

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024 년 10 월 10 일 (10.10.2024) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/210420 A1

(51) 국제특허분류:

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12N 5/074 (2010.01)

서울특별시 성북구 안암로 145, R&D센터 417호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 정은열 등 (JUNG, Eun Youl et al.); 06149 서울특별시 강남구 테헤란로55길 21, 402호 (정엔김 특허법률사무소), Seoul (KR).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/004140

(22) 국제출원일:

2024 년 4 월 1 일 (01.04.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0044654 2023 년 4 월 5 일 (05.04.2023) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김동휘 (KIM, Dong Hwee); 서울특별시 성북구 안암로 145, R&D센터 416A, Seoul (KR). 이건희 (LEE, Geon hui); 서울특별시 성북구 안암로 145, R&D센터 417호, Seoul (KR). 한성범 (HAN, Seong Beom);

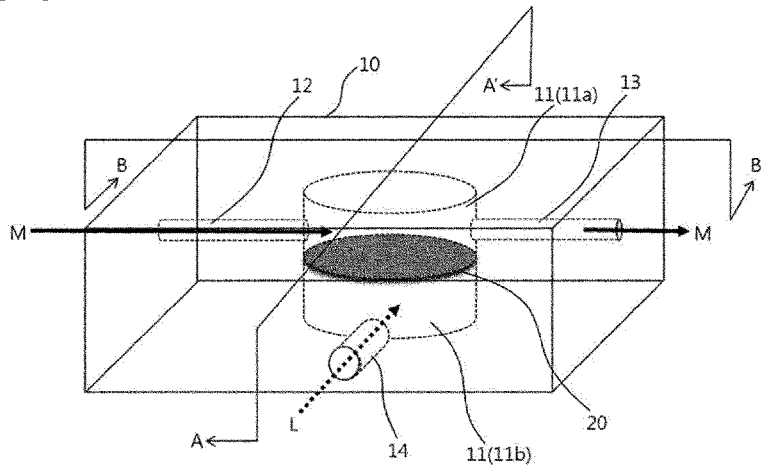
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

(54) Title: STEM CELL DIFFERENTIATION CONTROL DEVICE AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 줄기세포 분화 제어 장치 및 그 제조방법

[도1]



(57) Abstract: The present invention relates to a stem cell differentiation control device and a manufacturing method therefor. The stem cell differentiation control device according to an embodiment of the present invention applies tensile force with a uniform intensity and cycle to a polymer PLCL thin film structure having excellent biocompatibility and strong physical properties so as to culture stem cells, and thus can cause stem cells to differentiate and control the differentiation rate thereof. Particularly, differentiation of mesenchymal stem cells into smooth muscle cells (SMCs) can be controlled.

(57) 요약서: 본 발명은 줄기세포 분화 제어 장치 및 그 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치는 생체적합성이 우수하고 강한 물성을 가진 고분자 PLCL 박막 구조체에 균일한 세기 및 주기로 인장력을 인가하여 줄기세포를 배양함으로써 줄기세포를 분화시키고, 그 분화 속도를 제어할 수 있다. 특히, 중간엽 줄기세포의 평활근 세포 (Smooth muscle cell, SMC)로의 분화를 제어할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2024/210420 A1

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, ME, 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))

명세서

발명의 명칭: 줄기세포 분화 제어 장치 및 그 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 줄기세포 분화 제어 장치 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 다공성 고분자 박막의 인장을 활용하여 줄기세포 분화를 제어하는 장치 및 그 장치의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인체 내 장기 및 조직들은 세포와 더불어 세포외기질(extracellular matrix)과 함께 구성되어 있다. 최근 세포를 배양하기 위한 배양 플랫폼의 물리적인 특성 및 자극에 따라 세포가 이를 인지(mechanosensing)하고 그에 따라 세포의 기능이 결정(mechanoregulation)된다는 연구 결과들이 발표됨에 따라 세포의 기능을 결정할 수 있는 배양 기술에 관련 중요성이 대두되고 있다.
- [3] 줄기세포의 분화과정에서 줄기세포가 외부에서의 물리적인 환경 및 자극에 따라 세포 골격을 재구성해 세포의 형태 및 세포소기관의 역학적 상태를 변화시켜 줄기세포의 분화에 직접적인 영향을 끼친다. 이런 과정을 통해 중간엽 줄기세포는 근육, 신경, 골세포로 분화가 결정된다는 사실이 알려져 있다.
- [4] 한편, 혈관 지지는 세포와 조직의 생존과 기능 유지에 있어 중요한 역할을 하고, 조직 손상으로부터 회복하기 위해서 혈관 내 중간엽 줄기세포는 평활근 세포로 분화하는 것으로 알려졌다. 혈관 지지에 활용되는 고분자 소재는 혈관의 수축과 팽창을 지지하기 위해서 우수한 탄성 및 생체적합성을 가져야 하며, 또한 세포의 분화를 잘 유도할 수 있어야 한다.
- [5] 그러나 현재는 생체적합성이 우수하고 강한 물성을 가진 고분자 박막을 제조하고, 그 고분자 박막을 이용하여 중간엽 줄기세포를 평활근 세포로 분화하는 장치가 개발되지 않아 혈관 내 중간엽 줄기세포를 평활근 세포로 분화하는데 어려움이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일 측면은 줄기세포가 배양되는 박막에 인장력을 인가하여 줄기세포의 분화를 제어하는 줄기세포 분화 제어 장치를 제공하는 데 있다.
- [7] 또한, 본 발명의 다른 측면은 극성이 다른 용액 내 PLCL 박막의 결정화를 통해 구조적, 물리적으로 우수한 특성을 가지는 PLCL 박막을 제조하여 이를 줄기세포 분화 제어 장치에 적용하는 줄기세포 분화 제어 장치 제조방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치는 내부에 형성된 챔버, 상기 챔버의 내상부로 배양액을 공급하는 공급채널, 상기 챔버의 내상부에 수용된 상기 배양액을 배출하는 배출채널, 및 상기 챔버의 내하부로 팽창유체를 공급하는 유체수송채널을 포함하는 미세유체장치; 및 상기 챔버를 가로질러 상기 챔버의 내상부와 내하부를 구획하고, 상면에 줄기세포가 배치되며, 상기 팽창유체가 상기 챔버의 내하부로 유입될 때에 상방으로 볼록하게 만곡되도록 탄성을 가지는 박막;을 포함하고, 상기 박막이 상방으로 볼록하게 만곡될 때에 상기 줄기세포에 인장력이 인가되어 상기 줄기세포의 분화를 제어한다.
- [9] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치에 있어서, 상기 배양액이 상기 공급채널, 상기 챔버의 내상부, 및 상기 배출채널을 따라 순차적으로 이동할 때에, 상기 줄기세포에 전단력이 인가될 수 있다.
- [10] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치에 있어서, 상기 박막의 표면에 다수의 세공이 형성될 수 있다.
- [11] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치에 있어서, 상기 박막은, Poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone)(PLCL) 고분자 박막일 수 있다.
- [12] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치에 있어서, 상기 박막의 상면에 코팅되어, 상기 줄기세포를 부착하는 세포부착층;을 더 포함할 수 있다.
- [13] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치에 있어서, 상기 배양액을 상기 공급채널에 주입하는 배양액 주입펌프;를 더 포함할 수 있다.
- [14] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치에 있어서, 상기 팽창유체를 상기 유체수송채널에 주입하는 팽창유체 주입펌프;를 더 포함할 수 있다.
- [15] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치에 있어서, 상기 팽창유체의 주입을 제어하여 상기 줄기세포에 인가되는 상기 인장력을 조절할 수 있다.
- [16] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치에 있어서, 상기 제어부는, 상기 팽창유체의 주입량, 주입속도, 및 주입주기 중 적어도 1개 이상을 제어할 수 있다.
- [17] 한편, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 제조방법은, (a) Poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone)(PLCL) 고분자를 유기용매에 용해하여 PLCL 고분자 용액을 제조하는 단계; (b) 상기 PLCL 고분자 용액과 서로 다른 극성을 갖는 용액 내에, 상기 PLCL 고분자 용액을 주입하여 PLCL 박막을 제조하는 단계; 및 (c) 내부에 형성된 챔버, 상기 챔버의 내상부로 배양액을 공급하는 공급채널, 상기 챔버의 내상부에 수용된 상기 배양액을 배출하는 배출채널, 및 상기 챔버의 내하부로 팽창유체를 공급하는 유체수송채널을 포함하는 미세유체장치의 상기 챔버의 내상부와 내하부가 구획되도록, 상기 챔버를 가로질러 상기 PLCL 박막을 배치하는 단계;를 포함할 수 있다..
- [18] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 제어방법에 있어서, 상기 유기용매는, 클로로포름(chloroform), 디클로로메탄(dichloromethane), 사염화탄소(carbon tetrachloride), 톨루엔(toluene), 시클로헥사논(cyclohexanone), 사

이클로헥사논 (Cyclohexanone), 디클로로벤젠 (Dichlorobenzene) 및 2-니트로프로판(2-nitropropane)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1개 이상을 포함할 수 있다.

[19] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 제어방법에 있어서, 상기 (b) 단계에서 상기 용액은, 물(water), 메탄올(methanol), 아이소프로필 알코올(isopropyl alcohol), 글리세롤(glycerol), 에탄디올(ethanediol), 시클로헥산올(cyclohexanol), 아세토나이트릴(acetonitrile), 니트로메탄(nitromethane), 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide) 및 시클로헥세인(cyclohexane)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1개 이상을 포함할 수 있다.

[20] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 제어방법에 있어서, 상기 (c) 단계는, 일면에 상기 챔버의 내상부가 음각 형태로 형성되고, 내부에 상기 공급채널, 및 상기 배출채널을 구비한 상부층과, 일면에 상기 챔버의 내하부가 음각 형태로 형성되고, 유체수송채널을 구비한 하부층 사이에, 상기 PLCL 박막을 배치하고, 상기 상부층의 일면과 상기 하부층의 일면을 접합할 수 있다.

[21]

[22] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[23] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 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.

발명의 효과

[24] 본 발명에 따르면, 생체적합성이 우수하고 강한 물성을 가진 고분자 PLCL 박막 구조체에 균일한 세기 및 주기로 인장력을 인가하여 줄기세포를 배양함으로써 줄기세포를 분화시키고, 그 분화 속도를 제어할 수 있다.

[25] 특히, 중간엽 줄기세포의 평활근 세포 (Smooth muscle cell, SMC)로의 분화를 제어할 수 있다.

[26] 또한, 극성이 다른 용액 내 PLCL 박막의 결정화를 통해 구조적, 물리적으로 다른 특성을 가지는 고분자 박막을 제조함으로써 줄기세포를 분화하는 마이크로 플랫폼 개발에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[27] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 사시도이다.

[28] 도 2는 도 1의 A-A' 라인에 따른 단면도이다.

[29] 도 3은 도 1의 B-B' 라인에 따른 단면도이다.

[30] 도 4는 본 발명의 다른 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 단면도이다.

[31] 도 5는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 구성도이다.

- [32] 도 6은 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치 제조방법을 나타내는 도면이다.
- [33] 도 7의 (A)는 혈관 수축 및 혈관 확장 동안 인장 중인 중간엽 줄기세포의 개략도, (B)는 PLCL 박막 구조체에서 중간엽 줄기세포의 정적 배양 개략도, (C)는 PLCL 박막 구조체에서 중간엽 줄기세포의 동적 배양 개략도이다.
- [34] 도 8의 (A)는 전단 응력 및 인장력을 생성하기 위해 생물 반응기에 연결된 미세 유체장치의 개략도, (B)는 미세유체장치의 인장 및 측정 압력을 제어하는 장치의 회로도, (C)는 서로 다른 주입량의 인장 하에서 미세유체장치의 하부층의 압력 변화, (D)는 서로 다른 주입주기의 인장 하에서 미세유체 장치의 하부층의 압력 변화, (E)는 주입된 배양액 부피에 따른 PLCL 박막 구조체의 변형률 변화를 각각 나타내는 도면이다.
- [35] 도 9는 메탄올 내에서 결정화된 PLCL 박막 표면의 전자 현미경 이미지로서, (A)는 메탄올, (B)는 메탄올:클로로포름(3:1), (C)는 메탄올:증류수(3:1) 용액에서 각각 결정화된 PLCL 박막 표면의 전자 현미경 이미지이다.
- [36] 도 10은 아이소프로판올 내에서 결정화된 PLCL 박막 표면의 전자 현미경 이미지로서, (A)는 아이소프로판올, (B)는 아이소프로판올:클로로포름(3:1), (C)는 아이소프로판올:증류수(3:1) 용액에서 각각 결정화된 PLCL 박막 표면의 전자 현미경 이미지이다.
- [37] 도 11은 메탄올, 아이소프로판올 용액 내에서 결정화된 PLCL 박막 표면의 기공 크기를 나타내는 그래프로서, (A)는 메탄올, (B)는 메탄올:클로로포름(3:1), (C)는 메탄올:증류수(3:1), (D)는 아이소프로판올, (E)는 아이소프로판올:클로로포름(3:1), (F)는 아이소프로판올:증류수(3:1) 용액에서 각각 결정화된 PLCL 박막 표면의 기공 크기이다.
- [38] 도 12는 메탄올, 아이소프로판올 용액 내에서 결정화된 PLCL 박막 구조체의 물리적 성질로서, (A)는 인장 변형률, (B)는 인장 강도를 각각 나타낸다.
- [39] 도 13은 물리적 자극의 종류와 유무에 따른 중간엽 줄기세포의 정렬도 평가 결과로서, (A)는 외력이 없는 상태에서의 세포 정렬 변화, (B)는 전단 응력이 인가된 경우에서 세포 정렬 변화, (C)는 인장력이 인가된 경우에서 세포 정렬 변화, (D)는 물리적 세기 유무와 종류에 따른 세포의 정렬 분포 변화를 각각 나타낸다.
- [40] 도 14는 물리적 자극의 종류와 유무에 따른 중간엽 줄기세포의 평활근 세포(SMC)로의 분화를 나타내는 것으로서, (A)는 α SMA 발현 정도, (B)는 분화한 SMC 세포의 수 변화를 각각 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [41] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를

가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 또한, "제1", "제2" 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 상기 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.

[42] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.

[43]

[44] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 사시도, 도 2는 도 1의 A-A' 라인에 따른 단면도, 및 도 3은 도 1의 B-B' 라인에 따른 단면도이다.

[45] 도 1 내지 도 3에 도시된 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치는 내부에 형성된 챔버(11), 챔버(11)의 내상부(11a)로 배양액(M)을 공급하는 공급채널(12), 챔버(11)의 내상부(11a)에 수용된 배양액(M)을 배출하는 배출채널(13), 및 챔버(11)의 내하부(11b)로 팽창유체(L)를 공급하는 유체수송채널(14)을 포함하는 미세유체장치(10), 및 챔버(11)를 가로질러 챔버(11)의 내상부(11a)와 내하부(11b)를 구획하고, 상면에 줄기세포(S)가 배치되며, 팽창유체(L)가 챔버(11)의 내하부(11b)로 유입될 때에 상방으로 볼록하게 만곡되도록 탄성을 가지는 박막(20)을 포함하고, 박막(20)이 상방으로 볼록하게 만곡될 때에 줄기세포(S)에 인장력이 인가되어 줄기세포(S)의 분화를 제어한다.

[46]

[47] 줄기세포는 미분화 상태의 세포로 자가복제능력을 가지며, 다양한 조직세포로 분화할 수 있다. 줄기세포의 분화는 외부의 물리적인 환경 및 자극에 따라 유도될 수 있고, 이런 과정을 통해 중간엽 줄기세포는 근육, 신경, 골세포로 분화가 결정된다. 본 발명은 이러한 줄기세포를 배양하면서 분화를 유도 및 제어하는 줄기세포 분화 조절 플랫폼 기술에 관한 것이다. 혈관 지지는 세포와 조직의 생존과 기능 유지에 있어 중요한 역할을 하고, 조직 손상으로부터 회복하기 위해서 혈관 내 중간엽 줄기세포는 평활근 세포로 분화하는 것으로 알려져 있는데, 본 발명에 따른 줄기세포 분화 제어 장치를 통해 중간엽 줄기세포의 평활근 세포로의 분화를 유도 및 제어할 수 있다. 다만, 본 발명이 반드시 혈관 내 중간엽 줄기세포를 대상으로, 평활근 세포로의 분화를 유도 및 제어하는데 사용되어야 하는 것은 아니다.

[48] 구체적으로, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치는 미세유체장치(10), 및 박막(20)을 포함한다.

[49]

[50] 미세유체장치(10)는 본체의 내부에 챔버(11), 공급채널(12), 배출채널(13), 및 유체수송채널(14)을 구비한다.

[51] 챔버(11)는 본체의 내부에 마련된 공간으로서, 내상부(11a)와 내하부(11b)로 구획된다. 공급채널(12)은 챔버(11)의 내상부(11a)와 본체의 외측을 연통시키는 제

1 통로로서, 그 제1 통로를 통해 배양액(M)이 주입될 수 있다. 따라서, 공급채널(12)을 통해 주입된 배양액(M)은 챔버(11)의 내상부(11a)로 공급된다. 배출채널(13)은 챔버(11)의 내상부(11a)와 본체의 외측을 연통시키는 제2 통로로서, 그 제2 통로를 통해 챔버(11)의 내상부(11a)에 수용된 배양액(M)이 본체의 외측으로 배출될 수 있다. 여기서, 공급채널(12)과 배출채널(13)은 동축 상에 배치될 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니므로, 챔버(11)를 중심으로 소정의 각도를 이루며 연장되거나, 서로 나란하게 배치될 수도 있다. 유체수송채널(14)은 챔버(11)의 내하부(11b)와 본체의 외측을 연통시키는 제3 통로이다. 이러한 유체수송채널(14)을 통해 본체의 외측으로부터 팽창유체(L)가 주입되어 챔버(11)의 내하부(11b)로 공급될 수 있다. 챔버(11)의 내하부(11b)에 수용된 팽창유체(L)는 유체수송채널(14)을 통해 배출되거나, 또는 챔버(11)의 내하부(11b)와 본체의 외측을 연통시키는 별도의 제4 통로(도시되지 않음)를 통해 외부로 배출될 수 있다.

[52]

[53] 박막(20)은 탄성을 가지는 멤브레인 부재로서, 챔버(11)를 가로질러 배치된다. 따라서, 박막(20)에 의해 챔버(11)의 내상부(11a)와 내하부(11b)가 구획된다. 박막(20)의 표면 중 챔버(11)의 내상부(11a)와 접하는 일면에는 줄기세포(S)가 배치될 수 있다. 여기서, 줄기세포(S)는 배양액(M)과 함께 공급채널(12)을 통해 챔버(11)의 내상부(11a)로 공급되어, 박막(20)의 일면에 부착될 수 있다. 이렇게 박막(20)의 일면에 배치된 줄기세포(S)는 챔버(11)의 내상부(11a)에 수용된 배양액(M) 내에서 배양된다. 이때, 챔버(11)의 내상부(11a)에 수용된 배양액(M)이 배출채널(13)을 통해 배출되고, 새로운 배양액(M)이 공급채널(12)을 통해 공급됨으로써, 배양액(M)이 교체될 수 있다. 챔버(11)의 내상부(11a)에 배양액(M)을 채우기 위해서는, 배양액(M) 공급 후 폐쇄부재(예를 들면, 마개 등)를 통해 공급채널(12) 및/또는 배출채널(13)을 폐쇄하거나, 또는 박막(20)보다 소정의 높이에 공급채널(12)의 배출구 및/또는 배출채널(13)의 유입구를 배치하여 그 높이차에 해당하는 공간영역에 배양액(M)을 채울 수도 있다.

[54]

한편, 도 2와 같이, 박막(20)은 탄성을 가지므로, 유체수송채널(14)을 통해 팽창유체(L)가 챔버(11)의 내하부(11b)로 공급되면, 팽창유체(L)가 박막(20)의 타면에 외력을 가하게 되고, 이로 인해 박막(20)이 스트레칭(stretching)되면서 상방으로 볼록하게 만곡될 수 있다. 이때, 줄기세포(S)에 인장력이 인가된다. 이렇게 인가되는 인장력은 줄기세포(S)에 대한 물리적 자극으로 제공하므로, 줄기세포(S)의 분화가 유도된다. 따라서, 팽창유체(L)의 주입량, 주입속도, 및 주입주기 중 어느 하나 이상의 주입조건을 제어함으로써, 줄기세포(S)의 분화가 제어될 수 있다. 한편, 챔버(11)의 내하부(11b)에서 팽창유체(L)가 빠져나가면 박막(20)은 원래 형태로 복원될 수 있다.

[55]

팽창유체(L)는 배양액(M)을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 박막(20) 상의 줄기세포(S)의 배양 및 분화에 영향을 미치지 않고, 박막(20)

에 외력을 가해 박막(20)의 형태 변화를 유도할 수 있기만 하면 특별한 제한은 없다.

[56]

[57] 한편, 도 3을 참고로, 본 발명의 실시예에 다른 줄기세포 분화 제어 장치는 전술한 인장력뿐만 아니라, 줄기세포(S)에 전단력을 인가할 수도 있다.

[58] 박막(20)의 일면에 줄기세포(S)가 배치된 상태에서, 공급채널(12)을 통해 배양액(M)을 주입하는 경우, 배양액(M)이 공급채널(12), 챔버(11)의 내상부(11a), 및 배출채널(13)을 따라 순차적으로 유동하게 되고, 이때 발생하는 배양액(M)의 유동에 의해 줄기세포(S)에 전단력이 인가된다. 이러한 전단력도 줄기세포(S)의 분화 유도 및 제어 자극으로 사용될 수 있다.

[59]

[60] 박막(20)은 그 표면, 즉 일면 및 타면 중 적어도 어느 한 면에 다수의 세공이 형성될 수 있다. 이러한 세공은 줄기세포(S)의 부착 내지 팽창유체(L)에 의한 박막(20)의 형태 변화를 용이하게 할 수 있다. 또한, 박막(20)은, Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)(PLCL) 고분자 박막(20)일 수 있다. PLCL 박막(20)은 생체적합성이 우수하고 강한 물성을 가지므로, 균일한 세기 및 주기로 인장력을 인가할 수 있다.

[61]

[62] 도 4는 본 발명의 다른 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 단면도이다. 도 4를 참고로, 본 발명의 다른 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치는 전술한 미세유체장치(10) 및 박막(20) 이외에, 세포부착층(30)을 더 포함할 수 있다.

[63] 세포부착층(30)은 박막(20)의 상면에 코팅되어, 줄기세포(S)가 이에 부착된다. 예를 들어, 피브로넥틴(fibronectin)이 박막(20)의 상면에 코팅됨으로써, 세포부착층(30)을 형성할 수 있다. 다만, 세포부착층(30)이 반드시 피브로넥틴 층(layer)에 한정되는 것은 아니고, 줄기세포(S)의 부착이 가능한 소재로 형성되기만 하면 특별한 제한은 없다.

[64]

[65] 도 5는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 구성도이다. 도 5에 도시된 바와 같이, 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치는 전술한 미세유체장치(10) 및 박막(20)을 포함하고, 세포부착층(30)을 더 포함할 수 있으며, 나아가 배양액 주입펌프(40)를 더 포함할 수 있다.

[66] 배양액 주입펌프(40)는 배양액(M)을 공급채널(12)에 주입하는 펌프이다. 일례로, 배양액 주입펌프(40)는 시린지 펌프일 수 있으나, 배양액(M)을 공급채널(12)에 주입할 수 있는 펌프이기만 하면 어떠한 펌프를 사용해도 무방하다.

[67]

[68] 또한, 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치는 팽창유체(L)를 유체수송채널(14)에 주입하는 팽창유체 주입펌프(50)를 더 포함할 수 있다.

일례로, 팽창유체 주입펌프(50)는 시린지 펌프일 수 있으나, 팽창유체(L)를 유체 수송채널(14)에 주입할 수 있는 펌프이기만 하면 특별한 제한은 없다.

[69]

[70] 나아가 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치는 제어부(60)를 더 포함할 수 있다.

[71]

제어부(60)는 팽창유체(L)의 유체수송채널(14)로의 주입을 제어한다. 제어부(60)는 전자전기 소자, 회로 등으로 구성될 수 있고, 일례로 전술한 팽창유체 주입펌프(50)의 작동을 제어할 수 있다. 이러한 제어부(60)가 팽창유체(L)의 주입을 제어함으로써, 줄기세포(S)에 인가되는 인장력을 조절할 수 있다. 즉, 제어부(60)에 의해 인장력의 크기, 인장력이 인가되는 주기 등이 제어된다. 여기서, 제어부(60)에 의해 제어되는 제어요소는 팽창유체(L)의 주입량, 주입속도, 및 주입주기 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 일례로, 제어부(60)에 의해 팽창유체(L)의 주입속도가 $0.5 \sim 2.6 \mu\text{l}/\text{min}$ 로 제어될 수 있고, 이때 PLCL 박막(20)에 3 ~ 15%의 변형률(strain)로 인장될 수 있다.

[72]

[73] 종합적으로, 본 발명에 따르면, 생체적합성이 우수하고 강한 물성을 가진 고분자 PLCL 박막(20) 구조체에 균일한 세기 및 주기로 인장력을 인가하여 줄기세포(S)를 배양함으로써 줄기세포(S)를 분화시키고, 그 분화 속도를 제어할 수 있다. 특히, 중간엽 줄기세포(S)의 평활근 세포 (Smooth muscle cell, SMC)로의 분화를 제어할 수 있다.

[74]

[75] 이하에서는 본 발명에 따른 줄기세포 분화 제어 장치의 제조방법에 대해 설명한다. 줄기세포 분화 제어 장치에 대해서는 전술하였는바, 이에 대한 자세한 설명은 생략하거나 간단하게만 기술한다.

[76]

[77] 도 6은 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치 제조방법을 나타내는 도면이다.

[78]

도 6에 도시된 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치 제조방법은 Poly(l-lactide-co-ε-caprolactone)(PLCL) 고분자를 유기용매에 용해하여 PLCL 고분자 용액을 제조하는 단계, 및 PLCL 고분자 용액을 서로 다른 극성을 갖는 용액 내에서 결정화하여 PLCL 박막을 제조하는 단계, 및 내부에 형성된 챔버, 챔버의 내상부로 배양액을 공급하는 공급채널, 챔버의 내상부에 수용된 배양액을 배출하는 배출채널, 및 챔버의 내하부로 팽창유체를 공급하는 유체수송채널을 포함하는 미세유체장치의 챔버의 내상부와 내하부가 구획되도록, 챔버를 가로질러 PLCL 박막을 배치하는 단계를 포함한다.

[79]

- [80] 구체적으로, 본 발명의 본 발명의 실시예에 따른 줄기세포 분화 제어 장치 제조 방법은 PLCL 고분자 용액 제조단계, PLCL 박막 제조단계, 및 PLCL 박막 배치단계를 포함한다.
- [81] PLCL 고분자 용액 제조단계에서는 Poly(l-lactide-co-ε-caprolactone)(PLCL) 고분자를 유기용매에 용해시켜 PLCL 고분자 용액을 제조한다. PLCL은 우수한 탄성 및 생체적합성을 가진 생분해성 고분자로, L-락타이드(L-Lactide)와 ε-카프로락톤(ε-Caprolactone)의 합성을 통해 제조될 수 있다. PLCL 고분자를 용해시키는 유기용매는 클로로포름(chloroform), 디클로로메탄(dichloromethane), 사염화탄소(carbon tetrachloride), 톨루엔(toluene), 시클로헥사논(cyclohexanone), 사이클로헥사논(Cyclohexanone), 디클로로벤젠(Dichlorobenzene) 및 2-니트로프로판(2-nitropropane)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1개 이상을 포함할 수 있다.
- [82]
- [83] PLCL 박막 제조단계에서는 PLCL 고분자와 서로 다른 극성을 갖는 용액 내에서 결정화하여 PLCL 박막을 제조한다. PLCL 고분자는 용액 내 결정화 방식을 통해 고분자 박막으로 응고된다. 여기서, PLCL 고분자 용액과 서로 다른 극성을 갖는 용액 내에, PLCL 고분자 용액이 주입되어 결정화됨으로써 PLCL 고분자 박막으로 생성되는데, 그 용액은 물(water), 메탄올(methanol), 아이소프로필 알코올(isopropyl alcohol), 글리세롤(glycerol), 에탄디올(ethanediol), 시클로헥산올(cyclohexane), 아세토나이트릴(acetonitrile), 니트로메탄(nitromethane), 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide) 및 시클로헥세인(cyclohexane)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1개 이상을 포함할 수 있다. 용액이 가지는 서로 다른 극성을 이용하여 PLCL 박막의 결정화를 유도하는 경우에, 구조적, 물리적으로 다른 특성을 가지는 고분자 박막을 제조할 수 있다.
- [84]
- [85] PLCL 박막 배치단계에서는 전술한 미세유체장치에 PLCL 박막을 적용한다. 여기서, PLCL 박막은 미세유체장치의 챔버를 가로질러 배치된다. 따라서, 미세유체장치의 챔버는 PLCL 박막에 의해 내상부와 내하부로 구획된다.
- [86] 일례로, 미세유체장치의 상부층과 하부층을 제작하고, 그 상부층과 하부층 사이에 PLCL 박막을 배치한 다음에, 상부층과 하부층을 결합할 수 있다. 여기서, 미세유체장치의 상부층의 일면에 챔버의 내상부가 음각 형태로 형성되고, 미세유체장치의 하부층의 일면에 챔버의 내하부가 음각 형태로 형성되며, 그 상부층의 일면과 그 하부층의 일면 사이에 PLCL 박막을 배치하고, 그 일면끼리 접합할 수 있다. 한편, 미세유체장치의 상부층에는 그 내부에 공급채널, 및 배출채널이 형성되고, 미세유체장치의 하부층에는 그 내부에 유체수송채널이 형성될 수 있다. 여기서, 공급채널, 배출채널, 유체수송채널은 각각 그 상부층과 하부층의 일면에 음각 형태로 형성되어 그 일면쪽에 개구부를 가지다가, 상부층과 하부층의 일면

끼리 결합함에 따라 그 개구부가 폐쇄되어 통로 형태의 공급채널, 배출채널, 유체수송채널이 마련될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[87] 이하에서는 실험예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[88]

[89] 실험예 1: PLCL 박막 구조체 제작

[90] L-락타이드와 ϵ -카프로락톤의 중합시켜 제작한 PLCL 고분자 용액을 극성이 다른 용액 내에서 응고시켜 PLCL 박막을 제작하였다. 먼저 각각 100 nmol의 L-락타이드와 ϵ -카프로락톤을 1,6-hexanediol(0.5 mmol)과 stannous octoate(1 mmol)와 함께 150°C에서 24시간 동안 중합시키고 이를 90°C에서 3차례 질소로 3번 퍼징한 다음 진공 포장 후 오일 내에서 170°C로, 24시간 동안 교반시킨다. 이렇게 얻어진 고분자를 클로로포름에 용해시킨 후 4.5 mm 사이즈의 필터를 통과시키고 과량의 메탄올에 침전시킨 후, 여과하고, 진공 하에서 건조시켜 PLCL 고분자를 제작하였다. PLCL 고분자를 클로로포름에 다시 용해하였으며, 이를 메탄올, 메탄올:클로로포름(3:1), 메탄올:증류수(3:1), 아이소프로필과놀, 아이소프로필과놀:클로로포름(3:1), 아이소프로필과놀:증류수(3:1) 각각의 극성이 다른 용매 내에 1ml 주입 후 결정화하여 PLCL 박막 구조체를 제작하였다.

[91]

[92] 실험예 2: 박막 스트레칭 시스템 제작

[93] 도 7의 (A)는 혈관 수축 및 혈관 확장 동안 인장 중인 중간엽 줄기세포의 개략도, (B)는 PLCL 박막 구조체에서 중간엽 줄기세포의 정적 배양 개략도, (C)는 PLCL 박막 구조체에서 중간엽 줄기세포의 동적 배양 개략도이다.

[94] 도 7에 도시된 바와 같이, 혈관의 수축·확산 과정에서 중간엽 줄기세포의 형태학적 변화를 모사하고 이를 관측하기 위해 실험예 1에서 제작한 PLCL 박막 구조체를 폴리디메틸실록세인(poly-dimethylsiloxane, PDMS)를 이용하여 세포 배양액을 주입할 수 있는 두 개의 미세유체 구조의 칩 사이에 부착시켜, PLCL 박막에 주기적으로 인장력을 인가할 수 있는 미세 유체 시스템을 제조하였다. 여기서, 1개의 미세유체 PDMS 칩은 그 일면에 챔버의 내상부가 음각 형태로 형성되고, 공급채널, 및 배출채널을 구비한다. 다른 1개의 미세유체 PDMS 칩은 그 일면에 챔버의 내하부가 음각 형태로 형성되고, 유체수송채널을 구비한다. 이러한 2개의 미세유체 칩 각각의 일면 사이에, 챔버의 내상부와 내하부가 폐쇄되도록 PLCL 박막 구조체를 배치한 다음에, 미세유체 칩을 결합하였다(도 6 참조).

[95] 중간엽 줄기세포는 PLCL 박막 구조체 위에 배양하였으며, 아래 PDMS 칩 내부를 통한 세포 배양액 주입량 변화를 통해 중간엽 줄기세포가 배양된 표면을 인장하였다.

[96]

- [97] 도 8의 (A)는 전단 응력 및 인장력을 생성하기 위해 생물 반응기에 연결된 미세 유체장치의 개략도, (B)는 미세유체장치의 인장 및 측정 압력을 제어하는 장치의 회로도, (C)는 서로 다른 주입량의 인장 하에서 미세유체장치의 하부층의 압력 변화, (D)는 서로 다른 주입주기의 인장 하에서 미세유체 장치의 하부층의 압력 변화, (E)는 주입된 배양액 부피에 따른 PLCL 박막 구조체의 변형률 변화를 각각 나타내는 도면이다.
- [98] 도 8을 참고로, PLCL 박막을 늘리기 위해 세포 배양액을 포함하고 있는 1ml 주사기를 박막 스트레칭 시스템 컨트롤 박스에 연결하였으며, 컨트롤 박스 내 신호에 따라 주사기는 일정한 양, 주기로 움직여 아래 PDMS 칩 내부에 주입되는 세포 배양액 양의 제어를 통해서 박막에 인장력을 인가하였다. 컨트롤 박스 내에는 제어 신호는 명령어를 실행하는 프로세서, 모터, 선형 액추에이터로 구성되어 있으며, 압력 센서를 통해서 박막에 주입되는 압력 변화를 실시간으로 확인할 수 있게 제작하였다.
- [99]
- [100] 실험예 3: PLCL 고분자 박막 표면의 물리적 성질 평가
- [101] 성이 다른 용액 내에서 형성되는 PLCL 고분자 박막 표면의 형태학적, 물리적 특성을 보기 위해, 주사형 전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM)을 이용하여 여섯 가지의 용액 조건(메탄올, 메탄올:클로로포름(3:1), 메탄올:중류수(3:1), 아이소프로판올, 아이소프로판올:클로로포름(3:1), 아이소프로판올:중류수(3:1))에서 제작된 PLCL 박막의 표면을 확인하였다.
- [102] 도 9는 메탄올 내에서 결정화된 PLCL 박막 표면의 전자 현미경 이미지로서, (A)는 메탄올, (B)는 메탄올:클로로포름(3:1), (C)는 메탄올:중류수(3:1) 용액에서 각각 결정화된 PLCL 박막 표면의 전자 현미경 이미지이고, 도 10은 아이소프로판올 내에서 결정화된 PLCL 박막 표면의 전자 현미경 이미지로서, (A)는 아이소프로판올, (B)는 아이소프로판올:클로로포름(3:1), (C)는 아이소프로판올:중류수(3:1) 용액에서 각각 결정화된 PLCL 박막 표면의 전자 현미경 이미지이다. 도 11은 메탄올, 아이소프로판올 용액 내에서 결정화된 PLCL 박막 표면의 기공 크기를 나타내는 그래프로서, (A)는 메탄올, (B)는 메탄올:클로로포름(3:1), (C)는 메탄올:중류수(3:1), (D)는 아이소프로판올, (E)는 아이소프로판올:클로로포름(3:1), (F)는 아이소프로판올:중류수(3:1) 용액에서 각각 결정화된 PLCL 박막 표면의 기공 크기이다.
- [103] 도 9 내지 도 10을 참고로, PLCL 박막 표면의 형태는 용액의 증발 속도에 따라 결정되며, 증발 속도가 빠른 클로로포름에서는 많은 기공이 형성하고 용액의 증발 속도가 느린 중류수에서는 매끄러운 표면을 가지는 것을 확인하였다. 이는 PLCL 박막 표면 내 기공의 크기 측정을 통해서 정량화하였다(도 11 참조).
- [104]
- [105] 도 12는 메탄올, 아이소프로판올 용액 내에서 결정화된 PLCL 박막 구조체의 물리적 성질로서, (A)는 인장 변형률, (B)는 인장 강도를 각각 나타낸다. 만능 재료

시험기(Universal tensile testing machine, UTM)을 이용하여 PLCL 고분자 박막의 물성을 측정하였으며, 기공의 크기가 작고 매끈한 형태의 PLCL 박막 구조체가 가장 높은 탄성을 가짐을 확인하였다.

[106]

[107] 결국, 메탄올 및 증류수 혼합용액, 아이소프로판올 및 증류수 혼합용액을 이용해 PLCL 고분자를 결정화하는 경우에 우수한 탄성을 가지고 인장력을 인가할 때에 세포의 분화를 잘 유도할 수 있는 것으로 평가된다.

[108]

[109] 실험예 4: 중간엽 줄기세포 배양 및 물리적 자극에 따른 정렬도와 분화 정도

[110] PLCL 박막 구조체를 이용하여 줄기세포의 분화 변화를 관찰하기 위해서 골수 중간엽 줄기세포(Bone-marrow mesenchymal stem cells, BMSC)를 이용하였다. 극성이 다른 용액 내에서 제작된 각각의 PLCL 박막 구조체는 피브로넥틴(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 통해서 코팅한 후 2,500개의 BMSC를 주입 (seeding) 후 총 10일 동안 배양하였으며, 배양액은 매일 새로 교체하여 실험을 진행하였다.

[111]

[112] 외부의 물리적 자극의 변화에 따른 중간엽 줄기세포의 형태학적 변화를 확인하기 위해서, PLCL 박막 구조체에 외력을 가하지 않은 경우, 전단 응력(shear stress)을 인가한 경우, 인장력(strain stress)을 인가한 경우에서 총 10일간 세포를 배양한 후 세포의 모양을 통해서 세포의 정렬 변화를 확인하였다.

[113] 도 13은 물리적 자극의 종류와 유무에 따른 중간엽 줄기세포의 정렬도 평가 결과로서, (A)는 외력이 없는 상태에서의 세포 정렬 변화, (B)는 전단 응력이 인가된 경우에서 세포 정렬 변화, (C)는 인장력이 인가된 경우에서 세포 정렬 변화, (D)는 물리적 세기 유무와 종류에 따른 세포의 정렬 분포 변화를 각각 나타낸다.

[114] 도 13을 참고로, 외력이 있는 경우에서 세포가 더 높은 정렬도를 가지는 것을 확인하였으며, 인장력을 인가한 경우에서 세포가 가장 잘 정렬되어 있음을 확인하였다.

[115]

[116] 중간엽 줄기세포의 분화 정도를 비교하기 위해서, BSMC의 SMC 분화과정에서 특이적으로 발현되는 단백질인 α -smooth muscle actin(α SMA) 단백질을 형광염색하고 단백질 발현 정도를 비교하였다.

[117] 도 14는 물리적 자극의 종류와 유무에 따른 중간엽 줄기세포의 평활근 세포(SMC)로의 분화를 나타내는 것으로서, (A)는 α SMA 발현 정도, (B)는 분화한 SMC 세포의 수 변화를 각각 나타낸다.

[118] 도 14를 참고로, 세포의 정렬이 가장 뚜렷하게 나타나는 인장력이 인가된 경우에서 α -SMA 단백질의 발현이 가장 높게 나타났다.

[119]

[120] 이상 본 발명을 구체적인 실시예를 통하여 상세히 설명하였으나, 이는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 본 발명

의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 그 변형이나 개량이 가능함이 명백하다.

- [121] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

산업상 이용가능성

- [122] 본 발명은 줄기세포 분화 제어 장치 및 그 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 줄기세포 분화 제어 장치에 따르면 생체적합성이 우수하고 강한 물성을 가진 고분자 PLCL 박막 구조체에 균일한 세기 및 주기로 인장력을 인가하여 줄기세포를 배양함으로써 줄기세포를 분화시키고, 그 분화 속도를 제어할 수 있으므로, 산업상 이용가능성이 인정된다.

청구범위

- [청구항 1] 내부에 형성된 챔버, 상기 챔버의 내상부로 배양액을 공급하는 공급채널, 상기 챔버의 내상부에 수용된 상기 배양액을 배출하는 배출채널, 및 상기 챔버의 내하부로 팽창유체를 공급하는 유체수송채널을 포함하는 미세유체장치; 및
상기 챔버를 가로질러 상기 챔버의 내상부와 내하부를 구획하고, 상면에 줄기세포가 배치되며, 상기 팽창유체가 상기 챔버의 내하부로 유입될 때에 상방으로 불록하게 만곡되도록 탄성을 가지는 박막;을 포함하고,
상기 박막이 상방으로 불록하게 만곡될 때에 상기 줄기세포에 인장력이 인가되어 상기 줄기세포의 분화를 제어하는 줄기세포 분화 제어 장치.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 배양액이 상기 공급채널, 상기 챔버의 내상부, 및 상기 배출채널을 따라 순차적으로 유동할 때에, 상기 줄기세포에 전단력이 인가되는 줄기세포 분화 제어 장치.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 박막의 표면에 다수의 세공이 형성된 줄기세포 분화 제어 장치.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 박막은, Poly(l-lactide-co-ε-caprolactone)(PLCL) 고분자 박막인 줄기세포 분화 제어 장치.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 박막의 상면에 코팅되어, 상기 줄기세포를 부착하는 세포부착층;을 더 포함하는 줄기세포 분화 제어 장치.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 배양액을 상기 공급채널에 주입하는 배양액 주입펌프;를 더 포함하는 줄기세포 분화 제어 장치.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,
상기 팽창유체를 상기 유체수송채널에 주입하는 팽창유체 주입펌프;를 더 포함하는 줄기세포 분화 제어 장치.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
상기 팽창유체의 주입을 제어하여 상기 줄기세포에 인가되는 상기 인장력을 조절하는 제어부;를 더 포함하는 줄기세포 분화 제어 장치.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서,
상기 제어부는,
상기 팽창유체의 주입량, 주입속도, 및 주입주기 중 적어도 1개 이상을 제어하는 줄기세포 분화 제어 장치.
- [청구항 10] (a) Poly(l-lactide-co-ε-caprolactone)(PLCL) 고분자를 유기용매에 용해하여 PLCL 고분자 용액을 제조하는 단계;

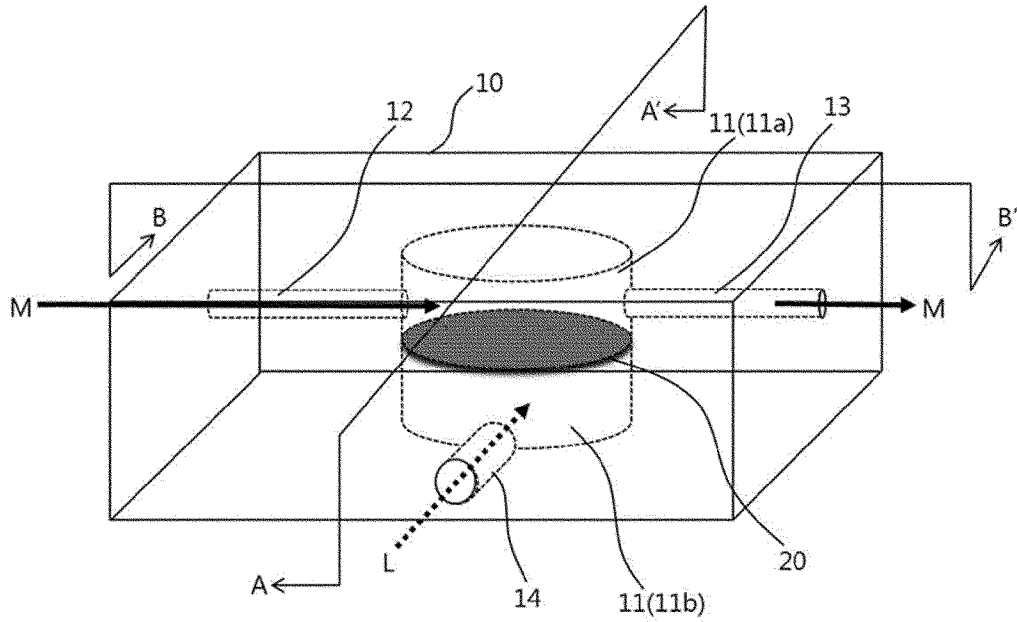
(b) 상기 PLCL 고분자 용액과 서로 다른 극성을 갖는 용액 내에, 상기 PLCL 고분자 용액을 주입하여 PLCL 박막을 제조하는 단계; 및
 (c) 내부에 형성된 챔버, 상기 챔버의 내상부로 배양액을 공급하는 공급채널, 상기 챔버의 내상부에 수용된 상기 배양액을 배출하는 배출채널, 및 상기 챔버의 내하부로 팽창유체를 공급하는 유체수송채널을 포함하는 미세유체장치의 상기 챔버의 내상부와 내하부가 구획되도록, 상기 챔버를 가로질러 상기 PLCL 박막을 배치하는 단계;를 포함하는 줄기세포 분화 제어 장치의 제조방법.

[청구항 11] 청구항 10에 있어서,
 상기 유기용매는,
 클로로포름(chloroform), 디클로로메탄(dichloromethane), 사염화탄소(carbon tetrachloride), 톨루엔(toluene), 시클로헥사논(cyclohexanone), 사이클로헥사논(Cyclohexanone), 디클로로벤젠(Dichlorobenzene) 및 2-니트로프로판(2-nitropropane)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1개 이상을 포함하는 줄기세포 분화 제어 장치의 제조방법.

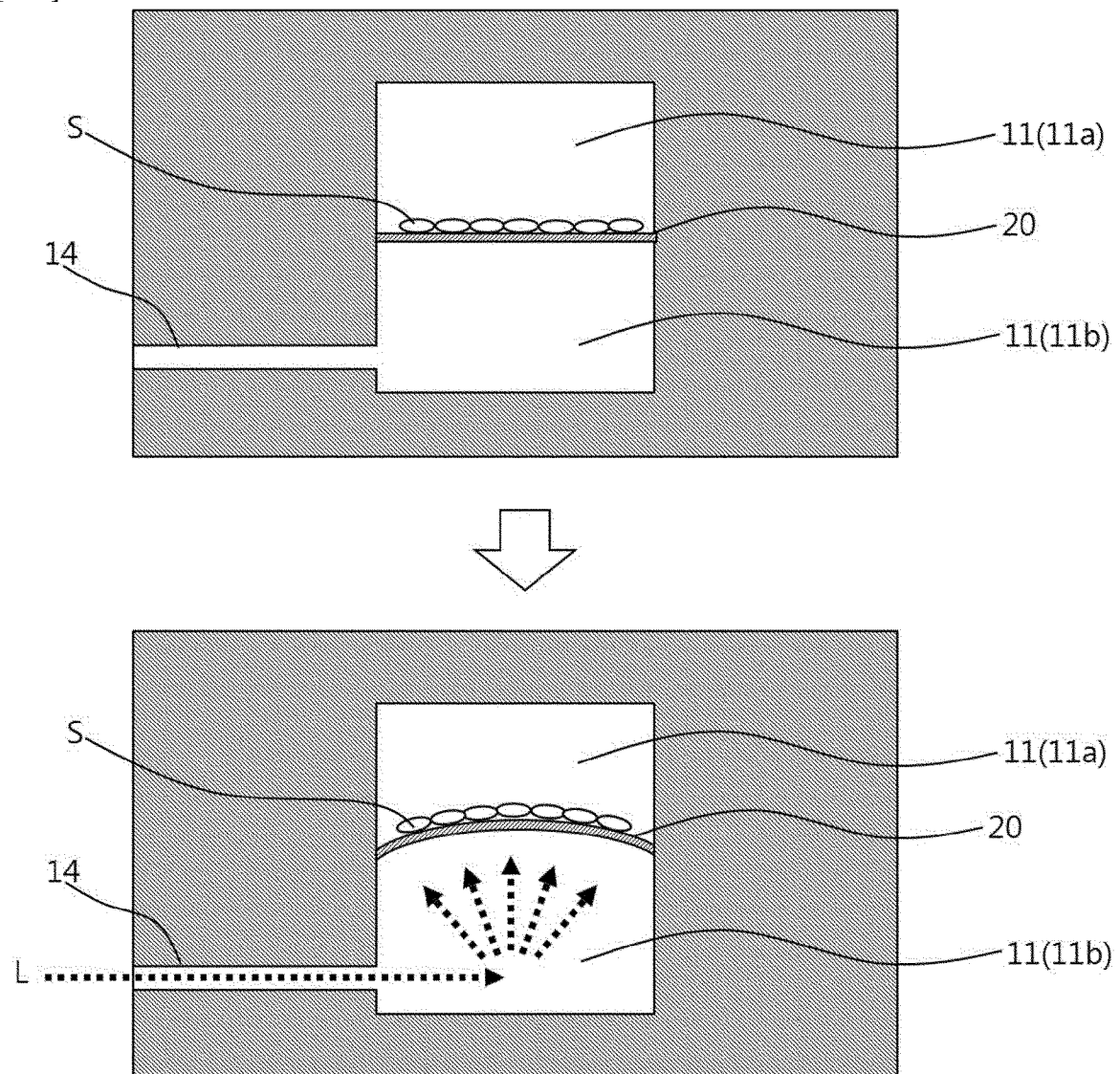
[청구항 12] 청구항 10에 있어서,
 상기 (b) 단계에서 상기 용액은,
 물(water), 메탄올(methanol), 아이소프로필 알코올(isopropyl alcohol), 글리세롤(glycerol), 에탄디올(ethanediol), 시클로헥산올(cyclohexanol), 아세토나이트릴(acetonitrile), 니트로메탄(nitromethane), 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide) 및 시클로헥세인(cyclohexane)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1개 이상을 포함하는 줄기세포 분화 제어 장치의 제조방법.

[청구항 13] 청구항 10에 있어서,
 상기 (c) 단계는,
 일면에 상기 챔버의 내상부가 음각 형태로 형성되고, 내부에 상기 공급채널, 및 상기 배출채널을 구비한 상부층과, 일면에 상기 챔버의 내하부가 음각 형태로 형성되고, 유체수송채널을 구비한 하부층 사이에, 상기 PLCL 박막을 배치하고, 상기 상부층의 일면과 상기 하부층의 일면을 접합하는 줄기세포 분화 제어 장치의 제조방법.

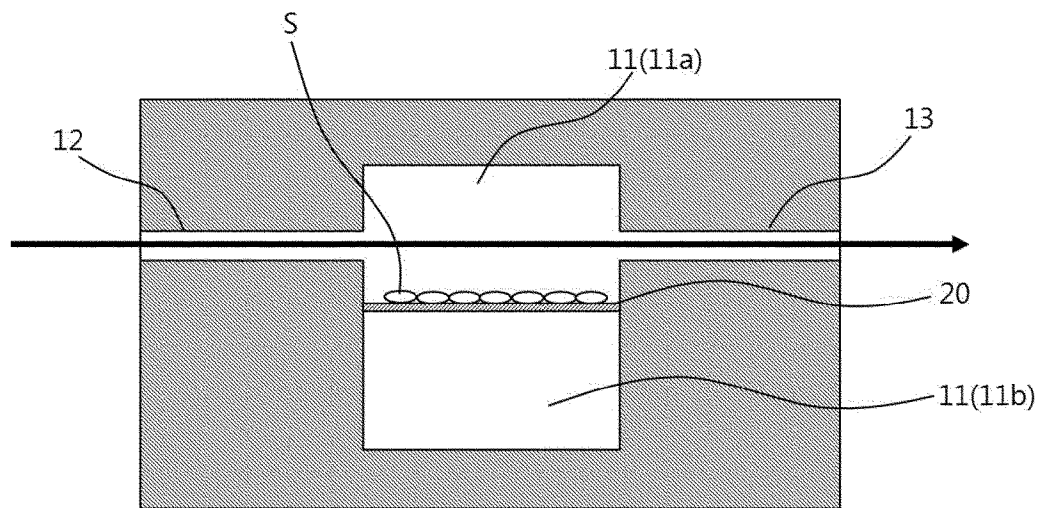
[도1]



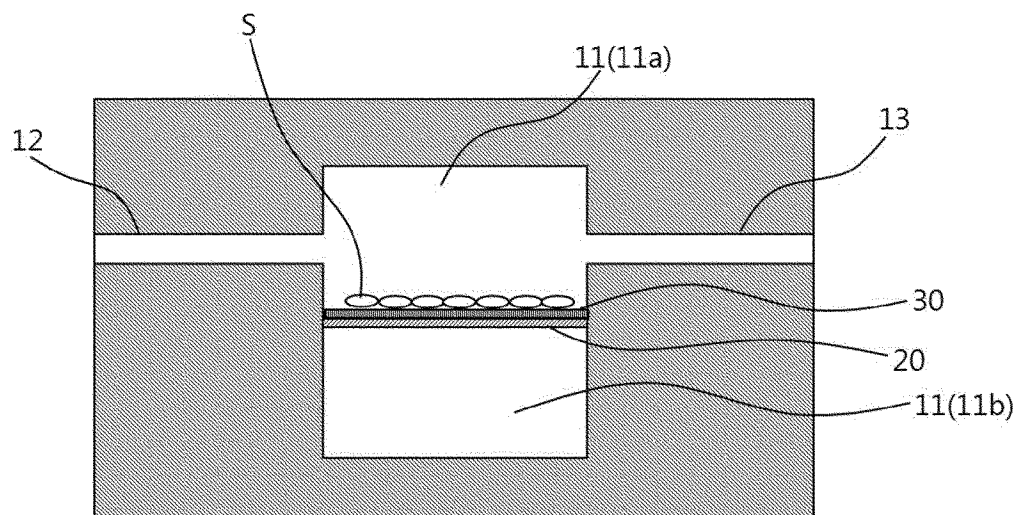
[도2]

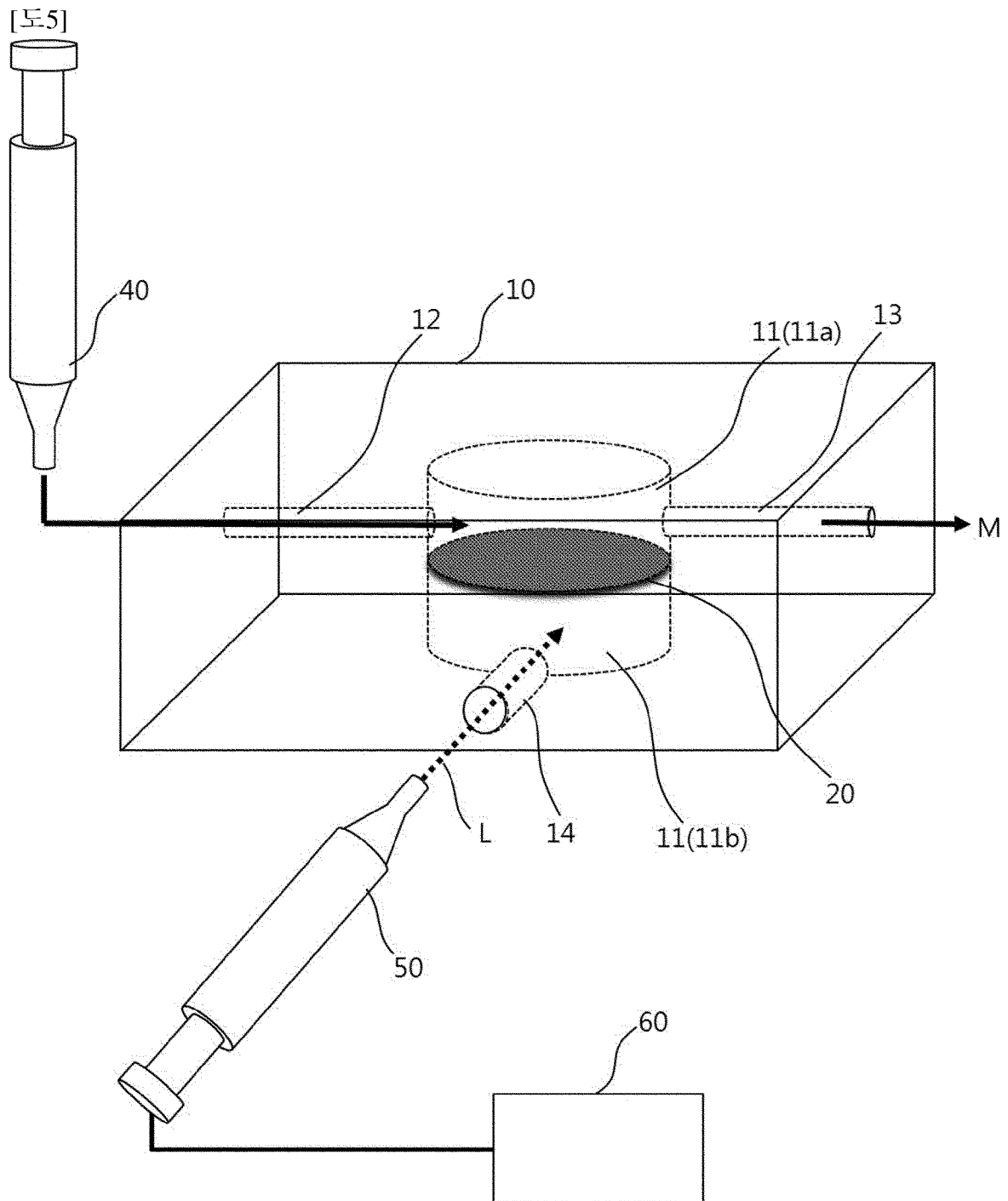


[도3]

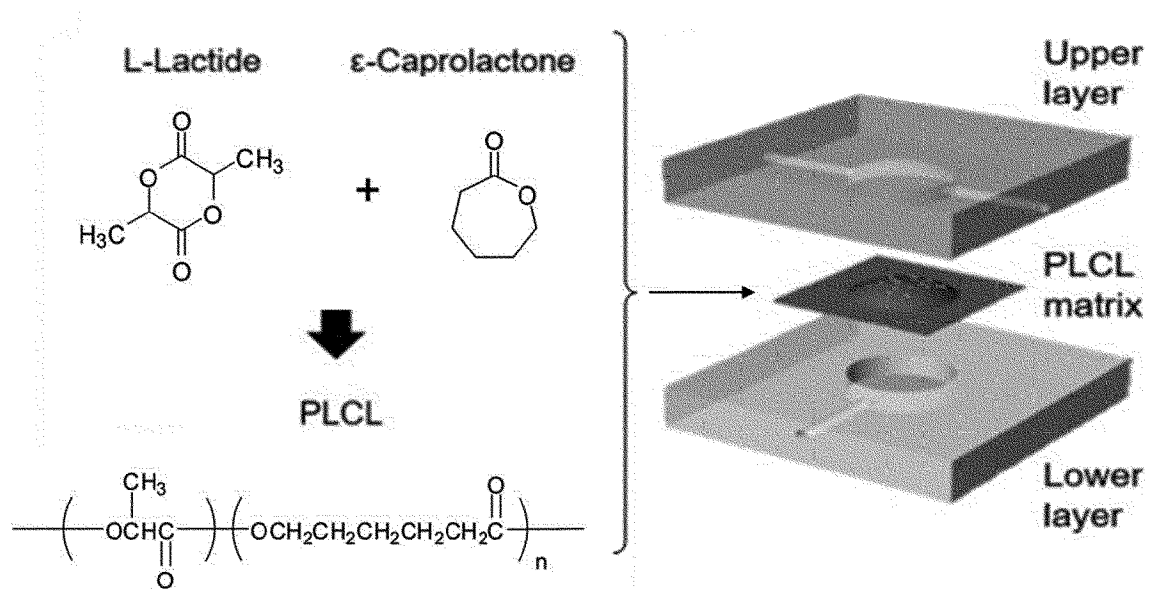


[도4]

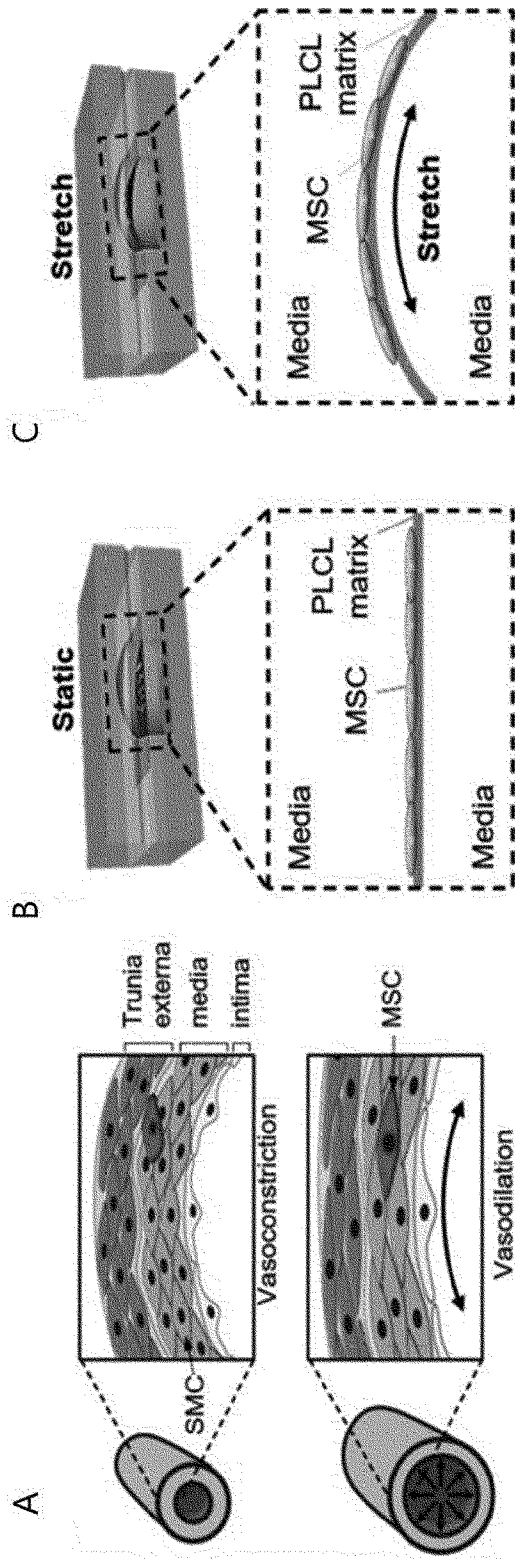




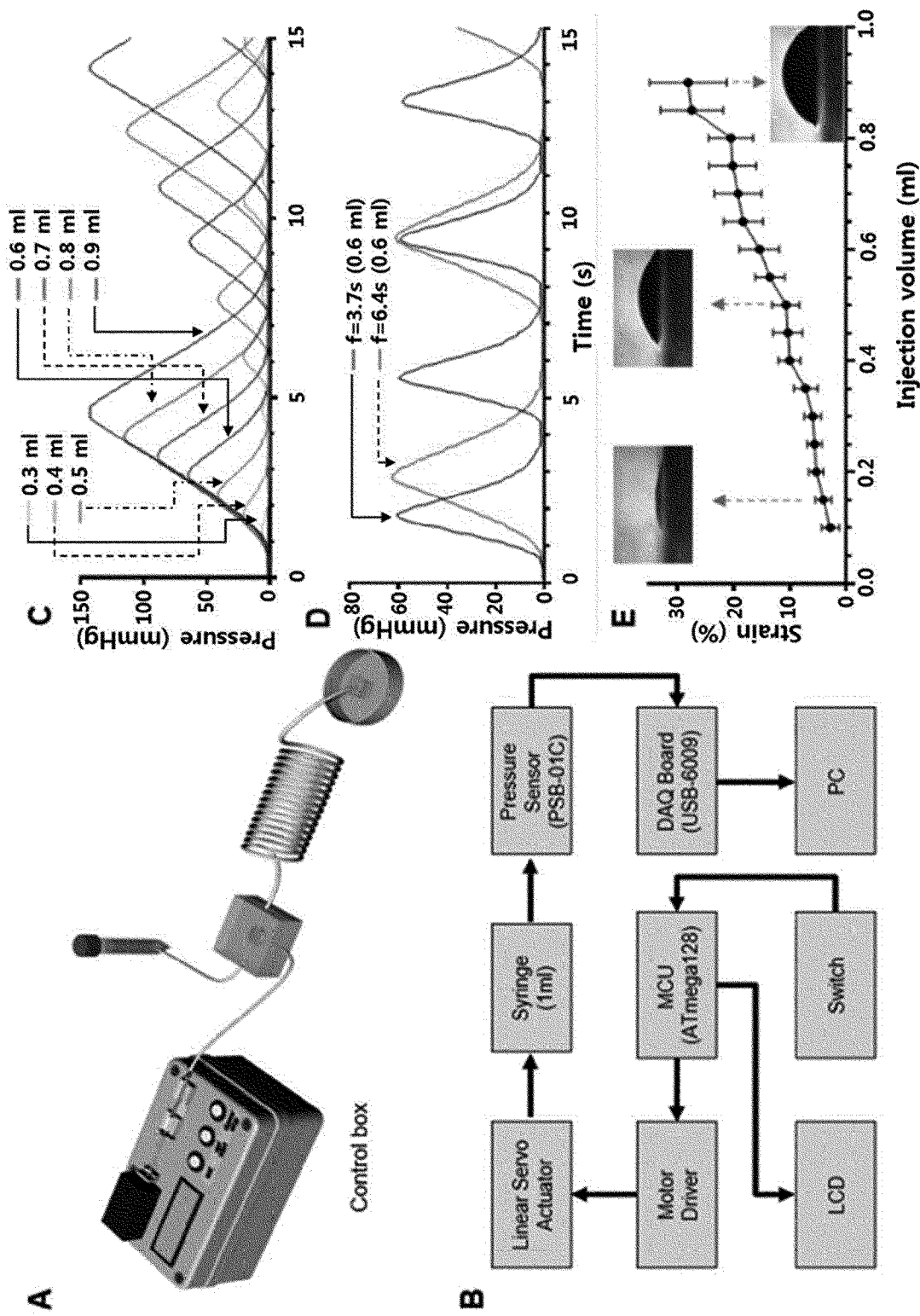
[도6]



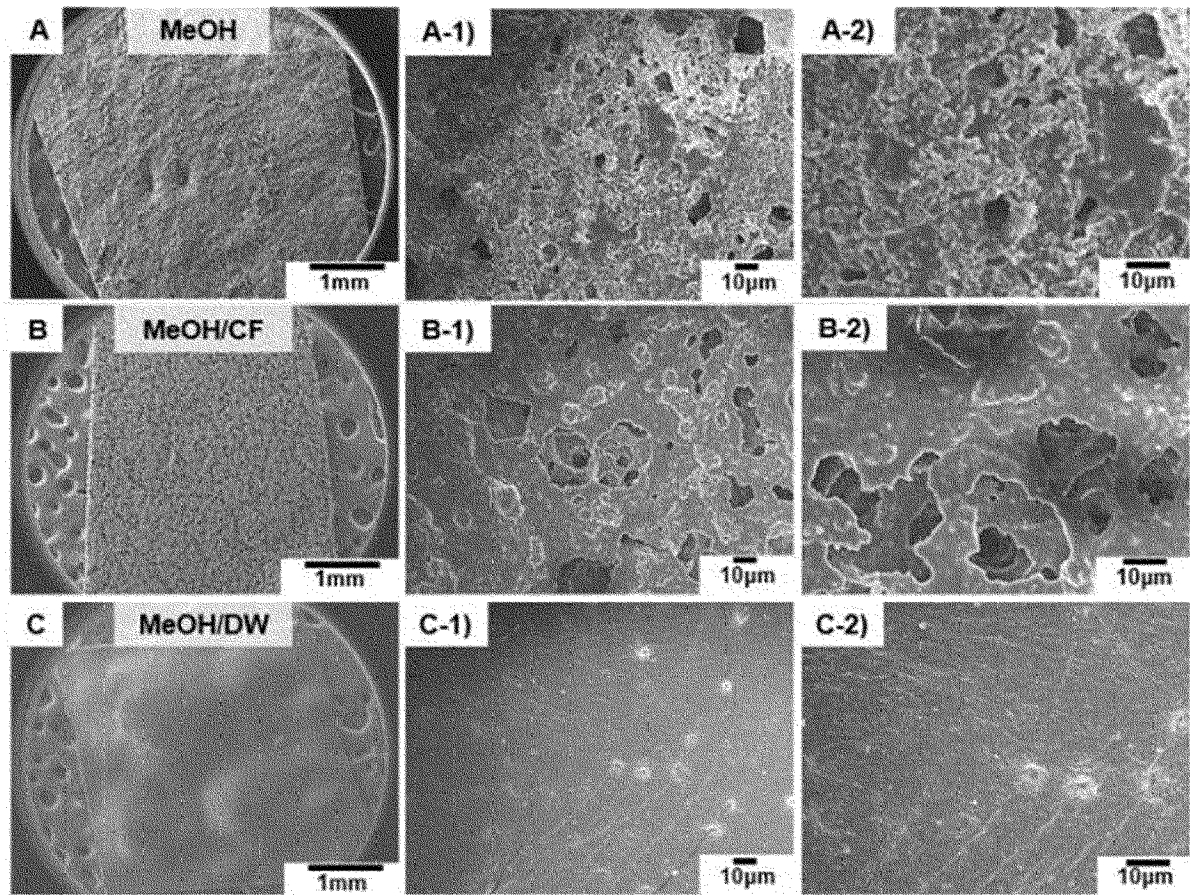
[도7]



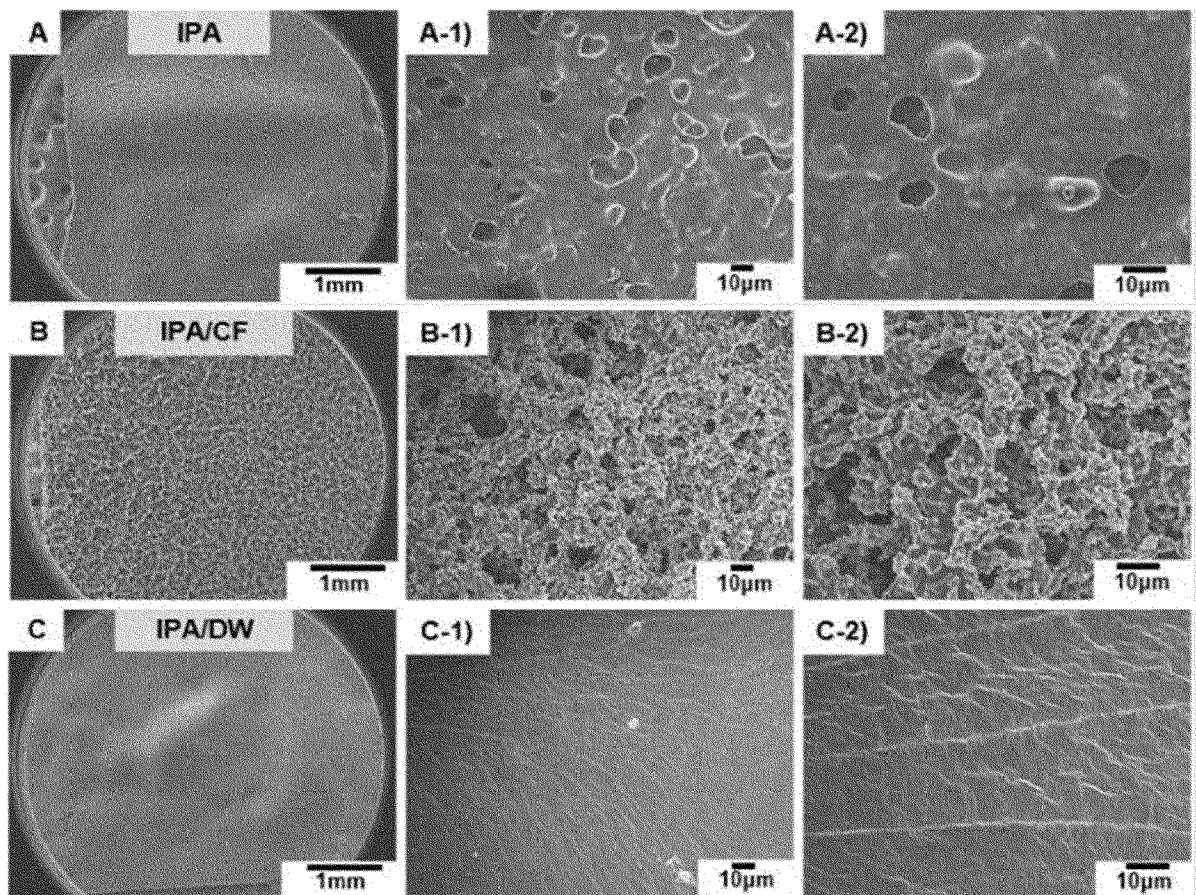
[도8]



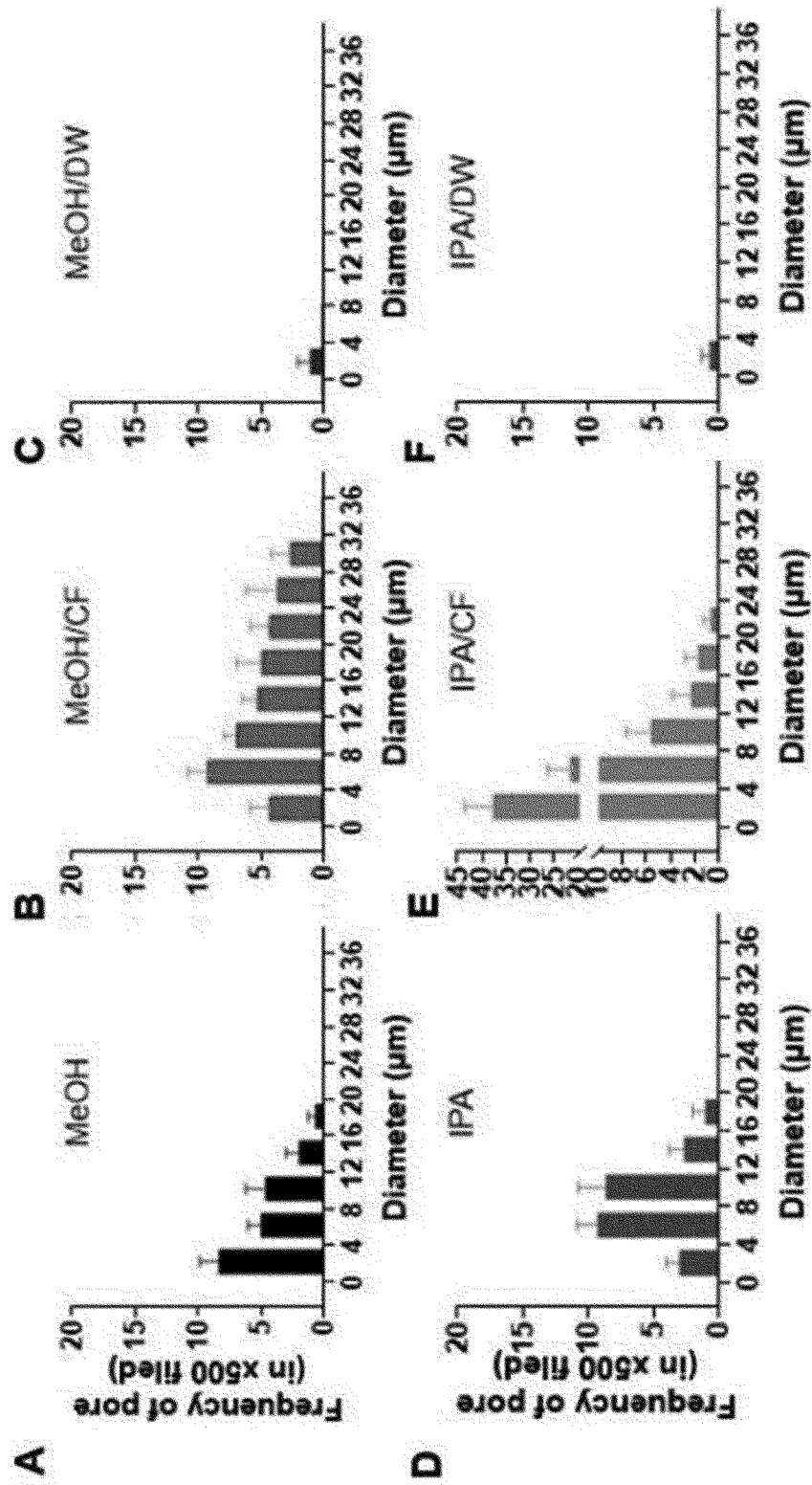
[도9]



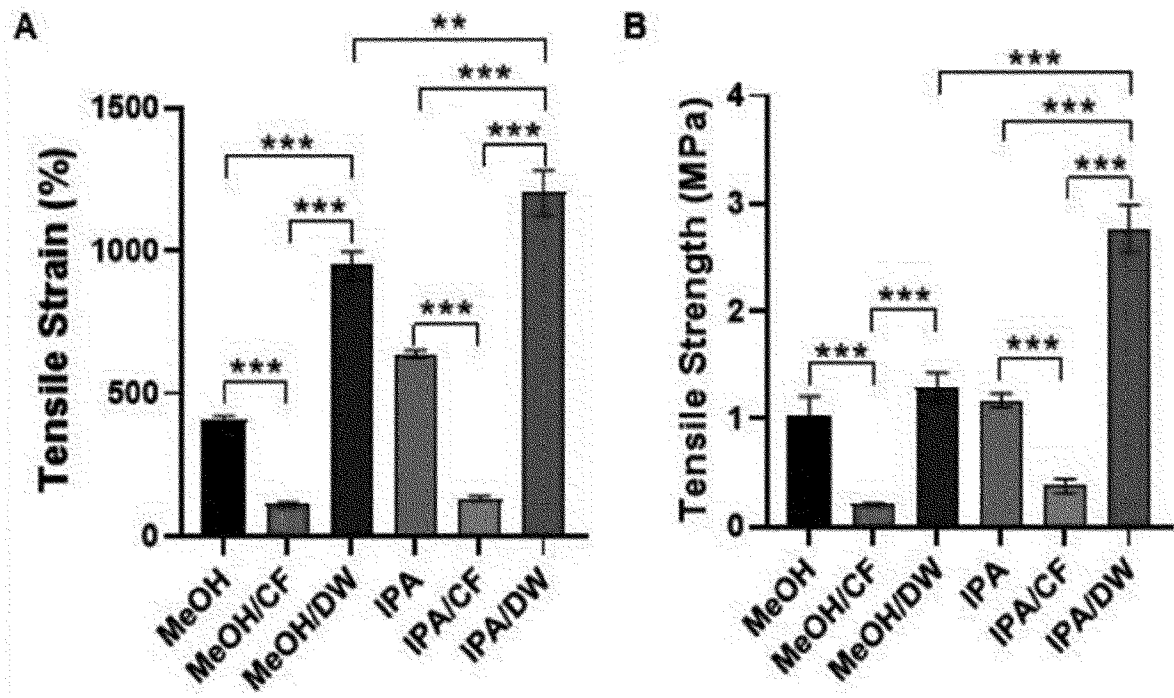
[도10]



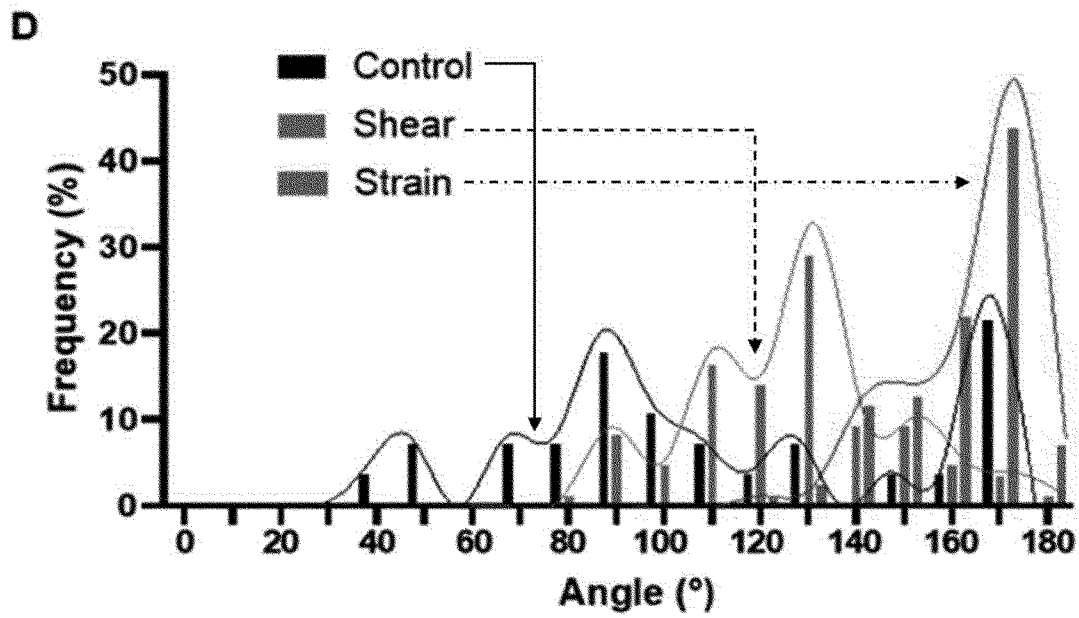
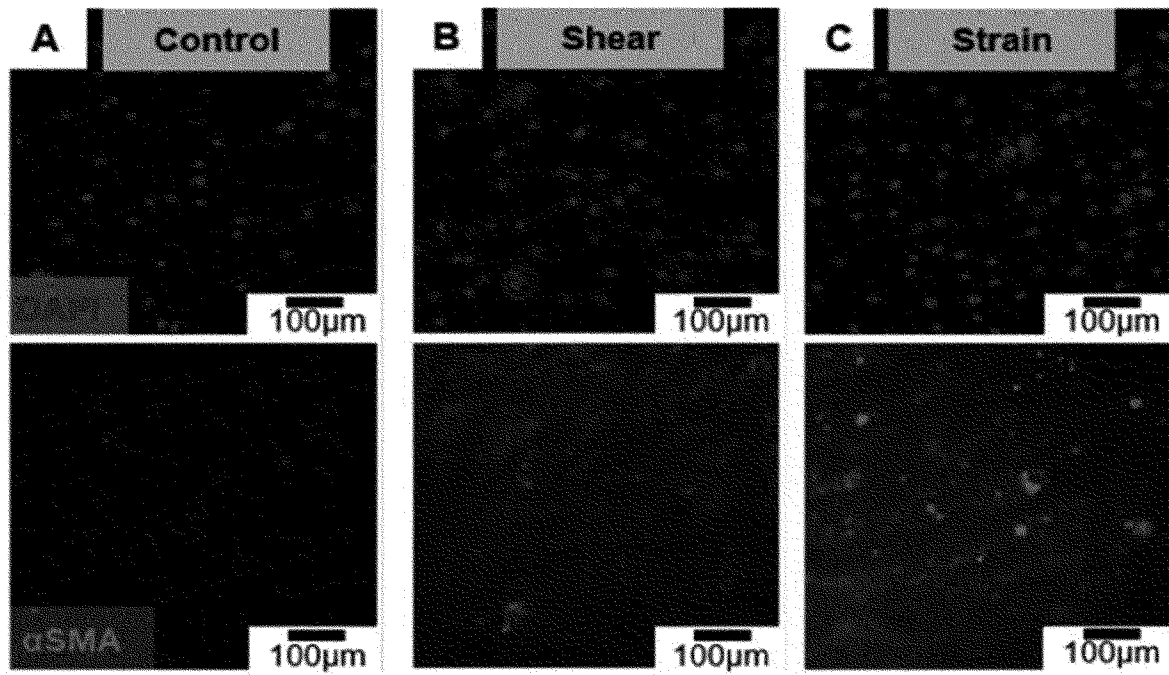
[도 11]



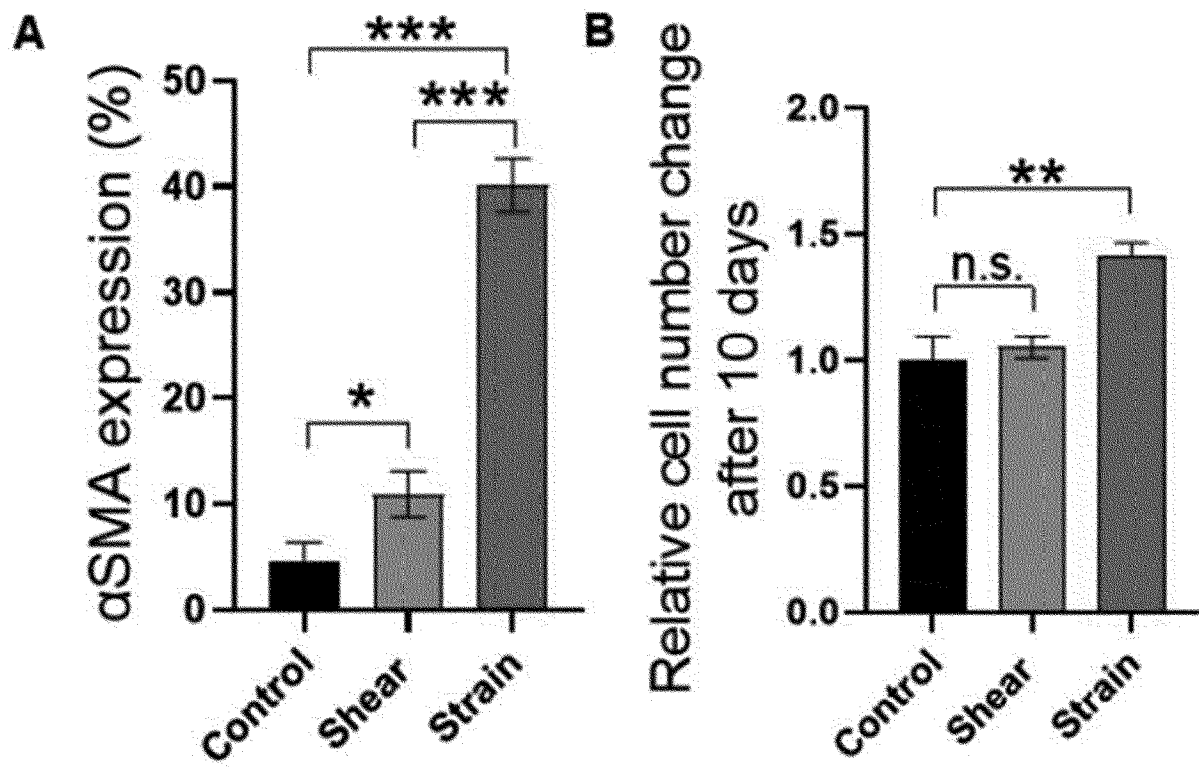
[도 12]



[도13]



[도14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/004140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/34(2006.01)i; C12M 3/06(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; C12N 5/074(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)

C12M 1/34(2006.01); C12M 1/00(2006.01); C12M 3/00(2006.01); C12M 3/06(2006.01); C12N 5/07(2010.01);
G01N 33/48(2006.01)

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: 줄기 세포 분화 제어 장치(stem cell differentiation control device), 미세 유체 장치(microfluidic device), 박막(thin film), 인장력(tensile force), 팽창 유체(expansion fluid), 펌프(pump)

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 (2015-11-12) See paragraphs [0026]-[0037] and [0040]-[0052]; and figure 3.	1-13
Y	KR 10-2019-0060894 A (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 03 June 2019 (2019-06-03) See paragraphs [0017], [0038], [0046]-[0057], [0062]-[0070], [0080]-[0092] and [0164]; and figures 1, 2a-2b and 3a.	1-13
Y	JEONG, Sung In et al. Manufacture of elastic biodegradable PLCL scaffolds for mechano-active vascular tissue engineering. Journal of Biomaterials Science. 2012, vol. 15, no. 5, pp. 645-660. See abstract; and pages 646-659.	4,10-13
A	ZHANG, Jie et al. Stem cell culture and differentiation in microfluidic devices toward organ-on-a-chip. Future Science OA. 08 May 2017 (online publication date), vol. 3, no. 2, pp. 1-15. See entire document.	1-13



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

03 July 2024

Date of mailing of the international search report

03 July 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/004140

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 113825831 A (NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED) 21 December 2021 (2021-12-21) See entire document.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/004140

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2015-0126520	A	12 November 2015	KR	10-1569619	B1	17 November 2015
KR	10-2019-0060894	A	03 June 2019	CN	107988072	A	04 May 2018
				CN	107988072	B	29 November 2022
				EP	3404093	A1	21 November 2018
				EP	3404093	B1	11 December 2019
				JP	5415538	B2	12 February 2014
				KR	10-2022-0016289	A	08 February 2022
				KR	10-2140055	B1	31 July 2020
				KR	10-2481683	B1	28 December 2022
				US	2011-0250585	A1	13 October 2011
				US	8647861	B2	11 February 2014
				WO	2010-009307	A2	21 January 2010
				WO	2010-009307	A3	15 July 2010
CN	113825831	A	21 December 2021	EP	3969560	A1	23 March 2022
				JP	2022-532614	A	15 July 2022
				KR	10-2022-0007669	A	18 January 2022
				US	2022-0204903	A1	30 June 2022
				WO	2020-227772	A1	19 November 2020

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12M 1/34(2006.01)i; C12M 3/06(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; C12N 5/074(2010.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12M 1/34(2006.01); C12M 1/00(2006.01); C12M 3/00(2006.01); C12M 3/06(2006.01); C12N 5/07(2010.01); G01N 33/48(2006.01) 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: 줄기 세포 분화 제어 장치(stem cell differentiation control device), 미세 유체 장치(microfluidic device), 박막(thin film), 인장력(tensile force), 팽창 유체(expansion fluid), 펌프(pump)		
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 단락 [0026]-[0037], [0040]-[0052]; 및 도면 3 참조.	1-13
Y	KR 10-2019-0060894 A (칠드런'즈 메디컬 센터 코퍼레이션) 2019.06.03 단락 [0017], [0038], [0046]-[0057], [0062]-[0070], [0080]-[0092], [0164]; 및 도면 1, 2a-2b, 3a 참조.	1-13
Y	JEONG, SUNG IN 등, "Manufacture of elastic biodegradable PLCL scaffolds for mechano-active vascular tissue engineering", Journal of Biomaterials Science, 2012, 15권, 5호, 페이지 645-660 요약; 및 페이지 646-659 참조.	4,10-13
A	ZHANG, JIE 등, "Stem cell culture and differentiation in microfluidic devices toward organ-on-a-chip", Future Science OA, 2017.05.08(온라인 개시일), 3권, 2호, 페이지 1-15 전체 문헌 참조.	1-13
A	CN 113825831 A (NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED) 2021.12.21 전체 문헌 참조.	1-13
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 2024년07월03일(03.07.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년07월03일(03.07.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0126520 A	2015/11/12	KR 10-1569619 B1	2015/11/17
KR 10-2019-0060894 A	2019/06/03	CN 107988072 A	2018/05/04
		CN 107988072 B	2022/11/29
		EP 3404093 A1	2018/11/21
		EP 3404093 B1	2019/12/11
		JP 5415538 B2	2014/02/12
		KR 10-2022-0016289 A	2022/02/08
		KR 10-2140055 B1	2020/07/31
		KR 10-2481683 B1	2022/12/28
		US 2011-0250585 A1	2011/10/13
		US 8647861 B2	2014/02/11
		WO 2010-009307 A2	2010/01/21
		WO 2010-009307 A3	2010/07/15
CN 113825831 A	2021/12/21	EP 3969560 A1	2022/03/23
		JP 2022-532614 A	2022/07/15
		KR 10-2022-0007669 A	2022/01/18
		US 2022-0204903 A1	2022/06/30
		WO 2020-227772 A1	2020/11/19