

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 5월 9일 (09.05.2019)



(10) 국제공개번호
WO 2019/088560 A1

- (51) 국제특허분류:
C12M 1/00 (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/012682
- (22) 국제출원일: 2018년 10월 25일 (25.10.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0145791 2017년 11월 3일 (03.11.2017) KR
- (71) 출원인: 한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 충남대학교산학협력단 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) [KR/KR]; 34134 대전시 유성구 대학로 99, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 강선웅 (KANG, Sun Woong); 34087 대전시 유성구 노은서로142번길 67, 1층, Daejeon (KR). 허강무 (HUH, Kang Moo); 34134 대전시 유성구 대학로 99, Daejeon (KR). 문성환 (MOON, Sung Hwan); 05029 서울시 광진구 능동로 120, Seoul (KR). 김다은 (KIM, Da Eun); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 오혜민 (OH, Hye Min); 34134 대전시 유성구 대학로 99, Daejeon (KR). 심혜은 (SHIM, Hye Eun); 34074 대전시 유성구 지족로190번길 36, 105-1602, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인(유)화우 (YOON & YANG (IP) LLC); 06175 서울시 강남구 테헤란로108길 11, 4층, Seoul (KR).

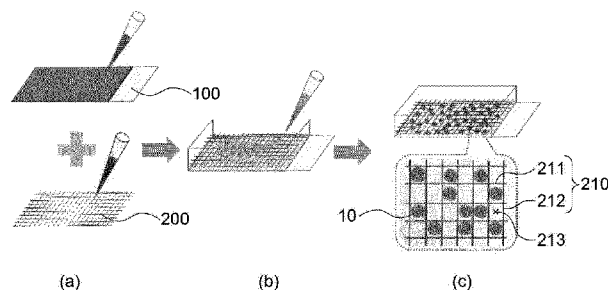
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: DEVICE FOR FORMING AND COUNTING SPHEROIDS AND METHOD FOR PRODUCING SAME, AND SPHEROID CULTURING METHOD AND COUNTING METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 스페로이드 형성 및 카운팅 기기 및 이의 제조 방법, 그리고 이를 이용한 스페로이드 배양 방법 및 계수 방법



(57) Abstract: A device for forming and counting spheroids according to one embodiment of the present invention may comprise a substrate, and a mesh member which is configured to be able to be positioned on the surface of the substrate and has a plurality of protruding members. The protruding members intersect in the form of a mesh and may form a plurality of pores.

(57) 요약서: 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기는, 기판 및 상기 기판 표면에 위치할 수 있도록 형성되며 복수의 돌출부재를 갖는 메쉬부재를 포함할 수 있다. 상기 복수의 돌출부재는 메쉬형태로 교차하여 복수의 포어(pore)를 형성할 수 있다.



WO 2019/088560 A1

명세서

발명의 명칭: 스페로이드 형성 및 카운팅 기기 및 이의 제조 방법, 그리고 이를 이용한 스페로이드 배양 방법 및 계수 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 스페로이드를 균일한 크기로 형성하고 이를 계수할 수 있는 스페로이드 형성 및 카운팅 기기 및 이를 이용한 스페로이드 배양 방법 및 계수 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 체내 세포 및 조직은 복잡한 3차원 구조로 상호 작용하면서 성장하고 분화 및 발전해 간다. 그러나 대부분 세포 배양은 2차원으로 된 불침투성의 평평한 평면에서 이루어지고 있다. 따라서, 2차원 세포배양은 우리 체내 세포 환경 조건을 모사 하지는 못한다는 한계점을 지니고 있다. 최근에는 생체 내와 동등한 기능을 갖는 3차원 세포 조직인 스페로이드(spheroid)의 배양이 주목을 받고 있다. 당뇨 치료를 위한 인슐린의 정상분비를 유도하기 위해서 췌도 세포를 이식함에 있어 응집된 세포를 이식하는 방법 등이 쓰이고 있어 스페로이드의 대량 생산이 요구되고 있다. 또한, 줄기세포 연구가 성숙됨에 따라 줄기세포를 3차원 배양하여 각종 분화 기전의 연구에 응용하기 위한 여러 가지 방법이 시도되고 있다. 종래의 3차원 세포배양 방법으로는 현적 배양법(hanging-drop method), 회전식 배양법, 원심분리법, 마이크로 몰딩(micromolding)법 등이 있다. 다만 이러한 종래의 배양법으로는 균일한 사이즈의 스페로이드를 배양하는 것에는 한계가 있다.
- [3] 나아가, 이러한 스페로이드를 보다 간편하고 정확하게 카운팅하기 위한 기기의 필요성이 크게 대두되고 있으나, 현재까지 그러한 기기는 존재하지 않는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명은 전술한 문제 및 이와 연관된 다른 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.
- [5] 본 발명의 일 예시적 목적은, 균일한 크기의 스페로이드를 배양하기 위한 기기를 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 다른 예시적 목적은, 스페로이드를 보다 간편하고 정확하게 계수하기 위한 기기를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기는, 기관 및 상기 기관 표면에 위치할 수 있도록 형성되며 복수의 돌출부재를 갖는 메쉬부재를 포함할 수 있다.

- [8] 실시예에 있어서, 상기 복수의 돌출부재는 메쉬형태로 교차하여 복수의 포어(pore)를 형성할 수 있다.
- [9] 실시예에 있어서, 상기 메쉬부재는 헥사노일 글리콜 키토산(Hexanoyl glycol chitosan)으로 코팅될 수 있다.
- [10] 실시예에 있어서, 상기 포어의 폭은 50 내지 500 μm 일 수 있다.
- [11] 실시예에 있어서, 상기 기관 표면은 헥사노일 글리콜 키토산으로 코팅될 수 있다.
- [12] 실시예에 있어서, 상기 기관은 슬라이드 글라스일 수 있다.
- [13] 실시예에 있어서, 상기 메쉬부재가 상기 기관 표면에 위치될 때 상기 메쉬부재의 상기 돌출부재가 형성되지 않은 일면이 상기 기관 표면에 접할 수 있다.
- [14] 실시예에 있어서, 상기 메쉬부재 및 상기 기관은 조립부재에 의해 서로 결합될 수 있다.
- [15] 실시예에 있어서, 상기 돌출부재는 제 1 방향으로 연장되며 서로 이격되어 위치하는 복수의 제 1 돌출부재 및 상기 제 1 방향과 교차하는 제 2 방향으로 연장되며 서로 이격되는 복수의 제 2 돌출부재를 포함할 수 있다.
- [16] 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 제조 방법은, 헥사노일 글리콜 키토산 용액을 제조하는 용액제조단계, 기관에 상기 제조된 용액을 분사한 후 상기 기관을 건조하여 상기 기관을 코팅하는 기관코팅단계, 메쉬부재에 상기 제조된 용액을 분사한 후 상기 메쉬부재를 건조하여 상기 메쉬부재를 코팅하는 메쉬부재코팅단계 및 상기 코팅된 기관 및 메쉬부재를 조립부재를 이용하여 조립하는 단계를 포함할 수 있다.
- [17] 실시예에 있어서, 상기 메쉬부재코팅단계에서, 상기 메쉬부재는 세워서 고정된 상태에서 상기 메쉬부재에 상기 제조된 용액을 분사할 수 있다.
- [18] 실시예에 있어서, 상기 헥사노일 글리콜 키토산 용액은 0.01 내지 1 wt%일 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 배양 방법은, 상기 기기에 복수의 세포를 분주(seeding)하는 단계 및 수일이 지난 후 상기 기기의 각각의 포어에 관찰되는 스페로이드를 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [20] 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 계수 방법은, 상기 기기에 스페로이드를 분주하는 단계, 상기 기기의 일면과 평행한 양 방향으로 상기 기기를 흔들어 상기 기기의 각각의 포어에 스페로이드를 위치시키는 단계, 상기 기기를 현미경의 재물대에 위치시키는 단계 및 상기 현미경의 상의 위치를 이동해가며 시야 내의 스페로이드를 계수하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [21] 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용하면, 특별한 장비나 추가 공정없이 스페로이드를 균일한 사이즈로 대량 배양할 수 있어서 재생의료나 인공장기, 생체유용물질 생산, 신약 스크리닝, 동물 대체 시험법 등 다양한 분야의 산업에 이용이 기대될 수 있다.
- [22] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기는 HGC(hexanoyl glycol chitosan)로 코팅되어 배양기 표면과의 부착이 최소화되므로 3D 스페로이드를 배양한 후 간편하게 회수할 수 있는 장점이 있다.
- [23] 또한, 스페로이드 계수를 위하여 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 기존의 용기에 올려 놓은 후 사용 가능하므로 별도의 계수를 위한 장치를 구비할 필요가 없어 비용이 절감되고 매우 간편하다.
- [24] 한편, 앞서 기재된 효과는 예시적인 것에 불과하며 당업자의 관점에서 본 발명의 세부 구성으로부터 예측되거나 기대되는 효과들 또한 본원발명 고유의 효과에 추가될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 전반적으로 설명하기 위한 도이다.
- [26] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 제조 방법의 순서도이다.
- [27] 도 3 및 도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 제조 방법을 설명하기 위한 도이다.
- [28] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 배양 방법의 순서도이다.
- [29] 도 6 내지 도 9은 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 배양 방법을 설명하기 위한 도이다.
- [30] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 계수 방법의 순서도이다.
- [31] 도 11 및 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 계수 방법을 설명하기 위한 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [32] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 명세서에 개시된 실시 예를 상세히 설명하되, 도면 부호에 관계없이 동일하거나 유사한 구성요소에는 동일한 참조 번호를 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.

- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.
- [36] 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.
- [37] 이하에서는, 도면을 참조하여 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기에 대하여 설명한다.
- [38] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 전반적으로 설명하기 위한 도이다.
- [39] 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기는, 기관(100) 및 메쉬부재(200)를 포함할 수 있다.
- [40] 기관(100)은 광투과성 재질로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 기관(100)은 슬라이드 글라스일 수 있다.
- [41] 메쉬부재(200)는 기관(100) 표면에 위치할 수 있도록 형성될 수 있다.
- [42] 예를 들어, 메쉬부재(200)는 유연한 재질로 이루어지며 펼쳐진 상태에서는 상기 기관(100) 표면을 덮도록 이루어질 수 있다.
- [43] 또한, 메쉬부재(200)는 복수의 돌출부재(210)를 가질 수 있다. 복수의 돌출부재(210)는 메쉬형태로 교차하여 복수의 포어(Pore, 213)를 형성할 수 있다.
- [44] 구체적으로, 상기 돌출부재(210)는, 제 1 방향으로 연장되며 서로 이격되어 위치하는 복수의 제 1 돌출부재(211) 및 상기 제 1 방향과 교차하는 제 2 방향으로 연장되며 서로 이격되는 복수의 제 2 돌출부재(212)를 포함할 수 있다. 복수의 제

- 1 돌출부재(211)는 서로에 대해 평행하며, 마찬가지로, 복수의 제 2 돌출부재(212)는 서로에 대해 평행할 수 있다.
- [45] 한편, 복수의 포어(213)는 각각의 포어(213)가 하나의 스페로이드(10)를 수용하기 적합한 크기로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 포어(213)의 폭은 50 내지 500 μm 일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 약 140 μm 일 수 있다. 포어(213)의 폭이 140 μm 인 경우, 다양한 세포 실험에서 가장 적합하게 사용될 수 있는 크기로 스페로이드가 배양될 수 있다.
- [46] 보다 구체적으로, 메쉬부재(200)의 일면은 돌출부재(210)가 형성되지 않으며 타면은 돌출부재(210)가 형성될 수 있다. 이 경우, 메쉬부재(200)가 기관(100) 표면에 위치될 때 상기 메쉬부재(200)의 돌출부재(210)가 형성되지 않은 일면이 기관(100) 표면에 접하도록 위치될 수 있다.
- [47] 이렇게 포개어진 기관(100) 및 메쉬부재(200)는 별도의 조립부재에 의해 서로에 대해 결합 또는 고정될 수 있다.
- [48] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기는 그 내부 표면에 헥사노일 글리콜 키토산(Hexanoyl glycol chitosan: HGC)으로 코팅될 수 있다.
- [49] 보다 구체적으로는, 스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 기관(100) 및 메쉬부재(200)는 각각 헥사노일 글리콜 키토산으로 코팅될 수 있다.
- [50] 이하에서는, 도면을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 제조 방법에 대하여 상세히 설명하도록 한다.
- [51] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 제조 방법의 순서도이다. 도 3 및 도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 제조 방법을 설명하기 위한 도이다.
- [52] 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 제조방법은, 용액제조단계(S110), 기관코팅단계(S120), 메쉬부재코팅단계(S130), 및 기관 및 메쉬부재 고정단계(S140)를 포함할 수 있다.
- [53] 용액제조단계(S110)에서는, 헥사노일 글리콜 키토산(HGC) 용액이 제조된다. 일 실시예에 있어서, HGC 용액은 아래와 같이 제조되었다.
- [54] 가압 멸균 처리한 증류수(Distilled water: DW)를 0.2 μm 필터로 걸러, 박테리아 등을 제거하는 과정을 수행하였다. 상기 처리된 증류수를 20 ml 를 50 ml 튜브에 옮긴 뒤, 튜브에 계량한 HGC 0.1 g을 첨가하였다. 상기 HGC가 포함된 증류수를 냉장보관(4 $^{\circ}\text{C}$)하면서 1시간마다 한번씩 1 내지 2분간 섞어주었다(vortexing). HGC가 완전히 녹아 HGC 용액이 되기까지 약 3 내지 4일 정도 소요되었다.
- [55] 이때, HGC 용액의 농도는 0.01 내지 1 wt% 일 수 있으며, 바람직하게는 약 0.5 wt%일 수 있다.
- [56] 이후, 기관코팅단계(S120)에서는 기관(100)에 제조된 HGC 용액을 분사한 후 상기 기관(100)을 건조하여 기관(100)을 코팅한다.
- [57] 일 실시예에 따른 기관(슬라이드 글라스, 100) 코팅 과정은 다음과 같다. 1 ml

짜리 주사기의 바늘 부분을 제거한 후 HGC 용액을 400 ml 취하였다. 앞서 계량한 400 ml의 HGC 용액을 슬라이드 글라스(5.6 cm × 2.6 cm)에 골고루 퍼지도록 뿌려주었다. 위의 과정을 마친 슬라이드 글라스를 55 °C 오븐에서 하루 정도 건조하였다.

[58] 이후, 메쉬부재코팅단계(S130)에서는 메쉬부재(200)에 제조된 HGC 용액을 분사한 후 상기 메쉬부재(200)을 건조하여 메쉬부재(200)를 코팅한다.

[59] 상기 메쉬부재코팅단계(S130)에서, 상기 메쉬부재(200)는 세워서 고정된 상태에서 상기 메쉬부재(200)에 상기 제조된 용액을 분사할 수 있다.

[60] 도 3에 도시된 바와 같이 고정틀을 이용하여 메쉬를 세워서 고정시킬 수 있다. 구체적으로 상기 고정틀(300)은 본체(310), 고정부(320), 및 고정바(330)를 포함할 수 있다. 메쉬부재(200)는 고정부(320)에 의해 본체(310)에 고정될 수 있다. 본체(310)는 고정바(330)에 의해 지면으로부터 이격되어 위치될 수 있다. 한편, 상기 고정틀(300)은 철제 건조틀일 수 있다.

[61] 이 때, 메쉬부재(200)를 세워서 고정하는 이유는 메쉬부재(200)를 코팅할 때 메쉬부재(200)의 포어(213)가 HGC 용액(코팅 용액)으로 인해 막히지 않도록 하기 위함이다.

[62] 이후, HGC 용액을 1ml 파이펫을 이용하여 고정된 메쉬부재(200)에 골고루 뿌려준다.

[63] 위의 과정을 마친 메쉬부재(200)를 세워서 고정된 채로 청정 실험대 안에서 하루 동안 건조시킨다.

[64] 기관 및 메쉬부재 고정단계(S140)에서는 상기 코팅된 기관(100) 및 메쉬부재(200)를 조립부재를 이용하여 조립될 수 있다.

[65]

[66] *예를 들어, 상기 코팅 과정을 마친 메쉬부재(200)를 5.6 cm × 2.6 cm의 크기로 자른 후 상기 코팅 과정을 마친 슬라이드 글라스 위에 올렸다. 도 4에 도시된 바와 같이, 이들을 고정부재를 이용하여 고정시켰다. 상기 고정부재는 클립일 수 있다.

[67] 이하에서는, 도면을 참조하여, 위와 같이 제조된 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 배양 방법은 설명하도록 한다.

[68] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 배양 방법의 순서도이다. 도 6 내지 도 9은 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 배양 방법을 설명하기 위한 도이다.

[69] 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 배양 방법은 세포 분주(seeding) 단계(S210) 및 스페로이드 수득 단계(S220)를 포함할 수 있다.

[70] 세포 분주(seeding) 단계(S210)에서는 스페로이드 형성 및 카운팅 기기에 복수의 세포를 분주(seeding)한다.

- [71] 일 실시예에 있어서, 4 개 웰 세포 배양 슬라이드 (Pore size: 140 μm) 중 1 개 웰에 간암세포 (HepG2) 1×10^5 cells / 1 ml를 분주(seeding)하였다.
- [72] 도 6에 도시된 바와 같이, 세포 접종 후 1일이 지나면 세포들이 격자 속에서 유사한 사이즈로 뭉쳐진다(aggregate). 세포 접종 후 2일이 지나면 도 7에 도시된 바와 같이 밀도있게 뭉쳐진 스페로이드가 관찰 가능하다.
- [73] 스페로이드 수득 단계(S220)에서는 수일이 지난 후 상기 기기의 각각의 포어(213)에 관찰되는 스페로이드를 수득한다.
- [74] 일 실시예에 있어서, 스페로이드 수득 시 팁 끝을 잘라 수득하며, 세척(washout)과정을 통하여 스페로이드 수득이 가능하다. 도 8는 세척과정을 통한 스페로이드 수득 이후 메쉬부재(200)를 나타내며, 도 9는 수득된 스페로이드 사진을 도시한다.
- [75] 한편, 균일한 크기로 제작된 세포-spheroids를 실험에 이용하기 위해서는 정확한 계수가 요구된다. 이하에서는, 도면을 참조하여 HGC 코팅된 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용하여 기존에 비해 개선된 스페로이드 계수 방법에 대하여 설명한다.
- [76] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 계수 방법의 순서도이며, 도 11 및 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 계수 방법을 설명하기 위한 도이다.
- [77] 본 발명의 일 실시예에 따른 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 계수 방법은 스페로이드 분주 단계(S310), 스페로이드 위치 단계(S320), 및 스페로이드 계수 단계(S330)를 포함할 수 있다.
- [78] 스페로이드 분주 단계(S310)에서는, 스페로이드 형성 및 카운팅 기기에 스페로이드를 분주한다(도 1의 (b) 참조).
- [79] 스페로이드 위치 단계(S320)에서는, 상기 기기의 일면과 평행한 양 방향으로 상기 기기를 흔들어 상기 기기의 각각의 포어(213)에 스페로이드를 위치시킨다(도 1의 (c) 참조).
- [80] 이 때, 상기 기기를 양 방향으로 흔드는 과정은 수동 또는 자동으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 상기 기기는 상기 기기를 왕복운동시키는 별도의 구동부에 연결될 수 있다.
- [81] 이후, 상기 기기를 현미경의 재물대에 위치시킨 후 현미경의 상의 위치를 이동해가며 시야를 변경할 수 있다.
- [82] 스페로이드 계수 단계(S330)에서는, 시야 내의 스페로이드를 계수할 수 있다. 예를 들어, 스페로이드의 계수는 수동적으로 또는 자동적으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 스페로이드의 계수가 자동적으로 이루어지는 경우에는, 별도의 제어부가 시야 내의 영상에서 스페로이드의 상을 추출함으로써, 스페로이드의 수가 자동적으로 카운팅될 수 있다.
- [83] 이하에서는, 스페로이드 계수 방법의 일 실험예에 대하여 설명한다.

- [84] 도 11을 참조하면, 시인성을 높이기 위해 세포-spheroids 대신에 트립판-블루 염색된 Cytodex 마이크로캐리어를 사용하였다. Cytodex의 직경은 165~220 μm 일 수 있다.
- [85] 5 ml의 D-PBS에 트립판-블루 시약을 20 μl 떨어뜨린 후, Cytodex를 혼합하였다. 약 20분 염색 후 새 D-PBS로 세척(wash-out)하여 샘플을 준비하였다.
- [86] HGC 코팅된 스페로이드 카운팅 기기는 미리 D-PBS 또는 배지로 충분히 적셔준다. 여기서 사용된 메쉬 사이즈는 약 200 μm 일 수 있다.
- [87] Cytodex가 포함된 100 μl 의 D-PBS를 파이펫으로 수득하여, HGC 코팅된 스페로이드 카운팅 기기에 분주한다. 한 개의 Cytodex가 메쉬 한 칸(포어, 213)에 들어 갈 수 있도록 잘 흔들어 준다. 약 5분 정도 Cytodex가 바닥면에 충분히 가라앉도록 기다린다.
- [88] 광학현미경 상의 위치를 이동시키며 메쉬에 존재하는 Cytodex를 계수하였다.
- [89] 도 11의 (a)에 도시된 바와 같이, 일부분의 사진을 여러 번 찍어 Cytodex를 계수한 후 총 Cytodex의 개수를 산출하였다. 예를 들어, 사진 1, 사진 2, 사진 3, 사진 4 및 사진 5의 계수값이 26, 30, 31, 22, 및 23인 경우 평균 계수값은 26.4이다. 이때 각각의 사진 내의 메쉬 구멍 개수는 63개이고 기기 전체에 대한 메쉬 구멍 개수는 2380개이다. 따라서 총 Cytodex의 개수는 $26.4 \times 2380 / 63 = 997$ 개로 산출될 수 있다.
- [90] 도 11의 (b)를 참조하면, 계수 후 광학현미경 상의 위치를 이동시키면서 메쉬에 존재하는 Cytodex를 전부 계수한 후 수득하여 새로운 페트리 접시(Petri dish)에 옮겨 수득하였다.
- [91] 전술한 것과 동일한 방법으로 총 4회에 걸쳐 계수하였다. 도 12에 도시된 바와 같이 정확도는 약 94%이상으로 확인되었다.
- [92] 본 발명이 단지 한정된 수의 실시예와 관련되어 상세하게 설명되었지만, 본 발명은 그러한 개시된 실시예들로 한정되지 않음이 쉽게 이해되어야 한다. 그보다는, 본 발명은 지금까지 설명되지는 않았지만 본 발명의 사상 및 범위와 상응하는 임의의 수의 변형, 개조, 대체 또는 균등한 배열을 통합하도록 변형될 수 있다. 부가적으로, 본 발명의 다양한 실시예가 설명되었지만, 본 발명의 측면들은 설명된 실시예들 중 일부만을 포함할 수도 있음을 이해해야 한다. 따라서, 본 발명은 앞에서의 설명에 의해 제한되는 것으로 간주되지 않아야 하고, 단지 첨부된 청구항들의 범위에 의해서만 한정된다.
- [93] [부호의 설명]
- [94] 100: 기관
- [95] 200: 메쉬부재
- [96] 210: 돌출부재
- [97] 211: 제 1 돌출부재
- [98] 212: 제 2 돌출부재
- [99] 213: 포어(Pore)

- [100] 300: 고정틀
- [101] 310: 본체
- [102] 320: 고정부
- [103] 330: 고정바
- [104]

청구범위

- [청구항 1] 기관 및
 상기 기관 표면에 위치할 수 있도록 형성되며 복수의 돌출부재를 갖는
 메쉬부재를 포함하고,
 상기 복수의 돌출부재는 메쉬형태로 교차하여 복수의 포어(pore)를
 형성하는
 스페로이드 형성 및 카운팅 기기.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
 상기 메쉬부재는 헥사노일 글리콜 키토산(Hexanoyl glycol chitosan)으로
 코팅되는
 스페로이드 형성 및 카운팅 기기.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
 상기 포어의 폭은 50 내지 500 μm 인
 스페로이드 형성 및 카운팅 기기.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
 상기 기관 표면은 헥사노일 글리콜 키토산으로 코팅되는
 스페로이드 형성 및 카운팅 기기.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
 상기 기관은 슬라이드 글라스인 스페로이드 형성 및 카운팅 기기.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
 상기 메쉬부재가 상기 기관 표면에 위치될 때 상기 메쉬부재의 상기
 돌출부재가 형성되지 않은 일면이 상기 기관 표면에 접하는
 스페로이드 형성 및 카운팅 기기.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
 상기 메쉬부재 및 상기 기관은 조립부재에 의해 서로 결합되는
 스페로이드 형성 및 카운팅 기기.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,
 상기 돌출부재는
 제 1 방향으로 연장되며 서로 이격되어 위치하는 복수의 제 1 돌출부재 및
 상기 제 1 방향과 교차하는 제 2 방향으로 연장되며 서로 이격되는 복수의
 제 2 돌출부재를 포함하는
 스페로이드 형성 및 카운팅 기기.
- [청구항 9] 헥사노일 글리콜 키토산 용액을 제조하는 용액제조단계;
 기관에 상기 제조된 용액을 분사한 후 상기 기관을 건조하여 상기 기관을
 코팅하는 기관코팅단계;
 메쉬부재에 상기 제조된 용액을 분사한 후 상기 메쉬부재를 건조하여
 상기 메쉬부재를 코팅하는 메쉬부재코팅단계 및

상기 코팅된 기관 및 메쉬부재를 조립부재를 이용하여 조립하는 단계를 포함하는

스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 제조방법.

[청구항 10] 제 9 항에 있어서,

상기 메쉬부재코팅단계에서, 상기 메쉬부재는 세워져 고정된 상태에서 상기 메쉬부재에 상기 제조된 용액을 분사하는 스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 제조방법.

[청구항 11] 제 9 항에 있어서,

상기 헥사노일 글리콜 키토산 용액은 0.01 내지 1 wt%인 스페로이드 형성 및 카운팅 기기의 제조방법.

[청구항 12] 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따르는 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 배양 방법에 있어서,

상기 기기에 복수의 세포를 분주(seeding)하는 단계 및 수일이 지난 후 상기 기기의 각각의 포어에 관찰되는 스페로이드를 수득하는 단계를 포함하는

스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 배양 방법.

[청구항 13] 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따르는 스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 계수 방법에 있어서,

상기 기기에 스페로이드를 분주하는 단계;

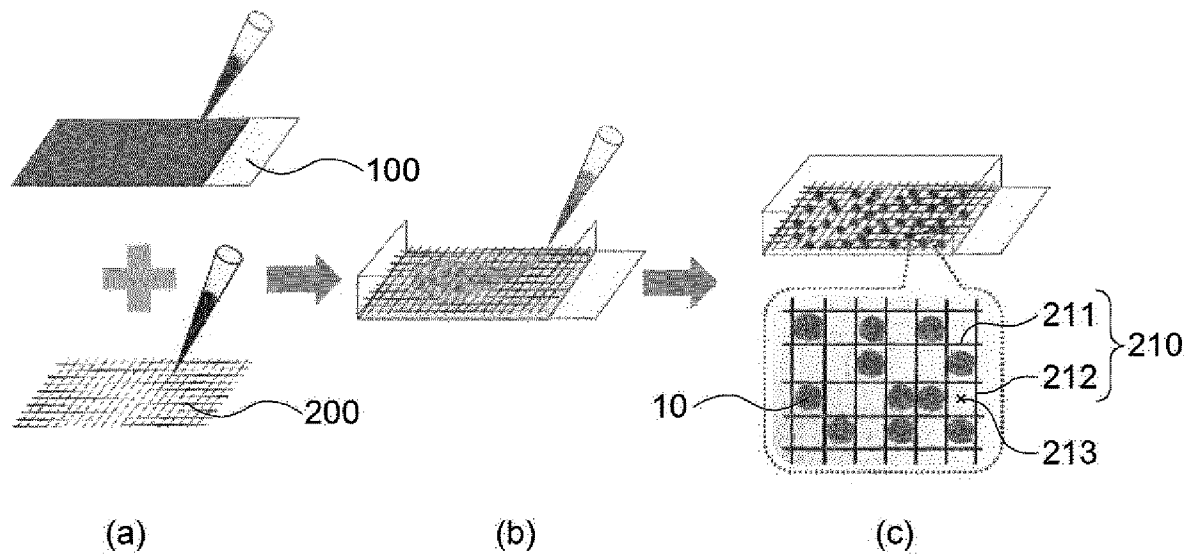
상기 기기의 일면과 평행한 양 방향으로 상기 기기를 흔들며 상기 기기의 각각의 포어에 스페로이드를 위치시키는 단계;

상기 기기를 현미경의 재물대에 위치시키는 단계 및

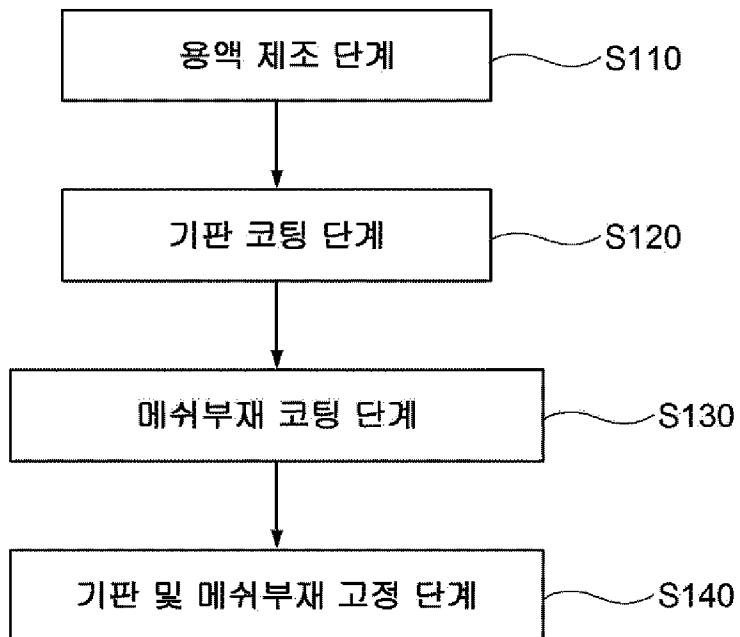
상기 현미경의 상의 위치를 이동해가며 시야 내의 스페로이드를 계수하는 단계를 포함하는

스페로이드 형성 및 카운팅 기기를 이용한 스페로이드 계수 방법.

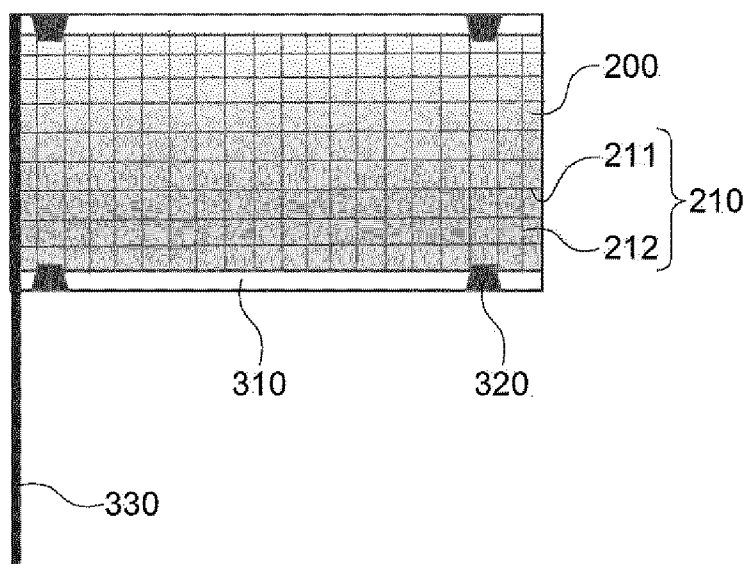
[도1]



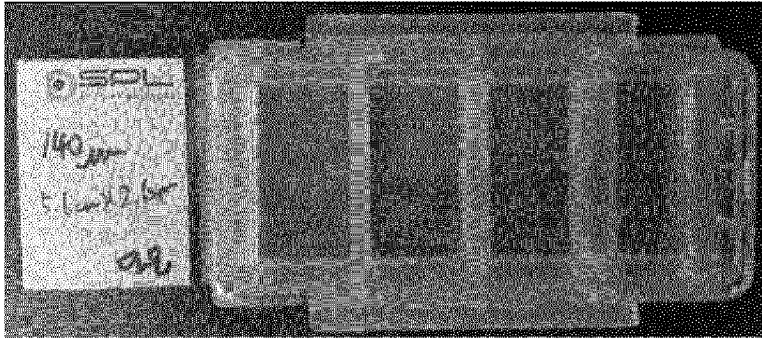
[도2]



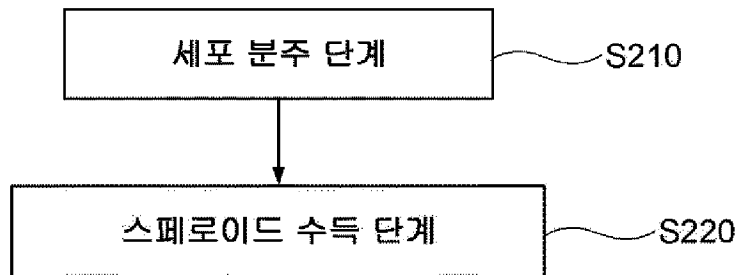
[도3]



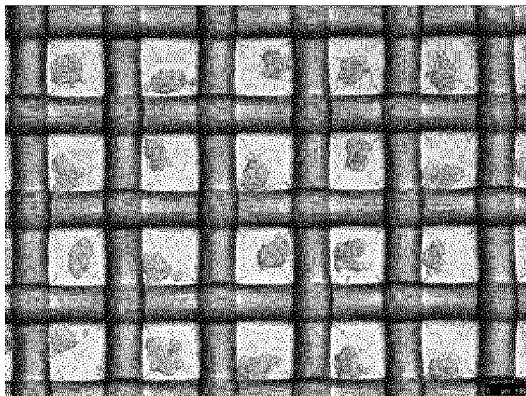
[도4]



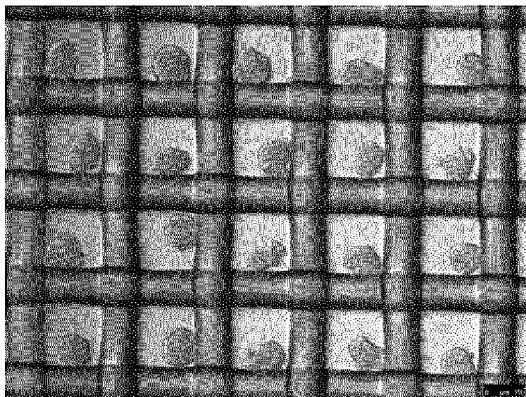
[도5]



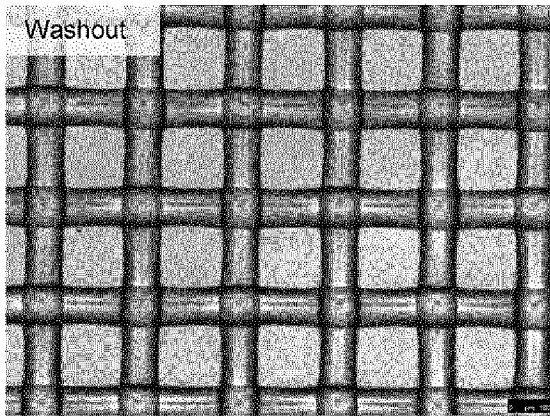
[도6]



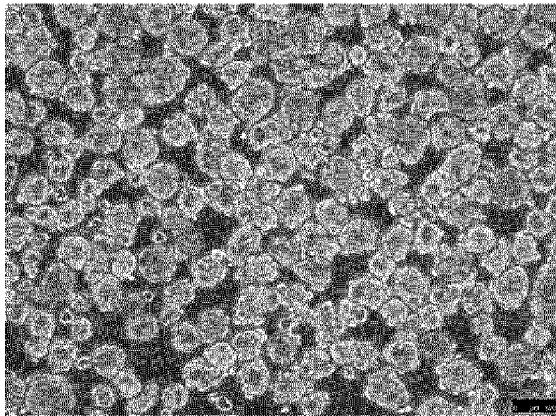
[도7]



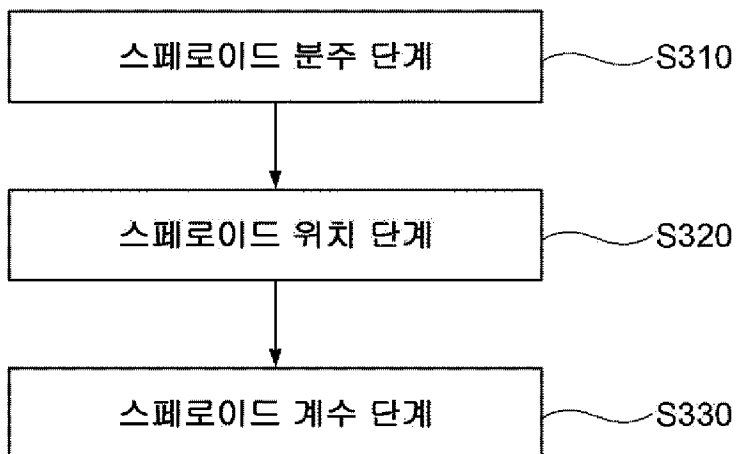
[도8]



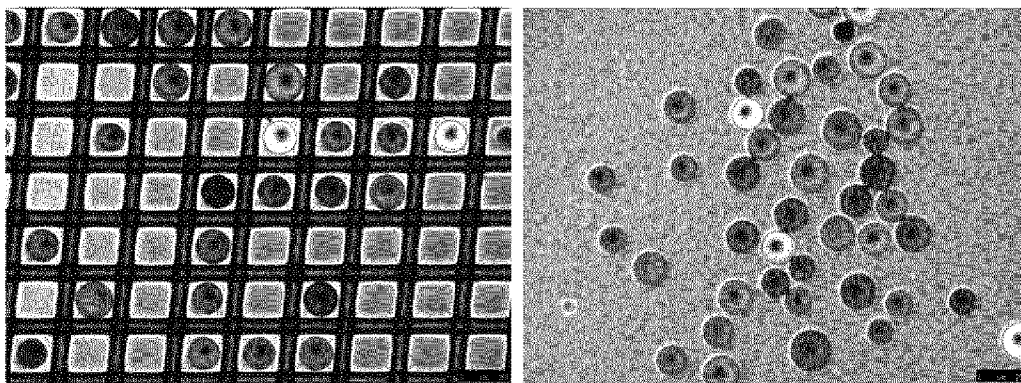
[도9]



[도10]



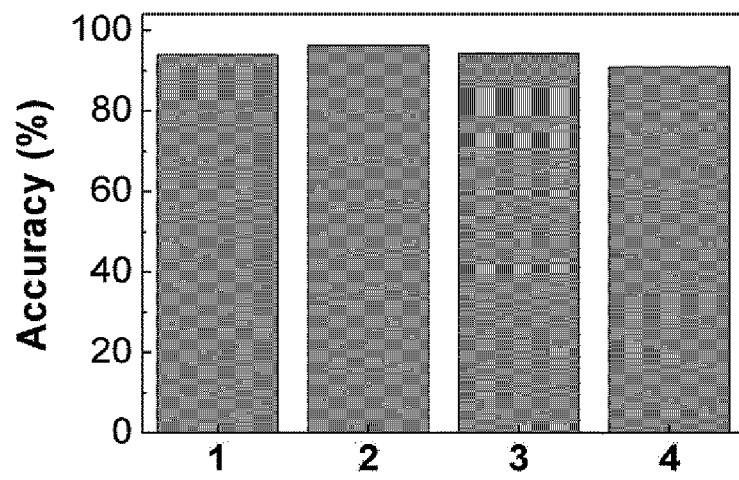
[도11]



(a)

(b)

[도 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/012682

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/00(2006.01)i, C12M 1/34(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 1/00; B82Y 30/00; C08B 37/08; C12M 1/34; C12M 3/00; C12N 5/09

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: spheroid formation, counting, substrate, protruding member, mesh member, pore, hexanoyl glycol chitosan, coating

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2009-0004879 A (SCIVAX CORPORATION) 12 January 2009 See claims 1-47; paragraphs [0061]-[0072], [0117]-[0130]; and figures 1-18.	1,3,5-8,12,13
Y		2,4,9-11
Y	KR 10-2016-0027669 A (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY et al.) 10 March 2016 See claims 1-13; and paragraph [0060].	2,4,9-11
X	KR 10-2014-0069148 A (KURARAY CO., LTD.) 09 June 2014 See claims 1-14; paragraphs [0018]-[0030], [0042]-[0045], [0058]-[0069]; table 1; and figures 1-11.	1,3,5-8,12,13
Y		2,4,9-11
Y	CHO, M. O. et al., "Bioinspired Tuning of Glycol Chitosan for 3D Cell Culture", NPG Asia Materials, 2016, vol. 8, e309, inner pages 1-10, <DOI:10.1038/am.2016.130> See abstract; page 2, right column, "Preparation of Culture Plates Coated with GC and HGC" section.	2,4,9-11
A	KR 10-1437147 B1 (CYTOGEN, INC.) 02 September 2014 See the 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

"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

06 MARCH 2019 (06.03.2019)

Date of mailing of the international search report

06 MARCH 2019 (06.03.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/012682

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0004879 A	12/01/2009	EP 1988152 A1	05/11/2008
		EP 1988152 B1	23/11/2016
		JP 4159103 B2	01/10/2008
		JP 5397934 B2	22/01/2014
		KR 10-1362293 B1	12/02/2014
		US 2009-0246872 A1	01/10/2009
		US 7727759 B2	01/06/2010
		WO 2007-097120 A1	30/08/2007
		WO 2007-097121 A1	30/08/2007
KR 10-2016-0027669 A	10/03/2016	JP 2017-526373 A	14/09/2017
		KR 10-1647793 B1	12/08/2016
		US 2017-0275586 A1	28/09/2017
		WO 2016-036011 A1	10/03/2016
KR 10-2014-0069148 A	09/06/2014	CA 2848875 A1	28/03/2013
		CA 2848875 C	14/11/2017
		CN 103814125 A	21/05/2014
		CN 103814125 B	16/09/2015
		EP 2759592 A1	30/07/2014
		JP 6313043 B2	18/04/2018
		KR 10-2017-0061723 A	05/06/2017
		US 2014-0227784 A1	14/08/2014
KR 10-2013-0142053 A	27/12/2013	WO 2013-042360 A1	28/03/2013
KR 10-1437147 B1	02/09/2014		

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12M 1/00(2006.01)i, C12M 1/34(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12M 1/00; B82Y 30/00; C08B 37/08; C12M 1/34; C12M 3/00; C12N 5/09

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:스페로이드 형성, 카운팅, 기판, 돌출부재, 메쉬부재, 포어, 핵사노일 글리콜 키토산, 코팅

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2009-0004879 A (에스씨아이에비에이엑스 가부시키키가이샤) 2009.01.12 청구항 1-47; 단락 [0061]-[0072], [0117]-[0130]; 및 도면 1-18 참조.	1,3,5-8,12,13
Y		2,4,9-11
Y	KR 10-2016-0027669 A (충남대학교산학협력단 등) 2016.03.10 청구항 1-13; 및 단락 [0060] 참조.	2,4,9-11
X	KR 10-2014-0069148 A (가부시키키가이샤 구라레) 2014.06.09 청구항 1-14; 단락 [0018]-[0030], [0042]-[0045], [0058]-[0069]; 표 1; 및 도면 1-11 참조.	1,3,5-8,12,13
Y		2,4,9-11
Y	CHO, M. O. 등, "Bioinspired tuning of glycol chitosan for 3D cell culture", NPG Asia Materials, 2016, 8권, e309, 내부 페이지 1-10, <DOI:10.1038/am.2016. 130> 초록; 페이지 2, 우컬럼, "Preparation of culture plates coated with GC and HGC" 섹션 참조.	2,4,9-11
A	KR 10-1437147 B1 (주식회사 싸이토젠) 2014.09.02 전문 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 03월 06일 (06.03.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 03월 06일 (06.03.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



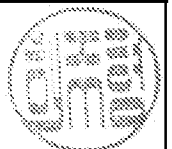
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0004879 A	2009/01/12	EP 1988152 A1 EP 1988152 B1 JP 4159103 B2 JP 5397934 B2 KR 10-1362293 B1 US 2009-0246872 A1 US 7727759 B2 WO 2007-097120 A1 WO 2007-097121 A1	2008/11/05 2016/11/23 2008/10/01 2014/01/22 2014/02/12 2009/10/01 2010/06/01 2007/08/30 2007/08/30
KR 10-2016-0027669 A	2016/03/10	JP 2017-526373 A KR 10-1647793 B1 US 2017-0275586 A1 WO 2016-036011 A1	2017/09/14 2016/08/12 2017/09/28 2016/03/10
KR 10-2014-0069148 A	2014/06/09	CA 2848875 A1 CA 2848875 C CN 103814125 A CN 103814125 B EP 2759592 A1 JP 6313043 B2 KR 10-2017-0061723 A US 2014-0227784 A1 WO 2013-042360 A1	2013/03/28 2017/11/14 2014/05/21 2015/09/16 2014/07/30 2018/04/18 2017/06/05 2014/08/14 2013/03/28
KR 10-1437147 B1	2014/09/02	KR 10-2013-0142053 A	2013/12/27