(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0039304
(43) 공개일자 2025년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C07K 7/08* (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6845 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0125195
(22) 출원일자 2024년09월12일
심사청구일자 2024년09월12일
(30) 우선권주장
1020230121307 2023년09월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
박태은
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
권태준
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

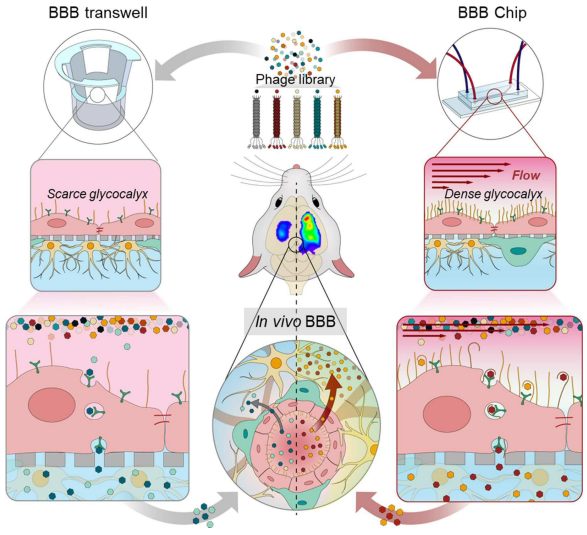
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 펩티드-디스플레이 파지 라이브러리를 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩의 마이크로채널에 순환시키는 단계; 및 각 라운드 별로 BBB 침투 파지의 비율을 평가하는 단계를 포함하는 BBB 투과 펩티드를 검출하는 방법으로서, 상기 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩은 a) 칩의 마이크로채널을 BBB 세포외기질(Extracellular Matrix, ECM)로 코팅하는 단계; b) 성상교세포(astrocyte) 및 혈관 주변세포(pericyte)를 상기 채널에 접종하는 단계; 및 c) 칩에서 뇌 내피 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되고, 상기 칩에서는 생체 내 혈액 순환을 모방하는 유체 유동이 일어나며, 상기 칩의 뇌 내피 세포가 내피 당질 구조를 갖는 것인 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12N 15/1037 (2013.01)
G01N 33/5008 (2013.01)
(72) 발명자
최정원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김경하
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711191284
과제번호 2020R1C1C1014753
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 뇌혈관장벽 셔틀 발굴을 위한 미세유체 생체칩 기반 파지디스플레이 교차스크리닝 기술개발
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465039841
과제번호 HU20C0094020023
부처명 다부처
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 치매극복연구개발사업(복지부,과기부)
연구과제명 인간 뇌-혈관 장벽 시스템 및 약물 전달 분석 플랫폼 개발
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

펩티드-디스플레이 파지 라이브러리를 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩의 마이크로채널에 순환시키는 단계; 및

각 라운드 별로 BBB 침투 파지의 비율을 평가하는 단계를 포함하는 BBB 투과 펩티드를 검출하는 방법으로서,

상기 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩은

a) 칩의 마이크로채널을 BBB 세포외기질(Extracellular Matrix, ECM)로 코팅하는 단계;

b) 성상교세포(astrocyte) 및 혈관 주변세포(pericyte)를 상기 채널에 접종하는 단계; 및

c) 칩에서 뇌 내피 세포를 배양하는 단계

를 포함하는 방법에 의해 제조되고,

상기 칩에서는 생체 내 혈액 순환을 모방하는 유체 유동이 일어나며, 상기 칩의 뇌 내피 세포가 내피 당질 구조를 갖는 것인 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 내피 당질 구조는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan) 및 단당류 시알산을 포함하는 것인 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 글리코사미노글리칸은 헤파란 설페이트 (heparan sulfate) 또는 콘드로이틴 설페이트 (chondroitin sulfate)인 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 내피 당질 구조는 프로테오글리칸 코어 단백질을 포함하는 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 프로테오글리칸 코어 단백질은 신데칸, 글리피칸, 퍼레칸, 버시칸, 데코린, 비글리칸, 및 미메칸으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 내피 당질 구조가 세포막 상에 위치하는 것인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 칩의 뇌 내피 세포는 Has2, Hmmr, Dcn 및 Gpc4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 당질 연관 유전자의 발현이 증가된 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 유체 유동의 유속은 30 μL/시간 내지 2000 μL/시간인 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 고처리량 시퀀싱(high-throughput sequencing, HTS)으로 BBB 침투 파지의 비율이 높은 펩티드 서열을 선별하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

청구항 1의 방법에 의해 검출된 BBB 투과 펩티드로서, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩티드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 혈액뇌장벽(Blood-brain barrier, BBB)은 신경계 질환에서 약물 전달 방법을 개발하는 데 있어서의 주요 장애물로 여겨진다. BBB 셔틀은 큰(> 500 Da) 분자의 뇌 내로의 전달을 거의 100% 방지하는 중추신경계(CNS)의 미세혈관 구조인, BBB의 까다로운 특성으로 인하여 수십년 동안 연구의 중요한 영역이었다.

[0003] 표적 약물 전달의 효율성을 더욱 향상시키기 위해, 가속화된 내피 수송 능력 및 장기 특이성을 갖는 신규 분자 셔틀이 파지 디스플레이 및 지수 농축(SELEX)에 의한 리간드의 전신 진화와 같은 스크리닝 기술을 사용하여 조사되었다. 특히, 파지 디스플레이 라이브러리의 바이오패닝은 신약 개발 및 다른 생의학 연구를 포함한 다양한 응용 분야에서의 신규 분자 셔틀의 신속한 발견을 향상시키는 것으로 확인되었다.

[0004] 그러나, 시험관 내 바이오패닝은 스크리닝 플랫폼으로 활용되는 내피 모델의 불충분한 생리학적 관련성으로 인해 기대에 미치지 못하는 문제가 있고, 구체적으로 종래 트랜스웰-기반 내피 모델은 혈류로 인한 층상 유동 전단 스트레스에 지속적으로 노출되는 미세혈관 내피 세포의 기능적 특징을 정확하게 반영하지 못하는 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 공개특허공보 제10-2023-0116556호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 펩티드-디스플레이 파지 라이브러리를 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩의 마이크로채널에 순환시키는 단계; 및 각 라운드 별로 BBB 침투 파지의 비율을 평가하는 단계를 포함하는 BBB 투과 펩티드를 검출하는 방법으로서, 상기 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩은 a) 칩의 마이크로채널을 BBB 세포외기질(Extracellular Matrix, ECM)로 코팅하는 단계; b) 성상교세포(astrocyte) 및 혈관 주변세포(pericyte)를 상기 채널에 접종하는 단계; 및 c) 칩에서 뇌 내피 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되고, 상기 칩에서는 생체 내 혈액 순환을 모방하는 유체 유동이 일어나며, 상기 칩의 뇌 내피 세포가 내피 당질 구조를 갖는 것인 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 상기 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩으로 우수한 생체 내 성능을 나타내는 혈관 셔틀링 펩티드를 식별하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] [1] 일 측면에서, 본 발명은 펩티드-디스플레이 파지 라이브러리를 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩의 마이크로채널에 순환시키는 단계; 및 각 라운드 별로 BBB 침투 파지의 비율을 평가하는 단계를 포함하는 BBB 투과 펩티드를 검출하는 방법으로서, 상기 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩은 a) 칩의 마이크로채널을 BBB 세포외기질(Extracellular Matrix, ECM)로 코팅하는 단계; b) 성상교세포(astrocyte) 및 혈관 주변세포(pericyte)를 상기 채널에 접종하는 단계; 및 c) 칩에서 뇌 내피 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되고, 상기 칩에서는 생체 내 혈액 순환을 모방하는 유체 유동이 일어나며, 상기 칩의 뇌 내피 세포가 내피 당질 구조를 갖는 것인 방법에 관한 것이다..

[0009] [2] 상기 [1]에 있어서, 상기 내피 당질 구조는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan) 및 단당류 시알산을 포함할 수 있다.

[0010] [3] 상기 [2]에 있어서, 상기 글리코사미노글리칸은 헤파란 설페이트 (heparan sulfate) 또는 콘드로이틴 설페이트(chondroitin sulfate)일 수 있다.

[0011] [4] 상기 [1]에 있어서, 상기 내피 당질 구조는 프로테오글리칸 코어 단백질을 포함할 수 있다.

[0012] [5] 상기 [4]에 있어서, 상기 프로테오글리칸 코어 단백질은 신데칸, 글리피칸, 퍼레칸, 버시칸, 데코린, 비글리칸, 및 미메칸으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

[0013] [6] 상기 [1]에 있어서, 상기 내피 당질 구조가 세포막 상에 위치할 수 있다.

[0014] [7] 상기 [1]에 있어서, 상기 칩의 뇌 내피 세포는 Has2, Hmmr, Dcn 및 Gpc4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 당질 연관 유전자의 발현이 증가될 수 있다.

[0015] [8] 상기 [1]에 있어서, 상기 유체 유동의 유속은 30 μL/시간 내지 2000 μL/시간일 수 있다.

[0016] [9] 상기 [1]에 있어서, 고처리량 시퀀싱(high-throughput sequencing, HTS)으로 BBB 침투 파지의 비율이 높은 펩티드 서열을 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0017] [10] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 [1]의 방법에 의해 검출된 BBB 투과 펩티드로서, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩티드에 관한 것이다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩은 생체 내 혈액 순환을 모방하는 유체 유동이 일어나 혈류로 인한 층상 유동 전단 스트레스에 지속적으로 노출되어 미세혈관 내피 세포의 기능적 특징을 정확하게 반영할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩을 바이오패닝 플랫폼으로 사용하여 우수한 생체 내 성능을 나타내는 혈관 셔틀링 펩티드를 식별할 수 있다. 식별된 펩티드는 뇌혈관 세포로 목적 물질을 전달하거나, 뇌표면 장벽, 뇌혈관 장벽, 또는 혈액-뇌척수액 장벽을 통과하여 뇌 조직으로 목적 물질을 전달하는 데 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 트랜스웰 및 마이크로유체 장치에서의 마우스 BBB의 재구성 및 BBB 셔틀 펩티드의 식별을 위한 바이오패닝에 관한 것이다: (a) 마우스 BBB 트랜스웰 및 BBB 칩의 개략도. 마우스 뇌 내피 세포(mBEC)는 다공성 막에서 배양되었으며, 성상교세포(astrocyte) 및 혈관 주변세포(pericyte)는 서로 반대 측면에서 공동 배양됨. BBB 칩의 mBEC에 100 μL/시간으로 낮은 유동을 가함. (b) 트랜스웰 삽입물 또는 BBB 칩 장치에서 배양된, ZO-1(적색) 및 Claudin 5(녹색)로 표지된 5일차 mBEC의 면역형광 현미경 사진. 핵은 DAPI(청색)로 대조염색됨. 스케일 바 = 20 μm. (c) 형광 트레이서를 이용한 마우스 BBB 모델의 물리적 배리어 기능 평가. BBB 트랜스웰 배양물 또는 비어있는 트랜스웰 삽입물(상단), 또는 BBB 칩 또는 비어있는 장치(하단)에서의 BBB 인터페이스에서의 10 kDa 덱스트란의 투과성 계수 비율. (d) BBB 트랜스웰 또는 BBB 칩을 사용한 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리의 바이오패닝의 개략도. (e) BBB 트랜스웰 및 BBB 칩에서의 바이오패닝의 각 라운드 후 계산된 파지 회수 비율. 비율은 출력 파지의 플라크 형성 단위(pfu)를 입력 파지의 pfu로 나눔으로써 계산됨. (f) 제1 및 제3 바이오패닝을 통한 펩티드 농축의 변화는 트랜스웰(회색) 및 칩(자홍색)에서의 log 2(CPM)의 산점도를 라이브러리 배경(흑색)과 비교함으로써 확인됨. 우측 하단 코너 삽입도는 제3 바이오패닝의 배경에 대한 샘플의 $\log_2$(CPM) 분포 패턴을 표시함. (g) BBB 트랜스웰 또는 BBB 칩에서 3회 라운드의 바이오패닝 후 상위 2개의 펩티드 서열. (h) 인간 BBB 트랜스웰 모델(좌측) 또는 BBB 칩(우측)에서 각각 스크램블된 펩티드(Sc)에 대한 TAMRA 표지된 Tw 펩티드 또는 C 펩티드의 BBB 침투 효율. 통계 분석은 일원 분산 분석(One-way ANOVA)을 사용하여 수행함(*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). (i) 유세포 분석에 의한, BBB 트랜스웰(좌측) 또는 BBB 칩(우측)의 mBEC에서 펩티드의 세포 흡수 평가. 통계 분석을 위해, 일원 분산 분석을 수행함(*P < 0.05, **P < 0.01).

도 2는 BBB 트랜스웰 및 BBB 칩 기반 바이오패닝에 의해 식별된 BBB 셔틀 후보의 BBB 침투에 대한 생체 내 평가 결과를 나타낸 것이다: (a) 마우스 뇌의 BBB 셔틀 펩티드 축적을 간, 비장, 신장, 심장 및 폐를 포함하는 다양한 다른 장기와 비교하기 위한 실험 설정의 개략도. TAMRA-표지 펩티드 처리 후, 처리 후 1시간차에 관류된 마

우스 장기를 수집하고 생체 내 이미징 시스템을 사용하여 영상화함. 각 장기에 대해 사전 정의된 관심 영역(ROI) 내의 형광 강도를 정량화하고, 뇌에 대한 ROI의 비율을 다른 장기의 ROI 합에 대해 정규화하여 뇌 특이성을 결정함. 통계 분석을 위해 일원 분산 분석을 사용함(**P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001). (b) 주사 후 1시간차에 생체 내 이미징 시스템에 의해 영상화된 비오티닐화 펩티드(Sc, Tw1, C2 및 M1)에 결합된 SA-Cy5.5로부터의 형광 신호를 표시하는 마우스의 등쪽 모습. (c) 뇌 영역의 총 형광 복사 효율. 통계적 유의성은 일원 분산 분석에 의해 결정됨(*P < 0.05).

도 3은 마이크로유체 BBB 칩으로부터의 내피 세포에서 당질 발현의 전사체 분석 및 검증한 결과를 나타낸 것이다: (a) 시험관 내 조건에서의 DEG는 BBB 트랜스웰에서 DEG의 평균 CPM에 대한 CPM의 $\log_2$(배수 변화)를 기준으로 그룹화됨, 2개의 그룹은 BBB 칩에서 뚜렷한 DEG 발현 경향을 나타냄. (b) MA 플롯은 BBB 트랜스웰(짙은 회색) 및 BBB 칩(와인색)으로 DEG를 강조함. 선택된 당질 또는 BBB 관련 DEG가 플롯 상에 표시됨. (c) 당질과 관련된 코어 유전자에 대해 클러스터 분석을 수행함. BBB 트랜스웰 및 BBB 칩에서의 이들 유전자의 $\log_2$(배수 변화)를 BBB 트랜스웰의 평균 CPM과 비교하여 표시함. 조정된 p-값이 0.05보다 낮은 유전자는 별표로 표시됨. (d) 공초점 현미경 이미지는 마우스 BBB 트랜스웰과 BBB 칩 사이의 당질 발현 차이를 확인함. 상단 패널은 세포의 직교 시각을 나타내며, 이는 당질의 국소화를 입증하고, 하단 패널은 단일 z-스택에서의 당질의 국소화를 나타냄. 스케일 바 = 20 μm.

도 4는 mBEC 당질에 대한 유체 유동의 영향 및 이의 펩티드 BBB 침투 효율에 미치는 영향을 조사한 결과를 나타낸 것이다: (a) 정적(유동 없음) 조건 및 유동 조건에서의 BBB 칩에서의 mBEC의 당질의 차등 발현 및 위치의 시각화. 공초점 면역형광 이미지는 WGA-렉틴(녹색)으로 염색되고 DAPI로 대조염색된 mBEC의 당질을 나타냄. 상단 패널은 당질 층의 두께를 강조하는 직교 시각을 제공하는 한편, 하단 패널은 두 조건 하에서의 당질 발현을 대조하는 단일 Z-축을 따르는 mBEC의 현미경 사진을 제공함. 스케일 바 = 10 μm. (b) mBEC의 차등 당질 발현 수준의 정량적 표현. 통계 분석을 위해, 비쌍 t-테스트를 수행함. (****P < 0.0001). (c) 정적 또는 유동 조건 하에서 BBB 칩에서 배양된 수확된 mBEC의 제타 전위. 통계 분석을 위해, 비쌍 t-테스트를 수행함(*P < 0.05). (d) 정적 및 유동 조건에서 배양된, 단일 Z-축을 따른 mBEC에서의 당질의 국소화를 나타내는 공초점 형광 현미경 사진. (e) 특정 라인을 따라 형광 강도를 측정하고, 이에 상응하는 형광 강도의 정량화 데이터를 나타냄. 스케일 바 = 5 μm. (f) 정적 조건 대비 유동 조건에서 성장한 mBEC에서 당질 성분을 암호화하는 유전자의 상대적 mRNA 발현. 통계 분석을 위해, 비쌍 t-테스트를 수행함. (*P < 0.05, **P<0.01). (g) 24시간 동안 100의 속도로 유체 유동 조건에서 배양되거나, 정적 조건에서 배양된, BBB 칩 내에서 1시간 동안 mBEC에 침투한, TMARA-표지 펩티드(Tw1, Tw2, C1 및 C2)의 비율. 통계 분석을 위해, 비쌍 t-테스트를 수행함. (*P < 0.05, **P < 0.01).

도 5는 BBB 셔틀 펩티드의 통과세포외배출(transcytosis)에서의 내피 당질의 조사 결과를 나타낸 것이다: (a) 공초점 이미지는 시알산에 특이적인 효소인 뉴라미니다아제(NA) 처리 후 mBEC에서의 당질의 밀도 및 위치의 변화를 나타냄. 상단 시각은 NA 처리 후 Alexa Fluor 488 접합 WGA-렉틴으로 표시된 당질의 감소를 나타내는 한편, 하단 시각은 단일 z-축 평면 상에서의 당질 발현을 나타냄. 스케일 바 = 10 μm. (b) NA 처리 후 WGA-렉틴의 형광 강도의 정량적 표현. 통계 분석을 위해, 비쌍 t-테스트를 수행함(*P < 0.05). 통계적 평가를 위해 비쌍 t-테스트를 활용함(*P < 0.05). (c) 모델 단백질 화물로서 기능하는, 스트렙타비딘(SA)-Cy5.5에 연결된 BBB 셔틀 펩티드를 도시하는 다이어그램(좌측). 유동 조건에서 BBB 칩의 NA 처리된 mBEC에서의 Tw1-SA-Cy5.5(녹색) 및 C2-SA-Cy5.5(녹색)의 흡수를 나타내는 공초점 이미지(우측). 스케일 바 = 20 μm. (d) 유체 조건에서의 미처리 mBEC 대비 NA 처리된 mBEC의 Tw1-SA-Cy5.5(좌측) 및 C2-SA-Cy5.5(우측)의 세포 흡수 효율 비교. 이미지 분석을 위해 ImageJ를 사용함. 비쌍 t-테스트를 사용하여 통계적 차이를 기록함(**P < 0.01). (e) 24시간 동안 유체에 노출되고 NA, HepIII로 전처리되거나 미처리된 BBB 칩의 BBB 셔틀 펩티드(Tw1, Tw2, C1 및 C2)의 침투 효율 평가. 통계적 평가는 일원 분산 분석을 통해 이루어짐(*P < 0.05; ***P < 0.001).

도 6은 기존 트랜스웰 시스템과 마이크로유체 OoC(Organ-on-a-chip)-기반 바이오패닝 기술을 개념적으로 표현한 것이다.

도 7은 숙성 배지에 노출된 후 BBB의 물리적 배리어 기능을 평가한 결과를 나타낸 것이다(일원 분산 분석 수행(****P < 0.0001)).

도 8은 숙성 배지 도포 및 유체 유동에 대한 노출 후 mBMEC의 BBB 속성 향상을 확인한 것이다: (a) 마우스 BBB 칩을 3일차에 숙성 배지에 적용시킨 후, 24시간 동안 100 μL/시간의 유체 유속에 노출시킴. mBEC는 ZO-1 및 F-액틴으로 표지되었으며, 이는 세포 형태의 변화 및 스트레스 섬유의 정렬을 나타냄, 스케일 바 = 20 μm. (b) qRT-PCR 분석은 숙성 배지 및 유체 유동 처리 후 접합 단백질(Clnd5, Cdh5, Tjp1 및 Ocln), 유출 펌프 단백질

(Abcb1a), 및 수송체(Slc2a1)를 포함하는 BBB 마커와 관련된 유전자의 발현의 유의미한 증가를 나타냄. 통계 분석을 위해, 이원 분산 분석을 수행함(*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001).

도 9는 파지 디스플레이 바이오패닝에 사용된 BBB 트랜스웰 및 BBB 칩의 투과성을 나타낸 것이다.

도 10은 BBB 트랜스웰 및 BBB 칩 모델로부터의 농축된 펩티드 후보 선택 과정을 나타낸 것이다: (a) 펩티드의 log_2(CPM) 변화는 BBB 트랜스웰(회색) 및 BBB 칩(자홍색) 실험 둘 모두에서의 순차적인 바이오패닝 라운드에 걸쳐 평가됨(라운드 1과 라운드 2간의 비교, 및 라운드 2와 라운드 3간의 비교). (b) 제1 및 제3 증폭에서 평균 log_2(CPM)가 높은 상위 10개 염기서열 중, 각 모델로부터의 상위 2개 서열을 선택함. 해당 선택은 입력 라이브러리 백그라운드의 각 서열의 CPM을 BBB 트랜스웰 및 BBB 칩 기반 바이오패닝으로부터 수득한 농축된 서열과 비교하는 것을 기반으로 함. 산점도는 제1 및 제3 증폭에서 관찰된 평균 CPM 패턴 및 log_2(배수 변화)를 나타냄.

도 11은 마우스 모델에서의 생체 내 파지 디스플레이 및 마우스 BBB 침투 펩티드의 발견을 위한 서열 분석 결과를 나타낸 것이다: (a) 생체 내 파지 디스플레이에서의 3회 라운드의 바이오패닝에 걸친 파지의 농축. 파지 라이브러리를 꼬리 정맥 주사를 통해 투여하고 1시간 동안 순환되도록 함. 관류 후, 뇌를 채취하고, 뇌 조직으로부터 용출된 파지를 정량화함. (b) 생체 내 파지 스크리닝에서의 연속 바이오패닝 라운드 동안 관찰된 log_2(CPM) 변화. (c) 산점도는 생체 내 스크리닝으로부터 수득한 펩티드 라이브러리 와 제1 및 제3 증폭 동안의 입력 백그라운드 라이브러리 간의 log_2(CPM) 비교를 도시함. 삽입도는 제3 농축 후 각 라이브러리의 판독 계수 분포를 나타냄. (d) 생체 내 농축으로부터의 상위 10개의 농축된 펩티드 서열 중, 최고로 농축된 2개의 서열(적색으로 강조 표시됨)이 시험관 내 선택에 사용된 기준에 따라 선택됨. (e) 생체 내 파지 디스플레이를 통해 상위 2개의 서열을 선택하고, 이를 M1 및 M2로 지정함.

도 12는 mBEC에 의한 펩티드 접합 화물의 흡수 효능을 조사한 결과를 나타낸 것이다: (a) 좌측 도면은 비오티닐화된 Tw1 및 Cy5.5-표지 스트렙타비딘(SA-Cy5.5)에 결합된 C2를 나타냄. 우측의 공초점 형광 현미경 사진은 Tw1-SA-Cy5.5, C2-SA-Cy5.5, 또는 SA-Cy5.5와 복합체화된 스크램블 펩티드(Sc-SA-Cy5.5)로 처리된 mBEC를 나타냄. 스케일 바 = 20 μm. (b) Sc-SA-Cy5.5와 비교한 Tw1-SA-Cy5.5 및 C2-SA-Cy5.5의 세포 흡수 효능의 정량적 비교. SA 복합체의 흡수 효능을 정량화하고 소프트웨어 ImageJ를 사용하여 분석함. 통계 분석을 위해, 비쌍 t-테스트를 수행함. (*P < 0.05; **P < 0.01).

도 13은 BBB 트랜스웰 및 BBB 칩의 유전자를 기반으로 하는 생물학적 프로세스에 대한 유전자 온톨로지(GO) 농축 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 내피 유출 펌프, 접합 단백질 및 세포 표면 수용체 관련 유전자에 대한, BBB 칩과 BBB 트랜스웰 실험 간의 CPM 발현 비교를 나타낸 것으로서, 히트맵은 각 샘플의 CPM의 log_2(배수 변화)를 나타내며, 이를 BBB 트랜스웰에서 관찰된 평균 CPM 값과 비교한 결과이다.

도 15는 정적(유동 없음) 및 유체(유동) 조건 하에서 BBB 칩의 배리어 기능을 평가하기 위해 BBB의 투과성을 평가한 것이다(비쌍 t-테스트 수행, ns: 유의미하지 않음).

도 16은 헤파리나제 III(HepIII) 처리 후 헤파란 설페이트의 발현 변화를 나타낸 것으로서, 공초점 현미경 이미지는 유체 조건 하에서 mBEC에서 발현된 헤파란 설페이트의 염색을 나타낸다(스케일 바 = 10 μm).

도 17은 유세포 분석을 사용한 mBEC 후 당질 효소 처리에 의한 펩티드의 세포 흡수 평가를 나타낸 것이다(비쌍 t-테스트를 수행함(ns: 유의미하지 않음; **P < 0.01; ***P < 0.001))

도 18은 생리학적으로 관련된 전단 스트레스 하에서의 BBB 칩의 당질의 발현 수준을 관찰한 결과를 나타낸 것이다. 좌측 패널은 전체 실험에 대해 설정된 BBB 칩 조건(100 μL/시간의 유동; 0.04 dyne cm^{-2}) 하에서의 mBEC의 렉틴 염색을 나타내는 공초점 현미경 영상이고, 우측 패널은 생리학적 전단 스트레스 하에서의 BBB 칩 조건 하에서의 mBEC의 렉틴 염색을 나타내는 공초점 현미경 영상이다(스케일 바 = 20 μm; 비쌍 t-테스트 수행(ns: 유의미하지 않음)).

도 19는 트랜스웰 또는 OoC 장치에서 마우스 BBB의 재구성을 위한 타임라인을 나타낸 것으로서 명시야 이미지는 BBB 칩 조건 하에서 캡처된 것이다(스케일 바 = 200 μm).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0022] 본 발명은 일 관점에서, 퀜티드-디스플레이 파지 라이브러리를 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩의 마이크로채널에 순환시키는 단계; 및 각 라운드 별로 BBB 침투 파지의 비율을 평가하는 단계를 포함하는 BBB 투과 퀜티드를 검출하는 방법으로서, 상기 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩은 a) 칩의 마이크로채널을 BBB 세포외기질(Extracellular Matrix, ECM)로 코팅하는 단계; b) 성상교세포(astrocyte) 및 혈관 주변세포(pericyte)를 상기 채널에 접종하는 단계; 및 c) 칩에서 뇌 내피 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되고, 상기 칩에서는 생체 내 혈액 순환을 모방하는 유체 유동이 일어나며, 상기 칩의 뇌 내피 세포가 내피 당질 구조를 갖는 것인 방법에 관한 것이다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 제조 방법은 미세생리시스템(microphysiological system, MPS)에서 수행될 수 있다. 마이크로유체는 미세 유체(microfluidics)라고도 하며, 유체가 흐르는 마이크로채널을 통해 유체의 흐름을 정밀하게 조절할 수 있다. 상기 제조 방법은 세포 공배양 기술과 혈류 모사 미세 유체역학 기술을 융합하여 조직 또는 장기의 세포 간 상호작용 및 미세환경을 체외(in vitro)에서 재현할 수 있다. 미세생리시스템은 장기-온-칩(organ-on-a-chip, OoC), 조직-온-칩(tissue-on-a-chip), 생체모사칩(biomimetic chip) 및 미니 장기 기술 등을 포함하는 것으로서, 상기 용어로 혼용될 수 있다.

[0024] 일 실시예에서, 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩은 폴리디메틸실록산(poly(dimethylsiloxane), PDMS), 폴리메틸메타클릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리아크릴레이트(polyacrylates), 폴리카보네이트(polycarbonates), 폴리시클릭 올레핀(polycyclic olefins), 폴리이미드(polyimides) 및 폴리우레탄(polyurethanes)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 재질로 제조될 수 있고, 예를 들어, 폴리디메틸실록산(poly(dimethylsiloxane), PDMS)으로 제조될 수 있다.

[0025] 일 실시예에서, 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩은 2 이상의 분리된 배양 공간(채널)을 갖는 것일 수 있으며, 상기 채널은 다공성 막으로 분리된 것일 수 있다. 상기 다공성 막은 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리카보네이트(polycabonate, PC), 리카프로락톤(polycaprolactone, PCL), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS), 질화 규소(silicon nitride, SiN) 및 이산화 규소(silicon dioxide, SiO_2)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로 구성될 수 있으며, 구체적으로 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET)으로 제조된 것일 수 있다.

[0026] 일 실시예에서, 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩의 구조상 제1 채널은 상부에 존재하고, 제2 채널은 하부에 존재하는 것일 수 있다. 따라서, 상기 제1 채널은 상부 채널로 불리며, 상기 제2 채널은 하부 채널로 불릴 수 있다. 또한, 상기 제1 채널 및 제2 채널은 다공성막에 의해 분리되어 제1 채널-다공성막-제2 채널의 순으로 구성된 것일 수 있다.

[0027] 일 실시예에서, 상기 a) 단계의 코팅은 약 30 내지 37° C에서 4 내지 8시간 동안 이루어질 수 있다.

[0028] 상기 b) 단계는 성상교세포(astrocyte) 및 혈관 주변세포(pericyte)를 상기 채널에 접종하는 단계로서 성상교세포 및 혈관 주변세포는 서로 반대 측면에서 공동 배양될 수 있다.

[0029] 상기 c) 단계는 칩에서 뇌 내피 세포를 배양하는 단계로서, 뇌 내피 세포는 칩의 다공성 막에서 배양될 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, 세포 배양(cell culture)은 일정 조건 하에서 인공적으로 체외에서 살아있는 세포를 키우는 과정을 의미한다.

[0031] 뇌 내피 세포(BEC)는 뇌의 혈관에서 혈액뇌장벽(BBB)을 형성하는 주요 세포이며, 인접한 내피 세포 간의 밀착연접(tight junction)을 형성하여 혈액과 뇌 사이의 물질 이동을 엄격히 조절함으로써 특정 물질만을 선택적으로 통과시키는 특성이 있다. 뇌 미세 혈관 내피 세포(BMEC)는 뇌 내피 세포를 구성하는 것으로서, 뇌 내피 세포(BEC) 및 뇌 미세 혈관 내피 세포(BMEC)는 구별없이 혼용될 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩에서는 생체 내 혈액 순환을 모방하는 유체 유동이 일어남으로써, 혈류로 인한 층상 유동 전단 스트레스에 지속적으로 노출되어 세포골격 조직, 유전자 발현, 세포내 수송 역학 및 내피 당질과 같은 미세혈관 내피 세포의 생리학적 특징이 반영될 수 있다. 상기 칩의 뇌 내피 세포는 내피 당질 구조를 가지며, 세포막 상에 위치하는 것일 수 있고, 상기 내피 당질 구조는 유체 유동으로 인한

전단 스트레스에 의해 유도될 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 내피 당질 구조는 뇌의 혈관 내피 세포 표면에 위치한 당질 성분의 복합적인 구조를 의미한다. 내피 당질 구조는 혈액-뇌 장벽의 무결성을 유지하여 혈액뇌장벽(BBB)을 유지하는 역할을 하고, 인접한 세포 간의 상호작용을 조절하여, 내피 세포의 접착 및 혈관의 안정성을 유지하는 역할을 한다.

[0034] 일 실시예에서, 내피 당질 구조는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan) 및 단당류 시알산을 포함하는 것일 수 있고, 상기 글리코사미노글리칸은 헤파란 설페이트 (heparan sulfate) 또는 콘드로이틴 설페이트 (chondroitin sulfate)일 수 있고, 상기 단당류 시알산은 뉴로아미드산 또는 이의 아미노 유도체일 수 있다.

[0035] 일 실시예에서, 내피 당질 구조는 프로테오글리칸 코어 단백질을 포함할 수 있고, 상기 프로테오글리칸 코어 단백질은 신데칸, 글리피칸, 퍼레칸, 버시칸, 데코린, 비글리칸, 및 미메칸으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있으며, 구체적으로 신데칸 및 글리피칸일 수 있다.

[0036] 또한 유동 전단 조건 하에서 칩의 뇌 내피 세포는 당질 연관 유전자가 상향 조절될 수 있다. 상기 당질 연관 유전자는 예컨대 Has2, Hmmr, Dcn 및 Gpc4로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 일 실시예에서, 상기 유체 유동은 유체 흐름(유동)을 도입할 수 있는 것이라면 제한되지 않고, 구체적으로 연동 펌프에 연결하여 발생되는 것일 수 있다.

[0038] 상기 유체 유동의 유속은 목적에 따라 유체 유동의 유속을 적절히 조절할 수 있고, 예컨대, 약 30 μL/시간, 약 40 μL/시간, 약 50 μL/시간, 약 60 μL/시간, 약 70 μL/시간, 약 80 μL/시간, 약 90 μL/시간, 약 100 μL/시간, 약 150 μL/시간, 약 200 μL/시간, 약 250 μL/시간, 약 300 μL/시간, 약 350 μL/시간, 약 400 μL/시간, 약 450 μL/시간, 약 500 μL/시간, 약 550 μL/시간, 약 600 μL/시간, 약 650 μL/시간, 약 700 μL/시간, 약 750 μL/시간, 약 800 μL/시간, 약 850 μL/시간, 약 900 μL/시간, 약 1000 μL/시간, 약 1100 μL/시간, 약 1200 μL/시간, 약 1300 μL/시간, 약 1400 μL/시간, 약 1500 μL/시간, 약 1600 μL/시간, 약 1700 μL/시간, 약 1800 μL/시간, 약 1900 μL/시간 또는 약 2000 μL/시간일 수 있고, 약 30 μL/시간 내지 2000 μL/시간, 약 30 μL/시간 내지 1500 μL/시간, 약 30 μL/시간 내지 1000 μL/시간, 약 30 μL/시간 내지 500 μL/시간, 약 50 μL/시간 내지 2000 μL/시간, 약 50 μL/시간 내지 1500 μL/시간, 약 50 μL/시간 내지 1000 μL/시간, 약 50 μL/시간 내지 500 μL/시간, 약 50 μL/시간 내지 400 μL/시간, 약 100 μL/시간 내지 300 μL/시간, 약 150 μL/시간 내지 300 μL/시간, 약 200 μL/시간 내지 300 μL/시간, 약 250 μL/시간 내지 300 μL/시간 또는 약 350 μL/시간 내지 400 μL/시간일 수 있다.

[0039] 상기 유체 유동은 약 12시간 내지 24시간, 약 14시간 내지 24시간, 약 16시간 내지 24시간, 약 18시간 내지 24시간, 약 20시간 내지 24시간, 약 22시간 또는 24시간 동안 연동 펌프에 연결하여 발생되는 것일 수 있다.

[0040] 일 실시예에서, 상기 유체 유동은 칩을 약 12 내지 24시간 동안 약 50 μL/시간 내지 400 μL/시간의 유속의 연동 펌프에 연결하여 발생되는 것일 수 있다.

[0041] 일 실시예에서, BBB 칩에 대한 바이오패닝을 위해, 뇌 내피 세포 단층에 다양성을 갖는 펩티드-디스플레이 파지 라이브러리를 마이크로채널에 순환시킬 수 있다. 순환속도는 약 50 μL/시간 내지 400 μL/시간으로 순환시킬 수 있다.

[0042] 일 실시예에서, 각 라운드 별로 BBB 침투 파지의 비율을 평가하는 단계는 바이오패닝의 각 라운드에서 뇌 내피 세포를 파지에 노출시키고, 출력 대 입력 파지 수의 비율(BBB가 침투된 파지의 수를 뇌 내피 세포에 도포된 총 파지의 수로 나눈 값)을 마이크로적정으로 결정할 수 있다.

[0043] 일 실시예에서, 고처리량 시퀀싱(high-throughput sequencing, HTS)으로 BBB 침투 파지의 비율이 높은 펩티드 서열을 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 BBB 투과 펩티드를 검출하는 방법에 의해 검출된 BBB 투과 펩티드로서, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 펩티드에 관한 것이다.

[0045] 전술한 본 발명의 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩 및 BBB 투과 펩티드를 검출하는 방법과 중복된 내용은 그 기재를 생략한다.

[0046] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 마이크로유체 혈액뇌장벽(BBB) 칩을 바이오패닝 플랫폼으로 사용하여 우수한 생체 내 성능을 나타내는 혈관 셔틀링 펩티드를 식별할 수 있고, 식별된 펩티드는 뇌혈관 세포로 목적 물질을 전

달하거나, 뇌표면 장벽, 뇌혈관 장벽, 또는 혈액-뇌척수액 장벽을 통과하여 뇌 조직으로 목적 물질을 전달할 수 있다.

[0048] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[0050] **실시예**

[0051] **세포 배양**

[0052] 일차 BALB/c 마우스 뇌 미세혈관 내피 세포(mBEC) 및 BALB/c 마우스 성상교세포(mAC)를 Cell biologics(USA)에서 구입하고, 완전 내피 세포 배지(M1168, Cell Biologics, USA) 및 완전 성상교세포 배지(M2266, Cell Biologics, USA)에서 각각 유지하였다. BALB/c 마우스의 뇌 조직으로부터 단리된 일차 마우스 혈관주변세포(mPC)를 iXCELL biotechnologies에서 구입하고, 혈관주변세포 성장 배지(MD-0030, iXCELL biotechnologies, USA)에서 유지하였다. 모든 세포는 제조업체의 프로토콜에 따라 37° C의 5% CO_2 인큐베이터에서 유지되었으며. 실험 전반에 걸쳐 표현형 일관성을 유지하기 위해 6개 미만의 통로에서 사용되었다.

[0053] **2-채널 마이크로유체 장치의 제작**

[0054] 마이크로유체 장치의 설계는 일반적인 인간 BBB 칩을 수정하여 수행하였다. 장치는 폴리디메틸실록산(PDMS)으로 만들어진 상부 및 하부를 포함하며, 다공성 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 막이 2개 피스의 PDMS 사이에 끼워지며, 하단의 커버 글래스로 지지되었다. 마이크로채널은 길이 2500 μm, 폭 1000 μm이고, 상부 및 하부 채널에 대해 각각 1000 μm 및 200 μm의 높이를 가졌다. PDMS 베이스와 경화제의 10:1 혼합물을 상부 채널을 위한 아크릴 몰드(Microfit, 대한민국) 및 하부 채널을 위한 SU-8 몰드(Microfit, 대한민국)에서 캐스팅하였다. 샘플을 진공 데시케이터에 15분 동안 넣어 기포를 제거한 후, 65° C의 오븐에서 2시간 동안 경화시켰다. 경화가 끝나면, PDMS 피스를 몰드에서 조심스럽게 떼어내고 설계된 대로 트리밍하였다. 1 mm 생검 펀치를 사용하여 유입구 및 유출구 구멍을 만들었다. 2 μm 기공 크기의 트랙 에칭된 PET 멤브레인을 ipCELLCULTURE™(it4ip, USA)에서 구입하고, 설계에 대해 레이저 커팅을 통해 처리하였다. PDMS 부품을 PET 멤브레인에 결합시키기 위해, 종래 알려진 에폭시 실란 방법을 사용하였다. 80W에서 1분 동안 50 sccm의 O_2 가스 유동으로 0.80 mbar까지 O_2 플라즈마로 처리한 후, PDMS 부품을 즉시 5% (3-아미노프로필)트리에톡시실란 용액(Sigma, USA)에 침지시키고, PET 멤브레인을 1% (3-글리시딜옥시프로필)트리메톡시실란 용액(Sigma, USA)에 실온에서 20분 동안 로테이터 상에서 침지시켰다. 압축 공기로 피스를 건조시킨 후, 부품 및 멤브레인을 수동으로 정렬하고 집게로 고정하였다. 완성된 장치를 65° C 오븐에 2일 이상 보관하였다.

[0055] **마우스 BBB 트랜스웰 및 BBB 칩의 재구성**

[0056] 마우스 BBB 트랜스웰 모델을 설정하기 위해, 1.0 μm 투명 PET 멤브레인이 구비된 12-웰 플레이트에 대해 Falcon® Permeable Support를 사용하였다. Dulbecco 인산염 완충 식염수(DPBS; Welgene, 대한민국) 중 100 μg mL^{-1} 콜라겐 IV(Sigma, USA) 및 100 μg mL^{-1} 피브로넥틴(Sigma, USA)으로 구성된 BBB 세포외 기질(ECM) 용액으로 트랜스웰을 코팅시키고, 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 삼중-배양 BBB 모델의 경우, 1.8 × 10^4의 mAC 및 mPC를 6시간 동안 트랜스웰을 거꾸로 배치시켜 멤브레인의 바닥면에 시딩(접종)하였다. 이어서, 트랜스웰 삽입물을 정점 및 기저부 양쪽 상에서 성상교세포 및 혈관주변세포 배지의 1:1 혼합물을 함유하는 12-웰 플레이트 내에 조심스럽게 배치하였다. 1일 후, 1.33 × 10^5의 mBEC를 트랜스웰의 정점 측면에 시딩하고, 배지를 내피 세포 배지로 변경하였다. 세포가 합쳐질 때까지 이틀 동안 신선한 배지를 공급하였다. 3일차에, BBB 표현형의 발달을 촉진시키기 위해, 10 ng mL^{-1}의 표피 성장 인자(EGF; Peprotech), 10 ng mL^{-1}의 섬유아세포 성장 인자(PeproTech, USA), 15 μg mL^{-1}의 내피 세포 성장 보충제(Sigma, USA), 0.5 μg mL^{-1}의 하이드로코르티손(Sigma, USA), 50 μg mL^{-1}의 L-아스코르브산(Sigma, USA), 17.4 μM의 RO 20-1724(Sigma, USA), 및 250 μM의 CPT-cAMP(Sigma, USA)가 보충된 마우스 내피 세포 배지로 이루어진 숙성 배지로 배양 배지를 교체하였다. 이틀 동안 숙성 배지에서 유지된 배양물을 추가 검정에 사용하였다.

[0057] 마이크로유체 장치에서의 마우스 BBB의 재구성을 위해, 채널을 70% EtOH 및 DPBS로 2회 세척하고, 65° C 오븐에서 건조시켰다. 이어서, 장치를 80 W에서 1분 동안, 50 sccm의 O_2 가스 유동으로 0.80 mbar까지 O_2 플라즈마로 처리하였다. 채널을 즉시 0.01% 폴리-L-리신(Merck, USA) 용액으로 처리하고 37° C에서 2시간 동안 인큐베이션하여 세포 부착을 향상시켰다. DPBS로 2회 세척한 후, 채널을 37° C에서 6시간 동안 전술한 BBB ECM 용액으로 코팅하였다. 세포 시딩 전, 두 채널 모두를 성상교세포 및 혈관주변세포 배지의 1:1 혼합물로 플러싱하였다. 공동 배양을 위해, 0.2×10^6 세포 mL^{-1} 밀도의 mAC의 및 0.2×10^6 세포 mL^{-1} 밀도의 mPC를 혼합하고 장치의 뇌 채널에 시딩하였다. 다음날, 두 채널 모두를 내피 세포 배지로 헹구고, mBEC를 6.65×10^6 세포 mL^{-1}의 밀도로 칩의 혈액 채널에 시딩하였다. mBEC가 ECM 코팅된 PET 멤브레인의 측면에 부착될 수 있도록 장치를 즉시 뒤집었다. 6시간의 배양 후, 장치를 원래의 배향으로 되돌리고, 내피 세포 배지를 조심스럽게 주입하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. BBB 칩을 추가로 18시간 동안 인큐베이션한 후, 이틀 동안 신선한 내피 세포 배지를 공급하였다. BBB 칩은 전술한 숙성 배지를 거쳤고, 유체 유동의 제공을 위해 연동 펌프에 연결되었다. 도 19는 배양 조건의 타임라인을 도시한다. 도 19에서 보듯이, mBEC를 유체 유동에 도달할 때까지 3일 동안 성장 배지에서 배양하고. 이어서, 추가로 2일 동안 배지를 숙성 배지로 전환하고, 2일 동안 숙성 배지로 변경하고, 4일차에 BBB 칩을 100 μL/시간의 유속으로 연동 펌프에 연결하였다.

[0058] **BBB 모델의 배리어 기능**

[0059] BBB 모델의 무결성을 결정하기 위해, 경혈관 내피 전기 저항(TEER) 측정 및 트레이서 투과성 검정을 수행하였다. TEER 측정을 위해 BBB 트랜스웰 모델을 실온에서 15분 동안 안정화시켰다. TEER는 EVOM2 기기(WPI, USA)를 사용하여 측정하였으며, 측정치는 다음과 같이 표현된다: Ω × cm^2 = (Ω - 백그라운드 Ω) × 멤브레인 면적(cm^2). 두 BBB 모델의 세포주변 투과성은 10 kDa 캐스케이드 청색 덱스트란(Invitrogen, USA)의 P_{app}를 측정하여 평가되었다. 트랜스웰 모델의 경우, 25 μg mL^{-1}의 트레이서를 삽입물의 정점 측면에 도포하고 2시간 동안 진탕기 상에서 인큐베이션하였다. 기저 챔버에서 배지를 30분마다 수집하고, 여기 파장 400 nm, 방출 파장 430 nm의 Neo2 마이크로플레이트 판독기(BioTek, USA)를 사용하여 덱스트란 트레이서의 농도를 결정하였다. 다음의 식을 사용하여 P_{app}를 산출하였다.

$$P_{app} = \frac{C_x}{C_0 \times t(s) \times A(cm^2)} \times V(cm^3)$$

[0060]

[0061] BBB 칩의 경우, 25 μg mL^{-1}의 10 kDa 캐스케이드 청색 덱스트란 트레이서를 300 μL/시간의 속도로 혈액 채널을 통해 주입하였다. 두 채널 모두로부터 유출물을 수집하고, Neo2 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 형광 강도를 측정하여 트레이서의 농도를 결정하였다. 상기 식을 사용하여 P_{app}를 산출하였다.

[0062] **마우스 BBB 트랜스웰 또는 BBB 칩을 이용한 시험관 내 파지 디스플레이**

[0063] 무작위 12량체 펩티드의 파지 라이브러리(Ph.D.™-12 Phage Display Peptide Library; E8210)을 New England Biolabs(USA)로부터 구입하였다. LB 배지, 테트라사이클린, LB/IPTG/Xgal 플레이트, Tris 완충 식염수(TBS) 및 PEG/NaCl 용액을 포함하는, 파지 디스플레이에 필요한 물질은 제공된 프로토콜에 따라 제조되었다. 대장균 숙주균주 ER2738을 20 μg mL^{-1}의테트라사이클린과 함께 LB 배지에서 배양 및 증폭시키고 향후 사용을 위해 -80° C의 글리세롤에 보관하였다. 패닝 전, 마우스 BBB 트랜스웰 모델을 2시간 동안 무혈청 마우스 내피 세포 배지와 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 정점 챔버를 1시간 동안 진탕기 상에서 1.0×10^{11} pfu의 파지 라이브러리와 함께 인큐베이션하고, BBB가 침투된 파지를 함유하는 배지를 기저 챔버로부터 수집하였다.

[0064] 잔류 혈청, 항생제 또는 파편을 제거하기 위해, BBB 칩에 대한 패닝을 위한 무혈청 마우스 내피 세포 배지로 두 채널 모두를 플러싱하였다. 이어서, 1×10^{11} pfu의 파지 라이브러리를 300 μL 시간$^{-1}$의 속도로 2시간 동안 혈액 채널을 통해 투여하고, 뇌 채널로부터 유출 샘플을 수집하였다.

[0065] BBB 트랜스웰 또는 BBB 칩으로부터 수집된 배지의 분취량을 마이크로적정에 사용하였고, 나머지 파지는 다음 라운드의 바이오패닝을 위해 제조자의 프로토콜에 따라 증폭시켰다. BBB 트랜스웰 또는 BBB 칩에 대한 바이오패닝

의 각 라운드에서, mBEC를 1 × 10^{11} pfu의 파지에 노출시키고, 출력 대 입력 파지 수의 비율(BBB가 침투된 파지의 수를 mBEC에 도포된 총 파지의 수로 나눈 값)을 마이크로적정으로 결정하였다. 또한, 바이오패닝 프로세스 동안에서의 BBB 모델의 무결성은 각 라운드에서 10 kDa 캐스케이드 청색 덱스트란의 P_{app}를 결정함으로써 모니터링하였다.

[0066] **마우스의 생체 내 파지 디스플레이**

[0067] 동물 관리 및 실험 프로토콜은 국립 울산과학기술원(Ulsan National Institute of Science and Technology)의 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인(UNISTIACUC-22-06)을 받았다. 생후 6 내지 8주령의 BALB/c 암컷 마우스에게 150 μl의 TBS 중 현탁된 1× 10^{11} pfu의 파지 라이브러리를 정맥 주사하였다. 1시간 후, 마우스를 마취시키고, 연동 펌프를 사용하여 심장 관류 후 뇌를 적출하였다. 관류 절차에는 헤파린을 함유하는 DMEM에 3분 동안, PBS 중 0.1% Tween-20에 추가의 3분 동안, 그리고 헤파린을 함유하는 DMEM에 3분 동안, 모두 2.4 mL $분^{-1}$의 속도로 순차적으로 통과시키는 단계가 포함된다. 단리된 뇌를 조직 현탁액 용액(헤파린, BSA 및 프로테아제 억제제 칵테일을 함유하는 DMEM)으로 옮기고, 칭량하고, 차가운 DPBS로 3회 세척하였다. 이에 후속하여, 뇌를 1 ml의 용출 완충액(BSA를 함유하는 0.2 M 글리신-HCl, pH 2.2)을 함유하는 5 ml 튜브(Eppendorf)로 옮기고, 균질화기(BioSpec Products, Inc., USA)로 1.5분 동안 균질화하고, 7분 동안 얼음 위에서 배양하였다. 이어서, 중화 완충액(1 M Tris-HCl, pH 9.1) 150 μL를 첨가하고, 10,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 용출된 파지를 함유하는 상청액을 새로운 튜브로 조심스럽게 옮기고, 제조사의 프로토콜에 따라, 다음 라운드의 바이오패닝을 위한 마이크로적정 및 증폭에 사용하였다. 생체 내에서의 마우스에 대한 바이오패닝의 각 라운드에서, 1 × 10^{11} pfu의 파지를 주사하고, 출력 대 입력 파지 수의 비율(뇌에 축적된 파지의 수를 마우스에 도포된 총 파지의 수로 나눈 값)을 마이크로적정으로 결정하였다.

[0068] **파지 펩티드의 차세대 시퀀싱**

[0069] 각 모델의 패닝의 각 라운드로부터 증폭된 파지를 시퀀싱에 사용하였다. 대조군으로서, 초기 파지 라이브러리를 또한 3배 증폭하고 분석하였다. 파지 DNA 단리 키트(Norgen)를 사용하여 파지 DNA를 추출하고 PCR로 증폭하였다. 프라이머는 표 1에 기재되어 있다.

표 1

[0070]

Primers used for amplicon sequencing from phage screened peptides			
Primer	Length	Sequence (5' →3')	SEQ ID NO.
Forward primer	59	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNTTGTCGTCTTTCCAGACGTT	5
Reverse primer	62	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNACCGATACAATTAAAGGCTCCT	6

[0071] 가변 영역을 중심으로 양쪽 단부에서의 각각의 파지 라이브러리를 결합하고 226개 뉴클레오티드 길이의 파지 서열의 특정 영역을 증폭하는 프라이머를 설계하였다. 이어서, 서로 다른 샘플을 표시하고 분류하는 어댑터 서열(Illumina, 인덱스 1(i7) 어댑터 및 인덱스 2(i5) 어댑터)을 사용하여 증폭된 각각의 DNA 서열을 표지하였다. 다음으로, DNA Clean and Concentrator 키트(Zymo, USA; D4014)를 사용하여 고농도의 라이브러리를 얻었고, 각 샘플의 펩티드 서열이 증폭되었는지 그리고 겔 전기영동을 통해 어댑터와 결찰되었는지의 여부를 확인하였다. 이어서, 각각의 정제된 라이브러리를 연속 희석을 통해 2 nM로 설정하고, 모든 샘플을 풀링하였다. 추가적으로, qPCR 키트(USA, KAPA Biosystems, KK4824)를 사용하여 라이브러리의 최종 로딩 농도를 검증하였다. 그 후, 300 사이클 중간 출력 키트(Illumina, USA; 20024905)를 사용하는 Illumina NextSeq 500을 사용하여 쌍단 시퀀싱으로 라이브러리를 시퀀싱하였다. 샘플의 모든 시퀀싱 프로세스 및 품질 관리는 대한민국 성남시 분당구에 소재한 LabGenomics Co., Ltd.에서 수행되었다.

[0072] **파지 펩티드의 시퀀싱 데이터 분석**

[0073] DNA 서열의 전처리를 위한 모든 도구는 기본 옵션을 사용하여 실행되었다. 또한, 서열 분석을 위한 Illumina NGS 데이터 프로세싱은 사용자 지정 배쉬(bash) 스크립트 및 Python 코드를 통해 수행되었다. 시퀀싱을 통해 수득한 쌍 1 및 쌍 2를 트림모매틱(trimmomatic)(버전 0.39)을 사용하여 각각 트리밍하고, 저품질 판독을 제거하였다. 가변 영역을 둘러싸고 있는 양쪽 단부의 M13 파지 서열을 5' 또는 3' 측면 영역으로 설정하고, bowtie2

(버전 2.3.5.1)를 사용하여 서열을 사용하고 정렬하였다. 하나의 증폭 조건으로부터의 두 기술 복제물에 대한 판독은 SAMtools(버전 1.10)를 사용하는 단일 이진 정렬 맵(BAM) 파일로 병합되었다. 이에 후속하여, 측면 영역이 M13 파지 참조 서열과 일치하는 가변 영역을 맞춤형 Python 스크립트를 통해 추출하고, 각 영역의 수를 계수하였다. 또한, DNA 서열을 펩티드 서열로 번역하고, 각 펩티드 서열의 비율 및 순위를 산출하였다. 계수의 비는 CPM으로 정규화되었다. 숫자 그룹의 절반 이상에서 계수가 0인 서열을 이상치로 지정하였다. 다음으로, CPM 값과 시험관 내 및 신체 내에서 수집된 라이브러리의 농축 양태 및 입력 백그라운드를 서로 비교하였다.

[0074] **시험관 내 BBB 침투 분석**

[0075] BBB 칩에 300 μL/시간 유속으로 16시간 동안 유체 유동을 제공한 후, 이를 무혈청 배지로 세척하였다. 5 μM 농도의 TAMRA-접합 펩티드를 혈액 채널을 통해 투여하고 뇌 채널은 정적 상태로 두었다. 1시간의 인큐베이션 후, 뇌 채널로부터의 샘플을 조심스럽게 수집하고, 마이크로플레이트 리더(BioTek)로 형광 강도를 평가하였다. 표준 곡선을 이용하여 침투된 펩티드의 농도를 산출하였다. 당질 분해 검정을 위해, 15 mU mL^{-1}의 클로스트리디움 퍼프린젠스(Clostridium perfringens)(Sigma) 또는 10 mU mL^{-1}의 플라보박테리움 헤파리눔(Flavobacterium heparinum)(Sigma) 유래의 헤파리나아제 III을 37ºC에서 2시간 동안 전처리하였다. 처리 후, 세포를 PBS로 1회 세척하고, 투과성 연구로 실험을 진행하였다.

[0076] **유세포 분석**

[0077] 형광 표지 펩티드 처리 1시간 후, 세포를 4° C에서 4분 동안 500 g로 원심분리하고 차가운 DPBS로 2회 세척하였다. NovoCyte 유세포분석기 시스템(Agilent)을 사용하여 샘플당 최소 10,000개의 이벤트를 분석하였다. NovoExpress 소프트웨어(Agilent)를 사용하여 데이터를 게이팅하고 평균 형광 강도를 측정하였다.

[0078] **면역세포화학 및 공초점 이미징**

[0079] BBB 트랜스웰 및 BBB 칩 둘 모두를 4% 파라포름알데히드(PFA; Biosesang)로 15분 동안 처리한 후, 실온에서 10분 동안 0.1% Triton X-100(Sigma)으로 투과시켰다. 비특이적 결합을 최소화하기 위해, 세포를 실온에서 30분 동안 0.1% Triton X-100을 함유한 10% 염소 혈청 중에서 차단시켰다. DPBS 중 10% 염소 혈청(Gibco)에 희석된 일차 항체를 4° C에서 밤새 처리하고 배양하였다. BBB 칩 모델의 경우, 건조를 방지하기 위해 피펫 팁을 사용하여 유입구와 유출구를 차단하였다. 3회 세척 후, 세포를 실온에서 1시간 동안 암실에서 이차 항체와 함께 배양하였다. 장착 매체(Leica)를 사용하여 샘플을 장착하고, LSM980 공초점 현미경(Zeiss)을 사용하여 시각화하고 분석하였다. 사용된 항체는 표 2에 기재되어 있다.

표 2

[0080]

Primary and secondary antibodies used for immunostaining			
Targeted antigen	Antibody description	vendor	dilution
ZO-1	mouse monoclonal	Invitrogen	1:200
Claudin-5	mouse monoclonal	Invitrogen	1:200
Heparan Sulfate Proteoglycan 2	Rabbit polyclonal	Bioss	1:50
Goat anti-rabbit Alexa Fluor™ 488	Goat polyclonal	Invitrogen	1:500

[0081] 세포 표면 당질(당질)의 염색을 위해, 고정 단계 후 5 μg mL^{-1}의 Alexa Fluor 488 접합 WGA-렉틴(Invitrogen)으로 10분 동안 처리하였다. ZEN 소프트웨어(Zeiss) 및 ImageJ를 사용하여 이미지를 분석하였다.

[0082] **생체 내 및 생체 외 이미징에서의 펩티드의 생체 분포**

[0083] 생후 6 내지 8주령의 암컷 BALB/c 누드 마우스(Orient Bio) 및 BALB/c 마우스(Orient Bio)를 생체 내 및 생체 외 이미징에 각각 사용하였다. DMEM 중 총 5 nmol의 TAMRA 접합 펩티드를 꼬리 정맥을 통해 정맥 주사하고, 마우스를 1시간 시점에서 희생시켰다. 혈액 내 잔류 펩티드는 생체 내 파지 디스플레이와 동일한 방법을 사용하여 심장 관류를 통해 제거되었다. 뇌, 간, 신장, 비장, 심장, 및 폐와 같은 주요 장기를 In-Vivo Xtreme II™ (Bruker)를 사용하여 수집하고 이미징하였다. 장기의 형광 강도는 In-Vivo Xtreme II 이미징 소프트웨어를 사용하여 정량화되었으며, 뇌 형광 강도의 비율은 모든 장기로부터의 총 형광 강도를 나눔으로써 산출되었다. 생체 내 라이브 이미징을 위해, 주사 후 30분, 1 또는 2시간 후에 생체 내 Optical Imaging Chamber(Spectral

Instruments Imaging)를 사용하여 이미지를 촬영하였다. 뇌 관심 영역(ROI)은 명시야 모드에서 촬영한 머리 이미지를 기반으로 산출되었다.

[0084] **mBEC의 제타 전위 평가**

[0085] 정적 및 유체 조건 둘 모두에서의 마이크로유체 칩으로부터의 mBEC를 트립신-EDTA를 사용하여 수확하였다. 세포는 제타 전위 측정에 사용된 최소 2 × 10^5개의 세포와 함께 여러 마이크로유체 칩으로부터 풀링되었다. 수확된 세포를 측정 전 차가운 PBS에 보관하였다. 해당 절차는 금-도금 베릴륨/구리 전극(DTS1070)이 장착된 일회용 제타 전위 큐벳을 사용하여 수행되었다. 전극을 물 및 PBS로 헹구고, 25° C에서 20 V의 전압을 인가하여, 10회 반복 측정을 통해 제타 전위를 측정하였다.

[0086] **qRT-PCR**

[0087] BBB 칩에서 배양된 뇌 내피 세포의 총 RNA를 AccuPrep® Universal RNA Extraction Kit(Bioneer)를 사용하여 추출하고, 열 순환기(T100 Thermal Cycler; Bio-Rad)를 사용하는 AccuPower® RT PreMix & Master Mix(Bioneer)를 사용하여 cDNA를 제조하였다. CFX Connect Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad) 상에서 SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix(TOYOBO)를 사용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 사용된 프라이머는 표 3에 기재되어 있다.

표 3

[0088]

Primers used for real-time PCR screened peptides (5' → 3')		
Gene	Forward	Reverse
Cldn5	TGACTGCCTTCCTGGACCACAA (SEQ ID NO. 7)	CATACACCTTGCACTGCATGTGC (SEQ ID NO. 8)
Cdh5	GAACGAGGACAGCAACTTCACC(SEQ ID NO. 9	GTTAGCGTGCTGGTTCCAGTCA (SEQ ID NO. 10)
Tjp1	GTTGGTACGGTGCCCTGAAAGA(SEQ ID NO. 11)	GCTGACAGGTAGGACAGACGAT (SEQ ID NO. 12)
Ocln	TGGCAAGCGATCATACCCAGAG(SEQ ID NO. 13)	CTGCCTGAAGTCATCCACACTC (SEQ ID NO. 14)
Abcb1a	TCCTCACCAAGCGACTCCGATA(SEQ ID NO. 15)	ACTTGAGCAGCATCGTTGGCGA (SEQ ID NO. 16)
Slc2a1	GCTTCTCCAACTGGACCTCAAAC(SEQ ID NO. 17)	ACGAGGAGCACCGTGAAGATGA (SEQ ID NO. 18)
Has2	GAATTACCCAGTCCTGGCTT(SEQ ID NO. 19)	GGATAAACTGGTAGCCAACA (SEQ ID NO. 20)
Hmmr	GCAAAGCCAGTCACTTCTGCAG(SEQ ID NO. 21)	AACTCAGCCAGGGCGAGCTTTA (SEQ ID NO. 22)
Dcn	ACTCTCCAGGAACTTCGTGTCC(SEQ ID NO. 23)	AGTCCCTGGAAGGCTCCGTTTT (SEQ ID NO. 24)
Gpc4	GAGGATGACTGCTGGAATGGCA(SEQ ID NO. 25)	GACGAAGGATCAGTATGTCTGGC (SEQ ID NO. 26)

[0089] **RNA 시퀀싱**

[0090] RNA 시퀀싱을 위해, 각 조건에 대한 뇌 내피 세포의 총 RNA 1 μg을 MGIEasy RNA Directional Library Prep Set를 갖는 라이브러리 구축을 위해 준비하고, MGI-T7 플랫폼(Clinomics Inc. 대한민국)을 이용하여 시퀀싱하였다. 원시 FASTQ 파일을 트림모매틱(버전 0.39)으로 전처리하고, STAR(버전 2.7.10a)를 사용하여 GRCm39 마우스 게놈 및 EnsEMBL 주석(버전 105)에 이를 맵핑하였다. 유전자 수준에서 백만당 카운트(CPM)로 풍부한 전사체를 정량화하였으며, 각 샘플의 절반 이상에 대해 CPM 값이 0인 유전자를 저발현 유전자로 필터링하였다.

[0091] DESeq2(버전 1.28.1)를 사용하여, Benjamini-Hochberg 방법으로 0.001 미만이고 배수 변화가 2배를 초과하는 조정된 p-값으로 DEG를 식별하였다. DEG의 각 그룹에 대해, PANTHER(버전 17.0)를 사용하여 GO 용어 농축 분석을 수행하였다. 거짓 발견률(false discovery rate, FDR)을 제어하기 위해, Benjamini-Hochberg 조정으로 2-단계 FDR 보정을 사용하였고, 조정된 p-값이 0.05 미만이고 배수 농축이 1을 초과하는 각각의 DEG 그룹에서 유의

미하게 농축된 GO 용어를 선택하였다.

[0092] **통계 분석**

[0093] 모든 데이터는 평균(± S.E.M)으로 표시된다. 통계 분석은 Prism(GraphPad)에서 비쌍 t-테스트를 사용하여 수행되었다. 0.05 < p-값은 유의한 것으로 간주되었다(*P <0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, 및 ****P < 0.0001).

[0095] **실험예**

[0096] **마우스 BBB 트랜스웰 및 마이크로유체 BBB 칩 개발**

[0097] 기능성 셔틀 리간드를 스크리닝하기 위한 기존의 트랜스웰-기반 접근법 및 마이크로유체 OoC(Organ-on-a-chip)-기반 접근법의 효능을 비교하기 위해, BBB 트랜스웰 및 BBB 칩 시스템을 개발하였다(도 1a). BBB의 종 변이를 고려하여, BALB/C 마우스의 일차 BBB 세포를 사용하여 BBB 셔틀 스크리닝 및 성능 측정 둘 모두를 위한 시험관 내 플랫폼을 구축하였다. 일차 mBEC는 트랜스웰 삽입물의 다공성 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 막 또는 OoC 장치의 하부 혈관 채널에서 배양되었다. BBB의 배리어 기능을 모방하기 위해, 일차 마우스 성상교세포와 혈관주변세포의 혼합물을 트랜스웰 시스템과 마이크로유체 칩 둘 모두에서 mBEC 단층과 인터페이싱하도록 공동 배양하였다.

[0098] 두 BBB 모델 모두를 내피 단층이 형성될 때까지 3일 동안 성장 배지에서 배양하였다. 이에 후속하여, BBB 속성을 향상시키기 위해 하이드로코르티손, cAMP 및 RO20-1724를 포함하는 숙성 배지에 이들을 노출시켰다. EVOM2(World Precision Instrument, USA)를 이용하여 경혈관 내피 전기 저항(TEER) 값을 매일 측정하였고, TEER 값은 숙성 배지의 도입 후 유의미하게 증가했으며, 가장 높은 경혈관 내피 전기 저항(TEER) 값은 숙성 배지에 대한 노출 후 1일차에 관찰되었으며(도 7), 해당 값은 추가 4일 동안 안정적으로 유지되었다. 숙성 배지에 대한 노출 후 1일차에, BBB 칩을 검정 전 24시간 동안 100 μL/시간으로 유동시켰다. 3일차와 5일차에 ZO-1 및 F-액틴의 면역형광 염색에 의해 나타난 바와 같은, mBEC에서의 세포 형태의 변화 및 마이크로필라멘트의 정렬을 관찰하였다. 이러한 결과는 BBB 모델의 배리어 무결성 향상에 있어서의 숙성 배지 및 유체 유동에 의해 유도된 전단 스트레스가 미치는 영향을 나타낸다(도 8a). mBEC 단층은 확장된 형태를 나타냈으며, 액틴 섬유는 유동 방향으로 정렬되었다. 또한, BBB 배양물의 숙성도를 나타내는 BBB 마커 유전자, 예컨대 *CLDN5*, *CDH5*, *TJP1*, *OCLN*, *ABCB1*, 및 *SLC2A1*의 발현이 현저히 증가하였다(도 8b). 공초점 면역형광 현미경 분석을 통해 ZO-1 및 Claudin-5와 같은 BBB 접합 단백질의 발현을 확인하였다(도 1b). BBB 모델의 배리어 무결성을 검증하기 위해, 10 kDa 덱스트란을 사용하여 세포주변 투과도를 측정하였다(도 1c). 두 BBB 모델 모두 비어있는 트랜스웰 삽입물 또는 BBB 칩 장치에 비해 현저히 낮은 덱스트란 투과성을 입증하였다.

[0099] **마우스 BBB 트랜스웰 및 BBB 칩 모델에 대한 시험관 내 바이오패닝**

[0100] 마우스 BBB 시스템을 사용하여 각 모델에서 3라운드의 시험관 내 바이오패닝을 수행하였다(도 1d). 트랜스웰 삽입물에서 성상교세포 및 혈관 주변세포와 접촉하는 mBEC 단층에 10^{11}의 다양성을 갖는 펩티드-디스플레이 파지 라이브러리를 적용하고, 정적 조건 하에서 1시간 배양 후 mBEC를 침투한 파지 풀을 기저 챔버로부터 수집하였다. 수확된 파지 라이브러리를 트랜스웰에 다시 적용하고, 이 단계를 3회 반복하였다. BBB 칩에 대한 바이오패닝을 위해, 동일한 농도의 파지 라이브러리를 혈관 채널(마이크로채널)에 300 μL/시간으로 순환시키고, 뇌 채널로부터 유출물을 수집하였다. 바이오패닝의 각 라운드에 대해, 플라크 검정을 사용하여 BBB 침투 파지의 비율을 평가하고, 트레이서로서 10 kDa 덱스트란의 투과성을 분석하여 각 BBB 설정에서의 배리어 무결성의 유지도를 평가하였다. 각 라운드에서 회수된 파지의 플라크 분석은 증가된 BBB 침투를 입증하였으며, 여기에서 트랜스웰의 기저 챔버 또는 마이크로유체 칩의 뇌 채널로부터 각각 16.8배 및 2.6배 더 높은 파지 회수율을 보였으며, 이는 바이오패닝 프로세스 동안 BBB 침투 파지의 성공적인 농축을 나타낸다(도 1e). 두 BBB 시스템에서 수행된 3라운드의 바이오패닝에 걸쳐, 패닝 프로세스 후 형광 표지된 10 kDa 덱스트란을 사용하여 배리어 무결성을 평가한 결과, 10 kDa 덱스트란의 세포주변 수송은 일정한 수준으로 유지되어 온전한 BBB의 투과성 범위 내에 있었으며(청색 섹션으로 강조 표시됨), 마우스 BBB 트랜스웰 및 BBB 칩 모델의 배리어 기능이 3회 라운드의 바이오패닝 전체에 걸쳐 유지되었다(도 9). 이는 배리어 무결성이 BBB-침투 능력에 의한 파지 농축에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

[0101] 트랜스웰 시스템의 기저 챔버 또는 BBB 칩의 뇌 채널에서 수확한 파지의 가변 영역을, 높은 BBB 침투 능력을 갖는 펩티드 서열을 식별하기 위해 각 바이오패닝 사이클 동안 고처리량 시퀀싱(high-throughput sequencing,

HTS)으로 분석하였다(도 1f). 우선적으로 펩티드 집단이 반복적인 바이오패닝 절차 간에 높은 상관관계가 있음을 확인하였으며(도 10a), 이를 통해 BBB 셔틀링에 대한 높은 능력을 가진 펩티드가 본 스크리닝에서 농축될 것으로 예상하였다. 신뢰성있게 확인된(2회 이상 관찰됨) 37,824 개의 펩티드 서열을 추가로 분석하였다. 각 샘플에서의 3회 라운드의 바이오패닝을 통해 다수의 고농축 펩티드를 여러 번 관찰했기 때문에, 관찰된 서열을 1회만 필터링하였다. 입력 라이브러리와 비교하여, 회귀 라인을 시프팅시키고 필터링된 판독의 백만 개당 정규화된 펩티드 수의 계수(CPM)로 입증된 바와 같이, BBB 트랜스웰 및 BBB 칩 기반 바이오패닝 후의 파지 풀 둘 모두가 특정 펩티드의 농축을 나타냈음을 발견하였다(도 1f). 초기 및 제3 바이오패닝 라운드 사이의 CPM 배수 변화를 평가함으로써, 각 BBB 모델에서, 효과적인 BBB 셔틀링에 대한 가능성을 나타내는 상위 2개의 후보 펩티드를 선택하였다(트랜스웰-기반 바이오패닝으로부터의 Tw1 및 Tw2; 마이크로유체 칩-기반 바이오패닝으로부터의 C1 및 C2)(도 1g 및 표 4).

표 4

[0102]

Name	Sequence (5' → 3')	SEQ ID NO.
마이크로유체 칩-기반 바이오패닝으로부터의 펩티드 1(C1)	QMGFMTSPKHSV	1
마이크로유체 칩-기반 바이오패닝으로부터의 펩티드 2(C2)	DHAQRYGAGHSG	2
트랜스웰-기반 바이오패닝으로부터의 펩티드 1(Tw1)	YPAAYHTLTREP	3
트랜스웰-기반 바이오패닝으로부터의 펩티드 2(Tw2)	ASLPKSDLGGNS	4

[0103] 원래의 입력 라이브러리와 비교하여, 관찰된 펩티드의 수가 2배를 초과하여 농축되었음을 확인하였다(도 10b).

[0104] 각 시험관 내 모델에서 이러한 최고 순위의 펩티드 서열의 BBB에 침투하는 능력을 실험적으로 검증하였다. BBB 트랜스웰 시스템을 사용하여, TAMRA-표지된 Tw1 및 Tw2의 BBB 투과성을 평가하였다. 이에 병행하여, BBB 칩을 사용하여 TAMRA-표지된 C1 및 C2를 혈관 채널에 도입하여 BBB 투과성을 테스트하였다. 스크램블된 펩티드(Sc; RDVYLTNDVYSH)와 비교 시, Tw1 및 Tw2는 BBB 트랜스웰 시스템에서 2배 및 2.5배 더 높은 BBB 침투 능력을 나타냈다(도 1h). 이와 유사하게, C1 및 C2는 BBB 칩에서 약 2배 더 높은 BBB 투과를 입증하였다. 이러한 결과를 추가로 검증하기 위해, 유세포 분석을 사용하여 펩티드의 세포 흡수를 분석하였다(도 1i). 유세포 분석 결과는 선택된 펩티드의 향상된 세포 흡수를 입증하였으며, 이는 선택된 펩티드의 BBB 침투 능력이 보다 높은 세포 흡수 효율과 연관된다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 BBB 트랜스웰 및 칩 모델 둘 모두에서의 바이오패닝을 통해 식별된 BBB 투과성 펩티드가 각각의 시험관 내 설정에서 BBB에 침투할 수 있는 능력을 갖고 있다는 것을 나타낸다.

[0105] **선택된 BBB 셔틀 후보의 BBB 침투에 대한 생체 내 검증**

[0106] 이에 후속하여, 각 모델에서 선택된 펩티드가 생체 내에서 BBB를 통과하여 뇌에 축적될 수 있는지의 여부를 조사하였다. 우선적으로, 본 발명의 시험관 내 스크리닝과 유사하게 생체 내 파지 디스플레이 스크리닝을 수행하여, 상위 2개의 펩티드(M1 및 M2)를 양성 대조군으로서 식별하였다(도 11). 양성 대조군 펩티드 (M1, M2) 및 시험관 내 스크리닝으로부터의 펩티드(트랜스웰로부터의 Tw1 및 Tw2; BBB 칩으로부터의 C1 및 C2) 둘 모두의 생체 내 BBB 셔틀링 효능을 시험하기 위해, 이들 펩티드에 TAMRA-라벨링을 BALB/C 마우스에 정맥 주사하고, 1시간 후 복수의 조직에 걸쳐 형광 신호 강도를 측정하였다. 이에 후속하여, 펩티드의 생체분포를 조사하기 위해, 뇌 신호를 모든 장기로부터의 전체 신호로 나눔으로써 뇌 신호 비율을 계산하였다(도 2a).

[0107] 시험관 내 BBB 침투 효율의 결과(도 1h 및 도 1i)와는 대조적으로, 종래의 BBB 트랜스웰로부터의 Tw1 및 Tw2 펩티드는 스크램블된 펩티드(Sc)에 비해 1시간차에서의 생체 내 뇌 축적 효능의 유의미한 향상을 나타내지 않았다(도 2a). 그러나 BBB 칩으로부터의 C1 및 C2 펩티드는 유의미하게 더 높은 뇌 축적을 나타냈다(p-값 < 각각 0.01 및 0.0001, 스튜던트(Student) 이원 t-테스트). 특히, C2는 M1 또는 M2와 유사한 생체 내 뇌 침투 능력을 나타냈으며, 이는 생체 내 성능의 맥락에서 마이크로유체 칩-기반 바이오패닝 접근법의 견고성을 강조한다(도 2a).

[0108] 또한 생체 내에서 BBB에 걸쳐 Cy5.5(SA-Cy5.5)로 표지된 60 kDa 스트렙타비딘(SA)을 수송하는 BBB 셔틀 후보의 능력을 평가하였다. SA를 표적 약물 전달 응용 분야를 위한 단백질 약물 화물의 모델로서 가정하고, 스크린으로부터 식별한 비오티닐화 펩티드(TW1, C2 및 M1)가 이들을 뇌에 효율적으로 전달할 수 있는지의 여부를 시험하였

다. 우선적으로 시험관 내 스크리닝 시스템을 사용하여 해당 개념을 검증하고(도 12), 이어서 마우스에 대한 꼬리 정맥 주사로 이를 적용하였다. 주사 후 1시간차에서의 전신 생체 내 이미징 시스템(IVIS) 이미지는 C2-SA-Cy5.5가 투여된 마우스가 Sc-SA-Cy5.5 또는 T1-SA-Cy5.5가 투여된 마우스에 비해 뇌에서 약 2배의 형광 강도를 나타낸다는 것을 확인하였다(도 2b 및 도 2c). C2는 M1에 비해 단백질 화물의 뇌 흡수를 촉진하는 유사한 능력을 나타냈다. 시험된 모든 제형이 간 및 신장에서 눈에 띄게 축적되었다. 기존의 트랜스웰 시스템과는 달리, 이러한 결과는 BBB 칩-기반 바이오패닝이, 생체 내 바이오패닝과 동등하게, CNS에 도달하도록 큰 분자를 운반할 수 있는 혈관 셔틀링 모이어티를 식별할 수 있다는 것을 의미한다.

[0109] **BBB 칩에서의 당질 관련 유전자의 차등 발현**

[0110] 상이한 배양 플랫폼이 mBEC의 특징에 미치는 영향을 평가하기 위해, BBB 트랜스웰 및 BBB 칩 둘 모두로부터의 mBEC의 전사체를 분석하고, BBB 칩에서 695개, 그리고 BBB 트랜스웰에서 599개의 상향조절된 유전자(DEG)를 식별하였다(도 3a 및 도 3b). 이러한 DEG에 대한 생물학적 프로세스에 대한 유전자 온톨로지(GO) 농축 분석은 세포 사이클 및 증식 관련 유전자 세트가 BBB 칩에서 상향 조절된 유전자에서 고도로 농축된다는 것을 나타냈으며(도 13), 이는 BBB 칩에서 mBEC가 추가로 증식할 수 있다는 것을 예측할 수 있다. 대조적으로, BBB 트랜스웰로부터의 세포는 혈관 발달의 음성 조절자의 상향 조절을 나타냈으며, 이에 따라 혈관 내피 세포가 트랜스웰에서 완전히 발달하지 않았음을 예측할 수 있다.

[0111] BBB 형성 및 수송과 관련된 초점은 세포 접합 단백질, 세포막 유출 펌프 및 세포 표면 수용체와 연결된 유전자 발현을 검사하는 데 중점을 둔다. BBB 트랜스웰과 BBB 칩 사이의 이러한 유전자 발현의 차이를 검증하였다. 특히, 유출 펌프 및 세포 표면 수용체와 관련된 유전자의 경우, BBB 트랜스웰의 평균 발현 수준에 비해 BBB 칩에서 보다 많은 유전자가 상향 조절되었다(도 14). 이러한 관찰은 BBB 칩이 BBB 트랜스웰과 비교했을 경우, BBB 유지 및 수송과 연관된 기능을 보다 충실하게 재현한다는 것을 시사한다.

[0112] BBB 칩과 트랜스웰 모델 사이의 당질-관련 유전자의 차이를 조사한 결과, 당질과 관련된 주요 유전자는 BBB에서 발현이 상향 조절된다(도 3c). 이는 두 가지 시험관 내 플랫폼이 당질 불균형으로 인해 BBB 셔틀 스크린에서 상이한 성능을 나타냄을 의미한다.

[0113] 두 조건 모두에서 배양된 mBEC 단층의 표면 상에서의 당질의 양을 시험하였다. 내피 당질을 모니터링하기 위해, N-아세틸화 글루코사민 잔기 및 내피 당질의 시알산에 결합하는 Alexa Fluor 488 접합 WGA-렉틴을 사용하였다. BBB 칩에서의 mBEC의 정점 측면에서, 트랜스웰 시스템과 구분되는, 생체 내 내피 당질과 유사한, 보다 조밀하게 팩킹되고 뚜렷하게 층상화된 당질을 관찰하였다(도 3d). 이러한 구분은 잠재적으로 바이오패닝 프로세스에 영향을 미칠 수 있으며, 스크리닝된 BBB 셔틀에 대한 다른 메커니즘으로 이어질 수 있다.

[0114] **유동 조건 하에서의 마이크로유체 칩의 BEC의 생체 내-유사 내피 당질**

[0115] 주로 프로테오글리칸 및 당단백질로 구성된 음전하를 띤 구조인 내피 당질은 혈관 내피 세포의 표면을 덮고 있다. 이러한 성분은 헤파란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트와 같은 글리코사미노글리칸 및 단당류 시알산에 의해 공유 결합된, 막횡단 신데칸 및 글리피칸을 포함하는 코어 단백질 골격을 포함한다. 이러한 당질은 정점 막에 조밀한 브러시 모양의 층을 형성함으로써 기계적 배리어로서, 그리고 세포 신호 전달 경로로의 유체 전단 스트레스의 기계적 감지를 위한 중간체로서 중요한 역할을 한다. 특히, 내피 세포에서 분자 수송 조절자로서 중요한 역할을 한다.

[0116] BBB 트랜스웰과 BBB 칩의 결정적인 차이점은 생체 내 혈액 순환을 모방하는 유체 유동에 있으며, 부피 대 면적 비율, 산소, 및 영양소 수송과 같은 다른 인자도 고려된다. 유체 유동이 mBEC에서 내피 당질을 복제하는 주요 인자인지의 여부를 조사하기 위해, 유동 및 정적 조건 둘 모두에서 BBB 칩의 내피 당질의 변화를 조사하였다(도 4a). 놀랍게도, 마이크로유체 장치에서 배양되고 24시간 동안 100 μL/시간의 속도의 유체 유동에 노출된 mBEC는 정적 조건에서 유지된 mBEC에 비해 유의미하게 더 높은 당질 강도를 나타냈다(도 4a 및 도 4b). 또한, 유동 조건 하에서의 mBEC의 낮은 제타 전위는 당질의 고유 특성과 유사하게, 세포막에서 당질의 보다 높은 발현을 나타낸다(도 4c).

[0117] 직교 시각에서, 또한, 생체 내 BBB를 모방하여, 당질이 정점 표면을 따라 조밀하게 국소화되어 있음을 관찰한 반면, 유체 유동이 없는 경우에서는 뚜렷한 당질 층이 검출되지 않았다. 단일 z-축을 따라 당질을 관찰할 경우, 유체 유동 하에서의 BBB 칩은 세포막 상에 위치한 당질을 나타내는 반면, 정적 조건에서의 BBB 칩은 세포질 전체에 걸쳐 비특이적 신호를 나타냈다(도 4d). 세포를 가로질러 그려진 선을 따르는 형광 강도 피크는 또한 당질 국소화의 명백한 증거를 제공하였다(도 4e). 이는 전단 스트레스가 보다 두꺼운 당질 층을 유도한다는 것을 나

타낸다. 또한 RNA-서열 분석에서 발견된 여러 당질 연관 유전자(Has2, Hmmr, Dcn 및 Gpc4) 또한 유동 조건 하에서 유의미하게 상향 조절된다는 것을 확인하였다(도 4f). 이는 층상 유동이 정점 막 상에서의 당질의 생성 및 전위를 향상시킴으로써 뇌의 생체 내 내피 당질의 복제에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

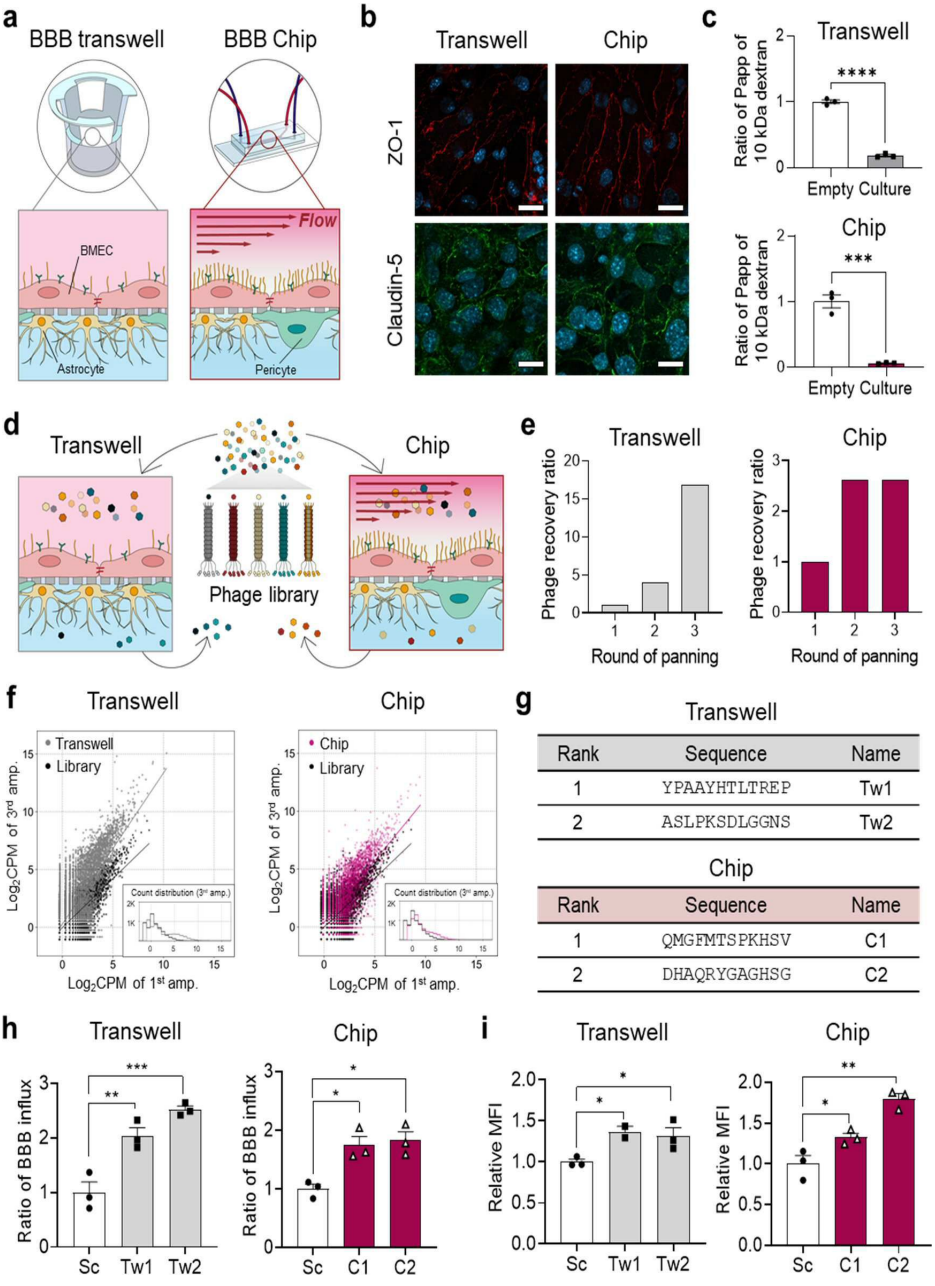
[0118] **BBB 셔틀 펩티드의 통과세포외 배출에서의 내피 당질의 관여**

[0119] 후속 조사에서, BBB 셔틀링 메커니즘에서의 내피 당질의 역할을 이해하는 데 중점을 두었다. 유체 유동의 존재에 따라 상이한 당질 전위를 관찰한 후, 우선적으로 유체 유동의 존재 또는 부재 하에 배양된 mBEC에 걸쳐 선택된 펩티드(Tw 및 C)의 투과성을 비교하였다. TAMRA 표지 펩티드를 하룻밤 또는 정적 조건에서 100 μL/시간의 유체 유동 속도에 적응된 BBB 칩의 혈액 채널에 도입하였다. 유체 및 정적 조건 하에서 배리어의 무결성을 평가하기 위해, 10 kDa 덱스트란을 사용하였으며, 유체 조건이 BBB 무결성을 손상시키지 않는다는 것을 발견하였다(도 15). 흥미롭게도, C1 및 C2 펩티드는 정적 조건에 비해 유체 유동에 적응된 mBEC에서 BBB 투과성을 증가시켰다(도 4g). 그러나, 정적 조건에서, C1 및 C2의 투과성은 T 펩티드의 낮은 비율과 일치하였다. 반면, Tw1 및 Tw2 펩티드는 유체 조건에 관계없이 투과성 차이를 나타내지 않았다. 이는 C1 및 C2가 생체 내 조건과 유사한 층상 유동 전단 스트레스에 적응된 mBEC에서 보다 양호한 기능을 갖는다는 것을 의미한다.

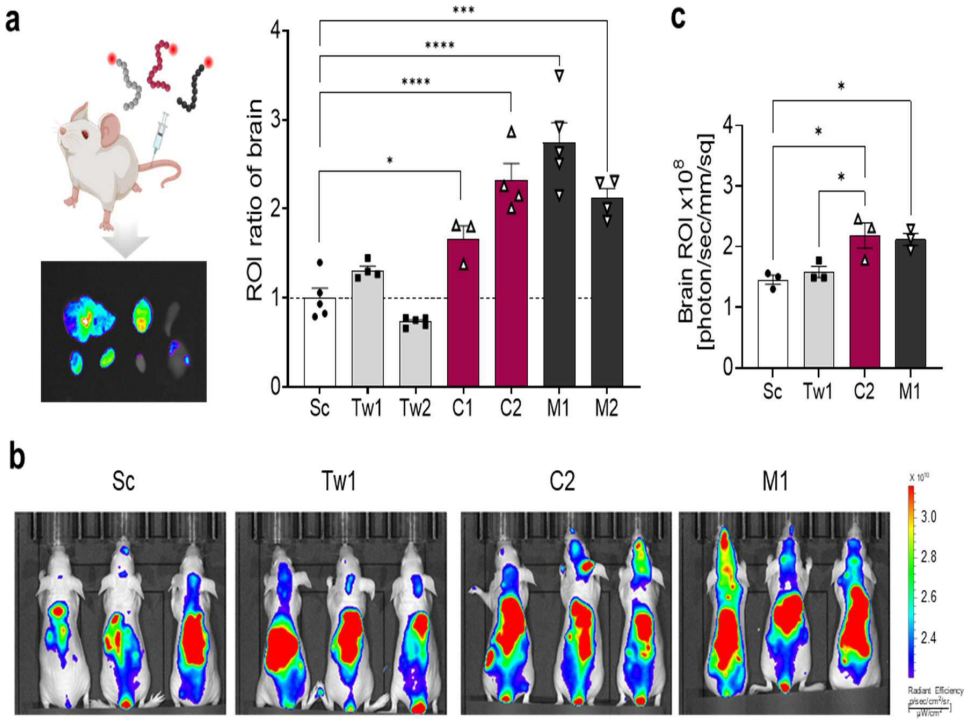
[0120] 다음으로, 펩티드 투과성에 대한 당질의 효과를 평가하기 위해, 뉴라미니다아제(NA) 또는 헤파리나제 III(HepIII)를 사용하여 마이크로유체 칩의 유동 조건에서 배양된 mBEC로부터 당질을 선택적으로 제거하였다. NA는 글리칸으로부터 시알산을 절단하는 한편, HepIII은 특히 헤파란 설페이트를 절단한다. 이러한 효소의 처리가 mBEC에서 독성의 형태학적 징후를 야기하지 않았지만, 시알산 및 헤파란 설페이트 발현의 현저한 감소를 가져왔다는 것을 확인하였다(도 5a 및 도 5b, 도 16). BBB 칩에 대한 NA-후 처리는 C2-SA-Cy5.5의 세포 흡수가 상당히 감소하였고, 이는 이의 시알산에 대한 의존성을 시사한다. 그러나, Tw1-SA-Cy5.5 흡수에는 변함이 없었다(도 5b 및 도 5c). 이어서 이전 효소 처리 유무에 관계없이 BBB 칩에 대한 펩티드 투과성을 평가하였다. mBEC를 NA로 처리한 후, Tw1 투과성은 약 38% 감소했지만 Tw2는 동일하게 유지되었다. 흥미롭게도, C1 및 C2의 투과성은 NA 처리로 각각 약 60% 및 50% 감소했고, 이는 Tw 펩티드에 비해 내피 당질에서 시알산에 대한 의존성이 더 높다는 것을 의미한다(도 5c). 이는 유세포 분석 결과와 일치하며, 투과성 결정에 있어서 핵심적인 역할을 하는 당질과 펩티드의 상호작용을 강조한다(도 17). 또한, HepIII 처리는 C2 투과성에 상당한 영향을 미쳤으며, 이는 BBB를 통한 이의 수송이 헤파란 설페이트 및 시알산 둘 모두에 의존한다는 것을 의미한다.

도면

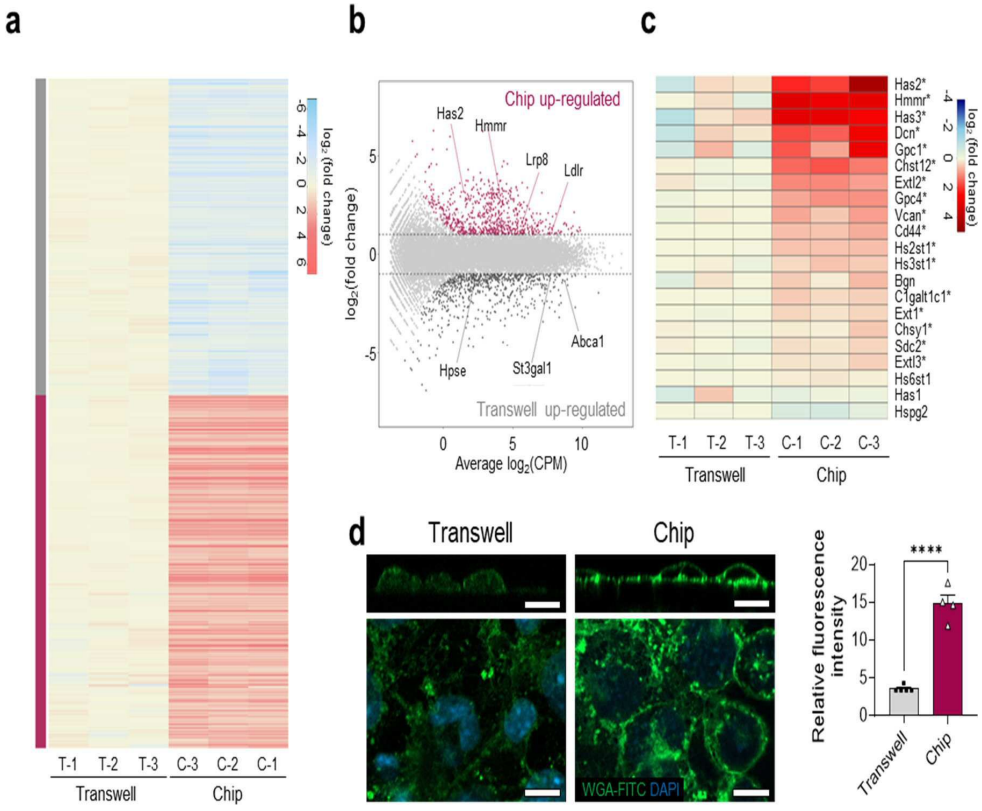
도면1


a
BBB transwell
BBB Chip
BMEC
Astrocyte
Flow
Pericyte
b
Transwell
Chip
ZO-1
Claudin-5
c
Transwell
Ratio of Papp of 10 kDa dextran
****
Empty Culture
Chip
***
Empty Culture
d
Transwell
Chip
Phage library
e
Transwell
Chip
Phage recovery ratio
Round of panning
f
Transwell
Chip
Library
Log2CPM of 3rd amp.
Log2CPM of 1st amp.
Count distribution (3rd amp.)
g
Transwell
Rank | Sequence | Name
1 | YPAAYHTLTREP | Tw1
2 | ASLPKSDLGGNS | Tw2
Chip
Rank | Sequence | Name
1 | QMGFMTSPKHSV | C1
2 | DHAQRYGAGHSG | C2
h
Transwell
Chip
Ratio of BBB influx
Sc
Tw1
Tw2
C1
C2
i
Transwell
Chip
Relative MFI
Sc
Tw1
Tw2
C1
C2

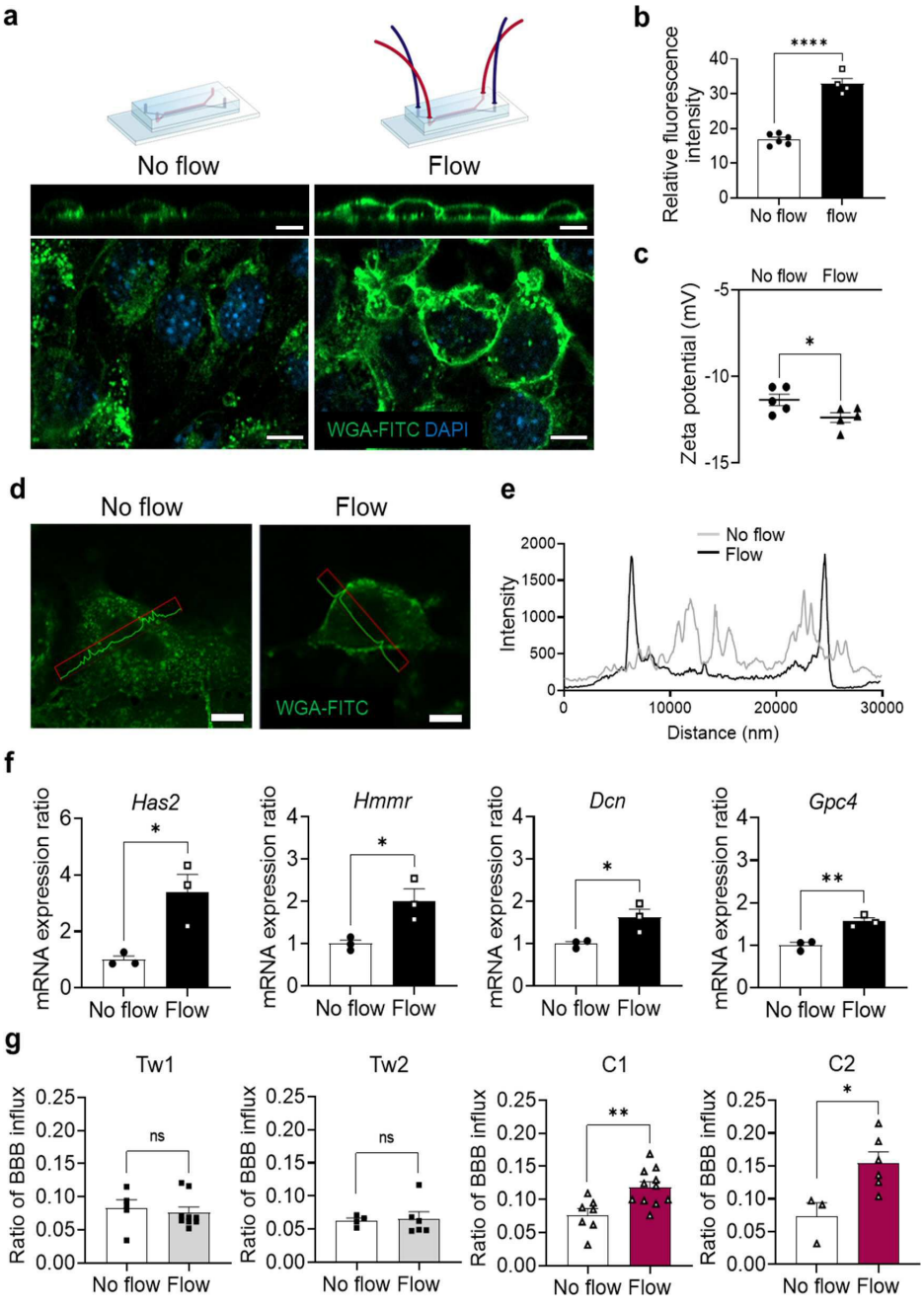
도면2


a
ROI ratio of brain
Sc
Tw1
Tw2
C1
C2
M1
M2
c
Brain ROI x10^8 [photon/sec/mm/sq]
b
Sc
Tw1
C2
M1

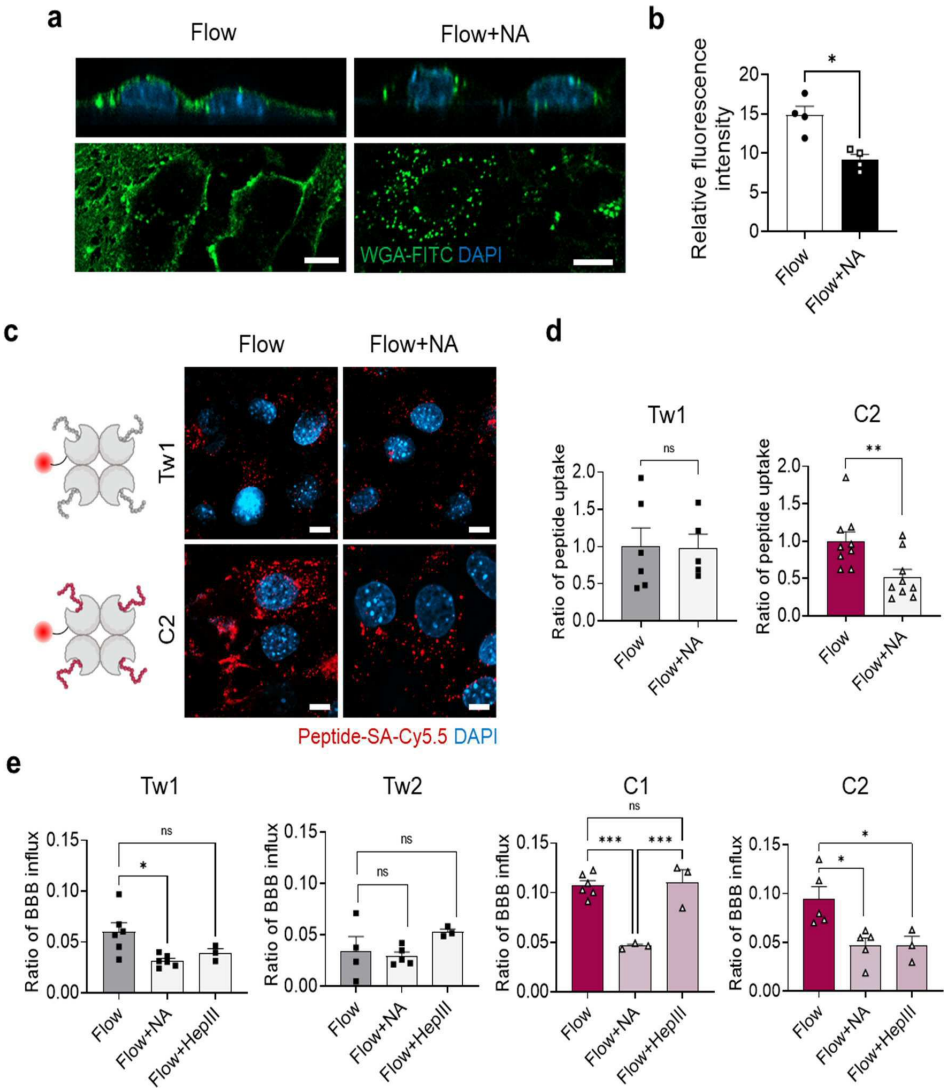
도면3


a
T-1
T-2
T-3
C-3
C-2
C-1
Transwell
Chip
b
Chip up-regulated
Transwell up-regulated
Has2
Hmmr
Lrp8
Ldlr
Hpse
St3gal1
Abca1
Average log2(CPM)
c
Has2*
Hmmr*
Has3*
Dcn*
Gpc1*
Chst12*
Extl2*
Gpc4*
Vcan*
Cd44*
Hs2st1*
Hs3st1*
Bgn
C1galt1c1*
Ext1*
Chsy1*
Sdc2*
Extl3*
Hs6st1
Has1
Hspg2
d
Transwell
Chip
WGA-FITC DAPI
Relative fluorescence intensity

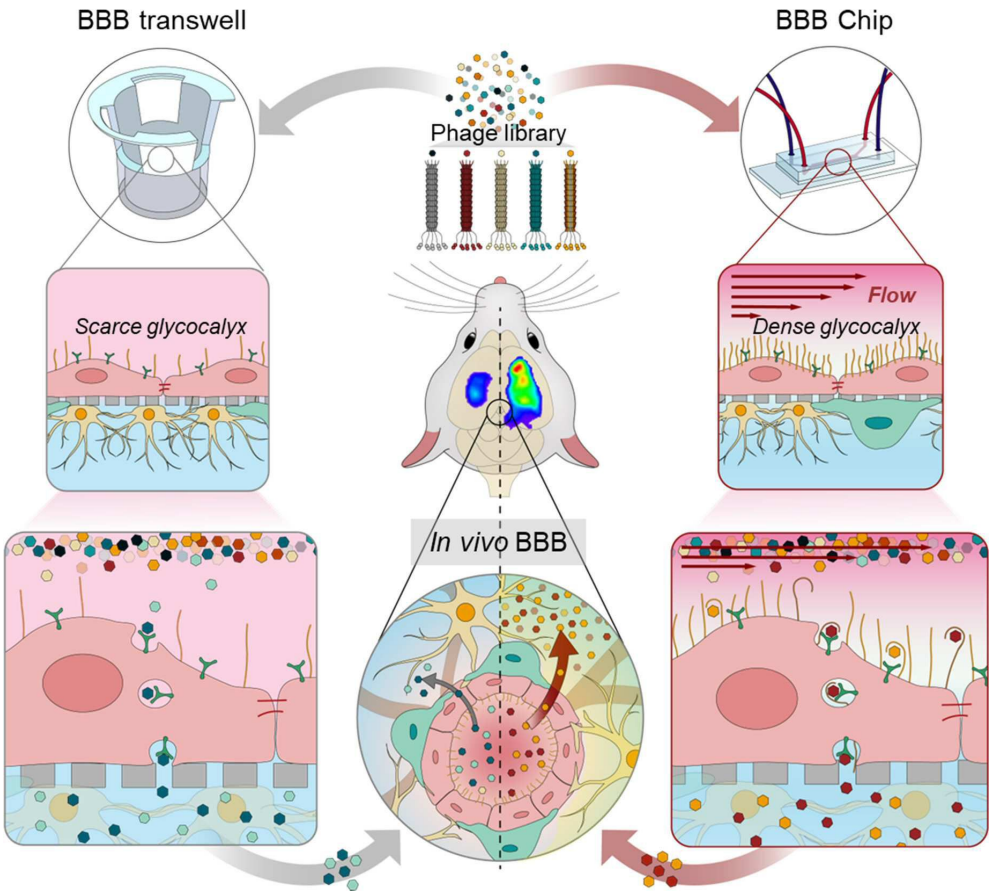
도면4


a
No flow
Flow
WGA-FITC DAPI
b
Relative fluorescence intensity
****
No flow
flow
c
No flow Flow
Zeta potential (mV)
*
d
No flow
Flow
WGA-FITC
e
No flow
Flow
Intensity
Distance (nm)
f
Has2
Hmmr
Dcn
Gpc4
mRNA expression ratio
No flow Flow
g
Tw1
Tw2
C1
C2
Ratio of BBB influx
ns
No flow Flow

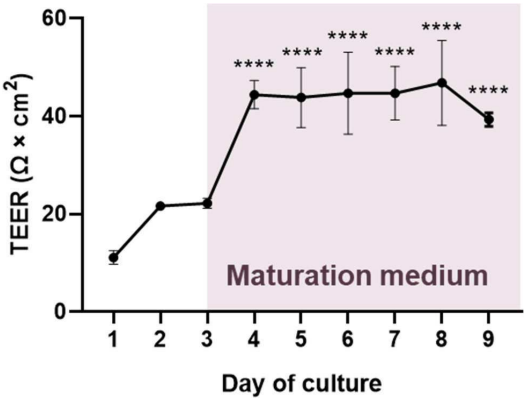
도면5


a
Flow
Flow+NA
WGA-FITC DAPI
b
Relative fluorescence intensity
Flow
Flow+NA
c
Flow
Flow+NA
Tw1
C2
Peptide-SA-Cy5.5 DAPI
d
Tw1
C2
Ratio of peptide uptake
ns
**
Flow
Flow+NA
e
Tw1
Tw2
C1
C2
Ratio of BBB influx
ns
*
***
Flow
Flow+NA
Flow+HepIII

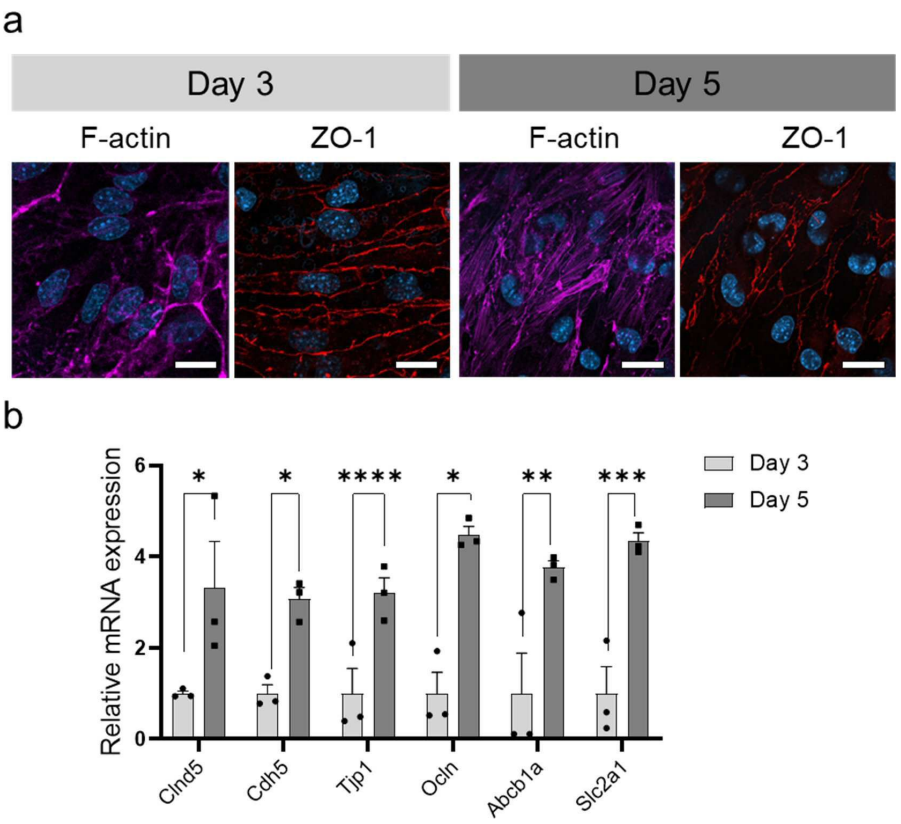
도면6


BBB transwell
BBB Chip
Phage library
Scarce glycocalyx
Flow
Dense glycocalyx
In vivo BBB

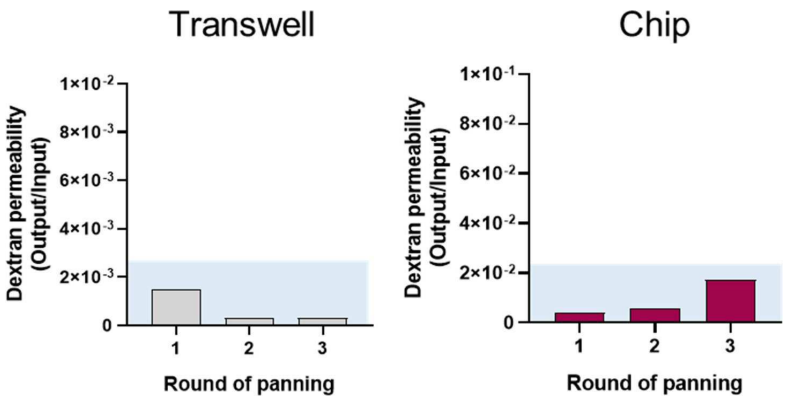
도면7


TEER (Ω × cm²)
60
40
20
0
****
****
****
****
****
****
Maturation medium
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Day of culture

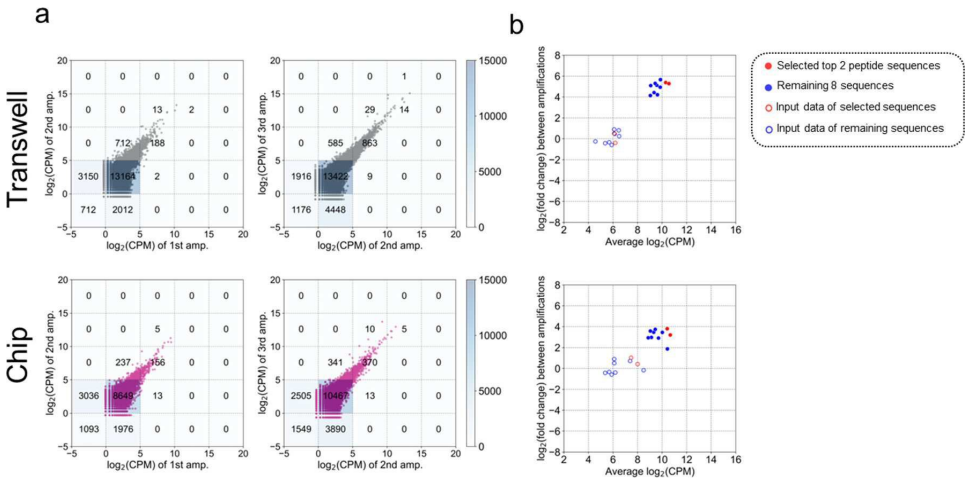
도면8


a
Day 3
Day 5
F-actin
ZO-1
F-actin
ZO-1
b
Relative mRNA expression
Day 3
Day 5
Cln5
Cdh5
Tjp1
Ocln
Abcb1a
Slc2a1

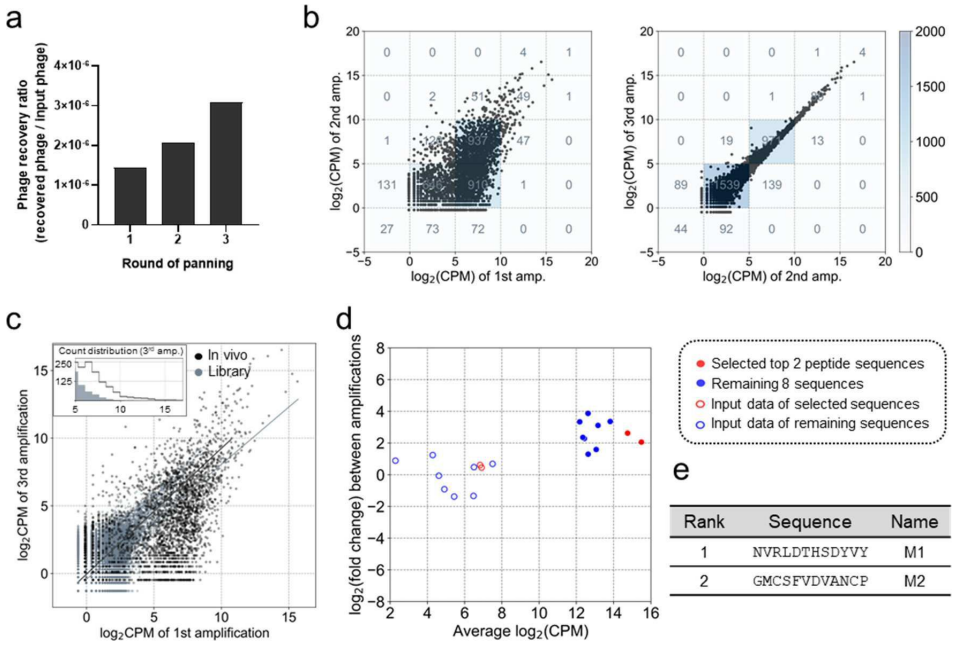
도면9


Transwell
Chip
Dextran permeability (Output/Input)
Round of panning
Dextran permeability (Output/Input)
Round of panning

도면10

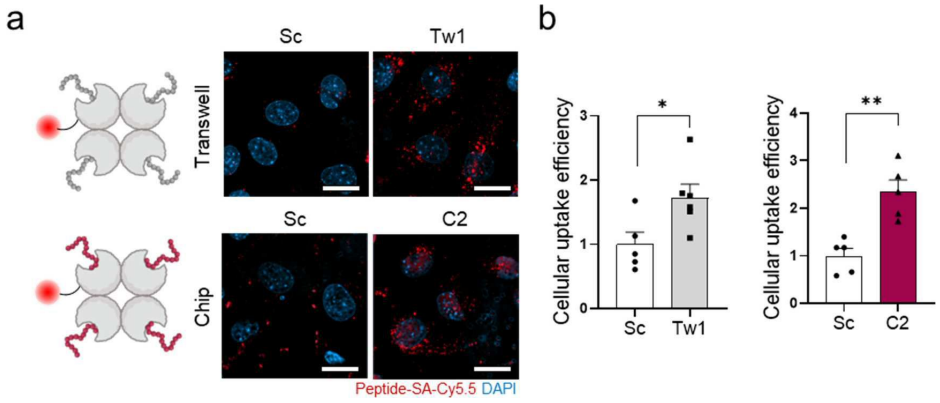


도면11

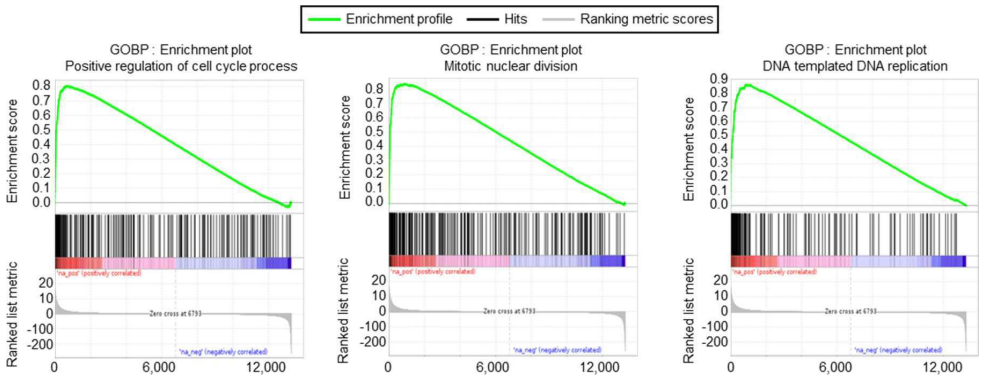


Rank	Sequence	Name
1	NVRLDTHSDYVY	M1
2	GMCSFVDVANCP	M2

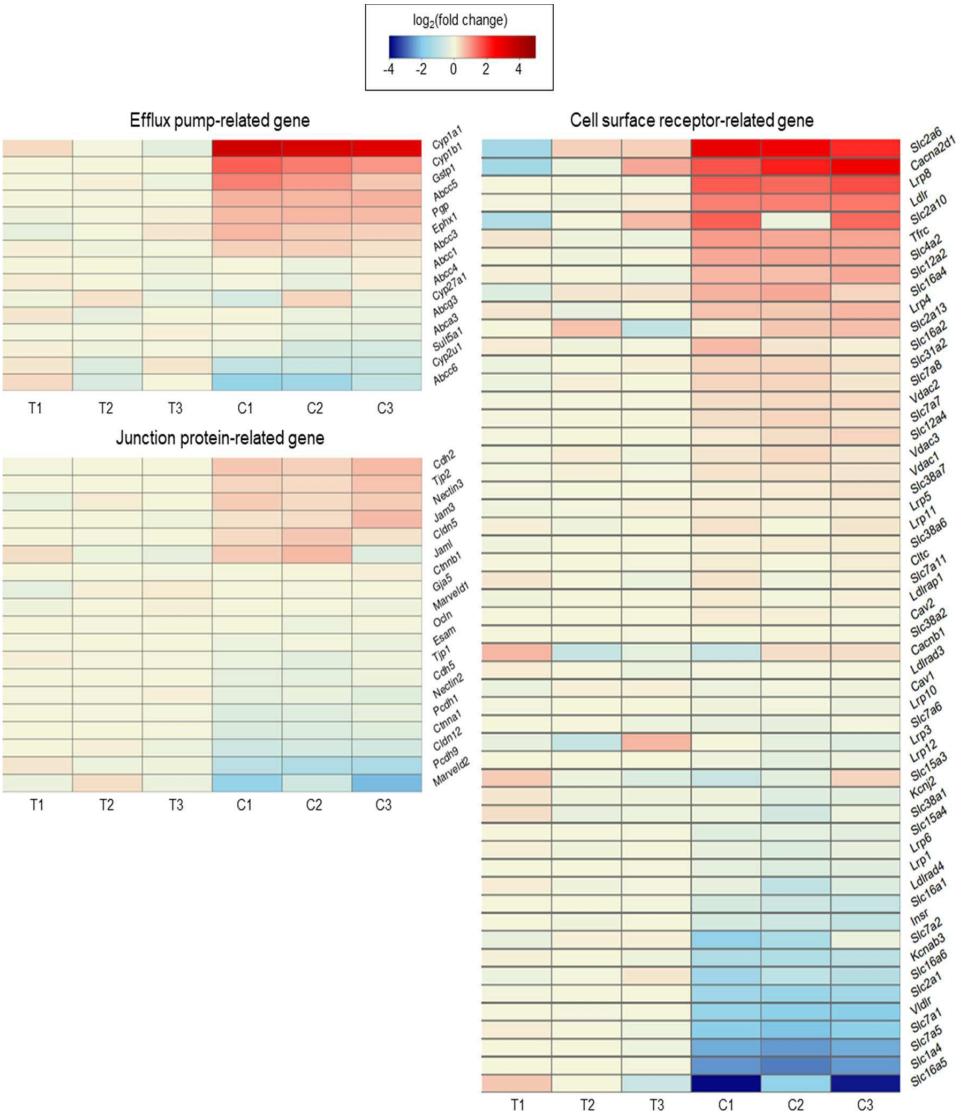
도면12



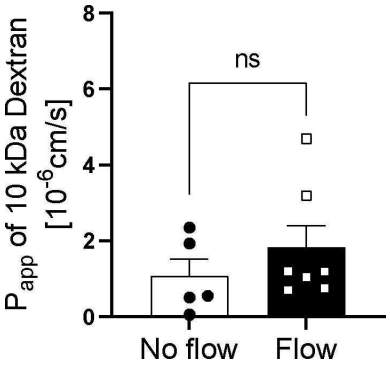
도면13


Enrichment profile
Hits
Ranking metric scores
GOBP : Enrichment plot
Positive regulation of cell cycle process
GOBP : Enrichment plot
Mitotic nuclear division
GOBP : Enrichment plot
DNA templated DNA replication
Enrichment score
Ranked list metric
Zero cross at 6793
0
6,000
12,000

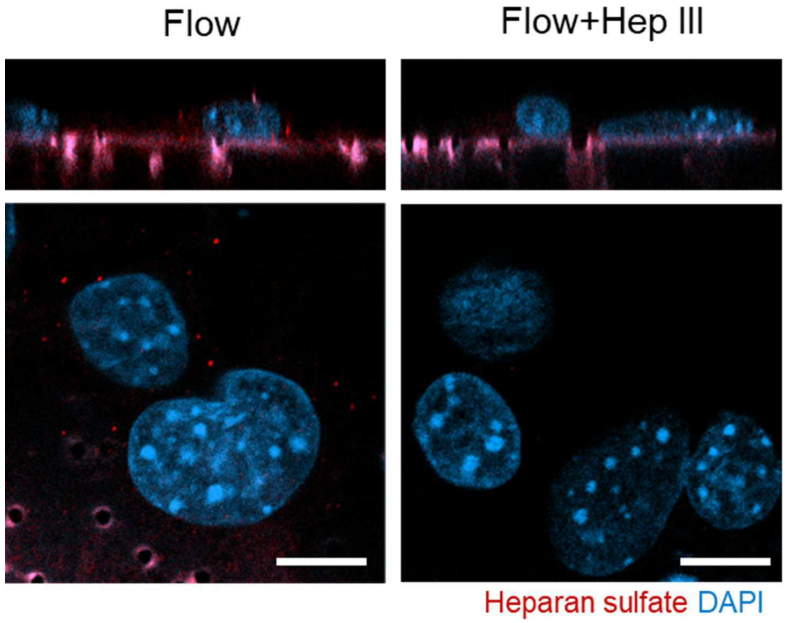
도면14


log2(fold change)
-4 -2 0 2 4
Efflux pump-related gene
Cyp1a1
Cyp1b1
Gstp1
Abcc5
Pgp
Ephx1
Abcc3
Abcc1
Abcc4
Cyp27a1
Abcg3
Abca3
Sult5a1
Cyp2u1
Abcc6
T1 T2 T3 C1 C2 C3
Junction protein-related gene
Cdh2
Tjp2
Nectin3
Jam3
Cldn5
Jaml
Ctnnb1
Gja5
Marveld1
Ocln
Esam
Tjp1
Cdh5
Nectin2
Pcdh1
Ctnna1
Cldn12
Pcdh9
Marveld2
T1 T2 T3 C1 C2 C3
Cell surface receptor-related gene
Slc2a6
Cacna2d1
Lrp8
Ldlr
Slc2a10
Tfrc
Slc4a2
Slc12a2
Slc16a4
Lrp4
Slc2a13
Slc16a2
Slc31a2
Slc7a8
Vdac2
Slc7a7
Slc12a4
Vdac3
Vdac1
Slc38a7
Lrp5
Lrp11
Slc38a6
Cltc
Slc7a11
Ldlrap1
Cav2
Slc38a2
Cacnb1
Ldlrad3
Cav1
Lrp10
Slc7a6
Lrp3
Lrp12
Slc15a3
Kcnj2
Slc38a1
Slc15a4
Lrp6
Lrp1
Ldlrad4
Slc16a1
Insr
Slc7a2
Kcnab3
Slc16a6
Slc2a1
Vldlr
Slc7a1
Slc7a5
Slc1a4
Slc16a5
T1 T2 T3 C1 C2 C3

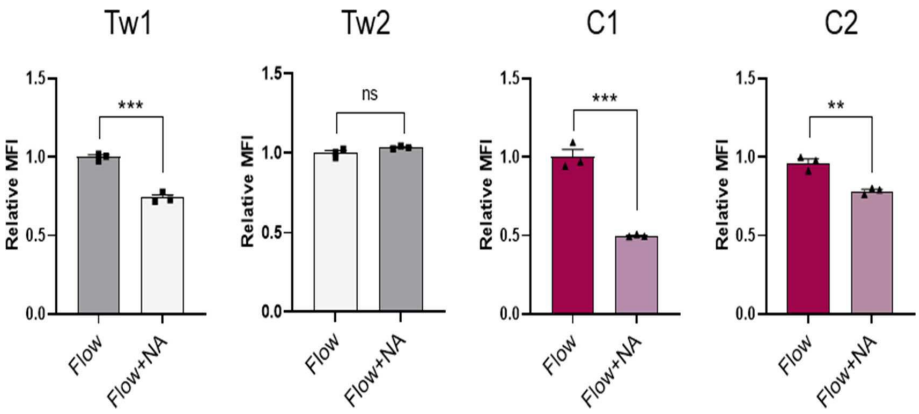
도면15



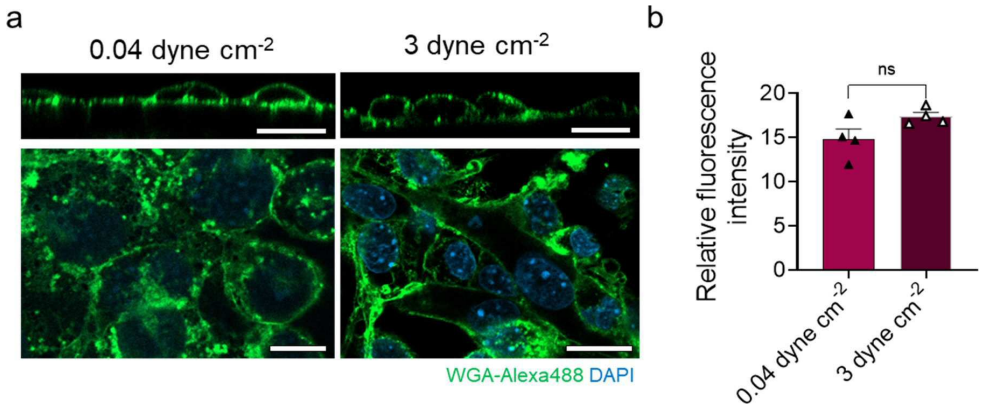
도면16



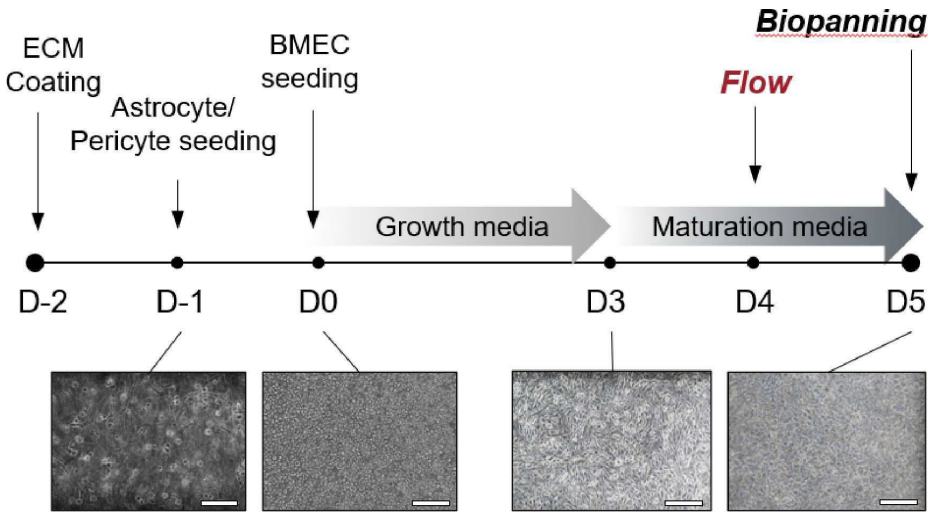
도면17



도면18


a
0.04 dyne cm-2
3 dyne cm-2
WGA-Alexa488 DAPI
b
Relative fluorescence intensity
ns
20
15
10
5
0
0.04 dyne cm-2
3 dyne cm-2

도면19


ECM Coating
Astrocyte/ Pericyte seeding
BMEC seeding
Biopanning
Flow
Growth media
Maturation media
D-2
D-1
D0
D3
D4
D5

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.