



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0121866

(43) 공개일자 2015년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 1/34 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0047992

(22) 출원일자 2014년04월22일

심사청구일자 2014년04월22일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

정석

서울특별시 서대문구 연희로 38-20 107동 402호
(연희동, 대우아파트)

한세운

경기도 성남시 분당구 동판교로 275 122동 401호
(삼편동, 풍성신미주아파트)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 생체 유사 혈관 시스템 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 출원은 생체 유사 혈관 시스템 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 본 출원에 따르면, 인 비트로에서, 생체 내 혈관과 유사한 특성을 갖는 생체 유사혈관 시스템을 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A2A2A03016122

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업-중견연구자지원사업

연구과제명 뇌질환 모사를 위한 3차원 신경 조직의 구성

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.30

명세서

청구범위

청구항 1

다공성 막 또는 미세유체 채널에 제1형 콜라겐 용액을 처리 및 고형화하여 콜라겐 구조물을 형성하는 단계;
상기 콜라겐 구조물의 표면 상에 제4형 콜라겐 및 라미닌을 포함하는 기저막 형성 용액을 처리 및 고형화하여 기저막을 형성하는 단계; 및
상기 기저막 상에 혈관 내피세포를 접종 및 배양하는 단계
를 포함하는 생체 유사 혈관 시스템의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 기저막 형성 용액은 엔탁틴, 비트로넥틴 및 피브로넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 더 포함하는 생체 유사 혈관 시스템의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 기저막 형성 용액의 농도는 100ug/ml 내지 300 ug/ml 인 생체 유사 혈관 시스템의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 기저막 형성 단계에서, 기저막 형성 용액을 1분 내지 90 분 동안 처리하는 생체 유사 혈관 시스템의 제조 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 생체 유사 혈관 시스템.

청구항 6

미세유체 소자, 제1형 콜라겐, 제4형 콜라겐 및 라미닌을 포함하는 생체 유사 혈관 시스템 제조용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 엔탁틴, 비트로넥틴 및 피브로넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 더 포함하는 생체 유사 혈관 시스템 제조용 키트.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 출원은 생체 유사 혈관 시스템 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

신약개발에서 동물실험은 비임상/임상실험 및 초기 스크리닝에 사용되는데 한 건의 신약개발에 수행되는 동물실험은 수천억 원이 넘는 비용을 초래한다. 또한, 전세계적으로 윤리적인 이유를 들어 동물실험을 극심하게 반대하고 있어 동물실험의 당위성은 점점 약화되고 있다. 따라서, 동물 혹은 인간의 세포를 이용한 시험관 내 실험을 통해 동물실험을 대체하려는 시도가 이루어지고 있다.

[0003]

특히, 혈관은 체내 거의 모든 기관에 걸쳐 존재하고 있어, 다양한 체내 질병환경의 모사하는 데 중요한 요소로 작용한다. 혈관 분석을 통해 질병의 발병 메커니즘을 밝힐 수 있다. 또한, 혈관 분석은 신약의 초기 스크리닝하는데 필수적이므로 체외에서 혈관세포를 이용하여 혈관 단층막이나 혹은 혈관을 배양하는 기술은 매우 중요하

다.

[0004] 그러나, 기존의 실험관내 (in vitro) 실험기술로는 실제 체내 혈관관련 현상을 예측하거나 모사하는 데 많은 어려움이 있는 실정이다. 대부분의 기존 실험들은 비생리학적 구조를 지닌 다공성 박막 (porous membrane) 표면에 혈관 내피세포를 배양하여 혈관단층막을 형성하기 때문에 분자단위의 혈관 투과율(vascular permeability) 이 비정상적으로 높아져, 실험의 정밀도가 매우 떨어진다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제 2013-0046750호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 출원은 생체 유사 혈관 시스템 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 생체의 혈관은 내피세포; 및 기저막과 세포외 기질을 포함하는 혈관 세포외 기질(endothelial extracellular membrane; endothelial ECM)로 이루어져 있다. 혈관 내피세포를 감싸고 있는 기저막(basement membrane) 층의 존재로 인하여 혈관은 혈관 외 물질에 대한 장벽 기능을 갖는 치밀한 구조를 가질 수 있게 된다. 본 출원은, 이러한 생체의 혈관 특성을 인 비트로에서 구현하여, 동물 실험을 대체할 수 있는 생체 유사 혈관 시스템을 제공하기 위한 것이다.

[0008] 따라서, 본 출원은 다공성 막 또는 미세유체 채널에 제1형 콜라겐 용액을 처리 및 고형화하여 콜라겐 구조물을 형성하는 단계;

[0009] 상기 콜라겐 구조물의 표면 상에 제4형 콜라겐 및 라미닌을 포함하는 기저막 형성 용액을 처리 및 고형화하여 기저막을 형성하는 단계; 및

[0010] 상기 기저막 상에 혈관 내피세포를 접종 및 배양하는 단계를 포함하는 생체 유사 혈관 시스템의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 구체적으로, 다공성 막 또는 미세유체 채널에 액체 상태의 콜라겐 용액을 겔화하면 콜라겐 섬유들이 생성되고, 생성된 콜라겐 섬유층 표면을 라미닌 등과 세포 배양의 혼합액으로 코팅하면 기저막 층이 형성된다. 이렇게 형성된 기저막 층에 혈관 내피세포를 접종하고 증식시키면, 생체와 매우 유사한 인공 혈관을 제조할 수 있다.

[0012] 다공성 막은 그 위의 세포 배양 및 성장을 지지할 수 있는 투과성 지지체로써 다공성 막의 종류는 제한되지 않으며, 인공 혈관의 특성에 영향을 주지 않는 한 업계에서 알려진 다공성 막을 자유롭게 사용할 수 있다. 예를 들어, 폴리카르보네이트, 폴리에스테르, 콜라겐-코팅된 폴리테트라플루오로에틸렌 등을 사용할 수 있다. 또한, 상부 챔버의 하단부가 미세다공성 막으로 이루어진 트랜스웰 플레이트를 사용할 수 있다. 트랜스웰 플레이트는 상업적으로 시판되는 제품을 사용할 수 있으며, 대표적으로는 Corning Incorporated 사로부터 시판되는 제품을 사용할 수 있다. 제품에 대한 상세한 정보는 Corning Incorporated 사에서 제공하는 제품 카탈로그 내지 웹사이트 (www.corning.com)로부터 얻을 수 있으며, 실제로, 트랜스웰 플레이트에 대한 정보 및 사용법은 당 업계의 통상의 기술적 지식을 가진 자의 기술 수준의 범위 내에 있다.

[0013] 미세유체 채널은 수 마이크로 미터 크기의 직경을 갖는 유체의 이동이 가능한 채널을 의미한다. 미세유체 채널은 업계에 잘 알려져 있으며, 채널의 형상이나 종류는 제한되지 않는다. 예를 들어, 대한민국 특허출원 제2011-0111302에 개시하고 있는 미세유체 채널이 형성된 미세유체 소자를 이용할 수 있다. 미세유체 채널을 이용함으로써, 3차원적인 생체 유사 혈관 시스템을 제조할 수 있어, 생체와 극히 유사한 혈관 환경을 인 비트로에서 구

현할 수 있다.

- [0014] 콜라겐 용액 및 기저막 형성 용액의 고형화 방법은 업계에서 알려진 방법을 자유롭게 사용할 수 있으며, 예를 들어, 화학적 방법에 의하거나, 열 또는 빛을 가하여 이루어질 수 있다.
- [0015] 혈관 기저막은 주로 제4형 콜라겐과 라미닌으로 이루어져 있기 때문에, 기저막 형성 용액은 제4형 콜라겐 및 라미닌을 포함한다. 또한, 기저막 형성 용액은 기저막의 다른 성분을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 엔탁틴, 비트로넥틴 및 피브로넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다.
- [0016] 혈관 내피세포의 배양은 업계에서 통상적으로 사용되는 배양 배지를 이용하여 이루어질 수 있다.
- [0017] 한 구체예에서, 기저막이 형성된 콜라겐 구조물의 두께는 수십 나노미터 내지 수십 마이크로미터일 수 있다. 여기에서, 기저막이 형성된 콜라겐 구조물의 두께는 전체 콜라겐 구조물 중에서 제4형 콜라겐 및 라미닌이 코팅된 부분을 의미한다. 기저막이 형성된 콜라겐 구조물의 두께는, 예를 들어, 10nm 내지 70um, 15nm 내지 60um, 20nm 내지 50um, 또는 25nm 내지 40um일 수 있다. 상기 범위에서 생체 혈관과 유사한 기능을 갖는 혈관 시스템을 제조할 수 있다.
- [0018] 또한, 기저막의 두께는 기저막 형성 용액의 농도 및 처리 시간에 따라 조절될 수 있다. 예를 들어, 기저막 형성 용액의 농도는 100ug/ml 내지 300 ug/ml 일 수 있고, 기저막 형성 용액의 처리 시간은 1분 내지 90분, 5분 내지 90분, 10분 내지 90분, 20분 내지 90분, 20분 내지 70분, 20분 내지 60분, 또는 30분 내지 50분 일 수 있다. 상기 농도 및 시간의 범위에서 생체 혈관과 유사한 기능을 갖는 혈관 시스템을 제조할 수 있다.
- [0019] 본 출원은 또한, 상기 방법에 따라 제조된 생체 유사 혈관 시스템을 제공한다. 본 출원에 따라 제조된 생체 유사 혈관 시스템은, 생체 내 혈관과 유사한 혈관 투과성을 나타내고, 생체 내 혈관과 동일 유사한 장벽 기능을 나타내어, 다양한 혈관 통과 이동 어세이에 이용될 수 있다.
- [0020] 본 출원은 또한, 미세유체 소자, 제1형 콜라겐 및 라미닌을 포함하는 생체 유사 혈관 시스템 제조용 키트를 제공한다.
- [0021] 한 구체예에서, 상기 키트는 제4형 콜라겐, 엔탁틴, 비트로넥틴 및 피브로넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0022] 미세유체 소자는 내부에 미세유체 채널이 형성되어 있는 수 마이크로 미터 크기의 장치로서, 본 명세서에서 인공 혈관 시스템을 구현하기 위하여 사용된다. 미세유체 소자는 업계에 잘 알려져 있으며, 제한 없이 이용 가능하다. 예를 들어, 대한민국 특허출원 제2011-0111302에 개시되어 있는 미세유체 소자를 사용할 수 있다. 상기에서 기술한 바와 같이, 미세유체 소자의 미세유체 채널에 제1형 콜라겐 및 라미닌을 순차적으로 처리 및 고형화한 후, 혈관 내피세포를 접종 및 배양하여 생체 유사 혈관 시스템을 제조할 수 있다.

발명의 효과

- [0023] 본 출원에 따르면, 인 비트로에서, 생체 내 혈관과 유사한 특성을 갖는 생체 유사혈관 시스템을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 미세유체 채널이 형성된 미세유체 소자의 구조를 보여준다.
- 도 2는 제1형 콜라겐(type 1 collagen; COL1) 나노섬유에 라미닌(laminin; LN)을 증착하는 과정을 보여주는 모식도이다.
- 도 3은 3D 혈관 세포의 기질의 위상차 현미경 관찰 결과를 보여준다(스케일 바, 200 um).
- 도 4는 BM(basement membrane) 형성 용액의 인큐베이션 시간에 따른 기저막의 두께를 나타낸 그래프 및 도 3에서 점선으로 표시된 사각형 부분의 공초점 현미경 관찰 결과를 보여준다.
- 도 5는 생체 유사 혈관 시스템의 형성 과정 및 구조를 보여준다.
- 도 6은 3D COL1(a), 3D 혈관 ECM(b) 및 3D 혈관 ECM + ECs 시스템(c)의 TEM 이미지를 보여준다(스케일 바, 4

um).

도 7은 3D COL1 시스템에서의 혈관 내피 세포 배양 결과를 보여준다(스케일 바, 200 um).

도 8은 3D 혈관 ECM 시스템에서의 혈관 내피 세포 배양 결과를 보여준다(스케일 바, 200 um).

도 9는 3D COL1 및 3D 혈관 ECM 시스템의 공초점 현미경 관찰 결과를 보여준다(스케일 바, 100 um).

도 10은 도 9의 공초점 현미경 이미지를 8개의 연속 구획으로 나누었을 때의 평면 이미지(Top view)를 보여준다(스케일 바, 50 um).

도 11은 도 9의 공초점 현미경 이미지를 8개의 연속 구획으로 나누었을 때의 횡단면 이미지(cross-section view)를 보여준다(스케일 바, 100 um).

도 12는 도 10에서 설계된 혈관의 3D 이미지를 보여준다(스케일 바, 100 um).

도 13은 3D COL1 및 3D 혈관 ECM +ECs 시스템의 EC 단층에서의 절대 투과율 분석 결과인 FITC 형광 이미지를 보여준다(스케일 바, 100 um).

도 14는 EC 단층이 없는 3D 혈관 ECM 시스템의 EC 단층에서의 절대 투과율 분석 결과인 FITC 형광 이미지를 보여준다(스케일 바, 100 um).

도 15는 3D COL1 및 3D 혈관 ECM +ECs 시스템의 절대 투과율을 나타낸 그래프이다(* $P = 0.029$).

도 16은 3D COL1 및 3D 혈관 ECM +ECs 시스템에서의 컴퓨터 모델에 의한 분자 확산의 가상 농도 프로파일 도출 결과를 보여준다.

도 17은 3D COL1 및 3D 생체 유사 혈관 시스템에서의 CLDN1(claudin-1), CLDN5(claudin-5), 및 OCLN(occluding)의 mRNA 발현 수준을 측정된 결과를 보여준다(* $P = 0.016$ 및 *** $P < 0.001$).

도 18은 3D COL1 및 3D 생체 유사 혈관 시스템에서의 CLDN1(claudin-1), CLDN5(claudin-5), 및 OCLN(occluding)의 단백질 발현 수준 측정 결과를 보여준다(스케일 바, 50 um).

도 19는 3D COL1 및 3D 혈관 ECM 시스템에서의 인테그린- $\alpha 6$ 발현 수준 측정 결과를 보여준다(스케일 바, 100 um).

도 20은 조절 미오신 경쇄 2의 포스포릴레이션에 의한 혈관 투과성 조절 메커니즘을 보여준다.

도 21은 3D COL1 및 3D 혈관 ECM 시스템에서의 디포스포릴레이티드 MLC-2의 발현 수준 측정 결과를 보여준다(스케일 바, 100 um).

도 22는 3D 생체 유사 혈관 시스템에서의 호중구의 혈관 통과 이동 모니터 결과를 보여준다(스케일 바, 100 um).

도 23은 3D 생체 유사 혈관 시스템에서의 혈관 생성 어세이 결과(a는 위상차 이미지; b는 공초점 현미경 이미지)를 보여준다(스케일 바, 150 um).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 출원을 실시예 및 실험예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 출원을 예시하는 것일 뿐 본 출원의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0026] [실시예]

[0027] [실시예 1] 3D 혈관 세포의 기질(Endothelial Extracellular matrix; endothelial ECM) 제조

[0028] 실시예 1.1. 미세유체 채널(microfluidic channel)의 제조

[0029] 소프트 리소그래피에 의하여 미세유체 채널을 제조하였다. 먼저, 95 °C에서 1 시간 동안 베이킹된 SU-8-100 포토레지스트 (MicroChem, USA)를 실리콘 웨이퍼에 스핀-코팅하였다. 미세유체 소자가 새겨져 있는 마스크를 통하여 코팅된 포토레지스트에 선택적으로 UV 광을 조사한 후, PGMEA(propylene glycol monomethyl ether acetate) 포토레지스트 디벨로퍼 (MicroChem, USA)에서 노출하여 포토레지스트를 현상하였다. 80 °C, 1 시간 동안 드라이 오븐에서 Sylgard 184 실리콘 엘라스토머 베이스 및 경화제(중량비, 10:1; Dow Corning, USA)를 함유하는 PDMS (Poly (dimethylsiloxane)) 용액을 패턴화된 웨이퍼 상에 경화시켰다. 하나의 EC 채널, 두 개의 사이드 채널,

및 네 개의 ECM 채널을 포함하는 모든 채널의 유입구 및 유출구를 생검 펀치(biopsy punch)로 열었다. 패턴된 PDMS(상부) 및 글래스 커버슬립(하부; 파울 마린펠트, 독일)을 오토클레이브한 후, 산소 플라즈마 처리(CUTE; 웹토사이언스, 한국)에 의하여 상부의 사이드 채널을 하부에 비가역적으로 결합시켰다. 그 다음, 탈이온 증류수(distilled deionized water; DDW) 중의 1-mg/mL 폴리-D-리신(PDL; MW: 30,000-70,000; 시그마 알드리치, USA) 용액을 즉시 결합된 소자에 넣고, 37 °C, 4 시간 동안 습식 인큐베이터에서 보관하였다. 초과 PDL을 세척한 후, 80 °C 오븐에서 24시간 이상 소자를 건조시켜, 미세유체 채널이 형성된 미세유체 소자를 얻었다(도 1).

실시예 1.2. 미세유체 채널 내에 3D COL1(3 dimensional type 1 collagen)의 형성

10 X PBS (phosphate buffered saline; 씨모 사이언티픽, USA) 및 DDW 혼합물에 희석시킨 COL1(type 1 collagen) 혼합 용액(BD 바이오사이언스, USA)을 ECM 채널에 주입하고 인큐베이터에서 30분 동안 겔화하였다. 0.5N NaOH 용액으로 COL1 용액의 pH를 pH 10으로 조정하였다. 상기 과정을 통하여 미세유체 채널 내에 3D COL1이 형성된 3D COL1 시스템을 얻었다(도 6a).

실시예 1.3. 3D 혈관 세포의 기질(Endothelial Extracellular matrix; endothelial ECM) 제조

실시예 1.2.에서 형성된 3D COL1에 기저막 형성 용액(basement membrane solution; BM solution)을 가하여, 세포의 기질을 형성하였다. 구체적으로, (i) 오토클레이브 미세유체 장치(autoclaved microfluidic device)에, (ii) ECM (Extracellular matrix) 채널에 COL1 겔 용액을 넣고 겔화하였다. (iii) EC(Endothelial cell; 내피 세포) 채널 및 양쪽 사이드 채널에 무혈청-성장 배지를 넣었다. (iv) EC 채널에 BM (Basement membrane) 용액을 가하고 겔화하였다. (v) 증착 과정 후, BM 용액을 제거하였다. (vi) 신선한 혈청-첨가 성장 배지로 세척하여 초과 BM 물질을 제거하여, 3D 혈관 세포의 기질(Endothelial Extracellular matrix; endothelial ECM)을 제조하였다. 기저막 형성 용액으로는 천연 기저막 물질로 알려진 GFR(growth factor reduced) 매트릭스 겔 용액을 사용하였다. 도 2에 상기의 3D 혈관 세포의 기질 제조 과정을 도식화하여 나타내었다.

제조된 3D 혈관 세포의 기질을 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 3D COL1의 표면 상에 라미닌이 코팅되어, 기저막(라미닌 코팅층; L-COL1 층; 화살표로 표시)이 형성되었음을 알 수 있었다. 기저막이 형성된 부분은 라미닌이 코팅되지 않은 3D COL1 (별표로 표시) 층과 뚜렷이 구별되었다(도 3).

또한, 도 3에서 점선으로 표시된 사각형 부분을 공초점 현미경으로 관찰하여 도 4에 도시하였으며, 공초점 현미경 이미지는 L-COL1(Laminin coated-type 1 collagen) 층이 얻어졌음을 보여준다(녹색, LN).

기저막 증착 공정에서, 라미닌이 코팅된 제1형 콜라겐(L-COL1), 즉 기저막 층의 두께(h)는 BM 용액의 농도 및 인큐베이션 시간에 의해 결정된다. 실험에서 사용된 GFR 매트릭스는 다른 하이드로겔에 비하여 섭씨 10도 이상의 비교적 낮은 온도에서도 급격히 겔화되기 때문에 이러한 현상을 방지하기 위하여 무혈청 증식 배지에 희석시켜 약 200 ug/ml 농도로 사용하였다. 이 때, 기저막의 두께는 하기의 수식을 따르며 인큐베이션 시간의 제곱에 비례하였다(도 4). 생성된 기저막의 두께는 수 마이크로미터이었다.

[식 1]

$$h(t) = A\sqrt{t}$$

상기 식에서 h = 라미닌 코팅된 콜라겐 층의 두께, t = 인큐베이션 시간, A = 겔화 온도 및 BM 용액의 농도에 따른 상수를 나타낸다.

[실시예 2] 3D 생체 유사 혈관 시스템 (in vivo like blood vessel system) 제조

실시예 2.1. 미세유체 채널에 세포를 씨앗하기 전의 EC 배양

동결 보존된 hMVECs(human microvascular endothelial cells; 3 세대); 내피 세포 기초 배지-2 (EBM-2); 및 hEGF(human epidermal growth factor), 하이드로코티손, 젠타마이신, VEGF(vascular endothelial growth factor), hFGF-B(human basic fibroblast growth factor), R3-IGF-1(R3-insulin-like growth factor-1), 아스코르빈산, 헤파린 및 FBS(fetal bovine serum)을 함유하는 EGM-2-MV SingleQuots 보충 배지를 론자 (USA)사로

부터 얻었다. 조직 배양 플라스크에서 EGM-2MV (EBM-2 및 EGM2-MV SingleQuots의 혼합물)를 5 세대 증식시킴으로써 hMVECs를 배양했다. 그리고 나서, 사용할 때까지 DMSO (10% v/v) 및 FBS (10% v/v)를 함유하는 EGM2-MV에서 1×10^6 세포/mL 농도의 hMVECs를 동결 보존하였다.

실시예 2.2. 미세유체 채널에서의 EC 배양

hMVECs를 EC(endothelial cell) 채널에 씨딩하기 전에, 동결 보존된 hMVECs의 바이알을 수조에서 녹였다. T75 조직 배양 플라스크에 세포를 씨딩하고 37 °C, 습식 CO₂ 인큐베이터에서 ~80% 컨플루언스에 달할 때까지 인큐베이트했다. 48시간 마다 증식 배지를 교체하였다. 0.05% 트립신/1 mM EDTA 용액을 처리하여 hMVECs를 분리하고 2×10^6 세포/mL의 밀도로 준비했다. 이 세포 서스펜션 50 uL로 중앙 EC 채널을 채우고, 소자를 37 °C 인큐베이터에 30 분 동안 두어 세포를 부착시켰다. 그리고 나서, 미세유체 채널의 모든 유입구 및 유출구에 50 uL의 배지 드랍렛을 떨어뜨려 비-부착 세포 및 세포 잔해를 제거하였다. 모든 미세유체 채널에서 매일 EGM2-MV(microvascular endothelial cell growth medium-2)로 증식 배지를 교체하였다. 상기 과정을 통하여 혈관 내피 세포-라미닌을 포함하는 기저막 층-COL1(EC + L-COL1 + COL1)의 구조를 가지는 생체 유사 혈관 시스템을 제조하였다 (도 5).

제조된 생체 유사 혈관 시스템은, 도 5의 후단에 도시한 바와 같이, 생성된 콜라겐 섬유 하나 하나의 표면에 라미닌이 코팅되고, 이 라미닌에 혈관 내피세포의 특정 인테그린들이 결합하여 안정적인 인공 혈관 구조를 형성하게 된다.

[실험예 1] 3D 생체 유사 혈관 시스템 (in vivo like blood vessel system) 의 구조 분석 (도 6)

실시예 1.2에 따른 3D COL1, 실시예 1.3에 따른 3D 혈관 ECM 및 실시예 2에 따라 제조된 3D 생체 유사 혈관 시스템의 구조를 TEM(Transmission electron microscopy)을 이용하여 비교 관찰 하였다.

여기서 사용된 모든 물질은 시그마-알드리치로부터 구입했다. 4 °C, 적어도 24 시간 동안 0.15 M HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 버퍼 중의 2.5% 글루타알데히드로 인큐베이트하여 샘플을 고정하였다. 그리고 나서 0.1 M 소듐 카코딜레이트 트리하이드레이트-버퍼 1% 오스뮴 테트록사이드(osmium tetroxide; OsO₄) 용액에서 1시간 동안 샘플을 포스트픽스(postfix)하고 0.5 M 트리즈마 말레이트(Trizma maleate)-버퍼 0.5% 우라닐아세테이트로 대조했다. 그리고 나서, DDW 중의 에탄올 용액 (25%, 50%, 75%, 95%, 및 100%)으로 샘플을 탈수하였다. 3D COL, 3D 혈관 ECM, 및 3D 혈관 ECM + ECs를 에폭시 임베딩 미디엄 키트(Epoxy Embedding medium Kit)에 임베드했다. 임베드된 샘플을 미세유체 소자의 하부(글래스 커버슬립)과는 달리 상대적으로 짧은 기간 동안 산소 플라즈마를 처리한 PDMS 멤브레인으로 분리하였다. 울트라마이크로톰 (울트라컷 UCT; 레이카, 독일)로 아주 얇은 섹션 (60-70 nm)을 준비하고 200-메쉬 그리드에 모았다. 우라닐아세테이트로 섹션을 대조하고 60 kV에서 작동하는 JEM 1010 투과 전자 현미경 (JEOL, 일본)으로 관찰하였다. CCD 카메라 (SC1000; 가탄, USA)로 TEM 이미지를 기록하였다.

그 결과, 도 6에 도시한 바와 같이, 3D COL1은 생성된 콜라겐 섬유가 동그란 스팟 형태로 나타나고, 3D 혈관 ECM은 콜라겐 층에 라미닌이 코팅되어 형성된 기저막 부분이 어둡게 나타나며, 라미닌 코팅층에 혈관 내피세포가 배양된 생체 유사 혈관 시스템(3D 혈관 ECM + ECs)은 혈관 내피 세포가 안정적으로 자라고 있음을 알 수 있었다.

[실험예 2] 라미닌이 3D 생체 유사 혈관 시스템 (in vivo like blood vessel system) 에 미치는 영향 분석

3D 생체 유사 혈관 시스템에서, 라미닌의 역할을 알아보기 위하여, 면역세포화학 분석을 수행하였다. 구체적으로, 라미닌 코팅 없이 콜라겐 층만 증착된 시스템(3D COL1) 및 콜라겐 층에 라미닌 코팅층이 증착된 시스템(LCOL1 + 3DCOL1)에 hMVECs를 부착 및 배양하여 혈관 내피 세포가 안정적으로 자라는지 알아보았다.

PBS 중의 4% (w/v) 파라포름알데히드를 소자의 각 저장소에 가하고 15분 동안 인큐베이트하여 미세유체 소자에서 배양된 ECs를 고정시켰다. PBS 중의 1% 트리톤-X100 (시그마 알드리치)로 세포를 10분 동안 투과시켰다. DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole; 시그마 알드리치) 및 로다민 팔로이딘 (시그마 알드리치)으로 세포 핵

및 액틴 필라멘트를 각각 대비염색 하였다. 염색된 세포를 형광 현미경(Axio Observer D1; 칼 자이스, 독일) 및 공초점 현미경(LSM-700; 칼 자이스)으로 관찰하였다.

[0053] 형광 현미경 관찰 결과, 도 7에 도시한 바와 같이, 3D COL1 시스템에서 배양된 EC(노란색, 액틴; 파란색, 핵)는 위에서부터 아래로 쉽게 분리되었다. 붉은색 화살표는 분리된 부분을 가리키고, 하얀색 화살표는 상단에서 EC 단층의 증식 방향을 가리킨다.

[0054] 반면에, LCOL1 + 3DCOL1 시스템(3D 혈관 ECM 시스템)에서는 ECs (노란색, 액틴; 파란색, 핵)가 모든 면적에 안정적으로 부착했다. 하얀색 화살표는 상단에서 EC 단층의 증식 방향을 가리키고 별표는 각 ECM 채널의 위쪽 끝으로부터 EC 단층이 융합된 부분을 가리킨다 (도 8).

[0055] AJs(Adherens junctions)는 혈관의 장벽 기능에 중요한 역할을 하므로, 제조된 생체 유사 혈관 시스템의 기능을 평가하기 위하여, 3D COL1 및 LCOL1 + 3DCOL1 시스템에서, 주요 AJs의 하나인 VE-카데린의 발현 정도를 분석하여 비교 평가하였다.

[0056] 공초점 현미경 관찰 결과, LCOL1 + 3DCOL1 시스템에서는, VE-카데린(녹색) AJs가 모든 EC-EC 접촉 부위에 밀집되어 있으나(하단 이미지), 3D COL1 시스템에서는 밀집도가 떨어지는 것을 볼 수 있다(상단 이미지). 상단의 별표는 목적하지 않은 부분에 혈관이 생성된 부분을 가리키고, 하얀색 화살표는 3D COL1 시스템에서 배양한 EC에서, VE-카데린이 결핍된 부분을 가리킨다 (도 9). 스케일 바, 100 μ m

[0057] 또한, 공초점 현미경 이미지를 8개의 연속 구획으로 나누어 평면 이미지(top view; 도 10) 및 횡단면 이미지(cross-section view; 도 11)를 관찰하였다. 평면 이미지를 통하여, LCOL1 + 3DCOL1 시스템에서 설계 제작된 혈관(빨간색, 액틴; 파란색, 핵)은 위, 아래, 라미닌 코팅층을 포함한 전 표면에 결함이 없음을 알 수 있었다 (도 10). 또한, 횡단면 이미지는 완벽한 EC 단층이 형성되었음을 보여준다 (도 11).

[0058] 또한, 이는 도 10 및 도 11에서 설계된 혈관의 3D 이미지에서도 확인할 수 있다 (도 12).

[0059] [실험예 3] 3D 생체 유사 혈관 시스템 (in vivo like blood vessel system) 의 투과율 분석

[0060] 투과도는 혈관의 중요한 특성 중 하나이기 때문에, 인공 혈관에서 투과도 측정이 매우 중요하다. 이에, 3D 생체 유사 혈관 시스템이 생체 내의 혈관과 유사한 투과도 가지는지 알아보기 위하여, 투과율 분석 실험을 수행하였다.

[0061] 3D COL1 시스템 및 3D 생체 유사 혈관 시스템의 EC 단층에서의 절대 투과율을 측정하였다. ECs를 씨당한 4일 후, 10 μ M FITC-텍스트란 (40 kDa, 녹색)이 첨가된 증식 배지를 EC 채널에 도입하고, 도입 2시간 후 FITC 형광 이미지를 얻었다.

[0062] 그 결과를 도 13에 나타내었다. 도 13에 삽입된 그래프는 각 점선(파란색 점선, 3D COL1; 빨간색 점선, 3D 혈관 ECM)에서의 형광 강도를 보여주고, 하얀색 화살표는 확산 방향을 가리킨다. 3D COL1 시스템과 비교하여, 3D 혈관 ECM +ECs 시스템에서 더 강한 콘트라스트를 나타내었다. 이는, 3D 혈관 ECM +ECs 시스템의 투과율이 더 낮음을 의미하고, 3D 혈관 ECM +ECs 시스템이 생체와 유사한 투과율을 나타냄을 제시한다.

[0063] 또한, EC 단층이 없는 3D 혈관 ECM 시스템에서, FITC-텍스트란 (40 kDa, 녹색)이 첨가된 증식 배지 도입 1시간 후의 형광 현미경 이미지를 분석하였다. 그 결과, EC 단층이 없는 3D 혈관 ECM 시스템에서는 FITC-텍스트란이 쉽게 투과됨을 알 수 있었다 (도 14).

[0064] 또한, ImageJ 소프트웨어를 이용하여 형광 이미지를 분석함으로써 시각화된 FITC-텍스트란 확산으로부터 내피 투과율을 추산하였다. FITC-텍스트란 용액의 농도 분포는 픽의 제 1 법칙에 의해 얻었다.

[0065] 그 결과, 3D COL1 시스템과 비교하여 3D 혈관 ECM +ECs 시스템(빨간색 막대)에서, 절대적 혈관 투과율이 급격히 감소함을 알 수 있었다(* $P = 0.029$) (도 15).

[0066] COMSOL Multiphysics 4.3 (COMSOL, 스웨덴) 소프트웨어를 이용한 컴퓨터 모델에 의하여 3D COL1 (파란색 선) 및 3D 생체 유사 혈관 시스템(EC 단층을 포함하는 혈관 ECM; 빨간색 선) 시스템에서 FITC-텍스트란-첨가 증식 배지 도입 2시간 후, EC 채널로부터 각 사이드 채널로의 분자 확산의 가상 농도 프로파일을 도출하였다. 가상 확산 프로파일 결과, 두 시스템에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 16). 이는 L-COL1 층은 상대적으로 얇고, ECM 구성에 큰 부분을 차지하고 있지 않기 때문인 것으로 생각되었다.

[0067] 위의 결과를 종합해 보면, 3D 혈관 ECM +ECs 시스템에서의 투과율 감소는, 단순히 라미닌 코팅층에 의한 것이 아니라, 라미닌 코팅층과 EC 단층의 접촉에 의한 것임을 시사한다.

[0068] **[실험예 4] 3D 생체 유사 혈관 시스템 (in vivo like blood vessel system) 의 인 비보 유사 장벽 기능 분석**

[0069] **실험예 4.1. 주요 TJ(tight junction) 단백질 발현 분석**

[0070] L-COL1이 hMVEC 세포-세포 연결(junction)의 견고성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 주요 TJ(tight junction) 단백질인 CLDN1(claudin-1), CLDN5(claudin-5), 및 OCLN(occluding)의 mRNA 발현 수준을 qRT-PCR(quantitative real time polymerase chain reaction)을 이용하여 분석하였다.

[0071] RNeasy Mini kit (Qiagen, USA)를 이용하여 각 샘플(그룹당, n = 4)로부터 총 RNA를 분리하였다. 260 nm NanoDrop 스펙트로포토미터 (써모 사이언티픽)를 이용하여 RNA 농도를 확정하고 흡광도를 측정하여 노멀라이즈 하였다. High Capacity RNA-to-cDNA Kit(Invitrogen, USA)를 이용하여 RT 반응을 수행하였다. StepOne 리얼-타임 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템)을 이용하여 유니버설 PCR 마스터 믹스(어플라이드 바이오시스템, USA)으로 유전자 발현의 qRT-PCR 측정을 수행하였다. CLDN1 (Hs00221623_m1), CLDN5 (Hs00533949_s1), OCLN(Hs00170162_m1), 및 GAPDH (Hs02758991_g1)에 대한 TaqMan Gene Expression Assays (어플라이드 바이오시스템)을 이용하여 3D COL1 및 3D 혈관 ECM 시스템에서 hMVECs의 유전자 발현을 정량하였다. 타겟 유전자의 mRNA 수준을 내인성 레퍼런스(GAPDH)로 노멀라이즈하고, comparative Ct 법을 이용하여 유전자 발현의 상대적 차이를 확정하였다.

[0072] 그 결과, 도 17에 도시한 바와 같이, 3D COL1 (파란색 막대)에 비하여 3D 생체 유사 혈관 시스템 (빨간색 막대)에서 CLDN1 및 OCLN의 mRNA 수준이 증가함을 알 수 있었다.

[0073] 이는 형광 현미경을 이용한 CLDN1, CLDN5, 및 OCLN의 단백질 발현 수준 측정 결과에서도 동일하게 나타났다 (도 18).

[0074] **실험예 4.2. 인테그린-α6 발현 수준 및 부착 강도 분석**

[0075] TJs에 더하여, 혈관 ECM에서 기계적 결합을 제공하는 초점 접착역(focal adhesion) 또한 강한 EC-ECM 접착을 위해 매우 중요하다. 세포골격과 상호작용하는 인테그린-트랜스멤브레인 수용체는 초점 접착역의 주요 구조 성분이다. 인테그린의 세포외 도메인은 피브로넥틴, 콜라겐, 비트로넥틴, 엔탁틴 및 라미닌을 포함하는 특정 ECM 단백질에 결합한다. 이들 ECM 단백질 중에서, 라미닌이 강한 세포 접착 활성을 나타내므로, L-COL1 층에 의해 유도된 인테그린-α6의 발현 수준 및 부착 강도를 분석하였다.

[0076] 그 결과, L-COL1이 효과적으로 인테그린-α6의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 3D COL1 시스템에서와 달리, L-COL1의 표면에 ECs가 부착된 부분에서의 인테그린-α6(녹색)의 발현이 증가하였다 (도 19). 이는, 인테그린-α6의 발현 증가로 인하여, 3D 생체 유사 혈관 시스템의 투과율이 감소될 수 있음을 의미한다.

[0077] 혈관 투과성은 또한 세포 골격의 장력 및 수축에 의해 조절된다 (도 20). 조절 미오신 경쇄 2 (MLC-2)의 Thr 18 및 Ser 19의 디포스포릴레이션은 장력을 증가시켜, EC-EC 연결간의 물리적 간극을 증가시켜 투과율을 증가시킨다. 이에, 혈관 투과율에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 3D 생체 유사 혈관 시스템에서의 디포스포릴레이트 조절 미오신 경쇄 2의 포스포릴레이션 (RLC2-pp; 녹색)의 발현 수준을 분석하였다

[0078] 그 결과, 도 21에 도시한 바와 같이, 배양 5일 후 3D 생체 유사 혈관 시스템과 비교하여 3D COL1시스템에서 MLC-2의 디포스포릴레이트된 형태(도 20에서 RLC-pp로 표시)가 상대적으로 상향-조절되었음을 알 수 있었다. 이는, L-COL1에 의한 EC-ECM이 부착에 의하여, ECs가 안정화되고 치밀해짐에 따라 인 비트로에서 생체 내와 유사한 혈관 시스템을 제조할 수 있음을 의미한다.

[0079] **[실험예 5] 3D 생체 유사 혈관 시스템의 적용**

[0080] **실험예 5.1. 호중구의 혈관 통과 이동 모니터링**

[0081] 구축된 3D 생체 유사 혈관 시스템은 호중구의 혈관 통과 이동 모니터링에 이용할 수 있다.

[0082] 인 비트로 염증 모델을 위하여, 37 °C 수조에서 dHL-60 세포의 냉동용기를 재빨리 녹였다. dHL-60 세포 서스펜

선을 1×10^6 세포/mL의 밀도로 준비하고 EC 배양 5일에, 이 세포 서스펜션의 100 μ L를 컨플루언트 소자 내의 EC 단층에 가하였다. 그리고 나서, 화학유인물질로서 fMLP(N-formylmethionine leucyl-phenylalanine; 10 nM)을 함유하는 100 μ L 증식 배지 드랍릿을 사이드 채널에 가하였다. 37 $^{\circ}$ C, 습식 5% CO₂ 인큐베이터에서, 10% FBS (론자), 0.1 mM 비필수 아미노산, 50 U/mL 페니실린, 및 50 μ g/mL 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI-1640 배지 (썬코 사이언티픽)에서 인간 전골수성 HL-60 세포 (KCLB, 한국)를 증식시켰다. HL-60 세포 서스펜션 (2×10^6 세포/mL)의 앨리쿼트를 조직 배양 플라스크에 씨딩하고 및 1.25% DMSO(dimethyl sulfoxide)의 존재 하에서 5일 동안 증식시킴으로써 HL-60 세포가 호중구 리니지로 분화하도록 유도하였다. 핵 분열 및 과립 형성, 540 nm에서의 스펙트로포토메트리, 및 CD11b, CD16, 및 CD33 (BD 바이오사이언스)에 대한 FITC-컨쥬게이트 모노클로날 항체의 유세포 분석에 의하여 HL-60 세포가 호중구-유사 세포 (약어로 dHL-60)로 완전히 분화되었음을 확인하였다. 그 후, dHL-60 세포를, EC 채널에 씨딩할 때까지, DMSO (10% v/v)를 함유하는 FBS 중에서 2×10^6 세포/mL의 농도로 동결 보존하였다.

[0083] dHL-60 세포를 녹이고, EC 채널에 씨딩 1시간 후 세포 이동 실험을 수행하였다.

[0084] 그 결과, 도 22에 도시한 바와 같이, 본 출원의 3D 생체 유사 혈관 시스템은 호중구-유사 세포(인간 HL-60 전골수성 백혈병 세포에서 분화 [dHL-60])의 EC 단층 및 L-COL1 층 통과를 저해하지 않음을 알 수 있었다.

[0085]

[0086] 실험예 5.2. 혈관 생성 어세이

[0087] 구축된 3D 생체 유사 혈관 시스템은 또한, 혈관 생성 어세이에 이용될 수 있다.

[0088] 인 비트로 혈관생성 모델을 위하여, EC 배양 5일에, 50 ng/mL의 VEGF 및 EGM-2MV (VEGF 농도: 20 ng/mL)가 첨가된 증식 배지를, 소자의 컨플루언트 EC 단층 및 사이드 채널에 가하고 3일 동안 14시간 마다 배지를 교체하였다.

[0089] VEGF 자극 3일 후 위상차 이미지 분석 결과, L-COL1의 존재 하에서 혈관이 생성되어 뿔어나감을 보여준다 (도 23a).

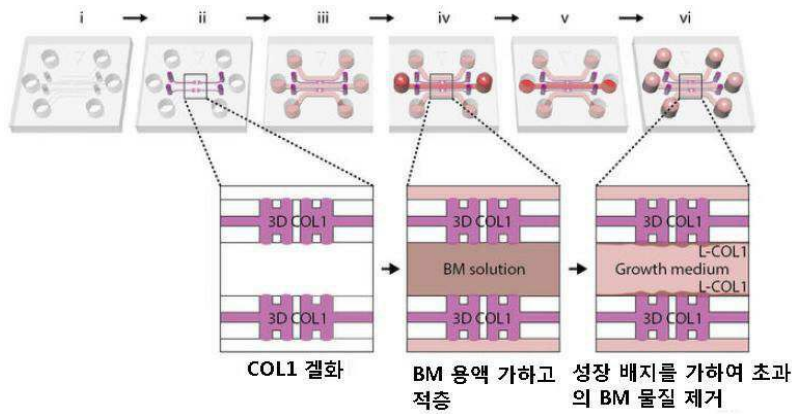
[0090] 또한, 이는 도 23a에서 점선으로 표시한 사각형 부분의 공초점 현미경 이미지 분석 결과(도 23b)로도 확인할 수 있었다.

도면

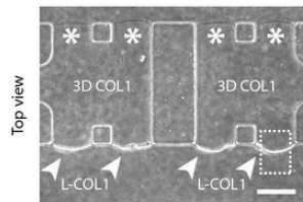
도면1



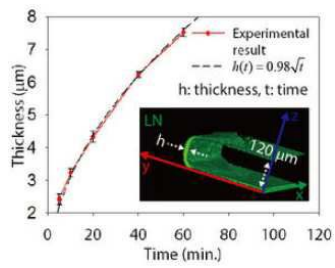
도면2



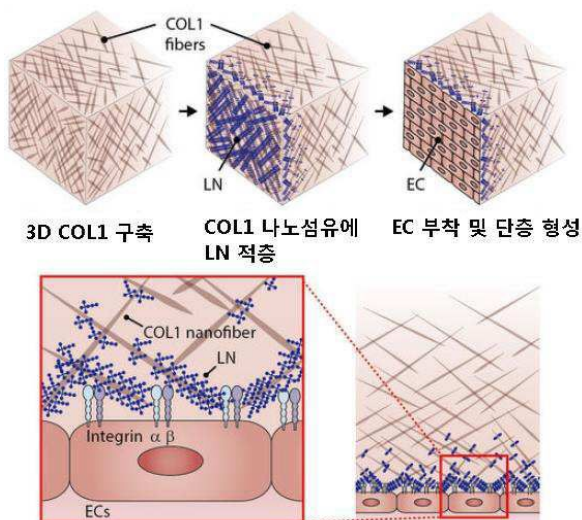
도면3



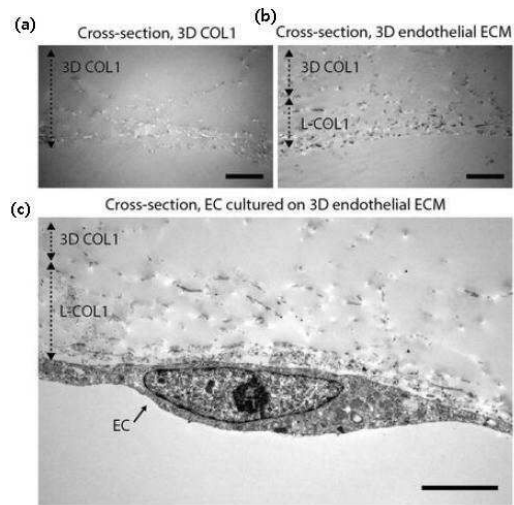
도면4



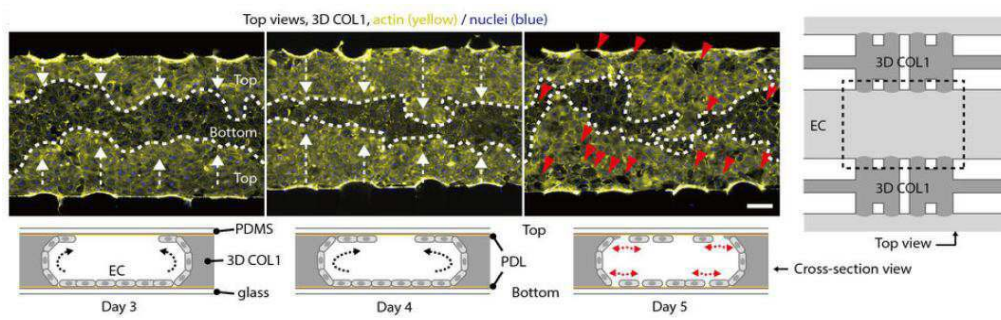
도면5



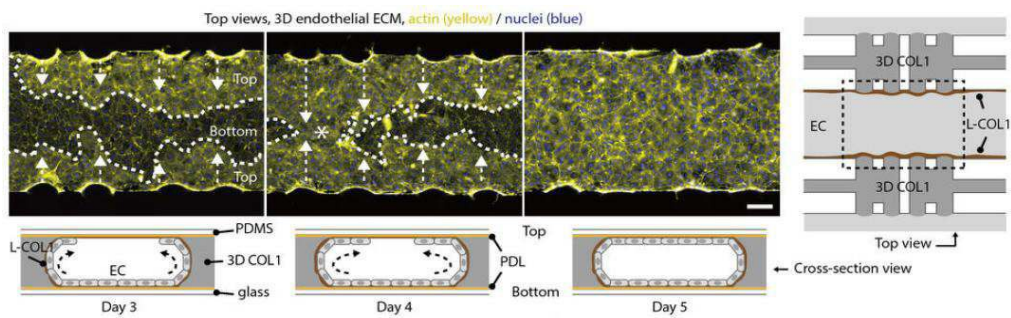
도면6



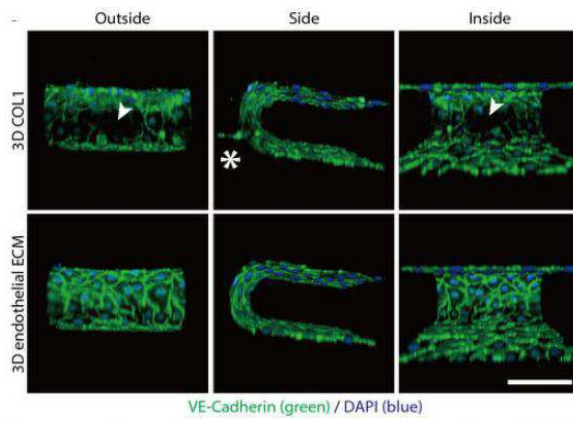
도면7



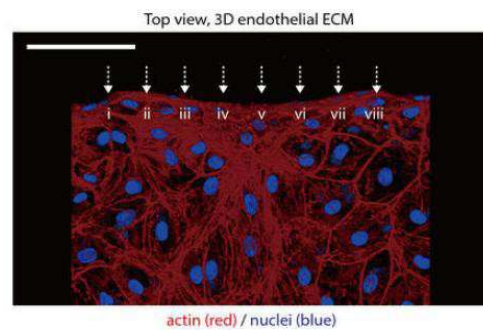
도면8



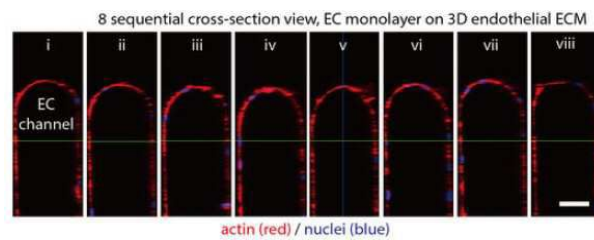
도면9



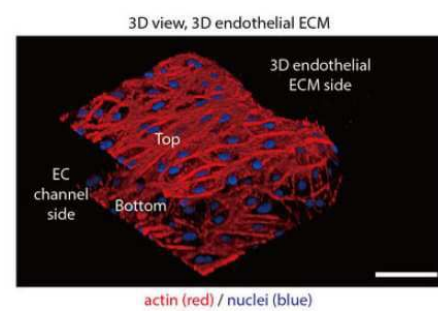
도면10



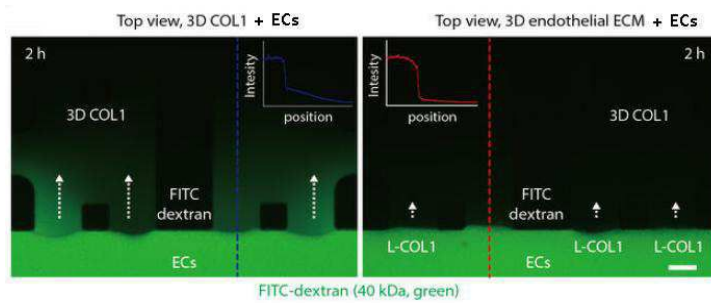
도면11



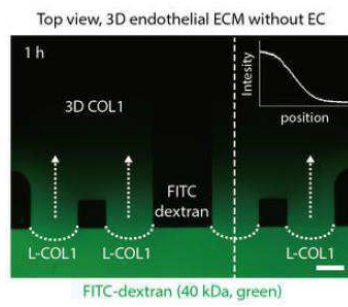
도면12



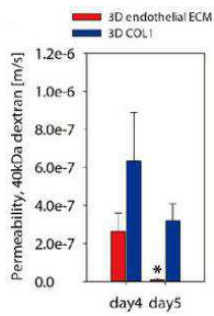
도면13



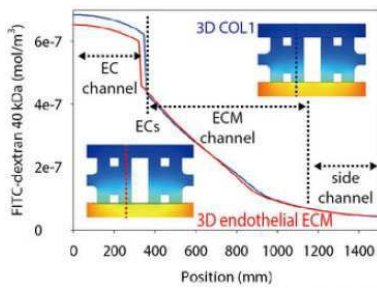
도면14



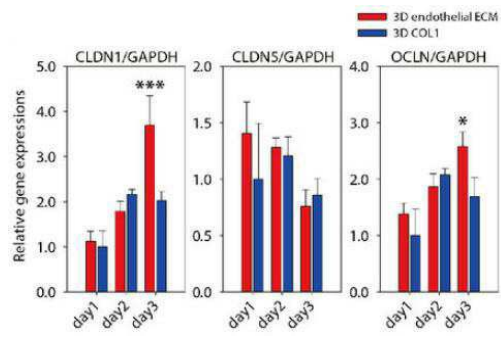
도면15



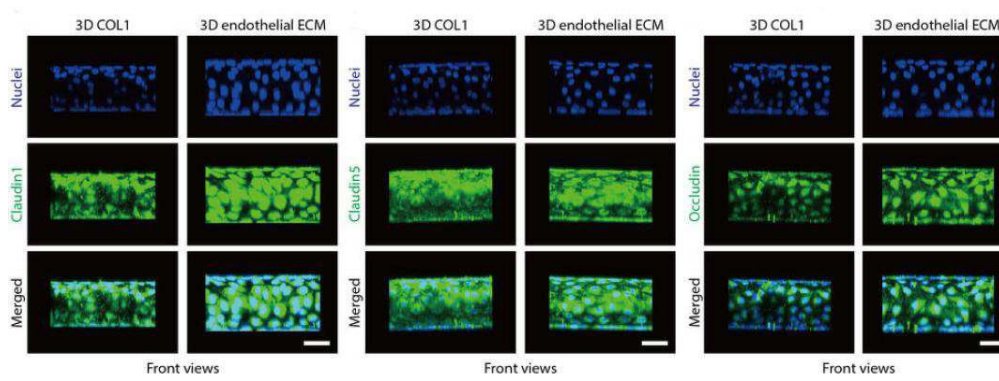
도면16



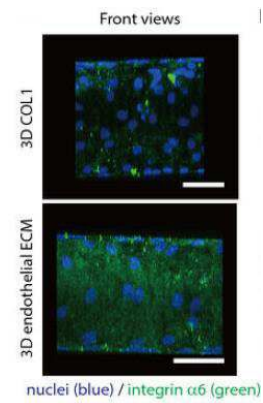
도면17



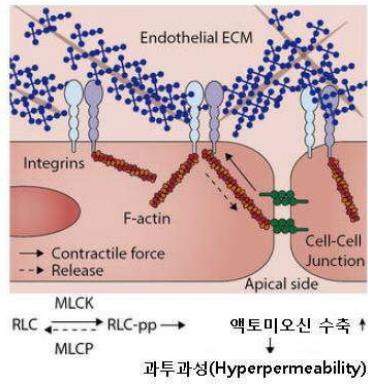
도면18



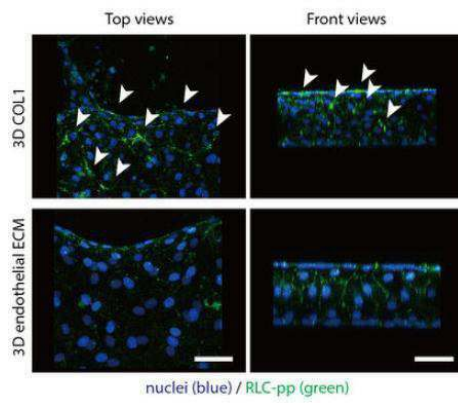
도면19



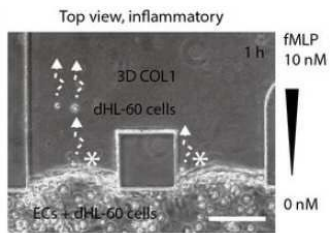
도면20



도면21



도면22



도면23

