

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12N 15/87 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년10월16일 10-0633273 2006년10월02일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2001-7001028	(65) 공개번호	10-2001-0072050
(22) 출원일자	2001년01월22일	(43) 공개일자	2001년07월31일
번역문 제출일자	2001년01월22일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB1999/002383	(87) 국제공개번호	WO 2000/05339
국제출원일자	1999년07월22일	국제공개일자	2000년02월03일

(81) 지정국 국내특허 : 아랍에미리트, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장	9815819.9	1998년07월22일	영국(GB)
------------	-----------	-------------	--------

(73) 특허권자	피에스아이메디카 리미티드 영국 우스터셔 더블류알14 3에스지 말번 제랄딘 로드 말번 힐즈 사이언스 파크
-----------	--

(72) 발명자	캔햄리트레버 영국우스터셔더블류알143피에스맬번세인트앤드류스로드디알에이맬번
----------	---

(74) 대리인	김영관 이병호 홍동오
----------	-------------------

심사관 : 신원혜

(54) 다공성 규소를 사용하여 물질을 세포로 이동시키는 방법

요약

본 발명은 물질을 세포로 운반하는 다공성 규소의 용도에 관한 것이다. 다공성 규소는 마이크로피어, 마이크로니들 및 세포를 관통시키기 위한 바이오리스틱 탄환으로 형성될 수 있다. 기공 크기 및 다공성 규소의 다공도를 조절하면 다공성 규소의 생체활성을 조절할 수 있다. 다공성 규소는 또한 재흡수성이어서, 어떠한 입자도 남기거나 이물로서 보여지지 않고도 세포로부터 재흡수된다. 본 발명은 또한 다공성 규소 마이크로피어, 마이크로니들, 마이크로전극, 생체용 탄환 및 생체활성 물질 위의 인산칼슘 침전에 관한 것이며, 물질을 세포로 운반하는 공지된 방법을 증가하는 이의 이점에 관한 것이다.

대표도

도 1

색인어

물질, 세포, 규소, 마이크로니들, 다공성

명세서

본 발명은 물질을 세포로 이동시키는 방법과 마이크로니들 배열(microneedle array)에 관한 것이다.

물질을 세포로 이동시킬 필요가 있는 경우, 예를 들면, 핵산 또는 핵산 작제물(예: 벡터 또는 플라스미드 등)을 유전자 조작을 위하여 세포로 이동시켜야 하는 경우가 많이 있다. 추가로, 약품, 예를 들면, 뉴클레오타이드 또는 염료, 및 세포에 생리학적 영향을 미치는 약품 또한 세포로 이동시킬 필요가 있을 수 있다. 다수의 화학적 및 기계적 공정으로 물질을 세포로 이동시키는 방법이 개발되어 왔다. 이러한 기술은 다음을 포함한다:

1. 직접 미세주사법(direct microinjection) - 니들을 세포로 삽입하여 물질을 니들을 통하여 방출함,
2. 전자천공법(electroporation) - 세포막을 고전압 충격을 적용하여 일부 분자가 투과성이 되도록 만듦.
3. 생체용 탄환(biolistics) - 텅스텐 또는 금 입자를 도입시키고자 하는 물질로 피복하여 세포로 발사함,
4. 인산칼슘 공침법 - 세포는 인산칼슘을 흡수하므로, DNA/기타 물질을 인산칼슘과 함께 공침시키는 경우, 이 역시 세포로 흡수됨,
5. 중재 형질전환법(리포솜, 바이러스 또는 세균성 벡터를 통한) 및
6. 원형질체 형질전환법.

본 발명의 한 양태의 목적은 물질을 세포로 이동시키는 데 조력하는 신규한 물질을 사용하는 것이다.

본 발명의 또 다른 양태의 목적은 작은 용적의 물질을 제공하는 개선된 방법을 제공하는 것이다.

직접 미세주사법은 DNA를 마이크로니들에 의해 각각의 세포의 핵에 직접 삽입함을 포함한다. 마이크로매니퓰레이터(micromanipulator)에 연결된 유리 마이크로피펫(micropipette)을 사용하여 물질, 전형적으로는 DNA 단편 용액 10^{-8} 내지 $10^{-7} \mu\text{l}$ 를 세포핵 내로 주입한다. "적중율(Hit)"은 조작자의 상당한 기술상 경험에 따라 거의 확실하지만, 기술은 힘들고 다수의 세포에 적용될 수 없다.

제1 양태에 따라, 본 발명은 물질을 세포로 이동시키는 방법을 포함한다.

바람직하게는, 재흡수성 또는 생체부식성 다공성 규소가 사용된다.

하나의 양태에서는 적어도 다공성 규소의 영역을 포함하는 마이크로니들이 사용되거나, 이러한 마이크로니들의 배열(array)이 사용된다.

제2 양태에 따라, 본 발명은 다공성 규소를 포함한 마이크로니들(또는 마이크로니들 배열)을 포함한다.

제3 양태에 따라, 본 발명은 물질을 세포로 이동시키기 위한 비히클(vehicle)을 포함하며, 당해 비히클은 적어도 부분적으로 다공성 규소와 세포로 이동시키고자 하는 물질을 포함한다.

바람직하게는, 다공성 규소는 재흡수성이다. 비히클은 다공성 규소 생체용 탄환(bullet)을 포함할 수 있다. 비히클은 사용 시 세포로 흡수되는 공침 물질과 함께 공침되는 물질을 포함할 수 있다. 비히클은 전기 전도성 생체활성 다공성 규소 전극을 포함할 수 있다.

제4 양태에 따라, 본 발명은 물질을 살아있는 세포로 이동시키기 위한 이동 매질로서의 다공성 규소의 용도를 포함한다.

다공성 규소는 생체적합성이라고 밝혀진바 있으며, 본 발명에 이르러, 다공성 규소가 현저히 해로운 영향을 미치지 않고도 포유동물 신체에서 부식하거나 포유류 신체로 재흡수될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 다공성 규소는 생물학적 물질(또는 세포로 도입되는 임의의 물질)을 위치시키고 실질적으로 부동화시키는 데 사용될 수 있으며, 당해 물질은 세포 속에서 세포 DNA와 결합하기에 충분히 자유롭거나, 그렇지 않으면 그러한 효과를 갖도록 방출된다.

마이크로기계화된 벌크한 규소의 측수(barb) 또는 첨단(tip)의 배열을 갖고 이를 대다수의 세포의 원형질 막을 동시에 천공시키는 데 기계적으로 사용한다는 것이 PCT 특허원 WO 제96/10630호로부터 공지되어 있다. 이는, 수백개의 세포에 물질을 도입할 필요가 있는 경우 힘든 공정을 초래할 수 있는, 단일 니들로 단일 세포를 천공시키는 방법보다 더욱 효율적이다. WO 제96/10630호의 첨단은 물질(예: DNA)을 천공된 세포로 이동시키는 데 있어서 생각보다 덜 효율적인 것으로 후에 밝혀졌다. 예를 들면, 근접한 간격의 첨단 사이의 표면 장력을 사용하여 생물학적 물질이 첨단 사이의 공간에 위치된 세포로 도입되도록 보유하고, 이를 첨단(탐침)과 기질 사이에서 포획하는 것이 당해 문헌에 제안되어 있다.

1993년에 공개된 미국 특허 제5,262,128호에 하나의 제안이 논의되어 있으며, 이는 리가 프로세스(Liga Process)를 사용하여 규소 니들의 배열을 제조함을 당해 기술분야의 숙련가에게 교시함을 취지로 한다. 당해 문서는 이의 출원일(및 공개일)에 실행가능치 않았으며, 이러한 이유로 본 발명의 신규성에 저촉되지 않는 것으로 여겨진다. 당해 문헌이 출원된 1989년 및 1993년에 공개되었을 때, 통상적인 지식을 가진 숙련가는 논의된 기술을 사용하여 문헌에 논의된 바와 같이 중심 루멘(central lumen)을 갖는 매우 얇은 규소 니들을 제조할 수는 없었다. 리가 프로세스는 규소로 된 중공성(hallow) 니들을 제조하는 데 적합하지 않고, 경사 구조를 제조할 수 없다.

미국 특허 제5,457,041호에는 우툴두툴한 첨단을 갖는 규소로 제조된 고체 니들 배열이 기재되어 있다.

미국 특허 제5,591,139호에는 규소 웨이퍼의 평면으로 형성된 규소 마이크로니들이 기재되어 있다.

WO 제97/06101호에는 웨이퍼로서의 생체활성 규소의 제조방법이 기재되어 있으며, 바이오센서 및 생체검정의 구축화에서의 생체활성 규소의 용도가 제안되어 있다.

WO 제92/01802호에는 물질을 액체에 혼입시키고, 액체의 입자를 제조한 다음, 얼음 입자가 세포를 투과하도록 촉진시키고, 세포 투과 후 얼음 입자를 용융시킴으로써, 물질을 세포로 들여보내는 의견이 기재되어 있다.

JP 제06 034 361호에는 다공성 규소 원자력 현미경 첨단이 기재되어 있다. 당해 장치는 투영된 표면을 관통하지 않는다.

삭제

미국 특허 제4,969,468호에는 신경과의 전기 접촉을 위한 고체 금속 니들이 논의되어 있다.

또 다른 양태에 따라, 본 발명은 다공성 규소로 제조된 세포 투과 부재(cell penetrating member) 또는 마이크로피어서(micropiercer)를 포함한다.

세포 투과 부재는 물질이 다공성 규소에 의해 운반되어 세포로 도입되도록 개조된다.

또 다른 양태에 따라, 본 발명은 적어도 다공성 규소의 영역을 포함하는 세포 투과 부재 또는 마이크로피어서를 포함한다. 바람직하게는, 물질은 DNA 또는 RNA, DNA 또는 RNA의 단편, 또는 DNA 또는 RNA의 작제물을 포함한다.

세포 투과 부재 또는 마이크로피어서는 바람직하게는 물질이 다공성 규소에 의해 운반되어 세포로 도입되도록 개조된다.

다공성 규소 영역은 티탄 등의 생체불활성 물질이 제공되는 경우의 이동성과 비교하여 물질(예: DNA)을 부동화시키도록 개조된다. 다공성 규소 영역은 바람직하게는 세포 투과 부재 또는 마이크로피어서의 첨단에 위치한다. 세포 투과 부재 또는 마이크로피어서는 중앙 루멘을 갖지 않는 첨단 또는 축수일 수 있거나, 중앙 채널을 갖는 니들일 수 있다. 세포 투과 부재 또는 마이크로피어서는 저장소 또는 채널로부터 세포 투과 부재 또는 마이크로피어서의 표면에 제공된 물질 운반 영역에 이르는 모세관 또는 기공 망상구조를 가질 수 있다.

세포 투과 부재 또는 마이크로피어서는 다공성 규소 피막을 가질 수 있거나, 적어도 이의 첨단(또는 첨단이 아닌 경우 기타 물질 운반 영역)에서는, 이의 횡단면에 걸쳐 다공성일 수 있다. 사용시 세포를 투과하는 세포 투과 부재 또는 마이크로피어서의 실질적으로 전체 외부 표면은 다공성 규소를 포함할 수 있다. 세포 투과 부재 또는 마이크로피어서는 다공성 규소 피막을 갖는 벌크한 규소 마이크로팁일 수 있다.

물질이 첨단 사이의 채널/공간 대신, 세포 투과 부재 또는 마이크로피어서 자체의 첨단에서 세포로 도입되도록 보유하는 데 대한 이점은 물질이 명확하게 그리고 전형적으로는 세포 깊숙이 도입된다는 점이다. 이는 작동의 성공률을 높일 수 있다(대부분의 경우 DNA를 세포로 도입하고 DNA/단편을 안정하게 흡수하는 것은 통계적으로 매우 성공적이지 않다 - 몇%만이 성공할 수 있으며, 이 때문에 매우 다수의 세포에 주입해야 한다).

물질을 첨단에 부동화시키고/ 적어도 일부의 물질이 첨단에 존재하도록 보장하기 위해 다공성 규소를 사용하는 대신에, 다른 보유 수단이 사용될 수 있다. 예를 들면, 다결정성 규소가 그래인 경계에서 일부 물질을 보유할 수 있다. 보유 수단은 다공성 물질을 포함할 수 있다.

통류 제노센서(flow-through genosensor) 분야에서 거공성(macroporous) 규소에 DNA 단편을 부동화시키는 것이 공지되어 있다[문헌: Advances in Genosensor Research. K.L. Beattie et al. Clin. Chem. 41, 700 (1995)].

다공성 규소의 이점은 이의 생체활성이 이의 기공 크기 및 다공도를 조절함으로써 조정될 수 있다는 점이다. 따라서, 기공이 목적하는 특정 분자 또는 물질을 보유/부동화시키도록 꾸며진 다공성 첨단을 갖는 세포 투과 부재 또는 마이크로피어서를 제조할 수 있다. 물론, 첨단이 세포 내에 있는 경우 적어도 일부의 물질이 첨단에서 방출될 수 없을 정도로 물질을 부동화시키지는 않는다.

다공성 규소는, 규소로부터 작은 규모의 장치를 구축하는데 대한 마이크로기계화 기술이 예를 들면, 전자 산업에 존재한다는 점에서, 세포 투과 부재 또는 마이크로피어서에 대한 선택 물질로서 또 다른 큰 이점을 갖는다.

규소 구조를 다공성으로 제조하는 방법은 공지되어 있다[참조: 예를 들면, 미국 특허 제5 348 618호].

세포 투과 부재 또는 마이크로피어서의 배열이 제공될 수 있다. 배열은 바람직하게는 $n \times m$ 마이크로피어서의 2차원 배열이다. 마이크로피어서는 바람직하게는 규칙적으로 격자 패턴(grid pattern)으로 배치되지만, 반드시 그럴 필요는 없을 것이다.

진공 마이크로전자 분야에 사용되는 전계 방출 음극용의, 완전히 상이한 목적으로 마이크로팁의 배열을 갖는 것 또한 공지되어 있다. 여기서, 5mm 정방형 규소 칩은 선택된 제조 파라미터에 따라, 전형적으로 첨단 폭이 50mm 내지 $1\mu\text{m}$ 이고 높이가 10 내지 $100\mu\text{m}$ 인 피라미드 형상의 마이크로팁 약 500개를 함유한다. 후에 밝혀졌지만, 이들은 다공질화에 적합할 것이며, 이어서 물질을 세포로 이동시키기 위한 마이크로피어서로서 사용한다. 다공성 규소 피라미드형 음극을 갖는 것이 예를 들면, 문헌에 공지되어 있다[참조: Field emission from pyramidal cathode covered in porous silicon: P.R. Wilshaw et al. J. Vac. Sci. Techn. B12, 1 (1994); Fabrication of Si field emitters by forming porous silicon. D. Kim et al. J. Vac. Sci. Tech. B14, 1906 (1996); and Porous silicon field emission cathode development. J.R. Jessing et al. J. Vac. Sci. Techn. B14, 1899 (1996)]. 그러나, 이들 모두는 전체적으로 상이한 분야이며, 어느 문헌에도 세포로 도입될 DNA, RNA 또는 임의의 다른 물질을 그 위에 보유하는 마이크로피어서가 나타나 있지 않다.

제3 양태에 따라, 본 발명은 하나 이상의 마이크로피어서 돌출부를 제조하고 돌출부의 침단에 또는 그의 부근에 물질 보유 수단을 제공함을 포함하는 마이크로피어서 장치의 제조방법을 포함한다.

바람직하게는 당해 방법은 돌출부의 적어도 일부를 다공성으로 제조함을 포함한다. 바람직하게는 당해 방법은 돌출부의 침단을 다공성으로 제조하거나, 침단의 실질적인 전체 범위를 다공성으로 제조하거나, 침단 위에 다공성 피막을 제공함을 포함한다. 바람직하게는 침단은 HF 양극처리 기술을 사용하여 다공성으로 제조된다.

또 다른 양태에 따라, 본 발명은 물질을 마이크로피어서의 침단 부분과 결합하고, 세포를 마이크로피어서로 천공시킴을 포함하여, 물질을 세포로 이동시키는 방법을 포함한다.

바람직하게는, 당해 방법은 다공성 구조를 사용하여 물질을 침단 부분에 또는 그 근처에 위치시킴을 포함한다.

본 발명은 추가의 양태에 따라, 유전자 물질을 마이크로피어서의 침단 부분과 결합하고, 세포를 마이크로피어서로 천공하여 유전자 물질이 세포로 들어가도록 함을 포함하는, 세포의 유전자 조작방법을 포함한다. 이어서, 유전자 물질은 세포에 안정하게 혼입될 수 있다.

또 다른 양태에 따라, 본 발명은 지지체로부터 연장된 복수의 니들(이때, 니들은 각각 이들의 기저로부터 침단까지 유체를 운송하도록 개조된 유체 운송 수단을 갖는다) 및 유체 운송 수단과 소통되어 있고 니들의 기저에 주입되는 유체를 공급하도록 개조된 유체 공급 수단을 포함하는 마이크로니들 배열을 포함한다.

바람직하게는 마이크로니들 배열은 구조로 제조된다. 이는 예를 들면, 구조 웨이퍼로부터 마이크로기계화될 수 있다.

유체 운송 수단은 니들 하부로 연장될 수 있는 저장소를 포함할 수 있다. 지지체는 하부, 상부 및 하부와 상부 사이에 걸친 채널 또는 저장소를 가질 수 있으며, 니들은 저장소 또는 채널에 이르는 유체 운송 수단 및 상부에 제공된다.

유체 운송 수단은, 루멘 또는 이의 종방향 범위를 통하여 일반적으로 니들의 중앙으로 확장할 수 있는 각각의 니들의 거공을 포함할 수 있다. 또 다른 방법으로, 또는 추가로, 유체 운송 수단은 복수의 메조 기공(mesopore)과 같은, 기공 또는 모세관 망상구조를 포함할 수 있다.

니들 배열은 집적된 구조 칩상에 제공될 수 있으며, 당해 칩 위에는 또한 바람직하게는 원위치에서 이동 과정을 모니터링할 수 있도록 하는 센서를 또한 가질 수 있다. 예를 들면, DNA와 결합된 광 방출 마커(예: 형광)가 연합된 광 방출기/검출기가 사용될 수 있다. 전력 공급 및/또는 가공 회로, 및/또는 조절 회로를 칩 위에 제공하도록 하는 것이 또한 바람직하다. 광 방출 장치 및 광검출기의 배열은 고도의 공간적 분해능하에 형질감염 과정이 모니터링되도록 할 수 있다.

본 발명은 또 다른 양태에 따라, 벌크한 구조 웨이퍼를 취하고, 니들 또는 니들의 배열을 만들며, 니들 또는 각각의 니들의 기저로부터 이의 침단에 이르는 유체 이동 수단을 생성함을 포함하는, 마이크로니들 또는 마이크로니들 배열의 제조방법을 포함한다.

바람직하게는, 당해 방법은 니들 또는 각각의 니들의 기저로부터 이의 침단으로의 기공의 망상 구조를 제공함을 포함한다. 기공은 거공 또는 메조 기공일 수 있거나, 일부 적용에서는, 세공일 수도 있다(그러나 거공이 바람직하다).

니들 또는 각각의 니들은 이방성 에칭(anisotropic etching) 또는 포토레지스트 석판술(photo-resist lithographic technique) 등의 석판술을 사용하여 제조할 수 있다.

구조 기판은 저항 범위가 0.1 내지 10Ωcm인 n형 기판일 수 있다.

니들 또는 니들 배열은 예를 들면, 비전도 마스크를 사용하여 평면화시킬 수 있다.

이어서 평면화 배열을 예를 들면, 산소 플라즈마 처리 및 HF 침지를 사용하여 침단을 단독으로 노출시킴으로써, 침단만을 노출시키도록 처리할 수 있다. 평면화된 배열은 또한 충전시킬 수 있다(in-filled). 이어서, 침단을 양극화하여 침단으로부터 웨이퍼 후면까지 기공을 생성시킬 수 있다. 이어서, 침단의 배열이 제공된 웨이퍼를 또 다른 지지 부재에 접촉하고, 이를 침단을 보유한 웨이퍼와 지지 부재 사이에 채널 또는 저장소를 한정하도록 형상화할 수 있다.

추가 양태에 따라, 본 발명은 물질을 세포로 이동시키는 비히클을 포함할 수 있으며, 비히클은 적어도 부분적으로 재흡수성 물질을 포함한다.

바람직하게는 비히클은 다공성 규소 또는 다결정성 규소 등의 재흡수성 규소를 포함한다. 비히클 전체 또는 이의 단지 일 부분은 재흡수성 물질로 제조될 수 있다. 비히클은 생체활성 규소를 포함할 수 있다. [용어 "재흡수성"은 물질이 부식/흡수/침식 또는 그렇지 않으면 생리학적 유체인 경우에 원위치에서 소멸함을 의미한다. 용어 "생체활성"은 물질이 생리학적 조건하에(체액내인 경우) 이의 표면에서 인산칼슘 침전물의 침착을 유도할 수 있음을 의미한다].

비히클이 세포에 유지되어 있는 경우, 이는 흡착/부식/침식 또는 재흡수되거나, 부분적으로 재흡수되고, 결국에는 세포에 대해 덜 자극/이물성이 된다.

재흡수성 규소/기타 물질은 생체의학 기술에 사용될 수 있다. 예를 들면, 물질을 세포로 이동시키기 위한 비히클은 생체용 탄환일 수 있다.

물질을 세포로 이동시키기 위한 비히클은 다공성 규소를 포함한 생체용 탄환을 포함할 수 있다.

탄환에는 부착된 세포로 도입될 물질이 부착될 수 있다. 탄환은 물질(예: DNA 물질)로 함침될 수 있다. 이는 실질적으로는 물질로 포화될 수 있다. 탄환은 초미세 규소 입자를 포함할 수 있다. 규소 입자를 스테인 에칭 기술로 다공성으로 만들 수 있다. 입자는 바람직하게는 메조 기공성(mesoporous)이다.

재흡수성 생체용 탄환은 금 또는 텅스텐 생체용 탄환에서와 같이, 세포에 입자를 잔존시키지 않을 것이다. 탄환은 전체적으로 다공성일 필요는 없고, 다공성 피막을 가질 수 있다. 재흡수성 탄환은 반드시 다공성 규소 또는 규소로 제조될 필요는 없지만, 다공성 규소가 특히 적합한 물질이라고 확인되었다.

본 발명은 또 다른 양태에 따라, 물질을 보유하는 비히클을 세포로 발사시키는 단계를 포함하여, 물질을 세포로 이동시키는 방법을 제공한다.

바람직하게는 비히클은 위에서 정의한 비히클이다. 바람직하게는 탄환은 가압 기체, 예를 들면, 헬륨에 의해 세포로 발사된다.

생물학적 생체의학 공정은 보다 표준인 기술이 작동하지 않는 경우 종종 사용된다. 다공성 규소 등의 재흡수성 함침 물질은 내부식성 벌크한 금속 물질보다 우월하게 생체적합성 이점을 제공한다.

본 발명은 추가 양태에 따라, 비히클을 적어도 부분적으로 다공성으로 만드는 단계 및 세포로 이동시킬 물질을 비히클에 도입하는 단계를 포함하는, 물질을 세포로 이동시키기 위한 비히클의 제조방법을 제공한다.

바람직하게는 비히클은 규소 탄환, 더욱 바람직하게는 초미세 규소 입자를 포함하며, 이들은 스테인 에칭 기술에 의해 다공성, 바람직하게는 메조 기공성이 되도록 할 수 있다. 탄환에는 세포로 도입될 물질이 부착되거나, 또 다른 방법으로 탄환을 당해 물질로 함침시킬 수 있다.

비히클은 초미세 입자일 수 있고, 세포로 이동시킬 물질은 성핵 부분으로서 비히클을 사용하여(침전 물질과) 공침시킬 수 있다.

물질을 세포로 이동시키기 위한 비히클은 생체활성 규소를 포함할 수 있다. 비히클은 세포로 흡수되는 물질과 공침되도록 하는 형태로 이동시킬 물질을 결합시킬 수 있다. 공침물은 인산칼슘 침전물일 수 있다.

또 다른 양태에 따라, 본 발명은 물질을 규소 입자와 결합하고, 인산칼슘을 입자 위에 침전시켜 인산칼슘/규소 입자 결합된 입자를 형성하고, 세포를 배열하여 인산칼슘/규소 입자 결합체를 흡수하도록 함을 포함하여, 물질을 세포로 도입하는 방법을 포함한다.

전자천공 기술에서, 세포막은 매우 높은 전압의 짧은 전기 충격에 세포를 노출시킴으로써 투과성으로 만들 수 있다. 낮은 다공도 생체활성 규소는 전기적으로 전도성이고, 마이크로전극 배열 위에서 성장하는 부착성 포유동물 세포에 대한 친밀한 커플링 매트릭스로서 적합하게 전개된다.

전자천공 장치에서 하나 또는 양 전극으로서 생체활성 규소, 예를 들면, 다공성 규소 또는 다결정성 규소를 가짐으로써, 더 우수한 DNA 이동이 발생하는 것으로 구상된다.

추가적 양태에서, 본 발명은 전기적으로 전도성인 생체활성 규소 전극을 제공함을 포함하는 전자천공방법을 포함한다.

바람직하게는 당해 방법은 전극상에 세포를 성장시킴을 포함한다. 당해 방법은 생체활성 규소 전극 배열에 가능하면 그 위에서 성장시킨 세포를 제공함을 포함할 수 있다. 전극 또는 전극들은 다공성 규소로 피복되거나, 횡단면에 걸쳐서, 적어도 이의 높이 부분이 다공성 규소로 제조될 수 있다.

추가적 양태에 있어서, 본 발명은 생체활성 전극을 포함하는 전자천공 장치를 포함한다. 바람직하게는 전극은 생체활성 규소, 가장 바람직하게는 다공성 규소이다. 전극 또는 마이크로전극 배열이 제공될 수 있다.

본 발명은 또한 물질을 세포로 도입하기 위한 장치의 제조에서의 생체활성 규소, 바람직하게는 다공성 규소의 용도에 대한 것일 수 있다.

생체활성 물질이 생체 내에서 특정한 생물학적 반응을 유도하는 경우 살아있는 조직과 당해 물질 사이에 결합을 형성하는 물질의 계열인 것을 명백히 하는 것이 유익할 수 있다. 생체활성 물질은 또한 표면 반응성 생체물질로도 언급된다. 재흡수성 물질은 생체 내에서 시간 경과에 따라 점진적으로 소멸하거나 분해되도록 계획된 물질이며, 이는 조직으로 대체시킬 수 있거나, 대체시킬 수 없다. 생체부식성 물질은 가능하면 세포로 흡수되거나, 가능하면 흡수되지 않는 물질로, 생체 내에서 부식하는 물질이다. 생체불활성 물질은 생체내에서 국소적인 전반적 생물학적 반응을 유도하지 않는 물질이다.

이제 본 발명의 몇가지 양태를 오로지 도를 참조로 하여 예를 들어 설명할 것이며, 도에서,

도 1은 부분적으로 다공질화된 규소 마이크로팁을 나타내고,

도 2는 규소 마이크로니들 배열을 나타내고,

도 3은 침단에서 하부의 저장소까지 전개된 거공성 망상구조를 갖는 도 2의 규소 마이크로니들 배열을 나타내고,

도 4는 DNA로 함침시킨 다공성 규소 탄환을 나타내고,

도 5는 DNA로 함침되고 인산칼슘으로 둘러싸인 다공성 규소 코어를 나타내고,

도 6은 본 발명의 전자천공 기술을 나타내며,

도 7 및 8은 다공성 규소에 대한 DNA 친화도를 나타내는 SIMS 플롯을 나타내는 것으로, 이는 다공성 규소 표면으로부터 방출될 수 있다는 것을 나타낸다.

도 1은 폭(A) 50 μ m의 기저 및 높이(B) 100 μ m 및 침단 폭(C) 0.5 μ m을 갖는 마이크로팁(12)의 형태의 마이크로피어(10)를 나타낸다. 마이크로팁(12)의 표면은 깊이(D) 0.1 μ m의 다공성 규소(14)로 피복된다.

사용시, 다공성 규소 피막(14)은 침단 자체에 세포로 운반되는 물질(예: DNA/RNA)을 부동화시며, 이는 침단 위의 부동화된 물질이 살아있는 세포로 도입되도록 하는 기회를 증가시킨다.

기공 크기 및 다공성 규소 피막의 다공도를 조절하여 마이크로팁(12)의 생체활성을 조절할 수 있다. 기공 크기 및 다공성 규소의 다공도를 조절함으로써, 본 발명자들은 특정 분자가 다소 용이하게 이를 성공적으로 만들 수 있게 한다. 본 발명자들은 소정 시간 동안 세포 내부에 마이크로팁을 방치하여 분자가 다공성 규소로부터 자체 분리되도록 할 수 있다.

도 2는 규소 지지체 또는 지지 부재(24)로부터 연장된 규소 마이크로니들(22)의 배열(20)을 나타낸다. 마이크로니들(22)은, 마이크로니들(22)과, 후면의 지지 부재(32)가 제공된, 다공성 규소 마이크로팁(26)과, 상부 부재 사이에서 한정된 마이크로팁(26)과 저장소(30) 사이를 소통하는 중앙 루멘(28)을 갖는다. 지지 부재(24)는 벌크 규소로 제조된다.

도 3은 도 2와 유사한 규소 마이크로니들(34)의 배열(33)을 나타낸다. 도 2와 도 3에서 나타나는 배열간의 주요 차이는 도 3에서 나타나는 마이크로니들(34)에는 중앙 루멘(28)이 제공되지 않는다는 것이다. 대신 도 3의 규소 마이크로니들(34)의 배열(33)에는 마이크로니들의 마이크로팁으로부터 저장소(30')에 이르는 메조 기공성 망상 구조(36)가 제공되어, 저장소(30')와 마이크로팁 사이를 유체가 소통하도록 한다.

사용시, 세포로 운반되는 물질은 저장소(30) 및 (30')로부터 다공성 규소 마이크로팁(22) 및 (24)까지 중앙 루멘(28) 또는 메조 기공성 망상구조(36)를 통하여 제공된다. 이어서, 물질은 세포로 도입될 준비가 된 다공성 규소 마이크로팁에 의해 보유된다.

세포로 도입되는 물질은 저장소(30) 및 (30')로 펌핑(pumping)시키고, 펌프(도에 나타나지 않음)로 루멘(28) 또는 다공성 망상구조를 통하여 배출된다[화살표(39)는 액체를 저장소로 운반하는 펌프를 나타낸다].

최종 구조 내의 규소 표면 전체 또는 일부는 생물학적 시스템과 이들의 상호작용을 변경시키는 방식으로 처리할 수 있다. 이는 다공성 규소 층을 표면에 형성시킴으로써 달성될 수 있다. 이러한 층은 전기화학적 양극처리 공정에 의해서나, 가능하다면 구조를 하이드로플루오르산과 질산의 혼합물과 같은 스테인 에칭 용액으로 침지시킴으로써 형성할 수 있다.

도 4는 스테인 에칭에 의해 메조 기공성이 되는 초미세 규소 입자를 포함하는 생체용 탄환(40)을 나타낸다.

사용시, 탄환(40)은 세포로 도입되는 물질로 함침시키고, 가압 헬륨을 사용하여 세포로 발사된다. 다공성 규소가 재흡수될 물질이기 때문에, 바람직하게는 완전히, 적어도 부분적으로 진입한 세포에 의해 재흡수되고, 따라서, 금속 입자를 세포에 잔존시키는 금 또는 텅스텐 등의 공지된 생체용 탄환보다 덜 외래성 물질을 포함하게 된다.

도 5는 세포로 도입되는 물질(예: DNA/RNA)로 함침시킨 다공성 규소 코어(50) 및 코어(50) 주위에 형성된 인산칼슘 침전물(52)을 나타낸다. 인산칼슘(52)은 DNA/RNA와 공침되어, 유전자 물질/인산칼슘 층이 생체활성 규소 코어(50)를 둘러싸도록 한다. 생체활성 규소 코어는 국소적으로 인산칼슘 초포화를 유도한다. 생체활성 규소 코어를 세포 옆에/세포벽에 기대어 위치시키고, 공침물 DNA/Ca(PO₄)₂는 코어와 세포벽에 기대어 위치시키는 것이 가능할 수 있다. 코어가 식세포작용화되면 재흡수될 수 있다.

코어(50)는 DNA/RNA/임의의 활성 물질을 그 위에 가질 필요는 없다 - 이는 단순히 DNA/Ca(PO₄)₂의 공침에 대한 우수한 성향 부위로서 작용할 수 있다.

인산칼슘 공침물 DNA 형질감염에 대한 성향 부위로서 유리 비드를 사용하는 것이 공지되어 있다 - 예를 들면, 문헌[참조: Watson and Latchman, "Methods (San Diego) 1996 10(3), 289-291 (Eng)]을 참조한다.

세공은 직경이 2nm 이하이고, 메조 기공은 직경이 2 내지 50nm이며, 거공은 직경이 50nm 이상인 것으로 구별한다.

도 6에서 나타낸 바와 같이, 다공성 규소, 바람직하게는 메조 기공성 규소(거공성 및 미공성 규소도 유용하다)를 사용하여 전자천공 기술로 물질을 세포로 도입하는 효율성을 개선시키는 것이 가능하다는 것 또한 실현되었다.

다공성 규소(또는 다른 다공성 생체활성 물질 또는 생체활성 다결정성 규소) 전극(60) 및 (61)을 사용하면 더욱 우수한 전자천공 성능을 달성한다. 전극은 생체불활성이기 보다 생체활성이기 때문에, 세포(전형적으로는 동물 세포)는 이에 대한 친화성을 갖고, 이의 표면 위에 위치한다.

낮은 다공도(50% 이하, 30% 이하, 또는 10% 이하)의 생체활성 규소는 전기 전도성이고, 마이크로전극 배열(60) 및 (61)에서 성장할 수 있는 부착된 포유동물 세포(62)에 대한 적합하고 친밀한 복합 매트릭스이다. 따라서, 생체활성 다공성 규소 전극 위에 포유동물 세포를 성장시킨 다음, DNA(또는 기타 물질)를 전자천공법을 사용하여 세포로 도입할 수 있으며, 이때 세포가 성장하는 기질은 전자천공 장치의 전극 또는 전극(60) 및 (61) 모두이다. 이는 세포를 취급하는 데 유리하며, 액체 매질(63)에 현탁된 세포를 단독으로 갖는 것보다 DNA 도입의 더 우수한 효율도를 달성한다.

다공성 규소가 포유동물에서 생체내 재흡수성/부식성이라는 사실이 본 발명자들에 의해 입증되었으며, 이는 본 발명의 몇 가지 측면을 지지한다. 규소가 생체활성으로 될 수 있다는 사실은 본 발명의 기타 측면을 지지한다.

도 7은 다공성 규소의 시트에서 질소 농도를 깊이에 따라 나타낸 SIMS 플롯(2급 이온 질량 분광계)을 나타낸다. DNA는 질소가 풍부하며, 다공성 규소에서 높은 질소 농도를 검출하는 것은 얼마나 많은 DNA가 존재하는지에 대한 척도이다. 플롯(70)은 어떠한 DNA도 시트의 표면에 가해지지 않은, 질소에 대해 분석한 "노화된(aged)" 다공성 규소 시트를 나타낸다. 질소의 배경 수준은 다공성 규소 필름 유형과 이의 "노화" - 주위 공기에서의 저장 기간에 좌우된다. 플롯(72)은 물 한방울을 다공성 규소 시트 표면에 적가한 후 다공성 규소 시트를 분석한 결과를 나타낸다. 물 한 방울에는 μg 당 DNA가 1ng 존재한다. DNA 용액 적가물은 시트를 분석하기 전 50°C에서 건조시킨다. 플롯(74)은 물 한 방울 중의 동일한 DNA 1ng/ μg 를 시트에 적가하고 건조시킨 다음, 시트를 50°C의 탈이온수로 세척하는 경우 다공성 규소 중의 질소의 양을 나타낸다.

알 수 있는 바와 같이, 플롯(70)보다 플롯(72)의 질소가 훨씬 많으며, DNA가 시험으로 검출된다는 것을 나타낸다. 플롯(74)은 세척 단계가 DNA 전부가 아닌 일부를 제거시킴을 나타낸다 - DNA 일부는 아마도 다공성 규소에 부분적으로 부동화되어 후에(세척 동안) 방출되는 것 같았다.

도 8은 순수한 수처리 후 동일한 층에 대한 동등한 SIMS 플롯을 나타낸다. "노화된" 다공성 규소는 주위 공기중에서 저장되어, 산화질소 및 암모니아의 흡착 - 일반적인 미량의 오염 기체로 인한 질소의 배경 농도를 획득한다. 플롯(80)은 DNA가 없는 노화된 다공성 규소를 나타내고, 플롯(82)은 물 한방울이 침착된(DNA 용액 아님) 노화된 다공성 규소를 나타내며, 플롯(84)은 용액에 DNA 1ng/ μg 를 부가 후 50°C에서 건조시킨 노화된 다공성 규소를 분석한 결과를 비교를 위하여 다시 나타낸다.

도 7 및 8에 나타낸 SIMS 데이터는 다공성 규소가 DNA와 역으로 결합할 수 있음을 나타낸다.

본 발명은 물질을 살아있는 세포로 운송/이동시키기 위한 무기 벡터로서의 다공성 규소(또는 다결정성 규소)를 사용하는 것을 고려할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

물질을 세포로 이동시키기 위한 다공성 또는 다결정성 규소를 사용함을 포함하여, 물질을 세포로 이동시키는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 재흡수성 또는 생체부식성 다공성 또는 다결정성 규소를 사용함을 포함하는 방법.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 다공성 또는 다결정성 규소의 영역을 포함하는 마이크로니들(microneedle)을 사용함을 포함하는 방법.

청구항 4.

제3항에 있어서, 니들의 첨단(tip)에 다공성 또는 다결정성 규소가 제공됨을 포함하는 방법.

청구항 5.

제1항 또는 제2항에 있어서, 다공성 또는 다결정성 규소 피막을 갖는 마이크로니들을 사용함을 포함하는 방법.

청구항 6.

제1항 또는 제2항에 있어서, 부분적으로 다공성 또는 다결정성 규소를 포함하는 마이크로니들의 배열을 사용함을 포함하는 방법.

청구항 7.

제1항 또는 제2항에 있어서, 중공(hollow)을 갖고 다공성 또는 다결정성 규소를 포함하며, 물질이 중공으로 제공되거나 중공을 통하여 이동하는 마이크로니들 또는 마이크로니들 배열을 사용함을 포함하는 방법.

청구항 8.

제1항 또는 제2항에 있어서, 지지재로부터 연장되고, 다공성 또는 다결정성 규소를 포함하는, 각각의 니들이 기저로부터 침단까지 유체를 이동시키도록 개조된 유체 운송 수단을 갖는 복수의 니들, 및 유체 운송 수단과 소통되어 있고 니들의 기저에 주입되는 유체를 공급하는 유체 공급 수단을 포함하는 마이크로니들 배열이 사용되는 방법.

청구항 9.

제3항에 있어서, 마이크로니들이 중앙 루멘(central lumen)을 갖지 않고 마이크로팁을 포함하며, 다공성 또는 다결정성 규소가 마이크로니들 위에 제공되어 운반될 물질을 보유하는 방법.

청구항 10.

제1항 또는 제2항에 있어서, 저장소 또는 채널로부터 니들의 표면에 제공된 물질 운반 영역에 이르는 기공 망상 구조를 갖는 니들 또는 니들들을 제공함을 포함하는 방법.

청구항 11.

제1항 또는 제2항에 있어서, 다공성 또는 다결정성 규소 생체용 탄환을 사용함을 포함하는 방법.

청구항 12.

제1항 또는 제2항에 있어서, 물질이 결합된 다공성 또는 다결정성 규소를 사용하고, 당해 다공성 또는 다결정성 규소를, 세포로 흡수되는 공침물을 형성하는 또 다른 물질과 공침되도록 개조된 형태로 제공함을 포함하는 방법.

청구항 13.

제12항에 있어서, 공침물로서 인산칼슘을 사용함을 포함하는 방법.

청구항 14.

제1항 또는 제2항에 있어서, 다공성 또는 다결정성 규소를 포함하는 전기적으로 생체활성인 전극을 사용하고, 전자천공법(electroporation)을 사용하여 물질을 세포로 이동시킴을 포함하는 방법.

청구항 15.

제14항에 있어서, 세포가 전극에 부착되는 방법.

청구항 16.

제1항 또는 제2항에 있어서, 물질이 DNA 또는 RNA, DNA 또는 RNA의 단편, 또는 DNA 또는 RNA의 작제물을 포함하는 방법.

청구항 17.

다공성 또는 다결정성 규소를 포함하는 마이크로니들.

청구항 18.

제17항에 있어서, 도관(duct)을 갖는 마이크로니들.

청구항 19.

제18항에 있어서, 도관이 마이크로니들의 기저 영역으로부터 마이크로니들의 첨단에 이르는 마이크로니들.

청구항 20.

제17항 내지 제19항 중의 어느 한 항에 있어서, 완전히 다공성 또는 다결정성 규소로 제조되는 마이크로니들.

청구항 21.

제17항 내지 제19항 중의 어느 한 항에 있어서, 마이크로니들의 일부가 다공성 또는 다결정성 규소의 표면 층을 포함하는 마이크로니들.

청구항 22.

제17항 내지 제19항 중의 어느 한 항에 있어서, 다공성 또는 모세관 망상 구조가 제공되는 마이크로니들.

청구항 23.

세포로 운반되도록 개조된 물질을 추가로 포함하는 제17항에 따른 마이크로니들을 갖는 니들 배열.

청구항 24.

제23항에 있어서, 물질이 다공성 또는 다결정성 규소에 의해 마이크로니들에 의해 운반되거나, 마이크로니들 위에 보유되는 니들 배열.

청구항 25.

제23항 또는 제24항에 있어서, 마이크로니들이 재흡수성 또는 생체흡수성인 니들 배열.

청구항 26.

마이크로니들이 제17항 내지 제19항 중의 어느 한 항에 따르는 것인, 지지재로부터 확장된 마이크로니들의 배열.

청구항 27.

다공성 또는 다결정성 규소 및 세포로 이동시킬 물질을 포함하는, 물질을 세포로 이동시키기 위한 세포 진입 비히클.

청구항 28.

제27항에 있어서, 다공성 또는 다결정성 규소가 재흡수성인 비히클.

청구항 29.

제27항 또는 제28항에 있어서, 다공성 또는 다결정성 규소를 포함하는 생체용 탄환을 포함하는 비히클.

청구항 30.

제29항에 있어서, 생체용 탄환이 완전히 다공성 또는 다결정성 규소로 제조되는 비히클.

청구항 31.

제28항에 있어서, 사용시 세포로 흡수되는 공침물과 함께 공침되는 물질을 포함하는 비히클.

청구항 32.

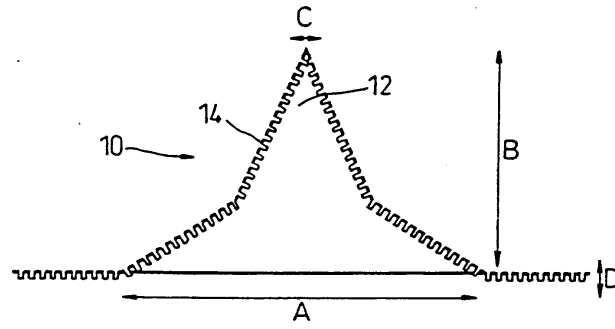
제28항에 있어서, 전기 전도성 생체활성 다공성 또는 다결정성 규소 전극을 포함하는 비히클.

청구항 33.

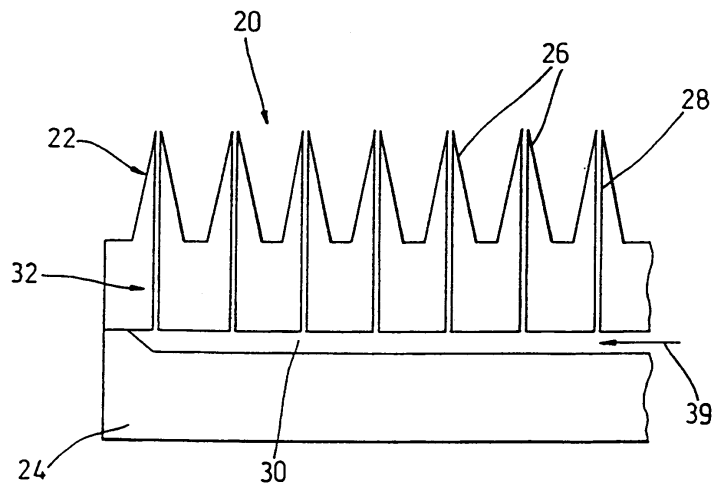
삭제

도면

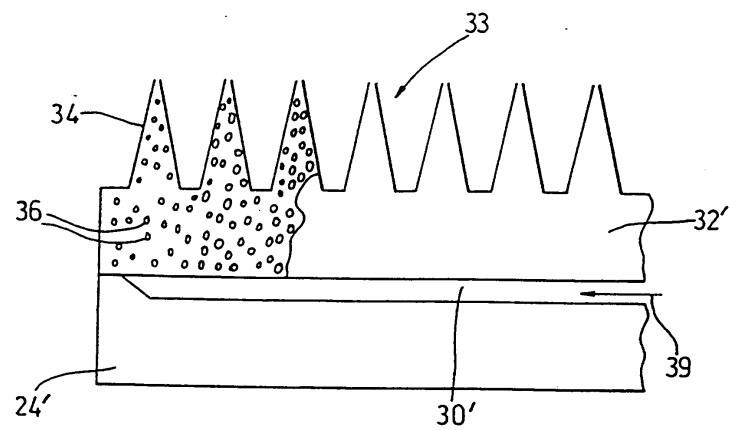
도면1



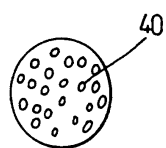
도면2



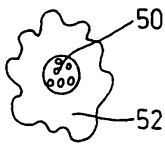
도면3



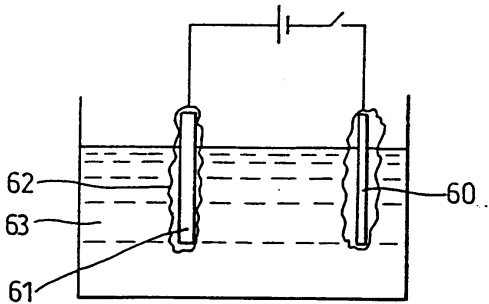
도면4



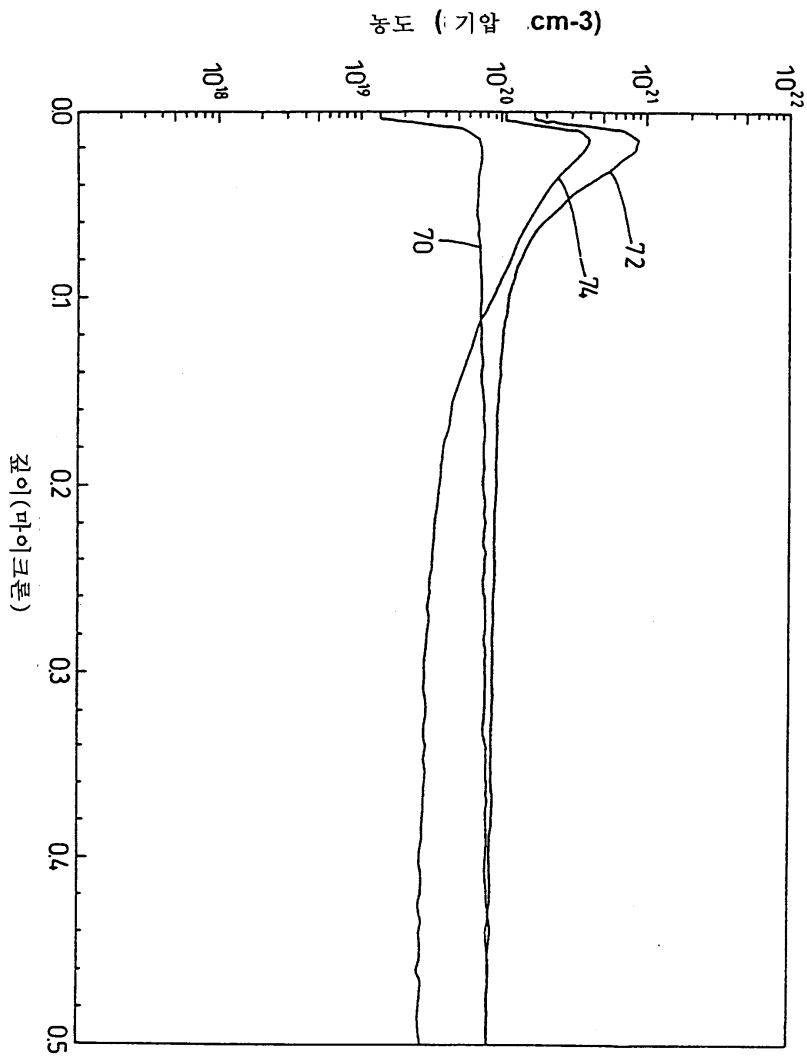
도면5



도면6



도면7



도면8

