(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0039916
(43) 공개일자 2022년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/00 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12M 1/26 (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) *C12N 5/09* (2010.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12M 21/08 (2013.01)
C12M 23/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0121767
(22) 출원일자 2020년09월21일
심사청구일자 2020년09월21일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
한국표준과학연구원
대전 유성구 가정로 267(가정동, 한국표준과학연구원)
(72) 발명자
이동우
대전광역시 서구 관저로 184 느리울마을아파트12단지 1208동 501호
허민범
대전광역시 서구 도안동로 77 도안18단지린풀하우스 1807동 1304호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인도담

전체 청구항 수 : 총 5 항

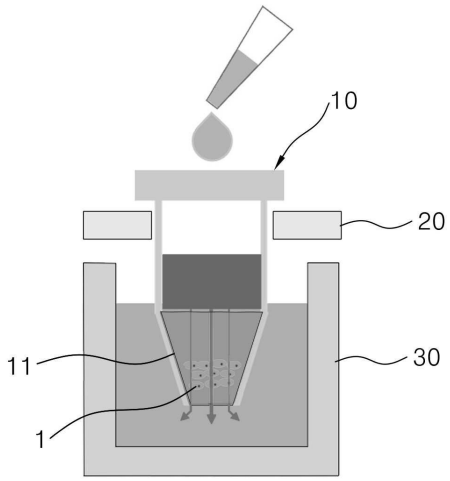
(54) 발명의 명칭 **박막이 없는 마이크로 트렌스 웰, 이를 이용한 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법**

(57) 요 약

본 발명은 마이크로 트렌스 웰을 이용한 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법에 관한 것이다.

보다 구체적으로, 고분자 박막이 없는 ECM 분석 팁(Tip) 끝단에 세포-ECM층을 형성한 마이크로 트렌스 웰, 이를 이용하여 3차원 세포를 배양하고 3차원 세포 배양을 통해 나노입자의 투과성 및 독성을 동시 분석하거나 약물의 투과성과 효능을 동시분석할 수 있는 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12M 29/00 (2013.01)
C12M 33/04 (2013.01)
C12M 41/46 (2013.01)
C12N 5/0062 (2013.01)
C12N 5/0693 (2013.01)
G01N 33/5014 (2013.01)
G01N 33/5067 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)
C12N 2533/90 (2013.01)

(72) 발명자
최재원
세종특별자치시 남세종로 302 새샘마을6단지 601동 2304호

이태걸
대전광역시 유성구 대덕대로541번길 68 대덕연구원 현대아파트 103동 505호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711017364
과제번호	2016M3A7B6908929
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노·소재기술개발사업
연구과제명	국가 나노안전 기준설정을 위한 측정표준 및 국제 인증체계 확립 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국표준과학연구원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

팁 형태로 성형된 몸체; 및

상기 몸체의 내부 하단에 형성된 세포-ECM층;을 포함하고,

상기 몸체의 상단에는 피펫과 호환되는 어댑터가 형성되어 세포와 세포외 기질이 혼합된 혼합액을 흡입하여 상기 세포-ECM층을 형성하되, 상기 세포-ECM층은 겔화된 것을 특징으로 하는 마이크로 트랜스 웰.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포외 기질은 매트리겔이되고, 상기 몸체에 상기 혼합액을 4㎕ 흡입시킨 것을 특징으로 하는 마이크로 트랜스 웰.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 마이크로 트랜스 웰을 생성하는 단계;

복수 개의 중공이 구비된 홀더에 복수의 마이크로 트랜스 웰을 삽입 고정 후, 세포배양액이 분주된 웰 플레이트에 디핑하여 3차원 세포를 제1배양하는 단계;

상기 제1배양된 마이크로 트랜스 웰에, 세포 독성 및 효능 확인을 위한 화합물 또는 나노입자를 분배하여 제2배양하는 단계;

상기 제2배양된 마이크로 트랜스 웰이 고정 삽입된 홀더를 웰 플레이트에서 분리 후, 세포 생존율을 정량하기 위한 시약이 채워진 새로운 웰 플레이트로 이동시키는 단계;

상기 마이크로 트랜스 웰의 광학밀도를 측정하는 단계; 및

상기 제1배양된 마이크로 트랜스 웰이 분리된 웰 플레이트에 대한 형광 강도를 측정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로 트랜스 웰을 이용한 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 세포는 간암 세포주인 HepG2이 되는 것을 특징으로 하는 마이크로 트랜스 웰을 이용한 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

독소루비신(DOX) 또는 FITC 25nm SiO_2의 나노입자를 사용하여 상기 화합물 또는 나노 입자의 침투, 효능 및 세포 독성에 대한 분석을 동시 수행하는 것을 특징으로 하는 마이크로 트랜스 웰을 이용한 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 마이크로 트렌스 웰, 마이크로 트렌스 웰을 이용한 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법에 관한 것이다.

[0002] 보다 구체적으로, 고분자 박막이 없는 ECM 분석 팁(Tip) 끝단에 세포-ECM층을 형성한 마이크로 트렌스 웰, 이를 이용하여 3차원 세포를 배양하고 3차원 세포 배양을 통해 나노입자의 투과성 및 독성을 동시 분석하거나 약물의 투과성과 효능을 동시분석할 수 있는 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 종래의 2차원 세포 배양은 시험관 내에서 세포를 평평한 형태로 성장시키기 위해 연구되어 왔으며 많은 문헌에 보고되어 있다. 하지만, 2차원 세포 배양에서, 세포를 부착시키는 코팅제의 종류들은 각 세포에 따라 배양 용기의 바닥에 코팅되어진다. 또한, 생체 적합성이 저하되어 정확한 생체정보를 표현할 수 없다는 단점이 있다.

[0005] 이러한 단점을 개선하기 위해, 최근에는 3차원 세포 배양이 연구되고 있다. 3차원 세포 배양은 생물학 및 다양한 연구 분야에서 관심을 보였다. 스페로이드(Spheroids), 오가노이드(Organoids), 스콜폴딩(Scaffolding), 3차원 바이오프린팅(bioprinting) 및 바이오 장기 칩(Organs-on-chip)은 3차원 세포 배양을 기반으로 활발하게 연구되고 있다.

[0006] 3차원 세포 배양은 세포를 배양 용기에 부착시켜 성장시키는 2차원 세포 배양법과 다르게 바닥에서 띄우는 부유 방법을 통해 세포를 다양한 방식으로 성장시킬 수 있다. 더하여, 실제 생체 내 환경에 존재하는 세포외 기질(ECM:Extracellular matrix)을 사용하면 세포-세포, 세포-ECM 및 세포-외부 환경을 인공적으로 생성할 수 있어 실제와 아주 유사하게 생체 환경을 구현할 수 있다는 장점이 있다.

[0007] 3차원 세포 배양 방법은 다양하게 존재하며 3차원 실험 및 분석을 가능하게 하는 장비도 상용화되고 있다. 그중에서도 많이 사용되고 있는 트렌스 웰(transwell)은 3차원 세포배양을 기반으로 화합물 투과성, 효능과 독성 분석에 매우 유용한 장비 중 하나이다.

[0008] 이러한 트렌스 웰은 투과성으로 아주 미세한 μ단위의 기공을 가진 고분자 막 위에서 ECM을 사용하여 세포를 배양한다. 세포-ECM 층은 투과성 중합체 막 상에 형성되고 세포배양액에 넣을 수 있다.

[0009] 트렌스 웰은 주로 화합물의 효능 및 독성, 화합물 또는 나노 입자의 투과성을 평가하는데 사용된다. 이때, 효능 및 독성은 미세한 기공을 가진 고분자막 위에 형성된 막상의 세포-ECM 층에서 세포 생존율을 측정함으로써 추정되고, 투과율은 처음 트렌스 웰 위로 넣은 화합물의 농도 대비 일정 시간이 지난 후 트렌스 웰 밖으로 빠져나온 화합물의 농도를 측정함으로써 계산된다. 이러한 특허문헌으로 한국등록특허 제10-1381079호가 있다.

[0010] 이러한 트렌스 웰은 앞에서 언급한 거와 같이 화합물의 효능 및 독성뿐만 아니라 ECM을 통과하는 투과성 측정도 가능하지만, 각각에 대한 실험이 요구된다. 또한, 트렌스 웰의 가장 큰 단점으로는 미세한 기공을 가진 고분자 박막을 사용하여 생산되기 때문에 트렌스 웰의 크기가 작아질수록 비용이 비싸진다는 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 제10-1381079호(2014.04.10.공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은, 고분자 박막이 없는 ECM 분석 팁(Tip) 끝단에 세포-ECM층을 형성한 마이크로 트렌스 웰, 이를 이용하여 3차원 세포를 배양하고 3차원 세포 배양을 통해 나노입자의 투과성 및 독성을 동시 분석하거나 약물의 투과성과 효능을 동시분석할 수 있는 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법에 관한

것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시 예에 따른 마이크로 트랜스 웰은, 팁 형태로 성형된 몸체; 및 상기 몸체의 내부 하단에 형성된 세포-ECM층;을 포함하고, 상기 몸체의 상단에는 피펫과 호환되는 어댑터가 형성되어 세포와 세포외 기질이 혼합된 혼합액을 흡입하여 상기 세포-ECM층을 형성하되, 상기 세포-ECM층은 겔화된 것을 특징으로 한다.

[0016] 그리고 상기 세포외 기질은 매트리겔이되고, 상기 몸체에 상기 혼합액을 4㎕ 흡입시킨다.

[0017] 또한 본 발명에 따른 마이크로 트랜스 웰을 이용한 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법은, 상술한 바와 같이 마이크로 트랜스 웰을 생성하는 단계; 복수 개의 중공이 구비된 홀더에 복수의 마이크로 트랜스 웰을 삽입 고정 후, 세포배양액이 분주된 웰 플레이트에 디핑하여 3차원 세포를 제1배양하는 단계; 상기 제1배양된 마이크로 트랜스 웰에, 세포 독성 및 효능 확인을 위한 화합물 또는 나노입자를 분배하여 제2배양하는 단계; 상기 제2배양된 마이크로 트랜스 웰이 고정 삽입된 홀더를 웰 플레이트에서 분리 후, 세포 생존율을 정량하기 위한 시약이 채워진 새로운 웰 플레이트로 이동시키는 단계; 상기 마이크로 트랜스 웰의 광학밀도를 측정하는 단계; 및 상기 제1배양된 마이크로 트랜스 웰이 분리된 웰 플레이트에 대한 형광 강도를 측정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0018] 여기서 상기 세포는 간암 세포주인 HepG2이 된다.

[0019] 그리고 독소루비신(DOX) 또는 FITC 25nm SiO_2의 나노입자를 사용하여 상기 화합물 또는 나노 입자의 침투, 효능 및 세포 독성에 대한 분석을 동시 수행한다.

발명의 효과

[0020] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 마이크로 트렌스 웰, 이를 이용한 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법은, ECM 분석 팁(Tip)의 끝단에 세포-ECM층을 형성함으로써, 종래의 트렌스 웰 보다 사이즈를 축소시켜 소량의 시약을 이용하여 다양한 분석실험을 동시에 할 수 있다. 이때, 분석실험으로 나노입자의 투과성 및 독성을 동시 분석하거나 약물의 투과성과 효능을 동시 분석할 수 있다.

[0022] 또한, 세포-ECM층을 하이드로겔 스캐폴드로 형성하고, ECM의 주요성분을 마트리겔을 사용함으로써 실제 in vivo 환경에서 유동성을 가지는 것과 동일한 환경을 조성하여 in vitro에서 실험이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 일 실시 예에 따른 마이크로 트랜스 웰 플랫폼을 도시한 도면,

도 2는 본 발명의 일 실시 예에 따른 마이크로 트랜스 웰을 이용한 세포배양 및 ECM분석 방법을 설명하기 위한 도면,

도 3은 본 발명의 일 실시 예에 따른 마이크로 트랜스 웰 및 이를 이용한 세포배양 및 ECM분석을 설명하기 위한 도면,

도 4는 나노입자(SiO_2)의 동적 빛 산란(Dynamic light scattering, DLS) 결과에 따른 크기분포도,

도 5는 실험약물(DOX)의 농도에 따른 상대투과도,

도 6은 실험약물(DOX)의 용량 반응곡선,

도 7은 나노입자(SiO_2)의 농도에 따른 세포 생존율 반응곡선,

도 8은 나노입자(SiO_2)의 농도에 따른 상대 투과도,

도 9는 나노입자(SiO_2)의 형광 이미지,

도 10은 나노입자(SiO_2)의 농도에 따른 세포 생존율 반응곡선,

도 11은 나노입자(SiO_2)의 농도에 따른 상대 투과도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하에서는 본 발명에 따른 마이크로 트렌스 웰 및 이를 이용한 3차원 배양 세포 기반 화합물 투과도, 효능 및 독성 분석방법에 관하여 첨부된 도면과 함께 더불어 상세히 설명하기로 한다.

[0027] 도 1은 본 발명의 일 실시 예에 따른 마이크로 트랜스 웰 플랫폼을 도시한 도면이다. 도 1을 참고하면, 본 발명의 일 실시 예에 따른 마이크로 트랜스 웰 플랫폼(100)은 마이크로 트랜스 웰(10), 홀더(20), 웰 플레이트(30) 및 덮개(40)를 포함할 수 있다.

[0028] 여기서, 마이크로 트랜스 웰(10)은 고분자 박막이 없는 ECM 분석 팁(Tip)의 끝단에 형성된 세포-ECM층(11)을 구비할 수 있다. 마이크로 트랜스 웰(10)은 폴리스티렌(polystyrene)을 사출 성형하여 팁 형태로 생성되며, 상단은 피펫과 호환되어 흡입방식으로 세포배양액과 스캘포드가 1:1: 혼합된 혼합액을 흡입함으로써 하단에 세포-ECM층(11)을 형성할 수 있다. 여기서, 스캘포드는 쥐 꼬리에서 채취한 단백질인 매트리겔(Matrigel)을 이용할 수 있고, 마이크로 트랜스 웰(10)에 형성된 세포-ECM층(11)은 겔(gel)화 될 수 있다.

[0029] 홀더(20)은 마이크로 트랜스 웰(10)이 삽입될 수 있는 중공을 구비하되, 중공에 삽입된 마이크로 트랜스 웰(10)의 어뎁터에 의해 지지될 수 있는 지지플레이트로 형성될 수 있다. 즉, 홀더(20)는 다수의 중공이 구비된 지지플레이트가 될 수 있다.

[0030] 웰 플레이트(30)는 세포배양을 위한 세포배양액을 수용할 수 있고, 홀더(20)를 지지하며 고정시킬 수 있다. 웰 플레이트(30)는 홀더(20)에 지지된 마이크로 트랜스 웰(10)의 세포-ECM층(11)이 세포배양액에 디핑(dipping)되어 3차원 세포를 배양시킬 수 있다. 이때, 홀더(20)의 중공 및 웰 플레이트(30)는 마이크로 트렌스 웰(10)의 개수에 대응되게 형성될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 96-well plate로 구현하였다.

[0031] 덮개(40)는 세포배양액의 증발 방지를 위해 마이크로 트랜스 웰(10)이 홀더(20) 및 웰 플레이트(30)에 삽입된 채로 마이크로 트랜스 웰(10)을 덮는 뚜껑이 될 수 있다.

[0033] 한편, 마이크로 트랜스 웰의 생성, 이를 이용한 세포배양 및 ECM분석 방법은 도 2 및 3을 통해 설명할 수 있다. 도 2는 본 발명의 일 실시 예에 따른 마이크로 트랜스 웰을 이용한 세포배양 및 ECM분석 방법을 설명하기 위한 도면이다. 도 3은 본 발명의 일 실시 예에 따른 마이크로 트랜스 웰 및 이를 이용한 세포배양 및 ECM분석을 설명하기 위한 도면이다.

[0035] (a)단계는, 마이크로 트렌스 웰(10)의 상단 어댑터를 피펫(1-10 ㎕:50)에 결합시켜 흡입방식으로 세포배양액과 스캘포드가 1:1: 혼합된 혼합액을 흡입함으로써 하단에 세포-ECM층(11)을 형성할 수 있다.

[0036] 이때, 마이크로 트렌스 웰(10)의 몸체인 팁(tip)은 내 화학성과 생체 적합성을 가지고 많은 세포를 옮기는데 사용되는 폴리스티렌(polystyrene)을 사출 성형하여 생성하되 상단 어댑터를 피펫과 호환되는 형태로 형성시킬 수 있다.

[0037] 또한, 상단의 어댑터를 피펫에 결합시켜 흡입방식으로 세포배양액과 스캘포드가 1:1: 혼합된 혼합액을 흡입시킴으로써 마이크로 트렌스 웰(10)의 하단에 세포-ECM층(11)을 형성할 수 있다.

[0039] 여기서, 스캘포드는 쥐 꼬리에서 채취한 단백질인 매트리겔(Matrigel)을 이용할 수 있다. 매트리겔은 37℃ 온도에서 겔(gel)화가 되며 -10℃~20℃에서는 액화상태로 존재한다. 매트리겔을 미리 준비해둔 세포가 혼합되어있는 세포배양액과 1:1로 혼합하였다. 모든 준비과정은 얼음으로 가득 찬 보틀(Bottle)에서 이루어졌으며, 각각의 마이크로 트렌스 웰(10)에 혼합액을 4㎕씩 흡입시켜 마이크로 트렌스 웰(10)의 하단에 세포-EMC층(11)을 형성한다.

[0040] 다음으로, (b)단계와 같이, 세포-EMC층(11)이 형성된 마이크로 트렌스 웰(10)을 배양액이 분주되지 않은 웰플레이트(30) 위에 제작된 홀더(20)의 중공에 고정시키고, 덮개(40)를 덮어 37도 인큐베이터(5% CO_2)에서 40분 동안 매트리겔을 겔화 시켰다.

[0042] 다음으로, (c)단계와 같이, 홀더(20)의 중공에 고정된 세포-EMC층(11)이 형성된 마이크로 트렌스 웰(10)을 새로운 세포배양액으로 채워진 새로운 웰플레이트(30)로 이동시켜 디핑하였다.

[0043] (c) 단계는 구체적으로, 웰 플레이트(30)에 세포 배양액을 50㎕씩 분주시키고 마이크로 트렌스 웰(10)이 고정되어 있고 덮개(40)가 덮여있는 상태로 홀더(30)만 들어서 이동시킨 후, 세포배양액이 새로 채워진 웰 플레이트(30)와 결합시킨다. 이때, 37도 인큐베이터(5% CO_2)에서 하루 동안 세포를 3차원적으로 성장시켰다. 이에, 세포

는 3차원 구체를 형성하였다.

[0045] 이때, 사용된 세포는 세포 독성 및 세포에 대한 약물의 효능을 확인하기 위한 것으로, 본 발명의 일 실시 예에서는 간암 세포주인 HepG2를 사용하였다. American Type Culture Collection (ATCC) 국제 세포주 은행에서 분양받아 배양 하였으며, 세포를 배양시키기 위하여 고 포도당을 갖는 500㎖의 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Welgene. Ltd, Daejeon, Korea)을 구매하여 사용하였다.

[0046] 배양액에 10% Fetal Bovine Serum(Heat inactivated FBS, Welgene. Ltd, Daejeon, Korea)과 1%의 Penicillin-Streptomycin 100X(Welgene. Ltd, Daejeon, Korea)을 첨가하여 0.2㎛ pore size의 고분자 필터로 여과하여 세포 배양에 사용하였다.

[0047] 3차원 세포 실험 전에, T75 플라스크 (Corning. Ltd, Daejeon, Korea)에서 구매하여 분양받은 HepG2 세포를 $2*10^6$ cells/㎖로 2차원 배양을 하였다. 이틀 후 T75 플라스크에 있는 배양액을 석션하고 플라스크 바닥에 붙어 있는 세포를 Phosphate-Buffered Saline (PBS, Sigma-Aldrich, Ltd, Daejeon, Korea) 5㎖로 세척하고 0.05%의 Trypsin-EDTA(1X, Sigma-Aldrich, Ltd, Daejeon, Korea) 3㎖을 주입하여 37° 인큐베이터(5% CO_2)에 3분 동안 처리하여 세포를 플라스크 바닥에서 분리하였다. 이어서 세포를 2000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포를 다운시켰으며, 원심분리 후 상층 부유액은 석션(suction)하고 1㎖의 DMEM을 넣어 다운시킨 세포와 다시 혼합시켰다. 세포는 Trypan Blue(Invitrogen, Ltd, Daejeon, Korea)와1 : 1로 희석하고 계수 측정하였다.

[0048] 세포(1)는 마이크로 트렌스 웰(10)당 4㎕의 스캘포드에 $1*10^4$ cells/마이크로 트렌스 웰의 세포를 함유하는 것으로 계산하여 실험을 진행하였다.

[0050] 다음으로, (d)단계와 같이, (c)단계의 3차원 성장한 세포-ECM층(11)이 형성된 마이크로 트렌스 웰(10) 각각에 화합물 또는 나노입자(3)를 분배한 후, 1일동안 세포배양을 한다. 이 경우, 도 3과 같이, 마이크로 트렌스 웰(10)에 주입된 화합물 또는 나노입자는 세포-ECM층(11)을 관통하고, 마이크로 트렌스 웰(10) 밖으로 빠져나와 세포배양액과 희석될 수 있다.

[0052] 다음으로, (e)단계와 같이, 마이크로 트렌스 웰(10)이 삽입된 홀더(20)를 웰 플레이트(30)에서 분리한 후, (f)와 같이 120㎕ MTS 시약으로 채워진 새로운 웰 플레이트(30)로 옮겼다.

[0053] 다음으로, (g)단계와 같이, (f)단계의 120㎕ MTS 시약이 채워진 웰 플레이트(30)에 디핑된 마이크로 트렌스 웰(10)이 삽입된 홀더(20)를 2시간 후, MTS 시약의 광학 밀도를 측정하여 마이크로 트렌스 웰(10)에서 세포 생존력을 교정하였다.

[0054] 또한, (h)단계와 같이, (e)단계에서 분리된 웰 플레이트(30)에 대해 형광 강도를 측정함으로써 화합물 또는 나노 입자의 세포-ECM층(11) 투과도를 계산하였다.

[0056] 실험 약물 및 나노입자

[0057] 이때, 마이크로 트렌스 웰(10)에 배양한 3차원 세포의 약물 효능을 분석하기 위해 파장대역 485~570nm의 항암제로 사용되고 있는 독소루비신(DOX, Korea United Pharm Inc)을 구입하였으며, 독성과 투과성을 분석하기 위해 파장대 485~538nm의 FITC가 존재하는 25nm SiO_2(Korea Research Institute of Standards and Science, KRISS) 나노입자를 구매하여 사용하였다. DOX 와 FITC 25nm SiO_2의 최대 농도는 각각 32㎍ 및 250㎍㎖로 하였으며, 5번으로 2배씩 희석하였다.

[0058] 참고로 SiO_2 나노입자 특성상 세포배양액에 FBS의 존재 유무에 따라 나노입자 주변으로 단백질 코로나(protein corona)를 형성함으로써 크기가 변한다는 보고가 있어 나노입자는 Serum-free (SF) 와 Serum-containing (SC)의 배양액으로 나누어 실험을 진행하였다.

[0060] 마이크로 트렌스 웰의 투과 효율 분석

[0061] 또한, 마이크로 트렌스 웰(10)에 형성된 ECM(scaffold)에서 성장한 3차원 세포를 투과한 효율 분석은 마이크로 트렌스 웰(10)의 상부 주입구에 50㎕의 실험 약물 및 나노입자를 주입하여 1시간 동안 수압으로 인하여 웰 플레이트(30)에 150㎕로 분주 되어있는 세포배양액으로 희석되게 하였다.

[0062] 이것은 마치 실제 in vivo에서 흐르는 혈액과 피부에 흡수되는 것을 묘사한 것과 같다. 1시간 후 마이크로 트렌스 웰(10)의 ECM을 투과하여 웰 플레이트(30)로 흡수된 용액의 최종 농도는 4배 희석된 것으로 계산할 수 있다.

[0063] 침투된 DOX 와 FITC 25nm SiO_2는 마이크로 플레이트 리더(micro plate reader)로 형광 강도를 측정함으로써 계산하였다. 상대 투과율은 다음과 같이 계산하였다. 하기에서, E-PAT는 마이크로 트렌스 웰(10)될 수 있다.

[0064] $$\text{상대투과도}[\%] = \frac{E-PAT\text{을 사용한 시험 웰에서의 형광 강도}}{E-PAT\text{이 없는 최고농도의 형광 강도}} \times 100 \quad (1)$$

[0065] 침투율은 다음과 같이 계산하였다.

[0066] $$\text{침투율}[\%] = \frac{E-PAT\text{이 있는 시험웰의 형광 강도}}{E-PAT\text{이 없는 시험웰의 형광 강도}} \times 100 \quad (2)$$

[0068] 세포 효능 및 독성 평가

[0069] 보통 세포 생존율을 정량하기 위해서는 MTT, MTS, XTT, WST1, WST8과 같이 많은 종류의 시약이 있다. 본 발명의 일 실시 예에서는 마이크로 트렌스 웰(10)에 형성되어있는 ECM(스캘포드)안의 3차원 세포에 대한 약물의 효능 및 독성을 분석하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethonyphenol)-2- (4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, Promega, CellTiter 96, Ltd.)을 사용하여 3차원 세포의 세포 생존율을 정량하였다.

[0070] 이것은 기존에 많이 사용되는 MTT와 비슷한 개념의 분석 시약이지만 Dimetht1 sulfoxide (DMSO)를 사용하지 않은 장점을 가지고 있다. DMSO는 보통 10% 정도 첨가하여 세포 동결 보존 시에 내동성 부여 및 동결보존재로 이용되는 것으로, 세포 내에 수분을 감소시켜 수분의 결정 형성을 막아 주는 역할을 한다. 하지만, 극성 유기용매이기 때문에 세포에 독성을 나타낼 수 있어 정확한 실험을 위하여 DMSO를 사용하지 않는 MTS시약을 사용하였다.

[0071] MTS시약을 사용하여 사멸되는 세포의 효소들 가운데 미토콘드리아(mitochondria)에서 배출되는 미토콘드리아 탈수소효소(michondrial dehydrogenase)가 MTS의 시약과 만나 formalzan을 형성하여 특정 파장대를 가지게 된다. 이러한 특정 파장대를 측정하여 생존율을 측정할 수 있다. 시약은 배양액과 1 : 5로 희석하여 사용하였다.

[0072] 2차원 세포 같은 경우 희석된 MTS시약을 처리 후 1시간 동안 37도 인큐베이터(5% CO_2)로 충분히 측정이 가능하지만, 3차원 세포인 경우 스캘포드안으로 희석된 MTS시약이 흡수되어 세포와 반응하기까지는 시간이 더 필요하여, 37도 인큐베이터(5% CO_2)에서 2시간 동안 반응시킨 후 측정하였다.

[0074] 형광이미지를 관찰하여 나노입자의 독성 결과 증명

[0075] 형광이미지 관찰은 FITC가 흡착되어있는 나노입자를 관찰함에 있어 나노입자의 무혈청배양액(serum-free(SF))과 혈청배양액(serum-containing(SC))에서 나타나는 독성결과를 증명하기 위해 형광현미경장비를 통해 관찰하였다.

[0077] 통계 분석

[0078] 마이크로 트렌스 웰(10)에서 배양된 3차원세포의 약물과 나노입자의 효능 및 투과 실험 데이터는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 통계 분석은 Student’ T-test를 이용하여 95%의 유의수준으로 검정하였다.

[0080] 나노입자의 특성분석결과

[0081] 마이크로 트렌스 웰(10)에 형성된 3차원세포에 적용할 수 있는 나노입자는 우태아혈청(fetal bovine serum;FBS) 유무에 따라 크기 분포가 다른 것으로 보고되어왔다. 우태아혈청이 있는 배양액에서는 나노입자 주위로 단백질 코로나가 형성되어 나노입자의 응집을 용이하게 하고 나노입자의 크기를 증가시킨다. 그러나, 우태아혈청이 없는 배양액에서는 나노입자는 원래 크기를 유지하였다. 따라서, 배양액에 우태아혈청 유무 조건에 따라 ECM(scaffold)에서의 나노입자 투과성 및 세포 독성이 상이하다.

[0082] 본 발명의 일 실시 예에 따른 마이크로 트렌스 웰(10)에는 나노입자 투과성 및 세포 독성측정에 적용되었다. 마이크로 트렌스 웰(10)는 두 가지 무혈청(SF), 혈청(SC) 조건에서 한 번에 나노 입자 투과성과 세포 독성을 측정할 수 있다.

[0083] 이때, 마이크로 트렌스 웰(10)에서 투과성 및 세포 독성을 측정하기 전에, 25 nm 나노 입자 크기가 변경된 두 가지 배양액 조건을 확인하였다. 먼저, 혈청 배양액(SC)은 고 포도당을 가지는 500㎖ 세포 배양액 DMEM에 10% FBS 및 1% 페니실린 스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)을 함유하여 혼합되어 있는 반면에 무혈청배양액(SF)은 동일한 세포 배양액 DMEM에 FBS를 첨가하지 않고 단지 1%의 페니실린 스트렙토마이신만 첨가하여 혼합하였다. 그 후, 동적 빛 산란(DLS:Dynamic Light Scattering) 장비를 사용하여 각각의 조건이 다른 세포 배양액에 나노입자를 분산하여 수용액 상에서의 입자크기(hydrodynamic size)를 측정하였다.

[0084] 도 4는 나노입자(SiO_2)의 동적 빛 산란(Dynamic light scattering, DLS) 결과에 따른 크기분포도이다. 도 4에 도시된 바와 같이, 25nm 나노입자는 무혈청배양액에서 원래의 크기 분포를 가졌다. 하지만, 혈청배양액에서는 25nm SiO_2 나노입자가 단백질 코로나를 형성하여 훨씬 큰 크기인 77nm까지 커진 것을 확인하였다.

[0086] 독소루비신(Doxorubicin:DOX)의 투과성 및 효능 분석

[0087] 독소루비신(DOX)은 485-570 nm의 파장을 방출하며, DOX의 농도는 빛이 차단된 black well로 100㎕씩 분주하여 리더를 통해 형광 강도를 측정하였다. DOX는 마이크로 트렌스 웰(10)에서 형성된 세포(HepG2)-ECM(scaffold)층(11)으로 유입되면서 HepG2 세포는 DOX에 노출되었고 일부 DOX는 ECM (scaffold)층을 투과하였다.

[0088] 도 5는 실험약물(DOX)의 농도에 따른 상대투과도이다. 도 5는 HepG2에서의 DOX의 투과성 및 효능을 나타내었다. 실험은 6회 용량(대조군 포함)으로 나누어 진행하였으며, 대조군 2㎍, 4㎍, 8㎍, 16㎍, 32㎍의 DOX 농도와 비교하였다. 대조군과 달리 마이크로 트렌스 웰(10)의 세포-ECM층(11)을 투과한 DOX의 농도는 도 5에 도시된 바와 같이 상당히 낮아진 것을 볼 수 있다(P값<0.01).

[0089] DOX의 농도가 낮을수록 침투 속도는 낮아지는데 이는 DOX의 일부는 세포에 흡수되거나 ECM(scaffold)로 사용한 매트리겔에 흡수될 수 있다. 따라서, 세포-ECM 층(11)에서 흡수 및 투과된 DOX양이 일정하기 때문에 투과 속도는 DOX 농도에 의해 감소된다는 것을 알 수 있다. 32㎍ DOX에서는 투과된 DOX의 농도와 원래의 농도가 유사하였다.

[0091] 도 6은 실험약물(DOX)의 용량 반응곡선이다. 도 6은 DOX 농도에 의한 세포 생존율을 보여준다. 50% 세포를 사멸시키는 DOX의 농도는 IC_{50} = 3.383㎍인 것으로 분석하였다. 이러한 약물 실험에 의해, 실험 약물이 마이크로 트렌스 웰(10)에 형성된 세포-ECM층(11)에서 성장한 3차원 세포층을 투과하면서 암세포인 HepG2를 사멸시킬 수 있음을 확인하였다.

[0093] 나노입자의 투과성 및 독성 분석

[0094] 마이크로 트렌스 웰(10)에 ECM (scaffold)과 그 안에서 형성된 3차원으로 성장한 HepG2(세포)의 나노입자 투과성 및 독성평가를 진행하기 위해 FITC 25nm SiO_2를 15㎍㎖에서 250㎍㎖까지의 다양한 농도로 무혈청(SF) 및 혈청(SC)의 세포배양액 DMEM에 분배하여 제조하였다.

[0095] 도 7은 나노입자(SiO_2)의 농도에 따른 세포 생존율 반응곡선이다. 세포 독성 분석에서는 도 7의 (a)에 도시된 바와 같이 FITC 25nm SiO_2 나노입자가 무혈청배양액에서 HepG2 세포를 사멸시킨 반면에, 도 7의 (b)에 도시된 바와 같이 혈청배양액에서 분산된 FITC 25nm SiO_2 나노입자는 세포를 사멸시키지 못하였다.

[0096] 3차원으로 성장한 HepG2 세포를 50%까지 사멸시킨 무혈청배양액에 분산된 FITC 25nm SiO_2 농도의 IC_{50} = 113.8㎍㎖인 것을 확인하였다. 그 반대인 혈청배양액에서는 세포가 50%까지도 사멸되지 않았기에 IC_{50} 값을 구할 수 없었다. 따라서, 동일한 FITC 25nm SiO_2 나노입자는 무혈청배양액에서만 세포 독성을 나타내었다.

[0097]

[0098] 마이크로 트렌스 웰(10)의 투과성 분석은 DOX와 마찬가지로 세포 독성 및 효능분석과 동일하게 한 번의 실험으로 분석할 수 있다. 도 8은 나노입자(SiO_2)의 농도에 따른 상대 투과도이다. 도 8의 (a) 및 (b)는 각각 무혈청 배양액 및 혈청 배양액에 FITC 25nm SiO_2 나노입자의 투과를 대조군과 함께 나타내었다. 무혈청 배양액에서는 평균 95%의 투과율을 보였으며 혈청배양액의 평균 84%보다 높은 것을 알 수 있다. 이러한 이유는 혈청배양액에서 FITC 25nm SiO_2 나노입자가 FBS에 의하여 단백질 코로나를 형성하여 크기가 증가함으로써 3차원 세포-ECM층(11)의 투과율을 감소시켰을 것이라 판단된다. 따라서 혈청배양액에 분산된 FITC 25nm SiO_2 나노입자는 무혈청 배양액에 분산된 나노입자보다 투과성 및 세포 독성이 낮은 것을 확인하였다.

[0100] 도 9는 나노입자(SiO_2)의 형광 이미지를 나타낸다. 도 9의 (a)는 무혈청배양액에 분산된 FITC 25nm SiO_2 나노입자가 3차원 세포에 흡수되어있음을 볼 수 있지만, 도 9의 (b)는 혈청배양액에 분산된 FITC 25nm SiO_2 나노입자가 세포에 무혈청 배양액 보다 훨씬 적게 흡수된 것을 볼 수 있었다.

[0101] 도 10은 나노입자(SiO_2)를 처리한 각각의 시간과 세포수에 따른 세포 생존율 반응곡선이다. 도 10의 (a)는 무혈

청배양액에 분산된 FITC 25㎚ SiO_2 나노입자를 노출한 1일 동안은 세포수에 따라 큰 차이를 보이지 않았지만, 도 10의 (b)는 혈청배양액에 분산된 FITC 25㎚ SiO_2 나노입자를 3일 동안 노출하였을때 세포의 수가 적을수록 IC_{50} 값이 낮아지는 경향을 보였다. 이러한 경향은 세포수가 많고 배양을 길게 할 경우 세포끼리의 상호작용으로 인해 저항력이 생기는 것을 알 수 있었다..

[0102] 도 11은 세포양과 나노입자(SiO_2) 노출 시간에 따른 상대 투과도이다. 도 11의 (a) 및 (b)는 각각 무혈청 배양액 으로 FITC 25㎚ SiO_2 나노입자의 투과를 노출 시간에 따라 투과도를 나타내었다. 1일 에서는 큰 차이를 보이지 않았지만, 3일 에서는 세포양이 많을수록 나노입자의 투과가 현저히 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 이것은 세포양이 많을 수로 서로 뭉쳐져 단일 세포가 아닌 구형체를 이루면서 나노입자의 투과가 떨어지는 것으로 볼 수 있다.

[0103] 결과적으로, 실험약물인 독소루비신(DOX) 또는 FITC 25㎚ SiO_2의 나노입자를 사용하여 화합물 또는 나노 입자 침투 및 효능, 세포 독성 분석을 동시에 수행했다. 그 결과, DOX는 IC_{50}이 3.383㎍이고 HepG2 세포주에서 평균 약 82%의 침투성을 보여 주었다. 25㎚ SiO_2 나노입자는 무혈청(SF) 배지에서만 높은 독성 (IC_{50} : 113.8 ㎍㎖) 및 평균 약 96%의 높은 침투성을 나타내었다.

[0104] 이것은 앞서 DLS 결과와 같이 세포배양액에 FBS가 첨가되지 않으면 25㎚ SiO_2 나노입자에 단백질 코로나가 형성이 되지 않아 크기를 그대로 유지하였기 때문이라고 사료되며, 반대로 혈청배지(SC)는 단백질 코로나를 형성하여 나노입자의 크기가 변하여 투과를 못한 것으로 보인다.

[0106] 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

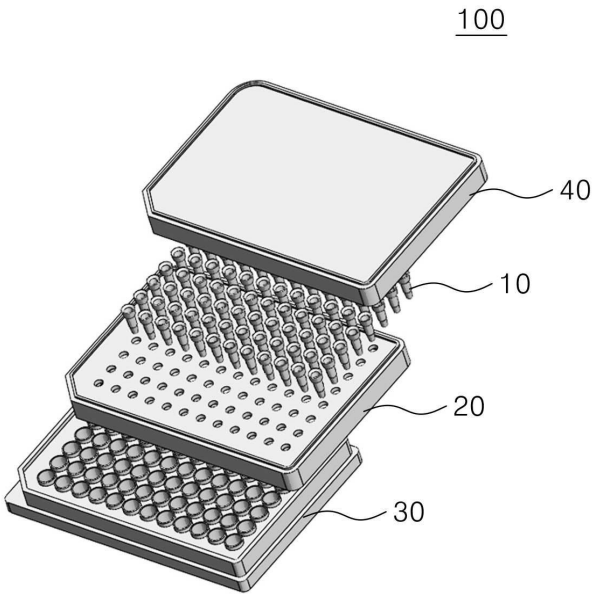
부호의 설명

[0108]

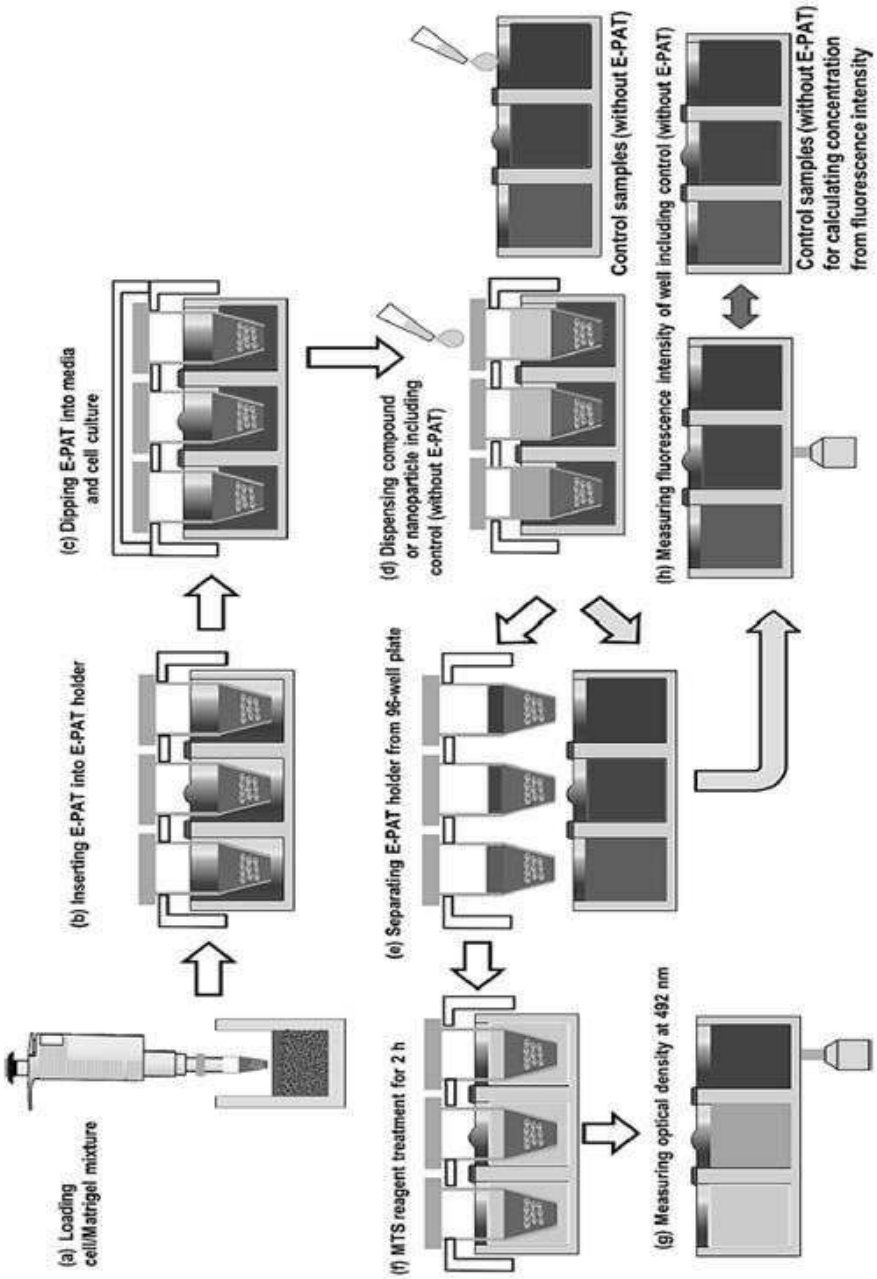
100 : 플랫폼	10 : 마이크로 트렌스 웰
11 : 세포-ECM층	20 : 홀더
30 : 웰 플레이트	40 : 덮개
1 : 세포	3 : 화합물 또는 나노입자
50 : 피펫	

도면

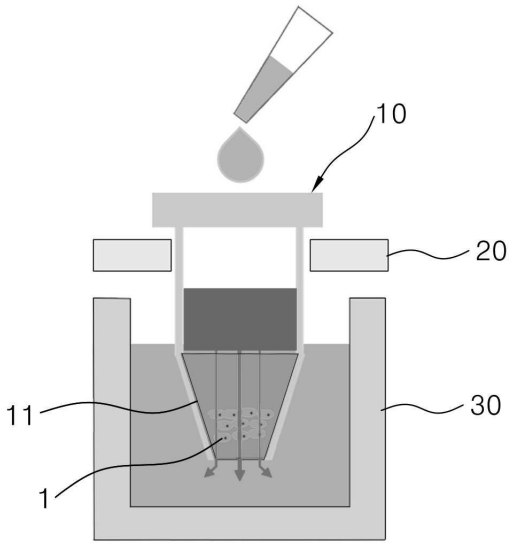
도면1



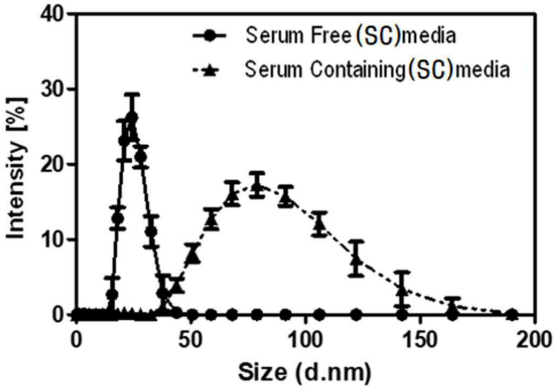
도면2


(a) Loading cell/Matrigel mixture
(b) Inserting E-PAT into E-PAT holder
(c) Dipping E-PAT into media and cell culture
(d) Dispensing compound or nanoparticle including control (without E-PAT)
Control samples (without E-PAT)
(e) Separating E-PAT holder from 96-well plate
(f) MTS reagent treatment for 2 h
(g) Measuring optical density at 492 nm
(h) Measuring fluorescence intensity of well including control (without E-PAT)
Control samples (without E-PAT) for calculating concentration from fluorescence intensity

도면3

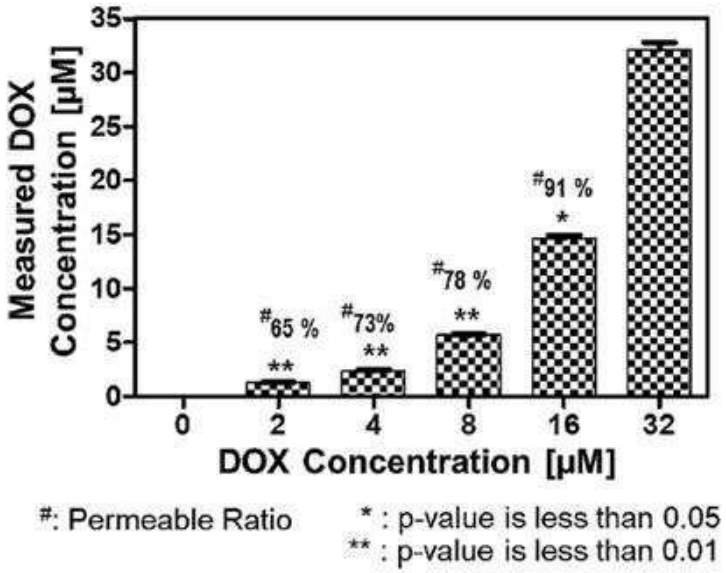


도면4

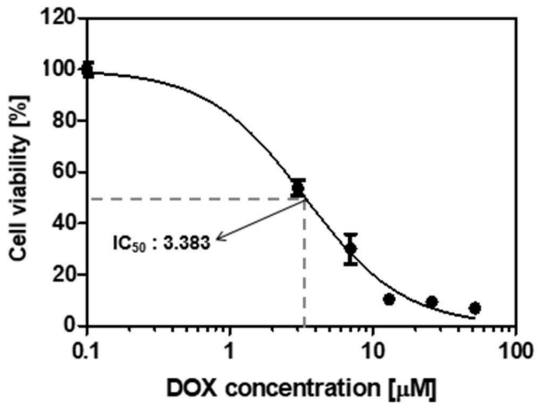


Media	Size (diameter, nm)
Serum Free (SF)	24.08 ± 4.7
Serum Containing (SC)	77.04 ± 21.4

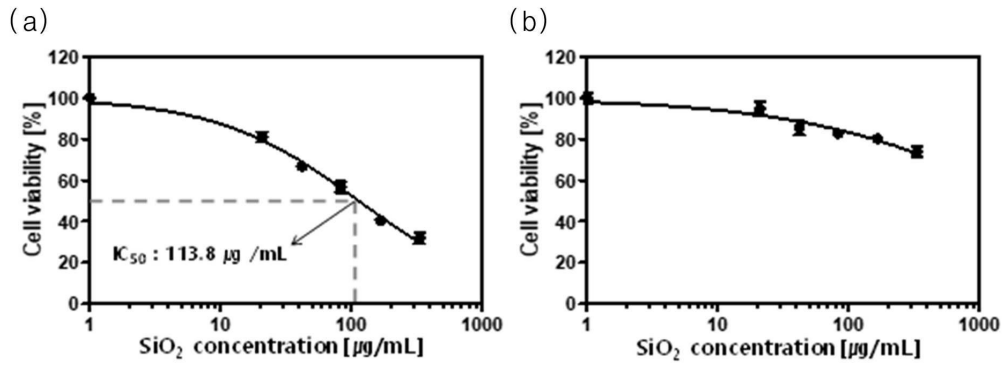
도면5


Measured DOX Concentration [μM]
35
30
25
20
15
10
5
0
#65 %
**
#73%
**
#78 %
**
#91 %
*
0
2
4
8
16
32
DOX Concentration [μM]
#: Permeable Ratio
* : p-value is less than 0.05
** : p-value is less than 0.01

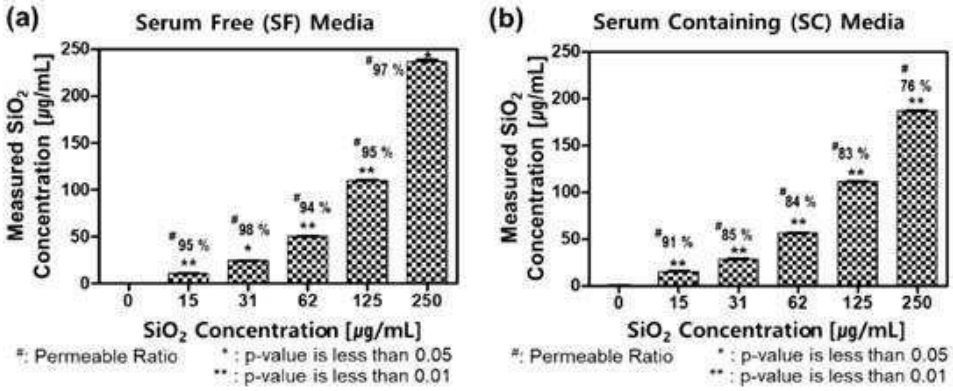
도면6


Cell viability [%]
120
100
80
60
40
20
0
IC50 : 3.383
0.1
1
10
100
DOX concentration [μM]

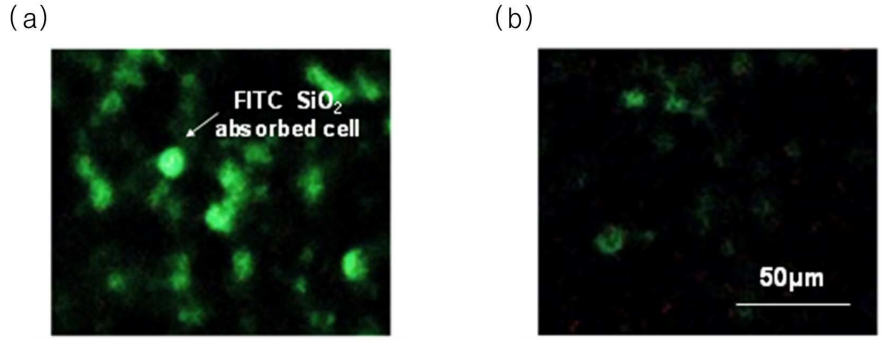
도면7


(a)
(b)
Cell viability [%]
120
100
80
60
40
20
0
IC50 : 113.8 μg /mL
1
10
100
1000
SiO2 concentration [μg/mL]

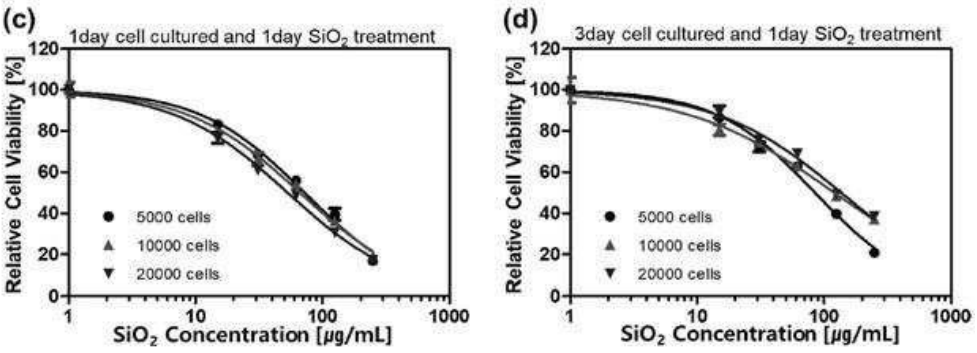
도면8


(a)
Serum Free (SF) Media
Measured SiO2 Concentration [μg/mL]
SiO2 Concentration [μg/mL]
#: Permeable Ratio
* : p-value is less than 0.05
** : p-value is less than 0.01
(b)
Serum Containing (SC) Media
Measured SiO2 Concentration [μg/mL]
SiO2 Concentration [μg/mL]
#: Permeable Ratio
* : p-value is less than 0.05
** : p-value is less than 0.01

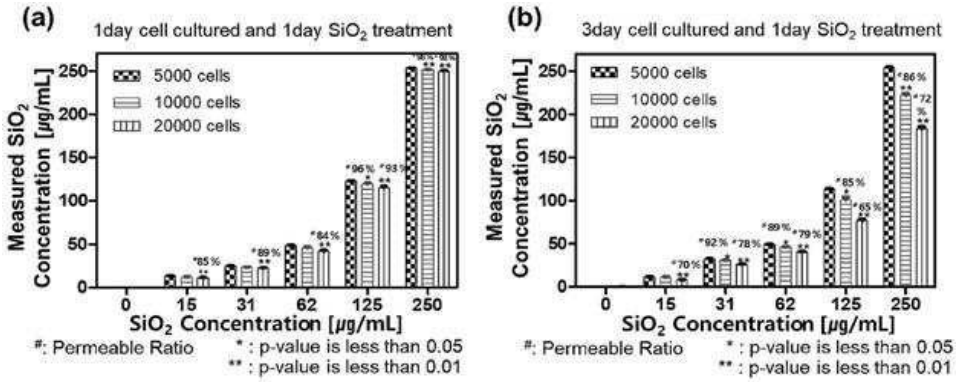
도면9


(a)
FITC SiO2 absorbed cell
(b)
50μm

도면10


(c)
1day cell cultured and 1day SiO2 treatment
Relative Cell Viability [%]
5000 cells
10000 cells
20000 cells
SiO2 Concentration [μg/mL]
(d)
3day cell cultured and 1day SiO2 treatment
Relative Cell Viability [%]
5000 cells
10000 cells
20000 cells
SiO2 Concentration [μg/mL]

도면11


(a)
1day cell cultured and 1day SiO2 treatment
5000 cells
10000 cells
20000 cells
Measured SiO2 Concentration [μg/mL]
SiO2 Concentration [μg/mL]
#: Permeable Ratio
* : p-value is less than 0.05
** : p-value is less than 0.01
(b)
3day cell cultured and 1day SiO2 treatment
5000 cells
10000 cells
20000 cells
Measured SiO2 Concentration [μg/mL]
SiO2 Concentration [μg/mL]
#: Permeable Ratio
* : p-value is less than 0.05
** : p-value is less than 0.01