(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년12월26일
(11) 등록번호 10-0875713
(24) 등록일자 2008년12월17일

(51) Int. Cl.
C12M 3/06 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0083842
(22) 출원일자 2007년08월21일
심사청구일자 2007년08월21일
(56) 선행기술조사문헌
US20060182738 A1
KR1020070023642 A
KR1020050021369 A

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
이상훈
경기도 안산시 단원구 고잔동 720(21/7) 호수공원 아파트 136-102
박중열
서울 송파구 신천동 7번지 장미아파트 5동 906호
(74) 대리인
이재인

전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 정재철

(54) 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치

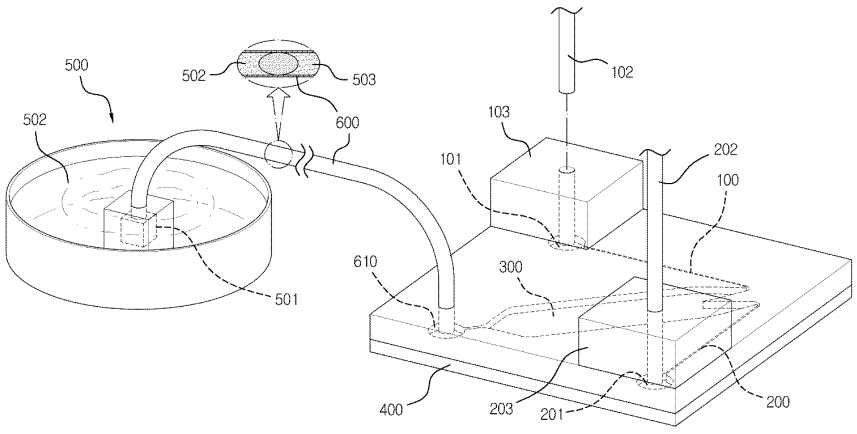
(57) 요 약

본 발명은 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치에 관한 것으로, 특히 세포의 약물에 대한 반응 그레이언트 프로파일을 얻거나 세포 주화성 연구에 필요한 정보를 얻기 위하여 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치를 개시한다.

본 발명의 PDMS(Polydimethylsiloxane)를 이용한 마이크로칩은 제 1주입구와 제 2주입구를 형성하고, 이와 제1가이드 채널과, 제2가이드 채널이 연통되도록 하며, 제 1, 2가이드 채널이 메인채널에서 합류되도록 하고, 유체 배출구로 배출되도록 하되, 유체 배출구를 삼투압펌프와 연결함과 아울러, 유체배출구와 삼투압펌프 사이를 순용매로 사용되는 물로 채운 배출관으로 연결하여서 된 것이다. 이에 따라, 본 발명은 마이크로 칩에서 요구되는 미세량의 펌핑이 가능할 뿐만 아니라, 펌핑 압력에 있어서 일체의 맥동이 전혀 없는 것이어서, 제 1, 2주입구 등 복수개로 주입된 물질간의 상호 반응 또는 메인채널에 미리 배치한 세포와 주입된 물질간의 반응에 관련하여 안정되고도 정확한 그레디언트 프로파일 데이터를 제공할 수 있게 되는 유용한 효과가 있다.

뿐만 아니라, 본 발명은 삼투압 펌프를 이용하는 것이므로, 장치의 전체적인 부피를 최소화하고 일체의 전원이 불필요하므로 포터블 타입으로 제작하여 장소에 구애받지 않고 사용할 수 있게 되는 효과가 있다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

제 1주입구와 제 2주입구를 형성하고, 제 1주입구와 제 1가이드 채널, 제 2주입구와 제 2가이드 채널이 각각 연통되도록 하며, 제 1가이드 채널과 제 2가이드 채널이 메인 채널에서 합류되도록 하고, 유체 배출구로 배출되도록 하여서 된 공지의 그레디언트 발생장치에 있어서,

전술한 유체 배출구를 삼투압펌프와 연결하되, 용액으로 둘러싸인 반투과막으로 구성된 삼투압펌프의 반투과막과 순용매로 사용되는 물로 채운 배출관의 일단을 연결하고, 배출관의 타단을 유체 배출구에 연결하여서 됨을 특징으로 하는 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

전술한 제 1주입구와 제 2주입구 각각에 1㎜ 내지 3㎜ 직경의 관체를 삽입하여 반응 물질을 주입함을 특징으로 하는 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

전술한 제 1주입구와 제 2주입구 각각에 돌출 블록을 형성함을 특징으로 하는 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

전술한 삼투압펌프에서 용액으로 사용되는 물질은 PEG(Poly Ethylene Glycol)임을 특징으로 하는 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치에 관한 것으로 특히 세포의 약물에 대한 반응 그레이언트 프로파일을 얻거나 세포 주화성 연구에 필요한 정보를 얻기 위한 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 종래에도 대한민국 특허 제 0733914호(발명의 명칭: 미세유체 기술을 이용한 3차원 세포배양 시스템; 이하 '인용발명'이라 함)가 제안된 바 있으며, 이는 주입구(1)에 약물 및 신약후보물질, 주입구(2)에 PBS (phosphate buffered saline) 혹은 배지를 주입하여 주채널에 약물 및 신약후보물질의 농도 그레디언트(gradient)를 형성함으로써 약물 농도에 따른 세포의 활성도를 알 수 있도록 하거나 주입구(1)와 주입구(2)에 서로 다른 약물 및 신약후보물질을 주입하면 주채널에서 두 약물이 만나게 되고 이를 통해 약물간의 반응을 통한 독성검사도 수행 할 수 있게 되는 것이다.

<3> 반면에 이러한 인용발명은 주입구들로부터 유입되는 약물, 물질이 주채널에서 반응하도록 하기 위한 이동 동력원으로 실린지 펌프를 사용하는 것이다.

<4> 이러한, 실린지 펌프는 스텝모우터와 기어, 피스톤에 의하여 발생된 압력으로 유체를 이동시키게 되는 것인바, 특히 초저속으로 흐르는 미세 유량을 얻기 위하여 실린지 펌프를 초저속으로 유지하기 위하여 모우터가 매우 느린 속도로 회전하게 되는 경우 모우터가 구형 파형 전류에 의하여 아주 작은 변위를 회전하고 멈춘 다음 다시

회전하는 동작을 반복하게 되며, 이같이 스텝모우터를 구동하는 극수에 상응한 단속적인 회전을 하게 되는 것이다.

<5> 이러한 단속적인 회전에 의하여 실린지 펌프의 압력도 흐름상태가 강하고 약함이 반복되는 맥동을 보이게 되며, 이러한 맥동은 실제로 상당히 커서 1㎕/min 이하의 제어가 매우 어려운 실정이다. 또한, 이러한 실린지 펌프는 20㎖/min 내지 50㎖/min 의 용량를 갖는 것이 보급되어 있으며, 이에 따라, 반도체 웨이퍼 상에 미세하고 정밀한 구조의 유입로 및 유출로 그리고 챔버를 구성하고, 이에 유기 폴리머인 PDMS(Polydimethylsiloxane)를 씌워 경화시킨 다음 이를 유리판 등 평활도가 높은 기판위에 프라즈마 처리 등의 방법으로 고착시켜서 된 미세 구조의 마이크로칩에서 필요로 하는 수 ㎕~수n ℓ /min정도의 제어가 사실상 불가능하게 되어 반응 결과에 영향을 미치는 흐름 속도의 정밀 제어가 불균일하게 되는 문제점이 있다. 이에 따라, 반응 중인 세포가 유속의 맥동에 의하여 영향을 받게 되어 정확한 데이터를 얻기 어렵게 될 뿐만 아니라, 이러한 실린지펌프는 반드시 전원이 필요하며, 그 부피가 커지게 되어 사용 장소에 제한을 받게 되는 문제점이 있는 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 본 발명의 목적은 이러한 문제점을 해결하기 위하여 미세 구조의 마이크로칩에서 필요로 하는 미세 용량이면서 균일한 동력을 제공할 수 있도록 한 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치를 제공함에 있다.

과제 해결수단

<7> 본 발명은 이러한 목적을 달성하기 위하여 반도체 웨이퍼 상에 미세하고 정밀한 구조의 유입로 및 유출로 그리고 챔버를 구성하고, 이에 유기 폴리머인 PDMS(Polydimethylsiloxane)를 씌워 경화시킨 다음 이를 유리판 등 평활도가 높은 기판위에 프라즈마 처리 등의 방법으로 고착시켜서 된 미세 구조의 마이크로칩을 형성하며, 이러한 마이크로칩은 제1주입구와 제 2주입구를 형성하고, 이와 제 1가이드 채널과, 제2가이드 채널이 연통되도록 하며, 제 1, 2가이드 채널이 메인채널에서 합류되도록 하고, 유체 배출구로 배출되도록 하여서 된 공지의 것에 있어서, 유체 배출구를 삼투압펌프와 연결함과 아울러, 유체배출구와 삼투압펌프 사이를 순용매로 사용되는 물로 채운 배출관으로 연결하여서 된 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치를 제안한다.

효 과

<8> 이와 같이 하여 본 발명은 마이크로 칩에서 요구되는 미세량의 펌핑이 가능할 뿐만 아니라, 펌핑 압력에 있어서 일체의 맥동이 전혀 없는 것이어서, 제 1, 2주입구로 주입된 물질간의 상호 반응 또는 메인채널에 미리 배치한 세포와 주입된 물질간의 반응에 관련하여 안정되고도 정확한 그레디언트 프로파일 데이터를 제공할 수 있게 되는 유용한 효과가 있다.

<9> 뿐만 아니라, 본 발명은 삼투압 펌프를 이용하는 것이므로, 장치의 전체적인 부피를 최소화하고 일체의 전원이 불필요하므로 포터블 타입으로 제작하여 장소에 구애받지 않고 사용할 수 있게 되는 효과가 있다.

<10> 또한, 본 발명은 제 1, 2주입구로 주입되는 물질이 최적 직경의 관체에 의하여 최적 압력으로 공급되는 것이어서, 더욱 안정적인 반응 결과를 얻을 수 있게 되며, 삼투압 펌프와 유체 배출구 사이를 연결하는 배출관에 채운 순용매인 물의 부피에 해당하는 용량만큼 펌핑이 가능하므로 종래의 실린지 펌프를 사용하는 경우와 같은 작동 상태 모니터링이 불필요하게 되므로 취급의 편의성을 제공할 수 있게 되는 유용한 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<11> 이러한 본 발명을 첨부된 도면을 참조하여 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다. 먼저, 본 발명에서는 미세 구조의 마이크로 칩을 제조하여야 한다.

<12> 이를 위한 제작 방법을 도 2으로 도시하였다.

<13> 이에서 볼 수 있는 바와 같이 본 발명은 먼저 실리콘 웨이퍼에 포토레지스트 도포 및 에칭 등의 반도체 공정을 그대로 적용하여 제1가이드 채널(100)과, 제2가이드 채널(200) 그리고 메인 채널(300)을 형성하기 위한 돌기를 형성한다.

<14> 이어서, 이러한 실리콘 웨이퍼에 PDMS를 덮어 성형시키고, 이를 떼어 낸 다음 드릴링 작업을 통하여 제1주입구(101)와 제2주입구(201) 그리고 유체 배출구(610)를 형성한다. 이어서, 이와 같이 하여 얻은 PDMS를 평활도가

우수한 유리면 등에 놓고 산소 프라즈마 처리를 통하여 기판(400)에 고정한다.

<15> 이와 같이 하여 얻은 마이크로 칩과 삼투압 펌프(500)를 도 3으로 보인 바와 같이 연결하되, 유체 배출구(610)를 삼투압펌프(500)와 연결함과 아울러, 유체배출구(610)와 삼투압펌프(500) 사이를 순용매(503)로 사용되는 물로 채운 배출관(600)으로 연결하여서 된 것이다. 이러한 본 발명은 도 4로 보인 사진으로 보인 바와 같이 일예로 줄기세포를 메인 채널(300)에 배열하고 도 5로 보인 사진으로 확인되는 바와 같이 제 1주입구로 소의 태아 혈청을 넣은 배양액을 주입하고, 제 2주입구(201)로 순수 배양액을 주입한 후 관측하면, 직사각형으로 보인 프로파일에서 확인되는 바와 같이, 소의 태아 혈청을 주입한 제 1주입구(101) 측에 가까운 부분은 PDMS의 독성(PDMS 자체는 무독성이나 그 합성과정에서 100% 반응하지 못하여 남은 세포의 생장에 장애를 주는 성분 low weight molecule -LWM- 를 지칭함)으로 공격을 받았음에도 불구하고 줄기 세포의 생존 확률이 높으나, 일반 배양액만을 주입한 제 2주입구(201) 측의 줄기 세포는 PDMS의 독성에 의하여 많이 사멸되었음을 알 수 있다.

<16> 이를 확대하여 보면 그 차이를 더욱 확연하게 확인할 수 있으며, 이를 도 6의 사진을 보였다.

<17> 이러한 결과를 토대로 하여 메인 채널(300)의 폭을 4㎜로 하였다면, 도면상 상단측 부분으로부터 생존한 줄기세포의 수는 도 7로 보인 바와 같은 상태의 그레이디언트 효과를 얻는다.

<18> 이에서 볼 수 있는 바와 같이 초기의 상태에서는 청색 점선으로 보인 바와 같이 세포가 랜덤하게 배치되어 있으므로, 메인 채널(300)의 4㎜ 폭 범위 내에서 다양한 분포를 보이고 있으며, 그 평균값은 청색 점선으로 보인 바와 같이 되어 있다. 이러한 상태에서 전술한 바와 같이 제 1주입구에는 소의 태아 혈청이 함유된 배양액을 투입하고, 제 2주입구(201)에는 일반 배양액을 주입한 다음 시간이 경과하게 되면 도 7의 적색선으로 보인 바와 같이 줄기 세포의 수가 전체적으로 감소하는 것이며, 특히, 제 1주입구(101) 측의 줄기세포 수는 그 감소폭이 작으나, 제 2주입구(201) 측의 줄기세포 수는 그 감소폭이 매우 큰 상태를 보이게 된다.

<19> 이러한 줄기 세포수의 평균값을 밝은 적색선으로 표시하였으며, 이와 같이 일목요연하게 확인 가능한 그레디언트 프로파일은 각종 약물간의 반응이나 약물에 대한 세포의 반응을 정확하게 파악할 수 있는 데이터를 제공하게 되는 것이다.

<20> 이와 같은 일련의 반응은 약물의 이동에 의하여 수반되는 것이므로, 메인 챔버의 유체 배출구(610)에서 발생되는 미세 흡입력이 필수적이다.

<21> 본 발명에서는 이를 위하여 유체 배출구(610)를 삼투압펌프(500)와 연결함과 아울러, 유체배출구(610)와 삼투압펌프(500) 사이를 순용매(503)로 사용되는 물로 채운 배출관(600)으로 연결하여서 된 것이어서, 순용매(503)인 물이 삼투압펌프(500)의 반투과막(501)을 통과하게 된다. 이에 따라, 배출관(600)에 부압이 발생되고, 이에 따라 메인 챔버의 내부에 부압(負壓)이 걸려 유체가 배출되는 것인바, 유체와 배출관(600)의 물사이 기포를 넣은 상태에서 물은 계속 반투과막(501)을 통과하여 용액(502)으로 공급되고, 이에 따라 기포와 메인 챔버를 통과한 유체는 삼투압펌프(500)의 반투과막(501)으로 계속 이동되는 것이다.

<22> 실제로는 이러한 반투과막(501)을 통과하는 순용매(503)인 물의 양은 200분에 40㎕를 조금 넘는 미세량이므로 매우 배출관(600)에 채워진 물이 모두 이동하여 기포가 반투과막(501)에 도달하는 데에는 많은 시간이 소요되므로 이러한 시간 동안 약품간 또는 약품과 세포간의 반응은 모두 완료될 수 있는 것이어서, 필요한 그레디언트를 얻을 수 있게 됨은 물론이며, 기포가 반투과막(501)에 도달하면 삼투압 작용이 중단되므로 작동을 완료하게 되는 것이다.

<23> 이러한 과정에서 본 발명은 미세량을 안정적으로 흡입할 수 있게 되는 것이며, 반투과막(501)을 더욱 큰 것으로 하거나 더욱 작은 것으로 하여 흡입량을 시료의 종류에 따라 최적화하여 효과적이면서도 능률적인 그레디언트 프로파일을 제공할 수 있게 된다.

<24> 또한, PEG의 농도를 조절함으로써 흡입량을 조절하는 것이 더욱 효과적인 방법이 될 수 있으며, 더욱이 본 발명에서는 삼투압 펌프에 의하여 수pℓ/min 나 그 이하의 더욱 정밀한 유량 제어가 가능하게 된다.

<25> 아울러, 본 발명에서는 마이크로 칩을 구성하기 위하여 PDMS를 사용한 예를 도시하였으나, 폴리메틸메타클릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리아크리레이트(polyacrylates), 폴리카보네이트(polycarbonates), 폴리실릭 올레핀(polycyclic olefins), 폴리이미드(polyimides), 폴리우레탄(polyurethanes)등을 사용할 수도 있다.

<26> 아울러, 실험결과 제1,2주입구(100,200)에 최적화된 압력으로 반응 관측 대상 물질을 주입하여야 하는 바, 이에는 그 표면적과 깊이가 변수임을 인식하여 1㎜ 내지 3㎜의 관체(102, 202)를 이용하여 주입하는 것이 가장 최적

화된 압력으로 반응 물질을 주입할 수 있음을 알게 되었다. 또한, 이러한 관체(102, 202)의 사용시에 주입구에 결합된 상태에서 안정적으로 지지되어야 하므로 제 1, 2주입구(100,200)에 돌출 블록(103, 203)을 구비할 필요가 있는 것이다.

<27> 그리고, 본 발명에서는 삼투압펌프(500)에서 용액(502)으로 사용되는 물질을 분자량 2000인 PEG(Poly Ethylene Glycol)로 선정하여 사용하였다. 그 결과 반투과막(501)에 의하여 순용매(503)인 물이 원활하게 유입되고 용액(502)이 유출됨을 방지할 수 있게 되어 삼투압 펌프의 원활한 작용이 가능하게 되었다.

<28> 아울러, 본 발명의 도면에서는 편의상 주입구가 2개로 된 예를 도시하였으니, 필요에 따라 4개의 주입구, 혹은 8개의 주입구 등 필요한 개수로 된 주입구에서 서로 다른 용액이 들어가도록 할 수 있고, 중앙에서 반응하여 그레디언트를 형성하도록 할 수 있음은 물론이다.

도면의 간단한 설명

<29> 도 1은 종래의 미세유체 기술을 이용한 3차원 세포배양 시스템의 요부를 보인 평면도.

<30> 도 2는 본 발명에 활용되는 미세 구조의 마이크로 칩을 제조 방법을 보인 설명도.

<31> 도 3은 본 발명에 의한 삼투압펌프를 이용한 그레디언트 발생장치를 보인 설명도.

<32> 도 4는 줄기세포는 메인 채널에 배열한 상태를 보인 사진.

<33> 도 5는 양측 주입구에 소 태아 혈청이 함유된 배양액과, 일반 배양액을 주입한 결과를 보인 사진.

<34> 도 6은 도 4와 도 5를 대조하는 설명 사진.

<35> 도 7은 도 4내지 도 6으로 보인 줄기 세포 생존에 관한 그레디언트의 실예를 설명하기 위한 도표.

<36> *도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명

<37> 100, 200: 제 1, 2 가이드 채널 101, 201: 제 1, 2주입구

<38> 102, 202: 관체 103, 203: 블록

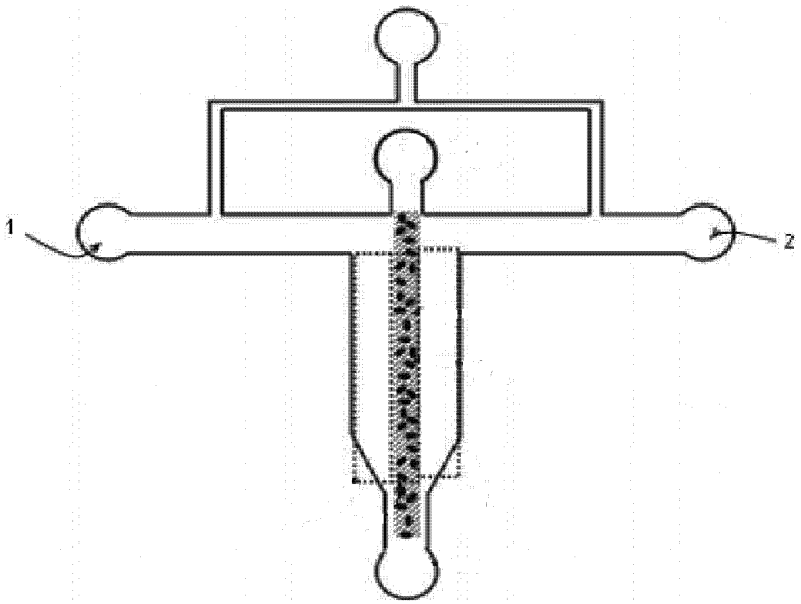
<39> 300: 메인 채널 400: 기판

<40> 500: 삼투압펌프 502: 용액

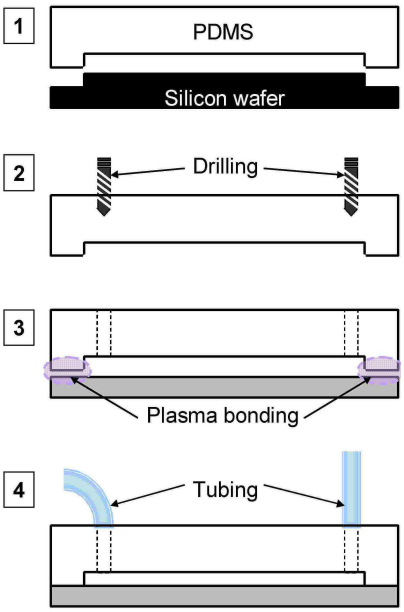
<41> 503: 순용매 600: 배출관

도면

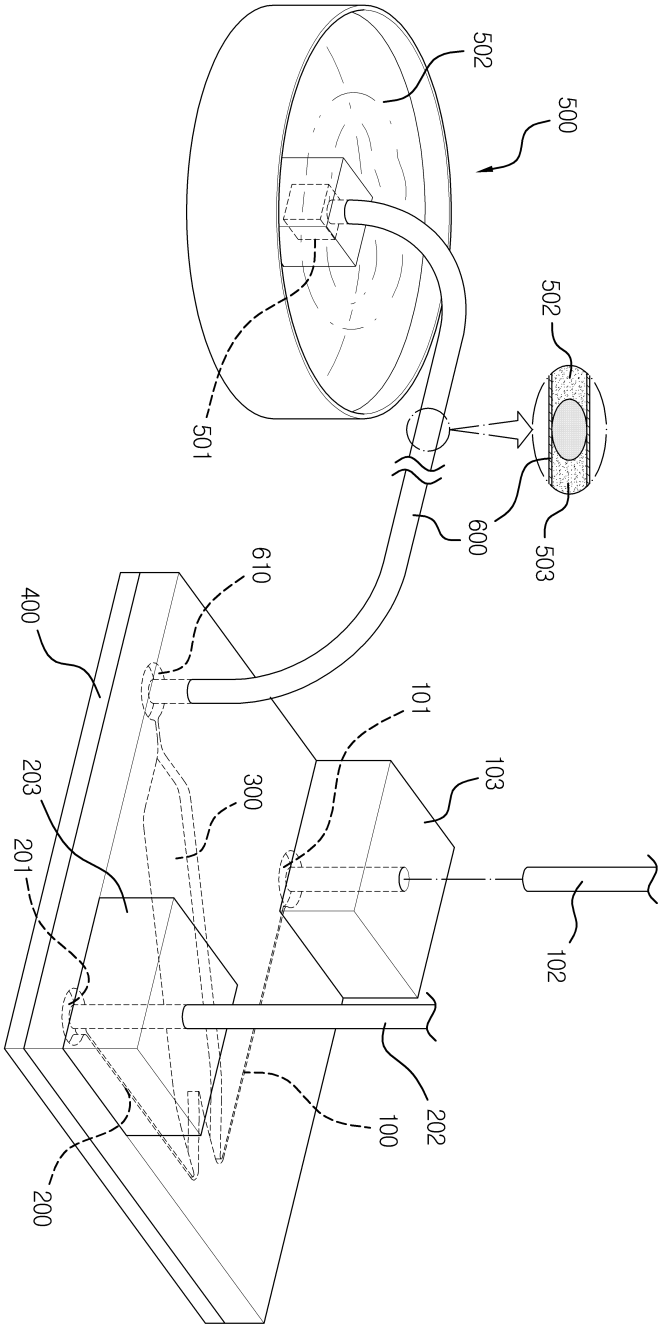
도면1



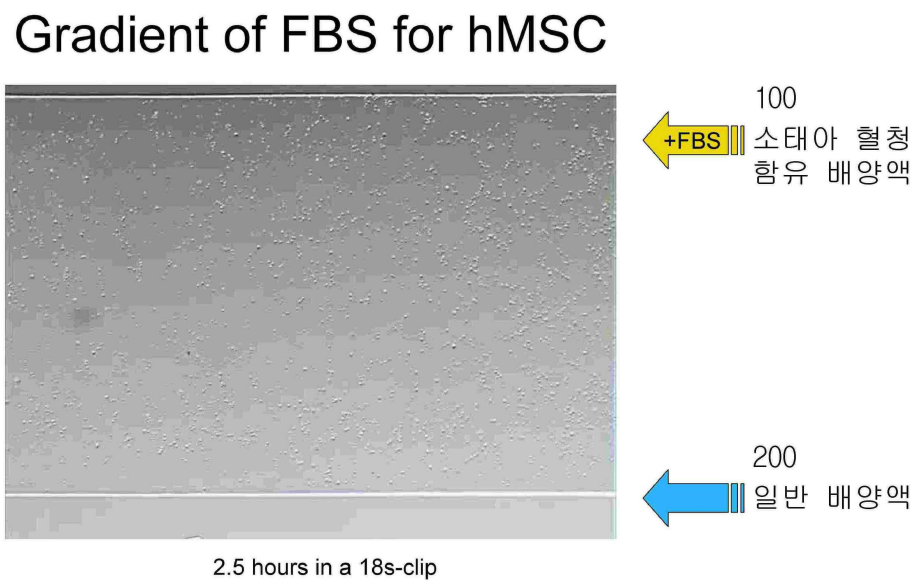
도면2



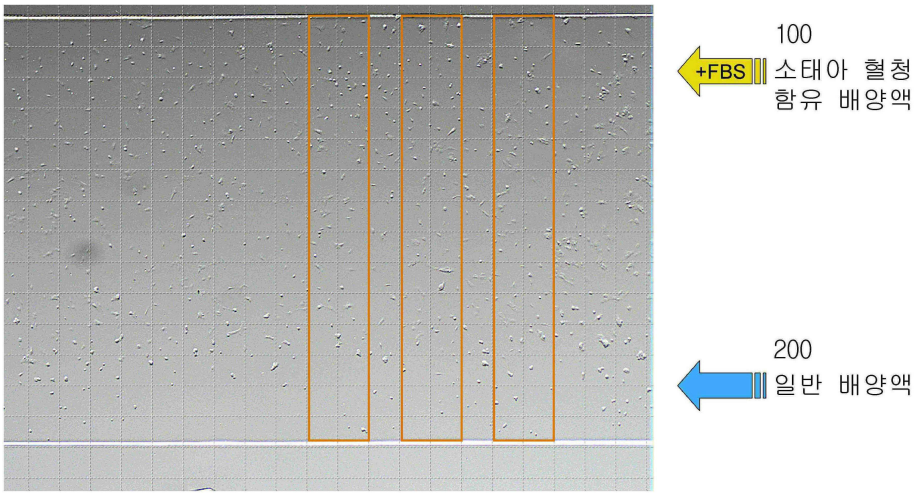
도면3


502
500
501
502
600
503
610
400
101
103
203
300
201
102
202
100
200

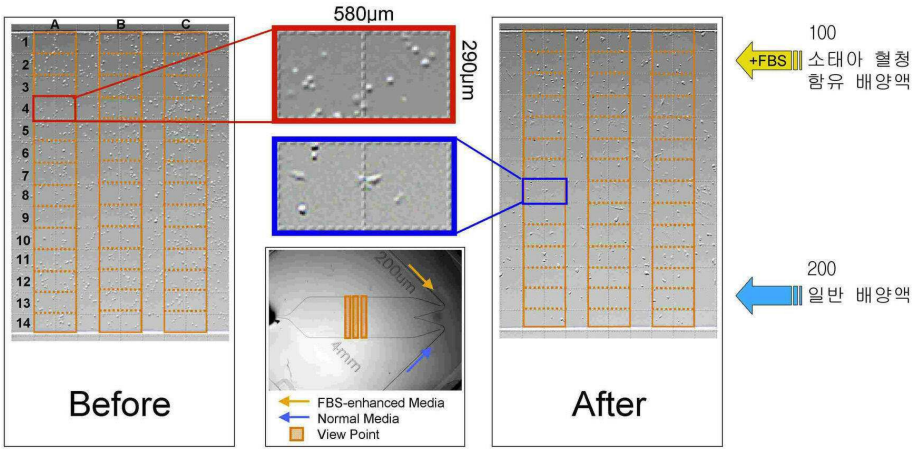
도면4


Gradient of FBS for hMSC
100
+FBS
소태아 혈청
함유 배양액
200
일반 배양액
2.5 hours in a 18s-clip

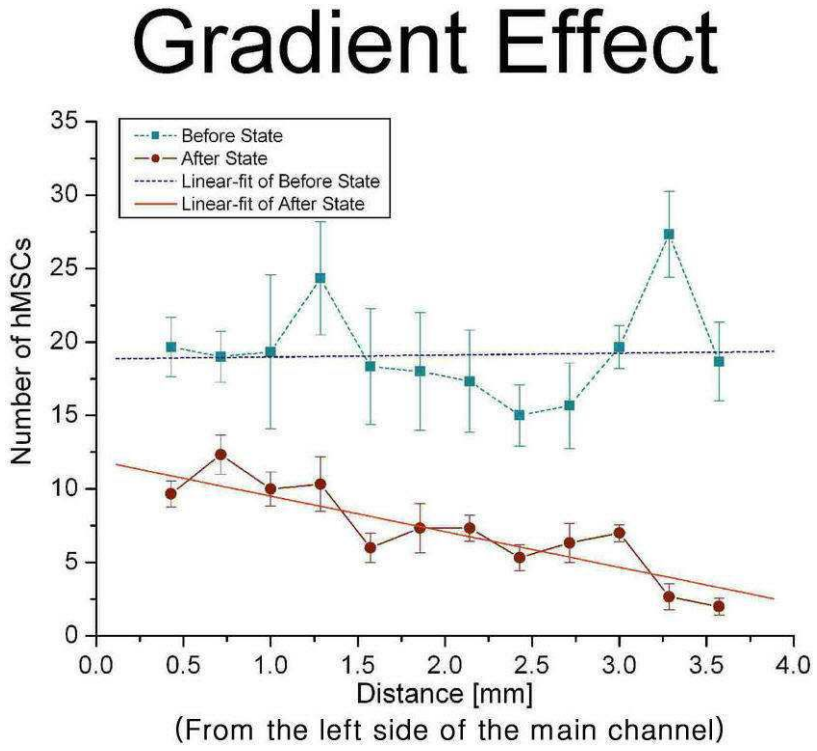
도면5


100
+FBS
소태아 혈청
함유 배양액
200
일반 배양액

도면6


580μm
290μm
A
B
C
Before
200μm
4mm
FBS-enhanced Media
Normal Media
View Point
After
100
+FBS
소태아 혈청
함유 배양액
200
일반 배양액

도면7


Gradient Effect
Before State
After State
Linear-fit of Before State
Linear-fit of After State
Number of hMSCs
Distance [mm]
(From the left side of the main channel)