



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0027696
(43) 공개일자 2011년03월16일

(51) Int. Cl.

C12M 1/08 (2006.01) *C12M 3/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7028446

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년06월10일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년12월17일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/004200

(87) 국제공개번호 WO 2009/152990

국제공개일자 2009년12월23일

(30) 우선권주장

10 2008 029 307.5 2008년06월20일 독일(DE)

(71) 출원인

바이엘 테크놀로지 서비시즈 게엠베하

독일 51368 레버쿠젠

(72) 발명자

카우링, 죄르크

독일 51069 쾰른 젤샤이더베그 20

프람, 브죄른

독일 40699 에르크라트 슈미데슈트라세 1

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

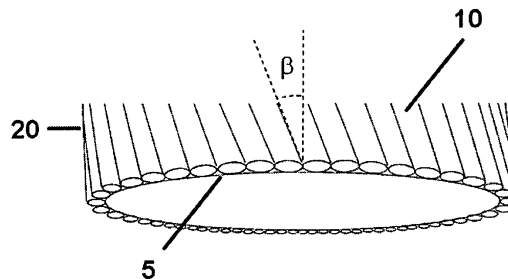
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 세포를 보호유지하고 재순환시키는 방법 및 장치

(57) 요약

본 발명은 연속 흐름 또는 회분식 흐름 용기에서 세포를 보호유지하고 재순환시키는 장치 및 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 연속 흐름 또는 회분식 흐름 용기에서 세포를 보호유지하고 재순환시킬 수 있는 장치를 제조하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

젠네, 마르크

독일 51375 레버쿠센 자르슈트라세 12

브로드, 헬무트

독일 51061 쾰른 모르겐그라벤 3

키르크너, 슈테판

독일 42281 부페르탈 하쾰펜더 슈트라세 64

브라운, 아른트

독일 42859 램샤이드, 도데슈트라세 40

특허청구의 범위

청구항 1

인접하여 배열된 다수의 채널들을 포함하고, 상기 채널들이 직립형 중공 실린더를 형성하며 상기 중공 실린더의 종축에 대하여 $+10^\circ$ 내지 $+60^\circ$ 사이의 각도 β 로 경사져 있는 것인, 연속적으로 또는 회분식으로 흐름이 통과하는 용기에서 세포를 보호유지하고 재순환시키는 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 채널들이 아래쪽을 향해서 폭이 감소하는 횡단면, 바람직하게는 원형 또는 타원형 횡단면을 갖는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 중공 실린더의 셸이 1 내지 100개의 채널 층들을 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널이 3 mm 내지 30 mm의 내경을 갖는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널이 가요성 튜브, 바람직하게는 실리콘 튜브로 형성되는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 채널의 외부 표면 및/또는 중간 공간을 기체로 처리하기 위한 수단을 더 포함하는 장치.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중공 실린더를 통해서 상기 중공 실린더의 외부 표면을 따라 순환하는 흐름을 발생시키기 위한 수단을 더 포함하는 장치.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 냉각 장치가 일체화된 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에서 정의한 장치를 연속적으로 작동하는 에어리프트 생물반응장치의 가이드 튜브로 사용하는 용도.

청구항 10

세포 함유 배지를, 상기 세포가 침강하고 다시 활주해서 나오는 인접하게 배열된 다수의 채널들을 통해 이송하는 것을 포함하며, 상기 채널들이 직립형 중공 실린더를 형성하며 상기 중공 실린더의 종축에 대하여 10° 내지 60° 사이의 각도 β 로 경사져 있는 것을 특징으로 하는, 연속적으로 또는 회분식으로 흐름이 통과하는 용기에서 세포를 보호유지하고 재순환시키는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 기체 처리에 의해서 및/또는 교반에 의해서, 상기 중공 실린더를 통해 상기 중공 실린더의 외부 표면을 따라 배지의 순환하는 흐름을 일으키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 채널들의 외부 표면 및/또는 상기 채널들 사이의 중간 공간도 기체 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

인접하게 배열된 채널들 또는 골 부분들을 포함하는 필름 또는 매트릭 나선형 또는 헬릭 권취법에 의해 성형하여 하나 이상의 채널 층을 갖는 중공 실린더를 형성하며, 여기서 상기 채널들은 상기 중공 실린더의 종축에 대하여 경사를 이루고 있는 것을 특징으로 하는, 세포를 보호유지하고 재순환시키는 장치를 제조하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 인접하게 배열된 채널들을 포함하는 매트릭, 튜브 또는 가요성 튜브를 실린더 주위에 1 내지 100개의 층으로 권취하고, 인접한 코일들을 서로 기계적으로 연결하며, 코일들의 복합체를 상기 실린더 주위에 나선상으로 뻗어있는 교차선을 따라 분할하는 방법에 의해서 제조되는 것인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 인접하게 배열된 골 부분들을 포함하는 필름이, 엠보싱되거나 열간성형 또는 냉간성형된 필름을 평활한 필름에 결합시켜서 필름 복합체를 형성하는 방법에 의해서 제조되는 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은, 연속적으로 또는 회분식으로 흐름이 통과하는 용기에서 세포를 보호유지하고 재순환시키는 장치에 관한 것이며, 본 발명의 장치는 생물반응장치(bioreactor)의 내부 또는 외부에서 작동할 수 있다. 또한, 본 발명은 생물반응장치의 내부 또는 외부에서 세포를 보호유지하고 재순환시키는 방법에 관한 것이다. 이외에도, 본 발명은 연속적으로 또는 회분식으로 흐름이 통과하는 용기에서 세포를 보호유지하고 재순환시킬 수 있는 장치를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 식물 및 동물 세포를 배양하는 것은 생물학적 활성 물질과 약학적 활성 제품을 제조하는데 있어서 매우 중요하다. 구체적으로, 자유 현탁 상태의 영양 배지에서 빈번하게 수행되는 세포의 배양이 요구되는데, 그 이유는 미생물과 달리 세포는 기계적인 전단 응력 및 불충분한 영양소 공급에 대하여 매우 민감하기 때문이다.

[0003] 일반적으로, 동물 및 식물 세포주는 회분식으로 배양된다. 이러한 배양법은 기질, 생성물 및 바이오매스(biomass) 농도를 끊임없이 변화시키는 노력이 있어야만 최적의 세포 공급을 이룰 수가 있다는 단점을 갖는다. 또한, 발효 종료시에, 부산물, 예를 들면 죽은 세포의 성분들이 축적되는데, 이것은 일반적으로 차후 처리시에 다대한 노력을 기울여 제거해야만 하는 것이다. 따라서, 이와 같은 이유 때문에, 특히 예를 들면 단백질분해 공격에 의해 손상을 입을 수 있는 불안정한 제품을 제조할 때는 연속적으로 작동하는 생물반응장치를 사용하는 것이 바람직하다.

[0004] 연속적인 생물반응장치를 사용한다면, 다음과 같은 요건들이 충족될 경우에 이와 관련된 높은 세포 밀도 및 높은 생산성을 얻을 수 있다:

[0005] - 세포에 기질, 특히 용해된 산소를 충분한 저전단 상태로 공급

[0006] - 호흡시에 생성된 이산화탄소의 충분한 제거

[0007] - 높은 세포 농도를 형성하기 위한 효과적인 저전단 폐색 방지 세포 보호유지 시스템

[0008] - 생물반응장치의 장기 안정성(멸균성, 수력학적 특성).

[0009] 연속적인 작업 방식 외에도, 효율적인 세포 보호유지 시스템을 갖는 생물반응장치를 예컨대 특히 높은 세포 밀도를 갖는 예비배양물(preculture)을 배양하기 위해서 사용할 수 있다. 이 때, 바이오매스가 거의 없는 세포 배양 상청액을 분리시키기 위해서 세포 보호유지 시스템을 불연속적으로 사용한다. 이어서, 예비배양 반응기에

다시 새로운 영양 배지를 채우고, 이런 식으로 배양물을 단순한 회분식 작업에 비해 더 높은 세포 밀도로 만들 수 있다.

- [0010] 많은 경우에, 용해된 산소를 세포에 저전단 공급하기 위해서, 막을 이용한 기포없는 기체의 도입이 사용된다. 예를 들면, 막은 원통형 베스킷 고정자(stator)상의 가요성 튜브로서 개발될 수 있다(Henzler, H.-J., Kauling, J., Oxygenation of cell cultures, Bioprocess Engineering, 9, 1993, 61-75, EP A 0172478, EP A 0240560). 큰 질량 이동 표면을 위한 공간을 만들기 위해서, 상기 가요성 튜브를 서로의 측면에 가능한한 좁은 간격으로 조밀하게 배치한다.
- [0011] 저전단 반경방향 이동 교반기 요소, 예컨대 블레이드(blade) 또는 앵커(anchor) 교반기의 도움으로, 흐름은 액체-측면 질량 이동 저항을 감소시키기 위해 동심원상으로 배열된 가요성 튜브 막들을 통해 반경 방향으로 통과한다.
- [0012] 용해된 산소를 세포에 공급할 수 있는 또 다른 가능성은 산소 함유 기체로 버블 가스를 살포하는 것이다. 그러나, 굵은 버블 가스를 살포하고 교반기 요소를 사용해서 기포를 분산시키는 방법을 사용하는 것은 저밀도 세포에 제한되는데, 그 까닭은 굵은 기포들의 고유 상 계면 면적이 낮고 이와 관련하여 질량 이동이 낮기 때문이다. 또한, 세포의 생존 가능성은, 세포 배양에는 관례적으로 사용되지 않는 고성능 범위로 교반기 요소를 사용하여 기포를 분산시키는데 수반되는 기계적인 전단 응력으로 인하여 악화된다 (WO 03/020919 A2).
- [0013] 이러한 이유 때문에, 최근에는 용해된 산소를 세포에 공급하기 위해 미세 버블 가스를 살포하는 방법이 개발된 바 있다(Nienow, A.W., Reactor Engineering in Large Scale Animal Cell Culture, Cytotechnology, 50, 1-3, 2006, 9-33, Varley, J., Birch, J., Reactor design for large scale suspension animal cell culture, Cytotechnology, 29, 3, 2004, 177-205).
- [0014] 미세 버블 가스 살포법은 금속 및 세라믹 재료로 이루어진 특수 소결체, 필터 판 또는 레이저 천공판을 사용해서 이루어지며, 여기서 천공판의 소공 또는 구멍은 일반적으로 15 μm 보다 작다. 0.5 m/h 미만의 낮은 표면 기체 속도하에서, 매우 미세한 기포들이 발생되며, 이 기포들은 세포 배양에 통상 사용되는 배지에서 응집하는 경향이 낮다. 교반기는 단순히 생물반응장치에서 미세한 기포를 분포시키는 역할만 할 뿐, 미세한 기포를 발생시키는 역할은 하지 못한다.
- [0015] 연속적으로 작동하는 생물반응장치에서 높은 세포 밀도(1밀리리터당 2000만 초과)의 생세포를 달성할 수 있도록 하기 위해서, 세포를 효율적으로 보호유지하는 것도 필요하다. 요구되는 보호유지도는 이 경우에 세포의 성장 속도 및 관류 속도 q/V (생물반응장치 부피 V 당 배지 생산량 q)에 좌우된다.
- [0016] 종래, 연속적으로 작동하는 생물반응장치용으로 다양한 세포 보호유지 시스템이 제안된 바 있으며, 이 시스템은 대개 생물반응장치 외부에 배치된다. 그 이유는 보수유지 및 세정 목적으로 세포 보호유지 시스템에 용이하게 접근할 수 있기 때문이다.
- [0017] 특히 부적절한 산소 공급 및 이산화탄소 제거에 기인한 세포에 대한 손상을 생물반응장치 외부에서 가능한 한 낮게 유지시키기 위해서, 작은 작업 용량 및 이와 관련된 짧은 세포 체류 시간을 갖는 세포 보호유지 시스템이 바람직하다.
- [0018] 막 필터외에도, 고정막 및 이동막, 특수 원심분리 및 중력 분리기를 사용한 교차 흐름 여과 원리에 의해 작동하는 장치들이 사용된다.
- [0019] 막 필터를 사용한 세포 보호유지의 경우에, 퇴적물 및/또는 오염물이 관찰되는데, 이들은 신뢰가능하고 보수유지가 필요 없는 장기 작업을 방해한다. 막 표면상의 흐름이 빠를 경우에 퇴적물은 감소될 수 있다. 그러나, 이러한 요건은 저전단 세포 배양 발효의 기본 전제 조건에 상반되는 것이다.
- [0020] 원심분리 분야에서 세포를 분리시키기 위해 특수 저전단 원심분리법이 개발된 바 있다. 그러나, 이러한 원심분리법은 보수유지 작업 없이는 단 수 주동안에 걸쳐서만 작동한다. 보수유지 작업하는 동안에 요구되는 원심분리 소자의 교체는 멸균불가능의 위험을 증가시킨다.
- [0021] 세포 배양 브로쓰(broth)로부터 세포를 분리시키는 또 다른 가능성은 중력 분리기를 사용하는 것이다. 세포 배양에 주로 사용되는 중력 분리기는 침강 용기 및 경사 채널 분리기이다. 단순한 침강 용기에 비해서, 경사 채널 분리기는 부피가 상당히 더 작다는 장점을 갖는다. 한 문헌(Henzler, H.-J., Chemie-Technik, 1, 1992, 3)에서는, 역류식, 교차 흐름식 및 병류식으로 작동할 수 있는 경사 채널 분리기에서의 세포 보호유지에 관해 설명하고 있다. 흐름이 통과하는 채널 횡단면은 판 또는 튜브를 구비할 수 있다. 특허 공보 US 5,817,505 및

EP 0 699 101 B1은 역류식 분리기에서 세포를 보호유지하기 위한 경사 분리기의 용도를 청구하고 있다. W02003020919 A2호에는 특히 세포를 보호유지하기 위한 역류식 및 교차 흐름식 분리기, 그리고 다양한 예비분리기(예:히드로사이클론(hydrocyclone))와의 조합이 설명되어 있다.

[0022] 경사 채널 분리기는 외부 회로를 통해서 생물반응장치에 연결된다. 이를 위해서, 가요성 튜브 라인과 펌프가 필요하고, 이들을 사용하면 플랜트의 복잡성이 증가하므로 실패의 위험도 증가한다. 또한, 세포의 전단 응력이 증가된다.

[0023] 중력 분리기에서 세포의 케이크 형성 및 신진대사 활성을 감소시키기 위해서, 세포 배양 브로쓰를 중력 분리기에 이르는 그 경로상에서 냉각시키는 방법이 제안되어 있다. 저온에서 감소된 신진대사 활성은 특히 생물반응장치 외부에서 세포의 체류 시간이 비교적 긴 경우에 유리하다. 자유 대류의 효율 감소성 흐름 현상을 유발할 수 있는 중력 분리기 내부에서의 온도 및 밀도 기울기의 발생은 냉각 온도를 제한함으로써 방지된다.

[0024] 또한, 생물반응장치 내부에 세포 보호유지 시스템이 배치된 생물반응장치도 개시되어 있다. EP 0 227 774 B1호는 연속적으로 작동하는 발효 케틀(kettle)을 개시하고 있으며, 여기서 세포는 에어리프트(airlift) 루프(loop) 반응기 내부에 보호유지된다. 에어리프트 루프 흐름은 수직 격벽에 의해 형성된 내부 무흐름 침강 영역 주위에서 세포 현탁액을 통과한다. 상기 침강 영역에 퇴적된 세포가 교반된 세포 현탁액으로 재순환됨과 동시에 세포 상청액은 침강 영역의 상부에서 분리된다. 그러나, 위에 설명한 수직으로 작용하는 보호유지 기구의 단점은 그것을 대규모화 하기가 곤란하다는 점이다. 이로 말미암아 발효 영역에 비해서 분리기 부피의 불균일한 확장이 유발된다. 그 결과는 부적절하게 공급되는 분리기에서 세포의 체류 시간이 높아짐으로써, 반응기 시스템의 생산성이 저하된다는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0025] 그러므로, 종래 기술에 비추어, 본 발명의 목적은 연속적으로 또는 회분식으로 작동하는 방법에서 동물 및 식물 세포를 보호유지하고 재순환시키는 효율적인 방법을 제공하는 것이며, 이와 같은 방법은 기계적 전단 응력에 대한 세포의 감수성 및 세포에의 부적절한 영양소 공급을 고려한 것이고, 의약 산업의 보수유지, 세정 및 멸균성 요건을 충족하는 것이며, 이와 같은 방법을 사용하면 복잡성 및 실패의 위험이 감소하게 된다.

과제의 해결 수단

[0026] 그러므로, 본 발명은 흐름이 통과하는 용기에서 세포를 보호유지하고 재순환시키는 장치에 관한 것이며, 본 발명의 장치는 인접하여 배열된 다수의 채널들을 포함하고, 이 채널들은 직립형 중공(hollow) 실린더를 형성하며, 상기 중공 실린더의 종축에 대하여 10° 내지 60° 사이의 각도 β 로 경사져있다.

[0027] 상기 흐름이 통과하는 용기는 생물반응장치 또는 세포 보호유지 및 세포 재순환을 위해 생물반응장치에 연결된 용기일 수 있다.

[0028] 상기 흐름은 상기 용기를 연속적으로 또는 회분식으로 통과할 수 있으며, 연속적으로 통과하는 것이 바람직하다.

[0029] 상기 채널들은 그 하단에서 개방된다. 상단에서, 상기 채널들은 공유된 환형 공간으로 통하며, 상기 공간은 하나 이상의 라인을 갖고, 상기 라인을 통해서 수확물(harvest) 스트림을 상기 용기로부터 이송할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 상기 세포 및 세포 배양 용액은 상기 채널에서 분리된다. 생물반응장치로부터 수확물 스트림을 연속적으로 분리시킨 결과, 세포 배양 용액과 세포가 채널내로 인출된다. 세포는 경사를 이루어 배열된 채널 내부에 침강되며, 종래의 경사 채널 분리기에서와 마찬가지로, 채널로부터 다시 유입되는 수확물 스트림으로 역류식으로 환류함으로써, 용기내에 유지된다. 세포로부터 분리된 세포 배양 용액은 채널에 의해서 상기 채널 상부의 환형 공간내로, 이어서 최종적으로 용기밖으로 이송된다.

[0031] 상기 채널은 다각형, 타원형 또는 원형 횡단면을 갖는다. 종래 기술을 통해 공지된 경사 채널판은 직사각형 윤곽을 갖는다. 세포를 침강시키기 위한 분리 표면 영역은 직사각형 윤곽으로 평면이 되도록 설계된다. 횡단면 폭이 d인 정사각형 채널은 동일한 직경 d를 갖는 원형 채널보다 더 큰 분리 표면 영역을 갖는다. 그러나, 의외

로, 직경이 d인 원형 채널에서의 세포의 보호유지 및 재순환 효율은, 그 표면적이 더 작음에도 불구하고, 횡단면 폭이 d인 직사각형 채널의 효율에 대응하는 것으로 밝혀졌다. 이것은 원형 횡단면의 경우에 접촉 면적이 더 작기 때문에 침강된 세포와 채널 내벽 사이의 마찰이 더 적으므로, 세포가 더욱 용이하게 하향 활주할 수 있기 때문이라고 설명할 수 있다. 또한, 사태(avalanche) 효과가 어떤 역할을 한다고 생각할 수 있다. 원형 채널 횡단면에서 침강하는 세포들은 수직축상의 최저점을 향해 배향되는 추가의 압축 과정에 기인하여 점차로 층층이 놓이게 되므로, 직사각형 횡단면에서보다 더욱 용이하게 서로를 끌어당기게 된다. 결국, 이로 말미암아 분리기에 존재하는 세포들이 감소하므로, 자유 유동 횡단면이 증가하게 된다.

[0032] 그러므로, 상기 채널들은 그 하측면을 향해서 감소하는 횡단면을 갖는 것이 바람직하다. 특히, 하측면상에서 채널 횡단면은 반원 또는 타원형 윤곽을 갖는 것이 바람직하다. 종래 기술에 의한 직선형 관들 대신에 하측면을 향해 감소하는 횡단면을 갖는 채널을 사용하게 되면, 세포의 미끄러짐을 현저하게 가속시킬 수 있으므로, 채널내의 용해된 산소가 소모될 가능성에 대응할 수 있다. 본 발명에 의한 장치의 바람직한 실시양태에서, 상기 채널은 원형 횡단면을 갖는다.

[0033] 채널의 규모(수, 직경, 길이)는 각 경우에 보호유지하고자 하는 세포, 생물반응장치의 크기 및 생산량에 좌우된다.

[0034] 필요한 분리 표면적 A_{erf} 는 침강 속도 ws , 관류 속도 q/V (생물반응장치 부피 V 당 배지 생산량 q) 및 생물반응장치 부피에 의해 하기 수학적 식 1에 따라 주어진다. 효율 η 는 수직형 분리기 대비 경사 채널 분리기의 성능 감소를 고려한 것이다(수학적 식 2).

[0035] 직사각형 및 원통형 횡단면에 대한 이론적인 분리 표면적 A_{th} 는 문헌에 발표된 방법에 따라서 수학적 식 3 및 수학적 식 4를 통한 근사값으로 결정될 수 있다(H.-J. Binder, Sedimentation aus Ein- und Mehrkornsuspensionen in schrag stehenden, laminar durchstromten Kreis- und Rechteckrohren(Sedimentation from single- and multigrain suspensions in inclined laminar-flow circular and rectangular tubes), Dissertation Berlin, 1980):

[0036] [수학적 식 1]

$$A_{erf} = \frac{\text{관류 속도} \cdot V}{ws}$$

[0037]

[0038] [수학적 식 2]

$$A_{th} = \frac{A_{erf}}{\eta}$$

[0039]

[0040] [수학적 식 3]

[0041] 직사각형: $A_{th} \approx Z \cdot \sin(\beta) \cdot d \cdot L$

[0042] [수학적 식 4]

$$A_{th} \approx \frac{3 \cdot \pi}{16} \cdot Z \cdot \sin(\beta) \cdot d \cdot L$$

[0043] 원통형:

[0044] 상기 식에서, Z 는 채널의 수이고, β 는 채널들이 중력의 방향에 대하여 경사진 각도이며, d 는 내부 직경이고, L 은 채널의 길이이다. π 는 원의 수학 상수이다($\pi=3.14159\dots$).

[0045] 각도 β 는 세포의 침강 및 미끄러짐 양상에 좌우되며, $10^\circ \leq \beta \leq 60^\circ$ 인 것이 바람직하다. 바람직한 실시양태에서, 각도 β 는 15° 내지 45° 이고, 특히 바람직하게는 25° 내지 35° 이다. 미끄러짐 양상을 개선하기 위해서, 장치를 적당한 수단, 예를 들면 공기압 또는 전기 진동자에 의해서 진동시킬 수 있다. 1 밀리리터당 2000만을 초과하는 높은 부피 농도 또는 세포 밀도 및 제한된 진동 가능성하에서, $20^\circ \leq \beta \leq 35^\circ$ 인 것이 특히 바람직하다.

[0046] 채널의 길이에 걸쳐 각도를 변화시키는 것도 생각할 수 있다.

- [0047] 채널의 폭 d (최대 횡단면 폭, 원형 윤곽의 경우에는 채널의 직경)은 채널의 폐색을 방지하기 위해 $d \geq 3 \text{ mm}$ 인 것이 바람직하다. 바람직한 실시양태에서, 첫째로는 폐색된 상태를 확실하게 방지하되, 둘째로는 분리기의 시간 간 수율 및 생물반응장치 공간을 감소시키는 부피 비율을 가능한 한 낮게 유지시키기 위해서, 채널 폭이 3 mm 내지 100 mm , 바람직하게는 5 mm 내지 20 mm , 특히 바람직하게는 5 mm 인 채널을 사용한다.
- [0048] 채널 길이를 설계함에 있어서는, 층상 흐름 조건($Re < 2300$; Re = 레이놀즈(Reynolds) 지수)을 유지하는 것을 반드시 고려해야 한다. 용기내에 장착할 때, 채널 길이는 수직 방향에서 이용 가능한 용기 내부 치수, 및/또는 반응기에서 달성하고자 하는 충전도에 좌우된다. 짧은 채널 길이는 압력 강하가 감소되기 때문에 분배 문제를 유발할 수 있고, 이러한 문제는 특히 상부 환형 공간으로부터 수확물 용액을 분리시키는 동안에 분리 속도를 감소시키기 위해서 복잡한 분배 장치를 필요로 할 수 있다. 분리 부위에서 동적 압력은 이 경우에 채널내의 압력 강하보다 적어도 5배 내지 10배 더 낮아야 한다. 이 점에서 볼 때, 0.1 m 부서의 채널 길이가 공업적으로 얻을 수 있는 길이로 간주될 수 있는 한편, 0.2 m 내지 5 m 의 채널 길이가 바람직하고/하거나 0.4 m 내지 2 m 가 특히 바람직하다.
- [0049] 본 발명에 의한 장치는 2 내지 10^6 개의 채널, 바람직하게는 10 내지 $100,000$ 개, 특히 바람직하게는 100 내지 $10,000$ 개의 채널을 포함한다.
- [0050] 채널들에 의해 형성되는 직립형 중공 실린더의 셸(shell)은 하나 이상의 채널 층을 포함한다. 상기 셸은 1 내지 100 개의 층을 포함하는 것이 바람직하고, 특히 생물반응장치내로 내부 장착하는 경우에 1 내지 10 개의 층을 포함하는 것이 특히 바람직하다. 이러한 층들은 고리 형태로 또는 서로의 주위에 나선형으로 배열될 수 있다. 상기 층들은 기계적인 지지체를 제공하는 고정자에 연결될 수 있다.
- [0051] 상기 실린더는 생물반응장치내로 장착될 때, 생물반응장치의 충전 높이의 30% 내지 95% 인 높이를 갖는 것이 바람직하고, 60% - 90% 인 높이를 갖는 것이 특히 바람직하다. 이러한 장착 방식에 의하면, 실린더를 통과하는 방향성있는 흐름이 가능해진다. 실린더를 통과하는 흐름은, 원통형 생물반응장치의 벽이 예진대 추가로 열교환을 위해, 또는 분리기 장치의 장착시에 센서를 수용하는데 이용될 수 있다는 장점을 제공한다. 또한, 순환하는 흐름은 입자의 현탁을 유발하거나 촉진한다. 생물반응장치의 편리한 바닥 형태는 둥근 모서리를 갖거나 접시형 또는 원형 바닥 형태로 구성된다. 바닥에 근접하여 중앙에 기체를 공급할 경우에는, 침강하는 입자들, 예를 들면 미생물 또는 진핵 세포가 순환하는 흐름에 의해서 바닥 중심까지 이동되며, 바닥 중심에서 상기 입자들은 상향 기체 처리 유도 흐름에 의해, 적절한 경우에는 교반기 시스템을 이용해서, 수용되고 재현탁된다. 이와 같은 장착 조건하에서, 바람직한 실린더 직경은 제공하고자 하는 분리기 표면적 및/또는 장착하고자 하는 환형 또는 나선형 채널 층들의 수에 따라서, 반응기 직경의 50% - 85% 가 된다. 이 경우에, 생물반응장치 벽과 고정자 사이에 위치한 환형 표면은 실린더 횡단면의 5% - 300% , 특히 바람직하게는 100% 를 차지할 수 있도록 확보해야 한다. 이런 식으로, 과도하게 큰 마찰 손실없이 높은 효율로 순환하는 흐름이 유도될 수 있다. 필요한 분리기 표면적은 세포의 침강 성질 및 목적하는 관류 속도 및 세포 농도에도 좌우된다. 바람직한 관류 속도는 $0.2\text{--}40 \text{ l/일}$ 범위, 특히 바람직하게는 0.5 내지 20 l/일 범위이다. 생물반응장치 부피당 바람직한 분리기 표면적은 세포의 침강 성질에 따라서(세포의 농도, 크기 및 응집 경향에 좌우됨), 0.1 내지 $100 \text{ m}^2/\text{m}^3$, 특히 바람직하게는 2 내지 $20 \text{ m}^2/\text{m}^3$ 이다.
- [0052] 외측 또는 내측을 향한 실린더의 셸 표면은 세포가 채널 중간 공간으로 침입하는 것을 방지함으로써 오염을 방지하기 위해 밀봉되는 것이 바람직하다.
- [0053] 본 명세서에서 실린더는 2개의 평행한 평면(밀면 및 상면) 및 평행선들에 의해 형성된 셸 또는 실린더 표면에 의해 형성된다. 상기 실린더는 직선을 따라서 평면상의 가이드 곡선을 배치함으로써 형성되며, 여기서 상기 직선은 상기 평면에 존재하지 않는다. 따라서, 채널들에 의해 형성된 실린더는 다양한 형태를 가질 수 있다. 예를 들면, 실린더는 원형 실린더, 타원형 밀면을 가진 실린더 또는 프리즘, 즉, 다각형(삼각형, 사각형, 오각형 등)을 밀면으로 갖는 실린더일 수 있다. 다른 형태도 생각할 수 있으며, 그러한 예로는 채널들을 끝이 잘린 원추 형태로 배열하는 것을 들 수 있다. 상기 실린더는 원형 또는 타원형 밀면을 갖는 실린더인 것이 바람직하다. 상기 실린더는 셸 표면에 대하여 평행한 내부 채널(중공 실린더)를 갖고, 밀면과 동일한 횡단면 형태를 갖는 것이 바람직하다.
- [0054] 튜브 또는 가요성 튜브를 채널로서 사용하는 것이 바람직하다. 채널 재료로서 고려되는 물질의 예로는 플라스틱과 금속이 있다. 바람직하게는, 당업자에게 잘 알려진 플라스틱, 예를 들면 테플론(Teflon), 실리콘 고무(이하, 실리콘으로 축약함), 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌을 사용한다. 튜브 또는 가요성 튜브에는 바이오매스의

접착 경향이 낮은 재료를 사용하는 것이 바람직하다. 특히 매우 적합한 재료는 실리콘인데, 그 이유는 실리콘을 의약 공정에 충분한 품질로 우수하게 가공할 수 있기 때문이다. 또한, 실리콘은 산소 투과성이므로, 채널 내부에서조차도 어느 정도까지는 산소 공급을 달성할 수 있다. 이러한 이유로, 채널 주위의 외부 공간을 산소 함유 기체로 소제할 수 있다. 상기 산소 함유 기체는 기체 공급 라인 및 배출 라인을 통해 채널의 중간 공간내로, 즉, 상부 채널 홀더와 하부 채널 홀더 사이에 공급한다.

[0055] 본 발명에 의한 장치는 그 전체가, 또는 본 발명에 의한 장치의 일부가, 세정 문제점을 피하도록 1회용 물품으로 구성되는 것이 바람직할 수 있다.

[0056] 본 발명에 의한 장치의 바람직한 실시양태에서, 실리콘 튜브를 채널로서 사용한다. 실리콘 튜브들은 서로 결합되어 매트릭스를 형성하고 소정의 분리 표면적이 얻어질 때까지 하나 이상의 층 형태로 원통형 고정자상에 권취되는 것이 바람직하다. 경사부에서 가요성 튜브의 매트릭스는, 의약학적 원리에 따라 정화된 보호유지 시스템을 제공하기 위한 비용을 최소한으로 감소시키는 1회용 요소로서 구성되는 것이 바람직하다.

[0057] 본 발명에 의한 장치를 제조하는 바람직한 방법에서, 채널로서, 튜브 또는 가요성 튜브를 실린더상에 권취한다. 이 경우에, 각각의 코일이 서로 가까이 인접하는 것이 바람직하다. 다수의 채널 층이 장치에 필요할 경우에는, 튜브 또는 가요성 튜브의 다수의 층을 층층이 권취할 수 있다. 각각의 코일은 서로 기계적으로, 예를 들면 접착에 의해 결합되는 것이 바람직하다. 최종 채널의 길이는 실린더 주위의 코일의 원주에 대응한다. 채널의 연장을 무시하면, 채널 길이 L 은 하기 수학식 5에 의한 근사값으로 실린더의 원주 U 에 의해 주어진다(π =원의 수학적 상수).

[0058] [수학식 5]

$$L = \frac{U}{\pi}$$

[0059]

[0060] 코일의 수는 최종 채널들의 수 Z 를 제공한다.

[0061] 이어서, 권취된 튜브 또는 권취된 가요성 튜브를 코일에 대하여 횡방향으로 절단한다. 이 작업을 실린더 주위에서 나선형으로 진행한다(예: 도 3 참조). 이 경우에, 나선들의 기울기는 경사를 이루어 존재하는 채널들의 최종 각도 β 를 제공한다. 그 결과는 경사를 이루어 존재하는 하나 이상의 채널 층들의 매트릭스이다(예: 도 4 참조). 상기 매트릭스를 경사진 단부에서 결합시킴으로써, 원통체(sock) 형태(중공 실린더)를 만든다. 필요에 따라서, 상기 실린더를 지지체(고정자)상에 고정시킬 수 있다(예: 도 5 참조). 채널의 하측면은 개방된 상태로 유지되는 반면, 상측면은 홀더에 결합되어, 상기 채널들 위에 환형 공간이 형성되고, 그 공간내로 장치를 작동시키는 동안에 각각의 채널을 통해 흐르는 액체 스트림들이 모이게 된다.

[0062] 세포 배양 용액과 세포가 채널들 사이의 중간 공간내로 침입하여 오염을 일으키는 것을 방지하기 위해서 외부로부터 중공 실린더의 내외부를 밀봉하는 것이 유리하다. 마찬가지로, 채널들 사이의 중간 공간은 세포 배양 용액 및 세포의 침입을 방지하기 위해 중공 실린더의 하측면과 상측면에서 밀폐되어야 한다. 이와 같은 밀폐된 채널 외부 공간의 특수한 설계상의 특징에 의해서, 상기 공간을 산소가 농후한 기체로 소제할 수 있다. 채널에 산소 투과성 재료, 바람직하게는 실리콘을 사용함으로써, 분리된 공간내에 보호유지된 세포들에 산소를 공급할 수 있다.

[0063] 다른 바람직한 제조 방법에 의하면, 본 발명에 의한 장치는 프로파일링된(profiled) 필름으로 제조된다(예: 도 6 참조). 프로파일링된 필름은 평활한 측면 및 일정한 간격으로 일련의 마루와 골을 갖는 측면을 포함하는 것이 바람직하다. 필름을 하나 이상의 층으로 나선형으로 또는 셸 형태로, 예를 들면 고정자상에, 권취할 때 채널이 형성된다. 골의 경우에, 개방된 측면을 향해서, 각각의 골은 인접한 층의 평활한 측면에 의해서 또는 고정자의 벽에 의해서 폐쇄된다.

[0064] 채널의 기하학적 형태는 마루 높이 h_s 대 채널 폭 b 의 비율에 의해 설정된다. 기술적으로 얻을 수 있는 h_s/b 비율은 변형성, 탄성, 성형(deep-draw) 용량 등의 성질에 따라 0.33 내지 5 범위이다. 이 경우에, 두 치수 h_s 와 b 는 둘다 3 mm보다 크거나 같아야 하고, 바람직하게는 5 mm보다 크거나 같아야 한다. 바람직한 h_s/b 비율은 0.5 내지 3이다. 마루의 폭 b_s 는 필름 재료의 기계적 안정성에 의해 결정된다. 마루 폭 b_s 는 분리기 부피 단위당 높은 공유 면적을 가능하게 하기 위해 가능한 한 작아야 한다. 동시에, 마루 폭은 형태 변화없이 하부층에 비-양화(non-positive) 방식으로 결합하는 것을 허용하기 위해, 너무 작게 선택해서는 안된다.

- [0065] 나선형으로 권취할 경우에, 전이점에서 발효기 공간과 분리 공간 사이에서 축방향 밀봉을 달성하기 위해 매트에 대한 체결부 및 경사로 형태의 연결부가 필요하다.
- [0066] 쉘 형태로 권취할 경우에, 각 층의 안정성을 증가시키기 위해서, 층마다 양의 입사각과 음의 입사각 사이에서 교대로 채널들의 방향을 변화시키는 것이 합리적일 수 있다. 그러므로, 본 발명에 의한 장치의 한 실시양태에서, 경사를 이루어 배열된 채널들을 갖는 매트는 쉘의 형태로 배열되며, 여기서 각각의 쉘은 중공 실린더로부터 성형된 매트에 의해 형성되고, 각각의 매트를 인접한 매트에 대하여 매트의 종축중 하나에 대해 180° 만큼 회전시킬 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 하나 걸러 하나씩의 쉘을 180° 만큼 회전시킨다.
- [0067] 상기 프로파일링된 필름은 필름 제조시에 즉시 성형함으로써, 또는 엠보싱되고 열간 성형 또는 냉간 성형된 필름을 평활한 필름에 결합(예: 접착)시킴으로써 얻을 수 있다. 엠보싱된 필름과 평활한 필름의 재료 특성을 최적의 상태로, 즉, 당업자에게 알려지고 상응하는 표면 특성을 갖는 적당한 재료를 선택함으로써, 다양한 기능성(우수한 활주성 및 엠보싱된 필름의 형태 안정성, 평활한 필름의 우수한 밀도 특성)에 맞게 조정할 수 있다.
- [0068] 필름 채널을 사용한 제조 방법에서는, 결과적으로 장치가 채널 주위에서의 기체 소제 및 이로써 유도 가능한 질량 이동을 막대한 비용을 들여서만 달성할 수 있으므로, 이러한 유형의 장치는 생물반응장치 외부 용도로 제공 하는 것이 바람직하다.
- [0069] 본 발명의 방법에 의하면, 세포를 보호유지 및 재순환시키는 장치를 간단하고 경제적으로 제조할 수 있다. 튜브 또는 가요성 튜브가 권취된 실린더, 코일의 수, 코일 간격, 층의 수 및 절단된 나선의 기울기를 선택함으로써, 최종 장치의 기하학적 형태는 간단하고 정확하게 정해질 수 있다. 또한, 최종 장치의 기하학적 형태는 천공된 필름 및 코일(층)의 수를 선택함으로써 간단하고 정확하게 정해질 수 있다.
- [0070] 상기 방법에 의하면, 구체적으로, 1회용 요소를 저렴하게 생산할 수 있으며, 이러한 1회용 요소를 사용하여 의약학적 원리에 따라 정화된 보호유지 시스템을 제공하는 비용을 최소로 감소시킬 수 있다.
- [0071] 본 발명에 의한 장치는 간단하게 생물반응장치 내부 또는 외부에 연결되어 작동될 수 있다. 이와 같은 연결, 작동 및 보수유지에는 전혀 문제가 없다. 본 발명에 의한 장치 또는 본 발명에 의한 장치의 일부분을 1회용 요소로서 설계함으로써 세정 문제를 배제할 수 있다.
- [0072] 본 발명에 의한 장치를 생물반응장치의 내부에 사용하면, 침강 영역내에서 온도 및 밀도 기울기의 형성이 감소됨으로써, 원하지 않는 대류 스트림 및 세포 보호유지 효율에 미치는 관련된 악영향을 용이하게 피할 수 있다. 또한, 생물반응장치 내부에 배열할 경우에는, 예를 들면 경사 채널판 분리기를 외부에 배열한 경우에 비해서 전반적인 장비의 복잡성과 고장 위험을 줄일 수 있다.
- [0073] 그러므로, 바람직한 실시양태에서, 분리기 장치는 생물반응장치 내부에 사용된다. 생물반응장치 내부에서, 상기 분리기 장치는 발효 영역을 두 영역, 즉, 원통형 내부 공간과 환형 외부 공간으로 분할한다.
- [0074] 본 발명에 의한 장치를 순환하는 흐름을 발생시키는 수단과 병용하는 것이 바람직하다. 순환하는 흐름은 세포 배양 용액을 그 내부에 함유된 세포와 함께 원통형 장치의 외부 표면을 따라 원통형 내부 공간을 통해, 또 환형 외부 공간을 통해, 그리고 다시 원통형 내부 공간을 통해 이송한다. 순환하는 흐름을 발생시키는 적당한 수단은 예컨대 기계적 교반기 또는 기체 처리 시스템이다. 순환하는 흐름을, 미세 기포로 처리하는 시스템에 의해 달성함으로써, 이러한 기포로의 처리를 통해서 산소 주입을 수행할 뿐만 아니라 두 발효 영역 사이에서의 자연적인 순환을 추가의 교반기 요소를 사용할 필요 없이 유도하는 것이 특히 바람직하다. 이러한 방식으로, 전술한 바와 같은 고집적 반응기에 의해 세포 배양 발효에 대하여 다음과 같은 여러 가지 장점을 얻을 수 있다.
- [0075] - 순환 반응기는 저전단이고, 탁월한 혼합 양상 및 기체 공급 양상을 갖는다.
- [0076] - 루프 흐름의 결과로서, 분리기 내부임에도 불구하고, 반응기 벽은 열교환에도 이용될 수 있으므로, 기존의 발효 유닛내로 확실하게 일체화된다.
- [0077] - 생물반응장치 내부에 대규모화 가능한(즉, 분리기 용량과 생물반응장치 용량의 비례에 따른 확대) 보호유지 표면을 장착시킴으로써, 감염 위험 증가와 관련된 오토클레이브 하류에서 생물반응장치와 분리기를 결합하지 않는다. 또한, 모든 세포 이송 펌프 및 다수의 외부 가요성 튜브 라인이 필요하지 않을 수 있다. 그 결과, 특히 냉각된 분리기 영역과 재가열된 발효 영역 사이에서 온도 변화가 사라지고, 전단 응력이 감소하며, 공정의 신뢰도가 증가한다.
- [0078] - 분리기로부터 수확물 스트림까지 역류식으로 생물반응장치내로 다시 미끄러지는 세포들은, 순환하는 흐름에

의해서, 다시 신속하게 특히 저전단 방식으로 추가의 펌프를 사용하는 일 없이 생물반응장치의 공급이 원할한 부분 영역내로 이동된다.

[0079] 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 의한 장치와 병용되는 생물반응장치는 에어리프트 생물반응장치(참조예: EP 0 227 774 B1)로서 구성되며, 이 장치에서 기체, 예를 들면 공기는 당분야에 상승기(riser)로도 알려져 있는 생물반응장치의 상향 부분내로 도입된다. 바람직하게는, 미세 기포를 사용한 처리를 수행하며, 이 때 거품을 방지하고 세포를 고전단 기체상 계면으로부터 멀리 유지시키기 위해 계면활성제를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 상기 상승기는 그 상단 및 하단에서, 당분야에 하강기(downcomer)로도 알려져 있는 생물반응장치의 또 다른 상향 부분의 상단 및 하단과 연결된다. 실질적으로 원통형인 에어리프트 생물반응장치의 광범위한 변형에는 중앙에 배열된 원통형 가이드 튜브를 함유하며, 상기 가이드 튜브는 에어리프트 생물반응장치를 상기 가이드 튜브내의 상승부(상승기), 및 상기 가이드 튜브와 에어리프트 생물반응장치의 용기 외벽 사이의 환경 공간내의 하강부(하강기)로 분할한다. 상기 상승부가 상기 가이드 튜브와 용기 외벽 사이의 환경 공간에서도 관찰되며, 상기 하강부가 상기 가이드 튜브 내부에서도 관찰될 수 있다. 예를 들면, 산소가 농후한 기체를 상기 상승기의 하단에서 공급하여, 상승기내의 현탁 배양액의 평균 밀도를 감소시킴으로써, 상승기내 상향 액체 흐름을 유도함에 따라 하강기의 액체 내용물을 치환시키고, 차례로 상기 액체 내용물을 상승기의 하단으로 다시 유도시킨다. 이러한 방식으로, 액체 순환이 발생하며, 이를 통해 현탁 배양물을 적절하게 혼합하고 세포를 현탁된 상태로, 즉, 자유 현탁 상태로 유지시킨다. 이와 같은 방식으로 교반된 생물반응장치의 장점은, 영양 배지에 용해된 산소를 세포에 적절히 공급하고 호흡으로 말미암아 생긴 이산화탄소를 적절히 제거함으로써, 기계적인 교반기와 같은 이동성 부품이 전혀 필요하지 않다는 점이다. 상기 상승기와 하강기의 횡단면 표면적은 실질적으로 동일하다.

[0080] 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 의한 장치는 연속적으로 작동하는 에어리프트 생물반응장치의 하강기와 상승기 사이에서 가이드 튜브를 형성한다. 본 발명에 의한 장치 주위에서 흐르는 대등한 온도의 현탁 배양에 의해서, 자유 대류의 흐름 현상이 방지된다.

[0081] 또 다른 바람직한 실시양태는 발효 영역과 분리기 영역을 공간적으로 분리 배치하는 것이다. 즉, 본 발명에 의한 장치가 생물반응장치의 외부에 연결된다. 분리기의 공급은 2개 이상의 펌프, 바람직하게는 저전단 연동 펌프에 의해서 확보된다. 이와 같은 펌프에 의하면 세포 배양 용액을 생물반응장치 공간으로부터 분리시켜서, 냉각후에 열교환기를 경유하여 침강 장치로 공급하고, 수확물 스트림을 침강 장치로부터 분리시켜서 농축물 스트림을 다시 생물반응장치로 이송할 수 있다.

[0082] 발효 배지를 냉각시키는데 필요한 냉각 장치를 1회용 요소로서 구성되는 것이 바람직한 분리기의 하우징내로 일체화시킬 수 있으며, 상기 냉각 장치도 1회용 요소로서 구성함으로써 이 필수 장치에 대해 요구되는 세정 요건의 필요성이 없도록 할 수도 있다.

[0083] 생물반응장치 및 내부 또는 외부 보호유지 기구로 이루어진 관류 반응기는 잘 알려진 방식으로 작동시킬 수 있다. 영양 배지를 연속적으로 공급하고 세포 농도가 낮은 세포 배양 상청액을 연속적으로 제거한다. 상기 관류 반응기는, 높은 관류 속도 q/V (생물반응장치 부피 V 당 배지 생산량 q)가 생물학적으로 의미있고 충분한 분리기 표면적이 제공될 경우, 이러한 높은 관류 속도하에 작동시킬 수 있다.

[0084] 또한, 내부 또는 외부 보호유지 장치를 구비한 생물반응장치는, 배양을 먼저 회분식으로 전개하도록 작동시킬 수 있다. 배지가 바이오매스의 유효 증가가 더 이상 불가능한 정도까지 소모된 경우에, 바이오매스가 거의 없는 배양 상청액을 내부 또는 외부 보호유지 장치를 통해서 분리시킨다. 이어서, 생물반응장치내에서 얻어지는 공간을 새로운 영양 배지를 공급하는데 이용할 수 있으며, 결과적으로 추가의 성장 및 보다 높은 총 바이오매스 생산량을 얻을 수 있다. 이러한 방법은 예비배양의 일례로서 제안된 것이며, 매우 큰 생물반응장치에 이와 같은 예비배양물을 집중할 수 있는데, 그 까닭은 상기 방법이 기존의 예비배양 반응기의 생산성을 증가시킬 수 있기 때문이다.

[0085] 생물반응장치는 시험관내에서 자유 현탁 상태로 또는 미소담체상에서 성장하는 세포를 배양하는데 사용될 수 있다. 바람직한 세포로서는, 원생동물문 및 사람, 동물 또는 식물 기원의 접착 및 비접착성 진핵 세포를 들 수 있으며, 이러한 세포들은 예컨대 유전자 조작에 의해 바이러스, 단백질, 효소, 항체 또는 진단 구조물과 같은 특수한 활성 약제를 생성할 수 있는 것들이다. 의학학적으로 고성능 생산에 적합한 세포, 예를 들면 섬유모세포, 곤충 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, HKB 세포(인간 HEK 293 세포주와 인간 버키트(Burkitt) 림프종 세포주 2B8의 융합에 의해 형성됨), 또는 하이브리도마 세포를 사용하는 것이 특히 바람직하다.

- [0086] 또한, 본 발명은 흐름이 통과하는 용기에 세포를 보호유지 및 재순환시키는 방법에 관한 것이다. 새로운 배지 및/또는 처리된 배지를 용기에 연속적으로 또는 회분식으로 공급하고, 소모된 배지를 상기 용기내에 배치된 세포 보호유지 및 재순환 장치에 의해서 제거한다. 상기 장치는 경사를 이루어 배열된 다수의 채널들로 이루어지며, 상기 채널들은 직립형 중공 실린더를 구성하고, 상기 중공 실린더의 종축에 대하여 10° 내지 60° 의 각도 β , 바람직하게는 15° 내지 45° 의 각도 β , 특히 바람직하게는 25° 내지 35° 의 각도로 경사져 있다.
- [0087] 경사를 이루어 배열된 채널에서는, $Re < 2300$ 에 따라 층상 흐름 상태의 유지를 가능하게 하는 유속이 만연함으로써, 중력의 장에 대한 퇴적된 세포의 효율 감소성 재현탁을 방지하는 것이 바람직하다.
- [0088] 레이놀즈 지수 Re 는 하기 수학적 식 6에 따라서, 횡단면에 걸쳐 평균한 유속 w , 유동하는 매체의 운동학적 점도 ν 및 한 채널의 내경 d 로부터 계산될 수 있다:
- [0089] [수학적 식 6]
- [0090] $Re = (w \cdot d / \nu)$
- [0091] 이 경우에, 채널 중심에서보다 채널 내벽에서 보다 낮은 유속이 만연하다. 세포는 채널내에서 침강하고 흐름 방향에 맞서 하부 채널 단부까지 채널의 하측면상에서 활주한다. 용기내에서는 순환 흐름이 만연하여 세포를 하부 채널 단부에서 견인하여 용기내에 세포를 분포시키는 것이 바람직하다. 상기 순환 흐름은 채널의 직립 중공 실린더의 내외 표면 주위에서 루프 흐름으로 진행되는 것이 바람직하다. 그러므로, 본 발명에 의한 방법은 흐름이 연속적으로 통과하는 용기에서 순환 흐름과 결합되는 것이 바람직하다. 세포가 없는 세포 배양 용액은 채널에 의해서 상기 채널 상부에 배열된 환형 공간내로 이송되고, 최종적으로는 용기 밖으로 이송된다.
- [0092] 본 발명에 의한 방법은 생물반응장치의 내부에서 수행될 수 있다. 이 경우에, 세포는 생물반응장치의 내부에 보호유지된다. 생물반응장치 및 분리기 영역에서, 균일한 온도가 발생함으로써, 분리기에서 대류 흐름이 배제된다. 그러나, 이러한 조건하에서 세포는 다른 한편으로 그들의 신진 대사 및 산소 호흡을 계속할 수 있다. 장치의 외부 공간을 산소가 농후한 기체로 소제함으로써, 산소 소모에 대응할 수 있으며, 그로 인한 생물학적 결과를 약화시킬 수 있다. 이 경우에, 산소는 산소 투과성 채널 벽을 통해서, 적어도 하부 채널 횡단면에서, 즉, 세포 농도가 높은 영역에서, 비교적 혼합이 잘되는 것으로 생각될 수 있는 유동 채널내로, 당해 영역에서 집중적으로 진행되는 공급 및 침강 과정에 의해 확산된다. 미끄러져 내려가서 상기 영역에 위치하는 세포들은 시스템내에서 짧은 체류 시간만을 가짐으로써, 일반적으로 세포의 최적 공급 농도의 단기간의 부족 현상을 손상 없이 견뎌낼 수 있다. 상부 채널 횡단면에서 세포의 공급은 경우에 따라 10-45분의 매우 긴 체류 시간에 기인하여 상당히 더 중요하므로, 당해 영역에서 산소를 공급하는 것이 특히 유리하다는 것을 입증할 수 있다.
- [0093] 또한, 본 발명에 의한 방법을 생물반응장치 외부에서 수행할 수도 있다. 이를 위해서, 세포 배양 용액을 생물반응장치로부터 용기내로 세포와 함께 이송하며, 이 때 상기 용기에는 다수의 채널들이 직립형 중공 실린더의 형태로 경사를 이루어 배열된다. 상기 용기에서, 세포와 세포 배양 용액의 혼합물이 채널을 통해 이송되어 분리되며, 상기 채널에서 세포가 침강하고 흐름 방향에 맞서 채널의 단부까지 활주하고, 그리고 최종적으로 침강 영역내로 공급되며, 상기 침강 영역으로부터 세포는 다시 생물반응장치내로 이송될 수 있다. 세포를 외부 용기에서 냉각시켜서 신진대사를 지연시킴으로써 생산성을 감소시키는 세포의 공급 부족에 대응하는 것이 바람직하다. 냉각된 현탁액에서, 외부로부터 채널을 소제함으로써 침강하는 세포에 산소를 공급하는 것이 절대적으로 필요한 것은 아니다. 일반적으로, 세포 배양 용액을 분리기의 주위 온도로 냉각시키는 것이면 완벽하게 충분하므로, 소정의 대사 효과 이외에도, 대류 흐름이 안전하게 방지된다.
- [0094] 본 발명에 의한 방법에 따르면, 흐름이 연속적으로 통과하는 용기에서 세포를 효과적으로 보호유지하고 재순환시킬 수 있다. 보호유지 및 재순환하는 동안에, 온화한 전단력만이 세포에 작용하며, 이러한 전단력은 일반적으로 세포가 잘 견디는 정도이다. 채널내의 세포는 발효 온도 또는 저하된 온도로 유지되며, 세포에는 영양소가 공급된다. 필요에 따라서, 채널의 중간 공간 또는 채널의 외부로 추가로 기체 처리함으로써 질량 이동을 최적화시킬 수 있다.
- [0095] 또한, 본 발명에 의한 방법에 따르면, 용기에서 세포를 보호유지하고 재순환시킬 수 있으며, 상기 용기에서는 연속적 또는 불연속적인 배지 교환에 의해 배지 교환이 없는 회분식 배양 방법의 경우에 비해서 더 높은 세포 밀도를 달성할 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명의 방법은 예비배양 반응기의 생산성을 증가시키는데 유리하게 사용될 수 있으며, 예비배양 반응기의 바이오매스를 사용해서 매우 큰 회분식 작동 생물반응장치를 접종할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 유가(fed-batch) 발효기의 사용 가능성까지 그 범위가 확장될 수 있으며, 상기 유가 발효기에서 바이오매스를 생성물 수확기 동안에 수집하여 소위 반복된 유가 방식으로 새로운 발효기에

접촉한다.

- [0096] 이하에서는 첨부 도면을 참조하여 본 발명의 실시양태들을 더욱 상세히 설명하고자 하나, 이것이 본 발명의 보호 범위를 제한하는 것은 결코 아니다.
- [0097] 도 1은 본 발명에 의한 장치의 한 실시양태를 도시한 개요도이다. 원형 횡단면을 갖는 채널(10)들이 중공 원형 실린더(20)를 형성한다. 상기 원형 실린더의 쉘은 경사를 이루어 배열된 하나의 채널 층을 포함한다. 채널들은 원형 실린더의 종축에 대하여 각도 β 로 경사져 있다. 작동시에, 상기 종축은 중력의 방향과 동일한 것이 바람직하다. 도 1(a)는 측면도이고, 도 1(b)는 도 1(a)에서 실린더(20)를 위 또는 아래에서 관통하는 점선을 따라 취한 횡단면도이다.
- [0098] 도 2는 원형 횡단면을 갖는 채널(10)에서 세포 분리 상태를 도시한 개요도이다. 채널(10)에는 아래부터 세포 현탁액이 채워진다(1). 수확물 스트림(2)은 채널의 상단에서 분리된다. 세포 잔류물(3)은 채널의 하측면상에 침강하고 흐름 방향에 맞서 하부 채널 단부까지 활주한다.
- [0099] 도 3은 경사지게 배열된 채널들로부터 매트(200)를 제조하는 방법을 도시한 개요도이다. 튜브 또는 가요성 튜브(200)를 실린더(300)상에 권취한다. 이 경우에, 작은 공간상에서 가능한 가장 큰 분리기 표면적을 수용하기 위해 코일들이 서로 가까이 위치한다. 코일들을 서로 기계적으로 결합시켜서 차후에 채널 절단시에 채널의 방향이 유지되도록 확보하는 것이 바람직하다. 이를 위해서, 채널들을 서로 점 또는 표면에서 직접 또는 캐리어 층(예: 직물 또는 부직물)에 의해 실린더 외부 표면을 경유해서 결합시킬 수 있다. 바람직한 결합은 접착을 통해서 이루어진다. 적당한 접착제는 재료 및 채널의 표면 특성과 조화되며 당업자에게 잘 알려진 접착제 성분들이다. 실리콘 튜브의 경우에, 필수 FDA 품질 등급으로 시판되는 실리콘 접착제를 사용하는 것이 바람직하다. 접착하는 동안에, 기체 투과성 채널 주위에서 기체 흐름이 가능하도록 밀봉하기 위해 가요성 튜브들이 서로 결합되지 않도록 주의는 기울여야 한다. 접착한 후에, 가요성 튜브 매트를 실린더 주위에 나선상으로 뻗어있는 점선으로 표시한 절단선(210)을 따라서 절단하고 실린더로부터 분리시킨다. 그 결과, 도 4에 도시한 바와 같은 경사지게 배열된 채널들의 매트(200)가 형성된다.
- [0100] 도 4는 채널 하측면을 따라 취한 이론적인 선에 대하여 각도 β 로 배열된 원형 횡단면을 갖는 채널(10)들의 매트(220)를 도시한 개요도이다. 이와 같은 매트(220)는 도 3에 도시하고 도 3의 설명 부분에서 설명한 방법에 의해 얻을 수 있다. 경사진 종방향 측면(230, 231)을 서로 결합하여 세포를 보호유지 및 재순환시키기 위한 본 발명에 의한 장치의 분리기 채널의 한 층을 얻을 수 있다. 표면적을 확대하기 위해서, 여러 층들을 서로 그 종방향 측면(230, 231)을 따라 쉘 형태로 접착시킬 수 있다. 또한, 매트를 권취하여 나선형으로 층층이 적층된 여러 개의 층들을 얻을 수 있다. 여기서, 두 경우에 모두, 원통체(중공 실린더(20))가 형성되며, 상기 실린더는 경사를 이루어 배열된 채널(10)들의 하나 이상의 층을 갖는다(참조예: 도 1, 도 5). 이러한 실린더를 기계적인 지지체(고정자)상에 고정시킬 수도 있다.
- [0101] 도 5는 본 발명에 의한 장치의 하측면을 개략적으로 도시한 투시도이다. 원형 횡단면을 갖는 채널(10)의 한 층은 튜브형 고정자(5)상에 배치된다. 상기 채널은 중공 실린더(20)의 종축에 대하여 각도 β 로 경사져 있다.
- [0102] 도 6(a)는 프로파일링된 필름(250)의 실시예를 도시한 것이다. 상기 필름은 일정한 간격으로 배열된 일련의 골(251)과 마루(252)를 포함한다.
- [0103] 도 6(b)는 도 6(a)의 필름을 선 B-B를 따라 취한 횡단면도이다. 필름을 절단하여 매트를 형성한다. 이와 같은 매트는 예컨대 그 횡단면에서 볼 때 마치 도 6(b)에서의 필름 횡단면처럼 보인다. 상기 매트는 서로 평평하게 층층이 배치되어 서로 결합될 수 있으며, 이 때 매트의 마루(252)들이 그 위에 놓인 매트의 평활한 하측면에 결합하여 골 부분들이 마루를 따라 폐쇄된 채널을 형성할 수 있다. 이어서, 결합된 매트를 성형하여 직립 중공 실린더를 제조하고 측면에서 도 4의 실시예와 유사한 방식으로 결합시킬 수 있다. 또한, 프로파일링된 필름을 하나이상의 층으로 고정자 주위에 권취할 수 있다. 이 경우에, 개방된 측면을 향한 골(251) 부분들은 각각 인접한 층으로, 또는 고정자의 벽으로 밀봉되어 채널을 형성한다.
- [0104] 도 6(a) 및 도 6(b)에 도시한 유형의 필름의 경우에, 직사각형 횡단면 윤곽을 갖는 채널이 형성된다. 다른 윤곽을 갖는 필름을 사용하는 것도 생각할 수 있다. 도 6(c)에, 예를 들면 반원형 골 윤곽을 갖는 필름이 도시되어 있다. 따라서, 다른 채널 기하학적 형태도 제조된다.
- [0105] 도 7(a)는 접착제(270)에 의해서 결합된 엠보싱 필름(260)과 평활한 밀봉 필름(265)의 복합체로서 프로파일링된 필름의 실시예를 도시한 것이다.

- [0106] 도 7(b)는 세 개의 프로파일링 필름(250)의 결합을 도시한 것이며, 여기서 각 경우에 필름의 평활한 하측면은 아래 쪽의 필름의 마루에 결합되어, 여러 개의 인접하게 배열된 채널(10)들을 제공한다.
- [0107] 도 8은 본 발명에 의한 장치의 구성의 일례를 채널(10-1, 10-2)들에 의해 형성된 중공 실린더의 종축에 수직인 횡단면으로 도시한 도면이다. 원형 밀면을 갖는 중공 실린더는 2개의 층들을 포함하며, 이 층들은 원형 횡단면을 갖는 채널상에 고리 형태로 배열된다((10-1)= 제 1 층내의 채널, (10-2)= 제 2 층내의 채널). 중공 실린더는, 채널(10-1, 10-2)들 사이의 중간 공간(15)내로 세포가 통과하여 오염을 유발하는 것을 방지하기 위해, 셸(외부(13), 내부(14))에 의해서 외부 및 내부상에서 밀봉되는 것이 바람직하다.
- [0108] 도 9에는, 세포 보호유지 시스템(400)을 기포 통기 생물반응장치(100)에 장착한 실시예를 횡단면도로 도시하였다. 상기 세포 보호유지 시스템은 가요성 튜브 고정자(5) 주위에 다수의 층으로 배열된 경사지게 배열된 채널(10)들을 포함한다. 도면에서, 채널(10)은 그래픽상의 이유로 수직 형태로 도시되어 있다. 그러나, 본 발명에 의하면, 상기 채널은 가요성 튜브 고정자(5)의 종축에 대하여 경사져 있다. 바람직하게는 기체 분배기(40)을 통해서 발생된 초미세 기포들이 도시된 실시예에서 중앙 반응기 영역(51)(기체 처리되며, 당해 영역을 통해 흐름이 위를 향해 통과함)과 벽에 근접한 기체 비처리 반응기 영역(52)(흐름이 아래를 향해 통과함) 사이에서 자연적인 순환을 확보한다. 이러한 방식으로, 산소 운반 이외에도, 기체-액체 수단에 의해 반응기의 우수한 혼합이 확보된다. 수확물 스트림(2)은 세포 보호유지 시스템(400)에서 세포가 분리된 후에 생물반응장치(100)의 상단 입구에서 분리된다. 세포 보호유지 시스템(400)에서 분리 제거된 입자들은 다시 순환 흐름에 의해 기체 처리된 반응기의 중앙부로 이송된다. 이와 동시에 순환 흐름에 의해서 반응기내의 침강이 효과적으로 방지된다. 배기 가스는 배출구(42)를 통해서 반응기의 상단에서 제거된다. 분리기 가요성 튜브 주위의 외부 공간의 기체 처리는 기체 공급 라인 및 배출 라인(21, 22)에 의해서 이루어지며, 상기 공급 라인과 배출 라인은 세포 보호유지 시스템(400)에 연결된다. 루프 반응기(100)으로부터/을 향한 또 다른 공급 라인과 배출 라인은 배지 공급 라인(30) 및 온도 조절 매체 공급 라인(61), 그리고 생물반응장치(100)의 온도 조절을 위한 자켓(60)내로의 배출 라인(62)이다.
- [0109] 도 10은 다수의 층들(가요성 튜브 매트)를 형성하도록 권취되고 하부 결합 부위(11) 및 상부 결합 부위(12)에 유지되는 가요성 튜브 형태의 채널(10)들의 배열의 실시예를 도시한 도면이다. 도면에서, 채널(10)은 그래픽상의 이유에서 수직 형태로 도시하였다. 그러나, 본 발명에 의하면, 채널은 가요성 튜브 고정자(5)의 종축에 대하여 경사져 있다. 상기 결합 부위(11, 12)를 형성하는 재료는 예컨대 당분야에 공지된 가요성 접착제 재료, 예를 들면 바람직하게 실리콘을 주성분으로 하는 재료이며, 이러한 접착제 재료가 가요성 튜브(실리콘으로 제조되는 것이 바람직하고 채널(10)을 형성함)를 단단히 포위하고, 상기 접착제 재료는 양 반경 방향에서 내측과 외측으로 평활한 밀봉 표면을 제공한다. 이와 같은 밀봉 표면에 의해서, 가요성 튜브 고정자(5)에 대하여, 그리고 셸(13)에 대하여 밀봉 작용이 이루어질 수 있다. 상기 셸(13)은 상기 가요성 튜브 고정자(5)에 결합된 상부 요소(27)에 대하여 가요성 튜브 매트상으로 돌출한 칼라(collar)를 통해서 밀봉된다. 도 8에 도시된 밀봉된 구성은, 가요성 튜브 주위의 공간이 액체로 채워지지 않도록 확보한다. 바람직한 실시양태에서, 이와 같은 가요성 튜브들 사이의 중간 공간을 산소가 농후한 기체로 소제하여, 침강 과정동안에 침강된 세포의 산소 공급을 개선한다. 상부(27)는 경사부(28)을 통해 가요성 고정자(5)에 결합되며, 상기 경사부는 세포의 퇴적을 방지하기 위한 것이다. 상기 경사부(28)에 용접된 수확물 배출구(22)는 상기 채널(10) 바로 위의 환형 공간(24)로 개방되어 있다. 수확물 배출구의 수가 제한된 경우에 바람직한 액체 분포, 예를 들면 접선 방향 흐름 유도 또는 차원 분열도형(fractal) 흐름 분포를 확보하기 위해서, 격자판(baffle plate)(25)을 장착하는 것이 유리하다.
- [0110] 도 11에는, 분리기 설비(110)내로 일체화된 세포 보호유지 시스템(400)의 외부 배치를 갖는 종래의 방법의 개요도를 도시한 것이다. 생물반응장치 순서에서 세포의 호흡 활동을 감소시키기 위해, 냉각 장치(90)에서 분리된 후에 가능한 한 직접적으로 생물반응장치의 온도를 보다 낮은 수준으로 저하시킨다. 이러한 방식으로, 세포가 세포 보호유지 시스템(400)내에서 산소 제한된 상태로 너무 오랜 시간 동안 체류하는 것이 방지되며, 이러한 장시간의 체류는 세포를 생리학적으로 손상시킬 수 있는 것이다. 도시된 실시예에서, 분리기(110)는 세포 보호유지 시스템(400) 및 일체화된 냉각 장치(90)로 이루어진다. 생물반응장치(100)와 분리기(110) 사이의 액체 스트림은 저전단 펌프(91, 92)에 의해서 조정된다. 다른 회로 배치, 예를 들면 두 펌프(91, 92)중 하나를 생물반응장치 배출구에 배치하는 것도 생각할 수 있다.
- [0111] 도 12에는 하우징(80)내로 일체화되고 세포 보호유지 시스템(400)과 냉각 장치(90)를 포함하는 분리기(110)이 도시되어 있다. 세포 배양 용액(1)을 하강 파이프(72)를 통해서 분리기내로 도입하고 세포 보호유지 시스템(400) 아래에서 냉각시키며, 상기 파이프는 필요에 따라 탈기시킬 수 있다. 냉각 과정은 상승 파이프(77)을 따라 진행하며, 상기 파이프에서는 냉각액이 역류식으로 하향 유동하는 세포 배양 용액까지 상승한다. 상승기 파

이프(77)의 작은 벽 두께, 상승기 파이프와 침지 파이프(76,77) 사이의 간격에서의 냉각 매체의 높은 속도, 그리고 하강 파이프(72)와 상승 파이프(76) 사이에서의 세포 배양 용액에 대한 나선 형상의 내부 흐름에 의해서, 특히 우수한 열의 이동, 따라서 냉각기의 압축 구성이 확보된다. 원추체내로 유입되기 전에, 세포 배양 용액의 속도를 감소시켜서 이미 퇴적된 농축된 세포 물질이 재차 소용돌이치는 것을 방지하는 것이 유리하다. 큰 유입 횡단면을 확보하기 위해서, 냉각 장치는 흡수 영역까지 바로 아래로 움직이지 않아야 한다. 속도에 따라서, 추가로 격자판(74)을 장착하는 것이 유리하다. 세포 침강물이 세포 보호유지 시스템(400)으로부터 다시 원추체(70)내로 미끄러진 후에, 세포 잔류물(3)을 원추 선단에서 제거할 수 있다. 20° 내지 70° 의 원추 각도를 사용할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 구조물의 높이가 너무 커지는 것을 피하기 위해서, 가능한 한 작은 원추 각도가 바람직하지만, 폐색된 상태를 확실하게 방지할 수 있어야 한다. 그러므로, 특히 바람직한 실시양태에서, 원추 각도는 40° 내지 60° 이다. 적절한 진동이 있을 경우에, 45° 의 원추 각도가 특히 바람직하다. 침강된 세포 물질의 산소 공급을 위해서, 기체 공급 라인(21) 및 기체 배출 라인(22)을 외부로부터 하우징(80)내로 용접된 연결구를 통해 구비할 수 있다. 기체 처리를 위해서, 가요성 튜브로 제조된 채널(10)을 사용할 필요가 있다.

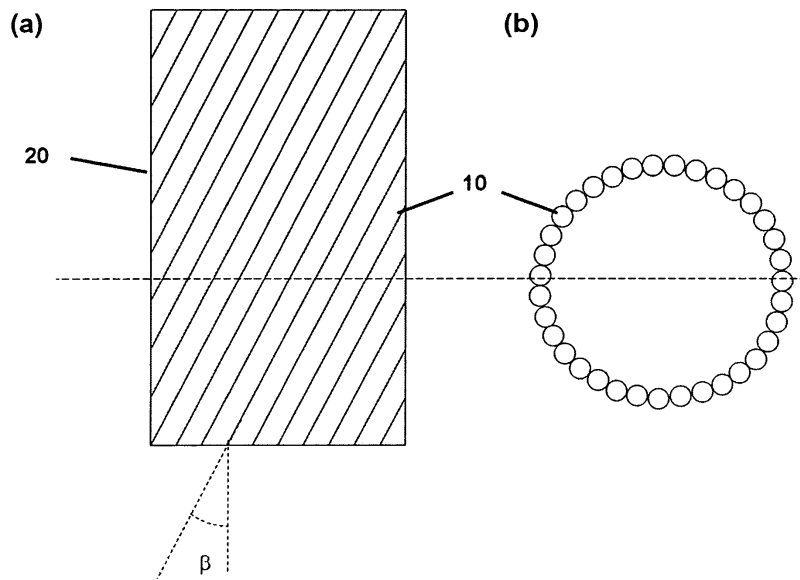
부호의 설명

[0112]

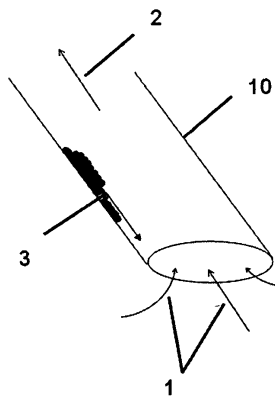
1: 세포 배양 용액 2: 수확물 3: 세포 잔류물 5: 가요성 튜브 고정자
10: 경사진 채널 11: 하부 결합 부위 12: 상부 결합 부위 13: 외부 셸
14: 내부 셸 15: 중간 공간 20: 실린더 21: 기체 공급 22: 기체 배출
24: 환형 채널 25: 격자판 27: 상부 28: 활주 표면 30: 배지 공급
40: 기체 분배기 41: 기체 공급 42: 기체 제거 50: 루프 흐름
51: 상향 흐름 52: 하향 흐름 60: 잭 61: 온도 조절 매체의 공급
62: 온도 조절 매체의 배출구 70: 원추체 71: 원추 각도 72: 하강 파이프
73: 나선 74: 격자판 76: 침지 파이프 77: 상승 파이프 80: 하우징
81: 프레임 82: 진동체 90: 냉각기 91: 복귀 펌프 92: 수확 펌프
100: 생물반응장치 110: 일체화된 분리기 200: 튜브/가요성 튜브
210: 교차선 220: 튜브/가요성 튜브의 매트 230: 매트와 종방향 측면
231: 매트와 종방향 측면 250: 프로파일링된 필름 251: 골 252: 마루
260: 엠보싱 필름 265: 밀봉 필름 270: 접촉제 300: 실린더
400: 세포 보호유지 시스템

도면

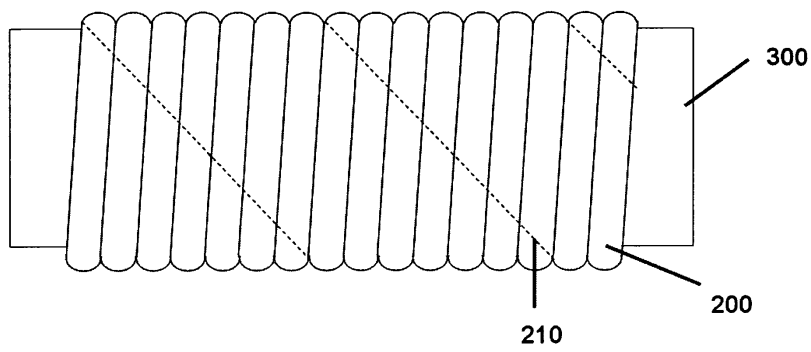
도면1



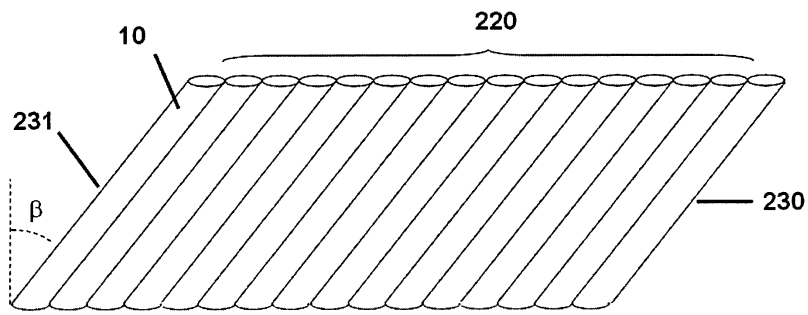
도면2



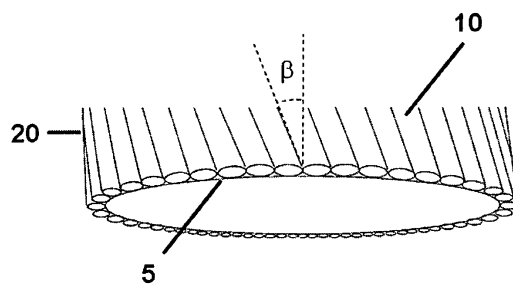
도면3



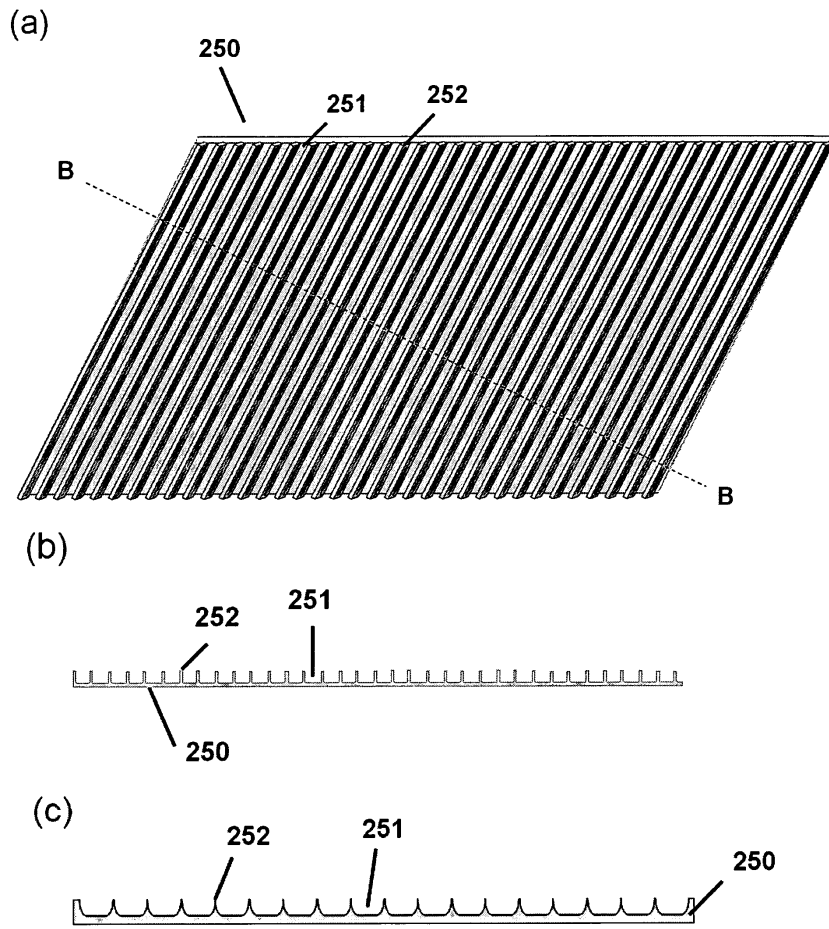
도면4



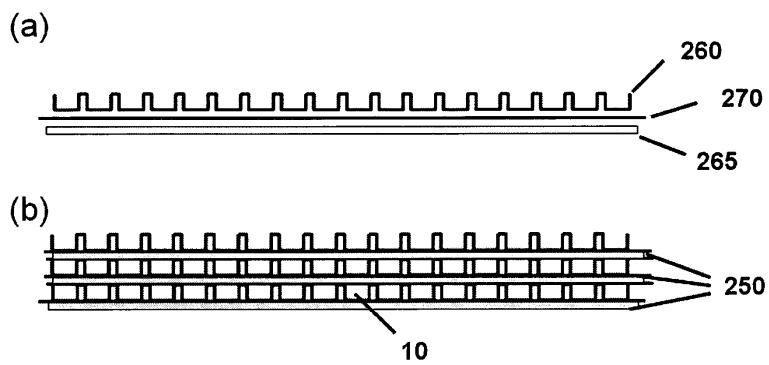
도면5



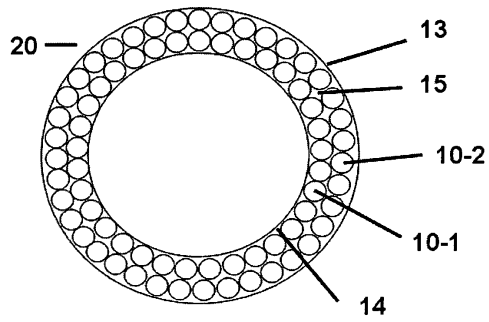
도면6



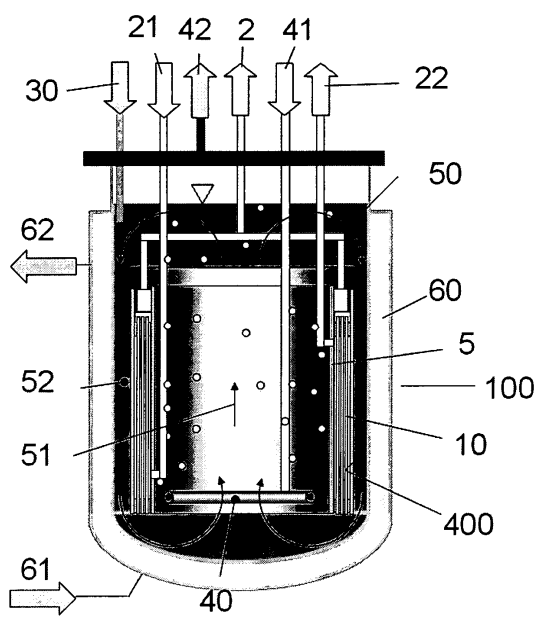
도면7



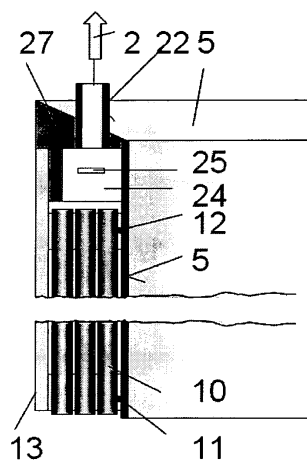
도면8



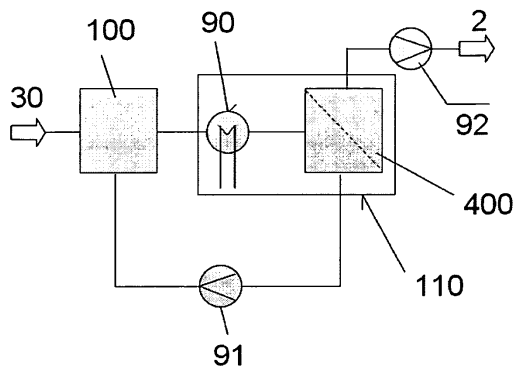
도면9



도면10



도면11



도면12

