



(51) 국제특허분류:

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/002306

(22) 국제출원일:

2018년 2월 26일 (26.02.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0026770 2017년 2월 28일 (28.02.2017) KR

(71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR];
04348 서울시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR).

(72) 발명자: 남도현 (NAM, Do Hyun); 06351 서울시 강남구 일원로 81, Seoul (KR). 공두식 (KONG, Doo Sik); 06351

서울시 강남구 일원로 81, Seoul (KR). 유규하 (RYU, Gyu Ha); 06351 서울시 강남구 일원로 81, Seoul (KR).

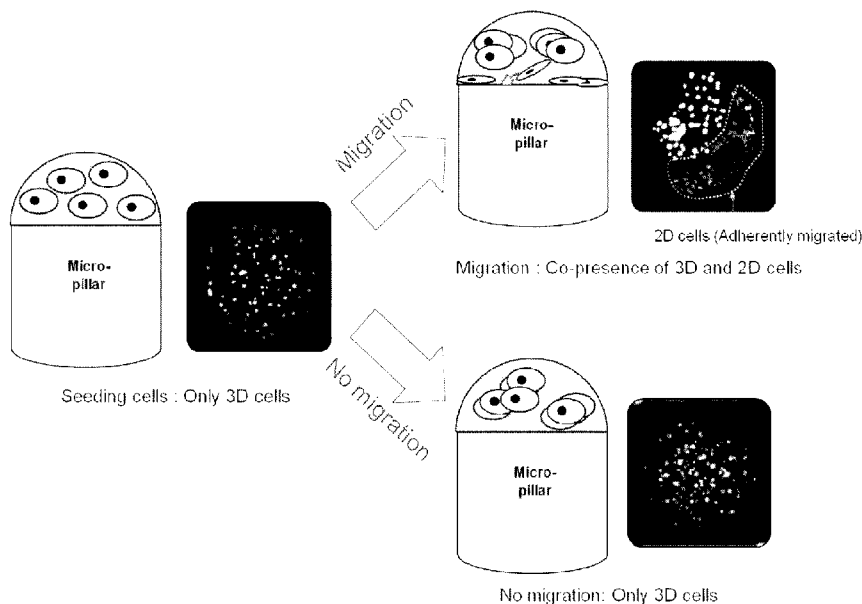
(74) 대리인: 특허법인 피씨알 (PCR INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06194 서울시 강남구 선릉로90길 70 인텔빌딩 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: CELL MIGRATION MEASUREMENT METHOD, AND METHOD FOR SCREENING CELL MIGRATION INHIBITOR USING SAME

(54) 발명의 명칭: 세포 이동성 측정 방법 및 이를 이용한 세포 이동성 저해제의 스크리닝 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for measuring cell migration by means of fluorescence observation of cells using a frequency ratio of a three-dimensionally cultured cell in a structure of an upper part of a micro-pillar chip that migrates to a contact surface between the micro-pillar chip and the structure and that adherently grows; and at the same time provides a tool for determining the effectiveness of a drug which is generally the degree of cell migration inhibition according to the concentration of the drug, the toxicity of the drug, and the like by observing and comparing cell activity.

(57) 요약서: 본 발명은 세포의 형광 관측을 통하여, 마이크로필라 칩(micropillar chip) 상부의 구조체에서 3차원으로 배양된 세포가 마이크로필라 칩과 구조체의 접촉면으로 이동하여 부착 성장하는 빈도비(frequency ratio)를 이용한 세포의 이동성 측정 방법에 관한 것으로, 이와 동시에 세포 활성도를 관측하여 비교함으로써, 약물 농도에 따른 세포 이동성의 저해 정도, 약물의 독성 등을 총괄한 약물의 효용성을 판단하는 도구를 제공한다.

LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 세포 이동성 측정 방법 및 이를 이용한 세포 이동성 저해제의 스크리닝 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 3차원으로 배양된 세포의 형광 관측을 이용한 세포의 이동성 측정 방법 및 이를 이용한 세포 이동성 저해제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 세포 이동(cell migration)이란, 다양한 물리, 화학, 생물학적 자극에 의하여 일련 또는 개개의 세포가 이동하는 것을 지칭한다. 이러한 세포 이동은 신생혈관형성(angiogenesis), 암전이, 조직의 발생 및 분화, 손상조직 재생, 면역반응 등의 다양한 생물학적 현상과 다양한 질병의 치료에 깊게 연관되어 있다.
- [3] 근래까지 세포 이동에 대한 연구는 대부분 체외 조직 배양 세포를 2차원 커버슬립(cover slip) 표면에 배양한 후 움직임을 관찰함으로써 수행되었다. 그러나 이러한 방법은 인체 등 생리적인 조건과는 상당히 차이가 있어 인체 내부 등에서 일어나는 현상을 예측하기 어려운 문제점이 있었다. 따라서, 생리적인 조건을 모사할 수 있는 장치, 기법 등이 요구되어 왔으며, 최근 3차원적인 체외 조직 배양 도구들이 사용이 활발해지고 있다.
- [4] 또한, 한국 공개특허 제10-2014-0011325호는 균일한 두께를 갖는 나노섬유매트와 세포 형광 염색을 이용하여 세포의 3차원적 이동을 측정하는 세포이동 측정용 어세이 칩에 관하여 개시하고 있으나, 이는 유도 물질을 이용한 세포의 상하 이동 여부만을 확인할 수 있다는 점에서 한계가 있었다.
- [5] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 세포의 형광 관측을 통하여, 마이크로필라 칩 상부의 구조체에서 3차원으로 배양된 세포가 마이크로필라와 구조체의 접촉면으로 이동하여 부착 성장하는 빈도비를 이용한 세포의 이동성 측정 방법을 제공하며, 이와 동시에 세포활성도를 관측하여 비교함으로써, 약물 농도에 따른 세포 이동성의 저해 정도, 약물의 독성 등을 총괄한 약물의 효용성을 판단하는 도구를 제공한다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 일 양상은 (a) 마이크로필라 칩(micropillar chip)에 접촉되어 있고 세포외 기질(extracellular matrix)을 포함하는 3차원 구조체 내에서 세포를

배양하는 단계; (b) 상기 3차원 구조체 내 세포를 형광염색하고 세포의 형광 이미지를 획득하는 단계; 및 (c) 상기 획득한 형광 이미지로부터 상기 3차원 구조체와 마이크로필라 칩의 접촉면에 부착된 세포를 확인함으로써 상기 세포의 이동 여부를 판단하는 단계를 포함하는 세포의 이동성 측정 방법을 제공한다.

[8] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (a) 내지 (c)를 2회 이상, 바람직하게는 10 내지 16회 수행하여 상기 부착된 세포의 빈도비(frequency ratio)를 측정함으로써 상기 세포의 이동 여부를 판단할 수 있다.

[9] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 세포의 기질은 알지네이트(Alginate), 콜라겐(Collagen), 피브린(fibrin), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol), 자가조립 펩타이드 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[10] 본 발명의 일 양상은 (a) 마이크로필라 칩에 접촉되어 있고 세포 이동성 저해제의 후보 물질 및 세포의 기질을 포함하는, 3차원 구조체 내에서 세포를 배양하는 단계; (b) 상기 3차원 구조체 내 세포를 형광염색하고, 세포의 형광 이미지를 획득하는 단계; (c) 상기 획득한 형광 이미지로부터 상기 3차원 구조체와 마이크로필라 칩의 접촉면에 부착된 세포를 확인함으로써 상기 세포의 이동성을 판단하는 단계; 및 (d) 상기 획득한 형광 이미지로부터 상기 3차원 구조체와 마이크로필라 칩의 접촉면에 부착된 세포와 부착되지 않은 세포의 활성화도 또는 세포의 골격을 측정하는 단계를 포함하는 세포 이동성 저해제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[11] 본 발명의 일 실시예는 상기 단계 (a) 내지 (d)를 2회 이상, 바람직하게는 10 내지 16회 수행하여 상기 부착된 세포의 빈도비 및 활성을 측정함으로써 상기 세포의 이동성 및 활성도를 판단할 수 있다.

발명의 효과

[12] 기존의 세포 이동/침윤 실험(migration/invasion assay)이 세포의 움직임을 2차원으로 배양 및 분석함과 달리, 본 발명은 세포의 3차원에서의 움직임을 측정하는 것을 기본으로 하여, 인체 등 생물 환경을 보다 흡사하게 모사하는 모델을 제공한다. 또한, 기존에 1개의 웰에서만 측정했던 것과 달리, 수 개, 바람직하게는 14개의 복제된 웰에서의 세포 이동여부를 관찰하여 세포가 이동하여 마이크로필라 바닥에 부착되는 세포의 빈도비를 계산하므로, 세포 이동도 측정의 정확성과 정밀도를 높일 수 있다. 살아 있는 세포를 염색하기 때문에 세포의 이동도 뿐만 아니라 세포의 활성화도 동시에 측정이 가능하다.

[13] 본 발명은 세포의 이동도 및 세포 활성도를 관측하여 비교함으로써, 약물 농도에 따른 세포 이동성의 저해 정도, 약물의 독성 등을 총괄한 약물의 효용성을 판단할 수 있으며, 약물의 고속대량/고집적 스크리닝(high throughput/high contents screening) 분야에 적용 가능할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 본 발명에 따른 3차원 세포 이동성 측정 방법에 따른 세포 형광 이미지의 예시를 나타낸다.
- [15] 도 2는 마이크로필라 칩에 포함된 오아바인(Ouabain)에 따른 세포활성도 및 세포 이동성 측정 결과를 나타낸다.
- [16] 도 3은 마이크로필라 칩에 포함된 겔다나마이신(Geldanamycin)에 따른 세포활성도 및 세포 이동성 측정 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [17] 이하에서는 본 발명에 따른 세포의 이동성 측정 방법을 상세히 설명한다.
- [18] 본 발명의 일 양상은 (a) 마이크로필라 칩에 접촉되어 있고 세포외 기질을 포함하는 3차원 구조체 내에서 세포를 배양하는 단계; (b) 상기 3차원 구조체 내 세포를 형광염색하고, 세포의 형광 이미지를 획득하는 단계; 및 (c) 상기 획득한 형광 이미지로부터 상기 3차원 구조체와 마이크로필라 칩의 접촉면에 부착된 세포를 확인함으로써 상기 세포의 이동 여부를 판단하는 단계를 포함하는 세포의 이동성 측정 방법을 제공한다.
- [19] 본 발명에 따른 세포의 이동성 측정 방법은 (a) 마이크로필라 칩 상단에 접촉되어 있고 세포외 기질을 포함하는 3차원 구조체 내에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [20] 본 명세서 사용되는 용어 "세포"는 이동이 가능한 동물세포, 바람직하게는 포유류 세포를 지칭하며, 보다 바람직하게는 원발성 종양 세포, 침습성 세포 및 전이성 세포를 포함하는 암세포일 수 있다. 상기 암은 전이성 암 또는 전이성 유발가능한 암인 것일 수 있으며, 구체적으로는 유방암, 간암, 위암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 전립선암, 방광암, 신장암, 수노관암, 신장세포암종, 신장골반암종 및 중추신경계 종양으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 세포는 녹색형광단백질(GFP) 등 형광단백질로 표시된 것이 바람직하며, 상기 표시는 형광단백질의 유전자를 프로모터 등에 삽입하여 이식하거나 항체염색법에 의하여 수행될 수 있다.
- [21] 본 명세서 사용되는 용어 "배양"은 사용되는 세포에 따라 당업계에 공지된 적절한 조건(세포의 밀도, 세포 외부의 pH 및 산소 농도 등) 하에서 실험에 사용된 세포를 성장, 증식, 분화 또는 유지시키는 것을 지칭한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (a)에서 세포의 배양은 세포외 기질을 포함하는 3차원 구조체 내에서 24시간 내지 60시간, 바람직하게는 36시간 내지 54시간, 보다 바람직하게는 48시간 동안 진행될 수 있다.
- [22] 본 명세서 사용되는 용어 "3차원 구조체"는 세포가 배양 및 이동되는 3차원 공간을 지칭한다. 상기 3차원 구조체는 세포의 배양에 적합한 배지(medium)일 수

있고, 구체적으로 고체 배지 또는 반고체 배지인 것이 바람직하며, 이는 외부 환경 요인의 영향이 배제된 채 세포 자체의 이동성을 관찰하기 위함이다. 상기 3차원 구조체는 정상 세포 대사에 필수적인 특정 벌크 무기 이온 및 물과 함께 세포를 제공하고 세포 내외의 삼투압 균형을 유지하는 염 및 다른 구성요소의 수용액 또는 기본 염 영양소를 포함할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 상기 3차원 구조체는 에너지 공급원으로서 적어도 하나의 탄수화물 및/또는 생리적 pH 범위 내에서 배지를 유지하기 위한 완충 시스템을 포함한다. 3차원 구조체로 사용 가능한, 상업적으로 입수가능한 배지의 예는 인산염 완충 식염수(PBS), 돌베코 변형 이글 배지(DMEM), 최소 필수 배지(MEM), 기본 배지 이글(Basal Medium Eagle: BME), RPMI 1640, 함(Ham)의 F-10, 함의 F-12, α -최소 필수 배지(α MEM), 글래스고(Glasgow)의 최소 필수 배지(G-MEM), 이스코브 변형 돌베코 배지, 또는 만능 세포와 함께 사용하기 위해 변형된 일반적 목적의 배지, 예컨대 X-VIVO (Lonza) 또는 조혈 기본 배지를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

- [23] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 3차원 구조체는 세포외 기질을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "세포외 기질"은 생체 내의 포유동물 조직에서 발견되는, 세포를 지지해 주는 세포 주변의 복잡한 구조체를 지칭하며, 흔히 결합 조직이라 불린다. 천연적인 세포외 기질은 주로 콜라겐(collagen) 및 엘라스틴(elastin) 등의 구조 단백질, 피브릴린(fibrillin), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin), 엔탁틴(entactin) 및 프로테오글리칸 등의 분화 단백질을 비롯한 주요한 3가지 부류의 생체분자로 이루어진다. 이러한 세포외 기질들을 이용하여 생체 유사 3차원 스캐폴드를 실험실에서 제작할 수 있으며, 주로 사용되고 있는 자연적 스캐폴드는 제1형 콜라겐(type 1 collagen), 제4형 콜라겐(type IV collagen), 라미닌, 피브로넥틴 또는 히알루론산(hyaluronic acid)과 같은 천연물질의 하이드로겔(hydrogel)이며, 매트릭젤(Matrigel), 알지네이트(alginate), 콜라겐(collagen), 피브린(fibrin), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol), 자가조립 펩타이드 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 알지네이트이다. 상기 3차원 구조체는 이 외에 세포의 배양에 필요한 보충 성분들을 추가로 포함할 수 있다.

- [24] 또한, 상기 3차원 구조체는 스크리닝의 대상이 되는 세포 이동성 저해제의 후보 물질을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 세포의 이동성 및 활성도를 측정 및 분석함으로써, 여러 후보 물질 중 세포에 대한 독성이 낮으면서 효과적으로 세포의 이동을 억제할 수 있는 물질을 선정할 수 있다. 상기 3차원 구조체에 포함된 세포 이동성 저해제에 의하여 세포의 이동이 중단된 경우, 세포는 3차원 구조체 내에서 3차원적으로만 성장하게 된다.

- [25] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 3차원 구조체는 형상 및 크기에 영향을 받지 않으나, 바람직하게는 반구, 원기둥, 정육면체, 직육면체, 원뿔, 다각뿔 등의

형태일 수 있고, 보다 바람직하게는 반구 형태일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [26] 본 명세서 사용되는 용어 "마이크로필라 칩"은 3차원 구조체의 하부에 위치하여 지지체의 역할을 하며, 3차원 구조체와 달리 마이크로필라 칩 내부에서는 세포의 이동이 불가능하다. , 마이크로필라 상에 세포가 형성된 후에 마이크로필라 칩을 배양액 및 약물에 담구어 마이크로필라 상에 형성된 세포를 배양하거나 약물과 반응시키는 역할을 할 수도 있다. 상기 마이크로필라 칩은 몰딩 성형을 이용하여 제조된 것으로, 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS) 또는 폴리우레탄 아크릴레이트(polyurethane acrylate, PUA)으로 제조될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 마이크로필라 칩은 형상 및 크기에 영향을 받지 않으나, 바람직하게는 원기둥, 다각기둥, 원뿔, 다각뿔 등의 형태일 수 있고, 보다 바람직하게는 원기둥 형태일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [27] 본 명세서에서 사용되는 용어 "형광염색"은 살아있는 세포를 육안으로 확인할 수 있도록 녹색, 적색 등의 형광을 띄는 염색시약을 사용하여 세포를 염색하는 면역형광염색을 포함하는 것으로, 이를 촬영함으로써 수득한 세포의 형광 이미지를 통하여 세포의 활성화, 골격 등을 확인할 수 있다. 상기 형광염색을 위하여, 형광물질, (칼세인 AM(Calcein AM), FITC(Fluorescein isothiocuanate), 팔로딘(Phalloidin), 플루오레세인(fluorescein), 로다민, TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, 텍사스레드(Texas Red), DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) 및 코마린(Coumarin)], 형광 염료(Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 647(Life Technology 사), DyLight 633, DyLight 650, DyLight 680(Thermo Fisher 사), TF5, TF6, TF7(ACZO Biotech) 등) 및 형광 염료를 내포한 입자(Flash Red(Bangs Labs 사), Dark Red, Infrared(Invitrogen 사), Sky Blue(Sperotech 사) 등) 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [28] 이와 동일한 효과를 수득하기 위하여, 세포를 배양 후 형광염색을 수행하는 대신, 세포 자체가 녹색 형광 단백질(GFP)로 표지된 세포를 사용하여 배양할 수도 있다. 이를 위하여, GFP를 암호화하는 유전자를 세포에 도입시킬 수 있다(문헌[Ogawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1995, 92:11899-11903] 참조).
- [29] 본 명세서 사용되는 용어 "접촉면"은 상기 3차원 구조체의 일면과 마이크로필라 칩의 일면이 접합되는 평면을 지칭한다. 세포는 중력에 의하여 3차원 구조체의 하부로 이동하게 되며, 상기 접촉면에 도달한 이후에는 마이크로필라 칩 내부로 이동하지 못하고 접촉면에 부착되어 성장하게 된다.
- [30] 본 발명에 따른 세포의 이동성 측정 방법은 (b) 상기 3차원 구조체 내 세포를 형광염색하고 세포의 형광 이미지를 획득하는 단계; 및 (c) 상기 획득한 형광 이미지로부터 상기 3차원 구조체와 마이크로필라의 접촉면에 부착된 세포를 확인함으로써 상기 세포의 이동 여부를 판단하는 단계를 포함한다.
- [31] 상기 배양된 세포는 3차원 구조체와 마이크로필라 칩의 부착면에 평행한

방향으로 형광 이미지 촬영시 결합된 형광 단백질 또는 별도 살아있는 세포의 형광 염색에 의하여 식별이 가능하며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 형광단백질로 GFP를 사용한 경우, 3차원 구조체 내에 3차원적으로 배양 중인 세포는 밝은 형광을 나타내며, 부착면에 부착된 세포는 탁한 형광을 나타낸다. 따라서, 상기 형광 이미지 상의 탁한 형광을 보이는 개체의 존재를 통하여 세포의 이동을 확인할 수 있다. 또한, 밝은 형광은 원형을 띄는 반면, 탁한 형광은 세포가 마이크로필라의 바닥에 부착되어 자라기 때문에 넓게 퍼진 타원 형상을 가진다.

[32] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (a) 내지 (c)를 2회 이상, 바람직하게는 10 내지 16회, 보다 바람직하게는 14회 수행하여 상기 부착된 세포의 빈도비를 측정할 수 있다. 상기 세포의 빈도비는 전체 측정 횟수에 대하여 접촉면에 부착된 세포가 존재하는 횟수의 비율로 결정된다. 상기 2회 이상의 측정은 동시에 일어나거나 순차적으로 일어날 수 있다. 종래 1회의 시료에서 세포의 이동 여부를 확인했던 것과 달리, 바람직하게는 동일 또는 유사한 조건 하에서 배양된, 수개의 독립된 시료에서의 결과값을 통계냄으로써, 실험 결과의 정확도 및 정밀도를 보다 향상시킬 수 있다.

[33] 본 발명의 일 양상은 (a) 마이크로필라 칩에 접촉되어 있고 세포 이동성 저해제의 후보 물질 및 세포의 기질을 포함하는, 3차원 구조체 내에서 세포를 배양하는 단계; (b) 상기 3차원 구조체 내 세포를 형광염색하고, 세포의 형광 이미지를 획득하는 단계; (c) 상기 획득한 형광 이미지로부터 상기 3차원 구조체와 마이크로필라 칩의 접촉면에 부착된 세포를 확인함으로써 상기 세포의 이동성을 판단하는 단계; 및 (d) 상기 획득한 형광 이미지로부터 상기 3차원 구조체와 마이크로필라 칩의 접촉면에 부착된 세포와 부착되지 않은 세포의 활성도를 측정하는 단계를 포함하는 세포 이동성 저해제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[34] 상기 세포의 활성은 세포의 IC_{50} 값을 관찰함으로써 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[36]

[37] 실시예 1. 무처리된 마이크로필라 칩을 이용한 세포의 배양

[38] 세포를 배양하기 위하여, ATCC로부터 구매한 A549(상용 세포주)와 및 RPMI 배양액(10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin)를 준비하였다.

[39] 상기 세포가 포함되어 있는 배양액(4×10^6 cells/ml)과 1.5중량%의 알지네이트 용액을 혼합하였다. 웰(well)에 상기 세포 혼합액 40nl 내지 1μ l를 분주하고,

수면에 맞추어 마이크로필라 칩을 올렸다. 알지네이트가 굳은 후(gelation), 상기 마이크로필라를 미디어 또는 약물이 들어있는 웰에 담구어서 이를 37°C, 5% CO₂ 농도의 배양기에 넣고 72시간 동안 세포를 배양 또는 약물 반응시켰다.

[40]

[41] 실시예 2. 오와바인이 포함된 마이크로필라 칩을 이용한 세포의 배양

[42] 배양액에 오와바인을 최고농도 20μM에서 3배씩 희석하여 총 12개의 농도(0.11nM, 0.34nM, 1nM, 3nM, 9nM, 27nM, 82nM, 247nM, 741nM, 2.22μM, 6.67μM 및 20μM)로 각 웰에 첨가한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 조합된 구조체를 제조하고 세포를 배양하였다.

[43]

[44] 실시예 3. 겔다나마이신이 포함된 마이크로필라 칩을 이용한 세포의 배양

[45] 배양액에 겔다나마이신을 최고농도 20μM에서 3배씩 희석하여 총 12개의 농도(0.11nM, 0.34nM, 1nM, 3nM, 9nM, 27nM, 82nM, 247nM, 741nM, 2.22μM, 6.67μM 및 20μM)로 각 웰에 첨가한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 조합된 구조체를 제조하고 세포를 배양하였다.

[46]

[47] 실험예 1. 배양된 세포의 형광 이미지 촬영을 통한 세포 이동성 및 활성 측정

[48] 실시예 1 내지 3에서 각각 배양시킨 조합된 구조체로부터 마이크로필라 칩을 제거한 후, 형광 현미경을 이용하여 접착면에 평행한 방향으로 형광 이미지를 촬영하였다(도 1 참조).

[49] 특히, 오와바인 및 겔다나마이신, 두 약물을 12개의 농도로 마이크로필라 칩에 첨가하여 칼세인 AM을 이용하여 세포의 활성과 이동을 동시에 측정하여 비교하였다 세포의 활성은 각 마이크로필라 칩에서 살아있는 세포(녹색 형광)의 강도를 측정하여 정량화하였고, 세포의 이동성은 14개의 동일 조건을 가진 마이크로필라 칩에서 세포가 부착면에 부착이 일어난 마이크로필라 칩의 수를 측정하여 정량화하였다.

[50]

상기 실험을 통하여, 오와바인을 첨가한 실시예 2에서는 세포 이동성을 기준으로 하는 IC₅₀ 값이 세포 활성을 기준으로 하는 IC₅₀ 값보다 100배 작게 나와, 세포가 약물에 의해 괴사되기 전에 세포의 이동성이 감소한다는 것을 확인할 수 있었다(도 2 참조). 이에 비하여, 겔다나마이신을 첨가한 실시예 3에서는 세포 이동성을 기준으로 하는 IC₅₀ 값이 세포 활성을 기준으로 하는 IC₅₀ 값의 약 1/2에 해당하여, 세포가 약물에 의해 괴사되기 전에 세포의 이동성이 감소하기는 하나, 그 농도차이가 크지 않음을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

[51]

[52] 실험예 2. 배양된 세포의 형광 이미지 촬영을 통한 세포 골격 측정

[53] 형광 염색 시약으로서 팔로딘을 사용할 것을 제외하고는 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 형광염색으로 수행하여, 접착면에 평행한 방향으로 형광 이미지를 촬영하였다.

[54] 실험 결과, 이동 후 세포의 골격을 확인하였으며, 이를 통하여 세포 형상을 확인할 수 있었다.

[55]

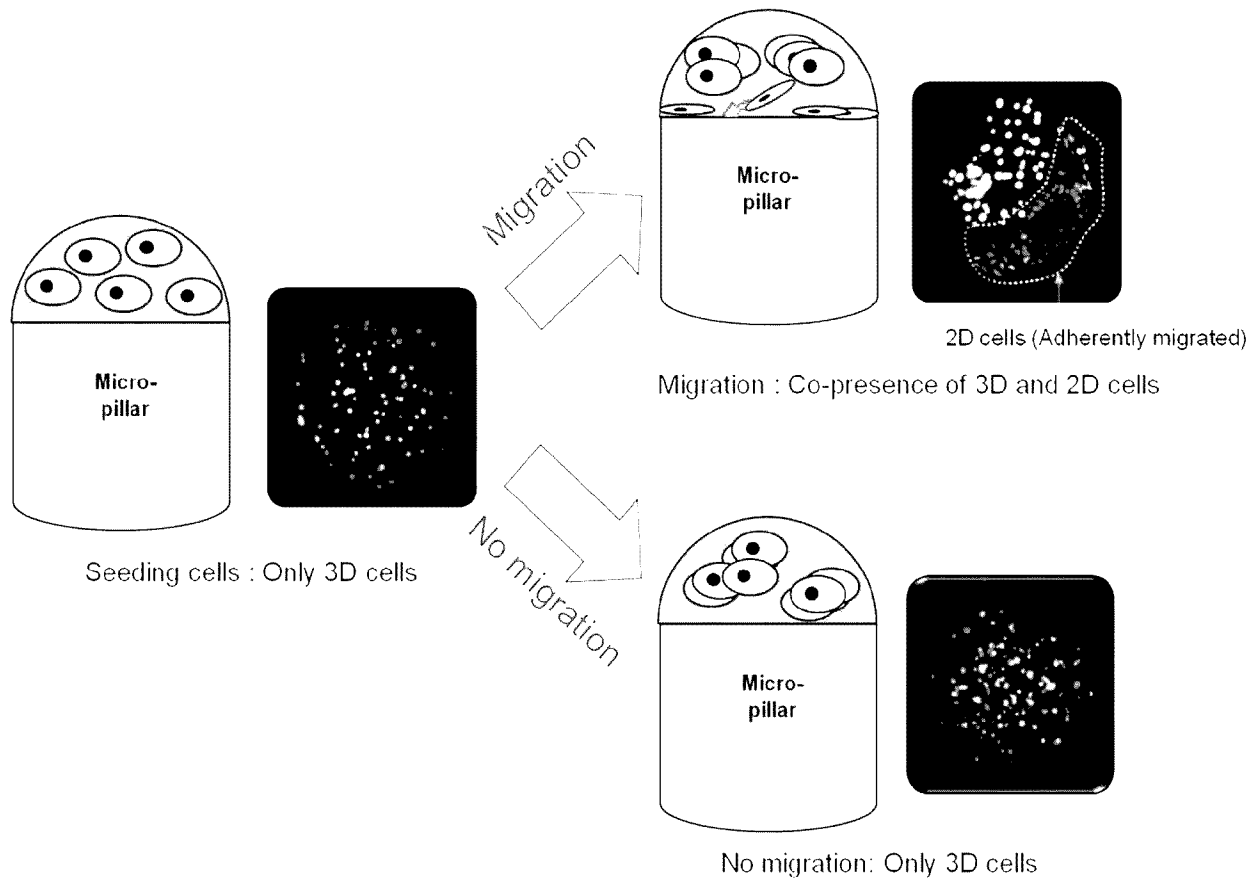
[56] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

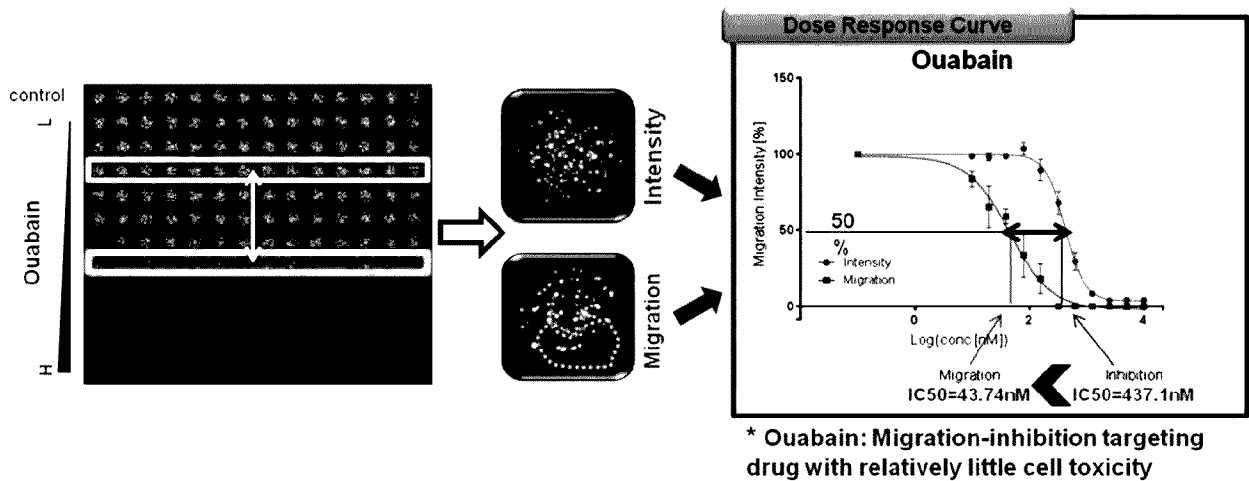
- [청구항 1] (a) 마이크로필라 칩(micropillar chip)에 접촉되어 있고 세포의 기질(extracellular matrix)을 포함하는 3차원 구조체 내에서 세포를 배양하는 단계;
(b) 상기 3차원 구조체 내 세포를 형광염색하고 세포의 형광 이미지를 획득하는 단계; 및
(c) 상기 획득한 형광 이미지로부터 상기 3차원 구조체와 마이크로필라 칩의 접촉면에 부착된 세포를 확인함으로써 상기 세포의 이동 여부를 판단하는 단계
를 포함하는 세포의 이동성 측정 방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 단계 (a) 내지 (c)를 2회 이상 수행하여 상기 부착된 세포의 빈도비(frequency ratio)를 측정함으로써 상기 세포의 이동 여부를 판단하는 것을 특징으로 하는 세포의 이동성 측정 방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 단계 (a) 내지 (c)를 10 내지 16회 수행하여 상기 부착된 세포의 빈도비를 측정함으로써 상기 세포의 이동 여부를 판단하는 것을 특징으로 하는 세포의 이동성 측정 방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 세포와 기질은 알지네이트(Alginate), 콜라겐(Collagen), 피브린(fibrin), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol), 자가조립 펩타이드 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 세포의 이동성 측정 방법.
- [청구항 5] (a) 마이크로필라 칩에 접촉되어 있고 세포 이동성 저해제의 후보 물질 및 세포와 기질을 포함하는, 3차원 구조체 내에서 세포를 배양하는 단계;
(b) 상기 3차원 구조체 내 세포를 형광염색하고, 세포의 형광 이미지를 획득하는 단계;
(c) 상기 획득한 형광 이미지로부터 상기 3차원 구조체와 마이크로필라 칩의 접촉면에 부착된 세포를 확인함으로써 상기 세포의 이동성을 판단하는 단계; 및
(d) 상기 획득한 형광 이미지로부터 상기 3차원 구조체와 마이크로필라 칩의 접촉면에 부착된 세포와 부착되지 않은 세포의 활성도 또는 세포의 골격을 측정하는 단계
를 포함하는 세포 이동성 저해제의 스크리닝 방법.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서,
상기 단계 (a) 내지 (d)를 2회 이상 수행하여 상기 부착된 세포의 빈도비 및 활성을 측정함으로써 상기 세포의 이동성 및 활성도를 판단하는 것을

- 특징으로 하는 세포 이동성 저해제의 스크리닝 방법.
- [청구항 7] 제 5 항에 있어서,
상기 단계 (a) 내지 (c)를 10 내지 16회 수행하여 상기 부착된 세포의
빈도비 및 활성을 측정함으로써 상기 세포의 이동성 및 활성도를
판단하는 것을 특징으로 하는 세포 이동성 저해제의 스크리닝 방법.

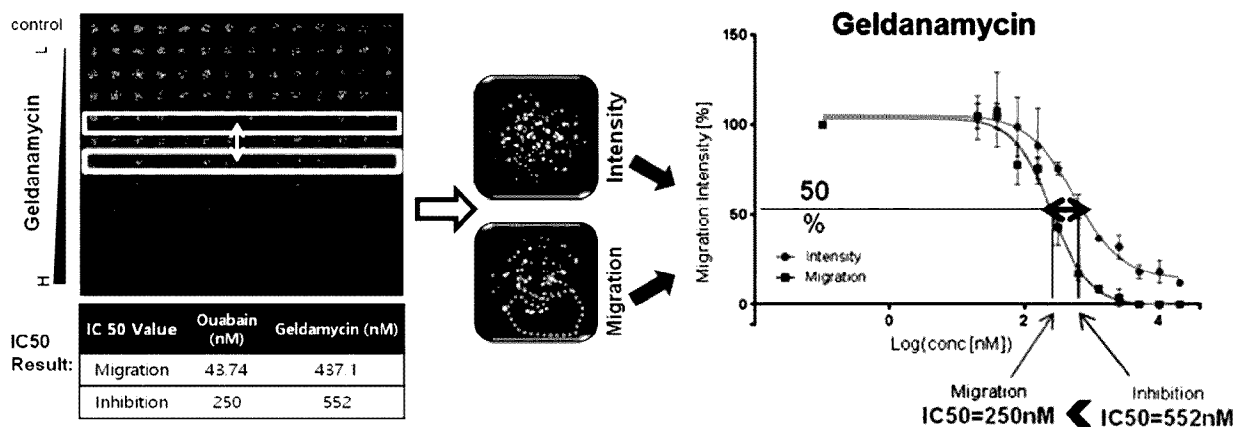
[도1]



[도2]



[도3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/002306

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/483(2006.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/50; C12Q 1/02; C12Q 1/00; C12Q 1/68; C08F 112/08; C12Q 1/24; C12M 1/34; G01N 33/483; G01N 21/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: micropillar clip, extracellular matrix, three-dimensional structure, cell culture, fluorescent image, cell migration

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2012-0044650 A (SAMSUNG ELECTRO-MECHANICS CO., LTD.) 08 May 2012 See claims 1-7; paragraphs [0020], [0032], [0036] and [0039]; figures 1-4.	1-7
Y	KR 10-1410293 B1 (KOREA POLYTECHNIC UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 20 June 2014 See claims 1-5 and 9-15; figures 1-4.	1-7
Y	KR 10-2012-0026999 A (LEE, Moo Yeal et al.) 20 March 2012 See claims 6-17 and 27-29; paragraphs [0137]-[0139]; figures 3-5.	1-7
A	US 2003-0032048 A1 (KIM, E. et al.) 13 February 2003 See the entire document.	1-7
A	US 2013-0244889 A1 (YIM, K. F. E. et al.) 19 September 2013 See the entire document.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 MAY 2018 (16.05.2018)

Date of mailing of the international search report

16 MAY 2018 (16.05.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/002306

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0044650 A	08/05/2012	KR 10-1167435 B1	19/07/2012
KR 10-1410293 B1	20/06/2014	NONE	
KR 10-2012-0026999 A	20/03/2012	KR 10-2013-0100149 A	09/09/2013
		US 2012-0088693 A1	12/04/2012
		US 2014-0011711 A1	09/01/2014
		WO 2012-034022 A2	15/03/2012
		WO 2012-034022 A3	02/08/2012
US 2003-0032048 A1	13/02/2003	AT 412049 T	15/11/2008
		AU 2002-327385 A1	17/02/2003
		AU 2002-365249 A1	02/09/2003
		AU 2003-213834 A1	29/09/2003
		AU 2003-223722 A1	10/11/2003
		AU 2003-282950 A1	13/05/2004
		AU 2003-287170 A1	13/05/2004
		CA 2429056 A1	20/06/2002
		CA 2484058 A1	06/11/2003
		CA 2503186 A1	06/05/2004
		CA 2503203 A1	06/05/2004
		EP 1339838 A2	03/09/2003
		EP 1339838 B1	22/10/2008
		EP 1502108 A1	02/02/2005
		EP 1558076 A2	03/08/2005
		EP 1578194 A2	28/09/2005
		JP 2004-515776 A	27/05/2004
		JP 2005-523710 A	11/08/2005
		JP 2006-503581 A	02/02/2006
		JP 2006-507815 A	09/03/2006
		US 2002-0168757 A1	14/11/2002
		US 2003-0017582 A1	23/01/2003
		US 2003-0021457 A1	30/01/2003
		US 2003-0022153 A1	30/01/2003
		US 2003-0022197 A1	30/01/2003
		US 2003-0022269 A1	30/01/2003
		US 2003-0022362 A1	30/01/2003
		US 2003-0030184 A1	13/02/2003
		US 2003-0032046 A1	13/02/2003
		US 2003-0032076 A1	13/02/2003
		US 2003-0036188 A1	20/02/2003
		US 2003-0040031 A1	27/02/2003
		US 2003-0040033 A1	27/02/2003
		US 2003-0040087 A1	27/02/2003
		US 2003-0068637 A1	10/04/2003
		US 2003-0073228 A1	17/04/2003
		US 2004-0002131 A1	01/01/2004
		US 2004-0142408 A1	22/07/2004
		US 2004-0142411 A1	22/07/2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/002306

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2005-0100974 A1	12/05/2005
		US 2005-0250097 A1	10/11/2005
		US 2006-0172280 A1	03/08/2006
		US 6699665 B1	02/03/2004
		US 6803205 B2	12/10/2004
		US 6811968 B2	02/11/2004
		US 6818403 B2	16/11/2004
		US 6844184 B2	18/01/2005
		US 6864065 B2	08/03/2005
		US 6893851 B2	17/05/2005
		US 6921660 B2	26/07/2005
		US 6967074 B2	22/11/2005
		US 6982171 B2	03/01/2006
		US 7001740 B2	21/02/2006
		US 7033819 B2	25/04/2006
		US 7033821 B2	25/04/2006
		US 7123764 B2	17/10/2006
		US 7166459 B2	23/01/2007
		US 7211209 B2	01/05/2007
		US 7326563 B2	05/02/2008
		US 7351575 B2	01/04/2008
		US 7364899 B2	29/04/2008
		US 7371563 B2	13/05/2008
		US 7374906 B2	20/05/2008
		US 7419823 B2	02/09/2008
		US 7439056 B2	21/10/2008
		WO 02-48676 A2	20/06/2002
		WO 02-48676 A3	29/08/2002
		WO 03-012392 A2	13/02/2003
		WO 03-012392 A3	24/07/2003
		WO 03-078565 A1	25/09/2003
		WO 03-091730 A1	06/11/2003
		WO 2004-038367 A2	06/05/2004
		WO 2004-038367 A3	11/11/2004
		WO 2004-038368 A2	06/05/2004
		WO 2004-038368 A3	29/07/2004
US 2013-0244889 A1	19/09/2013	SG 188071 A1	28/03/2013
		US 2018-051107 A1	22/02/2018
		US 9815921 B2	14/11/2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/483(2006.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/50; C12Q 1/02; C12Q 1/00; C12Q 1/68; C08F 112/08; C12Q 1/24; C12M 1/34; G01N 33/483; G01N 21/64

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 마이크로필라 칩, 세포외 기질, 3차원 구조체, 세포 배양, 형광 이미지, 세포 이동

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2012-0044650 A (삼성전기주식회사) 2012.05.08 청구항 1-7; 단락 [0020], [0032], [0036] 및 [0039]; 도면 1-4 참조.	1-7
Y	KR 10-1410293 B1 (한국산업기술대학교산학협력단) 2014.06.20 청구항 1-5 및 9-15; 도면 1-4 참조.	1-7
Y	KR 10-2012-0026999 A (이무열 등) 2012.03.20 청구항 6-17 및 27-29; 단락 [0137]-[0139]; 도면 3-5 참조.	1-7
A	US 2003-0032048 A1 (KIM, E. 등) 2003.02.13 전체 문헌 참조.	1-7
A	US 2013-0244889 A1 (YIM, K. F. E. 등) 2013.09.19 전체 문헌 참조.	1-7

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 05월 16일 (16.05.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 05월 16일 (16.05.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



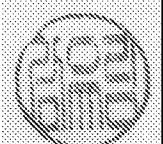
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0044650 A	2012/05/08	KR 10-1167435 B1	2012/07/19
KR 10-1410293 B1	2014/06/20	없음	
KR 10-2012-0026999 A	2012/03/20	KR 10-2013-0100149 A	2013/09/09
		US 2012-0088693 A1	2012/04/12
		US 2014-0011711 A1	2014/01/09
		WO 2012-034022 A2	2012/03/15
		WO 2012-034022 A3	2012/08/02
US 2003-0032048 A1	2003/02/13	AT 412049 T	2008/11/15
		AU 2002-327385 A1	2003/02/17
		AU 2002-365249 A1	2003/09/02
		AU 2003-213834 A1	2003/09/29
		AU 2003-223722 A1	2003/11/10
		AU 2003-282950 A1	2004/05/13
		AU 2003-287170 A1	2004/05/13
		CA 2429056 A1	2002/06/20
		CA 2484058 A1	2003/11/06
		CA 2503186 A1	2004/05/06
		CA 2503203 A1	2004/05/06
		EP 1339838 A2	2003/09/03
		EP 1339838 B1	2008/10/22
		EP 1502108 A1	2005/02/02
		EP 1558076 A2	2005/08/03
		EP 1578194 A2	2005/09/28
		JP 2004-515776 A	2004/05/27
		JP 2005-523710 A	2005/08/11
		JP 2006-503581 A	2006/02/02
		JP 2006-507815 A	2006/03/09
		US 2002-0168757 A1	2002/11/14
		US 2003-0017582 A1	2003/01/23
		US 2003-0021457 A1	2003/01/30
		US 2003-0022153 A1	2003/01/30
		US 2003-0022197 A1	2003/01/30
		US 2003-0022269 A1	2003/01/30
		US 2003-0022362 A1	2003/01/30
		US 2003-0030184 A1	2003/02/13
		US 2003-0032046 A1	2003/02/13
		US 2003-0032076 A1	2003/02/13
		US 2003-0036188 A1	2003/02/20
		US 2003-0040031 A1	2003/02/27
		US 2003-0040033 A1	2003/02/27
		US 2003-0040087 A1	2003/02/27
		US 2003-0068637 A1	2003/04/10
		US 2003-0073228 A1	2003/04/17
		US 2004-0002131 A1	2004/01/01
		US 2004-0142408 A1	2004/07/22
		US 2004-0142411 A1	2004/07/22

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2005-0100974 A1	2005/05/12
		US 2005-0250097 A1	2005/11/10
		US 2006-0172280 A1	2006/08/03
		US 6699665 B1	2004/03/02
		US 6803205 B2	2004/10/12
		US 6811968 B2	2004/11/02
		US 6818403 B2	2004/11/16
		US 6844184 B2	2005/01/18
		US 6864065 B2	2005/03/08
		US 6893851 B2	2005/05/17
		US 6921660 B2	2005/07/26
		US 6967074 B2	2005/11/22
		US 6982171 B2	2006/01/03
		US 7001740 B2	2006/02/21
		US 7033819 B2	2006/04/25
		US 7033821 B2	2006/04/25
		US 7123764 B2	2006/10/17
		US 7166459 B2	2007/01/23
		US 7211209 B2	2007/05/01
		US 7326563 B2	2008/02/05
		US 7351575 B2	2008/04/01
		US 7364899 B2	2008/04/29
		US 7371563 B2	2008/05/13
		US 7374906 B2	2008/05/20
		US 7419823 B2	2008/09/02
		US 7439056 B2	2008/10/21
		WO 02-48676 A2	2002/06/20
		WO 02-48676 A3	2002/08/29
		WO 03-012392 A2	2003/02/13
		WO 03-012392 A3	2003/07/24
		WO 03-078565 A1	2003/09/25
		WO 03-091730 A1	2003/11/06
		WO 2004-038367 A2	2004/05/06
		WO 2004-038367 A3	2004/11/11
		WO 2004-038368 A2	2004/05/06
		WO 2004-038368 A3	2004/07/29
US 2013-0244889 A1	2013/09/19	SG 188071 A1	2013/03/28
		US 2018-051107 A1	2018/02/22
		US 9815921 B2	2017/11/14