



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0113139
(43) 공개일자 2014년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/00 (2006.01) C12M 1/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0028131
(22) 출원일자 2013년03월15일
심사청구일자 2013년03월15일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정석
서울 서대문구 연희로 38-20, 107동 402호 (연희동, 대우아파트)
한세운
경기 성남시 분당구 동판교로 275, 122동 401호 (삼평동, 봇들마을풍성신미주아파트)
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
특허법인다나

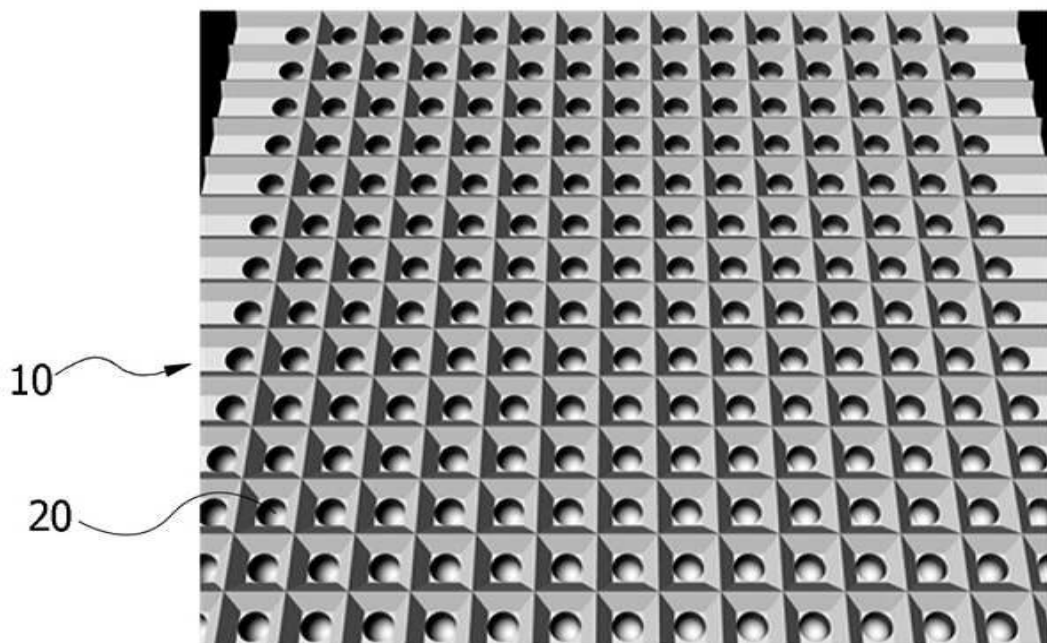
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 세포 스페로이드 배양판

(57) 요약

본 발명은 세포 스페로이드 배양판에 관한 것이다. 본 발명은 배양판 몸체; 및 상기 배양판 몸체에 다수의 열 및 행으로 배치되고, 내부에는 세포 스페로이드가 배양되는 배양홈을 포함하고, 상기 배양홈은, 하부를 향하여 폭이 좁아지는 제1 배양홈; 및 상기 제1 배양홈의 하부에 형성되고, 하부가 곡면으로 형성되는 제2 배양홈을 포함한다. 이와 같은 본 발명에 의하면, 반복적 패턴을 가지도록 배양홈을 형성하여 플라스틱 사출을 위한 몰드 제작을 위해 미세 기계가공을 사용하여 생산단가를 낮출 수 있고, 쉽게 크기를 확대할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

신유진

서울 은평구 수색로12길 14, 209호 (수색동, 동양주택)

김정현

서울 노원구 동일로183길 34, 101동 101호 (공릉동, 대아아파트)

정효은

서울 동대문구 안암로 60, 202호 (용두동)

변재영

서울 성북구 종암로14길 26-14, 302호 (종암동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0009565

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-첨단융합기술개발사업

연구과제명 능동포획형 유체시스템 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

배양판 몸체; 및

상기 배양판 몸체에 다수의 열 및 행으로 배치되고, 내부에는 세포 스페로이드가 배양되는 배양홈을 포함하고,

상기 배양홈은,

하부를 향하여 폭이 좁아지는 제1 배양홈; 및

상기 제1 배양홈의 하부에 형성되고, 하부가 곡면으로 형성되는 제2 배양홈을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 스페로이드 배양판.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제1 배양홈은 4개의 면이 하부를 향하여 폭이 좁아지도록 경사면이 형성되는 것을 특징으로 하는 세포 스페로이드 배양판.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 제1 배양홈의 경사각은 20 내지 70° 인 것을 특징으로 하는 세포 스페로이드 배양판.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 제1 배양홈은 그 횡단면이 원형 또는 다각형 형상인 것을 특징으로 하는 세포 스페로이드 배양판.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 제2 배양홈은 상부는 평행한 직선면으로 형성되고, 하부는 반원형으로 형성되는 것을 특징으로 하는 세포 스페로이드 배양판.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 제2 배양홈의 깊이는 상기 제2 배양홈의 폭의 1/2 이상인 것을 특징으로 하는 세포 스페로이드 배양판.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 제2 배양홈의 폭은 50 내지 1000 μ m 인 것을 특징으로 하는 세포 스페로이드 배양판.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 배양홈에는 고분자 화합물, 생체유래 소재 또는 비점착성 물질(non-adhesive materials)이 코팅되는 것을 특징으로 하는 세포 스페로이드 배양판.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 비접착성 물질은,

페릴린(Parylene), 시그마코트(Sigmacote), 폴리-헤마(poly-HEMA), poly(N-p-vinylbenzyl-D-lactonamide) (PVLA), F108, 리피듀어(LIPIDURE), 아가로스 겔(agarose gel), 소혈청알부민(BSA; bovine serum albumin), 키토산(Chitosan), 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC; (Hydroxypropyl)methyl cellulose), 폴리 아미노산 (Poly amino acid), 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol), 이산화티타늄 겔(TiO₂ gel)의 물질 중 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 하는 세포 스페로이드 배양판.

청구항 10

제1 세포 배양 용기;

상기 제1 세포 배양 용기의 내측에 착탈가능하고, 제1 세포 스페로이드가 배양되는 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 세포 스페로이드 배양판; 및

상기 세포 스페로이드 배양판의 상부에 부착되고, 내부에는 제2 세포 스페로이드가 배양되는 제2 세포 배양 용기를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 스페로이드 배양 조립체.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 스페로이드 배양판에 관한 것으로, 보다 상세하게는 다양한 세포 스페로이드 또는 조직 배양을 위한 구조물을 가진 세포 스페로이드 배양판에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신약개발에서 동물실험은 비임상/임상실험 및 초기 스크리닝에 사용되는데 한 건의 신약개발에 수행되는 동물 실험은 수천억 원이 넘는 비용이 소요된다. 또한, 전세계적으로 윤리적인 이유를 들어 동물실험을 극심하게 반대하고 있어 동물실험의 당위성은 점점 약화되고 있다. 따라서, 동물 혹은 인간의 세포를 이용한 체외 실험을 통해 동물실험을 대체하려는 시도가 이루어지고 있다.

[0003] 하지만, 기존의 체외 실험기술로 실제 임상 반응을 예측하기에는 많은 어려움이 있는 실정이다. 이는 실제 대부분의 체내 세포들이 대부분 3차원적으로 주변 세포들, 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM) 등과의 상호작용을 통해 생명활동을 유지하지만, 기존의 체외 실험에서 배양한 세포들은 대부분 2차원적 구조를 지니고 있어, 체내의 생리학적 현상을 모사하는 데 실패했기 때문이다. 예를 들어, 암의 경우, 실제 체내에서는 대부분 3차원적으로 존재할 뿐만 아니라, 혈관으로부터 150~200 마이크로미터 이상의 거리가 떨어진 지점부터는 여러 가지 영양분, 산소 등의 결핍이 발생하고, 비정상적으로 대사물질이 축적되기 때문에, 기존의 2차원 체외 실험기술들로 이러한 현상을 모사하기에는 큰 어려움이 있으며, 실제 동물실험의 결과와 상이한 결과를 초래하게 된다.

[0004] 따라서, 최근 여러 연구그룹에서 생리학적으로 체내의 세포 조직들과 매우 유사한 3차원 세포 스페로이드의 배양기술에 관한 연구가 진행 중이다.

[0005] 종래의 전통적인 hanging drop method의 경우 노동집약적, 대량 생산이 불가능하다. 최근 개발된 멀티-웰(multi-well) 타입의 Perfecta3D 제품이나, Gravity PLUS 제품의 경우, 매우 작은 양의 배양액을 사용하기 때문에 방울 하나의 볼륨이 매우 작아 증발문제가 있으며, 배양액 교환이 용이하지 못한 문제가 있다. 또한, 384 well 타입의 경우엔, 다뤄야 할 well의 수가 매우 많아 실험자가 직접 파이펫팅 하기가 어렵기 때문에 추가적으로 로봇 시스템(robot system)을 필요로 하게 되므로 단가 상승요인이 될 수 있다.

[0006] 다음으로, 단일 세포 배양(single cell culture on non-adhesive surface) 방법의 경우, 만들어지는 세포 스페로이드의 사이즈, 형성된 세포 스페로이드의 수, 모양 등이 불균일하기 때문에 균일한 크기 분배를 가진 세포 스페로이드가 필수적인 특정 어플리케이션(암 관련 신약개발 등)에 적용이 어려운 단점이 있다.

[0007] 또한, 마이크로 몰딩 기술(micro-molding technique)의 경우, 기존의 마이크로몰딩 기술은 대부분 반도체 공정을 기반으로 만들어지기 때문에 제작 시 특수한 장비들을 필요로 한다. 또한, 생산단가가 매우 높아 현실적으로 상용화되기 어려우며, 현재까지 나온 기술들은 대부분 실험실 단위에서만 가능한 단점이 있다. 또한, 배

양액 교환 시 마이크로-웰(micro-well) 내부에 자라고 있는 세포 스페로이드가 빠져 나올 가능성이 높고, 웰과 웰 사이의 공간에서 세포 스페로이드가 의도치 않게 생성될 수 있는 단점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 상기한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 배양액 교환 시 세포 스페로이드가 배양벽 외부로 빠져 나오는 것을 방지하고, 크기 및 모양이 균일한 구조를 가진 세포 스페로이드 배양판을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명은 배양판 몸체; 및 상기 배양판 몸체에 다수의 열 및 행으로 배치되고, 내부에는 세포 스페로이드가 배양되는 배양홈을 포함하고, 상기 배양홈은, 하부를 향하여 폭이 좁아지는 제1 배양홈; 및 상기 제1 배양홈의 하부에 형성되고, 하부가 곡면으로 형성되는 제2 배양홈을 포함할 수 있다.

[0010] 상기 제1 배양홈은 4개의 면이 하부를 향하여 폭이 좁아지도록 경사면이 형성될 수 있다.

[0011] 상기 제1 배양홈의 경사각은 20 내지 70° 일 수 있다.

[0012] 상기 제1 배양홈은 그 횡단면이 원형 또는 다각형 형상일 수 있다.

[0013] 상기 제2 배양홈은 상부는 평행한 직선면으로 형성되고, 하부는 반원형으로 형성될 수 있다.

[0014] 상기 제2 배양홈의 깊이는 상기 제2 배양홈의 폭의 1/2 이상일 수 있다.

[0015] 상기 제2 배양홈의 폭은 50 내지 1000 μ m 일 수 있다.

[0016] 상기 배양홈에는 고분자 화합물, 생체유래 소재 또는 비점착성 물질(non-adhesive materials)이 코팅될 수 있다.

[0017] 상기 비점착성 물질은, 페릴린(Parylene), 시그마코트(Sigmacote), 폴리-헤마(poly-HEMA), poly(N-p-vinylbenzyl-D-lactonamide) (PVLA), F108, 리피듀어(LIPIDURE), 아가로스 겔(agarose gel), 소혈청알부민(BSA; bovine serum albumin), 키토산(Chitosan), 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC; (Hydroxypropyl)methyl cellulose), 폴리 아미노산(Poly amino acid), 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol), 이산화티타늄 겔(TiO₂ gel)의 물질 중 적어도 어느 하나일 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명은 제1 세포 배양 용기; 상기 제1 세포 배양 용기의 내측에 착탈가능하고, 제1 세포 스페로이드가 배양되는 세포 스페로이드 배양판; 및 상기 세포 스페로이드 배양판의 상부에 부착되고, 내부에는 제2 세포 스페로이드가 배양되는 제2 세포 배양 용기를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 의하면, 반복적 패틴을 가지도록 배양홈을 형성하여 플라스틱 사출을 위한 몰드 제작을 위해 미세 기계가공을 사용하여 생산단가를 낮출 수 있고, 쉽게 크기를 확대할 수 있다.

[0020] 또한, 제1 배양홈에 경사면을 형성하여 세포들이 배양홈 내부로 안정적으로 들어갈 수 있도록 하였고, 세포배양액 교체 시 의도치 않은 유동으로 인하여 세포들이 빠져 나오는 것이 방지될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드 배양판을 보인 사시도.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드 배양판의 단면도.

도 3은 세포 스페로이드 배양판이 조립된 세포 스페로이드 배양 조립체의 분해 사시도.

도 4는 세포 스페로이드 배양판이 조립된 세포 스페로이드 배양 조립체의 사시도.

도 5는 도 4의 세포 스페로이드 배양 조립체의 단면도.

도 6 및 도 7은 세포 스페로이드 형성 실험결과를 보인 사진.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하에서는 본 발명에 의한 세포 스페로이드 배양관의 일 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 상세하게 설명한다.
- [0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드 배양관을 보인 사시도이고, 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 스페로이드 배양관의 단면도이다.
- [0024] 이에 도시된 바에 따르면, 본 발명에 의한 세포 스페로이드 배양관은 배양관 몸체(10); 및 상기 배양관 몸체(10)에 다수의 열 및 행으로 배치되고, 내부에는 세포 스페로이드가 배양되는 배양홈(20)을 포함할 수 있다.
- [0025] 배양관 몸체(10)는 몰드를 통해 플라스틱 사출 성형된 플레이트 형상으로 만들어진 다. 이와 같이 플라스틱 사출을 위한 몰드 제작을 위해 미세 기계가공을 사용하여 생산단가를 낮추고, 쉽게 크기를 확대할 수 있도록 배양홈(20)은 마이크로-웰(micro-well) 구조물로서 반복적 패턴을 가진다. 따라서, 세포 스페로이드의 대량 생산이 용이하며, 사용자의 요구에 맞추어 다양한 크기로 변형하여 사용이 가능하다.
- [0026] 여기에서, 배양홈(20)은 하부를 향하여 폭이 좁아지는 제1 배양홈(22); 및 상기 제1 배양홈(22)의 하부에 형성되고, 하부가 곡면으로 형성되는 제2 배양홈(24)을 포함할 수 있다.
- [0027] 본 실시예에서는 제1 배양홈(22)이 상부 제2 배양홈(24)이 하부에 형성되는 것으로 도시하였으며, 제1 배양홈(22)은 하부를 향하여 폭이 좁아지는 경사면을 가진다. 상기 경사면은 도 1에서와 같이 제1 배양홈(22)을 둘러싸는 4면으로 형성될 수 있다.
- [0028] 물론, 본 도면에서는 제1 배양홈(22)이 소정의 경사면을 가지는 것으로 도시하였으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니고 하부를 향하여 폭이 좁아지는 어떠한 형상이라도 적용할 수 있다.
- [0029] 예를 들어, 제1 배양홈(22)은 그 횡단면이 원형으로 형성되어 대략 깔대기 형상을 가질 수도 있고, 5각형 또는 6각형 등 다각형 형상의 횡단면을 가지도록 형성될 수도 있다. 한편, 제2 배양홈(24)의 횡단면이 원형일 경우, 제1 배양홈(22)이 다각형 형상의 횡단면을 가질 필요는 없다.
- [0030] 제1 배양홈(22)을 상기와 같이 경사지게 형성한 것은 배양을 위해 투입된 세포들이 초기에 배양홈(20)으로 잘 들어갈 수 있도록 한 것이다. 즉, 제1 배양홈(22)이 경사지게 형성되어 인접한 다른 제1 배양홈(22)으로 들어가지 않고 제2 배양홈(24) 쪽으로 쉽게 떨어질 수 있는 것이다.
- [0031] 다음으로, 제1 배양홈(22)으로 투입된 세포들은 충분한 깊이를 가진 배양홈(20)에서 배양되지 않으면 세포배양액 교체 시 의도치 않은 유동으로 인하여 세포들이 배양홈(20)에서 빠져나올 수 있다. 따라서, 본 실시예에서는 제1 배양홈(22)의 보다 깊게 제2 배양홈(24)을 형성하여 세포들이 배양홈(20)에서 빠져나오지 않고 배양될 수 있도록 한 것이다.
- [0032] 제2 배양홈(24)은 도 2에 잘 도시된 바와 같이, 상부는 평행한 직선면으로 형성되고, 하부는 반원형으로 형성되는 것이 바람직하다. 이는 세포 스페로이드 형태로 균일한 크기로 안정적으로 자라게 하도록 하기 위함이다. 물론, 제2 배양홈(24)의 형태는 상술한 형태에 제한되는 것은 아니고, 세포 스페로이드가 안정적으로 배양될 수 있는 충분한 깊이로 형성되면 어떠한 형태도 적용할 수 있다. 예를 들어, 제2 배양홈(24) 전체가 반원형으로 형성될 수도 있고, 타원형으로 형성될 수도 있다.
- [0033] 다음으로, 상기에서 설명한 배양홈(20)은 다음과 같이 설계되는 것이 바람직하다. 먼저, 상술한 바와 같이 세포배양액 교체 시 의도치 않은 유동으로 인하여 세포들이 빠져 나오는 것을 방지하기 위해 제2 배양홈(24)의 깊이는 제2 배양홈(24)의 폭의 1/2 이상인 것이 바람직하다. 또한, 제1 배양홈(22)의 세포들이 경사각은 20 내지 70° 인 것이 바람직하고, 제2 배양홈(22)의 폭은 50 내지 1000 μ m 인 것이 바람직하다.
- [0034] 한편, 상기 배양홈(20)에는 고분자 화합물, 생체유래 소재 또는 비점착성 물질(non-adhesive materials)이 코팅될 수 있다. 특히, 세포에 무해한 비점착성 물질이 배양홈(20)에 코팅되면, 세포가 스페로이드 형태로 균일한 크기로 안정적으로 자랄 수 있고, 이후에 형성된 세포 스페로이드를 수집할 때 쉽게 획득할 수 있는 장점이 있다.
- [0035] 상기한 비점착성 물질의 예로는 페릴린(Parylene), 시그마코트(Sigmacote), 폴리-헤마(poly-HEMA), poly(N-p-vinylbenzyl-D-lactonamide) (PVLA), F108, 리피듀어(LIPIDURE), 아가로스 겔(agarose gel), 소혈청알부민

(BSA; bovine serum albumin), 키토산(Chitosan), 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC; (Hydroxypropyl)methyl cellulose), 폴리 아미노산(Poly amino acid), 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol), 이산화티타늄 겔(TiO₂ gel) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

한편, 이하에서는 세포 스펀로이드 배양 조립체에 대하여 상세하게 설명한다. 도 3은 세포 스펀로이드 배양판이 조립된 세포 스펀로이드 배양 조립체의 분해 사시도이고, 도 4는 세포 스펀로이드 배양판이 조립된 세포 스펀로이드 배양 조립체의 사시도이며, 도 5는 도 4의 세포 스펀로이드 배양 조립체의 단면도이다.

이에 도시된 바에 따르면, 상술한 세포 스페로이드 배양판은 제1 세포 배양 용기(30)의 내측에 착탈가능하다. 물론, 본 도면에서는 세포 스페로이드 배양판이 제1 세포 배양 용기(30)에 부착되는 것으로 도시하였으나, 이에 제한되는 것은 아니고 제1 세포 배양 용기(30)와 일체로 형성될 수도 있다.

제1 세포 배양 용기(30)의 내측에 부착된 세포 스펀지 배양판에서는 제1 세포 스펀지(50)가 배양된다. 제1 세포 스펀지(50)는 상술한 배양홈(20)에 안착되어 안정적으로 배양될 수 있다.

그리고, 세포 스페로이드 배양관의 상부에는 제2 세포 스페로이드(52)가 배양되는 제2 세포 배양 용기(40)를 부착된다. 제2 세포 배양 용기(40)는 제1 세포 배양 용기(30)의 상면에 세포 스페로이드 배양관을 감싸도록 부착될 수 있다. 이와 같이 부착된 상태에서 배양액이 제1,2 세포 배양 용기(30,40)의 내부에 유입되면, 각각의 제1,2 세포 스페로이드(50,52)가 배양될 수 있다.

한편, 도 6에서는 1일부터 11일까지의 마우스 뉴럴 줄기세포(Mouse neural stem cell)의 세포 스페로이드 형성 실험결과를 비점착성 물질을 코팅한 것과 코팅하지 않은 것으로 비교하여 도시하였고, 도 7에서는 1일부터 11일까지의 HepG2 간암세포주의 세포 스페로이드 형성 실험결과를 비점착성 물질을 코팅한 것과 코팅하지 않은 것으로 비교하여 도시하였다.

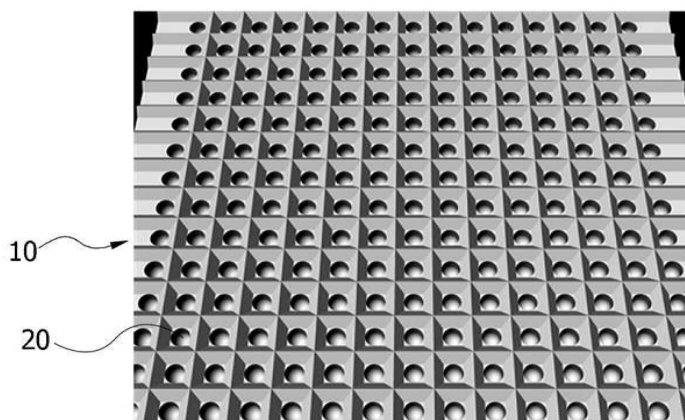
본 발명의 권리범위는 위에서 설명된 실시예에 한정되지 않고 청구범위에 기재된 바에 의해 정의되며, 본 발명의 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 청구범위에 기재된 권리범위 내에서 다양한 변형과 개작을 할 수 있다는 것은 자명하다.

부호의 설명

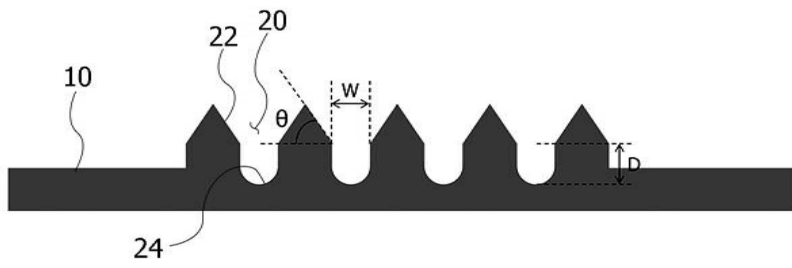
10 : 배양관 몸체	20 : 배양홈
22 : 제1 배양홈	24 : 제2 배양홈
30 : 제1 세포 배양 용기	40 : 제2 세포 배양 용기
50 : 제1 세포 스펙로이드	52 : 제2 세포 스펙로이드

도면

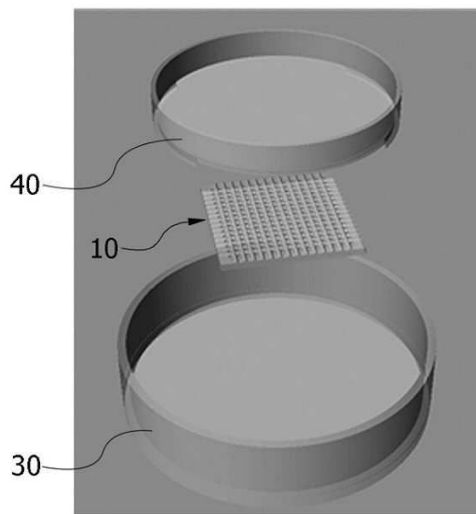
도면1



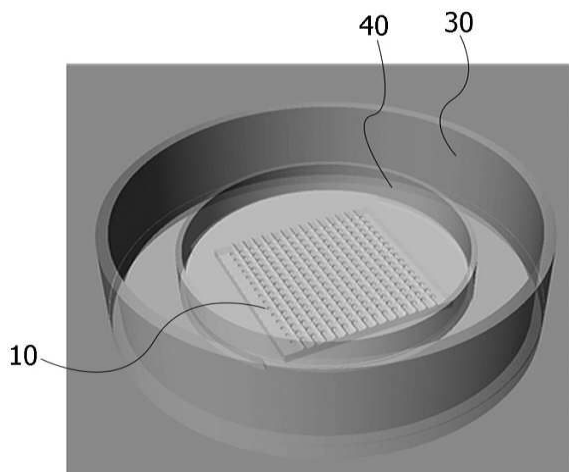
도면2



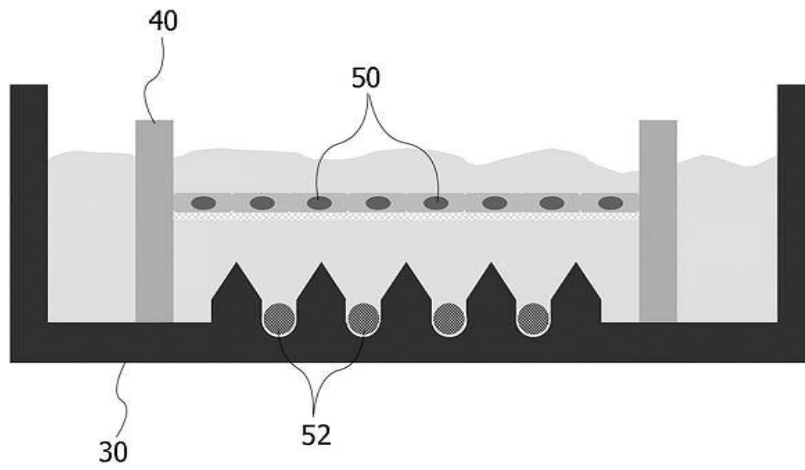
도면3



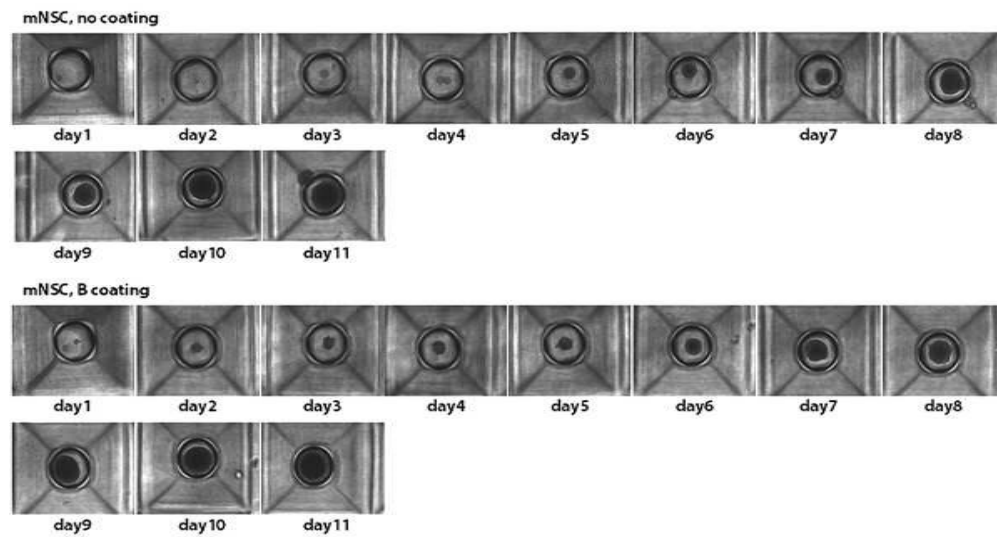
도면4



도면5



도면6



도면7

