

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 3월 24일 (24.03.2022)



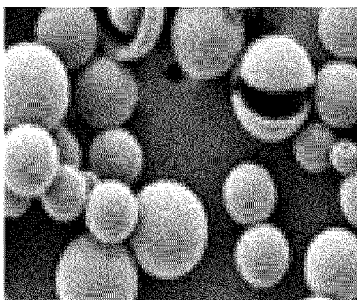
(10) 국제공개번호

WO 2022/059980 A1

- (51) 국제특허분류: *C12M 1/12* (2006.01) *C08F 2/20* (2006.01) *C08F 12/08* (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01) 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).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/011985
- (22) 국제출원일: 2021년 9월 6일 (06.09.2021) 공개:
- (25) 출원언어: 한국어 — 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0118533 2020년 9월 15일 (15.09.2020) KR
10-2021-0117811 2021년 9월 3일 (03.09.2021) KR
- (71) 출원인: 주식회사 엘지화학 (LG CHEM, LTD.) [KR/KR]; 07336 서울시 영등포구 여의대로 128, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김예지 (KIM, Yeji); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 김민채 (KIM, Minchae); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 김지선 (KIM, Jee Seon); 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,

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

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



(57) Abstract: The present invention relates to a microcarrier for cell culture, a method for producing same, and a cell culture composition using same, the microcarrier comprising polystyrene-based particles including at least one of a hydrocarbon oil of at least 12 carbon atoms, or pores derived therefrom.

(57) 요약서: 본 발명은 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일, 또는 이로부터 유도된 공극 중 적어도 하나 이상을 포함한 폴리스티렌계 입자를 포함하는 세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용한 세포 배양 조성물에 관한 것이다.

WO 2022/059980 A1

명세서

발명의 명칭: 세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용한 세포 배양 조성물

기술분야

- [1] 관련 출원(들)과의 상호 인용
- [2] 본 출원은 2020년 9월 15일자 한국 특허 출원 제10-2020-0118533호 및 2021년 9월 3일자 한국 특허 출원 제10-2021-0117811호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국 특허 출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [3] 본 발명은 세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용한 세포 배양 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [4] 바이오 의약품 및 재생 의료 분야가 확장됨에 따라, 세포, 조직, 미생물 등을 효율적으로 생산할 수 있는 세포 대량 배양 기술에 대한 요구가 증대하고 있다.
- [5] 부착성을 갖는 세포는 3D 바이오리액터(bioreactor) 내에서 마이크로 캐리어를 이용하여 배양된다. 바이오리액터 내에 세포, 배양액 및 마이크로 캐리어를 넣고, 배양액을 교반하여 세포 및 마이크로 캐리어를 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.
- [6] 현재 상업적으로 이용되는 마이크로 캐리어는 밀도가 약 1.1 내지 1.3 g/cm³이며, 세포의 밀도는 약 1.2 g/cm³ 정도이다. 이 경우, 바이오리액터 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, 세포의 손실이 발생할 수 있는 문제가 있다.
- [7] 이러한 문제를 해결하기 위해, 밀도가 1.0 g/cm³ 보다 낮거나, 1.3 g/cm³ 보다 높은 재료의 특성을 이용하여 마이크로 캐리어를 제조하였으나, 이 경우 구현할 수 있는 밀도의 범위가 제한적이고, 손상 및 파괴 없이 완전한 구형을 갖는 마이크로 캐리어의 수율이 충분히 확보되기 어려운 단점이 있다.
- [8] 따라서, 손상 및 파괴 없이 완전한 구형을 갖는 마이크로 캐리어의 수율이 충분히 확보되면서도, 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포의 분리 회수 시 보다 손쉽게 분리할 수 있는 새로운 마이크로 캐리어의 개발이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 손상 및 파괴 없이 완전한 구형을 갖는 마이크로 캐리어의 수율이 충분히 확보되면서도, 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포의 분리 회수 시 보다 손쉽게 분리할 수 있는 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제공하기 위한 관한 것이다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어를 이용한 세포 배양 조성물에 관한 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 명세서에서는, 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일, 또는 이로부터 유도된 공극 중 적어도 하나 이상을 포함한 폴리스티렌계 입자를 포함하는 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제공한다.
- [13] 본 명세서에서는 또한, 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일 존재하에, 스티렌 단량체가 함유된 단량체 조성물의 현탁 중합 반응을 진행하는 단계를 포함하는 세포 배양용 마이크로 캐리어 제조방법이 제공된다.
- [14] 본 명세서에서는 또한, 세포 및 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어를 포함하는 세포 배양 조성물이 제공된다.
- [15] 이하 발명의 구체적인 구현예에 따른 세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용한 세포 배양 조성물에 대하여 보다 상세하게 설명하기로 한다.
- [16]
- [17] 본 명세서에서 명시적인 언급이 없는 한, 전문용어는 단지 특정 실시예를 언급하기 위한 것이며, 본 발명을 한정하는 것을 의도하지 않는다.
- [18] 본 명세서에서 사용되는 단수 형태들은 문구들이 이와 명백히 반대의 의미를 나타내지 않는 한 복수 형태들도 포함한다.
- [19] 본 명세서에서 사용되는 '포함'의 의미는 특정 특성, 영역, 정수, 단계, 동작, 요소 및/또는 성분을 구체화하며, 다른 특정 특성, 영역, 정수, 단계, 동작, 요소, 성분 및/또는 균의 존재나 부가를 제외시키는 것은 아니다.
- [20] 그리고, 본 명세서에서 '제 1' 및 '제 2'와 같이 서수를 포함하는 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로 사용되며, 상기 서수에 의해 한정되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 권리 범위 내에서 제 1 구성요소는 제 2 구성요소로도 명명될 수 있고, 유사하게 제 2 구성요소는 제 1 구성요소로 명명될 수 있다.
- [21] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [22]
- [23] **1. 세포 배양용 마이크로 캐리어**
- [24] 발명의 일 구현예에 따르면, 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일, 또는 이로부터

유도된 공극 중 적어도 하나 이상을 포함한 폴리스티렌계 입자를 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어가 제공될 수 있다.

- [25] 본 발명자들은 상기 일 구현예의 세포 배양용 마이크로 캐리어의 경우, 폴리스티렌계 입자 내부에 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일, 또는 이로부터 유도된 공극 중 적어도 하나 이상이 포함되어, 세포 배양용 마이크로 캐리어의 밀도를 낮출 수 있을 뿐 아니라, 손상 및 파괴 없이 완전한 구형 입자 비율이 현저히 높아져 균질한 구형 형상의 마이크로 캐리어를 높은 수율로 확보할 수 있다는 점을 실험을 통해 확인하고 발명을 완성하였다.
- [26] 구체적으로, 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어는 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일, 또는 이로부터 유도된 공극 중 적어도 하나 이상을 포함한 폴리스티렌계 입자를 포함할 수 있다. 즉, 상기 폴리스티렌계 입자는 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일 1종, 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일로부터 유도된 공극 1종, 혹은 이들 2종의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [27] 상기 폴리스티렌계 입자가 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일로부터 유도된 공극 1종을 포함하거나, 혹은 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일 및 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일로부터 유도된 공극을 모두 포함하는 경우, 상기 폴리스티렌계 입자는 다공성 폴리스티렌계 입자에 해당할 수 있다.
- [28] 상기 폴리스티렌계 입자는 후술하는 다른 구현예의 제조방법과 같이 탄화수소 오일 존재 하에서 현탁중합에 의해 폴리스티렌 입자 합성을 진행하여 탄화수소 오일이 폴리스티렌 입자 내부에 갇힌 상태로 계속 잔류하거나, 고속의 현탁중합 교반조건에 의해 갇혀있던 탄화수소 오일 일부 혹은 전체가 빠져나와 폴리스티렌 입자 내부에 공극이 형성될 수 있다.
- [29] 상기 공극이란 폴리스티렌계 입자 내부의 빈 공간을 의미하며, 기공, 할로우(hollow), 구멍, 보이드(void) 등과 같은 의미로 사용될 수 있다.
- [30] 상기 공극은 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일로부터 유도된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 공극은 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일이 현탁 중합 도중 폴리스티렌과 상분리되면서 형성된 공간에 해당한다.
- [31] 따라서, 상기 폴리스티렌계 입자가 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일 1종만을 포함하는 것은 중합 과정에서 탄화수소 오일이 완전히 상분리되었으나 중합 및 세척 공정 중 입자 외부로 소실되지 않은 것을 의미하며, 상기 폴리스티렌계 입자가 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일로부터 유도된 공극 1종만을 포함하는 것은 중합 과정에서 탄화수소 오일이 완전히 상분리되어 중합 및 세척 공정 중 입자 외부로 소실된 상태를 의미한다. 또한, 상기 폴리스티렌계 입자가 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일 및 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일로부터 유도된 공극을 모두 포함하는 것은 탄화수소 오일이 중합 과정에서 일부 상분리되어 소실되고 일부는 잔류하는 상태를 의미한다.
- [32] 본 발명자들은 상기 공극이 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일로부터 유도된 것을 입증하기 위해, 상기 일 구현예에서 얻어진 세포 배양용 마이크로 캐리어에

대한 성분 분석시 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일이 검출됨을 확인하였다. 구체적으로, 상기 일 구현예에서 얻어진 세포 배양용 마이크로 캐리어를 동결 분쇄하고 클로로포름(Chloroform)에 녹여 미반응 잔류 화합물을 추출하고, GC/FID(가스 크로마토그래피 - 불꽃 이온화 검출기)를 통해 세부 성분을 정성, 정량분석하였고, 그 결과 오일 또는 이로부터 유래된 성분이 검출되었다. 이를 통해 상기 공극 내부에 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일 또는 이로부터 유래된 성분이 잔류하였음을 확인할 수 있었다.

- [33] 구체적으로, 상기 공극의 직경은 $0.1 \mu\text{m}$ 내지 $5 \mu\text{m}$ 일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 공극의 직경은 $0.1 \mu\text{m}$ 이상, 또는 $1 \mu\text{m}$ 이상일 수 있고, $5 \mu\text{m}$ 이하, 또는 $3 \mu\text{m}$ 이하일 수 있고, $0.1 \mu\text{m}$ 내지 $10 \mu\text{m}$, 또는 $0.1 \mu\text{m}$ 내지 $5 \mu\text{m}$, 또는 $1 \mu\text{m}$ 내지 $5 \mu\text{m}$, 또는 $1 \mu\text{m}$ 내지 $4 \mu\text{m}$ 일 수 있다.
- [34] 상술한 바와 같이, 상기 공극은 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일로부터 유도된 것임에 따라, 상기 공극의 직경은 $0.1 \mu\text{m}$ 내지 $5 \mu\text{m}$ 로 작은 크기의 공극을 구현할 수 있으며, 이에 따라 마이크로 캐리어의 밀도를 용이하게 조절할 수 있다.
- [35] 종래 폴리스티렌 입자의 밀도를 낮추기 위해 폴리스티렌 중합 과정 중 저비점의 발포제를 투입한 후 추가 발포 공정을 통해 발포 스티렌을 제조해 왔으나, 이와 같은 경우 수십 μm 크기의 큰 공극이 형성되어, 마이크로 캐리어의 밀도 조절이 어려운 한계가 있다.
- [36] 상기 탄화수소 오일의 탄소수는 12이상, 또는 12 이상 50 이하, 또는 12 이상 16 이하일 수 있다. 상기 탄화수소 오일의 탄소수가 12 미만으로 지나치게 감소하게 되면, 현탁 중합 중 탄화수소 오일과 폴리스티렌의 상분리 속도의 감소로 인해 입자 표면이 균일하지 않고 움푹 패인 형상의 입자가 다수 제조되는 한계가 있다.
- [37] 구체적으로, 상기 탄화수소 오일은 탄소수 12 이상 50 이하인 직쇄 또는 분지쇄의 포화탄화수소 화합물을 포함할 수 있다. 상기 탄소수 12 이상 50 이하인 직쇄 또는 분지쇄의 포화탄화수소 화합물은 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있으며, 상기 탄소수 12 이상 50 이하인 직쇄 또는 분지쇄의 포화탄화수소 화합물의 예로는 탄소수 12 이상 16 이하의 노말알케인, 탄소수 12 이상 16 이하의 이소알케인, 또는 이들의 혼합물을 들 수 있다.
- [38] 보다 구체적으로, 상기 탄화수소 오일로는 탄소수 12의 도데칸, 탄소수 16의 헥사데칸, 또는 Isopar M(탄소수 12 이상 14 이하의 이소알케인과 탄소수 13 이상 16 이하의 이소알케인의 혼합물)을 사용할 수 있다.
- [39] 상기 탄화수소 오일은 스티렌 모노머를 포함하는 분산상 조성물 전체 중량(100% 중량)을 기준으로 30 중량% 이하, 또는 10 중량% 이상 30 중량% 이하로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 탄화수소 오일의 함량 하한은 10 중량% 이상, 또는 11 중량% 이상, 또는 12 중량% 이상, 또는 13 중량% 이상, 또는 14 중량% 이상이고, 그 상한은 예를 들어, 30 중량% 이하, 또는 25 중량% 이하, 또는 20 중량% 이하일 수 있다. 상기 탄화수소 오일의 함량이 상기 함량 범위 미만으로

사용될 경우, 저밀도 특성의 캐리어 입자를 확보하기 어렵고, 상기 함량 범위를 지나치게 초과할 경우, 폴리스티렌계 입자의 형상이 구형을 갖기 어려워져 제조되는 입자의 균일성이 감소하게 된다.

- [40] 상기 탄화수소 오일의 밀도는 0.75 g/cm^3 이상 0.80 g/cm^3 이하, 또는 0.75 g/cm^3 이상 0.791 g/cm^3 이하일 수 있다. 상기 탄화수소 오일의 밀도가 상술한 범위로 매우 낮기 때문에, 이를 통해 폴리스티렌계 입자의 밀도를 현저히 낮출 수 있다.
- [41] 다만, 상기 탄화수소 오일의 밀도가 0.75 g/cm^3 미만으로 지나치게 감소하게 되면, 현탁 중합 중 탄화수소 오일과 폴리스티렌의 상분리 속도의 감소로 인해 입자 표면이 균일하지 않고 움푹 패인 형상의 입자가 다수 제조되는 한계가 있다.
- [42] 구체적으로, 상기 폴리스티렌계 입자의 겉보기 밀도가 0.95 g/cm^3 이상 1.00 g/cm^3 미만일 수 있다. 상술한 저밀도 범위를 가짐에 따라, 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포를 분리 회수 시 중력에 의한 침강 속도 차이를 통하여 세포와 마이크로 캐리어를 손쉽게 분리할 수 있다.
- [43] 상기 마이크로 캐리어의 밀도가 1 g/cm^3 를 초과하는 경우, 세포와 마이크로 캐리어의 밀도 차이가 적어 배양 후 세포 분리 회수 시 원심 분리가 어려울 수 있고, 0.95 g/cm^3 미만인 경우, 배양 초기에 마이크로 캐리어가 배양액 표면에서만 부유하여 세포를 부착하기 어려운 문제가 발생할 수 있다.
- [44] 상기 세포는 부착성 동물 세포로 그 예가 크게 한정되는 것은 아니나, 예를 들어 섬유아세포 (fibroblasts), 상피세포 (epithelial cell), 골아세포 (osteoblast), 연골세포 (chondrocyte), 간세포, 인간 유래 제대혈 세포, 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell), CHO (Chinese hamster ovary) 세포, 신장세포 (HEK293, BHK21, MDCK, vero cell 등), 또는 이들의 2종 이상 혼합물일 수 있다.
- [45] 상기 세포의 밀도는 1.02 g/cm^3 이상 1.1 g/cm^3 미만일 수 있다.
- [46] 또한, 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어와 상기 세포의 밀도 차이가 0.02 g/cm^3 이상 0.20 g/cm^3 이하일 수 있다. 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어와 상기 세포의 밀도 차이가 0.02 g/cm^3 이상 0.20 g/cm^3 이하를 만족함에 따라, 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포를 분리 회수 시 중력에 의한 침강 속도 차이를 통하여 세포와 마이크로 캐리어를 손쉽게 분리할 수 있다.
- [47] 상기 폴리스티렌계 입자는 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일, 또는 이로부터 유도된 공극 중 적어도 하나 이상이 내부에 분산된 폴리스티렌계 고분자를 포함할 수 있다.
- [48] 즉, 상기 폴리스티렌계 입자는 폴리스티렌계 고분자 매트릭스와, 상기 폴리스티렌계 고분자 매트릭스 내부에 분산된 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일, 또는 이로부터 유도된 공극 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [49] 상기 폴리스티렌계 고분자는, 스티렌 단량체 1 중량부; 및 에틸렌계 불포화 가교제 0.033 중량부 초과 3 중량부 미만, 또는 0.1 이상 1 이하, 또는 0.33 이상 1 이하;의 반응 결과물을 포함할 수 있다. 스티렌 단량체 1 중량부에 대하여,

에틸렌계 불포화 가교제 0.033 중량부 미만으로 지나치게 감소할 경우, 상기 폴리스티렌계 고분자의 가교 밀도가 감소함에 따라 입자의 형태가 구형을 안정적으로 유지하기 어렵고 폴리스티렌계 입자의 전체적인 밀도가 목표한 수준까지 낮아지기 어려운 한계가 있다.

- [50] 반면, 스티렌 단량체 1 중량부에 대하여, 에틸렌계 불포화 가교제 3 중량부 이상으로 지나치게 증가할 경우, 입자의 형태가 구형을 안정적으로 유지하기 어려운 한계가 있다.
- [51] 상기 에틸렌계 불포화 가교제의 예로는 디비닐벤젠을 들 수 있다.
- [52] 상기 폴리스티렌계 입자의 전체 표면적을 기준으로, 상기 폴리스티렌계 입자 표면에 존재하는 마이크로포어와 접촉하는 상기 폴리스티렌계 입자의 표면적의 비율이 0.01% 미만일 수 있다. 상기 폴리스티렌계 입자의 전체 표면적은 폴리스티렌계 입자의 최외각에서 공기중에 노출된 표면적의 합계를 의미하며, 상기 폴리스티렌계 입자 표면에 존재하는 마이크로포어와 접촉하는 상기 폴리스티렌계 입자의 표면적은 상기 폴리스티렌계 입자 표면에 존재하는 마이크로포어가 폴리스티렌계 입자의 최외각 표면과 접촉하는 표면적의 합계를 의미한다. 또한, 상기 마이크로포어란 최대 직경이 마이크로미터 사이즈인 공극으로서, 예를 들어 1 μm 이상 500 μm 이하의 최대 직경을 갖는 공극을 의미한다.
- [53] 보다 구체적으로, 상기 폴리스티렌계 입자의 전체 표면적을 기준으로, 상기 폴리스티렌계 입자 표면에 존재하는 마이크로포어와 접촉하는 상기 폴리스티렌계 입자의 표면적의 비율은 하기 수학식 3을 통해 구할 수 있다.
- [54] [수학식3]
- [55] 상기 폴리스티렌계 입자의 전체 표면적을 기준으로, 상기 폴리스티렌계 입자 표면에 존재하는 마이크로포어와 접촉하는 상기 폴리스티렌계 입자의 표면적의 비율(%) = [(상기 폴리스티렌계 입자 표면에 존재하는 마이크로포어와 접촉하는 상기 폴리스티렌계 입자의 표면적) / (상기 폴리스티렌계 입자의 전체 표면적)] x 100
- [56] 상기 폴리스티렌계 입자의 전체 표면적을 기준으로, 상기 폴리스티렌계 입자 표면에 존재하는 마이크로포어와 접촉하는 상기 폴리스티렌계 입자의 표면적의 비율이 0.01% 미만이라 함은, 상기 폴리스티렌계 입자의 표면에 존재하는 마이크로 크기 포어가 아예 없거나, 거의 없다고 볼 수 있을 정도로 극히 적다는 것을 의미한다. 즉, 상기 폴리스티렌계 입자 표면에 마이크로포어가 존재하지 않을 수 있다.
- [57] 종래 폴리스티렌 입자의 밀도를 낮추기 위해 발포제를 투입하여 발포 스티렌을 제조해 왔으나, 이 경우 폴리스티렌 입자의 직경범위와 밀도범위의 분포가 지나치게 넓어짐에 따라 세포 배양용 마이크로 캐리어로서 적용 가능한 범위로의 수율을 확보하는데 어려움이 있었다.
- [58] 반면, 상기 폴리스티렌계 입자는 상기 폴리스티렌계 입자의 전체 표면적을

기준으로, 상기 폴리스티렌계 입자 표면에 존재하는 마이크로포어와 접촉하는 상기 폴리스티렌계 입자의 표면적의 비율이 0.01% 미만이므로, 종래의 발포스티렌과 달리 발포제에 의한 발포공정이 전혀 진행되지 않아, 폴리스티렌 입자의 직경범위와 밀도범위의 분포를 보다 정밀하게 조절할 수 있는 장점이 있다.

- [59] 상기 폴리스티렌계 입자의 평균 직경이 50 μm 이상 400 μm 이하, 또는 60 μm 이상 390 μm 이하일 수 있다. 상기 폴리스티렌계 입자의 평균 직경이 상술한 범위를 만족하는 경우 세포 부착 및 배양 성능이 우수하다. 한편, 상기 폴리스티렌계 입자의 평균 직경이 50 μm 미만인 경우, 세포 배양이 가능한 표면적이 작아 배양 효율이 낮아지는 문제점이 발생할 우려가 있고, 400 μm 초과인 경우, 부착 세포간 상호 작용이 저하되고, 배양기 내 세포 밀도가 낮아져, 세포 배양 효율이 낮아지는 문제가 발생할 수 있다.
- [60] 상기 폴리스티렌계 입자의 직경은 상기 폴리스티렌계 입자의 무게 중심점을 지나는 직선이 폴리스티렌계 입자의 최외각 표면과 만나는 두 지점 간의 거리를 의미하며, 상기 폴리스티렌계 입자의 평균 직경은 광학현미경을 통해 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어에 포함되는 전체 폴리스티렌계 입자의 직경을 확인하여 구할 수 있다. 또한 상기 폴리스티렌계 입자의 평균 직경은 상기 폴리스티렌계 입자의 제조과정에서 얻어지는 전체 폴리스티렌계 입자의 직경이나 이들의 평균 직경을 통하여도 확인 가능하다.
- [61] 상기 폴리스티렌계 입자는 50 μm 이상 400 μm 이하, 또는 60 μm 이상 390 μm 이하의 평균 직경을 갖는 개별 입자의 군(group)일 수 있으며, 이러한 군(group)에 포함되는 개별 미립자는 평균적으로 50 μm 이상 400 μm 이하, 또는 60 μm 이상 390 μm 이하의 직경을 가질 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 군(group)에 포함되는 개별 미립자의 95%, 또는 99%가 50 μm 이상 400 μm 이하, 또는 60 μm 이상 390 μm 이하의 직경을 가질 수 있다.
- [62] 상기 폴리스티렌계 입자 표면에, 프라이머 고분자층, 세포부착 유도층, 또는 이들의 조합층이 더 포함될 수 있다. 즉, 상기 폴리스티렌계 입자 표면에, 프라이머 고분자층 1종, 세포부착 유도층 1종, 또는 프라이머 고분자층 1종과 세포부착 유도층 1종의 혼합층이 더 포함될 수 있다. 프라이머 고분자층 1종과 세포부착 유도층 1종의 혼합층에서 이들의 적층 순서는 특별히 한정되지 않으며 프라이머 고분자층상에 세포부착 유도층이 적층된 구조, 혹은 세포부착 유도층상에 프라이머 고분자층이 적층된 구조를 모두 적용가능하다.
- [63] 한편, 상기 프라이머 고분자층은 관능기가 없는 폴리스티렌계 입자 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.
- [64] 상기 프라이머 고분자층은 그 예가 크게 한정되는 것은 아니나, 수상 점착을 유도할 수 있는 카테콜 유도체로서 L-디하이드록시 페닐알라닌(L-DOPA),

- 도파민(dopamine), 폴리도파민, 노레피네프린(norepinephrine), 에피네프린(epinephrine), 에피갈로카테킨(epigallocatechin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [65] 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.
- [66] 상기 세포 부착 유도층을 형성하는 고분자는 그 예가 크게 한정되는 것은 아니나, 젤라틴, 콜라겐, 피브로넥틴(fibronectin) 키토산, 폴리도파민, 폴리 L-라이신, 비트로넥틴(vitronectin), RGD를 포함한 펩타이드, RGD를 포함한 아크릴계 고분자, 리그닌(lignin), 양이온성 덱스트란 및 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [67] 일례로, 상기 마이크로 캐리어는 폴리스티렌계 입자의 표면에 형성되는 프라이머 고분자층을 포함하여, 마이크로 캐리어의 표면을 친수성으로 개질하는 것을 통해 수분산 되고, 상기 프라이머 고분자층 표면에 세포 부착 유도층을 도입하여 배양액 내에서 마이크로 캐리어의 부유도가 조절될 수 있으며, 세포를 안정적으로 부착 배양하는 효과를 가질 수 있다.
- [68] 한편, 상기 폴리스티렌계 입자의 반경과 프라이머 고분자층의 두께의 비율은 1:0.00001 내지 1:0.01, 또는 1:0.0001 내지 1:0.001일 수 있다.
- [69] 폴리스티렌계 입자의 반경과 표면 코팅층의 두께의 비율이 1:0.00001 미만인 경우, 폴리스티렌계 입자 대비 프라이머 고분자층이 너무 얇아 마이크로 캐리어 표면이 친수성으로 개질하는 효과가 미미하며, 1:0.01를 초과하는 경우, 폴리스티렌계 입자 대비 프라이머 고분자층이 두꺼워져, 세포 배양 시 세포와 마이크로 캐리어의 부착도가 감소될 우려가 있다.
- [70] 한편, 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어는 하기 수학식1에 의한 손상 및 파괴없이 완전한 구형 입자 비율이 90% 초과 100% 이하, 또는 92% 이상 100% 이하, 또는 95% 이상 100% 이하, 또는 96% 이상 99% 이하일 수 있다.
- [71] [수학식1]
- [72] 손상 및 파괴 없이 완전한 구형 입자 비율(%) = (손상 및 파괴 없이 완전한 구형을 갖는 폴리스티렌계 입자의 개수 / 전체 폴리스티렌계 입자의 개수) x 100.
- [73] 상기 수학식1에 의한 손상 및 파괴 없이 완전한 구형 입자 비율은 상기 일 구형예의 세포 배양용 마이크로 캐리어에 대하여, 전체 입자 중 손상 및 파괴 없이 완전한 구형을 갖는 입자의 개수를 SEM을 통해 측정하고, 전체 입자 대비 손상 및 파괴 없이 완전한 구형입자의 개수의 퍼센트 비율을 계산하여 구할 수 있다.
- [74] 즉, 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어는 복수의 폴리스티렌계 입자를 함유할 수 있으며, 이러한 복수의 폴리스티렌계 입자들 중 손상 및 파괴 없이 완전한 구형인 형상을 갖는지 여부는 SEM을 통해 육안으로 판별할 수 있다.

- [75] 상기 수학식1에 의한 손상 및 파괴 없이 완전한 구형 입자 비율이 90% 이하로 감소하게 되면, 입자 표면이 균일하지 않고 움푹 패인 비정형 입자의 수가 증가하고 세포 배양액 내에 비정형 입자가 부유하여 배양 중인 세포에 물리적 충격을 가해 세포 배양이 불가능할 정도로 세포 배양 효율이 낮아지는 문제점이 발생할 우려가 있다.
- [76] 또한, 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어는 하기 수학식2에 의한 공극율이 0% 이상 8% 미만, 또는 1% 이상 8% 미만, 또는 2% 이상 8% 미만, 또는 3% 이상 8% 미만, 또는 3.9% 이상 7.5% 이하, 또는 6.5% 이상 7.5% 이하일 수 있다.
- [77] [수학식2]
- [78]
$$\text{공극율}(\%) = [1 - (\text{폴리스티렌계 입자의 겉보기 밀도} / \text{폴리스티렌계 입자의 진밀도})] \times 100.$$
- [79] 상기 겉보기 밀도는 입자와 입자간 공극이 포함된 실제 입자 부피를 이용하여 구한 밀도이고, 진밀도는 공극을 제외한 입자재료들만의 부피를 이용하여 구한 밀도이다.
- [80] 상기 수학식2에 의한 공극율에서, 폴리스티렌계 입자의 겉보기 밀도는 밀도가 0.95 g/cm³인 에탄올 수용액과, 밀도가 1 g/cm³인 물에 각각 첨가하여 입자가 부유 또는 침강하는지 확인하여 측정할 수 있으며, 진밀도는 He pycnometry를 이용하여 측정할 수 있다.
- [81] 상기 수학식2에 의한 공극율이 0%라는 것은, 중합 과정에서 탄화수소 오일이 상분리되지 않고 중합 중 소실되어 상기 폴리스티렌계 입자가 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일 1종을 포함하지 않는 상태를 의미한다. 그리고, 상기 수학식2에 의한 공극율이 0% 초과 8% 미만이라는 것은, 탄화수소 오일이 중합 과정에서 상분리된 후 중합 및 세척 과정에서 소실되거나 일부는 잔류하여, 상기 폴리스티렌계 입자가 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일 및 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일로부터 유도된 공극을 모두 포함하는 상태를 의미한다.
- [82] 상기 수학식2에 의한 공극율이 8% 이상 등으로 지나치게 증가하게 되면, 폴리스티렌계 입자의 밀도가 지나치게 감소하면서, 배양 초기에 마이크로 캐리어가 배양액 표면에서만 부유하여 세포를 부착하기 어려운 문제가 발생할 수 있다.
- [83]
- [84] **2. 세포 배양용 마이크로 캐리어 제조방법**
- [85] 발명의 다른 구현예에 따르면, 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일 존재하에, 스티렌 단량체가 함유된 단량체 조성물의 현탁 중합 반응을 진행하는 단계를 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어 제조방법이 제공될 수 있다.
- [86] 상기 탄화수소 오일, 스티렌 단량체에 대한 내용은 상기 일 구현예에서 상술한 내용을 모두 포함한다.
- [87] 상기 단량체 조성물은 스티렌 단량체 1 중량부 및 에틸렌계 불포화 가교제 0.033 중량부 초과 3 중량부 미만이 혼합된 것일 수 있다. 구체적으로, 스티렌

단량체 1 중량부에 대하여, 에틸렌계 불포화 가교제 0.033 중량부 미만으로 지나치게 감소할 경우, 상기 폴리스티렌계 고분자의 가교 밀도가 감소함에 따라 탄화수소 오일로 인해 생성된 공극이 안정적으로 제조되기 어려워 폴리스티렌계 입자의 밀도를 충분히 낮추기 어렵고, 입자의 형태가 손상 및 파괴없는 완전한 구형을 유지하기 어려운 한계가 있다.

[88] 반면, 스티렌 단량체 1 중량부에 대하여, 에틸렌계 불포화 가교제 3 중량부 이상으로 지나치게 증가할 경우, 상기 폴리스티렌계 고분자의 가교밀도가 증가하면서, 폴리스티렌계 입자의 전체적인 밀도가 목표한 수준까지 낮아지기 어려운 한계가 있다.

[89] 또한, 상기 단량체 조성물의 중량을 기준으로, 상기 탄화수소 오일의 함량이 10 중량% 이상 30 중량% 이하, 또는 14 중량% 이상 20 중량% 이하일 수 있다. 상기 탄화수소 오일의 함량이 지나치게 감소할 경우, 탄화수소 오일이 중합 중 상분리되는 양이 적어 폴리스티렌계 입자의 밀도가 충분히 낮아지기 어렵다. 또한, 상기 탄화수소 오일의 함량이 지나치게 증가할 경우, 폴리스티렌계 입자의 형상이 구형을 갖기 어려워져 제조되는 입자의 균일성이 감소하게 된다.

[90] 보다 구체적으로, 상기 단량체 조성물의 현탁 중합 반응은, 상기 단량체 조성물을 수계 분산액에 혼합하고 전단력을 가하여 상기 단량체 조성물을 수계 분산액에 액적 형태로 균질화하는 단계; 및 상기 균질화된 단량체 조성물을 300 rpm 이상 1000 rpm 이하의 교반속도로 현탁 중합하는 단계를 포함할 수 있다.

[91] 상기 균질화된 단량체 조성물을 300 rpm 이상 1000 rpm 이하, 또는 400 rpm 이상 800 rpm 이하의 교반속도로 현탁 중합하는 단계에서 폴리스티렌과 탄화수소 오일의 입자 구조 형성 중 폴리스티렌과 탄화수소 오일의 상분리에 의해 내부 공극을 형성하면서 세포 배양용 마이크로 캐리어의 밀도를 보다 낮출 수 있으면서도, 손상 및 파괴없이 완전한 구형 입자 비율이 높은 세포 배양용 마이크로 캐리어 제조가 가능하다.

[92] 상기 균질화된 단량체 조성물을 300 rpm 이상 1000 rpm 이하, 또는 400 rpm 이상 800 rpm 이하의 교반속도로 현탁 중합하는 단계에서 상기 현탁 중합 조건의 예가 크게 한정되는 것은 아니나, 예를 들어, 50 °C 이상 100 °C 온도에서 3 시간 이상 18 시간 이하로 진행할 수 있다.

[93] 한편, 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어 제조방법은 상기 현탁 중합 반응을 진행하는 단계 이후에, 현탁 중합 반응 결과물을 세척하는 단계 및 건조하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[94] 구체적으로 상기 현탁 중합 반응 결과물을 세척하는 단계는 현탁 중합 반응 결과물을 50 μm 이상 100 μm 이하의 sieve에 거른 뒤, 에탄올 100%에 5-7 회 상온 교반하는 단계를 포함할 수 있다.

[95] 상기 현탁 중합 반응 결과물을 건조하는 단계는 진공 오븐에 넣고 상온에서 진공 건조하는 단계를 포함한다. 다만, 이에 한정되는 것은 아니고, 통상적으로 사용되는 것으로 알려진 건조 방법을 별 다른 제한 없이 사용할 수 있다.

- [96] 한편, 상기 다른 구현예의 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조방법은, 상기 현탁 중합 반응을 진행하는 단계 이후에, 상기 현탁 중합 반응 결과물의 표면에 프라이머 고분자층, 세포부착 유도층, 또는 이들의 조합층을 도포하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [97] 상기 프라이머 고분자층, 세포부착 유도층에 대한 내용은 상기 일 구현예에서 상술한 내용을 모두 포함한다.
- [98]
- [99] **3. 세포 배양 조성물**
- [100] 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 세포 및 상기 일 구현예의 세포 배양용 마이크로 캐리어를 포함하는 세포 배양 조성물이 제공될 수 있다. 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어에 대한 내용은 상기 일 구현예에서 상술한 내용을 모두 포함한다.
- [101] 상기 세포는 부착성 동물 세포로 그 예가 크게 한정되는 것은 아니나, 예를 들어 섬유아세포 (fibroblasts), 상피세포 (epithelial cell), 골아세포 (osteoblast), 연골세포 (chondrocyte), 간세포, 인간 유래 제대혈 세포, 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell), CHO(Chinese hamster ovary) 세포, 신장세포 (HEK293, BHK21, MDCK, vero cell 등), 또는 이들의 2종 이상 혼합물일 수 있다.
- [102] 상기 세포의 밀도는 1.02 g/cm^3 이상 1.1 g/cm^3 미만일 수 있다.
- [103] 또한, 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어와 상기 세포의 밀도 차이가 0.02 g/cm^3 이상 0.20 g/cm^3 이하일 수 있다. 상기 세포 배양용 마이크로 캐리어와 상기 세포의 밀도 차이가 0.02 g/cm^3 이상 0.20 g/cm^3 이하를 만족함에 따라, 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포를 분리 회수 시 중력에 의한 침강 속도 차이를 통하여 세포와 마이크로 캐리어를 손쉽게 분리할 수 있다.
- [104] 상기 세포 배양 조성물은 배지 용액을 더 포함할 수 있다. 상기 배지 용액은 혈장이나 림프액과 같은 체액을 근거한 생체의 조건에 가까운 영양분과 pH, 온도, 삼투압 등의 환경 조건을 충분히 만족시켜 주기 위한 각종 첨가제들을 포함할 수 있고, 이는 세포 배양 관련 기술분야에서 널리 알려진 다양한 물질을 제한 없이 사용할 수 있다.
- [105] 일례로, 상기 일 구현예의 세포 배양용 마이크로 캐리어는 배지 용액보다 작은 밀도를 가져, 배지 용액 내에 주입되어 교반 조건 하에 배지 용액 내부에서 부유하게 된다. 이후, 저밀도의 마이크로 캐리어의 표면에 부착되는 세포의 수가 증가함에 따라, 세포가 부착된 마이크로 캐리어(이하, '마이크로 캐리어-세포 결합체'라고 함)의 밀도는 점차 증가하여 배지 용액내에서 점차 가라앉게 된다.
- [106] 이에, 세포가 부착된 마이크로 캐리어(마이크로 캐리어-세포 결합체)을 세포 탈착효소 첨가 처리 후 원심분리를 통해 분리하여, 마이크로 캐리어-세포 결합체로부터 세포를 분리시킴으로서 배양된 세포를 용이하게 확보할 수 있다.

발명의 효과

- [107] 본 발명에 따르면, 손상 및 파괴없이 완전한 구형을 갖는 마이크로 캐리어의 수율이 충분히 확보되면서도, 세포 배양 후 마이크로 캐리어와 세포의 분리 회수 시 보다 손쉽게 분리할 수 있는 세포 배양용 마이크로 캐리어, 이의 제조방법 및 이를 이용하는 세포 배양 방법이 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [108] 도 1은 실시예1에서 얻은 세포 배양용 마이크로 캐리어의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.
- [109] 도 2는 참고예1에서 얻은 세포 배양용 마이크로 캐리어의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.
- [110] 도 3은 참고예5에서 얻은 세포 배양용 마이크로 캐리어의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.
- [111] 도 4은 실시예2에서 얻은 세포 배양용 마이크로 캐리어의 입자 단면 형상 SEM 이미지를 나타낸 것이다.
- [112] 도 5는 비교예1에서 얻은 세포 배양용 마이크로 캐리어의 입자 단면 형상 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[114]

[115] <실시예: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조>

[116] 실시예1

[117] 물 250 g에 폴리바이닐 알코올 2.5g을 혼합하여 수계 분산액을 제조한 후, 상온에서 20 분간 교반하였다.

[118] 하기 표1에 기재된 함량비율로 단량체인 스티렌과 가교제인 디비닐벤젠과 하기 표 1에 기재된 오일(투입량: 총 합 기준 오일 첨가량)의 합계 25 g을 혼합하여 충분히 녹이고, 상기 혼합물에 benzoyl peroxide 개시제 (Sigma Aldrich) 2.06 중량%, tert-butyl peroxybenzoate 개시제 (Sigma Aldrich) 0.3125 중량 % (개시제 투입량: 단량체, 가교제, 오일 총 합 기준)을 첨가하여 5 분간 추가로 교반함으로써 단량체 조성물을 제조하였다.

[119] 그리고, 상기 수계 분산액에 상기 단량체 조성물을 첨가하고, 800 rpm 의 속도로 상기 수계 분산액 및 단량체 조성물에 전단력을 가하여 상기 단량체 조성물을 수계 분산액에 미세한 액적 형태로 분산시켜 균질화하였다.

[120] 상기 균질화된 혼합물을 하기 표1에 기재된 교반속도로 교반하면서 90 °C에서 6 시간 동안 질소 퍼징하에 반응시켜 폴리스티렌 입자를 제조하고, 에탄올에 세척된 입자를 상온 건조하여 회수하였다.

[121] 건조 후 회수된 입자를 dopamine hydrochloride가 1mg/mL로 용해된 tris buffer

(pH 8.0)에 침지하여 교반 하에 상온에서 2시간 코팅하였다. 과량의 코팅물질을 ethanol로 세척 후 70 μm sieve에 입자를 거른 뒤 상온 건조하였으며, 건조된 입자를 세포 배양용 마이크로 캐리어로 사용하였다.

[122]

[123] 실시예2 내지 실시예8

[124] 하기 표1에 기재된 바와 같이, 스티렌과 디비닐벤젠 중량비율, 오일, 또는 교반속도를 달리 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예1과 동일한 방법으로 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제조하였다.

[125]

[126] <비교예: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조>

[127] 비교예1 내지 비교예3

[128] 하기 표1에 기재된 바와 같이, 스티렌과 디비닐벤젠 중량비율, 오일, 교반속도를 달리 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예1과 동일한 방법으로 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제조하였다.

[129]

[130] <참고예: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 제조>

[131] 참고예1 내지 참고예8

[132] 하기 표1에 기재된 바와 같이, 스티렌과 디비닐벤젠 중량비율, 오일을 달리 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예1과 동일한 방법으로 세포 배양용 마이크로 캐리어를 제조하였다.

[133] [표1]
현탁중합 조건

구분	스티렌 : 디비닐벤젠 중량비율	오일 종류	오일 밀도 (g/cm ³)	오일 투입량 (wt%)	교반속도(r pm)
실시예1	1:0.33	Isopar M	0.791	14	800
실시예2	1:0.33	Isopar M	0.791	20	800
실시예3	1:0.33	Isopar M	0.791	20	400
실시예4	1:1	Isopar M	0.791	20	800
실시예5	1:0.33	Dodecane	0.750	14	800
실시예6	1:0.33	Dodecane	0.750	20	800
실시예7	1:0.33	Hexadecane	0.773	14	800
실시예8	1:0.33	Hexadecane	0.773	20	800
비교예1	1:0	-	-	0	800
비교예2	1:0.33	n-헵탄	0.684	14	800
비교예3	1:0.33	이소-옥탄	0.690	14	800
참고예1	1:0	Isopar M	0.791	20	800
참고예2	1:0	Isopar M	0.791	50	800
참고예3	1:0.0025	Isopar M	0.791	20	800
참고예4	1:0.033	Isopar M	0.791	20	800
참고예5	1:3	Isopar M	0.791	20	800
참고예6	1:0.33	Isopar M	0.791	7	800
참고예7	1:0.33	Dodecane	0.750	7	800
참고예8	1:0.33	Hexadecane	0.773	7	800

[134] <실험예: 세포 배양용 마이크로 캐리어의 물성 측정>상기 실시예 및 비교예에서 얻어진 세포 배양용 마이크로 캐리어에 대하여, 하기 방법으로 물성을 측정하였으며, 그 결과를 표2에 나타내었다.

[135]

[136] 1. 입자 크기

[137] 상기 실시예 및 비교예에서 얻어진 세포 배양용 마이크로 캐리어에 대하여, 광학현미경을 통해 100개의 입자 직경을 측정하고, 이들의 산술평균값을 구하였다.

[138]

[139] **2. 입자 겉보기 밀도**

[140] 상기 실시예 및 비교예에서 얻어진 세포 배양용 마이크로 캐리어에 대하여, 건조 과정이 완료된 조건의 시료를 준비하고, 상기 시료를 상온(25 °C) 및 상압(1 atm) 조건에서, 밀도가 0.95 g/cm³, 0.97 g/cm³, 0.98 g/cm³ 또는 0.995 g/cm³인 에탄올 수용액과, 밀도가 1 g/cm³인 증류수(DIW)에 각각 첨가하여 입자가 부유 또는 침강하는지 확인하여 다음 기준하에 겉보기 밀도를 평가하였다.

[141] 1) 밀도가 0.95 g/cm³인 에탄올 수용액에서 부유 : 0.95 g/cm³ 미만

[142] 2) 밀도가 1 g/cm³인 증류수(DIW)에서 침강 : 1 g/cm³ 초과

[143] 3) 밀도가 0.95 g/cm³인 에탄올 수용액에서 침강하고, 밀도가 1 g/cm³인 증류수(DIW)에서 부유 : 0.95 g/cm³ 이상 1 g/cm³ 미만

[144] 4) 밀도가 0.95 g/cm³인 에탄올 수용액에서 침강하고, 밀도가 0.97 g/cm³인 에탄올 수용액에서 부유 : 0.95 g/cm³ 이상 0.97 g/cm³ 미만

[145] 5) 밀도가 0.98 g/cm³인 에탄올 수용액에서 침강하고, 밀도가 0.995 g/cm³인 에탄올 수용액에서 부유 : 0.98 g/cm³ 이상 0.995 g/cm³ 미만

[146]

[147] **3. 손상 및 파괴 없는 완전한 구형 입자 비율**

[148] 상기 실시예 및 비교예에서 얻어진 세포 배양용 마이크로 캐리어를 이용하여, 건조 과정이 완료된 조건의 시료를 준비하고, 상기 시료에서 전체 입자 중 구형을 갖는 입자(부서지지 않은 완전한 구형 입자)의 개수를 SEM을 통해 측정하고, 다음 수학적식1에 의해 구형입자의 개수 퍼센트 비율을 측정하였다.

[149] [수학적식1]

[150] 손상 및 파괴없는 완전한 구형 입자 비율(%) = (손상 및 파괴없는 완전한 구형을 갖는 입자의 개수 / 전체 입자의 개수) x 100.

[151]

[152] **4. 입자 내부 공극율(Porosity)**

[153] 상기 실시예 및 비교예에서 얻어진 세포 배양용 마이크로 캐리어를 이용하여, 건조 과정이 완료된 조건의 시료를 준비하고, 상기 시료에서 He pycnometry로 진밀도를 측정하고, 다음 수학적식2에 의해 공극율을 측정하였다.

[154] [수학적식2]

[155] 공극율 (%) = [1 - (겉보기밀도 / 진밀도)] x 100

[156]

[157]

[158] **5. 입자 내부 구조 및 공극 직경**

[159] (1) 입자 내부 구조

[160] 상기 실시예 및 비교예에서 얻어진 세포 배양용 마이크로 캐리어에 대하여, SEM을 통해 입자 내부 구조를 확인하였다. 구체적으로 입자를 에폭시에 embedding한 후 ion milling을 통해 단면을 제조한 후 입자 단면의 형상을 SEM을

통해 확인하였다.

[161] (2) 공극 직경

[162] 입자를 에폭시에 embedding한 후 ion milling을 통해 단면을 제조한 후 입자 단면의 형상을 SEM으로 확인하여 입자 내부 공극 중 최소 직경과 최대 직경을 구하였다.

[163]

[164] **6. 마이크로 캐리어의 회수 효율 평가**

[165] 상기 실시예 및 비교예에서 얻어진 세포 배양용 마이크로 캐리어를 dopamine hydrochloride가 1mg/mL로 용해된 tris buffer (pH 8.0)에 침지하여 교반 하에 상온에서 2시간 코팅하였다. 과량의 코팅물질을 ethanol로 세척 후 70 μm sieve에 입자를 거른 뒤 상온 건조하였다.

[166] 100mL vertical wheel bioreactor (PBS社)에 중간엽 줄기세포(밀도: 1.05 g/cm³)를 포함하는 배양액을 채우고, Polydopamine이 코팅된 세포 배양용 마이크로 캐리어를 배양액에 주입하고 교반하였다. 상온에서 14일간 배양한 후, 0.25% trypsin 처리 후 배양액을 원심분리 하여 상층액에 부유하는 마이크로 캐리어를 회수하였으며, 이를 건조 후 무게를 측정하여 회수 효율을 평가하였다.

[167]

[168] **7. 공극 성분 분석**

[169] 상기 실시예 및 비교예에서 얻어진 세포 배양용 마이크로 캐리어에 대하여, 내부 공극에 함유된 성분을 분석하기 위해, 세포 배양용 마이크로 캐리어를 동결 분쇄하고 클로로포름(Chloroform)에 녹여 미반응 잔류 화합물을 추출하고, GC/FID(가스 크로마토그래피 - 불꽃 이온화 검출기)를 통해 세부 성분을 정성, 정량분석하였다.

[170] 구체적으로 클로로포름과 메탄올을 1:2 부피비로 혼합한 용매에 농도별로 스티렌 (1/4000 mg/mL~1 mg/mL), 디비닐벤젠 (1/10000 mg/mL~1 mg/mL), Isopar M (1/400 mg/mL~10 mg/mL)의 표준 시료를 제조하였다. GC/FID 기기에 1 μL 의 표준 시료를 주입하고 검량선을 작성하였다. 표 1의 시료로부터 추출한 미반응 잔류 화합물 용액을 1 μL 주입하고 검량선을 이용하여 함량을 계산하였다. GC/FID 측정은 내경 0.53mm, 길이 30 m, 필름 두께 5 μm 의 Rtx (스티렌, Isopar M) 또는 wax (디비닐벤젠)상의 컬럼을 이용하였으며, 초기 오븐 온도 50°C에서 시작하여 10°C/min 속도로 250°C까지 승온하였다. 이동상 기체는 15 mL/min의 헬륨 기체를 사용하였다.

[171] 이때, 오일 또는 이로부터 유래된 성분이 검출되는 경우를 "O", 오일 또는 이로부터 유래된 성분이 검출되지 않는 경우를 "X"로 표시하였다.

[172]

[173] [표2]

실시에 및 비교예의 실험예 측정 결과

구분	입자크기(μm)	입자 겉보기 밀도(g/cm^3)	공극율 (%)	공극 직경(μm)	손상 및 파괴 없는 완전한 구형 입자 비율 (%)	입자내 부구조	회수 효율 (%)	공극성 분석
실시예1	104(± 24)	0.98이상 0.995 미만	3.9	최소:1 최대:4	99(도면1)	다공성	90	O
실시예2	92(± 22)	0.95이상 0.97 미만	7.1	최소:1 최대:4	99	다공성 (도면4)	90	O
실시예3	322(± 51)	0.95이상 미만	17.5	최소:1 최대:4	99	다공성	90	O
실시예4	99(± 21)	0.95이상 미만	16.7	최소:1 최대:4	99	다공성	90	O
실시예5	96(± 30)	0.95이상 미만	16.9	최소:1 최대:4	99	다공성	90	O
실시예6	105(± 27)	0.95이상 미만	17.3	최소:1 최대:4	99	다공성	90	O
실시예7	107(± 23)	0.95이상 미만	17.2	최소:1 최대:4	99	다공성	90	O
실시예8	102(± 26)	0.95이상 미만	16.5	최소:1 최대:4	99	다공성	90	O

비 교 예1	198(±99)	1초과	0	-	100	기공 없음(도면5)	원심분 리를 통한 세포-마 이크로 캐리어 분리 불가	X	
비 교 예2	93(±20)	0.95 미만	-	최소:1 최대:4	90	다공성	세포배 양불가	O	
비 교 예3	99(±15)	0.95 미만	-	최소:1 최대:4	90	다공성	세포배 양불가	O	
참 고 예1	92(±66)	1초과	-	최소:1 최대:4	0(도면 2)	다공성	세포배 양불가	O	
참 고 예2	입자제조 불가	-	-	-	-	-	세포배 양불가	-	
참 고 예3	80(±16)	1초과	-	최소:1 최대:4	50	다공성	세포배 양불가	O	
참 고 예4	97(±24)	0.95이상 미만	1	-	최소:1 최대:4	50	다공성	세포배 양불가	O
참 고 예5	112(±22)	0.95이상 미만	1	-	최소:1 최대:4	70(도 면3)	다공성	세포배 양불가	O
참 고 예6	96(±26)	1초과	-	최소:1 최대:4	90	다공성	세포배 양불가	O	
참 고 예7	120(±26)	1초과	-	최소:1 최대:4	90	다공성	세포배 양불가	O	

참 고 예8	98(±24)	1초과	-	최소:1 최대:4	90	다공성	세포배 양불가	O
--------------	---------	-----	---	--------------	----	-----	------------	---

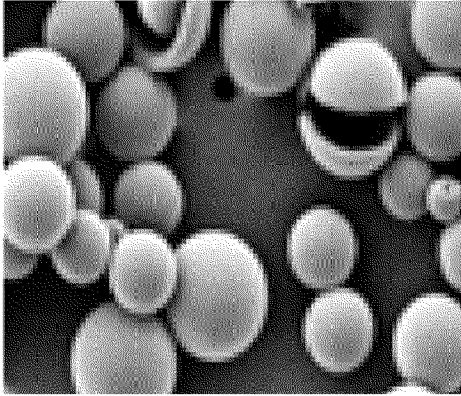
- [174] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 실시예의 세포 배양용 마이크로 캐리어는 입자 내부가 3.9% 이상 7.5% 이하의 공극율을 나타내어 다공성 구조를 가져 0.95 g/cm^3 이상 1 g/cm^3 미만의 저밀도를 만족하면서도, 손상 및 파괴 없는 완전한 구형 입자 비율이 99%로 매우 높아 대다수의 입자가 균질하게 구형 형상을 가질 수 있었다. 또한, 실시예의 세포 배양용 마이크로 캐리어는 세포 배양 조건에서 캐리어 배양이 효과적으로 진행되고, 배양후 마이크로 캐리어의 회수 효율도 90%로 높다는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 비교예1의 세포 배양용 마이크로 캐리어는 입자 내부 공극율이 0%로 기공이 없는 비다공성 구조로서, 1 g/cm^3 초과로 밀도가 증가하여 세포 배양 및 탈착 후 원심 분리를 통해 세포와 마이크로캐리어를 분리할 수 없는 문제가 있었다. 또한, 비교예2, 3의 세포 배양용 마이크로 캐리어는 입자의 밀도가 0.95 g/cm^3 미만으로 지나치게 낮아, 교반 조건 하에서 입자가 배양액 표면에서 부유되어 세포 부착성이 감소하여 세포배양이 불가능한 문제가 있었다. 또한, 비교예2, 3의 세포 배양용 마이크로 캐리어는 손상 및 파괴 없는 완전한 구형 입자 비율이 90%로 측정되면서, 입자 표면이 균일하지 않고 움푹 패인 형상의 입자가 실시예 대비 다량 발생되면서 세포 배양이 불가능할 정도로 세포 배양 효율이 낮아지는 문제가 있었다.
- [175] 한편, 참고예 1 내지 5의 세포 배양용 마이크로 캐리어는 손상 및 파괴 없는 완전한 구형 입자 비율이 0% 이상 70% 이하로 실시예 대비 낮아 입자의 형상이 상대적으로 실시예에 비해 불균일해지는 한계가 있었다. 또한, 참고예 6 내지 8의 세포 배양용 마이크로 캐리어는 세포 배양시 겔보기 밀도가 1 g/cm^3 초과로 높아 배양 중 저속 교반 과정에서 침전이 발생하거나, 비구형 입자에 의해 배양액의 현탁도가 높아져 향후 물리적 충격으로 인해 세포 배양이 불가능할 정도로 세포 배양 효율이 낮아지는 문제가 있었다.

청구범위

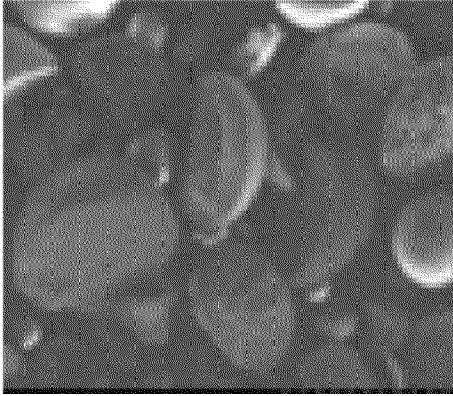
- [청구항 1] 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일, 또는 이로부터 유도된 공극 중 적어도 하나 이상을 포함한 폴리스티렌계 입자를 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
하기 수학식1에 의한 손상 및 파괴 없이 완전한 구형 입자 비율이 90% 초과 100% 이하인, 세포 배양용 마이크로 캐리어:
[수학식1]
손상 및 파괴 없는 완전한 구형 입자 비율(%) = (손상 및 파괴 없는 완전한 구형을 갖는 폴리스티렌계 입자의 개수 / 전체 폴리스티렌계 입자의 개수) x 100.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 폴리스티렌계 입자의 겉보기 밀도가 0.95 g/cm³ 이상 1.00 g/cm³ 미만인, 세포 배양용 마이크로 캐리어.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 폴리스티렌계 입자의 하기 수학식2에 의한 공극율이 0% 이상 8% 미만인, 세포 배양용 마이크로 캐리어:
[수학식2]
공극율(%) = [1 - (폴리스티렌계 입자의 겉보기밀도 / 폴리스티렌계 입자의 진밀도)] x 100.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 탄화수소 오일의 밀도가 0.75 g/cm³ 이상 0.80 g/cm³ 이하인, 세포 배양용 마이크로 캐리어.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 탄화수소 오일은 탄소수 12 이상 50 이하인 직쇄 또는 분지쇄의 포화탄화수소 화합물을 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 폴리스티렌계 입자는 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일, 또는 이로부터 유도된 공극 중 적어도 하나 이상이 내부에 분산된 폴리스티렌계 고분자를 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 폴리스티렌계 고분자는, 스티렌 단량체 1 중량부; 및 에틸렌계 불포화 가교제 0.033 중량부 초과 3 중량부 미만;의 반응 결과물을 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 폴리스티렌계 입자의 평균 직경이 50 μm 이상 400 μm 이하인, 세포 배양용 마이크로 캐리어.

- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 탄화수소 오일은 폴리스티렌계 입자의 중량을 기준으로 30 중량% 이하로 함유되는, 세포 배양용 마이크로 캐리어.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 폴리스티렌계 입자의 전체 표면적을 기준으로, 상기 폴리스티렌계 입자 표면에 존재하는 마이크로포어와 접촉하는 상기 폴리스티렌계 입자의 표면적의 비율이 0.01% 미만인, 세포 배양용 마이크로 캐리어.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 공극의 직경이 0.1 μm 내지 5 μm 인, 세포 배양용 마이크로 캐리어.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 폴리스티렌계 입자 표면에, 프라이머 고분자층, 세포부착 유도층, 또는 이들의 조합층이 더 포함되는, 세포 배양용 마이크로 캐리어.
- [청구항 14] 탄소수 12 이상인 탄화수소 오일 존재하에, 스티렌 단량체가 함유된 단량체 조성물의 현탁 중합 반응을 진행하는 단계를 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어 제조방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 단량체 조성물의 중량을 기준으로, 상기 탄화수소 오일의 함량이 10 중량% 이상 30 중량% 이하인, 세포 배양용 마이크로 캐리어 제조방법.
- [청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 단량체 조성물은 스티렌 단량체 1 중량부 및 에틸렌계 불포화 가교제 0.033 중량부 초과 3 중량부 미만이 혼합된 것인, 세포 배양용 마이크로 캐리어 제조방법.
- [청구항 17] 제14항에 있어서,
상기 단량체 조성물의 현탁 중합 반응은,
상기 단량체 조성물을 수계 분산액에 혼합하고 전단력을 가하여 상기 단량체 조성물을 수계 분산액에 액적 형태로 균질화하는 단계; 및
상기 균질화된 단량체 조성물을 300 rpm 이상 1000 rpm 이하의 교반속도로 현탁 중합하는 단계;를 포함하는, 세포 배양용 마이크로 캐리어 제조방법.
- [청구항 18] 세포 및 제1항의 세포 배양용 마이크로 캐리어를 포함하는, 세포 배양 조성물.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 세포는 섬유아세포, 상피세포, 골아세포, 연골세포, 간세포, 제대혈 세포, 중간엽 줄기세포, CHO 세포, 신장세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 화합물을 포함하는, 세포 배양 조성물.
- [청구항 20] 제18항에 있어서,
상기 세포 배양용 마이크로 캐리어와 상기 세포의 겔보기 밀도 차이가 0.02 g/cm^3 이상 0.20 g/cm^3 이하인, 세포 배양 조성물.

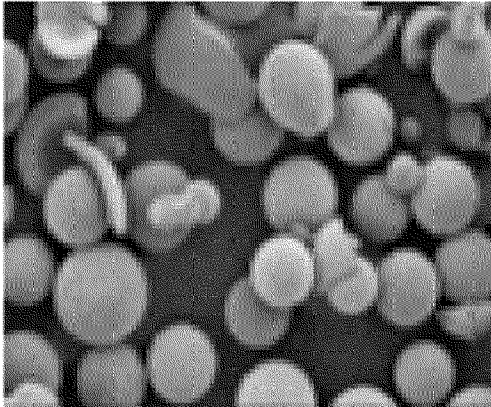
[도1]



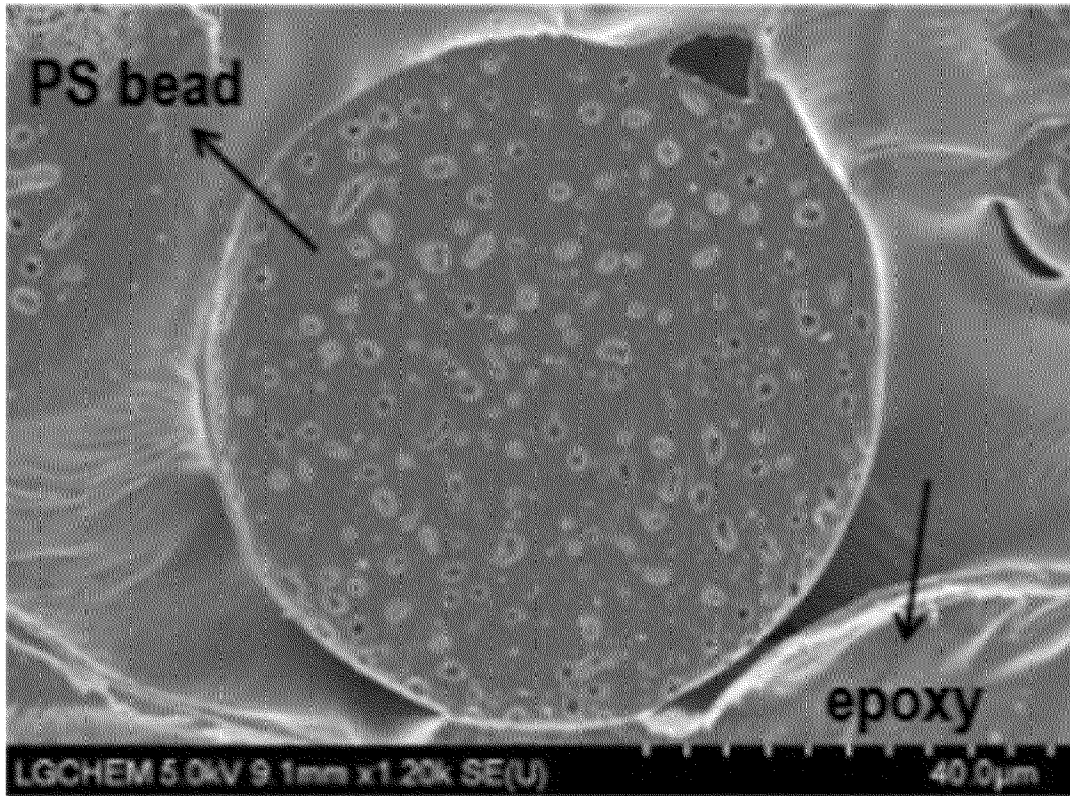
[도2]



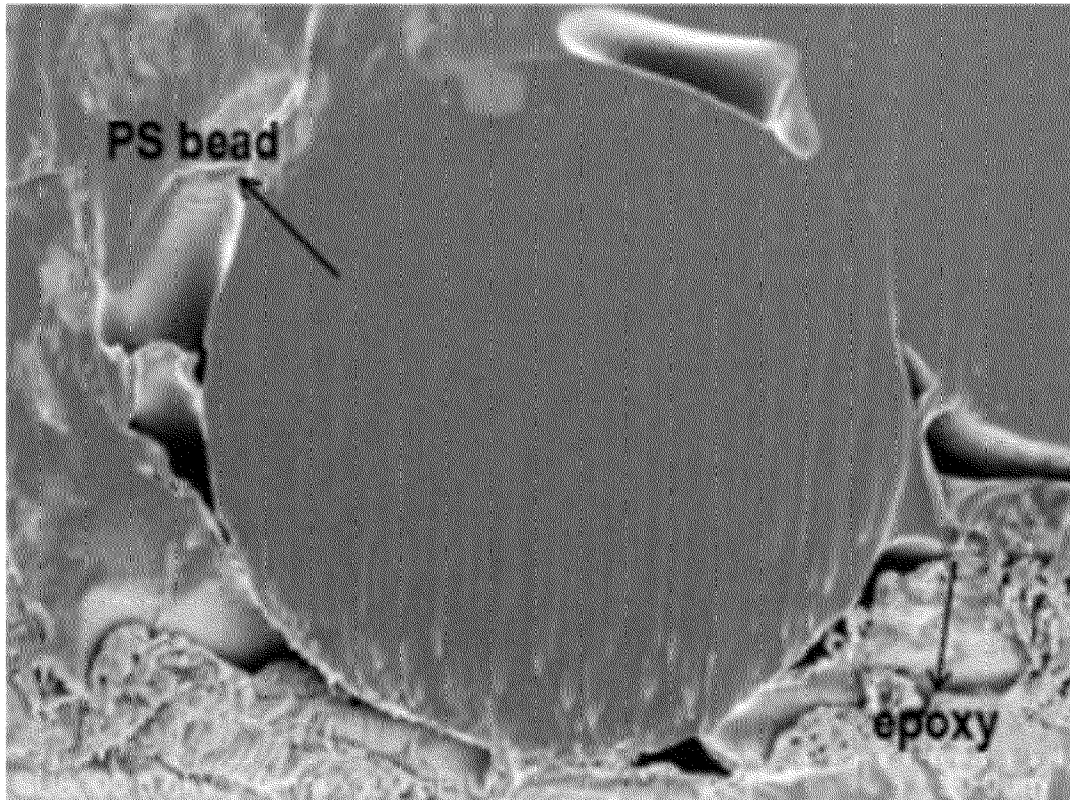
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/011985

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12M 1/12(2006.01)i; C08F 12/08(2006.01)i; C08F 2/20(2006.01)i; C12N 5/00(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 1/12(2006.01); C08J 9/10(2006.01); C12M 3/00(2006.01); C12N 11/00(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/06(2006.01); C12N 5/074(2010.01)		
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: 탄화수소(hydrocarbon), 공극(pore), 폴리스티렌(polystyrene), 세포 배양 (cell culture), 마이크로 캐리어(microcarrier), 밀도(density), 가교제(crosslinking agent), 도데칸(dodecane), 헥사데칸 (hexadecane), 코팅(coating)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5863957 A (LI, Nai-Hong et al.) 26 January 1999 (1999-01-26) See column 1, lines 27-31; column 4, lines 41-48; column 5, lines 8-11; column 5, line 16 - column 6, line 14; column 6, lines 28-56; column 8, line 23 - column 9, line 19; column 11, lines 40-65; column 19, line 52 - column 20, line 6; column 20, line 27 - column 21, line 3 and tables 1 and 2.	1-12,14-20
Y		13
Y	KR 10-2014-0056014 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 09 May 2014 (2014-05-09) See paragraphs [0004], [0006], [0007], [0009] and [0011].	13
A	KR 10-0871652 B1 (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 02 December 2008 (2008-12-02) See claims 1, 5, 6 and 9-14.	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 31 December 2021		Date of mailing of the international search report 31 December 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/KR2021/011985

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-136212 A (OLYMPUS CORP.) 01 June 2006 (2006-06-01) See claims 1-7.	1-20
A	US 4994388 A (HILLEGAS, William J. et al.) 19 February 1991 (1991-02-19) See claims 1-14	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/011985

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	5863957	A	26 January 1999	AU	1995-26937	B2	18 February 1999
				CN	1150764	A	28 May 1997
				EP	0764047	A1	26 March 1997
				JP	10-501173	A	03 February 1998
				JP	2009-057578	A	19 March 2009
				US	5583162	A	10 December 1996
				US	5653922	A	05 August 1997
				US	5760097	A	02 June 1998
				US	6100306	A	08 August 2000
				WO	95-33553	A1	14 December 1995
<hr/>							
KR	10-2014-0056014	A	09 May 2014	KR	10-1545217	B1	18 August 2015
<hr/>							
KR	10-0871652	B1	02 December 2008	None			
<hr/>							
JP	2006-136212	A	01 June 2006	None			
<hr/>							
US	4994388	A	19 February 1991	None			
<hr/>							

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12M 1/12(2006.01)i; C08F 12/08(2006.01)i; C08F 2/20(2006.01)i; C12N 5/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12M 1/12(2006.01); C08J 9/10(2006.01); C12M 3/00(2006.01); C12N 11/00(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/06(2006.01); C12N 5/074(2010.01) 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: 탄화수소(hydrocarbon), 공극(pore), 폴리스티렌(polystyrene), 세포 배양(cell culture), 마이크로 캐리어(microcarrier), 밀도(density), 가교제(crosslinking agent), 도데칸(dodecane), 헥사데칸(hexadecane), 코팅(coating)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 5863957 A (LI, NAI-HONG 등) 1999.01.26 칼럼 1의 라인 27-31; 칼럼 4의 라인 41-48; 칼럼 5의 라인 8-11; 칼럼 5의 라인 16 - 칼럼 6의 라인 14; 칼럼 6의 라인 28-56; 칼럼 8의 라인 23 - 칼럼 9의 라인 19; 칼럼 11의 라인 40-65; 칼럼 19의 라인 52 - 칼럼 20의 라인 6; 칼럼 20의 라인 27 - 칼럼 21의 라인 3 및 표 1, 2	1-12,14-20
Y		13
Y	KR 10-2014-0056014 A (연세대학교 산학협력단) 2014.05.09 단락 [0004], [0006], [0007], [0009], [0011]	13
A	KR 10-0871652 B1 (한양대학교 산학협력단) 2008.12.02 청구항 1, 5, 6, 9-14	1-20
A	JP 2006-136212 A (OLYMPUS CORP.) 2006.06.01 청구항 1-7	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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		
국제조사의 실제 완료일 2021년12월31일(31.12.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년12월31일(31.12.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대 전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 한인호 전화번호 +82-42-481-3362

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 4994388 A (HILLEGAS, WILLIAM J. 등) 1991.02.19 청구항 1-14	1-20

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 5863957 A	1999/01/26	AU 1995-26937 B2	1999/02/18
		CN 1150764 A	1997/05/28
		EP 0764047 A1	1997/03/26
		JP 10-501173 A	1998/02/03
		JP 2009-057578 A	2009/03/19
		US 5583162 A	1996/12/10
		US 5653922 A	1997/08/05
		US 5760097 A	1998/06/02
		US 6100306 A	2000/08/08
		WO 95-33553 A1	1995/12/14
KR 10-2014-0056014 A	2014/05/09	KR 10-1545217 B1	2015/08/18
KR 10-0871652 B1	2008/12/02	없음	
JP 2006-136212 A	2006/06/01	없음	
US 4994388 A	1991/02/19	없음	