

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 9월 10일 (10.09.2021) **WIPO | PCT**



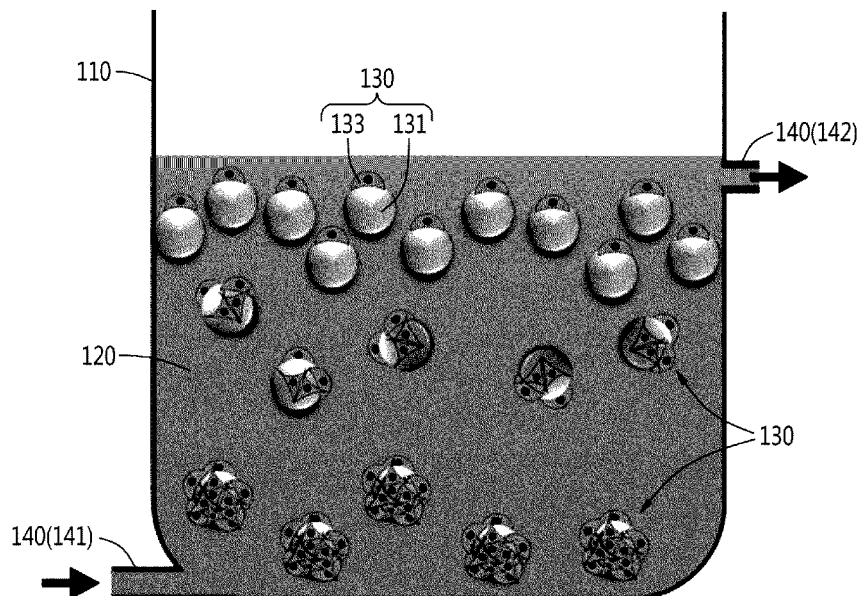
(10) 국제공개번호
WO 2021/177792 A1

- (51) 국제특허분류: *C12M 3/00* (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12M 1/09 (2006.01) *C12M 1/26* (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01) *G01N 15/02* (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01) *G01N 15/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/002775
- (22) 국제출원일: 2021년 3월 5일 (05.03.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0028471 2020년 3월 6일 (06.03.2020) KR
- (71) 출원인: 경희대학교산학협력단 (**UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY**) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 이은아 (**LEE, Eun Ah**); 05262 서울시 강동구 올림픽로98가길 47, 1110호, Seoul (KR). 박욱 (**PARK, Wook**); 16509 경기도 수원시 영통구 애플타운로 65, 5206동 2603호, Gyeonggi-do (KR). 김태우 (**KIM, Tae Woo**); 18444 경기도 화성시 동탄문화센터로 39, 318동 501호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 김연권 (**KIM, Youn Gwon**); 05836 서울시 송파구 법원로 127 문정대명벨리온 15층 1501호 및 1502호, Seoul (KR).
- (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, 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, IT, 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: MICROCARRIER-BASED FOUR-DIMENSIONAL CELL CULTURE DEVICE AND METHOD FOR MONITORING CELL CULTURE USING SAME

(54) 발명의 명칭: 마이크로캐리어 기반 4차원 세포 배양기 및 이를 이용한 세포배양 모니터링 방법

100



(57) Abstract: The present invention relates to a low specific gravity microcarrier-based cell culture device and a method for monitoring cell culture using same and, more specifically, to four-dimensional cell culture having the characteristics of monitoring the growth state of cells by reflecting a time factor to three-dimensional cell culture, and being capable of stable cell expansion culture by minimizing changes in the cell characteristics.

(57) 요약서: 본 발명은 저 비중 마이크로캐리어 기반 세포 배양 장치 및 이를 이용한 세포 배양 모니터링 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 3차원 세포배양에 대하여 시간(Time) 요소를 반영하여 세포의 성장 상태를 모니터링하고, 세포 특성변화를 최소화하여 안정적인 세포 확장배양이 가능한 특성이 반영된 4차원 세포배양에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2021/177792 A1



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 역
내 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), 유
럽 (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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 마이크로캐리어 기반 4차원 세포 배양기 및 이를 이용한 세포배양 모니터링 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 저 비중 마이크로캐리어 기반 세포 배양 장치 및 이를 이용한 세포 배양 모니터링 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 3차원 세포배양에 대하여 시간(Time) 요소를 반영하여 세포의 성장상태 모니터링이 가능하게 하며, 세포 특성변화를 최소화하여 안정적인 세포 확장배양이 가능한 기능이 반영된 4차원 세포배양에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 부착세포(adherent cell)인 줄기세포 또는 전구세포를 이용하여 인간의 세포와 조직, 장기를 대체하거나 재생시켜서 원래의 기능을 할 수 있도록 복원시키는 의학분야인 재생의학(Regenerative medicine) 기술 개발이 활발해지고 있다.
- [3] 암세포를 제외한 대부분의 고형 조직 유래의 세포는 유리, 플라스틱 또는 나일론 등의 표면에 단층으로 부착하여 증식하고, 이러한 세포가 증식할 수 있는 환경을 제공하는 배양기 및 배양 소재에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.
- [4] 특히, 세포 배양용 지지체로서 생체 적합성 마이크로 비드(micro-bead)를 이용하여 세포 부착의 표면적을 증대시켜 배양하는 3차원 세포 배양방법이 개발되고 있다.
- [5] 마이크로 비드는 이와 같이 세포 증식을 위한 넓은 표면적을 제공함으로써, 줄기세포 또는 전구세포와 같은 부착성 세포가 부유배양 환경에서도 성장할 수 있도록 세포가 안착할 수 있는 환경을 제공한다.
- [6] 그러나, 세포를 회수하기 위해서는 마이크로 비드와 세포를 분리해야 하는데, 원심분리를 통해 분리하는 경우, 마이크로 비드와 세포 간의 비중 차이가 크게 나지 않아 분리 시간이 증대되며 이로 인하여 세포의 손상이 일어나고 마이크로 비드와 세포층의 구분이 명확하지 않아 세포가 유실될 가능성이 존재한다.
- [7] 또한, 마이크로 비드는 세포를 안전하고 효율적으로 배양하기 위해서 세포의 특성과 목적에 따라 사용되는 물질이 제한적이고, 이들을 보통 천연 또는 합성 고분자 물질로서 비중이 세포와 비슷한 물질이 사용되고 있다.
- [8] 이러한 물질 들의 비중은 1.0 내지 1.3 근처에서 결정되고, 세포나 인체 유래 고형 물질의 비중도 1.0 이상이므로, 고분자 물질과 세포나 인체 유래 고형 물질의 비중이 유사하여 원심분리에 의해 분리가 용이하지 않다는 문제점이 존재한다. 또한, 원심분리 이외의 방법으로 세포와 마이크로캐리어를 분리하기 위해 마이크로 단위의 기공(pore) 크기를 가진 필터를 추가로 사용해야 한다는 단점이 있다.

- [9] 한편, 부착성 줄기세포의 체외 확장배양을 위해 개발된 3차원 배양 방법 중 가장 최선의 성체줄기세포 확장 배양 성능을 나타내는 것으로 평가되고 있는 플라스틱 마이크로캐리어 기반 3차원 확장 배양은 지속적인 교반을 통해 세포가 부착된 마이크로캐리어가 부유상태를 유지하도록 하는 특징을 가지고 있으며, 이러한 3차원 배양 과정에서 부가되는 교반력은 마이크로캐리어 표면에 부착되어 배양되는 세포에 물리적 스트레스(shear stress)를 가하게 되어, 세포성장을 억제시키는 동시에 배양된 세포의 활성이 저하되는 단점이 있다.
- [10] 보다 구체적으로, 상용화된 플라스틱 마이크로캐리어는 밀도(density)가 배양액보다 높아 배양과정에서 빠르게 가라 앉는 특성을 가지므로, 부유상태를 유지하기 위하여 지속적으로 교반력이 가해져야 하며, 이로 인하여 마이크로캐리어 표면에 부착되어 배양되는 세포에 물리적 스트레스가 전달되는 문제점이 존재한다. 그러나, 3차원 세포 배양 플랫폼의 교반력 인가는 마이크로캐리어의 부유상태 유지만이 아닌 배양액 성분의 균일한 분포를 위해서도 필요한 것인 바, 교반력으로 인한 세포에 대한 물리적 스트레스를 줄일 수 있는 방법이 요구된다.
- [11] 또한, 플라스틱 마이크로캐리어는 구(sphere) 형태이며, 세포 증식에 따라 다차별적 특성이 구현되는 것이 아니므로, 세포의 증식상태를 직관적으로 파악하는 것이 용이하지 않으며, 마이크로캐리어를 샘플링하여 3차원적 관찰이 가능한 특수장비를 이용하여야 하는 문제점이 존재한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명은 저 비중 마이크로캐리어 기반 3차원 세포배양시 주입되는 배양배지(culture media)로서 세포 배양액의 유속(flow rate)을 조절하여 배양배지에 가해지는 별도의 교반력 없이 3차원 공간에서 부유상태를 유지하며 세포 배양이 가능한 플랫폼(platform)을 제공하는 것에 본 발명의 목적이 있다.

과제 해결 수단

- [13] 해결하고자 하는 과제의 달성을 위하여, 본 발명의 일 형태에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기는 세포 배양 챔버; 상기 챔버 내에 수용되는 세포 배양액; 및 상기 세포 배양액 내에 부유하며 세포가 성장되는 표면을 제공하는 마이크로캐리어를 포함한다.
- [14] 상기 세포 배양액은 상기 세포 배양 챔버 하부로 유입되어 상기 세포 배양 챔버 상부로 유출되는 것일 수 있다.
- [15] 상기 마이크로캐리어는 상기 세포 배양액 보다 비중이 낮은 것일 수 있다.
- [16] 상기 마이크로캐리어는 표면에서 세포가 증식됨에 따라 상기 세포 배양 챔버의 하단으로 침강하는 것일 수 있다.
- [17] 상기 세포 배양 챔버는 상기 세포 배양 챔버의 하단에 난류 차단 구조물(Turbulent Eddy-Breaker; 150)을 포함하는 것일 수 있다.

- [18] 또한, 본 발명의 일 형태에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양 모니터링 방법은 세포 배양 챔버 하부에서 세포 배양액이 유입되며 상기 세포 배양액이 상기 세포 배양 챔버 상부로 유출되는 세포 반응기를 제공하는 단계; 상기 세포 배양 챔버 내에 수용되는 세포 배양액 상에 마이크로캐리어와 성장 대상 세포를 투입하는 세포 투입 단계; 및 상기 마이크로캐리어 표면에 상기 성장 대상 세포가 부착된 세포-마이크로캐리어 복합체의 상기 세포 배양 챔버 내에서의 위치분포 변화를 확인하는 세포 증식 관찰 단계를 포함한다.
- [19] 상기 세포-마이크로캐리어 복합체의 비중을 산출하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 상기 산출된 세포-마이크로캐리어 복합체의 비중으로부터 세포의 성장 상태 데이터를 도출하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [20] 본 발명의 일 형태에 따르면, 연속적인 세포 배양액의 유입 및 유출을 통한 배지흐름(media flow)을 유도함으로써 별도의 교반력(stirring force)을 요하지 않으므로, 세포배양시 세포에 물리적 스트레스(stress)를 노출시키지 않는 효과가 있다.
- [21] 또한, 세포에 가해지는 물리적 스트레스를 현저히 감소시킴에 따라 2차원 세포배양과 유사한 수준의 활성유지를 기대할 수 있다.
- [22] 또한, 최소한의 배지흐름(media flow)만으로 3차원 세포배양의 마이크로캐리어의 부유상태를 유지시킴으로써, 세포성장에 따른 마이크로캐리어의 분포 변화를 방해하지 않고, 마이크로캐리어의 분포위치를 기반으로 세포의 성장 상태를 용이하게 모니터링 할 수 있다.
- [23] 또한, 3차원 세포 배양에 있어서 시간 변화에 따른 세포-마이크로캐리어 복합체의 거동 변화를 구현함으로써 4차원 세포 배양 플랫폼을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양기의 개략도를 도시한 것이다.
- [25] 도 2a는 난류 차단 구조물(Turbulent Eddy-Breaker)을 포함하지 않는 마이크로캐리어 기반 세포 배양기를 개략적으로 도시한 것이고, 도 2b는 난류 차단 구조물(Turbulent Eddy-Breaker)을 포함하는 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양기를 개략적으로 도시한 것이다.
- [26] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 배양기의 수직(높이) 구배에 따른 세포(세포-마이크로캐리어 복합체) 및 영양성분의 분포를 도시한 것이다.
- [27] 도 3b는 본 발명의 비교예에 따른 2차원 세포배양 접시의 수직(높이) 구배에 따른 세포 및 영양성분의 분포를 도시한 것이다.
- [28] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 4차원 세포배양의 개략도를 도시한 것이다.
- [29] 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기에 포함되는 마이크로캐리어를 도시한 것이다.
- [30] 도 6은 본 발명의 실시예에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기에 포함되는

마이크로캐리어의 위치 거동에 따른 마이크로캐리어 표면 세포의 증식 정도를 보여주는 것이다.

- [31] 도 7은 폴리스타이렌 재질의 마이크로캐리어 및 본 발명의 실시예에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기에 포함되는 마이크로캐리어의 시간에 따른 거동을 도시한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [32] 이하 첨부 도면들 및 첨부 도면들에 기재된 내용들을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세하게 설명하지만, 본 발명이 실시예에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다.
- [33] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprises)" 및/또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 구성요소, 단계, 동작 및/또는 소자는 하나 이상의 다른 구성요소, 단계, 동작 및/또는 소자의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.
- [34] 본 명세서에서 사용되는 "실시예", "예", "측면", "예시" 등은 기술된 임의의 양상(aspect) 또는 설계가 다른 양상 또는 설계들보다 양호하다거나, 이점이 있는 것으로 해석되어야 하는 것은 아니다.
- [35] 아래 설명에서 사용되는 용어는, 연관되는 기술 분야에서 일반적이고 보편적인 것으로 선택되었으나, 기술의 발달 및/또는 변화, 관례, 기술자의 선호 등에 따라 다른 용어가 있을 수 있다. 따라서, 아래 설명에서 사용되는 용어는 기술적 사상을 한정하는 것으로 이해되어서는 안 되며, 실시예들을 설명하기 위한 예시적 용어로 이해되어야 한다.
- [36] 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 설명 부분에서 상세한 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 아래 설명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌 그 용어가 가지는 의미와 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 이해되어야 한다.
- [37] 한편, 제1, 제2 등의 용어는 다양한 구성 요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 구성 요소들은 용어들에 의하여 한정되지 않는다. 용어들은 하나의 구성 요소를 다른 구성 요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다.
- [38] 또한, 막, 층, 영역, 구성 요청 등의 부분이 다른 부분 "위에" 또는 "상에" 있다고 할 때, 다른 부분의 바로 위에 있는 경우 뿐만 아니라, 그 중간에 다른 막, 층, 영역, 구성 요소 등이 개재되어 있는 경우도 포함한다.
- [39] 다른 정의가 없다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어(기술 및 과학적 용어를 포함)는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공통적으로 이해될 수 있는 의미로 사용될 수 있을 것이다. 또 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 용어들은 명백하게 특별히 정의되어 있지 않는 한 이상적으로

또는 과도하게 해석되지 않는다.

- [40] 한편, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는, 그 상세한 설명을 생략할 것이다. 그리고, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.
- [41] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참조하여 상세하게 설명한다.
- [42] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기를 개략적으로 도시한 것이다.
- [43] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 형태에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기(100)는 세포 배양 챔버(110); 세포 배양 챔버(110) 내에 수용되는 세포 배양액(120); 및 세포 배양액(120) 내에 부유하며 세포(133)가 성장되는 표면을 제공하는 마이크로캐리어(131)를 포함한다.
- [44] 따라서, 본 발명의 일 형태에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기(100)는 표피세포, 섬유아세포, 중배엽성줄기세포 또는 연골세포를 포함하는 모든 부착성 세포의 배양이 가능하다.
- [45] 세포 배양 챔버(110)는 상부 및 하부 상기 세포 배양액이 각각 유입 및 유출이 가능한 관통공(140)을 구비하는 것일 수 있으며, 보다 상세하게는 세포 배양 챔버(110) 측부에 세포 배양액(120)이 유입 및 유출이 가능한 관통공(140)이 형성될 수 있으며, 보다 더 상세하게는 세포 배양 챔버(110) 일 측의 하부에 상기 세포 배양액(120)이 유입 가능한 관통공(141)이 구비되며, 세포 배양 챔버(110) 타 측의 상부에 세포 배양액(120)이 유출 가능한 관통공(142)이 구비될 수 있다.
- [46] 세포 배양액(120)은 세포 배양 챔버(110) 내에서 배양 배지(culture media)로서 세포(133) 성장 또는 증식에 요구되는 영양성분(nutrient)을 포함하는 유체(fluid)이다.
- [47] 세포 배양액(120)은 세포 배양 챔버(110) 하부로 유입되어 세포 배양 챔버 상부(110)로 유출되는 것으로, 세포 배양액(120)은 세포 배양 챔버(110) 내에서 유체의 흐름(flow)을 형성하며, 보다 구체적으로는 세포 배양 챔버(110) 하부(bottom)에서 상부(top) 방향으로 배지 흐름(media flow)을 형성할 수 있다.
- [48] 세포 배양액(120)은 세포 배양 챔버(110) 일 측의 하부로 유입되는 것일 수 있으며, 유입된 세포 배양액(120)은 세포 배양 챔버(110) 타 측의 상부로 유출되는 것일 수 있으며, 이로 인하여, 세포 배양액(120)은 세포 배양 챔버(110) 내에서 하부(bottom)에서 상부(top) 방향으로 배지 흐름(media flow)을 형성하며, 후술하는 침강하는 마이크로캐리어(131) 또는 세포-마이크로캐리어 복합체(130)와의 이동 방향과 반대 방향의 배지 흐름(media flow)을 형성함에 따라, 세포 배양 챔버(110) 내에서 마이크로캐리어(131) 또는 세포-마이크로캐리어

복합체(130)의 부유상태(suspension)를 유지시킬 수 있다.

- [49] 세포 배양액(120)에 의한 하부(bottom)에서 상부(top) 방향으로의 배지 흐름(media flow)은 기존의 세포 배양기 내 마이크로캐리어가 고르게 분산되어 부유하는 상태를 유도하기 위하여 요구되던 교반력을 대체할 수 있다. 따라서, 세포 배양 시 별도의 교반력을 요구하지 않으므로, 세포 성장에 물리적 스트레스(stress)를 가하지 않고 세포 성장을 가능하게 한다. 세포 배양 챔버(110) 내 배지 흐름(media flow) 만으로 세포-마이크로캐리어 복합체(130) 또는 마이크로캐리어(131)의 부유상태를 유지할 수 있으며, 동시에 후술되는 세포-마이크로캐리어 복합체(130)의 비중 증가에 따른 분포위치 변화를 방해하지 않으므로, 세포-마이크로캐리어 복합체(130) 분포위치의 확인을 통하여 세포-마이크로 복합체(130)의 세포(133)의 성장 상태를 직관적으로 확인할 수 있다.
- [50] 세포 배양액(120)은 세포 배양 챔버(110)에 연속적으로 유입되고 연속적으로 유출됨으로써, 세포 배양 챔버(110) 내에 세포(133)에 대하여 세포성장에 필요한 영양성분을 지속적으로 제공할 수 있다.
- [51] 마이크로캐리어(131)는 표면에서 세포(133)가 부착되어 성장하기 위한 마이크로 크기의 비드 입자로서, 마이크로캐리어(131)는 세포 배양 안정성을 구비하여야 생체 적합성 소재이고, 생물학적으로 안정한 물질인 것이다.
- [52] 마이크로캐리어(131)는 구(sphere) 또는 원반형일 수 있으며, 마이크로캐리어(131) 표면에 세포(133)가 부착되어 세포-마이크로캐리어 복합체(130)를 형성할 수 있다.
- [53] 마이크로캐리어(131)는 표면에 세포(133)가 부착되어 세포-마이크로캐리어 복합체(130)를 형성함으로써, 마이크로캐리어(131) 표면에 부착된 세포(133)의 성장 또는 증식을 가능하게 하는 것이다. 보다 구체적으로는, 세포(131)의 성장 또는 증식은 구(sphere) 또는 원반형의 마이크로캐리어(131) 3차원 표면을 모두 활용하는 것이며, 3차원의 표면에 세포(133)가 부착되어 배양(성장)됨으로써 생체와 유사한 환경을 체외에서 제공하는 군집 형태의 3차원 세포 배양(3-dimesional cell culture) 또한 가능하게 한다.
- [54] 세포-마이크로캐리어 복합체(130)는 마이크로캐리어(131) 표면에 세포(131)가 성장됨에 따라 비중이 증가되고, 비중이 증가됨에 따라 세포 배양 챔버(110)의 하단으로 침강하는 것일 수 있다.
- [55] 이때, 마이크로캐리어(131)는 세포 배양액(120) 보다 비중(specific gravity)이 낮은 것일 수 있으며, 마이크로캐리어(131)는 세포 배양액(120) 보다 비중이 낮은 재질로 구성될 수 있다. 마이크로캐리어(131)는 세포 배양액(120) 내에서 상대적으로 가벼운 물질의 거동 특성을 나타냄으로써 세포 배양액(120)에 의한 매우 적은 배지흐름(media flow)만으로도 마이크로캐리어(131) 또는 세포-마이크로캐리어 복합체(130)의 부유상태를 유도할 수 있으며, 동시에 세포-마이크로캐리어 복합체(130)의 비중 증가에 따른 위치 분포를 확인할 수

있다. 이러한 위치 분포의 확인을 통하여 세포-마이크로 복합체(130)의 세포(133)의 성장 상태를 직관적으로 확인할 수 있다.

- [56] 마이크로캐리어(131)의 표면에 부착되어 성장하는 세포(133)의 비중은 세포 배양액(120) 보다 비중이 큰 것일 수 있으며, 배양하고자 하는 세포에 따라 세포 배양액, 마이크로캐리어의 비중 값이 결정될 수 있다.
- [57] 일례로서, 통상의 세포 배양액의 비중은 1.04 내지 1.20를 가지고 있는 바, 세포 배양액의 비중보다 낮은 비중을 갖는 마이크로캐리어는 1.02 이하의 비중을 가지는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 세포가 골수기질세포(BMSCs)인 경우, 세포의 비중은 1.053일 수 있으며, 이때의 배양배지로서 세포배양액의 비중은 1.04일 수 있으며, 이때의 마이크로캐리어의 비중은 1.0 이하의 비중을 가지는 것일 수 있다. 또한, 마이크로캐리어 비드의 비중이 너무 낮으면 세포 배양액 내에서의 부유상태를 유지할 수 있으나, 세포 증식에 따른 마이크로캐리어의 비중 변화가 미비할 수 있으므로, 0.775 이상의 비중을 가지는 것이 바람직할 수 있다.
- [58] 도 2a는 난류 차단 구조물(Turbulent Eddy-Breaker)을 포함하지 않는 마이크로캐리어 기반 세포 배양기를 개략적으로 도시한 것이고, 도 2b는 난류 차단 구조물(Turbulent Eddy-Breaker)을 포함하는 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양기를 개략적으로 도시한 것이다.
- [59] 도 2b는 도 1의 도시된 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양기와 동일한 구성요소를 포함하고 있고, 동일한 구성요소에 대한 설명은 생략하기로 한다.
- [60] 도 2a는 난류 차단 구조물(Turbulent Eddy-Breaker)가 없는 상태로 세포 배양액(120)을 하단에서 주입 시 형성되는 큰 소용돌이(Large Eddy)에 의해 세포-마이크로캐리어 복합체(130)의 총체적 비중 변화에 따른 부유 거동을 확인하기가 어렵다.
- [61] 도 2a를 참조하면, 세포 배양 챔버(110)의 하단에 세포 배양액(120)이 유입 가능한 관통공(141)(예; 유입부(Inlet))이 세포 배양 챔버(110)에 비해 직경이 작아, 세포 배양액(120)이 유입 직후에 형성한 큰 소용돌이(Large Eddy)는 점차 크기가 작아지면서 난류(Turbulent Eddy)를 형성하여 세포 배양 챔버(110)의 전체가 난류로 채워지게 되어 세포 성장에 따른 세포-마이크로캐리어 복합체(130)의 미묘한 비중 변화를 감지하기 어렵다.
- [62] 반면, 도 2b를 참조하면, 난류 차단 구조물을 포함하는 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양기는 세포 배양액(120)이 유입되는 세포 배양 챔버(110)의 하단에 난류 차단 구조물(Turbulent Eddy-Breaker; 150)를 설치하여, 세포 배양액(120)의 유입에 의해 큰 소용돌이(Large Eddy)가 형성되는 것을 방지하고 난류(Turbulent Eddy)를 작은 소용돌이(Small Eddy)로 감소시킴으로써 세포 배양 챔버(110) 내 하단-상단 축을 따라 안정적인 흐름을 형성할 수 있다.
- [63] 즉, 난류 차단 구조물(Turbulent Eddy-Breaker)을 포함하는 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양기는 난류 차단 구조물(Turbulent Eddy-Breaker)에 의한 세포

배양액(120)의 안정적인 흐름에 의해 높은 세포 증식을 나타내는 세포-마이크로캐리어 복합체(130)가 세포 배양 챔버(110) 하단에 위치하여 신선한 세포 배양액(110)이 원활하게 공급받도록 하는 구조를 형성할 수 있으며, 세포 증식이 높지 않은 세포-마이크로캐리어 복합체(130)는 세포 배양 챔버(110) 상단에 분포될 수 있다.

- [64] 난류 차단 구조물(Turbulent Eddy-Breaker; 150)는 비드 사이로 세포 배양액(120)이 흐를 수 있도록 비드가 충전된 형태이고, 예를 들어, 비드는 유리 비드(glass bead), 티타늄 비드 및 스테인레스 스틸 비드 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [65] 또한, 도 2b에 도시된 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양기(100)는 4차원 세포배양(4-dimensional cell culture) 모니터링에 사용될 수 있다.
- [66] 도 3a는 도 1의 도시된 본 발명의 실시예에 따른 세포 배양기(100) 내(도 3a의 왼쪽 이미지)의 수직(높이) 구배에 따른 세포(133)(또는 세포-마이크로캐리어 복합체(130)) 분포(도 2a의 'Cell density') 및 세포 배양액(120) 내의 영양성분 분포(도 3a의 'Media nutrient gradient')를 도시한 것이다.
- [67] 도 3b는 본 발명의 비교예로서, 배지 용액 바닥면에서 세포 배양(2차원 세포배양)(도 3b의 왼쪽 이미지)에 따른 수직(높이) 구배에 따른 세포 분포(도 3b의 'Cell density') 및 세포 배양액 내의 영양성분 분포(도 2b의 'Media nutrient gradient')를 도시한 것이다.
- [68] 도 1 및 도 3a를 참조하면, 마이크로캐리어(131)의 표면에 부착되어 성장하는 세포(133)는 세포 배양액(120) 내에 존재하는 영양성분을 소모하면서 성장하게 되는 것이다. 세포 배양 초기에는 마이크로캐리어(131) 표면에 부착된 세포의 수가 적고, 성장이 시작되는 단계에 해당되는 것이므로, 세포 배양액(120) 상층부에는 많은 수의 세포-마이크로캐리어 복합체(130) 및 마이크로캐리어(131)가 부유상태로 존재하게 된다.
- [69] 세포 배양이 진행됨에 따라, 마이크로캐리어(131)의 표면에 부착된 세포(133)가 성장하게 되며, 이로 인하여 세포-마이크로캐리어 복합체(130)의 비중이 증가된다. 비중이 증가된 세포-마이크로캐리어 복합체(131)는 세포 배양 챔버(110) 하부로 침강한다.
- [70] 비중이 증가된 세포-마이크로캐리어 복합체(130)가 세포 배양 챔버(110) 하부로 침강함으로 인하여, 세포 배양 시간의 증가함에 따라서 세포 배양액(120)의 상층부에서 하부층으로 갈수록 세포-마이크로캐리어 복합체(130)의 분포가 증가하는 경향을 보인다.
- [71] 이때, 세포 배양액(120)은 세포 반응 챔버(110) 하부에서 지속적으로 유입됨에 따라서, 세포 배양 챔버(110) 하층부에는 지속적으로 세포 배양액(120) 내 영양성분이 증가하게 되며, 상층부에서부터 세포-마이크로캐리어 복합체의 세포 성장에 따른 지속적인 영양성분의 소모가 진행되고 영양성분이 소모된 세포 배양액(120)은 세포 배양 챔버(110) 상부에서 유출됨에 따라, 세포

배양액(120) 내 영양성분은 상층부에서 하층부로 갈수록 분포가 증가하는 경향을 보이며, 이는 상술한 세포 배양 챔버(110) 내 세포-마이크로캐리어 복합체(130)의 표면에 존재하는 세포의 분포와 동일한 경향을 보인다.

- [72] 이로 인하여, 세포 배양 챔버(110)에의 수직(높이) 구배에 따른 세포-마이크로캐리어 복합체(130)와 세포 배양액(120) 내 영양성분의 분포 경향이 동일함에 따라, 세포-마이크로캐리어 복합체(130)의 세포 성장에 효과적인 세포 배양 환경을 제공한다.
- [73] 또한, 마이크로캐리어(131)를 이용한 3차원 세포배양에 있어서 시간(time)이 경과함에 따라서 세포-마이크로캐리어 복합체(130)는 비중이 증가되어 세포 배양액(120) 내에서 침강하게 되고, 세포 배양 챔버(110)에 하부에서 유입되는 세포 배양액(120)으로 인하여 세포 배양 챔버(110)의 하부에는 높은 분포 수준의 영양성분이 존재하는 바, 시간(time)이 경과함에 따라 지속적인 성장을 가능하게 하는 시공간(space-time)을 모두 활용하는 4차원 세포배양(4-dimensional cell culture)을 제공할 수 있다.
- [74] 이에 비하여, 도 3b를 참조하면, 비교예로서, 세포 배양 챔버내 세포 배양액의 연속적인 유입 및 유출이 없어 배지 흐름(media flow)을 형성하지 않으며, 세포 배양 배지 하부 표면에 세포가 고정되는 2차원 세포 배양기의 경우, 세포 배양액 하부층에만 세포가 성장하여 증식됨에 따라 하부층에만 세포가 집중되어 있으며, 이로 인하여 세포 배양액의 하층부에 존재하는 영양성분의 소모가 집중된다. 세포 배양액 하층부의 영양성분이 소모됨에 따라 세포 배양액 상층부의 영양분은 높은 분포를 보이나, 세포 배양액 하층부의 영양성분은 낮은 분포를 보이게 된다. 이로 인하여, 하층부 표면에서의 세포는 세포 배양액 내 영양성분이 소모됨에 따라 세포 성장이 더디게 된다.
- [75] 도 4는 본 발명의 일 실시예로서 세포 배양기(100)를 이용한 4차원 세포 배양의 개략도를 도시한 것이다.
- [76] 도 4를 참조하면, 세포 배양액(220)의 밀도가 약 1.04 g/ml이고, 마이크로캐리어(231)의 밀도가 약 0.98 g/ml이고, 세포(233)의 밀도가 약 1.07 g/ml인 경우에 시간(Time)이 경과함에 따라 세포 배양액(220) 상에 표층부에 위치하고 있는 마이크로캐리어(231)는 세포(233)가 부착됨에 따라 세포-마이크로캐리어 복합체(230)를 형성하고, 세포(233)의 성장으로 인하여 밀도가 증가된 세포-마이크로캐리어 복합체(230)는 침강하게 되는 것이이다
- [77] 또한, 본 발명의 세포 배양기(100)는 세포 배양액(120)이 세포 배양 챔버(110) 내 하부에서 상부로 이동함에 따라, 세포 배양 챔버(110) 내에서 세포 성장 정도에 따른 세포-마이크로캐리어 복합체(130)의 분포위치가 변화되며, 변화된 분포위치로부터 세포(133)의 성장정도를 직관적으로 판단할 수 있다.
- [78] 본 발명의 일 형태에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양 모니터링 방법은 본 발명의 일 형태에 따른 세포 배양기를 통하여 세포 배양을 모니터링 하는 것으로, 후술하는 세포 배양기, 세포 배양액, 마이크로캐리어, 세포 및

세포-마이크로캐리어 복합체에 대한 중복되는 설명은 생략한다.

- [79] 상기 마이크로캐리어 기반 세포 배양 모니터링 방법은 세포 배양 챔버 하부에서 세포 배양액을 유입되며 상기 세포 배양액이 상기 세포 배양 챔버 상부로 유출되는 세포 반응기를 제공 단계; 상기 세포 배양 챔버 내에 수용되는 세포 배양액 상에 마이크로캐리어와 성장 대상 세포를 투입하는 세포 투입 단계; 및 상기 마이크로캐리어 표면 상에 상기 성장 대상 세포가 부착된 세포-마이크로캐리어 복합체의 위치분포 변화를 확인하는 세포 성장 관찰 단계를 포함한다.
- [80] 상기 세포 성장 관찰 단계는 시간(time) 경과에 따른 위치분포 변화를 관찰하는 것일 수 있으며, 상기 세포-마이크로캐리어 복합체의 비중 증가로 인하여 상기 세포 배양액 내에서 침강하는 세포-마이크로캐리어 복합체의 높이 변화를 관찰하는 것일 수 있다.
- [81] 또한, 상기 마이크로캐리어 기반 세포 배양 모니터링 방법은 상기 세포-마이크로캐리어 복합체의 비중을 산출하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [82] 또한, 상기 마이크로캐리어 기반 세포 배양 모니터링 방법은 상기 산출된 세포-마이크로캐리어 복합체의 비중으로부터 세포의 성장 상태 데이터를 도출하는 단계를 더 포함할 수 있다. 보다 상세하게는 상기 마이크로캐리어와 상기 세포-마이크로캐리어 복합체 상의 비중 차이로부터 성장된 세포의 비중을 산출하며, 산출된 성장된 세포와 상기 세포 투입 단계에서의 세포의 비중 차이로부터 세포의 성장 정도를 확인할 수 있다.
- [83] 상기 마이크로캐리어 기반 세포 배양 모니터링 방법은 상기 세포 성장 관찰 단계에서 상기 세포-마이크로캐리어 복합체의 침강 정도에 따라 세포의 성장 또는 증식 정도를 예측할 수 있으며, 시간 요소를 고려하여 세포 성장의 역학적 분석 및 실시간 모니터링이 가능할 수 있다.
- [84] [제조예]
- [85] 물에 비해 상대적으로 밀도가 낮은 플라스틱 재료인 폴리에틸렌(0.91-0.96 g/cm³)의 표면은 소수성을 나타내므로, 세포가 성장하는 환경인 수용액 환경에 분산이 가능하도록 하기 위하여 친수성으로 표면개질을 진행하였다. (참고: 폴리프로필렌의 밀도는 0.855-0.946 g/cm³)
- [86] 실험에 사용한 폴리에틸렌 코어(비드)는 로다민 B(Rhodamine B) 형광분자가 포함된 0.99 g/ml 또는 0.995 g/ml의 밀도를 가지는 코어를 사용하였다. 여기서, 폴리에틸렌 코어의 직경은 약 500 μ m이었다.
- [87] 폴리에틸렌 코어의 표면 에칭을 진행하기 위하여 증류수 : 30% 암모니아수 : 30% 과산화수소수가 5 : 1 : 1의 비율로 섞인 용액을 유리 바이알에 넣고 물중탕으로 2시간 동안 70°C를 유지하면서 10분 마다 흔들어 폴리에틸렌 코어가 분산되도록 하였다.
- [88] 반응 전 폴리에틸렌 코어는 표면이 젖지 않고 수용액 표면 위로 떠올라 위치하고 있었으나, 반응 후 표면이 친수성으로 바뀌어 수용액 표면을 덮게된

상태의 코어를 분리하여 트리메톡시아미노프로필실란 용액에 반응시켜 표면개질 반응을 진행하였다.

- [89] 트리메톡시아미노프로필실란으로 표면개질된 구 형상의 마이크로 비드의 직경은 약 500 μm 이었다.
- [90] 플라스틱 튜브에 표면개질된 500 μm 직경의 마이크로 비드 340개와 3.5×10^2 개의 중배엽성 줄기세포를 혼합하였다. 마이크로 비드의 표면에 세포가 결합되도록 37°C를 유지하고, 마이크로 비드와 세포가 고르게 결합되도록 하기 위하여 10분마다 흔들어주며 2시간 동안 배양하였다.
- [91] 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기에 포함되는 마이크로캐리어를 도시한 것이다.
- [92] 표면 에칭을 거쳐 표면이 친수성으로 변화된 폴리에틸렌 코어가 배양액에서 상층에 존재하는 상태에서 마이크로캐리어 표면적 당 $7.5 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ 의 밀도로 중배엽성 줄기세포를 주입하여 마이크로캐리어 표면에 세포가 결합되도록 도5의 시험관을 20rpm의 속도로 인터팅(inverting) 하여 하룻밤 동안(overnight) 배양하였다.
- [93] 도 5를 참조하면, 세포를 시딩(seeding)하기 전 저비중 마이크로캐리어는 세포 배양액에서 상층에 위치하고 있으나(Culture Media), 세포를 시딩(seeding)하고 16시간(overnight) 배양한 후에는 세포 배양액 전체에 고르게 분산(Cell seeded)되는 것을 알 수 있다.
- [94] 도 6은 본 발명의 실시예에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기에 포함되는 마이크로캐리어의 위치 거동에 따른 마이크로캐리어 표면 세포의 증식 정도를 보여주는 것이다.
- [95] 상기 도5의 방법으로 중배엽성 줄기세포를 시딩(seeding)한 뒤 48시간 동안 배양 후 배양액 내 세포-마이크로캐리어 복합체를 분포 위치에 따라 1)배양액 표면에 위치하는 분획(Upper), 2) 배양액 중에 고르게 분산된 분획(Middle), 3) 배양용 바이알 바닥에 침강한 분획(Lower)으로 나누어 포집하고, 도6과 같이 동일 부피의 배양액 내에서 배양 상태를 유지하며 MTT assay(세포독성 및 생존율 시험방법)를 수행하여 각 분획 별 생존하는 세포수를 상대 비교하였다.
- [96] 도 6을 참조하면, 세포 배양액의 하단에 침강해 있는 부분(fraction)에서 포획한 세포-마이크로캐리어 복합체 수가 가장 적었으나(우측 상단), 가장 높은 세포 수를 나타냈고, 세포 배양액의 상층에 위치하는 세포-마이크로캐리어 복합체의 수가 가장 많았으나, 가장 낮은 수의 세포수를 나타냈다.
- [97] 따라서, 세포-마이크로캐리어 복합체의 세포 배양액 내 거동을 확인함으로써 세포의 증식 상태를 직관적으로 모니터링 할 수 있음을 확인하였다.
- [98] 도 7은 폴리스타이렌 재질의 마이크로캐리어 및 본 발명의 실시예에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기에 포함되는 마이크로캐리어의 시간에 따른 거동을 도시한 것이다.
- [99] 도 7에 나타낸 바와 같이, 세포 배양액 내에 서로 다른 두 종류의

마이크로캐리어를 포함하는 시험관을 흔들어 고른 분산 상태를 만든 뒤 실험대에 올려놓고 시간에 따른 분포 거동을 살펴보면, 종래에 사용되는 폴리스타이렌 재질의 마이크로캐리어(밀도 1.04g/ml 이상)가 세포 배양액 내에서 3초 이내에 시험관 바닥으로 침강하였으나, 0.995g/ml 밀도의 코어를 형성된 저비중 마이크로캐리어는 5초 이상 고르게 분산된 형태가 유지됨을 보여주고 있으며, 30초 까지 50% 이상의 부피에 고르게 분산되어 있는 상태를 유지하는 결과를 보였다.

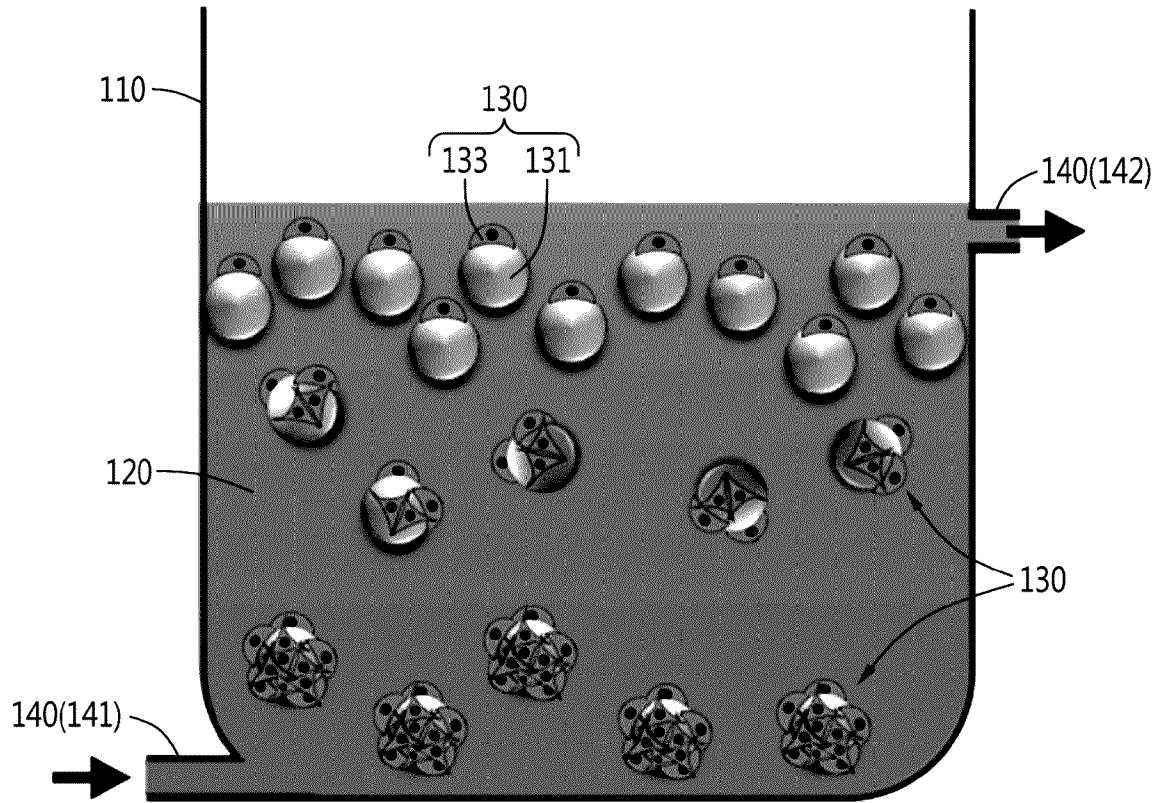
[100] 즉, 본 발명의 실시예에 따른 마이크로캐리어 기반 세포 배양기는 세포 배양 챔버 내 교반력을 최소한으로 적용하여 세포-마이크로캐리어 복합체의 부유 상태를 유지할 수 있는 것을 알 수 있다.

[101] 한편, 본 명세서와 도면에 개시된 본 발명의 실시 예들은 이해를 돕기 위해 특정 예를 제시한 것에 지나지 않으며, 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다. 여기에 개시된 실시 예들 이외에도 본 발명의 기술적 사상에 바탕을 둔 다른 변형 예들이 실시 가능하다는 것은, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 것이다.

청구범위

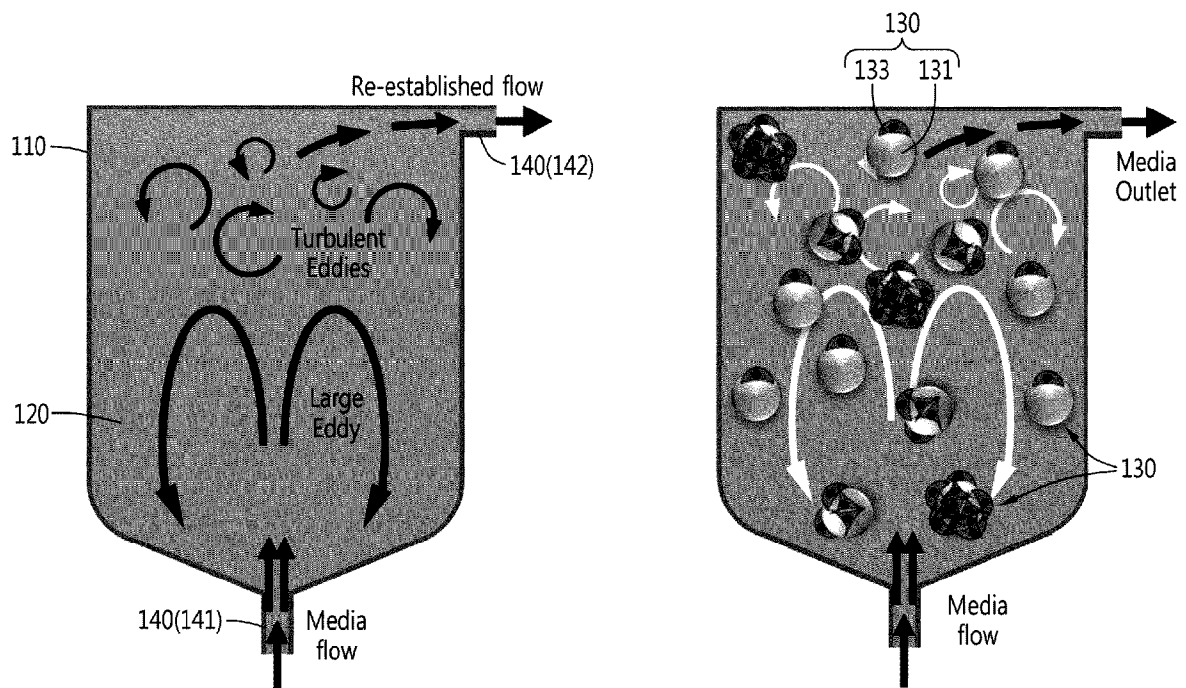
- [청구항 1] 세포 배양 챔버;
 상기 챔버 내에 수용되는 세포 배양액; 및
 상기 세포 배양액 내에 부유하며 세포가 성장되는 표면을 제공하는
 마이크로캐리어를 포함하며,
 상기 세포 배양액은 상기 세포 배양 챔버 하부로 유입되어 상기 세포 배양
 챔버 상부로 유출되는 것인
 마이크로캐리어 기반 세포 배양기.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
 상기 마이크로캐리어는 상기 세포 배양액 보다 비중이 낮은 것을
 특징으로 하는
 마이크로캐리어 기반 세포 배양기.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
 상기 마이크로캐리어는 표면에서 세포가 증식됨에 따라 상기 세포 배양
 챔버의 하단으로 침강하는 것을 특징으로 하는
 마이크로캐리어 기반 세포 배양기.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
 상기 세포 배양 챔버는 상기 세포 배양 챔버의 하단에 난류 차단
 구조물(Turbulent Eddy-Breaker; 150)을 포함하는 것을 특징으로 하는
 마이크로캐리어 기반 세포 배양기.
- [청구항 5] 세포 배양 챔버 하부에서 세포 배양액을 유입되며 상기 세포 배양액이
 상기 세포 배양 챔버 상부로 유출되는 세포 반응기를 제공 단계;
 상기 세포 배양 챔버 내에 수용되는 세포 배양액 상에 마이크로캐리어와
 성장 대상 세포를 투입하는 세포 투입 단계; 및
 상기 마이크로캐리어 표면에 상기 성장 대상 세포가 부착된
 세포-마이크로캐리어 복합체의 상기 세포 배양 챔버 내에서의 위치분포
 변화를 확인하는 세포 증식 관찰 단계를 포함하는
 마이크로캐리어 기반 세포 배양 모니터링 방법.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서,
 상기 세포-마이크로캐리어 복합체의 비중을 산출하는 단계를 더
 포함하는
 마이크로캐리어 기반 세포 배양 모니터링 방법.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
 상기 산출된 세포-마이크로캐리어 복합체의 비중으로부터 세포의 성장
 상태 데이터를 도출하는 단계를 더 포함하는
 마이크로캐리어 기반 세포 배양 모니터링 방법.

[도 1]

100

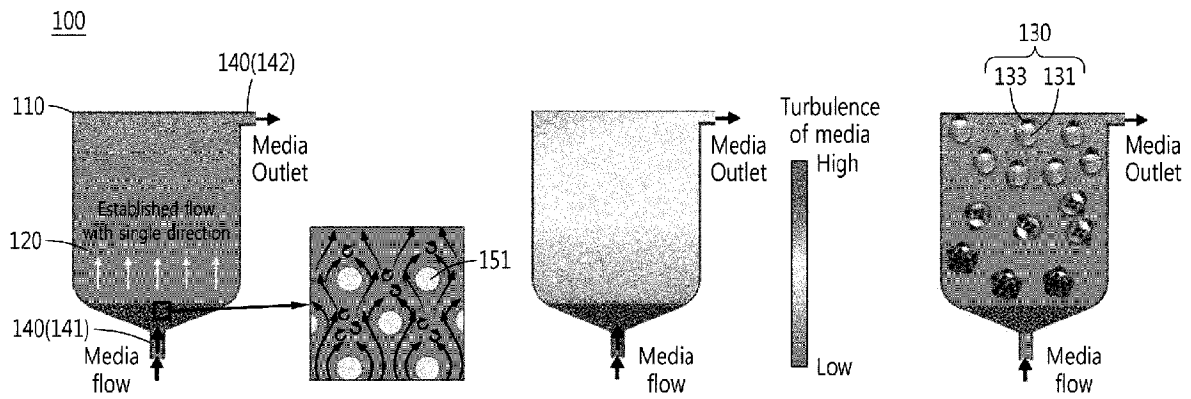
[도 2a]

Without Turbulent Eddy-Breaker

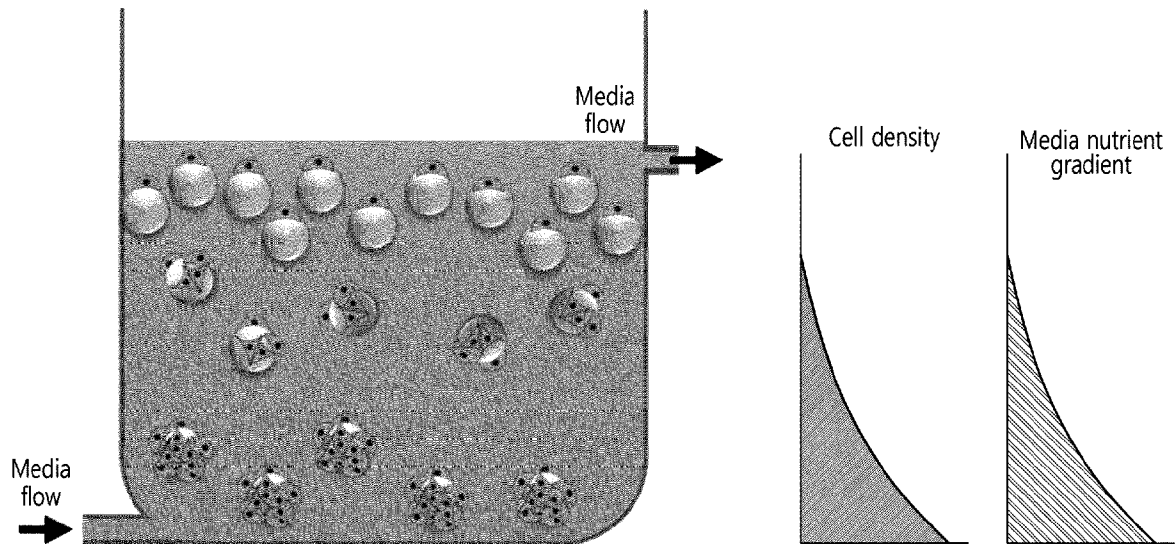


[도2b]

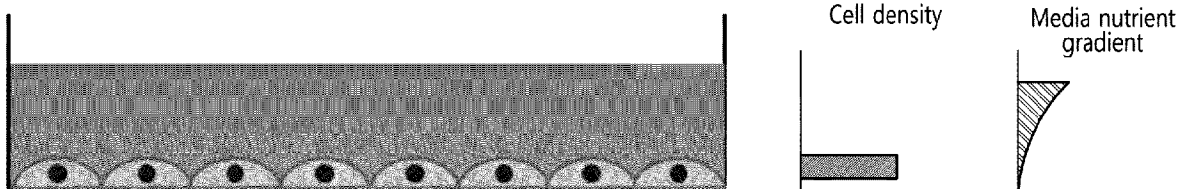
Without Turbulent Eddy-Breaker



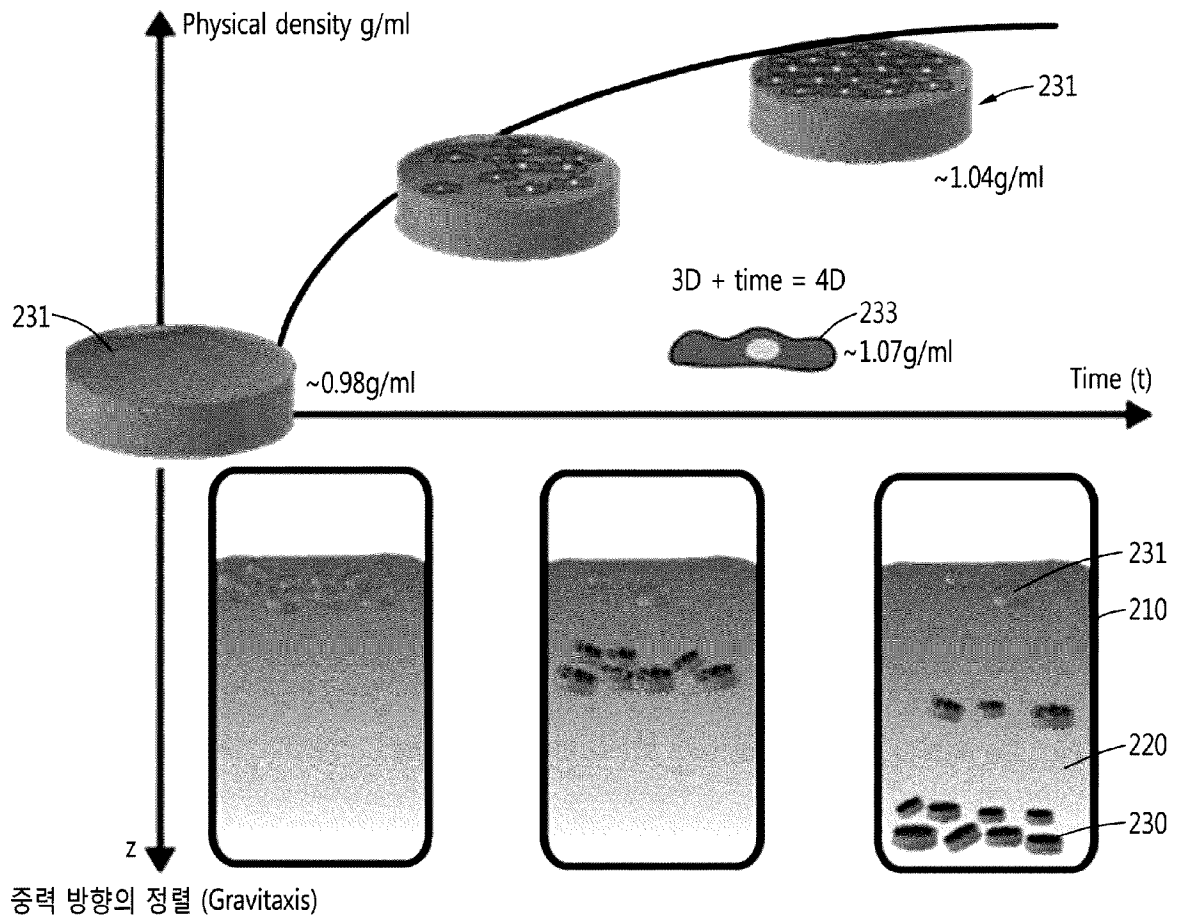
[도3a]



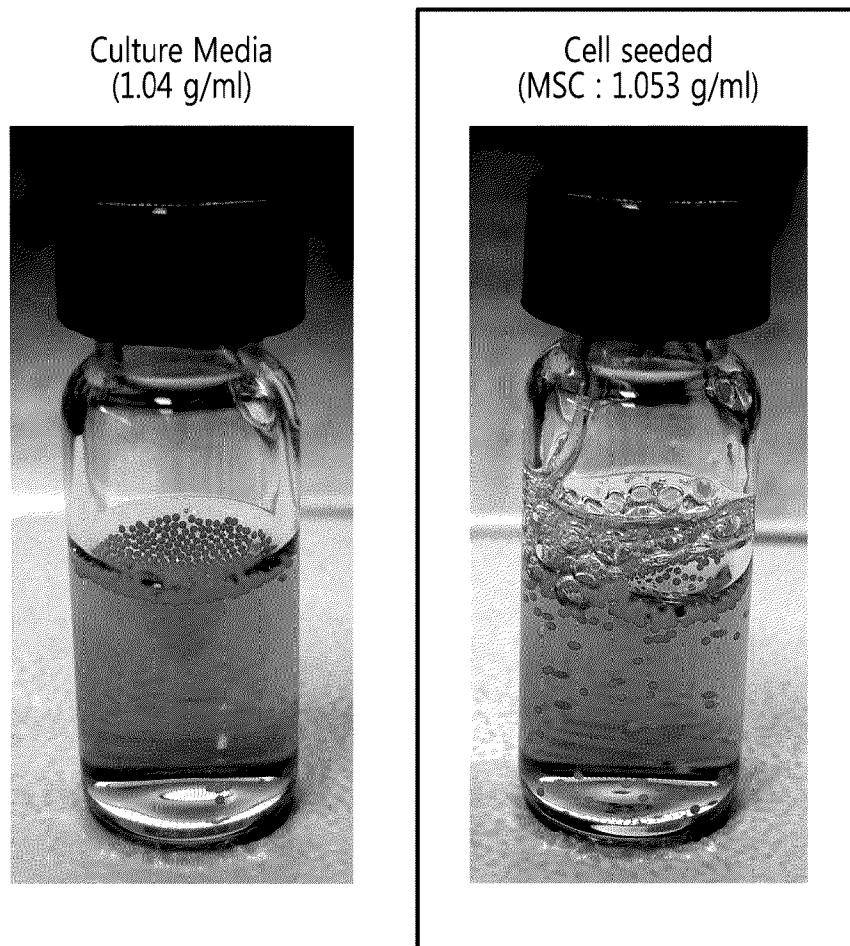
[도3b]



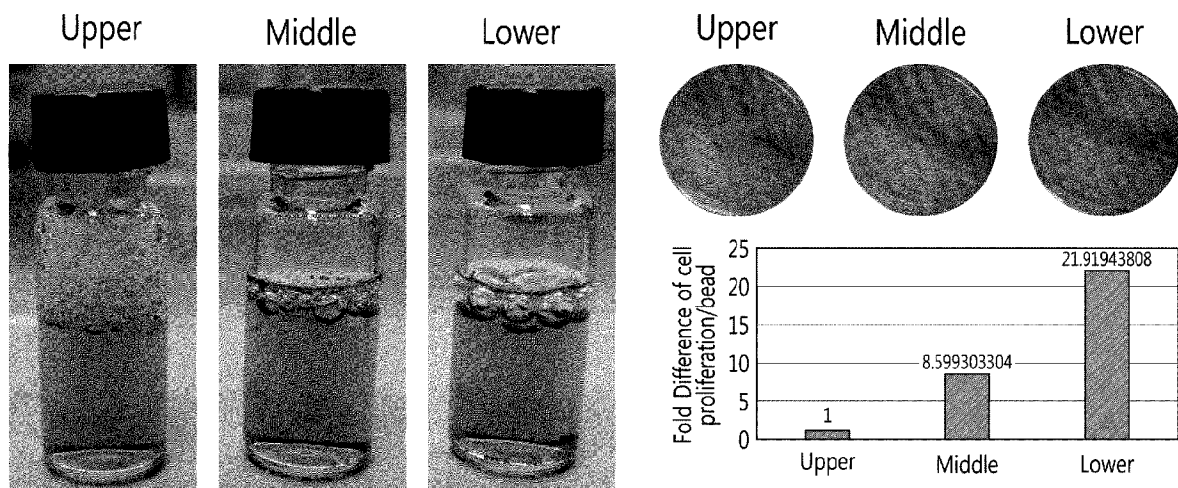
[도4]



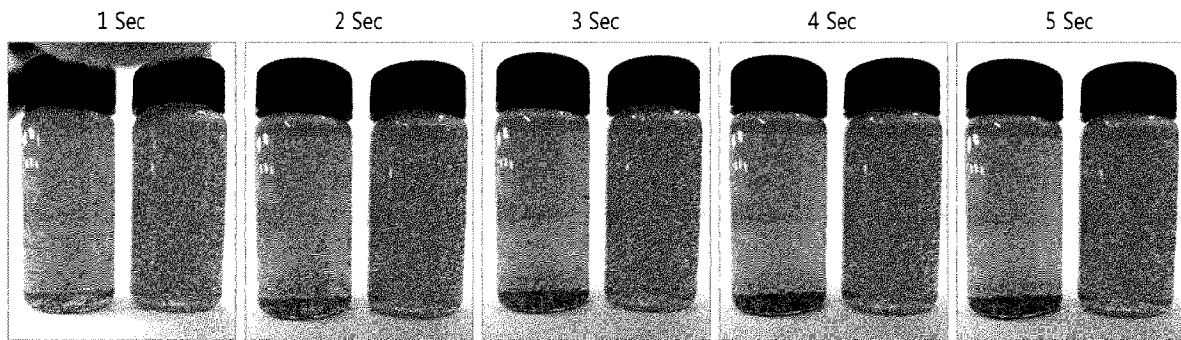
[도5]



[도6]



[도7]

좌) 폴리스타이렌 마이크로캐리어 (1.04g/cc, 500 μ m diameter)우) 저비중 마이크로캐리어 (0.995g/cc, 500 μ m diameter)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/002775

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 3/00(2006.01)i; **C12M 1/09**(2006.01)i; **C12M 1/12**(2006.01)i; **C12M 3/06**(2006.01)i; **C12M 1/00**(2006.01)i;
C12M 1/26(2006.01)i; **G01N 15/02**(2006.01)i; **G01N 15/00**(2006.01)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 3/00(2006.01); C12N 11/00(2006.01); C12N 11/02(2006.01); C12N 11/14(2006.01); C12N 5/00(2006.01);
C12N 5/06(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: 마이크로캐리어 (microcarrier), 세포 배양 (cell culture), 비중 (specific gravity), 침강 (sinking), 난류차단구조물 (turbulent eddy-breaker)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2011-172533 A (KOMADA, Fusao et al.) 08 September 2011 (2011-09-08) See abstract; paragraphs [0012], [0061], [0066]-[0067] and [0069]; and figure 2.	1
Y		2-7
Y	WO 2017-176055 A1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 12 October 2017 (2017-10-12) See abstract; and paragraphs [0030], [0119]-[0127] and [0138].	2-7
A	JP 3275411 B2 (TOYOBO CO., LTD.) 15 April 2002 (2002-04-15) See entire document.	1-7
A	JP 2004-236553 A (HITACHI LTD. et al.) 26 August 2004 (2004-08-26) See entire document.	1-7



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

02 June 2021

Date of mailing of the international search report

02 June 2021

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/KR2021/002775

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012-0009645 A1 (OH, S. et al.) 12 January 2012 (2012-01-12) See entire document.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/002775

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2011-172533	A	08 September 2011	None			
WO	2017-176055	A1	12 October 2017	KR	10-1975100	B1	03 May 2019
				KR	10-2017-0114993	A	16 October 2017
				US	2019-0144820	A1	16 May 2019
JP	3275411	B2	15 April 2002	JP	06-209761	A	02 August 1994
JP	2004-236553	A	26 August 2004	None			
US	2012-0009645	A1	12 January 2012	CN	102428172	A	25 April 2012
				EP	2408903	A1	25 January 2012
				EP	2408903	B1	06 August 2014
				JP	2012-520672	A	10 September 2012
				KR	10-2011-0137805	A	23 December 2011
				SG	174471	A1	28 October 2011
				US	9150829	B2	06 October 2015
				WO	2010-107392	A1	23 September 2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12M 3/00(2006.01)i; C12M 1/09(2006.01)i; C12M 1/12(2006.01)i; C12M 3/06(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/26(2006.01)i; G01N 15/02(2006.01)i; G01N 15/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12M 3/00(2006.01); C12N 11/00(2006.01); C12N 11/02(2006.01); C12N 11/14(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/06(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: 마이크로캐리어 (microcarrier), 세포 배양 (cell culture), 비중 (specific gravity), 침강 (sinking), 난류차단구조물 (turbulent eddy-breaker)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2011-172533 A (KOMADA FUSAO 등) 2011.09.08 요약; 단락 [0012], [0061], [0066]-[0067], [0069]; 도면 2	1
Y		2-7
Y	WO 2017-176055 A1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 2017.10.12 요약; 단락 [30], [119]-[127],[138]	2-7
A	JP 3275411 B2 (TOYOBO CO., LTD.) 2002.04.15 전체 문헌	1-7
A	JP 2004-236553 A (HITACHI LTD. 등) 2004.08.26 전체 문헌	1-7
A	US 2012-0009645 A1 (OH, S. 등) 2012.01.12 전체 문헌	1-7
☐ 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 2021년06월02일(02.06.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년06월02일(02.06.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 전선애 전화번호 +82-42-481-8399

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2011-172533 A	2011/09/08	없음	
WO 2017-176055 A1	2017/10/12	KR 10-1975100 B1	2019/05/03
		KR 10-2017-0114993 A	2017/10/16
		US 2019-0144820 A1	2019/05/16
JP 3275411 B2	2002/04/15	JP 06-209761 A	1994/08/02
JP 2004-236553 A	2004/08/26	없음	
US 2012-0009645 A1	2012/01/12	CN 102428172 A	2012/04/25
		EP 2408903 A1	2012/01/25
		EP 2408903 B1	2014/08/06
		JP 2012-520672 A	2012/09/10
		KR 10-2011-0137805 A	2011/12/23
		SG 174471 A1	2011/10/28
		US 9150829 B2	2015/10/06
		WO 2010-107392 A1	2010/09/23