



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월10일
(11) 등록번호 10-2497904
(24) 등록일자 2023년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56966 (2013.01)
G01N 33/5304 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0019505
(22) 출원일자 2021년02월10일
심사청구일자 2021년02월10일
(65) 공개번호 10-2022-0115462
(43) 공개일자 2022년08월17일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020200064060 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
황상현
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 103동 801호(대치동, 대치삼성아파트)
오홍범
서울특별시 성동구 성수일로8길 47, 106동 1502호(성수동2가, 성수동 롯데캐슬파크)
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 13 항

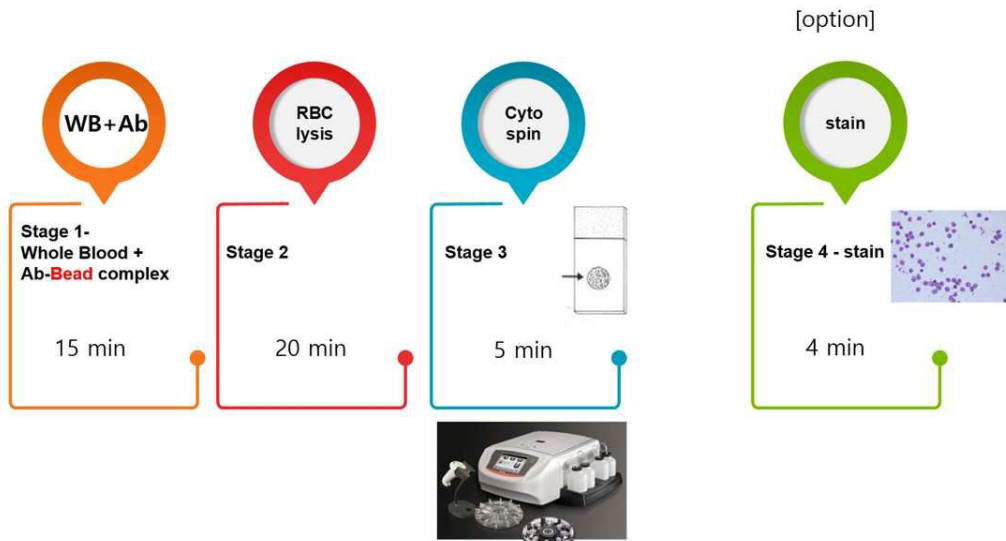
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 세포 원심분리 및 농축을 이용한 면역세포 검출 방법 및 면역세포 검출용 칩

(57) 요약

본 발명은 세포 원심분리 및 농축을 이용한 면역세포 검출 방법 및 면역세포 검출용 칩에 관한 것으로서, 본 발명의 면역세포 검출 방법은 면역세포 검출용 칩을 통해 마이크로비드를 결합한 항체를 혈액에 처리하고 적혈구 용해 및 세포 원심분리를 통한 세포 농축 과정을 거친 후 특정 면역세포를 검출함으로써, 형광을 기반으로 하는 고가의 유세포분석기를 사용하지 않고 쉽게 육안으로 특정 면역세포를 검출 및 계수할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/537 (2013.01)

G01N 33/54326 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR101858056 B1*

KR101770991 B1

KR1020140073215 A

KR1020190016446 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119403
과제번호	2020R1A5A1018052
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터지원사업
연구과제명	나노-광 융합 바이오의료 진단 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	중앙대학교
연구기간	2020.07.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 세포 원심분리 및 농축을 이용한 면역세포 검출 방법:

- (a) 마이크로비드(microbead) 및 항체를 접합(conjugate)시켜 비드-항체 복합체를 제조하는 단계;
- (b) 상기 비드-항체 복합체를 개체로부터 분리된 혈액과 반응시키는 단계;
- (c) 상기 반응 후 반응물에 적혈구 용해 버퍼를 처리하여 적혈구를 용해시킨 후 상등액을 제거하는 단계, 및 상등액 제거 후 세포 펠렛을 폴리에틸렌 글리콜 8000(PEG 8000)에 현탁시키는 단계; 및
- (d) 상기 상등액 제거 후 세포를 원심분리하여 세포를 농축하는 단계.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항체는 세포표면항원무리(cluster of designation, CD)에 대한 항체인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 항체는 항 CD4, 항 CD19, 항 CD3, 항 CD8, 항 CD14, 항 CD16, 항 CD25, 항 CD45, 항 CD56, 및 항 CD127로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 항체의 농도는 0.01 mg/mL 내지 3 mg/mL인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 마이크로비드 : 항체의 부피비는 1 내지 6 : 1인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 혈액은 전혈(whole blood) 및 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,
상기 마이크로비드는 직경이 0.1 μm 내지 4 μm인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,
상기 PEG 8000은 농도가 5 %(v/v) 내지 25 %(v/v)인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,
상기 (d) 단계에서 세포를 원심분리하여 농축하는 단계는 사이토스핀(cytospin)을 이용하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,
상기 사이토스핀을 이용한 세포 원심분리는 5000 rpm 내지 9000 rpm의 속도로 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

비드-항체 복합체와 개체로부터 분리된 혈액의 반응이 이루어지는 챔버 1(11, 21);
적혈구 용해 반응이 이루어지는 챔버 2(12, 22);
적혈구 용해 용액을 포함한 면역세포 검출 반응에 이용되는 용액을 담은 챔버 3(13, 23);
세포 원심분리 및 농축이 이루어지는 챔버 4(14, 24);
물을 흡수하는 종이로 이루어진 필터 페이퍼(16, 25);
필터 페이퍼와 밀착 또는 결합되고 현미경 이미지 관찰을 위해 투명한 소재로 이루어진 슬라이드(17, 26); 및
바코드(18, 27)로 이루어진, 면역세포 검출용 칩(10, 20)으로서,
상기 비드-항체 복합체는 마이크로비드(microbead) 및 항체가 접합(conjugate)되어 제조된 것이고,
상기 면역세포 검출용 칩(10, 20)은 챔버 5(15)를 더 포함하여, 상기 챔버 5에서 폴리에틸렌 글리콜 8000(PEG 8000) 처리에 의한 세포 펠렛 현탁이 이루어지는 반응이 일어나거나,
챔버 4(24)에서 상기 폴리에틸렌 글리콜 8000 처리에 의한 세포 펠렛 현탁이 이루어지는 반응이 일어나는 것을 특징으로 하는, 면역세포 검출용 칩.

청구항 13

삭제

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 슬라이드(17, 26)의 소재는 투명한 유리 또는 플라스틱인 것을 특징으로 하는, 면역세포 검출용 칩.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 면역세포 검출용 칩(10, 20)은 길이 7 cm 내지 13 cm, 높이 5 cm 내지 10 cm, 및 폭 0.5 cm 내지 5 cm로 이루어진 것을 특징으로 하는, 면역세포 검출용 칩.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 원심분리 및 농축을 이용한 면역세포 검출 방법 및 면역세포 검출용 칩에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] CD4⁺ T 세포 수는 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)/후천 면역결핍 증후군(acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 관리에 있어 중요한 테스트이며 항 레트로 바이러스 치료를 시작할 시기를 결정하고 치료 효과를 모니터링 하는데 널리 사용된다.

[0004] CD4⁺ T 세포 수는 일반적으로 혈액 마이크로 리터당 CD4⁺ T 림프구의 절대 수로 표시된다. 또한, 총 림프구 수에 대한 CD4⁺ T 세포의 비율(CD4 백분율) 및 CD8⁺ T 세포에 대한 CD4⁺ T 세포의 비율(CD4/CD8)은 감염 과정을 모니터링 하는데 특히 유용하며 신체의 면역 강도를 전반적으로 평가하는데 이용될 수 있다. CD4/CD8 비율은 또한 HIV에 감염된 영아에게도 특히 유용하며, 이는 CD8⁺ T 세포가 현저하게 증가하는 반면 HIV 감염으로 인한 CD4⁺ T 세포의 감소는 어린 시절에는 분명하지 않기 때문이다.

[0005] CD4⁺ T 세포 계수의 현재 황금 표준(gold standard)은 신뢰할 수 있고 정확한 방법인 유세포 분석법으로, BD FACSCount, FACSCalibur(BD Biosciences) 및 EPICS XL(Beckman Coulter)과 함께 여러 유형의 유세포 분석기를 사용할 수 있다. CD4⁺ T 세포 계수 전용 중간 산물 유세포 분석기는 FACSCount가 있으며, 2017년에는 또 다른 소형 중간 산물 유세포 분석기인 Muse Auto CD4/CD4 % 시스템이 개발되었다. 다만, 유세포 분석을 기반으로 한 최신 CD4⁺ T 세포 계수 방법은 높은 운영/유지 보수 비용과 숙련된 인력의 요구 사항으로 인해 자원이 제한된 설정에는 적합하지 않다.

[0006] 현재 가장 많이 사용되는 IVD 유세포 분석기는 숙련도가 높은 전담 인력이 작동하는 정교하고 크고 무겁고 매우 비싼 기기로서, 일반적으로 대형 병원에서 사용되며 반자동 또는 완전 자동화된 것이고 시료 처리량이 높다.

[0007] 이에, CD4⁺ T 세포 계수 전용인 보다 저렴한 기기가 개발되었으며, 그 결과, CD4⁺ T 세포 카운팅을 위해 일회용 카트리지를 사용하는 여러 휴대용 point-of-care(POC) 장치가 시장에 출시되었다. 이러한 기기는 작고 이동 가능하며 견고하고 합리적인 가격에 배터리로 작동하며, 손가락 찌르기 또는 정맥혈을 사용하여 환자와 가까운 의료 전문가가 작동할 수 있다. WHO에서 사전 검증한 카트리지 기반 POC CD4 기기 중 두 가지는 PIMA CD4 및 FACSPresto이다.

[0008] 그러나, 대부분의 1 세대 POC CD4⁺ T 세포 계수 방법은 형광 표지된 CD4⁺ T 세포의 이미지를 분석하여 계수하는 미세 유체 이미지 세포 계수와 같은 유세포 분석의 미세 유체 적응에 의존하거나, 수동 처리 및 핑거 스틱(finger stick)보다 큰 혈액량을 여전히 필요로 할 수 있다.

[0009] 이에, 상기와 같은 종래의 면역세포 계수 방법의 문제점을 극복하고, 형광 검출을 위한 고도의 광학 장비 없이 쉽고 빠르면서도 높은 정확도로 CD4⁺ T 세포와 같은 면역세포를 계수하는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Sci Transl Med. 2013 Dec 4;5(214):214ra170.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 자성 비드를 결합한 항체를 혈액에 처리하고 적혈구 용해 및 세포 원심분리를 통해 세포를 농축하여 특정 면역세포를 검출함으로써, 형광을 사용하지 않고 복잡하고 정밀한 광학적 기기 없이 쉽게 육안으로 면역세포를 검출할 수 있는 면역세포 검출 칩(chip) 및 이를 이용한 면역세포 검출 방법을 개발하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0013] 이에, 본 발명의 목적은 세포 원심분리 및 농축을 이용한 면역세포 검출 방법 및 면역세포 검출용 칩을 제공하는 것이다.

[0014] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 세포 원심분리 및 농축을 이용한 면역세포 검출 방법을 제공한다:

[0017] (a) 마이크로비드(microbead) 및 항체를 접합(conjugate)시켜 비드-항체 복합체를 제조하는 단계;

[0018] (b) 상기 비드-항체 복합체를 개체로부터 분리된 혈액과 반응시키는 단계;

[0019] (c) 상기 반응 후 반응물에 적혈구 용해 버퍼를 처리하여 적혈구를 용해시킨 후 상등액을 제거하는 단계; 및

[0020] (d) 상기 상등액 제거 후 세포를 원심분리하여 세포를 농축하는 단계.

[0021] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (c) 단계에서 상등액 제거 후 세포 펠렛을 폴리에틸렌 글리콜 8000(PEG 8000)에 현탁시키는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 항체는 세포표면항원무리(cluster of designation, CD)에 대한 항체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현 예로서, 상기 항체는 항 CD4, 항 CD19, 항 CD3, 항 CD8, 항 CD14, 항 CD16, 항 CD25, 항 CD45, 항 CD56, 및 항 CD127로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (a) 단계에서 항체의 농도는 0.01 mg/mL 내지 3 mg/mL일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (a) 단계에서 마이크로비드 : 항체의 부피비는 1 내지 6 : 1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 혈액은 진혈(whole blood) 및 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 마이크로비드는 직경이 0.1 μm 내지 4 μm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 PEG 8000은 농도가 5 %(v/v) 내지 25 %(v/v)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (d) 단계에서 세포를 원심분리하여 농축하는 단계는 사이토스핀(cytospin)을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 사이토스핀을 이용한 세포 원심분리는 5000 rpm 내지 9000 rpm의 속도로 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명은 비드-항체 복합체와 개체로부터 분리된 혈액의 반응이 이루어지는 챔버 1(11, 21);
- [0032] 적혈구 용해 반응이 이루어지는 챔버 2(12, 22);
- [0033] 적혈구 용해 용액을 포함한 면역세포 검출 반응에 이용되는 용액을 담은 챔버 3(13, 23);
- [0034] 세포 원심분리 및 농축이 이루어지는 챔버 4(14, 24);
- [0035] 물을 흡수하는 종이로 이루어진 필터 페이퍼(16, 25);
- [0036] 필터 페이퍼와 밀착 또는 결합되고 현미경 이미지 관찰을 위해 투명한 소재로 이루어진 슬라이드(17, 26); 및
- [0037] 바코드(18, 27)로 이루어진, 면역세포 검출용 칩(10, 20)으로서,
- [0038] 상기 비드-항체 복합체는 마이크로비드(microbead) 및 항체가 접합(conjugate)되어 제조된 것을 특징으로 하는, 면역세포 검출용 칩을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 면역세포 검출용 칩(10, 20)은 챔버 5(15)를 더 포함하여, 상기 챔버 5에서 폴리에틸렌 글리콜 8000(PEG 8000) 처리에 의한 세포 펠렛 현탁이 이루어지는 반응이 일어나거나,
- [0040] 챔버 4(24)에서 상기 폴리에틸렌 글리콜 8000 처리에 의한 세포 펠렛 현탁이 이루어지는 반응이 일어날 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 슬라이드(17, 26)의 소재는 투명한 유리 또는 플라스틱일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 면역세포 검출용 칩(10, 20)은 길이 7 cm 내지 13 cm, 높이 5 cm 내지 10 cm, 및 폭 0.5 cm 내지 5 cm로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0044] 본 발명의 면역세포 검출 방법은 면역세포 검출용 칩을 통해 마이크로비드를 결합한 항체를 혈액에 처리하고 적혈구 용해 및 세포 원심분리를 통한 세포 농축 과정을 거친 후 특정 면역세포를 검출함으로써, 염색 과정을 거치지 않고 육안으로 면역세포를 관찰할 수 있으며, 형광을 기반으로 하는 고가의 유세포분석기를 사용하지 않고 쉽게 특정 면역세포를 검출 및 계수할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출 방법의 과정을 간략하게 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 2a는 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출용 칩 1(10)의 정면도를 나타낸 도면이다.
- 도 2b는 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출용 칩 1(10)의 측면도를 나타낸 도면이다.
- 도 2c는 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출용 칩 2(20)의 측면도를 나타낸 도면이다.
- 도 3a 내지 3d는 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출 방법을 통해 항 CD19 항체를 이용하여 B 세포를 검출한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출 방법을 이용한 마이크로비드의 입자 크기에 따른 CD4⁺ T 세포 검출 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 5는 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출 방법을 이용한 항 CD4 항체의 양에 따른 CD4⁺ T 세포 검출 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 6a 내지 6c는 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출 방법을 이용한 PEG8000 농도에 따른 CD4⁺ T 세포

검출 결과를 나타낸 도면이다.

도 7a 및 7b는 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출 방법을 이용한 FACS 버퍼 처리에 따른 CD4⁺ T 세포의 검출 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출 방법을 이용한 세포 원심분리의 회전속도에 따른 CD4⁺ T 세포의 검출 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출 방법을 이용한 메틸렌 블루 염색 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 본 발명의 일 구현예에 따른 면역세포 검출 방법을 이용한 CD8⁺ T 세포 검출 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0047] 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 세포 원심분리 및 농축을 이용한 면역세포 검출 방법을 제공한다:
- [0048] (a) 마이크로비드(microbead) 및 항체를 접합(conjugate)시켜 비드-항체 복합체를 제조하는 단계;
- [0049] (b) 상기 비드-항체 복합체를 개체로부터 분리된 혈액과 반응시키는 단계;
- [0050] (c) 상기 반응 후 반응물에 적혈구 용해 버퍼를 처리하여 적혈구를 용해시킨 후 상등액을 제거하는 단계; 및
- [0051] (d) 상기 상등액 제거 후 세포를 원심분리하여 세포를 농축하는 단계.
- [0052] 본 발명에 있어서, “면역세포”란 골수 전구세포(골수 유래 억제 세포, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 거핵 세포 및 과립구세포와 같은 골수 세포에서 발생) 및 림프계 전구세포(T 세포, B 세포 및 자연살해(NK) 세포와 같은 림프계 세포에서 발생)의 두 가지 주요 계통에서 발생하는 조혈 줄기세포(예를 들어 골수 내) 기원의 면역계의 임의의 세포를 의미한다. 상기 면역세포는 예컨대, B 세포, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, CD3⁺ T 세포, CD14⁺ 단핵구(monocyte), CD16⁺ NK 세포, CD25⁺ T 세포, CD45⁺ 백혈구, CD56⁺ NK 세포, CD127⁺ T 세포, CD4⁺ CD8⁻ 이중 음성 T 세포, γ δ T 세포, 조절 T 세포, 항원 제시 세포(APC), 자연살해 세포, 및 수지상 세포를 포함한다.
- [0053] 본 발명에 있어서, “검출”이란 면역세포의 존재 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 면역세포의 존재 수준(세포 수)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 같은 맥락에서, 본 발명에서 상기 면역세포의 존재 수준을 측정하는 것은 존재 여부를 측정하는 것(즉, 존재 유무를 측정하는 것), 또는 상기 면역세포의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 면역세포 존재 여부 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험방법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 면역세포 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서 “마이크로비드(microbead)”란 형광 없이 육안으로 면역세포를 확인하기 위해 표지자로 사용되는 입자로서, 입자의 직경은 0.1 μ m 내지 5 μ m일 수 있고, 바람직하게는 0.1 μ m 내지 4 μ m, 0.1 μ m 내지 3 μ m, 0.1 μ m 내지 2 μ m, 0.5 μ m 내지 5 μ m, 0.5 μ m 내지 4 μ m, 0.5 μ m 내지 3 μ m, 0.5 μ m 내지 2 μ m, 1 μ m 내지 5 μ m, 1 μ m 내지 4 μ m, 1 μ m 내지 3 μ m, 1 μ m 내지 2.5 μ m, 1 μ m 내지 2 μ m, 또는 1 μ m일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 마이크로비드는 상기 입자 직경 범위 내에 속하는 입자라면 이의 종류에 제한이 없으며, 예컨대 자성 비드(magnetic bead), 폴리스티렌(polystyrene) 입자, 실리케이트(silicate) 입자, 또는 금속(금, 은, 구리, 수은, 또는 카드뮴) 입자일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 마이크로비드는 염료 없이도 육안으로 볼 수 있도록 갈색을 띠고 현미경에서 모양을 관찰할 수 있는 자성 비드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 마이크로비드는 스트렙트아비딘이 코팅된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서 “항체”란 항원에 특이적으로 결합하여 인식하는 면역글로불린 유전자 또는 이의 단편에서 유래하는 프레임워크 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 의미한다. 인식된 면역글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론, 및 뮤 불변 영역 유전자를 비롯하여, 무수한 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류되었다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로

분류되고, 결과적으로 각각 면역글로불린 부류 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 한정한다. 전형적으로, 항체의 항원-결합 영역은 결합 특이성 및 친화성에서 가장 핵심적이게 된다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항체의 단편은 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 낙타 등을 포함한, 상이한 유기체에서 유래될 수 있다. 본 발명의 항체는 항체의 바람직한 기능(예를 들어, 당화, 발현, 항원 인식, 이펙터 기능, 항원 결합, 특이성 등)을 개선시키거나 또는 조정하기 위해 1 이상의 아미노산 위치에서 변형되거나 또는 돌연변이된 항체를 포함할 수도 있다.

- [0058] 예시적인 면역글로불린(항체) 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각각의 사량체는 폴리펩티드 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경"쇄(약 25 kD) 및 하나의 "중"쇄(약 50-70 kD)를 갖는다. 각 사슬의 N 말단은 항원 인식을 주로 담당하는 약 100 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 한정한다. 용어 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄(VH)는 각각 이들 경쇄 및 중쇄를 의미한다. Fc(즉, 단편 결합가능 영역)는 면역글로불린의 "베이스" 또는 "꼬리부"이고 전형적으로 항체의 부류에 의존적으로 2 또는 3개의 불변 도메인에 기여하는 2개 중쇄로 구성된다. 특이적 단백질과의 결합에 의해, Fc 영역은 각각의 항체가 소정 항원에 대한 적절한 면역 반응을 생성시키는 것을 보장한다. Fc 영역은 또한 다양한 세포 수용체, 예컨대 Fc 수용체, 및 다른 면역 분자, 예컨대 보체 단백질에 결합한다.
- [0059] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 항체는 비오틴(biotin)이 부착된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 항체는 세포표면항원무리(cluster of designation, CD)에 대한 항체일 수 있고, 예컨대, 상기 항체는 항 CD4, 항 CD19, 항 CD3, 항 CD8, 항 CD14, 항 CD16, 항 CD25, 항 CD45, 항 CD56, 및 항 CD127로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 이때, 상기 (a) 단계에서 항체의 농도는 0.01 mg/mL 내지 3 mg/mL, 0.01 mg/mL 내지 2 mg/mL, 0.01 mg/mL 내지 1 mg/mL, 0.01 mg/mL 내지 0.5 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 3 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 2 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 1 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 0.5 mg/mL, 또는 0.2 mg/mL일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 또한, 상기 (a) 단계에서 비드-항체 복합체의 제조에 사용되는 마이크로비드 : 항체의 부피비는 1 내지 6 : 1, 1 내지 4 : 1, 1 내지 3 : 1, 1 내지 2.5 : 1, 1.5 내지 6 : 1, 1.5 내지 4 : 1, 1.5 내지 3 : 1, 2 내지 6 : 1, 2 내지 4 : 1, 또는 2 : 1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서 혈액은 개체에서 분리된 것으로서 전혈(whole blood) 및 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "전혈"이란 정제에 의해 성분이 전혀 제거됨이 없이 적혈구, 백혈구, 혈소판, 혈장 등의 모든 혈액 성분을 포함한 혈액을 의미한다. 상기 전혈 또는 말초 혈액 단핵세포는 모든 동물, 예컨대 인간, 토끼, 래트, 개, 고양이 및 기타 포유동물 등의 개체에서 수집할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계에서 상등액 제거 후 세포 펠렛을 폴리에틸렌 글리콜 8000(PEG 8000)에 현탁시키는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 이때, 상기 PEG 8000은 농도가 5 %(v/v) 내지 25 %(v/v), 5 %(v/v) 내지 20 %(v/v), 5 %(v/v) 내지 15 %(v/v), 5 %(v/v) 내지 10 %(v/v), 7 %(v/v) 내지 20 %(v/v), 7 %(v/v) 내지 15 %(v/v), 7 %(v/v) 내지 10 %(v/v), 7.5 %(v/v) 내지 15 %(v/v), 7.5 %(v/v) 내지 10 %(v/v), 또는 7.5 %(v/v)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 본 발명에 있어서, 상기 (d) 단계에서 세포를 원심분리하는 단계는 사이토스핀(cytospin)을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명에 있어서, "원심분리(centrifugation)"란 예를 들면 혼합물로부터 고체의 분리처럼 혼합물의 분리를 위해 원심력을 이용하는 것을 포함하는 공정을 의미한다. 시험관에 대한 유효 중력을 증가시키면 베시클(vesicle)의 저부에 침전물("펠렛")이 더 신속하고 완전히 모이게 된다. 이어서, 용액("상등액")은 침전물을 교란시키지 않고 베시클로부터 신속히 경사분리될 수 있다. 원심분리의 속도는, 전형적으로는 분당 회전수(rpm)로 측정되는 샘플에 적용되는 가속도에 의해 명시된다. 원심분리에서 입자의 침강 속도는 입자의 크기와 형상, 원심 가속도, 존재하는 고체의 체적비, 입자와 액체 사이의 밀도차, 및 점도의 함수이다. 본 발명에 있어서, 상기 원심분리를 통해 세포가 농축될 수 있다.
- [0068] 본 발명에 있어서, "사이토스핀(cytospin)"이란 일정수의 세포를 면역염색용 슬라이드 위에 얹어서 스핀(원심 분리)으로, 슬라이드에 붙게 만든 후, 면역 염색을 하는 방법으로서, 원심력을 이용하여 체액 내의 세포를 슬라이드에 잘 퍼서 한곳으로 모아주는 역할을 하기 때문에 염색 후에 보면 세포의 모양 성상을 확연하게 볼 수 있

는 장점이 있으며, 주로 현탁 배양한 세포의 표면 마커 염색 시 유용한 방법이다.

- [0069] 본 발명에 있어서, 상기 사이토스핀을 이용한 세포 원심분리는 5000 rpm 내지 9000 rpm, 5000 rpm 내지 8500 rpm, 5000 rpm 내지 8000 rpm, 5000 rpm 내지 7500 rpm, 6000 rpm 내지 9000 rpm, 6000 rpm 내지 8000 rpm, 6000 rpm 내지 7500 rpm, 6500 rpm 내지 9000 rpm, 6500 rpm 내지 8000 rpm, 6500 rpm 내지 7500 rpm, 또는 7000 rpm의 속도로 1분 내지 10분, 1분 내지 8분, 1분 내지 6분, 3분 내지 10분, 3분 내지 8분, 3분 내지 6분, 또는 5분 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0070] 본 발명에 따른 면역세포 검출 방법으로, 마이크로비드-항체 복합체를 제조하여 혈액과 반응시키고 사이토스핀을 이용하여 세포를 원심분리 및 농축하는 공정을 “Immunospin” 이라고 칭할 수 있다.
- [0071] 본 발명에 따른 면역세포 검출 방법을 통해 별도의 염색 과정을 거치지 않고도 면역세포를 육안으로 관찰할 수 있으며, 본 발명의 일 구현예에 따르면 염색 과정은 세포 확인용으로 추가로 수행되는 과정으로서, 사이토스핀 후, 또는 사이토스핀 없이 슬라이드를 만들고 여러 상황에서 세포를 확인하기 위해 수행될 수 있다.
- [0072] 본 발명에 따른 면역세포 검출 방법은 기존 면역화학염색법 및 유세포 방법의 검사 시간이 각각 1시간 이상, 40분 이내인 것에 비하여 검사 시간이 35분 이내, 바람직하게는 30분 이내로 단축되고, 기존 면역화학염색법 및 유세포 방법에 비교할 때 세척 단계를 거치지 않고 2차 항체를 사용하지 않으면서 면역세포를 검출할 수 있다. 또한, 면역세포 검출 시 세포의 염색 및 형광 없이도 충분히 간단하게 세포 모양 및 빈도를 측정할 수 있기 때문에 고가의 광학 기기를 필요로 하지 않는 장점이 있다.
- [0074] 또한, 본 발명은 비드-항체 복합체와 개체로부터 분리된 혈액의 반응이 이루어지는 챔버 1(11, 21);
- [0075] 적혈구 용해 반응이 이루어지는 챔버 2(12, 22);
- [0076] 적혈구 용해 용액을 포함한 면역세포 검출 반응에 이용되는 용액을 담은 챔버 3(13, 23);
- [0077] 세포 원심분리 및 농축이 이루어지는 챔버 4(14, 24);
- [0078] 물을 흡수하는 종이로 이루어진 필터 페이퍼(16, 25);
- [0079] 필터 페이퍼와 밀착 또는 결합되고 현미경 이미지 관찰을 위해 투명한 소재로 이루어진 슬라이드(17, 26); 및
- [0080] 바코드(18, 27)로 이루어진, 면역세포 검출용 칩(10, 20)으로서,
- [0081] 상기 비드-항체 복합체는 마이크로비드(microbead) 및 항체가 접합(conjugate)되어 제조된 것을 특징으로 하는, 면역세포 검출용 칩을 제공한다.
- [0082] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포 검출용 칩(10, 20)은 챔버 5(15)를 더 포함하여, 상기 챔버 5에서 폴리에틸렌 글리콜 8000(PEG 8000) 처리에 의한 세포 펠렛 현탁이 이루어지는 반응이 일어나거나,
- [0083] 챔버 4(24)에서 상기 폴리에틸렌 글리콜 8000 처리에 의한 세포 펠렛 현탁이 이루어지는 반응이 일어날 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0084] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포 검출용 칩(10, 20)은 면역세포 검출용 칩 1(10) 및 면역세포 검출용 칩 2(20)를 포함한다.
- [0085] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포 검출 방법은 상기 면역세포 검출용 칩을 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 본 발명에 있어서, “정밀도”는 여러 번 측정하거나 계산하여 그 결과가 서로 얼마나 가까운지를 나타내는 기준이다. 관측의 균질성을 나타내며, 관측된 값의 편차가 적을수록 정밀함을 의미한다.
- [0087] 본 발명에 있어서, “정확도”는 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 나타내며, 회수율(recovery rate) 등이 포함된다.
- [0088] 본 발명에 있어서, “직선성”은 정량 측정 범위에서 해당 검사가 농도에 따라 선형적으로 반응값을 보이는 정도를 의미한다.
- [0089] 본 발명의 일 실험예에서는 본 발명에 따른 방법으로 면역세포를 검출하였을 때의 정밀도, 정확성, 및 직선성을 확인하였다. 정밀도, 정확도, 직선성 등은 임상검사가 가져야 하는 분석적 성능 지표 중에 중요한 기본 성능을 나타내는 지표로서, 정밀도는 CV%로 나타내며 정확도는 알고 있는 값과 비교하여 나타내게 되는데, 본 발명에

다른 방법으로 면역세포를 검출하였을 때 정밀도, 정확성, 및 직선성을 확인한 결과, 정밀도(CV%)는 2.4 % ~ 8.2 %, 정확성은 bias가 -1.0 % ~ -4.6 %, 직선성은 $R^2 = 0.986(y = 0.9738x + 0.1429)$ 로 매우 우수하게 나타난 것을 확인하였다(실험예 1 참조).

- [0090] 본 발명의 다른 실험예에서는 항 CD19 항체 및 자성 비드의 복합체를 전혈과 반응시킨 후 PBMC를 관찰한 결과, 다른 염색 과정을 거치지 않고 육안으로 B 세포를 검출할 수 있음을 확인하였다(실험예 2 참조).
- [0091] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 본 발명에 따른 면역세포 검출 방법으로 비드 입자 크기에 따른 CD4⁺ T 세포 검출 결과, 자성 비드는 일정 크기 이상이 되면 세포간 응집이 발생하여 결과에 영향을 미치는 바, 1~2.5 μm 범위가 적절한 것을 확인하였으며(실험예 3-1 참조), 항 CD4 항체의 양에 따른 CD4⁺ T 세포 검출 결과, 항체의 양이 너무 적거나 많아도 반응이 잘 일어나지 않기 때문에 적절한 양의 항체가 필요한 것을 알 수 있었는데, 항체의 양은 1~4 μL 범위가 적절한 것을 확인하였다(실험예 3-2 참조).
- [0092] 또한, 본 발명에 따른 면역세포 검출 방법으로 PEG8000 농도에 따른 CD4⁺ T 세포 검출 결과, 7.5 % 내지 10 % 농도 범위의 PEG8000을 처리할 때 장시간 세포형태를 안정하게 유지하여 검출이 용이한 것을 확인하였으며(실험예 3-3 참조), FACS 버퍼 처리에 따른 CD4⁺ T 세포 검출 결과, FACS 버퍼를 사용하는 경우 세포막과 세포형태가 PBS만 사용하는 경우에 비해 선명하고, PEG8000과 함께 처리할 경우 장시간 세포의 변형이 덜하고 응집이 발생하지 않는 것을 확인하였다(실험예 3-4 참조).
- [0093] 이에 더하여, 본 발명에 따른 면역세포 검출 방법으로 세포 원심분리 회전속도에 따른 CD4⁺ T 세포 검출 결과, 세포 원심분리의 회전속도에 따라 세포형태 및 농축 정도가 차이가 있는 것을 알 수 있었는데, 5000 rpm 내지 7500 rpm이내의 범위가 적절한 것을 확인하였다(실험예 3-5 참조).
- [0094] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 본 발명에 따른 면역세포 검출 방법으로 CD8⁺ T 세포를 검출할 수 있음을 확인하였다(실험예 4 참조).
- [0096] 본 발명에 있어서, 상기 챔버1(11, 21)에서는 혈액 내 CD4, CD19, CD3, CD8, CD14, CD16, CD25, CD45, CD56, 및 CD127로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 특정 항원 등이 양성인 세포와 비드-항체 복합체 사이에 반응이 일어나며, 상기 챔버 1(11, 21)에서 혈액 내 항원과 반응하는 비드-항체 복합체는 마이크로비드 및 항체가 접합(conjugate)되어 제조된 것을 챔버 1에 넣어서 사용할 수도 있고 챔버 1에 포함되어 있을 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0097] 본 발명에 있어서, 상기 챔버2(12, 22)에서는 적혈구 용해 반응이 일어나며, 면역세포들만 남기고 적혈구를 제거함으로써 원심분리 및 농축 시 단위면적당 많은 면역세포를 볼 수 있도록 할 수 있다.
- [0098] 본 발명에 있어서, 상기 챔버 3(13, 23)은 면역세포 검출 과정에서 사용될 수 있는 용액을 담은 챔버로서, 예컨대 상기 용액은 적혈구를 용해하는 일반적인 염화암모늄(ammonium chloride) 용액 또는 BD FACS 용해 버퍼(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)와 같은 적혈구 용해 용액, 또는 이 외에도 면역세포 검출 과정에 사용될 수 있는 또 다른 용액일 수 있으며, 상기 용액의 종류에는 제한이 없다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 챔버 3에 담겨있는 적혈구 용해 용액의 적절한 양을 적혈구 용해 반응이 일어나는 챔버2로 이동시킬 수 있으며, 이때 상기 용액은 챔버 3에 넣어서 사용할 수도 있고 챔버 3에 포함되어 있을 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0099] 본 발명에 있어서, 상기 챔버 4(14, 24)에서는 세포들을 원심력으로 원심분리하고 이로 인해 농축시키는 반응이 일어날 수 있으며, 상기 챔버 4는 물을 흡수하는 종이로 이루어진 필터 페이퍼(16, 25) 및 슬라이드(17, 26)와 연결될 수 있다.
- [0100] 본 발명에 있어서, 상기 필터 페이퍼(16, 25)는 챔버 4와 연결되는 부위에 직경이 1 mm 내지 15 mm, 1 mm 내지 13 mm, 1 mm 내지 10 mm, 1 mm 내지 7 mm, 3 mm 내지 15 mm, 3 mm 내지 13 mm, 3 mm 내지 10 mm, 3 mm 내지 7 mm, 5 mm 내지 15mm, 5 mm 내지 13 mm, 5 mm 내지 10 mm, 5 mm 내지 7 mm, 또는 6 mm인 구멍을 가질 수 있고, 상기 슬라이드(17, 26)는 필터 페이퍼와 밀착 또는 결합되어 상기 필터 페이퍼의 구멍 크기로 원심분리 후 세포가 농축될 수 있으며, 상기 슬라이드에 농축된 세포를 현미경으로 관찰함으로써 면역세포를 검출할 수 있다.
- [0101] 본 발명에 있어서, 상기 슬라이드(17, 26)는 투명한 소재라면 그 종류에 제한이 없으며, 예컨대 투명한 유리 또는 플라스틱일 수 있다.

- [0102] 본 발명에 있어서, 상기 필터 페이지(16, 25) 및 슬라이드(17, 26)는 길이 0.5 cm 내지 5 cm, 0.5 cm 내지 4 cm, 0.5 cm 내지 3 cm, 1 cm 내지 5 cm, 1 cm 내지 4 cm, 1 cm 내지 3 cm, 2 cm 내지 5 cm, 2 cm 내지 4 cm, 2 cm 내지 3 cm, 또는 2.5 cm, 및 높이 5 cm 내지 10 cm, 5 cm 내지 9 cm, 5 cm 내지 8 cm, 6 cm 내지 10 cm, 6 cm 내지 9 cm, 6 cm 내지 8 cm, 7 cm 내지 10 cm, 7 cm 내지 9 cm, 7 cm 내지 8 cm, 또는 7.5 cm로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0103] 본 발명에 있어서, 상기 챔버 5(15)는 면역세포 검출용 칩 1(10)에서 폴리에틸렌 글리콜 8000(PEG 8000)을 처리하여 세포 펠렛 현탁이 이루어지는 챔버로서, 면역세포 검출용 칩 2(20)에서는 챔버 4(24)에서 상기 폴리에틸렌 글리콜 8000을 처리하여 세포 펠렛 현탁이 이루어지는 반응이 일어날 수 있다.
- [0104] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포 검출용 칩(10, 20)은 길이 7 cm 내지 13 cm, 7 cm 내지 12 cm, 7 cm 내지 11 cm, 8 cm 내지 13 cm, 8 cm 내지 12 cm, 8 cm 내지 11 cm, 9 cm 내지 13 cm, 9 cm 내지 12 cm, 9 cm 내지 11 cm, 또는 10 cm, 높이 5 cm 내지 10 cm, 5 cm 내지 9 cm, 5 cm 내지 8 cm, 6 cm 내지 10 cm, 6 cm 내지 9 cm, 6 cm 내지 8 cm, 7 cm 내지 10 cm, 7 cm 내지 9 cm, 7 cm 내지 8 cm, 또는 7.5 cm, 및 폭 0.5 cm 내지 5 cm, 0.5 cm 내지 4 cm, 0.5 cm 내지 3 cm, 1 cm 내지 5 cm, 1 cm 내지 4 cm, 1 cm 내지 3 cm, 2 cm 내지 5 cm, 2 cm 내지 4 cm, 2 cm 내지 3 cm, 또는 2.5 cm로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0105] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포 검출용 칩 1(10)은 챔버 1(11), 챔버 2(12), 챔버 3(13), 챔버 4(14), 및 챔버 5(15)의 구성을, 면역세포 검출용 칩 2(20)는 챔버 1(21), 챔버 2(22), 챔버 3(23), 및 챔버 4(24)의 구성을 포함하는 것이라면 칩 내 챔버 위치에 있어서 순서에 제한되는 것은 아니다. 면역세포 검출용 칩 1의 경우 각 챔버는 용액을 옮겨주는 자동 피펫 분주기 장치(liquid handler)를 사용하여 자동으로 용액을 이동시킬 수 있으며, 면역세포 검출용 칩 2의 경우 펌핑 장치를 이용하여 시료를 주입 또는 이동시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0106] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포 검출용 칩(10, 20)은 회전이 가능한 기기에 넣어 사용하는 형태일 수 있다. 상기 회전이 가능한 기기는 원심분리기일 수 있으며, 예컨대 저속 원심분리기, 고속 원심분리기, 또는 초원심분리기에 넣어 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0108] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0110] **[실시예]**
- [0111] **실시예 1. 재료 준비**
- [0112] 본 발명에서 사용한 실험 재료는 하기와 같다.
- [0113] - 비오틴이 부착된(Biotinylated) 항 CD19 단일 클론 항체(HIB19) (eBioscience, Thermo Fisher Scientific)
- [0114] - 비오틴이 부착된 항 CD3 단일 클론 항체(OKT3) (eBioscience)
- [0115] - 비오틴이 부착된 항 CD4 단일 클론 항체(RPA-T4) (eBioscience)
- [0116] - Dynabeads MyOne 스트렙트아비딘 C1 (Magnetic bead, Invitrogen),
- [0117] - HulaMixer 샘플 믹서 (ThermoFisher)
- [0118] - BD FACS 용해 버퍼(lysing buffer) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- [0119] - 염색 버퍼(Stain buffer) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- [0120] - 5 % FBS PBS (phosphate buffered saline),
- [0121] - 슬라이드 글라스, 커버 글라스,
- [0122] - 일회용 트랜스퍼 피펫(Disposable transfer pipette),
- [0123] - 메틸렌 블루(Methylene blue) 염색 용액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- [0124] - Wright staining 용액 (YD Wright Stain, YD Diagnostics, Yongin, Korea)
- [0126] **실시예 2. 항 CD4 항체를 사용한 비드의 기능화**

[0127] 평균 직경 1 μm의 스트렙타비딘 코팅 자성 비드(Dynabeads MyOne Streptavidin C1)를 비오틴이 부착된 항 CD4 항체(eBioscience)와 접합시켰다. 1 : 10으로 희석된 6 μL의 자성 비드(bead)를 1 % 소 혈청 알부민 (BSA)이 함유된 50 μL FACS 버퍼와 부드럽게 혼합하였으며, 1 : 10으로 희석된 3 μL의 단일 클론 항 CD4 항체 (0.2 mg/mL, eBioscience)를 자성 비드에 첨가하였다. 결합되지 않은 항체를 제거할 수 있는 세척 과정은 없었 으며, 항체가 결합된 자성 비드는 FACS 버퍼에서 1 % 소 혈청 알부민을 사용하여 블로킹(blocking)하였다. 상기 항체 기능화된 자성 비드는 나중에 사용하기 위해 4 °C에서 보관하였다.

[0129] **실시예 3. B 세포 검출을 위한 항CD19 항체 및 비드 반응**

[0130] 본 발명의 면역세포 검출 방법을 이용하여 다음과 같이 B 세포를 검출하였다.

[0131] 상기 실시예 2의 방법으로 비오틴이 부착된 0.5 mg/mL 농도의 항 CD19 항체 0.5 μL(0.25 μg) 및 스트렙타비 딘 코팅 자성 비드를 희석하지 않거나 또는 1 : 10의 비율로 희석하여 농도별로(0.5 μL, 1 μL, 또는 10 μL) 30분 동안 반응시키고, 이를 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)와 15분 동안 반응 시킨 다음 단핵세포(PBMC)를 관찰함으로써 B 세포를 검출하였다.

[0133] **실시예 4. CD4+ T 세포 검출을 위한 적혈구 용해**

[0134] CD4+ T 세포를 검출하기 위해 본 발명의 면역세포 검출 방법을 이용하여 "항체반응 - 적혈구 용해 또는 비용해 - PEG8000 처리 - 염색 또는 무염색" 프로토콜로 처리하였다. 구체적으로, 100 μL의 갓 채취한 말초 EDTA(ethylenediamineteraacetic acid) 처리 혈액을 튜브에 넣은 후 1 : 10으로 희석된 3 μL의 항 CD4 항체 및 1 : 10으로 희석된 6 μL의 자성 비드(Dynabeads MyOne Streptavidin C1, Invitrogen)와 반응시키고 실온에 서 15분 동안 배양하였다. 그런 다음, 적혈구를 500 μL BD FACS 용해 버퍼(BD Biosciences, 미국)로 용해시키 고 실온에서 10분~20분 동안 배양하였다. 그리고 나서 상등액을 제거한 후 7.5 % PEG8000 PBS 용액에 세포 펠렛 (pellet)을 현탁시켰다.

[0135] 상기 PEG8000 PBS 용액을 처리하는 과정은 세포가 너무 농축되는 것을 막고, 세포의 형태가 유지되도록 일종의 희석액을 넣어 주는 과정이다.

[0136] 상기와 같은 방법은 CD4뿐만 아니라 CD3, CD8, CD16, CD56 등 모든 CD 항원에 대해서도 적용이 가능하다.

[0138] **실시예 5. 사이토스핀(Cytospin)을 이용한 세포 원심분리 및 염색**

[0139] 상기 실시예 4의 세포 현탁액을 본 발명에 따른 면역세포 검출용 칩의 챔버 4에 해당하는 사이토스핀(cytospin) 큐벳(cuvettes)(Shandon, Inc., Pittsburgh, PA)에 로드하고, 유리 슬라이드 및 종이 카드에 장착한 다음, 800 x g, 7000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포의 단층이 슬라이드에 침착되도록 하였다. 슬라이드는 공기 건조 하고 Wright 염색으로 대조 염색하였으며, 세포 유형을 핵 형태 및 세포질 염색으로 식별하였다(Wright 염색 용 액, YD Wright Stain, YD Diagnostics, 대한민국). 모든 세포 계수는 광학 현미경을 사용하여 수행되었다.

[0141] **[실험예]**

[0142] **실험예 1. 성능평가**

[0143] **1-1. 정밀도(precision)**

[0144] 본 발명에 따른 면역세포 검출 방법의 실행 내 및 실행 간 부정확성은 각각 Multi-check Normal 및 Low Process Control(BD Biosciences)의 연속 작용일 5일(총 20 회 반복)에 걸쳐 각 실행 및 하루 2 회 실행의 중복 측정에 대해 평가되었다.

[0145] 정밀도 평가 결과는 하기 표 1에 나타난 바와 같았다.

표 1

%CD4 T cell	Mean%	Precision (CV) repeatability	Between-run	Within laboratory (between day)
Low CD4 control material (12.7 (8.7~16.7), BM11202L)	12.2%	4.1%	7.1%	8.2%

Normal CD4 control material (48.1 (41.6~54.6), BM1120N)	48.0%	1.0%	2.1%	2.4%
---	-------	------	------	------

[0148] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 정밀도(coefficient of variation, CV%)는 2.4 % ~ 8.2 %를 나타내었다.

[0150] **1-2. 정확도(accuracy)**

[0151] 정확도(편향)는 본 발명에 따른 면역세포 검출 방법 CD4/CD4 %의 결과를 유세포 분석기 BD FACSCanto II(BD Biosciences)에 의해 Multi-check Normal 및 Low process controls(BD Biosciences)의 해당 CD4 계수 결과에 대해 확립된 결과와 비교하여 평가되었다.

[0152] 정확도 평가 결과는 하기 표 2에 나타난 바와 같았다.

표 2

%CD4 T cell	Mean% (본 발명의 방법)	Assigned FACS %CD4	bias	Relative bias
Low CD4 control material (12.7 (8.7~16.7), BM11202L)	12.2%	12.8%	-0.6	-4.6%
Normal CD4 control material (48.1 (41.6~54.6), BM1120N)	48.0%	48.5%	-0.5	-1.0%

[0155] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 정확도는 참고 검사결과(assigned %CD4)에서 -1.0% ~ -4.6% bias를 나타내었다.

[0157] **1-3. 직선성(linearity)**

[0158] 선형성은 Multi-check Normal control(BD Biosciences) 및 매우 낮은(0.2 % 림프구) CD4 샘플을 6 가지 다른 비율(5/0, 4/1, 3/2, 2/3, 1/4, 0/5)로 혼합하여 평가하였으며, 유세포 분석기 BD FACSCanto II(BD Biosciences, San Jose, CA)에 의해 Multi-check Normal process control(BD Biosciences)에서 해당 CD4 계수 결과를 얻었다. 분석은 모두에 대해 중복으로 수행되었으며, 각 매개 변수 상관 계수 (R^2)는 선형 회귀 후 계산되었다.

[0159] $R^2 = 0.986, y = 0.9738x + 0.1429$

[0160] 그 결과, $R^2 > 0.975$ 로 우수한 직선성을 나타내었다.

[0162] **실험예 2. B 세포 검출 결과**

[0163] 상기 실시예 3의 방법으로 항 CD19 항체 및 자성 비드의 복합체를 전혈과 반응시킨 후 PBMC를 관찰한 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 1 : 10의 비율로 희석한 1 μ L의 자성 비드를 반응시켰을 때 많은 수의 B 세포에 많은 양의 비드가 결합하는 것을 확인하였다. 도 3a에서 WB-buffy는 전혈에서 백혈구가 많이 모여있는 buffy층을 따서 적혈구 용해 없이 슬라이드를 만든 것으로, 적혈구가 함께 관찰되는 것을 알 수 있었다. PBMC는 단핵구를 분리한 것으로 적혈구가 제거되어 있으며, 적혈구를 용해하는 방식과는 달리 밀도와 원심력을 이용하여 PBMC를 분리하는 것으로 단핵구만 순수히 분리된 것을 알 수 있었다.

[0164] 1 : 100의 비율로 자성 비드를 희석할 경우 응집은 현저히 줄었으나, 세포에 결합하는 비드의 양과 세포 수는 현저히 줄어들었다.

[0165] 0.5 mg/mL 농도의 항 CD19 항체 0.5 μ L(0.25 μ g) 및 희석하지 않은 자성 비드 0.5 μ L의 복합체를 처리하여 B 세포를 검출한 결과를 1000x 배율로 확대한 도면을 도 3b에 나타내었으며, 400x 확대한 도면을 도 3c에 나타내었다.

- [0166] 또한, 항 CD19 항체 및 자성 비드를 처리하였을 때 CD19⁺ 세포에서의 검출 결과를 CD19⁻ 세포에서의 결과와 비교하여 도 3d에 나타내었다.
- [0167] 상기와 같이, 본 발명에 따른 항체 및 비드 복합체를 이용하여 다른 염색 과정을 거치지 않고 육안으로 B 세포를 검출할 수 있음을 확인하였다.
- [0169] **실험예 3. 본 발명의 면역세포 검출 방법에 의한 CD4⁺ T 세포 검출 결과**
- [0170] **3-1. 비드 입자 크기에 따른 검출 결과**
- [0171] 스트렙트아비딘 코팅 자성 비드의 입자 크기에 따른 CD4⁺ T 세포의 검출 결과를 확인하기 위해, 상기 실시예 4의 방법에서 자성 비드의 직경 조건을 1 μm 또는 4.5 μm으로 하여 200x 배율로 결과를 관찰하였다.
- [0172] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 직경이 4.5 μm인 자성 비드를 반응시킨 경우 세포 응집이 발생하는 것을 확인하였다.
- [0173] 이와 같이, 자성 비드는 일정 크기 이상이 되면 세포간 응집이 발생하여 결과에 영향을 미치는 것을 알 수 있었는데, 자성 비드의 직경은 1~2.5 μm 범위가 적절한 것으로 확인하고 평균 직경 1 μm의 자성 비드를 사용하였다.
- [0175] **3-2. 항 CD4 항체의 양에 따른 검출 결과**
- [0176] 항 CD4 항체의 양에 따른 CD4⁺ T 세포의 검출 결과를 확인하기 위해, 상기 실시예 4의 방법에서 항 CD4 항체의 조건을 1:10으로 희석한 0.2mg/mL 농도의 항 CD4 항체 0.5 μL, 1 μL, 또는 5 μL 로 하여 결과를 관찰하였다.
- [0177] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 0.5 μL의 항체를 반응시킨 경우 검출 결과가 약하게 나타났으며, 5 μL의 항체를 반응시킨 경우 검출 결과가 양호하였고, 1 μL의 항체를 반응시킨 경우 검출 결과가 적절하게 나타나는 것을 확인하였다.
- [0178] 이와 같이, 항체의 양이 너무 적거나 많아도 반응이 잘 일어나지 않기 때문에 적절한 양의 항체가 필요한 것을 알 수 있었는데, 항체의 양은 1~4 μL 범위가 적절한 것으로 확인하고 3 μL의 항체를 사용하였다.
- [0180] **3-3. PEG8000 농도에 따른 검출 결과**
- [0181] PEG8000 농도에 따른 CD4⁺ T 세포의 검출 결과를 확인하기 위해, 상기 실시예 4의 방법에서 PEG8000 농도의 조건을 5 %, 10 %, 또는 25 %로 하여 400x 배율로 결과를 관찰하였다.
- [0182] 그 결과, 도 6a에 나타낸 바와 같이, PEG8000 농도가 25 % 이상으로 높을 경우 형태 변형이 심해 결과에 영향을 미치는 것을 확인하였다.
- [0183] 또한, 상기 PEG8000 대신 Ficoll170을 이용하여, 10 %의 Ficoll170과 10 %의 PEG8000을 3시간 처리하고 200x 및 400x 배율로 관찰한 결과, 도 6b에 나타낸 바와 같이 10 % Ficoll170을 처리한 경우 특별한 효과가 없었고, 10 % PEG8000을 처리한 경우에는 시간이 지나도 안정적으로 염색이 유지되는 것을 확인하였다.
- [0184] 특히, 도 6c에 나타낸 바와 같이 10 % PEG8000을 처리한 경우 PEG8000을 처리하지 않은 경우와 비교하여 400x 배율로 관찰하였을 때, 장시간 안정적인 세포형태를 유지하여 결과 판독에 도움이 되는 것을 확인하였다.
- [0185] 이에, CD4⁺ T 세포의 검출 시 7.5 % 내지 10 % 농도 범위의 PEG8000을 처리할 때 장시간 세포형태를 안정하게 유지하여 검출이 용이하였는 바, 7.5 %의 PEG8000을 사용하였다.
- [0187] **3-4. FACS 버퍼 처리에 따른 검출 결과**
- [0188] FACS 버퍼 처리에 따른 CD4⁺ T 세포의 검출 결과를 확인하기 위해, 상기 실시예 4에 개시된 방법으로 PEG8000과 함께 FACS 버퍼로서 1 % 소 혈청 알부민(BSA)을 함유한 PBS를 처리한 경우와 PBS만을 처리한 세포를 관찰하였다.
- [0189] 그 결과, 도 7a에 나타낸 바와 같이 FACS 버퍼를 사용하는 경우 좀 더 선명하고 뚜렷한 염색상이 관찰되는 것을 확인하였다.
- [0190] 또한, 도 7b에 나타낸 바와 같이 FACS 버퍼를 사용하는 경우 세포막과 세포형태가 PBS만 사용하는 경우에 비해

선명하였으며, PEG8000와 함께 처리할 경우 24시간이 지나도 세포의 변형이 덜하고 응집이 발생하지 않는 것을 확인하였다.

[0192] **3-5. 세포 원심분리 회전속도에 따른 검출 결과**

[0193] 세포 원심분리의 회전속도에 따른 CD4⁺ T 세포의 검출 결과를 확인하기 위해, 상기 실시예 5의 방법에서 세포 원심분리의 회전속도를 2000 rpm 또는 7500 rpm으로 하여 결과를 관찰하였다.

[0194] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 세포 원심분리의 회전속도에 따라 세포형태 및 농축 정도가 차이가 있는 것을 알 수 있었는데, 5000 rpm 내지 7500 rpm이내의 범위가 적절한 것으로 확인하고 7000 rpm의 속도로 원심분리 하였다.

[0196] **3-6. 메틸렌 블루 염색 결과**

[0197] 상기 실시예 4의 방법으로 전혈을 항 CD4 항체 및 자성 비드로 반응시키고 적혈구를 500 μL BD FACS 용해 버퍼 (BD Biosciences, 미국)로 실온에서 10 분~20분 동안 배양하였다. 그런 다음 사이토스핀 후, 또는 사이토스핀 없이 슬라이드를 만들고 세포를 확인하기 위해 메틸렌 블루로 2분, 3분, 또는 4분 동안 염색을 실시하였을 때, 도 9에 나타난 바와 같이 선명한 세포 염색 결과를 확인하였는 바, 약 2분 동안 염색을 실시할 경우 최적의 염색 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

[0199] **실험예 4. CD8⁺ T 세포의 검출**

[0200] 상기 실시예 4의 방법으로 CD4⁺ T 세포 외에도 다른 면역세포들을 검출할 수 있었다. 그 중 전혈에 항 CD8 항체 및 자성 비드를 처리하여 30분 동안 반응시키고, 세포 원심분리하고 400x(좌측 도면) 및 200x(우측 도면)의 배율로 세포를 관찰하였을 때, 도 10에 나타난 바와 같이 CD8⁺ T 세포가 검출되는 것을 확인하였다.

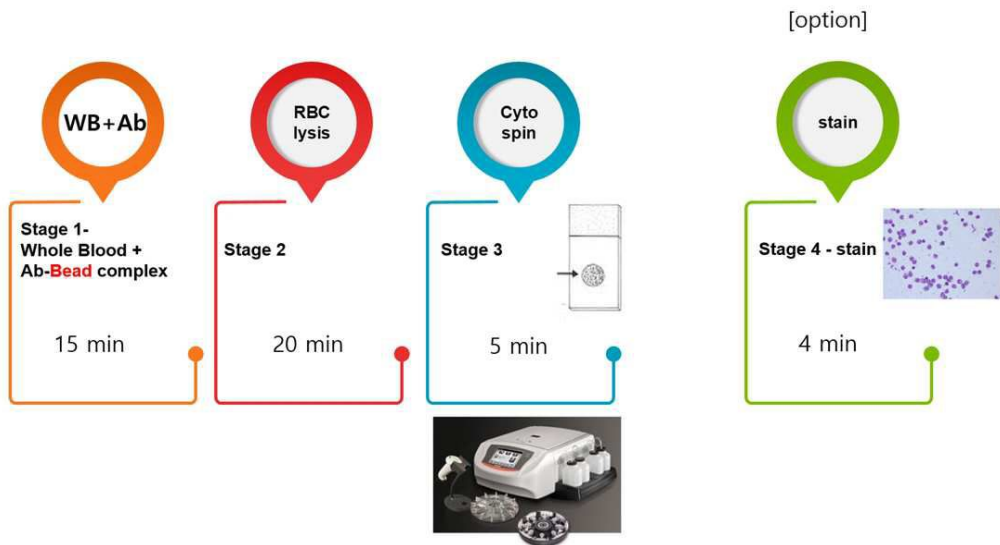
[0202] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

부호의 설명

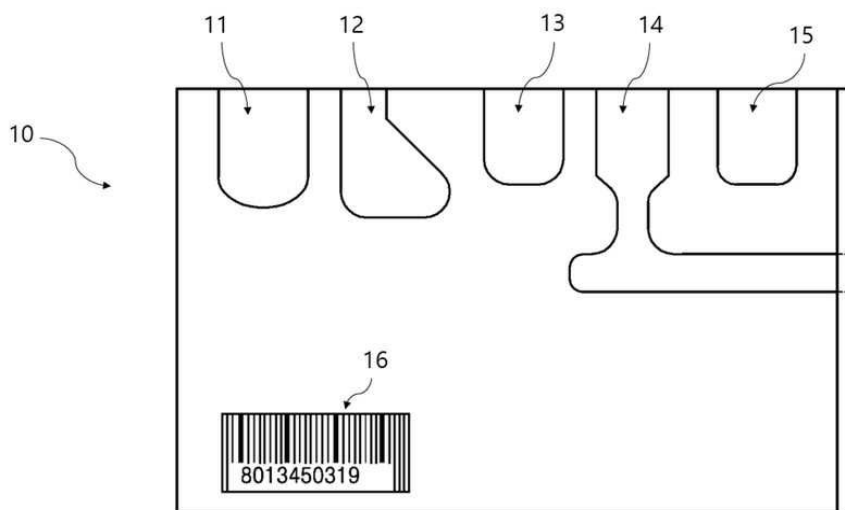
- [0204] 10: 면역세포 검출용 칩 1
- 20: 면역세포 검출용 칩 2
- 11, 21: 챔버(chamber) 1
- 12, 22: 챔버 2
- 13, 23: 챔버 3
- 14, 24: 챔버 4
- 15: 챔버 5
- 16, 25: 필터 페이지
- 17, 26: 슬라이드
- 18, 27: 바코드

도면

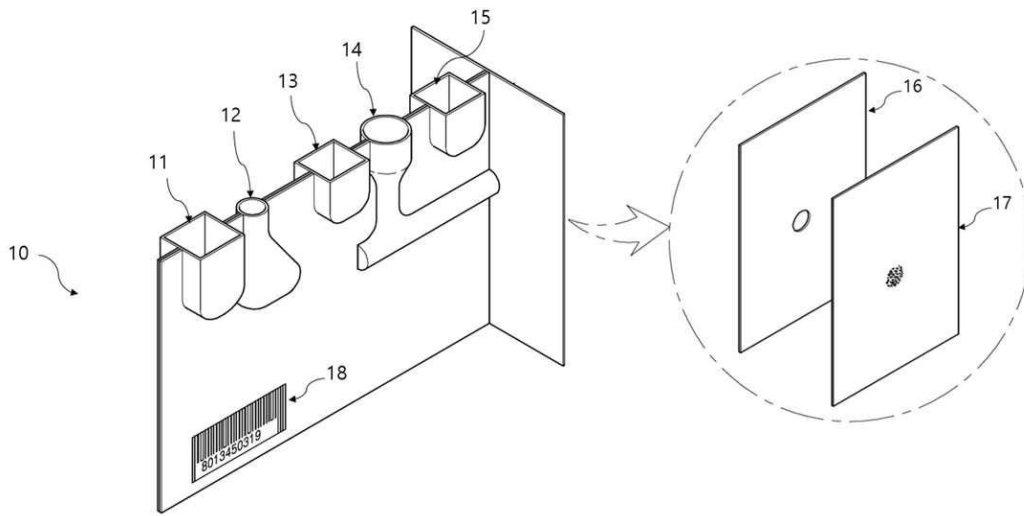
도면1



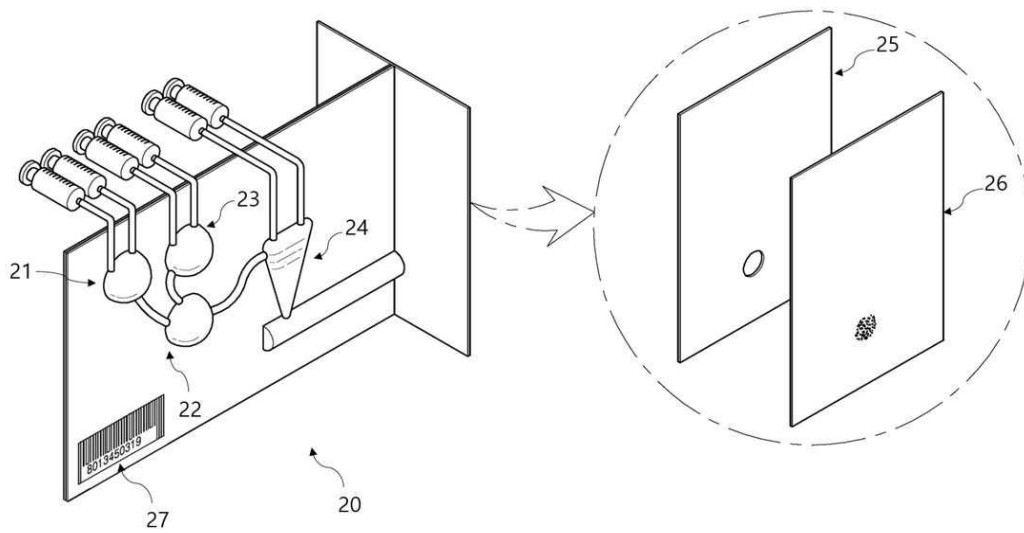
도면2a



도면2b



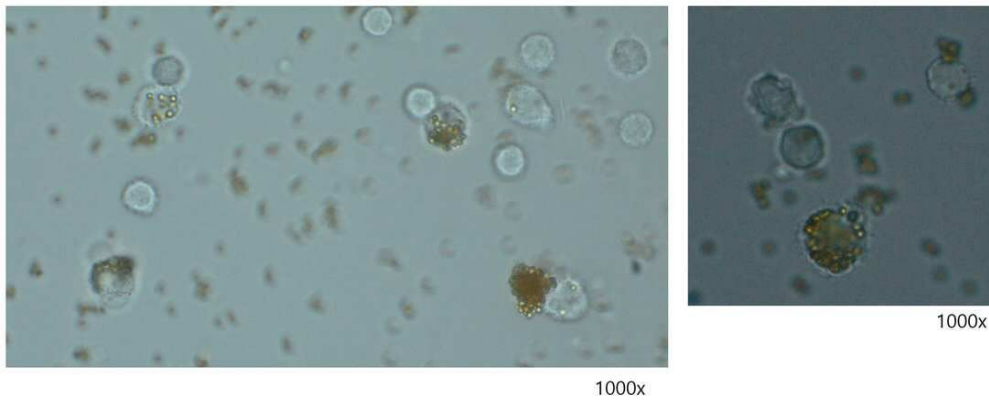
도면2c



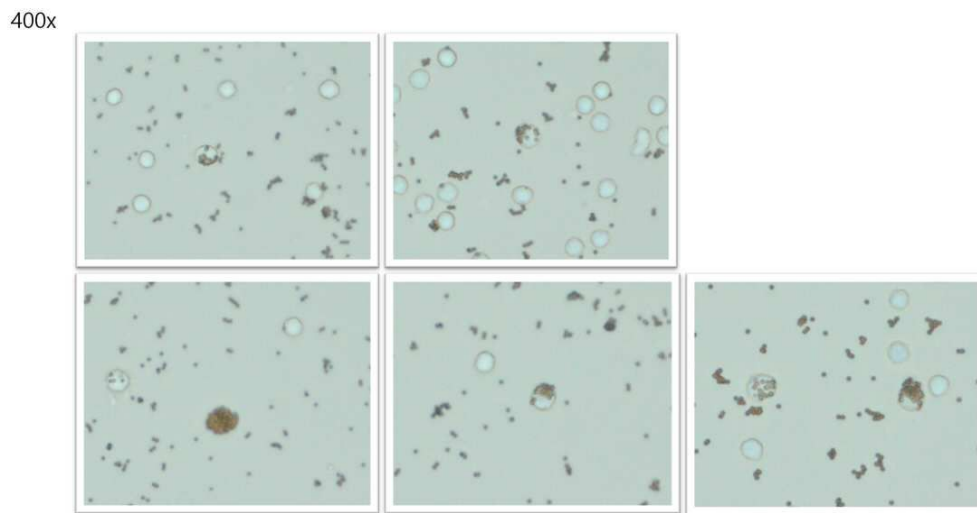
도면3a

Antibody 0.5 uL(0.25 ug) Magnetic beads 0.5 uL (PBMC)	Antibody 0.5 Magnetic beads 1:10희석 1uL (PBMC)	Antibody 0.5 Magnetic beads 1:10희석 10uL (WB-buffy)

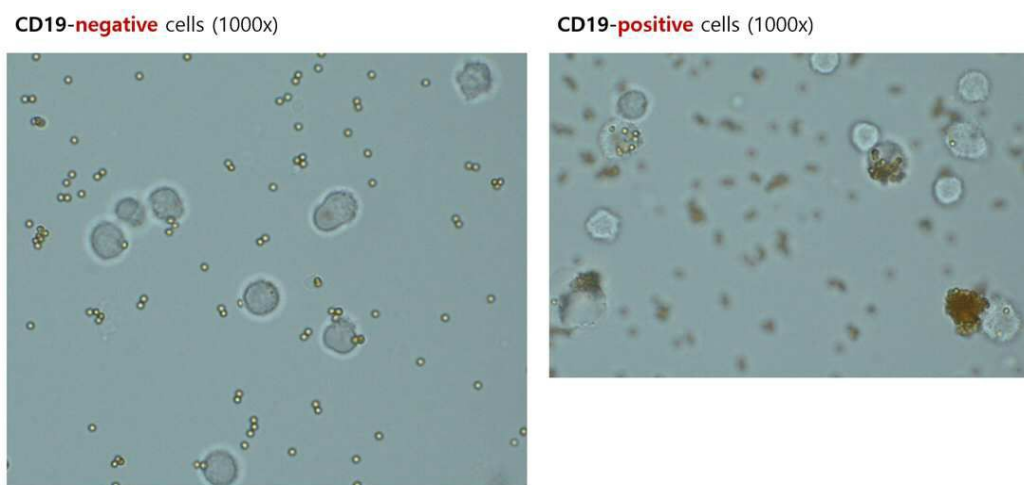
도면3b



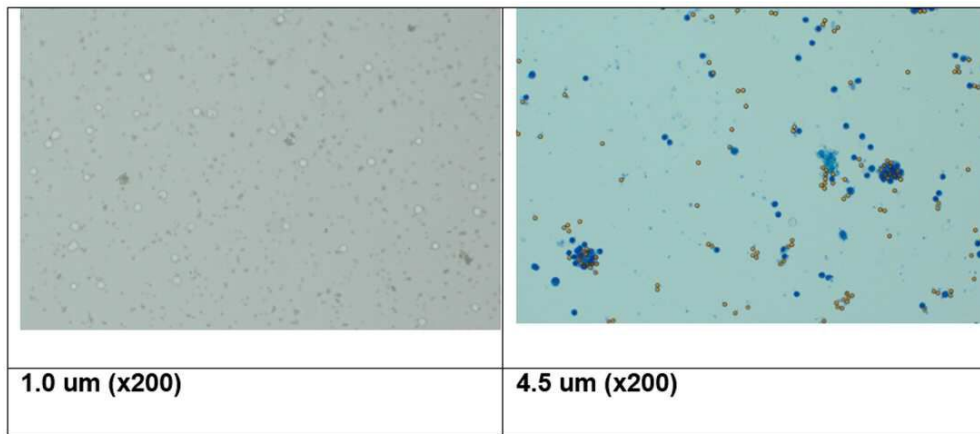
도면3c



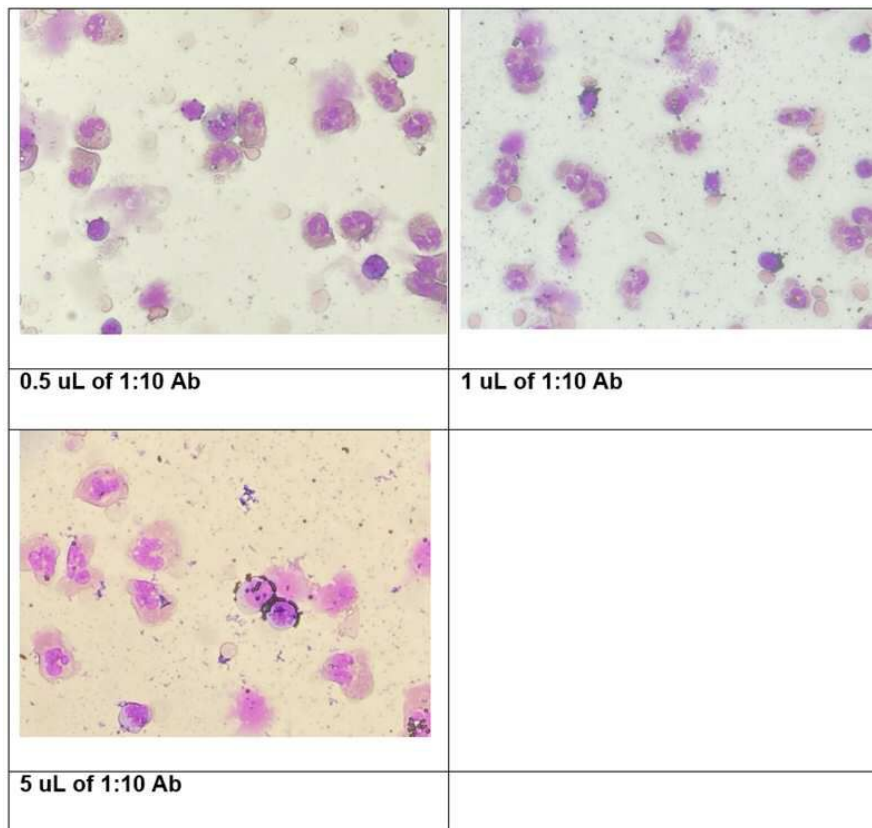
도면3d



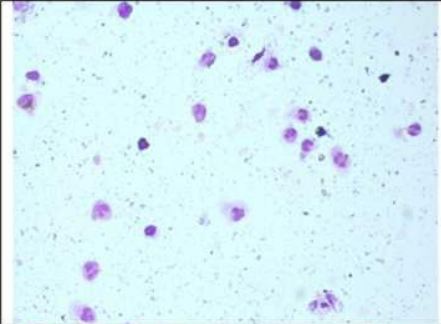
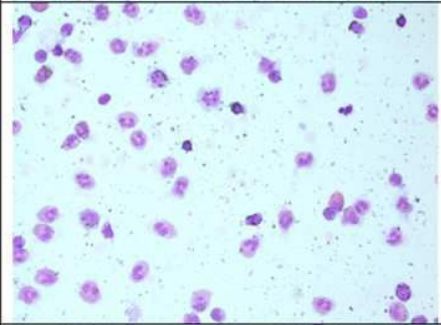
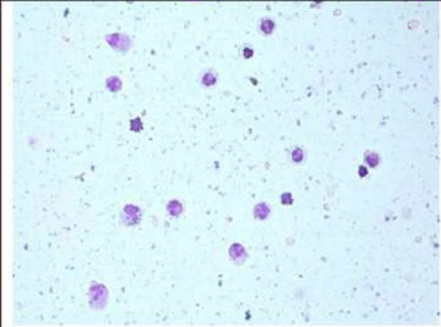
도면4



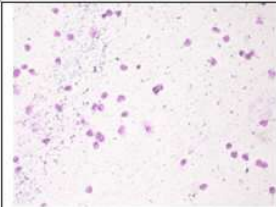
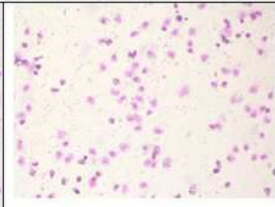
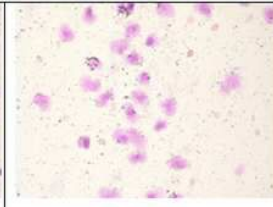
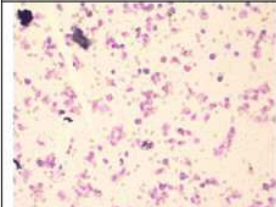
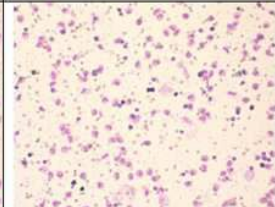
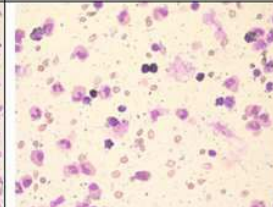
도면5



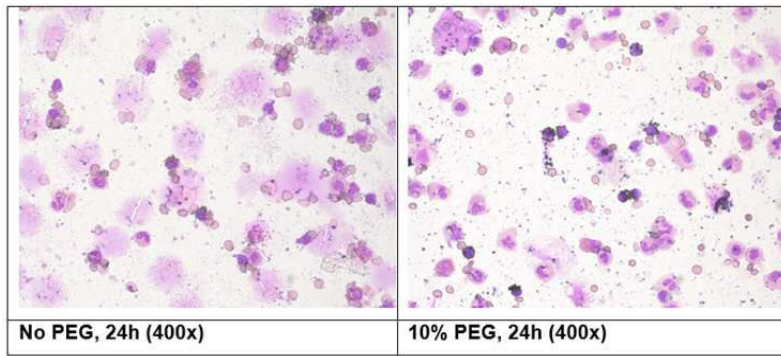
도면6a

	5% PEG8000 (400x)
	10% PEG8000 (400x)
	25% PEG8000 (400x)

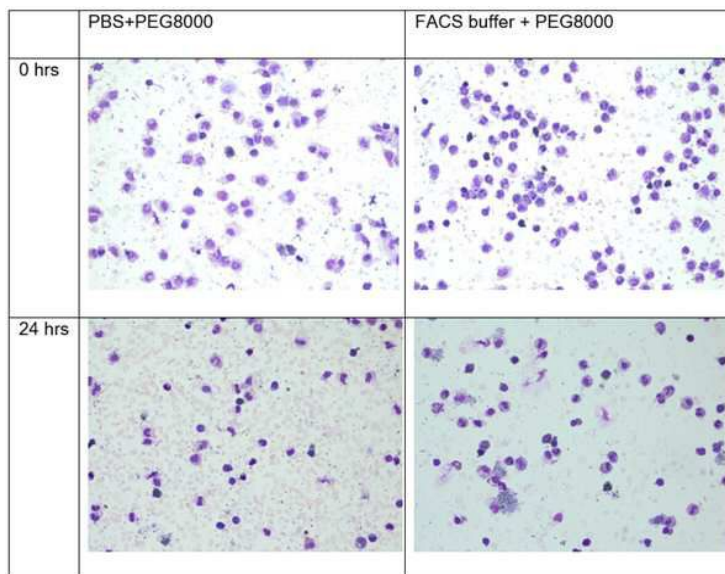
도면6b

		
10% Ficoll70 0h, (200x)	10% Ficoll70 3h, (200x)	10% Ficoll70 3h, (400x)
		
10% PEG 0h, (200x)	10% PEG 3h, (200x)	10% PEG 3h, (400x)

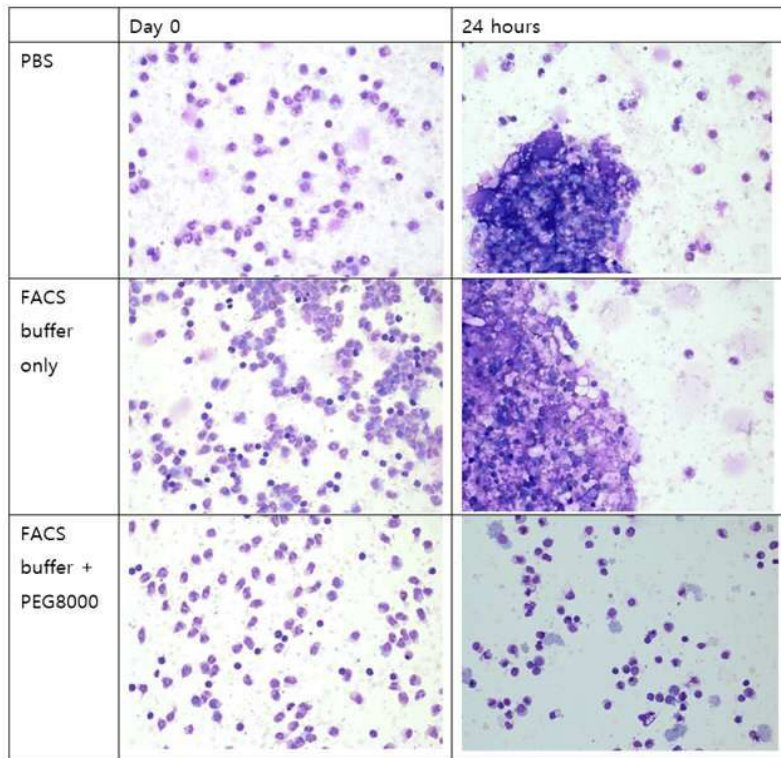
도면6c



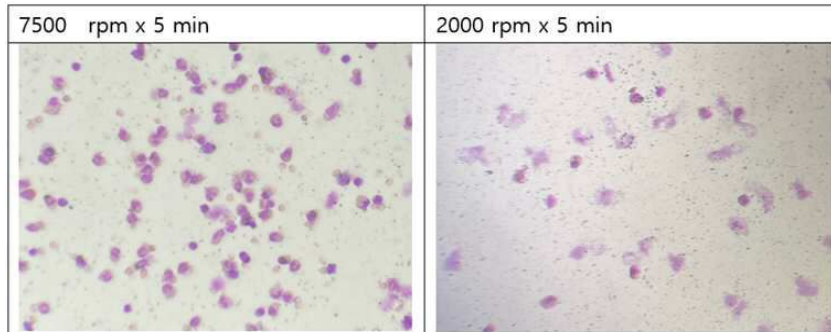
도면7a



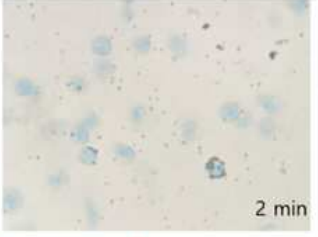
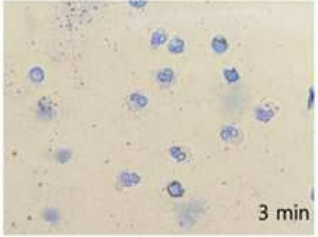
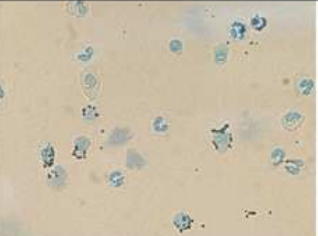
도면7b



도면8



도면9

시간	염색결과
2 min	
3 min	
4 min	

도면10

