



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0131299
(43) 공개일자 2019년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/32 (2006.01) C12M 1/33 (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/12 (2013.01)
C12M 45/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0056000
(22) 출원일자 2018년05월16일
심사청구일자 2018년05월16일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김대성
서울특별시 성동구 금호동 2가 신금호파크자이
104-606
모준원
경기도 성남시 수정구 창곡동 515, 호반베르디움
아파트 5304-403호
(74) 대리인
특허법인다나

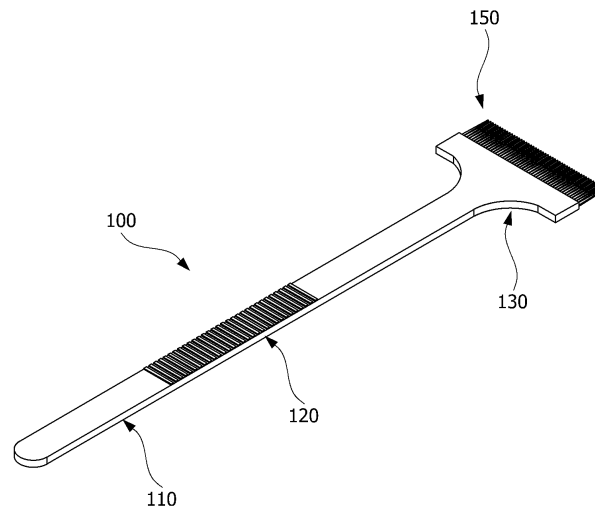
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양용 도구 및 이를 이용한 계대 배양 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 전분화능 줄기세포 배양용 도구 및 이를 이용한 계대 배양 방법에 관한 것으로, 본 발명의 일 측면에 따르면, 세포의 배양공간을 제공하는 하나 이상의 웰을 갖는 배양기 및 상기 웰 내의 세포를 복수 개의 절편으로 분절시키기 위한 복수 개의 빗살을 갖는 분절부를 포함하며, 웰은 배양공간의 바닥면이 다각 형상을 갖는 세포 배양용 도구가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0606 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9F8032402

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-바이오의료기술개발사업-줄기세포연구산업화촉진지원

연구과제명 생리활성물질 및 세포외기질 고정화를 통한 전분화능 줄기세포의 고효율 유지 배양 및 분
화용 배양기 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.04.01 ~ 2020.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

세포의 배양공간을 제공하는 하나 이상의 웰을 갖는 배양기; 및
상기 웰 내의 세포를 복수 개의 절편으로 분절시키기 위한 복수 개의 빗살을 갖는 분절부를 포함하며,
웰은 배양공간의 바닥면이 다각 형상을 갖는 세포 배양용 도구.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 분절부는,
손잡이부; 및
손잡이부에 고정되며, 일 방향을 따라 배열된 복수 개의 빗살을 갖는 빗살부를 포함하는 세포 배양용 도구.

청구항 3

제 2 항에 있어서,
빗살은 손잡이부 측의 고정단으로부터 자유단으로 갈수록 폭이 좁아지는 세포 배양용 도구.

청구항 4

제 2 항에 있어서,
분절부는, 배양공간의 바닥면에 접촉 후, 종방향 또는 횡방향으로 이동 시, 절단 가능 영역이 다각 형상을 갖는 세포 배양용 도구.

청구항 5

제 1 항에 있어서,
웰은 배양공간의 바닥면이 사각형상을 갖는 세포 배양용 도구.

청구항 6

제 1 항에 있어서,
분절부는 폭이 웰의 폭 이하인 세포 배양용 도구.

청구항 7

제 1 항에 있어서,
분절부는 폭이 웰의 폭 보다 0.1mm 내지 1mm 작은 세포 배양용 도구.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 세포 배양용 도구를 이용한 계대배양 방법으로서,
분절부를 웰의 배양공간의 바닥면에 접촉시킨 후 종방향 및 횡방향 중 적어도 한 방향으로 이동시켜 웰 내의 세포를 절편화하는 단계를 포함하는 계대배양 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,
효소 혹은 기계적 방법을 이용하여 세포 절편을 배양공간의 바닥으로부터 탈착시키는 단계를 추가로 포함하는

계대배양 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

세포는 콜로니 형태로 성장하는 세포인 계대배양 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서,

세포는 인간 전분화능 줄기세포를 포함하는 계대배양 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 배양용 도구 및 이를 이용한 계대 배양 방법에 관한 것으로, 특히, 효소 처리를 통해 단일세포 형태가 아닌 복수의 세포로 구성된 세포 조각들로의 분절화를 통해 계대 배양되어야 하는 세포, 예를 들어, 개, 소, 돼지, 원숭이, 및 인간에서 유래한 전분화능 줄기세포를 손쉽게 빠르며, 효율적으로 계대 배양할 수 있는 배양용 도구 및 이를 이용한 계대 배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전분화능 줄기세포의 안정적 유지를 위한 계대 배양은 줄기세포를 활용한 재생의학, 질환연구, 고등동물의 발생학 연구에 필수적인 기술이다. 하지만 전분화능 줄기세포는 다른 동물세포와는 달리 단일세포로 존재 시 세포 사멸하는 특성을 가지고 있어 별도의 세포사멸 방지를 위한 전처리 과정이 없는 경우(Watanabe 등, 2007, Nature Biotech. 25:681) 동물 세포의 계대 배양에 일반적으로 사용되는 효소(trypsin)처리 후 단일세포를 형성하는 방법의 적용이 불가능하다.

[0003] 따라서 단일 세포가 아닌 세포 덩어리 절편의 형태로 조각내어 계대 분주함으로써 콜로니 형태로 자라도록 한다. 다른 동물세포와 마찬가지로 콜로니가 일정 크기 이상으로 커지게 되면 계대 배양을 해 주어야 하는데 크게 다음과 같은 두 가지 방법이 일반적으로 사용된다. 첫 번째 방법으로, 특정 효소(collagenase IV 혹은 dispase) 처리 후 배양기 바닥에서 분리된 세포 덩어리를 부드러운 피펫팅으로 조각낸 후 세포배양액 혹은 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) 등으로 세척 후 새로운 배양기에 옮길 수 있다. 두 번째 방법으로, 해부 현미경 하에서 다양한 도구(마이크로 피펫 팁 혹은 유리 피펫을 길게 뽑아 만든 J 또는 L자 형의 후크) 등을 사용해 육안으로 관찰하면서 손으로 직접 기계적으로 조각내어 새로운 배양기에 옮길 수 있다.

[0004] 첫 번째 방법은 피펫팅 과정을 통해 무작위적인 크기로 세포 덩어리를 절편내기 때문에 새로이 옮겨진 배양기에 안착한 콜로니의 크기가 매우 불균일하며 피펫팅 과정 중에 세포가 손상을 입어 콜로니 형성 효율이 낮다. 또한, 두 번째 방법은 세포 절편의 크기는 조절이 어느 정도 가능하나 조각자의 경험에 크게 의존하며 또한 시간과 노력 집약적인 작업이므로 대량 배양으로 확대시키거나 공정화하기에 부적절하다. 콜로니 크기가 불균일할 경우 동일 배양기 내 세포 특성을 일정하게 유지시키기 힘들며, 때로 자연 분화되거나 혹은 분화 유도 시 그 결과가 일정하지 않게 된다.

[0005] 따라서 인간 전분화능 줄기세포 유지 계대 배양 시 일정한 크기로, 빠르고 간편하게 세포 덩어리 절편을 잘라내는 도구는 본 업계에서 필요로 하는 제품임이 자명하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 인간 전분화능 줄기세포를 손쉽게 빠르며 효율적으로 "일정한 크기로 절편화하여" 계대 배양할 수 있는, 세포 배양용 도구 및 이를 이용한 계대 배양 방법을 제공하는 것을 해결하고자 하는 과제로 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일 측면에 따르면, 세포의 배양공간을 제공하는 하나 이상의 웰을 갖는 배양기 및 상기 웰 내의 세포를 복수 개의 절편으로 분절시키기 위한 복수 개의 빗살을 갖는 분절부를 포함하며, 웰은 배양공간의 바닥면이 다각 형상을 갖는 세포 배양용 도구가 제공된다.
- [0008] 분절부는, 손잡이부 및 손잡이부에 고정된 빗살부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 빗살부에서, 복수 개의 빗살은 일 방향을 따라 배열될 수 있다.
- [0009] 또한, 빗살은 손잡이부 측의 고정단으로부터 자유단으로 갈수록 폭이 좁아질 수 있다.
- [0010] 또한, 분절부는, 배양공간의 바닥면 기준으로, 종방향 또는 횡방향으로 절단 시, 절단 가능 영역이 다각 형상을 가질 수 있다.
- [0011] 또한, 웰은 배양공간의 바닥면이 다각형인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게, 정사각형 상에 가까울 수록 분절부를 이용한 일정한 크기의 세포 절편화의 효율성과 편의성이 극대화된다.
- [0013] 또한, 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 세포 배양용 도구를 이용한 계대배양 방법으로서, 분절부를 웰의 배양공간의 바닥면에 접촉시킨 후, 종방향 및 횡방향 중 적어도 한 방향으로 이동시켜 웰 내의 세포를 절편화하는 단계를 포함하는 계대배양 방법이 제공된다.
- [0014] 또한, 계대배양 방법은, 효소를 이용하여 세포 절편을 배양공간의 바닥으로부터 탈착시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0015] 또한, 세포는 콜로니 형태로 성장하는 세포일 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 세포는, 효소 처리를 통해 단일세포 형태로가 아닌 복수의 세포로 구성된 세포 조각들로의 분절화를 통해 계대 배양되어야 하는 세포로서, 예를 들어, 개, 소, 돼지, 원숭이, 및 인간에서 유래한 전분화능 줄기세포일 수 있다.
- [0017] 특히, 상기 세포는, 인간 전분화능 줄기세포일 수 있다.

발명의 효과

- [0018] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 일 실시예와 관련된 세포 배양용 도구 및 이를 이용한 계대 배양 방법은 다음과 같은 효과를 갖는다.
- [0019] 본 발명은 효소 처리를 통해 단일세포 형태로가 아닌 복수의 세포로 구성된 세포 조각들로의 분절화를 통해 계대 배양되어야 하는 세포, 예를 들어, 개, 소, 돼지, 원숭이, 및 인간에서 유래한 전분화능 줄기세포에 적용이 가능하다. 특히, 인간 전분화능 줄기세포를 손쉽게 빠르게 효율적으로 계대 배양할 수 있고, 특히, 본 발명의 배양용 도구를 사용하는 경우, 인간 전분화능 줄기세포 콜로니(또는 콜로니들이 배양기 바닥을 대부분 차지하여 단일세포층 형태로 자라는 전분화능 줄기세포)를 신속하게 일정한 크기의 절편으로 절단할 수 있다.
- [0020] 또한, 배양기 바닥에 붙어서 자라면서 “절편화”를 통해 계대 배양해야 하는 세포를 분절부를 사용하여 종방향 및/또는 횡방향으로 절단하여 “쉽고 빠르게” 그리고 “일정한 크기”로 절편화 할 수 있다.
- [0021] 또한, 콜로니 형태로 배양기 바닥에 붙어 자라는 모든 형태의 세포를 일정한 크기의 절편으로 분절시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명의 일 실시예와 관련된 세포 배양용 도구를 구성하는 분절부의 사시도이다.
- 도 2는 도 1에 도시된 분절부의 평면도이다.
- 도 3은 도 1에 도시된 분절부의 빗살부 확대도이다.
- 도 4는 도 1에 도시된 손잡이부의 확대도이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예와 관련된 세포 배양용 도구를 구성하는 배양기의 사시도이다.
- 도 6은 도 5에 도시된 배양기의 평면도이다.

도 7은 세포 배양용 도구를 이용한 실험예를 나타내는 사진이다.

도 8은 다각형상의 웰과 원형의 웰에서 분절부 사용의 효과를 비교 설명하기 위한 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양용 도구(이하, '배양용 도구'라고도 약칭함) 및 이를 이용한 계대 배양 방법(이하, "계대배양 방법"이라고도 약칭함)을 첨부된 도면을 참고하여 상세히 설명한다.
- [0024] 또한, 도면 부호에 관계없이 동일하거나 대응되는 구성요소는 동일 또는 유사한 참조번호를 부여하고 이에 대한 중복 설명은 생략하기로 하며, 설명의 편의를 위하여 도시된 각 구성 부재의 크기 및 형상은 과장되거나 축소될 수 있다.
- [0025] 본 발명은 콜로니 형태로 배양기 바닥에 붙어 자라는 모든 형태의 세포를 일정한 크기의 절편으로 분절시키는데 사용될 수 있으나, 이하 설명의 편의를 위하여, 상기 세포는 인간 전분화능 줄기세포인 경우를 예로 들어 설명한다.
- [0026] 구체적으로, 본 발명은 인간 전분화능 줄기세포의 계대 배양을 쉽고 계대 비율을 일정하게 해주는 도구에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 도구는 인간 전분화능 줄기세포 계대 배양 시 세포 덩어리 절편의 크기를 일정하게 잘라 콜로니 크기를 일정하게 해 주어 매 계대 간 변동성을 줄여주고, 그 과정을 신속하고 간단하게 해 주는 도구에 관한 것이다.
- [0027] 도 1은 본 발명의 일 실시예와 관련된 세포 배양용 도구를 구성하는 분절부(100)의 사시도이고, 도 2는 도 1에 도시된 분절부의 평면도이며, 도 3은 도 1에 도시된 분절부의 빗살부(150)의 확대도이고, 도 4는 도 1에 도시된 손잡이부(110)의 확대도이다.
- [0028] 또한, 도 5는 본 발명의 일 실시예와 관련된 세포 배양용 도구를 구성하는 배양기(200)의 사시도이며, 도 6은 도 5에 도시된 배양기(200)의 본체(210)의 평면도이다.
- [0029] 상기 배양용 도구는, 세포의 배양공간을 제공하는 하나 이상의 웰(220)을 갖는 배양기(200) 및 상기 웰(220) 내의 세포를 복수 개의 절편으로 분절시키기 위한 복수 개의 빗살(151)을 갖는 분절부(100)를 포함한다.
- [0030] 도 6을 참조하면, 웰(220)은 배양공간의 바닥면이 다각 형상을 갖는다.
- [0031] 예를 들어, 웰(220)은 배양공간을 형성하는 복수 개의 측벽 및 각각의 측벽과 연결된 바닥을 가지며, 복수 개의 측벽은 배양공간의 바닥면 형상이 다각 형상을 갖도록 배열된다.
- [0032] 분절부(100)는, 손잡이부(110) 및 손잡이부(110)에 고정되며, 일 방향을 따라 배열된 복수 개의 빗살(151)을 갖는 빗살부(150)를 포함할 수 있다. 상기 분절부(100)는 예를 들어, 수지 재질 또는 열소독이 가능한 금속 재질로 형성될 수 있다.
- [0033] 또한, 도 2를 참조하면, 예를 들어, 빗살부(150)의 폭(w2)은 약 25mm일 수 있고, 손잡이부(110)의 폭(w1)은 약 5mm일 수 있다.
- [0034] 또한, 도 3을 참조하면, 빗살(151)은 손잡이부(110) 측의 고정단으로부터 자유단으로 갈수록 폭이 작아질 수 있다. 이에 따라, 인접하는 2개의 빗살(151)의 고정 단 측의 간격(d1, 예를 들어, 0.35mm)은 자유 단 측의 간격(d2, 예를 들어, 0.5mm)보다 작을 수 있다. 또한, 빗살(151)의 길이(l1)는, 예를 들어, 약 5mm일 수 있다.
- [0035] 또한, 빗살(151)의 끝은 세포 자체에 손상을 주지 않을 정도로 뾰족한 구조를 갖는 것이 바람직하고, 인접하는 빗살 간의 간격은 구현하고자 하는 세포 절편의 크기에 따라 10 μ m 내지 1000 μ m로 다양하게 제작이 가능하다. 또한, 빗살의 길이는 배양기(200)의 웰(220)의 깊이에 따라 3mm 내지 10mm로 다양하게 제작이 가능하다. 또한, 빗살부(150)의 폭(w2)은 웰(220)의 크기에 따라 5mm 내지 50mm로 다양하게 제작이 가능하다.
- [0036] 또한, 분절부는 폭이 웰의 폭 이하일 수 있고, 예를 들어, 분절부는 폭이 웰의 폭 보다 0.1mm 내지 1mm 작을 수 있다. 배양기 웰의 폭과 분절부의 폭이 약 1mm이내의 유격을 허용한 범위에서 동일한 경우 기능 효과가 극대화될 수 있다.
- [0037] 도 4를 참조하면, 손잡이부(110)는 미끄럼 방지부(120)를 가질 수 있다. 미끄럼 방지부(120)는 소정 간격(p1, 예를 들어, 0.7mm)으로 형성된 복수 개의 돌기(121)를 가질 수 있다. 상기 돌기(121)는 예를 들어, 손잡이부(110)의 길이방향에 따른 길이(l3)가 약 0.3mm일 수 있다.

- [0038] 또한, 손잡이부(110)는 빗살부(150)가 마련되는 중단에 확장부(130)를 가질 수 있다. 확장부는 손잡이부(110)의 폭(w1) 보다 큰 폭을 가지며, 예를 들어, 빗살부(150)의 폭(w2)과 동일한 폭을 가질 수 있다. 한편, 빗살부(150)의 폭은 복수 개의 빗살(151)가 배열된 방향에 따른 길이를 의미할 수 있다.
- [0039] 상기 배양기(200)는 하나 이상의 웰(220)이 형성된 본체(210) 및 본체(210)에 장착되는 뚜껑(220)을 포함할 수 있다. 상기 웰(220)은 배양공간의 바닥면이 다각 형상을 갖는다. 바람직하게, 웰(220)은 배양공간의 바닥면이 사각 형상을 가질 수 있다. 보다 바람직하게, 도 6을 참조하면, 웰(220)은 배양공간의 바닥면이 정사각 형상을 가질 수 있으며, 한 변의 길이(14)는 예를 들어, 25mm일 수 있고, 5mm 내지 50mm로 다양하게 제작이 가능하다. 또한, 상기 한 변의 길이(14)는 빗살부(150)의 폭(w2)보다 약 1mm 정도 크게 형성될 수도 있다.
- [0040] 상기 배양기(200)에 상기 웰(220)은 2개 이상 마련될 수 있다.
- [0042] 이러한 구조에서, 분절부(200)는, 배양공간의 바닥면 기준으로, 종방향 또는 횡방향으로 절단 시(도 6을 기준으로 웰(220)의 세로방향 또는 가로방향), 절단 가능 영역(빗살(151)에 의해 세포의 절편화가 이루어지는 영역)이 다각 형상을 가질 수 있다. 따라서, 웰(220)은 배양공간의 바닥면이, 분절부(100)의 절단 가능 영역에 부합하도록, 사각형상을 갖는 것이 바람직하다.
- [0044] 또한, 본 발명의 일 실시예와 관련된 계대배양 방법은, 전술한 세포 배양용 도구를 이용한 계대배양 방법으로서, 분절부(100)를 웰(220)의 배양공간의 바닥면에 접촉시킨 후 종방향 및 횡방향 중 적어도 한 방향으로 이동시켜 웰(220) 내의 세포를 절편화하는 단계를 포함한다.
- [0045] 이때, 빗살(151)을 배양공간의 바닥에 접촉시킨 상태로 분절부(100)를 이동시킬 수 있다. 빗살(151)을 배양공간의 바닥에 접촉시킨 상태로 분절부(100)를 이용하여 세포를 긁음으로써 일정한 크기로 절편화할 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 계대배양 방법은, 효소(예를 들어, collagenase IV 또는 dispase)를 이용하여 세포 절편을 배양공간의 바닥으로부터 탈착시키는 단계를 포함할 수 있으며, 절편화된 세포를 배양공간의 바닥에서 분리하여 새로운 배양기에 계대하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0047] 또한, 세포는 전술한 바와 같이, 인간 전분화능 줄기세포일 수 있다.
- [0048] 도 7은 세포 배양용 도구를 이용한 실험예를 나타내는 사진이다.
- [0049] 도 7의 (a)를 참조하면, 콜로니 형태로 단일세포층으로 자라는 세포(예, 인간 배아줄기세포)의 표면을 분절부(100)를 사용하여 좌우 방향으로 한번(도 7의 (b)참조) 긁고, 그리고 위아래 방향으로 한번(도 7의 (c)참조) 긁으면, 빗살들 간의 간격(d2)과 동일한 크기(이 실시예의 경우 500 μ m)로 절편화된 것을 확인할 수 있다. 도 7의 (d)는 DPBS로 1회 세척한 이후의 세포의 모습을 나타낸다. 이후, collagenase IV 또는 dispase와 같은 효소(또는, cell scraper와 같은 도구)를 사용하여 일정하게 절편화된 세포를 웰(220)의 바닥에서 분리하여 새로운 배양기에 계대할 수 있다.
- [0051] 도 8은 본 발명에서와 같은, 다각형상의 웰과 종래 원형의 웰을 비교 설명하기 위한 개략도이다.
- [0052] 기존의 원형의 웰을 갖는 세포배양기에 본 분절부(100)를 이용하여 세포 절편화를 수행하는 경우, 도 8에 도시된 바와 같이, 절편화가 가능한 유효 영역(E)뿐만 아니라 절편화가 되지 못하는 무효 영역(D)이 존재하여 그 효율성이 떨어지게 된다.
- [0053] 따라서 분절부(100)와 다각형상의 웰을 갖는 배양기(200)가 함께 사용될 경우, 효율이 극대화 될 것임은 자명하다. 또한, 다각 형상의 웰을 갖는 세포 배양기는 기존의 모든 콜로니 형태로 바닥에 부착하여 배양되는 모든 종류의 세포에 동일하게 적용될 수 있으므로, 그 범용성도 충분히 예상 가능하다.
- [0055] 위에서 설명된 본 발명의 바람직한 실시예는 예시의 목적을 위해 개시된 것이고, 본 발명에 대한 통상의 지식을 가지는 당업자라면 본 발명의 사상과 범위 안에서 다양한 수정, 변경, 부가가 가능할 것이며, 이러한 수정, 변경 및 부가는 하기의 특허청구범위에 속하는 것으로 보아야 할 것이다.

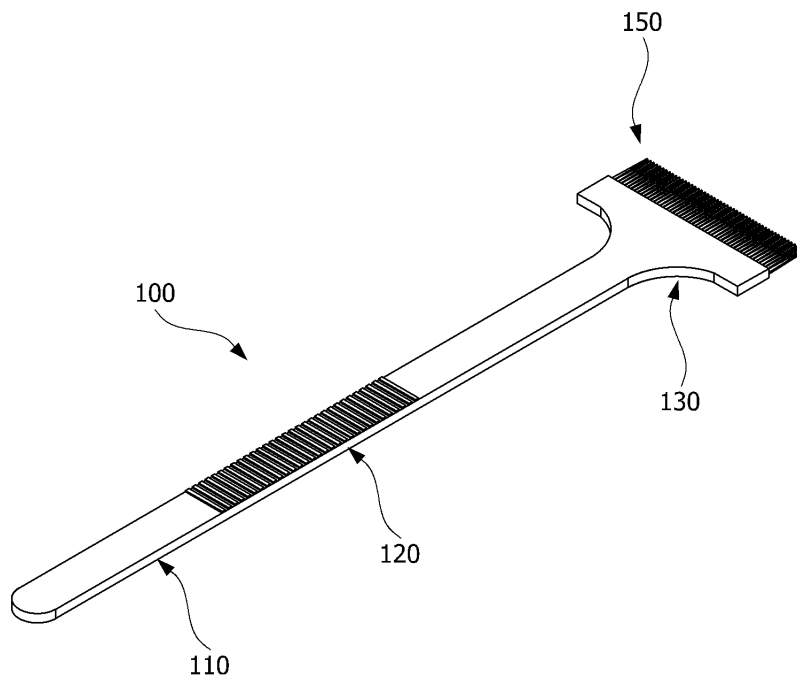
부호의 설명

[0056]

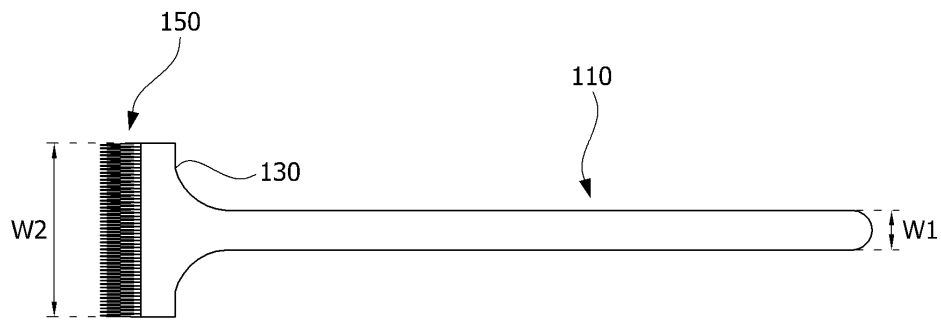
- 100: 분절부
- 110: 손잡이부
- 120: 미끄럼 방지부
- 150: 빗살부
- 151: 빗살
- 200: 배양기
- 210: 본체
- 220: 웰
- 250: 뚜껑

도면

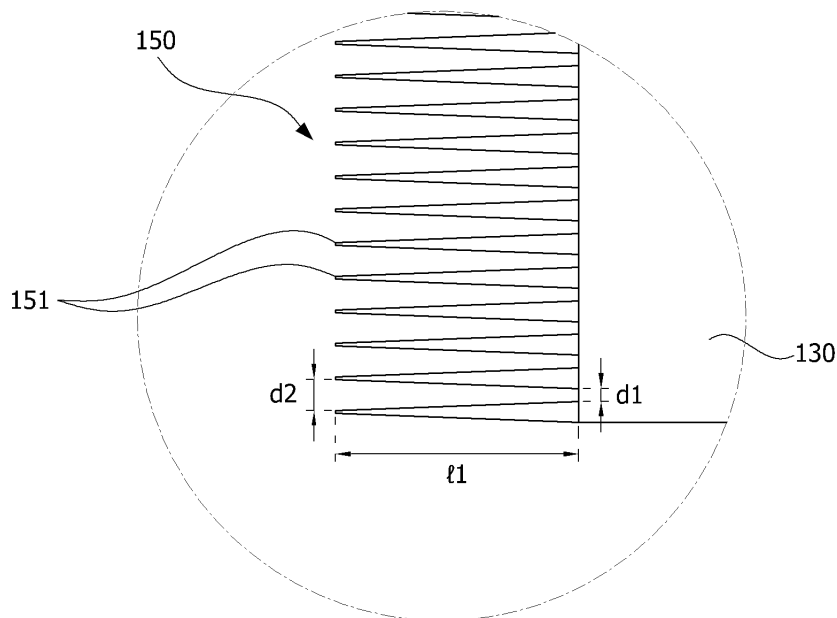
도면1



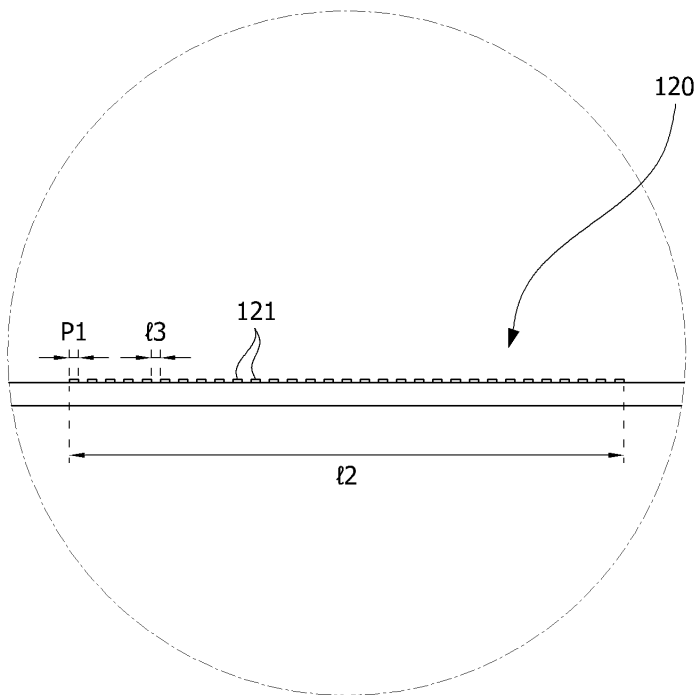
도면2



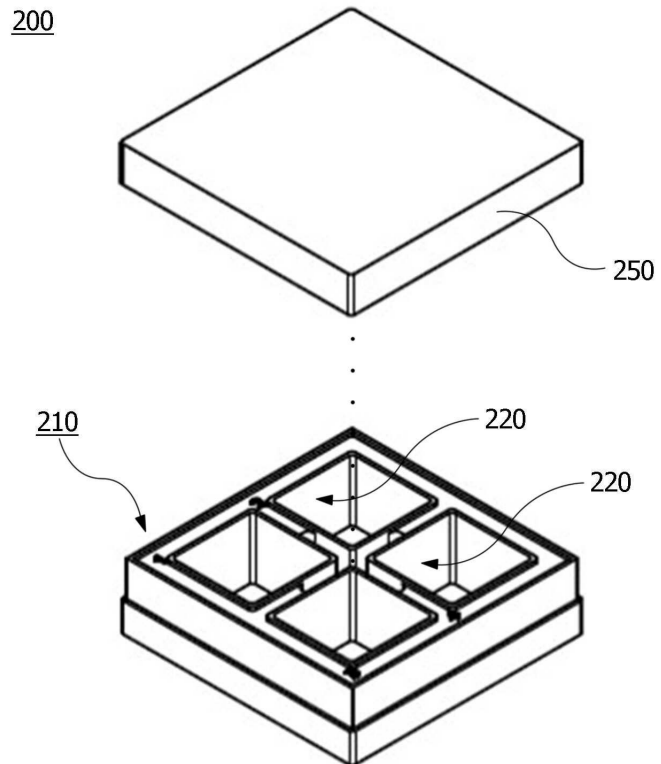
도면3



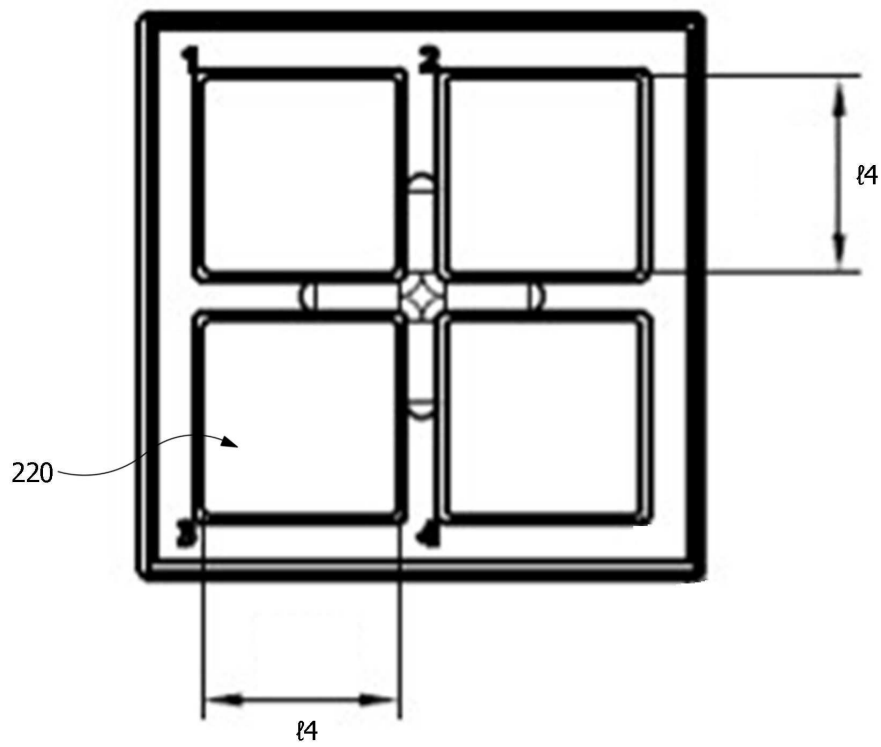
도면4



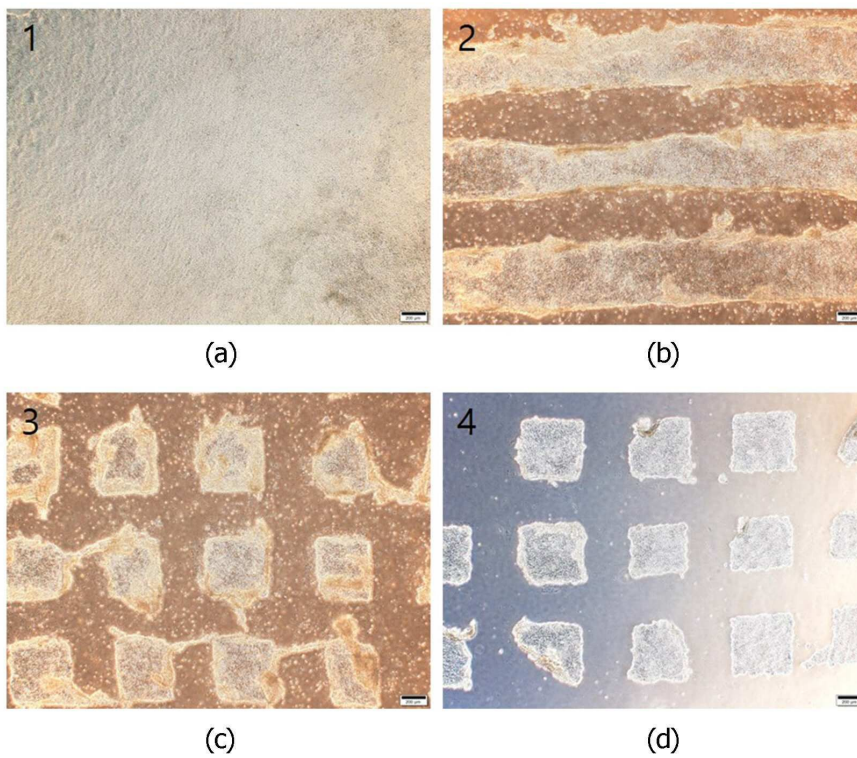
도면5



도면6



도면7



도면8

