

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2018년 3월 15일 (15.03.2018)



(10) 국제공개번호

WO 2018/048181 A2

(51) 국제특허분류:

C12M 1/32 (2006.01)

C12M 1/06 (2006.01)

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/009734

(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).

(22) 국제출원일:

2017년 9월 6일 (06.09.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0114379 2016년 9월 6일 (06.09.2016) KR

(71) 출원인: 한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

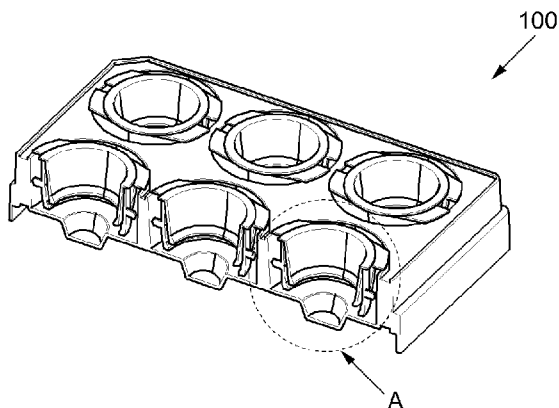
(72) 발명자: 강선웅 (KANG, Sun Woong); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 한상수 (HAN, Sang Soo); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 정초록 (JUNG, Cho Rok); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 정경숙 (CHUNG, Kyung Sook); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인(유)화우 (YOON & YANG (IP) LLC); 06175 서울시 강남구 테헤란로108길 11, 4층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 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,

(54) Title: CELL CULTURE RECEPTACLE

(54) 발명의 명칭: 세포 배양 용기



(57) Abstract: A cell culture receptacle according to the present invention comprises: a first receptacle having a mixing member disposed therein; and a second receptacle which is configured to be inserted in the first receptacle and has a hole through which a solvent received in the first receptacle flows into the second receptacle, wherein the mixing member is disposed in a recess portion formed in the first receptacle.

(57) 요약서: 본 발명에 따른 세포 배양 용기는 교반 부재가 배치되는 제1 용기 및 상기 제1 용기 내부에 삽입되도록 이루어지며 상기 제1 용기에 수용된 용매가 내부로 통과하도록 홀을 구비하는 제2 용기를 포함하며, 상기 교반 부재는 상기 제1 용기에 형성된 리세스부에 배치되는 것을 특징으로 한다.



WO 2018/048181 A2

명세서

발명의 명칭: 세포 배양 용기

기술분야

- [1] 본 발명은 부착 및 부유 배양이 가능한 세포 배양 용기에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 현재 질병의 치료에 배양 세포들을 이용하는 세포 치료가 확대됨에 따라 세포 배양에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 시험관 내 배양을 위해서는 체내와 유사한 배양 환경을 제공하기 위한 다양한 배양 기기 및 조건을 필요로 한다.
- [3] 이에 있어서 중요한 요소 중의 하나가 세포배양용기이다. 이와 같이 인공적으로 배양하는 세포들은 부착(adhesion) 또는 부유(suspension) 상태로 성장한다. 동물세포의 경우 혈액계 세포 등을 제외한 대부분의 세포들은 부착 상태로 성장한다. 이러한 부착배양 세포들은 부착성을 증가시키기 위한 세포외 기질성분(extracellular matrix components)이 코팅된 조직 배양 접시와 같은 표면을 필요로 한다.
- [4] 종래의 세포 배양 용기는 부유 배양시 세포액을 계속 교반시키기 위하여 교반 부재를 구비한다. 그러나 이러한 교반 부재는 세포 배양 용기의 밑면에 돌출되어 배치되어 부유 배양시 세포가 부유되는 공간을 감소시킨다. 또한, 세포 배양 용기의 밑면에는 세포의 부착이 일어나지 않아 부착 배양의 효율을 감소시킨다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 실시예에 따른 일 예시적 목적은, 부착 및 부유 배양의 효율성을 증가시키는 세포 배양 용기를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [6] 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양 용기는 교반 부재가 배치되는 제1용기 및 상기 제1용기 내부에 삽입되도록 이루어지며 상기 제1용기에 수용된 용매가 내부로 통하도록 홀을 구비하는 제2용기를 포함하며, 상기 교반 부재는 상기 제1용기에 형성된 리세스부에 배치되는 것을 특징으로 한다.
- [7] 실시예에 있어서, 상기 리세스부의 면적은, 상기 교반 부재를 상기 리세스부에 충분히 수용하는 동시에 상기 제1용기의 밑면에 세포 부착이 발생되도록 설정될 수 있다.
- [8] 실시예에 있어서, 상기 리세스부의 면적은 상기 제1용기의 일면의 면적의 70% 이하일 수 있다.
- [9] 실시예에 있어서, 상기 제2용기 내부에는 제3용기가 배치되며 상기 제3용기는 상기 제2용기에 수용된 용매가 내부로 통하도록 홀을 구비할 수 있다.
- [10] 실시예에 있어서, 상기 교반 부재는, 마그네틱 바일 수 있다.
- [11] 실시예에 있어서, 상기 제1용기는 복수 개 구비되며, 상기 복수의 제1용기는

플레이트에 일체로 형성될 수 있다.

- [12] 실시예에 있어서, 상기 제2용기의 상단에는, 상기 제1용기에 걸리도록 이루어지는 걸림부가 형성될 수 있다.

발명의 효과

- [13] 본 발명의 실시예에 의하면, 교반 부재가 세포 배양 용기 내벽에 형성된 리세스부에 배치되므로 상기 내벽을 부착 배양의 공간으로 활용할 수 있다. 따라서, 부착 배양 가능한 세포의 수를 증가시킬 수 있다.
- [14] 또한, 본 발명의 실시예에 의하면, 교반 부재가 상기 리세스부에 배치되므로, 세포가 부유되는 공간을 증가시킬 수 있다. 또한, 교반 부재에 걸리는 세포를 최소화시킬 수 있다. 따라서 부유 배양의 효율성을 증가시킬 수 있다.
- [15] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양 용기는 실험실에서 주로 사용하는 6-well, 12-well, 24-well 플레이트에 모두 적용 가능하며 소량으로 세포 배양하는데 적용 가능하다.
- [16] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양 용기는 공배양, direct/indirect culture, 3D culture법에 모두 적용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 본 발명의 실시예와 관련된 세포 배양 용기의 사시도이다.
- [18] 도 2는 도 1에 표시된 A부분의 확대도이다.
- [19] 도 3은 세포 배양 용기의 단면도이다.
- [20] 도 4a 및 도 4b는 본 발명의 실시예와 관련된 제2 및 제3용기를 각각 도시한 도이다.
- [21] 도 5a 내지 도 5f는 본 발명의 실시예와 관련된 세포 배양 용기의 사용상태도이다.
- [22] 도 6a 및 도 6b는 본 실험예에 따른 세포 배양 용기의 용량을 도시하기 위한 도 및 그래프이다.
- [23] 도 7a, 도 7b 및 도 7c는 정적인 배양조건에서 트립판-블루 염색시약을 이용한 샘플 1, 샘플 2 및 샘플 3의 배지의 순환 정도를 나타낸 도이다.
- [24] 도 8은 샘플 1 내지 3에서 용기의 벽면을 따라 트립판-블루 염색시약을 10 μ l 주입한 후, 동적인 배양조건에서 0분(직후), 1분 및 5분 후에 순환된 배지를 나타낸 도이다.
- [25] 도 9 내지 도 11은 동적인 배양조건에서 트랜스웰이 삽입된 샘플 1 내지 샘플 3의 트립판-블루 염색시약을 이용한 배지의 순환을 나타내는 도이다.
- [26] 도 12a 및 도 12b는 콜라겐 스폰지를 통해 3차원으로 배양한 조직의 세포증식 및 Live-dead assay로 생존확인을 나타낸 도이다.
- [27] 도 13a 및 도 13b는 Cytodex 3을 통해 2차원 대량 배양한 HepG2 세포증식 및 Live-dead assay로 생존확인을 나타낸 도이다.
- [28] 도 14는 콜라겐 스폰지를 통해 배양한 HepG2 세포 증식과 관련된 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [29] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 명세서에 개시된 실시 예를 상세히 설명하되, 동일하거나 유사한 구성요소에는 동일한 도면 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 이하의 설명에서 사용되는 구성요소에 대한 접미사 "모듈" 및 "부"는 명세서 작성의 용이함만이 고려되어 부여되거나 혼용되는 것으로서, 그 자체로 서로 구별되는 의미 또는 역할을 갖는 것은 아니다. 또한, 본 명세서에 개시된 실시 예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 명세서에 개시된 실시 예의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다. 또한, 첨부된 도면은 본 명세서에 개시된 실시 예를 쉽게 이해할 수 있도록 하기 위한 것일 뿐, 첨부된 도면에 의해 본 명세서에 개시된 기술적 사상이 제한되지 않으며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [30] 제1, 제2 등과 같이 서수를 포함하는 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성요소들은 상기 용어들에 의해 한정되지는 않는다. 상기 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다.
- [31] 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "연결되어" 있다거나 "접속되어" 있다고 언급된 때에는, 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되어 있거나 또는 접속되어 있을 수도 있지만, 중간에 다른 구성요소가 존재할 수도 있다고 이해되어야 할 것이다. 반면에, 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "직접 연결되어" 있다거나 "직접 접속되어" 있다고 언급된 때에는, 중간에 다른 구성요소가 존재하지 않는 것으로 이해되어야 할 것이다.
- [32] 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.
- [33] 본 출원에서, "포함한다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [34] 이하에서는, 도면을 참조하여 본 발명과 관련된 세포 배양 용기에 대하여 자세히 설명하도록 한다.
- [35] 도 1은 본 발명의 실시예와 관련된 세포 배양 용기의 사시도이며, 도 2는 도 1에 표시된 A부분의 확대도이다. 또한, 도 3은 도 1에 표시된 B-B 선을 따라 취한 단면도이다.
- [36] 도 1을 참조하면, 세포 배양 용기(100)는 제1 및 제2용기(110, 120)를 포함할 수 있다.

- [37] 제1용기(110)는 세포 배양 용기(100)의 플레이트를 이루는 부분이다.
- [38] 보다 구체적으로, 하나의 플레이트는 복수의 제1용기(110)가 일체로 형성될 수 있다. 다시 말해 하나의 플레이트는 6, 12, 24개의 제1용기(110)를 포함할 수 있다. 도면에서는, 하나의 플레이트가 6개의 제1용기(110)를 포함한 예를 도시하나, 본 발명은 이에 한정되지 않는다.
- [39] 다른 실시예로서, 상기 제1용기는 웰 타입 뿐 아니라 multi-insert dish와 같은 dish 타입의 용기일 수 있다. 또는, 하나의 웰 (또는 dish)에 복수의 insert가 들어가는 형태일 수도 있다.
- [40] 또한, 이러한 제1용기(110)는 플레이트상에 다양한 형태로 배열될 수 있다. 도면에서는, 매트릭스 형태로 배열된 예만을 도시하나 본 발명은 이에 한정되지 않고, 동심원 형태 등 다양한 형태로 배열될 수 있다.
- [41] 제1용기(110) 내부에는 교반 부재(140)가 배치된다.
- [42] 교반 부재는, 마그네틱 바(Magnetic Stirrer)로 이루어질 수 있다. 마그네틱 바는 자성을 띠는 물질로 이루어질 수 있다. 이러한 교반 부재는 상기 제1용기(110) 외부상에서 인가되는 자기장의 영향으로 회전하도록 이루어질 수 있다.
- [43] 제1용기(110) 내부에는 리세스부(111)가 배치될 수 있다. 이러한 리세스부(111)는 제1용기(110)를 한정하는 복수의 내벽 중 어느 하나에 형성될 수 있다.
- [44] 예를 들어, 상기 리세스부(111)는 제1용기(110)의 밑면에 형성될 수 있다. 즉, 리세스부(111)는 제1용기(110)의 밑면에서 제1용기(110)의 외측을 향하는 방향으로 리세스되어 이루어질 수 있다.
- [45] 한편, 상기 리세스부는 함몰부라고 지칭될 수도 있다.
- [46] 리세스부(111)의 면적은 상기 제1용기(110)의 일면(예를 들어, 밑면)의 면적의 70% 이하일 수 있다. 이러한 리세스부(111)의 면적은, 마그네틱 바를 리세스부(111)에 충분히 수용하는 동시에 제1용기의 밑면에 세포 부착이 발생되게 할 수 있다. 한편, 상기 제1용기의 밑면의 직경은 아래 표와 같을 수 있다.

[47] [표1]

제품	6 well	12 well	24 well	35 mm	60 mm
바닥직경(m m)	35	21.9	15.5	35	52.8

- [48] 한편, 리세스부(111)의 높이는 세포 배양 용기의 제조 방식, 인서트 체결시 여유공간 및 웰 플레이트의 내부 용량을 고려하여 설계될 수 있다. 예를 들어 인서트 길이조절 등을 감안하면 6 well 기준으로, 상기 리세스부의 높이는, 약 20 내지 25 mm 일 수 있다.
- [49] 보다 구체적으로, 리세스부(111)는, 제1 및 제2면(111a, 111b)을 포함할 수 있다. 제1 및 제2면(111a, 111b)은 서로 연결된다. 제1면(111a)은 상기 제1용기(110)의

- 밀면과 대체로 교차하도록 이루어질 수 있다. 제2면(111b)은 상기 제1용기(110)의 밀면과 대체로 평행하도록 이루어질 수 있다.
- [50] 앞서 설명한 교반 부재는, 상기 리세스부(111)의 제2면(111b)상에 배치될 수 있다. 보다 구체적으로, 마그네틱 바는 길이 방향이 상기 제2면(111b)과 평행하도록 제2면(111b)상에 배치된다. 마그네틱 바는 중양을 축으로 하여 회전되며, 상기 마그네틱 바의 회전면은 제2면(111b)과 대체로 평행할 수 있다.
- [51] 도 2를 참조하면, 제2용기(120)는 제1용기(110) 내부에 삽입되도록 이루어질 수 있다. 이때, 제2용기(120)와 제1용기(110)의 밀면이 서로 접하지 않도록, 제2용기(120)의 높이는 제1용기(110)의 높이보다 작게 이루어질 수 있다.
- [52] 이러한 구조에 의하여 제1 및 제2용기(110, 120)의 밀면 사이가 이루는 공간은 부유 배양이 이루어지는 공간으로 활용될 수 있으며 이는 추후에 도 5를 참조하여 구체적으로 설명한다.
- [53] 제2용기(120)의 상단에는 제1용기(110)에 걸리도록 이루어지는 걸림부(121)가 형성될 수 있다. 상기 걸림부(121)가 제1용기(110)에 걸리도록 이루어짐에 따라, 제1 및 제2용기(110, 120)의 상단이 대체로 동일면상에 배치될 수 있다.
- [54] 도 4a를 참조하면, 상기 제2용기(120)는 상기 제1용기(110)에 수용된 용매가 내부로 통하도록 홀(122)을 구비할 수 있다. 구체적으로, 복수의 홀(122)이 제2용기의 밀면 및 측면 중 적어도 하나에 골고루 형성될 수 있다.
- [55] 예를 들어, 도 3은 복수의 홀이 제2용기의 밀면에 분포된 것을 도시하며, 도 4a는 복수의 홀이 제2용기의 측면에 분포된 것을 도시한다.
- [56] 상기 홀의 직경은 약 0.4 내지 8 μm 이고, 밀도는 약 $10^5 \sim 10^8$ 개/ cm^2 의 일 수 있다.
- [57] 또는, 상기 제2용기의 적어도 일부는 멤브레인(membrane) 또는 메쉬(mesh)로 이루어질 수 있다.
- [58] 한편, 세포 배양 용기는 제3용기(130)를 더 포함할 수 있다. 상기 제3용기(130)는 제2용기(120) 내부에 배치되도록 이루어진다. 다시 말해, 제3용기(130)는 제2용기(120)의 폭과 높이보다 작게 이루어질 수 있다.
- [59] 도 4b를 참조하면, 상기 제3용기(130)는 상기 제2용기(120)에 수용된 용매가 내부로 통하도록 홀(132)을 구비할 수 있다. 구체적으로, 복수의 홀(132)이 제3용기의 밀면 및 측면 중 적어도 하나에 골고루 형성될 수 있다.
- [60] 또는, 상기 제3용기(130)의 적어도 일부는 멤브레인(membrane) 또는 메쉬(mesh)로 이루어질 수 있다. 한편, 도 4b에서는, 제3용기(130)는 바닥면이 존재하지 않고 측면에만 홀들이 형성되는 것이 도시되나 본 발명은 이에 한정되지 않는다. 즉, 제3용기(130)는 바닥면이 존재하고 상기 바닥면에 홀들이 형성될 수 있다(도 3 참조).
- [61] 한편, 제2용기(120)에 형성된 홀의 크기는 제3용기(130)에 형성된 홀의 크기와 다를 수 있다. 이와 같은 구조에 의하여 제2 및 제3용기(130) 중 어느 하나에는 다른 하나에 포함되지 않은 세포를 포함할 수 있다.
- [62] 또한, 제3용기(130)의 상단에는 제2용기(120)에 걸리도록 이루어지는

걸림부(131)가 형성될 수 있다. 상기 걸림부(131)가 제2용기(120)에 걸리도록 이루어짐에 따라, 제2 및 제3용기(120, 130)의 상단이 대체로 동일면상에 배치될 수 있다.

[63] 도 5a 내지 도 5f는 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양 용기의 사용상태도이다.

[64] 이하에서는, 제1 내지 제4세포를 예로 들어 설명한다. 제1 내지 제4세포 중 적어도 어느 하나는 Hepatocytes growing on Cytodex일 수 있다.

[65] 도 5a는 세포 배양 용기의 제2용기(120)의 바닥면의 하부에 세포가 부착되어 배양되는 것을 도시한다.

[66] 도 5b는 세포 배양 용기의 제2용기(120)의 바닥면의 상부에 세포가 부착되어 배양되는 것을 도시한다.

[67] 도 5c는 세포 배양 용기의 제2용기(120)의 바닥면의 상부 및 하부에 동시에 세포가 부착되어 배양되는 것을 도시한다.

[68] 도 5c에서 상기 제2용기(120)의 바닥면의 상부에 부착된 세포는 제1세포(210)이고, 하부에 부착된 세포는 제2세포(220)일 수 있다. 이때, 제1세포(210)는 제2용기(120) 내부에 수용되어 있고, 제2세포(220)는 제1용기(110) 내부에 수용되어 있을 수 있다.

[69] 도 5d는 세포 배양 용기의 제1 내지 제3용기(110, 120, 130)의 바닥면에는 제1 내지 제3세포(210, 220, 230) 중 적어도 하나가 부착되어 배양되는 것을 도시한다.

[70] 제1용기(110)의 바닥면에 제2세포(220)가 부착되고, 제2용기(120)의 바닥면에는 제1세포(210)가 부착되며, 제3용기(130)의 바닥면에는 제3세포(230)가 부착되어 배양되는 것이 도시된다.

[71] 도 5e는 제2용기(120) 내부에 제4세포(240)가 부유되어 배양되는 것을 도시한다.

[72] 도 5f는 제2용기(120) 내부에 제4세포(240)가 부유되어 배양되고 제2용기(120)의 바닥면에 제2세포(220)가 부착되어 배양되는 것을 도시한다.

[73] 본 발명의 실시예에서는, 교반 부재(140)가 세포 배양 용기 내벽에 형성된 리세스부(111)에 배치되므로 상기 내벽을 부착 배양의 공간으로 활용할 수 있다. 따라서, 부착 배양 가능한 세포의 수를 증가시킬 수 있다.

[74] 또한, 본 발명의 실시예에서는, 교반 부재(140)가 상기 리세스부(111)에 배치되므로, 세포가 부유되는 공간을 증가시킬 수 있다. 또한, 교반 부재에 걸리는 세포를 최소화시킬 수 있다. 따라서 부유 배양의 효율성을 증가시킬 수 있다.

[75] 한편, 상기와 같은 세포 배양 용기는 위에서 설명된 실시예들의 구성과 방법에 한정되는 것이 아니라, 상기 실시예들은 다양한 변형이 이루어질 수 있도록 각 실시예들의 전부 또는 일부가 선택적으로 조합되어 구성될 수도 있다.

[76] 실험예

[77] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기를 이용하여 세포의 증식량을 확인하였다.

- [78] 도 6a 및 도 6b는 본 실험예에 따른 세포 배양 용기의 용량을 도시하기 위한 도 및 그래프이다.
- [79] 도 6a의 (a), (b) 및 (c)는 60mm의 같은 직경을 갖는 세포 배양 용기를 각각 도시한다. 도 6a의 (a), (b) 및 (c)에 도시된 각각의 세포 배양 용기는 25mm, 20mm 및 15mm의 서로 다른 높이를 갖는다. 또한, 도 6a의 (a), (b) 및 (c)에 도시된 각각의 세포 배양 용기에는 10mm, 20mm 및 20mm의 지름을 갖는 리세스부가 형성되며, 상기 리세스부 내에는 교반 부재가 배치된다.
- [80] 도 6b를 참조하면, 도 6a의 (a), (b) 및 (c)의 세포 배양 용기에서 운용하는 배지의 용량이 도시된다. 도 6a의 (a), (b) 및 (c)의 용기에서 배지는 30ml, 20ml 및 15ml의 용량으로 운용되었다.
- [81] 이하에서는, 전술한 각각의 배지 용량으로 운용되는 도 6a의 (a), (b) 및 (c)에 도시된 세포 배양 용기를 샘플 1, 샘플 2 및 샘플 3(S1, S2, S3)이라 명명할 수 있다.
- [82] 도 7a, 도 7b 및 도 7c는 정적인 배양조건에서 트립판-블루 염색시약을 이용한 샘플 1, 샘플 2 및 샘플 3의 배지의 순환 정도를 나타낸 도이다.
- [83] 정적인 배양조건에서는, 교반 부재가 회전되지 않는다.
- [84] 도 7a의 (a), (b) 및 (c)는 샘플 1에서 용기의 벽면을 따라 트립판-블루 염색시약을 10 μ l 주입한 후, 교반 하지 않는 정적인 조건에서 1분, 5분 및 10분 후에 순환된 트립판-블루 염색시약을 나타낸 도이다.
- [85] 도 7b의 (a), (b) 및 (c)는 샘플 2에서 용기의 벽면을 따라 트립판-블루 염색시약을 10 μ l 주입한 후, 교반 하지 않는 정적인 조건에서 1분, 5분 및 10분 후에 순환된 트립판-블루 염색시약을 나타낸 도이다.
- [86] 도 7c의 (a), (b) 및 (c)는 샘플 3에서 용기의 벽면을 따라 트립판-블루 염색시약을 10 μ l 주입한 후, 교반 하지 않는 정적인 조건에서 1분, 5분 및 10분 후에 순환된 트립판-블루 염색시약을 나타낸 도이다.
- [87] 도 7a, 도 7b 및 도 7c 모두에서, 시간이 흐름에 따라 트립판-블루 염색시약이 보다 넓은 영역으로 확산되는 것을 확인하였다.
- [88] 도 8의 (a), (b) 및 (c)는 샘플 1 내지 3에서 용기의 벽면을 따라 트립판-블루 염색시약을 10 μ l 주입한 후, 동적인 배양조건에서 0분(직후), 1분 및 5분 후에 순환된 배지를 나타낸 도이다.
- [89] 여기서 동적인 배양조건은 교반 부재가 100rpm으로 교반하는 조건을 의미할 수 있다. 상기 교반 부재는 직경 1cm의 마그네틱 바로 이루어질 수 있다.
- [90] 도 7a 내지 도 7c와 도 8을 비교하면, 정적인 배양조건에서보다 동적인 배양조건에서 트립판-블루 염색시약이 더욱 빠르게 확산됨을 확인할 수 있다. 즉, 동적인 배양 조건에서 배지의 순환이 더욱 활발하게 일어난다.
- [91] 도 9 내지 도 11은 동적인 배양조건에서 트랜스웰(transwell)이 삽입된 샘플 1 내지 샘플 3의 트립판-블루 염색시약을 이용한 배지의 순환을 나타내는 도이다.
- [92] 트랜스웰의 벽면은 멤브레인(membrane)으로 처리하여 배지 교환이

- 용이하도록 구성되며, 바닥면은 세포배양이 가능하도록 구성된다.
- [93] 이때, 1 개의 트랜스웰에 트립판-블루 염색시약을 $10\ \mu\text{l}$ 떨어뜨려 배지의 순환을 관찰하였다. 상기 염색시약을 떨어뜨리고 1시간 동안은 십분 단위로 관찰하였고, 이후부터는 1시간 간격으로 5시간 30분 동안 관찰하였다.
- [94] 도 9 내지 도 11을 비교하면, 세포배양 용기에 운용하는 배지의 용량을 조절하여 트랜스웰 내부 배지의 순환을 조절할 수 있다. 배지의 용량이 적을수록 트랜스웰 내부 배지 순환은 더욱 활발하게 일어난다.
- [95] 도 12a 및 도 12b는 콜라겐 스폰지를 통해 3차원으로 배양한 조직의 세포증식 및 Live-dead assay로 생존확인을 나타낸 도들이다.
- [96] 도 12a는 A 세포의 증식 확인(CCK-8 assay)과 관련된 그래프이다.
- [97] 단계 1: Collacote사의 콜라겐 스폰지를 $2\times 5\times 5\ \text{mm}(\text{wxhxd})$ 의 크기로 절단하여, 1 개의 콜라겐 스폰지에 HepG2 세포를 5×10^4 개/ $10\ \mu\text{l}$ 를 주입하였다.
- [98] 단계 2: 세포가 주입된 콜라겐 스폰지는 3시간 후, 배지 9ml이 들어 있는 Petri 배양 용기로 옮겨 하루 동안 충분히 세포가 스폰지에 부착될 수 있도록 배양하였다.
- [99] 단계 3: 익일 트랜스웰을 삽입한 세포배양용기 중 샘플 3(Sample 3)에 콜라겐 스폰지를 옮겨주고, 정적인 배양환경과 동적인 배양환경(100rpm)으로 각각 나누어 장기간 배양하였다.
- [100] 단계 4: e-tube에 $50\ \mu\text{l}$ 의 세포생존을 확인하는 CCK-8 시약과 $500\ \mu\text{l}$ 의 배양배지 미리 섞어두었다.
- [101] 단계 5: 배양된 콜라겐 스폰지는 포셉으로 집어서 CCK-8시약이 첨가된 혼합배지에 옮겨주어 2시간 배양하였다.
- [102] 단계 6: 96-well plate 에 $100\ \mu\text{l}$ 씩 분주하여, 흡광도 450nm에서 측정하였다.
- [103] 도 12b는 B 세포 생존확인(Live-dead assay)을 나타내는 도이다.
- [104] 도 12b의 (a) 및 (b) 컬럼은 각각 동적인 배양조건 및 정적인 배양조건을 나타낸다.
- [105] 단계 1: 정적인 배양환경과 동적인 배양환경에서 1주, 2주 배양된 3차원 HepG2 세포 조직을 Live-dead assay를 통해, 공촛점형광현미경으로 촬영하였다.
- [106] 단계 2: 살아있는 세포는 녹색형광으로, 죽은 세포는 적색형광으로 발현하여 관찰하였다.
- [107] 단계 3: 콜라겐 스폰지의 두께감이 있으므로, Z-stack 으로 촬영한 후 여러장의 사진을 합쳤다.
- [108] 도 12b의 (a)를 비교하면, 정적인 배양 조건에서보다 동적인 배양조건에서 초기(배양 1일)에 생존된 세포의 수가 많음을 확인할 수 있다.
- [109] 도 12b의 (a) 및 (b)를 비교하면, 정적인 배양조건에서는 콜라겐 스폰지의 가운데 부분보다 바닥면쪽으로 세포가 몰려있는 반면, 동적인 배양 조건에서는 가운데 부분과 바닥면 모두 골고루 세포가 분포되어 있는 것을 확인할 수 있다. 이는 정적인 배양 조건에서보다 동적인 배양조건에서 3D 배양을 위한 콜라겐

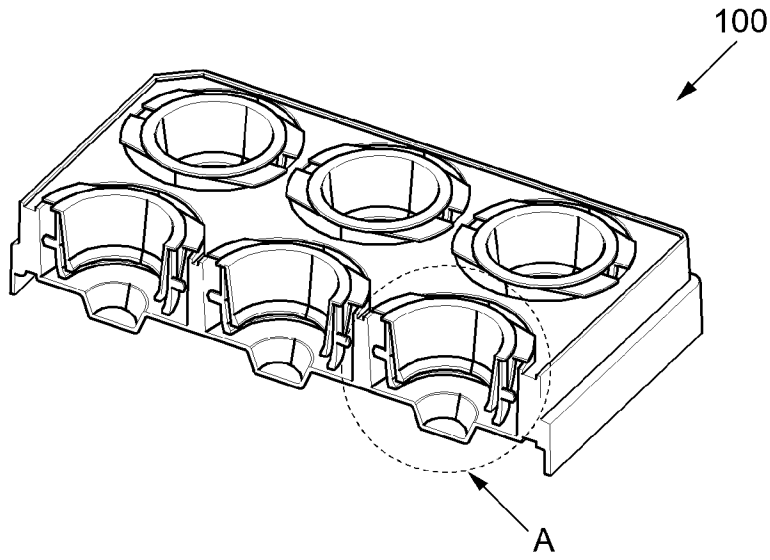
- 스폰지에서 성장한 세포의 분포가 고르게 성장한 것을 확인할 수 있다.
- [110] 도 13a 및 도 13b는 Cytodex 3을 통해 2차원 대량 배양한 HepG2 세포증식 및 Live-dead assay로 생존확인을 나타낸 도이다.
- [111] 도 13a는 A 세포의 증식 확인(CCK-8 assay)과 관련된 그래프이다.
- [112] 단계 1: 샘플 2에 트랜스웰을 삽입하고, 각 웰(well)당 20mg의 Ge healthcare사의 Cytodex 3과 HepG2 세포 5×10^4 개의 세포를 혼합하여 주입하였다.
- [113] 단계 2: 정적인 배양조건과 동적인 배양조건으로 각각 나누어 장기간 배양하였다. 동적인 배양조건에서는 교반 부재를 100rpm에서 30분 동안 교반하고, 2분간 정지하여 배양하였다.
- [114] 단계 3: e-tube에 $100\mu\text{l}$ 의 세포생존을 확인하는 CCK-8 시약과 $900\mu\text{l}$ 의 배양배지 미리 섞어둔다.
- [115] 단계 4: 트랜스웰에서 Cytodex 3에 부착하여 배양된 HepG2 세포를 $100\mu\text{l}$ 를 수득하여 CCK-8 혼합 배지가 들어있는 e-tube에 옮겨준 후 2시간 배양한다.
- [116] 단계 5: e-tube를 잘 섞은 후, HepG2-Cytodex 3를 가라앉힌다.
- [117] 단계 6: 상등액을 96-well plate 에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여, 흡광도 450nm에서 측정하였다.
- [118] 도 13b는 B 세포 생존확인(Live-dead assay)을 나타내는 도이다.
- [119] 도 13의 (a) 및 (b) 컬럼은 각각 동적인 배양조건 및 정적인 배양조건을 나타낸다.
- [120] 단계 1: 정적인 배양환경과 동적인 배양환경에서 1주 배양된 Cytodex 3을 Live-dead assay를 통해, 공초점 형광현미경으로 촬영하였다.
- [121] 단계 2: 살아있는 세포는 녹색형광으로, 죽은 세포는 적색형광으로 발현하여 관찰하였다.
- [122] 단계 3: Z-stack 으로 촬영한 후 여러 장의 사진을 합쳤다.
- [123] 도 13b의 (a) 및 (b)를 비교하면, 정적인 배양 조건에서보다 동적인 배양조건에서 생존된 세포의 수가 많음을 확인할 수 있다.
- [124] 도 14는 콜라겐 스폰지를 통해 배양한 HepG2 세포 증식과 관련된 그래프이다.
- [125] 도 14의 그래프는 앞서 도 12와 관련된 실험과 동일한 배양 조건에서 배양한 HepG2 세포의 증식을 나타낸다.
- [126] 구체적으로, 'Stir' 및 'Non-stir'로 표시된 그래프는 각각 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양 용기를 이용한 각각 동적인 배양 조건 및 정적인 배양 조건에서 시간에 따른 세포 성장률을 도시한다.
- [127] 또한, 'Control'로 표시된 그래프는 리세스부(함몰부)를 갖지 않는 배양 용기를 이용한 교반 부재(스트러바 또는 마그네틱바)가 회전하는 조건에서 시간에 따른 세포 성장률을 도시한다.
- [128] 도 14의 그래프를 참조하면, 리세스부가 존재하지 않는 일반적인 배양 용기보다 본 발명의 일 실시예에 따라 밀면에 리세스부가 형성되고 상기 리세스부에 교반 부재가 배치되는 용기의 경우 세포 성장률이 높은 것을 확인할

수 있다.

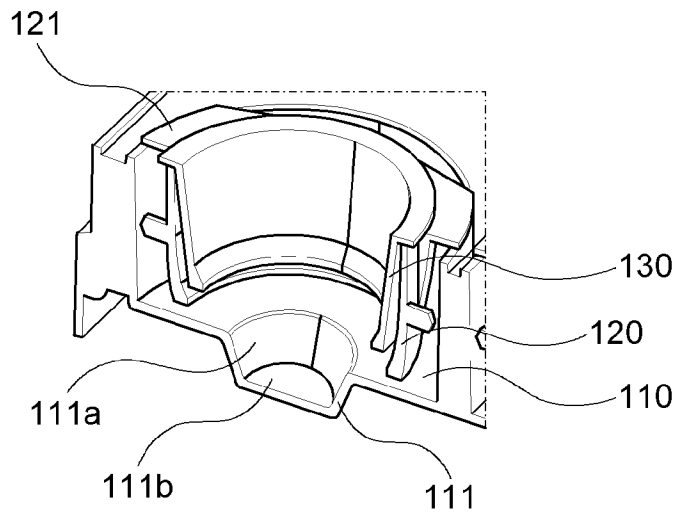
청구범위

- [청구항 1] 교반 부재가 배치되는 제1용기, 및
상기 제1용기 내부에 삽입되도록 이루어지며, 상기 제1용기에 수용된
용매가 내부로 통하도록 홀을 구비하는 제2용기를 포함하며,
상기 교반 부재는,
상기 제1용기에 형성된 리세스부에 배치되는 것을 특징으로 하는 세포
배양 용기.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 리세스부의 면적은, 상기 교반 부재를 상기 리세스부에 충분히
수용하는 동시에 상기 제1용기의 밑면에 세포 부착이 발생되도록
설정되는 것을 특징으로 하는 세포 배양 용기.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 리세스부의 면적은 상기 제1용기의 일면의 면적의 70% 이하인 것을
특징으로 하는 세포 배양 용기.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제2용기 내부에는 제3용기가 배치되며,
상기 제3용기는 상기 제2용기에 수용된 용매가 내부로 통하도록 홀을
구비하는 것을 특징으로 하는 세포 배양 용기.
- [청구항 5] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 교반 부재는, 마그네틱 바인 것을 특징으로 하는 세포 배양 용기.
- [청구항 6] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제1용기는 복수 개 구비되며,
상기 복수의 제1용기는 플레이트에 일체로 형성되는 것을 특징으로 하는
세포 배양 용기.
- [청구항 7] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제2용기의 상단에는, 상기 제1용기에 걸리도록 이루어지는
걸림부가 형성되는 것을 특징으로 하는 세포 배양 용기.

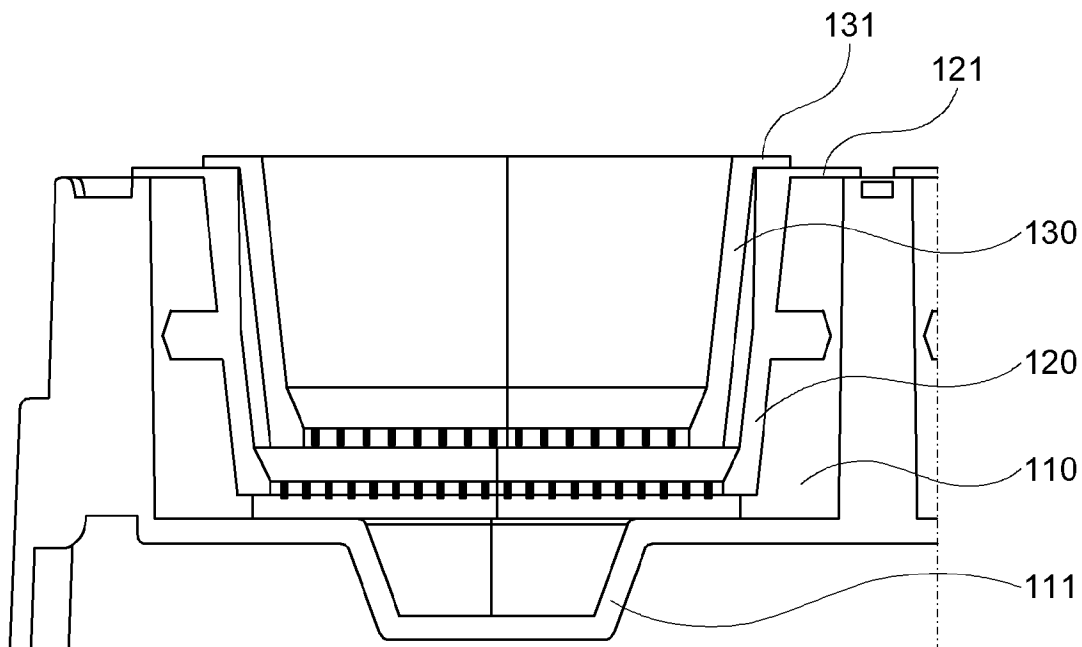
[도1]



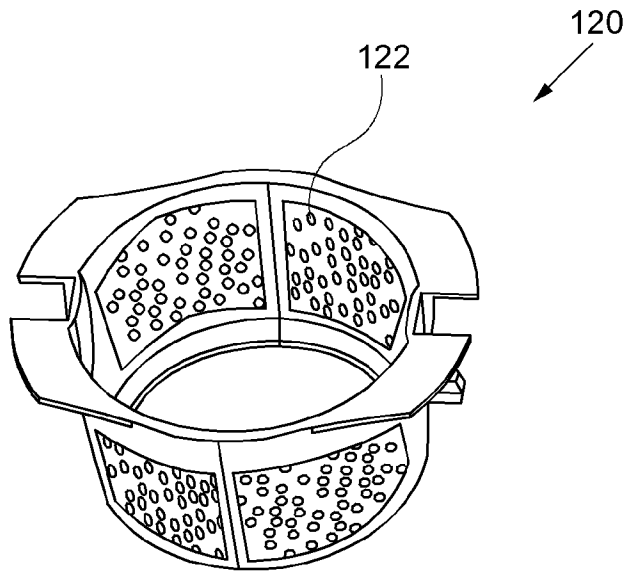
[도2]



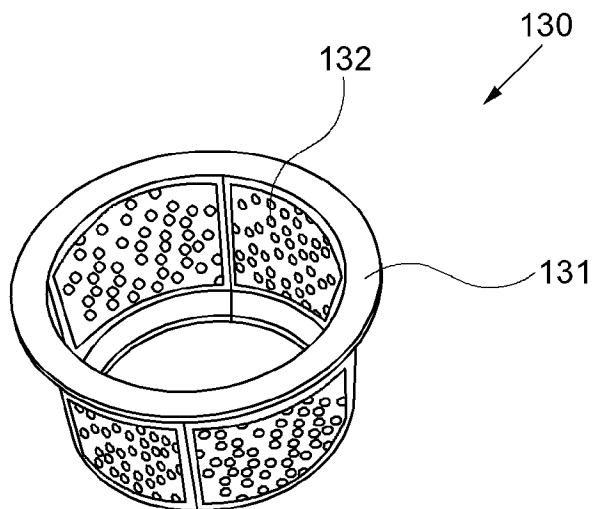
[도3]



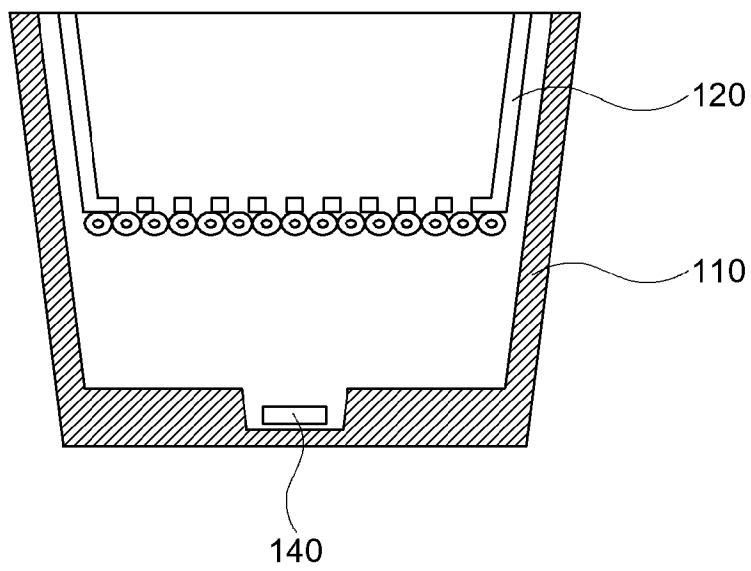
[도4a]



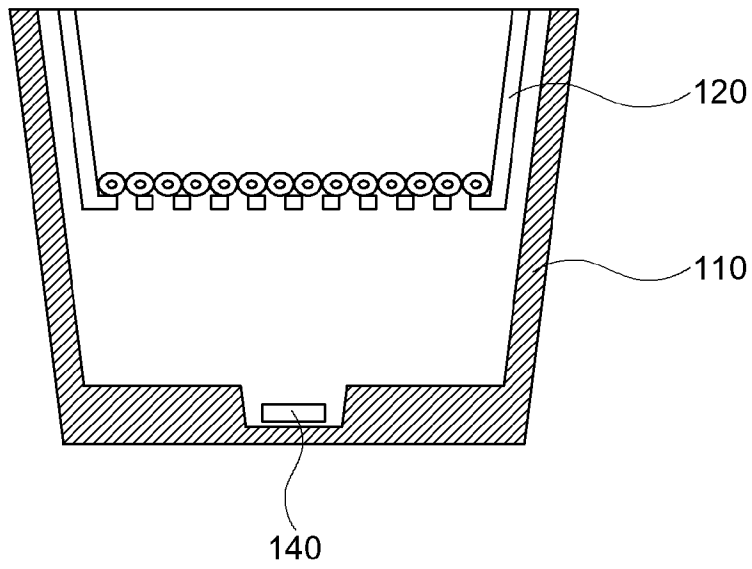
[도4b]



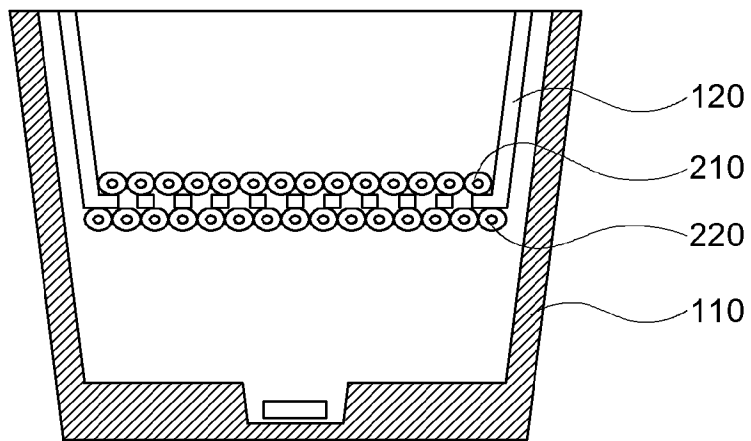
[도5a]



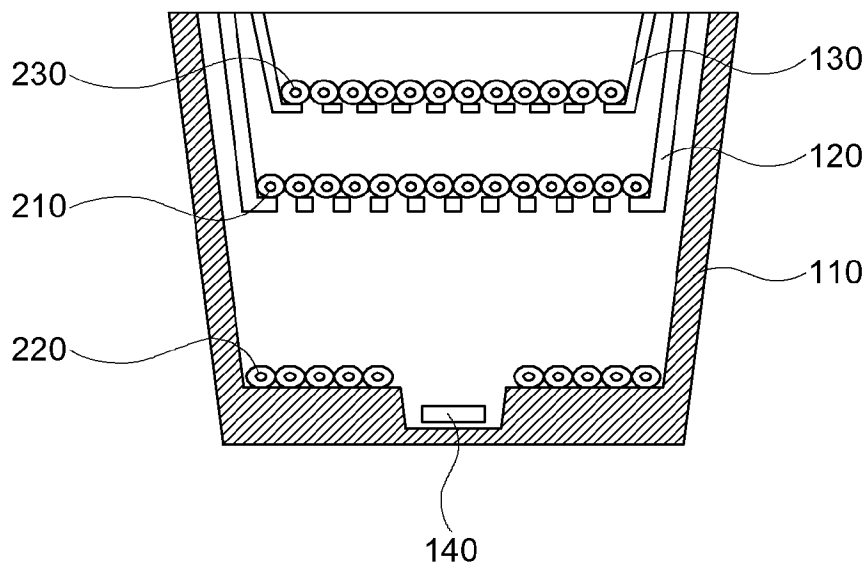
[도5b]



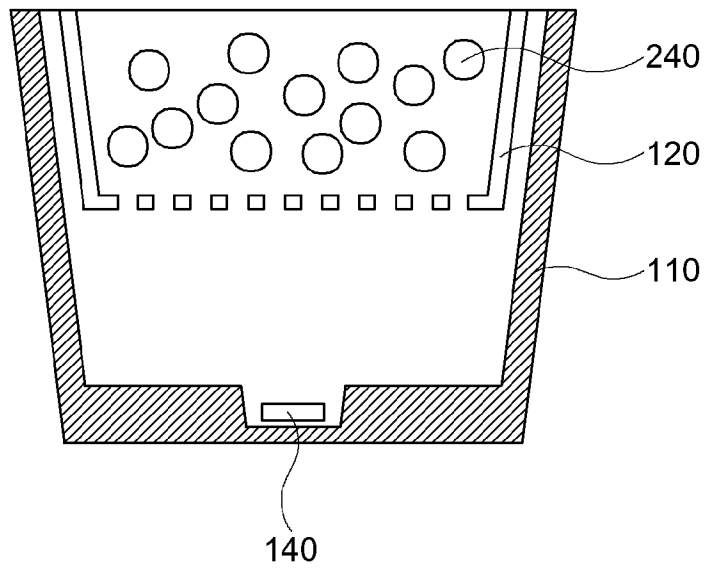
[도5c]



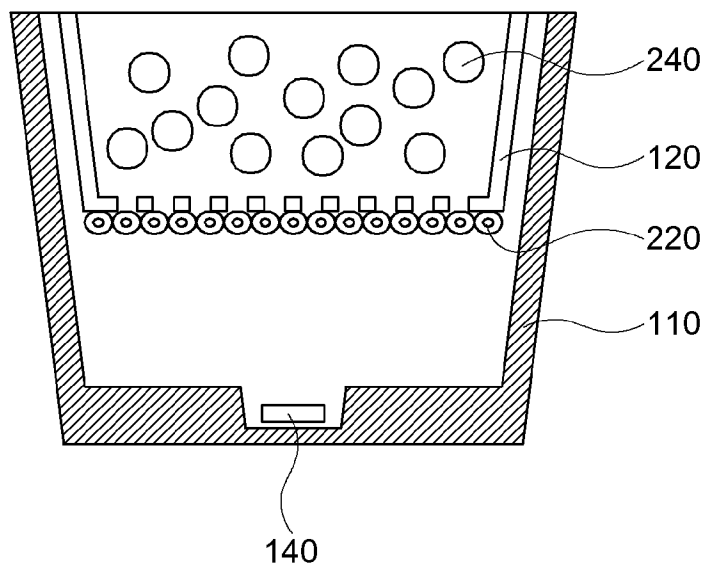
[도5d]



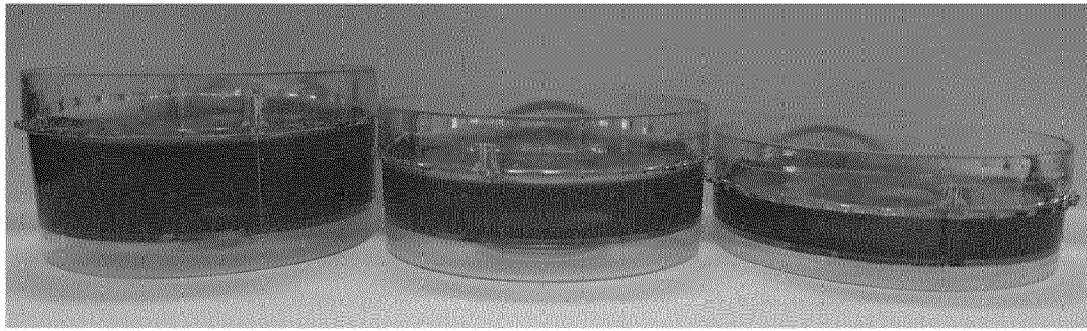
[도5e]



[도5f]



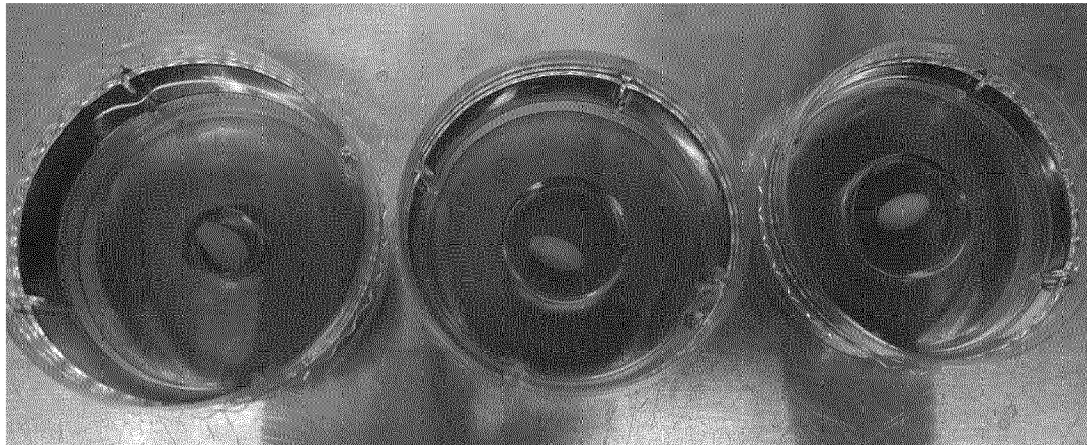
[도6a]



(a)

(b)

(c)

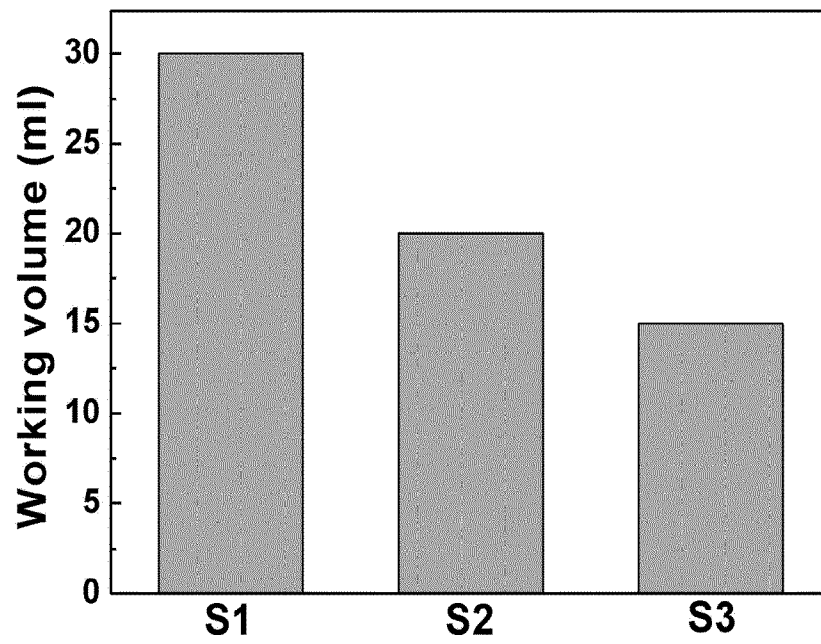


(a)

(b)

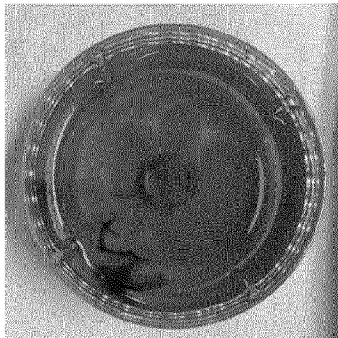
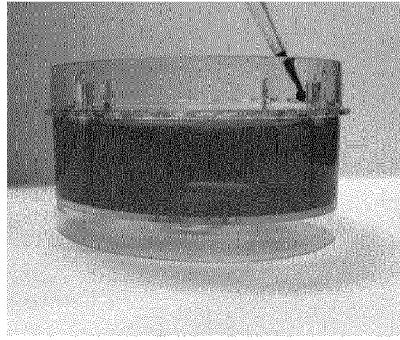
(c)

[도6b]



[도7a]

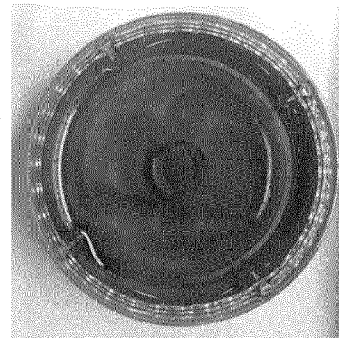
S1



(a)



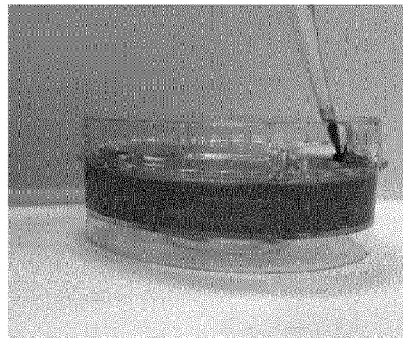
(b)



(c)

[도7b]

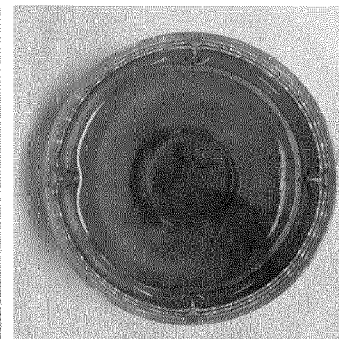
S2



(a)



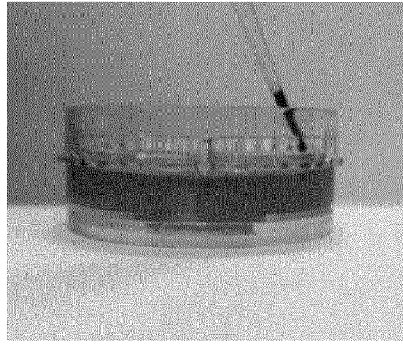
(b)



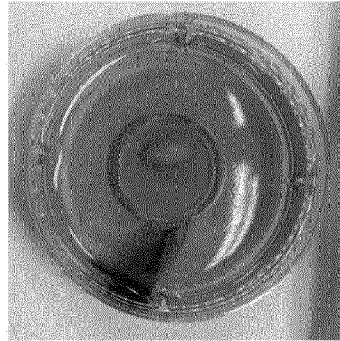
(c)

[도7c]

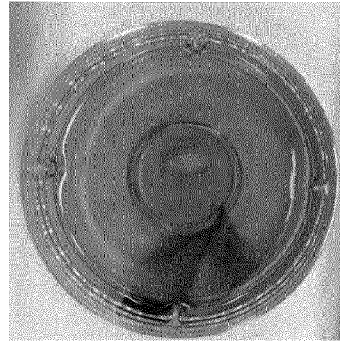
S3



(a)



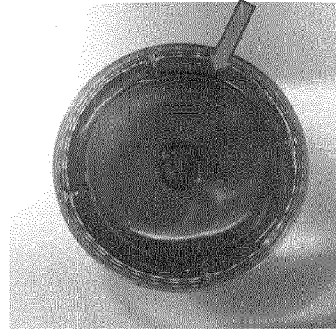
(b)



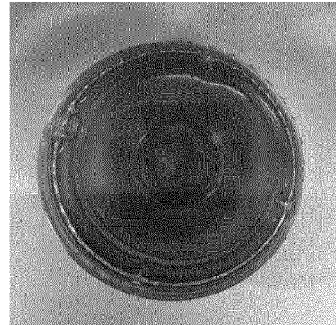
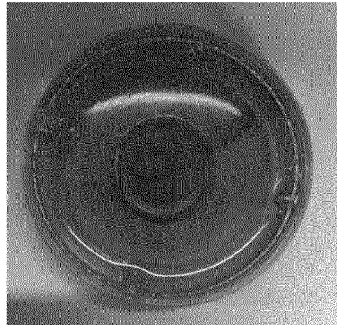
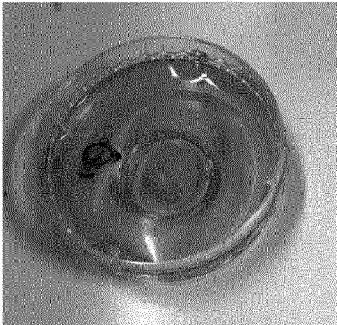
(c)

[도8]

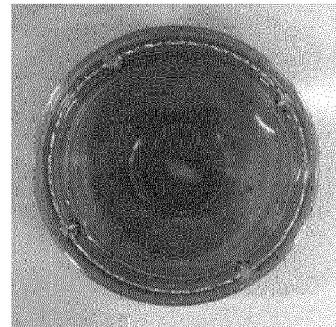
S1



S2



S3

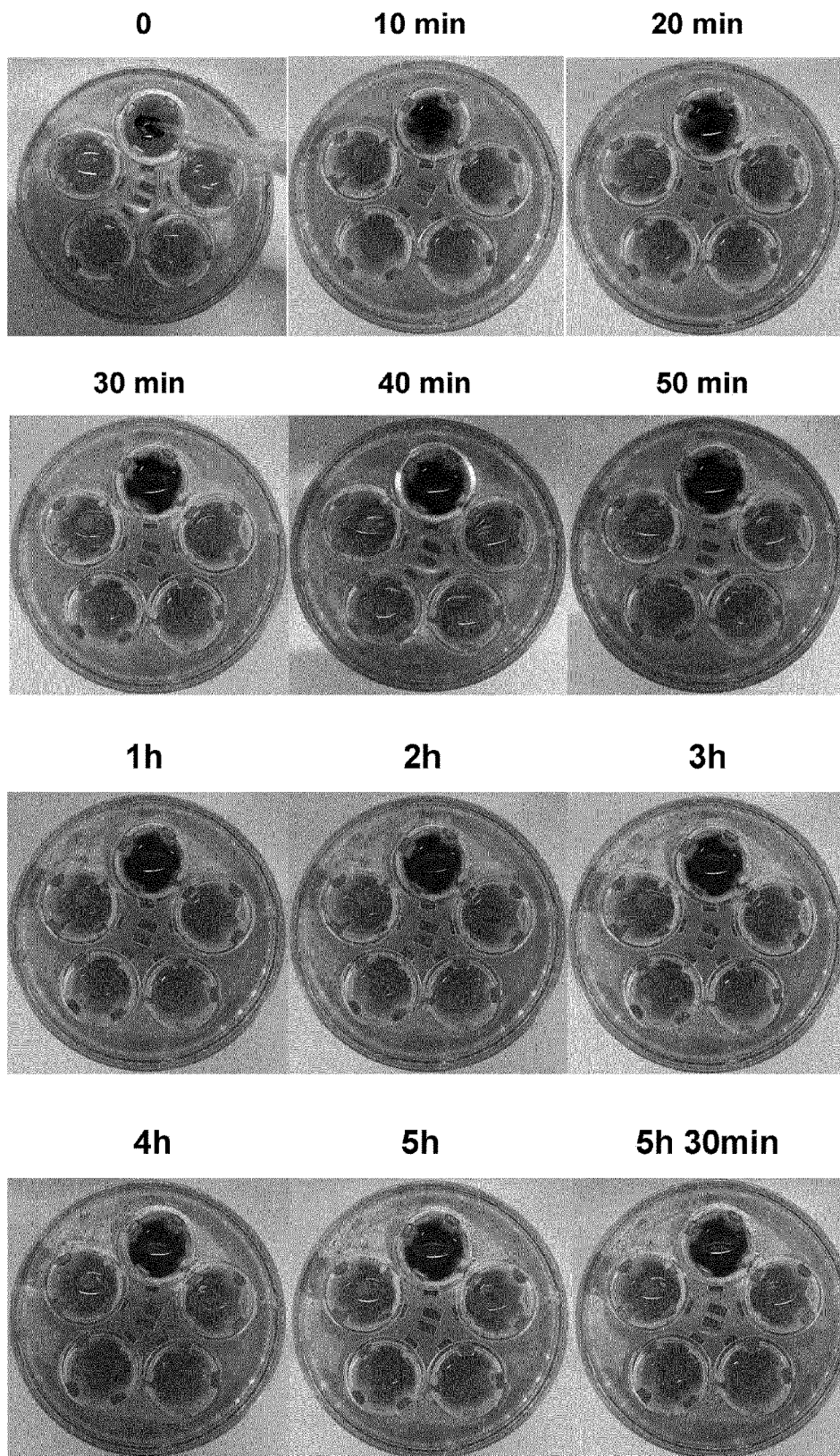


(a)

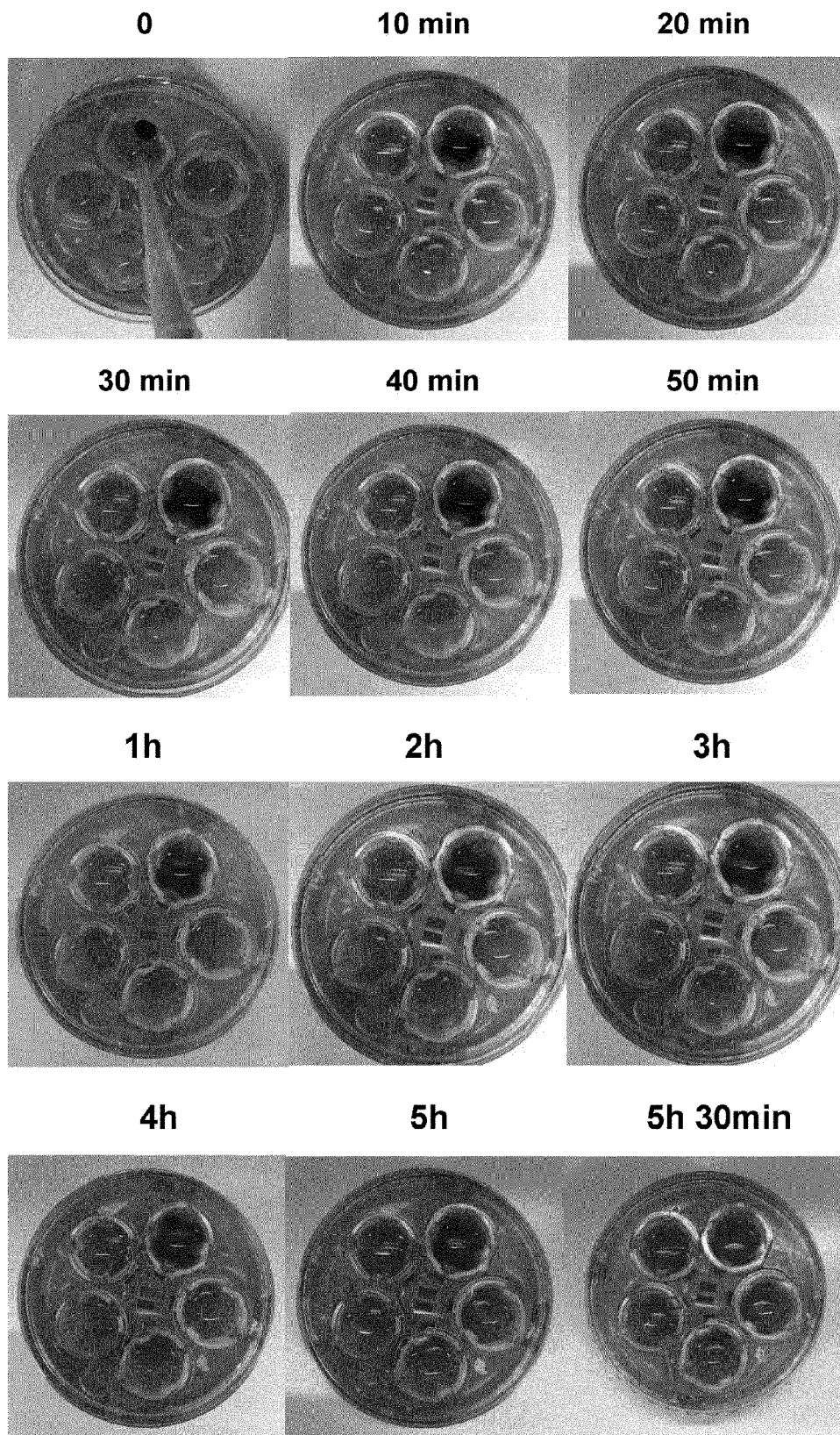
(b)

(c)

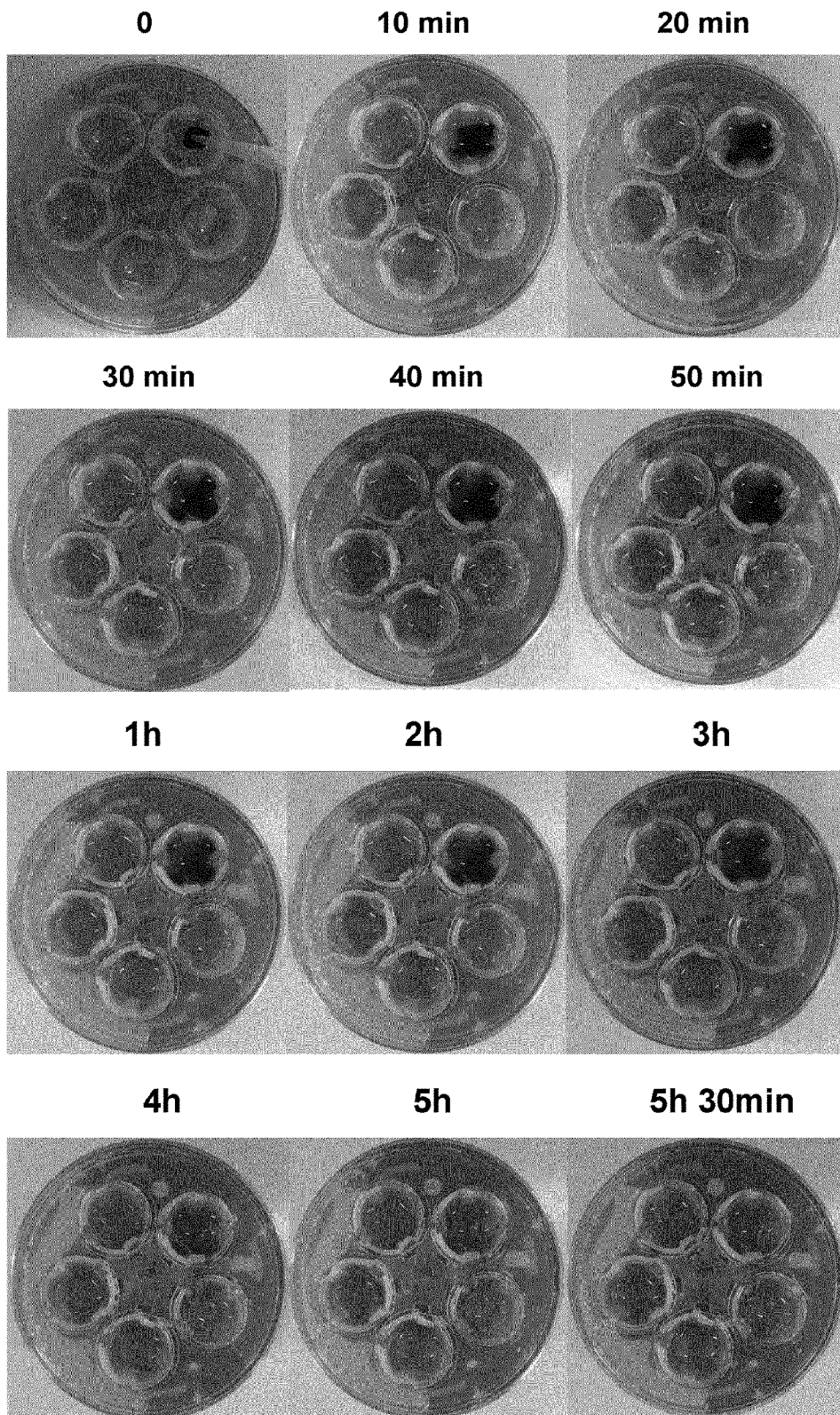
[도9]



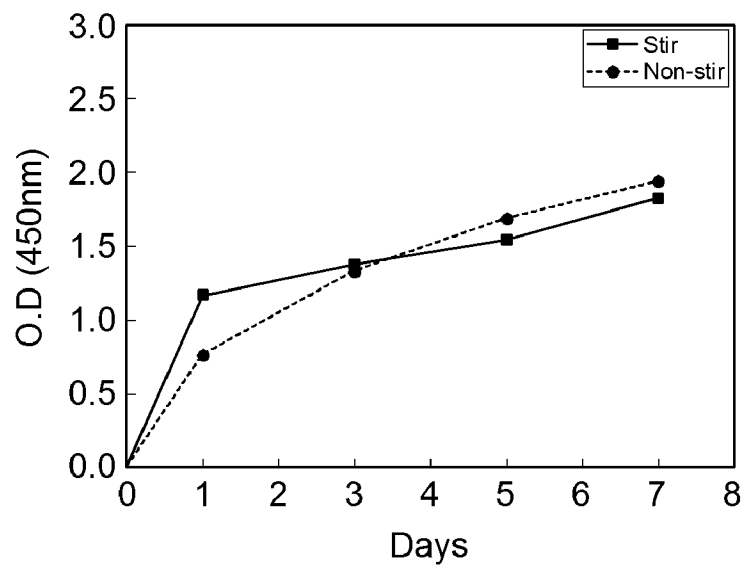
[도10]



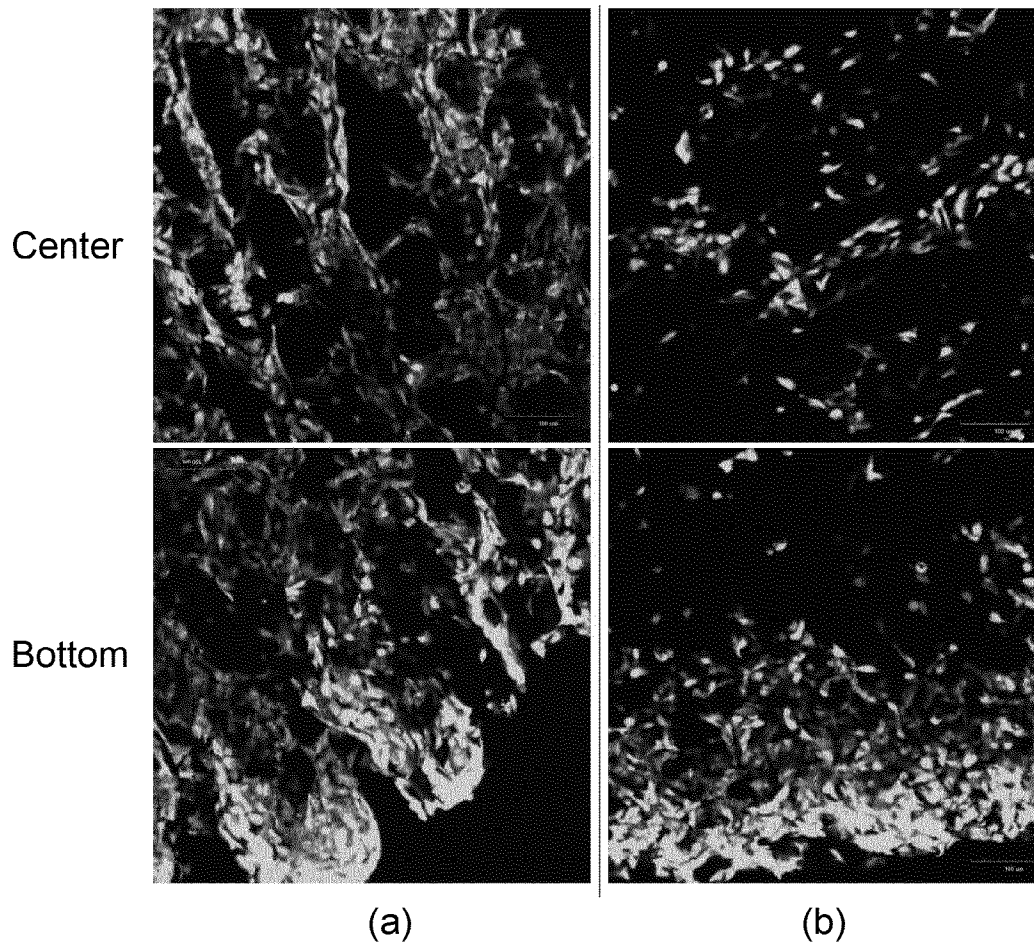
[도11]



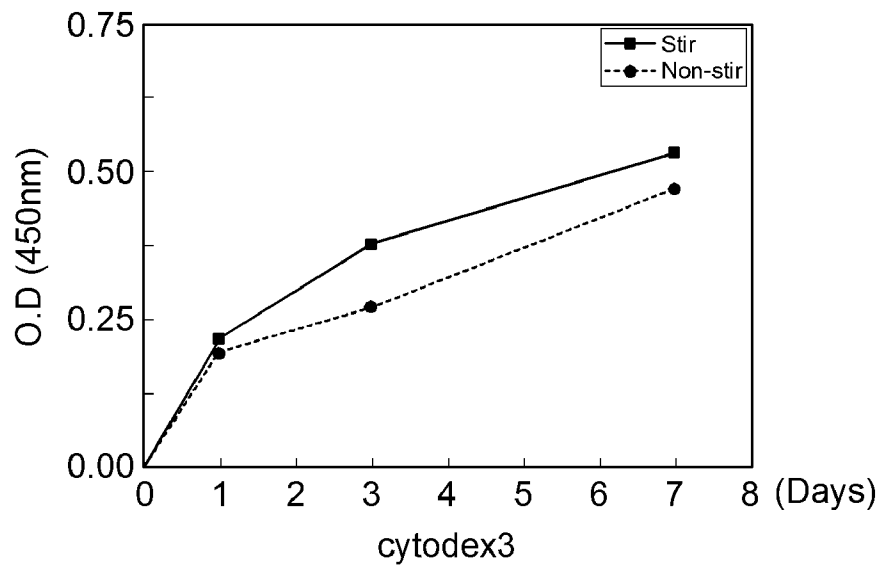
[도 12a]



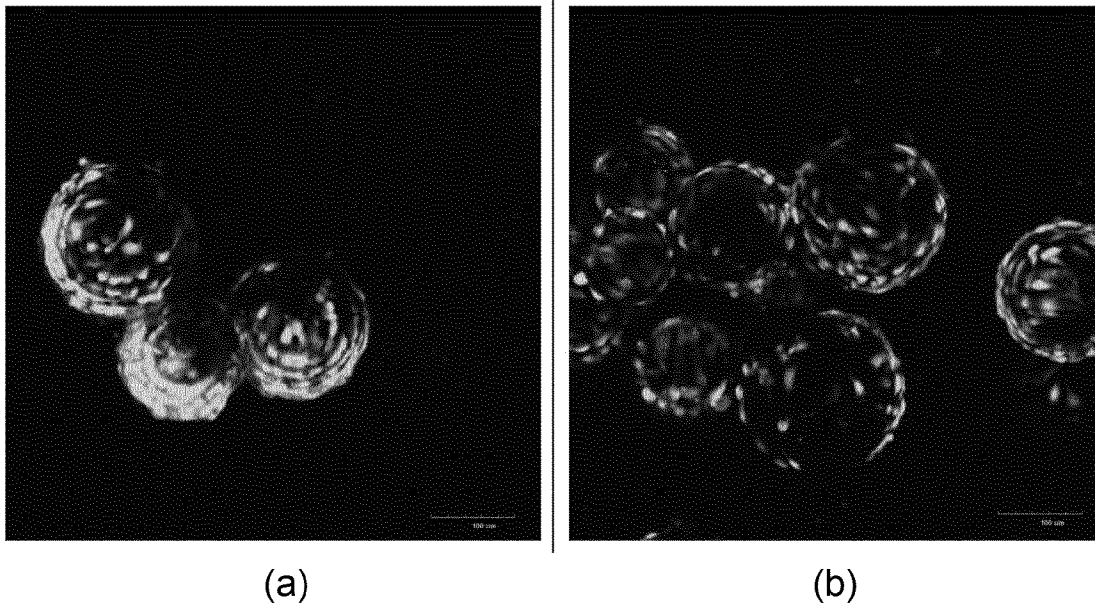
[도 12b]



[도13a]



[도13b]



[도14]

