

(19)대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C12M 3/00
C12M 1/26

(11) 공개번호 10-2005-0105480
(43) 공개일자 2005년11월04일

(21) 출원번호 10-2005-7015411
(22) 출원일자 2005년08월19일
 번역문 제출일자 2005년08월19일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/013580
 국제출원일자 2003년12월02일

(87) 국제공개번호 WO 2004/074425
 국제공개일자 2004년09월02일

(30) 우선권주장 103 07 487.2 2003년02월21일 독일(DE)

(71) 출원인 프라운호퍼-게젤샤프트 추르 뢰르데룽 데어 안제반텐 포르슘 에 파우
독일 80686 뮌헨 한자슈트라쎄 27 체

(72) 발명자 푸르, 귄터, 알.
독일, 베를린 카발리어 스트라쎄 15, 13187
짐머만, 하이코
독일 자르브뤼켄 폴-링케스트라쎄 20,66113

(74) 대리인 김홍균

심사청구 : 없음

(54) 생물 세포 물질을 형성하기 위한 방법 및 장치

요약

본 발명은 미리 결정된 기하학적 배열을 가지는 다수 개의 생물 세포(21)를 포함하는 세포 물질(20)의 형성을 위한 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 아래와 같은 단계를 포함한다; 조작 도구(10)가 세포 물질(20) 위에 적어도 부분적으로 표면이 위치하는 도구 몸체(11)에 제공되는 단계; 조작 도구(10)가 세포(21)의 기하학적 배열이 변경되는 방법으로 표면(12,14)의 기하학적 성질을 변경시키는 것에 의하여 이동되는 단계. 본 발명은 또한 상기 방법을 실행시키기 위한 조작 도구와 관련이 된다.

대표도

도 1

색인어

생물 세포, 조작도구, 형성 요소, 속이 빈 몸체, 진행 속도

명세서

기술분야

본 발명은 다수의 생물 세포들을 가지는 세포 물질을 형성하기 위한 방법, 특히 형성 및/또는 침착(depositing)을 위한 방법에 관한 것이고, 특히 세포 물질의 표면 국소 형태(topography)를 설정하거나 또는 변경하기 위한 방법 및 조직 공학을 위한 방법과 같은 세포물질의 기하학적 구조를 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 방법들을 실행하기 위한 조작 도구, 특히 세포 배지나 조직과 같은 세포물질을 위한 기질 및 모양을 형성하는 도구에 관한 것으로, 이들을 이용하여 세포물질의 기하학적 모양 및/또는 크기를 변경할 수 있다. 본 발명은 또한 상기 인용된 방법과 조작 도구의 새로운 응용에 관한 것이다.

배경기술

의학, 생명공학, 생화학 분야에서 생물 세포의 검사 또는 조작에 있어, 특히 세포 형성 또는 세포 그룹이 개별적인 세포들의 미리 형성된 기하학적 배열을 가지면서 제공된다는 점에서 특히 의료 세포 치료 및 조직 공학과 관련하여 기본적인 목적들이 존재한다. 예를 들어, 기관으로 이식된 세포물질의 모양은 이식 위치에서 기하학적 조건에 가능한 잘 맞추어져야 한다. 세포 배지로부터의 적절한 기계적 마름질(trimming)(절단)을 하는 것에 의하여 이식 물질의 모양을 적응시키는 것은 진료를 통하여 공지되어 있다. 그러나 세포 또는 세포물질에 대한 손상은 이식 후 조직이 재생하는 동안 원하지 않는 영향을 줄 수 있기 때문에 이것은 불리한 점을 가진다. 진료로부터 알려진 수많은 실험에서, 세포 또는 조직 형태의 필요한 재생 또는 새로운 성장이 발생하지 않고, 오히려 예를 들어 종양이 유발되었다. 종양 유발은 가정이 되었다. 세포들의 제어되지 않는 세포 재생으로 종양의 도입은 이식 지점에서 물리적, 화학적 또는 기계적 외부 영향에 의해 촉진된다고 추측된다. 이러한 영향들은 재생 가능하도록 실시되거나 또는 적어도 현행 기술을 이용하여 탐지되지 않을 수도 있다.

세포물질의 모양을 형성하는 것의 다른 실시 예는 조직 모델에서 활동 성분을 조사하는 것이다(약리학적 활동 성분의 시험). 바람직하게는, 회전 타원체가 조직 모델로 사용될 수 있고, 그리고 회전 타원체는 세포로 만들어진 내부 코어(core)에서 세포 물질의 층으로 이루어진 성장을 통해 구 형태로 생성될 수 있다. 종래의 조직 모델의 단점은 제한된 크기에 있다. 예를 들면, 지금까지 직경이 대략 150 μm 이르는 회전 타원체만이 사용될 수 있었다. 직경이 더욱 클 때에는 내부 세포의 영양 공급에서 문제가 일어난다. 내부 세포의 생명력이 제한을 받고 그리고 내부로부터 외부에 이르기까지 세포의 사멸이 발생할 수도 있다.

지금까지 실현되지 않은 조직 공학에서의 추가적인 목적은 다른 형태의 세포들의 세포 물질 또는 생물 세포들로부터 구조화된 복합 물질 또는 합성 물질들을 생산하는 것이다. 단점으로는 지금까지 복합체 형성이 세포나 세포물질의 기계적 손상과 관련된다는 것이다.

세포 치료에서 인용된 목적과 지금까지 부분적으로 만족스럽지 못했던 조직 공학에서의 결과들은 현재 생명공학과 의학에서 이러한 방법의 광범위한 응용의 가장 중요한 제한과 지연을 나타낸다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 목적은 미리 정의된 각 세포의 기하학적 배열을 가지는 세포물질을 형성하기 위한 향상된 방법을 제공하는 것으로, 이를 이용하여 종래 방법의 단점이 극복되고 그리고 상기 방법은 특히 각 세포를 손상시키는 일 없이 세포 물질의 모양을 형성하고 및/또는 세포를 생성할 수 있다. 이러한 형태의 방법을 실행하기 위한 향상된 조작 도구를 제공하는 것이 또한 본 발명의 목적이고, 그리고 이를 이용하여 종래의 세포 또는 조직 공학의 단점이 극복된다. 본 발명의 다른 목적은 모양 형성, 배지 또는 세포 물질의 생성의 새로운 응용을 구체적으로 개시하는 것이다.

이러한 목적들은 청구항 1 또는 청구항 20에 따르는 특징을 가지는 방법 및 조작 도구에 의해 이루어진다. 본 발명의 유리한 실시 형태들 및 응용들은 종속항으로부터 초래된다.

방법과 관련하여, 본 발명은 미리 정의된 방법으로 조작 도구의 표면 기하학적 형태를 변경시키는 것에 의하여 적어도 부분적으로 조작이 되어야 할 세포 물질에 접촉하는 조작 도구를 사용하여, 세포물질에서 세포의 기하학적 배열을 설정하는 일반적인 기술적 지침에 기초한다. 표면 기하학적 형태는 영역, 고정된 기준 시스템과 관련된 방향성, 표면 형상 및 표면 구조의 특징들 적어도 하나와 관련된 본 발명에 따라 변경될 수 있다. 도구 표면에 접촉하는 세포물질의 세포는 유리하게는 표면 운동을 따르고, 상기에서 세포는 표면 운동 중 물리적, 화학적 상태가 변화되지 않은 상태로 유지된다. 도구 표면의 기하학적 형태의 변화는 배타적으로 세포의 재배열, 특히 세포의 손상 없는 치환(displacement) 또는 변위(shifting)를 발생시키고, 상기에서 도구 몸체와 접촉하는 세포 또는 세포 물질 내 더욱 깊이 위치하는 세포가 변형이 되거나 또는 공간적 위치를 변경하지만, 그러나 메신저 물질이나 물질 분비의 형태로 임의의 화학적 신호를 방출하지 않는다.

세포 물질은 일반적으로 본 명세서에서 접착 접촉(거대분자 화학 결합, 반 데르 발스 결합이 없는 상태)을 통하여 환경과 연결된 세포들의 축적으로 이해된다. 세포 물질은 예를 들어 각 세포들의 복합체(composite) 또는 집적, 조직(동일하게 분화된 세포의 결합), 또는 기관이 된다. 각 세포들의 액체가 아닌 복합체는 추가로 합성 기질 물질과 같은 합성 성분을 포함할 수 있다. 세포물질의 형성은 일반적으로 본 명세서에서 세포물질의 모양, 밀도, 크기 및/또는 구조의 변화로 이해된다.

조작 도구는 일반적으로 고정된 표면을 가지는 세포물질과 관련하여 범위가 정해질 수도 있는 물질로 만들어진 외부 몸체 또는 물체가 되고, 그리고 그것의 기하학적 성질은 적어도 부분적인 영역에서 변경이 가능하다. 예를 들어, 조작 도구는 세포 배지를 위한 기질, 세포물질 내 프로브 또는 모양 형성을 위한 스탬프를 가질 수 있다. 조작 도구는 표면의 기하학적 성질들이 상기에서 언급된 적어도 하나의 특징과 관련하여 변하는 것과 같은 방법으로 조정 가능하다. 조정 속도는 진행 속도(advance velocity)라고 부른다.

본 발명은 특히 발명자들의 아래와 같은 고려에 기초한다. 먼저 예를 들어 현재까지 서로 다른 결과들을 가져온 조직이나 세포 복합체에서 세포의 반응은 세포 물질에 존재하는 세포들이 도구를 도입하는 것에 의하여 손상되거나 파괴되고 그리고 이로 인하여 손상된 효과가 유발되기 때문에 발생이 되는 것으로 인식되었다. 세포 또는 조직 손상의 경우, 화학적 신호(분자 메신저 물질의 방출) 또는 섬유 모세포(fibroblast) 유입, 섬유 결합소(fibronectin) 배출 또는 그와 유사한 것과 같은 세포 형태의 지지 과정이 생성된다. 손상된 세포들의 반응은 세포나 첨가물의 효과에 영향을 미친다. 예를 들어 줄기 세포는 줄기 세포가 손상이 되지 않는 세포 물질 내에 있는 경우에 비해 세포 손상의 환경에서 세포는 서로 다르게 행동한다. 둘째, 발명자들은 현재의 예상과 대조적으로, 접착력이 있게 결합된 세포조차도 손상 없이 공간적으로 이동할 수 있다는 것을 발견했다. 이는 세포 물질 내부로 도구의 기계적 삽입을 허용한다. 만약 진행 속도가 충분히 낮아서 세포 사이의 접착 접촉이 자연적인 방식, 예를 들면 세포에 영향을 주거나 파괴하지 않는 방식으로 작아진다면 세포는 세포물질 내 및/또는 세포물질을 통하여 도구 표면을 이동하는 동안 손상되지 않은 상태를 유지하고, 그리고 변화하는 환경에서 다시 형성될 수 있다.

위에서 언급된 요구 사항들은 도구 표면의 기하학적 조정 및 세포의 손상 없는 치환 또는 그것들과 관련된 세포의 변위에 의하여 완전히 충족될 수 있다. 세포 물질의 피해나 손상이 배제된다. 세포들의 물리적, 화학적, 기계적 상태는 완전히 특징이 지워질 수 있고 그리고 유지될 수 있다. 세포 및 외부 몸체의 표면 사이의 손상을 입히는 접촉은 회피되고, 원하지 않는 표면 접촉에 의한 세포 신호는 억제된다. 세포 조작은 손상 없는 이동에 의해 극도로 조심스럽게 실행된다. 조작 도구는 세포물질 내에서 특정 구성 내부로 정확하게 유도될 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시 예에 따르면, 조작 도구는 생물학적 세포의 생리학적 결합 속도에 의해 결정된 기준 속도(자연적인 세포 이동 동안에 세포들의 결합 속도)보다 작거나 또는 같은 진행속도로 조정된다. 자연적인 세포 이동(세포 운동)은 세포 기관(막 융기와 같은 막 관)의 접촉 접촉의 재배열에 의하여 고정된 표면이나 세포물질 내에서 완전한 세포의 위치의 변화를 포함하고, 예를 들면 M. Abercrombie 등에 의한 출판물 "The Locomotion of Fibroblast In Culture"("Experimental Cell Reserch", Vol. 67, 1971, 359-367쪽) 및 L.P. Cramer에 의한 출판물 "Organization and polarity of action filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility"("Biochem. Soc. Symp." Vol. 65, 1999, 173-205쪽)에 기술되어 있다.

생리학적 기준속도는 그 자체로 공지되어 있거나((예를 들면, G. Fuhr 등에 의한 "Biol. Chem.", 1998, Vol. 379, 1161-1173쪽 참조) 또는 동물이나 사람의 세포에서 측정 가능하다. 관련 결합 속도는 예를 들면 인공적 표면에서 각 세포의 접촉 패턴의 동역학을 측정하는 것에 의하여 유도될 수 있다.

본 명세서에서 진행 속도는 일반적으로 조작 도구의 표면이 세포물질에 대하여 이동하는 속도를 말한다. 이러한 속도는 그 자체로 전체 표면, 표면의 부분 또는 표면 확장을 나타내는 특정 모양 형성 요소와 관련될 수 있다. 표면 팽창의 경우, 예를 들어 진행 속도는 표면이 확장하는 동안 기준점의 상대속도를 말한다. 진행속도의 조정 과정에서, 조작 도구는 유리하게 움직이거나 손상 없이 자연적으로 생기는 복합체에서 세포를 재배열할 수 있다. 진행 속도는 조직에서 영구적 발생하는 세포 이동에 적합하도록 된다. 예를 들면, 특별한 형태의 면역 세포(예를 들면, 매크로파지)는 존재하는 세포를 치환시키는 것에 의하여 조밀한 조직조차 통과하여 움직일 수도 있다고 알려져 있다. 발명자들은 놀랍게도 만약 인용된 진행속도가 설정이 된다면, 이러한 치환 이동이 면역 세포보다 상당히 크고 서브-밀리미터 내지 센티미터 범위의 거시적인 크기를 가지는 프로브를 이용하여 또한 실행될 수 있다는 것을 발견했다. 도구 표면이 움직이거나 생성되는 동안, 예를 들어 세포들 사이에서 진행하는 거대 분자 결합(예를 들면, 인테그린 및 카드헤린 과들(families)의 막-관련 거대 분자)들은 분리되고 그리고 프로브 표면에 재결합이 된다.

만약 조작 도구의 진행속도가 $0.1 \mu\text{m}/\text{h}$ 내지 $1 \text{ mm}/\text{h}$ 의 속도 범위, 바람직하게는 $1 \mu\text{m}/\text{h}$ 에서 $500 \mu\text{m}/\text{h}$ 까지의 범위에서 선택된다면 본 발명의 특별한 이점이 발현된다. 전형적으로 인테그린 및 카드헤린 과들의 막과 관련된 거대 분자에 의해 중재되는 거대 분자 결합이 형성되거나 끊어지는 결합 속도는 이러한 속도 범위에 놓인다. 바람직한 속도 범위는 섬유모세포(fibroblast), 매크로파지, 림프구, 연골 세포 또는 특히 종양 세포의 세포 이동의 속도에 해당한다. 유리한 점으로서 만약 진행속도가 이러한 낮은 속도로 설정되면, 도구 표면의 위치 및 모양은 대략 $\pm 1 \mu\text{m}$ 또는 그 이하의 높은 정밀도로 설정될 수 있다. 인용된 범위의 추진 속도는 조직 내부와 표면에서 세포의 활동적이며 내부적 원인에 의한 이동 속도에 해당한다. 이로 인하여 프로브의 이동은 프로브 표면의 직접적 환경 내에 있는 세포의 영구적인 형성과 재구성을 초래하고 그리고 세포들의 치환은 영구적으로 진행 힘을 작용하는 것에 의하여 촉진된다.

만약 조작 도구가 영구적으로 작용하는 진행 힘에 의하여 영향을 받는다면, 원하는 진행속도에서 조작 도구의 이동은 심지어 힘의 가장 낮은 적용을 이용하여 유리하게 실행될 수 있다. 이것은 낮은 전력을 가지는 구동 장치의 사용을 허용한다. 만약 진행 힘이 기계적인 압력에 의하여 형성이 된다면, 프로브에 대한 진행 힘의 전달을 위한 이점이 초래될 수 있다. 만약 진행 힘이 전기장이나 자기장에서 힘들에 의하여 형성이 된다면, 진행 힘은 원격 작용에 의해 가해질 수 있기 때문에 주입 도구의 구성에 이점들이 초래될 수 있다.

만약 본 발명에 따르는 방법이 동물이나 사람의 기관 외부에 위치한 세포물질에 작용이 된다면, 특별한 이점이 초래될 수 있다. 세포 물질은 진행 힘의 작용에 대한 저항력으로 작용하는 고정된 캐리어 표면 위에 적당한 배치 조건 하에서 위치가 설정될 수 있다. 세포물질 및 프로브는 높은 정확도로서 위치가 설정될 수 있다.

대안으로, 세포물질은 살아있는 유기체의 복합체에 위치할 수 있다. 예를 들어 조작 도구는 실험 프로브, 생체 검사 도구 또는 주입 도구로써 조직 내에 삽입될 수 있다. 낮은 진행 속도로 인하여 예를 들어 유기체의 둘러싸는 부분을 이용하여 삽입은 영향을 받는 조직이 캐리어 위에서 하나의 위치에서 고정되어 유지되는 상태에서 발생한다. 마취제의 사용은 고정을 위해 바람직하지만, 그러나 방법의 손상이 없는 것과 관련하여 절대적으로 필요하지는 않다.

본 발명의 다른 바람직한 실시 예에 따르면, 조작 도구의 조정은 도구 표면의 팽창을 포함할 수 있다. 조작되어야 할 세포 물질은 도구 표면 위에 위치한다. 세포 물질은 표면의 팽창에 의하여 두께가 감소가 되는 세포층을 형성하고 그리고/또는 표면의 팽창 과정에서 도구 표면이 노출되는 갭이 발생한다. 유리한 점으로서 이로 인하여 세포 물질의 확장시키는 층 복합체의 생산이 인접하는 배치 매개물로부터 세포의 성장을 통하여 가능해진다. 그러므로 본 발명의 이러한 실시 형태는 특히 활성 성분 시험을 위한 위에서 언급된 조직 모델의 제공을 위한 이점을 가진다.

첫 번째 변형 형태에 따라, 조작 도구는 적어도 부분적으로 세포와 접촉하고 그리고 조작 도구를 제조하는 과정에서 신장이 되는 도구 표면을 형성하는 탄성이 있는 소재로 만들어진다. 탄성 소재(예를 들어 플라스틱, 고무)는 유리하게는 닫힌 연속적인 표면을 형성한다. 대안으로 두 번째 변형 형태에 따르면, 조정 가능한 표면은 서로 대체할 수 있는 금속이나 플라스틱으로 만들어진 얇은 판(lamellae)과 같은 비-탄성 소재로 만들어질 수 있고, 기하학적 표면 특성의 변경의 정밀도를 위한 이점이 초래될 수 있다.

만약 본 발명의 다른 변형 형태에 따라 조작 도구가 조작 도구의 조정 과정에서 확대되는 내부 표면을 가진 내부 공동(cavity)을 가진 속이 빈 몸체(hollow body)를 가진다면, 회전 타원체 조직 모델을 제공하기 위한 유리한 이점이 초래된다. 본 발명의 서로 다른 변형 형태에 따르면, 세포 물질은 속이 빈 도구 몸체 위, 도구 몸체의 내부 표면 또는 내부 및 외부 표면들 양쪽 위에 외부적으로 설치될 수 있다. 이러한 변형 형태들은 도구 표면의 외부 또는 내부로부터 성장할 수 있는 서로 다른 형태의 세포로 만들어진 층으로 된 조직 모델을 제공하기 위한 이점을 가지고, 그리고 이용 가능한 기질 영역이 본 발명에 따르는 표면의 조정을 통하여 연속적으로 커질 수 있다. 더 낮게 놓이는 세포의 불충분한 공급으로 인하여 초래되는 요구되지 않는 층 두께는 유리하게 방지되고, 그리고 동시에 전형적인 조직 모델에 비하여 상당히 큰 회전 타원체가 생성될 수 있다.

속이 빈 조작 도구는 바람직하게 직경 0.01 mm 내지 10 cm 의 범위의 지름을 가지도록 구형으로 만들어진다.

만약 본 발명에 따른 방법의 다른 변형에 따라 세포물질의 형성이 도구 표면을 조정하는 것에 의한 세포의 기하학적 재배치 및 이와 동시에 둘러싸고 있는 매개물로부터의 세포의 성장을 포함한다면 미리 규정할 수 최대 두께를 가지는 세포 배지의 생성을 위한 이점이 얻어질 수 있다. 따라서 대응하는 본 발명의 독립적인 목적은 배치 매개물로부터의 세포가 확장하는 기질 표면 위에서 성장하는 세포 배양 방법이다. 만약 세포물질이 다른 형태의 세포들로부터 속이 빈 도구 몸체 위 또는 내부에 있는 층에서 생산된다면, 조직 공학을 위한 특별한 이점이 얻어진다.

조작 도구의 내부에 유체 정역학적인 압력을 가함으로써 도구 표면은 확대될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 유리한 변형 형태에 따라 탄성 소재로 만들어진 속이 빈 도구는 압력 라인(액체 라인 같은 것)에 연결될 수 있고, 그리고 압력 라인을 통하여 압력 하에서 액체나 기체가 도구의 내부에 도입될 수 있다. 도구 표면을 신장시키는 것은 액체나 기체를 공급함으로써 실행된다. 액체를 사용하여 신장시키는 것은 공급하는 액체 부피가 표면의 확대와 직접적으로 관련이 된다는 이점을 가진다. 유리하게 세포 물질을 속이 빈 몸체의 내부에 위에서 언급된 것과 같은 침착을 위하여, 배양되는 세포를 내부로 전달하는 세포 부유물이 도구 표면을 신장시키기 위한 액체로 사용된다.

조직 공학에 적용하기 위해, 도구 몸체의 표면이 전기-생리학적 접촉, 도구의 내부 및 환경 사이의 물질 이동 및/또는 내부 및 외부 사이의 접촉을 허용하는 소재로 만들어진다면 유리할 수 있다.

본 발명의 다른 바람직한 실시 예에 따르면, 도구 몸체는 적어도 하나의 대체 가능한 형성 요소를 포함하고, 그리고 형성 요소는 도구 몸체의 조정 시 도구 표면으로 돌출이 되고 그리고 이로 인하여 표면 설계를 변경시킨다. 적어도 하나의 형성 요소는 플런저(plunger)의 기능을 하는 도구 몸체를 제공하고, 그리고 플런저 모양은 형성 요소의 대체 가능성에 의하여 특별한 요구 사항들에게 다양하게 적응이 될 수 있다. 만약 다수의 형성 요소가 제공된다면, 플런저 표면의 설계의 다양성이 유리하게 상승이 된다.

본 발명의 변형 형태에 따르면, 적어도 하나의 형성 요소를 가지는 도구는 세포 배지의 모양을 결정하는 세포 배지 캐리어로 사용될 수 있다. 대안으로 적어도 하나의 형성 요소의 위치에 의해 모양이 결정되는 표면을 가지는 조작 도구는 플런저와 같은 세포 물질 위에 밀어 넣어 질 수 있다.

본 발명의 하나의 독립적인 목적은 팽창된 캐리어 표면 위에 세포물질에 의해 형성된 세포 회전 타원체와 같은 본 발명에 따른 방법을 사용하여 생성되는 생물학적 세포물질 또는 세포-캐리어 복합체 물질이다.

장치와 관련하여, 상기 언급된 목적은 모양 및/또는 크기가 조정 가능한 적어도 하나의 표면을 가지는 도구 몸체 및 표면을 조정하기 위한 설정 장치를 포함하는 조작 도구를 제공하는 것에 의하여 이루어진다. 유리한 점으로서 조작되는 세포물질과의 접촉 시, 조작 도구는 세포물질이 표면 설계와 함께 융기가 되는 것(embossed)을 허용한다. 만약 표면 기하 형태를 변경시키기 위한 설정 장치가 생물학적 세포의 생리학적 기준 속도에 해당하는 특징적인 진행 속도를 가지도록 설정이 된다면, 위에서 언급된 이점들이 모양을 형성하는 동안 세포의 손상 없는 재배열을 위하여 초래가 된다.

특히 유리한 변형 형태 따르면, 조작 도구의 표면에는 생물학적 세포의 점착성 접촉을 촉진하는 구조 또는 코팅이 제공된다. 결합 물질은 도구 몸체, 적어도 도구 몸체의 앞쪽 또는 도구 몸체의 적어도 앞쪽의 코팅을 형성한다. 예를 들어, 코팅은 섬유결합소 또는 콜라겐으로 만들어진다. 본 발명의 이러한 실시 예는 세포 물질을 통해 프로브가 변위 이동을 하는 공간 결합 속도의 향상과 관련하여 이점을 가질 수 있다. 대안으로 결합 물질은 거칠기로 d인하여 서브- μm 의 특징 구조 크기들 가질 수 있고, 이로 인하여 세포물질의 프로브에 대한 결합이 촉진된다.

조작 도구의 표면에는 표면의 적어도 일부 영역에 생물학적 세포의 점착성 접촉을 막는 구조 또는 코팅이 추가로 구비될 수 있다. 예를 들면, 소수성 시레인(silanes) 및 친수성 중합체와 같이 그 자체로서 공지된 화학적 합성물이 코팅으로 제공된다.

도면의 간단한 설명

본 발명의 세부 사항과 이점이 첨부 도면을 참조하여 아래에서 기술이 된다.

도 1 및 도 2는 본 발명의 제1 실시 형태에 따른 세포물질의 생산 및 재배열의 예시를 도시한 것이다.

도 3은 본 발명에 따르는 조작 도구의 반지름 방향의 팽창 운동의 예시를 도시한 것이다.

도 4 및 도 5는 다수의 대체 가능한 형성 요소를 가지는 도구 표면의 예시를 도시한 것이다.

도 6은 조작 도구를 사용하여 본 발명에 따른 세포 물질의 모양 융기를 도시한 것이다.

실시예

도 1 및 도 2는 본 발명에 따라 미리 정의된 방법으로 세포 물질로부터 속이 빈 구 또는 다른 속이 빈 기하학적 형태를 생성의 본 발명에 따른 원리를 도시한 것이다. 이러한 목적을 위해, 조작 도구(10)는 탄성을 가진 속이 빈 도구 몸체(11) 그리고 압력 라인(13)을 가지도록 제공되고, 그리고 압력 라인(13)을 통하여 외부 압력 원(30)(부분 이미지(A)로만 도시됨)은 도구 몸체(11)의 내부(31)에 연결된다. 개략적으로 도시된 압력 원(30)은 도구 몸체(11)의 표면(12)을 조정하기 위한 설정 장치를 형성한다. 설정 장치는 예를 들어 액체 저장소 및 펌프를 포함한다.

도구 몸체(11)는 예를 들어 고무로 된 풍선을 형성하고, 그리고 예를 들면 이완된 상태에서 0.01 mm의 직경을 가지고 그리고 예를 들면 신장이 된 상태에서 100 mm에 이르는 직경을 가진다. 예를 들어 강철이나 유리로 된 모세관 형상이 압력 라인(13)으로 사용된다. 만약 도구(10)의 소재가 부분적으로 투과성이 있고 탄성 플라스틱 물질(예를 들면, 실리콘 막)을 포함한다면, 유리하게 세포 조직에서 물질 경사(material gradients)의 생성이 가능해진다.

내부(31)로 공기나 액체를 주입하는 것에 의하여, 도구 몸체(11)의 표면(12)은 모양이 기본적으로 유지된 상태에서 확대될 수 있다. 확대는 표면(12)에서 인접하는 기준점들이 위에서 언급된 생리학적 기준 속도에 해당하는 속도로 서로에 대해 멀어지도록 운동하는 방법으로 일어난다. 상응하여 표면(12)에 있는 세포들은 원하지 않는 기계적 파괴를 당하지 않고 시장 운동을 따른다. 도 1의 부분 이미지(A) 및 부분 이미지(B)는 주위 세포 부유물(81)로부터 세포(21)의 단일 층이 어떻게 이완된 도구 몸체의 표면(12)에서 초기에 성장하는 방법을 도시한 것이다. 표면(12)을 확대하는 것에 의하여, 세포 단일 층(20)을 확대하기 위한 공간은 연속적으로 확장이 된다.

다른 세포 형태들(22, 23)을 외부 매개물 및/또는 내부 매개물에 추가하는 것에 의하여, 부분 이미지(C)에서 개략적으로 예시된 것처럼 유연한 조직 형태 세포층들이 생성될 수 있다.

도 2는 세 개의 서로 다른 팽창 상태에 있는 속이 빈 몸체(11)의 내부 표면(14)에서 세포물질(20)의 배양을 도시한 것이다. 공동(31)은 압력 라인(13)을 통해 압력 원(30)의 액체 저장소로부터 세포 부유물로 채워진다. 점착성 성장 세포들(예를 들어, 섬유 모세포, 매크로파지 또는 종양 세포)은 활발하게 내부 표면(14)에 집락을 형성한다(colonize). 많은 형태의 세포를 위하여 기질 표면이 완전히 덮이는 경우 접촉 억제가 일어난다. 이것은 단일 층이 형성되자마자 추가적인 재생성이 종료가 된다는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 도구 표면의 신장을 통하여, 이러한 과정은 목표로 된 방법에 따라 제어될 수 있다.

도 2에서 가장 크게 신장이 된 변형 형태로 도시된 것처럼, 내부(31)는 순차적으로 또는 동시에 서로 다른 형태의 세포로 채워지고, 이로 인하여 세포물질의 형성에 참여하는 세포의 형태에 해당하는 기능을 가지는 조직과 유사한 세포물질이 생성된다. 또한 이러한 변형 형태에서 내부(31)는 외부 매개물(81)과 전기-생리학적 접촉 상태에 있을 수 있다.

도 3은 모세관 형상의 도구(10)의 반지름 방향의 팽창 운동의 실시 예를 도시한 것이고, 그리고 도구의 몸체(11)는 탄성 소재(플라스틱, 고무와 같은) 또는 비탄성 팽창 가능한 소재(서로에 대하여 치환 가능한 강철이나 플라스틱 또는 이와 유사한 것으로 만들어진 얇은 막과 같은)로 만들어진다. 도구(10)의 속이 빈 채널(31)에서 압력 상승에 의하여, 채널의 직경이 팽창이 될 수 있고, 그리고 세포의 손상 없는 이동이 발생한다. 도구 몸체(11)의 직경은 위에서 기술한 진행 속도로 확대가 된다.

도 4 및 도 5는 다수의 형성 요소(15)를 가지는 조작 도구(10)를 예시한 것이고, 그리고 조작 도구의 각각은 베이스 부분(도시되지 않음)에 부착된 설정 장치(30)를 이용하여 개별적으로 대체가 가능하다. 각각의 형성 요소(15)는 상단(top)(16)을 가지는 입방체 모양을 가진다. 상단(16)의 총 수 또는 그 위에 위치하는 적어도 유연한 층으로 된 커버 요소(17)(도 5 참조)는 세포 물질(20)의 모양을 형성하기 위하여 사용되는 조작 도구(10)의 표면(12)을 형성한다. 형성 요소(15)는 도구 몸체를 형성한다. 상단(16)은 0.01 mm 내지 5 mm까지 범위에서 전형적인 크기를 가진다. 형성 요소(15)는 상단(16)이 선형의 행과 열로 만들어진 매트릭스 배열을 형성하도록 방향이 정해진다. 베이스 부분과 관련된 형성 요소(15)의 이동이 예를 들어 위치 설정 모터 또는 압전기 구동(piezoelectric drives)을 이용하여 실행된다. 도구 표면은 형성 요소(15)의 선택된 추진에 의존하여 구성된다. 개별적 형성 요소(15)는 예를 들어 세포물질에 구멍(holes)을 형성하기 위해 설정 장치(30)로부터 분리 가능할 수 있다.

커버 요소(17)는 도구 표면이 국부적으로 매끄러워지고 세포물질을 도구로부터 제거하는 것이 용이하도록 만든다는 이점이 가진다. 예를 들어 커버 요소(17)는 모든 형성 요소(15)에 걸쳐서 연장이 되고 그리고 그 위쪽에 세포들이 위치되는 필름(폴리우레탄과 같은) 또는 막(membrane)을 포함한다. 대안으로 형성 요소들(15)이 단지 하나 또는 그 이상의 부분적인 그룹에 걸쳐서 연장이 되는 하나 또는 그 이상의 커버 요소(17)가 제공될 수 있다. 형성 요소(15)의 일부 또는 모든 상단(16)에 커버 요소(17)의 제거 가능한 접착이 제공될 수 있다.

커버 요소(17)는 하나 또는 그 이상의 층에 합성 중합체 물질 및/또는 키틴이나 뼈 기질 물질과 같이 생물 유기체에서 자연적으로 발생하는 물질로 만들어질 수 있다. 커버 요소(17)는 또한 일부 영역에서 생물학적 세포의 점착성 접착을 촉진하고 그리고 다른 영역에서는 점착성 접착을 차단하는 구조화된 코팅을 수행할 수 있다.

세포물질의 본 발명에 따르는 생산을 위하여, 세포물질은 먼저 도구 표면(12), 즉 상단(16) 또는 연결 커버 요소(17)의 전체에 위치하게 된다. 이러한 목적을 위하여, 예를 들어 배지 용기(82)에서 배양 매개물(81)로부터의 성장(도 5 참조)이 제공된다. 명확성을 위하여, 단지 개별적인 세포(21)들만이 도 4에 도시되어 있다. 조작 도구(10)의 표면은 형성 요소(15)를 특히 원하는 위치 내로 진행시키는 것에 의하여 그 후에 조정이 된다. 이러한 진행은 위에서 언급한 생리학적 기준 속도로 이루어지고, 이로 인하여 세포물질의 변형과정에서 세포의 손상이 없는 치환 및 재배열이 이루어진다. 이후 세포물질은 조작 도구(10)로부터 분리될 수 있다.

도 4는 또한 형성 요소(15)의 각각의 상단(16)이 특정 위치에서 세포물질을 추가로 수정하기 위하여 서로 다르게 형성될 수 있다는 것을 예시한다. 예를 들어, 미세 구조(도 16a참조)가 상단(16)의 접착 능력을 향상시키기 위해 제공될 수 있거나 또는 피라미드 모양(16b)과 같은 추가적인 구조 요소가 세포물질에서 구조를 만들기 위하여 제공될 수 있다. 추가로, 각각 또는 모든 형성 요소(15)는 접착-강화 코팅(16c)을 수행할 수 있다.

도 6에 도시된 이미지 연속에서 예시되어 있는 것처럼 도 4에 도시된 조작 도구는 대안으로 스탬프 도구로 사용될 수 있다. 부분 이미지(A)에 도시된 시작 상태에서 세포물질(20)은 본 발명에 따른 방법에 따라 변형되는 캐리어(80) 표면에 위치한다. 다수의 대체 가능한 형성 요소(15)를 가지는 조작 도구(10)는 세포물질(20)은 초기의 자유로운 표면 위에 위치가 된다. 이러한 경우 조작 도구(10)는 아래쪽을 가리키는 상단(16)이 세포물질(20)과 접촉할 때까지 세포물질(20)을 향하여 이동이 된다. 부분 이미지(B)에 도시된 것처럼, 이후 조작 도구(10)의 표면(11)은 개별적인 형성 요소(15)의 목표로 된 추진을 통해 조정된다. 진행 운동은 위에서 언급된 생물학적 세포의 생리학적 기준 속도로 실행된다. 각각의 형성 요소(15)는 손상 없이 세포물질에 있는 세포를 치환시킨다.

부분 이미지(C)에 나타난 것처럼, 이후 조작 도구(10)는 제거된다. 도구의 표면 모양은 세포물질(10)에서 상보적인 구조로 존재하여 유지된다. 조작 도구(10)를 세포물질(20)로부터 분리하는 것을 쉽게 하기 위하여 형성 요소(15)의 상단(16)에 세포의 접착이 억제되는 코팅이 제공될 수 있다. 코팅은 예를 들어 중합체 폴리 헤마(polymer Polyhema)를 사용하여 실행된다. 최종적으로 세포물질 내부로 도입된 껍은 부분 이미지(D)에 나타난 것처럼 다른 세포나 합성 기질 물질(25)로 채워질 수 있다.

모양 및 세포물질에 제공되는 것이 가능한 세포 또는 첨가물(20)들은 조직 공학의 영역에서 현실적인 과제에 따라 선택된다. 예를 들어 도 6에 나타난 순서를 이용하여 미리 정의된 구조를 가지는 상피 세포가 조직 세포에 연결될 수 있다.

위에서 기술된 내용, 청구항 및 도면에서 개시된 본 발명의 특징은 다양한 실시 예로 본 발명의 실시를 위해 개별적으로 또는 결합하는 양쪽으로 중요할 수 있다.

산업상 이용 가능성

본 발명은 미리 정의된 각 세포의 기하학적 배열을 가지는 세포물질을 형성하기 위한 향상된 방법을 제공하여 종래 방법의 단점을 극복한다. 본 발명에 따른 방법은 특히 각 세포를 손상시키는 지 않고 세포 물질의 모양을 형성하고 및/또는 세포를 생성할 수 있도록 한다. 본 발명에 따라 이러한 형태의 방법을 실행하기 위한 향상된 조작 도구가 제공되어 종래의 세포 또는 조직 공학의 단점이 극복된다. 본 발명은 모양 형성, 배지 또는 세포 물질의 생성의 새로운 응용을 구체적으로 개시한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

미리 정의된 기하학적 배치를 가지는 다수 개의 생물학적 세포를 가지는 생물 세포를 생산하기 위한 방법에 있어서,

- 표면이 적어도 부분적으로 세포물질과 접촉하는 도구 몸체를 가지는 조작 도구(10)를 제공하는 단계; 및

- 세포의 기하학적 배치가 변경되는 방법으로 표면의 기하학적 특성의 변화를 이용하여 조작 도구(10)를 조정하는 단계를 특징으로 하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 조작 도구(10)의 조정은 세포의 생리학적 기준 속도보다 더 작거나 동일한 진행 속도에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제2항에 있어서, 조작 도구(10)의 조정이 0.1 $\mu\text{m}/\text{h}$ 내지 1 mm/h 범위의 진행 속도에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제1항 내지 제 3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조작 도구(10)가 조정되는 동안 조작 도구(10)의 표면이 확대되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 조작 도구(10)는 조정 과정에서 신축되는 탄성 소재를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제4항에 있어서, 조작 도구(10)는 조정 과정에서 팽창이 되는 비탄성 소재를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제5항 또는 제6항에 있어서, 조작 도구(10)가 조정 과정에서 확장되는 내부(31)를 가지는 속이 빈 몸체(11)를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제7항에 있어서, 세포물질이 속이 빈 몸체(11) 위 및/또는 속이 빈 몸체의 내부(31)에 외부적으로 위치되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제8항에 있어서, 표면의 조정 과정에서 각각의 세포 또는 세포 그룹이 표면(12,14) 및/또는 속이 빈 몸체에 외부적으로 접촉하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제7항 또는 제8항에 있어서, 세포물질이 속이 빈 몸체(11) 위 및/또는 내부에 외부적으로 다른 형태의 세포들로 만들어진 층들에 위치되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제7항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 내부(31)는 속이 빈 몸체(11)를 조정하기 위해 압력 라인(13)을 통해 적용되는 압력을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제11항에 있어서, 세포 부유물이 속이 빈 몸체(11)를 조정하기 위해 내부로 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

제7항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 속이 빈 몸체(11)의 내부 및 환경 사이에 질량 전달이 발생하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제4항에 있어서, 도구 몸체가 적어도 하나의 형성 요소(15)를 포함하고, 그리고 형성 요소는 조작 도구(10)의 조정 과정에서 이동이 되고, 이로 인하여 표면(12)의 모양이 변하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제14항에 있어서, 도구 몸체가 다수의 형성 요소(15)를 포함하고, 그리고 형성 요소는 조작 도구의 조정 과정에서 이동이 되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 조작 도구(10)의 이동 과정에서 표면 (12) 및/또는 형성 요소(15)는 적어도 부분적으로 세포 물질 내로 밀어 넣어지고 그리고 조작 도구(10)의 표면(12)의 흔적 모양(imprint shape)이 세포물질 (20)에 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제16항에 있어서, 다른 세포 또는 합성 기질 물질(25)이 세포물질(20) 표면에 위치되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제1항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포물질(20)은 생물학적 세포 또는 생물학적 세포 및 기질 물질로 만들어진 복합 물질을 포함하는 방법.

청구항 19.

제1항 내지 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포(21)의 기하학적 배치가 동물이나 사람의 기관 외부에서 조작 도구(10)를 사용하여 변화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

미리 정의된 기하학적 배열을 가진 다수의 생물 세포(21)를 가지는 세포 물질(20)을 생산하기 위한 조작 도구(10)에 있어서,

- 적어도 하나의 표면(12,14)을 가지는 도구 몸체(11) 및
- 도구 몸체(11)를 조정하고, 이로 인하여 표면(12)의 기하학적 성질이 변화도록 하는 설정 장치(30)를 포함하는 조작 도구.

청구항 21.

제20항에 있어서, 상기 설정 장치(30)는 세포(21)의 생리학적 기준 속도와 동일하거나 더 작은 진행 속도에서 도구 몸체(11)를 조정하기 위해 설치되는 것을 특징으로 하는 조작 도구.

청구항 22.

제21항에 있어서, 상기 설정 장치는 0.1 $\mu\text{m}/\text{h}$ 내지 1 mm/h 범위의 진행 속도에서 도구 몸체(11)를 조정하기 위해 설치되는 것을 특징으로 하는 조작 도구.

청구항 23.

제20항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 도구 몸체(11)의 표면(12)은 조정 과정에서 확대가 되는 목적으로 설치되는 것을 특징으로 하는 조작 도구.

청구항 24.

제23항에 있어서, 상기 도구 몸체(11)는 가 탄성 물질을 가지는 것을 특징으로 하는 조작 도구.

청구항 25.

제23항에 있어서, 상기 도구 몸체(11)가 비탄성이고 팽창할 수 있는 물질을 가지는 것을 특징으로 하는 조작 도구.

청구항 26.

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 도구 몸체가 조정 과정에서 확대되는 내부(31)를 가지는 속이 빈 몸체(11)를 포함하는 조작 도구.

청구항 27.

제26항에 있어서, 속이 빈 몸체(11)는 압력 라인(13)을 통해 압력 원(30)과 연결되는 것을 특징으로 하는 조작 도구.

청구항 28.

제23항에 있어서, 도구 몸체(11)는 적어도 하나의 대체가 가능한 형성 요소(15)를 포함하는 조작 도구.

청구항 29.

제28항에 있어서, 도구 몸체(11)는 매트릭스 내에서 선형 행 및 열에 위치하는 다수 개의 대체 가능한 형성 요소(15)를 포함하는 조작 도구.

청구항 30.

제28항 또는 제29항에 있어서, 표면(12)을 형성하는 적어도 하나의 표면 요소(17)는 형성 요소(15) 위에 위치하는 것을 특징으로 하는 조작 장치.

청구항 31.

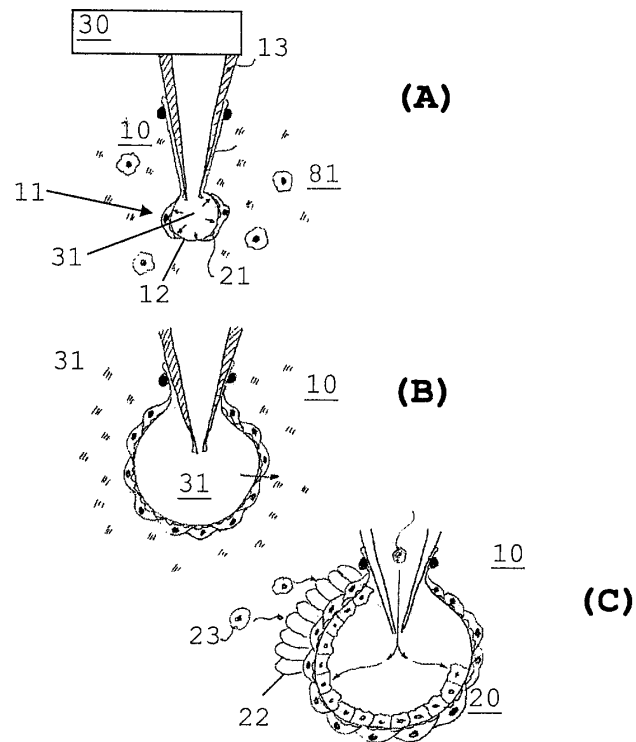
제20항 내지 제30항 중 어느 하나의 항에 있어서, 생물학적 세포의 점착성 접착을 촉진하는 구조 또는 코팅이 표면(12)에 제공되는 것을 특징으로 하는 조작 장치.

청구항 32.

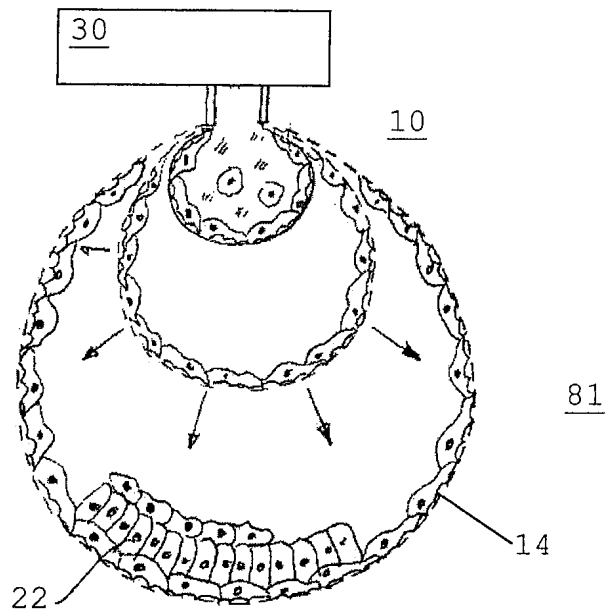
제20항 내지 제31항 중 어느 하나의 항에 있어서, 생물학적 세포의 점착성 접착을 방해하는 구조 또는 코팅이 표면(12)에 제공되는 것을 특징으로 하는 조작 장치.

도면

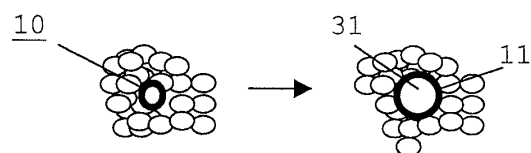
도면1



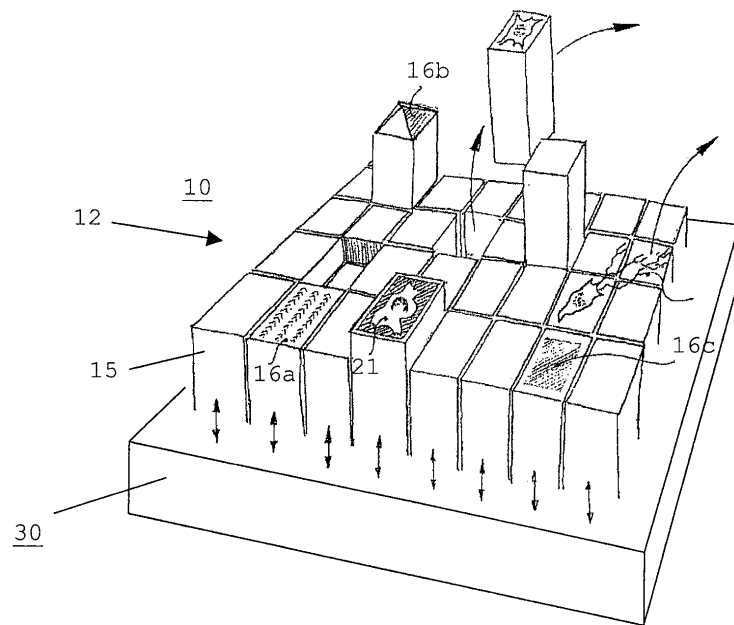
도면2



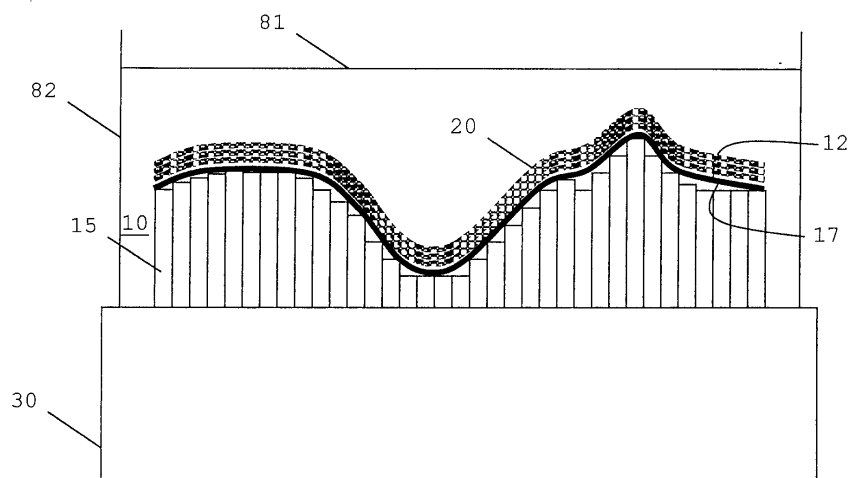
도면3



도면4



도면5



도면6

