

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0033936

(43) 공개일자 2023년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 3/06 (2006.01) C12M 1/12 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12M 23/16 (2013.01)

C12M 25/14 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0116931

(22) 출원일자 2021년09월02일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

김정욱

서울특별시 동작구 상도로53길 8 래미안상도3차아파트 323동 101호

유현지

서울특별시 마포구 백범로 35

강동원

서울특별시 마포구 백범로 35

(74) 대리인

김현진

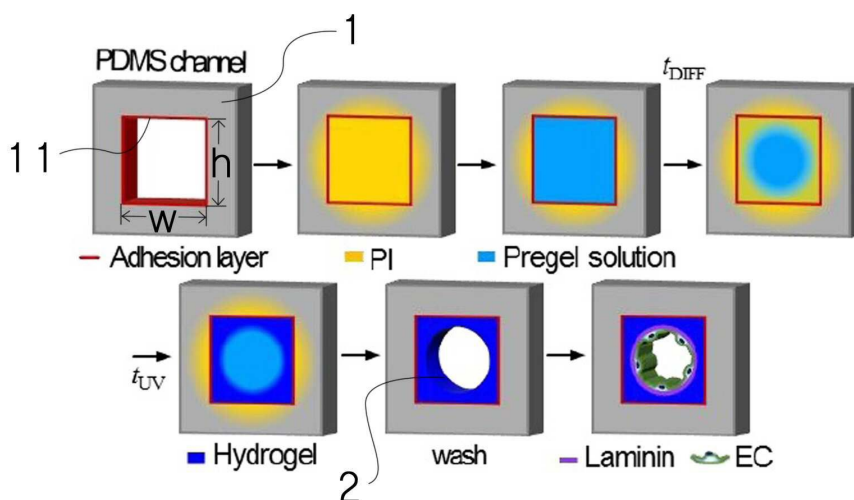
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 혈관 내피 세포 배양용 미세유체 장치의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 PDMS로 이루어진 미세유체 구조체 내에 다양한 혈관의 구조적 특징을 갖춘 하이드로젤을 제작하여 하이드로젤 표면에 배양되는 혈관내피세포에 생리학적/병리학적 수준의 4가지 종류의 기계적 신호를 가할 수 있는 미세유체 장치에 대한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/069 (2013.01)

C12N 2533/90 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	202121013
과제번호	2019R1I1A2A0106255113
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	기계적 힘에 감응하는 poly(spiropyran) 고분자 설계와 기계생물학 연구에 응용
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

미세유체 채널을 가지는 미세유체 구조체를 형성하는 구조체형성단계와, 상기 채널에 액상의 광개시제를 채워 미세유체 구조체에 광 개시제가 흡수되도록 한 후 위상하여 미세유체 구조체에 흡수되지 않은 광개시제를 제거하는 광개시제처리단계와, 상기 광개시제처리단계 후 프리젤 용액을 채널에 채운 후 일정 시간(tDIFF) 유지하여 미세유체 구조체에 흡수된 광 개시제가 프리젤 용액에 확산되도록 하는 프리젤용액처리단계와, 상기 프리젤용액처리단계 후 자외선을 상기 채널에 일정 시간(tUV) 조사하여, 상기 채널 내에 하이드로젤을 형성하고, 상기 채널을 위상하여 미반응 물질을 제거하여 하이드로젤에 의해 둘러싸여진 내강을 형성하는 내강형성단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

하이드로젤의 접착을 향상시키기 위해 상기 구조체형성단계와 광개시제처리단계 사이에 상기 채널을 화학적으로 개질하는 접착층형성단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미세유체 구조체는 나노포러스한 PDMS로 이루어지는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 구조체형성단계 이후 패턴화된 UV 조사를 통해 PDMS 안에 벤조페논을 가진 펜타에리트리톨 유도체를 광가 교시켜, 국부적으로 원주 변형률이 감소한 미세유체 구조체를 형성하는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 광개시제처리단계에서 tDIFF가 늘어날수록 원형의 내강이 형성되며,

상기 광개시제처리단계의 tDIFF와 상기 내강형상단계의 tUV의 조절을 통해 내강의 직경을 조절할 수 있는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 프리젤 용액은 젤라틴 메타크릴아미드를 포함하며,

상기 내강형상단계에서 자외선을 채널에 조사하여 채널 내에 하이드로젤을 형성 시 패턴화된 UV를 조사하여 병리적 상태하의 혈관 형태를 닮은 내강 형상을 형성할 수 있는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 내강형성단계에서, 채널 축을 따라 자외선 강도를 변화시키는 경우 좁아지는 또는 확장된 형태의 내강을 형성할 수 있고, 채널 폭과 축을 따라 자외선 강도를 변화시키는 경우 비축대칭 방식으로 국부적으로 좁아지는 형태의 내강을 형성할 수 있는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

하이드로젤 표면의 영률을 증가시키기 위해, 상기 내강형성단계 후 하이드로젤에 남아 있는 메타크릴아미드를 추가로 중합시키는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

하이드로젤 표면의 영률을 국부적으로 증가시키기 위해, 상기 내강형성단계 후, 패턴화된 자외선 조사를 통해 하이드로젤 안에 니트로신남산을 광학적으로 그래프트시킨 후, 상기 하이드로젤 표면에 EC를 배양한 후, 자외선을 조사하는 것을 특징으로 하는 미세유체 장치의 제조방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 PDMS로 이루어진 미세유체 구조체 내에 다양한 혈관의 구조적 특징을 갖춘 하이드로젤을 제작하여 하이드로젤 표면에 배양되는 혈관내피세포에 생리학적/병리학적 수준의 4가지 종류의 기계적 신호를 가할 수 있는 미세유체 장치에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈관 시스템을 라이닝(lining)하는 내피세포(Endothelial cells, ECs)는 혈관의 기능과 구조에 중요한 역할을 하는데, 대표적으로 다양한 기계적인 힘을 기능적 반응으로 변환시킨다. 상기 기능적 반응의 예로 혈관 긴장도(vascular tone)를 조절하거나 염증 반응(inflammatory response)을 활성화하는 것을 들 수 있다.

[0003] 따라서, EC 내에서 기계적인 힘이 어떻게 생화학적 신호로 변경되는지를 확인하기 위해, 하기의 논문문헌에 기재된 바와 같은 in vitro 세포 배양 플랫폼을 이용하여 기계생물학(mechanobiology)이 널리 연구되고 있다.

[0004] <논문문헌>

[0005] W. J. Polacheck, M. L. Kutys, J. Yang, J. Eyckmans, Y. Wu, H. Vasavada, K. K. Hirschi, C. S. Chen, *Nature* 2017, 552, 258-262.

[0006] 하지만, 혈관내피세포는 4가지 종류의 기계적 신호(전단응력(shear stress), 혈압(luminal pressure), 원주변형률(cyclic circumferential strain), 세포외기질 강성도(영률, Young's modulus))에 비가산적(non-additive)으로 반응하는데, 종래의 세포배양장치는 혈관내피세포에 가해지는 4가지 종류의 기계적 신호를 동시에 생리학/병리학 수준에서 구현할 수 없는 문제가 있다. 특히, 혈관의 국소적인 구조적 특성(협착, 분지 등)이 세포에 가해지는 기계적 신호에 큰 영향을 미치는데, 기존의 세포배양장치는 매우 단순하고 비생리학적인 구조를 가지므로 인체 내에서 세포에 가해지는 기계적 신호와는 크기나 방향이 다를 수밖에 없는 문제가 있다.

발명의 내용**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로,

[0008] 본 발명은 PDMS로 이루어진 미세유체 구조체 내에 다양한 혈관의 구조적 특징을 갖춘 하이드로젤을 제작하여 하이드로젤 표면에 배양되는 혈관내피세포에 생리학/병리학 수준의 4가지 종류의 기계적 신호를 가할 수 있는 미세유체 장치를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미세유체 장치의 제조방법은 미세유체 채널을 가지는 미세유체 구조체를 형성하는 구조체형성단계와, 상기 채널에 액상의 광개시제를 채워 미세유체 구조체에 광 개시제가 흡

수되도록 한 후 워싱하여 미세유체 구조체에 흡수되지 않은 광개시제를 제거하는 광개시제처리단계와, 상기 광개시제처리단계 후 프리젤 용액을 채널에 채운 후 일정 시간(tDIFF) 유지하여 미세유체 구조체에 흡수된 광개시제가 프리젤 용액에 확산되도록 하는 프리젤용액처리단계와, 상기 프리젤용액처리단계 후 자외선을 상기 채널에 일정 시간(tUV) 조사하여, 상기 채널 내에 하이드로젤을 형성하고, 상기 채널을 워싱하여 미반응 물질을 제거하여 하이드로젤에 의해 둘러싸여진 내강을 형성하는 내강형성단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미세유체 장치의 제조방법은 하이드로젤의 접착을 향상시키기 위해 상기 구조체형성단계와 광개시제처리단계 사이에 상기 채널을 화학적으로 개질하는 접착층형성단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미세유체 장치의 제조방법에 있어서 상기 미세유체 구조체는 나노포러스한 PDMS로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미세유체 장치의 제조방법에 있어서 상기 구조체형성단계 이후 패턴화된 UV 조사를 통해 PDMS 안에 벤조페논을 가진 펜타에리트리톨 유도체를 광가교시켜, 국부적으로 원주 변형률이 감소한 미세유체 구조체를 형성하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미세유체 장치의 제조방법에 있어서 상기 광개시제처리단계에서 tDIFF가 늘어날수록 원형의 내강이 형성되며, 상기 광개시제처리단계의 tDIFF와 상기 내강형상단계의 tUV의 조절을 통해 내강의 직경을 조절할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미세유체 장치의 제조방법에 있어서 상기 프리젤 용액은 젤라틴 메타크릴아미드를 포함하며, 상기 내강형상단계에서 자외선을 채널에 조사하여 채널 내에 하이드로젤을 형성 시 패턴화된 UV를 조사하여 병리학적 상태하의 혈관 형태를 닮은 내강 형상을 형성할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미세유체 장치의 제조방법은 상기 내강형성단계에서, 채널 축을 따라 자외선 강도를 변화시키는 경우 좁아지는 또는 확장된 형태의 내강을 형성할 수 있고, 채널 폭과 축을 따라 자외선 강도를 변화시키는 경우 비축대칭 방식으로 국부적으로 좁아지는 형태의 내강을 형성할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미세유체 장치의 제조방법은 하이드로젤 표면의 영물을 증가시키기 위해, 상기 내강형성단계 후 하이드로젤에 남아 있는 메타크릴아미드를 추가로 중합시키는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미세유체 장치의 제조방법은 하이드로젤 표면의 영물을 국부적으로 증가시키기 위해, 상기 내강형성단계 후, 패턴화된 자외선 조사를 통해 하이드로젤 안에 니트로신남산을 광학적으로 그래프트시킨 후, 상기 하이드로젤 표면에 EC를 배양한 후, 자외선을 조사하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.

[0020] 본 발명은 PDMS로 이루어진 미세유체 구조체 내에 다양한 혈관의 구조적 특징을 갖춘 하이드로젤을 제작하여 하이드로젤 표면에 배양되는 혈관내피세포에 생리학/병리학적 수준의 4가지 종류의 기계적 신호를 가할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세유체 장치의 제조 과정을 설명하기 위한 참고도.

도 2는 미세유체 장치에 가해지는 자외선 강도 패턴을 설명하기 위한 참고도.

도 3은 tDIFF에 따라 C_{PI} 의 시공간적 기울기를 확인하기 위한, FEA(finite element analysis)에 의해 측정된 횡단면 C_{PI} 프로파일을 나타내는 도면.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세유체 장치의 LSCM 이미지.

도 5 및 6은 tDIFF와 tUV의 조합에 따라 내강 직경이 변화함을 확인하기 위한 그래프.

도 7은 국부적으로 좁아지는 또는 확장된 내강을 가지는 미세유체 장치의 LSCM 이미지.

도 8은 미세유체 장치에 가해지는 일 자외선 강도 패턴을 나타내는 그래프.

도 9는 비축대칭 방식(non-axisymmetric way)으로 국부적으로 좁아지는 내강을 가지는 미세유체 장치의 LSCM 이미지.

도 10은 채널 형상과 자외선 강도 패턴의 조절을 통해 실제 생리학적 및 병리학적 상태하의 혈관을 닮은 채널 및 내강의 구조를 가지는 미세유체 장치의 LSCM 이미지.

도 11은 $t_{\text{post,UV}}$ 에 따라 하이드로젤 표면의 영률(E_s)이 증가함을 확인하기 위한 그래프.

도 12는 UV_{flood} 의 조사 전후에 nitrocinnamic acid derivative가 그래프된 지역에서 측정된 영률을 나타내는 그래프.

도 13은 4-arm benzophenone이 PDMS와 링크된 지역에서 측정된 원주변형률을 나타내는 그래프.

도 14는 EC가 배양된 후 미세유체 장치를 측정된 광학 현미경 이미지.

도 15는 EC가 배양된 후 VE-cadherin이 존재함을 확인하기 위한 미세유체 장치를 측정된 LSCM 이미지.

도 16은 펄스 플로우 발생기(pulse flow generator)를 설명하기 위한 참고도.

도 17은 미세유체 장치에 가해지는 pulsatile flow를 나타내는 그래프.

도 18은 기계적인 힘이 가해짐에 따라 EC에서 NO가 생성됨을 확인하기 위한 LSCM 이미지.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022]

이하에서는 본 발명에 따른 혈관 내피 세포 배양용 미세유체 장치의 제조방법을 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0024]

본 발명의 일 실시예에 따른 혈관 내피 세포 배양용 미세유체 장치의 제조방법을 도 1을 참조하여 설명하면, 상기 제조방법은 미세유체 채널(11)을 가지는 미세유체 구조체(1)를 형성하는 구조체형성단계와, 하이드로젤의 접착을 향상시키기 위해 상기 채널(1)을 화학적으로 개질하는 접착층형성단계와, 상기 접착층형성단계 후 상기 채널에 액상의 광개시제를 채워 미세유체 구조체에 광 개시제가 흡수되도록 한 후 워싱하여 미세유체 구조체에 흡수되지 않은 광개시제를 제거하는 광개시제처리단계와, 상기 광개시제처리단계 후 프리젤 용액을 채널에 채운 후 일정 시간(tDIFF) 유지하여 미세유체 구조체에 흡수된 광 개시제가 프리젤 용액에 확산되도록 하는 프리젤용액처리단계와, 상기 프리젤용액처리단계 후 자외선을 상기 채널에 일정 시간(tUV) 조사하여, 상기 채널 내에 하이드로젤을 형성하고, 상기 채널을 워싱하여 미반응 물질을 제거하여 하이드로젤에 의해 둘러싸여진 내강을 형성하는 내강형성단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0025]

상기 구조체형성단계는 미세유체 채널(11)을 가지는 미세유체 구조체(1)를 형성하는 단계로, 종래의 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예컨대 PDMS 베이스와 경화제 등을 포함하는 PDMS 전구체를 특정 형상을 가진 몰드에 붓고 경화시킨 후 몰드를 제거하여 내부에 미세유체 채널을 가지는 나노포러스 탄성체(PDMS) 미세유체 구조체를 형성할 수 있다. 또한, 사용되는 몰드에 따라 다양한 형상을 가지는 채널을 형성할 수 있고, PDMS 베이스와 경화제의 혼합 비율을 조절하여 미세유체 구조체의 전체적인 원주변형율을 조절할 수 있다. 또한, 상기 구조체형성단계 이후 패턴화된 UV 조사를 통해 PDMS 안에 벤조페논을 가진 펜타에리트리톨 유도체를 광가교시켜, 국부적으로 원주 변형률이 감소한 미세유체 구조체를 제조할 수 있다. 명세서 전체에 걸쳐, 패턴화된 UV(UV 강도 패턴)라 함은 채널의 폭 또는/및 축을 따라 조사되는 자외선의 강도를 달라지는 것을 의미한다. 구체적으로, 상기 구조체형성단계에서 미세유체 구조체가 형성된 후 벤조페논을 가진 펜타에리트리톨을 포함하는 용액을 채널

내에 채우고 상기 벤조페논을 가진 펜타에리트리톨이 PDMS에 확산되도록 한 후, 패턴화된 UV를 상기 채널에 조사하여 국부적으로 벤조페논을 가진 펜타에리트리톨이 PDMS와 링크되도록 하고, 상기 채널을 워싱하고 건조한 후 접착층형성단계, 광개시제처리단계, 프리젤용액처리단계, 내강형성단계를 차례로 수행한 후 채널에 일정 시간($t_{PDMS,UV}$) 동안 자외선을 조사하여 상기 미세유체 구조체가 국부적으로 감소된 원주 변형률을 가지도록 할 수 있다.

[0026] 상기 접착층형성단계는 하이드로젤의 접착을 향상시키기 위해 상기 채널(1)을 화학적으로 개질하는 단계로, 예컨대 상기 접착층형성단계에서는 젤라틴 하이드로젤의 접착을 향상시키기 위해 폴리아크릴산과 폴리알릴아민으로 만들어진 접착 이중층을 형성될 수 있다.

[0027] 상기 광개시제처리단계는 상기 접착층형성단계 후 상기 채널에 액상의 광개시제를 채워 미세유체 구조체에 광개시제가 흡수되도록 한 후 워싱하여 미세유체 구조체에 흡수되지 않은 광개시제를 제거하는 단계이다.

[0028] 상기 프리젤용액처리단계는 상기 광개시제처리단계 후 프리젤 용액을 채널에 채운 후 일정 시간(t_{DIFF}) 유지하여 미세유체 구조체에 흡수된 광개시제가 프리젤 용액에 확산되도록 하는 단계이다. 상기 프리젤 용액은 젤라틴 메타크릴아미드(Gelatin methacrylamide)를 포함하는 것이 바람직하다.

[0029] 상기 내강형성단계는 상기 프리젤용액처리단계 후 자외선을 상기 채널에 일정 시간(t_{UV}) 조사하여, 상기 채널 내에 하이드로젤을 형성하고, 상기 채널을 워싱하여 미반응 물질을 제거하여 하이드로젤에 의해 둘러싸여진 내강(2)을 형성하는 단계이다. 상기 광개시제처리단계에서 t_{DIFF} 가 늘어날수록 원형의 내강을 형성할 수 있으며, 상기 광개시제처리단계의 t_{DIFF} 와 상기 내강형성단계의 t_{UV} 의 조절을 통해 모세혈관으로부터 동맥 및 정맥까지의 직경을 가지는 내강을 형성할 수 있다. 또한, 상기 내강형성단계에서 자외선을 채널에 조사하여 채널 내에 하이드로젤을 형성 시 패턴화된 UV를 조사하여 병리학적 상태하의 혈관을 닮은 내강 형상을 구현할 수 있다. 예컨대, 자외선을 채널에 조사하여 채널 내에 하이드로젤을 형성 시, 채널 축을 따라 자외선 강도를 변화시키는 경우 협착(stenosis) 또는 방추형 동맥자루(fusiform aneurysm)를 가지는 동맥처럼 국부적으로 좁아지는 또는 확장된 내강을 얻을 수 있고, 채널 폭(y-방향)과 축(x-방향)을 따라 자외선 강도를 변화시키는 경우 죽상판(atheromatous plaque)을 가지는 동맥처럼, 비축대칭 방식(non-axisymmetric way)으로 국부적으로 좁아지는 내강을 얻을 수 있다. 또한, 상기 내강형성단계 후 하이드로젤에 남아 있는 메타크릴아미드(methacrylamide)를 추가로 중합시키는 경우 전체적으로 하이드로젤 표면의 영률을 증가시킬 수 있다. 또한, 상기 내강형성단계 후, 패턴화된 자외선 조사를 통해 하이드로젤 안에 니트로신남산을 광학적으로 그래프트시킨 후, 상기 하이드로젤 표면에 EC를 배양한 후, 자외선을 조사하는 경우 상기 하이드로젤 표면이 국부적으로 증가된 영률을 가지도록 할 수 있다. 구체적으로, NC-SH를 포함하는 용액을 내강에 채운 후, 패턴화된 자외선을 일정 시간($t_{NC,uv}$) 조사하여 하이드로젤 표면에서 잔류하는 메타크릴아미드와 NC-SH 사이의 thiol-ene 반응을 국부적으로 유도하고 워싱한 후, EC를 하이드로젤 표면에 시딩하고 자외선(UV_{flood} , a maximum intensity at 365 nm, 30.8 mW/cm²)을 조사하는 경우, 하이드로젤 표면의 영률을 국부적으로 증가시킬 수 있다. 본 발명의 다른 실시예는 상기 제조방법에 의해 제조된 미세유체 장치에 대한 것으로, 동맥의 내막과 유사한 연질 하이드로젤이 EC에 투과성 미세환경과 생리학적/병리학적인 영률을 제공하고, 동맥의 중막 및 외막에 비교되는 거친 PDMS는 하이드로젤을 보호하며 EC에 생리학적/병리학적인 원주변형률을 제공한다.

[0031] 상기 제조방법에 의해 제조된 미세유체 장치를 사용하여 EC에 기계적인 힘을 가하는 과정을 살펴보면, 먼저 생리학적/병리학적인 상태에 따라 전체적 또는 국부적으로 특정 영률 및 원주변형률을 가지는 미세유체 장치의 하이드로젤 표면에 단백질을 코팅하고 EC가 시딩된 후, 도 16에 도시된 바와 같은 펄스 플로우 발생기(pulse flow generator)를 이용하여 전단응력 및 압력이 교대로 발생하는 박동성 플로우를 가해, EC에 비가적으로 4종류의 기계적 신호를 가할 수 있게 된다. 상기 펄스 플로우 발생기는 솔레노이드 밸브와 플로우 레지스터의 사이즈의 작동 시퀀스를 조절하는 것에 의해, 건강한 동맥, 고혈압, 저혈압, 서맥 또는 빈맥에 관찰되는 전단응력 및 압력의 웨이프폼을 형성할 수 있다.

- [0034] 하거나,
- [0036] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하지만, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] <실시예 1> 미세유체 장치의 제조 및 확인
- [0039] 1. 미세유체 구조체의 제조
- [0040] PDMS base, 경화제 및 monohydride-terminated PDMS를 20:1:12의 중량비로 혼합하여 PDMS 전구체를 형성하고, 상기 PDMS 전구체를 포토리소그래피(photoresist: SU-8, Microchem, USA)에 의해 제조된 몰드에 붓고 경화시킨 후, plasma(CUTE, Femto Science, South Korea)를 가지고 처리하여 도 2에 도시된 형태의 나노포러스 PDMS 미세유체 구조체(1)를 제조하였다. 상기 나노포러스 PDMS 미세유체 구조체(1)에서 채널(11)의 높이(h)와 폭(w)은 각각 200um로 형성되었다.
- [0041] 2. 접착 이중층의 형성
- [0042] (1) 젤라틴 하이드로젤의 접착을 향상시키기 위해 상기 PDMS 미세유체 구조체의 채널을 화학적으로 개질하였다.
- [0043] (2) 아세톤에 용해된 벤조페논(10 w/v %)을 상기 채널에 채우고 10분 동안 유지한 후, 아세톤을 가지고 워싱하고 질소 가스로 건조하였다. 상기 채널에 아크릴산(10 w/v %)을 포함하는 수용액을 채우고 1분 동안 유지한 후, 자외선(UVL-21/4W, UVP, USA)을 10분 동안 조사하였다. 반응하지 않은 모노머를 제거하기 위해 탈이온수로 워싱한 후, N-hydroxysuccinimide(2 w/v %)와 EDC(2 w/v %)를 포함하는 MES 버퍼(0.1M, pH 4.5)를 상기 채널에 채운 후, MES 퍼버로 워싱하고, 상기 채널에 polyallylamine(2 w/v %, $M_w \sim 17.5$ kg/mol)를 포함하는 PBS(0.1 M, pH 7.4)를 채운 후 8시간을 유지하고 워싱하여, 폴리아크릴산과 폴리알릴아민으로 만들어진 접착 이중층을 형성하였다.
- [0044] 3. 채널 안에 내강(lumen)의 형성
- [0045] (1) DLP(digital light processing) 시스템을 갖춘 IOM(inverted optical microscope)의 샘플 스테이지에 접착 이중층이 형성된 미세유체 구조체를 위치시킨 후, 상기 채널에 액체 광 개시제(2-Hydroxy-2-methylpropiophenone)를 채운 후, 나노포러스 PDMS에 광 개시제가 확산되어 흡수되도록 5시간 동안 유지하였다. 상기 DLP 시스템은 digital micro-mirror device(DMD, W4100, Wintech, USA), total internal reflection prism(Visitech, Norway), light source(maximum intensity of 30.8 mW/cm^2 at 365 nm, a mercury short arc lamp; OmniCure S2000, Excelitas, USA) 및 optical lens로 이루어진다.
- [0046] (2) 이후, 질소 가스로 나노포러스 PDMS에 흡수되지 않은 광 개시제를 제거한 후, DPBS에 용해된 gelatin methacrylamide(8 w/v %), gelatin(5 w/v %), poly(ethylene glycol) diacrylamide(32 w/v %; M_w 600 g/mol) 및 N-vinyl pyrrolidone(7.5 v/v %)을 포함하는 프리젤(pregel) 용액을 상기 채널에 채운 후, PDMS에 흡수된 광 개시제가 프리젤 용액에 확산되어 채널의 횡단면의 중앙을 향하여 감소하는 광 개시제 농도(C_{PI})의 시공간적 기울기를 형성하도록, 일정 시간(tDIFF) 동안 유지하였다. 상기 Gelatin methacrylamide는 타입 A 돼지 피부 젤라틴을 60℃에서 DPBS(10 w/v %)에 용해시키고 교반한 후, methacrylic anhydride(20 vol. %)를 포함하는 DPBS를 추가로 혼합한 후, 60℃에서 2시간 동안 교반하여 혼합물을 형성하고, 상기 혼합물을 DPBS로 희석하고, 40℃에서 일주일 동안 여과하고 동결 건조하여 형성하였다. 도 3은 채널 내에 프리젤 용액을 채운 후 tDIFF에 따라 C_{PI} 의 시공간적 기울기를 확인하기 위한, FEA(finite element analysis)에 의해 측정된 횡단면 C_{PI} 프로파일을 나타내는데, 도 3을 보면 tDIFF가 늘어날수록 횡단면 C_{PI} 프로파일이 동심원의 형태를 가짐을 알 수 있다.
- [0047] (3) 일정 시간(tDIFF) 동안 유지한 후, 자외선을 상기 채널에 일정 시간(tUV) 조사하여, 상기 채널 내에 하이드로젤을 형성하였다. 40℃의 DPBS를 가지고 채널을 워싱하여 미반응 물질을 제거하여 하이드로젤에 의해 둘러싸여진 내강을 형성하여, 미세유체 장치를 제조하였다.
- [0048] 4. 미세유체 장치의 이미지화
- [0049] (1) 미세유체 장치의 이미지화를 위해, fluorescein-*o*-acrylate를 가지고 실시예 1의 3에서 제조된 미세유체 장

치(tDIFF는 4sec이고, tUV는 1.2sec임)의 하이드로젤을 공중합시키고, 형광 세기를 LSCM(laser scanning confocal microscope)을 이용하여 측정하고, ImageJ를 사용하여 3D 리컨스트럭티드 이미지를 얻어 도 4에 나타내었다. 도 4의 (a)는 횡단면 LSCM 이미지이고, 도 4의 (b)는 하이드로젤의 하측 절반을 나타내는 3D 리컨스트럭티드 이미지이고, 도 4의 (a)에서 점선 박스는 하이드로젤과 PDMS의 인터페이스를 나타내고, 스케일 바는 100um를 나타낸다.

[0050] (2) 도 4를 보면, 단면이 사각형인 채널 내에 원형의 내강을 가지는 하이드로젤이 형성됨을 알 수 있고, 또한, PDMS, 하이드로젤 및 물 사이의 인터페이스 근처 상단 부분에는 공초점 현미경에서 빛 통과 방향을 따라 형성되는 디머 영역(dimmer areas, 디머 영역이란 굴절률이 다른 물질(PDMS:1.43, 젤라틴 하이드로젤:~1.36, 물:1.33) 사이의 인터페이스에서 빛 간섭(회절 및 굴절)에 의해 생성된 광학 인공물)이 표시되는 것을 확인할 수 있다.

[0052] <실시예 2> 미세유체 장치의 내강 구조의 조절

[0053] 1. 내강 직경의 조절

[0054] (1) tDIFF와 tUV를 변화시킨 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 3과 동일하게 하여 미세유체 장치를 제조한 후, 실시예 1의 4와 동일한 방법으로 미세유체 장치를 이미지화한 후 횡단면의 직경을 계산하여, 그 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.

[0055] (2) 도 5를 보면, tDIFF와 tUV를 조절하여 30 내지 140um의 직경을 가지는 원형의 횡단면을 가지는 내강을 형성할 수 있음을 알 수 있고, 도 6을 보면 채널 축을 따라 일정한 직경의 내강이 형성됨을 확인할 있어, tDIFF와 tUV의 조절을 통해 모세혈관으로부터 동맥 및 정맥까지의 직경을 가지는 내강을 형성하는 것이 가능함을 알 수 있다.

[0056] 2. 질병 상태의 혈관의 모방

[0057] (1) 생리학 및 병리학 상태하의 혈관을 닮은 내강 형상을 구현하기 위해, 도 2에 도시된 바와 같은 DMD를 사용하여 그레이스케일 자외선 강도의 2차원 패턴을 조절하였다.

[0058] (2) 자외선을 채널에 조사하여 채널 내에 하이드로젤을 형성 시, 채널 축을 따라 자외선 강도를 변화시키는 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 3과 동일하게 하여 미세유체 장치를 제조한 후, 실시예 1의 4와 동일한 방법으로 미세유체 장치를 이미지화한 후 3D 리컨스트럭티드 이미지를 도 7에 나타내었다. 도 7을 보면, 협착(stenosis) 또는 방추형 동맥자루(fusiform aneurysm)를 가지는 동맥처럼, 국부적으로 좁아지는 또는 확장된 내강을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

[0059] (3) 또한, 자외선을 채널에 조사하여 채널 내에 하이드로젤을 형성 시, 도 8처럼 채널 폭(y-방향)과 축(x-방향)을 따라 자외선 강도를 변화시키는 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 3과 동일하게 하여 미세유체 장치를 제조한 후, 실시예 1의 4와 동일한 방법으로 미세유체 장치를 이미지화한 후 3D 리컨스트럭티드 이미지를 도 9에 나타내었다. 도 9를 보면, 죽상판(atheromatous plaque)을 가지는 동맥처럼, 비축대칭 방식(non-axisymmetric way)으로 국부적으로 좁아지는 내강을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

[0060] (4) 또한, 미세유체 구조체의 제조 시 사용되는 몰드를 변경하여 다양한 형상의 채널을 형성하고, 자외선을 채널에 조사하여 채널 내에 하이드로젤의 형성시 자외선 강도 패턴을 변경시키는 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 3과 동일하게 하여 미세유체 장치를 제조한 후, 실시예 1의 4와 동일한 방법으로 미세유체 장치를 이미지화한 후 3D 리컨스트럭티드 이미지를 도 10(도 10에서 스케일 바는 100um임)에 나타내었다. 도 10을 보면, 폭이 좁은 90도 가지를 가지는 내강(도 10의 (a)), 90도 굴곡된 형태의 내강(도 10의 (b)), 가지를 가지는 굴곡된 형태의 내강(도 10의 (c)), 반원 형태의 내강(도 10의 (d)), 협착이 있는 경동맥 분기를 모방한 협착이 있는 분기 형태의 내강(도 10의 (e)), 낭상동맥류를 모방한 돌출부를 가진 내강(도 10의 (f))을 얻을 수 있음을 확인할 수 있어, 채널 형상과 자외선 강도 패턴의 조절을 통해 실제 생리학 및 병리학 상태하의 혈관을 닮은 다양한 채널 및 내강의 구조를 생성할 수 있음을 알 수 있다.

[0062] <실시예 3> 병리학 상태의 영률 및 원주변형률의 구현

[0063] 1. 신체에서 영률(Young's modulus)은 나이, 염증, 동맥경화, 고혈압 등에 의해 증가하므로, 병리학 상태(최

대 ~30kPa)를 가진 동맥을 모방하도록, 영률을 증가시키기 위해 하이드로젤에 남아 있는 메타크릴아미드(methacrylamide) 그룹을 추가로 중합시켰다. 구체적으로, 실시예 1의 3과 같은 방식으로 제조된 미세유체 장치의 내강에 DMF에 용해된 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol(10 mM) 및 광 개시제(1 vol. %)를 채운 후, 일정 시간($t_{\text{post,UV}}$) 동안 자외선을 조사하였다. 이후, 자외선 조사 시간($t_{\text{post,UV}}$)에 따른 하이드로젤 표면의 영률(E_s)을 측정하여 그 결과를 도 11에 나타내었다. 상기 하이드로젤 표면의 영률 측정 결과 채널 축에 따라 일정함을 알 수 있었고, 도 11에서 확인할 수 있는 바와 같이 자외선 조사 시간이 증가될수록 하이드로젤 표면의 영률을 증가시킬 수 있었다.

[0064]

2. 또한, 하이드로젤 표면의 영률을 국부적으로 증가시키기 위해 패턴화된 자외선 조사에 의해 하이드로젤 안에 nitrocinnamic acid derivative를 광학적으로 그래프트시켰다. 구체적으로, 3-(4-nitrophenyl)-N-(2-sulfanylethyl)prop-2-enamide(NC-SH, ~50nM)를 에틸렌 글리콜에 용해시켜 에틸렌 글리콜 용액을 형성하고, 상기 에틸렌 글리콜 용액을 실시예의 1의 3과 같은 방식으로 제조된 미세유체 장치의 내강에 채운 후, 패턴화된 자외선 일정 시간($t_{\text{NC,UV}}$)조사하여 하이드로젤 표면에서 잔류하는 메타크릴아미드와 NC-SH 사이의 thiol-ene 반응을 유도한 후, 에틸렌 글리콜과 DPBS를 이용하여 차례로 워싱하였다. 이후, 하기의 실시예 4에 기재된 바와 같이 내강 표면에 laminin을 코팅하고 EC를 시딩(seeding)한 후, 패턴화되지 않은 자외선(UV_{flood} , a maximum intensity at 365 nm, 30.8 mW/cm²)을 조사한 후, 하이드로젤 표면의 영률을 측정하였다. 영률 측정 결과, 국부적으로 영률이 증가됨을 확인하였는데, 이는 패턴화된 자외선을 조사하므로, nitrocinnamic acid derivative는 국부적으로 하이드로젤 안에 그래프트되어, nitrocinnamic acid derivative가 그래프트된 영역에서만 광이화합체화(photodimerization) 및 가교(crosslinking)가 이루어졌기 때문인 것으로 보인다. 또한, 도 12는 UV_{flood} 의 조사 전후에 nitrocinnamic acid derivative가 그래프트된 지역에서 측정한 영률을 나타내는 그래프인데, 도 12를 보면 nitrocinnamic acid derivative가 그래프트된 영역의 영률은 UV_{flood} 의 조사 후에는 $t_{\text{NC,UV}}$ 가 증가할수록 커짐을 알 수 있다. 한편, 자외선(UV_{flood})에 노출된 EC의 생존력을 cell viability assay kit(Biotium, USA)를 사용하여 측정하였는데, 하이드로젤 표면의 영률을 국부적으로 증가시키기 위한 UV_{flood} 의 조사는 세포 생존력에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

[0065]

3. 또한, 국부적으로 감소된 원주변형률을 가진 혈관을 모방하기 위해, 패턴화된 UV 조사를 통해 PDMS 안에 벤조페논을 가진 pentaerythritol derivatives를 광가교시켰다. 구체적으로 N-(4-benzoylphenyl)acrylamide(BPAm) 및 pentaerythritol tetrakis가 DCM에 4:1의 몰비로 혼합되고, DBU가 반응 촉매로 추가되어 반응 혼합물이 수득되고, 반응 혼합물은 상온에서 하룻밤 동안 교반되고 DCM 및 탈이온수를 가지고 추출되고 건조되어, benzophenone-tethered pentaerythritol derivatives(이하, 4-arm benzophenone이라 함)를 얻었다. 실시예 1의 1과 같은 방식으로 제조된 미세유체 구조체의 채널 내에 4-arm benzophenone(20 w/f %)을 포함하는 아세톤을 채운 후 4-arm benzophenone이 나노포러스한 PDMS에 확산되도록 하룻밤 동안 유지하였다. 이후, 상기 채널에 1시간 동안 패턴화된 UV를 조사하여, 4-arm benzophenone이 부분적으로 PDMS와 링크되도록 하였다. 이후, 상기 채널을 워싱하고 건조한 후, 실시예 1의 2 및 3과 같은 방식으로 하이드로젤을 형성한 후, 잔류하는 벤조페논을 활성화하기 위해 상기 채널에 일정 시간($t_{\text{PDMS,UV}}$) 동안 자외선을 조사한 후, 원주 변형률(ϵ_c)을 측정하였다. 원주 변형률 측정 결과, 국부적으로 원주 변형률이 감소함을 확인하였다. 도 13은 4-arm benzophenone이 PDMS와 링크된 지역에서 측정한 원주변형률을 나타내는 그래프인데, 도 13을 보면 상기 원주 변형률은 $t_{\text{PDMS,UV}}$ 가 증가할수록 감소됨을 알 수 있다.

[0067]

<실시예 4> 미세유체 장치 내에 EC의 배양 및 기계생물학적 반응의 유도

[0068]

1. 미세유체 장치 내에 EC의 배양

[0069]

(1) EC의 국소 접착을 강화하고 인테그린 클러스팅(integrin clustering)을 증진시키기 위해, 실시예 1의 3과 같은 방식으로 제조된 미세유체 장치의 내강 표면은 라미닌과 콜라겐을 포함한 기저막 단백질을 함유하는 Matrigel(Reduced growth factor, BD Bioscience, USA)로 코팅된다. 구체적으로, 공유 부착을 위해, Matrigel(0.2ml)과 sulfo-SANPAH(10mg; Covacum, USA)를 DPBS에 혼합교반하여 혼합물을 형성하고, HEPES 버퍼(50mM)에 희석된 혼합물을 상기 미세유체 장치의 내강에 주입하고 1분 동안 UV를 조사하여 기저막 단백질이 내강 표면에 공유결합하도록 하였다. 미반응 종을 제거한 후, 에탄올 용액으로 살균한 다음, DPBS로 세척하였다.

[0070] (2) 이후, 배양된 EC(Human coronary artery endothelial cells)가 내강 내에 시딩되고(density : $\sim 5 \times 10^8$ cells/ml), 4시간 동안 내강 표면에 상기 EC가 부착되고 퍼진 후, 상기 미세유체 장치를 뒤집고 동일한 밀도로 EC를 시딩하고 4시간 동안 배양하여, EC의 단층(monolayer)을 형성하였다. 이후, EC 미세유체 장치를 syringe pump(KDS 230, KD Scientific, USA)를 사용하여 하루 동안 steady flow(shear stress(Pa)와 pressure(mmHg)이 각각 0.3이고 ~ 0 임)에 노출시켰다.

[0071] (3) phase-contrast mode하에 광학 현미경을 사용하여 미세유체 장치를 측정하여 그 결과를 도 14에 나타내었다. 또한, 상기 미세유체 장치 내의 EC를 paraformaldehyde(4w/v%)로 15분동안 고정하고, Triton X-100(1 v/v%)로 30분 동안 처리한 후, blocking solution(Block Ace, KAC, Japan)에 60분 동안 노출시켰다. 이후, Alexa Fluor 594가 컨쥬게이션된 VE-cadherin의 항체를 blocking solution에 1:10의 중량비로 용해시킨 후, 상기 내강에 주입하여 면역형광 염색을 수행하였고, 이때 핵은 DAPI solution(300nM)으로 염색하였다. 이후, LSCM을 사용하여 상기 미세유체 장치 내의 EC를 이미지화하여 도 15(도 15의 (a)는 횡단면의 이미지이고, 도 15의 (b)는 축을 따른 이미지임)에 나타내었다. 도 14를 보면, EC 단층(monolayer)이 미세유체 장치의 내강 표면에 존재함을 확인할 수 있고, 도 15를 보면, 내피 장벽 무결성(endothelial barrier integrity)을 유지하는 부착 접합부(adherens junctions)의 주된 요소인 VE-cadherin이 표현됨을 확인하였다.

[0072] 2. 기계생물학적 반응의 유도

[0073] (1) 실시예 1의 3 및 실시예 3의 1과 같은 방식으로 제조된 미세유체 장치들(서로 다른 영률을 가지는 미세유체 장치 사용)에 대해 실시예 4의 1과 같은 방식으로 EC를 배양한 후, 각각 steady flow 1(SF₁, shear stress(Pa)와 pressure(mmHg)이 각각 0.3이고 ~ 0 임), steady flow 2(SF₂, shear stress(Pa)와 pressure(mmHg)이 각각 1.5이고 ~ 80 임), 도 16에 도시된 바와 같은 펄스 플로우 발생기(pulse flow generator)를 사용하여 도 17에 도시된 바와 같은 pulsatile flow(PF)를 가하였다. 이후, 폐놀 레드가 없는 EGM-2를 가지고 내강을 워싱한 후, 30분 동안 세포막을 투과하고 세포질 NO와 반응하여 형광을 방출하는 DAF-2 DA(10uM; ab145283, Abcam, UK)를 가지고 EC를 배양하고, DPBS 및 EGM-2로 행군 후 LSCM을 사용하여 EC를 이미지화하여 도 18에 나타내었다.

[0074] (2) 혈관 긴장도(vascular tone)를 조절하는 NO의 생성은 EC의 주된 역할 중의 하나인데, 도 18을 보면 NO 생성은 PF에 의해 향상됨을 확인할 수 있다.

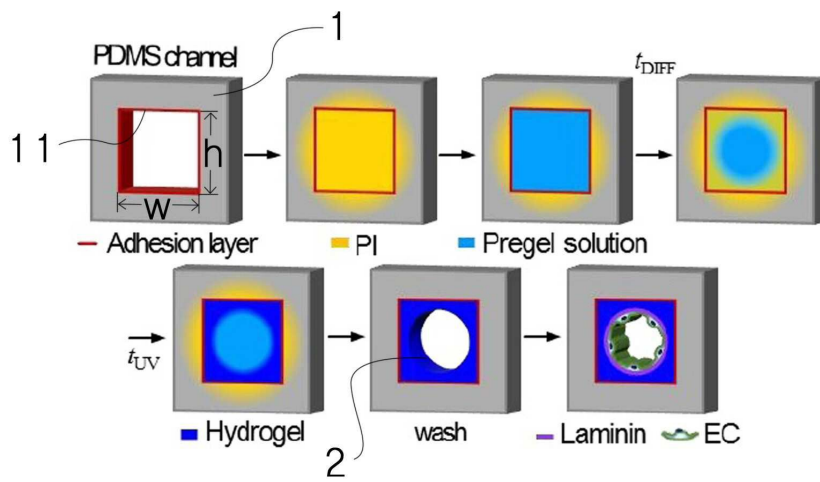
[0076] 이상에서, 출원인은 본 발명의 바람직한 실시예들을 설명하였지만, 이와 같은 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 일 실시예일 뿐이며 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 한 어떠한 변경에 또는 수정에도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

부호의 설명

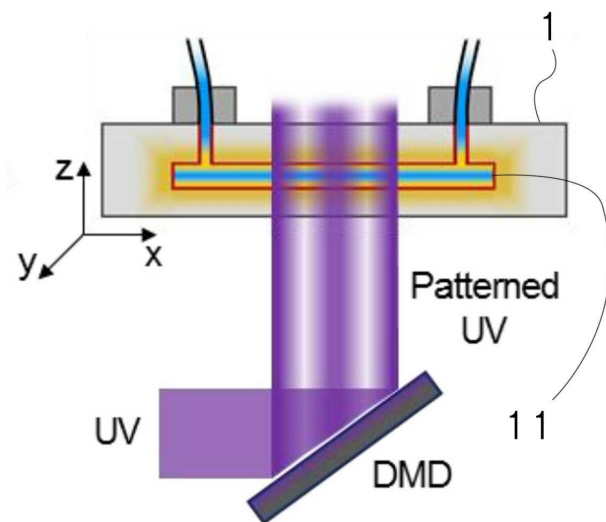
[0077] 1: 미세유체 구조체 2: 내강 11: 채널

도면

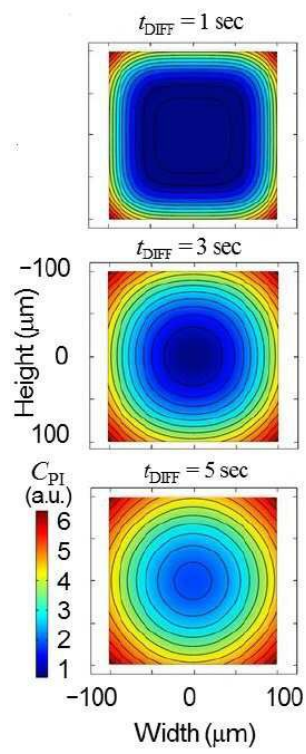
도면1



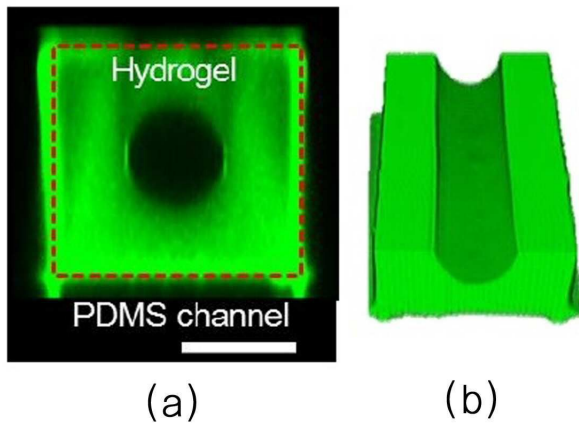
도면2



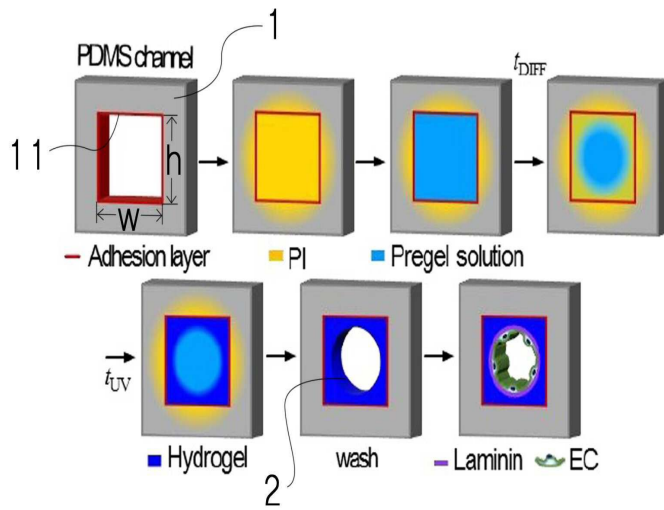
도면3



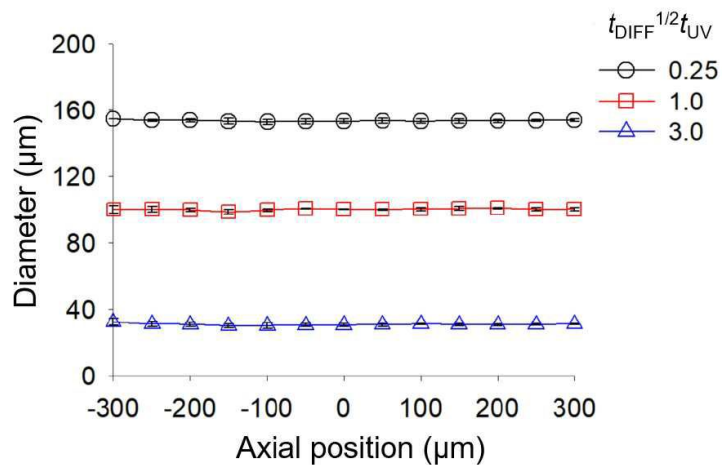
도면4



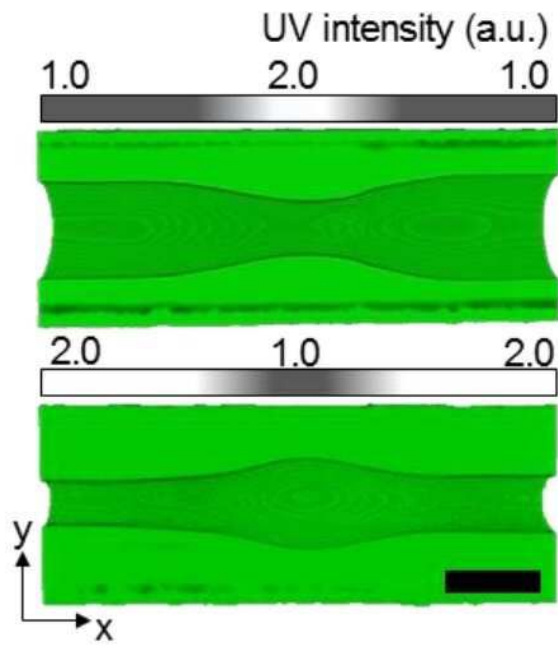
도면5



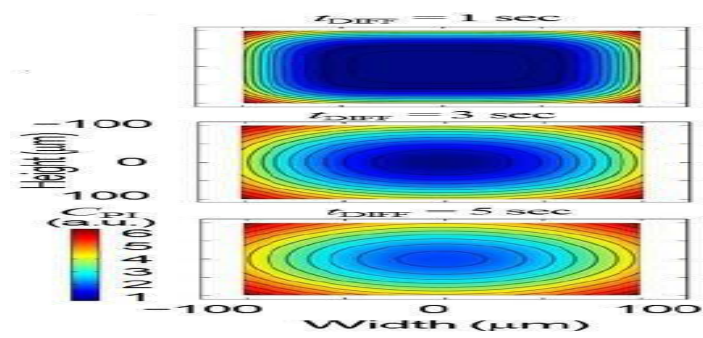
도면6



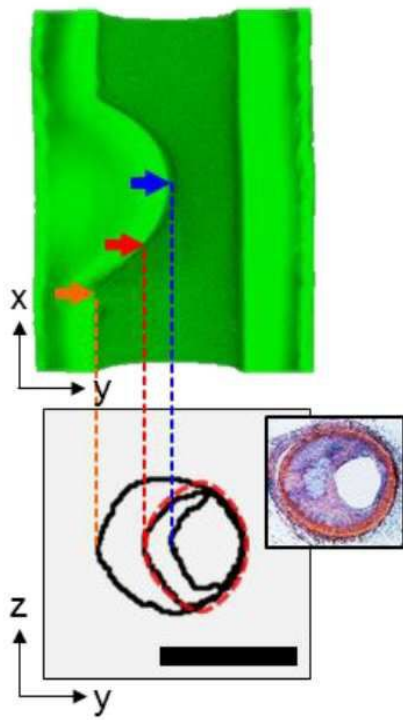
도면7



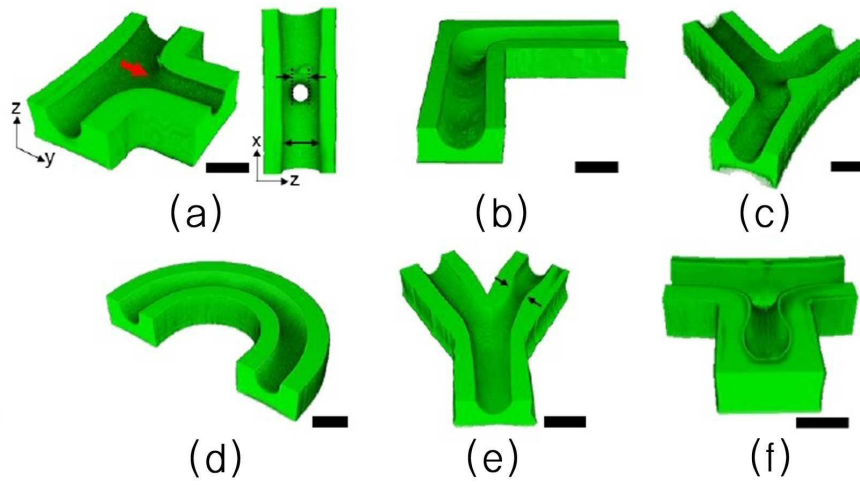
도면8



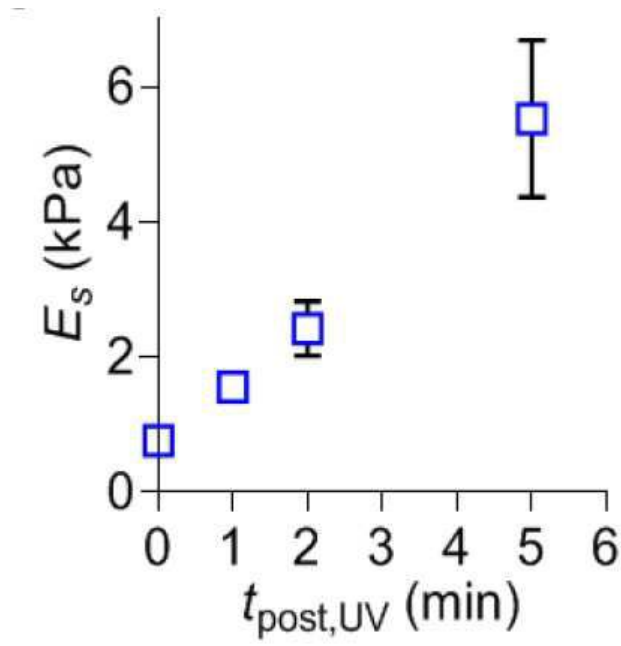
도면9



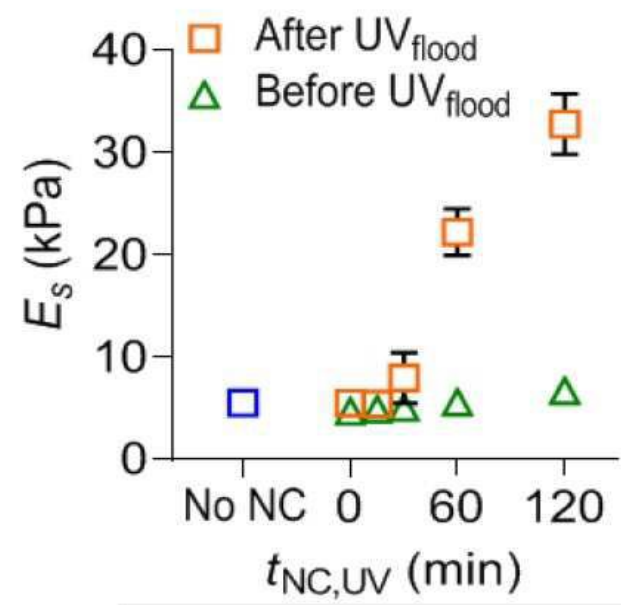
도면10



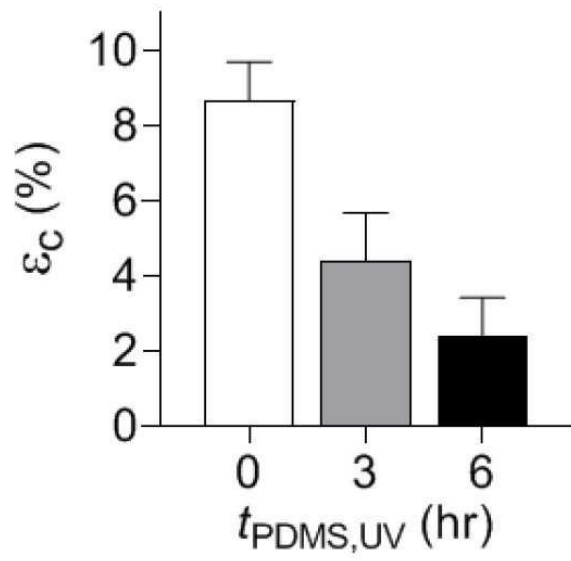
도면11



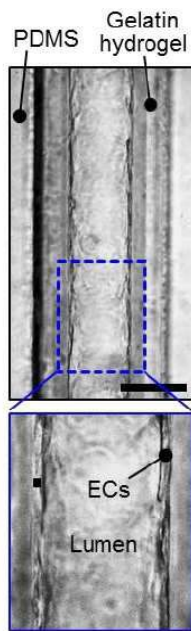
도면12



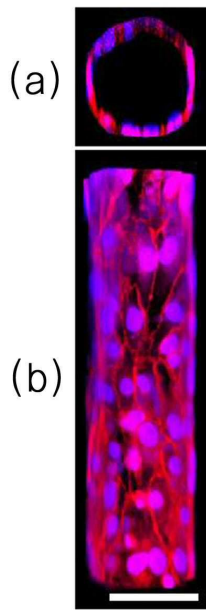
도면13



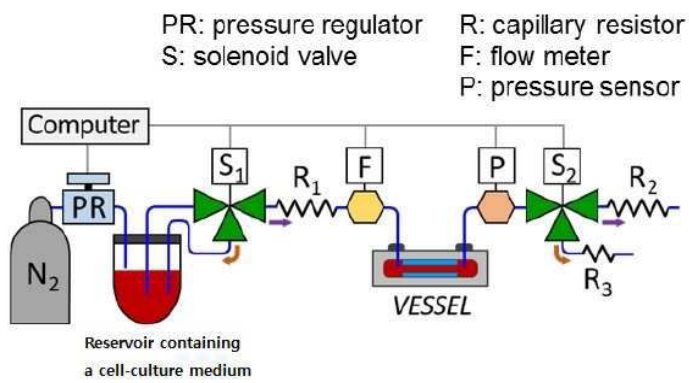
도면14



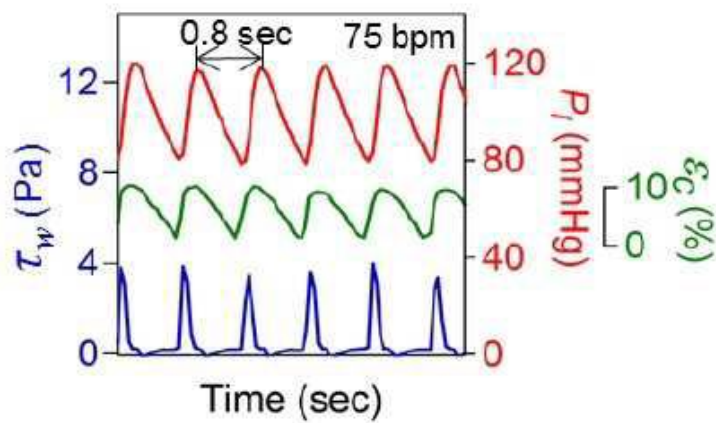
도면15



도면16



도면17



도면18

