(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월07일
(11) 등록번호 10-2726565
(24) 등록일자 2024년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
G16B 25/10 (2019.01) *G16B 5/20* (2019.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0068 (2013.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7004584
(22) 출원일자(국제) 2018년07월06일
심사청구일자 2021년07월06일
(85) 번역문제출일자 2020년02월17일
(65) 공개번호 10-2020-0030102
(43) 공개일자 2020년03월19일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/068318
(87) 국제공개번호 WO 2019/015988
국제공개일자 2019년01월24일
(30) 우선권주장
17181788.5 2017년07월18일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
인용발명 1: Pinto, S. et al., Journal of Biomedical Materials Research, Part A. (2011) 98A(4):535-543*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
코닌클리케 필립스 엔.브이.
네덜란드 아인트호벤 5656 에이쥐 하이 테크 캠퍼스 52
(72) 발명자
베커스 루카스 요하네스 안나 마리아
네덜란드 아인트호벤 5656 에이이 하이 테크 캠퍼스 5
크리게 얀 코넬리스
네덜란드 아인트호벤 5656 에이이 하이 테크 캠퍼스 5
(74) 대리인
장훈

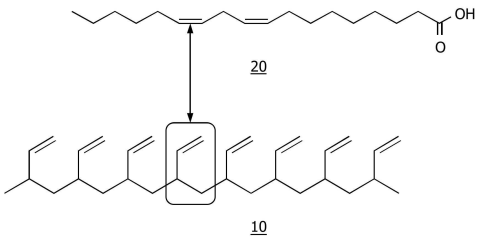
전체 청구항 수 : 총 19 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **세포 배양 재료**

(57) 요 약

세포 배양 단백질에 결합하는 재료가 개시된다. 이 재료는 벌크-개질된 탄성중합체를 함유하며, 벌크-개질된 탄성중합체는 탄성중합체 벌크에 공유 결합된 복수의 지방산 모이어티들을 포함하고, 모이어티들의 카르복실산 기들은 결합을 제공하는 데 이용가능하다. 유체 장치 모듈, 세포 배양 스캐폴드, 유체 장치, 그러한 재료의 합성 방법, 및 약물 시험 방법이 또한 개시된다. 그러한 재료에 의해, 단일 단계 사출 성형 공정만큼 적은 단계로 (모놀리식) 유체 장치 모듈이 제조될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G16B 25/10 (2019.02)
G16B 5/20 (2019.02)
C12N 2533/40 (2013.01)
C12N 2533/52 (2013.01)
C12N 2537/10 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
인용발명 2: 미국특허출원공개공보 US 2011/275539 A1 (2011.11.10.)*
인용발명 3: 일본 공개특허공보(A) 특개평 재6-133766호(1994.05.17.)*
인용발명 4: Schwarz, J. et al., Scientific Reports (2016) 6(1):36449*
JP06133766 A
US20110275539 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포 배양 단백질에 결합하는 재료로서,

상기 재료는 벌크-개질된(bulk-modified) 탄성중합체를 함유하며, 상기 벌크-개질된 탄성중합체는 탄성중합체 벌크에 공유 결합된 복수의 지방산 모이어티(moiety)들을 포함하고, 상기 모이어티들의 카르복실산 기들은 상기 재료의 외부 표면 상에서 상기 결합을 제공하는 데 이용가능하고,

상기 지방산 모이어티들의 각각은 상기 탄성중합체의 비닐 작용기 또는 하이드라이드 작용기와 불포화 지방산의 불포화 탄소-탄소 결합 사이의 가교결합 반응을 통해 상기 탄성중합체 벌크에 공유 결합되는, 재료.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 불포화 지방산은 미리스톨레산, 팔미톨레산, 사피엔산, 올레산, 엘라이드산, 박센산, 리놀레산, 리노엘라드산, α-리놀렌산, 아라키돈산, 에이코스펜타엔산, 에루스산 및 도코사헥사엔산으로부터 선택되는, 재료.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 탄성중합체는 폴리부타디엔 골격 또는 실리콘 골격을 포함하는, 재료.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 실리콘 골격 내의 상기 카르복실산 기들 중 적어도 일부는 비누화되는, 재료.

청구항 5

제1항 또는 제2항의 재료 및 상기 카르복실산 기들 중 적어도 일부에 결합된 세포 배양 단백질을 포함하는, 세포 배양 스캐폴드(scaffold).

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 단백질은 피브로넥틴, 콜라겐 및 엘라스틴으로부터 선택되는, 세포 배양 스캐폴드.

청구항 7

제1항 또는 제2항의 재료를 포함하는 막 위에서 연장되는 유동 채널을 포함하는, 유체 장치 모듈(fluidic device module).

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 유체 장치 모듈은 제1 유동 채널을 형성하는 제1 오목형 구조체를 포함하는 제1 주 표면, 및 상기 제1 주 표면의 반대편에 있으며 제2 유동 채널을 형성하는 제2 오목형 구조체를 포함하는 제2 주 표면을 포함하고; 상기 막은 상기 제1 유동 채널을 상기 제2 유동 채널로부터 분리하는, 유체 장치 모듈.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 유체 장치는 모놀리식(monolithic) 유체 장치인, 유체 장치 모듈.

청구항 10

제7항의 유체 장치 모듈 및 상기 유체 장치 모듈을 유체 밀봉하기 위한 한 쌍의 커버 플레이트(cover plate)들을 포함하는, 유체 장치.

청구항 11

제8항의 유체 장치 모듈 및 상기 유체 장치 모듈을 유체 밀봉하기 위한 한 쌍의 커버 플레이트(cover plate)들을 포함하는, 유체 장치로서.

상기 커버 플레이트들은 상기 커버 플레이트들 중 하나가 상기 제1 주 표면을 덮어서 상기 제1 유동 채널을 밀봉하고 상기 커버 플레이트들 중 다른 하나가 상기 제2 주 표면을 덮어서 상기 제2 유동 채널을 밀봉하도록 배열되는, 유체 장치.

청구항 12

세포 배양 단백질에 결합하는 재료를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은

극성 내부 표면을 갖는 금형 내에서 비닐-작용화되거나 하이드라이드-작용화된 탄성중합체 또는 이의 하나 이상의 전구체, 불포화 지방산 및 가교결합 촉매를 포함하는 조성물을 형성하는 단계; 및

상기 탄성중합체의 비닐 기 또는 하이드라이드 기와 상기 불포화 지방산의 불포화 탄소-탄소 결합 사이의 가교결합 반응에 의해 상기 금형 내에서 탄성중합체 벌크에 상기 지방산을 공유 결합시킴으로써 상기 비닐-작용화되거나 하이드라이드-작용화된 탄성중합체를 벌크-개질하여 상기 재료를 얻는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 비닐-작용화되거나 하이드라이드-작용화된 탄성중합체는 실리콘 골격을 포함하고 상기 불포화 지방산은 비누화되고, 상기 방법은 상기 얻어진 재료를 양성자성 산으로 처리하여 상기 비누화를 역전시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 비닐-작용화되거나 하이드라이드-작용화된 탄성중합체 또는 이의 하나 이상의 전구체, 불포화 지방산 및 가교결합 촉매를 포함하는 조성물을 형성하는 단계는 상기 조성물을 상기 금형 내로 주입하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 금형은 유동 채널을 포함하는 유체 장치 모듈을 제공하도록 형상화되고, 상기 유동 채널은 상기 재료를 포함하는 막위에서 연장되는 것인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 레이저를 사용하여 상기 유체 장치 모듈의 상기 막 내에 홈(groove)들 또는 구멍(hole)들을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 극성 내부 표면은 금속 산화물 내부 표면인, 방법.

청구항 18

제8항에 따른 유체 장치 모듈을 제공하는 단계;

상기 유체 장치 모듈의 상기 막을 세포 배양 단백질에 결합시켜 세포 배양 스캐폴드를 얻는 단계;

수확된 세포 배양물을 상기 세포 배양 스캐폴드에 도포하여 준비된 유체 장치 모듈을 얻는 단계;

상기 준비된 유체 장치 모듈로 유체 장치를 형성하는 단계;

상기 유체 장치의 한 쌍의 유동 채널들 중 하나를 통해 상기 세포 배양물을 공급하는 단계;

상기 유체 장치의 한 쌍의 유동 채널들 중 다른 하나를 통해 시험될 약물에 상기 세포 배양물을 노출시키는 단계; 및

상기 시험될 약물에 대한 상기 세포 배양물의 반응을 모니터링하는 단계

를 포함하는, 약물 시험 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 시험될 약물에 대한 상기 세포 배양물의 반응을 모니터링하는 단계는

상기 유체 장치 내에 상기 세포 배양물을 고정화(immobilizing) 및 고정(fixating)하고 상기 유체 장치 모듈을 슬라이싱하여, 상기 고정화 및 고정된 세포 배양물의 적어도 일부분을 포함하는 현미경 평가용 슬라이스를 얻는 것; 또는

공초점 현미경을 사용하여 상기 유체 장치 내에서 상기 세포 배양물을 모니터링하는 것을 포함하는, 약물 시험 방법.

청구항 20

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 배양 단백질에 결합하는 탄성중합체 재료에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 또한 그러한 재료를 포함하는 세포 배양 스캐폴드(scaffold)에 관한 것이다.

[0003] 본 발명은 또한 그러한 재료를 포함하는 유체 장치 모듈(fluidic device module)에 관한 것이다.

[0004] 본 발명은 또한 그러한 재료의 제조 방법에 관한 것이다.

[0005] 본 발명은 또한 그러한 재료를 포함하는 유체 장치 모듈을 사용하는 약물 시험 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0006] 포유류 세포 또는 조직의 시험관 내(in-vitro) 시험은 조사 중인 포유류 재료(mammalian material)의 임상적으로 중요한 정보를 얻는 데 중요한 기술이다. 예를 들어, 생검된 포유류 세포 또는 조직 재료는 그러한 포유류 재료에서의 이상 또는 질병을 결정하기 위해 또는 질병에 걸린 포유류 재료를 약물, 예를 들어 실험 약물에 노출시켜 그러한 노출에 대한 질병에 걸린 포유류 재료의 반응을 모니터링하기 위해 그러한 시험을 거칠 수 있다. 이러한 접근법은 예를 들어 종종 종양학적 절차에서 사용된다. 이는 약물 독성과 같은 여러 가지 이유로 바람직하지 않을 수 있는 다양한 잠재적으로 효과적인 약물에 개체를 노출시키지 않고서 개체의 질병을 효과적으로 치료할 수 있는 방법에 대한 중요한 통찰(insight)을 제공할 수 있다. 또한, 확립된 만족스러운 약물 치료가 아직 이용가능하지 않은 기존의 질병에 대한 실험 약물의 효능이 이러한 방식으로 시험될 수 있다. 그러한 시험관 내 시험을 활용하기 위한 많은 다른 잘 알려진 이유가 있다.

[0007] 그러한 시험관 내 시험에 대한 일반적인 접근법은 유체 장치 내에 포유류 재료를 고정화(immobilize)하는 것인데, 이는 때때로 장기칩(organ-on-chip)으로 지칭된다. 그러한 접근법에서, 포유류 재료는 전형적으로 유체 장치의 2개의 유체 채널들을 분리하는 막 상에 고정화되는데, 제1 채널은 포유류 재료를 공급하는 데 사용되고 제2 채널은 포유류 재료를 약물 치료와 같이 관심 화학 화합물 또는 조성물에 노출시켜, 예를 들어 앞서 설명된 바와 같이 약물의 효능 및/또는 독성을 시험하는 데 사용된다. 평가를 위한 포유류 재료를 포함하는 막의 슬라이스를 얻기 위해, 예를 들어, 관심 화학 화합물 또는 조성물에의 노출에 대한 포유류 재료의 반응을 평가하기 위해, 유체 장치가 다이싱(dicing)되거나 슬라이싱될 수 있도록, 유체 장치 또는 적어도 그의 막은 탄성중합체로 제조될 수 있다.

[0008] 그러한 시험관 내 시험에서의 과제는 포유류 재료, 예를 들어 세포 또는 조직이 유체 장치의 막 상에서 안정화되고 정상적으로 발달하여 시험 절차의 지속 기간 동안 살아 있도록 보장하는 것이다. 이는 실험이 다소 길 수 있는 종양학적 절차에서 특히 까다롭다. 이를 위해, 포유류 재료는 피브로넥틴과 같은 생체적합성 재료를 사용하여 안정화될 수 있으며, 이는 천연 조직의 화학적 환경을 모방하는 화학적 환경을 세포에 제공함으로써 포유류 세포가 계속 증식될 것을 보장한다.

[0009] 일반적인 접근법은 카르복실산 기를 갖는 중합체로 웰 세포 플레이트를 코팅하는 것인데, 그 이유는 그러한 기

가 피브로넥틴에 (공유 결합에 의해) 결합하여, 피브로넥틴이 중합체를 생체연결성(bioconnective)으로 만듦에 따라 유체 장치 내의 막 상의 포유류 세포의 안정화를 촉진할 수 있기 때문이다. 그러나, 이러한 접근법은 단점이 없지 않다. 첫 째로, 유체 장치를 통한 유체 스트림은 전술된 중합체를 부분적으로 제거할 수 있으며, 이는 이러한 재료의 적어도 일부가 손실되었을 수 있다는 사실로 인해 원하는 시점에 포유류 재료를 평가하는 능력을 손상시킨다. 다른 접근법에서, 막은 UV 또는 플라즈마로 처리되어 막 상에 피브로넥틴에 대한 결합 부위를 생성한다. 그러나, 이러한 접근법은 그러한 결합 부위의 불균질한 분포를 피하기가 다소 어렵다는 결점을 가지며, 이는 시험 결과의 평가를 역시 방해한다.

[0010] 둘째로, 그러한 생체적합성 코팅을 포함하는 막은 제조하기 어렵기로 악명 높으며, 이는 그러한 유체 장치의 제조를 다소 비용이 많이 들고 번거롭게 만든다. 예를 들어, 전형적으로 그러한 막은 고가인 박막 기술을 사용하여 제조될 필요가 있으며, 누설 없이 유체 장치 내에 통합될 필요가 있는데, 이는 결코 간단하지 않다. 또한, 막 자체가 생체적합성 재료로 제조되지 않은 경우, 전형적으로 막은 셀 성장을 촉진하기 위해 작은 피치로 복수의 셀-크기 구멍들을 구비할 필요가 있는데, 이는 또한 달성하기 어렵다.

[0011] 박막 기술에 기초한 그러한 인간 장기칩의 미세제작의 예는 문헌[Dongeun Huh et al. in Nature Protocols, Vol. 8, No. 11, 2013, pages 2135-2157]에 개시되어 있다. 이러한 프로토콜에서는, 양측에 진공 챔버가 있지만, 2개의 전체 높이(full-height)와 함께 얇은 다공성 가요성 막에 의해 분리된 2개의 평행한 탄성중합체 미세채널을 포함하는 다층 미세유체 장치를 제조하는 데 미세-엔지니어링(micro-engineering)이 사용되며, 이러한 장치는 제조하는 데 대략 3일 반이 걸린다. 총 미세제작 절차에는 100개가 넘는 단계가 포함되며, 이들 중 상당수는 중요한 단계이다. 이는 그러한 제조 절차의 복잡성을 명확하게 나타낸다. 따라서, 그러한 생체적합성 유체 장치를 단순화된 방식으로 제공하는 것에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은 그러한 생체적합성 유체 장치를 형성하는 데 사용될 수 있는 세포 배양 단백질에 결합하는 탄성중합체 재료를 제공하고자 한다.

[0013] 본 발명은 또한 그러한 탄성중합체 재료를 포함하는 세포 배양 스캐폴드를 제공하고자 한다.

[0014] 본 발명은 또한 그러한 탄성중합체 재료를 포함하는 생체적합성 유체 장치를 제공하고자 한다.

[0015] 본 발명은 또한 그러한 탄성중합체 재료의 제조 방법을 제공하고자 한다.

[0016] 본 발명은 또한 그러한 생체적합성 유체 장치를 사용하는 약물 시험 방법을 제공하고자 한다.

[0017] 일 태양에 따르면, 세포 배양 단백질에 결합하는 재료가 제공되고, 이 재료는 벌크-개질된(bulk-modified) 탄성중합체를 함유하며, 벌크-개질된 탄성중합체는 탄성중합체 벌크에 공유 결합된 복수의 지방산 모이어티(moiety)들을 포함하고, 상기 모이어티들의 카르복실산 기들은 상기 재료의 외부 표면 상에서 상기 결합을 제공하는 데 이용가능하다.

[0018] 본 발명은, 코팅(스핀 코팅, 딥 코팅, 분무 코팅, 분배) 또는 사출 성형 공정에서 탄성중합체와 지방산을 조합함으로써, 그러한 재료가 적은 수의 단계로, 예를 들어 일부 실시 형태에서 단일 단계로 제조될 수 있다는 통찰에 기초하는데, 스핀 코팅 또는 사출 형성 공정에서 주위 산소에 대한 제한된 노출로 인해 지방산 탄소-탄소 이중결합의 상당한 에폭시화 없이 탄성중합체와 지방산 탄소-탄소 이중 결합의 가교결합이 성취될 수 있다. 결과적으로, 탄성중합체가 지방산 모이어티들로 벌크-개질된 재료가 제공되는데, 지방산의 카르복실산 기들은 생체적합성 재료에 결합하는 데 이용가능하다. 더욱이, 재료가 형성되는 금형의 특성 및/또는 경화 공정을 제어함으로써, 그러한 카르복실산 기들이 주로 재료의 외부 표면 상에 존재할 수 있어서, 그러한 외부 표면 상의 카르복실산 기들의 실질적으로 균질한 분포를 제공할 수 있으며, 이는 재료를 유체 장치용 막 재료로서 특히 적합하게 만드는데, 그 이유는 생체적합성 재료가 그래프팅되거나 앞서 설명된 바와 같이 달리 형성될 필요가 있는 막 재료와는 대조적으로 재료의 각 단면이 동일한 표면 특성을 나타낼 것이기 때문이다. 또한, 전형적으로 탄성중합체 탄소-탄소 이중 결합들 중 단지 일부만이 그러한 가교결합 반응에서 소모되기 때문에, 본 발명의 재료는 탄성중합체의 탄성중합체성 특성을 보유하며, 이는 유체 장치에 사용하기 위한 본 발명의 재료의 적합성을 증가시키며 조사 목적을 위한 본 발명의 재료의 슬라이싱 또는 달리 절단을 용이하게 한다.

[0019] 바람직하게는, 지방산 모이어티들의 각각은 탄성중합체의 비닐 작용기 또는 하이드라이드 작용기와 불포화 지방산의 불포화 탄소-탄소 결합 사이의 가교결합 반응을 통해 탄성중합체 벌크에 공유 결합되어, 생체적합성 재료에 결합하는 데 이용가능한 카르복실산 기의 수가 최적화될 수 있도록 보장한다.

[0020] 불포화 지방산은 임의의 적합한 불포화 지방산일 수 있다. 예시적인 실시 형태에서, 불포화 지방산은 미리스톨레산, 팔미톨레산, 사피엔산, 올레산, 엘라이드산, 박센산, 리놀레산, 리노엘라드산, α-리놀렌산, 아라키돈산, 에이코스펜타엔산, 에루스산 및 도코사헥사엔산으로부터 선택된다. 리놀레산이 구체적으로 언급된다.

[0021] 유사하게는, 탄성중합체는 임의의 적합한 탄성중합체일 수 있다. 예시적인 실시 형태에서, 탄성중합체는 폴리부타디엔 골격 또는 실리콘 골격을 포함한다. 탄성중합체가 실리콘 골격을 포함하는 경우, 실리콘 골격 내의 카르복실산 기들 중 적어도 일부는 비누화될 수 있는데, 그 이유는 가교-결합 촉매가 불포화 지방산 분자의 카르복실산 기의 양성자에 의해 불활성화되는 것을 방지하기 위해 불포화 지방산 분자와 탄성중합체 분자 사이의 가교결합 전에 카르복실산 기의 비누화가 필요할 수 있기 때문이다.

[0022] 추가의 태양에 따르면, 본 명세서에 기재된 실시 형태들 중 임의의 것에 따른 본 발명의 재료 및 상기 카르복실산 기들 중 적어도 일부에 결합된 세포 배양 단백질을 포함하는 세포 배양 스캐폴드가 제공된다. 그러한 세포 배양 스캐폴드는 본 발명의 재료의 카르복실산 기들에 대한 세포 배양 단백질의 단순 결합 반응에 의해 간단한 방식으로 제조될 수 있으며, 이에 의해 본 발명의 재료의 표면을 가로질러 세포 배양 단백질의 실질적으로 균질한 분포를 갖는 세포 배양 스캐폴드가 생성된다. 예를 들어, 그러한 세포 배양 단백질은 피브로넥틴, 콜라겐 및 엘라스틴으로부터 선택될 수 있지만, 다른 세포 배양 단백질이 고려될 수 있다.

[0023] 또한 추가의 태양에 따르면, 본 명세서에 기재된 실시 형태들 중 임의의 것에 따른 본 발명의 재료를 포함하는 막 위에서 연장되는 유동 채널을 포함하는 유체 장치 모듈이 제공된다. 그러한 유체 장치 모듈은 제1 유동 채널을 형성하는 제1 오목형 구조체를 포함하는 제1 주 표면; 제1 주 표면의 반대편에 있으며 제2 유동 채널을 형성하는 제2 오목형 구조체를 포함하는 제2 주 표면을 포함할 수 있으며; 막은 제1 유동 채널을 제2 유동 채널로부터 분리한다. 바람직한 실시 형태에서, 유체 장치 모듈은, 장치 모듈이 사출 성형에 의해 적은 수의 가공 단계로, 예를 들어 단일 가공 단계로 제조될 수 있다는 이점을 갖는 모놀리식(monolithic) 유체 장치 모듈이다.

[0024] 막은 막을 통해 연장되는 복수의 구멍(hole)들 또는 홈(groove)들을 포함할 수 있다. 그러나, 막은 상기에 설명된 바와 같이 세포 배양 단백질에 결합하여 세포 배양 스캐폴드를 형성함으로써 생체적합성으로 될 수 있기 때문에, 이러한 구멍들 또는 홈들은 임의의 적합한 치수를 가질 수 있고 세포-크기 치수로 제한되지 않는데, 이는 그러한 유체 장치 모듈의 제조를 추가로 단순화시킨다.

[0025] 일 실시 형태에서, 제1 유동 채널 및 제2 유동 채널은 각각의 격막을 통해 접근 가능하여, 별개의 유동 채널이 교차-오염 위험 없이 개별적으로 접근될 수 있다.

[0026] 또한 추가의 태양에 따르면, 본 명세서에 기재된 실시 형태들 중 임의의 것의 유체 장치 모듈 및 유체 장치 모듈을 유체 밀봉하기 위한 한 쌍의 커버 플레이트(cover plate)들을 포함하는 유체 장치가 제공된다. 커버 플레이트들은 상기 커버 플레이트들 중 하나가 제1 주 표면을 덮어서 제1 유체 채널을 밀봉하고 상기 커버 플레이트들 중 다른 하나가 제2 주 표면을 덮어서 제2 유체 채널을 밀봉하도록 배열될 수 있다. 그러한 유체 장치는 간단한 방식으로 제조될 수 있는데, 그 이유는 유체 장치 모듈이 앞서 설명된 바와 같이 적은 수의 처리 단계로 형성될 수 있고 유체 장치 모듈의 가요성 특성으로 인해 누출에 대해 강건하기 때문이다.

[0027] 또한 추가의 태양에 따르면, 세포 배양 단백질에 결합하는 재료를 제조하는 방법이 제공되는데, 이 방법은 극성 내부 표면을 갖는 금형 내에서 비닐-작용화되거나 하이드라이드-작용화된 탄성중합체 또는 이의 하나 이상의 전구체, 불포화 지방산 및 가교결합 촉매를 포함하는 조성물을 형성하는 단계; 및 탄성중합체의 비닐 기 또는 하이드라이드 기와 불포화 지방산의 불포화 탄소-탄소 결합 사이의 가교결합 반응에 의해 상기 금형 내에서 탄성중합체 벌크에 지방산을 공유 결합시킴으로써 비닐-작용화되거나 하이드라이드-작용화된 탄성중합체를 벌크-개질하여 재료를 얻는 단계를 포함한다. 따라서, 이 방법은 생성되는 세포 배양 스캐폴드가 벌크-개질된 탄성중합체의 표면을 가로질러 세포 배양 단백질의 실질적으로 균질한 분포를 갖도록 세포 배양 단백질과의 반응에 의해 생체적합성으로 될 수 있는 재료를 제공하는 간단한 방식을 제공한다.

[0028] 그러한 비닐-작용화되거나 하이드라이드-작용화된 탄성중합체가 실리콘 골격을 포함하는 경우, 불포화 지방산은, 존재하는 경우, 가교결합 촉매, 예를 들어 백금 촉매의 독성을 방지하기 위해 비누화될 수 있으며, 이 경우에 본 방법은 벌크-개질된 탄성중합체의 적어도 노출된 표면에서 카르복실산 기들을 얻기 위하여, 얻어진 재료를 양성자성 산으로 처리하여 상기 비누화를 역전시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0029] 비닐-작용화되거나 하이드라이드-작용화된 탄성중합체 또는 이의 하나 이상의 전구체, 불포화 지방산 및 가교결합 촉매를 포함하는 조성물을 형성하는 단계는 조성물을 금형 내로 주입하는 것을 바람직하게는 포함한다.

[0030] 바람직하게는, 이 금형은 본 명세서에 기재된 실시 형태들 중 임의의 것의 유체 장치 모듈을 제공하도록 형상화되어, 그러한 유체 장치 모듈이 최소한의 수의 가공 단계를 사용하여 간단한 방식으로 제공될 수 있게 한다.

[0031] 그러한 유체 장치 모듈의 막 내의 홈들 또는 구멍들은 그러한 홈들 또는 구멍들을 간단한 방식으로 제공하기 위해 레이저로 형성될 수 있지만, 예를 들어, 모듈을 성형하는 동안 그러한 홈들 및 구멍들이 유체 장치 모듈의 막 내에 형성되도록 금형을 형상화하는 것에 의한 것과 같이, 그러한 홈들 또는 구멍들을 형성하기 위한 다른 기술이 고려될 수 있다.

[0032] 그러한 금형은 바람직하게는 지방산 모이어티들의 카르복실산 기들의 그러한 내부 표면과의 정렬을 촉진하기 위해 금속 산화물 내부 표면과 같은 극성 내부 표면을 가지며, 이에 의해 그의 외부 표면(들) 상에 높은 밀도의 카르복실산 기들을 갖는 벌크-개질된 탄성중합체의 형성을 촉진한다.

[0033] 또 추가의 태양에 따르면, 본 명세서에 기재된 실시 형태들 중 임의의 것에 따른 유체 장치 모듈을 제공하는 단계; 유체 장치 모듈의 막을 세포 배양 단백질에 결합시켜 세포 배양 스캐폴드를 얻는 단계; 수확된 세포 배양물을 세포 배양 스캐폴드에 도포하여 준비된 유체 장치 모듈을 얻는 단계; 준비된 유체 장치 모듈로 유체 장치를 형성하는 단계; 유체 장치의 한 쌍의 유동 채널들 중 하나를 통해 세포 배양물을 공급하는 단계; 유체 장치의 한 쌍의 유동 채널들 중 다른 하나를 통해 시험될 약물에 세포 배양물을 노출시키는 단계; 및 시험될 약물에 대한 세포 배양물의 반응을 모니터링하는 단계를 포함하는 약물 시험 방법이 제공된다. 그러한 약물 시험 방법은, 특히 그러한 약물 시험 방법에서 사용될 유체 장치의 제조 면에서, 단순하고 간단한 방식으로 활용될 수 있으며, 이에 의해 그러한 유체 장치로는 준비하기가 전형적으로 매우 번거로운 기존의 약물 시험 방법의 상당한 단순화를 제공한다.

[0034] 시험될 약물에 대한 세포 배양물의 반응을 모니터링하는 단계는 유체 장치 내에 세포 배양물을 고정화 및 고정(fixating)하고 유체 장치 모듈을 슬라이싱하여, 고정화 및 고정된 세포 배양물의 적어도 일부분을 포함하는 현미경 평가용 슬라이스를 얻는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 교시에 따르면, 세포 배양 스캐폴드가 유체 장치 모듈의 막 표면을 가로질러 균질하게 분포된다는 사실로 인해 현미경 평가를 위한 그러한 슬라이스의 생성은 더 이상 중요하지 않거나 결과가 변하는 것은 아니다.

[0035] 대안적으로, 바람직한 실시 형태에서, 세포 배양물의 반응의 모니터링은 조립된 유체 장치 내에서 공초점 현미경을 사용하여 수행될 수 있다. 이는 그러한 반응의 실시간 모니터링을 용이하게 한다.

도면의 간단한 설명

[0036] 본 발명의 실시 형태가 첨부 도면을 참조하여 비제한적인 예로서 그리고 더욱 상세히 기술된다.

도 1은 일 실시 형태에 따른 불포화 지방산에 의한 탄성중합체의 벌크 개질을 개략적으로 도시하고;

도 2는 그러한 벌크-개질된 탄성중합체를 포함하는 세포 스캐폴드 상의 포유류 세포의 고정화를 개략적으로 도시하고;

도 3은 일 실시 형태에 따른 유체 장치 모듈의 사시도를 개략적으로 도시하고;

도 4는 일 실시 형태에 따른 유체 장치 모듈의 다른 사시도를 개략적으로 도시하고;

도 5는 일 실시 형태에 따른 유체 장치의 분해도를 개략적으로 도시하고;

도 6은 다른 실시 형태에 따른 유체 장치의 사시도를 개략적으로 도시하고;

도 7은 또 다른 실시 형태에 따른 유체 장치의 분해 사시도를 개략적으로 도시하고;

도 8은 도 7의 유체 장치의 다른 분해 사시도를 개략적으로 도시하고;

도 9는 일 실시 형태에 따른 벌크-개질된 탄성중합체를 형성하기 위한 조성물의 FT-IR 스펙트럼의 일부이고;

도 10은 벌크 개질 반응 시간의 함수로서의 도 9의 FT-IR 스펙트럼에서의 2개의 특징적인 피크들의 강도 사이의 비의 변화를 도시하고;

도 11은 벌크 개질 반응 시간의 함수로서의 불포화 지방산의 C=C 신축 진동의 라만 스펙트럼을 도시하고;

도 12는 개질된 실리콘계 탄성중합체 및 개질되지 않은 실리콘계 탄성중합체의 접촉각 측정치의 그래프이고;

도 13은 개질된 폴리부타디엔계 탄성중합체 및 개질되지 않은 폴리부타디엔계 탄성중합체의 접촉각 측정치의 그

래프이고;

도 14 및 도 15는 본 발명의 실시 형태에 따른 벌크-개질된 탄성중합체와 피브로넥틴 사이의 결합 반응의 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 스펙트럼을 도시하고;

도 16은 피브로넥틴이 결합된 본 발명의 실시 형태에 따른 벌크-개질된 탄성중합체와 인간 조직 세포 사이의 결합 반응의 SPR 스펙트럼을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 도면은 단지 개략적인 것이며 일정한 축척으로 작성된 것이 아님이 이해되어야 한다. 동일한 도면 부호가 도면 전체에 걸쳐 동일하거나 유사한 부분을 지시하는 데 사용된다는 것이 또한 이해되어야 한다.

[0038] 도 1은 본 발명의 실시 형태들에 따른 벌크-개질된 탄성중합체 재료를 생성하기 위한 가교결합 반응을 개략적으로 도시한다. 이러한 가교결합 반응에서, 비닐-작용화된 탄성중합체(10)(본 명세서에서는 간단히 탄성중합체로 지칭됨)는, 탄성중합체(10)의 탄소-탄소 이중 결합들 중 하나와 불포화 지방산(20)의 탄소-탄소 이중 결합들 중 하나 사이의 가교결합 반응에 의해 불포화 지방산(20)에 가교결합되며, 이러한 가교결합 반응은 적절한 가교결합 촉매를 사용하여 촉매될 수 있다. 놀랍게도, 그러한 가교결합 반응은 벌크-개질된 탄성중합체를 제공할 수 있는데, 탄성중합체(10)와의 가교결합 반응에 관여한 불포화 지방산 분자(20)들 중 적어도 일부의 카르복실산 기들이 벌크-개질된 탄성중합체의 외부 표면 상에 제공되어, 이러한 카르복실산 기들이 피브로넥틴, 콜라겐 또는 엘라스틴과 같은 세포-안정화(세포-배양) 단백질과의 결합 반응에 이용가능하다는 것이 본 발명자에 의해 밝혀졌다. 이는, 특히 탄성중합체(10)가 비극성 용매에 용해될 때, 탄성중합체(10)의 특성이 비극성일 수 있다는 것을 고려하면 놀랍다. 그러한 비극성 환경에서, 불포화 지방산 분자(20)들은 미셀(micelle)을 형성하는 경향이 있으며, 이들 분자의 카르복실산 모이어티는 그러한 미셀 내에서 안쪽으로 향하며, 이는 전형적으로 그러한 카르복실산 모이어티가 결국 개질된 탄성중합체의 벌크 내에서 있게 한다. 대안적으로, 하기에 추가로 상세하게 설명되는 바와 같이, 탄성중합체(10)와 불포화 지방산(20) 사이의 가교결합 반응은, 예를 들어, 하이드라이드-작용화된 실리콘의 경우에서와 같이, 탄성중합체(10)의 하이드라이드 작용기와 불포화 지방산(20)의 탄소-탄소 이중 결합 사이의 반응에 의한 공유 결합의 형성을 수반할 수 있다.

[0039] 또한, 그러한 불포화 지방산(20)의 탄소-탄소 이중 결합이 산소의 존재 하에서 신속하게 에폭시화되기 쉽다는 것은 그 자체로 잘 알려져 있으며, 이는 그러한 화합물이 탄성중합체(10)와의 가교결합 반응에 관여하는 능력을 감소시킨다.

[0040] 본 발명의 실시 형태는, 탄성중합체(10)와 불포화 지방산(20)을 포함하는 반응 혼합물이 극성 표면과 접촉하게 되는 경우, 이는 그러한 극성 표면을 따른 지방산 분자들의 카르복실산 기들의 배향을 촉진하여, 벌크-개질된 탄성중합체 재료의 외부 표면이 이러한 카르복실산 기들의 고밀도 및 균질한 분포를 나타낸다는 통찰에 기초한다. 더욱이, 승온, 예를 들어 120 내지 240℃ 범위의 온도에서의 사출 성형 공정에서 이러한 방식으로 탄성중합체(10)를 벌크 개질할 때, 불포화 지방산 분자(20)의 탄소-탄소 이중 결합의 에폭시화는 탄성중합체(10)의 벌크 개질을 유의하게 방해하지 않으며, 즉 불포화 지방산 분자(20)와 탄성중합체(10) 사이의 가교결합 반응을 유의하게 억제하지 않는다. 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, 그러한 사출 성형 공정에서, 사출 성형 장치 내의 반응 혼합물에는 분자 산소가 거의 없어서, 이러한 탄소-탄소 이중 결합의 원치 않는 에폭시화를 억제하는 것으로 여겨진다.

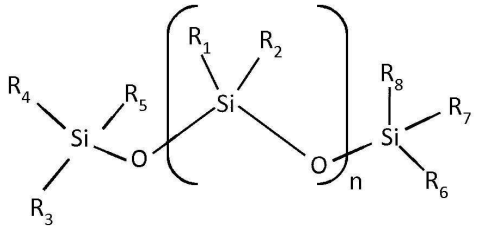
[0041] 그러한 사출 성형 공정에 사용되는 금형은 모놀리식 유체 장치 모듈이 단일 단계 사출 성형 공정으로 형성될 수 있도록 유체 장치 모듈의 형태로 형상화될 수 있다. 그러한 모놀리식 유체 장치 모듈의 외부 표면(들) 상의 카르복실산 기들의 고밀도 및 균질한 분포로 인해, 그러한 장치 모듈은 세포 배양 단백질, 예를 들어 피브로넥틴, 콜라겐 또는 엘라스틴을 벌크-개질된 탄성중합체의 외부 표면 상의 노출된 카르복실산 기들에 결합시킴으로써 간단한 방식으로 생체적합성으로 될 수 있다. 금형은 벌크-개질된 탄성중합체의 외부 표면들 중 하나 이상에서 벌크-개질된 탄성중합체의 카르복실산 기들의 원하는 배향을 달성하기 위해 스테인리스 강, 금속 또는 금속 산화물, 예를 들어 산화알루미늄과 같은 임의의 적합한 극성 재료로 제조될 수 있거나 그로 코팅된 내부 표면을 가질 수 있다.

[0042] 임의의 적합한 탄성중합체가 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 탄성중합체는 단일중합체, 공중합체, 블록 공중합체, 삼원공중합체, 블록 삼원공중합체 등일 수 있다. 특히 적합한 탄성중합체는 폴리부타디엔과 같은 폴리엔으로부터 선택될 수 있다. 폴리부타디엔이 사용되는 경우, 폴리부타디엔은 임의의 적합한 중합 공정을 사용하여 제조될 수 있다. Nd 또는 Li-촉매된 중합 반응에서 형성된 폴리부타디엔이 특히 바람직한

데, 그 이유는 그러한 폴리부타디엔이 낮은 분지도(전형적으로 5% 미만) 및 약 2의 낮은 다분산도(Mw/Mn)를 갖는다는 것이 그 자체로 잘 알려져 있기 때문이다. Li-촉매된 폴리부타디엔은 그의 고도의 1,2-비닐 함량(약 11%)으로 인해 특히 바람직하다. 그러나, 다른 유형의 폴리부타디엔, 예를 들어, Co, Ni 또는 Ti-촉매된 중합 반응으로부터 얻어지는 폴리부타디엔이 대신에 사용될 수 있다. 폴리부타디엔과 같은 폴리엔이 탄성중합체(10)로서 사용되는 경우, 탄성중합체(10)와 불포화 지방산(20) 사이의 가교결합 반응은 퍼옥사이드 촉매를 사용하여 촉매될 수 있다. 다른 유리한 실시 형태에서, 5 내지 15% 범위의 분지도를 갖는 Li-촉매된 폴리부타디엔이 사용되는데, 그 이유는 폴리부타디엔의 분지도가 이 범위 내에 있을 때, 폴리부타디엔과 불포화 지방산(20)의 반응성이 개선되는 것으로 밝혀졌기 때문이다. 완벽을 기하기 위해, 폴리부타디엔을 합성할 때 분지도를 제어하는 방법은 그 자체로 잘 알려져 있으므로 단지 간결함을 위해 추가로 설명하지 않을 것임에 유의한다.

[0043] 특히 언급되는 탄성중합체의 다른 부류는 사출 성형을 위한 실리콘(폴리실록산)이다. 그러한 실리콘은, 예를 들어 (폴리 메틸) 하이드로겐 실록산과의, Pt-촉매되는 부가 반응을 통한 가교결합을 용이하게 하기 위해 비닐 모이어티를 포함하는 PDMS 골격을 포함할 수 있다. (폴리 메틸) 하이드로겐 실록산과의 그러한 가교결합 대신에 또는 그에 더하여, 비닐-작용화된 PDMS 골격은 불포화 지방산(20)과 가교결합될 수 있다. 그러한 실리콘은 비닐-작용화된 선형 또는 분지형 실리콘 단량체 또는 올리고머, 예를 들어 T-분지형 또는 Q-분지형 실리콘 단량체 또는 올리고머와 선형 하이드라이드-작용화된 실리콘 단량체 또는 올리고머 사이, 하이드라이드-작용화된 선형 또는 분지형 실리콘 단량체 또는 올리고머, 예를 들어 T-분지형 또는 Q-분지형 실리콘 단량체 또는 올리고머와 선형 비닐-작용화된 실리콘 단량체 또는 올리고머 사이, 또는 비닐-작용화된 및 하이드라이드-작용화된 선형 또는 분지형 실리콘 단량체 또는 올리고머, 예를 들어, T-분지형 또는 Q-분지형 실리콘 단량체 또는 올리고머의 혼합물 및/또는 선형 하이드라이드-작용화된 및 비닐-작용화된 실리콘 단량체 또는 올리고머의 혼합물의 가교결합 반응에 의해 형성될 수 있다.

[0044] 예를 들어, 2성분 실리콘은 선형 성분 1과 선형 성분 2 사이의 가교결합 반응에 의해 형성될 수 있으며, 이들 각각은 하기 일반식에 상응할 수 있다:

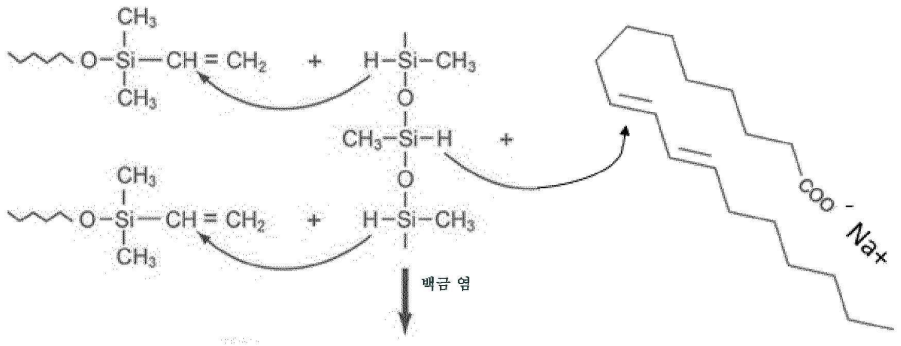


[0045]

[0046] 성분 1에서, R_1 및 R_2는 개별적으로 C_1-C_3 알킬로부터 선택되고, R_3 내지 R_8은 개별적으로 C_1-C_3 알킬 및 비닐로부터 선택되되, 단, R_3 내지 R_5 중 하나 이상 및 R_6 내지 R_8 중 하나 이상은 비닐이다. 바람직하게는, R_3 내지 R_8 중 3개 이상은 비닐이다. 모든 실시 형태에서, n은 100 내지 200,000의 범위일 수 있다. 성분 1의 구체적인 실시 형태에서, 알킬 기인 기 R_1 내지 기 R_8의 각각은 메틸 기이며, 즉, 성분 1은 말단 비닐 기를 갖는 비닐-작용화된 PDMS이다.

[0047] 성분 2에서, R_1은 수소이고, R_2 = C_1-C_3 알킬이고 R_2-R_8은 개별적으로 C_1-C_3 알킬 또는 수소로부터 선택되되, 단, R_3 내지 R_5 중 많아야 하나 및 R_6 내지 R_8 중 많아야 하나는 수소이고, n은 임의의 적합한 값을 가질 수 있으며, 예를 들어 n = 3 내지 1,000 이상, 구체적으로 n = 3 내지 10이다. 성분 2의 구체적인 실시 형태에서, 기 R_3 내지 기 R_8 중 어느 것도 수소가 아니다. 성분 2의 다른 구체적인 실시 형태에서, R_2 내지 R_8의 각각은 메틸이다.

[0048] 성분 2는 전형적으로 성분 1을 위한 가교결합제로서 작용한다. 전형적으로 Pt-촉매되는 그러한 가교결합 반응은 그 자체로 잘 알려져 있으며, 예를 들어 국제특허 공개 WO 2009/147602 A2호를 참조하고, 따라서 간결함을 위해 추가로 상세하게 설명하지 않는다. 임의의 적합한 실리콘 탄성중합체가 사용될 수 있다. 그러한 실리콘을 불포화 지방산(20)의 존재 하에 가교결합할 때, 실리콘과 불포화 지방산(20) 사이의 공유 결합은 대안적으로, 하기 반응 메커니즘에서 제안된 바와 같이, (가교결합된) 실리콘의 하이드라이드 작용기와 불포화 지방산(20) 사이의 반응에 의해 형성될 수 있는 것으로 이해되어야 한다:



[0049]

[0050] 그러한 가교결합 반응 동안 불포화 지방산(20)의 카르복실산 기의 양성자에 의한 촉매 억제를 방지하기 위하여, 불포화 지방산은 실리콘 탄성중합체와의 가교결합 반응에서 비누화된 형태로, 예를 들어, 그러한 불포화 지방산의 나트륨 염으로서 사용될 수 있으며, 가교결합 반응 생성물을 후속하여 강한 양성자성 산, 예를 들어 HCl 등으로 처리하여 벌크-개질된 탄성중합체의 표면 상의 카르복실산 기를 복원한다. 이러한 실시 형태에서, 벌크-개질된 탄성중합체의 표면과 그의 벌크 사이의 확산 채널의 길이로 인해 양성자성 산이 벌크에 도달할 수 없을 수 있다는 사실로 인해, 벌크-개질된 탄성중합체의 벌크 내의 지방산 모이어티들 중 일부는 비누화된 채로 유지될 수 있다. 쉽게 이해되는 바와 같이, 벌크-개질된 탄성중합체가 그의 표면들 중 하나 이상에서의 카르복실산 기의 이용가능성으로 인해 여전히 생체적합성으로 될 수 있다는 것을 고려하면 이는 문제가 되지 않는다. 임의의 적합한 유형의 폴리실록산이 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0051] 대안적으로, (폴리 메틸) 하이드로겐 실록산 골격과 같은 실리콘 골격이 폴리부타디엔 및 폴리아이소프렌과 같은 고무-유사 중합체와 가교결합될 수 있는데, 불포화 지방산은 그러한 가교결합된 생성물에 혼입된다. 이는 예를 들어 최종 재료의 물 투과성을 변화시키기 위해 수행될 수 있는데, 그 이유는 실리콘이 전형적으로 다소 개방된 구조를 갖는 반면에 그러한 고무-유사 중합체는 다소 폐쇄된 구조를 가져서, 실리콘 및 고무-유사 중합체의 비에 의해 가교결합된 생성물의 개방성, 즉 물 투과성이 조정될 수 있기 때문이다. 이러한 방식으로, 이 실시 형태에 따른 재료의 특성은 세포/단백질 상호작용에 최적화되어 양호한 스캐폴드를 형성할 수 있다. 예를 들어, 탄성중합체가 실리콘계, 예를 들어, PDMS계인 경우, 물 및 다른 화합물(예를 들어, 약물)에 대해 고도로 투과성인 재료가 얻어지며, 이는 유체 장치 모듈(100)의 막 상의 세포로의 이들 화합물의 최대화된 관류를 촉진한다. 그러나, 세포에 의한 약물 소모의 실시간 모니터링이 바람직한 경우, 물 및 약물에 대해 비-투과성인 폴리부타디엔계 재료와 같은 폴리엔계 재료가 바람직할 수 있는데, 그 이유는 막을 관통하는 개구의 밀도를 사용하여 이들 화합물의 세포로의 관류 속도를 제어할 수 있기 때문이다.

[0052] 일 실시 형태에서, 폴리실록산은 폴리실록산의 조기 가교결합을 방지하기 위하여 앞서 설명된 바와 같은 다성분 출발 재료로부터 형성될 수 있다. 그러한 다성분 출발 재료는 그 자체로 잘 알려져 있으며; 예를 들어, 그러한 다성분 출발 재료 키트는 독일 뮌헨 소재의 와커 케미 아게(Wacker Chemie AG)에 의해 상표명 엘라스토실(Elastosil)로 시판된다.

[0053] 불포화 지방산(20)과 관련하여, 임의의 적합한 불포화 지방산이 이를 탄성중합체(10)와 가교결합시킬 목적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 불포화 지방산(20)은 미리스톨레산, 팔미톨레산, 사피엔산, 올레산, 엘라이드산, 박센산, 리놀레산, 리노엘라드산, α-리놀렌산, 아라키돈산, 에이코스펜타엔산, 에루스산 및 도코사헥사엔산으로부터 선택될 수 있다. 리놀레산이 본 발명의 실시예에서 사용되었지만, 이는 단지 비제한적인 예이며 다른 불포화 지방산이 대신에 사용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 본 출원의 맥락에서, 불포화 지방산(20)이 언급되는 경우, 이는 지방족 테일(tail) 내에 10 내지 30개의 탄소 원자 및 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 지방족 테일에 공유 결합된 카르복실산 헤드 기를 포함하는 임의의 유기 화합물을 지칭하고자 하는 것으로 이해되어야 한다. 지방족 테일은 비방향족 고리 구조, 예를 들어, 5원 또는 6원 사이클로펜틸 또는 사이클로헥실 기로 종결될 수 있으며, 이는 그 자체로 하나 이상의 이중 결합을 포함할 수 있다. 불포화 지방산(20)의 상기 정의에 속하도록 의도된 유기 화합물의 비제한적인 예는 레틴산이다. 본 출원에서 명시적으로 언급된 예시적인 화합물에 더하여 많은 다른 화합물이 숙련자에게 즉시 명백할 것이다.

[0054] 탄성중합체(10) 및 불포화 지방산(20)은 조성물 내에서 임의의 적합한 비로 혼합되어 벌크-개질된 탄성중합체를 형성할 수 있다. 바람직하게는, 불포화 지방산(20)은 탄성중합체(10)의 0.05 내지 35 중량%의 범위로 그러한 조성물에 존재하여, 탄성중합체(10)의 벌크 개질 시에 벌크-개질된 탄성중합체가 탄성중합체 벌크에서 탄소-탄

소 이중 결합의 남아 있는 존재에 대한 그의 유연성을 유지하도록 한다.

[0055] 폴리부타디엔과 같은 폴리엔으로부터 벌크-개질된 탄성중합체를 제조하기 위한 예시적인 합성 절차가 하기에 주어져 있다(합성예 1).

[0056] 합성예 1

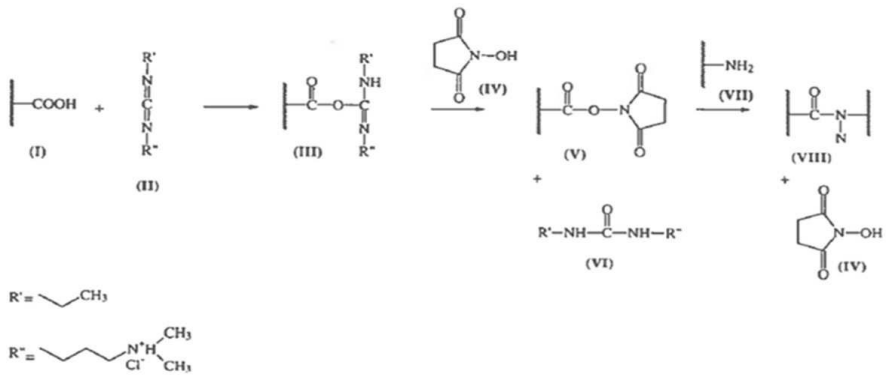
[0057] 독일 쾰른 소재의 랑세스 아게(Lanxess AG)로부터 입수되는 바와 같은 폴리부타디엔 청크(chunk)를 배합기(compounder) 또는 혼합 압출기 내에 삽입한다. 청크는 촉매로서 다이쿠밀퍼옥사이드와 같은 퍼옥사이드를 함유한다. 폴리부타디엔 청크의 중량 기준으로 1 내지 30 중량%의 범위의 양의 리놀레산(알드리치 케미스트리(Aldrich Chemistry)로부터 입수되는 바와 같이 60 내지 74% 농도)을 110 내지 150℃ 범위의 온도에서 혼련함으로써 폴리부타디엔 벌크 내에 혼합한다. 생성된 압출된 혼합물을, 150 내지 200℃ 범위의 온도에서 3 내지 10 분 동안 이 압출된 혼합물과 접촉하는 산화된 내부 표면을 갖고 유체 장치를 한정하는 스테인리스 강 금형 내로 주입하여, 리놀레산과 가교결합된 폴리부타디엔 고무의 모놀리식 유체 장치 모듈을 산출한다.

[0058] 실리콘 고무로부터 벌크-개질된 탄성중합체를 제조하기 위한 예시적인 합성 절차가 하기에 주어져 있다(합성예 2).

[0059] 합성예 2

[0060] 물 중 121 g의 소듐 리놀레에이트 용액(30 중량%)을 와커 케미 아게로부터의 엘라스토실 LR 3040의 실리콘 성분 A(240 g) 내에 혼합하고, 실온에서 진공 조건 하에 격렬하게 교반하여 조성물로부터 물을 증발시킨다. 생성된 혼합물을 (Pt-촉매를 포함하는) 와커 케미 아게로부터의 엘라스토실 LR 3040의 성분 B(277 g)와 혼합하고 사출 성형 장치 내로 공급하는데, 생성된 혼합물과 접촉하는 산화된 내부 표면을 갖고 유체 장치를 한정하는 스테인리스 강 금형 내로 이 생성된 혼합물을 주입하고 150 내지 200℃ 범위의 온도에서 10 내지 60초 동안 성형하여 소듐 리놀레에이트와 가교결합된 실리콘 고무의 모놀리식 유체 장치 모듈을 산출한다. 더 높은 농도의 여분의 소듐 리놀레에이트 가교결합제(폴리메틸하이드로실록산)를 반응 혼합물에 첨가하여 불포화 지방산의 과도한 이중 결합이 전환율을 감소시키는 것을 방지할 수 있다. 후속하여, 성형물을 수성 HCl 용액(pH 2 내지 4) 중에 적하하여 성형물의 표면에서 적어도 탄산나트륨 기를 유리 카르복실산 기로 전환시킨다.

[0061] 그렇게 벌크-개질된 탄성중합체는 그의 표면 상의 유리 카르복실산 기를 피브로넥틴, 콜라겐 또는 엘라스틴과 같은 세포 배양 단백질과 반응시킴으로써 생체적합성으로 될 수 있다. 이는 도 2에 개략적으로 도시되어 있는데, 여기서 세포 배양 단백질(40)은 벌크-개질된 탄성중합체(30)의 표면(31)으로부터 연장되는 지방산 테일(33)의 유리 카르복실산 기에 결합되어 세포 배양 스캐폴드를 형성할 수 있다. 그러한 세포 배양 스캐폴드의 세포 배양 단백질(40)은 세포(50)가 장기간에 걸쳐 살아남아 있고 정상적으로 증식되도록 포유류 세포 또는 조직(50), 예를 들어 인간 조직을 안정화시킬 수 있는데, 그 이유는 세포 배양 단백질(40)이 그 자체로 잘 알려진 바와 같이 그러한 세포의 자연적인 환경을 모방하기 때문이다. 피브로넥틴을 표면 카르복실산 기에 공유 결합시키기 위한 잘 문서화된 결합 프로토콜이 하기에 주어진다:



[0062]

[0063] 이러한 프로토콜의 설명은 문헌[L.H.H.Olde Daminnk, P,J,Dijkstra, M.J.A.Luyn, P.B.v.Wachem, P.Nieuwenhuis, and J.Feijen, "Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide", Biomaterials, 17(8) pp. 765-774 (1996)]에서 찾아볼 수 있다.

[0064] 이러한 프로토콜에서는, 카르복실산 기(화합물 I)를 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카르보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC, 화합물 II)와 반응시킨 후에 N-하이드록시석신이미드(NHS, 화합물 IV)와 반응시키는데, 이

는 피브로넥틴(화합물 VII)의 아민 기와 반응하여 피브로넥틴을 벌크-개질된 탄성중합체(30)의 카르복실산 기에 공유 결합시킬 수 있다. 이러한 방식으로, 피브로넥틴은 포유류 세포를 보유 및 배양하기 위한 스캐폴드를 형성할 수 있다. 그 자체로 잘 알려진 바와 같이, 그러한 세포의 인테그린 수용체는 피브로넥틴의 특정 아미노산 서열, 예를 들어, Arg-Gly-Asp-Ser 서열과 같은 서열을 인식할 수 있으며, 이는 세포가 새로운 환경을 받아들이고 살아있는 상태로 유지되게 한다. 앞서 설명된 바와 같이, 그러한 스캐폴드는 벌크-개질된 탄성중합체(30)의 표면, 예를 들어 유체 장치의 막의 표면의 커버리지(coverage)의 관점에서 그러한 표면을 가로지르는 카르복실산 기의 고밀도 균질 분포로 인해 높은 균일성으로 형성될 수 있다.

[0065] 유체 장치 모듈(100)의 서로 마주보는 주 표면들의 사시도가 개략적으로 도시되어 있는 도 3 및 도 4에 유체 장치 모듈(100)의 전형적인 예가 개략적으로 도시되어 있다. 유체 장치 모듈(100)은 막(110)을 포함할 수 있으며, 그 위에서 하나 이상의 유동 채널(115)이 연장된다. 바람직하게는, 유체 장치 모듈(100)은 막(110)에 의해 공간적으로 분리된 서로 마주보는 유동 채널들을 포함한다. 적어도 막(110)이 벌크-개질된 탄성중합체(30)로 제조되지만, 바람직한 실시 형태에서 전체 유체 장치 모듈(100)이 벌크-개질된 탄성중합체(30)로 제조되어, 모놀리식 유체 장치 모듈(100)을 생성한다.

[0066] 유체 장치 모듈(100)은 하나 이상의 격막(120)을 포함할 수 있으며, 그를 통해 그러한 유동 채널(115)들이 접근될 수 있다. 각각의 유동 채널(115)은 바람직하게는 다수의 유동 채널(115)들 사이의 교차-오염을 피하도록 격막(120)들의 전용 세트를 통해 접근가능하다. 상기에 설명된 바와 같이, 유체 장치 모듈(100)은, 세포(50)가 생체적합성 막(110)의 그렇게 형성된 세포 배양 스캐폴드 상에서 배양될 수 있도록, 상기에 설명된 바와 같은 막(110) 상의 카르복실산 기를 반응시켜 세포 배양 단백질, 예를 들어, 피브로넥틴, 콜라겐 또는 엘라스틴을 막(110)에 공유 결합시킴으로써 생체적합성으로 될 수 있다. 그러한 세포 배양 단백질을 포함하는 생체적합성 막에 대한 그러한 세포 고정화 절차는 그 자체로 잘 알려져 있기 때문에, 단지 간결함을 위해 추가로 상세하게 설명하지 않을 것이다. 임의의 적합한 프로토콜이 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다고 말하는 것으로 충분하다.

[0067] 막(110)은 잠재적인 약물과 같은 화합물을 갖는 용액 및 액체 영양분이 막의 양쪽 면 및 세포/조직에 도달할 수 있도록 복수의 구멍들 또는 홈들을 포함할 수 있으며, 이러한 구멍들 또는 홈들은 임의의 적합한 방식으로, 예를 들어 레이저 절삭을 통해 형성될 수 있다. 막(110)이 상기에 설명된 바와 같이 생체적합성으로 될 수 있기 때문에, 이러한 구멍들 또는 홈들의 크기 및 피치는, 구멍들 또는 홈들이 세포 재료를 고정화 및 배양하는 데 사용되는 종래 기술의 장치에서보다 덜 중요하다. 다시 말하면, 유체 장치 모듈(100)의 막(110)내의 그러한 구멍들 또는 홈들은 막(110) 상에 고정화될 세포의 전형적인 직경보다 실질적으로 더 클 수 있으며, 그러한 구멍들 또는 홈들 사이의 피치는 특별히 중요하지 않다.

[0068] 도 5에 개략적으로 도시된 바와 같은 유체 장치(200)는 한 쌍의 커버 플레이트(210, 220)들의 제공에 의해 그러한 유체 장치 모듈(100)로부터 형성될 수 있으며, 그러한 커버 플레이트들은 유체 장치 모듈(100)의 하나 이상의 유동 채널(115)을 통과한 유체가 유체 장치(200) 밖으로 누출될 수 없도록 유체 장치 모듈(100)을 유체 밀봉한다.

[0069] 일 실시 형태에서, 커버 플레이트(210, 220)들은 커버 플레이트(210)가 유체 장치 모듈(100)의 제1 주 표면을 덮어서 유체 장치 모듈의 제1 유체 채널(115)을 밀봉하고 다른 커버 플레이트(220)가 유체 장치 모듈(100)의 제2 주 표면을 덮어서 유체 장치 모듈의 제2 유체 채널(115)을 밀봉하도록 배열된다. 커버 플레이트(210, 220)들은 임의의 적합한 재료, 예를 들어 유리 또는 플라스틱 재료로 제조될 수 있다. 바람직하게는, 커버 플레이트들은 유체 장치(200)에서 유체 장치 모듈(100)의 가요성을 유지하면서 유체 장치 모듈(100)과의 양호한 끼워맞춤을 보장하도록 신축성이 있고 가요성이다. 그러한 유체 장치(200)는 당업자에 의해 용이하게 이해되는 바와 같이 장기칩으로서 활용될 수 있다.

[0070] 도 6은 유체 장치(200)의 예시적인 실시 형태를 개략적으로 도시하는데, 여기서 장치는 2개의 강성 커버 플레이트(210, 220)들 사이에 본 발명에 따른 유체 장치 모듈(100)을 포함한다. 상부 플레이트(210)는 유체 장치 모듈(100) 내의 막(110) 아래의 하부 채널(보이지 않음)과 유체 연통하는 제1 입구(231) 및 제1 출구(232)를 포함하여 막(110)이 이러한 하부 채널을 통과하는 유체와 유체 접촉하게 한다. 상부 플레이트(210)는 막(110) 위의 상부 채널(115)과 유체 연통하는 제2 입구(233) 및 제2 출구(234)를 추가로 포함하여 막(110)이 이러한 상부 채널(115)을 통과하는 추가의 유체와 유체 접촉하게 한다. 예를 들어, 하부 채널을 통과하는 유체는 하기에 더욱 상세히 설명되는 바와 같이 막(110)에 부착된 세포 배양물에 대해 시험될 약물을 포함할 수 있으며, 이러한 약물은, 예를 들어, 앞서 설명된 바와 같이 막(110)에 구멍들 또는 홈들을 레이저 드릴링함으로써 막(110)이 다공

성으로 된다는 사실로 인해, 막(110)을 통해 세포 배양물에 도달할 수 있다. 대안적으로, 그러한 구멍들 또는 홈들은 극성 금형 내에서 유체 장치 모듈(100)을 형성할 때 막(110)에 형성될 수 있다. 이는 그러한 유체 통로(기공)의 규칙적인 패턴이 막(110)을 관통하여 형성될 수 있다는 이점을 갖는다. 상부 채널(115)을 통과하는 추가의 유체는 그러한 세포 배양물과 직접 접촉할 수 있고 그러한 세포 배양물에 영양소를 제공할 수 있다. 일부 실시 형태에서 입구(231, 233) 및 출구(232, 234)는, 예를 들어 격막을 가압함으로써, 유체가 전술한 채널을 통해 막(110) 위로 유압식으로 펌핑될 수 있는 격막이다. 대안적으로, 입구(231, 233) 및 출구(232, 234)는, 예를 들어 유체 장치(200)가 랩 온 칩 시스템(lab on chip system)에서 웰 플레이트 등으로 사용될 때 유용한, 튜빙이 부착될 수 있는, 예컨대 클램핑될 수 있는 페룰(ferrule)일 수 있다.

[0071] 일 실시 형태에서, 상부 채널 및 하부 채널은 예를 들어 유체 장치 모듈(100)을 성형할 때 (모놀리식) 유체 장치 모듈(100) 내에 통합된다. 대안적으로, 상부 채널 및 하부 채널 중 하나 이상이 커버 플레이트들 중 하나에 형성될 수 있다. 도 7은 상부 채널(115)이 상부 커버 플레이트(210) 내에 형성되고 하부 채널(115')이 유체 장치 모듈(100) 내에 형성된 유체 장치(200)의 예시적인 실시 형태의 상부 사시도를 개략적으로 도시하고, 도 8은 이의 하부 사시도를 개략적으로 도시한다. 물론, 당업자에 의해 용이하게 이해되는 바와 같이 하부 커버 플레이트(220) 내에 하부 채널(115')을 형성하는 것이 마찬가지로 실현 가능하다. 도 7 및 도 8에 도시된 장치와 같은 유체 장치(200)는 예를 들어 랩 온 칩 장치에서 마이크로웰로서 사용될 수 있으며, 여기서, 복수의 그러한 마이크로웰들은 단일 랩 온 칩 장치 내에 복수의 상이한 샘플들의 평행 시험을 용이하게 하도록 클램핑되거나 달리 고정될 수 있으며, 각각의 마이크로웰은 전형적으로 이러한 샘플들 중 하나를 포함한다.

[0072] 그러한 유체 장치(200) 내에 세포 배양물(50)을 고정화할 때, 전형적으로 막(110)이 상기에 설명된 바와 같이 생체적합성으로 된 후에, 유체 장치(200)는 관심 화합물을 포함하는 유체에 고정화된 세포 배양물(50)을 노출시키는 방법에 사용될 수 있는데, 이러한 유체는 고정화된 세포 배양물(50)을 유체 내의 관심 화합물에 노출시키고 그러한 노출에 대한 고정화된 세포 배양물(50)의 반응을 모니터링하기 위해 유체 장치(200)의 유동 채널(115)에 통과될 수 있다. 예를 들어 그러한 방법은, 그러한 약물에 대한 고정화된 세포 배양물(50)의 반응을 모니터링하기 위하여, 고정화된 세포 배양물(50)이 약물, 예를 들어 화학요법 약물에 노출될 수 있는 종양학적 환경에서 활용될 수 있다. 이를 위해, 고정화된 세포 배양물(50)은 약물의 효능을 시험하기 위하여 종양 세포를 포함할 수 있고/있거나 건강한 조직 상의 약물의 독성을 시험하기 위하여 건강한 세포를 포함할 수 있다.

[0073] 그러한 약물 시험 방법은 전형적으로 본 발명의 하나 이상의 실시 형태에 따른 유체 장치 모듈(100)을 제공하는 단계, 예를 들어 모놀리식 유체 장치 모듈(100)을 제공하고 유체 장치 모듈(100)의 적어도 막(110)을 세포 배양 단백질(40), 예를 들어 피브로넥틴에 결합시켜 세포 배양 스캐폴드를 얻는 단계를 포함한다. 다음으로, 수확된 세포 배양물(50)을 세포 배양 스캐폴드에 도포하여 준비된 유체 장치 모듈(100)을 얻는데, 이로부터 앞서 설명된 바와 같이 유체 장치(200), 예를 들어 장기칩이 형성된다. 세포 배양물을 살아있는 채로 유지하기 위해 유체 장치(200)의 한 쌍의 유동 채널(115)들 중 하나를 통해 유체 장치(200) 내의 세포 배양물을 공급할 수 있는 한편, 유체 장치(200)의 한 쌍의 유동 채널(115)들 중 다른 하나를 통해 시험될 약물에 세포 배양물을 노출시킬 수 있으며, 약물 시험 방법은 전형적으로 시험될 약물에 대한 세포 배양물(50)의 반응을 모니터링함으로써 완료된다. 이는 예를 들어 커버 플레이트(210, 220)들을 제거하여 유체 장치(200)를 분해하고, 유체 장치 모듈(100)을 슬라이싱하여 세포 배양물(50)의 일부분을 포함하는 이러한 모듈의 슬라이스가 얻어지도록 함으로써 달성될 수 있으며, 이러한 슬라이스는 세포 배양물(50)에 대한 시험 하에서 약물의 효과를 조사하기 위해 현미경 등 하에서 조사될 수 있다. 그러한 조사 동안, 세포 배양물(50)은 그러한 현미경 조사를 용이하게 하기 위해 전형적으로 염색되고, 포르말린으로 처리되고, 파라핀과 같은 고정제 내에 고정된다. 세포 배양물(50)의 그러한 염색, 처리 및 고정은, 예를 들어 세포 배양물(50)이 노출되는 유체 장치(200)의 유체 채널(115)을 통해 적절한 화학 제제를 통과시킴으로써 유체 장치(200) 내에서 활용될 수 있다.

[0074] 대안적인 실시 형태에서, 유체 장치(200)의 그러한 분해는 피할 수 있으며, 시험될 약물과 같은 하나 이상의 화합물에 대한 세포 배양물(50)의 반응의 모니터링은 공초점 현미경을 사용하여 실시간으로 달성될 수 있다. 특히, 유체 장치(200)의 실시 형태들이 투명 커버 플레이트(210, 220)들, 예를 들어 유리 플레이트들 또는 중합체 플레이트들을 포함하는 경우, 조립된 유체 장치(200) 내의 세포 배양물(50)을 모니터링하기 위해 공초점 현미경이 사용될 수 있다. 이는 적어도 하부 커버 플레이트(220)가 얇게, 예를 들어 150 내지 300 μm 범위의 두께로 유지될 수 있고, 세포 배양물(50)을 보유하는 유체 장치 모듈(100)의 막(110)과 하부 커버 플레이트(220) 사이의 거리는 200 μm 미만이어서, 공초점 현미경의 초점 거리 한계(전형적으로 조사할 물체로부터 대물렌즈까지 대략 500 μm)라는 사실을 통해 가능하게 된다. 이를 위해, 막(110)은 10 내지 100 μm 범위의 두께, 예를 들어 20 내지 30 μm의 두께를 가질 수 있다. 상부 커버 플레이트(210)의 두께는 중요하지 않으며; 300 μm 내지

3 mm의 두께와 같은 임의의 적합한 두께가 고려될 수 있다.

[0075] 공초점 현미경을 이용한 유체 장치(200) 내의 세포 배양물(50)의 평가는, 공초점 현미경으로 선명한 이미지를 캡처하는 것을 용이하게 하는 광학 경로의 전체 초점 거리를 보장하도록, 세포 구상체의 직경이 500 μm 미만, 예를 들어 약 200 μm인 경우에 특히 적합하다. 더 큰 구상체의 경우, 공초점 현미경의 광학 대물렌즈에서 구상체를 포함하는 막(110)이 배치용 유리 커버 슬립 상으로 가압될 수 있도록 유체 장치(200)를 분해해야만 할 수 있다.

[0076] 유체 장치(200)의 전술된 치수들이 전형적으로 유체 장치(200) 내의 세포 배양물(50)의 실시간 모니터링 동안 적용된다는 것에 또한 유의한다. 유체 장치(200)가 앞서 설명된 바와 같이, 예를 들어 디지털 병리(digital pathology)를 위해 슬라이싱되는 실시 형태에서, 유체 장치 상에서 포르말린 및 파라핀 고정이 수행될 수 있는 한 유체 장치(200)의 치수는 덜 중요하다.

[0077] 당업자에 의해 용이하게 이해되는 바와 같이, 그러한 약물 시험 방법은 프로토콜, 예를 들어 약물 투여량, 투여 빈도 등의 관점에서 상당히 상이할 수 있다. 본 발명의 약물 시험 방법은, 앞서 설명된 바와 같이 막의 카르복실산 기를 세포 배양 단백질과 반응시켜 막을 세포 배양 스캐폴드로 전환시킴으로써 적어도 막(110)이 생체적합성으로 되는 본 발명의 일 실시 형태에 따른 유체 장치(200)를 사용하여 그러한 방법이 활용될 수 있는 한 특정 프로토콜로 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다.

[0078] 이때, 불포화 지방산(20)의 탄소-탄소 이중 결합과 탄성중합체(10) 사이의 가교결합 반응뿐만 아니라, 그러한 벌크-개질된 탄성중합체(의 카르복실산 기)에 대한 피브로넥틴의 성공적인 결합에 대한 보충적인 증거가 제공된다.

[0079] 그 후에, 가열가능한 골든 게이트(Golden Gate) ATR 모듈과 조합하여 써모(Thermo) iS50 FTIR 벤치를 사용하여 FT-IR 스펙트럼을 기록하였다. 64회 스캔의 평균을 모든 측정에 사용하였다. 측정에서는, 4000 내지 650 cm^{-1}의 스펙트럼 범위를 사용하여 해상도를 4 cm^{-1}로 설정하였다. 그러한 해상도가 사용될 수 있도록 하기 위해, 내부 분광계 조리개를 50%로 설정하였다.

[0080] 코히어런트 이노바(Coherent Innova) 70C Ar^{+} 레이저에 의해 제공되는 514 nm의 레이저 여기 파장과 조합된 레니쇼 인비아(Renishaw InVia) 라만 현미경을 사용하여 라만 스펙트럼을 기록하였다. 50 mW 여기 출력을 63x 유리 보정 대물렌즈와 조합하여 사용하였다. 각각의 스펙트럼이 기록되는 데 600초가 걸리도록 평균 300개의 스펙트럼을 사용하여 662 내지 3,000 cm^{-1}의 스펙트럼 범위에 걸쳐 2초의 적분 시간으로 그리고 1200개 라인/mm으로 이루어진 격자를 사용하여 유리 상부 커버를 통해 스펙트럼을 기록하였다.

[0081] 도 9는 소듐 리놀레에이트의 FT-IR 스펙트럼의 일부를 도시한다. 실선 화살표는 소듐 리놀레에이트의 C-C 이중 결합에 할당된 대략 3,050 cm^{-1}에서의 C-H 신축 진동을 나타내는 한편, 점선 화살표는 소듐 리놀레에이트의 카르복실레이트 기에 할당된 대략 1600 cm^{-1}에서의 C=O 신축 진동을 나타낸다. 도 10은 전술한 합성예 2에 따른 반응의 진행을 모니터링하는 동안 시간의 함수로서 이러한 C-H 신축 진동의 강도와 C=O 신축 진동의 강도 사이의 비를 도시한다. 샘플들을 200℃로 가열하여 가교결합 반응을 유도하면서 2개의 석영 플레이트들 사이에서 샘플들을 기록하였다. 도 10으로부터 명확하게 알 수 있는 바와 같이, 가교결합 반응 동안 소듐 리놀레에이트 내의 C-C 이중 결합의 감소가 보일 수 있는 반면 카르복실레이트 신축 진동 강도는 변경되지 않은 채로 유지되며, 이는 가교결합 반응 동안 C-C 이중 결합이 소모되고 있다는 명확한 표시를 제공하여, 소듐 리놀레에이트와 실리콘 탄성중합체 사이의 가교결합을 명확하게 시사한다.

[0082] 이를 추가로 확증하기 위하여, 가교결합 반응에 대한 환경적 산소의 영향을 최소화하도록 FT-IR 스펙트럼의 기록을 위해 사용된 것과 동일한 샘플 셋업을 사용하여, 가교결합 반응을 라만 분광법으로 추가로 모니터링하였다. 라만 스펙트럼에서, C=O 신축 진동은 비활성이었던 반면, C=C 신축 진동은 도 11에 도시된 바와 같이 명백한 활성을 나타내었다.

[0083] t = 250초까지의 샘플의 초기 열 안정화 시에(그 동안에 샘플은 라만 분광법에 사용되는 레이저로 열적으로 평형화됨), 라만 스펙트럼은 소듐 리놀레에이트의 C=C 신축 진동의 꾸준한 감소를 나타내어, 이들 결합이 실리콘 탄성중합체와의 가교결합에서 활성임을 명확하게 나타낸다.

[0084] 합성예 1 및 합성예 2에서의 탄성중합체의 벌크 개질을 추가로 입증하기 위하여, 리놀레산과의 반응 후 각 탄성

중합체의 블록을 앞서 설명된 바와 같이 극성 금형에서 성형하고, 후속하여 -40℃에서 마이크로톰(microtome)으로 슬라이싱하여 개질된 탄성중합체의 내부 슬라이스, 즉, 주 표면들 중 어느 것도 성형된 탄성중합체 블록의 외부 표면이 아닌 슬라이스를 얻었다. 후속하여, 이들 내부 슬라이스를 상이한 pH(pH 4, pH 7 및 pH 10)의 2 μl 물방울과 3분 동안 접촉시킨 후에 이들 내부 슬라이스와의 물방울의 접촉각을 측정하였다. 개질되지 않은 탄성중합체로 동일한 절차를 반복하여, 리놀레산 개질된 탄성중합체의 내부 슬라이스의 측정된 접촉각을 상응하는 개질되지 않은 탄성중합체의 내부 슬라이스의 측정된 접촉각과 비교하였다. 실리콘계 탄성중합체에 대한 결과가 도 12의 그래프에 나타나 있으며, 폴리부타디엔계 탄성중합체에 대한 결과가 도 13의 그래프에 나타나 있다. 실리콘계 탄성중합체의 경우, 6.6 중량%의 리놀레산을 사용하여 형성된 작용화된 탄성중합체를 벌크 접촉각 측정 및 표면 접촉각 측정 둘 모두에 사용한 반면에, 폴리부타디엔 탄성중합체의 경우에는, 6 중량%의 리놀레산을 사용하여 형성된 작용화된 탄성중합체를 표면 접촉각 측정에 사용하였고, 1.5 중량%의 리놀레산을 사용하여 형성된 작용화된 탄성중합체를 벌크 접촉각 측정에 사용하였다. 폴리부타디엔 탄성중합체에 대한 표면 접촉각 측정과 벌크 접촉각 측정 사이의 리놀레산 농도의 차이는 단지 측정 시점의 샘플의 이용가능성의 결과이다.

[0085] 이들 그래프로부터 알 수 있는 바와 같이, 리놀레산과 가교결합된 폴리부타디엔의 내부 슬라이스 및 (비누화된) 리놀레산과 가교결합된 실리콘의 내부 슬라이스 둘 모두는 pH가 증가함에 따라 측정되는 접촉각이 감소하는 측정된 접촉각의 강한 pH 의존성을 나타낸 반면, 개질되지 않은 폴리부타디엔 및 실리콘의 측정된 접촉각은 대체로 pH 독립적이었다. 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, pH가 증가함에 따른 비작용화된 실리콘에 대해 측정된 접촉각의 작은 증가는 실리콘 내의 물 분자와 실라놀 모이어티 사이의 수소 결합에 대한 pH 의존성의 결과일 수 있다.

[0086] 작용화된 탄성중합체의 벌크에 대한 측정된 접촉각의 강한 pH 의존성은 리놀레산과 같은 불포화 지방산과 가교결합된 탄성중합체의 벌크 내의 카르복실산 기의 존재를 명확하게 입증한다. 이는 하기와 같이 이해될 수 있다. 더 낮은 pH에서, 그러한 카르복실산 기는 대체로 양성자화되어, 탄성중합체의 내부 슬라이스의 표면 전하를 최소화한다. pH가 증가함에 따라, 카르복실산 기의 증가된 탈양성자화로 인해 이러한 표면 전하가 증가하며, 이는 이들 내부 슬라이스의 표면과 물방울의 접촉각을 감소시킨다. 반면에, 예를 들어 개질되지 않은 탄성중합체에서와 같이, 물방울에 노출된 표면에 그러한 카르복실기가 존재하지 않는 경우, 물방울의 pH 변화는 표면 전하의 변화를 야기하지 않아서, 그러한 표면과 상이한 pH의 물방울의 측정된 접촉각은 이러한 pH 변화에 훨씬 덜 민감하다.

[0087] 피브로넥틴과 같은 세포 배양 단백질에 결합하는 본 발명의 재료의 능력을 추가로 입증하기 위하여, 재료의 예시적인 실시 형태를 피브로넥틴에 결합시키고, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 스펙트럼을 기록하여 이 결합 반응을 입증하였다.

[0088] SPR 실험은 독일 함부르크 소재의 시에라 센서스(Sierra Sensors)에 의해 제공되는 것과 같은 SPR2 분광계를 사용하여 n-헵탄 중의 폴리부타디엔 청크 및 리놀레산의 용액으로 스핀 코팅된 베어 금(bare gold) SPR 칩(베어 금 12 pk. SPR 친화도 센서, 독일 함부르크 소재의 시에라 센서스)에서 그리고 아민 SPR 칩(고용량 아민 칩 SPR 친화도 센서, 독일 함부르크 소재의 시에라 센서스)에서 수행하였다. 병을 진탕하면서 72시간에 걸쳐 70℃에서 유리 병 내에서 n-헵탄에 폴리부타디엔 청크를 용해시킨 후에, 리놀레산을 첨가하고 혼합물 내로 교반함으로써 용액을 제조하였다.

[0089] 유동을 관찰하고 플러싱 및 탈기에 의해 시스템을 안정화시킨 후에, 각도 스캔을 수행하여 모든 채널들 사이의 상관 관계를 확인하였다. 각도 스캔 데이터를 저장하였고, 그에 앞서 피브로넥틴 가교결합에 대한 에세이를 선행하였다.

[0090] 표면 위에 2가지 용액의 3개의 상을 주입함으로써 칩 표면을 사전 컨디셔닝하였다. 제1 주입은 10 μl/min의 유량 및 1초로 설정된 해리 시간의 60 μl의 100 mM 염산(HCl)으로 이루어졌다. 두 번째 주입은 10 μl/min의 유량 및 1초로 설정된 해리 시간의 1 M 염화나트륨(NaCl) 및 100 mM 수산화나트륨(NaOH)으로 이루어진 60 μl의 용출 완충액으로 이루어졌다. 제1 상은 채널 1 및 채널 2 위에 용액을 주입하는 것으로 이루어졌으며, 제2 상은 채널 3 및 채널 4 위에 용액을 주입하는 것으로 이루어진 반면, 제3 상 및 최종 상은 채널 1 내지 채널 4 위에 용액을 주입하는 것으로 이루어졌다.

[0091] 사전 컨디셔닝 후에 모든 채널들을 세정하고 EDC/NHS로 활성화시켰다. 이는 밀리큐 스톡(MilliQ stock) 중 9.6 mg/ml의 100 μl EDC(1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카르보다이이미드 하이드로클로라이드, 미국 세인트 루이스 소재의 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)) 및 100 μl NHS(N-하이드록시석신이미드, 미국 세인트 루이스

소재의 시그마-알드리치)를 함께 혼합하여 수행하였으며, 그 후에 60 μl의 혼합물을 1초의 해리로 10 μl/min의 유량으로 4개 모두의 채널에서 표면 상에 주입하였다.

[0092] 모든 채널들을 사전 컨디셔닝하고 EDC/NHS로 활성화시킨 후, 채널들에 10 μl/min의 유량으로 pH 5.5의 아세트산나트륨 완충액(벨기에 디에겜 소재의 비아코어(Biacore))에 용해된 소 혈장 분말(세포 배양물에 적합한 바이오 시약(Bio Reagent), 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마 알드리치)로부터의 60 μl의 피브로넥틴을 주입하였다. 채널 2에는 1초의 해리 시간으로 1 ㎍/ml 피브로넥틴을 주입하였고 채널 3에는 1초의 해리 시간으로 5 ㎍/ml 피브로넥틴을 주입하였고, 채널 4에는 1초의 해리 시간으로 10 ㎍/ml 피브로넥틴을 주입하였다(채널 1을 기준으로서 사용하였다).

[0093] 후속하여, 시스템의 4개의 채널 모두를 10 μl/min의 유량 및 1초의 해리 시간으로 60 μl 러닝 완충액(running buffer) PBS 0.05% 트윈(Tween)으로 플러싱하여, 피브로넥틴이 본 발명의 재료에 진정으로 결합되었는지를 결정하였다. 스펙트럼 데이터를 저장하고 분석기 프로그램(애널라이저(Analyzer) R2, 독일 함부르크 소재의 시에라 센서)으로 분석하였다.

[0094] 도 14는 리놀레산과 가교결합된 폴리부타디엔으로 제조된 유체 장치 모듈(100)을 포함하는 유체 장치(200)의 표면 플라즈몬 공명(SPR) 스펙트럼을 도시하며, 이러한 개질된 폴리부타디엔을 전술된 바와 같이 EDC 및 NHS와 반응시키고, 생성된 구조체를 피브로넥틴과 반응시켰다. SPR 스펙트럼으로부터 명확하게 알 수 있는 바와 같이, 피브로넥틴은 개질된 폴리부타디엔의 표면에 결합되고, 이에 의해 그러한 벌크-개질된 탄성중합체가 세포 배양 스캐폴드로 성공적으로 전환될 수 있음을 나타낸다. 도 15는 이러한 표면 개질이 명확하게 나타나 있는 도 14의 SPR 스펙트럼의 일부를 나타낸다. 나타나 있는 바와 같이, SPR 베이스라인이 대략 2,000 RU 만큼 이동되고, 따라서 리놀레산-개질된 폴리부타디엔에 대한 피브로넥틴의 결합을 명확하게 나타낸다. 더욱이, 유체 장치(200)가 노출되는 유체 스트림(플러싱) 하에서 SPR 스펙트럼이 안정하게 유지되었으며, 리놀레산이 이러한 절차 동안 세척되지 않았기 때문에, 리놀레산이 폴리부타디엔에 (공유 결합에 의해) 결합됨을 추가로 입증한다. 예상되는 바와 같이, 피브로넥틴과 본 발명의 재료 사이의 가장 강한 공유 결합이 피브로넥틴의 최고 농도(즉, 채널 4의 칩)에서 관찰되었다.

[0095] 다음으로, 채널 4의 칩에 대한 세포주 MDA-MB231 및 MCF-7의 결합을 조사하여, 공유 결합된 피브로넥틴이 그러한 세포주에 결합하는 능력을 입증하였다. 이를 위해, 전술한 SPR 절차를 채널 2 내지 채널 4(채널 1을 다시 기준으로서 사용함)에서 새로운 칩을 사용하여 반복하였으며, 그 위에 10 μl/min의 유량으로 1초의 해리 시간으로 60 μl의 10 ㎍/ml 피브로넥틴을 흘려 넣어 새로운 칩의 표면을 피브로넥틴으로 코팅하였다. 표면을 피브로넥틴 세포로 재코팅한 후에, 1 ml의 MDA-MB231당 $2*10^6$개의 세포를 10 μl/min의 유량 및 최대 1800초로 설정된 해리 시간으로 200 μl의 4회 주입 단계로 채널 2를 가로질러 유동시켜, 피브로넥틴에 결합하기에 충분한 시간을 세포에 제공하였다. 200 μl의 4회 주입 단계로 세포주 MCF-7 1ml당 $1.3*10^6$개의 세포를 사용하여 채널 4에 대해서 동일하게 수행하였다. 전체적으로, 칩 표면에 결합하도록 거의 2시간을 세포에 제공하였다. 후속하여, 세포를 10 μl/min의 유량 및 최대 해리 시간으로 채널 1 내지 채널4 위에 주입한 0.05% 트윈을 갖는 200 μl 러닝 완충액 PBS에 노출시켜 칩 표면에 결합되지 않은 임의의 세포를 플러싱하여 제거하였다. 10 μl/min의 유량 및 최대 해리 시간으로 채널 1, 채널 2, 채널 3 및 채널 4 위에 200 μl의 0.25% 트립신을 주입하여, 결합된 세포를 칩 표면으로부터 제거하였다.

[0096] 각각의 실험 후에, 시스템을 70% 에탄올로 플러싱하고, 1 내지 2% 차아염소산염으로 살균하고, 0.5% SDS, 50 mM 글리신-NaOH(pH 9.5)로 탈착시켜 시스템에서 오염물 또는 다른 오물 축적을 감소시킴으로써 SPR 기기를 세정하였다.

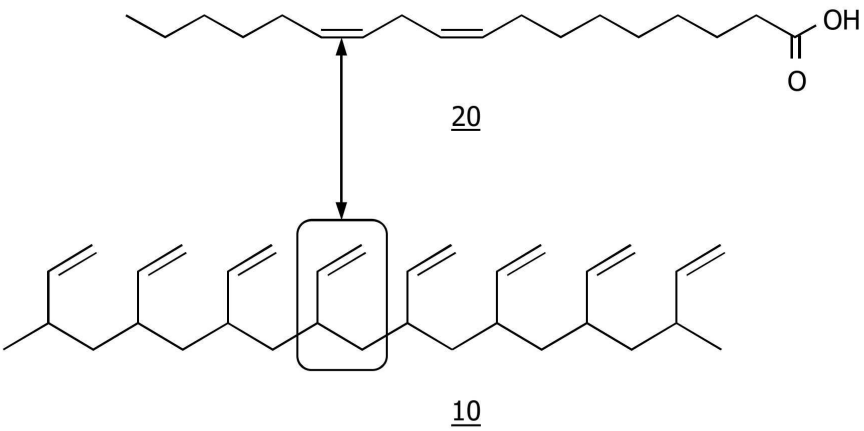
[0097] 도 16은 MDA-MB 231 및 MCF-7 세포주로부터의 세포로 장치를 시딩(seeding)한 후의 피브로넥틴-결합된 리놀레산-개질된 폴리부타디엔계 유체 장치(200)의 SPR 스펙트럼을 도시한다. 이들 세포주는 리놀레산-개질된 폴리부타디엔에 결합된 피브로넥틴에 부착됨을 알 수 있다. 러닝 완충액으로 장치를 플러싱하는 동안 세포는 유체 장치(200)에 부착된 채로 유지되지만, 트립신 용액에 의해 절단될 수 있었다. 따라서, 이는 피브로넥틴(및 결합된 세포)이 러닝 완충액에 의해 세척되지 않기 때문에, 피브로넥틴이 막 표면에 공유 결합 된 채로 세포가 장치의 막에 효과적으로 결합함을 명백하게 입증한다.

[0098] 전술된 실시 형태는 본 발명을 제한하기보다는 예시하며, 당업자는 첨부된 청구범위의 범주로부터 벗어남이 없이 많은 대안적인 실시 형태를 설계할 수 있을 것임에 유의하여야 한다. 청구범위에서, 괄호 안에 기재된 임의의 도면 부호는 청구항을 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 단어 "포함하는"은 청구항에 열거된 요소 또

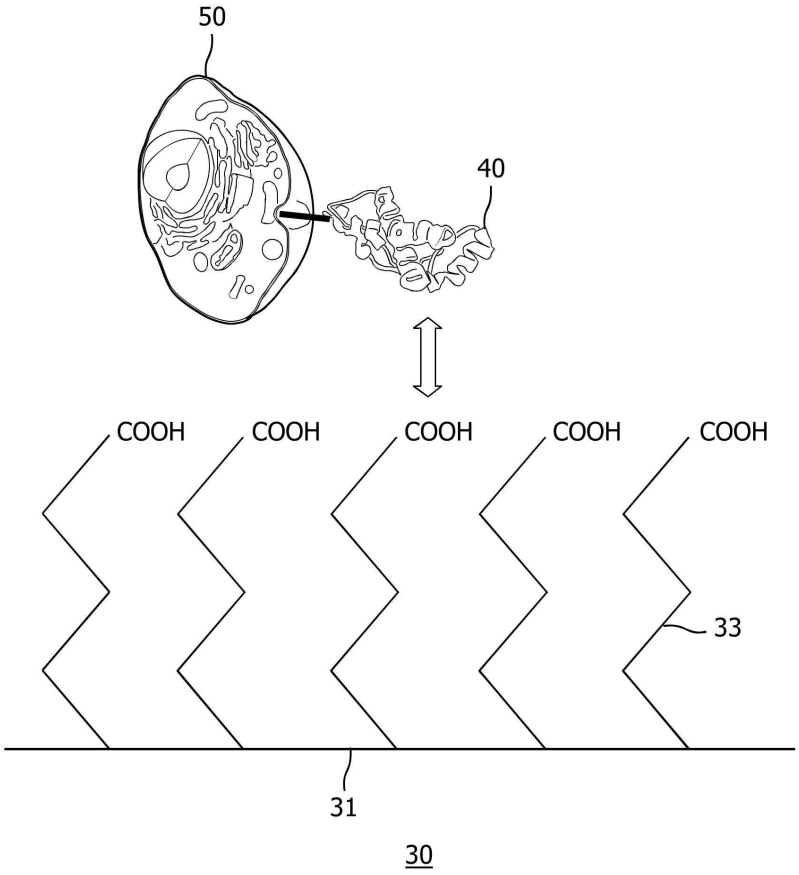
는 단계 이외의 요소 또는 단계의 존재를 배제하지 않는다. 요소에 선행하는 단수형 표현("a" 또는 "an")은 복수의 그러한 요소의 존재를 배제하지 않는다. 본 발명은 수개의 별개의 요소를 포함하는 하드웨어에 의해 구현될 수 있다. 수개의 수단을 열거하는 장치 청구항에서, 이들 수단 중 수개가 하드웨어의 하나의 동일한 항목에 의해 구현될 수 있다. 단순히 소정의 수단이 서로 상이한 종속항에 열거된다는 사실이 이들 수단의 조합이 유리하게 사용될 수 없다는 것을 나타내지는 않는다.

도면

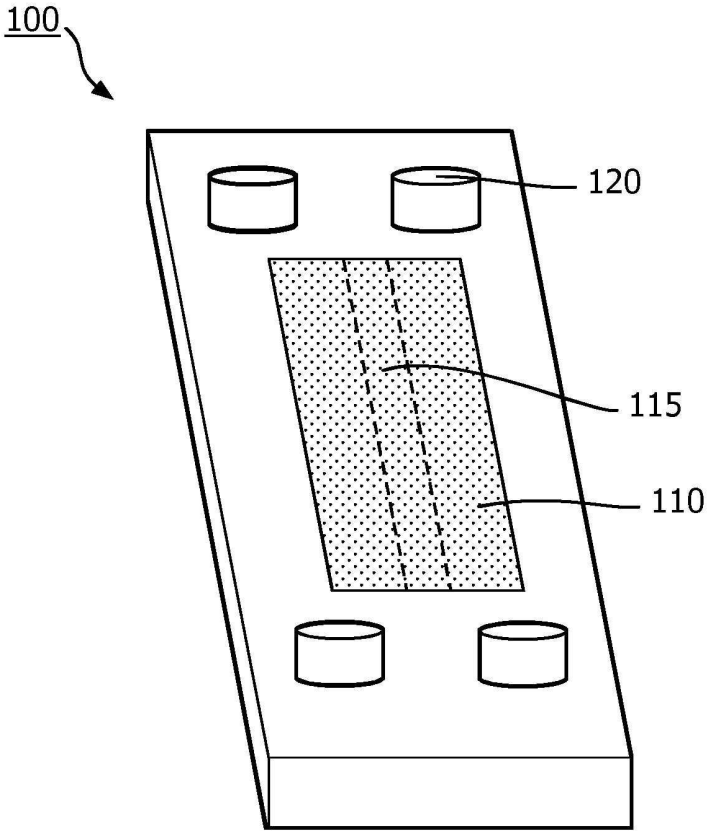
도면1



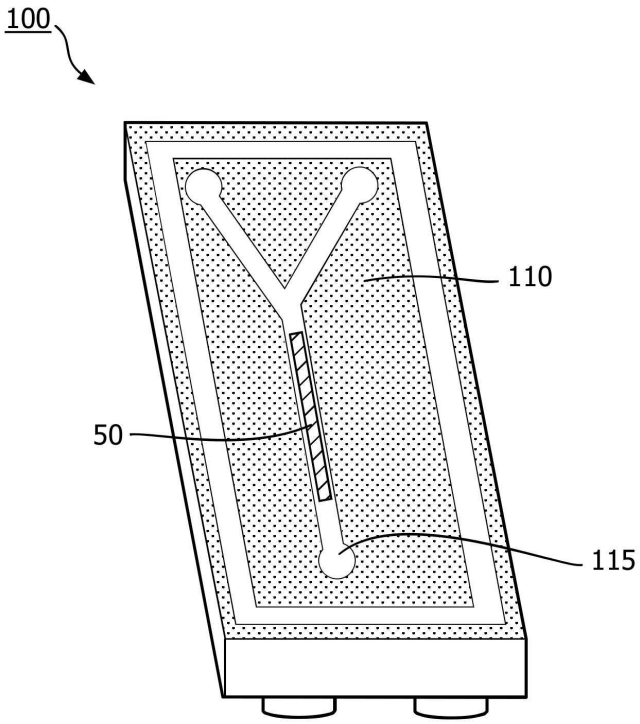
도면2



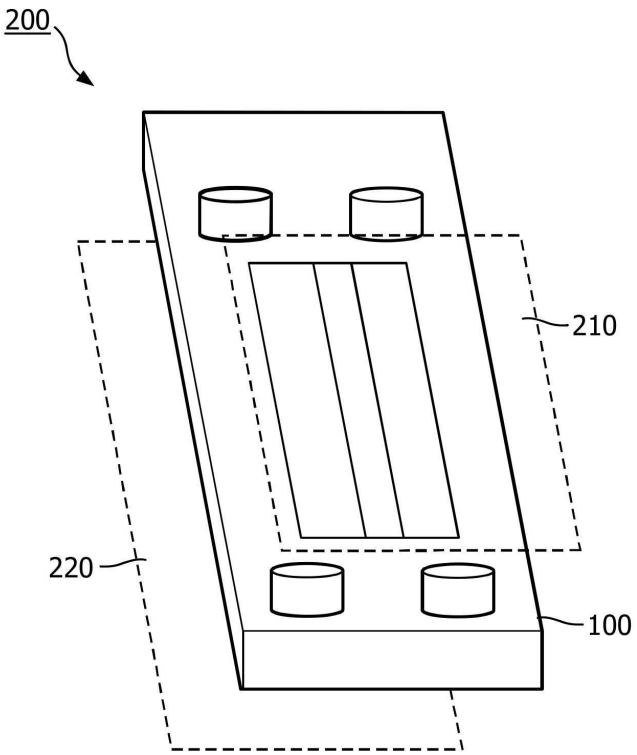
도면3



도면4

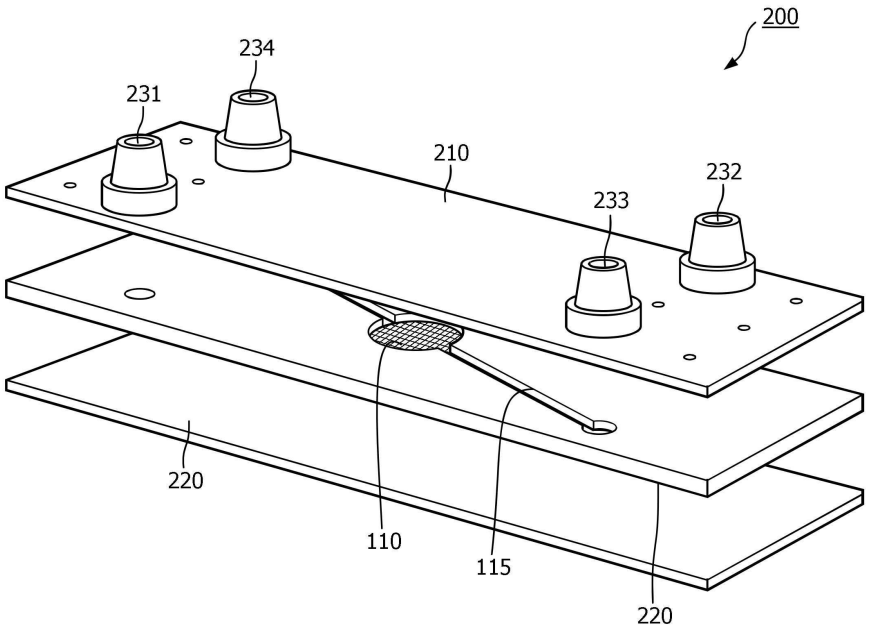


도면5

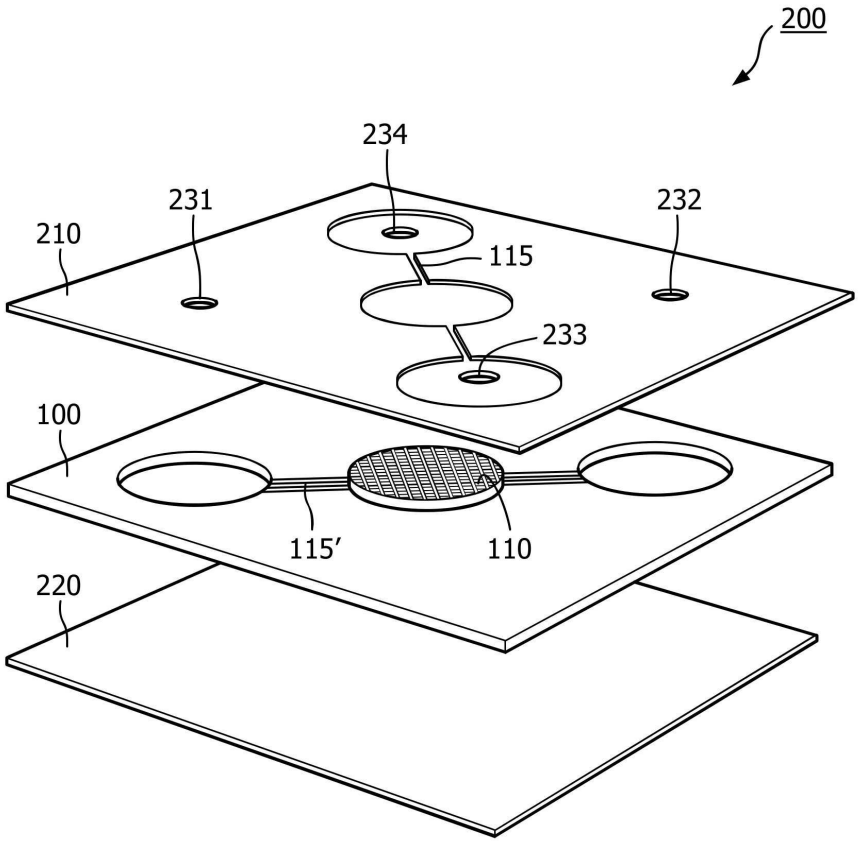


200

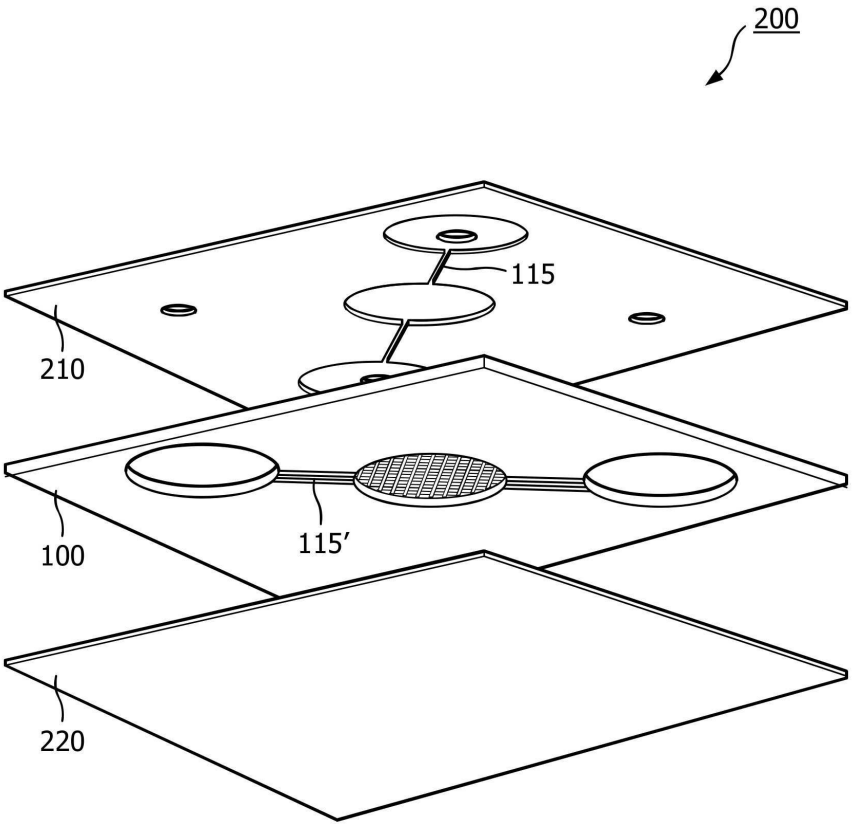
도면6



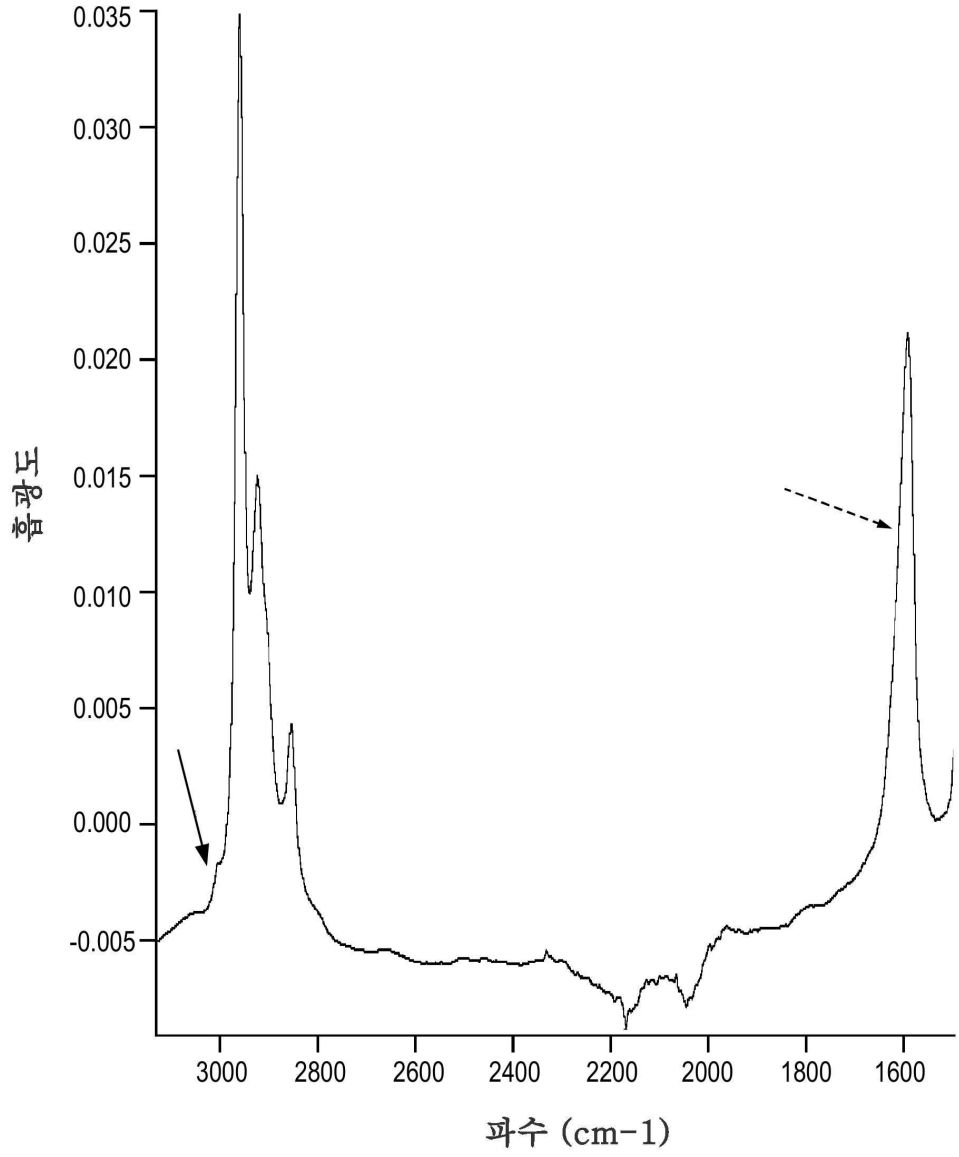
도면7



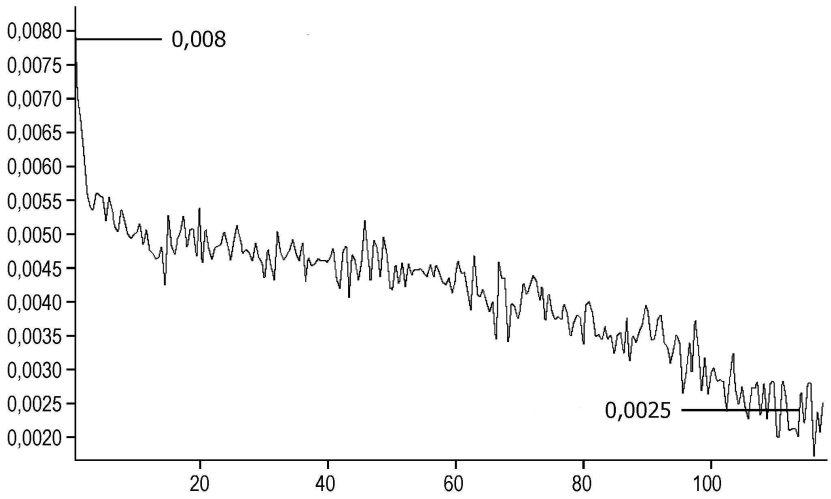
도면8



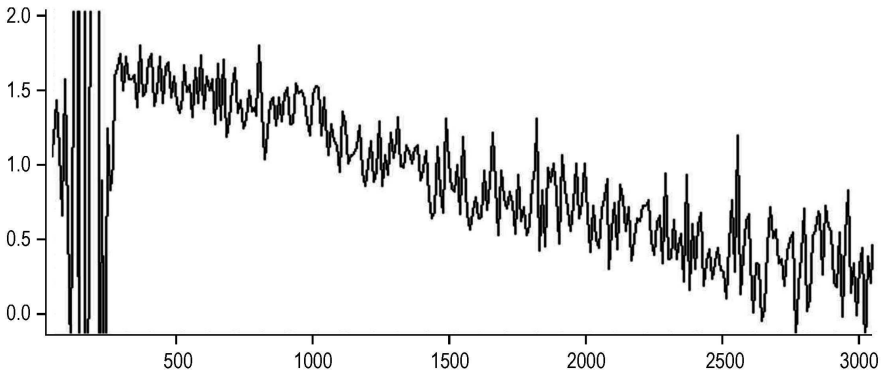
도면9


0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
-0.005
흡광도
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
파수 (cm-1)

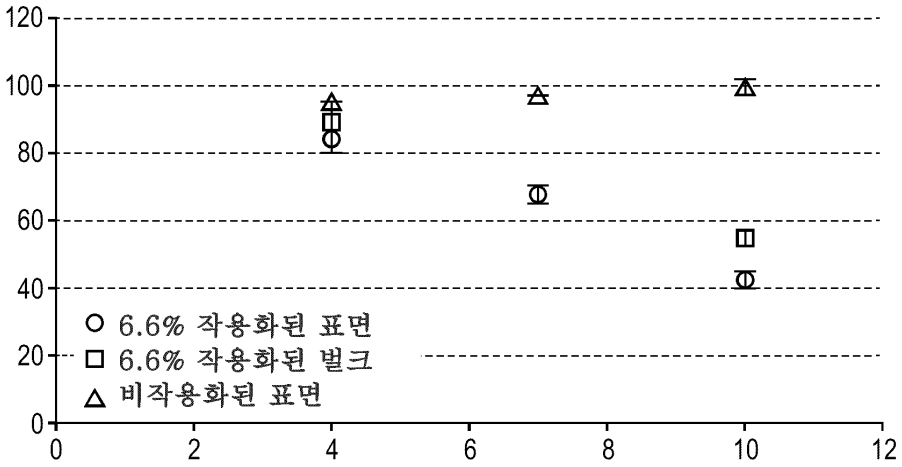
도면10


0,0080
0,0075
0,0070
0,0065
0,0060
0,0055
0,0050
0,0045
0,0040
0,0035
0,0030
0,0025
0,0020
0,008
0,0025
20
40
60
80
100

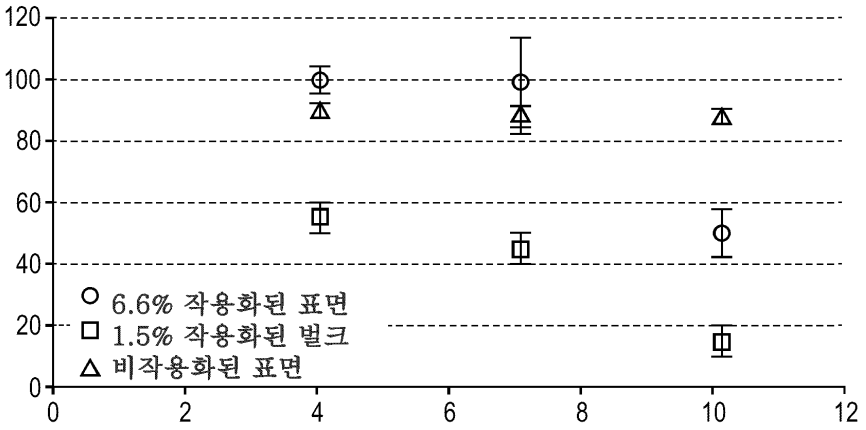
도면11


2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
500
1000
1500
2000
2500
3000

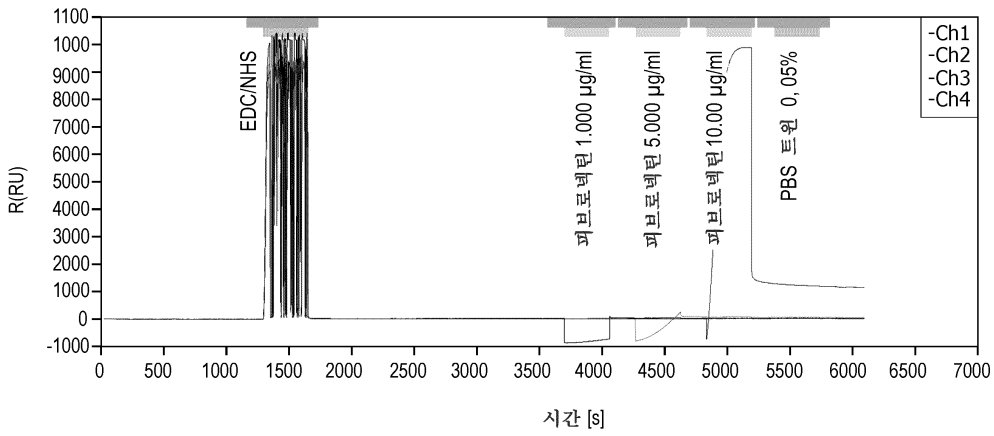
도면12



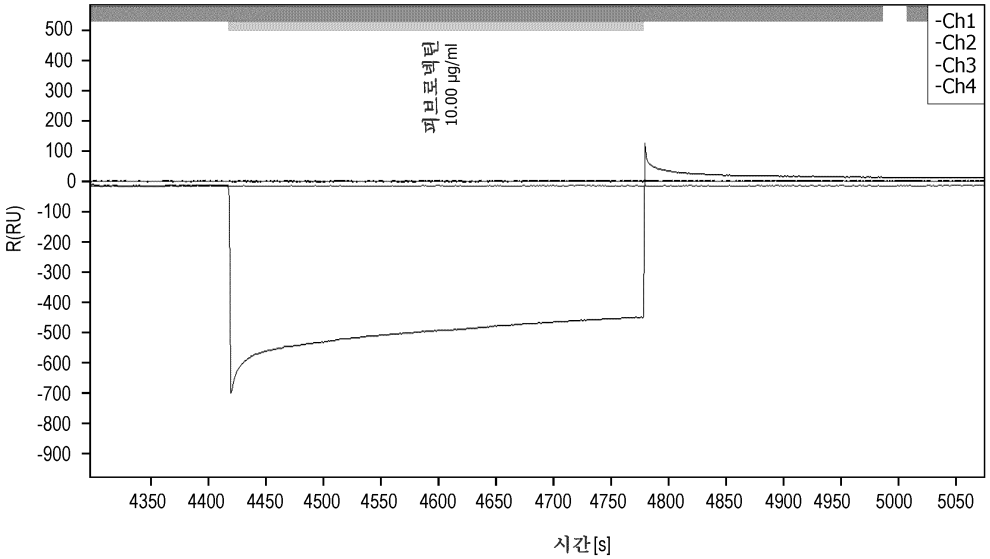
도면13



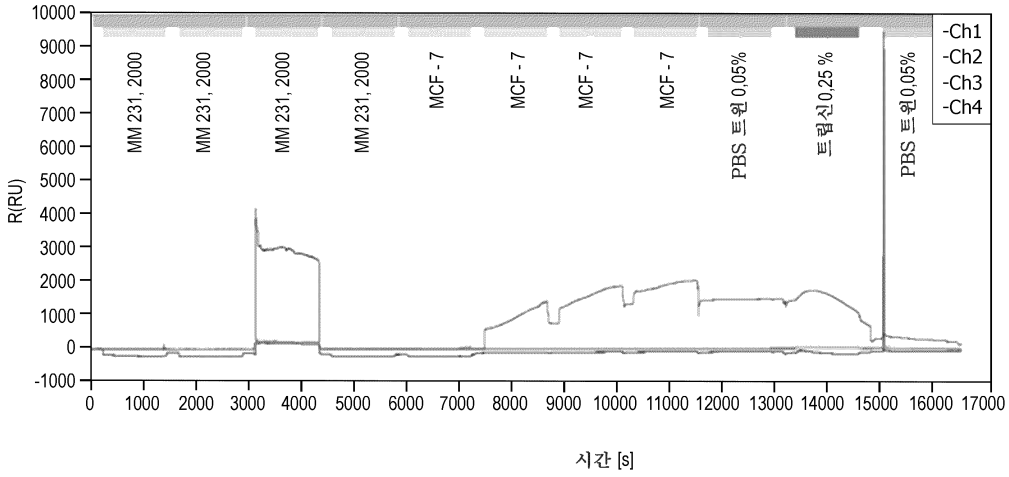
도면14



도면15


-Ch1
-Ch2
-Ch3
-Ch4
퍼브로넥틴
10.00 μg/ml
R(RU)
시간[s]

도면16


-Ch1
-Ch2
-Ch3
-Ch4
MM 231, 2000
MM 231, 2000
MM 231, 2000
MM 231, 2000
MCF - 7
MCF - 7
MCF - 7
MCF - 7
PBS 트윈 0,05%
트립신 0,25 %
PBS 트윈 0,05%
R(RU)
시간 [s]