

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 7월 1일 (01.07.2021)



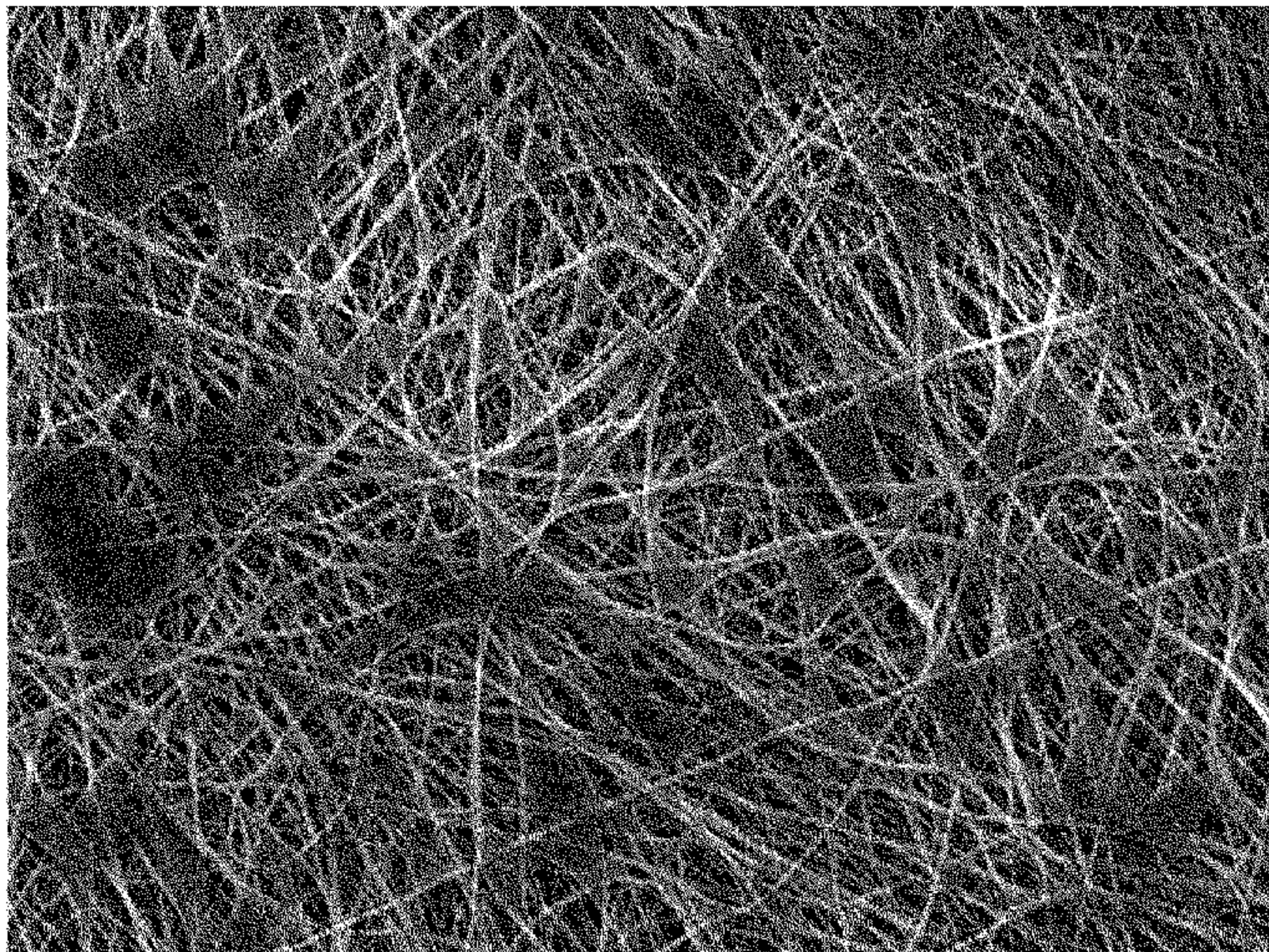
(10) 국제공개번호
WO 2021/133143 A1

- (51) 국제특허분류: *C12M 1/00* (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01) (SEO, Dong Sik); 06527 서울시 서초구 نارüter로 56, 3층 (잠원동), Seoul (KR). 구회관 (GOO, Hui Gwan); 06527 서울시 서초구 نارüter로 56, 3층 (잠원동), Seoul (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/019215 (74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).
- (22) 국제출원일: 2020년 12월 28일 (28.12.2020)
- (25) 출원언어: 한국어 (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0177073 2019년 12월 27일 (27.12.2019) KR
- (71) 출원인: 주식회사 아모라이프사이언스 (AMOLIFESCIENCE CO., LTD.) [KR/KR]; 06527 서울시 서초구 نارüter로 56, 3층 (잠원동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김형택 (KIM, Hyeong Taek); 06527 서울시 서초구 نارüter로 56, 3층 (잠원동), Seoul (KR). 서동식

(54) Title: CELL CULTURE SUBSTRATE AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 세포배양기재 및 이의 제조방법

[도1]



(57) Abstract: A cell culture substrate is provided. A cell culture substrate according to an embodiment of the present invention comprises: a fibrous web in which fibers are integrated; and a cell culture coating layer comprising a coating film connecting at least some fibers from among fibers positioned on one surface of the fibrous web, wherein the cell culture coating layer is realized through a fusion protein for cell culture in which a functional peptide is bound to a mussel adhesive protein. Thus, the substrate can be stored at room temperature for a long period of time, i.e., several years, despite containing protein-like substances that aid in cell culture, and thus exhibits very high storage stability. At the same time, the activity of substances that aid in cell culture is maintained at the same level or is reduced only minimally, thus enabling cell culture at an initially designed level. In addition, the cell culture substrate has excellent cell adhesion and can stably proliferate adhered cells, and thus can achieve high cell culture efficiency, and accordingly, can be widely applied to the culture of various cells such as stem cells.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/133143 A1



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 세포배양기재가 제공된다. 본 발명의 일 실시예에 의한 세포배양기재는 섬유들이 집적된 섬유웹, 및 상기 섬유웹의 일 표면에 위치하는 섬유들 중 적어도 일부 섬유들 사이를 연결하는 코팅막을 포함하는 세포배양 코팅층을 구비하고, 상기 세포배양 코팅층은 기능성 펩타이드가 혼합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질을 통해 구현된다. 이에 의하면, 세포배양에 도움을 주는 단백질과 같은 물질을 함유함에도 불구하고 상온에서 수년 간 장기간 저장이 가능해 저장안정성이 매우 우수한 동시에 세포배양에 도움을 주는 물질의 활성은 그대로 유지되거나 최소한의 저하만 발생해 초도 설계한 수준으로 세포를 배양시킬 수 있다. 또한, 세포배양기재에 세포 부착성이 우수하고, 부착된 세포를 안정적으로 증식시킬 수 있음에 따라서 높은 세포배양 효율을 달성할 수 있음에 따라서 줄기세포 등 각종 세포배양에 널리 응용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 세포배양기재 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 세포배양기재 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근, 질병 치료에 배양 세포의 이용이 확대됨에 따라 세포 배양에 대한 관심 및 연구가 증가하고 있다. 세포 배양은 세포를 생체로부터 채취하고, 생체 밖에서 배양시키는 기술이며, 배양된 세포는 피부, 장기, 신경 등 신체의 다양한 조직으로 분화시켜 인체에 이식되거나 분화시키기 전 상태로 인체에 이식시켜 생착 및 분화를 동시에 이루어지게 하여 다양한 질병 치료에 활용될 수 있다.
- [3] 포유류 세포의 배양은 생명 과학 및 보건 과학에서 많은 공정들 중 하나이다. 고정-의존성 세포를 수반하는 포유류 세포 배양 및 분석을 위한 세포배양기재는 흔히 예를 들어 고분자 중합체 또는 유리로 만들어진 웰-플레이트와 같은 용기나 필름과 같은 플레이트가 많이 사용되는데, 세포가 용기나 플레이트 표면에 부착되게 하는 추가의 표면 처리가 요구된다. 이와 같은 표면 처리는 예를 들어 흡착, 그래프팅 또는 플라즈마 중합 기술에 의해 표면 상에 흡착층을 형성시키거나 적절한 표면형상을 구현하는 것을 포함할 수 있다. 또는 상기 표면 처리는 용기나 플레이트 표면 그 자체에 화학적 개질을 통한 것일 수 있으며, 예를 들어 대기 코로나, 무선 주파수 진공 플라즈마(radio frequency vacuum plasma), DC 글로우 방전(glow discharge), 및 마이크로파 플라즈마 처리(microwave plasma treatments)등을 통해 수행될 수 있다.
- [4] 한편, 줄기세포 예를 들어 성인 줄기세포(adult stem cells, ASCs), 전분화능줄기세포(Pluripotent stem cell)을 포함한 각종 줄기세포 및 체세포들을 배양 및 분화, 교차분화, 리프로그래밍 하는 현재의 방법은 복잡한 배양 환경들, 예를 들어 세포외 기질 단백질이나, 세포의 증식에 도움을 주는 다른 여러 단백질을 이용한 코팅층을 고정 기재 표면 상에 형성시켜 세포외 기질과 같은 유사한 미세환경을 형성시켜 줄기 세포를 배양하는 것이 일반적이다.
- [5] 한편, 상기 코팅층은 상술한 각종 단백질들을 포함한 용액을 단순히 용기나 플레이트와 같은 세포부착 표면에 처리한 뒤 건조시켜 형성시키는데, 코팅층 내 단백질의 활성 안정성은 매우 낮아서 코팅층을 형성시킨 뒤 상온에서 몇 시간 내 활성을 쉽게 잃어버리는 문제가 있어서 미리 코팅층이 형성된 세포배양기재를 제조해 두기 어렵고, 제조하더라도 이를 저온에서 보관해야 하며, 저온 보관 시에도 보관일수가 30일 이내로 매우 짧은 문제가 있다. 또한, 이와 같은 열악한 저장안정성으로 인해 세포 로딩 작업 직전에 세포부착 표면에 코팅층을 형성시키는 것이 일반적이며, 이로 인해 세포배양 작업상 불편함과, 세포배양 전 준비시간이 연장되는 문제가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 점을 감안하여 안출한 것으로, 상온에서 수년 간 장기간 저장이 가능해 저장안정성이 매우 우수하고, 그럼에도 불구하고 세포배양에 도움을 주는 물질의 활성은 그대로 유지되거나 최소한의 저하만 발생해 초도 설계한 수준으로 세포를 배양시킬 수 있는 세포배양기재 및 이의 제조방법을 제공하는데 목적이 있다.
- [7] 또한, 본 발명은 세포 부착성이 우수하고, 부착된 세포를 안정적으로 증식시킬 수 있음에 따라서 높은 세포배양 효율을 달성할 수 있는 세포배양기재 및 이의 제조방법을 제공하는데 다른 목적이 있다.
- [8] 나아가 본 발명은 위와 같은 우수한 특성을 달성할 수 있도록 하는 세포배양 코팅조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제 해결 수단

- [9] 상술한 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 섬유들이 집적된 섬유웹, 및 상기 섬유웹의 일 표면에 위치하는 섬유들 중 적어도 일부 섬유들 사이를 연결하는 코팅막을 포함하는 세포배양 코팅층을 구비하고, 상기 세포배양 코팅층은 기능성 펩타이드가 홍합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질로 형성된 세포배양기재를 제공한다.
- [10] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 기능성 펩타이드는 세포의 부착, 이동, 증식 및 분화 중 어느 하나 이상을 촉진시키는 기능을 가질 수 있다.
- [11] 또한, 상기 섬유웹은 폴리스티렌(PS), 폴리에스테르, 폴리이더술폰(PES), 폴리비닐리덴플루오라이드(PVDF), 폴리디메틸실록산(PDMS), 폴리아미드, 폴리이미드, 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다.
- [12] 또한, 상기 홍합 접착단백질은 서열번호 1 내지 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 상기 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열이 연결된 단백질일 수 있다.
- [13] 또한, 상기 기능성 펩타이드는 RGD 서열을 포함할 수 있다.
- [14] 또한, 상기 기능성 펩타이드는 서열번호 15 내지 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 펩타이드 또는 상기 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열이 연결된 펩타이드일 수 있다.
- [15] 또한, 상기 섬유웹의 일면에 대향하는 타면에 배치된 지지체를 더 포함할 수 있다.
- [16] 또한, 상기 섬유웹은 평균직경이 200 ~ 1000nm이며, 두께가 2 ~ 20 μ m이고, 평량이 3 ~ 20g/m²일 수 있다.
- [17]
- [18] 또한, 본 발명은 (1) 카보디이미드계 커플링제 및 반응제를 포함하는

활성용액과 기능성 펩타이드가 혼합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질을 준비하는 단계, (2) 준비된 활성용액과 세포배양용 융합단백질을 혼합하여 세포배양 코팅조성물을 제조하는 단계, 및 (3) 세포배양 코팅조성물을 섬유웹 표면에 처리하여 세포배양 코팅층을 형성시키는 단계를 포함하는 세포배양기재 제조방법을 제공한다.

[19] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 카보디이미드계 커플링제는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필 카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC) 또는 N,N'-디시클로헥실카보디이미드(DCC)이며, 상기 반응제는 N-하이드록시석신이미드(NHS) 또는 N-하이드록시설포석신이미드(Sulfo-NHS)일 수 있다.

[20] 또한, 상기 카보디이미드계 커플링제와 반응제는 1: 0.1 ~ 10 중량비로 활성용액에 포함되며, 상기 세포배양 코팅조성물은 세포배양용 융합단백질 100 중량부에 대해서 카보디이미드 커플링제가 1: 1~100 중량부로 혼합될 수 있다.

[21]

[22] 또한, 본 발명은 피코팅 기재인 다공성 세포배양 기재 표면의 적어도 일부 기공을 폐색하는 코팅막을 형성하는 세포배양 코팅조성물로서, 상기 세포배양 코팅조성물은 기능성 펩타이드가 혼합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질, 카보디이미드계 커플링제 및 반응제를 포함하는 것을 특징으로 하는 다공성 세포배양 기재용 세포배양 코팅조성물을 제공한다.

[23]

[24] 이하, 본 발명에서 사용한 용어에 대하여 설명한다.

[25] 본 발명의 "세포외 기질(extracellular matrix, ECM)"은 세포의 외부를 둘러싸고 있는 기질로서, 세포와 세포 사이를 차지하고 있으며, 주로 단백질과 다당류로 이루어진 망상 구조를 가지는 것을 의미하는 것이다.

발명의 효과

[26] 본 발명에 의한 세포배양기재는 세포배양에 도움을 주는 단백질과 같은 물질을 함유함에도 불구하고 상온에서 수년 간 장기간 저장이 가능해 저장안정성이 매우 우수한 동시에 세포배양에 도움을 주는 물질의 활성은 그대로 유지되거나 최소한의 저하만 발생해 초도 설계한 수준으로 세포를 배양시킬 수 있다. 또한, 세포배양기재에 세포 부착성이 우수하고, 부착된 세포를 안정적으로 증식시킬 수 있음에 따라서 높은 세포배양 효율을 달성할 수 있음에 따라서 줄기세포 등 각종 세포배양에 널리 응용될 수 있다

도면의 간단한 설명

[27] 도 1 내지 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포배양기재의 표면 SEM 사진,

[28] 도 3 내지 도 4는 본 발명의 비교예에 따른 세포배양기재의 표면 SEM 사진 및 세포배양결과에 대한 사진,

[29] 도 5 내지 도 7은 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 세포배양기재에

유도만능줄기세포를 배양한 후 2종(Nanog, Sox2)의 마커의 발현정도를 촬영한 사진,

- [30] 도 8은 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 세포배양기재에 유도만능줄기세포를 동일한 조건에서 13번 계대배양한 후 계대1과 계대13에서의 배양세포를 세포염색법으로 염색하여 배양여부를 촬영한 사진,
- [31] 도 9는 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 세포배양기재에 유도만능줄기세포를 배양한 후 시간 별 배양세포수를 흡광도를 통해 세포 성장을 측정한 그래프,
- [32] 도 10은 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 세포배양기재에 유도만능줄기세포를 계대배양한 후 계대3과 계대9에서의 Oct4마커를 발현하는 배양세포를 촬영한 사진,
- [33] 도 11 및 도 12는 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 세포배양기재에 유도만능줄기세포를 배양한 후 유세포분석기를 이용하여 Oct4 마커가 발현하는 세포의 발현정도를 평가한 그래프,
- [34] 도 13 내지 도 15는 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 세포배양기재에 대해 각각 1 ~ 3개월 동안 가속화실험을 수행 후 유도만능줄기세포를 배양한 사진, 그리고
- [35] 도 16 내지 도 18은 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 세포배양기재에 대해 각각 1 ~ 3개월 동안 가속화실험을 수행 후 유도만능줄기세포를 배양한 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [36] 이하, 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 실시예에 대하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [37]
- [38] 본 발명의 일 실시예에 의한 세포배양기재는 섬유들이 집적된 섬유웹 및 세포배양 코팅층을 구비한다.
- [39] 상기 섬유웹은 파종된 세포가 안착하여 증식할 수 있는 지지체로서 후술하는 세포배양 코팅층에 대한 피코팅면을 제공한다. 상기 섬유웹은 섬유들이 집적된 3차원 네트워크 구조를 가지며, 구체적으로 각각의 섬유가 독립적으로 폴딩 및/또는 섬유길이방향의 정함이 없이 각각이 배열되고, 이들이 적층됨을 통해 구조적으로 더욱 복잡하고, 다양한 3차원 네트워크 구조를 형성할 수 있다. 이와 같이 복잡, 다양하게 형성된 내부 구조는 세포의 증식에 필요한 영양분을 포함하는 배양용액의 유로로 기능하여 섬유웹 내부에 위치한 세포까지 용이하게 영양분을 공급시킬 수 있고, 세포사멸을 방지하며, 세포증식을 향상시킬 수 있다.

- [40] 이때, 1가닥 섬유 내의 서로 다른 표면 간 및/또는 서로 다른 섬유의 표면 간에는 접착 또는 용착이 발생할 수 있고, 이를 통해 3차원네트워크 구조가 구조적으로 보다 안정화 될 수 있다.
- [41] 또한, 섬유들이 랜덤하게 배열되고 축적되어 형성된 섬유웹의 표면은 표면 모폴로지에 의해 세포의 입체적 배양을 유도할 수 있다. 표면 모폴로지의 일 예로써, 섬유웹 표면은 평평하지 않고, 울퉁불퉁한 표면이 형성될 수 있고, 표면 거칠기가 클 수 있다. 섬유웹의 표면 형상이 울퉁불퉁하다는 것은 예시적으로 다수개의 오목부 및/또는 볼록부를 포함한 것으로써, 세포의 입체적 성장효과 이외에 세포가 볼록부 간 사이 공간 또는 오목부의 홈에 보다 용이하고 견고하게 안착될 수 있어서 세포배양시트에 안착된 뒤 탈리되는 세포의 수를 현저히 감소시킬 수 있는 이점이 있다.
- [42] 상기 섬유웹을 형성하는 섬유는 세포배양에 사용되는 통상적인 재질의 경우 제한 없이 사용될 수 있다. 일례로서 상기 섬유는 폴리스티렌(PS), 폴리에틸렌테레프탈레이트 및 폴리카보네이트와 같은 폴리에스테르, 폴리이더술폰(PES), 폴리비닐리덴플루오라이드(PVDF) 등의 불소계 화합물, 폴리디메틸실록산(PDMS), 폴리아미드, 폴리이미드, 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 다만, 세포증식 및 회수성을 모두 고려하여 섬유는 불소계 화합물을 포함할 수 있고, 이 중에서도 폴리비닐리덴플루오라이드(PVDF)를 포함할 수 있다. 섬유가 PVDF인 경우 세포 회수 특성이 우수할 뿐만 아니라, 배양된 세포가 파종 시 세포 직경 보다 작게 구현하기에 유리할 수 있다.
- [43] 상기 섬유웹은 스핀본드, 펠트블로운 등의 공지된 방법으로 웹 형상으로 구현된 것이거나, 전기방사를 통해 구현된 것일 수 있다. 또한, 상기 섬유웹은 평균직경이 10nm ~ 1.5 μ m인 섬유들로 형성되며, 평량이 1 ~ 20g/m²일 수 있다. 만일 섬유의 평균직경이 10nm 미만일 경우 기계적 강도가 열위하고, 섬유웹의 제조가 어려울 수 있다. 만일 섬유의 평균직경이 1.5 μ m를 초과하는 경우 섬유웹의 밀도(평량)가 작아지고, 열압착시 섬유웹의 표면이 부분적으로 용융된 것과 같이 형성될 우려가 있다. 또한, 섬유웹 모폴로지가 세포배양에 유리한 토폴로지를 구현하기 어려워 세포배양 효율이 감소할 우려가 있다. 또한, 만일 평량이 1 g/m² 미만일 경우 섬유웹 제조 시 핸들링이 용이하지 않은 우려가 있고, 평량이 20g/m²를 초과하는 경우 압착롤에서 섬유웹이 용융될 수 있고, 섬유웹이 후술하는 별도의 지지체인 필름과 합지되어 세포배양시트를 구현하는 경우에 필름에 부착되기 어려울 수 있다. 또한, 섬유 직경과 섬유웹 평량 조건을 만족하지 못하는 경우 세포배양에 적합한 표면 모폴로지의 구현이 어려울 수 있고, 본 발명이 목적하는 수준의 세포배양 효율 등을 달성하기 어려울 수 있다. 한편, 섬유웹 표면이 세포배양, 특히 줄기세포의 배양에 유리한 모폴로지를 구현하기 위해서 바람직하게는 섬유웹은 섬유 평균직경이 200 ~ 1000nm이며, 두께가 2 ~ 10 μ m이고, 평량이 3 ~ 7g/m²일 수 있고, 이를 통해 세포배양효율이

향상됨과 더불어 배양된 세포가 파종 시보다 작은 직경을 갖도록 배양할 수 있어서 보다 짧고, 상태가 우수한 세포를 배양시키기에 유리하다. 특히 두께가 $2\mu\text{m}$ 미만일 경우 세포 증식 속도가 매우 저하될 수 있는 우려가 있다. 또한, 두께가 $10\mu\text{m}$ 를 초과할 경우 세포의 현미경 관찰이 어려울 수 있어서 증식되는 세포 관찰이 용이하지 않을 수 있다.

[44]

[45] 다음으로 상술한 섬유웹 상에 구비되는 세포배양 코팅층에 대해 설명한다.

[46] 상기 세포배양 코팅층은 배양될 세포가 파종된 뒤 안착 및 증식을 향상시킬 수 있는 세포부착 표면을 제공하는 층이다. 상기 세포배양 코팅층은 기능성 펩타이드가 혼합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질을 포함하여 형성된다.

[47] 도 1을 참고하여 설명하면, 상기 세포배양 코팅층은 섬유웹 표면에 위치하는 섬유들 중 일부 섬유간 사이의 공간을 연결하는 코팅막을 포함한다. 상기 코팅막은 섬유웹 표면에 군데군데 랜덤하게 형성되는데, 섬유 간 사이를 연결하는 코팅막과 섬유웹 표면에 위치하는 섬유들로 인해 형성되는 모폴로지는 세포배양에 보다 유리한 환경을 만들 수 있다. 또한, 상기 코팅막이 섬유웹 일 표면을 전부 덮지 않음에 따라서 배가 내부로 유입 및 유출이 가능하고, 이를 통해 섬유웹 표면에 안착한 세포에 3차원으로 배지를 공급할 수 있어서 세포배양에 상승된 효과를 얻기에 유리하다.

[48] 또한, 상기 세포배양 코팅층은 코팅막뿐만 아니라 섬유웹을 형성하는 섬유들 일부 또는 전부의 외부면 적어도 일부 표면 상에 형성된 피복층을 포함할 수 있다. 더불어 상기 코팅막은 섬유웹 표면에 위치하는 섬유들뿐만 아니라, 섬유웹 내부에 위치하는 섬유나, 섬유웹 타면에 위치하는 섬유들 중 일부 섬유 간 사이 공간을 연결하도록 형성될 수도 있다.

[49] 세포배양용 융합단백질을 통해 형성되고 섬유 간 사이 공간을 연결하는 코팅막을 포함한 세포배양 코팅층은 세포배양 효율에 있어서 매우 우수한 동시에 상온에서도 수 년 이상 보관하는 경우에도 세포배양 코팅층을 형성하는 세포배양용 융합단백질이 분해, 변성됨에 따라 야기되는 기능성 펩타이드의 활성 감소가 방지 또는 최소화됨에 따라서 저장안정성이 매우 향상되는 이점이 있다. 또한, 상기 세포배양 코팅층은 폴리머 계열의 접착성분, 예를 들어 아크릴계 접착성분을 사용하지 않고 기능성 펩타이드를 세포배양기재 표면에 도입함에 따라서 세포독성이 없고, 세포를 보다 생체친화적으로 배양시킬 수 있는 이점이 있다.

[50] 상기 세포배양 코팅층은 기능성 펩타이드가 혼합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질을 통해 형성되는데, 상기 기능성 펩타이드는 세포배양에 도움을 줄 수 있는 기능을 갖는 물질로서, 구체적으로는 세포의 부착, 이동, 증식 및 분화 중 어느 하나 이상을 촉진시키는 기능을 수행하는 물질일 수 있다. 상기 기능성 펩타이드는 이러한 기능을 수행하는 공지된

펩타이드의 경우 제한 없이 사용될 수 있다. 이에 대한 비제한적인 예로서, 아드레노메둘린(Adrenomedullin), 앙기오포이에틴(Angiopoietin), 뼈형성단백질(BMP), 뇌유래신경영양인자(BDNF), 표피생장인자(EGF), 에리스로포이에틴(Erythropoietin), 섬유아세포 증식인자(Fibroblast growth factor), 신경교의세포주유래신경영양인자(GDNF), 과립구집락자극인자(Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), 과립대식세포집락자극인자(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), 성장분화인자-9(Growth differentiation factor-9, GDF9), 간세포생장인자(HGF), 간세포선종 유래 생장인자(Hepatoma-derived growth factor, HDGF), 인슐린유사생장인자(Insulin-like growth factor, IGF), 각질세포 증식인자(Keratinocyte growth factor, KGF), 이동자극인자(Migration-stimulating factor, MSF), 마이오스타틴(Myostatin, GDF-8), 신경생장인자(Nerve growth factor, NGF), 혈소판유래생장인자(Platelet-derived growth factor, PDGF), 트롬보포이에틴(Thrombopoietin, TPO), T-세포생장인자(T-cell growth factor, TCGF), 뉴로필린, 형질전환생장인자-알파(TGF- α), 형질전환생장인자-베타(TGF- β), 종양괴사인자-알파(TNF- α), 혈관내피생장인자(VEGF), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-7로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 생장인자(GF)에 포함된 소정의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또는, 히알루론산, 헤파린황산염, 콘드로이틴황산염, 테르마틴황산염, 케라탄황산염, 알진염, 피브린, 피브리노겐, 콜라겐, 엘라스틴, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 카드헤린 및 라미닌으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 세포외 기질(extracellular matrix)에 포함되는 소정의 아미노산의 서열을 포함할 수 있다.

- [51] 일예로 상기 기능성 펩타이드는 아미노산 서열 내 RGD 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 기능성 펩타이드는 서열번호 15 내지 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 펩타이드 또는 상기 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열이 연결된 펩타이드일 수 있다 또한, 상기 기능성 펩타이드는 비트로넥틴 폴리펩타이드, 콜라겐 폴리펩타이드, 라미닌 폴리펩타이드, 피브로넥틴 폴리펩타이드 또는, 이들의 변이체일 수 있다.
- [52] 한편, 상기 기능성 펩타이드는 일예로 아미노산 개수가 a ~ b인 펩타이드 일 수 있으며, 이를 통해 장시간 상온에서 코팅층에 함유된 상태로 보관되는 경우에도 분해, 변성 등이 최소화 또는 방지되기에 보다 유리할 수 있다.
- [53] 또한, 상기 기능성 펩타이드는 홍합 접착단백질에 결합되는데, 구체적으로 홍합 접착단백질의 카르복시 말단, 아미노 말단 또는 카르복시 말단과 아미노 말단 양단에 결합될 수 있다. 이때 상기 결합은 공유결합이며, 구체적으로 아미노 결합일 수 있다. 한편, 기능성 펩타이드와 홍합 접착단백질은 공지된 방법을 통해 결합시킬 수 있고, 일예로 대장균을 이용한 재조합 단백질 생산법을 통해 제조할 수 있다. 한편, 홍합 접착단백질과 기능성 펩타이드 간에 직접

공유결합으로 결합될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며 가교제와 같은 소정의 물질을 매개하여 홍합 접착단백질과 기능성 펩타이드 간 간접적으로 결합될 수 있음을 밝혀둔다.

[54] 기능성 펩타이드를 홍합 접착단백질에 결합시키는 이유는 홍합 접착단백질이 기능성 펩타이드를 섬유웹의 섬유 표면에 부착특성이 좋게 고정시키기에 유리하며, 상술한 것과 같이 폴리머 기반의 접착성분에 대비해 배양세포에 가할 수 있는 독성이 없고, 생체적합성이 우수하기 때문이다. 또한, 파종된 세포와의 부착특성이 좋아서 파종된 세포가 세포부착 표면에 안착된 후 탈리를 최소화할 수 있는 이점이 있다.

[55] 상기 홍합 접착단백질은 홍합에서 유래한 접착단백질로서, 홍합 접착단백질로 통칭되는 공지의 접착단백질의 경우 제한 없이 사용될 수 있다. 바람직하게는 상기 홍합 접착단백질은 서열번호 1 내지 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 상기 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열이 연결된 단백질일 수 있고, 일례로 서열번호 13번으로 표시되는 홍합 접착단백질일 수 있다.

[56]

[57] 한편, 본 발명의 일 실시예에 의한 세포배양기재는 상기 섬유웹의 일면에 대향하는 타면에 배치된 지지체를 더 포함할 수 있다. 상기 지지체는 섬유웹의 기계적 강도를 보완하는 부재의 경우 제한 없이 사용될 수 있다. 일례로 상기 지지체는 직물, 편물, 부직포 또는 필름일 수 있다. 또한, 지지체의 재질은 세포배양에 영향이 없는 재질이 바람직하며, 일례로 폴리카보네이트, 폴리스티렌, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리이미드 등의 재질일 수 있다. 한편, 상기 지지체와 섬유웹은 지지체의 일부분 및/또는 섬유웹의 일부분이 용융에 의한 열융착 또는 별도의 접착제를 통해 상호 간에 부착될 수 있다. 이때, 접착제는 세포배양에 영향을 최소화할 수 있는 실리콘 재질의 접착제를 사용할 수 있다.

[58]

[59] 상술한 세포배양 코팅층이 구비된 본 발명의 일 실시예에 의한 세포배양기재는 (1) 카보디이미드계 커플링제 및 반응제를 포함하는 활성화액과 기능성 펩타이드가 홍합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질을 준비하는 단계, (2) 준비된 활성화액과 세포배양용 융합단백질을 혼합하여 세포배양 코팅조성물을 제조하는 단계, 및 (3) 세포배양 코팅조성물을 섬유웹 표면에 처리하여 세포배양 코팅층을 형성시키는 단계를 포함하여 제조될 수 있다.

[60] 먼저, 본 발명에 따른 (1) 단계로서 카보디이미드 커플링제 및 반응제를 포함하는 활성화액과 기능성 펩타이드가 홍합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질을 준비하는 단계를 수행한다.

[61] 상기 활성화액은 카보디이미드계 커플링제와 반응제를 포함하며, 용매를 더 포함할 수 있다. 활성화액은 세포배양용 융합 단백질에 섬유웹 표면에

도입시키는 물질로서, 단순히 세포배양용 융합 단백질을 통상의 방법으로 섬유웹 표면에 처리한 경우에 대비해 세포배양 코팅층과 세포배양기재 표면 간의 부착력을 향상시키며, 섬유 간 사이 공간을 연결하는 코팅막을 형성할 수 있게 하는 이점이 있다.

- [62] 상기 카보디이미드계 커플링제는 융합 단백질들이 서로 결합되도록 하는 커플링제의 경우 제한 없이 사용될 수 있으며, 일례로 1-[3-(디메틸아미노)프로필]-3-에틸카보이미드 하이드로클로라이드(EDC) 또는 N,N'-디시클로헥실카보이미드(DCC)일 수 있다.
- [63] 또한, 상기 반응제는 카보디이미드계 커플링제와 커플링된 상태의 융합단백질이 수화되는 것을 방지하여 융합 단백질들이 서로 결합되는 효율을 증가시키기 위해 구비되는 것으로서, 일례로 N-하이드록시설포석신이미드(Sulfo-NHS)일 수 있다. 한편, 반응제로 종래에 알려진 N-하이드록시석신이미드(NHS)의 경우 본 발명이 목적하는 효과를 발현하는데 있어서 용이하지 않을 수 있다.
- [64] 상기 활성화용액은 상기 카보디이미드계 커플링제와 반응제를 1:0.1 ~ 10 중량비로 포함할 수 있다. 만일 이들이 적절한 비율로 포함되지 못할 경우 본 발명이 목적하는 효과를 달성하기 어렵고, 구현된 세포배양코팅층에서 세포의 부착성이 현저히 저하될 우려가 있다.
- [65] 또한, 상기 활성화용액은 반응성 향상을 위하여 아세트산나트륨을 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 아세트산 나트륨은 카보디이미드 커플링제 100 중량부에 대해서 1 ~ 100 중량부로 포함될 수 있다.
- [66] 또한, 상기 활성화용액은 용매를 더 포함할 수 있는데, 상기 용매는 물 또는 유기용매일 수 있고, 일례로 물일 수 있다.
- [67] 상기 활성화용액은 제조하는 방법이 특별히 한정되는 것은 아니나, 일례로 아세트산 나트륨 용액을 카보디이미드계 커플링제 용액과 반응제 용액에 각각 투입하여 혼합하여 2 종의 용액을 제조한 뒤, 2종의 용액을 적절한 비율로 혼합한 뒤 20 ~ 50분간 반응을 유도하고, 이후 28 ~ 35°C 항온 배양기에서 다시 25 ~ 40분간 반응시켜 최종 활성화용액이 제조될 수 있다.
- [68]
- [69] 다음으로 본 발명에 따른 (2) 단계로서, 준비된 활성화용액과 세포배양용 융합단백질을 혼합하여 세포배양 코팅조성물을 제조하는 단계를 수행한다.
- [70] 이때, 상기 세포배양용 융합단백질과 활성화용액은, 세포배양용 융합단백질 100 중량부에 대해서 카보디이미드 커플링제가 1 ~ 100 중량부 포함되도록 함량을 조절하여 혼합될 수 있다. 만일 카보디이미드계 커플링제가 1 중량부 미만일 경우 세포의 부착이 되지 않거나 분화가 될 수 있고, 100 중량부를 초과할 경우 세포가 부착 후 탈리될 수 있어서 세포를 안정적으로 배양하기 어려울 수 있다.
- [71] 또한, 준비된 활성화용액과 세포배양용 융합단백질은 혼합 후 0 초과 ~ 2시간 동안 반응을 유도한 뒤 최종 세포배양용 코팅조성물로 제조될 수 있다.

[72]

[73] 다음으로 본 발명에 따른 (3) 단계로서, 세포배양 코팅조성물을 섬유웹 표면에 처리하여 세포배양 코팅층을 형성시키는 단계를 수행한다.

[74]

준비된 세포배양 코팅조성물을 섬유웹 표면에 처리하는 방법은 통상적인 코팅방법에 의할 수 있고, 일례로 파이펫 에이드를 이용한 분주나, 함침에 의할 수 있다. 세포배양 코팅조성물을 표면에 처리한 뒤 25 ~ 32°C 항온배양기에서 30분 ~ 2시간 동안 반응을 유도해 세포배양 코팅층을 형성시킬 수 있다.

[75]

이후 세척공정을 더 거칠 수 있고, 일례로 3차 증류수를 통해 3 ~ 6분씩 총 2 ~ 5회 세척공정을 반복수행할 수 있다. 세척공정을 거친 후에는 공기 중에서 자연건조시킬 수 있으며, 이를 통해 세포배양기재를 제조할 수 있다.

[76]

한편, 최종 제조된 세포배양기재에서 세포배양 코팅층은 건조공정을 거침에 따라서 수분율이 5% 미만일 수 있는데, 이러한 특징은 본 발명에 따른 융합단백질을 사용함에 따라서 발현되는 효과이다. 즉, 세포배양에 도움을 주는 상용화된 물질들은 섬유웹에 처리한 뒤 장기간 저장되지 못함에 따라서 통상적으로 섬유웹에 처리된 후 수일 내 사용할 수밖에 없고, 이로 인해 코팅 후 건조공정을 거치지 않는 것이 일반적이다. 이에 반해 본 발명에 따른 세포배양기재는 수년 간 상온에서 장기보관이 가능하고, 결과적으로 세포배양 코팅층 내 잔존하는 용매나, 세척공정에 따른 세척수는 모두 증발함에 따라서 매우 적은 수분율을 발현할 수 있다.

[77]

[78]

하기 표 1은 상술한 융합 접착단백질과 기능성 펩타이드에 대한 아미노산 서열을 나타낸다.

[79] [표1]

서열번호	아미노산 서열
1	Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys
2	Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys
3	Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys
4	Glu Val His Ala Cys Lys Pro Asn Pro Cys Lys Asn Asn Gly Arg Cys Tyr Pro Asp Gly Lys Thr Gly Tyr Lys Cys Lys Cys Val Gly Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Cys Ala Cys
5	Ala Asp Tyr Tyr Gly Pro Lys Tyr Gly Pro Pro Arg Arg Tyr Gly Gly Gly Asn Tyr Asn Arg Tyr Gly Gly Ser Arg Arg Tyr Gly Gly Tyr Lys Gly Trp Asn Asn Gly Trp Lys Arg Gly Arg Trp Gly Arg Lys Tyr Tyr Glu Phe Glu Phe
6	Ala Asp Tyr Tyr Gly Pro Lys Tyr Gly Pro Pro Arg Arg Tyr Gly Gly Gly Asn Tyr Asn Arg Tyr Gly Arg Arg Tyr Gly Gly Tyr Lys Gly Trp Asn Asn Gly Trp Lys Arg Gly Arg Trp Gly Arg Lys Tyr Tyr
7	Gly His Val His Arg His Arg Val Leu His Lys His Val His Asn His Arg Val Leu His Lys His Leu His Lys His Gln Val Leu His Gly His Val His Arg His Gln Val Leu His Lys His Val His Asn His Arg Val Leu His Lys His Leu His Lys His Gln Val Leu His
8	Ser Ser Glu Glu Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Ala Tyr His Tyr His Ser Gly Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Tyr Lys Asn Ser Gly Lys Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg Lys Gly Tyr Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Ser Ser
9	Ser Ser Glu Glu Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Thr Tyr His Tyr His Ser Gly Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Tyr Lys Asn Ser Gly Lys Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg Lys Gly Tyr Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Gly Ser Ser
10	Tyr Asp Asp Tyr Ser Asp Gly Tyr Tyr Pro Gly Ser Ala Tyr Asn Tyr Pro Ser Gly Ser His Trp His Gly His Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr Tyr

	Gly Lys Gly Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Phe Lys Arg Thr Gly Lys Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg Lys Gly Tyr Lys Lys His Tyr Gly Gly Ser Ser Ser
11	Ser Ser Glu Glu Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Thr Tyr His Tyr His Ser Gly Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Tyr Lys Asn Ser Gly Lys Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg Lys Gly Tyr Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Gly Ser Ser
12	Gly Gly Gly Asn Tyr Arg Gly Tyr Cys Ser Asn Lys Gly Cys Arg Ser Gly Tyr Ile Phe Tyr Asp Asn Arg Gly Phe Cys Lys Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Lys Tyr Asp Cys Gly Asn Tyr Ala Gly Cys Cys Leu Pro Arg Asn Pro Tyr Gly Arg Val Lys Tyr Tyr Cys Thr Lys Lys Tyr Ser Cys Pro Asp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Asn Asn Lys Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Asp Lys Asp Tyr Phe Asn Cys Gly Ser Tyr Asn Gly Cys Cys Leu Arg Ser Gly Tyr
13	Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ser Ser Glu Glu Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Ala Tyr His Tyr His Ser Gly Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Tyr Lys Asn Ser Gly Lys Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg Lys Gly Tyr Lys Tyr Tyr Gly Gly Ser Ser Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Tyr Lys
14	Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ser Ser Glu Glu Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Thr Tyr His Tyr His Ser Gly Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Tyr Lys Asn Ser Gly Lys Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg Lys Gly Tyr Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr

	Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Ly
15	Lys Gly Gly Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val Phe Thr Met Pro
16	Gly Ala Cys Arg Gly Asp Cys Leu Gly Ala
17	Lys Gly Gly Pro Gln Cys Val Thr Arg Gly Asp Val Phe Cys Thr Pro
18	Arg Gly Asp
19	Pro His Ser Arg Asn Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Gly Asp Ser Pro

[80]

발명의 실시를 위한 형태

[81] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하지만, 하기 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[82]

[83] <실시예1>

[84] 멸균처리된 평균직경이 260nm인 PVDF 섬유로 형성되며, 평량이 4.5g/m², 두께가 5μm인 섬유웹을 준비했다. 이후 하기의 준비예에서 제조된 세포배양 코팅조성물을 파이펫 에이드를 이용해 섬유웹 표면에 분주한 뒤 30°C 항온 배양기에서 한 시간 반응하여 섬유웹 표면에 세포배양 코팅층을 형성시켰다. 이후 3차 증류수를 이용하여 5분씩 3회 세척한 뒤, 클린벤치 내에서 플레이트 뚜껑을 열어둔 채로 공기 중에서 건조시켜 세포배양기재를 제조하였다.

[85]

[86] * 준비예 - 세포배양 코팅조성물 제조

[87] 세포배양용 융합단백질은 서열번호 13인 홍합 접착단백질의 카르복시 말단에 서열번호 19의 기능성 펩타이드를 아미노 말단에 결합시킨 것을 준비하였다. 이때, 융합단백질은 대장균을 이용한 재조합 단백질 생산법으로 제조하였다.

[88] 한편, 활성용액을 준비하기 위해서 3차 증류수에 용해된 NaOAc, NaHCO₃, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid 용액을 먼저 제조한 뒤 EDC와 Sulfo-NHS 시약이 각각 분주되어 있는 마이크로 튜브에 각각 넣어서 EDC용액과 Sulfo-NHS를 제조했다.

[89] 한편, 활성용액을 준비하기 위해서 3차 증류수에 용해된 NaOAc, NaHCO₃, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid 용액을 먼저 제조한 뒤 EDC와 Sulfo-NHS 시약이 각각 분주되어 있는 마이크로 튜브에 각각 넣어서 EDC용액과 Sulfo-NHS를 제조했다.

[90] 세포배양 코팅조성물을 제조하기 위해서 코니칼 튜브에 EDC 용액을 투입한 뒤, Sulfo-NHS 용액을 넣고 교반하면서 준비된 활성화용액에 세포배양용 융합단백질을 투입한 뒤 교반시켜 세포배양 코팅조성물을 제조하였다. 이때, 세포배양 코팅조성물은 세포배양용 융합단백질 100 중량부에 대해서 EDC가 1 중량부 포함되도록 하고, EDC와 Sulfo-NHS는 1:2 중량비가 되도록 혼합하였으며, 코팅조성물에 포함된 NaOAc는 EDC 100 중량부에 대해서 100 중량부가 되도록 포함시켰다. 이때, 세포배양 코팅조성물에서 세포배양용 융합단백질의 농도는 0.05mg/ml이었다.

[91]

[92] <실시예2>

[93] 실시예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 섬유웹을 평균직경이 500nm인 PVDF 섬유로 형성되며, 평량이 5.8g/m², 두께가 3μm인 섬유웹을 사용하여 세포배양기재를 제조하였다.

[94]

[95] <비교예1>

[96] 실시예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 세포배양 코팅조성물로 코팅시키지 않은 섬유웹을 세포배양기재로 사용하였다.

[97]

[98] <비교예2>

[99] 실시예2와 동일하게 실시하여 제조하되, 세포배양 코팅조성물로 코팅시키지 않은 섬유웹을 세포배양기재로 사용하였다.

[100]

[101] <실험예 1>

[102] 실시예1 ~ 2 및 비교예1 ~ 2에 따른 세포배양기재의 표면에 대한 SEM 사진을 촬영하여 이를 도 1 ~ 3에 나타내었다.

[103] 촬영결과 실시예1 ~ 2에는 세포배양코팅층이 표면에 위치하는 섬유들 중 일부 섬유들 사이를 연결하는 코팅막을 포함하는 것을 관찰할 수 있다.

[104]

[105] <비교예 3 ~ 4>

[106] 비교예1에 따른 세포배양기재에 세포배양용 코팅조성물로 시판 중인 Matrigel, Vitronectin-XFTM을 해당 코팅조성물 제조사의 프로토콜에 의거하여 코팅시켜서 세포배양기재를 제조하였다.

[107]

[108] <실험예 2>

[109] 실시예1, 비교예 3 및 4에 따른 세포배양기재에 유도만능줄기세포를 동일한 양을 분주한 뒤 줄기세포 배양배지(StemMACSTM)조건에서 배양 후 DAPI, NANOG, SOX2, Merge 마커의 발현여부를 관찰으며, 그 결과를 도 5(실시예1), 도 6(비교예3), 도 7(비교예4)에 나타내었다.

- [110] 도 5 내지 도 7을 통해 확인할 수 있듯이 실시예1에 따른 세포배양기재는 시판 중인 Matrigel, Vitronectin-XF™에 대비하여 세포배양성능이 유사하고, NANOG, SOX2 등의 미분화 마커가 잘 발현된 것을 알 수 있다.
- [111]
- [112] <실험예 3>
- [113] 실시예1 및 비교예3에 따른 세포배양기재에 유도만능줄기세포를 동일한 양을 분주한 뒤 줄기세포 배양배지(StemMACS™)조건에서 배양 후 배양된 세포의 계대1(P1)과 계대13(P13)의 모폴로지를 세포염색법으로 세포배양여부를 확인하여 도 8에 나타내었다. 또한, 시간별 증식률을 흡광도 분석을 통해 확인했고, 그 결과를 도 9에 나타내었다. 또한, 계대3(P3) 및 계대9(P9)에 대한 OCT4 마커의 발현을 면역세포화학법(Immunocytochemistry)확인하여 평가한 사진을 각각 도 10에 나타내었다. 또한, 유도만능줄기세포를 줄기세포 배양배지(StemMACS™)조건에서 5일간 배양 후 Oct4 마커에 대한 발현정도를 평가해 그 결과를 도11(실시예1) 및 도 12(비교예3)에 나타내었다.
- [114]
- [115] 도 8을 확인할 수 있듯이, 실시예1에 따른 세포배양기재는 시판 중인 세포배양 코팅조성물을 사용한 세포배양기재인 비교예3과 대비해 계대1과 계대13에서 알 수 있듯이 장기 배양 했을 때에도 모폴로지에 있어 차이가 없는 것을 알 수 있다.
- [116] 또한, 도 9를 통해 확인할 수 있듯이, 실시예1에 대한 더블링타임이 29.2시간, 비교예3에 대한 더블링타임이 29.0시간으로 세포배양효율에 있어서도 유사한 성능을 발현하는 것을 알 수 있다.
- [117] 또한, 도 10을 통해 확인할 수 있듯이, 실시예1에 따른 세포배양기재는 시판 중인 세포배양 코팅조성물을 사용한 세포배양기재인 비교예3과 대비해 장기 배양했을 때에도 계대3과 계대9에서 Oct4 발현이 잘되었고, 세포배양 성능이 유사함을 알 수 있다.
- [118] 또한, 도 11 및 도 12에서 알 수 있듯이, 오히려 실시예1에 따른 세포배양기재를 통해서 배양된 경우 세포 특이적 마커인 Oct4의 발현이 더 우수한 것을 알 수 있다.
- [119]
- [120] <비교예 5>
- [121] 비교예3과 동일하게 실시하여 제조하되, 비교예4의 섬유웹으로 변경하여 세포배양기재를 제조했다.
- [122]
- [123] <비교예 6>
- [124] 비교예4와 동일하게 실시하여 제조하되, 비교예4의 섬유웹으로 변경하여 세포배양기재를 제조했다.
- [125]
- [126] <실험예4>

- [127] 실시예1, 실시예2, 비교예 3 ~ 6에 따른 세포배양기재를 아래의 방법으로 의료기기 유효기간 설정 및 안정성 평가에 따른 가이드라인에 따라 가속노화 시험을 시킨 뒤 유도만능줄기세포를 배양시켜서 세포배양기재의 저장안정성을 평가했다.
- [128] 구체적으로 세포배양기재를 실시간노화를 단축된 시간 내에서 재현하기 위해 상승된 온도(60°C)에서 세포배양기재를 0개월, 1개월, 2개월, 3개월 보관하여 각각의 세포배양기재의 노화기간을 0년, 1년, 2년, 3년이 되도록 준비했다.
- [129]
- [130] 실시예 및 비교예 별 각각 준비된 3개의 유도만능줄기세포를 동일한 양을 분주한 뒤 줄기세포 배양배지(StemMACS™)를 이용하여 5일간 배양 후 세포염색법으로 염색하여 세포배양여부를 확인하였으며, 광학현미경으로 촬영하여, 세포배양 결과 사진을 도 13(실시예1), 도 14(비교예3), 도 15(비교예4), 도 16(실시예2), 도 17(비교예5), 도 18(비교예6)에 나타내었다.
- [131]
- [132] 도 13 내지 도 18을 통해 확인할 수 있듯이,
- [133] 실시예1 및 실시예2에 따른 세포배양기재의 경우 노화기간이 1년, 2년, 3년이 되도록 가속화 시킨 경우에도 모두 세포배양이 가능하며, 배양 성능도 우수한 것을 알 수 있다. 그러나 비교예3 ~ 비교예6에 따른 세포배양기재의 경우 모두 노화기간이 1년 ~ 3년이 되도록 가속화 시킨 시편에서 세포가 배양되지 않았으며, 이를 통해서 실시예1에 따른 세포배양기재의 저장안정성 및 세포배양성능이 매우 우수한 것을 알 수 있다.
- [134]
- [135] 이상에서 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 본 발명의 사상은 본 명세서에 제시되는 실시 예에 제한되지 아니하며, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서, 구성요소의 부가, 변경, 삭제, 추가 등에 의해서 다른 실시 예를 용이하게 제안할 수 있을 것이나, 이 또한 본 발명의 사상범위 내에 든다고 할 것이다.

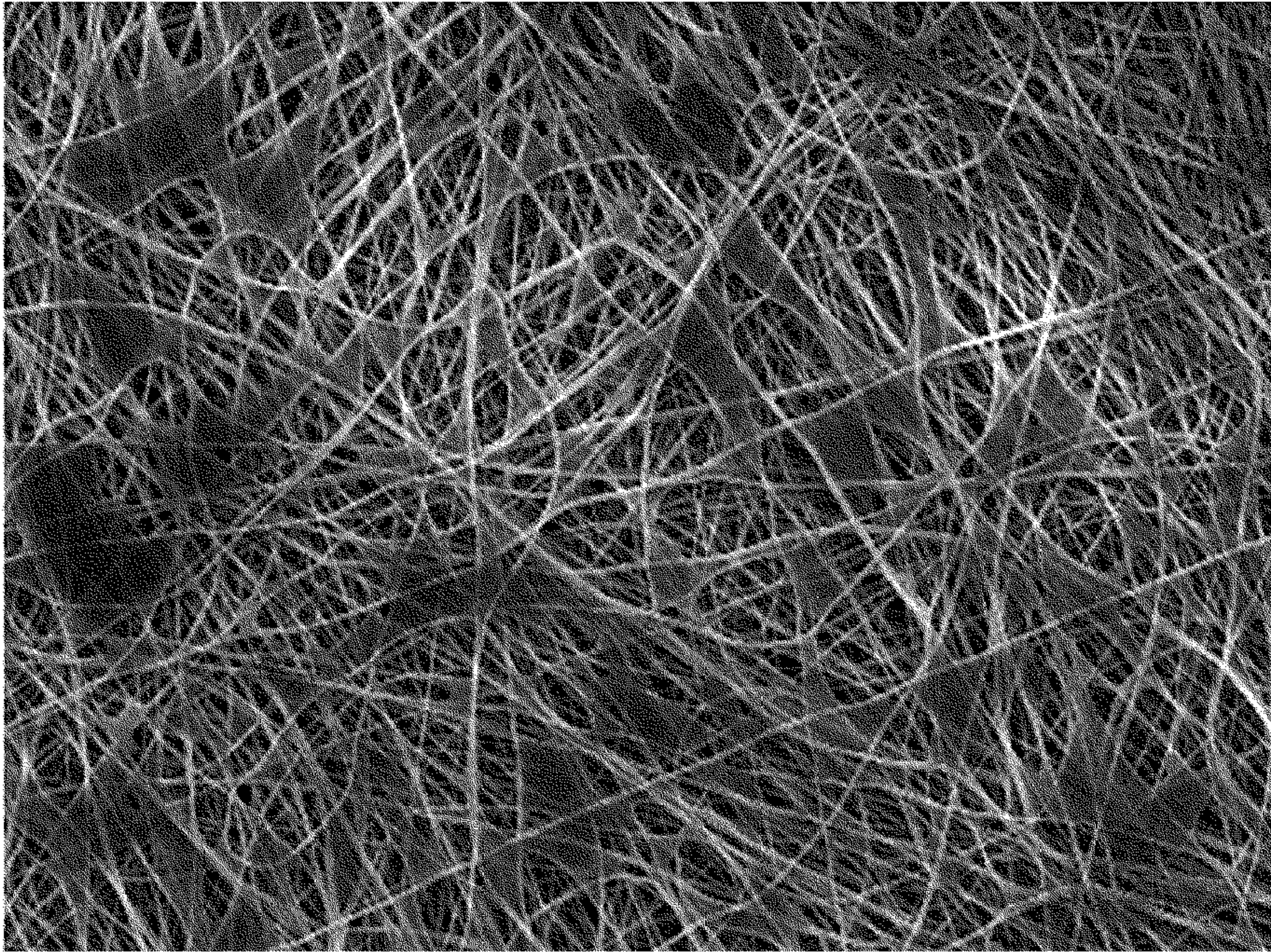
청구범위

- [청구항 1] 섬유들이 집적된 섬유웹; 및
상기 섬유웹의 일 표면에 위치하는 섬유들 중 적어도 일부 섬유들 사이를 연결하는 코팅막을 포함하는 세포배양 코팅층;을 구비하고, 상기 세포배양 코팅층은 기능성 펩타이드가 홍합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질로 형성된 세포배양기재.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 기능성 펩타이드는 세포의 부착, 이동, 증식 및 분화 중 어느 하나 이상을 촉진시키는 기능을 갖는 것을 특징으로 하는 세포배양기재.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 섬유웹은 폴리스티렌(PS), 폴리에스테르, 폴리이더술폰(PES), 폴리비닐리덴플루오라이드(PVDF), 폴리디메틸실록산(PDMS), 폴리아미드, 폴리이미드, 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 성분을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포배양기재.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 홍합 접착단백질은 서열번호 1 내지 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질 또는 상기 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열이 연결된 단백질인 것을 특징으로 하는 세포배양기재.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 기능성 펩타이드는 RGD 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포배양기재.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 기능성 펩타이드는 서열번호 15 내지 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 펩타이드 또는 상기 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열이 연결된 펩타이드인 것을 특징으로 하는 세포배양기재.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 섬유웹의 일면에 대향하는 타면에 배치된 지지체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세포배양기재.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 섬유웹은 평균직경이 200 ~ 1000nm이며, 두께가 2 ~ 20 μ m이고, 평량이 3 ~ 20g/m²인 것을 특징으로 하는 세포배양기재.
- [청구항 9] (1) 카보디이미드계 커플링제 및 반응제를 포함하는 활성용액과 기능성 펩타이드가 홍합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질을 준비하는 단계;

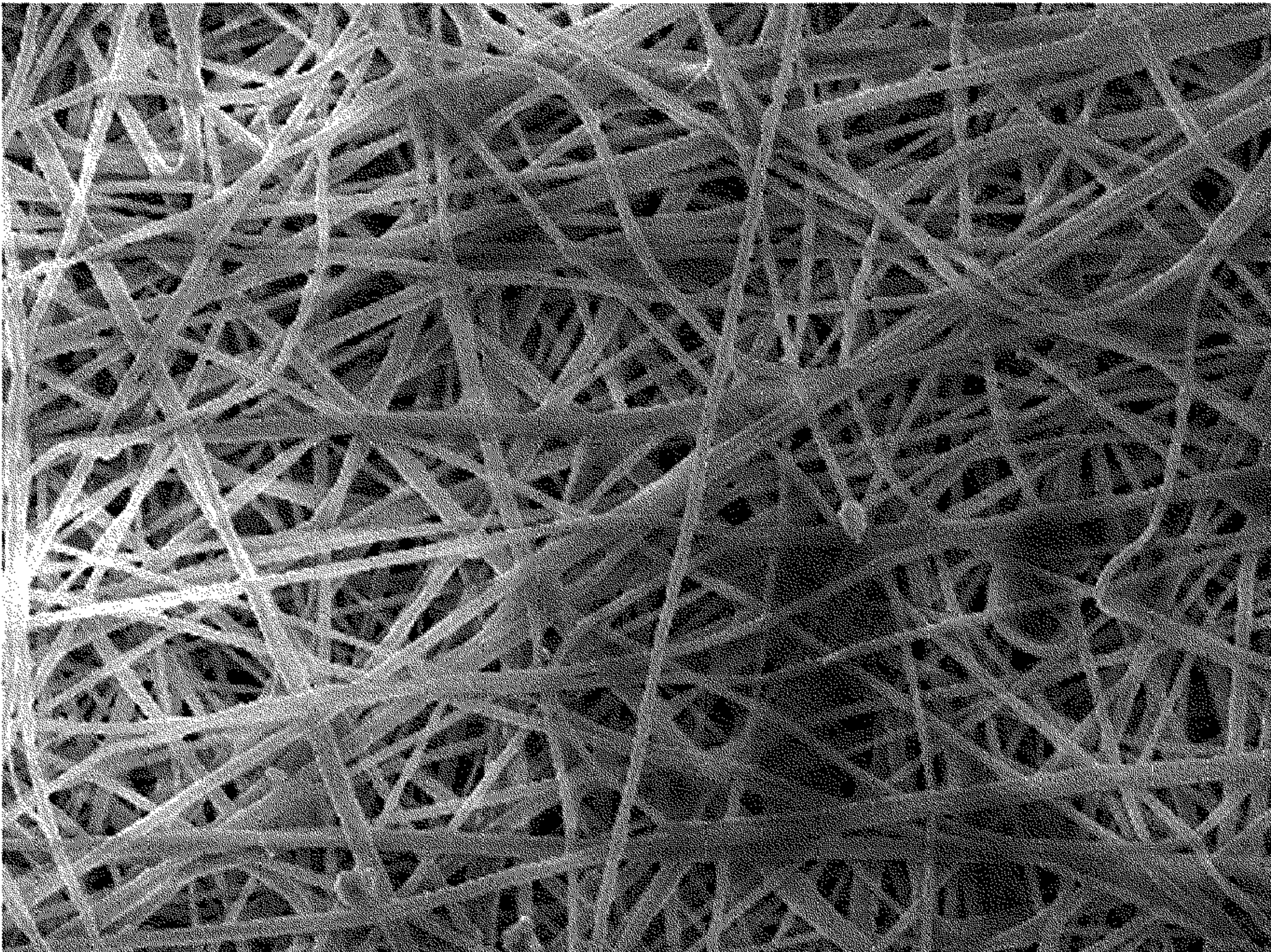
- (2) 준비된 활성화용액과 세포배양용 융합단백질을 혼합하여 세포배양 코팅조성물을 제조하는 단계; 및
- (3) 세포배양 코팅조성물을 섬유웹 표면에 처리하여 세포배양 코팅층을 형성시키는 단계;를 포함하는 세포배양기재 제조방법.

- [청구항 10] 제9항에 있어서,
 상기 카보디이미드계 커플링제는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필 카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC) 또는 N,N'-디시클로헥실카보디이미드(DCC)이며, 상기 반응제는 N-하이드록시설포석신이미드(Sulfo-NHS)인 것을 특징으로 하는 세포배양기재 제조방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
 상기 카보디이미드계 커플링제와 반응제는 1: 0.1 ~ 10 중량비로 활성화용액에 포함되며,
 상기 세포배양 코팅조성물은 세포배양용 융합단백질 100 중량부에 대해서 카보디이미드계 커플링제가 1: 1 ~ 100 중량부로 혼합되는 것을 특징으로 하는 세포배양기재 제조방법.
- [청구항 12] 다공성 세포배양 기재 표면의 적어도 일부 기공을 폐색하는 코팅막을 형성하는 세포배양 코팅조성물로서, 상기 세포배양 코팅조성물은 기능성 펩타이드가 융합 접착단백질에 결합된 세포배양용 융합단백질, 카보디이미드계 커플링제 및 반응제를 포함하는 것을 특징으로 하는 다공성 세포배양 기재용 세포배양 코팅조성물.

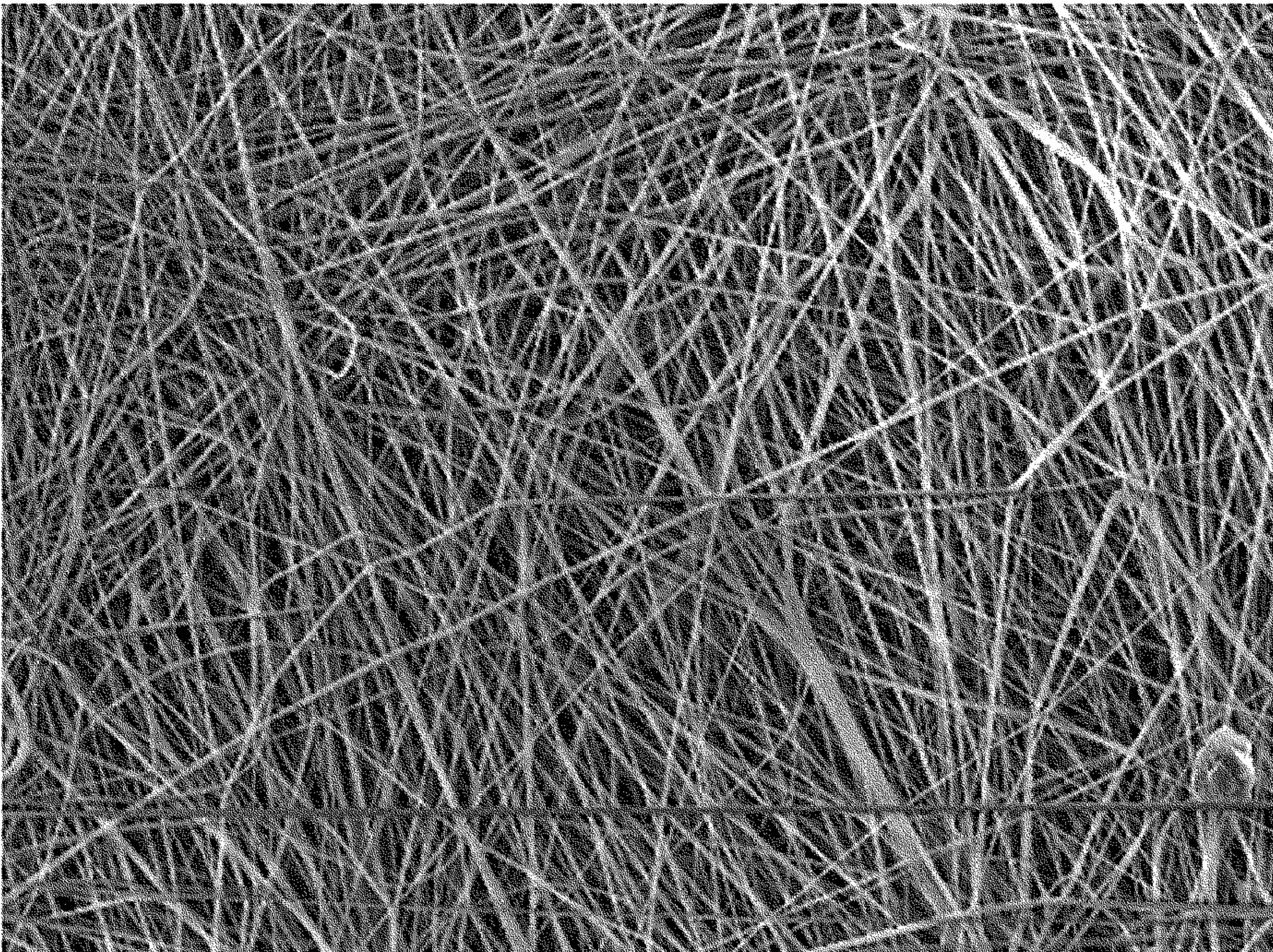
[도1]



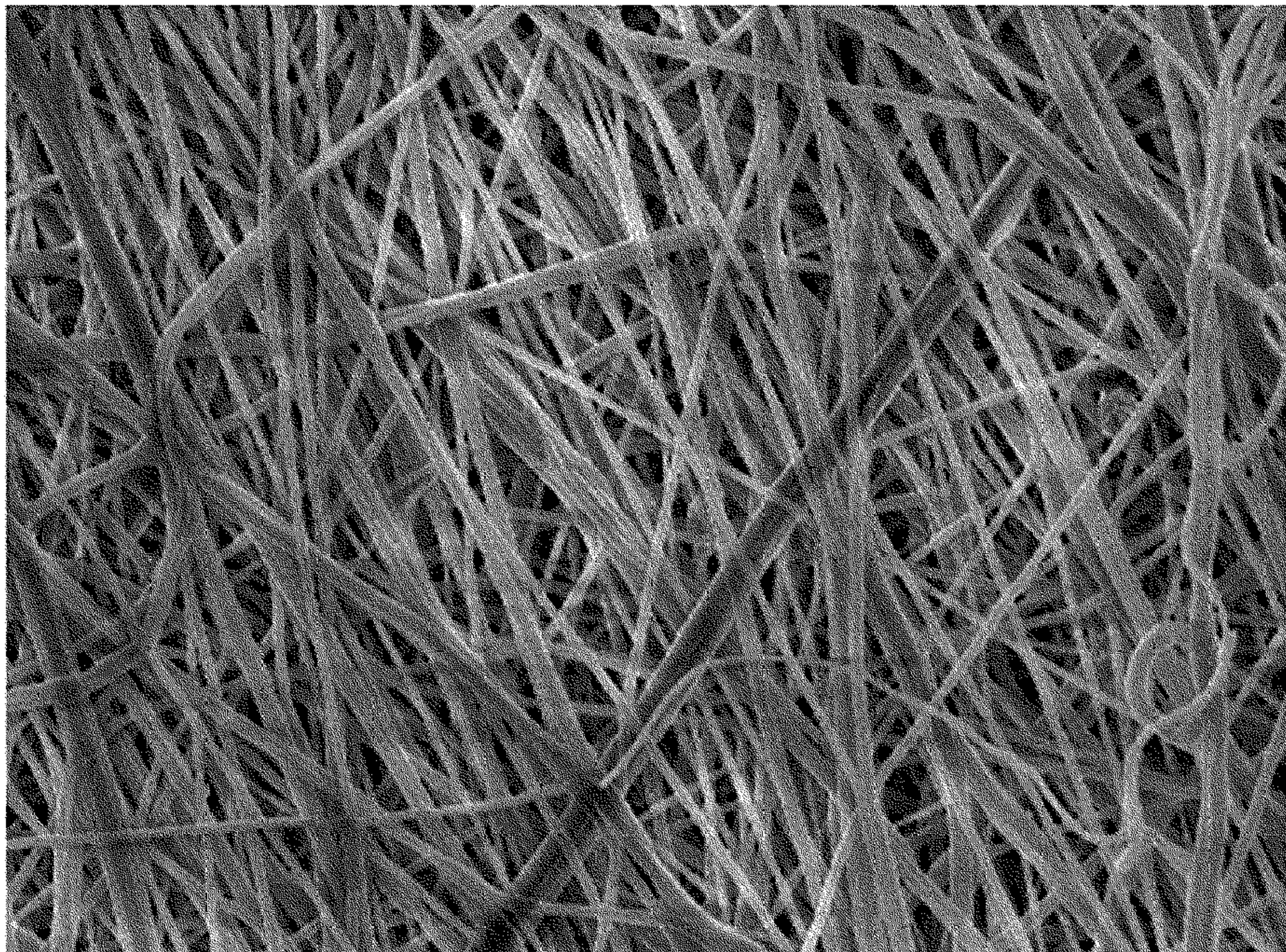
[도2]



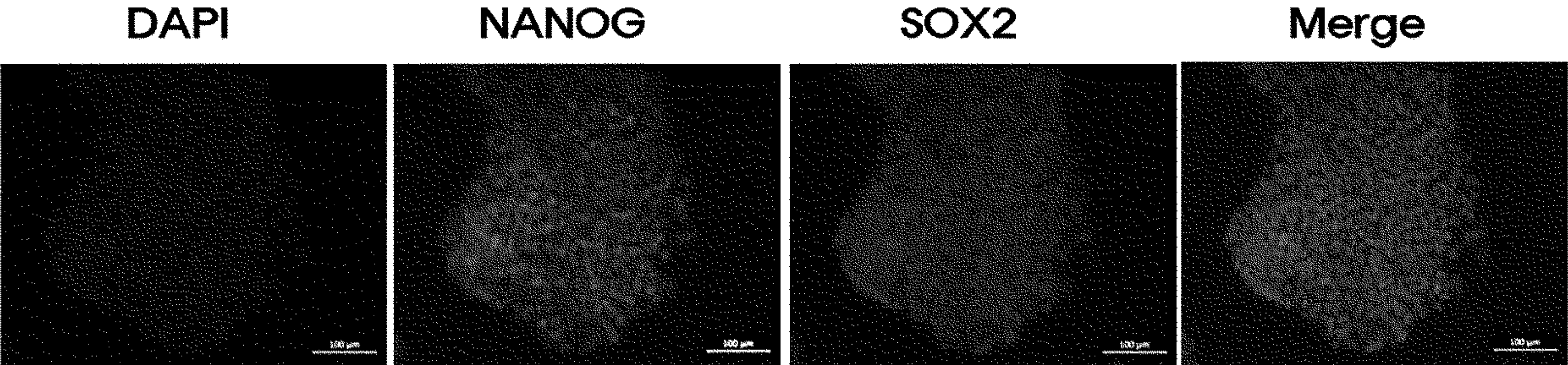
[도3]



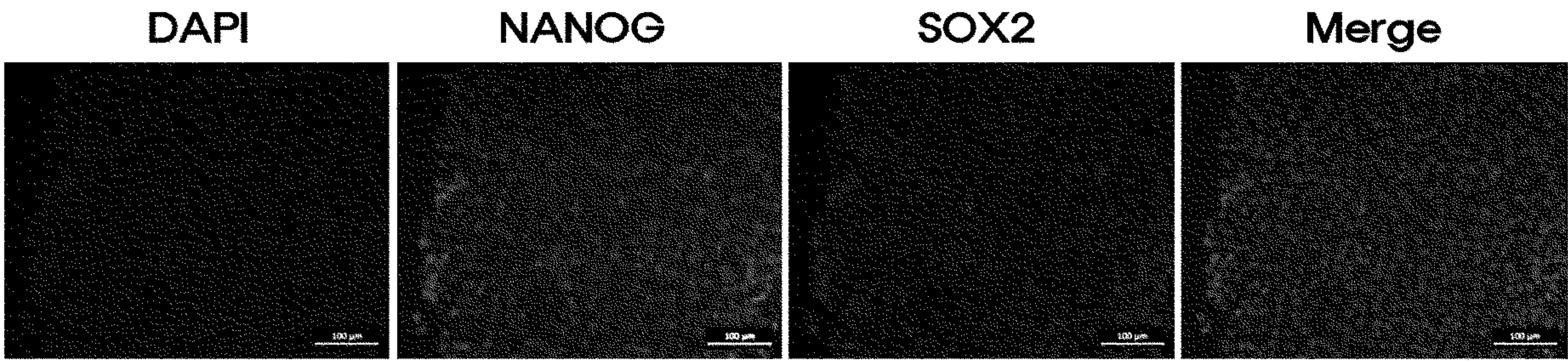
[도4]



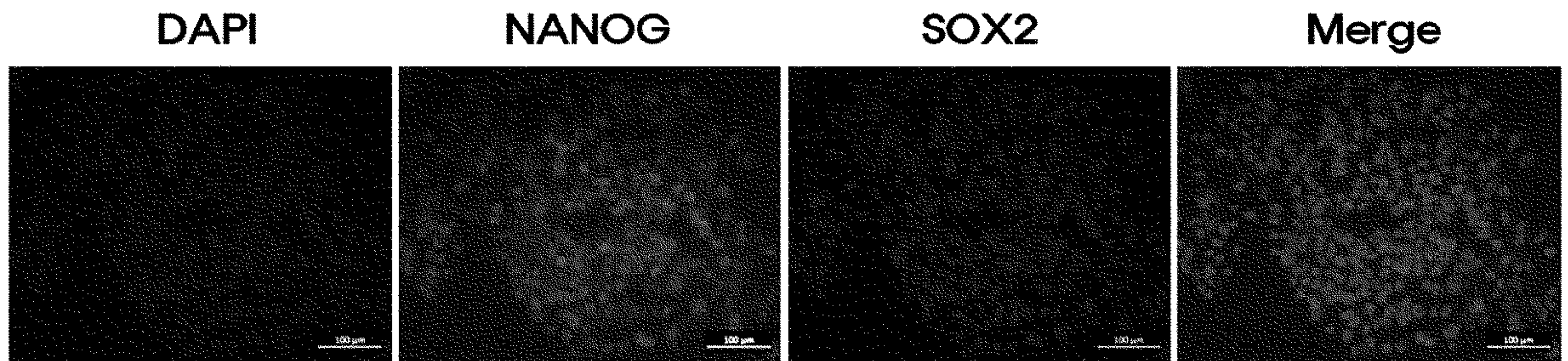
[도5]



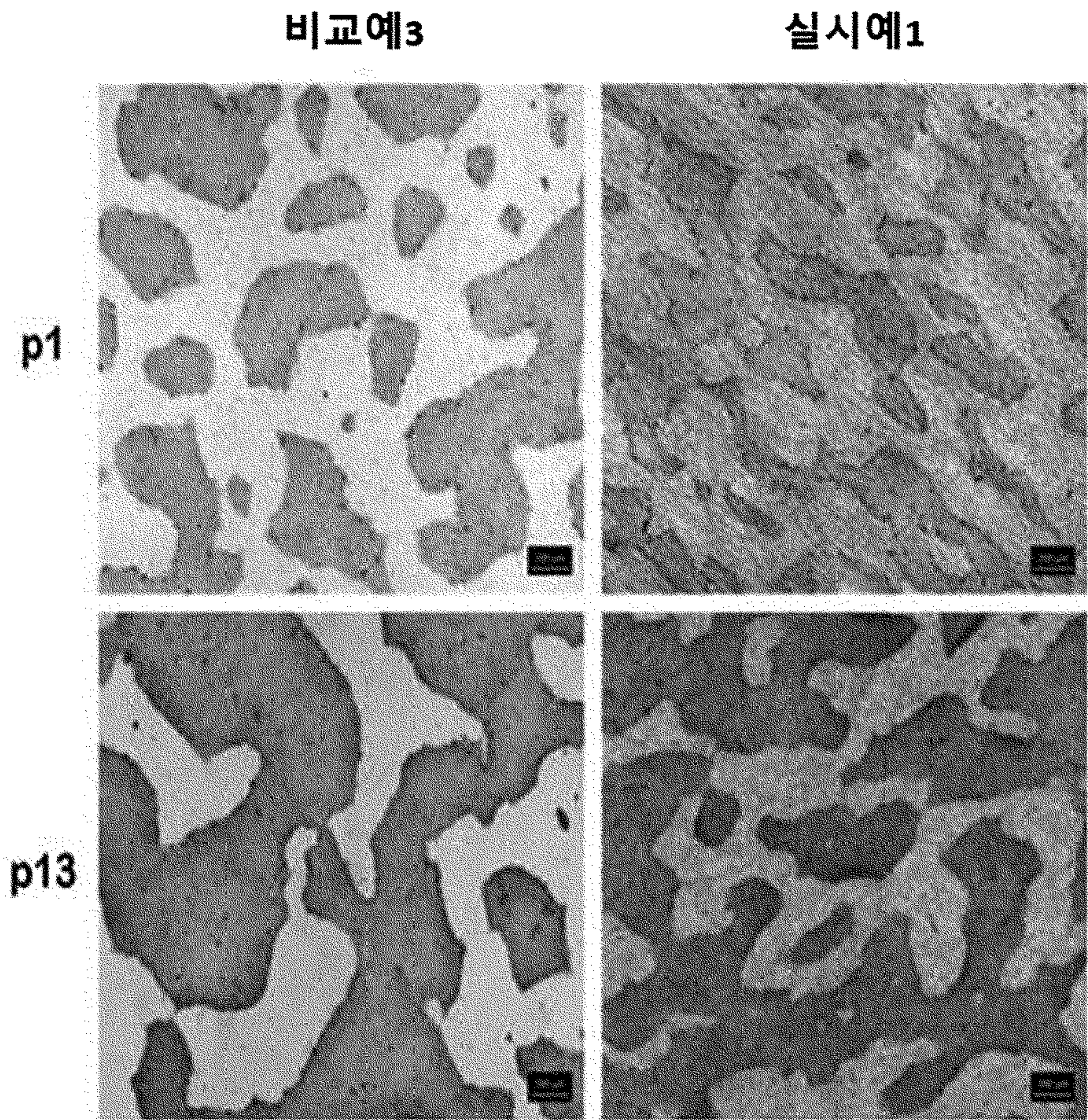
[도6]



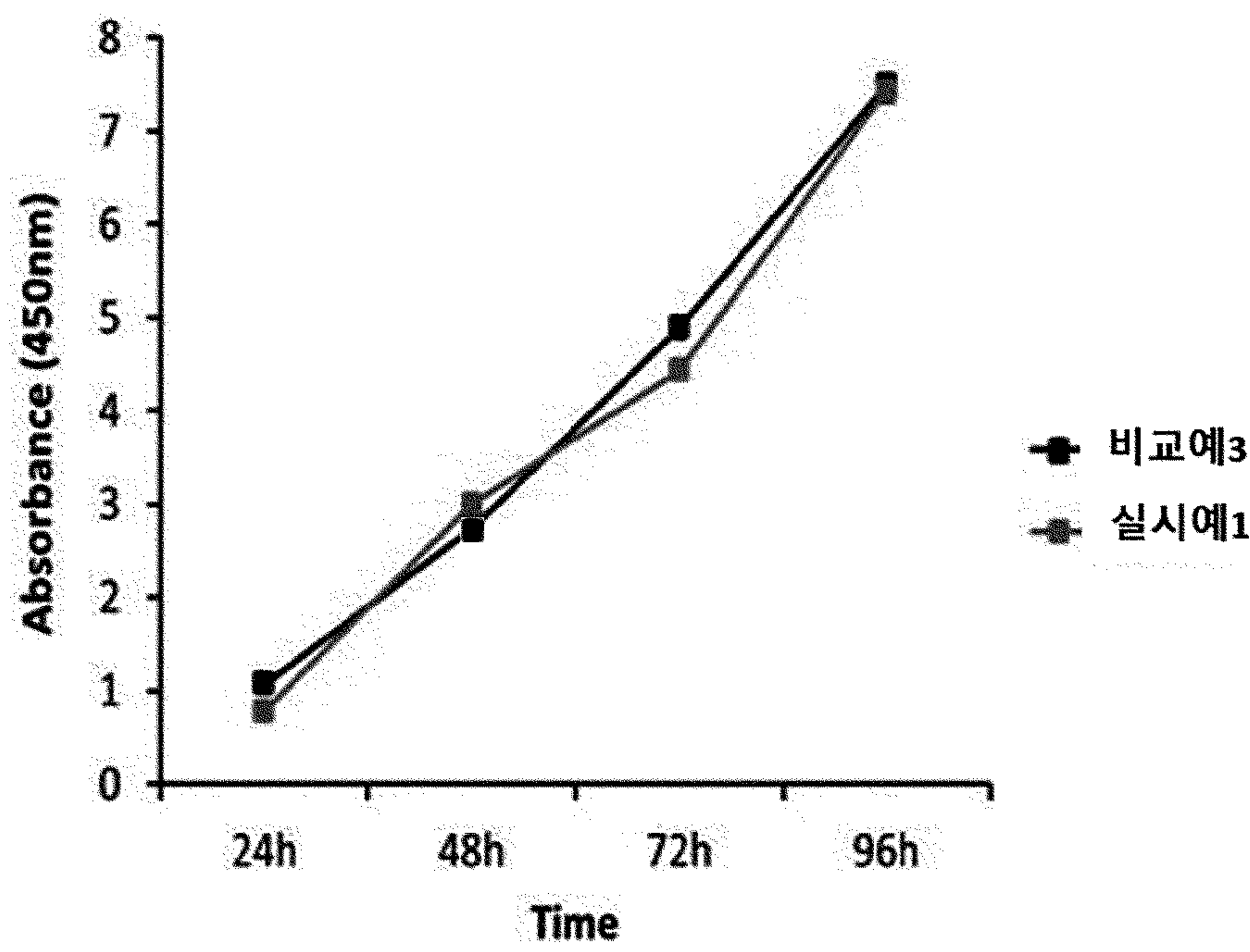
[도7]



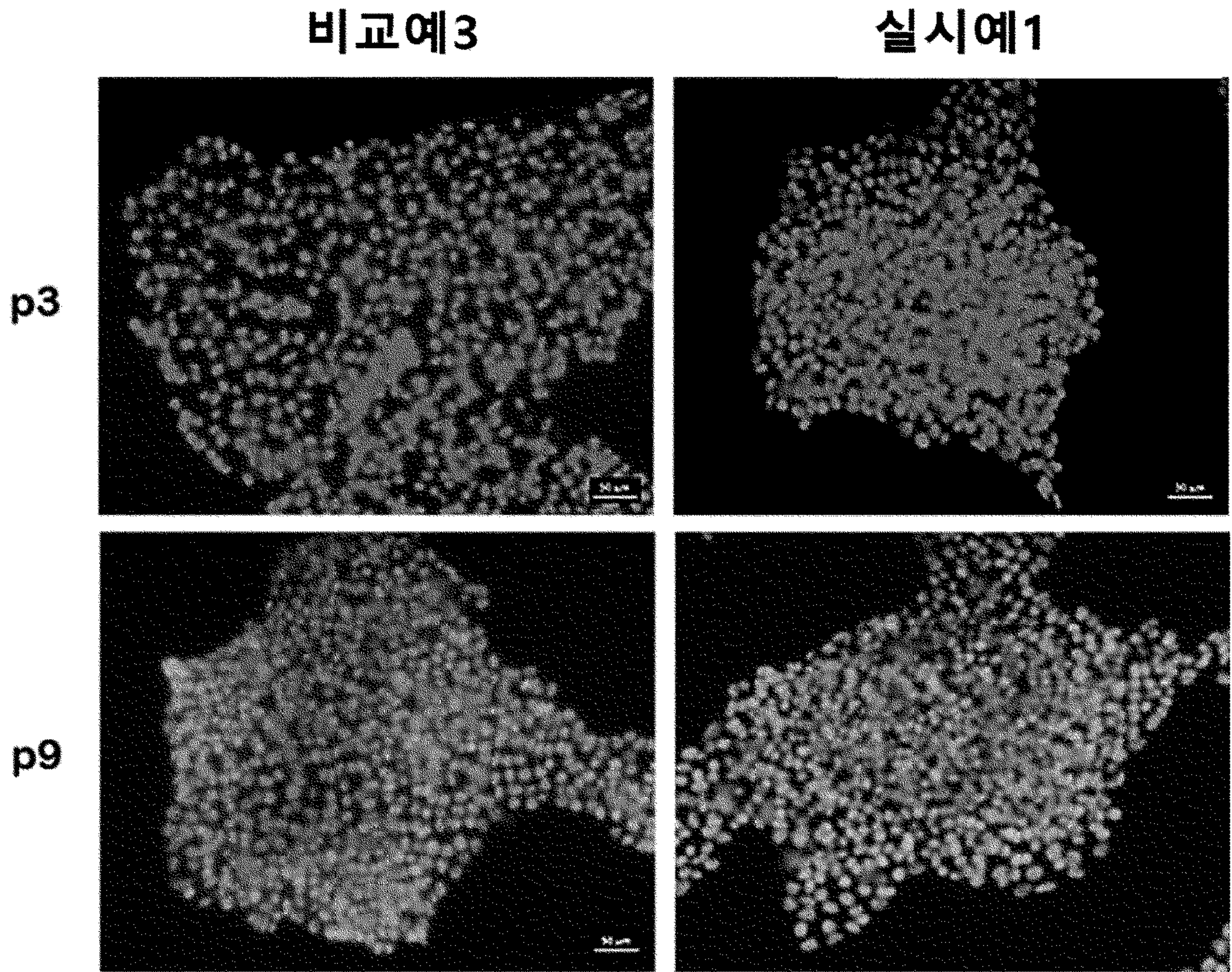
[도8]



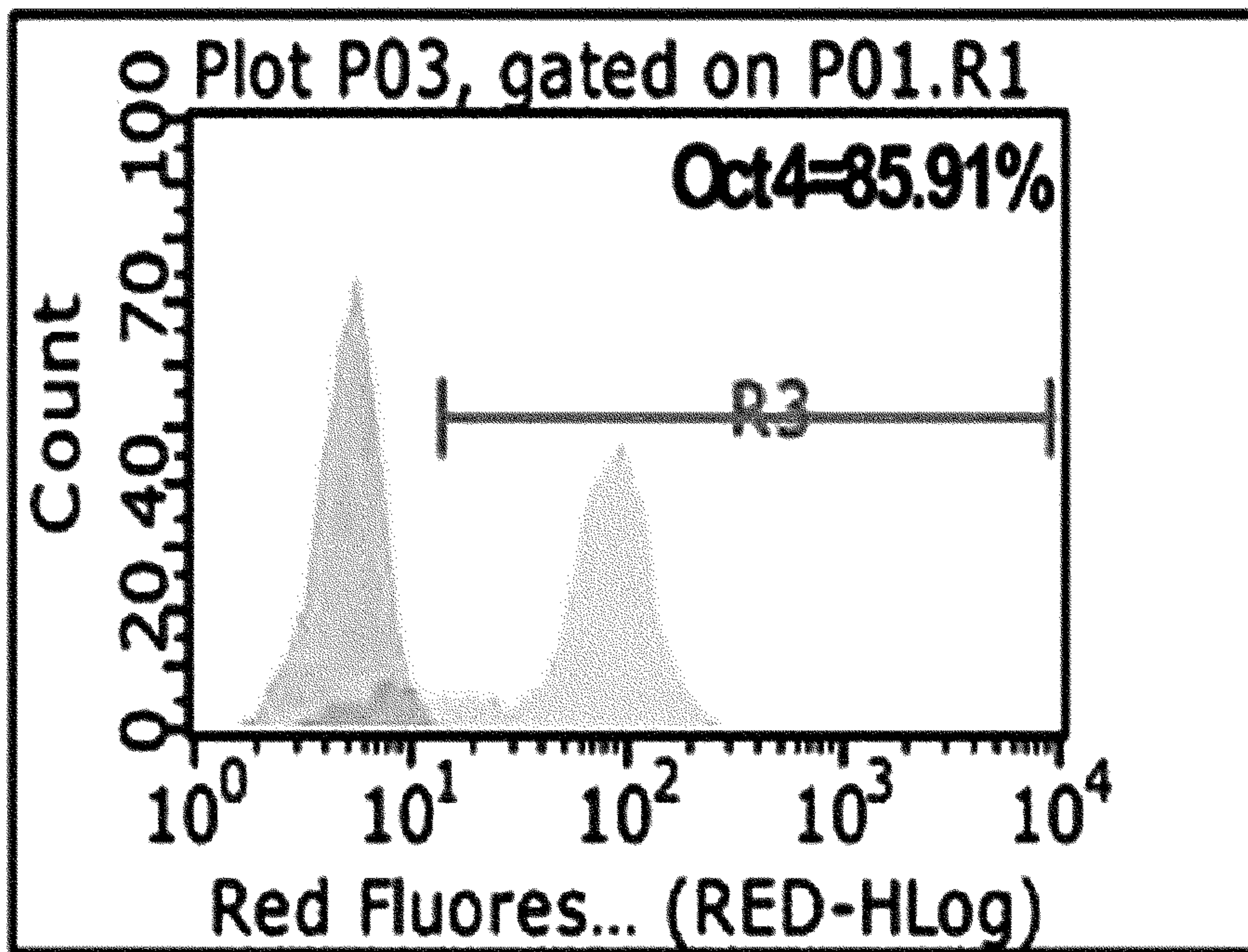
[도9]



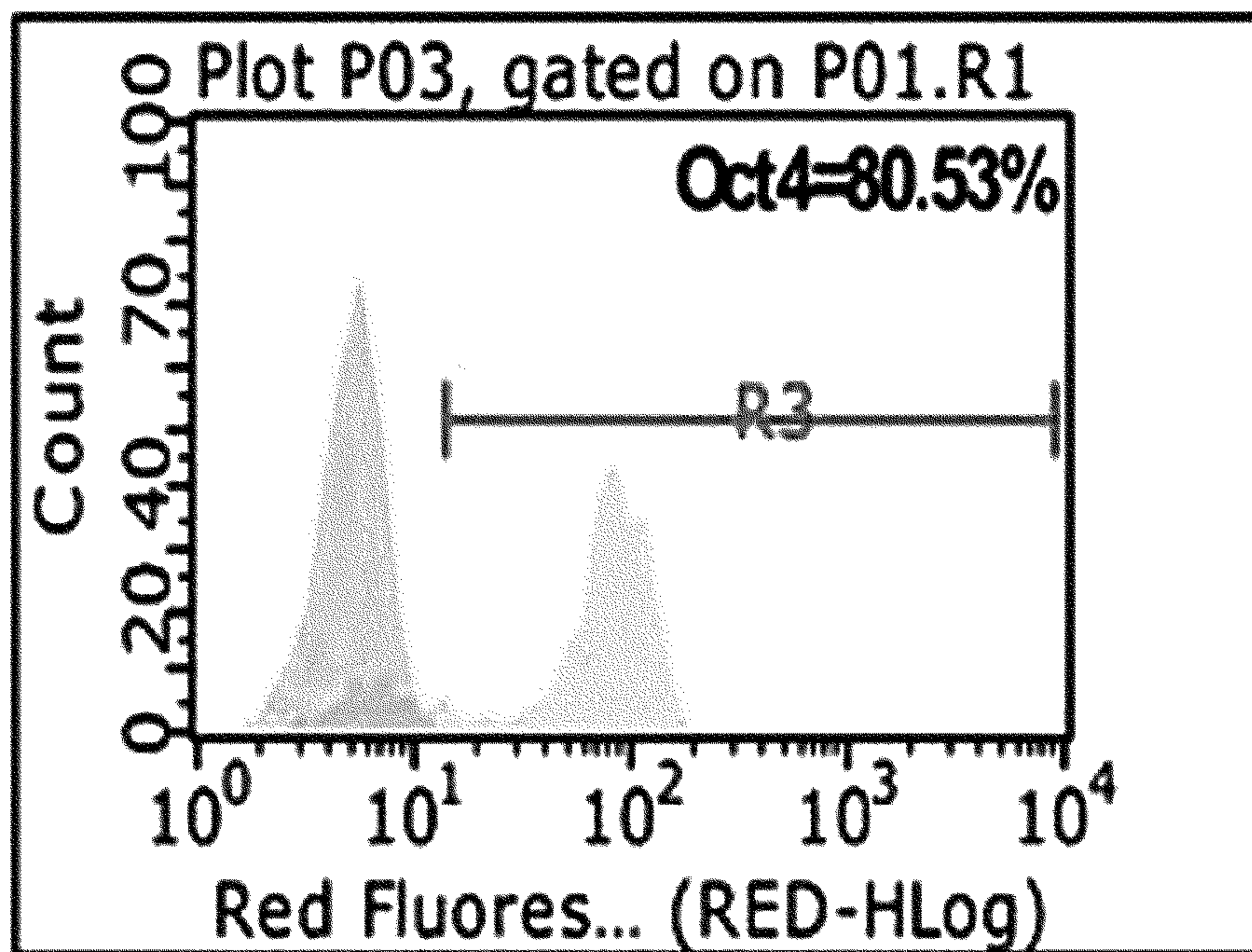
[도10]



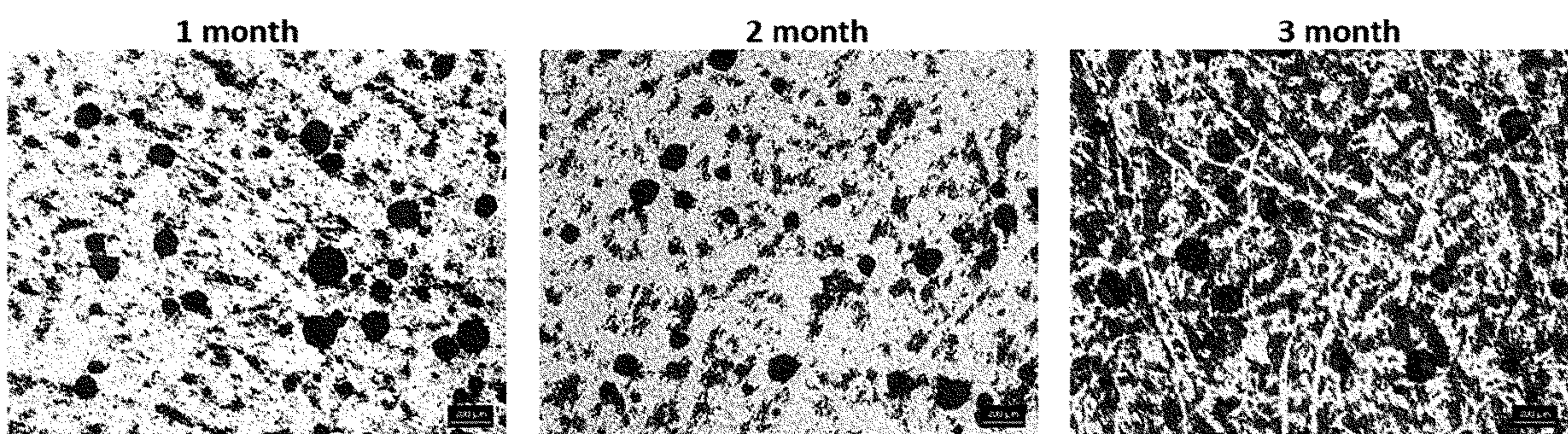
[도11]



[도12]

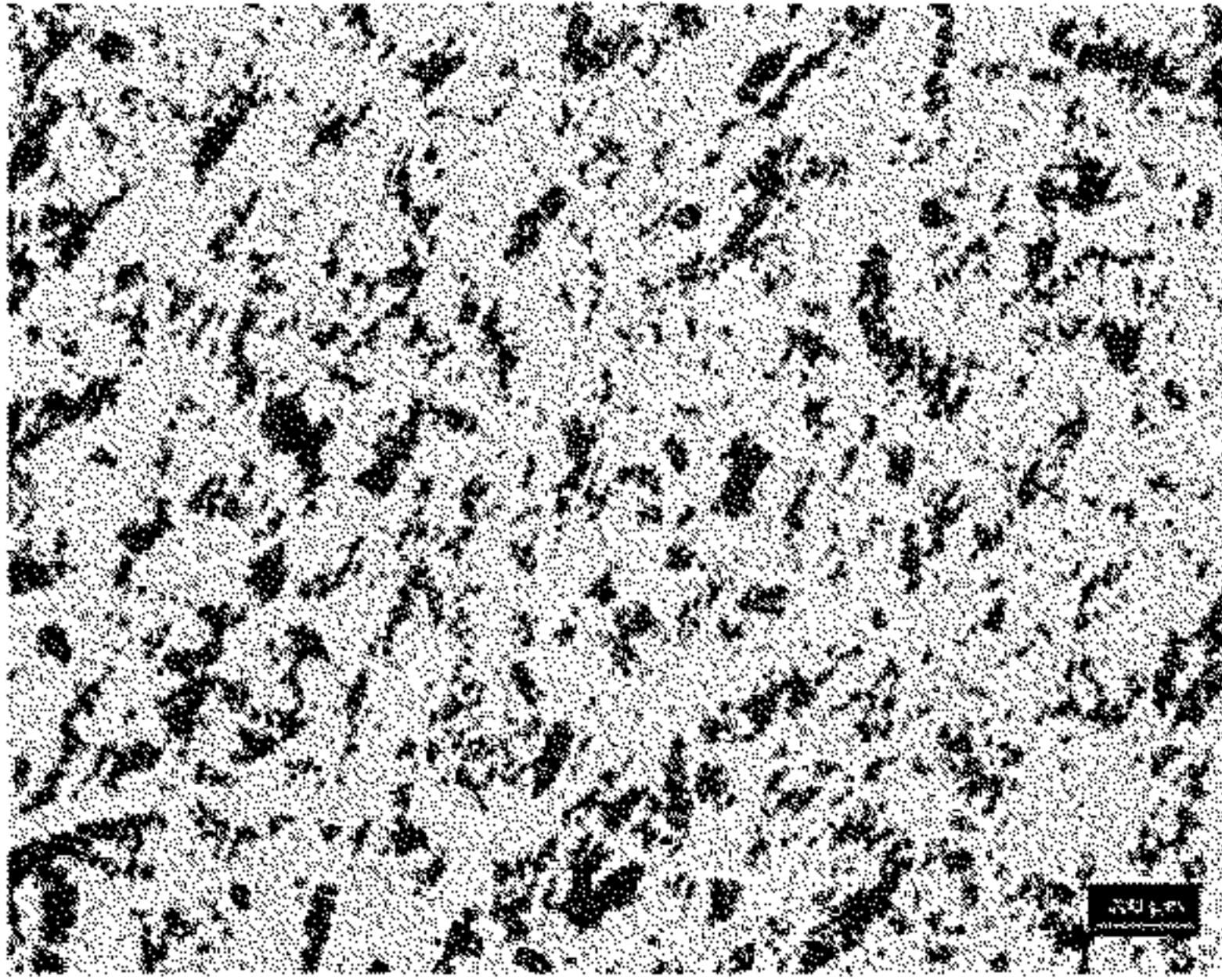


[도13]

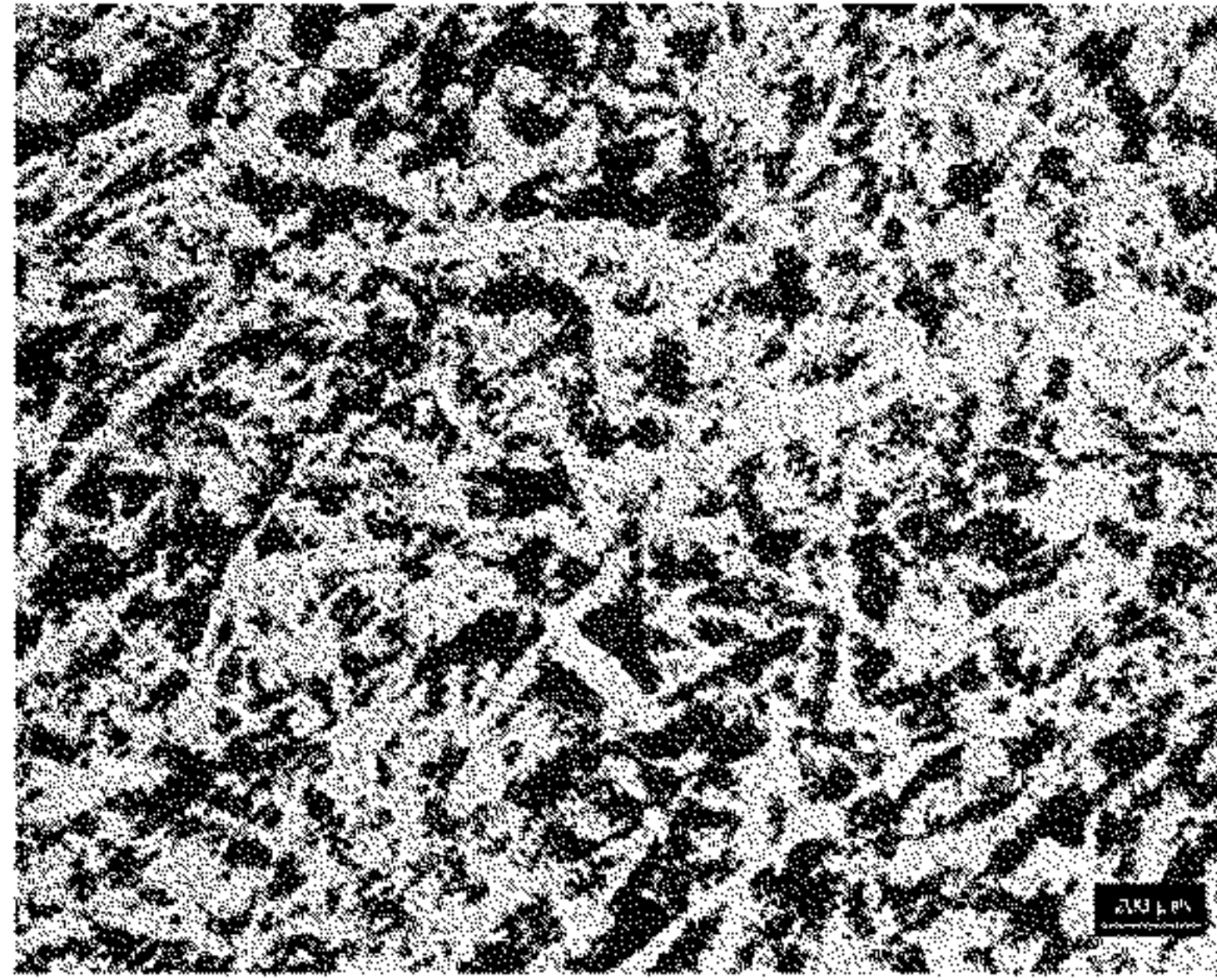


[514]

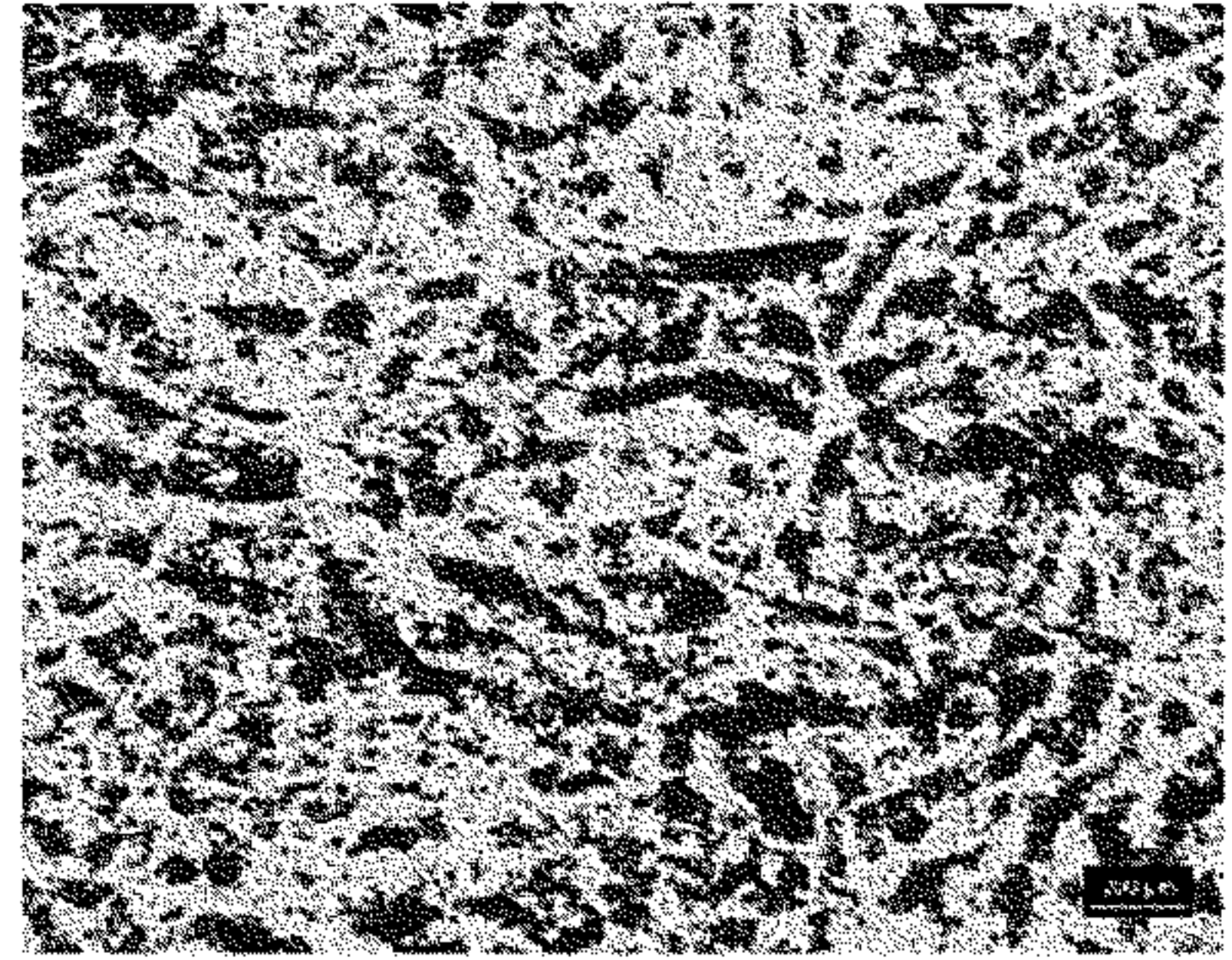
1 month



2 month

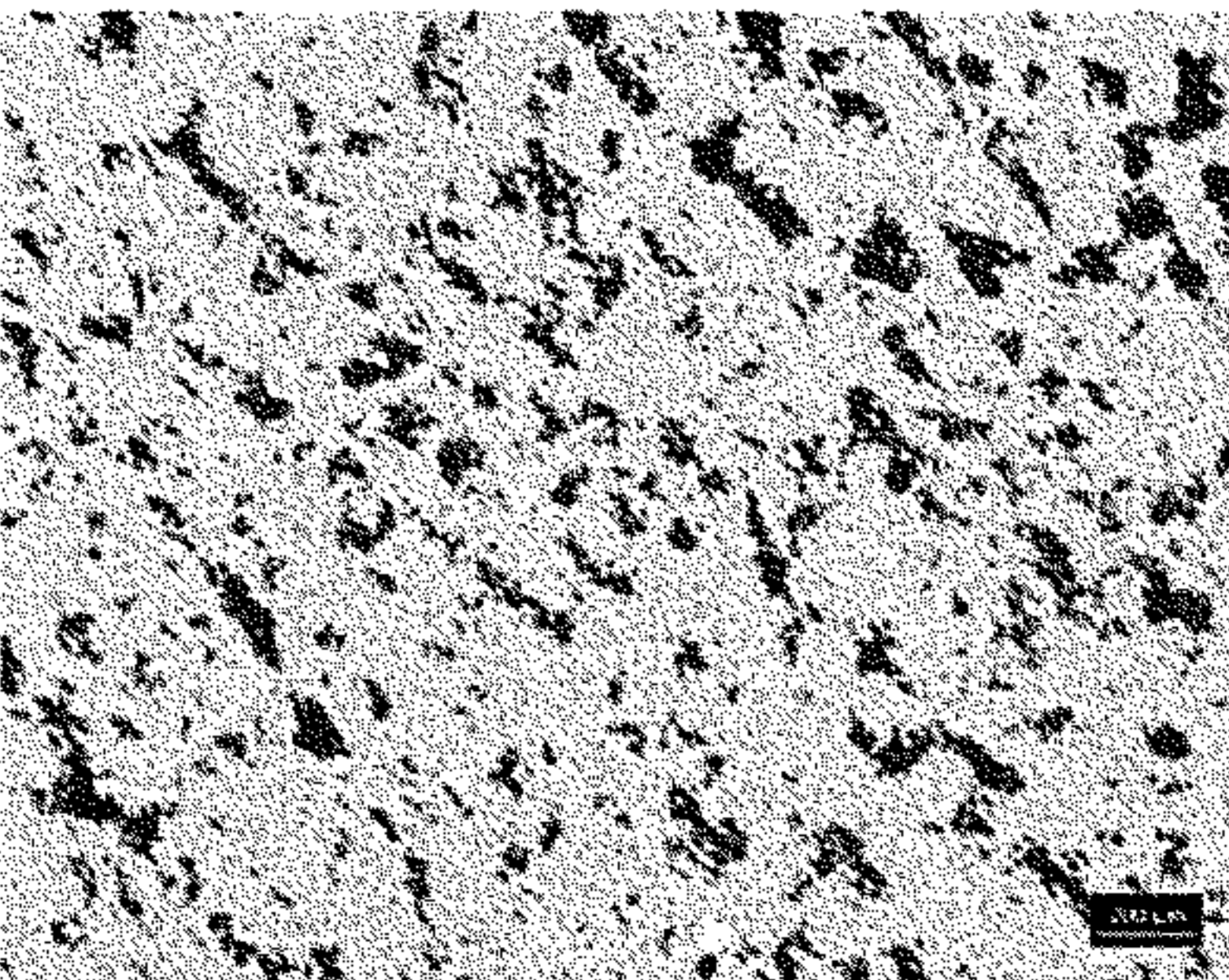


3 month

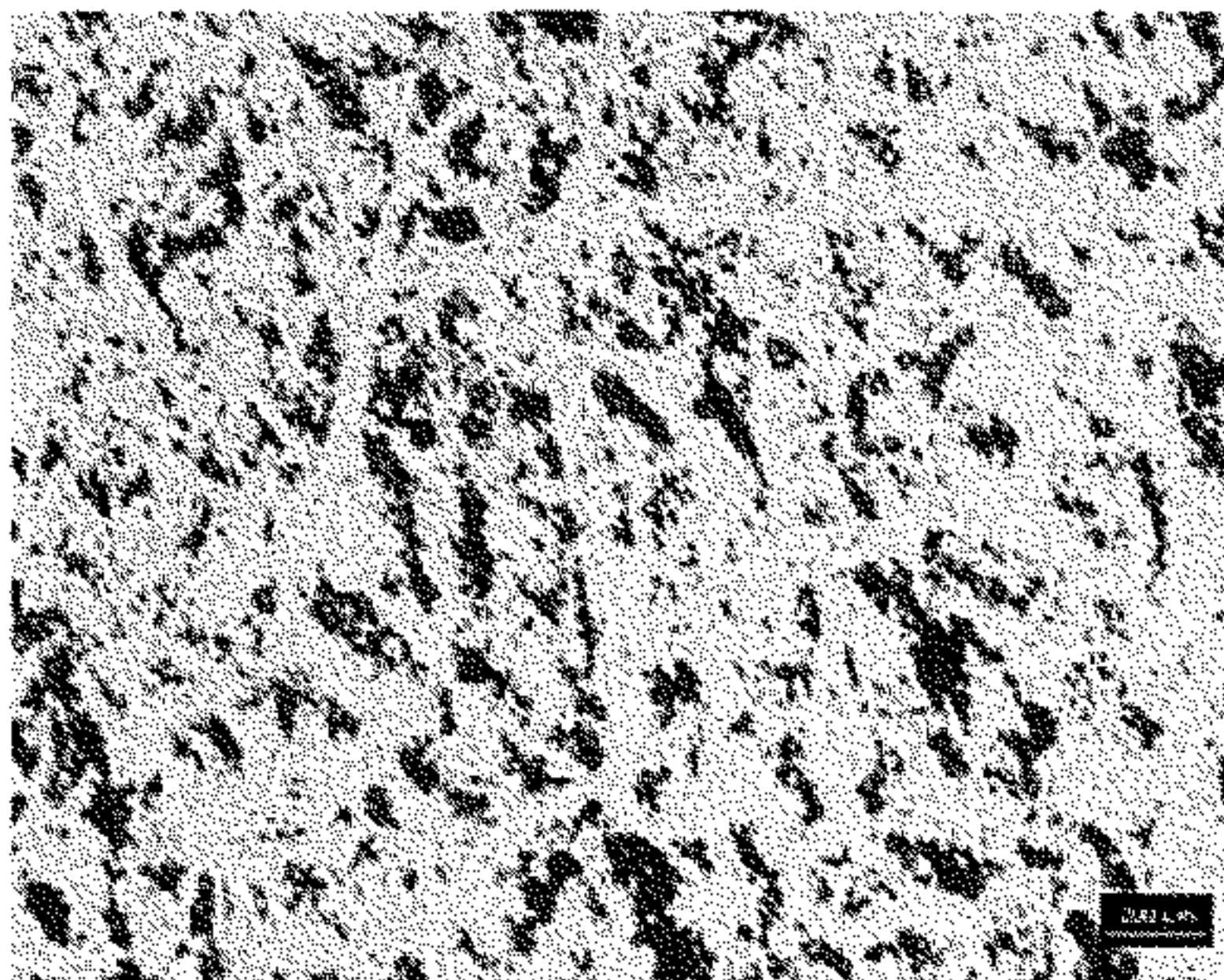


[도 15]

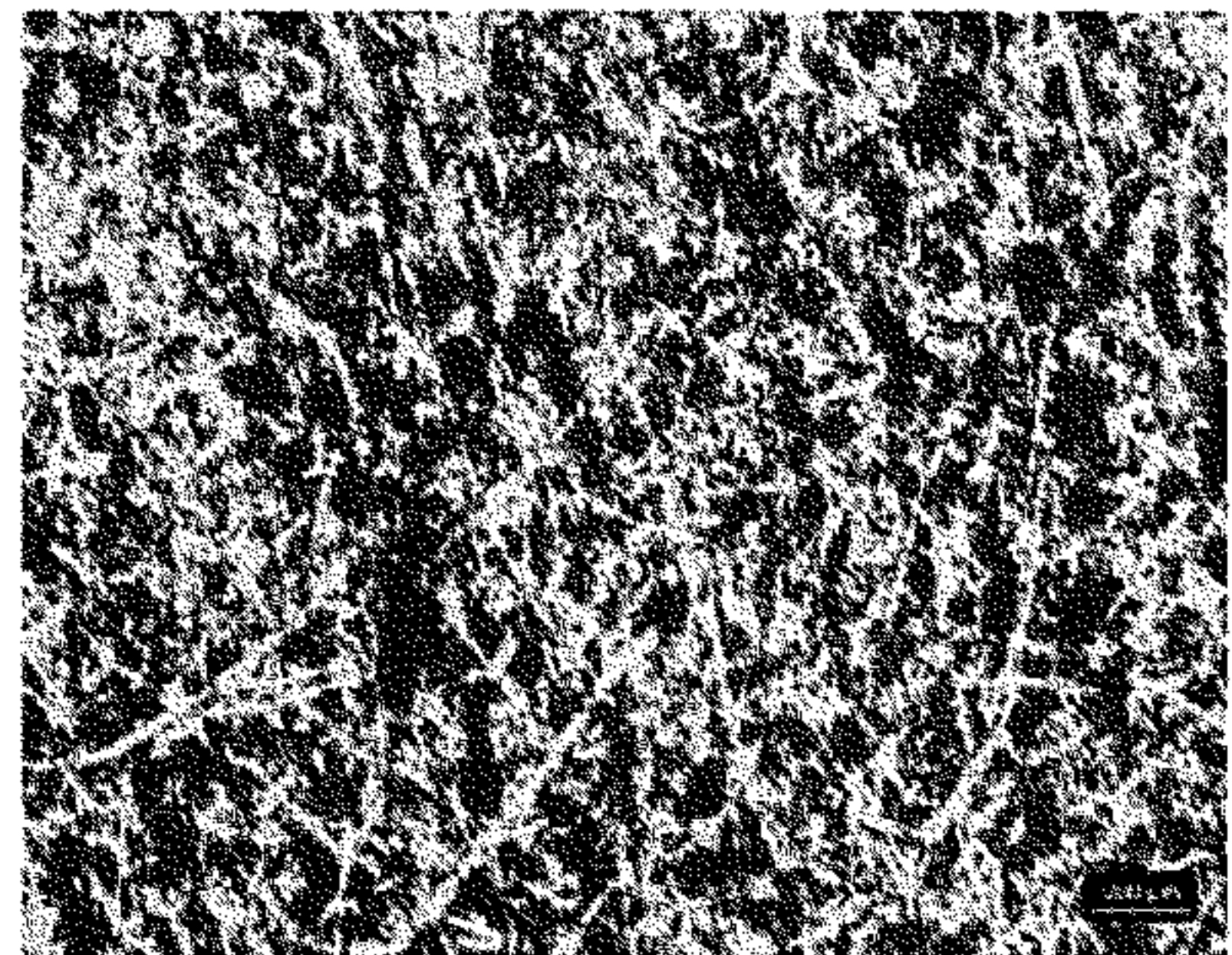
1 month



2 month

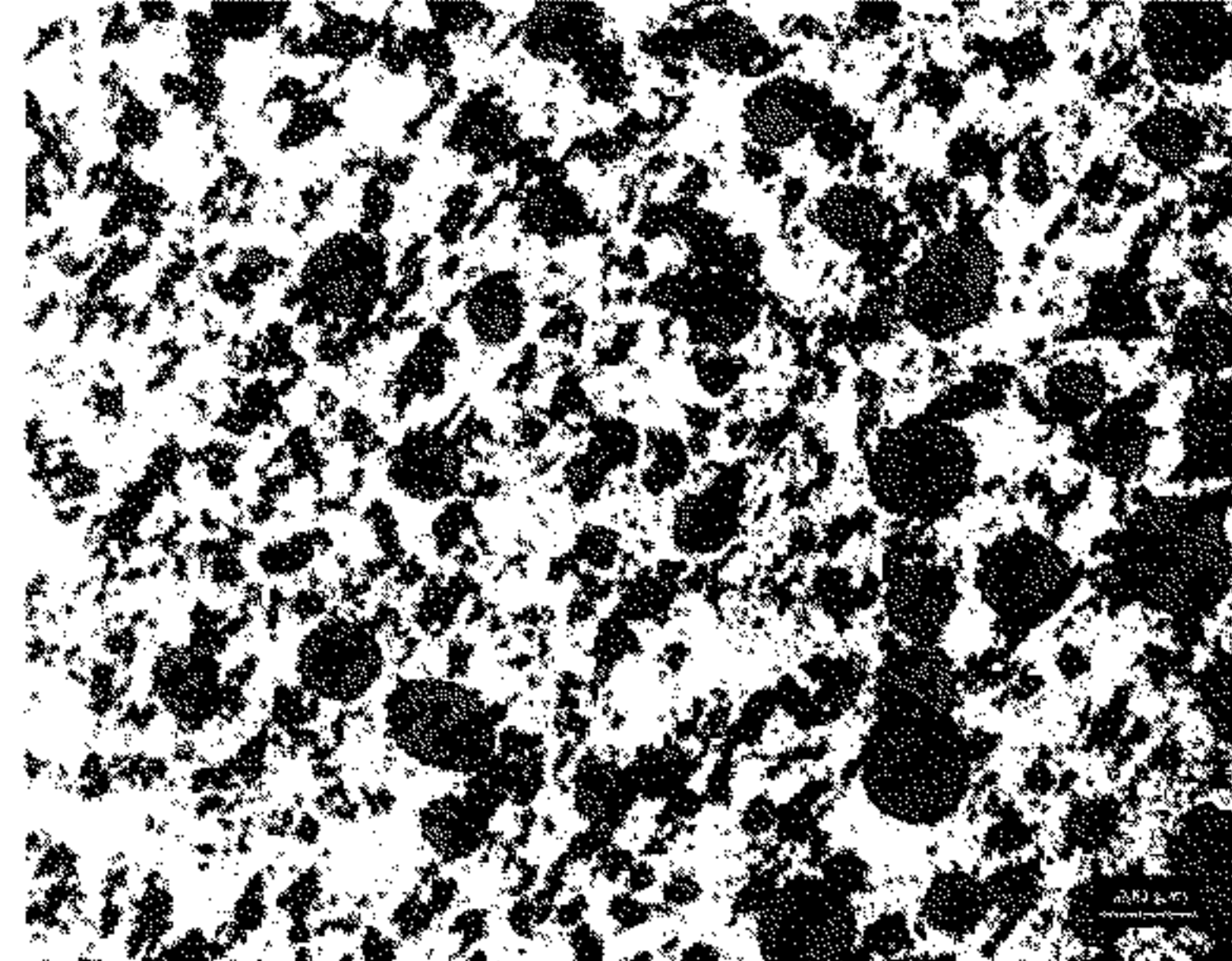


3 month

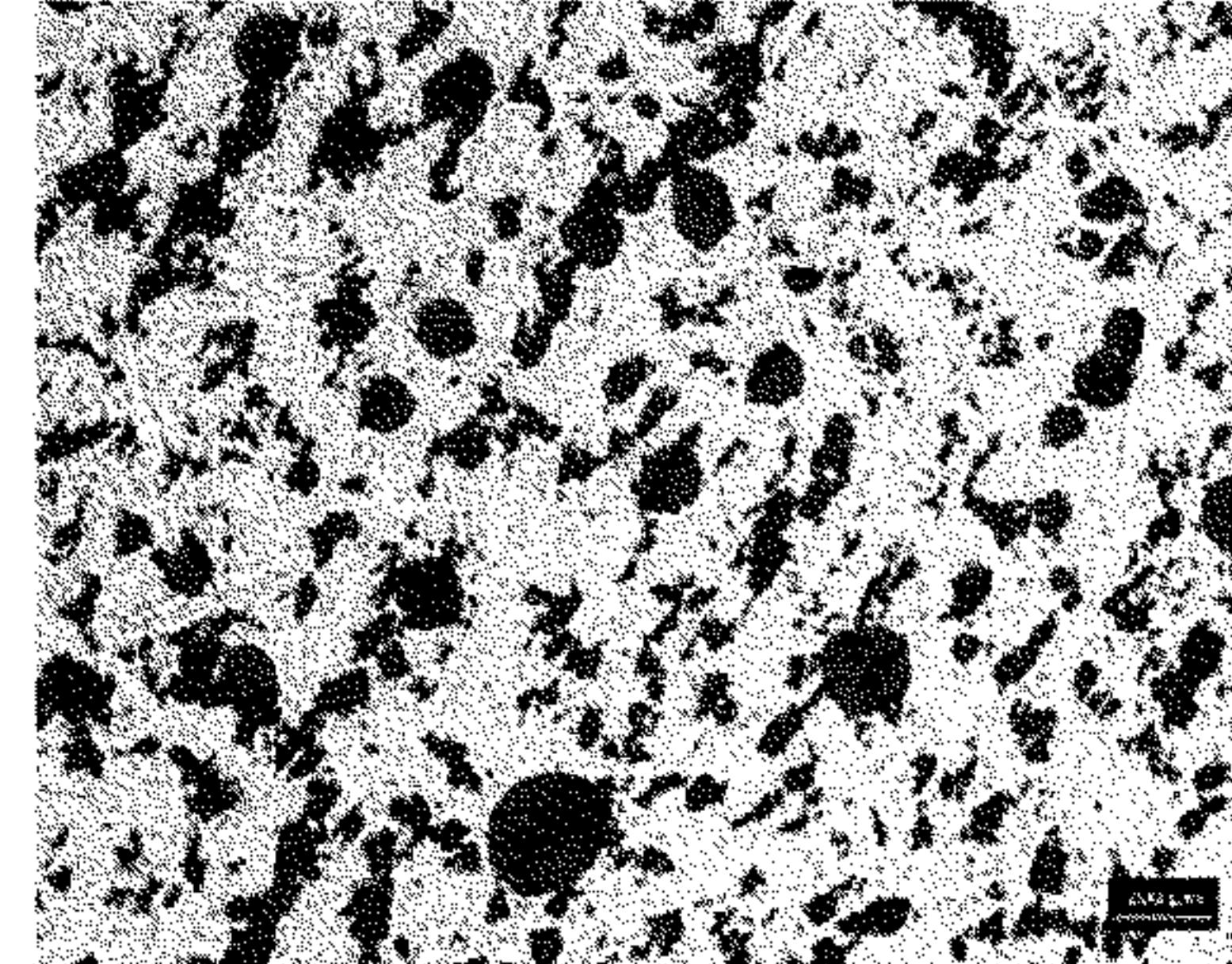


[도 16]

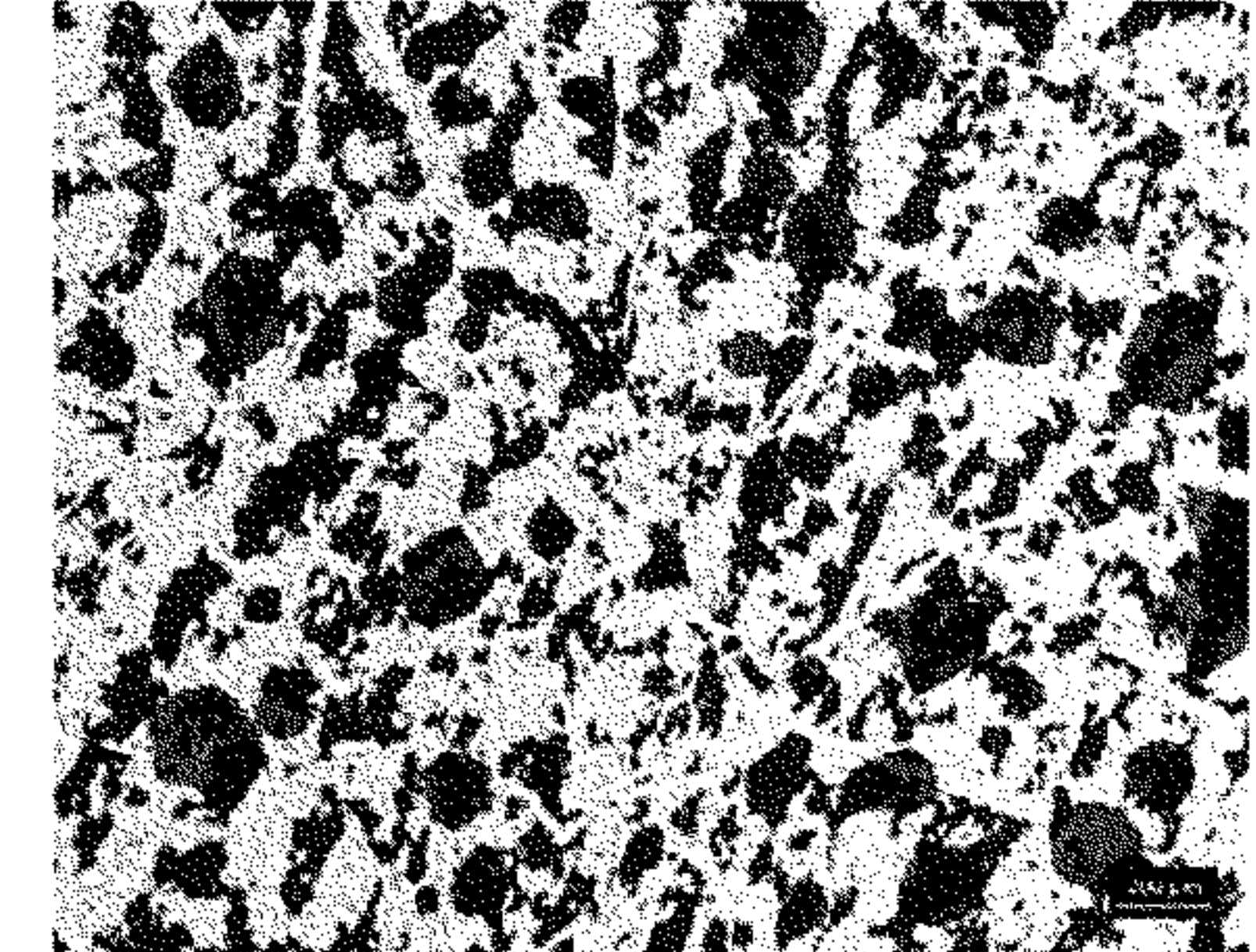
1 month



2 month

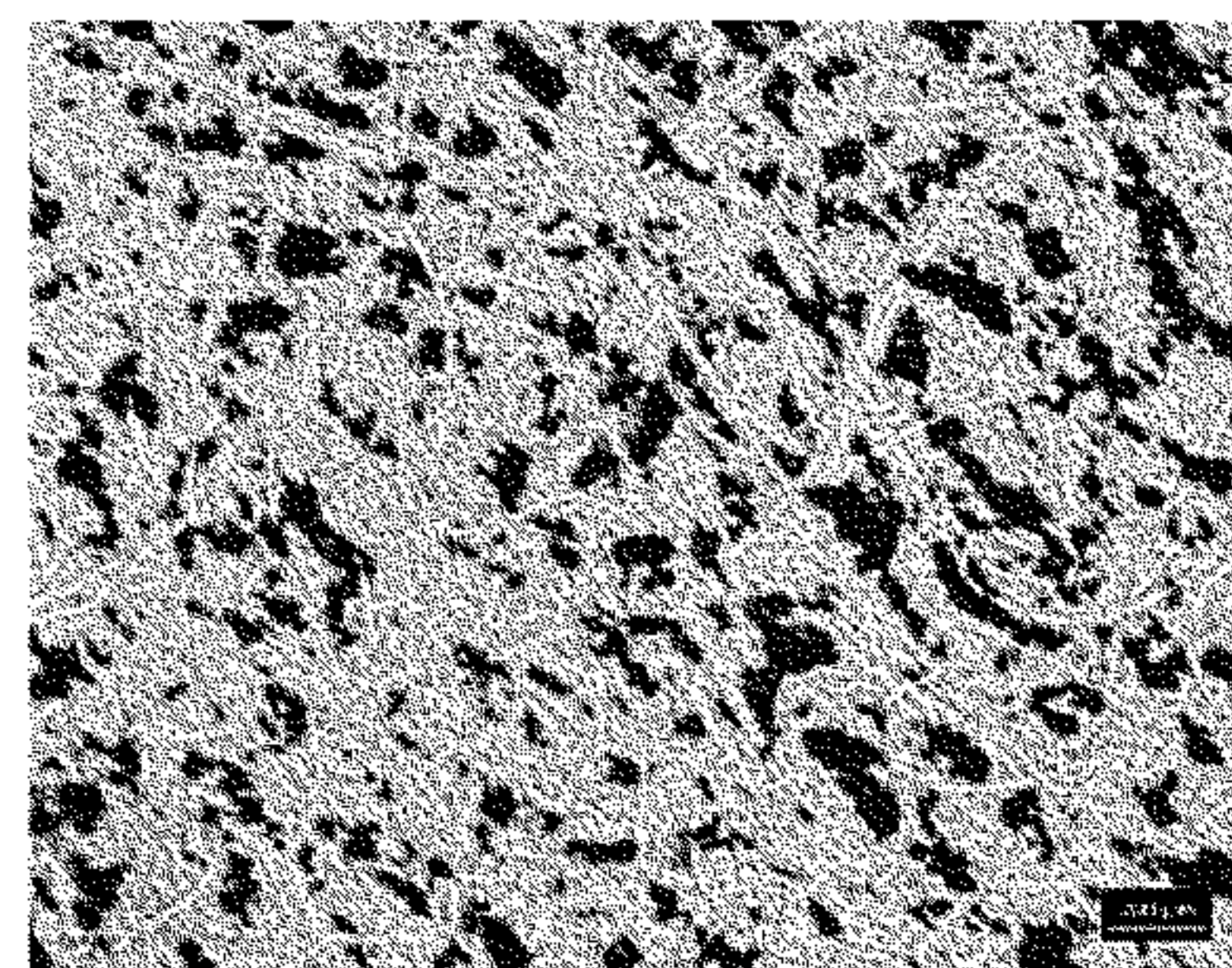


3 month

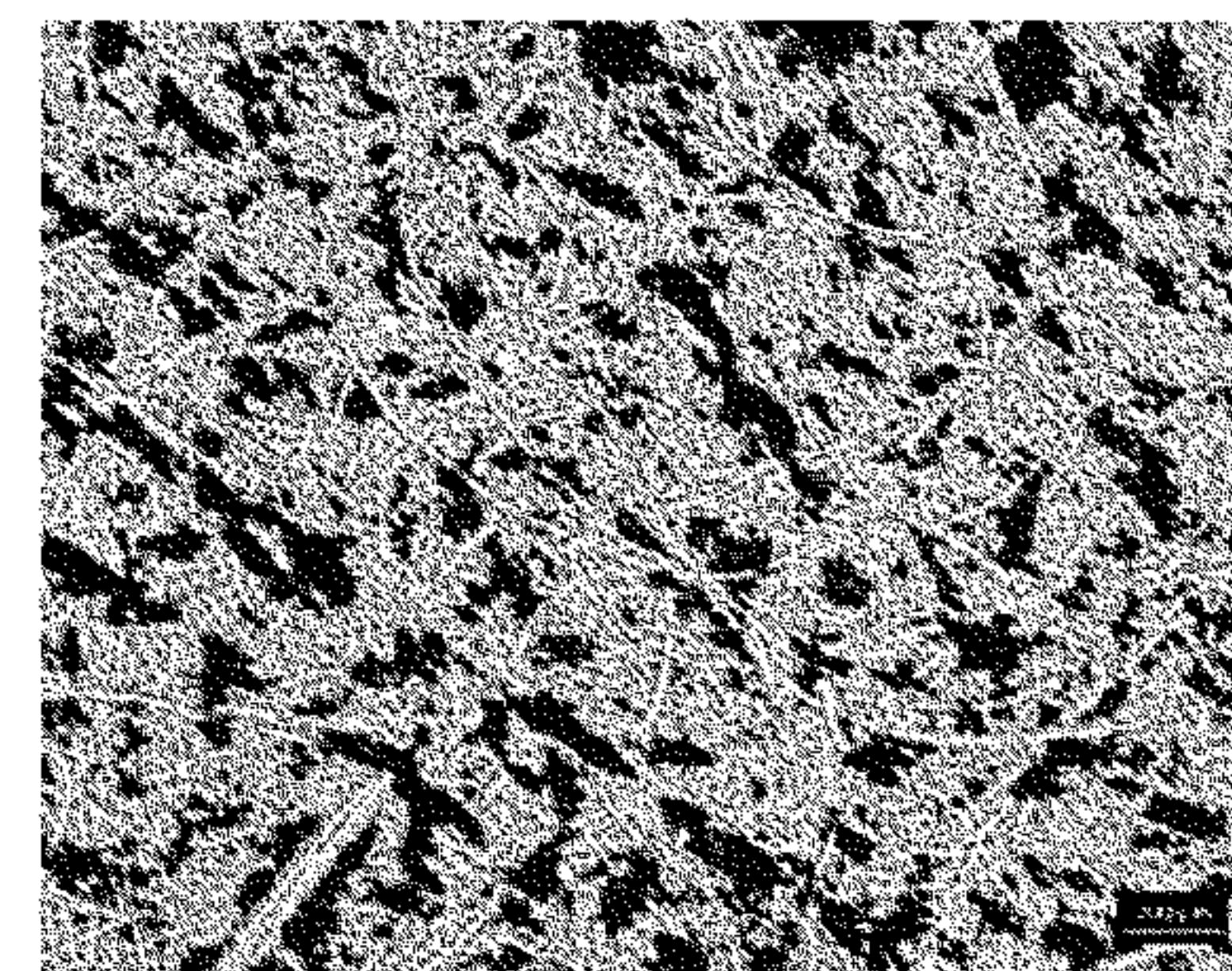


[517]

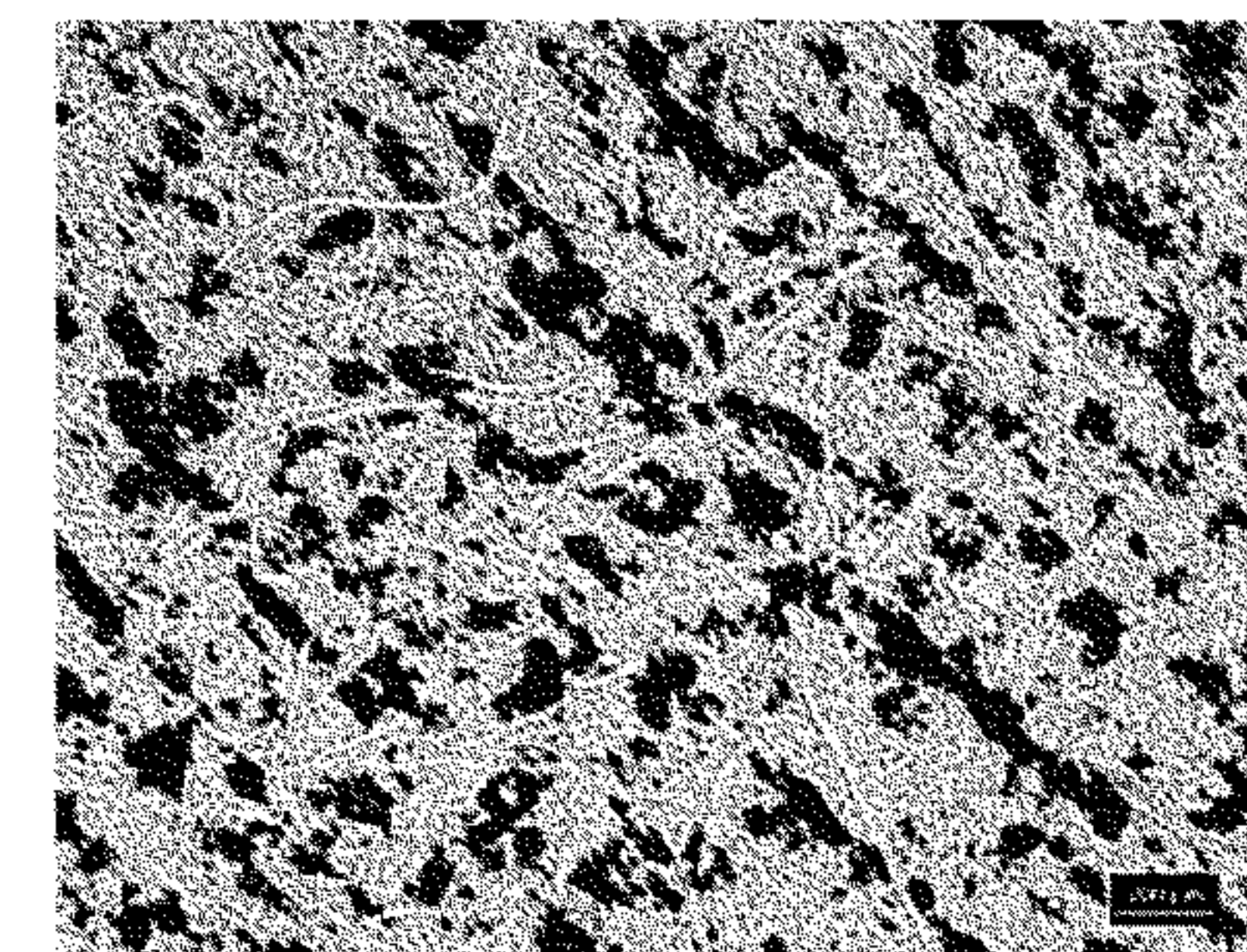
1 month



2 month

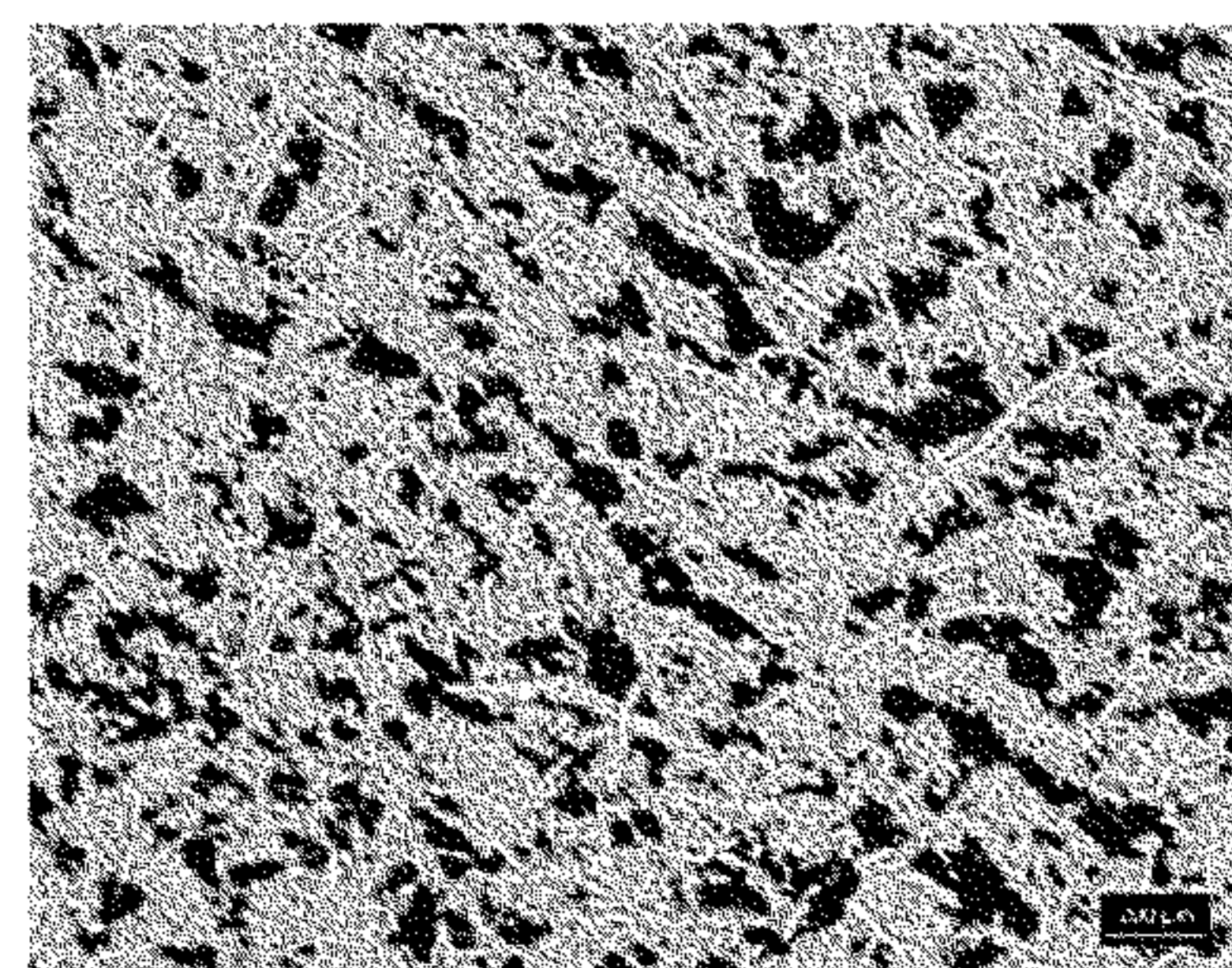


3 month

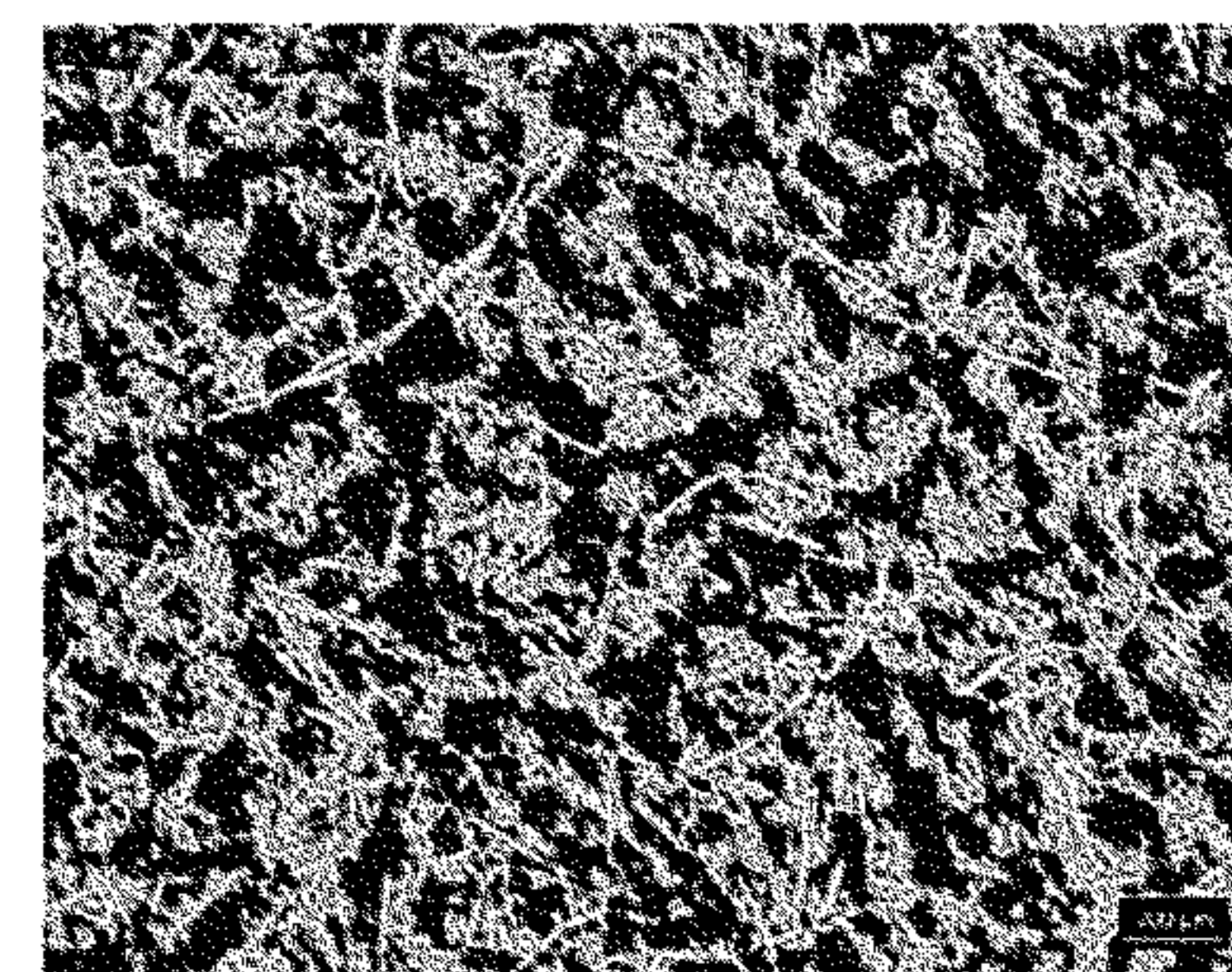


[도 18]

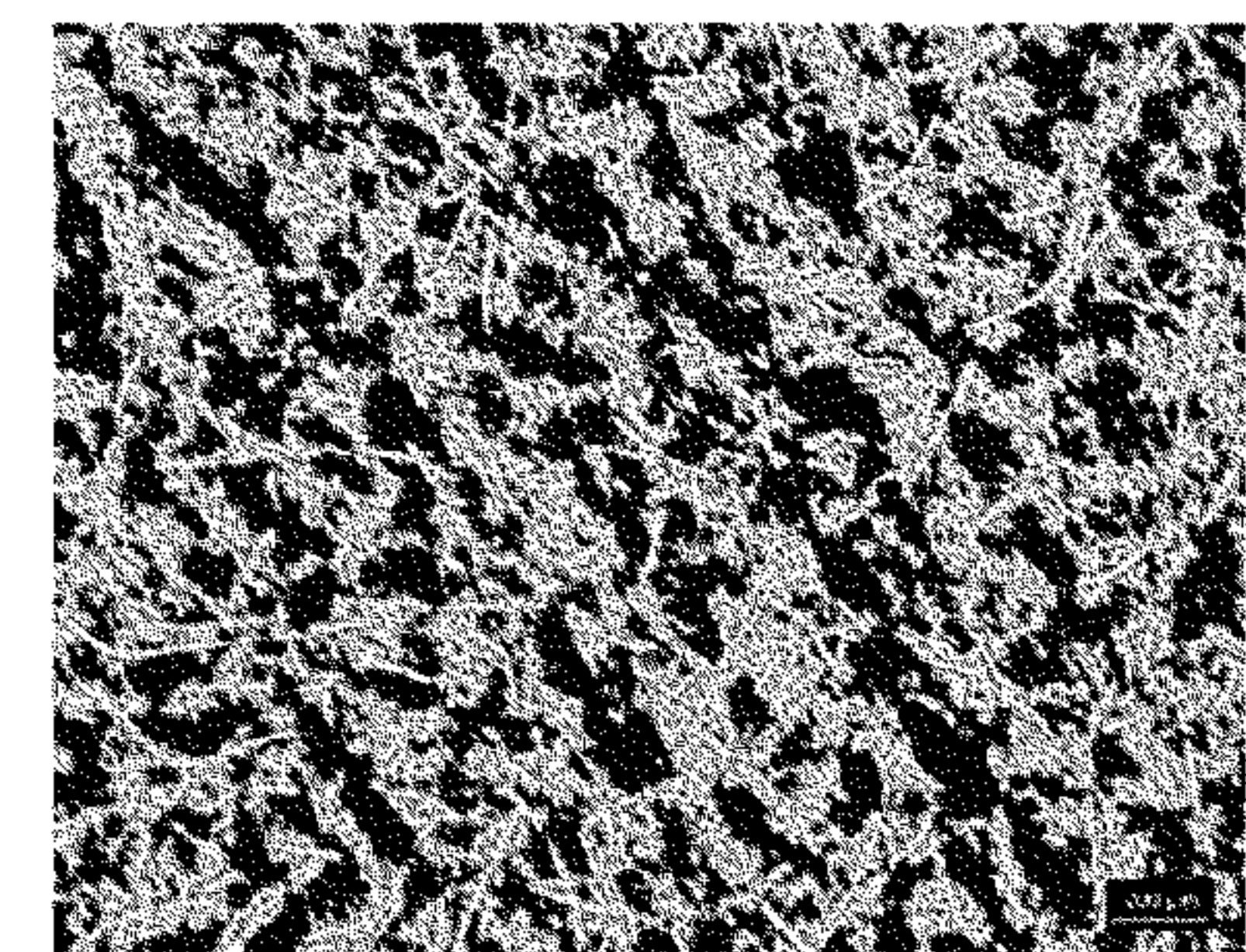
1 month



2 month



3 month



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/019215

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/12(2006.01)i; C12N 5/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M 1/00(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61L 27/00(2006.01); A61L 27/14(2006.01); A61L 27/38(2006.01); C07K 14/195(2006.01); C12M 1/12(2006.01); C12M 3/00(2006.01); C12N 5/00(2006.01); D02G 3/26(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 섬유웹(fiber web), 세포배양 코팅층, 세포배양기 재(cell culture substrate), 기능성 펩타이드, 홍합 접착단백질(mussel adhesive protein), 카보디이미드계(carbodiimide)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2017-0132994 A (AMOGREENTECH CO., LTD.) 05 December 2017 (2017-12-05) See claims 1-8; paragraphs [0010]-[0062]; and SEQ ID NOs. 7-28.	1-8
Y		9-12
Y	KR 10-2014-0053903 A (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 08 May 2014 (2014-05-08) See paragraphs [0201]-[0204].	9-12
A	JP 2017-147951 A (NIIGATA UNIV et al.) 31 August 2017 (2017-08-31) See abstract; and claims 1-6.	1-12
A	KR 10-2017-0135769 A (AMOLIFESCIENCE CO., LTD.) 08 December 2017 (2017-12-08) See abstract; and claims 1-15.	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 April 2021

Date of mailing of the international search report

08 April 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/019215

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019-013580 A1 (AMOLIFESCENCE CO., LTD. et al.) 17 January 2019 (2019-01-17) See abstract; and claims 1-13.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/KR2020/019215

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/019215

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0132994	A	05 December 2017	CN	109196151	A	11 January 2019
				KR	10-1856575	B1	19 June 2018
				US	2019-0203178	A1	04 July 2019
				WO	2017-204564	A1	30 November 2017
KR	10-2014-0053903	A	08 May 2014	AU	2012-253327	A1	28 November 2013
				AU	2012-253327	A1	15 November 2012
				AU	2012-253327	B2	25 May 2017
				AU	2012-253359	A1	15 November 2012
				AU	2012-253359	A1	28 November 2013
				AU	2012-253359	B2	08 June 2017
				BR	112013028887	B1	06 October 2020
				BR	112013028892	A2	31 January 2017
				CA	2835628	A1	15 November 2012
				CA	2835630	A1	15 November 2012
				CN	103648489	A	19 March 2014
				CN	103732222	A	16 April 2014
				CN	103732222	B	28 December 2018
				CN	108714212	A	30 October 2018
				CN	108840912	A	20 November 2018
				EP	2706991	A1	19 March 2014
				EP	2709603	A1	26 March 2014
				JP	2014-514363	A	19 June 2014
				JP	2014-517835	A	24 July 2014
				JP	2017-193557	A	26 October 2017
				JP	2018-197237	A	13 December 2018
				JP	2019-104758	A	27 June 2019
				JP	2020-079300	A	28 May 2020
				JP	6152378	B2	21 June 2017
				JP	6366501	B2	01 August 2018
				JP	6502420	B2	17 April 2019
				JP	6666389	B2	13 March 2020
				KR	10-2014-0146993	A	29 December 2014
				KR	10-2019-0104631	A	10 September 2019
				KR	10-2084509	B1	05 March 2020
				MX	2013013111	A	04 March 2015
				MX	2013013112	A	23 June 2014
				RU	2013154489	A	20 June 2015
				RU	2013154706	A	20 June 2015
				RU	2619176	C2	12 May 2017
				RU	2632651	C2	06 October 2017
				US	10017548	B2	10 July 2018
				US	10611805	B2	07 April 2020
				US	10766932	B2	08 September 2020
				US	2006-0052140	A1	09 March 2006
				US	2011-0053561	A1	03 March 2011
				US	2014-0154286	A1	05 June 2014
				US	2014-0154287	A1	05 June 2014
				US	2014-0364169	A1	11 December 2014
				US	2016-0090404	A1	31 March 2016
				US	2019-119335	A1	25 April 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/019215

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				US	2020-407404	A1		31 December 2020	
				US	7805169	B2		28 September 2010	
				US	8818462	B2		26 August 2014	
				US	9456069	B2		27 September 2016	
				US	9499593	B2		22 November 2016	
				WO	2012-155007	A1		15 November 2012	
				WO	2012-155053	A1		15 November 2012	
				ZA	201308461	B		27 May 2020	
				ZA	201308465	B		27 March 2019	
JP	2017-147951	A	31 August 2017	JP	6758616	B2		23 September 2020	
KR	10-2017-0135769	A	08 December 2017	CN	109196092	A		11 January 2019	
				KR	10-2119514	B1		05 June 2020	
				US	2020-0318049	A1		08 October 2020	
				WO	2017-209521	A1		07 December 2017	
WO	2019-013580	A1	17 January 2019	CN	111065727	A		24 April 2020	
				EP	3653696	A1		20 May 2020	
				KR	10-2019-0008148	A		23 January 2019	
				KR	10-2109453	B1		13 May 2020	

A.발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/12(2006.01)i; C12N 5/00(2006.01)i

B.조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12M 1/00(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61L 27/00(2006.01); A61L 27/14(2006.01); A61L 27/38(2006.01); C07K 14/195(2006.01); C12M 1/12(2006.01); C12M 3/00(2006.01); C12N 5/00(2006.01); D02G 3/26(2006.01)
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 섬유웹(fiber web), 세포배양 코팅층, 세포배양기재(cell culture substrate), 기능성 펩타이드, 홍합 접착단백질(mussel adhesive protein), 카보디이미드계(carbodiimide)

C.관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2017-0132994 A (주식회사 아모그린텍) 2017.12.05 청구항 1-8; 단락 [0010]-[0062]; 및 서열번호 7-28	1-8
Y		9-12
Y	KR 10-2014-0053903 A (칠드런즈 메디컬 센터 코퍼레이션) 2014.05.08 단락 [0201]-[0204]	9-12
A	JP 2017-147951 A (NIIGATA UNIV 등) 2017.08.31 요약; 및 청구항 1-6	1-12
A	KR 10-2017-0135769 A (주식회사 아모라이프사이언스) 2017.12.08 요약; 및 청구항 1-15	1-12
A	WO 2019-013580 A1 (AMOLIFESCIENCE CO., LTD. 등) 2019.01.17 요약; 및 청구항 1-13	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일
2021년04월08일(08.04.2021)

국제조사보고서 발송일
2021년04월08일(08.04.2021)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2. ☐추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0132994 A	2017/12/05	CN 109196151 A	2019/01/11
		KR 10-1856575 B1	2018/06/19
		US 2019-0203178 A1	2019/07/04
		WO 2017-204564 A1	2017/11/30
KR 10-2014-0053903 A	2014/05/08	AU 2012-253327 A1	2013/11/28
		AU 2012-253327 A1	2012/11/15
		AU 2012-253327 B2	2017/05/25
		AU 2012-253359 A1	2012/11/15
		AU 2012-253359 A1	2013/11/28
		AU 2012-253359 B2	2017/06/08
		BR 112013028887 B1	2020/10/06
		BR 112013028892 A2	2017/01/31
		CA 2835628 A1	2012/11/15
		CA 2835630 A1	2012/11/15
		CN 103648489 A	2014/03/19
		CN 103732222 A	2014/04/16
		CN 103732222 B	2018/12/28
		CN 108714212 A	2018/10/30
		CN 108840912 A	2018/11/20
		EP 2706991 A1	2014/03/19
		EP 2709603 A1	2014/03/26
		JP 2014-514363 A	2014/06/19
		JP 2014-517835 A	2014/07/24
		JP 2017-193557 A	2017/10/26
		JP 2018-197237 A	2018/12/13
		JP 2019-104758 A	2019/06/27
		JP 2020-079300 A	2020/05/28
		JP 6152378 B2	2017/06/21
		JP 6366501 B2	2018/08/01
		JP 6502420 B2	2019/04/17
		JP 6666389 B2	2020/03/13
		KR 10-2014-0146993 A	2014/12/29
		KR 10-2019-0104631 A	2019/09/10
		KR 10-2084509 B1	2020/03/05
		MX 2013013111 A	2015/03/04
		MX 2013013112 A	2014/06/23
		RU 2013154489 A	2015/06/20
		RU 2013154706 A	2015/06/20
		RU 2619176 C2	2017/05/12
		RU 2632651 C2	2017/10/06
		US 10017548 B2	2018/07/10
		US 10611805 B2	2020/04/07
		US 10766932 B2	2020/09/08
		US 2006-0052140 A1	2006/03/09
		US 2011-0053561 A1	2011/03/03
		US 2014-0154286 A1	2014/06/05
		US 2014-0154287 A1	2014/06/05
		US 2014-0364169 A1	2014/12/11
		US 2016-0090404 A1	2016/03/31
		US 2019-119335 A1	2019/04/25

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2020-407404 A1	2020/12/31
		US 7805169 B2	2010/09/28
		US 8818462 B2	2014/08/26
		US 9456069 B2	2016/09/27
		US 9499593 B2	2016/11/22
		WO 2012-155007 A1	2012/11/15
		WO 2012-155053 A1	2012/11/15
		ZA 201308461 B	2020/05/27
		ZA 201308465 B	2019/03/27
JP 2017-147951 A	2017/08/31	JP 6758616 B2	2020/09/23
KR 10-2017-0135769 A	2017/12/08	CN 109196092 A	2019/01/11
		KR 10-2119514 B1	2020/06/05
		US 2020-0318049 A1	2020/10/08
		WO 2017-209521 A1	2017/12/07
WO 2019-013580 A1	2019/01/17	CN 111065727 A	2020/04/24
		EP 3653696 A1	2020/05/20
		KR 10-2019-0008148 A	2019/01/23
		KR 10-2109453 B1	2020/05/13