



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0016187  
(43) 공개일자 2010년02월12일

(51) Int. Cl.

C12M 3/00 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2009-7022992

(22) 출원일자 2008년03월05일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년11월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/055856

(87) 국제공개번호 WO 2008/124229

국제공개일자 2008년10월16일

(30) 우선권주장

60/910,502 2007년04월06일 미국(US)

(71) 출원인

카리디안비씨티, 인크.

미국 콜로라도주 80215 레이크우드 웨스트 콜린스  
에버뉴 10811

(72) 발명자

앤트월러 글렌 델버트

미국 80215 콜로라도주 레이크우드 제논 스트리트  
2905

(74) 대리인

김성기, 김진희

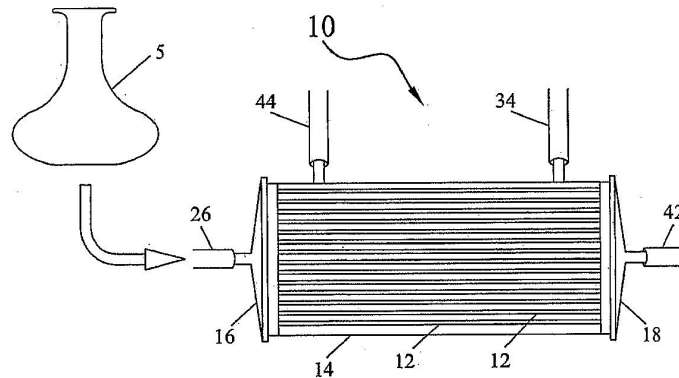
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 개선된 생물반응기 표면

(57) 요약

본 발명은 부착된 세포의 증식을 촉진하기 위해서, 중합체 생물반응기 표면을 처리하는 것에 관한 것이다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

생물반응기의 멤브레인 표면에 포유류 세포의 부착을 촉진하기 위한 방법으로서,

하우징, 및

상기 하우징 내부에 하나 이상의 표면을 포함하는 중합체 멤브레인

을 포함하는 생물반응기를 제공하는 단계; 및

상기 중합체 멤브레인 표면에 세포의 부착을 개선시키기 위한 충분한 양의 하나 이상의 표면 처리물로 중합체 멤브레인 표면을 처리하는 단계

를 포함하는 촉진 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 중합체 멤브레인은 하나 이상의 소수성 중합체 및 하나 이상의 친수성 중합체를 포함하는 것인 촉진 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 중합체 멤브레인은 중공 섬유 멤브레인인 촉진 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 하나 이상의 표면 처리물로 중합체 멤브레인 표면을 처리하는 단계는 혈소판 용해물로 멤브레인 표면을 처리하는 것을 더 포함하는 것인 촉진 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 하나 이상의 표면 처리물로 중합체 멤브레인 표면을 처리하는 단계는 혈장으로 멤브레인 표면을 처리하는 것을 더 포함하는 것인 촉진 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 하나 이상의 표면 처리물로 중합체 멤브레인 표면을 처리하는 단계는 제1 멤브레인 표면 처리물과 상이한 제2 표면 처리물로 멤브레인 표면을 처리하는 것을 더 포함하는 것인 촉진 방법.

### 청구항 7

하우징, 및

상기 하우징 내부에 중합체 멤브레인

을 포함하는 생물반응기를 포함하고,

여기서 중합체 멤브레인은 이 멤브레인에 세포의 부착을 개선시키기 위한 충분한 양의 혈소판 용해물로 처리되는 것인 세포를 생체 외 배양하기 위한 세포 배양 시스템.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 중합체 멤브레인은 중공 섬유 멤브레인인 세포 배양 시스템.

### 청구항 9

제7항에 있어서, 중합체 물질은 하나 이상의 소수성 중합체 및 하나 이상의 친수성 중합체를 포함하는 것인 세포 배양 시스템.

### 청구항 10

혈소판 용해물로 처리된 중합체 물질을 포함하는 세포 배양 시스템에 사용하기 위한 표면.

**청구항 11**

혈장으로 처리된 중합체 물질을 포함하는 세포 배양 시스템에 사용하기 위한 표면.

**명세서**

**기술분야**

- [0001] -관련 출원에 대한 교차 참조-
- [0002] 본 출원은 2007년 4월 6일 제출된 미국 가출원 제60/910,502호를 우선권으로 주장한다.
- [0003] 본 발명은 개선된 생물반응기 표면에 관한 것이다.

**배경기술**

- [0004] 줄기 세포는 장기 이식, 조직 재생, 혈액 수혈 및 골수 이식을 포함하는 다양한 치료 분야에서 가능성이 검증된 미분화 세포의 한 카테고리이다. 치료 용도를 위해 유용한 양으로 줄기 세포를 성장시키기 위해, 줄기 세포를 증식시키기 위한 효과적이고 신뢰할 수 있는 방법이 중요하다. 경제적으로 유용하도록, 이러한 방법은 줄기 세포의 오염 기회를 최소화하면서 다량의 줄기 세포 생산을 보장해야 한다.
- [0005] 포유류 세포는 생존을 위해 항상성을 요구하기 때문에, 인간 세포를 생체 외에서 성장시키는 경우, 온도, 산소 농도, pH, 삼투성, 영양분 농도 및 이온 농도를 포함하여, 일정한 환경적 매개 변수들이 주의 깊게 조절되어야만 한다. 또한, 줄기 세포 증식에 있어서, 여러번 빈번하게 성장시킨 세포 예컨대 간엽 줄기 세포(MSC)는 앵커리지(anchorage) 의존적이다. 이는 즉, MSC를 생체 외에서 증식시킬 때, 이들 세포가 고정된 표면 상에 고정되지 않으면 이들의 생존능 및 증식능이 감소될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0006] 따라서, 노동 비용과 오염 위험성을 최소화하면서 고정된 배양물 상태로 효율적으로 세포를 성장시킬 수 있는 시스템에 대한 요구가 증가하고 있다. 가장 기본적인 생물반응기 시스템은 폴리스티렌 조직 배양 플라스크의 사용을 포함하지만, 이러한 방법은 최소 규모의 적용분야를 제외하고는 모든 용도에 실용적인 것은 아니며, 배양 플라스크에서 세포 배양은 노동 집약적이고, 배양 플라스크를 빈번하게 개방하여 플라스크에 오염 가능성이 증가한다는 점으로 인해 오염 위험성이 높다. 조직 배양 플라스크와 관련된 문제를 해결하기 위해 개발된 여러 생물반응기 시스템을 "폐쇄(closed)" 시스템이라 하는데, 이 시스템은, 자동화된 유체 흐름이 세포에 영양분을 공급하여 오염 기회를 줄이고, 과정 전반에 걸쳐 제어성을 향상시키고, 세포의 생리적 환경을 보다 적절하게 유지할 수 있다. 자동화 배양 생물반응기는 평면 플레이트 또는 중공 섬유류로 제조될 수 있는데, 중공 섬유류는 소정 부피의 반응기 내에서 세포를 성장시키기 위해 이용할 수 있는 표면적을 최대화시킨다.
- [0007] 결과적으로, 부착성 세포를 부착시키는 생물반응기 표면을 개발하는데 노력을 기울여 왔다. 세포 부착을 위해 적절한 표면을 개발하기 위한 작업은 현행 중공 섬유류 제조하는 원료 물질에 세포가 용이하게 또는 강력하게 부착하지 않는다는 점으로 인해 보다 어려워졌다. 이러한 문제에 대한 해결법은 세포가 천연적으로 결합하지 않는 표면에 세포를 부착시킬 수 있고, 세포 위의 배지 흐름에 의해 야기되는 진단 응력에 일정하게 노출됨에도 불구하고 세포를 부착된 상태로 유지시킬 수 있는 세포 부착 시스템의 개발이 요구된다.
- [0008] 공지된 멤브레인 생물반응기에 세포 성장 표면을 제작하기 위한 물질로서 사용되는 중합체는 폴리스테렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리메틸펜틸렌, 사포닌화 셀룰로스 에스테르, 폴리메틸아크릴레이트, 폴리카르보네이트, 폴리에스테르, 폴리에테르설폰, 스티렌-아크릴로니트릴, 폴리아크릴로니트릴, PVC, 유기실리콘, 셀룰로스 에스테르 및 폴리아미드를 포함한다.
- [0009] 일부 중합체 표면은 공유 부착 또는 정전기 흡착력 등을 통해서 예컨대 라미닌, 콜라겐 및 피브로넥틴 등의 세포 부착 인자로 처리되었다. 다른 표면은 U.S. 특허 제5,912,177호에 기술된 바와 같이 다른 표면은 세포 부착 인자를 사용하여 멤브레인 표면에 물리적으로 세포를 고정하기 위해 처리된다. 그러나, 세포 부착 인자의 사용 자체는 예를 들어 미국 특허 제5,512,474호, 제5,912,177호, 및 문헌 [Prichard, h., Reichert, W. et al. in "Adult Adipose-Derived Stem Cell Attachment to Biomaterials" Biomaterials 28(6) 936-946]에 기술된 바와 같이, 당분야에서는 중합체 매트릭스에 장기간 세포 부착을 매개하는 데는 불충분한 것으로 인식되고 있다. 또한, 피브로넥틴 및 다른 세포 부착 인자는 고가이고, 현재 중합체 표면의 피브로넥틴 코팅물에 대한 흡착 기

술은 상당히 비경제적이다.

[0010] 따라서, 보다 효율적으로 피브로넥틴을 사용하는 방법, 또는 피브로넥틴에 대한 필요성을 피할 수 있는 방법을 찾는 것이 바람직하다.

**발명의 상세한 설명**

[0015] -본 발명의 요약-

[0016] 본 발명은 생물반응기의 멤브레인 표면에 포유류 세포의 부착을 촉진하기 위한 방법에 관한 것이다. 상기 생물 반응기는 하나 이상의 하우스징 및 이 하우스징 내부에 하나 이상의 표면을 갖는 중합체 멤브레인을 갖는다. 중합체 멤브레인 표면은 중합체 멤브레인 표면에 세포의 부착을 개선시키기 위한 충분한 양의 하나 이상의 표면 처리물로 처리된다.

[0017] 다른 구체예는 개선된 세포 배양 시스템을 포함하며, 상기 세포 배양 시스템은 하우스징 및 이 하우스징 내부에 중합체 멤브레인을 포함하는 생물반응기를 포함하고, 여기서 중합체 멤브레인은 멤브레인에 세포의 결합 및 부착을 촉진하기 위한 충분한 양의 혈소판 용해물 또는 혈장으로 처리된다.

[0018] 본 발명의 다른 구체예는 세포 배양 시스템에 사용하기 위한 세포 배양 표면을 포함한다. 이 세포 배양 표면은 중합체 물질에 세포의 부착을 촉진하기 위한 충분한 양의 혈소판 용해물 또는 혈장 또는 이의 조합물로 처리된 중합체 물질이다.

[0019] -본 발명의 상세한 설명-

[0020] 배경 기술에서 설명한 바와 같이, 부착 포유류 세포를 성장시키기 위해 생물반응기를 구성하는 방식은 여러 가지가 있다. 본 발명은 임의의 한 구성에 의존하지 않는다. 본 발명에서 사용하는 용어 "부착성 포유류 세포"는 종의 기원, 조직 기원, 세포 계통 또는 배양물 수명과 무관하게 포유류 핵 계통과 부착능을 보유하는 임의 유형의 진핵세포를 의미한다.

[0021] 본 발명의 구체예의 비제한적인 일례는 도 1에 도시한 중공 섬유 생물반응기이다. 생물반응기, 또는 세포 증식 모듈(10)은 하우스징(14) 내에 내포되어 있는, 중공 섬유의 기하 형태인 생체적합성 중합체 멤브레인(10)의 다발 세트로부터 제조된다. 이러한 목적을 위해서, 모든 중공 섬유 세트, 및 이들의 모세관내부(IC) 및 모세관외부(EC)를 멤브레인이라 한다. 용어 "멤브레인", "세포 배양 표면", "배양 표면", "중합체 멤브레인" 및 "중합체 표면"은 동의어이다. 섬유(12)를 함유하는 모듈(14), 또는 하우스징은 원통형일 수 있고, 임의의 생체적합성 중합체 물질로 제조될 수 있다. 멤브레인의 모세관내부면은 설명을 위해서, 중공 섬유와 닮은 멤브레인의 내강면, 및 이로 둘러싸이거나, 또는 실질적으로 둘러싸인 용적으로 정의된다. 멤브레인의 모세관외부면은 중공 섬유의 내강면으로 둘러싸이지 않거나, 또는 접촉하지 않는 생물반응기 하우스징 내 용적의 임의 성분을 의미한다. 설명을 위해서, 세포는 IC 공간에만 접촉되고, 여기서 성장하며, 재접종되는 것으로 가정하고, 이러한 가정은 청구항의 범주를 한정하려는 의도가 아니며, 대안적으로, 세포를 EC 공간에서 성장시킬 수 있고, 본 명세서에서 설명하는 동일 원리를 적용할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0022] 모듈 또는 하우스징의 각 말단은 말단 캡, 또는 헤더(16, 18)로 폐쇄되어 있다. 이들 말단 캡(16, 18)은 물질이 생물반응기에서 성장되는 세포 유형과 생체적합한 경우의 모든 적절한 물질 예컨대 폴리카르보네이트로 제조될 수 있다.

[0023] 모듈은 모듈 내로 유체의 유입 및 유출을 위한 하나 이상의 포트를 가지며, 비제한적인 예로서, 일 구체예에서, 모듈은 4개의 포트를 갖는다. 4 포트 중 2개는 모세관외부 공간에 유동적으로 연결되어 있다. 하나의 포트(34)는 모세관외부 공간으로 유체 및 용질이 유입되는데 사용되고, 다른 포트(44)는 모세관외부 공간으로부터 유체 및 용질이 나가는데 사용된다. 4 포트 중 다른 2개는 모세관내부 공간에 유동적으로 연결되어 있으며, 비제한적인 예에서, 이 중 한 포트(26)는 모세관내부 공간으로 유체 및 용질이 들어가는데 사용되고, 다른 포트(42)는 모세관내부 공간으로부터 유체 및 용질이 나가는데 사용된다. 상기 언급한 유입 포트(34, 26)를 통해서 세포, 처리물 및 배지가 생물반응기로 유입될 수 있고, 유출 포트(44, 42)를 통해서, 세포, 처리물 및 배지가 때때로 생물반응기로부터 제거될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서, 생물반응기로 물질의 유입을 가능하게 하는 생물반응기(10)의 임의의 물리적 개구부는 유입 포트이고, 생물반응기로부터 물질이 유출되는 임의의 포트는 유출 포트이다.

[0024] IC 공간은 세포 성장 챔버로 제공되는 것으로서 간주되지만, 앞서 언급한 바와 같이, 이러한 가정은 본 발명에

필수적이지 않은데, 세포가 EC 공간으로 흘러들어가서, 성장할 수도 있기 때문이다. 새로운 세포 증식 기간의 시작시에, 세포를 IC 공간으로 흘러보낼 수 있다. IC 공간은 시린지를 사용하거나, 또는 세포 제조물을 함유하는 백으로부터 세포를 적재할 수 있다. 세포는 세포 배양 배지 중에서 IC 공간으로 흘러들어가거나, 또는 골수 흡인물로서 흘러들어갈 수 있다.

- [0025] 일 구체예에서, IC 배지 백(22)(도 2 참조)은 탄성 튜빙(IC 유입선)의 일부를 통해서 생물반응기(10)의 IC 유입 포트(26)에 연결될 수 있다. IC 유입선(24)은 신선한 IC 배지를 생물반응기의 IC 면으로 전달한다. 추가의 튜빙 선(62)은 예컨대 생물반응기로 세포를 재접종 또는 재분배하는 등 특정 용도를 가능하게 하기 위해 필요에 따라서 시스템에 부가될 수 있다.
- [0026] 세포 투입 백(30)은 생물반응기(10)에서 증식시키려는 세포를 함유한다. 세포 투입 백(30)은 IC 유입 포트(26)를 통해서 중공 섬유(12)의 내강으로 세포를 전달하는 IC 유입선(24)에 연결된다.
- [0027] 세포를 이미 회수한 경우, 이들은 세포 회수선(31)을 통해서 세포 회수백(32)으로 생물반응기(10)의 IC 출구 포트(42) 밖으로 흘러나오게 된다.
- [0028] 상기 세포 성장 시스템은 또한 IC 재순환 루프(36)로서 작용하는 일정 길이의 튜빙을 포함할 수 있다. IC 배지는 튜빙 루프(36)를 통해서 IC 출구 포트(42)로부터 생물반응기(10)에서 흘러나와서 IC 유입 포트(26)를 통해서 다시 생물반응기로 들어갈 수 있다. 이 루프(36)는 중공 섬유를 통해서 IC 배지를 재순환시키기 위해 사용된다. 또한 중공 섬유 밖으로 세포를 흘러나가게 하고, 이들을 추가 증식을 위해 중공 섬유 전반에 재접종/재분포시키기 위해 사용할 수도 있으며 이하에 좀더 자세하게 설명한다.
- [0029] 도 1에 도시한 바와 같이, 섬유(12) 자체간 공간, 또는 EC 공간은 영양분 저장소 및 모세관내부 공간에 세포를 위한 폐기물 회수부로서 제공될 수 있다. 영양분은 중합체 멤브레인을 가로질러 확산을 통해 EC 공간으로부터 IC 공간으로 들어가며, 또한 세포 폐기물 생성물은 EC 공간을 통해서 IC 공간을 나간다. EC 배지는 세포 대사 폐기물을 제거하기 위해 일정 간격으로 교체되거나, 또는 연속적으로 교체될 수 있다. EC 배지는 산소공급기(4, 도 2)를 통해서 필요에 따라 순환될 수 있다. EC 배지는 일 구체예에서, 일정 길이의 탄성 튜빙을 통해 유동적으로 연결된 EC 배지 백(16, 도 2)으로부터, 또는 EC 유입 포트(34)에 연결된 도관(28)으로부터 생물반응기로 투입될 수 있다. 임의의 세포 폐기물과 함께, EC 배지는 일정 길이의 탄성 튜빙을 통해 유동적으로 연결된 IC 출구 포트(44)를 통해서, 또는 폐기물 백(60)에 연결된 도관(58)을 통해서 생물반응기로부터 흘러나갈 수 있다.
- [0030] 또한 선(40 및 41)을 포함하는 EC 재순환 루프를 EC 배지를 재순환시키기 위해 제공할 수도 있다. 또한, 세포가 EC 공간에서 성장하는 경우, IC 배지를 영양분 저장소 및 세포용 폐기물 회수 폴로서 제공한다.
- [0031] 설명 목적을 위한 2번째 가정은 IC 공간을 통해 흐르는 유체 및 EC 공간을 통해 흐르는 유체는 반대 방향으로 흐른다는 것이다. 이러한 가정은 본 발명에서 필수적인 것은 아닌데, 본 발명은 EC 및 IC의 양 공간에서 유체가 동일한 방향으로 흐르는 생물반응기에서 사용할 수도 있기 때문이다.
- [0032] 본 명세서에서 기술하는 특정 구체예에서 중공 섬유(12)는 대략 9000 개이고, 길이는 대략 295 mm이다. 중공 섬유는 폴리우레탄 포팅(potting)(도시하지 않음)에 의해서 하우징 내에 위치할 수 있다. 이 섬유(12) 및 포팅은 IC 공간을 통해서 유체가 흐르도록 하기 위해 단면으로 가로지를 수 있다. 섬유(12)의 길이 및 개수는 다양할 수 있고, 본 명세서의 구체예는 예시에 불과하다.
- [0033] 중공 섬유(12)는 반투과성, 생체적합성 중합체 물질로 제조될 수 있다. 이러한 중합체 물질 중 하나는 폴리아미드와 폴리아릴에테르설폰의 블렌드이다. 반투과성 멤브레인은 영양분, 폐기물 및 가스가 EC와 IC 공간 사이의 멤브레인을 통해서 수송될 수 있게 한다. 유체 교환은 섬유가 대체로 일관된 다공도를 가지므로, 멤브레인을 통한 분자의 확산 및 대류가 촉진되기 때문에, 부분적으로 일어난다.
- [0034] 멤브레인(12)의 일 구체예는 65~95 중량%의 하나 이상의 소수성 중합체 및 5~35 중량%의 하나 이상의 친수성 중합체를 포함한다. 소수성 중합체는 폴리아미드(PA), 폴리아르아미드(PAA), 폴리아릴에테르설폰(PAES), 폴리에테르설폰(PES), 폴리설폰(PSU), 폴리아릴설폰(PASU), 폴리카르보네이트(PC), 폴리에테르(PE), 폴리우레탄(PUR), 폴리에테르이미드 및 임의의 상기 중합체의 공중합체 혼합물, 예컨대 폴리에테르설폰 또는 폴리에테르설폰과 폴리아미드의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 친수성 중합체는 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리글리콜모노에스테르, 수용성 셀룰로스 유도체, 폴리설페이트 및 폴리에틸렌-폴리프로필렌 옥사이드 공중합체로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0035] 중합체 중공 섬유(12)는 물질, 또는 "표면 처리물"로 처리되어 특히 부착성 세포, 또는 앵커리지 의존적 세포를

생물반응기에서 성장시켜야 하는 경우에, 멤브레인에 세포의 부착을 개선시킨다. 용어 "처리", "처리된", 또는 '처리하는'은 중공 섬유용 세포 배양 표면의 실질적으로 모든 부분에 대해서 처리 분자가 멤브레인에 흡착되기에 충분한 시간 동안 표면 처리하는 것을 의미한다. 또한, 공유성, 흡착성 및 가용성 처리물을 상호 함께 사용할 수 있으며, 이의 조합 또는 양은 제한되지 않는다.

- [0036] 방법
- [0037] 표면 조제물로 멤브레인 또는 세포 배양 표면을 처리하는 단계는 다음과 같이 수행될 수 있다: 멤브레인 처리 단계 전에, 세포 배양 표면(12)을 염수 용액으로 습윤시켜 사전처리(prime)하는데, 여기서 염수 용액은 일 구체예에서, PBS 또는 인산 완충 염수이다. 침전물 형성을 피하기 위해서, PBS는 2가 양이온 예컨대  $Mg^{++}$  또는  $Ca^{++}$  등이 없어야만 한다.
- [0038] 사전처리 과정 이후에, 멤브레인을 표면 처리물, 예컨대 혈소판 용해물(PL), 혈장 및 피브로넥틴(FN)으로 처리한다.
- [0039] 본 발명의 목적을 위해서 인간 혈소판 용해물은 혈장 및 용해된 인간 혈소판을 함유하는 용액이다. 상기 용액은 당분야에서 현행 공지된 방법들을 포함하여 인간 혈소판을 용해시킬 수 있는 임의 방법을 통해 제조할 수 있다. 그 중 한 방법에서는, 혈장 중  $1.5 \times 10^9$ /mL 혈소판을  $-80^\circ C$ 에 동결시켜 혈소판을 용해시키며, 얻어진 생물학적 활성 용액이 이후 혈소판 용해물 용액으로서 공지된 것이다. 이 혈소판 용해물을 해동시키고 10분간  $1,000 \times g$ 에서 원심분리한다. 얻어진 상등액을 사용하여 멤브레인을 처리한다.
- [0040] 본 발명의 목적을 위해, 혈장은 당분야에서 공지된 방법을 포함하여 임의 방법을 통해서 실질적으로 모든 백혈구와 적혈구가 제거된 인간 혈장의 임의 조제물로 구성된다. 이 혈장의 혈소판 함량은 다양할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 목적을 위해, 표면 처리물은 또한 0.05 mg/mL 농도로 PBS에 용해된 피브로넥틴(FN)일 수 있다.
- [0042] 표면 처리물은 IC 공간에 표면 처리물을 펌핑하거나 함침시켜서 멤브레인(12)과 접촉시킨다.
- [0043] 표면 처리물은 그 자체로 생물반응기에 투입되거나, 또는 세포 배양 배지에 포함될 수 있다. 다른 구체예에서, 하나의 표면 처리물을 이 제1 표면 처리물과는 상이한 다른 표면 처리물과 함께 생물반응기에 투입할 수 있다.
- [0044] 생물반응기의 멤브레인과 접촉하면, 세포 부착 증강을 촉진하기에 충분한 양으로 표면 처리물의 흡착을 가능하게 하는 충분한 시간 동안 멤브레인과 함께 표면 처리물을 항온반응시킨다. 본 발명의 일 구체예에서, 피브로넥틴 처리 용액을 1시간 이상 동안 세포 배양 표면과 함께 항온반응시킨다.
- [0045] 세포 적재는 IC 유입 포트(26)를 통해서 생물반응기(10)로 수성 현탁 세포 샘플을 보내서 수행할 수 있다. 상기 기술한 바와 같이, 혈소판 용해물 또는 혈장은 또한 증식되는 세포와 함께 포함될 수 있다.

**실시예**

- [0046] 실시예 1
- [0047] 본 실시예에서는 3종의 폴리플렉스 중공 섬유 생물반응기를 사용하였다. 하나의 생물반응기는 어떠한 처리도 하지 않았다(도 3에서 no FN으로 표시함). 다른 생물반응기는 피브로넥틴(FN)을 처리하였고 나머지 하나는 상기 기술한 방법에 따라서 혈소판 용해물(no FN + PL)을 처리하였다. 0일에 대략  $3 \times 10^6$  간엽 줄기 세포를 각 생물반응기에 적재하였다. 이 세포들을 7일간 성장시켰다. EC 및 IC 배지를 3일 및 5일째에 교체하였고 7일째에 세포를 회수하여 계측하였다.
- [0048] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 피브로넥틴(FN) 또는 혈소판 용해물(PL)로 처리한 생물반응기는 미처리 생물반응기보다 더욱 양호한 세포 증식물을 생성시켰다. 처리된 섬유를 갖는 생물반응기에서 생성된 세포의 개체 수 증가는 세포가 멤브레인에 부착하여 성장할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0049] 실시예 2
- [0050] 4종의 폴리플렉스 중공 섬유 생물반응기를 본 실시예에서 사용하였다. 한 생물반응기는 일정량의 피브로넥틴( $1 \times FN$ )으로 처리하고, 다른 생물반응기는 일정량의 피브로넥틴을 2회( $2 \times FN$ ) 처리하였으며, 다른 생물반응기는 혈소판 용해물을 처리하였고 나머지 한 생물반응기는 상기 기술한 방법에 따라 혈장을 처리하였다. 0일에 대략  $3 \times 10^6$  간엽 줄기 세포를 각 생물반응기에 적재하였다. 이 세포들을 7일간 성장시켰다. EC 및 IC 배지를 3일 및

5일째에 교체하였고 7일째에 세포를 회수하여 계측하였다.

[0051] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 1× 또는 2× 피브로넥틴을 처리한 생물반응기는 최고의 세포 증식물을 생성시켰다. 그러나, 혈소판 용해물 및 혈장을 처리한 멤브레인에서 성장시킨 세포도 배양물이 양호하게 증식된 것으로 나타났다.

[0052] 상기 기술한 실시예는 본 발명의 원리에 따라 활용할 수 있는 일부 용도를 나타낸 것이며 첨부된 청구항에서 정의하는 바와 같은 본 발명의 범주 및 개념을 제한하고자 하는 것이 아니다.

**도면의 간단한 설명**

[0011] 도 1은 본 발명에서 유용한 생물반응기의 개략적인 단면도이다.

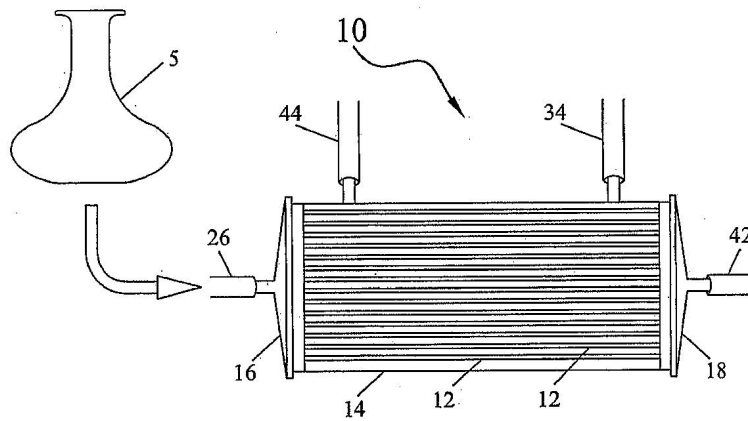
[0012] 도 2는 본 발명을 사용할 수 있는 세포 증식 시스템의 흐름도이다.

[0013] 도 3은 간엽 줄기 세포 성장에 대한 다양한 표면 처리물의 효과를 비교한 그래프이다.

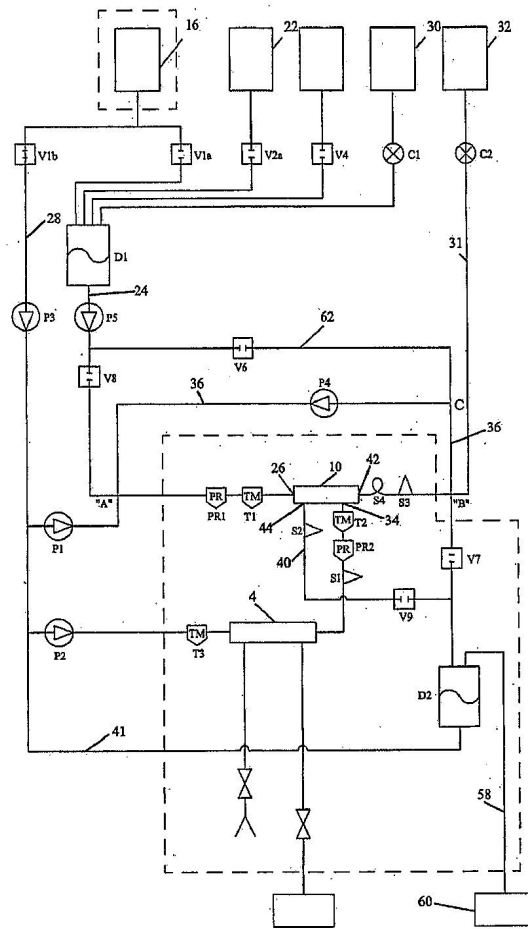
[0014] 도 4는 간엽 줄기 세포 성장에 대한 다양한 표면 처리물의 효과를 비교한 다른 그래프이다.

**도면**

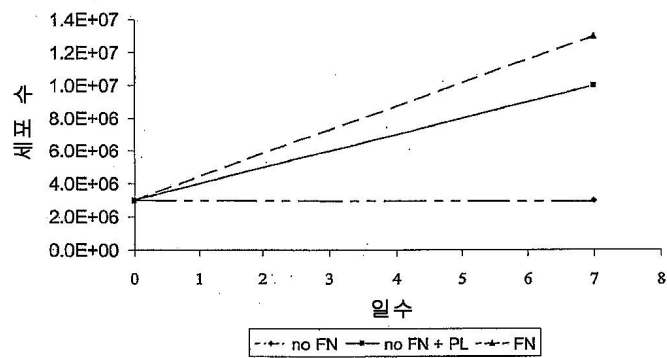
**도면1**



도면2



도면3





도면4

