



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0041652
(43) 공개일자 2019년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) C01B 32/198 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/20 (2013.01)
C01B 32/198 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2017-0133128
(22) 출원일자 2017년10월13일
심사청구일자 2017년10월13일

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
기초과학연구원
대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)
(72) 발명자
김대형
인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28 103동 1005호
현택환
서울특별시 강남구 남부순환로 2803 도곡동삼성래미안아파트 108동 104호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강문호

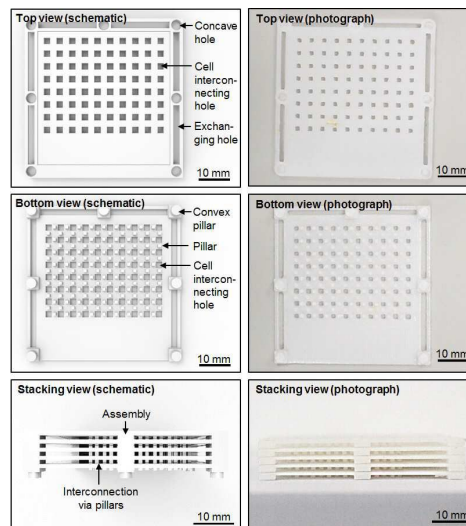
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양 기판

(57) 요약

세포 배양 기판이 제공된다. 상기 세포 배양 기판은 그래핀 산화물이 코팅된 고분자 기판을 포함한다. 상기 세포 배양 기판은 쉽게 적층될 수 있어 세포의 대량 배양에 적합하고, 다층으로 적층되어도 높은 세포 생존력을 유지할 수 있다. 세포 배양 기판에 코팅된 그래핀 산화물은 세포의 접착력을 향상시켜 세포 접착 보조제의 사용을 회피할 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

김석주

서울특별시 강동구 상일로11길 25 724동 401호(상
일동, 고덕주공아파트)

김재민

서울특별시 송파구 토성로 38-6, 103동 601호

조경원

경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46 214동 903호
(식사동, 위시티일산자이2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	IBS-R006-D1-2016-a00
부처명	과학기술정보통신부(전 미래창조과학부)
연구관리전문기관	기초과학연구원
연구사업명	기초과학연구원의부연구단
연구과제명	나노입자의 합성과 의료, 에너지 분야 응용
기 여 율	1/1
주관기관	서울대학교 산학협력단
연구기간	2016.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

그래핀 산화물이 코팅된 고분자 기판을 포함하는 세포 배양 기관.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 고분자 기판은 생체 적합성 고분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 배양 기관.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 세포 배양 기관은 상기 고분자 기판이 2~5개 적층된 것을 특징으로 하는 세포 배양 기관.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 고분자 기판은 가장자리의 상부 및 하부에 각각 형성된 오목부와 볼록부를 갖고,

위에 배치되는 고분자 기판의 하부에 형성된 볼록부가 아래에 배치되는 고분자 기판의 상부에 형성된 오목부에 삽입되는 것을 특징으로 하는 세포 배양 기관.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 고분자 기판은 복수 개의 천공 구멍을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 배양 기관.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 고분자 기판은 3D 인쇄에 의해 형성되고,

상기 그래핀 산화물은 스프레이 방법에 의해 상기 고분자 기판의 표면에 코팅되는 것을 특징으로 하는 세포 배양 기관.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 세포 배양 기관에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

대량 세포 배양은 개인별 세포 치료를 위한 제약 산업과 시험관내 독성 시험을 위한 화장품 산업 등에서 증가하고 있다. 그러나, 종래의 세포 배양 시스템은 센싱 및 작동, 스마트 피드백 제어 및 원위치 배지 교환 시스템을 포함하는 다기능에 한계가 있으며, 저비용 및 공장 규모의 대량 세포 배양에 부적합하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003]

상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 세포 배양에 우수한 세포 배양 기관을 제공한다.

- [0004] 본 발명은 세포를 대량으로 배양하기 위한 세포 배양 기판을 제공한다.
- [0005] 본 발명의 다른 목적들은 다음의 상세한 설명과 첨부한 도면으로부터 명확해 질 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명의 실시예들에 따른 세포 배양 기판은 그래핀 산화물이 코팅된 고분자 기판을 포함한다.
- [0007] 상기 고분자 기판은 생체 적합성 고분자를 포함할 수 있다.
- [0008] 상기 세포 배양 기판은 상기 고분자 기판이 2~5개 적층된 것일 수 있다. 상기 고분자 기판은 가장자리의 상부 및 하부에 각각 형성된 오목부와 볼록부를 갖고, 위에 배치되는 고분자 기판의 하부에 형성된 볼록부가 아래에 배치되는 고분자 기판의 상부에 형성된 오목부에 삽입될 수 있다.
- [0009] 상기 고분자 기판은 복수 개의 천공 구멍을 가질 수 있다.
- [0010] 상기 고분자 기판은 3D 인쇄에 의해 형성될 수 있고, 상기 그래핀 산화물은 스프레이 방법에 의해 상기 고분자 기판의 표면에 코팅될 수 있다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명의 실시예들에 따르면, 세포 배양 공장에서 적은 인원으로 여러 인큐베이터에 수용된 다수의 세포 배양 플랫폼을 무선으로 제어할 수 있어 저비용으로 세포를 대량으로 배양할 수 있다.
- [0012] 상기 인큐베이터를 개방하지 않고도 세포의 배양 상태를 실시간으로 확인할 수 있고, 세포를 자극하여 세포 증식 및 분화를 촉진할 수 있다. 또, 세포 배양 기판의 영역별로 세포의 배양 상태를 확인할 수 있고, 배양 상태가 미흡한 영역에 대하여만 세포를 자극하여 세포 증식 및 분화를 촉진할 수 있다. 이에 의해 세포 배양 기판 전체 영역에 대하여 세포 배양이 균일하게 잘 이루어질 수 있다.
- [0013] 세포 배양 기판은 쉽게 적층될 수 있어 세포의 대량 배양에 적합하고, 다층으로 적층되어도 높은 세포 생존력을 유지할 수 있다. 세포 배양 기판에 코팅된 그래핀 산화물은 세포의 접착력을 향상시켜 세포 접촉 보조제의 사용을 회피할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1 및 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 플랫폼을 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 센서와 발열기의 어레이를 개략적으로 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 기판의 개략적인 이미지를 나타낸다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 플랫폼의 제조 공정을 나타낸다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 플랫폼이 적층된 이미지를 나타낸다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 플랫폼을 이용한 세포 배양 공장의 이미지를 나타낸다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 그래핀 산화물(GO)의 코팅 공정을 설명하기 위한 도면이다.
- 도 9는 베어(bare) PLA 기판 및 그래핀 산화물이 코팅된 PLA(GO-PLA) 기판의 AFM 이미지를 나타낸다.
- 도 10은 베어 PLA 기판, GO-PLA 기판, 및 GO 파우더의 라만 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 11 및 12는 GO-PLA 기판의 SEM 이미지를 나타낸다.
- 도 13은 세포 배양 기간에 따른 PLA 기판과 GO-PLA 기판 위 세포의 SEM 이미지를 나타낸다.
- 도 14는 세포 배양 기판의 종류에 따른 세포수를 나타내는 그래프이다.
- 도 15는 세포 배양 기판 위 정렬된 세포 이미지를 나타낸다.
- 도 16은 세포 생존력을 실험하기 위해 배지에 담가진 적층된 세포 배양 기판을 포함하는 세포 배양 플랫폼을 나타낸다.
- 도 17 내지 도 19는 세포 배양 기판의 적층수와 배지 깊이에 따른 세포 생존율을 설명하기 위한 도면이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 임피던스 센서를 나타낸다.

도 21은 도 20의 임피던스 센서의 캘리브레이션 곡선을 나타낸다.

도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 발열기 및 온도 센서를 나타낸다.

도 23은 도 22의 발열기 및 온도 센서의 캘리브레이션 곡선을 나타낸다.

도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 pH 센서를 나타낸다.

도 25는 도 24의 pH 센서의 캘리브레이션 곡선을 나타낸다.

도 26은 본 발명의 일 실시예에 따른 칼륨이온 센서를 나타낸다.

도 27은 도 26의 칼륨이온 센서의 캘리브레이션 곡선을 나타낸다.

도 28 내지 도 33은 본 발명의 일 실시예에 따른 센서 및 발열기의 장기 안정성(long term stability)을 나타낸다.

도 34는 세포 종류에 따른 임피던스 곡선을 나타낸다.

도 35는 열 자극과 전기 자극을 받은 C2C12 근육 아세포의 형광 이미지를 나타낸다.

도 36은 자극의 종류에 따른 세포의 임피던스 곡선을 나타낸다.

도 37은 모니터링 소프트웨어에 무선으로 연결되는 세포 배양 플랫폼을 개략적으로 나타낸다.

도 38 내지 도 41은 센서와 발열기의 무선 제어를 개략적으로 나타낸다.

도 42는 본 발명의 일 실시예에 따른 적층된 세포 배양 기판을 포함하는 세포 배양 플랫폼의 C2C12 근육 아세포에 대한 임피던스 모니터링 캘리브레이션을 나타낸다.

도 43은 일반 성장 조건에서 C2C12 근육 아세포의 무선 임피던스 모니터링을 나타낸다.

도 44 및 도 45는 자극을 이용한 성장에서 C2C12 근육 아세포의 무선 임피던스 모니터링을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 실시예들을 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예들을 통해 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서, 이하의 실시예들에 의하여 본 발명이 제한되어서는 안 된다.
- [0016] 본 명세서에서 제1, 제2 등의 용어가 다양한 요소들(elements)을 기술하기 위해서 사용되었지만, 상기 요소들이 이 같은 용어들에 의해서 한정되어서는 안 된다. 이러한 용어들은 단지 상기 요소들을 서로 구별시키기 위해서 사용되었을 뿐이다. 또, 어떤 요소가 다른 요소 위에 있다고 언급되는 경우에 그것은 다른 요소 위에 직접 형성될 수 있거나 또는 그들 사이에 제3의 요소가 개재될 수도 있다는 것을 의미한다.
- [0017] 도면들에서 요소의 크기, 또는 요소들 사이의 상대적인 크기는 본 발명에 대한 더욱 명확한 이해를 위해서 다소 과장되게 도시될 수 있다. 또, 도면들에 도시된 요소의 형상이 제조 공정상의 변이 등에 의해서 다소 변경될 수 있을 것이다. 따라서, 본 명세서에서 개시된 실시예들은 특별한 언급이 없는 한 도면에 도시된 형상으로 한정되어서는 안 되며, 어느 정도의 변형을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 플랫폼은 세포 배양 기판, 세포 배양용 센서, 세포 배양용 발열기, 무선 통신 시스템, 및 원위치 배치 교환 시스템을 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 세포 배양 기판은 그래핀 산화물이 코팅된 고분자 기판을 포함할 수 있다. 상기 고분자 기판은 생체 적합성 고분자, 예를 들어, 폴리락트산(PLA)을 포함할 수 있다. 상기 그래핀 산화물은 스프레이 방법을 이용하여 상기 고분자 기판 표면에 코팅될 수 있다. 상기 세포 배양 기판은 기판 전체에 배지를 쉽게 침투시키기 위한 복수 개의 천공 구멍을 가질 수 있다. 또, 상기 세포 배양 기판은 둘 이상 적층되어 사용될 수 있다.

- [0021] 상기 세포 배양용 센서는 세포 배양 기관 위에 배치된다. 상기 세포 배양용 센서는 임피던스 센서, pH 센서, 칼륨이온(K⁺) 센서, 및 온도 센서 중 하나 또는 둘 이상 포함할 수 있다.
- [0022] 상기 임피던스 센서는 상기 세포 배양 기관에서 배양되는 세포의 상태를 모니터링할 수 있다. 상기 임피던스 센서의 회로에 바이패스 스위치를 연결하는 것에 의해 상기 임피던스 센서는 전기 자극기로 사용될 수 있고, 세포에 전기 자극을 제공할 수 있다.
- [0023] 상기 pH 센서와 상기 칼륨이온 센서는 세포 배양액의 pH와 칼륨이온 농도를 측정하여 세포 배양액의 상태를 모니터링할 수 있다. 이와 같이, 세포 배양액의 상태를 모니터링함으로써 상기 임피던스 센서에 의해 모니터링되는 세포의 상태 변화에 대한 정보를 더욱 정확하게 파악할 수 있다.
- [0024] 상기 온도 센서는 상기 세포 배양용 발열기에 인접하게 배치되어 상기 세포 배양용 발열기의 가열 온도를 측정할 수 있고, 상기 세포 배양용 발열기를 제어하여 세포에 대한 열 자극을 조절할 수 있다.
- [0025] 상기 세포 배양용 발열기는 상기 세포 배양 기관에서 배양되는 세포를 자극하여 세포의 증식 및 분화를 촉진할 수 있다. 상기 세포 배양용 발열기는 세포에 열 자극을 제공할 수 있다.
- [0026] 상기 세포 배양 기관은 복수 개의 세포 배양 영역으로 구분될 수 있고, 상기 센서 및 상기 세포 배양용 발열기는 하나 또는 둘 이상의 세포 배양 영역에 대응하도록 배치될 수 있다. 예를 들어, 상기 세포 배양 기관은 16개의 세포 배양 영역으로 구분될 수 있고, 상기 임피던스 센서는 16개의 세포 배양 영역 각각에 배치되어 16개의 영역별로 세포의 상태를 확인할 수 있다. 상기 세포 배양용 발열기, 상기 온도 센서, 및 상기 pH 센서는 4개의 세포 배양 영역에 하나씩 배치될 수 있다.
- [0027] 상기 무선 통신 시스템은 상기 센서 및 상기 세포 배양용 발열기와 전기적으로 연결되고 인큐베이터 밖에 배치된 외부 장치와 무선으로 통신할 수 있다. 상기 센서 및 상기 세포 배양용 발열기는 상기 무선 통신 시스템을 통하여 상기 외부 장치에 의해 무선으로 제어될 수 있다. 즉, 상기 센서에 의한 세포 배양의 원위치 모니터링 및 상기 세포 배양용 발열기에 의한 세포 자극이 상기 외부 장치에 의해 무선으로 제어될 수 있다.
- [0028] 복수 개의 세포 배양 영역에 각각 배치된 복수 개의 임피던스 센서는 순차적으로 세포의 상태를 센싱하고, 이렇게 획득된 세포 배양 영역별 임피던스 데이터는 상기 무선 통신 시스템을 통하여 순차적으로 상기 외부 장치로 무선으로 전송되어 세포 배양 영역별 세포 배양 상태를 확인할 수 있다. 또, 세포의 배양 상태가 다른 영역에 비해 미흡한 것으로 확인된 영역에 대하여 상기 외부 장치는 상기 세포 배양용 발열기를 무선으로 제어하여 열 자극을 제공함으로써 세포의 증식 및 분화를 촉진할 수 있다. 이에 의해, 세포 배양 기관 전체 영역에서 세포 배양이 균일하게 잘 이루어질 수 있다.
- [0029] 상기 원위치 배지 교환 시스템은 상기 세포 배양 기관이 배치된 웰(well) 및/또는 케이스의 유입구와 배출구에 연결된 관을 통해 세포 배양액을 공급 및 교환할 수 있다.
- [0031] 도 1 및 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 플랫폼(SCCP, Smart Cell Culture Platform)을 나타내고, 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 센서와 발열기의 어레이를 개략적으로 나타내며, 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 기관의 개략적인 이미지를 나타낸다.
- [0032] 도 1 내지 도 4를 참조하면, 상기 세포 배양 플랫폼은 그래핀 산화물(GO)로 코팅된 폴리락트산(PLA) 기관(GO-PLA 기관), 센서 및 자극기 어레이, 아두이노(Arduino) 기반 무선 통신 시스템, 및 원위치 배지 교환 시스템을 포함한다..
- [0033] 상기 GO-PLA 기관은 3D 인쇄를 이용하여 PLA로 기관을 형성한 후 스프레이 방법을 이용하여 기관 표면에 그래핀 산화물을 코팅하는 것에 의해 형성될 수 있다. 상기 GO-PLA 기관은 세포 배양 기관 전체에 배지를 쉽게 침투시키기 위한 복수 개의 천공 구멍(1×1 mm)을 가지며, 5개의 GO-PLA 기관이 적층되어도 높은 세포 생존력을 제공할 수 있다. 상기 GO-PLA 기관은 가장자리의 상부 및 하부에 각각 형성된 오목부(Concave hole)와 볼록부(Convex pillar)를 가질 수 있다. 위에 배치되는 GO-PLA 기관의 하부에 형성된 볼록부를 아래에 배치되는 GO-PLA 기관의 상부에 형성된 오목부에 삽입시키는 것에 의해 두 GO-PLA 기관이 자동정렬되면서 적층될 수 있다. 오목부와 볼록부의 위치는 서로 바뀔 수 있다. 적층되는 두 GO-PLA 기관 사이의 공간(1cm)을 통해 각 기관 내부에 배지가 흘러 들어갈 수 있다.
- [0034] 상기 센서 및 자극기 어레이는 상기 GO-PLA 기관 위에 배치된다. 상기 센서는 임피던스 센서, pH 센서, 칼륨이

온 센서, 및 온도 센서를 포함할 수 있고, 상기 자극기는 발열기(열 자극기) 및 전기 자극기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 GO-PLA 기관 위에 온도 센서와 상기 온도 센서를 덮는 제1 절연층이 배치될 수 있다. 상기 제1 절연층 위에 발열기와 상기 발열기를 덮는 제2 절연층이 배치될 수 있다. 상기 제2 절연층 위에 상기 임피던스 센서와 상기 임피던스 센서를 덮는 제3 절연층이 배치될 수 있다. 상기 pH 센서 및 상기 칼륨이온 센서는 상기 임피던스 센서와 함께 상기 제2 절연층 위에 배치될 수 있다.

[0035] 상기 임피던스 센서는 상기 GO-PLA 기관에서 배양되는 세포의 상태를 모니터링할 수 있다. 상기 임피던스 센서의 회로에 바이패스 스위치를 연결하는 것에 의해 상기 임피던스 센서는 전기 자극기로 사용될 수 있고, 세포에 전기 자극을 제공할 수 있다. 상기 pH 센서와 상기 칼륨이온 센서는 세포 배양액의 pH와 칼륨이온 농도를 측정하여 세포 배양액의 상태를 모니터링할 수 있다. 이와 같이, 세포 배양액의 상태를 모니터링함으로써 상기 임피던스 센서에 의해 모니터링되는 세포의 상태 변화에 대한 정보를 더욱 정확하게 파악할 수 있다.

[0036] 상기 온도 센서는 상기 발열기에 인접하게 배치되어 상기 발열기의 가열 온도를 측정할 수 있고, 상기 발열기를 제어하여 세포에 대한 열 자극을 조절할 수 있다.

[0037] 상기 자극기는 상기 GO-PLA 기관에 배양되는 세포를 자극하여 세포의 증식 및 분화를 촉진할 수 있다. 상기 발열기는 세포에 열 자극을 제공할 수 있고, 상기 전기 자극기는 세포에 전기 자극을 제공할 수 있다.

[0038] 상기 GO-PLA 기관은 복수 개의 세포 배양 영역으로 구분될 수 있고, 상기 센서 및 상기 자극기는 하나 또는 둘 이상의 세포 배양 영역에 대응하도록 배치될 수 있다. 예를 들어, 상기 GO-PLA 기관은 16개의 세포 배양 영역으로 구분될 수 있고, 상기 임피던스 센서는 16개의 세포 배양 영역 각각에 배치되어 16개의 영역별로 세포의 상태를 확인할 수 있다. 상기 발열기, 상기 온도 센서, 및 상기 pH 센서는 4개의 세포 배양 영역에 하나씩 배치될 수 있다.

[0039] 아두이노(Arduino) 기반 무선 통신 시스템은 상기 센서 및 상기 자극기와 전기적으로 연결되고 인큐베이터 밖에 배치된 외부 장치와 무선으로 통신할 수 있다. 상기 센서 및 상기 자극기는 상기 아두이노 기반 무선 통신 시스템을 통하여 상기 외부 장치에 의해 무선으로 제어될 수 있다. 즉, 상기 센서에 의한 세포 배양의 원위치 모니터링 및 상기 자극기에 의한 세포 자극이 상기 외부 장치에 의해 무선으로 제어될 수 있다.

[0040] 상기 원위치 배지 교환 시스템은 아크릴 케이스의 유입구와 배출구에 연결된 실리콘관을 통해 세포 배양액을 공급 및 교환한다.

[0042] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 플랫폼의 제조 공정을 나타낸다.

[0043] 도 5를 참조하면, 30nm의 Ni이 증착된 실리콘 웨이퍼 위에 파릴렌층(Parylene C layer)을 증착한 후 패터닝한다. 온도 센서를 만들기 위해 150nm의 Au층을 형성한 후 패터닝하고, 그 위에 에폭시(SU8)를 증착한다. 그리고 이 공정을 반복 수행하여 히터, 임피던스 센서, 칼륨이온 센서, 및 pH 센서를 형성한다. 에폭시층과 파릴렌층을 증착하여 인캡슐레이션층을 형성한다. 그 위에 스프레이 방법을 이용해 그래핀 산화물(GO)을 코팅한 후 패터닝하여 그래핀 산화물 패턴을 형성한다. 이에 의해 상기 실리콘 웨이퍼 상에 세포 배양용 장치가 형성된다. 상기 실리콘 웨이퍼 위에 증착되어 있던 Ni을 에칭하고 그 위에 형성된 상기 세포 배양용 장치를 SAM 처리한 후 스쿠핑(scooping) 방법을 이용하여 PLA 기관 위에 전사한다. ACF(anisotropic conductive film)를 PCB 기관에 연결한 후 pH 센서에 이리듐 산화물을 증착하고 칼륨이온 센서에 PEDOT을 증착하여 상기 이온 센서들의 작동 전극을 형성하고, Ag/AgCl 잉크를 이용해 기준 전극을 형성한 후, 이온 선택성 멤브레인(ion selective membrane)을 코팅한다. 상기 세포 배양용 장치가 전사된 PLA 기관을 적층한 후 무선 통신 시스템(wireless system)과 연결한다. 상기 적층된 PLA 기관을 PDMS 웰(well) 내에 배치하고 실리콘관을 통해 세포 배양액을 공급 및 교환한다.

[0045] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 플랫폼이 적층된 이미지를 나타낸다.

[0046] 도 6을 참조하면, 인큐베이터에서 최대수의 세포 배양 플랫폼을 배치하는 효율을 높이기 위해 각 세포 배양 플랫폼은 공기 통로와 유입구/배출구를 갖는 아크릴 케이스에 수용될 수 있다. 상기 아크릴 케이스는 각 세포 배양 플랫폼의 치수를 표준화하고 적층을 용이하게 할 수 있다.

- [0048] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 플랫폼을 이용한 세포 배양 공장의 이미지를 나타낸다.
- [0049] 도 7을 참조하면, 상기 세포 배양 공장에는 다수의 세포 배양 플랫폼을 수용하는 인큐베이터들이 배치된다. 상기 세포 배양 플랫폼은 부착 세포의 세포 생존력, 증식 및 분화와 같은 현재 상태를 지속적으로 모니터링하고 이에 따라 적절한 자극을 가하여 소프트웨어와 무선으로 통신하여 세포 증식 또는 분화를 촉진한다. 임피던스, 온도, pH, 및/또는 칼륨 이온 농도의 급격한 증가 또는 감소와 같은 비정상적인 조건이 발생하는 경우 적절한 조치가 수행될 수 있다. 상기 스마트 세포 배양 플랫폼은 무선 통신에 의해 작은 인원으로도 공장 규모로 관리할 수 있기 때문에 노동 비용 등의 관리 및 운영 비용이 크게 절감될 수 있다.
- [0051] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 그래핀 산화물(GO)의 코팅 공정을 설명하기 위한 도면이다. 도 8을 참조하면, 그래핀 산화물이 스프레이 방법으로 3D 인쇄된 PLA 기관 위에 코팅될 수 있다.
- [0053] 도 9는 베어(bare) PLA 기관 및 그래핀 산화물이 코팅된 PLA(GO-PLA) 기관의 AFM 이미지를 나타내고, 도 10은 베어 PLA 기관, GO-PLA 기관, 및 GO 파우더의 라만 스펙트럼을 나타내고, 도 11 및 12는 GO-PLA 기관의 SEM 이미지를 나타내고, 도 13은 세포 배양 기간에 따른 PLA 기관과 GO-PLA 기관 위 세포의 SEM 이미지를 나타내며, 도 14는 세포 배양 기관의 종류에 따른 세포수를 나타내는 그래프이다.
- [0054] 도 9 내지 도 14를 참조하면, 코팅된 그래핀 산화물은 높은 생존력을 갖기 위한 세포 접착력을 향상시키고, GO-PLA 기관은 베어 PLA 기관에 비하여 세포가 잘 부착하고, 폴리스티렌 기관, 유리 기관에 비하여 증식 및 분화되는 세포의 수가 크게 증가하는 것으로 나타났다.
- [0056] 도 15는 세포 배양 기관 위 정렬된 세포 이미지를 나타낸다. 도 15를 참조하면, 그래핀 산화물의 패터닝은 네이티브 조직(native tissue)을 모방할 필요가 있는 세포에 세포 정렬을 제공한다.
- [0058] 도 16은 세포 생존력을 실험하기 위해 배지에 담가진 적층된 세포 배양 기관을 포함하는 세포 배양 플랫폼을 나타내고, 도 17 내지 도 19는 세포 배양 기관의 적층수와 배지 깊이에 따른 세포 생존율을 설명하기 위한 도면이다.
- [0059] 도 16 내지 도 19를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 기관(Designed substrate)은 세포 배양 기관의 적층수가 5인 경우에도 세포 생존율이 거의 100%를 유지하였고, 평평한 기관(Flat substrate)에 비해 세포 생존력을 크게 향상시켰다. 또, 세포까지 배지의 깊이가 약 10mm가 될 때까지 세포 생존율이 거의 100%로 유지되었다.
- [0061] 도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 임피던스 센서를 나타내고, 도 21은 도 20의 임피던스 센서의 캘리브레이션 곡선을 나타낸다.
- [0062] 도 20 및 도 21을 참조하면, 임피던스 센서는 교차 전극(interdigitated electrodes)을 포함할 수 있다. 또, 임피던스 센서는 전압 또는 전류를 제공하는 것에 의해 세포에 전기 자극을 제공하는 전기 자극기로 기능할 수 있다.
- [0064] 도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 발열기 및 온도 센서를 나타내고, 도 23은 도 22의 발열기 및 온도 센서의 캘리브레이션 곡선을 나타낸다.
- [0065] 발열기(히터)는 구불구불한 라인 형상의 금속 패틴을 포함할 수 있다. 상기 발열기는 27℃에서 43℃까지 온도를 선형으로 변화시킬 수 있다. 온도 센서는 라인 형상의 금속 패틴을 포함할 수 있다. 상기 온도 센서는 상기 발열기 아래에 배치되어 상기 발열기의 온도를 측정할 수 있다. 상기 온도 센서의 저항은 25℃에서 50℃까지 온도에 선형적으로 변하며, 급격한 온도 변화에 신속하게 대응할 수 있다.
- [0067] 도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 pH 센서를 나타내고, 도 25는 도 24의 pH 센서의 캘리브레이션 곡선을 나

타내며, 도 26은 본 발명의 일 실시예에 따른 칼륨이온 센서를 나타내고, 도 27은 도 26의 칼륨이온 센서의 캘리브레이션 곡선을 나타낸다.

[0068] 도 24 내지 도 27을 참조하면, pH 센서와 칼륨이온 센서는 각각 4~10 pH와 1~32mM K⁺ 농도로 H⁺와 K⁺의 개방 회로 포텐셜을 측정하고 7.94~6.94 pH와 0.125~2mM K⁺ 농도로 작은 변화 범위에서 민감하게 감지한다.

[0070] 도 28 내지 도 33은 본 발명의 일 실시예에 따른 센서 및 발열기의 장기 안정성(long term stability)을 나타낸다.

[0071] 도 28 내지 도 33을 참조하면, 임피던스 센서, 전기 자극기, 발열기, 온도 센서, pH 센서, 및 칼륨이온 센서는 모두 배지 내에서 장기간 안정적으로 기능할 수 있다.

[0073] 도 34는 인간 제대 정맥 내피 세포(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast, hDFB), 심장 근육 세포(cardiac muscle cell, HL-1), 및 C2C12 근육 아세포의 임피던스 곡선을 나타낸다.

[0074] 도 34를 참조하면, 모든 유형의 세포에서, 세포가 증식하여 전극을 덮으면 임피던스는 증가한다. 근육 세포는 분화되면서 근관 세포(myotube)를 형성하여 전도성을 갖게 되므로 시간이 흐름에 따라 임피던스가 감소한다.

[0076] 도 35는 열 자극과 전기 자극을 받은 C2C12 근육 아세포의 형광 이미지를 나타내고, 도 36은 자극의 종류에 따른 세포의 임피던스 곡선을 나타낸다.

[0077] 도 35를 참조하면, C2C12 근육 아세포는 열 자극(TS) 및/또는 전기 자극(TS)에 의해 증식 및 분화가 향상되는 것으로 나타났다. 상기 두 가지 자극의 결합으로 근관 세포의 형성이 크게 향상되었다.

[0078] 도 36을 참조하면, C2C12 근육 아세포에 대한 자극의 증강된 효과는 임피던스 센서에 의해 감지되어 기록될 수 있다.

[0080] 도 37은 모니터링 소프트웨어에 무선으로 연결되는 세포 배양 플랫폼을 개략적으로 나타낸다.

[0081] 도 37을 참조하면, 세포 배양 플랫폼은 인쇄 회로 기판과 아두이노 기반 무선 통신 시스템을 사용하여 신호 컨디셔닝, 증폭 및 무선 데이터 전송을 통합하여 제어할 수 있고, 신호 프로세싱, 아날로그-디지털(AD) 변환 및 디지털-아날로그(DA) 변환 기능을 활용할 수 있다. 이에 의해 세포 배양 플랫폼의 세포 배양 기관에 배치된 센서와 자극기(발열기)는 무선으로 제어되고 관리될 수 있다.

[0083] 도 38 내지 도 41은 센서와 발열기의 무선 제어를 개략적으로 나타낸다.

[0084] 도 38 내지 도 41을 참조하면, 임피던스 측정을 위해, 생성된 교류 신호는 1:16 멀티플렉서(MUX)를 사용하여 임피던스 센서 어레이를 연속적으로 통과한다. 이 신호는 트랜스임피던스 증폭기(TIA)에 의해 증폭되고, 마이크로컨트롤러 유닛(MCU)에 의해 처리되며, 무선 데이터 전송을 위해 블루투스 모듈로 전송된다. 전기 자극을 위해, 임피던스 측정을 위한 회로는 추가적인 바이패스 스위치와 함께 그대로 사용될 수 있다. pH와 칼륨이온 농도 측정을 위해, pH 센서와 칼륨이온 센서의 높은 임피던스 때문에 개방 회로 전압을 정확하게 측정하기 위해 전압 버퍼를 사용하는 것이 바람직하다. 무선으로 멀티플렉서를 제어하는 것에 의해 발열기와 전기 자극기는 배양된 세포를 선택적으로 자극하여 세포의 증식 및 분화를 촉진할 수 있다.

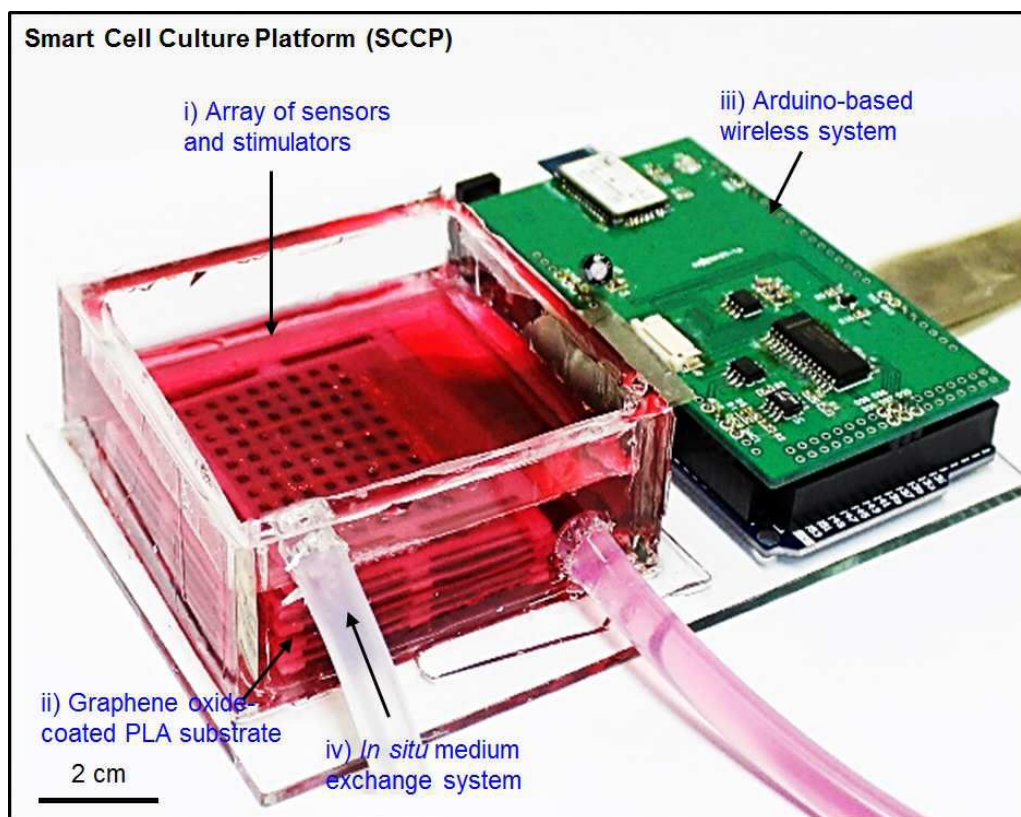
[0086] 도 42는 본 발명의 일 실시예에 따른 적층된 세포 배양 기관을 포함하는 세포 배양 플랫폼의 C2C12 근육 아세포에 대한 임피던스 모니터링 캘리브레이션을 나타내고, 도 43은 일반 성장 조건에서 C2C12 근육 아세포의 무선 임피던스 모니터링을 나타내며, 도 44 및 도 45는 자극을 이용한 성장에서 C2C12 근육 아세포의 무선 임피던스 모니터링을 나타낸다.

[0087] 도 43을 참조하면, 임피던스 컬러 맵은 자극 없이 정상 상태에서 C2C12를 배양하는 것을 나타낸다. 도 44를 참조하면, 제1 층(L1)의 상부 좌측의 위치가 열 및 전기로 자극되었고, 도 45를 참조하면, 제2 층(L2)의 우측 상부와 제4 층(L4)의 좌측 하부가 자극되었다. 자극된 C2C12의 증식과 분화는 자극 부위에서 촉진되는 것으로 나타났다.

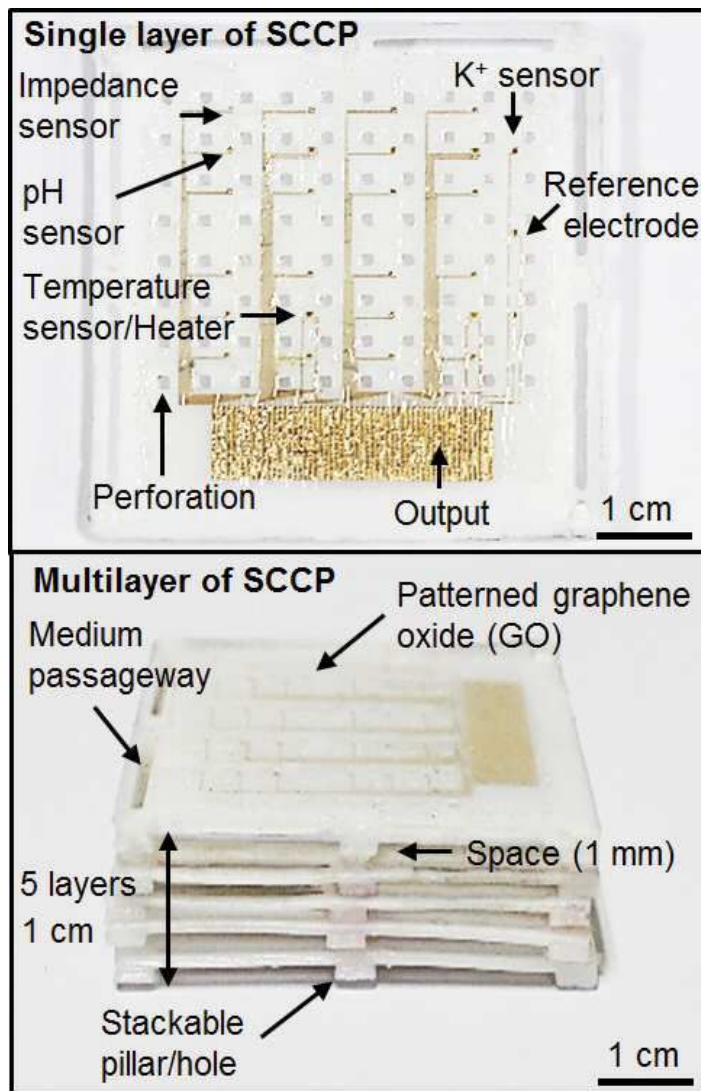
[0089] 이제까지 본 발명에 대한 구체적인 실시예들을 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

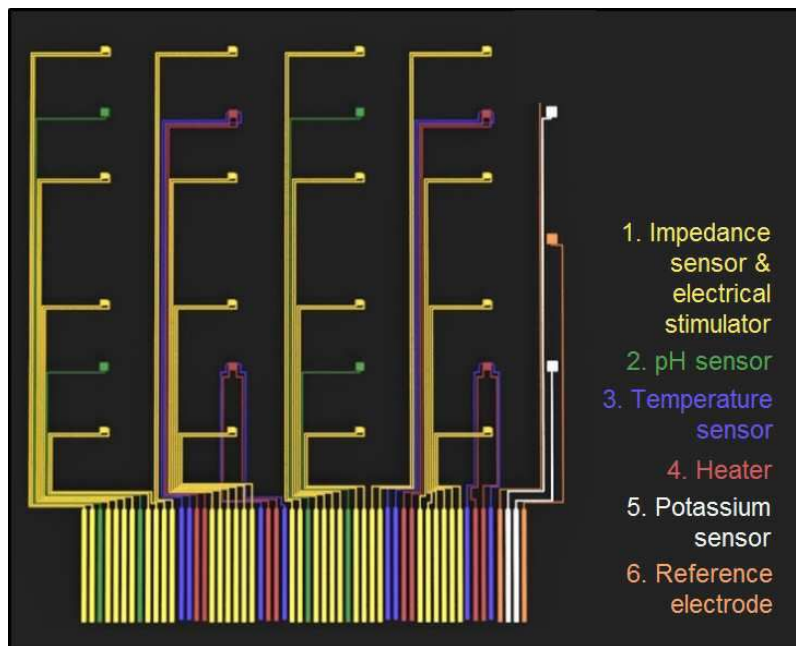
도면1



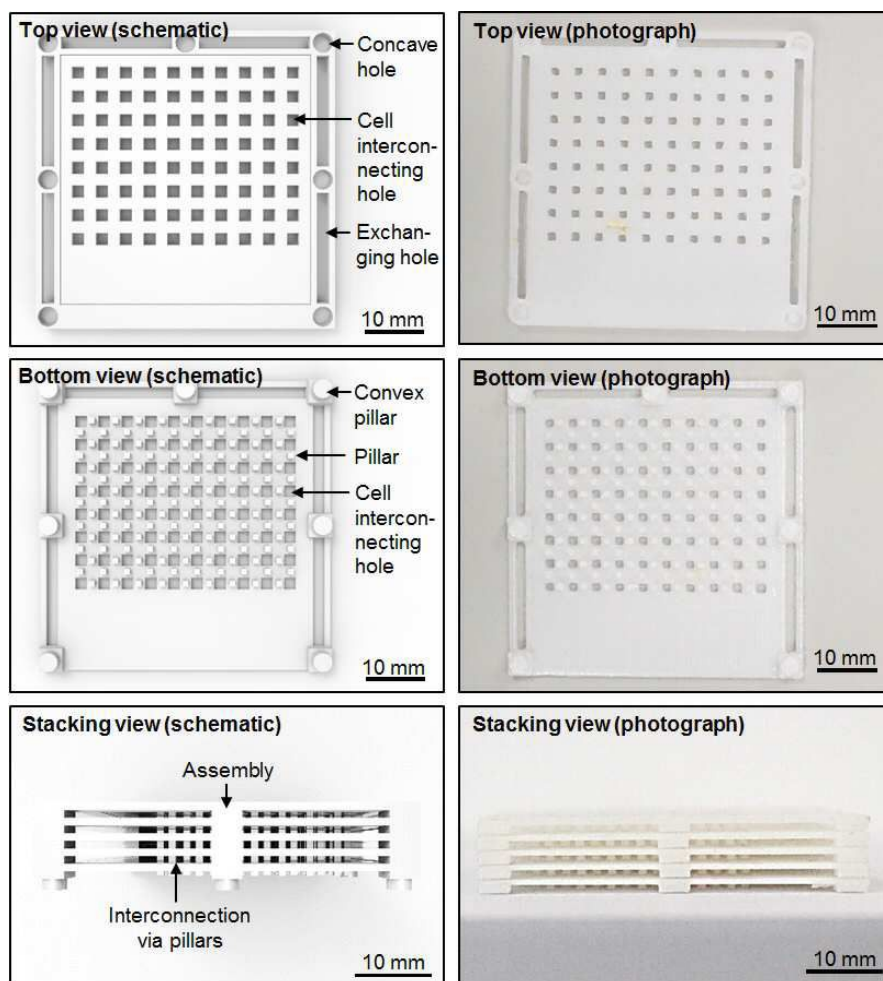
도면2



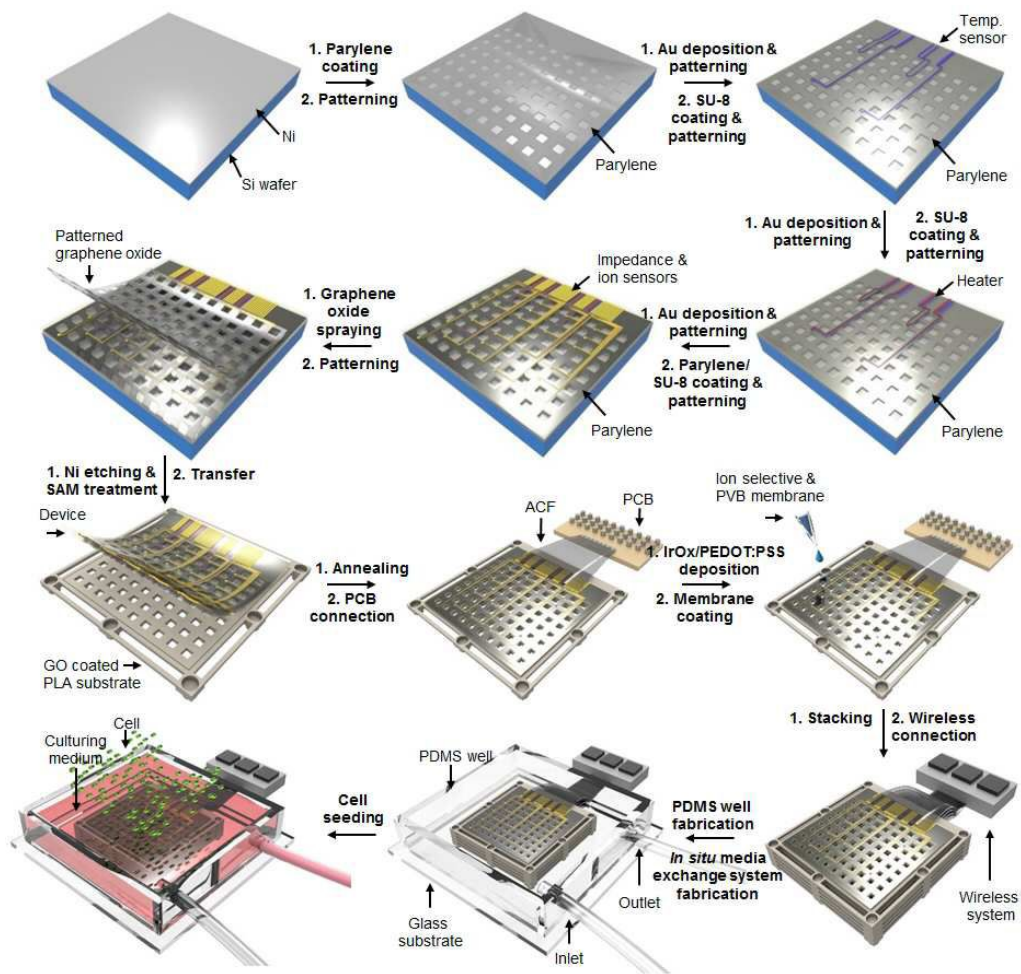
도면3



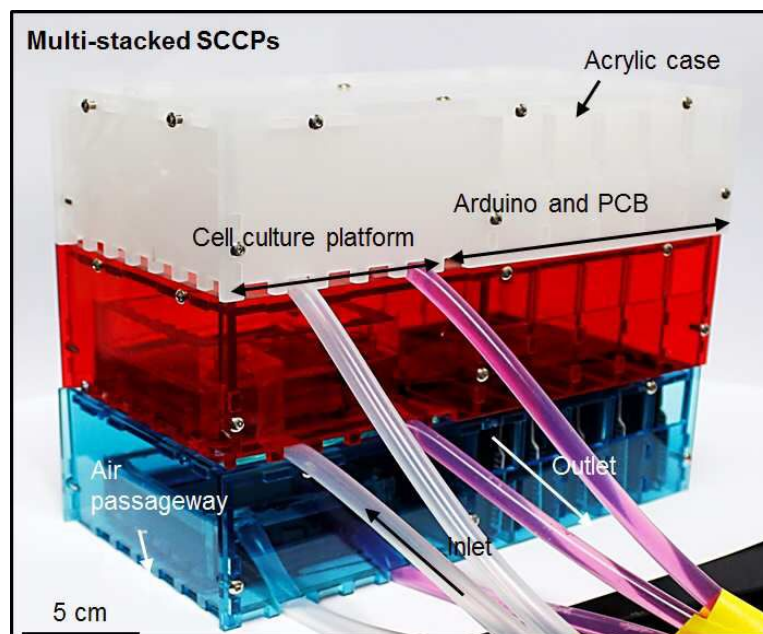
도면4



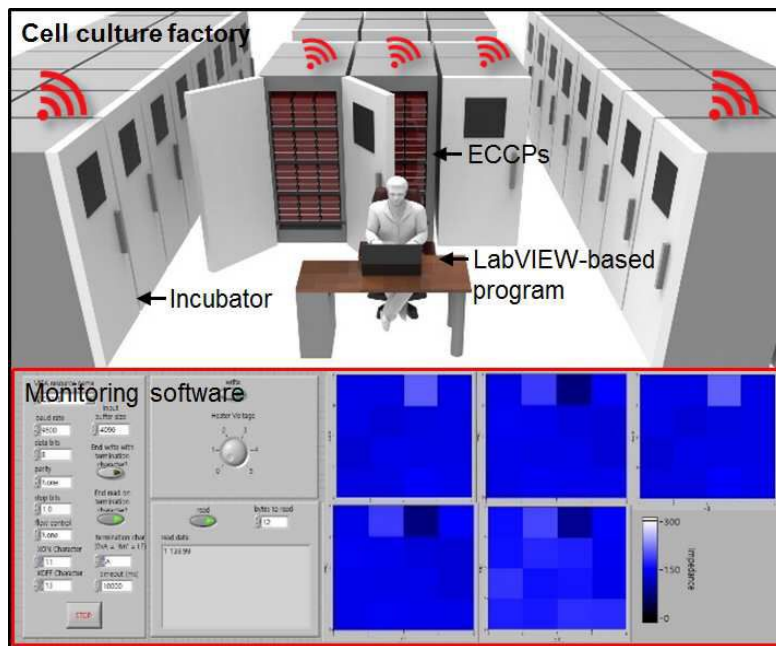
도면5



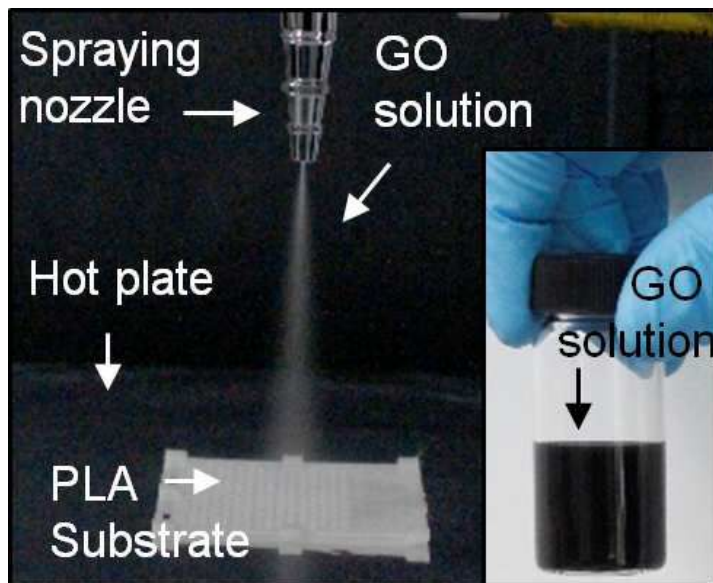
도면6



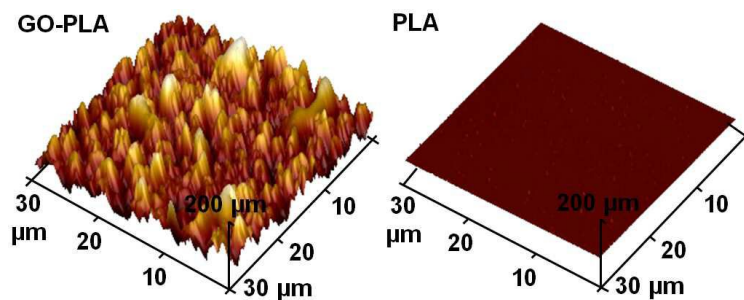
도면7



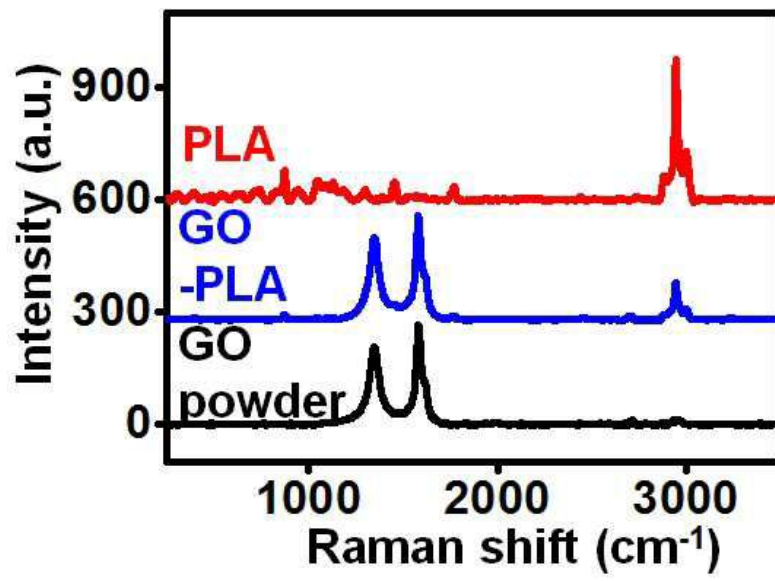
도면8



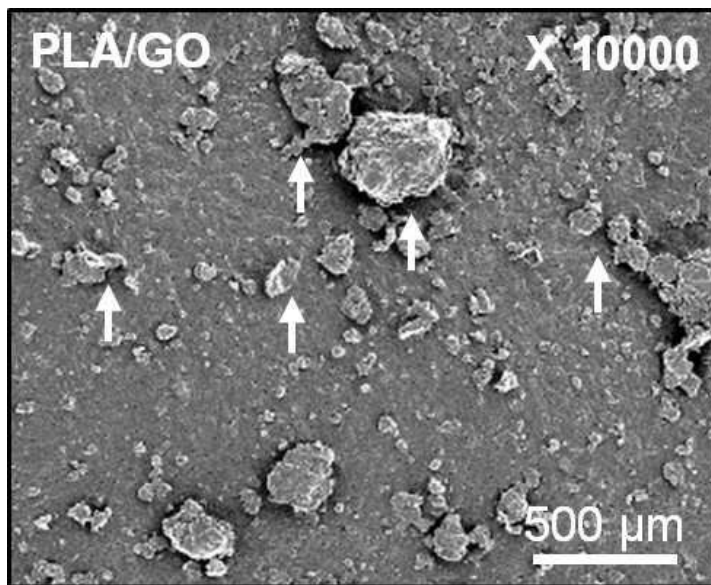
도면9



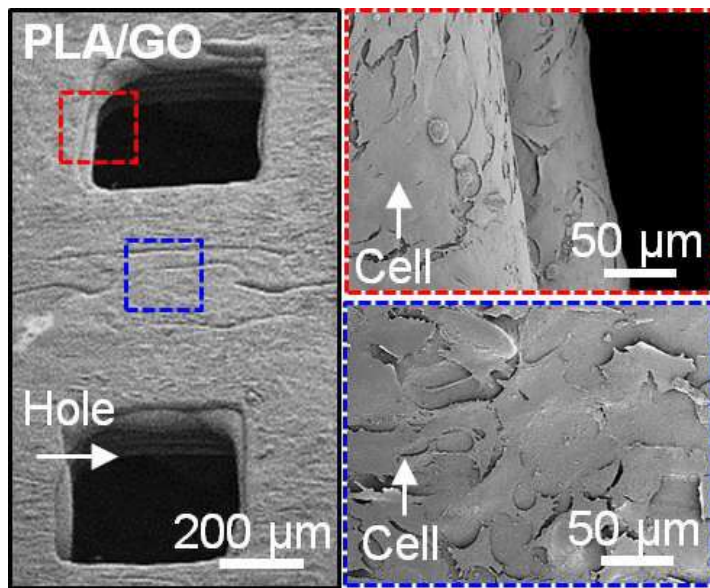
도면10



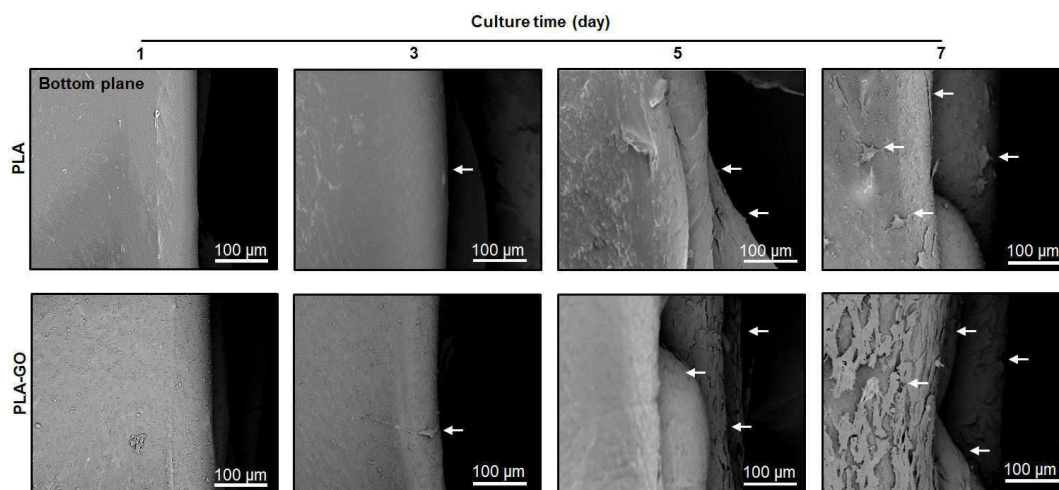
도면11



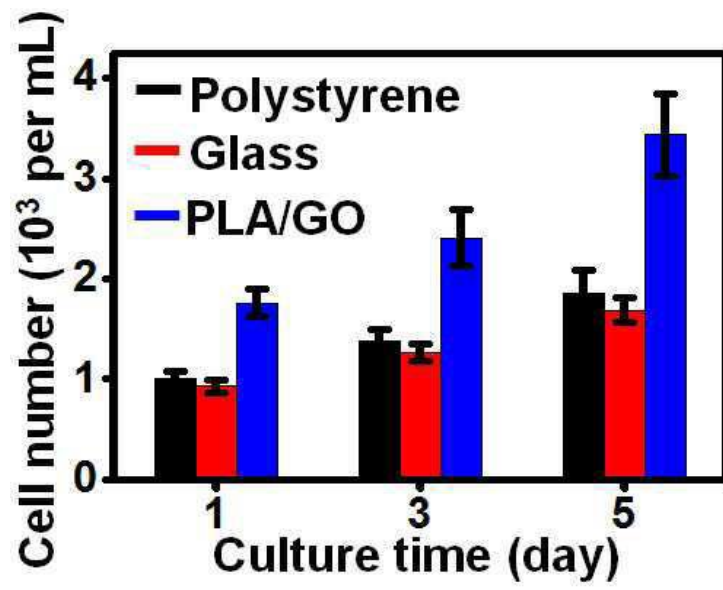
도면12



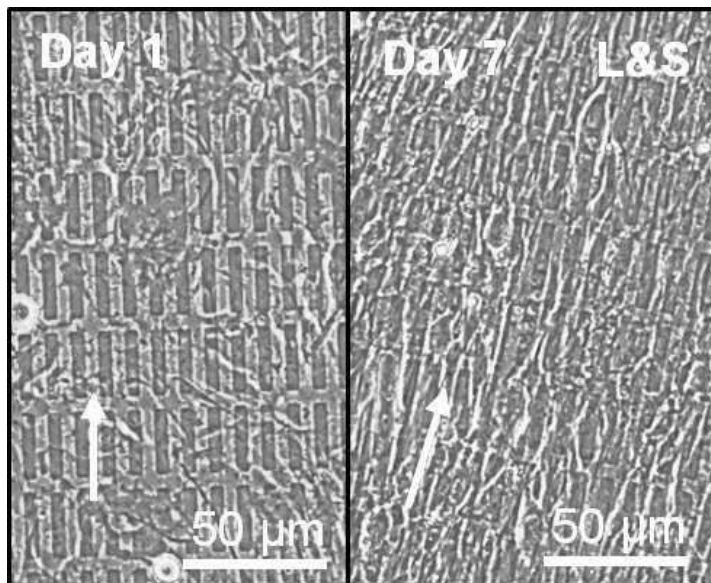
도면13



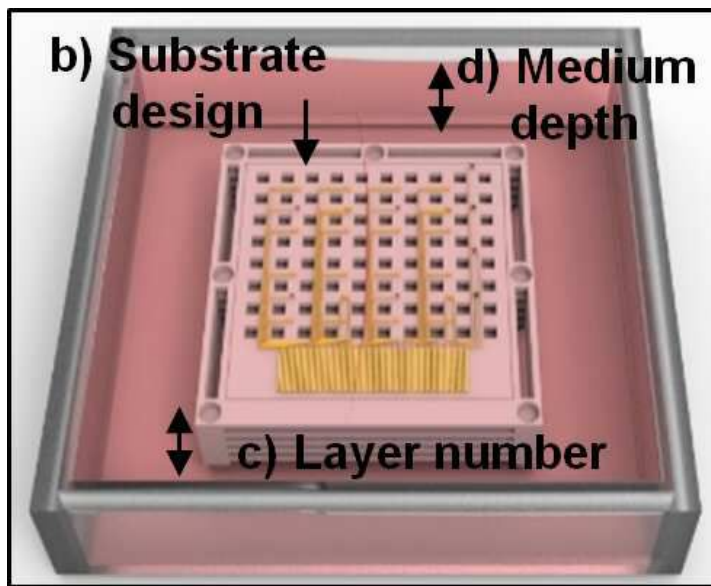
도면14



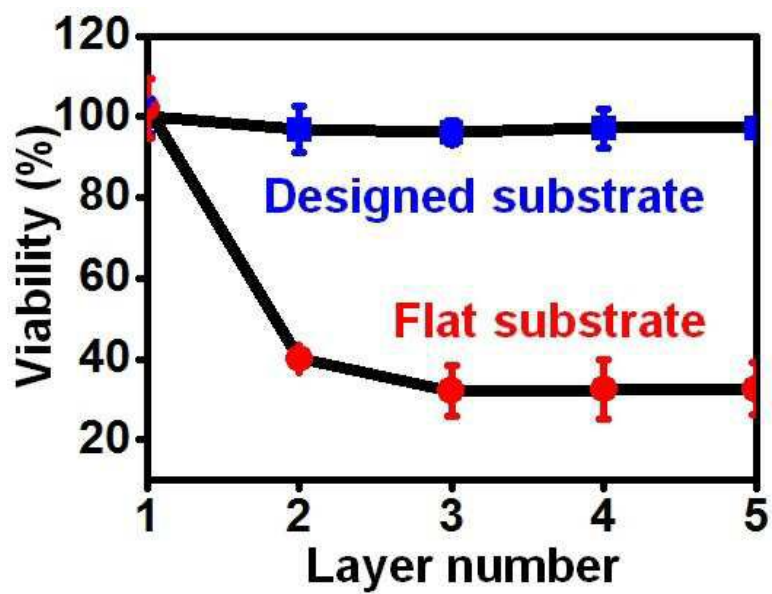
도면15



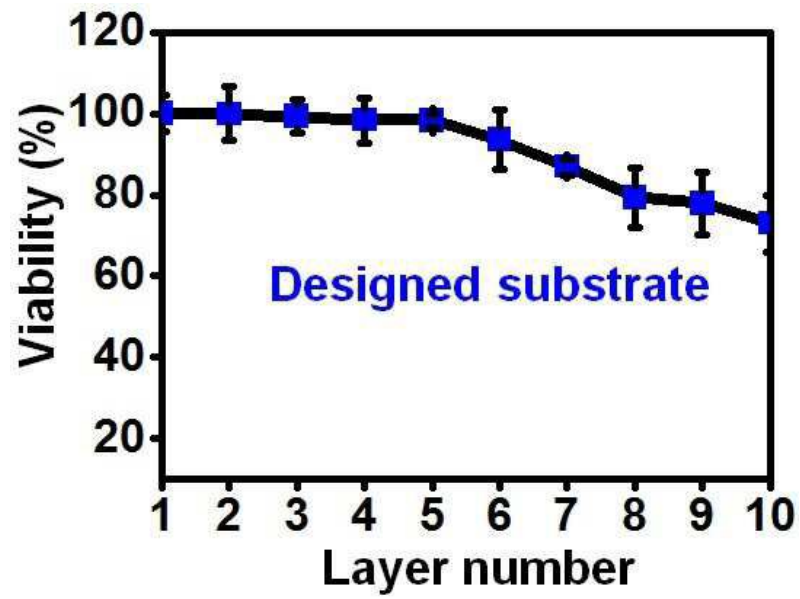
도면16



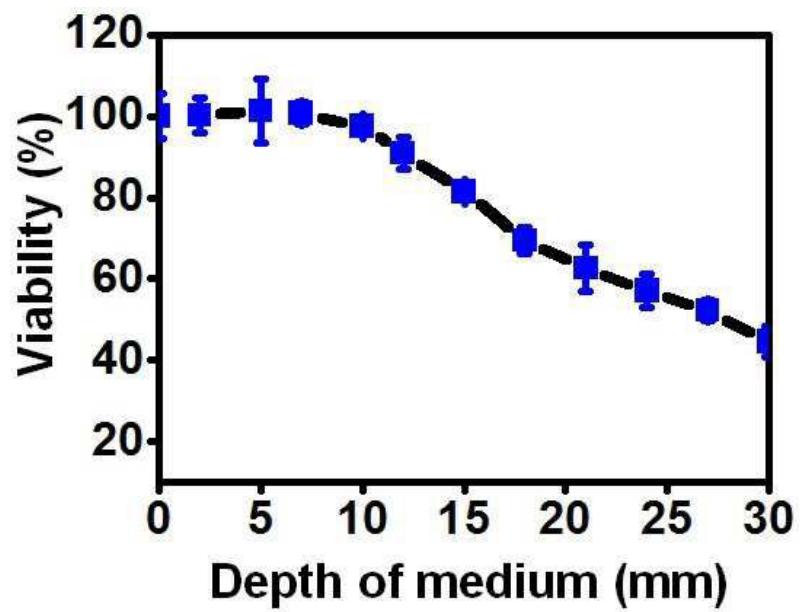
도면17



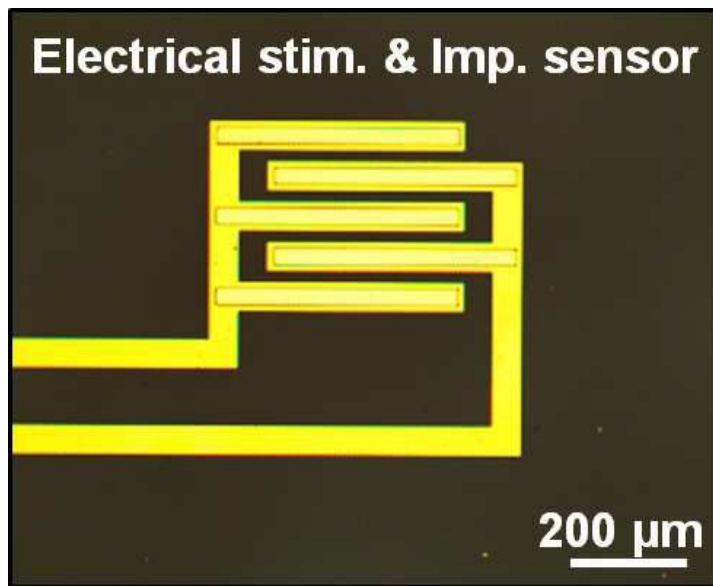
도면18



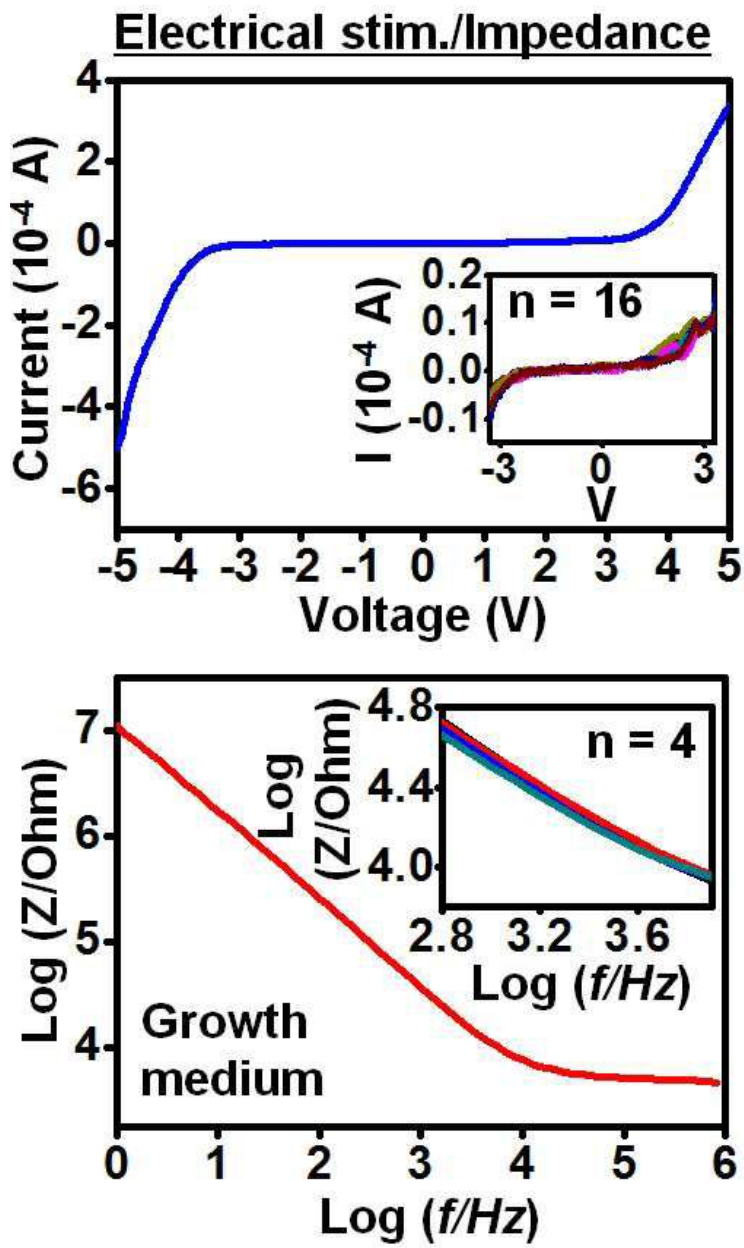
도면19



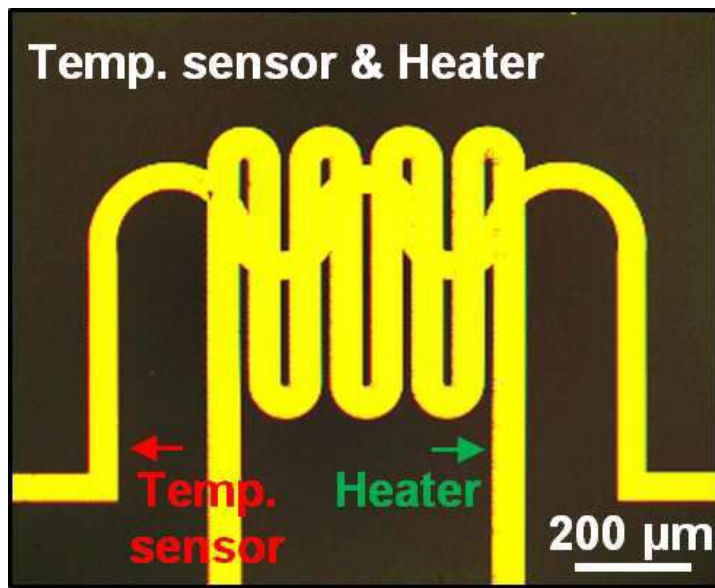
도면20



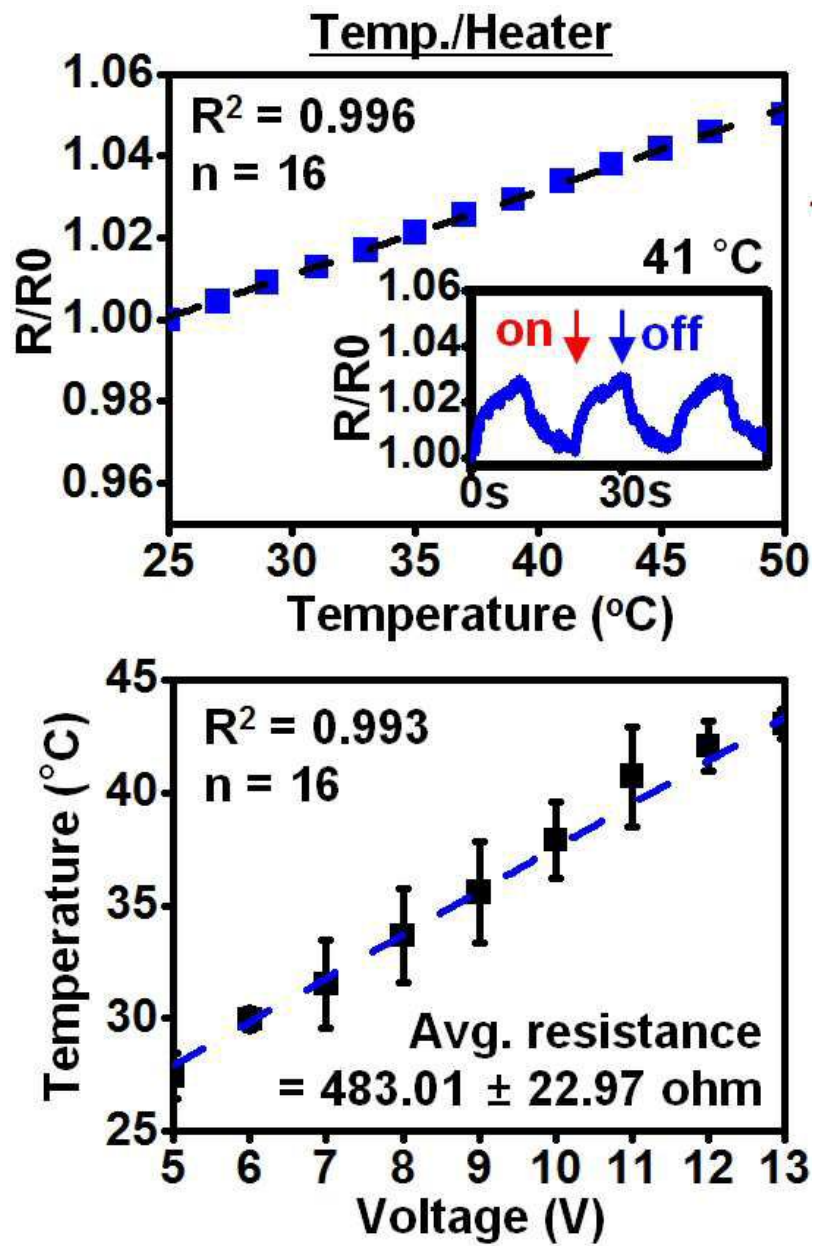
도면21



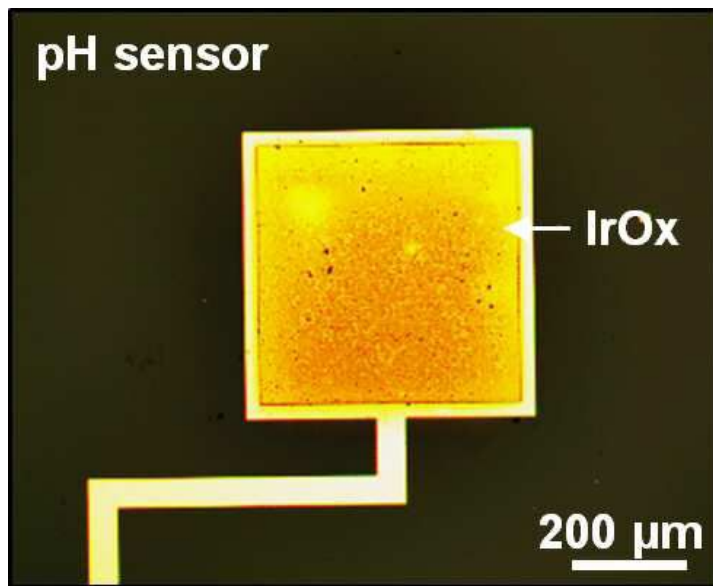
도면22



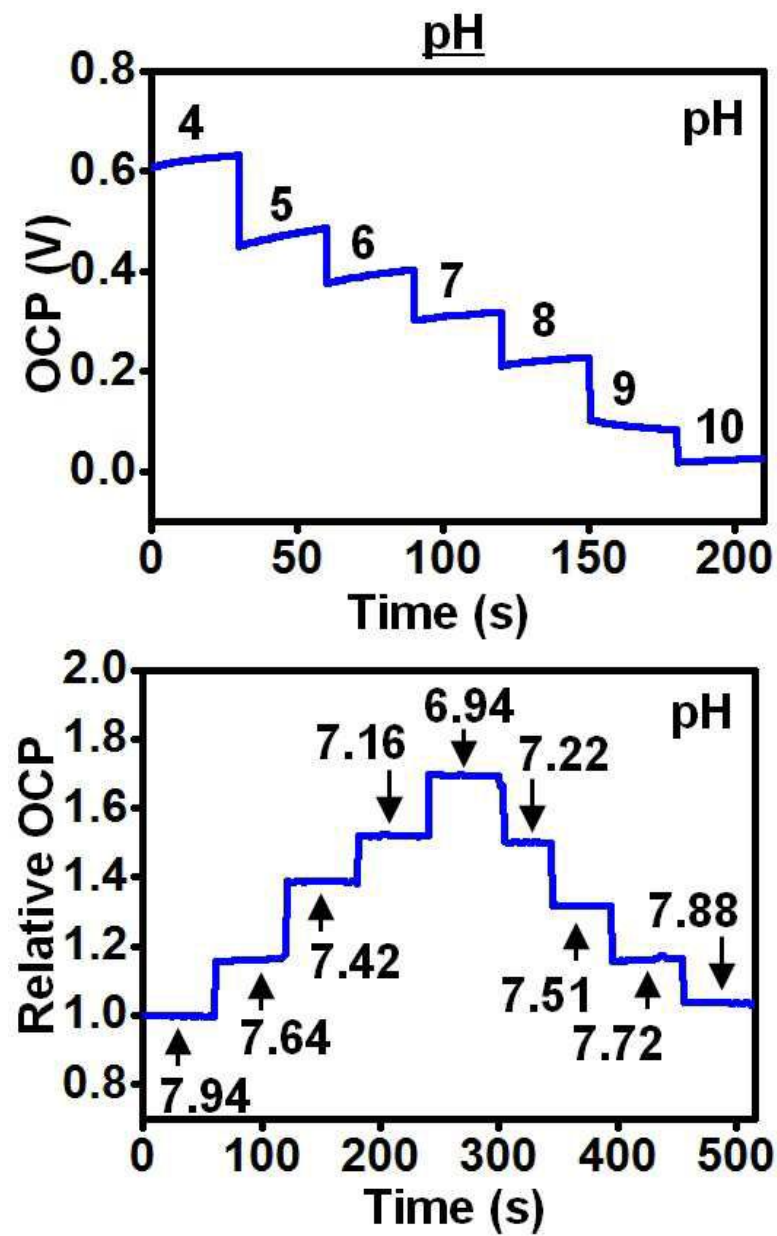
도면23



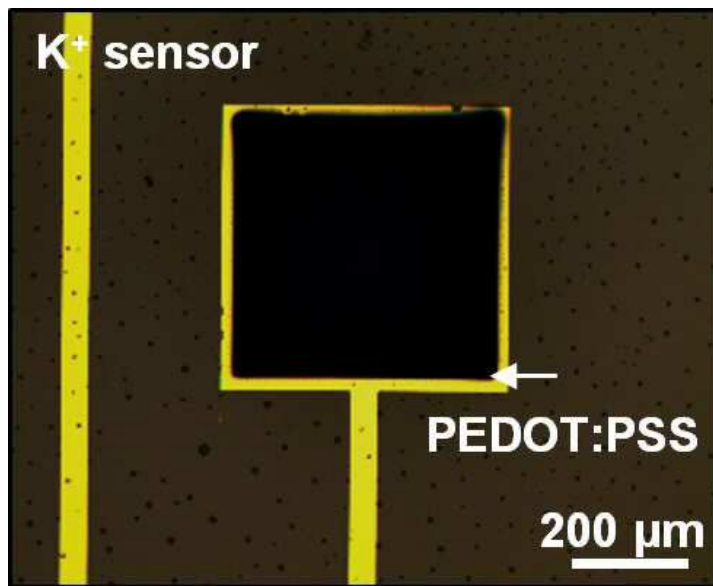
도면24



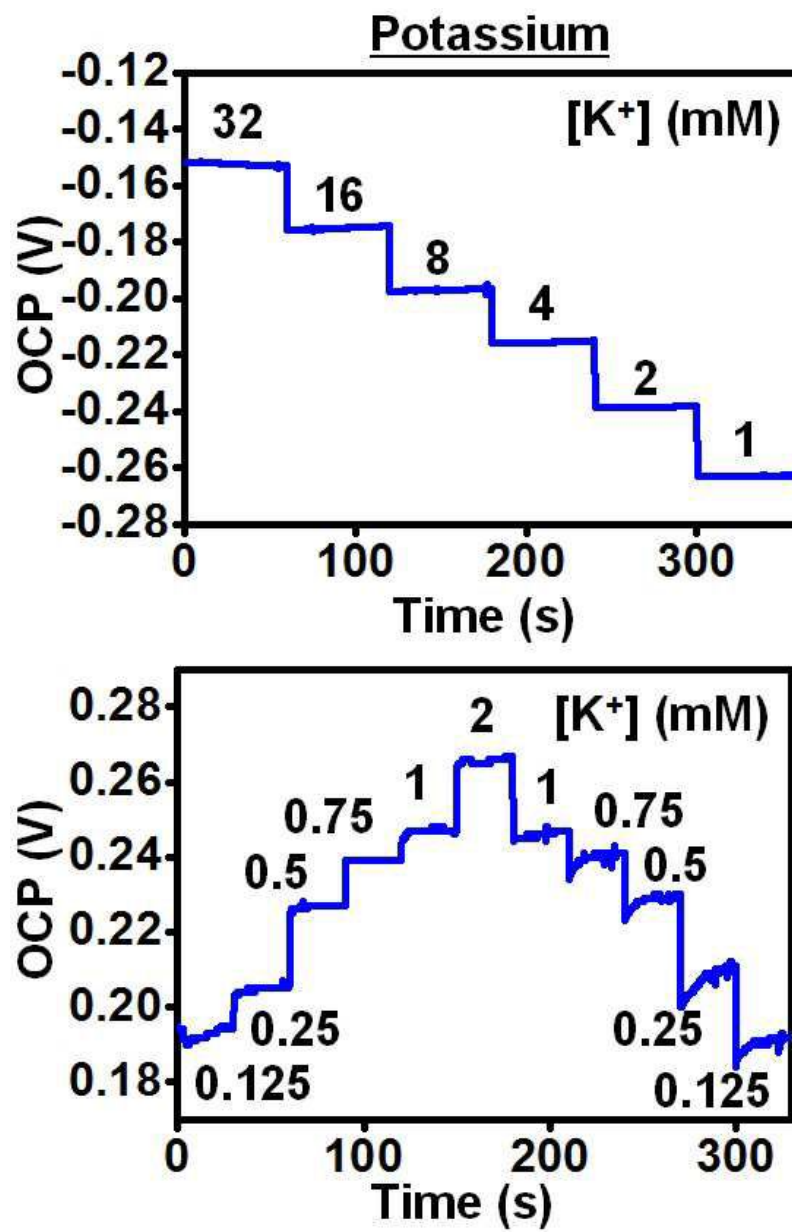
도면25



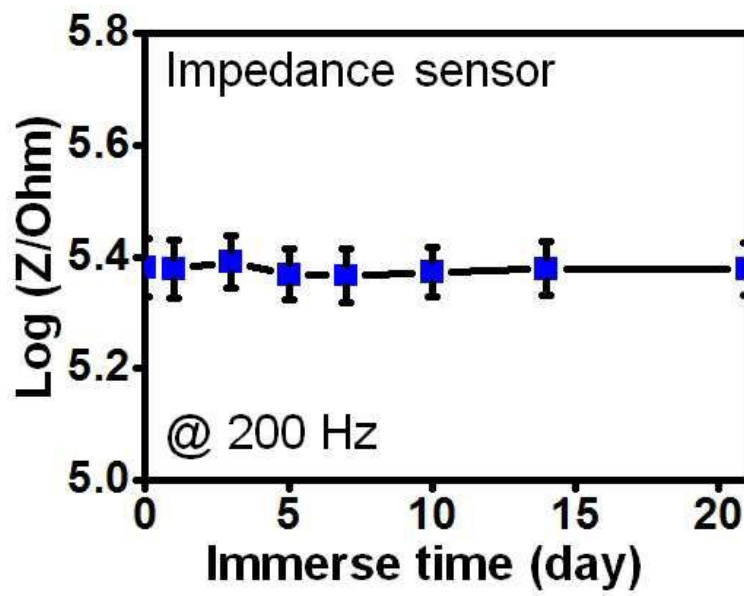
도면26



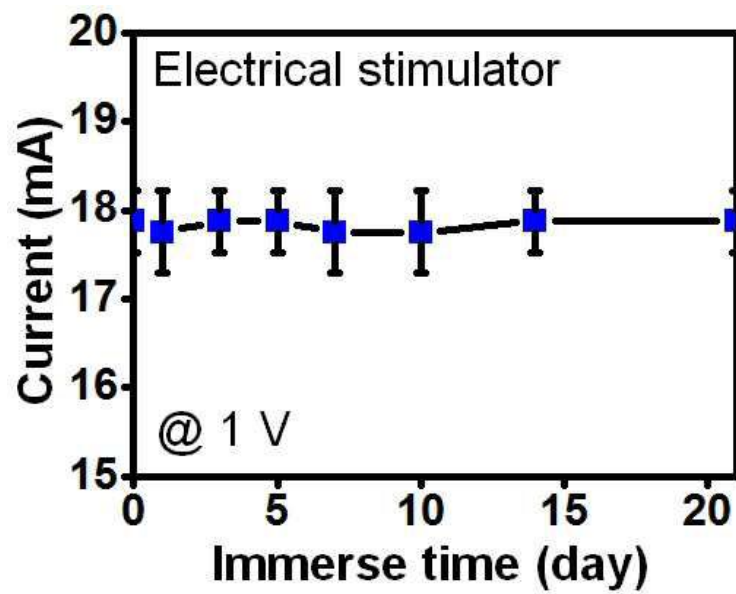
도면27



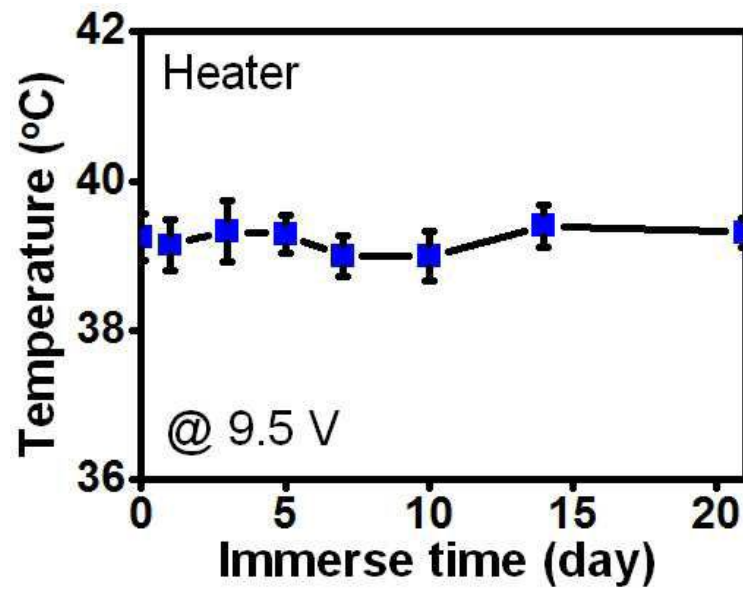
도면28



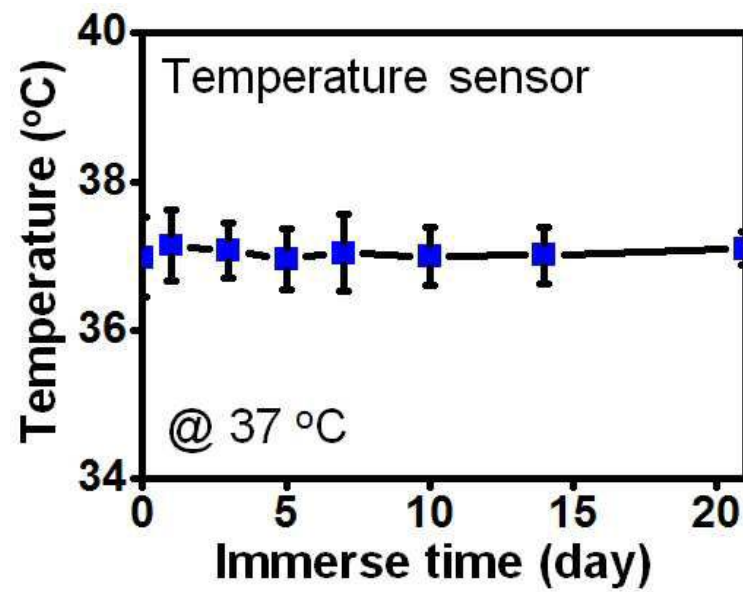
도면29



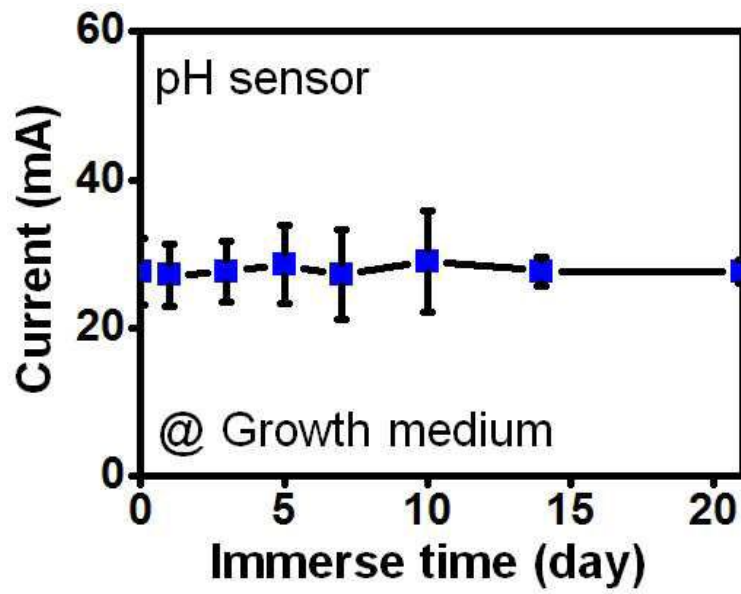
도면30



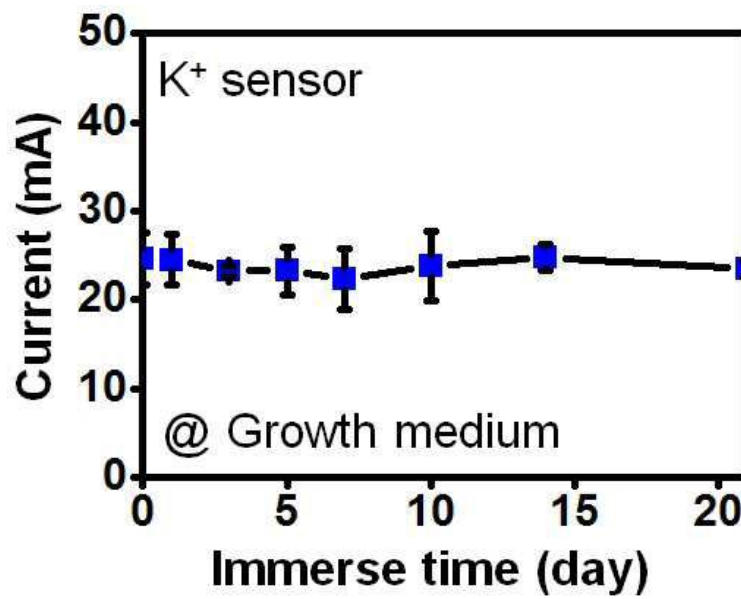
도면31



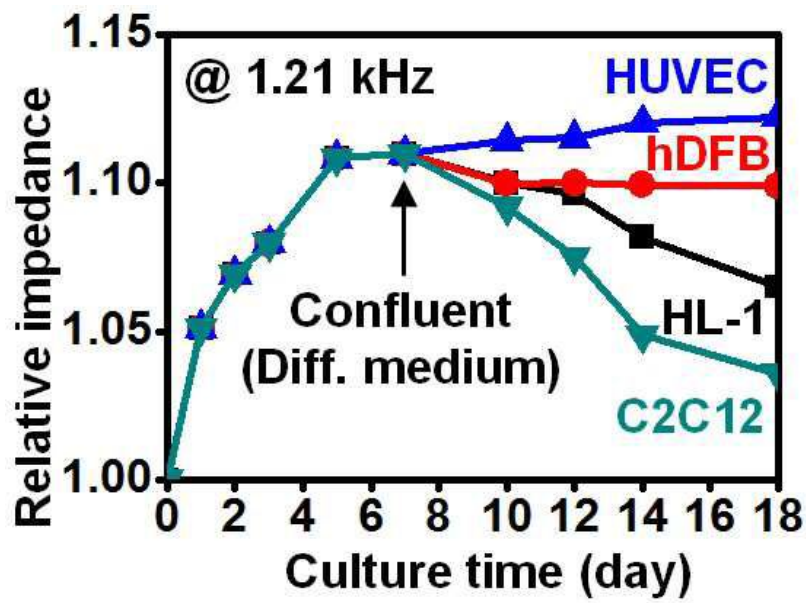
도면32



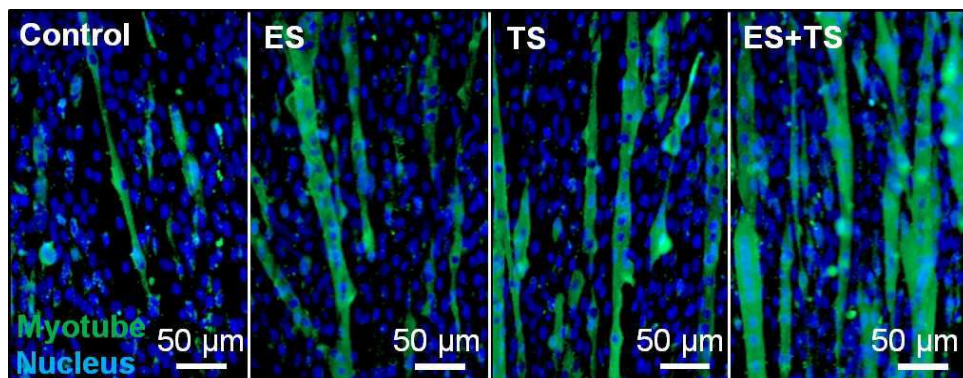
도면33



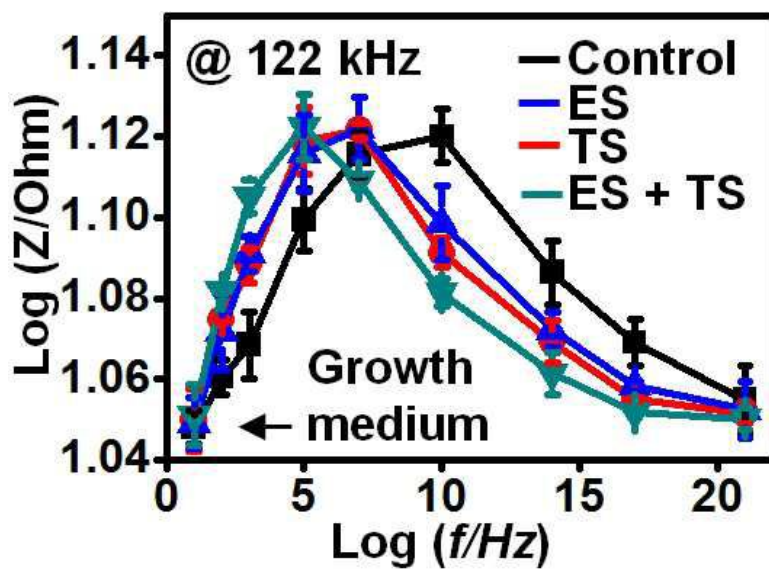
도면34



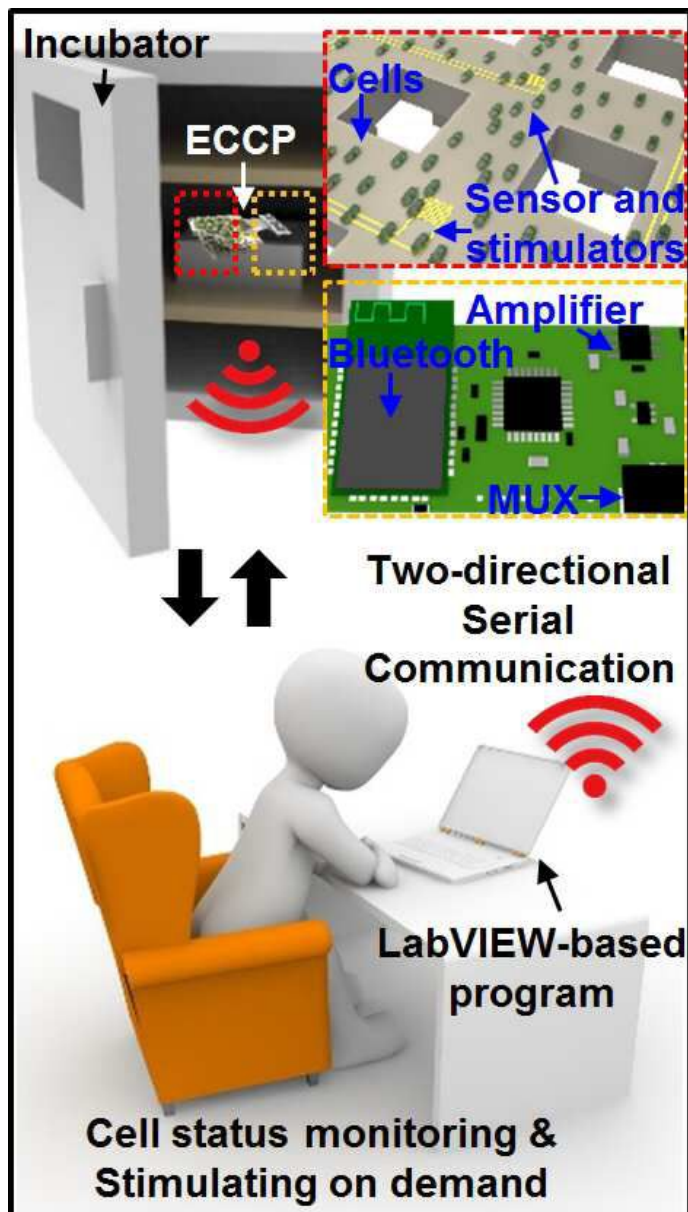
도면35



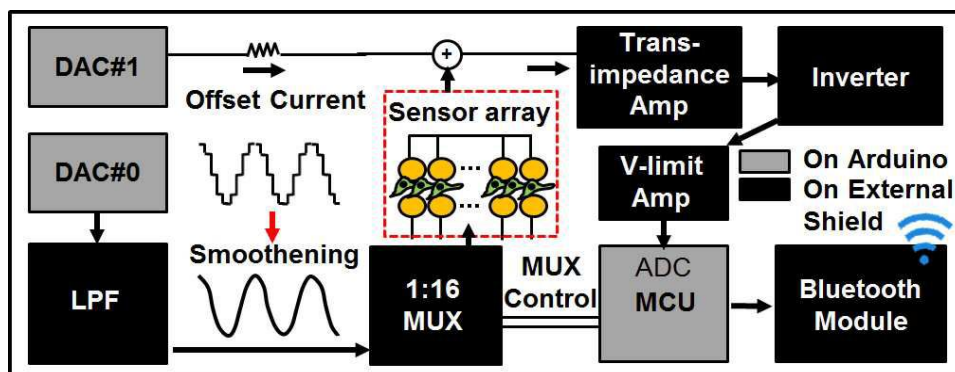
도면36



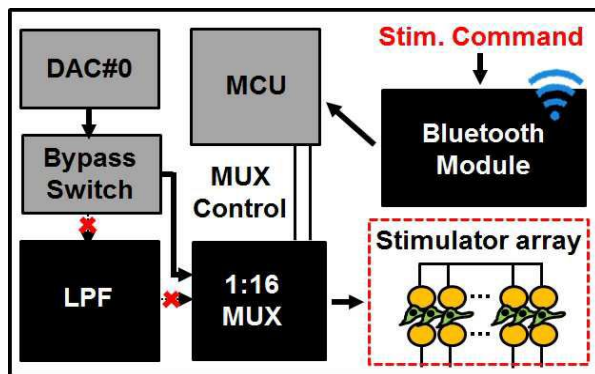
도면37



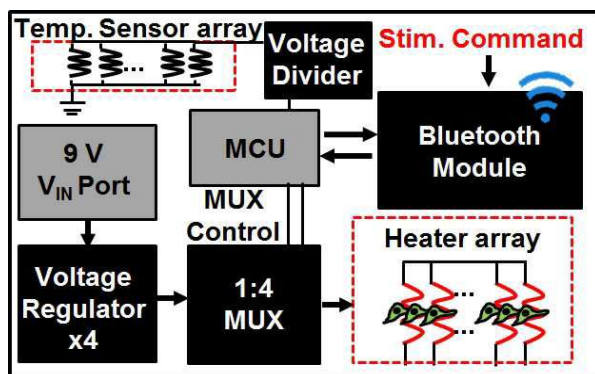
도면38



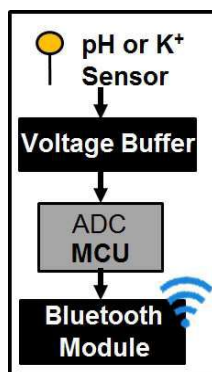
도면39



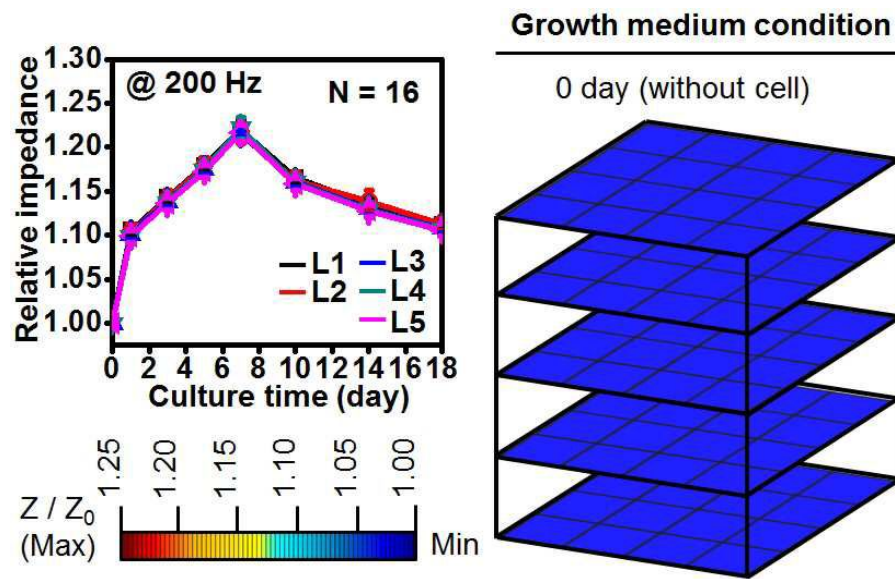
도면40



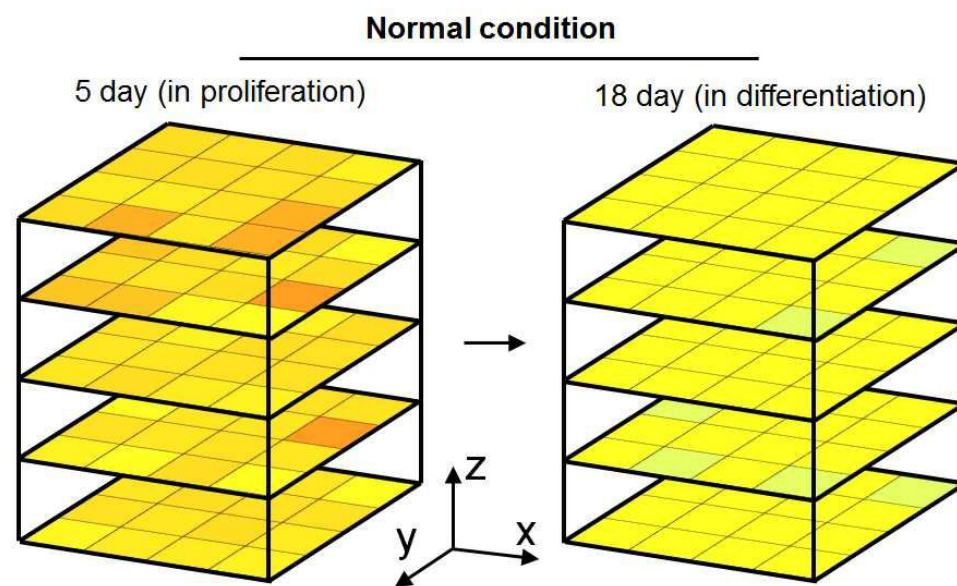
도면41



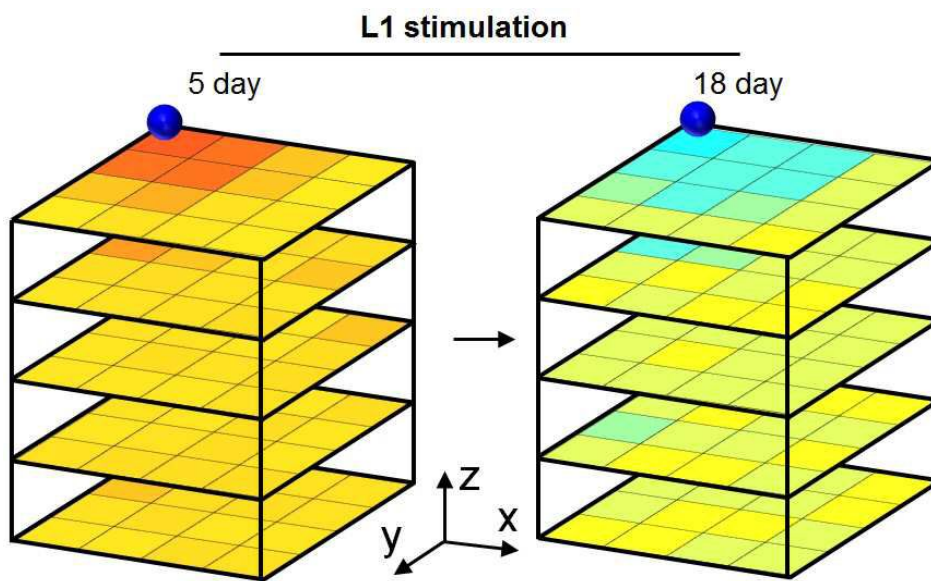
도면42



도면43



도면44



도면45

