



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0110153
(43) 공개일자 2023년07월21일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12M 29/00 (2013.01)
C12M 21/08 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0080654</p> <p>(22) 출원일자 2022년06월30일
심사청구일자 2023년01월16일</p> <p>(30) 우선권주장
1020220006035 2022년01월14일 대한민국(KR)
1020220011109 2022년01월26일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
주식회사 휴먼에이스
경기도 포천시 해룡로 120(동교동, 차의과대학교
창업보육센터장)</p> <p>(72) 발명자
백상원
경기도 성남시 중원구 둔촌대로 151번길 12-7
박성빈
경기도 성남시 중원구 광명로 115-1 노블레스 1동
104호</p> <p>(74) 대리인
특허법인한얼</p> |
|---|---|

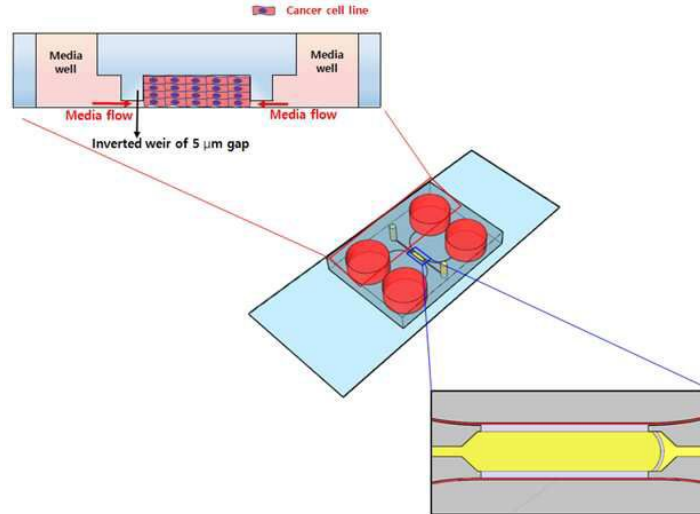
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 역-미세독 구조가 포함된 인간 생체조직칩 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 역-미세독 구조가 포함된 생체조직칩 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 약물의 효능 및 독성 평가용 생체조직칩을 사용하면, 기존 2차원 in-vitro 세포 배양법의 인체 미세환경을 모방하지 못하는 한계점과 동물실험의 이종간의 차이에 따른 부정확성을 극복할 수 있고, 약물처리에 따른 세포에 대한 보다 정확한 효능 및 독성결과를 도출할 수 있다. 이에 따라, 동물실험 대체 시험법으로 이용함으로써 신약 개발 및 약물 스크리닝 시 필요한 비용 및 시간을 획기적으로 감소시킬 뿐 아니라 세포 미세환경 연구 및 다른 장기칩(organ-on-a-chip)의 연구, 신약 개발, 약물 대사 기전 연구 등에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 23/58 (2013.01)

C12N 5/0693 (2013.01)

C12N 5/0697 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 배양액 공급 챔버; 배양액 회수 챔버; 및, 상기 각 챔버와 연통하는 배양액 채널;을 포함하는 배양액 공급부;
- (b) 일 측단에 구비된 세포 유입구; 다른 일 측단에 구비된 잔류물 유출구; 및, 상기 세포 유입구와 잔류물 유출구 사이에 구비되고, 상기 배양액 채널과 연결하여 동일한 방향으로 연장된 세포 챔버;를 포함하는 세포 공급부; 및
- (c) 상기 배양액 채널과 세포 챔버의 연결부, 상기 세포 챔버와 잔류물 유출구의 연결부 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 부위에 구비된 역-미세독 구조를 포함하는, 생체조직칩.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 역-미세독 구조는 그의 상단이 연결부의 상단과 결합되고, 하단이 연결부의 바닥과 이격되도록 구비되어, 상기 이격된 부위를 통해 세포 또는 경화된 세포는 통과하지 못하고, 액상성분은 통과할 수 있도록 구성되는 것인, 생체조직칩.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 이격된 부위의 간격은 5 내지 20 μm 인 것인, 생체조직칩.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 역-미세독 구조의 단면은 직방형 또는 호의 형태인 것인, 생체조직칩.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 배양액 채널과 세포 챔버의 연결부에 구비된 역-미세독 구조는 상기 연결부를 따라 동일한 방향으로 연장되도록 구비되고, 하단의 이격부위를 통해 배양액 채널과 세포 챔버간에 배양액의 상호유통을 허용하도록 구성되는 것인, 생체조직칩.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 세포 챔버와 잔류물 유출구의 연결부에 구비된 역-미세독 구조는 상기 잔류물 유출구 방향으로 굽어진 호의 형태로 구비되고, 하단의 이격부위를 통해 세포 챔버로부터 잔류물 유출구로의 잔류물 배출을 허용하도록 구성되는 것인, 생체조직칩.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 배양액 공급 챔버는 배양액 채널 및 역-미세독 구조를 통해 세포 챔버에 공급하기 위한 세포 배양용 배양액을 저장하는 것인, 생체조직칩.

청구항 8

제1항에 있어서,

약물의 효능 및 독성 평가를 위하여, 상기 배양액 공급 챔버에서 간세포를 추가로 배양하는 것인, 생체조직칩.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 배양액 채널은 상기 배양액 공급 챔버로부터 배양액 회수 챔버로 배양액이 유통하는 경로인 것인, 생체조직칩.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 배양액 채널의 폭은 20 내지 40 μ m인 것인, 생체조직칩.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 세포 유입구는 세포 챔버에 공급하기 위한 세포 혼합물을 유입하는 역할을 수행하는 것인, 생체조직칩.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 세포 혼합물은 세포 및 세포의 유통과 고정을 보조하는 하이드로젤을 포함하는 것인, 생체조직칩.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 세포 챔버는 세포 유입구를 통해 공급된 세포 혼합물에 포함된 세포가 정렬하여 고정되고, 고정된 세포를 배양하는 배양용기로서의 역할을 수행하는 것인, 생체조직칩.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 세포의 고정은 세포 혼합물에 포함된 하이드로젤의 경화에 의해 수행되는 것인, 생체조직칩.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 세포의 배양은 역-미세둑 구조의 하단부와 연결부의 바닥 사이에 형성된 이격부위를 통해 배양액 채널로부터 공급된 배양액이 세포 챔버에 고정된 세포에 공급되어 수행되는 것인, 생체조직칩.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 배양의 대상이 되는 세포는, 암세포, 심근세포, 평활근 세포, 횡문근 세포, 신장세포, 간세포, 상피세포, 신경세포, 줄기세포, 혈관내피세포, 뼈세포, 두피세포, 비장세포, 폐세포, 구강세포, 피부세포, 모낭세포, 뇌세포, 척수세포 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 세포인 것인, 생체조직칩.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 배양의 대상이 되는 암세포는, 유방암 세포, 자궁경부암 세포 또는 간암 세포인 것인, 생체조직칩.

청구항 18

제1항에 있어서,

상기 세포 챔버의 폭은 20 내지 2000 μ m인 것인, 생체조직칩.

청구항 19

제1항에 있어서,

상기 잔류물 유출구는 세포 챔버에 고정된 세포를 배양하면서 상기 세포로부터 생성된 오염물을 외부로 배출하는 역할을 수행하는 것인, 생체조직칩.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 생체조직칩은 하나의 배양액 공급부와 하나의 세포 공급부를 포함하는 것인, 생체조직칩.

청구항 21

제1항에 있어서,

상기 생체조직칩은 복수개의 배양액 공급부와 하나의 세포 공급부를 포함하는 것인, 생체조직칩.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 배양액 공급부는 세포 공급부를 중심으로 양쪽으로 정렬된 것인, 생체조직칩.

청구항 23

제1항에 있어서,

상기 생체조직칩은 하나의 배양액 공급부와 복수개의 세포 공급부를 포함하는 것인, 생체조직칩.

청구항 24

제1항에 있어서,

상기 생체조직칩은 복수개의 배양액 공급부와 복수개의 세포 공급부를 포함하는 것인, 생체조직칩.

청구항 25

제1항에 있어서,

상기 생체조직칩은 두 개의 배양액 공급 챔버(3); 두 개의 배양액 회수 챔버(4); 두 개의 배양액 채널(7); 한 개의 세포 유입구(5); 한 개의 잔류물 유출구(6); 상기 배양액 채널과 연결한 한 개의 세포 챔버(8); 및, 세포 챔버와 배양액 채널의 연결부 및 세포 챔버와 잔류물 유출구의 연결부에 구비된 역-미세독 구조(9, 10)를 포함하는 것인, 생체조직칩.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 두 개의 배양액 채널(7)은 세포 챔버(8)를 중심으로 양쪽으로 정렬된 것인, 생체조직칩.

청구항 27

- (a) 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 생체조직칩에 포함된 세포 챔버에 포함된 세포를 배양하는 단계;
- (b) 상기 생체조직칩에 포함된 배양액 공급 챔버에 목적하는 약물을 투여하는 단계; 및,
- (c) 상기 배양된 세포의 변화를 측정하는 단계를 포함하는, 세포에 미치는 약물의 효능을 평가하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 세포의 변화는 배양된 세포의 손상여부, 성장여부, 분비성분의 변화여부, 유전자 발현수준의 변화여부, 단백질 수준의 변화여부 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 29

제27항에 있어서,

상기 세포는 암세포이고, 상기 암세포의 변화는 배양된 세포의 손상여부인 것인, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 암세포는 유방암 세포, 자궁경부암 세포 또는 간암 세포인 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 역-미세독 구조가 포함된 인간 생체조직칩 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 약물 개발은 많은 시간과 노력을 필요로 하고 비용이 많이 들지만, 개발이 진행된 약물 중 극소수만이 승인을 받는다. 단일 의약품에 대한 규제 승인을 달성하기 위해선 약 25억 달러 이상의 엄청난 고비용과 10-15년 정도의 장 시간이 요구 된다. 이를 극복하기 위해, 많은 동물 또는 세포 기반 실험이 약물 개발의 초기 단계에서 일반적으로 수행되어 왔다.

[0003] 동물에 기반한 실험은 고비용이고 장 시간이 필요하고 윤리적인 문제에서도 자유로울 수 없었으며, 인간과 다른 이온채널의 존재, 약동학적 차이 등 종간 차이(inter-species differences)라는 한계점을 지니고 있어 동물실험 결과가 인간에게 똑같이 적용되지 않는 경우가 많고, 동물실험을 거쳐 임상실험을 통과한다고 하더라도 부작용으로 다시 퇴출되는 경우가 있는 실정이다. 세포 기반 실험에서 세포는 보통 2차원 조건에서 배양된다. 이러한 2차원 세포 배양 모델은 취급의 용이성과 높은 처리량 면에서 장점이 있지만, 2차원 배양 과정에서 세포가 고유의 기능을 상실하여 잘못된 평가 결과가 나오기 때문에 이를 이용한 약물 효능 및 독성평가에는 한계가 있다. 인체 장기에서 세포는 세포외기질(ECM, Extracellular Matrix)과 함께 3차원 구조 환경에 있고 모세혈관에서 영양소와 산소를 확산으로 계속 공급받고 그 후 생성된 노폐물과 대사산물 그리고 이산화탄소를 혈관을 통해 확산 배출 시킨다. 따라서 실제 장기의 구조적, 생리적, 환경적 특성을 반영하는 효율적인 약물 효능 및 독성평가 플랫폼이 필요하다.

[0004] 인간 생체조직칩 또는 생체조직칩(organ-on-a-chip; OoC)은 인체 특정 장기의 내부 미세환경(microenvironment) 구조를 모방하여 마이크로챔버에 해당 장기를 구성하는 세포를 배양함으로써 그 특성을 구현하는 시스템이다. 따라서, 생체조직칩은 이러한 동물실험의 한계점들을 극복할 수 있는 효과적인 대안이며, 조직 또는 장기 수준의 생리활성을 구현함으로써 전 임상 신약개발 플랫폼으로 기대되고 있다.

[0005] 이러한 인간 생체조직칩의 하나로서 암세포를 이용한 생체조직칩은 항암제 후보물질의 약리활성 시험, 암전이 작용기전의 규명 등의 목적을 달성하기 위하여 사용되고 있는데, 예를 들어, 한국등록특허 제10-1437149호에는 섬유아세포에 의해 농축된 배양액을 암세포에 공급하는 형태의 암세포 배양칩이 개시되어 있고, 한국등록특허 제10-1621211호에는 암세포가 혈관세포를 침윤하는지의 여부를 확인할 수 있는 항암제 검증용 마이크로 유체칩이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제10-1709312호에는 혈관내피세포 및 암세포의 공동 배양이 가능한 하이드로겔 기반의 세포 공동-배양용 미세유체칩이 개시되어 있고, 한국등록특허 제10-1701607호에는 세포 배양 챔버간 연속적인 농도구배를 유도함으로써 항암제 내성암세포를 스크리닝할 수 있는 미세유체 칩이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제10-1784703호에는 생체와 유사한 세포배양 환경을 조성할 수 있도록, 방광점막하기질을 이용한 하이드로겔을 포함하는 3차원 세포배양 칩이 개시되어 있고, 한국등록특허 제10-1913777호에는 3차원 피라미드 구조를 갖는 메쉬형 미세구조체를 이용하여 3차원 입체적 형상의 암세포를 배양함으로써, 암세포의 본래 특성 재현 및 생체 내 환경과 유사한 활동성을 구현할 수 있는 3차원 메쉬형 미세구조체 기반 항암제 효능평가용 세포칩이 개시되어 있으며, 한국공개특허 제10-2021-0014464호에는 정상 혈관조직, 암 조직 및 암이 전이된 혈관 조직을 모사할 수 있는 혈관모사 세포공동배양용 미세유체칩이 개시되어 있으며, 림프 전이 과정 중 염증성 사이토카인, 스트로마 반응, 저산소증, 영양소 결핍 등 다양한 세포의 자극 하에서 암 미세 환경에서의 세포간 상호작용을 확인할 수 있는 림프관-조직-혈관(LTB) 구조를 모방한 3채널 미세유체 시스템이 공지되어 있다(Cho H-Y, Choi J-H, Kim K-J, Shin M and Choi J-W (2021) Microfluidic System to Analyze the Effects of

Interleukin 6 on Lymphatic Breast Cancer Metastasis; Front. Bioeng. Biotechnol. 8:611802.).

[0006] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 인간으로부터 유래된 암세포를 생체내 환경과 유사한 환경에서 배양할 수 있는 생체조직칩을 새로이 개발하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 주된 목적은 세포에 배양액을 공급하기 위한 배양액 공급부와 고정된 세포를 포함하는 세포 공급부 및 이들 사이에 구비된 역-미세독 구조를 포함하는 생체조직칩을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 생체조직칩을 이용하여 암세포에 미치는 항암제의 효능을 평가하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 일 실시양태는 (a) 배양액 공급 챔버; 배양액 회수 챔버; 및, 상기 각 챔버와 연통하는 배양액 채널;을 포함하는 배양액 공급부; (b) 일 측단에 구비된 세포 유입구; 다른 일 측단에 구비된 잔류물 유출구; 및, 상기 세포 유입구와 잔류물 유출구 사이에 구비되고, 상기 배양액 채널과 연결하여 동일한 방향으로 연장된 세포 챔버;를 포함하는 세포 공급부; 및, (c) 상기 배양액 채널과 세포 챔버의 연결부, 상기 세포 챔버와 잔류물 유출구의 연결부 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 부위에 구비된 역-미세독 구조를 포함하는, 생체조직칩을 제공한다.

[0010] 본 발명에서 제공하는 "역-미세독 구조"란, 배양액 채널과 세포 챔버의 연결부 또는 세포 챔버와 잔류물 유출구의 연결부에 구비된 부분 차단부재를 의미하는데, 구체적으로, 상기 역-미세독 구조란, 배양액 채널과 세포 챔버의 연결부 또는 세포 챔버와 잔류물 유출구의 연결부의 일부 공간을 차단하여 세포의 이동은 방지하면서 액상성분의 이동을 허용하는 부분 차단부재를 의미하는데, 거꾸로 천정부위에 결합된 둥(weir) 형태의 구조물이라는 의미에서 "역-미세독 구조"라 명명하였다. 구체적인 예로서, 배양액 채널과 세포 챔버의 연결부의 경우 상기 연결부를 따라 동일한 방향으로 연장되고, 그의 상단이 연결부의 상단과 결합되고, 그의 하단이 연결부의 바닥과 이격되도록 구비된 형태의 역-미세독 구조가 구비될 수 있고, 다른 예로서, 세포 챔버와 잔류물 유출구의 연결부의 경우 상기 연결부를 따라 역-미세독 구조가 동일한 방향으로 연장되는데, 역-미세독 구조의 상단은 연결부의 상단과 결합되며, 역-미세독 구조의 하단은 연결부의 바닥과 이격되도록 구비될 수 있다.

[0011] 앞서 정의한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 포함된 역-미세독 구조는 그의 상단이 연결부의 상단과 결합되고, 그의 하단이 연결부의 바닥과 이격되도록 구비되어, 상기 이격된 부위를 통해 세포 또는 경화된 세포는 통과하지 못하고, 액상성분은 통과할 수 있도록 구성될 수 있다.

[0012] 상기 역-미세독 구조의 형태는 상술한 기능성을 나타내는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 단면이 직방형 또는 호의 형태를 갖는 미세 장벽 구조가 될 수 있는데, 이는 세포가 세포 챔버 외부로 빠져나가지 않는 상태에서 배양액을 자유로이 세포 챔버의 내부와 외부로 유통시키기 위함이다. 또한, 하단에 구비된 이격된 부위의 간격은 세포의 통과가 허용되지 않는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 5 μm 내지 20 μm 가 될 수 있고, 다른 예로서, 7 μm 내지 15 μm 가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 10 μm 가 될 수 있다.

[0013] 상기 이격된 부위의 간격이 5 μm 보다 작은 경우에는 표면장력에 의해 역-미세독 구조의 하단과 연결부의 바닥 사이로 액상성분이 통과할 수 없고, 상기 이격된 부위의 간격이 20 μm 보다 넓은 경우에는 상기 이격된 부위를 통해 세포가 이동하여 세포 챔버로부터 세포가 빠져나갈 수 있다.

[0014] 또한, 상기 역-미세독 구조 중에서, 배양액 채널과 세포 챔버의 연결부에 구비된 역-미세독 구조는 상기 연결부를 따라 동일한 방향으로 연장되도록 구비되고, 하단의 이격부위를 통해 세포의 통과를 방지하면서도, 배양액 채널과 세포 챔버간에 배양액의 상호유통을 허용하도록 구성될 수 있다.

[0015] 아울러, 상기 역-미세독 구조 중에서, 세포 챔버와 잔류물 유출구의 연결부에 구비된 역-미세독 구조는 상기 잔류물 유출구 방향으로 굽어진 호의 형태로 구비되고, 하단의 이격부위를 통해 세포의 통과를 방지하면서도, 세포 챔버로부터 잔류물 유출구로의 잔류물 배출을 허용하도록 구성될 수 있다.

[0016] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 있어서, 앞서 설명한 개량된 부분 차단부재인 역-미세독 구조는 종래의 미세 기둥 구조물과 동일하게 배양액 채널과 세포 챔버의 연결부를 완전히 개통하지 않고 부분적으로 개통하여 세

포의 이동을 방지하는 역할을 수행한다는 점에서 동일한 효과를 나타낸다.

- [0017] 그러나, 역-미세독 구조는 정교하고 복잡한 형태를 갖는 미세 기둥 구조물에 비하여, 단순한 형태를 나타내므로, 이의 제조에 사용되는 주형의 제작비용을 절감할 수 있고, 주형으로부터 얻어진 결과물의 수율을 향상시킬 수 있다는 장점이 있다.
- [0018] 뿐만 아니라, 종래의 심근내막 모방 심장칩에 구비된 미세 기둥 구조물은 세포 챔버에 세포 혼합물을 주입할 때, 상기 세포 혼합물이 세포 챔버에만 주입되고, 배양액 채널로는 주입되지 않도록, 미세 기둥 구조물의 등근 모서리가 시작되는 부분에서 표면장력에 의해 경계가 형성되게끔 유도하여야 하는데, 이를 위하여 80℃ 오븐에서 48시간 동안 유지하는 후처리 공정을 필수적으로 수행하여야만 하므로, 이로 인하여 생산비용과 시간이 증가된다는 단점이 있다. 이에 반하여, 본 발명에서 제공하는 역-미세독 구조는 구조적으로 세포가 통과할 수 없도록 설계되었기 때문에, 표면장력에 의한 경계를 형성할 필요도 없고, 이를 위한 후처리 공정을 수행할 필요도 없다는 장점이 있다.
- [0019] 따라서, 본 발명에서 제공하는 역-미세독 구조를 포함하는 생체조직칩은 제조공정을 보다 단순화시킬 수 있어, 이에 의한 생산성 향상효과를 나타낼 수 있다는 장점이 있다.
- [0020] 한편, 본 발명에서 제공하는 생체조직칩의 전체적인 구조물의 재질은 세포의 고정 및 배양을 저해하거나 좋지 않은 영향을 미치지 않는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL), 폴리디메틸실록산(poly(dimethylsiloxane), PDMS), 폴리락틱산(polylactic acid, PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid, PGA), 폴리디옥사논(polydioxanone, PDO) 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 광학적으로 투명하고, 내구성이 강하며, 생물 친화적이고, 유연한 PDMS 등이 될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 포함된 배양액 공급 챔버는 역-미세독 구조를 통해 세포 챔버에 공급하기 위한 세포 배양용 배양액을 저장하고, 저장된 배양액을 배양액 채널을 통해 세포에 공급하는 역할을 수행한다. 아울러, 암세포에 대한 항암제의 효능을 보다 정밀하게 평가하기 위하여, 상기 배양액 공급 챔버는 간세포를 배양하기 위한 배양용기로서 사용될 수도 있다.
- [0022] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 포함된 배양액 회수 챔버는 상기 배양액 공급 챔버로부터 공급된 배양액이 배양액 채널을 통과한 후, 최종적으로 저장되는 부위로서, 세포 배양 후 오염된 배양액을 회수하는 역할을 수행하는데, 배양 후 세포로부터 분비된 각종 대사산물, 노폐물 등으로 오염된 배양액으로 인한 주변환경 오염을 방지하기 목적으로 사용된다.
- [0023] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 포함된 배양액 채널은 배양액 공급 챔버로부터 배양액 회수 챔버로 배양액이 유통하는 배양액의 메인 유로로서의 역할을 수행하는데, 상기 역-미세독 구조를 통해 세포 챔버에 위치한 세포에 배양액을 공급하고, 세포 배양에 사용된 배양액을 회수하는 역할을 수행한다. 본 발명에 있어서, 상기 배양액 채널은 생체 내에 존재하는 세포에 영양을 공급하기 위한 모세혈관을 모사한 구성요소로서 해석될 수 있다. 이에 따라, 상기 배양액 채널의 폭은 모세혈관의 기능을 모사할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 20 내지 40 μm 의 폭을 가질 수 있고, 다른 예로서, 25 내지 35 μm 의 폭을 가질 수 있으며, 또 다른 예로서, 30 μm 의 폭을 가질 수 있다.
- [0024] 아울러, 상기 배양액 채널의 내부에 혈관내피세포를 배양하여, 보다 생체환경과 유사한 형태로 생체조직칩을 제조할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 포함된 세포 유입구는 세포 챔버에 공급하기 위한 세포 혼합물을 유입하는 역할을 수행하는데, 예를 들어, 세포 혼합물이 로딩된 세포 유입구에 주사기의 노즐이 연결될 수 있는 구조를 갖도록 구성될 수 있다. 상기 세포 혼합물은 세포와 상기 세포의 유통과 고정을 보조하는 보조성분을 포함할 수 있다. 본 발명의 생체조직칩은 이에 포함된 세포 챔버 내부에 정렬되어 고정된 형태로 존재하는 세포를 포함하게 되는데, 상기 세포 챔버 내부에 세포를 주입하고, 주입된 세포가 상기 세포 챔버 내부에 고정되기 위해서는 이를 보조하는 보조성분을 필요로 한다. 상기 보조성분은 세포 주변의 미세환경에 존재하는 세포외기질(ECM)을 모방한 것으로서, 세포의 3차원 세포배양에 필수적이며, 배양된 세포의 구조 및 기능이 생체 내의 것과 유사하도록 유지하는 역할을 수행할 수 있다. 상기 보조성분은 세포의 유입과 고정을 보조할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 하이드로젤을 사용할 수 있고, 다른 예로서, 콜라겐 하이드로젤, 알지네이트 하이드로젤, 젤마(GelMa) 하이드로젤 등을 사용할 수 있다. 상기 하이드로젤은 세포와 혼합되어, 세포의 3차원 배양을 보조하고, 추가적으로 상기 세포에 유동성을 부여하여, 상기 세포가 세포 유입구로부터 세포 챔버로 이동할 수 있게 한다. 뿐만 아니라, 상기 하이드로젤은 다양한 조건에 의해 경화될 수 있는데, 예를 들어, 콜라겐 하이

드로젤은 인큐베이터 내에 1시간 이상 두어 온도상승을 유도하여 경화시킬 수 있고, 알지네이트 하이드로젤은 배양액 채널에 배지를 대체하여 CaCl₂ 용액을 주입하여 경화시킬 수 있으며, 젤마 하이드로젤은 자외선을 조사하여 경화시킬 수 있다. 상기 세포 혼합물이 세포 챔버로 이동한 후, 이에 포함된 하이드로젤이 경화되면, 상기 경화된 하이드로젤 내에 포함된 세포가 자연스럽게 고정될 수 있는데, 하이드로젤의 내재적인 다공성 특징으로 인하여, 하이드로젤을 통해 외부의 배양액이 세포에 전달될 수 있어, 고정된 세포의 배양을 보조할 수 있다.

- [0026] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 포함된 세포 챔버는 상술한 바와 같이, 세포 유입구를 통해 공급된 세포 혼합물이 저장 및 고정될 뿐만 아니라, 고정된 세포를 배양하기 위한 배양용기로서의 역할을 수행할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 세포 챔버는 생체내 존재하는 세포의 미세구조를 모사한 구성요소로서 해석될 수 있다. 이에 따라, 상기 세포 챔버의 폭은 세포의 고정 및 배양을 수행할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 20 내지 2000 μ m의 폭을 가질 수 있고, 다른 예로서, 100 내지 1000 μ m의 폭을 가질 수 있으며, 또 다른 예로서, 600 μ m의 폭을 가질 수 있다.
- [0028] 상기 세포 챔버는 세포 유입구와 잔류물 유출구 사이에 연통된 통로의 형태가 될 수 있는데, 상기 잔류물 유출구와 연통된 부위에는 내부에 역-미세독 구조가 구비되어 있고, 이에 따라, 세포 유입구를 통해 공급된 세포 혼합물에 포함된 세포가 잔류물 유출구로 이동되지 않고, 세포 챔버 내에 잔류하게 된다.
- [0029] 또한, 상기 세포 챔버에 주입될 수 있는 세포는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 다양한 종류의 고휘암세포, 심근세포, 평활근 세포, 횡문근 세포, 신장세포, 간세포, 상피세포, 신경세포, 줄기세포, 혈관내피세포, 뼈세포, 두피세포, 비장세포, 폐세포, 구강세포, 피부세포, 모낭세포, 뇌세포, 척수세포 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 세포가 될 수 있고, 다른 예로서, 유방암 세포, 자궁경부암 세포, 간암세포 등의 고휘암 세포가 될 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 포함된 잔류물 유출구는 세포 챔버에 고정된 세포를 배양하면서 상기 세포로부터 생성된 대사산물 또는 노폐물 등의 오염물을 외부로 배출하는 역할을 수행할 수 있다. 이처럼 오염물을 배출하는 역할은 잔류물 유출구 뿐만 아니라 세포 유입구도 함께 수행할 수 있다. 즉, 세포를 세포 챔버에 유입하는 역할이 종료된 세포 유입구는 세포 챔버에 고정된 세포를 배양하면서 생성되는 오염물을 외부로 배출하는 역할을 수행할 수도 있다.
- [0031] 상기 잔류물 유출구의 형상은, 앞서 설명한 배양액 회수 챔버와 마찬가지로, 세포 혼합물에 포함된 세포로부터 분비된 각종 대사산물, 노폐물 등의 오염물을 외부로 배출하는 역할을 수행할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는다. 다만, 상기 오염물로 인한 세포 주변환경의 오염을 방지하기 위하여 튜브 또는 주사기의 노즐이 결합될 수 있는 형태로 구성될 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩은 적어도 하나의 배양액 공급부와 하나의 세포 공급부를 기본적으로 포함하지만, 상기 생체조직칩을 사용하는 목적에 따라, 다수의 배양액 공급부와 세포 공급부를 포함할 수도 있다.
- [0033] 예를 들어, 복수개의 배양액 공급부와 하나의 세포 공급부를 포함하거나, 하나의 배양액 공급부와 복수개의 세포 공급부를 포함하거나, 또는 복수개의 배양액 공급부와 복수개의 세포 공급부를 포함할 수 있다. 특히, 복수개의 배양액 공급부와 하나의 세포 공급부를 포함하는 경우, 일 예로서, 세포공급부를 중심으로 양쪽에 각각의 배양액 공급부가 구비된 형태가 될 수 있는데, 이 경우, 상기 역-미세독 구조는 복수개의 배양액 채널과 하나의 세포 챔버사이에 형성되고, 각 배양액 채널간의 간섭을 배제하기 위하여, 각 배양액 채널은 인접하지 않도록 구성되거나 또는 인접하더라도 상호 완전 격리되도록 구성될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 생체조직칩은 두 개의 배양액 공급 챔버; 두 개의 배양액 회수 챔버; 두 개의 배양액 채널; 한 개의 세포 유입구; 한 개의 잔류물 유출구; 상기 배양액 채널과 연결한 한 개의 세포 챔버; 및 세포 챔버와 배양액 채널의 연결부 및 세포 챔버와 잔류물 유출구의 연결부에 구비된 역-미세독 구조가 포함된 형태로 제조될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 목적하는 세포를 배양하게 되면, 약 7일 이내에 세포배양이 종료되고, 배양된 세포의 특징을 연구할 수 있다. 예시적으로, 유방암 세포를 배양할 경우 세포배양이 완료된 시점에서 배양액 공급 챔버에 약물을 투여하면, 상기 약물의 효과에 의하여 유방암 세포의 세포 사멸이 발생할 수 있다. 다른 예로서, 자궁경부암세포를 배양할 경우, 세포배양이 완료된 시점에서 배양액 공급 챔버에 약물을 투여하면, 상기 약물의 효과에 의하여 자궁경부암 세포의 세포 사멸이 발생할 수 있다. 또 다른 예로서, 간암세포를 배양할 경우, 세포배양이 완료된 시점에서 배양액 공급 챔버에 약물을 투여하면, 상기 약물의 효과에 의하여 간암 세포의

세포 사멸이 발생할 수 있다.

- [0036] 이하, 본 발명의 도 1 내지 도 5를 참조하여, 본 발명에서 제공하는 생체조직칩의 구조를 보다 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0037] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩(2)은 슬라이드 글라스(1)위에 구비된 구조물의 형태로서, 세포 유입구(5), 잔류물 유출구(6) 및 세포 챔버(8)로 구성된 심근세포 공급부를 중심으로, 배양액 공급 챔버(3), 배양액 회수 챔버(4) 및 배양액 채널(7)로 구성된 두 세트의 배양액 공급부가 각각 양쪽에 구비된 형태이다. 상기 세포 챔버(8)와 배양액 채널(7)은 이들의 연결부에 구비된 역-미세독 구조(9)에 의해 각각 구별되고, 상기 세포 챔버(8)와 잔류물 유출구(6)의 연결부에도 역-미세독 구조(10)가 구비되어 있다.
- [0038] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태는 상기 생체조직칩을 이용하여, 세포에 미치는 약물의 효능을 평가하는 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명에서 제공하는 세포에 미치는 약물의 효능을 평가하는 하나의 방법은 (a) 상기 생체조직칩에 포함된 세포 챔버에 포함된 세포를 배양하는 단계; (b) 상기 생체조직칩에 포함된 배양액 공급 챔버에 목적하는 약물을 투여하는 단계; 및, (c) 상기 배양된 세포의 변화를 측정하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 세포의 변화는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 배양된 세포의 손상여부, 성장여부, 분비성분의 변화여부, 유전자 발현수준의 변화여부, 단백질 수준의 변화여부 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 될 수 있고, 다른 예로서, 상기 세포의 변화는 배양된 암세포의 경우 배양된 암세포의 사멸 여부가 될 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 제공하는 세포에 미치는 약물의 효능을 평가하는 다른 방법은 (a) 상기 생체조직칩에 포함된 배양액 공급 챔버에서 간세포를 배양하는 단계; (b) 상기 생체조직칩에 포함된 세포 챔버에 포함된 세포를 배양하는 단계; (c) 상기 배양된 간세포를 포함하는 배양액 공급 챔버에 목적하는 약물을 투여하는 단계; 및, (d) 상기 배양된 세포의 변화를 측정하는 단계를 포함한다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 배양되는 세포로 유방암 세포(MCF-7)를 사용할 경우, 배양 후 약 1일이 경과된 시점에서 유방암 세포의 부착이 확인되었고, 상기 부착된 유방암 세포가 안정화 된 시점에서 배양액 공급 챔버에 목적하는 약물을 투여하면, 상기 약물의 효과에 의하여 유방암 세포의 세포 사멸이 발생할 수 있다.
- [0042] 따라서, 상기 유방암 세포의 세포 사멸정도를 확인하여, 목적하는 약물이 유방암 세포에 미치는 효과를 평가할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 배양되는 세포로 자궁경부암 세포(HeLa)를 사용할 경우, 배양 후 약 1일이 경과된 시점에서 자궁경부암 세포의 부착이 확인되었고, 상기 부착된 자궁경부암 세포가 안정화 된 시점에서 배양액 공급 챔버에 목적하는 약물을 투여하면, 상기 약물의 효과에 의하여 자궁경부암 세포의 세포 사멸이 발생할 수 있다.
- [0044] 따라서, 상기 자궁경부암 세포의 세포 사멸정도를 확인하여, 상기 목적하는 약물이 자궁경부암 세포에 미치는 효과를 평가할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 배양되는 세포로 간암 세포(HepG2)를 사용할 경우, 배양 후 약 1일이 경과된 시점에서 간암 세포의 부착이 확인되었고, 상기 부착된 간암 세포가 안정화 된 시점에서 배양액 공급 챔버에 목적하는 약물을 투여하면, 상기 약물의 효과에 의하여 간암 세포의 세포 사멸이 발생할 수 있다.
- [0046] 따라서, 상기 간암 세포의 세포 사멸정도를 확인하여, 상기 목적하는 약물이 간암 세포에 미치는 효과를 평가할 수 있다.

발명의 효과

- [0047] 본 발명에서 제공하는 생체조직칩을 사용하면, 암세포 등에 대한 항암제의 보다 정확한 효능을 도출할 수 있다. 이에 따라, 동물실험 대체 시험법으로 이용함으로써 신약 개발 및 약물 스크리닝 시 필요한 비용 및 시간을 획기적으로 감소시킬 뿐 아니라 세포 내 미세환경 연구 및 다른 장기칩(organ-on-a-chip)의 연구 등에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1은 본 발명에서 제공하는 생체조직칩의 입체도와 미세구조도 및 칩 내 구성요소가 포함된 전체 모식도이다.

도 2는 본 발명에서 제공하는 생체조직칩의 입체도이다.

도 3은 본 발명에서 제공하는 생체조직칩의 평면도이다.

도 4는 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 구비된 세포 챔버와 배양액 채널의 부분 확대도이다.

도 5는 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 구비된 역-미세독 구조의 부분 확대도이다.

도 6은 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 유방암 세포(MCF-7)를 주입하고, 2일 동안 배양한 다음, 항암제인 독소루비신을 처리하여, 유방암 세포의 손상정도를 대조군과 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

도 7은 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 자궁경부암 세포(HeLa)를 주입하고, 2일 동안 배양한 다음, 항암제인 독소루비신을 처리하여, 자궁경부암 세포의 손상정도를 대조군과 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

도 8은 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 간암 세포(HepG2)를 주입하고, 2일 동안 배양한 다음, 항암제인 독소루비신을 처리하여, 간암 세포의 손상정도를 대조군과 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 실시예 1: 역-미세독 구조 생체조직칩의 제작

[0051] 본 발명의 생체조직칩은 PDMS(polydimethylsiloxane)탄성중합체와 슬라이드글라스 (slide glass)를 이용하여 제작하였다.

[0052] 감광액 패터닝(PR patterning)이 완료된 주형(mold) 위에 PDMS 실리콘계 엘라스토머(silicone base elastomer)와 경화제(curing agent, SYLGARD 184 silicone elastomer kit, Dow Corning)의 비율을 10:1로 섞은 후 플라즈마 처리기(plasma processing system, CUTE, FEMTO Science)의 진공 시스템을 이용하여 믹싱 시 발생하는 기포를 제거하였다. 이후 SU-8 주형 위에 상기 혼합물을 부은 뒤 80℃의 열판 위에서 10시간 동안 열처리를 가해 고형화 하였다. 이를 주형으로부터 분리해 낸 후, 칩의 적정 크기에 따라 자른 후 원통형 1.2mm 및 8mm 직경의 생검 펀치(biopsy punch)를 이용하여 세포 및 하이드로젤 혼합물 유입구 및 유출구와 배지 저장 및 유입구 및 유출구를 각각의 크기에 맞게 펀치아웃(punch out)하여 미세유체소자를 제작하였다.

[0053] 상기 제작된 미세유체소자를 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)이 담겨있는 초음파 발생 장치(sonicator)에 PDMS 기반 미세유체소자를 담가 초음파 처리(sonication)를 수행하여 세척한 후, 에어건(air-gun)으로 완전히 건조시켰다.

[0054] 세척이 완료 된 PDMS기반 미세유체소자와 슬라이드글라스는 80℃ 드라이 오븐(dry oven) 내에서 10분 동안 건조시킨 뒤 30분 동안 자외선에 노출시켜 멸균시켰다. 최종적으로, PDMS 기반 미세유체소자와 슬라이드 글라스를 플라즈마 처리기에 넣고 산소 플라즈마 처리(oxygen plasma treatment)를 통해 접착시켜 생체조직칩을 제작하였다. 제작된 생체조직칩을 35mm 페트리 디쉬(petri dish)에 넣고, 플라즈마 처리에 의한 접착력을 단단하게 하기 위해 80℃로 가열된 핫플레이트(hot plate) 위에서 30분 동안 열을 가하였다.

[0055] 상기와 같이 제작된 생체조직칩의 전체 크기는 가로 2.7cm, 세로 2cm 이며 칩 내 모든 채널 미세구조의 높이는 50 μ m 이며, 역 미세 독 구조 이외의 높이는 5 μ m이다. 세포 채널의 폭 사이즈는 600 μ m로, 이는 생체 내 심근다발의 직경인 약 200 μ m의 3배 정도의 크기이다.

[0056] 배양액 채널의 폭은 30 μ m이며, 이는 생체 내 모세혈관의 직경인 약 10 μ m의 3배 정도로, 세포 채널을 중심으로 양쪽 최외각에 배치함으로써 생체내 심근섬유들의 사이사이에 위치하고 있는 모세혈관망을 모방하고자 디자인 하였다.

[0057] 세포 채널의 잔류물 유출구 방향에 위치한 역-미세독 구조는 세포 채널의 폭이 좁아지는 직진 부분에 두께 60 μ m으로 유출구 방향으로 호 형태로 위치하여 주입되는 세포-하이드로젤 혼합물이 잔류물 유출구 쪽으로 빠져나가지 않고 누적되게끔 유도하기 위한 디자인하였으며, 원활한 주입과 주입 시 발생하는 압력만으로 잔류물 유출구 쪽으로 빠져나갈 수 있게 하였다. 또한, 세포 채널과 배양액 채널의 연결부에 구비된 역-미세독 구조는 두께 100 μ m의 직사각형 형태로 디자인하였으며, 마찬가지로 세포-하이드로젤 혼합물이 세포 채널의 바깥으로 빠져나가지 않고 누적되게끔 디자인하였다. 세포 채널과 연결되어 있는 각 유입구(inlet)와 유출구(outlet)의 지름은

1.5mm 이며, 배양액 공급챔버 및 회수챔버에 연결된 배양액 채널의 지름은 8mm으로 설정하였다.

[0058]

실시예 2: 생체조직칩의 기능 평가

[0059]

실시예 2-1: 유방암 세포가 포함된 생체조직칩

[0060]

실시예 2-1-1: 유방암 세포가 포함된 생체조직칩의 제작

[0061]

상기 실시예 1에서 제작한 본 발명의 생체조직칩에 포함된 한 세트의 배양액 공급 챔버 및 회수 챔버에 각각 200 μ l의 배양액(10% FBS (Fetal bovine serum, gibco)를 보충한 RPMI 1640 (Gibco))을 로딩하고 파이펫을 이용하여 각 챔버간에 배양액의 흐름이 연결되도록 한 다음, 각 양쪽에 위치한 배양액 채널의 내부에 배양액을 채워 최종적으로 배지 흐름을 만들어주었다. 이때, 역-미세독 구조를 경계로 배양액 채널과 세포 챔버 사이에 표면장력에 의해 배지가 경계를 이루는 것을 확인하였다.

[0062]

그런 다음, 파이펫을 이용하여 유방암 세포(Michigan Cancer Foundation-7, MCF-7)를, 3×10^4 개의 세포 수만큼 세포 유입구에 주입하고, 파이펫팅을 수행하여 주입된 유방암 세포를 세포 챔버에 주입하였다. 이후, 역-미세독 구조에 의해 유방암세포가 유실되지 않고 경계를 이루는 것을 확인함으로써, 유방암세포와 배양액이 각각 성공적으로 분리 주입되었음을 확인한 후, 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 조건의 가습한 인큐베이터에 2일 동안 배양하였다.

[0063]

실시예 2-1-2: 유방암 세포가 포함된 생체조직칩의 기능 평가

[0064]

상기 실시예 2-1-1에서 제작한 유방암 세포가 포함된 생체조직칩의 배양액 공급 챔버에 100 μ M의 독소루비신(doxorubicin, TOCRIS)을 가하고, 상기 독소루비신에 의한 생체조직칩 내 유방암 세포의 변화를 광학현미경으로 관찰하고, 유방암 세포의 손상정도를 대조군과 비교 분석하였다(도 6). 이때, 대조군으로는 독소루비신을 처리하지 않은 유방암 세포가 포함된 생체조직칩을 사용하였다.

[0065]

도 6은 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 유방암 세포(MCF-7)를 주입하고, 2일 동안 배양한 다음, 항암제인 독소루비신을 처리하여, 유방암 세포의 손상정도를 대조군과 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

[0066]

상기 도 6에서 보듯이, 독소루비신을 처리하고 24시간이 경과한 후, 생체조직칩 내 배양된 유방암 세포가 대부분 사멸한 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 대조군은 24시간이 경과한 후에도, 세포 사멸 없이 정상적으로 배양이 이루어짐을 확인할 수 있었다.

[0067]

따라서, 유방암 세포가 포함된 생체조직칩을 이용하면, 유방암 세포에 대한 독소루비신의 항암활성을 효과적으로 검증할 수 있음을 알 수 있었다.

[0068]

실시예 2-2: 자궁경부암 세포가 포함된 생체조직칩

[0069]

실시예 2-2-1: 자궁경부암 세포가 포함된 생체조직칩의 제작

[0070]

상기 실시예 1에서 제작한 본 발명의 생체조직칩에 포함된 한 세트의 배양액 공급 챔버 및 회수 챔버에 각각 200 μ l의 배양액(10% FBS를 보충한 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, gibco))을 로딩하고 파이펫을 이용하여 각 챔버간에 배양액의 흐름이 연결되도록 한 다음, 각 양쪽에 위치한 배양액 채널의 내부에 배양액을 채워 최종적으로 배지 흐름을 만들어주었다. 이때, 역-미세독 구조를 경계로 배양액 채널과 세포 챔버 사이에 표면장력에 의해 배지가 경계를 이루는 것을 확인하였다.

[0071]

그런 다음, 파이펫을 이용하여 자궁경부암 세포(HeLa)를, 3×10^4 개의 세포 수만큼 세포 유입구에 주입하고, 파이펫팅을 수행하여 주입된 자궁경부암 세포(HeLa)를 세포 챔버에 주입하였다. 이후, 역-미세독 구조에 의해 자궁경부암 세포(HeLa)가 유실되지 않고 경계를 이루는 것을 확인함으로써, 자궁경부암 세포(HeLa)와 배양액이 각각 성공적으로 분리 주입되었음을 확인한 후, 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 조건의 가습한 인큐베이터에 2일 동안 배양하였다.

[0072]

실시예 2-2-2: 자궁경부암 세포가 포함된 생체조직칩의 기능 평가

[0073]

상기 실시예 2-2-1에서 제작한 자궁경부암 세포(HeLa)가 포함된 생체조직칩의 배양액 공급 챔버에 100 μ M의 독소루비신을 가하고, 상기 독소루비신에 의한 생체조직칩 내 자궁경부암 세포의 변화를 광학현미경으로 관찰하고, 자궁경부암 세포의 손상정도를 대조군과 비교 분석하였다(도 7). 이때, 대조군으로는 독소루비신을 처리하지 않은 자궁경부암 세포가 포함된 생체조직칩을 사용하였다.

- [0074] 도 7은 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 자궁경부암 세포(HeLa)를 주입하고, 2일 동안 배양한 다음, 항암제인 독소루비신을 처리하여, 자궁경부암 세포의 손상정도를 대조군과 비교한 결과를 나타내는 사진이다.
- [0075] 상기 도 7에서 보듯이, 독소루비신을 처리하고 24시간이 경과한 후, 생체조직칩 내 배양된 자궁경부암 세포가 대부분 사멸한 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 대조군은 24시간이 경과한 후에도, 세포 사멸 없이 정상적으로 배양이 이루어짐을 확인할 수 있었다.
- [0076] 따라서, 자궁경부암 세포가 포함된 생체조직칩을 이용하면, 자궁경부암 세포에 대한 독소루비신의 항암활성을 효과적으로 검증할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0077] **실시예 2-3: 간암 세포가 포함된 생체조직칩**
- [0078] **실시예 2-3-1: 간암 세포가 포함된 생체조직칩의 제작**
- [0079] 상기 실시예 1에서 제작한 본 발명의 생체조직칩에 포함된 한 세트의 배양액 공급 챔버 및 회수 챔버에 각각 200 μ l의 배양액(25 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, gibco), 25 mM NaHCO₃ (Sodium bicarbonate, Sigma-aldrich), 10% (v/v) FBS, P/S (100Uml-1penicillin/100Uml-1streptomycin, Sigma-Aldrich Co.,MO)를 보충한 MEM (Minimum Essential Media Eagle, high-glucose, gibco))을 로딩하고 파이펫을 이용하여 각 챔버간에 배양액의 흐름이 연결되도록 한 다음, 각 양쪽에 위치한 배양액 채널의 내부에 배양액을 채워 최종적으로 배지 흐름을 만들어주었다. 이때, 역-미세독 구조를 경계로 배양액 채널과 세포 챔버 사이에 표면장력에 의해 배지가 경계를 이루는 것을 확인하였다.
- [0080] 그런 다음, 파이펫을 이용하여 간암 세포(HepG2)를, 3×10^4 개의 세포 수만큼 세포 유입구에 주입하고, 파이펫팅을 수행하여 주입된 간암 세포(HepG2)를 세포 챔버에 주입하였다. 이후, 역-미세독 구조에 의해 간암 세포(HepG2)가 유실되지 않고 경계를 이루는 것을 확인함으로써, 간암 세포(HepG2)와 배양액이 각각 성공적으로 분리 주입되었음을 확인한 후, 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 조건의 가습한 인큐베이터에 2일 동안 배양하였다.
- [0081] **실시예 2-3-2: 자궁경부암 세포가 포함된 생체조직칩의 기능 평가**
- [0082] 상기 실시예 2-3-1에서 제작한 간암 세포(HepG2)가 포함된 생체조직칩의 배양액 공급 챔버에 100 μ M의 독소루비신을 가하고, 상기 독소루비신에 의한 생체조직칩 내 간암 세포의 변화를 광학현미경으로 관찰하고, 간암 세포의 손상정도를 대조군과 비교 분석하였다(도 8). 이때, 대조군으로는 독소루비신을 처리하지 않은 자궁경부암 세포가 포함된 생체조직칩을 사용하였다.
- [0083] 도 8은 본 발명에서 제공하는 생체조직칩에 간암 세포(HepG2)를 주입하고, 2일 동안 배양한 다음, 항암제인 독소루비신을 처리하여, 간암 세포의 손상정도를 대조군과 비교한 결과를 나타내는 사진이다.
- [0084] 상기 도 8에서 보듯이, 독소루비신을 처리하고 24시간이 경과한 후, 생체조직칩 내 배양된 간암 세포가 대부분 사멸한 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 대조군은 24시간이 경과한 후에도, 세포 사멸 없이 정상적으로 배양이 이루어짐을 확인할 수 있었다.
- [0085] 따라서, 간암 세포가 포함된 생체조직칩을 이용하면, 간암 세포에 대한 독소루비신의 항암활성을 효과적으로 검증할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0086] 상기 실시예 2-1 내지 2-3의 결과를 종합하면, 본 발명에서 제공하는 생체조직칩은 유방암, 자궁경부암, 간암 등의 다양한 고형암을 생체내 조건과 유사한 조건으로 배양함으로써, 항암제의 활성을 효과적으로 검증할 수 있음을 확인하였다.
- [0087] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

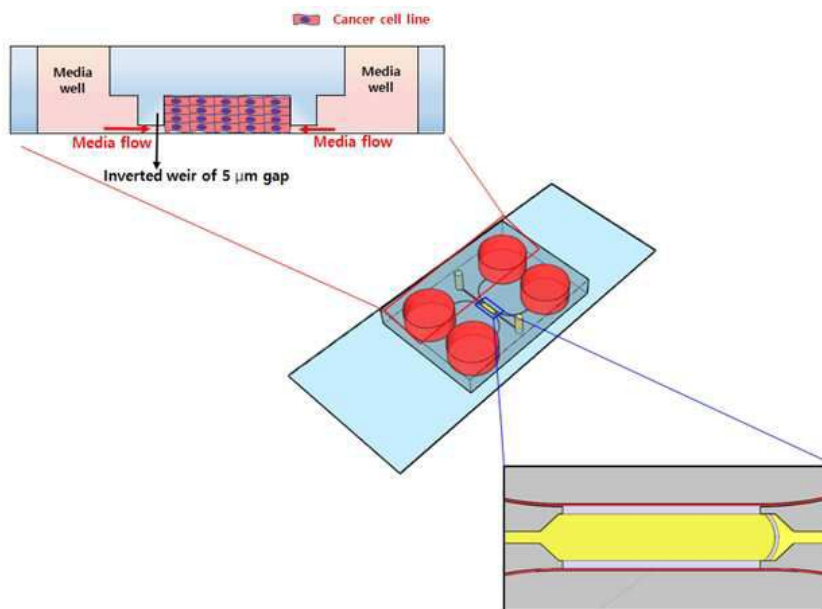
부호의 설명

- [0088] 1 : PDMS 기반 미세유체 소자

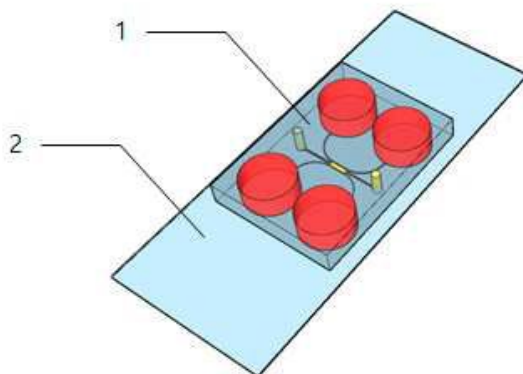
- 2 : 슬라이드 글라스
- 3 : 배양액 공급챔버
- 4 : 배양액 회수챔버
- 5 : 심근세포 유입구
- 6 : 잔류물 유출구
- 7 : 배양액 채널
- 8 : 세포 챔버
- 9 : 세포 챔버와 배양액 채널의 연결부에 위치한 역-미세독 구조
- 10 : 세포 챔버와 잔류물 유출구의 연결부에 위치한 역-미세독 구조

도면

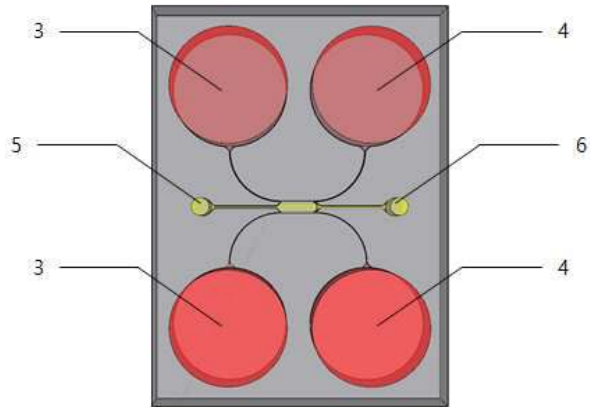
도면1



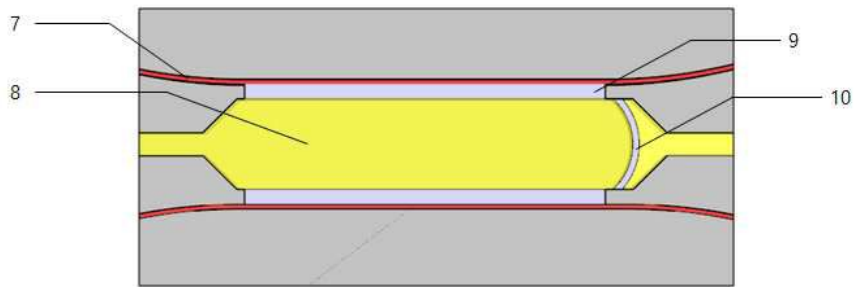
도면2



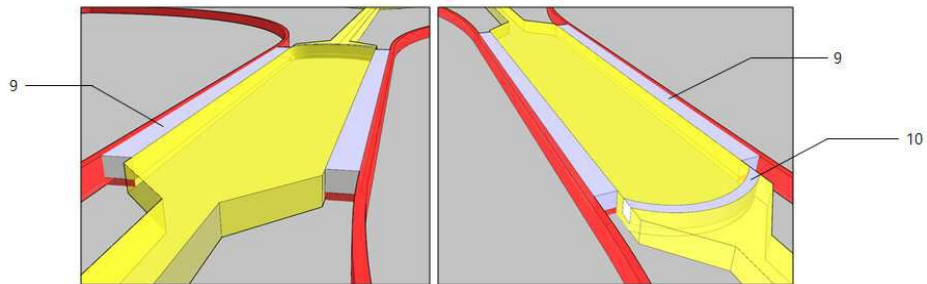
도면3



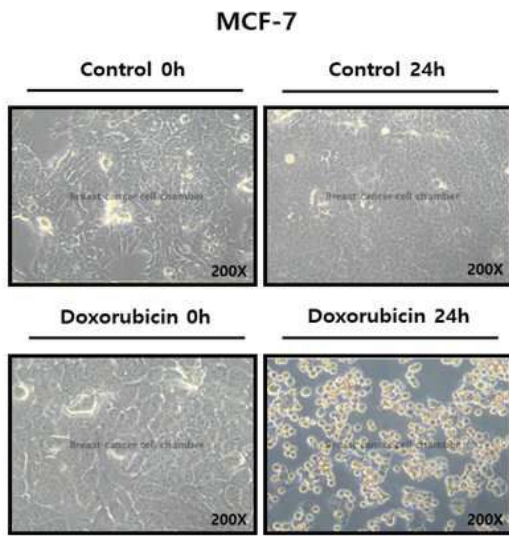
도면4



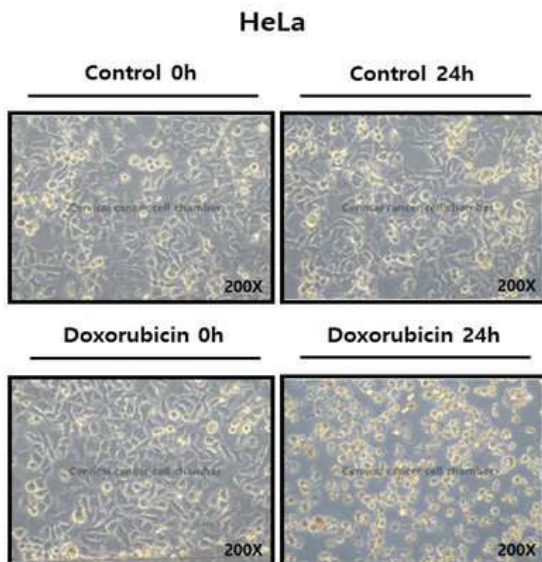
도면5



도면6



도면7



도면8

