



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0088028
(43) 공개일자 2019년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01) C12M 1/107 (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/073 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/5027 (2013.01)
C12M 23/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0006185
(22) 출원일자 2019년01월17일
심사청구일자 2019년01월17일
(30) 우선권주장
1020180006042 2018년01월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
서울대학교병원
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)
차의과학대학교 산학협력단
경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)
(72) 발명자
김선민
서울특별시 마포구 독막로18길 5, 104동 1804호(상수동, 상수두산위브아파트)
전태준
경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5409동 204호(이의동, 자연엔 힐스테이트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순용

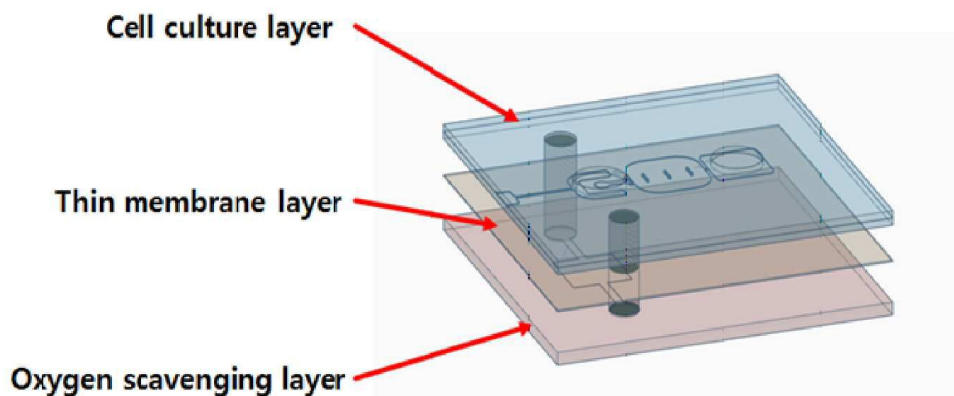
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 임신중독증 환경을 구현한 태반 모사 장기칩 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 임신중독증 환경을 구현한 태반 모사 장기칩에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 상기 태반 모사 장기칩을 이용하여 임신중독증 예방 또는 치료용 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩은 질병의 원인 요소를 칩 내에서 제어하여 임신중독증 환경을 구현 하였는바, 임신중독증 연구를 위한 연구 샘플을 대체할 수 있으며, 임신중독증 치료를 위한 약물 스크리닝 및 테스트에 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 23/36 (2013.01)
C12N 5/0605 (2013.01)
C12N 5/069 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
B01L 2200/10 (2013.01)
B01L 2300/06 (2013.01)
B01L 2300/0819 (2013.01)
B01L 2300/0887 (2013.01)

(72) 발명자

이인수

경기도 성남시 분당구 중앙공원로 17, 329동 407호(서현동, 시범단지한양아파트)

우진혁

인천광역시 미추홀구 경인남길 30, 4002호(용현동)

홍준석

서울특별시 강남구 삼성로64길 5, 108동 2201호(대치동, 대치현대아파트)

김기진

서울특별시 강남구 삼성로120길 21, 201호(삼성동, 세방타운하우스)

석진

서울특별시 성동구 용답길 19-7(용답동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711054663
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(미래부)
 연구과제명 허혈성 심장질환 연구를 위한 조직공학 기반 체외 3차원 심혈관 모델 개발
 기 여 율 40/100
 주관기관 인하대학교
 연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711076660
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
 연구과제명 저산소증 유래 임신중독증 산모의 태반 모델 장기 칩 구현 및 치료제 스크리닝 방법 개발
 기 여 율 60/100
 주관기관 인하대학교
 연구기간 2018.09.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

세포배양 층(cell culture layer);
멤브레인 층(Thin membrane layer); 및
산소흡수 층(Oxygen scavenging layer);을 포함하는 태반 모사 장기칩.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 세포배양 층은 영양막 세포가 배양되는 것인, 태반 모사 장기칩.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 세포배양 층은 산모의 혈관내피세포가 배양되는 것인, 태반 모사 장기칩.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 멤브레인 층은 기체 투과성 고분자 막인, 태반 모사 장기칩.

청구항 5

제4항에 있어서,
상기 투과성 고분자 막은 하이드로겔, 아세트산뷰티르산셀룰로오스(CAB)막, 하이드록시메틸아크릴레이트(HEMA) 막 및 실리콘 고분자막으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상인, 태반 모사 장기칩.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 산소흡수 층은 산소흡수용액을 포함하는 것인, 태반 모사 장기칩.

청구항 7

제6항에 있어서,
상기 산소흡수용액은 아황산나트륨(sodium sulfite) 및 질산코발트(cobalt nitrate) 혼합 용액; 또는 피로갈롤(Pyrogallol);인, 태반 모사 장기칩.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 태반 모사 장기칩을 이용한 임신중독증 예방 또는 치료용 약물을 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 임신중독증 환경을 구현한 태반 모사 장기칩에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 상기 태반 모사 장기칩을 이용하여 임신중독증 예방 또는 치료용 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 반도체 공정 기술과 함께 발달한 마이크로공학 기술은 높은 정확도로 마이크로 단위의 규격을 가진 구조체를 대량 생산할 수 있도록 하였다. 특히 포토리소그래피와 소프트리소그래피 기술은 반영구적몰드를 이용한 스탬핑(Stamping)을 통해 손쉽게 마이크로 구조를 생산할 수 있도록 하였고, 이를 통해 인체의 혈관이나 장기의 세포층 등 미세 구조를 생체외에서 모사하려는 시도가 있어왔다. 장기 모사칩의 성공적인 사례로는 하버드 위스 연구소에서 개발한 폐 모사 장기칩(Lung-on-a-chip)과 대장 모사 장기칩(Gut-on-a-chip)을 들 수 있다. 두 연구에서는 포토리소그래피와 소프트리소그래피 기술로 폴리디메틸실록산(PDMS) 미세채널과 다공성 막으로 이루어진 칩을 제작하였고, 칩 내부에서의 세포 배양을 통해 장기의 세포층 구조를 구현하였으며, 나아가 시린지 펌프와 진공펌프를 이용하여 실제 장기와 유사한 기계적 환경을 제공하여 유의미한 결과를 얻었다. 이러한 생체외 장기 모사칩은 모사된 세포층을 기준으로 장기 내부와 외부의 교류에 관한 연구에 유용한 플랫폼으로써, 인체와 구조적 유사성이 높고 환경적인 조건을 조절할 수 있다는 점에서 세포층의 기능과 상호 작용에 대한 실험은 물론 약물 전임상 테스트에도 활용될 수 있는 잠재성을 지니고 있다.

[0003] 한편, 임신중독증은 전체 임산부의 5 내지 8 %에 대하여 모태 및 태아의 주산기 사망의 주요한 원인이 된다. 임신중독증의 대표적인 주요 증상으로는 고혈압, 부종 및 임신중독성 뇨 단백질량의 증가, 심한 두통 및 갑작스런 체중 증가 등이 있다. 임신중독증은 대부분 20주 이후에 발생하고 조산의 주요한 원인이 되기도 한다. 그러나 현재까지 이의 정확한 발병원인과 치료방법은 명확하게 규명되어 있지 않다. 단지 유일한 치료 방법으로는 분만을 통하여 임신상태에서 벗어나는 것이다.

[0004] 이에, 많은 연구진이 임신중독증 치료를 위하여 태반의 물질 수송 등에 대한 연구하고 있다. 태반에 대한 생체내(in vivo) 연구는 재정적, 윤리적 한계와 태아에 대한 위험성으로 인해 제약이 많다. 특히 직접적으로 물질을 투여해야 하는 수술 실험의 경우에는 해당 물질이 태아에게 미치는 영향과 안전성에 대해 단언하기 힘들기 때문에, 많은 경우 실험 모델을 이용하여 연구를 진행해왔다. 현재 사용되고 있는 대표적인 실험 모델로는 실험 동물 모델, 탈체(ex vivo) 태반분엽 관류 실험 모델, 생체외(in vitro) 세포 배양 모델 등이 있다. 이들 중 실험 동물 모델은 윤리적인 논란과 이종 간의 차이점 등의 문제로 가능한 경우 다른 모델로 대체하여 사용하는 추세이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 임신중독증 연구의 연구대상인 태반이 임신 중에만 형성되어 연구 샘플의 공급이 어렵다는 문제점을 해결하기 위하여 태반 모사 장기칩을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 따라서 본 발명의 목적은, 세포배양 층, 멤브레인 층 및 산소흡수 층을 포함하는 태반 모사 장기칩을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은, 상기 태반 모사 장기 칩을 이용한 임신중독증 예방 또는 치료용 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포배양 층, 멤브레인 층 및 산소흡수 층을 포함하는 태반 모사 장기칩을 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 상기 태반 모사 장기칩을 이용한 임신중독증 예방 또는 치료용 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩은 질병의 원인 요소를 칩 내에서 제어하여 임신중독증 환경을 구현 하였는바, 임신중독증 연구를 위한 연구 샘플을 대체할 수 있으며, 임신중독증 치료를 위한 약물 스크리닝 및 테스트에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩의 구조를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩의 평면도를 나타낸 도이다.

도 3 및 4는 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩의 사진을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩의 세포배양 모식도를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩 내부의 산소농도 예측 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩 내부의 산소농도 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩에서 세포의 관 형성 여부 확인 방법을 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩에서 인간 복대동맥혈관내피세포의 관 형성 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명에 따른 태반 모사 장기칩에서 인간 복대동맥혈관내피세포 및 영양막 세포의 공동 배양시 인간 복대동맥혈관내피세포의 관 형성 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0014] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 세포배양 층, 멤브레인 층 및 산소흡수 층을 포함하는 태반 모사 장기칩을 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, “장기칩(organ-on-a-chip)”은 칩 위에 특정 장기를 구성하는 살아있는 세포를 배양함으로써, 해당 장기의 기능과 특성 뿐만 아니라, 역학적, 생리적 세포반응을 모방한 칩을 의미한다. 상기 장기칩은 장기의 세포운동이나 물리 화학적 반응의 메커니즘을 상세하게 연구할 수 있고, 신약 개발 및 독성평가에 대한 모델로 이용될 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, “세포배양 층(cell culture layer)”은 태반 모사 장기칩에서 특정 장기를 구성하는 살아있는 세포가 배양되는 층을 의미한다.

[0017] 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, 세포배양 층은 태반을 모사하기 위하여 영양막 세포와 산모의 혈관내피세포를 배양할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, “멤브레인 층(thin membrane layer)”은 기체 투과성 고분자 막으로 구성되며, 세포배양 층의 세포와 산소 흡수 용액의 직접적인 접촉을 방지한다. 상기 기체 투과성 고분자 막은 이온 또는 기공을 이용하여 기체의 투과성이 조정된 막을 의미한다.

[0019] 상기 기체 투과성 고분자 막은 하이드로겔, 아세트산부티르산셀룰로오스(CAB)막, 하이드록시메틸아크릴레이트(HEMA)막 및 실리콘 고분자막으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명에 있어서, “산소흡수 층(oxygen scavenging layer)”은 산소 흡수 용액이 포함되어 있어, 세포배양 층의 세포로부터 산소를 흡수하는 층을 의미한다.

- [0021] 상기 산소 흡수 용액은 아황산나트륨(sodium sulfite) 및 질산코발트(cobalt nitrate) 혼합 용액; 또는 피로갈롤(Pyrogallol);인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 산소 흡수 용액은 용액이 아닌 산소를 흡수 할 수 있는 겔 또는 젤의 형태인 것을 이용할 수도 있다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 태반 모사 장기칩은 도 1 내지 4와 같은 구조일 수 있으며, 세포주입부, 세포 배양부, 미세유체 주입부, 미세유체 배출구 및 산소제어부를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 태반 모사 장기칩의 산소 농도 및 질병인자 제어를 통해 임신중독증을 포함한 임신 중 질병의 환경을 구현할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 태반 모사 장기칩을 이용한 임신중독증 예방 또는 치료용 약물을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, “임신중독증”은 임신과 합병된 고혈압성 질환을 의미하며, 구체적으로 임신성 고혈압, 병태가 더 진행된 형태인 전간증 및 자간증을 포함하는 개념이다. 임신중독증의 증상으로는 두통, 부종, 구역, 구토, 거품뇨 등이 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, “예방”은 약물의 투여로 개체에서 질병을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, “치료”는 약물의 투여로 개체에서 질병의 증세가 호전되거나 질병의 억제 또는 경감 및 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0029] 본 발명의 태반 모사 장기칩은 임신중독증의 원인요소를 칩 내에서 제어하여 임신중독증 환경을 구현하였으므로, 임신중독증 예방 또는 치료를 위한 약물의 스크리닝 및 독성시험 등에 활용될 수 있다.
- [0031] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0033] **실시예 1. 태반 모사 장기칩 제작**
- [0034] 미세공정 및 미세유체 기술을 기반으로 태반 모사 장기칩을 제작하였다. 구체적으로 미세제조기술인 포토리소그래피를 사용하여 세포배양 층, 멤브레인 층 및 산소흡수 층을 각각 제작하였고, 제작된 각 층을 접착하여 태반 모사 장기칩을 완성하였다. 제작된 태반 모사 장기칩은 도 1 내지 5에 나타내었다.
- [0035] 도 1 내지 4에 나타난 바와 같이, 태반 모사 장기칩은 세포배양 층, 멤브레인 층 및 산소흡수 층을 포함하며, 다수의 미세유체관 및 챔버로 구성된다.
- [0036] 또한 도 5는 태반 모사 장기칩에서의 세포 배양을 나타낸 모식도로, 태반 모사 장기칩의 세포배양 층 내에 태아의 영양막 세포 및 산모의 혈관내피세포를 배양하여 저산소증(hypoxia) 상태가 된 것을 나타낸다.
- [0038] **실시예 2. 태반 모사 장기칩 내부의 산소 농도 측정**
- [0039] 광학 산소 센서 필름과 광학 탐지기를 이용하여 태반 모사 장기칩 내부의 산소 측정을 진행하였다. 산소 농도 측정 방법은 도 6에 나타내었다. 구체적으로, 광학 산소 센서 필름은 산소 농도에 따라 다른 형광을 띄는 특성을 갖고 산소 흡수 용액에 맞는 멤브레인 층 윗부분에 부착되었다. 광학 산소 센서 필름이 부착된 태반 모사 장기칩은 정확한 산소 측정 실험을 위해 소형 인큐베이터 내에 설치되었다. 산소 흡수 층에 산소 흡수 용액을 흘렸을 때 멤브레인 층을 통해 산소의 교환이 이루어지고 광학 산소 센서 필름의 형광 변화를 컴퓨터에 연결된 광학 탐지기를 이용해 촬영하였다. 촬영한 그림을 영상 처리 소프트웨어를 이용해 형광 강도를 분석하여 산소 농도를 계산하였다. 상기 산소 농도 측정 방법을 바탕으로 실제 세포 배양중인 태반 모사 장기칩 내부의 산소 농도를 측정하였다. 산소 농도를 측정한 결과는 도 7에 나타내었다.
- [0040] 도 7에 나타난 바와 같이, 태반 모사 장기칩 내부의 산소 농도는 상층 및 하층의 흐름 속도를 증가시켰을 때 산

소 농도가 높아진다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 태반 모사 장기칩 내부의 산소 농도는 흐름 속도에 영향을 받으며, 상층 및 하층의 흐름 속도 조절을 통해 장기칩 내부의 산소 농도를 제어할 수 있음을 의미한다.

[0042] 실시예 3. 태반 모사 장기칩의 동맥 형성 확인

[0043] 태반 모사 장기칩에서 산모의 혈관내피세포는 관 형태로 배양되어야 한다. 이를 확인하기 위하여, 태반 모사 장기칩에서 인간 복대동맥혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell HUVEC)가 관을 형성하는지 확인하였다. 구체적으로, 세포를 배양한 후 세포에 염색되어 있는 형광 시료를 공초점 현미경을 이용해 3차원 이미지를 얻었다. 상기 3차원 이미지들을 취합하여 3차원 도형으로 전환해서 세포의 배양상태 및 전체적인 모양을 확인하였다. 특히, 면역염색기법을 통해 세포간 연결을 나타내는 세포 표면단백질 CD31과 세포 핵의 발현을 확인하여 혈관이 형성되었는지 확인하였다. 그 과정은 도 8에 나타내었다. 태반 모사 장기칩의 동맥 형성 여부 확인 결과는 도 9에 나타내었다.

[0044] 도 8 및 9에 나타낸 바와 같이, 인간 복대동맥내피세포는 태반 모사 장기칩 내에서 관을 형성하는 것을 확인하였다.

[0046] 또한, 상기와 같은 방법으로, 태반 모사 장기칩에서 인간 복대동맥혈관내피세포(HUVEC) 및 영양막세포주(HTR-8)을 함께 배양할 경우 관 형성여부를 확인하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

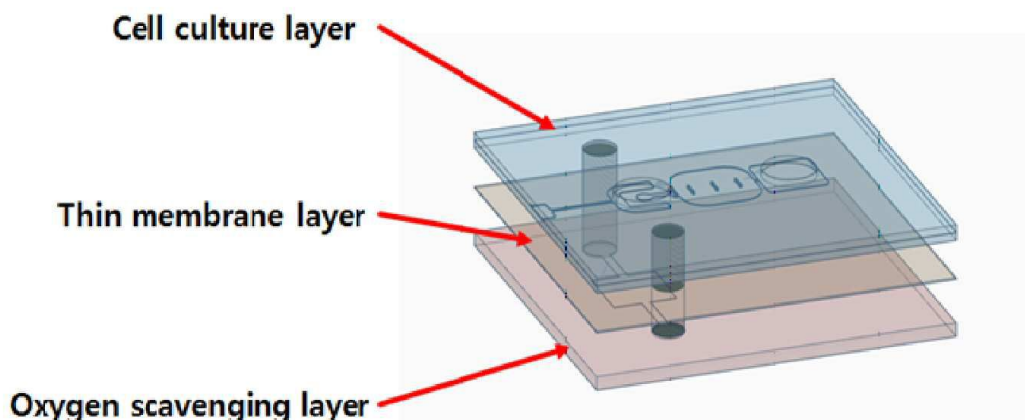
[0047] 도 10에 나타낸 바와 같이, 인간 복대동맥혈관내피세포 및 영양막 세포를 함께 배양한 경우 관을 형성하는 것을 확인하였다.

[0049] 종합적으로 본 발명자들은 태반 모사 장기칩 내에서 인간 복대동맥혈관내피세포가 관을 형성하는 것과, 태반 모사 장기칩 내의 산소 농도를 제어할 수 있음을 확인하였다. 이는 태반 모사 장기칩에서 태반을 모사할 수 있을 뿐만 아니라 질병요인 제어를 통해 임신중독증 환경을 구현할 수 있음을 의미하는 바, 본 발명의 태반 모사 장기칩은 임신 중 질병 연구 및 신약 개발 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

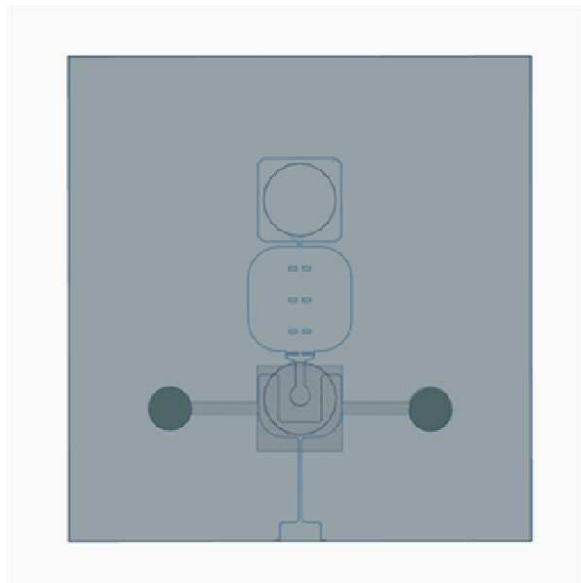
[0051] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

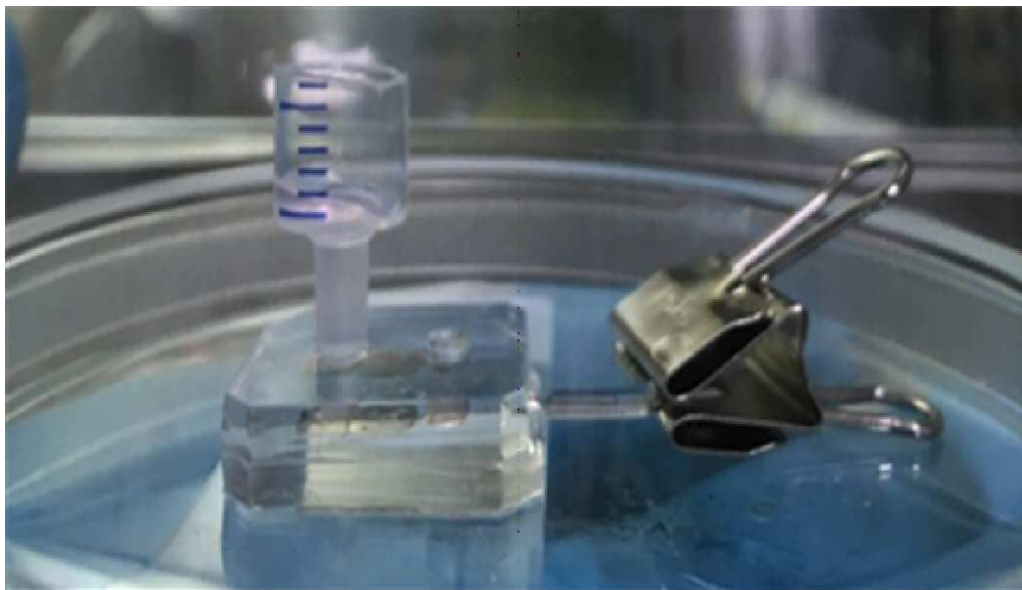
도면1



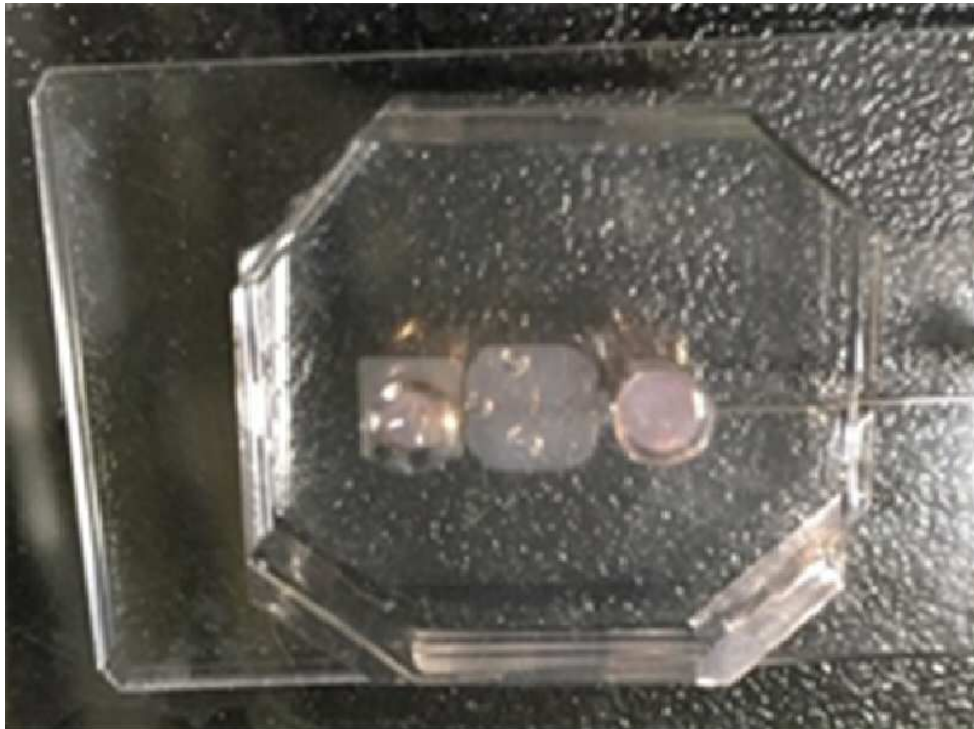
도면2



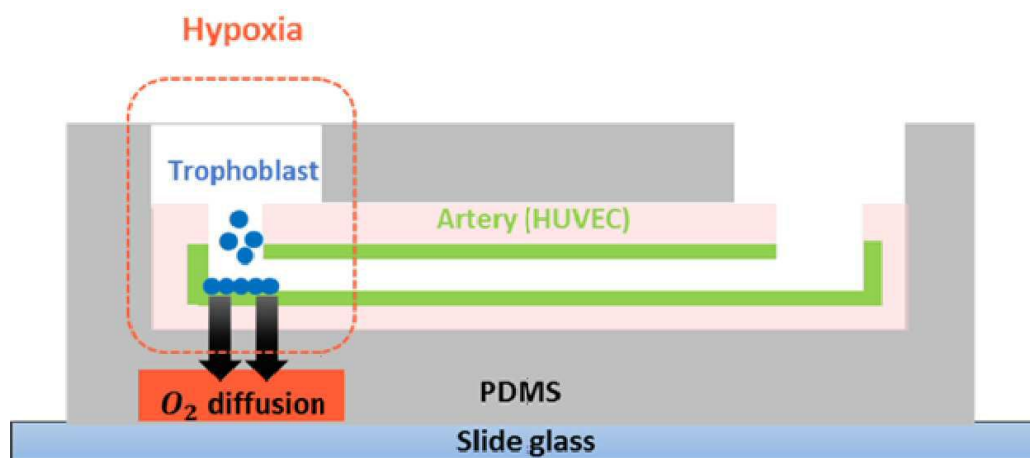
도면3



도면4



도면5



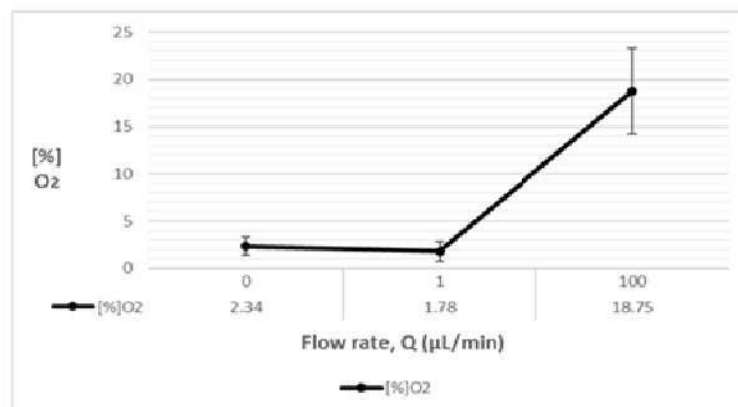
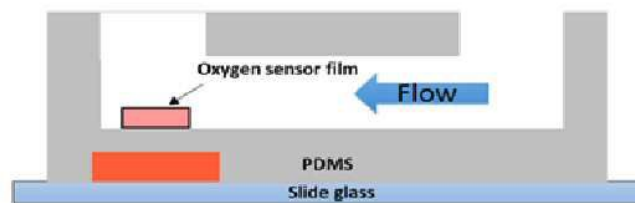
도면6



도면7

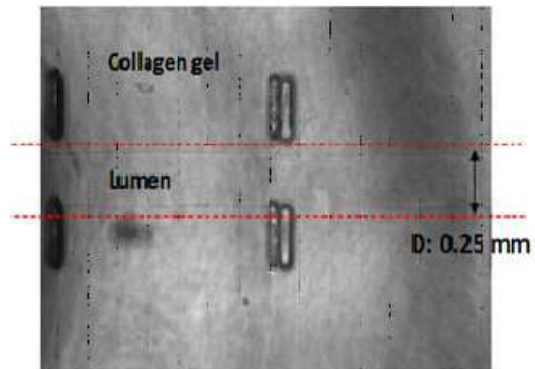
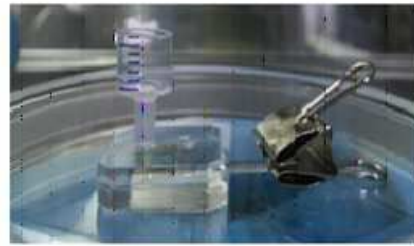
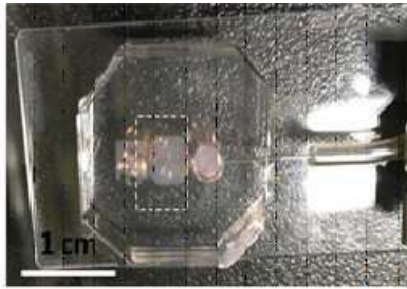
Top layer (DIW)
 $Q = 0, 1, 100 \mu\text{L}/\text{min}$

Bottom layer
 (Oxygen free water)
 $Q = 20 \mu\text{L}/\text{min}$



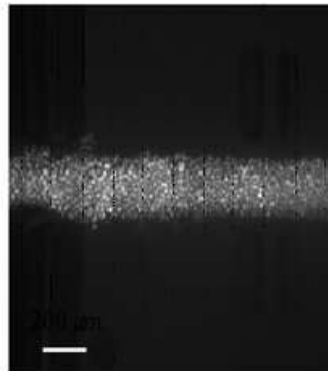
- Top / bottom layer 의 flow rate 조절을 통해 oxygen level control 가능할 것

도면8



Collagen gel molding

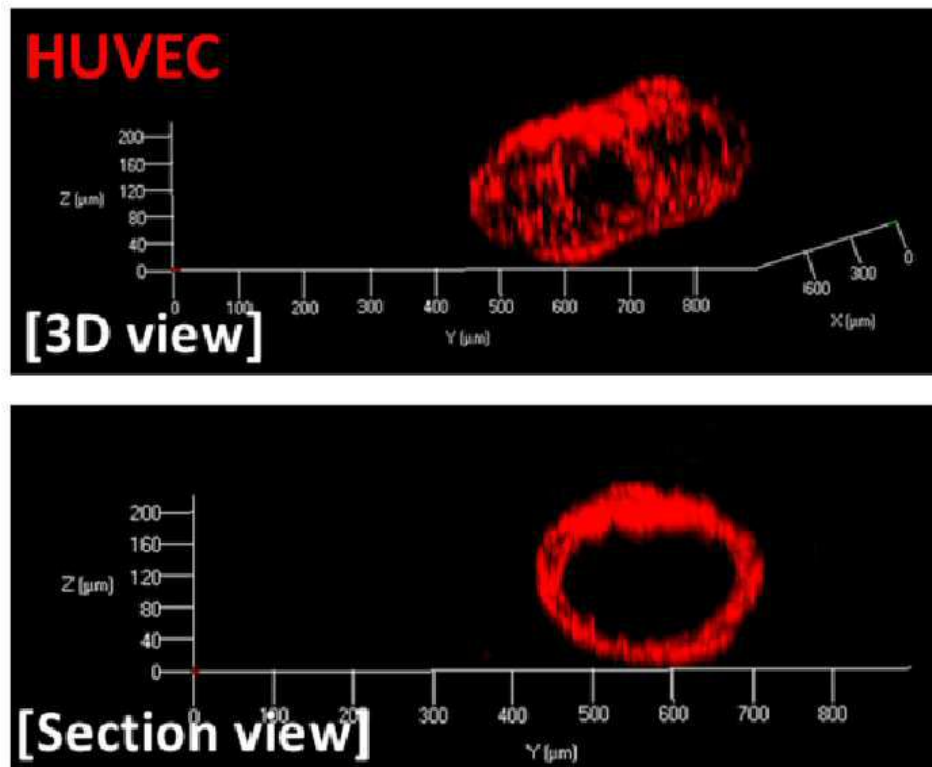
- Insert needle (D: 0.25mm)
- Fibronectin coating (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



HUVEC cell seeding

- Cell tracker staining
- Cell density: 20M $\frac{\text{cells}}{\text{mL}}$, 30 μL

도면9



도면10

