(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월22일
(11) 등록번호 10-2411750
(24) 등록일자 2022년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) *C12M 1/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0068 (2013.01)
C12M 25/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7003406(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년01월23일
심사청구일자 2022년02월25일
(85) 번역문제출일자 2022년01월28일
(65) 공개번호 10-2022-0020418
(43) 공개일자 2022년02월18일
(62) 원출원 특허 10-2021-7008352
원출원일자(국제) 2015년01월23일
심사청구일자 2021년03월19일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2015/051787
(87) 국제공개번호 WO 2015/111686
국제공개일자 2015년07월30일
(30) 우선권주장
JP-P-2014-010842 2014년01월23일 일본(JP)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
US20130344036 A1
Hassanzadeh, P. et al., J. Mater. Chem. (2013) 1:4217-4224
Muller, D. et al., J. Biomater. Sci. Polym. Ed. (2013) 24(11):1368-1377

(73) 특허권자
닛산 가가쿠 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 쥬오쿠 니혼바시 2쵸메 5반 1고
(72) 발명자
하야시 히사토
일본 지바켕 후나바시시 츠보이니시 2쵸메 10방 1고 닛산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤 붓시츠가 가쿠겡큐쇼 나이
오타니 미사요
일본 지바켕 후나바시시 다카네다이 4-32-8 302
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **배양 배지 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 세포 및/또는 조직의 침강을 방지하는 효과를 갖는 배지 조성물을 사용함으로써 세포 및/또는 조직을 현탁된 상태로 배양하는 것을 포함하는 세포 및/또는 조직의 배양 방법을 제공하는데, 이것은 용액에 첨가되고 액체 배지 등에 균일하게 분산시킨 나노섬유에 의해 용액의 점도를 실질적으로 증가시키지 않으면서 세포 및/또는 조직을 실질적으로 유지함으로써 제공된다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류
C12N 2533/72 (2013.01)
C12N 2535/00 (2013.01)

(72) 발명자
사루하시 고이치로
일본 지바켕 후나바시시 츠보이니시 2쵸메 10방 1고 닛산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤 붓시츠가가쿠겡큐쇼 나이
니시노 다이토
일본 사이타마켕 시라오카시 시라오카 1470 닛산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤 세이부츠가가쿠겡큐쇼 나이
이와마 다케히사
일본 지바켕 후나바시시 츠보이니시 2쵸메 10방 1고 닛산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤 붓시츠가가쿠겡큐쇼 나이
가나키 다츠로
일본 사이타마켕 시라오카시 시라오카 1470 닛산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤 세이부츠가가쿠겡큐쇼 나이
아이하라 아야코
일본 사이타마켕 시라오카시 시라오카 1470 닛산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤 세이부츠가가쿠겡큐쇼 나이

(30) 우선권주장
JP-P-2014-123772 2014년06월16일 일본(JP)
JP-P-2014-174574 2014년08월28일 일본(JP)
JP-P-2014-217761 2014년10월24일 일본(JP)

명 세 서

청구범위

청구항 1

부착 세포를 액체 배지 중에서, 현탁시켜 배양할 수 있는 배지 조성물로서, 키틴 나노섬유를 함유하고, 그 키틴 나노섬유가 분쇄에 의해 얻어진 것임을 특징으로 하는, 배지 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

배지 조성물 중의 키틴 나노섬유의 함유량이, 0.0001 % (중량/부피) 이상, 0.1 % (중량/부피) 이하인, 배지 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

키틴 나노섬유의 평균 섬유 직경이 0.001 ~ 1.00 ㎛ 이고, 평균 섬유 직경 (D) 에 대한 평균 섬유 길이 (L) 의 비 (L/D) 가 2 ~ 500 인, 배지 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 물에 대한 분산성을 높인 다당류 등의 나노섬유를 사용하여, 동식물 세포 및/또는 조직을, 특히 삼차원 또는 현탁 상태에서 배양하기 위한 배지 조성물, 및 그 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근, 동식물의 체내에서 다른 역할을 하는 다양한 기관, 조직, 및 세포를 생체외 (in vitro) 에서 증식 또는 유지시키기 위한 기술이 발전하고 있다. 기관 및 조직을 생체외에서 증식 또는 유지하는 것은, 각각 기관 배양 및 조직 배양으로 불리고 있고, 기관 또는 조직으로부터 분리된 세포를 생체외에서 증식, 분화 또는 유지하는 것은 세포 배양으로 불리고 있다. 세포 배양은 분리한 세포를 배지 중에 생체외에서 증식, 분화 또는 유지하는 기술이며, 생체내 각종 기관, 조직 및 세포의 기능 및 구조를 상세하게 분석하는데 불가결하다. 또한, 상기 기술에 의해 배양된 세포 및/또는 조직은, 화학 물질, 약학 제품 등의 효능 및 독성 평가, 효소, 세포 성장 인자, 항체 등의 유용한 물질의 대량 생산, 질환 및 결손에 의해 상실된 기관, 조직 및 세포를 보충하는 재생 의료, 식물의 품종 개량, 유전자 조작 생성물의 제조 등에 관한 다양한 분야에서 이용된다.

[0003] 동물 유래의 세포는 그 특성을 기반으로 비-부착 세포와 부착 세포로 폭넓게 나뉘어진다. 비-부착 세포는, 성장 및 증식을 위한 스캐폴드 (scaffold) 를 필요로 하지 않는 세포이며, 부착 세포는 성장 및 증식을 위한 스캐폴드를 필요로 하는 세포이다. 생체를 구성하는 대부분의 세포는 후자의 부착 세포이다. 부착 세포의 배양 방법으로서, 단층 배양, 분산 배양, 포매 배양, 마이크로담체 배양, 스피어 배양 등이 알려져 있다.

[0004] 단층 배양은, 유리 또는 다양한 표면 처리를 실행한 합성 중합체 재료로 이루어진 배양 용기, 또는 피더 세포 (feeder cell) 로 불리는 지지 세포를 스캐폴드로서 사용함으로써 단층으로서 목적하는 세포를 배양하는 방법이며, 가장 일반적으로 보급되어 있다. 예를 들어, 다양한 표면 처리 (플라즈마 처리, 코로나 처리등) 가 적용되거나, 콜라겐, 파이브로넥틴, 폴리라이신 등과 같은 세포 부착 인자로 코팅되거나, 피더 세포가 미리 파종 (plate) 되는 등의 폴리스티렌과 같은 다양한 형상 또는 특성의 배양 용기를 사용한 배양 방법이 개발되고 있다. 그러나, 단층 배양은, 그 2차원적 배양 환경이 생체내 환경과 완전히 상이하기 때문에 세포가 생체내에서 가지고 있는 특이적 기능을 장기간 유지할 수 없고, 세포는 생체내와 유사한 조직을 재구축할 수 없고, 이는 일정 면적 당 세포 수가 제한되기 때문에 세포의 대량 배양에 적합하지 않다는 것 등이 문제가 되고 있다 (특허문헌 1). 또한, 피더 세포상에서 목적하는 세포를 배양하는 방법은 때때로 피더 세포와 목적하는 세포의 분리에서 문제에 직면한다 (비특허문헌 1).

[0005] 분산 배양은, 배지 안에 세포를 시딩 (seeding) 하고, 세포 부착을 저해하는 표면 처리가 적용된 배양 용기 중에서 배양 배지를 교반하여, 세포의 배양 용기에 대한 부착을 저해하는 것을 포함하는, 현탁 상태로 부착 세포를 배양하는 방법이다. 그러나, 상기 방법으로 배양되는 부착 세포는 스캐폴드에 부착될 수 없으므로, 세포 증식을 위한 스캐폴드에 대한 부착을 본질적으로 필요로 하는 세포에는 적용될 수 없다. 또한, 전단력에 의해 계속해서 파괴되어, 세포는 이의 본래의 세포 기능을 나타낼 수 없으므로, 기능성 세포는 때때로 대량으로 배양될 수 없다 (비특허문헌 2).

[0006] 포매 배양은, 한천, 메틸셀룰로오스, 콜라겐 겔, 젤라틴, 피브린, 아가로오스, 알기네이트 등의 고체 또는 반고체 겔 기질 내에 세포를 포매 및 고정시켜 세포를 배양하는 방법이다. 이 방법은, 세포를 생체내에 가까운 상태로 3차원 적으로 배양하는 것을 가능하게 하고 겔 기질 자체는 때때로 세포의 증식 및 분화를 촉진하기 때문에, 단층 배양 및 분산 배양에 비해 세포의 기능을 유지한 채로 세포를 고밀도로 배양할 수 있다 (특허문헌 2, 3). 더욱이, 겔 기질에 세포를 포매시킴으로써 크기 100 ~ 300 ㎛ 의 마이크로캡슐을 형성하고, 마이크로캡슐을 분산시키면서 수용액 배지 중에 세포를 배양하는 것을 포함하는 세포 배양 방법이 또한 개발되고 있다 (비특허문헌 3). 그러나, 이러한 방법은 가시광이 겔 기질을 투과하지 않는 한 배양 세포의 연속적인 관찰을 할 수 없으며, 겔 기질을 포함하는 배지 및 마이크로캡슐은 점도가 높기 때문에 배지로부터 세포의 회수는 효소 처리 (예를 들어, 콜라겐 겔의 경우에는 콜라게나아제 처리) 등의 세포를 손상시키는 복잡한 작업을 필요로 하고, 장기간 배양에 필요한 배지 교환이 곤란한 등의 문제를 가지고 있다. 최근, 열, 전단력 등의 처리에 의해 겔 기질로부터의 세포 회수를 가능하게 하는 기술이 개발되고 있다. 그러나, 열, 전단력 등은 세포 기능에 악영향을 줄 수 있고, 겔 기질의 생체에 대한 안전성은 아직 분명하게 되지 않았다 (특허문헌 4, 5, 비특허문헌 4, 5, 6, 7). 또한, 작게 절단한 과일, 야채 등의 입상 식품의 침전 및 현탁을 방지하여 균일하게 분산 및 현탁된 식품을 유지하는 졸 식품이 식품 분야에서 개발되고 있다. 그러나, 졸 식품은 분산된 입상 식품을 회수하는 것은 고려하지 않고, 세포 및 조직이 현탁 배양될 수 있는지는 시험되지 않았다 (특허문헌 6). 수용액 내의 젤란이 칼슘 이온의 작용에 의해 겔화해, 미세 구조를 형성하는 것이 알려져 있다 (비특허문헌 8).

[0007] 마이크로담체 배양은, 물보다 약간 더 무거운 미립자 (이하, 마이크로담체로 또한 나타냄) 의 표면상에 세포를 단층으로 증식시키고, 미립자를 플라스크 등의 배양 용기 내에서 교반하여, 현탁 상태로 세포를 배양하는 방법이다. 통상, 방법에 사용된 마이크로담체는, 직경 100 ~ 300 ㎛, 표면적 3000 ~ 6000 cm^2/g, 비중 1.03 ~ 1.05 의 구상 입자이며, 덱스트란, 젤라틴, 알긴산 또는 폴리스티렌 등의 물질로 구성되어 있다. 마이크로담체의 표면에는 세포의 부착을 용이하게 하기 위해 콜라겐, 젤라틴 또는 디메틸아미노에틸 등의 하전된 기를 또한 부여할 수 있다. 이러한 방법은, 배양 면적을 매우 증대시킬 수 있기 때문에 세포의 대량 배양에 적용된다 (특허문헌 7, 8). 그러나, 모든 마이크로담체에 목적으로 하는 세포를 거의 균일하게 부착시키는 것은 어렵고, 교반 동안의 전단력으로 인한 마이크로담체로부터의 세포의 탈착, 세포에 대한 손상 등의 문제가 발생한다 (비특허문헌 9).

[0008] 스피어 배양은, 목적으로 하는 세포 수 십 ~ 수 백 개로 이루어진 응집물 (이하, 스피어로 또한 나타내어짐) 을 형성하고, 응집물을 배지 중에 정치 또는 진탕시키면서 배양하는 것을 포함하는 배양 방법이다. 스피어는 세포 밀도가 높고, 생체내 환경의 것과 근접한 세포-세포간 상호작용 및 세포 구조를 재구축하고, 단층 배양 및 분산 배양 방법에 비해 더 장기간 동안 세포 기능을 유지한 채로 배양할 수 있음이 알려져 있다 (비특허문헌 10, 11). 그러나, 스피어 배양은 스피어의 크기가 너무 큰 경우 스피어 내부의 영양분의 공급과 노폐물의 배출이 곤란하기 때문에 큰 스피어를 형성할 수 없다. 또한, 형성한 스피어는 배양 용기의 하부에서 분산 상태로 배양될 필요가 있기 때문에, 주어진 부피 당 스피어 수가 용이하게 증가될 수 없고, 대량 배양에 적합하지 않는다. 또한, 스피어의 형성 방법으로서, 현적 배양 (hanging drop culture), 세포 비-부착 표면에서의 배양, 마이크로웰 내에서의 배양, 회전 배양, 세포 스캐폴드를 이용한 배양, 원심력, 초음파, 전기장 또는 자기장에 의한 응집 등이 알려져 있다. 그러나, 이러한 방법은 작업이 복잡하고, 스피어의 회수가 곤란하고, 사이즈의 제어 및 대량 생산이 곤란하고, 세포에 대한 영향이 불명확하고, 특수한 전용 용기 및 장치가 필요한 등의 문제가 있다 (특허문헌 9).

[0009] 다른 한편으로는, 식물에 관해 말하자면, 세포, 세포벽이 없는 원형질체 또는 잎, 줄기, 뿌리, 성장점, 종자, 배, 화분 등의 식물의 기관, 조직, 유합 조직은 무균 상태로 배양에 의해 또한 성장될 수 있다. 상기 식물 조직 및 세포의 배양 기술을 사용하여, 식물의 품종 개량 및 유용한 성분의 제조가 가능해졌다. 식물 세포 및 조직을 단기간에 대량으로 증식시키는 방법으로서, 식물 세포 및 조직을 액체 배지 중에 현탁 배양하는 방법이 알려져 있다 (비특허문헌 12). 이의 양호한 증식을 달성하기 위해서는, 충분한 산소의 공급, 균일한 혼

합 상태의 유지, 세포 손상의 방지 등이 중요하다. 배양 배지에 대한 산소 공급 및 세포 및 조직의 현탁은, 통기와 기계적 교반을 조합하여 또는 통기 단독에 의해 수행될 수 있다. 전자는 교반에 의한 세포 및 조직에 대한 손상으로 인해 불량한 증식을 초래할 수 있으며, 후자는 비록 세포나 조직의 전단이 적을지라도, 고밀도 배양에서 균일한 혼합 상태를 유지하는 것이 어려울 수 있기 때문에 세포 및 조직이 침강물을 형성하여 증식 효율을 저하시키는 등의 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 일본 공개특허공보 2001-128660호

(특허문헌 0002) 일본 공개특허공보 소 62-171680호

(특허문헌 0003) 일본 공개특허공보 소 63-209581호

(특허문헌 0004) 일본 공개특허공보 2009-29967호

(특허문헌 0005) 일본 공개특허공보 2005-60570호

(특허문헌 0006) 일본 공개특허공보 평 8-23893호

(특허문헌 0007) 일본 공개특허공보 2004-236553호

(특허문헌 0008) 국제 공개 제 2010/059775호

(특허문헌 0009) 일본 공개특허공보 2012-65555호

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Klimanskaya et al., Lancet 2005, 365:1636-1641

(비특허문헌 0002) King et al., Curr Opin Chem Biol. 2007, 11:394-398

(비특허문헌 0003) Murua et al., J. of Controlled Release 2008, 132:76-83

(비특허문헌 0004) Mendes, Chemical Society Reviews 2008, 37:2512-2529

(비특허문헌 0005) Moon et al., Chemical Society Reviews 2012, 41:4860-4883

(비특허문헌 0006) Pek et al., Nature Nanotechnol. 2008, 3:671-675

(비특허문헌 0007) Liu et al., Soft Matter 2011, 7:5430-5436

(비특허문헌 0008) Perez-Campos et al., Food Hydrocolloids 2012, 28:291-300

(비특허문헌 0009) Leung et al., Tissue Engineering 2011, 17:165-172

(비특허문헌 0010) Stahl et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 2004, 322:684-692

(비특허문헌 0011) Lin et al., Biotechnol J. 2008,3:1172-1184

(비특허문헌 0012) Weathers et al., Appl Microbiol Biotechnol 2010, 85:1339-1351

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 상기의 종래 기술의 문제를 해결하고자 하는 것이며, 동식물의 세포 및/또는 조직을, 특히 삼차원 또는 현탁 상태에서 배양하기 위한 배지 조성물, 및 당해 배지 조성물을 사용한 동식물의 세포 및/또는 조직의 배양 방법을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은 예의 검토한 결과, 셀룰로오스, 키틴 등의 다당류로 구성되는 나노섬유를 액체 배지 안에 혼합함으로써, 그 액체 배지의 점도를 실질적으로 증가시키지 않으면서, 동식물 세포 및/또는 조직의 현탁 배양을 정치한 상태로 수행할 수 있다는 것, 및 이 배지 조성물을 사용하여 배양함으로써 세포의 증식 활성이 촉진된다는 것을 알아냈다. 또, 셀룰로오스 등의 비수용성의 다당류 뿐만 아니라, 탈아실화 젤란 검 등의 수용성의 다당류도, 액체 배지 내에서, 섬유-유사 구조를 형성해, 이것이 액체 배지의 점도를 실질적으로 증가시키지 않으면서, 동식물 세포 및/또는 조직의 현탁 배양을 정치한 상태로 유지하면서 가능하게 하는 것을 알아냈다. 더욱, 이들은 배지 조성물로부터, 배양한 세포 및/또는 조직을 용이하게 회수 할 수 있다는 것도 추가로 알아냈다. 이상의 발견에 근거해, 추가 연구를 수행하여, 본 발명을 완성시키기에 이르렀다.

[0014] 즉, 본 발명은 하기와 같다:

[0015] [1] 세포 또는 조직을 현탁 상태로 배양할 수 있는 배지 조성물로서, 나노섬유를 포함하는 배지 조성물.

[0016] [2] 상기 [1] 에 있어서, 배양 동안 배지 조성물의 교환 처리, 및 배양 종료 후에 있어서 세포 또는 조직의 회수를 허용하는 배지 조성물.

[0017] [3] 상기 [1] 에 있어서, 세포 또는 조직의 회수 시에, 온도 변화, 화학 처리, 효소 처리 및 전단력 중 어느 것도 필요로 하지 않는 배지 조성물.

[0018] [4] 상기 [1] 에 있어서, 점도가 8 mPa · s 이하인 배지 조성물.

[0019] [5] 상기 [1] 에 있어서, 상기 나노섬유의 평균 섬유 직경이 0.001 ~ 1.00 ㎛, 평균 섬유 직경 (D) 에 대한 평균 섬유 길이 (L) 의 비 (L/D) 가 2 ~ 500 인 배지 조성물.

[0020] [6] 상기 [1] 에 있어서, 상기 나노섬유가 중합체 화합물로 구성되는 배지 조성물.

[0021] [7] 상기 [6] 에 있어서, 상기 중합체 화합물이 다당류인 배지 조성물.

[0022] [8] 상기 [7] 에 있어서, 상기 다당류가,

[0023] 셀룰로오스, 키틴 및 키토산으로 이루어지는 군에서 선택되는 비수용성 다당류; 또는

[0024] 히알루론산, 젤란 검, 탈아실화 젤란 검, 람잔 검, 디우탄 검, 잔탄 검, 카라기난, 잔탄 검, 헥수론산, 푸코이단, 펙틴, 펙트산, 펙틴산, 헤파란 술페이트, 헤파린, 헤파리틴 술페이트, 케라토술페이트, 콘드로이틴 술페이트, 데르마탄 술페이트, 람난 술페이트, 알긴산 및 그들의 염으로 이루어지는 군에서 선택되는 수용성 다당류를 포함하는 배지 조성물.

[0025] [9] 상기 [8] 에 있어서, 상기 다당류가 셀룰로오스 또는 키틴을 포함하는 배지 조성물.

[0026] [10] 상기 [9] 에 있어서, 상기 나노섬유가 분쇄에 의해 수득되는 배지 조성물.

[0027] [11] 상기 [1] 내지 상기 [10] 중 어느 하나에 있어서, 세포 배양용인 배지 조성물.

[0028] [12] 상기 [11] 에 있어서, 상기 세포가 부착 세포 또는 비-부착 세포인 배지 조성물.

[0029] [13] 상기 [12] 에 있어서, 상기 부착 세포가 스피어인 배지 조성물.

[0030] [14] 상기 [1] 내지 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물과, 세포 또는 조직을 포함하는 세포 또는 조직 배양물.

[0031] [15] 상기 [1] 내지 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물 중에서 세포 또는 조직을 배양하는 것을 포함하는, 세포 또는 조직의 배양 방법.

[0032] [16] 상기 [14] 에 따른 배양물로부터 세포 또는 조직을 분리하는 것을 포함하는, 세포 또는 조직의 회수 방법.

[0033] [17] 상기 [16] 에 있어서, 상기 분리가 원심분리로 행해지는 방법.

[0034] [18] 상기 [1] 내지 상기 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물 중에서 부착 세포를 배양하는 것을 포함하는, 스피어의 제조 방법.

[0035] [19] 상기 [1] 내지 상기 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물을 조제하기 위한 배지 첨가제로서, 당해 나노

섬유 또는 당해 나노섬유를 구성하는 수용성 중합체 화합물을 포함하는 배지 첨가제.

[0036] [20] 상기 [19] 에 따른 배지 첨가제와 배지를 혼합하는 것을 포함하는, 배지 조성물의 제조 방법.

[0037] [21] 상기 [1] 내지 상기 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물의 제조 방법으로서, 당해 나노섬유 또는 당해 나노섬유를 구성하는 수용성 중합체 화합물과 배지를 혼합하는 것을 포함하는, 배지 조성물의 제조 방법.

[0038] [22] 상기 [1] 내지 상기 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물 중에서 세포 또는 조직을 보존하는 것을 포함하는, 세포 또는 조직의 보존 방법.

[0039] [23] 상기 [1] 내지 상기 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물 중에서 세포 또는 조직을 수송하는 것을 포함하는, 세포 또는 조직의 수송 방법.

[0040] [24] 상기 [1] 내지 상기 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물 중에서 세포 또는 조직을 배양하는 것을 포함하는, 세포 또는 조직의 증식 방법.

[0041] [25] 이하의 단계를 포함하는, 부착 세포의 계대 배양 방법:

[0042] (1) 상기 [1] 내지 상기 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물 중에서 부착 세포를 현탁 배양하는 단계; 및

[0043] (2) 배양 용기로부터의 세포의 박리 조작을 실시하는 일 없이, (i) 단계 (1)의 현탁 배양에 의해 얻어진 부착 세포를 포함하는 배양물에, 신선한 상기 [1] 내지 상기 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물을 첨가하는 단계, 또는 (ii) 신선한 상기 [1] 내지 상기 [13] 중 어느 하나에 따른 배지 조성물에, 단계 (1) 의 현탁 배양에 의해 얻어진 부착 세포를 포함하는 배양물의 전부 또는 일부를 첨가하는 단계.

[0044] [26] 키틴 나노섬유를 함유하는 배지 조성물 중에서 부착 세포를 그 키틴 나노섬유에 부착한 상태로 현탁 배양하는 것을 포함하는, 부착 세포의 증식 방법.

[0045] [27] 상기 [26] 에 있어서, 배지 조성물 중의 키틴 나노섬유의 함유량이, 0.0001% (중량/부피) 이상, 0.1% (중량/부피) 이하인 방법.

발명의 효과

[0046] 본 발명은, 나노섬유, 특히 다당류로 구성되는 나노섬유를 함유하는 배지 조성물을 제공한다. 당해 배지 조성물을 사용하여, 세포 및 조직의 손상 및 기능 상실을 일으키는 위험이 있는 진탕, 회전 등의 조작을 수반하지 않고 세포 및/또는 조직을 현탁 상태에서 배양할 수 있다. 더욱, 당해 배지 조성물을 사용하여, 배양 동안 배지를 용이하게 교환할 수 있고, 배양된 세포 및/또는 조직을 또한 용이하게 회수할 수도 있다. 본 발명은 상기 배양 방법을, 동물체 또는 식물체로부터 수집한 세포 및/또는 조직에 적용해, 목적의 세포 및/또는 조직을 그 기능을 손상시키지 않고 대량으로 제조할 수 있다. 그리고, 당해 배양 방법으로 얻어지는 세포 및/또는 조직은, 화학 물질, 의약품 등의 약효 및 독성 평가나, 효소, 세포 증식 인자, 항체 등의 유용 물질의 대량생산, 질환 및 결손에 의해 없어진 기관, 조직 및 세포를 보충하는 재생 의료등을 실시할 때에 이용할 수 있다.

[0047] 또, 본 발명의 배지 조성물은 세포 또는 조직을 생물학적 환경과 가까운 환경에서 유지할 수 있기 때문에, 이것은 세포 및 조직의 보존 및 수송에 유용하다. 예를 들어, 플레이트 상에서 세포를 부착 배양하고, 상기 플레이트를 그대로 수송하는 경우, 수송 동안의 진동으로 인해, 세포가 플레이트로부터 박리할 수 있고, 따라서 세포가 갖는 본래의 기능이 저하되는 경우가 있다. 그러나, 본 발명의 배지 조성물 내에서, 나노섬유가 삼차원의 네트워크를 형성하고, 이것이 세포를 지지함으로써, 세포를 현탁 상태로 유지 할 수 있다. 따라서, 수송 중의 진동에 의해 산출되는 플레이트로부터의 박리 등과 같은 세포 상에 손상을 회피할 수 있고, 세포의 본래의 기능을 유지한 상태로 세포를 보존 및 수송할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] [도 1] 은 배지 조성물에서 HepG2 세포의 스피어를 배양할 때, 스피어가 균일하게 분산되고 현탁 상태로 배양될 수 있음을 나타내는 도면이다.

[도 2] 는 배지 조성물에서 HeLa 세포의 스피어를 배양할 때, 스피어가 균일하게 분산되고 현탁 상태로 배양될 수 있음을 나타내는 도면이다.

[도 3] 은 배지 조성물에서 HeLa 세포의 스피어를 배양하고 현미경으로 관찰할 때, 기존의 배지에 비해 스피어

들의 회합이 억제될 수 있음을 나타내는 도면이다.

[도 4] 는 배지 조성물에서 HepG2 세포를 부착시킨 마이크로담체를 배양할 때, HepG2 세포가 마이크로담체 위에서 증식될 수 있음을 나타내는 도면이다.

[도 5] 는 배지 조성물에 HeLa 세포의 스피어를 첨가했을 때, 스피어가 균일하게 분산되고 현탁 상태에 있음을 나타내는 도면이다.

[도 6] 은 배지 조성물에서 HeLa 세포의 스피어가 형성될 수 있음을 나타내는 도면이다.

[도 7] 은 구조체의 한 구현예인 필름을 나타내는 도면이고, 여기서 배지 조성물 중 탈아실화 젤란 검의 농도는 0.02% (중량/부피) 이었다.

[도 8] 은 배지 조성물에서 HepG2 세포의 스피어가 형성될 수 있음을 나타내는 도면이다.

[도 9] 는 HepG2 세포를 부착시킨 라미닌-코팅된 GEM 를 배지 조성물에서 배양했을 때 이의 현탁 상태를 나타내는 도면이다.

[도 10] 은 HepG2 세포를 포매한 알긴산 비이드를 배지 조성물에서 배양했을 때 이의 현탁 상태를 나타내는 도면이다.

[도 11] 은 HepG2 세포를 포매한 콜라겐 겔 캡슐을 배지 조성물에서 배양했을 때 이의 현탁 상태를 나타내는 도면이다.

[도 12] 는 배지 조성물에서 벼 유래 유합 조직을 배양했을 때 이의 현탁 상태를 나타내는 도면이다.

[도 13] 은 25℃ 에서의 각 배지 조성물의 점도를 나타낸다.

[도 14] 는 실시예 1 의 MNC-함유 배지 조성물의 주사 전자 현미경 사진을 나타낸다.

[도 15] 는 실시예 2 의 PNC-함유 배지 조성물의 주사 전자 현미경 사진을 나타낸다.

[도 16] 은 실시예 3 의 CT-함유 배지 조성물의 주사 전자 현미경 사진을 나타낸다.

[도 17] 은 실시예 4 의 DAG-함유 배지 조성물의 주사 전자 현미경 사진을 나타낸다.

[도 18] 은 실시예 5 의 Car-함유 배지 조성물의 주사 전자 현미경 사진을 나타낸다. 실온에서 건조.

[도 19] 는 실시예 5 의 Car-함유 배지 조성물의 주사 전자 현미경 사진을 나타낸다. 110℃ 에서 건조.

[도 20] 은 비교예 3 의 Xan-함유 배지 조성물의 주사 전자 현미경 사진을 나타낸다.

[도 21] 은 비교예 4 의 DU-함유 배지 조성물의 주사 전자 현미경 사진을 나타낸다.

[도 22] 는 실시예 1 의 MNC-함유 배지 조성물 중에서, HepG2 세포의 스피어를 6 일간 현탁 배양한 후, HepG2 세포 스피어의 분산 상태의 관찰 결과를 나타낸다. 왼쪽으로부터, MNC 농도는, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 w/v% 이다.

[도 23] 은 실시예 2 의 PNC-함유 배지 조성물 중에서, HepG2 세포의 스피어를 6 일간 현탁 배양한 후, HepG2 세포 스피어의 분산 상태의 관찰 결과를 나타낸다. 왼쪽으로부터, PNC 농도는, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 w/v% 이다.

[도 24] 는 실시예 3 의 CT-함유 배지 조성물 중에서, HepG2 세포의 스피어를 6 일간 현탁 배양한 후, HepG2 세포 스피어의 분산 상태의 관찰 결과를 나타낸다. 왼쪽으로부터, CT 농도는, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 w/v% 이다.

[도 25] 는 실시예 4 의 DAG-함유 배지 조성물 중에서, HepG2 세포의 스피어를 6 일간 현탁 배양한 후, HepG2 세포 스피어의 분산 상태의 관찰 결과를 나타낸다. 왼쪽으로부터, DAG 농도는, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 w/v% 이다.

[도 26] 은 실시예 5 의 Car-함유 배지 조성물 중에서, HepG2 세포의 스피어를 6 일간 현탁 배양한 후, HepG2 세포 스피어의 분산 상태의 관찰 결과를 나타낸다. 왼쪽으로부터, Car 농도는, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 w/v% 이다.

[도 27] 은 실시예 5 의 Xan-함유 배지 조성물 중에서, HepG2 세포의 스피어를 6 일간 현탁 배양한 후, HepG2

세포 스피어의 분산 상태의 관찰 결과를 나타낸다. 왼쪽으로부터, Xan 농도는, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 w/v% 이다.

[도 28] 은 비교예 4 의 DU-함유 배지 조성물 중에서, HepG2 세포의 스피어를 6 일간 현탁 배양한 후, HepG2 세포 스피어의 분산 상태의 관찰 결과를 나타낸다. 왼쪽으로부터, DU 농도는, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 w/v% 이다.

[도 29] 는 비교예 5 의 Alg-함유 배지 조성물 중에서, HepG2 세포의 스피어를 6 일간 현탁 배양한 후, HepG2 세포 스피어의 분산 상태의 관찰 결과를 나타낸다. 왼쪽으로부터, Alg 농도는, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 w/v% 이다.

[도 30] 은 MCF7 세포를, 실시예 1' 및 비교예 5' 의 배지 조성물 중에서 현탁 배양을 개시해 6 일째에 있어서의 RLU 값을 나타낸다.

[도 31] 은 MCF7 세포를, 실시예 2' 및 3' 의 배지 조성물 중에서 현탁 배양을 개시해 6 일째에 있어서의 RLU 값을 나타낸다.

[도 32] 는 MCF7 세포를, 실시예 4' 및 실시예 5' 의 배지 조성물 중에서 현탁 배양을 개시해 6 일째에 있어서의 RLU 값을 나타낸다.

[도 33] 은 MCF7 세포를, 비교예 3' 및 4' 의 배지 조성물 중에서 현탁 배양을 개시해 6 일째에 있어서의 RLU 값을 나타낸다.

[도 34] 는 A375 세포를, 실시예 1' 및 비교예 5' 의 배지 조성물 중에서 현탁 배양을 개시해 6 일째에 있어서의 RLU 값을 나타낸다.

[도 35] 는 A375 세포를, 실시예 2' 및 3' 의 배지 조성물 중에서 현탁 배양을 개시해 6 일째에 있어서의 RLU 값을 나타낸다.

[도 36] 은 A375 세포를, 실시예 4' 및 실시예 5' 의 배지 조성물 중에서 현탁 배양을 개시해 6 일째에 있어서의 RLU 값을 나타낸다.

[도 37] 은 A375 세포를, 비교예 3' 및 4' 의 배지 조성물 중에서 현탁 배양을 개시해 6 일째에 있어서의 RLU 값을 나타낸다.

[도 38] 은 현탁 배양 개시 2 일째에 있어서의, 각 배지 조성물 중에 있어서의 MCF7 세포의 분산 상태를 현미경 관찰한 결과이다.

[도 39] 는 현탁 배양 개시 2 일째에 있어서의, 각 배지 조성물 중에 있어서의 A375 세포의 분산 상태를 현미경 관찰한 결과이다.

[도 40] 은 현탁 배양 개시 4 일째에 있어서의, 각 배지 조성물 중에 있어서의 MDCK 세포의 분산 상태를 현미경 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하에서 더욱 상세하게 본 발명을 설명한다.

[0050] 본 명세서에서 사용하는 용어는 이하와 같이 정의된다.

[0051] 본 발명에서 세포는 동물 및 식물을 구성하는 가장 기본적인 단위이며, 그 요소로서 세포막의 내부에 세포질과 각종 세포 소기관을 갖는다. 이 경우, DNA를 캡슐화하는 핵은 세포 내부에 포함될 수 있거나 포함되지 않을 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 동물 유래의 세포에는, 정자, 난자 등의 생식 세포, 생체를 구성하는 체세포, 줄기 세포, 선구 세포 (progenitor cell), 생체로부터 분리된 암 세포, 생체로부터 분리되고 불사화능 (immortalizing ability) 을 획득하고 체외에서 안정적으로 유지되는 세포 (세포주), 생체로부터 분리되고 인위적으로 유전자 변형이 적용된 세포, 생체로부터 분리되는 (여기서 핵은 인위적으로 교환됨) 세포 등이 포함된다. 생체를 구성하는 체세포의 예로서는, 이하로 한정되는 것은 아니지만, 섬유아세포, 골수 세포, B 임파구, T 임파구, 호중구, 적혈구, 혈소판, 대식세포, 단핵백혈구, 골세포, 골수 세포, 혈관주위세포, 수지상 세포, 케라티노사이트, 지방세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 표피 세포, 내피세포, 혈관 내피 세포, 간실질 세포, 연골 세포, 난구세포, 신경계 세포, 신경교 세포, 뉴런, 올리고덴드로사이트, 미세교 세포, 성상세포, 심

장 세포, 식도 세포, 근육 세포 (예를 들어, 평활근 세포 또는 골격근 세포), 췌장 베타 세포, 멜라닌 세포, 조혈 선구 세포, 및 단핵 세포 등이 포함된다. 체세포는, 예를 들어 피부, 신장, 비장, 부신, 간장, 폐, 난소, 췌장, 자궁, 위, 결장, 소장, 대장, 비장, 방광, 전립선, 정소, 흉선, 근육, 결합 조직, 뼈, 연골, 혈관 조직, 혈액, 심장, 눈, 뇌, 신경 조직 등의 임의의 조직으로부터 채취되는 세포가 포함된다. 줄기 세포는, 자기 자신을 복제하는 능력 및 다른 복수 계통으로 분화하는 능력을 동시에 갖는 세포이다. 그 예는, 이하로 한정되는 것은 아니지만, 배아 줄기 세포 (ES 세포), 배아 종양 세포, 배아 생식 줄기 세포, 인공 다능성 줄기 세포 (iPS 세포), 신경 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 간 줄기 세포, 췌장 줄기 세포, 근육 줄기 세포, 생식 줄기 세포, 장 줄기 세포, 암 줄기 세포, 모낭 줄기 세포 등을 포함한다. 선구 세포는, 상기 언급된 줄기 세포로부터 특정 체세포나 생식 세포로 분화하는 도중에 있는 세포이다. 암 세포는, 체세포로부터 유래되고 무한의 증식 능력을 획득한 세포이다. 세포주는, 생체 외에서의 인위적인 조작에 의해 무한의 증식 능력을 획득한 세포이며, 그 예는 이하로 한정되는 것은 아니지만, CHO (차이니즈 햄스터 난소 세포주), HCT116, Huh7, HEK293 (인간 태아 신장 세포), HeLa (인간 자궁암 세포주), HepG2 (인간 간암 세포주), UT7/TPO (인간 백혈병 세포주), MDCK, MDBK, BHK, C-33A, HT-29, AE-1, 3D9, Ns0/1, Jurkat, NIH3T3, PC12, S2, Sf9, Sf21, High Five (등록상표), Vero 등을 포함한다.

[0052] 본 발명에 있어서의 식물 유래의 세포는 식물체의 각 조직으로부터 분리한 세포, 및 세포로부터 세포벽을 인위적으로 제거하여 얻어진 원형질체를 포함한다.

[0053] 본 발명에 있어서의 조직은 일부 유형의 상이한 특성 및 기능을 갖는 세포가 특정 방식으로 집합한 구조체의 단위이며, 동물 조직의 예는 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직, 신경 조직 등을 포함한다. 식물의 조직의 예는, 분열 조직, 표피 조직, 동화 조직, 엽육 조직, 통도 조직, 기계 조직, 유조직, 탈분화 세포 덩어리 (유합 조직: 캘러스) 등을 포함한다.

[0054] 세포 및/또는 조직을 배양할 때, 배양하고자 하는 세포 및/또는 조직은 상기 기재한 세포 및/또는 조직으로부터 자유롭게 선택되고 배양될 수 있다. 세포 및/또는 조직은 동물 또는 식물체로부터 직접 회수될 수 있다. 세포 및/또는 조직은 특정의 처리를 적용함으로써 동물 또는 식물체로부터 유도되거나, 성장되거나, 형질 전환되고, 이후 채취될 수 있다. 이 경우, 처리는 생체내에서 또는 생체외에서 일어날 수 있다. 동물의 예는, 어류, 양서류, 파충류, 조류, 범갑각류, 6각류, 포유류 등을 포함한다. 포유 동물의 예는, 이에 한정되는 것은 아니지만, 랫트, 마우스, 토끼, 기니어 피그, 다람쥐, 햄스터, 들쥐, 오리너구리, 돌고래, 고래, 개, 고양이, 염소, 소, 말, 양, 돼지, 코끼리, 명주 원숭이, 다람쥐 원숭이, 히말라야 원숭이, 침팬지 및 인간을 들 수 있다. 식물은 수집한 세포 및/또는 조직이 액체 배양될 수 있는 한 특별히 제한되지 않는다. 이의 예는 생약물 (예를 들어, 사포닌, 알칼로이드, 베르베린, 스코폴린, 식물 스테롤 등) 을 생성하는 식물 (예를 들어, 인삼, 빙카, 사리풀, 황련, 벨라도나 등), 화장품 또는 식품 원료가 되는 색소 또는 다당류 (예를 들어, 안토시아닌, 잇꽃 염료, 꼭두서니 염료, 샤프란 염료, 플라본 등) 를 생성하는 식물 (예를 들어, 블루베리, 잇꽃, 꼭두서니, 샤프란 등), 또는 의약물 성분을 생성하는 식물 등을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0055] 본 발명에 있어서의 세포 및/또는 조직의 현탁은 배양 용기에 대해 세포 및/또는 조직이 부착하지 않는 상태 (비-부착) 인 것을 말한다. 게다가 본 발명에 있어서, 세포 및/또는 조직을 증식, 분화 또는 유지시킬 때, 외부로부터의 액체 배지 조성물에 대한 압력 또는 이의 진동 또는 조성물 중에서의 진탕, 회전 작동 등의 부재하에서 세포 및/또는 조직이 액체 배지 조성물 중에 균일하게 분산 및 현탁되는 상태는 "현탁 정치" 로 나타내어지고, 상기 조건에서 세포 및/또는 조직의 배양은 "현탁 정치 배양" 으로 나타내어진다. "현탁 정치" 에서, 현탁 기간은 적어도 5 분 이상, 바람직하게는, 1 시간 이상, 24 시간 이상, 48 시간 이상, 6 일 이상, 21 일 이상이지만, 현탁 상태를 유지하는 한 이들의 기간으로 한정되지 않는다.

[0056] 바람직한 구현예에 있어서, 본 발명의 배지 조성물은, 세포 및 조직의 유지나 배양이 가능한 온도 범위 (예를 들어, 0 ~ 40℃) 내의 적어도 1 지점에 있어서, 세포 및/또는 조직의 현탁 정치가 가능하다. 본 발명의 배지 조성물은, 바람직하게는 25 ~ 37℃, 가장 바람직하게는 37℃ 의 온도 범위 내의 적어도 1 지점에 있어서, 세포 및/또는 조직의 현탁 정치가 가능하다.

[0057] 현탁 정치가 가능한가 아닌가는, 예를 들어, 폴리스티렌 비이드 (Size 500-600 ㎛, Polysciences Inc. 사제) 를, 평가 표적의 배지 조성물 중에 균일하게 분산시키고, 이를 25℃ 에서 정치시키고, 적어도 5 분 동안 (바람직하게는, 24 시간 이상, 48 시간 이상), 당해 세포의 현탁 상태가 유지될 수 있는 지를 관찰함으로써, 평가할 수 있다.

[0058] 본 발명의 배지 조성물은, 세포 또는 조직을 현탁 상태로 배양할 수 있는 (바람직하게는 현탁 정치 배양할 수

있음) 나노섬유와 배지를 함유하는 조성물이다.

[0059] 배지 조성물은, 바람직하게는 배양 동안 배지 조성물의 교환 처리 및 배양 완료 이후 세포 또는 조직의 회수를 허용하는 조성물이다. 보다 바람직하게는, 세포 또는 조직의 회수를 위해, 온도 변화, 화학 처리, 효소 처리 및 전단력 중 임의의 것을 필요로 하지 않는 조성물이다.

[0060] [나노섬유]

[0061] 본 발명의 배지 조성물 중에 포함되는 나노섬유는, 액체 배지 중에서, 세포 및/또는 조직을 균일하게 현탁시키는 효과를 나타낸다. 보다 상세하게는, 공유 결합 또는 이온 결합, 정전 상호작용, 소수성 상호작용, 반데르 발스 힘 등을 통해 집합 및 자체-조직화한 저-분자량 화합물 또는 중합체 화합물에 의해 액체 배지 중에서 형성된 나노섬유, 중합체 화합물로 구성된 비교적 큰 섬유 구조체를 고압 처리 등에 의해 미세화 함으로써 얻어진 나노섬유 등이, 본 발명의 배지 조성물 중에 포함되는 나노섬유로서 언급될 수 있다. 이론에는 구속되지 않지만, 본 발명의 배지 조성물에 있어서는, 나노섬유가 삼차원의 네트워크를 형성해, 이것이 세포 및 조직을 지지하여, 이에 의해 세포 및 조직이 현탁 상태로 유지된다.

[0062] 본 명세서에 있어서, 나노섬유란, 평균 섬유 직경 (D) 이, 0.001 내지 1.00 ㎛ 의 섬유를 말한다. 본 발명에 사용하는 나노섬유의 평균 섬유 직경은, 바람직하게는, 0.005 내지 0.50 ㎛, 보다 바람직하게는 0.01 내지 0.05 ㎛, 더욱 바람직하게는 0.01 내지 0.02 ㎛ 이다. 평균 섬유 직경이 0.001 ㎛ 미만인 경우, 나노섬유가 너무 미세하게 되어 현탁 효과가 달성되지 않을 우려가 있고, 그것을 함유하는 배지 조성물의 특성이 개선될 수 없을 수 있다.

[0063] 본 발명에 사용되는 나노섬유의 종횡비 (L/D) 는, 평균 섬유 길이/평균 섬유 직경으로부터 얻어지고, 통상 2 ~ 500 이며, 바람직하게는 5 ~ 300 이며, 보다 바람직하게는 10 ~ 250 이다. 종횡비가 2 미만의 경우에는, 배지 조성물 중에서의 분산성이 부족할 수 있어 충분한 현탁 작용이 얻어지지 않을 우려가 있다. 상기 비가 500 을 초과하는 경우에는, 섬유 길이가 매우 커지게 되어, 이 경우 당해 조성물의 점도를 상승시킴으로써 배지 교환 등과 같은 계대 조작에 지장을 초래할 우려가 있다는 것을 의미한다. 또한, 배지 조성물이 가시광을 투과하기 어려워져서, 투명성이 저하되게 되고, 배양된 세포의 시간-경과 관찰이 곤란해지고, 흡광, 형광, 발광 등을 사용한 세포 평가에 지장을 초래할 가능성이 있다.

[0064] 또한, 본 명세서에서, 나노섬유의 평균 섬유 직경 (D) 은 이하와 같이 측정되었다. 먼저 Okenshoji Co., Ltd. 에 의해 제조된 콜로디온 지지막을 JEOL Ltd. 사제 이온 크리나 (ion creaner, JIC-410) 로 3 분간 친수화 처리를 가해, 평가 표적의 나노섬유 분산액 (초순수에서 희석) 의 여러 액적을 적가하고, 실온 건조했다. 이것을 Hitachi, Ltd. 사제 투과형 전자현미경 (TEM, H-8000) (10,000 배) 에서 가속 전압 200 kV 로 관찰하였다. 얻어진 화상을 사용하여, 나노섬유 (표본수: 200~250 개) 에 대해 각각 하나의 섬유 직경을 계측하였고, 그의 평균치를 평균 섬유 직경 (D) 으로 했다.

[0065] 또한, 평균 섬유 길이 (L) 는, 이하와 같이 측정하였다. 평가 표적이 되는 나노섬유 분산액을 순수에 의해 100 ppm 이 되도록 희석하고, 초음파 세척기를 사용하여 나노섬유를 균일하게 분산시켰다. 이 나노섬유 분산액을 미리 농축 황산을 사용하여 표면을 친수화 처리한 실리콘 웨이퍼 (wafer) 상에 캐스트하고, 110℃ 에서 1 시간 건조시켜 시료로서 사용했다. 얻어진 시료를 주사 전자 현미경 (SEM, JSM-7400 F) (2,000 배) 로 관찰함으로써 수득된 화상을 사용하여, 나노섬유 (표본수: 150 ~ 250 개) 에 대해 각각 하나의 섬유 길이를 계측하였고, 그의 평균치를 평균 섬유 길이 (L) 로 했다.

[0066] 본 발명에 사용하는 나노섬유는, 액체 배지와 혼합했을 때, 일차 섬유 직경을 유지하면서 당해 나노섬유가 당해 액체 내로 균일하게 분산되고, 당해 액체의 점도를 실질적으로 증가시키지 않으면서 세포 및/또는 조직을 실질적으로 유지하고, 그 침강을 방지하는 효과를 갖는다. "액체의 점도를 실질적으로 증가시키지 않음" 은, 액체의 점도가 8 mPa·s 를 초과하지 않는 것을 의미한다. 이 때의 당해 액체의 점도 (즉, 본 발명의 제조 방법에 의해 제조되는 배지 조성물의 점도) 는, 8 mPa·s 이하이며, 바람직하게는 4 mPa·s 이하이며, 보다 바람직하게는 2 mPa·s 이하이다. 게다가 당해 나노섬유를 액체 배지 중에 분산시켰을 때, 당해 액체의 점도를 실질적으로 증가시키지 않으면서 세포 및/또는 조직을 균일하게 현탁시키는 (바람직하게는 현탁 정치시키는) 효과를 나타내는 경우에는, 나노섬유의 화학 구조, 분자량, 물성 등은 제한되지 않는다.

[0067] 나노섬유를 함유하는 액체의 점도는, 예를 들어 후술의 실시예에 기재된 방법으로 측정될 수 있다. 구체적으로는, 25℃ 조건 하에 소리 굽쇠 진동식 점도 측정기 (SV-1A, A&D Company Ltd.) 를 사용하여 평가될 수 있다.

[0068] 나노섬유를 구성하는 원료의 예로서는, 특별히 제한되는 것은 아니지만, 저-분자량 화합물이나 중합체 화합물을 들 수 있다.

[0069] 본 발명에 사용하는 저-분자량 화합물의 바람직한 구체예로서는, 특별히 제한 되는 것은 아니지만, 예를 들어, L-이소류신 유도체, L-발린 유도체, L-라이신 유도체 등의 아미노산 유도체, trans-1,2-디아미노시클로헥산산디아미드 유도체 등의 시클로헥산 디아민 유도체, 및 5-아미노이소프탈산 유도체, R-12-하이드록시스테아르산, 1,3,5-벤젠트리카르복사미드, cis-1,3,5-시클로헥산트리카르복사미드, 2,4-디벤질리덴-D-소르비톨, N-라우로일-L-글루탐산-α,γ-비스-n-부틸아미드, 칼슘 데히드로아비에테이트 등의 저분자 겔화제를 들 수 있다.

[0070] 본 발명에 사용하는 중합체 화합물의 바람직한 구체예로서는, 특별히 제한 되는 것은 아니지만, 예를 들어 다당류, 폴리펩티드 등을 들 수 있다.

[0071] 다당류란, 단당류 (예를 들어, 트리오스, 테트로스, 펜토스, 헥소스, 헵토스 등) 가 10 개 이상 중합되는 당중합체 (glycopolymer) 를 의미한다. 다당류에는, 비수용성 다당류 및 수용성 다당류가 포함된다.

[0072] 비수용성 다당류로서는, 셀룰로오스, 헤미세르로스등의 셀룰로오스 류; 키틴, 키토산 등의 키틴 성분 등을 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0073] 수용성 다당류로서는, 음이온성 관능기를 갖는 산성 다당류를 들 수 있다. 음이온성 관능기를 갖는 산성 다당류로서는, 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 구조 중에 우론산 (예를 들어, 글루쿠론산, 이듀론산, 갈락투론산, 만누론산) 을 갖는 다당류; 구조 중에 황산 또는 인산을 갖는 다당류, 및 그 양방의 구조를 가지는 다당류 등을 들 수 있다. 보다 구체적으로는, 히알루론산, 젤란 검, 탈아실화 젤란 검 (DAG), 람잔 검, 디우탄 검, 잔탄 검, 카라기난, 잔탄 검, 헥수론산, 푸코이단, 펙틴, 펙트산, 펙틴산, 헤파란 술페이트, 헤파린, 헤파리틴 술페이트, 케라토술페이트, 콘드로이틴 술페이트, 데르마탄 술페이트, 람난 술페이트, 알긴산 및 그들의 염으로 이루어지는 군에서 선택되는 1 종 이상의 종류로 구성되는 중합체 화합물이 예시된다.

[0074] 여기서 말하는 염으로서는, 리튬, 나트륨, 칼륨과 같은 알칼리 금속 염; 칼슘, 바륨, 마그네슘과 같은 알칼리토금속 염; 알루미늄, 아연, 구리, 철 등의 염; 암모늄 염; 테트라에틸암모늄, 테트라부틸암모늄, 메틸트리부틸암모늄, 세틸 트리메틸암모늄, 벤질메틸헥실데실암모늄, 콜린 등의 4급 암모늄 염; 피리딘, 트리에틸아민, 디이소프로필아민, 에탄올아민, 디올아민, 트로메타민, 메글루민, 프로카인, 클로로프로카인 등의 유기 아민과의 염; 글리신, 알라닌, 발린 등의 아미노산과의 염 등을 들 수 있다.

[0075] 폴리펩티드로서는, 살아있는 유기체에서 섬유를 구성하는 폴리펩티드를 들 수 있다. 구체적으로는, 콜라겐, 엘라스틴, 미오신, 케라틴, 아밀로이드, 피브로인, 액틴, 튜불린 등을 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0076] 본 발명에 사용하는 나노섬유를 구성하는 원료로서는, 천연 유래의 물질 뿐만 아니라, 미생물에 의해 생성된 물질, 유전-공학적으로 생성된 물질, 및 효소 및 화학 반응을 사용하여 인공적으로 합성된 물질도 포함된다. 본 발명에 사용하는 나노섬유를 구성하는 원료는, 바람직하게는 천연 유래의 물질 (즉, 자연적으로 추출된 물질), 또는 이것을 화학 반응 또는 효소 반응에 의해 변형함으로써 얻어진 물질이다.

[0077] 하나의 구현예에 있어서, 다당류는 비수용성 다당류이다. 바람직한 비수용성 다당류로서는, 셀룰로오스; 및 키틴, 키토산 등의 키틴 성분을 들 수 있다. 배지 조성물의 점도를 낮게 할 수 있다는 점과 세포 또는 조직의 회수가 용이하다는 점을 고려하면, 셀룰로오스 및 키틴이 가장 바람직하다.

[0078] 셀룰로오스란, 포도당의 6 원자 고리인 D-글루코피라노스가 β-1,4 글루코시드 결합된 천연 중합체 화합물이다. 원료로서는, 예를 들어, 목재, 대나무, 마, 황마, 케나프 (kenaf), 코튼, 농작물·음식 잔류물 등 식물 유래의 셀룰로오스, 또는 박테리아 셀룰로오스, 클라도포라 (Cladophora), 글라우코시스티스 (Glaucocystis), 발로니아 (Valonia), 튜니케이트 (Tunicate) 셀룰로오스 등의 미생물 생성 혹은 동물 생성의 셀룰로오스를 사용할 수 있다. 식물 유래의 셀룰로오스는 마이크로피브릴로 불리는 매우 가는 섬유가 다발이 되어 피브릴, 라멜라 및 섬유 세포와 같은 단계적으로 고차 구조를 형성하고 있다. 또, 박테리아 셀룰로오스에서, 박테리아 세포로부터 분비되고 변치 않는 두께를 갖는 셀룰로오스 마이크로피브릴이, 미세한 네트 구조를 형성한다.

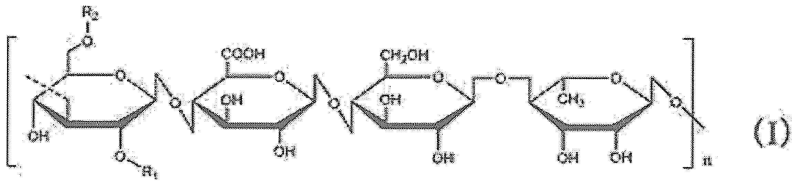
[0079] 본 발명에 있어서, 코튼, 박테리아 셀룰로오스 등과 같은 고 순도의 셀룰로오스 원료는 직접적으로 사용될 수 있다. 그러나, 다른 식물 유래의 셀룰로오스 등은, 바람직하게는 단리 및 정제 후에 사용된다. 본 발명에 있어서 바람직하게 사용되는 셀룰로오스는, 코튼 셀룰로오스, 박테리아 셀룰로오스, 크라프트 펄프 셀룰로오스, 미결정 셀룰로오스 등이다. 특히, 높은 현탁 작용을 갖기 때문에, 크라프트 펄프 셀룰로오스가 특히 바람직하게 사용된다.

[0080] 키틴 성분이란, 키틴 및 키토산으로 이루어지는 군에서 선택되는 1 개 이상의 탄수화물을 말한다. 키틴 및 키토산을 구성하는 주요한 당 단위는, 각각, N-아세틸글루코사민 및 글루코사민이다. 일반적으로, 키틴은 N-아세틸글루코사민의 함유량이 높고 산성 수용액에 대해 난용성이고, 키토산은 글루코사민의 함유량이 높고 산성 수용액에 대해 가용성이다. 본 명세서에 있어서는, 편의상, 구성 당에 차지하는 N-아세틸글루코사민의 비율이 50% 이상의 것을 키틴, 50% 미만의 것을 키토산이라고 부른다. 높은 현탁 작용을 달성하는 관점에서, 키틴을 구성하는 당 단위 중에서 N-아세틸글루코사민의 비율이 높은 것이 더욱 바람직하다. 키틴을 구성하는 당 단위 중에서 N-아세틸글루코사민의 비율은, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 100% 이다.

[0081] 키틴의 원료로서는, 예를 들어, 새우, 게, 곤충, 조개, 버섯 등의 많은 생물자원을 사용할 수 있다. 본 발명에 사용하는 키틴은, 게 껍질, 새우 껍질 유래의 키틴 등의 α-형태의 결정 구조를 갖는 키틴일 수 있고, 또는 오징어의 뼈 유래의 키틴등의 β-형태의 결정 구조를 갖는 키틴일 수도 있다. 게 및 새우의 겉껍데기는 종종 산업 폐기물로서 간주되고, 입수가 용이하며 효과적으로 사용된다는 관점에서 원료로서 바람직하다. 한편으로는, 불순물로서 포함되는 단백질, 회분 등의 제거를 위해서 단백질 제거 공정 및 탈회 공정이 필요하다. 그래서, 본 발명에 있어서는, 이미 매트릭스 제거 처리가 실시된 정제된 키틴을 사용하는 것이 바람직하다. 정제된 키틴은 시판되고 있다.

[0082] 하나의 구현예에 있어서, 다당류는 수용성 다당류이다. 바람직한 수용성 다당류로서는, 탈아실화 젤란 검, 카라기난 등을 들 수 있다. 높은 현탁 작용을 달성하는 관점에서, 탈아실화 젤란 검이 가장 바람직하다.

[0083] 탈아실화 젤란 검이란, 1-3 결합한 글루코오스, 1-4 결합한 글루쿠론산, 1-4 결합한 글루코오스 및 1-4 결합한 람노오스의 4 분자의 당을 구성 단위로서 함유하는 선형 중합체 다당류이며, 하기 일반식 (I) 에 있어서, 식 중 R1, R2 가 각각 수소 원자이고, n 은 2 개 이상의 정수인 다당류이다. 단, R1 이 글리세릴기를 함유할 수 있고, R2 가 아세틸기를 함유할 수 있으며, 아세틸기 및 글리세릴기의 함유량은, 바람직하게는 10% 이하이며, 보다 바람직하게는 1% 이하이다.

[0084] 

(I)

[0085] 젤란 검의 제조 방법으로서는, 발효 배지 중에서 생산 미생물을 배양하고, 균체 외부에 생산된 점막 성분을 통상적인 정제 방법에 의해 회수하고, 건조, 분쇄 등의 공정 후, 분말화하면 된다. 또, 탈아실화 젤란 검은, 발효 배지 중에서 젤란 검을 생산하는 미생물을 배양하고, 균체 외부에서 생산된 점막 분비물을 회수함으로써 수득된다. 이 경우, 점막 성분이 회수되는 경우 알칼리 처리를 가해, 1-3 결합한 글루코오스 잔기에 결합된 글리세릴기와 아세틸기를 탈아실화한 후에 회수하면 된다. 회수된 점막 분비물로부터의 탈아실화 젤란 검의 정제는, 예를 들어, 액체-액체 추출, 분별 침전, 결정화, 각종의 이온 교환 크로마토그래피, Sephadex LH-20 등을 사용한 겔 여과 크로마토그래피, 활성 숯, 실리카 겔 등에 의한 흡착 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피에 의한 활성 물질의 흡탈착 처리, 역상 칼럼을 사용한 고 성능 액체 크로마토그래피 등을 포함하며, 이들을 단독으로 또는 임의의 순서로의 조합, 또는 반복하여 실시할 수 있다. 젤란 검의 생산 미생물의 예로서는, 이것으로 한정되는 것은 아니지만, 스핑고모나스 엘로디아 (Sphingomonas elodea) 및 스핑고모나스 엘로디아 (Sphingomonas elodea) 의 유전자를 개변함으로써 수득된 미생물을 들 수 있다.

[0086] 그리고, 탈아실화 젤란 검의 경우, 시판되는 것, 예를 들어, SANSHO Co., Ltd. 사제 "KELCOGEL (CP Kelco 의 등록상표) CG-LA", San-Ei Gen F.F.I., Inc. 사제 "KELCOGEL (CP Kelco 의 등록상표)" 등을 사용할 수 있다.

[0087] 본 발명에 사용하는 중합체 화합물의 중량 평균 분자량은, 바람직하게는 1,000 내지 50,000,000 이며, 보다 바람직하게는 10,000 내지 20,000,000, 더욱 바람직하게는 100,000 내지 10,000,000 이다. 예를 들어, 당해 분자량은, 겔 침투 크로마토그래피 (GPC) 에 의한 폴리에틸렌 글리콜, 풀루란 환산, 수용액의 점도 등으로부터 추측할 수 있다.

[0088] 본 발명에 있어서는, 상기 언급된 중합체 화합물을 복수 종류 (바람직하게는 2 종) 조합하여 사용할 수 있다.

중합체 화합물의 조합의 종류는, 액체 배지 중에서 나노섬유가 형성되는, 또는 나노섬유로서 분산되어, 당해 액체 배지의 점도를 실질적으로 증가시키지 않으면서 세포 및/또는 조직을 현탁시킬 (바람직하게는 현탁 정치시키는) 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않는다. 바람직하게는, 당해 조합은 적어도 셀룰로오스, 키틴, 콜라겐, 또는 탈아실화 젤란 검을 포함한다. 즉, 바람직한 중합체 화합물의 조합에는, 셀룰로오스, 키틴, 콜라겐, 또는 탈아실화 젤란 검; 및 그 이외의 중합체 화합물 (예를 들어, 잔탄 검, 알긴산, 카라기난, 디우탄 검, 메틸셀룰로오스, 로커스트 빈 검 또는 그들의 염) 이 포함된다.

[0089] [나노섬유의 조제]

[0090] 본 발명의 배지 조성물은, 상기 서술한 원료로부터 조제된 나노섬유를 함유한다. 나노섬유의 조제 방법은, 원료로서 비수용성의 중합체 화합물 (예를 들어, 셀룰로오스, 키틴 등의 비수용성 다당류) 을 사용한 경우와 수용성의 중합체 화합물 (예를 들어, 탈아실화 젤란 검 등의 수용성 다당류) 을 사용한 경우에서 상이하다.

[0091] 나노섬유의 원료가 비수용성의 중합체 화합물 (예를 들어, 셀룰로오스, 키틴 등의 비수용성 다당류) 인 경우, 나노섬유는 일반적으로는 당해 원료를 분쇄함으로써 수득된다. 분쇄 방법은 한정되지 않지만, 본 발명의 목적을 충족하는 하기 언급되는 섬유 직경 및 섬유 길이에까지 미세화하기 위해서는, 고압 호모게나이저, 분쇄기 (맷돌), 비이드밀 (beadmill) 등의 매체 교반 밀과 같은, 강한 전단력을 제공하는 방법이 바람직하다.

[0092] 이들 중에서도 고압 호모게나이저를 사용하여 미세화하는 것이 바람직하고, 예를 들어 일본 공개특허공보 2005-270891 호나 특허 제 5232976 호에 개시되는 것 같은 습식 분쇄법을 사용하여 미세화 (분쇄화) 하는 것이 바람직하다. 구체적으로는, 원료의 분산액을, 1 쌍의 노즐로부터 고압에서 분사시키고, 서로 충돌시킴으로써, 원료를 분쇄하고, 예를 들어 Star Burstsystem (Sugino Machine Limited 사제의 고압 분쇄 장치) 또는 NanoVater (yoshida kikai co., ltd 사제의 고압 분쇄 장치) 가 이에 대해 사용된다.

[0093] 전술한 고압 호모게나이저를 사용하여 원료를 미세화 (분쇄화) 할 때, 미세화 및 균질화의 정도는, 고압 호모게나이저의 초고압 챔버 내로 펌프하는 압력과, 초고압 챔버에 통과시키는 횟수 (처리 횟수), 및 수 분산액 중의 원료의 농도에 의존하게 된다. 펌프 압력 (처리 압력) 은 일반적으로, 50 ~ 250 MPa 이며, 바람직하게는 150 ~ 245 MPa 이다. 펌프 압력이 50 MPa 미만의 경우에는, 나노섬유의 미세화가 불충분하게 되어, 미세화에 의해 기대되는 효과가 달성되지 않을 수 있다.

[0094] 또, 미세화 처리 동안의 수 분산액 중의 원료의 농도는 0.1 질량% ~ 30 질량%, 바람직하게는 1 질량% ~ 10 질량% 이다. 수 분산액 중의 원료의 농도가 0.1 질량% 미만인 경우, 생산성이 낮아지게 되고, 30 질량% 보다 높은 농도인 경우 분쇄 효율이 낮아지게 되어, 원하는 나노섬유가 얻어질 수 없다. 미세화 (분쇄화) 의 처리 횟수는 특별히 한정되지 않지만, 상기 수 분산액 중의 원료의 농도에 따라 다르다. 원료의 농도가 0.1 ~ 1 질량% 인 경우에는 10 ~ 100 회의 처리 횟수로 충분히 미세화되지만, 1 ~ 10 질량% 에서는 약 10 ~ 1000 회의 처리가 필요하다. 또, 30 질량% 를 초과하는 고농도인 경우에는, 수천회 이상의 처리 횟수가 필요하나, 점도가 정상 취급을 수행하기에는 너무 높게 증가하기 때문에, 산업적으로는 비현실적이다.

[0095] 나노섬유의 원료가 수용성의 중합체 화합물 (예를 들어, 탈아실화 젤란 검 등의 수용성 다당류) 을 포함하는 경우, 당해 물질을 배지에 첨가하면, 당해 물질이 배지 중의 금속 양이온을 통해 집합해, 배지 중에 나노섬유를 형성하고, 이것이 삼차원 네트워크를 구축한다. 결과적으로, 세포 또는 조직을 현탁 상태로 배양할 수 있는 나노섬유가 형성된다.

[0096] 본 발명의 배지 조성물 중에 있어서의 나노섬유의 농도는, 배지의 점도를 실질적으로 증가시키지 않으면서 세포 및/또는 조직을 현탁시키도록 (바람직하게는 현탁 정치시키도록), 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 0.0001% 내지 1.0% (중량/부피), 예를 들어 0.0005% 내지 1.0% (중량/부피), 바람직하게는 0.001% 내지 0.5% (중량/부피), 보다 바람직하게는 0.005% 내지 0.1% (중량/부피), 더욱 바람직하게는 0.005% 내지 0.05% (중량/부피) 의 범위 내이다.

[0097] 예를 들어, 셀룰로오스 나노섬유의 경우, 통상 0.0001% 내지 1.0% (중량/부피), 예를 들어 0.0005% 내지 1.0% (중량/부피), 바람직하게는 0.001% 내지 0.5% (중량/부피), 보다 바람직하게는 0.01% 내지 0.1% (중량/부피), 더욱 바람직하게는, 0.01% 내지 0.05% (중량/부피) 로 배지 내에 첨가된다.

[0098] 셀룰로오스 나노섬유 중 펄프 셀룰로오스 나노섬유의 경우, 배지 중의 농도의 하한치는, 현탁 작용 발현의 관점 및, 현탁 정치 배양을 가능하게 하는 관점에서, 바람직하게는, 0.01% (중량/부피) 이상, 0.015% (중량/부피) 이상, 0.02% (중량/부피) 이상, 0.025% (중량/부피) 이상, 또는, 0.03% (중량/부피) 이상이다. 또, 펄프 셀룰로오스 나노섬유의 경우, 배지 중의 농도의 상한치는, 배지의 점도를 실질적으로 높이지 않는 관점에서, 바람

직하게는 0.1% (중량/부피) 이하, 또는 0.04% (중량/부피) 이하이다.

[0099] 미결정 셀룰로오스 나노섬유의 경우, 배지 중의 농도의 하한치는, 현탁 작용 발현의 관점에서, 바람직하게는 0.01% (중량/부피) 이상, 0.03% (중량/부피) 이상, 또는 0.05% (중량/부피) 이상이다. 현탁 정치 배양을 가능하게 하는 관점에서는, 배지 중의 미결정 셀룰로오스 나노섬유 농도의 하한치는, 바람직하게는 0.03% (중량/부피) 이상, 또는 0.05% (중량/부피) 이상이다. 또, 미결정 셀룰로오스 나노섬유의 경우, 배지 중의 농도의 상한치는, 바람직하게는, 0.1% (중량/부피) 이하이다.

[0100] 키틴 나노섬유의 경우, 통상 0.0001% 내지 1.0% (중량/부피), 예를 들어 0.0005% 내지 1.0% (중량/부피), 바람직하게는 0.001% 내지 0.5% (중량/부피), 보다 바람직하게는 0.01% 내지 0.1% (중량/부피), 가장 바람직하게는, 0.03% 내지 0.07% (중량/부피) 로 배지 내에 첨가된다. 현탁 작용 발현의 관점에서, 배지 중의 키틴 나노섬유 농도의 하한치는, 바람직하게는 0.0001% (중량/부피) 이상, 0.0003% (중량/부피) 이상, 0.0005% (중량/부피) 이상, 또는 0.001% (중량/부피) 이상이다. 현탁 정치 배양을 가능하게 하는 관점에서는, 배지 중의 키틴 나노섬유의 하한치는, 바람직하게는 0.03% (중량/부피) 이상이다. 배지 중의 키틴 나노섬유 농도의 상한치는, 바람직하게는, 0.1% (중량/부피) 이하이다.

[0101] 셀룰로오스 나노섬유, 키틴 나노섬유 등과 같은 비수용성의 나노섬유에 대해서는, 통상, 0.1% (중량/부피) 이하의 농도이면, 배지 조성물의 점도를 실질적으로 증가시키지 않는다.

[0102] 카라기난의 경우, 0.0005% 내지 1.0% (중량/부피), 바람직하게는 0.001% 내지 0.5% (중량/부피), 보다 바람직하게는 0.01% 내지 0.1% (중량/부피), 가장 바람직하게는, 0.02% 내지 0.1% (중량/부피) 로 배지 내에 첨가된다. 배지 중의 카라기난 농도의 하한치는, 바람직하게는, 0.01% 이상이다. 현탁 작용 발현의 관점 및, 현탁 정치 배양을 가능하게 하는 관점에서, 배지 중의 카라기난 농도의 상한치는, 바람직하게는, 0.1% (중량/부피) 이하이다. 배지의 점도를 실질적으로 높이지 않는 관점에서, 카라기난의 상한치를, 0.04% (중량/부피) 이하로 하는 것도 또 바람직하다.

[0103] 탈아실화 젤란 검의 경우, 통상 0.001% 내지 1.0% (중량/부피), 예를 들어, 0.005% 내지 1.0% (중량/부피), 바람직하게는 0.003% 내지 0.5% (중량/부피), 보다 바람직하게는 0.01% 내지 0.1% (중량/부피), 더욱 바람직하게는 0.01 내지 0.05% (중량/부피), 가장 바람직하게는, 0.01% 내지 0.02% (중량/부피) 로 배지 내에 첨가된다. 현탁 작용 발현의 관점에서, 배지 중의 탈아실화 젤란 검 농도의 하한치는, 바람직하게는 0.005% (중량/부피) 이상, 또는 0.01% 이상이다. 현탁 정치 배양을 가능하게 하는 관점에서, 배지 중의 탈아실화 젤란 검 농도의 하한치는, 바람직하게는 0.01% (중량/부피) 이상이다. 배지의 점도를 실질적으로 높이지 않는 관점에서, 배지 중의 탈아실화 젤란 검 농도의 상한치는, 0.05% (중량/부피) 이하이다. 배지의 점도를 실질적으로 높이지 않는 관점에서, 배지 중의 탈아실화 젤란 검의 상한치를, 0.04 (중량/부피) % 이하로 하는 것도 또 바람직하다.

[0104] [다당류의 병용]

[0105] 상기 나노섬유에 더해, 다당류를 복수종 (바람직하게는 2종) 조합하여 사용할 수도 있다. 다당류의 농도는, 당해 액체 배지의 점도를 실질적으로 증가시키기 않으면서 세포 및/또는 조직을 균일하게 현탁시키는 (바람직하게는 현탁 정치시키는) 경우라면, 적절히 설정할 수 있다. 예를 들어, 나노섬유와 다당류와의 조합을 사용하는 경우, 나노섬유의 농도로서는 0.005 ~ 0.1% (중량/부피), 바람직하게는 0.01 ~ 0.07% (중량/부피) 가 예시되고, 다당류의 농도로서는, 0.005 ~ 0.4% (중량/부피), 바람직하게는 0.1 ~ 0.4% (중량/부피) 가 예시된다. 구체적인 농도 범위의 조합으로서는, 이하가 예시된다.

[0106] 셀룰로오스 또는 키틴 나노섬유: 0.005 ~ 0.1% (바람직하게는 0.01 ~ 0.07%) (중량/부피)

[0107] 다당류

[0108] 잔탄 검: 0.1 ~ 0.4% (중량/부피)

[0109] 알긴산나트륨: 0.1 ~ 0.4% (중량/부피) (바람직하게는 0.0001 ~ 0.4% (중량/부피))

[0110] 로커스트 빈 검: 0.1 ~ 0.4% (중량/부피)

[0111] 메틸셀룰로오스: 0.1 ~ 0.4% (중량/부피) (바람직하게는 0.2 ~ 0.4% (중량/부피))

[0112] 카라기난: 0.05 ~ 0.1% (중량/부피)

[0113] 디우탄 검: 0.05 ~ 0.1% (중량/부피)

[0114] 네이티브 젤란 검: 0.0001 ~ 0.4% (중량/부피)

[0115] 또한 그 농도는, 이하의 식에서 산출할 수 있다.

[0116] 농도 (%) = 나노섬유의 중량 (g) /배지 조성물의 부피 (ml)×100

[0117] [금속 양이온]

[0118] 한 구현예에 있어서, 본 발명의 배지 조성물은 금속 양이온, 예를 들어 2원자가 금속 양이온 (칼슘 이온, 마그네슘 이온, 아연 이온, 철 이온 및 구리 이온 등), 바람직하게는 칼슘 이온을 함유한다. 특히, 본 발명의 배지 조성물에 함유되는 나노섬유가, 수용성의 중합체 화합물 (예를 들어, 탈아실화 젤란 검 등의 수용성 다당류) 으로 구성되는 경우, 본 발명의 배지 조성물은 상기 금속 양이온을 함유하는 것이 바람직하다. 금속 양이온이 함유되는 경우, 당해 수용성의 중합체 화합물 (예를 들어, 탈아실화 젤란 검 등의 수용성 다당류) 의 집합이 금속 양이온을 통해 형성되어 배지 조성물 중에서 나노섬유를 형성해, 이것이 삼차원 네트워크를 구축한다. 결과적으로, 세포 또는 조직을 현탁 상태로 배양할 수 있는 나노섬유가 형성될 수 있다.

[0119] [배지]

[0120] 본 발명의 배지 조성물 중에 포함되는 배지로서는, 둘베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) (DMEM), hamF12 배지 (Ham's Nutrient Mixture F12), DMEM/F12 배지, McCoy's 5A 배지, Eagle MEM 배지 (Eagle's Minimum Essential Medium; EMEM), αMEM 배지 (alpha Modified Eagle's Minimum Essential Medium; αMEM), MEM 배지 (Minimum Essential Medium), RPMI1640 배지, 이스코브 변형 둘베코 배지 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (IMDM), MCDB131 배지, William Medium E, IPL41 배지, 피셔 배지 (Fischer's medium), StemPro34 (Invitrogen 사제), X-VIVO 10 (Cambrex Corporation 사제), X-VIVO 15 (Cambrex Corporation 사제), HPGM (Cambrex Corporation 사제), StemSpan H3000 (STEMCELL Technologies 사제), StemSpanSFEM (STEMCELL Technologies 사제), StemlineII (Sigma Aldrich 사제), QBSF-60 (Qualitybiological 사제), StemPro hESC SFM (Invitrogen 사제), mTeSR1 또는 2 배지 (STEMCELL Technologies 사제), Sf-900II (Invitrogen 사제), Opti-Pro (Invitrogen 사제) 등을 포함한다.

[0121] 세포 및/또는 조직이 식물 유래인 경우, 식물 조직 배양에 통상 사용되는 Murashige Skoog (MS) 배지, Linsmaier Skoog (LS) 배지, White 배지, Gamborg's B5 배지, 니케 배지, 헬라 배지, 모렐 배지 (Morel medium) 등의 기본 배지, 또는 이러한 배지 성분이 최적 농도 (예를 들어 암모니아 질소가 절반 농도 등) 로 개질되는 개질 배지에 적합한 농도로, 옥신 및 필요한 경우 사이토키닌 등의 식물 성장 조절 성분 (식물 호르몬) 을 첨가함으로써 수득된 배지가 배지로서 언급될 수 있다. 이러한 배지는 필요에 따라 카세인 분해 효소, 옥수수 침지액, 비타민 등으로 더 보충될 수 있다. 옥신의 예는, 3-인돌아세트산 (IAA), 3-인돌부티르산 (IBA), 1-나프탈렌아세트산 (NAA), 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-D) 등을 포함하나, 그것들로 한정되지는 않는다. 옥신은, 예를 들어 약 0.1 ~ 약 10 ppm 의 농도로 배지에 첨가될 수 있다. 사이토키닌의 예는 키네틴, 벤질아데닌 (BA), 제아틴 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 사이토키닌은, 예를 들어 약 0.1 ~ 약 10 ppm 의 농도로 배지에 첨가될 수 있다.

[0122] 당업자는 상기 언급된 배지에 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 인, 염소, 각종 아미노산, 각종 비타민, 항생제, 혈청, 지방산, 당 등을 목적에 따라 자유롭게 첨가할 수 있다. 동물 유래의 세포 및/또는 조직의 배양의 경우, 당업자는 목적에 따라 기타 화학 성분 및 생체 성분을 1종 이상 조합하여 또한 첨가할 수 있다. 동물 유래의 세포 및/또는 조직을 위한 배지에 첨가되는 성분의 예는, 우태 혈청, 인간 혈청, 말 혈청, 인슐린, 트랜스페린, 락토페린, 콜레스테롤, 에탄올아민, 나트륨 셀레나이트, 모노티오글리세롤, 2-메르캅토에탄올, 소 혈청 알부민, 나트륨 피루베이트, 폴리에틸렌 글리콜, 각종 비타민, 각종 아미노산, 한천, 아가로오스, 콜라겐, 메틸셀룰로오스, 각종 사이토카인, 각종 호르몬, 각종 증식 인자, 각종 세포외 매트릭스, 각종 세포 부착 분자 등을 포함한다. 배지에 첨가되는 사이토카인의 예는, 인터류킨-1 (IL-1), 인터류킨-2 (IL-2), 인터류킨-3 (IL-3), 인터류킨-4 (IL-4), 인터류킨-5 (IL-5), 인터류킨-6 (IL-6), 인터류킨-7 (IL-7), 인터류킨-8 (IL-8), 인터류킨-9 (IL-9), 인터류킨-10 (IL-10), 인터류킨-11 (IL-11), 인터류킨-12 (IL-12), 인터류킨-13 (IL-13), 인터류킨-14 (IL-14), 인터류킨-15 (IL-15), 인터류킨-18 (IL-18), 인터류킨-21 (IL-21), 인터페론-α (IFN-α), 인터페론-β (IFN-β), 인터페론-γ (IFN-γ), 과립구 콜로니 촉진 인자 (G-CSF), 단핵구 콜로니 촉진제 (M-CSF), 과립-대식세포 콜로니 촉진제 (GM-CSF), 줄기세포 인자 (SCF), flk2/flt3 리간드 (FL), 백혈병 세포 저해 인자 (LIF), 온코스타틴 M (OM), 에리트로포이에틴 (EPO), 트롬보포이에틴 (TPO) 등을 포함하나, 이들에 한

정되는 것은 아니다.

[0123] 배지에 첨가되는 호르몬의 예는, 멜라토닌, 세라토닌, 티로신, 트리요오드티로닌, 에피네프린, 노르에피네프린, 도파민, 항-뮐러리안 호르몬 (Mullerian hormone), 아디포넥틴, 부신피질자극 호르몬, 안지오텐시노겐 및 안지오텐신, 항이뇨 호르몬, 심방 나트륨이뇨성 펩티드, 칼시토닌, 콜레시스토키닌, 코르티코트로핀 방출 호르몬, 에리트로포이에틴, 난포 자극 호르몬, 가스트린, 그렐린, 글루카곤, 고나도트로핀 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 인간 융모성 고나도트로핀, 인간 태반성 락토겐, 성장 호르몬, 인히빈, 인슐린, 인슐린형 성장 인자, 렙틴, 황체 형성 호르몬, 멜라닌세포 자극 호르몬, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, 프로락틴, 세크레틴, 소마트스타틴, 트롬보포이에틴, 갑상선 자극 호르몬, 티로트로핀 방출 호르몬, 코르티솔, 알도스테론, 테스토스테론, 데히드로에피안드로스테론, 안드로스텐디온, 디히드로테스토스테론, 에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 프로게스테론, 칼시트리올, 칼시디올, 프로스타글란딘, 류코트리엔, 프로스타사이클린, 트롬복산, 프로락틴 방출 호르몬, 리포트로핀, 뇌 나트륨이뇨성 펩티드, 신경펩티드 Y, 히스타민, 엔도텔린, 췌장 폴리펩티드, 렌닌 및 엔케팔린을 포함하나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0124] 배지에 첨가되는 성장 인자의 예는, 형질전환 성장 인자-α (TGF-α), 형질전환 성장 인자-β (TGF-β), 대식세포 염증 단백질-1α (MIP-1α), 표피 세포 성장 인자 (EGF), 섬유아세포 성장 인자-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 (FGF-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), 신경 세포 성장 인자 (NGF), 간세포 성장 인자 (HGF), 백혈병 저해 인자 (LIF), 프로테아제 넥신 I, 프로테아제 넥신 II, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 콜린 혈관작용 분화 인자 (CDF), 케모카인, Notch 리간드 (Delta1 등), Wnt 단백질, 안지오포이에틴형 단백질 2, 3, 5 또는 7 (Angpt2, 3, 5, 7), 인슐린형 성장 인자 (IGF), 인슐린형 성장 인자 결합 단백질-1 (IGFBP), 플레이오트로핀 (Pleiotrophin) 등을 포함하나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0125] 또한, 유전자 재조합 기술에 의해 인위적으로 바뀐 아미노산 서열을 갖는 이러한 사이토카인 및 성장 인자가 또한 첨가될 수 있다. 그 예는 IL-6/가용성 IL-6 수용체 복합체 또는 Hyper IL-6 (IL-6 및 가용성 IL-6 수용체의 융합 단백질) 등을 포함한다.

[0126] 각종 세포외 매트릭스 및 각종 세포 부착 분자의 예는, 콜라겐 I 내지 XIX, 파이브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌-1 내지 12, 니토젠, 테나신, 트롬보스폰딘, 폰 빌레브란트 (von Willebrand) 인자, 오스테오폰틴, 피브리노겐, 각종 엘라스틴, 각종 프로테오글리칸, 각종 카드헤린, 데스모콜린, 데스모글레인, 각종 인테그린, E-셀렉틴, P-셀렉틴, L-셀렉틴, 면역 글로블린 슈퍼패밀리, 매트리겔, 폴리-D-라이신, 폴리-L-라이신, 키틴, 키토산, 세파로오스, 히알루론산, 알기네이트 겔, 각종 하이드로 겔, 이의 절단 분절 등을 포함한다.

[0127] 배지에 첨가되는 항생 물질의 예는, 술폰아미드 및 제제, 페니실린, 페네티실린, 메티실린, 옥사실린, 클록사실린, 디클록사실린, 플루클록사실린, 나프실린, 암피실린, 페니실린, 아목시실린, 시클라실린, 카르베니실린, 티카르실린, 피페라실린, 아즐로실린, 메즐로실린, 메실리남, 안디노실린, 세팔로스포린, 및 이의 유도체, 옥솔린산, 아미플록사신, 테마플록사신, 날리딕신산, 피로미드산, 시프로플록사신, 시녹사신, 노르플록사신, 퍼플록사신, 로삭사신, 오프록사신, 에녹사신, 피페미드산, 술박탐, 클라불란산, β-브로모페니실란산, β-클로로페니실란산, 6-아세틸메틸렌-페니실란산, 세폭사졸, 술탐피실린, 아디노시린 및 술박탐 포름알데히드 허드레이트 에스테르, 타조박탐, 아즈테오남, 술파제틴, 이소술파제틴, 노르카르디신, m-카르복시페닐, 페닐아세트아미도포스폰산 메틸, 클로르테트라실클린, 옥시테트라시클린, 테트라시클린, 데메클로시클린, 독시시클린, 메타시클린 및 미노시클린을 포함한다.

[0128] [배지 조성물의 제조 방법]

[0129] 상기 언급된 나노섬유를, 액체 배지의 점도를 실질적으로 증가시키지 않으면서 세포 및/또는 조직을 균일하게 현탁시키는 (바람직하게는 현탁 정치시키는) 것을 허용하는 농도로, 세포 및/또는 조직을 배양할 때에 사용되는 배지와 혼합함으로써, 상기 언급된 본 발명의 배지 조성물을 제조할 수 있다. 본 발명은, 또한 이러한 본 발명의 배지 조성물의 제조 방법도 제공한다.

[0130] 당해 나노섬유의 형상은, 분말, 정제, 환제, 캡슐제, 과립제와 같은 제형화 된 고체, 적절한 생리적인 수성 용매 중의 분산액과 같은 액체이거나, 또는 기질이나 단일 기질에 결합될 수 있다. 제형화에 사용되는 첨가제의 예로서는, p-옥시 벤조산 에스테르 등의 방부제; 락토오스, 글루코오스, 수크로오스, 만니트 등의 부형제; 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등의 윤활제; 폴리(비닐 알코올), 하이드록시프로필셀룰로오스, 젤라틴 등의 결합제; 지방산 에스테르 등의 계면활성제; 글리세린 등의 가소제 등을 들 수 있다. 이들의 첨가제는 상기 언급된 것으로 한정될 것은 없고, 당업자가 이용 가능하면 자유롭게 선택될 수 있다. 멸균 방법은 특별히 제한

은 없고, 예를 들어, 방사선 멸균, 에틸렌 옥시드 기체 멸균, 오토클레이브 멸균, 필터 멸균 등이 언급될 수 있다.

[0131] 바람직한 구현예에 있어서, 상기 언급된 나노섬유의 생리적인 수성 용매 중의 분산액과 액체 배지를 혼합함으로써, 본 발명의 배지 조성물을 제조한다. 그 분산액은, 멸균 (오토클레이브, 감마선 멸균 등) 될 수 있다. 대안적으로는, 그 분산액과 분말 배지를 물에 용해하여 제조한 액체 배지 (배지로서의 수용액) 를 혼합할 수 있고, 멸균 후에 사용해도 된다. 그 분산액과 액체 배지는 혼합하기 전에, 개별적으로 멸균될 수 있다. 수성 용매의 예로서는, 물, 디메틸 술폭시드 (DMSO) 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 수성 용매로서는 물이 바람직하다. 수성 용매는 적절한 완충제 및 염을 함유할 수 있다. 상기 언급된 나노섬유의 분산액은 본 발명의 배지 조성물을 제조하기 위한 배지 첨가제로서 유용하다. 본 발명은 또한 이러한 배지 첨가제도 제공한다.

[0132] 혼합 비율은 나노섬유의 분산액:액체 배지 (배지로서의 수용액) 가, 통상 1:99 ~ 99:1, 바람직하게는 10:90 ~ 90:10, 보다 바람직하게는, 20:80 ~ 80:20 이다.

[0133] 나노섬유가 수용성의 중합체 화합물 (예를 들어, 탈아실화 젤란 검 등의 수용성 다당류) 로 구성되는 경우에는, 당해 나노섬유와 배지를 혼합하는 대신에, 당해 수용성의 중합체 화합물 (예를 들어, 탈아실화 젤란 검 등의 수용성 다당류) 과 배지를 혼합해, 당해 배지 중에 나노섬유를 형성시킴으로써, 본 발명의 배지 조성물을 제조한다. 당해 중합체 화합물의 형상은, 분말, 정제, 환제, 캡슐제, 과립제, 또는 가용화제를 사용하여 적절한 용매에 용해시켜 수득된 용액 또는 현탁액과 같은 액체일 수 있고, 또는 기질 또는 담체에 결합될 수 있다. 제형화에 사용되는 첨가제의 예로서는, p-옥시벤조산 에스테르 등의 방부제; 락토오스, 글루코오스, 수크로오스, 만니트 등의 부형제; 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등의 윤활제; 폴리(비닐 알코올), 하이드록시프로필셀룰로오스, 젤라틴 등의 결합제; 지방산 에스테르 등의 계면활성제; 글리세롤 등의 가소제 등을 들 수 있다. 이들의 첨가제는 상기 언급된 것으로 한정되지는 않고, 당업자가 이용 가능한 것이면 자유롭게 선택할 수 있다.

[0134] 상기 언급된 중합체 화합물은, 필요에 따라 멸균될 수 있다. 멸균 방법은 특별히 제한은 없고, 예를 들어, 방사선 멸균, 에틸렌 옥시드 기체 멸균, 오토클레이브 멸균, 필터 멸균 등이 언급될 수 있다.

[0135] 바람직한 구현예에 있어서, 수용성의 중합체 화합물 (예를 들어, 탈아실화 젤란 검 등의 수용성 다당류) 의 수용액 (배지 첨가제 2 로서 사용됨) 이 본 발명의 제조 방법에 사용된다. 당해 수용액은, 수용성의 중합체 화합물은 고체 (예, 분말) 로서 생리적인 수성 용매에 용해함으로써 수득될 수 있다. 수성 용매의 예로서는, 물, 디메틸 술폭시드 (DMSO) 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 수성 용매로서는 물이 바람직하다.

[0136] 수성 용매는 적절한 완충제 또는 염을 함유할 수 있다. 수성 용매는 2원자가 금속 양이온을 함유할 수 있거나 함유할 수 없는 반면, 2원자가 금속 양이온은 바람직한 구현예에 함유되지 않는다. 수성 용매에 2원자가 금속 양이온을 포함하지 않는 경우, 수용액에서 수용성의 중합체 화합물 (예를 들어, 탈아실화 젤란 검 등의 수용성 다당류) 은, 세포 또는 조직을 현탁 상태로 배양할 수 있는 나노섬유 구조를 쉽게 형성할 수 없고, 물 중에 용해 상태로 안정적으로 보존될 수 있다.

[0137] 또한 상기 언급된 배지 첨가제에는, 나노섬유의 효과를 향상시키거나 사용할 때의 농도를 낮추기 위한 첨가체를 상기 언급된 배지 첨가제에 추가로 첨가하는 것이 가능하다. 이러한 첨가제의 예로서 구아검, 타마린드 검, 알긴산 프로필렌 글리콜 에스테르, 로커스트 빈 검, 아라비아 검, 타라 검, 타마린드 검, 메틸셀룰로오스 등을 포함하는 다당류를 1 종 이상 혼합할 수 있다.

[0138] 하기에 본 발명의 배지 조성물의 제조 방법을 예시 하지만, 본 발명은 이로써 한정되는 것은 아니다. 나노섬유를 이온 교환수 또는 초순수에 첨가한다. 그리고, 전체적으로 균일한 분산액이 형성될 때까지 혼합물을 실온에서 교반하고, 멸균 (예를 들어, 121℃ 에서 20 분 동안의 오토클레이브 멸균) 을 실시한다. 정치 배양에 사용하고자 하는 제시된 배지에 교반 (예를 들어, 호모믹서 등) 하면서, 상기 나노섬유 분산액을 첨가해, 용액을 당해 배지와 균일하게 혼합한다. 본 수용액과 배지의 혼합 방법은 특별히 제한은 없고, 예를 들어 파이펫팅 등의 수동 혼합, 자석 교반기, 기계 교반기, 호모믹서 및 호모게나이저 등의 기기를 사용한 혼합을 들 수 있다.

[0139] 예를 들어, 셀룰로오스 나노섬유를 사용하여 배지 조성물을 제조하는 경우, 0.0001% 내지 5.0% (중량/부피), 바람직하게는 0.001% 내지 1.0% (중량/부피), 보다 바람직하게는 0.01% 내지 0.6% (중량/부피) 가 되도록 이온 교

환수 또는 초순수에 셀룰로오스 나노섬유를 첨가한다. 그리고, 전체가 균일한 상태가 될 때까지 혼합물을 실온에서 교반한 후, 멸균 (예를 들어, 121℃ 에서 20 분 동안의 오토클레이브 멸균) 을 실시한다. 예를 들어 DMEM 배지 등의 액체 배지를 호모믹서 등으로 교반하면서, 당해 액체 배지에 상기 수용액을 원하는 최종 농도가 되도록 첨가하고 (예를 들어 최종 농도가 0.03% 인 경우, 0.6% 수용액: 배지의 비율은 1: 20 임), 혼합물을 균질하게 혼합한다. 대안적으로는, DMEM 배지 등의 액체 배지를 본 수용액에 원하는 최종 농도가 되도록 파이펫트로 첨가하고 (예를 들어, 최종 농도가 0.03% 인 경우, 0.6% 수용액: 배지의 비율은 1: 20 임), 파이펫팅으로 균일하게 혼합한다. 본 분산액과 배지의 혼합 방법은 특별히 제한은 없고, 예를 들어 파이펫팅 등의 수동 혼합, 또는 자석 교반기, 기계 교반기, 호모믹서 및 호모게나이저 등의 기기를 사용한 혼합을 들 수 있다.

[0140] [배양 방법]

[0141] 본 발명은 또한 상기 언급된 본 발명의 배지 조성물을 사용하여, 세포 또는 조직을 증식시키는 배양 방법, 수득되는 세포 또는 조직을, 예를 들어 여과, 원심 또는 자성 분리에 의해 회수하는 방법, 및 본 발명의 배지 조성물을 사용하여, 스피어를 제조하는 방법도 제공한다.

[0142] 본 발명에서 사용되는 나노섬유는, 세포 및/또는 조직을 생체외에서 배양했을 때, 당해 세포 및/또는 조직을, 당해 나노섬유를 함유하는 액체 중에서 현탁시키는 효과 (바람직하게는 현탁 정치시키는 효과) 를 나타낸다. 당해 현탁 효과에 의해, 단층 배양에 비해, 제시된 부피 당 세포 및/또는 조직의 양을 좀더 증가시켜 배양하는 것이 가능하다. 또, 종래의 현탁 배양 방법이 회전이나 진탕 조작을 수반하는 경우, 세포 및/또는 조직에 대한 전단력이 작용하기 때문에, 세포 및/또는 조직의 증식율이나 회수율이 낮아지고, 또는 세포의 기능이 손상될 수 있다. 나노섬유를 함유하는 본 발명의 배지 조성물을 사용하는 것은 진탕 등의 조작을 실시하지 않고 세포 및/또는 조직을 균일하게 분산할 수 있으며, 목적으로 하는 세포 및/또는 조직을 세포 기능의 손실 없이 용이하게 대량으로 수득할 수 있다. 또한, 종래의 겔 기질을 함유하는 배지에서 세포 및/또는 조직을 현탁 배양할 때, 세포 및/또는 조직의 관찰 및 회수가 종종 곤란하고, 회수 동안 그 기능이 종종 손상되는 경우가 있다. 그러나, 본 발명의 나노섬유를 함유하는 배지 조성물을 사용하여, 세포 및/또는 조직을 현탁 배양에 적용하고, 그 기능을 손상 없이 관찰하고, 회수할 수 있다. 또한, 겔 기질을 함유하는 종래의 배지는, 종종 점도가 높고 배지의 교환을 곤란하게 할 수 있다. 그러나, 본 발명의 나노섬유를 함유하는 배지 조성물은, 저점도이기 때문에, 파이펫, 펌프 등을 사용하여 용이하게 배지를 교환할 수 있다.

[0143] 본 발명의 방법에 의해 배양된 인간 유래의 세포 및/또는 조직은, 질환 또는 장해를 갖는 환자에 대해 치료 목적에서 이식할 수 있다. 이 경우, 치료 표적 질환, 장해의 종류, 전 처치 방법 및 세포 이식 방법은, 당업자에 의해 적절히 선택된다. 수령자 내의 이식된 세포의 생착, 질환 또는 장해로부터의 회복, 이식에 수반하는 부작용의 유무, 및 치료의 효과는, 이식 치료에 있어서의 일반적인 방법에 의해 적절히 검사되고 판단된다.

[0144] 게다가 세포 및/또는 조직이 효율적으로 증식되기 때문에, 본 발명의 배지 조성물은 세포의 연구용 시약으로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 세포 및 조직의 분화 및 증식을 조절하는 인자를 해명할 때, 세포와 목적의 인자를 공존시켜 배양했을 때의 세포의 수 및 종류, 및 세포 표면 분화 마커 및 발현 유전자의 변화를 분석한다. 이 경우, 본 발명의 배지 조성물을 사용하는 것은 분석 표적 세포의 수를 효율적으로 증폭할 수 있을 뿐 아니라, 효율적으로 회수할 수 있다. 목적으로 하는 인자를 해명할 때의 배양 조건, 배양 장치, 배지의 종류, 본 발명 나노섬유의 종류, 나노섬유의 함량, 첨가제의 종류, 첨가제의 함량, 배양 기간, 배양 온도 등은, 본 명세서에 기재한 범위로부터 당업자에 의해 적절히 선택된다. 배양에 의해 증식 또는 출현한 세포는, 당해 분야에서 표준 현미경을 사용하여 관찰할 수 있다. 이 경우, 배양한 세포를 특이적 항체를 사용하여 염색할 수 있다. 목적의 인자로 인해 변화한 발현 유전자는, 배양한 세포로부터 RNA (리보 핵산) 를 추출해 노던 블롯팅법, RT-PCR 법 등에 의해 검출할 수 있다. 또한, 세포 표면 분화 마커는, 특이적 항체를 사용하여 ELISA 및 유세포 분석법에 의해 검출되고, 목적의 인자에 의한 분화 및 증식에 대한 효과를 관찰할 수 있다.

[0145] 본 발명의 배지 조성물을 사용하여 세포 및/또는 조직이 효율적으로 증식되기 때문에, 본 발명의 배양 방법은 세포 및/또는 조직의 증식 방법 또는 세포 및/또는 조직의 증식 촉진 방법으로서 우수하다. 본 발명의 배지 조성물을 사용하여 세포 및/또는 조직을 배양하는 경우, 세포 및/또는 조직은 배양 용기에 부착하지 않고, 또는 배양 용기의 저면에만 편재하지 않고, 삼차원적으로 확대하면서 분산해, 증식이 촉진된다. 특히, 나노섬유로서 키틴 나노섬유를 사용하는 경우, 세포가 키틴 나노섬유에 부착하고, 그곳으로부터 스캐폴드로서 강력하게

증식한다. 그 결과, 증식된 세포, 세포 덩어리 (스피어 등) 및/또는 조직이, 나노섬유 상에 포도 송이처럼 연결된다. 이 증식 촉진 효과에는, 세포 및/또는 조직을 현탁시키는 (즉, 세포 및 조직의 배양 용기에 대한 부착을 회피하는) 것에 충분한 농도의 나노섬유의 배지 조성물 중에의 존재를 필요로 하고, 현탁 정치 (즉, 외부로부터의 압력, 진동, 진탕, 회전 조작 등을 수반하지 않고 세포 및/또는 조직이 액체 배지 조성물 중에서 균일하게 분산되고 또한 현탁 상태로 있는 것) 능력은 필수적인 것은 아니다. 예를 들어, 키틴 나노섬유의 경우, 현탁 작용 발현에 충분한, 0.0001% (중량/부피) 이상의 농도가 달성되기만 하면, 안정적인 현탁 정치 배양을 가능하게 하는 0.03% (중량/부피) 미만의 농도 (예, 0.025% (중량/부피) 이하, 0.02% (중량/부피) 이하) 로서도, 증식 촉진 효과가 제공된다. 미결정 셀룰로오스 나노섬유의 경우, 현탁 작용 발현에 충분한 0.01% (중량/부피) 이상이면, 안정적인 현탁 정치 배양을 가능하게 하는 0.03% (중량/부피) 미만의 농도 (예, 0.025% (중량/부피) 이하, 0.02% (중량/부피) 이하) 로서도, 증식 촉진 효과가 제공된다. 탈아실화 젤란 검의 경우, 현탁 작용 발현에 충분한 0.005% (중량/부피) 이상이면, 안정적인 현탁 정치 배양을 가능하게 하는 0.01% (중량/부피) 미만의 농도 (예, 0.009% (중량/부피) 이하, 0.008% (중량/부피) 이하) 로서도, 증식 촉진 효과가 제공된다.

[0146] 나노섬유 중 에서도, 특히 키틴 나노섬유는, 세포 증식 촉진 효과가 우수하다.

[0147] 본 발명의 배양 방법에 있어서는, 비-부착 세포 및 부착 세포 둘 다 사용할 수 있다. 부착 세포는, 성장 및 증식을 위해 스캐폴드를 필요로 한다. 비-부착 세포는, 성장 및 증식을 위해 스캐폴드를 필요로 하지 않는다. 본 발명의 배양 방법에 있어서는, 바람직하게는 부착 세포가 사용된다. 본 발명의 방법에 부착 세포가 사용되는 경우, 부착 세포는 배양 용기의 저면에 부착하지 않고 배양 용기의 저면에만 편재하지 않으면서, 삼차원적으로 확대하면서 분산되고, 나노섬유에 부착한 상태로, 또는 스피어 상태로 증식한다. 특히, 키틴 나노섬유가 나노섬유로서 사용되는 경우, 세포가 키틴 나노섬유에 부착하고, 그곳으로부터 스캐폴드로서 강력하게 증식한다. 그 결과, 증식된 세포, 세포 덩어리 (스피어 등) 및/또는 조직이 나노섬유 상에 포도 송이처럼 연결된다. 따라서, 부착 세포의 현탁 배양이 수행될 수 있다. 또한, 그 결과, 배양 용기의 저면에 부착시킨 상태로 배양했을 경우보다, 부착 세포의 증식이 촉진될 수 있다. 또, 배양 용기의 저면에 부착시킨 상태로 배양했을 경우보다, 높은 밀도로 부착 세포를 배양할 수 있다.

[0148] 본 발명의 배양 방법에 있어서는, 부착 세포의 현탁 배양을 수행할 수 있으므로, 본 발명의 배양 방법에 의해 부착 세포를 현탁 배양한 후, 배양 용기로부터의 세포의 박리 조작을 필요로 하는 일 없이, 신선한 본 발명의 배지 조성물을 배양 후의 배양물에 단순히 첨가함으로써, 또는 신선한 본 발명의 배지 조성물에, 배양 후의 배양물의 전부 또는 일부를 첨가함으로써 부착 세포를 계대할 수 있다. 본 발명은 또한 이와 같은 부착 세포의 계대 배양 방법도 제공한다. 따라서, 본 발명의 계대 배양 방법을 사용하여, 부착 세포를 배양 용기로부터의 세포의 박리 조작을 실시하는 일 없이, 계대 배양할 수 있다. 게다가, 본 발명의 계대 배양 방법을 사용하면, 배양 용기로부터의 세포의 박리 조작을 실시하는 일 없이, 부착 세포의 배양 스케일을 확대할 수가 있다. 배양 용기로부터의 세포의 박리 조작으로서는, 킬레이트제 (예, EDTA) 및/또는 프로테아제 (예, 트립신, 콜라게나아제) 에 의한 처리가 언급될 수 있다. 본 발명의 계대 배양 방법은, 배양 용기로부터의 세포의 박리 조작에 감수성이 높은 부착 세포 (예를 들어, 박리 조작에 의해 생존성이 저하하는 부착 세포, 박리 조작에 의해 형질이 변하기 쉬운 부착 세포) 의 계대 배양에 유리하다. 배양 용기로부터의 세포의 박리 조작에 감수성이 높은 부착 세포의 예로서는, 인간 다능성 줄기 세포; 인간 선구 세포; 간세포, 신장 세포, 연골 세포, 혈관 세포 및 지방세포 등의 조직으로부터 제조되는 일차 세포; MDCK 세포, HEK293 세포 및 CHO 세포 등의 생물 의약품 (의약품용 단백질) 의 생산 세포 등이 포함되나, 이들로 한정되지 않는다.

[0149] 본 발명의 배지 조성물을 사용하여, 높은 밀도로 부착 세포를 배양할 수 있고, 세포 및/또는 조직을 효율적으로 증식시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 배양 방법은, 시험관 내 세포 배양에 의한 유용 물질의 생산에 유용하다. 유용 물질을 생성하는 세포를, 본 발명의 배지 조성물 중에서 현탁 배양에 적용하고, 배양물로부터 유용 물질을 단리함으로써, 당해 유용 물질(들) 을 얻을 수 있다. 유용 물질의 예로서는, 항체, 효소 (우로키나아제 등), 호르몬 (인슐린 등), 사이토카인 (인터페론, 인터류킨, 종양 괴사 인자, 콜로니 촉진제, 성장 인자 등), 백신 항원, 및 그 밖의 생리 활성 물질 (단백질, 펩티드 등) 이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.

유용 물질을 생성하는 세포에는, 피부 세포, 연골 세포, 간세포, 췌장 세포, 신장 세포 등의 비형질전환 세포, 및 유용 물질을 코딩하는 유전자, 또는 유용 물질의 생합성에 관여하는 유전자를 도입한 형질전환 세포가 포함된다. 유용 물질을 생성하는 세포는, 부착 세포 또는 비-부착 세포일 수 있고, 바람직하게는 부착 세포이다. 유용 물질을 생성하는 세포는, 바람직하게는 유용 물질을 세포외로 분비한다. 유용 물질을 생성하는 세포의 구체적 예로는, 유용 물질을 코딩하는 유전자 또는 유용 물질의 생합성에 관여하는 유전자를 도입

한, HEK293, CHO-K1, BHK-21, MDCK, Vero, HepG2, MCF-7 등을 들 수가 있지만, 이들로 한정되지 않는다. 재조합 단백질 등의 유용 물질의 생산에 사용되는 세포는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 이러한 세포가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 배양 스케일은 본 발명의 상기 언급된 계대 배양 방법에 의해 부착 세포의 현탁 배양 후, 배양 용기로부터의 세포의 박리 조작을 실시하는 일 없이, 신선한 본 발명의 배지 조성물을 배양 후의 배양물에 첨가함으로써, 또는 신선한 본 발명의 배지 조성물에, 배양 후의 배양물의 전부 또는 일부를 첨가함으로써 확대될 수 있다. 유용 물질을 배양물로부터 단리하기 위해서, 배양물로부터 세포를 제거할 필요가 있다. 본 발명의 배지 조성물의 점도가 나노섬유의 첨가에 의해 실질적으로 증가되지 않고, 또 세포가 배지 조성물 중에 현탁하고 있기 때문에, 원심분리, 여과 처리 등의 편리한 방법에 의해 세포를 제거할 수 있다. 또한, 배지 조성물 중의 나노섬유도, 원심분리, 여과 처리 등의 편리한 방법으로 제거할 수 있다. 유용 물질을 배양물로부터 단리하는 방법은 당업자에게 잘 공지되어 있으며, 예를 들어 크로마토그래피 (예, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피 등의 크로마토그래피) 등의, 생리 활성 물질의 생화학적인 분리 및 정제 방법을 적용할 수 있다.

[0150] 본 발명의 배양 방법을 사용하여 세포 및/또는 조직을 배양하는 경우에는, 세포의 배양에 일반적으로 사용되는 배양 도구, 예컨대 샬레, 플라스크, 비닐팩, 테플론 (등록상표) 백, 디쉬, 샬레, 조직배양용 디쉬, 멀티디쉬, 마이크로플레이트, 마이크로웰 플레이트, 멀티플레이트, 멀티웰 플레이트, 챔버 슬라이드, 튜브, 트레이, 배양백, 롤러 보틀 등을 배양에 사용할 수 있다. 이들의 배양 도구의 재질은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 유리, 폴리비닐 클로라이드, 셀룰로오스 계 폴리머, 폴리스티렌, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리카보네이트, 폴리술폰, 폴리 우레탄, 폴리에스테르, 폴리아미드, 폴리스티렌, 폴리프로필렌 등의 플라스틱 등이 언급될 수 있다. 게다가, 이들의 플라스틱에 대해 여러 가지의 표면 처리 (예를 들어, 플라즈마 처리, 코로나 처리 등) 를 적용할 수 있다. 더욱, 이들의 배양 도구는, 미리 세포외 매트릭스, 세포 부착 분자 등으로 코팅될 수 있다. 이와 같은 코팅 재료의 예로서는, 콜라겐 I 내지 XIX, 파이브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌-1 내지 12, 니토젠, 테나신, 트롬보스폰딘, 폰 빌레브란트 (von Willebrand) 인자, 오스테오폰틴, 피브리노겐, 각종 엘라스틴, 각종 프로테오글리칸, 각종 카드헤린, 데스모콜린, 데스모글레인, 각종 인테그린, E-셀렉틴, P-셀렉틴, L-셀렉틴, 면역글로블린, 히알루론산, 슈퍼패밀리, 매트리겔, 폴리-D-라이신, 폴리-L-라이신, 키틴, 키토산, 세파로스, 알긴산 겔, 하이드로겔, 이들의 절단 단편 등을 들 수 있다. 유전자 재조합 기술에 의해 아미노산 배열을 인위적으로 개변시킨 이들 코팅 재료도 사용할 수 있다. 또, 세포 및/또는 조직의 배양 도구에 대한 부착을 저해하기 위한 코팅 재료를 사용할 수도 있다. 이와 같은 코팅 재료의 예로서는, 실리콘, 폴리(2-하이드록시메틸메타크릴레이트), 폴리(2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴 콜린) 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0151] 세포 및/또는 조직의 배양은, 기계적 제어 하에, 폐쇄 환경 하에서 세포 파종, 배지 교환, 세포 이미지 취득, 및 배양 세포 회수를 자동으로 실행함으로써, pH, 온도, 산소 농도 등을 제어하면서, 고밀도에서의 배양이 가능한 바이오리액터 (bioreactor) 나 자동 배양장치에 의해 실시할 수도 있다. 이들의 장치를 사용하여 배양 도중에 새로운 배지를 제공하고, 요구하는 물질을 세포 및/또는 조직에 공급하는 방법으로서, 공급-배치 배양, 연속 배양 및 관류 배양이 이용가능하고, 상기 모든 방법을 본 발명의 배양 방법으로 사용할 수 있다.

[0152] 본 발명의 방법으로 배양되는 세포 및/또는 조직의 형태나 상태를 당업자는 자유롭게 선택할 수 있다. 그 바람직한 구체적 예는 특별히 제한되는 것은 아니지만, 세포 및/또는 조직이 단독으로 배지 조성물 중에 분산한 상태, 세포 및/또는 조직이 담체 표면에 부착한 상태, 세포 및/또는 조직이 담체 내부에 포매된 상태, 복수의 세포가 집합하고 세포 응집물 (스피어) 를 형성한 상태, 또는 2종 이상의 세포가 집합하고 세포 응집물 (스피어) 을 형성한 상태 등을 포함한다. 더 바람직한 것은 세포 및/또는 조직이 담체 표면상에 부착한 상태, 세포 및/또는 조직이 담체 내부에 포매된 상태, 복수의 세포가 집합하고 세포 응집물 (스피어) 을 형성한 상태, 및 2종 이상의 세포가 집합하고 세포 응집물 (스피어) 을 형성한 상태이다. 더욱 바람직한 것은 세포 및/또는 조직이 담체 표면 상에 부착한 상태, 복수의 세포가 집합하고 세포 응집물 (스피어) 을 형성한 상태, 및 2종 이상의 세포가 집합하고 세포 응집물 (스피어) 을 형성한 상태이다. 이러한 상태 중 세포 응집물 (스피어) 을 형성한 상태는, 생체내 환경의 것과 근접한 세포-세포 상호작용 및 세포 구조체가 재구축되고, 세포 기능을 유지한 채로 장기간 배양이 수행될 수 있고, 또한 세포 회수가 상대적으로 용이하기 때문에, 본 발명의 배양 방법으로 배양되는 가장 바람직한 상태로서 언급될 수 있다.

[0153] 세포 및/또는 조직을 표면 상에 지지하기 위한 담체로서, 다양한 중합체로 구성된 마이크로담체 및 유리 비이드, 세라믹 비이드 등을 들 수 있다. 중합체의 예로서, 비닐 수지, 우레탄 수지, 에폭시 수지, 폴리스티렌, 폴리메틸메타크릴레이트 폴리에스테르, 폴리아미드, 폴리이미드, 실리콘 수지, 페놀 수지, 멜라민 수지,

우레아 수지, 아닐린 수지, 아이오노머 수지, 폴리카르보네이트, 콜라겐, 덱스트란, 젤라틴, 셀룰로오스, 알기네이트 및 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다. 담체는 세포 부착을 향상시키거나 세포로부터의 물질의 방출을 향상시키는 화합물로 코팅될 수 있다. 상기 코팅 물질의 예로서, 폴리(모노스테아로일글리세리드 코-숙신산), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드, 나트륨 히알루로네이트, n-이소프로필아크릴아미드, 콜라겐 I 내지 XIX, 파이브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌-1 내지 12, 니토젠, 테나신, 트롬보스폰딘, 폰 빌레브란트 (von Willebrand) 인자, 오스테오폰틴, 피브리노겐, 각종 엘라스틴, 각종 프로테오글리칸, 각종 카드헤린, 데스모콜린, 데스모글레인, 각종 인테그린, E-셀렉틴, P-셀렉틴, L-셀렉틴, 면역글로블린 슈퍼패밀리, 매트리겔, 폴리-D-라이신, 폴리-L-라이신, 키틴, 키토산, 세파로오스, 알긴산 겔, 각종 하이드로 겔, 또한 이의 절단 분절 등을 들 수 있다. 여기서, 2종 이상의 코팅 물질이 조합될 수 있다. 또한, 세포 및/또는 조직을 표면상에 지지하는 담체의 배양에 사용되는 배지와, 구아검, 타마린드 검, 로커스트 빈 검, 아라비아 검, 타라 검, 타마린드 검, 메틸셀룰로오스 등의 다당류 1종 이상이 또한 혼합될 수 있다. 또한 담체는 자성 물질, 예를 들어 페라이트를 함유할 수 있다. 담체의 직경은 수 십 ㎛ 내지 수 백 ㎛, 보다 바람직하게는 100 ㎛ 내지 200 ㎛ 이며, 그 비중은 1 에 가까운 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 0.9 ~ 1.2, 특히 바람직하게는 약 1.0 이다. 담체의 예는, 이것에 한정되는 것은 아니지만, Cytodex 1 (등록상표), Cytodex 3 (등록상표), Cytoline1 (등록상표), Cytoline2 (등록상표), Cytopore1 (등록상표), Cytopore2 (등록상표), (이상, GE Healthcare Life Sciences), Biosilon (등록상표) (NUNC), Cultispher-G (등록상표), Cultispher-S (등록상표) (이상, Thermo SCIENTIFIC), HILLEXCT (등록상표), ProNectinF-COATED (등록상표), 및 HILLEXII (등록상표) (Solo Hill Engineering) 등을 포함한다. 담체는 필요에 따라 멸균 처리될 수 있다. 멸균 방법은 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 방사선 멸균, 에틸렌 옥사이드 가스 멸균, 오토클레이브 멸균 및 건열 멸균 등이 언급될 수 있다. 담체를 사용하여 동물 세포를 배양하는 방법은 특별히 제한되지 않고, 통상적인 유동층형 배양 용기 또는 충전층형 배양 용기를 사용하는 배양 방법 등이 사용될 수 있다. 이 때, 세포 및/또는 조직을 표면 상에 지지시키고, 본 발명의 나노섬유를 포함하는 배지 조성물을 사용하는 담체는 심지어 진탕 등의 조작을 실시하지 않고 균일한 분산을 가능하게 한다. 그 결과, 목적으로 하는 세포 및/또는 조직을 세포 기능의 손실 없이 배양할 수 있다. 이러한 방법에 의해 배양된 세포 및/또는 조직은, 세포 및/또는 조직이 배양 후에 담체에 의해 지지된 채로 원심분리 및 여과 처리를 수행함으로써 수집될 수 있다. 이 경우, 사용된 액체 배지의 첨가 후 원심분리 및 여과 처리를 실시할 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, 원심 분리의 중력 가속도 (G) 는 100 G 내지 400 G 이며, 여과 처리에 사용되는 필터의 공극 크기는 10 ㎛ 내지 100 ㎛ 이다. 또한, 담체에 페라이트 등의 자성을 갖는 재료를 캡슐화함으로써 자성력에 의해 배양 담체를 회수할 수 있다.

이러한 방법에 의해 배양된 세포 및/또는 조직은, 각종 킬레이트제, 열 처리 또는 효소를 사용하여 담체로부터 배출시킴으로써 수집될 수 있다.

[0154] 세포 및/또는 조직을 담체 내부에 포매할 때, 다양한 중합체로 구성된 물질을 담체로서 선택할 수 있다. 상기 중합체의 예로서, 콜라겐, 젤라틴, 알기네이트, 키토산, 아가로오스, 폴리 글리콜산, 폴리락트산, 피브린 접착제, 폴리락트산-폴리글리콜산 공중합체, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸, 폴리우레탄 폼 등의 스펀지, DseA-3D (등록상표), 폴리 N-치환 아크릴아미드 유도체, 폴리 N-치환 메타크릴아미드 유도체 및 이들의 공중합체, 폴리비닐 메틸에테르, 폴리프로필렌 옥사이드, 폴리에틸렌 옥사이드, 부분적으로 아세트화된 폴리(비닐 알코올) 과 같은 온도 감응성 중합체, 폴리아크릴아미드, 폴리(비닐 알코올), 메틸셀룰로오스, 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스 부티레이트, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리(2-히드록시에틸메타크릴레이트)/폴리카프로락톤 등의 하이드로 겔이 언급될 수 있다. 또한, 이러한 중합체를 2종 이상 사용하여 세포를 포매하기 위한 담체를 제조할 수 있다. 또한, 담체는 이러한 중합체 이외에 생리 활성 성분을 가질 수 있다. 생리 활성 성분의 예로서, 세포 성장 인자, 분화 유도 인자, 세포 부착 인자, 항체, 효소, 사이토카인, 호르몬, 렉틴, 세포외 매트릭스 등을 들 수 있고, 이들 복수가 또한 함유될 수 있다. 게다가, 구아검, 타마린드 검, 알긴산 프로필렌 글리콜 에스테르, 로커스트 빈 검, 아라비아 검, 타라 검, 메틸셀룰로오스 등의 증점제 1 종 이상을 또한 세포 및/또는 조직을 포매하는 담체의 배양에 사용되는 배지와 혼합할 수 있다.

[0155] 이들의 담체에 세포 및/또는 조직을 포매시키는 방법은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 세포와 상기 중합체의 혼합물을 주사기에 흡인하고, 대략 25 G ~ 19 G 의 주사 바늘로부터 이들을 배지에 적하하거나, 또는 마이크로파이펫을 사용하여 배지에 적하하는 등을 포함하는 방법을 사용할 수 있다. 여기서 형성되는 비이드-유사 담체의 크기는, 세포와 상기 중합체의 혼합물을 적하 첨가할 때에 사용하는 도구의 선단의 형상에 의해 결정되며, 이것은 바람직하게는 수 십 ㎛ 로부터 수 천 ㎛, 보다 바람직하게는 100 ㎛ 에서 2000 ㎛ 이다. 비이드-유사 담체 상에 배양할 수 있는 세포 수는 특별히 제한되지 않지만, 이 비이드 크기에 따라 자유롭게 선택될 수 있다. 예를 들어, 직경 약 2000 ㎛ 의 비이드-유사 담체 내에, 500 만개의 세포를 포매할 수 있다.

담체 내에서, 세포는 단일 분산되거나 복수 개의 세포가 집합하여 세포 덩어리를 형성할 수 있다. 이 때, 본 발명의 나노섬유를 포함하는 배지 조성물을 사용하여 세포 및/또는 조직을 포매시킨 담체가, 심지어 교반 등의 조작을 실시하지 않고 균일하게 분산할 수 있다. 그 결과 목적으로 하는 세포 및/또는 조직을 세포 기능의 손실 없게 배양할 수 있다. 본 방법에 의해 배양된 세포 및/또는 조직은, 세포 및/또는 조직이 배양 후에 담체에 포매한 상태로 원심분리 및 여과 처리에 의해 수집될 수 있다. 이 경우, 사용한 액체 배지를 첨가한 이후 원심분리 및 여과 처리가 수행될 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, 원심분리의 중력 가속도 (G)는 100 G 내지 400 G 이며, 여과 처리에 사용된 필터의 공극 크기는 10 ㎛ 내지 100 ㎛ 이다. 이러한 방법에 의해 배양된 세포 및/또는 조직은 각종 킬레이트제, 열, 효소 등을 사용한 처리에 의해 담체를 분해함으로써 이를 분산시켜 수집될 수 있다.

[0156] 세포 응집물 (스피어) 을 형성하는 방법은 특별히 제한되지 않고, 당업자가 적절히 선택할 수 있다. 그 예는 세포 비-부착 표면을 갖는 용기를 사용한 방법, 현적 방법 (hanging drop method), 선회 배양법, 3차원 스캐폴드법, 원심분리법, 전기장 또는 자기장에 의한 응집을 사용한 방법 등을 포함한다. 예를 들어, 세포 비-부착 표면을 갖는 용기를 사용한 방법을 사용하여, 목적으로 하는 세포를 세포 부착을 저해하는 표면 처리가 적용된 배양 용기 중에서 배양하여, 스피어를 형성시킬 수 있다. 상기 세포 비-부착성 배양 용기를 사용하는 경우, 먼저 목적으로 하는 세포를 수집하고, 그 세포 현탁액을 제조하고, 배양 용기 중에 파종하여 배양을 수행한다. 약 1 주 동안 배양이 계속되는 경우, 세포는 자발적으로 스피어를 형성한다. 여기서 사용하는 세포 비-부착성 표면으로서, 일반적으로 사용된 샬레 등의 배양 용기의 표면 (이는 세포 접착을 저해하는 물질로 코팅됨 등) 을 사용할 수 있다. 상기 물질의 예는, 아가로오스, 한천, 폴리-HEMA(폴리-(2-하이드록시-에틸메타크릴레이트)2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴 콜린 및 다른 모노머(예를 들어 부틸 메타크릴레이트 등) 의 공중합체 등을 포함한다. 세포 독성이 부재하는 경우, 성분이 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0157] 세포 응집물 (스피어) 을 형성하는 방법으로서, [NATURE BIOTECHNOLOGY, VOL. 28, NO. 4, APRIL 2010, 361-366, NATURE PROTOCOLS, VOL. 6, NO. 5, 2011, 689-700], [NATURE PROTOCOLS, VOL. 6, NO. 5, 2011, 572-579, Stem Cell Research, 7, 2011, 97-111], [Stem Cell Rev and Rep, 6, 2010, 248-259] 등에 기재된 방법을 또한 사용할 수 있다.

[0158] 또한, 스피어를 형성하는 배양에 사용된 배지는 또한 스피어의 형성을 촉진시키거나 이의 유지를 촉진시키는 성분을 함유할 수 있다. 상기 효과를 갖는 성분의 예는, 디메틸 술폭시드, 슈퍼옥사이드 디스무타아제, 카에룰로플라스민, 카탈라아제, 퍼옥시다아제, L-아스코르브산, L-아스코르브산 포스페이트 에스테르, 토코페롤, 플라보노이드, 요산, 빌리루빈, 셀레늄-함유 화합물, 트랜스페린, 불포화 지방산, 알부민, 테오필린, 포르스콜린, 글루카곤, 디부티릴 cAMP, Y27632, Fasudil (HA1077), H-1152, Wf-536 등의 ROCK 저해제 등을 들 수 있다. 셀레늄-함유 화합물로서는 나트륨 셀레나이트, 나트륨 셀레네이트, 디메틸 셀레나이드, 수소 셀레나이드, 셀레노메티오닌, Se-메틸셀레노시스테인, 셀레노시스티오닌, 셀레노시스테인, 셀레노호모시스테인, 아데노신-5'-트리포스포르산, Se-아데노실셀레노메티오닌을 언급할 수 있다. 목적으로 하는 균일한 크기의 세포 응집물을 얻기 위해, 사용되는 세포 비-부착성 배양 용기 상에 목적으로 하는 세포 응집물과 동일한 직경을 갖는 복수의 함몰부가 또한 도입될 수 있다. 이러한 함몰부는 서로 접촉하고 있거나 목적으로 하는 세포 응집물의 직경 범위 이내이고 세포가 파종된 경우, 파종한 세포는 함몰부 사이에 세포 응집물를 형성하지 않지만 확실히 함몰부 내에 그 부피에 해당하는 크기를 갖는 세포 응집물을 형성하여 균일한 크기의 세포 응집물 집단을 얻는다. 이 때의 함몰부의 형상으로서는 반구 또는 원뿔형이 바람직하다.

[0159] 대안적으로, 세포 부착성을 나타내는 지지체 기반의 스피어가 또한 형성될 수 있다. 상기 지지체의 예는 콜라겐, 폴리로탁산, 폴리락트산 (PLA), 폴리락트산 글리콜산 (PLGA) 공중합체, 하이드로겔 등을 포함한다.

[0160] 또한, 피더 세포와 공동-배양함으로써 스피어가 또한 형성될 수 있다. 스피어 형성을 촉진시키기 위한 피더 세포로서, 임의의 부착성 세포가 사용될 수 있다. 바람직하게는 각종 세포를 위한 피더 세포가 바람직하다. 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 간 또는 연골로부터 유래된 세포의 스피어가 형성되는 경우, 피더 세포의 예는 COS-1 세포 및 혈관내 내피 세포를 바람직한 세포 유형으로서 포함한다.

[0161] 게다가 본 발명의 나노섬유를 함유하는 배양 조성물을 사용하여 스피어를 형성시킬 수도 있다. 이 경우, 당해 나노섬유의 농도가, 세포의 현탁 배양 (바람직하게는 현탁 정치 배양) 을 가능하게 하는 농도가 되도록, 당해 나노섬유를 스피어 형성 시에 사용하는 배지 안에 첨가하는 것이 필요하다. 예를 들어, 당해 나노섬유의 농도가, 통상 0.0001% 내지 1.0% (중량/부피), 예를 들어 0.0005% 내지 1.0% (중량/부피), 바람직하게는 0.001% 내지 0.3% (중량/부피), 보다 바람직하게는 0.005% 내지 0.1% (중량/부피), 더욱 바람직하게는 0.01%

내지 0.05% (중량/부피) 가 되도록, 당해 나노섬유를 스피어 형성 시에 사용하는 배지 안에 첨가하는 것이 필요하다. 스피어는, 당해 나노섬유를 함유하는 배지 안에 목적으로 하는 세포를 균일하게 분산시켜, 3 일 내지 10 일 동안 이들을 정치시켜 배양되도록 함으로써 조제된다. 여기서 조제된 스피어는, 원심분리 및 여과 처리에 의해 회수될 수 있다. 예를 들어, 원심분리의 중력 가속도 (G) 는 100G 내지 400 G 이며, 여과 처리에 사용되는 필터의 공극의 크기는 10 ㎛ 내지 100 ㎛ 이지만, 이들에 제한되지 않는다. 또, 목적으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 항체를 표면 상에 코팅한 자성 미립자를 사용하여, 배양한 스피어를 자력에 의해 회수할 수 있다. 이 같은 자성 미립자의 예로서는, Dynabeads (Veritas Ltd. 사제), MACS 마이크로비이드 (Miltenyi Biotec 사제), BioMag (Techno Chemicals Corporation 사제) 등을 들 수 있다.

[0162] 스피어의 크기는, 세포 유형 및 배양 기간에 따라 변화하고, 특별히 한정되지 않는다. 이것이 구형 또는 타원형인 경우, 그 직경은 20 ㎛ 내지 1000 ㎛, 바람직하게는 40 ㎛ 내지 500 ㎛, 보다 바람직하게는 50 ㎛ 내지 300 ㎛ 이다.

[0163] 상기 스피어는 정치 배양을 계속함으로써 10 일 이상, 바람직하게는 13 일 이상, 더욱 바람직하게는 30 일 이상의 기간 동안 증식 수용력을 유지할 수 있다. 정치 배양 동안 정기적으로 기계적 분할 또는 단세포-형성 처리 및 응집을 추가 수행함으로써, 실질적으로 무기한으로 증식 수용력을 유지할 수 있다.

[0164] 스피어의 배양에 사용되는 배양 용기는 일반적으로 동물 세포의 배양을 허용하는 한 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 플라스크, 디쉬, 샬레, 조직 배양 디쉬, 멀티디쉬, 마이크로플레이트, 마이크로웰 플레이트, 멀티플레이트, 멀티 웰 플레이트, 챔버 슬라이드, 샬레, 튜브, 트레이, 배양 백, 롤러 보틀 등을 들 수 있다.

[0165] 스피어의 정치 배양에 사용되는 배지는, 세포 부착 인자를 함유할 수 있고, 그 예로서는, 매트리겔, 콜라겐 겔, 젤라틴, 폴리-L-라이신, 폴리-D-라이신, 라미닌 및 파이브로넥틴을 들 수 있다. 이들의 세포 부착 인자는, 2 종류 이상을 조합하여 첨가할 수도 있다. 게다가, 스피어의 배양에 사용되는 배지를 구아검, 타마린드 검, 알긴산 프로필렌 글리콜 에스테르, 로커스트 빈 검, 아라비아 검, 타라 검, 메틸셀룰로오스 등의 증점제와 혼합할 수 있다.

[0166] 본 발명의 나노섬유를 포함하는 배지 조성물을 사용하면, 심지어 진탕 등의 조작을 실시하지 않고 배양액 중에 균일한 분산을 제공할 수 있다. 그 결과, 목적으로 하는 세포 및/또는 조직을 세포 기능의 손실 없이 스피어로서 배양할 수 있다. 이러한 방법에 의해 정치 배양된 스피어는 배양 후에 원심분리 또는 여과 처리를 실시함으로써 수집될 수 있다. 이 경우, 사용된 액체 배지를 첨가한 후, 원심분리 또는 여과 처리를 실시할 수 있다. 예를 들어, 원심분리의 중력 가속도 (G) 는 100 G 내지 400 G 이며, 여과 처리에 사용되는 필터의 공극의 크기는 10 ㎛ 내지 100 ㎛ 이지만, 이들에 제한되지 않는다. 또한, 목적으로 하는 세포에 특이적에 결합하는 항체에 의해 표면 상에서 코팅된 자성 미립자를 사용하여, 자성력에 의해 배양된 스피어를 회수할 수 있다. 상기 자성 미립자의 예는, Dynabeads (Veritas Ltd. 사제), MACS 마이크로비이드 (Miltenyi Biotec 사제), BioMag (Techno Chemicals Corporation 사제) 등을 들 수 있다. 회수된 스피어는 각종 킬레이트제, 열, 필터, 효소 등에 의한 처리에 의하여 추가 분해됨으로써 단일 세포로서 분산될 수 있다.

[0167] 식물 유래의 세포 및/또는 조직을 정치 배양하는 방법으로서, 미분화 식물 세포 응집물인 유합 조직을 배양할 수 있다. 유합 조직은, 사용하는 각각의 식물 종에 대해 공지된 방법에 의해 유도될 수 있다. 예를 들어, 분화한 식물체의 조직 중 일부 (예를 들어, 뿌리, 줄기, 잎 부분, 종자, 생장점, 배, 화분 등) 의 표면을 필요에 따라 70% 알코올, 1% 하이포아염소산 나트륨 용액 등을 사용하여 멸균하고, 나이프 등을 사용하여 적합한 크기의 조직 부분 (예를 들어, 약 1 ~ 약 5 ㎟ 제곱 면적) 을 자르고, 청정 실험대 등을 사용한 무균 작업에 의해 조직 부분을 미리 멸균한 유합 조직 유도 배지에 파종하고, 적당한 조건 아래에서 무균 배양한다. 여기서 유도된 유합 조직은 대량 증식을 위해 액체 배양에 적용될 수 있거나, 계대 배지 내에 계대 배양함으로써 종자 균주로서 유지할 수 있다. 계대 배양은 액체 배지 및 고형 배지 중 임의의 것을 사용하여 수행할 수 있다.

[0168] 본 발명의 배지 조성물을 사용하여 정치 배양을 개시할 때에 접종되는 식물세포 응집물의 양은, 목적으로 하는 세포의 증식 속도, 배양 방식 (배치식 배양, 공급-배치식 배양, 연속식 배양 등), 배양 기간 등에 따라 변동한다. 예를 들어, 유합 조직 등의 식물 세포 응집물를 배양하고자 하는 경우, 본 발명의 배지 조성물에 대한 세포 응집물의 습식 중량이 4 ~ 8 (중량/부피(w/v))%, 바람직하게는 5 ~ 7 (w/v)% 가 되도록 본 발명의 배지 조성물에 접종된다. 배양 동안 식물 세포 응집물의 입자 크기는 3 ㎜ 내지 40 ㎜, 바람직하게는 3 ㎜ 내지 20 ㎜, 보다 바람직하게는 5 ㎜ 내지 15 ㎜ 이다. 여기서 사용된 바와 같은, "입자 직경" 은 예를 들어 식물 세포 응집물이 구형인 경우 직경을 의미하고, 이것이 타원 구형인 경우 장축을 의미하고, 이것이 기타 형성을

갖는 경우 가능한 최대 길이를 의미한다.

[0169] 세포 및/또는 조직을 배양할 때 온도는 동물 세포의 경우 통상 25 내지 39℃, 바람직하게는 33 내지 39℃ 이다. CO_2 농도는 통상 배양의 분위기 중 4 내지 10 부피% 이고, 4 내지 6 부피% 가 바람직하다. 배양 기간은 통상 3 내지 35 일이고, 배양의 목적에 따라 자유롭게 설정될 수 있다. 식물 세포의 배양 온도는 통상 20 내지 30℃ 이며, 빛이 필요한 경우 이는 조도 2000 ~ 8000 룩스의 조도 조건 아래에서 배양될 수 있다. 배양 기간은 통상 3 내지 70 일인 한편, 이는 배양의 목적에 따라 자유롭게 설정될 수 있다.

[0170] 본 발명 방법에 의해 세포 및/또는 조직을 배양할 때, 본 발명의 배양 조성물에 별도 제조한 세포 및/또는 조직을 첨가하고 혼합하여, 균일한 분산을 산출한다. 이 경우, 혼합 방법은 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 파이펫팅 등을 사용한 수동 혼합, 교반기, 보르텍스 혼합기, 마이크로플레이트 혼합기, 진탕 기계 등의 기기를 사용한 혼합을 들 수 있다. 혼합 이후, 배양 배지는 계속 정치될 수 있거나, 배양 배지는 필요에 따라 배양 배지를 회전, 진탕 또는 교반시킬 수 있다. 회전 수 및 빈도는 당업자의 목적에 따라 적절히 설정될 수 있다. 정치 배양 기간 동안 배지 조성물이 교환될 필요가 있을 때, 원심분리 또는 여과 처리에 의해 세포 및/또는 조직 및 배지 조성물을 분리하고, 새로운 배지 조성물을 세포 및/또는 조직에 첨가할 수 있다. 대안적으로, 원심분리 또는 여과 처리에 의해 세포 및/또는 조직을 적절히 농축하고, 새로운 배지 조성물을 농축액에 첨가할 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, 원심분리의 중력 가속도 (G) 는 100 G 내지 400 G 이며, 여과 처리에 사용되는 필터의 공극의 크기는 10 ㎛ 내지 100 ㎛ 이다. 또한, 목적으로 하는 세포에 특이적에 결합하는 항체에 의해 표면 상에서 코팅된 자성 미립자를 사용하여, 자성력에 의해 배양 세포 및/또는 조직을 분리할 수 있다. 상기 자성 미립자의 예는, Dynabeads (Veritas Ltd. 사제), MACS 마이크로비이드 (Miltenyi Biotec 사제), BioMag (Techno Chemicals Corporation 사제) 등을 포함한다. 배지 조성물의 교환은 또한 기계적 제어 하에 및 폐쇄 환경 하에서 수행될 수 있는 바이오리엑터 (bioreactor) 및 자동 배양 장치에 의해 수행될 수 있다.

[0171] [세포 또는 조직의 보존 또는 수송 방법]

[0172] 부가적으로, 본 발명은 상기 언급된 본 발명의 배지 조성물을 사용하는, 세포 또는 조직을 보존하는 보존 방법 및 수송 방법을 제공한다. 본 발명의 보존 또는 수송 방법에 있어서는, 본 발명의 배지 조성물을 사용함으로써, 세포 및 조직을 현탁 상태로 (바람직하게는, 현탁 정치 상태로), 보존 또는 수송할 수 있다.

[0173] 보존 또는 수송의 표적이 되는 세포 및 조직으로서는, 본 발명의 배지 조성물을 사용한 배양에 사용할 수 있는 세포 및 조직으로서 상기 서술한 것을 들 수가 있다.

[0174] 보존 또는 수송에 사용하는 본 발명의 배지 조성물에는, 상기 서술한 조성에 가세해, 세포 및 조직의 비-동결 상태에서의 보존 시에, 세포 수명-연장 효과가 있는 각종 성분이 포함되어 있어도 된다. 그 성분의 예로서는, 당류 (단, 다당류를 제외함) (예를 들어, 단당류, 이당류), 항산화제 (예를 들어, SOD, 비타민 E 또는 글루타티온), 친수성 중합체 (예를 들어, 폴리비닐피롤리돈), 킬레이트제 (예를 들어, EDTA), 당 알코올 (예를 들어, 만니톨, 소르비톨), 글리세롤 등을 들 수가 있다.

[0175] 본 발명의 보존 또는 수송 방법에 있어서는, 원하는 세포 또는 조직을, 본 발명의 배지 조성물 중에 분산한 다음, 밀봉 가능한 용기 안에 넣는다. 그 용기의 예로서는, 플라스크, 비닐팩, 테플론 (등록상표) 백, 튜브, 배양 백 등을 들 수가 있지만, 이들로 한정되지 않는다. 보존 또는 수송 동안, 내용물의 누락이나 외부로부터의 박테리아 등의 오염을 회피하기 위해, 본 발명의 배지 조성물 중에 세포 및 조직의 분산물을 넣은 용기는 바람직하게는 밀봉된다.

[0176] 보존 또는 수송 동안의 온도는, 세포 또는 조직의 생존이 유지되는 한 특별히 한정되지 않지만, 통상은, 37℃ 이하이다. 온도가 낮은 경우, 보존 또는 수송동안의 세포 또는 조직의 생존성의 저하를 회피할 수 있다. 그러나, 세포 또는 조직의 동결을 방지하기 위해, 이들을 통상, 본 발명의 배지 조성물의 융점을 초과하는 온도로 보존 또는 수송한다. 따라서, 보존 또는 수송 동안의 온도는, 통상 -5 ~ 42℃, 바람직하게는 1 ~ 37℃, 보다 바람직하게는 4 ~ 32℃, 더욱 바람직하게는 18 ~ 30℃ 로 유지된다.

[0177] 현탁 정치 상태에서의, 세포 또는 조직의 보존 또는 수송을 가능하게 하기 위해서는, 보존 또는 수송 동안의 온도는, 본 발명의 배지 조성물 중에 세포 또는 조직의 현탁 정치를 가능하게 하는 온도인 것이 바람직하다. 세포 또는 조직의 현탁 정치를 가능하게 하는 온도는, 나노섬유를 구성하는 원료의 종류에 따라 적절히 설정할 수 있다.

[0178] 하나의 구현예에 있어서, 본 발명의 보존 또는 수송 방법에 있어서 사용하는, 본 발명의 배지 조성물 중에 함유되는 나노섬유를 구성하는 원료로서 카라기난 (바람직하게는, κ-카라기난) 이 사용된다. 카라기난으로 구성된 나노섬유를 함유하는 본 발명의 배지 조성물은, 25℃ 이하에 있어서 현탁 작용을 갖고, 37℃ 에서는 현탁 작용을 잃는다. 따라서, 25℃ 이하 (바람직하게는 0 ~ 25℃) 에서, 원하는 세포 또는 조직을 현탁 정치 상태로 보존 또는 수송하고, 보존 또는 수송의 완료 후, 온도를 37℃ 이상 (예를 들어, 37 ~ 40℃, 바람직하게는 37℃) 으로 설정함으로써, 현탁하고 있던 세포 또는 조직을 침강시킴으로써, 세포 또는 조직을 용이하게 회수할 수 있다.

[0179] 보존 또는 수송의 기간은, 본 발명의 배지 조성물 중에서 세포 또는 조직을 생존 상태로 유지할 수 있는 범위 내에서 특별히 한정 되지 않는다. 이것은 통상 1 시간 이상, 10 일 이내, 바람직하게는 1 ~ 8 일, 보다 바람직하게는 1 ~ 3 일이다. 보존 또는 수송 기간 동안, 세포 또는 조직은 본 발명의 배지 조성물 중에서 현탁 정치 상태가 유지되는 것이 바람직하다.

[0180] 본 발명의 보존 또는 수송 방법을 사용하면, 세포 및 조직을 현탁 상태로 유지 할 수 있다. 따라서, 수송 동안의 진동에 의한 플레이트로부터의 박리나, 침강으로 인한 서로 접촉하고 있는 세포 및 조직의 응집으로부터 야기되는 세포 및 조직에 대한 손상을 회피할 수 있고, 본래의 기능을 유지한 상태로 세포 및 조직을 보존 및 수송할 수 있다.

[0181] [실시예]

[0182] 이하에 본 발명의 배지 조성물의 실시예를 구체적으로 말하는 것으로, 본 발명을 한층 더 상세하게 설명한다. 이하의 실시예에 나타내는 재료, 사용량, 비율, 처리 내용 및 처리 순서는, 본 발명의 취지를 일탈하지 않는 한 적절히 변경할 수 있다. 따라서, 본 발명의 범위는 이하에 제시되는 구체예인 것으로 해석되어서는 안된다.

[0183] 참조예 1 고온에서 가열 처리한 탈아실화 젤란 검을 포함하는 배지의 점도 측정 및 세포 현탁시험

[0184] 탈아실화 젤란 검-함유 배지의 제조 및 점도 측정

[0185] 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.4%(w/v) 로 순수한 물에 현탁시키고, 90℃ 에서 가열하면서 교반해 용해시켰다. 이러한 수용액을 교반하면서 실온까지 냉각시키고, 121℃ 에서 20 분 동안 오토클레이브 중에서 멸균했다. 300 mL 톨 비커 (tall beaker) 에 2 배 농도의 DMEM/F-12 배지 (Aldrich 사제, 50 mL) 및 멸균수 (47.5 mL) 를 실온에서 호모믹서 (3000 rpm) 에 의해 교반하면서 넣고, 탈아실화 젤란 검 수용액 (2.5 mL) 을 첨가하고, 1 분 동안 혼합물을 계속 교반하여, 탈아실화 젤란 검 배지 조성물을 최종 농도 0.01% 로 제조하였다. 최종 농도가 0.02, 0.03 및 0.05%(w/v) 인 탈아실화 젤란 검 수용액을 첨가한 배지 조성물을 유사하게 제조했다. 배지 조성물의 점도는, 37℃ 조건 아래에서 100 rpm 으로 5 분 동안 E형 점도계 (Toki Sangyo Co., Ltd. 사제, Viscometer TVE-22 L, 표준 로터 1° 34'×R24) 를 사용하여 측정했다.

[0186] 탈아실화 젤란 검-함유 배지의 세포 현탁액

[0187] 인간 자궁 경부암 세포주 HeLa (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 EMEM 배지 (WAKO 사제) 에 250000 개의 세포/mL 로 현탁시키고, 현탁액 (10 mL) 을 EZ SPHERE (ASAHI GLASS CO., LTD. 사제) 에 파종하고, CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 3 일 동안 배양했다. 얻어진 스피어 (직경 100 ~ 200 ㎛) 의 현탁액 (10 mL) 을 원심분리 (200 G, 5 분) 하여, 스피어를 침강시키고, 상청액을 제거하여, 스피어 현탁액 (1.0 mL) 을 제조했다. 연속적으로, 상기 제조된 탈아실화 젤란 검-함유 배지를 1.5 mL 에펜도르프 튜브에 1.0 mL 로 넣고, HeLa 세포 스피어 현탁액 (10 μL) 을 추가로 첨가했다. 탭핑 (tapping) 에 의해 세포 응집물을 분산시키고, 37℃ 에서 인큐베이션하고, 1 시간 이후 세포의 분산 상태를 시각적으로 관찰했다.

[0188] [표 1]

탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa·s)	HeLa 세포 현탁액/ 침강
0.01	액체	1.31	현탁액
0.02	액체	1.92	현탁액
0.03	액체	2.38	현탁액
0.05	액체	3.34	현탁액

[0189]

[0190] 참조 비교예 메틸셀룰로오스 및 콜라겐-함유 배지의 제조

[0191] 메틸셀룰로오스-함유 배지의 제조

[0192] 200 mL 회수 플라스크에 DMEM/F-12 배지 (Aldrich 사제, 100 mL) 를 넣고, 메틸셀룰로오스 (M0387, Aldrich 사제, 0.1 g) 를 첨가했다. 얼음 배쓰에서 냉각하면서 혼합물을 교반하여, 메틸셀룰로오스를 용해시켰다. 이러한 용액을 사용하여, 최종 농도 0.1, 0.3, 0.6 또는 1.0%(w/v) 에서 메틸셀룰로오스 수용액이 첨가된 배지 조성물을 제조했다.

[0193] 콜라겐 함유 배지의 제조

[0194] 0.3% 세포 매트릭스 유형 I-A (Nitta Gelatin Inc. 사제, 6.5 mL) 에 10 배 농도의 DMEM/F-12 배지 (Aldrich 사제, 1 mL), 재구성용 완충액 (Nitta Gelatin Inc. 사제, 1 mL) 및 순수한 물 (1.5 mL) 을 첨가하고, 얼음 중에서 혼합물을 교반하여 0.2% 의 콜라겐-함유 배지를 제조했다. 유사하게, 최종 농도 0.01, 0.05, 0.1 또는 0.2%(w/v) 로 콜라겐이 첨가된 배지 조성물을 제조했다.

[0195] 상기 제조된 배지 조성물을 탈아실화 젤란 검-함유 배지와 동일한 방식으로, HeLa 세포 스피어의 현탁 시험 및 점도 측정에 적용했다. 1.0%(w/v) 메틸셀룰로오스의 점도를 장치의 측정 범위로 인해 50 rpm 에서 측정했다.

[0196] [표 2]

메틸셀룰로오스 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa·s)	HeLa 세포 현탁액/ 침강
0.1	액체	2.31	침강
0.3	액체	8.15	침강
0.6	액체	13.0	침강
1.0	액체	48.2	침강

[0197]

[0198] [표 3]

콜라겐 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa·s)	HeLa 세포 현탁액/ 침강
0.01	액체	1.18	침강
0.05	액체/고체 (겔)	측정불가능	현탁액
0.1	고체 (겔)	측정불가능	현탁액
0.2	고체 (겔)	측정불가능	현탁액

[0199]

[0200] 참조 실험예

[0201] 이하의 참조 실험예에서, CO_2 인큐베이터 중 CO_2 의 농도(%) 는 분위기 중의 CO_2 의 부피% 로 나타내어진다. PBS 는 포스페이트 완충 생리 식염수 (Sigma Aldrich Japan 사제) 를 의미하고, FBS 는 우태 혈청 (Biological Industries 사제) 을 의미한다. 또한, (w/v) 는 부피 당 중량을 나타낸다.

[0202] 참조 실험예 1: 단일 세포를 분산시키는 것에 의한 세포 증식 시험

[0203] 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.3%(w/v) 로 초순수 (Milli-Q 물) 에 현탁하고, 90℃ 에서 가열하면서 교반하여 용해했다. 이러한 수용액을 오토클레이브 중에 121℃ 에서 20 분 동안 멸균했다. 이러한 용액을 사용하여, 10%(v/v) 우태 혈청 및 10 ng/mL 의 트롬보포이에틴 (WAKO 사제) 을 포함하는 IMDM 배지 (Gibco 사제) 에 최종 농도 0.015%(w/v) 로 탈아실화 젤란 검을 첨가하여 배지 조성물을 제조

했다. 연속하여, 인간 백혈병 세포주 UT7/TPO 를, 20000 개의 세포/mL 로 상기 언급된 탈아실화 젤란 검이 첨가된 배지 조성물에 파종하고, 6-웰 평저 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제) 에 1 웰 당 5 mL 로 현탁시켰다. 유사하게, 인간 자궁 경부암 세포주 HeLa (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를, 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 EMEM 배지 (WAKO 사제) 에 0.015%(w/v) 의 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 첨가하여 수득된 배지 조성물에 20000 개의 세포/mL 로 파종하고, 6-웰 평저 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제) 에 1 웰 당 5 mL 로 조성물을 분배하였다. 세포 현탁액을 CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 3 일 동안 계속 정치시키면서 배양했다. 그 후, 배양 배지의 일부를 회수하고, 트립판 블루 (Trypan Blue) 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 동량을 첨가하고, 혈액 세포 계측기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다.

[0204] 그 결과, 상기 언급된 배지 조성물을 사용하여 UT7/TPO 세포 및 HeLa 세포는 현탁 상태에서 균일하게 배양될 수 있고, 배지 조성물에서 효율적으로 증식함이 확인되었다. 3 일 동안 정치 현탁 배양한 이후 UT7/TPO 세포 및 HeLa 세포의 세포수를 표 4 에 나타낸다.

[0205] [표 4]

[0206]

	UT7/TPO 세포	HeLa 세포
세포 수 (×10000/mL)	38	40

[0207] 참조 실험예 2: 세포주-유래 스피어의 배양에 의한 세포 증식 시험

[0208] 인간 간암 세포주 HepG2 (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 (WAKO 사제) 에 250000 개의 세포/mL 로 현탁시키고, 이러한 현탁액 (10 mL) 을 EZ SPHERE (ASAHI GLASS CO., LTD. 사제) 에 파종하고, CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 7 일간 배양했다. 유사하게, 인간 자궁 경부암 세포주 HeLa (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 EMEM 배지 (WAKO 사제) 에 250000 개의 세포/mL 로 현탁시키고, 이러한 현탁액 (10 mL) 을 EZ SPHERE (ASAHI GLASS CO., LTD. 사제) 에 파종하고, CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 7 일간 배양했다. 여기서 얻어진 각각의 세포주의 스피어 (직경 100~200 ㎛) 의 현탁액 (2.5 mL) 을 원심분리 (200 G, 5 분) 하여 스피어를 침강시키고, 상청액을 제거했다. 연속하여, 스피어 (약 800 개의 스피어) 에 상기 언급된 배지 (10 mL) 를 첨가하여 이를 현탁시키고, 현탁액을 평저 튜브 (BM Equipment Co., Ltd. 사제) 로 옮겼다. 유사하게, 상기 언급된 배지에 0.015%(w/v) 의 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 첨가하여 수득된 배지 조성물을 사용하여, 스피어 현탁액을 제조하고, 평저 튜브 (BM Equipment Co., Ltd. 사제) 에 수송했다. 0.015%(w/v) 의 탈아실화 젤란 검이 첨가된 배지 조성물은, 먼저 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.3%(w/v) 로 초순수 (Milli-Q 물) 에 현탁시키고, 이를 90℃ 에서 가열하면서 교반하여 용해시키고, 이러한 수용액을 121℃ 에서 20 분 동안 오토클레이브에서 멸균하고, 1/20 희석으로 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지에 첨가함으로써 제조되었다.

[0209] 37℃ 에서 3 일간, CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 상기 언급된 스피어 현탁액을 정치 배양한 후, 2 배 부피의 배지를 첨가했다. 혼합물을 원심분리 (200 G, 5 분) 하여 스피어를 침강시키고, 상청액을 제거했다. 이 지점에서, 스피어의 일부를 취하고, 광학 현미경 (OLMPUS 사제, CK30-F100) 으로 그 형상을 관찰했다. 연속하여, 회수한 스피어를 PBS (10 mL) 로 1 회 세척하고, 1 mL 의 트립신-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 (WAKO 사제) 을 첨가하고, 혼합물을 37℃ 에서 5 분 동안 인큐베이션했다. 상기 언급된 배지 (9 mL) 를 첨가하고, 원심분리 (200 G, 5 분) 에 의해 세포를 수집했다. 얻어진 세포 현탁액 (2 mL) 의 일부에 대해 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포 (viable cell) 및 사세포 (dead cell) 의 수를 측정했다.

[0210] 그 결과, 상기 언급된 배지 조성물을 사용하여 HepG2 세포 및 HeLa 세포의 스피어는 현탁 상태에서 배양될 수 있고, 배지 조성물 중에서 효율적으로 세포가 증식함이 확인되었다. 또한 배지 조성물은 세포를 증식시켰을 때 기존의 배지에 비해 사세포의 비율이 적고, 우수한 세포 증식 촉진 효과를 가짐이 확인되었다. 기존 배지에서 배양된 스피어는 배양 용기의 하부에 침강된다. 또한, 배양된 스피어의 형상을 광학 현미경으로 관찰했다. 그 결과, 배지 조성물은 스피어들의 회합을 나타내지 않았는데에 반해, 기존 배지에서는 스피어들의 회합이 관찰되었다.

[0211] 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지에서 배양된 세포수가 1 인, HepG2 세포 및 HeLa 세포의 상대적 수를 표

5 에 나타낸다. 또한, 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지에서 배양된 사세포의 비율(사세포 수/생세포 수) 이 1 인,상대적 사세포율을 표 6 에 나타낸다. 배지 조성물에서 배양된 HepG2 세포 및 HeLa 세포의 스피어의 현탁 상태를 도 1 및 도 2 에 각각 나타낸다. 또한 배양한 HeLa 세포의 스피어의 형상을 도 3 에 나타낸다.

[0212] [표 5]

[0213]

탈아실화 젤란 검		HepG2 세포	HeLa 세포
부재	상대적 세포 수	1.0	1.0
존재	상대적 세포 수	1.7	1.5

[0214] [표 6]

[0215]

탈아실화 젤란 검		HepG2 세포	HeLa 세포
부재	상대적 사망률	1.0	1.0
존재	상대적 사망률	0.5	0.5

[0216] 참조 실험예 3: 마이크로담체 위에 부착된 세포주의 배양에 의한 세포 증식 시험

[0217] 마이크로담체 Cytodex (등록상표) 1 (GE Healthcare Life Sciences 사제) 을 PBS 에 0.02 g/mL 로 현탁시키고, 밤새 현탁액을 정치시켰다. 상청액을 버리고, 새로운 PBS 로 마이크로담체를 2 회 세척했다. 그 후, 이를 다시 PBS 중에 0.02 g/mL 로 현탁시키고, 121℃ 에서 20 분 동안 오토클레이브 중에서 멸균했다. 연속하여, 이러한 마이크로담체를 70% 에탄올에 의해 2 회 및 PBS 에 의해 3 회 세척하고, 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 (WAKO 사제) 중에 0.02 g/mL 로 현탁시켰다. 이러한 마이크로담체 현탁액을 사용하여, 120 mg 의 Cytodex (등록상표) 1 및 4000000 개의 HepG2 세포를 포함하는 DMEM 배지 (10%(v/v) 우태 혈청 함유, 20 mL) 를 제조하고, 세포 현탁액을 미리 실리콘 코팅제 (AGC TECHNO GLASS Co., Ltd. 사제) 로 처리된 비커 중에서 37℃ 하에 6 시간 동안 교반기를 사용해 교반 (100 rpm) 하면서 배양했다. 이 지점에서, HepG2 세포의 마이크로담체에 대한 부착을 현미경으로 확인했다. 연속하여, 세포가 부착한 마이크로담체를 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지에 의해 2 회 세척하고, 동일한 배지 (3 mL) 에 현탁시켰다.

[0218] 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 (20 mL) 및 이러한 배지에 0.015%(w/v) 의 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 첨가하여 수득된 배지 조성물 각각에, 상기 언급된 마이크로담체 현탁액 (300 μL) 을 첨가하고, 3 일 동안 37℃ 에서 배양했다. 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배양액의 경우, 혼합물을 교반기로 교반 (100 rpm) 하면서 배양했다. 배양 후는, 현미경으로 마이크로담체 상의 세포의 부착 상태를 확인하였고, 원심분리 (200 G, 5 분) 에 의해 마이크로담체를 침강시켰다. PBS (10 mL) 로 이러한 마이크로담체를 세척하고, 1 mL 의 트립신-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 (WAKO 사제) 을 첨가하고, 혼합물을 37℃ 에서 5 분 동안 인큐베이션했다. 또한, 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 (9 mL) 를 첨가하고, 셀 스트레이너 (Cell Strainer) (BD Falcon 사제, 메시 크기 70 ㎛) 를 사용하여 마이크로담체를 제거했다. 수득된 여과액으로부터 원심분리 (200 G, 5 분) 에 의해 세포를 회수했다. 세포를 배지 (500 μL) 에 현탁시키고, 그 일부에 대해 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다. 그 결과, 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배양액은 123,000 개의 세포를 함유하지만, 탈아실화 젤란 검을 포함하는 배양 배지는 1,320,000 개의 세포를 포함했다. 상기 언급된 바와 같이, 특정 화합물의 구조체를 포함하는 배지 조성물은 심지어 마이크로담체를 사용하여 세포가 배양될 때에도 기존의 배지에 비해 세포 증식 촉진 효과가 우수함이 확인되었다. 특정 화합물의 구조체를 포함하는 배지 조성물을 사용한 마이크로담체 배양의 3 일 이후 HepG2 세포의 부착 상태를 도 4 에 나타낸다.

[0219] 참조 실험예 4: 세포주-유래 스피어를 사용한 세포 현탁 시험

[0220] 잔탄 검 (KELTROL CG, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 1%(w/v) 의 농도로 초순수 (Milli-Q 물) 에 현탁하고, 90℃ 에서 가열하면서 교반하여 용해했다. 이러한 수용액을 사용하여, 잔탄검 최종 농도 0.1, 0.15 또는 0.2%(w/v) 인 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. 또한, 0.2%(w/v) k-카라기난 (GENUGEL WR-80-J, SANSHO Co., Ltd. 사제) 및 0.2%(w/v) 의 로커스트 빈 검 (GENUGUM RL-200-J, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 포함하는 수용액을 90℃ 에서 가열하여 제조했다. 이러한 수용액을 사용하여, 0.03, 0.04 또는 0.05%(w/v) 의 k-카라기난 및 로커스트 빈 검을 포함하는 DMEM/F-12 배지 (Sigma Ltd. 사제) 조성물을 제조했다.

[0221] 참조 실험예 2 에서와 동일한 방식으로, HeLa 세포의 스피어를 형성하고, 상기 제조한 배지 (1 mL) 각각에 수

십개의 스피어를 첨가하고, 1 시간 동안 37℃ 에서 혼합물을 정치시키고, 스피어 세포의 현탁 상태를 시각적으로 관찰했다. 그 결과, HeLa 세포의 스피어는 상기 언급된 배지 조성물 중 임의의 것에서 현탁 상태를 유지했다. 또한, 세포 현탁액에 대한 등량의 배지의 첨가 및 이의 원심분리 (300 내지 400 G, 5 분) 는 HeLa 세포의 스피어의 침강 및 회수를 산출함을 확인했다. 배지 조성물 중에서 배양된 HeLa 세포의 스피어의 현탁 상태는 각각 도 5 에 나타낸다. 또한, 분석예 1 에서와 동일한 방식으로 측정된 점도를 표 7 및 8 에 나타낸다.

[0222] [표 7]

[0223]

잔탄 검 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa·s)	HeLa 세포 현탁액/ 침강
0.1	액체	3.69	현탁액
0.15	액체	5.46	현탁액
0.2	액체	7.26	현탁액

[0224] [표 8]

[0225]

κ-카라기난, 로커스트 빈 검 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa•s)	HeLa 세포 현탁액/침강
0.03	액체	1.34	현탁액
0.04	액체	1.55	현탁액
0.05	액체	1.95	현탁액

[0226] 참조 실험예 5: 필터에 의해 여과된 배지 조성물을 사용한 세포 현탁 시험

[0227] 참조 실험예 2 에서와 동일한 방식으로, 0.015% 의 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 함유하는 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. 연속하여, 이러한 배지 조성물 (1 mL) 을 70 ㎛ 필터 또는 40 ㎛ 필터 (BD Falcon 사제), 30 ㎛ 필터 또는 20 ㎛ 필터 (AS ONE Corporation 사제), 10 ㎛ 의 필터 (Partec 사제), 또는 5 ㎛ 필터, 1.2 ㎛ 필터, 0.45 ㎛ 필터 또는 0.2 ㎛ 필터 (Sartorius Stedim Japan 사제) 를 통해 여과했다. 참조 실험예 2 에서와 동일한 방식으로 제조된 HepG2 세포의 스피어를 상기 언급된 여과액에 대해 약 수 십 개의 스피어로 첨가하고, 1 시간 동안 37℃ 에서 정치시키고, 스피어 세포의 현탁 상태를 시각적으로 관찰했다. 그 결과, HepG2 세포의 스피어는 10 ㎛ 이상의 필터를 통과한 배지 조성물 중에 현탁 상태로 유지되지만, 5 ㎛ 이하의 필터를 통과한 배지 조성물 중에서 침강됨을 확인했다. 또한, 현탁 상태에 있는 HepG2 세포 스피어의 실온, 300 G, 5 분에서의 원심분리, 또는 등량의 배지의 첨가 및 실온, 200 G, 5 분에서의 원심분리는 스피어의 침강 및 회수를 야기함을 확인했다.

[0228] 참조 실험예 6: 스피어 형성 시험

[0229] 참조 실험예 2 에서와 동일한 방식으로, 0.01% 의 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 및 10%(v/v) 우태 혈청을 함유하는 EMEM 배지 (WAKO 사제) 의 조성물을 제조했다. 연속하여, HeLa 세포를 1000 개의 세포/mL 의 농도로 첨가하고, 24-웰 플레이트 (Corning Incorporated 사제) 에 분배하였다. 이러한 플레이트를 9일 동안 37℃ 에서 정치시켜 현탁-배양하고, 스피어의 형성을 현미경으로 확인했다. 또한, 원심분리 처리 (300G, 5 분) 에 의해 스피어 세포를 침강시키고, PBS (5 mL) 로 1 회 세정하였다. 100 μL 의 트립신-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 (WAKO 사제) 을 첨가하고, 혼합물을 37℃ 에서 5 분 동안 인큐베이션했다. 여기서, 얻어진 세포 현탁액 (100 μL) 에 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 EMEM 배지 (100 μL) 를 첨가하여, 세포 현탁액의 부분에 대해 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량으로 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다. 그 결과, 170000 개의 세포/mL 로 HeLa 세포를 증가시킴을 확인했다. 배지 조성물에서 형성된 HeLa 세포의 스피어를 도 6 에 나타냈다.

[0230] 참조 실험예 7: 구조체의 광학 현미경 관찰

[0231] 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.4%(w/v) 로 순수한 물에 현탁시키고, 90℃ 에서 가열하면서 교반하여 용해시켰다. 300 mL 톨 비커에 2 배 농도의 DMEM/F-12 배지 (Aldrich 사제, 95 mL) 를 넣고, 실온에서 자성 교반기에 의해 교반하면서 탈아실화 젤란 검 수용액 (5 mL) 을 첨가하고, 그대로 5 분간 교반을 계속하여, 최종 농도 0.02 % 로 탈아실화 젤란 검을 함유하는 배지 조성물을 제조했다. 또한, 배지 조성물을 호모믹서 (3000 rpm) 에 의해 5 분간 교반했다. 제조한 배지 조성물을 광학 현미경 (KEYENCE

Corporation, BIOREVO BZ-9000) 에 의해 관찰했다. 관찰된 구조체를 도 7 에 나타낸다.

[0232] 참조 실험예 8: 분말 배지 및 DAG 의 혼합 가열에 의한 제조

[0233] 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제, 20 mg) 및 DMEM/F-12 배지 (Life Technologies 사제, 1.58 g) 를 200 mL 삼각 플라스크에 넣고, 순수한 물 (100 mL) 를 그 안에 따랐다. 121℃ 에서 20 분 동안 오토클레이브 중에서 혼합물을 멸균하여, 탈아실화 젤란 검 농도가 0.02% 인 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. 제조한 배지에 덱스트란 비이드 Cytodex 1 (크기 200 ㎛, GE Healthcare Life Sciences 사제) 를 첨가하고, 비이드의 분산 상태를 시각적으로 확인했다. 평가를 위해, 분산 상태는 ○, 일부 침강/분산 상태는 △, 및 침강 상태는 × 이다. 결과를 아래 표 9 에 나타낸다.

[0234] [표 9]

[0235]

탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	상태	Cytodex1 분산
0.05	액체	○
0.02	액체	○
0.01	액체	○

[0236] 참조 실험예 9: 다당류를 함유하는 배지 조성물의 제조

[0237] 잔탄 검 (KELTROL CG, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.5%(w/v) 의 농도로 순수한 물에 현탁시키고, 90℃ 에서 가열하면서 교반에 의해 용해했다. 유사하게, 나트륨 알기네이트 (Duck 알긴산 NSPM, FOOD CHEMIFA Co., Ltd. 사제), 로커스트 빈 검 (GENUGUM RL-200-J, SANSHO Co., Ltd. 사제), k-카라기난 (GENUGEL WR-80-J, SANSHO Co., Ltd. 사제), 또는 디우탄 검 (KELCO CRETE DG-F, SANSHO Co., Ltd. 사제) 의 0.5%(w/v) 수용액을 제작했다.

[0238] 수용액 및 0.2 또는 0.1%(w/v) 탈아실화 젤란 검 용액 및 10 배 농도의 DMEM/F-12 배지 각각을 혼합하고, 혼합물을 80℃ 에서 30 분 동안 가열하고, 실온까지 냉각하고, 7.5% 탄산수소나트륨 수용액을 첨가해, 최종 농도 0.01, 0.02%(w/v) 의 탈아실화 젤란 검과 최종 농도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4%(w/v) 의 다른 다당류를 함유하는 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. 또한, 탈아실화 젤란 검을 포함하는 배지를 상기 언급된 바와 같이 제조하고, 메틸셀룰로오스 (cP400, WAKO 사제) 의 분말을 첨가했다. 얼음 배쓰에서 혼합물을 교반하여 메틸셀룰로오스를 용해시켜, 최종 농도 0.01, 0.02%(w/v) 로 탈아실화 젤란 검 및 최종 농도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4%(w/v) 로 다른 메틸셀룰로오스를 함유하는 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다.

[0239] 상기 제조된 배지에 폴리스티렌 비이드 (크기 500 - 600 ㎛, Polysciences Inc. 사제) 를 첨가하고, 비이드의 분산 상태를 시각적으로 확인했다. 평가를 위해, 현탁 상태는 ○, 일부 침강/분산 상태는 △, 및 침강 상태는 × 이다. 결과를 표 10 에 나타낸다.

[0240] [표 10]

탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	다당류 농도 %(w/v)	잔탄 검	알긴산 Na	로커스트 빈 검	메틸-셀룰로오스	k-카라기난	디우탄 검
0.01	0.1	O	O	O	×	O	O
	0.2	O	O	O	Δ/×	고체화	측정되지 않음
	0.3	O	O	O	Δ/×	고체화	측정되지 않음
	0.4	O	O	O	Δ/×	고체화	측정되지 않음
0.02	0.1	O	O	O	O/×	O	O
	0.2	O	O	O	O	고체화	측정되지 않음
	0.3	O	O	O	O	고체화	측정되지 않음
	0.4	O	O	O	O	고체화	측정되지 않음

[0241]

[0242] 참조 실험예 10: 다당류를 함유하는 배지 조성물의 점도 측정

[0243] 참조 실험예 9 의 다당류 혼합물에 대해서와 유사한 방법에 의해, 최종 농도 0.005, 0.01%(w/v) 로 탈아실화 젤란 검 및 다른 다당류를 포함하는 DMEM/F-12 배지를 제조했다. 다당류의 최종 농도는 잔탄 검, 나트륨 알기네이트, 로커스트 빈검의 경우 0.1%(w/v), 메틸셀룰로오스의 경우 0.2%(w/v), k-카라기난 및 디우탄 검의 경우 0.05%(w/v) 로 설정되었다. 각각의 배지 조성물 상태 및 분석예 1 에서와 유사한 방법으로 측정한 점도를 표 11 ~ 16 에 나타낸다.

[0244] [표 11]

잔탄 검 농도 %(w/v)	탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa·s)
0.1	0.005	액체	4.36
0.1	0.010	액체	4.59

[0245]

[0246] [표 12]

나트륨 알기네이트 농도 %(w/v)	탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa·s)
0.1	0.005	액체	1.53
0.1	0.010	액체	1.75

[0247]

[0248] [표 13]

로커스트 빈 검 농도 %(w/v)	탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa•s)
0.1	0.005	액체	1.92
0.1	0.010	액체	2.36

[0249]

[0250] [표 14]

메틸셀룰로오스 농도 %(w/v)	탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa·s)
0.2	0.005	액체	3.36
0.2	0.010	액체	3.81

[0251]

[0252] [표 15]

κ-카라기난 농도 %(w/v)	탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa·s)
0.05	0.005	액체	1.04
0.05	0.010	액체	1.28

[0253]

[0254] [표 16]

디우탄 검 농도 %(w/v)	탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	상태	점도 (mPa·s)
0.1	0.005	액체	2.76
0.1	0.010	액체	3.04

[0255]

[0256] 참조 실험예 11: 변경된 2가 금속 이온 농도를 갖는 배지 조성물의 제조

[0257] 칼슘 클로라이드, 마그네슘 술페이트 및 마그네슘 클로라이드를 포함하지 않는 DMEM/F-12 (D9785, Aldrich 사제) 를 사용하고 참조 실험예 8 의 방법과 동일한 방식으로, 0.02%(w/v) 의 탈아실화 젤란 검을 포함하는 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. 최종 농도가 DMEM/F-12 배지의 정의된 양으로 설정되도록 칼슘 클로라이드 또는 마그네슘 술페이트 및 마그네슘 클로라이드를 첨가한 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. DMEM/F-12 배지의 정의된 조성의 관점에서, 각각의 최종 농도는 칼슘 클로라이드의 경우 0.116 g/L, 마그네슘 술페이트의 경우 0.049 g/L, 마그네슘 클로라이드의 경우 0.061 g/L 으로 설정되었다.

[0258] 제조된 배지 조성물에 덱스트란 비이드 Cytodex 1 (GE Healthcare Life Sciences 사제) 를 더하고, 2 일 후에 비이드의 분산 상태를 시각적 관찰에 의해 확인했다. 평가를 위해, 현탁 상태는 ○, 일부 침강/분산 상태는 △, 침강 상태는 × 이다. 결과를 표 17에 나타낸다.

[0259] [표 17]

탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	칼슘 클로라이드	마그네슘 술페이트 마그네슘 클로라이드	Cytodex1 분산
0.02	+	+	○
0.02	+	-	○
0.02	-	+	△
0.02	-	-	×

[0260]

[0261] 참조 실험예 12: 2가 금속 양이온이 나중에 첨가된 배지 조성물의 제조

[0262] 0.1%(w/v) 탈아실화 젤란 검 용액, 5배 농도의 DMEM/F-12 배지 (칼슘 클로라이드, 마그네슘 술페이트 및 마그네슘 클로라이드를 함유하지 않음, D9785, Aldrich 사제), 칼슘 클로라이드 (1167 mg), 마그네슘 술페이트 (489 mg) 및 마그네슘 클로라이드 (287 mg) 를 순수한 물 (300 mL) 에 용해시켜 염 용액을 제조했다. 200 mL 톨

비커에 탈아실화 젤란 검 수용액 및 순수한 물을 넣고, 앵커형 교반 블레이드를 사용하여 200 rpm 에서 용액을 교반했다. 배지 용액 및 물의 혼합물인 용액 A 를 첨가하고, 혼합물을 10 분 동안 바로 교반했다. 이후, 염 용액을 첨가하고, 7.5% 탄산수소나트륨 수용액 (1.6 mL) 을 추가로 첨가해, 최종 농도 0.02% 로 탈아실화 젤란 검을 포함하는 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. 각각의 용액의 혼합량을 표에 나타낸다. 제조 4 시간 이후, 6 개의 배지 조성물을 폴리스티렌 비이드 및 Cytodex1 의 분산 평가에 적용했다. 결과를 표 18, 19 에 나타낸다.

[0263] [표 18]

	0.1%(w/v) 탈아실화 젤란 검 수용액	순수한 물	용액 A		염 용액 칼슘 클로라이드 마그네슘 클로라이드 마그네슘 술페이트
			5-배 농도 DMEM/F-12	순수한 물	
1	20 mL	10 mL	20 mL	50 mL	없음
2	20 mL	10 mL	20 mL	47 mL	3 mL
3	20 mL	10 mL	20 mL	40 mL	3 mL/물 7 mL
4	20 mL	30 mL	20 mL	30 mL	없음
5	20 mL	30 mL	20 mL	27 mL	3 mL
6	20 mL	30 mL	20 mL	20 mL	3 mL/물 7 mL

[0264]

[0265] [표 19]

	탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	염 용액	폴리스티렌 비이드 분산	Cytodex1 분산
1	0.02	-	×	×
2	0.02	+	○	○
3	0.02	+	○	○
4	0.02	-	×	×
5	0.02	+	○	○
6	0.02	+	○	○

[0266]

[0267] 참조 실험예 13: 각종 배지 조성물의 제조

[0268] 0.1%(w/v) 탈아실화 젤란 검 용액 및 고농도의 배지 용액을 제조했다. 고농도의 배지 용액으로서, 10 배 농도의 MEM (M0268, Aldrich 사제), 10 배 농도의 RPMI-1640 (R6504, Aldrich 사제) 및 5 배 농도의 DMEM (고압멸균 대응 배지, Nissui 사제) 를 제조했다. 0.1%(w/v) 탈아실화 젤란 검 용액, 각각의 고농도 배지 및 농도 조정을 위한 순수한 물을 혼합하고, 80℃ 에서 30 분 동안 가열했다. 실온으로 혼합물을 냉각하고, 7.5% 탄산수소나트륨 수용액을 첨가해, 최종 농도 0.01, 0.02, 0.03%(w/v) 으로 탈아실화 젤란 검을 함유하는 배지 조성물을 제조했다. 제조한 6 개의 배지 조성물을 폴리스티렌 비이드 및 덱스트란 비이드 Cytodex1 의 현탁 및 분산 상태에 대해 평가하였고, 여기서 현탁 상태는 ○, 일부 침강/분산 상태는 △, 침강 상태는 × 이다. 결과를 표 20, 21 에 나타낸다.

[0269] [표 20]

MEM 배지			
탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	상태	폴리스티렌 비이드 분산	Cytodex1 분산
0.01	액체	△	△
0.02	액체	○	○
0.03	액체	○	○

[0270]

[0271] [표 21]

DMEM 배지			
탈아실화 젤란 검 농도 %(w/v)	상태	폴리스티렌 비이드 분산	Cytodex1 분산
0.01	액체	△	△
0.02	액체	○	○
0.03	액체	○	○

[0272]

[0273] 참조 실험예 14: 탈아실화 젤란 검을 포함하는 배지 조성물의 입자 크기 분포 측정

[0274] 참조예 1 에 따라, 0.038%(w/v) 의 탈아실화 젤란 검을 포함하는 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. 배지

는 호모믹서에 의해 3000 rpm 또는 6000 rpm 에서 1 분 동안 교반하여 제조했다. 배지 조성물의 입자 크기 분포를 Beckman Instruments Coulter, Inc. Multisizer 4 (Coulter 이론에 의한 정밀 입자 크기 분포 측정 장치) 에 의해 측정하고, 부피 표준 입자 크기 분포의 중간 직경 (d50) 을 측정했다. 결과를 표 22 에 나타낸다.

[0275] [표 22]

[0276]

배지 제조에서 호모믹서 회전 수	d50 (μm)
3000 rpm	1.709
6000 rpm	1.499

[0277] 참조 실험예 15: 탈아실화 젤란 검의 인산화

[0278] 100 mL 유리 시험관에서 탈아실화 젤란 검 (1 g) 및 순수한 물 (40 mL) 을 측량하고, 혼합물을 100℃ 에서 30 분간 가열하여 현탁액을 제조했다. 이 현탁액에 인산 수용액 (85%, 1 g) 을 첨가하고, 혼합물을 5 시간 동안 환류 하에 가열했다. 그 후, 이를 12 시간 동안 교반하면서 실온까지 냉각하고, 얻은 백색 현탁액을 99% 에탄올 (500 mL) 에 따랐다. 생성된 면상 (floc) 백색 고체를 여과하여 채취하고 건조하여, 탈아실화 젤란 검의 인산화물로서 담갈색 고체 (0.4 g) 를 얻었다. 포스페이트 기의 도입은 푸리에-변환 적외 분광 분석 (SHIMADZU CORPORATION 사제, IR-Prestage21) 에 의해 확인했다 (1700 cm-1 ; P-OH, 1296 cm-1, 1265 cm-1 ; P=O). 담갈색 고체를 마이크로파 가열 분해 장치 (ETHOS TC, Milestone General 사제) 에 의해 분해하고, 유도 결합 플라즈마 방사 분광 분석기 (ICP-OES) (SPS 5520, SII NanoTechnology 사제) 에 의해 인 원자의 함량을 측정했다. 결과는 3.5 wt% (n=2) 였다.

[0279] 참조 실험예 16: 인산화 탈아실화 젤란 검을 포함하는 배지 조성물의 제조

[0280] 임의량의 인산화 탈아실화 젤란 검 (30 mg) 및 DMEM/F-12 배지 (Life Technologies 사제, 1.56 g) 를 200 mL 삼각 플라스크에 넣고, 순수한 물 (100 mL) 을 그 안에 부었다. 121℃ 에서 20 분 동안 오토클레이브 중에서 혼합물을 멸균해, 탈아실화 젤란 검 농도가 0.03% 인 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. 제조한 배지에, 덱스트란 비이드 Cytodex1 (GE Healthcare Life Sciences 사제) 를 첨가하고, 비이드의 분산 상태를 시각적 관찰에 의해 확인했다. 0.03%(w/v) 의 인산화 탈아실화 젤란 검 농도에서 비이드의 분산 상태가 밝혀졌다.

[0281] 참조 실험예 17: 탈아실화 젤란 검을 포함하는 배지 조성물의 제조

[0282] 탈아실화 젤란 검 수용액 및 배지 용액을 아래 표에 나타낸 비율로 혼합해, 탈아실화 젤란 검 농도가 0.02% 인 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조하고, 폴리스티렌 비이드 (Size 500-600 ㎛, Polysciences Inc. 사제) 의 분산 상태를 평가했다. 결과를 표 23 및 24 에 나타낸다. 1 일 이상 정치함으로써, 모든 조건 하에서 스티렌 비이드가 분산되었다.

[0283] [표 23]

[0284]

탈아실화 젤란 검/순수한 물	DMEM/F12 분말 배지/순수한 물	정치 시간
20 mg/ 10 mL	1.56 g/ 90 mL	5 min
20 mg/ 20 mL	1.56 g/ 80 mL	5 min
20 mg/ 30 mL	1.56 g/ 70 mL	5 min
20 mg/ 40 mL	1.56 g/ 60 mL	6 h
20 mg/ 50 mL	1.56 g/ 50 mL	6 h
20 mg/ 60 mL	1.56 g/ 40 mL	6 h
20 mg/ 70 mL	1.56 g/ 30 mL	6 h
20 mg/ 80 mL	1.56 g/ 20 mL	1 일
20 mg/ 90 mL	1.56 g/ 10 mL	1 일

[0285] "DMEM/F12 분말 배지/순수한 물" 은 "탈아실화 젤란 검/순수한 물" 에 첨가되었다.

[0286] [표 24]

탈아실화 젤란 검/순수한 물	DMEM/F12 분말 배지/순수한 물	정치 시간
20 mg/ 10 mL	1.56 g/ 90 mL	5 min
20 mg/ 20 mL	1.56 g/ 80 mL	5 min
20 mg/ 30 mL	1.56 g/ 70 mL	1 h
20 mg/ 40 mL	1.56 g/ 60 mL	6 h
20 mg/ 50 mL	1.56 g/ 50 mL	6 h
20 mg/ 60 mL	1.56 g/ 40 mL	6 h
20 mg/ 70 mL	1.56 g/ 30 mL	1 일
20 mg/ 80 mL	1.56 g/ 20 mL	1 일
20 mg/ 90 mL	1.56 g/ 10 mL	1 일

[0287]

[0288] "탈아실화 젤란 검/순수한 물" 은 "DMEM/F12 분말 배지/순수한 물" 에 첨가되었다.

[0289] 참조 실험예 18: 필터를 사용한 배지 조성물의 제조

[0290] 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 최종 농도 0.02 또는 0.04%(w/v) 로 초순수 (Milli-Q 물) 에 현탁시키고, 90℃ 에서 30 분 동안 또는 121℃ 에서 20 분 동안 가열하여 용해했다. 또한, 이러한 수용액 (100 mL) 을 공극 크기가 0.22 ㎛ 인 폴리에테르술폰 막 필터 (Corning Incorporated 사제) 에 의해 여과했다. 연속하여, 이러한 여과액을 2- 내지 4-배 농도의 DMEM/F-12 배지 (Sigma Aldrich 사제) 와 혼합하고, 혼합물을 마일드 믹서 (SI-24, TAITEC Co., Ltd. 사제) 에 의해 1 시간 동안 진탕하여, 최종 농도 0.01 또는 0.015%(w/v) 로 탈아실화 젤란 검을 포함하는 배지 조성물을 제조했다 (예를 들어, 0.02%(w/v) 탈아실화 젤란 검 수용액 및 2 배 농도의 DMEM/F-12 배지를 각각 25 mL 씩 혼합하여, 0.01%(w/v) 탈아실화 젤란 검 배지 조성물 (50 mL) 을 제조함). 참조 실험예 2 에서와 유사한 방법에 의해, HepG2 세포의 스피어를 형성하고, 상기 제조된 배지 (1 mL) 에 수 십 개의 스피어를 첨가하고, 37℃ 에서 정치하고, 1 시간 및 하룻밤 이후 스피어 세포의 현탁 상태를 시각적으로 관찰했다. 그 결과, HepG2 세포의 스피어가 상기 언급된 배지 조성물 모두에서 현탁 상태로 유지됨을 확인했다. 또한, 2 배 부피의 배지를 첨가하고, 세포 현탁액을 원심분리 (500 G, 5 분) 했다. HepG2 세포의 스피어가 침강하고 세포를 모든 배지 조성물에서 회수할 수 있음을 확인했다. 하룻밤 이후 스피어의 분산 상태를 시각적 관찰에 의해 확인하고 평가하였으며, 여기서 현탁 분산 상태는 ○, 일부 침강/분산 상태는△, 침강 상태는 × 이다. 평가 결과는 표 25 에 나타냈다.

[0291] [표 25]

탈아실화 젤란 검 수용액 농도 (%)	용해 동안 온도 (℃)	배지 조성물의 탈아실화 젤란 검 농도 (%)	HepG2 세포의 현탁 효과
0.02	90	0.010	○
		0.015	○
	120	0.010	○
		0.015	○
0.04	90	0.010	○
		0.015	○
	120	0.010	○
		0.015	○

[0292]

[0293] 참조 실험예 19: 세포주 유래 스피어를 배양하는 것에 의한 세포 증식 시험

[0294] 인간 태아 신장 세포주 HEK293 (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 EMEM 배지 (WAKO 사제) 에 250000 개의 세포/mL 로 현탁하고, 이러한 현탁액 (10 mL) 을 EZ SPHERE (ASAHI GLASS CO., LTD. 사제) 에 파종하고, CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 2 일 동안 배양했다. 여기서 얻어진 HEK293 세포의 스피어 (직경 100 ~ 200 ㎛) 의 현탁액 (10 mL) 을 원심분리 (200 G, 5 분) 하여, 스피어를 침강시키고, 상청액을 제거하고, 스피어를 1 mL 에 현탁시켰다. 연속하여, 스피어 현탁액 (200 μL, 세포수 약 200000 개) 에 배지 (10 mL) 를 첨가하여, 이를 현탁시키고, 현탁액을 평저 튜브 (BM Equipment Co., Ltd. 사제) 에 옮겼다. 유사하게, 상기 언급된 배지에 0.015% (w/v) 의 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 첨가하여 수득된 배지 조성물을 사용하여, 스피어 현탁액을 제조하고, 평저 튜브 (BM Equipment Co., Ltd. 사제) 에 옮겼다. 0.015%(w/v) 탈아실화 젤란 검을 첨가한 배지 조성물은, 먼저

탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.3%(w/v) 로 초순수 (Milli-Q 물) 에 현탁시키고, 90℃ 에서 가열하면서 교반에 의해 상기를 용해시키고, 이러한 수용액을 121℃ 에서 20 분 동안 오토클레이브 중에서 멸균하고, 이 용액을 1/20 희석으로 10% (v/v) 우태 혈청을 포함하는 EMEM 배지에 첨가함으로써 제조되었다.

[0295] 37℃ 에서 5 일 동안 CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 상기 언급된 스피어 현탁액의 정치 배양 이후, 2 배 부피의 배지를 첨가했다. 혼합물을 원심분리 (500 G, 5 분) 하여 스피어를 침강시키고, 상청액을 제거했다. 연속하여, 회수한 스피어를 PBS (10 mL) 에 의해 1 회 세척하고, 1 mL 의 트립신-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 (WAKO 사제) 을 첨가하고, 혼합물을 37℃ 에서 5 분 동안 인큐베이션했다. 상기 언급된 배지 (9 mL) 를 첨가하고, 원심분리 (500 G, 5 분) 에 의해 세포를 수집했다. 얻어진 세포 현탁액 (2 mL) 의 일부에 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포 및 사세포의 수를 측정했다. 대조로서, 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지 조성물을 제조하고, 유사한 실험을 수행했다.

[0296] 그 결과, HEK293 세포의 스피어는 배지 조성물을 사용하여 현탁 상태로 배양될 수 있고, 세포가 배지 조성물에서 효율적으로 증식함이 확인되었다. 또한, 배지 조성물은, 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지 조성물에 비해 세포를 증식시켰을 때 사세포의 비율이 적고, 우수한 세포 증식 촉진 효과를 가짐이 확인되었다. 기존의 배지에서 배양한 스피어는 배양 용기의 저면에 침강했다.

[0297] 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지에서 배양된 세포의 수가 1 인, HEK293 세포의 상대적 수를 표 26 에 나타낸다. 또한, 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지에서 배양된 사세포 비율 (사세포 수/생세포 수) 이 1 인, 상대적 사세포 비율을 표 27 에 나타낸다.

[0298] [표 26]

[0299]

탈아실화 젤란 검		HEK293 세포
부재	상대적 세포 수	1.0
존재	상대적 세포 수	1.6

[0300] [표 27]

[0301]

탈아실화 젤란 검		HEK293 세포
부재	상대적 사세포 비율	1.0
존재	상대적 사세포 비율	0.3

[0302] 참조 실험예 20: 곤충 세포를 배양하는 것에 의한 세포 증식 시험

[0303] 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.3%(w/v) 로 초순수 (Milli-Q 물) 에 현탁하고, 90℃ 에서 가열하면서 교반에 의해 용해시켰다. 이러한 수용액을 121℃ 에서 20 분 동안 오토클레이브 중에서 멸균했다. 이러한 용액을 사용하여, Sf-900 (등록 상표) III SFM 배지 (Gibco 사제) 에 최종 농도 0.015%(w/v) 로 탈아실화 젤란 검을 첨가하여 배지 조성물을 제조했다. 연속하여, 스포도프테라 프루기페르다 (Spodoptera frugiperda) 유래의 Sf9 세포 (Gibco 사제) 를 100000 개의 세포/mL 로 탈아실화 젤란 검을 첨가한 상기 언급된 배지 조성물에 접종하고, 24-웰 평저 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제) 의 웰에 1 mL/웰 로 분배하였다. 세포 현탁액을 인큐베이터에서 25℃ 하에 5 일 동안 계속 정치시켜 배양했다. 이후, 배양 배지의 일부를 회수하고, 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다. 대조로서, 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지 조성물을 제조하고, 유사한 실험을 실시했다.

[0304] 그 결과, Sf9 세포는 배지 조성물을 사용하여 현탁 상태로 균일하게 배양될 수 있고 배지 조성물에서 증식함이 확인되었다. 또한, 배지 조성물은 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지 조성물에 비해 세포를 증식시켰을 때 세포 증식의 촉진 효과가 우수함이 확인되었다. 5 일 동안의 현탁 정치 배양 이후 Sf9 세포의 세포수를 표 28 에 나타낸다.

[0305] [표 28]

[0306]

탈아실화 젤란 검	Sf9 세포 수 (×10000)
부재	33.5
존재	47.4

[0307] 참조 실험예 21: CD34 양성 세포를 배양함에 의한 세포 증식 시험

[0308] 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.3%(w/v) 로 초순수 (Milli-Q 물) 에 현탁시키고, 90℃ 에서 가열하면서 교반에 의해 용해시켰다. 이러한 수용액을 121℃ 에서 20 분 동안 오토클레이브 중에서 멸균했다. 이러한 용액을 사용하여, StemSpan SFEM 배지 (StemCell Technologies 사제) 에 최종 농도 0.015%(w/v) 로 탈아실화 젤란 검, 20 ng/mL 의 트롬보포이에틴 (WAKO 사제) 및 100 ng/mL 의 줄기 세포 인자 (SCF, WAKO 사제) 를 첨가하여 배지 조성물을 제조했다. 연속하여, 인간 탯줄 혈액-유래 CD34 양성 세포 (Lonza 사제) 를 10000 개의 세포/mL 로 탈아실화 젤란 검이 첨가된 상기 언급된 배지 조성물에 파종하고, 24-웰 평저 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제) 의 웰에 1 mL/웰 로 분배하였다. 세포 현탁액을 37℃ 에서 7 일간 CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 중에서 정치 배양했다. 이후, 배양 배지의 일부를 회수하고, 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다. 배양 배지에 3-배 부피의 배지를 첨가하고 혼합물을 원심분리 (500 G, 5 분) 하여, 모든 세포를 침강시켰다. 대조로서, 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지 조성물을 제조하고, 유사한 실험을 실시했다.

[0309] 그 결과, CD34 양성 세포는 배지 조성물을 사용하여 현탁 상태로 균일하게 배양될 수 있고, 배지 조성물 중에서 증식함이 확인되었다. 또한, 배지 조성물은 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 기존의 배지의 것 이상의 세포 증식 촉진 효과를 가짐이 확인되었다. 또한, 원심분리는 세포의 침강을 야기하고 세포는 회수될 수 있음을 확인했다. 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지에서 배양된세포의 수가 1 인, 7 일 동안의 현탁 정치 배양 이후의 CD34 양성 세포로부터 증식 된 세포의 상대적 수를 표 29 에 나타낸다.

[0310] [표 29]

[0311]

탈아실화 젤란 검	상대적 세포 수
부재	1.0
존재	1.2

[0312] 참조 실험예 22: 스피어 형성 시험

[0313] 참조 실험예 2 에서와 동일한 방식으로, 0.015% 의 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 및 10%(v/v) 우태 혈청을 함유하는 DMEM 배지 (WAKO 사제) 의 조성물을 제조했다. 연속하여, HepG2 세포를 15000 개의 세포/mL 의 세포 농도로 첨가하고, 24-웰 플레이트 (Corning Incorporated 사제) 에 1 mL 로 분배하였다. 이러한 플레이트를 7 일 동안 37℃ 에서 계속 정치시켜 현탁-배양하고, 스피어의 형성을 현미경으로 확인했다. 또한, 원심분리 처리 (400 G, 5 분) 에 의해 스피어 세포를 침강시키고, PBS (5 mL) 에 의해 1 회 세척했다. 100 μL 의 트립신-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 (WAKO 사제) 을 첨가하고, 혼합물을 37℃ 에서 5 분간 인큐베이션했다. 여기서, 얻어진 세포 현탁액 (100 μL) 에 대해 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 (100 μL) 를 첨가하여, 세포 현탁액 중 일부에 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다. 그 결과, HepG2 세포는 배지 조성물에서 스피어를 형성하고, 80800 개의 세포/mL 로 증가함이 확인되었다. 배지 조성물에서 형성한 HepG2 세포의 스피어를 도 8 에 나타낸다.

[0314] 참조 실험예 23: 세포주-유래 스피어를 사용한 세포 현탁 시험

[0315] 디우탄 검 (KELKO-CRETE DG, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.3%(w/v) 의 농도로 초순수 (Milli-Q 물) 에 현탁하고, 90℃ 에서 가열하면서 교반하여 용해했다. 이러한 수용액을 사용하여, 최종 디우탄 검 농도가 0.1%(w/v) 인 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. 또한, 0.5%(w/v) 의 네이티브형 (native-type) 젤란 검 (KELCO GEL HT, San-Ei Gen F.F.I., Inc. 사제) 을 포함하는 수용액을 90℃ 에서 가열하여 제조했다. 수용액을 사용하여, 0.05 또는 0.1%(w/v) 의 네이티브형 젤란 검을 포함하는 DMEM/F-12 배지 (Sigma Ltd. 사제) 조성물을 제조했다.

[0316] 참조 실험예 2 에서와 동일한 방식으로, HeLa 세포의 스피어를 제조하고, 상기 제조된 배지 (1 mL) 각각에 수십 개의 스피어를 첨가하고, 혼합물을 1 시간 동안 37℃ 에서 계속 정치시키고, 스피어 세포의 현탁 상태를 시각적으로 관찰했다. 그 결과, HeLa 세포의 스피어는 상기 언급된 배지 조성물 중 임의의 것에서 현탁 상태를 유지함이 확인되었다. 또한, 0.1%(w/v) 의 디우탄 검을 포함하는 세포 현탁액의 원심분리 (200 G, 5 분) 는 HeLa 세포의 스피어의 침강 및 회수를 산출함을 확인했다.

[0317] 참조 실험예 24: 세포 부착 능력을 갖는 자성 비이드를 사용한 세포 현탁 시험- 1

[0318] 라미닌 또는 파이브로넥틴에 의해 코팅된 GEM (등록상표, Global Eukaryotic Microcarrier, GL Sciences Inc. 사제) 의 현탁액을 1.5 mL 부피의 마이크로 시험 튜브 (Eppendorf 사제) 에 500 μL 로 분배하고, 자성 스탠드 (TA4899N12, TAMAGAWA SEIKI CO., LTD. 사제) 를 사용해 상기 언급된 GEM 현탁액으로부터 GEM 를 축적시키고, 용매를 제거했다. 또한, 10%(v/v) 우태 혈청을 함유하는 DMEM 배지 (WAKO 사제, 500 μL) 에 의해 GEM 을 2 회 세척하고, 상기 배지 (500 μL) 에 현탁시켰다. 이러한 현탁액을 세포 저부착 플레이트인 Sumilon cell tight plate 24 F (SUMITOMO BAKELITE 사제) 에 1 웰 당 50 μL 로 분배하였다. 연속하여, 별도 제조한 HepG2 세포를 250000 개의 세포/mL 로 첨가하고, 동일한 배지에 의해 최종 부피를 500 μL/웰로 조절했다.

이러한 세포 현탁액을 수동으로 교반하고, 플레이트를 밤새 CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 정치시켰다.

GEM 상에서의 세포의 접착을 현미경으로 확인한 후, 세포 현탁액을 1.5 mL 의 마이크로 시험 튜브 (Eppendorf 사제) 로 옮기고, 상기 언급된 자석 스탠드를 사용하여 세포-부착 GEM 을 축적시키고, 상청액을 제거했다.

[0319] 참조 실험예 2 에서와 유사한 방법에 의해, 0.015% 의 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 및 10%(v/v) 우태 혈청을 함유하는 DMEM 배지 (WAKO 사제) 조성물을 제조했다. 이러한 배지 조성물 또는 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 상기 배지를 각각 상기에서 제조한 HepG2 세포-부착 GEM (라미닌 또는 파이브로넥틴 코팅) 에 1 mL 로 첨가하고, 현탁시키고, Sumilon cell tight plate 24 F 에 옮겼다. 연속하여, 이러한 플레이트를 6 일 동안 CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 정치시키고, 세포 배양 배지를 1.5 mL 마이크로 시험 튜브 (Eppendorf 사제) 로 옮기고, 상기 언급된 자석 스탠드 상에서 가볍게 파이펫팅하면서 세포-부착 GEM 을 축적시키고 상청액을 제거했다. GEM 을 PBS (1mL) 에 의해 1 회 세척하고, 200 μL 의 트립신-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 (WAKO 사제) 을 첨가하고, 혼합물을 37℃ 에서 10 분 동안 인큐베이션했다.

여기서 얻어진 세포 현탁액 200 μL 에 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 800 μL 를 첨가하고, 세포 현탁액 중 일부에 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다.

[0320] 그 결과, HepG2 세포를 부착시킨 GEM 는 배지 조성물을 사용하여 현탁 상태로 배양될 수 있고, 배지 조성물에서 효율적으로 증식함이 확인되었다. 또한, 배지 조성물은 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 기존의 배지의 것보다 우수한 세포 증식 촉진 효과를 나타냄이 확인되었다. 또한, 자성력을 사용하여 배지 조성물로부터 HepG2 세포-부착 GEM 이 수집될 수 있고, 또한 이러한 GEM 으로부터 HepG2 세포를 회수할 수 있음을 확인했다.

[0321] 탈아실화 젤란 검-함유 또는 비함유 배지 중에 GEM 상에서 6 일간 배양했을 때 HepG2 세포의 수를 표 30 에 나타낸다. 또한, 배지 조성물에서 배양했을 때HepG2 세포-부착 라미닌-코팅된 GEM 의 현탁 상태를 도 9 에 나타낸다.

[0322] [표 30]

[0323]

탈아실화 젤란 검	HepG2 세포 수 (×10000/mL)	
	라미닌 코팅된 GEM	파이브로넥틴 코팅된 GEM
부재	50.0	54.7
존재	112.3	94.0

[0324] 참조 실험예 25: 세포 부착 능력을 갖는 자성 비이드를 사용한 세포 현탁 시험 - 2

[0325] 참조 실험예 24 에서와 동일한 방식으로, 파이브로넥틴-코팅된 GEM (등록상표, Global Eukaryotic Microcarrier, GL Sciences Inc. 사제) 을 MF-Medium (등록상표) 중간엽 줄기 세포 증식 배지 (TOYOBO CO., LTD. 사제) 에 현탁했다. 이 현탁액을 세포 저부착 플레이트인 Sumilon cell tight plate 24 F (SUMITOMO BAKELITE 사제) 에 1 웰 당 50 μL 로 현탁시켰다. 연속하여, 별도 제조한 인간 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (Cell Applications 사제) 를 250000 개의 세포/mL 로 첨가하고, 참조 실험예 24 에서와 동일한 방식으로 이러한 플레이트를 밤새 CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 정치시켜, 중간엽 줄기 세포가 접착된 GEM 를 제조했다.

[0326] 참조 실험예 2 에서와 유사한 방법에 의해, 0.015% 의 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 함유하는 MF-Medium (등록상표) 중간엽 줄기 세포 증식 배지 (TOYOBO CO., LTD. 사제) 조성물을 제조했다. 이러한 배지 조성물 또는 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 상기 배지를 상기 제조한 중간엽 줄기 세포-부착 GEM (파이브로넥틴-코팅됨) 에 1 mL 로 각각 첨가하고, 현탁시키고, Sumilon cell tight plate 24 F

로 옮겼다. 연속하여, 이러한 플레이트를 4 일 동안 CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 정치시키고, 세포 배양액을 1.5 mL 의 마이크로 시험 튜브 (Eppendorf 사제) 로 옮기고, 상기 언급된 자석 스탠드 상에서 가볍게 파이펫팅하면서 세포-부착 GEM 을 축적시키고, 상청액을 제거했다. GEM 을 PBS (1mL) 에 의해 1 회 세척하고, 200 μL 의 트립신-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 (WAKO 사제) 을 첨가하고, 37℃ 에서 10 분 동안 인큐베이션했다. 여기서 얻어진 세포 현탁액 200 μL 에 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 800 μL 를 첨가하고, 세포 현탁액 중 일부에 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다.

[0327] 그 결과, 중간엽 줄기 세포를 부착시킨 GEM 은 배지 조성물을 사용하여 현탁 상태로 배양될 수 있고, 배지 조성물 중에서 효율적으로 증식함이 확인되었다. 또한, 배지 조성물은 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 기존의 배지의 것보다 우수한 세포 증식의 촉진 효과를 나타냄이 확인되었다. 또한, 자성력을 사용하여 배지 조성물로부터 중간엽 줄기 세포-부착 GEM 을 수집할 수 있고, 또한 이러한 GEM 으로부터 중간엽 줄기 세포를 회수할 수 있음을 확인했다.

[0328] 탈아실화 젤란 검-함유 또는 -비함유 배지 중에 GEM 상에서 4 일 동안 배양했을 때 중간엽 줄기 세포의 세포수를 표 31 에 나타낸다.

[0329] [표 31]

탈아실화 젤란 검	중간엽 줄기 세포수 (×10000/mL)
부재	11.3
존재	20.9

[0330]

[0331] 참조 실험예 26: 알긴산 비이드를 사용한 세포 현탁 시험

[0332] 이하의 시험은 PG Research 사제의 알긴산 3차원 배양 키트의 방법에 따라 실시했다. 별도 제조한 HepG2 세포를 400000 개의 세포/mL 로 나트륨 알기네이트 용액 (PG Research 사제, 2.5 mL) 에 첨가하고, 인간 재조합 라미닌 511 (Veritas Ltd. 사제) 을 5 μg/mL 로 추가 첨가하여, 세포 현탁액을 제조했다. 세포 현탁액을 개비지 바늘 (gavage needle) 을 갖는 5 mL 주사기 (TERUMO CORPORATION 사제) 로 회수하고, 이러한 주사기에 22 G 주사 바늘 (TERUMO CORPORATION 사제) 을 장착했다. 연속하여, 칼슘 클로라이드 수용액 (PG Research 사제) 각각 2 mL 가 첨가된 24 웰 평저 마이크로 플레이트 (PG Research 사제) 의 웰 각각에 대해, 세포 현탁액을 10 액적으로 첨가했다. 10 분 동안 실온에서 혼합물을 정치시키고, 알긴산 비이드의 형성을 확인하고, 칼슘 클로라이드 용액을 제거하고, PBS (2 mL) 를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 15 분 동안 정치시켰다. 또한, PBS 를 제거하고, 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 (WAKO 사제, 2 mL) 를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 15 분 동안 정치시켰다. 배지를 제거하고, 참조 실험예 2 에서와 유사한 방법에 의해 제조한 0.03% 의 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 및 10%(v/v) 우태 혈청을 함유하는 DMEM 배지 (WAKO 사제), 또는 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 상기 배지를 각각의 웰에 1 mL 로 첨가하고, 8 일 동안 CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 정치 배양했다. 배지는 배양 4 일째에 교환했다.

[0333] 배양한 알긴산 비이드를 1 mL 의 팁을 사용하여 1.5 mL 의 마이크로 시험 튜브 (Eppendorf 사제) 로 옮기고, 나트륨 시트레이트 용액 (1 mL, PG Research 사제) 을 각 튜브에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 15 분 동안 교반하여, 알긴산 비이드를 용해시켰다. 연속하여, 300 G 에서 3분 동안 원심분리에 의해 세포를 침강시키고, 상청액을 제거했다. 세포에 200 μL 의 트립신-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 (WAKO 사제) 을 첨가하고, 혼합물을 37℃ 에서 5 분 동안 인큐베이션했다. 수득된 세포 현탁액 (200 μL) 에 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 800 μL 를 첨가하고, 세포 현탁액 중 일부에 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다.

[0334] 그 결과, HepG2 세포를 포매한 알긴산 비이드는 배지 조성물을 사용하여 현탁 상태로 배양될 수 있고, 배지 조성물에서 효율적으로 증식함이 확인되었다. 또한, 배지 조성물은 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 기존의 배지의 것보다 우수한 세포 증식 촉진 효과를 나타냄이 확인되었다.

[0335] 탈아실화 젤란 검-함유 또는 -비함유 배지 중 알긴산 비이드에서 8 일 동안 배양했을 때 HepG2 세포의 세포수를 표 32 에 나타낸다. 또한, HepG2 세포-포매 알긴산 비이드를 배지 조성물에서 배양했을 때 현탁 상태를 도 10 에 나타낸다.

[0336] [표 32]

[0337]

탈아실화 젤란 검	HepG2 세포 수 (×10000/mL)
부재	34.9
존재	51.8

[0338] 참조 실험예 27: 콜라겐 겔 캡슐을 사용한 세포 현탁 시험

[0339] A: 조직 배양 콜라겐 Cell matrix (등록상표) Type I-A (세포 매트릭스, Nitta Gelatin Inc. 사제), B: 10-배 농도의 DMEM/F-12 배지 (Aldrich 사제), C: 재구성용 완충액 (0.05N 수산화나트륨 용액 (100 mL) 에 탄산수소나트륨 (2.2 g), HEPES (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산)) (4.77 g) 를 첨가하고 혼합물을 여과 살균하여 수득됨) 을 얼음 중에서 냉각하면서 A:B:C=8:1:1 로 혼합했다. 또한, 인간 재조합 라미닌 511 (Veritas Ltd. 사제) 을 5 ㎍/mL 로 첨가해, 콜라겐 혼합 용액 (500 μL) 을 제조했다. 혼합 용액에 별도 제조한 HepG2 세포를 200000 개의 세포/mL 로 첨가하고, 25G 주사 바늘 (TERUMO CORPORATION 사제) 을 장착한 1.5 mL 주사기 (TERUMO CORPORATION 사제) 를 사용하여 총량을 회수했다. 연속하여, 37℃ 에서 미리 인큐베이션되고 10%(v/v) 우태 혈청을 함유하는 DMEM 배지 (WAKO 사제) (10 mL) 를 포함하는 평저 튜브 (BM Equipment Co., Ltd. 사제) 에, 상기 언급된 주사기를 사용하여 세포 현탁액을 1 액적으로 적가하였다. 혼합물을 37℃ 의 물 배쓰에서 10 분간 인큐베이션하고, 약 2 mm 직경을 갖는 부정형 콜라겐 겔 캡슐의 형성을 확인하고, 참조 실험예 2 에서와 유사한 방법으로 최종 농도 0.04% 로 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 첨가하고, 상기 캡슐을 가볍게 교반하여 현탁시켰다. 연속하여, 5 일 동안 CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 튜브를 정치 배양했다.

[0340] 콜라겐 겔 캡슐을 포함하는 배양 배지에 PBS (25 mL) 를 첨가하고, 400 G 에서 5 분 동안 원심분리에 의해 콜라겐 겔 캡슐을 침강시키고, 상청액을 제거했다. 또다시, PBS (25 mL) 를 첨가하고, 혼합물을 원심분리하고, 잔량이 5 mL 가 되도록 상청액을 제거했다. 이러한 용액에 대해 1%(W/V) 의 콜라게나아제 L (Nitta Gelatin Inc. 사제, 20 μL) 를 첨가하고, 혼합물을 37℃ 에서 2 시간 동안 진탕했다. 콜라겐 겔의 용해를 확인한 후, PBS (10 mL) 를 첨가하고, 400 G 에서 5 분 동안 원심분리에 의해 세포를 침강시키고, 상청액을 제거했다.
세포에 1 mL 의 트립신-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 (WAKO 사제) 을 첨가하고, 37℃ 에서 5 분 동안 인큐베이션했다. 얻어진 세포 현탁액에 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지를 4 mL 첨가하고, 400 G 에서 5 분 동안 원심분리에 의해 세포를 침강시키고, 상청액을 제거했다. 얻어진 세포를 2 mL 의 상기 동일한 배지에서 현탁시키고, 그 일부에 대해 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다.

[0341] 그 결과, HepG2 세포를 포매한 콜라겐 겔 캡슐은 배지 조성물을 사용하여 현탁 상태로 배양될 수 있고, 세포가 배지 조성물에서 효율적으로 증식함이 확인되었다. 또한, 배지 조성물은 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 기존의 배지의 것보다 우수한 세포 증식 촉진 효과를 나타냄이 확인되었다.

[0342] 탈아실화 젤란 검-함유 또는 비함유 배지에서 콜라겐 겔 캡슐 중에 5 일간 배양했을 때 HepG2 세포의 수를 표 33 에 나타낸다. 또한, HepG2 세포-포매된 콜라겐 겔 캡슐을 배지 조성물에서 배양했을 때 현탁 상태를 도 11 에 나타낸다.

[0343] [표 33]

[0344]

탈아실화 젤란 검	HepG2 세포 수 (×10000/mL)
부재	62.4
존재	106.0

[0345] 참조 실험예 28: 필터를 사용한 스피어의 회수 시험

[0346] 참조 실험예 2 에서와 유사한 방법에 의해 0.015% 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 및 10%(v/v) 우태 혈청을 함유하는 DMEM 배지 (WAKO 사제) 조성물을 제조했다. 또한, 대조로서 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 동일한 배지를 제조했다. 참조 실험예 2 에서와 유사한 방법에 의해 HepG2 세포 스피어를 형성하고, 상기 제조된 배지 (1 mL) 에 86000 개의 세포로 첨가하고, 혼합물을 1 시간 동안 37℃ 에서 정치시키고, 스피어 세포 현탁액을 시각적으로 관찰했다. 또한, 메시 크기가 40 ㎛ 인 셀 스트레이너 (Becton, Dickinson and Company 사제) 위에 세포 현탁액을 첨가해, 스피어를 필터 상에 포획했다. 연속하여, 필터의 후면으로부터 PBS (10 mL) 를 흘려 스피어를 15 mL 튜브에 회수하고, 300 G 에서 5 분 동안 원심분

리에 의해 스피어를 침강시켰다. 상청액을 제거하고, 스피어에 500 μL 의 트립신-EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 (WAKO 사제) 을 첨가하고, 37℃ 에서 5 분 동안 인큐베이션했다. 얻어진 세포 현탁액에 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 (1 mL) 를 첨가하고, 그 일부에 트립판 블루 염색 용액 (Invitrogen Corporation 사제) 을 동량 첨가하고, 혈구 계산기 (ERMA INC. 사제) 에 의해 생세포의 수를 측정했다. 그 결과, HepG2 세포의 스피어는 상기 언급된 배지 조성물에서 현탁 상태로 유지됨을 확인했다. 또한, 0.015% 의 탈아실화 젤란 검을 포함하는 스피어 현탁액을 필터 처리하여, HepG2 세포 스피어의 세포를 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지의 것과 동등한 회수율로 회수될 수 있음을 확인했다. 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 배지를 사용하고 필터에 의해 회수된 HepG2 세포의 수가 1 인, 탈아실화 젤란 검을 포함하는 배지로부터 회수된 상대적 수를 표 34 에 나타낸다.

[0347] [표 34]

[0348]

탈아실화 젤란 검	상대적 HepG2 세포 수
부재	1.0
존재	1.1

[0349] 참조 실험예 29: 각종 다당류의 조합제를 사용한 스피어의 세포 현탁 시험

[0350] 참조 실험예 9 에서와 유사한 방법에 의해, 잔탄 검 (KELTROL CG, SANSHO Co., Ltd. 사제), 나트륨 알기네이트 (Duck 알긴산 NSPM, FOOD CHEMIFA Co., Ltd. 사제), 로커스트 빈 검 (GENUGUM RL-200-J, SANSHO Co., Ltd. 사제), 메틸셀룰로오스 (cP400, WAKO 사제), k-카라기난 (GENUGEL WR-80-J, SANSHO Co., Ltd. 사제), 펙틴 (GENU pectin LM-102 AS, SANSHO Co., Ltd. 사제) 또는 디우탄 검 (KELCO CRETE DG-F, SANSHO Co., Ltd. 사제) 및 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 의 조합을 함유하는 DMEM/F-12 배지 조성물을 제조했다. 참조 실험예 2 에서와 동일한 방식으로, HepG2 세포의 스피어를 제조하고, 상기로 제조한 각각의 배지 (1 mL) 에 수 십 개의 스피어를 첨가하고, 혼합물을 37℃ 에서 1 시간 또는 하룻밤 동안 정치시키고, 스피어 세포의 현탁 상태를 시각적으로 관찰했다. 그 결과, HepG2 세포의 스피어는 상기 언급된 배지 조성물 중 임의의 것에서 현탁 상태를 유지함을 확인했다. 또한, 2-배 양의 배지의 첨가 및 세포 현탁액의 원심분리 (500 G, 5 분) 는 HepG2 세포 스피어의 침강 및 회수를 산출함을 모든 배지 조성물에서 확인했다. 하룻밤 이후 스피어의 분산 상태를 시각적 관찰에 의해 확인하였고, 여기서 현탁 및 분산 상태는 ○ 이고, 일부 침강/분산 상태는 △ 이고, 침강 상태는 × 이다. 평가 결과를 표 35 및 표 36 에 나타낸다. 표에서, - 는 미실시를 나타낸다.

[0351] [표 35]

[0352]

탈아실화 젤란 검 농도 (%)	당류 첨가 농도 (%)	메틸셀룰로오스	디우탄 검
0.005	0.05	-	Δ
	0.2	Δ	-

[0353] [표 36]

탈아실화 젤란 검 농도 (%)	당류 첨가 농도 (%)	잔탄 검	나트륨 알기네이트	로커스트 빈 검	메틸-셀룰로오스	κ-카라기난	펙틴	디우탄 검
0.01	0.05	-	-	-	-	○	-	○
	0.1	○	○	○	-	-	Δ	-
	0.2	-	-	-	○	-	-	-

[0354]

[0355] 비이드와 세포의 분산성 비교 - 1

[0356] 상기(비교예) 에서 제조한 탈아실화 젤란 검 함유 배지와 메틸셀룰로오스-함유 배지 사이에서, 덱스트란 비이드 Cytodex (등록 상표) 1 (GE Healthcare Life Sciences 사제) 및 HeLa 세포 스피어의 분산 상태를 비교했다. 결과를 표 (표 37 및 38) 에 나타낸다. Cytodex1 와 HeLa 세포 스피어의 분산 상태는 익히 상관관계가 있고, Cytodex1 는 세포 스피어 모델로서 사용될 수 있다.

[0357] [표 37]

탈아실젤란 검 농도 %(w/v)	Cytodex1 현탁액/ 침강	HeLa 세포 현탁액/ 침강
0.01	현탁액/일부 침강	현탁액
0.02	현탁액	현탁액
0.03	현탁액	현탁액
0.05	현탁액	현탁액

[0358]

[0359] [표 38]

메틸셀룰로오스 %(w/v)	Cytodex1 현탁액/ 침강	HeLa 세포 현탁액/ 침강
0.1	침강	침강
0.3	침강	침강
0.6	침강	침강
1.0	침강	침강

[0360]

[0361] 비이드와 세포의 분산성 비교 - 2

[0362] 참조 실험예 9 에서 제조한 다당류와 탈아실화 젤란 검-함유 배지 사이에서, 폴리스티렌 비이드 (크기 500-600 ㎛, Polysciences Inc. 사제) 및 HepG2 세포 스피어의 분산 상태를 비교했다. 평가에서 현탁 및 분산 상태는 ○ 이고, 일부 침강/분산 상태는 △ 이고, 침강 상태는 × 이다. 결과를 표 (표 39) 에 나타낸다. 폴리스티렌 비이드 및 HepG2 세포 스피어의 분산 상태는 익히 상관관계가 있고, 폴리스티렌 비이드는 세포 스피어 모델로서 사용될 수 있다.

[0363] [표 39]

		잔탄 검		알긴산 Na		로커스트 빈 검		디유탄 검	
	다당류 농도	PS 비이드	HepG2 덩어리	PS 비이드	HepG2 덩어리	PS 비이드	HepG2 덩어리	PS 비이드	HepG2 덩어리
탈아실화 젤란 검 농도 0.01%(w/v)	0.05%							O	O
	0.1%	O	O	O	O	O	O	O	
	0.2%	O		O		O			

[0364]

[0365] 참조 실험예 30: 벼-유래 식물 유합 조직의 현탁 배양 시험

[0366] 염 용액과 함께 선택된 벼 닙폰바레 (Nipponbare) 의 완전 완숙 종자 (Koto agricultural cooperatives 로부터 구입) 50 종자를 50 mL 폴리스티렌 튜브 (BD Falcon 사제) 에 옮기고, 멸균수 (50 mL) 에 의해 세척하고, 70% 에탄올 물 (30 mL) 중에서 1 분 동안 교반했다. 에탄올 물을 제거하고, Kitchen Haiter (Kao Corporation 사제, 30 mL) 를 첨가하고, 혼합물을 1 시간 동안 교반했다. Kitchen Haiter 를 제거하고, 멸균수 (50 mL) 에 의해 4 회 세척했다. 멸균한 종자를, 2 μg/mL 의 2,4-디클로로페녹시아세트산 (Sigma Aldrich 사제) 및 한천을 포함하는 무라시게 스쿠그 (Murashige Skoog) 기초 배지 (M9274, Sigma Aldrich 사제) 상에 1.5 mL/웰 (24 웰 평저 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제)) 로 배양했다. 30℃, 16 시간 어두운 장소/8 시간 어두운 장소의 조건 하에 3 주간 배양하고, 종자 낭포에서 성장한 엷은 황색의 유합 조직 (1 ~ 2 mm) 을 수확했다.

[0367] 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.3%(w/v) 로 초순수 (Milli-Q 물) 에 현탁시키고, 90℃ 에서 가열하면서 교반하여 용해시켰다. 이러한 수용액을 121℃ 에서 20 분 동안 오토클레이브 중에 멸균했다. 이러한 용액을 사용하여, 2 μg/mL 의 2,4-디클로로페녹시아세트산 (Sigma Aldrich 사제) 을 포함하는 무라시게 · 스쿠그 기초 배지 (M9274, Sigma Aldrich 사제) 에 최종 농도 0.03%(w/v) 로 탈아실화 젤란 검을 첨가하여 배지 조성물을 제조했다. 상기에서 제조한 유합 조직 15 개를 10 mL/평저 튜브 (BM

Equipment Co., Ltd. 사제) 에서 이러한 조성물에 첨가하고, 7 일간 25℃ 에서 진탕 배양을 실시했다. 그 결과, 벼 유래 유합 조직은 배지 조성물을 사용하여 현탁 상태로 배양될 수 있고, 유합 조직이 배지 조성물에서 유지됨을 확인하였다. 벼-유래 유합 조직을 배지 조성물에서 배양했을 때 현탁 상태를 도 12 에 나타낸다.

[0368] [제조예 1: 결정 셀룰로오스 유래 셀룰로오스 나노섬유의 제조]

[0369] 시판되는 결정 셀룰로오스 (PH-101, Asahi Kasei Chemicals Corporation 사제) (4 질량부) 를 순수한 물 (396 질량부) 에 분산시키고, Sugino Machine Limited 사제의 고압 분쇄 장치 (Star Burstsystem) 를 사용하여, 220 MPa 에서 100 회 분쇄 처리를 실시해, 결정 셀룰로오스 유래의 셀룰로오스 나노섬유의 수분산액 (MNC) 을 얻었다. 얻어진 분산액을 페트리 디쉬에서 저울로 측정하고, 110℃ 에서 1 시간 동안 건조시켜, 수분을 제거했다. 잔류물의 양을 측정하고, 농도를 측정했다. 그 결과, 물 중의 셀룰로오스 농도 (고형분 농도) 는, 1.0 질량% 였다. 이 수분산액을 121℃, 20 분간 오토클레이브에서 처리함으로써 멸균했다.

[0370] [제조예 2: 펄프 유래 셀룰로오스 나노섬유의 제조]

[0371] 시판되는 크라프트 펄프 (LBKP, Oji F-Tex Co., Ltd. 사제, 고형분 89 질량%) (5 질량부) 를 순수한 물 (145 질량부) 에 분산시키고, MASUKO SANGYO CO., LTD. 사제의 맷돌식 분쇄 장치 (Masscolloider) 를 사용하여, 1500 rpm 에서 9 회 분쇄 처리를 실시하여, 펄프 슬러리를 제작했다. 상기 언급된 펄프 슬러리를 Sugino Machine Limited 사제 고압 분쇄 장치 (Star Burstsystem) 를 사용하여, 220 MPa 에서 300 회 처리함으로써, 나노셀룰로오스의 수 분산액 (PNC) 을 얻었다. 얻어진 분산액을 페트리 디쉬에서 저울로 측정하고, 110℃ 에서 1 시간 동안 건조시켜, 수분을 제거했다. 잔류물의 양을 측정하고, 농도를 측정했다. 그 결과, 물 중의 셀룰로오스 농도 (고형분 농도) 는, 1.6 질량% 였다. 이 수분산액을 121℃, 20 분간 오토클레이브에서 처리함으로써 멸균했다.

[0372] [제조예 3: 키틴 나노섬유의 제조]

[0373] 시판되는 키틴 분말 (KOYO CHEMICAL CO., LTD. 사제) (20 질량부) 를 순수한 물 (980 질량부) 에 분산시키고, Sugino Machine Limited 사제 고압 분쇄 장치 (Star Burstsystem) 를 사용하여, 245 MPa 에서 200 회 처리함으로써, 키틴 나노섬유의 수 분산액 (CT) 을 얻었다. 얻어진 분산액을 페트리 디쉬에서 저울로 측정하고, 110℃ 에서 1 시간 동안 건조시켜, 수분을 제거했다. 잔류물의 양을 측정하고, 농도를 측정했다. 그 결과, 물 중의 키틴 농도 (고형분 농도) 는, 2.0 질량% 였다. 이 수분산액을 121℃, 20 분간 오토클레이브에서 처리함으로써 멸균했다.

[0374] [시험예 1: 평균 섬유 직경 D 및 평균 섬유 길이 L 의 측정]

[0375] 나노섬유의 평균 섬유 직경 (D) 은 이하와 같이 측정했다. 먼저 Okenshoji Co., Ltd. 에 의해 제조된 콜로디온 (collodion) 지지막을 JEOL Ltd. 사제 이온 크리나 (ion creaner, JIC-410) 로 3 분간 친수화 처리에 적용했다. 제조예 1 내지 3 에서 제작된 나노섬유 분산액 (초순수로의 희석) 의 여러 액적을 적가하고, 실온에서 건조했다. 이것을 Hitachi, Ltd. 사제 투과형 전자 현미경 (TEM, H-8000) (10,000 배) 에서 가속 전압 200 kV로 관찰했다. 얻어진 화상을 사용하여, 나노섬유 (표본수: 200 ~ 250 개) 의 각각 하나씩의 섬유 직경을 측정하고, 그의 평균치를 평균 섬유 직경 (D) 으로 했다.

[0376] 또, 평균 섬유 길이 (L) 는, 제조예에서 제조된 나노섬유 분산액을 순수한 물에 의해 100 ppm 가 되도록 희석하고, 초음파 세척기를 사용하여 나노섬유를 균일하게 분산시켰다. 이 나노섬유 분산액을 미리 농축 황산을 사용하여 표면을 친수화 처리에 적용한 실리콘 웨이퍼 (wafer) 상에 캐스트하고, 110℃ 에서 1 시간 건조시켜 시료로서 사용했다. 얻어진 시료를 주사 전자 현미경 (SEM, JSM-7400 F) (2,000 배) 로 관찰함으로써 수득된 화상을 사용하여, 나노섬유 (표본수: 150 ~ 250 개) 의 각각 하나씩의 섬유 길이를 측정하고, 그의 평균치를 평균 섬유 길이 (L) 로 했다.

[0377] 제조예 1 내지 제조예 3 에서 수득된 나노섬유의 평균 섬유 직경 D 및 평균 섬유 길이 L 를 측정하고, 이들의 값으로부터 종횡비 L/D 를 측정했다. 얻어진 결과를 표 40 에 나타낸다.

[0378] [표 40]

	평균 섬유 직경 D [nm]	평균 섬유 길이 L [nm]	종횡비 L/D
제조예 1(MNC)	15	181	12
제조예 2(PNC)	13	2810	222
제조예 3(CT)	12	352	29

[0379]

[0380] [실시예 1 내지 실시예 4]

[0381] 상기 언급된 제조예 1 내지 제조예 3 에서 제조된 나노섬유 분산액 및 탈아실화 젤란 검 수용액을 사용하여, 하기 표 41 에 기재된 배지 조성물을 제조했다.

[0382] 먼저, 제조예 1 내지 제조예 3 에서 제조된 셀룰로오스 나노섬유 MNC, PNC 및 키틴 나노섬유에 멸균수를 첨가하여, 각각 1%(w/v) 수분산액으로 희석했다. 한편, 탈아실화 젤란 검 (KELCOGELCG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제: DAG) (1 질량부) 에 99 부피부의 멸균수를 첨가하고, 121℃, 20 분간 오토클레이브 처리함으로써 용해 및 멸균시켜, 탈아실화 젤란 검 1%(w/v) 수용액을 산출했다.

[0383] 상기 언급된 1%(w/v) 분산액 또는 수용액 (1 부피부) 를 50 mL 코니칼 튜브에 넣고, 49 부피부의 멸균수를 첨가하고, 균일해질 때까지 혼합물을 파이펫팅했다. 여기에 0.22 ㎛ 필터로의 멸균에 의해 여과한 후 2 배 농도의 DMEM (high glucose, Aldrich 사제, 소정량의 탄산수소나트륨을 포함함) 를 50 부피부 첨가하고, 파이펫팅에 의해 혼합하여, 나노섬유 농도가 0.01%(w/v) 인 배지 조성물을 제조했다.

[0384] 유사하게는, 최종의 원하는 농도가 0.01 ~ 0.1%(w/v) 가 되도록 나노섬유 분산액 또는 탈아실화 젤란 검 수용액을 첨가한 배지 조성물을 제조했다.

[0385] [실시예 5 및 비교예 2 내지 비교예 5]

[0386] κ - 카라기난 (GENUGEL WR-80-J, SANSHO Co., Ltd. 사제: Car) (실시예 5), 로커스트 빈 검 (GENUGUM RL-200-J, SANSHO Co., Ltd. 사제: LBG) (비교예 2), 잔탄 검 (KELTROL CG, SANSHO Co., Ltd. 사제: Xan) (비교예 3), 디우탄 검 (KELCO CRETE DG-F, SANSHO Co., Ltd. 사제: DU) (비교예 4), 알긴산 Na (Duc 알긴산 NSPM, Food Chemifa Co., Ltd. 사제: Alg) (비교예 5) (1 질량부) 에 99 질량부의 멸균수를 첨가하고, 121℃, 20 분간 오토클레이브 처리함으로써, 용해 및 멸균시켰다.

[0387] 상기 언급된 바와 같이 제조된 다당류 용액을, 실시예 1 내지 4 와 유사한 조작에 적용하여, 최종 농도가 0.03, 0.05, 0.07, 0.1%(w/v) 가 되도록 다당류 용액을 첨가한 배지 조성물을 제조했다.

[0388] [시험예 2: 현탁 작용의 평가 - 1]

[0389] 실시예 1 내지 5 및 비교예 2 내지 5 의 배지 조성물에, 폴리스티렌 비이드 (Polysciences Inc. 사제, 200-300 ㎛) 를 첨가하고, 보르텍스 교반에 의해 배지 조성물 중에 비이드가 균일하게 분산한 것을 확인한 후, 조성물을 실온 (25℃) 에서 하루 동안 방치하여, 비이드의 분산 상태를 시각적 관찰에 의해 확인했다. 배지 조성물 중에서 균일하게 비이드가 현탁된 상태를 ◎, 일부 상청을 일으킨 상태를 ○, 침강 상태를 × 로서 평가했다. 결과를 표 41 에 나타낸다.

[0390] 그 결과, 실시예 1 내지 실시예 4 의 배지 조성물은, 비이드를 현탁시키는 작용을 나타냈다. 또, 실시예 5 에서는 실온에서 비이드의 현탁 작용을 나타냈지만, 비이드는 37℃ 로 가온함으로써 침강했고, 세포 배양 조건에서는 현탁 작용은 얻어지지 않았다. 비교예 2 내지 비교예 5 에서는 비이드는 완전하게 저면에 침강했다.

[0391] [표 41]

			농도 %(w/v)				
			0.01	0.03	0.05	0.07	0.1
실시예	1	MNC	×	×	○	○	○
	2	PNC	○	◉	◉	◉	◉
	3	CT	×	○	○	○	○
	4	DAG	◉	◉	◉	◉	◉
	5	Car	×	○*	○*	○*	○*
비교예	2	LBG	×	×	×	×	×
	3	Xan	×	×	×	×	×
	4	DU	×	×	×	×	×
	5	Alg	×	×	×	×	×

[0392]

[0393] * 실시예 5 의 κ-카라기난 (Car) 은, 25℃ 에서 현탁 작용을 나타낸 반면, 세포 배양 조건과 동등한 37℃ 에서는, 즉석에서 현탁 작용을 잃고, 비이드는 침강했다. 그 밖의 배지에 대해서는, 37℃ 및 25℃ 에서, 동일한 결과가 수득되었다.

[0394] [시험예 3: 현탁 작용의 평가 - 2]

[0395] 시험예 2 와 동일한 방식으로, 실시예 2, 4 및 5 및 비교예 2 의 배지 조성물 에 대해, 저농도 영역 (0.01 ~ 0.04%(w/v)) 에 있어서의 현탁 작용을 상세하게 평가했다. 폴리스티렌 비이드를 첨가하고, 조성물을 2 일간 정치시키고, 비이드의 분산 상태를 시각적 관찰에 의해 확인했다. 이들을 현탁된 및 분산된 상태를 ○, 침강 상태를 × 로서 평가했다. 일부 침강/분산 상태에 대해서는, 10 mL 코니칼 튜브 중의 현탁 영역의 높이에 근거해 비이드 현탁률을 산출했다. 결과를 표 42 에 나타낸다.

[0396] [표 42]

		중합체	농도 %(w/v)					
			0.015	0.02	0.025	0.03	0.035	0.04
실시예	2	PNC	50*	65*	85*	90*	○	○
	4	DAG	○	○	○	○	○	○
	5	Car	×	×*	×*	×*	×*	×*
비교예	2	LBG	×	×	×	×	×	×

[0397]

[0398] * 는 비이드 현탁률을 나타낸다. PNC 는 0.015%(w/v) 이상의 농도에서, 실시예 4 의 배지 조성물은 0.015%(w/v) 이상의 농도에서, 현탁 작용을 나타냈다. 실시예 2 의 배지 조성물은, 농도가 증가함에 따라, 단계적으로 현탁 작용이 향상되었다는 것을 보여준다. 실시예 5 의 배지 조성물이 0.02% 이상에서, 25℃ 에 있어서 현탁 작용을 나타냈지만, 37℃ 에서는, 즉석에서 현탁 작용을 잃고, 비이드가 침강했다 (*). 그 밖의 배지에 대해서는, 37℃ 및 25℃ 에서, 동일한 결과를 수득하였다.

[0399] [시험예 4: 배지 조성물의 점도]

[0400] 실시예 1~5 및 비교예 2~5 의 배지 조성물의 점도를, 25℃ 조건 아래에서 소리 굽쇠 진동식 점도 측정기 (SV-1A, A&D Company Ltd.) 를 사용하여 평가했다. 결과를 도 13 에 나타낸다. 수득된 결과는 본 발명의 배지 조성물이 나노섬유 또는 다당류 증점제의 함유량이 매우 적기 때문에, 일반적인 배지의 점도와 비교해, 현저한 점도 증가를 나타내지 않는다는 것을 나타낸다. 시험예 2 의 결과와의 비교로부터, 점도와 현탁 작용과의 사이에 상관성이 없다는 것을 나타냈다.

[0401] [시험예 5: 배지 조성물의 주사 전자 현미경 관찰]

[0402] 실시예 1 내지 5, 비교예 3 내지 4 에서 제조된 배지 조성물을 미리 농축 황산을 사용하여 표면을 친수화 처리한 실리콘 웨이퍼 (wafer) 상에 캐스트하고, 110℃ (비교예 1 만 실온) 에서 1 시간 건조시켰다. 그 위에 순수한 물을 부어 여분의 염 내용물 등을 제거하고, 조성물을 다시 110℃ 에서 1 시간 건조시켜 시료로서 사용했다. 상기 언급된 시료를 JEOL Ltd. 사제 주사 전자 현미경 (SEM, JSM-7400F) (10,000 배) 을 사용하여 관찰했다. 실시예 1 내지 4 및 비교예 3 및 4 의 배지 조성물의 관찰 결과를 도 14 내지 21 에 제시했다.

[0403] 관찰 결과로서, 실시예 1 내지 4 및 실온으로 건조시킨 실시예 5 에서는, 섬유가 다수 관찰된 것에 반해, 110℃ 으로 건조시킨 실시예 5 및 비교예 3 내지 4 에서는, 섬유가 전혀 관찰되지 않았다. 또한, 관찰 화상 중에

다수 관찰되는 구상 물체는, 배지 중의 염 성분이 석출된 것이다. 이 결과로부터, 배지 조성물 중에 포함되는 섬유 구조가 현탁 작용에 기여할 수 있을 것이라는 가능성이 시사되었다.

[0404] [시험예 7: 스피어-현탁 작용]

[0405] 인간 간암 세포주 HepG2 (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를, 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 (WAKO 사제) 에 50000 개의 세포/mL 로 현탁시키고, 이러한 현탁액 (10 mL) 을 EZ SPHERE (ASAHI GLASS CO., LTD. 사제) 에 파종하고, CO_2 인큐베이터 (5% CO_2) 내에서 2 일간 배양했다. 여기서 얻어진 스피어의 현탁액 (80 mL) 를 원심분리 처리 (800 rpm, 5 분) 에 적용하여 스피어를 침강시키고, 상청액을 제거하여 스피어 현탁액 (4.5 mL) 을 제조했다. 연속하여, 실시예 1 내지 4 및 비교예 1, 비교예 3 내지 5 의 배지 조성물을 15 mL 코니칼 튜브에 10 mL 씩 넣고, 추가로 HepG2 세포의 스피어 현탁액 (100 μL) 을 첨가했다. 파이펫팅에 의해 스피어를 분산시키고, 37℃ 에서 5 일간 인큐베이션하고, 배지 조성물 중에 있어서의 스피어의 분산 상태를 시각적으로 관찰했다. 배지 조성물 중에서 균일하게 스피어가 현탁된 상태를 ◎, 상청을 일으킨 상태를 ○, 침강 상태를 × 로서 평가했다. 실시예 1 내지 5, 비교예 3 내지 5 의 배지 조성물의 관찰 결과를 표 43 및 도 22 내지 29 에 제시했다.

[0406] 그 결과, 실시예 1 내지 실시예 4 의 배지 조성물 중에서는 6 일간 배양 후에도 현탁된 상태가 발견되었다. 한편, 실시예 5 및 비교예 3 내지 비교예 5 의 배지 조성물에서는, 모든 스피어는 침강되었고, 스피어는 서로 응집되어 있었다.

[0407] [표 43]

[0408]

		중합체	농도 %(w/v)				
			0.01	0.03	0.05	0.07	0.1
실시예	1	MNC	×	○	○	○	○
	2	PNC	○	○	○	○	○
	3	CT	×	○	○	○	○
	4	DAG	○	◎	◎	◎	◎
	5	Car	×	×	×	×	×
비교예	3	Xan	×	×	×	×	×
	4	DU	×	×	×	×	×
	5	Alg	×	×	×	×	×

[0409] [실시예 1' 내지 실시예 4']

[0410] 제조예 1 내지 제조예 3 에서 제조된 셀룰로오스 나노섬유 MNC, PNC 및 키틴 나노섬유에 멸균수를 첨가하여, 각각 1%(w/v) 수 분산액을 제조했다. 한편, 탈아실화 젤란 검 (KELCOGELCG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제: DAG) (1 질량부) 에 99 부피부의 멸균수를 첨가하고, 121℃, 20 분간 오토클레이브 처리함으로써 용해 및 멸균시켜, 1%(w/v) 수용액을 산출했다. 상기 제조된 1%(w/v) 섬유 분산액 또는 탈아실화 젤란 검 수용액을 사용하여, 최종 농도가 0.01%, 0.03%, 0.06% 및 0.1%(w/v) 가 되도록 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. 사제, high-glucose) 에 첨가해, 배지 조성물을 제조했다.

[0411] [실시예 5', 및 비교예 3' 내지 비교예 5']

[0412] κ-카라기난 (GENUGEL WR-80-J, SANSHO Co., Ltd. 사제: Car), 잔탄 검 (KELTROL CG, SANSHO Co., Ltd. 사제: Xan), 디우탄 검 (KELCO CRETE DG-F, SANSHO Co., Ltd. 사제: DU), 알긴산 Na (Duc 알긴산 NSPM, Food Chemifa Co., Ltd. 사제: Alg) (1 질량부) 에 99 질량부의 멸균수를 첨가하고, 121℃, 20 분간 오토클레이브 처리함으로써, 용해 및 멸균시켜, 각각 1%(w/v) 다당류 수용액을 제조했다. 상기 언급된 바와 같이 제조된 각각의 다당류 수용액을, 실시예 5 내지 8 과 유사한 조작에 적용하여, 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 DMEM 배지 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. 사제) 에 최종 농도 0.01%, 0.03%, 0.06% 및 0.1%(w/v) 가 되도록 다당류 수용액을 첨가함으로써, 배지 조성물을 제조했다.

[0413] [시험예 8: 세포 증식 시험]

[0414] 인간 유방암 세포주 MCF-7 (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 및 인간 흑색종 세포주 A375 (ATCC제) 를, 33333 개의 세포/mL 가 되도록 실시예 1' 내지 실시예 5' 및 비교예 3' 내지 비교예 5' 에서 제조한 배지 조성물에 파종하고, 96 웰 평저 초저부착 표면 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제, #3474) 의 웰에 1 웰 당 150 μL 가 되도록 분배했다. 음성 대조군으로서, 나노섬유 또는 다당류를 포함하지 않는 상기 배지

에 MCF7 세포 또는 A375 세포를 현탁하고, 현탁액을 분배했다. 연속하여, 본 플레이트를 CO_2 인큐베이터 (37℃, 5% CO_2) 내에서 최대 6 일간 정치 상태로 배양했다. 2 일간 및 6 일간 배양 후의 배양 배지에서, ATP 시약 150 μL (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하고 현탁시키고, 배지를 약 10 분간 실온으로 정치시켰다. FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에 의해 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 생 세포의 수를 측정했다.

[0415] 그 결과, PNC, MNC, 또는 나노키틴을 포함하는 당해 배지 조성물로 세포 응집 덩어리의 크기가 과잉이 되는 일 없이, 균일하게 분산된 상태에서 배양하는 것이 가능하고, 효율적으로 증식하는 것이 확인되었다. 한편, 알긴산나트륨을 포함하는 당해 배지 조성물에서는, 증식 촉진이 보이지 않았다. MCF7 세포의 정치 배양 2 일간 및 6 일간 후의 RLU 값 (ATP 측정, 발광 강도) 을 표 44 내지 표 47, 및 6 일간 후의 RLU 값을 도 30 내지 도 33 에, A375 세포의 결과를 표 48 내지 표 51, 및 6 일간 후의 RLU 값을 도 34 내지 도 37 에 나타낸다. 2 일간 배양의 응집덩어리의 현미경 관찰에 있어서, MCF7 세포의 결과를 도 38 에, A375 세포의 결과를 도 39 에 나타낸다.

[0416] [표 44]

MCF7	배양 일수	중합체 농도 %(w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
실시예 1′	2	9192	14688	15735	17096	17114
	6	7134	18829	21113	22987	22863
비교예 5′	2	9192	10795	11016	11027	11947
	6	7134	9052	8727	7751	10444

[0417]

[0418] [표 45]

MCF7	배양 일수	중합체 농도 %(w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
실시예 2′	2	8324	14836	16139	15188	15292
	6	7213	21391	20795	19498	19912
실시예 3′	2	8324	13563	14601	14760	15125
	6	7213	19340	19997	20439	21883

[0419]

[0420] [표 46]

MCF7	배양 일수	중합체 농도 %(w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
실시예 4′	2	10137	12454	13639	13424	9490
	6	9221	16246	18949	20341	15391
실시예 5′	2	10137	10018	10714	11446	11888
	6	9221	5175	9414	9271	9191

[0421]

[0422] [표 47]

MCF7	배양 일수	중합체 농도 %(w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
비교예 3′	2	9915	11163	12016	11867	11501
	6	9201	10180	11686	12727	13678
비교예 4′	2	9915	13354	13490	15527	15857
	6	9201	19364	19965	20615	21895

[0423]

[0424] [표 48]

A375	배양 일수	중합체 농도 %(w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
실시예 1′	2	31487	38387	39421	39260	39514
	6	49234	110943	113026	119850	125918
비교예 5′	2	31487	30733	29778	29299	32224
	6	49234	46701	42424	43863	52514

[0425]

[0426] [표 49]

A375	배양 일수	중합체 농도 %(w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
실시예 2′	2	30087	35275	35385	35648	35637
	6	50280	111250	130356	146403	153298
실시예 3′	2	30087	36297	38784	37907	37408
	6	50280	112508	111581	123872	132729

[0427]

[0428] [표 50]

A375	배양 일수	중합체 농도 %(w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
실시예 4′	2	32553	41656	41349	43184	41347
	6	43620	81160	80734	103404	122478
실시예 5′	2	32553	28039	29995	31168	30212
	6	43620	33578	31297	40548	36972

[0429]

[0430] [표 51]

A375	배양 일수	중합체 농도 %(w/v)				
		0	0.01	0.03	0.06	0.1
비교예 3′	2	29361	30417	28822	25348	23952
	6	38820	37202	38083	38340	38566
비교예 4′	2	29361	34219	29473	34592	35261
	6	38820	54749	57507	68100	82009

[0431]

[0432] [시험예 9: 3T3-L1 세포를 사용한 보존 시험]

[0433] 마우스 지방전구세포주 3T3-L1 (ATCC 사제) 를, 10% FBS-함유 DMEM 배지를 사용하여 10 cm 폴리스티렌 페트리 디쉬 상에 파종하고, 5% CO_2, 37℃ 로 설정한 인큐베이터 내에서 배양했다. 3T3-L1 세포가 컨플루언트 상태가 되면, 배지를 흡인제거하고, D-PBS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 사제) 에 의해 FBS 를 제거하고, 0.25% 트립신 및 1 mM EDTA 를 함유하는 용액 (1 ml) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 사제) 를 상기 언급된 폴리스티렌 페트리 디쉬에 첨가했다. 세포의 박리를 확인한 후, 10 부피% FBS 함유 DMEM 배지를 첨가하고, 페트리 디쉬로부터 세포를 회수하고, 원심분리 튜브로 옮겼다. 세포를 300×g 로 원심분리하고, 상청액을 제거했다. 약 100×10^4 개의 세포/mL 의 세포 현탁액을 제조하고, 1.5 mL 마이크로튜브 내에 100 μL 의 세포 현탁액을 첨가하고, 10%(v/v) FBS 를 포함하도록 미리 조제해 둔 실시예 1 및 실시예 2, 실시예 4 및 실시예 5, 비교예 3 및 비교예 5 의 배지 조성물을 각각 100 μL 씩 첨가하고, 혼합물을 파이펫팅하여 세포 현탁액을 제작했다.

[0434] 세포 현탁액을 밀폐 상태로 실온에서 10 일간 정치 상태로 보존하고, 3 일 또는 10 일간의 경과 후에, 상기 세포 현탁액의 일부를 10% FBS 함유 DMEM 배지로 1/10 희석했다. 희석한 세포 현탁액 (100 μL) 에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하고 현탁시키고, 상기 배지를 15 분간 실온에서 정치시켰다. FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에서 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 생 세포의 수를 측정했다. 음성 대조군은 다당류 없이 배지 단독을 포함하는 샘플이었다.

[0435] 그 결과, 음성 대조군 또는 비교예 3 및 비교예 5 의 배지 조성물의 각 세포 생존률에 대한 것과 같이, ATP 값은 3 내지 10 일간의 실온 보존으로 현저하게 감소하였고, 실시예 1 내지 실시예 2 및 실시예 4 의 배지 조성물에서는, ATP 값에서의 감소가 억제되어, 따라서 세포 보호 효과를 나타냈다. 생 세포수의 결과를 표 52 에

나타낸다.

[0436] [표 52]

		다당류	농도	RLU 값 (생 세포수)		
				제 0 일	3 일 후	10 일 후
음성 표적		—	0%	106016	34965	13069
실시예	1	MNC	0.03%	-	62627	36046
	2	PNC	0.03%	-	59723	32436
	4	DAG	0.015%	-	75493	49952
비교예	3	Xan	0.03%	-	40667	13441
	5	Alg	0.03%	-	47068	8834

[0437]

[0438] [시험예 10: CHO-K1 세포를 사용한 보존 시험]

[0439] 중국 햄스터 난소주 CHO-K1-hIFNβ 세포 (Kitakyushu National College of Technology 의, 카와하라 교수에 의해 제공됨) 를, 10% FBS 함유 F12 배지를 사용하여 10 cm 폴리스티렌 페트리 디쉬 상에 파종하고, 5% CO_2, 37℃ 로 설정한 인큐베이터 내에서 배양했다. CHO-K1-hIFNβ 세포가 컨플루언트 상태가 되면, 배지를 흡인제거하고, D-PBS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 사제) 에 의해 FBS 를 제거하고, 0.25% 트립신 및 1 mM EDTA 를 함유하는 용액 (1 ml) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 사제) 를 상기 언급된 폴리스티렌 페트리 디쉬에 첨가했다. 세포의 박리를 확인한 후, 10% FBS 함유 F12 배지를 첨가하고, 페트리 디쉬로부터 세포를 회수하고, 원심분리 튜브로 옮겼다. 세포를 300×g 로 원심분리하고, 상청액을 제거했다. 약 5×10^6 개의 세포/mL 의 세포 현탁액을 제조하고, 1.5 mL 마이크로튜브 내에 25 μL 의 세포 현탁액을 첨가하고, 10%(v/v) FBS 를 포함하도록 미리 조제해 둔 실시예 2 및 실시예 4 의 배지 조성물을 각각 25μL 씩 첨가하고, 혼합물을 파이펫팅하여 세포 현탁액을 제작했다.

[0440] 세포 현탁액을 밀폐 상태로 실온에서 1 일간 정치 상태로 보존하고, 상기 세포 현탁액의 일부를 10% FBS 함유 F12 배지로 1/10 희석했다. 희석한 세포 현탁액 (100 μL) 에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하고 현탁시키고, 상기 현탁액을 약 10 분간 실온에서 정치시키고, FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에서 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 생 세포의 수를 측정했다. 음성 대조군은 다당류 없이 배지 단독을 포함하는 샘플이었다.

[0441] 그 결과, 음성 대조군에서의 각 세포 생존률에 있어서는, 1 일간 실온으로 보존함으로써 ATP 값이 감소되었으나; 실시예 2 및 실시예 4 의 배지 조성물에서는, 파종시 수준의 ATP 값을 나타내, 세포 보호 효과를 나타냈다. 생 세포수의 결과를 표 53 에 나타낸다.

[0442] [표 53]

	다당류	농도	RLU 값 (생 세포수)	
			제 0 일	1 일 후
음성 대조군	-	0%	109376	87031
실시예 2	PNC	0.1%	-	108666
실시예 4	DAG	0.03%	-	95028
		0.1%	-	111383

[0443]

[0444] [시험예 11: 3T3-L1 세포를 사용한 보존 시험, 다당류 농도의 변경]

[0445] 마우스 지방전구세포주 3T3-L1 (ATCC 사제) 를, 10% FBS-함유 DMEM 배지를 사용하여 10 cm 폴리스티렌 페트리 디쉬 상에 파종하고, 5% CO_2, 37℃ 로 설정한 인큐베이터 내에서 배양했다. 3T3-L1 세포가 40% 컨플루언트 상태가 되면, 배지를 흡인제거하고, D-PBS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 사제) 에 의해 FBS 를 제거하고, 0.25% 트립신 및 1 mM EDTA 를 함유하는 용액 (1 ml) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 사제) 를 상기 언급된 폴리스티렌 페트리 디쉬에 첨가했다. 세포의 박리를 확인한 후, 10 부피% FBS 함유 DMEM 배지를 첨가하고, 페트리 디쉬로부터 세포를 회수하고, 원심분리 튜브로 옮겼다. 세포를 300×g 로 원심분리하고, 상청액을 제거했다. 약 100×10^4 개의 세포/mL 의 세포 현탁액을 제조하고, 1.5 mL 마이크로튜브 내에

100 μL 의 세포 현탁액을 첨가하고, 10%(v/v) FBS 를 포함하도록 미리 조제해 둔 실시예 2 및 실시예 4, 및 비교예 5 의 배지 조성물을 각각 100 μL 씩 첨가하고, 혼합물을 파이펫팅하여 세포 현탁액을 제작했다.

[0446] 세포 현탁액을 밀폐 상태로 실온에서 8 일간 정치 상태로 보존하고, 0 일, 5 일 또는 8 일간의 경과 후에, 상기 세포 현탁액의 일부를 10% FBS 함유 DMEM 배지로 1/5 희석했다. 희석한 세포 현탁액 (100 μL) 에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하고 현탁시키고, 상기 배지를 15 분간 실온에서 정치시켰다. FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에서 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 생 세포의 수를 측정했다. 음성 대조군은 다당류 없이 배지 단독을 포함하는 샘플이었다.

[0447] 그 결과, 음성 대조군 또는 비교예 3 의 배지 조성물의 각 세포 생존률에 대한 것과 같이, ATP 값은 5 내지 8 일간의 실온 보존으로 현저하게 감소하였고, 실시예 2 및 실시예 4 의 배지 조성물에서는, ATP 값에서의 감소가 억제되어, 따라서 세포 보호 효과를 나타냈다. 생 세포수의 결과를 표 54 에 나타낸다.

[0448] [표 54]

		다당류	농도%	RLU 값 (생 세포수)		
				제 0 일	5 일 후	8 일 후
음성 표적		-	0	99550	38344	34158
실시예	2	PNC	0.015	-	55431	57008
			0.03	-	76226	72182
			0.05	-	70520	47521
	4	DAG	0.015	-	67938	61719
			0.03	-	61126	-
			0.05	-	65334	55547
비교예	5	Alg	0.015	-	35927	26641
			0.03	-	43659	40677
			0.05	-	49629	44898

[0449]

[0450] [시험예 12: MDCK 세포에 대한 세포 생존 작용에 대한 효과]

[0451] 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.3%(w/v) 가 되도록 초순수 (Milli-Q 수) 에 현탁하고, 90℃ 에서 가열하면서 교반에 의해 용해했다. 상기 수용액을 121℃ 에서 20 분 오토클레이브에서 멸균했다. 본 용액을 사용하여, 10%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 EMEM 배지 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.사제) 에 최종 농도 0.005%(w/v) 또는 0.015% 의 탈아실화 젤란 검을 첨가한 배지 조성물, 및 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 EMEM 배지로 구성된 배지 조성물을 제조했다. 연속해서, 혈청을 함유하지 않은 배지에서 1 일 동안 배양한 (단식 처리) 개 신장 요세관 표피 세포주 MDCK (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를, 100000 개의 세포/mL 가 되도록 탈아실화 젤란 검을 첨가한 상기 언급된 배지 조성물에 접종하고, 96 웰 평저 초저부착 표면 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제, #3474) 의 웰에 1 웰 당 100 μL 가 되도록 분배했다. 각 플레이트를 CO_2 인큐베이터 (37℃, 5% CO_2) 내에서 15 일 동안 정치 상태로 둠으로써 배양했다. 2, 6, 9, 12 및 15 일 동안 배양 후 배양 배지에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하여 현탁액을 산출하고, 이것을 약 10 분간 실온에서 정치시키고, FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에 의해 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 생 세포의 수를 측정했다.

[0452] 그 결과, 본 발명의 배지 조성물을 사용하여 MDCK 세포를 저부착 플레이트 상에서 배양함으로써, 생 세포수의 감소가 억제될 수 있다는 것이 분명해졌다. 각 배양에서의 RLU 값 (ATP 측정, 발광 강도) 을 표 55 에 나타낸다.

[0453] [표 55]

배양 기간 (날짜)	첨가 없음	탈아실화 젤란 검 (0.005%)	탈아실화 젤란 검 (0.015%)
2	23453	25309	26069
6	15839	17643	26602
9	9939	14552	26668
12	9833	12409	26210
15	10374	13152	29512

[0454]

[0455] [시험예 13: Vero 세포에 대한 세포 생존 작용에 대한 효과]

[0456] 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 0.3%(w/v) 가 되도록 초순수 (Milli-Q 수) 에 현탁하고, 90℃ 에서 가열하면서 교반에 의해 용해했다. 상기 수용액을 121℃ 에서 20 분 오토클레이브에서 멸균했다. 본 용액을 사용하여, 5%(v/v) 우태 혈청을 포함하는 Emedium199 배지 (Sigma Ltd. 사제) 에 최종 농도 0.005%(w/v) 또는 0.015% 의 탈아실화 젤란 검을 첨가한 배지 조성물, 및 탈아실화 젤란 검을 포함하지 않는 미첨가 배지 조성물을 제조했다. 연속해서, 혈청을 함유하지 않은 배지에서 1 일 동안 배양한 (단식 처리) 원숭이 신장 표피 세포주 Vero (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를, 100000 개의 세포/mL 가 되도록 탈아실화 젤란 검을 첨가한 상기 언급된 배지 조성물에 접종하고, 96 웰 평저 초저부착 표면 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제, #3474) 의 웰에 1 웰 당 100 μL 가 되도록 분배했다. 각 플레이트를 CO_2 인큐베이터 (37℃, 5% CO_2) 내에서 15 일 동안 정치 상태로 둠으로써 배양했다. 2, 6, 9, 12 및 15 일 동안 배양 후 배양 배지에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하여 현탁액을 산출하고, 이것을 약 10 분간 실온에서 정치시키고, FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에 의해 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 생 세포의 수를 측정했다.

[0457] 그 결과, 본 발명의 배지 조성물을 사용하여 Vero 세포를 저부착 플레이트 상에서 배양함으로써, 생 세포수의 감소가 억제될 수 있다는 것이 분명해졌다. 각 배양에서의 RLU 값 (ATP 측정, 발광 강도) 을 표 56 에 나타낸다.

[0458] [표 56]

배양 기간 (날짜)	첨가 없음	탈아실화 젤란 검 (0.005%)	탈아실화 젤란 검 (0.015%)
2	17518	17870	16940
6	12970	13298	13472
9	9500	12560	13097
12	8702	10039	14053
15	6934	9207	14910

[0459]

[0460] [시험예 14: MDCK 세포 증식 작용에 대한 각각의 기질의 효과]

[0461] 제조예 2 에서 제조된 셀룰로오스 나노섬유 (PNC), 키틴 나노섬유 (바이오매스 (biomass) 나노섬유 BiNFi-S 2 질량%, Sugino Machine Limited) 및 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 1%(w/v) 가 되도록 초순수 (Milli-Q 수) 에 현탁하고, 90℃ 에서 가열하면서 교반에 의해 용해했다. 상기 수용액을 121℃ 에서 20 분 오토클레이브에서 멸균했다. 무혈청 배지 KBM220 배지 (KOHJIN BIO 사제) 에 최종 농도 0.01%(w/v), 0.03%, 또는 0.1% 의 셀룰로오스 나노섬유를 첨가한 배지 조성물, 무혈청 배지 KBM220 배지에 최종 농도 0.01%(w/v), 0.03%, 또는 0.1% 의 키틴 나노섬유를 첨가한 배지 조성물, 무혈청 배지 KBM220 배지 (KOHJIN BIO 사제) 에 최종 농도 0.005%(w/v), 0.015%, 0.03%, 0.06%, 또는 0.1% 의 탈아실화 젤란 검을 첨가한 배지 조성물 및 임의의 기질을 포함하지 않는 상기 언급된 미첨가 배지 조성물을 제조했다. 연속해서, 혈청을 함유하지 않은 배지에서 1 일 동안 배양한 (단식 처리) 개 신장 요세관 표피 세포주 MDCK (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를, 100000 개의 세포/mL 가 되도록 각각의 기질을 첨가한 상기 언급된 배지 조성물에 접종하고, 96 웰 평저 초저부착 표면 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제, #3474) 의 웰에 1 웰 당 100 μL 가 되도록 분배했다. 각 플레이트를 CO_2 인큐베이터 (37℃, 5% CO_2) 내에서 14 일 동안 정치 상태로 둠으로써 배양했다. 3, 7, 10 및 14 일 동안 배양 후 배양 배지에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-

Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하여 현탁액을 산출하고, 이것을 약 10 분간 실온에서 정치시키고, FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에 의해 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 생 세포의 수를 측정했다.

[0462] 그 결과, 본 발명의 배지 조성물인, 탈아실화 젤란 검, 나노셀룰로오스 섬유 PNC, 또는 키틴 나노섬유를 사용하여 MDCK 세포를 저부착 플레이트 상에서 배양했을 때, MDCK 세포에 대한 증식 촉진 작용이 각각의 기질을 첨가한 모든 조성물에서 관찰되었다. 이 중에서, 키틴 나노섬유가 가장 강한 효과를 보였다. 각 배양에서의 RLU 값 (ATP 측정, 발광 강도) 을 표 57 에 나타낸다.

[0463] [표 57]

	제 3 일	제 7 일	제 10 일	제 14 일
첨가 없음	6945	7388	7611	10225
탈아실화 젤란 검 0.005%	7389	9039	10981	16549
탈아실화 젤란 검 0.015%	7735	10467	14369	21255
탈아실화 젤란 검 0.03%	7943	21459	30706	38572
탈아실화 젤란 검 0.06%	7538	17257	31697	44346
탈아실화 젤란 검 0.1%	6696	15065	27092	35897
나노셀룰로오스 PNC 0.01%	7622	14815	22065	34661
나노셀룰로오스 PNC 0.03%	7795	17250	29732	44805
나노셀룰로오스 PNC 0.1%	7406	15408	27157	41852
키틴 나노섬유 0.01%	8777	21536	42566	54671
키틴 나노섬유 0.03%	8886	28311	44933	58338
키틴 나노섬유 0.1%	8621	29025	45074	59755

[0464]

[0465] [시험예 15: MDCK 증식 작용에 대한 키틴 나노섬유의 효과]

[0466] 제조예 1 에서 제조된 셀룰로오스 나노섬유 (PNC), 키틴 나노섬유 (바이오매스 (biomass) 나노섬유 BiNFi-S 2 질량%, Sugino Machine Limited) 및 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 1%(w/v) 가 되도록 초순수 (Milli-Q 수) 에 현탁하고, 90℃ 에서 가열하면서 교반에 의해 용해했다. 상기 수용액을 121℃ 에서 20 분 오토클레이브에서 멸균했다. 무혈청 배지 KBM220 배지 (KOHJIN BIO 사제) 에 최종 농도 0.0001%(w/v), 0.0003%, 0.001%, 0.003%, 0.01%, 0.02%, 또는 0.03% 의 키틴 나노섬유를 첨가한 배지 조성물, 무혈청 배지 KBM220 배지 (KOHJIN BIO 사제) 에 최종 농도 0.005%(w/v), 0.015%, 또는 0.03% 의 탈아실화 젤란 검을 첨가한 배지 조성물 및 기질을 포함하지 않는 상기 언급된 미첨가 배지 조성물을 제조했다. 연속해서, 혈청을 함유하지 않은 배지에서 1 일 동안 배양한 (단식 처리) 개 신장 요세관 표피 세포주 MDCK (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를, 100000 개의 세포/mL 가 되도록 상기의 탈아실화 젤란 검 또는 키틴 나노섬유를 첨가한 상기 언급된 배지 조성물에 접종하고, 96 웰 평저 초저부착 표면 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제, #3474) 의 웰에 1 웰 당 100 μL 가 되도록 분배했다. 각 플레이트를 CO_2 인큐베이터 (37℃, 5% CO_2) 내에서 14 일 동안 정치 상태로 둠으로써 배양했다. 5, 9, 12 및 15 일 동안 배양 후 배양 배지에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하여 현탁액을 산출하고, 이것을 약 10 분간 실온에서 정치시키고, FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에 의해 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 3 점의 평균치로서 생 세포의 수를 측정

했다.

[0467] 그 결과, 본 발명의 배지 조성물인, 탈아실화 젤란 검 및 키틴 나노섬유를 사용하여 MDCK 세포를 저부착 플레이트 상에서 배양했을 때, MDCK 세포에 대한 증식 촉진 작용이 각각의 기질을 첨가한 두 조성물에서 관찰되었다. 이 중에서, 키틴 나노섬유는 0.0001% 이상, 특히 0.001% 이상의 농도에서 증식 촉진 효과를 보였다. 각 배양에서의 RLU 값 (ATP 측정, 발광 강도) 을 표 58 에 나타낸다.

[0468] [표 58]

	제 5 일	제 9 일	제 12 일	제 15 일
첨가 없음	30616	22182	32644	27527
탈아실화 젤란 검 0.005%	36600	32749	49935	54224
탈아실화 젤란 검 0.015%	44682	54161	71837	85747
탈아실화 젤란 검 0.03%	35918	43907	55424	64556
키틴 나노섬유 0.0001%	44955	42380	55915	55612
키틴 나노섬유 0.0003%	61972	66269	75845	81075
키틴 나노섬유 0.001%	72036	93296	114045	122244
키틴 나노섬유 0.003%	78232	108468	140210	146761
키틴 나노섬유 0.01%	74018	104834	148507	156114
키틴 나노섬유 0.02%	84482	113526	160236	168680
키틴 나노섬유 0.03%	84062	127656	174498	173008

[0469]

[0470] [시험예 16: MDCK 세포 증식 작용에 대한 키틴 나노섬유의 효과]

[0471] 일차 배양;

[0472] 제조예 2 에서 제조된 셀룰로오스 나노섬유 (PNC), 또는 키틴 나노섬유 (바이오매스 (biomass) 나노섬유 BiNFi-S 2 질량%, Sugino Machine Limited) 를 1%(w/v) 가 되도록 초순수 (Milli-Q 수) 에 현탁하고, 90℃ 에서 가열하면서 교반에 의해 용해했다. 상기 수용액을 121℃ 에서 20 분 오토클레이브에서 멸균했다. 무혈청 배지 KBM220 배지 (KOHJIN BIO 사제) 에 최종 농도 0.01%(w/v) 의 키틴 나노섬유를 첨가한 배지 조성물, 및 키틴 나노섬유를 첨가하지 않은 무혈청 배지 KBM220 배지 (KOHJIN BIO 사제) 인 미첨가 배지 조성물을 제조했다. 연속해서, 혈청을 함유하지 않은 배지에서 1 일 동안 배양한 (단식 처리) 개 신장 요세관 표피 세포주 MDCK (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를, 75000 개의 세포/mL 가 되도록 상기 언급된 키틴 나노섬유를 첨가한 상기 언급된 배지 조성물에 접종하고, 125 ml 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask) (Corning Incorporated 사제, #431405) 에 1 개 플라스크 당 30 mL 가 되도록 분배했다. 플라스크를 CO_2 인큐베이터 (37℃, 5% CO_2) 내에서 6 일 동안 정치 상태로 둠으로써 배양했다. 0 및 6 일째에 배양 배지를 파이펫으로 현탁하고, 100 μL 를 3 지점으로 분배하고, 각각에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하여 현탁액을 산출하고, 이것을 약 10 분간 실온에서 정치시키고, FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에 의해 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써 생 세포의 수를 측정했다.

[0473] 계대 배양;

[0474] 계대 배양에 대한 효과를 확인하기 위해서, 0.01% 키틴 나노섬유를 포함하는 배지 중에서 MDCK 세포를 6 일간 배양함으로써 수득된 세포 현탁액을 연구했다. 세포 현탁액 (3 ml) 및 미첨가 배지 조성물 (27 ml) 을 혼합함으로써 키틴 나노섬유 농도를 0.001% 로 수득한 세포 현탁액, 및 세포 현탁액 (3 ml) 와 최종 농도 0.01%(w/v) 의 키틴 나노섬유를 첨가한 배지 조성물 (27 ml) 을 혼합함으로써 키틴 나노섬유 농도를 0.01% 로

수득한 세포 현탁액을, 각각 125 ml 삼각 플라스크 (Erlenmeyer flask) (Corning Incorporated 사제, #431405) 에 1 개 플라스크 당 30 mL가 되도록 분배했다. 플라스크를 CO_2 인큐베이터 (37℃, 5% CO_2) 내에서 14 일 동안 정치 상태로 둠으로써 배양했다. 0, 7 및 14 일째에 배양 배지를 파이펫으로 현탁하고, 100 μL 를 3 지점으로 분배하고, 각각에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하여 현탁액을 산출하고, 이것을 약 10 분간 실온에서 정치시키고, FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에 의해 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 3 점의 평균치로서 생 세포의 수를 측정했다.

[0475] 그 결과, 본 발명의 배지 조성물인 키틴 나노섬유를 사용하여 삼각 플라스크에서 MDCK 세포를 배양함으로써, MDCK 세포에 대한 증식 촉진 작용이 관찰되었다. 키틴 나노섬유를 함유하는 배지를 첨가하는 경우, MDCK 세포의 증식이 관찰되고, 계대 배양이 트립신 등으로의 처리 없이 간편하게 수행될 수 있다는 것이 분명해졌다.
예비 배양에서의 RLU 값 (ATP 측정, 발광 강도) 을 표 59 에, 계대 배양에서의 RLU 값 (ATP 측정, 발광 강도) 을 표 60 에 나타낸다.

[0476] [표 59]

[0477]

	제 0 일	제 6 일
키틴 나노섬유 0.01%	12853	28826

[0478] [표 60]

[0479]

	제 0 일	제 7 일	제 14 일
키틴 나노섬유 0.001%	2428	11461	18641
키틴 나노섬유 0.01%	2553	13981	34397

[0480] [시험예 17: 각 배지 중의 키틴 나노섬유의 MDCK 세포의 증식 촉진 작용의 비교]

[0481] 제조예 1 에서 제조된 셀룰로오스 나노섬유 (PNC), 키틴 나노섬유 (바이오매스 (biomass) 나노섬유 BiNFi-S 2 질량%, Sugino Machine Limited) 및 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 1%(w/v) 가 되도록 초순수 (Milli-Q 수) 에 현탁하고, 90℃ 에서 가열하면서 교반에 의해 용해했다. 상기 수용액을 121℃ 에서 20 분 오토클레이브에서 멸균했다. 무혈청 배지 KBM220 배지 (KOHJIN BIO 사제) 또는 Cosmedium 012 배지 (COSMO BIO co., Ltd. 사제) 에 최종 농도 0.001%(w/v), 또는 0.01% 의 키틴 나노섬유를 첨가한 배지 조성물, 무혈청 배지 KBM220 배지 또는 Cosmedium 012 배지에 최종 농도 0.03% 의 탈아실화 젤란 검을 첨가한 배지 조성물 및 상기 언급된 기질을 포함하지 않는 상기 언급된 미첨가 배지 조성물을 제조했다.
연속해서, 혈청을 함유하지 않은 배지에서 1 일 동안 배양한 (단식 처리) 개 신장 요세관 표피 세포주 MDCK (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를, 100000 개의 세포/mL 가 되도록 상기 언급된 탈아실화 젤란 검 또는 키틴 나노섬유를 첨가한 상기 언급된 배지 조성물에 접종하고, 96 웰 평저 초저부착 표면 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제, #3474) 의 웰에 1 웰 당 100 μL 가 되도록 분배했다. 각 플레이트를 CO_2 인큐베이터 (37℃, 5% CO_2) 내에서 12 일 동안 정치 상태로 둠으로써 배양했다. 4, 8 및 12 일째에 배양 배지에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하여 현탁액을 산출하고, 이것을 약 10 분간 실온에서 정치시키고, FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에 의해 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 3 점의 평균치로서 생 세포의 수를 측정했다.

[0482] 그 결과, 본 발명의 배지 조성물인, 탈아실화 젤란 검 및 키틴 나노섬유를 사용하여 MDCK 세포를 저부착 플레이트 상에서 배양함으로써, MDCK 세포 증식 촉진 작용이 탈아실화 젤란 검 및 키틴 나노섬유 두 기질을 첨가하여 관찰되었다. 이 중에서, 키틴 나노섬유는 심지어 0.001% 이상의 농도에서 Cosmedium012 배지를 사용해도 높은 증식 역량을 보였다. 4 일째의 세포 상태를 현미경으로 관찰했다. 그 결과, 탈아실화 젤란 검을 사용한 배지 조건에서는 세포 응집 덩어리(스피어) 가 단지 분산되어 있었던 반면, 키틴 나노섬유를 사용한 배지 조건에서는 스피어 및 세포가 포도 송이 모양으로 증식하고 있었다. KBM220 배지를 사용한 배양에서의 RLU 값 (ATP 측정, 발광 강도) 을 표 61 에, Cosmedium012 배지를 사용한 배양에서의 RLU 값 (ATP 측정, 발광 강도) 을 표 62 에 나타낸다. 4 일간 배양의 현미경 관찰의 결과를 도 40 에 나타낸다.

[0483] [표 61]

	제 4 일	제 8 일	제 12 일
첨가 없음	23542	23441	30472
탈아실화 젤란 검 0.015%	28314	35649	57595
탈아실화 젤란 검 0.03%	27360	33025	53464
키틴 나노섬유 0.001%	49998	63869	120492
키틴 나노섬유 0.01%	55646	70073	131614

[0484]

[0485] [표 62]

	제 4 일	제 8 일	제 12 일
첨가 없음	23373	23709	27167
탈아실화 젤란 검 0.015%	27412	29959	51690
탈아실화 젤란 검 0.03%	25382	27227	44496
키틴 나노섬유 0.001%	45617	62417	102726
키틴 나노섬유 0.01%	57318	69040	118593

[0486]

[0487] [시험예 18: 키토산 나노섬유 및 키틴 나노섬유의 MDCK 세포 증식 작용의 비교]

[0488] 키토산 나노섬유 (바이오매스 (biomass) 나노섬유 BiNFi-S, 1 질량%, Sugino Machine Limited) 및 키틴 나노섬유 (바이오매스 (biomass) 나노섬유 BiNFi-S, 2 질량%, Sugino Machine Limited) 및, 탈아실화 젤란 검 (KELCOGEL CG-LA, SANSHO Co., Ltd. 사제) 을 1%(w/v) 가 되도록 초순수 (Milli-Q 수) 에 현탁하고 이를 90℃ 에서 교반함으로써, 참고예 1 과 동일한 방식으로 제조된 수용액을 각각 121℃ 에서 20 분 오토클레이브 멸균했다. 무혈청 배지 KBM220 배지 (KOHJIN BIO 사제) 에 최종 농도 0.001%(w/v), 0.003%, 0.01%, 또는 0.03% 의 키토산 나노섬유 또는 키틴 나노섬유를 첨가한 배지 조성물, 무혈청 배지 KBM220 배지에 최종 농도 0.03% 의 탈아실화 젤란 검을 첨가한 배지 조성물, 및 상기 언급된 기질을 포함하지 않는 미첨가 배지 조성물을 제조했다. 연속해서, 혈청을 함유하지 않은 배지에서 1 일 동안 배양한 (단식 처리) 개 신장 요세관 표피 세포주 MDCK (DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. 사제) 를, 100000 개의 세포/mL 가 되도록 상기 언급된 탈아실화 젤란 검, 키토산 나노섬유 또는 키틴 나노섬유를 첨가한 상기 언급된 배지 조성물에 접종하고, 96 웰 평저 초저부착 표면 마이크로플레이트 (Corning Incorporated 사제, #3474) 의 웰에 1 웰 당 100 μL 가 되도록 분배했다. 각 플레이트를 CO_2 인큐베이터 (37℃, 5% CO_2) 내에서 12 일 동안 정치 상태로 둠으로써 배양했다.

7 및 11 일째에 배양 배지에 ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 를 첨가하여 현탁액을 산출하고, 이것을 약 10 분간 실온에서 정치시키고, FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에 의해 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 3 점의 평균치로서 생 세포의 수를 측정했다.

[0489] 그 결과, 본 발명의 배지 조성물인, 키토산 나노섬유 및 키틴 나노섬유를 사용하여 MDCK 세포를 저부착 플레이트 상에서 배양함으로써, 탈아실화 젤란 검의 것보다 높은 증식 촉진 작용이 관찰되었다. 또한, 키틴 나노섬유는 심지어 0.001% 농도에서 높은 증식 역량을 보였고, 키토산 나노섬유는 0.01% 농도로부터 높은 증식 역량을 보였다. RLU 값 (ATP 측정, 발광 강도) 을 표 63 에 나타낸다.

[0490] [표 63]

	제 7 일	제 11 일
첨가 없음	30653	27078
탈아실화 젤란 검 0.015%	51436	63794
탈아실화 젤란 검 0.03%	41146	51356
키틴 나노섬유 0.001%	83013	93642
키틴 나노섬유 0.003%	92611	102669
키틴 나노섬유 0.01%	91771	106490
키틴 나노섬유 0.03%	115710	126305
키토산 나노섬유 0.001%	46009	50525
키토산 나노섬유 0.003%	46103	48083
키토산 나노섬유 0.01%	85922	93831
키토산 나노섬유 0.03%	119566	126395

[0491]

[0492] [시험예 19: 신선한 필리핀 원숭이 (Macaca fascicularis) 일차 간세포 보존 시험]

[0493] 제조예 2 에서 제조한 셀룰로오스 나노섬유 (PNC) 및, 실시예 5 와 동일한 방식으로 제조된 κ-카라기난 (GENUGEL WR-80-J, SANSHO Co., Ltd.: Car) 1 질량%(w/v) 수용액을 사용했다. 10% FBS 함유 Williams'E 배지 (Life Technologies, Inc. 사제) 에 최종 농도 0.03%(w/v), 0.1% 의 PNC 또는 카라기난을 첨가한 배지 조성물, 및 상기 언급된 기질을 포함하지 않는 미첨가 배지 조성물을 제조했다. 연속해서, 신선한 필리핀 원숭이 (Macaca fascicularis) 일차 간세포 (Ina Research Inc. 사제) 를, 2,500,000 개의 세포/mL 가 되도록 PNC 또는 카라기난을 첨가한 상기 언급된 배지 조성물에 혼합하고, Cryogenic 세포 동결 바이알 (Thermo SCIENTIFIC 사제) 에 분배했다. 또한, 기질을 포함하지 않는 상기 언급된 배지 및 현탁 필리핀 원숭이 (Macaca fascicularis) 일차 간세포를 분배했다. 상기 언급된 조작을 2 로트 (lot) 로 실시했다. 연속해서, 본 튜브를 냉장 보관 (약 4℃) 에서 2 일간 정치 상태로 두면서 수송했다. 2 일간 냉장 보관 조건에서 수송한 세포 현탁액에 대해 트립판 블루 시약 (Life Technologies, Inc. 사제) 을 사용하여, 현탁액 중의 세포 생존률을 측정했다.

[0494] 그 결과, 본 발명의 배지 조성물인 PNC 를 사용하여 신선한 원숭이 일차 간세포를 냉장 보관하여 수송함으로써, 미첨가 조건보다 높은 생존률을 수득했다. 반대로, 카라기난은 그러한 작용을 보이지 않았다. 생존률을 표 10 에 나타낸다.

[0495] [표 64]

	lot 1	lot 2
	생존률 (%)	생존률 (%)
첨가 없음	48	41
PNC 0.03%	62	48
PNC 0.1%	62	56
카라기난 0.03%	37	35
카라기난 0.1%	42	23

[0496]

[0497] [시험예 20: 재파종 후의 증식 능력 평가]

[0498] 마우스 지방전구세포주 3T3-L1 (ATCC 사제) 를, 10% FBS-함유 DMEM 배지를 사용하여 10 cm 폴리스티렌 페트리 디쉬 상에 파종하고, 5% CO_2, 37℃ 로 설정한 인큐베이터 내에서 배양했다. 3T3-L1 세포가 컨플루언트 상태

가 되면, 배지를 흡인제거하고, D-PBS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 사제) 에 의해 FBS 를 제거하고, 0.25% 트립신 및 1 mM EDTA 를 함유하는 용액 (1 ml) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 사제) 를 상기 언급된 폴리스티렌 페트리 디쉬에 첨가했다. 세포의 박리를 확인한 후, 10 부피% FBS 함유 DMEM 배지를 첨가하고, 페트리 디쉬로부터 세포를 회수하고, 원심분리 튜브로 옮겼다. 세포를 300×g 로 원심분리하고, 상청액을 제거했다. 약 200×10^4 개의 세포/mL 의 세포 현탁액을 제조하고, 1.5 mL 마이크로튜브 내에 150 μL 의 세포 현탁액을 첨가하고, 10%(v/v) FBS 를 포함하도록 미리 조제해 둔 실시예 2 (PNC 농도 0.06%) 내지 실시예 4 (DAG 농도 0.03%), 비교예 5 (Alg 농도 0.03%) 의 배지 조성물 및 음성 대조군으로서 10 부피% FBS 함유 DMEM 배지를 각각 150 μL 씩 첨가하고, 혼합물을 파이펫팅하여 세포 현탁액 (약 100×10^4 세포/mL) 을 제작했다.

[0499] 세포 현탁액을 밀폐 상태로 실온에서 7 일간 정치 상태로 보존하고, 상기 세포 현탁액의 일부를 10% FBS 함유 DMEM 배지로 희석했다. 7 일간 보존 전의 파종 농도를 기준으로서 약 10×10^4 개의 세포/mL 의 세포 현탁액을 조제했다. 세포 현탁액을 96 웰 Multiplate (Corning Incorporated 사제) 에 100 μL 씩 파종하고, ATP 시약 (100 μL) (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega 사제) 을 파종 날짜, 1 일 후 및 2 일 후에 그곳에 첨가하고, 혼합물을 15 분간 실온에서 정치시켰다. FlexStation3 (Molecular Devices 사제) 에 의해 발광 강도 (RLU 값) 를 측정하고, 배지 단독의 발광값을 공제함으로써, 생 세포의 수를 측정했다.

[0500] 그 결과, 7 일간 보존 후의 재파종 당일의 음성 대조군 및 비교예 5 의 배지 조성물의 생 세포수 (RLU 값) 는, 실시예 2 내지 실시예 4 의 배지 조성물과 비교해 현저하게 저하되었다. 재파종 하루 후의 실시예 2 및 실시예 4 의 생 세포수 (RLU 값) 는 각각 재파종 당일과 비교해 증가했고, 보존 후의 세포도 증식성을 유지하고 있었다. 생 세포수의 결과를 표 65 에 나타낸다.

[0501] [표 65]

		다당류	농도	RLU 값 (생 세포수)	
				재-파종 날짜	1 일 후
음성 표적		-	0%	1749	6845
실시예	2	PNC	0.03%	13717	20282
	4	DAG	0.015%	14770	22588
비교예	5	Alg	0.03%	7466	14407

[0502]

[0503] **산업상의 이용 가능성**

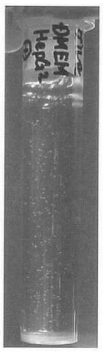
[0504] 본 발명의 배지 조성물은, 우수한 세포 및/또는 조직 현탁 효과를 나타내고, 동식물 유래의 세포 및/또는 조직을 그 기능을 유지하면서 대량으로 배양할 때에 매우 유용하다. 또, 본 발명의 방법에 의해 배양된 세포 및/또는 조직은, 화학 물질, 의약품 등의 약효 및 독성 평가, 효소, 세포 증식 인자, 항체 등의 유용 물질의 대량 생산, 및 질환이나 결손에 의해 없어진 기관, 조직 및 세포를 보충하는 재생 의료 등의 분야에 있어서 매우 유용하다.

[0505] 본원에 진술된 특허 및 특허 출원 명세서를 포함하는 모든 간행물에 기재된 내용은, 본원에 인용된 것에 의해, 그 모두가 명시된 범위로 본 명세서에 인용된다.

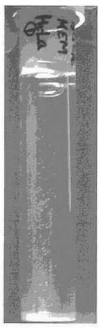
[0506] 본 출원은 그 내용은 본 명세서에 모두 포함되는, 일본에서 출원된 일본 특허출원 2014-010842 (출원일: 2014년 1월 23 일), 일본 특허출원 2014-123772 (출원일: 2014년 6월 16 일), 일본 특허출원 2014-174574 (출원일: 2014년 8월 28 일), 및 일본 특허출원 2014-217761 (출원일: 2014년 10월 24 일) 을 기초로 하고 있다.

도면

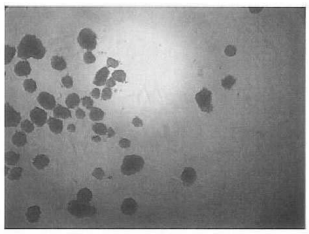
도면1



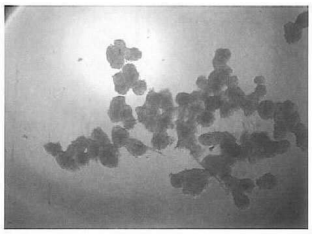
도면2



도면3

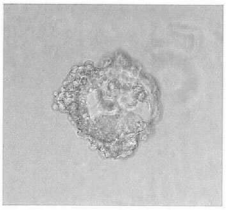


탈아실화 젤란 검 있음

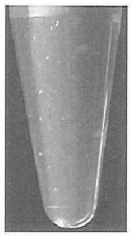


탈아실화 젤란 검 없음

도면4



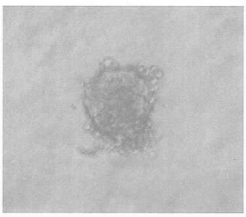
도면5



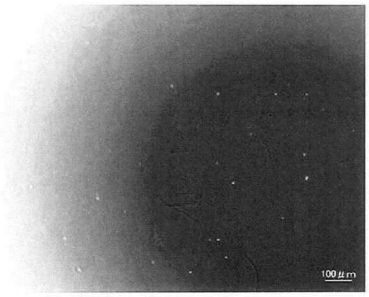
잔탄 검
(0.15%)

κ-카라기난 (0.05%) + 로커스트 빈 검 (0.05%)

도면6

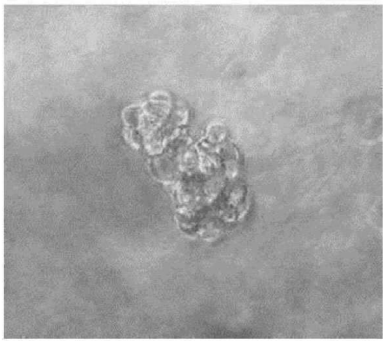


도면7



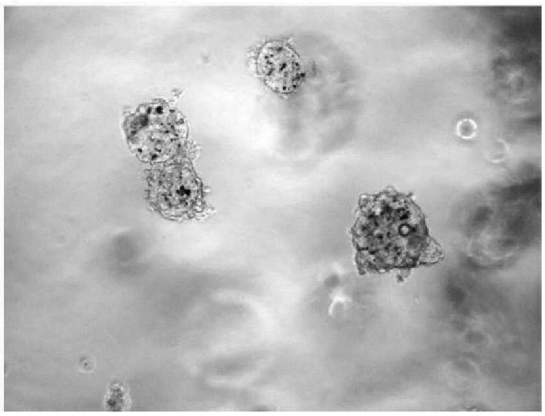
도면8

HepG2 세포 스피어



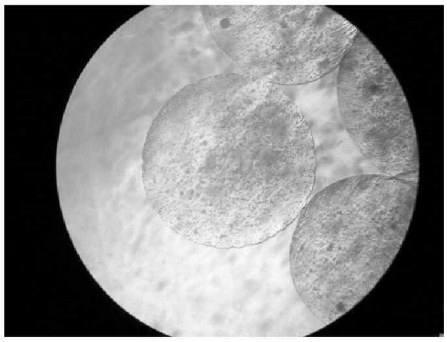
도면9

라미닌-코팅된 GEM



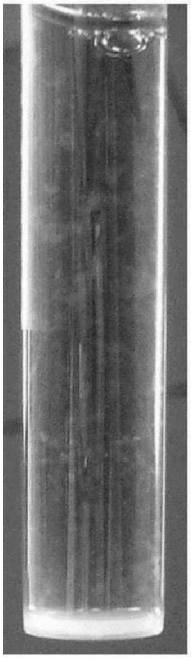
도면10

알긴산 비이드



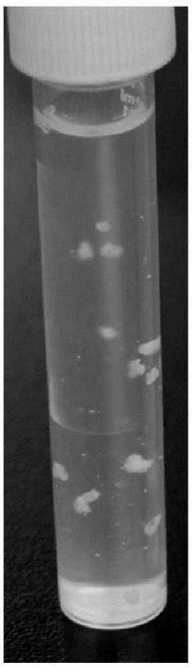
도면11

콜라겐 겔 캡슐

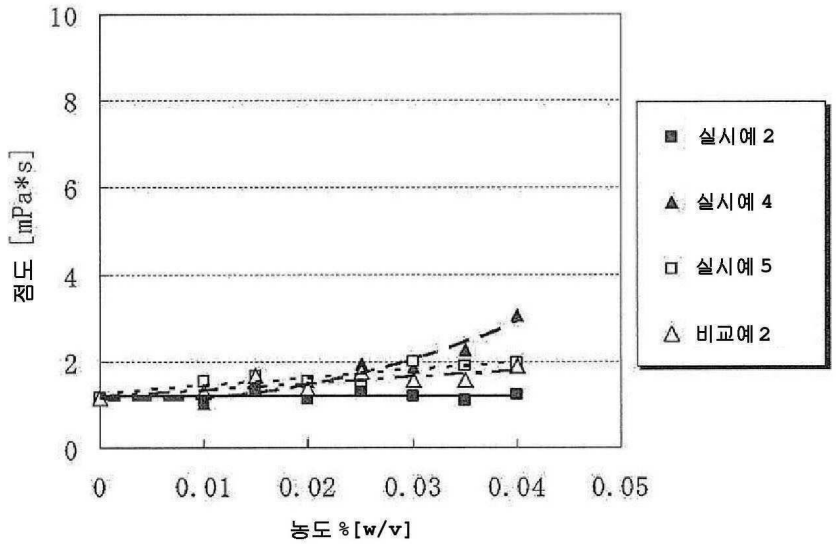


도면12

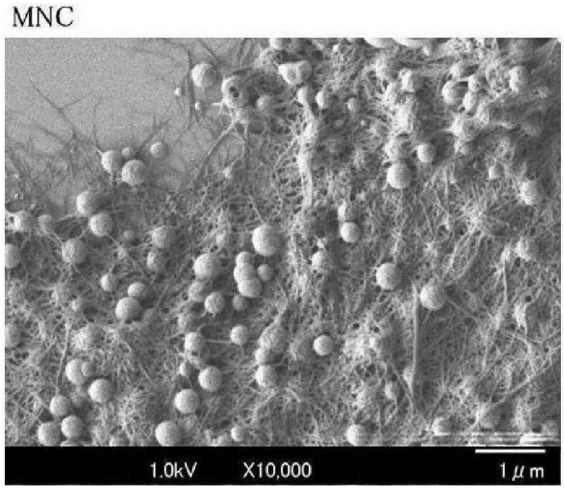
벼-유래 유합 조직의 현탁 배양



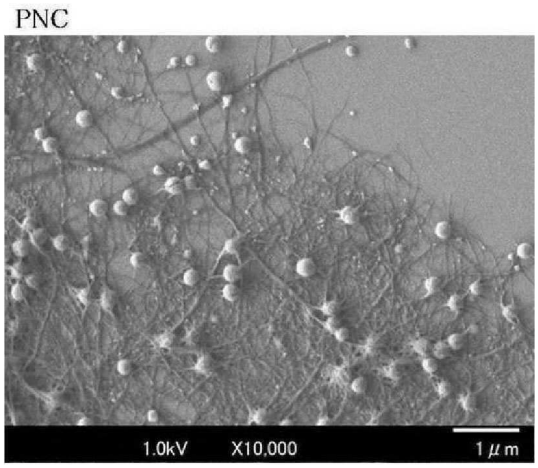
도면13



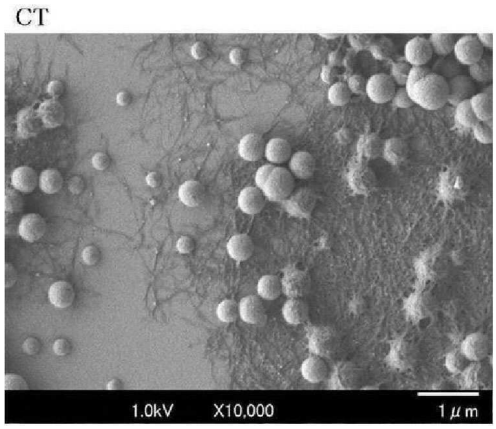
도면14



도면15

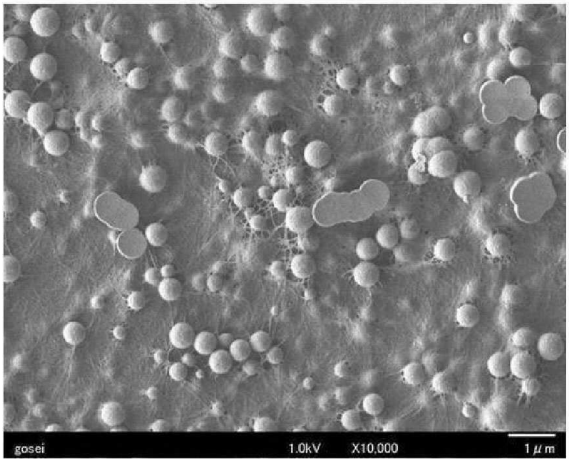


도면16



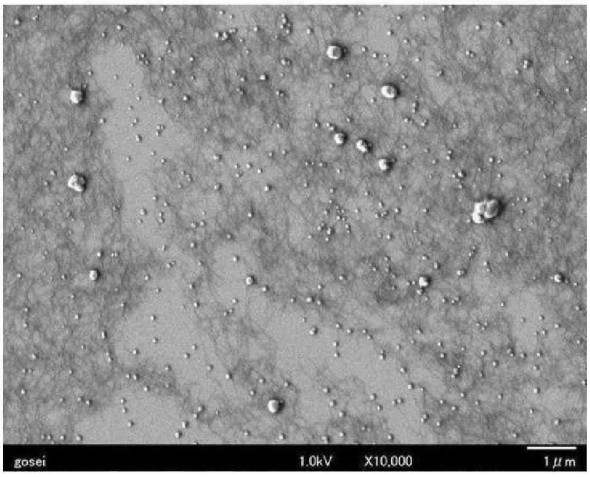
도면17

DAG



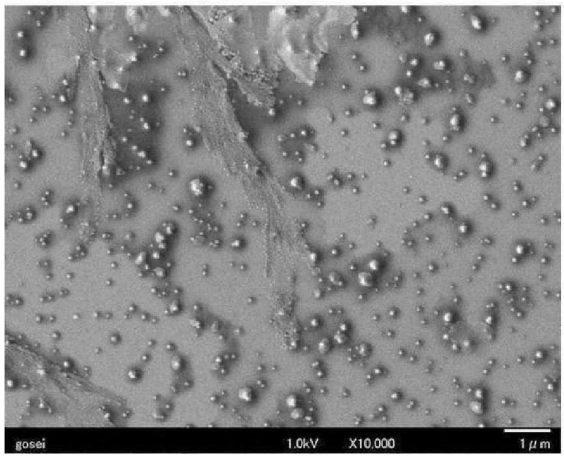
도면18

실온에서 건조된 Car

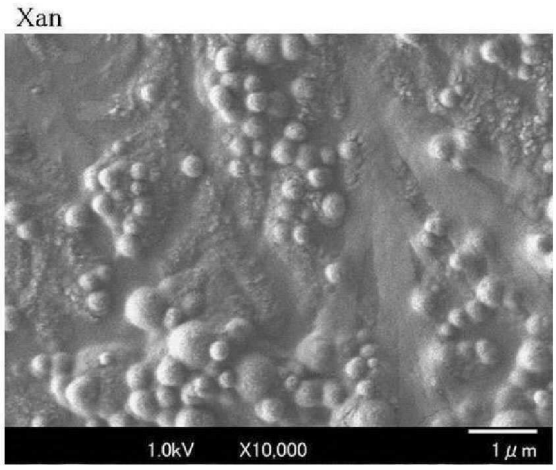


도면19

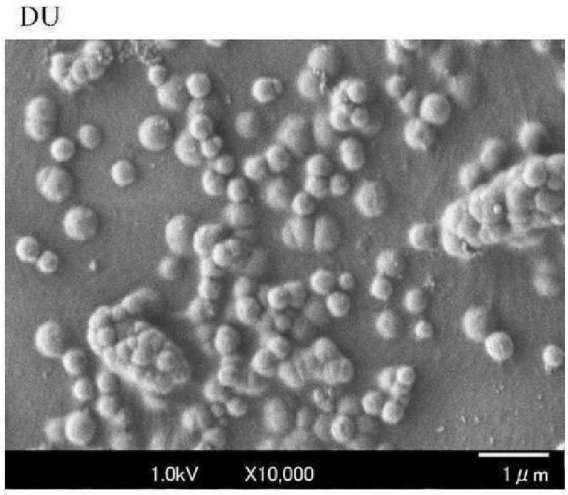
110℃ 에서 건조된 Car



도면20

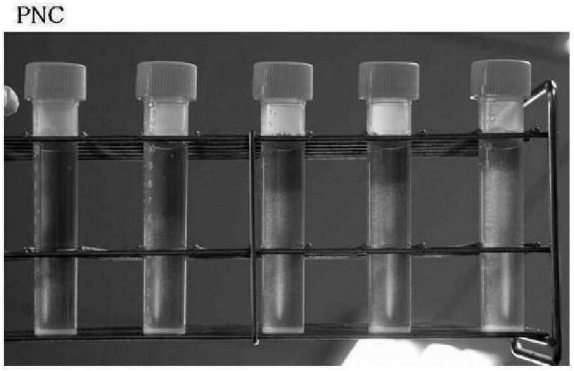


도면21



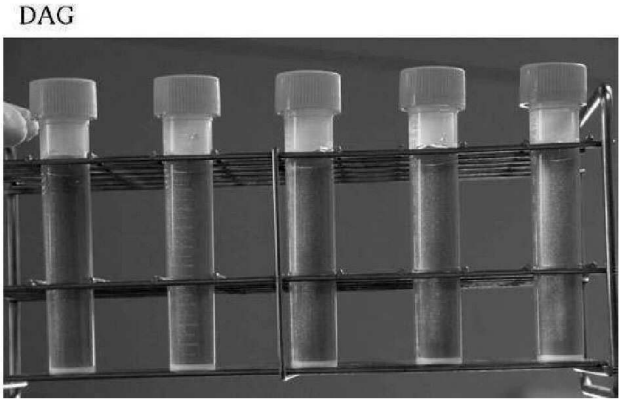
도면22

도면23



도면24

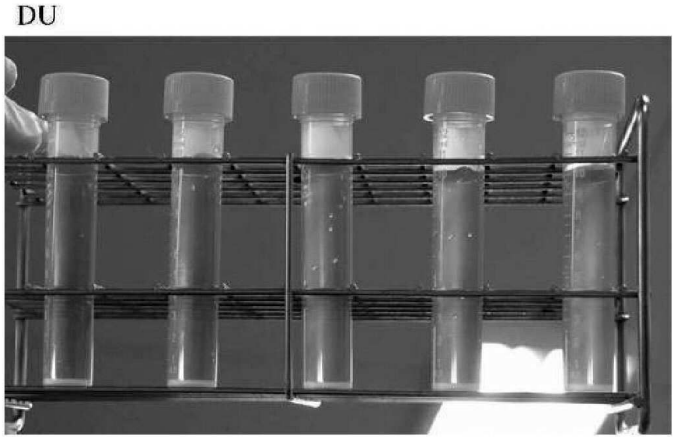
도면25



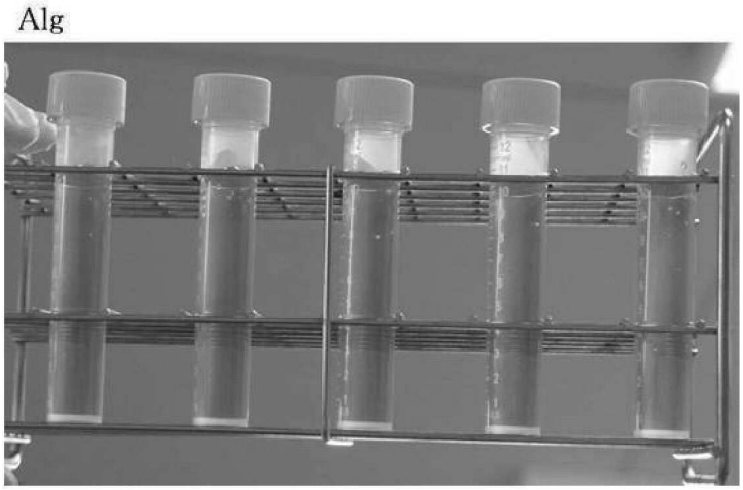
도면26

도면27

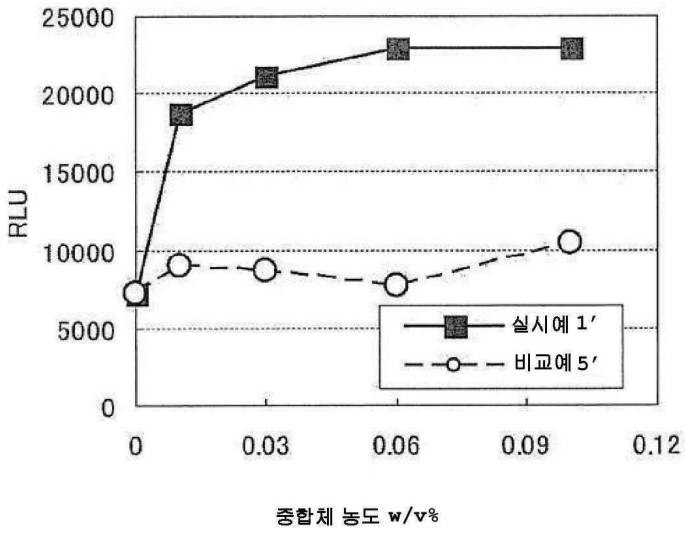
도면28



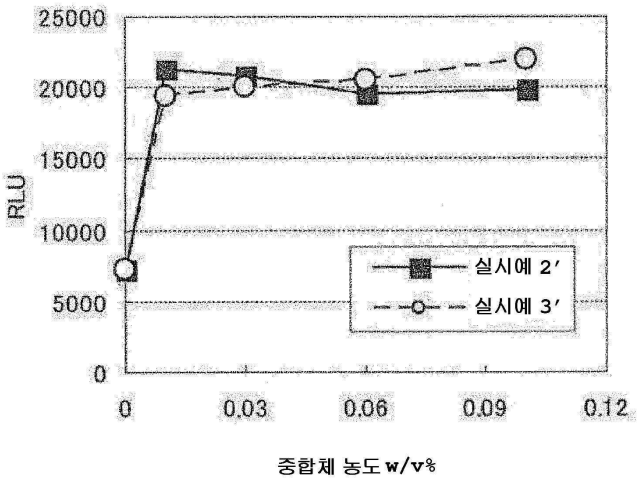
도면29



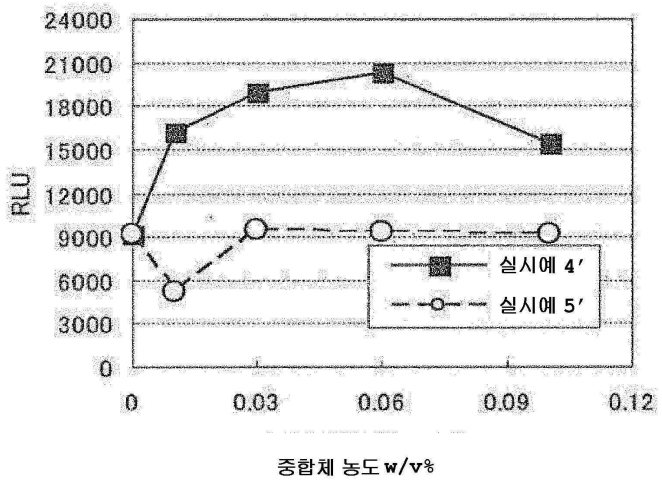
도면30



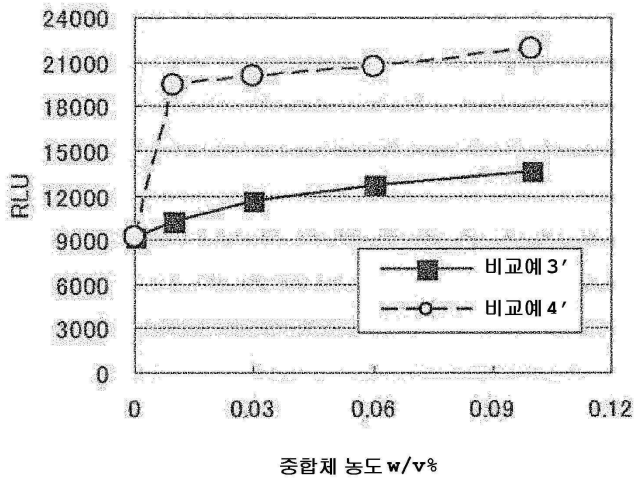
도면31



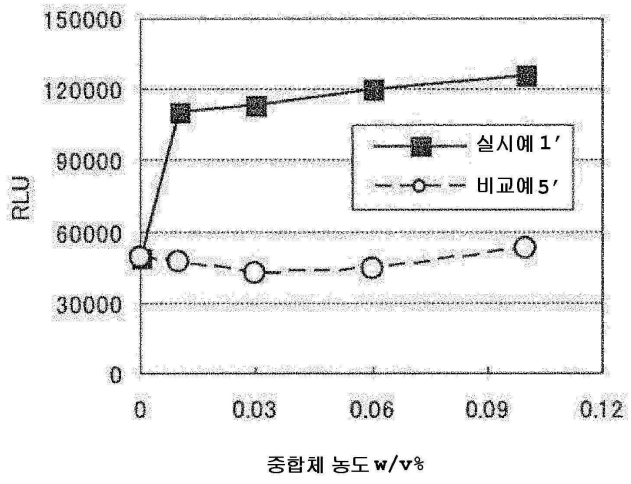
도면32



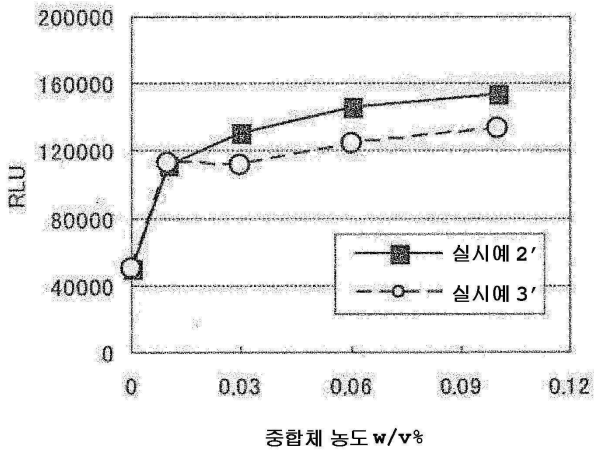
도면33



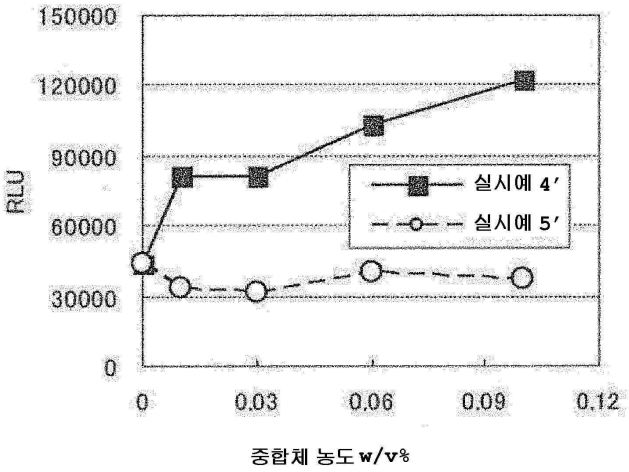
도면34



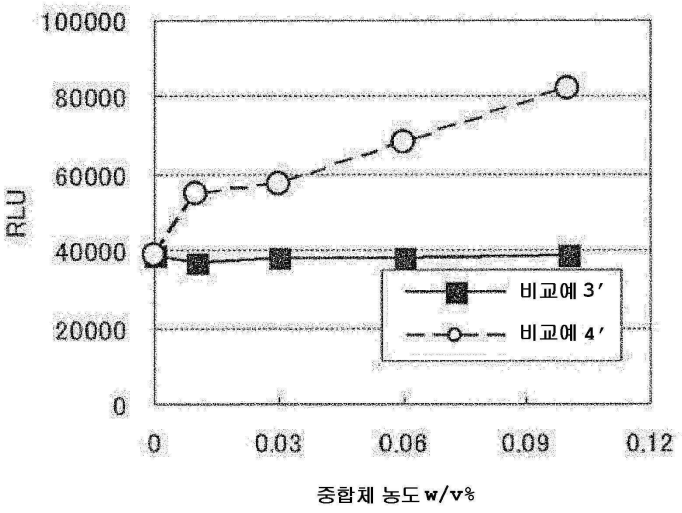
도면35



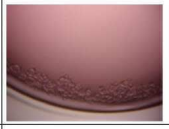
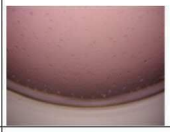
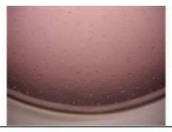
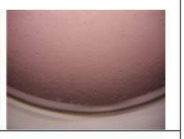
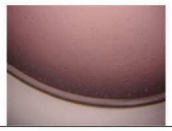
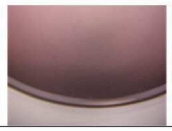
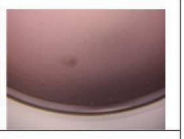
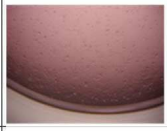
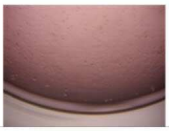
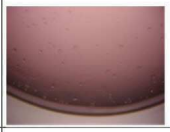
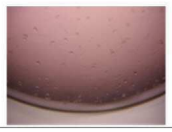
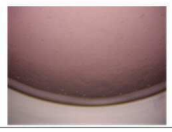
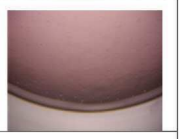
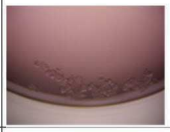
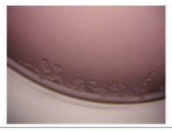
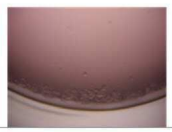
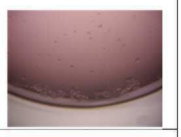
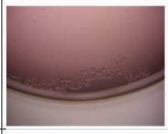
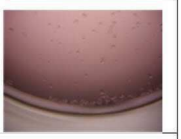
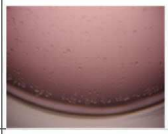
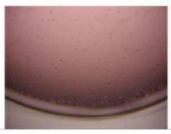
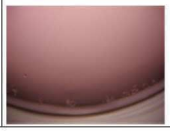
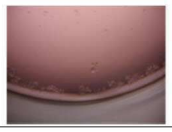
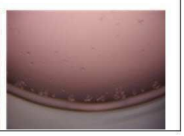
도면36



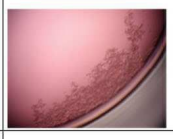
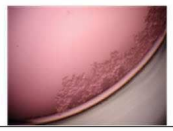
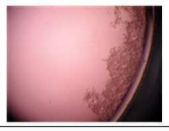
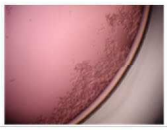
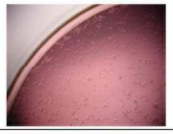
도면37



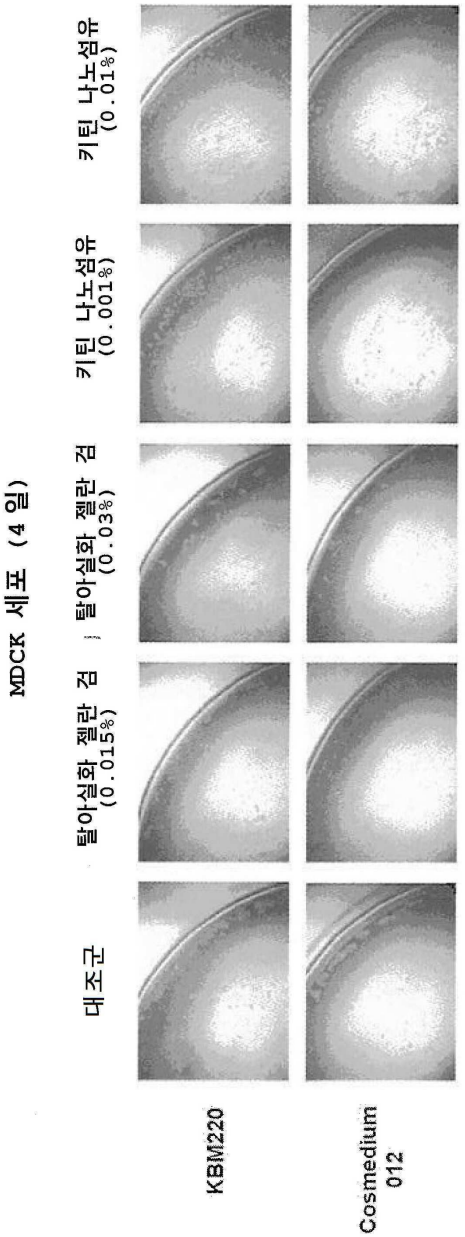
도면38

음성 대조군 (0 w/v%)				
농도	0.01 w/v%	0.03 w/v%	0.06 w/v%	0.1 w/v%
실시예 1′ MC				
실시예 2′ PC				
실시예 3′ CT				
실시예 4′ DAG				
실시예 5′ Car				
비교예 3′ Xan				
비교예 4′ DU				
비교예 5′ Alg				

도면39

음성 대조군 (0 w/v%)				
농도	0.01 w/v%	0.03 w/v%	0.06 w/v%	0.1 w/v%
실시예 1′ MC				
실시예 2′ PC				
실시예 3′ CT				
실시예 4′ DAG				
실시예 5′ Car				
비교예 3′ Xan				
비교예 4′ DU				
비교예 5′ Alg				

도면40


MDCK 세포 (4 일)
대조군
탈아실화 젤란 검 (0.015%)
탈아실화 젤란 검 (0.03%)
키틴 나노섬유 (0.001%)
키틴 나노섬유 (0.01%)
KBM220
Cosmedium 012