

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일

2021 년 1 월 28 일 (28.01.2021)

WIPO | PCT

WO 2021/015547 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 11/08 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/009642

(22) 국제출원일:

2020 년 7 월 22 일 (22.07.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0088576 2019 년 7 월 22 일 (22.07.2019) KR

10-2020-0090266 2020 년 7 월 21 일 (21.07.2020) KR

(71) 출원인: 주식회사 엘지화학 (LG CHEM, LTD.) [KR/KR]; 07336 서울시 영등포구 여의대로 128, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김지선 (KIM, Jee Seon); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 신정연 (SHIN, Jung Youn); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 김찬중 (KIM, Chan-joong); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 김민채 (KIM, Minchae); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 김윤섭 (KIM, Yunseop); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 김창영 (KIM, Chang Young); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 남승우 (NAM, Seung Woo); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, 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, 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 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).

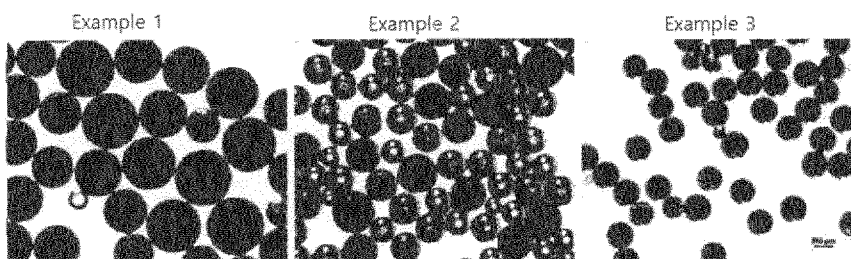
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: CELL CULTURE MICROCARRIER, METHOD FOR PRODUCING SAME, AND CELL CULTURE METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용하는 세포 배양 방법

【도 1】



(57) Abstract: The present invention pertains to: a cell culture microcarrier which has excellent adhesion to cells and is easily isolated from post-culture cells; a method for producing same; and a cell culture method using same.

(57) 요약서: 본 발명은 세포와 부착도가 우수하면서도 배양 후 세포와 분리가 용이한 세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용하는 세포 배양 방법에 관한 것이다.



WO 2021/015547 A1

【발명의 명칭】

세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용하는 세포 배양 방법

【기술분야】

5 관련 출원(들)과의 상호 인용

본 출원은 2019년 7월 22일자 한국 특허 출원 제 10-2019-0088576호 및 2020년 7월 21일자 한국 특허 출원 제 10-2020-0090266호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국 특허 출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.

10 본 발명은 세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용하는 세포 배양 방법에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

15 바이오 의약품 및 재생 의료 분야가 확장됨에 따라, 세포, 조직, 미생물 등을 효율적으로 생산할 수 있는 세포 대량 배양 기술에 대한 요구가 증대하고 있다.

부착성을 갖는 세포는 3D 바이옱액터(bioreactor) 내에서 마이크로 캐리어를 이용하여 배양된다. 바이옱액터 내에 세포, 배양액 및 마이크로 캐리어를 넣고, 배양액을 교반하여 세포 및 마이크로 캐리어를
20 접촉시킴으로써, 세포를 마이크로 캐리어의 표면에 부착시켜 배양하게 된다. 이 때 사용하는 마이크로 캐리어는 세포가 부착하여 증식할 수 있는 높은 표면적 비율(surface area/volume)을 제공하기 때문에, 세포의 대량 배양에 적합하다.

현재 상업적으로 이용되는 마이크로 캐리어는 밀도가 약 1.1 내지
25 1.3 g/cm³이며, 세포의 밀도는 약 1.2 g/cm³ 정도이다. 이 경우, 바이옱액터 내 배양 초기 세포를 부착하기에는 유리하지만, 배양 후 세포 분리 회수 시 원심분리가 어렵고, 마이크로 캐리어와 세포의 크기에 근거한 필터링 방법을 이용하여야 한다. 그러나 이러한 경우 필터가 막히거나 공정 시간이 오래 걸리고, 세포의 물리적 손상 및 오염이 쉽게 발생할 수 있으며,
30 세포의 손실이 발생할 수 있는 문제가 있다.

이러한 문제를 해결하기 위해, 밀도가 1.0 g/cm^3 보다 낮거나, 1.3 g/cm^3 보다 높은 재료의 특성을 이용하여 마이크로 캐리어를 제조하였으나, 이 경우 구현할 수 있는 밀도의 범위가 제한적이고, 배양 조건에 맞춰 마이크로 캐리어의 부유도를 조정할 수 없는 단점이 있다.

- 5 따라서, 수용액 내에서 배양 조건에 맞춰 입자의 부유도를 조절하면서도, 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포의 분리 회수 시 보다 손쉽게 분리할 수 있는 새로운 마이크로 캐리어의 개발이 요구되고 있다.

【발명의 내용】

10 【해결하고자 하는 과제】

본 발명은 세포와 부착도가 우수하면서도 배양 후 세포와 분리가 용이한 마이크로 캐리어를 제공하기 위한 것이다.

또한, 본 발명은 세포와 부착도가 우수하면서도 배양 후 세포와 분리가 용이한 마이크로 캐리어의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

- 15 또한, 본 발명은 세포와 부착도가 우수하면서도 배양 후 세포와 분리가 용이한 마이크로 캐리어를 이용하는 세포 배양 방법에 관한 것이다.

【과제의 해결 수단】

- 본 명세서에서는, 폴리스티렌을 포함하는 발포체 코어; 상기 발포체
20 코어의 표면에 형성되는 프라이머 고분자층; 및 상기 프라이머 고분자층 표면에 형성되는 세포 부착 유도층;을 포함하고, 0.80 내지 0.99 g/cm^3 의 밀도를 갖는, 세포 배양용 마이크로 캐리어가 제공된다.

- 본 명세서에서는 또한, 발포체가 포함된 폴리스티렌을 포함하는 수용액을 가열하는 단계; 상기 발포체를 발포시켜 발포체 코어를 제조하는
25 단계; 및 상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 상기 발포체 코어의 표면에 프라이머 고분자층을 도포하는 단계;를 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조방법이 제공된다.

- 본 명세서에서는 또한, 폴리스티렌을 포함하는 발포체 코어; 상기 발포체 코어의 표면에 형성되는 프라이머 고분자층; 및 상기 프라이머
30 고분자층 표면에 형성되는 세포 부착 유도층;을 포함하고, 0.80 내지 0.99

g/cm³의 밀도를 갖는, 세포 배양용 마이크로 캐리어를 이용하는 세포 배양 방법이 제공된다.

이하 발명의 구체적인 구현예에 따른 세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용하는 세포 배양 방법에 대하여 보다 상세하게
5 설명하기로 한다.

본 명세서에서 사용되는 용어는 단지 예시적인 실시예들을 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도는 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본
10 명세서에서, "포함하다", "구비하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 실시된 특징, 숫자, 단계, 구성 요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 구성 요소, 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

15 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 예시하고 하기에서 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 상기 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

20

발명의 일 구현예에 따르면, 폴리스티렌을 포함하는 발포체 코어; 상기 발포체 코어의 표면에 형성되는 프라이머 고분자층; 및 상기 프라이머 고분자층 표면에 형성되는 세포 부착 유도층;을 포함하고, 0.80 내지 0.99 g/cm³의 밀도를 갖는, 세포 배양용 마이크로 캐리어가 제공될 수 있다.

25 본 발명자들은, 세포 배양용 마이크로 캐리어에 대한 연구를 진행하여, 폴리스티렌을 포함하는 발포체 코어; 상기 발포체 코어의 표면에 형성되는 프라이머 고분자층; 및 상기 프라이머 고분자층 표면에 형성되는 세포 부착 유도층;을 포함하고, 0.80 내지 0.99 g/cm³의 밀도를 갖는 마이크로 캐리어를 이용하여 세포를 배양하는 경우, 배양기 내에서 교반
30 과정에 적합하게 유동성을 조절하여 세포 부착도를 증진시키면서도, 세포

배양 후 중력에 의한 침강속도 차이를 이용하여 마이크로 캐리어와 세포를 손쉽게 분리할 수 있다는 점을 실험을 통하여 확인하고 발명을 완성하였다.

상기 구현예의 마이크로 캐리어는, 폴리스티렌을 포함하는 발포체 코어 및 상기 발포체 코어의 표면에 1차로 형성되는 프라이머 고분자층을 포함하고, 상기 상기 프라이머 고분자층 표면에 2차로 형성되는 세포 부착 유도층을 포함한 마이크로 캐리어이다.

이때, 상기 마이크로 캐리어는 0.80 내지 0.99 g/cm³, 또는 0.85 내지 0.99 g/cm³, 또는 0.90 내지 0.99 g/cm³, 또는 0.95 내지 0.99 g/cm³ 밀도를 가질 수 있다.

상기 마이크로 캐리어가 상기 범위의 밀도를 가지는 경우, 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포를 분리 회수 시 중력에 의한 침강 속도 차이를 통하여 세포와 마이크로 캐리어를 손쉽게 분리할 수 있다.

상기 마이크로 캐리어의 밀도가 0.99 g/cm³를 초과하는 경우, 세포와 마이크로 캐리어의 밀도 차이가 적어 배양 후 세포 분리 회수 시 원심 분리가 어려울 수 있고, 0.80 g/cm³ 미만인 경우, 배양 초기에 마이크로 캐리어에 세포를 부착하기 어려울 수 있다.

한편, 상기 마이크로 캐리어의 발포체 코어는 닫힌 셀(closed cell) 구조를 가질 수 있다. 통상 다공성 구조는 다수의 기공을 포함하고, 상기 다수의 기공은 예를 들어, 닫힌 기공 또는 열린 기공의 두 가지 형태로 분류될 수 있으며, 상기 다공성 구조는 이들 각각을 포함하거나 또는 이들 모두를 포함한 구조로 형성될 수 있다.

상기 닫힌 기공은 기공의 벽면이 모두 닫힌 구조로 형성되어 다른 기공과 연결되지 않은 기공으로서 독립 기공(closed cell)이라고도 하고, 상기 열린 기공은 기공의 벽면 중 적어도 일부가 열린 구조로 형성되어 다른 기공과 연결된 기공으로서 연속 기공(opened cell)이라고도 할 수 있다.

상기 마이크로 캐리어의 발포체 코어가 닫힌 셀 구조를 갖는 경우, 세포 배양 중 마이크로 캐리어 내부로 배양액이 침투하는 것을 방지할 수 있어, 마이크로 캐리어가 상기 범위의 밀도를 가지도록 조절할 수 있으며, 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포를 분리 회수 시 중력에 의한 침강

속도 차이를 통하여 세포와 마이크로 캐리어를 손쉽게 분리할 수 있다.

이때, 상기 마이크로 캐리어의 발포체 코어가 닫힌 셀(closed cell) 구조가 아닌 열린 셀(open cell) 구조를 갖는 경우 배양 중 마이크로 캐리어 내부로 배양액이 침투하여 마이크로 캐리어의 밀도를 증가시키는 문제가 있다.

한편, 배양액 침투율은 배양 전후의 마이크로캐리어의 밀도 변화로 확인할 수 있다. 즉, 하기 일반식 1로부터 확인할 수 있으며, 이 때 d_2 은 배양 전 마이크로캐리어의 밀도이며 d_3 는 배양 후 마이크로캐리어의 밀도, d_m 은 배양액의 밀도이다. 그리고 p 는 마이크로 캐리어 내 기공의 부피 비율을 의미한다.

[일반식 1]

$$\text{배양액 침투율 (\%)} = \frac{d_3 - d_2}{d_m} \times \frac{1}{p} \times 100$$

예를 들어, 상기 발포체 코어는 37 °C에서 72 시간 세포 배양 시, 배양액 침투율이 내부 기공 부피의 0 내지 30 vol%일 수 있다.

상술한 바와 같이, 상기 발포체 코어는 닫힌 셀 구조를 가지게 되어, 세포 배양 중 마이크로 캐리어 내부로 배양액이 침투하는 것을 방지할 수 있어, 세포 배양시 배양액 침투율을 상기 범위 내로 조절할 수 있다.

이때, 37 °C에서 72 시간 세포 배양 시, 배양액 침투율이 내부 기공 부피의 30 vol%를 초과하는 경우, 마이크로 캐리어의 밀도가 증가되어 배양 후 세포 분리 회수 시 원심 분리가 어려울 수 있다.

한편, 상기 발포체 코어는 후술하는 마이크로 캐리어의 제조방법에서와 같이 발포제가 포함된 폴리스티렌을 포함하는 수용액을 가열한 후, 상기 발포제를 발포시켜 제조할 수 있다.

이때, 발포제가 포함된 폴리스티렌을 포함하는 수용액의 온도를 높인 후, 수용액 내 침지 시간을 조절하여 발포제의 발포를 유도하며, 이를 통해 상기 발포체 코어의 내부 기공율을 조절할 수 있다.

한편, 상기 발포체 코어는 그 내부에 발포체 부피의 2% 내지 30%, 또는 5% 내지 30%, 또는 5% 내지 25%의 기공을 가질 수 있다. 즉, 상기 발포체 코어는 2% 내지 30%, 또는 5% 내지 30%, 또는 5% 내지 25%의 내부

기공율을 가질 수 있다. 상기 내부 기공율은 상기 발포체 코어 전체 부피에 대하여 상기 발포체 코어 내부에 형성된 기공의 부피의 퍼센트 비율을 의미하며, 상기 내부 기공율은 다양한 기공도측정기(Porosimeter) 등을 이용하여 공지된 방법을 제한없이 적용하여 측정 가능하다.

- 5 이러한 발포체 코어의 내부 기공율 조절을 통해, 세포 별로 배양 및 분리 공정에 적합하게 마이크로 캐리어의 부유도를 조절할 수 있다. 세포의 배양조건에 맞춰 수용액 내에서 발포체 코어의 부유도를 조절하여, 마이크로 캐리어와 세포와의 부착도를 증가시킬 수 있으며, 세포 탈착 후 밀도차를 이용하여 간단히 정제할 수 있다.

- 10 한편, 상기 프라이머 고분자층은 관능기가 없는 폴리스티렌 표면에 기능성 고분자를 도입할 수 있는 점착층 역할을 하며, 이로 인해 마이크로 캐리어 표면에 세포 부착을 위한 고분자 층이 효과적으로 도입되고 배양 중에도 안정적으로 유지될 수 있도록 한다.

- 상기 프라이머 고분자층은 그 예가 크게 한정되는 것은 아니나, 수상
15 접착을 유도할 수 있는 카테콜 유도체로서 L-디하이드록시 페닐알라닌(L-DOPA), 도파민(dopamine), 노레피네프린(norepinephrine), 에피네프린(epinephrine), 에피갈로카테킨(epigallocatechin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

- 20 한편, 상기 세포 부착 유도층은 세포 부착성 물질들로 구성되며, 이들은 세포의 막관통 단백질(transmembrane protein)들이 결합할 수 있는 장소를 제공하는 역할을 하여, 부착성 세포들이 안정적으로 부착, spreading 및 배양될 수 있도록 한다.

- 상기 세포 부착 유도층을 형성하는 고분자는 그 예가 크게 한정되는
25 것은 아니나, 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴(fibronectin) 키토산, 폴리도파민, 폴리 L-라이신, 비트로넥틴(vitronectin), RGD를 포함한 펩타이드, 리그닌(lignin), 양이온성 텍스트란 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

- 상기 마이크로 캐리어는 폴리스티렌을 포함하는 발포체 코어의
30 표면에 형성되는 프라이머 고분자층을 포함하여, 마이크로 캐리어의 표면을

친수성으로 개질하는 것을 통해 수분산 되고, 상기 프라이머 고분자층 표면에 세포 부착 유도층을 안정적으로 도입하여 배양액 내에서 마이크로 캐리어의 부유도가 조절될 수 있으며, 세포를 안정적으로 부착 배양하는 효과를 가질 수 있다.

- 5 한편, 상기 발포체 코어의 반경과 프라이머 고분자층의 두께의 비율은 1:0.00001 내지 1:0.01, 또는 1:0.0001 내지 1:0.001일 수 있다.

발포체 코어의 반경과 표면 코팅층의 두께의 비율이 1:0.00001 미만인 경우, 발포체 코어 대비 프라이머 고분자층이 너무 얇아 마이크로 캐리어 표면이 친수성으로 개질하는 효과가 미미하며, 1:0.01를 초과하는
10 경우, 발포체 코어 대비 프라이머 고분자층이 두꺼워져, 세포 배양 시 세포와 마이크로 캐리어의 부착도가 감소될 우려가 있다.

한편, 상기 마이크로 캐리어는 평균 직경이 50 내지 800 μm , 또는 100 내지 700 μm , 또는 120 내지 600 μm , 또는 150 내지 500 μm 일 수 있는데, 마이크로 캐리어의 평균 직경이 상술한 범위를 만족하는 경우 세포
15 부착 및 배양 성능이 우수하다.

한편, 상기 마이크로 캐리어의 평균 직경이 50 μm 미만인 경우, 발포체 포함량이 낮아져 발포 효율이 저하되며, 또한 세포 배양이 가능한 표면적이 작아 배양 효율이 낮아지는 문제점이 발생할 우려가 있고, 800 μm 초과하는 경우, 부착 세포간 상호 작용이 저하되고, 배양기 내 세포 밀도가
20 낮아져, 세포 배양 효율이 낮아지는 문제가 발생할 수 있어 바람직하지 않다.

한편, 상기 마이크로 캐리어는 50 내지 2000 cm^2/g , 또는 70 내지 1500 cm^2/g , 또는 100 내지 800 cm^2/g , 또는 150 내지 500 cm^2/g 의 비표면적을 가질 수 있다. 상기 비표면적은 공지된 BET(Brunauer-Emmett-
25 Teller) 측정법을 제한없이 적용하여 측정할 수 있다.

상술한 바와 같이 상기 발포체 코어는 부피 팽창을 통해 마이크로 캐리어의 비표면적을 증대시킬 수 있다. 마이크로 캐리어가 상기 범위의 비표면적을 만족하는 경우, 세포와 마이크로 캐리어의 부착도가 극대화
되어 세포의 대량 배양에 보다 적합할 수 있다.

30 상기 마이크로 캐리어의 비표면적이 2000 cm^2/g 를 초과하는 경우,

마이크로 캐리어의 크기가 작아져 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포의 분리가 어려울 수 있고, $50 \text{ cm}^2/\text{g}$ 미만인 경우, 바이오 리액터 내부의 마이크로 캐리어 수가 크게 낮아져 초기 마이크로 캐리어와 세포의 부착과 배양 효율이 감소할 수 있다.

5

한편, 도 3는 폴리스티렌을 포함하는 발포체에 대한 FT-IR spectrum 결과로, 구체적으로 도 3의 각 스펙트럼이 의미하는 바는 하기와 같다.

- Spectrum 1: 폴리스티렌 발포체 표면 위의 젤라틴
- Spectrum 2: 폴리도파민 층이 도입된 폴리스티렌 발포체 표면 위의

10 젤라틴

- Spectrum 3: 폴리스티렌 발포체 표면 위의 폴리도파민
- Spectrum 4: 폴리도파민 층이 도입된 폴리스티렌 발포체 표면 위의 젤라틴과 polydopamine 층

도 3에 따르면, Spectrum에 나타난 1650 cm^{-1} 의 아미드 결합과 3300
 15 - 3400 cm^{-1} 영역의 아민 관능기에 기반한 젤라틴 특성 피크 세기에 근거하여 볼 때, 프라이머 고분자층(polydopamine층)을 도입한 폴리스티렌 발포체에 세포 부착 유도층(젤라틴 층)이 보다 안정적으로 도입되었음을 알 수 있다.

한편, 도 4은 발포제가 포함된 폴리스티렌의 발포 전후 및 프라이머
 20 고분자층 코팅 후 폴리스티렌 표면에 대한 SEM 분석 결과로, 도 4의 각각의 경우에 해당하는 폴리스티렌의 형상 비교를 통해 발포 과정 중 입자의 표면 거칠기가 증가하고 미세 균열이 발생할 수 있으나, 프라이머 고분자층 코팅 과정을 통하여 입자 표면의 균열이 회복되고, 거칠기가 완화되었음을 확인할 수 있다.

25

한편, 발명의 다른 구현예에 따르면, 발포제가 포함된 폴리스티렌을 포함하는 수용액을 가열하는 단계; 상기 발포제를 발포시켜 발포체 코어를 제조하는 단계; 및 상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 상기 발포체 코어의 표면에 프라이머 고분자층을 도포하는 단계;를 포함하는,
 30 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조방법이 제공될 수 있다.

상기 폴리스티렌 입자는 스티렌, α -메틸스티렌 등의 스티렌계 단량체의 중합체, 또는 스티렌계 단량체 및 그것과 공중합 가능한 단량체를 현탁 중합하여 얻어질 수 있으며, 그 예가 크게 한정되는 것은 아니다.

예를 들어, 반응기에 물, 스티렌을 포함한 단량체, 개시제 및 계면활성제를 투입하여 1차 중합을 실시한 후, 합성된 구형의 폴리스티렌 입자를 반응기 내에 밀폐하고 발포제를 주입하여 발포제가 포함된 폴리스티렌을 수득할 수 있다.

이때, 상기 발포제는 그 예가 크게 한정되는 것은 아니나, 예를 들어 물리적 발포제, 화학 발포제, 무기 발포제 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

예를 들어, 물리적 발포제는 부탄, 펜탄, 헥산, 2-메틸부탄, 사이클로헥산 네오펜탄, 헵탄, 이소헵탄, 벤젠, 톨루엔, 메틸글로라이드, 트리클로에틸렌, 디클로에탄, 메틸렌 클로라이드, 트리클로로플로우로메탄, 프레온 11, 프레온 12, 프레온 13, 프레온 113, 프레온 114 등과 같은 저비점 액체와 유기용제일 수 있다.

상기 구현예의 마이크로 캐리어의 제조방법은 상기 발포제가 포함된 폴리스티렌을 포함하는 수용액을 가열하는 단계 및 상기 발포제를 발포시켜 발포체 코어를 제조하는 단계를 포함할 수 있다.

이때, 발포제가 포함된 폴리스티렌을 포함하는 수용액의 온도를 높인 후, 수용액 내 침지 시간을 조절하여 발포제의 발포를 유도하며, 이를 통해 상기 발포체 코어의 내부 기공율을 조절할 수 있다.

구체적으로, 상기 발포제가 포함된 폴리스티렌을 포함하는 수용액을 가열하는 단계는, 50 °C 내지 150 °C, 또는 80 °C 내지 120 °C 온도, 또는 90 °C 내지 110 °C 온도로 1분 내지 10분, 또는 2분 내지 8분, 또는 3분 내지 5분간 열처리하는 단계를 포함할 수 있다.

상술한 바와 같이 상기 발포체 코어는 그 내부에 발포체 부피의 2% 내지 30%, 또는 5% 내지 30%, 또는 5% 내지 25%의 기공을 가질 수 있다. 즉, 상기 발포체 코어는 2% 내지 30%, 또는 5% 내지 30%, 또는 5% 내지 25%의 내부 기공율을 가질 수 있다. 상기 내부 기공율은 상기 발포체 코어 전체 부피에 대하여 상기 발포체 코어 내부에 형성된 기공의 부피의 퍼센트

비율을 의미하며, 상기 내부 기공율은 다양한 기공도측정기(Porosimeter) 등을 이용하여 공지된 방법을 제한없이 적용하여 측정 가능하다.

이러한 발포체 코어의 내부 기공율 조절을 통해, 세포 별로 배양 및 분리 공정에 적합하게 마이크로 캐리어의 부유도를 조절할 수 있다. 세포의 배양조건에 맞춰 수용액 내에서 발포체 코어의 부유도를 조절하여, 마이크로 캐리어와 세포와의 부착도를 증가시킬 수 있으며, 세포 탈착 후 밀도차를 이용하여 간단히 정제할 수 있다.

한편, 상기 마이크로 캐리어의 발포체 코어는 닫힌 셀(closed cell) 구조를 가질 수 있다. 상기 마이크로 캐리어의 발포체 코어가 닫힌 셀 구조를 갖는 경우, 세포 배양 중 마이크로 캐리어 내부로 배양액이 침투하는 것을 방지할 수 있어, 마이크로 캐리어가 0.80 내지 0.99 g/cm³의 범위의 밀도를 가지도록 조절할 수 있으며, 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포를 분리 회수 시 중력에 의한 침강 속도 차이를 통하여 세포와 마이크로 캐리어를 손쉽게 분리할 수 있다.

한편, 상기 구현예의 마이크로 캐리어의 제조방법은, 발포제를 발포시켜 발포체 코어를 제조하는 단계 이후 상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 상기 발포체 코어의 표면에 프라임어 고분자층을 도포하는 단계를 포함할 수 있다.

구체적으로, 상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 상기 발포체 코어의 표면에 프라임어 고분자층을 도포하는 단계는, 상기 발포체 코어를 프라임어 고분자 용액에 1시간 내지 10시간, 또는 2시간 내지 6시간, 또는 3시간 내지 5시간 동안 침지시키는 단계를 포함할 수 있다.

상기 프라임어 고분자층은 그 예가 크게 한정되는 것은 아니나, 수상 접착을 유도할 수 있는 카테콜 유도체로서 L-디하이드록시 페닐알라닌(L-DOPA), 도파민(dopamine), 노레피네프린(norepinephrine), 에피네프린(epinephrine), 에피갈로카테킨(epigallocatechin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 프라임어 고분자층을 도포하여, 마이크로 캐리어의 표면을 친수성으로 개질하는 것을 통해

수분산 되고, 세포 부착 유도층을 안정적으로 도입하여 배양액 내에서 마이크로 캐리어의 부유도가 조절될 수 있으며, 세포를 안정적으로 부착 배양하는 효과를 가질 수 있다.

이때, 상기 발포체 코어의 반경과 프라이머 고분자층의 두께의 비율은 1:0.00001 내지 1:0.01, 또는 1:0.0001 내지 1:0.001일 수 있다.

상기 발포체 코어의 반경과 프라이머 고분자층의 두께에 관한 내용은 상기 일 구현예에 관하여 상술한 내용을 포함한다.

한편, 상기 구현예의 마이크로 캐리어의 제조방법은, 상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 상기 발포체 코어의 표면에 프라이머 고분자층을 도포하는 단계 이후, 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴(fibronectin) 키토산, 폴리도파민, 폴리 L-라이신, 비트로넥틴(vitronectin), RGD를 포함한 펩타이드, 리그닌(lignin), 양이온성 덱스트란 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 용액으로 코팅하는 단계를 더 포함할 수 있다.

상기 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴(fibronectin) 키토산, 폴리도파민, 폴리 L-라이신, 비트로넥틴(vitronectin), RGD를 포함한 펩타이드, 리그닌(lignin), 양이온성 덱스트란 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 용액은 세포와 마이크로 캐리어를 접착하는 접착 인자 역할을 할 수 있어, 프라이머 고분자층을 상기 젤라틴 등을 포함하는 용액으로 코팅하는 경우, 세포와 마이크로 캐리어의 부착도를 증가시킬 수 있어 세포의 대량 배양에 보다 적합할 수 있다.

구체적으로, 상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 상기 발포체 코어의 표면에 프라이머 고분자층을 도포하는 단계 이후, 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴(fibronectin) 키토산, 폴리도파민, 폴리 L-라이신, 비트로넥틴(vitronectin), RGD를 포함한 펩타이드, 리그닌(lignin), 양이온성 덱스트란 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 용액으로 코팅하는 단계는, 상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 상기 발포체 코어의 표면에 프라이머 고분자층을 도포하는 단계에서 얻어진 물질을 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴(fibronectin) 키토산, 폴리도파민, 폴리 L-라이신, 비트로넥틴(vitronectin), RGD를

포함한 펩타이드, 리그닌(lignin), 양이온성 텍스트란 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 용액에 10시간 내지 20시간, 또는 15시간 내지 20시간, 또는 17시간 내지 19시간 동안 침지시키는 단계를 포함할 수 있다.

5

한편, 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 폴리스티렌을 포함하는 발포체 코어; 상기 발포체 코어의 표면에 형성되는 프라이머 고분자층; 및 상기 프라이머 고분자층 표면에 형성되는 세포 부착 유도층;을 포함하고, 0.80 내지 0.99 g/cm³의 밀도를 갖는, 세포 배양용 마이크로 캐리어를

10 이용하는 세포 배양 방법이 제공될 수 있다.

상기 폴리스티렌을 포함하는 발포체 코어; 상기 발포체 코어의 표면에 형성되는 프라이머 고분자층; 및 상기 프라이머 고분자층 표면에 형성되는 세포 부착 유도층;을 포함하고, 0.80 내지 0.99 g/cm³의 밀도를 갖는, 세포 배양용 마이크로 캐리어에 관한 내용은 상기 일 구현예에

15 관하여 상술한 내용을 포함한다.

한편, 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어를 이용하여 배양 가능한 세포는 부착성 동물 세포로 그 예가 크게 한정되는 것은 아니나, 예를 들어 fibroblasts, chondrocyte, mesenchymal stem cell, CHO, HEK 293, vero cell, BHK21, MDCK 등일 수 있다.

20

【발명의 효과】

본 발명에 따르면, 세포와 부착도가 우수하면서도 배양 후 세포와 분리가 용이한 마이크로 캐리어가 제공될 수 있다.

또한 본 발명에 따르면, 세포와 부착도가 우수하면서도 배양 후

25 세포와 분리가 용이한 마이크로 캐리어의 제조방법이 제공될 수 있다.

또한 본 발명에 따르면, 세포와 부착도가 우수하면서도 배양 후 세포와 분리가 용이한 마이크로 캐리어를 이용하는 세포 배양 방법이 제공될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 실시예 1 내지 3에서 제조한 마이크로 캐리어의 광학현미경 관찰 사진이다.

도 2는 본 발명의 실시예 3에서 제조한 마이크로 캐리어의 발포 후의 단면에 대한 SEM 분석 결과이다.

도 3는 폴리스티렌을 포함하는 발포체에 대한 FT-IR spectrum 결과이다.

도 4은 발포체가 포함된 폴리스티렌의 발포 전후 및 프라이머 고분자층 코팅 후 폴리스티렌 표면에 대한 SEM 분석 결과이다.

도 5는 본 발명의 실시예 1 내지 3에서 제조한 마이크로 캐리어의 배양액 내 분포를 관찰한 결과이다.

도 6는 본 발명의 실시예 3 과 비교예 2에서 제조한 마이크로 캐리어 0.2 g을 이용하여 1×10^4 의 연골세포를 3일간 세포 배양한 결과이다.

도 7은 본 발명의 실시예 3 과 비교예 3에서 제조한 마이크로 캐리어의 세포 부착 형상 분석 결과이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

발명을 하기의 실시예에서 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조

평균 지름 250 μ m 이하의 발포형 폴리스티렌 입자(LG 화학 제공)를 포함하는 수용액을 100℃에서 5분간 가열한 후 상온의 물을 넣어 발포과정을 정지하여 발포체 코어를 제조 한 후, 이를 회수하여 상온에서 건조하였다.

건조된 발포체 코어를 1mg/mL 도파민 수용액에 침지시켜, 4시간 동안 교반하여, 발포체의 표면에 고르게 폴리도파민 층을 도입하는데, 이때, 프라이머 고분자층의 두께는 1 μ m 이하이다. 코팅된 발포체를 회수하여, 에탄올로 3회이상 세척하여 상온에서 18시간동안 건조하였다. 밀도가 0.8g/cm³(0.78 - 0.83 g/cm³)인 입자를 정제하기 위하여 75% 에탄올

수용액과 100% 에탄올을 이용하여 밀도차 분리를 실시하였으며, 이후, 0.2w/v 농도의 멸균 젤라틴 용액에 넣어 18시간동안 코팅한 후 회수하여 에탄올로 세척 후 건조하여 회수 한다. 위 방식으로 평균직경이 500um 비표면적이 150cm²/g인 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제조하였다.

5

실시에 2: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조

평균 지름 250 um 이하의 발포형 폴리스티렌 입자(LG 화학 제공)를 포함하는 수용액을 100 °C에서 4분간 가열한 후 상온의 물을 넣어 발포 과정을 정지하여 발포체 코어를 제조 한 후, 이를 회수하여 상온에서 건조하였다.

10

건조된 발포체 코어를 1 mg/mL 도파민 수용액에 침지시켜, 4시간 동안 교반하여, 발포체의 표면에 고르게 폴리도파민 층을 도입하는데, 이때, 프라이머 고분자층의 두께는 1μm 이하이다. 코팅된 발포체를 회수하여, 에탄올로 3회이상 세척하여 상온에서 18시간동안 건조하였다.

15

이후, 0.2 w/v 농도의 멸균 젤라틴 용액에 넣어 18시간동안 코팅한 후 회수하여 에탄올로 세척 후 건조하여 회수 한다. 밀도가 0.9 g/cm³(0.85 - 0.93 g/cm³)인 입자를 정제하기 위하여 30% 에탄올 수용액과 70% 에탄올 수용액을 이용하여 밀도차 분리를 실시하였으며, 위 방식으로 평균직경이 350um 비표면적이 190 cm²/g인 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제조하였다.

20

실시에 3: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조

평균 지름 250 um 이하의 발포형 폴리스티렌 입자(LG 화학 제공)를 포함하는 수용액을 100 °C에서 3분간 가열한 후 상온의 물을 넣어 발포 과정을 정지하여 발포체 코어를 제조 한 후, 이를 회수하여 상온에서 건조하였다.

25

건조된 발포체 코어를 1mg/mL 도파민 수용액에 침지시켜, 4시간 동안 교반하여, 발포체의 표면에 고르게 폴리도파민 층을 도입하는데, 이때, 프라이머 고분자층의 두께는 1μm 이하이다. 코팅된 발포체를 회수하여, 에탄올로 3회이상 세척하여 상온에서 18시간동안 건조하였다.

30

이후, 0.2w/v 농도의 멸균 젤라틴 용액에 넣어 18시간동안 코팅한 후

회수하여 에탄올로 세척 후 건조하여 회수 한다. 밀도가 0.95 g/cm^3 ($0.93 - 0.98 \text{ g/cm}^3$)인 입자를 정제하기 위하여 20% 에탄올 수용액과 5% 에탄올 수용액을 이용하여 밀도차 분리를 실시하였으며, 위 방식으로 평균직경이 300 um 비표면적이 $210 \text{ cm}^2/\text{g}$ 인 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제조하였다.

5

상기 제조된 마이크로 캐리어의 밀도, 내부 기공율, 평균직경 및 비표면적을 정리하면 하기 표 1과 같다.

【표 1】

구분	실시예1	실시예2	실시예3
밀도(g/cm^3)	0.8	0.9	0.95
내부 기공율 (%)	23	13	9
평균직경(um)	500	350	300
비표면적(cm^2/g)	150	190	210

10

비교예 1: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조

지름 250um 이하의 비발포형 폴리스티렌 입자를 3분간 상온의 물에 침지시킨 후, 이를 회수하여 상온에서 건조하였다. 건조된 비발포체 코어를 1mg/mL 도파민 수용액에 침지시켜, 4시간 동안 교반하여, 비발포체의 표면에 고르게 폴리도파민 층을 도입하는데, 이때, 프라이머 고분자층의 두께는 $1\mu\text{m}$ 이하이다. 코팅된 발포체를 회수하여, 에탄올로 3회이상 세척하여 상온에서 18시간동안 건조하였다.

이후, 0.2w/v 농도의 멸균 젤라틴 용액에 넣어 18시간동안 코팅한 후 회수하여 에탄올로 세척 후 건조하여 회수 한다. 위 방식으로 평균직경이 250 um 비표면적이 $230 \text{ cm}^2/\text{g}$ 인 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제조하였다.

20

비교예 2: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조

지름 $212-250 \text{ um}$ 범위이고 밀도가 0.96 g/cm^3 인 저밀도 폴리에틸렌 입자를 3분간 상온의 물에 침지시킨 후, 이를 회수하여 상온에서

건조하였다. 건조된 저밀도 폴리에틸렌 코어를 1 mg/mL 도파민 수용액에 침지시켜, 4시간 동안 교반하여, 폴리도파민 층을 도입하는데, 이때, 프라이머 고분자층의 두께는 1 μm 이하이다. 코팅된 입자를 회수하여, 에탄올로 3회이상 세척하여 상온에서 18시간동안 건조하였다.

- 5 위 방식으로 평균직경이 300 μm 비표면적이 200 cm^2/g 인 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제조하였다.

비교예 3: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조

- 10 지름 250 μm 이하의 발포형 폴리스티렌 입자(LG 화학 제공)를 포함하는 수용액을 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 가열한 후 상온의 물을 넣어 발포 과정을 정지하여 발포체 코어를 제조 한 후, 이를 회수하여 상온에서 건조하였다.

- 15 건조된 발포체 코어에 프라이머 고분자층을 도입하지 않고, 0.2 w/v 농도의 멸균 젤라틴 용액에 넣어 18시간동안 코팅한 후 회수하여 에탄올로 세척 후 건조하여 회수 한다. 밀도가 0.95 g/cm^3 (0.93 - 0.98 g/cm^3)인 입자를 정제하기 위하여 20% 에탄올 수용액과 5% 에탄올 수용액을 이용하여 밀도차 분리를 실시하였으며, 위 방식으로 평균직경이 300 μm 비표면적이 210 cm^2/g 인 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제조하였다.

- 20 비교예 1 내지 3 에서 제조된 마이크로 캐리어의 밀도, 내부 기공율, 평균직경 및 비표면적을 정리하면 하기 표 2과 같다.

【표 2】

구분	비교예 1	비교예 2	비교예 3
밀도(g/cm^3)	1.05	0.96	0.95
내부 기공율	0	0	9
평균직경(μm)	250	300	300
비표면적(cm^2/g)	230	200	210
비고	-	세포 부착 유도층	프라이머

		없음	고분자층 없음
--	--	----	---------

실험예: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 물성 측정

상기 실시예 및 비교예에서 제조된 세포 배양용 마이크로 캐리어에 대하여 다음과 같은 방법으로 마이크로 캐리어의 세포 배양율, 배양액 내의
5 마이크로 캐리어의 거동 및 마이크로 캐리어의 회수 효율을 평가하였다.

1. 마이크로 캐리어의 세포 배양율 평가

250ml 교반용 플라스크(spinner flask)에 배양액을 채우고, 0.1g의 마이크로 캐리어를 넣어 30rpm으로 교반하였다. 이때 배양액의 온도는
10 37 °C를 유지하였고, 3일간 배양하여 마이크로 캐리어의 세포 배양율을 확인하였다.

2. 배양액 내의 마이크로 캐리어의 거동 평가

250ml 교반용 플라스크(spinner flask)에 배양액을 채우고, 0.1g의
15 마이크로 캐리어를 넣어 30rpm으로 교반하였다. 이때 배양액의 온도는 37 °C를 유지하며 마이크로 캐리어의 거동을 확인하였으며 배양시간에 따른 마이크로 캐리어의 침강도를 평가하였다.

3. 마이크로 캐리어의 회수 효율 평가

20 배양액에서 세포(chondrocyte)와 상기 실시예 및 비교예에서 제조된 세포 배양용 마이크로 캐리어를 주입하고 교반하여, 마이크로 캐리어에 세포를 부착하였다. 37 °C에서 3일간 배양한 후, 세포가 부착된 마이크로 캐리어를 회수한 후 trypsin 처리하여 부착된 세포를 떼어낸 후, 배양액에 재분산하여 부착된 세포를 원심분리기에서 1000 rpm 회전속도로 5분간
25 분리하였다. 이후 침전된 배양액의 상층액을 0.2 μm 필터로 필터링하여 마이크로 캐리어를 회수하였으며, 이를 건조 후 무게를 측정하여 회수 효율을 평가하였다.

【표 3】

	실시예1	실시예2	실시예3	비교예1	비교예2	비교예3
세포 배양율	~ 200%	~ 300%	~ 400%	~ 400%	~150%	~200%
침강도	-	-	-	100%	-	-
회수 효율	75%	90%	95%	0%	95%	95%

상기 표 3에 나타난 바와 같이, 실시예 1 내지 3에서 제조된 마이크로 캐리어를 이용하는 경우, 비교예에 비하여 세포 배양율을 높게 유지하면서도, 배양 후 세포와 마이크로 캐리어의 분리가 용이한 것을
5 확인할 수 있었다.

한편, 도 2는 본 발명의 실시예 3에서 제조한 마이크로 캐리어의 발포 후의 단면에 대한 SEM 분석 결과로, 도 2를 통해 발포 후 내부 기공율이 증가된 마이크로 캐리어의 단면을 확인할 수 있으며, 도 5는 본 발명의 실시예 1 내지 3에서 제조한 마이크로 캐리어의 배양액 내 분포를
10 관찰한 결과로, 도 5를 통해 마이크로 캐리어의 밀도가 $0.90 - 0.98 \text{ g/cm}^3$ 범위에 속할 때 배양액 내에서 고르게 부유하여 세포 배양에 유리함을 확인할 수 있었다.

또한, 도 6은 본 발명의 실시예 3 과 비교예 2에서 제조한 마이크로 캐리어 0.2g을 이용하여 1×10^4 의 연골세포를 3일간 세포 배양한 결과로, 비교예 2을 통해, 세포 부착 유도층이 도입되지 않았을 때, 세포의 배양 효율이 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.
15

도 7은 본 발명의 실시예 3 과 비교예 3에서 제조한 마이크로 캐리어의 세포 부착 형상 분석 결과로, 비교예 3의 경우, 동일 조건의 실시예 3과 비교하였을 때, 프라이머 코팅층이 도입되지 않아 세포 부착 유도층이 불안정하여 세포가 고르게 부착되지 못하여 효율적으로 세포 배양을 할 수 없음을 확인할 수 있었다.
20

25

【청구범위】

【청구항 1】

- 폴리스티렌을 포함하는 발포체 코어;
 상기 발포체 코어의 표면에 형성되는 프라이머 고분자층; 및
 5 상기 프라이머 고분자층 표면에 형성되는 세포 부착 유도층;을
 포함하고,
 0.80 g/cm³ 내지 0.99 g/cm³의 밀도를 갖는, 세포 배양용 마이크로
 캐리어.

10 【청구항 2】

- 제1항에 있어서,
 상기 발포체 코어는 닫힌 셀 구조를 갖는, 세포 배양용 마이크로
 캐리어.

15 【청구항 3】

- 제1항에 있어서,
 상기 발포체 코어는 2 % 내지 30 % 의 내부 기공율을 갖는, 세포
 배양용 마이크로 캐리어.

20 【청구항 4】

- 제1항에 있어서,
 상기 발포체 코어는 37 °C에서 72 시간 세포 배양 시, 배양액
 침투율이 내부 기공 부피의 0 vol% 내지 30 vol%인, 세포 배양용 마이크로
 캐리어.

25

【청구항 5】

- 제1항에 있어서,
 상기 프라이머 고분자층은 L-디하이드록시 페닐알라닌, 도파민,
 노레피네프린, 에피네프린, 에피갈로카테킨 및 이들의 유도체로 이루어진
 30 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어.

【청구항 6】

- 제1항에 있어서,
 상기 세포 부착 유도층은 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴 키토산,
 5 폴리도파민, 폴리 L-라이신, 비트로넥틴, RGD를 포함한 펩타이드, 리그닌,
 양이온성 덱스트란 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 어느
 하나 이상을 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어.

【청구항 7】

- 10 제1항에 있어서,
 상기 마이크로 캐리어는 50 μm 내지 800 μm 의 평균직경을 갖는, 세포
 배양용 마이크로 캐리어.

【청구항 8】

- 15 제1항에 있어서,
 상기 마이크로 캐리어는 50 cm^2/g 내지 2000 cm^2/g 의 비표면적을
 갖는, 세포 배양용 마이크로 캐리어.

【청구항 9】

- 20 발포제가 포함된 폴리스티렌을 포함하는 수용액을 가열하는 단계;
 상기 발포제를 발포시켜 발포체 코어를 제조하는 단계; 및
 상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 상기 발포체 코어의
 표면에 프라이머 고분자층을 도포하는 단계;를 포함하는, 세포 배양용
 마이크로 캐리어의 제조방법.

25

【청구항 10】

- 제9항에 있어서,
 상기 발포체 코어는 닫힌 셀 구조를 갖는, 세포 배양용 마이크로
 캐리어의 제조방법.

30

【청구항 11】

제9항에 있어서,

상기 발포체 코어는 2% 내지 30% 의 내부 기공율을 갖는, 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조방법.

5

【청구항 12】

제9항에 있어서,

상기 프라이머 고분자층은 L-디하이드록시 페닐알라닌, 도파민, 노레피네프린, 에피네프린, 에피갈로카테킨 및 이들의 유도체로 이루어진
10 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조방법.

【청구항 13】

제9항에 있어서,

상기 프라이머 고분자층을 도포하는 단계 이후, 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴 키토산, 폴리도파민, 폴리 L-라이신, 비트로넥틴, RGD를 포함한 펩타이드, 리그닌, 양이온성 텍스트란 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서
15 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 용액으로 코팅하는 단계를 더 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조방법.

20

【청구항 14】

제9항에 있어서,

상기 발포제는 물리적 발포제, 화학 발포제, 무기 발포제 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포 배양용 마이크로 캐리어의
25 제조방법.

【청구항 15】

제9항에 있어서,

상기 발포제가 포함된 폴리스티렌을 포함하는 수용액을 가열하는
30 단계는, 50 °C 내지 150 °C 온도로 1분 내지 10분간 열처리하는 단계를

포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조방법.

【청구항 16】

제9항에 있어서,

- 5 상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 상기 발포체 코어의 표면에 프라이머 고분자층을 도포하는 단계는, 상기 발포체 코어를 프라이머 고분자 용액에 1시간 내지 10시간 동안 침지시키는 단계를 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조방법.

10 【청구항 17】

제13항에 있어서,

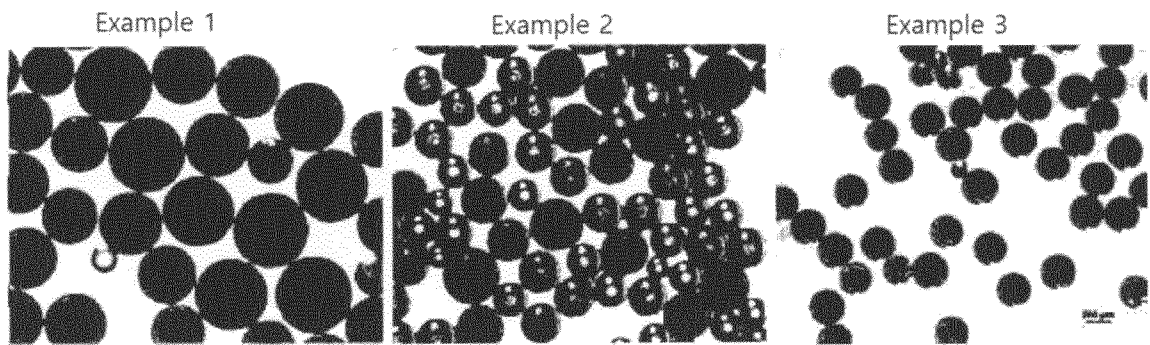
- 상기 프라이머 고분자층을 도포하는 단계 이후, 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴 키토산, 폴리도파민, 폴리 L-라이신, 비트로넥틴, RGD를 포함한 펩타이드, 리그닌, 양이온성 텍스트란 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서
15 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 용액으로 코팅하는 단계는,
 상기 제조된 발포체 코어를 회수하여 건조 후 상기 발포체 코어의 표면에 프라이머 고분자층을 도포하는 단계에서 얻어진 물질을 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴(fibronectin) 키토산, 폴리도파민, 폴리 L-라이신, 비트로넥틴(vitronectin), RGD를 포함한 펩타이드, 리그닌(lignin),
20 양이온성 텍스트란 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 용액에 10시간 내지 20시간 동안 침지시키는 단계를 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조방법.

【청구항 18】

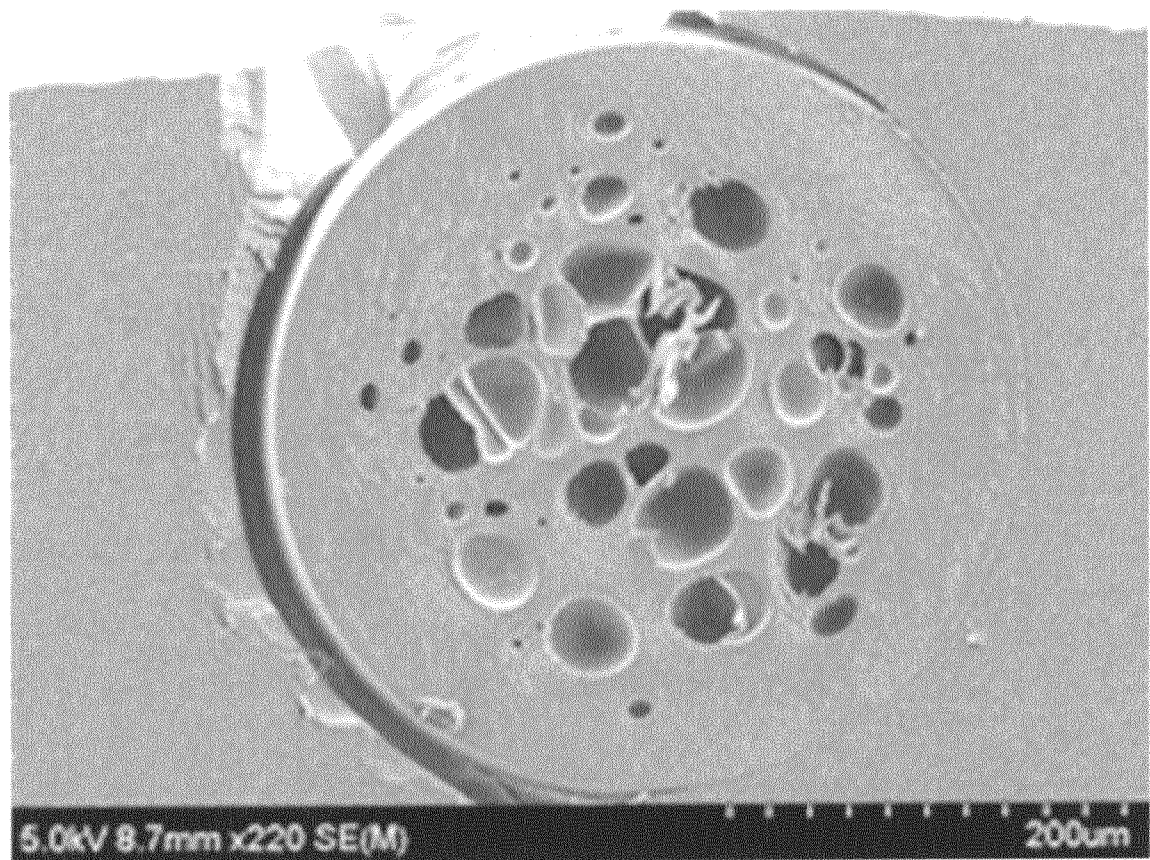
- 25 제1항의 마이크로 캐리어를 이용하는 세포 배양 방법.

【도면】

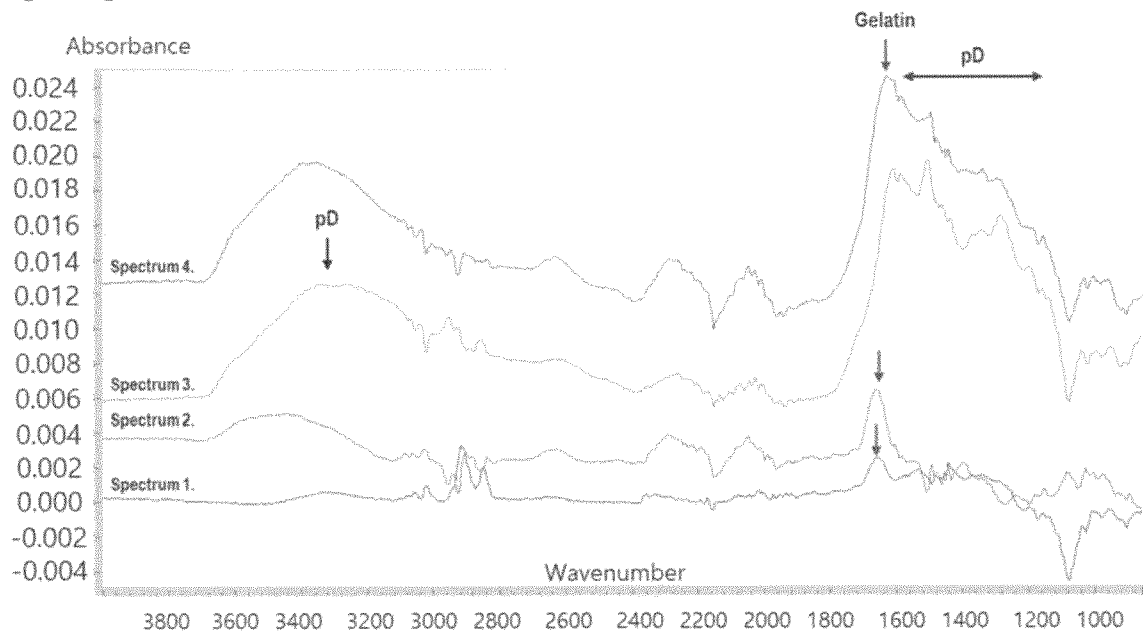
【도 1】



【도 2】

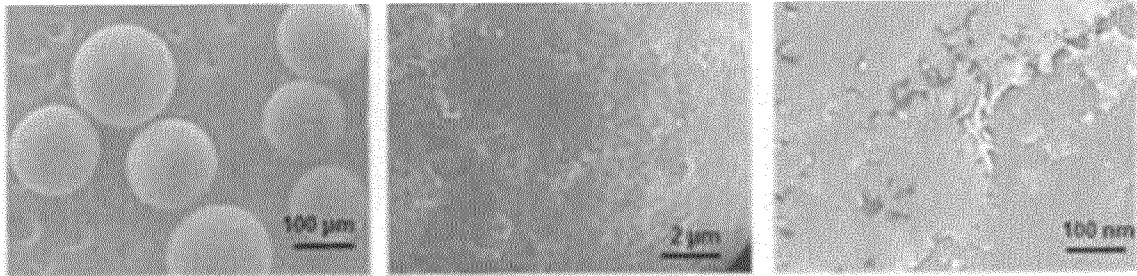


【도 3】

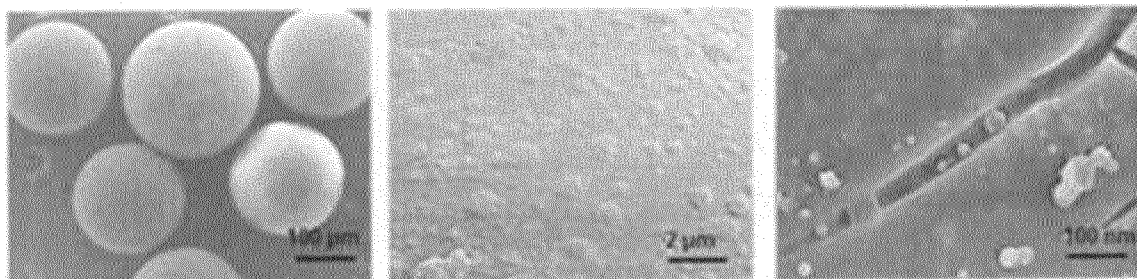


【도 4】

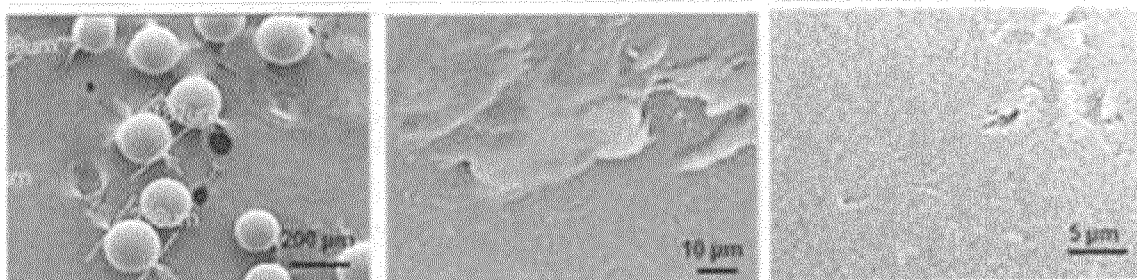
Before foaming



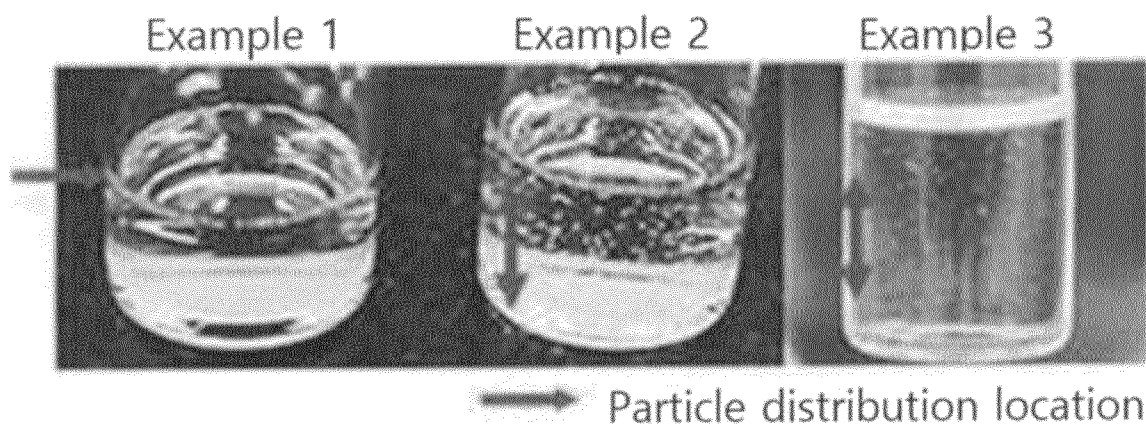
After foaming



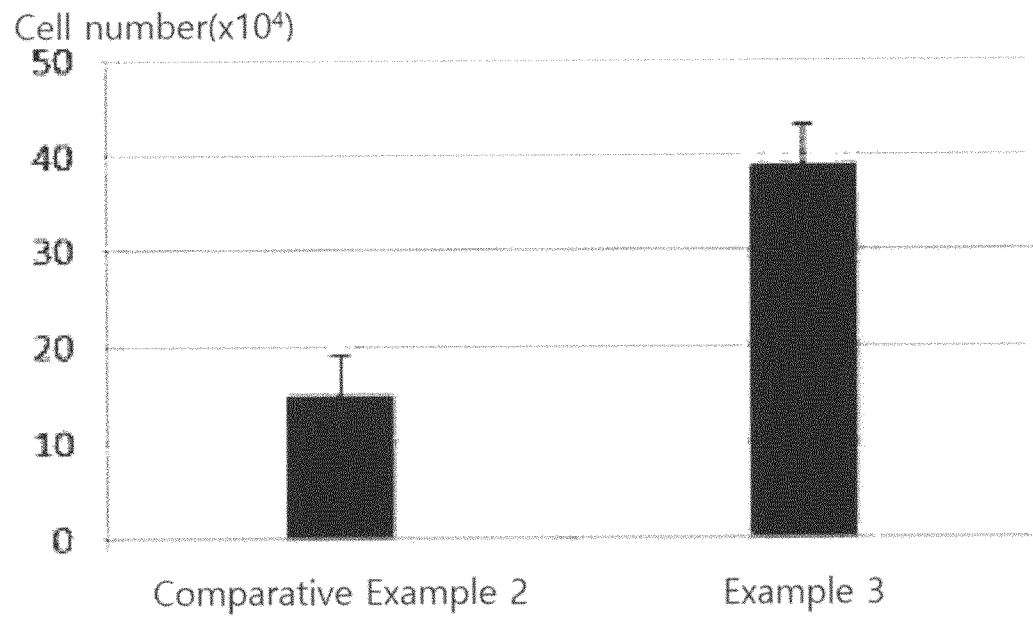
After coating



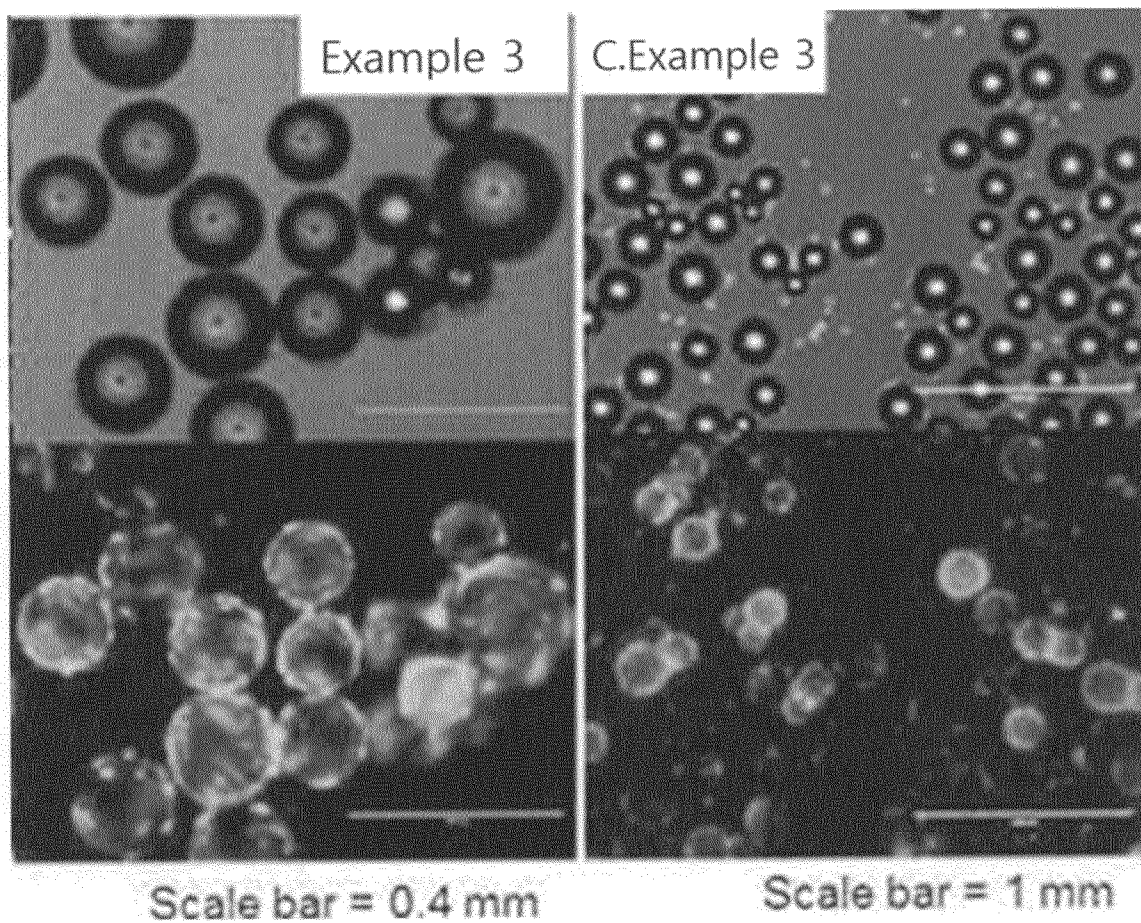
【도 5】



【도 6】



【도 7】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/009642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/00(2006.01)i; C12N 11/08(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) C12N 5/00; C08J 7/04; C08J 9/04; C12M 003/04; C12M 1/00; C12N 11/00; C12N 5/074; C12N 11/08 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: 마이크로 캐리어(micro carrier), 세포 배양(cell culture), 폴리스티렌(polystyrene), 코어(core), 발포(foam)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2014-0056014 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 09 May 2014. See abstract; paragraph [0024]; figure 6; and claims 1-26.	1-18
Y	US 2002-0155594 A1 (HSIEH, H. V. et al.) 24 October 2002. See abstract; paragraph [0043]; figure 2; and claims 1 and 16-18.	1-18
A	KR 10-2017-0114993 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 16 October 2017. See abstract; and claims 1-15.	1-18
A	US 4994388 A (HILLEGAS, W. J. et al.) 19 February 1991. See abstract; and claims 1-14.	1-18
A	KR 10-0479218 B1 (PARK, Bong-Kuk) 24 March 2005. See abstract; and claims 1-10.	1-18
☐ 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 10 November 2020		Date of mailing of the international search report 11 November 2020
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/009642

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2014-0056014	A	09 May 2014	KR	10-1545217	B1	18 August 2015
US	2002-0155594	A1	24 October 2002	EP	1245670	A2	02 October 2002
				EP	1245670	A3	28 January 2004
				JP	2002-306155	A	22 October 2002
KR	10-2017-0114993	A	16 October 2017	KR	10-1975100	B1	03 May 2019
				US	2019-0144820	A1	16 May 2019
				WO	2017-176055	A1	12 October 2017
US	4994388	A	19 February 1991	None			
KR	10-0479218	B1	24 March 2005	AU	2004-314664	A1	11 August 2005
				CA	2554044	A1	11 August 2005
				CA	2554044	C	07 July 2009
				CN	100422245	C	01 October 2008
				CN	1906236	A	31 January 2007
				EA	008604	B1	29 June 2007
				EA	200601401	A1	27 February 2007
				EP	1709110	A1	11 October 2006
				EP	1709110	B1	18 March 2020
				JP	2007-518861	A	12 July 2007
				MX	PA06008247	A	31 August 2006
				NO	20063822	A	30 October 2006
				UA	79414	C2	11 June 2007
				US	2005-0266244	A1	01 December 2005
				US	7128973	B2	31 October 2006
				WO	2005-073301	A1	11 August 2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/00(2006.01)i, C12N 11/08(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/00; C08J 7/04; C08J 9/04; C12M 003/04; C12M 1/00; C12N 11/00; C12N 5/074; C12N 11/08

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: 마이크로 캐리어(micro carrier), 세포 배양(cell culture), 폴리스티렌(polystyrene), 코어(core), 발포(foam)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2014-0056014 A (연세대학교 산학협력단) 2014.05.09 요약; 단락 [0024]; 도면 6; 청구항 1-26	1-18
Y	US 2002-0155594 A1 (HSIEH, H. V. 등) 2002.10.24 요약; 단락 [0043]; 도면 2; 청구항 1, 16-18	1-18
A	KR 10-2017-0114993 A (경희대학교 산학협력단) 2017.10.16 요약; 청구항 1-15	1-18
A	US 4994388 A (HILLEGAS, W. J. 등) 1991.02.19 요약; 청구항 1-14	1-18
A	KR 10-0479218 B1 (박봉국) 2005.03.24 요약; 청구항 1-10	1-18

☐ 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 이후 “X”에 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

2020년 11월 10일 (10.11.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 11월 11일 (11.11.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



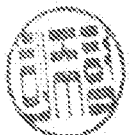
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0056014 A	2014/05/09	KR 10-1545217 B1	2015/08/18
US 2002-0155594 A1	2002/10/24	EP 1245670 A2	2002/10/02
		EP 1245670 A3	2004/01/28
		JP 2002-306155 A	2002/10/22
KR 10-2017-0114993 A	2017/10/16	KR 10-1975100 B1	2019/05/03
		US 2019-0144820 A1	2019/05/16
		WO 2017-176055 A1	2017/10/12
US 4994388 A	1991/02/19	없음	
KR 10-0479218 B1	2005/03/24	AU 2004-314664 A1	2005/08/11
		CA 2554044 A1	2005/08/11
		CA 2554044 C	2009/07/07
		CN 100422245 C	2008/10/01
		CN 1906236 A	2007/01/31
		EA 008604 B1	2007/06/29
		EA 200601401 A1	2007/02/27
		EP 1709110 A1	2006/10/11
		EP 1709110 B1	2020/03/18
		JP 2007-518861 A	2007/07/12
		MX PA06008247 A	2006/08/31
		NO 20063822 A	2006/10/30
		UA 79414 C2	2007/06/11
		US 2005-0266244 A1	2005/12/01
		US 7128973 B2	2006/10/31
		WO 2005-073301 A1	2005/08/11