



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년08월19일
(11) 등록번호 10-0852996
(24) 등록일자 2008년08월12일

(51) Int. Cl.
A01K 45/00 (2006.01) *A01K 43/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7009192
(22) 출원일자 2007년04월23일
심사청구일자 2007년04월23일
번역문제출일자 2007년04월23일
(65) 공개번호 10-2007-0059170
(43) 공개일자 2007년06월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/038270
국제출원일자 2005년10월21일
(87) 국제공개번호 WO 2006/047458
국제공개일자 2006년05월04일
(30) 우선권주장
60/621,964 2004년10월25일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US6244214B1
전체 청구항 수 : 총 33 항

(73) 특허권자
엠브렉스, 인코포레이티드
미국 노스 캐롤라이나 27703 스웨비아 코트 듀르
햄 1040
(72) 발명자
울프 스티븐 피.
미국 노스 캐롤라이나 27516 채플 힐 애버딘 درا
이브 608
마하토 디팍
미국 노스 캐롤라이나 27613 롤리 글렌 에린 웨이
4200
리마크직 필립 엘. 주니어
미국 노스 캐롤라이나 27517 채플 힐 더랜트 스트
리트 200아파트먼트 302
(74) 대리인
리엔특허법인

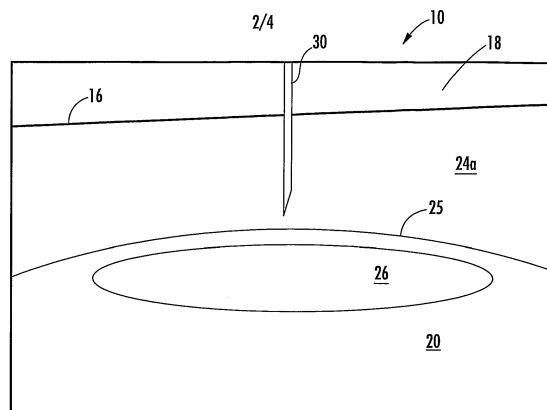
심사관 : 염금희

(54) 조류 난의 배하강 내에 기구를 정확하게 위치하는 방법 및 장치

(57) 요약

난 내에 기구를 확실하고 정확하게 위치하는 방법 및 장치가 제공된다. 구멍이 난의 껍질의 부분 내에 형성되며, 기구는 상기 구멍을 통해 연장된다. 상기 기구는 압력을 받는 유체를 포함하는 루멘을 갖는 바늘을 포함한다. 유체 압력을 모니터링하며, 상기 유체의 압력의 변화의 검출에 반응하여, 상기 기구의 이동이 정지된다. 대안적으로, 유체 흐름을 모니터링하고, 상기 바늘로부터 유체 흐름의 검출에 반응하여, 상기 기구의 이동이 정지된다. 상기 기구는 난의 배하강 내로 물질을 전달하도록 배치된 물질 전달 기구일 수 있다. 상기 기구는 난으로부터 물질을 제거하도록 배치된 물질 제거 기구일 수 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 난(egg) 내에 기구(device)를 위치하는 방법:

난의 껍질 부분 내에 구멍을 형성하는 단계;

압력을 받는 유체를 포함하는 루멘을 갖는 바늘을 포함하는 기구를 상기 구멍을 통해 난 내로 연장하는 단계;

상기 루멘 내의 유체의 압력 변화를 검출하는 단계; 및

상기 루멘 내의 유체의 압력 변화의 검출에 반응하여 상기 기구의 이동을 정지하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 기구는 물질 전달 기구를 포함하며, 상기 기구의 이동의 정지에 반응하여 상기 물질 전달 기구를 통해 난 내로 물질을 주입하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 물질은 세포, 백신, 핵산, 단백질, 펩티드, 바이러스, 항원, 호르몬, 성장인자, 및 시토키인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 기구는 물질 제거 기구를 포함하며, 상기 기구의 이동의 정지에 반응하여 상기 물질 제거 기구를 통해 난 으로부터 물질을 제거하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 난으로부터 상기 기구를 제거하는 단계; 및

상기 난 껍질에서 상기 구멍을 봉합하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 3 항에 있어서,

상기 물질을 주입한 후 상기 난을 부화까지 인큐베이션하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 제거 단계는 상기 루멘에서 유체의 압력이 예정된 수준으로 강아되는 것을 검출하는데 반응하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

하기 단계를 포함하는 조류 난의 배하강(subgerminal cavity) 내에 물질 전달 기구를 위치하는 방법:

난의 껍질 부분 내에 구멍을 형성하는 단계;

압력을 받는 유체를 포함하는 루멘을 갖는 바늘을 포함하고, 상기 루멘은 출구를 포함하는 것인 물질 전달 기구를 상기 구멍을 통해 난 내의 난백 내로 연장하는 단계;

상기 루멘 내의 유체의 압력 변화를 검출하는 단계; 및

상기 루멘 내의 유체의 압력 변화의 검출에 반응하여 상기 배하강 내에 루멘 출구가 위치하도록 상기 난백을 통해 상기 물질 전달 기구의 이동을 정지하는 단계.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 기구의 이동의 정지에 반응하여 상기 물질 전달 기구를 통해 배하강 내로 물질을 주입하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 물질은 세포, 백신, 핵산, 단백질, 펩티드, 바이러스, 항원, 호르몬, 성장인자, 및 시토키인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서,

상기 난으로부터 상기 물질 전달 기구를 제거하는 단계; 및

상기 난 껍질에서 상기 구멍을 봉합하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 물질을 주입하고 구멍을 봉합한 후 상기 난을 부화까지 인큐베이션하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

상기 제거 단계는 상기 루멘에서 유체의 압력이 예정된 수준으로 강아되는 것을 검출하는데 반응하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

하기 단계를 포함하는 난 내에 기구를 위치하는 방법:

난의 껍질 부분 내에 구멍을 형성하는 단계;

압력을 받는 유체를 포함하는 루멘을 갖는 바늘을 포함하고, 상기 루멘은 출구를 포함하는 것인 기구를 상기 구멍을 통해 난 내로 연장하는 단계;

상기 루멘 출구를 통한 유체의 흐름을 검출하는 단계; 및

상기 유체 흐름의 검출에 반응하여 상기 기구의 이동을 정지하는 단계.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 기구는 물질 전달 기구를 포함하며, 상기 기구의 이동의 정지에 반응하여 상기 물질 전달 기구를 통해 난 내로 물질을 주입하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 물질은 세포, 백신, 핵산, 단백질, 펩티드, 바이러스, 항원, 호르몬, 성장인자, 및 시토카인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 14 항에 있어서,

상기 기구는 물질 제거 기구를 포함하며, 상기 기구의 이동의 정지에 반응하여 상기 물질 제거 기구를 통해 난 으로부터 물질을 제거하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 14 항에 있어서,

상기 난으로부터 상기 기구를 제거하는 단계; 및

상기 난 껍질에서 상기 구멍을 봉합하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

상기 물질을 주입하고 구멍을 봉합한 후 상기 난을 부화까지 인큐베이션하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

하기 단계를 포함하는 조류 난의 배하강 내에 물질 전달 기구를 위치하는 방법:

난의 껍질 부분 내에 구멍을 형성하는 단계;

압력을 받는 유체를 포함하는 루멘을 갖는 바늘을 포함하고, 상기 루멘은 출구를 포함하는 것인 물질 전달 기구를 상기 구멍을 통해 난 내의 난백 내로 연장하는 단계;

상기 루멘 출구를 통해 상기 유체의 흐름을 검출하는 단계; 및

상기 유체 흐름의 검출에 반응하여 상기 배하강 내에 루멘 출구가 위치하도록 상기 난백을 통해 상기 물질 전달 기구의 이동을 정지하는 단계.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

상기 기구의 이동의 정지에 반응하여 상기 물질 전달 기구를 통해 배하강 내로 물질을 주입하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 물질은 세포, 백신, 핵산, 단백질, 펩티드, 바이러스, 항원, 호르몬, 성장인자, 및 시토카인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 20 항에 있어서,

상기 난으로부터 상기 물질 전달 기구를 제거하는 단계; 및

상기 난 껍질에서 상기 구멍을 봉합하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

상기 물질을 주입하고 구멍을 봉합한 후 상기 난을 부화까지 인큐베이션하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

압력을 받는 유체를 포함하는 루멘을 포함하고, 연장가능하며 후퇴가능한 바늘; 및

상기 바늘이 난에서 물질을 통과하여 이동할 때, 상기 루멘 내에 유체의 압력의 변화를 검출하도록 배치된 압력 변환기를 포함하고, 상기 바늘의 이동은 상기 유체의 압력의 변화를 검출하는 압력 변환기에 반응하여 정지되는 것인 난의 껍질에서 구멍을 통해 난 내로 제거가능하게 삽입되도록 배치된 장치.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

상기 바늘은 물질 전달 기구를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 27

제 25 항에 있어서,

상기 바늘은 물질 제거 기구를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 28

제 25 항에 있어서,

상기 장치는 난의 껍질에서 구멍을 형성하도록 배치된 펀치를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 29

압력을 받는 유체를 포함하는 루멘을 포함하고, 연장가능하며 후퇴가능한 바늘; 및

상기 바늘이 난에서 물질을 통과하여 이동할 때, 상기 루멘을 통한 유체의 흐름을 검출하도록 배치된 유량 센서를 포함하고, 상기 바늘의 이동은 상기 유체 흐름을 검출하는 유량 센서에 반응하여 정지되는 것인 난의 껍질에서 구멍을 통해 난 내로 제거가능하게 삽입되도록 배치된 장치.

청구항 30

제 29 항에 있어서,

상기 바늘은 물질 전달 기구를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 31

제 29 항에 있어서,

상기 바늘은 물질 제거 기구를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 32

제 29 항에 있어서,

상기 장치는 난의 껍질에서 구멍을 형성하도록 배치된 펀치를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 33

제 29 항에 있어서,

상기 유량 센서는 가스 질량 유량 센서를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

명세서

기술분야

<1> **관련 출원**

<2> 본 출원은 이의 개시가 본원에 원용에 의해 전체적으로 포함된, 미국 가출원 제60/621,964호 (2004년 10월 25일 출원)에 대한 우선권의 이익을 주장한다.

<3> **기술 분야**

<4> 본 발명은 일반적으로 난, 더욱 구체적으로, 난 가공 시스템 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<5> 가금류 부화장 및 기타 난 가공 시설에서, 난은 다수로 취급 및 가공된다. 용어 "가공"은 배아가 여전히 난에 있는 동안 (즉, 인 오보), 살아 있는 난을 약물, 영양분, 호르몬 및/또는 기타 유익한 물질로 처리하는 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 조류 난으로 다양한 물질의 인 오보 주입은 부화 후 이환율 및 사망율을 감소시키고, 생성된 조류의 잠재적인 성장 속도 또는 중국적인 크기를 증가시키고, 심지어 배아의 성 결정에 영향을 주기 위해 이용되어 왔다. 살아 있는 난에 백신의 주입은 인 오보 조류를 면역화하기 위해 효과적으로 이용되어 왔다.

<6> 지금 도 1을 참고하면, 조류 난(10)을 예시한다. 상기 예시된 난(10)은 껍질(12), 외부 껍질막(14), 내부 껍질막(16), 및 내부 및 외부 껍질막(14) 및 (16) 사이의 무딘 말단에 공기 셀(18)을 포함한다. 상기 예시된 난(10)은 또한 난황(20) 및 내부 얇은 난백(24a), 외부 두꺼운 난백(24b), 및 외부 얇은 난백(24c)에 의해 둘러싸인 배반엽(22)을 포함한다. 상기 배반엽(22)은 "배하강"(26) (도 2)의 정상에 위치한 수 개의 세포 깊이인 세포 원반이다. 상기 배반엽 원반(22)의 가장자리는 난황(20)에 부착된다.

<7> 현재로, 키메라 병아리를 제조하기 위해, 세포를 바늘로 상기 배반엽을 찌르고, 상기 세포를 상기 배하강 내로 전달함으로써 조류 난의 배하강 내로 주입한다. 그러나, 조류 난 내의 상기 배하강은 매우 작기 때문에, 상기 배하강 내로 세포의 정확한 전달은 어려울 수 있다. 더욱이, 작업자는 바늘이 상기 배하강 내로 연장된 깊이에 대해 거의 또는 전혀 제어가 안 될 수 있다. 또한, 배하강의 크기 및 깊이는 난마다 변할 수 있다. 상기와 같이, 배하강 내로 세포의 주입은 전형적으로 "맹목(blind) 주입"으로서 언급되는데, 이는 병아리가 부화하여 키메라현상에 대해 시험될 때까지 난의 배하강 내에 세포가 실제로 삽입되었는지 아는 것이 가능하지 않을 수 있기 때문이다. 따라서, 조류 난의 배하강 내에 기구(device)를 확실하고 정확하게 위치하는 개선된 방법에 대해 당업계에 요구가 존재한다.

발명의 상세한 설명

<8> **발명의 요약**

<9> 상기 논의의 면에서, 난 내에 기구를 확실하고 정확하게 위치하는 방법 및 장치가 제공된다. 본 발명의 구현예에 따라, 구멍이 난의 껍질의 부분 내에 형성되며, 기구는 상기 구멍을 통해 연장된다. 상기 기구는 압력을 받는 유체를 포함하는 루멘을 갖는 바늘을 포함한다. 유체 압력을 모니터링하며, 상기 유체의 압력의 변화의 검출에 반응하여, 상기 기구의 이동이 정지된다. 대안적으로, 유체 흐름을 모니터링하고, 상기 바늘로부터 유체 흐름의 검출에 반응하여, 상기 기구의 이동이 정지된다.

<10> 본 발명의 구현예는 난의 배하강 내의 바늘의 정확하고 확실한 위치를 허용한다. 본 발명의 구현예에 따라, 상기 기구는 난의 배하강 내로 물질 (예를 들면, 세포, 백신, 핵산, 단백질, 펩티드, 바이러스, 항원, 호르몬, 성장인자, 시토키인 등)을 전달하도록 배치된 물질 전달 기구일 수 있다. 본 발명의 다른 구현예에 따라, 상기 기구는 난으로부터 물질을 제거하도록 배치된 물질 제거 기구일 수 있다.

<11> **발명의 상세한 설명**

<12> 본 발명은 지금 본 발명의 구현예를 제시한 첨부된 도면을 참고하여 더욱 상세히 이후에 기재된다. 그러나, 본 발명은 많은 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 본원에 설명된 구현예에 제한되는 것으로 해석되어서는 안되며; 오히려, 상기 구현예는 상기 개시가 철저하고 완전하도록 제공되며, 당업자에게 본 발명의 범위를 충분히 전달할 것이다.

<13> 동등한 수는 명세서 전체적으로 동등한 구성요소를 언급한다. 도면에서, 특정 선, 층, 성분, 구성요소 또는 특징의 두께는 명확화를 위해 과장될 수 있다. 파선은 다르게 지정되지 않는다면 임의적인 특징 또는 작업을 예시한다. 본원에 언급된 모든 공개공보, 특허출원, 특허, 및 기타 참고문헌은 본원에 전체적으로 원용에 의해

포함된다.

- <14> 본원에 이용된 용어는 단지 특정 구현예를 기재할 목적이며, 본 발명을 제한할 의도는 아니다. 본원에 이용된, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 명세서가 명백하게 다르게 지정하지 않는다면, 또한 복수 형태를 포함할 의도이다. 본 명세서에서 이용될 때, 용어 "포함하다" 및/또는 "포함하는"은 언급된 특징, 정수, 단계, 작업, 구성요소, 및/또는 성분의 존재를 특정하나, 하나 이상의 기타 특징, 정수, 단계, 작업, 구성요소, 성분, 및/또는 이의 그룹의 존재 또는 첨가를 제외하지 않는 것으로 이해할 것이다. 본원에 이용된, 용어 "및/또는"은 하나 이상의 관련된 열거된 항목의 임의의 모든 조합을 포함한다. 본원에 이용된, "X 내지 Y" 및 "약 X 내지 Y"와 같은 구문은 X 및 Y를 포함하도록 해석되어야 한다. 본원에 이용된, "약 X 내지 Y"와 같은 구문은 "약 X 내지 약 Y"를 의미한다. 본원에 이용된, "약 X 내지 Y"와 같은 구문은 "약 X 내지 약 Y"를 의미한다.
- <15> 다르게 정의되지 않는다면, 본원에 이용된 모든 용어 (기술적 및 과학적 용어 포함)는 본 발명이 속하는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 흔히 이용되는 사전에서 정의된 것과 같은 용어는 본 명세서 및 관련 기술의 내용에서 이의 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 명백하게 본원에서 정의되지 않는다면 이상적이거나 또는 과도하게 형식적인 의미로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해할 것이다. 주지의 기능 또는 구성은 간결 및/또는 명료성을 위해 상세히 기재되지 않을 수 있다.
- <16> 구성요소가 또 다른 구성요소 "위에", "에 부착된", "에 연결된", "와 커플링된", "접촉하는" 등으로 언급될 때, 이는 직접 다른 구성요소 위에, 부착되어, 연결되어, 커플링되거나 또는 접촉할 수 있거나 또는 개재하는 구성요소가 또한 존재할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 대조적으로, 구성요소가 예를 들면, 또 다른 구성요소 "직접 위에", "직접 부착된", "직접 연결된", "직접 커플링된", "직접 접촉하는" 것으로 언급될 때, 존재하는 개재 구성요소는 없다. 또한, 또 다른 특징에 "인접하여" 배치된 구조 또는 특징에 대한 참고는 인접한 특징에 중첩되거나 또는 기초가 되는 부분을 가질 것이라는 것을 당업자는 인식할 것이다.
- <17> "아래(under)", "아래(below)", "더 낮은", "위에", "상단의" 등과 같은 공간적으로 상대적인 용어는 도면에 예시된 바와 같이 하나의 구성요소 또는 특징의 다른 구성요소(들) 또는 특징(들)과의 관계를 기재하기 위해 기재의 용어를 위해 본원에 이용될 수 있다. 공간적으로 상대적인 용어는 이용 중인 기구의 상이한 방향 또는 도면에 도시된 방향 외의 작업을 포함할 의도라는 것을 이해할 것이다. 예를 들면, 도면에서의 기구가 뒤집어진다면, 다른 구성요소 또는 특징의 "아래(under)" 또는 "아래(beneath)"로서 기재된 구성요소는 이어서 다른 구성요소 또는 특징의 "위에" 배향될 수 있다. 그리하여, 전형적인 용어 "아래(under)"는 "위" 및 "아래"의 방향 양자를 포함할 수 있다. 상기 기구는 다른 방법으로 배향될 수 있으며 (90도 또는 다른 방향으로 회전함), 본원에 이용된 공간적으로 상대적인 기재는 따라서 해석된다. 유사하게, 용어 "위쪽으로", "아래쪽으로", "수직의", "수평의" 등은 구체적으로 다르게 나타내지 않는다면 단지 설명의 목적으로 본원에 이용된다.
- <18> 용어 "제1", "제2" 등이 다양한 구성요소, 성분, 영역, 층 및/또는 섹션을 기재하기 위해 본원에 이용될 수 있지만, 상기 구성요소, 성분, 영역, 층 및/또는 섹션은 상기 용어에 의해 제한되어서는 안 되는 것으로 이해될 것이다. 상기 용어는 하나의 구성요소, 성분, 영역, 층 또는 섹션을 또 다른 구성요소, 성분, 영역, 층 또는 섹션으로부터 구별하기 위해 단지 이용된다. 그리하여, 하기 논의된 "제1" 구성요소, 성분, 영역, 층 또는 섹션은 또한 본 발명의 교시로부터 벗어나지 않고 "제2" 구성요소, 성분, 영역, 층 또는 섹션으로 언급될 수 있다. 작업 (또는 단계)의 순서는 구체적으로 다르게 나타내지 않는다면 청구범위 또는 도면에 제시된 순서에 제한되지 않는다.
- <19> 본원에 이용된 용어 "조류" 및 "조류 대상"은 임의의 조류 종의 수컷 및 암컷을 포함할 의도이나, 주로 난, 육류 또는 애완동물로서 상업적으로 키우는 가금을 포함할 의도이다. 따라서, 용어 "조류" 및 "조류 대상"은 특히 병아리, 칠면조, 오리, 거위, 메추라기, 꿩, 소형 앵무새, 앵무새, 앵무새(cockatoo), 코카틸 앵무새, 타조, 예뽀 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다양한 조류를 포함할 의도이다.
- <20> 본원에 이용된, 용어 "초기 배아"는 산란 시기 (배반엽 단계)에서 원시생식세포 (PGC)가 이동하는 거의 발생 단계까지의 조류 배아를 말한다. 특히 병아리 배아에 대해, "초기 배아"는 일반적으로 거의 배아 단계 20 (H&H) 배아 또는 그 전이다. 병아리 배아의 발생 단계는 당업계에서 잘 이해되며, 예를 들면, [The Atlas of Chick Development, R. Bellairs & M. Osmond, eds., Academic Press, 1998]을 참고한다.
- <21> 본원에 이용된, 용어 "배반엽"은 당업계에 이의 이해된 의미를 가진다. 일반적으로, 배반엽은 산란 시기에서 장배형성의 말기까지의 배아를 포함한다. 상기 배반엽은 종종 당업계에서 대안적인 표시 "배(germinal disc)" 또는 "배아 원반"에 의해 언급된다. 배반엽은 초기 배아에서 절단 동안 형성되는 세포의 평평해진 원반으로서 기

재될 수 있으며, 장배형성의 말기까지 지속한다. 산란 시기까지, 배반엽의 2가지 주요 영역인 중앙에 위치한 투명한 영역 및 주변에 위치한 불투명 영역이 보인다 (The Atlas of Chick Development, R. Bellairs & M. Osmond, eds., Academic Press, 1998). 특히 병아리 배아에 대해, 상기 배반엽은 산란의 시기 (즉, 단계 IX 또는 단계 X EG&K)에서 거의 단계 XIII (EG&K) 또는 그 이상까지의 배아로서 전형적으로 특징지어진다.

- <22> 본원에 이용된, 용어 "주입" 및 "주입하는"은 난 또는 배아 내로 물질을 전달 또는 방출하는 방법, 난 또는 배아로부터 물질 (즉, 시료)를 제거하는 방법, 및/또는 난 또는 배아 내로 검출기 기구를 삽입하는 방법을 포함하는, 난 또는 배아 내로 기구를 삽입하는 방법을 포함한다.
- <23> 용어 "키메라 조류" 또는 "키메라 배아"는 "공여자"로서 언급되는 또 다른 조류 또는 배아 유래의 세포를 포함하는 각각 수용자 조류 또는 배아를 말한다. 용어 "트랜스제닉 조류" 및 "트랜스제닉 배아"는 당업계에서 이의 일반적으로 이해되는 의미에 따라 본원에 이용된다. 트랜스제닉 조류 또는 트랜스제닉 배아는 하나 이상의 세포에서 외래 핵산 서열을 포함한다.
- <24> 본원에 이용된, 용어 "막"은 난 내의 임의의 조직 층을 말한다. 난 내의 전형적인 막은 외부 껍질 막, 내부 껍질 막, 용모막요막, 난황 (VM) 막, 및 양수막 (양막)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- <25> 본원에 이용된, 용어 "바늘", "피켓", 및 "마이크로피켓"은 상호교환될 의도이다.
- <26> 도 2를 참고하면, 본 발명의 구현예에 따라, 이의 배하강(26) 내에 삽입된 바늘(30)을 갖는 조류 난(10)이 예시된다. 상기 바늘(30)은 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 난의 배하강(26) 내에 침착되는 유체가 전달되는 루멘을 포함한다. 바늘(30)의 팁(tip)이 난황막(25)을 통과하고, 배하강(26)으로 들어갈 때 정확하게 측정하기 위해 압력 감지 시스템(40) (도 3)이 이용된다. 상기 압력 감지 시스템(40)은 상기 바늘(30) 내에 보유된 유체가 바늘 루멘 벽 사이의 표면 장력에 의해 어느 정도 유지되는 원리에 기초하여 작동된다. 유체가 상기 바늘 팁이 공기에 의해 둘러싸일 때 상기 바늘 팁에서 루멘 출구에서 흘러나오기 위해, 최소 압력이 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 루멘의 다른 말단 (즉, 루멘 입구)에 인가되어야 한다. 그러나, 상기 루멘 출구가 물과 같은 액체에 잠긴다면, 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 상기 표면 장력은 실질적으로 제거되며, 상기 루멘 내의 유체는 루멘 입구에 인가된 훨씬 적은 압력으로 상기 루멘에서 흘러나올 것이다.
- <27> 출원인은 루멘 출구가 공기 내에 배치될 때와 비교하여 상기 루멘 출구가 난백 내에 삽입될 때 상기 루멘을 통해 흐름을 야기하기 위해 루멘 입구에서 현저하게 더 큰 압력이 요구된다는 것을 발견하였다. 임의의 특정 이론에 구속되길 원하지 않지만, 출원인은 이는 적어도 부분적으로 난 내의 기타 유체와 비교하여 난백의 높은 점성에 기인할 수 있다고 믿는다. 출원인은 또한 배하강에서 배하 유체가 공기와 비교하여 상기 루멘 출구로부터 유체 흐름을 야기하기 위해 훨씬 낮은 압력을 요구하는 물과 유사한 특성을 가진다고 믿는다. 상기 바늘이 상기 배하강 내에 배치될 때와 비교하여 상기 바늘이 난백 내에 배치될 때 유체 흐름을 야기하기 위해 요구되는 압력 사이의 차이는 상기 바늘이 압력 센서를 통해 상기 배하강 내에 위치될 때의 정확한 측정을 허용한다.
- <28> 도 3을 참고하면, 본 발명의 구현예에 따라, 바늘 팁이 조류 난의 배하강 내에 삽입될 때 확실하고 정확하게 검출하도록 배치된 압력 감지 시스템(40)이 예시된다. 상기 예시된 시스템(40)은 압력 저장용기(42), 핀치 밸브(44), 압력 변환기(46), 로딩 주사기(48), 및 선형 슬라이드(50)를 포함한다. 마이크로피켓(30) (전술한 바늘의 기능을 수행함)은 조류 난의 배하강 내로 물질 (예를 들면, 세포, 백신, 핵산, 단백질, 펩티드, 바이러스, 항원, 호르몬, 성장인자, 시토카인 등)을 전달하도록 배치된다. 상기 마이크로피켓(30)은 유체를 포함하며, 예정된 압력으로 압력 저장용기(42)에 의해 가압된다. 상기 예정된 압력은 상기 마이크로피켓 팁이 난백에 위치할 때 유체가 상기 마이크로피켓(30)을 통해 흐르지 않으나, 상기 마이크로피켓 팁이 상기 배하강을 통과할 때 상기 마이크로피켓(30)을 통해 흐르는 압력이다. 상기 압력 변환기(46)는 상기 마이크로피켓(30)의 팁이 상기 배하강 내로 이동할 때 (이는 유체가 상기 마이크로피켓(30)에서 흘러나오게 함) 상기 마이크로피켓(30)에서 유체의 압력의 변화를 검출한다.
- <29> 압력 저장용기(42)는 가스 입구를 통해 용기에 연결된 압축된 공기 또는 기타 가스의 소스일 수 있으며, 용기의 유체 영역에서 액체 출구까지 뺀 튜브를 가진다. 예시된 구현예에서, 3-웨이 밸브(47)가 핀치 밸브(44) 및 로딩 주사기(48) 사이에 위치한다. 상기 핀치 밸브(44)는 압력 저장용기(42)를 통해 상기 마이크로피켓(30)의 가압을 촉진한다. 상기 3-웨이 밸브(47)는 상기 마이크로피켓(30)이 가압될 때 로딩 주사기(48)를 분리하며, 유체가 로딩 주사기(48)를 통해 상기 마이크로피켓(30) 내로 로딩될 때 상기 압력 저장용기(42)를 분리한다. 3-웨이 밸브(49)는 유체가 로딩 주사기(48)를 통해 상기 마이크로피켓(30) 내로 로딩될 때 상기 압력 변환기(46)를 분리한다.

- <30> 상기 선형 슬라이드(50)는 당업자에게 주지된 통상적인 X-Y 테이블일 수 있다. 상기 선형 슬라이드(50)는 상기 마이크로피펫(30)의 이동을 정확하게 제어한다. 상기 압력 변환기(46)는 상기 마이크로피펫 루멘 내의 유체의 압력의 변화를 검출하도록 배치된다.
- <31> 상기 압력 감지 시스템(40)은 바람직하게는 컴퓨터 제어하에 있다. 상기와 같이, 상기 압력 변환기로부터의 신호가 상기 마이크로피펫(30)의 이동을 제어하기 위해 이용될 수 있다. 유량 센서가 이용되는 기타 구현예에 따라, 상기 유량 센서 유래의 신호가 상기 마이크로피펫(30)의 이동을 제어하기 위해 이용될 수 있다.
- <32> 본 발명의 구현예에는 많은 이점을 가진다. 예를 들면, 본 발명의 구현예는 통상적인 방법보다 조류 난의 배하강 내로 세포 및 기타 물질을 전달하는 더욱 확실한 방법을 제공할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 구현예에 다른 압력 감지 시스템을 이용하는 것은 상기 배하강 내로 세포 전달이 일어날 때를 측정하는 피드백을 제공한다. 주입 바늘의 깊이를 정확하게 제어하기 위한 선형 슬라이드(50)의 이용이 또한 유리하다. 상기 선형 슬라이드는 상기 바늘의 제어된 이동을 제공한다. 주입이 수동으로 수행될 때, 난황막 및/또는 기타 내부 껍질막을 찢어지게 하는 측면 손 이동이 존재하는지 또는 상기 바늘을 상기 배하강 아래 또는 위의 영역으로 너무 깊이 위치하는 과도한 수직 이동이 있는지를 알 방법이 없다. 또한, 압력 강하는 전달된 부피와 직선으로 상관될 수 있으므로, 정확한 부피 (예를 들면, 0.1 μ l 이내)를 전달하는 매우 정확한 방법을 제공할 수 있다.
- <33> 도 4는 본 발명의 구현예에 따라, 난의 배하강에서 기구를 정확하게 위치하고, 거기에 물질을 전달하는 방법을 예시하는 흐름도이다. 상기 블록에서 언급된 기능은 도 4에 언급된 순서에서 벗어나서 일어날 수 있다는 것을 주목해야 한다. 연속하여 보여준 2개 (또는 그 이상) 블록은 사실 실질적으로 동시에 수행될 수 있거나 또는 상기 블록은 종종 관련된 기능에 의존하여 역순으로 수행될 수 있다.
- <34> 초기에, 구멍이 조류 난의 껍질에서 형성된다 (블록 100). 상기 구멍은 펀치를 통해 또는 당업자에게 공지된 기타 기구를 포함하는 다양한 방식으로 형성될 수 있다. 또한, 상기 구멍은 임의의 적당한 위치, 예를 들면, 적도축 근처의 난의 측면에, 난의 양 말단 등에서 형성될 수 있다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 난 껍질에서 구멍은 일반적으로 수평으로 위치한 난의 껍질 부분에 접한 위쪽에 도입된다. 그러나, 본 발명의 구현예는 난의 임의의 특정 방향에 제한되지 않는다.
- <35> 본 발명의 구현예에 따라, 난의 표면, 예를 들면 적어도 구멍의 형성 자리 주위는 미생물 (또는 기타) 오염을 줄이기 위해 살균될 수 있다 (예를 들면, 알코올 또는 기타 살균 용액으로). 그러나, 상기 구멍 자리를 포함하는 난을 살균하는 것은 본 발명의 구현예에 대해 요구되지 않는다.
- <36> 유체를 포함하는 루멘을 갖는 바늘은 상기 구멍을 통해 난의 난백 내로 삽입된다 (블록 105). 상기 바늘 루멘 내의 유체는 구멍 펀치 밸브(44)에 의해 가압되며 (예를 들면, 물의 약 5 내지 20 인치에서)(블록 110), 상기 압력은 도 3에 대해 기술한 바와 같이 압력 감지 시스템에 의해 모니터링된다. 상기 펀치 밸브(44)는 이어서 닫히고 (블록 115), 상기 바늘은 상기 난백 내로 및 난백을 통해 이동된다 (블록 120). 상기 루멘 내의 압력 강하가 검출될 때, 상기 바늘의 이동은 정지되며, 상기 바늘의 루멘 출구는 상기 난의 배하강 내에 위치한다 (블록 125). 유체 물질은 압력 강하 때문에 상기 배하강 내로 흐른다 (블록 130). 루멘으로부터 흐르는 유체는 상기 난으로 전달되는 물질일 수 있다 (예를 들면, 세포, 백신, 핵산, 단백질, 펩티드, 바이러스, 항원, 호르몬, 성장인자, 시토키인 등을 포함하는 유체). 대안적으로, 난으로 전달되는 물질은 압력 강하 때문에 흐르는 초기 유체를 따를 수 있다.
- <37> 상기 배하강 내로 전달되는 액체의 예정된 부피와 관련되는 상기 루멘 내의 예정된 압력 강하가 검출될 때 (블록 135), 상기 기구는 상기 난으로부터 물러난다 (블록 140). 상기 난 껍질에서 구멍은 봉합재로 봉합될 수 있으며 (블록 145), 상기 난은 부화까지 인큐베이션될 수 있다 (블록 150).
- <38> 본 발명의 기타 구현예에 따라, 저 유량 센서 또는 질량 유량 센서가 압력 센서 대신에 이용될 수 있다. 상기 구현예에서, 상기 유량 센서는 상기 유동 통로의 측면에서 배치되는 압력 센서와 마주보고 (또는 통하여) 일련으로 위치할 수 있다. 이는 전술한 압력 감지 시스템과 비교하여 유동 통로 및 유동 부피 양자에서 감소를 허용할 수 있었다. 상기 시스템은 액체 또는 가스 유량 센스를 이용할 수 있었다. 가스 유량 센서가 이용된다면, 이는 가스 압력이 유량 센서 다음, 그러나 마이크로피펫 또는 바늘 전에 유체 라인에 직접 적용될 수 있으므로 압력 저장용기를 제거할 수 있다. 그러므로, 상기 가스/유체 경계는 압력 저장용기 내부와 마주보는 튜빙 내부일 수 있다.
- <39> 도 5는 본 발명의 기타 구현예에 따라, 난의 배하강에서 기구를 정확하게 위치하고, 거기에 물질 (예를 들면, 세포, 백신, 핵산, 단백질, 펩티드, 바이러스, 항원, 호르몬, 성장인자, 시토키인 등)을 전달하는 방법을 예시

하는 흐름도이다. 상기 블록에 언급된 기능은 도 5에 언급된 순서에서 벗어나 일어날 수 있다는 것을 주목해야 한다. 연속하여 보여준 2개 (또는 그 이상) 블록은 사실 실질적으로 동시에 수행될 수 있거나 또는 상기 블록은 종종 관련된 기능에 의존하여 역순으로 수행될 수 있다.

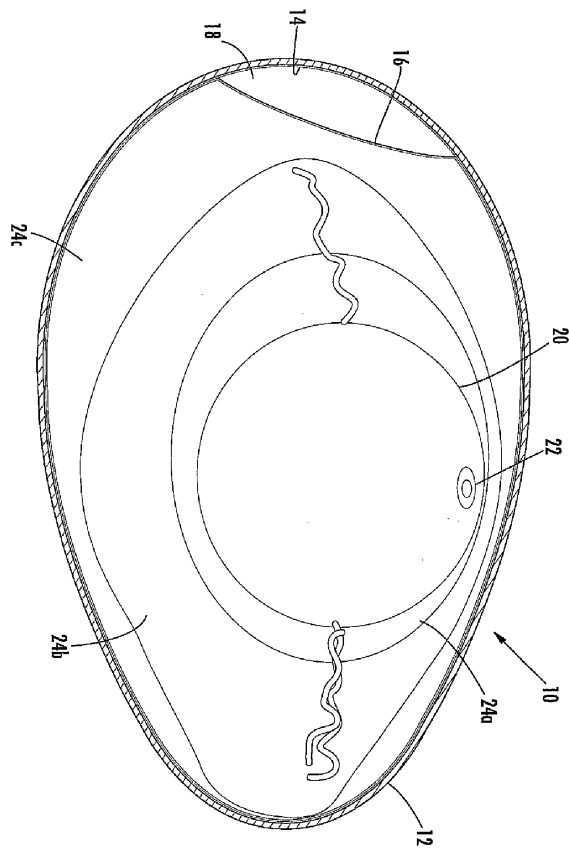
- <40> 초기에, 구멍이 조류 난의 껍질에서 형성된다 (블록 200). 상기 구멍은 펀치를 통해 또는 당업자에게 공지된 기타 기구를 포함하는 다양한 방식으로 형성될 수 있다. 또한, 상기 구멍은 임의의 적당한 위치, 예를 들면, 적도축 근처의 난의 측면에, 난의 양 말단 등에서 형성될 수 있다. 본 발명의 특정 바람직한 구현예에서, 상기 난 껍질에서 구멍은 일반적으로 수평으로 위치한 난의 껍질 부분에 접한 위쪽에 도입된다. 그러나, 본 발명의 구현예는 난의 임의의 특정 방향에 제한되지 않는다.
- <41> 본 발명의 구현예에 따라, 난의 표면, 예를 들면 적어도 구멍의 형성 자리 주위는 미생물 (또는 기타) 오염을 줄이기 위해 살균될 수 있다 (예를 들면, 알코올 또는 기타 살균 용액으로). 그러나, 상기 구멍 자리를 포함하는 난을 살균하는 것은 본 발명의 구현예에 대해 요구되지 않는다.
- <42> 유체를 포함하는 루멘을 갖는 바늘은 상기 구멍을 통해 난의 난백 내로 삽입된다 (블록 205). 상기 바늘 루멘 내의 유체는 가압되며 (예를 들면, 물의 약 5 내지 20 인치에서), 상기 바늘은 상기 난백 내로 및 난백을 통해 이동된다 (블록 210). 상기 루멘을 통한 유체 흐름이 검출될 때, 상기 바늘의 이동은 정지되며, 상기 바늘은 상기 난의 배하강 내에 올바르게 위치한다 (블록 215). 유체 물질 (예를 들면, 세포, 백신, 핵산, 단백질, 펩티드, 바이러스, 항원, 호르몬, 성장인자, 시토카인 등을 포함하는 유체)은 상기 배하강 내로 흐르도록 허용된다 (블록 220). 상기 루멘에서 상기 배하강 내로 예정된 유동이 유량 센서를 통한 평균 유속 및 분배 시간에 기초하여 계산될 때 (블록 225), 유체 전달은 정지되며, 상기 기구는 상기 난으로부터 물러선다 (블록 230). 상기 유량 센서 신호는 전달된 유체의 부피를 측정하기 위해 통합된다. 상기 난 껍질에서 구멍은 봉합재로 봉합될 수 있으며 (블록 235), 상기 난은 부화까지 인큐베이션될 수 있다 (블록 240).
- <43> 본 발명의 기타 구현예에 따라, 배하강으로 유속은 상기 바늘이 난 내의 난백에 위치하거나 또는 일단 바늘이 배하강에 있을 때 압력 저장용기(42)(도 3)를 가압함으로써 증가될 수 있다.
- <44> 도 6을 참고하면, 본 발명의 구현예에 따라, 바늘 팁이 조류 난의 배하강 내에 삽입될 때 확실하고 정확하게 검출하도록 배치된 유량 감지 시스템(300)이 예시된다. 상기 예시된 시스템(300)은 가압된 소스로부터 압축된 가스 (예를 들면, 공기)의 흐름을 조절하는 압력 조절기(302), 질량 유량계(304), 3-웨이 밸브(47), 및 마이크로 피펫(30) (전술한 바늘의 기능을 수행함)을 포함한다. 상기 마이크로피펫(30)은 조류 난의 배하강 내로 물질 (예를 들면, 세포, 백신, 핵산, 단백질, 펩티드, 바이러스, 항원, 호르몬, 성장인자, 시토카인 등)을 전달하도록 배치된다. 난 내로 전달되는 물질을 포함하는 상기 마이크로피펫(30)은 압축된 가스 소스로부터 압축된 가스를 통해 예정된 압력으로 가압된다. 상기 예정된 압력은 상기 마이크로피펫 팁이 난백에 위치할 때 유체가 상기 마이크로피펫(30)을 통해 흐르지 않으나, 상기 마이크로피펫 팁이 상기 배하강을 통과할 때 상기 마이크로피펫(30)을 통해 흐르는 압력이다. 상기 질량 유량계 (예를 들면, 가스 질량 유량계)(304)는 상기 마이크로피펫(30)의 팁이 상기 배하강 내로 이동할 때 (이는 유체가 상기 마이크로피펫(30)에서 흘러나오게 함), 상기 마이크로피펫(30)을 통한 유체 흐름을 검출한다. 예시되지 않지만, 유량 감지 시스템(300)은 또한 상기 마이크로피펫(30)의 이동을 정확하게 제어하기 위해 선형 슬라이드를 이용할 수 있다.
- <45> 예시된 구현예에서, 3-웨이 밸브(47)가 유량계(304) 및 난 내로 전달되는 유체 소스 사이에 위치한다. 상기 유체 소스는 상기 마이크로피펫(30)에 유체 또는 기타 물질을 공급하도록 배치된 펌프 또는 기타 기구일 수 있다. 상기 3-웨이 밸브(47)는 유체가 상기 마이크로피펫(30) 내로 로딩될 때 압축된 공기의 소스를 분리하며, 상기 마이크로피펫(30)이 가압될 때 유체 소스를 분리한다.
- <46> 상기 예시된 유량 감지 시스템(300)은 바람직하게는 컴퓨터 제어하에 있다. 상기와 같이, 유량계(304)로부터의 신호는 상기 마이크로피펫(30)의 이동을 제어하기 위해 이용될 수 있다.
- <47> 본 발명의 방법이 예를 들면, 상업적인 가금 작업에서 복수의 난에 대해 수행될 수 있다는 것을 당업자는 인식할 것이다. 더욱이, 본원에 기재된 방법은 완전히 수동, 완전히 자동, 또는 반자동일 수 있다.
- <48> 이전은 본 발명의 예시이며, 이를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명의 수 개의 전형적인 구현예가 기재되었지만, 당업자는 많은 변형이 본 발명의 신규한 교시 및 이점으로부터 실질적으로 벗어나지 않고 전형적인 구현예에서 가능하다는 것을 용이하게 인식할 것이다.

도면의 간단한 설명

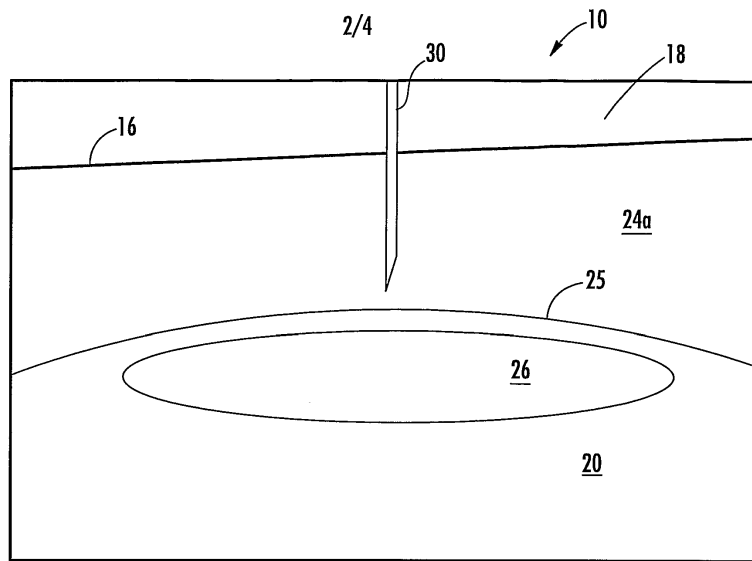
- <49> 도 1은 조류 난의 측단면도이다.
- <50> 도 2는 조류 난의 배하강 내로 바늘이 삽입된 도 1의 조류 난의 확대된 부분 단면도이다.
- <51> 도 3은 본 발명의 구현예에 따라, 조류 난의 배하강 내에 바늘을 확실하고 정확하게 위치하는데 이용하기 위한 압력 감지 시스템을 예시한다.
- <52> 도 4 및 5는 본 발명의 구현예에 따라, 조류 난의 배하강 내에 바늘을 확실하고 정확하게 위치하는 방법을 예시하는 흐름도이다.
- <53> 도 6은 본 발명의 구현예에 따라, 조류 난의 배하강 내에 바늘을 확실하고 정확하게 위치하는데 이용하기 위한 유량 감지 시스템을 예시한다.

도면

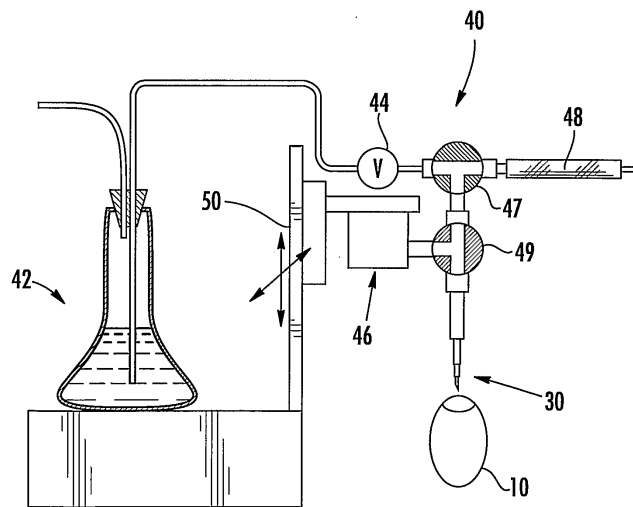
도면1



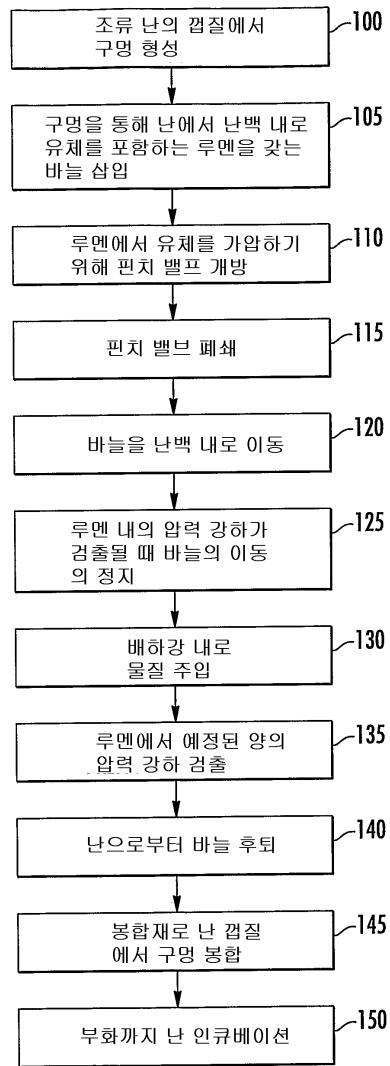
도면2



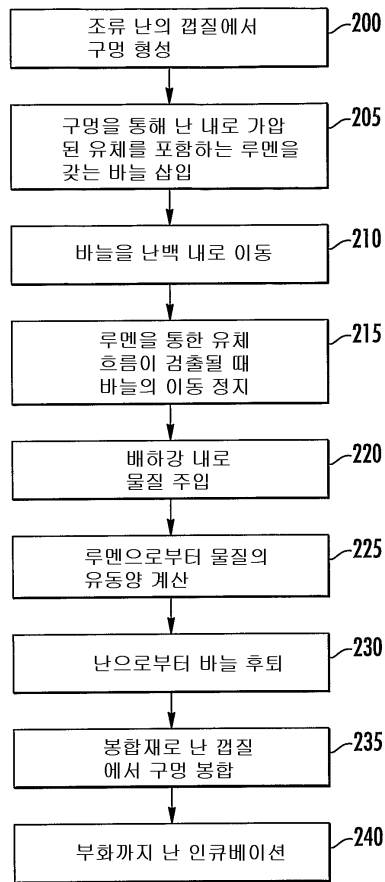
도면3



도면4



도면5



도면6

