

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 7월 27일 (27.07.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/126758 A1

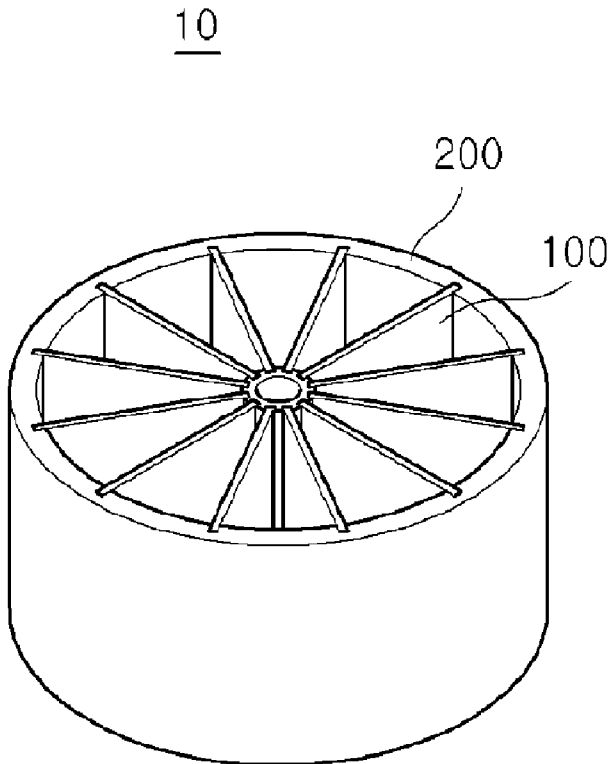
- (51) 국제특허분류:
G01N 33/50 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/008549
- (22) 국제출원일: 2016년 8월 3일 (03.08.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0007723 2016년 1월 21일 (21.01.2016) KR
- (71) 출원인: 한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 윤석주 (YOON, Seokjoo); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 오정화 (OH, Jung-Hwa); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 안재

- 환 (AHN, Jaehwan); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 김우근 (KIM, Woo-Keun); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: THREE-DIMENSIONAL HEPATOCYTE CULTURE UNIT, HEPATOTOXICITY ASSESSMENT SYSTEM AND HEPATOTOXICITY ASSESSMENT METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 3 차원 간세포 배양 유닛, 간독성 평가 시스템 및 이를 이용한 간독성 평가 방법



(57) Abstract: A three-dimensional hepatocyte culture unit is disclosed. The three-dimensional hepatocyte culture unit according to an embodiment of the present invention comprises a first culture structure in which liver-forming cells cultured, and a second culture structure into which the first culture structure can be inserted and which can accommodate therein a fluid comprising at least one of a culture medium for culturing the liver-forming cells and a hepatotoxic material for assessing hepatotoxicity.

(57) 요약서: 3 차원 간세포 배양 유닛이 개시된다. 본 발명의 실시예에 따른 3 차원 간세포 배양 유닛은 간 구성 세포들이 배양되는 제 1 배양 구조체 및 상기 제 1 배양 구조체가 삽입 설치될 수 있도록 제공되며, 상기 간 구성 세포들의 배양을 위한 배양 배지 및 간독성 평가를 위한 간독성 물질 중 적어도 어느 하나를 포함하는 유체가 내부에 수용될 수 있는 제 2 배양 구조체를 포함한다.



TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, **공개:**

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,

GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 3차원 간세포 배양 유닛, 간독성 평가 시스템 및 이를 이용한 간독성 평가 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 3차원 간세포 배양 유닛, 간독성 평가 시스템 및 이를 이용한 간독성 평가 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 간은 동물의 주요 생체 기관으로서, 간이 갖는 주 기능으로는 외부 물질을 해독하는 해독 기능을 들 수 있다. 일반적으로, 간은 간소엽(hepatic lobules)이라는 단위 구조체로 구성되어 있으며, 이러한 간소엽은 실질적으로 육각형 구조를 가질 수 있다.
- [4] 한편, 간소엽 내 간세포의 활성화는 간소엽의 구조에 큰 영향을 받기 때문에, 3차원적으로 간 조직을 모사하고, 간 조직의 환경과 유사한 분위기 하에서, 간 조직의 기능까지 구현하고자 하는 연구들이 진행되고 있다.
- [5] 예를 들어, 간의 상피 조직과 혈관의 경계를 모사하는 미세 구조체를 이용하여 인체에서 추출한 간세포를 장시간 배양하고, 알부민 생성과 같은 간 조직 고유의 기능을 발현하여 인체 내 담즙관과 유사한 구조체를 형성하게 하는 간 칩을 개발하는 연구가 보고된 바 있다. (An Artificial Liver Sinusoid With a Microfluidic Endothelial-Like Barrier for Primary Hepatocyte Culture, Lee et al. Biotechnology and Bioengineering, 97, 5, 1312, 2007 참조)
- [6] 또한, 포토리소그래피 기술을 사용하여 간세포(HepG2)와 내피 세포를 간소엽 육각 구조체 모양으로 2D 모사하는 연구도 보고되었다. (Liver-cell patterning Lab Chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue, Ho et al, Lab Chip, 2013, 13, 3578 참조)
- [7] 뿐만 아니라, 하이드로젤을 사용하여 간소엽 모사 구조체를 형성한 연구도 진행되고 있다. (Construction of hepatic lobule-like 3d tissues utilizing cell embedding hydrogel microfibers, Yuya Yajima et al. 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life sciences 참조)
- [8] 하지만 앞서 언급한 연구들은 간 조직과 간 기능 중 지엽적인 부분에만 초점이 맞추어져 있으며, 3차원적으로 간 조직을 모사하고, 간 조직의 환경과 유사한 분위기 하에서, 간 조직의 기능까지 구현이 가능한 연구는 현재 초기 단계에 머물고 있는 실정이다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명의 실시예들은 간의 단위 구조인 간소엽의 구조와 환경을 모사하여 간 조직을 구성하는 다양한 세포들을 공동 배양하고, 이를 간독성 평가에 활용한 3차원 간세포 배양 유닛, 간독성 평가 시스템 및 이를 이용한 간독성 평가 방법을 제공하고자 한다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 본 발명의 일 측면에 따르면, 간 구성 세포들이 배양되는 제 1 배양 구조체 및 상기 제 1 배양 구조체가 삽입 설치될 수 있도록 제공되며, 상기 간 구성 세포들의 배양을 위한 배양 배지 및 간독성 평가를 위한 간독성 물질 중 적어도 어느 하나를 포함하는 유체가 내부에 수용될 수 있는 제 2 배양 구조체를 포함할 수 있다.

[13] 또한, 상기 제 2 배양 구조체는, 상기 유체가 주입되는 적어도 하나 이상의 제 1 주입 수단, 상기 제 1 배양 구조체의 일측이 삽입되는 적어도 하나 이상의 제 1 요홈부 및 상기 제 1 배양 구조체의 타측이 삽입되는 적어도 하나 이상의 제 2 요홈부를 구비하며, 상기 제 1 주입 수단으로부터 주입된 유체 중 적어도 일부를 배수시키는 제 1 배수 수단을 포함할 수 있다.

[14] 또한, 상기 제 1 배수 수단은 상기 제 2 배양 구조체 내부에 수용된 상기 유체를 상기 제 2 배양 구조체의 상부로부터 하부로 하강시켜서 배출시키도록 제공될 수 있다.

[15] 또한, 상기 제 1 주입 수단의 일 단 및 상기 제 1 배수 수단의 일 단을 폐쇄시키면서 상기 제 2 배양 구조체를 수용하는 수용 케이스를 더 포함할 수 있다.

[16] 또한, 상기 제 1 배양 구조체는, 상기 간 구성 세포들이 배양되는 배양 공간을 제공하는 다공성 매트릭스(porous matrix)를 포함할 수 있다.

[17] 또한, 상기 간 구성 세포들은 간세포, 쿠퍼 세포(kupffer cell) 및 성상 세포(stellate cell) 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 측면에 따르면, 간 구성 세포들이 배양되는 제 1 배양 구조체 및 상기 적어도 하나 이상의 제 1 배양 구조체가 삽입 설치되며, 상기 간 구성 세포들의 배양을 위한 배양 배지 및 간독성 평가를 위한 간독성 물질 중 적어도 어느 하나를 포함하는 유체가 내부에 수용될 수 있는 제 2 배양 구조체를 구비하는 3차원 간세포 배양 유닛, 상기 3차원 간세포 배양 유닛이 적어도 하나 이상 설치되는 플레이트 및 상기 플레이트의 일측에 위치하며, 상기 3차원 간세포 배양 유닛에 유체를 공급하는 유체 공급 부재를 포함하는 간독성 평가 시스템이 제공될 수 있다.

[18] 또한, 상기 플레이트는, 상기 유체가 이동되는 유로, 상기 유로 상에 형성되며, 상기 유체를 상기 유로로부터 이동시켜서 상기 3차원 간세포 배양 유닛에 주입시키는 적어도 하나 이상의 제 2 주입 수단 및 상기 제 2 주입 수단으로부터 주입된 유체 중 적어도 일부를 배수시키는 제 2 배수 수단을 포함할 수 있다.

- [19] 또한, 상기 유로의 일단은 상기 유체 공급 부재와 연결되며, 상기 유로의 상기 분기점은 상기 유체 공급 부재와 연결된 상기 유로의 일단으로부터 연장된 일 지점일 수 있다.
- [20] 또한, 상기 플레이트의 타 측에 위치하며, 상기 유체를 외부로 배출시키는 유체 배출 부재를 더 포함할 수 있다.
- [21] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 간 구성 세포들이 배양된 제 1 배양 구조체가 삽입 설치된 제 2 배양 구조체를 구비하는 3차원 간세포 배양 유닛을 제공하는 단계, 상기 3차원 간세포 배양 유닛을 수용 케이스 내에 수용하는 단계, 상기 3차원 간세포 배양 유닛에 상기 간 구성 세포들의 배양을 위한 배양 배지 및 간독성 평가를 위한 간독성 물질 중 적어도 어느 하나를 포함하는 유체를 공급하는 단계, 상기 3차원 간세포 배양 유닛으로부터 상기 유체를 외부로 배출시키는 단계, 상기 제 1 배양 구조체를 상기 제 2 배양 구조체로부터 분리하여 상기 간 구성 세포들의 괴사 정도를 측정하는 단계 및 외부로 배출된 상기 유체에 생성된 사이토카인을 분석하는 단계를 포함하는 간독성 평가 방법이 제공될 수 있다.
- [22] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 간 구성 세포들이 배양된 제 1 배양 구조체가 삽입 설치된 제 2 배양 구조체를 구비하는 3차원 간세포 배양 유닛을 제공하는 단계, 상기 3차원 간세포 배양 유닛을 플레이트 상에 적어도 하나 이상 설치하는 단계, 상기 플레이트의 일측에 위치한 유체 공급 부재를 이용하여 상기 3차원 간세포 배양 유닛에 상기 간 구성 세포들의 배양을 위한 배양 배지 및 간독성 평가를 위한 간독성 물질 중 적어도 어느 하나를 포함하는 유체를 공급하는 단계, 상기 3차원 간세포 배양 유닛으로부터 상기 유체를 외부로 배출시키는 단계, 상기 제 1 배양 구조체를 상기 제 2 배양 구조체로부터 분리하여 상기 간 구성 세포들의 괴사 정도를 측정하는 단계 및 외부로 배출된 상기 유체에 생성된 사이토카인을 분석하는 단계를 포함하는 간독성 평가 방법이 제공될 수 있다.
- [23] 또한, 상기 3차원 간세포 배양 유닛을 제공하는 단계는, 상기 제 1 배양 구조체를 제조하는 단계, 상기 제 1 배양 구조체에 상기 간 구성 세포들을 배양시키는 단계 및 상기 제 1 배양 구조체를 상기 제 2 배양 구조체 내에 삽입 설치하는 단계를 포함할 수 있다.
- [24] 또한, 상기 제 1 배양 구조체를 제조하는 단계는, 3차원 프린팅(three dimensional printing) 공정, 염 침출(salt leaching) 공정, 상 분리(phase separation) 공정, 발포(gas foaming) 공정 및 전기 방사(electrospinning) 공정 중 적어도 하나의 공정을 통해 수행될 수 있다.
- [25] 또한, 상기 제 1 배양 구조체에 상기 간 구성 세포들을 배양하는 단계는, 상기 간 구성 세포들을 생체 고분자를 액체배지에 녹인 용액과 교반하여 상기 제 1 배양 구조체에 주입하는 단계 및 상기 제 1 배양 구조체를 24시간 이상 배양하여 안정화시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [26] 또한, 상기 제 1 배양 구조체를 상기 제 2 배양 구조체 내에 삽입 설치하는 단계

이후, 상기 제 1 배양 구조체에서 배양된 상기 간 구성 세포들을 추가적으로 배양시키는 단계를 포함할 수 있다.

- [27] 또한, 상기 유체 공급 부재에 의해 공급된 상기 유체는 상기 플레이트의 일측으로부터 상기 플레이트의 타 측으로 흐르는 상기 유체의 흐름에 따라 외부로 자동적으로 배출되거나, 상기 플레이트의 타 측에 위치한 유체 배출 부재에 의해 외부로 배출될 수 있다.

[28]

발명의 효과

- [29] 본 발명에 따른 실시예들은 간의 단위 구조체인 간소엽의 구조 및 환경과 유사한 3차원 간세포 배양 유닛에서 간 구성 세포들을 공동 배양시키고, 3차원 간세포 배양 유닛을 적어도 하나 이상 채용한 간독성 평가 시스템에서 간독성 평가를 연속적으로 진행하기 때문에, 상기 간 구성 세포들 간의 상호 연계가 반영된 간독성 평가가 가능하다.

[30]

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 간세포 배양 유닛을 나타내는 사시도이다.
- [32] 도 2는 도 1의 제 1 배양 구조체를 나타내는 사시도이다.
- [33] 도 3은 도 1의 제 2 배양 구조체를 나타내는 사시도이다.
- [34] 도 4는 도 1의 3차원 간세포 배양 유닛이 수용 케이스 내에 수용된 모습을 나타내는 결합 사시도이다.
- [35] 도 5는 도 1의 3차원 간세포 배양 유닛이 설치된 간독성 평가 시스템을 나타내는 사시도이다.
- [36] 도 6은 도 5의 간독성 평가 시스템에서 유체의 흐름을 나타내는 사시도이다.
- [37]

발명의 실시를 위한 형태

- [38] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 따른 구성 및 작용에 대해 상세하게 설명한다. 이하의 설명은 특히 청구 가능한 본 발명의 여러 측면(aspects) 중 하나이며, 하기의 설명은 본 발명에 대한 상세한 기술의 일부를 이룰 수 있다.
- [39] 다만, 본 발명을 설명함에 있어 공지된 구성 또는 기능에 관한 구체적인 설명은 본 발명을 명료하게 하기 위해 생략할 수 있다.
- [40] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예들을 포함할 수 있는바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

- [41] 제1, 제2 등과 같이 서수를 포함하는 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 해당 구성요소들은 이와 같은 용어들에 의해 한정되지는 않는다. 이 용어들은 하나의 구성요소들을 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다.
- [42] 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 '연결되어' 있다거나 '접속되어' 있다고 언급된 때에는, 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되어 있거나 또는 접속되어 있을 수도 있지만, 중간에 다른 구성요소가 존재할 수도 있다고 이해되어야 할 것이다.
- [43] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.
- [44]
- [45] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 간세포 배양 유닛을 나타내는 사시도이고, 도 2는 도 1의 제 1 배양 구조체를 나타내는 사시도이며, 도 3은 도 1의 제 2 배양 구조체를 나타내는 사시도이다.
- [46] 도 1 내지 도 3을 참조하면, 3차원 간세포 배양 유닛(10)은 제 1 배양 구조체(100) 및 제 2 배양 구조체(200)를 포함할 수 있다.
- [47]
- [48] 제 1 배양 구조체(100)는 적어도 하나 이상 제공될 수 있으며, 제 2 배양 구조체(200) 내에 삽입될 수 있다. 이 경우, 제 2 배양 구조체(200) 내에 삽입되는 제 1 배양 구조체(100)의 개수는 사용자의 목적 및/또는 조건에 따라 달라질 수 있다.
- [49] 여기서, 제 1 배양 구조체(100)는 다공성 구조를 가질 수 있으며, 일 예로, 제 1 배양 구조체(100)는 격자 구조체일 수 있다. 이때, 이러한 격자는 홈의 형태 또는 홀의 형태를 가질 수 있으며, 이 외에도 간 구성 세포들이 배양될 소정의 공간을 갖는 형태라면 상기 격자의 형태로서 자유롭게 적용이 가능하다. 또한, 제 1 배양 구조체(100)는 격자 구조체 이외에도, 스폰지 구조체, 하이드로젤, 생체 고분자를 액체배지에 녹인 용액 등 다양한 형태로서 구현이 가능하다.
- [50] 제 1 배양 구조체(100)는 일 예로 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL), 폴리유산(poly-lactic acid, PLA) 등으로 구성될 수 있다. 다만, 이것은 일 예에 불과하고, 생체 적합하고, 일정 수준 이상의 경도를 갖는 재료라면, 제 1 배양 구조체(100)를 구성하는 재료로서 적용될 수 있다. 이러한 제 1 배양 구조체(100)에서는 간세포, 쿠퍼 세포(kupffer cell) 및 성상 세포(stellate cell) 중에서 적어도 하나를 포함하는 간 구성 세포가 배양될 수 있다.
- [51]
- [52] 일 실시예에 있어서, 제 1 배양 구조체(100)는 격자마다 상기 간 구성 세포가 배양된 상태로 제 2 배양 구조체(200) 내에 삽입 수용될 수 있다. 다만, 이것은 일 예로서, 제 1 배양 구조체(100)를 제작한 다음, 제 1 배양 구조체(100)를 제 2 배양

구조체(200) 내에 삽입시킨 상태에서, 제 1 배양 구조체(100)에 상기 간 구성 세포를 배양시킬 수도 있다.

[53]

[54] 제 2 배양 구조체(200)는 제 1 배양 구조체(100)가 삽입될 수 있고, 배양 배지, 간독성 물질 등과 같은 유체를 수용할 수 있는 수용 공간을 가질 수 있으며, 상기 수용 공간은 일 예로 원기둥 형상으로 형성될 수 있다. 이를 위해, 제 2 배양 구조체(200)는 제 1 주입 수단(210), 제 1 요홈부(220) 및 제 1 배수 수단(230)을 포함할 수 있다.

[55] 제 1 주입 수단(210)은 제 2 배양 구조체(200)의 저부에 적어도 하나 이상 제공될 수 있다. 또한, 제 1 주입 수단(210)은 제 2 배양 구조체(200)의 저부의 둘레를 따라 소정 간격으로 이격 배치될 수 있다.

[56] 예를 들면, 제 1 주입 수단(210)은 제 2 배양 구조체(200)의 저부의 둘레를 따라 총 세 개가 제공될 수 있으며, 세 개의 제 1 주입 수단(210)은 제 2 배수 수단(230)을 중심으로 하는 가상의 원의 원주 상에 동일 간격으로 형성될 수 있다. 여기서, 제 1 주입 수단(210)은 홀의 형태로 형성될 수 있다. 또한, 배양 배지, 간독성 물질 등의 유체는 제 1 주입 수단(210)을 통과하여 제 2 배양 구조체(200) 내에 주입될 수 있다.

[57] 제 1 요홈부(220)는 제 2 배양 구조체(200)의 둘레벽에 적어도 하나 이상 제공될 수 있으며, 이러한 제 1 요홈부(220)에는 제 1 배양 구조체(100)의 일 측이 삽입될 수 있다.

[58] 제 1 배수 수단(230)은 제 2 배양 구조체(200)의 중심 부분에 제공될 수 있으며, 제 1 배양 구조체(100)의 타 측이 삽입되고, 제 1 요홈부(220)의 개수와 실질적으로 동일한 개수를 갖는 제 2 요홈부(225)가 구비될 수 있다. 여기서, 제 1 배수 수단(230)은 일 예로 원기둥 형상으로 형성될 수 있다.

[59] 이와 같이, 제 1 배양 구조체(100)는 제 1 요홈부(220) 및 제 2 요홈부(225)에 끼워지기 때문에, 제 2 배양 구조체(200)에 선택적으로 삽입 가능하며, 필요에 따라, 제 2 배양 구조체(200)에 삽입시킬 제 1 배양 구조체(100)의 개수는 자유롭게 변경될 수 있으므로, 간세포 배양 효율 및/또는 간독성 평가 효율을 증대시킬 수 있다.

[60] 다만, 본 실시예에서는, 제 1 배양 구조체(100)가 제 1 요홈부(220) 및 제 2 요홈부(225)에 의해 끼워지는 것으로 설명하였으나, 제 1 배양 구조체(100)와 제 2 배양 구조체(200)의 연결 관계가 이에 한정되는 것은 아니다. 일 예로, 제 1 배양 구조체(100)는 제 2 배양 구조체(200) 간의 자성, 압력 등을 제어하여 고정될 수도 있다.

[61]

[62] 제 1 배수 수단(230)은 제 1 주입 수단(210)을 통과하여 주입되는 유체 중 적어도 일부를 배수시킬 수 있다. 구체적으로, 제 1 배수 수단(230)은 제 2 배양 구조체(200) 내부에 수용된 상기 유체를 제 2 배양 구조체(200)의 상부로부터

하부로 이동시켜서 배출시킬 수 있도록 제공될 수 있다. 또한, 제 1 배수 수단(230)의 높이는 제 2 배양 구조체(200)의 높이보다 상대적으로 낮게 형성될 수 있다. 이에 따라, 제 1 주입 수단(210)을 통해 제 2 배양 구조체(200)에 연속적으로 유체가 주입되더라도, 상대적으로 낮은 높이를 갖는 제 1 배수 수단(230)에 의해, 상기 유체가 미리 배수될 수 있으므로, 상기 유체가 제 2 배양 구조체(200)로부터 외부로 넘치는 것을 방지할 수 있다. 다만, 이것은 일 예에 불과하며, 경우에 따라, 제 1 배수 수단(230)의 높이는 제 2 배양 구조체(200)의 높이와 동일하게 형성될 수도 있다.

[63]

[64] 본 실시예에서는 제 1 요홈부(220) 및 제 2 요홈부(225)가 각각 12개씩 구비되는 것으로 도시하였으나, 제 1 요홈부(220) 및 제 2 요홈부(225)의 개수가 이에 한정되는 것은 아니며, 제 1 요홈부(220) 및 제 2 요홈부(225)의 개수는 제 2 배양 구조체(200) 내에 삽입되는 제 1 배양 구조체(100)의 개수에 따라 달라질 수 있다.

[65]

상술한 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 간세포 배양 유닛(10)은 간의 기본 구조인 간소엽의 구조와 환경을 모사한 구조체인 제 2 세포 배양 구조체(200) 내에 간 구성 세포가 배양된 제 1 배양 구조체(100)를 선택적으로 삽입시켜 간독성 평가에 사용될 수 있다. 경우에 따라, 상기 간독성 평가는 제 1 배양 구조체(100)에서 배양된 간 구성 세포를 이용하여 수행되거나, 상기 간 구성 세포가 배양된 제 1 배양 구조체(100)를 제 2 배양 구조체(200) 내에 삽입하여 추가적으로 배양된 간 구성 세포를 이용하여 수행될 수 있다.

[66]

[67] 이하에서는, 3차원 간세포 배양 유닛(10)이 단독으로 사용되는 경우에 대하여 도 4를 참조하여 설명하겠다. 도 4는 도 1의 3차원 간세포 배양 유닛이 수용 케이스 내에 수용된 모습을 나타내는 결합 사시도이다.

[68]

도 4를 참조하면, 3차원 간세포 배양 유닛(10)은 수용 케이스(15) 내에 수용될 수 있다.

[69]

수용 케이스(15)는 육각형 형상을 가질 수 있으며, 3차원 간세포 배양 유닛(10)을 수용할 수 있도록, 내부에 원기둥 형상을 갖는 수용 공간을 추가적으로 구비할 수 있다. 이러한 수용 케이스(15) 내에 제 1 배양 구조체(100)가 삽입된 제 2 배양 구조체(200)가 수용되는 경우, 수용 케이스(15)에 의해 제 2 배양 구조체(200)의 제 1 주입 수단(210)의 일 단 및 제 1 배수 수단(230)의 일 단이 폐쇄될 수 있다. 이에 따라, 제 1 주입 수단(210) 및 제 1 배수 수단(230)으로 인해 발생할 수 있는 유체의 손실을 최소화할 수 있다. 이와 같이, 수용 케이스(15)는 3차원 간세포 배양 유닛(10)을 단독으로 사용하고자 할 때 요구되는 부재일 수 있다.

[70]

한편, 3차원 간세포 배양 유닛(10)은 상술한 바와 같이 수용 케이스(15)에 수용되어 단독으로 사용될 수도 있으나, 이하에서 설명되는 바와 같이, 적어도 하나 이상의 3차원 간세포 배양 유닛(10)을 포함하는 간독성 평가

시스템(1000)으로서 사용되는 것도 가능하다. 이하, 이러한 간독성 평가 시스템(1000)의 구체적인 구성을 도 5 및 도 6을 참조하여 설명하겠다.

- [71] 도 5는 도 1의 3차원 간세포 배양 유닛이 설치된 간독성 평가 시스템을 나타내는 사시도이고, 도 6은 도 5의 간독성 평가 시스템에서 유체의 흐름을 나타내는 사시도이다.
- [72] 도 5 및 도 6을 참조하면, 간독성 평가 시스템(1000)은 적어도 하나 이상의 3차원 간세포 배양 유닛(10)을 포함할 수 있다. 간독성 평가 시스템(1000)은 3차원 간세포 배양 유닛(10), 플레이트(300) 및 유체 공급 부재(400)를 포함할 수 있다. 한편, 실시예에 따라, 간독성 평가 시스템(1000)은 유체 배출 부재(500)를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [73]
- [74] 3차원 간세포 배양 유닛(10)은 제 1 배양 구조체(100), 제 1 주입 수단(210) 및 제 1 요흡부(220)와 제 1 배수 수단(230)을 구비하는 제 2 배양 구조체(200)를 포함할 수 있다. 다만, 이러한 3차원 간세포 배양 유닛(10)에 대해서는 도 1 내지 도 4를 참조하여 설명한 바 있으므로, 기 설명된 부분에 대해서는 중복되는 설명을 생략하기로 한다.
- [75] 플레이트(300) 상에는 적어도 하나 이상의 3차원 간세포 배양 유닛(10)이 설치될 수 있으며, 유로(310), 제 2 주입 수단(320) 및 제 2 배수 수단(330)을 포함할 수 있다.
- [76] 유로(310)는 플레이트(300)의 내부에 형성될 수 있으며, 도 6에 큰 화살표로 도시된 바와 같이, 유로(310)를 따라 배양 배지 및 간독성 물질을 포함하는 유체가 유동하면서 간 구성 세포 배양 또는 간독성 평가가 이루어질 수 있다. 다만, 이는 일 예에 불과하고, 유로(310)는 플레이트(300)의 저면에 형성되는 것도 가능하다. 여기서, 플레이트(300)의 상기 저면은 플레이트(300)에서 3차원 간세포 배양 유닛(10)이 접촉되는 면을 의미한다.
- [77] 또한, 유로(310)는 간독성 평가 시스템(1000)에 설치된 3차원 간세포 배양 유닛(10)의 개수만큼 분절되어 형성될 수 있으며, 상류측의 제 2 배수 수단(330)과, 이에 인접하는 하류측의 제 2 주입 수단(320)을 연결하는 연결로(312)를 포함할 수 있다. 또한, 유로(310)에 포함되는 연결로(312)의 제 2 주입 수단(320) 측 단부에는 분기점(311)이 형성될 수 있으며, 분기점(311)에 의해 유로(310)는 적어도 두 갈래 이상으로 갈라질 수 있다. 이와 같이 분기점(311)에 의해 유로(310)가 분기되어 형성됨에 따라, 유로(310)는 하나의 3차원 간세포 배양 유닛(10)을 중심으로 보았을 때 3차원 간세포 배양 유닛(10)의 주연부의 적어도 일부를 따라 연장 형성될 수 있다.
- [78] 한편, 분기점(311) 및 분기점(311)을 기점으로 분기되는 유로(310)의 각 단부들에는 제 2 주입 수단(320)이 형성될 수 있다. 제 2 주입 수단(320)은 플레이트(300)로부터 수직하게 돌출 형성될 수 있으며, 3차원 간세포 배양 유닛(10)이 플레이트(300)에 설치되었을 때 3차원 간세포 배양 유닛(10)의 제 1

주입 수단(210)을 관통할 수 있는 위치에 형성될 수 있다. 이에 따라, 유로(310)를 통해 유동하는 유체가 제 2 주입 수단(320)에 의해 3차원 간세포 배양 유닛(10)의 상부로 상승하고, 상승한 유체는 3차원 간세포 배양 유닛(10)의 상부로부터 내부로 확산될 수 있다. 이를 위해, 제 2 주입 수단(320)은 일 예로 미세관 형태로 제공되어, 유체가 모세관 현상에 의해 상승할 수 있도록 구성될 수 있다.

[79]

[80] 제 2 배수 수단(330)은 3차원 간세포 배양 유닛(10)의 제 2 배양 구조체(200)에 형성된 제 1 배수 수단(230)에 끼워질 수 있도록 제공될 수 있다. 이에 따라, 제 2 배수 수단(330)의 직경은 제 1 배수 수단(230)의 직경 보다 실질적으로 작게 형성될 수 있다. 이러한 제 2 배수 수단(330)은 제 2 주입 수단(320)으로부터 주입되는 상기 유체의 양이 3차원 간세포 배양 유닛(10)이 수용할 수 있는 유체의 양을 초과한 경우, 초과된 양 만큼의 유체를 3차원 간세포 배양 유닛(10)의 상부로부터 하부로 하강시켜, 상기 유체를 배수시키는 기능을 수행할 수 있다.

[81] 유체 공급 부재(400)는 플레이트(300)의 일측에 위치할 수 있으며, 일 예로 플레이트(300)의 일단에 설치된 3차원 간세포 배양 유닛(10)에 연속적으로 유체를 공급할 수 있는 유체 공급용 모터일 수 있다. 또한, 유체 공급 부재(400)는 유로(310)의 일단과 연결되어 상기 유체를 3차원 간세포 배양 유닛(10)에 연속적으로 주입할 수 있다.

[82] 한편, 유체 공급 부재(400)로부터 공급된 상기 유체는 플레이트(300)의 일측으로부터 플레이트(300)의 타 측으로 흐르는 상기 유체의 흐름에 따라 외부로 자동적으로 배출될 수 있으며, 외부로 배출된 상기 유체는 간독성 평가에 이용될 수 있다. 다만, 상기 유체가 외부로 배출되는 방법은 이에 한정되는 것이 아니며, 필요에 따라, 상기 유체는 유체 배출 부재(500)에 의해 외부로 배출될 수도 있다. 구체적으로, 유체 배출 부재(500)는 플레이트(300)의 타측에 위치할 수 있으며, 일 예로 플레이트(300)의 타단에 설치된 3차원 간세포 배양 유닛(10)으로부터 상기 유체를 배출시킬 수 있는 유체 배출용 모터일 수 있다. 또한, 유체 배출 부재(500)는 유로(310)의 타단과 연결되어 상기 유체를 3차원 간세포 배양 유닛(10)으로부터 연속적으로 배출시킬 수 있다.

[83] 한편, 도 6에 도시하지는 않았으나, 간독성 평가 시스템(1000)은 센서 및 제어부를 추가적으로 포함할 수도 있다. 이 경우, 상기 센서는 각각의 3차원 간세포 배양 유닛(10)에 연속적으로 주입되는 상기 유체의 양을 센싱하도록, 3차원 간세포 배양 유닛(10)의 제 2 배수 수단(330)의 인근에 제공될 수 있으며, 일 예로 유량 센서, 레벨 센서 등이 사용될 수 있다. 다만, 상기 센서의 설치 위치 및 종류가 이에 한정되는 것은 아니다.

[84] 또한, 상기 제어부에는 3차원 간세포 배양 유닛(10)이 수용할 수 있는 유체의 양에 관한 데이터가 기 저장되어 있으며, 상기 센서에 의해 센싱된 유체의 양과 상기 기 저장된 유체의 양을 비교하여, 이를 바탕으로 유체 공급 부재(400)의 유체 주입 속도 및 유체 배출 부재(500)의 유체 배출 속도를 제어할 수 있다. 이에

따라, 3차원 간세포 배양 유닛(10)에 상기 유체가 연속적으로 공급되는 과정에서 발생할 수 있는 유체의 범람을 미연에 방지할 수 있고, 상기 유체의 양을 보다 정확하게 제어하면서, 간독성 평가 시스템(1000)을 운용할 수 있다.

[85] 상술한 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 간독성 평가 시스템(1000)은 서로 연결된 복수의 3차원 간세포 배양 유닛(10)에 연속적으로 배양 배지를 주입 및 교환시켜주기 때문에, 산소 투과량이 증가되어 간 구성 세포들의 기능을 향상시킬 수 있다. 이어서, 배양된 간 구성 세포들에 간독성 물질을 주입하여 간독성 평가를 연속적으로 진행할 수 있다.

[86] 다만, 본 실시예에서는, 간독성 평가가 복수의 3차원 간세포 배양 유닛(10)을 구비하는 간독성 평가 시스템(1000)에 의해 수행되는 것으로 설명하였으나, 이것은 일 예에 불과하다. 경우에 따라, 3차원 간세포 배양 유닛(10)을 수용 케이스(15) 내에 수용시킨 다음, 이를 단독으로 간독성 평가에 활용할 수도 있다.

[87]

[88] 이하에서는, 간독성 평가 방법에 대하여 실시예를 들어 설명하겠다.

[89]

[90] 실시예 1: 3차원 간세포 배양 및 간독성 평가

[91] (a) 제 1 배양 구조체 형성

[92] 먼저, 3차원 프린팅 공정을 이용하여, 공극의 물리적 성질이 제어된 제 1 배양 구조체를 제조하였다. 여기서, 3차원 프린팅 공정은 약 0.2 mm의 직경을 갖는 노즐을 이용하였으며, 약 170°C 내지 약 270°C 온도 하에서, 약 30mm s⁻¹ 내지 120 mm s⁻¹의 프린팅 속도로 시행하였다.

[93] 상기 제 1 배양 구조체의 재료로는 생체 적합하며 3차원 프린팅이 가능하며, 경도가 강한 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL), 폴리유산(poly-lactic acid, PLA) 등을 사용하였다.

[94] 상기 제 1 배양 구조체는 지름이 약 0.1mm 내지 약 0.3 mm 인 격자 구조체로 3ds Max Design(Autodesk, Inc., San Rafael, CA, USA)를 이용하여 디자인하였다.

[95]

[96] (b) 간 구성 세포 배양

[97] 간 구성 세포들을 각기 상기 제 1 배양 구조체 내에서 배양하여 상기 간 구성 세포들을 안정화 시킨 다음, 상기 제 2 배양 구조체 내에 삽입하였다. 여기서, 상기 제 2 배양 구조체는 약 4cm 내지 약 8cm의 직경을 갖는 원기둥 형상의 구조체를 사용하였다.

[98] 상기 제 1 배양 구조체 내에 상기 간 구성 세포들을 각기 배양시키기 위해 생체 고분자를 액체배지에 녹인 용액과 상기 간 구성 세포들을 각기 교반하여 24시간 이상 배양시킴에 따라, 제 1 배양 구조체에서의 세포 부착률을 높였다.

[99] 상기 간 구성 세포들로는 인간초대배양간세포(human primary hepatocytes), HepaRG 또는 간암 세포주 (HepG2, Hep3B, Huh7) 등이 활용 가능하다. 쿠퍼 세포는 Human kupffer cell 또는 확립세포주로 U937이 활용 가능하다. 성상

세포주로는 확립세포주인 LX2 세포주가 활용 가능하다.

- [100] 상기 간 구성 세포들이 1차 배양된 제 1 배양 구조체를 상기 제 2 배양 구조체에 적정 비율로 (간세포: 쿠퍼 세포, 3:1 또는 4:1, 간세포: 정상 세포, 3:1 또는 4:1) 삽입한 후, 배양 배지를 제 2 배양 구조체의 높이만큼 채워서 상기 간 구성 세포들을 공동 배양시켰다.

[101]

- [102] (c) 간독성 평가

- [103] 양성대조 간독성 물질로써, 아세트아미노펜(acetoaminophen) 및 트리글리타존(Triglitazone) 등을 적정 농도로 상기 제 1 배양 구조체가 삽입된 상기 제 2 배양 구조체(이하, 3차원 간세포 배양 유닛)에 주입하였다. 이어서, 상기 3차원 간세포 배양 유닛을 일정 시간 노출시킨 다음, 상기 제 1 배양 구조체를 상기 제 2 배양 구조체로부터 분리하였다. 이어서, 상기 간독성 물질에 노출된 상기 제 1 배양 구조체를 The cell Counting Kit-8(Dojindo Laboratory, Kumanoto, Japan) 나 The celltiter-glo® luminescent cell viability assay(Promega Corp, Madison, USA)을 이용하여 상기 제 1 배양 구조체에서의 세포 생존율을 측정하였다. 또한, 세포 손상 지표인 LDH(lactate dehydrogenase) 측정을 통해 세포 괴사 정도를 측정하였다.

- [104] 이어서, 상기 3차원 간세포 배양 유닛으로부터 유체(예를 들면, 간 독성 물질이 주입된 후 일정 시간 동안 노출된 배양 배지)를 회수하였다. 회수된 유체에 생성된 인터루킨2(interleukin2), 인터루킨6(interleukin6), 인터루킨8(interleukin8) 등의 cytokine(사이토카인)을 분석하였다.

- [105] 상술한 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 간독성 평가 방법은, 간의 단위 구조체인 간소엽의 구조 및 환경과 유사한 3차원 간세포 배양 유닛에서 간 구성 세포들을 공동 배양시키고, 3차원 간세포 배양 유닛을 적어도 하나 이상 채용한 간독성 평가 시스템에서 간독성 평가를 연속적으로 진행하기 때문에, 상기 간 구성 세포들 간의 상호 연계가 반영된 간독성 평가가 가능하다.

- [106] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 예를 들어 당업자는 각 구성요소의 재질, 크기 등을 적용 분야에 따라 변경하거나, 실시형태들을 조합 또는 치환하여 본 발명의 실시예에 명확하게 개시되지 않은 형태로 실시할 수 있으나, 이 역시 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예는 모든 면에서 예시적인 것으로 한정적인 것으로 이해해서는 안 되며, 이러한 변형된 실시예는 본 발명의 특허청구범위에 기재된 기술사상에 포함된다고 하여야 할 것이다.

[107]

- [108] [부호의 설명]

- [109] 10: 3차원 간세포 배양 유닛 15: 수용 케이스

- [110] 100: 제 1 배양 구조체 200: 제 2 배양 구조체
- [111] 210: 제 1 주입 수단 220: 제 1 요흡부
- [112] 225: 제 2 요흡부 230: 제 1 배수 수단
- [113] 300: 플레이트 310: 유로
- [114] 311: 분기점 312: 연결로
- [115] 320: 제 2 주입 수단 330: 제 2 배수 수단
- [116] 400: 유체 공급 부재 500: 유체 배출 부재
- [117] 1000: 간독성 평가 시스템
- [118]

청구범위

- [청구항 1] 간 구성 세포들이 배양되는 제 1 배양 구조체; 및
상기 제 1 배양 구조체가 삽입 설치될 수 있도록 제공되며, 상기 간 구성 세포들의 배양을 위한 배양 배지 및 간독성 평가를 위한 간독성 물질 중 적어도 어느 하나를 포함하는 유체가 내부에 수용될 수 있는 제 2 배양 구조체를 포함하는 3차원 간세포 배양 유닛.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 제 2 배양 구조체는,
상기 유체가 주입되는 적어도 하나 이상의 제 1 주입 수단;
상기 제 1 배양 구조체의 일 측이 삽입되는 적어도 하나 이상의 제 1 요홈부; 및
상기 제 1 배양 구조체의 타측이 삽입되는 적어도 하나 이상의 제 2 요홈부를 구비하며, 상기 제 1 주입 수단으로부터 주입된 유체 중 적어도 일부를 배수시키는 제 1 배수 수단을 포함하는 3차원 간세포 배양 유닛.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 제 1 배수 수단은 상기 제 2 배양 구조체 내부에 수용된 상기 유체를 상기 제 2 배양 구조체의 상부로부터 하부로 하강시켜서 배출시키도록 제공되는 3차원 간세포 배양 유닛.
- [청구항 4] 제 2 항에 있어서,
상기 제 1 주입 수단의 일 단 및 상기 제 1 배수 수단의 일 단을 폐쇄시키면서 상기 제 2 배양 구조체를 수용하는 수용 케이스를 더 포함하는 3차원 간세포 배양 유닛.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 제 1 배양 구조체는,
상기 간 구성 세포들이 배양되는 배양 공간을 제공하는 다공성 매트릭스(porous matrix)인 3차원 간세포 배양 유닛.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 간 구성 세포들은 간세포, 쿠퍼 세포(kupffer cell) 및 성상 세포(stellate cell) 중 적어도 하나를 포함하는 3차원 간세포 배양 유닛.
- [청구항 7] 간 구성 세포들이 배양되는 제 1 배양 구조체 및 상기 제 1 배양 구조체가 삽입 설치되며, 상기 간 구성 세포들의 배양을 위한 배양 배지 및 간독성 평가를 위한 간독성 물질 중 적어도 어느 하나를 포함하는 유체가 내부에 수용될 수 있는 제 2 배양 구조체를 구비하는 3차원 간세포 배양 유닛;
상기 3차원 간세포 배양 유닛이 적어도 하나 이상 설치되는 플레이트; 및
상기 플레이트의 일 측에 위치하며, 상기 3차원 간세포 배양 유닛에 유체를 공급하는 유체 공급 부재를 포함하는 간독성 평가 시스템.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서,

상기 플레이트는,
 상기 유체가 이동되는 유로;
 상기 유로 상에 형성되며, 상기 유체를 상기 유로로부터 이동시켜서 상기 3차원 간세포 배양 유닛에 주입시키는 적어도 하나 이상의 제 2 주입 수단; 및
 상기 제 2 주입 수단으로부터 주입된 유체 중 적어도 일부를 배수시키는 제 2 배수 수단을 포함하는 간독성 평가 시스템.

[청구항 9] 제 8 항에 있어서,
 상기 유로의 일단은 상기 유체 공급 부재와 연결되며,
 상기 유로의 상기 분기점은 상기 유체 공급 부재와 연결된 상기 유로의 일단으로부터 연장된 일 지점인 간독성 평가 시스템.

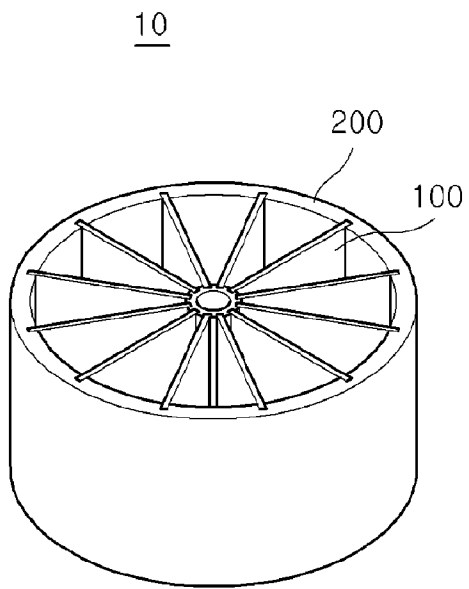
[청구항 10] 제 7 항에 있어서,
 상기 플레이트의 타 측에 위치하며, 상기 유체를 외부로 배출시키는 유체 배출 부재를 더 포함하는 간독성 평가 시스템.

[청구항 11] 간 구성 세포들이 배양된 제 1 배양 구조체가 삽입 설치된 제 2 배양 구조체를 구비하는 3차원 간세포 배양 유닛을 제공하는 단계;
 상기 3차원 간세포 배양 유닛을 수용 케이스 내에 수용하는 단계;
 상기 3차원 간세포 배양 유닛에 상기 간 구성 세포들의 배양을 위한 배양 배지 및 간독성 평가를 위한 간독성 물질 중 적어도 어느 하나를 포함하는 유체를 공급하는 단계; 상기 3차원 간세포 배양 유닛으로부터 상기 유체를 외부로 배출시키는 단계;
 상기 제 1 배양 구조체를 상기 제 2 배양 구조체로부터 분리하여 상기 간 구성 세포들의 괴사 정도를 측정하는 단계; 및
 외부로 배출된 상기 유체에 생성된 사이토카인을 분석하는 단계를 포함하는 간독성 평가 방법.

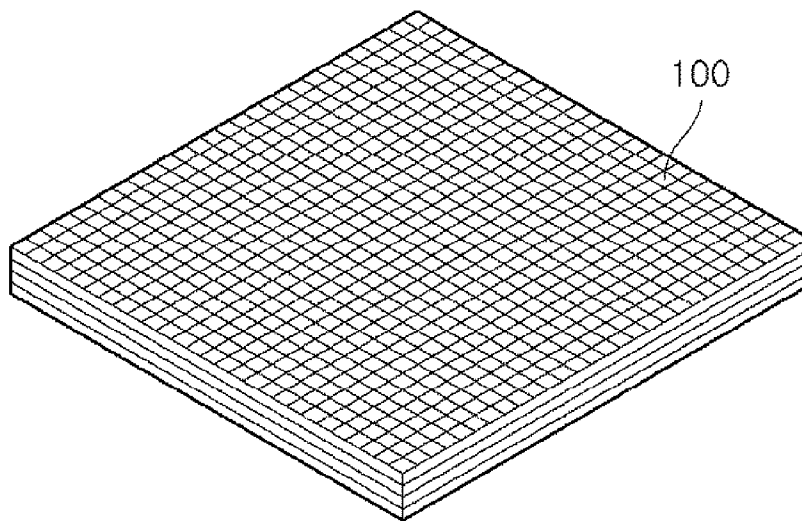
[청구항 12] 간 구성 세포들이 배양된 제 1 배양 구조체가 삽입 설치된 제 2 배양 구조체를 구비하는 3차원 간세포 배양 유닛을 제공하는 단계;
 상기 3차원 간세포 배양 유닛을 플레이트 상에 적어도 하나 이상 설치하는 단계;
 상기 플레이트의 일 측에 위치한 유체 공급 부재를 이용하여 상기 3차원 간세포 배양 유닛에 상기 간 구성 세포들의 배양을 위한 배양 배지 및 간독성 평가를 위한 간독성 물질 중 적어도 어느 하나를 포함하는 유체를 공급하는 단계;
 상기 3차원 간세포 배양 유닛으로부터 상기 유체를 외부로 배출시키는 단계;
 상기 제 1 배양 구조체를 상기 제 2 배양 구조체로부터 분리하여 상기 간 구성 세포들의 괴사 정도를 측정하는 단계; 및
 외부로 배출된 상기 유체에 생성된 사이토카인을 분석하는 단계를

- 포함하는 간독성 평가 방법.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
 상기 3차원 간세포 배양 유닛을 제공하는 단계는,
 상기 제 1 배양 구조체를 제조하는 단계;
 상기 제 1 배양 구조체에 상기 간 구성 세포들을 배양시키는 단계; 및
 상기 제 1 배양 구조체를 상기 제 2 배양 구조체 내에 삽입 설치하는
 단계를 포함하는 간독성 평가 방법.
- [청구항 14] 제 13 항에 있어서,
 상기 제 1 배양 구조체를 제조하는 단계는,
 3차원 프린팅(three dimensional printing) 공정, 염 침출(salt leaching) 공정,
 상 분리(phase separation) 공정, 발포(gas foaming) 공정 및 전기
 방사(electrospinning) 공정 중 적어도 하나의 공정을 통해 수행되는 간독성
 평가 방법.
- [청구항 15] 제 13 항에 있어서,
 상기 제 1 배양 구조체에 상기 간 구성 세포들을 배양하는 단계는,
 상기 간 구성 세포들을 생체 고분자를 액체배지에 녹인 용액과 교반하여
 상기 제 1 배양 구조체에 주입하는 단계; 및
 상기 제 1 배양 구조체를 24시간 이상 배양하여 안정화시키는 단계를
 포함하는 간독성 평가 방법.
- [청구항 16] 제 13 항에 있어서,
 상기 제 1 배양 구조체를 상기 제 2 배양 구조체 내에 삽입 설치하는 단계
 이후, 상기 제 1 배양 구조체에서 배양된 상기 간 구성 세포들을
 추가적으로 배양시키는 단계를 포함하는 간독성 평가 방법.
- [청구항 17] 제 12 항에 있어서,
 상기 유체 공급 부재에 의해 공급된 상기 유체는 상기 플레이트의
 일측으로부터 상기 플레이트의 타 측으로 흐르는 상기 유체의 흐름에
 따라 외부로 자동적으로 배출되거나, 상기 플레이트의 타 측에 위치한
 유체 배출 부재에 의해 외부로 배출되는 간독성 평가 방법.

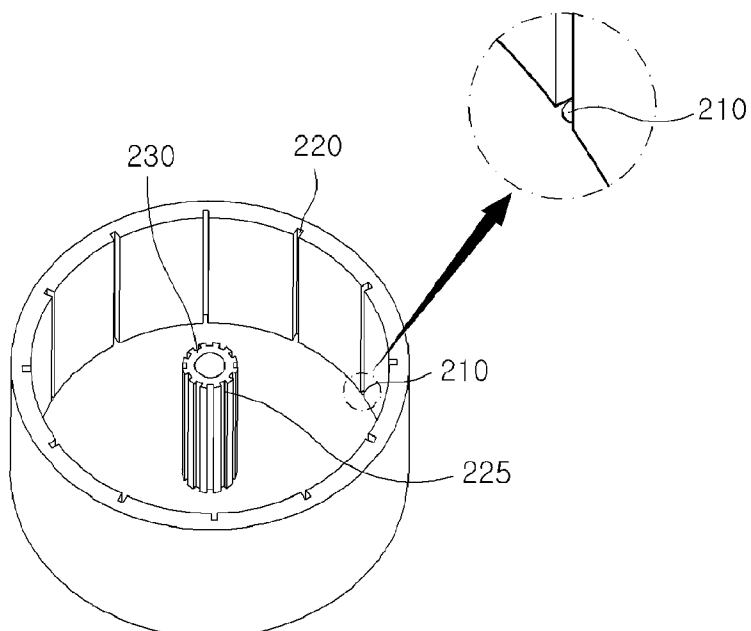
[도1]



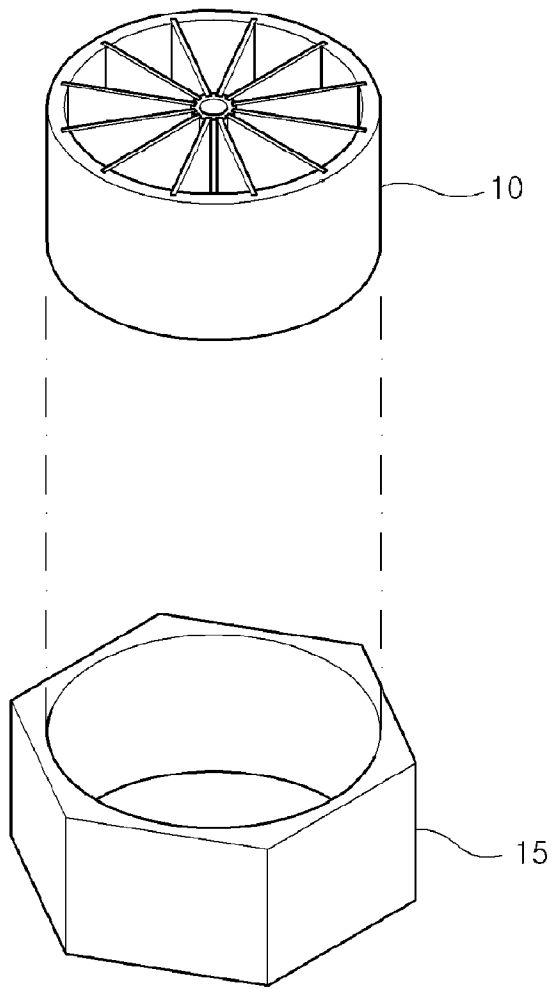
[도2]



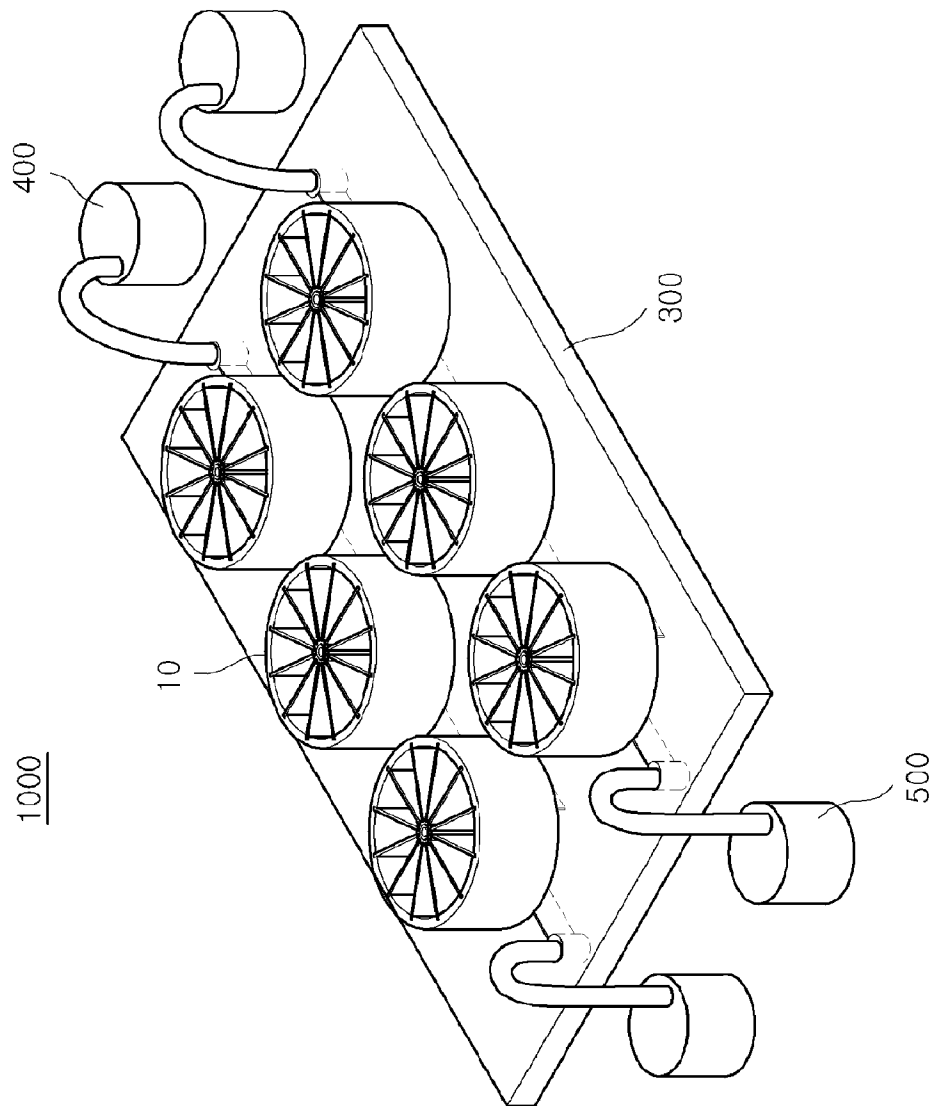
[도3]



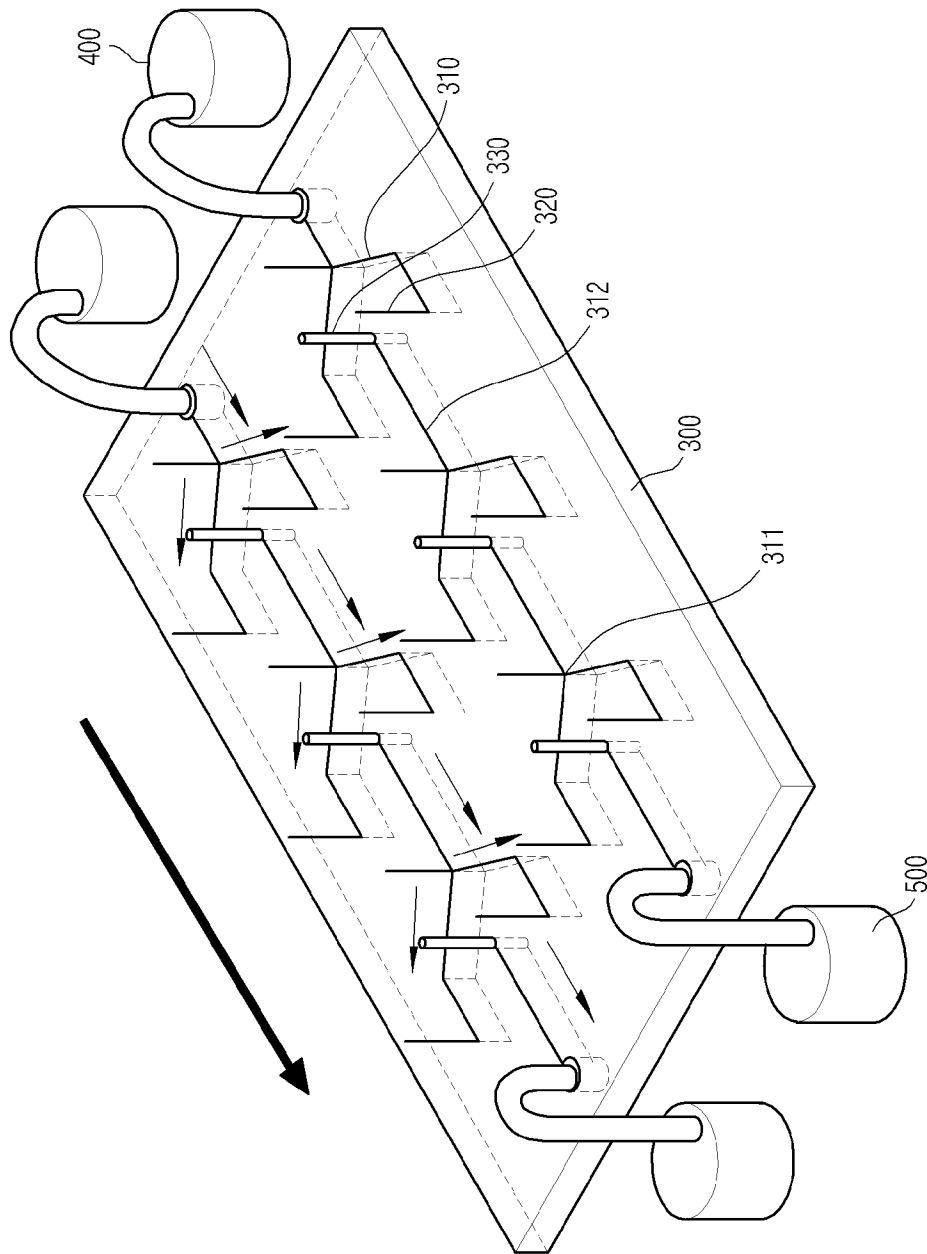
[도4]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/008549

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/50(2006.01)i, C12M 3/00(2006.01)i, C12M 1/12(2006.01)i, C12M 1/34(2006.01)i, C12N 5/00(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/50; C12N 5/22; C12Q 1/18; C12N 5/06; G01N 33/15; C12Q 1/20; C12M 3/00; C12M 1/34; C12M 1/12; C12N 5/00; C12N 5/071

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: culture structure, hepatocyte, culture unit, hepatotoxicity evaluation, liver organization cell, plate, fluid supply member, flow path, injection means, drain means

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011-0091930 A1 (VACANTI, J. P. et al.) 21 April 2011 See abstract; paragraphs [0005], [0010], [0011], [0015] and [0016]; claims 1-7; figures 1-3.	1-17
A	WO 2015-003160 A2 (COLORADO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 08 January 2015 See abstract; claims 117-120.	1-17
A	US 2007-0166816 A1 (CAMPBELL, S. et al.) 19 July 2007 See abstract; paragraph [0052]; claim 67; figures 5-10B.	1-17
A	JP 2007-024576 A (FUJIFILM HOLDINGS CORP.) 01 February 2007 See abstract; claims 1 and 10.	1-17
A	JP 08-503610 A (MERCK & CO., INC.) 23 April 1996 See abstract; claims 1-5.	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 NOVEMBER 2016 (04.11.2016)

Date of mailing of the international search report

04 NOVEMBER 2016 (04.11.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/008549

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0091930 A1	21/04/2011	EP 2254989 A1 WO 2009-102466 A1	01/12/2010 20/08/2009
WO 2015-003160 A2	08/01/2015	US 2015-0079673 A1 WO 2015-003160 A3	19/03/2015 14/05/2015
US 2007-0166816 A1	19/07/2007	AU 2003-265228 A8 CA 2479072 A1 EP 1490520 A2 EP 1490520 A4 US 2003-0215941 A1 US 2007-0166816 A1 WO 03-104439 A2 WO 2003-104439 A3	22/12/2003 18/12/2003 29/12/2004 07/06/2006 20/11/2003 19/07/2007 18/12/2003 02/09/2004
JP 2007-024576 A	01/02/2007	US 2007-0015272 A1	18/01/2007
JP 08-503610 A	23/04/1996	EP 0673433 A1 WO 94-12662 A1	10/12/1997 09/06/1994

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/50(2006.01)i, C12M 3/00(2006.01)i, C12M 1/12(2006.01)i, C12M 1/34(2006.01)i, C12N 5/00(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/50; C12N 5/22; C12Q 1/18; C12N 5/06; G01N 33/15; C12Q 1/20; C12M 3/00; C12M 1/34; C12M 1/12; C12N 5/00; C12N 5/071

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 배양 구조체, 간세포, 배양 유닛, 간독성 평가, 간 구성 세포, 플레이트, 유체 공급 부재, 유로, 주입 수단, 배수 수단

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2011-0091930 A1 (VACANTI, J. P. 등) 2011.04.21 요약; 문단 [0005], [0010], [0011], [0015] 및 [0016]; 청구항 1-7; 도면 1-3 참조.	1-17
A	WO 2015-003160 A2 (COLORADO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 2015.01.08 요약; 청구항 117-120 참조.	1-17
A	US 2007-0166816 A1 (CAMPBELL, S. 등) 2007.07.19 요약; 문단 [0052]; 청구항 67; 도면 5-10B 참조.	1-17
A	JP 2007-024576 A (FUJIFILM HOLDINGS CORP.) 2007.02.01 요약; 청구항 1 및 10 참조.	1-17
A	JP 08-503610 A (MERCK & CO., INC.) 1996.04.23 요약; 청구항 1-5 참조.	1-17

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 11월 04일 (04.11.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 11월 04일 (04.11.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2011-0091930 A1	2011/04/21	EP 2254989 A1 WO 2009-102466 A1	2010/12/01 2009/08/20
WO 2015-003160 A2	2015/01/08	US 2015-0079673 A1 WO 2015-003160 A3	2015/03/19 2015/05/14
US 2007-0166816 A1	2007/07/19	AU 2003-265228 A8 CA 2479072 A1 EP 1490520 A2 EP 1490520 A4 US 2003-0215941 A1 US 2007-0166816 A1 WO 03-104439 A2 WO 2003-104439 A3	2003/12/22 2003/12/18 2004/12/29 2006/06/07 2003/11/20 2007/07/19 2003/12/18 2004/09/02
JP 2007-024576 A	2007/02/01	US 2007-0015272 A1	2007/01/18
JP 08-503610 A	1996/04/23	EP 0673433 A1 WO 94-12662 A1	1997/12/10 1994/06/09