



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2018년10월10일  
 (11) 등록번호 10-1904883  
 (24) 등록일자 2018년09월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*G01N 33/49* (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01)  
*G01N 33/487* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*G01N 33/491* (2013.01)  
*B01L 3/502738* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0005156(분할)
- (22) 출원일자 2018년01월15일  
 심사청구일자 2018년01월15일
- (62) 원출원 특허 10-2017-0126341  
 원출원일자 2017년09월28일  
 심사청구일자 2017년09월28일
- (30) 우선권주장  
 1020170044808 2017년04월06일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌  
 JP2000508171 A\*  
 JP2005512089 A  
 KR1020140071222 A  
 KR1020150101307 A  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 재단법인대구경북과학기술원  
 대구 달성군 현풍면 테크노중앙대로 333,
- (72) 발명자  
 김민석  
 대구광역시 달성군 유가면 테크노대로5길 80, 21  
 1동 1602호(호반베르디움 THE CLASS)
- (74) 대리인  
 특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 기광용

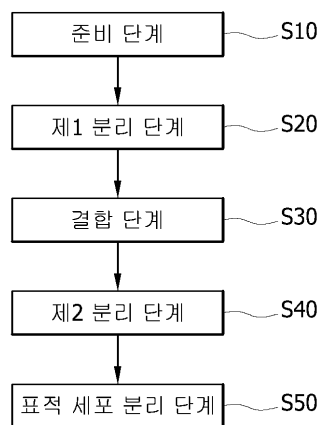
(54) 발명의 명칭 **표적 세포 분리 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 표적 세포 분리 방법에 관한 것이다.

본 발명의 일 실시 예에 따른 표적 세포 분리 방법은 시료 내에서 표적 세포와 상이한 제1 분리 물질을 분리하는 제1 분리 단계와 상기 시료 내의 제2 분리 물질에 결합 물질을 부착시키는 결합 단계 및 상기 시료 내에 상기 표적 세포가 남도록 상기 결합 물질이 결합된 상기 제2 분리 물질을 상기 시료에서 분리하는 제2 분리 단계를 포함하는 표적 세포 분리 방법을 포함한다.

**대표도** - 도5



(52) CPC특허분류

**G01N 33/4875** (2013.01)

*B01L 2200/0652* (2013.01)

*B01L 2300/0864* (2013.01)

*B01L 2300/087* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

혈액으로 제공되는 생물학적 시료 내에서 표적 세포를 분리하는 방법으로서,

상기 시료 내에서 표적 세포와 상이하되, 제 1 밀도 구배 물질을 포함하는 적혈구 및 혈장을 원심 분리를 이용하여 분리하는 제1 분리 단계;

상기 시료 내의 백혈구에 결합 물질을 부착시키는 결합 단계; 및

상기 시료 내에 상기 표적 세포가 남도록 상기 결합 물질이 결합된 상기 백혈구를 상기 시료에서 분리하는 제2 분리 단계를 포함하되,

상기 혈장은 상기 제1 밀도 구배 물질보다 밀도가 낮고, 상기 적혈구는 상기 제1 밀도 구배 물질보다 밀도가 높고, 상기 표적 세포는 상기 제1 밀도 구배 물질보다 밀도가 낮도록 형성되고,

상기 제 1 분리단계에서 상기 제 1 밀도 구배 물질에 의하여 상기 적혈구 및 혈장이 분리되고, 상기 표적 세포 및 상기 제 1 밀도 구배 물질보다 밀도가 높은 물질이 분리되는,

표적 세포 분리 방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 표적 세포는 혈중 종양 세포(circulating tumor cell), 암 줄기 세포(cancer stem cell) 또는 암 세포(cancer cell)를 포함하는 표적 세포 분리 방법.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 제2 분리 물질은 상기 시료 내에 제2 밀도구배물질을 제공하여 원심 분리를 이용하여 분리하는, 표적 세포 분리 방법.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 제2 밀도구배물질은 상기 결합 물질보다 밀도가 낮고, 상기 표적 세포 보다 밀도가 높은, 표적 세포 분리 방법.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 제1 분리 단계는 상기 제1 분리 물질을 분리 후 상기 시료가 위치한 공간 이외의 공간으로 상기 시료를 이

동시키며,

상기 결합 단계는 상기 제1 분리 단계와 상이한 장소에서 이루어지는, 표적 세포 분리 방법.

**청구항 7**

제 1 항에 있어서,

상기 제 2 분리단계는 상기 결합 단계와 상이한 장소에서 이루어지는 표적 세포 분리 방법.

**청구항 8**

제 1 항에 있어서,

상기 제 2 분리단계 이후에 상기 표적 세포를 별도의 공간으로 이동시키는 단계를 더 포함하는 표적 세포 분리 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 생물학적 시료 내의 표적 세포를 분리하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 악성 종양과 관련한 사망은 대부분 최초로 종양이 발생한 지점으로부터 떨어진 조직 및 기관으로의 전이 (metastasis)에 의한다. 따라서 전이를 조기에 발견하는 것은 암 환자의 생존 확률에 대한 중요한 결정 요소이며, 종양의 조기 발견 및 종양의 성장을 모니터링하는 것은 암 환자의 성공적인 치료에 매우 중요한 요소로 여겨진다.

[0003] 암의 진단은 대체로 조직 병리학(histopathology)에 의한 진단 기법을 이용한다. 조직 병리학 진단 기법은 생검 체로부터 얻어지는 조직 시료를 사용하여 종양을 진단하는 방법이다. 이러한 조직 병리학에 의한 접근방법은 종양 세포를 직접적으로 관찰할 수 있도록 한다. 그러나, 생검체 시료를 얻기 위하여 선택한 조직의 위치에서 종양이 존재하는 여부가 부정확할 수 있으며, 생검체로부터 얻어지는 특정 지점에 관한 데이터만 제공하므로, 다른 지점으로 종양이 전이되었는지 여부를 아는데 한계가 있다는 점에서 종양을 진단하거나 모니터링하는데 있어서 그 적용 가능성이 제한될 수 있다.

[0004] 혈중 종양 세포(circulating tumor cells, CTCs)는 최초로 종양이 검출되기 이전에 환자에게서 발견된다고 알려져 있다. 따라서, 혈중 종양 세포는 암의 조기 진단 및 예측에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다. 또한, 암은 대체로 혈액을 통해 전이된다는 점에서 혈중 종양 세포는 암의 전이 여부를 진단할 수 있는 표지가 될 수 있다.

[0005] 또한, 수술을 통해 암 세포를 제거한 후에도 혈중 종양 세포가 발견되는 경우가 있으며, 이러한 경우 암이 재발할 가능성도 존재한다. 그러나, 이러한 혈중 종양 세포는 혈액 내에서 그 양이 매우 적고 세포 자체가 연약하여 이를 감지하고 그 수를 파악하기가 매우 어렵다. 따라서, 환자의 체내에 존재하는 혈중 종양 세포, 암 세포 또는 암 줄기 세포를 검출할 수 있는 높은 민감성을 나타내는 진단 방법이 여전히 필요하다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 본 발명은 생물학적 시료 내의 표적 세포를 분리할 수 있는 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0007] 본 발명은 생물학적 시료 내의 표적 세포를 분리할 수 있는 미세 유동 장치를 제공하기 위한 것이다.

[0008] 본 발명은 여기에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0009] 본 발명은 생물학적 시료 내에서 표적 세포를 분리하는 방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 표적 세포 분리 방법은 혈액으로 제공되는 생물학적 시료 내에서 표적 세포를 분리하는 방법으로서, 상기 시료 내에서 표적 세포와 상이하되, 제 1 밀도 구배 물질을 포함하는 적혈구 및 혈장을 원심 분리를 이용하여 분리하는 제1 분리 단계; 상기 시료 내의 백혈구에 결합 물질을 부착시키는 결합 단계; 및 상기 시료 내에 상기 표적 세포가 남도록 상기 결합 물질이 결합된 상기 백혈구를 상기 시료에서 분리하는 제2 분리 단계를 포함하되, 상기 혈장은 상기 제1 밀도 구배 물질보다 밀도가 낮고, 상기 적혈구는 상기 제1 밀도 구배 물질보다 밀도가 높고, 상기 표적 세포는 상기 제1 밀도 구배 물질보다 밀도가 낮도록 형성되고, 상기 제 1 분리단계에서 상기 제 1 밀도 구배 물질에 의하여 상기 적혈구 및 혈장이 분리되고, 상기 표적 세포 및 상기 제 1 밀도 구배 물질보다 밀도가 높은 물질이 분리될 수 있다.
- [0011] 삭제
- [0012] 일 실시 예에 따르면, 상기 표적 세포는 혈중 종양 세포(circulating tumor cell), 암 줄기 세포(cancer stem cell) 또는 암 세포(cancer cell)를 포함할 수 있다.
- [0013] 일 실시 예에 따르면, 상기 제1 분리 물질은 상기 시료 내에 제1 밀도구배물질을 제공하며 원심 분리를 이용하여 분리할 수 있다.
- [0014] 일 실시 예에 따르면, 상기 제1 분리 물질 중 일부는 상기 제1 밀도구배물질보다 밀도가 낮고, 상기 제1 분리 물질 중 다른 일부는 상기 제1 밀도구배물질보다 밀도가 높을 수 있다.
- [0015] 일 실시 예에 따르면, 상기 표적 세포는 상기 제1 밀도구배물질보다 밀도가 낮을 수 있다.
- [0016] 일 실시 예에 따르면, 상기 제2 분리 물질은 상기 시료 내에 제2 밀도구배물질을 제공하여 원심 분리를 이용하여 분리할 수 있다.
- [0017] 일 실시 예에 따르면, 상기 제2 밀도구배물질은 상기 결합 물질보다 밀도가 낮고, 상기 표적 세포 보다 밀도가 높을 수 있다.
- [0018] 일 실시 예에 따르면, 상기 제1 분리 단계는 상기 제1 분리 물질을 분리 후 상기 시료가 위치한 공간 이외의 공간으로 상기 시료를 이동시키며 상기 결합 단계는 상기 제1 분리 단계와 상이한 장소에서 이루어질 수 있다.  
상기 제 2 분리단계는 상기 결합 단계와 상이한 장소에서 이루어질 수 있다.  
상기 제 2 분리단계 이후에 상기 표적 세포를 별도의 공간으로 이동시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명은 회전 구동부에 장착되어 원심력에 의하여 유체의 흐름을 유발하여 생물학적 시료 내의 표적 세포를 분리하는 미세 유동 장치를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 상기 시료 및 제1 밀도구배물질이 수용되며, 상기 시료 내의 제1 분리 물질을 분리하는 샘플 챔버 상기 샘플 챔버와 인접하게 위치하며, 상기 시료 및 상기 시료 내의 제2 분리 물질과 결합되는 결합 물질이 수용되는 반응 챔버 및 제2 밀도구배물질이 수용되며, 상기 반응 챔버에서 상기 시료를 공급받아 상기 결합 물질이 결합된 상기 제2 분리 물질과 상기 표적 세포를 분리하는 분리 챔버를 포함할 수 있다.
- [0021] 일 실시 예에 따르면, 상기 샘플 챔버는 상기 시료가 유입 시 위치하는 제 1 수용 공간과 상기 제1 밀도구배물질이 위치하는 제2 수용 공간으로 구획하는 격벽을 가질 수 있다.
- [0022] 일 실시 예에 따르면, 상기 격벽 중 상기 제 1 수용 공간에 위치하는 경사면은 상기 제 2 수용 공간을 향하도록 상향 경사지게 형성될 수 있다.
- [0023] 일 실시 예에 따르면, 상기 경사면의 경사각은 2 도 내지 85도일 수 있다.
- [0024] 일 실시 예에 따르면, 상기 샘플 챔버는 제1 밀도구배물질 및 원심분리를 이용하여 상기 시료 내의 제1 분리 물질을 분리할 수 있다.
- [0025] 일 실시 예에 따르면, 상기 분리 챔버는 제2 밀도구배물질 및 원심분리를 이용하여 상기 시료 내의 상기 결합 물질이 결합된 상기 제2 분리 물질과 상기 표적 세포를 분리할 수 있다.
- [0026] 일 실시 예에 따르면, 상기 미세 유동 장치는 상기 샘플 챔버에서 분리된 상기 제1 분리 물질이 이동되어 수용

되는 보관 챔버를 더 포함할 수 있다.

- [0027] 일 실시 예에 따르면, 상기 미세 유동 장치는 상기 결합 물질이 결합된 상기 제2 분리 물질이 분리 된 후 상기 표적 세포를 포함하는 상기 시료가 이동되어 수용되는 표적 챔버를 더 포함할 수 있다.
- [0028] 일 실시 예에 따르면, 상기 미세 유동 장치는 상기 샘플 챔버, 상기 반응 챔버, 상기 보관 챔버, 상기 분리 챔버 그리고 상기 표적 챔버를 가지는 몸체를 더 포함하며, 상기 몸체 내에서는 상기 샘플 챔버, 상기 반응 챔버, 상기 보관 챔버, 상기 분리 챔버 그리고 상기 표적 챔버가 복수개가 제공되며, 각각 동일한 개수로 형성될 수 있다.
- [0029] 일 실시 예에 따르면, 상기 샘플 챔버, 상기 반응 챔버, 상기 보관 챔버, 상기 분리 챔버 그리고 상기 표적 챔버는 각각 채널로 연결되며, 상기 채널에는 개폐가 가능한 밸브가 제공될 수 있다.
- [0030] 일 실시 예에 따르면, 상기 반응 챔버의 일면은 곡면으로 제공될 수 있다.

**발명의 효과**

- [0031] 상술한 바와 같이, 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 생물학적 시료 내의 표적 세포를 효과적으로 분리할 수 있다. 일 예로, 본 발명은 일 실시 예에 의하면, 혈중 암세포 포획을 원활히 할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 일 실시 예에 따르면, 생물학적 표적 세포를 최대한으로 획득할 수 있어, 표적 세포 분리 효율을 향상시킬 수 있다. 일 예로, 본 발명은 일 실시예에 의하면, 혈중 암세포를 최대한으로 획득할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 생물학적 시료 내의 표적 세포를 분리 시 다른 물질이 붙어 있지 않아 표적 세포의 변형 및 스트레스가 없으며, 세포 형태학적 관찰이 용이하다. 일 예로, 본 발명은 일 실시예에 의하면, 혈중 암세포의 검출 시 비드가 붙지 않아 암세포의 변형 및 스트레스를 최소화 할 수 있으며, 세포 형태학적 관찰이 용이하다.
- [0034] 또한, 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 생물학적 시료 내의 표적 세포가 암세포인 경우, 암세포 배양에 영향을 주지 않도록 혈중 암세포를 분리 할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 생물학적 시료 내의 표적 세포 분리 시 Negative depletion 방식의 자동화 방식을 사용하여 표적 세포 분리 효율을 향상시킬 수 있다.
- [0036] 본 발명의 효과가 상술한 효과들로 한정되는 것은 아니며, 언급되지 아니한 효과들은 본 명세서 및 첨부된 도면으로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0037] 도 1은 본 발명의 일 실시 예에 따른 미세유동 시스템의 개략적으로 보여주는 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시 예에 따른 미세 유동 장치를 보여주는 사시도이다.
- 도 3은 도 2의 미세 유동 장치 중 샘플 챔버를 보여주는 단면도이다.
- 도 4는 도 2의 미세 유동 장치의 일부를 확대하여 보여주는 확대도이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시 예에 따른 표적 세포 분리 방법을 보여주는 플로우 차트이다.
- 도 6 내지 도 13은 본 발명의 일 실시 예에 따른 표적 세포 분리 방법을 순차적으로 보여주는 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0038] 이하, 본 발명의 실시 예를 첨부된 도면들을 참조하여 더욱 상세하게 설명한다. 본 발명의 실시 예는 여러 가지 형태로 변형할 수 있으며, 본 발명의 범위가 아래의 실시 예들로 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 실시 예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 도면에서의 요소의 형상은 보다 명확한 설명을 강조하기 위해 과장되게 도시된 부분도 있다. 또한, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [0039] 일반적으로 생물학적 시료 내에 표적 세포를 분리하는 방법은 표적 세포에 특정 물질을 부착한 후, 표적 세포와

다른 세포들 간의 밀도구배를 이용하여 분리하는 방법이 사용되었다. 또는 표적 세포에 자성의 물질을 부착하여 자기장을 이용하여 표적 세포를 분리하는 방법도 사용되었다.

- [0040] 다만 이러한 방법은 아래와 같은 문제점이 존재한다.
- [0041] 먼저, 표적 세포에 다른 물질을 부착하여 따로 분리하는 경우에도 생물학적 시료 내에 표적 세포가 다수 남아 있는 문제점이 있다. 일 예로, 표적 세포가 혈중 암세포인 경우, 혈중 암세포를 비드 등을 부착하여 밀도 구배를 이용하여 분리하는 경우, 극미량으로 존재하는 혈중 암세포 모두를 포획하지 못하고 일부가 포획하는 문제점이 존재한다. 또한, 다양한 표면 단백질이 발현되는 다양한 특성을 지니는 혈중 암세포를 분리할 수 없는 단점이 있다.
- [0042] 즉, 종래의 방법은 암세포 특이적 항체를 이용하여 암세포와의 마이크로비드 결합을 구현하였기 때문에 분리된 혈중 암세포는 특이적 항체가 발현된 암세포만을 포집하게 되어 다양한 암세포를 포집 할 수 없는 단점이 있었다.
- [0043] 본 발명의 표적 세포 분리 방법 및 미세 유동 장치(10)는 상술한 문제점을 해결하고자, 혈중 암세포의 표면 단백질 발현과 상관없이 다양한 암세포를 분리할 수 있으며, 표적 세포(T)의 손상이 없이 분리할 수 있는 표적 세포 분리 방법 및 미세 유동 장치(10)를 제공하기 위한 것이다.
- [0044] 도 1은 본 발명의 일 실시 예에 따른 미세 유동 시스템의 개략적으로 보여주는 도면이다. 이를 참고하면, 미세 유동 시스템(1)은 회전 구동부(20), 전자기와 발생부(30), 미세 유동 장치(10) 그리고 제어부(40)를 포함한다.
- [0045] 미세 유동 시스템(1)은 미세 유동 장치(10)를 이용하여 생물학적 시료(S) 내에서 표적 세포(T)를 분리할 수 있다.
- [0046] 회전 구동부(20)는 미세 유동 장치(10)를 회전시킬 수 있다. 회전 구동부(20)가 미세 유동 장치(10)를 회전시켜, 시료(S)의 원심분리와 유체의 이동을 위한 원심력을 제공할 수 있다. 회전 구동부(20)는 후술하는 밸브(18)들을 전자기와 발생부(30)와 대면시키기 위해 미세 유동 장치(10)를 소정 위치로 정지시킬 수 있다.
- [0047] 회전 구동부(20)는 미세 유동 장치(10)의 밸브(18)들을 전자기와 발생부(30)와 정렬시키기 위해 미세 유동 장치(10)의 각 위치를 제어할 수 있는 모터 드라이브 장치를 포함할 수 있다.
- [0048] 모터 드라이브 장치는 스텝 모터를 이용한 것일 수 있다. 이와는 달리, 모터 드라이브 장치는 직류 모터를 이용하는 것일 수 있다.
- [0049] 전자기와 발생부(30)는 미세 유동 장치(10)의 밸브(18)들을 동작시킬 수 있다. 일 예로 전자기와 발생부(30)는 레이저 광을 밸브(18)에 조사할 수 있다.
- [0050] 또한, 전자기와 발생부(30)는 레이저뿐만 아니라, 국한된 영역에 열을 내는 장치일 수 있다.
- [0051] 전자기와 발생부(30)는 미세 유동 장치(10)의 반경 방향으로 이동될 수 있다. 전자기와 발생부(30)는 미세 유동 장치(10) 내부에 밸브(18) 중 특정 밸브(18)로 위치의 상부로 이동 될 수 있다. 전자기와 발생부(30)는 별도의 구동부를 통해서 미세 유동 장치(10)의 상부 중 원하는 위치로 이동될 수 있다.
- [0052] 제어부(40)는 회전 구동부(20) 및 전자기와 발생부(30)를 제어할 수 있다. 일 예로, 제어부(40)는 회전 구동부(20)의 회전 유무 또는 회전 속도를 제어할 수 있다. 일 예로, 제어부(40)는 전자기와 발생부(30)를 제어하여, 설정 위치에서 전자기과를 발생시키도록 제어할 수 있다.
- [0053] 도 2는 본 발명의 일 실시 예에 따른 미세 유동 장치를 보여주는 사시도이고, 도 3은 도 2의 미세 유동 장치 중 샘플 챔버를 보여주는 단면도이고, 도 4는 도 2의 미세 유동 장치의 일부를 확대하여 보여주는 확대도이다.
- [0054] 도 2 내지 도 4를 참고하면, 미세 유동 장치(10)는 원심력에 의하여 내부에 수용된 유체의 흐름을 유발한다. 미세 유동 장치(10)는 유체를 수용할 수 있는 공간과 유체의 통로를 제공하기 위한 미세 유동 구조물이 마련될 수 있다. 미세 유동 장치(10)는 예를 들어 회전 가능한 디스크 형상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0055] 미세 유동 장치(10)는 성형이 용이하고, 그 표면이 생물학적으로 비활성인 아크릴, PDMS 등의 플라스틱 소재로 만들어질 수 있다. 다만, 이에 한정되는 것은 아니고, 화학적, 생물학적 안정성과 광학적 투명성 그리고 기계적 가공성을 가지는 소재이면 족하다. 미세 유동 장치(10)는 여러 층의 판으로 이루어질 수 있다. 판과 판이 서로 맞닿는 면에 챔버나 채널(19) 등에 해당하는 음각 구조물을 만들고 이들을 접합함으로써 미세 유동 장치(10) 내부에 유체를 수용할 수 있는 공간과 유체의 통로를 제공할 수 있다.

- [0056] 일 예로, 미세 유동 장치(10)는 상부 커버와 몸체(11)의 2판 구조일 수 있다. 상부 커버와 몸체(11) 및 그 사이에서 미세 유동 구조물을 정의하는 구획관을 포함하는 3판 구조일 수도 있다. 커버와 몸체(11)의 접합은 접착제나 양면 접착테이프를 이용한 접착이나 초음파 용착, 레이저 용착 등 다양한 방법으로 이루어질 수 있다.
- [0057] 미세 유동 장치(10)에는 하나 또는 다수의 미세유동 구조물이 마련될 수 있다. 예를 들면, 미세 유동 장치(10)를 수개의 영역으로 나누고 각 영역마다 서로 독립적으로 작동되는 미세유동 구조물이 마련될 수 있다.
- [0058] 미세 유동 장치(10)는 상부커버, 몸체(11), 그리고 복수의 챔버를 포함한다.
- [0059] 상부커버는 몸체(11)의 상부를 덮는다. 상부커버는 상부에서 바라 볼 때 원형의 형상으로 제공될 수 있다.
- [0060] 몸체(11)의 내부에는 복수의 챔버들이 위치할 수 있다.
- [0061] 복수의 챔버는 샘플 챔버(13), 보관 챔버(15), 반응 챔버(14), 분리 챔버(16) 그리고 표적 챔버(17)를 포함할 수 있다.
- [0062] 샘플 챔버(13), 보관 챔버(15), 반응 챔버(14), 분리 챔버(16) 그리고 표적 챔버(17)는 각각 동일한 개수로 제공될 수 있다.
- [0063] 샘플 챔버(13)는 시료(S)가 유입되는 챔버일 수 있다. 샘플 챔버(13)에는 표적 세포(T)가 포함된 생물학적 시료(S)가 유입될 수 있다. 샘플 챔버(13)에는 제1 밀도구배물질(DGM1)이 유입될 수 있다. 샘플 챔버(13)는 유입구(미도시)가 형성될 수 있다. 유입구를 통해서 생물학적 시료(S)가 유입될 수 있다.
- [0064] 샘플 챔버(13) 내에는 격벽(131)이 위치할 수 있다. 샘플 챔버(13) 내의 공간은 격벽(131)에 의해 제1 수용 공간(135)과 제2 수용 공간(136)으로 구획될 수 있다.
- [0065] 격벽(131)은 샘플 챔버(13) 내에 위치할 수 있다. 격벽(131) 중 일면은 경사면(132)으로 제공될 수 있다. 일 예로, 경사면(132)은 격벽(131) 중 제1 수용 공간(135)과 마주보는 면일 수 있다. 경사면(132)은 제1 수용 공간(135)에서 제2 수용 공간(136)을 향하는 방향으로 상향 경사지게 형성될 수 있다. 일 예로, 경사각( $\theta$ )은 2도 내지 85도 일 수 있다.
- [0066] 격벽(131)의 높이는 샘플 챔버(13)의 외측벽의 높이보다 낮게 형성될 수 있다.
- [0067] 생물학적 시료(S)는 제1 수용 공간(135)에 최초 위치할 수 있다. 제1 밀도구배물질(DGM1)은 제2 수용 공간(136)에 위치할 수 있다. 일 예로, 생물학적 시료(S)가 유입되기 전에 제2 수용 공간(136)에 미리 제1 밀도구배물질(DGM1)이 배치될 수 있다. 이 후, 유입구를 통해서 생물학적 시료(S)가 제1 수용 공간(135)으로 유입될 수 있다. 이 후 원심분리에 의해 생물학적 시료(S)와 제1 밀도구배물질(DGM1)이 섞인 후 생물학적 시료(S) 및 제1 밀도구배물질(DGM1)은 다수개의 층을 형성할 수 있다.
- [0068] 여기서, 제1 밀도구배물질(DGM: density gradient medium)은 밀도 구배를 이용하여 유체로부터 표적 세포(T)을 분리하기 위한 것이다. 제1 밀도구배물질(DGM1)은 제1 분리 물질(D11, D12) 중 일부에 비해서는 밀도가 높다. 제1 밀도구배물질(DGM1)은 제1 분리 물질(D11, D12) 중 다른 일부보다 밀도가 낮다.
- [0069] 일 예로, 제1 분리 물질(D11, D12)이 적혈구(D12) 또는 혈장(D11)을 포함하는 경우, 제1 밀도구배물질(DGM1)은 적혈구(D12)보다는 밀도가 낮고 혈장(D11)보다는 밀도가 큰 물질로 제공될 수 있다. 제1 밀도구배물질(DGM1)은 백혈구 또는 혈중 종양 세포(CTC: circulating tumor cell)보다는 밀도가 큰 물질로 제공될 수 있다.
- [0070] 일 예로, 제1 밀도구배물질(DGM1)은 피콜(Ficoll) 또는 퍼콜(Percoll)로 제공될 수 있다. 이와는 달리, 제1 밀도구배물질(DGM1)은 공지의 다른 물질로 제공될 수 있으며 상술한 물질로 제한되지 않는다.
- [0071] 샘플 챔버(13)는 생물학적 시료(S)와 제1 밀도구배물질(DGM1)이 포함되어, 생물학적 시료(S) 내에 특정 물질을 분리할 수 있다. 일 예로, 샘플 챔버(13)는 시료(S) 내에 제1 분리 물질(D11, D12)을 분리할 수 있다. 일 예로, 샘플 챔버(13) 내부에서는 원심분리 방법 및 제1 밀도구배물질(DGM1)을 이용하여 시료(S) 내의 제1 분리 물질(D11, D12)과 다른 물질을 서로 다른 층으로 위치하도록 할 수 있다. 서로 다른 층으로 분리된 제1 분리 물질(D11, D12)은 샘플 챔버(13)와 보관 챔버(15) 사이에 위치한 채널(19)을 개방시켜 보관 챔버(15)로 이동될 수 있다.
- [0072] 구체적으로, 생물학적 시료(S)가 혈액으로 제공되는 경우, 샘플 챔버(13)는 제1 밀도구배물질(DGM1)에 의해 적혈구(D12)와 혈장(D11)을 분리할 수 있다. 적혈구(D12)는 제1 밀도구배물질(DGM1)보다 밀도가 높아 최외층에 위치할 수 있다. 혈장(D11)은 제1 밀도구배물질(DGM1) 및 백혈구나 혈중 종양 세포(CTC: circulating tumor



cell)보다는 밀도가 가벼워 최내층에 위치할 수 있다.

- [0073] 최내층에 혈장(D11)은 후술하는 보관 챔버(15)로 대부분 이동하여 분리될 수 있다. 최외층에 적혈구(D12)는 백혈구 및 혈중 종양 세포(CTC: circulating tumor cell)가 반응 챔버(14)로 이동 시 샘플 챔버(13)에 남게 되어 분리될 수 있다.
- [0074] 샘플 챔버(13)는 채널(19)을 통해서 보관 챔버(15) 및 반응 챔버(14)와 연결될 수 있다. 채널(19)을 통해서, 챔버들 내부에 시료(S) 또는 유체가 이동될 수 있다.
- [0075] 샘플 챔버(13)는 미세 유동 장치(10)의 중심에 인접하게 위치할 수 있다. 샘플 챔버(13)는 복수개가 제공될 수 있다.
- [0076] 보관 챔버(15)는 샘플 챔버(13)에서 분리된 제1 분리 물질(D11, D12)이 수용될 수 있다. 일 예로, 샘플 챔버(13)에서 원심 분리 후 제1 분리 물질(D11, D12)은 채널(19)을 통해서 보관 챔버(15)로 이동될 수 있다. 일 예로, 시료(S)가 혈액으로 제공되는 경우, 혈장(D11)은 보관 챔버(15)로 이동될 수 있다.
- [0077] 보관 챔버(15)는 미세 유동 장치(10)의 중심에서 샘플 챔버(13)보다 더 멀리 위치 할 수 있다. 보관 챔버(15)는 복수개가 제공될 수 있다. 보관 챔버(15)는 채널(19)을 통해서 샘플 챔버(13)와 연결될 수 있다. 채널(19)을 통해서 시료(S) 또는 챔버들 내부의 시료(S) 또는 유체가 이동될 수 있다.
- [0078] 반응 챔버(14)는 샘플 챔버(13)에 제1 분리 물질(D11, D12)이 분리된 시료(S)가 이동되어 수용될 수 있다. 일 예로, 제2 분리 물질(D2)은 시료(S)가 혈액으로 제공되는 경우 백혈구로 제공될 수 있다.
- [0079] 반응 챔버(14)는 샘플 챔버(13)와 인접하게 위치할 수 있다. 반응 챔버(14)는 샘플 챔버(13)보다 미세 유동 장치(10)의 중심에 더 멀리 위치 할 수 있다. 반응 챔버(14)는 복수개가 제공될 수 있다.
- [0080] 반응 챔버(14)는 채널(19)을 통해서 샘플 챔버(13) 및 분리 챔버(16)와 연결될 수 있다. 채널(19)을 통해서, 챔버들 내부에 시료(S) 또는 유체가 이동될 수 있다.
- [0081] 반응 챔버(14)의 일면은 곡면으로 제공될 수 있다. 반응 챔버(14)의 일면이 곡면으로 제공되어, 유체의 이동을 원활하게 할 수 있다.
- [0082] 반응 챔버(14)는 결합 물질(B)이 제공될 수 있다. 일 예로 결합 물질(B)은 시료(S) 내의 제2 분리 물질(D2)과 결합될 수 있다. 결합 물질(B)은 제2 분리 물질(D2)과 결합될 수 있으며, 밀도구배가 큰 물질로 제공될 수 있다.
- [0083] 결합 물질(B)은 백혈구가 결합될 수 있으며, 밀도가 큰 공지의 마이크로비드로 제공될 수 있다. 또는, 백혈구와 결합될 수 있으며 밀도가 큰 물질이라면 제한없이 적용 가능하다.
- [0084] 분리 챔버(16)는 표적 세포(T)와 시료(S)의 나머지 물질이 분리 될 수 있다.
- [0085] 여기서 표적 세포(T)는 혈중 종양 세포(CTC: circulating tumor cell), 암 줄기 세포(cancer stem cell) 또는 암 세포 (cancer cell)일 수 있다. 표적 세포(T)는 예를 들어, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 담관암종, 대장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 신장암, 간암, 폐암, 비인두암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 전립선암, 갑상선암, 골육종, 횡문근육종, 활막육종, 카포시육종, 평활근육종, 악성 섬유성 조직구종, 섬유육종, 성인 T세포 백혈병, 림프종, 다발 골수종, 신경교아세포종/성상세포종, 흑색종, 중피종 및 윌름스 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암 또는 종양 세포일 수 있다.
- [0086] 시료(S)는 표적 세포(T)가 존재할 수 있는 한 어떠한 생물학적 시료(S)라도 무방하다. 예를 들면, 생물학적 시료(S)는 생검시료, 조직시료, 분리된 세포를 액체 매질에 현탁시킨 세포 현탁물, 세포 배양물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 시료(S)는 혈액, 골수액, 타액, 눈액, 뇨, 정액, 점막액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 예를 들어, 혈중 종양 세포를 분리하기 위해, 혈액을 시료(S)로써 사용할 수 있다.
- [0087] 분리 챔버(16)에는 제2 밀도구배물질(DGM2)이 위치할 수 있다. 제2 밀도구배물질(DGM2)은 제2 분리 물질(D2) 및 결합 물질(B)과 함께 후술하는 분리 챔버(16)로 이동할 수 있다.
- [0088] 제2 밀도구배물질(DGM2)은 결합 물질(B) 및 제2 분리 물질(D2)보다 밀도가 낮고 표적 세포(T)보다 밀도가 높을 수 있다. 일 예로, 생물학적 시료(S)가 혈액으로 제공되는 경우, 제2 밀도구배물질(DGM2)은 백혈구 및 백혈구와 결합되는 마이크로비드보다 밀도가 낮고, 혈중 종양 세포(CTC: circulating tumor cell)보다 밀도가 높을 수 있다.

다.

- [0089] 일 예로, 제2 밀도구배물질(DGM2)은 피콜(Ficoll) 또는 퍼콜(Percoll)로 제공될 수 있다. 이와는 달리, 제2 밀도구배물질(DGM2)은 공지의 다른 물질로 제공될 수 있으며 상술한 물질로 제한되지 않는다.
- [0090] 분리 챔버(16)는 생물학적 시료(S)와 제2 밀도구배물질(DGM2)이 포함되어, 생물학적 시료(S) 내에 특정 물질을 분리할 수 있다. 일 예로, 분리 챔버(16)는 시료(S) 내에 결합 물질(B)과 결합된 제2 분리 물질(D2)을 분리할 수 있다. 일 예로, 분리 챔버(16) 내부에서는 원심분리 방법 및 제2 밀도구배물질(DGM2)을 이용하여 시료(S) 내의 결합 물질(B)과 결합된 제2 분리 물질(D2)과 다른 물질을 서로 다른 층으로 위치하도록 할 수 있다.
- [0091] 여기서, 시료(S) 내의 제2 분리 물질(D2)이 다른 층으로 분리되면, 시료(S) 내에는 표적 세포(T)만이 남게 된다. 분리 챔버(16)에서 분리된 표적 세포(T)는 이후 채널(19)을 통해서 후술하는 표적 챔버(17)로 이동하게 된다.
- [0092] 분리 챔버(16)는 채널(19)을 통하여 반응 챔버(14) 및 표적 챔버(17)와 연결될 수 있다. 채널(19)을 통해서, 챔버들 내부에 시료(S) 또는 유체가 이동될 수 있다.
- [0093] 표적 챔버(17)는 시료(S) 내에서 제1 분리 물질(D11, D12) 및 결합 물질(B)과 결합된 제2 분리 물질(D2)이 분리되고 난 후 표적 세포(T)가 포함된 시료(S)가 이동 되어 수용될 수 있다. 일 예로, 시료(S)가 혈액을 제공되는 경우, 제1 분리 물질(D11, D12)인 적혈구(D12) 또는 혈장(D11)과 제2 분리 물질(D2)인 백혈구가 분리되어, 시료(S) 내의 표적 세포(T)인 암세포만이 표적 챔버(17)에 남게 된다.
- [0094] 표적 챔버(17)는 분리 챔버(16)와 인접하게 위치할 수 있다. 표적 챔버(17)는 분리 챔버(16)보다 미세 유동 장치(10)의 중심에 더 멀리 위치 할 수 있다. 표적 챔버(17)는 복수개가 제공될 수 있다.
- [0095] 상술한 본 발명의 미세 유동 장치(10)를 통해서 시료(S) 내의 표적 세포(T)를 분리 시 다른 물질을 제1 및 제2 밀도구배물질(DGM1, DGM2) 및 결합 물질(B)을 통해서 분리할 수 있다. 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 표적 세포(T)의 별도의 물질이 부착하지 않고 분리하여, 표적 세포(T)의 손상을 최소화 할 수 있다. 또한, 표적 세포(T)가 아닌 시료(S) 내의 다른 물질을 분리하고 난 뒤에 남은 물질인 표적 세포(T)를 분리하는 방법을 사용하여, 표적 세포(T)가 손상되지 않으며, 가능한 많은 양의 표적 세포(T)를 분리할 수 있다. 이를 통해서, 표적 세포(T)의 세포학적 관찰이 용이하고 변형이 적은 세포를 얻을 수 있다. 본 발명에서는 암세포 분리만을 한정하는 것은 아니고, 혈액 내의 특정 백혈구 분리 등 다양한 시료에서 특정 입자를 분리 가능함을 명시한다.
- [0096] 상술한 각각의 챔버들, 즉 샘플 챔버(13), 보관 챔버(15), 반응 챔버(14), 분리 챔버(16) 및 표적 챔버(17)는 채널(19)로 연결되고, 밸브(18)로 유체가 제어될 수 있다.
- [0097] 여기서, 밸브(18)는 미세 유동 밸브(18)가 채용될 수 있다. 밸브(18)는 외부로부터 에너지를 전달받아 개방되기 전까지는 유체가 흐를 수 없도록 채널(19)을 폐쇄하는 폐쇄된 밸브(18)(normally closedvalve)이다.
- [0098] 폐쇄된 밸브(18)는 상온에서 고체 상태인 밸브(18) 물질을 포함할 수 있다. 밸브(18)물질은 고화된 상태로 채널(19)에 존재함으로써 채널(19)을 차단한다. 밸브(18)물질은 고온에서 용융되어 채널(19) 내의 공간으로 이동하며, 채널(19)을 개방한 채로 다시 응고된다. 외부에서 조사되는 에너지는 예를 들면 전자기파일 수 있으며, 에너지원은 레이저 빔을 조사하는 레이저 광원이거나, 가시광선 또는 적외선을 조사하는 발광소자(light emittingdiode) 또는 제논램프(Xenon)일 수 있다. 레이저 광원인 경우 적어도 하나의 레이저 다이오드(laser diode)를 포함할 수 있다.
- [0099] 외부 에너지원은 밸브(18) 물질에 포함된 발열 입자가 흡수할 수 있는 전자기파의 파장에 따라 선택될 수 있다. 밸브(18) 물질로서는 COC(cyclic olefin copolymer), PMMA(polymethylmethacrylate), PC(polycarbonate), PS(polystyrene), POM(polyoxymethylene), PFA(perfluoroalkoxy), PVC(polyvinylchloride), PP(polypropylene), PET(polyethylene terephthalate), PEEK(polyetheretherketone), PA(polyamide), PSU(polysulfone), 및 PVDF(polyvinylidene fluoride) 등의 열가소성 수지가 채용될 수 있다. 또, 밸브(18) 물질로서, 상온에서 고체 상태인 상전이 물질이 채용될 수 있다.
- [0100] 상전이 물질은 왁스(wax)일 수 있다. 왁스는 가열되면 용융하여 액체 상태로 변하며, 부피 팽창한다. 왁스로는, 예컨대 파라핀 왁스(paraffin wax), 마이크로크리스탈린 왁스(microcrystalline wax), 합성 왁스(synthetic wax), 또는 천연 왁스(natural wax) 등이 채용될 수 있다. 상전이 물질은 겔(gel) 또는 열가소성 수지일 수도 있다.

- [0101] 겔로는, 폴리아크릴아미드(polyacrylamide), 폴리아크릴레이트(polyacrylates), 폴리메타크릴레이트(polymethacrylates), 또는 폴리비닐아미드(polyvinylamides) 등이 채용될 수 있다. 밸브(18) 물질에는 전자기파 에너지를 흡수하여 발열하는 다수의 미세 발열입자가 분산될 수 있다. 미세 발열입자는 대략 0.1 mm 깊이와 1 mm 폭을 갖는 미세한 채널(19)(C)을 자유롭게 통과할 수 있게 1 nm 내지 100  $\mu$ m 의 직경을 가질 수 있다. 미세 발열입자는 예컨대 레이저광 등에 의하여 전자기파 에너지가 공급되면 온도가 급격히 상승하여 발열하는 성질을 가지며, 왁스에 고르게 분산되는 성질을 갖는다. 이러한 성질을 갖도록 미세 발열입자는 금속 성분을 포함하는 코어(core)와, 소수성(疏水性) 표면 구조를 가질 수 있다. 예컨대, 미세 발열입자는 철(Fe)로 이루어진 코어와, 철(Fe)에 결합되어 철(Fe)을 감싸는 복수의 계면활성성분(surfactant)을 구비한 분자구조를 가질 수 있다.
- [0102] 미세 발열입자들은 캐리어 오일(carrier oil)에 분산된 상태로 보관될 수 있다. 소수성 표면구조를 갖는 미세 발열입자가 고르게 분산될 수 있도록 캐리어 오일도 소수성일 수 있다. 용융된 상전이 물질에 미세 발열입자들이 분산된 캐리어 오일을 부어 혼합하고, 이 혼합물질을 채널(19)(C)에 주입하고 응고시킴으로써 채널(19)(C)을 막을 수 있다.
- [0103] 미세 발열입자는 위에서 예로 든 중합체(polymer) 입자에 한정되는 것은 아니며, 퀀텀 도트(quantum dot) 또는 자성비드(magnetic bead)의 형태도 가능하다. 또한, 미세 발열입자는 예컨대,  $Al_2O_3$ ,  $TiO_2$ ,  $Ta_2O_3$ ,  $Fe_2O_3$ ,  $Fe_3O_4$  또는,  $HfO_2$  와 같은 미세 금속 산화물일 수 있다. 한편, 폐쇄된 밸브(18)는 미세 발열입자를 반드시 포함하여야 하는 것은 아니며, 미세 발열입자 없이 상전이 물질만으로 이루어질 수도 있다.
- [0104] 이하, 본 발명의 일 실시 예에 따른 표적 세포 분리 방법을 설명한다.
- [0105] 도 5는 본 발명의 일 실시 예에 따른 표적 세포 분리 방법을 보여주는 플로우 차트이고, 도 6 내지 도 13은 본 발명의 일 실시 예에 따른 표적 세포 분리 방법을 순차적으로 보여주는 도면이다.
- [0106] 이하, 도 5 내지 도 13을 참고하면, 표적 세포 분리 방법은 준비 단계(S10), 제1 분리 단계(S20), 결합 단계(S30), 제2 분리 단계(S40), 표적 세포 분리 단계(S50)를 포함한다.
- [0107] 준비단계는 생물학적 시료(S)를 준비하는 단계이다. 일 예로, 준비 단계(S10)가 미세 유동 장치(10)에서 수행되는 경우, 샘플 챔버(13)에 시료(S)를 제공할 수 있다. 또한, 샘플 챔버(13)에 제1 밀도구배물질(DGM1)을 제공할 수 있다.
- [0108] 도 6 및 도 7을 참고하면, 샘플 챔버(13)에 시료(S)를 제공하기 전에, 미리 샘플 챔버(13)에 제1 밀도구배물질(DGM1)을 제공할 수 있다. 이 후, 준비된 시료(S)를 샘플 챔버(13)에 공급할 수 있다.
- [0109] 일 예로, 제1 밀도구배물질(DGM1)은 샘플 챔버(13) 내의 제2 수용 공간(136)에 제공될 수 있다. 최초 유입되는 시료(S)는 제1 수용 공간(135)으로 유입될 수 있다.
- [0110] 상술한 바와 같이 생물학적 시료(S)는 표적 세포(T)가 존재하는 한 어떠한 시료(S)라도 무방하다. 일 예로, 시료(S)는 혈액일 수 있다. 또한, 표적 세포(T)는 혈액 내 존재하는 혈중 종양 세포, 암 줄기 세포 또는 암세포일 수 있다.
- [0111] 제1 분리 단계(S20)는 준비된 시료(S)에서 제1 분리 물질(D11, D12)을 분리할 수 있다. 여기서 제1 분리 물질(D11, D12)은 표적 세포(T)와 상이한 물질일 수 있다. 일 예로, 제1 분리 물질(D11, D12) 중 일부는 제1 밀도구배물질(DGM1)보다 밀도구배가 가벼운 물질일 수 있다. 일 예로, 제1 분리 물질(D11, D12) 중 다른 일부는 제1 밀도구배물질(DGM1)보다 밀도구배가 무거운 물질일 수 있다. 일 예로, 제1 분리 물질(D11, D12)은 혈장(D11) 또는 적혈구(D12) 일 수 있다. 혈장(D11)은 제1 밀도구배물질(DGM1)보다 밀도구배가 가벼울 수 있다. 이와는 달리, 적혈구(D12)는 제1 밀도구배물질(DGM1)보다 밀도구배가 무거울 수 있다.
- [0112] 제1 분리 단계(S20)에서는 밀도구배물질(DGM)과 원심분리 방법을 이용하여 제1 분리 물질(D11, D12)을 분리할 수 있다.
- [0113] 도 6 내지 도 9을 참고하면, 시료(S)를 제1 밀도구배물질(DGM1)이 있는 샘플 챔버(13)에 넣는 경우, 밀도구배물질(DGM)을 중심으로 시료(S)가 분리될 수 있다. 즉, 밀도구배물질(DGM)을 중심으로 밀도가 낮은 제1 분리 물질(D11, D12) 중 일부는 밀도구배물질(DGM)의 최내층에 위치하며, 제1 분리 물질 중 밀도가 높은 나머지 시료들은 밀도구배물질(DGM)의 최외층에 위치할 수 있다.
- [0114] 시료(S)가 혈액으로 제공되는 경우, 제1 밀도구배물질(DGM)의 최내층에는 혈장(D11)이 위치할 수 있다. 제1 밀

도구배물질(DGM1)과 혈장(D11) 사이에는 백혈구 또는 혈중 종양 세포가 위치할 수 있다. 적혈구(D12)는 제1 밀도구배물질(DGM1)보다 외층에 위치할 수 있다. 이후 혈장(D11)은 보관 챔버(15)로 이동하여 분리되며, 적혈구(D12)는 백혈구 및 혈중 종양 세포가 반응 챔버(14)로 이동 시 이동하지 않고 샘플 챔버(13)에 남아 있게 되어 분리 할 수 있다.

- [0115] 이 후, 샘플 챔버(13)와 보관 챔버(15)을 연결하는 채널(19)의 밸브(18)를 개방하여 샘플 챔버(13)에서 층으로 분리된 제1 분리 물질(D11)을 보관 챔버(15)로 이동시켜 분리 할 수 있다.
- [0116] 결합 단계(S30)에서는 시료(S) 내의 제2 분리 물질(D2)을 분리하기 위해 결합 물질(B)과 시료(S)를 반응시키는 단계이다. 결합 단계(S30)에서는 시료(S) 내의 제2 분리 물질(D2)과 결합 물질(B)이 결합될 수 있다. 일 예로, 제2 분리 물질(D2)은 백혈구로 제공될 수 있으며, 결합 물질(B)은 마이크로 비드로 제공될 수 있다.
- [0117] 일 예로, 결합 단계(S30)가 미세 유동 장치(10)의 반응 챔버(14)에서 수행되는 경우, 샘플 챔버(13)에서 제1 분리 물질(D11, D12)이 분리된 후 남은 시료(S)는 채널(19)을 통해서 반응 챔버(14)로 이동할 수 있다. 반응 챔버(14)로 이동된 시료(S)의 제2 분리 물질(D2)이 결합 물질(B)과 결합될 수 있다.
- [0118] 결합 반응 이후 유체는 반응 챔버(14)에서 분리 챔버(16)로 이동할 수 있다. 분리 챔버(16)에는 시료(S)의 표적 세포(T), 제2 밀도구배물질(DGM2) 그리고 제2 분리 물질(D2)과 결합된 결합 물질(B)이 남아 있다.
- [0119] 제2 분리 단계(S40)에서는 시료(S) 내에서 표적 세포(T)와 나머지 물질을 분리할 수 있다. 일 예로, 결합 물질(B)이 결합된 제2 분리 물질(D2)과 표적 세포(T)를 분리할 수 있다.
- [0120] 이 후, 분리 챔버(16)는 원심 분리 방법 및 시료(S) 내의 제2 밀도구배물질(DGM)을 이용하여 표적 세포(T)와 다른 물질을 서로 다른 층으로 위치시킬 수 있다.
- [0121] 일 예로, 시료(S)가 혈액으로 제공되는 경우, 제2 밀도구배물질(DGM2)의 하부에는 마이크로비드와 결합된 백혈구층이 위치할 수 있다. 제2 밀도구배물질(DGM2)의 내층에는 혈중 종양 세포가 위치할 수 있다. 혈중 종양 세포는 이후 표적 챔버(17)로 이동하여 최종 분리할 수 있다.
- [0122] 분리 챔버(16)에서 제2 분리 물질(D2)을 분리시킴으로서 시료(S) 내의 남은 물질은 표적 세포(T)만이 남게 될 수 있다. 일 예로, 시료(S)가 혈액으로 제공되는 경우, 적혈구, 혈장 그리고 백혈구를 분리하여 혈액 내에는 혈중 종양 세포, 암 줄기 세포 또는 암세포만이 남게 되어 표적 세포(T)를 분리할 수 있다.
- [0123] 표적 세포 분리 단계(S50)는 분리 단계에서 분리된 시료(S) 내에서 표적 세포(T)만을 분리할 수 있다.
- [0124] 일 예로, 도 13과 같이, 표적 세포 분리 단계(S50)가 미세 유동 장치(10)의 표적 챔버(17)에서 수행되는 경우, 분리 챔버(16)에서 분리된 표적 세포(T)가 표적 챔버(17)로 이동한다. 표적 세포(T)와 분리 챔버(16)를 연결하는 채널(19)의 밸브(18)를 개방하여 표적 세포(T)가 포함된 시료(S)를 표적 챔버(17)로 이동시킬 수 있다.
- [0125] 표적 챔버(17) 내의 시료(S)에서 표적 세포(T)를 추출할 수 있다.
- [0126] 상술한 바와 같이, 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 생물학적 시료(S) 내의 표적 세포(T)를 효과적으로 분리할 수 있다. 일 예로, 본 발명은 일 실시 예에 의하면, 혈중 암세포 포획을 원활히 할 수 있다.
- [0127] 또한, 본 발명은 일 실시 예에 따르면, 생물학적 표적 세포(T)를 최대한으로 획득할 수 있어, 표적 세포(T) 분리 효율을 향상시킬 수 있다. 일 예로, 본 발명은 일 실시 예에 의하면, 혈중 암세포를 최대한으로 획득할 수 있다.
- [0128] 또한, 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 생물학적 시료(S) 내의 표적 세포(T)를 분리 시 다른 물질이 붙어 있지 않아 표적 세포(T)의 변형 및 스트레스가 없으며, 세포 형태학적 관찰이 용이하다. 일 예로, 본 발명은 일 실시 예에 의하면, 혈중 암세포의 검출 시 비드가 붙지 않아 암세포의 변형 및 스트레스가 없으며, 세포 형태학적 관찰이 용이하다.
- [0129] 또한, 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 생물학적 시료(S) 내의 표적 세포(T)가 암세포인 경우, 암세포 배양에 영향이 주지 않도록 혈중 암세포를 분리 할 수 있다.
- [0130] 또한, 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 생물학적 시료(S) 내의 표적 세포(T) 분리 시 Negative depletion 방식의 자동화 방식을 사용하여 표적 세포(T) 분리 효율을 향상시킬 수 있다.
- [0131] 이상의 상세한 설명은 본 발명을 예시하는 것이다. 또한 전술한 내용은 본 발명의 바람직한 실시 형태를 나타내어 설명하는 것이며, 본 발명은 다양한 다른 조합, 변경 및 환경에서 사용할 수 있다. 즉 본 명세서에 개시된

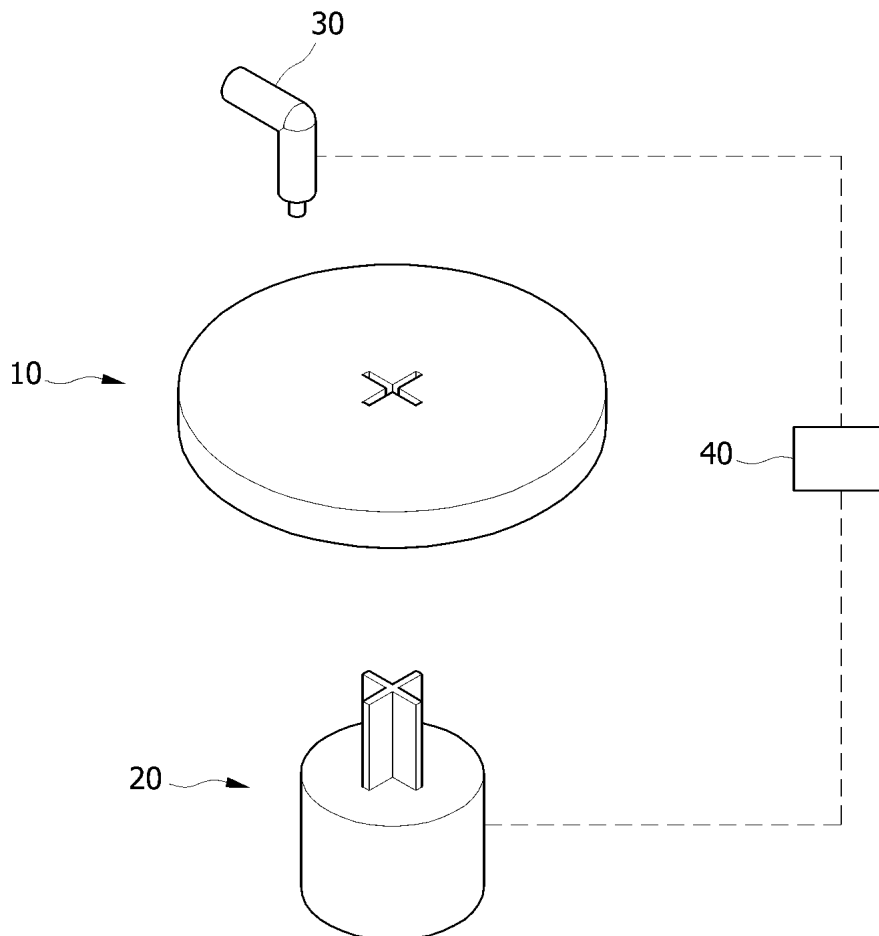
발명의 개념의 범위, 저술한 개시 내용과 균등한 범위 및/또는 당업계의 기술 또는 지식의 범위내에서 변경 또는 수정이 가능하다. 전술한 실시예는 본 발명의 기술적 사상을 구현하기 위한 최선의 상태를 설명하는 것이며, 본 발명의 구체적인 적용 분야 및 용도에서 요구되는 다양한 변경도 가능하다. 따라서 이상의 발명의 상세한 설명은 개시된 실시 상태로 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다. 또한 첨부된 청구범위는 다른 실시 상태도 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

**부호의 설명**

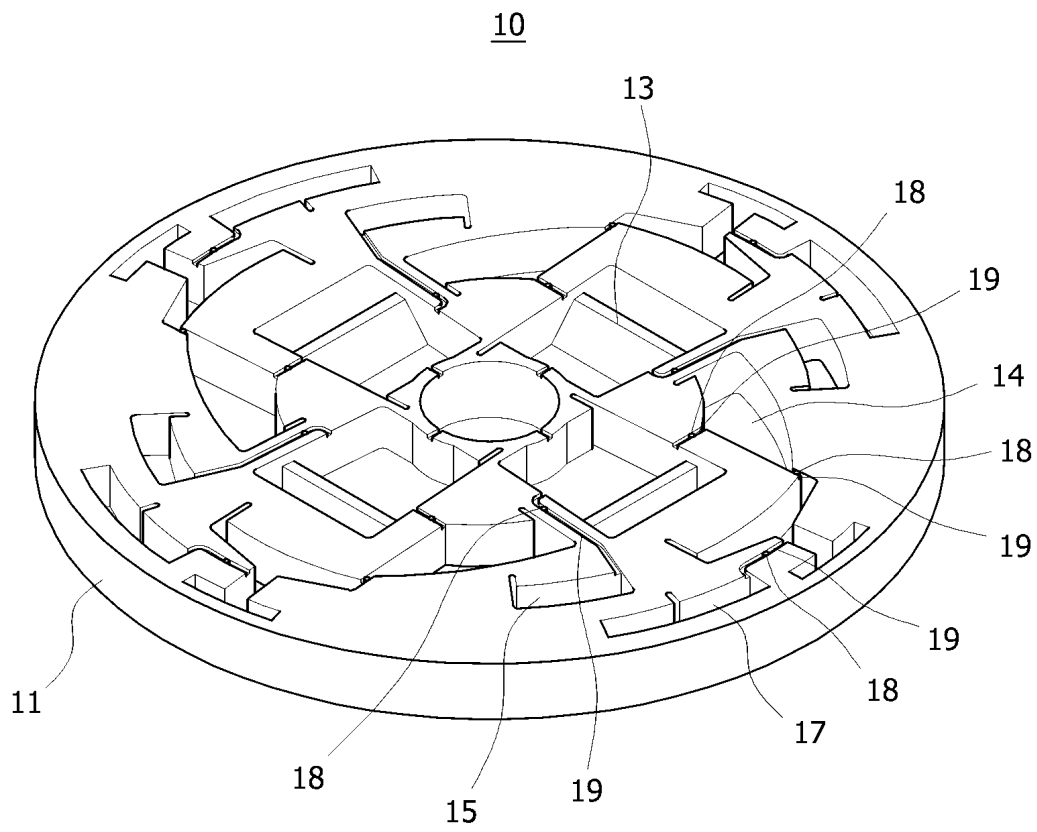
- [0132]
- |              |              |
|--------------|--------------|
| 1: 미세 유동 시스템 | 10: 미세 유동 장치 |
| 11: 몸체       | 13: 샘플 챔버    |
| 14: 반응 챔버    | 15: 보관 챔버    |
| 16: 분리 챔버    | 17: 표적 챔버    |
| 18: 밸브       | 19: 채널       |
| 20: 회전 구동부   | 30: 전자기파 발생부 |
| 40: 제어부      |              |

**도면**

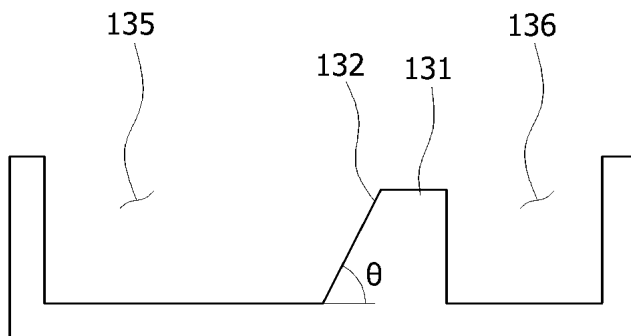
**도면1**



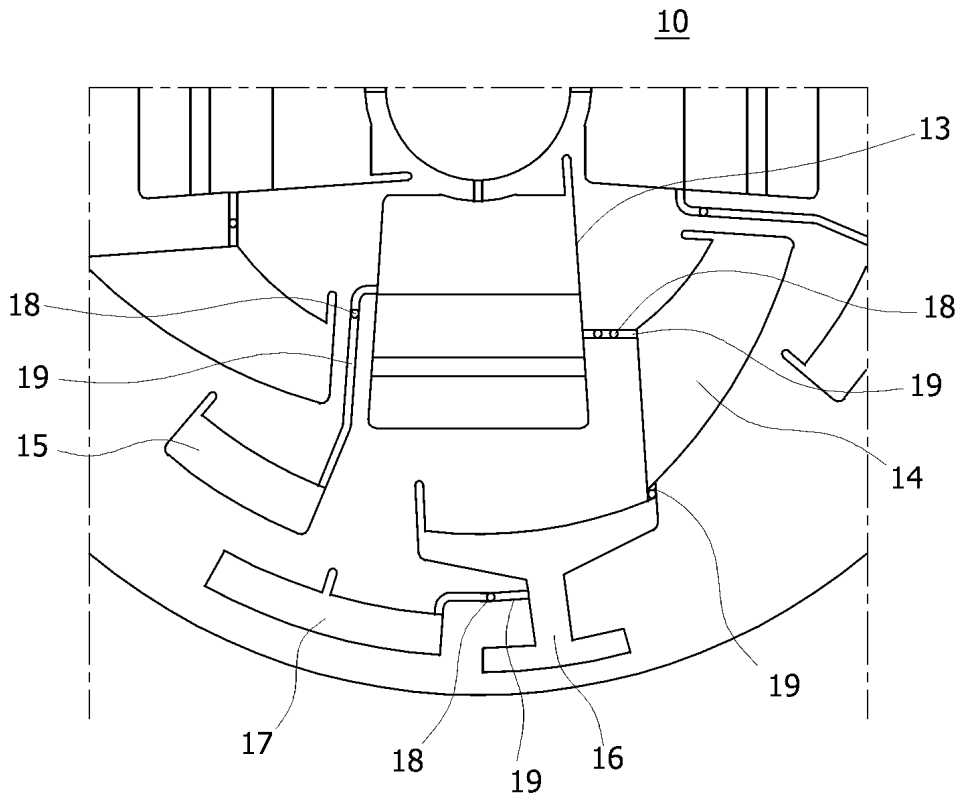
도면2



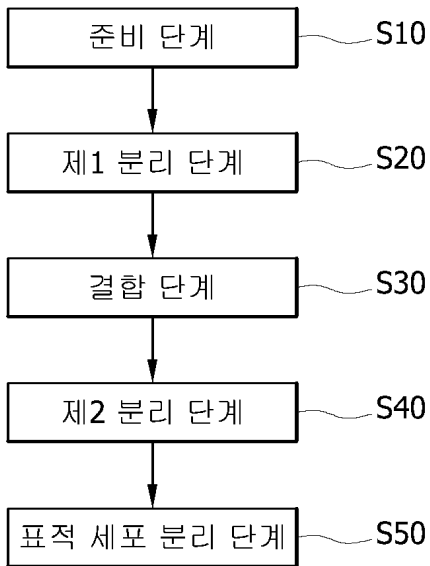
도면3



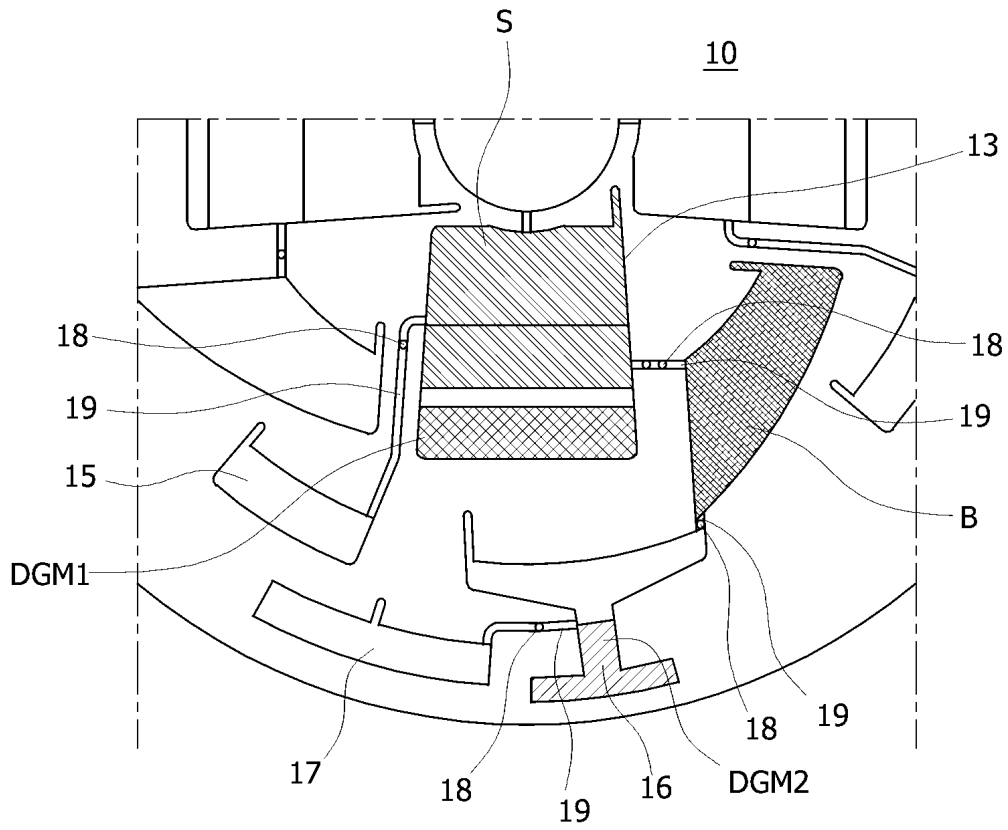
도면4



도면5

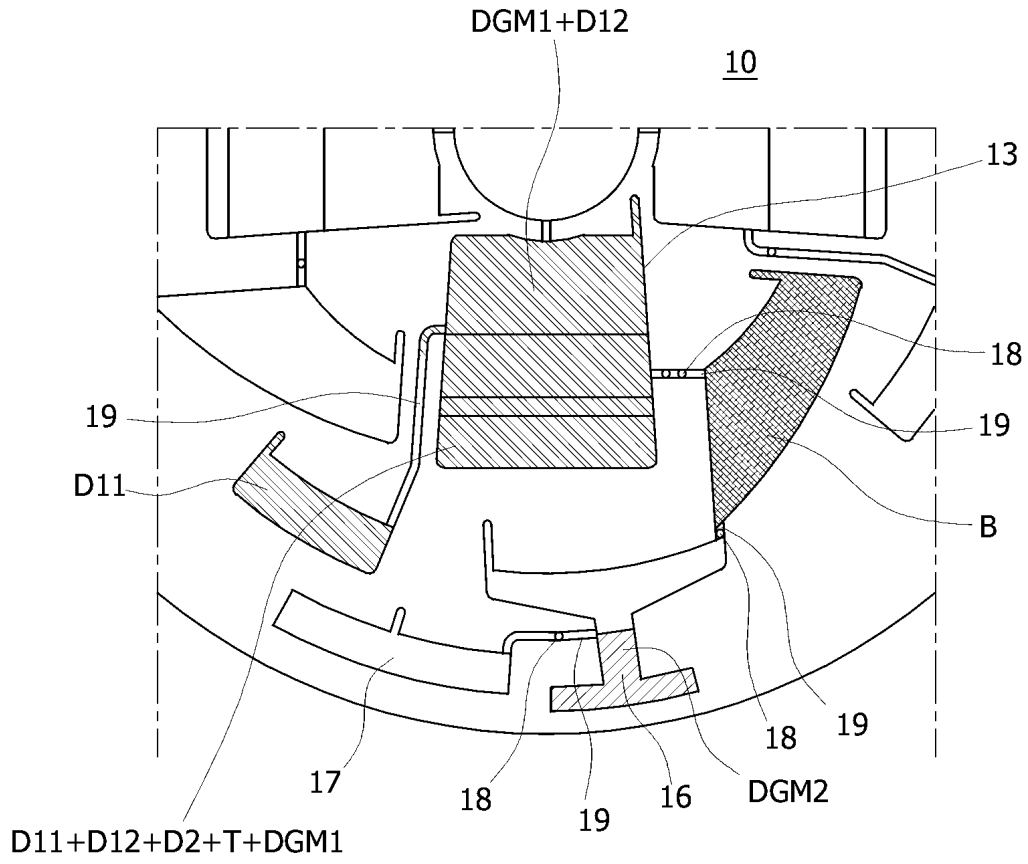


도면6

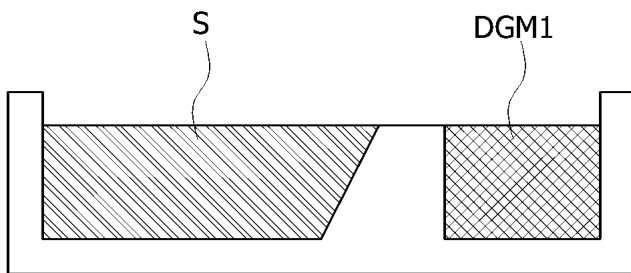




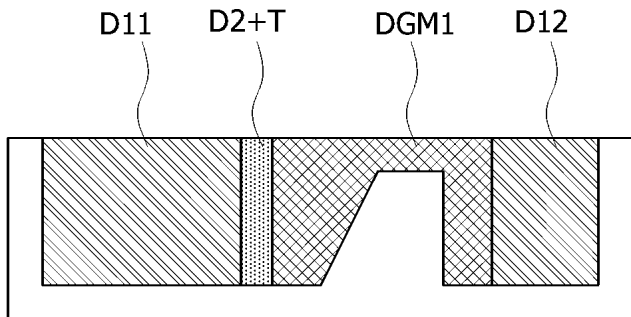
도면7



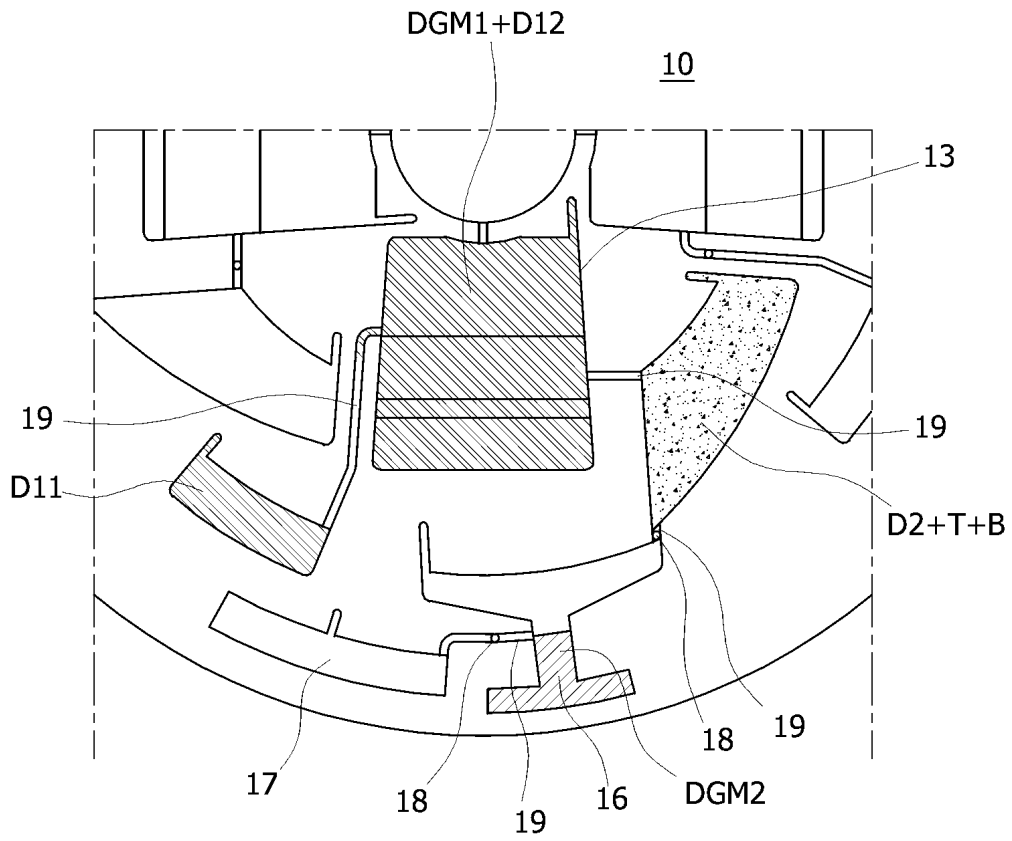
도면8



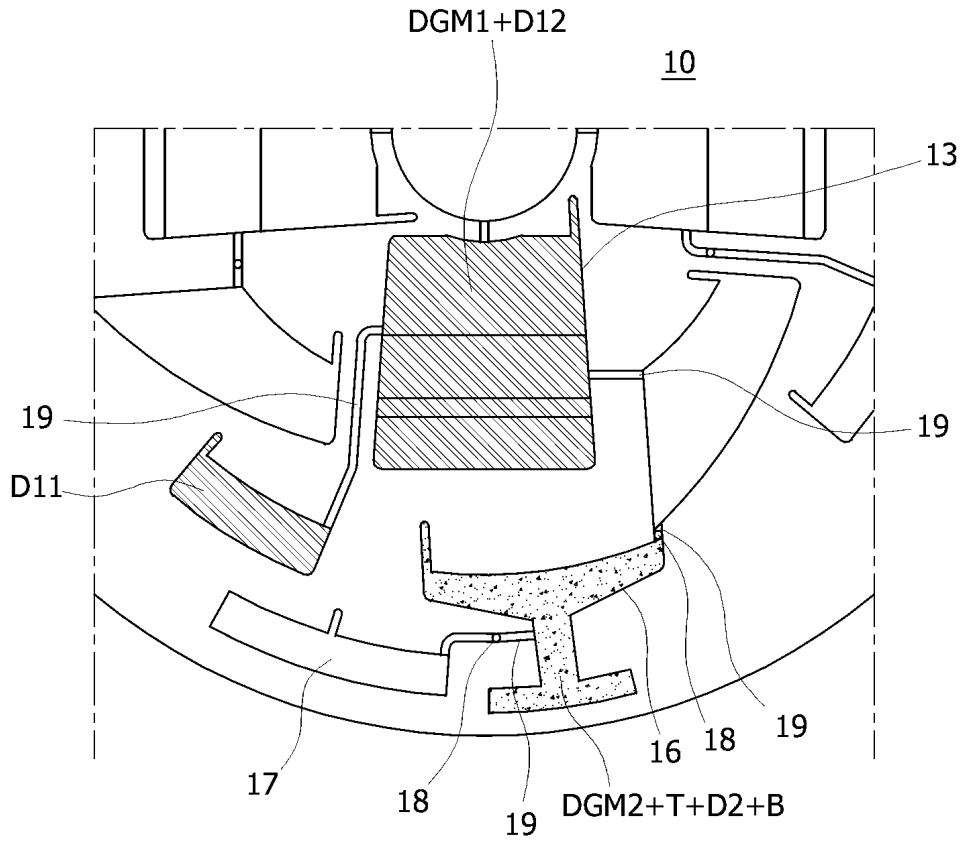
도면9



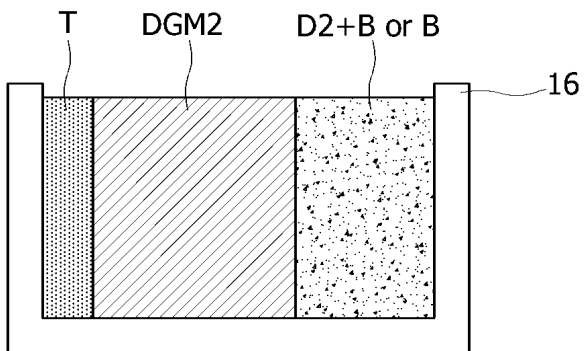
도면10



도면11



도면12



도면13

