(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0142776
(43) 공개일자 2020년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01) *B81C 3/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/502707 (2013.01)
B81C 3/001 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0070063
(22) 출원일자 2019년06월13일
심사청구일자 2019년06월13일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
강주헌
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
정수현
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
타오 니구엔 프엉
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

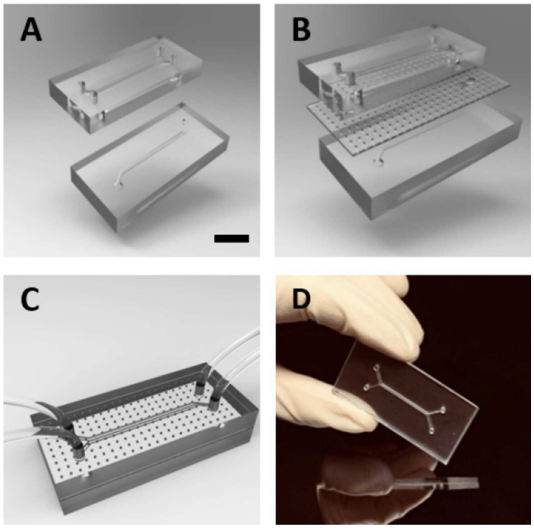
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **미세유체 칩 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 미세유체 칩**

(57) 요 약

비실리콘 재질의 상부 기판 및 비실리콘 재질의 하부 기판을 준비하는 단계; 다공성 멤브레인을 준비하는 단계; 상기 다공성 멤브레인을 상기 상부 기판 및 하부 기판 사이에 위치시켜 접촉시키는 단계; 및 상기 접촉된 상부 기판, 다공성 멤브레인 및 하부 기판을 가열 접착시키는 단계;를 포함하는 미세유체 칩(microfluidic chip) 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 미세유체 칩이 개시된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
B01L 2200/14 (2013.01)
B01L 2300/0887 (2013.01)
B01L 2300/12 (2013.01)
B01L 2300/16 (2013.01)
B81C 2203/033 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711081747
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 병원성 미생물의 자기영동 분리 및 FISH 분석을 위한 바이오유체 소자 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2019.01.30 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

비실리콘 재질의 상부 기판 및 비실리콘 재질의 하부 기판을 준비하는 단계;

다공성 멤브레인을 준비하는 단계;

상기 다공성 멤브레인을 상기 상부 기판 및 하부 기판 사이에 위치시켜 접촉시키는 단계; 및

상기 접촉된 상부 기판, 다공성 멤브레인 및 하부 기판을 가열 접착시키는 단계;를 포함하는 미세유체 칩(microfluidic chip) 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다공성 멤브레인의 두께가 1 nm 내지 1 mm인 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 상부 기판 및 하부 기판이 각각 독립적으로 PC(polycarbonate), PMMA(poly(methyl methacrylate), COC(cyclic olefin copolymer), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리설폰 (Polysulfones), 폴리비닐클로라이트(PVC), 폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), 폴리테트라플루오르에틸렌(PTFE), 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리(D, L-락트산) (PDLLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(카프로락톤)(PCL), 폴리(하이드록시알카노에이트), 폴리다이옥산온(PDS), 폴리트라이메틸렌카보네이트, 폴리(락트산-co-글리콜산)(PLGA) 및 폴리(L-락트산-co-카프로락톤)(PLCL), 폴리(글리콜산-co-카프로락톤)(PGCL)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머를 포함하는 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 비실리콘 재질의 상부 기판 및 상기 비실리콘 재질의 하부 기판이 동일한 재질인 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 다공성 멤브레인이 PETE(polyethylene terephthalate), PCTE(Polycarbonate), Polypropylene, PES(Polyethersulfone), PVDF (Polyvinylidenefluoride), PEEK(Polyetheretherketone), Nylon, PTFE (Polytetrafluoroethylene), PAN(Polyacrylonitrile), MCE(Mixed Cellulose Ester), Cellulose Acetate로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머를 포함하는 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 다공성 멤브레인에 포함되는 폴리머의 분자량이 0.01 g/mol 내지 1,000,000 g/mol인 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 다공성 멤브레인과 접촉하는 상부 기판의 면 및 상기 다공성 멤브레인과 접촉하는 하부 기판의 면은 공기

플라즈마로 처리된 면인 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

공기 플라즈마로 처리된 상부 기판의 면 및 하부 기판의 면이 -COOH 기, -OH 기, $-NH_2$ 기 또는 -CHO 기를 포함하는 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 다공성 멤브레인은 양 면이 모두 공기 플라즈마로 처리된 후, 반응성 기를 포함하는 알콕시실란으로 처리된 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 반응성 기가 에폭사이드 기인 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 다공성 멤브레인은 양 면이 모두 에폭사이드 기를 포함하는 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 상부 기판, 다공성 멤브레인 및 하부 기판의 열팽창 계수들의 차이가 0 내지 $130\times10^{-6}K^{-1}$ 인 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 가열 접착 단계는 80 내지 160℃의 온도에서 수행되는 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 가열 접착 단계는 1 초 내지 1 시간 동안 수행되는 미세유체 칩 제조 방법.

청구항 15

비실리콘 재질의 상부 기판,

비실리콘 재질의 하부 기판 및

다공성 멤브레인을 포함하는 미세유체 칩(microfluidic chip).

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 다공성 멤브레인의 두께는 1 nm 내지 1 mm인 미세유체 칩.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 미세유체 칩이 비실리콘 재질의 상부 기판/다공성 멤브레인/비실리콘 재질의 하부 기판의 구조를 갖는 미세유체 칩.

청구항 18

제15항에 있어서,

상기 상부 기판 및 상기 하부 기판이 각각 독립적으로 PC(polycarbonate), PMMA(poly(methyl methacrylate), COC(cyclic olefin copolymer), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리설폰 (Polysulfones), 폴리비닐클로라이트(PVC), 폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), 폴리테트라플루오르에틸렌(PTFE), 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리(D, L-락트산) (PDLLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(카프로락톤)(PCL), 폴리(하이드록시알카노에이트), 폴리다이옥산온(PDS), 폴리트라이메틸렌카보네이트, 폴리(락트산-co-글리콜산)(PLGA) 및 폴리(L-락트산-co-카프로락톤)(PLCL), 폴리(글리콜산-co-카프로락톤)(PGCL)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머를 포함하는 미세유체 칩.

청구항 19

제15항에 있어서,

상기 다공성 멤브레인은 PETE(polyethylene terephthalate), PCTE(Polycarbonate), Polypropylene, PES(Polyethersulfone), PVDF (Polyvinylidenefluoride), PEEK(Polyetheretherketone), Nylon, PTFE (Polytetrafluoroethylene), PAN(Polyacrylonitrile), MCE(Mixed Cellulose Ester), Cellulose Acetate로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머를 포함하는 미세유체 칩.

청구항 20

제15항에 있어서,

상기 상부 기판 및 다공성 멤브레인의 계면; 및 상기 하부 기판 및 다공성 멤브레인의 계면;에 화학적 공유 결합에 의한 접착이 존재하며, 상기 화학적 공유 결합을 이루는 원소는 Si, O, 및 C를 포함하는 미세유체 칩.

청구항 21

제15항의 미세유체 칩을 포함하는 장기 모사 칩(organ on a chip).

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 상부 기판 및 하부 기판이 미세 패터닝된 채널을 포함하고, 상기 채널에 유체 주입구 및 유체 배출구가 존재하는 장기 모사 칩.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 미세유체 칩 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미세유체 장치에서, 특히 다양한 유형의 셀을 공배양할 수 있게 하는 구획화된 미세유체 장치를 제작하는데 있어서, 다공성 멤브레인을 합체시키는 방식은 더 광범위하게 사용되고 있다. 지난 십여 년 동안, 폴리(디메톡시실란)(poly(dimethylsiloxane):PDMS)은 다양한 장기 모방 마이크로시스템의 프로토타입을 제작하는데 광범위하게 사용되어 왔으며, 트랙 에칭된 다공성 멤브레인은 PDMS 미세유체 채널과 조립되어 분리된 챔버를 구성하였고, 이는 살아있는 장기의 다세포 성분의 인터페이스를 모방한다.

[0003] 기판들의 비가역적인 조립을 위한 대부분의 접근은 폴리카보네이트(polycarbonate:PC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate: PET), 폴리(에테르 술폰)(poly(ether sulfone):PES), 사이클릭 올레핀 코폴리머(cyclic olefin copolymer:COC), 또는 폴리(메틸 메타크릴레이트)(poly(methyl methacrylate):PMMA)에 PDMS를 결합시키기 위해 (3-아미노프로필)트리에톡시실란(APTES) 및 (3-글리시딜 옥시프로필) 트리메톡시실란

(GLYMO)을 사용하는 화학 결합 공정에 의존하였다. 또한, 다른 화학적 링커, 예를 들어 3-멀캅토프로필 트리메톡시실란 (MPTS), 비스-트리에톡시-실릴-프로필-아민(bis-trimethoxy-silyl-propyl-amine:BTMSPA), 비스[3-(트리에톡시실릴)프로필]아민(bis[3-(trimethoxysilyl)propyl]amine), 및 멀캅토실란(mercaptosilane)이, 사용되어 PDMS를 열가소성 또는 다공성 멤브레인에 결합시켰다.

[0004] 그러나, 작은 분자를 흡수하는 성질, 유기 용매에 대한 낮은 저항성, 및 높은 가스 투과도를 포함하는 PDMS의 고유 특성으로 인하여, 실리콘계 폴리머없이 전체 장치를 제작하는 것에 대한 요구가 증가해 오고 있다. 그러나, PC, PMMA, 및 COC를 포함하는 비실리콘 폴리머간에 성공적인 결합을 부여하는 대부분의 노력들은, 다공성 트랙 에칭된 멤브레인 없이 주로 시연되었는데, 상기 멤브레인은 구획된 미세유체 챔버에서 반투과성 인터페이스(semi-permeable interface)를 합체시키는데 결정적인 것이다.

[0005] 최근 보고된 간단한 방법인 PCR 접착 테이프를 이용하는 것은 폴리머, 글래스, 및 3D 프린터 레진을 포함하는 여러 유형의 재료를 결합시키는데 있어 강건한 능력을 제공한다; 그러나, 이는 다공성 멤브레인을 합체시키는데 적용할 수 없는데 왜냐하면 접착 테이프가 다공성 멤브레인의 관통 구멍(through-hole)을 막기 때문이다.

[0006] 글래스 기판에 다공성 멤브레인을 결합시키기 위한 다른 시도가 있었으나, 이는 글래스 상에 미세유체 채널-페터닝하는 것, 큰 압력(5000 N), 및 상대적으로 긴 공정 시간 (6 시간 이상)을 필요로 한다.

[0007] 장기 모사 칩(organ-on-a-chip)은, 신체 내 특정 장기의 살아있는 세포를 칩 내에 배양하여, 해당 장기의 기능과 생리학적 세포반응을 모사하여 칩에서 구현하는 기술이다. 플라스틱 세포배양접시에서 배양하는 기존의 세포배양시스템과 달리, 장기 모사 칩은 장기를 구성하는 여러 세포 간의 상호작용과 기계적, 화학적 변화에 따른 세포의 반응을 관찰할 수 있기 때문에, 신약 개발과 독성평가 시장에서 활용될 것으로 주목받는 소재이다. 또한, 장기 모사 칩 기술의 최근 진전은 복합 장기(multiple organs)의 미세환경의 생리 기능을 압축적으로 반복하는 큰 잠재력을 증명하였기 때문에, 약제 약물의 동물 시험을 잠재적으로 대체하는 다양한 성능을 획득하는 것이 더 중요해졌다.

[0008] 그러나, 대부분의 항암 약물의 고유의 소수성 특성으로 인하여, PDMS를 이루는 미세유체 채널 내부로 흡수되며, 이는 약물 스크리닝에 대한 축소된 셀 배양 플랫포옴의 실질적인 적용에 난제로 여겨져 왔다. 이것은 낮은 농도에서 약물 독성을 시험할 때 더욱 문제가 될 수 있는데, 왜냐하면 PDMS 내로 흡수된 약물의 양이 세포 독성 결과에 심각한 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

[0009] 최근의 상당한 노력에도 불구하고 PDMS에 대부분 의존하는 통상적인 접근은 이러한 결정적인 문제를 해결하는데 적합하지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 한 측면은 미세유체 칩의 기판 및 다공성 멤브레인을 비가역적으로 강건하게 결합시킬 수 있는 간단한 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 다른 한 측면은 상기 방법에 의하여 제조된 미세유체 칩을 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 한 측면은 상기 미세유체 칩을 포함하는 장기 모사 칩을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 한 측면에 따라,

[0014] 비실리콘 재질의 상부 기판 및 비실리콘 재질의 하부 기판을 준비하는 단계;

[0015] 다공성 멤브레인을 준비하는 단계;

[0016] 상기 다공성 멤브레인을 상기 상부 기판 및 하부 기판 사이에 위치시켜 접촉시키는 단계; 및

[0017] 상기 접촉된 상부 기판, 다공성 멤브레인 및 하부 기판을 가열 접착시키는 단계;를 포함하는 미세유체 칩(microfluidic chip) 제조 방법이 제공된다.

[0018] 다른 한 측면에 따라,

[0019] 비실리콘 재질의 상부 기판,

[0020] 비실리콘 재질의 하부 기판 및

[0021] 다공성 멤브레인을 포함하는 미세유체 칩(microfluidic chip)이 제공된다.

[0022] 또 다른 한 측면에 따라,

[0023] 상기 미세유체 칩을 포함하는 장기 모사 칩(organ on a chip)이 제공된다.

발명의 효과

[0024] 비실리콘 소재인 PMMA 기판과 다공성 PETE 박막을 단시간에 견고하게 부착하여 미세유체 칩을 제작할 수 있는 방법을 제안함과 동시에, 제작된 미세유체 칩의 장기 모사 칩으로서의 활용 가능성을 확인하였다. 제안된 방법을 통해 기존의 비실리콘 소재를 이용한 미세유체 칩 제작의 생산성과 신뢰성을 향상시켰다. 또한 제안된 방법으로 제작한 비 실리콘 소재 기반의 미세유체 칩에서 실제 인간의 세포 배양과 생리학적 세포 반응을 관찰할 수 있음을 확인하였다. 이를 통해, 비실리콘 소재 기반의 미세유체 칩이 신약 개발 및 약물 검사에 주로 사용되는 PDMS 기반 미세유체 칩을 대체하여, 연구자들이 더 정확하고 신뢰성 높은 세포 생리학적 실험 결과를 얻을 수 있는 기회를 제공할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 미세유체 칩의 조립 공정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 다공성 멤브레인(예를 들어, PETE 멤브레인)에 상부 기판 및 하부 기판(예를 들어, PMMA)을 화학 결합시키는 과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 3은 GLYMO, APTES, 또는 공기 플라즈마로 관능화된 다공성 멤브레인, 상부 기판 및 하부 기판(예를 들어, PETE 및 PMMA 기판)의 FT-IR 분석 결과를 보여주는 도면이다.

도 4는 기판 및 다공성 멤브레인(예를 들어, PMMA 기판 및 PETE 멤브레인) 간의 결합 세기 평가를 보여주는 도면이다.

도 5는 액체의 유출 여부로 미세유체 장치의 강력한 결합을 확인하는 것을 보여주는 사진이다.

도 6은 기판으로서 각각 PMMA 및 PDMS을 사용하고 다공성 멤브레인으로서 PETE를 사용하여 조립된 미세유체 채널 및 PETE 멤브레인의 다이아그램을 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 7은 기판으로서 각각 PMMA 및 PDMS을 사용한 장치의 PETE 멤브레인 상에서 2 일 동안 배양된 칼세인-AM-염색된 인간 폐 선암 셀(녹색)을 보여주는 공초점 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 8은 기판으로서 각각 PDMS 및 PMMA을 사용한 장치에서 각각 약물 처리된 인간 폐 선암 셀의 셀 생존력을 나타낸 것이다.

도 9은 GLYMO-처리된 PETE 멤브레인의 XPS 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 10은 미처리 PETE 멤브레인, 공기 플라즈마 처리된 PETE 멤브레인, 및 GLYMO-처리된 PETE 멤브레인의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 문헌에서 발명자는 (3-글리시딜 옥시프로필)트리메톡시실란(GLYMO)을 사용하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PETE) 트랙 에칭된(track-etched) 멤브레인에 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMMA)를 결합시키는 간단하지만 신뢰성 있는 방법을 보고하며, 이는 항암 약물 같은 작은 분자에 불투과성인 미세유체 장치에서 세포 독성 시험을 신뢰성 있게 한다.

[0027] 일 구현예에 따른 미세유체 칩(microfluidic chip) 제조 방법은

[0028] 비실리콘 재질의 상부 기판 및 비실리콘 재질의 하부 기판을 준비하는 단계;

[0029] 다공성 멤브레인을 준비하는 단계;

[0030] 상기 다공성 멤브레인을 상기 상부 기판 및 하부 기판 사이에 위치시켜 접촉시키는 단계; 및

[0031] 상기 접촉된 상부 기판, 다공성 멤브레인 및 하부 기판을 가열 접착시키는 단계;를 포함한다.

[0032] 도 1은 미세유체 칩의 조립 공정을 개략적으로 나타낸 것이다.

[0033] 도 1에서 A는 CNC 기계를 사용하여 디자인된 미세유체 채널이 PMMA 기판 상에 패터닝된 것을 나타내며, B는 5% GLYMO로 처리된 다공성 PETE 멤브레인이 공기 플라즈마 처리된 PMMA 기판과 접촉되기 전 배열된 모습을 나타내며, C는 Tygon® 튜브를 주입구 및 배출구에 삽입하고, 다음으로 유출을 방지하기 위해 5-분 에폭시 접착제(5-min epoxy glue)로 고정시킨 것을 나타내고, D는 제작된 PMMA 장치를 보여주는 사진이다. 스케일 바는 1 cm이다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다공성 멤브레인의 두께는 1 nm 내지 1 mm 일 수 있다. 두께가 1 nm 미만인 경우 너무 얇아 셀 배양이 불가능할 수 있고, 두께가 1 mm를 초과하는 경우 다공성 멤브레인 양면에 배양된 세포간에 물질이동이 제한될 가능성이 있다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 상부 기판 및 하부 기판이 각각 독립적으로 PC(polycarbonate), PMMA(poly(methyl methacrylate), COC(cyclic olefin copolymer), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리설폰(Polysulfones), 폴리비닐클로라이트(PVC), 폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), 폴리테트라플루오르에틸렌(PTFE), 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리(D, L-락트산) (PDLLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(카프로락톤)(PCL), 폴리(하이드록시알카노에이트), 폴리다이옥산온(PDS), 폴리트라이메틸렌카보네이트, 폴리(락트산-co-글리콜산)(PLGA) 및 폴리(L-락트산-co-카프로락톤)(PLCL), 폴리(글리콜산-co-카프로락톤)(PGCL)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 상부 기판 및 하부 기판은 각각 독립적으로 PC(polycarbonate), PMMA(poly(methyl methacrylate), COC(cyclic olefin copolymer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머로 이루어질 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비실리콘 재질의 상부 기판 및 상기 비실리콘 재질의 하부 기판은 동일한 재질일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다공성 멤브레인은 PETE(polyethylene terephthalate), PCTE(Polycarbonate), Polypropylene, PES(Polyethersulfone), PVDF (Polyvinylidenefluoride), PEEK(Polyetheretherketone), Nylon, PTFE (Polytetrafluoroethylene), PAN(Polyacrylonitrile), MCE(Mixed Cellulose Ester), Cellulose Acetate로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 다공성 멤브레인은 PETE(polyethylene terephthalate) 폴리머로 이루어질 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다공성 멤브레인에 포함되는 폴리머의 분자량이 0.01 g/mol 내지 1,000,000 g/mol일 수 있다. 상기 다공성 멤브레인에 포함되는 폴리머의 분자량이 0.01 g/mol 미만인 경우 강도가 너무 낮아 칩 제조에 적합하지 않으며, 1,000,000 g/mol)를 초과하는 경우 가공이 어려울 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다공성 멤브레인과 접촉하는 상부 기판의 면 및 상기 다공성 멤브레인과 접촉하는 하부 기판의 면은 공기 플라즈마로 처리된 면일 수 있다. 공기 플라즈마 처리는 플라즈마 재료로서 공기를 사용하는 일반적으로 방법에 의할 수 있다.

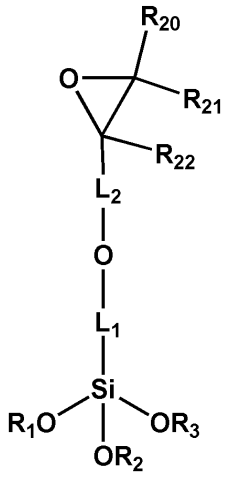
[0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 공기 플라즈마로 처리된 상부 기판의 면 및 하부 기판의 면은 -COOH 기, -OH 기, $-NH_2$ 기 또는 -CHO 기를 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다공성 멤브레인은 양 면이 모두 공기 플라즈마로 처리된 후, 반응성 기를 포함하는 알콕시실란으로 처리된 것일 수 있다. 반응성 기를 포함하는 상기 알콕시실란은 예를 들어 1 내지 7% 농도로 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 반응성 기는 에폭사이드 기일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다공성 멤브레인은 양 면이 모두 에폭사이드 기를 포함할 수 있다. 에폭사이드 기는 삼각형의 구조로서 링 스트레인(ring strain)이 존재하기 때문에 친핵체의 공격에 의해 링이 오픈되며 결합을 형성하는 반응성 기에 해당한다.

[0043] 반응성 기를 포함하는 상기 알콕시실란 화합물은 하기 화학식 1로 표현되는 화합물일 수 있다.

[0044] <화학식 1>



[0045]

[0046] 상기 화학식 1에서, R_1 내지 R_3, R_{20} 내지 R_{22}는 각각 독립적으로 C_1-C_{60}알킬기를 나타내며, L_1 및 L_2는 각각 독립적으로 C_1-C_{60}알킬렌기를 나타낸다.

[0047] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1에서, R_{20} 내지 R_{22}는 모두 수소일 수 있다.

[0048] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1에서, L_1은 프로필렌일 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1에서, L_2는 메틸렌일 수 있다.

[0050] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1에서, R_1 내지 R_3는 모두 메틸기일 수 있다. 예를 들어, 상기 반응성 기를 포함하는 알콕시실란은 3-글리시딜옥시프로필 트리메톡시실란(3-glycidyloxypropyl trimethoxysilane:GLYMO)일 수 있다.

[0051] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 상부 기판, 다공성 멤브레인 및 하부 기판의 열팽창 계수들의 차이는 0 내지 $130\times10^{-6}K^{-1}$ 일 수 있다. 상기 상부 기판, 다공성 멤브레인 및 하부 기판의 열팽창 계수들의 차이가 상기 범위 내이어야 고온 접착 과정에서 기판 및 멤브레인 계면의 뒤틀림이 발생하지 않는다.

[0052] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 가열 접착 단계는 80 내지 160℃의 온도에서 수행될 수 있다. 80℃ 미만의 온도에서 수행되는 경우, 상부 기판의 면 및 하부 기판의 면의, 예를 들어, -OH가 다공성 멤브레인의 반응성기, 예를 들어, 에폭사이드기와 반응의 활성화 에너지에 못 미칠 수 있다. 160℃ 초과의 온도에서 수행되는 경우, 상부 기판, 하부 기판 또는 다공성 멤브레인의 용융이 발생할 수 있다.

[0053] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 가열 접착 단계는 1초 내지 1시간 동안 수행될 수 있다. 1초 미만의 시간 동안 수행되는 경우, 상부 기판의 면 및 하부 기판의 면의, 예를 들어, -OH가 다공성 멤브레인의 반응성기, 예를 들어, 에폭사이드기와 충분한 시간 동안 반응할 수가 없다. 1 시간을 초과하여 수행되는 경우, 접착 세기에 변화는 없다.

[0054] 도 2는 다공성 멤브레인(예를 들어, PETE 멤브레인)에 상부 기판 및 하부 기판(예를 들어, PMMA)을 화학 결합시키는 과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

[0055] 도 2에서 A는 PETE 멤브레인이 공기 플라즈마 처리로 산화되고, 다음으로 5% GLYMO 용액으로 처리된 것을 나타내며, B는 PMMA 기판을 약 2 분 동안 공기 플라즈마 처리함으로써 PMMA 기판 상에 하이드록시기 등을 생성시키는 것을 나타내고, C는 GLYMO 코팅된 PETE 멤브레인을 하이드록시화된 2 개의 PMMA 기판과 조립해서 비가역적 결합을 형성시키는 것을 나타낸다.

[0056] 다른 일 구현예에 따른 미세유체 칩(microfluidic chip)은 비실리콘 재질의 상부 기판, 비실리콘 재질의 하부 기판 및 다공성 멤브레인을 포함한다.

[0057] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다공성 멤브레인의 두께는 1 nm 내지 1 ㎜일 수 있다.

[0058] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 미세유체 칩은 비실리콘 재질의 상부 기판/다공성 멤브레인/비실리콘 재질의 하부 기판의 구조를 가질 수 있다.

[0059] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 상부 기판 및 상기 하부 기판이 각각 독립적으로 PC(polycarbonate), PMMA(poly(methyl methacrylate), COC(cyclic olefin copolymer), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리설폰(Polysulfones), 폴리비닐클로라이트(PVC), 폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), 폴리테트라플루오르에틸렌(PTFE), 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리(D, L-락트산) (PDLLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(카프로락톤)(PCL), 폴리(하이드록시알카노에이트), 폴리다이옥산온(PDS), 폴리트라이메틸렌카보네이트, 폴리(락트산-co-글리콜산)(PLGA) 및 폴리(L-락트산-co-카프로락톤)(PLCL), 폴리(글리콜산-co-카프로락톤)(PGCL)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 상부 기판 및 하부 기판은 각각 독립적으로 PC(polycarbonate), PMMA(poly(methyl methacrylate), COC(cyclic olefin copolymer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머로 이루어질 수 있다.

[0060] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다공성 멤브레인은 PETE(polyethylene terephthalate), PCTE(Polycarbonate), Polypropylene, PES(Polyethersulfone), PVDF (Polyvinylidenefluoride), PEEK(Polyetheretherketone), Nylon, PTFE (Polytetrafluoroethylene), PAN(Polyacrylonitrile), MCE(Mixed Cellulose Ester), Cellulose Acetate로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리머를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 다공성 멤브레인은 PETE(polyethylene terephthalate) 폴리머로 이루어질 수 있다.

[0061] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 상부 기판 및 다공성 멤브레인의 계면 및 상기 하부 기판 및 다공성 멤브레인의 계면에는 화학적 공유 결합에 의한 접착이 존재하며, 상기 화학적 공유 결합을 이루는 원소는 Si, O, 및 C를 포함할 수 있다.

[0062] 또 다른 일 구현예에 따른 장기 모사 칩은 상기 미세유체 칩을 포함한다.

[0063] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 상부 기판 및 하부 기판이 미세 패터닝된 채널을 포함하고, 상기 채널에 유체 주입구 및 유체 배출구가 존재할 수 있다. 예를 들어, 상기 유체 주입구 및 유체 배출구는 상기 채널 말단에 존재할 수 있다.

[0064] 본 발명의 화학식에 사용된 치환기에 대해서 설명한다.

[0065] 본 명세서 중 C_1-C_{60}알킬기는, 탄소수 1 내지 60의 선형 또는 분지형 지방족 탄화수소 1가(monovalent) 그룹을 의미하며, 구체적인 예에는, 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소부틸기, sec-부틸기, ter-부틸기, 펜틸기, iso-아밀기, 헥실기 등이 포함된다. 본 명세서 중 C_1-C_{60}알킬렌기는 상기 C_1-C_{60}알킬기와 동일한 구조를 갖는 2가(divalent) 그룹을 의미한다.

[0066] 이하에서, 실시예를 들어, 본 발명의 일 구현예에 따른 미세유체 칩(microfluidic chip) 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 미세유체 칩 등에 대하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 도면 및 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 도면 및 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0067] **[실시예]**

[0068] **미세유체 채널 디자인 및 제작**

[0069] PMMA 기판(5 cm x 10 cm x 2 mm; 넓이 x 높이 x 두께)을 이용하여 미세유체 채널(넓이 x 깊이; 800 μm x 300 μm)을 제작하였다. 제작된 장치에서 셀을 관찰하는 동안 PMMA의 가스 및 작은 분자에 대한 불투과성, 생체적합성, 및 광학적 투명 특성으로 인한 약물 흡수 시험을 입증하기 위한 세팅을 했다. PMMA의 열팽창 계수는 70~77 $\times 10^{-6} K^{-1}$이다.

[0070] 컴퓨터 수치 제어(computer numerical control: CNC) 밀링 기계(David 3020C, David, 인천, 한국)로 PMMA 기판 상에 채널 패턴을 직접 새겼다. 상부 기판은 튜브(Tygon® Tubing ID 0.508 mm x OD 1.524 mm, Saint - Gobain PPL Corp., USA) 연결을 위한 4 개의 구멍(직경 1.58 mm)을 가진다(도 1 참조).

[0071] 기계 가공한 PMMA 기판을 이소프로판올(IPA, Samchun Pure Chemical, 경기도, 한국), 이온수(Biosesang, 경기도, 한국)로 세척하고, 다음으로 결합 공정 전 공기로 건조시켰다. 세포독성 시험에서 성능 비교를 위해, PMMA 장치와 동일한 크기를 갖는 PDMS를 이용하는 장치를 또한 제작하였고, 상술한 바와 같이 동일한 채널 패턴을 새겼다. PDMS의 열팽창 계수는 $3\times 10^{-4} K^{-1}$이다.

[0072] **PMMA 또는 PDMS을 PETE 다공성 멤브레인에 화학 결합시킴**

[0073] 트랙 에칭된 PETE 다공성 멤브레인(기공 크기 5 μm)(SterliTech, Kent, WA, USA)을 PMMA 장치의 크기로 다듬었다. 이를 IPA로 세척하고, 다음으로 이온수로 헹구고, 공기로 완전히 건조시켰다. PETE의 열팽창 계수는 $14\times10^{-6}K^{-1}$ ~ $200\times10^{-6}K^{-1}$이다. PETE의 분자량(Mw)은 100 g/mol ~ 1,000,000 g/mol이다.

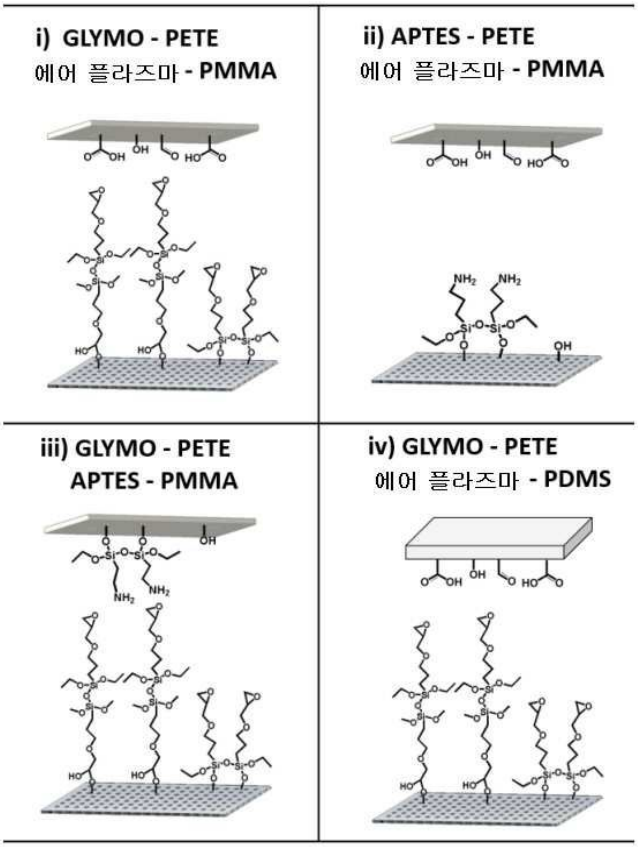
[0074] 다음으로 이를 2 분 동안 공기 플라즈마 처리로 산화시켰다(80 W, 50 kHz Cute-1MPR, Femto Science, 경기도, 한국). 플라즈마 처리 후, 상기 멤브레인을 에탄올(94%)에 용해된 (3-글리시딜 옥시프로필)트리메톡시실란(GLYMO)(5 wt%) (SigmaAldrich, MO, USA)으로 실온에서 1 시간 동안 처리하였다.

[0075] 기계 가공된 PMMA 기판(상부 기판 및 하부 기판)을 2 분 동안 공기 플라즈마로 처리하여(80 W, 50 kHz) 표면을 하이드록시기로 관능화하였는데, 이는 열 촉매하에서 PETE 멤브레인 상의 GLYMO의 에폭사이드기와 반응한다.

[0076] 5% GLYMO으로 처리된 PETE 멤브레인을 즉시 하이드록시기로 관능화된 2 개의 PMMA 기판 사이에 위치시켰다(i, GLYMO-PETE 대 OH-PMMA).

[0077] 이에 더하여, 본 발명의 일 구현예에 따른 방법의 우수성을 증명하기 위해, 다른 화학적 관능화(functionalization) 방법(ii, APTES-PETE 대 OH-PMMA 및 iii, GLYMO-PETE 대 APTES-PMMA) 및 PMMA 대신 다른 기판, 예를 들어 PDMS(iv, GLYMO-PETE 대 OH-PDMS)을 비교하였다(표 1).

[0078] [표 1]



[0079]

[0080] 장치의 가장 자리를 보호하기 위해 조립된 기판을 집게로 고정시켰으며, 이는 채널 패턴의 정열 불량을 방지한다. 조립된 장치를 100 ℃에서 2 분 동안 컨백션 오븐(C-DOD1, Changshin Science, 경기도, 한국)에 방치함으로써 결합 공정을 완성하였다(도 2 참조).

[0081] 얻은 주사 전자 현미경(SEM) 이미지(S4800, Hitachi High Technologies, USA)는 PETE 멤브레인 표면의 완전한 토폴로지를 입증한다. 관능화된 표면 특징을 파악하기 위해 X-선 광전자 분광법(X-ray photoelectron spectroscopy: XPS) (K-alpha, Thermo Fisher, Seoul, 한국)을 이용한 표면 분석, FT-IR(Cary 670-IR FT-IR 공기-Bearing Spectrometer, Agilent Technologies, CA, USA)을 수행하였다.

[0082] **결합 세기 측정**

[0083] 균일한 트랜스멤브레인 압력(UTP) 전단 시험(4000 Plus Bondtester, Nordson Dage, OH, USA)(전단 높이: 20 μm, 시험 속도: 500 μm/sec 최대, 카트리지 무게: 200 kg)을 이용하여 PMMA 기판 및 PETE 멤브레인 사이의 결합 세기를 평가하였다.

[0084] 표 1(i, ii, 및 iii)에 나타난 3 개의 결합 조건으로 제작된 장치를 UTP 시험에 대해 준비하였다(n = 3); i) 하이드록시화된 PMMA(OH-PMMA)에 GLYMO-PETE, ii) 하이드록시화된 PMMA(OH-PMMA)에 APTES-PETE, 및 iii) APTES-PMMA에 GLYMO-PETE. 장치의 제작 공정을 입증하기 위해 GLYMO 또는 APTES로 관능화된 PETE 멤브레인을 2 개의 PMMA 기판(OH-PMMA 또는 APTES-PMMA) 상에 조립하였다.

[0085] 결합 세기를 측정하기 위해, PMMA 하부 기판은 아직 PETE 다공성 멤브레인에 붙어 있으면서, PMMA 상부 기판이 멤브레인에서 미끄러질 때까지 UTP 장치에서 카트리지 무게를 증가시켰다. 더 무거운 카트리지 무게는 2개 기판 사이의 더 강한 결합 세기에 대응한다.

[0086] 유출 시험을 위해, 컬러 염료 용액(적색 및 녹색)을 각각의 상부 및 하부 미세유체 채널을 통과하도록 흘렸고, 장치에 용액이 흐르는 동안 배출구 부위를 조임으로써 장치 내의 내부 압력을 증가시켰고, 압력 센서(Harvard Apparatus, USA)를 이용해 장치 내의 압력을 측정하였다.

[0087] **제작된 장치에서 셀 배양**

[0088] 에탄올(70%)로 채널을 프라이밍하여 제작된 미세유체 장치를 멸균하였고, 다음으로 PBS 버퍼 용액으로 플러싱하였다. 미세유체 채널을 인큐베이터(37℃, 5% CO_2 가스)에서 1 시간 동안 피브로넥틴(PBS에 15 μL/mL) 및 콜라겐(PBS에 20 μL/mL)으로 각각 처리하였다.

[0089] 인간 폐 선암 셀(A549, ATCC® CCL-185 TM)을 Ham's F12 배지(Welgene, 경상북도, 한국)에 배양하였다. 셀을 포함하는 배양 배지를 장치의 하부 미세유체 채널 내로 주입하고 흐름을 중단시켰다.

[0090] 다음으로, 미세유체 장치를 2 시간 동안 뒤집어 장치의 미세유체 하부 채널의 상부(PETE 멤브레인) 위에 셀(10^6 셀/mL)이 부착되게 하였다. 셀 부착 후, 시린지 펌프(Fushion 200, Chemyx Inc., USA)를 사용하여 하부 채널을 통해 2 μL/min의 유속에서 배양 배지를 흘렸다. PETE 멤브레인 상에 합쳐서 배양된 셀 단일층의 형상화(visualization)를 위해, 칼세인 아세톡시메틸 에스터(calcein acetoxymethyl ester)(calcein-AM) 용액(PBS에 2 μM)을 바닥 채널 내에 로딩하고 다음으로 실온에서 40 분 동안 배양하였다.

[0091] 셀을 공초점 현미경(LSM 780 Configuration 16 NLO; Carl Zeiss, USA)으로 즉시 관찰하였다. PETE 멤브레인 상의 셀 단일층의 전체 모습을 형상화하기 위해 z-축을 따라 광 슬라이싱(Optical slicing)을 수행했다.

[0092] **세포독성 시험**

[0093] 상기 장치에서 세포독성 시험을 위해 다양한 암 유형을 처리하는 항암 약물, 빈크리스틴 (Sigma Aldrich, USA)을 5 mM 농도로 증류수에 용해시켰다. 제조된 빈크리스틴 용액을 300 nM 및 1 μM 농도로 배양 배지에 희석시키고, 다음으로 셀을 시험하기 위해 25 μL/h의 유속으로 48 시간 동안 미세유체 채널에 주입하였다.

[0094] 미세유체 채널에서 약물 처리 후 모든 셀 및 죽은 셀, 각각에서 DNA를 염색하는 형광 염료(Hoechst(Sigma Aldrich, USA) 및 프로피움 아이오다이드(PI)(Sigma Aldrich, USA))로 셀 생존력을 정량적으로 측정하였다. 장치의 PETE 멤브레인 상에서 함께 자란 인간 폐 선암 셀을 PI 1 μg/ml 및 Hoechst 0.5 μg/ml을 포함하는 배양 배지로 실온에서 40분 동안 배양하였다. 다음으로 셀을 1X PBS로 15 분 동안 세척하고 15 분 동안 4 % 파라포름알데히드(PFA)로 고정시켰다.

[0095] 각각의 장치에 대해, 공초점 현미경(LSM 780 Configuration 16 NLO)을 사용해 10배 확대로 3 개 이상의 임의의 필드에서 형광 이미지를 얻었다. 얻은 이미지를 이미지 처리 소프트웨어(Imaris, Bitplane; http://www.bitplane. com)로 분석하고 다음으로 식(1)로 계산하였다

[0096] 생존력 =

$$\frac{\sum_{\text{광학 섹션}}\left[\frac{\text{청색 물체의 수} - \text{적색 물체의 수}}{\text{청색 물체의 수}}\right]}{\text{광학 섹션의 수}} \times 100\ \%\ (1)$$

[0097] 통계적 분석

[0098] 결과는 모든 그래프에서 오차 막대로 표시 한 최소 세 가지 샘플 평균 ± 표준 오차 평균으로 나타냈다. 모든

데이터의 중요한 차이는 P값 <0.05로 정의된 양측 스튜던트 t 시험에 의해 결정되었다.

[0099] **결합 전략 및 실험적 확인**

[0100] PETE 및 PMMA을 포함하는 폴리머 상에서 공기 플라즈마 처리가 다른 산소 함유기(예를 들어, -(C=O)H, -(C=O)OH, 등)뿐만 아니라 많은 하이드록시기(-OH)를 생성시킬 수 있음은 잘 알려져 있다.

[0101] GLYMO는 커플링제 또는 접착 프로모터로 널리 사용되는데 이는 말단 에폭사이드기가 $-NH_2$, -OH 및 -SH를 포함하는 보통의 친핵체에 대해 반응하기 때문이며, 반면 트리메톡시 실란기는 가수분해, 뒤따르는 축합을 통한 폴리머의 -OH와 반응에 의해 C-O-Si 결합을 용이하게 형성할 수 있다.

[0102] 따라서, i) GLYMO-관능화된 PETE 멤브레인(GLYMO-PETE) 및 하이드록실-관능화된 PMMA(OH-PMMA) 간의 공유 결합에 접착제로서 GLYMO를 사용하였다.

[0103] 또한 ii) GLYMO-처리된 PETE 멤브레인과 결합 세기를 비교하기 위해 PETE 멤브레인을 APTES로 처리하였고(APTES-PETE), GLYMO-PETE 상의 에폭사이드기 보다 하이드록시기에 대한 아민기의 더 낮은 반응성으로 인하여 PETE 멤브레인 상의 APTES과 비교하여 PETE 멤브레인 상의 GLYMO가 하이드록시화된 PMMA 기판에 대한 훨씬 더 강한 결합을 제공할 것이라는 것을 예측했다.

[0104] 마지막으로, iii) GLYMO 처리된 PETE 멤브레인(GLYMO-PETE)을 APTES-관능화된 PMMA 기판(APTES-PMMA)에 결합시키는 시도를 하였는데, 이는 APTES의 아민기는 GLYMO의 에폭사이드기에 반응적이라는 것이 알려져 있기 때문이다.

[0105] 표면의 XPS, 및 SEM 이미지 관찰로 관능화된 표면 특성을 파악하였다. XPS 스펙트럼에 나타난 실록산기(Si2s 및 Si2p)는 PETE 표면 상의 GLYMO의 성공적인 관능화(functionalization)를 뒷받침한다(도 9).

[0106] 도 9은 GLYMO-처리된 PETE 멤브레인의 XPS 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0107] 도 9의 A는 GLYMO-처리된 PETE 멤브레인의 XPS 스펙트럼을 나타낸 것이고, B는 GLYMO 분자로부터 유도된 SiC 결합을 나타낸 것이고, C는 실란 커플링 반응에 의해 생성된 Si2s 및 Si2p 피크를 나타낸다.

[0108] 도 10은 미처리 PETE 멤브레인, 공기 플라즈마 처리된 PETE 멤브레인, 및 GLYMO-처리된 PETE 멤브레인의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

[0109] 도 10은 A, B, C는 미처리 PETE 멤브레인, D, E, F는 공기 플라즈마 처리된 PETE 멤브레인, G, H, I는 GLYMO-처리된 PETE 멤브레인의 SEM 이미지를 나타낸다. 스케일 바는, A, D, G에서 100 μm; B, E, H에서 50 μm; C, F, I에서 10 μm이다.

[0110] SEM 이미지는 또한 GLYMO 처리 후 100 ℃에서 2 분 동안 가열하는 단계를 포함하는 결합 공정 후에도 트랙 에칭된 PETE 멤브레인의 다공성 구조가 완전히 유지됨을 입증한다.

[0111] 도 3은 GLYMO, APTES, 또는 공기 플라즈마로 관능화된 PETE 및 PMMA 기판의 FT-IR 분석 결과를 보여주는 도면이다.

[0112] 표면 관능화의 보다 정량적인 분석을 위해, FT-IR 분석을 이용하여 PETE 및 PMMA 표면 상의 원소들의 고유 밀도를 분석하였다. FT-IR 스펙트럼에서 더 큰 피크 밀도는 임의의 분자 결합과 관련하여 작용기의 더 높은 밀도를 나타낸다. ii) APTES-처리된 PETE 멤브레인과 비교하여 i) GLYMO-처리된 멤브레인에서 매우 많은 C-H, C=O, C-O 결합을 확인하였다(도 3의 A, B 참조). 또한, iii) APTES로 처리된 PMMA 기판(APTES-PMMA)은 공기-플라즈마 처리된 PMMA 기판(OH-PMMA)보다 너 낮은 피크 밀도를 보였는데(도 3의 C 참조), 이는 PMMA 표면 상에 형성된 아민기의 수가 공기 플라즈마 처리로 유도된 표면 상의 하이드록시기 수보다 작다는 것을 의미한다.

[0113] 따라서, GLYMO-처리된 PETE 멤브레인 상의 더 많은 에폭사이드기가 PMMA 기판 상의 하이드록시기와의 결합에 이용가능하기 때문에, GLYMO-PETE 멤브레인 및 공기 플라즈마-처리된 PMMA 기판(OH-PMMA) 간에 더 강한 결합 세기가 달성될 것이 예측된다.

[0114] **결합 세기의 평가**

[0115] PETE 멤브레인 및 PMMA 기판 간의 결합 세기를 비교하였는데, 각각 i) GLYMO-PETE 대 OH-PMMA, ii) APTES-PETE 대 OH-PMMA, 및 iii) GLYMO-PETE 대 APTES-PMMA로써 결합 세기를 비교하였다.

[0116] 도 4는 UTP 방법을 이용한 PMMA 기판 및 PETE 멤브레인 간의 결합 세기 평가를 나타낸 도면이다. 도 4를 참조

하면, i) GLYMO-PETE 대 OH-PMMA의 결합 세기는 약 1.97 x 10^7 kg/m^2였고, 이는 다른 2 개 실험 조건 보다 훨씬 더 크다(ii, APTES-PETE 대 OH-PMMA: 1.33 x 10^7 kg/m^2 및 iii, GLYMO-PETE 대 APTES-PMMA: 1.14 x 10^7 kg/m^2). 예측한 바와 같이, GLYMO-PETE 및 OH-PMMA 간의 결합은 다른 경우 보다 더 강력한 결합을 제공했으며, 이는 표면 개질에 보통 사용되는 다른 알콕시실란인 APTES가, PETE 멤브레인 표면 상에 $-NH_2$기를 생성시켰고 이러한 $-NH_2$기는 PETE 멤브레인 상의 GLYMO에서 에폭사이드기보다 PMMA 기판의 하이드록시기(-OH)에 대해 덜 반응적이기 때문인 듯하다. 그러나, 예상과 달리, GLYMO-PETE 대 APTES-PMMA 간의 결합 세기는 GLYMO-PETE 대 OH-PMMA의 결합 세기보다 크지 않았는데 이는 PMMA 기판 상에 형성된 아민기의 밀도가 공기-플라즈마 처리된 PMMA 기판 상의 하이드록시기 보다 훨씬 더 낮기 때문이다. 표면을 관능화하기 위해 1 ~ 5 % 범위에서 GLYMO 및 APTES의 다양한 농도를 시험했는데, PETE 표면을 5% GLYMO로 처리한 것이 PMMA 기판과의 가장 강력한 결합을 나타냈다(자료 미도시).

[0117] 도 5는 액체의 유출 여부로 미세유체 장치의 강력한 결합을 확인하는 것을 보여주는 사진이다. 도 5의 A는 장치의 투시도를 나타내고 B는 장치의 평면도를 나타낸다. 도 5의 C인 장치의 측면도 및 D인 장치의 전면도는 다공성 PETE 멤브레인으로 분리된 미세유체 채널을 통해 흐르는 2 가지 색의 용액 간의 분명한 구별을 보여준다(스케일 바, 1 cm). 유출없이 액상 용액을 흐르게 하는 성능을 확실히 하기 위해, 컬러-염료 용액을 미세유체 채널을 통해 흐르게 하고 배출구 부분을 조임으로써 파열없이 장치 내부에 축적되는 내부 압력을, 압력 센서의 상한 이상으로(135 kPa의 게이지 압력) 높였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 용액이 4 주 동안 흐른 뒤에도 장치에는 유출이 전혀 발견되지 않았으며 장치 제작의 성공률은 99%보다 높았다.

[0118] **PMMA 장치 및 PDMS 장치에서의 셀 배양 및 약물 독성 시험**

[0119] 장치에서의 약물 스크리닝에의 활용성을 비교하기 위해, PMMA 또는 통상적인 PDMS로 제작된 미세유체 장치에서 인간 폐 선암 셀을 배양했다. 두 장치 모두에 트랙 에칭된 PETE 다공성 멤브레인이 합체되어 있다.

[0120] 도 6은 기판으로서 각각 PMMA 및 PDMS을 사용하고 다공성 멤브레인으로서 PETE를 사용하여 조립된 미세유체 채널 및 PETE 멤브레인의 다이아그램을 개략적으로 나타내는 도면이다. 도 6의 A는 PMMA-PETE 장치에서 평면인 PETE 멤브레인을 보여주고, B는 PDMS-PETE 장치에서 불규칙하게 주름 잡힌 PETE 멤브레인을 보여준다(스케일 바, 400 μm). PMMA 장치는 분명하고 편평한 PETE 멤브레인 표면을 보이는 반면, PDMS 장치에 합체된 멤브레인은 주름지고 뒤틀린 것이 발견되는데, 이는 대부분 PETE 멤브레인 및 PDMS 기판 간의 열팽창 계수의 차이에 기인한다.

[0121] 도 7은 기판으로서 각각 PMMA 및 PDMS을 사용한 장치의 PETE 멤브레인 상에서 2 일 동안 배양된 칼세인-AM-염색된 인간 폐 선암 셀(녹색)을 보여주는 공초점 현미경 이미지를 나타낸 것이다. 이미지의 상부 및 오른쪽의 2 개의 삽입 패널은 PMMA 및 PDMS 장치 각각에서 멤브레인 상에 배양된 셀의 세로 및 가로 단면을 나타낸다. 이러한 고르지 못한 멤브레인 표면은 도 7에 보이는 바와 같이 멤브레인 상에 배양된 셀을 이미징할 때 문제가 될 수 있는데 왜냐하면 불규칙적으로 변형된 멤브레인 구조로 인하여 한 초점 평면에서 전체 셀 이미지를 얻을 수 없기 때문이다. 더구나, 대부분의 셀 독성 및 멤브레인 투과도는 멤브레인의 표면 면적에 대해 종종 표준화되기 때문에 멤브레인의 불규칙한 표면 면적은 분석 결과에 심각한 영향을 미칠 수 있다.

[0122] 도 8은 기판으로서 각각 PDMS 및 PMMA을 사용한 장치에서 각각 약물 처리된 인간 폐 선암 셀의 셀 생존력을 나타낸 것이다(300 nM 및 1 μM 농도에서 48 시간 동안 빈크리스틴으로 처리).

[0123] 가장 중요하게는, PMMA 및 PDMS 장치에서 항암 약물(빈크리스틴) 처리에 대한 인간 폐 선암 셀의 세포독성 반응을 관찰하였다. PMMA 및 PDMS 장치에서 배양된 셀의 세포독성은 빈크리스틴 300 nM로 처리될 때 도 8에 나타난 바와 같이 심각한 차이($P<0.05$)를 보였다(각각 99.51 ± 0.27% 및 85.43 ± 2.25 % 의 셀 생존력). 이는 상당한 양의 빈크리스틴이 고유의 소수성 분자 특성으로 인하여 PDMS 내로 흡수되었기 때문이며(LogP = 2.82), 이는, 다시, 배양 배지에서 300 nM 아래로 약물 농도가 감소하는 결과가 되며, 따라서 PDMS 장치에서 처리된 셀의 셀 생존력이 증가하는 결과가 된다. 흥미롭게도, 상대적으로 더 높은 농도(1 μM)로 셀을 처리한 경우, PMMA 및 PDMS 장치 간의 세포독성에서의 차이는 작게 되었다. 이는 PDMS 내로 흡수된 빈크리스틴의 양이 상대적으로 더 높은 약물 농도에서는 무시할만하게 되었기 때문이다.

[0124] PDMS 장치에서 배양되는 셀이 영향을 받는 임계 농도는 측정할 수가 없었는데 이는 PDMS 미세유체 채널의 디자인 및 표면 면적에 의존하기 때문이다. 또한 PDMS 장치들에서 빈크리스틴의 세포독성을 시험하였는데, 상기 장치는 PDMS 전구체 및 경화제의 여러 비(5:1, 10:1, 20:1)로 제조된 PDMS로 만들어졌다; 그러나, 약물 농도에 있

어서 감소 정도는 불분명했다(자료는 미도시). 상술한 결과를 감안할 때, 장치에서 상대적으로 낮은 농도에서 약물 독성에서 미묘한 차이를 분별해야 할 때, 열팽창 계수 및 약물 흡수를 포함하는 미세유체 세포독성 장치의 재료 특성은 심각한 우려가 될 수 있다.

[0125] **결론**

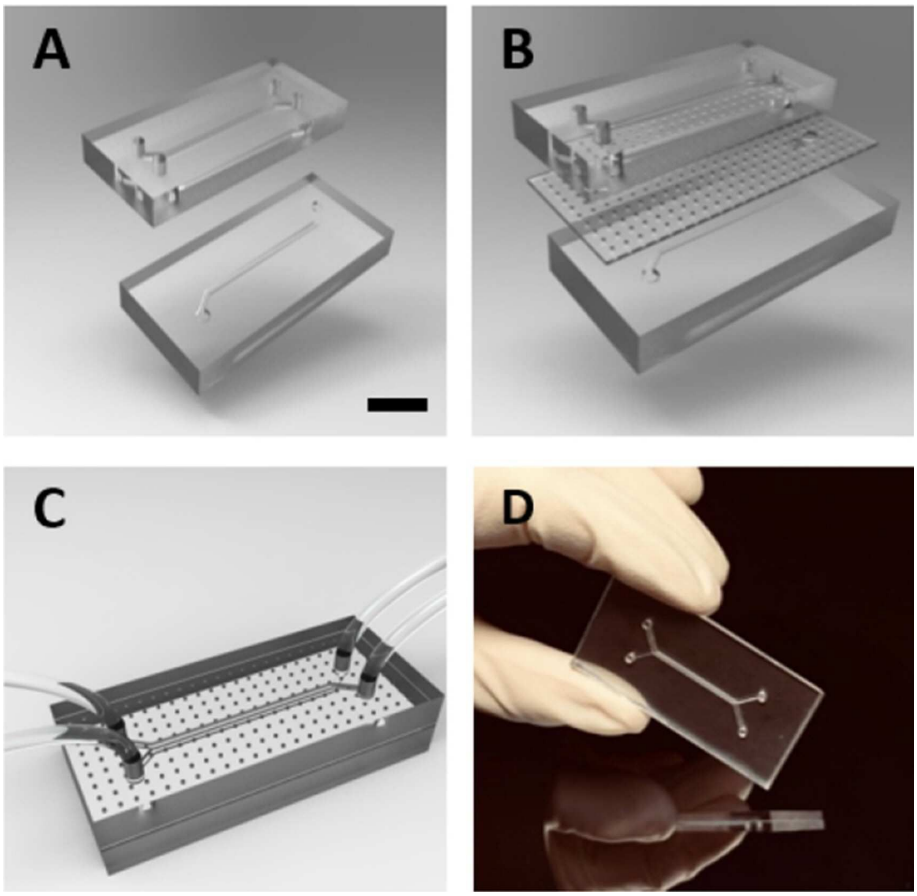
[0126] 미세유체 장치에서 항암 약물의 세포독성 시험을 위한 강건한 제작을 달성하기 위해 다공성 PETE 트랙 에칭된 멤브레인(porous PETE track-etched membrane)에 PMMA 기판을 화학적으로 결합시키는 방법을 제시한다. PETE 멤브레인-합체 PMMA 장치는 편평하고 균일한 다공성 멤브레인 및 목표 농도에서 약물의 셀로의 신뢰성 있는 전달을 가능하게 했다. 단백질에서 아민기에 반응적인 에폭사이드기(GLYMO)로 다공성 멤브레인 표면을 관능화하였기 때문에, 장치에 셀을 뿌리기 전에 피브로넥틴 및 콜라겐 같은 다양한 세포외 기질 분자를 간단히 코팅할 수 있다. 보다 실용적인 응용을 위한 장기 모사 칩(organ-on-a-chip) 또는 랩온칩(lab on a chip)의 유용성에 이르기까지, 본 발명의 일 구현예에 따른 방법 및 미세유체 칩은 생체내 미세-생리 환경을 더욱 정밀하게 모방하는 다양한 조건에서 세포 및 조직 공학을 연구할 수 있도록 큰 도움을 줄 수 있다.

[0127] 5% GLYMO로 처리된 다공성 PETE 멤브레인을 2 분 동안 공기 플라즈마 처리한 후의 미세유체 채널이 새겨진 PMMA 기판과 조립하고, 다음으로 100 ℃에서 2 분 동안 가열하였는데, 이는 1 시간 내에 비가역적이고 완전한 결합이 달성되도록 하였다. 두 기판 사이의 결합 세기(1.97×10^7 kg/m^2)는 135 kPa 이상의 게이지 압력에서도 유출없이 장치를 통해 배양 배지(culture medium)가 흐르게 하기에 충분히 강했다. 장치에서의 약물 시험에서 이의 효용성 확인을 위해, 발명자는 통상적인 폴리디메틸실록산(PDMS) 장치와 비교하여 작은 분자에 불투과성인 PMMA의 고유 특성으로 인하여 항암제 빈크리스틴(vincristine)에 대해 PMMA 장치에서 배양된 인간 폐암 세포가 더 신뢰성 있는 세포독성 결과를 보임을 성공적으로 입증하였다.

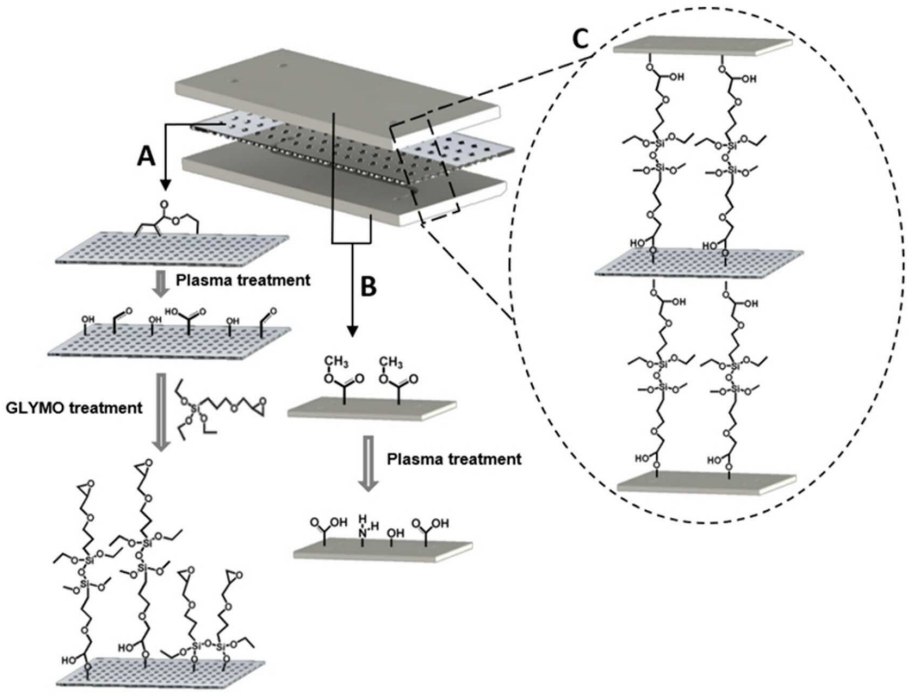
[0128] PDMS에 가장 의존하는 현재의 장기 모사 칩(organ-on-a-chip) 제조 방법을 감안할 때, 이러한 결합 전략은 여러 종류의 열가소성이며 다공성 트랙이 에칭된 멤브레인을 이용하여 단순한 제작(fabrication) 능력을 확장시킬 것이고, 장기 수준의 생리적인 조건을 더욱 정교하게 모방하는 3D-마이크로-구조물(micro-construct)을 만들 수 있게 할 것이다.

도면

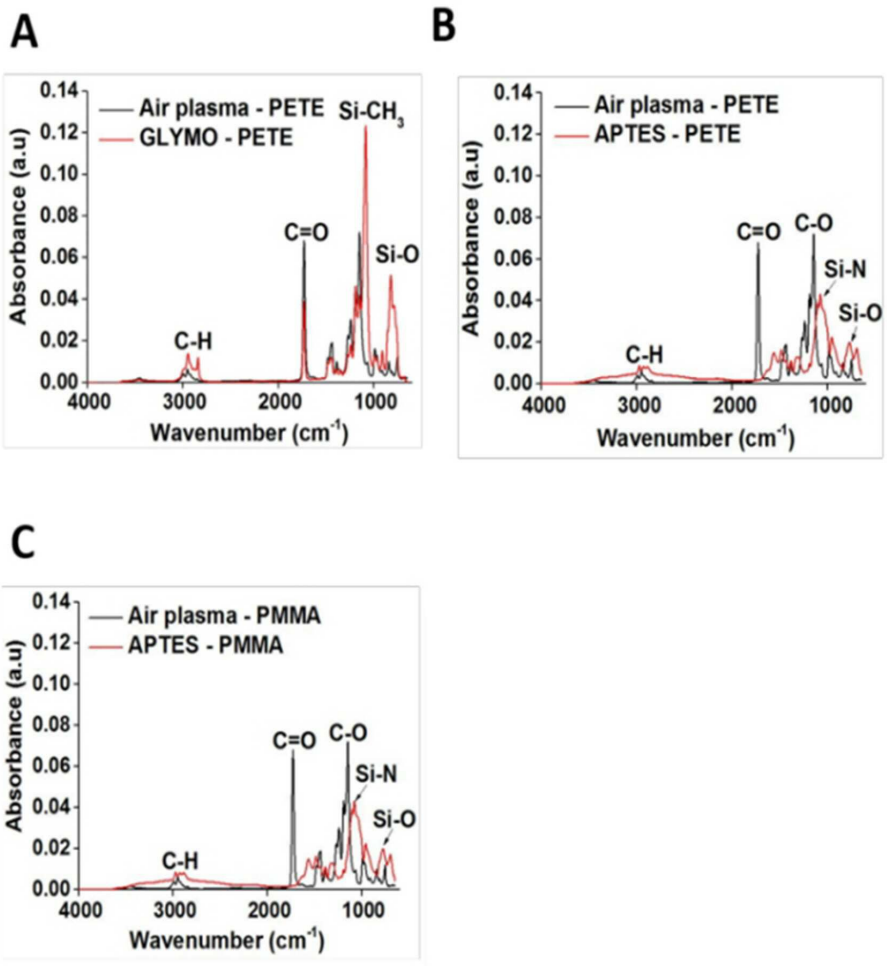
도면1


A
B
C
D

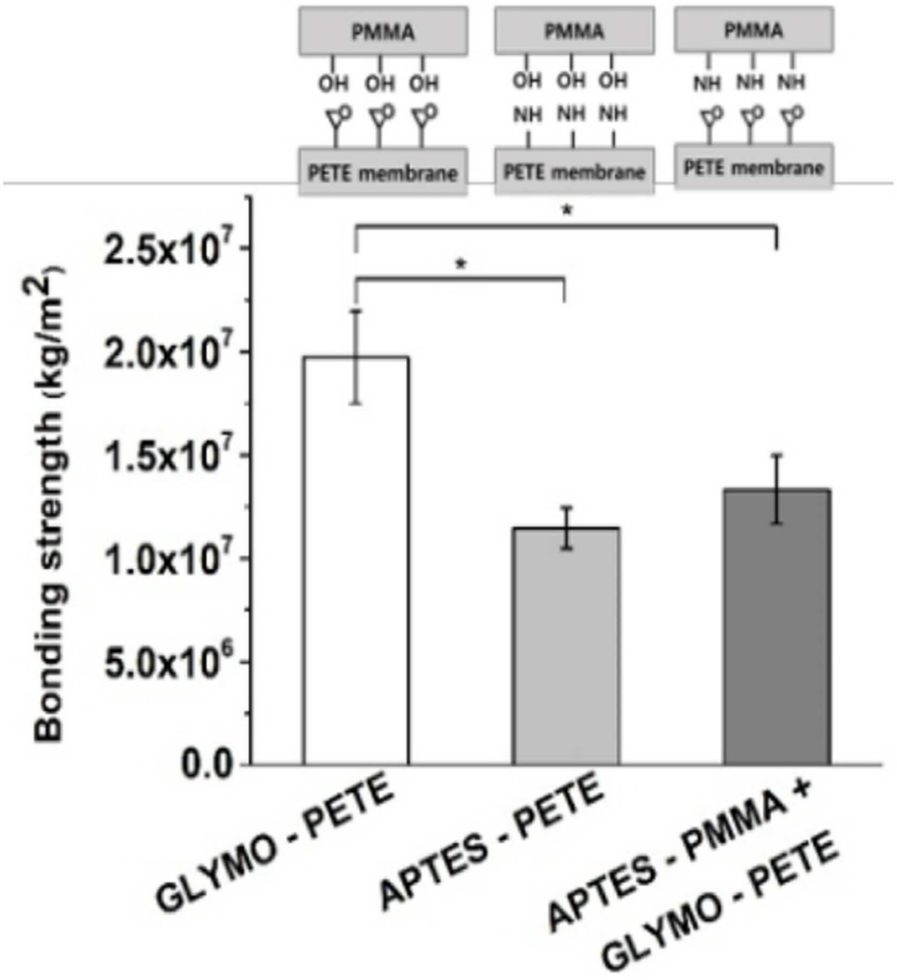
도면2


A
B
C
Plasma treatment
GLYMO treatment
Plasma treatment

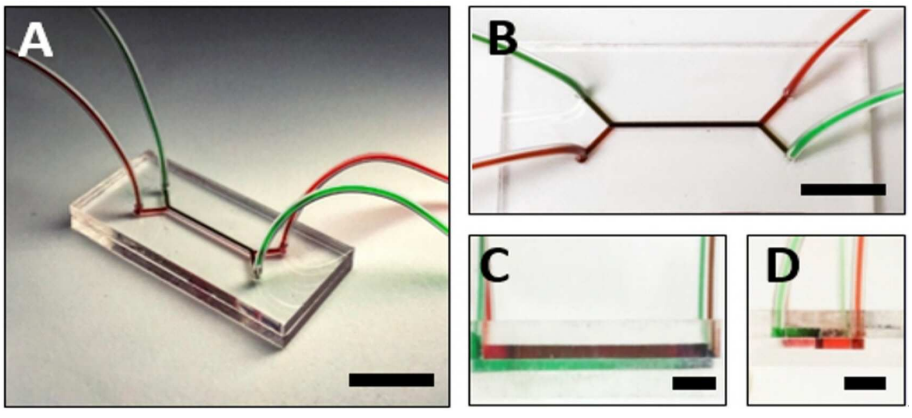
도면3


A
Air plasma - PETE
GLYMO - PETE
Si-CH3
C=O
Si-O
C-H
Absorbance (a.u)
Wavenumber (cm-1)
B
Air plasma - PETE
APTES - PETE
C=O
C-O
Si-N
Si-O
C-H
Absorbance (a.u)
Wavenumber (cm-1)
C
Air plasma - PMMA
APTES - PMMA
C=O
C-O
Si-N
Si-O
C-H
Absorbance (a.u)
Wavenumber (cm-1)

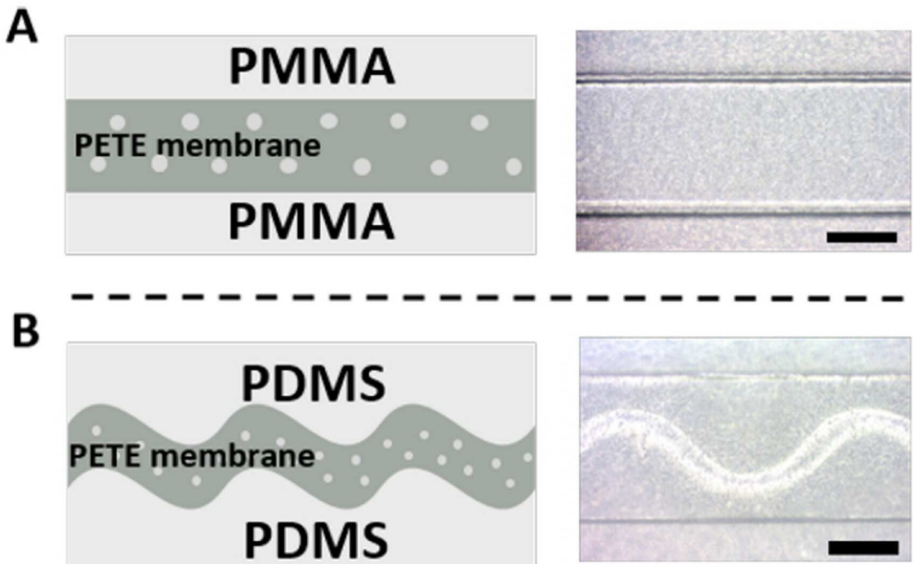
도면4


PMMA
PMMA
PMMA
OH OH OH
OH OH OH
NH NH NH
NH NH NH
PETE membrane
PETE membrane
PETE membrane
*
*
Bonding strength (kg/m2)
2.5x10^7
2.0x10^7
1.5x10^7
1.0x10^7
5.0x10^6
0.0
GLYMO - PETE
APTES - PETE
APTES - PMMA + GLYMO - PETE

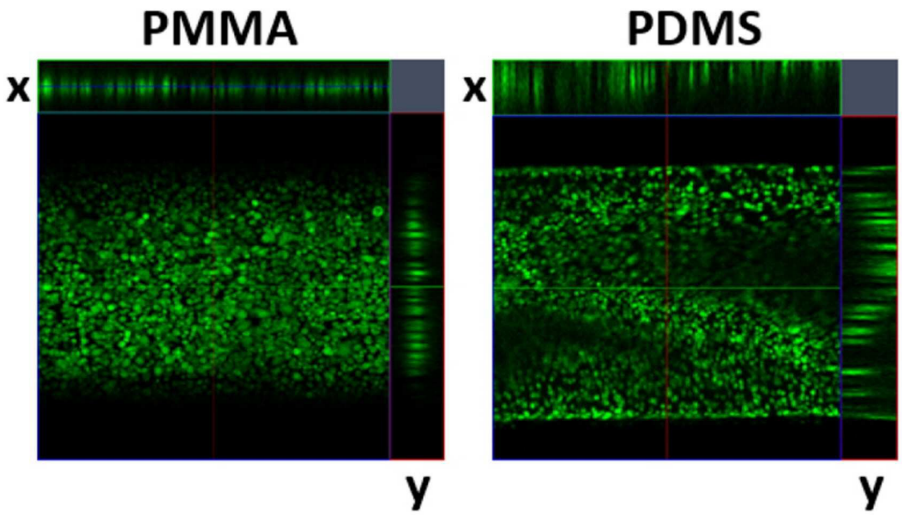
도면5


A
B
C
D

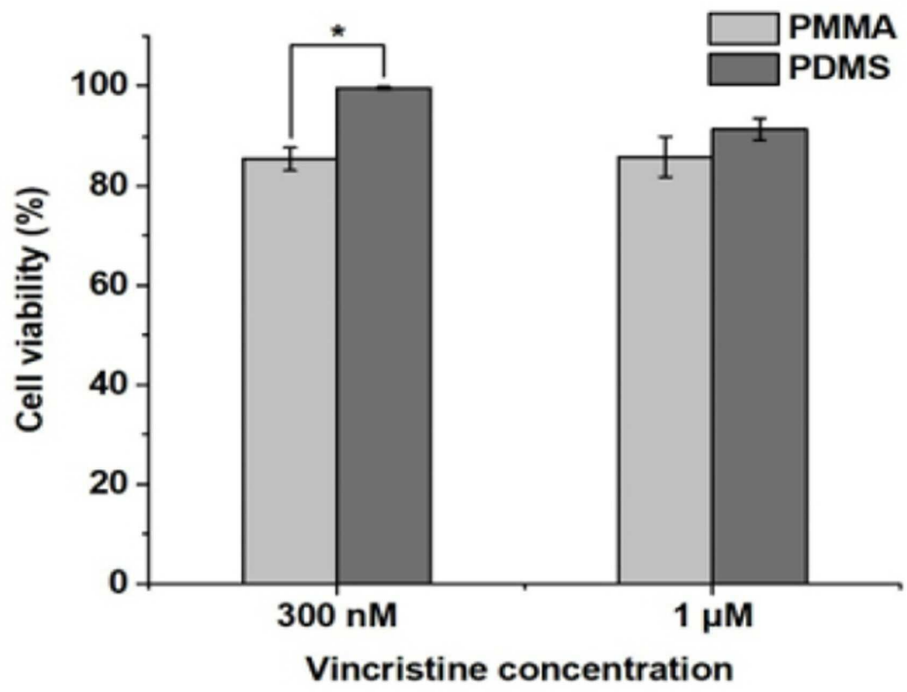
도면6


A
PMMA
PETE membrane
PMMA
B
PDMS
PETE membrane
PDMS

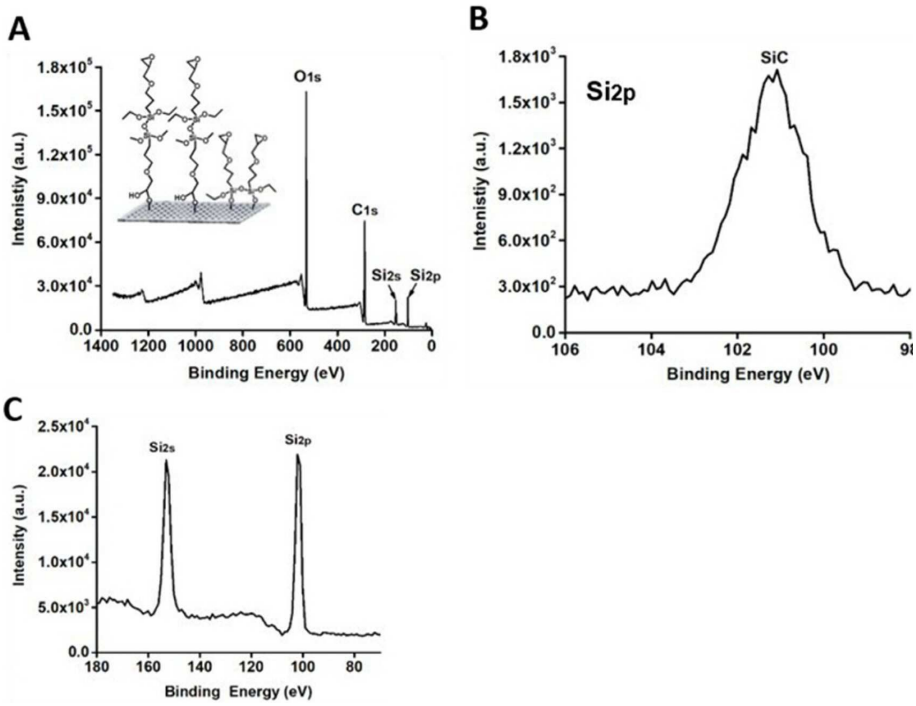
도면7


PMMA
PDMS
x
x
y
y

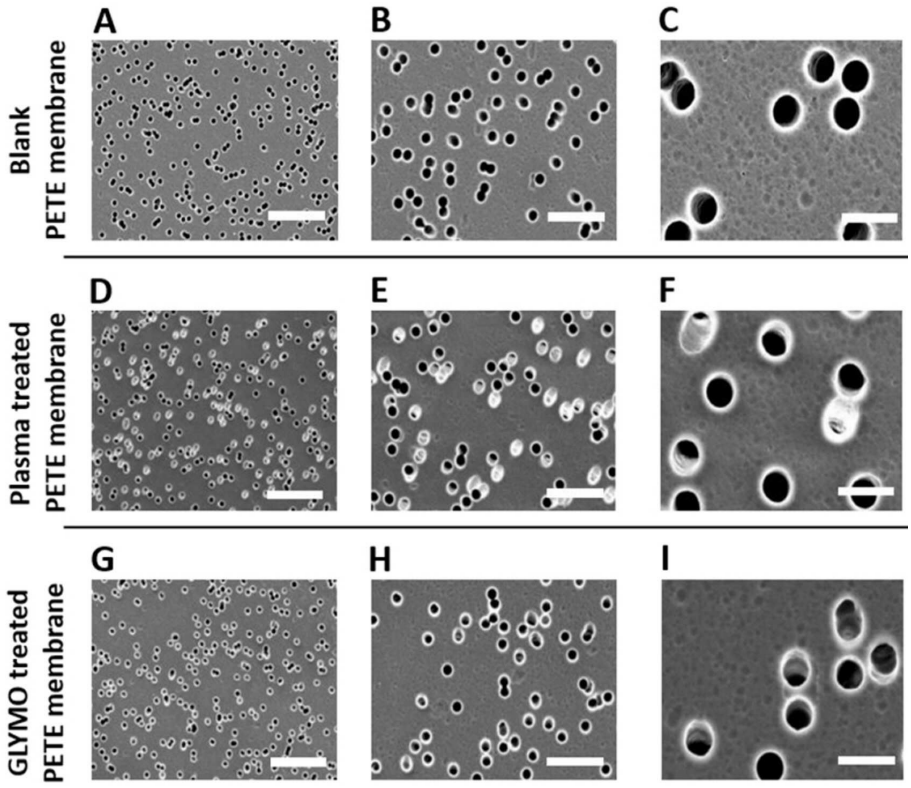
도면8


PMMA
PDMS
Cell viability (%)
100
80
60
40
20
0
*
300 nM
1 μM
Vincristine concentration

도면9


A
Intenistiy (a.u.)
O1s
C1s
Si2s
Si2p
Binding Energy (eV)
B
Si2p
SiC
Intenistiy (a.u.)
Binding Energy (eV)
C
Intensity (a.u.)
Si2s
Si2p
Binding Energy (eV)

도면10


A
B
C
Blank
PETE membrane
D
E
F
Plasma treated
PETE membrane
G
H
I
GLYMO treated
PETE membrane