



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월13일
(11) 등록번호 10-2499114
(24) 등록일자 2023년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/42 (2017.01) C12M 1/36 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 35/02 (2013.01)
C12M 41/48 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0143219
(22) 출원일자 2017년10월31일
심사청구일자 2020년09월10일
(65) 공개번호 10-2019-0048336
(43) 공개일자 2019년05월09일
(56) 선행기술조사문헌
JP2005538741 A*
WO2013128630 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 유스바이오글로벌
서울특별시 구로구 디지털로 273,
에이스트원타워2차 1201호 (구로동)
(72) 발명자
노종민
전라북도 익산시 고봉로24길 18, 301동 605호
(74) 대리인
양기혁

전체 청구항 수 : 총 10 항

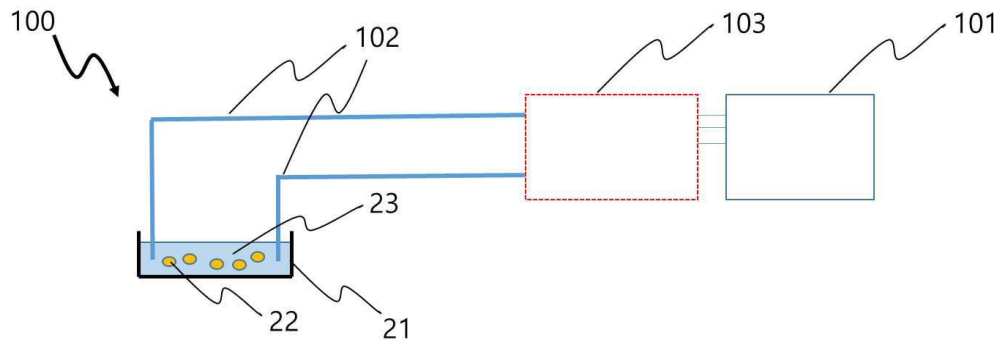
심사관 : 권혁성

(54) 발명의 명칭 세포 및 배양액 조건에 따른 전기자극 변수 제어장치 및 방법

(57) 요약

본 발명은 세포의 교차분화 유도방법에 관한 것으로서, 성인의 피부조직에서 유래된 섬유아세포를 고밀도 배양하는 고밀도 배양하여 섬유아세포 미세군집을 형성시키는 섬유아세포 미세군집 형성단계; 및 상기 섬유아세포 미세군집을 성장인자가 포함되지 않은 배양액에서 배양하면서 전류를 가하는 전기자극 단계;를 포함하는 피부 유래 섬유아세포의 연골세포로의 분화방법을 제공한다.

대표도 - 도2



명세서

청구범위

청구항 1

배양용기 내로 삽입이 되는 한 쌍의 전극;

상기 한 쌍의 전극에 연결되어 상기 배양용기 내 배양액의 임피던스를 측정하기 위한 임피던스 측정부; 및

상기 전극 및 상기 임피던스 측정부에 전기적으로 연결되며, 상기 임피던스 측정부에서 측정된 임피던스를 바탕으로 상기 한 쌍의 전극을 통해 상기 배양액에 인가되는 전류의 세기 및 주파수를 조절하기 위한 전기자극 제어부;

를 포함하는,

세포 전기자극 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

전원부를 추가로 포함하는, 세포 전기자극 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

교류를 직류로 바꾸기 위한 정류기를 추가로 포함하는, 세포 전기자극 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

교류 주파수의 조절을 위한 주파수 조절기를 추가로 포함하는, 세포 전기자극 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

세포 종류 선택 수단을 구비하고 세포 종류에 따라 측정된 임피던스 값으로부터 전류의 인가시간, 전류의 세기 또는 주파수의 값을 미리 결정하는 프로그램이 내장이 되거나, 상기 값을 수동으로 입력할 수 있는 입력장치를 추가로 포함하는, 세포 전기자극 장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 주파수는 1 Hz 내지 20 KHz로 조절되는, 세포 전기자극 장치.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 세포는 섬유아세포, 각질세포, 또는 줄기세포인, 세포 전기자극 장치.

청구항 8

세포 및 배양액의 상태의 변화에 따른 세포 전기자극 제어방법으로서,

세포가 배양되고 있는 배양 용기내의 배양액의 임피던스를 측정함으로써 배양액의 수위를 판정하는 단계; 및

상기 측정된 임피던스의 값에 따라 전류의 인가여부 및 인가되는 전류의 세기 및 주파수를 조절하는 전기자극

제어단계;
 를 포함하는,
 세포 전기자극 제어방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 임피던스는 실시간으로 측정되거나 일정한 간격으로 단속적으로 측정되는, 세포 전기자극 제어방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 세포의 종류에 따라서 측정된 임피던스에 따라 전류의 인가 시간, 인가되는 전류의 세기 및 주파수 값이 조절되는, 세포 전기자극 제어방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전기자극 변수 제어장치 및 방법에 관한 것으로서 보다 구체적으로는 세포 및 배양액 조건에 따른 전기자극 변수 제어장치 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포에 대한 전기자극이 분화를 유도할 수 있다는 사실이 알려지면서, 전기자극은 종래의 특정 성장인자의 처리법의 대체방법으로 줄기세포를 신경세포, 연골세포, 골원성세포 등 특정 기능을 담당하는 세포로 분화를 유도하는 많은 연구가 진행되어 왔다. 이와 관련하여, Genovese 등은 인간 중간엽 줄기세포에 대하여 전기자극을 가하여 심근 특이적 표지인자를 발현하는 가로무늬근 세포(striated muscle cell)로의 분화를 유도한다고 보고한 바 있고(Genovese *et al.*, *Front. Biosci.*, 14: 2996-3002, 2009), Cakmak 등은 실크-피브로인 필름 위에 파종된 인간 중간엽 줄기세포에 전기자극을 가하여 골원성 분화(osteogenic differentiation)에 성공하였음을 보고한 바 있다(Cakmak *et al.*, *Turk. J. Biol.*, 40: 462-472, 2016). 더 나아가 전기자극은 줄기세포를 특정 세포 유형으로 분화시키는 것 외에도 이미 분화된 특정 세포를 다른 유형의 세포로 교차분화하는데도 사용이 가능한 것으로 알려지고 있다. 이와 관련하여 Jin 등은 마찰대전 나노발전기를 이용하여 피부유래 섬유아 세포를 신경세포로 교차분화시킬 수 있음을 보고한 바 있고(Jin *et al.*, *Adv. Mater.* 28(34): 7365-7374, 2016), 본 출원인은 섬유아세포에 전기자극을 가하여 연골세포로 교차분화하는 방법에 대한 특허를 보유하고 있다(대한민국 특허 제1653197호).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 그러나, 상기 선행기술들은 특정 전기자극을 줄기세포 또는 섬유아세포에 인가하여 특정 세포로 분화하는 방법에 대하여만 개시하고 있을 뿐, 분화를 더욱 효율적으로 유도하기 위한 전류, 임피던스 등 전류의 파라미터를 최적화하는 것에 대하여는 아직 연구가 미진한 실정이다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 보다 효율적인 세포에 대한 전기자극을 위한 전기자극 제어시스템 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 배양용기내로 삽입이 되는 한 쌍의 전극, 상기 전극에 연결되어 배양용기 내 배양액 및/또는 세포의 임피던스를 측정하기 위한 임피던스 측정부, 상기 전극 및 임피던스 측정부와 전기적으로 연결되며, 상기 임피던스 측정부에서 측정된 임피던스를 바탕으로 상기 전극을 통해 상기 배양액 및/또는 세포에 인가되는 전류의 세기 및/또는 주파수를 조절하기 위한 전기자극 제어부를 포함하는 세포 전기자극 장치 제공된다.

[0006] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 세포가 배양되고 있는 배양 용기내의 배양액 및/또는 세포의 임피던스를 측정함으로써 배양액의 수위를 판정하는 단계; 및 상기 측정된 임피던스의 값에 따라 전류의 인가여부 및/또는 인가되는 전류의 세기 및/또는 주파수를 조절하는 전기자극 제어단계를 포함하는 세포 및 배양액의 상태의 변화에 따른 전기자극 제어방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0007] 도 1은 종래기술에 따른 세포 전기자극 시스템을 개략적으로 나타낸 개요도이다.
 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 임피던스 측정에 기반한 세포 전기자극 시스템을 개략적으로 나타낸 개요도이다.
 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라, 배양액 및 내부 세포변화가 다른 시료(W1 내지 W6)를 대상으로 다양한 주파수 변화에 따른 임피던스 값을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0008] 용어의 정의:

[0009] 본 문서에서 사용되는 용어를 정의하면 하기와 같다.
 [0010] 본 문서에서 사용되는 "임피던스(Z)"란 전기가 흘러갈 때 이를 방해하는 힘 으로, 교류회로에서 전압과 전류의 비를 의미하며, 공학적으로는 "전기저항(R)"과 "리액턴스(Xc)"의 벡터합으로 결정된다.
 [0011] 본 문서에서 사용되는 용어 "전기저항(R)"은 도체에서 전류의 흐름을 방해하는 정도를 나타내는 물리량으로 전류의 전압에 정비례하고 주류의 세기에 반비례한다.
 [0012] 본 문서에서 사용되는 "리액턴스(Xc)" 또는 "반응저항"은 교류 회로에서 코일과 축전기에 의해 발생하는 전기저항과 유사한 역할을 하는 물리량을 의미한다.
 [0013] 본 문서에서 사용되는 용어 "미세군집(micromass)"은 외래성 성장인자나 3차원 스캐폴드 없이 세포를 고밀도 배양하여 형성된 3차원 세포배양체를 의미한다. 통상의 단일층 배양(monolayer culture)와 달리 세포를 고밀도(약 1×10^7 내지 5×10^7 cells/ml)로 배양접시의 벽에 닿지 않도록 점적하여 배양할 경우, 바닥의 세포들은 배양접시에 부착하며, 세포들이 전체적으로는 3차원적으로 적층되어 배양되는데 이렇게 생성된 3차원 적층 세포들을 미세군집이라고 한다.
 [0014] 본 문서에서 사용되는 용어 "교차분화(reprogramming/conversion/trans-differentiation)"는 고등생물에서 전혀 다른 세포타입을 가지는 성숙한(분화가 끝난) 세포간의 전환을 유도하는 과정을 의미한다. 상기는 유도만능 줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)로 리프로그래밍하고 이를 재분화하여 목적하는 세포로 만들어야 하는 과정과 달리, 유도만능 줄기세포 단계를 거치지 않고 바로 목적하는 세포로의 전환을 유도한다는 점에서 차이를 가진다. 현재 직접 교차분화는 질병모델링과 신약발굴 등에 이용될 가능성을 인정받고 있으며, 미래에는 유전자 치료 그리고 재생의학 등에도 응용될 수 있을 것이라 기대된다.

[0015] 발명의 상세한 설명:

[0016] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다.
 [0017] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 배양용기내로 삽입이 되는 한 쌍의 전극, 상기 전극에 연결되어 배양용기 내 배양액 및/또는 세포의 전기저항 및/또는 임피던스를 측정하기 위한 임피던스 측정부, 상기 전극 및 임피던스 측정부와 전기적으로 연결되며, 상기 임피던스 측정부에서 측정된 전기저항 및/또는 임피던스를 바탕으로 상기 전극을 통해 상기 배양액 및/또는 세포에 인가되는 전류의 세기 및/또는 주파수를 조절하기 위한 전기자극 제어부를 포함하는 세포 전기자극 장치가 제공된다.
 [0018] 상기 장치는 전원부를 추가로 구비할 수 있다.
 [0019] 상기 장치는 교류를 직류로 바꾸기 위한 정류기를 추가로 구비할 수 있다.
 [0020] 상기 장치는 상기 전기자극 제어부는 교류 주파수의 조절을 위한 주파수 조절기를 포함할 수 있다.
 [0021] 상기 장치는 세포 종류 선택 수단을 구비하고 세포 종류에 따라 측정된 전기저항 및/또는 임피던스 값으로부터 전류의 인가시간, 전류의 세기 또는 주파수의 값을 미리 결정하는 프로그램이 내장이 되거나, 상기 값을 수동으

로 입력할 수 있는 입력장치를 구비할 수 있다.

- [0022] 상기 장치에 있어서, 상기 주파수는 1 Hz 내지 20 KHz로 조절될 수 있다.
- [0023] 상기 장치에 있어서, 상기 세포는 섬유아세포, 각질세포, 또는 줄기세포일 수 있고, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 지방 줄기세포, 배아 줄기세포, 유도만능 줄기세포(iPSC)일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 세포가 배양되고 있는 배양 용기내의 배양액 및/또는 세포의 임피던스를 측정함으로써 배양액의 수위를 판정하는 단계; 및 상기 측정된 임피던스의 값에 따라 전류의 인가여부 및/또는 인가되는 전류의 세기 및/또는 주파수를 조절하는 전기자극 제어단계를 포함하는 세포 및 배양액의 상태의 변화에 따른 전기자극 제어방법이 제공된다.
- [0025] 상기 방법에 있어서, 상기 임피던스는 실시간으로 측정되거나 일정한 간격으로 단속적으로 측정될 수 있다.
- [0026] 상기 방법에 있어서, 세포의 종류에 따라서 측정된 임피던스에 따라 전류의 인가 시간, 인가되는 전류의 세기 및/또는 주파수 값을 조절할 수 있다.
- [0027] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부한 도면을 참고하여 설명한다. 그러나 본 발명은 본 명세서에서 설명하는 실시예에 한정되지 않으며 여러 가지 다른 형태로 구현될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어는 실시예의 이해를 돕기 위한 것이며, 본 발명의 범위를 한정하고자 의도된 것이 아니다. 또한, 이하에서 사용되는 단수 형태들은 문구들이 이와 명백히 반대의 의미를 나타내지 않는 한 복수 형태들도 포함한다.
- [0028] 도 1은 종래기술에 따른 세포 전기자극 장치를 개략적으로 나타낸 개요도이다.
- [0029] 도 1에 나타난 바와 같이, 종래 기술에 따른 세포 전기자극 장치(10)는 전기자극 제어부(11)에 직접 전극(12)이 연결되어 배양용기(21) 내에 담긴 세포(22)가 포함된 배양액(23)에 특정 전압 및 전류의 세기가 조절된 전류를 특정 시간동안 인가하도록 고안되어 있다. 따라서, 한 종류의 세포에 대하여 최적화된 전류가 결정되면 이를 변화시키지 않고 일정하게 인가하는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 그러나, 특정 세포의 분화조건에 적합하다고 알려진 전류를 인가함에도 불구하고 세포의 분화 정도가 때에 따라 달라지게 됨을 발견하였고, 이의 원인에 대하여 면밀한 분석을 수행한 결과, 세포를 배양하는 과정에서 배양액 내의 수용액의 증발 등에 의해 세포배양액의 수위가 낮아지게 되고 이 경우 세포 배양액의 농도가 증가하게 됨에 따라 세포 배양액 내의 저항값이 달라지게 되는데, 이러한 저항값의 변화에 따라 동일한 전류를 인가하더라도 세포의 분화의 정도가 달라지며, 특히 전기자극을 이용하여 섬유아세포를 연골세포로 역분화시키는 방법의 두 번째 단계인 섬유아세포의 미세군집체로부터 연골세포로의 분화 정도에 차이가 발생함을 확인하였다. 또한, 앞서 언급한 수위가 낮아지는 것과 반대로 실험자가 주입해주는 배양액의 부피가 많아서, 수위가 높아짐에 따라 분화 환경 차이가 발생함을 확인할 수 있었다.
- [0031] 이에, 본 발명자들은 배양배지의 임피던스를 실시간으로 측정하여 그에 따라 인가되는 전류의 전압, 세기 또는 주파수를 변화시킬 경우 섬유아 세포의 교차분화의 효율이 어떻게 되는지 확인하고자 하였다.
- [0032] 이를 위해, 종래기술에 따른 세포 전기자극 장치에 임피던스 측정기를 부가함으로써 도 2에 도시된 형태와 같은 신규 세포 전기자극 장치를 제조하였다. 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 임피던스 측정에 기반한 세포 전기자극 시스템을 개략적으로 나타낸 개요도이다. 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 전기자극 장치(100)는 전기자극 제어부(101)와 양전극(102) 사이에 임피던스 측정기(103)가 추가되어 있어, 배양용기(21) 내에 담긴 세포(22)가 포함된 세포 배양액(23)의 임피던스를 실시간 또는 일정 간격을 두고 단속적으로 측정할 수 있다. 이렇게 측정된 임피던스 값이 변화하게 되면 변화정도 및 세포 종류에 따라 상기 전기자극 제어부에 미리 입력된 프로그램에 따라 자동으로 인가되는 전류의 전압, 전류의 세기 및/또는 주파수가 조절되게 된다. 상기 미리 입력된 프로그램 대신 외부 입력창을 통해 전류의 전압, 전류의 세기 및/또는 주파수를 수동으로 입력하는 것도 가능하나, 세포의 종류만 수동으로 입력하고 입력된 세포 종류 및 측정된 임피던스에 따라 인가되는 전류의 전압, 전류의 세기 및/또는 주파수는 내장된 프로그램을 통해 자동으로 계산이 되어 적용이 되는 것이 바람직하다.
- [0033] 상기 방법에 있어서, 상기 주파수의 조절은 상기 전기자극 제어부에 내장되거나 별도로 구비된 주파수 조절기를 통해 수행될 수 있는데, 상기 주파수의 범위는 1 Hz 내지 20 KHz일 수 있다.
- [0034] 종래의 세포 전기자극 장치는 교류전류를 정류기로 직류로 변환하여 직류의 형태로 전류를 인가하는 방식을 사용하였으나, 본 발명자들은 세포의 분화에 있어서 직류 뿐만 아니라 일정 주파수를 갖는 교류를 인가하는 것이

효율적이며, 교류의 주파수를 변조함으로써 최적의 조건을 달성할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 또 다른 중요한 기술적 특징은 직류와 함께 교류를 인가하면서 교류의 주파수를 조절할 수 있다는 점이다.

[0035] 뿐만 아니라, 본 발명의 세포 전기자극 장치 및 이를 이용한 전기자극 제어방법은 세부적으로는 임피던스 측정, 특정 구간의 임피던스 비율 등을 이용한 알고리즘 분석을 적용하여 세포 전기자극에 최적의 효율을 공급한다.

[0036] **실험예 1: 배양액 및 세포 상태에 따른 임피던스 측정**

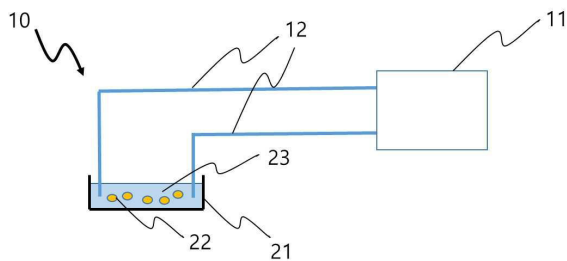
[0037] 본 발명자들은 6 가지의 배양액 및 내부 세포변화가 다른 시료(W1 내지 W6)를 대상으로 다양한 주파수 변화에 따른 임피던스 값을 측정하였다(도 3 상단). 그 결과 도 3의 상단에서 나타난 바와 같이, 세포의 종류 및 배양액의 상태에 따라, 그리고 인가된 전류의 주파수에 따라 측정되는 임피던스 값이 달라짐을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 임피던스 분석을 통해 배양액 및 세포 변화 측정이 가능함을 알 수 있다. 도 3에서 동일 표식을 갖는 다수의 점은 주파수의 변화에 따른 임피던스 측정값으로서 가로축은 임피던스 실수값이고 세로축은 임피던스의 허수값을 나타내며, 최 좌상단은 고주파(10 KHz)을 나타내며 대각선 방향으로 쉬프트될수록 주파수가 낮아져서 최 우하귀는 주파수 10 Hz일 때의 임피던스 값을 나타낸다. 고주파 전류의 인가시 임피던스 값은 좌상단쪽에 몰리는 경향을 나타내고 저주파로 내려갈 수록 임피던스 값의 차이가 더욱 분명해짐을 알 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 전기자극 장치 및 이를 이용한 세포 전기자극 제어방법을 이용하면, 앞서 언급한 배양액 내부 변화에 따른 최적의 전기자극 조건을 제어함으로써 보다 효율적인 줄기세포 분화 및 체세포의 교차분화를 수행할 수 있다.

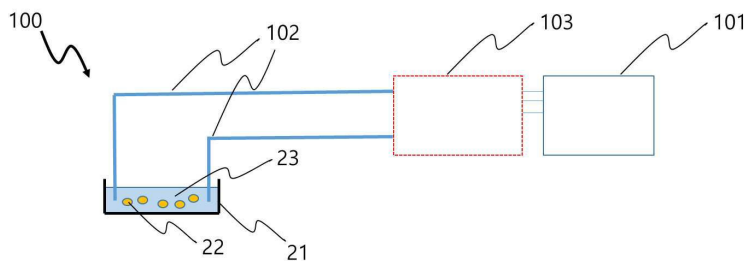
[0039] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예 및 실험예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

