(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월12일
(11) 등록번호 10-1307196
(24) 등록일자 2013년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/02 (2006.01) *C12M 1/18* (2006.01)
C12M 1/22 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0070232
(22) 출원일자 2011년07월15일
심사청구일자 2011년07월15일
(65) 공개번호 10-2013-0009260
(43) 공개일자 2013년01월23일
(56) 선행기술조사문헌
JP2008054511 A*
KR100733914 B1*
KR100870982 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
조윤경
울산광역시 울주군 범서읍 구영리 우미린2차아파트 703동 305호
황현두
부산광역시 수영구 광안2동 SK VIEW 104동 3501호
(74) 대리인
제일특허법인

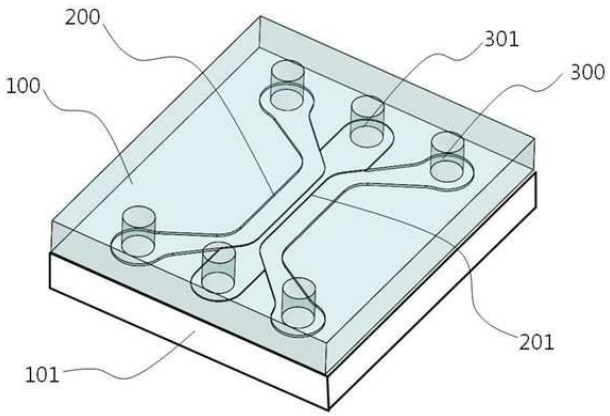
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 손연미

(54) 발명의 명칭 **미세 세포 배양 장치**

(57) 요 약

본 발명의 미세 세포 배양 장치는 유체가 이동 가능한 복수개의 미세유체유로; 및 상기 미세유체유로의 각각에 유체를 주입하기 위한 하나 이상의 주입구;를 포함하되, 상기 미세유체유로가 서로 관통하며 서로 다른 높이를 가지도록 상기 미세유체유로를 형성하는 물질을 기판에 접합하여 형성하며, 상기 미세유체유로 형성 물질 및 기판의 표면이, 친수성이거나 상기 주입시키고자 하는 유체의 접촉각이 90도 이하인 경우, 상기 유체는 상기 미세유체유로에 자발적으로 주입되며, 소수성이거나 상기 주입시키고자 하는 유체의 접촉각이 90도 이상인 경우, 상기 유체는 펌프에 의해 상기 미세유체유로에 주입됨에 따라, 저비용의 간단한 공정과정을 통해 제작할 수 있고, 펌프없이도 미세채널 내부의 특정 위치에 세포 배양을 할 수 있으며, 특히 미세채널 내부 특정 영역에 세포 배양, 이동 및 분화를 위한 3차원 골격을 손쉽게 형성하여 간질액의 흐름 또는 분자의 농도 구배에 따른 세포의 이동 및 분화를 쉽고 간편하게 관찰가능한 효과를 가진다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0028684
부처명	교육과학기술부
연구사업명	S/ERC(이공학분야)
연구과제명	생체 모방형 세포칩 개발 및 세포 간 신호교신 연구
주관기관	국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단
연구기간	2010.09.01 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

유체가 이동 가능한 복수개의 미세유체유로; 및

상기 미세유체유로의 각각에 유체를 주입하기 위한 하나 이상의 주입구;를 포함하되,

상기 미세유체유로가 서로 관통하며 서로 다른 높이를 가지도록 상기 미세유체유로를 형성하는 물질을 기판에 접합하여 형성하며,

상기 미세유체유로 형성 물질 및 기판의 표면이,

친수성이거나 상기 주입시키고자 하는 유체의 접촉각이 90도 이하인 경우, 상기 유체는 상기 미세유체유로에 자발적으로 주입되며,

소수성이거나 상기 주입시키고자 하는 유체의 접촉각이 90도 이상인 경우, 상기 유체는 펌프에 의해 상기 미세유체유로에 주입되는 것을 특징으로 하는

미세 세포 배양 장치.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제 1 항에 있어서,

상기 미세유체유로를 형성하는 물질은 폴리디메틸실록산 (poly(dimethylsiloxane), PDMS), 폴리메틸메타클릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리아크리레이트(polyacrylates), 폴리카보네이트(polycarbonates), 폴리실릭 올레핀(polycyclic olefins), 폴리이미드(polyimides), 폴리우레탄(polyurethanes) 의 플라스틱을 사용하는

미세 세포 배양 장치.

청구항 14

제 1 항에 있어서,

상기 기판은 산소 플라즈마 처리를 행한 폴리스티렌 접시 또는 유리를 사용하는

미세 세포 배양 장치.

청구항 15

제 1 항에 있어서,

상기 물질이 PDMS이고, 상기 기판이 폴리스티렌이면, 산소 플라즈마 처리를 행한 상기 폴리스티렌을 산소 플라즈마 처리를 행한 상기 PDMS에 접합하기 위해 실란을 사용하는

미세 세포 배양 장치.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미세 세포 배양 장치에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 저비용, 고효율의 미세 세포 배양 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로, 배양 접시를 이용한 고전적인 세포 배양 방식은 지나치게 많은 양의 배양액을 소모하여 비용 부담이 상당히 증가하게 되며, 다수 단계의 공정을 세심한 수작업으로 진행하여야 하므로, 작업 능률이 저조하게 되는 문제점이 있다.

[0003] 또한 개방된 2차원 평면 상에서 세포 배양이 가능하였으나, 3차원 배양을 위해서는 스캐폴드 역할을 하기 위한 값비싼 3차원 배양용 고분자성 물질이 대량으로 요구된다는 단점이 있다.

[0004] 최근에는 이러한 고전적인 세포 배양 방식의 한계점을 극복하기 위하여, 미세 가공 기술을 이용하여 제작한 수십 내지 수백 마이크로미터 스케일의 미세 채널 내에서 세포를 배양할 수 있는 미세 세포 배양 시스템이 한국특허 제10-0733914호; 공고일 2007.07.02)에 개발되어 있다.

[0005] 다른 예로서, 한국공개특허 제2011-0003526호: 공개일 2011.01.12)에는 수십 내지 수백 마이크로미터 스케일의 미세유체채널 내부에 3차원 골격을 형성하여 그것을 사이에 두고 양 옆으로 유체가 흐를 수 있도록 하여 상기 3차원 골격 내에서 세포를 배양할 수 있도록 한다. 미세유체채널내에서 복수개의 시약 등에 의하여 생체내의 환경에 가까운 조건, 조성으로 세포의 배양을 실시함에 따라, 전술한 바와 같은 고전적인 세포 배양법에 비하여 매우 적은 양의 시약, 배양액, 세포만으로도 세포 배양 및 분석이 가능하게 되므로 높은 감도의 세포분석이 필요한 경우에 매우 유용하고, 약물끼리의 영향 분석에도 활용 할 수 있으며, 생체내의 혈관크기 및 동맥경화, 뇌경색 등 다양한 질병까지도 모사하여 원하는 상태로 배양할 수 있으므로 신약 개발을 위한 기본 플랫폼으로 유용하게 쓰일 수 있다.

[0006] 하지만 기존의 미세 세포 배양 시스템은 다수의 펌프를 연결하여 미세 유체의 흐름을 정교하게 제어해야 하므로 고가의 장비와 복잡한 제어 장치, 세심한 수작업과 다수의 공정 단계가 필수적으로 요구된다.

[0007] 또한 표면 장력을 이용하여 상기 3차원 골격을 형성시키기 위해 미세 구조물을 사용하는 경우, 3차원 골격의 안정성은 유체의 표면 장력과 주입 압력, 온도, 미세구조물의 크기, 모양, 개수 및 간격 등과도 매우 밀접한 관련이 있어, 범용적으로 손쉽게 이용하기 어렵다.

[0008] 더구나 배양하고자 하는 세포의 종류에 따라 3차원 골격의 종류가 바뀌게 되면 미세구조물의 크기, 모양, 개수 및 간격도 미세구조물을 형성하는 물질의 표면 특성 또한 심각하게 고려되어야 하며, 이를 유지하기 위한 일련

의 공정이 추가적으로 제공되어야만 한다.

[0009] 또한 미세구조물에 의해 3차원 골격과 유체 간의 공간을 일부 가로막은 구조에서는 포스트의 모양, 크기, 개수 및 간격에 따라서도, 3차원 골격을 통한 유체의 이동량, 세포에 공급되는 배지와 화학물질들의 농도 구배가 달라지게 된다. 이로 인해 균일한 유동 및 농도 구배 조건에서의 세포 배양이 불가능하게 되며, 이러한 불확실성 때문에 미세 세포 배양 시스템을 이용한 정확한 미세 환경 제어가 어려워, 정확한 생물학적 실험 및 분석이 불가능하도록 하는 문제점이 있다.

[0010] 게다가, 상기와 같은 미세 세포 배양 장치를 제작하기 위해서는 미세공정과정이 필수적으로 요구되며, 특히 미세구조물은 수십 마이크로미터 이내의 크기를 지니기 때문에 광식각공정(photolithography), 활성이온식각(reactive ion etching) 등 많은 시간과 비용이 소모되는 미세 식각 공정이 필수적으로 요구된다.

[0011] 이러한 공정 과정에서 발생할 수 있는 미세한 오차 또한 상기 포스트의 크기 및 모양에 영향을 미치게 되어 3차원 골격 형성이 불가능하게 될 수 있으므로, 배양 장치의 제작 성공 효율 또한 높지 않아, 추가적인 비용 및 시간의 손실을 가져올 수 있는 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서, 본 발명은 상기한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로써, 저비용, 고효율의 미세 세포 배양 장치를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 미세 세포 배양 장치는 유체가 이동 가능한 복수개의 미세유체유로; 및 상기 미세유체유로의 각각에 유체를 주입하기 위한 하나 이상의 주입구;를 포함하되, 상기 미세유체유로가 서로 관통하며 서로 다른 높이를 가지도록 상기 미세유체유로를 형성하는 물질을 기판에 접합하여 형성하며, 상기 미세유체유로 형성 물질 및 기판의 표면이, 친수성이거나 상기 주입시키고자 하는 유체의 접촉각이 90도 이하인 경우, 상기 유체는 상기 미세유체유로에 자발적으로 주입되며, 소수성이거나 상기 주입시키고자 하는 유체의 접촉각이 90도 이상인 경우, 상기 유체는 펌프에 의해 상기 미세유체유로에 주입되는 것을 특징으로 한다.

[0015] 삭제

[0016] 삭제

[0017] 삭제

[0018] 삭제

발명의 효과

[0019] 본 발명의 실시예에 의하면, 저비용의 간단한 공정과정을 통해 제작할 수 있고, 펌프 등과 같은 정교한 유체제어장치 없이도 미세채널 내부의 특정 위치에 세포 배양을 할 수 있으며, 특히 미세채널 내부 특정 영역에 세포 배양, 이동 및 분화를 위한 3차원 골격을 손쉽게 형성하여 간질액의 흐름 또는 분자의 농도 구배에 따른 세포의 이동 및 분화를 쉽고 간편하게 관찰할 수 있다. 또한 상기 3차원 골격의 안정성을 위해 미세 포스트와 같은 추가적인 미세구조물을 요구하지 않기 때문에, 다양한 세포와 골격 형성물질에 범용적으로 적용할 수 있으며, 저비용의 공정이 가능하고, 3차원 골격의 모든 면이 상기 장치에 주입되는 미세유체유로에 개방되어 있어 3차원 골격 내부의 간질액의 흐름이나 분자의 농도 구배를 정확하게 제어하여, 정확한 세포 이동 및 분화 실험이 가능

한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 미세 세포 배양 장치를 나타내는 사시도이고,

도 2는 도 1 배양 장치의 단면도이고,

도 3은 도 1 배양 장치에 세포 배양을 위한 3차원 골격 및 유체를 주입한 예를 보여주는 사시도이고,

도 4는 도 3의 단면도이고,

도 5는 도 3의 3차원 골격이 형성된 이후의 모습을 보여주는 사진이고,

도 6은 도 1 배양 장치에 세포 배양을 위한 배지를 주입한 이후의 모습을 보여주는 사진이고,

도 7은 PDMS를 접합하기 위한 기판으로써 유리를 사용한 사진이고,

도 8은 본 발명 미세 세포 배양 장치를 이용하여 3차원 골격내에서 세포를 배양하고 있는 모습을 나타내는 단면도이고,

도 9는 도 8의 세포 배양 모습을 나타내는 현미경 사진이고,

도 10은 본 발명 미세 세포 배양 장치에서 3차원 골격을 통한 간질 유동을 유도하는 모습을 나타내는 단면도이고,

도 11은 한쪽의 미세유체유로에 특정 화합물을 주입하여 3차원 골격 내부에 형성되는 특정 화합물의 농도 구배를 나타내는 그래프이고,

도 12는 농도 구배에 따른 3차원 골격 내부에서의 세포의 이동을 나타내는 사진이고,

도 13은 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치를 이용하여 이종 세포의 동시 배양을 수행하는 실시예를 나타내는 단면도이고,

도 14는 도 13의 장치를 이용하여 이종 세포의 공동 배양을 수행한 예를 나타내는 사진이고,

도 15는 상대적으로 높이가 높은 미세 유체 유로에 유체가 주입된 경우의 예를 도시하는 단면도이고,

도 16은 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치의 제조 방법을 도시하는 공정 순서도이고,

도 17은 테이프를 오린 다음 겹쳐 붙여 형성한 미세구조물의 예시도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시 예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시를 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0022] 하기에서 본 발명을 설명함에 있어서 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 것이다. 그리고 후술되는 용어들은 본 발명에서의 기능을 고려하여 정의된 용어들로서 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 그러므로 그 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.

[0023] 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치는 서로 관통하며 서로 다른 높이를 갖는 복수 개의 미세유체유로와 상기 미세유체유로에 유체를 주입하기 위한 하나 이상의 주입구를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 도 1은 본 발명의 이해를 돕기 위한 하나의 실시예로써 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치를 나타낸 사시도이고, 도 2는 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치의 단면도이다.

[0025] 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치는 특정 높이를 갖는 유체가 이동 가능한 제 1 미세유체유로(200); 상기 제 1 미세유체유로(200)와 서로 관통하며, 상기 제 1 미세유체유로(200)의 높이보다 더 낮은 높이를 갖는 제 2 미

세유체유로(201); 제 1 미세유체유로(200)에 유체를 주입하기 위한 제 1 주입구(300); 상기 제 2 미세유체유로(201)에 유체를 주입하기 위한 제 2 주입구(301);를 포함한다.

[0026] 제 1 또는 제 2 미세유체유로(200)(201)를 형성하는 물질(100)을 기판(101)에 접합함으로써 상기 미세유체유로(200)(201)를 형성시킬 수 있으며, 서로 다른 높이를 갖는 복수 개의 미세유체유로(200)(201)가 각각 하나 이상의 주입구(300)(301)를 가질 수 있다.

[0027] 서로 다른 높이를 갖는 복수 개의 미세유체유로(200)(201)는 서로 관통하며, 각각의 미세유체유로(200)(201)는 상기 기판(101)과 평행한 평면상에 위치하되 특정한 높이를 가질 수 있다.

[0028] 미세유체유로(200)(201)를 형성하는 물질(100) 및 기판(101)은 광학적으로 투명한 것이 바람직하며, 본 발명에서는 폴리디메틸실록산 (poly(dimethylsiloxane),PDMS), 폴리메틸메타클릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리아크리레이트(polyacrylates), 폴리카보네이트(polycarbonates), 폴리실릭 올레핀(polycyclic olefins), 폴리이미드(polyimides), 폴리우레탄(polyurethanes) 등의 다양한 플라스틱 또는 유리로 형성될 수 있다.

[0029] 미세유체유로(200)(201)를 형성하는 물질(100) 및 기판(101)의 표면은 친수성일수록 유리하며, 주입시키고자 하는 유체의 접촉각은 90도 이하일 경우, 펌프 등과 같은 추가적인 주변 장치 없이도 유체가 자발적으로 미세유체유로(200)(201)에 주입될 수 있다.

[0030] 이에 반하여 미세유체유로(200)(201)를 형성하는 물질(100) 및 기판(101)의 표면이 소수성이거나, 주입시키고자 하는 유체의 접촉각이 90도 이상일 경우에는, 유체를 주입하기 위해 펌프 등의 주변 장치를 추가로 구비할 수도 있다.

[0031] 만약 서로 높이가 다른 복수개의 미세유체유로(200)(201)가 서로 관통하여 형성되어 있을 경우, 높이가 상대적으로 더 낮은 미세유체유로로부터 높이가 상대적으로 더 높은 미세유체유로로의 유체의 이동은 상기 주입된 유체의 표면장력에 의해 억제되며, 그 반대의 경우에는 원활하게 일어나게 된다.

[0032] 따라서 만약 높이가 더 낮은 미세유체유로로 유체가 먼저 주입될 경우, 높이가 낮은 미세유체유로가 먼저 채워지게 된다.

[0033] 도 3은 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치에 세포 배양을 위한 3차원 골격 및 유체를 주입한 예를 보여주는 사시도이고, 도 4는 도 3의 미세 세포 배양 장치에 세포 배양을 위한 3차원 골격 및 유체를 주입한 예를 보여주는 단면도이다.

[0034] 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치는 유체(400)가 이동 가능한 제 1 미세유체유로(200); 상기 제 1 미세유체유로(200)와 접하며 상기 제 1미세유체유로(200)보다 더 낮은 높이를 갖는 제 2 미세유체유로(201); 3차원 골격(401); 유체 주입을 위한 하나 이상의 주입구(300)(301);를 포함할 수 있다.

[0035] 3차원 골격(401)은 제 1미세유체유로(200)보다 더 낮은 높이는 갖는 제 2 미세유체유로(201)에 주입될 수 있다. 이때 제 2 미세유체유로(201)의 높이만큼 기판(101)으로부터 떨어진 제 2 주입구(301)를 통해 3차원 골격(401)을 형성하는 물질을 주입하는 것이 바람직 하며, 이때 3차원 골격(401)을 형성하는 물질은 제 2 미세유체유로(201)에만 먼저 채워지게 된다.

[0036] 이후 3차원 골격(401)을 형성시키게 되는데, 이 경우 솔-젤 변화를 통해 중합반응이 일어날 수 있는 특정 온도에서 일정 시간 이상 보관하거나, 중합반응을 유발하는 특정 파장의 빛을 조사하거나, 중합반응을 유발하는 물질을 추가적으로 넣어줄 수도 있다. 이때 특정 온도, 시간, 빛의 파장, 물질은 3차원 골격(401)을 형성하는 고분자성 물질의 종류에 따라 다르다.

[0037] 3차원 골격은 그 내부 또는 그 표면에서 세포를 3차원으로 배양하거나, 상기 3차원 골격을 통한 특정 화학물질의 확산을 통해 상기 화학물질의 농도 구배를 형성시키기 위한 것으로 매트리젤(Matrigel), 퓨라메트릭스(Puramatrix), 콜라겐(Collagen), 피브린 겔(Fibrin gel), PEGDA, 알지네이트(Alginate) 등을 이용할 수 있다.

[0038] 또한 상기한 여러가지 종류의 젤을 특정한 비율로 섞어 사용할 수 있으며, 이는 배양하고자 하는 세포의 종류나 연구의 목적에 따라 알맞게 조절될 수 있다.

[0039] 예를 들어, 매트리젤(Matrigel)의 경우에는 온도가 상온 이상으로 높아질 경우, 수 십분 이내에 솔-젤 변이가 일어나 골격을 형성할 수 있고, PEGDA의 경우에는, UV 주변 파장의 빛을 조사할 경우 중합반응이 일어나 골격을 형성할 수 있다. 알지네이트(Alginate)는 칼슘 이온을 주입할 경우 중합반응이 일어나 골격을 형성할 수 있다.

[0040] 만약 3차원 골격(401) 내에서 세포 배양을 수행하고자 한다면, 3차원 골격을 형성하는 물질과 세포를 섞어서 제 2 미세유체유로(201)에 주입할 수 있으며, 3차원 골격(401)을 형성한 이후, 세포에 영양분을 공급하기 위한 배지를 제 1 미세유체유로(200)에 주입할 수 있다.

[0041] 만약 3차원 골격(401)의 표면에서 세포 배양을 수행하고자 한다면, 3차원 골격(401)을 형성한 이후, 제 1 미세유체유로(200)를 통해 세포를 주입하는 것이 바람직하다.

[0042] 만약 3차원 골격(401) 내에 특정 화학물질의 농도구배를 형성시키고자 한다면, 3차원 골격(401)을 형성시킨 이후, 제 1 미세유체유로(200)를 통해 상기 특정 화학물질을 포함한 용액을 주입하면 된다. 상기 주입된 화학물질은 확산에 의해 3차원 골격(401)을 통해 이동하게 되는데, 상기 화학물질을 포함한 용액과 접한 곳은 농도가 가장 높아지며, 그곳으로부터 멀어질수록, 3차원 골격(401) 내 상기 화학물질의 농도는 낮아지게 된다.

[0043] 이러한 현상을 통해 상기 농도 구배를 형성시킬 수 있으며, 이러한 농도구배는 상기 특정 화학물질의 확산 특성, 크기, 주입 시간, 초기 농도 차이, 상기 3차원 골격의 종류 등에 영향을 받는다. 또한 상기 주입된 용액의 유속에 의해서도 상기 농도 구배는 달라질 수 있다.

[0044] 도 5 는 3차원 골격이 형성된 이후의 모습을 보여주는 사진이며, 도 6은 세포 배양을 위한 배지를 주입한 이후의 모습을 보여주는 사진이다.

[0045] 이때 미세유체유로(200)(201)를 형성하는 물질은 PDMS를 사용하였으며, 기판(101)으로는 폴리스티렌 접시를 사용하였다.

[0046] 본 실시예에서 높이가 상대적으로 낮은 제 2 미세유체유로(201), 즉 3차원 골격(401)의 높이는 100 um이며, 높이가 상대적으로 높은 제 1 미세유체유로(200), 즉 배지가 주입된 유로의 높이는 200um이다. 또한 3차원 골격(401)의 폭은 500 um이다.

[0047] 본 실시예에서 PDMS와 폴리스티렌을 접합하기 위해, 실란을 이용할 수 있다.

[0048] 최초에, 먼저 폴리스티렌을 1% 실란 용액에 담그고, 20분간 상온에서 반응시킨 뒤, 세척시킨다.

[0049] 이후 약 1분 동안 산소 플라즈마 처리를 한 후, 똑같이 산소 플라즈마 처리를 한 PDMS와 접촉시키면, 상온에서 손쉽게 접합시킬 수 있다.

[0050] 도 7과 같이 기판으로써 유리를 사용할 수도 있다. 이와 같은 경우에는 특별한 표면처리 없이, 유리와 PDMS에 각각 산소 플라즈마 처리를 한 이후 접촉시키면 바로 비가역적인 접합이 이루어진다.

[0051] 이때 펌프와 같은 주변 장치없이 손쉽게 유체를 주입하고 제어하기 위해서는 미세유체유로(200)(201)를 형성하는 물질(100) 및 기판(101)의 표면 성질이 친수성일수록 유리한데, 산소 플라즈마 처리를 통해 미세유체유로(200)(201)를 형성하는 물질(100) 및 기판(101)의 표면을 친수성으로 만들수 있고, 시간이 갈수록 상기 표면에 대한 유체의 접촉각의 커지므로, 상기 접합과정 이후 1시간 이내에 3차원 골격(401)을 형성하는 물질 및 배지 등의 유체를 주입하는 것이 바람직하다. 이때의 유체는 3차원 골격(401)을 형성하는 물질 및 배지 등을 포함한다.

[0052] 만약 2시간 이상 시간이 흐른 후 유체를 주입할 경우에는, 펌프 등과 같은 주변 장치를 사용하거나, 상기 산소 플라즈마와 같은 표면 처리 과정을 한번 더 거치면 된다.

[0053] 만약 상술한 실란 용액 등을 이용해 표면 처리를 해주었다면, 수일에서 수주 이상 상기 표면의 성질을 친수성으로 유지할 수 있기 때문에, 언제든지 바로 유체를 주입할 수도 있다.

[0054] 이때 제 2 미세유체유로(201)에 유체를 주입했을 때, 제 1 미세유체유로(200)로 새어나가지 않도록 하기 위해서, 제 2 미세유체유로(201)의 폭과 높이의 비율(폭/높이)을 4 이상으로 유지하는 것이 바람직하다. 물론 상기 폭과 높이의 비율이 더 작을 경우에도 제 2 미세유체유로(201)에만 유체가 먼저 채워지도록 할 수 있으며, 만약 너무 과한 압력으로 유체를 주입할 경우, 유체의 표면장력을 넘어서서 제 1 미세유체유로(200)로 유체가 새어 나갈 수 도 있다.

[0055] 하지만, 설사 제 1 미세유체유로(200)로 유체가 새어나간다고 하더라도, 만약 제 1 주입구(300)를 통해 유체를 빨아들이게 되면, 제 2 미세유체유로(201)의 유체보다 제 1 미세유체유로(200)의 유체가 먼저 빨려나오므로, 손쉽게 제 2 미세유체유로(201)에만 유체를 채울수 있다.

[0056] 도 8은 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치를 이용하여 3차원 골격 내에서 세포를 배양하고 있는 모습을 나타

낸 단면도이고, 도 9는 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치를 이용하여 3차원 골격 내에서 세포를 배양하고 있는 모습을 나타낸 현미경 사진이다.

[0057] 이때 사용한 세포는 유방암 세포의 한 종류로써 MDA-MB-231 세포이고, 사용한 3차원 골격은 매트리젤(Matrigel)이며, 10mg/ml의 농도로 제공되는 원액을 배지에 30% 희석하여 사용하였다. 또한 총 5uL에 불과한 양의 30% 매트리젤(Matrigel) 용액을 사용하였다.

[0058] 본 실시예에서는 상기의 사용 세포를 섞은 30% 매트리젤(Matrigel)을 상대적으로 높이가 낮은 미세유체유로에 먼저 주입한 이후, 37도 인큐베이터에서 30분간 매트리젤(Matrigel)을 굳혔으며, 이후 상기 세포를 배양하기 위한 배지를 상대적으로 높이가 높은 미세유체유로에 주입하였다.

[0059] 이때 펌프 등과 같은 주변 장치는 전혀 사용하지 않았으며, 피펫 등을 이용하여 유체를 주입구(300)(301)에 떨어뜨리면, 자연스럽게 유체가 미세유체유로(200)(201)에 채워졌다.

[0060] 이때 높이가 더 낮은 미세유체유로에서 높이가 더 높은 미세유체유로를 향한 유동은 유체의 표면장력에 의해 억제되었다.

[0061] 기존에는 3차원 세포 배양을 위해서 한 번에 수백 uL 이상의 양을 필요로 하였지만, 이에 비해 본 발명은 월등히 적은 양의 3차원 골격으로 실험을 할 수 있었으며, 세포 및 배지, 시약의 양도 수백배 이상 적게 소모되었다.

[0062] 도 10은 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치에서 3차원 골격을 통한 간질 유동을 유도하는 모습을 나타낸 단면도이다.

[0063] 본 실시예에서는 높이가 낮은 제 2 미세유체유로(201)에 3차원 골격(401)을 두고, 그것을 사이에 둔 두 개의 높이가 더 높은 제 1 미세유체유로(200)가 위치하였다.

[0064] 이때 3차원 골격(401)의 한쪽 면에 있는 제 1 미세유체유로(200)를 제 1-1 미세유체유로, 또 다른 면에 있는 제 1 미세유체유로(200)를 제 1-2 미세유체유로라고 명명하기로 한다.

[0065] 제 1-1 미세유체유로와 제 1-2 미세유체유로는 제 2 미세유체유로(201) 내부의 3차원 골격(401)에 의해 격리되어 있다. 그러나 이 3차원 골격(401)은 수 um 이하의 미세한 구멍을 지니고 있어 유체가 화살표 600의 방향으로 이동할 수 있는데, 이러한 유동을 간질유동이라 명명한다.

[0066] 일반적으로 제 1-1 미세유체유로와 제 1-2 미세유체유로 내부의 유체 압력은 서로 같아서, 3차원 골격(401)을 통해서는 유체 내부에 존재하는 화학물질의 확산만 일어나게 된다.

[0067] 그러나 제 1-1 미세유체유로와 제 1-2 미세유체유로 내부의 유체 압력이 서로 다를 경우, 상기 간질 유동이 발생할 수 있다.

[0068] 제 1-1 미세유체유로와 제 1-2 미세유체유로 내부의 유체 압력이 서로 다를 경우는 제 1-1 미세유체유로의 주입구와 제 1-2 미세유체 유로의 주입구에 연결된 유체의 높이가 다를 경우 발생할 수 있다. 이때 압력차이는 유체의 밀도, 중력가속도 및 유체의 높이 차이의 곱으로 나타나게 된다.

[0069] 이 압력차이가 클수록 상기 간질유동의 속도도 높아지게 된다. 또한 3차원 골격(401)의 유체 전도도가 높아지거나, 3차원 골격(401)의 폭이 줄어들수록 상기 간질유동의 속도도 높아지게 되며, 그 반대의 경우에는 간질유동의 속도가 낮아진다.

[0070] 3차원 골격(401)의 유체전도도는 3차원 골격(401)을 형성하는 물질에 따라 달라지게 된다. 예를 들어 매트리젤(Matrigel)의 경우, 콜라겐(collagen) IV가 60%, 라미닌(laminin)이 33%, 헤파린 설페이트(heparin sulfate)가 5.4%로 존재하는데, 각 화이버(fiber)의 반지름은 각각 0.7, 0.6, 0.5nm이다. 결과적으로 20mg/ml 매트리젤(Matrigel)에서는 한 화이퍼(fiber)표면으로부터 다른 화이버(fiber)표면까지의 평균 거리가 약 8nm이며, 300mg/ml 매트리젤(Matrigel)에서는 약 0.54nm이다. 즉, 매트리젤(Matrigel)의 농도가 높아질수록 간극의 크기는 줄어들며, 이 때문에 3차원 골격의 유체전도도 또한 낮아지게 되어, 상기 간질유동의 속도도 느려지게 된다.

[0071] 이러한 간질유동의 속도 및 이러한 유동 또는 확산을 통해 3차원 골격을 통해 이동하는 화학물질의 농도구배에 따라 3차원 골격 내부에서 배양되는 세포(500)의 성장, 분화, 이동이 달라지게 된다.

[0072] 그 한 예로써 세포의 주화성을 유도하는 화학물의 농도구배에 의한 세포의 이동 현상을 관찰한 바 있다.

[0073] 도 11에서는 한 쪽 미세유체유로에 특정 화학물을 주입하여 3차원 골격 내부에 특정 화학물의 농도구배를 형성

한 것을 나타내고 있다. 도 11에 있어서, 특정 화학물의 농도구배는 분자의 농도차이에 의한 확산에 의해 형성되며, 농도가 높은 곳에서 낮은 곳으로 이동하는 특징이 있다. 또한 미세유체유로에 지속적으로 유체 및 특정 화학물을 주입하게 되면 농도구배를 일정하게 유지할 수 있을 뿐만 아니라, 유속을 조절함으로써 농도구배의 형태를 자유자재로 제어할 수도 있다. 이때 각 미세유체유로 내의 유체의 이동속도나 유체 압력이 다를 경우, 간질 유동 또는 특정 화학물의 농도 구배에 영향을 미칠 수 있다.

[0074] 도 12에서는 농도구배에 따른 3차원 골격 내부에서의 세포의 이동을 나타내고 있다.

[0075] 도 12에서는 세포가 배양되는 3차원 골격을 사이에 두고 완전히 격리된 두개의 미세유체유로를 위아래로 위치시켰다. 아래쪽 미세유체유로에 상기 세포의 이동을 유도하는 주화성 물질을 세포 배양을 위한 배지에 섞어 주입하였고, 위쪽 미세유체유로에는 일반적인 배지만을 주입하였다.

[0076] 이때 3차원 골격 내부에 주화성 물질의 농도 구배가 형성되면서, 세포의 주화성에 의한 이동이 일어나는 것을 확인할 수 있다.

[0077] 본 발명에 따른 세포 배양 장치를 이용하면 서로 다른 종류의 세포를 동시에 배양할 수도 있다. 실제 우리 체내 환경은 다양한 세포들이 서로 일정한 간격으로 위치하여 서로 상호 작용을 하도록 이루어져 있다. 이러한 체내 환경과 유사한 환경에서 세포의 성장, 이동, 분화 등을 관찰하는 것은 약물 시험, 세포 생물학 및 분자생물학 연구 등의 분야에서 정확한 시험을 위해 매우 중요하다.

[0078] 도 13은 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치를 이용하여 이종 세포의 동시 배양을 수행하는 실시예를 나타내고 있다.

[0079] 이 경우 가장 낮은 높이를 지니는 미세유체유로(201)에 한 종류의 세포(500) 조성을 포함한 3차원 골격(401) 물질을 주입하고, 경화시킨 후, 그 다음으로 낮은 높이를 지니는 미세유체유로(202)에 또 다른 종류의 세포(501) 조성을 포함한 3차원 골격(402) 물질을 주입한 후 경화시킨다. 마지막으로 세포 배양을 위한 배지 또는 자극을 위한 화학물질 등을 포함한 유체(400)를 미세유체유로(200)를 통해 주입하여 이종세포의 공동 배양을 수행할 수 있다.

[0080] 도 14는 이종 세포의 공동 배양을 수행한 예를 나타낸 사진이다.

[0081] 본 실험에서는 유방암세포인 MDA-MB-231세포나 MCF7 세포를 초록색 형광 물질로 염색하고, 정상 유방세포인 MCF10a 세포를 빨간색 형광 물질로 염색하여 서로 구분하도록 하였다. 또한 3차원 골격 물질로는 모두 30% 매트리젤을 사용하였다.

[0082] 가장먼저 초록색 형광으로 염색한 유방암세포를 매트리젤과 섞어 가장 낮은 미세유체유로를 통해 주입하고, 37도 인큐베이터에서 약 30분간 경화시켰다. 이후 빨간색 형광으로 염색한 정상세포를 매트리젤과 섞어 상기 가장 낮은 미세유체유로와 접하며 서로 관통하는 미세유체유로에 주입하여 역시 약 30분간 경화시켰다. 마지막으로 상기 두 종류의 세포를 동시에 배양할 수 있는 배지를 제조하여 나머지 미세유체유로에 주입하였다. 세포의 3차원 형태를 유지하기 위해 경화단계에서 미세 세포 배양장치를 뒤집어 중력에 의해 세포가 바닥으로 가라앉지 않도록 해주었다. 상기 두 종류의 세포는 상기 미세유체유로 내 형성된 3차원 골격 내에 효과적으로 고정되었으며, 상기 미세유체유로는 모두 서로 관통하기 때문에 배양을 위한 배지 및 서로 다른 세포 간의 신호전달 물질이 서로 잘 전달될 수 있다.

[0083] 상기한 바와 같이 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치에서는 상대적으로 높이가 낮은 미세유체유로에 유체를 먼저 주입하고, 이때 표면장력에 의해 상대적으로 높이가 낮은 미세유체유로에 유체가 먼저 채워지게 된다. 그러나 상대적으로 높이가 높은 미세유체유로에도 유체를 주입하여 사용할 수도 있다.

[0084] 도 15는 상기와 같이 상대적으로 높이가 높은 미세유체유로에 유체가 주입된 경우의 실시예를 도시한 단면도이다.

[0085] 이러한 경우, 유체가 이동 가능한 두 개 이상의 미세유체유로(700)(702); 상기 두 개 이상의 미세유체유로(700)(702) 사이에 위치하며, 상기 두 개 이상의 미세유체유로(700)(702)보다 더 낮은 높이를 갖는 둔턱(701); 상기 미세유체유로(700)(702)에 유체를 주입 하기 위한 주입구(도시하지 않음); 를 포함할 수 있다.

[0086] 이 경우 둔턱(701)으로부터 미세유체유로(700)(702)를 향한 유동은 주입된 유체의 표면장력에 의해 억제되며, 유체가 주입된 미세유체유로(700)(702)와 둔턱(701)까지만 유체가 먼저 채워지게 된다.

[0087] 또한 3차원 골격을 이용할 경우, 유체가 이동 가능한 두 개 이상의 미세유체유로(700)(702); 상기 미세유체유로

(700)(702)와 접하는 3차원 골격(401); 상기 미세유체유로(700)(702)와 상기 3차원 골격(401) 사이에 위치하며, 상기 미세유체유로(700)(702)와 상기 3차원 골격(401)의 높이보다 더 낮은 높이를 갖는 둔턱(701); 상기 미세유체유로(700)(702)에 유체를 주입 하기 위한 주입구(도시하지 않음); 를 포함할 수 있다.

[0088] 도 16은 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치의 제조 방법을 도시하는 공정순서도이다.

[0089] 도 16에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치의 제조 방법은 특정 높이를 갖는 제 1 미세유체유로와 그보다 더 낮은 높이를 갖는 제2 미세유체유로의 합집합에 해당하는 영역에 제 2 미세유체유로의 높이와 같은 높이를 지닌 미세구조물을 형성시킨다.(제 1 단계; S100)

[0090] 이어, 제 1 미세유체유로에 해당하는 영역에 제 1 미세유체유로의 높이에서 제 2 미세유체유로의 높이를 뺀 높이를 지닌 미세구조물을 형성시킨다.(제 2 단계; S200)

[0091] 그 후, 미세구조물 상에 미세유체유로를 형성하는 액상 물질을 도포한 후, 경화시킨다.(제 3 단계; S300)

[0092] 다음으로, 상기 경화된 미세유체유로를 형성하는 물질을 기판과 접합하여 미세유체유로를 형성시킨다.(제 4 단계; S400)

[0093] 그 다음으로, 제 2 미세유체유로에 3차원 골격을 형성시키기 위한 고분자성 물질을 주입한다.(제 5 단계; S500)

[0094] 마지막으로, 제 1 미세유체유로에 유체를 주입한다.(제 6 단계; S600)

[0095] 제 1 단계(S100) 및 제 2 단계(S200)에서 미세구조물을 형성시키기 위해 다양한 방법을 사용할 수 있다.

[0096] 광식각공정(photolithography)를 이용할 경우에는 감광성 물질 인 포토레지스트(Photoresist)를 코팅하고, 특정 영역에만 UV 빛을 조사하여 굳히거나 녹여서 미세구조물 패턴을 형성시킬 수 있다.

[0097] 그러나 본 발명에서는 도 17과 같이 테이프(tape)을 오린 다음 겹쳐서 붙임으로써 매우 값싸고 빠르게 상기 미세구조물을 형성시킬 수 있었다.

[0098] 도 17에서 오른쪽에 보이는 것이 잘려진 테이프(tape)이며, 왼쪽에 나타나 있는 것이 테이프(tape)를 붙여 미세구조물을 제작한 것이다.

[0099] 이렇게 제작된 미세구조물 상에 미세유체유로를 형성하는 물질을 부어 굳히고 떼어낸 후, 기판과 접합함으로써 미세유체유로를 제작할 수 있었다.

[0100] 본 실시예에서는 미세유체유로를 형성하는 물질로써 PDMS를 사용하였으며, 이를 경화제와 10:1로 섞어 부은 후 65도에서 2시간가량 경화시켰다.

[0101] 이후 PDMS를 떼어내어 유리 기판과 산소 플라즈마 처리를 통해 접합시킨 후, 3차원 골격을 포함한 유체를 순차적으로 주입함으로써, 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치를 제작할 수 있었다.

[0102] 이상에서 설명한 것은 본 발명에 따른 미세 세포 배양 장치 및 제작 방법의 하나의 바람직한 실시예에 불과한 것으로서, 본 발명은 상기한 실시예에 한정되지 않는 것이므로, 이하의 특허청구범위에서 청구하는 바와 같이 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 누구든지 다양한 변경 실시가 가능한 범위까지 본 발명의 기술적 정신이 있다고 할 것이다.

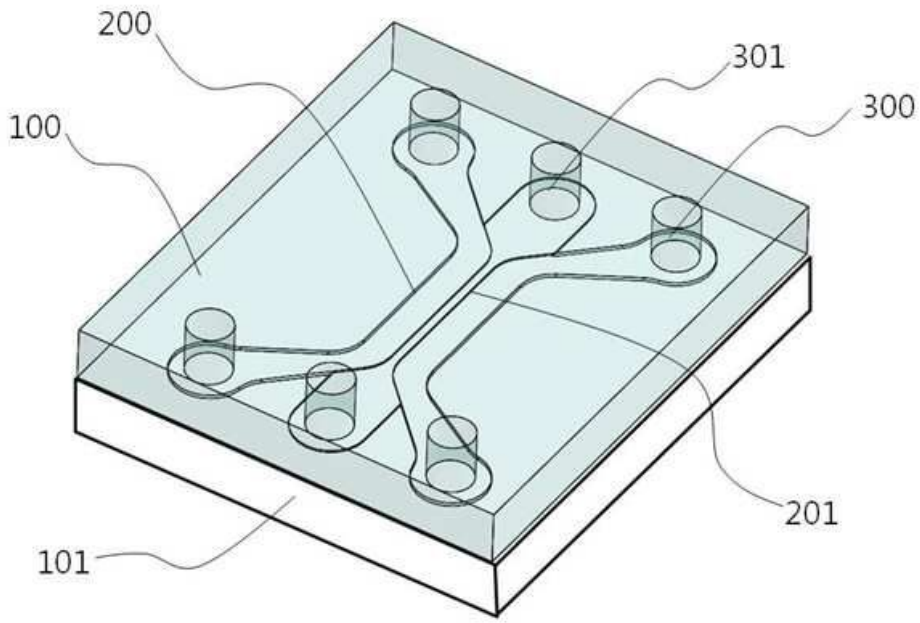
부호의 설명

[0103]

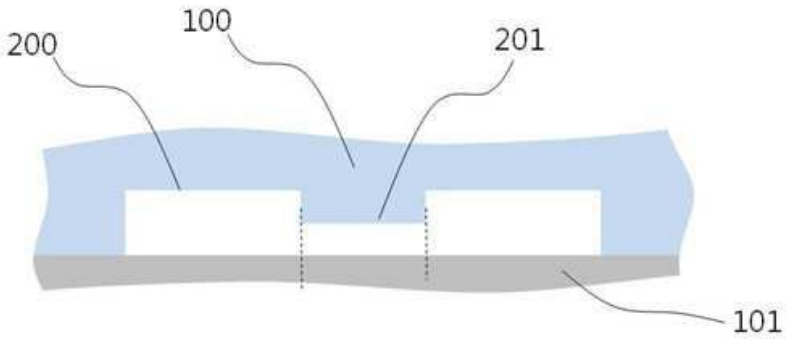
100 : 물질	101: 기판
200, 201, 202, 700, 702 : 미세유체유로	300,301 : 주입구
401,402 : 3차원 골격	500,501 : 세포
702 : 둔턱	

도면

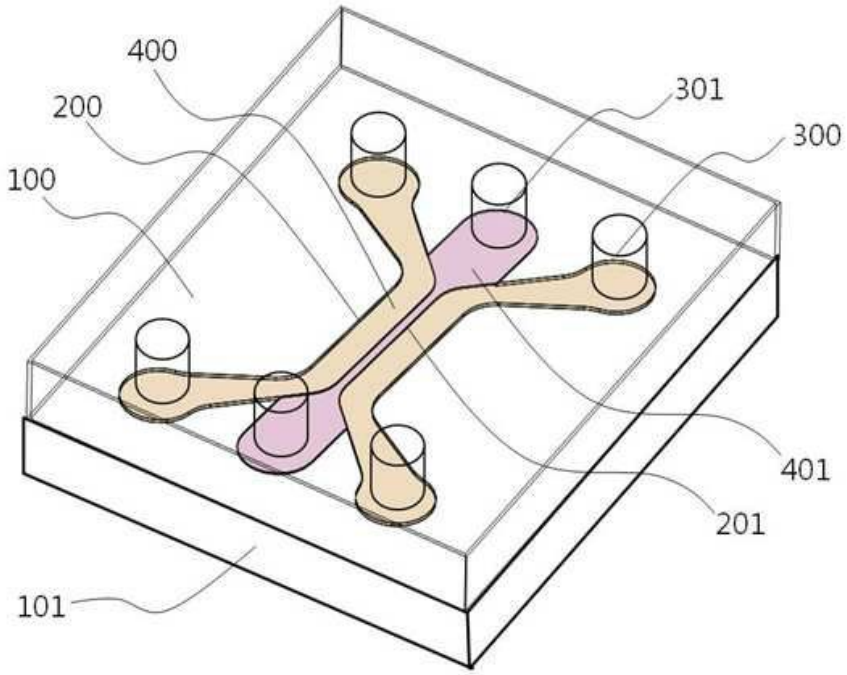
도면1



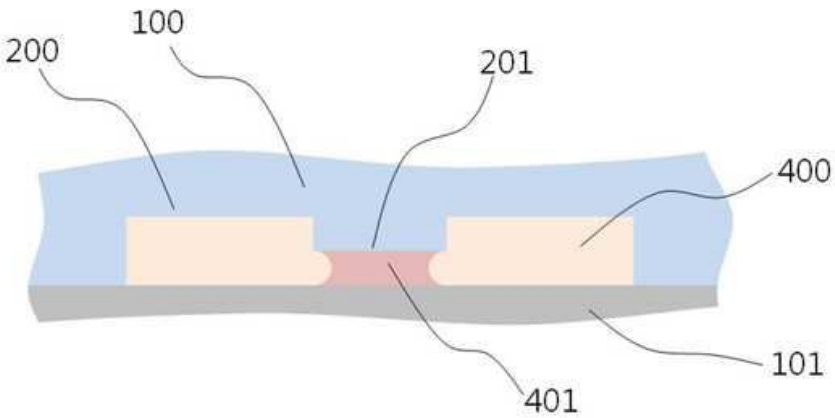
도면2



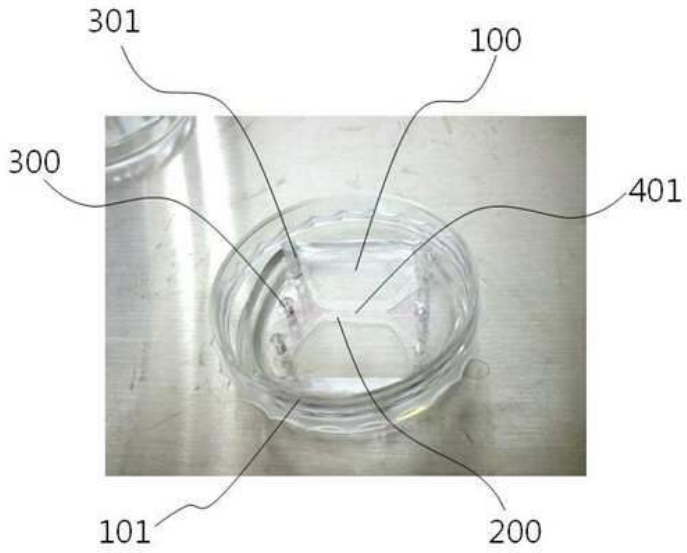
도면3



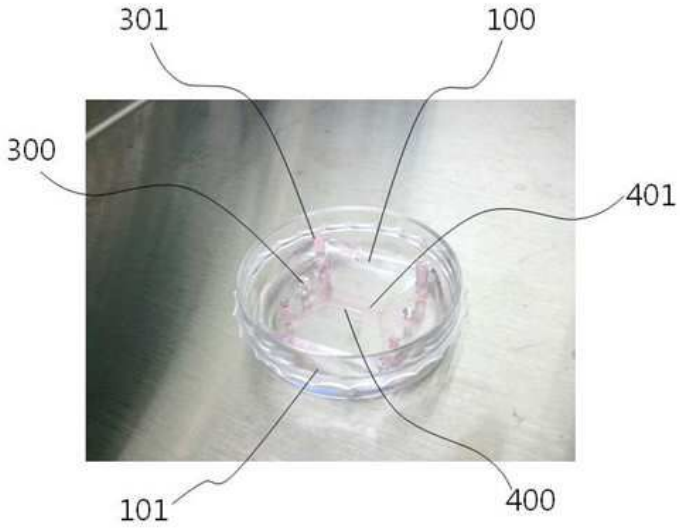
도면4



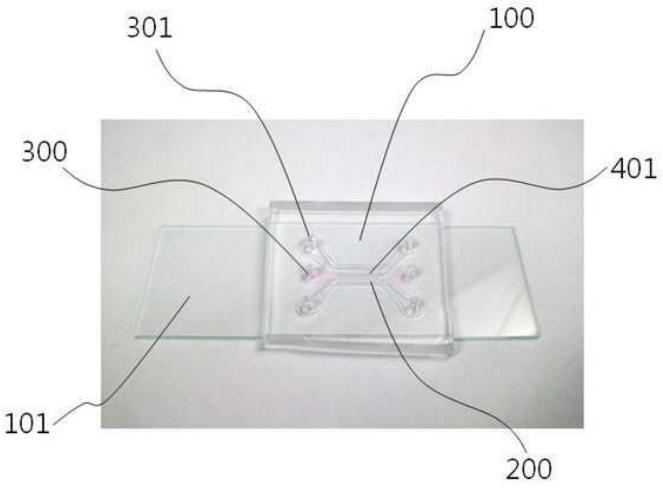
도면5


301
100
300
401
101
200

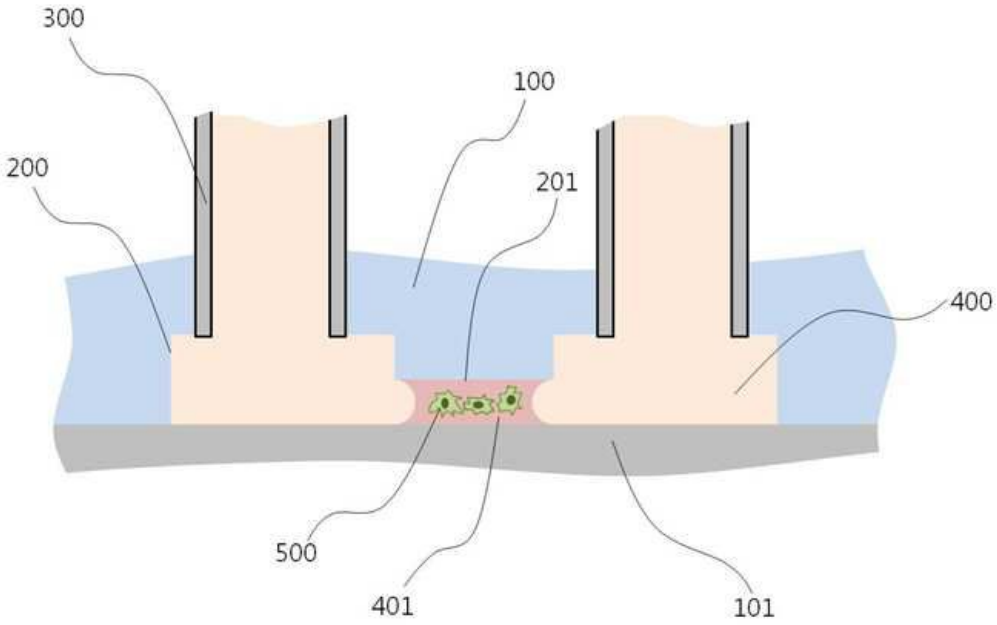
도면6


301
100
300
401
101
400

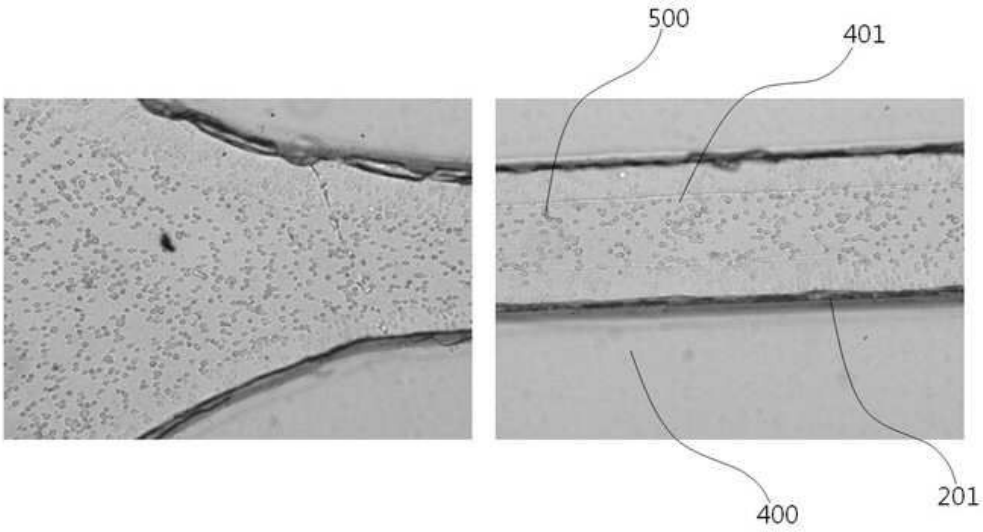
도면7


301
100
300
401
101
200

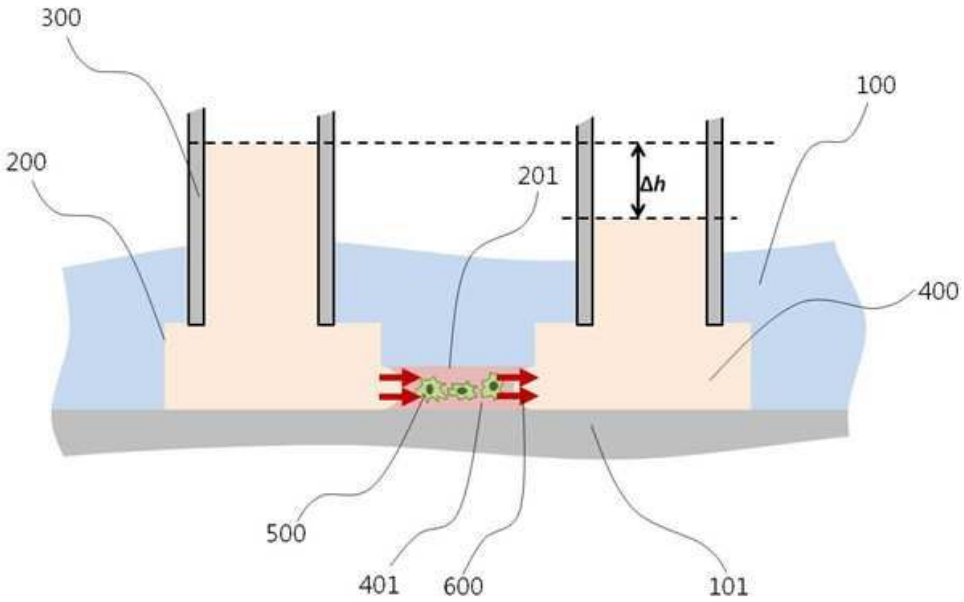
도면8



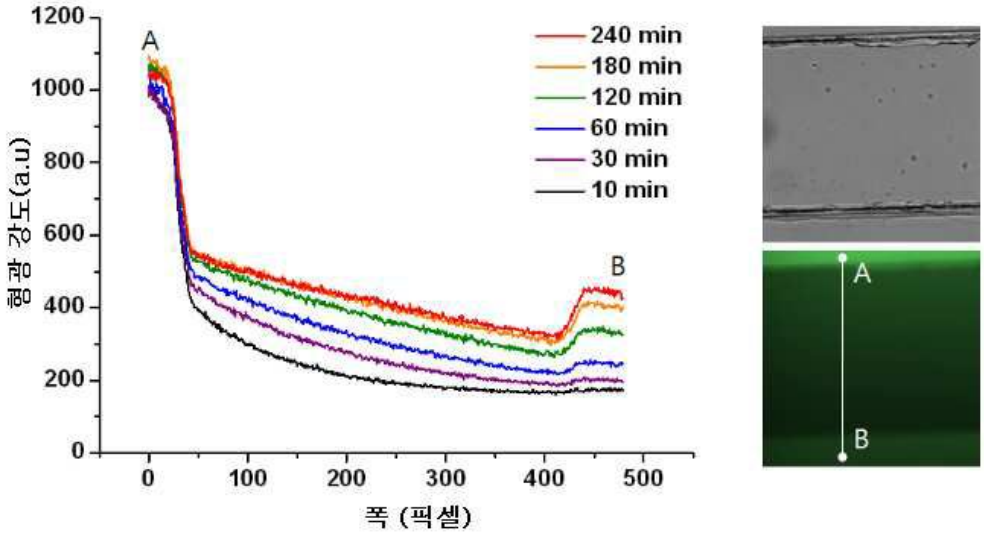
도면9



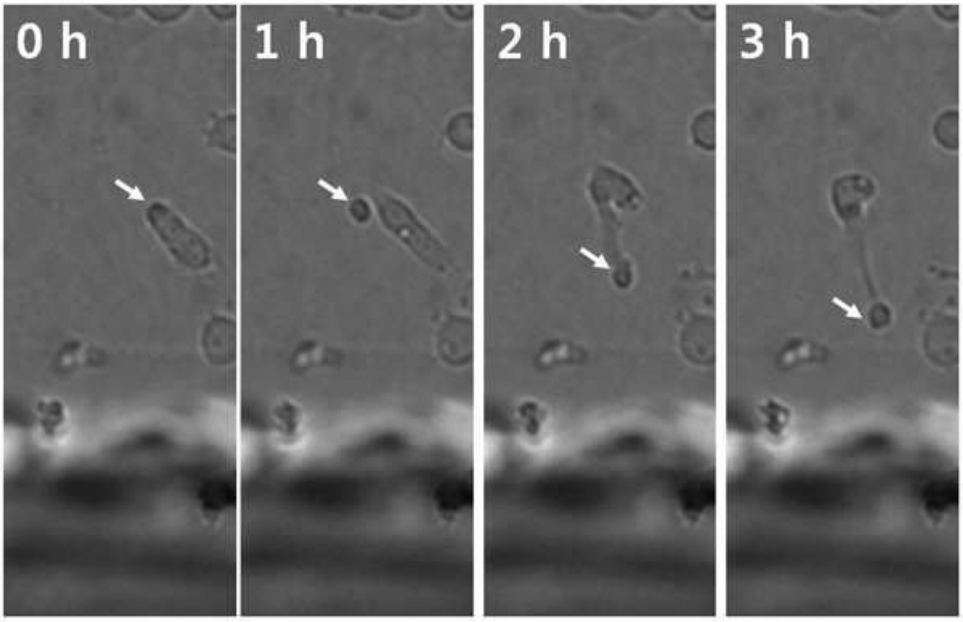
도면10


300
200
201
Δh
100
400
500
401
600
101

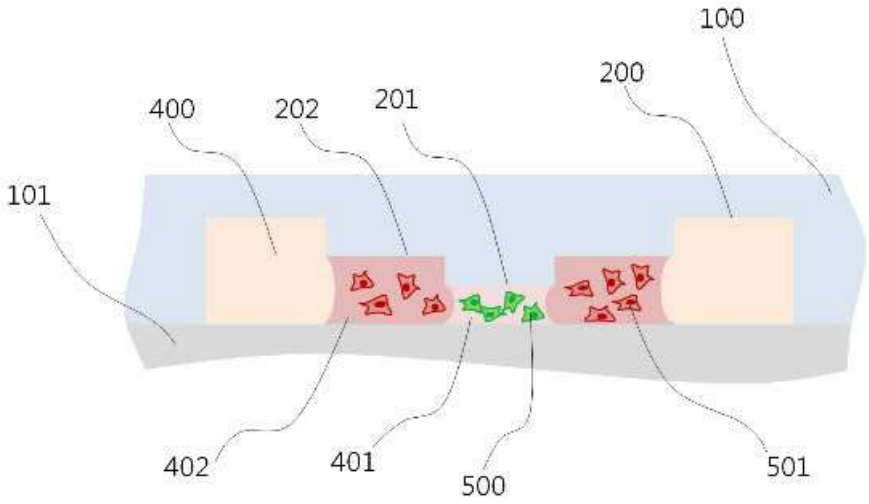
도면11


1200
1000
800
600
400
200
0
형광 강도(a.u)
A
B
240 min
180 min
120 min
60 min
30 min
10 min
0
100
200
300
400
500
폭 (픽셀)
A
B

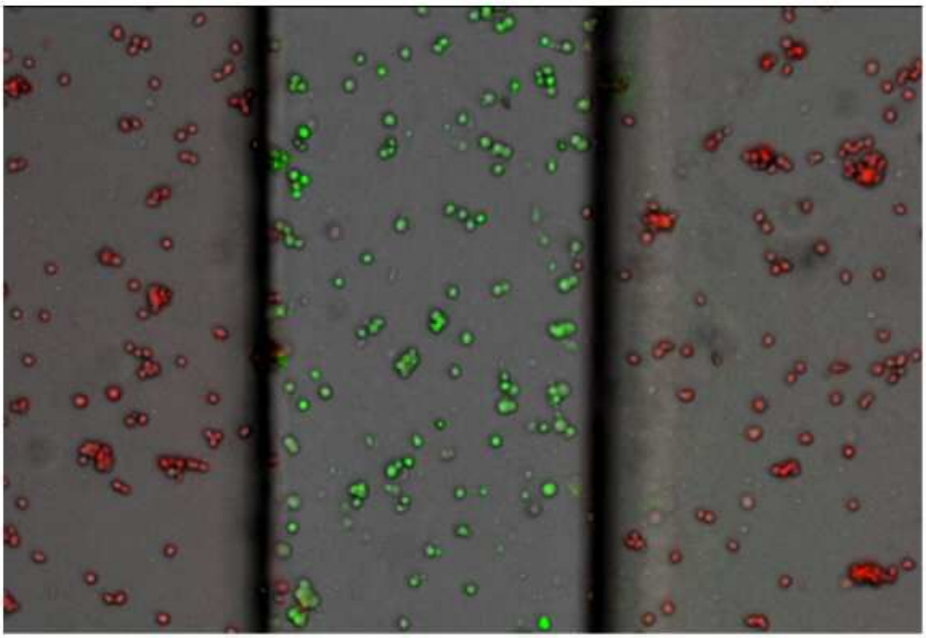
도면12



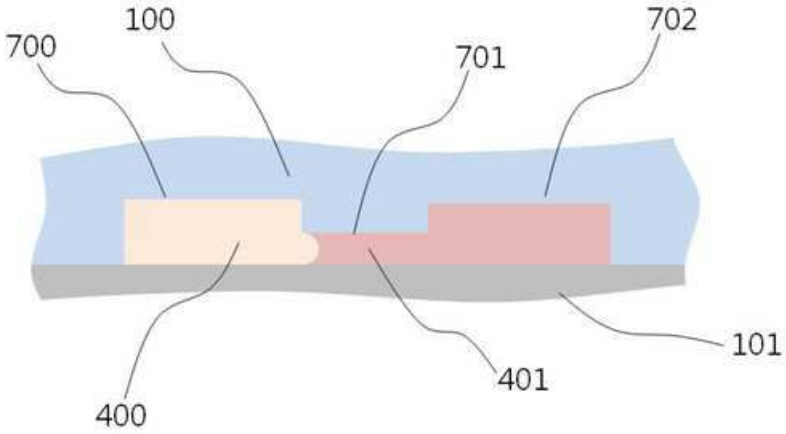
도면13



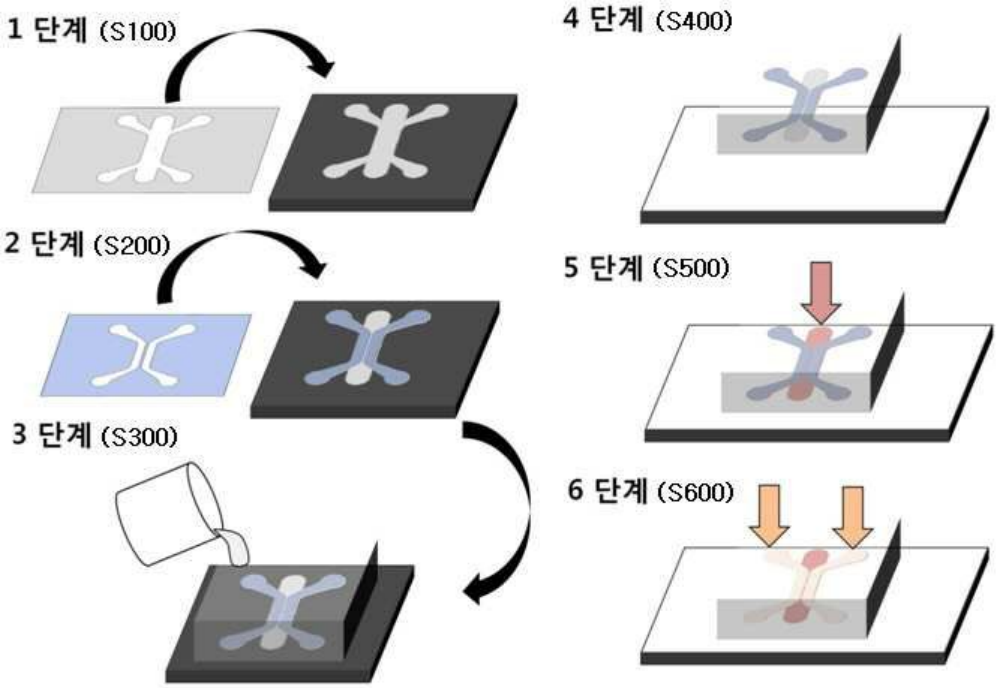
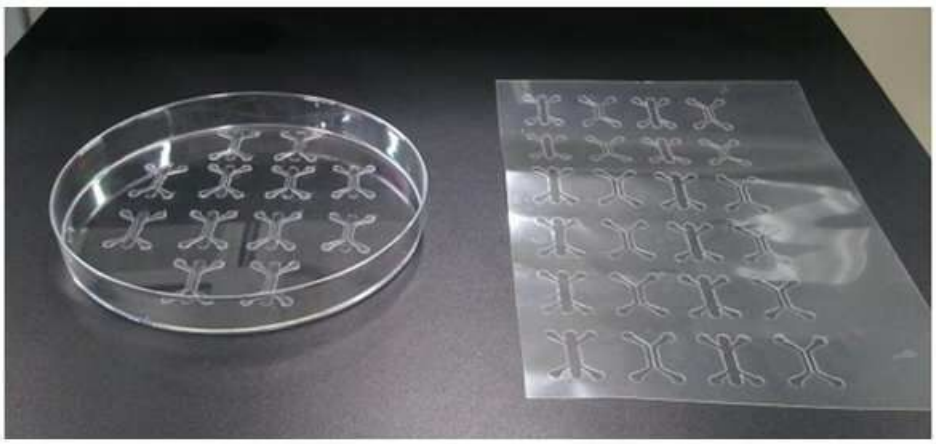
도면14



도면15



도면16



도면17