(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0031217
(43) 공개일자 2021년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01) *C12N 5/09* (2010.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/502784 (2013.01)
B01L 3/502761 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0112909
(22) 출원일자 2019년09월11일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
정봉근
경기도 과천시 관문로 143 래미안에코팰리스 1110동 1004호
최지욱
서울특별시 마포구 백범로 35 서강대학교 RA관 405호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

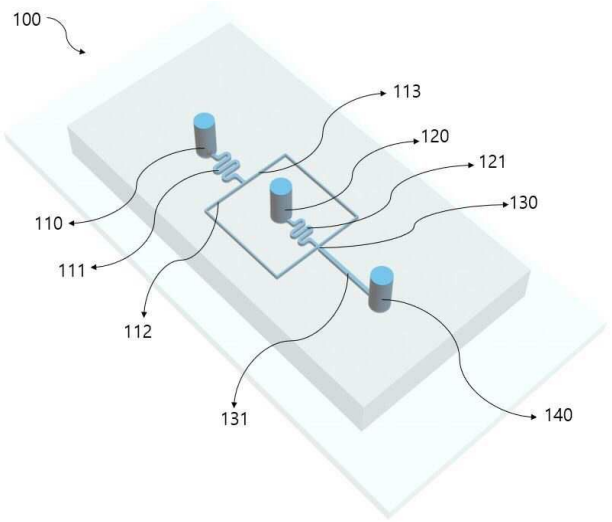
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **미세 액적 기반 미세유체칩 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 미세 액적 기반 미세유체칩에 관한 것으로 상기 미세유체칩이 유상물질과 수상물질이 별도의 유로를 통해 유동되어 상기 유로의 접합 영역에서 서로 혼합되어 미세 액적을 형성할 수 있도록 설계하여 종양세포가 내부에 포함된 미세 액적을 형성하도록 하였다. 본 발명의 미세 액적 기반 미세유체칩을 이용하면 균일한 크기의 3차원 종양세포 스페로이드를 간단한 방법으로 형성할 수 있고, 종양 스페로이드의 크기 세포의 숫자 등의 조절이 용이하다. 본 발명의 미세유체칩을 이용하여 생성한 3차원 종양세포는 다양한 종양 치료 연구에 폭넓게 이용될 수 있으며, 특히 종양세포에 대한 광열 치료 효과 연구에 적합하다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
C12N 5/0693 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
B01L 2200/0647 (2013.01)
B01L 2200/10 (2013.01)
B01L 2300/0874 (2013.01)
B01L 2300/088 (2013.01)
B01L 2300/0883 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)

(72) 발명자
이종민
서울특별시 은평구 갈현로9길 16
크리스티안 다니엘 알버그
서울특별시 서대문구 이화여대5길 12, 901호
최형우
충청남도 천안시 동남구 단대로 119
하장호
서울특별시 마포구 백범로 35 서강대학교 RA관 405호
문석규
서울특별시 마포구 백범로 35 서강대학교 RA관 405호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2019M3A9H2032547
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 콩팥 오가노이드 스크리닝을 위한 마이크로 시스템 개발
기 여 율 40/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2019.06.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016M3A7B4910652
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 나노소재원천기술개발
연구과제명 곰팡이 검출을 위한 미세유체칩 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2019.02.01 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2019R1I1A1A01041256
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 창의도전연구기반지원
연구과제명 알츠하이머성 치매 치료를 위한 3차원 센서 플랫폼 기술 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2019.06.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

유상물질(oil phase) 채널;

상기 유상물질 채널에 연결되어 유상물질이 흐르도록 형성된 제1 유로;

수상물질(aqueous phase) 채널;

상기 수상물질 채널에 연결되어 수상물질이 흐르고, 상기 제1 유로에서 분기된 제1분기 유로 및 제2분기 유로와 연결되어 접합 영역을 형성하는 제2 유로;

상기 접합 영역과 연결되며 상기 제2 유로와 일직선상에 배열되는 제3 유로; 및

상기 제3 유로의 하류에 연결되는 미세 액적 채널을 포함하며,

상기 제1분기 유로 및 제2분기 유로는 서로 교차된 형태로 상기 제2 유로에 연결되어 상기 제2유로의 수직 방향으로 접합 영역을 형성하며, 상기 접합 영역에서 제1분기 유로 및 제2분기 유로를 통해 공급되는 유상물질과 제2 유로를 통해 공급되는 수상물질이 유입되어 미세 액적이 형성되고, 상기 형성된 미세 액적은 제3 유로를 통해 미세 액적 채널로 이동하는 것인, 미세 액적 기반 미세유체칩.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 제1 유로는 분기(branched)되기 전 일부 영역에서 나선형 또는 구불구불한 형태를 포함하는 것인, 미세 액적 기반 미세유체칩.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 제2 유로는 제1 유로와 연결되기 전 일부 영역에서 나선형 또는 구불구불한 형태를 포함하는 것인, 미세 액적 기반 미세유체칩.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 분기된 2개의 제1 유로는 상기 제2 유로와 직각을 이루면서 연결되는 것인, 미세 액적 기반 미세유체칩.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 수상물질은 종양세포를 포함하는 것인, 미세 액적 기반 미세유체칩.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 미세 액적 기반 미세유체칩에 유상물질 및 수상물질을 주입하여 미세 액적을 생성하는 단계를 포함하는 3차원 종양세포 생산 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 수상물질은 종양세포를 포함하는 것인, 3차원 종양세포 생산 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 미세 액적을 생성하는 단계에서 상기 미세 액적의 크기 및 생산성을 고려하여 상기 유상물질 및 상기 수상물질 각각의 유속을 제어하는 것인, 3차원 종양세포 생산 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 유상물질 및 상기 수상물질의 유속은 각각 1 내지 5 μl/분 및 0.5 내지 2.0 μl/분인 것인, 3차원 종양세포 생산 방법.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 종양세포 광열 치료 효과의 분석 방법:

(a) 유상물질(oil phase) 채널;

상기 유상물질 채널에 연결되어 유상물질이 흐르도록 형성된 제1 유로;

수상물질(aqueous phase) 채널;

상기 수상물질 채널에 연결되어 수상물질이 흐르고, 상기 제1 유로에서 분기된 제1분기 유로 및 제2분기 유로와 연결되어 접합 영역을 형성하는 제2 유로;

상기 접합 영역과 연결되며 상기 제2 유로와 일직선상에 배열되는 제3 유로; 및

상기 제3 유로의 하류에 연결되는 미세 액적 채널을 포함하며,

상기 제1분기 유로 및 제2분기 유로는 서로 교차된 형태로 상기 제2 유로에 연결되어 상기 제2유로의 수직 방향으로 접합 영역을 형성하며, 상기 접합 영역에서 제1분기 유로 및 제2분기 유로를 통해 공급되는 유상물질과 제2 유로를 통해 공급되는 수상물질이 유입되어 미세 액적이 형성되고, 상기 형성된 미세 액적은 제3 유로를 통해 미세 액적 채널로 이동하는 것인, 미세 액적 기반 미세유체칩을 준비하는 단계;

(b) 상기 유상물질 채널 및 수상물질 채널에 각각 유상물질 및 종양세포를 포함하는 수상물질을 주입하여 미세 액적을 생성하는 단계;

(c) 상기 미세 액적에 광열효과(photothermal effect)를 나타내는 나노입자를 주입하고 배양하는 단계; 및

(d) 상기 배양한 미세 액적에 레이저를 조사하고 상기 미세 액적에 포함된 종양세포의 생존 및 사멸 정도를 분석하는 단계.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 나노입자는 산화 그래핀 기반의 나노입자 또는 금 나노입자 기반의 나노입자인 것인, 종양세포 광열 치료 효과의 분석 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 산화 그래핀 기반의 나노입자는 rGO(reduced graphene oxide)-bPEI(branched polyethylenimine)-PEG(polyethylene glycol)로 이루어진 것인, 종양세포 광열 치료 효과의 분석 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미세 액적 기반 미세유체칩 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 기존의 항암제 개발 연구는 2차원으로 배양한 암세포를 주로 이용하였다. 그러나 실제 체내 종양은 3차원 형태의 복잡한 구조를 가지고 있기 때문에 2차원의 암세포는 종양의 복잡한 구조를 정확히 모사하는데 한계가 있다.

[0004] 3차원 종양세포 스페로이드를 통한 종양 모델은 2차원 배양모델보다 생체내 환경과 유사성이 높고 세포, 세포외 기질, 세포 성장인자 등의 조합 등을 다양하게 재현할 수 있다. 하지만, 기존의 3차원 종양세포 배양모델은 복잡한 실험방법과 높은 난이도, 수율 문제로 인한 한계점을 가지고 있다. 그에 따라, 3차원 형태로 세포를 배양하는 기술에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0005] 미세 액적 기반의 미세유체칩은 간단한 방법을 통해 적은 샘플로도 원하는 3차원 스페로이드를 형성할 수 있다. 또한 미세유체칩에서 3차원 뇌종양세포 스페로이드 형성 후, 기능성 나노복합체와 근적외선 레이저를 활용하여 광열치료 효과 방법을 기술한 사례는 없다. 미세유체칩에서 종양을 형성하고 광열치료를 분석하는 방법은 가장 쉽고 빠르게 스페로이드 모델을 제작할 수 있으므로 다양한 장점을 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 3차원 종양세포 생성이 가능하고 나노입자의 광열치료 효과를 효과적으로 분석할 수 있는 미세 액적 기반 미세유체칩을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 유상물질 채널 및 수상물질 채널에 연결되는 유로를 통해 유입된 유상물질 및 종양세포를 포함하는 수상물질이 상기 유로의 접합 영역에서 미세 액적을 형성함을 확인하고, 상기 미세 액적에 나노입자를 처리하여 광열치료 효과에 대한 모니터링이 가능함을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 미세 액적 기반 미세유체칩을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 미세유체칩을 이용한 3차원 종양세포 생산 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 미세유체칩을 이용한 종양세포 광열 치료 효과의 분석 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 미세 액적 기반 미세유체칩(100)에 관한 것이다:

[0013] 유상물질(oil phase) 채널(110);

[0014] 상기 유상물질 채널(110)에 연결되어 유상물질(200)이 흐르도록 형성된 제1 유로(111);

[0015] 수상물질(aqueous phase) 채널(120);

[0016] 상기 수상물질 채널(120)에 연결되어 수상물질(300)이 흐르고, 상기 제1 유로(111)에서 분기된 제1분기 유로(112) 및 제2분기 유로(113)와 연결되어 접합 영역(130)을 형성하는 제2 유로(121);

[0017] 상기 접합 영역(130)과 연결되며 상기 제2 유로(121)와 일직선상에 배열되는 제3 유로(131); 및

[0018] 상기 제3 유로(131)의 하류에 연결되는 미세 액적 채널(140).

[0019] 상기 유상물질 채널(110)은 상기 미세유체칩의 일 끝단에 형성되며 상기 유상물질 채널(110)에 연결된 유상물질 주입구를 통해 유상물질(200)이 미세유체칩 내부로 인입된다.

[0020] 상기 제1 유로(111)는 상기 유상물질 채널(110)로부터 시작되어 도 1a에 도시된 바와 같이 나선형 또는 구불구

불한 형태의 유로를 형성한 후, 상기 제1분기 유로(112) 및 제2분기 유로(113)로 분기된다.

[0021] 분기된 상기 제1분기 유로(112) 및 제2분기 유로(113)는 상기 수상물질 채널(120) 및 상기 제2 유로(121)의 양측 외곽을 따라 서로 분기되어 연장되고, 끝단은 상기 제2 유로(121) 및 상기 제3 유로(131)와 연결된다.

[0022] 상기 수상물질 채널(120)은 상기 유상물질 채널(110)과 일정 거리를 두고 이격되어 형성되고, 상기 수상물질 채널(120)에 연결된 수상물질 주입구를 통해 수상물질(300)이 미세유체칩 내부로 인입된다.

[0023] 상기 수상물질(300)은 세포(301)를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 종양세포를 포함할 수 있다.

[0024] 상기 제2 유로(121)는 상기 수상물질 채널(120)로부터 시작되어 도 1a에 도시된 바와 같이 나선형 또는 구불구불한 형태의 유로를 형성하고, 상기 제1분기 유로(112) 및 제2분기 유로(113)와 서로 교차된 형태로 연결되어 상기 제2유로의 수직 방향으로 접합 영역(130)을 형성한다.

[0025] 상기 접합 영역(130)에서 제1분기 유로(112) 및 제2분기 유로(113)를 통해 공급되는 유상물질과 제2 유로(121)를 통해 공급되는 수상물질이 유입되어 미세 액적(400)이 형성되고, 상기 형성된 미세 액적(400)은 제3 유로(131)를 통해 미세 액적 채널(140)로 이동한다.

[0026] 상기 제3 유로(131)의 일 끝단은 상기 제1분기 유로(112) 및 제2분기 유로(113) 및 상기 제2 유로(121)와 연결되며, 다른 끝단은 상기 미세 액적 채널(140)에 연결된다.

[0027] 상기 미세 액적 채널(140)은 유출부가 연결되어 상기 미세유체칩 외부로 생성된 미세 액적(400)을 이동시킬 수 있다.

[0028] 상기 미세 액적 기반 미세유체칩(100)의 구조를 통해, 세포(301)가 포함된 수상물질(300)과 유상물질(200)은 미세 액적(400)을 생성한다.

[0029] 상기 유상물질 채널(110)을 통해 유입된 상기 유상물질(200)은 상기 제1 유로(111)를 통해 유동된 후, 상기 제1분기 유로(112) 및 제2 분기 유로(113)를 통해 서로 분기되어 유동된다.

[0030] 한편, 상기 수상물질 채널(120)를 통해 유입된 상기 세포(301)를 포함한 수상물질(300)은 상기 제2 유로(121)를 통해 유동된다.

[0031] 이 후, 도 1a에 도시된 바와 같이, 상기 제1분기 유로(112) 및 제2 분기 유로(113)를 통해 유동된 상기 유상물질(200)은 상기 제2 유로(121)를 통해 유동된 상기 세포(301)를 포함한 수상물질(300)과 접합 영역(130)에서 혼합되어, 세포를 포함하는 미세 액적(400)을 형성하고, 상기 미세 액적(400)은 상기 제3 유로(131)를 통해 유동된다.

[0032] 상기 제1분기 유로(112) 및 제2 분기 유로(113)는 서로 마주하도록 연결되며, 상기 제2 유로(121)는 상기 제1분기 유로(112) 및 제2 분기 유로(113)에 수직인 방향으로 연결된다. 또한, 상기 제3 유로(131)는 상기 제2 유로(121)와 일직선 방향으로 연결된다. 그에 따라, 상기 제1분기 유로(112) 및 제2 분기 유로(113)와 상기 제2유로(121) 및 제3 유로(131)는 서로 수직인 방향으로 교차하며 십자가 형상을 형성하며 연결된다.

[0033] 상기 유상물질(200)은 서로 마주하는 방향으로 유동된 후 수직방향으로 제공되는 상기 세포(301)가 포함된 수상물질(300)과 혼합되어, 상기 미세 액적(400)을 형성한다.

[0035] 본 발명의 일 양태는 상기 미세 액적 기반 미세유체칩(100)에 유상물질(200) 및 수상물질(300)을 주입하여 미세 액적(400)을 생성하는 단계를 포함하는 3차원 종양세포 생산 방법에 관한 것이다.

[0036] 상기 수상물질(300)은 세포(301)를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 종양세포를 포함할 수 있다.

[0037] 또한, 상기 수상물질(300)은 세포 배양액(302)을 포함할 수 있다.

[0038] 상기 3차원 종양세포 생산 방법에서 상기 유상물질(200) 및 수상물질(300)을 상기 미세유체칩(100)에 각각 주입하여 상기 미세 액적(400)을 생성한다.

[0039] 상기 유상물질(200)은 상기 유상물질 채널(110)을 통해 주입되어 상기 제1 유로(111)를 통과한 후, 상기 제1분기 유로(112) 및 제2 분기 유로(113)를 통해 유동되며, 상기 수상물질(300)은 상기 수상물질 채널(120)을 통해 주입되어 상기 제2 유로(121)를 통해 유동된다.

[0040] 상기 제1분기 유로(112) 및 제2 분기 유로(113)의 끝단 및 상기 제2 유로(121)의 끝단에 형성된 접합 영역(130)에서 상기 유상물질(200) 및 상기 세포(301)가 포함된 수상물질(300)이 서로 혼합되어 상기 미세 액적(400)을 형성하고, 상기 미세 액적(400)은 상기 제3 유로(131)를 통해 미세 액적 채널(140)로 유동된 후, 상기 미세 액적 채널(140)에 연결된 유출부를 통해 외부로 유출된다.

[0041] 상기 미세 액적을 생성하는 단계에서, 상기 미세 액적의 크기 및 생산성을 고려하여, 상기 유상물질 및 상기 수상물질 각각의 유속을 제어할 수 있다.

[0042] 상기 미세 액적(400)의 크기나, 미세 액적(400)에 포함된 세포(301)의 개수, 미세 액적(400)의 생산성 등을 고려하여 상기 유상물질(200) 및 상기 수상물질(300)의 유속을 제어할 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 유상물질의 유속은 1 내지 5 μl/분, 상기 수상물질의 유속은 0.5 내지 2.0 μl/분일 수 있다.

[0044] 상기 방법에 의해 생성된 미세 액적을 배양하여 3차원 종양세포를 생산할 수 있다.

[0045] 본 발명의 3차원 종양세포 생산 방법은 상술한 미세 액적 기반 미세유체칩을 이용하여 생성한 미세 액적을 이용하는 것으로 이 둘 사이의 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0047] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 종양세포 광열 치료 효과의 분석 방법에 관한 것이다:

[0048] (a) 유상물질(oil phase) 채널(110);

[0049] 상기 유상물질 채널(110)에 연결되어 유상물질(200)이 흐르도록 형성된 제1 유로(111);

[0050] 수상물질(aqueous phase) 채널(120);

[0051] 상기 수상물질 채널(120)에 연결되어 수상물질(300)이 흐르고, 상기 제1 유로(111)에서 분기된 제1분기 유로(112) 및 제2분기 유로(113)와 연결되어 접합 영역(130)을 형성하는 제2 유로(121);

[0052] 상기 접합 영역(130)과 연결되며 상기 제2 유로(121)와 일직선상에 배열되는 제3 유로(131); 및

[0053] 상기 제3 유로(131)의 하류에 연결되는 미세 액적 채널(140)을 포함하며,

[0054] 상기 제1분기 유로(112) 및 제2분기 유로(113)는 서로 교차된 형태로 상기 제2 유로(121)에 연결되어 상기 제2 유로(121)의 수직 방향으로 접합 영역(130)을 형성하며, 상기 접합 영역(130)에서 제1분기 유로(112) 및 제2분기 유로(113)를 통해 공급되는 유상물질(200)과 제2 유로(121)를 통해 공급되는 수상물질(300)이 유입되어 미세 액적(400)이 형성되고, 상기 형성된 미세 액적(400)은 제3 유로(131)를 통해 미세 액적 채널(140)로 이동하는 것인, 미세 액적 기반 미세유체칩(100)을 준비하는 단계;

[0055] (b) 상기 유상물질 채널(110) 및 수상물질 채널(120)에 각각 유상물질(200) 및 종양세포를 포함하는 수상물질(300)을 주입하여 미세 액적(400)을 생성하는 단계;

[0056] (c) 상기 미세 액적(400)에 광열효과(photothermal effect)를 나타내는 나노입자를 주입하고 배양하는 단계; 및

[0057] (d) 상기 배양한 미세 액적에 레이저를 조사하고 상기 미세 액적에 포함된 종양세포의 생존 및 사멸 정도를 분석하는 단계.

[0058] 본 명세서에서 용어 '광열 치료'(광열방산 또는 광학적 온열 현상)는 고형 종양을 치료하는 방법으로서 전형적으로 비 방사성 메커니즘을 통하여 흡수된 빛을 국부적인 열로 전환시키는 단계를 포함한다. 광열 치료 방법에 쓰이는 근적외선(NIR)은 일반 조직의 낮은 근적외선의 흡수로 기인하여 일반적인 생체 조직의 손상 없이 높은 공간적인 정밀성을 갖고 깊숙한 조직 침투가 가능하다.

[0059] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 미세 액적 기반 미세유체칩으로부터 생성된 미세 액적을 배양하고 광열 효과를 나타내는 나노입자를 주입하여 레이저를 조사한 다음 종양세포의 생존 및 사멸 정도를 분석함으로써 나노입자의 광열 치료 효과를 분석한다.

[0060] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 종양세포 광열 치료 효과 분석에 사용되는 상기 나노입자는 산화 그래핀 기반의 나노입자일 수 있고, 예를 들어, rGO(reduced graphene oxide)-bPEI(branched polyethylenimine)-

PEG(polyethylene glycol)일 수 있다.

[0061] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 종양세포 광열 치료 효과 분석에 사용되는 상기 나노입자는 금나노로드(Gold Nanorod)일 수 있다.

발명의 효과

[0063] 본 발명은 미세 액적 기반 미세유체칩에 관한 것으로 상기 미세유체칩이 유상물질과 수상물질이 별도의 유로를 통해 유동되어 상기 유로의 접합 영역에서 서로 혼합되어 미세 액적을 형성할 수 있도록 설계하여 종양세포가 내부에 포함된 미세 액적을 형성하도록 하였다. 본 발명의 미세 액적 기반 미세유체칩을 이용하면 균일한 크기의 3차원 종양세포 스페로이드를 간단한 방법으로 형성할 수 있고, 종양 스페로이드의 크기 세포의 숫자 등의 조절이 용이하다. 본 발명의 미세유체칩을 이용하여 생성한 3차원 종양세포는 다양한 종양 치료 연구에 폭넓게 이용될 수 있으며, 특히 종양세포에 대한 광열 치료 효과 연구에 적합하다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 액적 기반 미세유체칩을 도시한 사시도이다.

도 1b는 본 발명의 미세 액적 기반 미세유체칩을 통해 생성된 3차원 종양세포 스페로이드에 대한 모식도이다.

도 1c는 본 발명의 미세 액적 기반 미세유체칩을 통해 생성된 3차원 종양세포 스페로이드를 이용한 광열치료 방법의 모식도이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 액적 기반 미세유체칩에 대한 이미지이다.

도 2b는 본 발명의 미세 액적 기반 미세유체칩의 세포 채널로 형광염료를 주입하였을 때 미세유체칩에서의 유체 흐름을 나타낸 이미지이다.

도 3a는 본 발명의 미세 액적 기반 미세유체칩에서 생성된 미세 액적을 촬영한 이미지이다.

도 3b는 본 발명의 미세 액적 기반 미세유체칩에서 유상물질 유속에 따른 미세 액적 크기를 분석한 결과이다.

도 4a는 세포를 포함한 미세 액적을 촬영한 이미지이다.

도 4b는 미세 액적에 포함된 세포의 수를 분석한 그래프이다.

도 5a는 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)에 대한 투과전자현미경 이미지이다.

도 5b는 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)에 대한 푸리에변환 적외선 분광법 그래프이다.

도 5c는 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)에 대한 자외선-가시광선 분광법 그래프이다.

도 5d는 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)에 대한 제타전위 측정 결과이다.

도 6a는 NIR 레이저의 조사 여부에 따른 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)에 의한 세포 독성을 평가한 그래프이다.

도 6b는 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)에 NIR 레이저를 조사한 후 농도에 따른 온도 증가를 분석한 그래프이다.

도 7은 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)를 처리한 3차원 뇌종양세포 스페로이드에 대한 공초점 현미경 이미지이다.

도 8a는 3차원 뇌종양세포에서 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)를 처리하고 라이브/데드(live/dead) 어세이를 실시한 후 촬영한 형광 이미지이다.

도 8b는 도 8a의 결과를 수치화한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적

으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0068] **실시예**

[0069] **실시예 1. 미세 액적 기반 미세유체칩의 제조**

[0070] 1-1. 미세 액적 기반 미세유체칩의 제조

[0071] 미세유체칩에 미세 액적을 생성하는 디자인을 고안하였다. 먼저 실리콘 웨이퍼에 포토레지스트를 코팅한 후 캐드 공정으로 제작한 포토 마스크를 씌워 자외선을 조사하였다. 유상물질 주입구를 포함하는 직경 1.52 ㎜의 유상물질 채널(110)과 상기 채널에 연결된 폭 120 ㎛의 제1유로(111), 수상물질 주입구를 포함하는 직경 1.52 ㎜의 수상물질 채널(120)과 상기 채널에 연결된 폭 150 ㎛의 제2유로(121), 상기 제1 유로(111)에서 분기된 폭 80 ㎛의 제1분기 유로(112) 및 폭 80 ㎛의 제2분기 유로(113)와 교차된 형태로 상기 제2 유로(121)에 연결되어 상기 제2유로(121)의 수직 방향에 형성된 폭 80 ㎛, 길이 50 ㎛의 접합 영역(130), 상기 접합 영역(130)에 연결된 폭 200 ㎛의 제3유로(131) 및 상기 제3유로(131)에 연결된 미세 액적 유출부를 포함하는 직경 1.52 ㎜의 미세 액적 채널(140)을 포함하는 미세유체칩을 제작하였다(도 1a).

[0072] 기본 틀의 높이는 100 ㎛이고, 완성된 틀 위에 PDMS를 굳혀서 칩을 생산한다. 이 때 굳은 PDMS에 입구를 만들기 위해 입구 부분의 캐드 도면은 큰 원형으로 만든다. PDMS가 완전히 굳은 후에는 원하는 부분을 잘라내어 칩으로 만들 준비를 한다. 뜯어낸 PDMS에 유리 판을 위에 덮고 플라즈마 처리를 해 칩을 완성시킨다. 이렇게 완성된 칩에 유체를 넣기 위해 입구 부분의 큰 원 부분 중 아무 곳이나 송곳 등으로 구멍을 뚫어 입구 구멍을 만든다.

[0074] 1-2. 세포 배양

[0075] 시린지 펌프를 이용해 가장 왼쪽 입구에는 계면활성제를 담지한 미네랄 오일을, 그 오른쪽의 입구에는 뇌종양세포를 담지한 배양액을 주입하였다. 미세 액적의 크기를 조절하기 위해 배양액의 유속을 1 ㎕/min로 고정한 후, 미네랄 오일의 유속을 1 ㎕/min에서 5 ㎕/min까지 변화시켜 가며 실험한 결과, 오일의 유속이 증가함에 따라 액적의 크기가 작아졌고, 직경 180.82 ㎛부터 305.97 ㎛ 크기의 액적을 생성하였다. 이 실험의 결과, 액적의 크기가 출구쪽 채널의 폭보다 작아지는 미네랄 오일의 유량은 4 ㎕/min이라는 것을 알 수 있었다(도 3b).

[0076] 미세 액적 내에 담지되는 뇌종양세포의 수를 분석하기 위해 뇌종양세포를 담지한 배양액의 농도를 2×10^6/mL, 4×10^6/mL 및 6×10^6/mL로 변화시켜 가며 실험한 결과, 각각 미세 액적 내에 담지되는 세포의 수는 7.3개, 21.7개 및 30.83개로 변화하였다(도 4b). 결과적으로 세포의 주입양에 따라서 담지되는 세포의 수가 선형으로 증가한다는 것을 확인하였다.

[0078] **실시예 2. 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG) 합성**

[0079] 산화 그래핀(rGO)에 $ClCH_2COOH$와 NaOH를 이용하여 표면 OH기를 COOH으로 개질화한 뒤 EDC, NHS를 이용하여 아민 말단을 가진 2000 Da의 BPEI-PEG를 12시간 동안 교반한 뒤 6-8 kDa 투석 멤브레인을 이용하여 미반응물을 제거한다. 그 후 0.05 v/v%의 하이드라진과 90℃에서 반응하여 환원시켜 광열치료 효과 분석을 위한 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)를 만들었다.

[0080] 합성된 기능성 나노복합체의 분광학적 특성평가를 위해 투과전자현미경 이미지와 푸리에변환 적외선 분광법, 자외선-가시광선 분광법을 이용하여 평가하였다. 그 결과, 투과전자현미경 이미지에서 sheet 형태의 GO-COOH와 달리 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)는 uptake에 적합하게 sphere형태를 나타냈다(도 5a). 또한 푸리에변환 적외선 분광법 그래프에서 BPEI 구조내의 아민기로 인해 3410 cm^{-1}에서 피크를 보였으며, PEG의 C-O-C 구조로 1085 cm^{-1}에서 흡수파장을 보였다(도 5b). 자외선-가시광선 분광법 그래프에서 기능성 나노복합체는 비교군(GO-COOH, GO-BPEI-PEG)와 달리 환원 반응으로 인해 808 ㎚영역에서 흡광도가 높게 나타났다(도 5c). 제타전위 측정 결과, GO-COOH는 표면 COOH로 인해 약 -40 ㎷의 강한 음전하를, BPEI와의 결합으로 약 30 ㎷의 양전하를, PEG

와의 결합으로 약 40 mV의 강한 양전하를 띄었으며, 환원 반응 이후에는 약 30 mV의 양전하를 가지는 것을 확인하였다(도 5d).

[0081] 합성된 다양한 농도의 rGO-BPEI-PEG를 808 nm 근적외선 laser를 1W/cm^2의 세기로 조사하여, Thermocoupler로 측정하였다. 그 결과 농도가 증가할수록 광열효과를 띄는 것을 확인하였고, 온도가 일정 농도에서 포화에 이르는 지점 이내에서 농도의 최적화를 진행하였다(도 6b).

[0083] **실시예 3. 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)의 세포 내 흡수 및 광열치료 효과 평가**

[0084] 기능성 나노복합체(rGO-BPEI-PEG)의 뇌종양세포(U87Mg)에 대한 uptake를 확인하기 위해 공초점 레이저 현미경용 플레이트에 액적 기반 미세유체칩을 이용해 생성한 3차원 뇌종양세포 스페로이드를 시딩하고, 3일간 배양한 후, 기능성 나노복합체를 60 μg/ml의 농도로 4시간 동안 처리하였다. 기능성 나노복합체는 rGO-BPEI-PEG에 FITC 형광 다이와 결합해 형광 현미경으로 확인할 수 있게 하였다. 기능성 나노복합체를 처리한 세포를 Phalloidin 594(red) 및 DAPI(blue)로 염색했다. 공초점 레이저 현미경으로 이미지를 찍은 결과, 기능성 나노복합체를 처리한 스페로이드에 uptake가 되어 세포질 안에서 FITC의 형광색이 발현하는 것을 확인할 수 있었다(도 7).

[0085] 3차원 뇌종양세포 스페로이드에 기능성 나노복합체의 근적외선 레이저를 조사하여 광열치료 효과를 분석하였다. 96-well 플레이트에 생성된 스페로이드를 시딩하고 기능성 나노복합체를 60 μg/ml의 농도로 4시간 동안 처리하였다. 근적외선 레이저 조사 전의 경우 기능성 나노복합체를 4시간 동안 처리 후 바로 세포 생존율을 산출했다. 근적외선 레이저 조사 후의 경우 기능성 나노복합체를 4시간 동안 처리 후 근적외선 레이저를 1W/cm^2 의 강도로 10분 간 조사하고 세포 생존율을 산출했다. 근적외선을 조사하지 않은 경우 3차원 뇌종양세포는 91%의 높은 생존율을 보였지만, 근적외선 레이저 조사 후 생존율이 55%로 감소하는 것을 확인하였다(도 8b). 이를 통해 기능성 나노복합체와 근적외선 레이저를 이용한 3차원 뇌종양모델의 광열치료 효과를 확인하였다.

부호의 설명

[0087] 100: 미세 액적 기반 미세유체칩 110: 유상물질(oil phase) 채널

111: 제1 유로 112: 제1분기 유로

113: 제2분기 유로 120: 수상물질(aqueous phase) 채널

121: 제2 유로 130: 접합 영역

131: 제3 유로 140: 미세 액적 채널

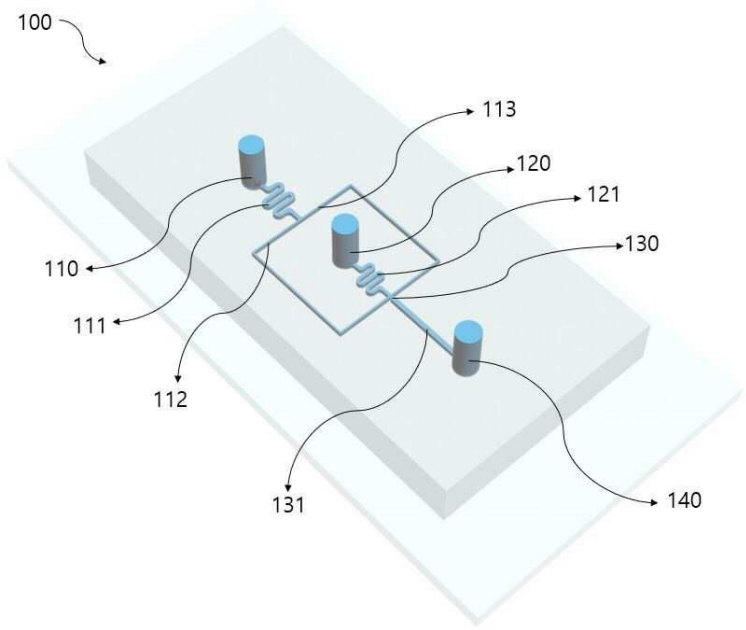
200: 유상물질 300: 수상물질

301: 세포 302: 세포 배양액

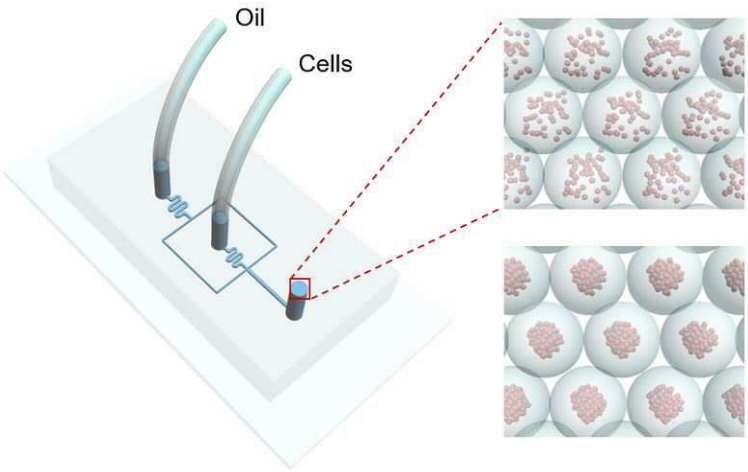
400: 미세 액적

도면

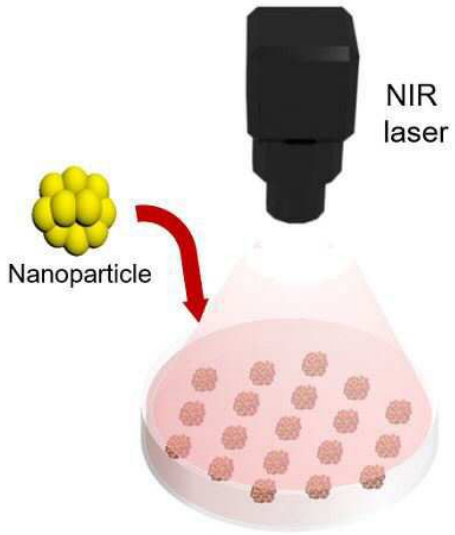
도면1a



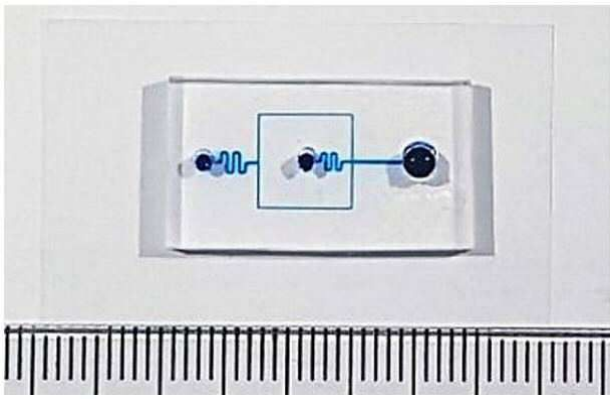
도면1b



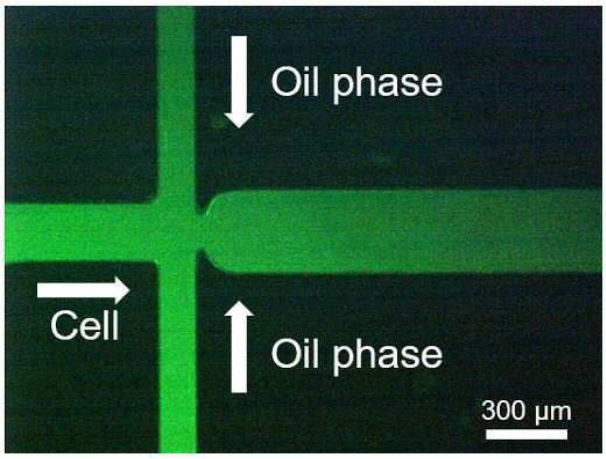
도면1c



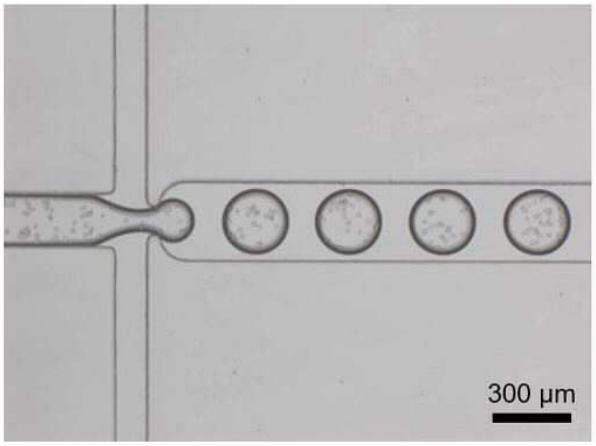
도면2a



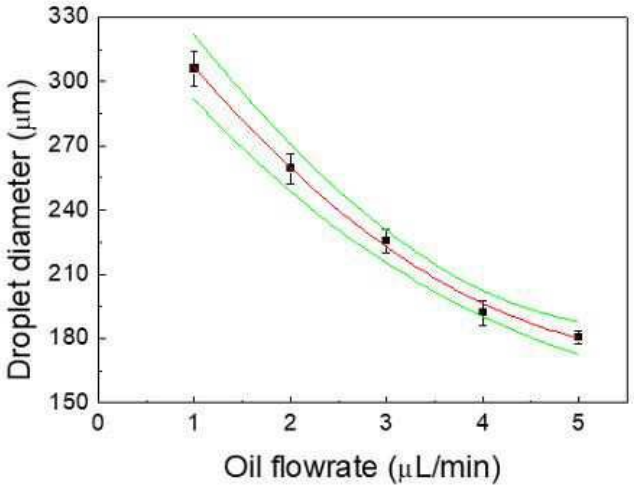
도면2b



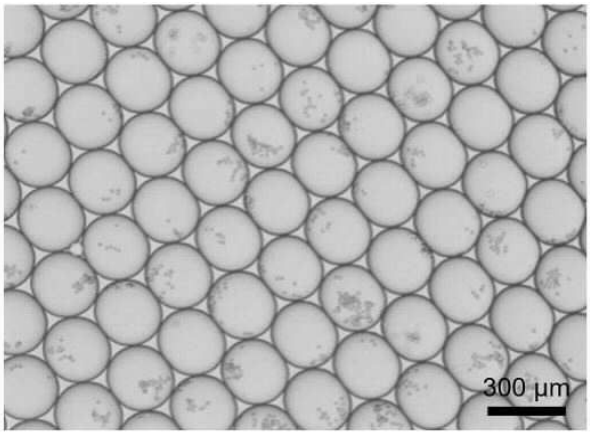
도면3a



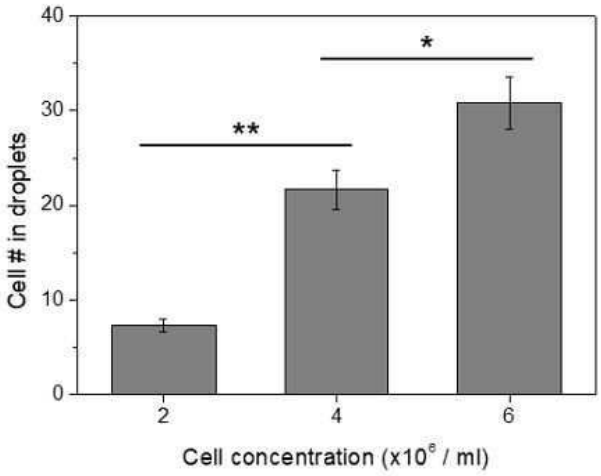
도면3b



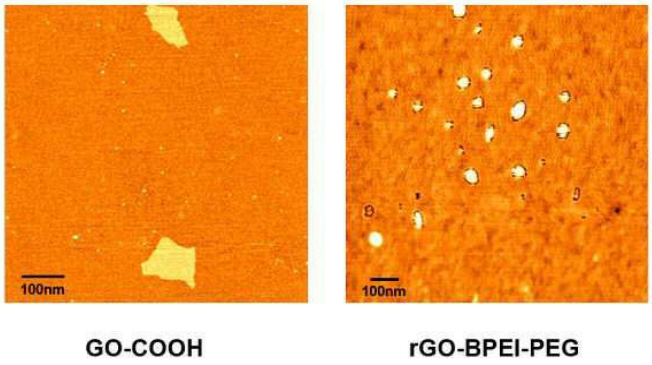
도면4a



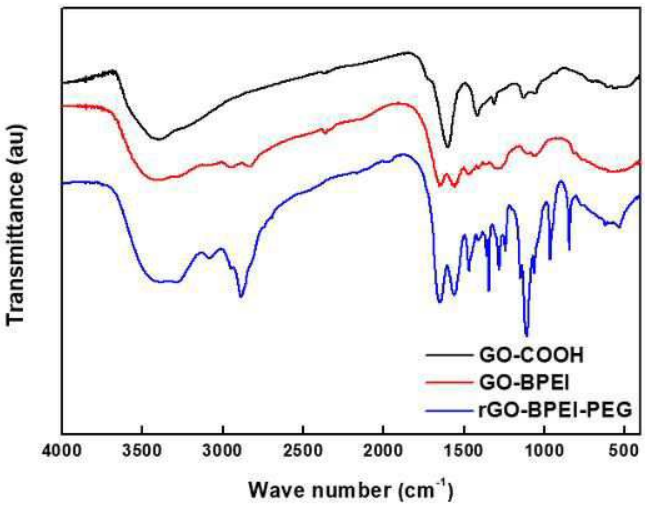
도면4b



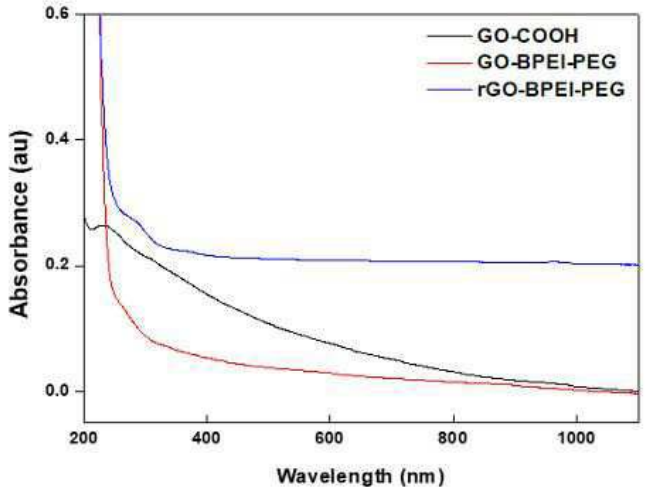
도면5a



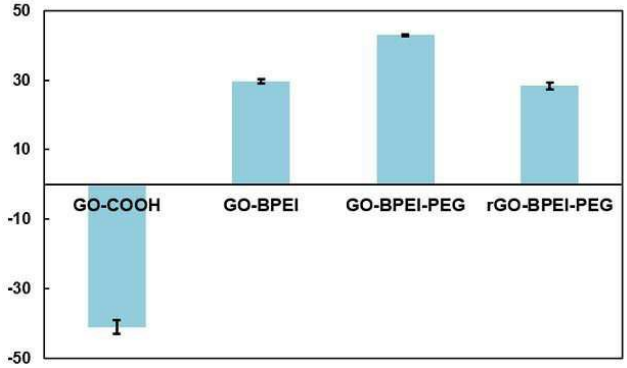
도면5b



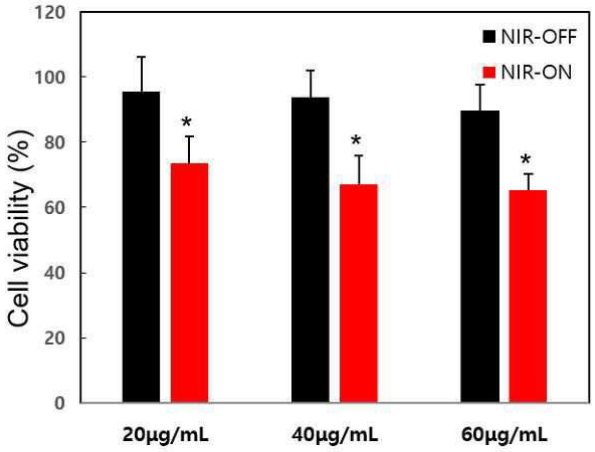
도면5c



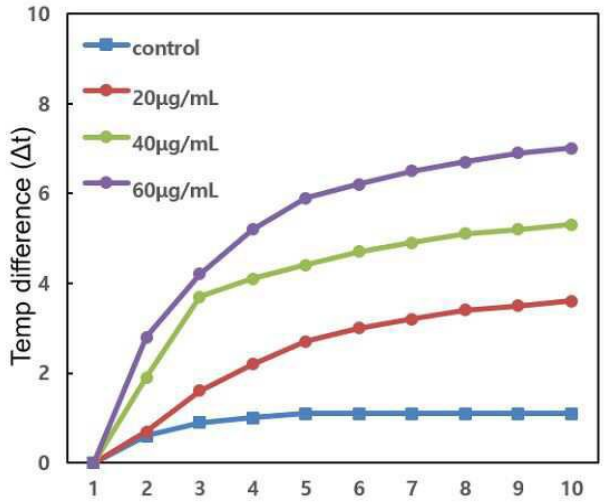
도면5d



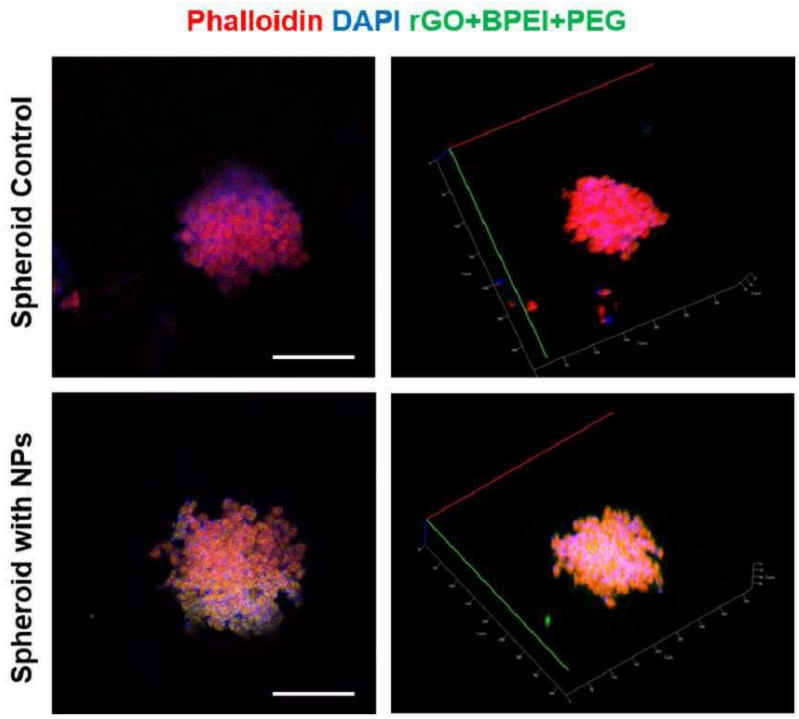
도면6a



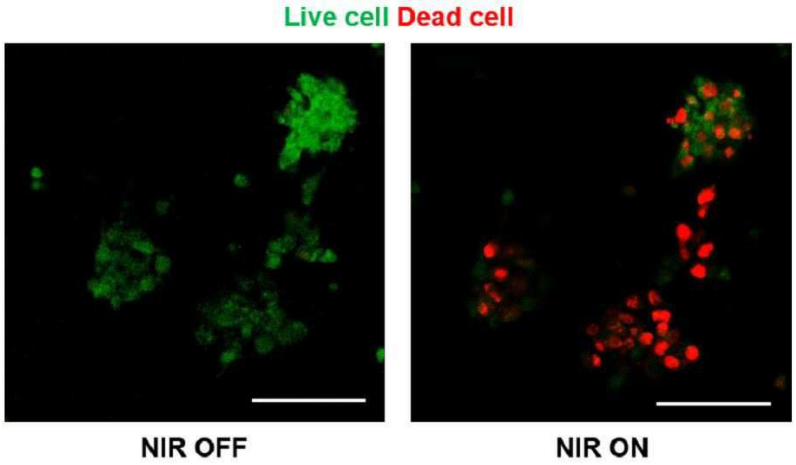
도면6b


control
20μg/mL
40μg/mL
60μg/mL
Temp difference (Δt)
0
2
4
6
8
10
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

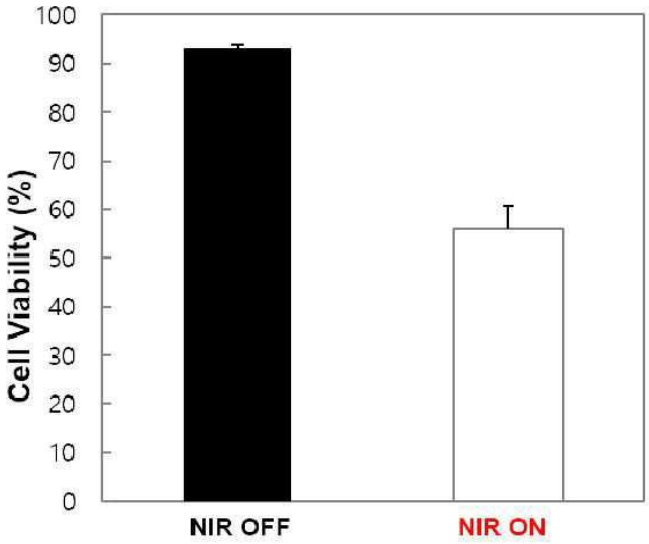
도면7


Phalloidin DAPI rGO+BPEI+PEG
Spheroid Control
Spheroid with NPs

도면8a


Live cell Dead cell
NIR OFF
NIR ON

도면8b


Cell Viability (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
NIR OFF
NIR ON