(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 7 월 2 일 (02.07.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/138581 A1

(51) 국제특허분류:
C12M 1/32 (2006.01) *B29C 51/08* (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01) *B29C 51/42* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/000182

(22) 국제출원일: 2019 년 1 월 7 일 (07.01.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0171798 2018 년 12 월 28 일 (28.12.2018) KR

(71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (**POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION**) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동), Gyeongsangbuk-do (KR).

(72) 발명자: 이성진 (**LEE, Seong Jin**); 41568 대구시 북구 대현로서15길 7, 305호 (대현동), Daegu (KR). 윤재승 (**YOON, Jae Seung**); 37664 경상북도 포항시 남구 효자동길10번길 37-1, 202호 (효자동), Gyeongsangbuk-do (KR). 엄성수 (**EOM, Seong Su**); 47015 부산시 사상구 가야대로284번길 12, 1동 103호 (주례동, 럭키주례아파트), Busan (KR). 박상민 (**PARK, Sang Min**); 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, 4동 205호 (지곡동, 대학원아파트), Gyeongsangbuk-do (KR). 김동성 (**KIM, Dong Sung**); 37673 경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 8동 1402호 (지곡동, 교수아파트), Gyeongsangbuk-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (**ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), 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, JO, 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.

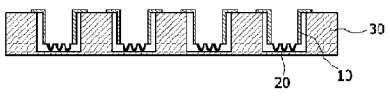
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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))

WO 2020/138581 A1

(54) **Title:** POROUS MICROWELL, AND MEMBRANE COMPRISING SAME AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) **발명의 명칭:** 다공성 마이크로웰 및 이를 구비한 멤브레인과 그 제조 방법



(57) **Abstract:** Provided according to an embodiment of the present invention is a porous microwell which serves as a cell culture surface for cell culture. One or more concave-downward microwells are formed such that each of the microwells is placed in an area formed by a throughhole portion of a cell culture container; and the microwells, together with connection portions formed around the microwells, have a plurality of pores, wherein a first porosity which is the porosity of first pores formed in the microwells is different from a second porosity which is the porosity of second pores formed in the connection portions.

(57) **요약서:** 본 발명의 일 실시예에 따른 다공성 마이크로웰은 세포가 배양되기 위한 세포 배양면인 다공성 마이크로웰로서, 하나 이상이 하부 방향으로 오목하게 형성되되 세포 배양 용기의 관통부가 이루는 영역 내에 위치하도록 형성되며, 그 주변에 형성되는 연결부와 함께 다수의 공극을 포함하되, 자신의 제1 공극들이 이루는 제1 공극률과 상기 연결부에 형성된 제2 공극들이 이루는 제2 공극률이 서로 다른 것을 특징으로 한다.

명세서

발명의 명칭: 다공성 마이크로웰 및 이를 구비한 멤브레인과 그 제조 방법

기술분야

[1] 본 발명은 다공성 마이크로웰 및 이를 구비한 멤브레인과 그 제조 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 3차원 세포 스페로이드(spheroid) 형성이 가능한 환경을 제공하는 다공성 마이크로웰 및 이를 구비한 멤브레인과 그 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 실제 몸속의 세포는 3차원의 형상이며 세포의 미세환경과도 3차원으로 상호작용 한다. 체외에서 세포를 3차원이 아닌 2차원의 단일층(monolayer)으로 배양 할 경우 체내의 세포와 유사성이 크게 결여 된다.

[3] 이러한 2차원 단일층 세포배양의 한계를 극복하기 위해, 3차원 세포 응집체(3D cell aggregatoin) 배양이 가능한 마이크로웰(microwell) 플랫폼이 존재한다. 즉, 마이크로웰은 단일세포(single cell)를 구획된 미세 공간에서 세포 응집을 유도하여 이러한 3D cell aggregation의 형성을 유도한다.

[4] 하지만, 종래의 마이크로웰은 다공성 구조를 갖지 않거나, 플라스틱 등을 이용하여 형성한다. 이에 따라, 종래의 마이크로웰은 3D cell aggregation 형성에 한계가 있었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 상기한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 3차원 세포 스페로이드(spheroid) 형성이 가능한 환경을 제공하는 다공성 마이크로웰 및 이를 구비한 멤브레인과 그 제조 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[6] 다만, 본 발명의 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[7] 상기와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 다공성 마이크로웰은 세포가 배양되기 위한 세포 배양면인 다공성 마이크로웰로서, 하나 이상이 하부 방향으로 오목하게 형성되되 세포 배양 용기의 관통부가 이루는 영역 내에 위치하도록 형성되며, 그 주변에 형성되는 연결부와 함께 다수의 공극을 포함하되, 자신의 제1 공극들이 이루는 제1 공극률과 상기 연결부에 형성된 제2 공극들이 이루는 제2 공극률이 서로 다르다.

[8] 상기 다공성 마이크로웰은 상기 연결부 보다 두께가 더 얇을 수 있다.

[9] 상기 다공성 마이크로웰은 상기 관통부가 이루는 영역 내에 다수 개가 위치할

수 있다.

[10] 상기 다공성 마이크로웰은 자신을 수용하는 수용 공간에 채워지는 유체가 상측에서 하측으로 통과하는 경우, 자신의 주변에서 유동 집중 현상을 발생시킬 수 있다.

[11] 상기 제1 공극률은 상기 제2 공극률 보다 클 수 있다.

[12] 상기 제1 공극 및 상기 제2 공극은 다수의 고분자 섬유가 서로 얽혀진 사이 영역에 형성될 수 있다.

[13] 본 발명의 일 실시예에 따른 멤브레인은 세포 배양 용기의 관통부에 채용되는 멤브레인으로서, (1) 하부 방향으로 오목하게 형성되되 상기 관통부가 이루는 영역 내에 위치하도록 형성되며, 세포가 배양하기 위한 세포 배양면인 하나 이상의 마이크로웰, (2) 마이크로웰 사이를 연결하는 연결부를 포함한다.

[14] 상기 마이크로웰 및 상기 연결부는 다수의 공극을 포함하되, 상기 마이크로웰에 형성된 제1 공극들이 이루는 제1 공극률과 상기 연결부에 형성된 제2 공극들이 이루는 제2 공극률이 서로 다르다.

[15] 상기 마이크로웰의 두께는 상기 연결부의 두께 보다 얇을 수 있다.

[16] 상기 마이크로웰은 다수 개가 상기 관통부가 이루는 영역 내에 위치할 수 있다.

[17] 상기 멤브레인은 상기 마이크로웰을 수용하는 수용 공간에 채워지는 유체가 상기 마이크로웰 및 상기 연결부의 상측에서 하측으로 통과하는 경우, 상기 마이크로웰 주변에서 유동 집중 현상이 발생될 수 있다.

[18] 상기 제1 공극률은 상기 제2 공극률 보다 클 수 있다.

[19] 상기 세포 배양 용기는 상기 관통부가 형성된 몸체를 포함할 수 있다.

[20] 상기 세포 배양 용기는 몸체와, 상기 몸체의 하부에 체결되며 상기 관통부가 형성된 체결부를 포함할 수 있다.

[21] 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰의 제조 방법은, (a) 다수의 고분자 섬유로 이루어져 상기 다수의 고분자 섬유의 사이 영역에 형성된 다수의 공극을 포함하는 멤브레인을 준비하는 단계, (b) 세포가 배양되기 위한 세포 배양면인 마이크로웰의 패턴이 형성된 몰드를 이용하여 상기 멤브레인에 엠보싱 공정을 수행함으로써, 하부 방향으로 오목하게 형성된 하나 이상의 상기 마이크로웰과 상기 마이크로웰 사이를 연결하는 연결부를 각각 상기 멤브레인에 형성하는 단계를 포함한다.

[22] 상기 (b) 단계는 세포 배양 용기의 관통부가 이루는 영역 내에 상기 마이크로웰이 위치 가능하도록 상기 마이크로웰을 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[23] 상기 마이크로웰에 형성된 제1 공극들이 이루는 제1 공극률과 상기 연결부에 형성된 제2 공극들이 이루는 제2 공극률은 서로 다를 수 있다.

[24] 상기 몰드는, (1) 상기 마이크로웰의 패턴에 따라 하부가 돌출된 제1 몰드, (2) 상기 마이크로웰의 패턴에 따라 상부가 오목한 제2 몰드를 포함할 수 있다.

[25] 상기 (b) 단계는 가열된 상기 몰드를 이용하는 핫 엠보싱 공정을 수행하는

단계를 포함할 수 있다.

[26] 상기 (b) 단계는, 상기 제1 몰드 또는 상기 제2 몰드를 가열하거나, 상기 제1 몰드 및 상기 제2 몰드를 모두 가열하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[27] 상기와 같이 구성되는 본 발명의 일 실시예에 따른 다공성 마이크로웰 및 이를 구비한 멤브레인과 그 제조 방법은 3차원 세포 스페로이드(spheroid) 형성이 가능한 환경을 제공하여, 일정 영역 안에 안착한 세포가 보다 원활하게 3차원적으로 증식 및 분화 가능한 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[28] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기를 나타낸다.

[29] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 일측 단면도를 나타낸다.

[30] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 플레이트(30)를 나타낸다.

[31] 도 4는 도 2에서 하나의 개구부(31) 주변을 확대한 도면을 나타낸다.

[32] 도 5는 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기에서 세포가 증식하는 모습을 나타낸다.

[33] 도 6은 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 몸체(10) 및 체결부(40)를 나타낸다.

[34] 도 7은 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법의 순서를 나타낸다.

[35] 도 8은 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법의 S10 또는 S100에 대한 일 예를 나타낸다.

[36] 도 9는 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법의 S20 또는 S200에 대한 일 예를 나타낸다.

[37] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법으로 형성한 멤브레인(20)의 사진을 나타낸다.

[38] [부호의 설명]

[39] 10 : 몸체 11 : 입구부

[40] 20 : 멤브레인 21 : 웰

[41] 22 : 연결부 23 : 고정부

[42] 30 : 플레이트 31 : 개구부

[43] 40 : 체결부 50 : 전해질 용액

[44] 60 : 전해질 용기 70 : 전기방사기

[45] 71 : 금속 니들

발명의 실시를 위한 형태

[46] 본 발명의 상기 목적과 수단 및 그에 따른 효과는 첨부된 도면과 관련한 다음의 상세한 설명을 통하여 보다 분명해 질 것이며, 그에 따라 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명의 기술적 사상을 용이하게

실시할 수 있을 것이다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서 본 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

[47] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 경우에 따라 복수형도 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다", “구비하다”, “마련하다” 또는 “가지다” 등의 용어는 언급된 구성요소 외의 하나 이상의 다른 구성요소의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.

[48] 본 명세서에서, “또는”, “적어도 하나” 등의 용어는 함께 나열된 단어들 중 하나를 나타내거나, 또는 둘 이상의 조합을 나타낼 수 있다. 예를 들어, “또는 B”“및 B 중 적어도 하나”는 A 또는 B 중 하나만을 포함할 수 있고, A와 B를 모두 포함할 수도 있다.

[49] 본 명세서에서, “예를 들어” 등에 따르는 설명은 인용된 특성, 변수, 또는 값과 같이 제시한 정보들이 정확하게 일치하지 않을 수 있고, 허용 오차, 측정 오차, 측정 정확도의 한계와 통상적으로 알려진 기타 요인을 비롯한 변형과 같은 효과로 본 발명의 다양한 실시 예에 따른 발명의 실시 형태를 한정하지 않아야 할 것이다.

[50] 본 명세서에서, 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 '연결되어' 있다거나 '접속되어' 있다고 기재된 경우, 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되어 있거나 또는 접속되어 있을 수도 있지만, 중간에 다른 구성요소가 존재할 수도 있다고 이해되어야 할 것이다. 반면에, 어떤 구성요소가 다른 구성 요소에 '직접 연결되어' 있다거나 '직접 접속되어' 있다고 언급된 때에는, 중간에 다른 구성요소가 존재하지 않는 것으로 이해될 수 있어야 할 것이다.

[51] 본 명세서에서, 어떤 구성요소가 다른 구성요소의 '상에' 있다거나 '접하여' 있다고 기재된 경우, 다른 구성요소에 상에 직접 맞닿아 있거나 또는 연결되어 있을 수 있지만, 중간에 또 다른 구성요소가 존재할 수 있다고 이해되어야 할 것이다. 반면, 어떤 구성요소가 다른 구성요소의 '바로 위에' 있다거나 '직접 접하여' 있다고 기재된 경우에는, 중간에 또 다른 구성요소가 존재하지 않은 것으로 이해될 수 있다. 구성요소간의 관계를 설명하는 다른 표현들, 예를 들면, '~사이에'와 '직접 ~사이에' 등도 마찬가지로 해석될 수 있다.

[52] 본 명세서에서, '제1', '제2' 등의 용어는 다양한 구성요소를 설명하는데 사용될 수 있지만, 해당 구성요소는 위 용어에 의해 한정되어서는 안 된다. 또한, 위 용어는 각 구성요소의 순서를 한정하기 위한 것으로 해석되어서는 안되며, 하나의 구성요소와 다른 구성요소를 구별하는 목적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, '제1구성요소'는 '제2구성요소'로 명명될 수 있고, 유사하게 '제2구성요소'도 '제1구성요소'로 명명될 수 있다.

[53] 다른 정의가 없다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공통적으로 이해될 수 있는 의미로

사용될 수 있을 것이다. 또한, 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 용어들은 명백하게 특별히 정의되어 있지 않는 한 이상적으로 또는 과도하게 해석되지 않는다.

[54]

[55] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 바람직한 일 실시예를 상세히 설명하도록 한다.

[56] 본 발명의 일 실시예 따른 다공성 마이크로웰 및 이를 구비한 멤브레인은 세포 배양 용기에 채용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다만, 설명의 편의를 위해, 이들 구성이 세포 배양 용기에 채용된 경우의 실시예에 대해서 이하에서 설명하도록 한다.

[57] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기를 나타내며, 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 일측 단면도를 나타낸다. 이때, 도 2는 도 1에서 A와 A'를 잘라낸 일측 단면을 나타낸다. 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 플레이트(30)를 나타낸다.

[58] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기는, 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 몸체(10) 및 멤브레인(20)을 포함할 수 있으며, 추가적으로 플레이트(30)를 더 포함할 수 있다. 다만, 이하에서는 설명의 편의를 위해, 플레이트(30)에 대해서 먼저 설명한 후, 몸체(10) 및 멤브레인(20)에 대해서 차례로 설명하도록 한다.

[59] 플레이트(30)는 개구 형상인 하나 이상의 개구부(31)를 구비한 것으로서, 몸체(10)가 개구부(31)에 삽입 장착될 수 있다. 이때, 개구부(31)는, 도 3(a)에 도시된 바와 같이, 하부가 닫히고 상부가 개방된 개방 형태이거나, 도 3(b)에 도시된 바와 같이, 플레이트(30)를 관통하는 관통 형태일 수 있다. 개구부(31)가 관통 형태인 경우, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기는 상부가 개방된 수용 공간을 가지고 수용 공간에 플레이트(30)를 장착하는 커버 용기를 더 포함할 수 있다.

[60] 특히, 플레이트(30)에 복수개의 개구부(31)가 구비된 경우, 각 개구부(31)가 서로 떨어지게 배열되므로, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기는 세포 배양 시에 각 개구부(31)의 샘플 간 영향을 차단할 수 있으며, 이에 따라, 복수의 독립적인 실험 데이터를 하나의 플레이트(30)를 이용하여 도출할 수 있다.

[61] 몸체(10)는, 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 측벽을 가지도록 일단에 형성된 스페이서와, 타단에 형성된 입구부(11)와, 스페이서와 입구부(11)를 관통하는 관통부를 각각 포함한다.

[62] 몸체(10)의 스페이서는 플레이트(30)의 개구부(31)에 삽입될 수 있다. 이때, 몸체(10)는 하나의 삽입부를 포함하거나, 복수개의 삽입부를 포함할 수 있다. 즉, 하나의 삽입부를 포함하는 경우, 몸체(10)는 해당 삽입부가 하나의 개구부(31)에 삽입될 수 있다. 또한, 복수의 삽입부를 포함하는 경우, 몸체(10)는 각 삽입부가 다수의 개구부(31)에 대응하여 삽입될 수 있다. 이때, 복수개의 삽입부를 포함할 경우, 몸체(10)는 각 삽입부가 서로 연결된 구조를 가지며, 각 삽입부가 각

개구부(31)에 대응하여 삽입될 수 있다.

[63] 도 1 내지 도 6은 하나의 삽입부를 포함한 몸체(10)에 대해서 도시하고 있지만, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 내용은 몸체(10)가 복수개의 스페이서 및 관통부를 포함하는 경우에도 당연히 적용될 수 있다.

[64] 몸체(10)의 스페이서가 개구부(31)에 삽입될 때, 몸체(10)의 스페이서는 하부에 위치하며, 몸체(10)의 입구부(11)는 상부에 위치한다. 몸체(10)의 스페이서는, 일단에서부터 타단까지 폭이 일정한 수직 형태이거나, 일단에서부터 타단까지 폭이 점차 확대되는 깔때기 형태이거나, 수직 형태와 깔때기 형태가 복합된 형태일 수 있다. 몸체(10)의 관통부는 그 단면이 원형, 다각형 등 다양한 형상으로 형성될 수 있으며, 그 크기도 다양하게 형성될 수 있다.

[65] 도 4는 도 2에서 하나의 개구부(31) 주변을 확대한 도면을 나타낸다.

[66] 특히, 몸체(10)의 스페이서가 플레이트(30)의 개구부(31)에 장착될 때, 몸체(10)의 스페이서 일단이 세포 배양 용기의 바닥면으로부터 일정 간격 떨어지게 위치하도록, 몸체(10)의 입구부(11)는, 도 4에 도시된 바와 같이, 몸체(10)의 스페이서 및 개구부(31)의 입구 보다 넓은 단면을 가지는 것이 바람직하다. 이에 따라, 몸체(10)의 스페이서와 세포 배양 용기의 바닥면 사이의 공간에는 세포에 공급하기 위한 영양분을 가지는 유체의 통로가 형성될 수 있다. 이때, 세포 배양 용기의 바닥면은 개방 형태 플레이트의 경우엔 그 개방부의 바닥면일 수 있으며, 관통 형태 플레이트의 경우엔 커버 용기의 바닥면일 수 있다.

[67] 멤브레인(20)은 세포가 배양되는 세포 배양면을 제공하는 층으로서, 몸체(10)의 스페이서 측의 관통부에 채용된다. 예를 들어, 멤브레인(20)은 전기방사법를 통해 형성되어 몸체(10)의 스페이서 일단을 덮는 형태로 형성될 수 있다. 이때, 멤브레인(20)은 복수개의 고분자 나노 섬유가 무작위로 얽혀짐으로써 이루어지거나, 고분자 합성 수지가 성형됨으로써 이루어질 수 있다. 예를 들어, 각 고분자 나노 섬유는 1㎚ 이상 내지 1000㎚ 미만의 직경을 가질 수 있다. 복수개의 고분자 나노 섬유로 이루어짐에 따라, 멤브레인(20)은 생체 내 기저막과 유사한 구조를 가짐에 따라 생체 내 혈액 유동 환경을 제공할 수 있다.

[68] 예를 들어, 고분자 나노 섬유 또는 고분자 합성 수지는 열가소성 수지, 열경화성 수지, 탄성 중합체 및 생체 고분자 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 고분자 나노 섬유 또는 고분자 합성 수지는 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리비닐리덴 플로라이드 (Polyvinylidene fluoride, PVDF), 폴리스티렌(polystyrene), 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin), 키토산(chitosan) 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.

[69] 멤브레인(20)은 다공성의 마이크로웰(microwell)(21), 연결부(22) 및 고정부(23)를 포함할 수 있다. 이때, 마이크로웰(21), 연결부(22) 및 고정부(23)는

복수개의 고분자 나노 섬유가 얽혀짐으로써 서로 연결된 구조를 갖는다.

[70] 마이크로웰(21)은 세포 배양면으로 작용하는 영역으로서, 하부 방향으로 오목하게 형성된다. 즉, 이러한 오목 형상에 의해, 세포는 마이크로웰(21) 내에 쉽게 안착하게 되며, 유체의 이동과 관계 없이 마이크로웰(21) 내에서 안정적으로 증식할 수 있게 된다. 이때, 마이크로웰(21)은 적어도 하나가 몸체(10)의 관통부가 이루는 영역 내에 위치한다. 즉, 상부 또는 하부에서 바라볼 때, 마이크로웰(21)은 몸체(10)의 관통부 보다 크기가 작으며 관통부가 이루는 영역 내에 포함된다.

[71] 즉, 세포 배양면인 마이크로웰(21)이 오목 형상으로 형성됨에 따라, 멤브레인(20)은 세포가 세포 배양면에 더 집중적으로 안정하게 부착될 수 있고 세포 배양면의 면적을 증가시킬 수 있어, 세포의 부착 효율을 향상시킬 수 있다. 또한, 통상적으로 평평한 형상의 세포 배양면을 구비하는 종래의 세포 배양 용기와 달리, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 몸체(10)는 입체적인 3차원 형상의 세포 배양면을 제공함으로써 생체 내와 같이 3차원 구조 환경에서 세포를 배양할 수 있어, 3차원 세포 스페로이드(spheroid)를 형성할 수 있다. 다만, 다수 개의 마이크로웰(21)이 몸체(10)의 관통부가 이루는 영역 내에 위치할 경우, 몸체(10)의 스페이서가 다수의 세포 배양면을 가져 세포 부착 효율을 더욱 향상시킬 수 있다.

[72] 연결부(22)는 마이크로웰(21) 그 주변에 형성되어 마이크로웰(21) 사이를 연결하는 영역으로서, 평평한 형태를 가질 수 있다. 특히, 연결부(22)는 마이크로웰(21) 보다 그 두께가 더 두꺼울 수 있다. 이는 후술할 엠보싱(embossing) 공정에 의해 마이크로웰(21)이 멤브레인(20) 중에서 하부 오목 형상으로 늘어나는 영역에 해당하여 원래 보다 얇아지는 반면, 연결부(22)는 늘어나지 않는 영역에 해당하여 원래 두께를 유지하기 때문이다.

[73] 고정부(23)는 몸체(10)의 스페이서 일단의 테두리에 고정된 영역이다. 특히, 고정부(23)는 연결부(22) 보다 두께가 얇고 밀도가 낮을 수 있다. 이는 멤브레인(20)이 전해질 용액을 이용한 전기방사법을 통해 형성될 수 있기 때문이다. 즉, 마이크로웰(21) 및 연결부(22)는 전기방사 시에 전해질 용액이 담긴 위치에서 생성되는 영역에 해당하므로, 고정부(23) 보다 더 많은 수의 고분자 나노 섬유가 형성되어 고정부(23)에 비해 밀도가 크고 두께가 두껍게 형성될 수 있다.

[74] 도 5는 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기에서 세포가 증식하는 모습을 나타낸다. 즉, 도 5(a), 도 5(b) 및 도 5(c)는 유체 집중 현상 하에서 시간에 따라 세포가 증식하는 모습을 차례로 나타낸다.

[75] 한편, 멤브레인(20)은 고분자 나노 섬유들의 사이 영역에 형성된 다수의 공극(hole)을 포함한다. 이때, 공극은 수 ㎛ 내지 수십 ㎛의 크기를 가질 수 있다. 즉, 멤브레인(20)은 공극으로 인해, 단일 세포들은 투과시키지 않되 타 물질들은 선택적으로 투과시키는 선택적 투과막으로 작용할 수 있으며, 이에 따라 물질

이동 장벽 및 통로의 역할을 할 수 있다.

[76] 마이크로웰(21)에 형성된 제1 공극들이 이루는 제1 공극률과, 연결부(22)에 형성된 제2 공극들이 이루는 제2 공극률은 서로 다를 수 있다. 이때, 공극률은 단위 면적 내에 존재하는 공극 면적의 비율일 수 있다. 특히, 제1 공극률이 제2 공극률 보다 클 수 있다. 이는 멤브레인(20) 중에서 마이크로웰(21)에 해당하는 영역이 엠보싱 공정에 의해 하부 오목 형상으로 늘어나면서, 해당 영역 중에서 얽혀진 고분자 나노 섬유들에 의해 막혀 있던 다수의 부분이 개구되거나 이미 개구된 부분의 면적이 넓어지는 현상이 발생하기 때문이다. 다만, 제1 공극률과 제2 공극률의 차이가 있음을 위해 이들 2가지 공극률에 대해서 설명하고 있으나, 본 발명이 이들 2가지 공극률만 가지는 것으로 한정되는 것은 아니다. 즉, 본 발명은 제1 공극률 및 제2 공극률 외에 다양한 공극률을 가질 수도 있다.

[77] 이러한 공극률의 차이에 따라, 도 5에 도시된 바와 같이, 마이크로웰(21) 주변 영역에서 유체 집중 현상이 발생하면서 마이크로웰(21)에서의 세포 증식이 더 활발하게 이루어질 수 있다. 이는 공극률이 높은 영역일수록 다르시의 방정식(Darcy's equation)에 따라 물질 투과성이 더 높기 때문이다.

[78] 세포 배양을 위해, 플레이트(30)의 개구부(31)에는 유체(예를 들어, 세포 배양액. 증류수, PBS 용액 등의 혼합물)가 채워지는데, 이러한 유체는 스포이트(spuit) 등을 이용하여 주기적으로 교체해줘야 한다. 이때, 유체의 교체는 몸체(10)의 외측에서 유체가 흡입 배출(suction)되면서 동시에 몸체(10)의 내측으로 새로운 유체가 공급되는 방법으로 이루어질 수 있다. 이는 몸체(10)의 내측에서 유체의 흡입 배출이 이루어지는 경우, 마이크로웰(21)에 안착하여 증식 및 분화 중인 세포에 악영향을 주거나 해당 세포가 함께 배출될 위험이 있기 때문이다.

[79] 상술한 유체 교체 과정에서, 마이크로웰(21)을 수용하는 수용 공간에 채워지는 유체는 마이크로웰(21) 및 연결부(22)의 상측에서 하측으로 통과하게 된다. 이때, 마이크로웰(21)은 연결부(22) 보다 공극률이 더 크므로, 도 5에 도시된 바와 같이, 연결부(22) 보다 더 많은 유체를 투과시킨다. 이에 따라, 마이크로웰(21)의 주변에서는 연결부(22)의 주변 보다 유체가 더 집중적으로 이동하는 현상, 즉 유체 집중 현상이 발생한다.

[80] 이러한 유체 집중 현상이 발생하는 경우, 마이크로웰(21) 내에서 증식 및 분화 중인 세포에게로 유체에 포함된 산소 및 영양소를 더 원활하게 공급할 수 있으며, 이에 따라 세포 증식 및 분화가 더 촉진될 수 있다. 또한, 이러한 유체 집중 현상에 의해, 마이크로웰(21) 내부로 세포들이 모이게 되는 현상도 발생한다. 즉, 공극률 차이를 갖는 다수의 영역을 구비하되 해당 영역 중 세포 배양면인 마이크로웰(21)이 연결부(22) 보다 더 높은 공극률을 갖도록 형성됨에 따라, 멤브레인(20)은 마이크로웰(21)에서의 세포의 증식 및 분화 효율을 증가시킬 수 있다.

[81] 플레이트(30)에 복수개의 개구부(31)가 구비된 경우, 본 발명에 따른 세포 배양

용기는 생체 내와 같이 3차원 구조 환경에서 실험한 복수의 독립적인 실험 데이터를 하나의 플레이트(30)를 이용하여 도출할 수 있다.

[82] 도 6은 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 몸체(10) 및 체결부(40)를 나타낸다.

[83] 한편, 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기는, 도 6에 도시된 바와 같이, 일단과 타단이 관통하며 몸체(10)의 스페이서 일단에 체결되는 체결부(40)을 더 포함할 수 있다.

[84] 이때, 체결부(40)는 하나의 관통부를 포함하거나, 복수개의 관통부를 포함할 수 있다. 즉, 하나의 관통부를 포함하는 경우, 체결부(40)는 몸체(10)의 각 스페이서에 체결될 수 있으며, 링 형상으로 형성될 수 있다. 또한, 복수개의 관통부를 포함할 경우, 체결부(40)는 각 관통부가 몸체(10)의 각 스페이서에 대응하여 체결될 수 있다. 도 6은 체결부(40)가 하나의 관통부를 포함하는 경우에 대해서 도시하고 있지만, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 내용은 체결부(40)가 복수개의 관통부를 포함하는 경우에도 당연히 적용될 수 있다.

[85] 체결부(40)가 더 포함되는 경우, 몸체(10)의 스페이서 일단에 멤브레인(20)이 구비되지 않고 체결부(40)의 일단에 멤브레인(20)이 구비되거나, 몸체(10)의 스페이서 일단 및 체결부(40)의 일단에 함께 멤브레인(20)이 구비될 수 있다. 몸체(10)의 스페이서에 체결부(40)가 체결되면 체결부(40)의 관통부와 몸체(10)의 관통부는 서로 연결된다.

[86] 체결부(40)는 몸체(10)의 스페이서 일단에 착탈(장착 및 분리)되는 형태로 구비될 수 있다. 예를 들어, 체결부(40)의 내부 또는 외부에 나사산이 형성되며, 몸체 일단의 외부 또는 내부에 체결부(40)의 나사산에 대응하는 나사산이 형성될 수 있다. 또한, 체결부(40)는, 도 6(b)에 도시된 바와 같이, 몸체(10)의 스페이서 일단의 관통부의 내주면에 끼움 결합되거나, 도 6(c)에 도시된 바와 같이, 몸체(10)의 스페이서 일단의 외주면에 끼움 결합될 수 있다.

[87] 체결부(40)의 일단에 구비되는 멤브레인(20)은 상술한 몸체(10)의 스페이서 일단에 구비되는 멤브레인(20)에서 몸체(10)의 스페이서를 체결부(40)로 대체하는 것을 외에는 동일하다. 즉, 체결부(40)의 일단에 구비되는 멤브레인(20)은 그 위치가 몸체(10)의 스페이서 일단에서 체결부(40)의 일단으로 달라졌을 뿐이다. 따라서, 체결부(40)의 일단에 구비되는 멤브레인(20)에 대한 상세한 설명은 이하 생략하고 상술한 몸체(10)의 스페이서 일단에 구비되는 멤브레인(20)에 대한 설명으로 갈음하도록 한다.

[88]

[89] 이하, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법에 대하여 설명하도록 한다. 이러한 세포 배양 용기의 제조 방법은 마이크로웰(21) 또는 멤브레인(20)의 제조 방법을 포함한다.

[90] 도 7은 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법의 순서를

나타낸다.

[91] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법은, 도 7에 도시된 바와 같이, 준비 단계(S10, S100) 및 형성 단계(S20, S200)를 포함한다. 이때, S10 및 S20은 상술한 몸체(10) 및 멤브레인(20)의 제조 방법이며, S100 및 S200은 상술한 몸체(10), 멤브레인(20) 및 체결부(40)의 제조 방법이다.

[92] S10은 몸체(10)와 멤브레인(20)을 준비하는 단계이다. 또한, S100은 몸체(10), 멤브레인(20) 및 체결부(40)을 준비하는 단계이다. 이때, 몸체(10), 멤브레인(20) 및 체결부(40)은 도 1 내지 도 6에 따라 상술한 내용과 동일하므로, 이들에 대한 설명은 이하 생략하도록 한다. 다만, 멤브레인(20)은 전해질 용액을 이용한 전기방사법을 통해 형성될 수 있으며, 이하 전해질 용액을 이용한 전기방사법에 대해서 설명하도록 한다.

[93] 도 8은 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법의 S10 또는 S100에 대한 일 예를 나타낸다.

[94] 전해질 용액을 이용한 전기방사법은 몸체(10)의 스페이서 또는 체결부(40)의 일단을 덮도록 멤브레인(20)을 형성하는 것으로서, 챔버 내부에서 이루어질 수 있다. 이때, 챔버는 작업이 이루어지는 공간으로서, 멤브레인(20)이 형성될 때 고분자 용액의 외부 누출을 방지할 수 있다. 이하, 몸체(10)의 스페이서 일단에 멤브레인(20)을 형성하는 전해질 용액을 이용한 전기방사법을 “제1 전기방사법”이라 지칭하며, 체결부(40)의 일단에 멤브레인(20)을 형성하는 전해질 용액을 이용한 전기방사법을 “제2 전기방사법”이라 지칭한다. 먼저, 제1 전기방사법에 대해서 설명하도록 한다.

[95] 제1 전기방사법은 전해질 채움 단계, 전압 인가 단계 및 멤브레인 형성 단계를 차례로 포함할 수 있다.

[96] 즉, 전해질 채움 단계는, 도 8(a)에 도시된 바와 같이, 일단과 타단이 관통하도록 형성된 몸체(10)의 스페이서에 전해질 용액(50)을 채우는 단계이다. 이때, 몸체(10)는 스페이서 일단이 상부를 향하도록 배치되고 타단이 차단된다. 이후, 몸체 10)의 스페이서 일단으로 전해질 용액(50)이 채워진다. 이때, 몸체(10)의 입구부(11)를 막도록 마개가 구비되는데, 해당 마개에는 전해질 용액(50)에 전압을 인가하기 위한 전극이 구비될 수 있다. 즉, 전극은 마개를 관통하도록 형성되어, 몸체(10)의 스페이서에 채워지는 전해질 용액(50)과 연결될 수 있다.

[97] 또는, 전해질 채운 단계에서는, 도 8(b)에 도시된 바와 같이, 전해질 용액(50)이 채워진 전해질 용기(60)에 몸체(10)의 스페이서를 배치하되, 몸체(10)의 스페이서 일단이 상부를 향하도록 배치함으로써 몸체(10)의 관통부에 전해질 용액(50)을 채울 수도 있다. 몸체(10)의 스페이서가 전해질 용기(60)의 수용 공간으로 배치되면, 전해질 용액(50)의 표면에 몸체(10)의 스페이서가 닿으면서 전해질 용액(50)의 표면을 누르는 압력이 생기고, 그 압력에 의해 몸체(10)의 스페이서로 전해질 용액(50)이 채워지게 된다. 이때, 전해질 용액(50) 표면의 압력이 보다 잘 생성될 수 있도록, 전해질 용기(60)의 수용 공간은 몸체(10)의

스페이서 형상에 일치하도록 형성될 수 있다.

[98] 전해질 용액(50)은 전도성을 가지므로, 전압 인가 단계에서 전압이 인가되면 (-) 전하를 띄게 되어 (+) 전하를 갖는 입자를 전기적 인력으로 끌어당기고, 이에 따라, (+) 전하를 갖는 입자는 전해질 상부에 집적될 수 있다. 전해질 용액(50)은 해리의 정도에 따라 강전해질, 약전해질로 분류된다. 해리의 정도는 용매에 따라서 다르다.

[99] 예를 들어, 전해질 용액(50)으로는 염화칼륨과 증류수의 3%mol 비율로 혼합한 용액을 사용할 수 있다. 또한, 물 또는 유기용매(에탄올, 메탄올)에 녹아 1 mS/cm보다 높은 전기 전도도를 띠는 물질 및 농도 일체를 전해질 용액(50)으로 사용할 수 있다. 또한, 물에 녹아 상대 유전율이 80 F/m보다 높은 값을 가지는 물질 및 농도 일체를 전해질 용액(50)으로 사용할 수 있다.

[100] 이후, 전압 인가 단계는, 도 8(c)에 도시된 바와 같이, 전해질 용액(50)과 전기방사기(70)의 금속 니들(needle)(71) 사이에 전압을 인가하는 단계이다. 이때, 전압은 전원 공급기를 통해서 공급되는데, 인가 전압의 세기 변화에 따라 형성되는 멤브레인 형성 단계에서 형성되는 멤브레인(20)의 구조에 변화가 생길 수 있다.

[101] 즉, 전해질 용액(50)과 전기방사기(70)의 금속 니들(71)의 사이에는 전기장이 형성되며, 이때 형성되는 전기장의 세기가 지나치게 낮을 경우, 고분자 용액물이 연속적으로 토출되지 않아, 균일한 두께의 고분자 나노 섬유를 제조하기 어려울 뿐만 아니라, 제조된 고분자 나노 섬유가 전해질 용액(50) 위에 원활하게 집속되기 어려울 수 있다. 반대로, 전기장의 세기가 지나치게 높을 경우, 고분자 섬유가 전해질 용액(50)의 상부 표면에 정확하게 안착되지 않기 때문에 정상적인 형태를 갖기 어려울 수 있다. 이런 내용을 고려할 때, 전해질 용액(50)과 전기방사기(70)의 금속 니들(71)에 인가되는 전압의 세기는 5kV 내지 30kV일 수 있다.

[102] 전해질 용액(50)에는 음(-)의 전압을 인가할 수 있으며, 금속 니들(71)에는 양(+)의 전압을 인가할 수 있다. 이에 따라, 전해질 용액(50)은 음(-)의 전하를 띠게 되고, 멤브레인 형성 단계에서 방사되는 고분자 용액은 양(+)의 전하를 띠게 된다.

[103] 이후, 멤브레인 형성 단계는, 도 8(c)에 도시된 바와 같이, 전압이 인가된 상태에서 전기방사기(70)를 통해 몸체(10)의 스페이서로 고분자 용액을 방사하여 멤브레인(20)을 형성하는 단계이다. 이때, 멤브레인(20)은 전해질 용액(50)의 높은 자유도로 인해 복수개의 고분자 나노 섬유가 무작위로 얽힌 망형으로 형성된다.

[104] 한편, 전기방사기(70)는 고분자 용액을 공급하는 장치이다. 즉, 전기방사기(70)는 고분자 용액을 전기 방사가 가능한 적절한 점도를 갖도록 저장한 후, 금속 니들(71)을 통해 고분자 용액을 토출할 수 있다. 이때, 토출된 고분자 용액은 비산과 동시에 경화되어 고분자 나노 섬유를 형성할 수 있다.

[105] 금속 니들(71)은 고분자 용액을 토출하는 구성이다. 금속 재질로 이루어짐에 따라, 금속 니들(71)은 전원 공급기와 연결하기 용이하며, 전원 공급기로부터 전압이 인가될 때 토출되는 고분자 용액의 전하 대전 효율을 향상시킬 수 있다. 특히, 금속 니들(71)은 몸체(10)의 스페이서와 이격된 상부에 위치하되 그 토출 단부가 몸체(10)의 스페이서를 향하도록 배치된 상태에서 고분자 용액을 방사할 수 있다.

[106] 예를 들어, 전기방사기(70)는 주사기, 주사기 펌프 및 금속 니들(71)로 구성될 수 있다. 즉, 고분자 용액을 주사기에 넣고 주사기 펌프의 동력을 통해서 금속 니들(71)로 고분자 용액을 공기 중에 토출할 수 있다. 이때, 금속 니들(71)은 23 Gauge needle를 사용할 수 있지만 고분자 용액에 따라 그 크기가 달라질 수 있다. 특히, 전해질 용액(50)의 표면 형상을 유지하면서 전해질 용액(50) 표면에 고분자 섬유가 얹혀질 수 있도록, 고분자 용액은 0.01 ml/h 내지 3 ml/h의 토출 속도로 방사될 수 있다.

[107] 상술한 전압 인가 범위(5kV 내지 30kV) 및 토출 속도 범위(0.01 ml/h 내지 3 ml/h)에서 고분자 용액을 방사하면, 고분자 나노 섬유는 그 직경이 10㎚ 내지 900㎚으로 형성될 수 있다.

[108] 예를 들어, 고분자 용액으로는 클로로폼(chloroform)과 메탄올(methanol)을 1: 1의 질량비로 혼합한 용액에 폴리카프로락톤(Polycarprolactone)을 혼합한 5% 내지 25% 농도의 용액을 사용할 수 있다. 또한, 아세톤(acetone)과 디메틸포름아미드(Dimethylformamide)를 3: 7의 부피비로 혼합한 후, 폴리비닐이딘 플루오라이드(Polyvinylidenefluoride, PVDF)을 혼합한 25% 내지 30% 농도의 용액을 고분자 용액으로 사용할 수 있다. 그 외에도 폴리스틸렌(Polystrene), 폴리카보네이트(Polycarbonate), 콜라겐과 폴리카보네이트 혼합 용액(collagen/Polycarbonate blending solution), 젤라틴 등을 이용하여 고분자 용액을 제조할 수 있다.

[109] 특히, 멤브레인 형성 단계에서, 전해질 용액(50)이 채워진 몸체(10)의 스페이서 측의 관통부와 고분자 용액의 사이에서 발생되는 전기적 인력은 일정하되, 몸체(10)의 스페이서의 테두리와 고분자 용액의 사이에서 발생되는 전기적 인력에 비해 크다. 이에 따라, 전해질 용액(50)이 채워진 몸체(10)의 스페이서 측의 관통부에 집적되는 멤브레인(20)의 영역(이하, “관통부 영역”이라 지칭함)은 일정하되 비교적 큰 밀도 및 두께를 갖는다.

[110] 이에 반하여, 몸체(10)의 스페이서의 테두리와 고분자 용액 사이에서 발생되는 전기적 인력의 크기는 몸체(10)의 스페이서의 관통부와 고분자 용액 사이에 발생되는 전기적 인력의 크기에 비해 작으며, 몸체(10)의 스페이서의 관통부에서 멀어질수록 점점 작아지게 된다. 이에 따라, 몸체(10)의 스페이서의 테두리에 집적되는 멤브레인(20)인 고정부(23)는 일정하지 않되 비교적 작은 밀도 및 두께를 갖는다.

[111] 멤브레인 형성 단계는 전기방사기(70)의 방사 시간을 조절하여 몸체(10)의

스페이서 일단에 형성되는 멤브레인(20)의 두께, 공극률 및 투명도 중 어느 하나 이상을 조절하는 단계를 더 포함할 수 있다. 즉, 전기방사기(70)의 방사 시간이 길어질수록 집적되는 고분자 나노 섬유의 양이 많아진다. 이에 따라, 몸체(10)의 스페이서 일단에 형성되는 멤브레인(20)은 그 두께가 두꺼워지면서, 그 공극률 및 투명도가 작아지게 된다.

[112] 또한, 멤브레인 형성 단계는 고분자 용액의 농도를 조절하여 형성되는 멤브레인(20)의 고분자 나노 섬유의 직경을 조절하는 단계를 더 포함할 수 있다. 즉, 고분자 용액의 농도가 높아지면 그 점성도가 커지므로, 몸체(10)의 스페이서 일단에 형성되는 멤브레인(20)의 고분자 나노 섬유의 직경은 커지게 된다.

[113] 다음으로, 제2 전기방사법에 대해서 설명하도록 한다.

[114] 제2 전기방사법은 제1 전기방사법과 동일하게 전해질 채움 단계, 전압 인가 단계 및 멤브레인 형성 단계를 포함하며, 추가적으로 체결부 체결 단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 전해질 채움 단계, 전압 인가 단계 및 멤브레인 형성 단계는 상술한 제1 전기방사법에서 몸체(10)의 스페이서를 체결부(40)으로 대체하는 것 외에는 동일하다. 따라서, 제2 전기방사법의 전해질 채움 단계, 전압 인가 단계 및 멤브레인 형성 단계에 대한 상세한 설명은 이하 생략하고 상술한 제1 전해질 전기방사법의 전해질 채움 단계, 전압 인가 단계 및 멤브레인 형성 단계에 대한 설명으로 갈음하도록 한다.

[115] 즉, 제2 전기방사법에서는 전해질 채움 단계, 전압 인가 단계 및 멤브레인 형성 단계를 통해 체결부(40)의 일단에 멤브레인(20)을 형성할 수 있다. 이후, 체결부 체결 단계는 일단과 타단이 관통하도록 형성된 몸체(10)의 스페이서 일단에 멤브레인(20)이 형성된 체결부(40)을 체결하는 단계이다. 예를 들어, 체결부 체결 단계는 몸체(10)의 스페이서 또는 체결부(40)를 이송하여 몸체(10)의 스페이서와 체결부(40)를 체결하는 이송 장치에 의해 수행될 수 있다.

[116] 다만, 제1 전기방사법 및 제2 전기방사법은 멤브레인(20)을 형성한 후, 몸체(10)의 스페이서 또는 체결부(40)의 모양에 맞춰 형성된 멤브레인(20)을 절삭하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[117] 도 9는 발명의 다른 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법의 S20 또는 S200에 대한 일 예를 나타낸다.

[118] S20은 몸체(10)의 스페이서에 형성된 멤브레인(20)에 엠보싱 공정을 수행하는 단계이다. 또한, S200은 체결부(40)에 형성된 멤브레인(20)에 엠보싱 공정을 수행하는 단계이다.

[119] 즉, S20 또는 S200에서는, 도 9에 도시된 바와 같이, 마이크로웰(21)의 패턴이 형성된 몰드(M)를 이용하여 S10 또는 S100에서 준비된 멤브레인(20)에 엠보싱 공정을 수행한다. 이때, 엠보싱 공정은 몰드(M)로 멤브레인(20)을 가압하여, 몰드(M)의 패턴에 대응하는 패턴을 멤브레인(20)에 형성하는 공정이다. 즉, 엠보싱 공정 결과, 멤브레인(20)에는 마이크로웰(21) 및 연결부(22)가 형성될 수 있다.

[120] 엠보싱 공정은 가열된 몰드(M)로 멤브레인(20)을 가압하는 핫 엠보싱(hot embossing) 공정일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다만, 핫 엠보싱 공정을 사용하는 경우에 보다 빠르게 S20의 결과를 도출할 수 있다.

[121] 몰드(M)는 마이크로웰(21)의 패턴에 따라 하부가 돌출된 제1 몰드(M1)와, 마이크로웰(21)의 패턴에 따라 상부가 오목한 제2 몰드(M2)를 포함할 수 있다. 즉, 제1 몰드(M1)와 제2 몰드(M2) 사이에 멤브레인(20)을 두고, 제1 몰드(M1)와 제2 몰드(M2)를 가압하여 합체한 후 분리함으로써, 멤브레인(20)에 마이크로웰(21) 및 연결부(22)가 형성될 수 있다. 합체 시, 제1 몰드(M1)의 돌출된 부분이 멤브레인(20)의 일면에 접촉하고, 제2 몰드(M2)의 오목한 부분이 멤브레인(20)의 타면에 접촉한다.

[122] 핫 엠보싱 공정의 경우 합체 전에, 제1 몰드(M1) 및 제2 몰드(M2) 중 어느 하나가 가열되거나, 제1 몰드(M1) 및 제2 몰드(M2)가 모두 가열될 수 있다. 다만, 제1 몰드(M1)의 돌출된 형상이 마이크로웰(21) 형성에 더 많은 영향을 미치므로, 제1 몰드(M1)만 가열하여 사용하는 것이 바람직할 수도 있다. 또한, 가열된 제1 몰드(M1) 또는 제2 몰드(M2)의 온도는 멤브레인(20)을 이루는 고분자 나노 섬유의 녹는점 보다 낮은 것이 바람직할 수 있다.

[123] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법으로 형성한 멤브레인(20)의 사진을 나타낸다. 이때, 도 10(c)는 멤브레인(20)의 평면 사진을 나타내고, 도 10(d)는 도 10(c)을 확대하여 도시한 마이크로웰(21) 및 연결부(22)의 평면도를 나타낸다. 또한, 도 10(a)는 마이크로웰(21)의 확대 사진을 나타내고, 도 10(b)는 도 10(a)의 마이크로웰(21)에 형성된 제1 공극을 나타낸다. 또한, 도 10(e)는 연결부(22)의 확대 사진을 나타내고, 도 10(f)는 도 10(e)의 연결부(22)에 형성된 제2 공극을 나타낸다.

[124] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법으로 형성한 멤브레인(20)은, 도 10(a) 및 도 10(e)에 도시된 바와 같이, 복수개의 고분자 나노 섬유가 얽힌 망형으로 형성되는 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 10(b) 및 도 10(f)를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기의 제조 방법으로 형성한 멤브레인(20)에서, 마이크로웰(21)에 형성된 제1 공극은 연결부(22)에 형성된 제2 공극 보다 개수가 더 많은 것을 확인할 수 있다. 이때, 제1 공극률은 제2 공극률에 비해 약 10배 이상 증가한 것을 확인할 수 있다.

[125]

[126] 본 발명의 상세한 설명에서는 구체적인 실시 예에 관하여 설명하였으나 본 발명의 범위에서 벗어나지 않는 한도 내에서 여러 가지 변형이 가능함은 물론이다. 그러므로 본 발명의 범위는 설명된 실시 예에 국한되지 않으며, 후술되는 청구범위 및 이 청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

산업상 이용가능성

[127] 본 발명은 다공성 마이크로웰 및 이를 구비한 멤브레인과 그 제조 방법에 관한

것으로, 3차원 세포 스페로이드(spheroid) 형성이 가능한 환경을 제공하여, 일정 영역 안에 안착한 세포가 보다 원활하게 3차원적으로 증식 및 분화 가능한 다공성 마이크로웰 및 이를 구비한 멤브레인과 그 제조 방법을 제공하므로 산업상 이용가능성이 있다.

청구범위

[청구항 1] 세포가 배양되기 위한 세포 배양면인 다공성 마이크로웰로서,
하나 이상이 하부 방향으로 오목하게 형성되되 세포 배양 용기의 관통부가 이루는 영역 내에 위치하도록 형성되며,
그 주변에 형성되는 연결부와 함께 다수의 공극을 포함하되, 자신의 제1 공극들이 이루는 제1 공극률과 상기 연결부에 형성된 제2 공극들이 이루는 제2 공극률이 서로 다른 것을 특징으로 하는 다공성 마이크로웰.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 연결부 보다 두께가 더 얇은 것을 특징으로 하는 다공성 마이크로웰.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 관통부가 이루는 영역 내에 다수 개가 위치하는 것을 특징으로 하는 다공성 마이크로웰.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
자신을 수용하는 수용 공간에 채워지는 유체가 상측에서 하측으로 통과하는 경우, 자신의 주변에서 유동 집중 현상을 발생시키는 것을 특징으로 하는 다공성 마이크로웰.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 제1 공극률은 상기 제2 공극률 보다 큰 것을 특징으로 하는 다공성 마이크로웰.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 제1 공극 및 상기 제2 공극은 다수의 고분자 섬유가 서로 얽혀진 사이 영역에 형성된 것을 특징으로 하는 다공성 마이크로웰.

[청구항 7] 세포 배양 용기의 관통부에 채용되는 멤브레인으로서,
하부 방향으로 오목하게 형성되되 상기 관통부가 이루는 영역 내에 위치하도록 형성되며, 세포가 배양되기 위한 세포 배양면인 하나 이상의 마이크로웰; 및
마이크로웰 사이를 연결하는 연결부;를 포함하며,
상기 마이크로웰 및 상기 연결부는,
다수의 공극을 포함하되, 상기 마이크로웰에 형성된 제1 공극들이 이루는 제1 공극률과 상기 연결부에 형성된 제2 공극들이 이루는 제2 공극률이 서로 다른 것을 특징으로 하는 멤브레인.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 마이크로웰을 수용하는 수용 공간에 채워지는 유체가 상기 마이크로웰 및 상기 연결부의 상측에서 하측으로 통과하는 경우, 상기 마이크로웰 주변에서 유동 집중 현상이 발생되는 것을 특징으로 하는 멤브레인.

[청구항 9] 제7항에 있어서,

상기 제1 공극률은 상기 제2 공극률 보다 큰 것을 특징으로 하는 멤브레인.

[청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 세포 배양 용기는 상기 관통부가 형성된 몸체를 포함하는 것을 특징으로 하는 멤브레인.

[청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 세포 배양 용기는 몸체와, 상기 몸체의 하부에 체결되며 상기 관통부가 형성된 체결부를 포함하는 것을 특징으로 하는 멤브레인.

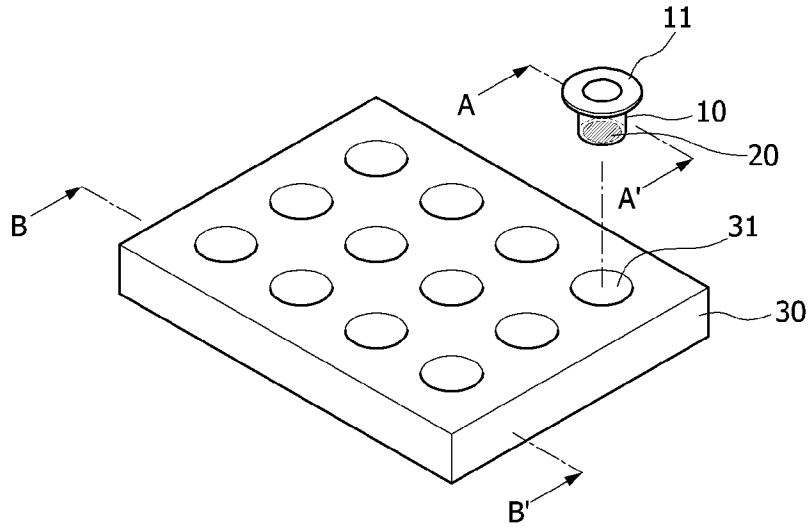
[청구항 12] (a) 다수의 고분자 섬유로 이루어져 상기 다수의 고분자 섬유의 사이 영역에 형성된 다수의 공극을 포함하는 멤브레인을 준비하는 단계; 및
(b) 세포가 배양되기 위한 배양면인 마이크로웰의 패턴이 형성된 몰드를 이용하여 상기 멤브레인에 엠보싱 공정을 수행함으로써, 하부 방향으로 오목하게 형성된 하나 이상의 상기 마이크로웰과 상기 마이크로웰 사이를 연결하는 연결부를 각각 상기 멤브레인에 형성하는 단계;를 포함하며,
상기 (b) 단계는 세포 배양 용기의 관통부가 이루는 영역 내에 상기 마이크로웰이 위치 가능하도록 상기 마이크로웰을 형성하는 단계를 포함하며,
상기 마이크로웰에 형성된 제1 공극들이 이루는 제1 공극률과 상기 연결부에 형성된 제2 공극들이 이루는 제2 공극률은 서로 다른 것을 특징으로 하는 다공성 마이크로웰의 제조 방법.

[청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 몰드는,
상기 마이크로웰의 패턴에 따라 하부가 돌출된 제1 몰드; 및
상기 마이크로웰의 패턴에 따라 상부가 오목한 제2 몰드;를 포함하는 것을 특징으로 하는 다공성 마이크로웰의 제조 방법.

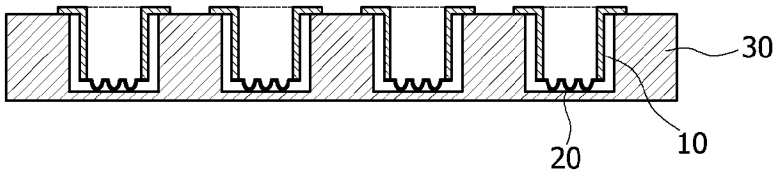
[청구항 14] 제12항에 있어서,
상기 (b) 단계는 가열된 상기 몰드를 이용하는 핫 엠보싱 공정을 수행하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 다공성 마이크로웰의 제조 방법.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 (b) 단계는,
상기 제1 몰드 또는 상기 제2 몰드를 가열하거나, 상기 제1 몰드 및 상기 제2 몰드를 모두 가열하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 다공성 마이크로웰의 제조 방법.

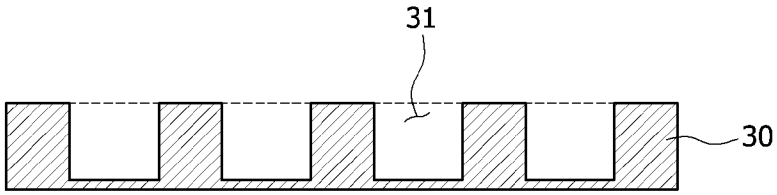
[도1]



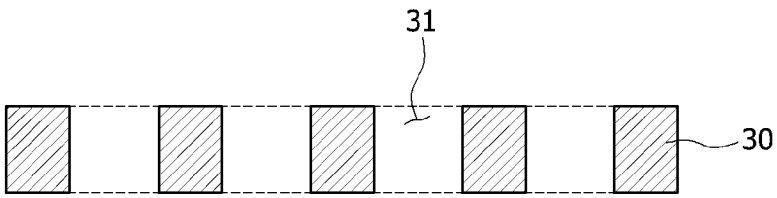
[도2]



[도3]

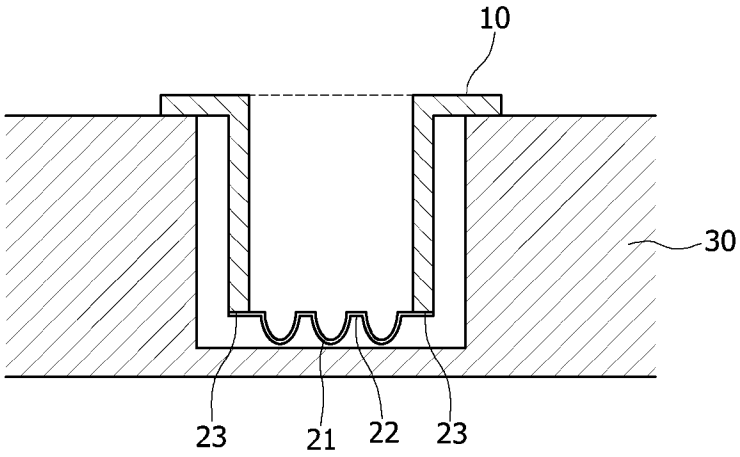


(a)

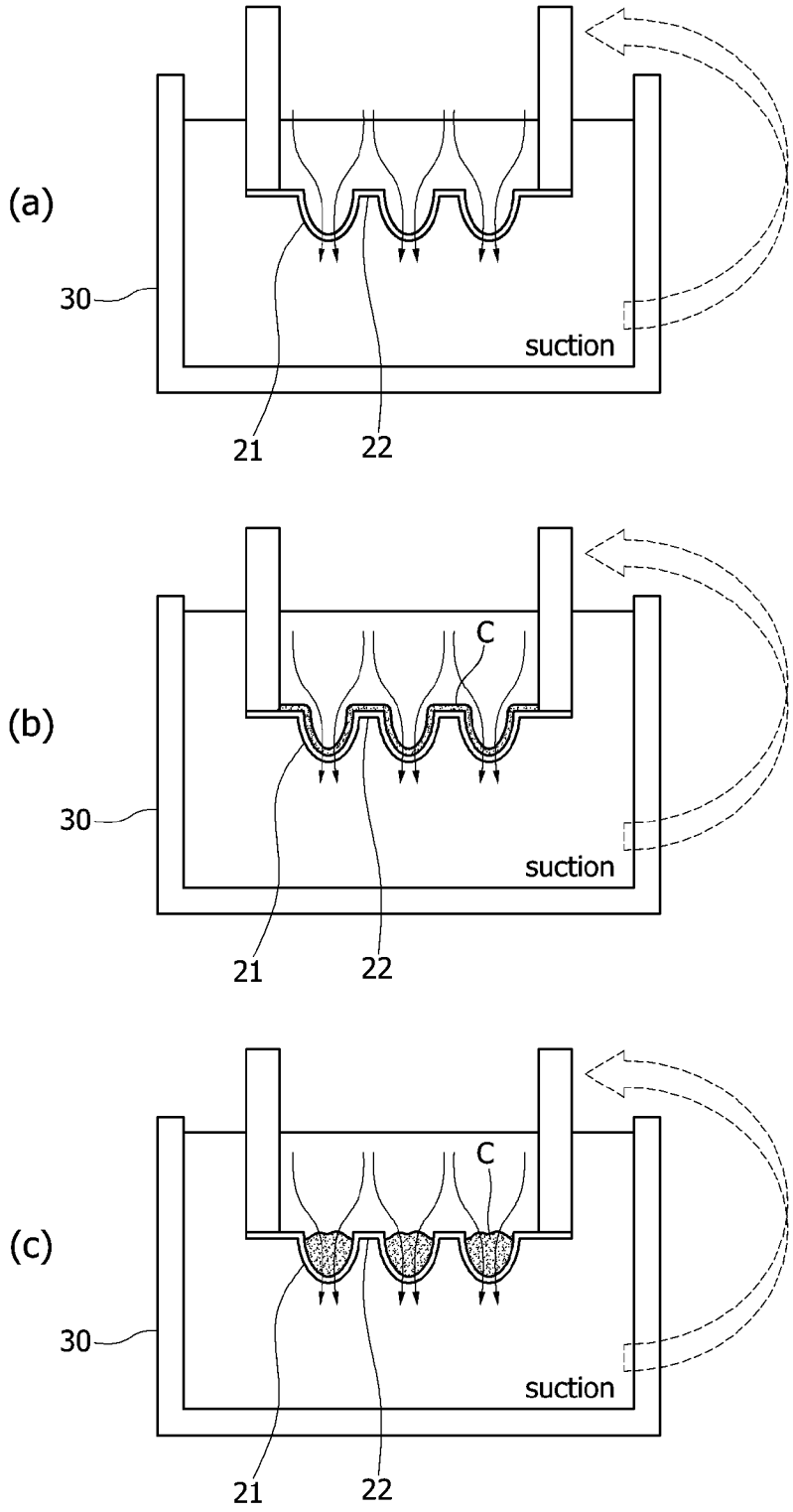


(b)

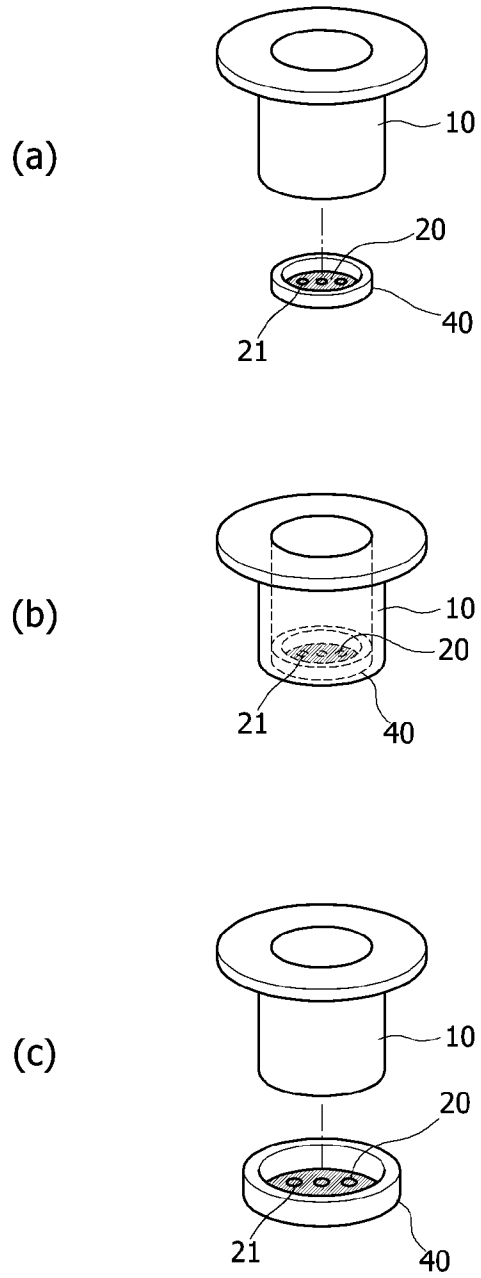
[도4]



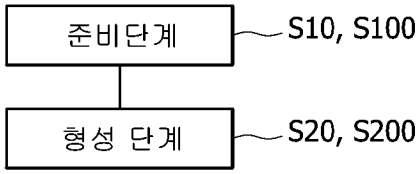
[도5]



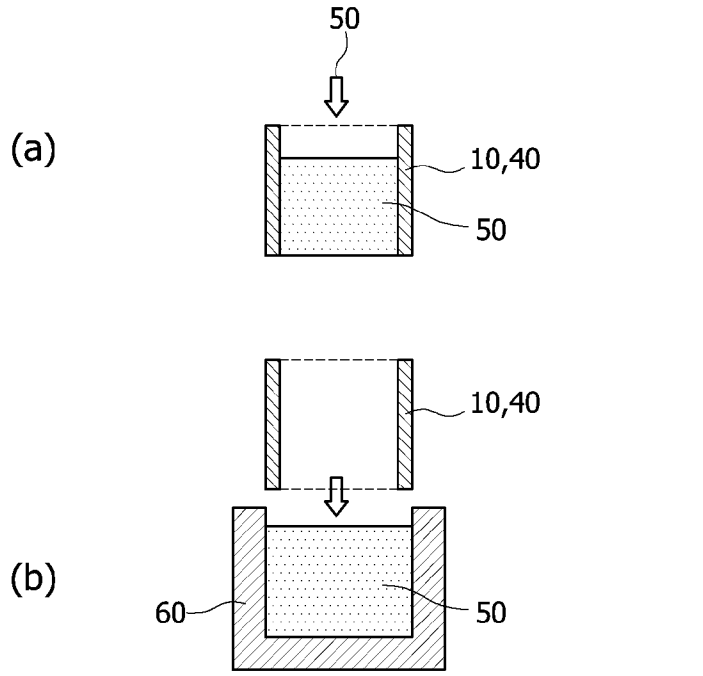
[도6]



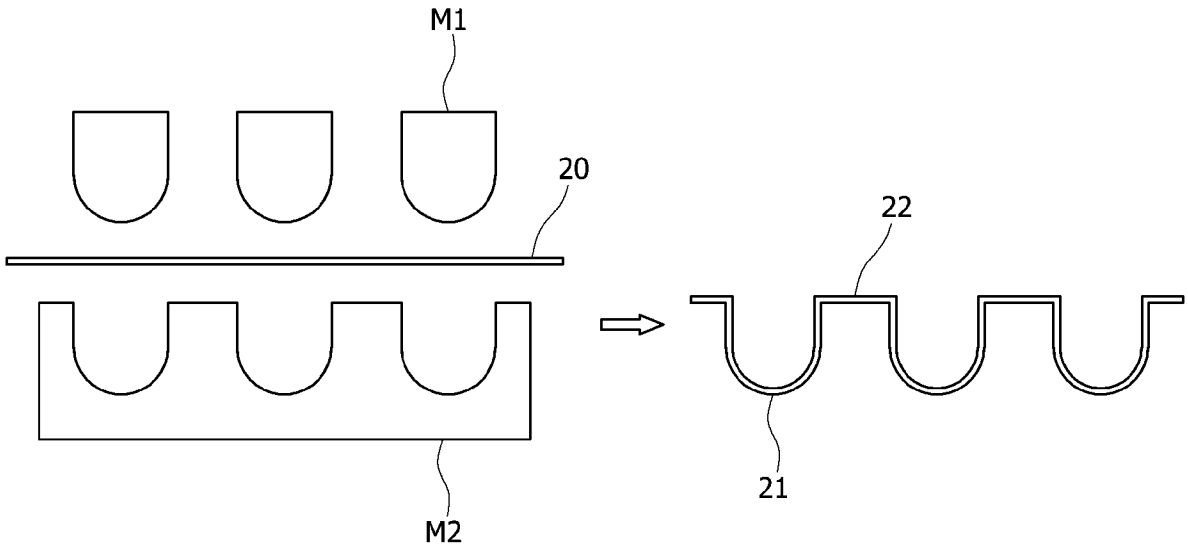
[도7]



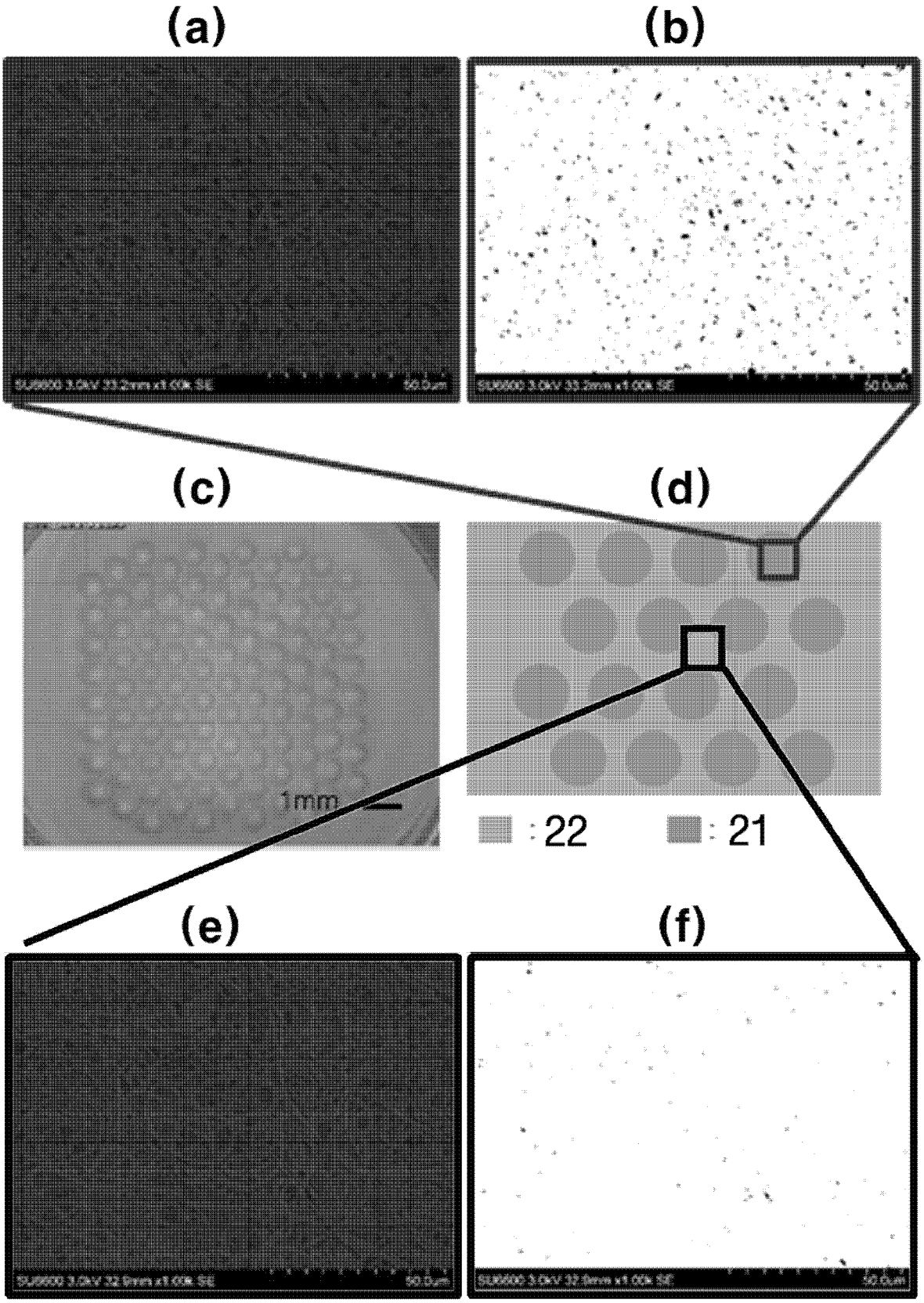
[도8]



[도9]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/000182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/32(2006.01)i, C12M 1/12(2006.01)i, B29C 51/08(2006.01)i, B29C 51/42(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 1/32; C12M 1/00; C12M 1/12; C12M 3/00; D01D 5/00; G01N 35/02; G01N 37/00; B29C 51/08; B29C 51/42

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: microwell, membrane, porous, cell, culture

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2017-0017548 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 15 February 2017 See paragraphs [0027]-[0039]; claims 1-2, 11-12; and figures 1-8.	1-15
Y	KR 10-2018-0091763 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 16 August 2018 See paragraphs [0026], [0031], [0082]; claims 1, 5; and figures 1-9.	1-15
Y	JP 2011-203181 A (SEIKO EPSON CORP.) 13 October 2011 See paragraphs [0019], [0026].	12-15
Y	JP 2017-532971 A (CORNING INCORPORATED) 09 November 2017 See paragraphs [0055]-[0057].	12-15
Y	KR 10-2017-0052524 A (NISSHA PRINTING CO., LTD.) 12 May 2017 See claims 1-7.	1-15

☐ 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	Date of mailing of the international search report
25 SEPTEMBER 2019 (25.09.2019)	**25 SEPTEMBER 2019 (25.09.2019)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, 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/KR2019/000182

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0017548 A	15/02/2017	KR 10-1862555 B1	30/05/2018
KR 10-2018-0091763 A	16/08/2018	None	
JP 2011-203181 A	13/10/2011	None	
JP 2017-532971 A	09/11/2017	EP 3212761 A1	06/09/2017
		US 2017-0226455 A1	10/08/2017
		WO 2016-069930 A1	06/05/2016
KR 10-2017-0052524 A	12/05/2017	EP 3124591 A1	01/02/2017
		EP 3124591 B1	24/10/2018
		JP 2016-054655 A	21/04/2016
		JP 5731704 B1	17/04/2015
		US 2017-0051241 A1	23/02/2017
		WO 2016-035407 A1	10/03/2016

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/000182

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12M 1/32(2006.01)i, C12M 1/12(2006.01)i, B29C 51/08(2006.01)i, B29C 51/42(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12M 1/32; C12M 1/00; C12M 1/12; C12M 3/00; D01D 5/00; G01N 35/02; G01N 37/00; B29C 51/08; B29C 51/42

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: 마이크로웰 (microwell), 멤브레인 (membrane), 공극 (porous), 세포 (cell), 배양 (culture)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2017-0017548 A (포항공과대학교 산학협력단) 2017.02.15 단락 [0027]-[0039]; 청구항 1-2, 11-12; 및 도면 1-8 참조.	1-15
Y	KR 10-2018-0091763 A (포항공과대학교 산학협력단) 2018.08.16 단락 [0026], [0031], [0082]; 청구항 1, 5; 및 도면 1-9 참조.	1-15
Y	JP 2011-203181 A (SEIKO EPSON CORP.) 2011.10.13 단락 [0019], [0026] 참조.	12-15
Y	JP 2017-532971 A (CORNING INCORPORATED) 2017.11.09 단락 [0055]-[0057] 참조.	12-15
Y	KR 10-2017-0052524 A (니폰샤신인사츠가부시키가이샤) 2017.05.12 청구항 1-7 참조.	1-15

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2019년 09월 25일 (25.09.2019)	2019년 09월 25일 (25.09.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/000182

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0017548 A	2017/02/15	KR 10-1862555 B1	2018/05/30
KR 10-2018-0091763 A	2018/08/16	없음	
JP 2011-203181 A	2011/10/13	없음	
JP 2017-532971 A	2017/11/09	EP 3212761 A1	2017/09/06
		US 2017-0226455 A1	2017/08/10
		WO 2016-069930 A1	2016/05/06
KR 10-2017-0052524 A	2017/05/12	EP 3124591 A1	2017/02/01
		EP 3124591 B1	2018/10/24
		JP 2016-054655 A	2016/04/21
		JP 5731704 B1	2015/04/17
		US 2017-0051241 A1	2017/02/23
		WO 2016-035407 A1	2016/03/10