



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0040407  
(43) 공개일자 2018년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/071 (2010.01) C12M 1/00 (2006.01)  
C12M 3/06 (2006.01) C12N 5/077 (2010.01)

(52) CPC특허분류  
C12N 5/0698 (2013.01)  
C12M 23/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0132272  
(22) 출원일자 2016년10월12일  
심사청구일자 2016년10월12일

(71) 출원인  
홍익대학교 산학협력단  
서울특별시 마포구 와우산로 94 (상수동)

(72) 발명자  
성종환  
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 110동 2201호  
(신천동, 파크리오)

이소진  
서울특별시 마포구 와우산로18길 38, 302호 (서교동)

곽봉신  
서울특별시 은평구 은평터널로13길 9-12, 301호  
(신사동)

(74) 대리인  
안병규

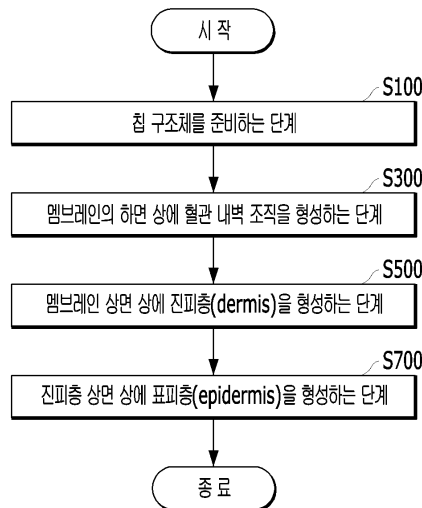
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 피부조직과 혈관을 모사한 무펍프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법

(57) 요약

피부조직과 혈관을 모사한 무펍프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법이 개시되며, 상기 피부조직과 혈관을 모사한 무펍프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법은, (a) 수평으로 배치되는 멤브레인에 의해 내부가 상부와 하부로 분리되는 챔버, 상기 챔버의 일측 및 타측 각각에 형성되는 제1 리저버와 제2 리저버, 및 유체가 이동 가능하도록 제1 리저버, 상기 챔버의 하부 및 상기 제2 리저버를 연결하는 채널을 포함하는 미세유체 스킨칩을 준비하는 단계; (b) 상기 멤브레인의 하면 상에 혈관 내벽 조직을 형성하는 단계; (c) 상기 멤브레인의 상면 상에 진피층(dermis)을 형성하는 단계; 및 (d) 상기 진피층의 상면 상에 표피층(epidermis)을 형성하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*C12M 23/20* (2013.01)

*C12N 5/0629* (2013.01)

*C12N 5/0656* (2013.01)

*C12N 5/069* (2013.01)

*C12N 2533/54* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S2272211

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 중소기업정보기술 진흥원

연구사업명 중소기업청 융복합기술개발사업

연구과제명 나노, 바이오 융합기술 기반 동물대체 스킨 온어 칩의 개발

기여율 1/1

주관기관 다인바이오

연구기간 2015.06.16 ~ 2017.06.15

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법으로서,

(a) 수평으로 배치되는 멤브레인에 의해 내부가 상부와 하부로 분리되는 챔버, 상기 챔버의 일측 및 타측 각각에 형성되는 제1 리저버와 제2 리저버, 및 유체가 이동 가능하도록 제1 리저버, 상기 챔버의 하부 및 상기 제2 리저버를 연결하는 채널을 포함하는 미세유체 스킨칩을 준비하는 단계;

(b) 상기 멤브레인의 하면 상에 혈관 내벽 조직을 형성하는 단계;

(c) 상기 멤브레인의 상면 상에 진피층(dermis)을 형성하는 단계; 및

(d) 상기 진피층의 상면 상에 표피층(epidermis)을 형성하는 단계를 포함하는, 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계는,

(b1) 상기 멤브레인의 하면을 코팅물질로 코팅하는 단계;

(b2) 상기 멤브레인의 하면 상에 HUVEC(혈관 내피 세포)를 배치하는 단계; 및

(b3) 상기 제1 리저버, 상기 챔버의 상부 및 상기 제2 리저버를 매지로 채워두는 단계를 포함하는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 (b1) 단계는,

상기 제1 리저버 및 상기 제2 리저버 중 하나에 코팅물질을 주입하여 상기 챔버의 하부를 코팅물질로 소정의 시간 동안 채워두는 단계; 및

상기 미세유체 스킨칩의 내부를 워싱(washing)하는 단계를 포함하는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 미세유체 스킨칩의 내부를 워싱하는 단계는,

상기 채널에 PBS 및 EGM-2MV를 순차적으로 흘려주는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 5

제2항에 있어서,

상기 (b2) 단계는,

상기 챔버의 하부를 HUVEC 포함 액체로 채우는 단계; 및

상기 챔버의 하부가 상측을 향하도록, 상기 미세유체 스킨칩을 뒤집는 단계를 포함하는 것인, 피부조직과 혈관

을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서,

상기 챔버의 하부를 HUVEC 포함 액체로 채우는 단계는,

상기 제1 리저버 및 상기 제2 리저버 중 하나에 HUVEC 포함 액체가 주입된 후, 나머지 하나로 HUVEC 포함 액체가 배출되면, 상기 챔버의 하부가 HUVEC 포함 액체로 채워진 것으로 판단하는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

**청구항 7**

제2항에 있어서,

상기 (b3) 단계에서, 상기 제1 리저버, 상기 챔버의 상부 및 상기 제2 리저버에 채워지는 배지는 EGM-2MV인 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

**청구항 8**

제2항에 있어서,

상기 (b) 단계는,

(b4) 상기 (b3) 단계의 상태에서 미리 설정된 시간 동안 배지의 흐름 없이 배양이 이루어지는 단계; 및

(b5) 상기 (b4) 단계 이후 상기 미세유체 스킨칩 내에서 배지의 흐름을 형성시키며 배양이 이루어지는 단계를 더 포함하는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

상기 (b5) 단계 이후에, 상기 (c) 단계의 수행을 위해, 상기 (b3) 단계에서 제1 리저버, 상기 챔버의 상부 및 상기 제2 리저버를 채웠던 배지가 적어도 일부 제거되는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

**청구항 10**

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계는,

(c1) 상기 멤브레인의 상면을 콜라겐 혼합물로 코팅하는 단계;

(c2) 코팅된 상기 콜라겐 혼합물의 상면 상에 Fibroblast(섬유아세포)가 혼합된 셀룰러 콜라겐 혼합물을 주입하여 굳히는 단계; 및

(c3) 상기 굳은 셀룰러 콜라겐 혼합물 상에 배지를 채우고, 상기 제1 리저버 및 상기 제2 리저버를 배지로 채우는 단계를 포함하는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

상기 (c) 단계에서,

상기 콜라겐 혼합물은, 콜라겐, 10X DMEM media, 0.5N NaOH 및 DMEM 배지를 섞은 혼합물인 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서,

상기 (c) 단계에서,

상기 셀룰러 콜라겐 혼합물은, 콜라겐, 10X DMEM media, 0.5N NaOH 및 Fibroblast를 섞은 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 13

제10항에 있어서,

상기 (c3) 단계에서, 상기 셀룰러 콜라겐 혼합물 상에 채워지는 배지는 DMEM인 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 14

제10항에 있어서,

상기 (c3) 단계에서, 상기 제1 리저버 및 상기 제2 리저버에 채워지는 배지는 EGM-2MV인 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 15

제10항에 있어서,

상기 (c) 단계는,

상기 (c3) 단계 이후에,

(c4) 상기 미세유체 스킨칩 내에서 배지의 흐름을 형성시키며 배양이 이루어지는 단계를 더 포함하는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서,

상기 (c4) 단계 이후에, 상기 (d) 단계의 수행을 위해, 상기 (c3) 단계에서 상기 셀룰러 콜라겐 혼합물 상에 채워졌던 배지 및 상기 제1 리저버와 상기 제2 리저버를 채웠던 배지가 제거되는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 17

제1항에 있어서,

상기 (d) 단계는,

(d1) 상기 진피층 상에 Keratinocyte의 cell line이 혼합된 cell suspension을 주입하는 단계;

(d2) 주입된 상기 cell suspension의 Keratinocyte의 cell line 상에 배지를 채우고, 상기 제1 리저버 및 상기 제2 리저버를 배지로 채우는 단계를 포함하되,

상기 (d2) 단계는 상기 (d1) 단계로부터 미리 설정된 시간 이후에 수행되는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서,

상기 (d) 단계에서, 상기 cell line은 HaCaT인 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

#### 청구항 19

제17항에 있어서,

상기 (d2) 단계는,

소정의 시간 동안, 상기 cell suspension의Keratinocyte의 cell line 상에DMEM을 채워두고 상기 제1 리저버 및 상기 제2 리저버를 EGM-2MV로 채워두는 단계; 및

소정의 시간 이후에, 상기 cell suspension의Keratinocyte의 cell line 상에 DMEM과 Ca<sup>2+</sup>를 채워두고 상기 제1 리저버 및 상기 제2 리저버를 EGM-2MV로 채워두는 단계를 포함하는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

**청구항 20**

제17항에 있어서,

상기 (d) 단계는,

상기 (d2) 단계 이후에,

(d3) 상기 cell suspension의Keratinocyte의 cell line 상에 채워진 배지 및 상기 제1 리저버 및 상기 제2 리저버를 채우는 배지의 적어도 일부를 제거하고, 상기 미세유체 스킨칩 내에서의 배지의 흐름을 형성시키며, 상기 cell suspension의 Keratinocyte의 cell line을 공기 노출(Air exposure)시키는 단계를 더 포함하는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

**청구항 21**

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계는, 상기 (c) 단계의 전 또는 상기 (d) 단계의 후에 수행되는 것인, 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법.

**청구항 22**

피부 모델로서,

수평으로 배치되는 멤브레인에 의해 내부가 상부와 하부로 분리되는 챔버, 상기 챔버의 일측 및 타측 각각에 형성되는 제1 리저버와 제2 리저버, 및 유체가 이동 가능하도록 제1 리저버, 상기 챔버의 하부 및 상기 제2 리저버를 연결하는 채널을 포함하는 미세유체 스킨칩;

상기 멤브레인의 하면 상에 형성되는 혈관 내벽 조직;

상기 멤브레인의 상면 상에 형성되는 진피층; 및

상기 진피층의 상면 상에 형성되는 표피층을 포함하는, 피부 모델.

**청구항 23**

제22항에 있어서,

상기 혈관 내벽 조직은 HUVEC(혈관 내피 세포)가 배양되어 형성되는 것인, 피부 모델.

**청구항 24**

제22항에 있어서,

상기 진피층은 Fibroblast(섬유아세포)가 배양되어 형성되는 것인, 피부 모델.

**청구항 25**

제24항에 있어서,

상기 진피층은 상기 멤브레인 상에 Fibroblast(섬유아세포)가 혼합된 셀룰러 콜라젠 혼합물이 주입되어 형성되는 것인, 피부 모델.

**청구항 26**

제25항에 있어서,

상기 셀룰러 콜라겐 혼합물은, 콜라겐, 10X DMEM media, 0.5N NaOH 및 Fibroblast를 섞은 것인, 피부 모델.

**청구항 27**

제22항에 있어서,

상기 표피층은 Keratinocyte의 cell line이 배양되어 형성되는 것인, 피부 모델.

**청구항 28**

제27항에 있어서,

상기 cell line은 HaCaT인 것인, 피부 모델.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본원은 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 피부는 몸의 가장 바깥에서 체내의 수분, 전해질 및 단백질이 소실되는 것을 막아주면서, 체온 조절, 피부의 감각 기능, 면역 기능 등 여러 가지 역할을 동시에 수행하는 인체의 중요 기관이다. 피부는 크게 표피와 진피층으로 나눌 수 있다. 표피는 피부의 보습 및 보호를 담당하는 중요한 기능을 하고, 조직의 수분 소실과 손상을 방어한다. 진피층은 약 2-3mm의 두께를 가지며 피부 부피의 대부분을 차지하고 있다. 진피층은 기질, 콜라겐, 엘라스틴 등으로 이루어져 있어서 혈관, 신경 등의 다양한 부속물을 지지해주는 결합조직이다.

[0003] 구체적으로, 표피는 각질층(stratum corneum), 과립층(stratum granulosum), 가시층(stratum spinosum) 및 기저층(stratum basale)의 다섯층으로 구성되어 있다. 또한, 표피의 대부분은 각질세포(keratinocyte)이며, 그 외에 면역 기능을 담당하는 랑게르한스세포(Langerhans cell)와 피부 색소를 만드는 멜라닌세포(melanocyte)가 표피를 구성한다. 또한, 진피는 주로 콜라겐, 면역세포 및 fibroblast(섬유아세포)로 이루어져 있고 모세관 및 기타 혈관의 네트워크를 통해 표피에 영양소를 공급한다.

[0004] 세계 화장품 시장 규모가 매년 꾸준히 증가하고 있는 현재의 상황에서, 화장품은 매일 일정량이 사용되고 피부에 직접적으로 사용되므로 의약품 이상으로 안전성이 보장되어야 하지만 정확한 평가 방법의 부재로 안전성 및 효능에 대한 정확한 예측이 어렵다. 화장품의 안전성 평가를 위해 동물 모델이 사용되어 왔으나 윤리적인 문제, 비용, 시간 등의 문제점이 있었고, 동물 모델은 인체와 차이가 있기 때문에 평가 결과의 예측이 정확하지 않다는 문제점이 있었다. 또한, 2009년 EU가 화장품법에 의해 화장품 평가 시 동물 실험을 금지시켰으며 2013년 3월부터 모든 동물 실험이 금지되었고 일본, 미국 등 타 선진국도 비슷한 추세를 보이고 있으며, 국내에서도 화장품에 대한 동물 실험을 제한하는 법안이 통과 되었다. 이 법안은 식품의약품안전처에서 공식적으로 받아들인 대체시험이 있는 경우 동물 실험을 하지 못하도록 하는 내용을 포함한다. 따라서 대체시험법 개발에 대한 수요가 증가하고 있다.

[0005] 그런데, 동물 실험을 대체하기 위한 기존 in vitro assay 는 인체 내에서 관찰되는 여러 메커니즘 한가지 혹은 일부만 관찰하여 평가하는 한계가 있다. 피부 안정성 평가를 위해서는 피부 표피와 진피 조직, 혈관을 통한 물질 이동 등이 동시에 구현된 모델 시스템이 필요하다. 그런데, Dish를 이용한 일반적인 세포배양환경에서는 피부조직의 특성을 재현할 수 없다. 예를 들면 표피세포의 분화도가 낮을 수 있고, 혈관 구조가 없기 때문에 혈관을 통한 물질의 이동 및 반응을 모사할 수 없다는 한계가 있다.

[0006] 따라서, 보다 생리적 유사성이 높은 피부의 3차원적인 조직구조 모델이 개발되어야 할 필요가 있었다.

[0007] 이와 관련해, 피부의 표피와 진피구조를 재현하기 위한 종래의 대표적인 방법은 세포배양 용기인 transwell에서 Type I collagen 내부에 섬유아세포 (fibroblast)를 포함한 지지체를 만들고 그 위에 표피세포를 분화시키는 것이다.

[0008] 보다 구체적으로, 상술한 바와 같이, 피부는 표피(epidermis)와 진피(dermis)로 구성되어 있고, 일반적으로 진

피의 세포의 기질(extracellular matrix, ECM)의 대부분은 콜라젠과 같은 구조 단백질(structural proteins)이 주를 이루며, 다당류(polysaccharides), 그리고 세포의 부착을 돕는 부착 단백질 (adhesive proteins)이 고정되어 있으며, 성장인자(growth factors) 등 다양한 생화학적 인자들이 이동하며 분포되어 있다. 종래의 방법은 ECM의 주성분인 Type I collagen 내부에 섬유아세포(fibroblast)를 포함하여 피부 dermis를 모사한다. 그리고 피부 dermis를 모사한 collagen 위에 표피세포를 배양하여 피부 epidermis를 모사한다.

[0009] 그런데, 종래의 피부 모델에 의하면, 실제 표피의 3차원적인 조직 구조가 재현되어 있지 않고, 피부조직의 분화도가 제한되어 있으며(표피층 형성 및 분화의 정도가 실제 피부에 비해 부족함), 다양한 피부의 조직 사이의 상호작용을 구현되어 있지 않는 문제(예를 들어 혈관 구조가 없기 때문에 혈관을 통해 피부 조직으로 이동하는 물질 및 혈관을 통한 물질의 피부 반응을 모사할 수 없음)이 있고, 면역세포가 없기 때문에 면역반응을 재현할 수 없다는 단점이 있었다. 즉, 현재 개발되어진 인공 피부 모델은 피부의 메커니즘 중 일부만 구현하여 피부 조직간의 다양한 상호작용을 구현할 수 없다는 단점이 있다.

[0010] 종래의 피부 모델과 관련된 기술은 Sung et al., Microfabricated mammalian organ systems and their integration into models of whole animals and humans, Lab on a chip, 2013, 13, p1201에 개시되어 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0011] 본원은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 실제 인체 조직의 3차원적인 구조와 배치를 모사하고 실제 피부와 유사성이 높은 피부 모델을 구현할 수 있는 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 피부를 구성하는 다양한 세포를 동시에 배양하는 다중세포배양 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 다만, 본원의 실시예가 이루고자 하는 기술적 과제는 상기된 바와 같은 기술적 과제들로 한정되지 않으며, 또 다른 기술적 과제들이 존재할 수 있다.

**과제의 해결 수단**

[0013] 상기한 기술적 과제를 달성하기 위한 기술적 수단으로서, 본원의 제 1 측면에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법은, (a) 수평으로 배치되는 멤브레인에 의해 내부가 상부와 하부로 분리되는 챔버, 상기 챔버의 일측 및 타측 각각에 형성되는 제1 리저버와 제2 리저버, 및 유체가 이동 가능하도록 제1 리저버, 상기 챔버의 하부 및 상기 제2 리저버를 연결하는 채널을 포함하는 미세유체 스킨칩을 준비하는 단계; (b) 상기 멤브레인의 하면 상에 혈관 내벽 조직을 형성하는 단계; (c) 상기 멤브레인의 상면 상에 진피층(dermis)을 형성하는 단계; 및 (d) 상기 진피층의 상면 상에 표피층(epidermis)을 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0014] 본원의 제2 측면에 따른 피부 모델은, 수평으로 배치되는 멤브레인에 의해 내부가 상부와 하부로 분리되는 챔버, 상기 챔버의 일측 및 타측 각각에 형성되는 제1 리저버와 제2 리저버, 및 유체가 이동 가능하도록 제1 리저버, 상기 챔버의 하부 및 상기 제2 리저버를 연결하는 채널을 포함하는 미세유체 스킨칩; 상기 멤브레인의 하면 상에 형성되는 혈관 내벽 조직; 상기 멤브레인의 상면 상에 형성되는 진피층; 및 상기 진피층의 상면 상에 형성되는 표피층을 포함할 수 있다.

[0015] 상술한 과제 해결 수단은 단지 예시적인 것으로서, 본원을 제한하려는 의도로 해석되지 않아야 한다. 상술한 예시적인 실시예 외에도, 도면 및 발명의 상세한 설명에 추가적인 실시예가 존재할 수 있다.

**발명의 효과**

[0016] 전술한 본원의 과제 해결 수단에 의하면, 멤브레인의 하면 상에 혈관 내벽 조직이 형성되고, 멤브레인의 상면 상에 진피층이 형성되며, 진피층의 상면 상에 표피층이 형성될 수 있어, 실제 인체 조직의 3차원적인 구조와 배치를 모사하고, 실제 피부와 유사성이 높은 피부 모델이 구현될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0017] 도 1은 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펌프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법의 개략적인 순서도이다.

도 2는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, 미세유체 스킨칩의 개략적인 단면도이다.

도 3a는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, 멤브레인의 하면을 콜라젠으로 코팅하는 단계를 설명하기 위한 개략적인 단면도이다.

도 3b는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, 멤브레인의 하면 상에 HUVEC(혈관 내피 세포)를 배치하는 단계를 설명하기 위한 개략적인 개념도이다.

도 4a는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, 멤브레인의 상면을 콜라젠 혼합물로 코팅하는 단계를 설명하기 위한 개략적인 단면도이다.

도 4b는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, 코팅된 콜라젠 혼합물의 상면 상에 Fibroblast(섬유아세포)가 혼합된 셀룰러 콜라젠 혼합물을 주입하여 굳히는 단계를 설명하기 위한 개략적인 단면도이다.

도 5a는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, Keratinocyte의 cell line이 혼합된 cell suspension을 주입하는 단계를 설명하기 위한 개략적인 개념도이다.

도 5b 및 도 5c는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, 주입된 cell suspension의 Keratinocyte의 cell line 상에 배지를 채우고, 제1 리저버 및 제2 리저버를 배지(22)로 채우는 단계를 설명하기 위한 개략적인 단면도이다.

도 5d는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, S700 단계의 공기 노출 시키는 단계를 설명하기 위한 개략적인 단면도이다.

도 6은 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법의 다른 구현예를 설명하기 위한 개략적인 순서도이다.

도 7a는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, Master fabrication 단계를 설명하기 위한 개략적인 개념도이다.

도 7b 및 도 7c는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, PDMS layer를 제작하는 단계를 설명하기 위한 개략적인 개념도이다.

도 7d는 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법에 있어서, S100 단계의 Chip bonding 단계를 설명하기 위한 개략적인 개념도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0018] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0019] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 "전기적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다.
- [0020] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에", "상부에", "상단에", "하에", "하부에", "하단에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0021] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0022] 참고로, 본원의 실시예에 관한 설명 중 방향이나 위치와 관련된 용어(상측, 상면, 하측, 하면 등)는 도면에 나타나 있는 각 구성의 배치 상태를 기준으로 설정한 것이다. 예를 들면, 도 2에서 보았을 때 전반적으로 12시 방향이 상측, 전반적으로 12시 방향을 향하는 면이 상면, 전반적으로 6시 방향이 하측, 전반적으로 6시 방향을

향하는 면이 하면 등이 될 수 있다.

- [0023] 이하에서는, 본원의 일 실시예에 따른 피부조직과 혈관을 모사한 무펄프 미세유체 스킨칩의 제작과 다중세포배양 방법(이하 '본 방법'이라 함)에 대해 설명한다.
- [0024] 도 1은 본 방법의 개략적인 순서도이고, 도 2는 본 방법의 미세유체 스킨칩에 있어서, 개략적인 단면도이다.
- [0025] 도 1을 참조하면, 본 방법은, 미세유체 스킨칩(9)을 준비하는 단계(S100)를 포함한다.
- [0026] 도 2에 나타난 바와 같이, 미세유체 스킨칩(9)은 수평으로 배치되는 멤브레인(membrane)(91)에 의해 내부가 상부(921)와 하부(922)로 분리(구획)되는 챔버(92), 챔버(92)의 일측 및 타측 각각에 형성되는 제1 리저버(93)와 제2 리저버(94), 및 유체가 이동 가능하도록 제1 리저버(93), 챔버(92)의 하부(922) 및 제2 리저버(94)를 연결하는 채널(95)을 포함한다.
- [0027] 예시적으로, 멤브레인(91)은 polycarbonate 재질로 이루어질 수 있다. 다른 예로, 멤브레인(91)은 polyester 재질로 이루어질 수 있다. 이러한 멤브레인(91)의 재질 차이에 따라, 후술하는 단계들에서 멤브레인(91)에 대한 콜라겐의 부착 정도에 다소 차이가 생길 수 있다.
- [0028] 또한, 도 1을 참조하면, 본 방법은 멤브레인(91)의 하면 상에 혈관 내벽 조직을 형성하는 단계(S300)를 포함한다.
- [0029] 도 3a는 본 방법에 있어서, 멤브레인의 하면을 콜라겐으로 코팅하는 단계를 설명하기 위한 개략적인 단면도이다.
- [0030] 혈관 내벽 조직을 형성하는 단계(S300)는, 멤브레인(91)의 하면을 코팅물질(11)로 코팅하는 단계를 포함할 수 있다. HUVEC의 멤브레인(91)에 대한 부착력을 증가시키고 confluent monolayer 로 HUVEC를 배양시키기 위해, 멤브레인(91)의 하면이 코팅물질(11)로 코팅될 필요가 있다.
- [0031] 구체적으로, 멤브레인(91)의 하면을 코팅물질(11)로 코팅하는 단계는 도 3a에 나타난 바와 같이, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94) 중 하나에 코팅물질(11)을 주입하여 챔버(92)의 하부(922)를 코팅물질(11)로 소정의 시간 동안 채워두는 단계를 포함할 수 있다.
- [0032] 예시적으로, 코팅물질(11)을 채널(95)의 한 쪽 끝에서 흘러주어 채널(95)의 반대쪽까지 흐른 것이 확인되면(다시 말해, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94) 중 하나에 코팅물질(11)을 주입하여 다른 하나로부터 코팅물질(11)이 배출되는 것이 확인되면), 코팅물질(11)이 챔버(92)의 하부(922)에 채워졌다고 생각할 수 있다. 이에 따라, 코팅물질(11)을 채널(95)의 한 쪽 끝에서 흘러주어 채널(95)의 반대쪽까지 흐른 것을 확인하고 인큐베이터(incubator)에 미세유체 스킨칩(9)을 소정의 시간, 예시적으로, 한 시간 동안 넣어둘 수 있다.
- [0033] 또한, 참고로, 코팅물질(11)은 70 ug/ml가 미세유체 스킨칩(9) 내로 주입될 수 있다. 또한, 코팅물질(11)은 Type I collagen일 수 있다. 다만, 코팅물질(11)의 종류는 이에 한정되지 않으며, Type I collagen이외에 다른 종류의 콜라겐 및 다른 종류의 하이드로젤이 코팅물질(11)로 적용될 수 있다.
- [0034] 또한, 멤브레인(91)의 하면을 코팅물질(11)로 코팅하는 단계는, 미세유체 스킨칩(9)의 내부를 워싱(washing)하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0035] 미세유체 스킨칩(9)의 내부를 워싱하는 단계는 채널(5)에 PBS 및 EGM-2MV를 순차적으로 흘려줄 수 있다. 이러한 워싱하는 단계는 챔버(92)의 하부(922)가 코팅물질(11)로 채워졌던 소정의 시간 이후에 수행될 수 있다.
- [0036] 도 3b는 본 방법에 있어서, 멤브레인의 하면 상에 HUVEC(혈관 내피 세포)를 배치하는 단계를 설명하기 위한 개략적인 개념도이다.
- [0037] 혈관 내벽 조직을 형성하는 단계(S300)는 멤브레인(91)의 하면 상에 HUVEC(혈관 내피 세포)(111)를 배치하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0038] 멤브레인(91)의 하면 상에 HUVEC(111)를 배치하는 단계는 도 3b를 참조하면, 챔버(92)의 하부(922)를 HUVEC 포함 액체(12)로 채우는 단계를 포함할 수 있다. 예시적으로, 챔버(92)의 하부(922)를 HUVEC 포함 액체(12)로 채우는 단계는 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94) 중 하나에 HUVEC 포함 액체(12)가 주입된 후, 나머지 하나로 HUVEC 포함 액체(12)가 배출되면 챔버(92)의 하부(922)가 HUVEC 포함 액체(12)로 채워진 것으로 판단할 수 있다. 다시 말해, 채널(95)의 한쪽 끝에서 HUVEC 포함 액체(12)를 흘러주어 반대쪽 채널(95)의 끝에서 HUVEC 포함 액체(12)가 흐르는 것이 확인되면, 챔버(92)의 하부(922)가 HUVEC 포함 액체(12)로 채워진 것으로 판단할

수 있다.

- [0039] 멤브레인(91)의 하면 상에 HUVEC(111)를 배치하는 단계는, 7.5x10<sup>4</sup>cells, 250-300ul의 HUVEC 포함 액체(12)로 챔버(92)의 하부(922)를 채울 수 있다.
- [0040] 또한, 멤브레인(91)의 하면 상에 HUVEC(111)를 배치하는 단계는 도 3b에 나타난 바와 같이, 챔버(92)의 하부(922)가 상측을 향하도록 미세유체 스킨칩(9)을 뒤집는 단계를 포함할 수 있다.
- [0041] 상술한 바와 같이, 채널(95)의 한쪽 끝에서 HUVEC 포함 액체(12)를 흘려주어 반대쪽 채널(95)의 끝에서 HUVEC 포함 액체(12)가 흐르는 것이 확인되면 미세유체 스킨칩(9) 내부의 배지(상술한 PBS, EGM-2MV 등)를 제거하고 미세유체 스킨칩(9)을 최대한 빨리 뒤집을 수 있다. 또한, 미세유체 스킨칩(9)이 뒤집어진 상태로 인큐베이터에서 소정의 시간 동안 있을 수 있게 한다. 예시적으로, 미세유체 스킨칩(9)은 뒤집어진 상태로 인큐베이터 내에서 1시간 가량 있을 수 있다. 상술한 바와 같은 과정을 통해, HUVEC(111)가 멤브레인(91)의 하면에 붙을 수 있다.
- [0042] 또한, 혈관 내벽 조직을 형성하는 단계(S300)는 제1 리저버(93), 챔버(92)의 상부(921) 및 제2 리저버(94)를 배지로 채워두는 단계를 포함할 수 있다. 이 단계(혈관 내벽 조직을 형성하는 단계(S300)의 제1 리저버(93), 챔버(92)의 상부(921) 및 제2 리저버(94)를 배지로 채워두는 단계)에서 제1 리저버(93), 챔버(92)의 상부(921) 및 제2 리저버(94)에 채워지는 배지는 EGM-2MV일 수 있다. 보다 구체적으로, 미세유체 스킨칩(9)이 인큐베이터로부터 나오면 제1 리저버(92) 및 제2 리저버(92) 각각에 EGM-2MV가 1.5 ml씩 채워질 수 있고, 챔버(92)의 상부, 즉, 멤브레인(91) 상에는 EGM-2MV가 가득 채워질 수 있다.
- [0043] 또한, 혈관 내벽 조직을 형성하는 단계(S300)는 제1 리저버(93), 챔버(92)의 상부(921) 및 제2 리저버(94)를 배지로 채워둔 상태에서 미리 설정된 시간 동안 배지의 흐름 없이 배양이 이루어지는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 혈관 내벽 조직을 형성하는 단계(S300)는 배지의 흐름 없이 배양이 이루어지는 단계 이후에, 미세유체 스킨칩(9) 내에서 배지의 흐름을 형성시키며 배양이 이루어지는 단계를 포함할 수 있다.
- [0044] 예시적으로, 제1 리저버(93), 챔버(92)의 상부(921) 및 제2 리저버(94)에 배지가 채워지면, 하루 동안은 미세유체 스킨칩(9)이 gravity machine 에 올라가지 않은 상태로 배양이 이루어지 그 후 2-3일 동안 미세유체 스킨칩(9)이 gravity machine 위에 올라가 있는 상태로 미세유체 스킨칩(9) 내부에 flow를 줄 수 있다.
- [0045] 또한, 배지의 흐름을 형성시키며 배양이 이루어지는 단계 이후에, 후술하는 진피층을 형성하는 단계(S500)의 수행을 위해, 제1 리저버(93), 챔버(92)의 상부(921) 및 제2 리저버(94)를 배지로 채워두는 단계에서 제1 리저버, 상기 챔버의 상부 및 상기 제2 리저버를 채웠던 배지(EGM-2MV)가 제거될 수 있다.
- [0046] 또한, 도 1을 참조하면, 본 방법은, 멤브레인(91)의 상면 상에 진피층(dermis)을 형성하는 단계(S500)를 포함한다.
- [0047] 도 4a는 본 방법에 있어서, S500 단계의 멤브레인의 상면을 콜라겐 혼합물로 코팅하는 단계를 설명하기 위한 개략적인 단면도이다.
- [0048] 도 4a를 참조하면, S500 단계는, 멤브레인(91)의 상면을 콜라겐 혼합물(13)로 코팅하는 단계를 포함할 수 있다. 콜라겐 혼합물(13)은, 콜라겐, 10X DMEM media, 0.5N NaOH 및 DMEM을 섞은 혼합물일 수 있다. 또한, 이러한 콜라겐 혼합물(13) 30ul 내지 35ul에 의해 멤브레인(91)의 상면이 코팅될 수 있다. 이를 테면, 콜라겐 혼합물(13) 30ul 내지 35ul이 멤브레인(91) 상에 주입될 수 있고, 콜라겐 혼합물(13)이 멤브레인(91) 상에 주입된 미세유체 스킨칩(9)이 인큐베이터 안에서 소정 시간을 보냄으로써, 콜라겐 혼합물(13)이 굳을 수 있다. 예시적으로, 콜라겐 혼합물(13)이 멤브레인(91) 상에 주입된 미세유체 스킨칩(9)은 37°C, 5% 인큐베이터 내에서 20분 정도 위치할 수 있다.
- [0049] 도 4b는 본 방법에 있어서, S500 단계의 코팅된 콜라겐 혼합물의 상면 상에 Fibroblast(섬유아세포)가 혼합된 셀룰러 콜라겐 혼합물을 주입하여 굳히는 단계를 설명하기 위한 개략적인 단면도이다.
- [0050] 또한, S500 단계는, 도 4b를 참조하면, 코팅된 상기 콜라겐 혼합물(13)의 상면 상에 Fibroblast(섬유아세포)가 혼합된 셀룰러 콜라겐 혼합물(14)을 주입하여 굳히는 단계를 포함할 수 있다. 셀룰러 콜라겐 혼합물은, 콜라겐, 10X DMEM media, 0.5N NaOH 및 Fibroblast를 섞은 것일 수 있다. 예시적으로, 셀룰러 콜라겐 혼합물은 콜라겐, 10X DMEM media 및 0.5N NaOH가 혼합되고 마지막으로 Fibroblast(섬유아세포)가 섞여짐으로써 제조될 수 있다. 이때, Fibroblast이 골고루 혼합될 수 있도록 섞어질 수 있다.

- [0051] 또한, S500 단계에서, Fibroblast(섬유아세포)가 혼합된 셀룰러 콜라젠 혼합물은 섬유아세포 이외에 다른 종류의 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fibroblast(섬유아세포)가 혼합된 셀룰러 콜라젠 혼합물은 피부 진피 조직에 있다고 알려진 다른 종류의 세포(예를 들면, 면역세포)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 셀룰러 콜라젠 혼합물(14) 50ul이 코팅된 콜라젠 혼합물(13) 상에 첨가될 수 있다. 이후, 미세유체 스킨칩(9)을 37°C, 5% 인큐베이터 내에 40분 정도 넣어 셀룰러 콜라젠 혼합물(14)을 굳힐 수 있다. 굳어진 셀룰러 콜라젠 혼합물(14)은 gel 형태일 수 있다.
- [0053] 이후, 도 4b에 나타난 바와 같이, S500 단계는 굳은 셀룰러 콜라젠 혼합물(14) 상에 배지(15)를 채우고, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)를 배지(16)로 채우는 단계를 수행할 수 있다. 이 단계에서, 예시적으로, 셀룰러 콜라젠 혼합물(14) 상에 채워지는 배지(15)는 DMEM일 수 있다. 또한, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)에 채워지는 배지(16)는 EGM-2MV일 수 있다.
- [0054] 또한, S500 단계는, 굳은 셀룰러 콜라젠 혼합물(14) 상에 배지(15)를 채우고, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)를 배지(16)로 채우는 단계 이후에, 미세유체 스킨칩(9) 내에서 배지(15, 16)의 흐름을 형성시키며 배양이 이루어지는 단계를 포함할 수 있다.
- [0055] 즉, 셀룰러 콜라젠 혼합물(14)이 굳도록 인큐베이터에 넣어졌던 미세유체 스킨칩(9)이 인큐베이터로부터 꺼내진 후, Fibroblast 및 그와 섞인 셀룰러 콜라젠 혼합물은 5 내지 7일 동안 수축하고 그 후에 수축이 안정화되므로, 5 내지 7일 동안 EGM-2MV(16)를 제1 및 제2 리저버(93, 94) 각각에 1500ul씩 주입하고, DMEM(배지)(15)을 굳은 셀룰러 콜라젠 혼합물(14) 상에 챔버(92)의 상부(921)가 가득 차도록 채운 후, 미세유체 스킨칩(9)을 gravity machine (10ul/min)에 올려 flow를 주면서 배양시킬 수 있다.
- [0056] 또한, 본 방법에 있어서, 배지(15, 16)의 흐름을 형성시키며 배양이 이루어지는 단계 이후에, 후술할 진피층 상면 상에 표피층(epidermis)을 형성하는 단계(S700)를 수행하기 위해, S500 단계 중 굳은 셀룰러 콜라젠 혼합물(14) 상에 배지(15)를 채우고 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)를 배지(16)로 채우는 단계에서, 셀룰러 콜라젠 혼합물(14) 상에 채워졌던 배지(15)가 제거되고 제1 리저버(93)와 제2 리저버(94)를 채웠던 배지(16)가 적어도 일부 제거될 수 있다.
- [0057] 셀룰러 콜라젠 혼합물(14) 상에 채워졌던 배지(15) 및 제1 리저버(93)와 제2 리저버(94)를 채웠던 배지(16)는, 표피층을 형성하는 단계(S700)에서 표피세포가 직접적으로 굳은 셀룰러 콜라젠 혼합물(14)에 시딩될 수 있도록 표피세포 배양 20분 전(다시 말해, S700 단계가 수행되기 20분 전)에 적어도 일부 제거될 수 있다. 그 결과, 제1 리저버(93)와 제2 리저버(94)에는 EGM-2MV가 350-400  $\mu$ l 정도만 채워질 수 있다. 상술한 바와 같은 S500 단계의 수행에 의해, 멤브레인(91)의 상면 상에 진피층이 형성될 수 있다.
- [0058] 또한, 도 1을 참조하면, 본 방법은, 진피층의 상면 상에 표피층(epidermis)(S700)을 형성하는 단계를 포함한다.
- [0059] 도 5a는 본 방법에 있어서, S700 단계의 Keratinocyte의 cell line이 혼합된 cell suspension을 주입하는 단계를 설명하기 위한 개략적인 개념도이다.
- [0060] 도 5a를 참조하면, S700은 상기 S500 단계를 통해 형성된 진피층 상에 Keratinocyte의 cell line(세포주)이 혼합된 cell suspension(18)을 주입하는 단계를 포함할 수 있다. 참고로, Keratinocyte는 표피세포 중 각질화 능력을 갖는 세포로 표피세포의 대부분을 차지한다. 또한, S700 단계에서, cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line은 HaCaT일 수 있다. 또는, 동물의 피부 또는 인체의 피부에서 추출한 keratinocyte 또는 줄기세포가 Keratinocyte의 cell line으로 이용될 수 있다.
- [0061] 또한, cell suspension(18)은 5x10<sup>5</sup>cells 이 포함된 50ul cell suspension일 수 있다. 또한, S500 단계를 통해 형성된 진피층이라 함은, gel 형태로 굳은 셀룰러 콜라젠 혼합물(14)을 의미할 수 있다.
- [0062] 또한, 상술한 바와 같이, 표피세포가 직접적으로 굳은 셀룰러 콜라젠 혼합물(14)(gel)에 시딩될 수 있도록 S700 단계의 수행 이전(대략 20분 전)에 미세유체 스킨칩(9)에 있는 DMEM을 제거하고 EGM-2MV의 양도 각각의 제1 및 제2 리저버(93, 94) 각각에 350-400  $\mu$ l 정도만 채워지게 할 수 있다.
- [0063] S700 단계의 수행 이전(대략 20분 전)에 미세유체 스킨칩(9)에 있는 DMEM이 제거된 후, 진피층 상에 Keratinocyte의 cell line(세포주)이 혼합된 cell suspension(18)을 주입하는 단계는 도 5a를 참조하면, cell suspension(18)을 굳은 셀룰러 콜라젠 혼합물(14)(gel) 위에 조심스럽게 첨가할 수 있다.
- [0064] 참고로, S700 단계는 cell suspension의 표피세포가 완전히 붙을 수 있도록, 미세유체 스킨칩(9)에 대한 배지

추가 없이 미세유체 스킨칩(9)을 미리 설정된 시간 동안, 예를 들면 60min 동안 37°C, 5% 인큐베이터에 둘 수 있다.

- [0065] 도 5b 및 도 5c는 본 방법에 있어서, S700 단계의 주입된 cell suspension의 Keratinocyte의 cell line 상에 배지를 채우고, 제1 리저버 및 제2 리저버를 배지(22)로 채우는 단계를 설명하기 위한 개략적인 단면도이다.
- [0066] 미세유체 스킨칩(9)을 미리 설정된 시간 동안 인큐베이터에 둔 이후에, S700 단계는 도 5b 및 도 5c를 참조하면, 주입된 상기 cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line 상에 배지(21, 23)를 채우고, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)를 배지(22)로 채우는 단계를 수행할 수 있다.
- [0067] 구체적으로, 도 5b에 나타난 바와 같이, 주입된 cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line 상에는 소정의 시간 동안 DMEM(21)을 채워둘 수 있다. 이 때, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)에는 EGM-2MV(22)가 채워질 수 있다. 예시적으로, EGM-2MV(22)는 제1 및 제2 리저버(93, 94) 각각에 1500ul 씩 채워질 수 있고, DMEM(21)은 챔버(92)의 상부(921)에 가득 채워질 수 있다.
- [0068] 또한, 도 5c에 나타난 바와 같이, 주입된 cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line 상에 배지(21)를 채우고, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)를 배지(22)로 채우는 단계는, 소정의 시간 이후에, 주입된 상기 cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line 상에 소정의 시간 동안 칼슘( $Ca^{2+}$ )이 첨가된 DMEM(21)을 채워둘 수 있다. 이 때, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)에는 EGM-2MV(22)를 채워둘 수 있다.
- [0069] 예시적으로, cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line 상에 DMEM(21)을 채워두는 소정의 시간은 1일 내지 2일일 수 있다. 이 기간에는 표피세포가 gel(셀룰러 콜라겐 혼합물(14)) 상에서 분열과 증식이 일어날 수 있다. 이 후, 약 2일 동안 cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line 상에는 칼슘이 첨가된 DMEM(21)이 채워질 수 있으며, 이에 따라, 표피세포가 분화될 수 있다.
- [0070] 또한, cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line 상에 배지(21, 23)를 채우고, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)를 배지(22)로 채우는 단계가 수행되는 동안에는, 표피세포가 셀룰러 콜라겐 혼합물(14) 상에서 균일하게 배양될 수 있도록 미세유체 스킨칩(9)에 대한 배지의 흐름이 형성되지 않도록 한다. 다시 말해, cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line 상에 배지(21, 23)를 채우고, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)를 배지(22)로 채우는 단계가 수행되는 동안에는, 미세유체 스킨칩(9)은 gravity machine 에 올리지 않도록 함이 바람직하다.
- [0071] 도 5d는 본 방법에 있어서, S700 단계의 공기 노출 시키는 단계를 설명하기 위한 개략적인 단면도이다.
- [0072] 또한, S700 단계는, cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line 상에 배지(21, 23)를 채우고, 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)를 배지(22)로 채우는 단계 이후에, 도 5d를 참조하면, 상기 cell suspension(18)의 Keratinocyte의 cell line 상에 채워진 배지(여기서는, 칼슘이 첨가된 DMEM(23)) 및 제1 리저버(93) 및 제2 리저버(94)를 채우는 배지의 적어도 일부를 제거하고, 미세유체 스킨칩(9) 내에서의 배지의 흐름을 형성시키며, Keratinocyte(18)의 cell line을 공기 노출(Air exposure)시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0073] 보다 구체적으로, 이 단계는, 제1 및 제2 리저버(93, 94)의 EGM-2MV(22) 양을 350ul 내지 400ul로 줄이고 셀룰러 콜라겐 혼합물(14) 위의 칼슘이 첨가된 DMEM(23)을 제거해 7 일 내지 10 일 동안 flow 를 주면서 Air exposure 시킬 수 있다. 이 단계가 수행되는 동안, 표피세포의 분화가 진행될 수 있다.
- [0074] 도 6은 본 방법의 다른 구현예를 설명하기 위한 개략적인 순서도이다.
- [0075] 도 6을 참조하면, 본 방법에 있어서, S300 단계는 상술한 바와 같이 S500 단계 이전에 수행될 수 있고, 또 다른 구현예로서, S300 단계는 S700 단계 이후에 수행될 수 있다. 참고로, 상술한 본 방법의 일 구현예와 여기에서 후술하는 본 방법의 다른 구현예는 세포를 배양하는 순서에 차이가 있는데, 순서의 차이에 따라 각 세포의 상태와 기능에 차이가 생길 수 있다
- [0076] 이하에서는, S300 단계가 S700 단계 이후에 수행되는 구현예에 대해 간략히 설명한다.
- [0077] 도 6을 참조하면, S100 단계 이후에, 상술한 S500 단계가 수행될 수 있다. 이 때, S500 단계의 수행은 상술한 바와 같다.
- [0078] 또한, 도 6을 참조하면, S500 단계 이후에 S700 단계가 수행될 수 있다. S700 단계의 수행은 상술한 바와 같다.

- [0079] 또한, 도 6을 참조하면, S700 단계 이후에 S300 단계가 수행될 수 있다. 이 때, S300 단계는, S700 단계의 상술한 공기 노출시키는 단계 이전에 수행되기 시작할 수 있다.
- [0080] 예시적으로, 상술한 공기 노출 단계가 이루어지기 하루 전 미세유체 스킨칩(9)에 HUVEC를 배양할 수 있다. 미세유체 스킨칩(9)에 있는 배지를 다 제거하고 미세유체 스킨칩(9)을 PBS로 washing 할 수 있다. 그리고 상술한 방법과 같은 방법으로 HUVEC를 배양할 수 있다. 미세유체 스킨칩(9)을 뒤집은 지 1 시간이 지난 후, 미세유체 스킨칩(9)의 제1 및 제2리저버(93, 94) 각각에 EGM-2MV를 1.5ml 씩 채우고 멤브레인(91)위 챔버(92)의 상부(921)에 갈숨을 첨가한 DMEM을 가득 채워줄 수 있다. 하루 동안은 gravity machine 에 올리지 않은 상태로 배양할 수 있다. 하루가 지난 후, 제1 및 제2 리저버(93, 94) 내의 EGM-2MV의 양을 300ul 내지350ul 로 줄이고 셀룰러 콜라겐 혼합물(14) 위 챔버(92)의 상부(921)에 채워진 분화배지(갈숨을 첨가한 DMEM)를 제거해 7 일 내지 10 일 동안 flow 를 주면서 Air exposure 시킬 수 있다. 이에 따라, 표피세포의 분화가 진행될 수 있다.
- [0081] 한편, S100 단계는 이하와 같이 수행될 수 있다.
- [0082] 도 7a는 본 방법에 있어서, S100 단계의 Master fabrication 단계를 설명하기 위한 개략적인 개념도이다.
- [0083] S100 단계는 Master fabrication 단계를 포함할 수 있다.
- [0084] 도 7a를 참조하면, Master fabrication 단계는, wafer(82)에 SU-8 50을 도포하기 위해 spin coater의 속도를 500rpm 5sec, 1000rpm, 30sec 조건으로 맞추어 사용할 수 있다. 그 후에 65℃ Hot plate에 10분간 올려둔 뒤, 95℃ Hot plate에 30분 동안 올려두어 Soft bake해줄 수 있다. 또한, MA6 Aligner II(4인치 전용)을 이용하여 photolithography를 진행할 수 있다. 이 후, 다시 Hot plate에 올려놓아 PEB를 해줄 수 있다. 그 뒤에 SU-8 Developer를 이용하여 10분 이상 Develop을 하여 가교가 되지 않은 SU-8은 제거가 되어 원하는 구조의 양각형상의 wafer(81, 82)를 얻을 수 있다. Master fabrication 단계의 결과, 너비가 200 μm이고 높이가 120 μm 인 채널 모양의 양각 형상이 얻어질 수 있다.
- [0085] 도 7b 및 도 7c는 본 방법에 있어서, S100 단계의 PDMS layer를 제작하는 단계를 설명하기 위한 개략적인 개념도이다.
- [0086] 또한, S100 단계는 PDMS layer를 제작하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0087] 도 7b를 참조하면, PDMS layer를 제작하는 단계는, Master fabrication 단계를 통해, soft photolithography를 이용하여 원하는 구조의 양각 형상으로 형성한 Wafer 기판(81, 82)에 Sylgard 184 A와 B 을 10:1 로 섞은 용액을 부어줄 수 있다. 이후, 60℃ 오븐에서 6시간 이상 굳힌 후 분리하면 PDMS(85)에 원하는 음각의 채널패턴을 얻을 수 있다. 채널 패턴이 있는 5mm 내지 6mm 두께의 PDMS(85)와 패턴이 있지 않은 6mm 두께의 PDMS(84)를 가교시켜 준비한다. 도 7c를 참조하면, 음각의 채널 패턴이 있는 PDMS(85)의 챔버(92) 부분을 8mm biopsy punch 로 구멍을 내고 제1 리저버 및 제2 리저버(93, 94) 부분은 채널(95)의 끝부분이 포함되도록 8mm biopsy punch를 이용해 연속적인 원을 뚫어 구름 모양 같은 구멍을 낼 수 있다. 패턴이 있지 않은 PDMS(84)도 똑같이 구멍을 낼 수 있다.
- [0088] 도 7d는 본 방법에 있어서, S100 단계의 Chip bonding 단계를 설명하기 위한 개략적인 개념도이다.
- [0089] 또한, S100 단계는 Chip bonding 단계를 포함할 수 있다.
- [0090] 도 7d를 참조하면, Chip bonding 단계는, PDMS 표면을 플라즈마(plasma)를 처리하여 라디칼 활성화시킨 후 아래부터 slide glass(86)와 채널이 있는 PDMS(85), 멤브레인(88), 채널없는 PDMS (84)순이 되도록 결합시킬 수 있다. 이 단계가 끝나면, 도 1에 도시된 미세유체 스킨칩(9)이 형성될 수 있다.
- [0091] 또한, S100 단계는, 미세유체 스킨칩(9)을 멸균시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0092] 세균의 내생포자를 파괴하기 위해서는 100℃ 이상에서 높은 증기압으로 멸균해야 하므로 미세유체 스킨칩(9)을 멸균시키려면 고압멸균(autoclave)이 필요하다. 따라서, 미세유체 스킨칩(9)을 멸균시키는 단계에 있어서, 고압 멸균(autoclave)이 121℃의 온도와 15lb psi의 압력에서 약 15분 정도 진행될 수 있다.
- [0093] 또한, S100 단계는, 미세유체 스킨칩(9)을 워싱하는 단계를 포함할 수 있다. 워싱하는 단계는, 미세유체 스킨칩(9)의 채널(95)의 한쪽 끝에 에탄올을 흘려주어 에탄올이 채널(95)을 따라 흐르도록 할 수 있다. 에탄올이 어느 정도 흐르는 것이 확인이 되면 PBS 를 흘려줄 수 있다.
- [0094] 한편, 본 방법에 있어서, 미세유체 스킨칩(9) 내에서 흐름을 형성하는 것은 상술한 Gravity flow machine 을 포

함하는 Gravity-flow 시스템에 의해 이루어질 수 있다.

- [0095] 기존에 개발되어진 여러 종류의 장기온어 칩 시스템의 경우, 일반적으로 펌프와 연결되어 구동되도록 설계되어 있어 사용하기에 불편함이 많고, 오염, 누수 등의 위험요소가 많았다. 따라서 사용자 친화성이 개선되고, 일반적인 생물학적 실험기법 훈련을 받은 연구자가 사용하기에 충분한, 낮은 난이도의 시스템이 필요하였다.
- [0096] 반면에, 본 방법은, Gravity-flow 시스템을 이용해 중력 기반 방식으로 미세유체 스킨칩(9) 내에 흐름을 형성함으로써, 챔버(92)에 유체를 공급할 수 있다. 이에 따라, 기존의 펌프를 사용하는 방식에 비해 사용자 편의성과 재현성을 증대함으로써 제조 과정의 편리성을 획기적으로 개선하였다.
- [0097] 참고로, Gravity flow machine이란, APT User 프로그램을 통해 기울어져 있는 각도와 움직이는 속도, 기울어져서 정지해있는 시간을 자동화 할 수 있는 장치로서, Gravity flow machine 위에 올려져 있는 미세유체 스킨칩(9)의 채널(95)을 따라 배지가 일정한 volume flow rate를 가지고 흐를 수 있도록 해준다. 구동 Parameter(속도, 각도, 멈춰있는 시간)을 모니터링 컴퓨터의 APT User 프로그램에 입력하면 gravity flow machine 이 입력한 parameter 값에 따라 작동한다. 따라서 미세유체 스킨칩(9)에 대한 구동을 자동화 할 수 있다. 본 발명에서는 10ul/min 의 volume flow rate을 칩에 적용시키기 위해 (기울기 : 15° , 정지 시간 : 17min)로 parameter 들을 입력하였다.
- [0098] 또한, 본 방법에 있어서 위에서 언급했던 재료들을 정리하자면, Human Dermal Primary Fibroblast (진피세포), HaCaT (표피세포), HUVEC (혈관내피세포), Type I collagen, 10X DMEM media, 0.5N NaOH, microfluidic chip (상술한 미세유체 스킨칩), DMEM (10% FBS, 1% P/S 포함) (Fibroblast, HaCaT media), EGM-2MV (HUVEC media) 이 본 방법에 이용될 수 있다.
- [0099] 정리하면, 본 방법은, 실리콘 고분자 물질 PDMS(Polydimethylsiloxane), 또는 플라스틱을 이용하여 피부의 진피와 표피의 3차원적인 구조 내부에 혈관 채널이 구현된 미세유체 3차원 스킨 칩을 제작하는 것에 관한 것으로서, 미세유체 스킨칩(9) 내부에 진피와 표피, 혈관내벽 조직에 각각 해당하는 세포를 배양하고 분화를 유도하였다.
- [0100] 이러한 본 방법에 의하면, 3주 이상 미세유체 스킨칩(9) 내에서 세포를 배양하는 동안 피부와의 생리적 유사성을 높이고 세포의 성장, 분화가 가능하도록 진피/표피조직과 혈관의 크기, 개수 및 배지의 공급 속도 등을 조절할 수 있다.
- [0101] 또한, 본 방법은 중력을 기반으로 하는 챔버(92)에 대한 유체 공급 방식을 이용함으로써, 펌프와 튜빙의 필요성을 제거하였다. 이를 이용해, 미세유체 스킨칩(9)의 챔버(92)에 대한 배지 공급 속도를 중력 기반으로 생리적인 범위 내에서(예를 들어 혈관의 혈류속도와 일치하도록) 조절할 수 있다.
- [0102] 이러한 본 방법에 의하면, 동물 및 인간 피부와 유사한 흡수 패턴 및 피부과민 반응을 재현할 수 있는 마이크로 스킨 온어 칩으로 적용 가능한 피부 모델이 구현될 수 있다. 구현되는 피부 모델은 표피, 진피, 혈관 등 실제 피부의 마이크로 조직구조와 피부를 구성하는 여러 종류의 세포를 포함한 칩 기반 인공 모델로서, 약물 또는 화장품에 대한 피부의 반응을 기존의 피부모델에 비해 실제와 더 유사하게 재현할 수 있어 동물 및 인체 실험을 대체 및 보완할 수 있다.
- [0103] 즉, 본 방법은, 실제 인체 조직의 3차원적인 구조와 배치를 모사함으로써, 실제 피부와 유사성이 높은 피부모델로 적용 가능한 피부 모델을 구현할 수 있고, 구현된 피부 모델은 피부질환 연구, 화장품 및 피부의약품 개발에 활용이 가능하다.
- [0104] 또한, 본 방법에 의하면, 피부표피와 섬유아세포의 상호작용(예를 들면 성장 인자 분비), 혈관을 통한 면역반응(백혈구의 이동) 등과 같이 기존의 in vitro 피부 모델로 구현이 불가능했던 생리적인 현상이 인공적으로 구현될 수 있고, 그 메커니즘을 연구하는데 활용이 가능하다.
- [0105] 또한, 본 방법은 중력기반 미세유체칩을 활용함으로써(중력 기반 방식으로 미세유체 스킨칩(9) 내에 흐름이 형성되는 시스템) 일반적인 생물실험기법 훈련을 받은 사람이라면 충분히 사용이 가능하다. 따라서, 본 방법은 미세유체칩 또는 장기온어 칩 기술의 활용도와 산업화 가능성을 높일 수 있다.
- [0106] 또한, 본 방법에 따라 구현되는 피부 모델은 혈관구조를 포함한 3차원 스킨 온어 칩으로서, 표피, 진피 및 혈관 등 실제 피부의 마이크로 조직구조와 여러 종류의 세포를 포함한 모델이므로 약물 또는 화장품에 대한 실제 피부의 반응을 재현할 수 있어 동물 및 인체 실험을 대체 및 보완할 수 있다.
- [0107] 또한, 본 방법에 따라 구현되는 피부 모델은 펌프나 튜빙 커넥션 없이 피부/혈관 조직에서 산소, 영양분, 외부

물질 등의 이동 과정의 제어가 가능하여 스킨 온어 칩 구동에 필요한 비용을 절감할 수 있다.

- [0108] 한편 이하에서는, 전술한 본 방법에 의해 제조된 본원의 일 실시예에 따른 피부 모델(이하 '본 피부 모델'이라 함)에 대해 설명한다. 다만, 앞서 살핀 본 방법에서 설명한 구성과 동일 또는 유사한 구성에 대해서는 동일한 도면부호를 사용하고, 중복되는 설명은 간략히 하거나 생략하기로 한다.
- [0109] 본 피부 모델은 미세유체 스킨칩(9)을 포함한다.
- [0110] 미세유체 스킨칩(9)은 수평으로 배치되는 멤브레인(91)에 의해 내부가 상부(921)와 하부(922)로 분리되는 챔버(92), 챔버(92)의 일측 및 타측 각각에 형성되는 제1 리저버(93)와 제2 리저버(94), 및 유체가 이동 가능하도록 제1 리저버(93), 챔버(92)의 하부(933) 및 제2 리저버(94)를 연결하는 채널(95)을 포함한다.
- [0111] 또한, 본 피부 모델은 멤브레인(91)의 하면에 형성되는 혈관 내벽 조직을 포함한다. 혈관 내벽 조직은 HUVEC(혈관 내피 세포)가 배양되어 형성될 수 있다.
- [0112] 또한, 본 피부 모델은 멤브레인(91)의 상면 상에 형성되는 진피층을 포함한다. 진피층은 Fibroblast(섬유아세포)가 배양되어 형성될 수 있다. 예시적으로, 진피층은 멤브레인(91) 상에 Fibroblast가 혼합된 셀룰러 콜라겐 혼합물이 주입되어 형성될 수 있다. 여기에서, Fibroblast가 혼합된 셀룰러 콜라겐 혼합물은, 콜라겐, 10X DMEM media, 0.5N NaOH 및 Fibroblast를 섞은 것일 수 있다.
- [0113] 또한, 본 피부 모델은 진피층의 상면 상에 형성되는 표피층을 포함한다. 표피층은 Keratinocyte의 cell line이 배양되어 형성될 수 있다. cell line은 HaCaT일 수 있다.
- [0114] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0115] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

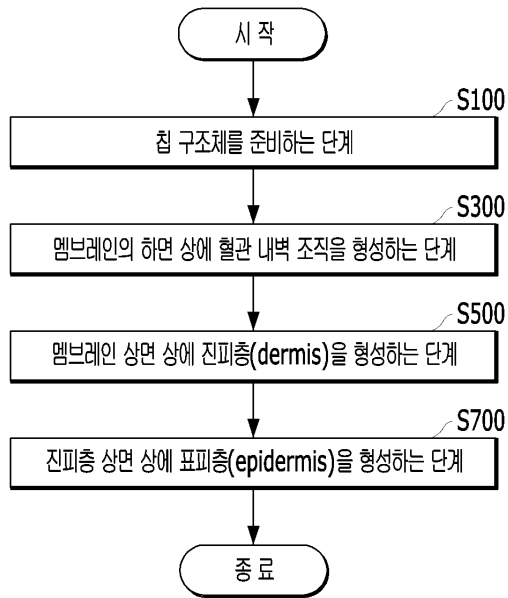
**부호의 설명**

- [0116] 11: 콜라겐
- 111: 멤브레인의 하면 상에 붙어 배양된 HUVEC
- 12: HUVEC 포함 액체
- 13: 콜라겐 혼합물
- 14: 셀룰러 콜라겐 혼합물
- 15: 배지 DMEM
- 16: 배지 EGM-2MV
- 18: cell suspension
- 21: 배지 DMEM
- 22: 배지 EGM-2MV
- 23: 칼슘이 첨가된 DMEM
- 9: 미세유체 스킨칩
- 91: 멤브레인
- 92: 챔버
- 921: 챔버의 상부

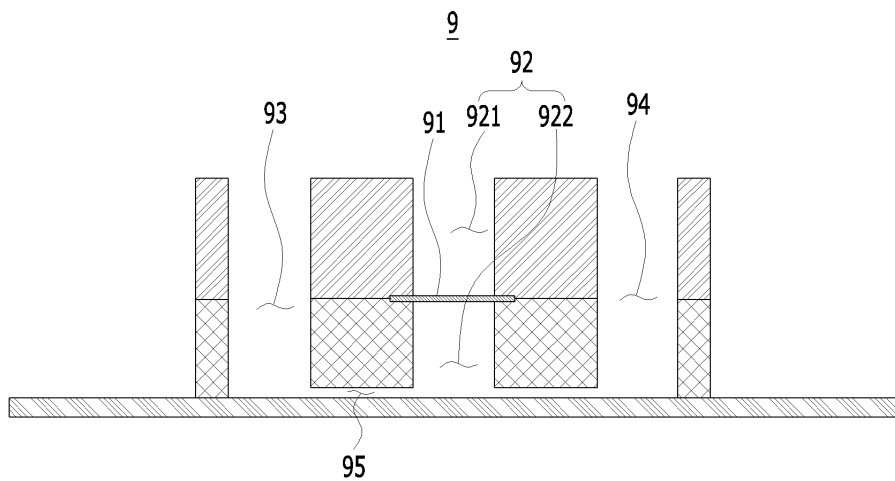
- 92: 챔버의 하부
- 93: 제1 리저버
- 94: 제2 리저버
- 95: 채널

도면

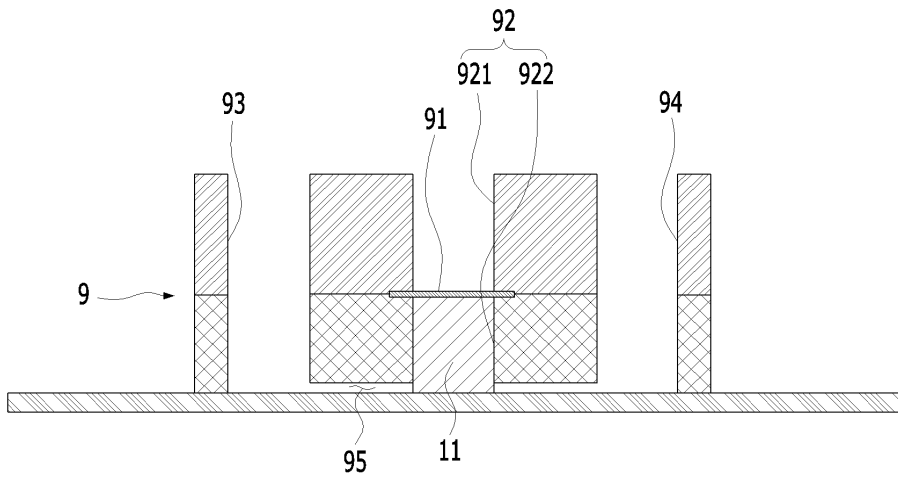
도면1



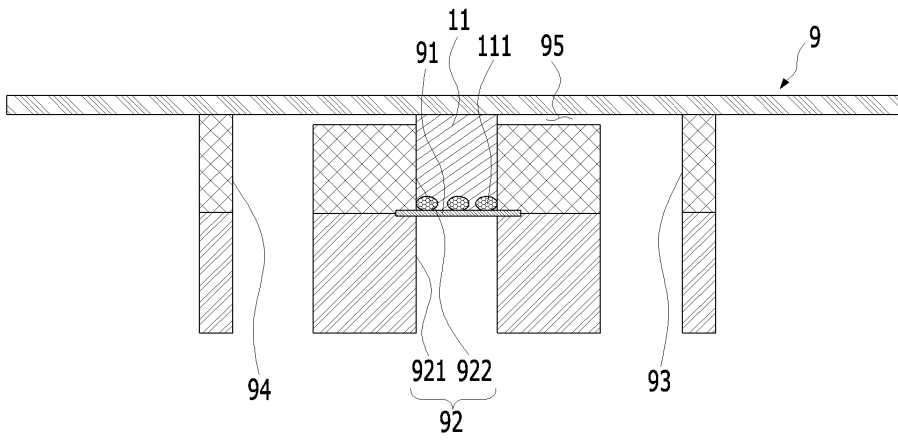
도면2



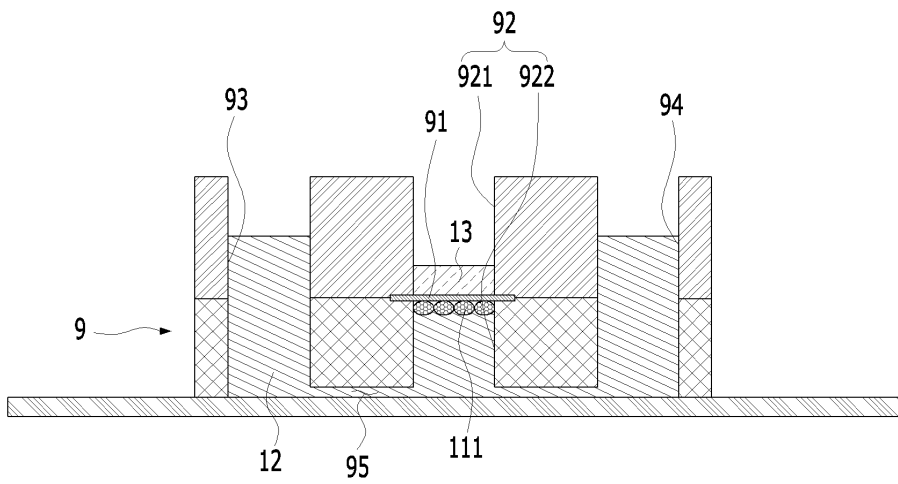
도면3a



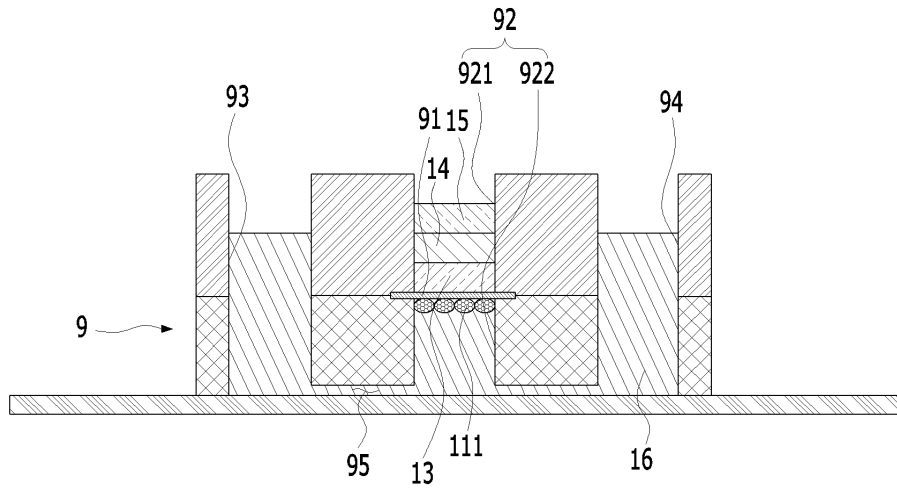
도면3b



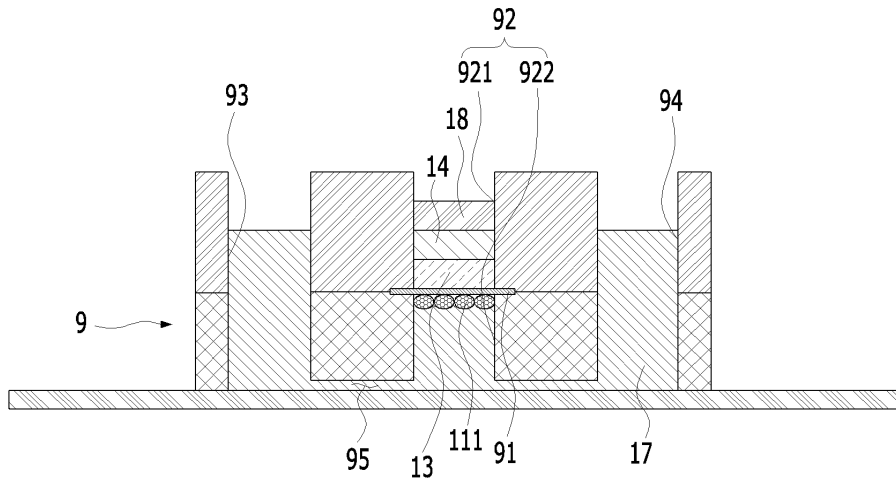
도면4a



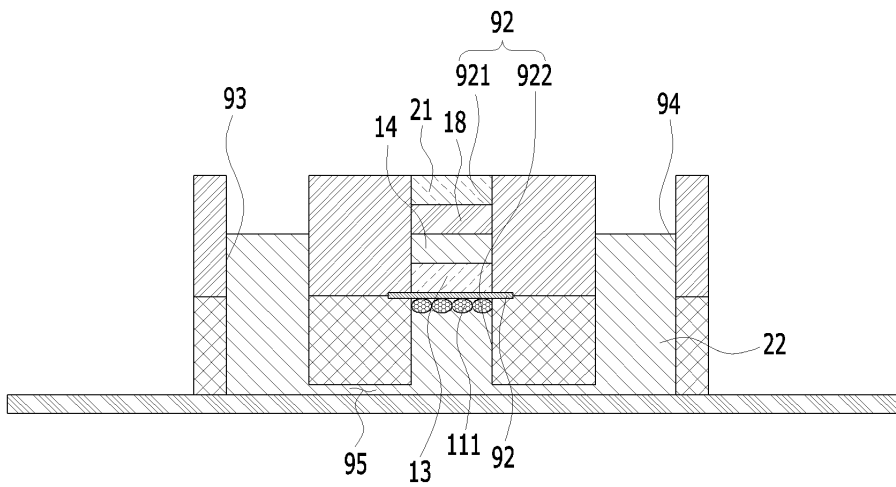
도면4b



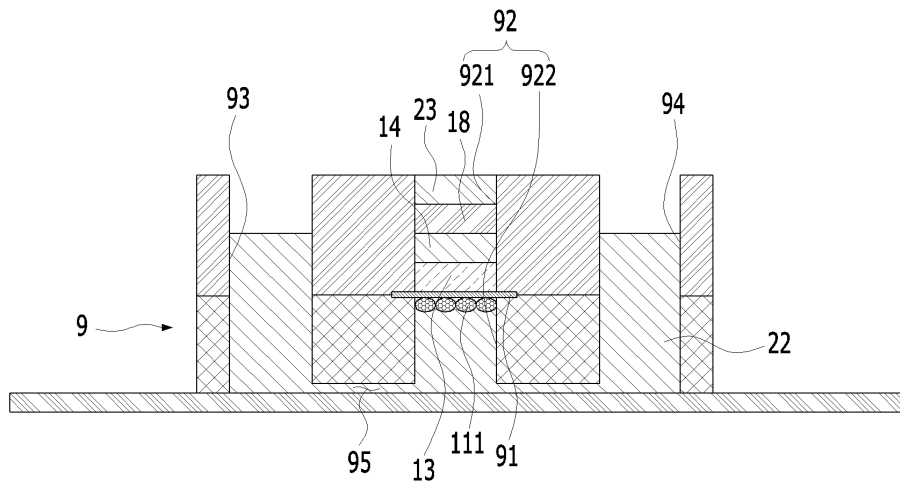
도면5a



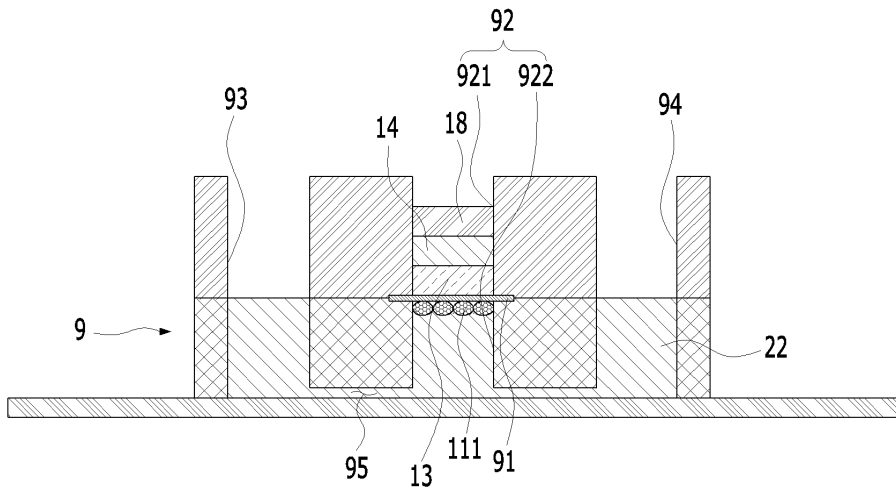
도면5b



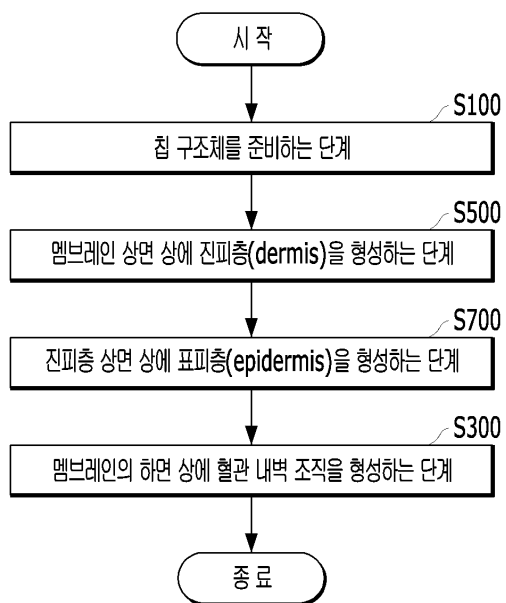
도면5c



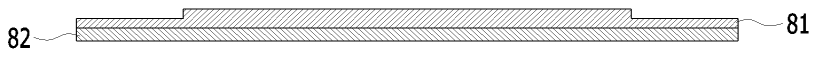
도면5d



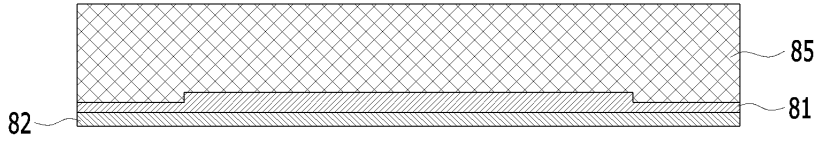
도면6



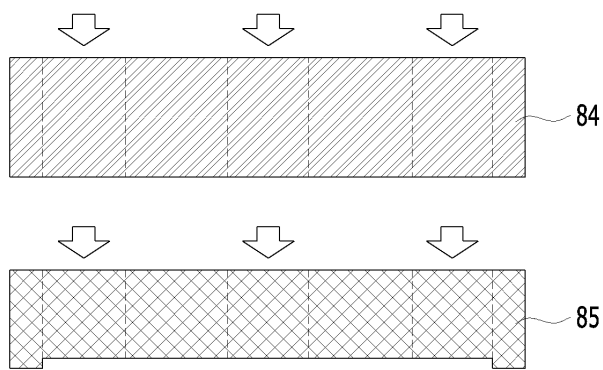
도면7a



도면7b



도면7c



도면7d

