



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0120105
(43) 공개일자 2017년10월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/58 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)
B01L 3/502753 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7022338
- (22) 출원일자(국제) 2016년01월19일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년08월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/013865
- (87) 국제공개번호 WO 2016/118484
국제공개일자 2016년07월28일
- (30) 우선권주장
62/107,261 2015년01월23일 미국(US)

- (71) 출원인
유니메드 바이오텍 (상하이) 컴퍼니 리미티드
중국 201203 상하이 귀서우징 로드 넘버 199 룸 321
- (72) 발명자
천, 판칭
미국 94556 캘리포니아주 모라가 볼터스롤 스트리트 5
차크라바르티, 타니아
미국 94568 캘리포니아주 더블린 센트럴 파크웨이 3175
- (74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 24 항

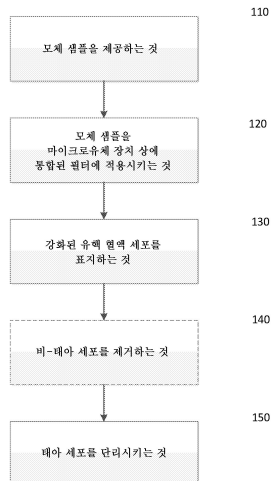
(54) 발명의 명칭 비-침습적 산전 검사를 위한 마이크로유체공학 기반 태아 세포 검출 및 단리

(57) 요약

본원에 개시된 실시양태는 모체 혈액 샘플을 제공하는 것; 모체 혈액 샘플을 마이크로유체 장치 상에 통합된 필터에 적용시켜 모체 혈액 샘플로부터 유핵 혈액 세포를 강화시키는 것; 마이크로유체 장치 내의 강화된 유핵 혈액 세포를 태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 형광성 결합 모이어티 또는 친화성 분자로 표지하는 것; 및 태아 세포를 단리시키는 것을 포함하는, 비-침습적 산전 진단을 위한 태아 세포의 단리를 위한 방법을 제공한다. 본원에 개시된 실시양태는 필터; 태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자; 및 현미경검사-가시화가능한 챔버를 포함하는, 태아 세포의 비-침습적 단리를 위한 통합형 마이크로유체 장치를 제공한다.

대표도 - 도1

100



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6816 (2013.01)

G01N 33/53 (2013.01)

B01L 2200/0647 (2013.01)

B01L 2200/0652 (2013.01)

B01L 2300/0681 (2013.01)

C12Q 2565/601 (2013.01)

C12Q 2565/629 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

모체 혈액 샘플을 제공하는 것;

모체 혈액 샘플을 마이크로유체 장치 상에 통합된 필터에 적용시켜 모체 혈액 샘플로부터 유핵 혈액 세포를 강화시키는 것;

마이크로유체 장치 내의 강화된 유핵 혈액 세포를 태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 형광성 결합 모이어티 또는 친화성 분자로 표지하는 것; 및

태아 세포를 단리시키는 것

을 포함하는, 비-침습적 산전 진단을 위한 태아 세포의 단리를 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 필터가 투명한 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 유핵 혈액 세포가 세포의 모폴로지 및/또는 다른 물리적 특징을 통해 강화되는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 표지된 유핵 혈액 세포를 마이크로유체 장치 내의 현미경검사-가시화가능한 챔버에서 가시화하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 표지된 유핵 혈액 세포를 가시화 및/또는 현미경 분석을 위해 필터 장착된 마이크로유체 장치 내에 선택적으로 고정화시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 가시화 및/또는 현미경 분석이 수동적인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 가시화 및/또는 현미경 분석이 기계 비전을 통해 자동화된 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 태아 세포가 유핵 적혈구 (nRBC)인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 태아 세포-특이적 항원이 CD45, 트랜스페린 수용체 (CD71), 글리코포린 A (GPA), HLA-G, EGFR, 트롬보스폰딘 수용체 (CD36), CD34, HbF, HAE 9, FB3-2, H3-3, 에리트로포이에틴 수용체, HBE, AFP, APOC3, SERPINC1, AMBP, CPB2, ITIH1, APOH, HPX, 베타-hCG, AHSG, APOB, J42-4-d, 2,3-비오포스포글리세레이트 (BPG), 카르보닉 안하이드라제 (CA), 티미딘 키나제 (TK), MMP14 (매트릭스 메탈로프로테이나제 14), 및 태아 헤모글로빈으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 필터가 유핵 혈액 세포를 강화시키고/거나 성숙한 적혈구 (RBC)를 제거하도록 구성되어 있는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 비-태아 세포를 제거하는 것을 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 비-태아 세포를 제거하는 것이 비-태아 세포를 고정화시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 태아 세포를 고정화시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 태아 세포를 고정화시키는 것이 태아 세포를 태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자와 접촉시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 태아 세포-특이적 항원이 CD45, 트랜스페린 수용체 (CD71), 글리코포린 A (GPA), HLA-G, EGFR, 트롬보스폰딘 수용체 (CD36), CD34, HbF, HAE 9, FB3-2, H3-3, 에리트로포이에틴 수용체, HBE, AFP, APOC3, SERPINC1, AMBP, CPB2, ITIH1, APOH, HPX, 베타-hCG, AHSG, APOB, J42-4-d, 2,3-비오포스포글리세레이트 (BPG), 카르보닉 안히드라제 (CA), 티미딘 키나제 (TK), MMP14 (매트릭스 메탈로프로테이나제 14), 및 태아 헤모글로빈으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 태아 세포를 서열분석을 통해 핵산 서열에 대해 분석하는 것 또는 다른 통상적으로 사용되는 방법, 예컨대 FISH 또는 DNA 마이크로어레이를 사용하여 단리된 태아 세포에서 유전적 이상을 검출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 분석하는 것이 검출가능한 프로브를 하나 이상의 단리된 태아 세포의 게놈 DNA에 하이브리드화하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 분석하는 것이 하나 이상의 단리된 태아 세포의 게놈 DNA를 서열분석하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 게놈 DNA를 서열분석하는 것이 단일 세포의 DNA를 서열분석하는 것을 포함하고, 여기서 단일 세포의 DNA를 서열분석하는 것은 하나 이상의 단리된 태아 세포에 대해 수행되는 것인 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 유전자의 발현을 분석하는 것이 검출가능한 항체를 하나 이상의 단리된 태아 세포의 표면에 하이브리드화하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 태아 세포가 유전적 결함에 대해 분석되는 것인 방법.

청구항 22

필터;

태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자; 및

현미경검사-가시화가가능한 챔버

를 포함하는, 태아 세포의 비-침습적 단리를 위한 통합형 마이크로유체 장치.

청구항 23

제22항에 있어서, 단리된 태아 세포의 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 검출하도록 구성되어 있는 시약을 포함하는 통합형 마이크로유체 장치.

청구항 24

필터;

태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자; 및

현미경검사-가시화가가능한 챔버

를 포함하는, 태아 세포의 비-침습적 단리를 위한 통합형 마이크로유체 장치, 및

단리된 태아 세포의 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 검출하도록 구성되어 있는 시약

을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2015년 1월 23일 출원된 발명의 명칭이 "비-침습적 산전 검사를 위한 마이크로유체공학 기반 태아 세포 검출 및 단리(MICROFLUIDICS BASED FETAL CELL DETECTION AND ISOLATION FOR NON-INVASIVE PRENATAL TESTING)"인 미국 가출원 번호 62/107,261을 우선권 주장하고, 그의 내용은 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 발명의 분야

[0004] 본원에 개시된 실시양태는 비-침습적 산전 진단을 위한 모체 혈액으로부터의 마이크로유체공학 기반 태아 세포 검출 및 단리를 위한 방법, 장치 및 키트에 관한 것이다.

[0005] 관련 기술분야의 설명

[0006] 비-침습적 산전 진단을 위한 모체 혈액으로부터의 태아 세포 단리는 이러한 세포의 진귀함에 기인하여 다양한 도전과제를 야기한다. 하류 유전적 분석 및 진단 검정을 위해 이러한 세포를 추출하고, 분석하기 위한 다양한 접근법이 시도된 바 있지만, 그러한 추출의 성공 및 순도는 매우 불충분한 바 있다. 추가적으로, FACS-기반 분석 이외의 이러한 검출 및 추출의 처리량은 여전히 낮은 상태 그대로 유지되고 있으며, 이는 비-침습적 산전 검사 분야에서 또 다른 도전과제를 야기한다. 그러므로, 비-침습적 산전 진단은 현재까지 대개는 모체 혈액으로부터의 무세포 DNA (cfDNA)를 분석하는 것에 의존해 오고 있다. 그러나, 고도로 단편화된 cfDNA는 상기 DNA를 분석하고, 존재할 경우에, 태아 게놈 이상의 완전한 산전 분석을 제시하는데 있어서 많은 도전과제를 야기하고 있다.

발명의 내용

[0007] 본원에 개시된 실시양태는 모체 혈액 샘플을 제공하는 것; 모체 혈액 샘플을 마이크로유체 장치 상에 통합된 필터에 적용시켜 모체 혈액 샘플로부터 유핵 혈액 세포를 강화시키는 것; 마이크로유체 장치 내의 강화된 유핵 혈액 세포를 태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 형광성 결합 모이어티 또는 친화성 분자로 표지하는 것; 및 태아 세포를 단리시키는 것을 포함하는, 비-침습적 산전 진단을 위한 태아 세포의 단리를 위한 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 필터는 투명한 것이다. 일부 실시양태에서, 유핵 혈액 세포는 세포의 모폴로지 및/또는 다른 물리적 특징을 통해 강화된다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 표지

된 유핵 혈액 세포를 마이크로유체 장치 내의 현미경검사-가시화가능한 챔버에서 가시화하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 표지된 유핵 혈액 세포를 가시화 및/또는 현미경 분석을 위해 필터 장착된 마이크로유체 장치 내에 선택적으로 고정화시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 가시화 및/또는 현미경 분석은 수동식이다. 일부 실시양태에서, 가시화 및/또는 현미경 분석은 기계 비전을 통해 자동화되어 있다. 일부 실시양태에서, 태아 세포는 유핵 적혈구 (nRBC)이다. 일부 실시양태에서, 태아 세포-특이적 항원은 CD45, 트랜스페린 수용체 (CD71), 글리코포린 A (GPA), HLA-G, EGFR, 트롬보스폰딘 수용체 (CD36), CD34, HbF, HAE 9, FB3-2, H3-3, 에리트로포이에틴 수용체, HBE, AFP, APOC3, SERPINC1, AMBP, CPB2, ITIH1, APOH, HPX, 베타-hCG, AHSB, APOB, J42-4-d, 2,3-비오포스포글리세레이트 (BPG), 카르보닉 안히드라제 (CA), 티미딘 키나제 (TK), MMP14 (매트릭스 메탈로프로테이나제 14), 및 태아 헤모글로빈으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 필터는 유핵 혈액 세포를 강화시키고/거나 성숙한 적혈구 (RBC)를 제거하도록 구성되어 있다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 비-태아 세포를 제거하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-태아 세포를 제거하는 것은 비-태아 세포를 고정화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 태아 세포를 고정화시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 태아 세포를 고정화시키는 것은 태아 세포를 태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 태아 세포-특이적 항원은 CD45, 트랜스페린 수용체 (CD71), 글리코포린 A (GPA), HLA-G, EGFR, 트롬보스폰딘 수용체 (CD36), CD34, HbF, HAE 9, FB3-2, H3-3, 에리트로포이에틴 수용체, HBE, AFP, APOC3, SERPINC1, AMBP, CPB2, ITIH1, APOH, HPX, 베타-hCG, AHSB, APOB, J42-4-d, 2,3-비오포스포글리세레이트 (BPG), 카르보닉 안히드라제 (CA), 티미딘 키나제 (TK), MMP14 (매트릭스 메탈로프로테이나제 14), 및 태아 헤모글로빈으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 단리된 태아 세포를 서열분석을 통해 핵산 서열에 대해 분석하는 것 또는 다른 통상적으로 사용되는 방법 예컨대 FISH 또는 DNA 마이크로어레이를 사용하여 단리된 태아 세포에서 유전적 이상을 검출하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 분석하는 것은 검출가능한 프로브를 하나 이상의 단리된 태아 세포의 게놈 DNA에 하이브리드화하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 분석하는 것은 하나 이상의 단리된 태아 세포의 게놈 DNA를 서열분석하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 게놈 DNA를 서열분석하는 것은 단일 세포의 DNA를 서열분석하는 것을 포함하고, 여기서 단일 세포의 DNA를 서열분석하는 것은 하나 이상의 단리된 태아 세포에 대해 수행된다. 일부 실시양태에서, 유전자의 발현을 분석하는 것은 검출가능한 항체를 하나 이상의 단리된 태아 세포의 표면에 하이브리드화하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 태아 세포는 유전적 결함에 대해 분석된다.

[0008] 본원에 개시된 실시양태는 필터; 태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자; 및 현미경검사-가시화가능한 챔버를 포함하는, 태아 세포의 비-침습적 단리를 위한 통합형 마이크로유체 장치를 제공한다. 일부 실시양태에서, 통합형 마이크로유체 장치는 단리된 태아 세포의 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 검출하도록 구성되어 있는 시약을 추가로 포함한다.

[0009] 본원에 개시된 실시양태는 필터; 태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자; 및 현미경검사-가시화가능한 챔버를 포함하는 태아 세포의 비-침습적 단리를 위한 통합형 마이크로유체 장치, 및 단리된 태아 세포의 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 검출하도록 구성되어 있는 시약을 포함하는 키트를 추가로 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 한 실시양태에서 모체 혈액 샘플로부터 태아 세포를 단리시키기 위한 예시적인 프로세스를 도시한다. 도 2는 단리된 태아 세포에 대한 하류 분석을 위한 예시적인 프로세스를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본원에 개시된 태아 세포 단리를 위한 방법 및 장치는 친화성 및/또는 바이오마커 기반 단리를 모폴로지-기반 단리와 조합한다. 이들 프로세스를 통합형 마이크로유체 장치를 조합함으로써, 본원에 개시된 방법 및 장치는 모체 혈액 샘플로부터의 태아 세포 단리에 대한 처리량의 오랜 도전과제를 해결한다. FACS와 달리, 현미경 플랫폼 상에서 수행되는 영상화 세포 분석법과 유사한 가시화-기반 방법이 본원에 개시된다. 여기서 기재된 방법은 부분적으로 또는 전체적으로 자동화될 수 있으며, 이는 본 개시내용에 또 다른 이점을 부가한다.

[0012] 바람직하게, 본원에 개시된 방법 및 장치는 마이크로유체 칩 상에 통합된 필터를 이용한다. 이는 모체 혈액 샘플로부터 유핵 혈액 세포를 강화시킬 수 있는 단리 프로세스의 초기 단계에서 사용된다. 예를 들어, 모폴로지-

기반 선택 필터는 성숙한 적혈구 (RBC)의 대부분 또는 모두가 필터 상의 개구부를 통과하고, 유핵 혈액 세포 대부분을 포획할 수 있도록 허용한다. 이어서, 유핵 혈액 세포는 관심 유핵 혈액 세포의 서브세트의 양성 또는 음성 선택을 위한 핵 염료 및/또는 특이적인 바이오마커로 염색되고/거나 표지된다. 태아 유핵 적혈구 (fnRBC) 집단이 비-침습적 산전 진단을 위해 특히 관심의 대상이 된다.

[0013] 이와 같이, 본원에 개시된 방법 및 장치는 1) 수작업 및 개입은 최소화하면서, 하나의 통합형 플랫폼 상에서 세포 여과, 염색, (필요할 경우에) 강화를 허용하고; 2) 자동화를 사용하여 모체 혈액의 프로세싱이 간소화될 수 있게 하고; 3) 시약 사용 및 비용을 절감하면서, 시약 전달을 위해 마이크로유체공학이 사용될 수 있게 하고; 4) 오염 및 샘플 혼잡을 감소시키면서, 실링된 마이크로유체 챔버가 사용될 수 있게 하고; 5) 다른 기능성 예컨대 세포 용해를 위해 사용될 수 있는 유연한 플랫폼을 허용한다.

[0014] 정의

[0015] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 갖는다. 본원에 언급된 모든 특허, 출원, 공개된 출원 및 다른 공개 문헌은 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본 섹션에 제시된 정의가, 본원에 참조로 포함되는 특허, 출원, 공개된 출원 및 다른 공개 문헌에 제시된 정의와 상반되거나, 또는 다르게는 모순된다면, 본 섹션에 제시된 정의가 본원에 참조로 포함된 것의 정의에 우선한다.

[0016] 본원에 사용되는 바와 같이, 단수 형태는 달리 명시되지 않는 한, 복수 지시대상을 포함한다. 예를 들어, "한" 이량체는 하나 이상의 이량체를 포함한다.

[0017] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "마이크로유체 장치"는 일반적으로 물질, 특히, 유체를 통해 전달되는 물질 예컨대 액체가 그를 통과하여 수송될 수 있는 장치를 지칭하며, 일부 실시양태에서는 마이크로-규모이고, 일부 실시양태에서는 나노규모이다. 따라서, 개시된 본 주제에 의해 기재된 마이크로유체 장치는 마이크로규모 특색부, 나노규모 특색부, 및 그의 조합을 포함할 수 있다. 이러한 장치 상에서 전달되는 샘플은 유체 단독 또는 성분 예컨대 세포 및 입자가 현탁되어 있는 유체일 수 있다.

[0018] 따라서, 예시적인 마이크로유체 장치는, 유체를 5 mL/분 이하 정도의 유속으로 조작할 수 있는, 전형적으로 치수가 대략 밀리미터 규모 이하인 구조적 또는 기능적 특색부를 포함한다. 전형적으로, 이러한 특색부는 채널, 유체 저장소, 반응 챔버, 혼합 챔버, 및 분리 영역을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 예에서, 채널은 범위가 약 0.1 μm 내지 약 10 밀리미터인 적어도 하나의 횡단면 치수를 포함한다. 이러한 정도의 치수를 사용함으로써 더 많은 채널을 더욱 작은 소면적에 도입하도록 하고, 이는 더욱 적은 부피의 유체를 이용한다.

[0019] 마이크로유체 장치는 단독으로 존재할 수 있거나, 또는 예를 들어, 및 제한 없이, 유체, 예를 들어, 샘플, 시약, 완충제 등을 시스템 내로 및/또는 시스템을 통해 도입하기 위한 펌프 및 밸브; 검출 장치 또는 시스템; 데이터 저장 시스템; 및 적용가능할 경우에, 센서를 이용하여, 장치내 유체 수송 및/또는 방향을 제어하고, 장치내 유체에 가해지는 환경 조건, 예를 들어, 온도, 전류 등을 모니터링 및 제어하기 위한 제어 시스템을 포함할 수 있는 마이크로유체 시스템의 일부일 수 있다. 이러한 시스템 중의 밸브는 압력 또는 진공 구동식일 수 있다.

[0020] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "채널," "마이크로-채널," 및 "마이크로유체 채널"은 상호교환적으로 사용되고, 패턴화된 기관으로부터의 패턴을 물질에 부여함으로써, 또는 임의의 적합한 물질 제거 기술에 의해 물질에 의해 형성된 리세스 또는 공동을 의미할 수 있거나, 또는 리세스 또는 공동에 탑재된 임의의 적합한 유체 운반 구조, 예컨대 튜브, 모세관 등과 조합된 리세스 또는 공동을 의미할 수 있다.

[0021] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "유동 채널" 및 "제어 채널"은 상호교환적으로 사용되며, 이는 물질, 예컨대, 유체, 예를 들어, 기체 또는 액체가 통과할 수 있는 마이크로유체 장치 중의 채널을 의미할 수 있다. 보다 특히, 용어 "유동 채널"은 관심 물질, 예를 들어 임의의 유체 (현탁된 물질의 존재 또는 부재 하에) 또는 화학 시약이 통과할 수 있는 채널을 지칭한다. 추가로, 용어 "제어 채널"은 물질, 예컨대 유체, 예를 들어, 기체 또는 액체가 밸브 또는 펌프를 가동시키는 방식으로 통과할 수 있는 유동 채널을 지칭한다. 이러한 채널 중의 유체 유동은 능동적인 유동을 위해 압력 또는 진공 구동식이거나, 또는 표면 장력을 통해 수동적으로 구동될 수 있다.

[0022] 본원에 사용되는 바와 같이, "칩"은 그 위에서 특정 프로세스, 예컨대 물리적, 화학적, 생물학적, 생물리학적, 또는 생화학적 프로세스 등이 수행될 수 있는, 복수의 1-, 2- 또는 3-차원 마이크로 구조 또는 마이크로-규모 구조를 포함하는 고체 기관을 지칭한다. 마이크로 구조 또는 마이크로-규모 구조 예컨대, 채널 및 웰, 전극 소

자, 전자기 소자는 칩 상에서의 물리적, 생물리학적, 생물학적, 생화학적, 화학 반응 또는 프로세스를 촉진시키기 위해 기관 내로 도입되거나, 기관 상에 제작되거나, 또는 다르게는 부착된다. 칩은 1차원으로 가늘 수 있고, 다른 차원으로 다양한 형상, 예를 들어, 직사각형, 원형, 타원형 또는 다른 불규칙한 형상을 가질 수 있다. 본 발명의 칩의 주요 표면의 크기는, 예를 들어, 약 1 mm^2 내지 약 0.25 m^2 으로 상당히 달라질 수 있다. 바람직하게, 칩의 크기는 약 4 mm^2 내지 약 25 cm^2 이며, 특징적인 치수는 약 1 mm 내지 약 5 cm이다. 칩 표면은 편평하거나, 또는 편평하지 않을 수 있다. 표면이 편평하지 않은 칩은 표면 상에 제작된 채널 또는 웰을 포함할 수 있다.

[0023] 마이크로유체 칩은 임의의 적합한 물질, 예컨대 PDMS (폴리디메틸실록산), 유리, PMMA (폴리메틸메타크릴레이트), PET (폴리에틸렌 테레프탈레이트), PC (폴리카르보네이트) 등, 또는 그의 조합으로부터 제작될 수 있다. 칩에 통합된 필터는 유사 물질 또는 상이한 물질로부터 제작될 수 있다.

[0024] "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역에 위치하는 적어도 하나의 항원 인식 부위를 통해 표적, 예컨대 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질, 폴리펩티드 등에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자이고, 이는 임의 부류의 면역글로불린, 예를 들어, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE일 수 있다. 조류 중 예컨대 닭에서의 주요 항체 유형인 IgY가 또한 상기 정의 내에 포함된다. 본원에 사용되는 바와 같이, 상기 용어는 무손상 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 뿐만 아니라 그의 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 체 (ScFv), 그의 돌연변이체, 자연적으로 발생된 변이체, 필요한 특이성의 항원 인식 부위와 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 및 필요한 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포함한다.

[0025] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합한다"는 특이적인 결합 쌍의 결합 특이성을 지칭한다. 다른 잠재적 표적의 존재 하에서 항체에 의한 특정한 표적 인식은 이러한 결합의 하나의 특징이 된다. 특이적인 결합은, 분자 중 하나가 화학적 또는 물리적 수단을 통해 제2 분자와 특이적으로 결합하는 것인 2개의 상이한 분자를 수반한다. 2개의 분자는 그들 서로와의 결합은 그들이 그의 결합 파트너를 특징이 유사한 다른 검정 구성 성분으로부터 구별할 수 있도록 한다는 의미에서 관련이 있는 것이다. 결합 성분 쌍의 구성원은 리간드 및 수용체 (항-리간드), 특이적인 결합 쌍 (SBP) 구성원 및 SBP 파트너, 항체-항원 등으로 지칭된다. 분자는 또한 분자 응집을 위한 SBP 구성원일 수 있고; 예를 들어 제2 항체 및 그의 상응하는 항원의 면역 복합체에 대한 항체는 상기 면역 복합체에 대한 SBP 구성원인 것으로 간주될 수 있다.

[0026] 본원에 기재된 본 발명의 측면 및 실시양태는 측면 및 실시양태"로 이루어진 것" 및/또는 "그로 본질적으로 이루어진 것"을 포함하는 것으로 이해된다.

[0027] 본 발명의 다른 목적, 이점, 및 특색은 첨부된 도면과 함께 하기 명세서로부터 명백해질 것이다.

[0028] 태아 세포를 단리시키는 방법

[0029] 본원에 개시된 실시양태는 비-침습적 산전 진단을 위한 태아 세포의 단리를 위한 방법을 제공한다. 태아 세포는 생물학적 샘플, 예를 들어, 모체 혈액 샘플로부터 단리될 것이다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 모체 혈액 샘플을 마이크로유체 장치 상에 통합된 필터에 적용시켜 모체 혈액 샘플로부터 유핵 혈액 세포를 강화시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 양성 선택 또는 음성 선택을 위해 예를 들어, 마이크로유체 장치 내의 강화된 유핵 혈액 세포를 태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 형광성 결합 모이어티 또는 친화성 분자로 표지하는 것을 포함할 수 있다.

[0030] 개시된 실시양태에 따라 태아 세포를 단리시키는 방법 (100)의 비제한적인 예는 도 1에 제시된 흐름도에 예시되어 있다. 도 1에 예시되어 있는 바와 같이, 방법 (100)은 하나 이상의 오퍼레이션 (110)-(150)에 의해 예시되는 바와 같은 하나 이상의 평선, 오퍼레이션 또는 액션을 포함할 수 있다.

[0031] 방법 (100)은 오퍼레이션 (110), "모체 샘플을 제공하는 것"으로 시작될 수 있다. 오퍼레이션 (110)은 오퍼레이션 (120), "마이크로유체 장치 상에 통합된 필터에 모체 샘플을 적용시키는 것"으로 이어질 수 있다. 오퍼레이션 (120)은 오퍼레이션 (130), "강화된 유핵 혈액 세포를 표지하는 것"으로 이어질 수 있다. 오퍼레이션 (130)은 임의적인 오퍼레이션 (140), "비-태아 세포를 제거하는 것"으로 이어질 수 있다. 오퍼레이션 (130) 또는 오퍼레이션 (140)은 오퍼레이션 (150), "태아 세포를 단리시키는 것"으로 이어질 수 있다.

[0032] 도 1에서, 오퍼레이션 (110)-(150)은 오퍼레이션 (110)을 처음에 및 오퍼레이션 (150)을 마지막에 순차적으로 수행하는 것으로 예시되어 있다. 그러나, 이들 오퍼레이션은 적절하게는 특정 실시양태에 맞게 적합화하기 위

해 추가의 또는 다른 오퍼레이션으로 조합되고/거나, 또는 나누어질 수 있는 것으로 인지될 것이다. 예를 들어, 추가의 오퍼레이션이 하나 이상의 오퍼레이션 (110)-(150) 이전, 그 동안, 또는 그 이후에 추가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 오퍼레이션 중 하나 이상의 것이 거의 동시에 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 임의의 다른 오퍼레이션 없이, 단지 오퍼레이션 (110), (120), (130), 및 (150)으로만 이루어진다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 오퍼레이션 (110), (120), (130), 및 (150)으로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 임의의 다른 오퍼레이션 없이, 단지 오퍼레이션 (110), (120), (130), 및 (150) 및 오퍼레이션 (140)으로만 이루어진다.

[0033] 오퍼레이션 (110), "모체 샘플을 제공하는 것"에서, 하나 이상의 유핵 태아 세포를 함유하는 모체 샘플은 표준 채혈을 이용하여 인간 임신부로부터 획득될 수 있다. 모체 샘플은 제1 3개월간 (임신 약 첫 3개월), 제2 3개월간 (임신 약 4-6개월), 또는 제3 3개월간 (임신 약 7-9개월) 동안에 채취될 수 있다. 전형적으로, 획득되는 샘플은 혈액 샘플이다.

[0034] 인간으로부터 모체 샘플 (예를 들어, 혈액 샘플)을 획득할 때, 샘플의 양은 크기, 임신 기간 및 스크리닝되는 상태에 의존하여 달라질 수 있다. 한 실시양태에서, 최대 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 또는 5 mL의 샘플이 획득된다. 한 실시양태에서, 5-200, 10-100, 또는 30-50 mL의 샘플이 획득된다. 한 실시양태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 또는 150 mL 초과 샘플이 획득된다. 한 실시양태에서, 임신한 암컷으로부터 약 10-100 또는 30-50 mL의 말초 혈액 샘플이 획득된다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플은 임신 36, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8주 이내, 또는 상기 값 중 임의 값 사이의 범위인 기간 이내에 인간 임신부로부터 획득된다. 예를 들어, 혈액 샘플은 임신 8주 정도로 조기 시점에 인간 임신부로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플은 심지어 임신 종료 후에도 인간 임신부로부터 획득된다.

[0035] 샘플은 샘플의 전체 성분 대비 유핵 태아 세포를 강화시키고/거나, 샘플 중 전체 세포 대비 유핵 태아 세포를 강화시키는 하나 이상의 단계를 거치게 된다. 모체 샘플은 있는 그대로 사용될 수 있거나, 바람직한 완충제 중에 미리 희석될 수 있거나, 또는 필요할 경우에, 그를 필터에 적용시키기 이전에 칩 상에서 희석될 수 있다.

[0036] 일부 실시양태에서, 유핵 태아 세포의 강화는 하나 이상의 크기-기반 분리 방법을 사용하여 진행된다. 크기-기반 분리 모듈의 예는 여과 막, 분자체, 및 매트릭스를 포함한다. 본 발명에 의해 고려된 크기-기반 분리 모듈의 예는 그의 전문이 본원에 참조로 포함된 국제 공개 번호 WO 2004/113877에 개시된 것들을 포함한다. 다른 크기 기반 분리 방법은 국제 공개 번호 WO 2004/0144651 및 미국 특허 출원 공개 번호 US20080138809A1 및 US20080220422A1에 개시되어 있으며, 이들은 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0037] 오퍼레이션 (120), "마이크로유체 장치 상에 통합된 필터에 모체 샘플을 적용시키는 것"에서, 유핵 혈액 세포 및/또는 성숙한 적혈구 (RBC)를 선택하는 적합한 임의의 필터가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 필터는 RBC를 통과시킬 수 있지만, 유핵 혈액 세포는 보유하는 크기 및/또는 형상을 갖는 개구부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 개구부 크기는 4.0 μm , 4.1 μm , 4.2 μm , 4.3 μm , 4.4 μm , 4.5 μm , 4.6 μm , 4.7 μm , 4.8 μm , 4.9 μm , 5.0 μm , 6.0 μm , 7.0 μm , 8.0 μm , 9.0 μm , 10.0 μm , 11.0 μm , 12.0 μm , 13.0 μm , 14.0 μm , 15.0 μm , 16.0 μm , 17.0 μm , 18.0 μm , 19.0 μm , 20.0 μm , 21.0 μm , 22.0 μm , 23.0 μm , 24.0 μm , 25.0 μm , 26.0 μm , 27.0 μm , 28.0 μm , 29.0 μm , 30.0 μm , 또는 상기 값 중 임의의 2개 값 사이의 범위, 예를 들어, 2.0 μm 내지 2.5 μm , 1.8 μm 내지 3.0 μm 등이거나, 약 상기 값이거나, 또는 상기 값 미만인 크기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 개구부의 형상은 직사각형, 원형, 타원형, 삼각형 등 또는 불규칙한 형상일 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, 개구부의 "크기"는 필터에 대한 최소 유효 개구부를 지칭한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 유핵 혈액 세포는, RBC가 유핵 혈액 세포가 아닌 RBC를 통과시킬 수 있는 크기 및/또는 형상을 갖는 필터 상의 개구부를 통과할 때 강화될 수 있다.

[0038] 일부 실시양태에서, 필터는 유핵 혈액 세포 또는 RBC에 선택적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자로 코팅될 수 있다. 예를 들어, 유핵 혈액 세포에 특이적으로 결합하는 항체가 필터를 코팅하는데 사용될 수 있고, 이로써, 유핵 혈액 세포는 보유되는 반면, RBC는 필터를 통과하게 된다.

[0039] 일부 실시양태에서, 오히려 강화된 생성물은 관심의 대상이 아닌 세포 (예를 들어 유핵 모체 적혈구)가 우세할 수 있다 (>50%). 일부 경우에서, 강화된 샘플의 유핵 태아 세포는 강화된 샘플 중의 모든 세포의 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95%를 구성한다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법 및 시스템을 사용하여, 임신한 인간으로부터의 10-20 mL의 모체 혈액 샘플을 하나 이상의 유핵 태아 세포, 예컨대 유핵 적혈구에 대해 강화시킬 수 있고, 이로써, 강화된 샘플은 총 약 1천개 내지 약 10백만개의 세포를 각개 되고,

그 중 2%는 유핵 태아 세포는 유핵 태아 세포이고, 상기 세포의 나머지는 모체의 것이다. 일부 실시양태에서, 수행된 강화 단계는 샘플로부터 모든 원치않는 분석물 (예를 들어, 모체 세포 예컨대 혈소판 및 백혈구, 성숙한 RBC) 중 적어도 50, 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8 또는 99.9%를 제거하였다.

[0040] 오퍼레이션 (130), "강화된 유핵 혈액 세포를 표지하는 것"에서, 강화된 유핵 혈액 세포를 염료로 직접 또는 간접적으로 표지할 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA를 염색시키는 염료, 예컨대 아크리딘 오렌지(AO), 에티디움 브로마이드, 헤마톡실린, 나일 블루, 핵스트, 사프라닌, 또는 DAPI가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 유형-특이적 염료, 예를 들어, 태아 세포 또는 비-태아 세포를 특이적으로 표지하는 염료가 사용될 수 있다. 세포 유형-특이적 염료를 사용하여, 예를 들어, 세포 유형-특이적 항체를 통해 세포를 직접 또는 간접적으로 표지할 수 있다. 수반된 표지 전략은 순차적으로 수행될 수 있거나, 또는 동시에 수행될 수 있다.

[0041] 일부 실시양태에서, 임의적인 오퍼레이션 (140), "비-태아 세포를 제거하는 것"은 태아 세포를 강화시키기 위해 수행될 수 있다. 이러한 임의적인 오퍼레이션에서, 비-태아 세포는 다양한 기술에 의해 강화된 유핵 혈액 세포로부터 제거될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 비-태아 세포 대부분은, 성숙한 RBC를 용해시키는 분별 용해 또는 유핵 분획을 강화시키는 밀도 구배 원심분리에 의해, 또는 마이크로-채널 또는 챔버 중의 비-태아 세포를 태아 세포가 위치하는 마이크로-채널 또는 챔버와 다른 마이크로유체 장치 상에 고정화시킴으로써 제거될 수 있다. 이들 강화 단계는 하나의 기술, 또는 상기 언급된 기술의 조합을 사용할 수 있다. 태아 세포 단리를 위해 강화된 샘플을 칩 상에 로딩하기 전에 칩 밖에서 부분적 강화 단계 또한 수행될 수 있다. 예를 들어, 비-태아 세포는 비-태아 세포에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자로 코팅된 마이크로-채널 또는 챔버에 고정화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-태아 세포는 형광 활성화 프로세스에 의해 제거될 수 있다.

[0042] 친화성-기반 강화

[0043] 일부 실시양태에서, 유핵 태아 세포는 결합 모이어티 또는 친화성 분자에 대한 그의 친화성에 기반하여 강화될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 모체 샘플의 원치않는 성분으로부터의 유핵 태아 세포의 분리를 촉진시키기 위해 결합 모이어티를 적합하게 표지한다. 예를 들어, 유핵 태아 세포에 대해 친화성을 갖는 결합 모이어티는 유핵 태아 세포에 결합할 수 있고, 고체 지지체 예컨대 크로마토그래피 물질의 자기 비드 또는 비-자기 고체상에의 결합에 의해 유핵 태아 세포를 분리시키는데 사용될 수 있거나, 또는 결합 모이어티는 유핵 태아 세포의 검출 지원 강화, 시간화 기반 방법에 의해 또는 그의 다른 방식으로 유핵 태아 세포를 다른 샘플 성분으로부터 구별할 수 있도록 검출가능하게 표지될 수 있다.

[0044] 일부 실시양태에서, 친화성 방법은 태아 세포 표면 마커에 대해 친화성을 갖는, 직접 또는 간접적으로 표지된 결합 모이어티 또는 친화성 분자를 사용하는 것을 포함한다. 예를 들어, 결합 모이어티 또는 친화성 분자를 고정상, 형광단, 방사성 핵종, 또는 다른 검출가능한 모이어티에 부착시킬 수 있고, 태아 유핵 세포는 결합 모이어티 또는 친화성 분자에 특이적으로 결합할 수 있도록 허용하는 반면, 샘플의 다른 성분은 결합 모이어티 또는 친화성 분자에 특이적으로 결합하지 못하도록 하는 조건 하에서 샘플을 표지된 결합 모이어티 또는 친화성 분자와 접촉시킬 수 있다. 이어서, 예를 들어, 유세포 분석법, 영상화 세포 분석법, 현미 조작 장치, 광학 집게, DEP, 자기 포획, 밀도 원심분리기, 및 크기-기반 액체 크로마토그래피를 사용하여 표지된 결합 모이어티 또는 친화성 분자를 처리하여 표지된 결합 모이어티 또는 친화성 분자에 결합된 모체 샘플의 성분을 표지된 결합 모이어티 또는 친화성 분자에 결합되지 않은 모체 샘플의 성분으로부터 분리할 수 있다. 모체 샘플의 결합된 성분을 임의적으로 세척하여 비-특이적으로 결합된 성분을 제거할 수 있다. 이어서, 태아 유핵 세포를 포함하는, 표지된 결합 모이어티 또는 친화성 분자에 결합된 샘플의 성분을 추가 강화 또는 분석을 위해 보유시키거나, 또는 수거할 수 있다.

[0045] 결합 모이어티로는 예를 들어, 유핵 태아 세포에 특이적으로 결합하는 단백질, 핵산, 및 탄수화물을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 결합 모이어티는 하나 이상의 탄수화물, 예컨대 갈락토스에 대해 친화성을 갖는다. 예를 들어, 결합 모이어티는 렉틴일 수 있다. 다른 실시양태에서, 결합 모이어티는 항체이다. 결합 모이어티 항체의 예는 항-매트릭스 메탈로프로테이나제 14 (항-MMP14), 항-트랜스페린 수용체 (항-CD71), 항-글리코포린 A (항-GPA), 항-트롬보스폰딘 수용체 (항-CD36), 항-CD34, 항-HbF, 항-HAE9, 항-FB3-2, 항-H3-3, 항-에리트로포이에틴 수용체, 항-CD235a, 항-탄수화물, 항-셀렉틴, 항-CD45, 항-GPA, 항-항원-i, 항-EpCAM, 항-E-카드헤린, 항-Muc-1, 항-hPL, 항-CHS2, 항-KISS1, 항-GDF15, 항-CRH, 항-TFP12, 항-CGB, 항-LOC90625, 항-FN1, 항-COL1A2, 항-PSG9, 항-PSG1, 항-HBE, 항-AFP, 항-APOC3, 항-SERPINC1, 항-AMBP, 항-CPB2, 항-ITIH1,

항-APOH, 항-HPX, 항-베타-hCG, 항-AHSG, 항-APOB, 항-J42-4-d, 항-2,3-비오포스포글리세레이트 (항-BPG), 항-카르보닉 안히드라제 (항-CA), 또는 항-티미딘 키나제 (항-TK)를 포함한다.

[0046] 한 실시양태에서, 유핵 태아 세포는 항-MMP14, 항-CD71 및/또는 항-GPA 선택을 사용하여 강화된다. 또 다른 실시양태에서, 유핵 태아 세포는 유전자 MMP14, CD71, GPA, HLA-G, EGFR, CD36, CD34, HbF, HAE 9, FB3-2, H3-3, 에리트로포이에틴 수용체, HBE, AFP, APOC3, SERPINC1, AMBP, CPB2, ITIH1, APOH, HPX, 베타-hCG, AHSG, APOB, J42-4-d, BPG, CA, 또는 TK로부터 발현되는 단백질에 결합할 수 있는 하나 이상의 항체 또는 항체 단편을 사용하여 강화된다.

[0047] 고정상-기반 강화

[0048] 일부 실시양태에서, 친화성 크로마토그래피 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 결합 모이어티 또는 친화성 분자를 고정상, 예컨대 비드, 칼럼 또는 입자에 부착시킬 수 있고, 태아 유핵 세포는 결합 모이어티 또는 친화성 분자에 특이적으로 결합할 수 있도록 허용하는 반면, 샘플의 다른 성분은 결합 모이어티 또는 친화성 분자에 특이적으로 결합하지 못하도록 하는 조건 하에서 샘플을 친화성 분자가 부착된 고정상과 접촉시킬 수 있다. 이어서, 예를 들어, 이동상을 사용하여 접촉시킨 고정상을 처리하여 친화성 분자가 부착된 고정상에 결합된 모체 샘플의 성분을 친화성 분자가 부착된 고정상에 결합되지 않은 모체 샘플의 성분으로부터 분리할 수 있다. 태아 유핵 세포를 포함하는, 친화성 분자가 부착된 고정상에 결합된 샘플의 성분을 추가 강화 또는 분석을 위해 보류시키거나, 또는 수거할 수 있다.

[0049] 한 실시양태에서, 자기 입자를 사용하여 유핵 태아 세포를 강화시킨다. 한 실시양태에서, 결합 모이어티 예컨대 항체를 자기 입자 (예를 들어, 자기 비드)에 커플링시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 비드를 항-MMP14, 항-CD71, 항-GPA, 항-CD36, 항-CD34, 항-HbF, 항-HAE9, 항-FB3-2, 항-H3-3, 항-에리트로포이에틴 수용체, 항-CD235a, 항-탄수화물, 항-셀렉틴, 항-CD45, 항-GPA, 항-항원-i, 항-EpCAM, 항-E-카드헤린, 항-Muc-1, 항-hPL, 항-CHS2, 항-KISS1, 항-GDF15, 항-CRH, 항-TFP12, 항-CGB, 항-LOC90625, 항-FN1, 항-COL1A2, 항-PSG9, 항-PSG1, 항-HBE, 항-AFP, 항-APOC3, 항-SERPINC1, 항-AMBP, 항-CPB2, 항-ITIH1, 항-APOH, 항-HPX, 항-베타-hCG, 항-AHSG, 항-APOB, 항-J42-4-d, 항-BPG, 항-CA, 또는 항-TK 항체 또는 항체의 단편인 항체 또는 항체의 단편에 커플링시킨다.

[0050] 본원에 제공되는 핵산, 항체 또는 항체-기반 단편 프로브와 함께 사용될 수 있는 다양한 형광성 분자 또는 염료 중 임의의 것으로는 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 350, AMCA, 알렉사 플루오르 488, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), GFP, RFP, YFP, BFP, CFSE, CFDA-SE, 디라이트 288, 스펙트럼그린, 알렉사 플루오르 532, 로다민, 로다민 6G, 알렉사 플루오르 546, Cy3 염료, 테트라메틸로다민 (TRITC), 스펙트럼오렌지, 알렉사 플루오르 555, 알렉사 플루오르 568, 리사민 로다민 B 염료, 알렉사 플루오르 594, 텍사스 레드 염료, 스펙트럼레드, 알렉사 플루오르 647, Cy5 염료, 알렉사 플루오르 660, Cy5.5 염료, 알렉사 플루오르 680, 피코에리트린 (PE), 프로피디움 아이오다이드 (PI), 페리딘 염록소 단백질 (PerCP), PE-알렉사 플루오르 700, PE-Cy5 (트리-컬러), PE-알렉사 플루오르 750, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, 드라크-5, 퍼시픽 오렌지, 아민 아쿠아, 퍼시픽 블루, 알렉사 플루오르 405, 알렉사 플루오르 430, 알렉사 플루오르 500, 알렉사 플루오르 514, 알렉사 플루오르-555, 알렉사 플루오르-568, 알렉사 플루오르-610, 알렉사 플루오르-633, 디라이트 405, 디라이트 488, 디라이트 549, 디라이트 594, 디라이트 633, 디라이트 649, 디라이트 680, 디라이트 750, 또는 디라이트 800을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0051] 태아 바이오마커

[0052] 일부 실시양태에서, 태아 바이오마커를 사용하여 하나 이상의 태아 세포를 검출 및/또는 단리시킬 수 있다. 예를 들어, 이는 태아 발생 동안 차별적으로 발현되는 유전자 (예를 들어, DYS1, DYZ, CD-71, MMP14)의 상대적 발현에 기초하여 태아 및 모체 유핵 세포 사이를 구별함으로써 수행될 수 있다. 제공하는 본 발명의 한 실시양태에서, MMP14, CD71, GPA, HLA-G, EGFR, CD36, CD34, HbF, HAE 9, FB3-2, H3-3, 에리트로포이에틴 수용체, HBE, AFP, APOC3, SERPINC1, AMBP, CPB2, ITIH1, APOH, HPX, 베타-hCG, AHSG, APOB, J42-4-d, 2,3-비오포스포글리세레이트 (BPG), 카르보닉 안히드라제 (CA), 또는 티미딘 키나제 (TK)를 포함하는, 하나 이상의 유전자의 전사체 또는 단백질 발현의 검출을 사용하여 태아 세포를 강화, 정제, 열거, 확인, 검출 또는 구별한다. 발현은 이들 유전자로부터 발현된 전사체 또는 단백질을 포함할 수 있다. 제공된 본 발명의 한 실시양태에서, MMP14, CD71, GPA, HLA-G, EGFR, CD36, CD34, HbF, HAE 9, FB3-2, H3-3, 에리트로포이에틴 수용체, HBE, AFP, AHSG, J42-4-d, BPG, CA, 또는 TK를 포함하는 하나 이상의 유전자의 발현을 사용하여 유핵 태아 세포 예컨대 유핵 태아 적혈구를 확인, 정제, 강화, 또는 열거한다.

- [0053] 베타-hCG (b-hCG, HCG, CGB, CGB3 및 hCGB로도 공지됨)는 당단백질 호르몬 베타 쇠 패밀리의 구성원이고, 융모 성 고나도트로핀 (CG)의 베타 3 서브유닛을 코딩한다. 당단백질 호르몬은 공통 알파 서브유닛과 생물학적 특이성을 부여하는 독특한 베타 서브유닛으로 이루어진 이종이량체이다. CG는 태반의 영양막 세포에 의해 생성되고, 임신을 유지하는데 필수적인 스테로이드를 합성하도록 난소를 자극한다. CG의 베타 서브유닛은 염색체 19q13.3 상에 탠덤으로 및 역위 쌍으로 배열되고, 황체 형성 호르몬 베타 서브유닛 유전자와 인접해 있는 6개의 유전자에 의해 코딩된다.
- [0054] APOB (아포지단백질 B (Ag(x) 항원 포함)) 및 FLDB로도 공지됨)는 킬로마이كرون 및 저밀도 지단백질의 주요 아포지단백질이다. 이는 혈장 내에 2가지 주요 이소형, 즉, apoB-48 및 apoB-100으로서 존재하며: 전자는 위장관 내에서만 합성되고, 후자는 간에서 합성된다. 장 및 간 형태의 apoB는 매우 긴 단일 mRNA로부터의 단일 유전자에 의해 코딩된다. 2종의 이소형은 공통 N-말단 서열을 공유한다. 더 짧은 apoB-48 단백질이 잔기 2180에서의 apoB-100 전사체의 RNA 편집 이후에 (CAA->UAA) 생성되고, 이로써, 정지 코돈이 생성되고, 조기 번역 종결이 일어나게 된다. 이러한 유전자 또는 그의 조절 영역 내에서의 돌연변이는 혈장 콜레스테롤 및 apoB 수준에 영향을 미치는 질환인, 저베타지단백혈증, 정상 양의 혈중 트리글리세리드를 갖는 저베타지단백혈증, 및 리간드-결손 apoB에 기인한 고콜레스테롤혈증을 유발한다.
- [0055] AHSB (알파-2-HS-당단백질; AHS; A2HS; HSGA; 및 FETUA로도 공지됨)는 혈청에 존재하는 당단백질이고, 간세포에 의해 합성될 수 있다. AHSB 분자는, 둘 다가 단일 mRNA로부터 코딩된 전구 단백질로부터 절단된 것인, 2개의 폴리펩티드 쇠로 이루어진다. 이는 여러 기능, 예컨대 세포내 이입, 뇌 발생 및 골 조직 형성에 수반된다. 상기 단백질은 미성숙 대뇌 피질의 대뇌 피질 판 및 골수 조혈 매트릭스에 통상적으로 존재하는 바, 이는 상기 조직의 발생에 참여한다고 가정된 바 있다.
- [0056] HPX (헤모펙신으로도 공지됨)는 헴에 결합할 수 있다. 이는 헴 단백질 예컨대 헤모글로빈의 전환에 의해 방출되거나, 상실된 헴을 스캐빈징함으로써 유리 헴에 의해 유발될 수 있는 산화적 손상으로부터 신체를 보호해줄 수 있다. 신체의 철분을 보존하기 위하여, 간 세포의 표면 상에 위치한 특이적 수용체와의 상호 작용시, 헤모펙신은 내재화를 위하여 그의 결합된 리간드를 방출할 수 있다.
- [0057] CPB2 (카르복시펩티다제 B2 (혈장); CPU; PCPB; 및 TAFI로도 공지됨)는 C-말단 펩티드 결합을 가수분해시킬 수 있는 효소이다. 카르복시펩티다제 패밀리는 메탈로-, 세린 및 시스테인 카르복시펩티다제를 포함한다. 그의 기질 특이성에 따라, 이들 효소는 카르복시펩티다제 A (지방족 잔기를 절단함) 또는 카르복시펩티다제 B (염기성 아미노 잔기를 절단함)로서 지칭된다. 이러한 유전자에 의해 코딩된 단백질은 트립신에 의해 활성화되고, 카르복시펩티다제 B 기질서 대해 작용한다. 트롬빈 활성화 후, 성숙한 단백질은 섬유소용해를 하향조절한다. 이러한 유전자 및 그의 프로모터 영역에 대한 다형성이 기재된 바 있다. 이용가능한 서열 데이터 분석은 상이한 이소폼을 코딩하는 스플라이스 변이체를 보여준다.
- [0058] ITIH1 (인터-알파 (글로불린) 억제제 H1; H1P; ITIH; LATIH; 및 MGC126415로도 공지됨)은 세린 프로테아제 억제제 패밀리의 구성원이다. 이는 2개의 전구체 단백질: 경쇄, 및 1 또는 2개의 중쇄로부터 어셈블리된다. ITIH1은 시험관내에서 세포 부착을 증가시킬 수 있다.
- [0059] APOH (아포지단백질 H (베타-2-당단백질 I); BG; 및 B2G1로도 공지됨)는 지단백질 대사, 응집, 및 항-인지질 자기항체 생성을 포함한, 다양한 생리학적 경로에 연루된 바 있다. APOH는 루푸스 및 원발성 항-인지질 증후군을 앓는 많은 환자의 혈청에서 발견되는 항-인지질 자기항체에 의한 음이온성 인지질 결합에 필요한 보조 인자일 수 있다.
- [0060] AMBP (알파-1-마이크로글로불린/비쿠닌 전구체; HCP; ITI; UTI; EDC1; HI30; ITIL; IATIL; 및 ITILC로도 공지됨)는 혈장에서 분비된 복합 당단백질을 코딩한다. 전구체는 리포칼린 수송 단백질의 수퍼패밀리에 속하고, 염증 프로세스의 조절에서 중요한 역할을 할 수 있는 알파-1-마이크로글로불린; 및 쿠니츠(Kunitz)-유형 프로테아제 억제제의 수퍼패밀리에 속하는 노 트립신 억제제이고, 다수의 생리학적 및 병리학적 프로세스에서 중요한 역할을 하는 비쿠닌인, 별개의 기능성 단백질로 단백질 분해적으로 프로세스된다. 이러한 유전자는 리포칼린 유전자의 클러스터 내의 염색체 9에 위치한다.
- [0061] J42-4-d는 또한 t-복합체 11 (마우스)-유사 2; MGC40368 및 TCP11L2로도 공지되어 있다.
- [0062] 오퍼레이션 (150), "태아 세포를 단리시키는 것"에서, 태아 세포를 수동식 또는 자동화된 방법을 사용하여 단리시킬 수 있다. 예를 들어, 태아 세포의 선택 및/또는 비-태아 세포의 선택 해제에 의해 태아 세포를 단리시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 태아 세포를 단일 세포 포획에 의해 단리시킨다. 일부 실시양태에서, 태아 세포

를 현미경 플랫폼 상에서 가시화하면서 동시에 단리시킬 수 있다.

- [0063] 다양한 실시양태에서, 오퍼레이션 이전, 그 동안, 또는 그 이후의 특정 시점에서, 세척 완충제를 마이크로-채널 및/또는 챔버로 유동시켜 과량의 시약, 예컨대 완충제, 염료, 항체, 핵산, 세포, 세포 파편 등을 세척하여 제거할 수 있다.
- [0064] 단리된 태아 세포의 평가
- [0065] 본원에 개시된 실시양태는 산전 검사 및/또는 진단을 위해 단리된 태아 세포에 대해 하나 이상의 분석 수행에 대한 유연성을 추가로 제공한다. 개시된 실시양태에 따른 단리된 태아 세포의 하류 분석 (200)의 비제한적인 예는 도 2에 제시된 흐름도에 예시되어 있다. 도 2에서, 단리된 태아 세포는 하류 유전적 분석을 위한 세포 용해 단계 및 DNA 추출 단계의 대상이 될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 용해 및/또는 DNA 추출은 세포 분류 칩이 장착된, 동일한 또는 별개의 마이크로유체 칩 상에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 용해 및/또는 DNA 추출은 칩에 기반하지 않을 수 있는 표준 접근법을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 단리된 태아 세포는 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열, 또는 유전자의 발현에 대해 평가될 수 있다. 예를 들어, 단리된 태아 세포는 유전적 결함, 예컨대 SNP 검출, 표적화된 서열분석, 전체 게놈 증폭 (WGA) 및/또는 이수성 분석을 위한 서열분석, 이러한 유전적 결함을 보유하는 개체에 유해한 영향을 미치는 유전자 상의 특정 영역의 삽입 및 결실 분석, 염색체 이상 (예를 들어, 삼염색체성 18, 21 또는 13)에 대한 마이크로어레이 기반 분석을 위해 분석될 수 있다.
- [0067] 용어 "염색체 이상"은 대상 염색체의 구조와 정상적인 상동 염색체 사이의 편차를 지칭한다. 용어 "정상적인"은 특정 종의 건강한 개체에서 발견되는 우세한 핵형 또는 밴딩 패턴을 지칭한다. 염색체 이상은 수치상 또는 구조상의 이상일 수 있고, 이수성, 다배수성, 역위, 삼염색체성, 일염색체성, 중복, 결실, 염색체의 일부분의 결실, 부가, 염색체의 일부분의 부가, 삽입, 염색체의 단편, 염색체의 영역, 염색체 재배열, 및 전좌를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 염색체 이상은 병적 상태의 존재와, 또는 병적 상태로 발전할 수 있는 소인과 상관관계를 가질 수 있다. 본원에 정의되는 바, 단일 뉴클레오티드 다형성 ("SNP")은 염색체 이상이 아니다.
- [0068] 일염색체성 X (X0, 전체 X 염색체의 부재)는, 살아서 태어난 소녀 2500명당 1명 내지 3000명당 1명에서 발생하는, 가장 흔한 유형의 터너 증후군이다 (Sybert and McCauley *N Engl J Med* (2004) 351:1227-1238). XXY 증후군은 남성 1000명당 대략 1명 정도로 존재하는, 인간 남성이 추가 X 염색체를 갖는 상태이다 (Bock, Understanding Klinefelter Syndrome: A Guide for XXY Males and Their Families. NIH Pub. No. 93-3202 (1993)). XYY 증후군은 남성 출생 1000명당 1명이 이환되고, 잠재적으로는 남성 불임을 유도하는 것인, 인간 남성이 추가의 Y 염색체를 받음으로써, 보다 일반적인 46개 대신 총 47개의 염색체를 제공하는, 성 염색체의 이수성이다 (Aksglaede, et al., *J Clin Endocrinol Metab* (2008) 93:169-176).
- [0069] 터너 증후군은 여러 상태들을 포함하며, 그중 일염색체성 X (X0, 전체 성 염색체, 바르 소체의 부재)가 가장 흔하다. 전형적인 여성은 2개의 X 염색체를 갖지만, 터너 증후군에서는 이들 성 염색체 중 하나가 소실되어 있다. 표현형상의 여성 2000명당 1명 내지 5000명당 1명에서 발생하는 상기 증후군은 다수의 방식으로 스스로 소견을 나타낸다. 클라인펠터 증후군은 인간 남성이 추가의 X 염색체를 갖는 상태이다. 인간에서, 클라인펠터 증후군은 가장 흔한 성 염색체 장애이고, 추가의 염색체의 존재에 의해 유발된 것에서는 두번째로 가장 흔한 상태이다. 상기 상태는 남성 1,000명당 대략 1명 정도로 존재한다. XYY 증후군은 인간 남성이 추가의 Y 염색체를 받음으로써, 보다 일반적인 46개 대신 총 47개의 염색체를 제공하는, 성 염색체의 이수성이다. 이를 통해 47개인 XYY 핵형이 생성된다. 상기 상태는 일반적으로 무증상이고, 남성 출생 1000명당 1명이 이환되고, 잠재적으로는 남성 불임을 유도한다.
- [0070] 삼염색체성 13 (파타우 증후군), 삼염색체성 18 (에드워드 증후군) 및 삼염색체성 21 (다운 증후군)은 임상적으로 가장 중요한 상염색체의 삼염색체성이며, 그를 검출하는 방법은 항상 높은 관심의 대상이 되어 왔다. 상기 태아 염색체 이상의 검출은 산전 진단에 있어서 매우 중요하다 (Ostler, *Diseases of the eye and skin: a color atlas*. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 72. ISBN 9780781749992 (2004); Driscoll and Gross, *N Engl J Med* (2009) 360: 2556-2562; Kagan, et al., *Human Reproduction* (2008) 23:1968-1975).
- [0071] 일부 실시양태에서, 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 분석하는 것은 검출가능한 프로브를 하나 이상의 단리된 태아 세포의 게놈 DNA에 하이브리드화시키는 것을 포함한다. 본 접근법은 FISH (형광 동소 하이브리드화)의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 분석하는 것은 하나 이상의 단리된 태아 세포의 게놈 DNA를 서열분석하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 게놈 DNA를 서열분석하는 것은 단일 또는

소수 세포의 DNA를 서열분석하는 것을 포함하고, 여기서 단일 세포의 DNA를 서열분석하는 것은 하나 이상의 단리된 태아 세포에 대해 수행된다.

[0072] 다수의 상이한 서열분석 방법 및 변형 방법이 사용될 수 있다는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 한 실시양태에서, 대량 병렬 서열분석을 사용하여 서열분석을 수행한다. "대량 병렬 서열분석"이란, 예를 들어, 무작위로 단편화된 게놈 DNA를 평면이고, 광학적으로 투명한 표면에 부착시키고, 고체상 증폭을 수행하여 각각이 제곱 cm당 ~1,000개의 주형 카피를 함유하는 수백만개의 클러스터를 포함하는 고밀도 서열분석 유동 셀을 생성하는 것을 사용하는, 수백만개의 핵산 단편을 서열분석하기 위한 기술을 의미한다. 이들 주형을 4색 DNA 서열분석에 이어서 합성 기술을 사용함으로써 서열분석된다. 대량 병렬 서열분석, 예컨대, 454 플랫폼(로슈(Roche)) (Margulies, et al., Nature (2005) 437:376-380), 일루미나 게놈 애널리저(Illumina Genome Analyzer) (또는 솔렉사(Solexa)TM 플랫폼) 또는 SOLiD 시스템(SOLiD System) (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)) 또는 헬리코스 트루 싱글 분자 DNA 서열분석 기술(Helicos True Single Molecule DNA sequencing technology) (Harris, et al., Science (2008) 320:106-109), 퍼시픽 바이오사이언시스(Pacific Biosciences)의 단일 분자, 실시간 (SMRTTM) 기술, 및 나노포어 서열분석 (Soni and Meller, Clin Chem (2007) 53:1996-2001) 상에서 달성가능한 대량 병렬 서열분석을 통해 표본으로부터 단리된 다수의 핵산 분자를 병렬 방식으로 고차 다중화로 서열분석할 수 있다 (Dear, Brief Funct Genomic Proteomic (2003) 1:397-416). 이들 플랫폼은 각각 클론에 의해 확장되거나, 또는 심지어는 증폭되지 않은, 핵산 단편의 단일 분자를 서열분석한다. 폴리뉴클레오티드 단편의 서열 정보를 얻는데 상업적으로 이용가능한 서열분석 장치가 사용될 수 있다. 본원에 사용되는 서열분석은 바람직하게는 사전 증폭 또는 클로닝 단계 없이 수행되지만, PCR 및 현미경 주형-기반 서열분석 둘 다에 대한 반응 챔버를 갖는 마이크로유체 칩에서는 증폭-기반 방법과 조합될 수 있다. 특이적인 인간 염색체에 속하는 바, 서열을 확인하는데에는 단지 약 30 bp의 무작위 서열 정보가 요구된다. 독특하게는 긴 서열일수록 특정 표적을 더 많이 확인할 수 있다. 본 경우에서, 다수의 35 bp 관독물을 수득하였다. 대량 병렬 서열분석 방법에 관한 추가 설명은 문헌 [Rogers and Ventner, Nature (2005) 437:326-327]에서 볼 수 있다.

[0073] 통합형 마이크로유체 장치

[0074] 본원에 개시된 실시양태는 필터; 태아 세포의 양성 선택, 또는 원치않는 세포의 음성 선택을 위한, 태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자; 및 현미경 기반-가시화가능한 챔버를 포함하는, 태아 세포의 비-침습적 단리를 위한 통합형 마이크로유체 장치를 제공한다.

[0075] 일부 실시양태에서, 통합형 마이크로유체 장치는 현미경 플랫폼 상에서 가시화되도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 통합형 마이크로유체 장치는 투명하고, 현미경 하에 가시화가능한 필터를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 통합형 마이크로유체 장치는 투명하고, 현미경 하에 가시화가능한 마이크로-채널 및/또는 챔버를 포함할 수 있다.

[0076] 일부 실시양태에서, 통합형 마이크로유체 장치는 유사한 또는 상이한 물질로 제조되고, 다양한 이용가능한 결합 기술을 통해 어셈블리된 다층으로 구성될 수 있다.

[0077] 일부 실시양태에서, 통합형 마이크로유체 장치는 통합형 마이크로유체 장치 상의 혈액 용기로부터 마이크로-채널 또는 챔버로의 유체 유동을 구동시키도록 구성되어 있는 펌프를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 통합형 마이크로유체 장치는 칩의 다른 영역으로의 액체 유동을 조절하는 밸브로서 작용하는 가요성 막의 조합을 사용하여 마이크로유체 장치 상의 마이크로-채널 및/또는 챔버 중의 유체 유동을 조절하도록 구성되어 있는 펌프를 포함할 수 있다.

[0078] 일부 실시양태에서, 통합형 마이크로유체 장치는 유체 유동을 제어하기 위해 마이크로-채널 및/또는 챔버 사이의 교차 지점에 마이크로밸브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 초과 마이크로밸브는 마이크로-채널 및/또는 챔버 사이의 다중의 교차 지점에서 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 마이크로밸브는 제어 채널에 의해 제어될 수 있다. 마이크로밸브를 활성화시키기 위해, 제어 채널의 개방형 단부를 압력원, 예컨대 펌프, 시린지, 고압 실린더에 연결시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 액체 유동은 진공에 의해 가이드될 수 있다.

[0079] 일부 실시양태에서, 1개 초과 제어 채널이 마이크로유체 장치에 포함될 수 있다. 1개 초과 제어 채널이 마이크로유체 장치에 포함된 실시양태에서, 각 제어 채널은 함께 또는 별개로 작동될 수 있다. 예를 들어, 제어

채널 중 일부는 압력을 받을 수 있는 반면, 동시에 나머지는 압력 해제된다. 특정 실시양태에서, 제어 채널을 별개로 작동시키면, 샘플 및/또는 시약을 일부 반응 챔버에는 첨가하고, 다른 나머지는 첨가하지 않을 수 있게 할 수 있다.

[0080] 개요성 막을 위해 임의의 적합한 물질이 사용될 수 있다. 예를 들어, 탄성 막의 물질은 PDMS, 실리콘 고무, 기억 합금, 또는 PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 등 또는 그의 조합일 수 있다.

[0081] 예시적인 마이크로유체 장치는 다양한 마이크로유체 소자가 배치되어 있는 중앙식 본체 구조를 포함할 수 있다. 본체 구조는 외부 부분 또는 표면 뿐만 아니라, 전체 마이크로유체 장치의 각종 마이크로규모 채널 및/또는 챔버를 정의하는 내부 부분을 포함한다. 예를 들어, 예시적인 마이크로유체 장치의 본체 구조는 전형적으로, 구조가 평면일 수 있는, 즉, 실질적으로 편평하거나, 또는 적어도 하나의 편평한 표면을 갖는 고체 또는 반고체 기판을 사용한다. 적합한 기판은 각종 물질 중 어느 하나, 또는 물질의 조합으로부터 제작될 수 있다. 대개, 평면 기판은 마이크로가공 분야에서 통상적인 고체 기판, 예를 들어, 실리카-기반 기판, 예컨대 유리, 석영, 실리콘 또는 폴리실리콘 뿐만 아니라, 공지된 다른 기판, 즉, 갈륨 비소를 사용하여 제작된다. 이들 기판인 경우에, 통상적인 마이크로가공 기술, 예컨대 포토리소그래피 기술, 습식 화학적 에칭, 마이크로기계 가공, 즉, 드릴링, 밀링 등이 마이크로유체 장치 및 기판을 제작하는데 쉽게 적용될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어, 폴리디메틸실록산 (PDMS), 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리우레탄, 폴리비닐클로라이드 (PVC), 폴리스티렌, 폴리스플론, 폴리카르보네이트 등을 포함한 중합체 기판 물질이 본 발명의 장치를 제작하는데 사용될 수 있다. 이러한 중합체 물질인 경우에, 상기 기재된 바와 같은 채널 및 저장소 기하학적 형태를 갖는 기판을 형성하는데 사출 성형 또는 엠보싱 방법이 사용될 수 있다. 이러한 경우에서, 원래의 몰드는 상기 기재된 물질 및 방법 중 임의의 것을 사용하여 제작될 수 있다. 원하는 경우에, 어셈블리 후에 어셈블리된 칩을 표면 습윤성을 변경시키기 위해 플라즈마로 처리할 수 있거나, 또는 바람직하게는 먼저 처리한 후, 이어서, 어셈블리할 수 있다.

[0082] 키트

[0083] 본원에 개시된 실시양태는 필터; 태아 세포-특이적 항원 또는 비-태아 세포-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 결합 모이어티 또는 친화성 분자; 및 임의적으로 확인을 위해 현미경 가시화를 가능하게 하는 광학적으로 투명한 챔버를 포함하는 태아 세포의 비-침습적 단리를 위한 통합형 마이크로유체 장치, 및 단리된 태아 세포의 하나 이상의 뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 서열을 검출하도록 구성되어 있는 시약을 포함하는 키트를 제공한다.

[0084] 단리된 태아 세포의 하나 이상의 뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 서열을 검출하는데 임의의 적합한 시약, 예를 들어, 겔 전기영동 시약, 크로마토그래피 시약, 분광광도법 시약 등이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 태아 세포의 하나 이상의 뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 서열을 검출하기 위한 시약은 서열분석 장치일 수 있다.

[0085] 일부 실시양태에서, 키트는 폴리뉴클레오티드의 특이적인 증폭을 허용하는 프라이머 및 프라이머 쌍, 및 단리된 태아 세포의 핵산 분자에 선택적으로 또는 특이적으로 하이브리드화하는 프로브를 포함할 수 있다. 프로브를 검출가능한 마커, 예컨대, 예를 들어, 형광성 화합물, 생체발광성 화합물, 화학발광성 화합물, 금속 킬레이터 또는 효소로 표지할 수 있다. 이러한 프로브 및 프라이머는 단리된 태아 세포 중 폴리뉴클레오티드의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다.

[0086] 일부 실시양태에서, 키트는 폴리펩티드의 존재를 검출하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 이러한 시약은 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 다른 결합 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체 또는 결합 분자는 다형성의 결과로서 폴리펩티드의 구조적 편차를 구별할 수 있고, 이로써, 유전자형 분석을 위해 사용될 수 있다. 항체 또는 결합 분자는 검출가능한 마커, 예컨대, 예를 들어, 방사성 동위 원소, 형광성 화합물, 생체발광성 화합물, 화학발광성 화합물, 금속 킬레이터, 효소, 또는 입자로 표지될 수 있다. 결합 검정법, 예컨대 ELISA를 수행하기 위한 다른 시약이 키트에 포함될 수 있다.

[0087] 일부 실시양태에서, 키트는 적어도 2종, 적어도 3종, 적어도 5종, 적어도 10종, 또는 15종의 바이오마커의 유전자형 분석을 위한 시약을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 증폭된 핵산의 검출을 위해 포획 프로브를 위한 표면 또는 기판 (예컨대 마이크로어레이)을 추가로 포함할 수 있다.

[0088] 키트는, 각 용기 수단이 본 방법에 사용하고자 하는 개별 소자 중 하나를 포함하는 것인 하나 이상의 용기 수단 예컨대 바이알, 관 등을 밀폐 상태로 수용하도록 구획화된 캐리어 수단을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 용기 수단 중 하나는 검출가능하게 표지되거나, 또는 표지될 수 있는 프로브를 포함할 수 있다. 이러한 프로브

는 바이오마커에 특이적인 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 키트가 표적 핵산을 검출하기 위해 핵산 하이브리드화를 이용하는 경우에, 키트는 또한 표적 핵산 서열의 증폭을 위한 뉴클레오티드(들)를 함유하는 용기, 및/또는 리포터 분자, 예컨대 효소적, 형광성, 또는 방사성 동위 원소 표지에 결합된 리포터 수단, 예컨대 비오틴 결합 단백질, 예컨대 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 포함하는 용기를 가질 수 있다.

[0089] 키트는 전형적으로는 상기 기재된 용기, 및 완충제, 희석제, 필터, 니들, 시린지, 사용 설명서를 포함하는 패키지 인서트를 포함한, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 물질을 포함하는 하나 이상의 다른 용기를 포함할 것이다. 라벨은 본 조성물은 특정 요법 또는 비-치료학적 적용을 위해 사용됨을 표시하기 위해 용기 상에 존재할 수 있거나, 또는 이는 생체내 또는 시험관내 사용을 위한 지침, 예컨대 상기 기재된 것들을 표시할 수 있다.

[0090] 키트는 조직 또는 세포 샘플을 제조하고, 샘플로부터 핵산 (예컨대 게놈 DNA)을 제조하기 위한 물질 및 설명서 세트를 추가로 포함할 수 있다.

[0091] 본원에 개시된 실시양태는 키트에 사용될 수 있는, 본 발명의 방법을 수행하는데 있어서 사용하기 적합한 각종의 조성물을 제공한다. 예를 들어, 본원에 개시된 실시양태는 표면, 예컨대 이러한 방법에 사용될 수 있는 어레이를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 어레이는 본 발명의 바이오마커를 검출하는데 유용한 개별 핵산 분자 또는 그의 집합을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 어레이는 표적 핵산을 포함하는 샘플에 하이브리드화할 수 있는, 분리되어 배치된 연속된 개별 핵산 올리고뉴클레오티드 또는 핵산 올리고뉴클레오티드 조합 세트를 포함할 수 있으며, 그를 통해 이러한 하이브리드화는 본 발명의 바이오마커의 유전자형을 나타낸다.

[0092] 핵산을 고체 기관, 예컨대 유리 슬라이드에 부착시키는 것에 관하여 수종의 기술이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 하나의 방법은 고체 기관에 부착될 수 있는 모이어티, 예컨대 아민 기, 아민 기의 유도체, 또는 양전하를 포함하는 또 다른 기를 함유하는 변형된 염기 또는 유사체를 합성된 핵산 분자 내로 도입시키는 것이다. 이어서, 합성된 생성물은 고체 기관, 예컨대 증폭된 생성물 상에 존재하는 반응성 기와 공유 결합을 형성하게 되는 알데히드 또는 또 다른 반응성 기로 코팅된 유리 슬라이드와 접촉되고, 유리 슬라이드에 공유적으로 부착되게 된다.

[0093] 실시예

[0094] 모체 혈액 샘플을 임신한 여성으로부터 그녀의 임신 제1 또는 조기의 제2 3개월간에 수집한다. 수집 후 48시간 이내에 혈액 샘플을 프로세싱한다. 혈액 샘플을 포스페이트-완충처리된 염수 (PBS)를 이용하여 1:2-1:20로 적절한 부피가 될 때까지 희석시킨다. 희석된 혈액 샘플을 시린지 또는 자동화된 피펫 유사 시스템을 통해 통합형 필터가 있는 마이크로유체 칩에 적용시킨다. 필터는 개구부 패턴 및 구조를 고려하여 5 μm 및 다양한 다른 실시양태의 최소 유효 개구부를 갖는다. 혈액 샘플이 필터를 통과한 후, 실온에서 전형적으로 2 mL의 세척 완충제를 3회에 걸쳐 마이크로유체 칩에 가한다. 회로에 의해 용액 저장소에 연결된 마이크로-채널을 통해 염색액을 가함으로써 강화된 유핵 혈액 세포를 DAPI로 표지한다. FITC 또는 PE 접합된 항-CD71 항체 및/또는 항-GPA 항체로 표지하는 것을 포함하는 다양한 형광성 표지 전략을 통해 태아 세포를 확인한다. 형광성 태그부착된 CD45 항체로의 염색을 통해 모체 유핵 혈액 세포 중 상당부가 제거되거나, 거부된다. 칩을 현미경 플랫폼 상에 배치함으로써 표지된 태아 세포를 가시화한다. 비디오 카메라를 사용하여 상단로부터의 직접 조명을 통해, 또는 하단으로부터의 낙사-조명을 통해 표지된 태아 세포의 형광 영상을 포착한다. (이러한 구성에 대한 정확한 성질은 여전히 결정되고 있음).

[0095] 10 mg의 단백질 A/G 자기 비드 혼합물 (라이프 테크놀로지스 코퍼레이션(Life Technologies Corporation))을 현탁시키고, PBS + 트윈-20으로 2회에 걸쳐 세척한다. 50 μg의 CD45 항체를 PBS + 트윈-20으로 희석된 400 μl 비드 혼합물에 첨가하고, 인큐베이션시키고, 실온에서 30분 동안 회전시킨다. CD45 항체와 커플링된 비드를 자기 스탠드를 이용하여 분리하고, PBS + 트윈-20 중에서 3회에 걸쳐 세척한다. CD45는 백혈구를 표적화하고, 수집된 혈액 샘플의 비-태아 집단 중 상당부를 제거시키면서, 검출 및 단리를 위한 세포 로드는 감소시키고, 처리량을 증가시킨다. 항체로 코팅된 비드를 강화된 유핵 혈액 세포에 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션시킨다. 칩에 자기력을 가하여 비드를 칩 상의 수집 챔버로 이동시킴으로써 비드에 부착된 비-태아 세포를 태아 세포로부터 제거한다. 이러한 단계는 또한 칩 상에 부분적으로 강화된 혈액 샘플을 로딩하기 이전에 음성 고갈을 위해 칩 밖에서 이루어지는 사전 조기 단계로서 수행될 수 있다.

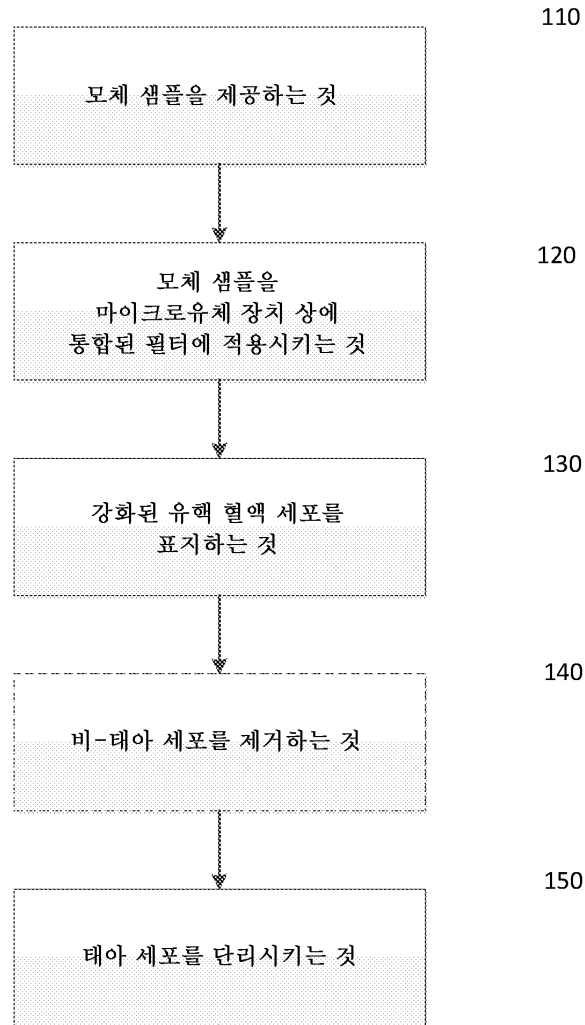
[0096] 칩의 상부 층을 하부 층으로부터 분리시켜 표지된 태아 세포를 함유하는 챔버를 노출시킨다. 자동화된 로봇 피펫을 이용하여 태아 세포를 단리시켜, 비디오 카메라에 의해 취득되는 형광 영상을 이용하여 컴퓨터에 의해 제어되는 마이크로타이퍼 플레이트에 놓는다. 게놈 DNA를 수집된 태아 세포로부터 정제하고, 차세대 서열분석

(NGS) 방법, 마이크로어레이 분석, FISH 또는 SNP 기반 게놈 분석에 의해 삼염색체성 21, 18 또는 13 또는 다른 유전적 이상에 대해 분석한다.

도면

도면1

100



도면2

200

