(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0110740
(43) 공개일자 2016년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/00 (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01)
C12N 5/09 (2010.01) *G01N 21/17* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 3/00 (2013.01)
B01L 3/5027 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0033951
(22) 출원일자 2015년03월11일
심사청구일자 2015년03월11일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
정봉근
경기도 과천시 관문로 143 (중앙동, 래미안 에코팰리스아파트) 1110동 1004호
이종민
서울특별시 은평구 갈현로9길 16 (역촌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

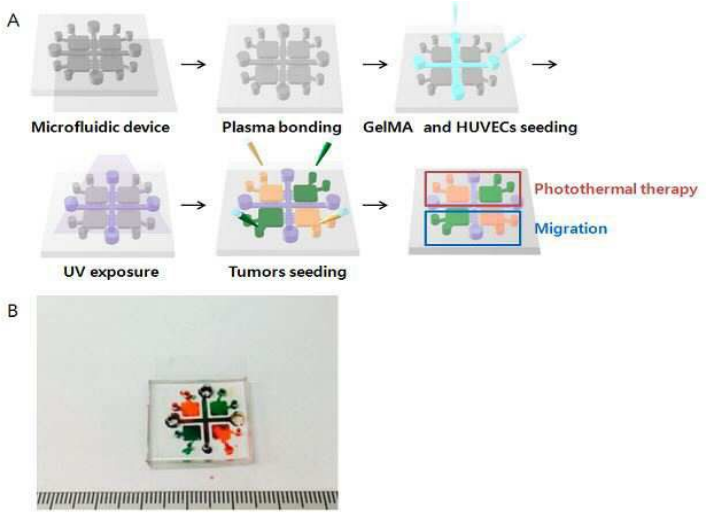
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **하이드로젤 기반의 세포 공동-배양용 미세유체칩**

(57) 요 약

본 발명은 하이드로젤-기반 세포 공동-배양(co-culture) 미세유체칩(microfluidic chip) 및 이의 용도를 제공한다. 본 발명의 미세유체칩은 혈관내피세포 및 암세포의 공동 배양이 가능한 미세유체칩으로서 암과 관련된 연구에서 폭넓게 이용될 수 있으며, 특히 암세포에 대한 광열 치료 효과 연구에 적합하다. 본 발명의 미세유체칩은 생체적합성이 우수하고, 기계적 물성이 좋으며 경제적이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 5/0693 (2013.01)
G01N 21/17 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/5044 (2013.01)
C12N 2502/28 (2013.01)

(72) 발명자
서혜인
경기도 성남시 중원구 둔촌대로 363 102동 501호
(하대원동,자이아파트)

배준혁
경기도 고양시 일산서구 주엽로 156 905동 805호
(주엽동,문촌마을9단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013K1A4A3055268
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 해외우수연구기관유치사업
연구과제명 서강-하버드 질병 바이오물리 연구 센터
기 여 율 1/3
주관기관 서강대학교
연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014M3A6B2060503
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 글로벌프론티어연구개발사업(바이오나노헬스가드 연구단)
연구과제명 디지털 진단을 위한 마이크로플루이딕칩 개발
기 여 율 1/3
주관기관 서강대학교
연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C3347
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 첨단의료기술개발사업
연구과제명 3차원 기술을 이용한 근위축성측상경화증 모델 개발 및 치료제 효능검증 표준화 시스템 확립
기 여 율 1/3
주관기관 서강대학교
연구기간 2014.12.01 ~ 2018.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 세포 배양 구간으로서 시료주입구를 포함하는 하나 이상의 복수 개로 형성되는 미세챔버; (b) 상기 미세챔버에 연결되는 브릿지 채널; 및 (c) 상기 브릿지 채널이 연결되며 하이드로젤 주입구를 포함하는 미세유체 채널을 포함하는 암세포 공동-배양(co-culture) 미세유체칩으로서 상기 하이드로젤 주입구를 통해 주입된 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤 및 혈관내피세포에 의해 배리어(barrier)가 형성되는 것을 특징으로 하는 세포 공동-배양(co-culture)용 미세유체칩(microfluidic chip).

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 아크릴 고분자는 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴산 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴산 공중합체, 시아노에틸 메타크릴산 공중합체, 아미노알킬 메타크릴산 공중합체, 폴리(아크릴산) 공중합체, 폴리아크릴아마이드 공중합체, 글리시딜 메타크릴산 공중합체 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 아크릴 고분자인 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 5-15 중량%의 농도를 갖는 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 광가교결합(photo-crosslinking)하는 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 미세유체칩은 폴리디메틸실록산(poly(dimethylsiloxane), PDMS), 폴리메틸메타클릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리아크리레이트(polyacrylates), 폴리카보네이트(polycarbonates), 폴리시클릭 올레핀(polycyclic olefins), 폴리이미드(polyimides) 및 폴리우레탄(polyurethanes)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 재질로 제조된 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 미세유체칩은 슬라이드 글라스, 크리스탈 및 유리 글라스로 구성된 군으로부터 선택되는 광학적 측정이 용이한 플레이트 상부에 접합되는 것을 특징으로 하는 미세유체칩.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 미세챔버는 하나 이상의 복수 열 및 하나 이상의 복수 행으로 배열되는 것을 특징으로 하는 미세유체칩

청구항 8

다음 단계를 포함하는 세포 공동-배양 방법:

(a) (ⅰ) 세포 배양 구간으로서 시료주입구를 포함하는 하나 이상의 복수 개로 형성되는 미세챔버; (ⅱ) 상기 미세챔버에 연결되는 브릿지 채널; 및 (ⅲ) 상기 브릿지 채널이 연결되며 하이드로젤 주입구를 포함하는 미세유체 채널을 포함하는 세포 공동-배양(co-culture) 미세유체칩을 준비하는 단계;

(b) 상기 하이드로젤 주입구에 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤 및 혈관내피세포를 주입한 다음, 광가교결합(photo-crosslinking)을 유도하여 배리어(barrier)를 구축하는 단계; 및

(c) 상기 시료주입구로 암세포를 주입하고 배양하는 단계.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 암세포 광열 치료 효과의 분석 방법:

(a) (ⅰ) 세포 배양 구간으로서 시료주입구를 포함하는 하나 이상의 복수 개로 형성되는 미세챔버; (ⅱ) 상기 미세챔버에 연결되는 브릿지 채널; 및 (ⅲ) 상기 브릿지 채널이 연결되며 하이드로젤 주입구를 포함하는 미세유체 채널을 포함하는 세포 공동-배양(co-culture) 미세유체칩을 준비하는 단계;

(b) 상기 하이드로젤 주입구에 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤 및 혈관내피세포를 주입한 다음, 광가교결합(photo-crosslinking)을 유도하여 배리어(barrier)를 구축하는 단계;

(c) 상기 시료주입구를 통해 암세포를 주입하고 배양하는 단계;

(d) 상기 시료 주입구를 통해 광열효과(photothermal effect)를 나타내는 나노입자를 주입하고 배양하는 단계; 및

(e) 상기 미세챔버에 레이저를 조사하고 상기 암세포의 생존 및 사멸 정도를 분석하는 단계.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 나노입자는 금나노로드(Gold Nanorod)인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 하이드로젤 기반의 세포 공동-배양용 미세유체칩에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 신경 교모세포종(glioblastoma)은 가장 일반적인 형태의 뇌종양이자 악성 종양으로 발생 빈도에 비하여 치료효과가 매우 낮은 것으로 알려져 있다. 종양치료는 방사선 요법이나 화학 요법 등 다양한 방법들이 있지만 부작용 문제로 인하여 안전한 치료방법을 찾는 연구는 매우 중요하다[1, 2]. 신경 교모종세포는 방사능 및 화학요법에 저항성이 매우 높으며, 신 혈관 억제(anti-angiogenesis)와 세포 자멸사(apoptosis) 유도 등의 치료법도 한계가 있는 실정이다[3]. 한편, 여성들에게서 자주 발생하는 유방암도 조기 발견 시에는 절제 수술만으로 치료가 가능하지만 전이(metastasis)가 시작되면 사망률이 매우 높은 질병이다. 암은 신체의 다양한 부위로 전이될 수 있는데, 전이된 암은 발견이 어려우며, 사망을 불러 올 수 있으므로 이러한 과정을 이해하는 것은 매우 중요하다. 따라서 암세포의 전이와 관련된 연구는 유전자의 발현 조절, 신호전달 등 다양한 수준의 연구가 필요하다. 암의 전이 과정은 세포의 이동, 혈관내 침입(intravasation), 혈관밖 유출(extravasation), 수송 등의 과정을 통해 진행된다. 전이의 단계에 유전자가 중요한 역할을 한다는 연구가 진행되었다. 다른 기관의 미세혈관을 통과하는 혈관외유출(extravasation)의 역할을 하는 유전자에 대한 연구와 함께 다양한 전이과정에서 유전자들이 관여한다는 연구들이 진행되었다[4, 5]. CD133+ 종양 줄기세포를 이용한 BMP(bone morphogenic

proteins)로 분화를 유도하여 뇌종양 치료효과를 보기 위한 연구가 진행되었다[6]. 하지만 종양줄기세포를 이용하여 자가 재생산(self-Renewal)을 억제하는 방법은 신개념의 치료방법으로 사용될 수 있지만 필요한 종양줄기세포는 극소량으로 존재하기 때문에 연구의 어려움이 있다.

[0004] 최근 암 치료를 위해 광열치료에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 광열치료는 근적외선 빛에너지를 열로 전환하여 암 세포나 암 조직에 손상을 입히는 것으로, 금 나노입자는 훌륭한 광열제로서 사용될 수 있다[7]. 금 나노입자는 생체 적합성이 우수하며 표면 변형이 쉬워 생체 고분자, 항체, DNA등과 결합하기 용이하다는 장점을 가지고 있다. 또한 금 나노입자는 모양과 크기에 따라 표면 플라즈몬 공명효과를 조절 할 수 있다. 특히, 금 나노로드는 비등방성 모양을 가지고 있어 두 개의 파장에서 표면 플라즈몬 공명효과를 보인다. 금 나노로드의 넓이에 상응하는 520 nm 파장에서의 횡축에 의한 표면 플라즈몬 공명과 650-900 nm 파장(근적외선 파장)에서의 종축에 의한 표면 플라즈몬 공명인데, 특히 근적외선 파장에서 강한 흡수를 보인다[8, 9]. 이때 종축에 의한 표면 플라즈몬 공명의 파장영역을 이동함으로써 형상비(aspect ratio)를 조절할 수 있다[10].

[0005] 암 조직에 금 나노로드를 주입하고 장파장의 근적외선 빛을 조사하면 금 나노로드가 에너지를 흡수하여 암 조직에만 국한되어 열이 발생하기 때문에 정상 조직의 손상없이 암 조직에 깊게 (~10㎝) 침투하여 광열효과를 일으킬 수 있다[11, 12]. 최근에, 금 나노로드에 PEG(polyethyleneglycol), 실리카와 같은 생체 고분자를 접합(conjugation)시켜 광열치료에 많이 이용하고 있다. PEG은 나노입자의 응집과 비특이적 단백질의 흡착을 막을 수 있으며, 장시간 혈액에 머무를 수 있기 때문에 암세포로 나노입자의 축적을 도울 수 있다는 장점을 가지고 있다[13]. 실리카는 약물전달을 위한 약물 운반체로써 효과적으로 이용될 수 있다. 금 나노로드 표면에 약물을 로딩하기에는 한계가 있기 때문에 실리카 나노입자를 코팅하여 약물을 로딩하면 광열치료와 동시에 화학치료를 병행 할 수 있다[14]. 이처럼 금 나노로드는 독특한 광학적 성질 때문에 광열치료를 위한 광열제로서 많은 연구가 진행되고 있으며, 다양한 생체 의학적 적용을 위해 활발하게 연구되고 있다.

[0006] 이전에 세포주변의 미세환경을 조절할 수 있는 미세유체칩의 연구가 진행되었다[15, 16]. 미세 환경의 변화가 암의 성장 및 증식에도 기여할 수 있다. 미세유체칩을 암세포에 적용할 경우 인체 내에서 일어나는 혈관생성, 면역반응, 암 전이 등의 다양한 현상을 관찰할 수 있으며 세포간의 상호작용, 세포와 세포의 기질과의 상호작용 등을 관찰할 수 있기 때문에 체계적인 연구가 가능하며 인 비트로에서 약물 및 독성 평가가 가능하다. 최근에는 말초혈액 내에서 암세포를 분리하기 위한 마이크로 칩이 개발되었다[17]. 혈액 내에 순환하는 종양세포(circulating tumor cells)는 암전이의 근원이 되는 세포이다. 이러한 세포를 암 환자로부터 분리하는 것을 매우 어려운데, 마이크로 칩을 이용하여 순환하는 종양세포를 효과적으로 분리하였다. 또한 항원-항체의 상호작용으로 암세포를 분리하는 기술 이외에 암세포의 크기와 밀도 등 유체역학적 특성을 이용하여 유방암 환자로부터 순환 종양세포를 연속적으로 분리하는 기술도 개발되었다[18]. 이러한 기술은 다양한 종류의 순환 종양세포를 분리할 수 있기 때문에 다양한 세포로의 응용이 가능하다. 하지만 이러한 순환 종양세포 검출 마이크로칩은 암세포의 전이와 함께 치료에 대한 부분은 고려되지 않았다. 종양과 그 주변의 미세환경의 정밀모사 및 제어를 위해서는 암세포뿐만 아니라 면역세포(immune cells), 혈관 내피세포(endothelial cell), 섬유아세포(fibroblast) 등의 세포와 3차원적 공동배양이 요구된다. 이러한 연구는 공학적 연구뿐만 아니라 암과 관련된 병리학적 지식의 유기적인 융합이 필요하다. 하이드로젤 기반의 간, 암세포, 골수세포를 미세유체 챔버에서 배양하고, 항암 약물인 5-플루러유러실(fluorouracil)의 약물 효과와 동력학을 분석하였다[19]. 이러한 미세유체칩은 독성 평가에 있어서 고속대량 스크리닝이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 또한 3차원적으로 세포배양 및 분석을 위한 미세유체 소자가 개발되었다[20]. 혈관내피세포를 배양하여 채널내에 3차원 혈관구조물을 만들고 혈관신생 반응을 확인하였다. 혈관내피세포와 평활근 세포를 함께 배양하였을 때, 혈관 내피세포의 신생반응에서 평활근 세포가 미치는 영향을 관찰할 수 있으며, 유방암 세포의 3차원적 배양에 관한 연구도 진행되었다[21]. 이러한 3차원적으로 배양된 미세유체칩은 다양한 인체 환경을 모사할 수 있기 때문에 정밀한 분석이 가능하다. 하지만, 기존의 미세유체칩에서는 다양한 구획을 통하여 광열치료 연구와 전이연구를 효과적으로 고려하지 못하였다. 개발된 하이드로젤 기반의 미세유체칩은 삼차원 현상을 구현하여 암세포의 물리적, 화학적 기전을 달리하여 신약개발이나 약물 평가들에 활용할 수 있다. 그러므로 이러한 하이드로젤 기반의 공동배양 미세유체칩은 암의 광열치료와 전이 연구를 위한 매우 잠재력 있는 도구로 사용될 수 있다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 세포 특히, 세포를 효율적으로 공동배양 할 수 있는 세포 공동-배양(co-culture)용 미세유체칩(microfluidic chip)을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 미세챔버, 브릿지 채널 및 미세유채 채널을 포함하는 미세유체칩을 제조하고, 젤라틴 하이드로젤 및 혈관내피세포를 미세유채 채널을 통해 주입하여 배리어(barrier)를 구축함으로써 미세챔버 사이에 분자 확산이 억제되도록 하여 챔버별 암세포의 독립적 배양과 암세포와 혈관내피세포의 공동배양이 가능한 미세유체칩을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 하이드로젤-기반 세포 공동-배양용 미세유체칩을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 미세유체칩을 이용한 세포 공동-배양 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 미세유체칩을 이용한 암세포 광열 치료 효과의 분석 방법을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 세포 배양 구간으로서 시료주입구를 포함하는 하나 이상의 복수 개로 형성되는 미세챔버; (b) 상기 미세챔버에 연결되는 브릿지 채널; 및 (c) 상기 브릿지 채널이 연결되며 하이드로젤 주입구를 포함하는 미세유체 채널을 포함하는 세포 공동-배양용 미세유체칩으로서 상기 하이드로젤 주입구를 통해 주입된 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤 및 혈관내피세포에 의해 배리어(barrier)가 형성되는 것을 특징으로 하는 세포 공동-배양용 미세유체칩을 제공한다.

[0019] 본 발명자들은 세포를 효율적으로 공동배양 할 수 있는 세포 공동-배양용 미세유체칩을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 미세챔버, 브릿지 채널 및 미세유채 채널을 포함하는 미세유체칩을 제조하고, 젤라틴 하이드로젤 및 혈관내피세포를 미세유채 채널을 통해 주입하여 배리어를 구축함으로써 미세챔버 사이에 분자 확산이 억제되도록 하여 챔버별 암세포의 독립적 배양과 암세포와 혈관내피세포의 공동배양이 가능한 미세유체칩을 개발하였다.

[0020] 본 발명의 주요한 특징은 암세포 공동-배양을 위한 미세유체칩에 하이드로젤 및 혈관내피세포로 구성된 배리어를 두어 공동-배양하는 암세포 사이의 분자 확산을 억제하는데 있다. 또한, 암세포를 배양하는 미세챔버와 하이드로젤 및 혈관내피세포로 채워진 브릿지 채널이 연결되어 암세포와 혈관내피세포의 공동배양이 가능하도록 하였다. 이러한 암세포 및 혈관세포의 공동배양을 통해 암 관련 다양한 연구에 폭넓은 응용이 가능하다. 실제로 본 발명의 미세유체칩을 이용하여 암세포 및 혈관내피세포를 배양한 경우, 암세포가 혈관내피세포 쪽으로 이동하는 것을 확인하였다.

[0021] 본 발명의 하이드로젤-기반 세포 공동-배양 미세유체칩에서 미세챔버는 세포 배양 구간으로서 시료주입구를 포함하며, 상기 시료주입구를 통해 세포, 세포배양액, 분석에 필요한 시료, 광열효과를 나타내는 나노입자 등을 주입할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 세포 공동-배양 미세유체칩에서 미세챔버은 하나 이상의 복수 개로 형성되며, 하나 이상의 복수 열 및 하나 이상의 복수 행으로 배열된다. 가장 바람직하게는 본 발명의 세포 공동-배양 미세유체칩에서 미세챔버는 2열 및 2행으로 배열된다.

[0023] 본 발명의 세포 공동-배양 미세유체칩에서 미세챔버는 브릿지 채널에 연결된다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 세포 공동-배양 미세유체칩에서 미세챔버, 브릿지 채널 및 미세유체 채널은 각각 200-300 μm, 30-50 μm 및 200-300 μm의 두께를 가지며, 이로 인해 서로 연결된 미세챔버와 브릿지 채널 및 브릿지 채널과 미세유체 채널은 단차를 형성한다.

[0025] 본 발명의 세포 공동-배양 미세유체칩에서 브릿지 채널은 미세유체 채널에 연결된다. 미세유체 채널은 브릿지 채널을 통해 미세챔버에 연결되도록 배치되며, 바람직하게는 십자가 형태를 갖는다.

[0026] 본 발명의 세포 공동-배양 미세유체칩은 하이드로젤 주입구를 통해 주입된 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤 및 혈관내피세포에 의해 형성되는 배리어에 의해 미세챔버간 분자 확산이 억제되며, 이에 따라 미세챔버별로 독립적인 세포 배양이 가능하다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아크릴 고분자는 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴산 공중합체, 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴산 공중합체, 시아노에틸 메타크릴산 공중합체, 아미노알킬 메타크릴산 공중합체, 폴리(아크릴산) 공중합체, 폴리아크릴아마이드 공중합체, 글리시딜 메타크릴산 공중합체 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 아크릴 고분자이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 아크릴 고분자는 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴산 공중합체, 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 아크릴 고분자이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 아크릴 고분자는 메타크릴산 공중합체이다.

[0028] 본 발명의 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 농도를 조절하여 세포 공동-배양의 분자 확산을 조절할 수 있다. 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 당업계의 공지된 다양한 방법에 따라 제조할 수 있다. 예컨대, PBS(Phosphate Buffered Saline)에 젤라틴을 완전히 용해될 때까지 50℃로 교반하여 혼합하고, 무수 메타크릴산(methacrylic anhydride)을 0.5 ㎖/분의 속도로 첨가하여 GelMA(Gelatin methacylate) 하이드로젤을 제조한다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 5-15 w/v%의 농도를 갖는다. 보다 바람직하게는 7-12 w/v%이고, 가장 바람직하게는 10 w/v%이다.

[0030] 본 발명의 하이드로젤-기반 세포 공동-배양 미세유체칩에서 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 광가교결합(photo-crosslinking) 한다.

[0031] 본 명세서에서, 용어 "광가교결합"은 광개시제(photoinitiator)의 존재하에 빛을 조사하여 공유적 및 물리적으로 가교결합을 형성시켜 중합시키는 과정을 의미한다. 상기 광개시제는 화학물질로 빛에 의해 중합 반응 및/또는 라디칼 가교결합을 개시한다.

[0032] 본 발명의 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤의 광가교결합은 GelMA 하이드로젤을 PBS 및 광개시제(photo-initiator)인 80℃의 2-히드록시-1-(4-(히드록시에톡시)페닐)-2-메틸-1-프로파논(2-hydroxy-1-(4-(hydroxyethoxy)phenyl)-2-methyl-1-propanone)과 혼합하고, 챔버에 주입한 후, 자외선(360-480 ㎚ 파장)을 조사하여 광-가교결합을 유도한다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 하이드로젤-기반 세포 공동-배양 미세유체칩에서 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 세포를 캡슐화(encapsulation)한다.

[0034] 본 명세서에서 용어, "캡슐화"는 세포 대사의 필수적인 산소, 영양, 성장인자 등의 유입, 및 노폐물 및 치료단백질의 유출과 같은 분자의 양방향성 확산이 가능하게 중합된 반-투과성 젤(또는 막) 내 세포가 고정화되는 것을 의미한다. 세포 캡슐화 기술의 주요 동기는 조직 공학 적용에 있어 이식편거부반응(graft rejection)에 존재하는 문제를 극복하여 장기 이식 후 부작용을 조적하기 위한 면역억제 약물의 장기(long-term) 사용을 감소시키기 위함이다.

[0035] 본 발명의 미세유체칩을 암 전이와 혈관과의 관계 연구에 사용가능하도록 미세유체칩 내 혈관 구조를 모사하기 위하여 혈관 내피세포를 캡슐화 하여 사용하였다.

[0036] 본 발명의 미세유체칩은 폴리디메틸실록산(poly(dimethylsiloxane), PDMS), 폴리메틸메타클릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리아크리레이트(polyacrylates), 폴리카보네이트(polycarbonates), 폴리시클릭 올레핀(polycyclic olefins), 폴리이미드(polyimides) 및 폴리우레탄(polyurethanes)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 재질로 제조된다. 가장 바람직하게는 폴리디메틸실록산(poly(dimethylsiloxane), PDMS)으로 제조된다.

[0037] 본 발명의 미세유체칩은 슬라이드 글라스, 크리스탈 및 유리 글라스로 구성된 군으로부터 선택되는 광학적 측정이 용이한 플레이트 상부에 접합된다. 가장 바람직하게는 유리 글라스 상부에 접합된다.

[0038] 본 발명의 세포 공동-배양 미세유체칩에서 배양가능한 암세포로는 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 유방암세포,

뇌종양세포, 전립선암세포, 직장암세포, 폐암세포, 췌장암세포, 난소암세포, 방광암세포, 자궁내막암세포, 자궁경부암세포, 간암세포, 신장암세포, 갑상선암세포, 골암세포, 림프종암세포 또는 피부암세포 등을 포함한다.

[0040] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포 공동-배양 방법을 제공한다:

[0041] (a) (ⅰ) 세포 배양 구간으로서 시료주입구를 포함하는 하나 이상의 복수 개로 형성되는 미세챔버; (ⅱ) 상기 미세챔버에 연결되는 브릿지 채널; 및 (ⅲ) 상기 브릿지 채널이 연결되며 하이드로젤 주입구를 포함하는 미세유체 채널을 포함하는 세포 공동-배양용 미세유체칩을 준비하는 단계;

[0042] (b) 상기 하이드로젤 주입구에 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤 및 혈관내피세포를 주입한 다음, 광가교결합을 유도하여 배리어를 구축하는 단계; 및

[0043] (c) 상기 시료주입구로 암세포를 주입하고 배양하는 단계.

[0044] 본 발명의 세포 공동-배양 방법은 상술한 세포 공동-배양 미세유체칩을 이용하여 암세포 및 혈관내피세포를 배양하는 것으로 이 둘 사이의 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0046] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 암세포 광열 치료 효과의 분석 방법을 제공한다:

[0047] (a) (ⅰ) 세포 배양 구간으로서 시료주입구를 포함하는 하나 이상의 복수 개로 형성되는 미세챔버; (ⅱ) 상기 미세챔버에 연결되는 브릿지 채널; 및 (ⅲ) 상기 브릿지 채널이 연결되며 하이드로젤 주입구를 포함하는 미세유체 채널을 포함하는 세포 공동-배양(co-culture) 미세유체칩을 준비하는 단계;

[0048] (b) 상기 하이드로젤 주입구에 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤 및 혈관내피세포를 주입한 다음, 광가교결합(photo-crosslinking)을 유도하여 배리어(barrier)를 구축하는 단계;

[0049] (c) 상기 시료주입구를 통해 암세포를 주입하고 배양하는 단계;

[0050] (d) 상기 시료 주입구를 통해 광열효과를 나타내는 나노입자를 주입하고 배양하는 단계; 및

[0051] (e) 상기 미세챔버에 레이저를 조사하고 상기 암세포의 생존 및 사멸 정도를 분석하는 단계.

[0052] 본 명세서에서 용어 '광열 치료'(광열방산 또는 광학적 온열 현상)는 고형 종양을 치료하는 방법으로서 전형적으로 비 방사성 메커니즘을 통하여 흡수된 빛을 국부적인 열로 전환시키는 단계를 포함한다. 광열 치료 방법에 쓰이는 근적외선(NIR)은 일반 조직의 낮은 근적외선의 흡수로 기인하여 일반적인 생체 조직의 손상 없이 높은 공간적인 정밀성을 갖고 깊숙한 조직 침투가 가능하다.

[0053] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 암세포 공동-배양용 미세유체칩에 암세포를 배양하고, 각 미세챔버에 광열 효과를 나타내는 나노입자를 주입하고 레이저를 조사한 다음 암세포의 생존 및 사멸 정도를 분석함으로써 나노입자의 광열 치료 효과를 분석한다.

[0054] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 암세포 광열 치료 효과 분석에 사용되는 나노입자는 금나노로드(Gold Nanorod)이다.

발명의 효과

[0056] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0057] (a) 본 발명은 하이드로젤-기반 세포 공동-배양용 미세유체칩 및 이의 용도를 제공한다.

[0058] (b) 본 발명의 미세유체칩은 혈관내피세포 및 암세포의 공동 배양이 가능한 미세유체칩으로서 암과 관련된 연구에서 폭넓게 이용될 수 있으며, 특히 암세포에 대한 광열 치료 효과 연구에 적합하다.

[0059] (c) 본 발명의 미세유체칩은 생체적합성이 우수하고, 기계적 물성이 좋으며 경제적이다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 젤라틴 메타크릴레이트 하이드로젤 기반의 공동 배양 미세유체칩을 나타낸다. (A) 미세유체 채널과 미세챔버를 포함한 젤라틴 메타크릴레이트 하이드로젤 기반의 공동 배양 미세유체칩의 모식도, (B) 젤라틴 메타아크릴레이트 하이드로젤 기반의 공동 배양 미세유체칩의 사진.

도 2a 내지 2c는 광가교결합 GelMA 하이드로젤의 5 w/v%, 15 w/v% 및 25 w/v%에 따른 SEM 이미지를 나타낸다. 스케일바는 20 ㎛를 나타낸다.

도 3a 내지 3b는 GelMA 하이드로젤 농도(5-25 w/v%)의 영향을 나타낸다. 도 3a 및 3b는 각각 구멍 크기 및 종횡비를 나타낸다. 종횡비는 구멍의 길이를 구멍의 너비로 나눈 값을 의미한다(*p<0.05, **p<0.01).

도 4는 배리어(barrier)와 세포 캡슐화를 위한 10 w/v% 젤라틴 메타크릴레이트 하이드로젤의 분석 결과를 나타낸다. (A) 10 w/v% 젤라틴 메타크릴레이트 하이드로젤의 SEM 사진, (B) 4구역의 사각형 형태의 미세챔버(Left-up (LU), Right-up (RU), Left-down (LD), 및 Right-Down (RD))에서 분자 확산의 형광 사진. 로다민 B-덱스트란은 RU 미세챔버에만 주입되었으며 LD 미세챔버 까지 확산 되었다. (C) 1일과 5일 동안 10w/v% 젤라틴 메타크릴레이트 하이드로젤을 지나는 분자 확산 분석 그래프

도 5는 금나노로드의 합성 결과를 나타낸다. (A) 합성된 금나노로드의 TEM 사진, (B) CTAB으로 안정된 금나노로드의 UV-가시 스펙트럼 결과. (C)는 합성된 금나노입자를 사각형 형태의 마이크로챔버에 주입하는 모식도.

도 6은 금나노로드의 광열 치료 효과 분석 결과를 나타낸다. (A) 금나노로드의 NIR 레이저 조사 후의 농도에 따른 온도 증가 분석(808 nm, 7W), (B) 96웰 플레이트 안에서 교아종세포와 유방암세포의 광열 치료 효과의 CCK-8 라이브/데드(live/dead) 어세이 분석 그래프, (C) 공동 배양 미세유체칩 안에서 교아종세포와 유방암세포의 광열 치료 효과의 라이브/데드 어세이 형광 사진.

도 7은 암세포의 전이에 관한 공초점 현미경 사진을 나타낸다. (A) 암세포 전이 연구를 위한 하이드로젤 기반의 공동 배양 미세유체칩의 모식도. (B) MCF7 세포의 공초점 현미경 사진, (C) 유리 기판 위에서 U87MG 세포의 공초점 현미경 사진, (D) 디바이스 안에서 U87MG 세포의 챔버에서 GelMA 배리어 챔버로의 전이된 공초점 현미경 사진, (E) U87MG세포가 전이된 GelMA 배리어 챔버의 공초점 현미경 사진, (F) MCF7이 배양된 챔버의 공초점 현미경 사진, (G) 고 배율의 디바이스 안에서 U87MG 세포의 챔버에서 GelMA 배리어 챔버로의 전이되는 브릿지 채널의 공초점 현미경 사진.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0064] **실시예**

[0065] **실험 재료 및 실험 방법**

[0066] *3D 미세유체 공동-배양 장치의 제조*

[0067] 공지된 방법을 이용하여 2 단계 포토리소그래피(photolithography) 방법으로 챔버 및 브리지 채널을 제조하였다. 3D 미세유체 공동-배양 장치를 제조하기 위해, AutoCAD 프로그램으로 챔버 및 브리지 채널을 디자인하였다. 브리지 채널을 제조하기 위해, SU-8 25 포토레지스트(photoresist)를 실리콘 웨이퍼 상에 스핀-코팅(1000 rpm, 60 초 및 40 Gm in thickness)하였다. 챔버를 제조하기 위해, SU-8 100을 SU-8 50 포토레지스트-패턴 기질 상에 스핀-코팅(3,000 rpm, 60 초 및 250 Gm in thickness)하였다. PDMS[poly(dimethylsiloxane)] 전구 용액을 포토레지스트-패턴 실리콘 웨이퍼로 본뜨고, PDMS-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치를 글래스 슬라이드에 산소 플라스마 처리(Femto Science, 대한민국)하여 접착하였다.

[0068] 미세유체칩은 네 개의 사각형 모양의 미세챔버(Left-up (LU), Right-up (RU), Left-down (LD), and Right-Down (RD) 와 브릿지 미세유체 채널로 연결된 십자가 모양의 미세유체 채널로 구성되어 있다. 네 개의 사각형 형태의 미세챔버는 (250 μ두께) 브릿지 채널로 연결되어 있으며 (40 μ두께)과 연결되어 있으며, 브릿지 채널은 십자가 모양의 미세유체 채널 (250 μ두께)과 연결되어 있다. 십자가 모양의 미세유체 채널은 젤라틴 메타크릴

레이트 하이드로젤의 혈관 내피세포의 캡슐화와 사각형 모양의 미세챔버간 분자의 확산을 막기 위해 만들었으며, 브릿지 채널은 유체의 저항을 높여주기 위해 설계되었다. 결과적으로 젤라틴 메타크릴레이트 하이드로젤은 UV 빛에 의해 십자가 형태의 미세유체 채널에서만 가교결합 하였으며, 사각형의 미세챔버에는 유방암세포와 교아종세포를 각각 교차하여 주입할 수 있다. 그 다음, 10 w/v% 젤라틴 메타크릴레이트 하이드로젤의 분자 확산 효과를 확인하였다. 로다민 B-덱스트란을 RU 미세챔버에 주입하여 LD 미세챔버까지 분자 확산을 확인하였으며, 1일과 5일 동안 젤라틴 메타크릴레이트 하이드로젤이 분자의 확산을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서 젤라틴 메타크릴레이트 하이드로젤은 십자가 형태의 미세유체 채널 안에서 세포 캡슐화와 배리어(barrier)로 사용되었다.

[0070] *젤라틴 메타크릴레이트(methacrylated gelatin, GelMA) 하이드로젤 합성*

[0071] 광가교결합 GelMA 하이드로젤은 타입 A 돼지 피부 젤라틴을 50℃에서 교반하고, 완전히 용해할때까지 PBS(Phosphate Buffered Saline, GIBCO, 미국)을 혼합하였다. 2시간동안 교반 조건에서 무수 메타크릴산(methacrylic anhydride)을 0.5 ㎖/분의 속도로 첨가하였다. 혼합물을 12-14 kDa 컷오프 투석 튜브에 넣고, 3-4일 동안 40℃의 조건에서 증류수로 투석하여, 염 및 메타크릴산을 제거하였다. 용액을 1주 동안 동결건조하고 80℃에 보관하였다.

[0073] *금나노로드 합성*

[0074] 금나노로드는 seeded-growth 방법으로 합성하였다. 먼저 시드 용액은 0.1 M CTAB 용액 7.5 ml에 0.01 M $HAuCl_4$ 수용액 0.25 ml과 0.01 M $NaBH_4$ 용액 0.6 ml을 첨가하여 준비한다. 이때, 시드 용액은 2시간이상 상온에서 안정화 시킨 후 사용한다. 성장(growth) 용액은 0.1 M CTAB 4.75 ml에 0.01 M $HAuCl_4$ 0.2 ml, 0.01 M $AgNO_3$ 0.03 ml, 0.1 M 아스코르브산 0.032 ml을 첨가하여 준비한다. 성장 용액에 준비된 시드 용액 0.01 ml을 첨가하고 3시간 이상 상온에서 안정화시키면 금나노로드가 합성된다.

[0076] *주사형 전자 현미경*

[0077] 주사형 전자 현미경(Scanning Electron Microscope; SEM)을 이용하여 GelMA 하이드로젤의 구조를 분석하였다. 팽창된 하이드로젤을 냉동시키고 동결건조하였다. 동결건조된 시료를 절단하고 터보 스푸터 제피기(EMITECH, K575X)를 이용하여 단면을 백금으로 코팅하였다. 30 kV 고압에서 SEM 이미지를 수득하였다.

[0079] *암세포의 배양*

[0080] 내피세포는 2% 젤라틴으로 코팅된 플라스크에서 내피세포 배양액(EGM2 + Single Quot Kit Components, Lonza, Switzerland)과 함께 배양하였으며 유방암세포(MCF7)와 교아종세포(U87MG)는 10% FBS(fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM으로 배양하였다.

[0082] *GelMA 하이드로젤 및 세포-캡슐화 콜라겐 겔의 로딩*

[0083] 혈관 내피세포를 3차원적인 방법으로 배양하기 위해서 $2X10^6$ 세포/ml으로 100 μGelMA 하이드로젤 솔루션 안에 서스펜션하여 캡슐화하였다. 그 중에 20 μ내피세포가 캡슐화된 GelMA 하이드로젤 용액을 십자가 형태의 채널 안에 넣어주었다. UV를 20초 조사하면 광가교결합에 의해 미세유체칩 안에서 GelMA 하이드로젤이 배리어를 형성한다. 그 다음 $2X10^6$ 세포/ml의 MCF7 세포와 U87MG 세포를 배양액과 함께 사각형의 LU, RU, RD, LD 챔버에 각각 교차하여 10 μ를 넣어주었다.

[0085] *광열 치료 효과 분석*

[0086] 세포를 챔버에 주입하고 하루 동안 배양하여 세포를 부착시킨 다음, 200 μ의 세포 배양액에 20, 30, 40 μ의

금나노로드를 혼합하여 챔버 주입구를 통해 주입하고 NIR 레이저를 조사한 뒤에 온도 증가를 분석하였다. 또한, 칩 내에서 교아종세포와 유방암 세포를 하루 동안 배양하고 마찬 가지로 NIR 레이저를 조사하고 라이브/데드 어세이로 확인하였다.

[0087] 라이브/데드 어세이는 다음 방법을 통해 실시하였다: 유방암세포와 교모종 세포는 $1x10^5$ 세포로 96웰 플레이트와 마이크로 챔버에 주입하였다. 세포를 주입하고 하루 뒤에 세포배양액을 15 v/v% 금나노로드가 있는 세포 배양액으로 교체하고 6시간 정도 세포 배양기에 넣어두었다. 그 다음 NIR을 챔버와 96웰 플레이트에 각각 조사하였다. 결과적으로 세포의 생존률은 96웰 플레이트 안에서 CCK-8(cell-countingkit-8,USA)에 의해 분석되고(도 4b), 마이크로 챔버 안에서 라이브/데드 어세이(invitrogen, USA)에 의해 공초점 현미경으로 형광으로 분석할 수 있다(도 4c).

[0089] **결과 및 고찰**

[0090] *GelMA 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치의 제조*

[0091] 광가교결합 가능한 GelMA 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치를 개발하였다(도 1). GelMA 하이드로젤-기반 3D 미세유체 장치는 2단계 포토리소그래피 공정에 의해 4 챔버 및 브릿지 미세유체 채널로 연결된 십자가 모양의 미세유체 채널로 구성되도록 제조된다(도 1c). 4 챔버(250 ㎛ 두께)는 미세한 홈의 브리지 채널(40 ㎛ 두께)로 연결된다(도 1c).

[0092] 250 ㎛ 두께의 챔버는 혈관 내피세포가 캡슐화된 GelMA 하이드로젤과 유방암세포와 교모종세포로 채워진다. 40 ㎛ 두께의 미세한 홈의 채널은 유체의 저항을 증가시킨다. UV로 십자가 모양의 마이크로 채널에 GelMA 하이드로젤을 광가교결합하였다. 십자가 형태의 챔버의 광-가교결합 GelMA 하이드로젤은 물리적 장벽으로 브리지 채널을 통한 분자 확산을 억제하며 혈관 내피세포의 배양을 가능하게 한다. 그 다음 유방암 세포와 교모종 세포를 교차하여 주입하였다. 이러한 다구획 미세유체 배양 장치는 세포의 상호작용 및 고속대량 약물스크리닝에 많은 이점이 있지만 이전의 미세유체 공동-배양 장치는 광열 치료와 혈관 내피세포 및 암세포의 공동-배양을 위한 광가교결합 하이드로젤-기반 3D 미세유체 장체가 고려되지 않았다.

[0094] *다공성 및 분자 확산에 대한 GelMA 하이드로젤 농도의 영향*

[0095] 다공성에 대한 GelMA 하이드로젤 농도의 영향을 확인한 결과, 구멍 크기는 GelMA 하이드로젤 농도와 반비례함을 나타내었다(도 2). SEM 이미지는 25 w/v% GelMA 하이드로젤의 다공성으로, 5 w/v% 하이드로젤과 비교하여 균일한 크기 및 형태를 나타낸다(도 2a 내지 2c). 5 w/v% GelMA 하이드로젤의 구멍 크기는 34 ㎛인데 반해, 25 w/v% GelMA 하이드로젤의 구멍 크기는 4 ㎛였다(도 3a). 25 w/v% GelMA 하이드로젤의 다공성은 원형(종횡비=1)인 반면, 5 w/v% GelMA 하이드로젤은 타원형(종횡비=1.9, 도 3b)이었다. 또한, 분자 확산에 대한 GelMA 하이드로젤 농도의 영향을 조사한 결과, 5 w/v% GelMA 하이드로젤의 경우 분자 확산이 쉽게 일어났고, 25 w/v% GelMA 하이드로젤은 분자 확산을 완전히 억제하였다. 이로써, 5 w/v% GelMA 하이드로젤 농도는 배리어로 사용할 수 없다고 판단하였으며, 15 w/v% GelMA 하이드로젤 농도는 배리어로서 사용 가능하지만 구멍 크기가 세포를 캡슐화 하기에는 작아 적당하지 않다고 판단하였다. 본 발명에서 미세유체칩의 배리어 및 세포 캡슐화 용도를 갖는 GelMA 하이드로젤의 적정 농도는 10 w/v% GelMA인 것으로 판단하였다.

[0097] *광열 치료 효과 분석*

[0098] 200 μ의 세포 배양액에 20, 30, 40 μ의 금나노로드를 혼합하여 NIR 레이저를 조사하고 온도 증가를 분석한 결과, 금나노로드의 농도에 의존적으로 온도가 증가하였다(도 6a). 200 μ의 세포 배양액에 30 μ금나노로드가 혼합된 용액(20 v/v%) 이 세포의 형태에 영향을 주지 않으면서 광열 효과에 의해 세포가 죽는 것을 확인하였다.

[0099] 예비 실험 결과에서 200 μl + 금나노로드 40 μl 용액을 처리한 경우, 세포는 광열 치료 전에 건강하지 않은 형태로 변하였다(데이터 미기재). 일반적으로 광열치료에서 온도가 45℃ 이상 너무 높아지게 되면 세포 뿐만 아니라 조직에도 손상을 줄 수 있다. 따라서 200 μl + 금나노로드 40 μl는 광열치료 조건을 최적화 하기에 적절하지 않다고 판단하였다.

[0100] 한편, 칩 내에서 교아종세포와 유방암 세포를 하루 동안 배양하고 마찬 가지로 NIR 레이저를 조사하고 라이브/

데드 어세이로 확인한 결과 대부분의 세포가 광열 효과에 의해 죽는 것을 확인하였다.

[0102] *3D 미세유체 장치 내 암 세포의 공동-배양*

[0103] 유방암세포 및 교아종세포를 각각 다른 미세챔버에 주입하고 공동-배양하였다. 혈관 내피세포는 젤라틴 메타크릴레이트 하이드로젤에 캡슐화 하여 십자가 형태의 미세유체 채널에 주입하였다. 미세유체 채널에 주입된 GelMA 하이드로젤을 물리적 장벽이 되어 각 암세포 및 이들의 배양 배지는 교차-오염이 일어나지 않았다. VEGF를 포함하고 있는 혈관 내피세포 배양액을 미세유체 채널을 통해 흘려보낸 결과, 암세포(U87MG)가 혈관 내피세포 쪽으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다(도 7).

[0105] 참고문헌

[0106] 1. Madajewicz S, Chowhan N, Tfayli A, Roque C, Meek A, Davis R, Wolf W, Cabahug C, Roche P, Manzione J *et al*: *Cancer* 2000, 88(10):2350-2356.

[0107] 2. Kesari S: *Seminars in oncology* 2011, 38 Suppl 4:S2-10.

[0108] 3. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C *et al*: *Genes & development* 2007, 21(21):2683-2710.

[0109] 4. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, Gray JW, Naber SP, Weinberg RA: *Nature genetics* 2005, 37(10):1047-1054.

[0110] 5. Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL, Cooper CR: *Clinical & experimental metastasis* 2008, 25(4):305-324.

[0111] 6. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL: *Nature* 2006, 444(7120):761-765.

[0112] 7. Fang J, Chen YC: *Current pharmaceutical design* 2013, 19(37):6622-6634.

[0113] 8. Cobley CM, Chen J, Cho EC, Wang LV, Xia Y: *Chemical Society reviews* 2011, 40(1):44-56.

[0114] 9. Stone J, Jackson S, Wright D: *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology* 2011, 3(1):100-109.

[0115] 10. Alkilany AM, Thompson LB, Boulos SP, Sisco PN, Murphy CJ: *Advanced drug delivery reviews* 2012, 64(2):190-199.

[0116] 11. Letfullin RR, Joenathan C, George TF, Zharov VP: *Nanomedicine* 2006, 1(4):473-480.

[0117] 12. Terentyuk GS, Maslyakova GN, Suleymanova LV, Khlebtsov NG, Khlebtsov BN, Akchurin GG, Maksimova IL, Tuchin VV: *Journal of biomedical optics* 2009, 14(2):021016.

[0118] 13. von Maltzahn G, Park JH, Agrawal A, Bandaru NK, Das SK, Sailor MJ, Bhatia SN: *Cancer research* 2009, 69(9):3892-3900.

[0119] 14. Zhang Z, Wang L, Wang J, Jiang X, Li X, Hu Z, Ji Y, Wu X, Chen C: *Advanced materials* 2012, 24(11):1418-1423.

[0120] 15. Lee JM, Kim JE, Borana J, Chung BH, Chung BG: *Electrophoresis* 2013, 34(13):1931-1938.

[0121] 16. Chung BG, Lin F, Jeon NL: *Lab on a chip* 2006, 6(6):764-768.

[0122] 17. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A *et al*: *Nature* 2007, 450(7173):1235-1239.

[0123] 18. Hyun KA, Kwon K, Han H, Kim SI, Jung HI: *Biosensors & bioelectronics* 2013, 40(1):206-212.

[0124] 19. Sung JH, Kam C, Shuler ML: *Lab on a chip* 2010, 10(4):446-455.

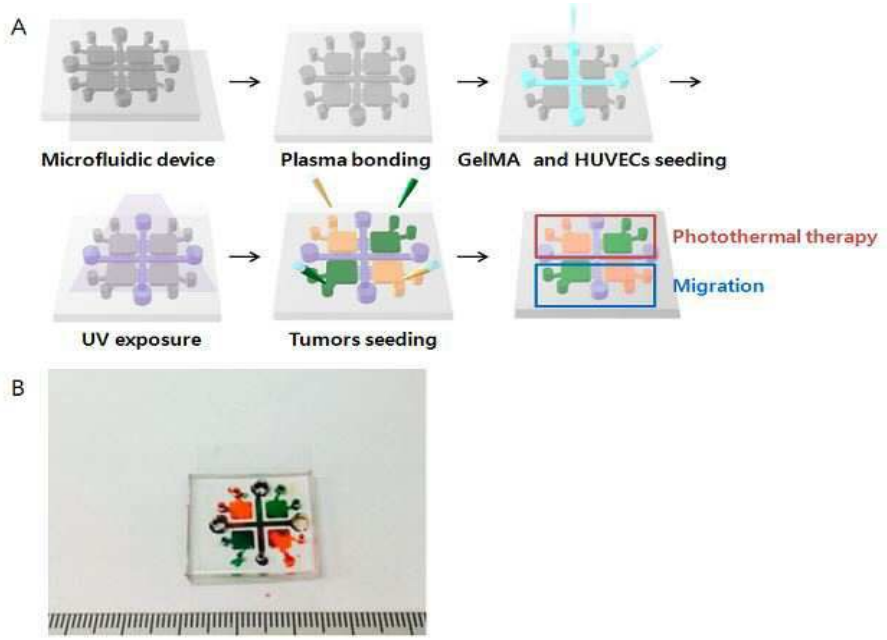
[0125] 20. Chung S, Sudo R, Mack PJ, Wan CR, Vickerman V, Kamm RD: *Lab on a chip* 2009, 9(2):269-275.

[0126] 21. Shin Y, Han S, Jeon JS, Yamamoto K, Zervantonakis IK, Sudo R, Kamm RD, Chung S: *Nature protocols* 2012, 7(7):1247-1259.

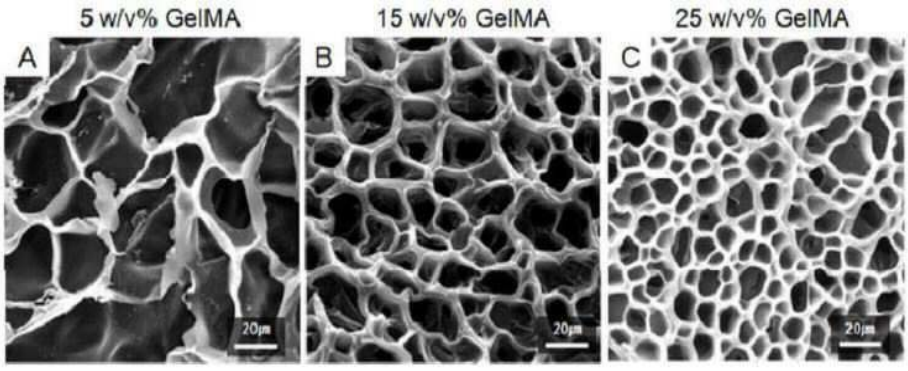
[0128] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

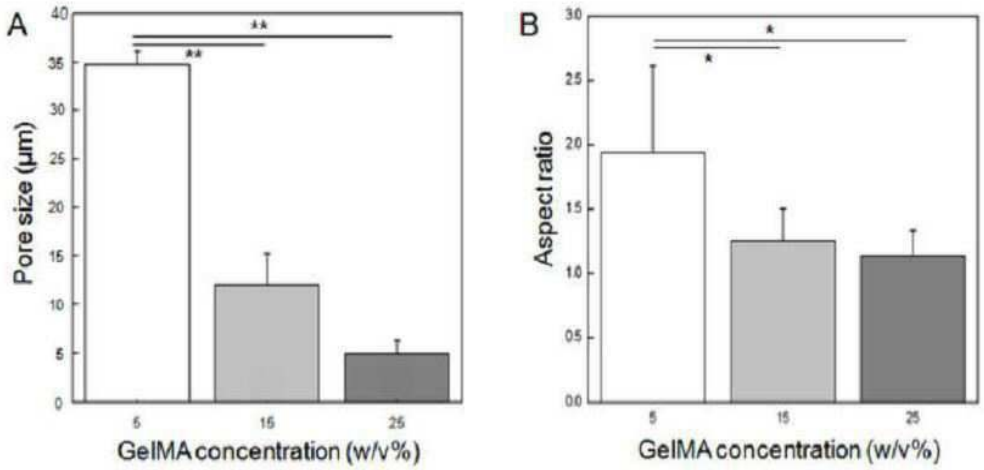
도면1



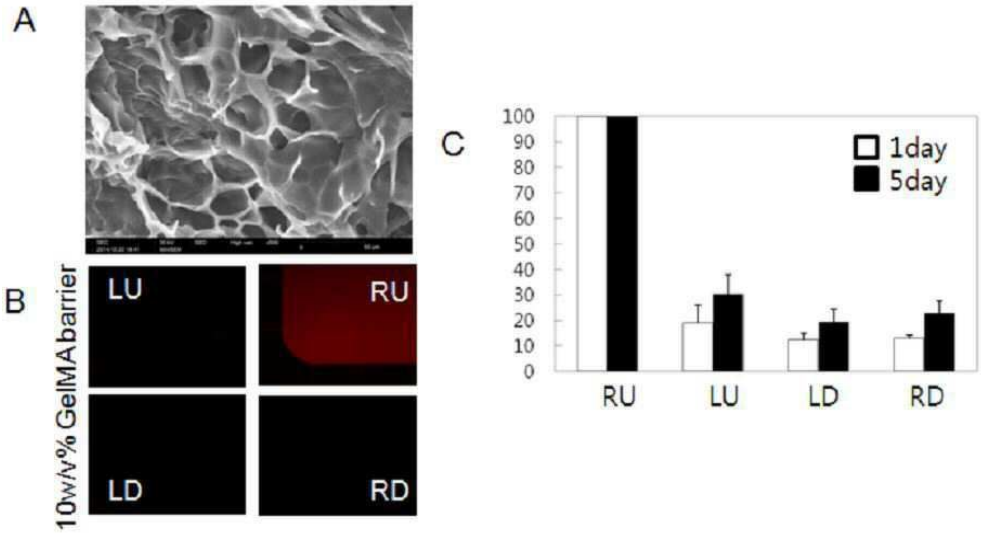
도면2



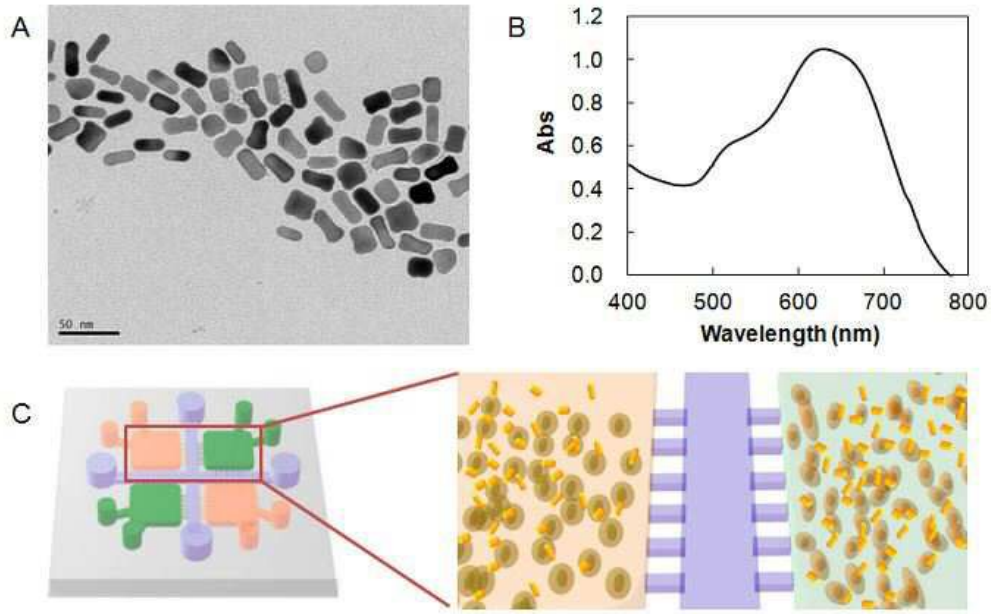
도면3


A
Pore size (μm)
GelMA concentration (w/v%)
B
Aspect ratio
GelMA concentration (w/v%)

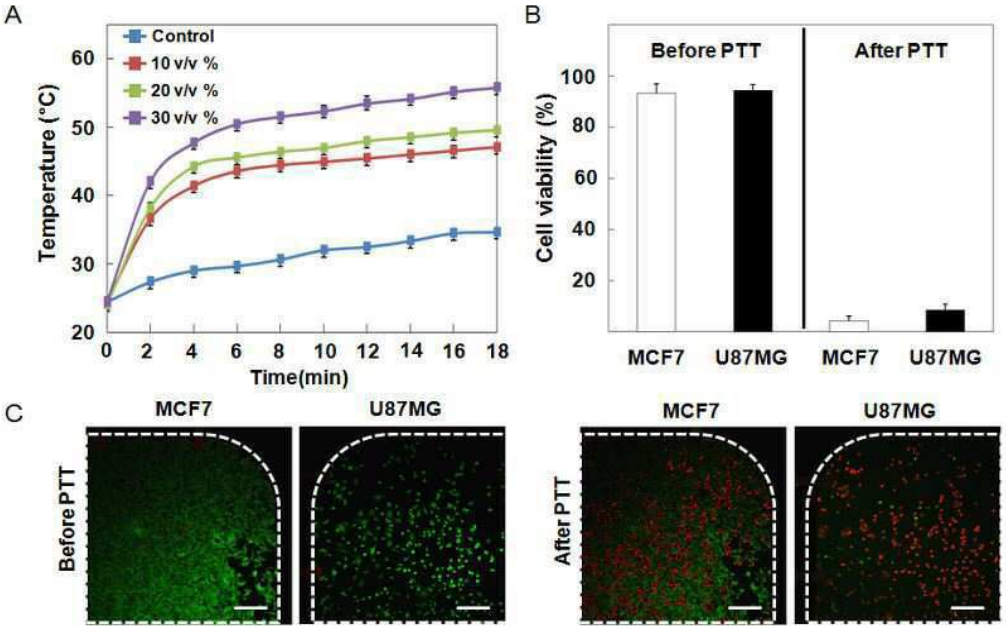
도면4


A
B
10w/v% GelMA barrier
LU
RU
LD
RD
C
1day
5day
RU
LU
LD
RD

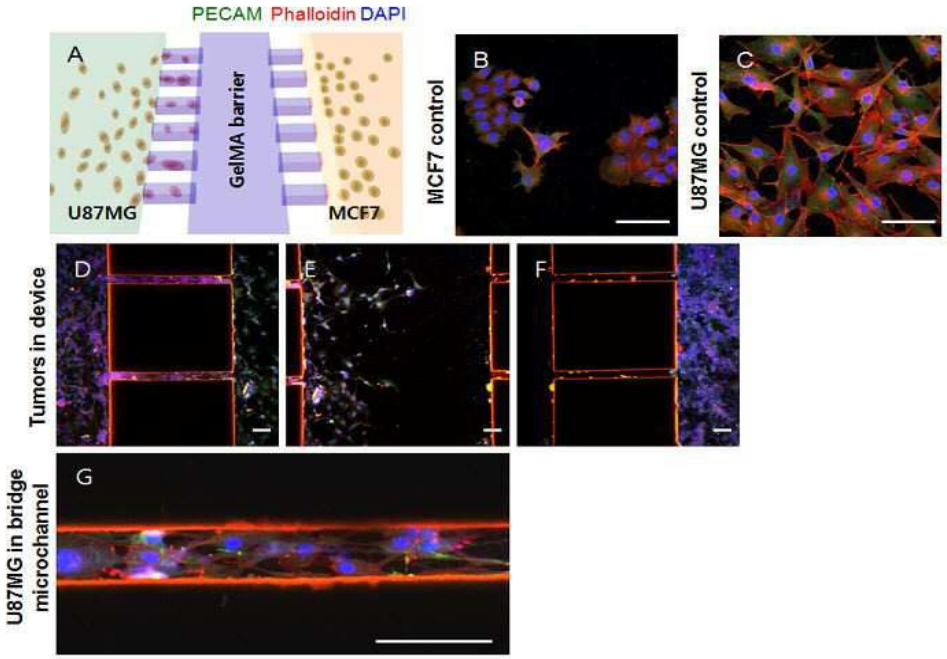
도면5


A
50 nm
B
Abs
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
400
500
600
700
800
Wavelength (nm)
C

도면6


A
Control
10 v/v %
20 v/v %
30 v/v %
Temperature (°C)
60
50
40
30
20
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Time(min)
B
Before PTT
After PTT
Cell viability (%)
100
80
60
40
20
MCF7
U87MG
MCF7
U87MG
C
MCF7
U87MG
MCF7
U87MG
Before PTT
After PTT

도면7


PECAM Phalloidin DAPI
A
GelMA barrier
U87MG
MCF7
B
MCF7 control
C
U87MG control
Tumors in device
D
E
F
U87MG in bridge microchannel
G