(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0052549
(43) 공개일자 2018년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/32 (2006.01) *C12M 1/26* (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01) *C12N 5/09* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/12 (2013.01)
C12M 23/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0149889
(22) 출원일자 2017년11월10일
심사청구일자 2017년11월10일
(30) 우선권주장
1020160149798 2016년11월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
정기석
서울특별시 노원구 동일로227길 86, 1603동 1406호(상계동, 상계주공16단지아파트)
황창모
서울특별시 성북구 북악산로 828, 101동 202호(정릉동, 스카이쌍용아파트)
장세진
경기도 성남시 분당고 야탑로 124, 605동 704호(야탑동, 탑마을벽산아파트)
(74) 대리인
제일특허법인

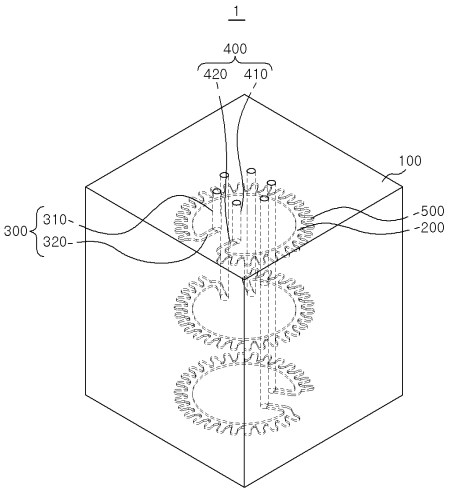
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **삼차원 채널 구조물**

(57) 요 약

본 발명의 일 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물은 내부에 통로가 형성된 브릿지 채널, 브릿지 채널의 외측으로 돌출 구비되고, 브릿지 채널을 따라 적어도 하나가 형성되며, 내부 공간은 통로와 연통되는 적어도 하나의 웰, 브릿지 채널의 일측 단부에 연결되는 유입 채널 및 브릿지 채널의 타측 단부에 연결되는 배출 채널을 포함할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12M 33/22 (2013.01)
C12N 5/0693 (2013.01)
C12N 2501/80 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 10067407
부처명 산업자원부
연구관리전문기관 산업기술평가원
연구사업명 산업기술혁신 사업
연구과제명 환자유래 오가노이드 기반 고속/고용량 투명화 시스템과 3차원 이미징시스템의 개발
기 여 율 1/1
주관기관 로고스바이오시스템즈
연구기간 2016.10.01 ~ 2020.09.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

내부에 통로가 형성된 브릿지 채널;

상기 브릿지 채널의 외측으로 돌출 구비되고, 상기 브릿지 채널을 따라 적어도 하나가 형성되며, 내부 공간은 상기 통로와 연통되는 적어도 하나의 웰;

상기 브릿지 채널의 일측 단부에 연결되는 유입 채널; 및

상기 브릿지 채널의 타측 단부에 연결되는 배출 채널;을 포함하는 삼차원 채널 구조물.

청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 브릿지 채널은 곡선, 꺾인선, 호형, 원형, 나선형 또는 다각형으로 형성되는 삼차원 채널 구조물.

청구항 3

제1 항에 있어서,

상기 유입 채널은 상기 브릿지 채널의 일측 단부와 연통되는 제1 연통부; 및

상기 제1 연통부에서 절곡 연장되는 제1 연장부를 포함하고,

상기 배출 채널은,

상기 브릿지 채널의 타측 단부와 연통되는 제2 연통부; 및

상기 제2 연통부에서 절곡 연장되는 제2 연장부;를 포함하는 삼차원 채널 구조물.

청구항 4

제1 항에 있어서,

상기 브릿지 채널은 복수 회 절곡되어 형성된 삼차원 채널 구조물.

청구항 5

제1 항 내지 제4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 웰은 상기 브릿지 채널로 갈수록 상기 웰의 입구 직경이 증가하거나 감소하도록 형성된 삼차원 채널 구조물.

청구항 6

제1 항 내지 제5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 브릿지 채널, 상기 유입 채널 및 상기 배출 채널은 경화성 중합체로 일체로 형성되는 삼차원 채널 구조물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 삼차원 채널 구조물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항암제를 포함하는 약물에 대한 평가는 약 10년 가량 약물의 효능 및 독성 평가를 수행하여 이루어진다. 그 후

최종적으로 해당 약물은 환자에게 사용이 가능하다. 일반적으로 기초 약물 후보군에 대한 약물의 효능 및 독성 평가를 수행하기 위해서, 세포 배양 접시에 암세포를 배양하고 여기에 약물 후보물질을 투여한 후에 해당 암세포의 사멸 또는 유전자 발현 등을 측정하는 방법을 사용한다. 이와 같이 세포 수준에서 약물의 효능 및 독성 평가를 수행한 후에 동물실험을 수행한다. 동물실험을 거친 약물에 대하여 임상시험을 실시하게 되며, 이러한 평가과정을 모두 거친 후에 해당 약물은 상업적 판매가 가능하다.

[0003] 이와 같이 약물에 대한 평가는 일반적으로 10년 이상의 기간이 소요된다. 이러한 과정에서 금전적으로 막대한 비용이 소요되는 문제가 있어서, 신약 개발 과정은 소위 죽음의 계곡이라고 불리기도 한다.

[0004] 세포 수준에서 약물을 투여를 했을 때 효과를 보였음에도, 해당 약물을 동물 실험 또는 임상 실험에 적용했을 때에 효과를 나타내지 않을 수 있다. 그 원인으로는 세포 수준의 2차원 배양에 약물을 투여하여 약물을 평가하는 시스템에서는 세포가 실제로 작용하는 환경을 입체적으로 반영하지 못하여, 약물의 효과를 정확하게 측정하지 못하는 것이 중요한 이유라고 알려져 있다. 다세포 종양 응집체(Multicellular Tumor Spheroid)에는 암세포와 함께 혈관조직, 섬유아세포, 면역세포 및 세포외기질(extracellular matrix)이 복합적으로 구성되어 있다.

[0005] 이러한 종양 응집체는 유기적으로 작용하여 성장인자를 비롯한 다양한 생체 물질을 분비하여 상호보완적으로 암세포와 함께 성장해 나간다. 이러한 다세포 종양 응집체에 대하여 항암제 약물을 투여했을 경우 일시적으로 암세포를 사멸시킬 수 있다. 그러나, 약물을 암세포로 전달하는 방식이 약물 분자의 확산을 이용하기 때문에 투여한 약물이 상기의 다세포 종양 응집체 조직의 내부에 있는 암세포에 도달하기 어렵고, 또한 약물에 대한 암세포의 유전적 변이에 의해서 내성이 생기게 되어 해당 약물에 대한 효과가 초기와 같은 상태로 지속되기 힘들다는 문제가 있다.

[0006] 최근까지도 세포 수준에서의 약물 평가는 암세포를 둘러싸고 있는 다세포 종양 응집체 조직간의 상호작용을 반영하지 못하고, 평면적으로 2차원상에서 배양된 암세포에 대한 약물의 반응을 측정하였다. 따라서, 세포수준에서 좋은 효과를 나타낸 약물을 동물 실험 또는 임상 실험에 적용했을 때 실험 결과와 상이한 결과를 나타내는 경우가 빈번하였다. 이러한 문제로 인해서, 항암제와 같은 신약 개발 과정은 장시간이 소용되고 막대한 비용이 소요되었다. 또한, 예상치 못한 독성 및 부작용이 발생하여 신약개발 자체가 중지되기도 하였다.

[0007] 따라서, 이러한 문제점을 해결하여 약물의 효능을 평가하고 신약 개발에 적용하기 위해서 체내의 입체적 환경을 모사한 시스템을 개발하는 연구가 필요한 실정이다.

[0008] 한편, 오가노이드(organoid)는 '장기유사체' 또는 '유사장기'라고도 칭하는데, 줄기세포나 장기 기원 세포로부터 분리한 세포를 3차원 배양법으로 다시 응집·재조합하여 제조된 장기 특이적 세포 집합체로서, 모델로 하는 장기의 특이적 세포를 포함하고, 장기가 지닌 특정 기능을 재현하며, 실제 장기와 유사한 형태로 공간적 조직화가 가능하다. 환자유래 종양 오가노이드(patient-derived tumor organoid)는 환자의 암세포 및 암조직의 특성을 그대로 나타내며 또한 환자 암조직의 유전적 변이 특성을 재현할 수 있다고 보고되었다. 따라서, 이를 이용한다면, 환자 맞춤형 약물평가 시스템 구축이 가능하다.

[0009] 이러한 시스템을 구현하기 위해서는 다양한 세포를 공배양(co-culturing)하고, 오가노이드를 효율적으로 형성하는 기술이 필수적으로 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 복수 개의 웰을 포함하는 삼차원 채널 구조물을 제공하는데 발명의 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물은 내부에 통로가 형성된 브릿지 채널, 브릿지 채널의 외측으로 돌출 구비되고, 브릿지 채널을 따라 적어도 하나가 형성되며, 내부 공간은 통로와 연통되는 적어도 하나의 웰, 브릿지 채널의 일측 단부에 연결되는 유입 채널 및 브릿지 채널의 타측 단부에 연결되는 배출 채널을 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물에서 브릿지 채널은 곡선, 꺾인선, 호형, 원형, 나선형 또는 다각형으로 형성될 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물에서 유입 채널은 브릿지 채널의 일측 단부와 연통되는 제1 연

통부 및 제1 연통부에서 절곡 연장되는 제1 연장부를 포함하고, 배출 채널은, 브릿지 채널의 타측 단부와 연통되는 제2 연통부; 및 제2 연통부에서 절곡 연장되는 제2 연장부를 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물에서 브릿지 채널은 복수 회 절곡되어 형성될 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물에서 제1 항 내지 제4 항 중 어느 한 항에 있어서, 웰은 브릿지 채널로 갈수록 웰의 입구 직경이 증가하거나 감소하도록 형성될 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물에서 브릿지 채널, 유입 채널 및 배출 채널은 글래스 또는 경화성 중합체로 일체로 형성될 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물은 복수 개의 웰을 포함하며, 여기에서 세포를 배양할 경우 용이하게 삼차원 세포 응집체를 형성 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로유체칩과 마이크로유체칩에 결합된 기판을 도시한 개략 사시도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로 유체칩의 저면 사시도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로 유체칩의 저면도이다.

도 4a 내지 도 4l은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로 유체칩의 변형예를 도시한 저면도이다.

도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따른 마이크로유체칩의 사시도이다.

도 6은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 마이크로유체칩의 사시도이다.

도 7은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 마이크로유체칩의 사시도이다.

도 8은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 마이크로유체칩의 사시도이다.

도 9는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물의 사시도이다.

도 10은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물의 사시도이다.

도 11은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물의 평면도이다.

도 12a 내지 도 12g는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물의 브릿지 채널의 변형예들의 평면도이다.

도 13은 원형 형태의 브릿지 채널 및 세포를 위치시킬 수 있는 삼차원 채널 구조물을 나타낸다.

도 14a 내지 14f는 암세포를 마이크로유체칩에 시딩(seeding)하는 방법을 나타낸다.

도 15a는 원심력에 의해 세포 웰 내부로 이동하는 모습을 개략적으로 도시한 것이고. 도 b는 원심력에 의해서 세포가 웰 바닥에 위치된 것을 촬영한 사진이다.

도 16a 내지 16c는 1차 시딩으로 폐암세포주(A549)를 주입하고 2차 시딩으로 섬유아세포를 주입한 후, 이를 형광현미경 및 광학현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다. 도 16a는 각 세포의 위치 및 콜라겐과 배양액의 흐름 방향을 나타내는 모식도이다. 도 16b는 폐암 세포주(A549) 및 섬유아세포를 형광현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다. 도 16c는 광학현미경으로 A549, 섬유아세포, 및 혈관세포 (HUVECs)를 관찰한 결과를 나타낸다.

도 17a 내지 도 17d는 췌장암 세포를 마이크로유체칩에 주입한 후에 암 세포가 성장하여 혈관구조 방향으로 이동하고 있는 것을 나타낸다.

도 18은 폐암 세포를 마이크로유체칩에 주입한 후에 암 세포가 성장하여 다세포 종양 응집체로 발전한 것(Multicellular Tumor Spheroid)을 나타낸다.

도 19a 내지 도 19d는 도 18에서 주입한 폐암 세포, 콜라겐 매트릭스, 및 혈관세포가 하나의 조직처럼 형성되어 있는 것을 형광현미경 (a), 공초점 현미경 (b), 및 전자 현미경 (c, d)으로 관찰한 것을 나타낸다. b는 종양 조

직 형성 (tumor formation) 후에 전자현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

도 20은 도 17a 내지 도 17d에서 시딩한 췌장암 세포에 대하여 젬시타빈을 처리한 후에, 암 세포의 분포 면적과 암 세포가 혈관 구조에 도달하는 속도를 측정한 결과를 나타낸다. 상단의 왼쪽은 암 세포의 분포 면적의 변화를 나타내고 상단의 오른쪽은 암 세포의 혈관 구조에 도달하는 속도의 변화를 나타낸다. 하단의 그림은 젬시타빈의 처리 전후의 암세포의 분포를 형광현미경 및 광학현미경을 이용하여 확인한 것을 나타낸다.

도 21a 내지 도 21c는 도 18에서 시딩한 폐암 세포에 대하여 MMP-1 억제제 (Matrix metalloproteinase-1 inhibitor)를 처리한 후에 세포를 광학 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다. 도 21a는 MMP-1 저해제를 10 uM, 50 uM, 및 100 uM을 처리한 후에 세포의 분포 변화를 광학현미경으로 관찰한 결과로서, 상단은 MMP-1 저해제를 처리한 것이고 하단은 MMP-1 저해제를 처리하지 않고 DMSO를 처리한 것을 나타낸다. 도 21b는 a에서 MMP-1 저해제를 농도별로 처리한 후에 바닥에 위치한 폐암 세포가 원래의 위치에서 떨어져 나와 이동한 거리를 나타낸 것을 나타내는 그래프이다. 도 21c는 a에서 MMP-1 저해제 농도별로 처리한 후에 바닥에 위치한 폐암 세포가 혈관 세포의 이동한 면적을 나타내는 그래프이다.

도 22는 종양 오가노이드의 발달 과정을 광학현미경을 이용하여 날짜별로 확인한 것이다.

도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세유체칩에 유체를 공급하는 구성이 개시된 사진이며, 미세유체칩에 배양액을 지속적으로 공급하기 위한 배양액 보관통 및 실로 연결된 유량 조절시스템이 도시되어 있다.

도 24는 종양세포 및 주위 조직간의 상호 작용에 의해서 종양이 형성되는 과정을 나타낸다.

도 25는 종양이 형성되는 과정을 날짜별로 나타낸다.

도 26은 종양조직이 형성되는 과정에서 혈관세포와 섬유아세포가 정렬되면서 종양세포를 위로 당기는 것을 나타낸다.

도 27은 종양형성 과정에서 형상조절인자(TGFβ)가 발현되고, 또한 기질단백질분해효소(MMP1,9)가 발현되어 종양형성이 가속화되는 것을 나타낸다.

도 28은 배양된 종양조직의 표면을 관찰한 사진이다.

도 29는 체외 종양 모델 형성과정에서 채널내에서 혈관이 형성되는 과정을 관찰한 사진이다.

도 30은 채널내에서 종양이 형성된 것을 모델링한 것이다.

도 31은 채널내에서 종양이 형성된 것을 확인한 형광사진이다.

도 32는 혈관 네트워크가 형성된 종양 모델에 대한 전자주사 현미경 사진이다.

도 33은 종양이 형성되는 기간을 나타내는 그래프이다.

도 34a 내지 도 34d는 콘포칼 현미경 사진을 이용하여 단층 촬영 및 3차원으로 분석한 사진이다.

도 35a 및 도 35b는 형성된 종양을 서로 합쳐서 큰 종양으로 만들 수 있음을 나타내며, 내부에 혈관이 형성되어 있음을 보여주는 콘포칼 현미경 사진이다.

도 36a 내지 도 36f는 종양의 형성과정에서 섬유아세포의 영향에 의해서 세포내 유전적 변형이 발생함을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하에서는 본 발명의 사상을 구현하기 위한 구체적인 실시예에 대하여 도면을 참조하여 상세히 설명하도록 한다. 여기서, 도면은 설명의 편의를 위해 일정한 비율로 그려지지 않았음을 밝혀둔다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 구성 또는 기능에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략한다.

[0020] 이하에서는 도 1 내지 도 4를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로유체칩의 구성에 대해 설명한다. 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로유체칩과 마이크로유체칩에 결합된 기판을 도시한 개략 사시도이고, 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로 유체칩의 저면 사시도이고, 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로 유체칩의 저면도이고, 도 4a 내지 도 4k는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로 유체칩의 변형예를 도시한 저면도이다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로유체칩(1)은 플레이트(100), 브릿지 채널(200), 유입부(300), 배출부(400) 및 웰(500)을 포함할 수 있다.

[0022] 플레이트(100)는 마이크로유체칩(1)의 외관을 형성하는 부재로서, 글래스(glass) 또는 경화성 중합체로 형성될 수 있다. 예를 들어, 플레이트(100)는 실리콘 성분을 포함하여 형성될 수 있다.

[0023] 플레이트(100)의 일면에는 음각으로 브릿지 채널(200)이 형성될 수 있다. 브릿지 채널(200)은 세포, 세포 배양 배지를 포함하는 유체 등(이하, '유체'라 통칭함)이 이동할 수 있는 통로를 제공해 주는 것으로서, 플레이트(100)의 일면에서 소정 깊이 음각되어 형성될 수 있다. 따라서, 플레이트(100)의 일면에 기판(600)이 결합하는 경우, 브릿지 채널(200)의 개방된 부분이 밀폐되어 브릿지 채널(200)은 호스 또는 파이프와 같이 유체가 이동할 수 있는 통로를 제공할 수 있다.

[0024] 이러한 브릿지 채널(200)은 다양한 형상으로 구비될 수 있다. 예를 들어, 브릿지 채널(200)은 곡선, 꺾인선, 호형, 원형, 나선형, 다각형 등 다양한 형상으로 구비될 수 있다. 브릿지 채널(200)의 형상에 대한 상세한 설명은 후술한다.

[0025] 유입부(300)는 유체가 펌프 등의 구동부에 의해 유입되는 부분으로서, 플레이트(100)를 관통하여 형성될 수 있으며, 플레이트(100)를 관통한 단부는 브릿지 채널(200)과 연결될 수 있다. 다시 말해, 유입부(300)는 브릿지 채널(200)의 일측 단부와 연통하도록 플레이트(100)를 관통하여 형성될 수 있다.

[0026] 유입부(300)는 플레이트(100)를 관통하여 형성되는 제1 통로(310) 및 제1 통로(310)와 브릿지 채널(200)의 일측 단부를 연결하는 제1 연결홈(320)을 포함할 수 있다. 제1 통로(310)는 플레이트(100)를 관통하는 영역으로서, 플레이트(100)의 타면으로 입구가 노출될 수 있으며, 제1 연결홈(320)은 플레이트(100)의 일면에 소정 깊이 인입되어 형성될 수 있다. 여기서, 제1 통로(310)를 브릿지 채널(200)의 일측 단부에 대응하는 위치에 형성하는 경우, 제1 연결홈(320)은 생략될 수 있다. 다시 말해, 브릿지 채널(200)의 일측 단부 상측에 제1 통로(310)를 형성하는 경우, 제1 통로(310)는 직접 브릿지 채널(200)과 연통할 수 있다.

[0027] 배출부(400)는 유입부(300)를 통해 브릿지 채널(200)로 유입된 유체가 브릿지 채널(200) 및 웰(500)을 순환한 후 배출되는 부분으로서, 플레이트(100)를 관통하여 형성될 수 있으며, 플레이트(100)를 관통한 단부는 브릿지 채널(200)과 연결될 수 있다. 다시 말해, 배출부(400)는 브릿지 채널(200)의 타측 단부와 연통하도록 플레이트(100)를 관통하여 형성될 수 있다.

[0028] 배출부(400)는 플레이트(100)를 관통하여 형성되는 제2 통로(410) 및 제2 통로(410)와 브릿지 채널(200)의 타측 단부를 연결하는 제2 연결홈(420)을 포함할 수 있다. 제2 통로(410)는 플레이트(100)를 관통하는 영역으로서, 플레이트(100)의 타면으로 입구가 노출될 수 있으며, 제2 연결홈(420)는 플레이트(100)의 일면에 소정 깊이 인입되어 형성될 수 있다. 여기서, 제2 통로(410)를 브릿지 채널(200)의 타측 단부에 대응하는 위치에 형성하는 경우, 제2 연결홈(420)은 생략될 수 있다. 다시 말해, 브릿지 채널(200)의 타측 단부 상측에 제2 통로(410)를 형성하는 경우, 제2 통로(410)는 직접 브릿지 채널(200)과 연통할 수 있다.

[0029] 한편, 브릿지 채널(200)과 연결된 유입부(300) 및 배출부(400)의 위치는 다양하게 변경될 수 있다. 예를 들어, 유입부(300) 및 배출부(400)는 브릿지 채널(200)의 내측 영역(S1, 도 4a 참조) 또는 외측 영역(S2, 도 4b 참조) 중 어느 하나에 형성될 수 있다. 이와 같이, 유입부(300)와 배출부(400)는 동일한 영역에 형성될 수 있다. 뿐만 아니라, 유입부(300) 및 배출부(400)가 서로 상이한 영역에 형성되는 것도 가능하다. 다시 말해 유입부(300) 및 배출부(400) 중 어느 하나는 브릿지 채널(200)의 내측 영역에 형성되고 다른 하나는 브릿지 채널(200)의 외측 영역에 형성될 수 있다(도 4c 참조). 다만, 유입부(300) 및 배출부(400)의 구성은 제시된 구성에 제한되지 않으며, 플레이트(100)의 타면에 입구가 형성되고, 플레이트(100)의 일면에서 브릿지 채널(200)과 연결되는 구성에 해당하는 한 다양하게 변경 가능하다. 여기서, 브릿지 채널(200)의 유입부(300)와 연결된 부분과 배출부(400)와 연결된 부분은 대칭된 형상으로 형성될 수 있다. 다시 말해, 브릿지 채널(200)은 유입부(300)와 배출부(400) 사이의 중심선(C1)을 기준으로 대칭되는 형상으로 형성될 수 있다. 이러한, 유입부(300)와 배출부(400)의 위치 구성 변경은 브릿지 채널(200)이 원형으로 형성되는 경우뿐만 아니라, 브릿지 채널(200)이 곡선, 꺾인선, 호형, 나선형, 다각형 등으로 형성되는 경우에도 적용가능하다.

[0030] 브릿지 채널에(200)에는 적어도 하나의 웰(500)이 형성될 수 있다. 이러한 웰(500)은 세포 배양 공간 등 다양한 목적으로 활용될 수 있는 공간을 제공하기 위해 구비되는 것으로서 브릿지 채널(200)로부터 플레이트(100)의 외측방향으로 연장되어 형성될 수 있다. 이와 같이 웰(500)을 플레이트(100)의 외측방향으로 연장 형성함으로써, 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로유체칩(1)이 원심 분리기에 장착되어 회전하는 경우, 브릿지 채널(200)에

위치한 유체는 웰(500)로 유입될 수 있다. 웰(500)은 복수 개가 형성될 수 있다. 웰(500)이 복수 개가 형성되는 경우, 웰(500)은 브릿지 채널(200)을 따라 이격되어 형성될 수 있다.

[0031] 또한, 웰(500)은 브릿지 채널(200)로 갈수록 웰(500)의 입구 직경(D1)이 증가하거나 감소하도록 형성된 경사부(510)를 포함할 수 있다.

[0032] 웰(500)은 전체적으로 원기둥 형상으로 형성될 수 있으며, 웰(500)의 브릿지 채널(200)과 연결되지 않은 측의 단부는 플레이트(100)의 외측방향으로 만곡된 곡면으로 형성될 수 있다. 다만, 웰(500)의 형상은 전술한 형상에 제한되지 않으며, 공간을 제공할 수 있는 형상에 해당하는 한 다양한 형상으로 형성될 수 있다. 한편, 웰(500)이 세포 배양 공간으로서 기능하는 경우, 웰(500)의 내부에는 배양 대상 세포가 배치될 수 있다. 여기서, 세포 배양을 위해 필요한 양분을 포함한 유체는 유입부(300)를 통해 브릿지 채널(200)로 유입될 수 있으며, 유체는 브릿지 채널(200)을 흐르면서, 브릿지 채널(200)과 연통되게 형성된 적어도 하나의 웰(500)에 공급될 수 있다. 웰(500)에 공급된 유체는 최종적으로 배출부(400)를 향해 외부로 배출될 수 있다.

[0033] 플레이트(100)의 일면에는 기판(600)이 결합될 수 있다. 기판(600)은 플레이트(100)의 일면에 결합되어 브릿지 채널(200)의 개방된 부분을 밀폐시켜 브릿지 채널(200)이 유체의 이동 통로로서 기능하게 할 수 있다. 이러한 기판(600)은 일 예로서, 슬라이드 글래스, 커버 글래스 등 투평한 재질로 형성될 수 있다.

[0034] 한편, 도 4d 내지 도 4k에는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로유체칩(1)에 제공될 수 있는 다양한 형상의 브릿지 채널(200) 구성이 도시되어 있다. 이하에서는 도 4d 내지 도 4k를 참조하여 브릿지 채널(200)의 다양한 변형예들에 대해 설명한다.

[0035] 도 4d 내지 4k를 더 참조하면, 브릿지 채널(200)은 유체가 이동하는 통로를 제공하는 것으로서 곡선, 꺾인선, 호형, 나선형 또는 다각형으로 형성될 수 있다. 뿐만 아니라, 브릿지 채널(200)은 플레이트(100)의 일면에 복수 개가 형성될 수 있다.

[0036] 도 4d, 도 4e 및 도 4f를 참조하면, 브릿지 채널(200)은 복수 회 굴곡되어 형성될 수 있으며, 예를 들어, 크기가 다른 복수 개의 호형, 원형 또는 다각형이 서로 연결된 상태로 형성될 수 있다. 이때, 브릿지 채널(200)은 일정한 패턴을 가진 정형화된 곡선(도 4d 참조) 또는 나선형(도 4f)으로 형성될 수 있을 뿐만 아니라, 규칙성이 없는 비정형 곡선(도 4e 참조)으로도 형성될 수 있다. 또한, 도 4g 및 도 4h를 참조하면, 브릿지 채널(200)은 사각형(도 4g 참조), 팔각형(도 4h) 등 다양한 형상의 다각형으로도 형성될 수 있다.

[0037] 한편, 도 4i 내지 도 4l를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로유체칩(1)에서 브릿지 채널(200)은 플레이트(100)의 일면에 복수 개가 형성될 수 있다. 다시 말해, 브릿지 채널(200)은 플레이트(100)의 일면에 음각으로 복수 개가 형성될 수 있으며, 유입부(300)는 복수 개의 브릿지 채널(200) 각각의 일측 단부와 연통하도록 플레이트(100)를 관통하여 형성될 수 있고, 배출부(400) 역시 복수 개의 브릿지 채널(200) 각각의 타측 단부와 연통하도록 플레이트(100)를 관통하여 복수 개가 형성될 수 있다(도 4i 참조).

[0038] 복수 개의 브릿지 채널(200)은 서로 직경이 다른 호형 또는 원형으로 형성될 수 있으며, 이때, 복수 개의 브릿지 채널(200) 중 가장 작은 직경을 갖는 브릿지 채널(200)이 내측에 배치되고, 가장 큰 직경을 갖는 브릿지 채널(200)이 외측에 배치될 수 있다(도 4j 참조). 뿐만 아니라, 브릿지 채널(200)은 폐쇄된 또는 일부분이 개방된 넓이가 서로 다른 복수의 다각형으로 형성될 수 있으며, 이때, 복수 개의 브릿지 채널(200) 중 가장 작은 넓이를 갖는 브릿지 채널(200)이 내측에 배치되고, 가장 큰 넓이를 갖는 브릿지 채널(200)이 외측에 배치될 수 있다(도 4k 참조). 이와 같이 복수 개의 브릿지 채널(200) 중 적어도 어느 하나의 브릿지 채널(200)과 다른 브릿지 채널(200)이 중첩되지 않도록 브릿지 채널(200) 각각을 독립적으로 형성할 수 있을 뿐만 아니라(도 4i 내지 도 4k 참조), 복수 개의 브릿지 채널(200) 중 적어도 두 개의 브리지 채널이 서로 연결되도록 브릿지 채널(200)을 형성할 수도 있다(도 4l 참조). 이상에서는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로유체칩(1)에 형성되는 다양한 형태의 브릿지 채널(200) 구성에 대해 설명하였다. 다만, 브릿지 채널(200)의 구성은 제시된 실시예에 제한되지 않으며, 마이크로유체칩(1)이 회전장치, 다시 말해, 원심분리기에 장착되어 회전하는 경우 유체가 브릿지 채널(200)에서 웰(500)로 이동할 수 있는 구성에 해당하는 한 다양하게 변경가능하다.

[0040] 이하에서는 도 5 내지 도 7을 참조하여, 본 발명의 다른 실시예들 따른 마이크로유체칩(1)의 구성에 대해 설명한다.

[0041] 도 5 내지 도 7을 참조하면, 본 발명의 다른 실시예에 따른 마이크로유체칩(1)은 플레이트(100), 플레이트(10

0)의 내부에 형성된 브릿지 채널(200), 브릿지 채널(200)의 일측 단부와 연통하도록 상기 플레이트(100)에 형성된 유입부(300), 브릿지 채널(300)의 타측 단부와 연통하도록 플레이트에 형성된 배출부(400) 및 브릿지 채널(200)로부터 플레이트(100)의 외측 방향으로 연장되어 공간을 제공하는 적어도 하나의 웰(500)을 포함할 수 있으며, 브릿지 채널(200)은 곡선, 꺾인선, 호형, 원형, 나선형 또는 다각형으로 형성될 수 있다.

[0042] 여기서, 본 발명의 다른 실시예에 따른 마이크로유체칩(1)은 브릿지 채널(200)이 플레이트(100)의 내부에 형성되는 구성을 제외하고, 브릿지 채널(200)의 형상, 유입부(300)의 배치구성 및 배출부(400)의 배치구성 더하여 이러한 구성들의 변형예들까지 도 1 내지 도 4에 도시된 마이크로유체칩과 동일하다 따라서 동일한 구성에 대한 상세한 설명은 생략하고 상기한 설명에 갈음한다.

[0043] 도 5 내지 도 7을 참조하면, 본 발명의 다른 실시예에 따른 마이크로유체칩(1)에서 브릿지 채널(200)은 플레이트(100)의 내부에 형성될 수 있다. 따라서, 플레이트(100)에 별도의 기판을 결합하지 않아도 브릿지 채널(200)은 유체가 이동할 수 있는 통로를 제공할 수 있다. 또한, 도 5 내지 도 7에는 브릿지 채널(200)이 원형으로 형성된 구성만이 도시되어 있으나, 브릿지 채널(200)의 형상은 전술한 바와 같이 곡선, 꺾인선, 호형, 나선형 또는 다각형으로 다양하게 변경될 수 있다. 다시 말해, 브릿지 채널(200)의 형상은 유체가 이동할 수 있는 통로를 제공할 수 있는 한 다양한 형상으로 변경 가능하다.

[0044] 브릿지 채널(200)의 일측에는 유체가 유입되는 유입부(300)가 연결될 수 있으며 유입부(300) 플레이트(100)를 관통하여 형성되는 제1 통로(310) 및 제1 통로(310)와 브릿지 채널(200)의 일측 단부를 연결하는 제1 연결통로(320)를 포함할 수 있다.

[0045] 브릿지 채털(200)의 타측에는 유체가 배출되는 배출부(400)가 연결될 수 있으며, 배출부(400)는 플레이트(100)를 관통하여 형성되는 제2 통로(410) 및 제2 통로(410)와 브릿지 채널(200)의 타측 단부를 연결하는 제2 연결통로(420)를 포함할 수 있다.

[0046] 한편, 브릿지 채널(200)은 복수 개가 형성될 수 있다. 예를 들어, 브릿지 채널(200)은 플레이트(100)의 상하 방향으로 이격되도록 복수개가 형성될 수 있다.

[0047] 브릿지 채널(200)을 복수 개로 형성하는 경우, 유입부(300) 및 배출부(400)는 복수 개의 브릿지 채널(200)에 대응하여 복수 개로 형성될 수 있다. 예를 들어, 유입부(300)는 복수 개의 브릿지 채널(200) 각각에 연통되도록 복수 개가 구비될 수 있으며, 복수 개의 유입부(300)는 서로 이격되어 독립된 통로를 형성할 수 있다. 또한, 배출부(400)는 복수 개의 브릿지 채널(200) 각각에 연통되도록 복수 개가 구비될 수 있으며, 복수 개의 배출부(400)는 서로 이격되어 독립된 통로를 형성할 수 있다(도 5 참조).

[0048] 뿐만 아니라, 브릿지 채널(200)을 복수 개로 형성하는 경우, 유입부(300) 및 배출부(400)를 단일하게 형성하는 것도 가능하다. 유입부(300) 및 배출부(400)가 단일하게 형성되는 경우, 복수 개의 브릿지 채널(200)은 유입부(300) 및 배출부(400)를 공유하도록 형성될 수 있다(도16 참조).

[0049] 한편, 브릿지 채널(200)이 형성된 블록(110, 120, 130)을 복수 개 적층하여 플레이트(100)를 형성하는 것도 가능하다. 다시 말해, 도 7을 참조하면, 플레이트(100)는 복수 개의 블록(110, 120, 130)이 적층된 형상으로 구비될 수 있으며, 각각의 블록(110, 120, 130)에는 적어도 하나의 브릿지 채널(200)이 형성될 수 있다.

[0050] 이하에서는, 도 8을 참조하여 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 마이크로유체칩(1)의 구성에 대해 설명한다. 도 8을 참조하면 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 마이크로유체칩(1)은 플레이트(100), 플레이트(100)의 내부에 형성된 브릿지 채널(200), 브릿지 채널(200)의 일측 단부와 연통하도록 상기 플레이트(100)에 형성된 유입부(300), 브릿지 채널(300)의 타측 단부와 연통하도록 플레이트에 형성된 배출부(400) 및 브릿지 채널(200)로부터 플레이트(100)의 외측 방향으로 연장되어 공간을 제공하는 적어도 하나의 웰(500)을 포함할 수 있으며, 브릿지 채널(200)은 플레이트(100)의 상하 방향으로 연장된 나선형으로 형성될 수 있다.

[0051] 여기서, 브릿지 채널(200)이 전체적으로 나선형상으로 플레이트(100)의 상하 방향으로 연장된 나선형에 해당하는 한 브리릿지 채널(200) 부분 부분은 곡선, 꺾인서, 호형, 다각형 등으로 다양하게 변경될 수 있다.

[0053] 이하에서는 도 9 내지 도 12를 참조하여 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물에 대해 설명한다. 도 9는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물의 사시도이고, 도 10은 도 9의 A-A'에 따른 단면도이도, 도 11은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물의 평면도이고, 도 12는 본 발

명의 또 다른 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물의 브릿지 채널의 변형예들의 평면도이다.

[0054] 도 9 내지 도 12를 참조하면 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물(10)은 내부에 통로가 형성된 브릿지 채널(200), 브릿지 채널(200)의 외측으로 돌출 구비되고, 브릿지 채널을 따라 적어도 하나가 형성되며, 내부 공간은 브릿지 채널(200)의 내부 통로와 연통되는 적어도 하나의 웰(500), 브릿지 채널(200)의 일측 단부에 연결되는 유입 채널(300) 및 브릿지 채널(200)의 타측 단부에 연결되는 배출 채널(400)을 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물(10)은 브릿지 채널(200)에 구비된 웰(500)의 내부 공간을 활용하여 세포 배양, 세포 실험 등을 하기 위해 구비될 수 있으며, 예를 들어, 실리콘과 같은 경화성 중합체를 사용하여 제작되거나, 수지를 사출성형한 사출 성형물로 제작될 수 있다.

[0056] 유입 채널(300)은 유체가 유입되는 통로로서 기능할 수 있으며, 브릿지 채널(200)의 일측 단부와 연통되게 구비될 수 있다. 이러한 유입 채널(300)은 브릿지 채널(200)의 일측 단부와 연통되는 제1 연통부(310) 및 제1 연통부(310)에서 절곡 연장되는 제1 연장부(320)를 포함할 수 있다. 여기서, 유입 채널(300)은 브릿지 채널(200)의 내측 영역(S1) 또는 외측 영역(S2)에 배치될 수 있다. 다시 말해, 제1 연통부(310)를 브릿지 채널(200) 내측으로 연장되게 형성하여 유입 채널(300)을 브릿지 채널(200)의 내측 영역에 배치시키거나(도 9 참조), 제1 연통부(310)를 브릿지 채널(200) 외측으로 연장되게 형성하여 유입 채널(300)을 브릿지 채널(200)의 외측영역에 배치시킬 수 있다(도 12a 참조).

[0057] 배출 채널(400)은 유입 채널(300)을 통해 유입된 유체가 브릿지 채널(200) 및 웰(500)을 순환한 후 최종적으로 배출되는 통로로서 기능할 수 있으며, 브릿지 채널(200)의 타측 단부와 연통되게 구비될 수 있다. 이러한 배출 채널(400)은 브릿지 채널(200)의 타측 단부와 연통되는 제2 연통부(410) 및 제2 연통부(410)에서 절곡 연장되는 제2 연장부(420)를 포함할 수 잇다. 배출 채널(400)도 유입 채널(300)과 마찬가지로 브릿지 채널(200)의 내측 영역(S1) 또는 외측 영역(S2)에 배치 가능하다. 다시 말해, 제2 연통부(410)를 브릿지 채널(200)의 내측으로 연장되게 형성하여 배출 채널(400)을 브릿지 채널(200)의 내측 영역에 배치시키거나, 제2 연통부(410)를 브릿지 채널(200) 외측으로 연장되게 형성하여 배출 채널(400)을 브릿지 채널(200)의 외측 영역에 배치시킬 수 있다.

[0058] 뿐만 아니라, 유입 채널(300) 및 배출 채널(400) 중 어느 하나는 브릿지 채널(200)의 내측에 배치시키고, 다른 하나는 브릿지 채널(200)의 외측에 배치시키는 것도 가능하다(도 12b 참조)

[0059] 브릿지 채널(200)은 다양한 형상으로 구비될 수 있다. 예를 들어, 브릿지 채널(200)은 곡선, 꺾인선, 호형, 원형, 나선형, 다각형 등 다양한 형상으로 구비될 수 있다. 여기서 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 브릿지 채널(200)은 양각형태로 형성된 것을 제외하고 그 변형예의 형상은 실질적으로 도 4a 내지 도 4i에 도시된 브릿지 채널의 형상과 동일하다 따라서 형상에 대한 상세한 설명은 생략하고 상기한 설명에 갈음한다.

[0060] 브릿지 채널에(200)에는 적어도 하나의 웰(500)이 형성될 수 있다. 이러한 웰(500)은 세포 배양 공간 등 다양한 목적으로 활용될 수 있는 공간을 제공하기 위해 구비되는 것으로서 브릿지 채널(200)로부터 외측방향으로 연장되어 형성될 수 있다. 이와 같이 웰(500)을 외측방향으로 연장 형성함으로써, 본 발명의 일 실시예에 따른 삼차원 채널 구조물(10)이 원심 분리기에 장착되어 회전하는 경우, 브릿지 채널(200)에 위치한 유체는 웰(500)로 유입될 수 있다. 웰(500)은 복수 개가 형성될 수 있다. 웰(500)이 복수 개가 형성되는 경우, 웰(500)은 브릿지 채널(200)을 따라 이격되어 형성될 수 있다.

[0061] 또한, 웰(500)은 브릿지 채널(200)로 갈수록 웰(500)의 입구 직경(D1)이 증가하거나 감소하도록 형성된 경사부(510)를 포함할 수 있다. 다시 말해, 웰(500)의 브릿지 채널(200)측 일측 단부는 깔대기 형상으로 형성될 수 있다

[0063] 이하에서는 본 발명의 실시예들에 따른 마이크로유체칩 및 삼차원 채널 구조물을 이용한 세포 배양 방법 및 생리활성 물질의 활성 평가 방법에 대해 설명한다.

[0064] 마이크로유체칩 및 삼차원 채널 구조물의 웰에는 세포가 공급될 수 있으며, 세포는 3차원 생체모사 세포지지체와 혼합된 상태로 공급될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] '웰'은 곡면으로 형성될 수 있으며, 그 깊이는 20-20,000um, 100-10,000um 또는 200-2000um일 수 있으며, 그 평균직경은 10-10,000um, 50-5,000um 또는 100-1,000um일 수 있으나 이에 제한 되는 것은 아니다.

[0066] 또한, 웰은 3차원 생체모사 세포지지체로 충전될 수 있다. 상기 웰은 복수 개 일 수 있으며, 이는 마이크로유체

칩의 외각 지름에 따라서 달라질 수 있다. 마이크로유체칩의 외각은 1 mm이상 1000 mm이하일 수 있으나 바람직하게는 10 mm 이상 100 mm 이하일 수 있다.

[0067] '3차원 생체모사 세포지지체'는 체내의 세포 배양 환경을 모사한 것으로 세포외기질(Extracellular Matrix, ECM)을 포함할 수 있다. 상기 세포지지체는 암세포를 생체와 비슷하게 3차원으로 배양할 때 많이 사용하며 이를 이용할 경우 생체와 가장 유사하게 암세포를 배양할 수 있다. 따라서, 3차원 생체모사 세포지지체에서 세포를 배양하면, 세포간 상호작용 및 대사활동이 체내와 유사한 상태에서 세포를 배양할 수 있다. 상기 3차원 생체모사 세포지지체는 콜라겐, 매트리젤 (matrigel), 피브린, 젤라틴, 히알루론산 하이드로젤 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 3차원 생체모사 세포 지지체는 세포와 함께 혼합된 상태 또는 단독으로 상기 마이크로유체칩에 공급될 수 있다.

[0068] 마이크로유체칩에 추가로 공급 될 수 있는 세포는 마이크로유체칩의 배양 대상이 되는 세포로서, 영장류, 설치류 등을 포함하는 포유류로부터 유래한 세포일 수 있다. 일 예로서, 세포는 인간의 세포일 수 있으며, 예컨대, 인간의 정상세포 및 암세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 정상세포는 각종 조직에서 유래하는, 암세포가 아닌 세포를 의미할 수 있다. 정상세포 또는 암세포는 줄기세포 또는 비줄기세포 (non-stem cell; stemness를 갖지 않는 세포)일 수 있다. 예컨대, 줄기세포는 정상 조직, 예컨대 정상 장기 (위장, 소장, 대장, 심장, 간장, 신장, 폐장, 비장 등)의 줄기세포 (장기줄기세포), 성체줄기세포, 또는 암줄기세포일 수 있다. 또한 정상 세포 또는 암세포는 환자유래의 세포일 수 있다. 세포는 3차원 생체모사 세포지지체와 혼합되어 공급될 수 있다.

[0069] "성체줄기세포 (adult stem cell)"는 제대혈(탯줄혈액) 또는 성인의 골수, 혈액, 신경 등에서 추출해낸 줄기세포로, 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포를 의미한다. 성체줄기세포는 조혈모세포 (hematopoietic stem cell), 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell), 신경줄기세포(neural stem cell) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 성체줄기세포는 포유류, 예컨대 사람의 성체줄기세포일 수 있다. 성체줄기세포는 증식이 어렵고 쉽게 분화되는 경향이 강하다. 반면 여러 종류의 성체줄기세포를 사용하여 실제 의학에서 필요로 하는 다양한 장기 재생을 할 수 있다. 그뿐 아니라 성체 줄기 세포는 이식된 후 각 장기의 특성에 맞게 분화할 수 있는 특성을 지니고 있어서, 난치병/불치병 치료에 유리하게 적용될 수 있다.

[0070] 일 예로서, 상기 '암세포'는 췌장암 세포주 (Mia Paca-2) 또는 폐암 세포주 (A549)에서 유래한 것 등을 포함하여 다양한 종류의 암세포를 의미할 수 있다. 상기 '환자유래 세포'는 특정 질병을 앓고 있는 환자, 예컨대 췌장암 및 폐암 환자에서 채취한 세포를 의미할 수 있다. 상기 '환자유래 암세포' 특정 질병을 앓고 있는 환자, 예컨대 췌장암 및 폐암 환자에서 채취한 암세포를 의미할 수 있다.

[0071] 다른 구현 예로, 마이크로유체칩은 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널을 추가로 포함할 수 있다. 웰의 입구와 브릿지 채널 간의 연결은 직선 또는 곡선으로 되어 있을 수 있다. 또한, 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널의 폭은 10-10,000um, 50-5,000um 또는 100-5,000 um일 수 있으며, 바람직하게는 100-1,000 um일 수 있다.

[0072] 브릿지 채널은 세포 배양 배지를 포함하는 유체를 추가로 포함할 수 있다. 세포 배양 배지에는 약물 및 약물이 코팅 또는 포함되어 있는 입자를 포함할 수 있다. 상기 약물에는 Gemcitabine (4-amino-1-(2-deoxy-2,2-difluoro-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimidin-2(1H)-on), Paclitaxel (2α,4α,5β,7β,10β,13α)-4,10-Bis(acetyloxy)-13-{[(2R,3S)-3-(benzoylamino)-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl]oxy}-1,7-dihydroxy-9-oxo-5,20-epoxytax-11-en-2-yl benzoate), 또는 MMP-1 저해제 같은 항암제 및 항바이러스제가 포함될 수 있다.

[0073] '유체'는 흐르는 성질을 가지는 물질로서 세포와 혼합되어 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널을 통해 주입될 수 있다. 유체는 세포 배양 배지, 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 다. 유체는 혈관세포, 섬유아세포, 면역세포, 암 줄기세포, 암세포, 장기줄기세포 (위장, 소장, 대장, 심장, 간장, 신장, 폐장, 비장 등의 줄기세포), 성체줄기세포 및 일반 조직세포 (예컨대, 혈관을 제외한 조직의 비줄기세포 (non-stem cell) 또는 줄기세포)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0074] '암 줄기세포(Cancer Stem CELL; CSC)'는 암 세포들 중에서 종양을 생성할 수 있는 능력을 가지는 세포를 의미한다. 이는 종양을 형성하지 않은 암세포와 다르게 종양형성 (tumorigenic) 능력을 가지므로, 종양생성세포 (Tumor-initiating cells, TICs)라고도 칭해진다.

[0075] 일 예에서, '암세포'는 췌장암 세포주 (Mia Paca-2) 또는 폐암 세포주 (A549)에서 유래한 것 등을 포함하여 다양한 종류의 암세포를 의미한다. 상기 '환자유래 세포'는 특정 질병을 앓고 있는 환자, 예컨대 췌장암 및 폐암 환자에서 채취한 세포를 의미하며 특정 질병을 앓고 있는 환자, 예컨대 췌장암 및 폐암 환자에서 채취한 암세포

를 의미할 수 있다.

[0076] '장기줄기세포'는, 앞서 설명한 바와 같이, 심장 (Heart), 폐장 (Lung), 비장 (Spleen), 간장 (Hepatic), 신장 (kidney), 위장 (위, 소장 및/또는 대장)의 줄기세포를 의미할 수 있다.

[0077] '조직세포'는 분화의 방향을 똑같이 하는 세포가 모여서 형성된 기능상·구조상의 합목적성을 가지는 하나의 유기체인 조직, 예컨대 상피조직, 지지조직, 근조직, 신경조직을 구성하는 세포를 의미한다. 단일한 종류의 세포만을 의미할 수도 있고, 특정조직을 형성하는 다양한 종류의 세포 집합을 의미할 수도 있다.

[0078] 마이크로유체칩은 유체를 연속적으로 공급받을 수 있는 유입부를 추가로 포함할 수 있으며, 유입부에는 유체 공급을 위한 펌프가 연결될 수 있다. 유입부는 유체를 공급받는 역할을 하는 부분으로, 펌프가 연결되어 유체를 마이크로유체칩에 공급할 수 있다.

[0079] 다른 구현 예로, 마이크로유체칩은 웰이 연결된 브릿지 채널; 및 생리활성 물질을 포함하는 유체, 세포, 또는 이들의 조합을 포함하고, 유체는 브릿지 채널에 공급될 수 있으며, 마이크로유체칩은 생리활성 물질의 세포에 대한 활성 평가용으로 사용될 수 있다.

[0080] '생리활성 물질'은 생물체의 유전자 발현과 생리기능을 조절하는 물질로서 생체의 기능을 증진시키거나 혹은 억제시키는 물질을 의미할 수 있다. 생리활성 물질에는 화합물, 항암제, 및 신경전달물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0081] 생리활성 물질의 세포에 대한 활성 평가용 마이크로유체칩에 추가로 포함 될 수 있는 '세포'는 생리활성 물질의 세포에 대한 활성 평가용 마이크로유체칩의 배양 대상이 되는 세포로서, 영장류, 설치류 등을 포함하는 포유류로부터 유래한 세포일 수 있다. 일 예에서, 세포는 인간의 세포일 수 있으며, 예컨대, 인간의 정상세포 및 암세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 정상세포는 각종 조직에서 유래하는, 암세포가 아닌 세포를 의미한다. 정상세포 또는 암세포는 줄기세포 또는 비줄기세포 (non-stem cell; stemness를 갖지 않는 세포)일 수 있다. 줄기세포는 정상 조직, 예컨대 정상 장기 (위장, 소장, 대장, 심장, 간장, 신장, 폐장, 비장 등)의 줄기세포 (장기줄기세포), 성체줄기세포, 또는 암줄기세포일 수 있다. 또한 정상 세포 또는 암세포는 환자유래의 세포일 수 있다. 세포는 3차원 생체모사 세포지지체와 혼합되어 웰을 통해 공급될 수 있으며, 바람직하게는 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널을 통해 공급될 수 있다.

[0082] 다른 구현예로, 본 발명은 1-1) 세포 및 3차원 생체모사 세포지지체와의 혼합물을 마이크로유체칩의 웰에 공급하는 단계; 2-1) 마이크로유체칩을 회전장치에 장착시키는 단계; 및 3) 회전장치를 회전시키는 단계를 포함하거나, 1-2) 마이크로유체칩을 회전 장치에 장착시키는 단계; 2-2) 세포 및 3차원 생체모사 세포지지체와의 혼합물을 마이크로유체칩의 웰에 공급하는 단계; 및 3) 회전장치를 회전시키는 단계;를 포함하는, 세포 배양 방법을 제공한다.

[0083] 웰은 복수 개일 수 있으며, 웰은 회전축을 중심으로 대칭, 동심원 형태, 또는 나선 형태로 위치할 수 있다.

[0084] '회전 장치'는 회전축을 중심으로 구심력이 작용하여 회전을 하는 것을 의미하며, 일 예로 원심분리기일 수 있다. 또한, 마이크로유체칩은 회전 장치에 장착되어 원심력을 받게 되고, 회전 장치의 회전 속도는 웰에 주입된 세포에 손상이 가지 않을 정도로 500-6000 rpm이며, 마이크로유체칩에 주입된 세포는 원심력에 의해서 웰에 위치될 수 있다.

[0085] 마이크로유체칩은 회전 장치에 '장착'될 수 있는데, 이는 마이크로유체칩이 회전 장치에 연결 장치를 통해 연결되는 것을 의미할 수 있고, 장착 장치를 통해 마이크로유체칩이 회전 장치에 부착되는 것을 의미할 수 있고, 마이크로유체칩이 회전장치의 내부에 들어가는 것을 의미할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0086] 회전 장치를 회전시키는 단계는 3-60초 동안 수행될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0087] '3차원 생체모사 세포지지체'는 체내의 세포 배양 환경을 모사한 것으로 세포외기질 (Extracellular Matrix, ECM)을 포함하고 있으며 암세포를 생체와 비슷하게 3차원으로 배양할 때 많이 사용하며 이 곳에는 여러 주위의 세포를 함께 넣어줄 수 있어서 생체와 가장 유사하게 배양할 수 있다. 따라서, 3차원 생체모사 세포지지체에서 세포를 배양하면 세포간 상호작용 및 대사활동이 체내와 유사한 상태에서 세포를 배양할 수 있다. 3차원 생체모사 세포지지체는 콜라겐, 매트리젤 (matrigel), 피브린, 젤라틴, 히알루론산 하이드로젤 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으며, 세포와 함께 혼합된 상태 또는 단독으로 웰에 공급될 수 있다.

[0088] 세포 배양 방법으로 배양할 수 있는 '세포'는 마이크로유체칩의 배양 대상이 되는 세포로서, 영장류, 설치류 등

을 포함하는 포유류로부터 유래한 세포일 수 있다. 일 예에서, 세포는 인간의 세포일 수 있으며, 예컨대, 인간의 정상세포 및 암세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 정상세포는 각종 조직에서 유래하는, 암세포가 아닌 세포를 의미한다. 정상세포 또는 암세포는 줄기세포 또는 비줄기세포 (non-stem cell; stemness를 갖지 않는 세포)일 수 있다. 예컨대, 줄기세포는 정상 조직, 예컨대 정상 장기 (위장, 소장, 대장, 심장, 간장, 신장, 폐장, 비장 등)의 줄기세포 (장기줄기세포), 성체줄기세포, 또는 암줄기세포일 수 있다. 또한 정상 세포 또는 암세포는 환자유래의 세포일 수 있다. 세포는 3차원 생체모사 세포지지체와 혼합되어 웰을 통해 공급될 수 있으며, 바람직하게는 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널을 통해 공급될 수 있다.

[0089] 세포 배양 방법에서 상기 웰은 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널을 추가로 포함할 수 있고 세포 및 3차원 생체모사 세포지지체와의 혼합물을 마이크로유체칩의 웰에 공급하는 단계는 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널을 통하여 수행되는 것 일 수 있으며, 웰의 입구와 브릿지 채널 간의 연결은 직선 또는 곡선으로 되어 있을 수 있다. 또한, 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널의 폭은 100-5000 um일 수 있으며, 브릿지 채널은 세포 배양 배지를 포함하는 유체를 추가로 포함할 수 있으며, 세포 배양 배지에는 약물 및 약물이 코팅 또는 포함되어 있는 입자를 포함할 수 있다. 약물에는 Gemcitabine (4-amino-1-(2-deoxy-2,2-difluoro-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimidin-2(1H)-on), Paclitaxel (2α,4α,5β,7β,10β,13α)-4,10-Bis(acetyloxy)-13-{[(2R,3S)-3-(benzoylamino)-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl]oxy}-1,7-dihydroxy-9-oxo-5,20-epoxytax-11-en-2-yl benzoate), 또는 MMP-1 저해제 같은 항암제 및 항바이러스제가 포함될 수 있다.

[0090] 세포 배양 방법에서 브릿지 채널을 통해 세포 배양 배지를 포함하는 유체를 공급하는 단계를 추가로 포함 할 수 있으며, 유체는 세포 배양 배지, 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 유체는 혈관세포, 섬유아세포, 면역세포, 암 줄기세포, 암세포, 장기 줄기세포, 성체줄기세포, 일반 조직세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포를 추가로 포함한 것일 수 있으며, 유체와 생리활성 물질을 혼합하여 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널에 투입할 수 있다.

[0091] 브릿지 채널을 통하여 세포 배양 배지를 포함하는 유체를 공급하는 단계에서 상기 유체를 공급하는 단계는 특정시간 동안으로, 또는 지속적으로, 단속 또는 연속적으로 발생할 수 있다.

[0092] 세포 배양 방법에서 유체를 연속적으로 공급받는 유입부를 추가로 포함할 수 있으며, 유입부에는 유체 공급을 위한 펌프가 연결될 수 있다. 유입부는 유체를 공급받는 역할을 하는 부분으로, 유입부에는 펌프가 연결되어 유체를 마이크로유체칩에 특정시간 동안으로, 지속적으로, 또는 연속적으로 공급할 수 있다.

[0093] 세포 배양 방법은 단계 3) 회전장치를 회전시키는 단계에서 얻어진 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0094] 다른 구현예로, 본 발명 일 실시예에 따른 세포 배양 방법은 1-1) 세포 및 3차원 생체모사 세포지지체와의 혼합물을 마이크로유체칩의 웰에 공급하는 단계; 2-1) 마이크로유체칩을 회전장치에 장착시키는 단계; 3) 회전장치를 회전시키는 단계; 및 4) 단계 3)에서 얻어진 반응물에 생리활성 물질을 투입하는 단계를 포함하거나, 1-2) 마이크로유체칩을 회전장치에 장착시키는 단계; 2-2) 세포 및 3차원 생체모사 세포지지체와의 혼합물을 마이크로유체칩의 웰에 공급하는 단계; 3) 회전장치를 회전시키는 단계; 및 4) 단계 3)에서 얻어진 반응물에 생리활성 물질을 투입하는 단계를 포함하는, 생리활성 물질의 활성 평가 방법을 제공한다.

[0095] 상기 생리활성 물질의 활성 평가 방법에서 "생리활성 물질"은 생물체의 유전자 발현과 생리기능을 조절하는 물질로서 생체의 기능을 증진시키거나 혹은 억제시키는 물질을 의미할 수 있으며, 여기에는 화합물, 항암제, 신경전달물질 등을 포함할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 예컨대, 항암제에는 Gemcitabine (4-amino-1-(2-deoxy-2,2-difluoro-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimidin-2(1H)-on), Paclitaxel (2α,4α,5β,7β,10β,13α)-4,10-Bis(acetyloxy)-13-{[(2R,3S)-3-(benzoylamino)-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl]oxy}-1,7-dihydroxy-9-oxo-5,20-epoxytax-11-en-2-yl benzoate), 또는 MMP-1 저해제 같은 항암제 및 항바이러스제가 포함될 수 있다.

[0096] 생리활성 물질의 세포에 활성 평가 방법에 있어서, 웰은 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널을 추가로 포함하고, 세포를 마이크로유체칩의 웰에 공급하는 단계 또는 생리활성 물질을 투입하는 단계는 상기 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널을 통하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0097] 생리활성 물질의 세포에 대한 활성 평가 방법에 있어서, 세포 및 3차원 생체모사 세포지지체와의 혼합물을 웰에 공급하는 단계 또는 생리활성 물질을 투입하는 단계는 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널을 통하여 수행되는 것일 수 있다. 세포 및 3차원 생체모사 세포지지체와의 혼합물을 웰에 공급하는 단계 또는 생리활성 물질을 투입하는

단계는 브릿지 채널을 통하여 세포 배양 배지를 포함하는 유체를 공급하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0098] 브릿지 채널을 통하여 세포 배양 배지를 포함하는 유체를 공급하는 단계에서 유체를 공급하는 단계는 특정시간 동안, 또는 지속적으로, 단속 또는 연속적으로 발생할 수 있다.

[0099] 유체는 세포 배양 배지, 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 유체는 혈관세포, 섬유아세포, 면역세포, 암 줄기세포, 암세포, 일반 조직세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포를 추가로 포함할 수 있다.

[0100] 또한, 유체는 상기 생리활성 물질을 추가로 포함한 것일 수 있으며, 상기 웰을 통해 상기 생리활성 물질을 포함하는 유체를 공급할 수 있으며, 바람직하게는 웰의 입구와 연결된 브릿지 채널을 통해 공급할 수 있다.

[0101] 생리활성 물질의 세포에 대한 활성 평가 방법에서 세포 배양 배지를 포함하는 유체를 공급하는 단계는 생리활성 물질의 세포에 대한 활성 평가 방법의 각 단계의 하나 이상의 단계와 동시에 수행되거나, 각 단계 사이에 수행되거나, 또는 모든 단계에 걸쳐서 연속적으로 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0102] 다른 구현예로, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 방법에 의하여 평균직경이 100 내지 1000 um이고 세포에서 분비되는 세포외기질을 포함하는 것인, 다세포 종양 응집체 (Multicellular Tumor Spheroid)가 배양될 수 있다.

[0103] '세포외기질'(Extracellular matrix, ECM)은 조직내 또는 세포외의 공간을 채우고 있는 생체고분자의 복잡한 집합체이며, 세포에 의해 합성되고 세포외에 분비, 축적된 분자로 구성되어 있다. 세포외기질은 콜라겐, 매트리젤(matrigel), 피브린, 젤라틴, 히알루론산 하이드로젤로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0104] '다세포 종양 응집체'는 배양하는 세포, 혈관세포 (Endothelial cell, EC), 및 세포외기질 등을 포함하는 응집체를 말하는 것일 수 있으며, 이는 혈관세포, 섬유아세포, 면역세포, 암 줄기세포, 암세포, 장기줄기세포, 성체줄기세포, 및 일반 조직세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0105] 다세포 종양 응집체를 구성하는 세포는 췌장암 세포, 폐암 세포 등을 포함하는 다양한 종류의 암세포를 의미할 수 있으며, 상기 다세포 종양 응집체는 암줄기세포 기능을 갖는 것일 수 있다.

[0106] 본 발명에서 사용하는 용어 '오가노이드'는 인체 장기의 기능과 구조가 유사한 작은 인공장기 또는 유닛 (unit) 장기를 통칭한다. 또한, 줄기세포 분화기술을 이용하여 형성하는 기술 및 장기세포를 이용하여 체외에서 배양기술을 이용하여 형성하는 기술도 알려져 있다. 또한, 오가노이드는 생체 모방특성으로 인해 체외환자(in vitro patient), 체외 인간 (in vitro human) 또는 체외 실험동물 (in vitro laboratory animal)이라고 불려지기도 한다. 다만, 줄기세포를 전공하는 학자들은 줄기세포 분화를 통해 형성된 것만 오가노이드라고 말하며, 장기세포를 이용하여 체외에서 배양기술을 이용하여 형성하는 것은 장기 스패로이드 (Organ spheroid)라고 구분하여 지칭한다. 오가노이드는 작은 인공장기를 체내와 유사한 수준으로 형성한 것으로, 현재까지 약물개발과정에서 막대한 비용이 소모되는 평가과정을 임상시험 전에 정밀하게 수행할 수 있기 때문에 약물개발의 정밀도를 향상하여 비용을 크게 감소시킬 수 있다고 신뢰받는 최신의 약물개발 접근방법중의 하나이다.

[0107] 한편, 전술한 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로 유체칩 또는 삼차원 채널 구조물은 내부에 브릿지 채널, 유입부 및 배출부를 형성할 수 있는 구조체가 구비된 몰드에 실리콘 성분을 포함하는 레진을 사출성형하여 제작될 수 있다. 또는, 마이크로유체칩 및 삼차원 채널 구조물은 임의의 부분으로 분할될 수 있으며, 마이크로 유체칩 및 삼차원 채널 구조물을 구성하는 각각의 부분을 개별적으로 사출한후 접착시켜 마이크로 유체칩 및 삼차원 채널 구조물은 제작될 수 있다.

[0109] **<준비예 1> 마이크로유체칩의 구성**

[0110] 도 13에 나타난 것과 같이, 세포 및 콜라겐 등을 주입하는 브릿지 채널과 이에 연결되어 있는 웰이 반복된 구조의 마이크로유체칩을 형성한다. 전체 마이크로유체칩을 원심분리기를 이용하여 회전시킴에 따라서 회전 전에 브릿지 채널에 있는 세포들이 빠른 시간 안에 웰의 하단부로 이동하게 된다. 원심분리는 1000 ~ 6000 rpm의 속도로 10초간 수행한다.

[0112] **<실시예 1> 암 세포를 마이크로유체칩 (Microfluidic chip)에 시딩 (Seeding)**

[0113] 암 세포를 다음과 같은 방법으로 마이크로유체칩에 시딩하였다.

[0114] 첫째, 세포-액상 콜라겐 혼합물을 준비하였다. 암세포를 액상의 콜라겐 (Type 1 collagen)과 잘 섞고, 용액 상태의 콜라겐에 암 세포가 고르게 분포하도록 하였다.

[0115] 둘째, 커버글래스 또는 슬라이드 글래스와 같은 기판에 실리콘 고무 재질의 마이크로유체칩을 접착시키고, 암세포가 섞여 있는 콜라겐 용액을 기포가 생기지 않도록 마이크로유체칩의 브릿지 채널에 주입하였다. 주입한 세포의 농도는 10^5~10^6 cell/mL이다.

[0116] 셋째, 브릿지 채널과 웰 모두에 존재하는 콜라겐과 섞여 있는 암세포를 상온에서 2000 rpm 속도로 원심분리 하여 웰 바닥에 암세포가 위치하도록 하였다. 콜라겐이나 매트릭스 등이 젤화 되어서 고체 상태가 되면 암세포나 기타 다른 세포들을 웰 안으로 주입하기 어려워지므로, 젤화 단계 이전에 콜라겐이나 매트릭스 등이 젤로 되는 것을 막기 위해서 마이크로유체칩 의 온도를 1 ~ 4℃로 유지하였다. 또한, 첫째에서 셋째까지의 단계를 반복함으로써 다양한 세포를 웰 안에 순차적으로 주입할 수 있다.

[0117] 넷째, 브릿지 채널에 남아 있는 액상의 잔여 콜라겐이나 매트릭스를 제거하기 위해서 브릿지 채널에 연결된 배출부 또는 유입부를 통하여 흡입 (suction)하였다. 이 경우, 웰 안에 들어간 콜라겐, 매트릭스, 및 암세포를 포함한 다른 세포들은 웰 안에 계속 남아 있게 된다.

[0118] 다섯째, 혈관 구조를 형성하기 위해서, 상기의 넷째의 흡입 과정 이후 마이크로유체칩을 37℃ 세포배양기에 집어 넣어서 콜라겐, 매트릭스를 젤화시켰다. 이후에 혈관 세포 (Endothelial cell, EC)를 첫째 및 둘째 방법을 사용하여 브릿지 채널에 주입하였다. 브릿지 채널에 주입한지 2~3시간이 경과하면 혈관세포는 브릿지 채널과 웰에 존재하는 매트릭스에 부착되어, 혈관 구조를 형성하게 된다.

[0119] 여섯째, 혈관 세포가 젤에 부착한 후에, 마이크로유체칩의 브릿지 채널에 수동 펌프를 사용하여 세포 배양액을 흘려주었다.

[0120] 이러한 과정은 도 14에서 a 내지 f의 순서로 모식화되어 있다.

[0121] 또한, 도 15는 세포를 마이크로유체칩의 유체 브릿지 채널에 시딩하고, 원심분리하여 세포를 웰의 바닥에 위치하게 한 후에, 브릿지 채널의 잔여물을 흡입한 상태를 나타낸다. 도 15의 오른쪽 끝의 그림은 웰에 위치된 세포를 광학현미경 (EVOS, LifeScience, 40배율)으로 관찰한 것을 나타낸다.

[0123] **<실시예 2> 폐암 세포 (A549)의 1차 시딩 후 섬유아세포 (NIH-3T3)의 2차 시딩**

[0124] 실시예 1의 도 14에 나타난 방법을 사용하여 폐암세포(A549) 세포를 웰의 바닥에 위치시켰다. 그 후에, 2차로 섬유아세포 (NIH-3T3, ATCC)를 시딩하고, HUVEC 세포를 포함하는 세포 배양액을 도 16a와 같이 화살표 방향으로 흘려주어 유체 브릿지 채널에 혈관세포를 시딩하였다.

[0125] 여기서 폐암세포(A549) 세포주 (ATCC, CCL-185, Manassas, VA, USA) 및 섬유아세포(NIH-3T3) 세포주는 (ATCC, 마우스 태아 섬유 아세포 세포주, CRL-1658, Manassas, VA, USA)는 10 % 소 태아혈청 (FBS, Biowest, MO, USA)과 1 % 항생제 (Thermo Fisher Scientific)를 함유 한 RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, MA, 미국) 및 Dulbecco 변형 이글의 배지 (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 배양하였다. 사람의 제대 정맥 내피 세포 (HUVECs, ATCC, CRL-1730, Manassas, VA, USA)는 EGM2 (Lonza, Basel, Swiss) 및 1 % 항생제를 포함한 배양액을 이용하여 배양하였다. 이때, 체외 종양모델을 제작하기 위해서, 웰을 채우는 폐암세포(A549) 와 미리 혼합한 콜라겐을 유입부를 통해 마이크로유체칩에 주입하고 장치를 분당 6,000 회전 (RPM)으로 30초간 원심 분리하였으며 (KA.MC-01, 한국 에이스 사이언 티픽, 서울) 이를 통하여 마이크로유체칩의 웰에 암세포를 주입할 수 있었다.

[0126] 도 16b는 폐암 세포 (A549) 및 섬유아세포 (Fibroblast, NIH-3T3)를 형광현미경 (EVOS, LifeScience, 100배율)으로 관찰한 결과를 나타내고, 오른쪽 그림은 광학현미경 (EVOS, LifeScience, 100배율)으로 폐암 세포 (A549), 섬유아세포, 및 혈관세포 (HUVECs)를 관찰한 것을 나타낸다. 폐암 세포 (A549)는 PKH67 (Sigma-Aldrich)로, 섬유아세포는 PKH26 (Sigma-Aldrich)로 제조사에서 제공하는 방법을 사용하여 형광 염색하였으며, 그 후에 실시예 1과 같은 방법으로 마이크로유체칩에 시딩하였다. 상기의 시딩한 세포는 형광 현미경(EVOS,

LifeScience, 100배율)을 사용하여 관찰하였다.

[0127] 이러한 실험 결과를 통해서, 본 발명의 마이크로유체칩은 1차로 시딩한 폐암세포 (A549)가 웰 바닥에 위치되었고, 2차로 주입한 섬유아세포가 폐암 세포 (A549) 위에서 층을 형성하였으며, 브릿지 채널의 주변부에 혈관 구조가 형성되어서 체내의 환경을 유사하게 모사했음을 알 수 있다.

[0129] **<실시예 3> 마이크로유체칩에 췌장암 세포 시딩**

[0130] 췌장암 세포의 이동, 증식을 통한 성장, 및 주위 조직으로의 침윤 과정을 확인하기 위해서, 도 17에서와 같이 실시예 2와 같은 방법을 사용하여 췌장암 세포(Mia Paca-2, ATCC)를 마이크로유체칩에 1차로 시딩하고, 2차로 혈관 세포를 시딩하였다.

[0131] 암 세포는 주위조직으로의 침윤, 성장, 혈관벽 통과 및 혈관내 이동 이후 다른 장기로의 전이되는 과정을 거쳐 발달한다. 따라서 브릿지 채널방향 (위쪽)으로 암 세포의 이동은 상기 전이과정 중에 초기단계인 침윤 및 성장이 일어나고 있음을 나타낸다.

[0132] 도 17 a는 췌장암 세포를 초기 시딩했을 때의 모습, 도 17b 는 하루 후에 세포가 이동한 모습, 도 17c는 증식에 의한 세포의 성장, 및 도 17d는 췌장암 세포에 의해서 혈관조직이 파괴되는 현상을 실시예 2와 같은 방법으로 형광현미경을 통해 확인한 것이다.

[0134] **<실시예 4> 다세포 종양 응집체 (Multicellular Tumor Spheroid)의 형성**

[0135] 많은 경우에 폐암은 다세포 종양 응집체와 같은 큰 조직 형태로 관찰되므로, 본 발명 일 실시예에 따른 마이크로유체칩에서 배양한 세포가 발달하여 다세포 종양 응집체를 형성하는지 확인하는 실험을 수행하였다.

[0136] 폐암세포에 의한 다세포 종양 응집체 형성을 확인하기 위해서, 도 18에서와 같이 실시예 2과 같은 방법을 사용하여 폐암 세포 (A549)를 마이크로유체칩에 시딩하고 암세포의 발달 과정을 광학현미경 (EVOS, LifeScience, 100배율)을 이용하여 확인하였다.

[0137] 그 결과 도 18에서 볼 수 있는 바와 같이, 폐암 세포를 시딩하고 1일 후에는 폐암세포가 채널부위 (위쪽, 초록색 화살표 방향)로 이동하고 혈관세포가 웰 바닥부위 (아래쪽, 파란색 화살표 방향)로 이동하였고, 폐암 세포를 시딩하고 3일 후에는 폐암 세포와 혈관세포가 보다 더 이동하여 다세포 종양 응집체를 형성한 것을 확인할 수 있었다.

[0138] 암세포가 주위조직과 상호작용을 통하여 다세포 종양 응집체를 형성하는 과정을 확인하기 위해서, 도 19에서와 같이 실시예 1과 같은 방법을 사용하여 마이크로유체칩에 다세포 종양 응집체를 형성시켰다. 그것을 하기와 같은 방법으로 전자현미경 (세론테크, AIS 2100C) 및 형광현미경을 사용하여 확인하였다.

[0139] 다세포 종양 응집체는 실온에서 10분간 PBS 완충액에 희석된 4% paraformaldehyde에 의해 고정되었다. 그 후, -20에서 냉장된 100% 메탄올이 실온에서 5분동안 추가되었다. 잠복 후에 유체 경로는 차갑게 냉장된 PBS 완충액으로 다섯 번 수세되었다. 상기 종양 응집체는 실온에서 40분동안 잠복으로 0.1% Triton X-100이 포함된 PBS 완충액의 투과를 이루었고 45분동안 PBST 완충액 (PBS 완충액에 0.1% Tween 20 이 포함)에 첨가된 2% 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin) 용액으로 블로킹되었다. 그리고 4℃에서 1% 소 혈청 알부민이 포함된 PBST 완충액에 1차 항체를 추가하여 잠복시켰다. 그 후 세포는 5분동안 PBS 완충액으로 수세되었고 2차 항체들(Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 647 from Abcam, Cambridge, UK; CFL 488 from Santa Cruz, Dallas, Taxas, USA)을 첨가하여 실온에서 4시간동안 잠복시켰다.

[0140] 그리고, 다시 PBS 완충액으로 수세하였다. 세포의 핵은 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 이용하여 대조 염색을 하였다. Ki-67 (Abcam), von Willebrand factor (vWF; Santa Cruz), 그리고 혈관 내피 성장 인자 (VEGF; Abcam)에 대한 1차 항체는 종양 형성을 관찰하기 위해 사용되었고 매트릭스 메탈로프로테이네이즈-1 (MMP-1; Abcam)는 내피세포(Endothelial cells; EC)의 이동과 세포외기질 (Extracellular matrix; ECM)의 분리를 관찰하기 위해 사용되었다. 형광 이미지는 형광현미경(EVOS; Life Technologies)과 공초점 현미경(Zeiss LSM780; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)을 이용하여 얻었다.

[0141] 그 결과는 도 19에 나타나있다. 현광 현미경을 사용하여 얻은 결과인 도 19a에서 KI-67을 사용한 염색을 통해

암 세포의 증식을 확인하였다.

[0142] 도 19c 내지 도 19d의 전자현미경 관찰결과를 통해서 다세포 종양 응집체 표면의 구조를 구체적으로 확인하였다. 도 19c는 다세포 종양 응집체를 전자현미경으로 확인한 것이고, 도 19d는 도 19c의 흰 박스 부분을 확대한 부분이다. 흰 쐐기는 세포에 의해서 생성된 세포외기질을 나타낸다.

[0143] 도 19a 내지 도 19d의 전자현미경 및 형광현미경 관찰 결과를 통해서 세포간 위치, 암세포의 증식 정도 및 세포간 연결성을 확인할 수 있었다.

[0145] **<실시예 5> 마이크로유체칩을 사용한 젬시타빈 약물 효능 평가**

[0146] 마이크로유체칩을 사용하여 항암제 효능을 평가하기 위해서, 실시예 2에서와 같은 방법을 사용하여 췌장암 세포(Mia Paca-2, ATCC)를 마이크로유체칩에 시딩하였다. 2차적으로 혈관 세포 (HUVEC, ATCC 구입)를 시딩하고 이 세포가 부착된 것을 확인한 후 (day0: 세포 시딩한 날짜) 3일 후에 젬시타빈 (GEMZAR, Eli Lilly and Company, USA) 약물을 투여하여 암 세포의 확산 범위를 측정하였다.

[0147] 도 20에서와 같이, 세포를 시딩한 시점 (day0)에서부터 약물을 처리한 시점 (day3)을 지나 7일째까지 세포의 성장과 발달을 관찰하였다. 세포의 관찰을 위하여, 광학현미경 이미지 (EVOS, LifeScience, 100배율)와 현광현미경 이미지 (EVOS, LifeScience, 100배율)를 겹쳐서 나타냈다.

[0148] 도 20 하단은 세포 발달을 광학현미경 및 현광 현미경을 이용하여 관찰한 것으로 일반배양이라고 표시된 8개의 그림은 day3에 DMSO를 처리하고 day7까지 관찰한 것이고, 약물처리라고 표시된 8개의 그림은 day3에 젬시타빈을 처리하고 day7까지 관찰한 것이다. 도 20 상단은 하단의 현미경 이미지에서 암세포 성장 넓이를 Origin Pro8 (Origin Lab, Northampton, MA, USA., ±5% , 유의도: 0.001)를 사용하여 통계적으로 수량화한 그래프를 나타낸다.

[0149] 도 20에서 나타난 바와 같이, 젬시타빈을 처리하지 않았을 때에 비하여 젬시타빈을 처리했을 때 암세포의 분포 면적이 감소하였다, 이러한 결과를 통해서 젬시타빈 약물의 처리로 인해 췌장암 세포의 성장이 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0151] **<실시예 6> 마이크로유체칩을 사용한 MMP-1 억제제 약물 효능 평가**

[0152] 마이크로유체칩을 사용하여 항암제 효능을 평가하기 위해서, 실시예 1에서와 같은 방법을 사용하여 폐암 세포(A549, ATCC)를 마이크로유체칩에 시딩하였다. 2차적으로 혈관 세포를 시딩한 후 (day0) 1일 후에 MMP-1 저해제 (MMP-1 inhibitor GM6001 (Santa Cruz, Dallas, Taxas, USA)) 약물을 투여하고 도 21a에서 볼 수 있는 바와 같이 광학현미경 (EVOS, LifeScience, 100배율)을 사용하여 암 세포의 증식의 변화를 확인하였다.

[0153] 또한, 도 21b 내지 도 21c에 나타난 바와 같이, 도 21a에서 관찰한 결과를 바탕으로 MMP-1 저해제를 농도를 증가시켜서 처리하고 암세포의 떨어져 나오는 거리, 혈관 세포로 이동한 면적을 측정하고 실시예 5와 같은 방법으로 통계처리 하였다. 그 결과 MMP-1 저해제의 농도를 증가시켜 처리 및 배양함에 따라서 폐암 세포가 떨어져 나오는 거리가 점점 줄어들고, 폐암 세포가 혈관 세포로 이동한 면적이 감소함을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 통해서 MMP-1 저해제 약물을 처리함에 따라서 본 발명의 세포 배양용 장치에서 배양하는 폐암 세포의 전이 과정이 저해됨을 알 수 있었다.

[0155] **<실시예 7> 환자유래 폐암 오가노이드 형성 (Patient-derived lung cancer organoid)**

[0156] 많은 경우에 폐암은 다세포 종양 응집체와 같은 큰 조직 형태로 관찰되므로, 환자유래 폐암 세포를 본 발명의 세포 배양용 장치에서 배양한 경우 그 세포가 발달하여 종양 오가노이드 (Organoid)를 형성하는지 확인하는 실험을 수행하였다.

[0157] '오가노이드'는 장기의 특징을 가지는 체외에서 형성한 세포의 조직으로서 줄기세포와 유사하게 하나의 세포로부터 장기가 형성되어 장기의 생성연구나 약물의 효능평가에 사용되고 있다. 또한, 종양 오가노이드는 종양세포로 발전한 조직세포가 지속적으로 자라서 원래 조직의 특징과 종양의 특징을 함께 가지는 조직체이다.

[0158] 조직검사를 위해 연구용으로 허락받은 환자의 암조직을 분리하여 세포 배양장치에 실시예 2과 같은 방법을 사용

하여 환자유래 암 세포를 마이크로유체칩에 시딩하고 배양액을 2주간 지속적으로 브릿지 채널을 통해서 주입한 후에 종양 오가노이드의 발달 과정을 광학현미경 (EVOS, LifeScience, 100배율)을 이용하여 날짜별로 확인하였다.

[0159] 그 결과 도 22에서 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명의 일실시예에 따른 마이크로 유체칩에서 배양한 암조직 세포가 커다란 조직으로 성장하여 오가노이드를 형성하였다.

[0160] 이상 본 발명의 마이크로유체칩, 삼차원 채널 구조물 및 이를 이용한 세포배양방법의 구체적인 실시 형태로서 설명하였으나, 이는 예시에 불과한 것으로서, 본 발명은 이에 한정되지 않는 것이며, 본 명세서에 개시된 기초 사상에 따르는 최광의 범위를 갖는 것으로 해석되어야 한다. 당업자는 개시된 실시형태들을 조합/치환하여 적시되지 않은 형상의 패턴을 실시할 수 있으나, 이 역시 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 것이다. 이외에도 당업자는 본 명세서에 기초하여 개시된 실시형태를 용이하게 변경 또는 변형할 수 있으며, 이러한 변경 또는 변형도 본 발명의 권리범위에 속함은 명백하다.

부호의 설명

[0161] 1: 마이크로 유체칩 10: 삼차원 채널 구조물

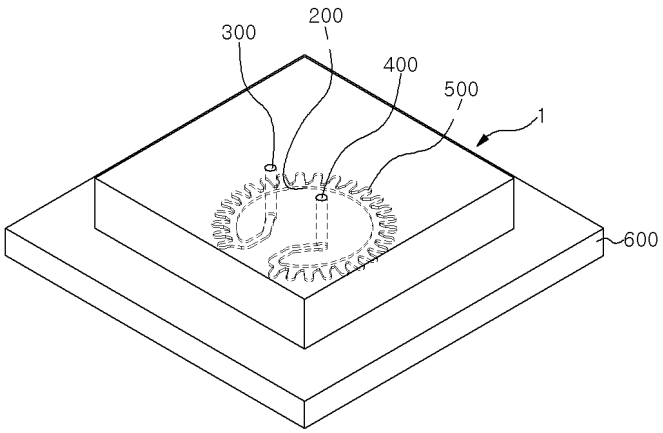
100: 플레이트 200: 브릿지 채널

300: 유입부, 유입 채널 400: 배출부, 배출 채널

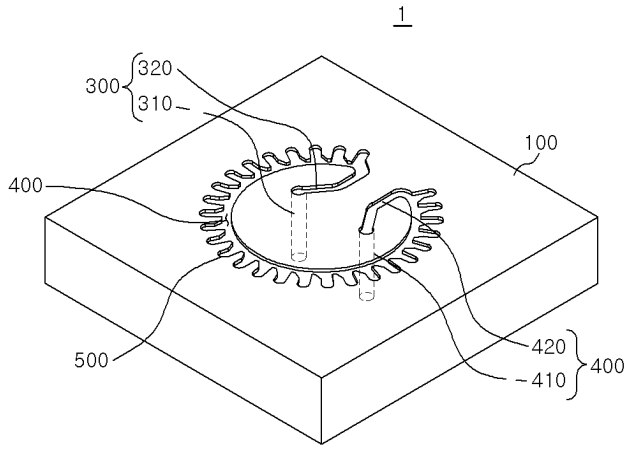
500: 웰 600: 기판

도면

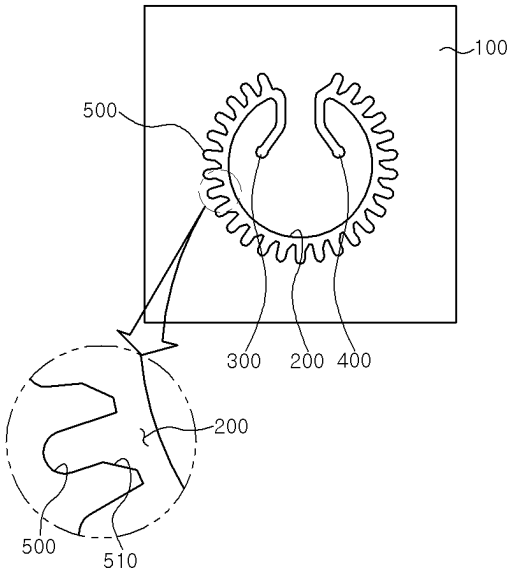
도면1



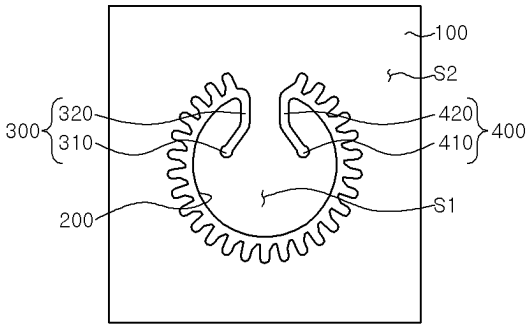
도면2


1
300
320
310
100
400
500
420
410
400

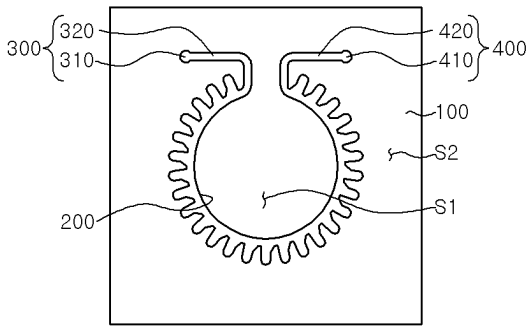
도면3


100
500
300
200
400
200
500
510

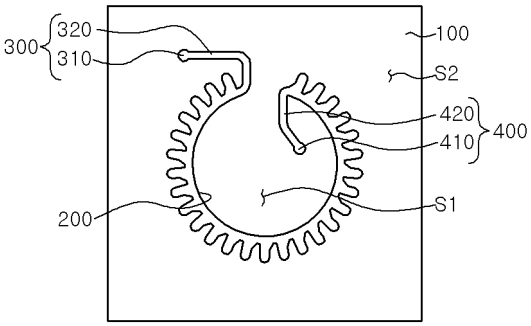
도면4a


100
S2
300
320
310
420
410
400
200
S1

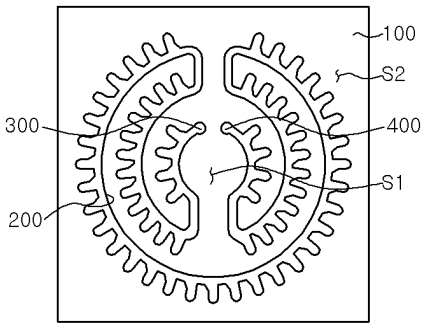
도면4b



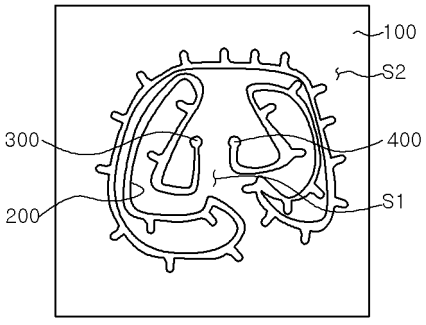
도면4c



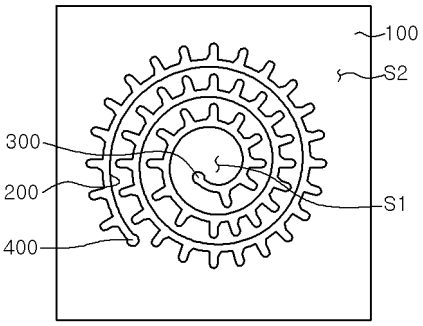
도면4d



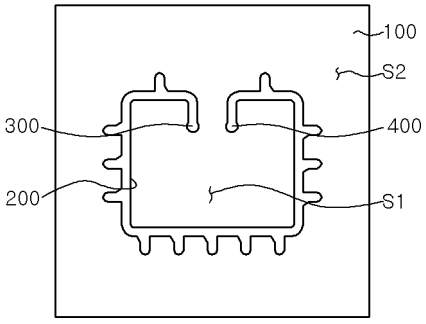
도면4e



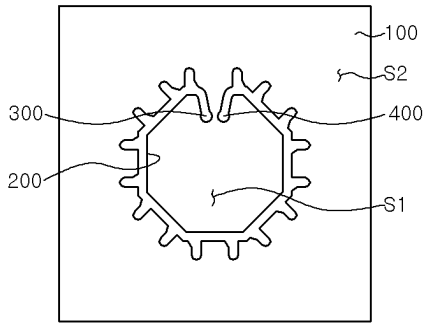
도면4f



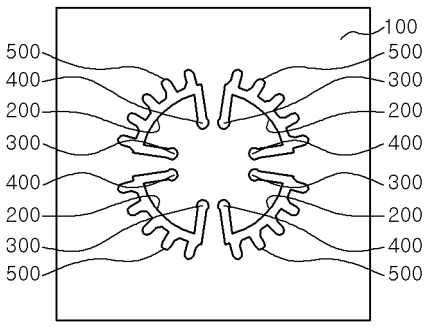
도면4g



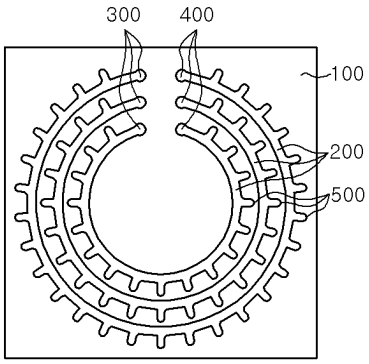
도면4h



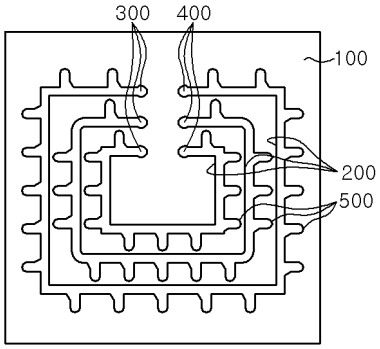
도면4i



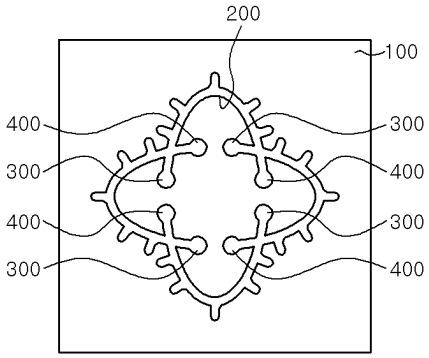
도면4j



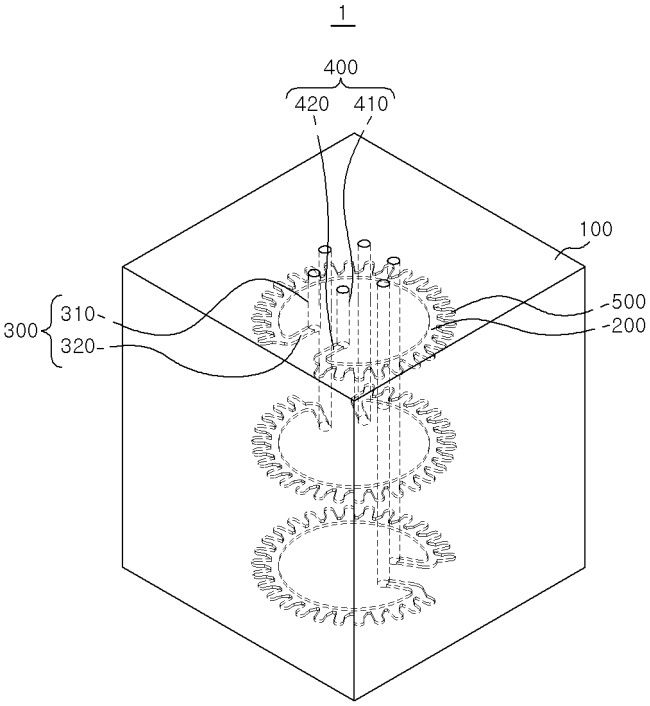
도면4k



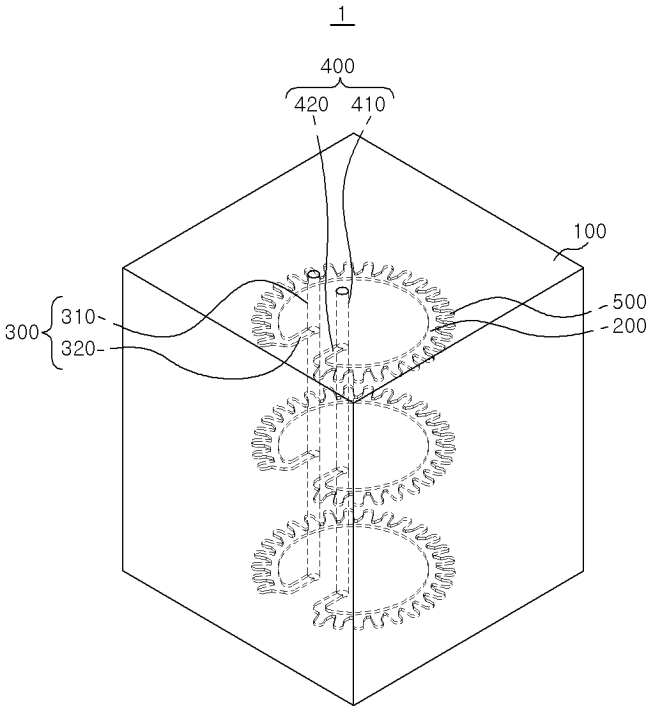
도면4l



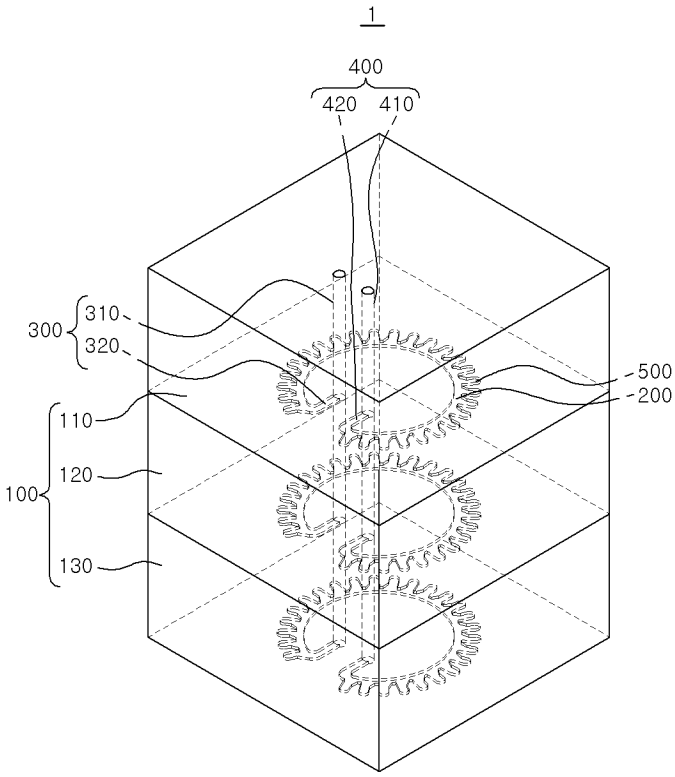
도면5


1
400
420
410
100
500
200
300
310
320

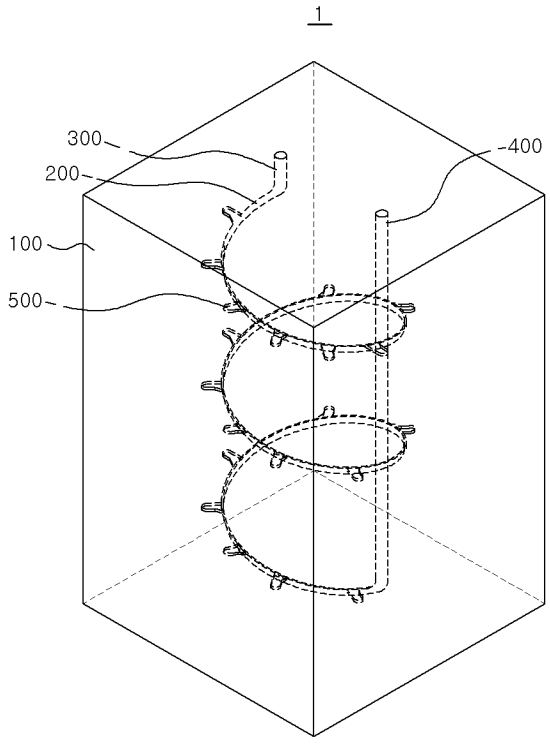
도면6


1
400
420
410
100
500
200
300
310
320

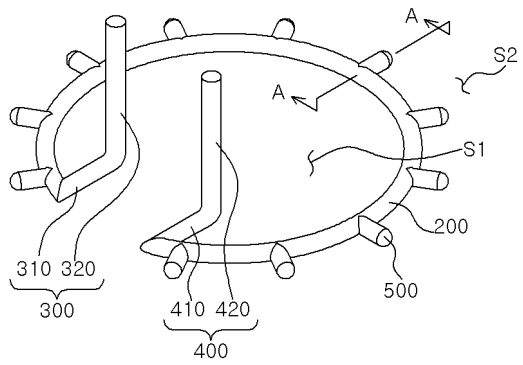
도면7


1
400
420
410
300
310
320
500
200
110
120
100
130

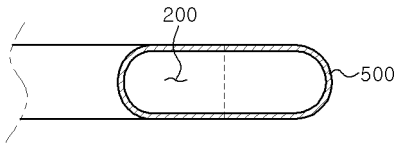
도면8


1
300
200
400
100
500

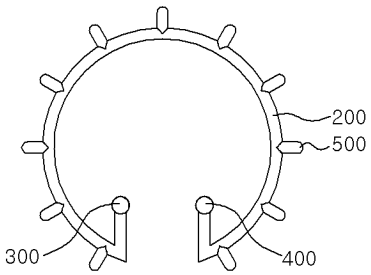
도면9



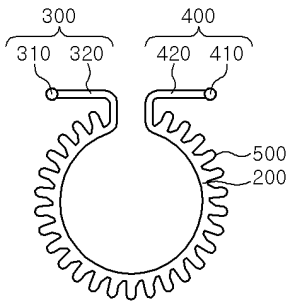
도면10



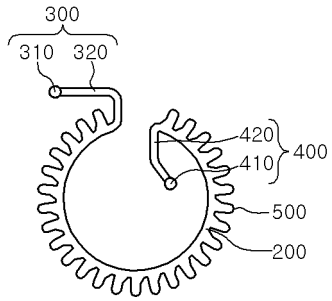
도면11



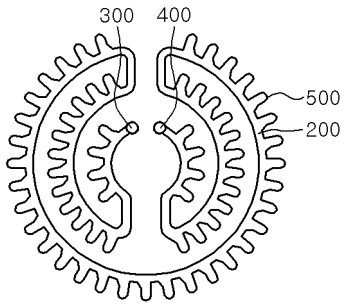
도면12a



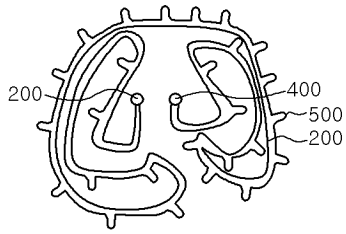
도면12b



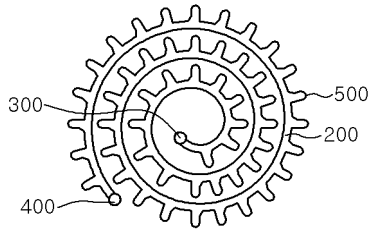
도면12c



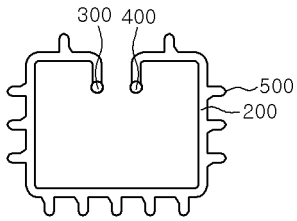
도면12d



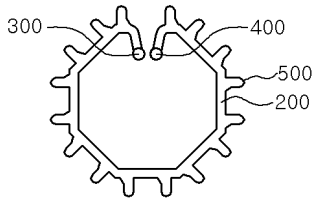
도면12e



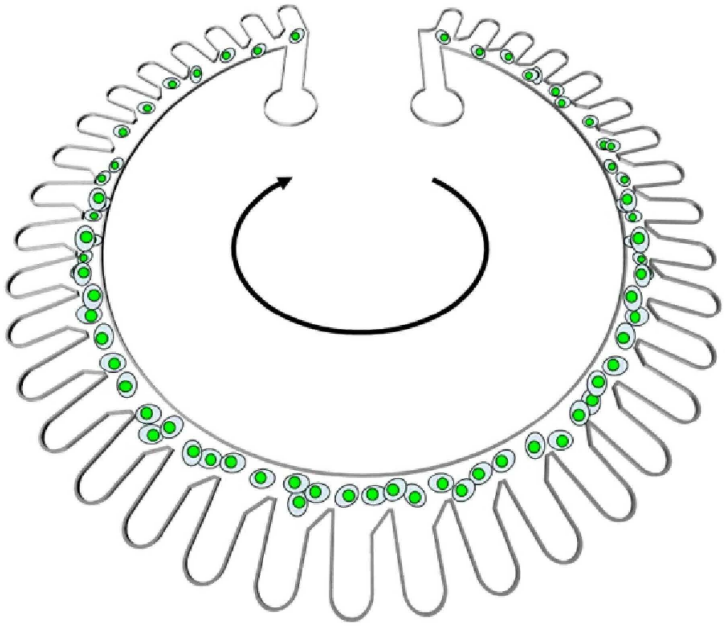
도면12f



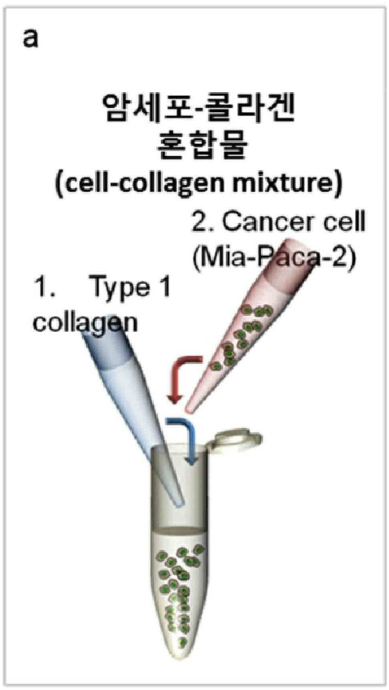
도면12g



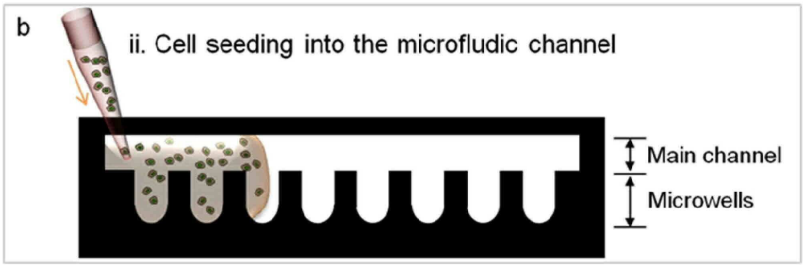
도면13



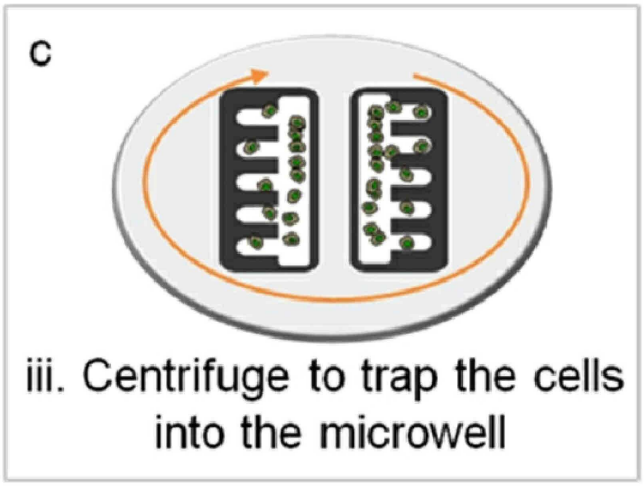
도면14a



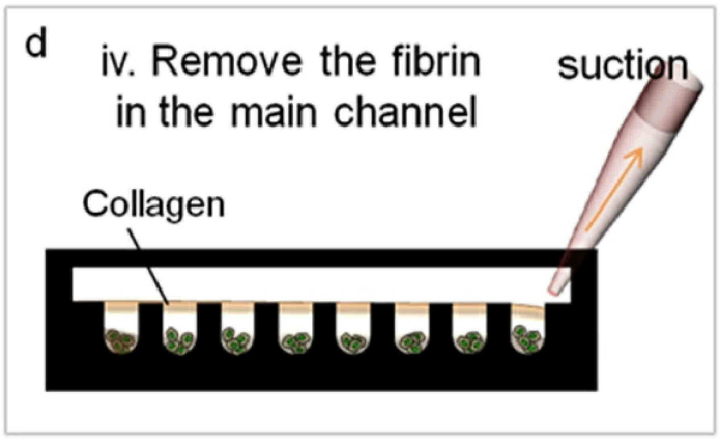
도면14b



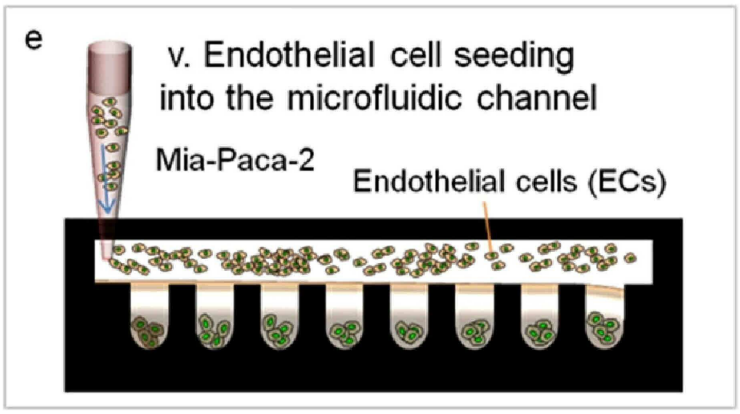
도면14c



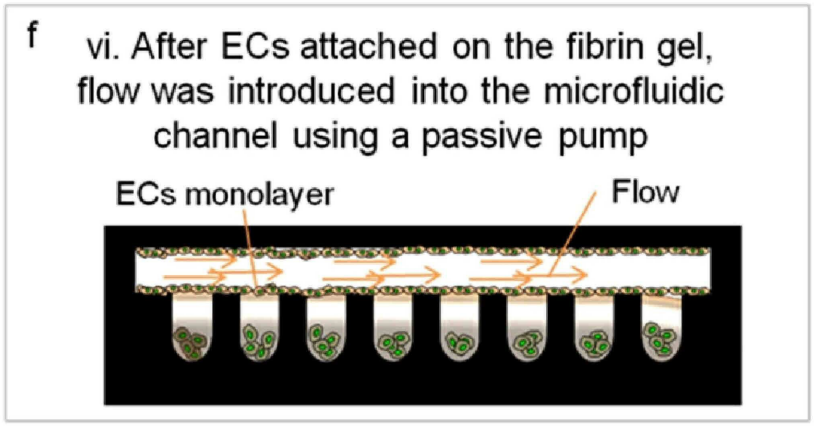
도면14d



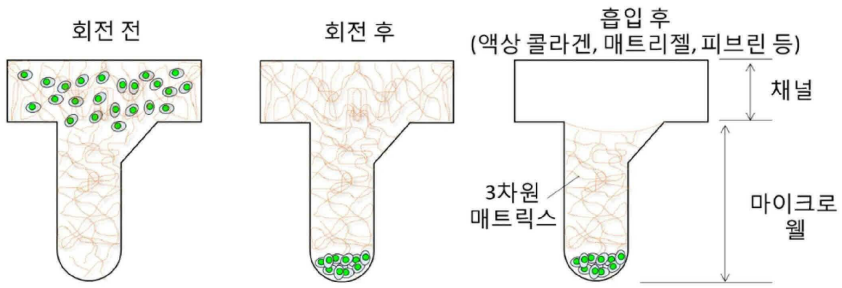
도면14e



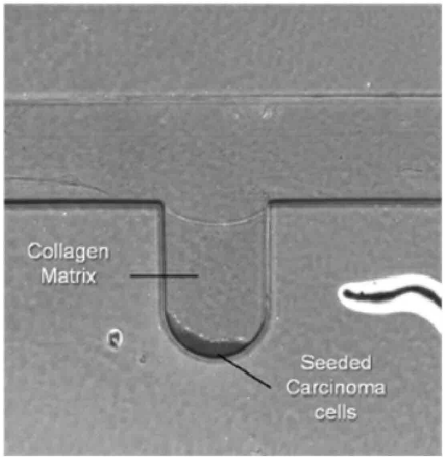
도면14f



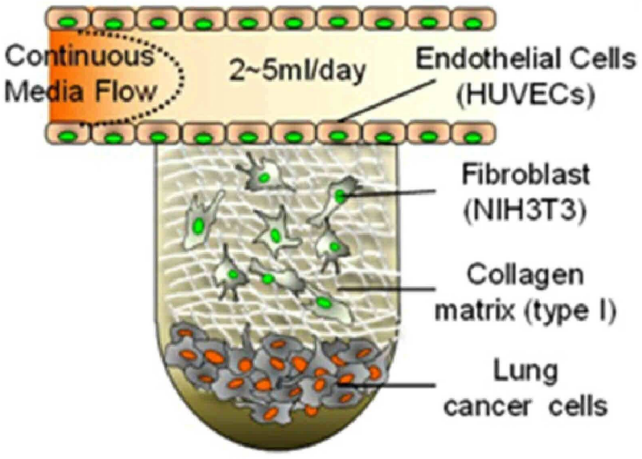
도면15a



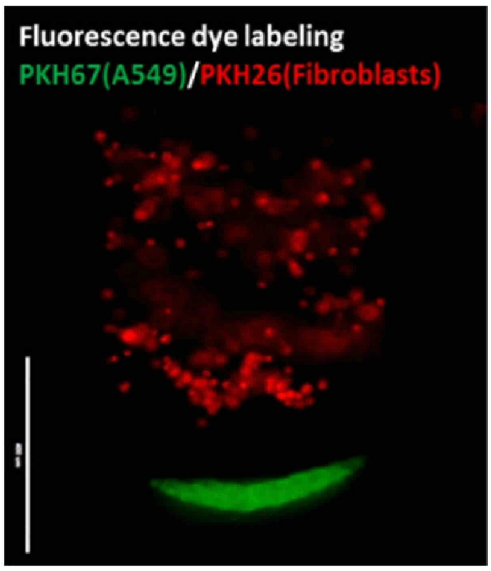
도면15b



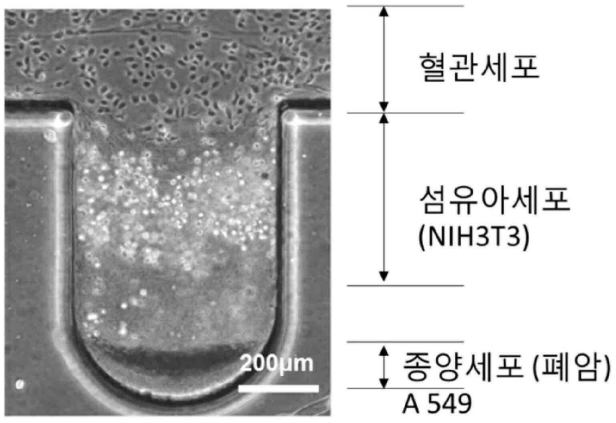
도면16a



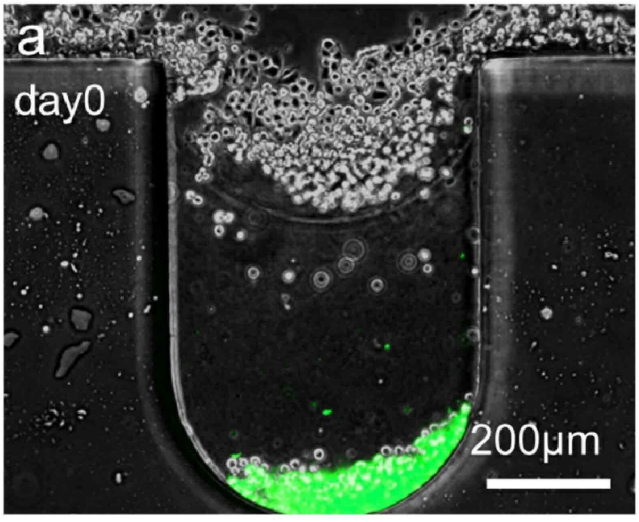
도면16b



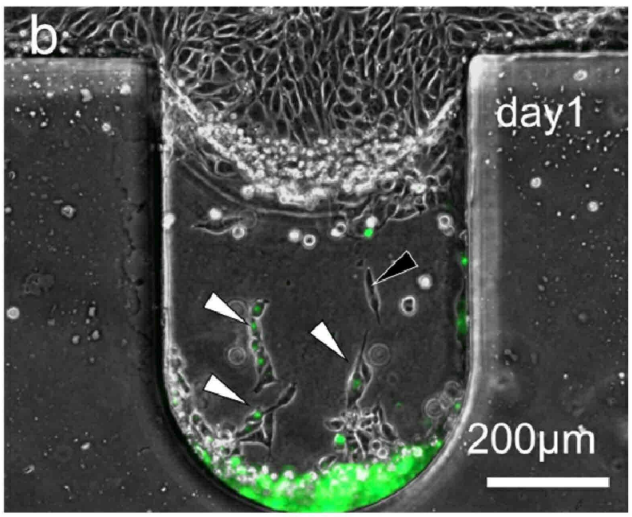
도면16c



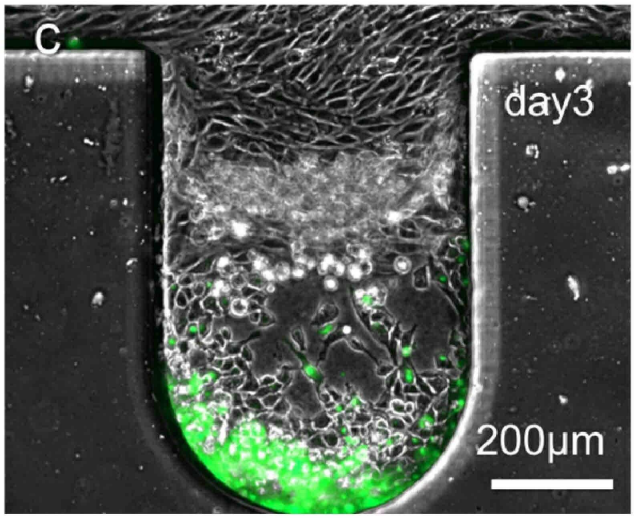
도면17a



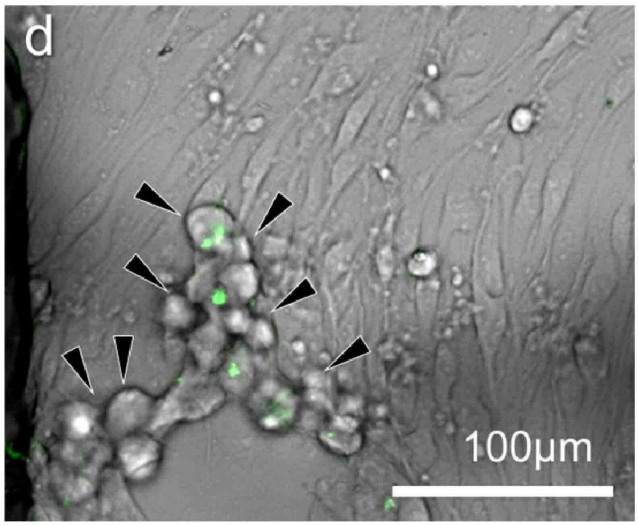
도면17b



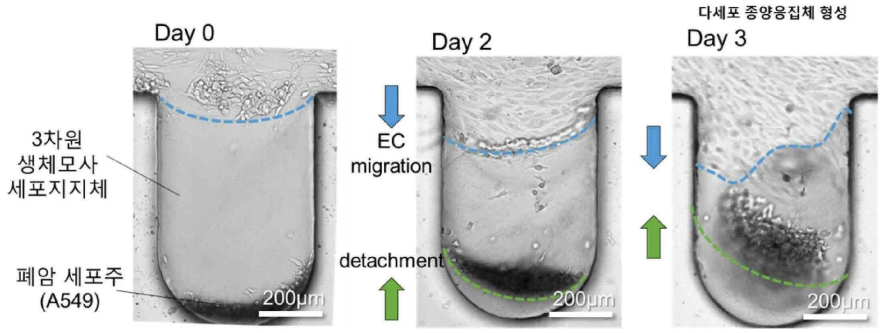
도면17c



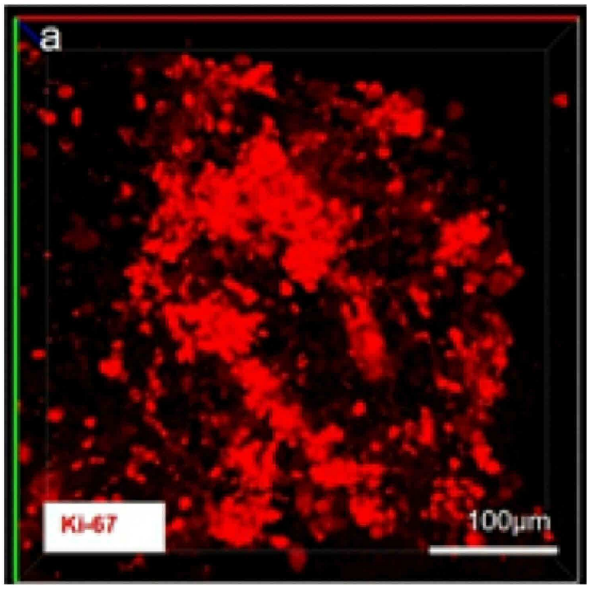
도면17d



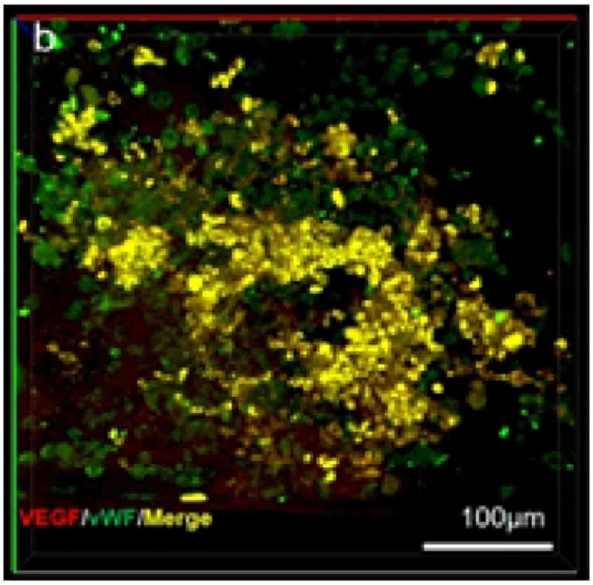
도면18



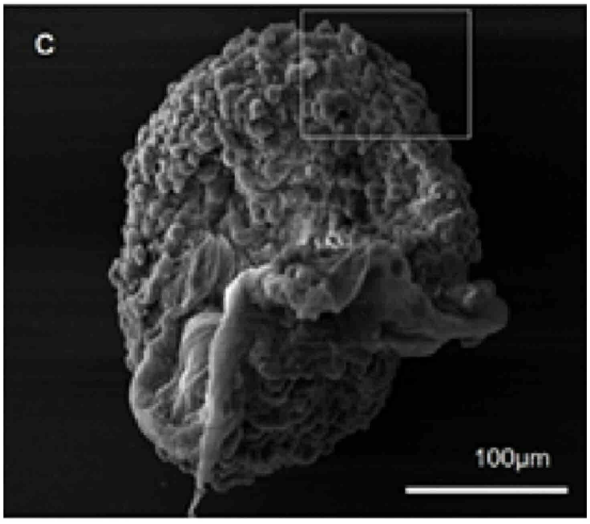
도면19a



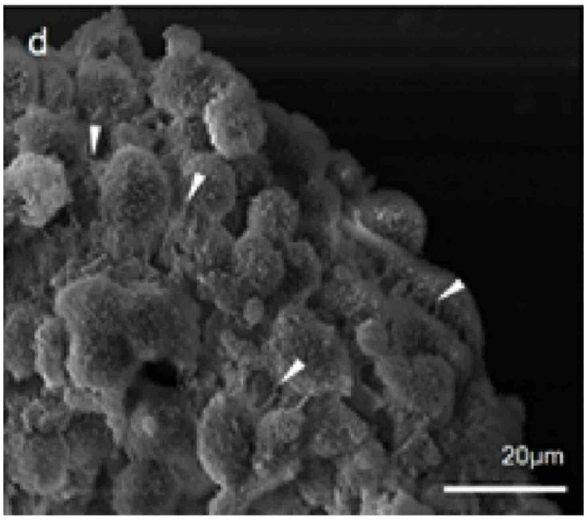
도면19b



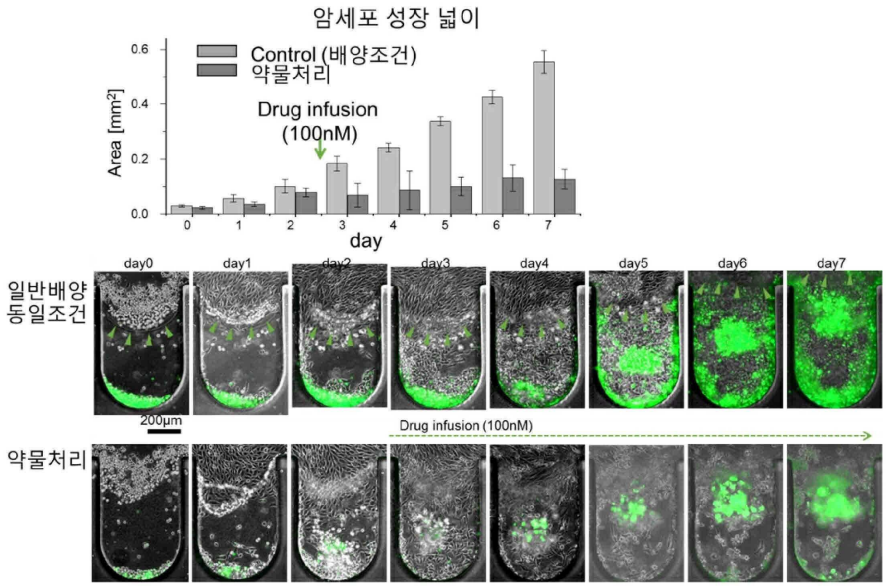
도면19c



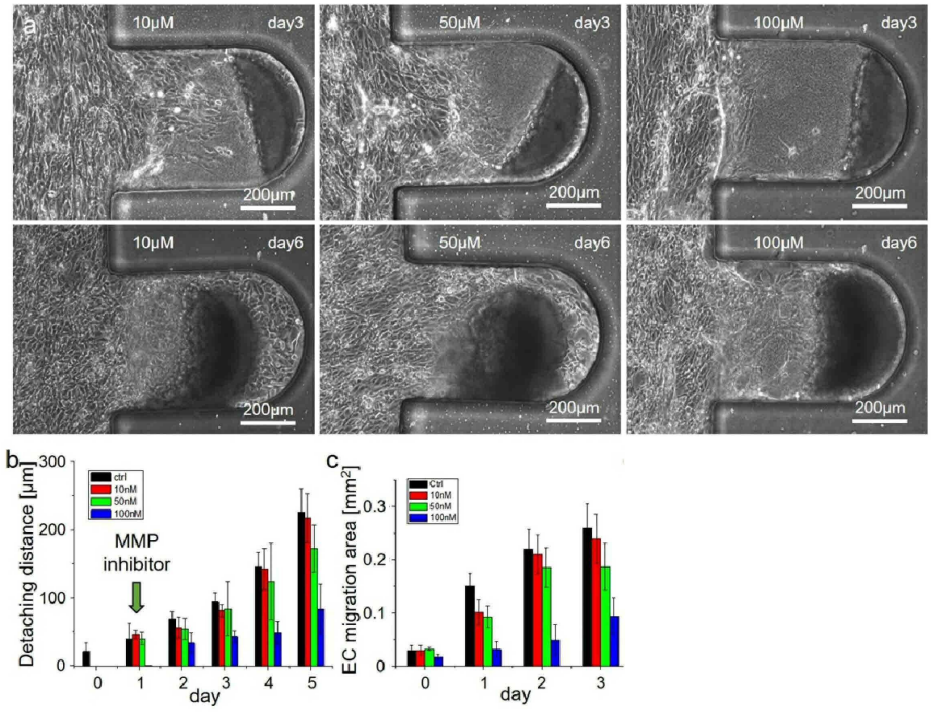
도면19d


d
20μm

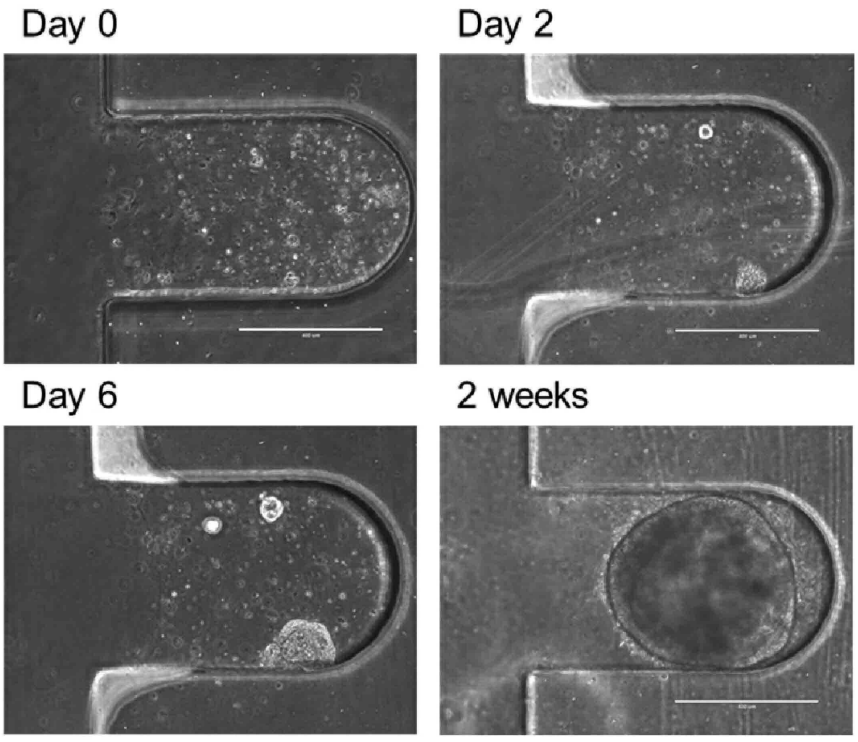
도면20


암세포 성장 넓이
Control (배양조건)
약물처리
Drug infusion
(100nM)
Area [mm²]
0.6
0.4
0.2
0.0
0
1
2
3
4
5
6
7
day
day0
day1
day2
day3
day4
day5
day6
day7
일반배양
동일조건
200μm
Drug infusion (100nM)
약물처리

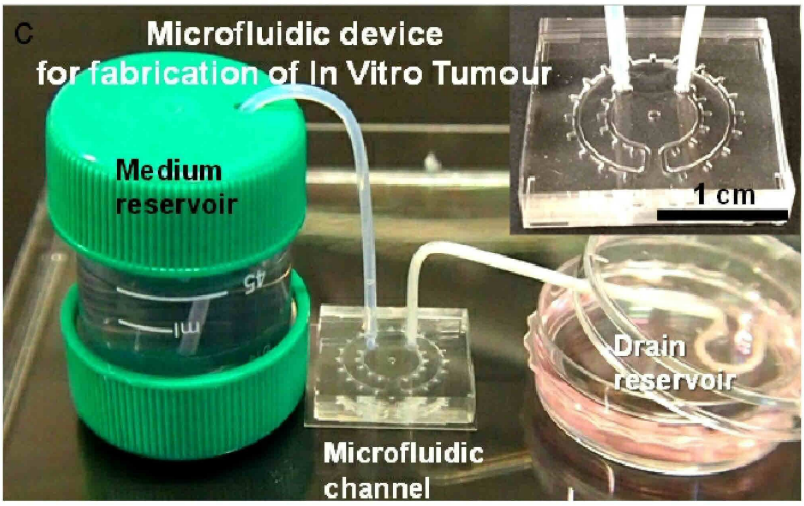
도면21


a
10μM
day3
50μM
day3
100μM
day3
200μm
10μM
day6
50μM
day6
100μM
day6
b
Detaching distance [μm]
ctrl
10nM
50nM
100nM
MMP
inhibitor
day
c
EC migration area [mm²]
day

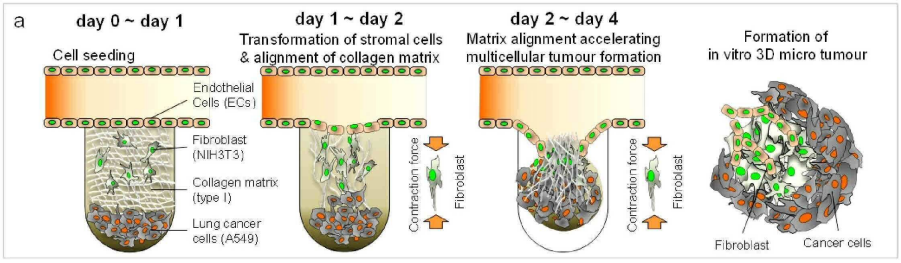
도면22


Day 0
Day 2
Day 6
2 weeks

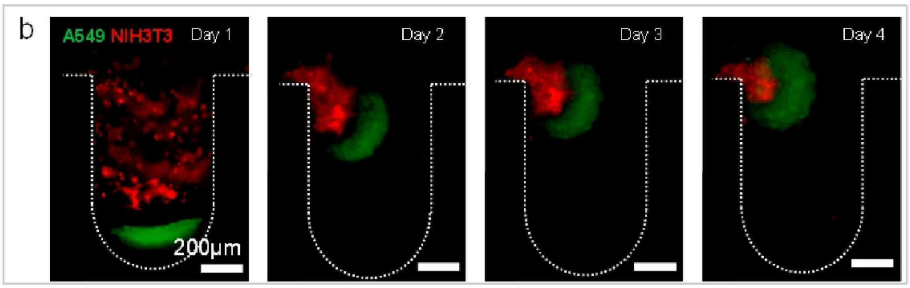
도면23



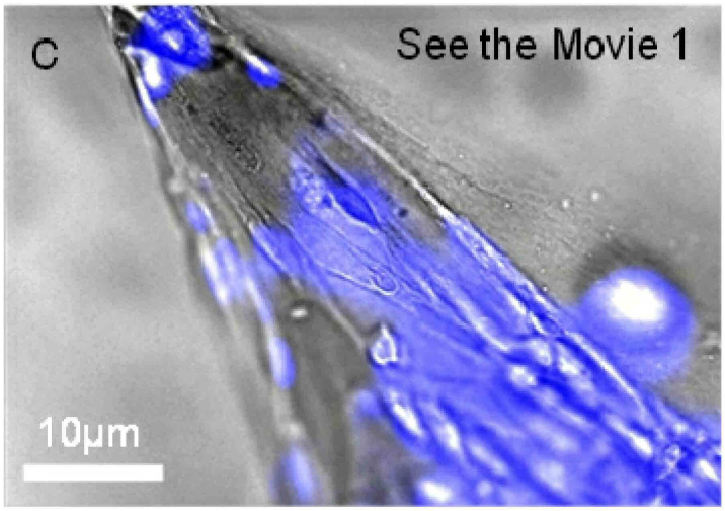
도면24



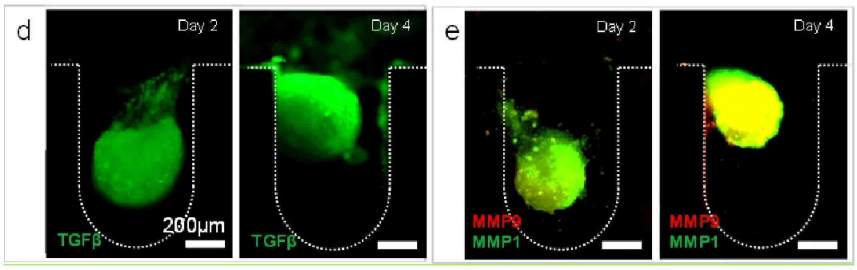
도면25



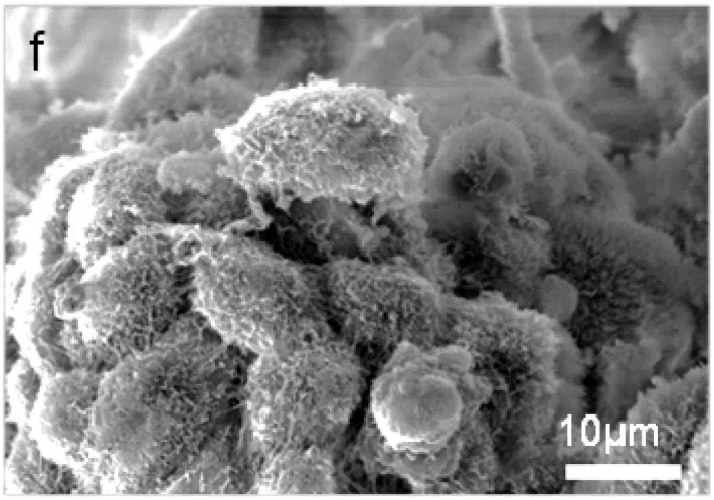
도면26



도면27



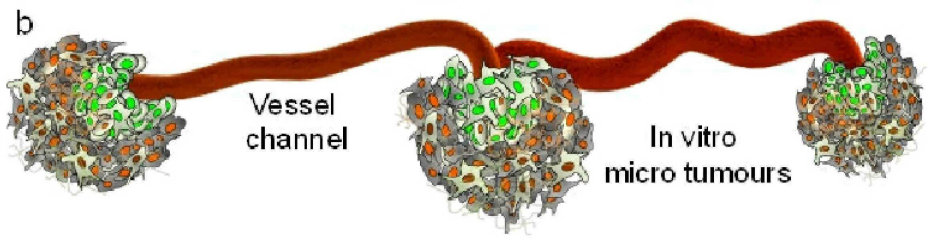
도면28



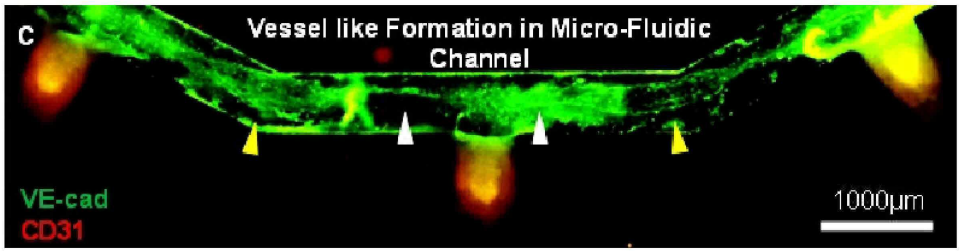
도면29



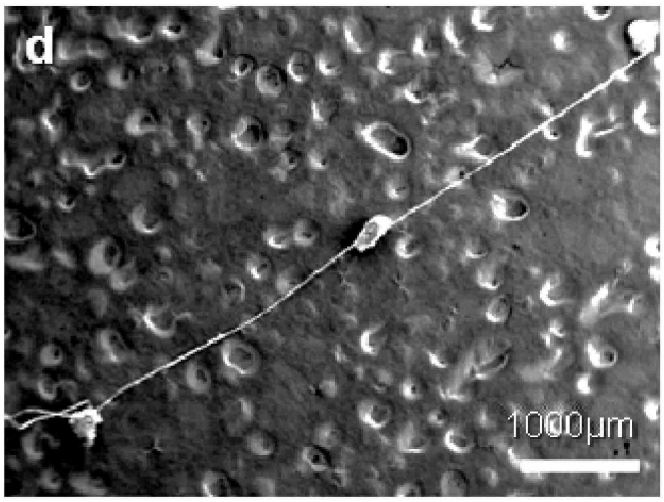
도면30



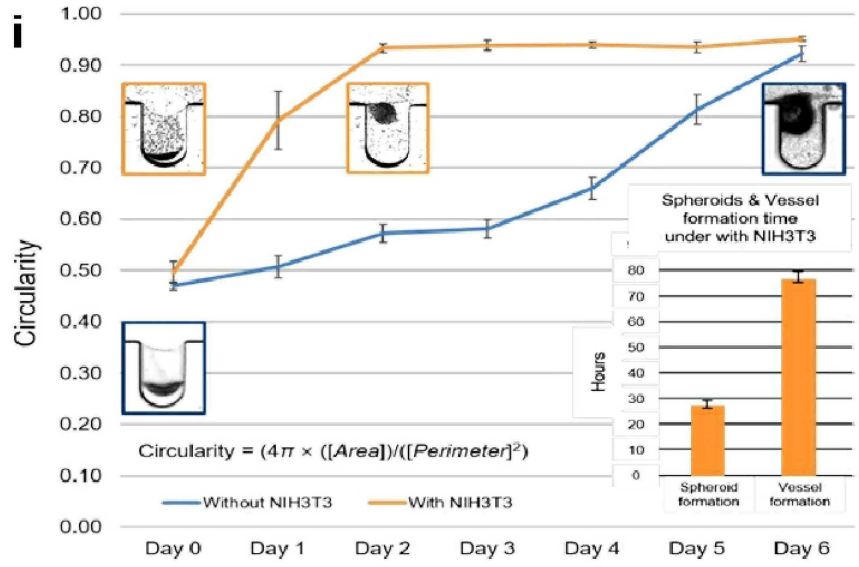
도면31



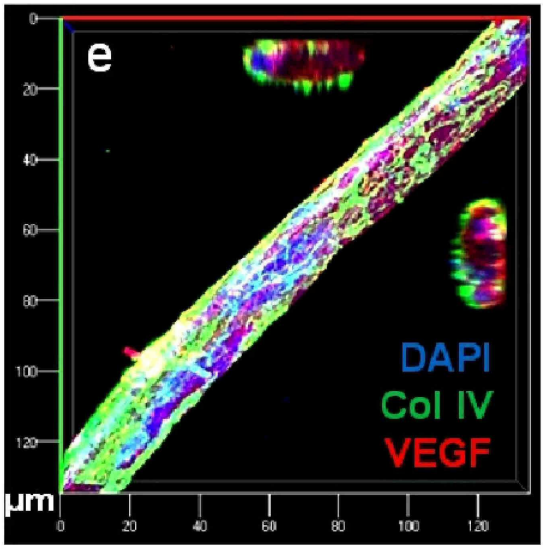
도면32



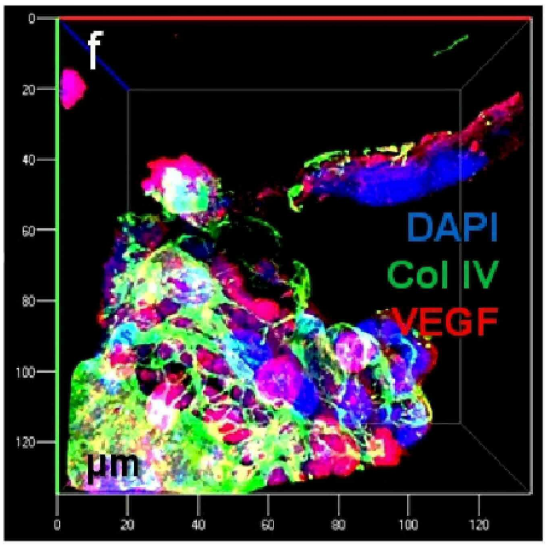
도면33


i
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
Circularity
Spheroids & Vessel formation time under with NIH3T3
Hours
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Spheroid formation
Vessel formation
Circularity = (4π × ([Area])/([Perimeter]²)
Without NIH3T3
With NIH3T3
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6

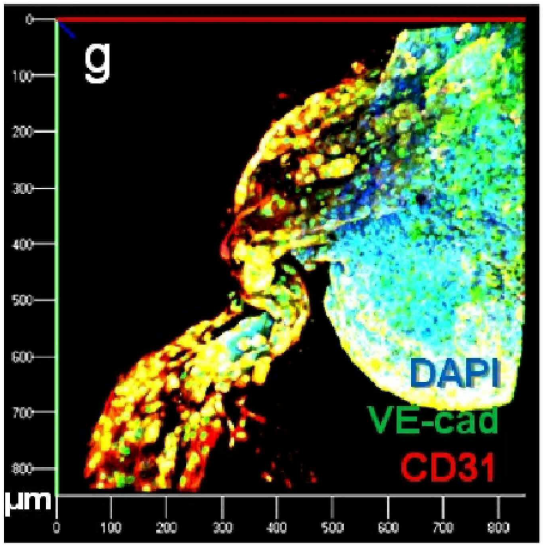
도면34a


e
0
20
40
60
80
100
120
μm
DAPI
Col IV
VEGF

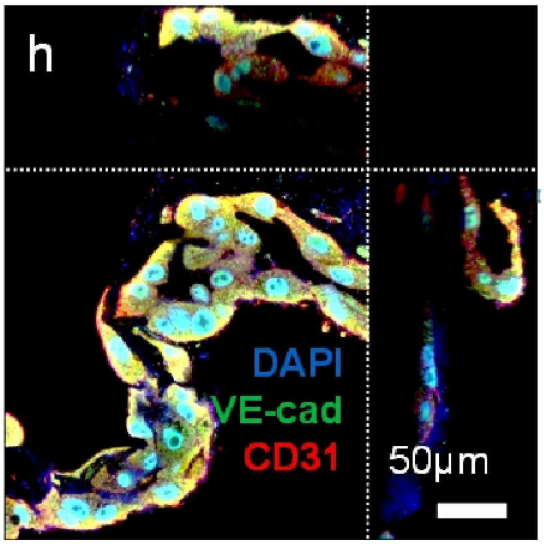
도면34b


f
DAPI
Col IV
VEGF
μm
0
20
40
60
80
100
120

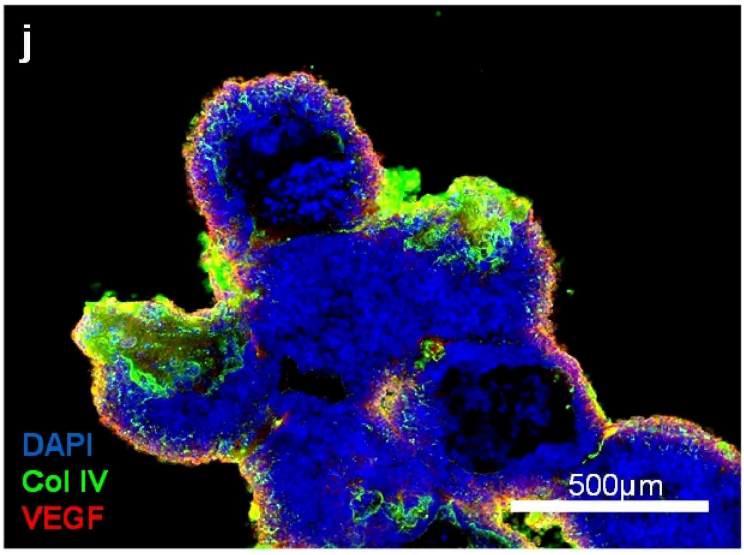
도면34c


g
DAPI
VE-cad
CD31
μm
0
100
200
300
400
500
600
700
800

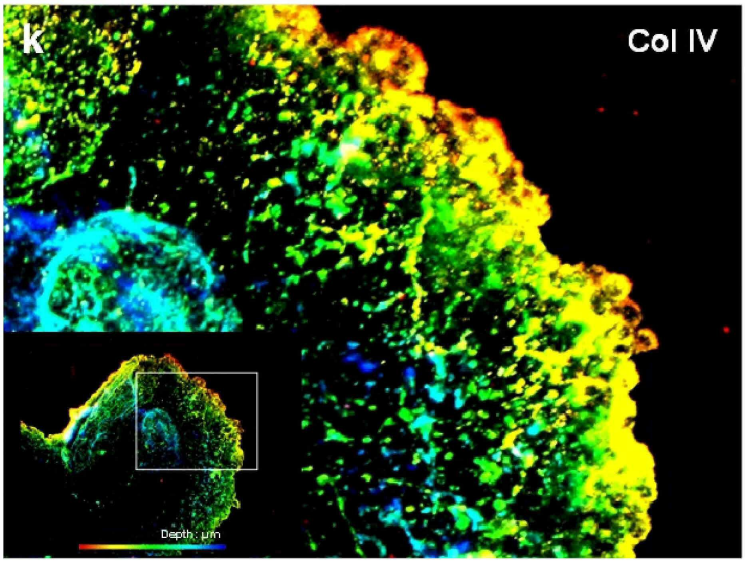
도면34d



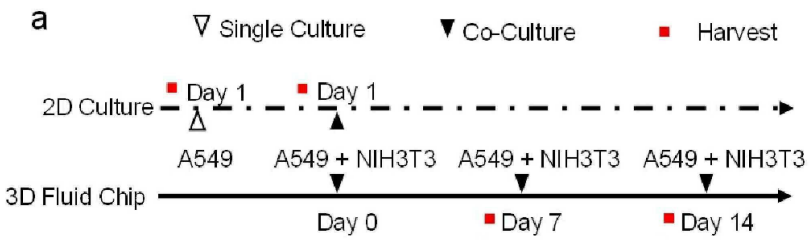
도면35a



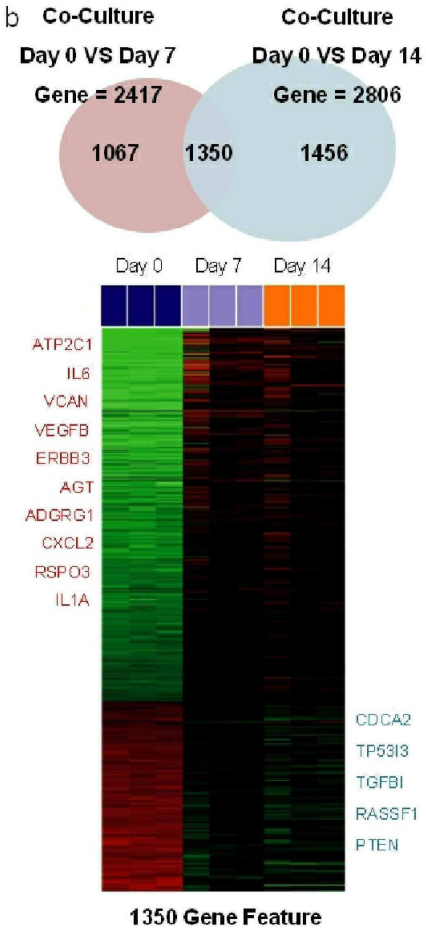
도면35b


k
Col IV
Depth : μm

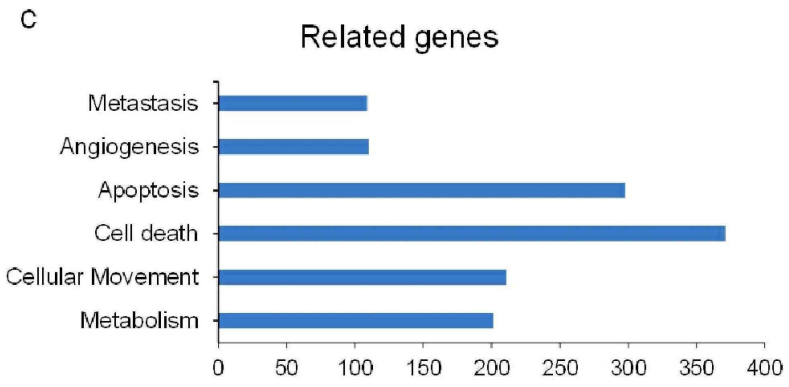
도면36a


a
Single Culture
Co-Culture
Harvest
2D Culture
Day 1
Day 1
A549
A549 + NIH3T3
A549 + NIH3T3
A549 + NIH3T3
3D Fluid Chip
Day 0
Day 7
Day 14

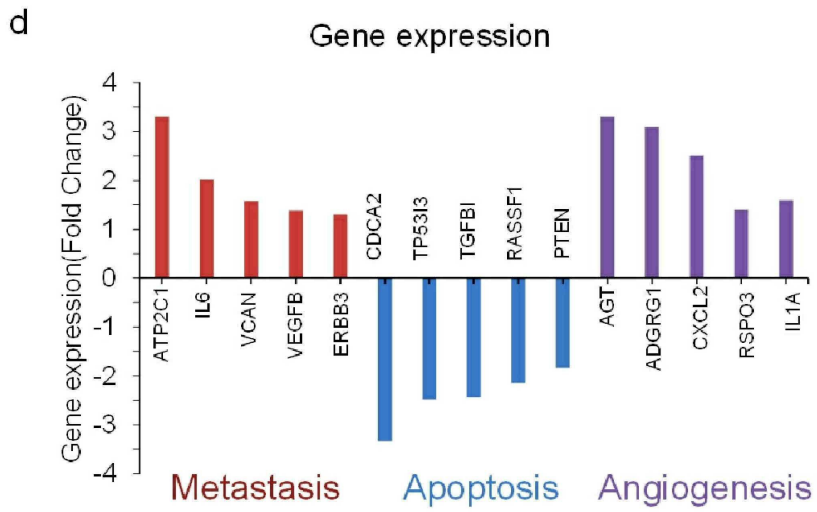
도면36b


b
Co-Culture
Day 0 VS Day 7
Gene = 2417
1067
1350
Co-Culture
Day 0 VS Day 14
Gene = 2806
1456
Day 0
Day 7
Day 14
ATP2C1
IL6
VCAN
VEGFB
ERBB3
AGT
ADGRG1
CXCL2
RSPO3
IL1A
CDCA2
TP53I3
TGFBI
RASSF1
PTEN
1350 Gene Feature

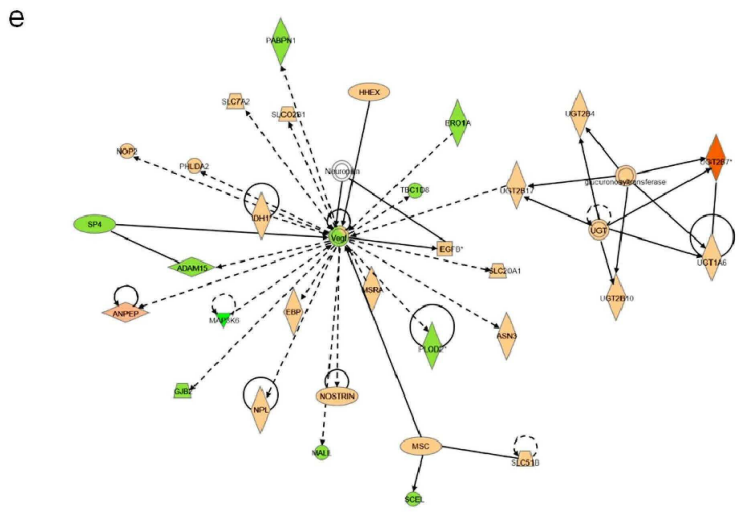
도면36c


c
Related genes
Metastasis
Angiogenesis
Apoptosis
Cell death
Cellular Movement
Metabolism
0
50
100
150
200
250
300
350
400

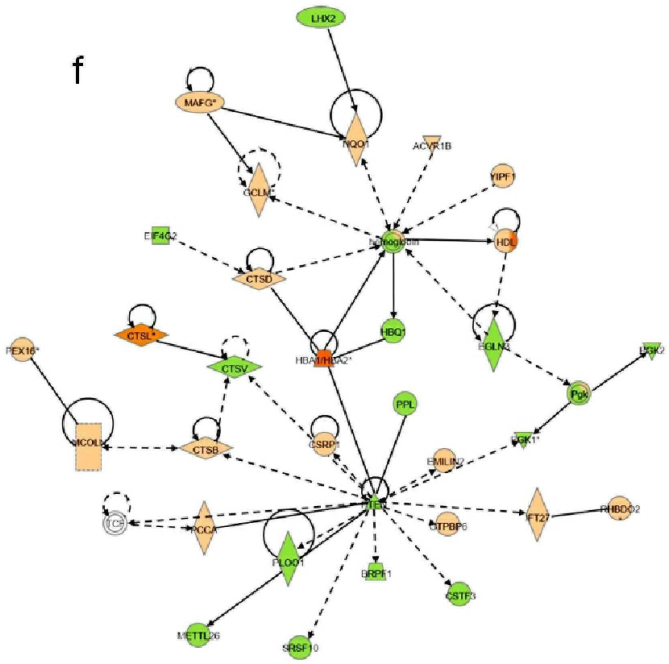
도면36d


d
Gene expression
Gene expression(Fold Change)
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
ATP2C1
IL6
VCAN
VEGFB
ERBB3
CDCA2
TP53I3
TGFBI
RASSF1
PTEN
AGT
ADGRG1
CXCL2
RSPO3
IL1A
Metastasis
Apoptosis
Angiogenesis

도면36e


e

도면36f


f
LHX2
MAFG*
NQO1
ACVR1B
OCLM*
YIPF1
EIF4G2
HDL
CTSD
CTSL*
HBQ1
HBA1/HBA2*
EGLN1
PEX16*
CTSV
PGK1
PPL
NCOA4
CTSB
CSRP1
EMILIN2
YWHAZ
PCCA
FLOT1
BRPF1
CSTF3
METTL26
SRSF10
FT27
RHBDD2
CTPBP6