



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098657
(43) 공개일자 2008년11월11일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) Int. Cl.
G01N 21/03 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7022140</p> <p>(22) 출원일자 2008년09월10일
심사청구일자 2008년09월10일
번역문제출일자 2008년09월10일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/SE2007/000283
국제출원일자 2007년03월23일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/111555
국제공개일자 2007년10월04일</p> <p>(30) 우선권주장
0600687-8 2006년03월28일 스웨덴(SE)</p> | <p>(71) 출원인
헤모큐에이비
스웨덴왕국안겔홀름26223피오박스1204</p> <p>(72) 발명자
린드버그, 스텔란
스웨덴 에스-260 91 피르슬뢰프 란가게르트베겐 52</p> <p>(74) 대리인
남상선</p> |
|---|--|

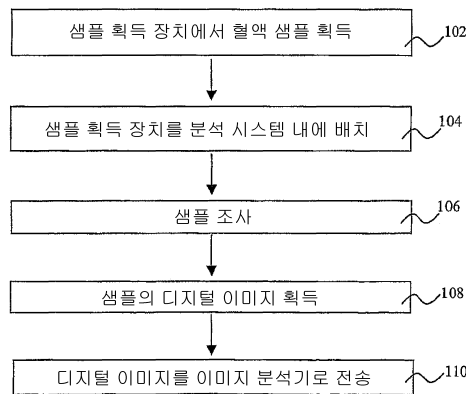
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 형광 표지된 생물학적 성분을 탐지하는 방법 및 장치

(57) 요약

액체 샘플 내의 생물학적 성분의 탐지를 위한 샘플 획득 장치는: 액체 샘플을 수용하기 위한 측정 공동 및 시약을 포함하고, 상기 측정 공동은 미리 정해진 일정 두께를 가지며, 상기 시약은 상기 측정 공동 내부에 건조된 형태로 배치된다. 상기 시약은 형광물질이 조합된 분자를 포함한다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

액체 샘플 내의 생물학적 성분의 탐지를 위한 샘플 획득 장치로서:

액체 샘플을 수용하기 위한 측정 공동 및 시약을 포함하고,

상기 측정 공동은 미리 정해진 일정 두께를 가지며,

상기 시약은 상기 측정 공동 내부에 건조된 형태로 배치되며, 상기 시약은 형광물질이 조합된 분자를 포함하는 샘플 획득 장치.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 형광물질 조합 분자가 상기 생물학적 성분의 특정 분자 구조와 결합하도록 구성되는

샘플 획득 장치.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 샘플 획득 장치는 상기 측정 공동을 형성하는 두 개의 평면형 표면을 구비하는 본체 부재를 포함하는 샘플 획득 장치.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 평면형 표면들은 서로로부터 미리 정해진 거리로 정렬되어 광학적 측정을 위한 샘플 두께를 결정하는 샘플 획득 장치.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 측정 공동은 50-170 마이크로미터의 균일한 두께를 가지는

샘플 획득 장치.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 측정 공동은 100 마이크로미터 이상의 균일한 두께를 가지는

샘플 획득 장치.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서,

상기 측정 공동은 150 마이크로미터 이하의 균일한 두께를 가지는

샘플 획득 장치.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 샘플의 양호하게-규정된 부피의 분석을 제공하기 위해서 상기 측정 공동의 영역이 이미지화되도록 구성되

며,

그에 따라, 상기 샘플 내의 생물학적 성분의 부피 계산이 이루어지는
샘플 획득 장치.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 측정 공동을 상기 샘플 획득 장치의 외부와 소통시키는 샘플 유입구를 더 포함하며, 상기 유입구는 액체
샘플을 획득하도록 구성되는

샘플 획득 장치.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

모세관력을 통해서 액체 샘플을 획득하도록 상기 유입구가 구성되는

샘플 획득 장치.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 시약이 휘발성 액체에 용해되어 상기 표면에 도포되고, 상기 휘발성 액체는 증발되어 건조된 형태의 시약
을 남기는

샘플 획득 장치.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 형광물질이 조합된 분자가 항체 또는 항체 단편인

샘플 획득 장치.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 샘플 획득 장치가 일회용인

샘플 획득 장치.

청구항 14

제 1 항에 있어서,

상기 시약이 액체 샘플에 용해가능한 및/또는 현탁화가 가능한

샘플 획득 장치.

청구항 15

액체 샘플 내의 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 탐지를 위한 방법으로서:

형광물질이 조합된 분자가 액체 샘플 내의 생물학적 성분의 특정 분자 구조와 결합하도록 형광물질이 조합된 분
자를 포함하는 시약을 액체 샘플과 혼합하는 단계;

상기 액체 샘플을 샘플 획득 장치의 미리 정해진 일정 두께를 가지는 측정 공동 내로 도입하는 단계;

형광물질의 여기 파장에 상응하는 파장의 전자기 복사선을 이용하여 상기 측정 공동 내의 샘플의 영역(area)을

조사(irradiate)하는 단계; 그리고

상기 측정 공동의 전체 두께에서 형광물질 표지화된 생물학적 성분을 탐지하는 단계로서, 상기 측정 공동 내의 조사된 영역의 디지털 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 생물학적 성분을 탐지하는 단계; 를 포함하는 생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 샘플 획득 장치는 상기 측정 공동 내부에 건조된 형태로 배치되는 시약을 포함하고,

상기 시약은 형광물질이 조합된 분자를 포함하며,

상기 혼합 단계는 상기 시약과의 접촉을 위해서 상기 액체 샘플을 상기 측정 공동 내로 도입함으로써 달성되는 생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 17

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서,

상기 형광물질을 나타내는 생물학적 성분은 형광물질의 방출 파장에 상응하는 파장의 전자기 복사선을 방출하는 형광 도트로써 디지털 이미지내에서 구분되는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

상기 디지털 이미지가 3-50x, 보다 바람직하게는 3-10x의 광학적 확대 배율을 이용하여 획득되는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 19

제 17 항 또는 제 18 항에 있어서,

상기 형광물질을 나타내는 생물학적 성분을 식별하고 상기 샘플 내에서 형광물질을 나타내는 생물학적 성분의 개체수를 결정하기 위해서 상기 디지털 이미지를 디지털적으로 분석하는 단계를 더 포함하는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 분석하는 단계는 방출된 전자기 복사선으로부터 얻어지는 디지털 이미지 내의 영역들을 식별하는 단계를 포함하는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 21

제 19 항 또는 제 20 항에 있어서,

상기 분석하는 단계는 방출된 전자기 복사선으로부터 얻어지는 디지털 이미지 내의 도트들을 식별하는 단계를 포함하는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 22

제 19 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분석하는 단계는 특정의 방출된 파장을 각각 디스플레이하는 둘 이상의 획득 이미지들을 중첩시키는 단계를 포함하는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 23

제 19 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분석하는 단계는 획득된 디지털 이미지를 전자적으로 확대하는 단계를 포함하는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 24

제 15 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 액체 샘플은 모세관력에 의해서 모세관 샘플 유입구를 통해서 샘플 획득 장치의 측정 공동 내로 도입되는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 25

제 15 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 디지털 이미지는 적어도 측정 공동의 두께에 상응하는 심도를 이용하여 획득되는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 26

제 15 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분석되는 액체 샘플의 부피는 측정 공동의 두께 및 이미지화되는 샘플의 영역에 의해서 양호하게-규정되는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 27

제 15 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조사하는 단계는 발광다이오드를 포함하는 광원에 의해서 실시되는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

청구항 28

제 15 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 여기 파장에 상응하는 파장은 색채 필터와 조합된 발광다이오드의 이용을 통해서 얻어지는

생물학적 성분의 탐지를 위한 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 샘플 획득 방법, 액체 샘플 내에서 형광 표지된 생물학적 성분을 탐지 및 부피 계산(volumetric enumeration) 하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다.

배경기술

<2> 세포 샘플과 같은 생물학적 샘플을 분석할 때, 샘플의 여러 성분들, 예를 들어 존재 세포의 여러 타입들을 식별(identify)할 수 있는 것이 바람직하다. 이들 상이한 성분들은 세포 표면 마커(markers)와 같은 각각의 분자 구조를 나타내며, 그러한 분자 구조에 의해서 성분들이 구분될 수 있을 것이다. 이들 분자 구조에 결합되도록

정렬된 형광물질 결합형(fluorophore conjugated) 분자를 이용함으로써, 생물학적 성분들이 형광적으로 표지화(labelled)될 수 있다. 형광 표지된 성분들, 주로 세포들을 탐지하고 분석하기 위한 몇 가지 기술이 소위 당업계에 공지되어 있으며, 주로 유체 세포측정법(flow cytometry) 및 형광현미경(fluorescence microscopy) 기술로서 공지되어 있다.

- <3> 유체 세포측정법에서, 현탁화된(suspended) 형광 표지된 세포들이 레이저 비임 전방의 유동 채널을 통해서 하나씩 통과하게 되고 몇 가지 상이한 파장의 형광이 측정될 수 있을 것이며, 이때 빛은 전방으로 그리고 직각으로 산란할 것이다. 그에 따라, 몇 가지 상이한 형광물질의 표지화(labeling), 그리고 세포의 크기 및 입도(granularity)가 분석될 수 있을 것이다. 유체 세포측정법은 예를 들어, US 3,826,364, US 4,248,412 및 US 5,047,321에 개시되어 있다.
- <4> 일반적으로, 형광현미경은 현미경 슬라이드에 도말(smear)된 검사 대상 형광 샘플에 특정의 짧은 파장을 가지는 전자기 복사선을 조사(irradiating)하여, 샘플내의 형광물질이 상기 복사선을 흡수하게 하고 후속하여 특정의 긴 파장의 전자기 복사선을 방출하게 함으로써 실시된다. 방출된 복사선은 방출된 긴 파장의 복사선만을 통과시키는 색채 필터, 또는 균등한 단색화장치(monochromator)를 구비하는 현미경을 이용하여 탐지된다.
- <5> US 4,125,828 및 US 2006/0017001에서, 현미경 슬라이드에 도말된 형광 샘플을 탐지하기 위한 방법 및 형광현미경이 개시되어 있다.
- <6> US 5,932,428에는, 이미징 기구에 의해서 혈액 샘플의 형광 착색(fluorescently stained) 목표 성분을 측정(enumeration)하는 실험 및 샘플 혼합이 개시되어 있다. US 5,932,428의 일 측면에서, 전체 혈액이 건조된 형광 표지된 항체 및 양이온성 계면활성제(zwitterionic detergent)와 혼합하고, 그 후에 혈액 혼합물이 스캔 모세관으로 공급된다. 충전된 모세관은 모세관과 교차하는 가우시안 웨이스트(Gaussian waist) 형태로 좁아진 레이저 비임을 이용하여 스캐닝된다. 그에 따라, 레이저는 가우시안 웨이스트 굽기 모세관의 루멘(lumen)의 깊이를 굽한 것과 같은 모세관의 주상형(columnar) 영역을 조명하고 그 영역내에서 형광 물질을 여기시킨다. 이러한 영역으로부터의 형광이 광 탐지기에 의해서 탐지된다. 이어서, 레이저는 모세관의 다른 영역을 조사하고, 그 영역의 형광 또한 탐지된다. 이러한 방식에서, 미리 정해진 부피의 샘플이 형광 스캐닝된다.
- <7> US 2006/0024756에서, 형광적으로 그리고 자기적으로 표지화된 세포를 측정계산하기 위한 장치, 방법 및 알고리즘이 개시되어 있다. 개시된 방법에 따라, 모든 세포들은 형광 표지화되나, 목표 세포만이 자기적으로도 표지화된다. 큐벳(cuvet)의 관찰 표면까지 표지화된 세포를 자기적으로 선택 이동시키기 위해서, 표지화된 세포 샘플이 두 개의 췌기형 자석들 사이에서 챔버 또는 큐벳 내에 위치된다. LED가 세포를 조사하고 CCD 카메라가 목표 세포로부터 방출되는 형광 빛의 이미지를 캡처한다. 세포 표지화는 분석을 위해서 사용되는 큐벳 또는 챔버 내에서 실시될 수 있고, 또는 세포 표지화에 필요한 충분한 시간이 경과된 후에 큐벳 또는 챔버로 샘플이 이송될 수 있다. 부피를 알고 있는 큐벳을 이용하여 혈액 샘플 내의 목표 세포의 절대 농도를 결정한다. 그러나, 이러한 것은, 탐지되고 계수되기에 앞서서 모든 목표 세포가 관찰 표면까지 자기적으로 이동되어야 할 것을 요구한다.
- <8> EP 0 422 708은 화학적 테스트 절차에서 이용하기 위한 장치를 개시한다. 그러한 장치는 두 개의 평면형의 평행한 벽들에 의해서 형성된 공동을 포함하며, 상기 벽들 중 하나는 공유적으로 부동화된(covalently immobilised) 항체를 홀딩하며 해당 벽 또는 다른 벽은 건조되었지만 공유적으로 부동화되지 않은 형광적으로 표지화된 항체를 홀딩한다. 목적은, 부동화된 항체 및 표지화된 항체 모두에 결합될 수 있는 항원(antigen)의 샌드위치 평가(sandwich assays)를 위한 장치를 이용하는 것이다. 평가되는 항원을 포함하는 액체 샘플이 모세관력에 의해서 장치내로 흡입되고, 표지화된 항체들을 용해시킨다. 항원은 부동화된 것에 결합되고 그리고 표지화된 항체들은 상기 항원에 결합되며, 그에 따라 형광으로 표지화된 항체들이 공유적으로 부동화된 항체를 홀딩하는 벽에서 농축된다. 이러한 벽은 유리 또는 다른 빛 투과 물질로 제조되고, 광섬유 또는 도파관과 같은 광 전도 능력을 갖는다. 액체 샘플내의 항원의 존재는 벽의 엣지(edge)에서 빛의 세기 즉, 상기 벽에 존재하는 형광 항체로부터 방출되고 벽에 의해서 안내되는 빛의 세기를 측정함으로써 탐지된다.

발명의 상세한 설명

- <9> 본 발명의 목적은 액체 샘플의 형광 표지화된 생물학적 성분을 탐지하기 위한 간단한 분석을 제공하는 것이다. 본 발명의 일 측면에 따라서, 액체 샘플의 형광 표지화된 생물학적 성분의 부피 계산을 위한 간단한 분석을 제공하는 것을 목적으로 한다. 복잡한 장치나 비용이 많이 드는 샘플 준비 과정이 필요 없는 신속한 분석을 제공하는 것도 본 발명의 목적이다.

- <10> 이들 목적은 특허청구범위의 독립항들에 따른 샘플 획득 장치, 방법 및 시스템에 의해서 부분적으로 또는 전체적으로 달성된다. 바람직한 실시예들은 종속항들로부터 명확하게 이해될 수 있을 것이다.
- <11> 일 측면에 따라, 본 발명은 액체 샘플 내의 생물학적 성분의 탐지를 위한 샘플 획득 장치에 관한 것으로서, 상기 샘플 획득 장치는 액체 샘플을 수용하기 위한 측정 공동을 포함하고, 상기 측정 공동은 미리 정해진 일정 두께를 가진다. 또한, 샘플 획득 장치는 시약(reagent)을 포함하며, 상기 시약은 상기 측정 공동 내부에서 건조된 형태로 배치되며, 상기 시약은 형광물질이 결합된 분자를 포함한다.
- <12> 다른 측면에 따라서, 본 발명은 액체 샘플 내의 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 탐지를 위한 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 형광물질이 결합된 분자가 액체 샘플 내의 생물학적 성분의 특정 분자 구조와 결합하도록 형광물질이 결합된 분자를 포함하는 시약을 액체 샘플과 혼합하는 단계; 상기 액체 샘플을 미리 정해진 일정 두께를 가지는 샘플 획득 장치의 측정 공동 내로 도입하는 단계; 형광물질의 여기(excitation) 과정에 상응(corresponding)하는 과정의 전자기 복사선을 이용하여 측정 공동 내의 샘플의 영역을 조사(irradiate)하는 단계; 그리고 상기 측정 공동의 전체 두께에서 형광물질 표지화된 생물학적 성분을 탐지하는 단계를 포함하며, 상기 생물학적 성분을 탐지하는 단계는 상기 측정 공동 내의 조사된 영역의 디지털 이미지를 획득하는 단계를 포함한다.
- <13> 샘플 획득 장치는 전체 혈액 샘플을 측정 공동 내로 직접적으로 획득할 수 있는 가능성을 제공하고 분석될 수 있도록 제공한다. 샘플 준비절차가 불필요하다. 사실상, 혈액 샘플은 바늘로 찌른 환자의 손가락으로부터 직접적으로 측정 공동 내로 흡입될 수 있다. 시약을 가지는 샘플 획득 장치를 제공하는 것은 샘플 획득 장치 내에서의 반응을 가능하게 하며, 이는 샘플의 분석을 용이하게 한다. 그러한 반응은 혈액 샘플이 시약과 접촉하기 시작할 때 개시된다. 그에 따라, 수동적으로 샘플을 준비할 필요가 없고, 이는 환자가 기다리는 동안에 실험실 내에서 분석을 적절하게 실시할 수 있게 한다.
- <14> 시약이 건조된 형태로 제공되기 때문에, 샘플 획득 장치는 샘플 획득 장치의 유용성(usability)에 영향을 미치지 않고 오랜 시간 동안 이송되고 저장될 수 있을 것이다. 그에 따라, 시약을 가지는 샘플 획득 장치는 혈액 샘플의 분석보다 오랜 시간 전에 제조되고 준비될 수 있을 것이다.
- <15> 그에 따라, 본 발명의 샘플 획득 장치는 훈련되지 않은 사람도 용이하게 그리고 반복가능하게 사용할 수 있으며, 반드시 규정으로 표준화된 실험실 환경에서 사용될 필요도 없으며, 그에 따라 샘플 획득 장치는 분석이 용이한 형태의 샘플을 제공하기 위해서 샘플 획득 장치의 샘플 유입구를 샘플과 접촉하기만 하면 되는 용이한 키트(kit)를 형성할 수 있게 된다.
- <16> 또한, 측정 공동의 일정한 두께는 액체 샘플의 부피 단위(unit) 당 생물학적 성분의 카운트(count)를 결정할 수 있는 가능성을 제공한다. 상기 방법이 측정 공동의 전체 두께에서 형광물질 표지화된 생물학적 성분을 탐지하도록 정렬되기 때문에, 액체 샘플의 분석을 신속하게 실시할 수 있다. 관심 대상이 되는 생물학적 성분이 측정 공동 내에 안착(settle)되는 것 또는 관찰 표면으로 안내되는 것을 기다릴 필요가 없다.
- <17> 액체 샘플의 생물학적 성분은 예를 들어, 포유류 세포(mammalian cells)(예를 들어, 백혈구 및 혈소판(leucocytes 및 platelets))와 같은 진핵 세포(eukaryotic cells); 박테리아; 바이러스; 및 DNA와 같은 거대분자(macro molecules)일 수 있다.
- <18> 액체 샘플은 예를 들어, 희석되지 않은 전혈, 소변, 또는 척수액(spinal fluid)과 같은 체액; 또는 포유류 세포 배양이나 박테리아 배양과 같은 세포 배양일 수 있다. 액체 샘플은 어떠한 전처리(pre-treatment)도 거치지 않은 희석되지 않은 생물학적 유체일 수 있다. 희석, 원심분리, 및 용해(lysing)와 같은 생물학적 샘플의 전처리는 계산된 목표 세포를 분석된 부피에 연관시킬 때 정확도를 떨어뜨린다. 사용 준비된 샘플 획득 장치 내로 샘플을 도입하기 전에 어떠한 타입의 전처리도 하지 않으므로써, 상기 방법이 보다 더 단순해질 수 있다.
- <19> 그에 따라, 예를 들어, 혈액 샘플 내의 특정 세포 타입의 양 또는 존재를 탐지할 수 있다.
- <20> 샘플 획득 장치는 상기 측정 공동을 형성하기 위해서 두 개의 평면형 표면을 가지는 본체 부재를 포함할 수 있다. 평면형 표면들은 광학적 측정을 위한 샘플 두께를 결정하기 위해서 서로로부터 미리 정해진 거리에 정렬된다. 이는 샘플 획득 장치가 광학적 측정에 대해 양호하게-규정된(well-defined) 두께를 제공한다는 것을 의미하며, 이는 액체 샘플의 부피 단위 당 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 카운트를 정확하게 결정하는데 이용될 수 있다. 분석된 액체 샘플의 부피는 측정 공동의 두께에 의해서 양호하게-규정될 것이며, 샘플의 영역은 이미지화된다. 그에 따라, 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 개체수를 샘플의 부피와 연관시킴으로써 형광물

질 표지화된 생물학적 성분의 부피 카운트가 결정될 수 있도록, 양호하게-규정된 부피가 이용될 수 있을 것이다.

- <21> 바람직하게, 측정 공동은 50-170 마이크로미터의 균일한 두께를 가진다. 50 마이크로미터 이상의 두께는, 단일 층으로 도달되는 세포 샘플과 같은 액체 샘플에 측정 공동이 힘을 가하지 않는다는 것을 의미하며, 이는 보다 큰 부피의 액체 샘플이 작은 단면적에 걸쳐 분석될 수 있게 허용한다는 것을 의미한다. 그에 따라, 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 신뢰가능한 카운트를 제공하기 위한 충분히 큰 부피의 액체 샘플이 세포 샘플의 비교적 작은 이미지를 이용하여 분석될 수 있다. 보다 바람직하게, 두께는 100 마이크로미터 이상이며, 이는 보다 작은 단면적이 분석될 수 있게 허용하고 또는 보다 큰 샘플 부피가 분석될 수 있게 허용한다. 또한, 50 마이크로미터 이상의 그리고 보다 바람직하게 100 마이크로미터 이상의 두께는 두 개의 평면형 표면 사이에서 양호하게-규정된 두께를 가지는 측정 공동의 제조를 단순화시킬 수 있게 된다.
- <22> 두께가 170 마이크로미터 이하인 공동 내에 정렬된 대부분의 샘플의 경우에, 예를 들어 혈액 샘플의 경우에, 혈액 샘플의 세포와 같이 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 카운트가 너무 작아서, 서로 중첩되게 정렬된 성분들로 인한 편차가 작게 될 것이다. 그러나, 그러한 편차의 영향은 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 카운트와 관련될 것이고, 그에 따라, 적어도 어느 정도 범위에 걸쳐, 적어도 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 큰 카운트 값에 대한 통계학적으로 정정(correction)된 결과에 의해서 핸들링(handled)될 것이다. 이러한 통계학적 정정은 측정 장치의 교정(calibrations)을 기초로 할 것이다. 편차는 두께가 150 마이크로미터 이하인 측정 공동의 경우에도 아주 작을 수 있으며, 그에 따라 보다 단순한 교정이 이용될 수도 있다. 이러한 두께는 중첩하는 생물학적 성분에 대한 어떠한 교정도 필요치 않을 수 있다.
- <23> 또한, 측정 공동의 두께가 충분히 작아서, 측정 공동의 전체 깊이가 동시에 분석될 수 있도록 측정 장치가 디지털 이미지를 획득할 수 있게 된다. 측정 장치에서 확대 시스템이 이용된다면, 큰 심도(심도; depth of field)를 얻는 것은 단순하지 않을 것이다. 그에 따라, 디지털 이미지에서 전체 두께가 동시에 분석될 수 있도록 하기 위해서 측정 공동의 두께가 150 마이크로미터를 초과하지 않는 것이 바람직할 것이다. 170 마이크로미터의 측정 공동 두께를 핸들링하도록 심도가 구성될 수 있을 것이다.
- <24> 디지털 이미지는 적어도 측정 공동의 두께에 대응하는 심도와 함께 획득될 수 있을 것이다. 이는, 측정 공동의 전체 두께가 샘플의 디지털 이미지 내에서 동시에 분석될 수 있도록 전체 샘플 두께의 충분한 포커스가 얻어진다는 것을 의미한다. 그에 따라, 예를 들어 측정 공동 내에서 세포가 안착되기를 기다릴 필요가 없으며, 그에 따라 분석을 위한 시간이 짧아진다. 샘플의 특정 부분에 대해 매우 정확하게 포커싱하지 않는 것을 선택함으로써, 샘플내의 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 개체수의 식별을 허용하기 위해서 전체 샘플 두께의 충분한 포커스가 얻어진다. 이는, 형광 성분이 다소 흐릿(blurred)할 수 있고 여전히 심도의 포커스 내에 있는 것으로 간주될 수 있다는 것을 의미한다.
- <25> 측정 공동의 일정한 두께는 양호하게-규정된 샘플의 부피 분석을 허용한다. 특히, 양호하게-규정된 샘플 부피의 분석을 제공하기 위해서 측정 공동의 영역이 이미지화되도록 구성되며, 그에 따라 샘플 내의 생물학적 성분의 부피 계산이 얻어질 수 있게 된다. 측정 공동의 두께와 함께 이미지화되는 영역은 양호하게-규정된 샘플 부피를 제공한다. 이러한 정적인 부피 내의 표지화된 생물학적 성분의 개체수를 카운트함으로써, 샘플 내의 생물학적 성분의 부피 카운트가 용이하게 얻어질 수 있다. 부피 카운트는 부피의 디지털 이미지를 분석함으로써 얻어질 수 있을 것이다. 그에 따라, 유체 세포측정 원리에 따라 실시되었던 바와 같이 분석기의 전방으로 샘플을 통과시킬 필요가 없이 부피 카운트가 달성될 수 있다.
- <26> 샘플 획득 장치는 증발되어 건조 형태의 시약을 남기는 휘발성 액체 내에 용해되고 표면에 도포되는 시약을 구비할 수 있다.
- <27> 측정 공동 내로 삽입되기에 앞서서 시약을 휘발성 액체 내에 용해시키는 것이 바람직할 것이다. 이는, 샘플 획득 장치의 제조 및 준비 중에 측정 공동의 좁은 공간으로부터 효과적인 방식으로 증발될 수 있다는 것을 의미한다.
- <28> 바람직하게, 시약은 유기 용매 내에 용해되고, 보다 바람직하게는 메탄올 내에 용해된다. 그러한 용매는 휘발성을 가지며 측정 공동의 표면 상에서 시약을 건조하기 위해서 적절하게 이용될 것이다.
- <29> 바람직하게, 본 발명의 시약(모든 성분을 포함한 시약)은 분석되는 액체 샘플 내에 용해될 수 있고 및/또는 현탁화될 수 있으며, 바람직하게, 분석 중에 용액/현탁액 내에서 유지되도록 의도된다. 전술한 바와 같이, 측정 공동의 전체 두께에서 형광물질 표지화된 생물학적 성분을 탐지하도록 상기 방법이 구성되고 대상 생물학적 성

분을 관찰 표면까지 전달하고 그 표면상에서 부동화할 필요가 없기 때문에, 시약 또는 시약의 임의 성분도 용해/현탁화할 필요가 없고 또는 부동화할 필요가 없다. 역으로, 용해가능한/현탁화가능한 시약의 이용, 바람직하게 용이하게 용해가능한/현탁화가능한 시약의 이용은 액체 샘플과 시약의 혼합을 촉진하고 측정되는 생물학적 성분을 포함하는 액체 샘플과 시약의 반응을 가속화시킨다.

- <30> 본 발명의 시약은 형광물질과 조합된 분자를 포함한다. 여기에서, 형광물질, 또는 형광색소(fluorochrome)가 분자를 형광화시키는 분자의 일부(moiety)로서 규정된다. 다른 파장의 복사선의 조사에 응답하여 특정 파장의 전자기 복사선을 방출하는 경우에 그 분자가 형광적이라 할 것이다.
- <31> 일반적으로 이용되는 형광물질, 또는 형광색소는 예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate; FITC), 파이코에리트린(phycoerythrin; PE), 페리디닌 클로로필 단백질(peridinin chlorophyll protein; PerCP), 알로피코시아닌(allophycocyanin; APC) 및 시아닌-5.5(Cy5.5)를 포함한다.
- <32> 바람직하게, 형광물질 조합 분자는 생물학적 성분의 특정 분자 구조에 결합되도록 구성된다. 그러한 분자의 예시적인 예를 들면, 리간드, 수용체, 항원, 항체 및 항체 단편(antibody fragment)을 포함한다. 항체 단편의 예를 들면, 단편 항원 결합(fragment antigen binding; Fab) 단일 사슬 단편(single chain fragment variable; scFv)을 포함한다. 항체 및 항체 단편이 바람직한데, 이는 모든 종류의 분자 구조에 대해서 친화도를 가지는 것으로서 구입이 비교적 용이하기 때문이며, 여러 종류의 형광물질과의 다양한 조합 과정도 공지되어 있기 때문이다.
- <33> 분자 구조는 생물학적 성분의 임의의 특정 분자 구조, 예를 들어, CD4 또는 CD8과 같은 세포 표면 마커, 또는 DNA와 같은 내부 세포 구조일 수 있다. 여기에서, 세포 표면 마커는 항원이나 에피토프(epitope)와 같이 세포의 외부로부터 접근할 수 있는 세포의 원형질막(plasma membrane)의 임의 분자 특성으로서 규정된다. 이는, HIV 감염을 모니터링하기 위해서 CD4+ 세포를 탐지하고 계산하는 것과 같이 임의 타입의 세포들이 임의 목적을 위해서 탐지될 수 있다는 것을 의미한다.
- <34> 바람직하게, 생물학적 성분과 충분히 결합할 수 있는 양이 되도록 형광물질 조합 분자의 양이 선택된다. 본질적으로 모든 목표 생물학적 분자가 적절한 시간 내에 형광물질 조합 분자에 의해서 적절하게 표지화될 수 있도록 하기 위해서, 형광물질 조합 분자가 과다하게 존재할 필요가 있을 것이다. 그러나, 혼합 샘플 내에는 여전히 결합되지 않은 형광물질 조합 분자가 존재할 것이고, 이러한 비결합 농도를 충분히 낮게 유지하여 샘플이 분석될 때 배경 형광(background fluorescence)을 억제하는 것이 바람직할 것이다. 그에 따라, 형광물질 조합 분자가 너무 과다하게 존재하지 않아야 한다. 결합된 형광물질 조합 분자 대 비결합 형광물질 조합 분자의 비율은 형광물질 조합 분자와 생물학적 성분 사이의 친화도에 따라 달라지고, 형광물질 조합 분자와 생물학적 성분의 혼합에 할당된 시간에 따라 달라진다.
- <35> 샘플 획득 장치는 측정 공동을 샘플 획득 장치의 외부와 소통시키는 샘플 유입구를 더 포함할 수 있으며, 상기 유입구는 액체 샘플을 획득할 수 있도록 구성된다. 샘플 유입구는 모세관력에 의해서 액체 샘플을 끌어들이도록 구성될 수 있고, 측정 공동은 유입구로부터 공동 내로 액체를 추가로 끌어들이 수 있다. 결과적으로, 단순히 샘플 유입구를 액체와 접촉시킴으로써, 액체 샘플이 측정 공동 내로 용이하게 제공될 수 있을 것이다. 이어서, 측정 공동 및 샘플 유입구의 모세관력은 양호하게-규정된 양의 액체를 측정 공동 내로 견인할 것이다. 대안적으로, 샘플 획득 장치로 외부의 펌핑력을 인가함으로써, 액체 샘플이 측정 공동 내로 흡입 또는 견인되게 할 수 있을 것이다. 다른 대안에 따라서, 피펫을 이용하여 액체 샘플을 획득하고 이어서 피펫을 이용하여 측정 공동 내로 유입시킬 수도 있을 것이다.
- <36> 샘플 획득 장치는 일회용일 수 있으며, 즉 한 번만 사용하도록 구성될 수 있다. 샘플 획득 장치가 액체 샘플을 수용할 수 있고 또 샘플 카운팅을 위해 필요한 모든 시약을 홀딩할 수 있기 때문에, 샘플 획득 장치는 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 카운트를 실시하기 위한 키트를 제공한다. 이는, 샘플 획득 장치가 한 번만 사용하도록 구성되고 샘플 획득 장치의 세정 및 시약의 재도포를 고려할 필요가 없이 형성되기 때문에, 특별히 가능할 것이다. 또한, 샘플 획득 장치는 플라스틱 물질로 성형될 수 있고 그에 따라 저렴하게 제조될 수 있다. 그에 따라, 일회용 샘플 획득 장치를 이용해도 여전히 비용 측면에서 효과적이다.
- <37> 액체 내에서 형광물질 표지화된 생물학적 성분을 탐지하기 위한 방법의 일 실시예에 따라, 샘플 획득 장치는 측정 공동 내에 건조된 형태로 정렬된 시약을 포함하며, 상기 시약은 형광물질 조합 분자를 포함한다. 이어서, 시약과 접촉시키기 위해서 액체 샘플을 측정 공동 내로 도입함으로써 혼합이 달성된다. 이는, 샘플 준비과정 불필요하다는 것을 의미한다. 혈액 샘플이 시약과 접촉하게 될 때 반응이 시작될 것이다. 그에 따라, 샘플을

수동적으로 준비하는 과정이 필요하지 않으며, 이는 환자가 기다리는 동안에 실험실에서 직접적으로 분석을 실시하는 것을 용이하게 한다.

- <38> 그러나, 다른 실시예에 따라서, 액체 샘플과 시약의 혼합은 액체 샘플이 측정 공동 내로 도입되기에 앞서서 실시된다. 다른 대안에 따라서, 혼합은 둘 이상의 단계에서 실시될 수 있으며, 이때 제 1 단계는 샘플이 측정 공동 내로 도입되기 전에 실시되고 제 2 단계는 측정 공동 내에서 실시된다. 이는, 샘플 준비과정이 샘플 획득 장치에서 그리고 샘플 획득 장치의 외부에서 적어도 부분적으로 이루어진다는 것을 의미한다. 그러나, 두께가 일정한 측정 공동을 가지는 샘플 획득 장치를 이용하는 것의 이점은 여전히 유지된다. 따라서, 상기 방법은 액체 샘플의 부피 단위 당 생물학적 성분의 카운트를 결정할 수 있는 가능성을 제공한다. 또한, 측정 공동 내에서 관심 대상이 되는 생물학적 성분이 안착되는 것을 또는 관찰 표면까지 견인되는 것을 기다릴 필요가 없다.
- <39> 검사되는 샘플의 조사(irradiation)를 위해서, 샘플의 형광물질에 의해서 방출되는 파장과 동일한 또는 그와 유사한 파장을 복사하지 않도록 구성된 복사선 공급원을 이용하는 것이 바람직하는데, 이는 그러한 동일 또는 유사한 파장이 방출된 복사선의 탐지와 간섭할 수 있기 때문이다. 이러한 제한된 파장의 복사선을 얻기 위해서, 바람직하게 색채 필터와 조합된 복사선 공급원이 이용된다. 그 대신에, 형광물질에 의해서 흡수되는 특정 파장을 복사하는 레이저를 이용할 수도 있다. 또한, 복사선 공급원으로부터 샘플로 특정 파장의 복사선만이 전달될 수 있도록 프리즘 또는 레이저(그리드; grid)를 이용할 수도 있을 것이다. 바람직하게, 복사선 공급원은 발광다이오드(LED)이나, 레이저 또는 일반 광 전구와 같은 다른 복사선 공급원도 이용될 수 있을 것이다. LED는 비교적 저렴하고 신뢰할 수 있기 때문에 바람직하다 할 것이다.
- <40> 바람직하게, 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 탐지는 측정 공동 내의 조사된 샘플의 디지털 이미지를 획득하는 단계를 포함하며, 상기 형광물질(fluorophore)을 나타내는 생물학적 성분은 형광물질의 방출 파장에 상응하는 파장의 전자기 복사선을 방출하는 형광 도트(fluorescing dots)로서 구분된다. 일반적으로, 디지털 이미지는 형광 현미경에 통합된 CCD 카메라를 이용하여 획득되며, 상기 현미경은 형광물질에 의해서 방출되는 전자기 복사선의 파장만이 색채 필터를 통해서 카메라에 도달하도록 구성되는 것이 바람직할 것이다.
- <41> 바람직하게, 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 탐지는 형광물질을 나타내는 생물학적 성분을 식별하기 위해서 디지털 이미지를 디지털적으로 분석하는 단계 및 샘플에서 형광물질을 나타내는 생물학적 성분의 개체수를 결정하는 단계를 더 포함한다. 이는, 생물학적 성분의 탐지 및/또는 카운팅이 컴퓨터를 기초로 하는 이미지 분석에 의해서 용이하게 달성될 수 있다는 것을 의미한다. 그에 따라, 신뢰할 수 있고 반복이 가능한 결과치가 얻어질 수 있을 것이다.
- <42> 바람직하게, 액체 샘플은 모세관력에 의해서 모세관 샘플 유입구를 통해서 샘플 획득 장치의 측정 공동 내로 도입된다.
- <43> 디지털 이미지는 3-50x 배율, 보다 바람직하게 3-10x 배율을 이용하여 얻어질 수 있다. 이러한 확대 배율의 범위 내에서, 본 발명의 방법에 의해서 타겟이되는 포유류 세포와 같은 대부분의 생물학적 성분이 탐지를 위해서 충분히 확대될 수 있으며, 샘플 두께를 감당(cover)할 수 있도록 심도가 구성될 것이다. 낮은 확대 배율은, 큰 심도가 얻어진다는 것을 의미한다. 그러나, 낮은 확대 배율이 사용된다면, 생물학적 성분의 탐지가 어려워질 것이다. 획득 이미지 내의 픽셀의 개체수를 증대시킴으로써, 다시 말해 디지털 이미지의 해상도를 개선함으로써, 낮은 확대 배율을 이용할 수 있을 것이다. 이러한 방식에서, 3-4x의 확대 배율을 이용할 수 있으며, 동시에 포유류 세포와 같은 생물학적 성분도 여전히 탐지될 수 있을 것이다.
- <44> 분석 단계는 디지털 이미지 내에서 생물학적 성분을 표지화하는 형광물질의 방출 파장에 상응하는 특정 파장의 전자기 복사선의 높은 방출 영역을 식별하는 단계를 포함할 수 있다. 분석 단계는 특정의 방출된 전자기 복사선으로부터 초래된 디지털 이미지 내에서 광 도트(light dots)를 식별하는 단계를 더 포함할 수 있다. 형광물질 조합 분자가 타겟화된 생물학적 성분 주위에 축적될 수 있기 때문에, 특정 형광의 방출이 분리된(separate) 지점들에서 피크(peak)를 가질 것이다. 이러한 지점들은 타겟화된 생물학적 성분에 상응하여 탐지될 수 있는 디지털 이미지 내의 광 도트를 형성할 것이다.
- <45> 분석 단계는 획득된 디지털 이미지를 전자적으로 확대하는 단계를 더 포함할 수 있다. 샘플의 확대된 디지털 이미지를 획득하기 위해서 샘플을 확대하는 동안, 획득된 디지털 이미지 내에서 서로 매우 근접하게(very closely) 이미지화된 대상들 사이의 식별을 단순화시키기 위해서 획득된 디지털 이미지 자체를 전자적으로 확대할 수 있다.

- <46> 상이한 형광물질에 각각 조합되어 각각 상이한 파장의 전자기 복사선을 방출하고, 상이한 분자 구조에 각각 결합하도록 구성된, 둘 이상의 서로 상이한 형광물질 조합 분자들이 시약에 포함된다면, 샘플의 각각의 복사선의 방출된 파장의 이미지가 얻어질 수 있을 것이다. 이들 이미지들을 겹쳐 놓을 수 있으며, 그에 따라 분석 결과에서, 일부 생물학적 성분이 하나의 분자 구조를 나타낼 수 있고, 다른 생물학적 성분들은 다른 분자 구조를 나타낼 수 있으며, 그리고 다른 생물학적 성분들은 양 분자 구조 모두를 나타낼 수 있을 것이다. 셋 이상의 서로 상이한 형광물질 조합 분자가 사용되는 경우에도, 유사할 것이다.
- <47> 또 다른 실시예에서, 본 발명은 액체 샘플 내의 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 부피 계산을 위한 시스템에 관련되며, 상기 시스템은 전술한 바와 같은 샘플 획득 장치 및 측정 장치를 포함하며, 상기 측정 장치는 측정 공동 내에서 액체 샘플을 저장하는 샘플 획득 장치를 수용하도록 구성된 샘플 획득 장치 홀더, 미리 규정된 파장의 전자기 복사선을 이용하여 액체 샘플을 조사(irradiation)하도록 구성된 광원(광 공급원), 상기 측정 공동 내의 조사된 샘플의 디지털 이미지를 획득하기 위한 디지털 이미지 획득 수단을 포함하는 이미징 시스템, 그리고 이미지 분석기를 포함하며, 상기 형광물질이 조합된 생물학적 성분들은 선택적인 전자기 파장 이미징에 의해서 디지털 이미지 내에서 구분되며, 상기 이미지 분석기는 형광물질 조합 생물학적 성분을 식별하고 상기 액체 샘플 내의 형광물질 조합 생물학적 성분의 개체수를 결정하기 위해서 획득된 디지털 이미지를 분석하도록 구성된다.
- <48> 상기 측정 장치는 측정 공동 내로 직접적으로 획득된 액체 샘플의 분석을 위해서 전술한 바와 같은 샘플 획득 장치의 특성을 이용한다. 측정 장치는 샘플 내의 생물학적 성분의 부피 계산을 위해서 샘플의 결정된 부피를 이미지화할 수 있다.
- <49> 이하에서는, 첨부 도면을 참조하여 본원 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

실시예

- <54> 도 1을 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 샘플 획득 장치(10)가 도시되어 있다. 샘플 획득 장치(10)는 일회용일 수 있으며 분석을 위해서 사용된 후에 폐기될 수 있다. 이는, 샘플 획득 장치(10)가 복잡한 취급을 요하지 않는다는 것을 의미한다. 샘플 획득 장치(10)는 플라스틱 물질로 형성되고 사출-성형에 의해서 제조된다. 이는, 샘플 획득 장치(10)의 제조를 단순하고도 저렴하게 만들며, 그에 따라 샘플 획득 장치(10)와 관련한 비용이 낮게 유지될 수 있다.
- <55> 샘플 획득 장치(10)는 본체 부재(12)를 포함하며, 상기 본체 부재는 베이스(14)를 포함하며, 상기 베이스는 분석 결과에 간섭을 초래하지 않으면서 사용자가 터치할 수 있다. 또한, 베이스(14)는 분석 장치 내의 홀더에 피팅(fit)되는 돌출부(16)를 구비한다. 샘플 획득 장치(10)가 분석 장치 내에 정확하게 위치될 수 있도록 돌출부(16)가 구성된다.
- <56> 샘플 획득 장치(10)는 샘플 유입구(18)를 더 포함한다. 샘플 유입구(18)는 샘플 획득 장치(10) 내의 대향하는 벽들 사이에 형성되며, 상기 벽들은 서로 밀접하게 배치되어 샘플 유입구(18) 내에 모세관력이 생성되게 한다. 혈액이 샘플 획득 장치(10) 내로 견인될 수 있도록 하기 위해서 샘플 유입구(18)는 샘플 획득 장치(10)의 외부와 소통한다. 샘플 획득 장치(10)는 세포와 같은 형광물질 표지화된 생물학적 성분을 카운팅하기 위한 챔버를 포함하며, 상기 챔버는 샘플 획득 장치(10) 내부의 대향하는 벽들 사이에 정렬된 측정 공동(20) 형태를 가진다. 측정 공동(20)은 샘플 유입구(18)와 소통하도록 정렬된다. 모세관력이 샘플 유입구(18)로부터 측정 공동(20) 내로 혈액을 견인할 수 있도록, 측정 공동(20)을 형성하는 벽들은 샘플 유입구(18)의 벽들 보다 서로 근접하여 정렬된다.
- <57> 측정 공동(20)의 벽들은 서로 140 마이크로미터의 거리에서 정렬된다. 그 거리는 전체 측정 공동(20)에 걸쳐서 균일하다. 측정 공동(20)의 두께는 실험되는 혈액의 부피를 결정한다. 분석 결과가 실험되는 혈액 샘플의 부피에 대해서 비교되기 때문에, 측정 공동(20)의 두께가 매우 정확해야 할 필요가 있으며, 다시 말해 측정 공동(20) 내에서 그리고 여러 샘플 획득 장치(10)의 측정 공동(20)들 사이에서 매우 적은 편차가 유지되어야 할 필요가 있다. 그러한 두께는 공동의 적은 영역에서 상대적으로 큰 샘플 부피가 분석될 수 있게 허용한다. 이론적으로, 그러한 두께는 측정 공동(20) 내에서 세포들이 서로의 상부에 정렬될 수 있게 허용한다. 그러나, 혈액 샘플과 같은 샘플 내의 세포의 양이 적어서 그러한 것이 발생할 가능성은 낮다.
- <58> 샘플 획득 장치(10)는 0.5 x 10⁹ 세포/리터 혈액을 초과하는 형광물질 표지화된 세포 카운트를 측정하도록 구성된다. 적은 세포 카운트에서, 샘플 부피가 너무 적어서 통계학적으로 의미가 있을 정도로 많은 세포의 양이 카

운트될 수 없을 것이다. 또한, 형광물질 표지화된 세포 카운트가 12×10^9 세포/리터 혈액을 초과하는 경우에, 서로 중첩되게 정렬된 세포들이 측정된 세포 카운트에 상당한 영향을 미치기 시작할 것이다. 이러한 형광물질 표지화된 세포의 카운트에서, 표지화된 세포는 측정 공동(20)의 두께가 140 마이크로미터일 때, 표지화된 세포는 조사되는 샘플 단면의 약 8%를 커버할 것이다. 그에 따라, 형광물질 표지화된 세포의 정확한 카운트를 획득하기 위해서, 이러한 영향이 고려되어야 할 필요가 있을 것이다. 따라서, 12×10^9 개의 표지화된 세포/리터 혈액보다 많은 표지화된 세포 카운트의 값의 통계학적 정정이 이용될 것이다. 형광물질 표지화된 세포의 증대되는 카운트의 경우에 이러한 통계학적 정정이 증대될 것인데, 이는 중첩되는 표지화된 세포의 영향이 보다 많은 세포 카운트에서 보다 커질 것이기 때문이다. 통계학적 정정은 측정 장치의 교정에 의해서 결정될 수 있다. 대안으로서, 통계학적 정정은 샘플 획득 장치(10)와 관련하여 사용되는 측정 장치를 셋업(setting up)하기 위한 일반적인 레벨에서 결정될 수 있을 것이다. 50×10^9 개의 표지화된 세포/리터 혈액 정도로 많은 형광물질 표지화된 세포의 카운트를 분석하기 위해서 샘플 획득 장치(10)를 이용할 수도 있을 것이다.

- <59> 대안적인 실시예에 따라서, 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 탐지는 특정 생물학적 성분이 샘플 내에 존재하는지의 여부를 결정하기 위해서 이용된다. 이러한 실시예에서, 부피 카운트를 실시할 필요가 없으며, 그에 따라, 생물학적 성분의 존재는 샘플 내의 성분의 양이 매우 적은 경우에도 탐지될 수 있을 것이다.
- <60> 측정 공동(20)의 벽의 표면은 시약(22)으로 적어도 부분적으로 코팅된다. 시약(22)은 동결-건조될 수 있고, 가열-건조될 수 있으며, 또는 진공-건조될 수 있으며 측정 공동(20)의 표면에 도포될 수 있다. 샘플이 측정 공동(20) 내로 제공되었을 때, 샘플은 건조 시약(22)과 접촉할 것이고 시약(22)과 샘플 성분 사이의 결합 반응이 시작될 것이다.
- <61> 피펫 또는 분배기를 이용하여 시약(22)을 측정 공동(20) 내로 삽입함으로써 시약(22)이 도포된다. 측정 공동(20) 내로 삽입되었을 때 시약(22)은 메탄올에 용해된다. 시약(22)을 가지는 용매가 측정 공동(20)을 채운다. 이어서, 건조가 실시되어 용매를 증발시키고 시약(22)은 측정 공동(20)의 표면에 부착된다.
- <62> 시약이 좁은 공간의 표면 상에서 건조되어야 하기 때문에, 액체는 대기 분위기와 접촉하는 매우 작은 표면을 가질 것이고, 그에 따라 액체의 증발이 어렵게 될 것이다. 따라서, 메탄올과 같은 휘발성 액체를 이용하는 것이 바람직하며, 그에 따라 측정 공동의 좁은 공간으로부터 액체가 효과적으로 증발될 수 있게 된다.
- <63> 대안적인 제조 방법에 따라서, 두 개의 피스(pieces)를 서로 부착함으로써 샘플 획득 장치(10)가 형성되며, 이때 상기 하나의 피스는 측정 공동(20)의 바닥을 형성하고 다른 피스는 측정 공동(20)의 상부 벽을 형성한다. 이는, 두 피스들이 서로 부착되기에 앞서서 시약(22)이 개방된 표면 상에서 건조될 수 있게 허용한다. 따라서, 시약(22)은 물에 용해될 수 있는데, 이는 용매가 휘발성을 가질 필요가 없기 때문이다.
- <64> 시약(22)은 하나 이상의 형광물질이 조합된 항체를 포함할 수 있다. 항체들은 세포와 같이 타겟이 되는 생물학적 성분의 특정 분자 구조 특성에 결합되도록 구성된다. 그러한 구조는 CD4 또는 CD8과 같은 세포 표면 마커일 수 있다. 혈액 샘플이 시약(22)과 접촉할 때, 항체가 활성화되어 타겟 혈액 세포의 특정 분자 구조에 결합될 것이며, 그에 따라 세포에 축적될 것이다. 바람직하게, 시약(22)은 본질적으로 전체 세포를 커버링하는 타겟 세포의 부분들을 뚜렷하게 표지화하기 위한 충분한 양의 항체를 포함하여야 한다. 이는, 본질적으로 전체 표지화된 세포들이 형광상태라는 것을 의미하고 그에 따라 샘플의 디지털 이미지 내에서 용이하게 탐지될 수 있다는 것을 의미한다. 또한, 형광물질 조합 항체의 잉여분이 종종 존재할 것이며, 이는 혈장 내에서 상호혼합될 것이다. 항체의 잉여분은 혈장 내에서 균일하고 낮은 형광 배경 레벨을 제공할 것이다. 타겟 세포에 축적된 항체는 배경 형광 레벨과 명확하게 구분될 수 있을 것이다.
- <65> 또한, 시약(22)은 활성적인, 다시 말해서 예를 들어 혈액 샘플의 세포와의 화학적 결합에 참여할 수 있는, 또는 비-활성적인, 다시 말해서 결합에 참여하지 않는 다른 성분들도 포함할 수 있다. 활성 성분들은 예를 들어 각 타겟 분자 구조에의 항체 결합을 촉진하도록 구성될 수 있다. 비-활성 성분들은 예를 들어 측정 공동(20)의 벽의 표면에 대한 시약(22)의 부착을 개선하도록 구성될 수 있다.
- <66> 몇 분내에, 혈액 샘플은 시약(22)과 반응할 것이며, 그에 따라 형광물질 표지화된 항체가 타겟 세포에 결합될 것이다.
- <67> 도 2를 참조하면, 샘플 획득 장치의 다른 실시예를 개시한다. 샘플 획득 장치(110)는 측정 공동을 형성하는 챔버(120)를 포함한다. 샘플 획득 장치(110)는 상기 챔버(120)로 혈액을 이송하기 위한 챔버(120)로의 유입구(118)를 구비한다. 챔버(120)는 흡입 튜브(121)를 통해서 펌프(도시하지 않음)로 연결된다. 샘플이 유입구

(118)를 통해서 챔버(120)내로 흡입되도록 펌프는 흡입 튜브(121)를 통해서 챔버(120)로 흡입력을 인가할 것이다. 샘플 획득 장치(110)는 측정이 실시되기에 앞서서 펌프로부터 분리된다. 제 1 실시예에 따른 샘플 획득 장치(10)의 측정 공동(20)과 유사하게, 챔버(120)는 검사되는 샘플의 두께를 규정하는 양호하게-규정된 두께를 가진다. 또한, 시약(122)이 샘플과의 반응을 위해서 챔버(120)의 벽에 도포된다.

<68> 도 3을 참조하여, 형광물질 표지화된 생물학적 성분의 탐지 및 부피 계산을 위한 시스템을 설명한다. 시스템(30)은 혈액 샘플과 함께 샘플 획득 장치(10)를 수용하기 위한 샘플 홀더(32)를 포함한다. 샘플 획득 장치(10)의 측정 공동(20)이 시스템(30) 내에 정확하게 배치되도록 하는 방식으로 샘플 홀더(32)가 샘플 획득 장치(10)를 수용하게끔 구성된다. 시스템(30)은 샘플 획득 장치(10) 내에서 샘플을 조사하기 위한 광원(34)을 포함한다. 광원(34)은 색채 필터와 조합되어 샘플과 함께 사용되는 형광물질의 여기 파장에 상응하는 광(48)을 조사하는 LED일 수 있다. 형광물질 표지화된 샘플 이외의 샘플이 형광 화합물을 흡수하는 것이 상대적으로 적도록 파장이 선택되어야 한다. 또한, 샘플 획득 장치(10)의 벽들은 파장에 대해서 본질적으로 투과성을 가져야 한다. 색채 필터를 통과한 후에, 광은 이색성(dichroic) 거울(35)의 이용을 통해서 샘플로 지향된다. 세포와 같은 샘플의 표지화된 생물학적 성분 주위에(또는 내부에) 축적되는 형광물질은 특정 파장을 가지는 이러한 광(48)을 흡수할 것이고 보다 긴 특정 파장의 광(50)을 방출할 것이다. 이렇게 방출된 보다 긴 파장의 광(50)은 이색성 거울을 통과하여 이미징 시스템(36)에 도달할 것이며, 그에 따라 성분들이 밝은 영역 또는 도트로서 샘플의 디지털 이미지에 나타게 될 것이다. 색채 이미지가 획득된다면, 표지화된 세포는 특정 색으로 채색된 도트로서 나타날 것이다. 흑백 이미지가 얻어진다면, 표지화된 세포는 어두운 배경에 대한 밝은 도트로서 표시될 것이다.

<69> 그 대신에, 광원(34)은 레이저, 또는 색채 필터와 조합된 백열광일 수 있다.

<70> 대안적으로, 광(48)은, 이색성 거울의 개입 없이, 각도를 이루어 샘플로 직접적으로 지향될 수 있다.

<71> 시스템(30)은 이미징 시스템(36)을 더 포함하며, 상기 이미징 시스템은 샘플 홀더(32)의 위쪽에 배치된다. 그에 따라, 이미징 시스템(36)은 혈액 샘플에 의해서 방출되는 복사선(50)을 수용하도록 구성된다. 이미징 시스템(36)은 광학적 확대 시스템(38) 및 이미지 획득 수단(40)을 포함할 수 있다. 샘플의 형광물질에 의해서 방출되지 않은 빛이 이미지 획득 수단(40)에 도달하는 것을 방지하기 위해서, 색채 필터가 이용될 수 있다. 확대 시스템(38)은 3-50x의 확대 배율, 보다 바람직하게 3-100x의 확대 배율, 가장 바람직하게 3-4x 확대 배율을 제공하도록 구성될 수 있다. 이러한 확대 배율의 범위 내에서, 표지화된 세포를 구분할 수 있을 것이다. 낮은 확대 배율이 이용될 수 있도록 허용하기 위해서 해상도가 개선된 이미지를 획득할 수 있다. 또한, 여전히, 확대 시스템(38)의 심도는 적어도 측정 공동(20)의 두께에 상응하도록 구성될 것이다.

<72> 확대 시스템(38)은 샘플 홀더(32)에 인접하여 정렬되는 대물 렌즈 또는 렌즈 시스템(42), 그리고 대물 렌즈(42)로부터 거리를 두고 배치되는 접안 렌즈 또는 렌즈 시스템(44)을 포함할 수 있다. 대물 렌즈(42)는 샘플의 제 1 확대를 제공하고, 접안 렌즈(44)는 추가적인 확대를 제공한다. 대물 렌즈(42)는 이색성 거울(35)과 샘플 홀더(32) 사이에 정렬될 수 있다. 확대 시스템(38)은 샘플의 적절한 확대 및 이미징을 위한 추가적인 렌즈들을 더 포함할 수 있다. 샘플 홀더(32) 내에 위치되었을 때 측정 공동(20)내의 샘플이 이미지 획득 수단(40)의 이미지 평면 상에서 포커싱될 수 있도록 확대 시스템(38)이 구성된다.

<73> 이미지 획득 수단(40)은 샘플의 디지털 이미지를 획득하도록 구성된다. 이미지 획득 수단(40)은 CCD 카메라와 같은 임의 종류의 디지털 카메라일 수 있다. 이미지 평면 내의 착란원(circle of confusion)이 심도 내의 픽셀 크기를 초과하지 않도록, 디지털 카메라의 픽셀 크기는 이미징 시스템(36)에 대한 제한(restriction)을 설정한다. 그러나, 표지화된 세포가 다소 흐리더라도 여전히 탐지될 수 있을 것이며, 그에 따라 착란원이 픽셀 크기를 초과하면서도 여전히 심도 내에 있을 수 있도록 허용된다. 디지털 카메라(40)는 디지털 이미지 내에서 이미지화될 측정 공동(20)의 영역을 규정할 것이다. 측정 공동(20)의 두께와 함께 이미지화되는 그러한 영역은 이미지화되는 샘플의 부피를 형성한다. 이미징 시스템(36)은 샘플 획득 장치(10)에서 혈액 샘플을 이미징하는 것에 맞출 수 있도록 설정된다. 이미징 시스템(36)의 설정을 변경할 필요가 없다. 바람직하게, 설정이 우연히 변경되지 않도록 이미징 시스템(36)이 하우징 내에 정렬된다.

<74> 대안적으로, 시스템(30)은 하나 이상의 이미징 시스템(36)을 포함할 수 있으며, 그에 따라 여러 파장의 방출된 형광이 각각의 여러 이미징 시스템으로 지향될 수 있을 것이다. 여러 파장의 빛을 여러 이미징 시스템(36)으로 지향시키는 것은 예를 들어 하나 이상의 이색성 거울 또는 그리드를 이용함으로써 달성될 수 있을 것이다.

<75> 또한, 다수의 광원(34)이 이용될 수 있으며, 그에 따라 샘플이 몇 개의 상이한 파장의 빛으로 동시에 또는 순차

적으로 조사될 수 있을 것이다. 이는, 하나 이상의 색채 필터와 각각 조합된 다수의 LED를 이용함으로써 달성될 수 있다. 통상적으로, 시스템(30) 내에서 사용되는 모든 색채 필터는 휠(wheels) 상에 배치될 수 있고, 상기 휠 상에는 가장 일반적으로 요구되는 필터 모두가 정렬될 수 있으며, 그에 따라 특정 탐지에 필요한 특정 필터가 용이하게 색인되어 활성 위치로 배치될 수 있을 것이다. 여기 빛을 위해서 필터가 사용된다면, LED로부터의 빛이 샘플에 도달하기 전에 필터와 교차할 때 그 필터가 활성 위치에 있다고 할 수 있을 것이며, 또는 방출된 빛을 위해서 필터가 사용된다면, 이미지 획득 수단(40)에 도달하기 전에 샘플로부터의 형광 빛이 필터와 교차할 때 그 필터가 활성 위치에 있다고 할 수 있을 것이다.

<76> 시스템(30)은 이미지 분석기(46)를 더 포함한다. 이미지 분석기(46)는 디지털 카메라(40)에 의해서 얻어진 디지털 이미지를 수신하기 위해서 디지털 카메라(40)에 연결된다. 이미지 분석기(46)는 디지털 이미지 내에 존재하는 표지화된 세포의 개체수를 카운팅하기 위해서 표지화된 세포에 대응하는 디지털 이미지 내의 패턴들을 식별하도록 구성된다. 그에 따라, 이미지 분석기(46)는 어두운 배경에 대한 빛의 도트를 식별하도록 구성될 수 있을 것이다. 이미지 분석기(46)는 디지털 이미지를 분석하기에 앞서서 디지털 이미지를 먼저 전자적으로 확대하도록 구성될 것이다. 이는, 비록 디지털 이미지의 전자적인 확대가 디지털 이미지를 다소 흐리게 만들 것임에도 불구하고, 이미지 분석기(46)는 서로 밀접하게 이미지화된 표지화된 세포들을 보다 용이하게 구별할 수 있다는 것을 의미한다.

<77> 이미지 분석기(46)는 디지털 이미지 내에서 식별된 표지화된 혈액 세포의 개체수를 전술한 바와 같이 양호하게-규정된 혈액 샘플의 부피로 나눔으로써 혈액의 부피 당 표지화된 혈액 세포의 개체수를 계산할 수 있을 것이다. 부피적으로 표지화된 혈액 세포 카운트가 장치(30)의 디스플레이 상에 표시될 것이다.

<78> 이미지 분석기(46)는 이미지 분석을 실시하기 위한 코드를 포함하는 프로세싱 유닛으로서 구현될 수 있을 것이다.

<79> 도 4를 참조하여, 생물학적 성분의 형광 표지화 방법을 설명한다. 그러한 방법은 표지화된 T 림프구의 탐지 및 부피 계산(volumetric enumeration)을 위한 방법을 참조하여 특히 설명될 것이다. 그러나, 소위 당업자는 다른 생물학적 성분의 탐지 및 부피 계산을 위해서 그러한 방법을 조정할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 소위 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 대상이 되는 생물학적 성분의 표지화를 위한 적절한 시약을 사용할 필요가 있을 것이며, 선택된 형광물질의 여기 및 방출 파장에 맞춰 탐지 및 조사(irradiation)를 실시할 필요가 있을 것이다.

<80> T 림프구의 탐지 및 부피 계산을 위한 방법은, 단계(102)에서, 140 μm의 일정 두께를 가지는 샘플 획득 장치 내에서 혈액 샘플을 획득하는 단계를 포함한다. 인간의 전체 혈액의 희석되지 않은 샘플이 모세혈관 또는 정맥혈로부터 획득될 수 있을 것이다. 모세혈관의 샘플은 바늘로 찌른 환자의 손가락으로부터 측정 공동 내로 직접적으로 견인될 수 있을 것이다. 혈액 샘플은 샘플 획득 장치 내에서 시약(22)과 접촉하고, 결합 반응이 개시될 것이다. 시약은 하나의 Fitc 표지화된 반(anti) CD4 항체 및 하나의 APC 표지화된 반 CD8 항체를 포함한다. 몇 분 이내에, 혈액 샘플은 시약(22)과 반응할 것이고, 그에 따라 형광물질 표지화된 항체가 혈액 샘플의 T 헬퍼 림프구의 CD4 마커에 그리고 T 킬러 림프구의 CD8 마커에 결합되며, 그에 따라 상기 샘플은 분석 준비가 완료된다. 단계(104)에서, 샘플 획득 장치가 분석 장치 내에 위치된다. 분석 장치의 버튼을 누름으로써 분석이 개시될 것이다. 그 대신에, 장치가 샘플 획득 장치의 존재를 탐지함으로써 분석이 자동적으로 실시될 수도 있을 것이다.

<81> 단계(106)에서, 약 450 nm의 빛만이 통과할 수 있게 허용하도록 구성된 색채 필터와 함께 LED를 이용하여 조사된다. 허용된 빛은 샘플 획득 장치의 상부 표면에 대해서 약간 경사진 상태로 샘플로 직접 지향된다. LED 빛은 Fitc 형광물질 표지화된 CD4+ 림프구에 의해서 흡수되며, 그에 따라 Fitc는 약 500 nm의 빛을 방출한다. 단계(108)에서, CCD 카메라를 이용하여 어떠한 광학적 확대도 없이 형광 샘플의 이미지를 획득한다. 카메라는 약 500 nm 파장의 빛만이 통과하여 카메라로 진행할 수 있게 허용하도록 구성된 색채 필터와 조합된다. 이는, 디지털 이미지가 표지화된 T 헬퍼 세포의 위치 내의 빛 도트/영역을 포함할 것임을 의미한다.

<82> 다시, 전술한 바와 같은 방식으로, 약 590 nm의 빛만이 샘플을 향해 통과될 수 있게 허용하는 색채 필터와 조합된 LED로 샘플이 조사되고, 그에 따라 CD8+ T 킬러 세포를 표지화하는 APC 형광물질을 여기서킨다. Fitc 표지화된 세포의 탐지와 유사하게, 약 640 nm의 빛만을 CCD 카메라로 통과시키는 색채 필터가 이용되며, 그에 따라 제 2 디지털 이미지가 얻어지고, 이번에는 샘플에 존재하는 표지화된 T 킬러 세포 위치 내의 빛 도트/영역이 포함된다.

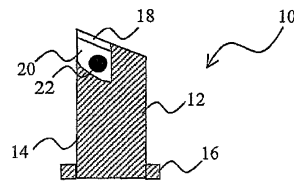
- <83> 획득된 디지털 이미지는 이미지 분석기로 전달되고, 단계(110)에서, 각각의 디지털 이미지 내의 빛 도트의 개체 수를 카운트하기 위해서 전자 확대 이미지 분석이 실시된다. 그에 따라, 이미지 분석기는 혈액 샘플 내의 각각의 T 헬퍼 세포 및 T 킬러 세포의 농도를 결정할 수 있게 된다. 또한, 예상과 반대로, CD4 및 CD8 모두를 디스플레이하는 임의 세포가 있는지를 결정하기 위해서, 이미지 분석기는 두 이미지를 중첩시킬 수 있다.
- <84> 대안적으로, 액체 샘플이, 즉 본 예에서는 전체 혈액이 샘플 획득 장치(10) 외부의 시약(22)(항체)와 반응될 수 있고, 또는 부분적으로 반응될 수 있고, 그 후에 반응된 또는 부분적으로 반응된 샘플이 샘플 획득 장치(10)에서 획득될 수 있을 것이다.
- <85> 일 실시예에서, 시약(22)은 1차 항체에 대해 친화적인(affinity) 형광물질 표지화된 2차 항체를 포함하며, 그러한 2차 항체는 샘플 획득 장치(10)의 측정 공동(20) 내에서 건조된 형태로 존재한다. 액체 샘플은 먼저, 샘플 획득 장치(10)의 외부에서, 1차 항체로 처리되고, 이는 타겟이 되는 샘플의 생물학적 성분의 특성의 미리 규정된 분자 구조에 결합시킨다. 이어서, 1차 항체를 포함하는 샘플은 2차 항체를 홀딩하는 샘플 획득 장치(10)에서 획득된다. 그에 따라, 2차 항체는 샘플과 혼합되고 1차 항체에 결합되며, 이는 다시 타겟이 되는 생물학적 성분에 결합되며, 그에 따라 타겟이 되는 생물학적 성분이 형광물질로 표지화된다. 이러한 실시예는, 건조된 형광물질 조합형 항체가 다양한 많은 종류의 생물학적 성분을 표지화하기 위해서 이용될 수 있다는 것을 의미하며, 이때 상기 생물학적 성분들은 그 성분들에 대해서 친화성을 가지는 1차 항체로 전처리(pre-treat)되기만 하면 된다. 그에 따라, 샘플의 전처리는, 샘플 획득 장치(10)가 다양한 여러 용도에 사용될 수 있게되며, 단 하나의 생물학적 성분을 탐지하기 위한 샘플 획득 장치(10)를 개조할 필요도 없을 것이다.
- <86> 본 명세서에서 설명된 바람직한 실시예들이 제한적이 아니고 특허청구범위에 의해서 정해지는 보호 범위 내에서 도 많은 변형 실시예들이 가능하다는 것을 이해할 것이다.

도면의 간단한 설명

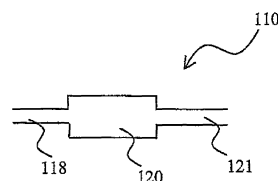
- <50> 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 샘플 획득 장치의 개략도이다.
- <51> 도 2는 본 발명의 다른 실시예에 따른 샘플 획득 장치의 개략도이다.
- <52> 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 측정 장치의 개략도이다.
- <53> 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 방법을 도시한 흐름도이다.

도면

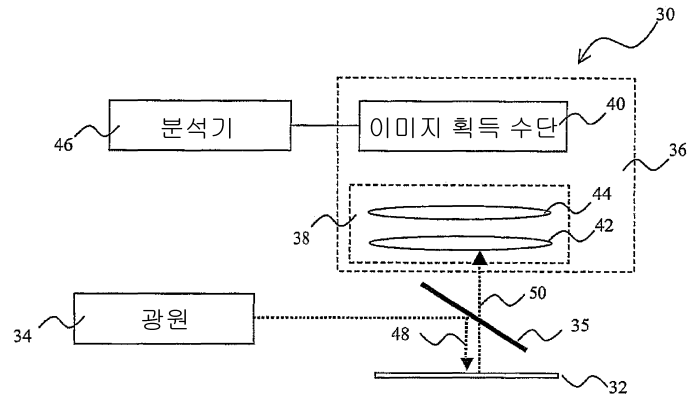
도면1



도면2



도면3



도면4

