(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 12 월 30 일 (30.12.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/199395 A1

(51) 국제특허분류:
C12M 1/24 (2006.01) *G01N 35/08* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/006306

(22) 국제출원일: 2015 년 6 월 22 일 (22.06.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0076310 2014 년 6 월 23 일 (23.06.2014) KR

(71) 출원인: **경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY)** [KR/KR]; 446-701 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **최성용 (CHOI, Sungyoung)**; 446-967 경기도 용인시 기흥구 중부대로 55 번길 11, 110 동 101 호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **안소영 (AHN, So-Young)**; 137-881 서울시 서초구 서초대로 344, 4 층 안소영 국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

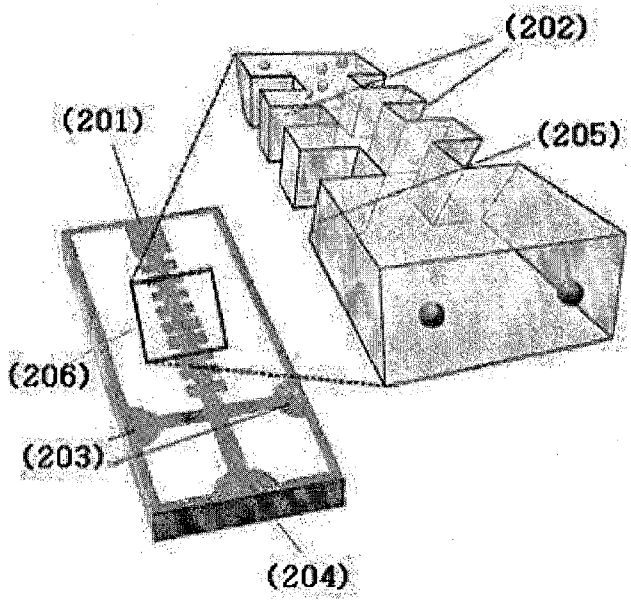
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) **Title**: APPARATUS FOR SEPARATING FINE PARTICLES AND SEPARATING METHOD USING SAME

(54) **발명의 명칭** : 미세입자 분리 장치 및 이를 이용한 분리 방법

[Fig. 2]



(57) **Abstract**: The present invention relates to an apparatus for separating fine particles and a separating method using same, for respectively separating fine particles from a fluid that includes fine particles and the fluid from which the fine particles have been removed. The apparatus for separating the fine particles may separate the fine particles regardless of a flow rate and may also separate the fine particles through manual manipulation using a pipette or a syringe.

(57) **요약서**: 본 발명은 미세입자 분리 장치 및 이를 이용하여 미세입자를 포함하는 유체로부터 미세입자와 미세입자가 제거된 유체를 각각 분리하는 분리 방법에 관한 것으로 유속에 관계없이 미세입자의 분리가 가능하고 피펫이나 시린지를 이용한 수동 조작으로도 미세입자의 분리가 가능하다.

WO 2015/199395 A1

명세서

발명의 명칭: 미세입자 분리 장치 및 이를 이용한 분리 방법

기술분야

[1] 본 발명은 미세입자 분리 장치 및 이를 이용한 분리 방법에 관한 것이다.

[2] 보다 상세하게는 유속에 관계없이 미세입자를 포함하는 유체로부터 미세입자를 분리할 수 있는 미세입자 분리 장치 및 이를 이용한 분리 방법에 관한 것이다.

배경기술

[3] 정확하고 신속한 생체시료의 분자분석을 위해서는 타겟 분자 이외에 분석에 방해가 되는 세포를 분리 및 제거하는 과정이 필요하다.

[4] 종래에는 원심분리기를 이용하여 세포와 세포 부유액을 분리하였으나 해당기술은 (1) 전처리를 위해 고가의 장비를 필요로 하고 (2) 휴대가 어렵다는 단점이 있다.

[5] 현재 미세유체역학을 이용하여 입자를 분리하는 방법은 크게 능동적 분리방법(active separation method)과 수동적 분리방법(passive separation method)으로 나눌 수 있다.

[6] 능동적 분리방법은 전기장과 같은 외부 에너지장을 이용하여 입자를 분리한다. 대표적인 예로 모세관 전기영동과 유전영동 분리법을 들 수 있다.

[7] 모세관 전기영동은 주로 단백질 또는 DNA와 같이 극성을 띄는 물질을 크기별로 분리하는 데 많이 이용되고 있으나 분리 시 고전압이 필요하고 세포와 같은 비극성 입자를 분리할 수 없다는 단점이 있다.

[8] 이에 반해 유전영동 분리법은 불균일한 전기장에 노출된 입자가 입자의 크기와 종류에 따라 받는 유전영동력의 차이를 이용하기 때문에 비극성 분자나 세포 등도 전처리 과정 없이 분리할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 유전영동 분리법은 세포배지와 같은 전해질 용액 내에서 전기분해를 일으킬 수 있으므로 세포친화적인 용액은 분리용액으로 사용할 수 없다는 문제점이 있다. 또한 세포와 같은 생물학시료의 경우 인가된 전압에 의해 세포의 활성이 영향을 받으므로 분리 수확물을 세포치료용의 목적으로 사용하고자 할 때에는 제약이 있을 수 있다.

[9] 상기 능동적 분리방법과 달리 수동적 분리방법은 시료공급을 위한 유동에너지를 이용하여 입자를 분리함으로써 미세유로 이외에 부가적인 장비 없이 미세입자를 분리할 수 있다는 장점이 있다.

[10] 따라서 현재 이를 활용한 다양한 미세 유체 시스템에 관한 연구가 활발히 진행되고 있고 예를 들어 입자의 크기에 따라 미세 채널 내에 정렬되는 입자의 위치 차이를 이용하여 분리하는 방법(일본등록특허 제 2005-205387호)이 있다.

[11] 그러나 이러한 수동적 분리방법은 입자를 분리하기 전에 미세유로 내 초기

위치를 동일하게 정렬시켜주기 위한 시료유동(sample flow)과 제어유동(sheath flow)간의 정교한 미세유량제어가 필요하다는 문제점이 있다.

[12] 또한 관성유체소자, 유체영동소자 등 미세유체역학기술에 기반한 세포분리소자가 개발된 바 있으나 상기 개발된 소자들은 소자 구동 유속에 따라 그 효율이 크게 달라지는 단점을 있다.

[13] 구체적으로 유체영동소자는 유속이 높아질수록 세포제거효율이 낮아지는 경향을 보이고 관성유체소자는 유속이 낮아질수록 세포제거효율이 낮아지는 경향을 보인다.

[14] 따라서 상기 유체영동소자 또는 관성유체소자를 구동하기 위해서는 높은 유속 정밀도를 갖는 특수한 고가의 시린지 펌프가 필요한 문제점이 있다.

[15] 또한 세포, DNA와 같은 생물학적 미세입자의 조작을 위해서는 추가적인 전기적 혹은 물리적 에너지가 필요하고 이러한 추가적인 에너지를 사용하기 위해서는 미세유체 소자에 별도의 에너지원 장치가 필요하며 이를 위한 복잡한 제작공정이 필수적으로 수반된다.

[16] 따라서 미세유체소자의 제작공정과 작동원리가 더욱 복잡해지므로 소자의 휴대성과 실용성을 높이는데 제한이 되었다.

[17] 이에 따라, 유속에 관계없이 미세입자를 포함하는 유체로부터 미세입자를 분리할 수 있고 휴대성 및 실용성이 높은 미세입자 분리 장치 및 이를 이용한 분리 방법이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[18] 본 발명은 미세유체 채널 내의 구조적 특징을 이용하여 유속에 관계없이 미세입자를 분리할 수 있는 미세입자 분리 장치 및 분리 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

[19] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은

[20] 미세입자를 포함하는 유체가 주입되는 미세유체 주입부;

[21] 상기 미세유체 주입부에 연결되어 주입된 유체로부터 미세입자를 분리하는 미세입자 분리부;

[22] 상기 미세입자 분리부에 연결되어 분리된 미세입자를 배출하는 제1 배출부; 및

[23] 상기 미세입자 분리부에 연결되어 미세입자가 제거된 유체를 배출하는 제2 배출부를 포함하며,

[24] 여기서, 상기 미세입자 분리부는 미세유체 채널부를 포함하고,

[25] 상기 미세유체 채널부는 확장채널부과 축소채널부가 교대로 반복적으로 형성된 형태이며,

[26] 상기 미세유체 채널부의 측면은 유체의 일차 유동방향에 대해 일정한 경사를 갖고,

[27] 상기 미세유체 주입부에 체결되는 압력발생기로부터 발생하는 압력에 의해

미세입자 분리부를 구동하는 미세입자 분리 장치를 제공한다.

[28] 상기 미세입자 분리 장치의 미세유체 주입부는 미세유체를 주입하기 위한 압력발생기를 포함하며, 상기 압력발생기에서 발생한 압력으로 미세입자 분리부를 구동할 수 있다.

[29] 본 발명의 일 실시예에서 상기 미세유체 주입부의 압력발생기는 피펫 또는 시린지 중 어느 하나일 수 있다.

[30] 또한 상기 압력발생기에 의해 발생한 압력에 의해 주입된 유체들은 미세유체 채널로 이동하여 흐를 수 있다.

[31] 경사(傾斜)의 사전적 의미는 한쪽으로 비스듬히 기울어진 정도이며, 즉, 0°, 90°, 및 180°가 아닌 비스듬히 기울어진 각도를 갖는 것을 의미한다.

[32] 본 발명의 미세유체 채널 측면의 일정한 경사는 수직 또는 수평이 아니며, 일 실시예로 90°를 제외한 0° 초과 180° 미만의 경사를 가질 수 있다. 또한 일 실시예로 본 발명의 미세유체 채널 측면의 일정한 경사는 90°를 제외한 30° 이상 150° 이하일 수 있다. 또한 일 실시예로 본 발명의 미세유체 채널 측면의 일정한 경사는 90°를 제외한 60° 이상 120° 이하일 수 있다. 또한 일 실시예로 본 발명의 미세유체 채널 측면의 일정한 경사는 90°를 제외한 70° 이상 100° 이하일 수 있다.

[33] 또한 본 발명의 일 실시예에서 확장채널의 너비는 축소채널의 너비의 2배 이상일 수 있으며, 일 실시예로 본 발명의 확장채널의 너비는 2배 내지 10배일 수 있다.

[34] 본 발명의 일 실시예에서 상기 축소채널의 너비는 분리하고자하는 미세입자의 지름 이상이고 분리하고자 하는 미세입자 지름의 4배 이하일 수 있다.

[35] 본 발명의 일 실시예에서 상기 미세유체 채널의 높이는 축소채널의 너비의 3배 이상일 수 있으며, 일 실시예로 본 발명의 미세유체 채널의 높이는 축소채널의 너비의 3배 내지 10배일 수 있다.

[36] 본 발명의 일 실시예에서 상기 확장채널 및 축소채널의 길이는 10 μm 이상일 수 있으며, 일 실시예로 본 발명의 확장채널 및 축소채널의 길이는 10 μm 이상 1000 μm 이하일 수 있다.

[37] 본 발명의 일 실시예에서 미세유체 분리부는 2개 이상의 미세유체 채널부를 포함하고, 상기 2개 이상의 미세유체 채널부는 서로 평행하게 적층된 형태일 수 있다.

[38] 본 발명의 일 실시예에서 미세유체 분리부는 10개 이상의 미세유체 채널부를 포함하고, 상기 2개 이상의 미세유체 채널부는 서로 평행하게 적층된 형태일 수 있다. 일 실시예로 본 발명의 미세유체 채널은 10개 이상 100개 이하의 층이 서로 상부에 적층되어 평행할 수 있다.

[39] 본 발명에서 유속은 주어진 압력에 비례하고 채널 저항에 반비례하기 때문에 상기 평행하게 적층된 미세유체 채널부는 주어진 압력에서 세포 처리량을 보다 높일 수 있다.

[40] 본 발명의 일 실시예에서 미세입자를 배출하는 제1 배출부는 측면에 위치하여

측면 배출부를 이루고, 미세입자가 제거된 유체를 배출하는 제2 배출부는 중앙에 위치하여 중앙 배출부를 이룰 수 있다.

[41] 본 발명에서 분리되는 미세입자의 크기는 5 μm 이상 내지 50 μm 이하일 수 있다.

[42] 또한 본 발명은 상기 미세입자 분리 장치를 이용하여 미세입자를 포함하는 유체로부터 미세입자와 미세입자가 제거된 유체를 각각 분리하는 미세입자 분리 방법을 제공한다.

[43] 상기 미세입자 분리 방법은 압력발생기를 이용하여 미세입자를 포함하는 유체를 취하는 단계; 압력발생기와 본원발명에 따른 미세입자 분리 장치를 체결하는 단계; 상기 미세유체 주입부에 체결되는 압력발생기로부터 발생하는 압력에 의해 미세입자 분리부를 구동시켜 미세입자를 분리하는 단계; 및 미세입자와 미세입자가 제거된 유체를 각각 배출하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

[44] 본 발명은 미세유체 채널 내의 구조적 특징을 이용하여 유속에 관계없이 미세입자를 포함하는 유체로부터 미세입자의 분리가 가능하다.

[45] 본 발명은 정밀한 유속 제어를 위한 고가의 장치 없이 제한된 환경 하에서도 간편하고 빠르게 미세입자를 포함하는 유체로부터 미세입자의 분리가 가능하다.

[46] 본 발명은 피펫이나 시린지를 이용한 수동 조작으로도 미세입자 분리 장치의 구동이 가능하다.

[47] 본 발명을 이용하여 세포 부유액으로부터 효율적으로 세포를 분리, 제거 또는 농축할 수 있다.

[48] 본 발명을 이용하여 혈액로부터 혈구 및 혈장을 분리하고 세포를 포함하는 세포 배양액로부터 세포 및 세포 배양액을 분리할 수 있다.

[49] 본 발명은 세포 부유액의 분자분석을 위해서 반드시 거쳐야 하는 세포제거 과정을 하나의 칩 상에서 구현함으로써 원심분리기와 같이 고가의 대형 장비 없이도 시료 전처리를 단순화 및 신속화 시킬 수 있으며 이로써 안정적이고 정확한 분자분석이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[50] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치를 제조하는 방법을 나타낸다.

[51] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치의 사시도를 나타낸다.

[52] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치와 피펫을 이용한 미세입자 분리방법을 나타낸다.

[53] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리부의 구조의 사시도와 미세입자의 회전유동을 나타내는 미세유체 채널부의 단면도를 나타낸다.

[54] 도 5는 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 (a) 미세입자 분리부의 구조 및

개략적인 구동을 보여주는 사시도 및 (b) 미세유체 분리부에 대한 평면도와 단면도를 나타낸다. 도 5의 (a)의 왼쪽 및 (b)의 위쪽은 실시예 1의 미세입자 분리부를 나타내고, 도 5의 (a)의 오른쪽 및 (b)의 아래쪽은 비교예 1의 미세입자 분리부를 나타내며 기준자(scale bar)는 50 μm이다.

[55] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치를 이용한 세포 제거 및 분리 실험을 보여주는 도로서, (a)의 맨 위는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치와 1 ml 피펫을 1 ml 피펫팁을 통해 체결한 모습을 보여주는 사진이고, (a)의 중간은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치로 혈액 시료에서 혈구세포를 분리하는 것을 보여주는 사진이며, (a)의 맨 아래는 분리되는 미세입자의 흐름(붉은색 화살표) 및 분리된 유체의 흐름(검은색 화살표)을 보여주는 단면도이며, (b)의 왼쪽은 분리 전 혈액 시료를 보여주는 사진이고, (b)의 오른쪽은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치로 분리된 혈액 시료를 보여주는 사진이며, 기준자(scale bar)는 100 μm이다.

[56] 도 7은 (a) 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치와 시린지를 체결한 모습을 보여주는 사진이며, (b) 상기 장치의 분리되는 미세입자의 흐름(녹색 화살표) 및 분리된 유체의 흐름(검은색 화살표)을 보여주는 단면도이며, 및 (c) 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치와 종래의 원심분리기로 각각 분리한 세포에 대한 세포독성(cytotoxicity) 실험의 결과(백분율)를 나타내며, 기준자(scale bar)는 100 μm이다.

[57] 도 8은 (a) 본 발명의 실시예 1 및 비교예 1의 미세입자 분리 장치를 이용한 미세입자의 정렬을 나타내는 형광 현미경 사진 및 (b) 이에 대한 각각의 형광 프로파일을 보여주는 도이다.

[58] 도 9는 본 발명의 일 실시예 1의 미세입자 분리 장치를 이용하여 (a) 4.1 μm 형광 폴리스티렌 미세입자 및 (b) 9.9 μm 형광 폴리스티렌 미세입자에 대한 각각 입자 크기별 미세입자 분리 효율을 보여주는 도이다.

[59]

[60] <도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>

[61] 101: 실리콘 웨이퍼

[62] 102: 포토레지스트

[63] 103: 폴리다이메틸실록산(PDMS)

[64] 104: 생검(biopsy) 펀치

[65] 105: 배출부

[66] 106, 201: 유체 주입부

[67] 202: 채널 측면의 경사 벽 구조

[68] 203, 306, 605: 제1 배출부(측면 배출부)

[69] 204, 307, 606: 제2 배출부(중앙 배출부)

[70] 205, 403: 채널 측면인 일정한 경사를 갖는 경사 벽

[71] 301: 미세입자를 포함하는 유체

[72] 302, 601: 피펫

[73] 303, 603: 피펫 팁

[74] 206, 304: 미세입자 분리부

[75] 305: 피펫 구동부

[76] 401: 확장채널부

[77] 402: 축소채널부

[78] 404: 회전유동

[79] 405: 미세입자

[80] 501, 502: 미세입자 분리부의 입구 부분

[81] 602: 혈액시료

[82] 604: 미세입자 분리 장치

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[83] 이하 본 발명의 일 실시예를 첨부된 도면을 참조하여 보다 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[84]

[85] **<제조예>**

[86] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치를 제조하는 방법을 나타낸다. 본 발명에 의한 미세입자 분리부는 폴리다이메틸실록산(poly(dimethylsiloxane)) (PDMS)을 이용한 마이크로몰딩(micromolding) 기법으로 제작한다.

[87] 도 1을 참조하면, 먼저 실리콘 웨이퍼(101) 상부를 스핀 코팅에 의해 SU-8 포토레지스트(MicroChem Corp., Newton, MA)(102)로 소정의 두께(예를 들어, 60 내지 70 μm로 덮고 건조(baking) 후, 실리콘 웨이퍼를 UV 빛에 실리콘 웨이퍼(101)의 수직 방향에 대해 5° 각도로 비스듬히 노출시킨다. 실리콘 웨이퍼는 그리고 나서 베이킹 후 현상하여 경사 구조의 최종 포토레지스트 패턴(몰드)을 생성한다(단계 1). 포토레지스트의 길이, 너비 및 높이와, UV 조사량은 디자인 및 공정조건에 따라 조절될 수 있다.

[88] 이어서 실리콘 몰드를 복제함으로써 폴리다이메틸실록산 poly(dimethylsiloxane) (PDMS)(103)으로 미세유체 장치를 만들었다(단계 2). 상기 고분자 기판에 사용되는 고분자 재질은 폴리다이메틸실록산(PDMS) 이외에도 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리아크릴레이트, 폴리카보닐레이트, 폴리사이클릭올레핀, 폴리이미드, 또는 폴리우레탄 등이 바람직하다.

[89] 구체적으로, 채널 복제를 위해 상기 제작된 주형에 PDMS의 초기중합체(prepolymer)와 경화제(curing agent)의 혼합물 (10:1 배율) (PDMS Sylgard184 kit, Dow Chem Corp., Midland, MI)을 포토레지스트 패턴(몰드)에 부어서, 70 °C에서 1 시간 동안 경화시켰다. 상기 복제된 PDMS 채널부를 산소

플라즈마에 40 초 동안 노출시킨 후에 유리 슬라이드와 접합하였다. 상기 PDMS 채널부의 구조는 도 2의 미세입자 분리부의 채널부의 구조에 해당한다. 각 채널부는 확장채널부과 축소채널부가 교대로 반복적으로 형성된 형태로 확장채널부의 너비와 길이는 각각 60 μm및 40 μm이고, 축소채널부의 너비와 길이는 각각 20 μm및 40 μm이며, 채널의 높이는 72.5 μm이다. 미세유체 채널부는 확장채널부와 축소채널부는 160개가 반복된 구조이다.

[90] PDMS 슬랩(slab)에 배출부(105)와 주입부(106)를 생성하기 위하여 1.5 mm 생검(biopsy) 펀치(104)를 사용하여 배출부(105)와 주입부(106) 구멍을 생성한다(단계 3).

[91] 구멍이 뚫린 PDMS 슬랩을 산소 플라즈마 처리 후에 정렬하고 비가역적으로 결합시킨다(단계 4).

[92] 본 발명의 분리 장치 제조에 사용된 폴리다이메틸실록산(PDMS)의 변형성(deformability)은 적당한 압력 하에서 누설 방지 연결(leak-proof interconnection)을 가능하게 한다.

[93]

[94] **<비교 제조예>**

[95] 실리콘 웨이퍼를 UV 빛에 노출시킬 때 실리콘 웨이퍼(101)의 수직 방향으로 노출시키는 것과, 채널의 높이가 62.9 μm인 것을 제외하면 제조예와 동일한 방법으로 제조한다.

[96]

[97] **<실시예 1> 미세입자 분리 장치**

[98] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치의 사시도를 나타낸다.

[99] 도 2를 참조하면, 미세입자 분리 장치는 미세입자를 포함하는 유체가 주입되는 미세유체 주입부(201), 상기 미세유체 주입부에 연결되어 주입된 유체로부터 미세입자를 분리하는 미세입자 분리부(206), 상기 미세입자 분리부에 연결되어 분리된 미세입자를 배출하는 제1(측면) 배출부(203) 및 상기 미세입자 분리부에 연결되어 제거된 미세유체를 배출하는 제2(중앙) 배출부(204)를 포함한다. 상기 미세입자 분리부는 미세유체 채널부(206)를 포함하고, 상기 미세유체 채널부(206)는 확장채널부과 축소채널부가 교대로 반복적으로 형성된 형태이다.

[100] 상기 미세입자를 포함하는 유체는 예를 들어, 혈액 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 상기 미세입자는 혈구, 세포, 박테리아, 바이러스, DNA 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[101] 상기 미세유체 채널부의 측면(202)은 유체의 일차 유동방향에 대해 일정한 경사(205)를 갖고, 상기 일정한 경사는 0° 및 90°가 아니다. 상기 유체의 일차 유동방향은 입구에서 출구를 향하는 미세유체의 주 이동 방향을 나타낸다. 즉, 상기 유체의 일차 유동방향에 대한 일정한 경사는 상기 유체의 일차 유동방향과 수직 또는 수평이 아닌 각도를 가지는 경사를 나타낸다. 예를 들어, 상기 일정한 경사는 90°를 제외한 0° 초과 180° 미만일 수 있다. 일 예로, 상기 일정한 경사는

85°이다. 각 채널부는 확장채널부과 축소채널부가 교대로 반복적으로 형성된 형태로 확장채널부의 너비와 길이는 각각 60 μm및 40 μm이고, 축소채널부의 너비와 길이는 각각 20 μm및 40 μm이며, 채널의 높이는 72.5 μm이다

[102] 상기 미세입자 분리 장치는 상기 미세유체 주입부에 체결되는 압력발생기로부터 발생하는 압력에 의해 미세입자 분리부를 구동한다.

[103] 상기 미세유체 주입부에 체결되는 압력발생기는 일정 압력을 발생시켜 미세유체를 주입할 수 있는 수단을 지칭하며, 피펫, 시린지 주사기, 연동 펌프, 또는 시린지 펌프 중 어느 하나일 수 있으며, 수동으로 조작할 수 있는 피펫 또는 시린지에 의해 발생하는 압력만으로도 미세유체 분리부의 구동이 가능하다. 상기 일정 압력은 예를 들어 10 kPa 내지 608.4 kPa일 수 있다.

[104] 본 발명에서 유체영동의 평형 위치(Hydrophoretic equilibrium positions)(Lp)는 다음 파라미터로 설명할 수도 있다.

[105] $$L_p \propto f\left(\frac{w_c}{d}, \frac{h}{d}, \mathrm{Re}\right) \quad (1)$$

[106] 상기 식 (1)에서, Wc 는 축소채널의 너비, h는 채널 높이, d는 분리하고자 하는 입자(미세입자)의 직경이다. Re는 Re=ρuL/μ로 정의되는 레이놀드 수이고, 여기서 ρ은 유체(액체)의 밀도, u은 유체(액체)의 속도, L 은 유체 채널의 특징적인 채널 치수(dimension)이고, μ는 유체(액체)의 점성(viscosity)이다. 즉, Re는 유체의 속도에 비례한다.

[107] 상기 확장채널부의 너비는 축소채널부의 너비의 2배 이상일 수 있다.

[108] 상기 축소채널의 너비부는 분리하고자하는 미세입자 지름 이상이고 분리하고자하는 미세입자 지름의 4배 이하일 수 있으며 이는 다음 식 (2)로 나타낼 수 있다.

[109] $d \leq Wc \leq 4d$ (2)

[110] 상기 확장채널 및 축소채널의 길이는 1 μm 이상일 수 있다.

[111] 미세유체 채널의 높이는 축소채널부의 너비의 3배 이상일 수 있다.

[112]

[113] <비교예 1> 미세입자 분리 장치

[114] 비교예 1의 미세입자 분리 장치는 미세유체 채널부의 측면은 유체의 일차 유동방향에 대해 90°의 각도를 가지며 채널의 높이가 62.9 μm인 것을 제외하면 실시예 1과 동일한 구조를 가진다.

[115]

[116] <실시예 2> 복수 개(2개 이상)의 미세유체 채널부를 포함하는 미세입자 분리 장치

[117] 미세유체 분리부는 2개 이상의 미세유체 채널부를 포함하고, 상기 2개 이상의 미세유체 채널부는 서로 평행하게 적층된 것을 제외하고 실시예 1의 미세입자 분리 장치를 제공한다(도 5(a) 참조).

[118] 예를 들어, 미세유체 분리부는 10개 이상의 미세유체 채널부를 포함하고, 상기 10개 이상의 미세유체 채널부는 서로 평행하게 적층된 것을 제외하고 실시예 1의 미세입자 분리 장치일 수 있다.

[119] 일 실시예에서, 미세유체 분리부는 10개의 미세유체 채널부를 포함하고, 상기 10개의 미세유체 채널부는 서로 평행하게 적층된 것을 제외하고 실시예 1의 미세입자 분리 장치일 수 있다.

[120]

[121] <실시예 3> 미세입자 분리방법

[122] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치와 피펫을 이용한 미세입자 분리방법을 나타낸다.

[123] 도 3을 참조하면, 미세입자 분리방법은 압력발생기로서 피펫(302)을 이용하여 미세입자를 포함하는 유체(301)를 취하는 단계(단계 1); 피펫팁(303)을 통해 피펫(302)과 실시예 1에 따른 미세입자 분리 장치를 체결하는 단계(단계 2); 및 피펫의 구동부(305)를 눌러 미세입자 분리 장치를 구동시켜 압력발생기로부터 미세입자를 포함하는 유체(301)를 배출시켜 미세입자를 포함하는 유체(301)로부터 미세입체와 유체를 각각 분리하는 단계(단계 3)를 포함한다. 상기 단계 3에서 압력발생기로부터 배출된 미세입자를 포함하는 유체(301)가 도 4에 나타낸 미세입자의 회전 유동에 의해 분리된다.

[124] 도 4를 참조하면, 미세유체 채널부는 확장채널부(401)와 축소채널(402)부가 교대로 반복적으로 형성되며, 상기 미세유체 채널부의 측면은 유체의 일차 유동방향에 대해 일정한 경사(403)를 갖고, 상기 일정한 경사는 0° 및 90°가 아니다. 상기 유체의 일차 유동방향은 입구에서 출구를 향하는 미세유체의 주 이동 방향을 나타낸다.

[125] 상기 경사를 갖는 미세유체 채널부의 측면 구조에 의해 유체의 일차 유동방향과 수직인 방향으로 이차 압력구배장이 형성되어 미세입자는 미세유체 채널부의 측면방향으로 회전유동(404)을 형성할 수 있다.

[126] 따라서 미세유체 채널부에 주입된 미세입자(405)는 상기 회전유동을 따라 미세유체 채널부의 측면으로 이동할 수 있다.

[127] 이 때 축소채널부(402)에 의한 미세입자 정렬효과에 의해 상기 미세유체 채널부의 측면으로 이동된 미세입자가 회전유동(404)을 따라 다시 미세유체 채널부 중앙으로 이동되는 것이 억제될 수 있다.

[128] 따라서 상기 회전유동(404)과 축소채널부(402)에 의한 미세입자 정렬효과에 의해 미세입자가 채널의 측면 벽 쪽으로 정렬될 수 있다.

[129] 한편 높은 유속(유체의 속도) 하에서는 상기 회전유동과 미세입자 정렬효과 이외에 관성력이 미세입자유동에 영향을 미칠 수 있다.

[130] 도 4를 참조하면 단면이 일정한 사각채널에서는 관성력에 의해 미세입자가 채널부의 넓은 면의 중앙으로 이동하는 관성 이동을 하게 된다. 이때, 상기 미세입자 채널부의 축소채널부(402)는 높이가 너비보다 크게 형성(예를 들어

높이가 너비의 3배 이상)되므로 관성력에 의해서도 미세입자가 채널의 측면 벽 쪽으로 정렬하게 된다.

[131] 따라서 본 발명의 미세입자 분리 장치는 높은 유속 하에서도 동일한 정렬위치를 갖게 되므로 유속의 영향을 받지 않고 일정하게 안정적으로 미세입자를 정렬할 수 있다.

[132] 구체적으로, 도 5(a)를 참조하면 본 발명의 미세입자 분리 장치(실시예 1의 미세입자 분리 장치)에서 미세유체 채널의 측면이 일정한 경사를 갖는 경사 구조(좌)인 경우에는 낮은 Re에서 주로 유체영동(hydrophoresis)에 의해 채널의 측면 벽 가까이에 입자가 모일 수 있고 높은 Re에서 주로 관성력(inertial forces)에 의해 채널의 긴 면에 두 가지 입자 흐름에 모일 수 있으므로 유속에 관계없이 입자 정렬이 가능하다.

[133] 이와 비교하여 비교예 1의 미세입자 분리장치의 채널부의 수직 구조(우)인 경우에는 낮은 Re에서는 채널의 측면으로 입자가 모이지 못하고 유속에 영향을 받음을 알 수 있다.

[134]

[135] <u>실시예 3-1. 압력발생기로서 피펫을 이용하여 혈액(유체)으로부터 혈구(미세입자)를 분리하는 방법</u>

[136] 본 실시예는 압력발생기로서 피펫을 이용하여 혈액(유체)으로부터 혈구(미세입자) 분리하는 방법에 관한 것이다.

[137] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치를 이용한 세포 제거 및 분리 실험을 보여주는 도로서, (a)의 맨 위는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치와 1 ml 피펫을 1 ml 피펫팁을 통해 체결한 모습을 보여주는 사진이고, (a)의 중간은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치로 혈액 시료에서 혈구세포를 분리하는 것을 보여주는 사진이며, (a)의 맨 아래는 분리되는 미세입자의 흐름(붉은색 화살표) 및 분리된 유체의 흐름(검은색 화살표)을 보여주는 단면도이며, (b)의 왼쪽은 분리 전 혈액 시료를 보여주는 사진이고, (b)의 오른쪽은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치로 분리된 혈액 시료를 보여주는 사진이며, 기준자(scale bar)는 100 μm이다.

[138] 도 6(a)를 참조하면, 미세입자 분리방법은 압력발생기로서 피펫(601)을 이용하여 미세입자(혈구세포 등)를 포함하는 유체인 혈액 시료(602)를 취하는 단계(단계 1); 피펫팁(603)을 통해 피펫(601)과 실시예 1에 따른 미세입자 분리 장치(604)를 체결하는 단계(단계 2); 및 피펫의 구동부를 눌러 미세입자 분리 장치를 구동시켜 압력발생기로부터 미세입자(혈구세포 등)를 포함하는 유체인 혈액 시료(602)를 배출시켜 미세입자(혈구세포 등)를 포함하는 유체인 혈액 시료(602)로부터 미세입자(혈구세포 등)와 유체(혈구세포가 제거된 세포부유액)를 각각 분리하는 단계(단계 3)를 포함한다.

[139] 구체적으로 혈액 시료는 안전 규정을 준수하여 대한적십자사에서 얻었고, 실시 전에 혈액 시료를 둘베코 인산염 완충 식염수(Dulbecco's phosphate-buffered

saline (DPBS))로 1:10으로 희석하여 적혈구 세포(RBCs)의 최종 농도는 약 3.4×10^{8} 세포 mL^{-1}로 하였다.

[140] 희석된 혈액 시료 1 mL를 피펫(601)으로 취한 후에 본 발명의 미세유체 분리 장치(604)를 1 mL 팁(603) 끝을 통해 피펫(601)에 체결하였다.

[141] 초기 저항의 지점까지 마이크로피펫의 구동부를 눌러서 공기를 공기 변위 미세피펫(air displacement micropipette) (Gilson Inc., Middleton, WI) 안에서 압축함으로써 장치 안에서 유체의 흐름을 가능한 압력을 발생시킬 수 있었다.

[142] 단일 장치에 대해 이 조건은 $29.3\pm3.3\ \mu Lmin^{-1}$의 평균 부피 유속 average volumetric flow rate (qav)을 산출할 수 있었다.

[143] 상기 장치에 적용된 평균 압력(Pav)은 약 90 kPa이고, 상기 압력(Pav)은 평균 부피 유속(qav)을 수치 시뮬레이션에 의해 결정되는 장치의 유압 저항(hydraulic resistance)과 곱하여 계산하였다.

[144] 10개의 미세유체 채널부를 포함하고, 상기 10개의 미세유체 채널부는 서로 평행하게 적층된 것 실시예 2의 미세유체 분리 장치는 장치 수행 효율의 저하 없이 최대 7배($29.3\pm3.3\ \mu Lmin^{-1}$) 이상 평균 부피 유속(average volumetric flow rate (qav)) 능력이 향상되었다.

[145] 압력은 유속과 유압 저항의 곱의 관계를 이용하여 계산하였으며, 유속은 배출구에서 단위 시간당 수확한 유체볼륨을 측정함으로써 계산하였고, 유압 저항은 수치 시뮬레이션을 통해 산출한 압력을 유속으로 나눔으로써 계산하였다.

[146] 도 6(b)로부터 본 발명에 따른 미세유체 분리 장치를 이용하여 혈액 시료를 분리하였을 때 세포를 분리하기 전(좌)보다 분리 후(우)에 혈액 시료 내의 적혈구 농도가 확연히 감소하였다.

[147] 상기 실험에서 본 발명의 미세유체 분리 장치를 이용한 세포 분리는 1.8×10^{5} 세포 S^{-1}의 처리량에서 상당히 높은 분리 효율인 88.9± 2.7%를 보였다. 분리된 유체의 회수율은 20.0± 1.7%를 보였다.

[148] 세포 분리 처리량은 단위 시간당 주입한 세포의 수를 나타내며, 분리 효율은 분리된 세포의 수를 주입한 세포의 수로 나눔으로써 계산하였다. 유체 회수율은 수확출구에서 얻은 유체볼륨을 주입한 유체볼륨으로 나눔으로써 계산하였다.

[149]

[150] <u>실시예 3-2. 압력발생기로서 시린지를 이용하여 세포배양액(유체)으로부터 세포(미세입자)를 분리하는 방법</u>

[151] 본 실시예는 압력발생기로서 시린지를 이용하여 세포배양액(유체)으로부터 세포(미세입자) 분리하는 방법에 관한 것이다.

[152] 도 7은 (a) 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치와 시린지를 체결한 모습을 보여주는 사진이며, (b) 상기 장치의 분리되는 미세입자의 흐름(녹색 화살표) 및 분리된 유체의 흐름(검은색 화살표)을 보여주는 단면도이며, 및 (c) 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치와 종래의 원심분리기로 각각

분리한 세포에 대한 세포독성(cytotoxicity) 실험의 결과를 나타내며, 기준자(scale bar)는 100 μm이다. 상기 실험에서 본 발명의 미세유체 분리 장치를 이용한 세포 분리는 상당히 높은 분리 효율인 99.9%를 보였다. 분리된 유체의 회수율은 18.7± 0.9%를 보였다.

[153]

[154] <실험예 1> 세포독성 실험

[155] 도 7(c)는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치와 종래의 원심분리기로 각각 분리한 세포에 대한 세포독성(cytotoxicity) 실험의 결과(백분율)를 나타내며, 기준자(scale bar)는 100 μm이다.

[156] 본 발명의 본 발명의 일 실시예에 따른 트리톤 X-100(Triton X-100)을 처리한 세포를 미세입자 분리 장치와 1 mL 시린지를 체결한 장치와 종래의 원심분리기를 통해 분리 후 수확한 세포배양액으로부터 측정한 세포독성(cytotoxicity)(%)을 나타낸다.

[157] 구체적으로 주르카트(Jurkat) 세포를 10% FBS (웰진 주식회사, 한국)와 페니실린과 스트렙토마이신(웰진)을 함유하는 1% 항생제 용액으로 현탁된 RPMI (웰진)에서 배양하였다. 세포의 흐름을 시각화를 위해, DPBS (웰진)으로 세척하고 그리고 나서 실온에서 15분 동안 10 μMCFDA 세포 추적자(cell tracer) (인비트로젠)로 염색하였다. 염색한 후에, 세포를 DPBS로 두 번 세척하였다.

[158] 주르카트(Jurkat) 세포를 30분 동안 CO_2배양기(incubator)에서 다양한 농도(0 내지 0.1%)의 트리톤 X-100(Triton X-100)에 노출시켰다. 이후 시린지와 체결된 본원발명의 미세입자 분리 장치(실온에서 수동 주입으로 3분 동안) 및 원심분리기(실온에서 1000 rpm으로 5분 동안)를 각각 사용하여 미세입자가 분리된 유체를 얻었다. 50 마이크로리터의 각 분리된 배양액을 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase)(LDH) 분석을 위해 사용하였다. 상기 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase)(LDH) 분석은 제조자의 지시에 따라 수행하였고(#88953, pierce, Rockford, IL), 그 후 즉시 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성의 백분율은 0.1% 트리톤 X-100이 처리된 세포의 LDH 활성으로부터 비처리 세포의 LDH 활성으로 감산한 값의 백분율로써, 0.1% 트리톤 X-100의 경우, 100%의 독성을 나타내고 비처리된 경우, 0%의 독성을 나타낸다.

[159] 상기 도 6(b)의 반응-용량 곡선으로부터 결정되는 트리톤 X-100(Triton X-100)의 IC_{50}의 값은 0.0076%이며, 본 발명에 따른 미세분리 장치를 이용한 시린지와 원심분리기를 각각 사용하여 제조된 시료에 대해 세포독성 분석에서 유의한 차이가 보이지 않았다(p=0.11, two-tailedpaired t-test). 원심분리기를 대신하여 미세분리 장치를 세포독성분석에 이용할 수 있음을 나타낸다.

[160]

[161] <실험예 2> 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치와 비교예의 미세입체 분리 장치의 미세입자 분리 효율 비교

[162] 실시예 1의 미세입체 분리 장치 및 비교예의 미세입체 분리 장치의 분리 장치의 입체의 분리의 미세입자 분리 효율을 비교하였다.

[163] 도 8은 (a) 본 발명의 실시예 1 및 비교예 1의 미세입자 분리 장치를 이용한 미세입자의 정렬을 나타내는 형광 현미경 사진 및 (b) 이에 대한 각각의 형광 프로파일을 보여주는 도이다.

[164] 6.1 μm 형광 폴리스티렌 미세입자(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)를 10^5 내지 3×10^5의 입자의 농도로 0.1% 트윈 용액 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)으로 현탁하여 실험하였고, 위치 측정은 500 μm 너비의 배출영역에서 수행되었다. 입자 정렬(forcusing)효율은 두 개의 평형 위치의 평균 표준 편차(σ)는 계산하여 정량화 하였다.

[165] 도 8에서 나타내는 바와 같이 6.1 μm 형광 폴리스티렌 미세입자를 포함하는 유체 및 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치를 사용하는 경우에서 두 개의 평형 위치에 대한 평균 표준 편차 (σ)는 Re = 0.7, 3.6, 18.0, 및 36.0 각각에 대해 24.8, 19.8, 16.4, 및 15.1 μm이었다.

[166] 또한, 도 8에서 나타내는 바와 같이 6.1 μm 형광 폴리스티렌 미세입자를 포함하는 유체 및 비교예 1에 따른 미세입자 분리 장치를 사용하는 경우에서 두 개의 평형 위치에 대한 평균 표준 편차 (σ)는 Re = 0.8, 4.0, 20.1, 및 40.2 각각에 대해 61.5, 59.4, 4.7, 및 10.5 μm이었다.

[167] 비교예 1의 미세입자 분리 장치의 경우 두 개의 평형 위치에 대한 평균 표준 편차 (σ)는 유속에 크게 영향을 받았으며, 특히 낮은 Re(10 이하)인 경우 평균 표준 편차(σ)가 커서 효율적으로 미세입자를 분리할 수 없음을 확인할 수 있었다. 이에 반해 본 발명의 실시예의 미세입자 분리 장치의 경우는 Re에 대한 영향이 작고 평균 표준 편차(σ)의 변동 범위가 크지 않아 유속과 영향을 적게 받으면서 미세입자를 분리할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[168]

[169] <실험예 3> 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치의 입자 크기별 미세입자 분리 효율 비교

[170] 각각 4.1 및 9.9 μm 형광 폴리스티렌 미세입자(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)를 10^5 내지 3×10^5의 입자의 농도로 0.1% 트윈 용액 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)으로 현탁하여 실험하였고, 위치 측정은 500 μm 너비의 배출영역에서 수행되었다. 입자 정렬(forcusing)효율은 두 개의 평형 위치의 평균 표준 편차(σ)는 계산하여 정량화 하였다.

[171] 도 9에서 나타난 바와 같이, 4.1 μm 형광 폴리스티렌 미세입자를 포함하는 유체 및 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치를 사용하는 경우에서 두 개의 평형 위치에 대한 평균 표준 편차 (σ)는 Re = 0.7 및 18.0 각각에 대해 57.7 및 20.4 μm이었다.

[172] 도 9에서 나타난 바와 같이, 9.9 μm 형광 폴리스티렌 미세입자를 포함하는 유체 및 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분리 장치를 사용하는 경우에서 두

개의 평형 위치에 대한 평균 표준 편차 (σ)는 Re = 0.7 및 18.0 각각에 대해 17.8 및 6.5 μm이었다.

[173] 상기 실험예 3을 통해, 입자의 크기가 커질수록 두 개의 평형 위치에 대한 평균 표준 편차 (σ)가 작아 미세입자의 분리가 효율적임을 확인할 수 있었다.

산업상 이용가능성

[174] 본 발명은 세포 부유액의 분자분석을 위해서 반드시 거쳐야 하는 세포제거 과정을 하나의 칩 상에서 구현함으로써 원심분리기와 같이 고가의 대형 장비 없이도 시료 전처리를 단순화 및 신속화 시킬 수 있으며 이로써 안정적이고 정확한 분자분석하는데 사용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 미세입자를 포함하는 유체가 주입되는 미세유체 주입부;
상기 미세유체 주입부에 연결되어 주입된 유체로부터 미세입자를 분리하는 미세입자 분리부;
상기 미세입자 분리부에 연결되어 분리된 미세입자를 배출하는 제1 배출부; 및
상기 미세입자 분리부에 연결되어 미세입자가 제거된 유체를 배출하는 제2 배출부를 포함하며,
여기서, 상기 미세입자 분리부는 미세유체 채널부를 포함하고,
상기 미세유체 채널부는 확장채널부과 축소채널부가 교대로 반복적으로 형성된 형태이며,
상기 미세유체 채널부의 측면은 유체의 일차 유동방향에 대해 일정한 경사를 갖고,
상기 미세유체 주입부에 체결되는 압력발생기로부터 발생하는 압력에 의해 미세입자 분리부를 구동하는 미세입자 분리 장치.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 압력발생기는 피펫 또는 시린지 주사기 중 어느 하나인 미세입자 분리 장치.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 일정한 경사는 유체의 일차 유동방향에 대해 90°를 제외한 0° 초과 180° 미만인 미세입자 분리 장치.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 확장채널부의 너비는 축소채널부의 너비의 2배 이상인 미세입자 분리 장치.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 축소채널부의 너비는 분리하고자 하는 미세입자의 지름 이상이고 분리하고자하는 미세입자 지름의 4배 이하인 미세입자 분리 장치.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 미세유체 채널부의 높이는 축소채널부의 너비의 3배 이상인 미세입자 분리 장치.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 확장채널 및 축소채널의 길이는 10 μm 이상인 미세입자 분리 장치.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 미세유체 분리부는 2개 이상의 미세유체 채널부를 포함하고, 상기 2개 이상의 미세유체 채널부는 서로 평행하게 적층된 미세입자 분리 장치.

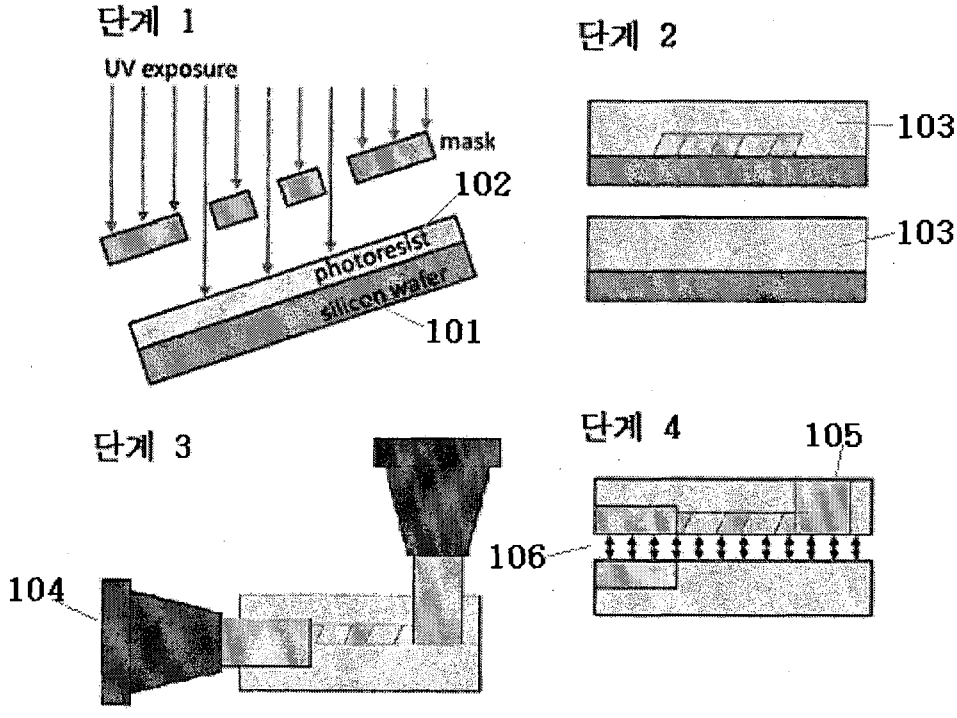
[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 미세유체 분리부는 10개 이상의 미세유체 채널부를 포함하고, 상기 10개 이상의 미세유체 채널부는 서로 평행하게 적층된 미세입자 분리 장치.

[청구항 10] 압력발생기를 이용하여 미세입자를 포함하는 유체를 취하는 단계;
상기 압력발생기와 제1항의 미세입자 분리 장치의 주입부를 체결하는 단계;

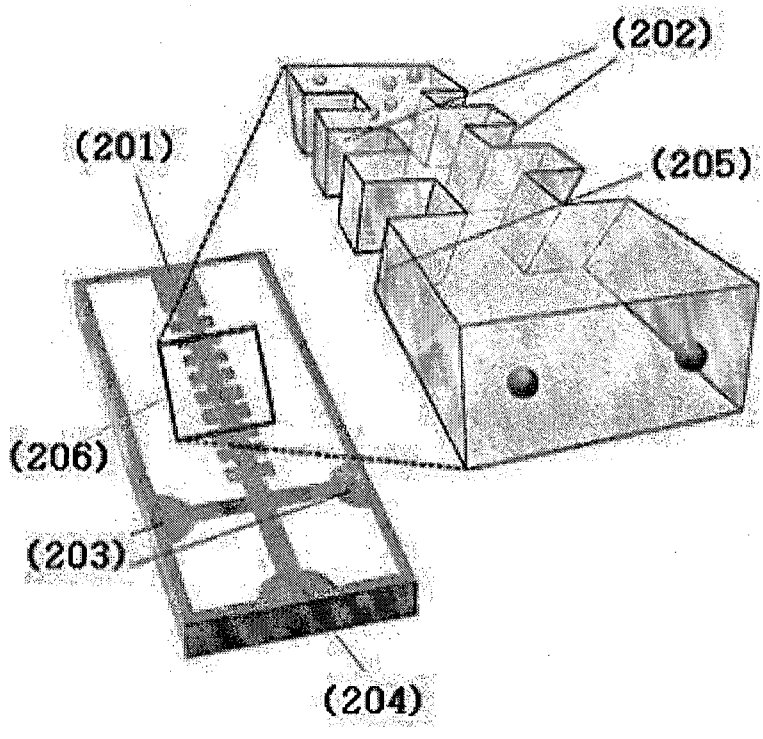
상기 미세유체 주입부에 체결되는 압력발생기로부터 발생하는 압력에 의해 제1항의 미세입자 분리부를 구동시켜 미세입자를 분리하는 단계; 및

미세입자와 미세입자가 제거된 유체를 각각 배출하는 단계를 포함하는 제1항의 미세입자 분리 장치를 이용한 미세입자 분리 방법.

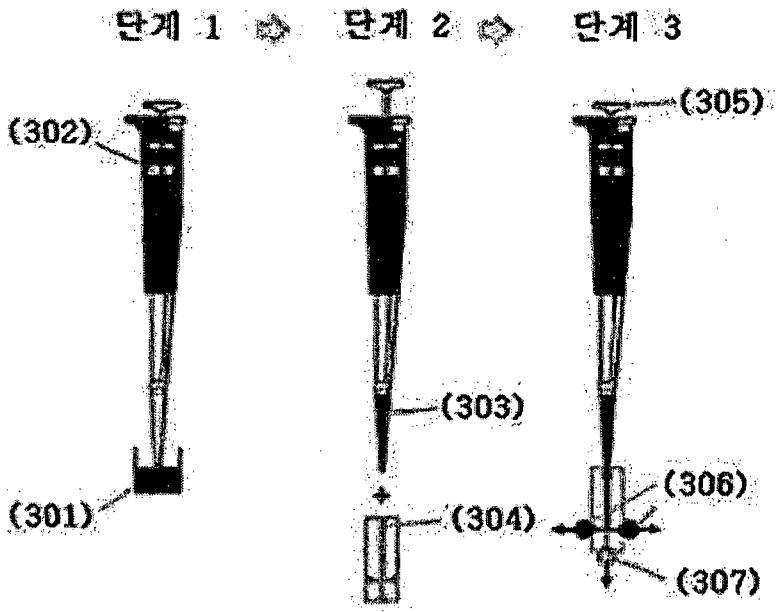
[Fig. 1]


단계 1
UV exposure
mask
102
photoresist
silicon wafer
101
단계 2
103
103
단계 3
104
단계 4
105
106

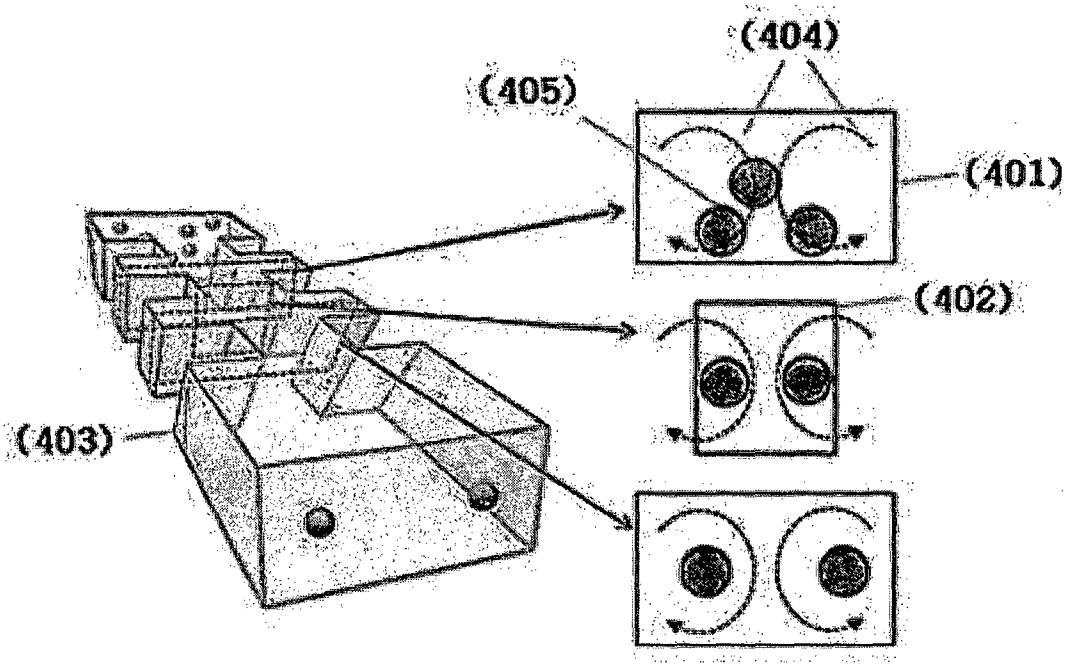
[Fig. 2]


(202)
(201)
(205)
(206)
(203)
(204)

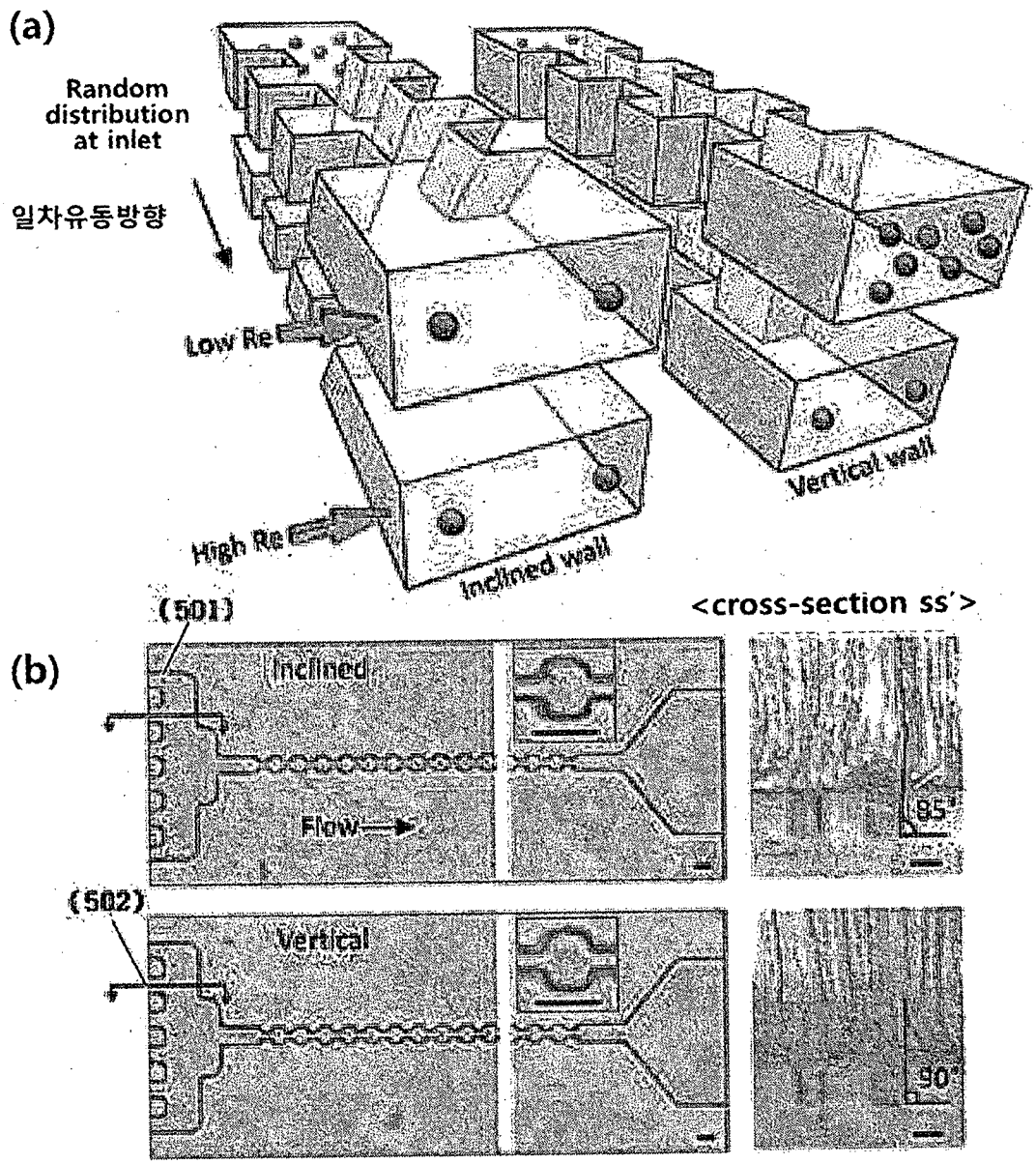
[Fig. 3]



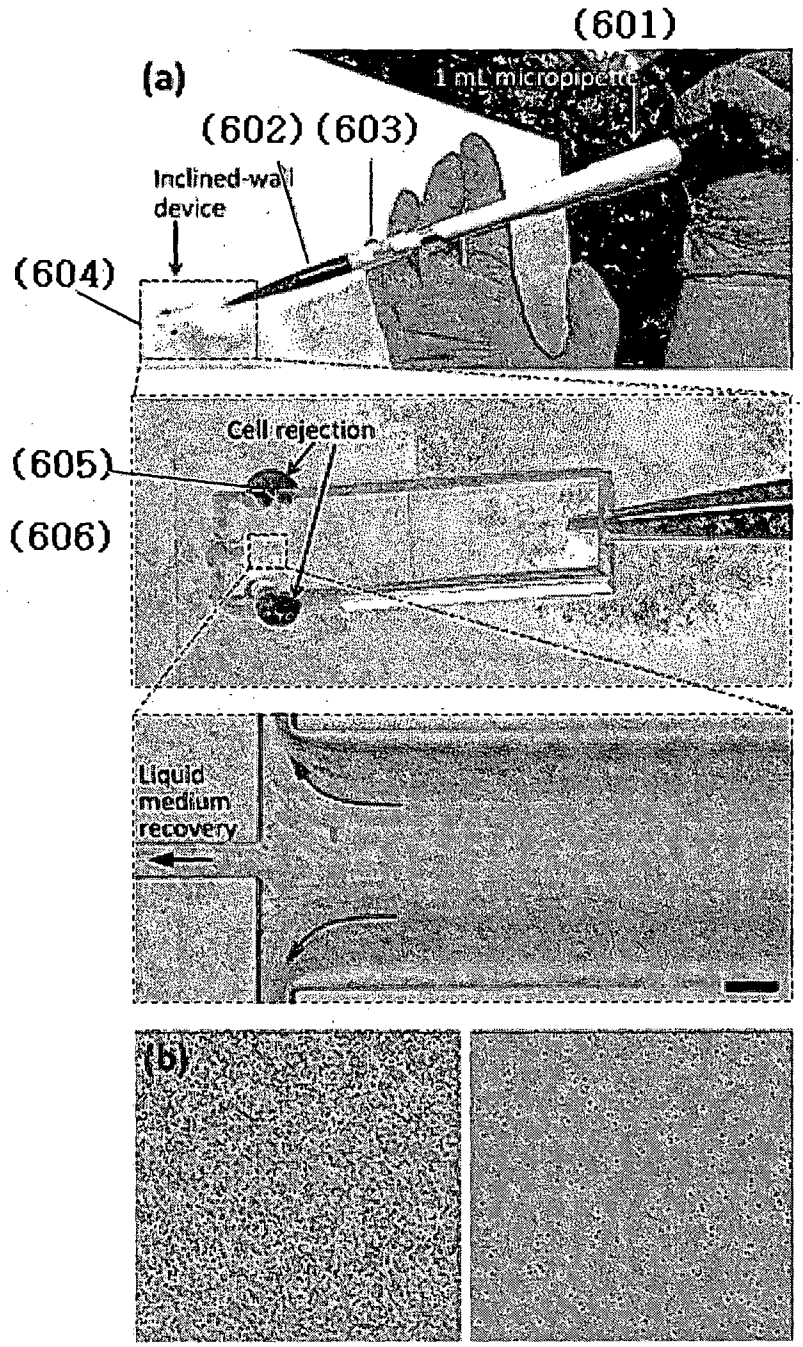
[Fig. 4]



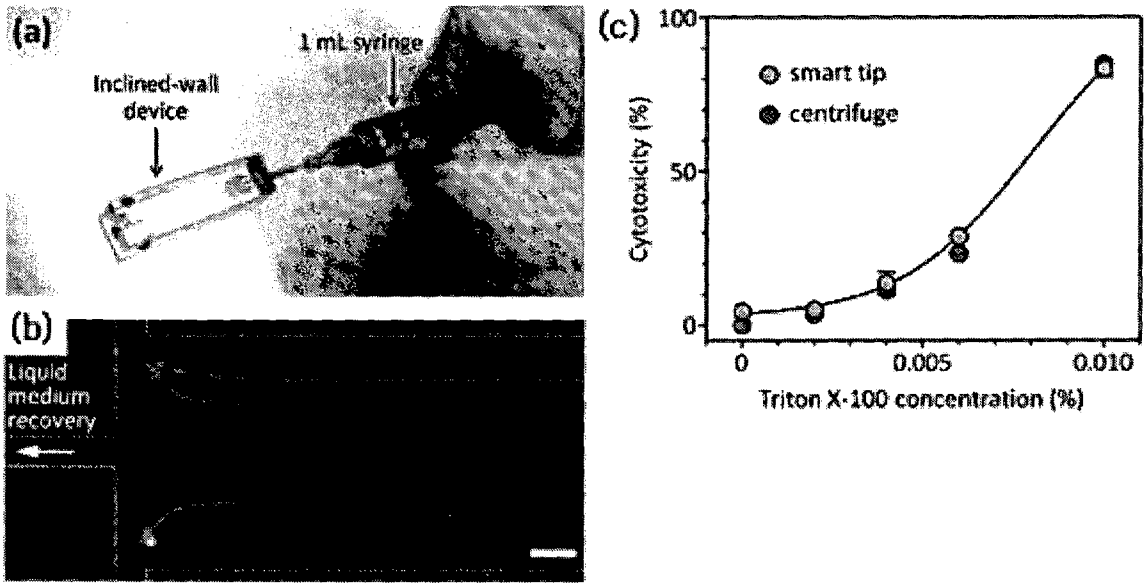
[Fig. 5]


(a)
Random distribution at inlet
일차유동방향
Low Re
High Re
Inclined wall
Vertical wall
(b)
(501)
Inclined
Flow
<cross-section ss'>
85°
(502)
Vertical
90°

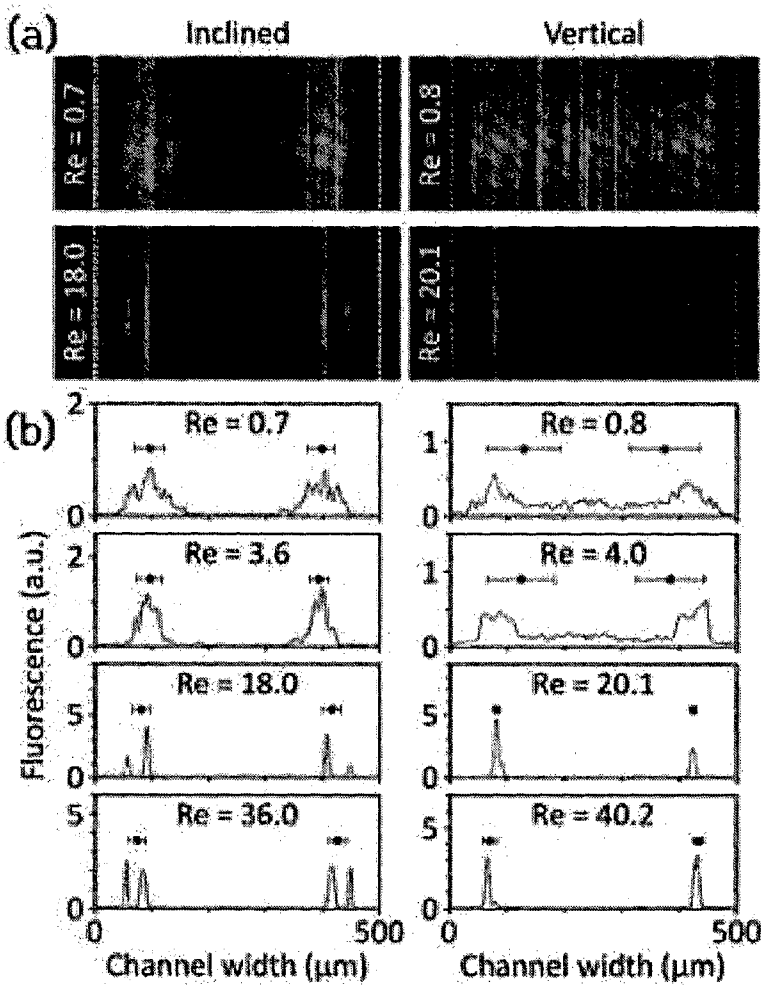
[Fig. 6]


(601)
(a)
1 mL micropipette
(602) (603)
Inclined-wall device
(604)
Cell rejection
(605)
(606)
Liquid medium recovery
(b)

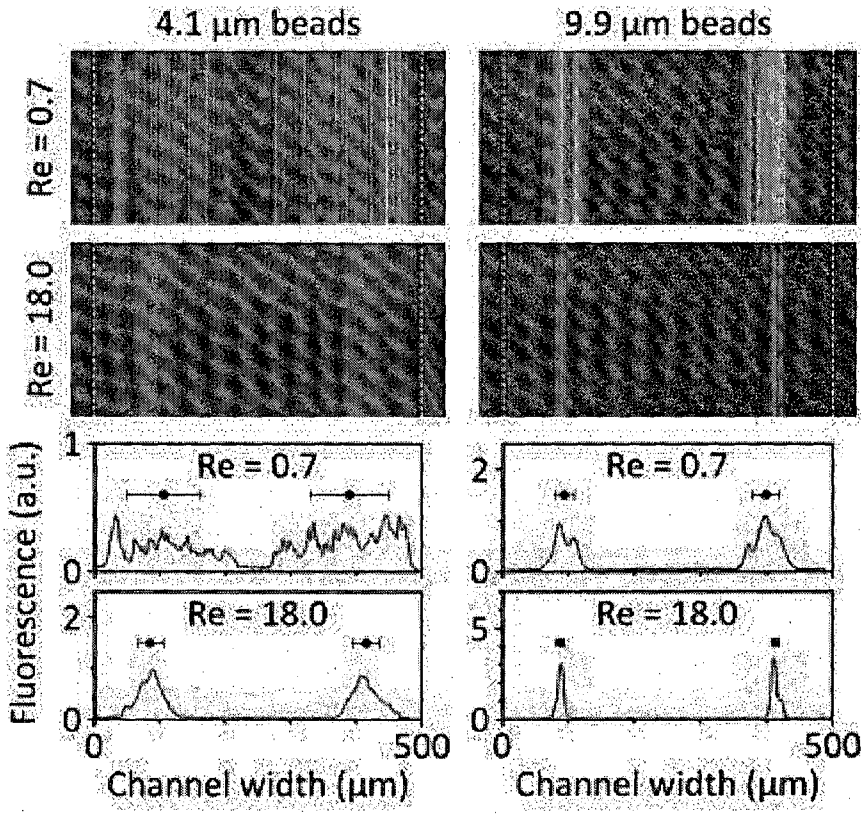
[Fig. 7]


(a)
1 mL syringe
Inclined-wall device
(b)
Liquid medium recovery
(c)
100
50
0
Cytotoxicity (%)
smart tip
centrifuge
0
0.005
0.010
Triton X-100 concentration (%)

[Fig. 8]


(a)
Inclined
Vertical
Re = 0.7
Re = 0.8
Re = 18.0
Re = 20.1
(b)
Re = 0.7
Re = 0.8
Re = 3.6
Re = 4.0
Re = 18.0
Re = 20.1
Re = 36.0
Re = 40.2
Fluorescence (a.u.)
0
500
Channel width (μm)
Channel width (μm)

[Fig. 9]


4.1 μm beads
9.9 μm beads
Re = 0.7
Re = 18.0
Fluorescence (a.u.)
Re = 0.7
Re = 18.0
Channel width (μm)
Channel width (μm)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/006306

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/24(2006.01)i, G01N 35/08(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M 1/24; C12M 1/00; G01N 15/05; G01N 33/49; C12M 3/00; C12M 1/34; C12Q 1/24; G01N 35/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: separation, particle, micro fluid, incline

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2010-0074874 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 02 July 2010 See claims 1, 3, 14, paragraphs [0049], [0060], [0070]; figure 1.	1-10
A	KR 10-2013-0000396 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 02 January 2013 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2014-0073051 A (LG ELECTRONICS INC. et al.) 16 June 2014 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2008-0096661 A (BIOCEPT, INC.) 31 October 2008 See the entire document.	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 OCTOBER 2015 (02.10.2015)	**02 OCTOBER 2015 (02.10.2015)**
Name and mailing address of the ISA/**KR** Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

International application No.
PCT/KR2015/006306

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0074874 A	02/07/2010	KR 10-1133288 B1	05/04/2012
KR 10-2013-0000396 A	02/01/2013	CN 102884170 A	16/01/2013
		EP 2542661 A1	09/01/2013
		JP 2013-521001 A	10/06/2013
		WO 2011-109762 A1	09/09/2011
KR 10-2014-0073051 A	16/06/2014	NONE	
KR 10-2008-0096661 A	31/10/2008	CN 101374939 A	25/02/2009
		EP 1976971 A2	08/10/2008
		JP 2009-523429 A	25/06/2009
		JP 2010-193891 A	09/09/2010
		JP 2012-152230 A	16/08/2012
		US 2007-0161051 A1	12/07/2007
		US 2010-0167337 A1	01/07/2010
		US 7695956 B2	13/04/2010
		WO 2007-082302 A2	19/07/2007
		WO 2007-082302 A3	10/01/2008

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/006306

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12M 1/24(2006.01)i, G01N 35/08(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12M 1/24; C12M 1/00; G01N 15/05; G01N 33/49; C12M 3/00; C12M 1/34; C12Q 1/24; G01N 35/08

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 분리, 입자, 미세유체, 경사

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2010-0074874 A (한국과학기술원) 2010.07.02 청구항 1,3,14, 식별번호 49,60,70; 도면 1 참조.	1-10
A	KR 10-2013-0000396 A (메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지 등) 2013.01.02 전체문헌 참조.	1-10
A	KR 10-2014-0073051 A (엘지전자 주식회사 등) 2014.06.16 전체문헌 참조.	1-10
A	KR 10-2008-0096661 A (바이오셉트 인코포레이티드) 2008.10.31 전체문헌 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2015년 10월 02일 (02.10.2015)	2015년 10월 02일 (02.10.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
이재영
전화번호 +82-42-481-8169

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/006306

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0074874 A	2010/07/02	KR 10-1133288 B1	2012/04/05
KR 10-2013-0000396 A	2013/01/02	CN 102884170 A	2013/01/16
		EP 2542661 A1	2013/01/09
		JP 2013-521001 A	2013/06/10
		WO 2011-109762 A1	2011/09/09
KR 10-2014-0073051 A	2014/06/16	없음	
KR 10-2008-0096661 A	2008/10/31	CN 101374939 A	2009/02/25
		EP 1976971 A2	2008/10/08
		JP 2009-523429 A	2009/06/25
		JP 2010-193891 A	2010/09/09
		JP 2012-152230 A	2012/08/16
		US 2007-0161051 A1	2007/07/12
		US 2010-0167337 A1	2010/07/01
		US 7695956 B2	2010/04/13
		WO 2007-082302 A2	2007/07/19
		WO 2007-082302 A3	2008/01/10