

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 4월 5일 (05.04.2018)

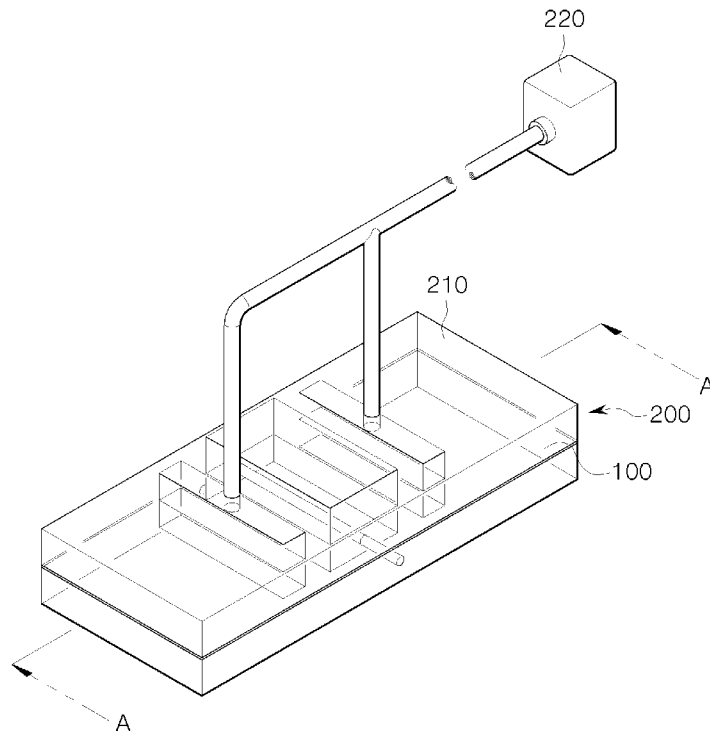


(10) 국제공개번호
WO 2018/062655 A1

- (51) 국제특허분류: *C12M 1/42* (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12M 1/32 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004324
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 24일 (24.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0126516 2016년 9월 30일 (30.09.2016) KR
- (71) 출원인: 계명대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY) [KR/KR]; 42601 대구시 달서구 달구벌대로 1095, Daegu (KR).
- (72) 발명자: 허윤석 (HEO, Yun Seok); 42602 대구시 달서구 달구벌대로 199길 53-8, 303호, Daegu (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털로 151 이노플렉스 1차 601호, 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, DJ, 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, KH, KN, KP, KW, 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.

(54) Title: CELL CULTURING APPARATUS AND CELL CULTURING METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 세포 배양장치 및 이를 이용한 세포 배양방법



(57) Abstract: A cell culturing apparatus according to an aspect of the present invention, is constructed so as to apply stimulation to cells during cultivation of the cells such that the culturing conditions of the cells are similar to a living body. The cell culturing apparatus comprises: a membrane which has a plurality of placement grooves into which the cells are placed, is composed of an expandable and contractible material, and applies pressure to the placed cells while expanding or contracting, the placement grooves being characterized by being formed in a planar shape having a long axis and a short axis; and a tensioning means, which is coupled to both ends of the membrane and selectively tensions the membrane. Such a cell culturing apparatus according to the present invention generates the physical stimulation that cells receive inside of a body, thereby allowing the cells to be cultured in an environment that is most similar

[다음 쪽 계속]



WO 2018/062655 A1



(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, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, 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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

to the inside of the body. Thus, culturing efficiency and the accuracy of monitored values may be increased.

(57) 요약서: 본 발명의 일 측면에 따른 세포 배양장치는 세포가 배양되는 동안 자극을 가하여 상기 세포의 배양조건을 생체와 유사하도록 조성하는 것으로, 내부로 상기 세포가 안착되는 복수의 안착홈을 구비하고 신축 가능한 재질로 이루어져 수축 또는 신장하면서 상기 안착된 세포에 압력을 가하되, 상기 안착홈은 장축과 단축을 가지는 평면 형상으로 형성되는 것을 특징으로 하는 멤브레인; 상기 멤브레인의 양단에 결합하여 상기 멤브레인을 선택적으로 인장시키는 인장수단을 포함한다. 이러한 본 발명에 따른 세포 배양장치는 세포가 체내에서 받는 물리적 자극을 구현하여 상기 세포가 체내와 가장 유사한 환경에서 배양될 수 있도록 함으로써, 배양의 효율을 높이고 모니터 값의 정확도를 높일 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 세포 배양장치 및 이를 이용한 세포 배양방법

기술분야

- [1] 본 발명은 세포 배양장치 및 이를 이용한 세포 배양방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 미세유체 시스템을 이용하여 세포의 배양환경을 제어하는 세포 배양장치 및 이를 이용한 세포 배양방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 일반적으로 미세유체 반응기(Microfluidic reactor)는 수십에서 수백 마이크로미터의 채널 크기를 가지는 장치를 이용한 합성 반응 장치 또는 반응 시스템으로서, 소량의 시약을 사용하여 반응시간의 단축, 빠른 물질 및 열전달, 확산 거리 최소화, 부 반응 (Side reaction)의 최소화 등 다양한 장점을 가지며 유기, 무기 합성, 나노재료합성, 단백질, DNA 반응을 통한 분석 시스템 개발 등 생물학에서부터 나노 재료, 화학 등에 이르기까지 여러 분야에 사용되고 있다.
- [3] 위와 같은 미세유체 반응기가 적용된 사례로는, 세포, 신경세포, 미생물 또는 세균 등을 배양하는데 사용되는 세포 배양칩이 대표적이다. 상기 세포 배양칩은 폴리디메틸실록산(Polydimethylsiloxane, 이하, 'PDMS'라 함) 소재의 미소 구조체로 구성되며, 상기 구조체 상에 세포가 안착된 상태에서 마이크로 단위의 아주 작은 영역에서 배양액의 흐름을 통해 세포를 성장 또는 배양시킨다.
- [4] 여기서 상기 세포 배양칩은 PDMS 소재로 이루어져 높은 투과성과 생체 안정성을 가지며, 미세 면적에서 반응하여 반응 공간의 효율성을 확대하고 부피에 대한 면적 비를 증진시킬 수 있으며, 정교한 실험 변수 조절이 가능하다.
- [5] 이에 관련된 기술로서 대한민국 공개특허 제10-1167435호가 개시되어 있다. 여기에서는 생체물질을 수용하는 배양 영역과 습도 유지용 복수의 관통홀이 형성된 베이스 부재, 상기 관통홀에 이동 가능하게 결합된 필터, 및 상기 필터에 형성되며, 생체물질을 내장하는 바이오 매트릭스를 포함하는 세포칩이 제안되고 있다.
- [6] 그러나 상기와 같은 세포칩은 실제 세포가 체내에서 받는 물리적 자극이 구현되지 않아, 세포의 배양 과정에서 상기 세포가 생존에 필요한 최적의 조건을 조성하기가 어려우며 상기 세포의 배양을 관찰함에 있어 실제 배양 결과와는 오차가 발생한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 창출된 것으로, 생체와 유사한 환경을 조성하여 세포의 배양 효율을 높일 수 있는 세포 배양장치 및 이를 이용한 세포 배양방법을 제공하는 것에 그 목적이 있다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 일 측면에 따른 세포 배양장치는 세포가 배양되는 동안 자극을 가하여 상기 세포의 배양조건을 생체와 유사하도록 조성하는 것으로, 내부로 상기 세포가 안착되는 복수의 안착홈을 구비하고, 신축 가능한 재질로 이루어져 수축 또는 신장하면서 상기 안착된 세포에 압력을 가하되, 상기 안착홈은 장축과 단축을 가지는 평면 형상으로 형성되는 것을 특징으로 하는 멤브레인; 상기 멤브레인의 양단에 결합하여 상기 멤브레인을 선택적으로 인장시키는 인장수단을 포함한다.
- [9] 여기서, 상기 멤브레인은 상기 배양챔버의 수용공간에 배치되어 상기 복수의 안착홈을 구비하는 세포안착부와, 상기 세포 안착부의 양측으로 연장되어 상기 인장수단에 의하여 양방향으로 인장력을 받는 제1 및 제2당김부를 포함할 수 있다. 이때 상기 안착홈은 평면 형상이 타원형인 타원홈인 것이 바람직하다.
- [10] 또한, 상기 타원홈의 내측면을 따라 내피 또는 상피세포를 배양한 것을 특징으로 한다.
- [11] 또한, 상기 타원홈의 장축은 상기 멤브레인의 신장방향과 수직인 방향인 것을 특징으로 한다.
- [12] 또한, 상기 세포안착부는 내부 공간을 통해 세포를 수용하고, 바닥과 하부를 연통시킨 관통홀을 형성한 안착홈과, 상기 세포 안착부 저면에 형성되어, 근거리 인자를 분비하는 세포막과, 상기 세포 안착부 저면에 배치되어, 상기 세포막의 하부에 해당 유체가 유동하는 통로를 제공하는 채널을 포함한다.
- [13] 또한, 상기 인장수단은 내부에 상기 멤브레인이 수평으로 배치되고, 양측 내부에 멤브레인의 양단을 수용하는 한 쌍의 공압챔버가 형성되는 몸체와, 상기 공압챔버로 에어를 주입 또는 흡입하여 상기 공압챔버를 선택적으로 진공상태로 만드는 에어흡입수단을 포함할 수 있다.
- [14] 또한, 상기 공압챔버는 상기 멤브레인에 의하여 분할되며, 상기 에어흡입수단은 분할된 공간 중 하나의 공간인 에어수용공간에 연결되어 상기 에어수용공간의 공기를 흡입 또는 주입하는 것이 바람직하다.
- [15] 또한, 상기 인장수단은 상기 멤브레인의 양측에 배치되어 상기 멤브레인의 양단을 파지하는 한 쌍의 클램프 및 상기 클램프를 이동시키는 마이크로구동부를 포함할 수 있다.
- [16] 본 발명의 다른 측면에 따른 세포 배양방법은 세포의 배양 조건을 생체에 유사하도록 조성하여 배양 효율을 향상시키기 위한 것으로, (a) 상면에 복수개의 안착홈이 형성되는 멤브레인의 양단을 당겨서 상기 멤브레인을 신장시키는 단계; (b) 상기 신장된 멤브레인의 안착홈에 세포를 안착시키는 단계; (c) 상기 멤브레인 양단의 당기는 힘을 해제하여 상기 멤브레인을 복원시키는 단계; (d) 상기 (b) 단계 및 (c) 단계를 복수 회 반복하는 단계; 및 (e) 상기 세포를 상기 안착홈으로부터 이탈시키는 단계를 포함한다.

발명의 효과

- [17] 본 발명에 따른 세포 배양장치 및 이를 이용한 배양방법에 의하면, 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.
- [18] 첫째, 세포가 체내에서 받는 물리적 자극을 구현하여 상기 세포를 체내와 가장 유사한 환경에서 배양함으로써, 배양의 성공률을 높이고 모니터 값의 정확도를 높일 수 있다.
- [19] 둘째, 일방향으로 너비가 좁은 안착홈의 형상을 이용하여 상기 세포를 가압하는 구조로서, 상기 안착홈의 장축과 단축을 계산하는 방법으로 상기 세포에 가해지는 압력의 세기를 가늠할 수 있으며 압력의 세기를 미세하게 조절할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 본 발명의 제1실시예에 따른 세포 배양장치의 사시도,
 [21] 도 2는 도 1에서 나타낸 세포 배양장치의 AA'단면도,
 [22] 도 3은 도 1에서 나타낸 멤브레인의 사시도,
 [23] 도 4a은 도 3의 멤브레인에 세포를 안착한 상태를 도시한 사용상태도,
 [24] 도 4b는 도 4a에서 멤브레인을 인장한 상태를 도시한 사용상태도,
 [25] 도 5는 본 발명의 제2실시예에 따른 세포 배양장치의 사시도,
 [26] 도 6은 본 발명의 제3실시예에 따른 세포 배양장치의 사시도,
 [27] 도 7은 본 발명의 제4실시예에 따른 세포 배양장치의 사시도,
 [28] 도 8은 본 발명에 따른 세포 배양장치를 이용하여 세포를 배양하는 방법을 설명하기 위한 순서도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 본 발명에 따른 세포 배양장치는 내부로 상기 세포가 안착되는 복수의 안착홈을 구비하고 신축 가능한 재질로 이루어져 수축 또는 신장하면서 상기 안착된 세포에 압력을 가하되, 상기 안착홈은 장축과 단축을 가지는 평면 형상으로 형성되는 것을 특징으로 하는 멤브레인과, 상기 멤브레인의 양단에 결합하여 상기 멤브레인을 선택적으로 인장시키는 인장수단을 포함한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [30] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [31] 따라서 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들은 대체할 수 있는 균등한 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

- [32] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [33] 도 1은 본 발명의 제1실시예에 따른 세포 배양장치의 사시도이고, 도 2는 도 1에서 나타낸 세포 배양장치의 AA'단면도이며, 도 3은 도 1에서 나타낸 멤브레인(100)의 사시도이고, 도 4a는 도 3에서 나타낸 멤브레인(100)에 세포를 안착한 상태를 도시한 사용상태도, 도 4b는 도 4a에서 멤브레인(100)을 인장한 상태를 도시한 사용상태도이다.
- [34] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 세포 배양장치(이하, “배양장치”라 함)는 세포가 배양되는 동안, 상기 세포(S)의 배양조건을 생체와 유사하도록 물리적 자극을 가하는 장치이다. 이를 위해 상기 배양장치는 멤브레인(100) 및 인장수단(200)을 구비한다.
- [35] 여기서 상기 세포(S)로는 수정란이 예시될 수 있으나 그 적용범위를 한정하는 것은 아니다.
- [36] 도 2 및 도 3을 참조하면, 상기 멤브레인(100)은 세포(S)가 배양되는 동안 상기 세포(S)를 지지하는 것으로서, 세포 안착부(110)와 제1 및 제2당김부(120,130)로 구성한다. 여기서 상기 세포 안착부(110)는 개방된 상측을 통해 내부로 상기 세포(S)가 인입되어 안착하는 복수의 안착홈(111)을 구비한다.
- [37] 이때, 본 발명에서는 상기 세포(S)가 안착되는 곳을 상측은 개방되고, 하측은 폐쇄된 홈에 한정하여 설명하나, 이에 한정하지 않고 상기 안착홈(111)은 세포의 종류에 따라 상하방향으로 관통된 공동으로 형성할 수도 있다.
- [38] 그리고 도 6을 참조하면 상기 안착홈(111)에는 둘 이상의 세포가 배양될 수 있는 공동배양을 실시하는데, 상기 안착홈(111)의 내측면을 따라 하이드겔을 도포하여 내피막을 이루고, 상기 하이드로겔로 이루어진 내피막에 상피 또는 내피세포를 배양하여 상기 안착홈(111)의 내측면에 상피 또는 내피세포로 이루어진 세포막을 형성할 수도 있다.
- [39] 따라서, 상기 안착홈(111)의 내측면에 상피 또는 내피세포로 이루어진 세포막을 형성하고, 세포막이 형성된 안착홈(111) 내부에 세포(S)를 안착시킴으로서 공동배양이 이루어진다.
- [40] 또한, 상기 안착홈(111)은 평면 형상이 장축과 단축으로 가지도록 형성되어, 상기 안착홈(111)의 일방향으로 너비가 좁은 형상에 의하여 상기 안착홈(111)에 안착된 세포(S)가 일방향으로 가압된다. 보다 바람직하게는 상기 안착홈(111)은 평면 형상이 타원을 이루는 타원홈일 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 이때 상기 안착홈(111)의 평면 형상은 상기 안착된 세포에 가하고자 하는 압력의 세기에 따라 다르게 제작되며 상기 압력의 세기를 바탕으로 그 장축과 단축이 계산된다.
- [41] 보다 상세하게는, 상기 안착된 세포(S)에 비교적 센 압력을 가하는 경우 상기 안착홈(111)은 단축이 짧은 타원 형상으로 제작하고, 상기 세포(S)에 비교적 적은 압력을 가하는 경우 상기 안착홈(111)을 단축이 보다 길게 형성하여 원형에

가까운 형상으로 제작하는 것이 바람직하다. 이처럼 본 발명에 따른 세포 배양장치는 세포(S)가 안착된 안착홈(111)의 타원 형상을 이용하여 상기 세포(S)에 압력을 가함으로써, 상기 세포에 가해지는 압력의 세기를 가늠하기에 용이하고 압력의 세기를 미세하게 조절할 수 있다.

[42] 상기 제1 및 제2당김부(120,130)는 상기 세포 안착부(110)의 양측으로 연장되어, 후술(後述)할 인장수단(200)에 의하여 양방향으로 당겨어진다. 이때 상기 제1 및 제2당김부(120,130)는 신축 가능한 재질로 이루어져 상기 인장수단(200)의 당김에 의하여 상기 세포 안착부(110)를 신장 또는 수축시킨다.

[43] 또한, 상기 멤브레인(100)은 신축 가능한 재질로 이루어져 후술(後述)할 인장수단(200)으로부터 인장력을 받아 수축 또는 신장한다. 이때 상기 멤브레인(100)은 상기 인장수단(200)에 의하여 상기 타원홈의 장축과 수직 방향으로 인장된다. 여기서 상기 멤브레인(100)은 인장력이 가해지면 안착홈(111)의 형상이 타원형에서 원형에 가까워지며, 최대 인장된 상태에서 상기 안착홈(111)의 형상이 완전한 원형을 이룬다.

[44] 상기 인장수단(200)은 상기 멤브레인(100)을 양단을 선택적으로 인장하여 상기 안착홈(111)의 형상을 변형하기 위한 것으로 상기 멤브레인(100)의 양단에 결합한다. 이를 위해 상기 인장수단(200)은 몸체(210)와 에어흡입수단(220)을 구비한다.

[45] 상기 몸체(100)는 내부에 상기 멤브레인(100)이 수평으로 배치되고, 양측 내부에 멤브레인의 양단을 수용하는 한 쌍의 공압챔버(211)가 형성된다. 이때 상기 한 쌍의 공압챔버(211)에는 상기 멤브레인(100)의 제1 및 제2 당김부(120,130)가 수용될 수 있다. 여기서 상기 한 쌍의 공압챔버(211)는 상기 수용된 멤브레인(100)에 의하여 내부 공간이 분할되는데, 상기 분할된 공간 중 하나의 공간은 에어수용공간(211-1)을 형성하여 그 내부 에어가 후술(後述)할 에어흡입수단(220)에 의하여 유입되거나 외부로 배출된다.

[46] 한편, 상기 몸체(100)는 중앙에 배양챔버(212)가 구비될 수 있으며, 상기 배양챔버(212)는 내부에 상기 멤브레인(100)의 세포 안착부(110)가 수용될 수 있다. 이때 상기 몸체(100)는 PDMS(Polydimethylsiloxane) 소재로 이루어지는 것이 바람직하다.

[47] 상기 에어흡입수단(220)은 상기 공압챔버(211)로 에어를 주입 또는 흡입하여 상기 공압챔버(211) 내부를 선택적으로 진공상태로 만든다. 이때 상기 에어흡입수단(220)은 상술한 바와 같이 공압챔버(2110)의 에어수용공간(211-1)과 연통하여 상기 에어수용공간(211-1)의 에어를 선택적으로 주입 또는 흡입한다.

[48] 또한, 본 발명의 다른 측면에 따른 세포 배양장치에 의하면, 다른 실시예의 인장수단(200)을 구비하는 세포 배양장치를 제공할 수 있다.

[49] 이하에서는 인장수단의 다른 실시예를 도 5를 참조하여 상세하게 설명하도록 한다. 도 5는 본 발명의 제2실시예에 따른 세포 배양장치의 사시도이다. 여기서

도 1 내지 도 4b와 동일한 참조번호는 동일한 구성 및 작용을 하는 동일부재이므로 반복적인 설명을 생략하도록 한다.

[50] 한편, 상기 인장수단(200)은 도 5와 같이, 한 쌍의 클램프(230a, 230b)와 상기 클램프를 슬라이딩 구동시키는 마이크로 구동부(240)를 구비할 수 있다.

[51] 이때 상기 한 쌍의 클램프(230a, 230b)는 상기 멤브레인(100)의 제1 및 제2당김부(120, 130)를 선택적으로 클램핑(Clamping)한다. 또한 상기 한 쌍의 클램프(230a, 230b)의 일측에는 상기 마이크로 구동부(240)가 연결되어, 상기 한 쌍의 클램프(230a, 230b)는 상기 마이크로 구동부(240)의 제어에 의하여 사이 간격이 좁혀지거나 넓혀지며 상기 멤브레인(100)을 인장 또는 복원한다.

[52] 도 7을 참조하여 본 발명의 또 다른 실시예를 살펴보면, 자가분비(AUTOCRINE), 근거리분비(PARACRINE), 내분비(ENDOCRINE)가 이루어지는 생체 환경과 유사한 배양 환경을 제공하기 위해 상기 세포 안착부(110)에 수정란(세포)이 인입되어 안착하는 안착홈(111)을 형성하는데, 상기 안착홈(111)은 상면이 개방된 상태로 형성하고, 상기 안착홈(111)의 바닥면에서 상기 세포 안착부(110)의 하부와 연통하는 관통홀을 형성한다.

[53] 그리고 상기 세포 안착부(110)의 저면에는 상기 관통홀을 제외한 저면 전체면에 상피 또는 내피세포로 이루어진 세포막을 형성하고, 상기 세포막의 하부에는 혈류와 같은 환경을 제공하기 위해 유체가 유동할 수 있는 채널을 배치하여, 해당 유체(인슐린(Insulin) 등을 포함하는 배양액, 식염수 등)를 지속적으로 흐르도록 하는 유체흐름을 제공한다.

[54] 또한 상기한 배양 환경에서도 세포를 배양할 시, 상기 안착홈(111)의 인장 및 수축이 연속반복으로 이루어지는 기계적 자극 역시 제공되는 것이 바람직하다.

[55] 따라서 상기한 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 인위적 배양 환경에도 생체환경과 같이 상기 세포 안착부(110)에 인입되어 안착된 수정란은 자가분비인자(LIF, IL-1 β , IGF-II, PDGFA, EGF, TGF α , SCF 등)를 분비함과 함께 수정란의 자가수용체를 통해 인자들을 받아들이는 자가분비(AUTOCRINE)가 이루어진다.

[56] 그리고 상기 세포막에서 분비된 근거리분비인자(IGF-I, HB-EGF, GM-CSF, LIF, PDGFB, TGF α , EGF)는 관통홀을 통해 수정란이 안착된 안착홈(111)으로 인입되어, 수정란의 수용체를 통해 인자들이 받아 들려지고, 상기 수정란에서 분비된 근거리분비인자(IL-1 β , PAF, VEG-F, EGF 등)은 관통홀을 통해 상기 세포막으로 분비되어 세포막의 수용체를 통해 인자들이 받아 들려지는 근거리분비(PARACRINE)가 이루어진다.

[57] 또한, 상기 유체흐름에 포함된 내분비인자(Insulin 등)가 관통홀을 통해 상기 안착홈(111)으로 인입되어, 수정란의 수용체를 통해 인자들이 받아 들려지는 내분비(ENDOCRINE)가 이루어진다.

[58] 이하에서는 본 발명에 따른 배양장치를 이용하여 세포를 배양하는 방법에 관하여 도 8을 참조하여 상세하게 설명하도록 한다.

- [59] 도 8은 상기 배양장치를 이용하여 세포를 배양하는 방법을 설명하기 위한 순서도이다.
- [60] 먼저 안착홈(111)이 형성된 멤브레인(100)을 준비하고, 상기 멤브레인(100)의 양단을 당겨서 상기 멤브레인(100)을 신장시킨다.(S610) 이때 상기 멤브레인(100)의 양단에는 상기 인장수단(200)이 결합되고, 상기 멤브레인(100)은 상기 인장수단(200)의 당김에 의하여 양방향으로 신장한다. 이때 상기 멤브레인(100)은 상기 타원홈의 장축에 수직방향으로 인장된다.
- [61] 여기서 상기 인장수단(200)으로서 몸체(210)와 에어흡입수단(220)을 이용하는 경우, 상기 에어흡입수단(220)으로 상기 몸체(210)의 공압챔버(211) 내부 공기를 흡입하여, 상기 공압챔버(211) 내를 진공 상태로 만들고 그 진공압에 의하여 상기 멤브레인(100)이 당겨지도록 한다. 한편, 상기 인장수단(200)으로 한 쌍의 클램프(230a,230b) 및 마이크로 구동부(240)를 이용하는 경우, 상기 멤브레인(100)의 양단을 한 쌍의 클램프(230a,230b)를 이용하여 클램핑(Clamping)하고 상기 마이크로 구동부(240)를 조작하여 상기 한 쌍의 클램프(230a,230b)의 사이를 넓힌다. 여기서 상기 멤브레인(100)의 안착홈(111)의 단면 형상은 도 4a와 같이 원형을 이룬다.
- [62] 이후에 상기 원형홈 형상의 안착홈(111)에 상기 세포(S)를 안착시킨다.(S620)
- [63] 그리고 상기 안착홈(111)에 세포(S)를 모두 안착한 후, 상기 인장수단(200)의 작동을 중단하여 상기 멤브레인(100)의 양단에 가해지는 인장력을 해제함으로써 상기 멤브레인(100)을 원 형상으로 복원한다. 이때 상기 인장수단(200)으로서 상기 몸체(210)와 에어흡입수단(220)을 채택한 경우, 상기 에어흡입수단(220)을 이용하여 상기 공압챔버(211) 내부에 에어를 주입하여 진공의 공압챔버(211) 내부를 기압 상태로 전환한다. 이때 상기 공압챔버(211)의 진공압이 해제되면서 상기 멤브레인(100)에 가해지던 인장력 또한 해제된다. 한편, 상기 인장수단(200)으로서 상기 한 쌍의 클램프(230a,230b)를 이용하는 경우, 이격된 사이를 상기 멤브레인(100)의 원래 크기에 맞도록 좁혀 인장력을 해제한다. 이때 상기 안착홈(111)은 타원홈으로 복원되며, 도 4b와 같이 상기 안착홈(111)에 안착된 세포(S)가 상기 타원홈의 단축 방향으로 가압된다.
- [64] 그리고 상기 S620단계, S630단계 및 S640단계를 복수 회 반복하여 상기 세포(S)를 물리적 자극 하에 배양시킨다.
- [65] 마지막으로 배양이 완료된 세포(S)를 상기 안착홈(111)으로부터 이탈시킨다. 이때 상기 세포(S) 상기 안착홈(111)에 안착시킬 때와 마찬가지로, 상기 인장수단(200)을 이용하여 (a)단계를 수행한 상태에서 상기 세포(S)를 이탈시키는 것이 바람직하다.
- [66] 이러한 본 발명에 세포 배양장치는 상기 세포가 체내에서 받는 물리적 자극을 구현하여 상기 세포가 체내와 가장 유사한 환경에서 배양될 수 있도록 함으로써, 배양의 효율을 높이고 모니터 값의 정확도를 높일 수 있다.
- [67] 본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에

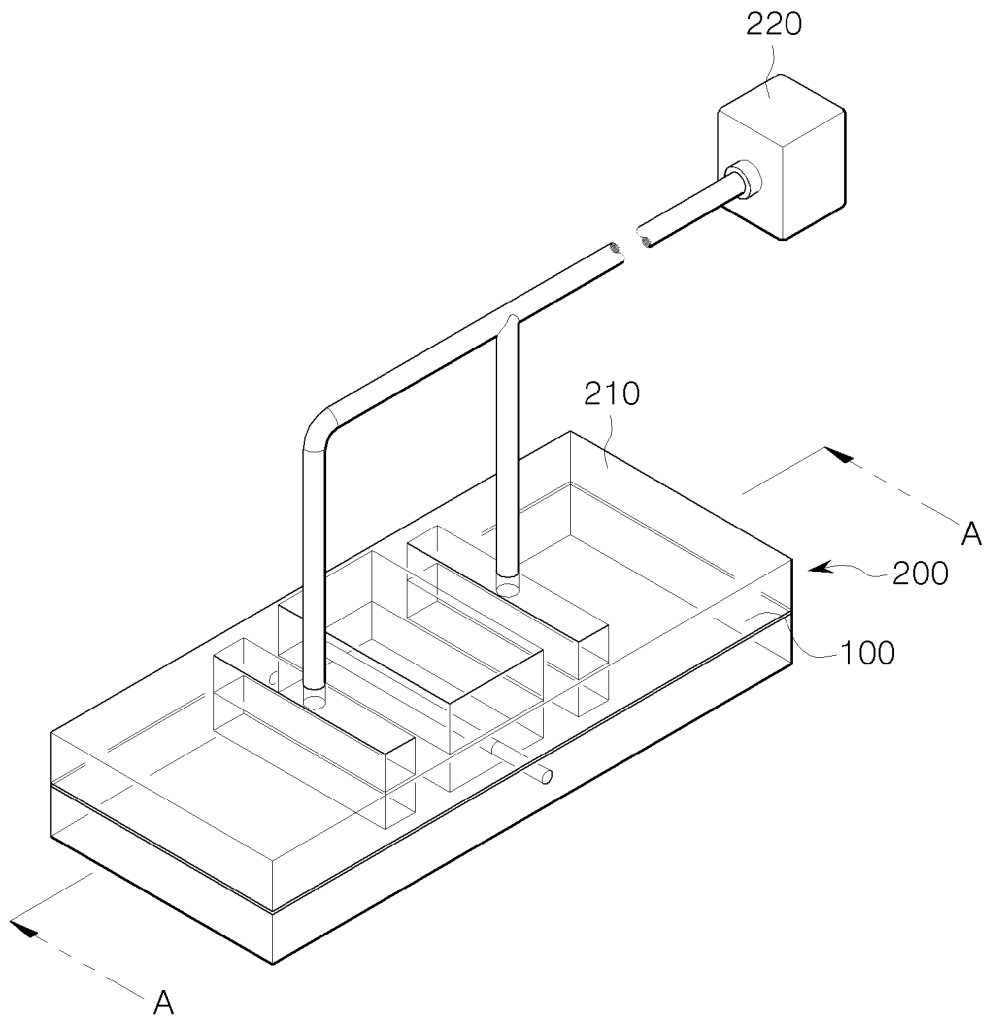
불과하며, 본 기술분야의 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

청구범위

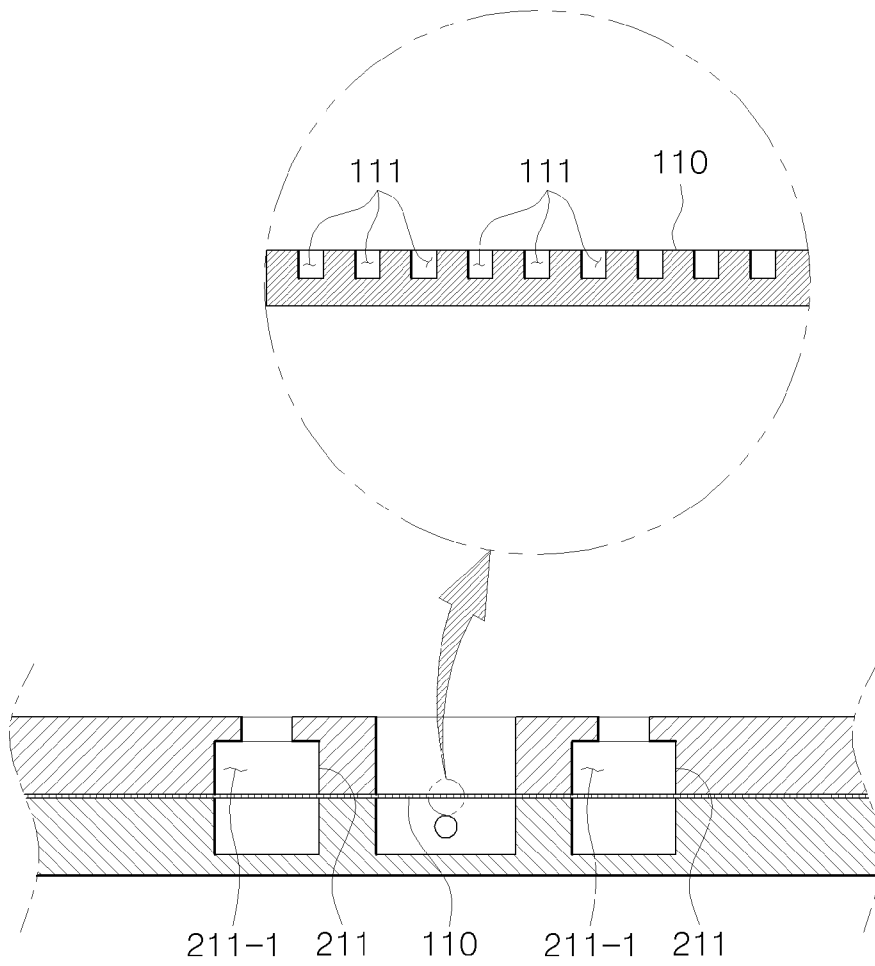
- [청구항 1] 세포가 배양되는 동안 자극을 가하여 상기 세포의 배양조건을 생체와 유사하도록 조성하는 세포 배양장치에 있어서,
내부로 상기 세포가 안착되는 복수의 안착홈을 구비하고 신축 가능한 재질로 이루어져 수축 또는 신장하면서 상기 안착된 세포에 압력을 가하되, 상기 안착홈은 장축과 단축을 가지는 평면 형상으로 형성되는 것을 특징으로 하는 멤브레인;
상기 멤브레인의 양단에 결합하여 상기 멤브레인을 선택적으로 인장시키는 인장수단을 포함하는 세포 배양장치.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 멤브레인은,
상기 배양챔버의 수용공간에 배치되어 상기 복수의 안착홈을 구비하는 세포안착부와,
상기 세포 안착부의 양측으로 연장되어 상기 인장수단에 의하여 양방향으로 인장력을 받는 제1 및 제2당김부를 포함하는 세포 배양장치.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서,
상기 안착홈의 내측면을 따라 내피 또는 상피세포를 배양한 것을 특징으로 하는 세포 배양장치.
- [청구항 4] 청구항 2에 있어서,
상기 안착홈은 타원형의 평면 형상을 가지는 타원홈인 것을 특징으로 하는 세포 배양장치.
- [청구항 5] 청구항 3에 있어서,
상기 타원홈의 장축은, 상기 멤브레인의 신장방향과 수직인 방향인 것을 특징으로 하는 세포 배양장치.
- [청구항 6] 청구항 2에 있어서,
상기 세포안착부는
내부 공간을 통해 세포를 수용하고, 바닥과 하부를 연통시킨 관통홀을 형성한 안착홈과;
상기 세포 안착부 저면에 형성되어, 근거리 인자를 분비하는 세포막과;
상기 세포 안착부 저면에 배치되어, 상기 세포막의 하부에 해당 유체가 유동하는 통로를 제공하는 채널;을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 배양장치.
- [청구항 7] 청구항 1 내지 5 중 선택된 어느 한 항에 있어서,
상기 인장수단은,
내부에 상기 멤브레인이 수평으로 배치되고, 양측 내부에 멤브레인의 양단을 수용하는 한 쌍의 공압챔버가 형성되는 몸체와,
상기 공압챔버로 에어를 주입 또는 흡입하여 상기 공압챔버를

- 선택적으로 진공상태로 만드는 에어흡입수단을 포함하는 세포 배양장치.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서,
상기 공압챔버는 상기 멤브레인에 의하여 분할되며, 상기
에어흡입수단은 분할된 공간 중 하나의 공간인 에어수용공간에 연결되어
상기 에어수용공간의 공기를 흡입 또는 주입하는 것을 특징으로 하는
세포배양장치.
- [청구항 9] 청구항 1 내지 5 중 선택된 어느 한 항에 있어서,
상기 인장수단은,
상기 멤브레인의 양측에 배치되어 상기 멤브레인의 양단을 파지하는 한
쌍의 클램프 및 상기 클램프를 이동시키는 마이크로구동부를 포함하는
세포 배양장치.
- [청구항 10] 세포의 배양 조건을 생체에 유사하도록 조성하여 배양 효율을
향상시키기 위한 세포 배양장치를 이용한 세포의 배양방법에 있어서,
(a) 상면에 복수개의 안착홈이 형성되는 멤브레인의 양단을 당겨서 상기
멤브레인을 신장시키는 단계;
(b) 상기 신장된 멤브레인의 안착홈에 세포를 안착시키는 단계;
(c) 상기 멤브레인 양단의 당기는 힘을 해제하여 상기 멤브레인을
복원시키는 단계;
(d) 상기 (b) 단계 및 (c) 단계를 복수 회 반복하는 단계; 및
(e) 상기 세포를 상기 안착홈으로부터 이탈시키는 단계를 포함하는 세포
배양방법.

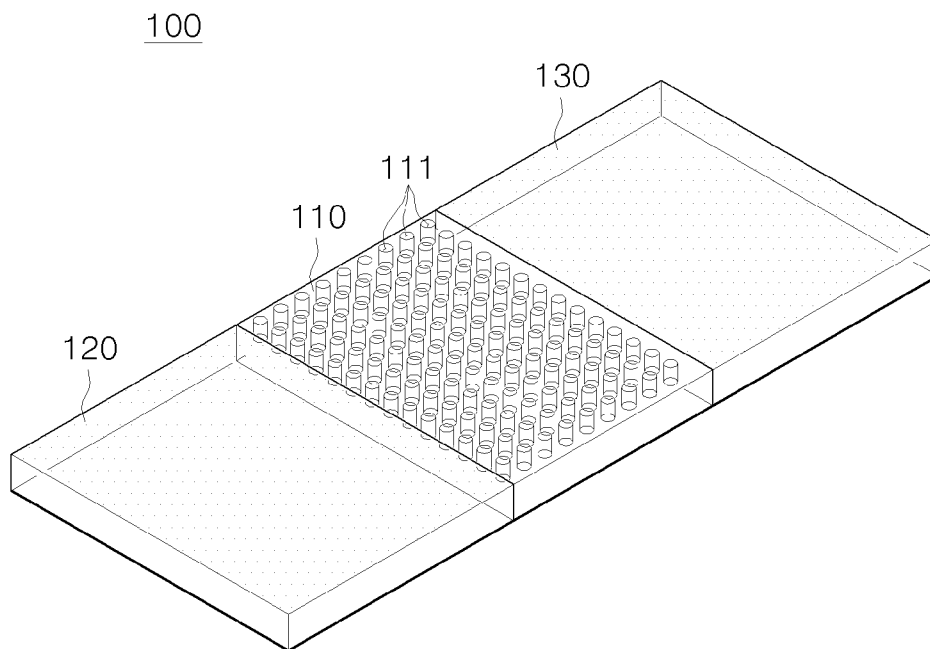
[도1]



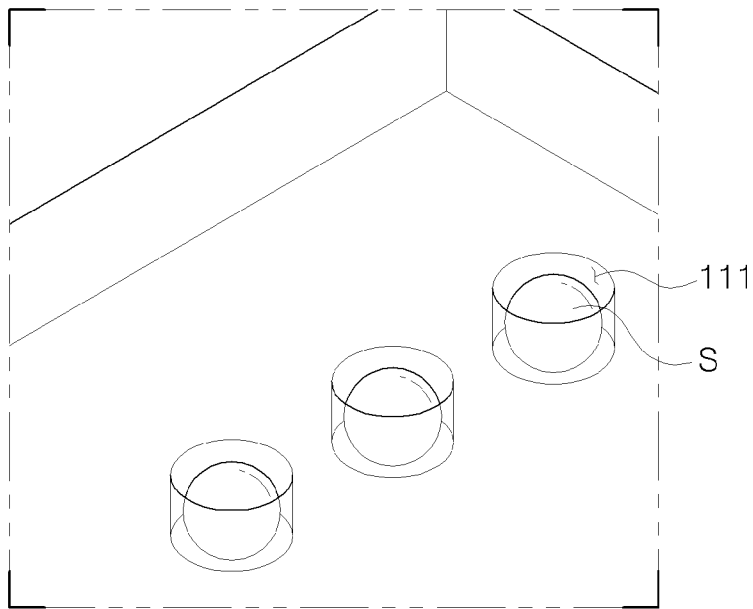
[도2]



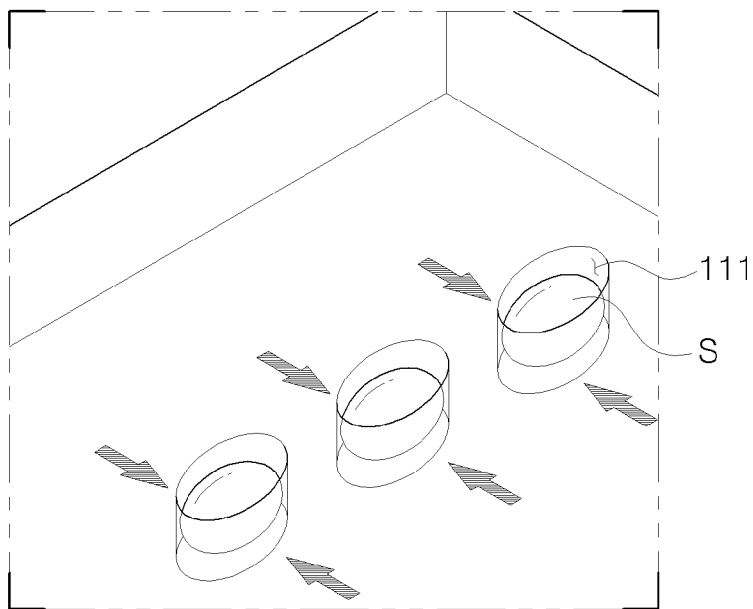
[도3]



[도4]

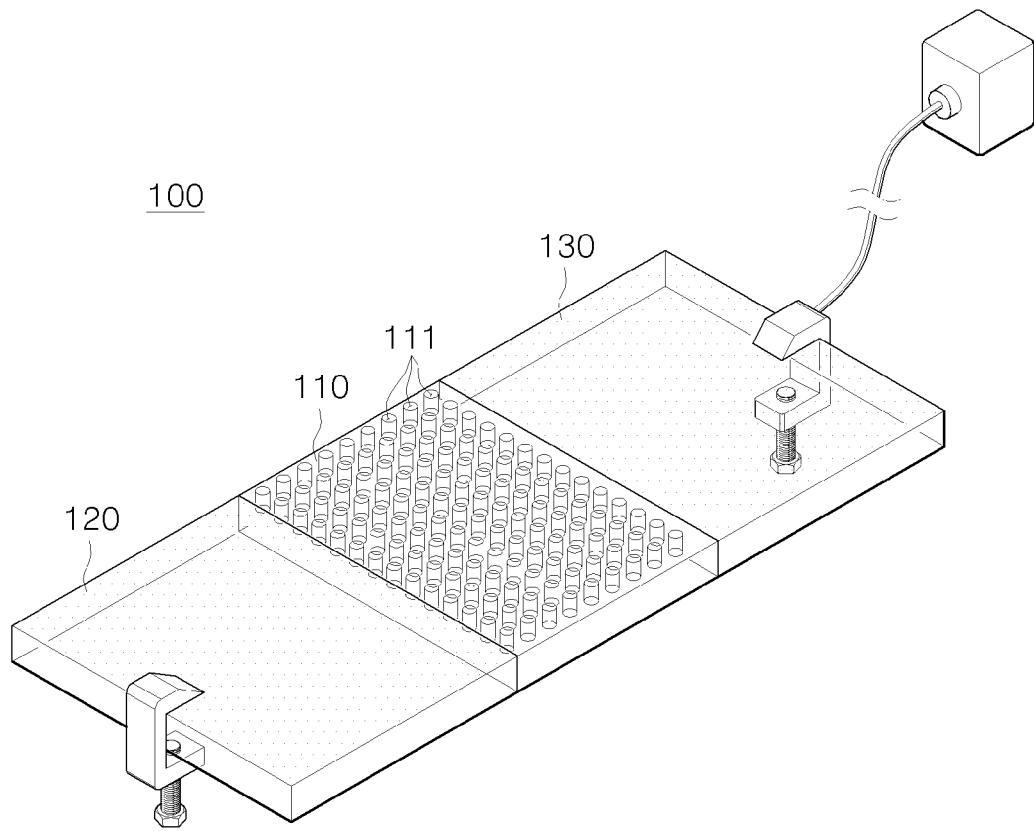


(a)

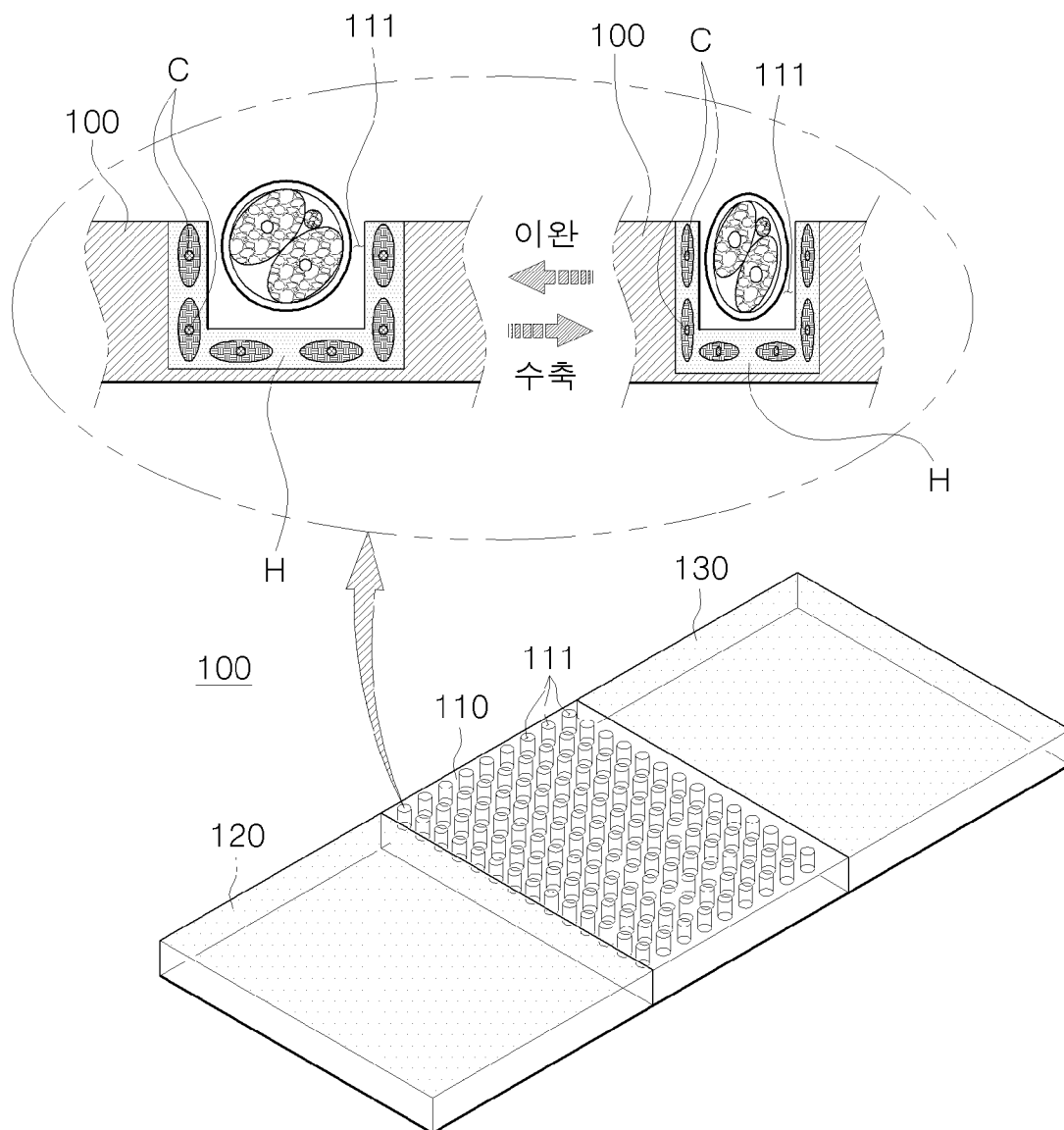


(b)

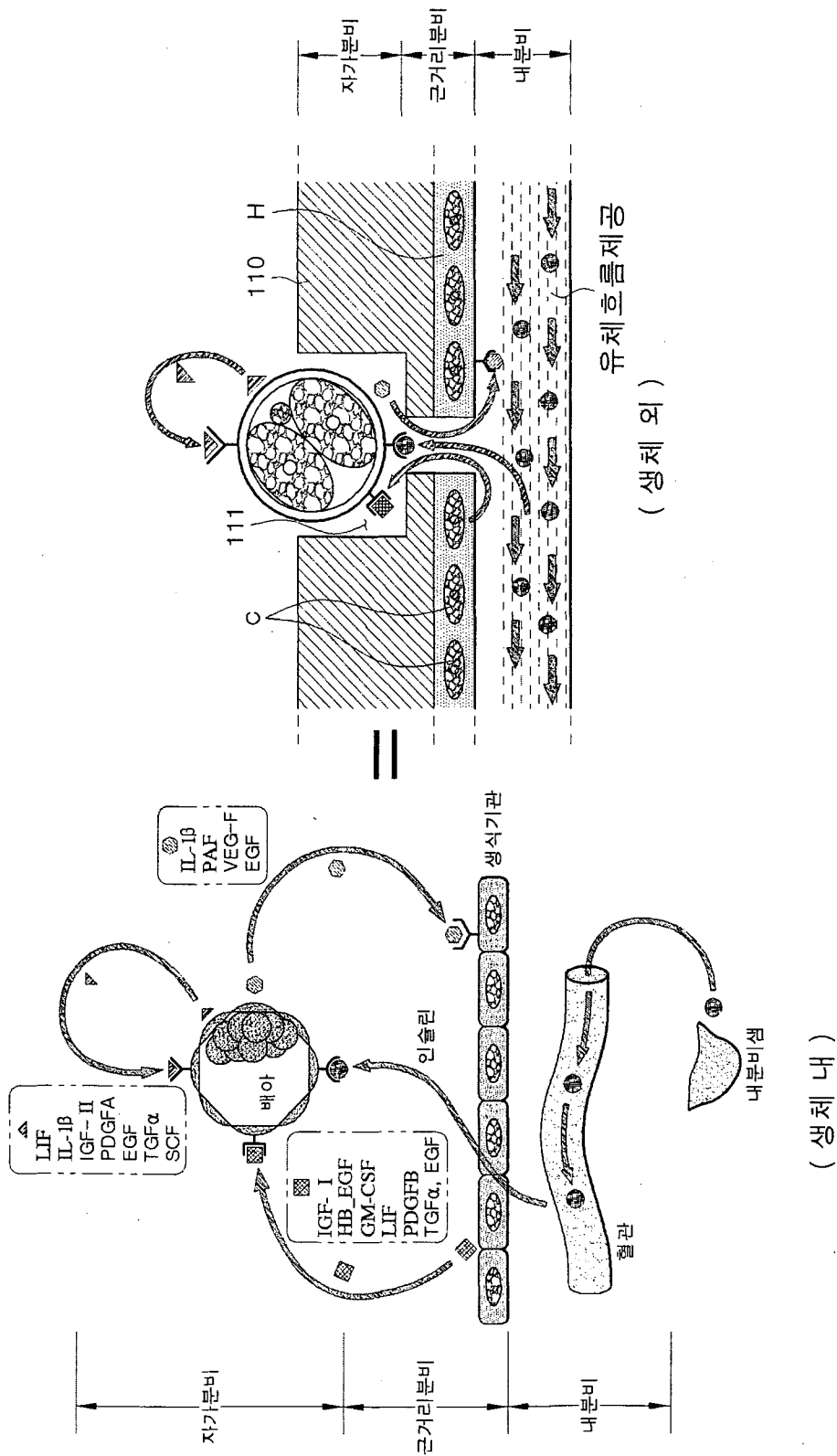
[도5]



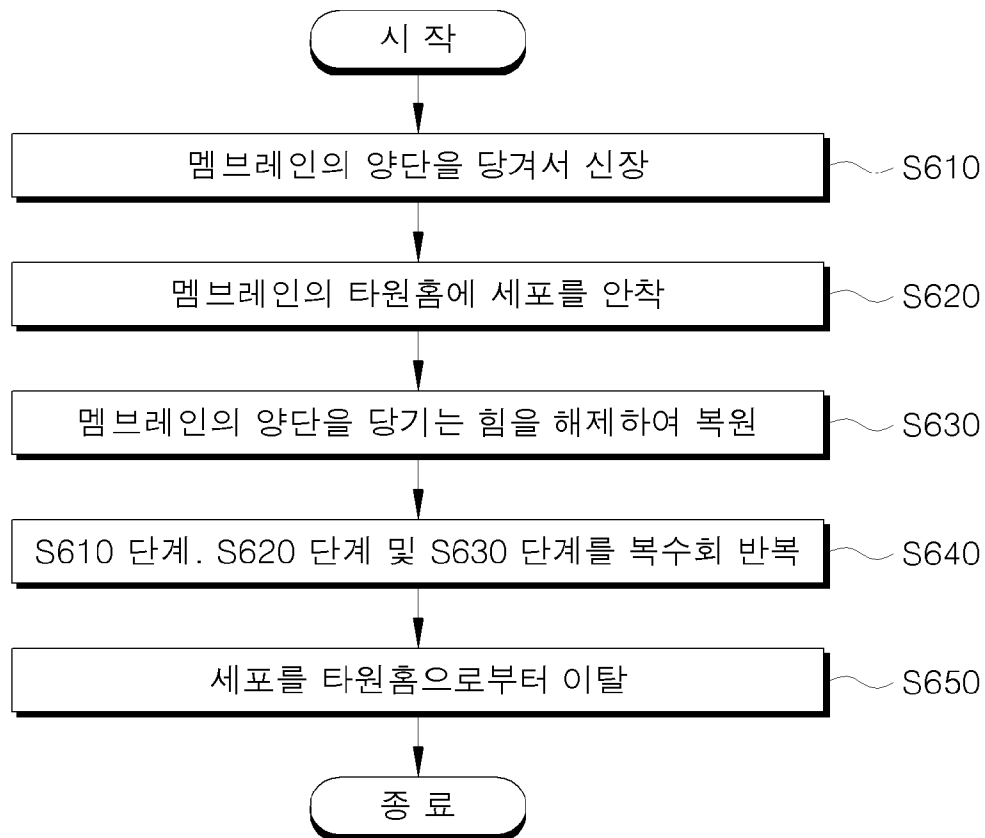
[도6]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004324

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/42(2006.01)i, C12M 1/32(2006.01)i, C12M 1/00(2006.01)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)

C12M 1/42; C12M 1/00; C12N 5/071; G01N 33/48; C12M 3/02; C12M 3/00; C12M 1/32

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: cell culture, receiving groove, membrane, tensile means, contraction, extension

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2015-0126520 A (INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 12 November 2015 See claims 1, 6-7 and 9; paragraphs [0007] and [0051].	1-10
Y	KR 10-2014-0040704 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 03 April 2014 See claims 1 and 25; paragraphs [0051], [0055]-[0057] and [0183]; figures 2, 5 and 22-23.	1-10
A	KR 10-2012-0122832 A (TAE SAN SOLUTIONS CO., LTD.) 07 November 2012 See claims 1-7.	1-10
A	KR 10-2015-0098089 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 27 August 2015 See claims 1-7; figure 2.	1-10
A	KR 10-2015-0032126 A (INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 25 March 2015 See claims 1-2.	1-10



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

08 AUGUST 2017 (08.08.2017)

Date of mailing of the international search report

08 AUGUST 2017 (08.08.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-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/KR2017/004324

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0126520 A	12/11/2015	KR 10-1569619 B1	17/11/2015
KR 10-2014-0040704 A	03/04/2014	AU 2012-223526 A1	12/09/2013
		AU 2012-223526 B2	09/03/2017
		AU 2017-202616 A1	11/05/2017
		CA 2828110 A1	07/09/2012
		CN 103502426 A	08/01/2014
		EP 2681306 A2	08/01/2014
		JP 2014-506801 A	20/03/2014
		JP 6122388 B2	26/04/2017
		RU 2013143537 A	10/04/2015
		RU 2612915 C2	13/03/2017
		SG 10201601434R A	30/03/2016
		SG 192931 A1	30/09/2013
		US 2014-0038279 A1	06/02/2014
		US 2017-0101628 A1	13/04/2017
		WO 2012-118799 A2	07/09/2012
		WO 2012-118799 A3	22/11/2012
KR 10-2012-0122832 A	07/11/2012	WO 2012-150787 A2	08/11/2012
		WO 2012-150787 A3	21/03/2013
KR 10-2015-0098089 A	27/08/2015	KR 10-1691049 B1	29/12/2016
KR 10-2015-0032126 A	25/03/2015	KR 10-1562504 B1	23/10/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12M 1/42(2006.01)i, C12M 1/32(2006.01)i, C12M 1/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12M 1/42; C12M 1/00; C12N 5/071; G01N 33/48; C12M 3/02; C12M 3/00; C12M 1/32 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: 세포 배양, 안착홈, 멤브레인, 인장수단, 수축, 신장		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2015-0126520 A (인하대학교 산학협력단) 2015.11.12 청구항 1, 6-7 및 9; 단락 [0007] 및 [0051] 참조.	1-10
Y	KR 10-2014-0040704 A (프레지던트 앤드 켈로우즈 오브 하바드 칼리지) 2014.04.03 청구항 1 및 25; 단락 [0051], [0055]-[0057] 및 [0183]; 도면 2, 5 및 22-23 참조.	1-10
A	KR 10-2012-0122832 A (주식회사 태산솔루션즈) 2012.11.07 청구항 1-7 참조.	1-10
A	KR 10-2015-0098089 A (한국과학기술연구원) 2015.08.27 청구항 1-7; 도면 2 참조.	1-10
A	KR 10-2015-0032126 A (인제대학교 산학협력단 등) 2015.03.25 청구항 1-2 참조.	1-10
☐ 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 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2017년 08월 08일 (08.08.2017)		국제조사보고서 발송일 2017년 08월 08일 (08.08.2017)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 조기훈 전화번호 +82-42-481-5655 

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2017/004324

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0126520 A	2015/11/12	KR 10-1569619 B1	2015/11/17
KR 10-2014-0040704 A	2014/04/03	AU 2012-223526 A1	2013/09/12
		AU 2012-223526 B2	2017/03/09
		AU 2017-202616 A1	2017/05/11
		CA 2828110 A1	2012/09/07
		CN 103502426 A	2014/01/08
		EP 2681306 A2	2014/01/08
		JP 2014-506801 A	2014/03/20
		JP 6122388 B2	2017/04/26
		RU 2013143537 A	2015/04/10
		RU 2612915 C2	2017/03/13
		SG 10201601434R A	2016/03/30
		SG 192931 A1	2013/09/30
		US 2014-0038279 A1	2014/02/06
		US 2017-0101628 A1	2017/04/13
		WO 2012-118799 A2	2012/09/07
		WO 2012-118799 A3	2012/11/22
KR 10-2012-0122832 A	2012/11/07	WO 2012-150787 A2	2012/11/08
		WO 2012-150787 A3	2013/03/21
KR 10-2015-0098089 A	2015/08/27	KR 10-1691049 B1	2016/12/29
KR 10-2015-0032126 A	2015/03/25	KR 10-1562504 B1	2015/10/23