



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0008842
(43) 공개일자 2016년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 1/18 (2006.01) *B81B 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0089131

(22) 출원일자 2014년07월15일

심사청구일자 2014년07월15일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교천안캠퍼스내(안서동)

(72) 발명자

정기석

서울특별시 노원구 동일로227길 86 1603동 1406호(상계동, 상계주공16단지아파트)

강아란

서울특별시 송파구 삼학사로19길 7 동화빌딩 5층(삼전동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 항암제 검증용 마이크로 유체칩 및 이의 제조방법

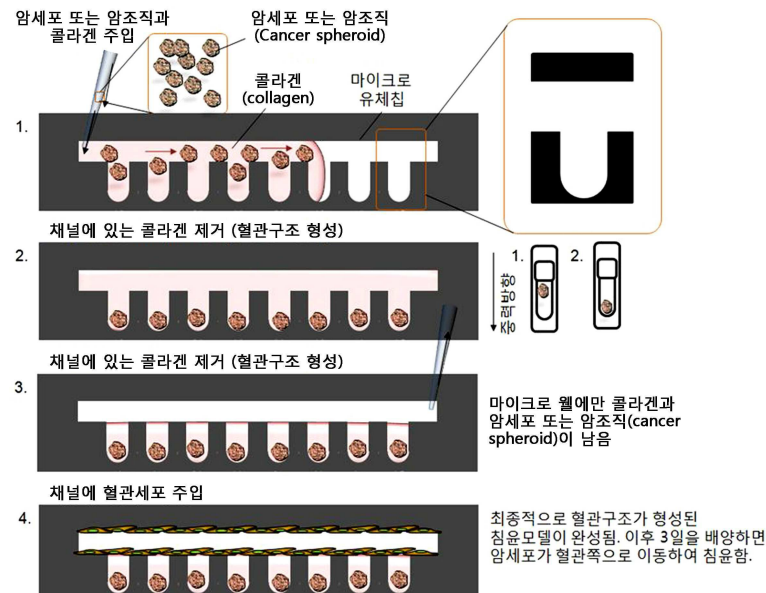
(57) 요약

본 발명은 항암제 검증용 마이크로 유체칩 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩 및 이의 제조방법은 인체 내의 환경과 유사한 조건을 마이크로 유체칩 내에 실현시키고, 이를 통해 항암제의 유효성, 안정성 및 효능 등을 보다 확실하게 검증하는 것이다. 이

(뒷면에 계속)

대표도 - 도6



렇게 마이크로 유체칩을 통하여 보다 확실하게 항암제의 안정성이나 유효성 등을 검증하게 되면 특정 항암제의 효능이 과대 포장되어 소비자나 환자에게 악영향을 주는 것을 방지하는 것이 가능하며, 항암제를 사용하여 암세포 및 암조직을 치료하는 속도를 정확히 밝혀내는 것이 가능하므로 해당 항암제를 통한 암질환의 치료기간이나 기대여명을 밝히는데 기여하는 것이 가능하다. 또한 본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩 및 이의 제조방법은 암세포가 아닌 암조직을 배양하여 항암제를 검증하는 것이 가능한 것으로서, 검증 단계에서 약물의 영향으로 암세포가 과발현되는 것을 방지하는 것이 가능하여 보다 정확한 검증을 가능하게 한다.

(72) 발명자

김만복

충청남도 천안시 동남구 안서3길 17 102호(안서동, 풀하우스)

김준

서울특별시 강남구 선릉로 222 106-901(대치동, 대치아이파크아파트)

이상훈

서울특별시 성북구 북악산로 828 101-1408(정릉동, 쌍용아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

암세포 또는 암조직을 배양하는 마이크로 웰 및 배양액이 공급되는 마이크로 유동채널로 이루어지며;
상기 마이크로 유동채널의 외벽은 콜라겐으로 코팅되어 이루어지고;
상기 마이크로 웰 내부는 겔화한 콜라겐으로 충전되며; 및
상기 마이크로 웰 내부에 겔화한 콜라겐 내에서 암세포 또는 암조직을 배양하고;
상기 겔화한 콜라겐이 코팅된 마이크로 유동채널의 외벽에는 혈관세포가 부착되는 것을 특징으로 하는 항암제 검증용 마이크로 유체칩.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 마이크로 웰의 깊이는 500-2,000 μm 인 것을 특징으로 하는 항암제 검증용 마이크로 유체칩.

청구항 3

제 1항에 있어서,
상기 마이크로 웰의 폭은 200-1,000 μm 인 것을 특징으로 하는 항암제 검증용 마이크로 유체칩.

청구항 4

제 1항에 있어서,
상기 마이크로 유동채널의 직경은 300-1,000 μm 인 것을 특징으로 하는 항암제 검증용 마이크로 유체칩.

청구항 5

제 1항에 있어서,
상기 마이크로 유체칩은 마이크로 웰에서 배양된 암세포 또는 암조직이 성장하여 혈관세포를 침윤함으로써 항암제를 검증하는 것을 특징으로 하는 항암제 검증용 마이크로 유체칩.

청구항 6

1) 암세포 또는 암조직을 배양하는 마이크로 웰의 내부에 콜라겐을 주입하는 단계 및 배양액이 공급되는 마이크로 유동채널의 외벽에 콜라겐을 코팅하는 단계; 및
2) 상기 콜라겐이 코팅된 마이크로 유동채널의 외벽에 혈관세포를 부착시키는 단계;
를 포함하는 항암제 검증용 마이크로 유체칩의 제조방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 1)단계 이후에 마이크로 웰에 주입된 콜라겐 및 마이크로 유동채널에 코팅된 콜라겐을 겔화시키는 단계를 더 포함하는 항암제 검증용 마이크로 유체칩의 제조방법.

청구항 8

- 1) 마이크로 유동채널로 콜라겐, 암세포 또는 암조직을 주입하여 마이크로 웰 및 마이크로 유동채널에 콜라겐, 암세포 또는 암조직을 충전하는 단계;
 - 2) 상기 암세포 또는 암조직을 마이크로 웰의 하부로 침강시키는 단계 및 상기 콜라겐이 충전된 마이크로 유동채널 내부의 콜라겐을 제거하여 마이크로 유동채널의 외벽에 콜라겐이 코팅된 상태를 형성하는 단계;
 - 3) 상기 콜라겐이 코팅된 마이크로 유동채널의 외벽에 혈관세포를 부착시키는 단계; 및
 - 4) 상기 마이크로 웰로 침강한 암세포 또는 암조직이 성장하여 혈관세포를 침윤하는 단계;
- 를 포함하는 항암제 검증용 마이크로 유체칩을 이용한 항암제 검증방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 2)단계 이후에 마이크로 웰에 주입된 콜라겐 및 마이크로 유동채널에 코팅된 콜라겐을 겔화시키는 단계를 더 포함하는 항암제 검증용 마이크로 웰을 이용한 항암제 검증방법.

청구항 10

제 1항에 따른 마이크로 유체칩을 이용하여 항암제가 정상조직과 암세포에 미치는 영향을 동시에 확인하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항암제 검증용 마이크로 유체칩 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 인류는 환경이나 여러 가지 요인에 의해 각종 암 질환에 노출되어 있으며, 이러한 암 질환을 완전히 정복하는데 많은 연구와 노력을 허비하고 있음에도 최종 목적을 달성하는데 번번히 실패하고 있다.

[0003] 초기의 암세포는 주위의 세포로부터 확산에 의해서 산소 및 영양분을 공급받아 생존을 유지하게 된다. 이때 암세포의 전체 크기는 매우 작아서 주위 영양분의 확산 작용만으로도 생존이 가능하게 되는 것이다. 하지만 암세포의 크기가 커지면서 암세포는 주위 조직으로부터 확산 작용만으로 얻어지는 산소 및 영양분 만으로는 생존하기 어려우며, 이러한 상태에서 암세포의 종류에 따라 다른 조직으로 이동하거나 혈관세포를 암조직으로 유도하는 과정을 통하여 생존을 유지하게 된다. 여기서 암세포가 이동하여 정상세포를 파괴하는 것을 침윤이라고 하며, 주로 혈관조직으로 이동하여 영양분을 공급받고 이를 이동통로로 하여 다른 정상조직으로 이동하게 된다. 이러한 과정이 좀더 진행되면 다른 조직으로 전이가 발생하게 되는 것이다. 그러므로 이러한 침윤 작용을 면밀히 연구하여, 침윤을 억제하거나 침윤한 암세포를 파괴시키면 암조직의 전이 또한 예방할 수 있기에 침윤 작용의 연구는 암 질환 정복의 중요한 열쇠가 된다.

[0004] 한편 항암제는 암세포를 직접 공격하는 항암제, 신생성 혈관의 유도를 억제하는 약물, 암세포의 이동을 억제하

는 약물로 나눌 수 있으며, 이러한 항암제의 효능 및 유효성을 검증하는 방법을 가장 많이 사용되는 방법은 통상적으로 세포배양용기에 암세포를 배양하고, 이곳에 항암제를 투여하여 세포의 성장, 이동 및 소멸을 관찰하는 방법이 주로 사용되고 있다. 하지만, 이렇게 세포배양용기(하기 도 1 참조)에 암세포를 배양하여 검증하는 방법은 인체 내의 여러 가지 환경을 전혀 반영하지 않는 검증 방법으로서 암세포의 침윤 및 신혈관 생성에 영향을 확인하기에는 용이하지 않다는 문제점이 있다.

[0005]

이러한 문제점을 해결하기 위해 최근에는 마이크로 유체칩을 이용한 항암제 검증 방법이 연구되고 있다. 하지만, 이러한 마이크로 유체칩을 이용하는 경우에도 암세포를 일정한 위치에 trap 시킨 후 약물의 영향에 따라서 암세포의 크기나 사멸을 확인하는 것에 그치는 경우가 대부분이어서 인체내 환경과 유사한 모델을 제시하면서 항암제를 검증하는 마이크로 유체칩은 전무한 실정이다. 또한 이러한 마이크로 유체칩을 활용하는 경우에도 혈액이 공급되는 구조를 포함하지 않아서 암세포 또는 암조직을 괴사시키는 효과가 chemical 농도 때문인지 아니면 또 다른 약물의 영향인지 확실하게 확인할 수 없으며, 또한 약물의 영향으로 인체 내의 환경 보다는 과발현되는 문제점이 있다. 이는 혈액이 지속적으로 암조직에 공급되는 인체내의 환경에서는 약물은 어느 정도 시간이 지나서 wash out 되기 때문에 야기되는 문제점이다. 또한 마이크로 유체칩을 활용하는 경우 침윤하는 속도 및 약물에 의한 암세포의 크기 변화를 확인하기 어렵다는 문제점이 있다. 또한 인체 내에서는 암세포가 성장하여 암조직을 이룬 상태로 침윤하게 되는데, 상기 마이크로 유체칩을 이용하여 검증하는 경우에는 암세포 상태로만 관찰하는 것이 가능하고 암조직으로 성장한 모델을 가지고 항암제의 유효성이나 안정성을 검증하기 어렵다는 문제점이 있다. 이러한 문제점들을 해결하지 않게 되면 상기 마이크로 유체칩을 활용하는 경우에도 항암제의 성능이 과대 평가될 수 있다는 문제점이 있다. 이러한 문제점으로 인하여 체외실험을 통하여 항암효과가 발현된 물질이 임상에 사용된다 하더라도 약물로서 성공적으로 상품화되지 못하는 경우가 대부분이며, 이러한 문제점이 항암제의 가격상승이나, 항암물질 개발을 저해하는 요인이 된다.

[0006]

본 발명과 관련된 선행기술문헌으로는 대한민국 등록특허 제10-1008602호가 있으며, 상기 특허문헌 1은 암세포 침윤 저해제의 스크리닝 방법 및 스크리닝 시스템에 관한 것이나, 상기 암세포 침윤을 인체 내의 환경과 유사한 조건으로 모사하여 실현시키는 방법에 대하여는 어떠한 개시 또는 암시조차 되어 있지 않은 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007]

(특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록특허 제10-1008602

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 항암제의 유효성, 안정성 및 효능 등을 보다 확실하게 검증하기 위해서 인체 내에서 일어나는 침윤 모델과 유사한 시스템이 구현된 마이크로 유체칩 및 이의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 구체적으로는 침윤 모델을 보다 구체적으로 실현시키기 위해 마이크로 유체칩 내에서 혈액이 공급되는 구조를 포함하며, 암세포가 암조직으로 성장한 단계에서의 침윤 모델을 제시하여 이에 대한 항암제의 효능 등을 인체와 유사한 정도로 검증하는 것을 목적으로 한다. 이를 통해 다른 조직으로 전이하여 정상 세포를 파괴하는 침윤 모델을 제시하고, 이를 통해 항암제의 유효성, 안정성 및 효능 등을 마이크로 유체칩 상에서 보다 확실하게 검증하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009]

위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩은

[0010]

암세포 또는 암조직을 배양하는 마이크로 웰 및 배양액이 공급되는 마이크로 유동채널로 이루어지며;

[0011]

상기 마이크로 유동채널의 외벽은 콜라겐으로 코팅되어 이루어지고;

- [0012] 상기 마이크로 웰 내부는 겔화한 콜라겐으로 충전되며; 및
- [0013] 상기 마이크로 웰 내부에 겔화한 콜라겐 내에서 암세포 또는 암조직을 배양하고;
- [0014] 상기 겔화한 콜라겐이 코팅된 마이크로 유동채널의 외벽에는 혈관세포가 부착되는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩의 제조방법은
- [0016] 1) 암세포 또는 암조직을 배양하는 마이크로 웰의 내부에 콜라겐을 주입하는 단계 및 배양액이 공급되는 마이크로 유동채널의 외벽에 콜라겐을 코팅하는 단계; 및
- [0017] 2) 상기 콜라겐이 코팅된 마이크로 유동채널의 외벽에 혈관세포를 부착시키는 단계;
- [0018] 를 포함한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩을 이용한 항암제 검증방법은
- [0020] 1) 마이크로 유동채널로 콜라겐, 암세포 또는 암조직을 주입하여 마이크로 웰 및 마이크로 유동채널에 콜라겐, 암세포 또는 암조직을 충전하는 단계;
- [0021] 2) 상기 암세포 또는 암조직을 마이크로 웰의 하부로 침강시키는 단계 및 상기 콜라겐이 충전된 마이크로 유동채널 내부의 콜라겐을 제거하여 마이크로 유동채널의 외벽에 콜라겐이 코팅된 상태를 형성하는 단계;
- [0022] 3) 상기 콜라겐이 코팅된 마이크로 유동채널의 외벽에 혈관세포를 부착시키는 단계; 및
- [0023] 4) 상기 마이크로 웰로 침강한 암세포 또는 암조직이 성장하여 혈관세포를 침윤하는 단계;
- [0024] 를 포함한다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩 및 이의 제조방법은 인체 내의 환경과 유사한 조건을 마이크로 유체칩 내에 실현시키고, 이를 통해 항암제의 유효성, 안정성 및 효능 등을 보다 확실하고 정확하게 검증하는 것이다. 이렇게 마이크로 유체칩을 통하여 보다 확실하게 항암제의 안정성이나 유효성 등을 검증하게 되면 특정 항암제의 효능이 과대 포장되어 소비자나 환자에게 악영향을 주는 것을 방지하는 것이 가능하며, 항암제를 사용하여 암세포 및 암조직을 치료하는 속도를 정확히 밝혀내는 것이 가능하므로 해당 항암제를 통한 암질환의 치료 기간이나 기대여명을 밝히는데 기여하는 것이 가능하다. 또한 본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩 및 이의 제조방법은 암세포가 아닌 암조직을 배양하여 항암제를 검증하는 것이 가능한 것으로서, 검증 단계에서 약물의 영향이 인체에 비하여 과발현하여 오히려 암세포의 사멸이 과발현되는 것을 방지하는 것이 가능하여 보다 정확한 검증을 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 기존 암세포를 배양하는 세포배양용기 사진이다.
- 도 2는 암세포 침윤과정 모식도이다.
- 도 3은 실시예에 따른 암세포 침윤과정 모식도이다.
- 도 4는 실시예 중 몰드 제조과정을 도시한 그림이다.
- 도 5는 실시예의 마이크로 유체칩 제조과정을 도시한 그림이다.
- 도 6은 실시예에 의해 암세포가 침윤되는 과정을 도시한 그림이다.
- 도 7은 실시예의 마이크로 유체칩을 이용하여 항암바이러스의 암세포 사멸 결과를 보여주는 사진이다.

도 8은 실시예의 마이크로 유체칩을 이용하여 유방암의 암세포 사멸 결과를 보여주는 사진이다.

도 9는 실시예의 마이크로 유체칩을 이용하여 항암바이러스의 암세포 사멸 결과를 보여주는 그래프이다.

도 10은 항암바이러스로 알려진 리오 바이러스를 1회 주입한 결과(Reo-1)와 3회 연속 주입(Reo-3)한 결과 및 폭스바이러스를 감염시킨 결과를 바이러스를 주입하지 않은 결과와 비교하여 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이에 본 발명자들은 인체 내의 침윤 모델과 비슷한 시스템을 제시하여 보다 정확하게 항암제를 검증하는 마이크로 유체칩을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩 및 이의 제조방법을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0028] 구체적으로 본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩은
- [0029] 암세포 또는 암조직을 배양하는 마이크로 웰 및 배양액이 공급되는 마이크로 유동채널로 이루어지며;
- [0030] 상기 마이크로 유동채널의 외벽은 콜라겐으로 코팅되어 이루어지고;
- [0031] 상기 마이크로 웰 내부는 겔화한 콜라겐으로 충전되며; 및
- [0032] 상기 마이크로 웰 내부에 겔화한 콜라겐 내에서 암세포 또는 암조직을 배양하고;
- [0033] 상기 겔화한 콜라겐(400)이 코팅된 마이크로 유동채널(200)의 외벽에는 혈관세포(600)가 부착되는 것을 특징으로 한다.
- [0034] 이러한 구조로 이루어진 항암제 검증용 마이크로 유체칩은 인체 내에서 암세포 또는 암조직(500)이 정상 세포에 침윤하는 과정 및 전이하는 과정을 유사하게 모사하여 항암제의 안정성, 유효성 및 효능 등을 보다 정확하게 검증하는 것이 가능하다.
- [0035] 즉, 기존 마이크로 유체칩을 이용하여 항암제의 효능이나 유효성을 검증하는 경우에는 혈관세포 등을 포함하는 조건을 구현하지 못해 인체 내에서의와 같은 유사한 조건을 제시하는 것이 불가능하며, 암조직 레벨이 아닌 암세포 레벨에서만 항암제의 유효성 등을 검증하는 것이 가능할 뿐이어서 항암제의 유효성 등이 과대 포장되게 되는 데, 본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩의 경우 이러한 문제점을 모두 해결한 것이다.
- [0036] 이렇게 본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩이 인체 내에서 암세포 또는 암조직이 침윤하는 과정을 유사하게 모사하는 것이 가능한 것은 상기 마이크로 유동채널의 외벽에 콜라겐을 코팅하고, 이렇게 코팅된 콜라겐 때문에 혈관세포가 마이크로 유동채널의 외벽에 부착하는 것이 가능하여 혈관세포를 통한 침윤 또는 전이 등의 현상을 재현하는 것이 가능하기 때문이다. 또한 상기 마이크로 웰(300) 내에서 겔화된 콜라겐을 통해 암세포 또는 암조직이 인체 내와 유사한 조건을 배양하는 것이 가능하여 보다 정확한 항암제의 검증을 가능하게 한다. 특히 상기 콜라겐의 겔화와 함께 암세포 또는 암조직은 중력이 작용하게 되어 마이크로 웰의 하부로 침강하여 배양하는 것이 가능하게 되고, 이를 통해 인체 내에서 암세포 또는 암조직이 성장하는 것과 유사한 모델을 제시하는 것이 가능하다.
- [0037] 한편 상기 마이크로 웰의 깊이는 바람직하게는 500-2,000 μm 인 것이 바람직한데, 상기 마이크로 웰의 깊이가 500 μm 미만인 경우에는 혈관세포가 안정화되기 이전에 너무 빠르게 암조직이 성장하게 되어 바람직하지 않으며, 상기 마이크로 웰의 깊이가 2,000 μm 를 초과하는 경우에는 암조직이 성장하여 침윤 모델을 완성하는데 시간이 많이 걸리기 때문에 효과적이지 못하다.
- [0038] 또한 상기 마이크로 웰의 폭은 200-1,000 μm 인 것이 바람직한데, 상기 마이크로 웰의 폭이 200 μm 미만인 경우에는 암세포 또는 암조직이 마이크로 웰로 잘 들어가지 않아 바람직하지 않으며, 상기 마이크로 웰이 1,000 μm 를 초과하는 경우에는 암세포 또는 암조직이 마이크로 웰의 내부에서 괴사할 가능성이 커져 바람직하지 않다.
- [0039] 또한 상기 마이크로 유동채널의 직경은 300-1,000 μm 인 것이 바람직한데, 상기 마이크로 유동채널의 직경이 300 μm 미만인 경우에는 암세포 또는 암조직을 투입하여 이동시키는 것이 용이하지 않을 수 있어 바람직하지 않으며, 상기 마이크로 유동채널의 직경이 1,000 μm 를 초과하는 경우에는 혈관벽을 형성하는데 어려움이 있어서 바람직하지 않다.
- [0040] 또한 본 발명에 따른 마이크로 유체칩을 이용하게 되면 항암제가 정상조직과 암세포에 미치는 영향을 동시에 확

인하는 것이 가능하다.

- [0041] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩의 제조방법은
- [0042] 1) 암세포 또는 암조직을 배양하는 마이크로 웰의 내부에 콜라겐을 주입하는 단계 및 배양액이 공급되는 마이크로 유동채널의 외벽에 콜라겐을 코팅하는 단계; 및
- [0043] 2) 상기 콜라겐이 코팅된 마이크로 유동채널의 외벽에 혈관세포를 부착시키는 단계;
- [0044] 를 포함한다.
- [0045] 이러한 본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩의 제조방법은 본 발명의 또 다른 특징에 따른 상기 항암제 검증용 마이크로 유체칩을 제조하는 방법에 해당한다.
- [0046] 상기 1)단계의 마이크로 웰 및 마이크로 유동채널로 구성된 마이크로 유체칩은 당업계에 공지된 모든 제조방법에 의해 제조된 마이크로 유체칩을 포함한다. 또한 상기 1)단계 이전에 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 상기 마이크로 웰 및 마이크로 유동채널을 구비하는 마이크로 유체칩을 제조하기 위해 몰드, 즉 주형을 이용하여 상기 마이크로 웰 및 마이크로 유동채널이 구비된 마이크로 유체칩을 제조하는 것이 가능하다. 이렇게 몰드를 이용하는 경우 당업계에 공지된 모든 제조방법에 의해 제조된 몰드를 이용하는 것이 가능하다.
- [0047] 한편 상기 1)단계는 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 상기 마이크로 유동채널에 콜라겐을 주입하게 되고, 이렇게 주입된 콜라겐은 마이크로 유동채널과 마이크로 웰을 충전시키게 된다. 이렇게 충전된 콜라겐 중 상기 마이크로 유동채널에 충전된 콜라겐을 제거하게 되면, 마이크로 유동채널의 외벽에만 콜라겐이 코팅되면서 마이크로 웰의 내부에는 콜라겐이 충전된 상태를 이룰 수 있다. 이때 상기 마이크로 유동채널의 콜라겐을 제거하는 방법은 특별한 제한이 있는 것은 아니며, 바람직하게는 주사기 등을 이용하여 쥘러하는 방법을 사용할 수 있다. 이때 항암제 검증시 바람직하게는 상기 콜라겐과 함께 암세포 또는 암조직을 상기 마이크로 유동채널이 투입하게 된다. 이렇게 암세포 또는 암조직을 투입하고, 상기 마이크로 웰을 중력 방향으로 아래를 향하게 하면 상기 암세포 또는 암조직이 마이크로 웰의 아래로 자동으로 침강하게 된다.
- [0048] 상기 콜라겐을 젤화시키는 온도는 30-40 ℃의 온도에서 젤화시키는 것이 바람직하며, 젤화의 시간은 20-40 분간 젤화시키는 것이 바람직하다. 이러한 젤화의 온도와 시간의 상하한을 유지하는 것이 젤화 상태가 변하지 않으면서 주입된 암세포의 생존을 가장 적절하게 유지할 수 있다.
- [0049] 한편 상기 콜라겐이 코팅된 마이크로 유동채널의 외벽에는 상기 2)단계에 의해 혈관세포를 부착시키게 된다. 이렇게 혈관세포를 부착하는 것이 가능한 이유는 상기 콜라겐이 마이크로 유동채널의 외벽에 코팅되어 혈관세포가 달라붙기 용이하도록 마이크로 유동채널의 외벽이 표면 개질되었기 때문이다.
- [0050] 이러한 제조방법으로 마이크로 유체칩을 제조하여 항암제를 검증하게 되면, 인체 내에서 암세포 또는 암조직이 정상세포를 침윤하는 모델을 그대로 재현하여 모사하는 것이 가능하므로, 항암제의 안정성이나 유효성 등의 검증을 보다 정확하게 수행하는 것이 가능하게 된다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩을 이용한 항암제 검증방법은
- [0052] 1) 마이크로 유동채널로 콜라겐, 암세포 또는 암조직을 주입하여 마이크로 웰 및 마이크로 유동채널에 콜라겐, 암세포 또는 암조직을 충전하는 단계;
- [0053] 2) 상기 암세포 또는 암조직을 마이크로 웰의 하부로 침강시키는 단계 및 상기 콜라겐이 충전된 마이크로 유동채널 내부의 콜라겐을 제거하여 마이크로 유동채널의 외벽에 콜라겐이 코팅된 상태를 형성하는 단계;
- [0054] 3) 상기 콜라겐이 코팅된 마이크로 유동채널의 외벽에 혈관세포를 부착시키는 단계; 및
- [0055] 4) 상기 마이크로 웰로 침강한 암세포 또는 암조직이 성장하여 혈관세포를 침윤하는 단계;
- [0056] 를 포함한다.
- [0057] 상기 1)단계에 의한 마이크로 웰 및 마이크로 유동채널을 구비한 마이크로 유체칩은 당업계에 공지된 모든 제조방법에 의해 제조된 마이크로 유체칩을 모두 포함한다.

- [0058] 한편 상기 1)단계는 마이크로 유동채널의 내부로 콜라겐, 암세포 또는 암조직을 투입하는 경우 상기 마이크로 웰이 아래쪽을 향하도록 하여 상기 암세포 또는 암조직이 중력의 작용으로 인해 하부로 침강할 수 있도록 한다. 이러한 침강시 온도를 0-10 ℃로 하여 침강시키는 경우 침강이 보다 원활하면서 콜라겐의 겔화를 방지할 수 있다.
- [0059] 또한 상기 1)단계에 의해 투입되는 암세포 또는 암조직은 cancer spheroid에 해당하는 것으로서 지름은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 200-500 μm 에 해당하는 것이 바람직하다.
- [0060] 또한 특별한 제한이 있는 것은 아니며, 상기 콜라겐을 마이크로 유동채널의 내부에 먼저 투입하고 나서, 상기 암세포 또는 암조직을 투입하는 것이 마이크로 유동채널 외벽의 표면 부착력을 증가시킬 수 있어 더욱 바람직할 수 있다.
- [0061] 한편 상기 2)단계에서 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 암세포 또는 암조직의 침강이 완전히 이루어지고 나서 마이크로 유동채널의 콜라겐을 제거하는 것이 바람직하다.
- [0062] 또한 상기 2)단계 이후에 상기 마이크로 웰에 주입된 콜라겐 및 상기 마이크로 유동채널의 외벽에 코팅된 콜라겐을 겔화시키는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다. 이러한 겔화의 온도는 바람직하게는 30-40 ℃에서 이루어지는 것이 바람직하다. 상기 콜라겐을 겔화시키는 온도는 30-40 ℃의 온도에서 겔화시키는 것이 바람직하며, 겔화의 시간은 20-40 분간 겔화시키는 것이 바람직하다. 이러한 겔화의 온도와 시간의 상하한을 유지하는 것이 겔화 상태가 변하지 않으면서 주입된 암세포의 생존을 가장 적절하게 유지할 수 있다.
- [0063] 이러한 과정을 통해 콜라겐을 겔화시키게 되며, 상기 마이크로 유동채널의 외벽에 코팅된 콜라겐에 혈관세포를 부착시켜 인체 내의 암세포가 혈관세포에 침윤하는 모델과 유사한 모델을 완성하게 된다.
- [0064] 이러한 모델을 가지고 항암제의 유효성이나 안정성 등을 검증하게 되는데, 상기 콜라겐이 외벽에 코팅되고 혈관세포가 부착된 마이크로 유동채널의 내부에는 배양액을 통과시켜 암세포 또는 암조직의 혈관세포 침윤을 유도하게 된다.
- [0065] 이렇게 혈관세포에 암세포 또는 암조직의 침윤이 발생한 후, 마이크로 유동채널에 항암제를 투여하여 혈관세포에 부착된 암세포 또는 암조직의 크기 및 마이크로 웰 내부의 암세포의 크기를 immunochemistry를 이용하여 확인할 수 있다. 이러한 과정을 통해 암세포 또는 암조직의 항암제에 의한 사멸 여부, 억제 여부 등을 실제 인체 내에서 발생하는 현상과 유사한 모델을 제시하여 정확하게 확인하는 것이 가능하다. 그러므로 본 발명에 따른 항암제 검증방법은 기존에 마이크로 유체칩을 이용하는 방법에 비해 보다 정확하게 항암제의 유효성, 안정성 또는 효능 등을 검증하는 것이 가능하다.
- [0066] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0067] **실시예**
- [0068] 마이크로 유체칩은 softlithography 방법을 이용하여 Polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard 184, Dowcorning, USA)으로 제작하였다. 이러한 마이크로 유체칩을 제작하기 위하여 먼저 마스터 몰드(master mold)를 제작하였다. 이러한 마스터 몰드의 제조과정은 하기 도 1에 나타난 바와 같은데, 구체적으로는 포토레지스터를 실리콘 웨이퍼 상에 투여하여 스핀코팅하였다. 그리하여 두께가 500 μm 인 SU-8 층을 형성하였다. 그리고 여기에 마이크로 웰 및 유동채널의 형상을 갖는 포토 마스크를 부착하였다. 그리고 여기에 UV 를 노출하여 SU-8 마스터 몰드를 제작하였다. 이렇게 제작된 마스터 몰드를 이용하여 마이크로 유체칩을 제조하게 되는데, 제작된 마스터 몰드를 이용하여 고형화(polymerization) 되지 않은 PDMS mixture(PDMS base and curing agent, 비율 10:1)를 마스터 몰드에 부어서, 80 ℃의 오븐에 1 시간 정도 두어서 완전히 고형화를 시킨 후 고체의 PDMS를 마스터 몰드로부터 분리한다. 입구와 출구를 약 2 mm직경의 홀을 뚫어서 세포 및 배양액이 들어갈 수 있는 통로를 만든다. 이후 PDMS와 커버 글라스(cover glass)를 산소 플라즈마 처리를 하여 부착시켜, 최종적으로 마이크로 유동채널을 완성시켰다.
- [0069] 한편 하기 도 2는 암세포의 침윤과정의 모식도이며, 하기 도 3은 상기 실시예에 의한 마이크로 유체칩을 이용하

는 경우 암세포 침윤과정의 모식도이다.

[0070]

한편 하기 도 4는 마이크로 유체칩을 제조하기 위한 몰드를 제조하는 과정을 나타낸 것이며, 하기 도 5는 이러한 마이크로 유체칩의 제조과정을 도시한 것이고, 도 6은 상기 마이크로 유체칩에서 마이크로 웰과 마이크로 유동채널의 구조를 확인할 수 있는 마이크로 유체칩의 단면도 및 본 발명에 따른 마이크로 유체칩을 이용한 항암제 검증방법을 보다 자세히 그림으로 나타낸 것이다. 이러한 도 5 및 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이 상기 마이크로 유체칩은 암세포 및 암조직을 배양하는 마이크로 웰과 혈관세포의 배양 및 배양액을 공급하게 되는 마이크로 유동채널을 구비하게 된다. 이때 상기 마이크로 웰의 깊이는 1,000 μm 이며, 폭은 500 μm 이다. 또한 마이크로 유동채널의 직경은 500 μm 가 되도록 제작하였다.

[0071]

제작된 마이크로 유동채널에 10 분 후 collagen을 넣어준다. 플라즈마 처리된 마이크로 유동채널의 내부는 친수성이 높기 때문에 콜라겐(collagen)을 넣을 때, 마이크로 유동채널 및 마이크로 웰까지 쉽게 채울 수 있으며, 또한 콜라겐(collagen)은 유리 및 PDMS표면의 부착성을 높여주기 때문에 10 분 안에 먼저 마이크로 유동채널 안에 콜라겐(collagen)을 채워두었다. 이렇게 콜라겐을 채워 놓은 다음, 마이크로 유동채널 내로 원형의 암조직인 cancer spheroid를 채널에 위치할 할 수 있게 제작하여 넣어준다(도 6-1). 이후 마이크로 웰이 아래쪽으로 향하게 하여 약 4 $^{\circ}\text{C}$ 정도의 냉장고에 넣어두면 cancer spheroid는 마이크로 웰 안으로 가라앉게 된다. 이때 온도가 높은 곳에 있으면 collagen이 젤화되기 때문에 cancer spheroid가 가라앉는 동안은 마이크로 유체칩을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관해야 한다(도 6-2). 약 20 분이 지나면 cancer spheroid는 마이크로 웰에 위치하게 되고, 현미경으로 확인 후 완전히 가라앉은 것이 확인되면, 혈관구조를 형성하기 위하여 채널에 있는 콜라겐(collagen)을 제거해준다(도 6-3). 이 때 주사기의 니들이 없는 상태에서 입구나 출구에 대고 당기면 아직 유체상태인 collagen은 마이크로 유동채널에 있는 것만 제거되고 마이크로 유동채널의 벽면이나 마이크로 웰안의 cancer와 collagen은 그대로 남게 된다. 또한 마이크로 유동채널에 콜라겐이 부착된 상태로 이러한 collagen을 젤화시키기 위하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 세포배양용 인큐베이터에 30 분 정도 둔다. 이후 마이크로 유동채널을 제외한 마이크로 유동채널의 벽면에 부착된 콜라겐 및 마이크로 웰안의 콜라겐은 젤화되었다. 여기에 최종적으로 혈관구조를 완성하기 위하여 마이크로 유동채널에 혈관세포가 포함된 배양액 (2 x 10⁷ cells/ml)을 넣어주고 다시 30 분 정도 세포배양용 인큐베이터에 넣어두면 혈관세포가 부착되며, 약 4 시간 정도 안정화단계가 지난 후 마이크로 유동채널에 펌프를 이용하여 배양액(3 ml/day)을 공급해준다. 이러한 방법으로 혈관구조가 포함된 암세포의 침윤모델이 완성되었다. 이후 3-7 일 정도 배양하면 암조직이 성장하여 혈관세포에 의해서 형성된 혈관구조를 뚫고 나와서 암세포의 침윤이 완성되었으며, 이 때 항암제를 투여하여 혈관에 부착된 암세포의 크기 및 마이크로 웰 내부의 암세포의 크기 및 immunochemistry를 이용하여 암세포의 생존유무를 파악할 수 있는 마이크로 유체칩이 완성되었다.

[0072]

실험예

[0073]

본 실험을 위하여 항암바이러스(Oncolytic virus: OV) [리오바이러스 (Reovirus; Reo), 다람쥐 폭스바이러스 (Squirrel poxvirus; SQPV)]를 상기 실시예에 따른 마이크로 유체칩에 주입하여 암세포의 크기변화 및 사멸을 확인하였다. 이의 결과는 하기 도 7에 나타내었다.

[0074]

한편 본 실험을 위한 침윤 모델은 상기 실시예에 따른 마이크로 유체칩을 이용하였으며, 마이크로 웰에 암조직 (지름 약 0.3 mm)을 투입하고 혈관모델을 완성한 후, 3 일동안 혈관쪽으로 혈관세포 배양액을 지속적으로 공급하여 침윤모델을 완성하였다 (도 7a 참조). 혈관쪽으로 침윤한 암세포를 항암바이러스로 감염시키기 위하여, 4 일째 항암바이러스의 감염이 잘 일어나고 또한 임상에서 클램핑 방법을 이용하여 혈액을 정지시키는 모델을 모사하여 정확한 약물효과를 확인할 수 있도록 1 시간 동안 배양액의 펌핑을 정지시키고 마이크로 유체칩의 마이크로 유동채널 쪽으로 항암바이러스를 주입하였다. 1 시간 후 다시 펌프와 연결하여 배양액을 지속적으로 공급하였으며, 이후 매일 현미경을 이용하여 암조직의 크기변화를 관찰하였다.

[0075]

측정 결과 리오바이러스는 감염 후 2-4 일 정도 후부터 암세포의 사멸이 나타나며, 다람쥐 폭스바이러스의 경우 감염 후 4-6 일 정도가 지나면 실제 암세포의 사멸이 확인되었다.

[0076]

한편 도 8은 추가적으로 유방암세포가 본 실시예에 따른 마이크로 유체칩의 혈관세포에 침윤하고 나서 폭스바이러스를 주입한 후 암세포의 크기변화를 보여주고 있다. 폭스바이러스에 의해서 암세포가 감염된 후 5 일째(괄호 안은 폭스 바이러스를 주입하여 감염이 일어난 후의 날짜를 나타냄) 암조직이 마이크로 유체칩에서 떨어 나간 것을 확인 할 수 있다. 뿐만 아니라, 폭스바이러스는 암세포를 선택적으로 사멸시키고, 정상세포에는 영향을 미치

지 않는 것으로 알려져 있는데, 도 8에서는 암세포가 선택적으로 사멸하고 정상세포인 혈관세포는 살아있는 것이 확인된다. 또한 도 9는 폭스바이러스의 감염에 의한 암조직의 변화에 대한 그래프를 나타내고 있으며, 감염 후 4 일째부터, 암조직의 크기가 급속히 감소하는 것을 확인할 수 있으며, 이는 임상에서 보여왔던 결과와 매우 일치하는 결과를 보여주고 있다. 또한 도 10의 그래프에서는 리오 바이러스를 1회 주입한 결과 (Reo-1)와 3 회 연속 주입(Reo-3)한 결과 및 폭스바이러스를 감염시킨 결과를 바이러스를 주입하지 않은 결과와 비교를 하였으며, 암조직의 크기가 감염후 다음날부터, 리오 바이러스는 전체 크기가 일정하게 유지되거나(Reo-1), 감소(Reo-3)가 되는 것을 관찰할 수 있었으며, 폭스는 감염 후 4 일째부터 암조직의 크기가 급속히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 항암바이러스를 처리하지 않은 경우는 암조직이 지속적으로 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 리오 바이러스는 혈관세포에도 영향을 미치기 때문에 혈관 신생성을 저해하는 효과를 나타내는데, 본 실험을 통하여 이를 증명하였다. 본 실험의 그래프는 재현성 검증을 위하여 각 항암바이러스당 24개 마이크로 웰이 포함된 마이크로 칩을 3 개이상 사용하여 동일한 실험을 2 회 이상 실시한 결과이다.

[0077]

이러한 실험 결과를 통하여 본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩을 이용하여 항암제를 검증하게 되면, 인체 내에서 일어나는 현상과 유사한 모델의 모사가 가능하여 보다 정확한 항암제의 검증이 가능하다. 한편 하기 도 11은 이러한 본 발명에 따른 항암제 검증용 마이크로 유체칩의 단면도를 나타낸 것이다.

[0078]

상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

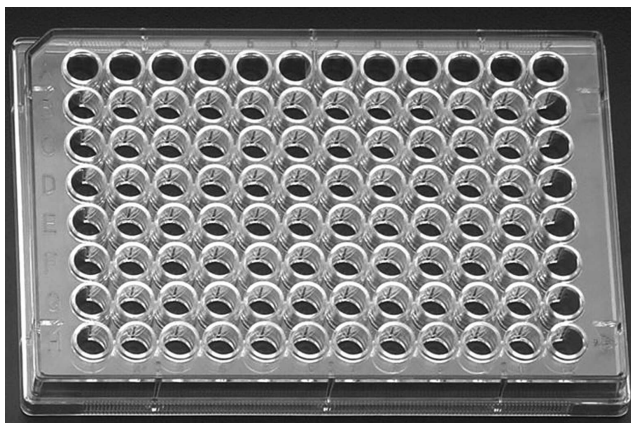
부호의 설명

[0079]

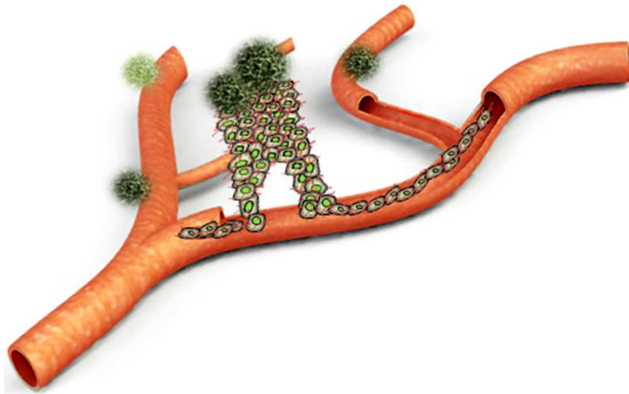
- 100. PDMS
- 200. 마이크로 유동채널
- 300. 마이크로 웰
- 400. 콜라겐
- 500. 암세포 또는 암조직
- 600. 혈관세포

도면

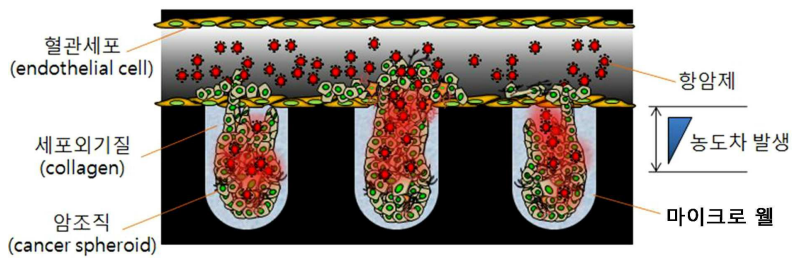
도면1



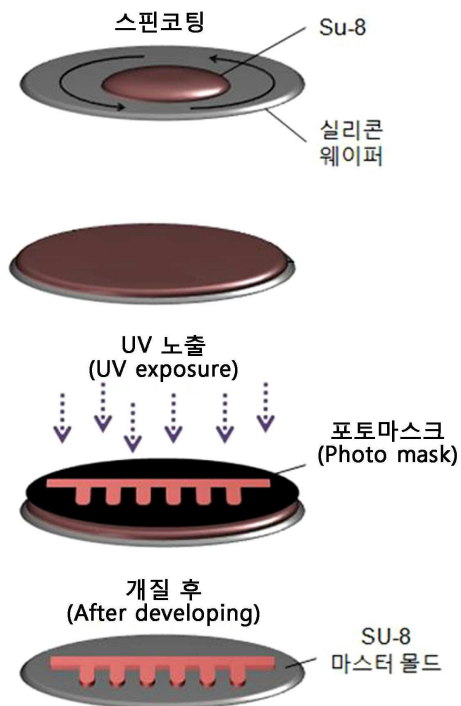
도면2



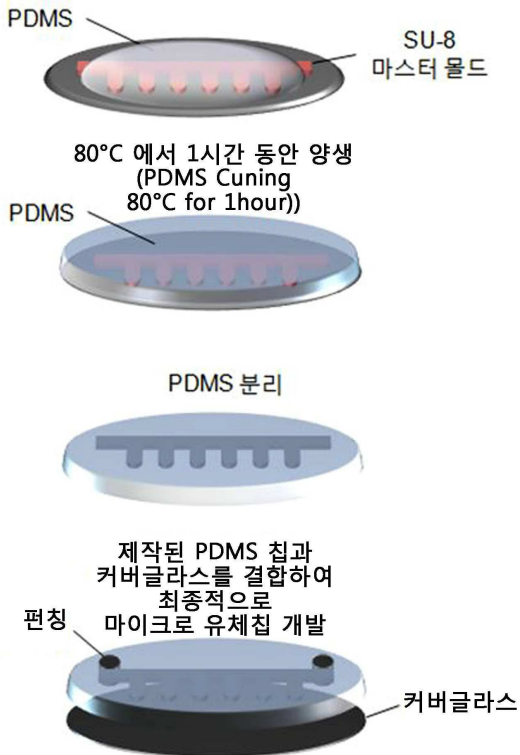
도면3



도면4



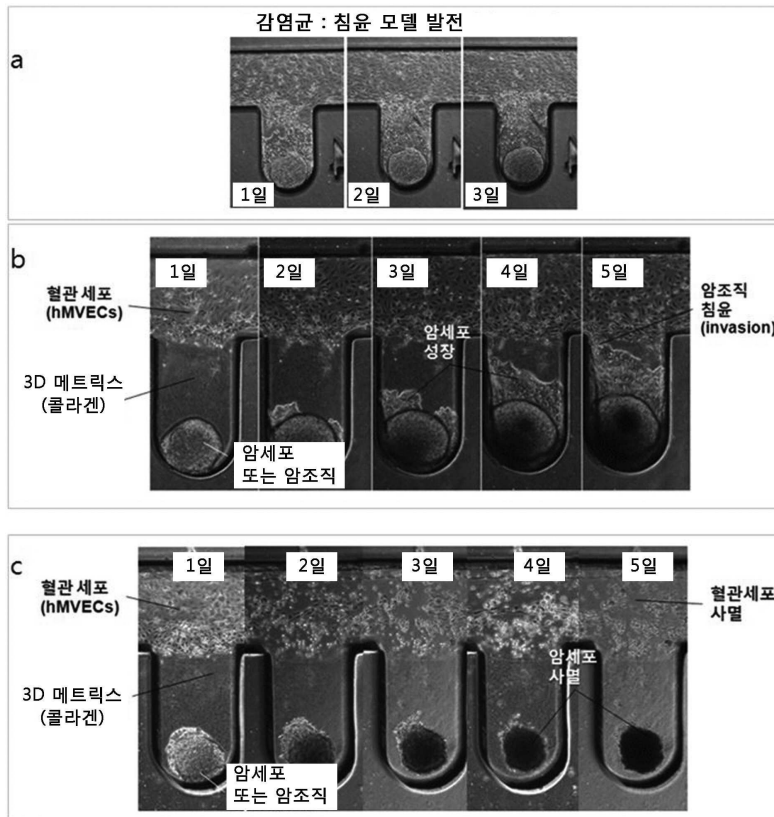
도면5



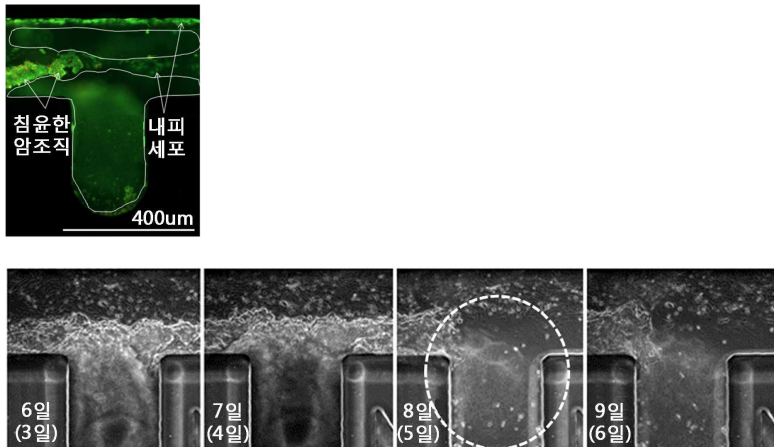
도면6



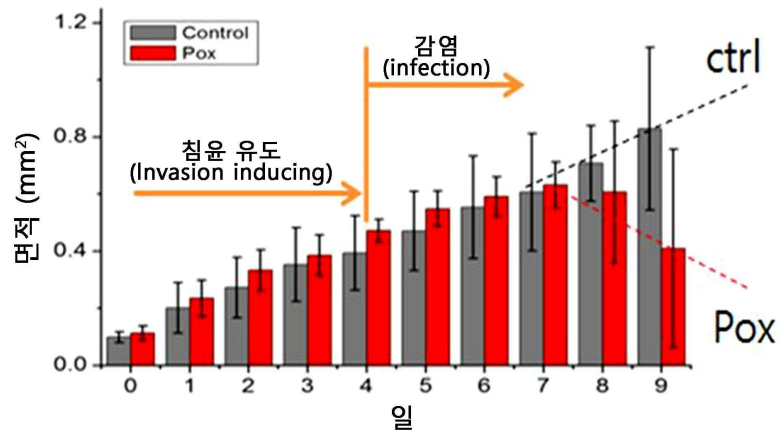
도면7



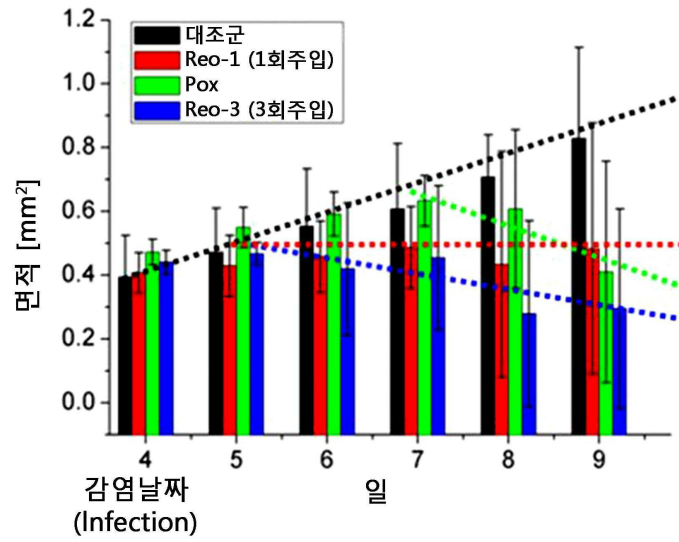
도면8



도면9



도면10



도면11

