



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0134646
(43) 공개일자 2024년09월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/00 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12M 21/08 (2013.01)
C12M 23/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0027960
(22) 출원일자 2023년03월02일
심사청구일자 2023년03월02일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박민
서울특별시 마포구 토정로4길 26 ,1층1호(합정
동)
허윤정
경기도 용인시 기흥구 예현로 15 서그내마을에스
케이아파트 102동 406호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강현욱

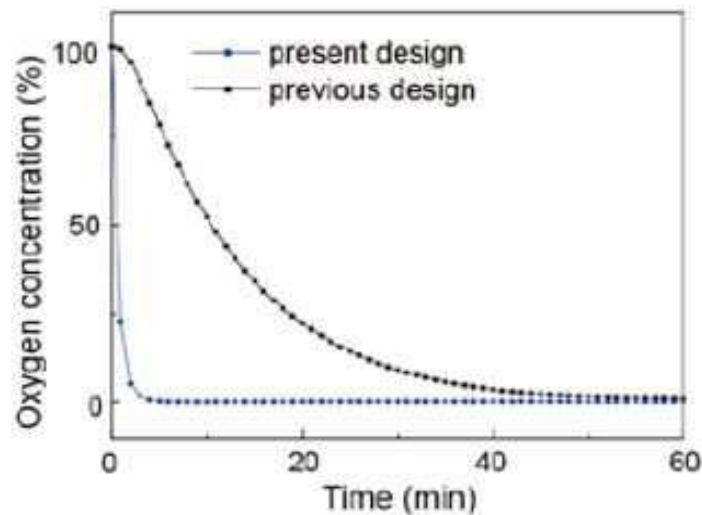
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 간 은 칩 및 이를 활용한 및 알부민 모니터링 시스템

(57) 요약

본 발명의 간 은 칩은 세포를 배양하는 세포 배양 채널, 세포 배양 채널의 용해된 산소를 수송하는 가스 투광성 막 및 가스 투광성 막의 산소를 제거하는 산소 제거 채널을 포함하고, 세포 배양 채널, 상기 투광성 막, 상기 산소 제거 채널이 서로 수직하게 위치되도록 배치되는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 41/34 (2013.01)

C12N 5/067 (2013.01)

(72) 발명자

김지영

서울특별시 노원구 덕릉로 459-18 미도아파트 101동 1505호

한유나

경기도 수원시 영통구 영통로200번길 112

영통SKVIEW 102동 102호

전봉관

강원도 춘천시 교동길17번길 11, 302호

남미송

경기도 수원시 영통구 봉영로1482번길 7-3, 103호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1345347076

과제번호

2021R1I1A3055700

부처명

교육부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

이공학학술연구기반구축

연구과제명

NADH 산화효소 표면발현을 통한 직접전자전달 NADH 바이오센서 개발

기 여 율

1/2

과제수행기관명

한림대학교

연구기간

2021.06.01 ~ 2024.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711135202

과제번호

2020R1A4A1016793

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

집단연구지원(R&D)

연구과제명

산소 제어 및 병렬 혈액순환 미세유체 시스템 기반 복합 장기칩 연구실

기 여 율

1/2

과제수행기관명

인하대학교

연구기간

2021.06.01 ~ 2026.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

세포를 배양하는 세포 배양 채널;

상기 세포 배양 채널의 용해된 산소를 수송하는 가스 투광성 막; 및

상기 가스 투광성 막의 산소를 제거하는 산소 제거 채널을 포함하고,

상기 세포 배양 채널, 상기 가스 투광성 막, 상기 산소 제거 채널이 서로 수직하게 위치되도록 배치되는 것을 특징으로 하는,

간 온 칩.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 산소 제거 채널은 산소 제거 물질이 유입되는 것을 특징으로 하는,

간 온 칩.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 산소 제거 물질은 이황산나트륨인 것을 특징을 하는,

간 온 칩.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 산소 제거물질은 100 μ l/min 유속으로 흐르는 1% 아황산나트륨 용액인 것을 특징을 하는,

간 온 칩.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 가스 투광성 막은 PDMS로 이루어지는 것을 특징으로 하는,

간 온 칩.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 간 온 칩은 5분 이내에 산소 농도 0.5% 미만인 저산소증 환경을 제공하는 것을 특징으로 하는,

간 온 칩.

청구항 7

제1항에 따른 간온칩; 및

알부민을 감지하도록 구성된 바이오센서를 포함하는,

알부민 모니터링 시스템.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 바이오센서는 알부민에 대한 항체가 고정화된 Au 전극을 포함하는,
알부민 모니터링 시스템.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 Au 전극은 표면이 카르복실기로 개질된 후 알부민에 대한 항체가 고정되는 것을 특징으로 하는,
알부민 모니터링 시스템.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 바이오센서는 10회 이상 재사용이 가능한 것을 특징으로 하는,
알부민 모니터링 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저산소증을 유도하는 간 온 칩 및 그를 활용한 알부민 모니터링 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 저산소증과 간 기능에 대한 상관관계를 연구하기 위해서는 저산소증 모델을 구축하여야 한다.

[0003] 하지만, 질병 모델의 대부분은 in vivo 마우스 모델이기 때문에 비인간 종을 이용하는 데에는 한계가 있다. 또한, 동물실험에서는 일정 기간이 지난 후 조직검사나 혈액검사를 시행하므로 약물치료나 질병의 진행에 따른 동역학을 관찰하는 것에 그치고 있다.

[0004] 따라서 in vitro에서 인간 세포로 진행되는 질병 모델과 그 모니터링 시스템에 대한 연구가 요구되고 있다.

[0005] 장기 온 칩(organ-on-a-chip) 또는 시험관 내 장기 구조라고도 하는 미세생리학 시스템(Microphysiological systems, MPS)은 체외에서 인간의 생리학을 모방하는 미세 유체 장치이다.

[0006] 현재까지 MPS에서 직접적인 화학적 영향 없이 저산소증을 실현하기 위한 다양한 연구 개발이 이루어지고 있다. Anada 등은 산소 비투과성 아크릴 수지를 이용한 캡슐화 방법을 제안하였으나, 캡슐화 방법은 저산소증 수준을 제어할 수 없었다. 이를 개선하기 위해 연구자들은 세포 배양 채널 옆에 배치된 산소 제거 채널을 사용했으나, 이는 저산소증을 실현하기 위해 긴 산소 청소 채널 또는 오랜 시간을 필요로 하는 단점이 있다.

[0007] 이에, 구조가 단순하고 짧은 시간 내 저산소증을 실현할 수 있는 질병 모델에 대한 기술 개발이 요구된다.

[0008] 한편, 바이오센서의 이상적인 상태는 특정 기간 동안 칩의 유출로부터 바이오마커를 실시간으로 모니터링하는 것이다.

[0009] 또한, 소량의 미세유체 배양 시스템에서 낮은 세포수로 분비되는 바이오마커의 농도가 낮기 때문에 높은 감도가 요구된다.

[0010] ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 및 PCR(polymerase chain reaction)과 같은 오프칩 측정은 각각 단백질 및 핵산 기반 바이오마커 분석을 위해 널리 수행되어 왔으나, 해당 방법은 긴 분석 시간, 많은 시료량, 숙련된 분석기술이 요구된다는 단점이 있다.

[0011] 이에, 소량의 바이오마커를 높은 감도로 단시간에 측정할 수 있는 바이오센서에 대한 기술 개발이 요구된다.

[0012] 한편, 전문한 배경기술은 반드시 본 발명의 출원 전에 일반 공중에게 공개된 공지기술이라 할 수는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2017-0068805호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 일 실시예는 저산소증과 같은 환경을 실현할 수 있는 유도 간 온 칩 및 저산소증 질환을 모니터링하기 할 수 있는 바이오센서를 제공하는 데에 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 전문한 기술적 과제를 달성하기 위한 기술적 수단으로서, 본 발명의 면역 간 온 칩은 세포를 배양하는 세포 배양 채널, 세포 배양 채널의 용해된 산소를 수송하는 가스 투광성 막 및 가스 투광성 막의 산소를 제거하는 산소 제거 채널을 포함하고, 세포 배양 채널, 상기 투광성 막, 상기 산소 제거 채널이 서로 수직하게 위치되도록 배치되는 것을 특징으로 한다.

[0016] 예컨대, 산소 제거 채널은 산소 제거 물질이 유입되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0017] 예컨대, 산소 제거 물질은 이황산나트륨일 수 있다.

[0018] 예컨대, 산소 제거물질은 100 μ l/min 유속으로 흐르는 1% 아황산나트륨 용액일 수 있다.

[0019] 예컨대, 가스 투광성 막은 PDMS로 이루어질 수 있다.

[0020] 예컨대, 간 온 칩은 5분 이내에 산소 농도 0.5% 미만인 저산소증 환경을 제공할 수 있다.

[0021] 본 발명의 알부민 모니터링 시스템은 제1항에 따른 간 온 칩 및 알부민을 감지하도록 구성된 바이오센서를 포함한다.

[0022] 예컨대, 바이오센서는 알부민에 대한 항체가 고정화된 Au 전극을 포함할 수 있다.

[0023] 예컨대, Au 전극은 표면이 카르복실기로 개질된 후 알부민에 대한 항체가 고정되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0024] 예컨대, 바이오센서는 10회 이상 재사용이 가능한 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0025] 전문한 본 발명의 과제 해결 수단 중 어느 하나에 의하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 간 온 칩은 단순한 구조로 빠른 시간 내로 저산소증을 유도할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오센서는 알부민 항체에 대한 민감성이 보다 향상될 수 있다.

[0027] 본 발명에서 얻을 수 있는 효과는 이상에서 언급한 효과들로 제한되지 않으며, 언급하지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 실시예 1과 비교예 1의 시간 경과에 따른 산소 농도를 나타낸 그래프이다.

도 2은 전극에 대한 항체 고정화 과정의 개략도이다.

도 3은 전극에 대한 항체 고정화 과정에서의 CV 측정값을 나타낸 그래프이다.

도 4는 항체 고정화 공정 전후의 전극 표면 SEM 이미지이다.

- 도 5는 PBS에서 스파이크된 알부민의 The Nyquist plot을 나타낸 도면이다.
- 도 6은 PBS에서 스파이크된 알부민의 Bode plot을 나타낸 도면이다.
- 도 7은 PBS에서 스파이크된 알부민의 표준곡선을 나타낸 도면이다.
- 도 8은 RPMI1640을 포함하는 10% FBS의 The Nyquist plot을 나타낸 도면이다.
- 도 9는 RPMI1640을 포함하는 10% FBS의 Bode plot을 나타낸 도면이다.
- 도 10은 RPMI1640을 포함하는 10% FBS의 표준곡선을 나타낸 도면이다.
- 도 11은 10회 연속 측정 시 바이오센서의 측정값을 나타낸 도면이다.
- 도 12는 시료의 형광현미경 이미지이다.
- 도 13은 정상 산소 환경과 저산소 환경에서 생존 가능한 세포의 양을 나타낸 도면이다.
- 도 14는 저산소증 하 알부민과 Arg 1의 mRNA 수치를 나타낸 도면이다.
- 도 15는 HIF-1 α 의 mRNA 수치를 나타낸 도면이다.
- 도 16은 HIF-2 α 의 mRNA 수치를 나타낸 도면이다.
- 도 17은 저산소증 유도 과정중의 알부민 농도 값을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0030] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 구성을 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0031] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [0032] 본 발명은 저산소증을 실현할 수 있는 질병 모델 및 그를 활용한 바이오센서에 관한 것이다.
- [0033] 저산소증은 산소 농도가 정상 산소증에 비해 0.5% 미만인 상태를 말한다. 저산소증은 산소를 이용하여 에너지원(ATP)을 생산하는 미토콘드리아의 기능을 저하시킬 수 있다. 미토콘드리아의 기능이 저하되면, 에너지원의 생산이 감소되고, 이는 ATP 의존성 세포막 펌프 메커니즘의 불균형을 야기하여 세포질에 나트륨과 물이 축적되어 세포사멸을 유도한다. 저산소증으로 인해 세포가 손상되면 장기의 기능에도 문제가 발생할 수 있다.
- [0034] 간은 인체의 복부에서 가장 큰 체기관이다. 간은 혈액 공급, 담도 흐름, 신진대사, 호르몬 분해 등의 다양한 기능을 수행한다. 간은 체내 산소의 약 20%를 소비하므로 혈액 내 산소 농도에 대한 민감도가 높다. 따라서, 저산소증은 다양한 간질환의 발병에 원인이 된다.
- [0035] 간은 문맥혈액순화에 의존하는데, 저산소증이 되면 전신순환으로부터 혈액이 다소 늦게 공급되므로, 중심소엽세포가 일차적으로 손상을 받게 된다. 급성 저산소증이 있는 경우, 중심소엽세포는 괴사되고 장기화되면 섬유화가 일어난다. 또한, 저산소증으로 인하여 지방간이 유발될 수 있고, 간병변을 앓는 만성 간질환 환자에게 간폐증후군이 발병할 수 있다.
- [0036] 본 발명은 저산소증을 유도할 수 있는 간 온 칩(liver-on-a-chip)에 대한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따른 간 온 칩은 저산소증에 의한 질병을 진단할 수 있도록 인체 내 저산소증 환경과 유사한 환경을 제공할 수 있다.
- [0037] 간 온 칩이란 전자회로가 놓인 칩 위에 살아있는 간을 구성하는 세포를 배양함으로써, 간의 기능과 특성뿐만 아니라, 역학적, 생리적 세포반응을 모방한 모델을 말한다. 쉽게 말해, 간 온 칩은 칩 안에 간의 기능을 넣어둔 것을 의미한다.

- [0038] 본 발명의 간 온 칩은 미세 유체 기술을 기반으로 한다. 구체적으로 간의 성질 및 기능을 마이크로 단위 칩 위에 구현하고, 세포와 주위 미세환경 간 상호작용을 모사함으로써, 약물 스크리닝, 약물 전달시스템에 대한 정량적 정보를 제공할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 따른 간 온 칩은 산소 제거 채널, 가스 투과성 막, 세포 배양 채널을 포함한다.
- [0040] 세포 배양 채널은 세포를 성장시키기 위해 구성될 수 있다.
- [0041] 이때, 세포는 간세포로 이루어질 수 있으며, 세포 배양 채널은 산소가 용해되어 있는 환경을 갖도록 구성된다.
- [0042] 산소 제거 채널은 세포 배양 채널에 용해된 산소의 농도를 감소시키기 위해 구성될 수 있다.
- [0043] 산소 제거 채널에는 산소 제거 물질이 유입될 수 있다. 산소 제거 물질로는 산소와 결합 반응을 일으키는 물질이 사용될 수 있다. 구체적으로, 산소 제거 물질로 아황산나트륨이 사용될 수 있다. 아황산나트륨은 세포 배양 채널에 용해된 산소와 다음과 같은 반응식과 같이 반응할 수 있다.
- [0044] [반응식 1]
- [0045] $2\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{Na}_2\text{SO}_4$
- [0046] 아황산나트륨의 화학 반응은 산소 농도를 크게 감소시켜 얇은 기체 투과성 막을 통해 세포 배양 채널의 저산소 환경을 생성한다.
- [0047] 가스 투과성 막은 산소를 수송하기 위해 구성될 수 있다.
- [0048] 가스 투과성 막은 세포 배양 채널 내 산소가 산소 제거 채널로부터 안정하게 제거될 수 있도록 한다. 구체적으로, 산소 제거 채널 내 산소 제거 물질의 직접적인 화학 영향을 받지 않는 상태로 산소가 제거될 수 있도록 한다. 산소 제거 물질인 아황산나트륨이 산소 제거 채널로 유입되면 세포 배양 채널에 용해된 산소가 가스 투과성 막을 통해 간접적으로 제거될 수 있다.
- [0049] 가스 투과성 막은 폴리디메틸실록산(PDMS)으로 구성될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에 따른 간조직칩의 세포 배양 채널, 가스 투과성 막, 산소 제거 채널은 서로 수직하게 배치된다. 구체적으로, 세포 배양 채널은 가장 하단에 위치하고, 가스 투과성 막은 산소 제거 채널과 세포 배양 채널 사이에 위치되며, 산소 제거 채널은 가장 상단에 위치하도록 배치되며, 각 구성들은 서로 수직하게 배치된다.
- [0051] 본 발명의 일 실시예에 따른 간조직칩은 세포 배양 채널, 가스 투과성 막, 산소 제거 채널이 서로 수직하게 배치되므로, 저산소증과 유사한 환경을 보다 빠르고 균일하게 유도할 수 있다.
- [0052] 또한, 산소 제거 채널과 세포 배양 채널 사이에 가스 투과성 막이 배치되므로, 산소 제거 물질의 직접적인 화학적 영향 없이 저산소증과 유사한 환경을 보다 안정적으로 유도할 수 있다.
- [0053] 본 발명은 간 온 칩에 의해 유도된 저산소 환경에서의 알부민 농도를 모니터링하기 위해, 간 온 칩과 바이오센서를 결합한 알부민 모니터링 시스템을 제공한다.
- [0054] 본 발명의 일 실시예에 따른 알부민 모니터링 시스템은 상술한 저산소증 유도 간 온 칩과 바이오센서를 포함한다.
- [0055] 본 발명의 바이오센서는 간에서 분비되는 중요한 생체지표 중 하나인 알부민을 감지할 수 있도록 구성된다.
- [0056] 본 발명에는 간 온 칩의 간 기능 모니터링을 위한 분석물로 인간 혈청 알부민을 사용한다. 간에서만 생성되는 알부민은 혈액 내에서 가장 풍부한 순환 단백질로 전체 단백질 함량의 약 50%를 차지한다. 이는 호르몬, 비타민, 지방산, 이온 및 이질적인 약물과 같은 다양한 분자와 결합하여 분자 수송체로 작용한다. 또한, 항염증, 안정화 및 삼투압 조절과 같은 다양한 역할을 수행한다. 이러한 이유들로부터, 알부민은 간 기능을 나타내며 허혈을 포함한 다양한 간 질환의 바이오 마커로 사용되고 있다.
- [0057] 본 발명의 바이오센서는 알부민에 대한 항체가 고정화된 Au 전극을 포함한다.
- [0058] Au 전극은 작업 전극, 카운터 전극 및 기준 전극으로 구성될 수 있으며, Au 전극 표면에는 인간 알부민에 대한 항체가 고정될 수 있다.
- [0059] 구체적으로, Au 전극 표면은 카르복실기로 기능화되고, 기능화된 표면 상에 인간 알부민에 대한 항체가 공유 고

정화될 수 있다.

[0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] <실시예>

[0063] 재료준비

[0064] SU-810은 Kayaku Advanced Materials (Westborough, MA, US), Inc.에서 구입했다. 폴리디메틸실록산 엘라스토머 키트(PDMS, Sylgard 184)는 Dow Corning(Midland, MI, USA)에서 구입하였다. 소 알부민에 대한 교차 반응성이 없는 인간 혈청 알부민에 대한 마우스 단일클론 항체는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구입하였다. 정제된 인간 혈청 알부민, 11-메르캅토운데칸산(MUA), 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필)카르보다이미드(EDC), N-하이드록시숙신이미드(NHS), 페리시안화칼륨, 백금 옥타에틸 포르피린(PtOEP), 트리톤 X-100, 송아지 피부의 콜라겐, 피브로넥틴 및 기타 분석 등급 화학 물질은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 인산염 완충 식염수(PBS)는 LPS Solution(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 간암 세포주 Huh7의 세포는 한국세포주은행(KLCB)에서 입수하였다. 팔로이딘과 4', 6-다이아미드노-2-페닐린돌(DAPI)을 포함하는 안티페이드 마운팅 용액은 Vector Laboratories(Newark, CA, US)에서 구입하였다. PrimeScript RT Master Mix 및 SYBR premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus)는 Takara (Kyoto, Japan)에서 구입하였다.

[0065]

[0066] **제조예 1: 간 온 칩(the liver-on-a-chip)을 위한 장치 제작**

[0067] 간 온 칩은 소프트 리소그래피를 사용하여 제작되었다.

[0068] 먼저 SU-8을 이용하여 마스터 몰드를 제작하였다. PDMS를 베이스 폴리머의 10:1 비율로 혼합하고, 마스터 몰드에 경화제를 부어 산소 제거 채널을 얻었다. PDMS는 또한 세포 배양 채널을 위한 마스터 몰드에 부은 후 스핀 코팅되었다. 밤새 80° C에서 경화한 후, PDMS를 마스터 몰드에서 분리하였다. 패터닝된 PDMS 장치는 120° C에서 20분 동안 오토클레이브에서 멸균되었고 멸균된 장치는 80° C 오븐에서 최소 4시간 동안 건조되었다. 산소 제거 채널 및 세포 배양 채널 패턴을 갖는 PDMS 소자를 O₂ 플라즈마 처리를 통해 유리 슬라이드에 접합 및 연결하였다.

[0069]

[0070] **제조예 2: 세포 배양**

[0071] Huh7 세포를 10% 태아소혈청(FBS), 1% v/v 페니실린, 스트렙토마이신 항생제 용액으로 보충된 RPMI1640 배지에서 배양하고 37° C에서 5% CO₂로 배양하였다. 2차원(2D) 세포 배양은 세포주의 약 80-90%의 컨플루언스로 수행되었다. 세포 접착을 위해 소자의 셀 챔버에 50 µg/ml의 콜라겐과 1 µg/ml의 피브로넥틴을 코팅하였다. Huh7 세포는 셀 챔버 내에 총 3x10⁶ cells/mL로 접종하였다. 세포부착 및 안정화를 위하여 세포 접종 후 미세유체장치 12시간 배양하였다. 이후, 셀 챔버 상의 유속을 24시간 동안 100 µL/h로 설정하고, 산소 제거 챔버는 24시간 동안 100 µL/min의 유속으로 1% 아황산나트륨을 관류시켰다.

[0073] **제조예 3: 세포 생존 특성화**

[0074] 칩 상의 Huh7 세포 형태는 DAPI와 팔로이딘에 의해 결정되었다. 세포는 미세유체 채널에서 4% 파라포름알데히드를 사용하여 실온에서 15분간 고정하고, 인산염 완충 식염수(PBS)로 채널에서 두 번 세척한 후, 0.1%(vol/vol) Triton X-100으로 5분간 투과시킨 후, 다시 PBS로 두 번 세척한 후, DAPI를 포함하는 팔로이딘과 안티페이드 마운팅 용액이 함유된 안티페이드 마운팅 매체로 암실에서 15분 동안 염색하였다. 염색된 세포는 형광 현미경(Leica, DMI 4000B, Germany)으로 관찰되었다. 세포의 생존 및 사멸을 분석하기 위해 세포를 LIVE/DEAD Cell 이미징 키트(Invitrogen, USA)로 염색하였다. 염색은 제조사에서 제공된 표준 프로토콜에 따라 진행되었다. Calcein-AM은 살아있는 세포 지표로 사용되었고, BOBO-3 Iodide는 죽은 세포 지표로 사용되었다. 이후, 세포들이 살아있는지(녹색) 죽었는지(빨간색)를 결정하기 위해 형광 현미경으로 촬영된 세포들을 관찰했다.

[0076] **제조예 4: 통합 바이오센싱 시스템의 구성**

[0077] 알부민 모니터링 시스템의 제작을 위해 작업 전극, 카운터 전극 및 기준 전극 구성을 가진 3개의 Au 전극이 사용되었다. 유리 웨이퍼 세척 후, 세척된 기판에 전극을 부착하기 위해 선택적으로 30 nm의 Cr을 새도 마스크 위에 증착하였다. 그 후, 스퍼터링에 의해 200 nm의 Au 층이 순차적으로 증착되었다. 상기 작업 전극의 면적은 0.5mm^2 이고, 직경은 0.8mm였다. 기판에서 마스크를 벗겨내고 세척한 후, 10 mM MUA를 30분 동안 처리하여 전극 표면을 카르복실기로 개질하였다. 개질된 전극은 50 mM EDC/NHS를 이용하여 30분간 세척 및 활성화하였다. 그 후, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 항알부민 항체를 전극에 1시간 동안 고정시켰다. 항체 고정화 후 미반응 활성기를 에탄올아민으로 30분간 처리하여 비특이적 결합을 방지하였다.

[0079] **제조예 5: 정량 역전사 PCR (RT-qPCR)**

[0080] 총 RNA는 RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 정상 산소 및 저산소 조건 하에서 칩에서 수확된 Huh 7 세포에서 추출되었다. 총 RNA는 PrimeScript RT Master Mix를 사용하여 상보적 DNA로 역전사되었다. RT-qPCR은 SYBR premix ExTaq™ (TliRNaseH Plus)로 수행되었으며, PCR 증폭은 95° C에서 1분 동안 1사이클 동안 수행한 후, 95° C에서 15초 동안, 60° C에서 1분 동안 40사이클을 수행하였다. 이어서, 적절한 PCR 생성물만을 증폭시키기 위해 해리 곡선을 생성하였다. 모든 실시간 반응은 CFX Opus 96 Real-Time PCR 시스템(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 수행되었다. 상대적인 발현 수준은 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(GAPDH)의 수준에 대해 계산되었다. 프라이머 시퀀스는 표 1에 개시하였다.

표 1

[0081]

Gene	Primer sequences (5'-3')	Reverse (5'-3')
Albumin	GATGAGATGCTGCTGACTTGC	CACGACAGAGTAATCAGGATGCC
Arg 1	GTCTGTGGGAAAAGCAAGCG	CACCAGGCTGATTCTTCCGT
HIF-1a	GAACAAAACACACAGCGAAG	ACAAATCAGCACCAAGCAG
HIF-2a	CTCATCCCTGCGACCATGA	TTCCCAAAACCAGAGCCATT
GAPDH	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	CATGGGTGGAATCATATTGG

[0083] **실시예 1: 간조직칩에서 저산소 상태 구축**

[0084] 본 발명의 일 실시예에 따른 간조직칩의 저산소화 유도 능력을 입증하기 위해 산소 제거 채널의 위치에 따른 저산소 상태를 분석하였다.

[0085] 이때, 실험은 비교예 및 실시예는 산소 제거 채널 위치를 제외한 다른 조건은 모두 동일하게 진행되었다.

[0086] 먼저, 산소 제거 채널의 위치를 다르게 배치한 실시예 1 및 비교예 1을 준비하였다. 여기서, 실시예 1은 산소 제거 채널과 세포 배양 채널이 수직하도록 배치되었으며, 비교예 1은 산소 제거 채널과 세포 배양 채널이 수평하도록 배치되었다.

[0087] 이후, 1% 아황산나트륨 용액 유속 100 $\mu\text{l/min}$ 의 하에서 5분마다 실시예 1 및 비교예 1의 산소 농도를 측정하였다.

[0088] 도 1은 실시예 1과 비교예 1의 시간 경과에 따른 산소 농도를 나타낸 그래프이다.

[0089] 도 1을 참조하면, 비교예 1은 전체 세포 배양 채널의 산소 농도가 공기 포화도 1% 미만으로 완전히 떨어지는 데 1시간 이상이 소요된 것을 확인할 수 있다.

[0090] 이와 달리, 실시예 1은 전체 세포 배양 채널의 산소 농도가 공기 포화도 1% 미만으로 완전히 떨어지는 데 5분 미만이 소요된 것을 확인할 수 있다.

[0091] 이를 통해, 세포 배양 채널과 산소 제거 채널이 수직하게 배치되는 것이 수평하게 배치될 경우에 비해 저산소증을 빠르고 균일하게 유도하는 데 더 유리함을 확인할 수 있었다.

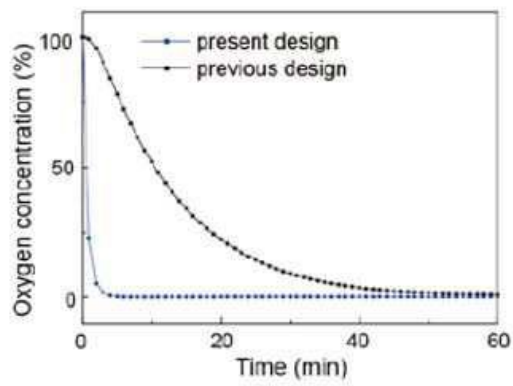
- [0093] **실시예 2: 간온칩 통합을 위한 알부민 바이오센서 최적화**
- [0094] 저산소 상태에서 간 온 칩에서 인간 알부민의 농도를 모니터링하기 위해 전극 표면에 항체를 고정시켜 알부민 바이오센서를 제작했다.
- [0095] 도 2은 전극에 대한 항체 고정화 과정의 개략도이다.
- [0096] 도 2에 나타난 바와 같이, SAM을 이용하여 전극의 Au 표면이 카르복실기로 기능화되었으며, 인간 알부민에 대한 항체는 EDC/NHS 화학에 의해 기능화된 전극의 표면에 공유 고정화되었다.
- [0097] 항체 고정화 과정은 CV 측정을 통해 확인되었다.
- [0098] 도 3은 전극에 대한 항체 고정화 과정에서의 CV 측정값을 나타낸 그래프이다.
- [0099] 도 3을 참조하면, 고정화 공정 전 노출된 전극(검은색)은 페로(II)/페리(III)-시아니드의 명확한 산화환원 피크 전류를 보였다. SAM 층 형성 후 CV 곡선(빨간색)은 사라진 산화환원 피크 전류가 사라지고, 곡선 면적이 감소함을 보여주었다.
- [0100] 상기 SAM층은 표면을 전극에 전기적으로 패시베이션하기 위해 균일하게 형성되었다. 고정화 과정이 진행됨에 따라 CV 플롯의 곡선 아래 피크 전류와 면적은 감소하였다.
- [0101] 이는 항체의 고정화가 순차적으로 진행되었으며, 공유 고정화 항체를 갖는 면적 친화성 층이 간 온 칩에서 인간 알부민의 농도를 모니터링하기 위해 제작되었음을 의미한다.
- [0102] 또한, 본 실험에서는 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 항체 고정화 공정 전후의 전극 표면을 관찰하였다.
- [0103] 도 4는 항체 고정화 공정 전후의 전극 표면 SEM 이미지이다.
- [0104] 도 4를 참조하면, Au 전극의 표면은 투명한 것으로 관찰되었으며 항체 고정화 후 큰 변화가 없어 표면 형태에 영향을 주지 않고 면적 친화성 층이 형성되었음을 시사하였다.
- [0105] 제작된 바이오센서를 사용하여 PBS에서 알부민 샘플이 스파이크된 상태에서 EIS 측정을 수행하였다.
- [0106] 도 5는 PBS에서 스파이크된 알부민의 The Nyquist plot을 나타낸 도면이다.
- [0107] 도 6은 PBS에서 스파이크된 알부민의 Bode plot을 나타낸 도면이다.
- [0108] 도 7은 PBS에서 스파이크된 알부민의 표준곡선을 나타낸 도면이다.
- [0109] 본 실험에서는 알부민 농도가 1ag/mL에서 10ng/mL까지 상이한 검체를 검사하였다.
- [0110] 도 5를 참조하면, 나이키스트 플롯(the Nyquist plots)은 알부민 농도가 증가함에 따라 지속적으로 증가하는 패턴을 보였다.
- [0111] 이러한 현상은 Bode plot에서도 관찰되었다.
- [0112] 도 6을 참조하면, 모든 주파수 범위에서 알부민 농도가 증가함에 따라 임피던스 스펙트럼이 증가하였다.
- [0113] 도 7에서는 특정 주파수 14.5Hz에서의 임피던스 값을 수집하여 표준곡선으로 기술하였다. 측정된 모든 농도 범위에서 알부민 농도가 증가함에 따라 신호 값이 증가하는 것이 관찰되었다.
- [0114] 이러한 결과로부터 검출한계(LOD)는 10 ag/mL에서 10 ng/mL까지의 동적 범위를 갖는 3개의 시그마 기준에 기초하여 10 ag/mL로 계산되었다.
- [0115] 이러한 결과는 조작된 면적 센서가 높은 감도와 넓은 동적 범위로 알부민을 측정하는 데 적합함을 나타낸다.
- [0116] 본 발명의 일 실시예에 따른 간 온 칩의 모니터링 능력을 확인하기 위해 배양 배지에 다양한 농도의 알부민이 스파이크된 표준 검체인 RPMI1640을 포함하는 10% FBS를 측정하였다.
- [0117] 도 8는 RPMI1640을 포함하는 10% FBS의 The Nyquist plot을 나타낸 도면이다.
- [0118] 도 9는 RPMI1640을 포함하는 10% FBS의 Bode plot을 나타낸 도면이다.
- [0119] 도 10은 RPMI1640을 포함하는 10% FBS의 표준곡선을 나타낸 도면이다.

- [0120] 도 8과 도 9에 나타난 바와 같이, Nyquist plot과 Bode plot은 모든 주파수 범위에서 지속적으로 패턴과 스펙트럼이 증가하여 알부민 농도가 증가하였다.
- [0121] 도 10을 참조하면, 표준곡선은 14.5Hz의 특정 주파수에서 임피던스 값으로 설정되었으며, PBS 시료와 마찬가지로 모든 측정 범위에서 알부민 농도가 증가함에 따라 신호값이 증가하는 것이 관찰되었다
- [0122] 이러한 데이터로부터 LOD는 10ag/mL로 계산되었다.
- [0123] 표준곡선은 0.99의 R제곱값으로 우수한 선형적합성을 나타내어 제작된 알부민센서의 선형범위가 10ag/mL 내지 1ng/mL임을 확인할 수 있었다.
- [0124] 제작된 면역센서는 수많은 단백질과 이온의 화합물인 혈청에 포함된 샘플에서 측정되었지만 높은 감도와 넓은 선형 범위로 우수하고 구체적인 성능을 보였다.
- [0125] 이러한 결과로부터 개발된 전기화학 바이오센서는 간 온 칩에서 인간 알부민의 농도를 모니터링할 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0127] 모니터링 시스템을 미세 생리학적 시스템에 통합하기 위해서는 측정 가능한 횟수도 매우 중요한 요소 중 하나이다. 이에, 본 발명의 바이오센서의 연속 측정 능력을 테스트하기 위해 동일한 농도의 알부민을 반복적으로 측정하였다.
- [0128] 농도가 1 ng/mL로 일정한 알부민 시료를 측정하였으며, 각 측정 간에는 재생 단계 없이 세척 단계만 수행하였다.
- [0129] 도 11은 10회 연속 측정 시 바이오센서의 측정값을 나타낸 도면이다.
- [0130] 도 11에서 보는 바와 같이 10회 측정된 결과 면역센서는 편차가 5% 미만인 안정적인 신호를 보였다.
- [0131] 따라서 바이오센서를 10회 재사용할 수 있음을 확인하였다.
- [0132] 이러한 결과는 제조된 바이오센서가 간 온 칩으로부터 배양 배지의 알부민 농도를 지속적으로 측정할 수 있음을 나타낸다.
- [0133]
- [0134] **실시예 3: 저산소 유도 간 온 칩 내 알부민 모니터링**
- [0135] 산소 제거 채널을 기반으로 간 온 칩에 저산소증을 유도하고, 제작된 바이오센서를 이용하여 알부민 농도를 모니터링하였다.
- [0136] 도 12는 시료의 형광현미경 이미지이다.
- [0137] 살아있는 Huh7 세포와 고정된 Huh7 세포를 결정하기 위해 DAPI와 Paloidin 염색을 수행하였다. 도 12에 나타난 바와 같이, 핵 및 f-actin 서브유닛의 Huh 7 세포를 확인하였다. 대부분의 세포는 살아있었지만(녹색 신호), 적은 비율의 죽은 세포(빨간색 신호)도 관찰되었다.
- [0138] 이후, 정상 산소 환경과 저산소 환경에서 생존 가능한 세포의 양을 확인하였다.
- [0139] 도 13은 정상 산소 환경과 저산소 환경에서 생존 가능한 세포의 양을 나타낸 도면이다.
- [0140] 도 13을 참조하면, 정상산소 환경과 저산소 환경에서 생존 가능한 세포가 각각 87.68%와 79.19%임을 확인할 수 있다.
- [0141] 이러한 데이터는 간세포가 조작된 칩에 정착하고 유도된 저산소 상태에서 모든 세포의 죽음 없이 성공적으로 생존력을 유지한다는 것을 의미한다.
- [0142] 다음으로는, 저산소증 하 알부민, Arg1, 저산소 유도 인자-1 α (HIF-1 α 및 HIF-2 α)의 mRNA 수치를 측정했다.
- [0143] 도 14는 저산소증 하 알부민과 Arg 1의 mRNA 수치를 나타낸 도면이다.
- [0144] 도 15는 HIF-1 α 의 mRNA 수치를 나타낸 도면이다.
- [0145] 도 16는 HIF-2 α 의 mRNA 수치를 나타낸 도면이다.

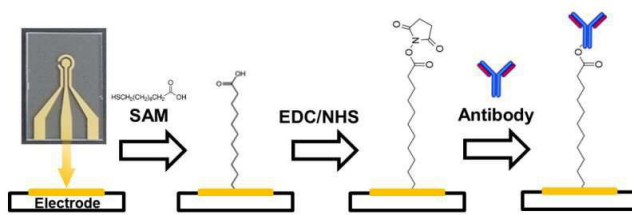
- [0146] 도 14를 참조하면, 저산소증 하에서 Arg 1가 증가하는 것을 확인할 수 있다.
- [0147] 저산소증 하에서 Arg 1의 증가는 생리학적 연구와 잘 일치한다. Arg1은 간의 세포질에서 발현되며, 간 오르니틴 회로에서 중요한 역할을 하며, 발현 또한 저산소증에 의해 유도된다. 저산소 조건에서 혐기성 해당과정은 젖산을 생성하며, 이는 Arg1 발현을 생성했을 수 있다.
- [0148] 저산소증 24시간 동안 HIF-1 α mRNA 발현 수준은 저산소증 24시간과 비교하여 유의미한 차이를 보이지 않았다.
- [0149] 반면, HIF-2 α 의 mRNA 발현 수준은 저산소 상태에서 현저하게 증가하였다.
- [0150] HIF-1 α 와 HIF-2 α 는 저산소 유도 전사 활성화의 필수 조절인자로 알려져 있다.
- [0151] HIF-1은 저산소증에 대한 초기 적응을 유지하고, HIF-2는 주로 장기 저산소증 하에서 작동하기 때문에, HIF-2 α 는 저산소증 하에서 24시간 후에 정상산소증 하에서 HIF-2 α 에 비해 1.8배 증가했다.
- [0152] 이로써, 간 온 칩이 충분한 저산소 민감성으로 간 기능을 입증했음을 확인했다.
- [0153] 저산소 유도 전후의 알부민 농도는 전기화학 면역 센서를 사용하여 모니터링하였다.
- [0154] 도 17은 저산소증 유도 과정중의 알부민 농도 값을 나타낸 도면이다.
- [0155] 도 17에 나타난 바와 같이, Huh7 세포는 24시간 동안 정상적인 산소 결핍 상태에서 간 온 칩에서 성장하였고, 산소 제거 채널에 아황산나트륨을 주입하여 24시간 더 저산소증을 유도하였다.
- [0156] 정상 산소 상태의 경우 분비되는 알부민의 농도가 6, 12, 24시간에 각각 308, 514, 584ng/mL로 증가하였다. 알부민 분비의 증가는 칩 간의 부착과 증식에 의한 간세포의 활성화의 증가로부터 고려되었다.
- [0157] 저산소증 발생 후 25h에서 알부민 농도를 739ng/mL로 증가시켰다. 이는 1h의 저산소 상태가 알부민 섹션에 영향을 미치지 않는다는 의미일 수 있다.
- [0158] 이후 알부민 농도는 27, 28, 29, 30, 36, 48시간에서 각각 423, 235, 247, 259, 136, 197ng/mL로 감소하였다.
- [0159] 알부민 농도가 가장 높은 것과 비교하여 저산소 상태 후 10시간에 알부민 농도가 급격히 감소하였으며, 그 후 24시간까지 27%의 알부민 분비 수준을 보였다.
- [0160] 저산소증 하에서 알부민 분비가 감소하는 것으로 알려져 있으며, 본 연구의 결과는 이러한 현상과 일치하였다.
- [0161] 이러한 데이터는 산소 청소 채널을 통해 간 온 칩에서 저산소증이 성공적으로 유도되었고 제조된 바이오센서가 간 온 칩의 알부민 농도 측정에 적합했음을 의미한다.
- [0162] 또한 바이오센서는 미세환경의 변화를 관찰할 수 있는 능력을 보이며 저산소 상태에서 반응을 보였다.
- [0163] 이러한 결과는 본 발명의 알부민 모니터링 시스템이 시험관 내 간의 저산소 환경을 모방하고 모니터링할 수 있음을 나타낸다.
- [0164] 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

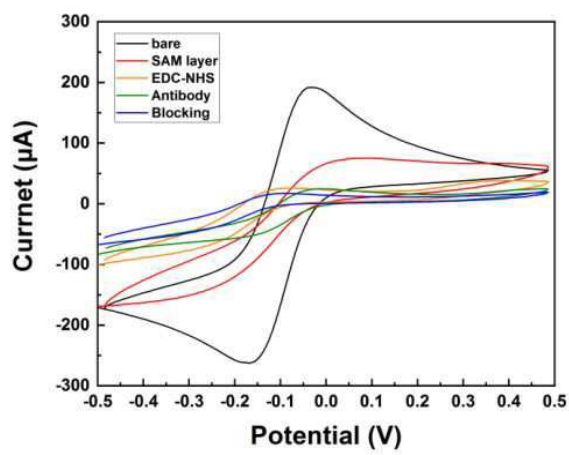
도면1



도면2



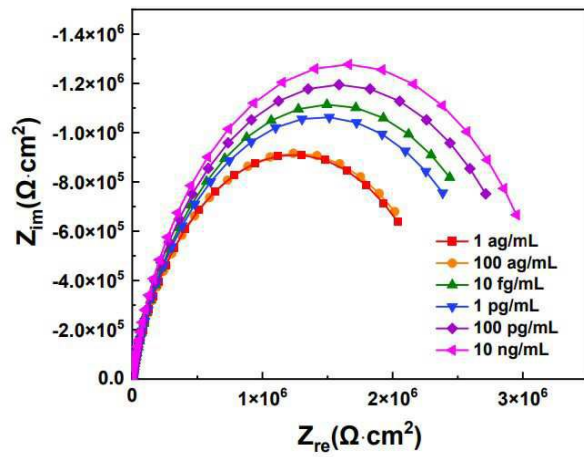
도면3



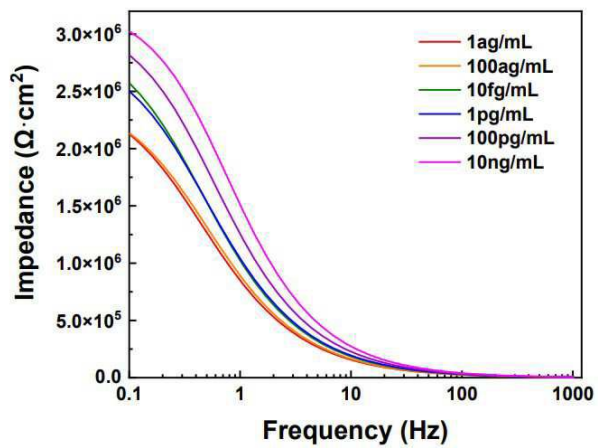
도면4



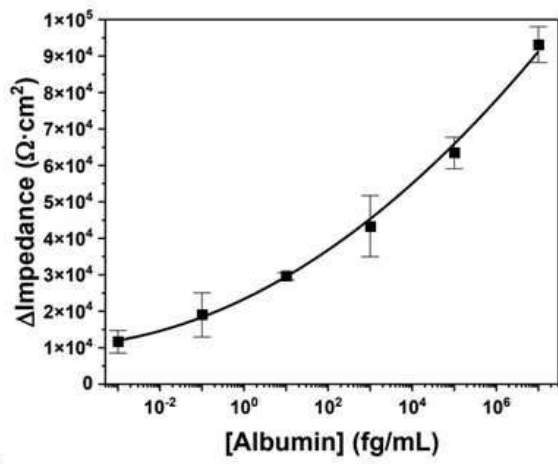
도면5



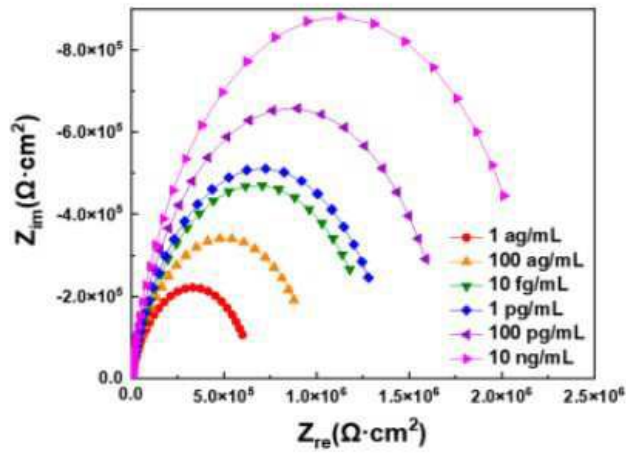
도면6



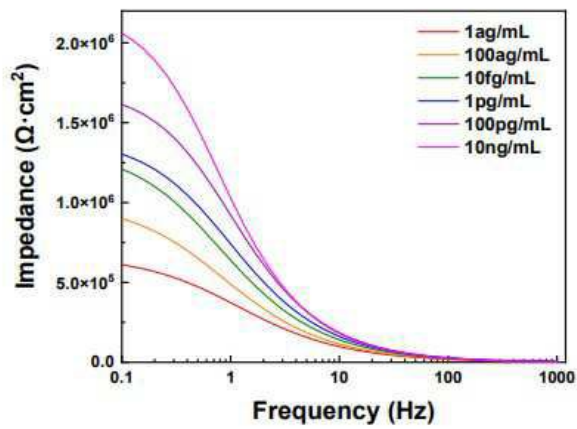
도면7



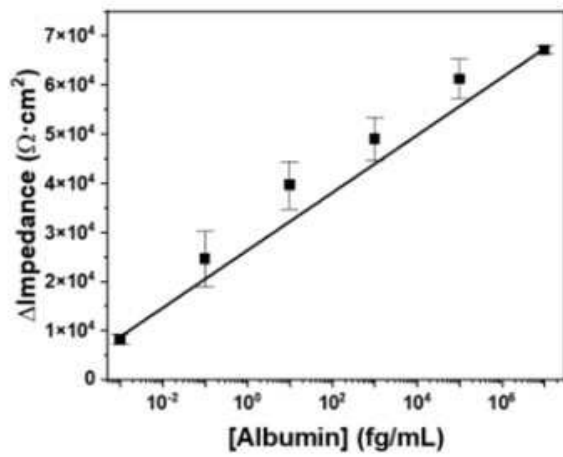
도면8



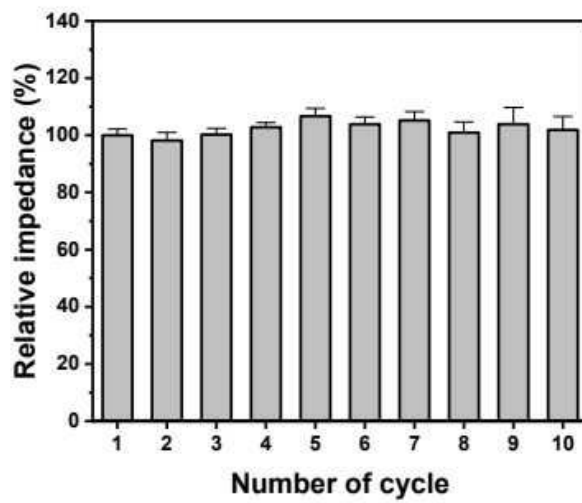
도면9



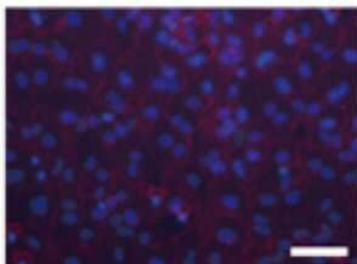
도면10



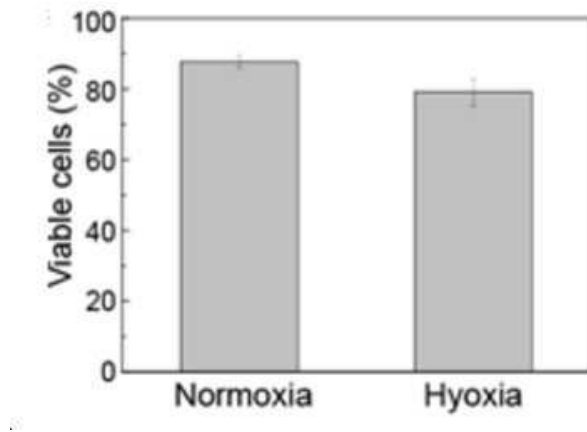
도면11



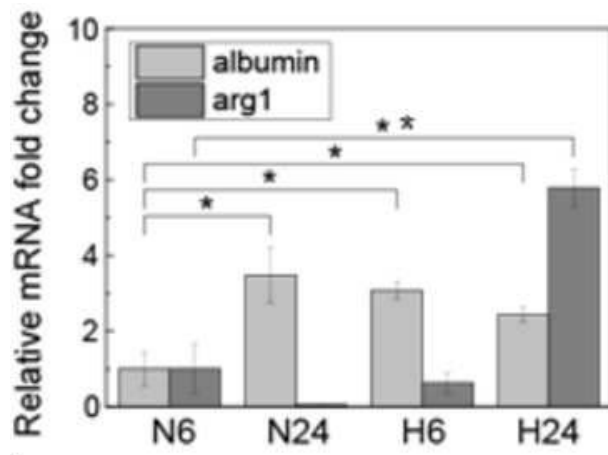
도면12



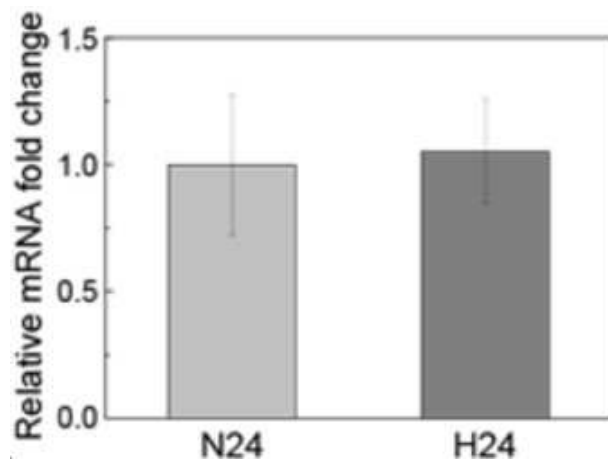
도면13



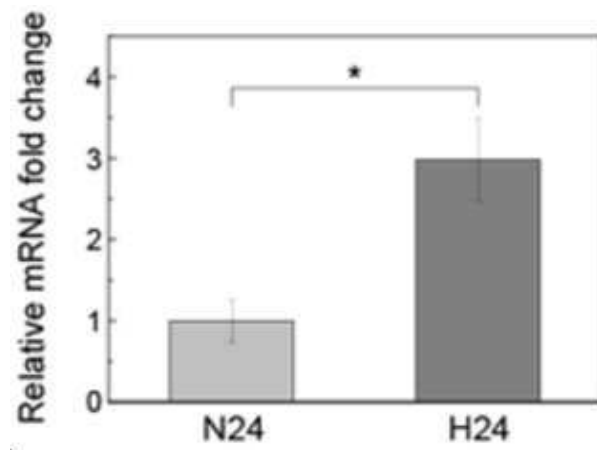
도면14



도면15



도면16



도면17

