



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0016620
(43) 공개일자 2022년02월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

B01L 3/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

B01L 3/502753 (2013.01)

B01L 2200/0652 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0096748

(22) 출원일자 2020년08월03일

심사청구일자 2020년08월03일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

임채승

경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 302동 804호
(평촌동, 꿈마을건영아파트)

남정훈

서울특별시 구로구 구로동로 148 (구로동)

(74) 대리인

특허법인 무한

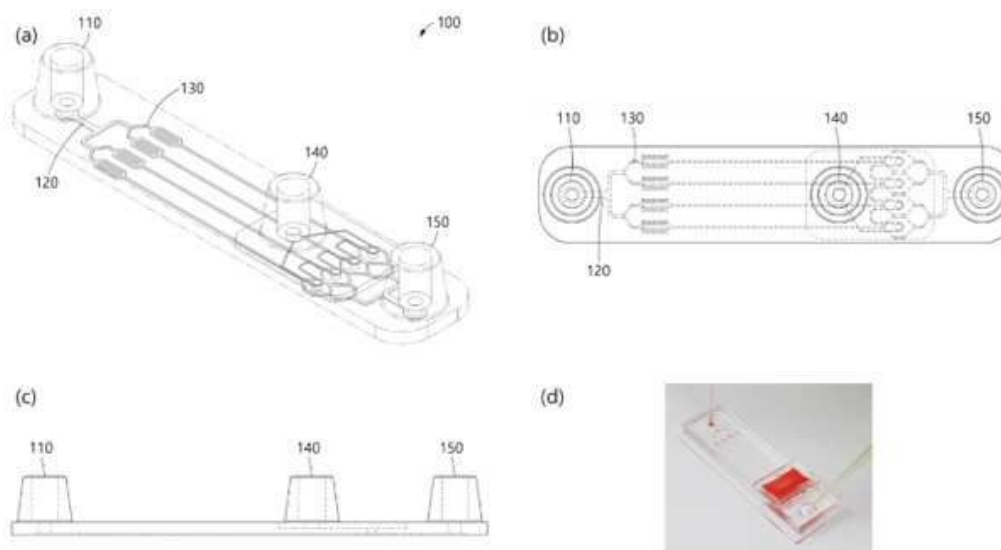
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **나노입자 분리소자 및 이를 이용한 나노입자 분리방법**

(57) 요약

본 발명은 미세유동채널을 포함하는 나노입자 분리소자로, 단일 주입구, 적어도 두 개의 출구, 주입 채널 및 복수의 병렬 채널부를 포함하고, 상기 병렬 채널부 채널의 높이 대 채널폭의 종횡비는 1초과 5이하인 것을 특징으로 하는, 나노입자 분리소자 및 이를 이용한 나노입자 분리방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B01L 2300/0848 (2013.01)

B01L 2300/0864 (2013.01)

B01L 2400/0475 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108599
과제번호	2020R1A2C101446011
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)(유형1-1)중견연구(연평균 연구비 1억원 이내)
연구과제명	액체 생검을 위한 혈중 나노 시료 전처리 및 고감도 센서 통합 분석시스템 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465031664
과제번호	HR20C0021
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성R&D
연구과제명	신종 감염병 초고속 정밀진단기술 개발 및 사업화
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교 구로병원
연구기간	2020.07.16 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

미세유동채널을 포함하는 나노입자 분리소자로,
단일 주입구, 적어도 두 개의 출구, 주입 채널 및 복수의 병렬 채널부를 포함하고,
상기 병렬 채널부의 높이 대 채널폭의 종횡비는, 1 초과 5 이하인 것을 특징으로 하는, 나노입자 분리소자.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 분리소자는 상기 종횡비를 갖는 상기 병렬 채널부 내부의 압력구배로 인하여 주입된 시료 중 나노입자를 분리하는 것을 특징으로 하는, 나노입자 분리소자.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 분리소자는, 상기 병렬 채널부의 채널내 폐색율이 0.1 이상인 입자를 채널 중앙으로 위치시키는, 나노입자 분리소자.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 출구는, 폐순환 시스템을 포함하는, 나노입자 분리소자.

청구항 5

제4항에 있어서,
상기 폐순환 시스템은, 병렬 채널부의 중앙에 집중된 세포를 튜빙펌프를 통해 재순환시키는 것인, 나노입자 분리소자.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 나노입자는, 직경이 $1\mu\text{m}$ 이하의 세포 유래의 나노입자인, 나노입자 분리소자.

청구항 7

제6항에 있어서,
상기 나노입자는, 혈소판 유래 미세입자((platelet-derived microparticle, PDMP) 인, 나노입자 분리소자.

청구항 8

단일 주입구로 시료를 주입하는 단계,
주입된 시료가 채널을 통과하는 단계, 및
분리소자로부터 나노입자를 추출하는 단계를 포함하고,
상기 채널의 높이 대 채널폭의 종횡비는 1초과 5이하이고,
상기 종횡비를 갖는 채널 내부의 압력구배로 인하여 상기 시료 중 나노입자를 분리하는 것을 특징으로 하는, 나노입자 분리방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 분리방법은, 폐순환 시스템을 포함하는, 나노입자 분리방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 폐순환 시스템은, 병렬 채널부의 중앙에 집중된 세포를 주입구 및 적어도 하나의 출구와 연결되는 튜브 펌프를 통해 재순환시키는, 나노입자 분리방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 점탄성 비뉴턴성 유체 기반 나노입자의 분리 기술에 관한 것이며, 보다 상세하게는, 미세유동채널 내에서 비뉴턴성 유체 유동특성을 이용하여 혈액샘플로부터 세포 유래 나노입자를 분리하는 소자 및 그 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포 유래 나노입자는 세포의 세포소포 (extracellular vesicle)의 일종으로서 세포 간의 커뮤니케이션이나 혈액 응고, 염증, 암세포의 전이 등의 생리학적 과정에서 중요한 역할을 하는 바이오 마커로 알려져 있다. 이러한 세포 유래 나노입자는 약100-1000 nm의 크기를 가지며, 세포의 활성화, 세포 자멸사 (apoptosis), 또는 외부 자극 등의 원인으로 인하여 적혈구, 백혈구, 혈소판, 내피 세포 등의 다양한 세포로부터 발생한다. 혈액 내에 포함된 세포 유래 나노입자를 분리하는 것은 생물학적 연구나 임상학적 분석을 위해서 중요하기 때문에 이를 위한 기술 개발이 요구되고 있다. 특히 혈액 내에 세포 유래 나노입자의 양이 증가될 경우, 심혈관 질환이나 염증질환, 암의 질병을 예측할 수 있는 유용한 바이오 마커로 주목받을 수 있다.

[0003] 세포 유래 나노입자의 분리를 위해 사용되는 주된 방법은 초원심분리 방식과 면역친화성 캡처 방법이다. 그러나 초원심분리 방식은 높은 전단력이 세포에 자극으로 가해져 인공적인 세포 유래 나노입자가 생성될 수 있고, 아직 프로토콜이 확립되지 않았으며, 원심분리 과정에서 세포 유래 나노입자의 크기 분포가 편향적이 될 수 있다는 문제점이 존재한다. 한편 면역 친화성 캡처 방식은 나노입자가 본연의 기능을 잃거나 입자 상태에 변화를 일으킬 수 있다는 단점이 존재한다. 따라서 이러한 한계점을 극복하기 위하여 별도의 라벨링이 필요하지 않고, 원심분리기를 사용하지 않으며 세포 유래 나노입자를 온전한 상태로 분리할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

[0004] 미세유체역학 기술의 개발에 따라 필터 방식, 미세유체소자 내에서의 면역친화성 캡처 방식, 관성 유체역학 기술, 결정론적 측방 이동법 (deterministic lateral displacement) 등 나노 크기의 세포 유래 나노입자를 분리하는 기술이 다양하게 개발되고 있다. 최근 점탄성 비뉴턴성 유체 기반의 미세유체역학 기술이 유체 고유의 비선형적인 탄성력 구배를 특징으로 크게 주목을 받고 있다. 일차 수직응력차 (first normal stress difference, N1)의 불균일한 분포는 유체 내에 부유된 입자 및 세포를 크기에 비례하는 탄성력(Fe)의 영향으로 측면 이동시킬 수 있다.

$$F_e \sim a^3 \frac{\partial N_1}{\partial x} \sim \lambda (a/W)^3 Q^2$$

[0005] 상기 식에서 a는 세포/입자의 직경, N1은 일차수직응력차, λ는 relaxation time, W는 미세유동채널의 너비, Q는 유동율을 의미한다. 해당 기술은 최근 미세유동채널 내에서 입자/세포의 포커싱 및 크기 기반 분리에 널리 활용되었다.

[0006] 채널내부를 유동하는 점탄성력이 크기에 비례하여 나노 크기를 대상으로 할 때는 영향력이 작기 때문에 점탄성 유체 기반 미세유체역학 분야에서 나노 크기의 세포의 세포소포 영역은 크게 다뤄지지 않았으나, 최근 점탄성 유체를 기반으로 하여 다른 세포외소포로부터 엑소좀을 분리하는 연구가 수행되었다. 세포 배양액으로부터 엑소좀을 분리한 것으로서 크기의 컷오프(cutoff)는 200nm로 설정되었다. 그러나 혈액은 적혈구, 백혈구, 혈소판 등의 다양한 세포가 부유되어 있는 생체유체로서, 헤마토크릿, 즉 혈액 내에서 적혈구가 차지하는 부피 비율이 약 50% 정도로 고농도의 적혈구를 포함하고 있으므로, 혈액 내에 존재하는 세포 유래 나노입자를 분리해내기 위해서는

많은 수의 혈액 세포를 제거할 수 있는 기술이 필요하다. 이를 위해, 종래에는 원심분리가 가장 널리 사용되어 왔으나 원심분리 과정에서 발생하는 높은 전단력에 의해 세포에 물리적 자극이 가해져, 자극에 약한 혈소판을 활성화시킴으로써 인공적인 혈소판 유래 나노입자(platelet-derived microparticle, PDMP)를 발생시키게 된다. 따라서, 원심분리 방식을 대체하기 위하여 혈액으로부터 적혈구, 백혈구, 혈소판 등의 세포를 제거하며 순도 99.99%의 혈장을 추출하는 기술이 개발되었으나, 해당 기술은 혈장 추출을 위한 수율이 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 로 낮은 수준에 불과하고, 혈장 내에 존재하는 나노 크기의 입자는 분석 대상에서 제외되는 한계점이 존재한다.

[0008] 따라서, 도움 유체없이 많은 양의 적혈구를 포함하고 있는 고농도 혈액으로부터 세포유래 나노입자를 분리하는 연구는 여전히 해결해야 할 과제로 남아있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) NPG Asia Materials 2017, 9, e434, Rapid purification of sub-micrometer particles for enhanced drug release and microvesicles isolation
- (비특허문헌 0002) Lab on a Chip 2012, 12, 5202, Microfluidic filtration system to isolate extracellular vesicles from blood
- (비특허문헌 0003) Analyst 2019, 144, 5785, Multiplex isolation and profiling of extracellular vesicles using a microfluidic DICE device
- (비특허문헌 0004) Biomedical microdevices 2014, 16, 869, Microfluidic isolation of cancer cell-derived microvesicles from heterogeneous extracellular shed vesicle populations
- (비특허문헌 0005) ACS nano 2015, 9, 2321, Acoustic Purification of Extracellular Microvesicles
- (비특허문헌 0006) Proceedings of the National Academy of Sciences 2017, 114, 10584, Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics
- (비특허문헌 0007) Lab on a Chip 2016, 16, 3919, Continuous plasma extraction under viscoelastic fluid in a straight channel with asymmetrical expansion-contraction cavity arrays
- (비특허문헌 0008) ACS nano 2017, 11, 6968, Field-Free Isolation of Exosomes from Extracellular Vesicles by Microfluidic Viscoelastic Flows

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명을 통해 복잡한 채널 설계 없이 미세유동채널 내에서 고농도의 혈액을 이용하여 혈액 내에 존재하는 세포 유래 입자를 분리할 수 있는 기술을 제공하고자 한다. 이 과정에서 세포에 가해지는 물리적 자극이 없어 혈소판 활성화에 의한 나노입자의 인공적 발생이 없음을 확인하였다.
- [0011] 본 발명의 목적은 미세유동채널을 포함하는 나노입자 분리소자로, 단일 주입구, 적어도 두 개의 출구, 주입 채널 및 복수의 병렬 채널부를 포함하고, 상기 채널부의 높이 대 채널폭의 종횡비는 1초과 5이하인 것을 특징으로 하는, 나노입자 분리소자를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 단일 주입구로 시료를 주입하는 단계, 주입된 시료가 채널을 통과하는 단계, 및 분리소자로부터 나노입자를 추출하는 단계를 포함하고, 상기 채널의 높이 대 채널폭의 종횡비는 1초과 5이하이고, 상기 종횡비를 갖는 채널 내부 압력구배로 인해 상기 시료 중 나노입자를 분리하는 것을 특징으로 하는, 나노입자 분리방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 미세유동채널을 포함하는 나노입자 분리소자로, 단일 주입구, 적어도 두 개의 출구, 주입 채널 및 복수의 병렬 채널부를 포함하고, 상기 채널부의 높이 대 채널폭의 종횡비는 1초과 5이하인

것을 특징으로 하는, 나노입자 분리소자가 제공된다.

- [0014] 일 측에 따르면, 상기 분리소자는 상기 중형비를 갖는 상기 병렬 채널부 내부 압력구배로 인하여 주입된 시료 중 고농도 혈액 내의 혈구세포를 제거하는 것을 특징으로 하며, 특히 세포에 가해지는 물리적 자극에 의한 혈소판 활성화 없이 혈소판까지 제거하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0015] 일 측에 따르면, 상기 분리소자는 상기 중형비를 갖는 채널 내부의 압력구배로 인하여 주입된 시료 중 나노입자를 분리하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 일 측에 따르면, 상기 분리소자는, 상기 병렬 채널부의 채널 내 폐색율이 0.1 이상인 입자를 채널 중앙으로 위치시킬 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 출구는, 폐순환 시스템을 포함할 수 있다.
- [0018] 일 측에 따르면, 상기 폐순환 시스템은, 병렬 채널부의 중앙에 집중된 세포를 튜빙펌프를 통해 주입구로 재순환시킬 수 있다.
- [0019] 일 측에 따르면, 상기 나노입자는, 직경이 $1\mu\text{m}$ 이하인 세포 유래의 나노입자일 수 있다.
- [0020] 일 측에 따르면, 상기 나노입자는, 혈소판 유래 미세입자(platelet-derived microparticle, PDMP)일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 단일 주입구로 시료를 주입하는 단계, 주입된 시료가 채널을 통과하는 단계, 및 분리소자로부터 나노입자를 추출하는 단계를 포함하고, 상기 채널의 높이 대 채널폭의 중형비는 1초과 5 이하이고, 상기 중형비를 갖는 채널 내부 압력구배로 인해 상기 시료 중 나노입자를 분리하는 것을 특징으로 하는, 나노입자 분리방법이 제공된다.
- [0022] 일 측에 따르면, 상기 분리방법은, 폐순환 시스템을 포함할 수 있다.
- [0023] 일 측에 따르면, 상기 폐순환 시스템은, 병렬 채널부의 중앙에 집중된 세포를 주입구 및 적어도 하나의 출구와 연결되는 튜빙펌프를 통해 재순환시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명을 이용하면 소량의 혈액 시료로부터 세포 유래 나노입자를 분리할 수 있다. 구체적으로 활성화에 의한 인공적인 나노입자의 발생없이 적혈구, 백혈구, 혈소판 등의 혈액 세포를 물리적 자극에 의한 활성화 없이 제거하고 혈액 내에 포함된 세포 유래 나노입자를 추출할 수 있다. 또한, 점탄성 유체의 유동특성을 이용하여 단순한 직사각 형태 단면을 갖는 채널을 이용하여 나노 크기의 미세입자의 분리가 가능하므로, 복잡한 설계나 제작 등 번거로운 과정을 생략할 수 있다. 특히, 단일 주입구, 고중형비 단면적을 갖는 채널구조로 인해 유도된 채널 내부 압력 구배를 이용하여 고순도 나노입자 추출이 가능하다.
- [0025] 한편, 원심분리기술을 이용하지 않고 분리가 가능하므로 입자 또는 세포의 물리적 손상을 최소화할 수 있고, 별도의 라벨링이나 도움 유체 없이 소량의 시료만으로도 단시간 내에 나노입자를 분리할 수 있는 장점이 있다.
- [0026] 본 발명의 나노입자 분리소자는, 펌프 없이 손으로 밀어서 나노입자를 추출할 수도 있으므로 사용이 간편한 이점이 있다. 추가적으로, 튜빙펌프를 이용하는 경우, 폐순환 시스템을 적용할 수도 있다.
- [0027] 본 발명의 나노입자 분리소자는 액체 생검 기반 체외진단시 이용할 수 있고, 시료전처리용으로 이용될 수 있다. 또한, 상기 소자에 폐순환 형태 유체제어장치를 적용하여 고농도 세포농축기로 활용할 수 있으므로, 순환종양세포, 백혈구, 말라리아 감염 적혈구 등 생체 시료 내 희박하게 존재하는 세포의 고농도 농축 및 평가가 가능한 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 유래 나노입자 분리 소자를 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 2는 종래기술과 본 발명의 소자를 이용한 혈소판 유래 나노입자(platelet-derived microparticle, PDMP) 분리기술을 비교한 개념도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 소자의 유동특성을 평가한 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 소자의 헤마토크릿 5% 희석된 혈액 내 PDMP 분리 효과를 확인한 것이다.

도 5는 본 발명의 소자의 나노입자 크기별 유동특성을 평가한 것이다.

도 6은 본 발명의 소자 및 종래 기술을 이용한 PDMP 회수율을 비교 평가한 것이다.

도 7은 본 발명의 소자에 루프를 추가로 적용한 고농도 농축 원리를 개략적으로 도시한 것이다.

도 8은 본 발명의 소자를 이용한 재순환 루프 시스템의 농축효능을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0030] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0031] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0032] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0033] 본 명세서에서 설명하는 시료란, 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간으로부터 수득된 생체 시료를 의미한다. 한편, 이러한 생체 시료는 나노 입자가 분산된 수용액, 세포체 및 회귀 생체 입자를 포함하는 소변, 혈액, 태액, 객담일 수 있고, 특히, 혈액일 수 있다. 상기 생체 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있으며, 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 한편, 본 발명에서 말하는 세포 유래 나노입자란, 상기 생체 시료 내의 세포로부터 유래하는 나노 사이즈의 입자를 의미하는 것으로, 적혈구, 백혈구, 혈소판, 내피 세포 등 다양한 세포로부터 발생되는 나노입자를 의미한다. 앞서 언급한 바와 같이, 세포 유래 나노입자는, 심혈관 질환, 염증 질환, 기타 질병을 예측할 수 있는 유용한 바이오 마커로서 중요한 의미가 있다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 미세유동채널을 포함하는 나노입자 분리소자로, 단일 주입구, 적어도 두 개의 출구, 주입 채널 및 복수의 병렬 채널부를 포함하고, 상기 병렬 채널부의 높이 대 채널폭의 중형비는 1초과 5이하인 것을 특징으로 하는, 나노입자 분리소자가 제공된다. 상기 미세유동채널은 크게 주입 채널 및 병렬채널부로 구분되며, 주입 채널은 주입구와 연결되는 채널을 의미하고, 실질적으로 입자의 유동에 관여하는 주 채널은 병렬 채널부의 일부 채널 또는 전체일 수 있다. 이후, 특별한 설명이 없다면, 용어 '채널'은 병렬채널부의 일부 또는 전체를 의미하는 것으로 이해하는 것이 바람직하다.
- [0035] 채널의 높이 대 채널폭의 중형비가 상기 범위(1 초과 5이하)인 경우, 세포 유래 나노입자의 분리에 유리하다. 즉, 낮은 중형비 단면을 갖는 채널을 이용하는 경우, 혈소판이 채널의 측면 쪽으로 패터닝 시키도록 $0.3 \beta < 0.7$ (β 는 폐색율, β 이때 a 는 세포의 직경, H 는 채널의 높이)의 조건을 만족하기 위한 $2.85 < H \leq 10 \mu\text{m}$ 의 높이를 갖는 채널의 설계가 필요했으며, 해당 채널에서 백혈구 크기의 세포(10~15마이크론의 원형)들은 사용될 수가 없으므로 고순도의 나노입자를 획득하기 어려운 문제가 있었다. 그러나, 본 발명의 소자는 고중형비를 이용하여 채널폭보다 높이가 큰 단면형상의 소자를 구현함으로써, 특정 폐색율 이상의 크기를 갖는 입자는 모두 중앙부로 집중시킬 수 있으므로, 혈소판 크기 이상의 입자는 모두 중앙부로 집중시킨 뒤 중앙 채널과 연결되는 출구(출구 A)로 제거할 수 있고, 혈소판 보다 직경이 작은 나노크기의 입자는 측면 채널과 연결된 다른 출구(출구 B)로 추출할 수 있다.
- [0036] 구체적으로는, 단일 주입구는 주입 채널과 연결되고, 주입 채널은 복수의 병렬 채널부와 연결된다. 상기 주입

채널은 폭이 $30\mu\text{m}$ ~ $60\mu\text{m}$ 임이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 한편, 상기 병렬 채널부는 적어도 두 개의 출구에 연결되는 구조일 수 있으며, 이 때, 상기 주입구는 역지끼움 연결부일 수 있으며, 적어도 하나의 출구는 레저버(reservoir) 또는 역지끼움 연결부일 수 있다. 레저버는 폐순환 시스템의 구성 중 하나로, 박스의 형태로 내부에 분리 및 농축된 세포를 포함하는 시료 및 제거된 혈구세포를 포함하는 시료 등을 수용할 수 있고, 레저버 내부의 액체는 펌프로부터 유동압력을 제공받아 소정의 경로를 따라 유동할 수 있다.

[0037] 예를 들면, 본 발명의 나노입자 분리소자는, 도 1의 구성을 포함할 수 있다. 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 유래 나노입자 분리 소자(100)를 개략적으로 나타낸 것으로, 도 1의 (a)는 사시도, (b)는 평면도, (c)는 측면도를 도시한 것이고, (d)는 제작된 시제품을 도시한 것이다. 도 1을 보면, 소자(100)의 주입구(110)는 분리하고자 하는 입자가 포함된 시료가 주입되는 부분으로, 역지끼움 연결부를 포함할 수 있다. 상기 주입구(110)는 하나의 주입 채널(120)에 연결되어 있으며, 주입 채널(120)은 병렬 채널부에 연결되어 있다. 이 때, 병렬 채널부는 병렬구조의 복수의 채널이 주채널로부터 분岐된 형상으로, 본 발명의 소자(100)는 주입 채널(120)과 병렬 채널부(130)가 연결되는 분기점을 적어도 1 이상 포함하게 된다. 병렬 채널부의 각 채널은 출구 영역에 하나의 분기점을 포함하고, 이 중 중앙채널은 소자(100)의 상판으로 연결된 중앙출구 병합 채널부를 통해 출구 A(140)와 연결되고, 측면채널은 소자(100)의 후류에서 병합되어 출구 B(150)와 연결될 수 있다. 이러한 구조적 특징에 의해 중앙에 위치(포커싱)되는 입자는 출구 A(140)로 배출되고, 중앙에 위치되지 않는 입자는 병렬 채널부의 측면채널을 통해 출구 B(150)로 추출될 수 있다. 이 때, 출구는 특정 크기 범위의 입자를 회수할 수 있는 포집부를 더 포함할 수 있다. 도 1의 (d)는 일 실시예에 따른 본 발명의 분리소자를 시제작한 결과물을 도시한 것으로, 도 1의 (d)에 도시된 바와 같이, 출구 A가 4개로 제작되어 소자의 상판에 위치한 레저버로 연결되고, 출구 B가 1개로 제작될 수 있으나, 일 실시예에 불과하고 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 일 측에 따르면, 상기 분리소자는 상기 종횡비를 갖는 채널 내부의 압력구배로 인하여 주입된 시료 중 나노입자를 분리하는 것을 특징으로 할 수 있다. 예를 들면, 상기 분리소자는 고농도 혈액 내 혈구세포를 제거하고 혈소판 유래 나노입자를 분리하는 것일 수 있다. 여기서, 고농도 혈액이란 헤마토크릿 25% 이하의 혈액을 의미하는 것일 수 있다.

[0039] 즉, 초원심분리 방식이나 면역친화성 캡처 방식을 이용하지 않고도, 세포의 파괴없이 채널 내부의 압력구배로 인하여 세포 유래 나노입자의 분리가 가능하다. 이 때, 종횡비란, 채널 너비에 대한 높이의 치수비를 의미하는 것으로, 상기 고종횡비는 채널폭보다 높이가 큰 단면형상을 의미하는 것일 수 있다.

[0040] 채널 내부의 압력구배로 인하여 세포유래의 나노입자를 분리함으로써, 도움유체나 라벨링 없이도 고순도의 나노입자의 추출이 가능하게 된다. 한편, 종래기술로는 헤마토크릿이 1% 이상인 경우 혈소판까지 제거하기 어려웠으나 본 발명의 소자를 이용하여 헤마토크릿 25% 이하의 혈액 시료를 주입하더라도 물리적 자극에 의한 활성화 없이 혈소판까지 제거하며 고순도의 나노입자를 추출할 수 있다. 아울러, 채널의 종횡비를 높이면, 동일한 유동조건에서도 나노입자의 추출 수율을 높일 수 있으며, 추출하고자 하는 대상의 입자크기에 따라 채널의 높이 또는 너비는 조절될 수 있다. 구체적으로, 채널 단면의 종횡비는 1 이상임이 바람직하고, $1 < \text{종횡비} \leq 5$ 임이 가장 바람직하다.

[0041] 일 측에 따르면, 상기 분리소자는, 상기 병렬 채널부의 채널 내 폐색율이 0.1 이상인 입자를 채널의 가운데로 위치시킬 수 있다. 상기 폐색율(β ; blockage ratio)은 입자의 크기와 채널의 치수비율(d/H , 여기서, d 는 입자의 지름 및 수력학적인 지름(비구형성), H 는 정사각이나 직사각 단면 형상 채널의 높이나 너비로, 단면 중 짧은 길이가 H 임)를 의미한다. 이 때, 시료는 점탄성 유체일 수 있으며, HA(Hyaluronic acid)로 희석된 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 분리소자에 희석된 시료가 주입되어 메인 채널부를 유동하는 중에 점탄성 유체에 의한 탄성력의 영향을 받게되고, 탄성력의 영향은 세포의 크기에 비례하게 된다. 예를 들어, 시료가 혈액인 경우, 혈액 내 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 다양한 세포는 폐색율 0.1 이상으로 채널 중앙에 포커싱 되나, 크기가 작은 나노입자인 PDMP(100~1000nm)는 가운데로 포커싱 되지 않으며, 채널 전반에 넓게 분포된다.

[0042] 상기와 같은 원리로, 원심분리를 이용하지 않더라도 나노크기의 입자의 분리가 가능하다. 분리하고자 하는 입자가 혈소판 유래 나노입자인 경우, 원심분리를 이용하게 되면 혈소판 활성화에 의해 혈소판 유래 나노입자가 추가적으로 발생되므로 분석의 정확도가 떨어질 수 있는 반면, 본 발명의 소자를 이용하게 되면 채널 통과 전 후의 혈소판 활성화에 의한 혈소판 유래 나노입자의 추가 발생 없이 혈소판 유래 나노입자 수의 변화가 거의 없으므로 고순도로 혈소판 유래 나노입자를 분리할 수 있는 이점이 있다.

[0043] 일 측에 따르면, 상기 출구는, 폐순환 시스템을 이용하는 것일 수 있다.

- [0044] 본 발명의 분리소자에 폐순환 시스템을 적용하는 경우, 분리소자의 병렬 채널부와 연결되는 적어도 하나의 출구로 배출되는 세포를 농축 및 재순환 농축할 수 있다. 구체적으로, 상기 출구는 병렬 채널부 중 중앙채널과 연결되는 어느 하나의 출구(예컨대, 출구 A) 및 병렬 채널부 중 측면채널과 연결되는 다른 어느 하나의 출구(예컨대, 출구 B)일 수 있다.
- [0045] 폐순환 시스템은 샘플 레저버(reservoir), 튜빙펌프, 튜브, 폐액 레저버(waste reservoir)를 포함할 수 있으며, 레저버 및 펌프를 연결하는 하나 이상의 도관을 더 포함할 수 있다. 상기 도관은 공급도관 또는 배출도관일 수 있다. 폐순환 시스템을 이용하면, 시료를 재순환시켜 원하는 입자를 고농도 농축시킬 수 있다.
- [0046] 일 측에 따르면, 상기 폐순환 시스템은, 병렬 채널부의 중앙에 집중된 세포를 튜빙펌프를 통해 샘플 레저버로 보내고, 이를 소자 주입구로 재순환시킬 수 있다. 튜빙펌프로부터 유동압력을 제공받아 샘플 레저버 내부 액체를 소정의 경로를 따라 유동시킴으로써 시료를 재순환시켜 원하는 크기의 입자만을 고농축시킬 수 있다.
- [0047] 일 측에 따르면, 상기 나노입자는, 직경이 $1\mu\text{m}$ 이하인 세포 유래의 나노입자일 수 있다. 구체적으로는, 약 100 내지 1000nm임이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들면, 상기 시료가 혈액인 경우, 세포 유래 나노 입자는 세포외소포(extracellular vesicle)의 한 종류일 수 있으며, 세포 간의 커뮤니케이션이나 혈액 응고, 염증, 암세포의 전이 등 생리학적 과정에서 중요한 기능을 수행하는 바이오파커일 수 있다.
- [0048] 상기 나노입자는, 혈소판 유래 미세입자(platelet-derived microparticle, PDMP)일 수 있다. PDMP는 평균 100 내지 1000nm의 크기 분포를 가지며, 그 중 90%는 500nm이하의 크기를 가진다.
- [0049] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 단일 주입구로 시료를 주입하는 단계, 주입된 시료가 채널을 통과하는 단계, 및 분리소자로부터 나노입자를 추출하는 단계를 포함하고, 상기 채널의 높이 대 채널폭의 종횡비는 1초과 5 이하이고, 상기 종횡비를 갖는 채널 내부 압력구배로 인해 상기 시료 중 나노입자를 분리하는 것을 특징으로 하는, 나노입자 분리방법이 제공된다. 예를 들어, 전혈로부터 PDMP를 분리하는 과정을 분리하는 경우, 본 발명의 나노입자 분리방법은 도 2의 (b)와 같은 과정으로 분리되는 것일 수 있으며, 종래의 분리방법과 구체적으로 비교하면 다음과 같다.
- [0050] 도 2는 종래기술과 본 발명의 소자를 이용한 혈소판 유래 나노입자(platelet-derived microparticle, PDMP) 분리기술을 비교한 개념도를 나타낸 것으로, 전혈로부터 $100\mu\text{l}$ 의 PDMP를 분리하기 위한 종래의 다중 원심분리방법과 본 발명의 소자를 이용한 분리방법을 비교한 것이다. 도 2의 (a)는 다중 원심분리 방식을 이용하는 것으로, 적혈구 용적율이 높은 전혈로부터 $100\mu\text{l}$ 의 PDMP를 추출하기 위해서는 수차례의 원심분리과정을 거치게 되므로, 5ml의 전혈이 필요하고 약 60분의 처리 시간이 소요된다. 반면, 도 2의 (b)와 같이 본 발명의 소자를 이용하는 경우, 0.3ml의 전혈만으로도 약 2분간의 처리로 $100\mu\text{l}$ 의 PDMP를 추출할 수 있다.
- [0051] 도 2의 (b)를 보다 구체적으로 살펴보면, 먼저, 단일 주입구에 0.1%의 HA(hyaluronic acid) 용액으로 희석된 전혈을 주입한다. 전혈은 고농도의 적혈구, 백혈구, 혈소판 그리고 PDMP를 포함하고 있고, 희석된 전혈을 넣으면, 주입구에서는 모든 세포가 채널 너비 전반에 랜덤하게 분포하게 된다. 이후, 주입구와 연결되는 주입 채널 및 병렬 채널부를 유동하면서 점탄성 유체에 의한 탄성력의 영향을 받게 되는데, 이 때, 탄성력의 영향은 세포 크기에 비례하게 된다. 채널 내에서의 폐색율이 0.1 이상인 경우, 탄성력의 영향으로 나노크기의 입자인 PDMP를 제외한 전혈에 포함된 세포들은 가운데로 포커싱 되고, PDMP는 채널 전반에 넓게 분포하게 된다.
- [0052] 분리소자의 채널이 고종횡비를 갖도록 설계되는 되는 경우, 입자 분리시간이 더욱 단축될 수 있다. 예를 들어, 혈소판까지 제거하기 위하여 혈소판 크기($2\sim3\mu\text{m}$)의 입자가 중앙으로 집중되어 제거될 수 있도록 폐색율이 0.1 이상, 즉 채널 폭은 최대 $30\mu\text{m}$ 이하로 설계되는 것이 바람직하다. 하지만 채널 단면의 높이를 $70\mu\text{m}$ 이상으로 설계하는 경우, 동일한 유동조건에서 더 많은 양을 처리할 수 있으므로, PDMP의 분리 수율이 향상될 수 있다. 전혈로부터 고순도 PDMP를 분리하기 위해서는 혈소판 제거가 중요한 기능 중 하나이므로 채널폭은 최대 $30\mu\text{m}$ 이하, 높이는 최소 $30\mu\text{m}$ 이상임이 바람직하다. 단, 전술한 분리방법은 일 실시예에 불과하고, 분리하고자 하는 입자에 따라 소자를 구성하는 채널의 폭, 높이, 종횡비 및 시료의 상태 등은 적절히 변경될 수 있다.
- [0053] 일 측에 따르면, 상기 분리방법은, 폐순환 시스템을 이용할 수 있다. 폐순환 시스템은 샘플 레저버(reservoir), 튜빙펌프, 튜브, 폐액 레저버(waste reservoir)를 포함할 수 있으며, 레저버 및 펌프를 연결하는 하나 이상의 도관을 더 포함할 수 있다. 상기 도관은 공급도관 또는 배출도관일 수 있다. 폐순환 시스템을 이용하면, 시료를 재순환시켜 원하는 입자를 고농도 농축시킬 수 있다. 일 측에 따르면, 상기 폐순환 시스템은, 병렬 채널부의 중앙에 집중된 세포를 주입구 및 적어도 하나의 출구와 연결되는 튜빙펌프를 통해 재순환시킬 수 있다.

- [0054] 샘플 레저버(reservoir)로부터 튜빙펌프를 통해 주입구로 샘플을 주입한 뒤, 주입된 샘플 중 폐색율이 0.1 이상 (β 는 폐색율, $\beta=a/H$, 이때 a 는 세포의 직경, H 는 채널의 높이)의 조건을 만족하는 입자는 채널 내 유동에 의해 병렬 채널부의 중앙에 위치되어, 중앙채널에 연결된 출구 A로 빠져나오게 되며, 이후 튜빙펌프를 통해 샘플 레저버로 회수되어 재순환되고, 출구 A로 배출된 입자 외의 완충액(버퍼)는 출구 B로 빠져나와 튜빙펌프를 통해 폐액 레저버(waste reservoir)로 배출되어 제거된다. 이와 같은 과정을 반복하는 재순환 루프 방식을 통해 입자(ex. 세포)의 고농축 분리가 가능하다.
- [0055] 보다 구체적인 방법은 실시예를 통해 후술하도록 한다.
- [0057] (실시예)
- [0059] 실시예 1. 나노입자 분리소자의 유동특성 평가
- [0061] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 분리소자의, 각 조건별 유동특성을 평가하였다. 유동율별, 채널길이별, 적혈구 농도별 유동특성을 각각 평가한 결과, 도 3과 같았다.
- [0062] 도 3의 (a)는 유동율별, (b)는 채널길이별, (c)는 적혈구 농도별 유동특성을 각각 평가한 것이다. 도 3의 (a)를 보면, 먼저 $2\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유동조건에서 0.1% HA(hyaluronic acid) 용액 내에 부유된 $2\mu\text{m}$ 입자는 채널 가운데 영역으로 모이긴 하나, 낮은 수준으로 포커싱 된 것을 알 수 있다. 그러나, 유동율을 $20\mu\text{l}/\text{min}$, $100\mu\text{l}/\text{min}$, $200\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 증가시킨 결과, 입자가 점차 가운데 일렬로 포커싱 된 것을 확인하였다. 즉, 20 내지 $200\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유동율 범위 내에서 $2\mu\text{m}$ 크기의 입자는 채널 가운데 영역에 모두 포커싱되는 점을 검증하였다. 도 3의 (b)는 혈액으로부터 혈소판까지 제거 가능한 최소 채널 길이를 결정하기 위해 $2\mu\text{m}$ 입자의 유동특성을 평가한 것이다. 도 3의 (b)는, 왼쪽부터 각각 7.5, 15, 22.5, 30mm 길이의 채널 내에서의 유동특성을 분석한 것으로, 15mm 이상의 채널 길이에서는 $2\mu\text{m}$ 입자가 모두 채널의 가운데로 타이트하게 포커싱됨을 확인하였다. 채널의 길이는 유동저항과 밀접한 관계가 있으며 채널이 길어질수록 유동저항이 커지기 때문에, 소자의 수율 향상에 방해가 될 수 있다. 따라서, 후술하는 실험에서는 $2\mu\text{m}$ 입자가 포커싱되는 채널의 최소 길이를 15mm로 소자에 적용했으며, 이 때의 유동율은 $200\mu\text{l}/\text{min}$ 로 고정하였다.
- [0064] 실시예 2. 나노입자 분리소자의 혈액 내 PDMP 분리 효과
- [0066] 본 발명의 나노입자 분리소자를 이용하여 헤마토크릿 5% 희석된 혈액 내 PDMP 분리시켰으며, 그 효과는 도 4와 같았다.
- [0067] 도 4의 (a), (b)는 형광 염색된 혈소판의 유동특성을 나타낸 것으로, 채널 주입구는 형광 염색된 혈소판이 랜덤하게 채널 전반에 분포한 것으로 보이나, 소자를 통과한 후 출구에서는 혈소판이 채널 가운데로 포커싱되어 출구 A로 빠져나가는 것을 확인하였다.
- [0068] 도 4의 (c) 내지 (e)는 본 발명의 소자의 성능을 평가하기 위해 헤마토크릿(혈액 내 적혈구 용적률) 5%로 희석된 혈액을 이용하여 소자를 통과하기 전과 후의 주입시료, 출구 A 및 B에서의 시료 내 분포를 유세포분석으로 확인한 것이다. 적혈구와 PDMP의 유세포 분석 게이트는 10 및 $1\mu\text{m}$ 크기 입자를 이용하여 설정하였다. 이 때, 소자에 분리시키기 전 혈액 시료에 포함된 전체 세포 중 적혈구가 차지하는 비율은 약 78%였으며, 소자를 이용하여 분리한 후에 적혈구와 혈소판은 각각 출구 A로 제거되었고, PDMP는 출구 B로 추출되어 도 4의 (e)와 같이 PDMP 출구 게이트에서 85.4% 검출되었다.
- [0069] 도 4의 (f)는 주입구 및 출구 A, B에서의 시료 내 적혈구 개수를 측정한 것으로, 전체 10000개의 이벤트 중 주입구에서는 $7,874\pm 890$ 개, 출구 A 와 B에서는 각각 $8,688\pm 1,100$ 개와 108 ± 98 개가 검출되었다. 이를 통해, 본 발명의 소자를 이용하여 고농도 적혈구를 효과적으로 분리, 제거할 수 있음을 확인하였다.
- [0070] 도 4의 (g) 및 (h)는 본 발명의 소자를 이용한 혈소판 활성도를 평가한 것으로, 혈소판 검출을 위해서 CD41-FITC 항체 시약을 이용하였고, 혈소판의 활성도 평가를 위해 CD62-PE 항체를 이용하였다. CD41-positive 결과

는 혈소판의 검출을, CD62-positive 결과는 활성화된 혈소판의 검출을 나타낸다. 이 때, 소자는 너비 20 μm , 높이 70 μm , 길이 15mm로서 200 $\mu\text{l/min}$ 의 유동조건에서 가해지는 전단력은 209.4Pa로 계산되었다. 이와 같은 조건은 소자 내부에서 유동중에도 혈소판이 활성화되지 않는 조건으로, CD62 시약 기반 분석 결과로 확인할 수 있다. 분석 결과, CD41-positive로 검출된 혈소판 전체 중 CD62-positive로서 활성화된 것으로 나타난 혈소판은 24.73%로 나타났으며, 이는 소자를 통과하기 전과 비슷한 수준이었다. 따라서, 본 발명의 소자를 이용하더라도 혈소판이 활성화되지 않는 점을 확인하였다.

[0072] 실시예 3. 나노입자 크기별 유동특성 평가

[0074] 본 발명의 나노입자 분리소자를 이용한, 나노입자 크기별 유동특성을 평가하였다. 100-1000nm 의 크기 분포를 가지고, 그 중, 약 90%는 500nm 이하의 크기를 갖는 PDMP의 분리효과를 확인하기 위해, 각각 300, 500, 700, 1000 nm 크기의 형광입자를 200 $\mu\text{l/min}$ 의 유동조건에서 분리시켰으며, 그 결과, 도 5와 같았다.

[0075] 도 5의 (a)와 같이 300nm 입자는 작은 크기로 인하여 탄성력의 영향을 적게 받아 채널 전반에 분포한 채로 출구로 빠져나가는 것을 알 수 있다. 입자의 크기가 커질수록 탄성력의 영향이 커지며 이로 인해 입자가 채널의 가운데로 이동하여 채널 벽 근처에는 ‘입자 없는 영역(particle free layer)’ 이 넓어지게 된다. 도 5의 (b) 내지 (d)를 보면, ‘입자 없는 영역’의 너비는 입자가 커질수록 점차 넓어지는 것을 알 수 있다 (b, c, d 순으로 각각 $2.25 \pm 0.05 \mu\text{m}$, $2.71 \pm 0.09 \mu\text{m}$, and $3.12 \pm 0.05 \mu\text{m}$).

[0076] 도 5의 (e)와 같이 출구 A, B로 빠져나오는 시료의 유세포 분석을 통해 각 시료에 포함된 입자의 농도를 측정하였다. 측정 결과, 300nm 입자는 출구 A, B로 나오는 시료의 농도가 거의 동일하게 유지되었으나, 500nm, 700nm 입자의 경우 출구 A로 빠져나오는 시료의 농도가 출구 B에 비해 각각 4.8%, 8.6% 더 높게 나타났다. 한편, 1000nm 입자의 경우, 출구 A에서의 농도가 출구 B 대비 42.5% 더 높았으며, 이는 점탄성력에 의해 채널 가운데로 입자가 포커싱되었기 때문으로 확인되었다.

[0077] 상기와 같은 각 출구별 농도의 차이는 실험에 이용한 소자의 출구 분지가 3:2:3의 너비 비율로 설계되었기 때문인 것으로 확인되었으며, 이를 조절함으로써 출구별 수집 가능한 나노입자의 크기 및 농도 분포를 조절할 수 있다.

[0079] 실시예 4. PDMP 회수율 비교 및 유효성 평가

[0081] 본 발명의 나노입자 분리소자와 원심분리(중래 기술)를 이용한 PDMP의 회수율을 비교 평가하였다. 이 때, 시료로는 헤마토크릿 5%로 희석된 혈액(실시예 2와 동일)을 이용했으며, 그 결과 도 6과 같았다. 도 6의 (a)는 원심분리 방식으로 분리한 PDMP(왼쪽)와 본 발명의 분리소자를 통해 분리한 PDMP를 유세포 분석기(CytoFLEX)를 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다. 원심분리 조건은 1500g- 15분, 13000g-2분, 이어서 25000g-30분의 연속적인 과정을 이용하였다. 유세포 분석 결과에서 PDMP를 검출하기 위한 수단으로 CD41을 이용하였고, 이는 도 6(a)의 두 그래프에서 각각 노란색 음영 영역에 나타내었다. 분석된 결과를 비교하면, 원심분리를 통해 분리된 PDMP는 $5.4 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 의 농도를 가지며, 본 발명의 분리소자를 통해 분리된 PDMP는 $2.6 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 의 농도를 갖는다(도 6의 (b)). 즉, 동일한 혈액 샘플을 이용하여 PDMP를 분리한 경우, 원심분리를 이용하였을 때 다중 처리 과정에서 PDMP의 손실이 발생하게 되므로, 분리된 PDMP 개수는 약 4.8배의 차이가 나타남을 확인하였다.

[0082] 한편, 화학적 시약을 이용하여 인공적으로 혈소판을 활성화시켜 본 발명의 분리소자를 통해 PDMP를 분리하였다. 이는 PDMP 분리 방법의 표준화를 위하여 필요한 과정으로서 개발된 소자의 사용 유효성을 확보하기 위한 것이다. 혈소판 활성화를 위한 화학적 시약으로는 콜라겐(collagen), 트롬빈(thrombin), 아데노신(Adenosine), ADP(diphosphate), 칼슘운반체(calcium ionophore) 등이 사용될 수 있으며, 본 실험에서는 칼슘운반체를 이용하였다. 상기 화학적 시약은 혈액 시료와 혼합한 후 배양(incubation)시간에 따라, 생성되는 PDMP의 개수가 증가하며, 이는 소자를 통해 분리된 PDMP의 개수 분석을 통해서도 확인할 수 있었다(도 6의 (c)). 각 시간에 따른 PDMP 개수의 증가는 1, 2, 3, 4, 5시간 경과에 따라 $3700 \pm 959 / \mu\text{l}$, $4233 \pm 1165 / \mu\text{l}$, $8700 \pm 1710 / \mu\text{l}$, $13166 \pm 6109 / \mu\text{l}$, and $15166 \pm 10900 / \mu\text{l}$ 로 이와 같이 나타났다. 칼슘운반체를 처리하지 않은 샘플과 처리 이후 5시간

배양한 샘플을 각각 FE-SEM으로 분석하여 실제 생성된 PDMP를 확인한 결과 각각 도 6의 (d) 및 (e)와 같았다.

[0084] 실시예 5. 폐순환 시스템을 이용한 나노입자의 분리 효과

[0086] 도 7은 일 실시예에 따른 본 발명의 나노입자 분리소자 출구에 폐순환 시스템을 적용하는 경우를 개략적으로 나타낸 것이다. 도 7에 도시한 바와 같이 먼저 샘플 레저버(reservoir)로부터 튜빙펌프를 통해 병렬칩의 주입구로 샘플이 주입되면(①), 폐색율이 0.1 이상 (βa 는 세포의 직경, W 는 채널의 너비)의 조건을 만족하는 세포는 병렬칩의 개별 채널의 중앙으로 집중/농축되어 출구 1로 빠져나오며, 이는 튜빙펌프를 통해 샘플 레저버로 회수되어 재순환되고(②), 집중된 세포 외의 버퍼는 출구 2로 빠져나와 튜빙펌프를 통해 waste 레저버로 제거되게 된다(③). 즉, 재순환 루프 시스템이 구축되어, 분리/농축이 반복됨으로써 분리하고자 하는 대상 입자의 고농도의 농축이 가능하다.

[0087] 폐순환 시스템을 이용한 농축효과를 확인하기 위해 시스템 가동 1, 5, 10분 후의 형광 스트림을 관찰한 결과, 도 8의 (a)와 같이 시간이 지남에 따라 형광 스트림의 농도가 점차 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 농축 전후 샘플의 농도를 확인한 결과, 약 10분간 농축한 후 도 8의 (b)와 같이 현저하게 농축된 것을 확인할 수 있었으며, 구체적으로 수치화한 결과 약 50배 가량 농축된 것을 확인하였다.

[0088] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0089] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

부호의 설명

[0090] 100: 나노입자 분리소자

110: 주입구(Inlet)

120: 주입 채널

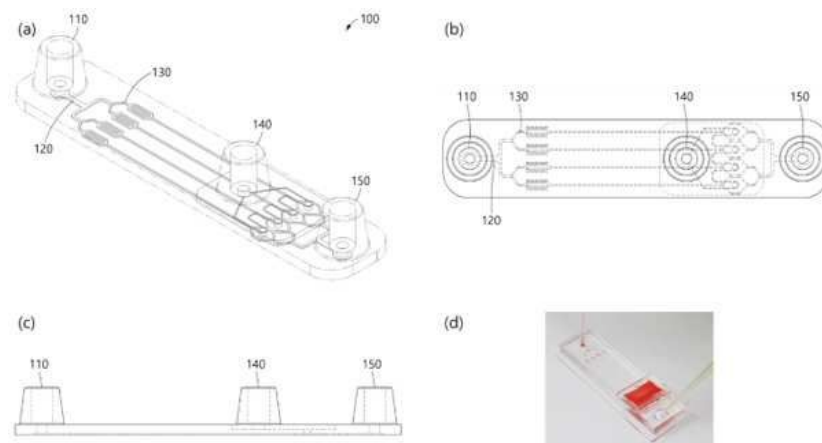
130: 병렬 채널부

140: 출구 A(outlet A)

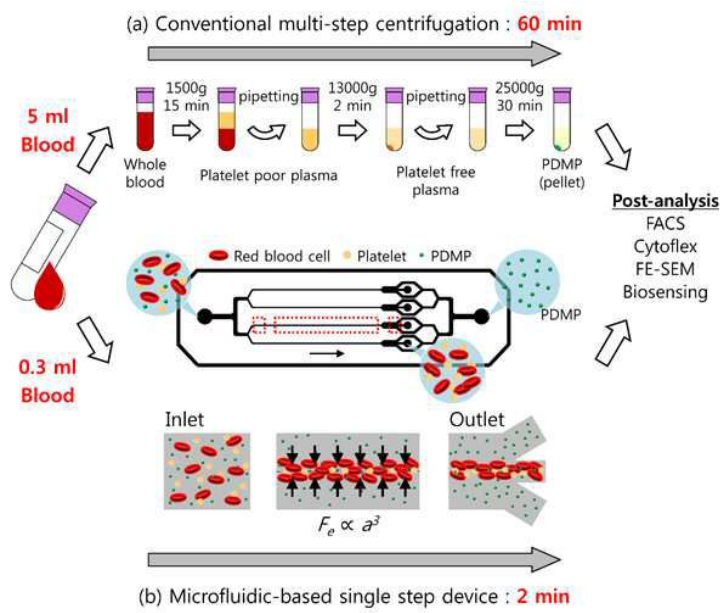
150: 출구 B(outlet B)

도면

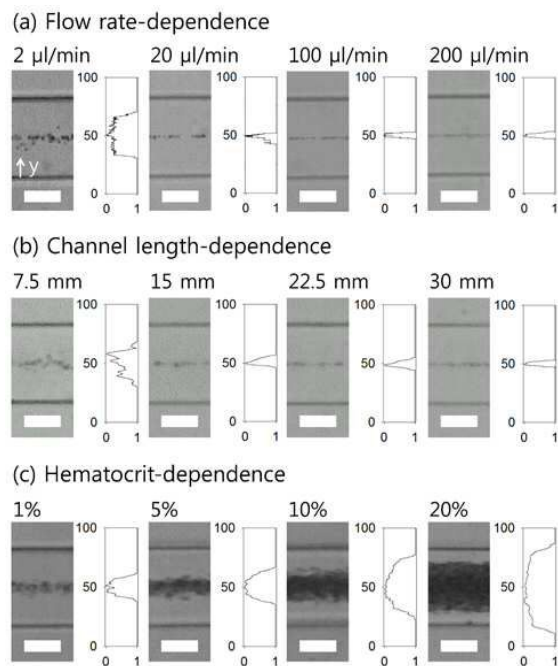
도면1



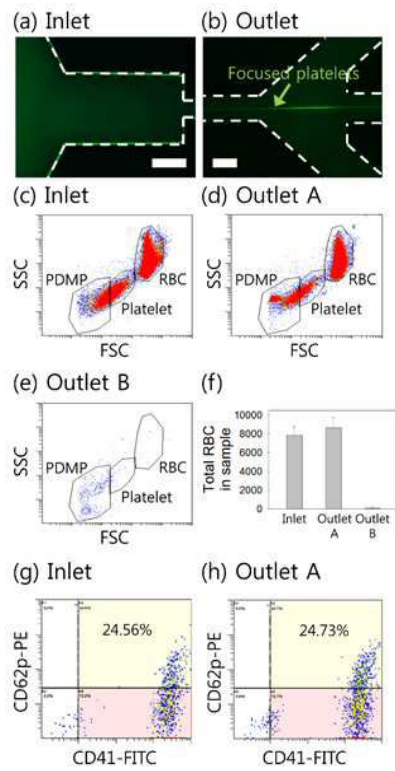
도면2



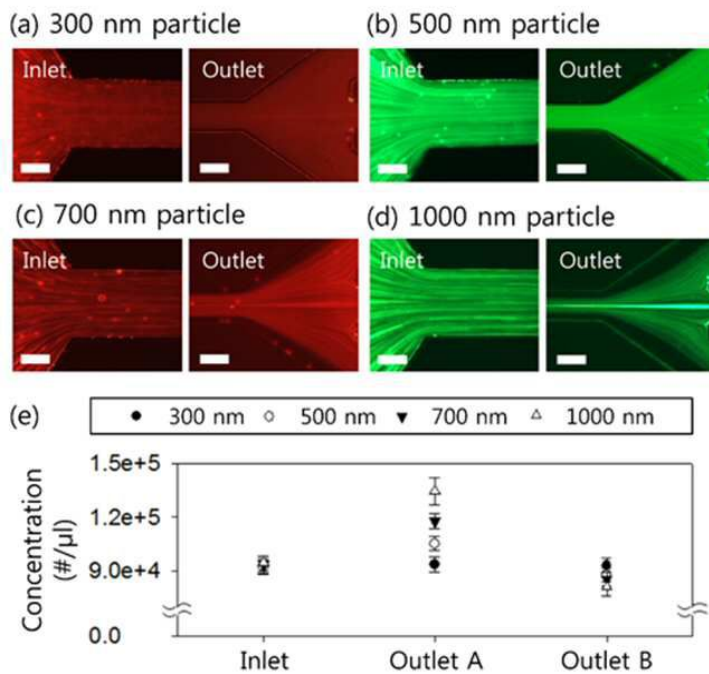
도면3



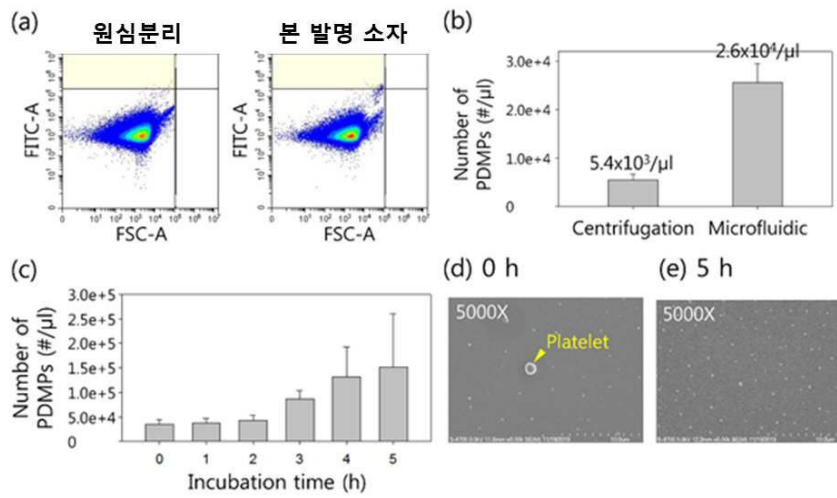
도면4



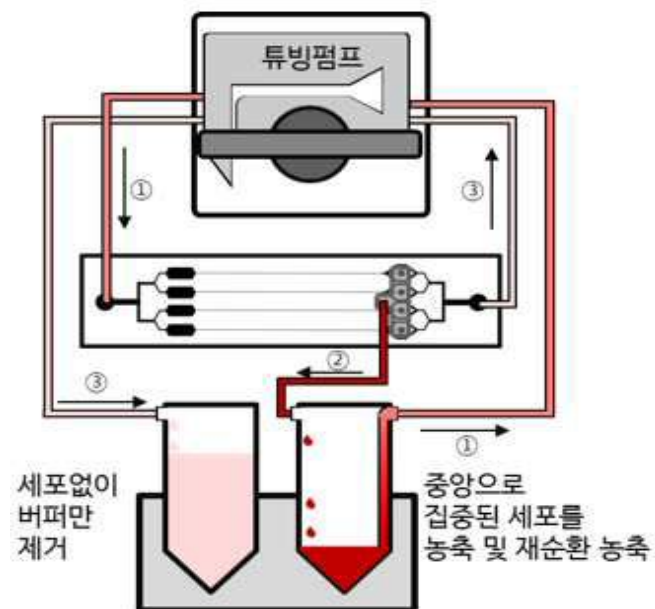
도면5



도면6



도면7



도면8

