(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0021805
(43) 공개일자 2009년03월04일

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0086637
(22) 출원일자 2007년08월28일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교
(72) 발명자
정형일
서울 강남구 신사동 대주 파크빌 아파트 101-1005
박주영
경기 안산시 단원구 초지동 호수마을아파트 105-2901
(74) 대리인
특허법인다나

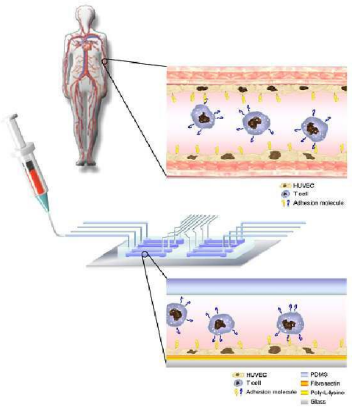
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 생체 유사 세포칩, 상기의 제조 방법, 상기를 사용한 세포기반 유착 분석 방법 및 약물 스크리닝 방법

(57) 요 약

본 발명은 마이크로유체 시스템을 응용하여, 생체 내의 혈관 상태를 구현한 생체 유사 세포칩, 상기 세포칩의 제조 방법, 상기 세포칩을 사용한 세포 기반 유착 분석 방법 및 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 생체 내 환경을 구현한 세포칩을 저가에 용이하게 제작할 수 있고, 장치 자체의 부피가 작아 소형화가 가능하며, 포함되는 채널의 디자인을 용이하게 변경할 수 있다는 장점을 가진다. 또한, 서로 평행하게 배열된 복수의 마이크로유체 채널을 포함하여, 상이한 표적물질 및/또는 환경에 따른 세포-세포 상호작용을 한 번에 신속하고 정확하게 검출할 수 있다. 또한, 별도의 동정 및 배양 과정을 생략하고도, 생체 내에서 분리된 소량의 전혈로도 매우 효율적인 검출이 가능하다는 이점을 가진다. 이에 따라, 본 발명의 생체 유사 세포칩은 질병의 진단 등에 사용되는 세포 기반 유착 분석 및 약물 스크리닝 방법 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

시료 주입구 및 시료 배출구를 갖는 복수의 마이크로유체 채널;

상기 채널 내벽면에 코팅된 세포 물질; 및

상기 채널의 시료 주입구와 연결되어 있고, 전단 응력을 가하면서 시료를 주입할 수 있는 시료 주입 장치를 포함하는 생체 유사 세포칩.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

복수의 마이크로유체 채널은 기판 상에 서로 평행하게 배열되어 있는 것을 특징으로 하는 생체 유사 세포칩.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

마이크로유체 채널의 재질은 PDMS, PMMA, 폴리아크릴레이트, 폴리카보네이트, 폴리사이클릭 올레핀, 폴리이미드 또는 폴리우레탄인 것을 특징으로 하는 생체 유사 세포칩.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

마이크로유체 채널은 폭이 1 내지 3 ㎜이고, 높이가 155 내지 175 ㎛이며, 길이가 1 내지 3 ㎝인 것을 특징으로 하는 생체 유사 세포칩.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

세포 물질은 혈관내피세포인 것을 특징으로 하는 생체 유사 세포칩.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

세포 물질은 유착 분자가 발현된 것을 특징으로 하는 생체 유사 세포칩.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

유착 분자는 셀렉틴 그룹 및 Ig-상과 CAMs로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 생체 유사 세포칩.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

유착 분자의 발현량은 10% 이상인 것을 특징으로 하는 생체 유사 세포칩.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

세포 물질은 폴리-L-리신, 피브로넥틴, 젤라틴, 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 접합 매개 물질을 통하여 마이크로유체 채널의 내부에 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 생체 유사 세포칩.

청구항 10

세포 물질을 마이크로유체 채널에 주입하는 제 1 단계;

채널 내부에서 세포 물질을 배양시키는 제 2 단계; 및

배양된 세포 물질을 활성화제로 처리하여, 유착 분자를 발현시키는 제 3 단계를 포함하는 생체 유사 세포칩의 제조 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

제 1 단계의 세포 물질은 혈관내피세포인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

제 1 단계의 혈관내피세포의 주입 농도는 1×10^6 내지 4×10^6 cell/ml인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

제 2 단계의 배양은 34 내지 40℃의 온도에서, 20 내지 28 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 14

제 10 항에 있어서,

제 3 단계의 활성화제가 TNF-α(Tumor Necrosis Factor-alpha), 인터류킨-1 인터류킨-1α, 인터류킨-1β, 인터류킨-2, 인터류킨-6, 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide, LPS) 및 인터페론 감마(Interferon-gamma)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 15

(1) 표적 물질을 포함하는 시료를 하기 식 1로 계산되는 전단 응력이 1 내지 4 dyn/cm^2가 되도록 마이크로유체 채널 내부로 통과시키는 단계; 및

(2) 채널 내부로부터 방출되는 신호를 검출하여, 표적 물질 및 혈관내피세포의 결합을 측정하는 단계를 포함하는

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 세포칩을 사용한 세포 기반 유착 분석 방법:

[수학식 1]

$$A = 6Q\eta/wh^2$$

상기 식에서 A는 채널의 벽에 가해지는 전단응력(wall shear stress)이고, Q는 채널에 주입되는 유체의 속도이며, w는 채널의 폭이며, h는 채널의 높이이고, η는 37℃에서의 시료의 점도를 나타낸다.

청구항 16

(A) 약물 후보 물질로 시료를 처리하는 단계;

(B) 약물 후보 물질로 처리된 시료를 하기 식 1로 계산되는 전단 응력이 1 내지 4 dyn/cm^2가 되도록 마이크로유체 채널 내부로 통과시키는 단계; 및

(C) 채널 내부로부터 방출되는 신호를 검출하여, 약품 후보 물질로 처리된 시료 및 혈관내피세포의 결

합을 측정하는 단계

를 포함하는 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 세포칩을 사용한 약물 스크리닝 방법:

[수학식 1]

$A = 6Q\eta/wh^2$

상기 식에서 A는 채널의 벽에 가해지는 전단응력(wall shear stress)이고, Q는 채널에 주입되는 유체의 속도이며, w는 채널의 폭이며, h는 채널의 높이이고, η는 37℃에서의 시료의 점도를 나타낸다.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 생체 내의 혈관의 상태를 구현한 생체 유사 세포칩, 상기세포칩의 제조 방법, 상기를 사용한 세포 기반 유착 분석 방법 및 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 바이오 융합 기술의 발전은 의학 및 약학 분야에도 큰 영향을 미쳤다. 특히, 신약 후보 물질을 검색하는데 소요되는 막대한 비용 및 시간과 같은 기존의 신약 개발 방법에서의 문제점들이 드러나면서 종전의 기술을 탈피하는 획기적인 신약 개발 방법이 필요하게 되었다. 이에 따라 최근의 신약 개발 및 진단을 위한 시스템들은 적은 양의 시료로도 신속하고, 정확하게 시료를 분석할 수 있는 HTS (High Throughput Screening) 기술의 일종인 랩온어칩 (Lab on a chip) 형태로 발전하고 있다.

<3> 여러 HTS 기술 중에서도 세포 기반 유착 분석(cell-based adhesion assay)은 신약 개발 과정에 있어서 가장 어려운 부분으로 여겨지는 전임상 이전의 2차 스크리닝 단계에 있어서 신약 후보의 검증에 필요한 비용과 시간을 절약할 수 있는 중요한 분석 기법으로 이용되고 있다. 이러한 세포 기반 분석법은 기존의 생화학적 분석법에 비하여 세포 내 총체적인 기능을 스크리닝할 수 있다는 장점을 가져, 이와 관련된 시장 규모는 점점 넓어질 것으로 전망된다.

<4> 현재까지 가장 일반적으로 사용되는 유착 분석(adhesion assay)은 정적 상태(static state)에서 내피 세포 단층(monolayer)에 부착된 T 세포와 같은 표적 세포의 수를 카운트하는 것이다. 이러한 방법에서 내피 세포는 마이크로챔버(micro-chamber) 내에 시딩(seeding) 및 배양되고, 상기를 활성화시키는 화학 물질로 처리된다. 처리된 T 세포는 상기 챔버로 주입되고, 세포-세포 상호작용을 위해 배양되며, 배양 후 미부착 세포는 세정되고, 부착 세포는 카운트된다. 그러나, 이 방법은 세포 이동 및 결합을 실시간으로 측정하기에는 적합하지 않다. 즉, 상기 방법은 정적 상태에서 수행되고, 이는 실제 혈관 내의 생리적 부착과는 전혀 상이하다. 추가로 상기 방법은 긴 배양 시간이 필요할 뿐만 아니라, 많은 양의 시료가 필요하게 된다.

<5> 이러한 문제들을 극복하기 위해서, 챔버 내에서 평행한 흐름을 생성하는 흐름 챔버(flow chamber)가 개발되었다. 상기와 같은 챔버는 현탁액 내의 세포가 내피 세포 단일층에 결합할 수 있도록 유체의 흐름을 제공한다. 상기 방법은 세포-세포 상호작용을 분석할 수 있는 우수한 방법이지만, 챔버 제작, 밸브를 통한 용액 흐름의 제어 및 다양한 채널의 제작이 어렵다는 문제가 있다.

<6> 이러한 단점을 극복하기 위하여, 정적 배양액 내에서 전-형성 리빙 세포 (pre-formed living cell)로의 비가역적인 결합을 할 수 있게 하는 진공 라인을 사용한 혈관 유사체(vascular mimetics)가 개발된 바 있다. 이러한 챔버는 마이크로유체 챔버 내부에서 세포 배양이 가능한 매우 진보한 형태이다. 그러나, 상기 챔버는 마이크로유체 챔버와 기질의 결합을 유지하기 위하여 진공 라인을 사용하기 때문에, 각각의 채널의 자극이 어렵다. 더욱이 상기 챔버에서는 복수(6개)의 웰 플레이트가 기질로서 사용되었기 때문에, 공초점 현미경(confocal microscopy) 또는 형광 현미경(fluorescence microscopy)과 같은 측정 장비의 사용에 많은 제한이 있다는 문제점을 가지고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 본 발명은 전술한 종래 기술을 고려하여 이루어진 것으로서, 생체 내 혈관의 생리학적 환경을 저가에 용이하게 구현할 수 있고, 장치의 소형화가 가능한 생체 유사 세포칩을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은 상기 생체 유사 세포칩을 사용하여, 전혈(whole blood) 등의 시료를 소량 사용하고, 별도의 동정 및/또는 배양 과정이 없이, 정확한 검출 결과를 신속하고, 용이하게 얻을 수 있는 세포 기반 유착 분석 방법 및 약물 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

<8> 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서,

<9> 시료 주입구 및 시료 배출구를 갖는 복수의 마이크로유체 채널;

<10> 상기 채널 내벽면에 코팅된 세포 물질; 및

<11> 상기 채널의 시료 주입구와 연결되어 있고, 전단 응력을 가하면서 시료를 주입할 수 있는 시료 주입 장치를 포함하는 생체 유사 세포칩을 제공한다.

<12> 본 발명의 세포칩에서는 복수의 마이크로유체 채널이 기판 상에 서로 평행하게 배열되어 있는 것이 바람직하다.

<13> 또한 본 발명의 세포칩에서는 포함되는 혈관내피세포가 유착 분자가 발현된 인간 제대정맥 내피세포인 것이 바람직하다.

<14> 본 발명에서는 상기 유착 분자가 셀렉틴 그룹 및 Ig-상과 CAMs로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

<15> 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서,

<16> 혈관내피세포를 마이크로유체 채널에 주입하는 제 1 단계;

<17> 채널 내부에서 혈관내피세포를 배양시키는 제 2 단계; 및

<18> 배양된 혈관내피세포를 활성화제로 처리하여, 유착 분자를 발현시키는 제 3 단계를 포함하는 본 발명에 따른 생체 유사 세포칩의 제조 방법을 제공한다.

<19> 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서,

<20> (1) 표적 물질을 포함하는 시료를 특정 식으로 계산되는 전단 응력이 1 내지 4 dyn/cm^2가 되도록 마이크로유체 채널 내부로 통과시키는 단계; 및

<21> (2) 채널 내부로부터 방출되는 신호를 검출하여, 표적 물질 및 혈관내피세포의 결합을 측정하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 세포칩을 사용한 세포 기반 유착 분석 방법을 제공한다.

<22>

<23> 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서,

<24> (A) 약물 후보 물질로 시료를 처리하는 단계;

<25> (B) 약물 후보 물질로 처리된 시료를 특정 식으로 계산되는 전단 응력이 1 내지 4 dyn/cm^2가 되도록 마이크로유체 채널 내부로 통과시키는 단계; 및

<26> (C) 채널 내부로부터 방출되는 신호를 검출하여, 약품 후보 물질로 처리된 시료 및 혈관내피세포의 결합을 측정하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 세포칩을 사용한 약물 스크리닝 방법을 제공한다.

효 과

<27> 본 발명에 따르면, 생체 내 환경을 구현한 세포칩을 저가에 용이하게 제작할 수 있고, 장치 자체의 부피가 작아 소형화가 가능하며, 포함되는 채널의 디자인을 용이하게 변경할 수 있다는 장점을 가진다. 또한, 서로 평행하게 배열된 복수의 마이크로유체 채널을 포함하여, 상이한 표적물질 및/또는 환경에 따른 세포-세포 상

호작용을 한 번에 신속하고 정확하게 검출할 수 있다. 또한, 별도의 동정 및 배양 과정을 생략하고도, 생체 내에서 분리된 소량의 전혈로도 매우 효율적인 검출이 가능하다는 이점을 가진다. 이에 따라, 본 발명의 생체 유사 세포칩은 질병의 진단 등에 사용되는 세포 기반 유착 분석 및 초고속 약물 스크리닝을 포함하는 약물 스크리닝 방법 등에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<28> 본 발명은

<29> 시료 주입구 및 시료 배출구를 갖는 복수의 마이크로유체 채널(microfluidic channel);

<30> 상기 채널 내벽면에 코팅된 세포 물질; 및

<31> 상기 채널의 시료 주입구와 연결되어 있고, 전단 응력을 가하면서 시료를 주입할 수 있는 시료 주입 장치를 포함하는 생체 유사 세포칩(*in vivo*-like cell chip)에 관한 것이다.

<32> 본 발명은 마이크로유체 시스템(microfluidic system)을 기반으로 하여, 생체 내의 혈관과 매우 근접한 환경을 제공할 수 있게 한 세포칩을 제공한 것을 특징으로 한다. 본 발명에서는 상기와 같은 세포칩을 저가에 용이하게 제작할 수 있고, 또한 장치 자체의 부피가 작아 소형화가 가능하며, 포함되는 채널의 디자인을 용이하게 변경할 수 있다는 장점을 가진다. 또한, 복수의 채널 내부 환경을 서로 상이하게 구현하거나, 채널 각각에 상이한 시료를 주입함으로써, 상이한 표적물질 및/또는 환경에 따른 세포-세포 상호작용을 한 번에 신속하고 정확하게 검출할 수 있다. 또한, 별도의 동정 및 배양 과정을 생략하고도, 생체 내에서 분리된 소량의 전혈(whole blood)로도 매우 효율적인 검출이 가능하다는 이점을 가진다. 이에 따라, 본 발명의 생체 유사 세포칩은 질병의 진단 등에 사용되는 세포 기반 유착 분석(cell-based adhesion assay), 및 초고속 약물 스크리닝(High Throughput Screening)을 포함하는 약물 스크리닝 방법 등에 유용하게 사용될 수 있다. 이하 본 발명의 명세서에서, 「생체 유사 세포칩」은 「마이크로유체 시스템」, 「마이크로유체 디바이스」 및 「마이크로구조」와 동일한 의미로 사용될 수 있다.

<33> 이하, 본 발명의 생체 유사 세포칩을 구체적으로 설명한다.

<34> 본 발명의 생체 유사 세포칩은 시료 주입구 및 시료 배출구를 갖는 복수의 마이크로유체 채널을 포함하는 것을 특징으로 한다. 특별히 한정되는 것은 아니지만, 상기 채널들은 기판 상에서 서로 평형하게 배열되어 있는 것이 바람직하다. 상기와 같이 평행하게 배열된 복수의 마이크로유체 채널을 포함하는 결과, 다양한 생체 환경 및/또는 시료에 대한 신속한 동시 분석이 가능하다.

<35> 본 발명에서 상기 마이크로유체 채널을 이루는 재질은 특별히 제한되지 않고, 소프트 리소그래피(soft lithography)에 적용될 수 있는 각종의 소재를 제한 없이 사용할 수 있다. 이러한 소재의 예로는 PDMS(poly(dimethylsiloxane)), PMMA (polymethylmethacrylate), 폴리아크릴레이트, 폴리카보네이트, 폴리사이클릭 올레핀, 폴리이미드 및 폴리우레탄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있고, 생체 유사 환경의 구현 및 세포 부착의 용이성의 관점에서 PDMS를 사용하는 것이 바람직하다.

<36> 또한, 상기 마이크로유체 채널의 형상 역시 특별히 한정되지 않으나, 폭이 1 내지 3 mm이고, 높이가 155 내지 175 ㎛이며, 길이가 1 내지 3 cm인 마이크로유체 채널을 사용하는 것이 바람직하다. 채널의 크기가 상기 범위를 벗어나는 경우, 채널 내벽면에 코팅된 세포 물질의 배양이 곤란하고, 혈관 내 염증 환경 등과 같은 생리학적 유사 모델을 구현하기 어려워질 우려가 있다.

<37> 본 발명의 세포칩의 마이크로유체 채널의 내부에는 세포 물질이 부착되어 있다. 이와 같이 채널 내벽면을 세포 물질을 코팅하고, 후술하는 주입 장치에 의해 전단 응력을 가하여 시료를 주입하면, 생체 내의 환경에 근접한 환경을 구현할 수 있게 된다.

<38> 본 발명에서 사용할 수 있는 세포 물질은 특별히 한정되는 것은 아니나, 인간 제대정맥내피 세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC), 인간 진피미세혈관내피 세포(Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, HDMEC), 정상 인간심장동맥내피 세포 (Normal Human Coronary Artery Endothelial Cells, HCAEC), 인간 제대동맥내피 세포 (Human Umbilical Artery Endothelial Cells, HUAEC), 인간 폐동맥내피 세포 (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells, HPAEC), 인간 폐미세혈관내피 세포(Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells, HPMEC), 인간 대동맥내피 세포(Human Aortic Endothelial Cells, HAoEC), 또는 인간 복재정맥내피 세포(Human Saphenous Vein Endothelial Cells, HSaVEC)와 같은 혈관내피세포; 상피세

포; 대식세포; T 세포 또는 B 세포와 같은 면역세포; 신경세포; CHO와 같은 난소세포; 대장암세포 (Colo) 또는 자궁경부암세포(HeLa)와 같은 암세포; 파골세포(Osteoclast)와 같은 골세포 등을 포함한다. 특히, 혈관내피세포인 것이 바람직하고, HUVEC인 것이 보다 바람직하다.

<39> 본 발명에서는 또한 상기와 같은 세포 물질의 표면에 유착 분자 (adhesion molecule)가 발현되어 있는 것이 바람직하다. 상기와 같은 유착 분자는 혈관내피세포가 존재하는 채널 내부를 특정의 활성화제 (stimulator)로 자극함으로써 발현시킬 수 있다. 본 발명에서는 적절한 활성화제의 선택에 의한 유착 분자의 발현을 통하여, 특정 질병 등의 상황에 따라 다양한 혈관 내부의 생리학적 환경을 구현할 수 있다.

<40> 상기 유착 분자는 면역글로블린 상과 (immunoglobulin superfamily)에 속하는 당단백질(glycoprotein)로서, 세포간의 접촉에 관여하는 중요 물질이다. 유착 분자는 상피 세포, 내피세포 및 대식세포 등에 분포되어 있으며, 알레르기 반응과 같은 염증 반응 시에 사이토카인 등에 의해 유도되어, 세포의 이동성 및 활동성을 매개하거나, 또는 염증 반응을 항진시키는 역할을 한다. 유착 분자는 특히 내피세포에서 염증 초기에 유핵 세포가 내피세포층을 투과하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, 혈소판 또는 백혈구 등은 평소에는 혈관 내피세포에 부착되지 않으나, 염증성 자극이 있어 혈관 내피 세포에 특정 유착 분자(E-셀렉틴, ICAM-1 등)가 활성화된 경우에는 부착 및 통과가 일어나게 된다. 이러한 점을 응용하여, 혈관 내피에서 E-셀렉틴 및 ICAM-1의 발현을 통하여 염증 반응을 유발하는 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 TNF-α(Tumor Necrosis Factor-alpha)로의 처리에 의해 염증 부위의 혈관과 매우 근접한 환경을 채널 내부에 유발시킬 수 있게 된다. 상기 E-셀렉틴 및 ICAM-1과 같은 유착 분자에 의한 내피와 T 세포의 결합은 염증(inflammation) 및 암 전이(cancer metastasis)에 있어서 중요하다. 즉, 상기 유착 분자의 발현에 의하여, 말초혈(peripheral blood)로부터 염증 부위로의 T 세포의 이동(transmigration)이 일어나며, 이러한 내피로의 T 세포의 부착은 염증 뿐만 아니라, 암 치료에서 중요한 의미를 가진다. 추가로, 상기 부착은 숙주 또는 이식된 조직을 바람직하지 않은 방향으로 공격하기 때문에, 자가면역 질환 및 이식 거부에 있어서도 중요한 역할을 한다. 따라서, 예를 들어, 본 발명의 세포칩에서 혈관내피세포로서 HUVEC을 사용하고, 상기 HUVEC에 특정 사이토카인 등으로 E-셀렉틴(E-selectin) 및/또는 ICAM-1(Intercellular adhesion molecule-1)과 같은 유착 분자를 발현시킬 경우에는 염증 부위, 암 부위 및 자가 면역 질환 등에서 일어나는 혈관의 생리학적 환경을 구현할 수 있게 된다.

<41> 이상, 채널 내부에 염증 부위 환경을 구현하는 경우를 주요 예로 들어 설명하였으나, 본 발명에서는 상기 유착 분자 외에도, L-셀렉틴 또는 P-셀렉틴과 같은 셀렉틴 그룹; 또는 ICAM-1, -2 -,3, VCAM-1, LFA-2 (CD2), LFA-3(CD58), 또는 MAdCAM-1과 같은 Ig-superfamily CAMs와 같은 다양한 유착 분자를 적절한 활성화제를 통하여 유착 분자를 발현시켜, 알려진 세포-세포 상호작용에 관계되는 환경을 자유롭게 구현할 수 있음은 물론이다. 상기와 같은 유착 분자는 본 발명의 세포 물질의 10% 이상, 보다 바람직하게는 20 내지 50%의 양으로 발현되어 있는 것이 바람직하다. 상기 발현양이 10% 보다 작으면, 표적 물질을 검출하기 어려워질 우려가 있다.

<42>

<43> 또한, 세포 물질은 접합 매개 물질을 통하여 채널 내부에 부착되어 있는 것이 바람직하다. 이와 같이 접합 매개 물질을 사용함으로써, 채널과 세포와의 결합력을 보다 향상시킬 수 있다. 이와 같은 접합 매개 물질의 예로는 폴리-L-리신, 피브로넥틴(fibronectin), 젤라틴 (gelatin), 및 콜라겐 (collagen)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기와 같은 매개 물질은 채널과 세포 사이에서 단일층으로 구성되어 있을 수 있으며, 또한 별개의 물질로 구성되는 복수의 층으로 존재할 수 있다.

<44> 본 발명의 세포칩은 또한 마이크로유체 채널의 내부로 전단 응력을 가하여 시료를 주입할 수 있는 시료 주입 장치를 포함한다.

<45> 본 발명에 사용된 용어 “시료”는 특별히 한정되지 않으나, 혈액으로부터 분리된 T 세포와 같은 특정 세포와 전혈(whole blood)을 포함한다. 특히 별도의 동정 과정 없이 사용할 수 있다는 점에서 전혈이 바람직하다. 특히 전혈을 사용하는 경우 Phosphate Buffered Salin (PBS)나 Dulbecco`s Phosphate Buffered Salin (DPBS)와 같이 saline이 포함된 버퍼로 2 ~ 60 배로 희석하여 사용하는 것이 바람직하다.

<46> 본 발명에서는 상기와 같은 장치를 사용하여, 혈관의 생리학적 상태와 동일한 전단 응력을 가하여 시료를 채널 내부로 주입할 수 있게 된다. 이에 따라 본 발명에서는 숙주로부터 분리된 소량의 전혈을 시료로 사용

하고도, 별도의 동정 및/또는 배양 공정 없이도, 시료 분석을 수행할 수 있게 된다. 상기와 같은 시료 주입 장치의 예로는 주사기(syringe)를 들 수 있으나, 시료에 전단 응력을 가할 수 있도록 구성된다면 특별히 한정되는 것은 아니다.

<47> 본 발명의 세포칩에는 또한, 채널 내부로부터 발생되는 신호를 검출할 수 있는 측정 장치를 추가로 포함하는 것이 바람직하다. 일반적으로 표적 물질의 검출 방법에서는 표적 물질 또는 유착 분자를 형광 물질 또는 방사선 동위 원소 등으로 표지(labelling)하게 되는데, 본 발명의 세포칩은 상기 표지 물질로부터 방출되는 신호를 검출하기 위한, 광학 측정 장치 등의 측정 장치를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 이와 같은 측정 장치의 예로는 광학 현미경, 형광 현미경 또는 공초점 현미경 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<48> 도 8을 참조하여 본 발명에 따른 세포칩의 일 구현예를 설명하면 하기와 같다. 도 8은 본 발명에 따른 세포칩 중 염증모델 면역시스템을 도시한 것이다. 왼쪽에서 내피세포나 내피세포와 함께 염증자극을 주입하고 주입된 내피세포는 각 챔버에서 배양한다. 아래쪽에서 다수의 주입기로 T 세포를 포함하는 전혈을 주입할 수 있으며, 위쪽에는 약물 처리 챔버를 제작하여 각각의 U 채널 안에서 전혈에 포함된 T 세포는 서로 다른 약물이나 다른 농도에 의해 처리되게 된다. 이러한 염증모델 면역시스템을 이용하면, 약물처리를 받은 T 세포와 그렇지 않은 T 세포가 내피세포와 어떤 결합의 차이를 보이는지를 실시간으로 측정할 수 있게 된다. 상기 실시예는 내피세포와 T 세포 사이의 결합을 이용한 염증모델 시스템 칩이며, 내피세포 대신 암세포를 주입하면 다양한 면역조절제에 의해 처리된 T 세포와 암세포사이의 반응을 실시간으로 관찰할 수 있다.

<49>

<50> 본 발명은 또한,

<51> 세포 물질을 마이크로유체 채널에 주입하는 제 1 단계;

<52> 채널 내부에서 세포 물질을 배양시키는 제 2 단계; 및

<53> 배양된 세포 물질을 활성화제로 처리하여, 유착 분자를 발현시키는 제 3 단계를 포함하는 생체 유사 세포칩의 제조 방법에 관한 것이다.

<54> 본 발명의 제 1 단계는 HUVEC과 같은 혈관내피세포를 마이크로유체 채널 내부에 주입하여, 배양을 준비하는 단계이다. 본 발명의 제 1 단계에서 사용되는 마이크로유체 채널은 소프트 리소그래피법을 사용하여 제조하는 것이 바람직하다. 소프트 리소그래피는 소프트 몰드(soft mold)를 사용하여 패턴을 제작하는 방법으로, 용이하고 저렴하게 패턴의 형성이 가능하며, 넓은 면적 및/또는 평평하지 않은 표면에 대해서도 신속하게 패턴을 형성할 수 있다는 이점을 가진다. 소프트 리소그래피에서 가장 중요한 요소는 탄성 스탬프(elastomeric stamp), 몰드 및 마스크이다. 본 발명에서 사용될 수 있는 엘라스토머의 예로는 PDMS (poly(dimethylsiloxane)), PMMA (polymethylmethacrylate), 폴리아크릴레이트, 폴리카보네이트, 폴리사이클릭 올레핀, 폴리이미드 및 폴리우레탄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있다. 본 발명에서는 상기 중 PDMS를 사용하는 것이 특히 바람직한데, PDMS는 첫째, 상대적으로 넓고, 평탄하지 않은 영역으로의 안정적인 점착이 가능하고, 둘째, 계면 자유 에너지 (interfacial free energy)가 낮아 몰딩 시에 접착이 방지되며, 셋째, 내구성이 우수하다는 장점을 가져, 몰딩 후 스탬프가 장기간 안정적인 상태를 유지할 수 있게 된다. 본 발명에서 상기와 같은 소재를 사용하여, 마이크로유체 채널을 제작하는 구체적인 방법 및 조건은 특별히 한정되지 않고, 이 분야의 통상의 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 예를 들면, 전자빔 또는 UV 등의 에너지원으로 패턴을 형성한 마스크를 이용하여 엘라스토머 프리폴리머를 주조 및/또는 경화시켜 얻을 수 있다. 이때 형성되는 바람직한 마이크로채널의 규격은 전술한 바와 같다.

<55> 본 발명의 제 1 단계에서는 상기와 같이 제조된 마이크로유체 채널 내부로 세포 물질을 주입한다. 이때 주입되는 세포 물질을 구체적인 종류는 전술한 바와 같다. 본 발명의 방법에서는 상기와 같이 세포 물질을 주입하기 전에, 채널 내부에 폴리-L-리신, 피브로넥틴(fibronectin), 젤라틴 (gelatin) 및 콜라겐 (collagen)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 접합 매개 물질을 코팅하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

<56> 본 발명의 제 1 단계에서 주입되는 혈관내피세포의 양은 1×10^6 내지 4×10^6 cell/ml인 것이 바람직하다. 그러나 상기 주입 농도는 본 발명의 일 태양에 불과하며, 본 발명에서는 목적하는 세포칩의 환경에 따라서 상기 농도를 자유롭게 변경할 수 있다.

<57> 본 발명의 제 2 단계는 제 1 단계에서 주입된 HUVEC을 채널 내부에서 배양시키는 단계이다. 이때의 배양 조건은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, 가습 배양기(humidified incubator)와 같은 통상의 수단을 사용

하여, 30 내지 40℃의 온도에서, 20 내지 28 시간 동안 수행될 수 있다.

<58> 본 발명의 제 3 단계는 상기에서 배양된 HUVEC을 활성화제로 처리하여, 표면에 유착 분자를 활성화시키는 단계이다. 본 발명에서 사용될 수 있는 활성화제의 예로는, TNF-α(Tumor Necrosis Factor-alpha), 인터류킨-1 인터류킨-1α, 인터류킨-1β, 인터류킨-2, 인터류킨-6, 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide, LPS) 및 인터페론 감마(Interferon-gamma)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 제 3 단계에서 활성화제의 처리 농도, 시간 및 온도 등의 조건은 특별히 한정되지 않는다. 또한, 상기 처리 농도 및/또는 시간을 다르게 조절하여, 각각의 채널별로 서로 상이한 내부 환경이 유발되도록 제어할 수 있음은 물론이다.

<59> 본 발명은 또한,

<60> (1) 표적 물질을 포함하는 시료를 특정의 식으로 계산되는 전단 응력이 1 내지 4 dyn/cm^2가 되도록 마이크로유체 채널 내부로 통과시키는 단계; 및

<61> (2) 채널 내부로부터 방출되는 신호를 검출하여, 표적 물질 및 혈관내피세포의 결합을 측정하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 세포칩을 사용한 세포 기반 유착 분석 (cell-based adhesion assay) 방법에 관한 것이다.

<62>

<63> 본 발명은 또한,

<64> (A) 약물 후보 물질로 시료를 처리하는 단계;

<65> (B) 약물 후보 물질로 처리된 시료를 특정의 식으로 계산되는 전단 응력이 1 내지 4 dyn/cm^2가 되도록 마이크로유체 채널 내부로 통과시키는 단계; 및

<66> (C) 채널 내부로부터 방출되는 신호를 검출하여, 약물 후보 물질로 처리된 시료 및 혈관내피세포의 결합을 측정하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 세포칩을 사용한 약물 스크리닝 (drug screening) 방법에 관한 것이다.

<67> 전술한 바와 같이 본 발명의 세포칩의 마이크로유체 채널은 혈관 내의 생리학적 환경에 근접한 상태로 제작되어 있다. 이에 따라 본 발명의 세포칩을 사용할 경우에, 전통적인 유착 분석법에서 필수적으로 수행되던, 목적 물질의 동정 및/또는 배양 과정을 생략하고, 전혈과 같은 시료를 소량 사용하면서도, 신속하고 효율적인 분석이 가능하다. 이에 따라, 본 발명의 세포칩은 특정 질병의 진단 등을 목적으로 하는 세포 기반 유착 분석 및/또는 특정 질병의 치료를 목적으로 하는 약물 스크리닝 방법 등에 효율적으로 적용될 수 있다.

<68> 본 발명의 방법에서는 유착 분석 방법의 단계 (1) 또는 약물 스크리닝 방법의 단계 (B)에서 시료를 마이크로유체 채널 내부로 주입할 때, 시료에 1 내지 4 dyn/cm^2의 전단 응력이 가해지도록 하는 것을 특징으로 하며, 상기 전단 응력은 하기 수학식 1에 의해 계산된다.

<69> [수학식 1]

<70> $A = 6Q\eta/wh^2$

<71> 상기 식에서 A는 채널의 벽에 가해지는 전단응력(wall shear stress)이고, Q는 채널에 주입되는 유체의 속도이며, w는 채널의 폭이며, h는 채널의 높이이고, η는 37℃에서의 시료의 점도를 나타낸다.

<72> 상기 제시된 전단 응력은 혈관 내 혈액에 가해지는 생리학적 전단 응력 (physiological shear stress)에 근접한 값이며, 이와 같은 전단 응력을 가하여 시료를 주입함으로써, 전혈과 같은 시료를 소량 사용할 때에도, 전통적인 유착 분석 또는 약물 스크리닝법에서 반드시 수행되던, 동정 및/또는 배양 과정을 생략하면서도, 정확하고 신속한 분석이 가능하게 된다.

<73> 이하, 혈관내피세포로서 E-셀렉틴 및/또는 ICAM-1을 발현하는 HUVEC을 사용하여, 염증 모델을 구현한 경우를 예로 들어, 본 발명의 유착 분석 방법 및 약물 스크리닝 방법의 일 태양을 설명한다.

<74> 본 발명의 유착 분석 방법(또는 약물 스크리닝 방법)의 원리는 염증,자가 면역 질환 또는 암 환자의 체내의 생리학적 환경을 칩 내부에 구현하고, 상기 내부 환경에서의 표적 물질과 혈관내피세포(HUVEC)의 결합 정

도를 측정함으로 질병의 진단 또는 약물의 스크리닝을 수행하는 것이다.

<75> 예를 들어, 염증과 같은 특정 환경 하에서 발현되는 E-셀렉틴 및 ICAM-1과 같은 유착 분자는 활성화된 T 세포가 발현하는 LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1)과 부착한다. 이에 따라, 본 발명의 세포칩 내부에 상기와 같은 유착 분자를 활성화시킨 후, 시료를 주입하여 T 세포의 결합 정도를 측정함으로써, 질병의 진단을 수행할 수 있게 된다.

<76> 또한, 본 발명의 세포칩은 약물 스크리닝에도 유용하게 사용될 수 있다. 예를 들면, 자가 면역 질환 및 이식 거부의 치료를 위해 임상적으로 사용되고 있는 약물인 사이클로스포린 A (CsA; cyclosporin A), 라파마이신(rapamycin) 및 타클로리무스 (tacrolimus; FK 506)와 같은 면역 억제제(immunosuppressive agent)는 세포내 단백질 (intracellula protein, immunophilins)과 결합하고, 활성화된 T 세포에서 인터류킨-2의 생산을 감소시키는 칼시뉴린 신호 (calcineurin signaling) 억제를 통하여 T 세포의 활성화를 억제한다. 이와 같이 활성화가 억제된 T 세포는 혈관내피세포와의 결합력이 감소하게 되는데, 이와 같이 약물로 처리된 대상 시료의 결합력의 변화를 측정함으로써, 약물 후보 물질의 스크리닝을 수행할 수 있게 된다.

<77>

<78> 이상, 본 발명의 세포칩에 염증 모델이 구현된 경우를 예로 들어, 본 발명을 구체적으로 설명하였으나, 본 발명에서는 혈과내피세포, 유착 분자의 발현량, 종류 및/또는 대상 시료를 자유롭게 변경하면서, 다양한 질병의 진단 및 약물 스크리닝에 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서는 각각의 질병 상태에 따라서 혈관내피세포, 활성화제, 유착 분자 및/또는 전단 응력값 등의 변경을 통하여, 채널 내부의 환경을 조절할 수 있고, 이와 같은 조절의 방법은 특별히 한정되지 않는다. 즉, 이 분야의 평균적 기술자는 특정 세포-세포 상호작용에 관여하는 물질, 및 세포칩 제조의 목적에 따라 상기 환경을 용이하게 구현할 수 있다. 이와 같은 본 발명의 세포칩이 적용될 수 있는 질병의 예로는, 염증 질환, 자가 면역 질환, 전신성 홍반성 낭창, 류마티스 관절염, 및 전신 경화증 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<79>

실 시 예

<80> 이하 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

<81> 실시예 1

<82> 마이크로유체 채널의 제조

<83> 생체 모델 세포칩을 소프트 리소그래피를 통하여, PDMS를 사용하여 제작하였다. 구체적으로는, 165 ㎛ 높이의 채널을 얻기 위하여, SU-8 2050 음성 포토레지스트(MicroChem Corp(제))를 1000 rpm에서 30초 동안 Si 웨이퍼 상에 스핀코트하고, 이어서 예비 베이킹하였다. 그 후, 20000 dpi의 고해상도 프린터(Han and All Tech(제))를 사용하여 투명 마스크를 제조하고, 이를 365 nm의 UV 하에서 SU-8 상에 패턴을 형성하는데 사용하였다. 이어서 다시 한 번 베이킹하고, 미결합 감광제를 제거하였다. 그리고, PDMS 프리폴리머 및 경화제의 혼합물(PDMS 프리폴리머:경화제=10:1)을 웨이퍼 상에 도포하였다. 기포를 제거하고, 80℃에서 2 시간 동안 PDMS를 경화시켜, 채널을 제작하고, 블런트 엔드 니들(blunt-end needle)을 사용하여 시료 주입구 및 시료 배출구를 형성시켰다. 그 후 제작된 PDMS 표면 및 커버 글래스를 플라즈마 클리너 (Harrick Plasma, NY, USA)에 위치시키고, 18W로 1분 동안 산화시켰다. 이어서 플라즈마 처리된 채널 및 커버 글래스를 즉시 결합시켜, 마이크로유체 채널을 제조하였다. 제조된 장치는 양끝에 시료 주입구 및 배출구가 형성되어 있고, 폭은 2 mm, 높이는 165 ㎛, 길이는 2 cm였다.

<84>

<85> 내피 세포의 배양

<86> 배양에 사용된 HUVEC는 Clonetics (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. HUVEC는 2% FBS (Fetal Bovine Serum), 하이드로코티손 (hydrocortisone), hFGF (human Fibroblast Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), 아스코르브산, hEGF (human Epidermal Growth Factor), 젠타아미신-암포테리신 (Gentamicin-Amphotericin) 및 헤파린으로 보충된 배지(endothelial basal medium-2)를 사용하여 37℃ 인큐베이터에서 배양시켰다.

<87> 생체 유사 세포칩의 제조

<88> 생체 유사 염증 시스템에 사용될 세포칩은 도 1에 나타난 바와 같이 제조하였다. 구체적으로, 0.1 mg/ml 폴리-L-리신 및 50 ㎍/ml 피브로넥틴으로 채널의 바닥을 이중 코팅하여, 세포 부착을 위한 매트릭스를 형성시켰다. 배양된 HUVEC은 trypsin-verene 혼합물 (Cambrex Bio Science Walersville, MD, USA)을 사용하여 배양 용기로부터 분리하고, EGM-2 배지로 재분산시켰다. 재분산된 HUVEC을 1 ml의 1회용 주사기를 사용하여 3 × 10^6 cells/ml의 밀도로 마이크로유체 채널 내로 주입하고, 가습 배양기 (humidified incubator, 37℃ 및 5% CO_2)에서 밤새 배양하였다. 각각의 채널에서 HUVEC에 상이한 부착 분자를 발현시키기 위하여, 10 ng/ml TNF-α (Bio Vision(제))로 4시간 및 16시간을 처리하여, E-셀렉틴 및 ICAM-1을 각각 발현시켰다.

<89> 시험예 1. 세포칩 내에서의 면역세포화학

<90> 세포칩 내에서 E-셀렉틴 및 ICAM-1의 발현을 면역세포화학으로 확인하였다. 구체적으로 TNF-α로 처리된 HUVEC을 PBS로 세척하고, 상온에서 15분 동안 3.7% 포름알데히드(Sigma(제))를 사용하여 고정시켰다. 이어서, 투과화(permeabilization) 공정을 수행하고, 실온에서 1 시간 동안 1% BSA 용액으로 처리하여, 비특이적인 결합을 방지하였다. E-셀렉틴 및 ICAM-1의 발현은 형광물질로 표지된 단일클론 항체를 사용하여 관찰하였고, 항체 처리 후에, 1 ㎍/ml의 DAPI 시약으로 염색하였다. 구체적으로, E-셀렉틴 및 ICAM-1에 대한 단일클론 항체를 플루오레세인(fluorescence)으로 표지하여, 3 dyn/cm^2의 전단 응력으로 마이크로채널 내로 주입하였다. 모든 시약의 주입은 주사기 펌프를 사용하여 3 dyn/cm^2의 전단 응력으로 수행되었다. 첨부된 도 2는 상기와 같은 방법으로 측정한 채널 내의 형광 이미지(fluorescence image)를 나타내는 도면이다. 도 2(A) 및 (C)는 미처리된 HUVEC, 도 2(B)는 활성화된 E-셀렉틴을 포함하는 HUVEC, 도 2(D)는 활성화된 ICAM-1을 포함하는 HUVEC의 경우을 나타낸다. 도 2로부터 알 수 있는 바와 같이, 유동 스트림(flow stream)을 갖는 본 발명의 세포칩 내부에서도, 기존 세포 기반 유착 분석 방법에서와 같이, TNF-α 자극에 따른 유착 분자의 활성화를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 발명의 세포칩 내부에서 HUVEC을 배양 및 활성화하는 것이 가능하다는 점을 나타낸다.

<91> 시험예 2. 세포 기반 유착 분석의 수행

<92> (1) Jurkat 세포 배양

<93> 암세포화된 Jurkat T 세포는 10% FBS, 1% L-글루타민 (L-glutamine) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 (penicillin-streptomycin) (BioWhittaker(제))을 함유하는 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium [BioWhittaker(제)])를 사용하여 37℃ 인큐베이터에서 배양시켰다.

<94> (2) 정적 상태에서의 유착 분석

<95> 본 발명에 따른 유착 분석법의 우수성을 확인하기 위하여, 우선 전통적인 기법에 의한 유착 분석을 수행하였다. 구체적으로는, HUVEC을 커버 글래스 상에서 배양하고, TNF-α로 활성화시켰다. 활성화된 HUVEC 상에 10 ng/ml의 PMA 및 1 ㎛M의 이오노마이신(ionomycin)으로 처리한 활성화된 Jurkat T 세포를 calcein-AM으로 표지 후 적재하고, 1 시간 동안 배양하였다. PBS 세척 후에, 부착 T 세포를 형광 현미경으로 관찰하고, 이를 도 3에 나타내었다. 도 3(A)는 활성화되지 않은 HUVEC, 도 3(B) 및 도 3(C)는 각각 E-셀렉틴 및 ICAM-1을 발현하고 있는 HUVEC의 경우를 나타내는 도면이다. 도 3으로부터 알 수 있는 바와 같이 유착 분자를 발현하고 있는 HUVEC 상에서 더 많은 T 세포가 검출되었다. 동일한 세척 조건에서도, E-셀렉틴을 발현하는 HUVEC보다 ICAM-1을 발현하는 HUVEC에서 더 많은 T 세포가 관찰되었는데, 이는 T 세포와 ICAM-1과의 상호작용이, E-셀렉틴과의 상호 작용에 비하여 더 강한 결합력을 나타내기 때문이다.

<96> (3) 생체 유사 세포칩을 사용한 유착 분석

<97> 생리학적 환경에 근접한 환경을 제공하는 본 발명의 세포칩 내부에서의 결합을 분석하기 위하여, 실시예 1에서 제조된 세포칩을 사용하여 분석을 수행하였다. 구체적으로, 활성화된 T 세포를 표지하여, 3 dyn/cm^2의 전단응력으로 채널 내부에 주입한 후, 즉시 세정하였다. 이 때 마이크로유체 채널 내의 HUVEC을 활성화시키지 않은 채널(대조 채널군) 및 활성화시킨 채널에 상기 T 세포를 각각 주입하였다. 첨부된 도 4는 각각의 마이크로유체 채널 내부에서 방출되는 신호를 형광 이미지 및 공초점 현미경으로 측정한 도면이다. 도 4(A) 및 (D)는 유착 분자가 활성화되지 않은 HUVEC, 도 4(B) 및 (E)는 E-셀렉틴을 발현한 HUVEC, 도 4(C) 및 (F)는 ICAM-1을 발현하고 있는 HUVEC의 경우를 나타낸다. 도 4로부터 알 수 있는 바와 같이, 유착 분자가 발현되지 않은 HUVEC의 경우, T 세포의 부착이 관찰되지 않았으나, 유착 분자를 발현하고 있는 HUVEC의 경우에는 유동 조

건에서도 T 세포의 부착이 관찰되었다.

<98>

<99> (4) SLE 진단 실험

<100> 정상인 및 SLE 환자의 전혈(whole blood)을, 별도의 동정 공정 없이 그대로 세포칩의 마이크로유체 채널 내부로 3 dyn/cm^2의 전단응력을 가하여 주입하였다. 또한, 활성화된 Jurkat 세포가 대조 실험군으로서 사용되었으며, 각각의 시료에서 동일한 수의 세포(2×10^5 cells)가 마이크로유체 채널 내부로 주입되었다. 첨부된 도 5은 상기와 같이 시료를 주입한 마이크로유체 채널 내의 형광 이미지를 나타낸다. 도 5에서 기본 T 세포는 FITC가 결합된 CD3 항체를 사용하여 측정하였다. 도 5(A) 및 (E)는 대조 실험군으로 사용된 활성화된 Jurkat 세포, 도 5(B) 및 (F)는 정상인의 전혈을 각각 미자극 HUVEC 및 TNF-α로 자극된 HUVEC에 주입한 경우, 도 5(C) 및 (D)는 SLE 환자의 전혈을 미자극 HUVEC에 주입한 경우, 도 5(G) 및 (H)는 SLE 환자의 전혈을 TNF-α 자극된 HUVEC에 주입한 경우를 나타내는 도면이다. 도 5으로부터 알 수 있는 바와 같이, 정상인의 전혈 내의 기본 T 세포와 비교하여, SLE 환자의 경우가 TNF-α로 자극된 내피 세포로 많이 부착되었고, 그 원인은 SLE 환자의 기본 T 세포(primary T cell)의 경우 별도의 자극이 없이도 큰 활성을 가지기 때문이다. 이상의 시험결과는 본 발명의 세포칩을 사용할 경우, 별도의 동정 공정이 없이 전혈 내의 기본 T 세포의 내피 세포로의 부착을 검출할 수 있다는 점, 그리고 본 발명의 마이크로 스케일의 장치가 염증 부위 혈관 환경과 매우 근접한 환경을 제공할 수 있다는 점을 나타낸다.

<101>

<102> 시험예 3. 약물 스크리닝 시험

<103> 본 발명의 생체 유사 세포칩이 약물 스크리닝 시스템에 적합하다는 것을 확인하기 위하여, 면역억제제로 처리된 조건 하에서의 결합력을 관찰하였다. 구체적으로는, 마이크로유체 채널 내부의 HUVEC을 활성화시키면서, 암세포화시킨 T 세포인 Jurkat T 세포(2×10^6 cells)를 완전 배지(complete media)에서 10 ng/ml의 PMA(Phorbol Myristate Acetate, Sigma(제)) 및 1 μM의 이오노마이신으로 37℃에서 1 시간 동안 활성화시켰다. 동시에, Jurkat T 세포의 활성화를 억제하기 위하여, 별도의 Jurkat T 세포(2×10^6 cells)를 완전 배지에서 10 ng/ml의 PMA, 1 μM의 이오노마이신, 10 nM의 타클로리무스(tacrolimus) 및 1 μg/ml의 사이클로스포린 A로 37℃에서 1 시간 동안 처리하였다. 모든 세포는 완전 배지에서 1 μM의 calcein-AM (Invitrogen, OR, USA)로 37℃에서 15분 동안 표지하였다. 활성화된 T 세포 및 약물로 처리된 T 세포를 HUVEC 단일층에 부착하기 위하여 3 dyn/cm^2로 주입하였다 (2×10^5 cells/channel). 주입 후 즉시, 미부착 T 세포는, 동일한 전단 응력 조건에서, PBS 세정을 통해 제거하였다. 활성화된 T 세포 및 약물 처리된 T 세포와 HUVEC의 부착은 공초점 현미경(LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Inc(제))으로 측정하였다. 첨부된 도 6는 상기와 같이 측정된 상태를 나타내는 도면이다. 도 6(B) 및 6(E)는 E-셀렉틴이 발현한 HUVEC, 도 6(C) 및 6(F)는 ICAM-1을 발현한 HUVEC의 경우를 나타낸다. 도 5로부터 알 수 있는 바와 같이, 약물로 처리된 T 세포의 경우 유착 분자를 발현하고 있는 HUVEC과의 결합력을 상실하였다. 이러한 결과는 본 발명의 세포칩이 대상 질병에 따른 채널 내부의 환경을 조절함에 의하여, 목표 약물의 스크리닝에 우수하게 적용될 수 있음을 나타낸다.

<104> 시험예 4. SLE, 전신경화증에 대한 약물스크리닝 시험

<105> 본 발명의 생체 유사 세포칩이 전혈을 이용한 약물 스크리닝 시스템에 적합하다는 것을 확인하기 위하여, 일반인, 전신성 홍반성 낭창(SLE) 환자 그리고 전신 경화증 환자의 전혈에 존재하는 백혈구를 면역억제제로 처리된 조건 하에서의 결합력을 관찰하였다. 구체적으로는, 마이크로유체 채널 내부의 HUVEC을 활성화시키면서, 일반인과 환자의 전혈에서 각각 백혈구(2×10^5 cells)를 취하여 DPBS (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline)로 희석하였다. 동시에, T 세포의 활성화를 억제하기 위하여, 이들의 전혈에서 백혈구($2\times10^5$ cells)를 취하여 DPBS (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline)에 10 nM의 타클로리무스(tacrolimus) 및 1 μg/ml의 사이클로스포린 A로 37℃에서 1 시간 동안 처리하였다. 일반인, 환자의 전혈 및 이들의 약물로 처리된 전혈을 HUVEC 단일층에 부착하기 위하여 3 dyn/cm^2로 주입하였다 (2×10^5 cells/channel). 주입 후 즉시, 미부착 T 세포는, 전단 응력 조건을 조정하면서(0.5~3 dyn/cm^2) PBS 세정을 통해 제거하였다. 전혈 및 약물 처리된 전혈과 HUVEC의 부착은 공초점 현미경(LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Inc(제))으로 측정하였다. 첨부된 도

7는 상기와 같이 측정된 상태를 나타내는 도면이다. 도 7은 ICAM-1을 발현한 HUVEC의 경우를 나타낸다. 도 7(B)로부터 알 수 있는 바와 같이, 환자의 전혈에 존재하는 T 세포의 경우 유착 분자를 발현하고 있는 HUVEC과의 결합력이 일반인의 전혈에 존재하는 T 세포 (A)에 비하여 증가된 상태를 알 수 있다. 반면에, 도 7 (C)로 미루어 보아 환자의 T 세포가 갖고 있는 유착 분자와의 결합력이 면역 억제 약물 처리에 의하여 상실됨을 알 수 있다. 이러한 결과는 본 발명의 세포칩이 대상 질병에 따른 채널 내부의 환경을 조절함에 의하여, 목표 약물의 스크리닝에 우수하게 적용될 수 있음을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

<106> 도 1은 인체 내 혈관 및 본 발명의 일 태양에 따른 생체 유사 세포칩의 모식도이다.

<107> 도 2는 마이크로유체 채널 내부에서 발현된 E-셀렉틴 및 ICAM-1의 발현 상태를 면역세포화학으로 측정한 결과를 나타내는 도면이다.

<108> 도 3은 종래의 유착 분석 방법으로 측정한 T 세포 및 HUVEC의 부착 상태를 나타내는 도면이다.

<109> 도 4는 본 발명의 일 태양에 따른 마이크로유체 채널 내에서 T 세포 및 HUVEC의 부착 상태를 나타내는 도면이다.

<110> 도 5는 정상인 및 SLE 환자의 전혈을 시료로 하여 본 발명의 일 태양에 따른 세포칩으로 세포-세포 상호작용을 측정한 결과를 나타내는 도면이다.

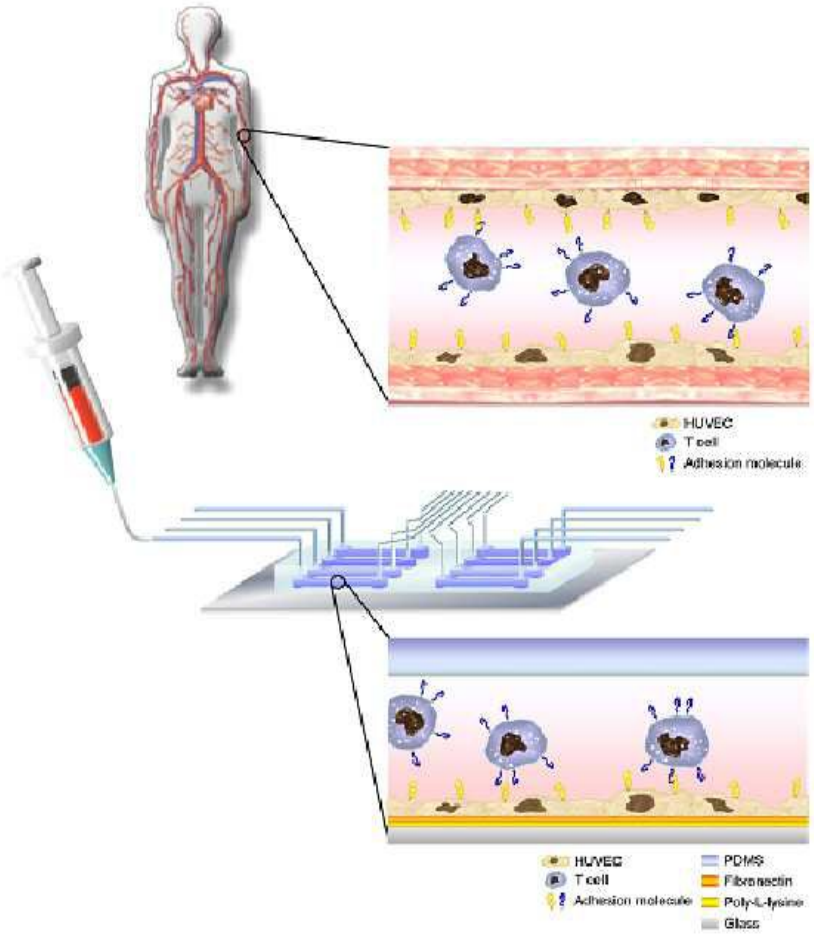
<111> 도 6는 약물로 처리된 T 세포와 미처리 T 세포의 마이크로유체 채널 내부에서의 결합 상태를 나타내는 도면이다.

<112> 도 7은 전신경화증에 대한 약물스크리닝 시험 결과를 도시한 도면이다.

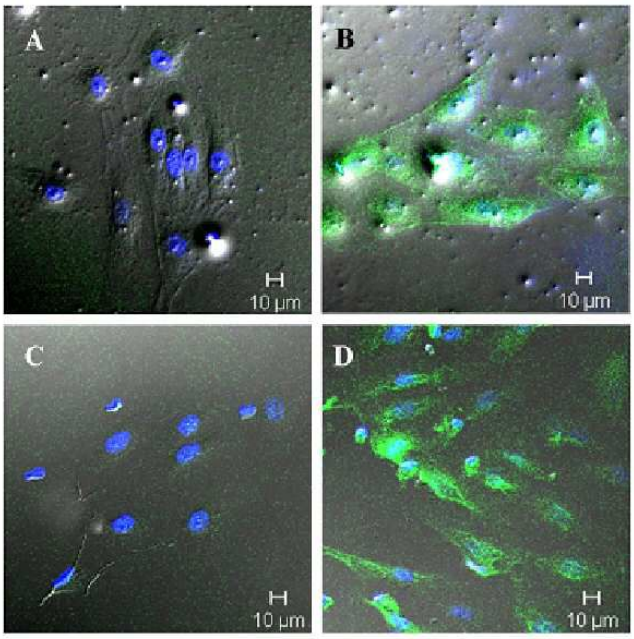
<113> 도 8은 약물 처리에 의한 T 세포와 내피세포 사이의 결합을 측정할 수 있는 염증모델 면역시스템 칩의 개념도이다.

도면

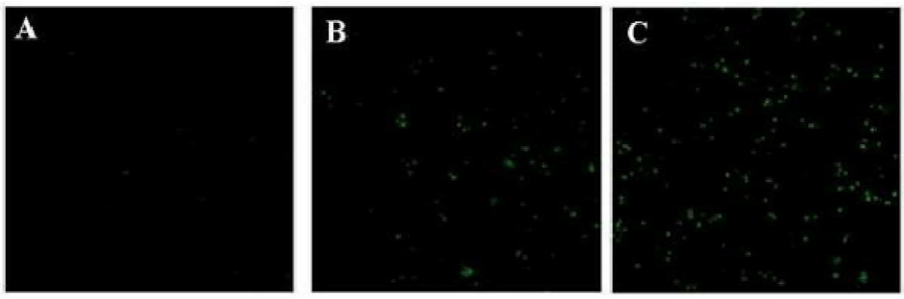
도면1


HUVEC
T cell
Adhesion molecule
HUVEC
T cell
Adhesion molecule
PDMS
Fibronectin
Poly-L-lysine
Glass

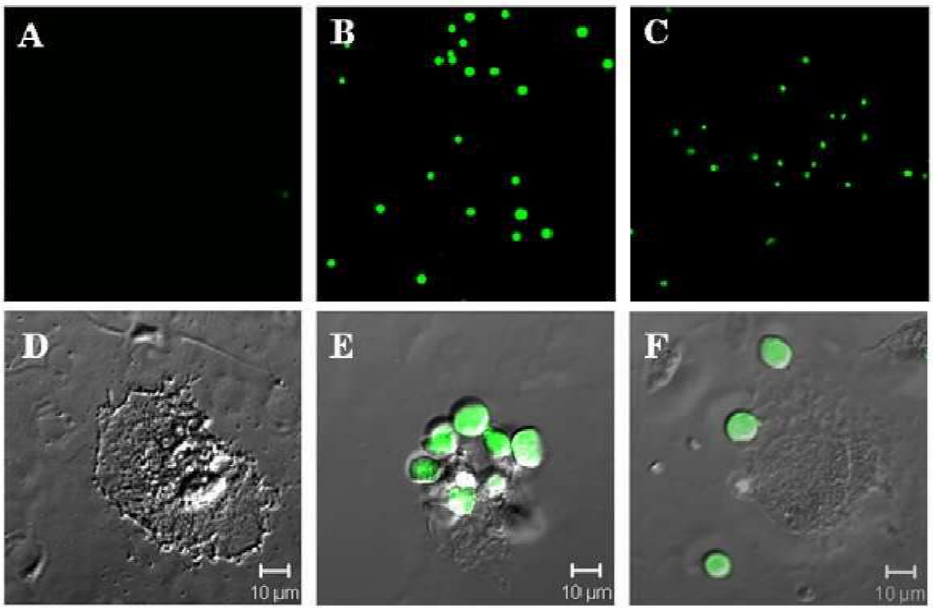
도면2



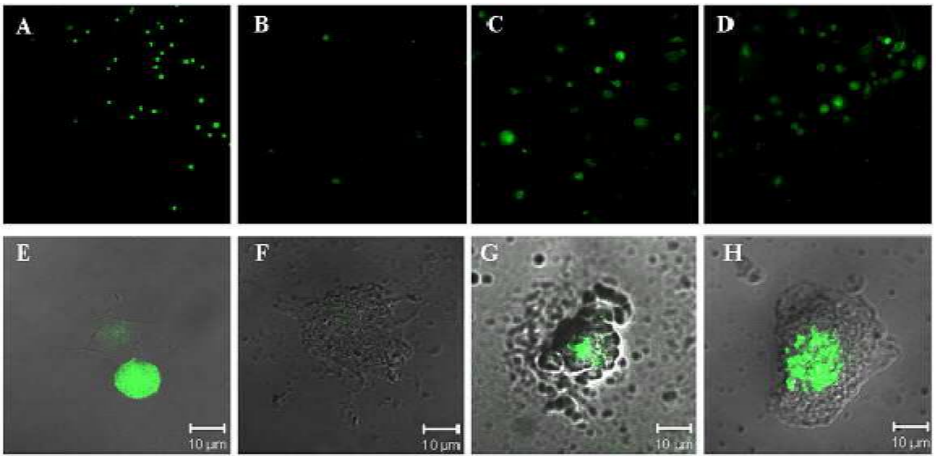
도면3



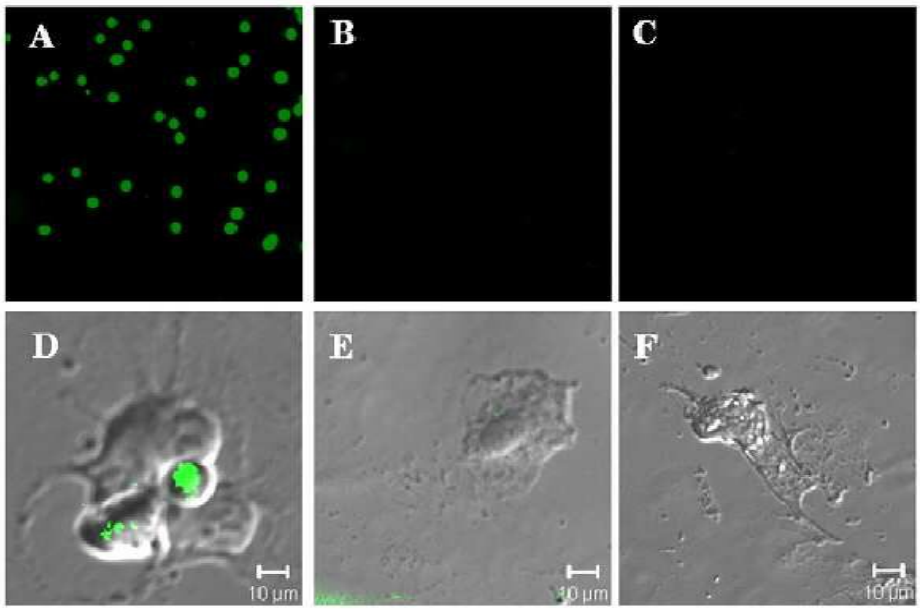
도면4



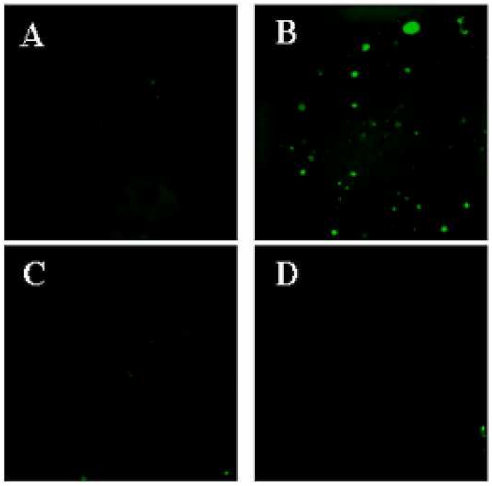
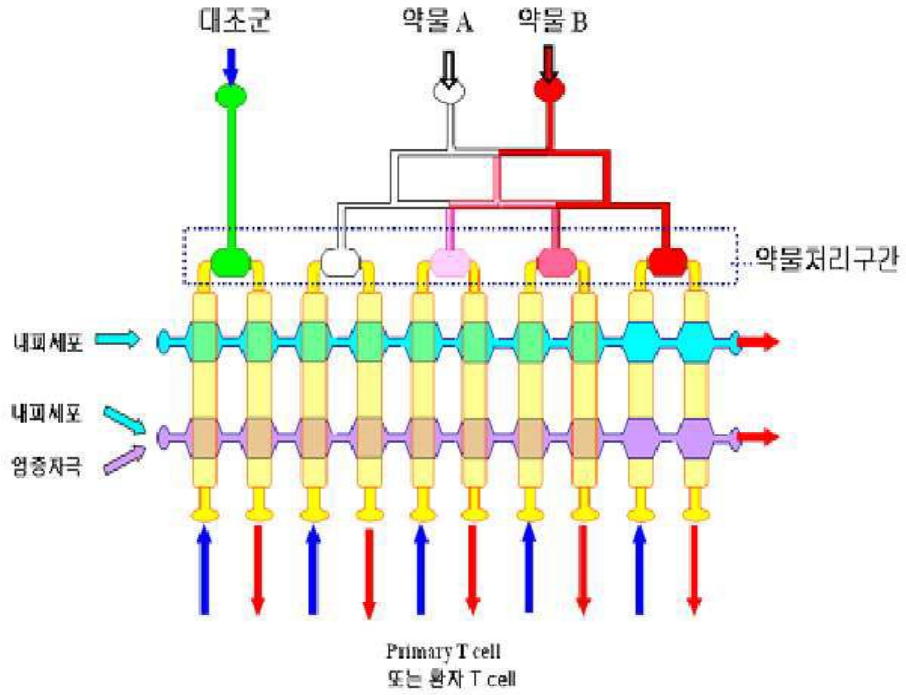
도면5



도면6



도면7



도면8