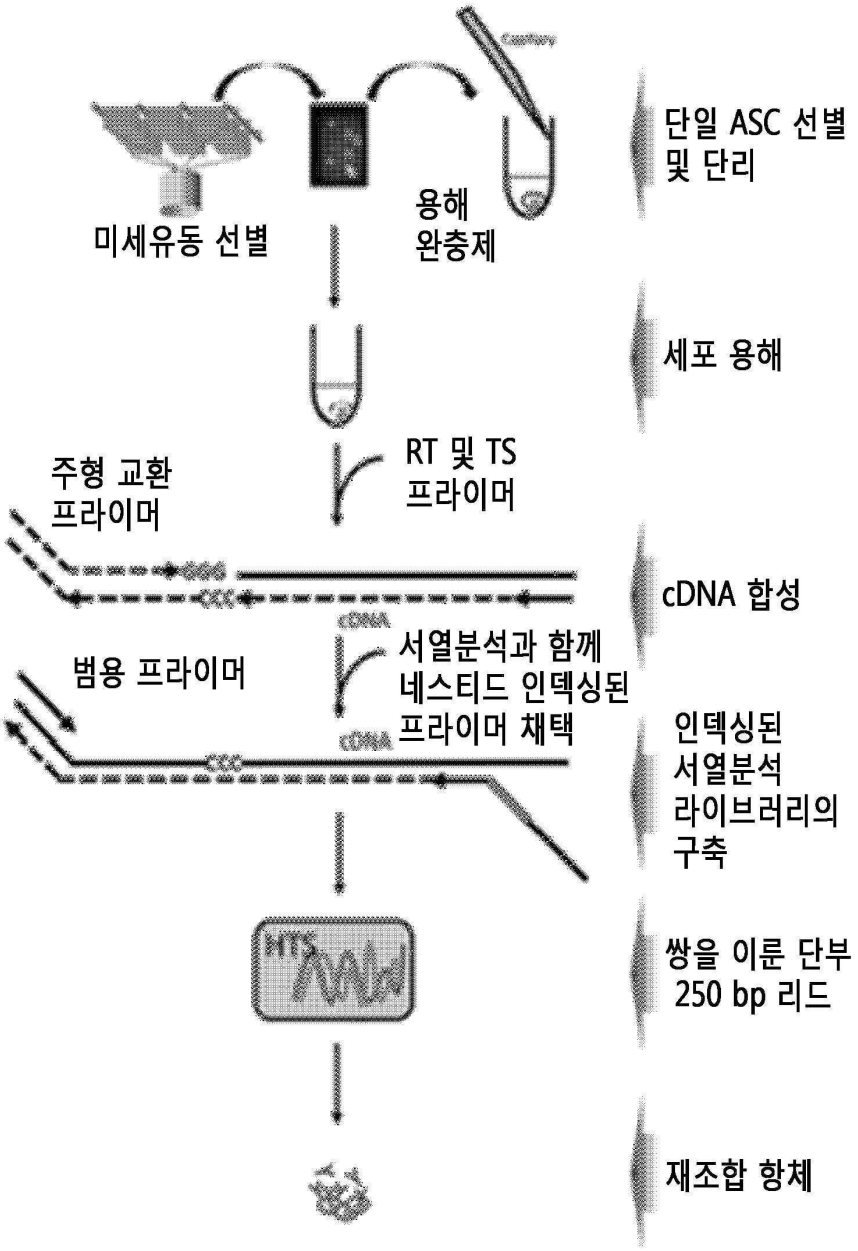
도면57


351
352
353
353
351
352

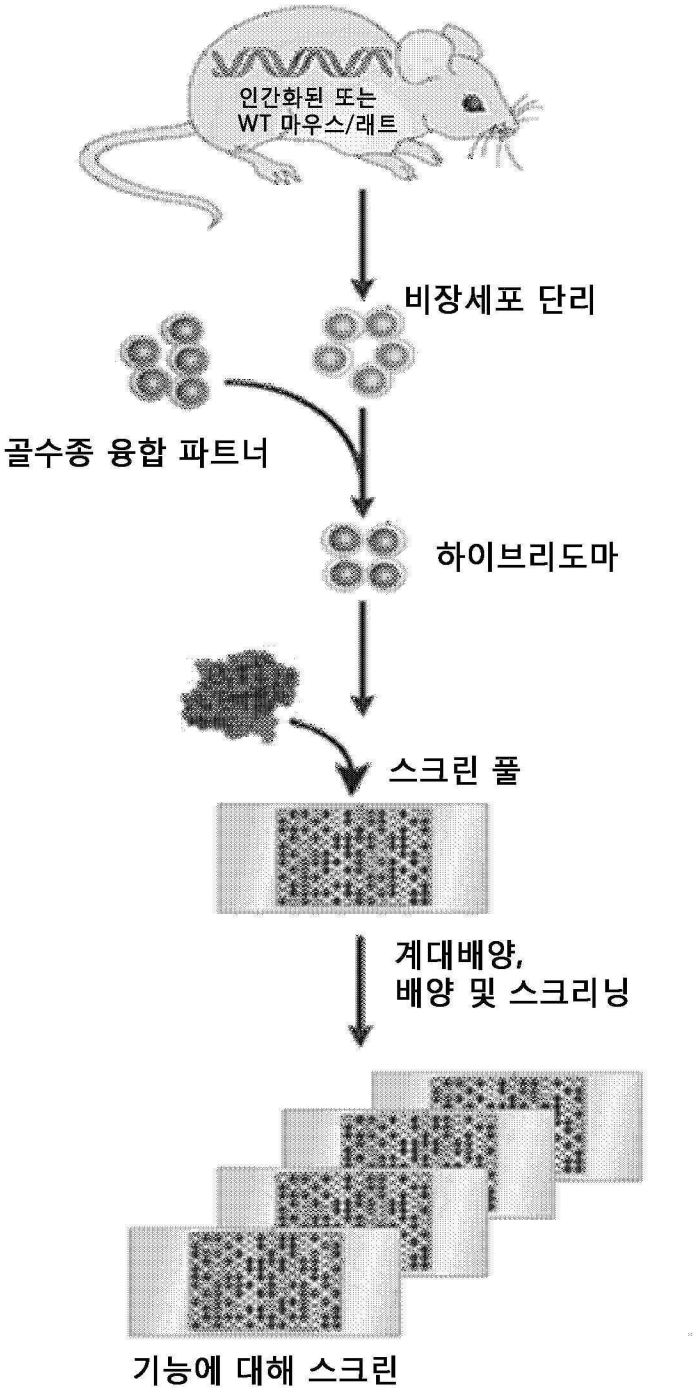
도면58



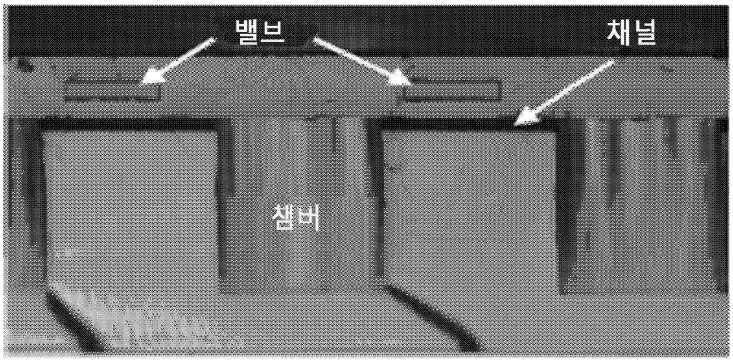
도면59


미세유동 선별
용해
완충제
단일 ASC 선별
및 단리
세포 용해
주형 교환
프라이머
RT 및 TS
프라이머
cDNA 합성
범용 프라이머
서열분석과 함께
네스티드 인덱싱된
프라이머 채택
인덱싱된
서열분석
라이브러리의
구축
HTS
쌍을 이룬 단부
250 bp 리드
재조합 항체

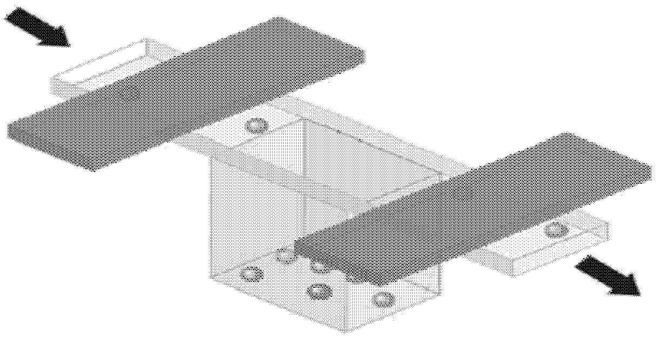
도면60


인간화된 또는
WT 마우스/래트
비장세포 단리
골수종 융합 파트너
하이브리도마
스크린 풀
계대배양,
배양 및 스크리닝
기능에 대해 스크린

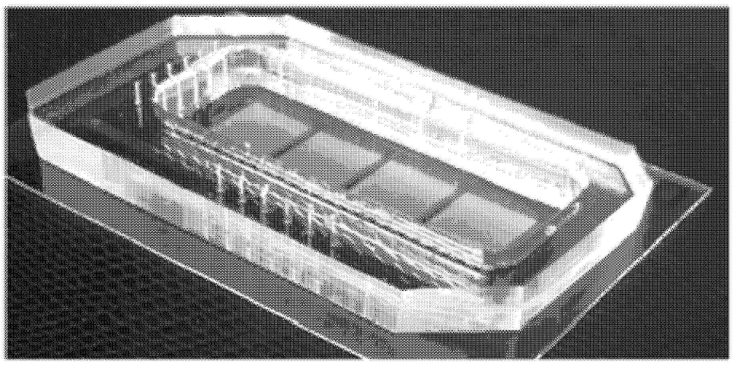
도면61



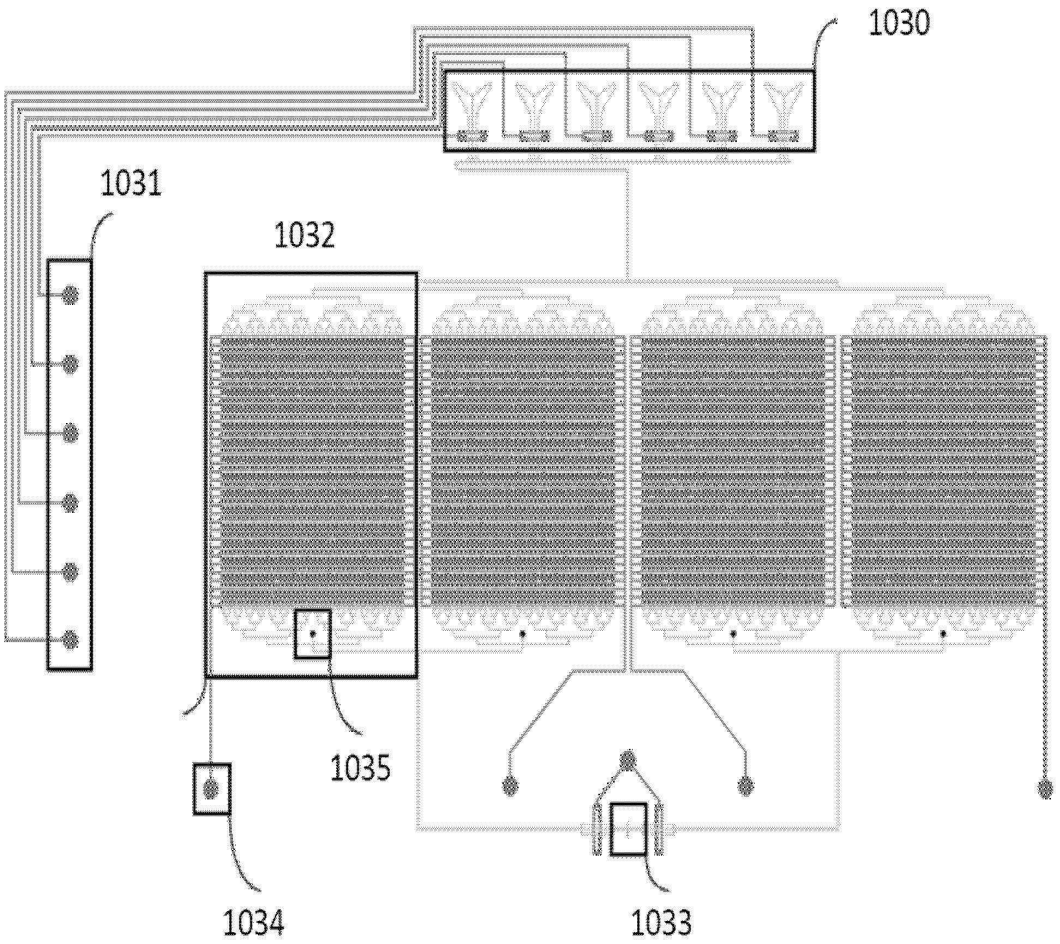
도면62



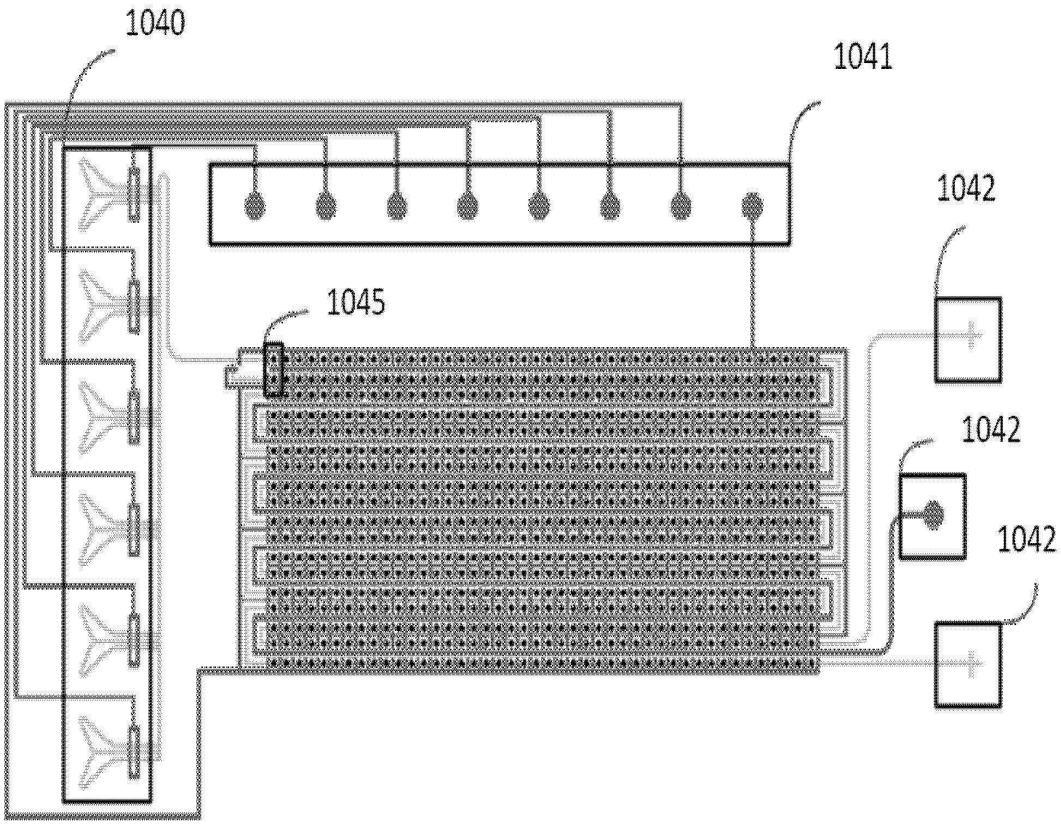
도면63



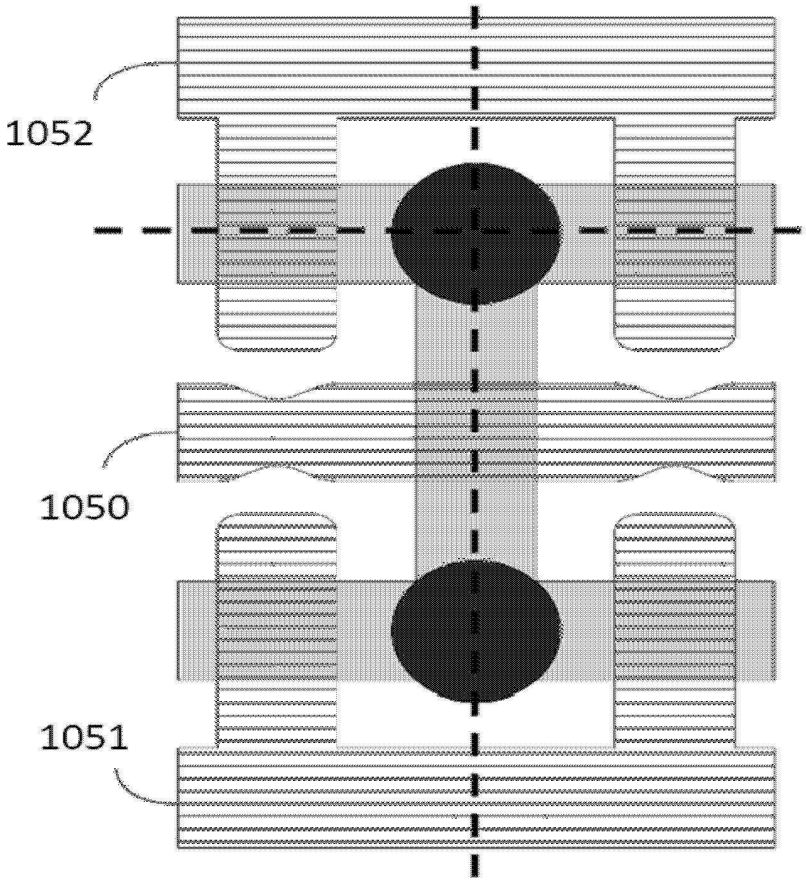
도면64



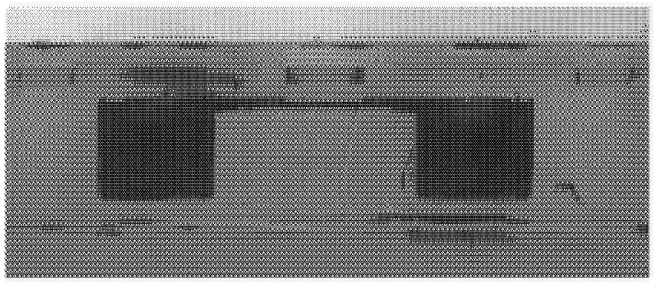
도면65



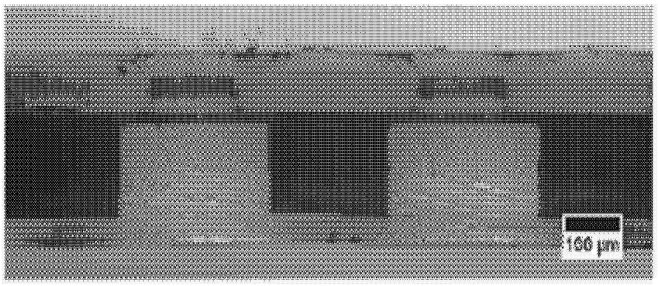
도면66



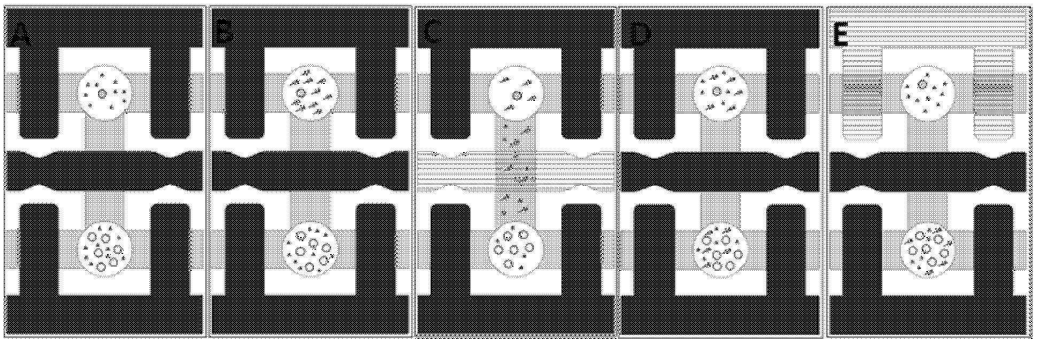
도면67



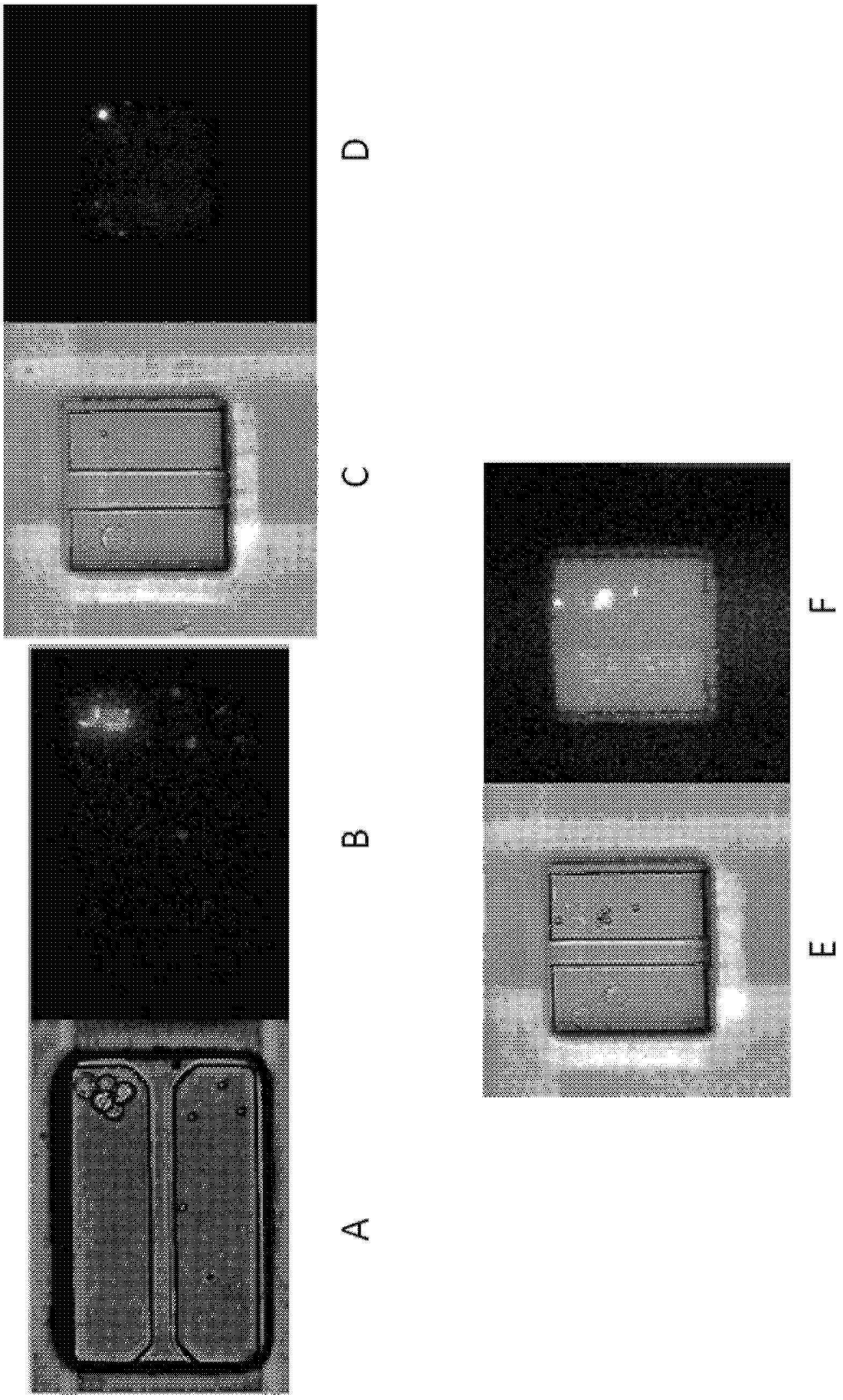
도면68



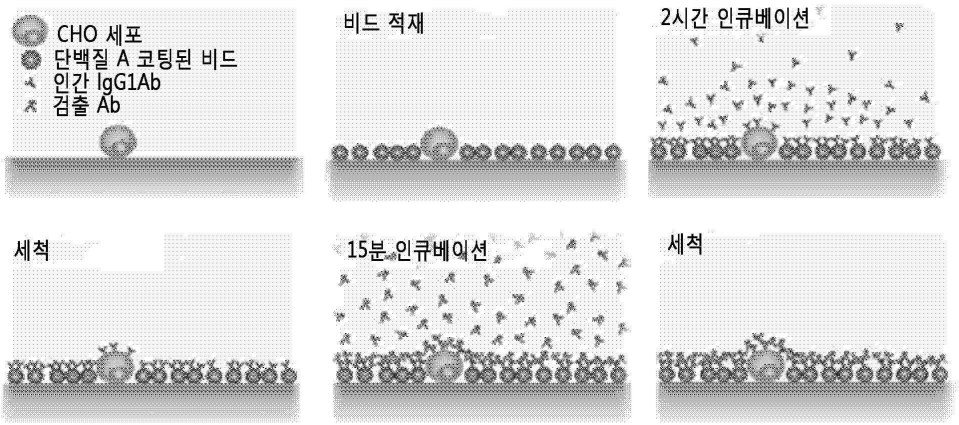
도면69



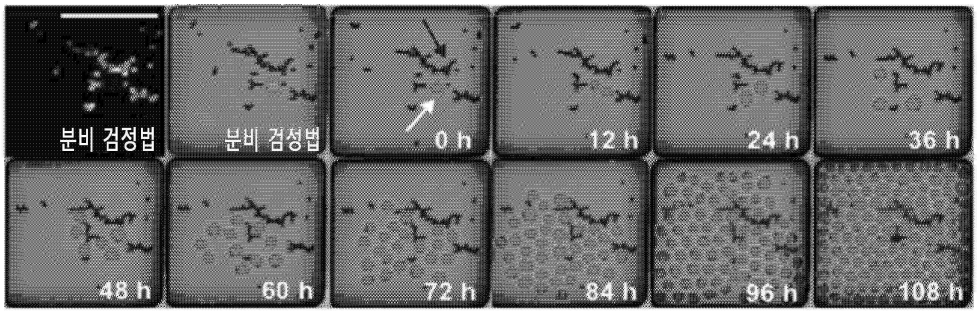
도면70



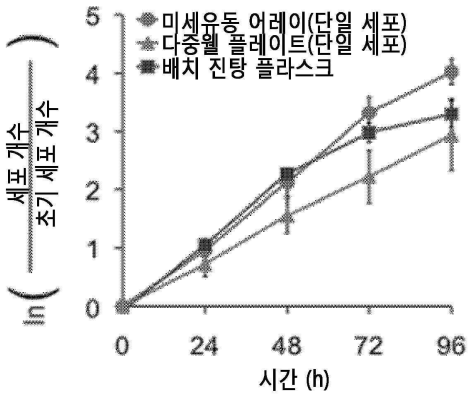
도면71



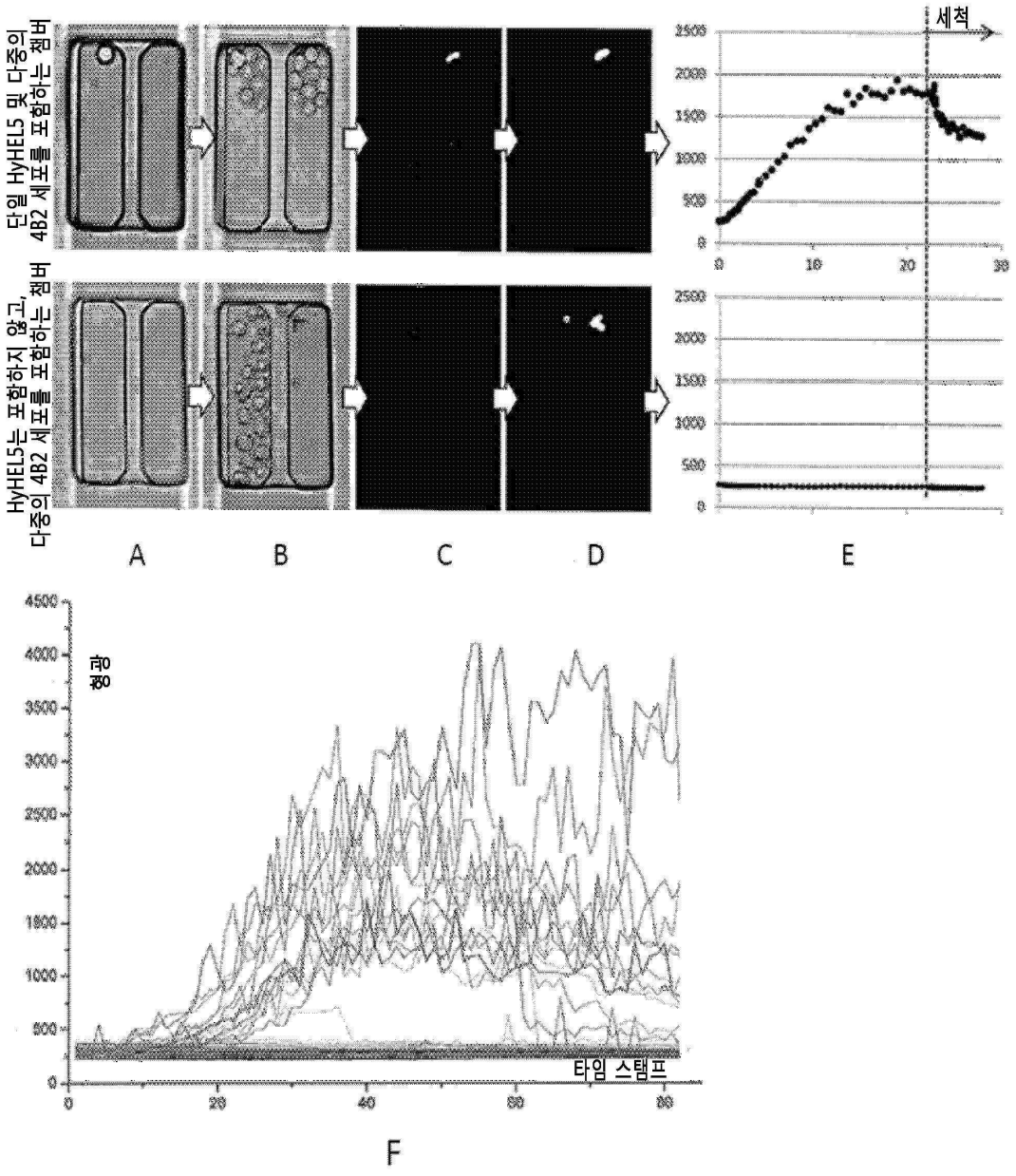
도면72



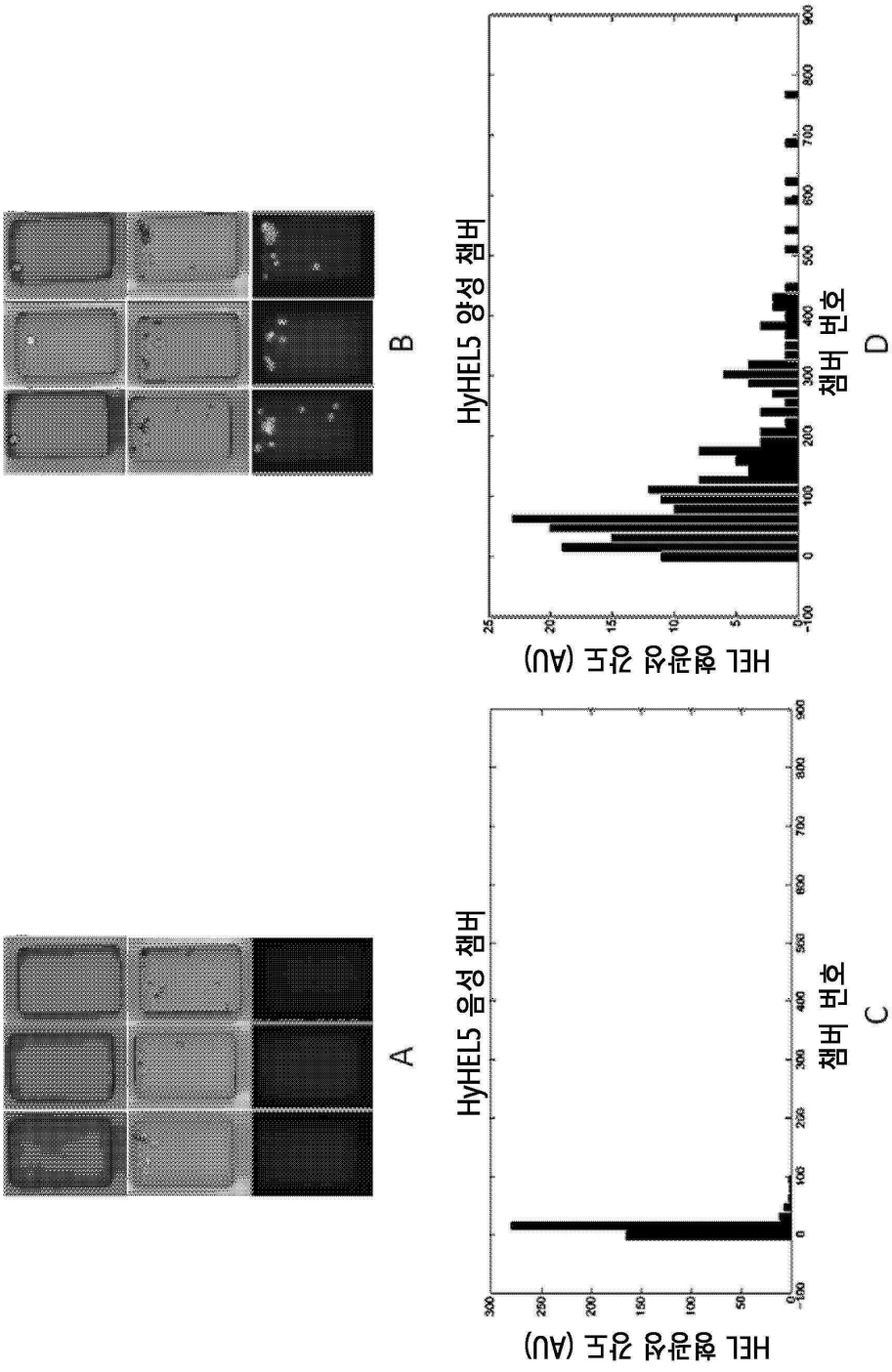
도면73



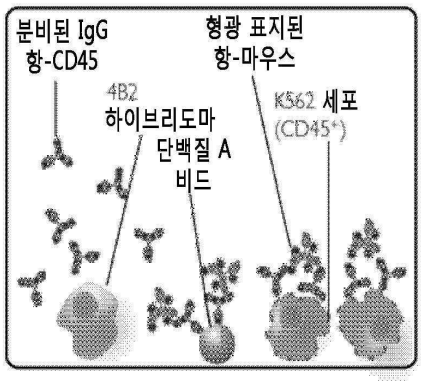
도면74


단일 HyHEL5 및 다중의 4B2 세포를 포함하는 챔버
HyHEL5는 포함하지 않고, 다중의 4B2 세포를 포함하는 챔버
세척
A
B
C
D
E
형광
타임 스탬프
F

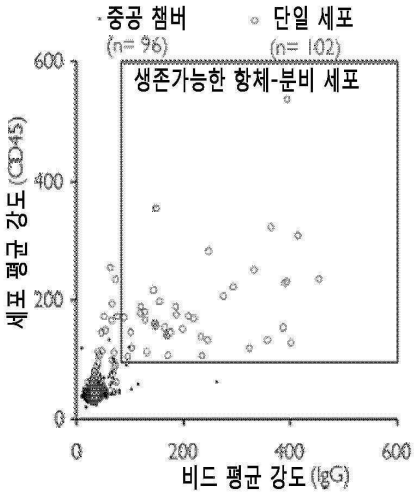
도면75


A
B
HyHEL5 음성 챔버
HEL 형광성 강도 (AU)
챔버 번호
C
HyHEL5 양성 챔버
HEL 형광성 강도 (AU)
챔버 번호
D

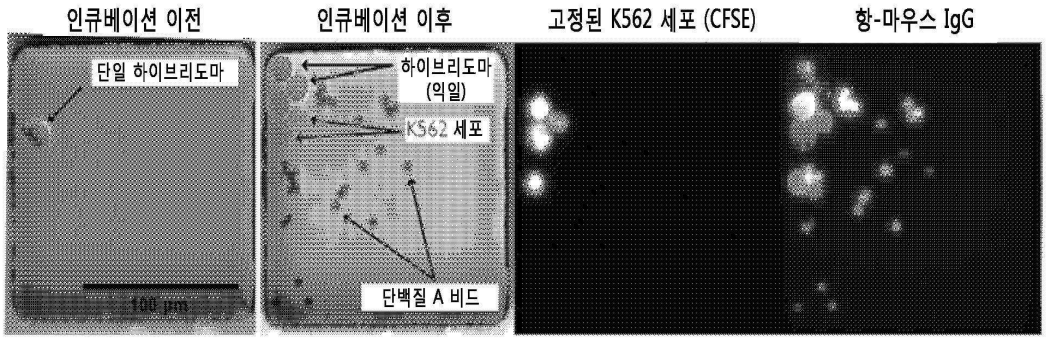
도면76


분비된 IgG
항-CD45
형광 표지된
항-마우스
4B2
하이브리도마
단백질 A
비드
K562 세포
(CD45+)

A

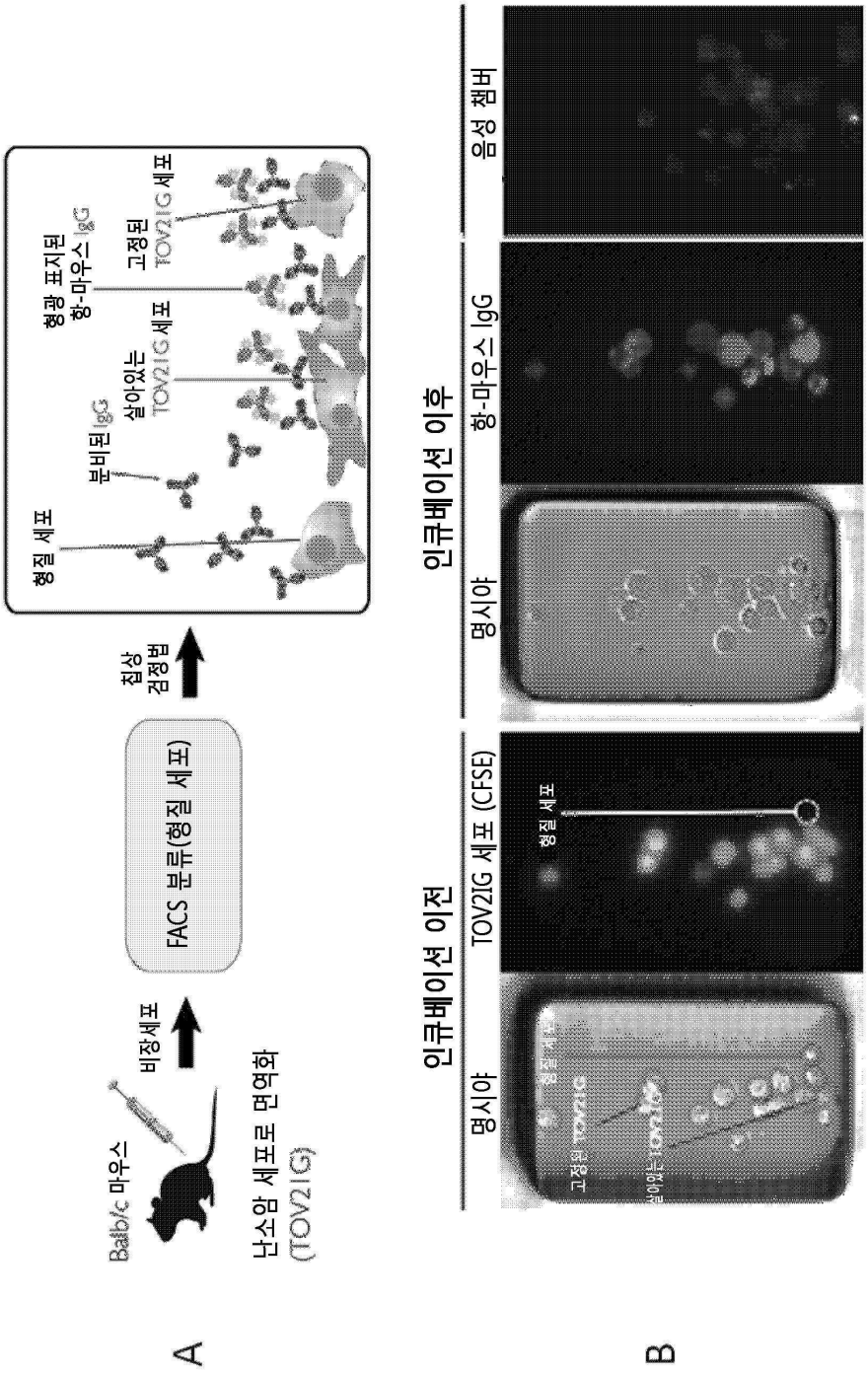

중공 챔버
(n= 96)
단일 세포
(n= 102)
생존가능한 항체-분비 세포
세포 평균 강도 (CD45)
비드 평균 강도 (IgG)
0
200
400
600

B

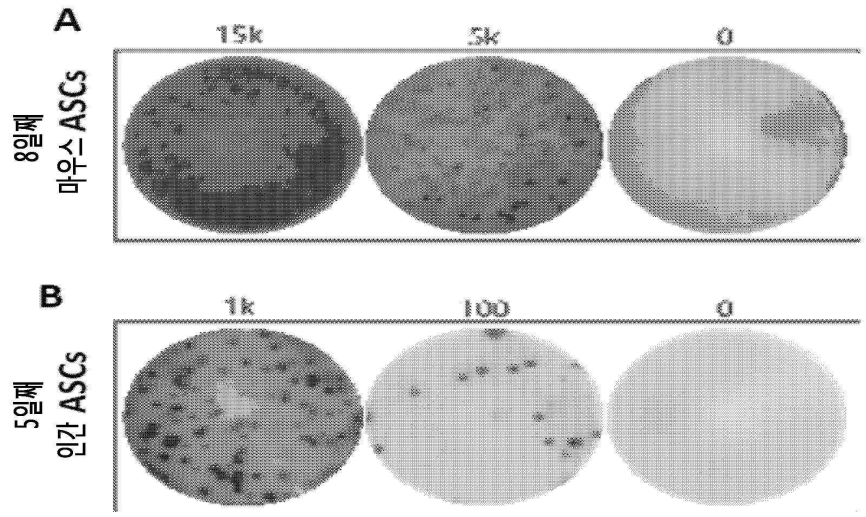

인큐베이션 이전
인큐베이션 이후
고정된 K562 세포 (CFSE)
항-마우스 IgG
단일 하이브리도마
하이브리도마
(익일)
K562 세포
단백질 A 비드
100 μm

C

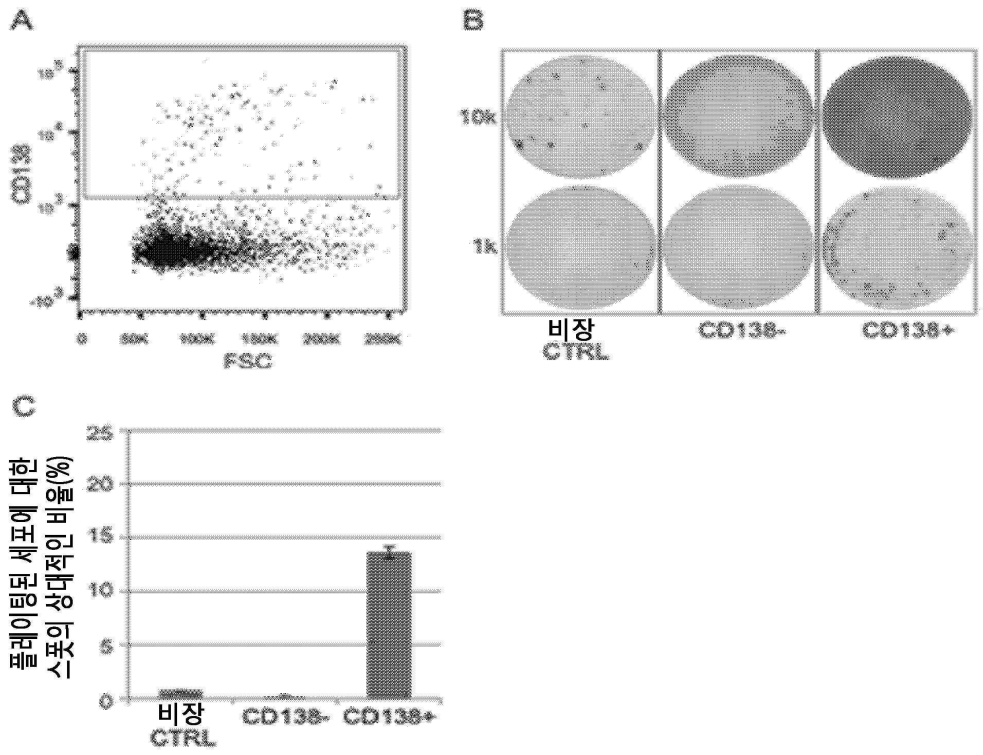
도면77


A
Balb/c 마우스
비장세포
난소암 세포로 면역화
(TOV21G)
FACS 분류(형질 세포)
침상
검정법
형질 세포
분비된 IgG
살아있는
TOV21G 세포
형광 표지된
항-마우스 IgG
고정된
TOV21G 세포
B
인큐베이션 이전
명시야
TOV21G 세포 (CFSE)
형질 세포
고정된 TOV21G
살아있는 TOV21G
인큐베이션 이후
명시야
항-마우스 IgG
음성 챔버

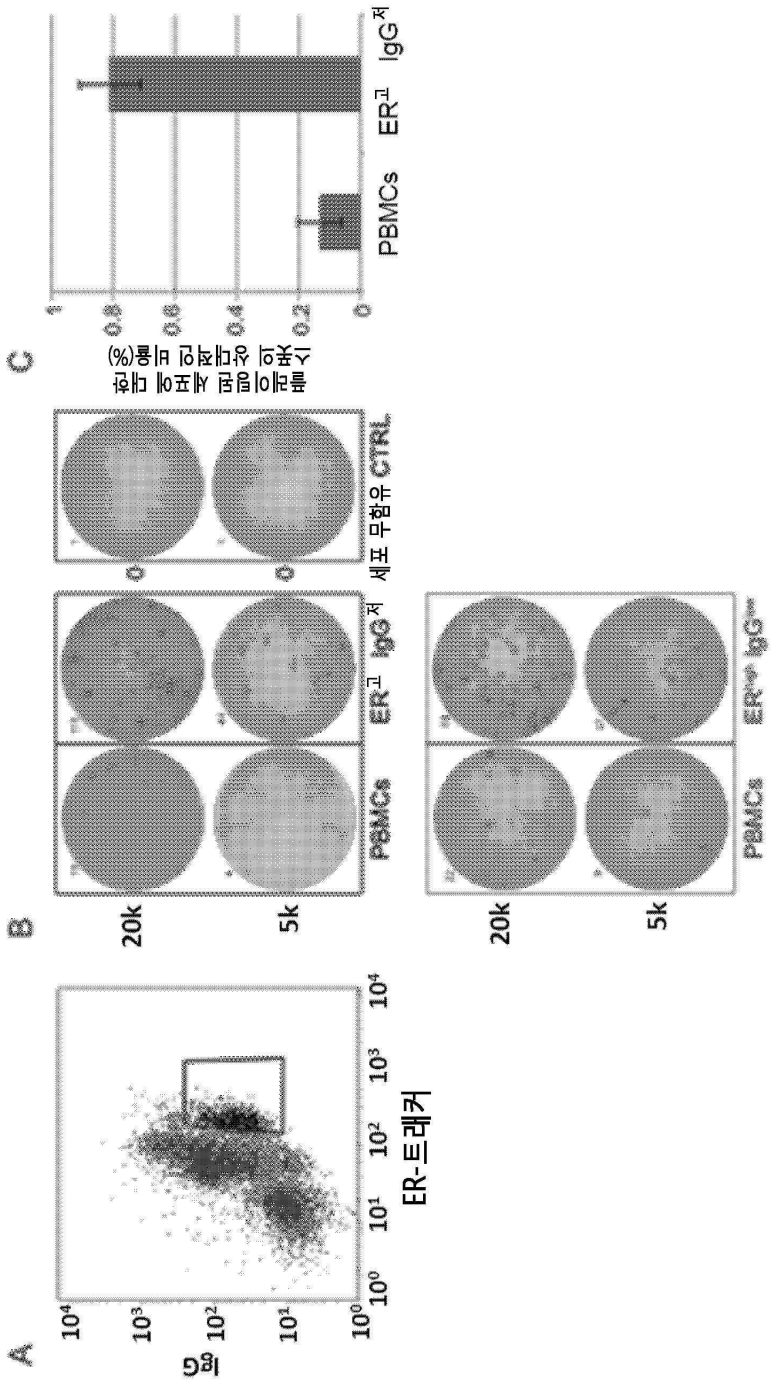
도면78


A
15k
5k
0
8일째
마우스 ASCs
B
1k
100
0
5일째
인간 ASCs

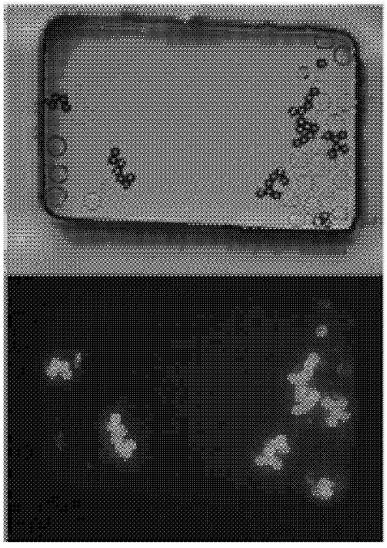
도면79


A
CD138
FSC
B
10k
1k
비장
CTRL
CD138-
CD138+
C
플레이팅된 세포에 대한
스폿의 상대적인 비율(%)
25
20
15
10
5
0
비장
CTRL
CD138-
CD138+

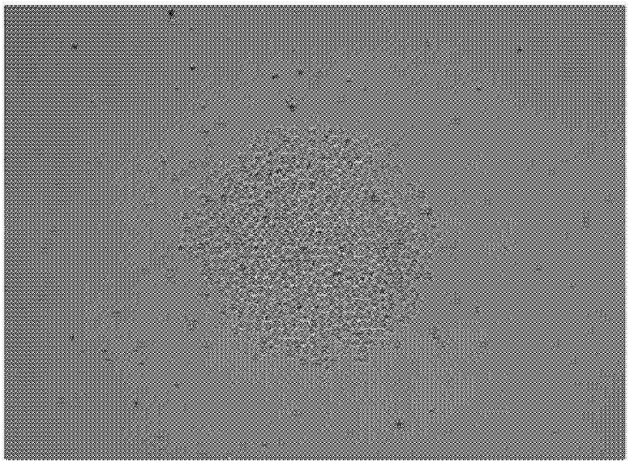
도면80


A
IgG
ER-트레커
B
20k
5k
PBMCs
ER고 IgG저
ER-/- IgG-/-
세포 무첨유 CTRL
C
플레이팅된 세포에 대한 Ig포의 상대적인 비율(%)
PBMCs
ER고 IgG저

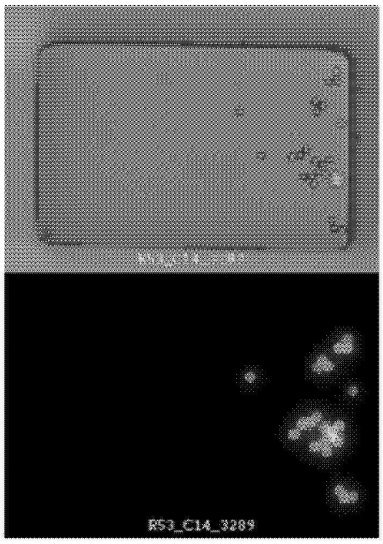
도면81



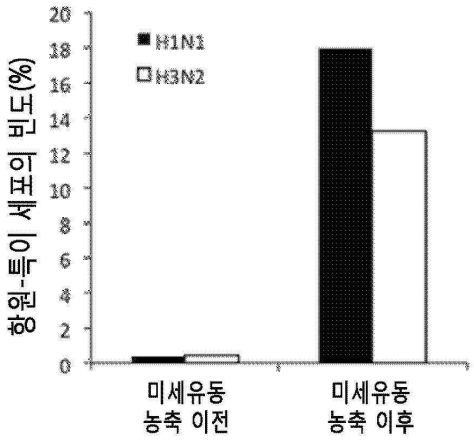
A



B

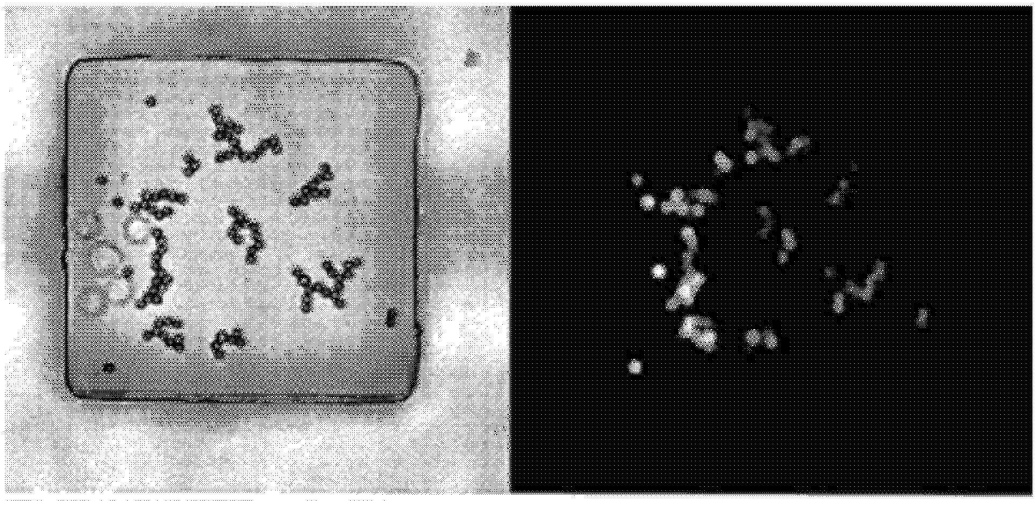

R53_C14_3289

C

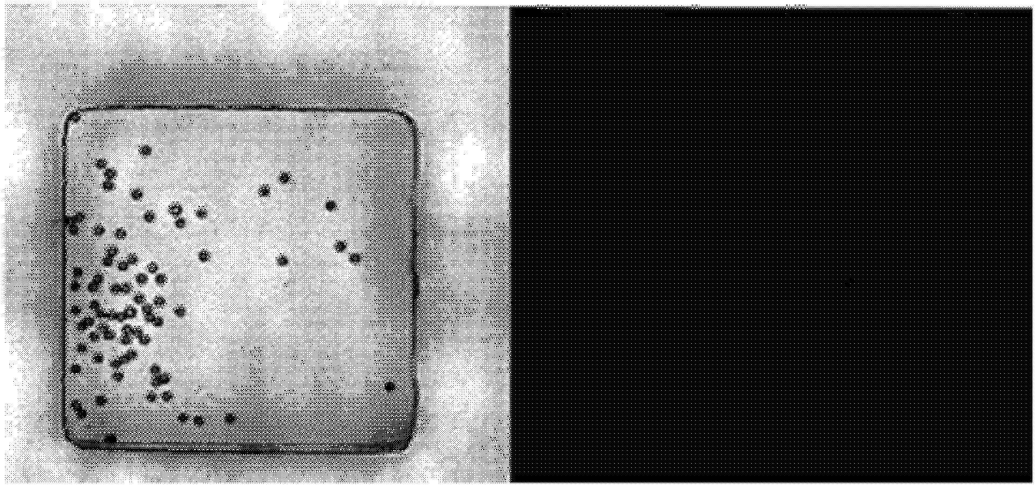

H1N1
H3N2
항원-특이 세포의 빈도(%)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
미세유동 농축 이전
미세유동 농축 이후

D

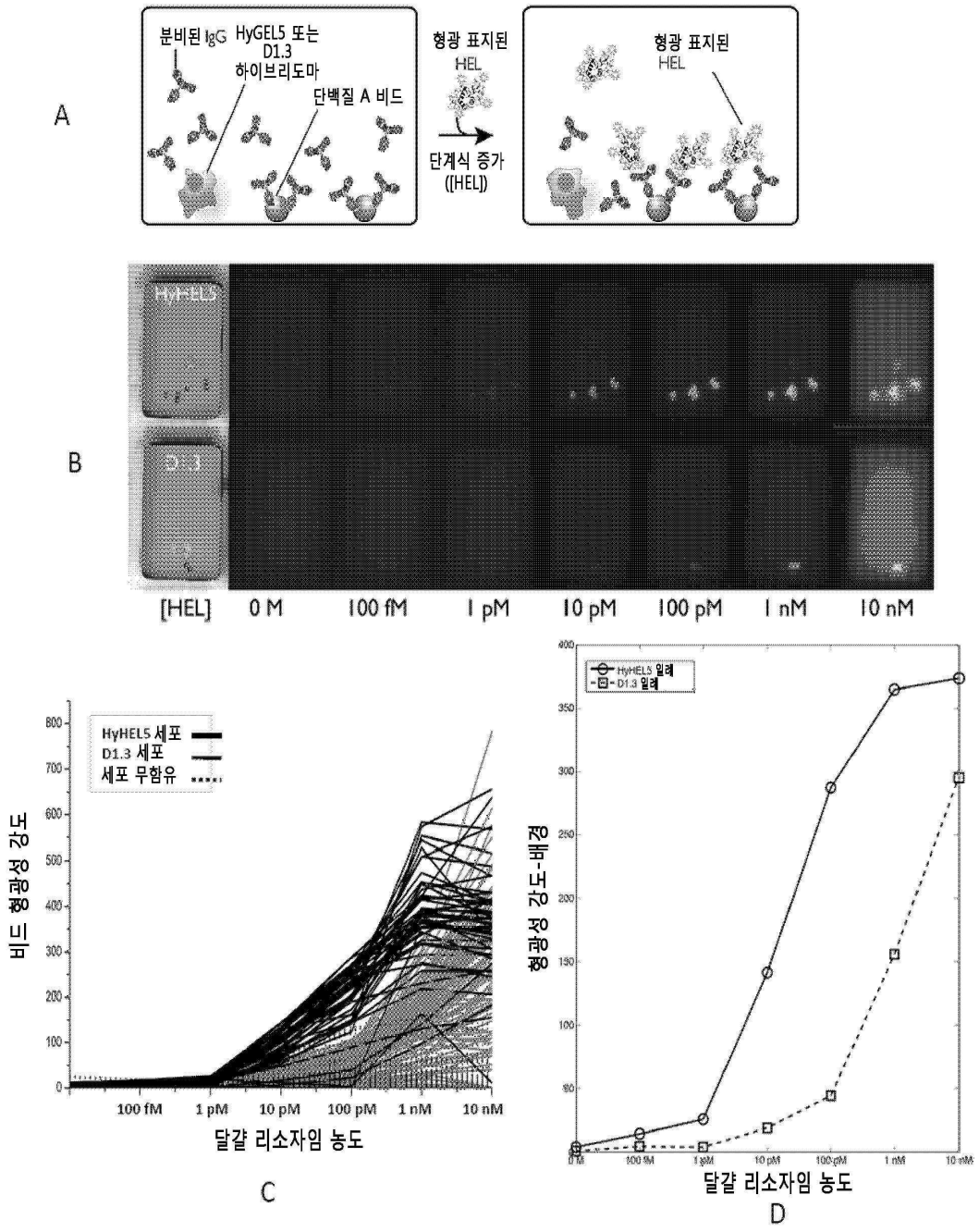
도면82



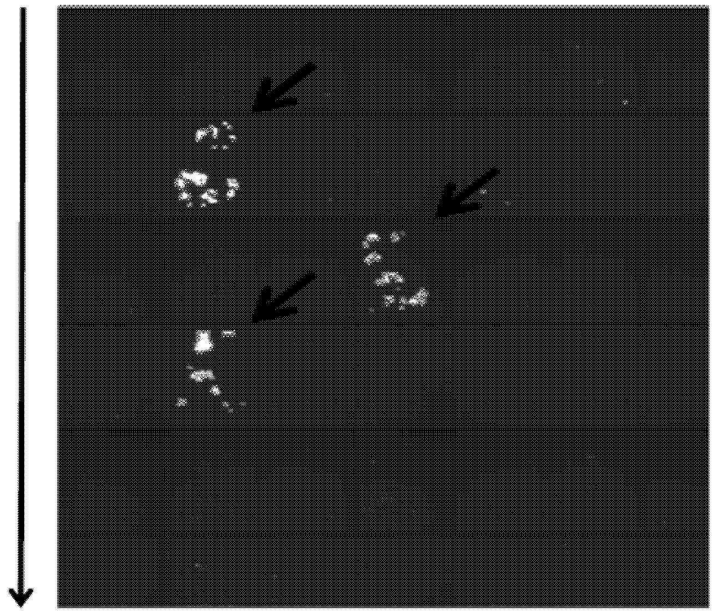
도면83



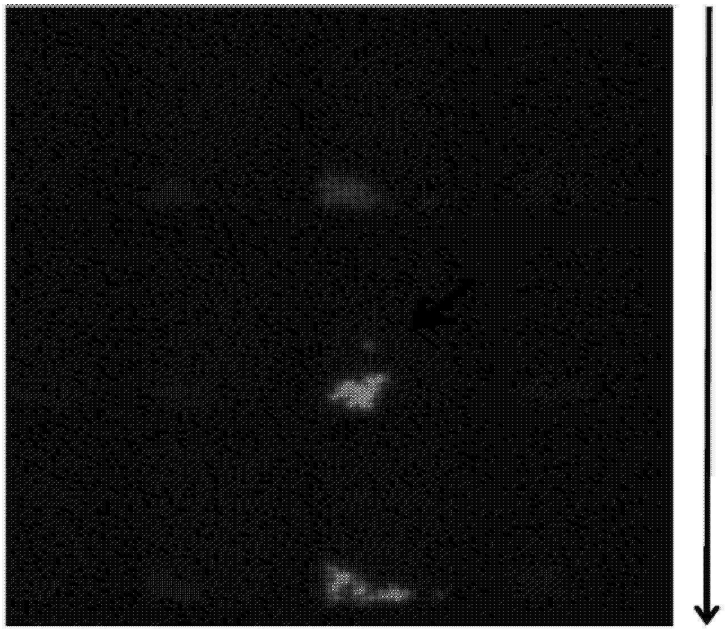
도면84


A
분비된 IgG
HyGEL5 또는
D1.3
하이브리도마
단백질 A 비드
형광 표지된
HEL
단계식 증가
([HEL])
형광 표지된
HEL
B
HyHEL5
D1.3
[HEL] 0 M 100 fM 1 pM 10 pM 100 pM 1 nM 10 nM
HyHEL5 세포
D1.3 세포
세포 무함유
비드 형광성 강도
100 fM 1 pM 10 pM 100 pM 1 nM 10 nM
달걀 리소자임 농도
C
HyHEL5 일례
D1.3 일례
형광성 강도-배경
달걀 리소자임 농도
D

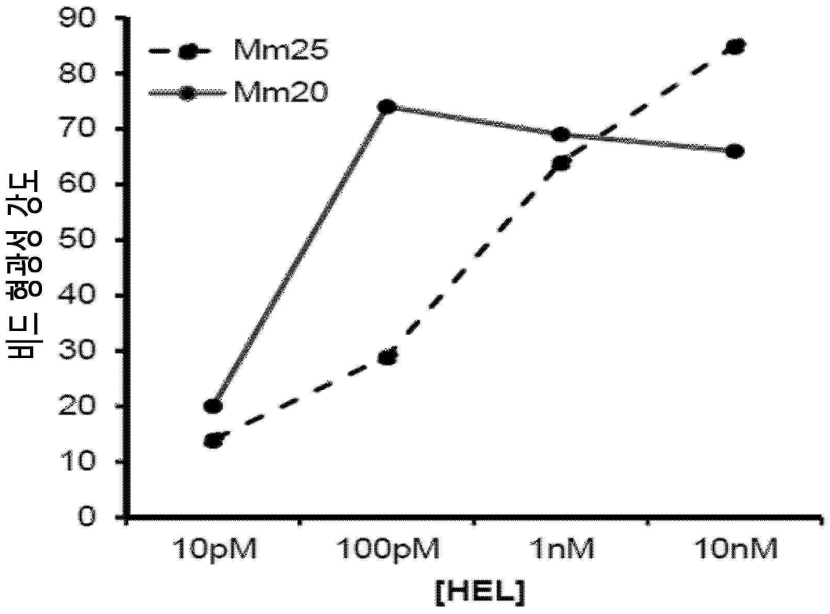
도면85



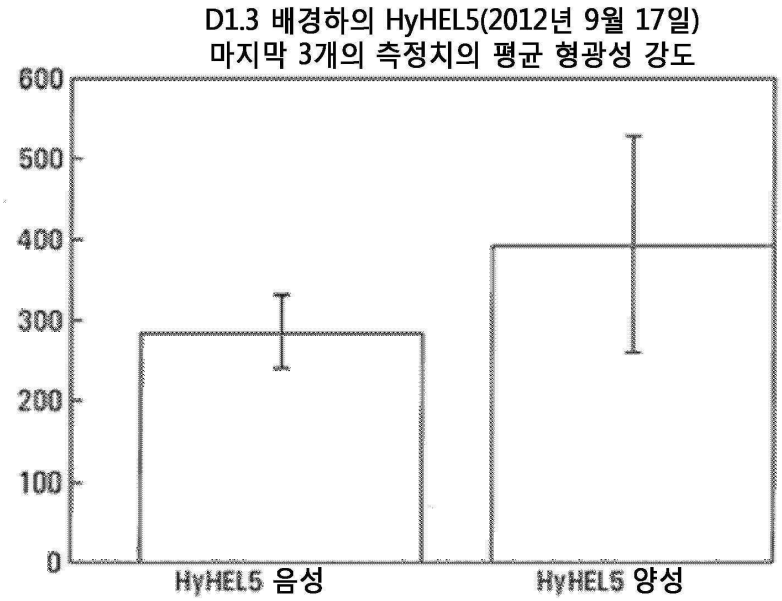
도면86



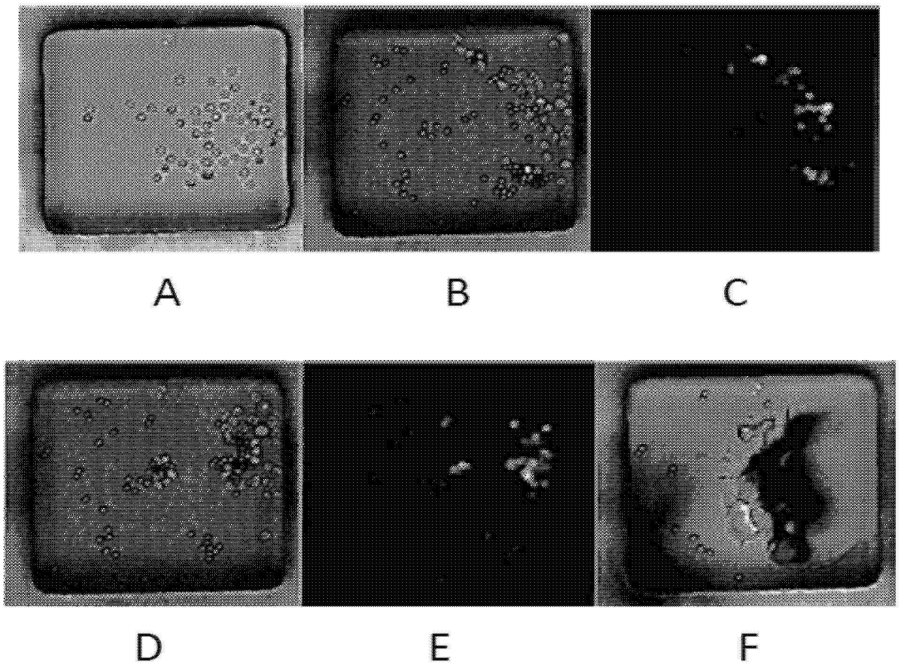
도면87


90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Mm25
Mm20
비드 형광성 강도
10pM
100pM
1nM
10nM
[HEL]

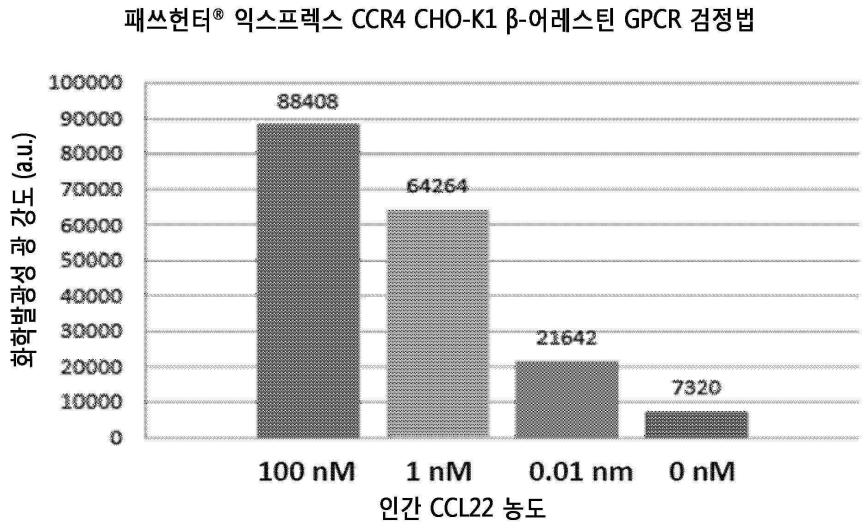
도면88


D1.3 배경하의 HyHEL5(2012년 9월 17일)
마지막 3개의 측정치의 평균 형광성 강도
600
500
400
300
200
100
0
HyHEL5 음성
HyHEL5 양성

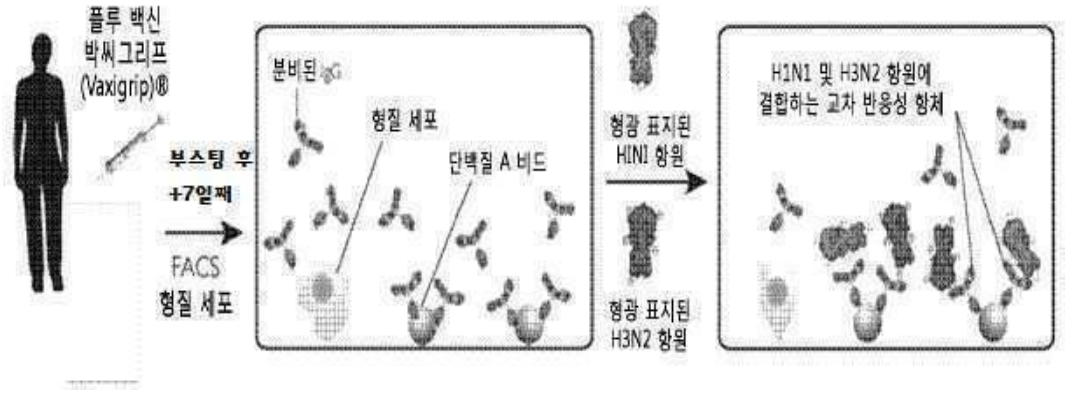
도면89


A
B
C
D
E
F

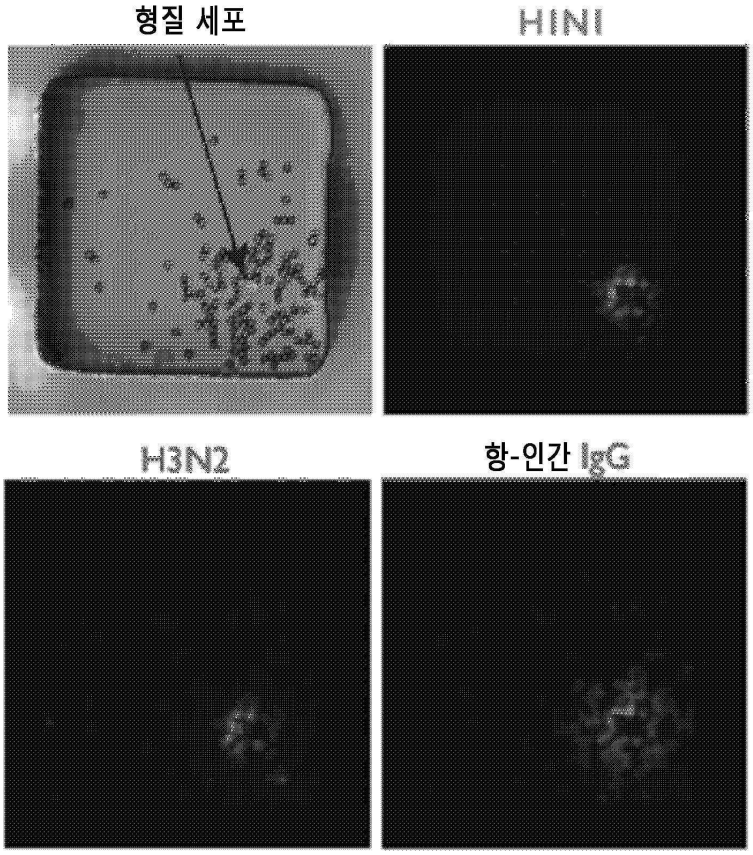
도면90


패쓰헌터® 익스프렉스 CCR4 CHO-K1 β-어레스틴 GPCR 검정법
화학발광성 광 강도 (a.u.)
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
88408
64264
21642
7320
100 nM
1 nM
0.01 nm
0 nM
인간 CCL22 농도

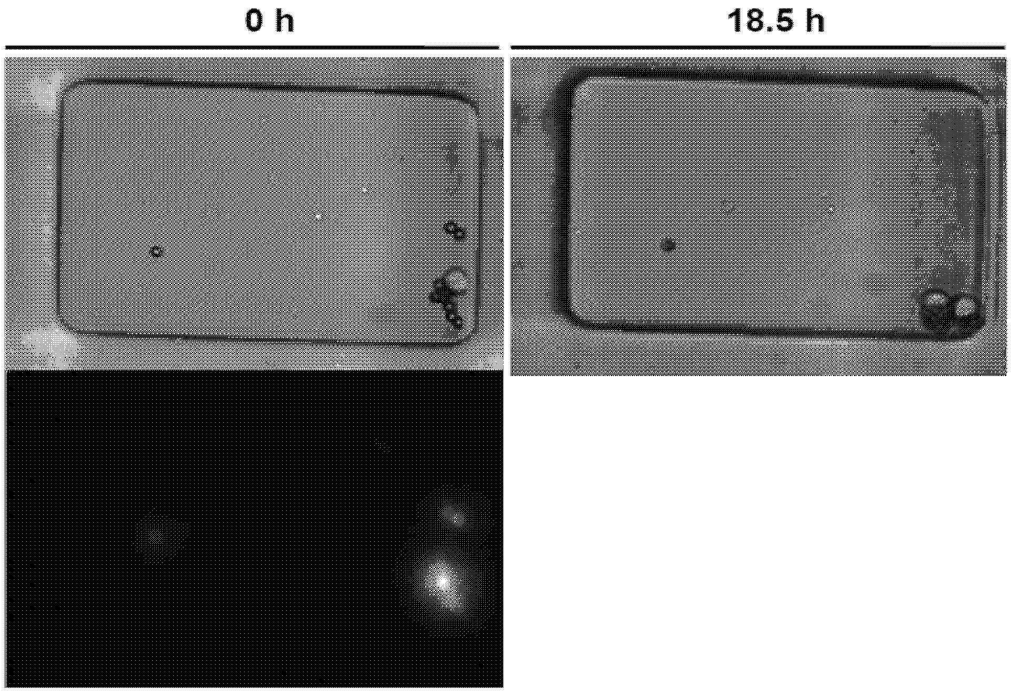
도면91


플루 백신
박씨그리프
(Vaxigrip)®
부스팅 후
+7일째
FACS
형질 세포
분비된 IgG
형질 세포
단백질 A 비드
형광 표지된
H1N1 항원
형광 표지된
H3N2 항원
H1N1 및 H3N2 항원에
결합하는 고차 반응성 항체

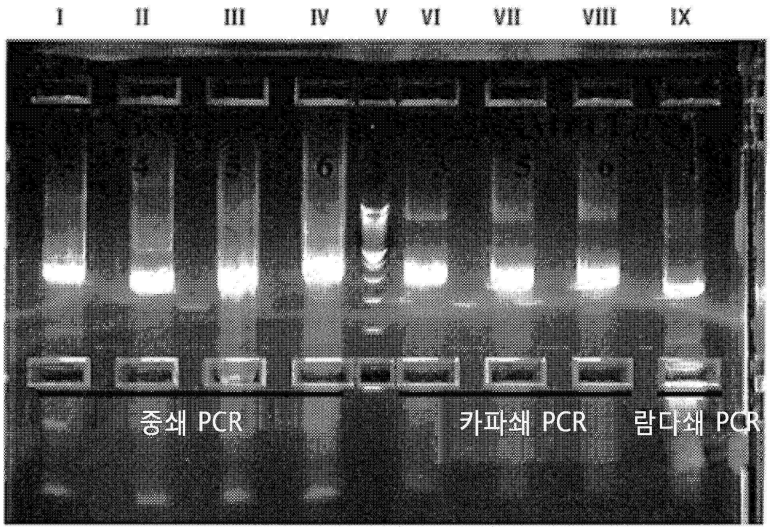
도면92


형질 세포
H1N1
H3N2
항-인간 IgG

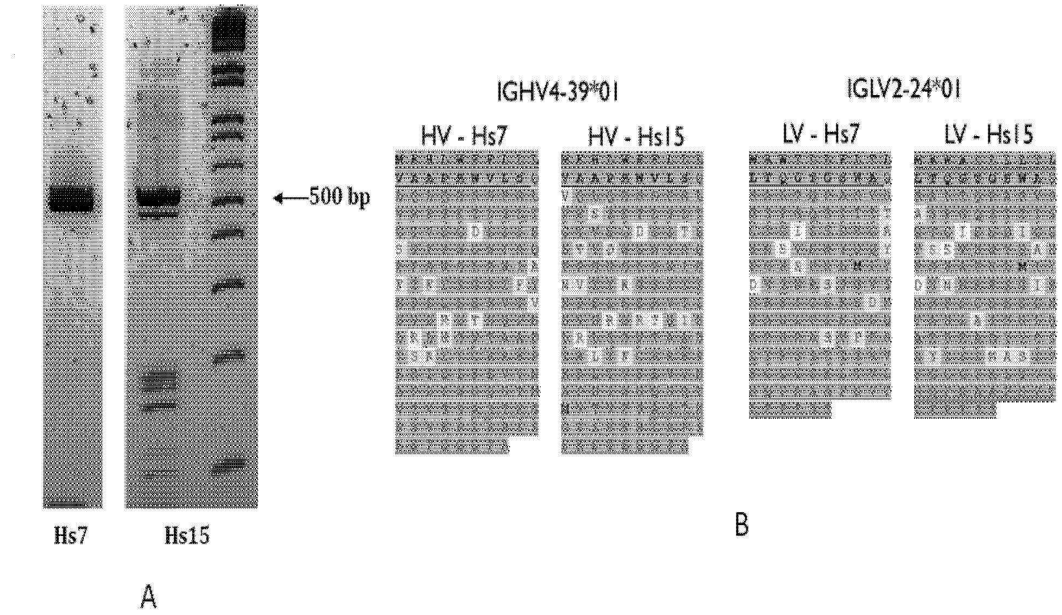
도면93

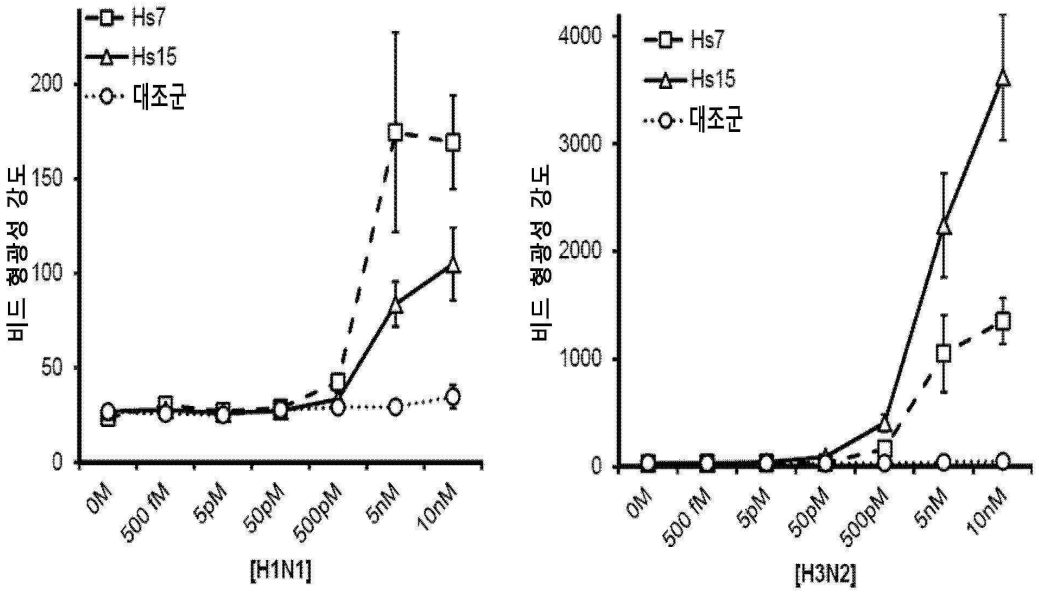


도면94

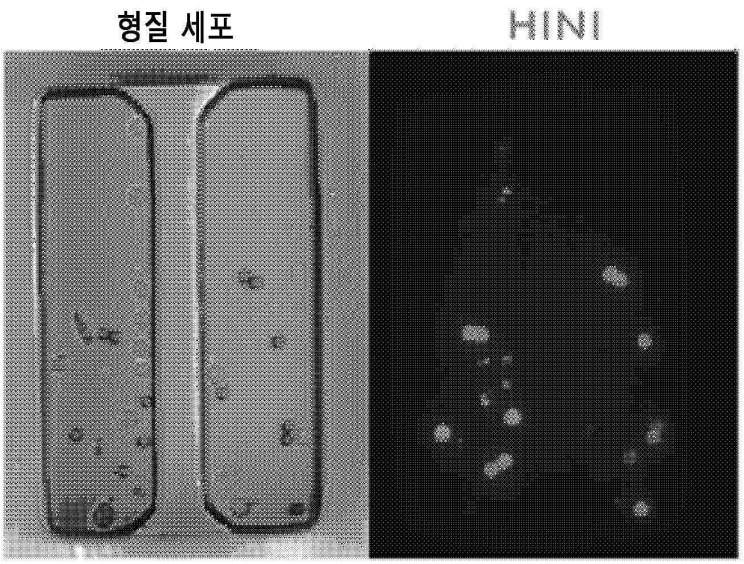


도면95

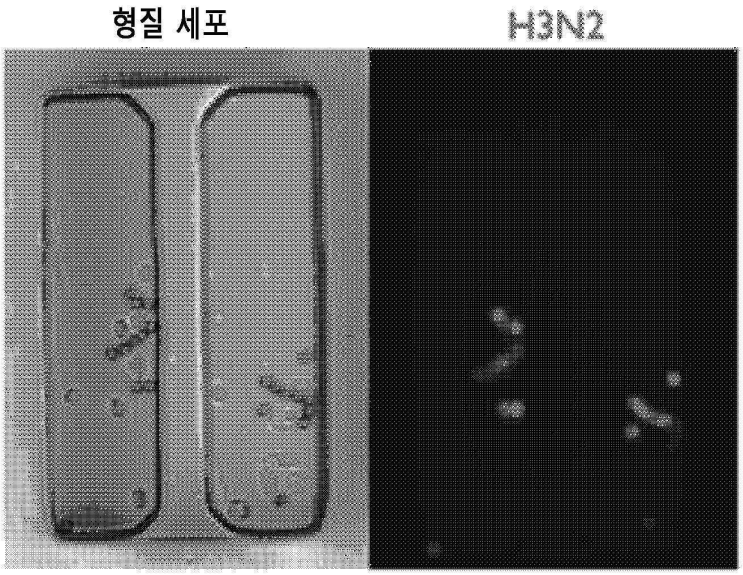

500 bp
Hs7
Hs15
A
IGHV4-39*01
HV - Hs7
HV - Hs15
IGLV2-24*01
LV - Hs7
LV - Hs15
B


Hs7
Hs15
대조군
비드 형광성 강도
200
150
100
50
0
0M
500 fM
5pM
50pM
500pM
5nM
10nM
[H1N1]
4000
3000
2000
1000
[H3N2]
C

도면96

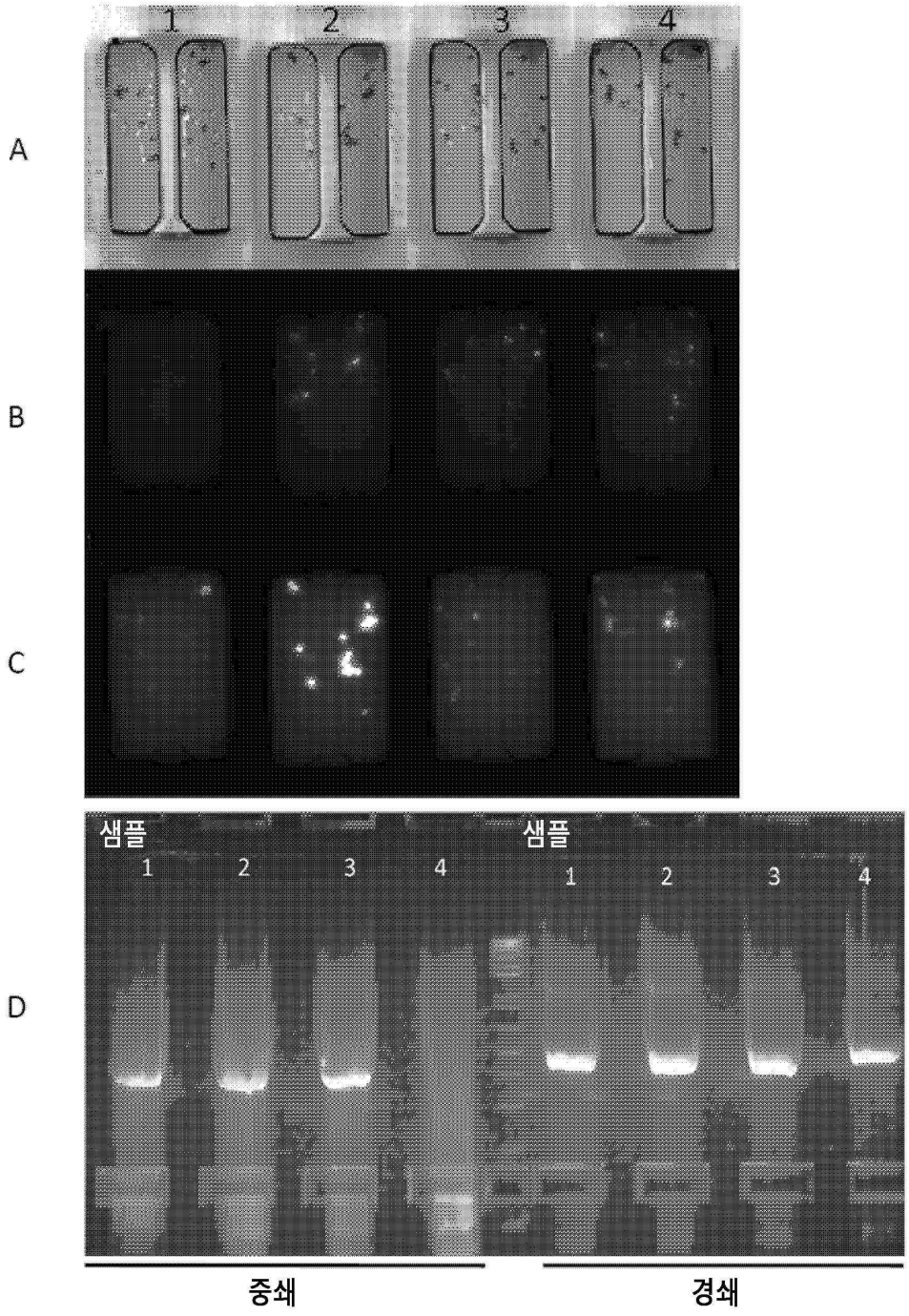


A

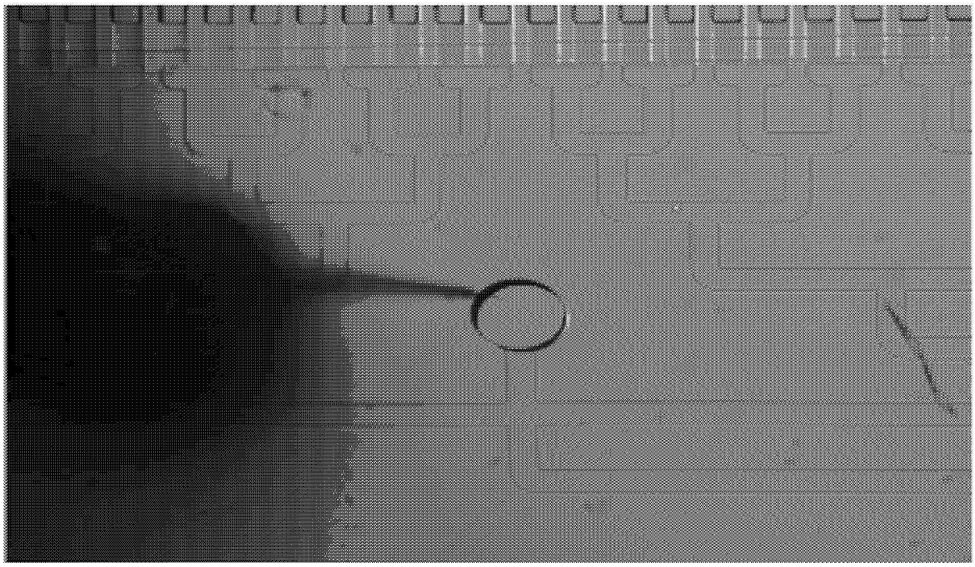


B

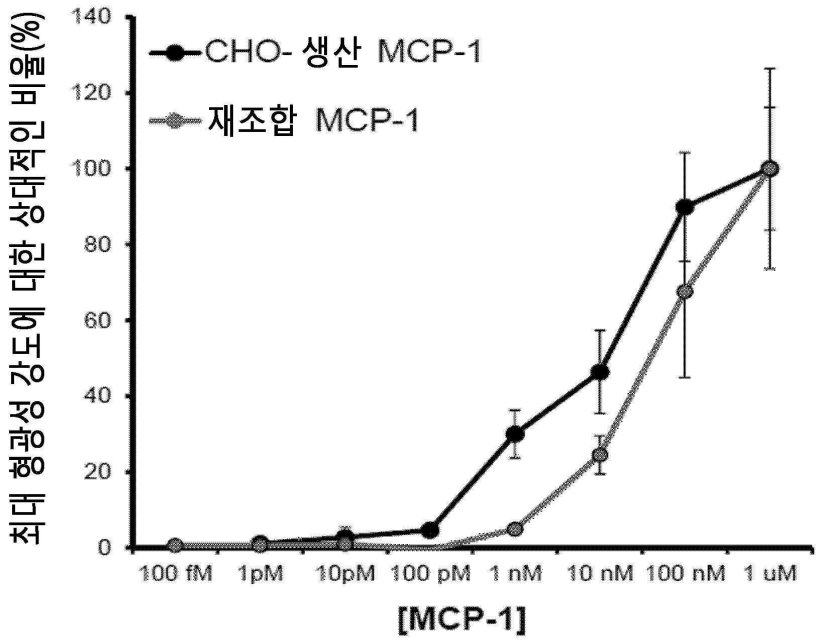
도면97



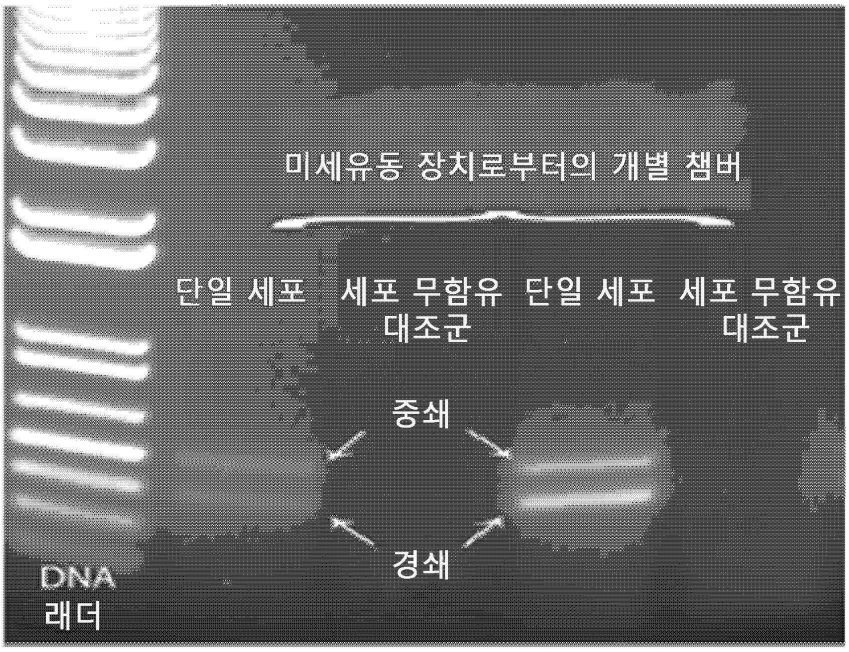
도면98



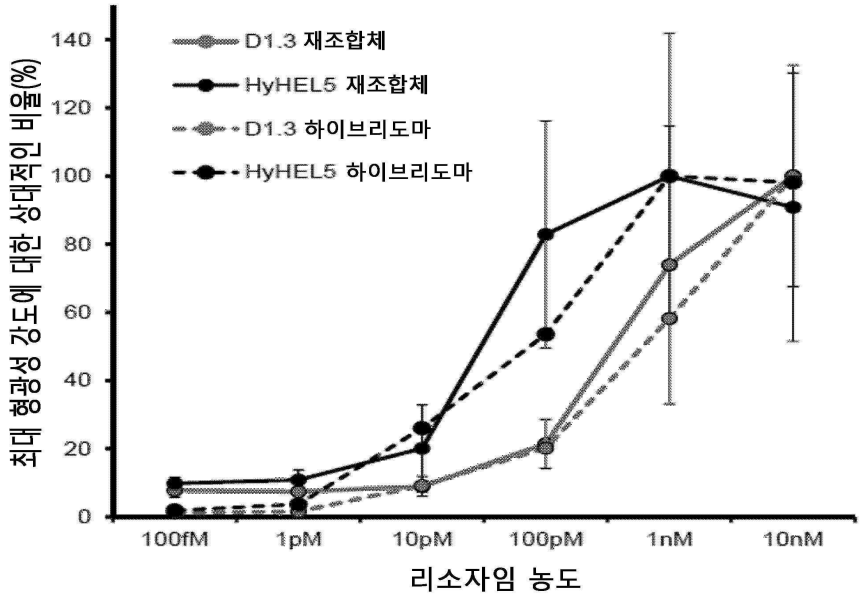
도면99


140
120
100
80
60
40
20
0
CHO- 생산 MCP-1
재조합 MCP-1
최대 형광성 강도에 대한 상대적인 비율(%)
100 fM
1pM
10pM
100 pM
1 nM
10 nM
100 nM
1 uM
[MCP-1]

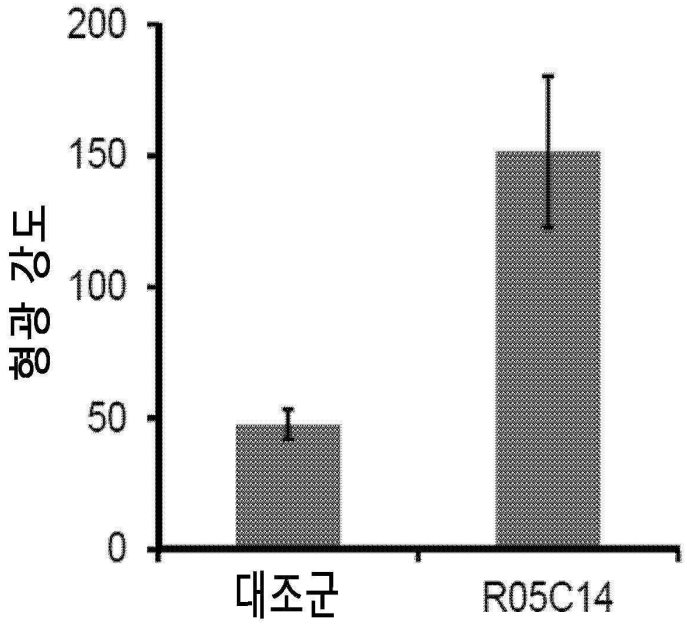
도면100


미세유동 장치로부터의 개별 챔버
단일 세포
세포 무함유 대조군
단일 세포
세포 무함유 대조군
중쇄
경쇄
DNA 래더

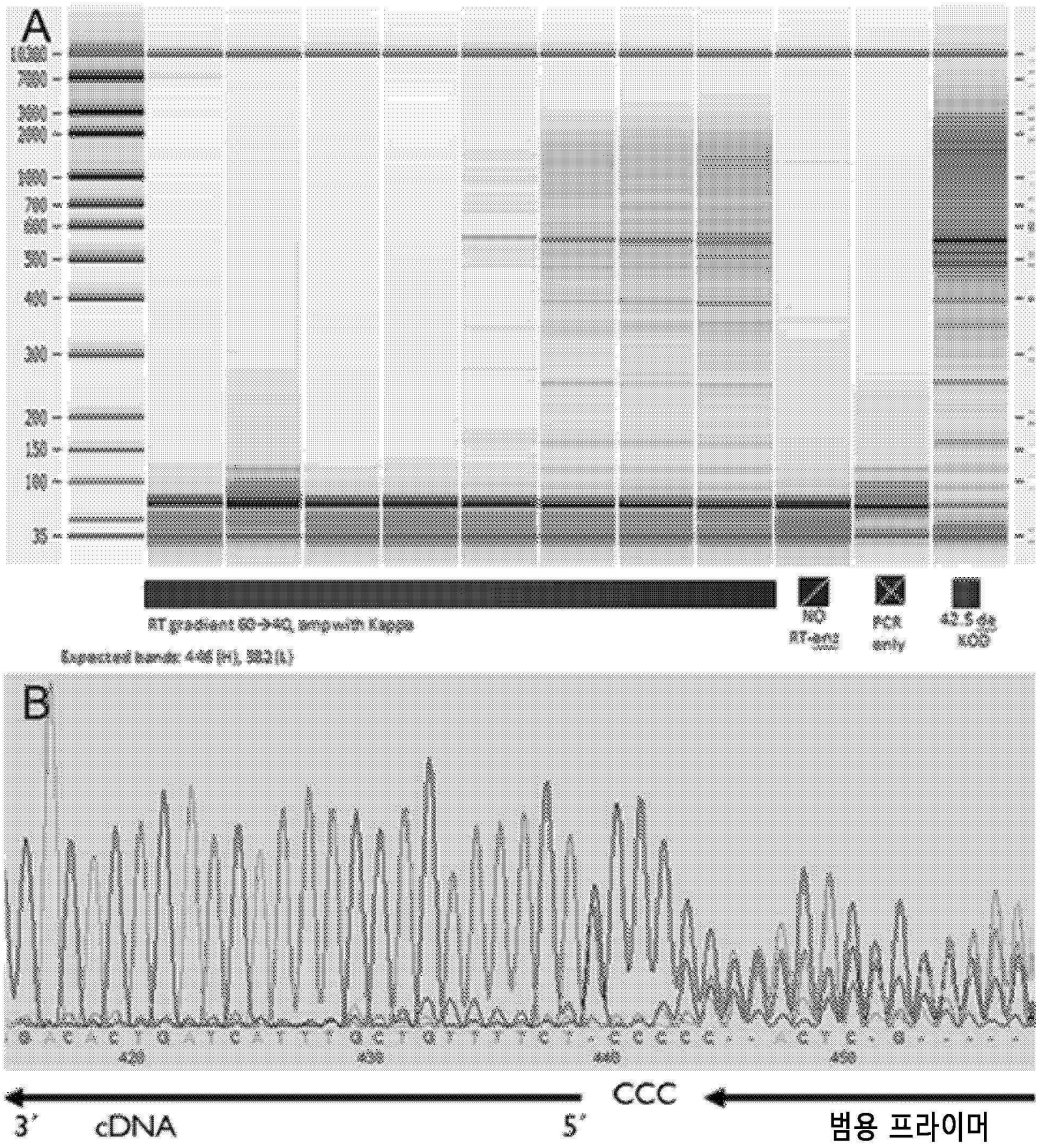
도면101


D1.3 재조합체
HyHEL5 재조합체
D1.3 하이브리도마
HyHEL5 하이브리도마
최대 형광성 강도에 대한 상대적인 비율(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
100fM
1pM
10pM
100pM
1nM
10nM
리소자임 농도

도면102

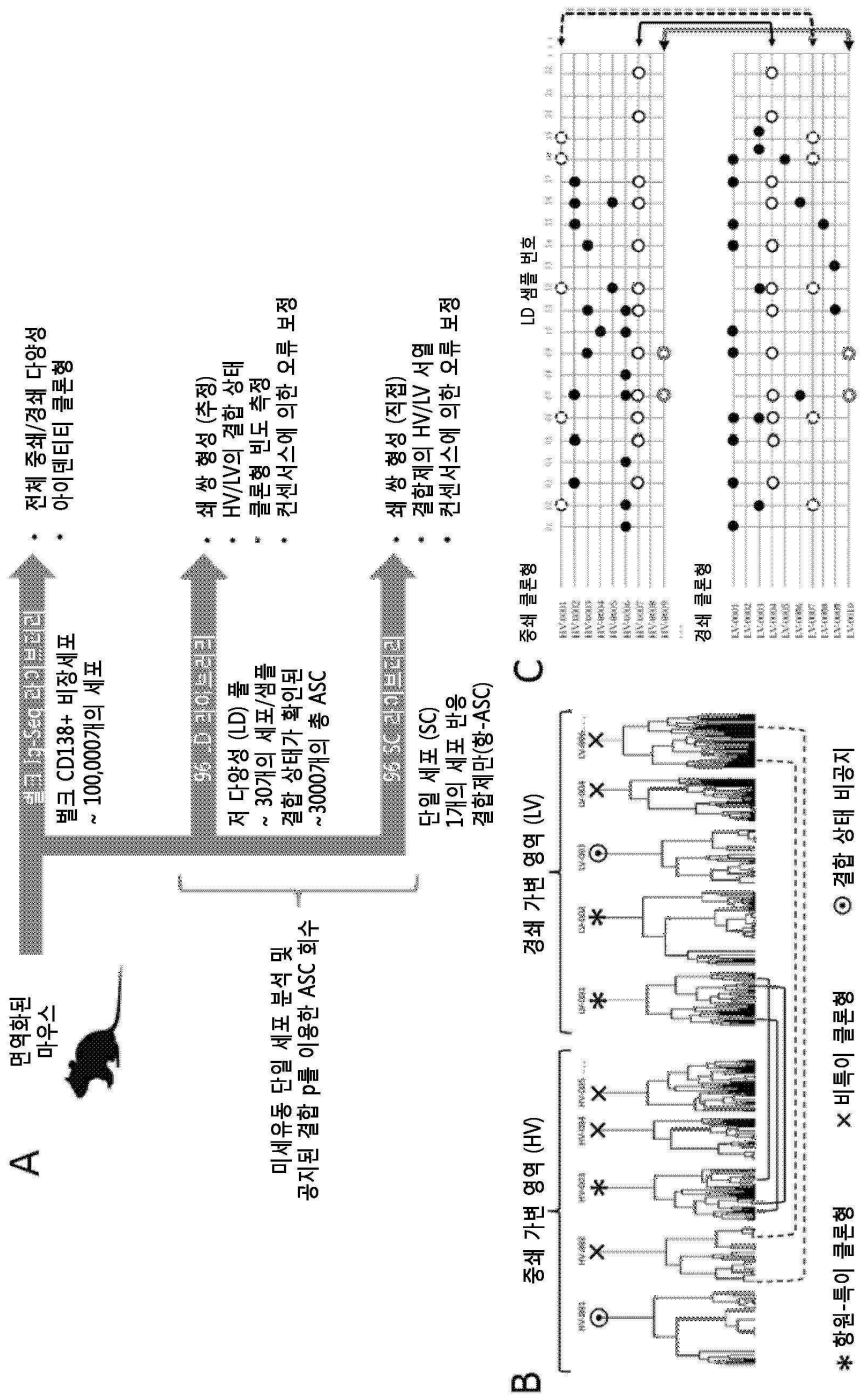


도면103

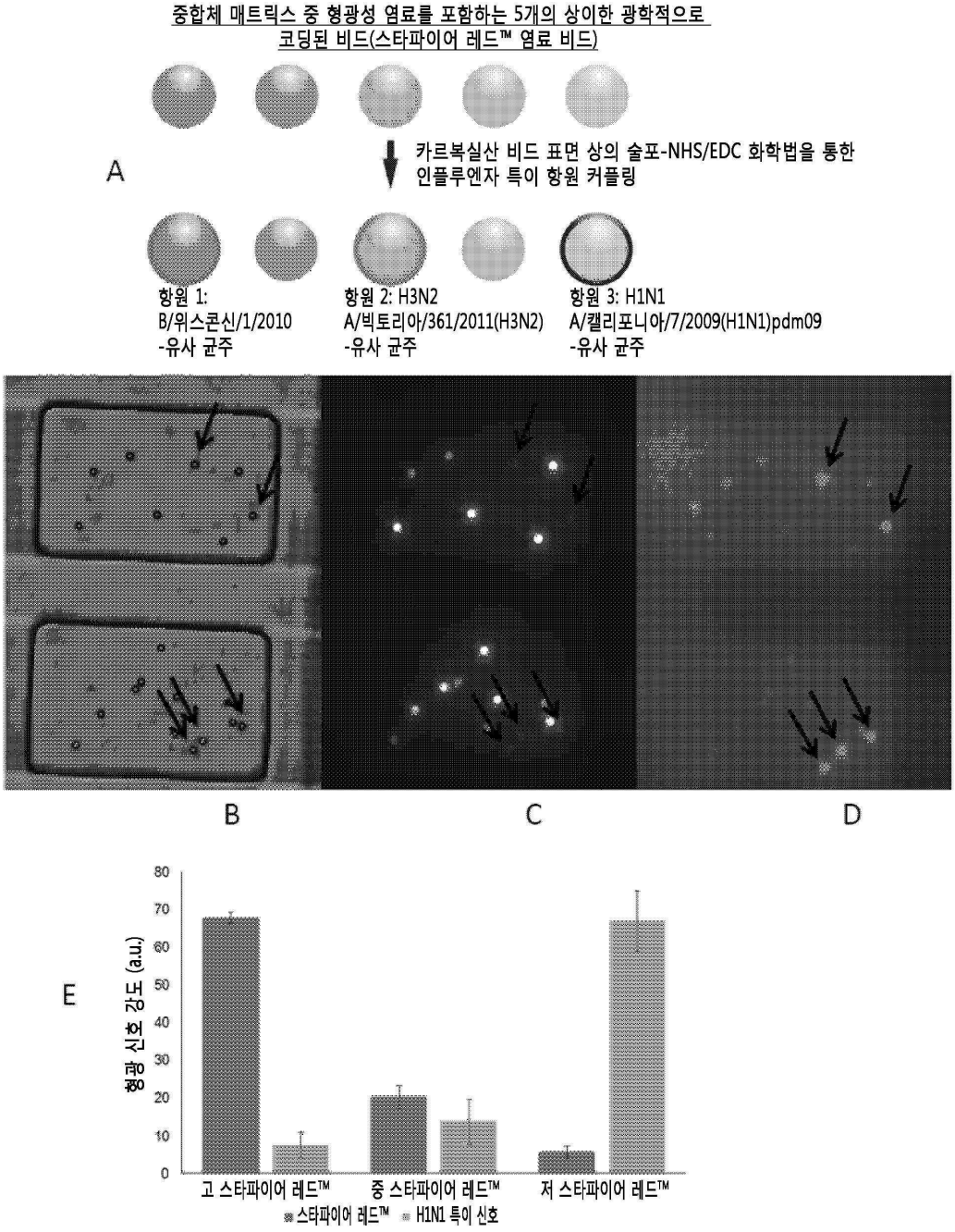


주형 교환 위치

도면104

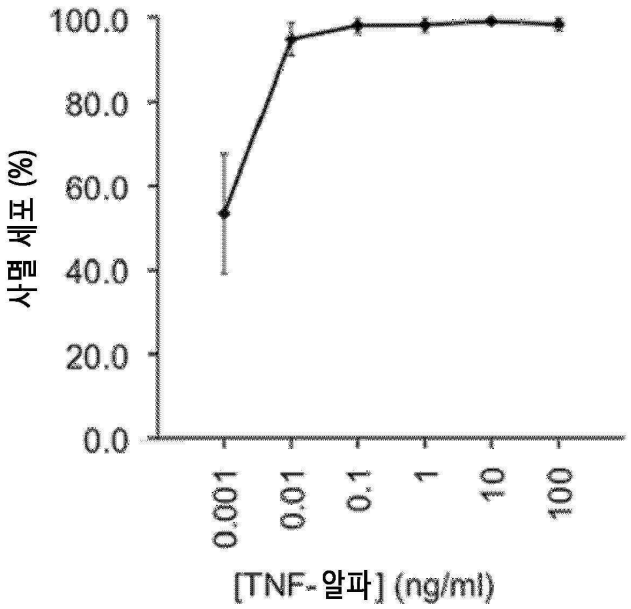

A
면역화된 마우스
벌크 CD138+ 비장세포
~ 100,000개의 세포
전체 중쇄/경쇄 다양성
아이덴티티 클론형
저 다양성 (LD) 풀
~ 30개의 세포/샘플
결합 상태가 확인된
~3000개의 총 ASC
쇄 쌍 형성 (추정)
HV/LV의 결합 상태
클론형 빈도 측정
컨센서스에 의한 오류 보정
단일 세포 (SC)
1개의 세포 반응
결합제만(항-ASC)
쇄 쌍 형성 (직접)
결합제의 HV/LV 서열
컨센서스에 의한 오류 보정
미세유동 단일 세포 분석 및
공지된 결합 p를 이용한 ASC 회수
B
중쇄 가변 영역 (HV)
경쇄 가변 영역 (LV)
항원-특이 클론형
비특이 클론형
결합 상태 비공지
C
중쇄 클론형
경쇄 클론형
LD 샘플 번호

도면105

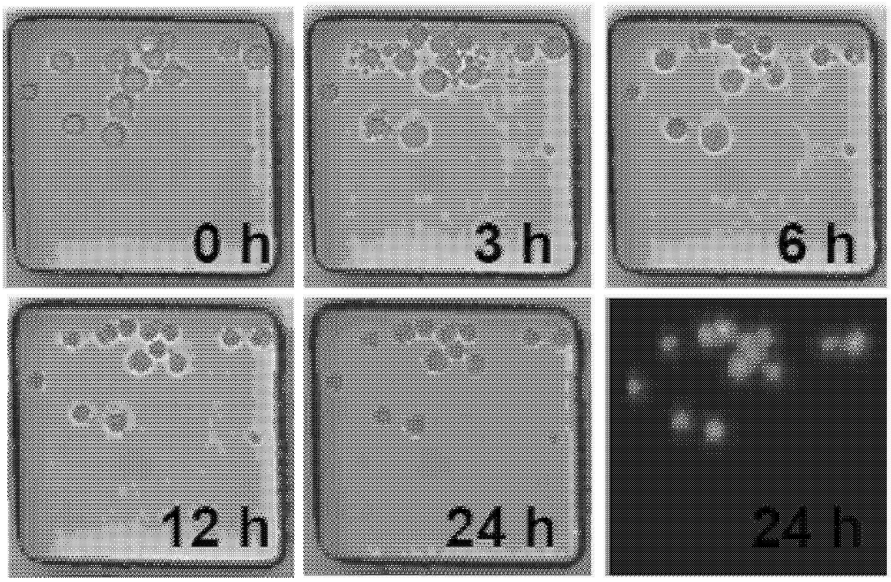

중합체 매트릭스 중 형광성 염료를 포함하는 5개의 상이한 광학적으로 코딩된 비드(스타파이어 레드™ 염료 비드)
A
카르복실산 비드 표면 상의 술포-NHS/EDC 화학법을 통한 인플루엔자 특이 항원 커플링
항원 1:
B/위스콘신/1/2010
-유사 균주
항원 2: H3N2
A/빅토리아/361/2011(H3N2)
-유사 균주
항원 3: H1N1
A/캘리포니아/7/2009(H1N1)pdm09
-유사 균주
B
C
D
E
형광 신호 강도 (a.u.)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
고 스타파이어 레드™
중 스타파이어 레드™
저 스타파이어 레드™
스타파이어 레드™
H1N1 특이 신호

도면106

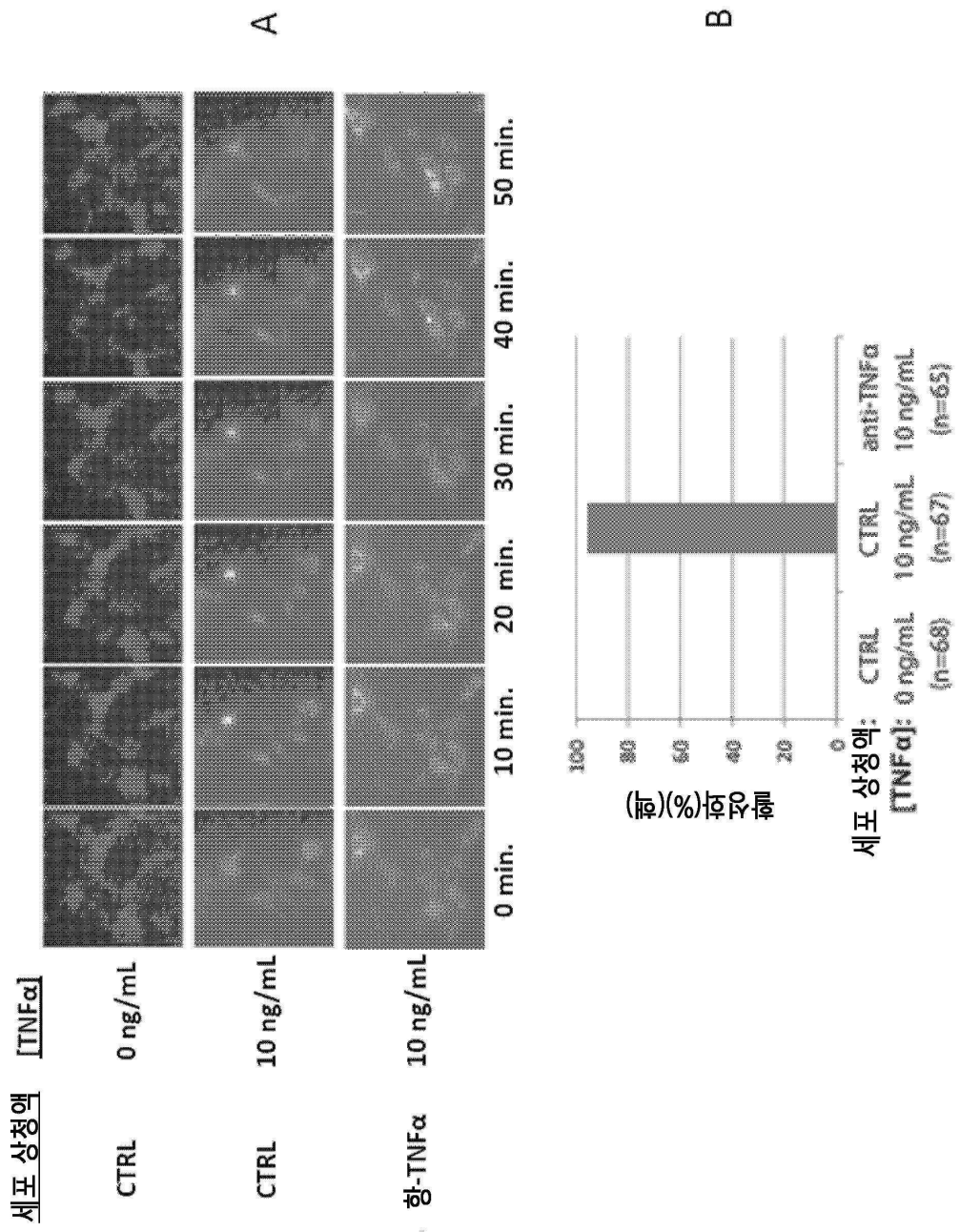
A


100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
사멸 세포 (%)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[TNF-알파] (ng/ml)

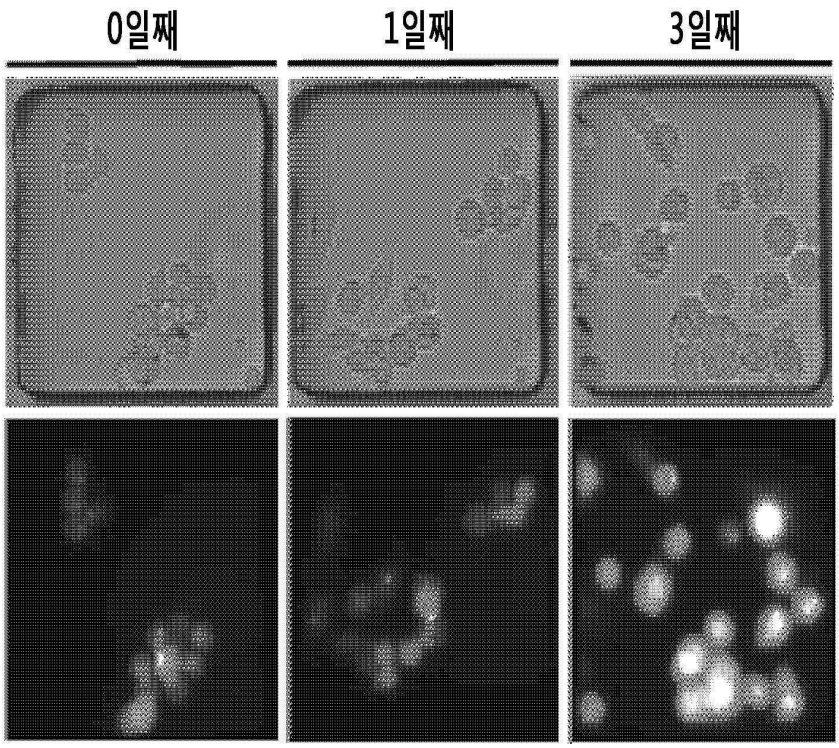
B


0 h
3 h
6 h
12 h
24 h
24 h

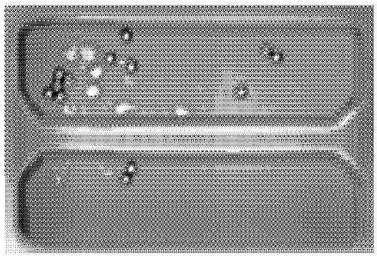
도면107


A
세포 상청액
[TNFα]
CTRL
0 ng/mL
CTRL
10 ng/mL
항-TNFα
10 ng/mL
0 min.
10 min.
20 min.
30 min.
40 min.
50 min.
B
활성화(%)(핵)
100
80
60
40
20
0
세포 상청액:
[TNFα]:
CTRL
0 ng/mL
(n=68)
CTRL
10 ng/mL
(n=67)
anti-TNFα
10 ng/mL
(n=63)

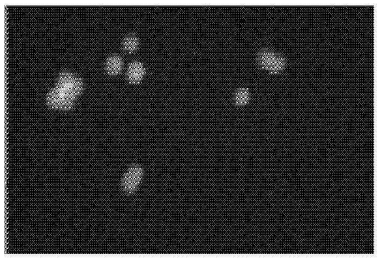
도면108



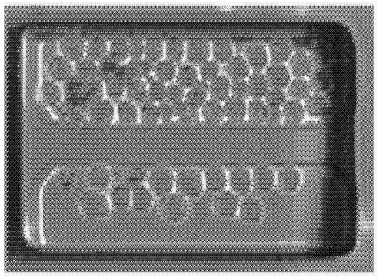
도면109



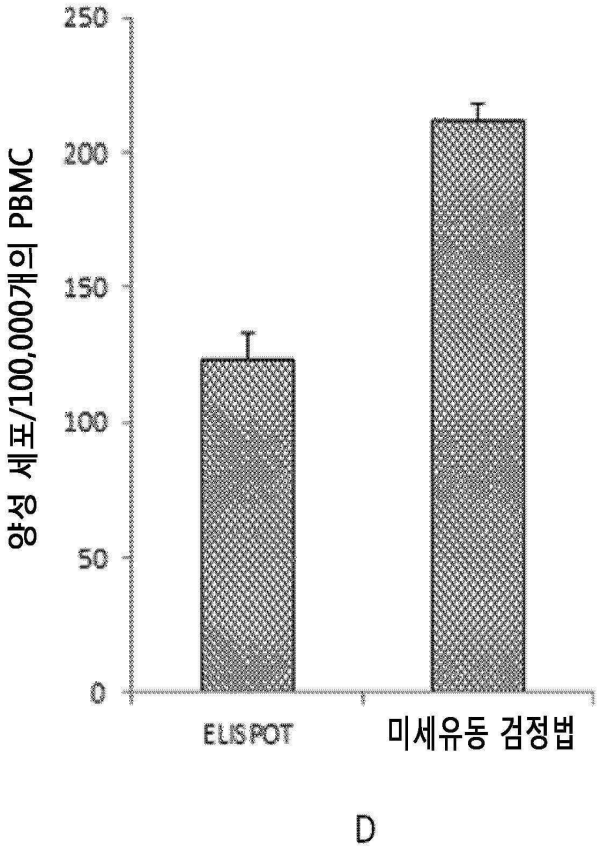
A



B

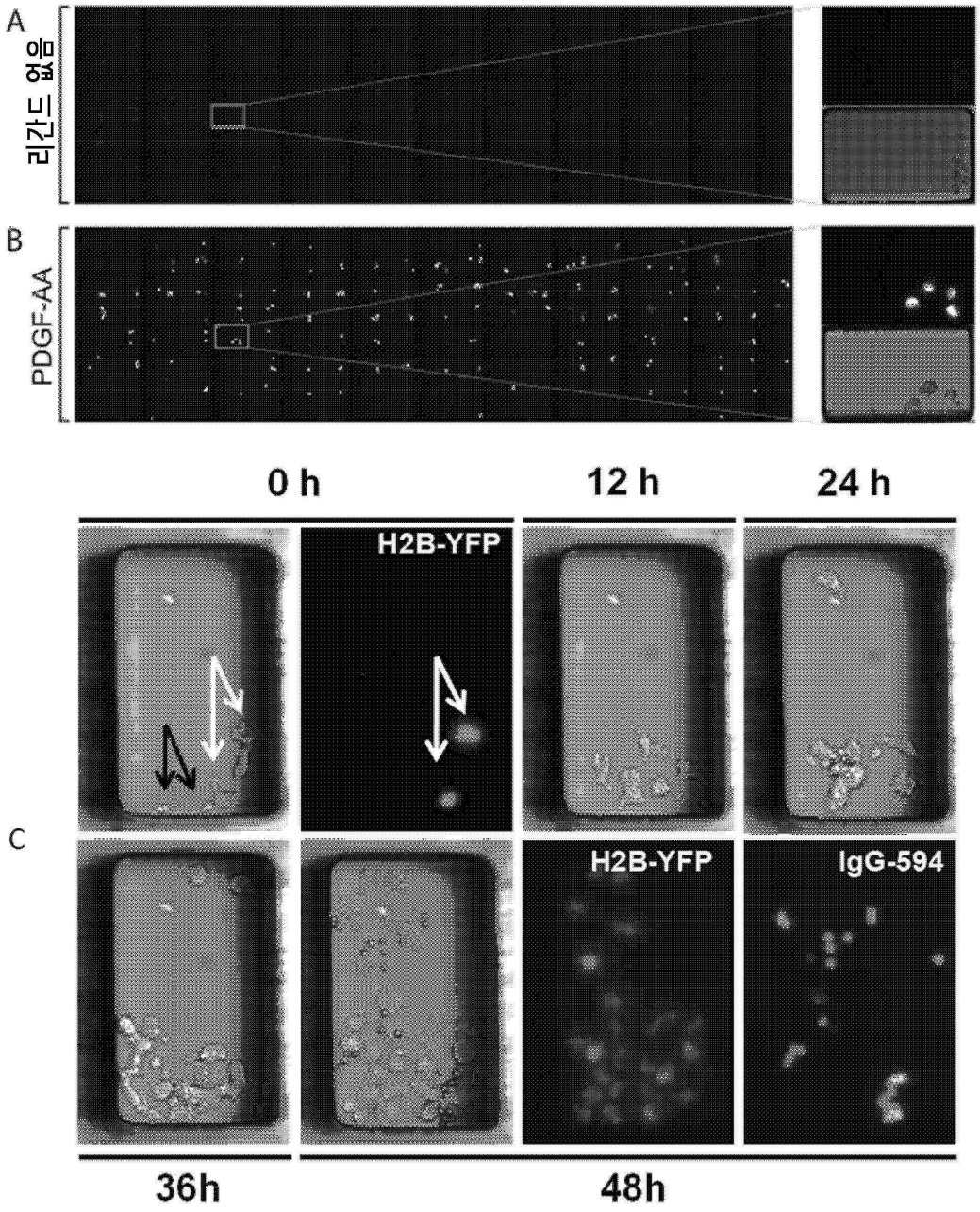


C

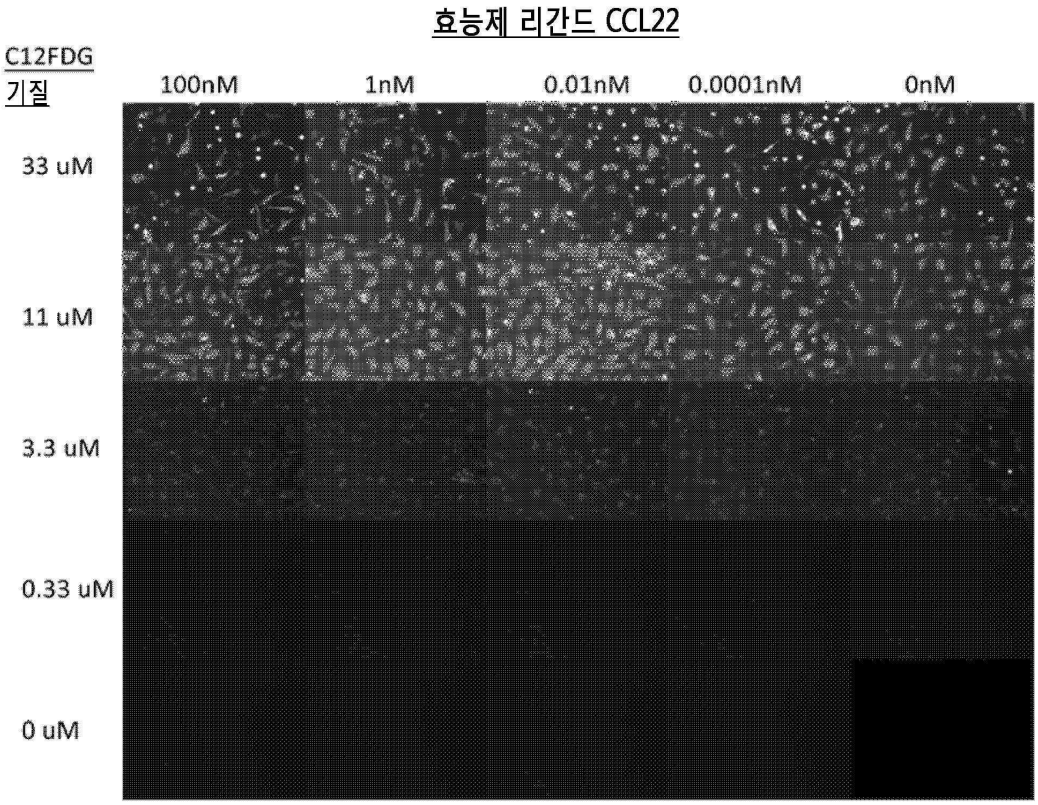


D

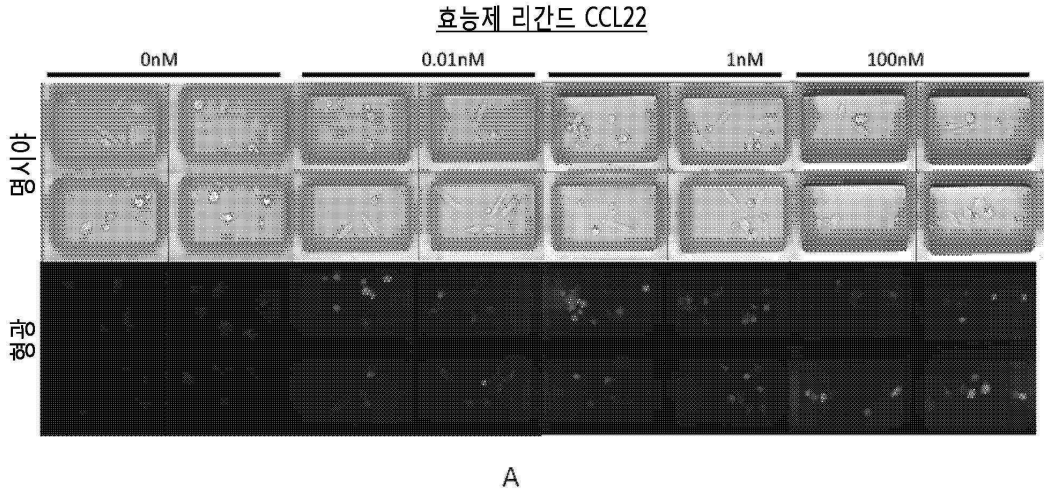
도면110



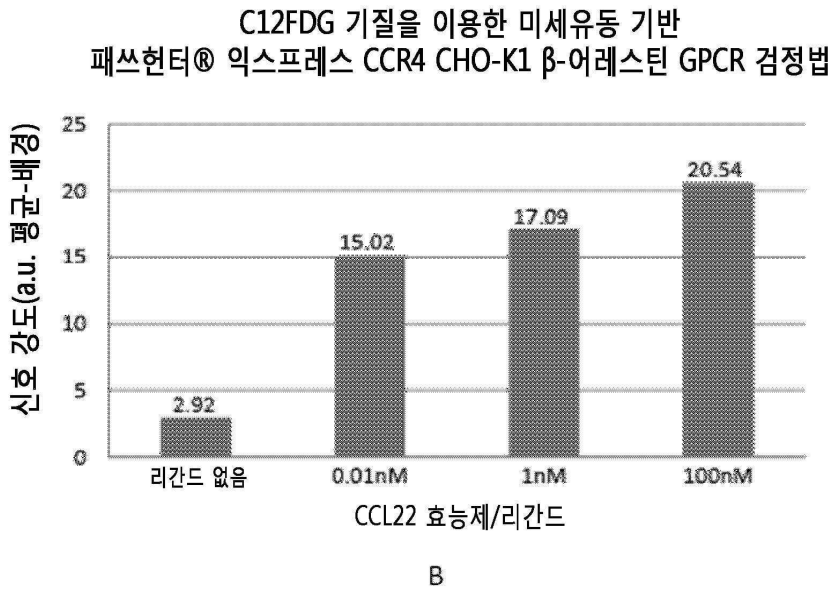
도면111


효능제 리간드 CCL22
C12FDG
기질
100nM
1nM
0.01nM
0.0001nM
0nM
33 uM
11 uM
3.3 uM
0.33 uM
0 uM

도면112



A



B

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA

<120> MICROFLUIDIC DEVICES AND METHODS FOR USE THEREOF IN MULTICELLULAR ASSAYS OF SECRETION

<130> IPA151048-US-D1

<150> US 61/806,329

<151> 2013-03-28

<160> 78

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 395

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 1

atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag 60

gttcagctgc agcagtctgg acctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120

tgcaaggcaa ctggctacac attcagaaac tactggatag agtggataaa gcagaggcct 180

ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctgaaa gtggtagtat taattacaat 240

gagaaattca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacttg 300

caactccgca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt attgttttta tgataattac 360

gtttttgact actggggcca aggcaccact ctcac 395

<210> 2

<211> 131

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Arg Asn Tyr Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Glu Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn

85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Phe Tyr Asp Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Thr Leu

130

<210> 3

<211> 372

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 3

atggattctc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgcctcggt catactatcc 60

agtggacaaa ttgttctcat ccagtctcca acaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120

gtcaccatga cctgcagtgc caactcaagt ttcagttaca tgcactggta ccagcagaag 180

tcaggcacct cccccaaaag atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtccct 240

gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaattag cagcatggag 300

gctgaagatg ctgccactta ttactgtcag cagtggagta gaaaccccac gttcggtgct 360

ggaccaagct ga 372

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Met Asp Ser Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Ile Leu Ser Ser Gly Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Thr Ile

20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn

35 40 45

Ser Ser Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser

50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

100 105 110

Ser Arg Asn Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu

115 120

<210> 5

<211> 347

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 5

atgcaagcag tggtatcaac gcagagtacg gggaaggagt caggacctgg cttggtggcg 60

ccctcacaga gcatgtccat catgtgcact gtctctgggt tttcattaag caactatggt 120

gtacactggg ttcgccagcc tccaggaaag ggtctggagt ggctgggagt aatttgggct 180

ggtggaaaca caaattataa ttcggctctc atgtccagac tgagcatcag caaagacaag 240

tccaagagtc aagttttctt aaaaatgaac cgtctggaaa ctgatgacac agccatgtac 300

tatctgtgcc agtgtaggat ggttacccct tgcttactgg gccaagg 347

<210> 6

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 6

Met Gln Ala Val Val Ser Thr Gln Ser Thr Gly Lys Glu Ser Gly Pro

1 5 10 15

Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Met Ser Ile Met Cys Thr Val Ser

20 25 30

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro

35 40 45

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr

50 55 60

Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Lys

65 70 75 80

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Arg Leu Glu Thr Asp Asp

85 90 95

Thr Ala Met Tyr Tyr Leu Cys Gln Cys Arg Met Val Thr Pro Cys Leu
100 105 110

Leu Gly Gln
115

<210> 7

<211> 369

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 7

atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60

gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120

atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt atttctgtag cctggtatca acagaaacca 180

ggacaatctc ctaaactact gatttactcg gcatcctacc ggtacactgg agtccctgat 240

cgcttcactg gcagtggatc tgggacggat ttcactttca ccatccgcag tgtgcaggct 300

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctcctttcac gtcggctcgg 360

gacaaagtg 369

<210> 8

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Ser Ile Ser Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Arg

85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr

100 105 110

Ser Thr Pro Phe Thr Ser Ala Arg Asp Lys Val

115 120

<210> 9

<211> 545

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatgggt cctgtctcag 60

gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagtctt cggagaccct gtccctcacc 120

tgcactgtct ctggtgactc catcaccagc agtacttacg actggggctg gatccgtcag 180

ccccccggga agggcctgga gtggattggc aatgtctatt atagagggag cacctactac 240

aacccgtccc tcaagagtcg agtcaccata tccgtagaca ggtccaggac ccagatctcc 300

ctgaggctga gctctgtgac cgccgctgac acggctctgt atttctgtgc gagacacccg 360

aaacgtctaa cggtttttga agtggtcaac gcttttgata tctggggcca agggacaatg 420

gtcaccgtct tttcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480

aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tctgctgacg aggcactgag 540

gactg 545

<210> 10

<211> 169

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys

20 25 30

Ser Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile

35 40 45

Thr Ser Ser Thr Tyr Asp Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Val Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Arg
85 90 95

Thr Gln Ile Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Leu Tyr Phe Cys Ala Arg His Pro Lys Arg Leu Thr Val Phe Glu Val
115 120 125

Val Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Gln Thr Met Val Thr Val
130 135 140

Phe Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145 150 155 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
165

<210> 11

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggcctggg ctctgctact cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gcatctcctg gacagtcgat caccatctcc 120

tgcactggaa tcagcagtga cattggtggt tatagctctg tctcctggta ccaagcgcac 180

ccaggcaaag cccccaaact catgatctat gatgtcaata atcggccctc aggcatttct 240

aatcgcttct ctggttccaa gtctggcaac acggcctccc tggccatctc tgggctccag 300

gctgaggacg aggcagatta ttactgcagc ttatatacaa gtatcaacgc ttccatagtg 360

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact 420

ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccaacaagg ccaca 465

<210> 12

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly
1 5 10 15

Ser Trp Ala Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ile Ser Ser Asp Ile
35 40 45

Gly Gly Tyr Ser Ser Val Ser Trp Tyr Gln Ala His Pro Gly Lys Ala
50 55 60

Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Ser
65 70 75 80

Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ala Ile
85 90 95

Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Leu Tyr
100 105 110

Thr Ser Ile Asn Ala Ser Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
115 120 125

Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Ser
145

<210> 13

<211> 545

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

atgaagcacc tgtggttctt ccttctgctg gtggcggctc ccagatgggt cctgtcccag 60

ctgcaactgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120

tgcactgtct ctggtgactc catcagcagt agtacttact actggggctg gatccgccag 180

cccccaggaa aggggctgga gtggattgcc tttatctttt atagcgggag caccttctac 240

aacccgtccc tcaagagtcg agtcaccgtc tccgtagaca ggtccacgaa ccagttctcc 300

ctgaggctga agtctgtgac cgccgcagac acgtccagat attactgtgc gagacaccca 360

aaacgtatct cgatttttga agtggtcaac gcttttgata tctggggcca ggggacaatg 420

gtcaccgtct cttcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480

aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tctgctgacg aggcactgag 540

gactg 545

<210> 14

<211> 168

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile
35 40 45

Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Ala Phe Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Phe Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Arg Ser Thr
85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Lys Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ser
100 105 110

Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Lys Arg Ile Ser Ile Phe Glu Val
115 120 125

Val Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
130 135 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

165

<210> 15

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

atggcctgga ctctgctatt cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggtctcctg gacagtcgat caccatcacc 120

tgcactggaa tcagcagtga cgttggtgct tataattctg tctcctggta ccagcagtac 180

ccaggcaaat cccccaagct catgatttat gatgtcagta atcggtcctc aggggtttct 240

aatcgcttct ctggctccaa gtctgacaac acggcctccc tgaccatctc tgggctccag 300

gctgaggacg aggcttctta tttctgcagc ttatatagaa gcagcaccac ttccgtggta 360

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta cgtcagccca aggctgcccc ctcggtcact 420

ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccaacaagg ccaca 465

<210> 16

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Trp Thr Leu Leu Phe Leu Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly
1 5 10 15

Ser Trp Ala Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser
20 25 30

Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Thr Cys Thr Gly Ile Ser Ser Asp Val
35 40 45

Gly Ala Tyr Asn Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ser
50 55 60

Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Ser Ser Gly Val Ser
65 70 75 80

Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Asp Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Ser Tyr Phe Cys Ser Leu Tyr

100 105 110

Arg Ser Ser Thr Thr Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr

115 120 125

Val Leu Arg Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro

130 135 140

Ser Ser

145

<210> 17

<211> 432

<212> DNA

<213> Oryctolagus sp.

<220><221> misc_feature

<222> (430)..(430)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (432)..(432)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 17

gctagccacc atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt 60

ccagtgtcag tcggtggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga cacccctgac 120

actcacctgc atagtctctg gaatcgacct cagtagctat gcaatgggct gggtccgcca 180

ggctccagga aaggggctgg aatacatcgg aatcattagt agcagtggta tcacatacta 240

cgcgagctgg gcgaaaggcc gattcaccat ctccaaaacc tcgtcgacca cggtgactct 300

gacaatcacc gatctgcaac cttcagacac gggcacctat ttctgtgcca gagggtctcg 360

ttatagtgct tttggtgctt ttgatacctg gggcccaggc accctggtca ccgtctcctc 420

agcaagcttn an 432

<210> 18

<211> 444

<212> DNA

<213> Oryctolagus sp.

<220><221> misc_feature

<222> (444)..(444)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 18

tttggctagc caccatggag actgggctgc gctggcttct cctggtcgct gtgctcaaag 60

gtgtccagtg tcagtcggtg gaggagtccg ggggtcgcct ggtcacgcct gggacacccc 120

tgacactcac ctgcacagtc tctggattct ccctcagtag ctatgcaatg ggctgggtcc 180

gccaggctcc agggaagggg ctggaatgga tcggagtcat taataataat ggtgacacat 240

actacgcgag ctggccgaaa ggccgattca ccatctccaa aacctcgacc acggtggatc 300

tgaaaatcac cagtccgaca accgaggaca cggccaccta tttctgtgcc agagatcgtg 360

gtaatagtta ttactttgga ttggactact ttaacttgtg gggcccaggc accctggtca 420

ccgtctcctc agcaagcttt atan 444

<210> 19

<211> 385

<212> DNA

<213> Oryctolagus sp.

<220><221> misc_feature

<222> (274)..(274)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (303)..(303)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (330)..(330)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (365)..(365)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (374)..(374)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (378)..(378)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (381)..(381)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (383)..(385)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 19

ctctgctgct ctggctccca ggtgccagat gtgccttcga attgacccag actccatcct 60

ccgtggaggc agctgtggga ggcacagtca ccatcaagtg ccaggccagt cagagtatta 120

atagttggtt atcctggtat cagcagaaac cagggcagcc tcccaagctc ctgatctaca 180

aggcatccaa tctggcatct ggggtcccat cgcggttcag aggcagtgga tctgggacag 240

agttcactct caccatcagc gacctggagt gtgncgatgc tgccacttac tactgtcaaa 300

gcnattatgc tactagtagt gttgattatn atgctttcgg cggaaggacc gaggtggtgg 360

tcaanactgc ggcngtanta ntnnn 385

<210> 20

<211> 425

<212> DNA

<213> Oryctolagus sp.

<220><221> misc_feature

<222> (416)..(416)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (425)..(425)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 20

tgcagctagc caccatggac acgagggccc ccatcagctg ctggggctcc tgctgctctg 60

gctcccaggt gccaggtgtg cccttgtgat gacccagact ccagcctctg tggaggtagc 120

tgtgggaggc acagtcacca tcaagtgcca ggccagtcag agcattgata gttggttatc 180

ctggtatcag cagaaaccag ggcagcgtcc caggctcctg atctattatg catccaatct 240

ggcatctggg gtctcatcgc ggttcaaagg cagtggatct gggacagaat acactctcac 300

catcagcggc gtggagtgtg ccgatgctgc cacttactac tgtcaagagg gttatagtag 360

tggtaatgtt gataatgttt tcggcggagg gaccgaggtg gtggtcaaaa ctgcgnccgc 420

tatan 425

<210> 21

<211> 367

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gaattccatg caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag 60

cgtgaaggtg tcctgcaagg ccagcggcct gaccatcagc gacacctaca tgcactgggt 120

gcgccaggct ccaggccagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa 180

caccaagttc gaccccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc 240

caccgcctac atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actattgtgc 300

cagaggcgtg ttcggcttct tcgactactg gggccagggc accaccgtga ccgtgtcatc 360

tgctagc 367

<210> 22

<211> 405

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

accggtgcca ccatgtaccg gatgcagctg ctgagctgta tcgccctgtc tctggccctc 60

gtgacgaatt cagccatgga catccagatg acccagagcc ccagcagcct gtctgccagc 120

gtgggcgaca gagtgaccat cacatgcaag gccaccgagg acatctacaa ccggctggcc 180

tggtatcagc agaagcccgg caaggccccc aagctgctga ttagcggagc caccagcctg 240

gaaaccggcg tgccaagcag attttccggc agcggctccg gcaaggacta caccctgacc 300

atcagctccc tgcagcccga ggacttcgcc acctactact gccagcagtt ttggagcgcc 360

ccctacacct ttggcggagg caccaaggtg gaaatcaagc gtacg 405

<210> 23

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 23

atgcaggtgc agctgaagga gtcaggacct ggcctggtgg cgccctcaca gagcctgtcc 60

atcacatgca ccgtctcagg gttctcatta accggctatg gtgtaaactg ggttcgccag 120

cctccaggaa agggtctgga gtggctggga atgatttggg gtgatggaaa cacagactat 180

aattcagctc tcaaatccag actgagcatc agcaaggaca actccaagag ccaagttttc 240

ttaaaaatga acagtctgca cactgatgac acagccaggt actactgtgc cagagagaga 300

gattataggc ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agctagc 357

<210> 24

<211> 318

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 24

atggacatcc agatgactca gtctccagcc tccctttctg cgtctgtggg agaaactgtc 60

accatcacat gtcgagcaag tgggaatatt cacaattatt tagcatggta tcagcagaaa 120

cagggaaaat ctcctcagct cctggtctat tatacaacaa ccttagcaga tggtgtgcca 180

tcaaggttca gtggcagtgg atcaggaaca caatattctc tcaagatcaa cagcctgcag 240

cctgaagatt ttgggagtta ttactgtcaa cattttgga gtactcctcg gacgttcggt 300

ggaggcacca agctcgag 318

<210> 25

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 25

atggaggtcc agctgcagca gtctggagct gagctgatga agccaggggc ctcagtgaag 60

atatcctgca aagcttctgg ctacacattc agtgactact ggatagagtg ggtaaagcag 120

aggcctggac atggccttga gtggattgga gagattttac ctggaagtgg tagcactaat 180

taccatgaga gattcaaggg caaggccaca ttcactgcag atacatcctc cagcacagcc 240

tacatgcaac tcaacagcct gacatctgaa gactctggcg tctattactg cctccatggt 300

aactacgact ttgacggctg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agctagc 357

<210> 26

<211> 312

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 26

atggatatcg ttctcacaca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc 60

accatgacct gcagtgccag ttcaagtgta aattacatgt actggtacca gcagaagtca 120

ggcacttccc ccaaaagatg gatttatgac acatccaaac tggcttctgg agtccctgtt 180

cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctct tactctctca caatcagcag catggagact 240

gaagatgctg ccacttatta ctgccaacag tggggtcgta accccacgtt cggagggggg 300

accaagctcg ag 312

<210> 27

<211> 510

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 27

tggaaggtgg tgcacactgc tggacaggga tccagagttc caggtcactg tcactggctc 60

agggaaatag cccttgacca ggcatcccag ggtcaccatg gagttagttt gggcagcaga 120

tccaggggcc agtggataga cagatggggg tgtcgttttg gctgaggaga ctgtgagagt 180

ggtgccttgg ccccagcagt ccccgtccca gtttgcacag taatatgtgg ctgtgtcctc 240

aggagtcaca gaaatcaact gcaggtagca ctggttcttg gatgtgtctc gagtgataga 300

gattcgacct ttgagagatg gattgtagta agtgctacca ctgtagctta tgtaccccat 360

atactcaagt ttgttccctg ggaatttccg gatccagctc cagtaatcat tggtgatgga 420

gtcgccagtg acagaacagg tgagggacag agtctgagaa ggtttcacga ggctaggtcc 480

agactcctgc agctgcacct cgaattccca 510

<210> 28

<211> 342

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 28

ttggtccccc ctccgaacgt gtacggccag ttgttactct gttgacagaa atacattcca 60

aaatcttcag tctccacact gatgatactg agagtgaaat ccgtccctga tccactgcca 120

ctgaacctgg aggggatccc agagatggac tgggaagcat acttgatgag aagccttgga 180

gactcatgtg atttttgttg ataccagtgt aggttgttgc taatactttg gctggccctg 240

caggaaagac tgacgctatc tcctggagtc acagacaggg tgtctggaga ctgagttagc 300

acaatatcac ctctggaggc tgaaatccag aaaagcaaaa aa 342

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Template switching primer

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(26)

<223> May be ribonucleic acid residues

<400>

29

gcagtggtat caacgcagag tacggg 26

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Universal primer TS

<400> 30

gcagtggtat caacgcagag tacg 24

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Universal primer RT

<400> 31

agacagtcct cagtgcctcg tcagcag 27

<210> 32

<211> 13

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220>

<223> Human RT primer HsRT-01

<400> 32

gtcctgagga ctg 13

<210> 33

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human RT primer HsRT-02

<400> 33

tgctctgtga cac 13

<210> 34

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human RT primer HsRT-03

<400> 34

ggtgtacagg tcc 13

<210> 35

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human RT primer HsRT-04

<400> 35

cagagagcgt gag 13

<210> 36

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human RT primer HsRT-05

<400> 36

tcatgtagta gctgtc 16

<210> 37

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human RT primer HsRT-06

<400> 37

ctcaggactg atgg 14

<210> 38

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human RT primer HsRT-07

<400> 38

gagtcctgag tactg 15

<210> 39

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human RT primer HsRT-08

<400> 39

gttgttgctt tgtttg 16

<210> 40

<211> 15

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220>

<223> Human RT primer HsRT-09

<400> 40

ttgttgctct gtttg 15

<210> 41

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific primer HsN2U_01

<400> 41

agacagtcct cagtgcctcg tcagcagacc aggcagccca gggc 44

<210> 42

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific primer HsN2U_02

<400> 42

agacagtcct cagtgcctcg tcagcagcag tgtggccttg ttggcttgaa gctcc 55

<210> 43

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific primer HsN2U_03

<400> 43

agacagtcct cagtgcctcg tcagcagagc aggcacacaa cagaggcagt tcc 53

<210> 44

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific primer HsN2U_04

<400> 44

agacagtcct cagtgcctcg tcagcaggcc cagagtcacg gaggtggcat tg 52

<210> 45

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific primer HsN2U_05

<400> 45

agacagtcct cagtgcctcg tcagcaggca tgcgacgacc acgttcccat cttg 54

<210> 46

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific primer HsN2U_06

<400> 46

agacagtcct cagtgcctcg tcagcaggca gccaacggcc acgctg 46

<210> 47

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific primer HsN2U_07

<400> 47

agacagtcct cagtgcctcg tcagcagatg ccaggaccac agggctgtta tcctttg 57

<210> 48

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific primer HsN2U_08

<400> 48

agacagtcct cagtgcctcg tcagcagagt gtggccttgt tggcttggag ctc 53

<210> 49

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific primer HsN2U_09

<400> 49

agacagtcct cagtgcctcg tcagcagacc acgttcccat ctggctgggt g 51

<210> 50

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT mouse primer MmRT_01

<400> 50

acagtcactg agct 14

<210> 51

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT mouse primer MmRT_02

<400> 51

ctttgacaag gcatc 15

<210> 52

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT mouse primer MmRT_03

<400> 52

ccacttgaca ttgatg 16

<210> 53

<211> 15

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT mouse primer MmRT_04

<400> 53

ctcttctcca cagtg 15

<210> 54

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific mouse primer Mmn2_01

<400> 54

agacagtcct cagtgcctcg tcagcagact gcaggagagc tgggaaggtg tg 52

<210> 55

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific mouse primer Mmn2_02

<400

> 55

agacagtcct cagtgcctcg tcagcaggac agctgggaag gtgtgcacac 50

<210> 56

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific mouse primer Mmn2_03

<400> 56

agacagtcct cagtgcctcg tcagctcaag aagcacacga ctgaggcacc tcc 53

<210> 57

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific mouse primer Mmn2_04

<400> 57

agacagtcct cagtgcctcg tcagcttgcc ttccaggcca ctgtcacacc 50

<210> 58

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific mouse primer Mmn2_05

<400> 58

agacagtcct cagtgcctcg tcagcatcca gatgtgtcac tgcagccagg gac 53

<210> 59

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long gene-specific mouse primer Mmn2_06

<400> 59

agacagtcct cagtgcctcg tcagcacctt ccagtccact gtcaccacac ctg 53

<210> 60

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT rabbit primer OcRT_01

<400> 60

tgaagctctg gac 13

<210> 61

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT rabbit primer OcRT_02

<400> 61

cacactcaga ggg 13

<210> 62

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT rabbit primer OcRT_03

<400> 62

ttccagctca cac 13

<210> 63

<211> 12

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT rabbit primer OcRT_04

<400> 63

aggaagctgc tg 12

<210> 64

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT rabbit primer OcRT_05

<400> 64

acactgctca gc 12

<210> 65

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT rabbit primer OcRT_06

<400> 65

tcacattcag aggg 14

<210> 66

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT rabbit primer OcRT_07

<400> 66

gtcttgtcca ctttg 15

<210> 67

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT rabbit primer OcRT_08

<400> 67

ctctgttgct gttg 14

<210> 68

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgHA1A7-12

<400> 68

agacagtcct cagtgcctcg tcaggatcag gcagccgacg acc 43

<210> 69

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgKC1

<400> 69

agacagtcct cagtgcctcg tcaggtggga agatgaggac agtaggtgc 49

<210> 70

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgKC1KC2

<400> 70

agacagtcct cagtgcctcg tcagagatgg tgggaagagg aggacag 47

<210> 71

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgLC4L5L6

<400> 71

agacagtcct cagtgcctcg tcagccttgt tgtccttgag ttcctcagag g 51

<210> 72

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgA2A6

<400> 72

agacagtcct cagtgcctcg tcagcggatc aggcagccga tgac 44

<210> 73

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgA4A5

<400> 73

agacagtcct cagtgcctcg tcagcaggtc agcgggaaga tgatcg 46

<210> 74

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgLC1C2C3

<400> 74

agacagtcct cagtgcctcg tcagcactga tcagacacac cagggtgg 48

<210> 75

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgG

<400> 75

agacagtcct cagtgcctcg tcagcaccgt ggagctgggt gtg 43

<210> 76

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgA3A5

<400> 76

agacagtcct cagtgcctcg tcaggatcag gcagccggcg atc 43

<210> 77

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgM

<400> 77

agacagtcct cagtgcctcg tcagggagac gagcgggtac agagttg 47

<210> 78

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Long rabbit gene-specific primer Oc-PCR-IgE

<400> 78

agacagtcct cagtgcctcg tcagtctgca gcaggaggcc aag 43