(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0046348
(43) 공개일자 2022년04월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/502784 (2013.01)
B01L 3/502715 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0129659
(22) 출원일자 2020년10월07일
심사청구일자 2020년11월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정아람
서울특별시 용산구 이촌로88길 15 4-105
주병주
서울특별시성북구 고려대로12길 4, 501호 (안암동2가)
이하성
서울특별시 강동구 고덕로 333, 130동 804호 (고덕동, 고덕그라시움)
(74) 대리인
최훈식

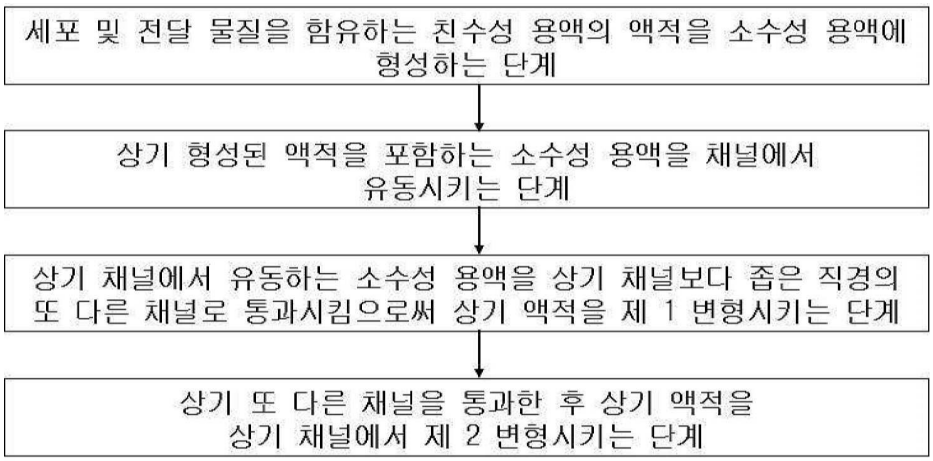
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **액적 변형에 기반한 세포내 물질 전달방법 및 이를 위한 칩**

(57) 요 약

세포내 물질 전달방법으로, 세포 및 전달 물질을 함유하는 친수성 용액의 액적을 소수성 용액에 형성하는 단계; 상기 형성된 액적을 포함하는 소수성 용액을 채널에서 유동시키는 단계; 상기 채널에서 유동하는 소수성 용액을 상기 채널보다 좁은 직경의 또 다른 채널로 통과시킴으로써 상기 액적을 제 1 변형시키는 단계; 및 상기 또 다른 채널을 통과한 후 상기 액적을 상기 채널에서 제 2 변형시키는 단계를 포함하며, 상기 제 1 변형하는 단계 및 제 2 변형하는 단계에서 상기 세포는 상기 채널 벽과 직접 접촉하지 않는 것을 특징으로 하는 세포내 물질 전달방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
B01L 2200/026 (2013.01)
B01L 2200/0647 (2013.01)
B01L 2400/0487 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포내 물질 전달방법으로,

세포 및 전달 물질을 함유하는 친수성 용액의 액적을 소수성 용액에 형성하는 단계;

상기 형성된 액적을 포함하는 소수성 용액을 채널에서 유동시키는 단계;

상기 채널에서 유동하는 소수성 용액을 상기 채널보다 좁은 직경의 또 다른 채널로 통과시킴으로써 상기 액적을 제 1 변형시키는 단계; 및

상기 또 다른 채널을 통과한 후 상기 액적을 상기 채널에서 제 2 변형시키는 단계를 포함하며,

상기 제 1 변형하는 단계 및 제 2 변형하는 단계에서 상기 세포는 상기 채널 벽과 직접 접촉하지 않는 것을 특징으로 하는 세포내 물질 전달방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 제 1 변형시키는 단계에서, 상기 액적은 압축(squeezing)되며 이때 상기 액적 내의 세포의 세포막에 나노포어가 형성되는 것을 특징으로 하는 세포내 물질 전달방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 제 2 변형시키는 단계에서, 상기 액적은 상기 제 1 변형시키는 단계 전의 형태로 회복되며, 이때 상기 제 1 변형시키는 단계에서 형성된 세포막의 포어를 통하여 상기 전달물질이 상기 세포 내로 전달되는 것을 특징으로 하는 세포내 물질 전달방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 제 2 변형시키는 단계에서 상기 액적 내에서는 확산 및 대류가 발생하며, 이로써 상기 액적 내의 전달물질의 세포 내 전달 효율을 증가하는 것을 특징으로 하는 세포내 물질 전달방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항에 있어서,

상기 액적은 상기 또 다른 채널을 적어도 1회 이상 통과하는 것을 특징으로 하는 세포내 물질 전달방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 세포 및 전달 물질을 함유하는 친수성 용액의 액적을 소수성 용액에 형성하는 단계는, 제 1 방향으로 유동하는 상기 친수성 용액에 제 2 방향으로 상기 소수성 용액을 유동시켜 상기 친수송 용액과 소수성 용액을 접촉시킴으로써 상기 액적이 형성되는 것을 특징으로 하는 세포내 물질 전달방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 세포내 물질 전달방법은,

상기 액적이 형성된 소수성 용액에, 또 다른 소수성 용액을 유동시킴으로써 상기 액적이 형성된 소수성 용액을

가속시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세포내 물질 전달방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 전달물질은 핵산, 단백질, 전사인자, 벡터, 플라스미드, 유전자 가위 물질 및 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 세포내 물질 전달방법.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 따른 세포내 물질 전달방법을 구현하기 위한 미세유체 칩.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 미세유체 칩은,

상기 제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 따른 세포내 물질 전달방법을 구현하기 위한 채널이 복수 개 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 채널은 병렬적으로 구성된 것을 특징으로 하는 위한 미세유체 칩.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 액적 변형에 기반한 세포내 물질 전달방법 및 이를 위한 칩에 관한 것으로, 보다 상세하게는 소수성 액적 내에 세포를 포함하는 친수성 용액이 포함된 미세액적(microdroplet)을 이용하여 세포 내 물질 전달을 구현하여 효율과 경제성 등을 향상시킨 액적 변형에 기반한 세포내 물질 전달방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포 내 물질 전달은 세포공학의 가장 기본이 되는 실험 중 하나로 보통 캐리어를 이용하거나 세포막/핵막에 나노구멍(nanopore)을 만들어 물질을 전달한다. 바이러스 또는 Lipofectamine 중심의 캐리어 기법들은 최적화 시 고효율 물질 전달이 가능하나 안전성, 느린 전달 속도, 노동/비용 집약적인 캐리어 준비 과정, 낮은 재현성 등의 문제점들이 존재한다.

[0003] 이에 반하여 세포막에 에너지를 가하여 나노구멍을 만드는 방법들(예: 전기천공(Electroporation) 또는 마이크로니들(microneedle))은 상대적으로 여러 물질을 다양한 세포주로 전달이 가능한 장점이 있다. 그러나 방법의 침습성으로 인한 낮은 세포 생존율, 전달 물질의 변성 그리고 낮은 처리량은 큰 한계로 지적되고 있다. 이러한 문제점들을 해결하고자 대량의 세포처리가 가능한 미세유체기기(microfluidic device)들의 사용이 두드러진다. 대표적으로 미세관에 병목 구간(narrow constriction or bottleneck)을 만들고 세포들이 병목 구간을 지날 때 세포의 물리적 변형을 통해 세포막에 나노구멍을 만드는 플랫폼이 존재한다. 그러나, 이 접근법은 실험 진행 시 병목 구간 자체가 막히고, 일정하지 못한 물질 전달 효율 등의 큰 단점들을 가진다.

[0004] 예를 들어 미국 특허 2014-0287509호(이하 종래기술)는 병목 구조를 갖는 채널로 세포를 직접 흘림으로서 세포에 압력을 인가하여 세포변형율 유도하는 기술을 개시하고 있다. 하지만, 이 경우, 세포가 병목구조를 막게 되는 문제가 있고, 세포가 직접 채널 벽과 접촉함으로써 마찰 등으로 인한 스트레스를 받아 세포 생존율이 떨어지고 채널 막힘(clogging)이 발생하는 문제가 있다. 또한 불균일한 속도로 세포들 때문에 세포 변형이 일정하지 못한 이유로 물질 전달 효율이 불균일한 점과 확산(diffusion) 현상으로만 전달이 되기에 물질 전달 효율이 근본적으로 낮다는 문제가 있다. 따라서 상기 미체유체 기기의 높은 처리 기능을 살리면서 세포 내에 다양한 물질을 균일하게 고효율로 전달할 수 있는 혁신적인 차세대 세포 내 물질 전달 플랫폼 개발이 시급하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 미세액적을 이용한 물질 전달 방식으로 전달 효율과 시스템 안정성을 크게 향상시킨 방법과 시스템을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 세포내 물질 전달방법으로, 세포 및 전달 물질을 함유하는 친수성 용액의 액적을 소수성 용액에 형성하는 단계; 상기 형성된 액적을 포함하는 소수성 용액을 채널에서 유동시키는 단계; 상기 채널에서 유동하는 소수성 용액을 상기 채널보다 좁은 직경의 또 다른 채널로 통과시킴으로써 상기 액적을 제 1 변형시키는 단계; 및 상기 또 다른 채널을 통과한 후 상기 액적을 상기 채널에서 제 2 변형시키는 단계를 포함하며, 상기 제 1 변형하는 단계 및 제 2 변형하는 단계에서 상기 세포는 상기 채널 벽과 직접 접촉하지 않는 것을 특징으로 하는 세포내 물질 전달방법을 제공한다.

[0007] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 제 1 변형시키는 단계에서, 상기 액적은 압축(squeezing)되며 이때 상기 액적 내의 세포의 세포막에 나노포어가 형성된다.

[0008] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 제 2 변형시키는 단계에서, 상기 액적은 상기 제 1 변형시키는 단계 전의 형태로 회복되며, 이때 상기 제 1 변형시키는 단계에서 형성된 세포막의 포어를 통하여 상기 전달물질이 상기 세포 내로 전달된다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 제 2 변형시키는 단계에서 상기 액적 내에서는 확산 및 대류가 발생하며, 이로써 상기 액적 내의 전달물질의 세포 내 전달 효율을 증가한다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 액적은 상기 또 다른 채널을 적어도 1회 이상 통과하며, 상기 세포 및 전달 물질을 함유하는 친수성 용액의 액적을 소수성 용액에 형성하는 단계는, 제 1 방향으로 유동하는 상기 친수성 용액에 제 2 방향으로 상기 소수성 용액을 유동시켜 상기 친수송 용액과 소수성 용액을 접촉시킴으로써 상기 액적이 형성된다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 세포내 물질 전달방법은, 상기 액적이 형성된 소수성 용액에, 또 다른 소수성 용액을 유동시킴으로써 상기 액적이 형성된 소수성 용액을 가속시키는 단계를 더 포함한다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 전달물질은 핵산, 단백질, 전사인자, 벡터, 플라스미드, 유전자 가위 물질 및 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 어느 하나 이상이다.

[0013] 본 발명은 또한 상술한 세포내 물질 전달방법을 구현하기 위한 미세유체 칩을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 미세유체 칩은, 상술한 세포내 물질 전달방법을 구현하기 위한 채널이 복수 개 포함하며, 상기 채널은 병렬적으로 구성된다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 소수성 액적 내에 세포를 포함하는 친수성 용액이 포함된 미세액적(microdroplet)을 이용하여 세포내 물질 전달을 구현한다. 이 경우 미세액적 속 세포들이 일정한 속도로 흐르는 상태에서 세포가 병목 구조를 통과하여 변형됨으로 균일하면서도 고효율의 세포 내 물질 전달이 가능하고, 세포 표면이 미세관 벽면과 직접 닿는 것을 원천적으로 막아 종래 기술의 채널 막힘 현상을 원천적으로 피할 수 있고, 세포와 채널벽간 마찰 등으로 인한 스트레스를 감소시킬 수 있다. 더 나아가, 확산 현상만으로 물질이 전달되는 종래 방식에 비하여 본 발명은 세포 원형으로의 회복하는 경우 일어나는 미세액적 내의 이차 유동(secondary flow)과, 세포막을 사이에 둔 확산과 대류(convection)를 통한 유체 맞교환으로 외부 물질이 전달될 수 있어 높은 전달 효율을 확보하고 또 세포 내로 물질 전달되는 물질 사용량을 미세 액적화함으로서 경제성을 확보할 수 있고, 전달되는 물질의 양 또한 액적 부피를 통하여 제어할 수 있다는 장점이 있다.

[0016] 따라서, 본 발명에 따른 세포내 물질 전달 방법과 시스템은, 세포 공학과 관련된 모든 연구 분야 및 산업에 적용되어 높은 효율과 고처리량 그리고 저렴하면서도 간편한 방식으로 세포 내 물질전달을 구현할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포내 물질 전달방법의 단계도이다.

도 2 내지 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포내 물질 전달 방법과 시스템의 모식도이다.

도 6은 도 2 내지 5에 따른 세포내 물질전달 방법의 모식도 및 각 단계별 채널 사진이다.

도 7은 종래 기술과 본 발명간 실험 케이스마다 동일 시간 경과 후 세포 위치를 찍은 사진이다.

도 8은 종래 기술과 본 발명간 미세관 막힘 실험결과이다.

도 9 좌측과 우측은 각각 본 발명과 종래기술에 따른 세포내 물질전달 효율을 비교한 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 연속하여 제 1 변형과 제 2 변형이 반복하는 채널의 사진이다.

도 11은 미세액적 내 세포 포획화, 병목 구간에서의 변형 그리고 FITC-Dextran 전달 결과이다.

도 12는 Dextran의 사이즈별 FITC 형광 세기 측정 결과이다.

도 13은 세포주 종류에 따른 생존율과 전달효율을 비교한 결과이다.

도 14는 병목 채널 구조, 개수와 유속에 따른 전달 효율을 비교한 실험 결과이다.

도 15는 K562 세포를 가지고 mRNA 전달에 따른 GFP 발현에 대한 실험결과이다.

도 16은 본 발명(DS) 및 현장에서 가장 많이 쓰이는 전기천공법(electroporation; Neon Transfection System, EP) 그리고 Lipofectamine(LP)과의 mRNA 전달 효율 비교 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하 본 발명에 따른 액적 압축을 이용한 세포 내 물질 전달 플랫폼을 첨부된 도면을 참조하여 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상 지식을 가진 이가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 같으며 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략함. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0019] 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위하여 세포 및 전달 물질을 함유하는 친수성 용액의 액적을 기름과 같은 소수성 용액에 형성하고, 액적을 직경이 좁아지는 채널 구간을 통과시켜 세포 내로 물질을 전달한다. 이로써 세포 원형으로의 회복 시 미세액적 내의 이차 유동과 세포막을 사이에 둔 유체 맞교환을 통해 확산과 대류로 외부 물질이 전달될 수 있다.

[0020] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포내 물질 전달방법의 단계도이다.

[0021] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포내 물질 전달방법은 세포 및 전달 물질을 함유하는 친수성 용액의 액적을 소수성 용액에 형성하는 단계; 상기 형성된 액적을 포함하는 소수성 용액을 채널에서 유동시키는 단계; 상기 채널에서 유동하는 소수성 용액을 상기 채널보다 좁은 직경의 또 다른 채널로 통과시킴으로써 상기 액적을 제 1 변형시키는 단계; 및 상기 또 다른 채널을 통과한 후 상기 액적을 상기 채널에서 제 2 변형시키는 단계를 포함하며, 상기 제 1 변형하는 단계 및 제 2 변형하는 단계에서 상기 세포는 상기 채널 벽과 직접 접촉하지 않는다.

[0022] 따라서, 본 발명은 세포 표면이 채널(미세관) 벽면과 직접 닿는 것을 원천적으로 막아 종래 기술의 채널 막힘 현상을 근본적으로 피할 수 있고, 세포-벽간 마찰 등으로 인한 스트레스를 감소시킬 수 있는 장점이 있다.

[0023] 도 2 내지 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포내 물질 전달 방법과 시스템의 모식도이다.

[0024] 도 2를 참조하면, 본 발명에 따른 세포내 물질 전달방법은, 세포 내로 전달되어야 하는 물질인 전달물질(20)과 세포(10)를 포함하는 친수성 용액(예를 들어 수용액, 100)을 채널(300)내로 제 1 방향으로 흘린다.

[0025] 도 3을 참조하면, 이후 상기 기름과 같은 소수성 용액(200)을 제 2 방향으로 상기 친수성 용액(100)에 빠른 속도로 흘리며 이로써 친수성 용액(100)은 소수성 용액(200)과 충돌하여 소수성 용액(200) 내에서 친수성 용액(세포 및 전달물질 함유)의 액적(D)이 형성되어 채널(100) 내로 흐르게 된다 (flow-focusing 방식). 이 경우, 본 발명은 전달물질을 전체 유체로 흘리는 종래 기술과 달리, 유속 증가에 따른 추가적인 전달 물질의 사용이 불필요하므로 외부 전달 물질 사용량을 현저하게 줄일 수 있는 장점이 있다.

[0026] 필요한 경우 초기 속도(v1)보다 더 빠른 속도(v2)로 소수성 용액을 상기 친수성 액적을 포함하는 소수성 용액에 또 다시 주입하고 흘림으로써 액적(D)이 충분한 유속으로 가속시킬 수 있다.

[0027] 도 4를 참조하면, 액적은 채널(100) 중앙에서 일정한 속도로 상기 채널(100)보다 직경이 좁은 또 다른 채널(110)을 액적(D)이 통과하게 되며, 이로써 상기 액적(D)은 제 1 변형된다.

[0028] 제 1 변형 단계에서, 상기 액적은 압축(squeezing)되며 이때 상기 액적 내의 세포의 세포막에는 포어(nanopore)가 형성되어 전달물질이 내부로 전달된다.

[0029] 본 발명은 세포를 좁아지는 병목 채널벽과 직접 접촉시키는 종래 기술과 달리, 기름과 같이 채널벽과 마찰계수가 낮은 소수성 용액을 통하여 액적 내에서 흘림으로써 세포가 채널벽과 직접 접촉하는 것을 방지하여 좁아지는 병목 채널에서의 막힘 방지, 세포와 채널벽간 접촉에 따른 스트레스를 감소시킨다.

[0030] 또한 종래 기술의 경우 세포들이 미세 채널 내에서 각기 다른 속도로 다가와 병목 구간을 지나면서 세포막이 열리게 되어 불균일한 외부 물질 전달 효율을 보이지만, 본 발명에서 세포는 액적 내에 캡슐화되어 있고 미세관 가운데에서 흘러 액적 속도와 동일한 일정 속도로 흐르게 되어 변형되므로 균일한 전달 효율을 보인다.

[0031] 도 5를 참조하면, 채널 직경이 좁은 상기 또 다른 채널(110)을 통과한 액적은 다시 채널(100)로 흐르며, 이때 상기 액적(D)과 세포(10)에는 제 2 변형이 일어나, 세포는 원래 크기로 회복된다.

[0032] 제 2 변형에 따라 미세액적 내의 이차 유동과 세포막을 사이에 둔 유체 맞교환을 통해 확산과 대류로 외부 물질이 전달되며, 그 결과 액적 형태로 농축된 전단물질과의 세포간 공간 등에 의하여 전달 효율이 크게 향상되는데, 이는 이하 보다 상세히 설명한다.

[0033] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서 상기 제 1 변형 및 제 2 변형은 적어도 2회 이상 진행될 수 있으며, 이를 위한 복수 개의 또 다른 채널이 하나의 채널 내에 구비될 수 있다(도 11 참조).

[0034] 도 6은 도 2 내지 5에 따른 세포내 물질전달 방법의 모식도 및 각 단계별 채널 사진이다.

[0035] 도 6을 참조하면, 미세유체 칩을 통하여 세포와 전달물질을 흘림으로써 별도의 전기천공 등과 같은 인위적 세포 침습 수단을 사용하지 않고서도 우수한 세포 내 물질 전달을 구현할 수 있다. 또한 오일과 같은 소수성 용액을 액적 형성 후 초기 주입속도(v1)더 빠른 속도(v2)로 주입하는 경우 원하는 속도로 액적을 가속시킬 수 있다. 본 발명에 따른 상기 방법은 미세채널이 형성되는 칩에서 구현될 수 있으며, 이 경우 별도의 미세요소(예를 들어 천공니들 등)가 필요없다는 장점이 있다.

[0036] 실험예

[0037] 유속 비교

[0038] 도 7은 종래 기술과 본 발명간 실험 케이스마다 동일 시간 경과 후 세포 위치를 찍은 사진이다.

[0039] 도 7을 참조하면, 종래 기술의 경우 유속이 각각 달라 세포 위치가 달라지는 것을 알 수 있으나, 본 발명은 일정하고 균일한 유속을 보이는 것을 알 수 있다. 이것은 액적 형태로 세포를 캡슐화하는 경우 미세한 유체 거동에도 불구하고 유속 변화는 사실상 크게 없다는 것을 의미하며, 이것은 결국 균일한 세포내 물질 전달 효율이라는 결과를 낳는다. 즉, 종래 기술의 경우 세포가 채널에 넓게 퍼져서 오기 때문에 불균일한 유속이 발생하지만, 본 발명에 따른 액적은 채널 중앙에서 생기며 그래서 액적이 매우 균일한 형태와 속도로 이동한다.

[0040] 미세관 막힘 비교

[0041] 도 8은 종래 기술과 본 발명간 미세관 막힘 실험결과이다.

[0042] 도 8을 참조하면, 세포와 채널벽을 직접 접촉시켜 병목채널을 통과시키는 종래 기술의 경우 세포막이 미세관 벽과 직접 접촉하게 되어 채널 막힘 현상이 발생한다. 하지만 본 발명은 미세액적의 이용을 통하여 세포가 벽면과 직접 접촉하지 않으므로 세포 막힘 현상을 극소화 시키는 장점이 존재하며, 이는 도 8의 결과로부터 알 수 있다.

[0043] 전달효율 및 생존율 비교

[0044] 도 9의 좌측과 우측은 각각 본 발명과 종래기술에 따른 세포내 물질전달 효율을 비교한 결과이다.

[0045] 도 9를 참조하면, 확산만으로 세포 내 물질이 일어나는 종래기술에 대비하여 본 발명은 확산과 대류로 외부 물질이 전달되며 미세액적이 병목을 통과 후 생기는 추가적인 이차 유동으로 인하여 종래기술에 비하여 높은 효율

을 보인다.

[0046] 특히 본 발명에 따른 세포내 물질 전달방법은 같은 양에 대해서 효율이 좋으며, 같은 농도에서는 훨씬 효율이 좋아진다. 이것은 좁은 액적 내에서 전달 물질과 세포를 가둔 상태에서 2단계의 변형을 좁은 액적에서 발생시키기 때문에 세포와 전달 물질간 확산, 대류에 의한 교환 가능성이 보다 높아지기 때문이다.

[0047] 다양한 면역 세포주에 대한 전달 효율 실험

[0048] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 연속하여 제 1 변형과 제 2 변형이 반복하는 채널의 사진이다.

[0049] 도 10을 참조하면, 하나의 채널에 연속적으로 직경이 좁아지는 병목 채널을 구성하여 세포내 물질전달 효율을 증가시킬 수 있다.

[0050] 도 11은 미세액적 내 세포 포획화, 병목 구간에서의 변형 그리고 FITC-Dextran 전달 결과이다.

[0051] 도 12는 Dextran의 사이즈별 FITC 형광 신호 측정 결과이고, 도 13은 세포주 종류에 따른 생존율과 전달효율을 비교한 결과이다.

[0052] 도 12 및 13을 참조하면, 생존율은 80% 이상이고, 전달효율은 99%에 이르는 것을 알 수 있다.

[0053] 채널 구조 및 유속에 따른 전달 효율 비교

[0054] 도 14는 병목 채널 구조, 개수와 유속에 따른 전달 효율을 비교한 실험 결과이다.

[0055] 도 14를 참조하면, 유속이 일정 수준 이상으로 증가함에 따라 세포내 물질 전달 효율을 증가하나 세포 원형으로 복귀하지 못하여 나중에는 더 이상 증가하지 않고 생존율도 낮아지는 것을 알 수 있다. 또한 병목 채널 구간의 직경이 작을 수록 전달효율이 증가하나 생존율은 감소하는 것을 알 수 있다. 병목 구간의 개수가 증가함에 따라 전달효율이 증가하나 역시 생존율 또한 감소함을 알 수 있다.

[0058] K562 세포 대상 실험

[0059] 도 15는 K562 세포를 가지고 mRNA 전달과 그에 따른 GFP 발현에 대한 실험결과이다.

[0060] 도 15를 참조하면, mRNA 전달양이 많을 수록 높은 효율을 보이기에 본 발명을 이용하는 경우 K562 세포에 대하여 mRNA 전달과 이에 따른 GFP 발현이 효과적으로 이루어지는 것을 알 수 있다.

[0061] 종래 전달방법과 비교

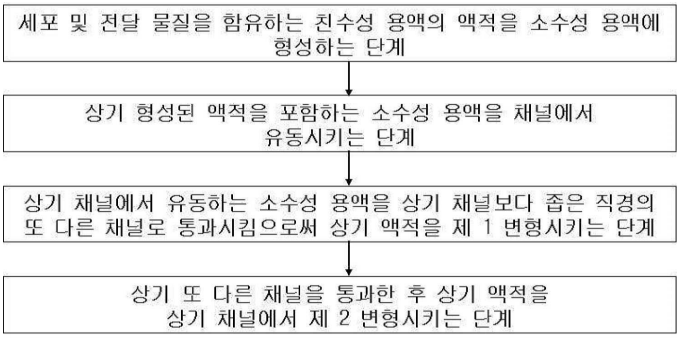
[0062] 도 16은 본 발명(DS) 및 현장에서 가장 많이 쓰이는 전기천공법(electroporation; Neon Transfection System, EP) 그리고 Lipofectamine(LP)과의 mRNA 전달 효율 비교 실험 결과이다.

[0063] 도 16을 참조하면, 본 발명의 경우 현저히 높은 발현효율을 보이는 것을 알 수 있다.

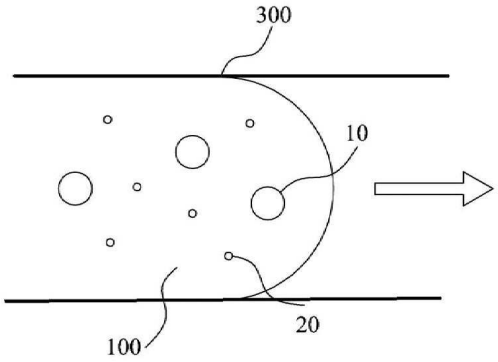
[0064] 본 발명에 따른 상기 전달방법을 구현하기 위한 방법은 미세유체 채널의 구조를 통하여 구현될 수 있으며, 이러한 미세유체채널을 구현된 칩 또한 본 발명의 범위에 속한다. 보다 높은 생산수율을 얻기 위하여 상술한 채널은 복수개로 상기 칩에 구성될 수 있으며, 이는 직렬 또는 병렬적으로 구성될 수 있으며, 이는 모두 본 발명의 범위에 속한다.

도면

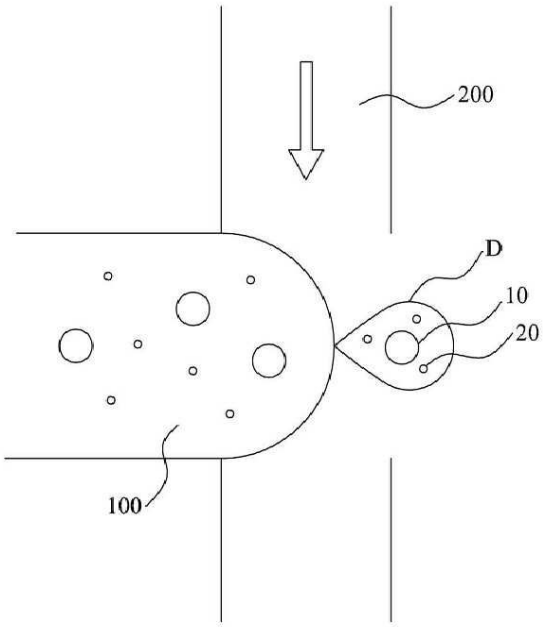
도면1


세포 및 전달 물질을 함유하는 친수성 용액의 액적을 소수성 용액에 형성하는 단계
상기 형성된 액적을 포함하는 소수성 용액을 채널에서 유동시키는 단계
상기 채널에서 유동하는 소수성 용액을 상기 채널보다 좁은 직경의 또 다른 채널로 통과시킴으로써 상기 액적을 제 1 변형시키는 단계
상기 또 다른 채널을 통과한 후 상기 액적을 상기 채널에서 제 2 변형시키는 단계

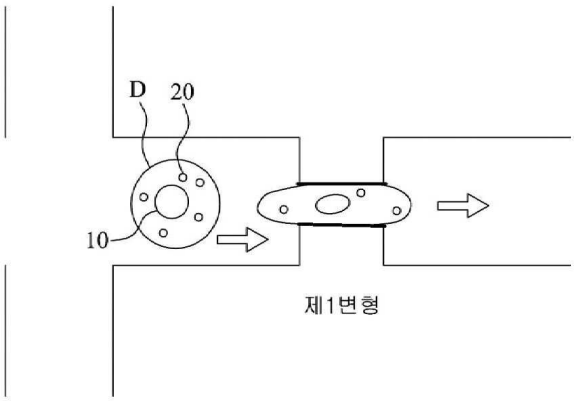
도면2


300
10
20
100

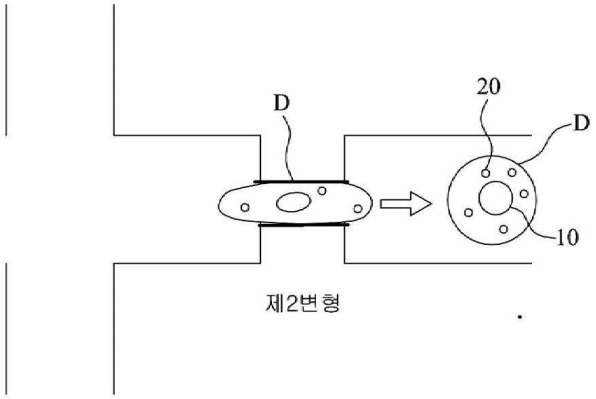
도면3



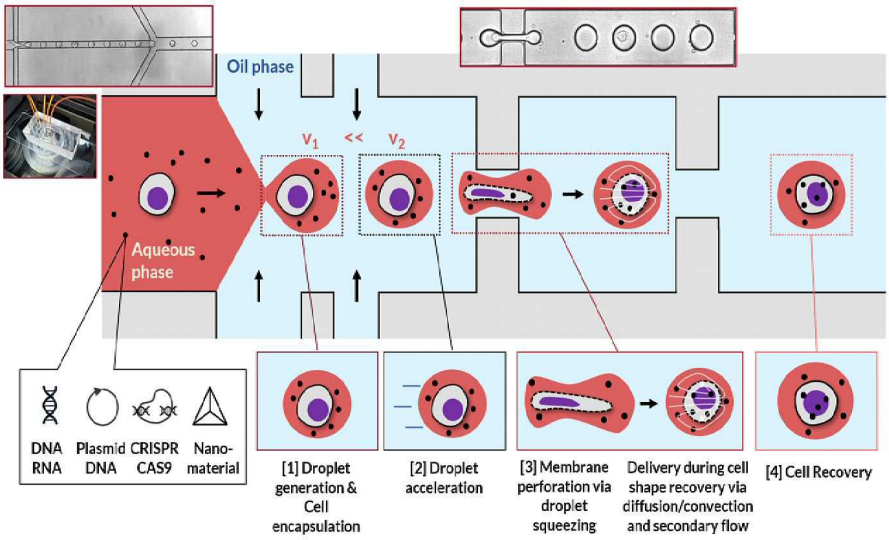
도면4



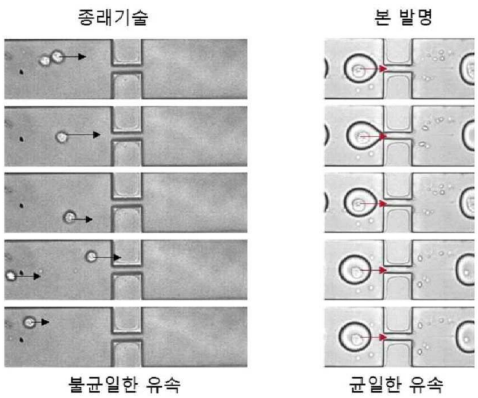
도면5


D
20
D
10
제2변형

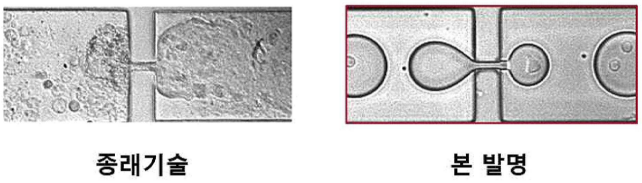
도면6


Oil phase
v1
<<
v2
Aqueous phase
DNA RNA
Plasmid DNA
CRISPR CAS9
Nano-material
[1] Droplet generation & Cell encapsulation
[2] Droplet acceleration
[3] Membrane perforation via droplet squeezing
Delivery during cell shape recovery via diffusion/convection and secondary flow
[4] Cell Recovery

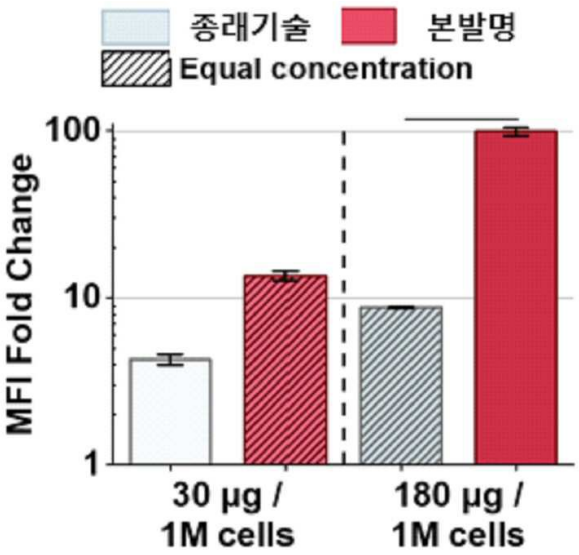
도면7


종래기술
본 발명
불균일한 유속
균일한 유속

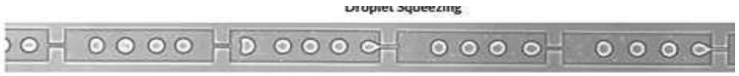
도면8



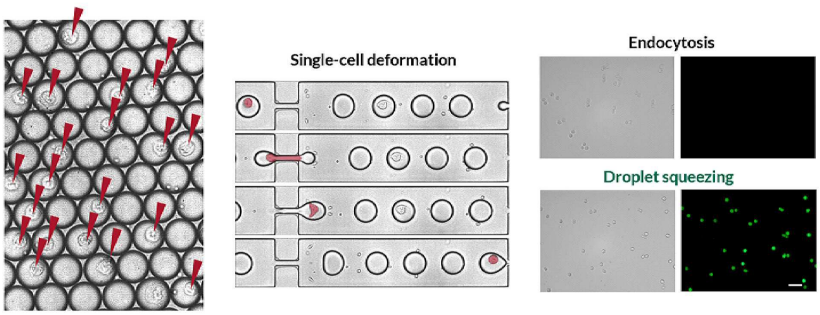
도면9



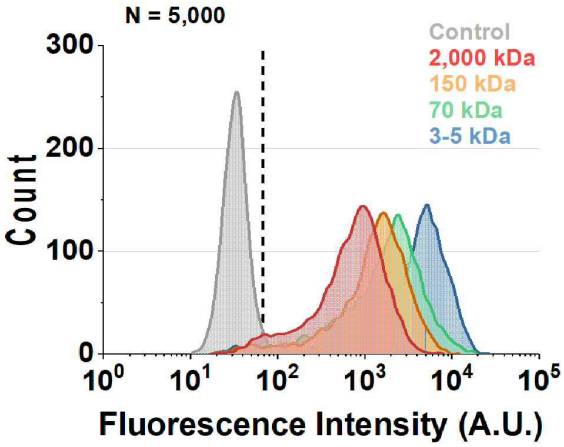
도면10



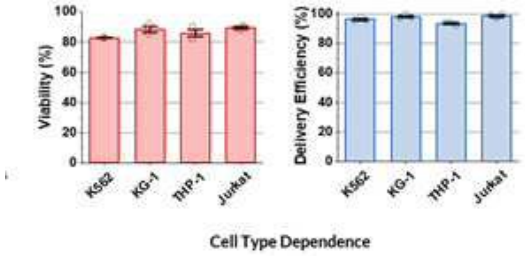
도면11



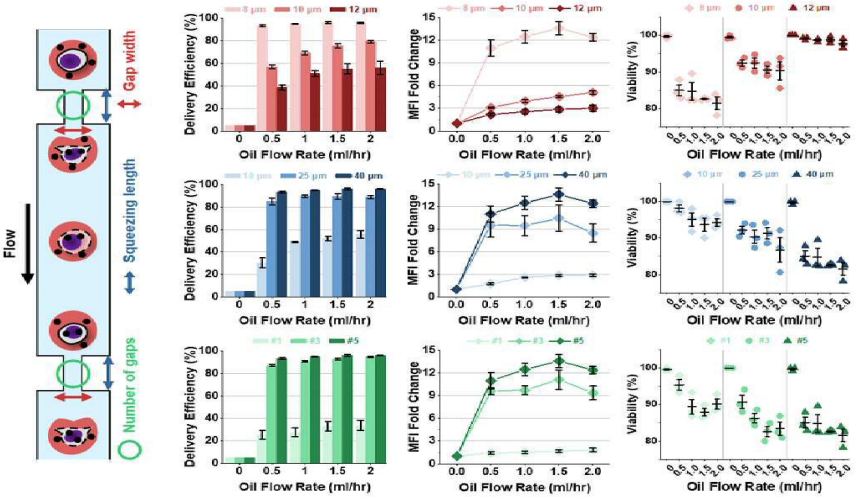
도면12



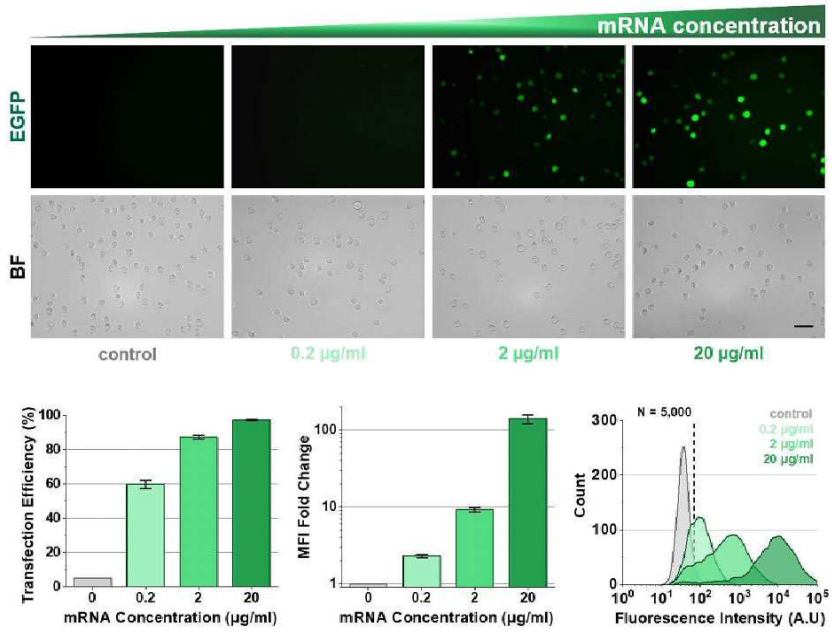
도면13



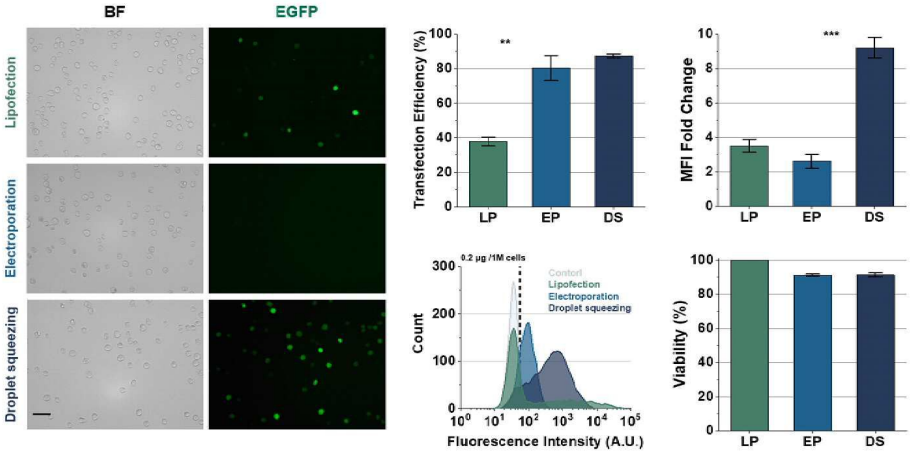
도면14



도면15


mRNA concentration
EGFP
BF
control
0.2 μg/ml
2 μg/ml
20 μg/ml
Transfection Efficiency (%)
mRNA Concentration (μg/ml)
MFI Fold Change
mRNA Concentration (μg/ml)
N = 5,000
control
0.2 μg/ml
2 μg/ml
20 μg/ml
Count
Fluorescence Intensity (A.U)

도면16


BF
EGFP
Lipofection
Electroporation
Droplet squeezing
Transfection Efficiency (%)
**
LP
EP
DS
MFI Fold Change
***
LP
EP
DS
0.2 μg /1M cells
Control
Lipofection
Electroporation
Droplet squeezing
Count
Fluorescence Intensity (A.U.)
Viability (%)
LP
EP
DS