

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 9월 10일 (10.09.2020) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2020/180106 A1

(51) 국제특허분류:
A01N 1/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/003058

(22) 국제출원일: 2020년 3월 4일 (04.03.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0025421 2019년 3월 5일 (05.03.2019) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이윤우 (LEE, Younwoo); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 손원수 (SON, Wonsu); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 박희정 (PARK, Hee-

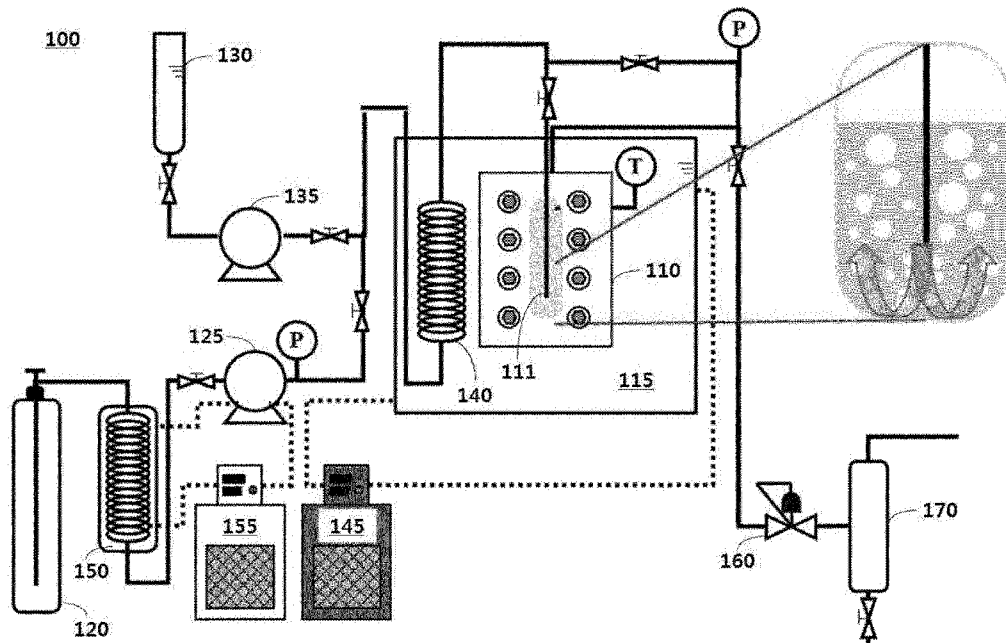
jeong); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 송순욱 (SONG, Sunuk); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 김시나 (KIM, Sina); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 이찬주 (LEE, Chanju); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(74) 대리인: 강문호 (KANG, Moonho); 06575 서울시 서초구 사평대로 70, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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,

(54) Title: APPARATUS AND METHOD FOR CRYSTALLIZATION AND SUPERCRITICAL DRYING OF CULTURE SOLUTION

(54) 발명의 명칭: 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치 및 방법



(57) Abstract: An apparatus and a method for crystallization and supercritical drying of a culture solution are provided. The apparatus for crystallization and supercritical drying of a culture solution is an apparatus, which dries a culture solution comprising a first solvent and a target material dissolved in the first solvent, so as to obtain the target material, and comprises: a high pressure vessel for accommodating the culture solution; a first supply part connected with the high pressure vessel so as to supply a second solvent to the high pressure vessel; a second supply part connected with the high pressure vessel so as to supply a third solvent to the high pressure vessel; a precooler which is arranged to be adjacent to the first supply part, and which precools the second solvent to be discharged from the first supply part; and a preheater which is arranged to be adjacent to the high pressure vessel, and which preheats the second solvent



WO 2020/180106 A1

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 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))

and the third solvent that are supplied to the high pressure vessel. The method for crystallization and supercritical drying of a culture solution is a method, which dries a culture solution comprising a first solvent and a target material dissolved in the first solvent, so as to obtain the target material, and comprises the steps of: replacing the first solvent with a second solvent in the culture solution so as to crystallize the target material; and phase-transferring the second solvent into a supercritical phase.

(57) 요약서: 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치 및 방법이 제공된다. 상기 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치는, 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 건조하여 상기 타겟 물질을 획득하기 위한 장치로서, 상기 배양액을 수용하는 고압 용기, 상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제2 용매를 공급하는 제1 공급부, 상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제3 용매를 공급하는 제2 공급부, 상기 제1 공급부에 인접하게 배치되어 상기 제1 공급부에서 배출되는 상기 제2 용매를 예열하는 예열기, 및 상기 고압 용기에 인접하게 배치되어 상기 고압 용기에 공급되는 상기 제2 용매 및 상기 제3 용매를 예열하는 예열기를 포함한다. 상기 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법은, 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 건조하여 상기 타겟 물질을 획득하기 위한 방법으로서, 상기 배양액에서 상기 제1 용매를 제2 용매로 치환하여 상기 타겟 물질을 결정화하는 단계 및 상기 제2 용매를 초임계 상으로 상전이 시키는 단계를 포함한다.

명세서

발명의 명칭: 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치 및 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 뼈, 연골, 지방, 근육세포를 포함한 여러 가지 중배엽성 세포 또는 신경세포와 같은 외배엽성 세포로도 분화하는 능력을 가진 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로, 면역 거부 반응을 억제하여 성공적인 세포 재생을 이룰 수 있다는 점에서 재생 의학의 재료로 각광 받고 있다.
- [3] 질병 치료를 위한 MSC 배양액은 시간이 충분하다면 치료를 필요로 하는 환자의 세포에서 추출하여 배양하지만 급성 환자의 경우 배양할 시간이 충분하지 않기 때문에 미리 배양해둔 MSC 배양액을 냉동시켜서 보관하다가 필요할 때 해동시켜서 사용한다. 만약 냉동하지 않은 수용액 상에서 보관한다면 수분에 의한 가수분해를 통한 아미노산 분해반응(deamination)으로 인해 물질의 3차원 구조 붕괴를 유발하고 그 결과, 약효가 사라질 수 있다. 또한, 의학적 인프라가 잘 되어있는 선진국에서는 냉동을 통한 보관이 가능하지만, 배양할 수 있는 설비가 없거나 냉동 보관을 할 수 있는 인프라조차 갖춰지지 않은 후진국에서도 MSC 배양액 분비 물질을 이용한 치료를 필요로 하는 사람이 많지만 그 혜택을 받기가 어렵다. 이러한 여러 가지 문제를 해결하기 위하여, 냉동 보관이 필요 없게끔 MSC 배양액의 건조가 요구되고 있다.
- [4] 종래 사용되고 있는 동결 건조(lyophilization)는 건조하고자 하는 유체를 삼중점(triple point) 미만으로 온도를 낮춰서 얼린 뒤 감압하여 기체로 승화시키는 방법이다. 상기 동결 건조는 건조해야 할 유체인 물이 얼면서 부피가 늘기 때문에 냉동과정에서 단백질의 3차원 구조가 파괴될 수 있고, 건조하는데 많은 에너지와 긴 시간을 요구한다. 또 동결 건조의 공정이 복잡하고 어려울 뿐만 아니라 단백질의 미세구조 내 수분이 완벽히 건조가 되지 않아, 잔여 수분에 의한 가수분해로 아미노산 간의 결합이 끊어질 수 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치를 제공한다.
- [6] 본 발명은 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 실시예들에 따른 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법은, 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 건조하여 상기

타겟 물질을 획득하기 위한 방법으로서, 상기 배양액에서 상기 제1 용매를 제2 용매로 치환하여 상기 타겟 물질을 결정화하는 단계 및 상기 제2 용매를 초임계 상으로 상전이 시키는 단계를 포함한다.

- [8] 본 발명의 실시예들에 따른 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치는, 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 건조하여 상기 타겟 물질을 획득하기 위한 장치로서, 상기 배양액을 수용하는 고압 용기, 상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제2 용매를 공급하는 제1 공급부, 상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제3 용매를 공급하는 제2 공급부, 상기 제1 공급부에 인접하게 배치되어 상기 제1 공급부에서 배출되는 상기 제2 용매를 예냉하는 예냉기, 및 상기 고압 용기에 인접하게 배치되어 상기 고압 용기에 공급되는 상기 제2 용매 및 상기 제3 용매를 예열하는 예열기를 포함한다.

발명의 효과

- [9] 본 발명의 실시예들에 따른 배양액의 결정화 및 초임계 건조는 배양액에 녹아있는 타겟 물질(건조물)의 구조 안정성 및 활성이 변성되는 것을 방지하면서 배양액을 건조할 수 있다. 상기 타겟 물질은 결정화되고 건조될 수 있다. 예를 들어, 상기 결정화 및 초임계 건조는 단백질 등 온도에 민감하고 미세구조를 유지하여야 하는 세포나 단백질을 결정화하고 건조하는데 사용될 수 있다. 상기 결정화 및 초임계 건조는 에너지 등의 공정 비용이나 공정 시간에 있어서 동결 건조보다 우수하다. 상기 결정화 및 초임계 건조에 의해 대량 생산이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치를 나타낸다.
- [11] 도 2 및 도 3은 노즐 내경 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 ELISA 분석 결과를 나타내며, 도 2는 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 3은 수율을 고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.
- [12] 도 4 및 도 5는 노즐 내경 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석을 통한 안정성 테스트 그래프를 나타내며, 도 4는 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 5는 수율을 고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.
- [13] 도 6 및 도 7은 총 유량($\text{CO}_2 + \text{EtOH}$) 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 ELISA 분석 결과를 나타내며, 도 6은 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 7는 수율을 고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.
- [14] 도 8 및 도 9는 총 유량($\text{CO}_2 + \text{EtOH}$) 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석을 통한 안정성 테스트 그래프를 나타내며, 도 8은 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 9는 수율을

고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.

- [15] 도 10 및 도 11은 온도 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 ELISA 분석 결과를 나타내며, 도 10은 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 11은 수율을 고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.
- [16] 도 12 및 도 13은 온도 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석을 통한 안정성 테스트 그래프를 나타내며, 도 12는 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 13은 수율을 고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.
- [17] 도 14 및 도 15는 압력 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 ELISA 분석 결과를 나타내며, 도 14는 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 15는 수율을 고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.
- [18] 도 16 및 도 17은 압력 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석을 통한 안정성 테스트 그래프를 나타내며, 도 16은 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 17은 수율을 고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.
- [19] 도 18 및 도 19는 CO₂/EtOH ratio 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 ELISA 분석 결과를 나타내며, 도 18은 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 19는 수율을 고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.
- [20] 도 20 및 도 21은 CO₂/EtOH ratio 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석을 통한 안정성 테스트 그래프를 나타내며, 도 20은 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 21은 수율을 고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.
- [21] 도 22는 각 공정의 최적 조건에서 얻어진 건조물의 성장 인자 어레이(Growth Factor Array)를 이용한 성장 인자의 발현 패턴을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [22] 이하, 실시예들을 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예들을 통해 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서, 이하의 실시예들에 의하여 본 발명이 제한되어서는 안 된다.
- [23] 본 명세서에서 제1, 제2 등의 용어가 다양한 요소들(elements)을 기술하기 위해서 사용되었지만, 상기 요소들이 이 같은 용어들에 의해서 한정되어서는 안 된다. 이러한 용어들은 단지 상기 요소들을 서로 구별시키기 위해서 사용되었을 뿐이다.

[24]

[25] 본 발명의 실시예들에 따른 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법은, 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 건조하여 상기 타겟 물질을 획득하기 위한 방법으로서, 상기 배양액에서 상기 제1 용매를 제2 용매로 치환하여 상기 타겟 물질을 결정화하는 단계 및 상기 제2 용매를 초임계 상으로 상전이 시키는 단계를 포함한다.

[26] 상기 용매 치환 단계는 상기 혼합물에서 상기 제1 용매를 상기 제2 용매와 제3 용매로 치환하는 단계를 포함할 수 있고, 상기 상전이 단계는 상기 제3 용매를 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

[27] 상기 제2 용매는 상기 타겟 물질의 변성 온도보다 낮은 임계 온도를 가질 수 있다. 상기 제3 용매는 상기 제1 용매 및 상기 제2 용매와 섞일 수 있다. 상기 제1 용매는 물을 포함할 수 있고, 상기 제2 용매는 이산화탄소 및 아산화질소 중에서 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 상기 제3 용매는 에탄올, 아세톤, 노말 메틸 피롤리돈((N-methyl-2-pyrrolidone, NMP), 및 디메틸 설펡사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO) 중에서 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[28] 상기 타겟 물질은 상기 초임계 건조 후에 구조 안정성을 유지할 수 있다. 상기 타겟 물질은 줄기세포 등의 세포를 포함할 수 있다. 상기 타겟 물질은 단백질을 포함할 수 있다.

[29] 상기 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법은 상기 초임계 상의 상기 제2 용매를 기화시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[30] 상기 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법은 0 ~ 40°C의 온도와 35 ~ 500bar의 압력에서 수행될 수 있다.

[31]

[32] 본 발명의 실시예들에 따른 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치는, 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 건조하여 상기 타겟 물질을 획득하기 위한 장치로서, 상기 배양액을 수용하는 고압 용기, 상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제2 용매를 공급하는 제1 공급부, 상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제3 용매를 공급하는 제2 공급부, 상기 제1 공급부에 인접하게 배치되어 상기 제1 공급부에서 배출되는 상기 제2 용매를 예냉하는 예냉기, 및 상기 고압 용기에 인접하게 배치되어 상기 고압 용기에 공급되는 상기 제2 용매 및 상기 제3 용매를 예열하는 예열기를 포함한다.

[33] 상기 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치는 상기 고압 용기 내에 배치되고, 상기 제2 용매 및 상기 제3 용매를 상기 고압 용기 내로 이송시키는 모세관 튜브를 더 포함할 수 있다. 상기 초임계 건조 장치는 상기 고압 용기 및 상기 예열기를 수용하는 수조를 더 포함할 수 있다. 상기 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치는 상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에서 배출되는 유체를 분리하는 기액 분리기를 더 포함할 수 있다. 상기 배양액의 결정화 및 초임계

- 건조 장치는 상기 고압 용기 및 상기 기액 분리기 사이에 배치되어 상기 고압 용기의 백프레셔를 조절하는 백프레셔 조절기를 더 포함할 수 있다.
- [34] 상기 제2 용매는 상기 타겟 물질의 변성 온도보다 낮은 임계 온도를 가질 수 있다. 상기 제3 용매는 상기 제1 용매 및 상기 제2 용매와 섞일 수 있다. 상기 제1 용매는 물을 포함할 수 있고, 상기 제2 용매는 이산화탄소 및 아산화질소 중에서 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 상기 제3 용매는 에탄올, 아세톤, 노말 메틸 피롤리돈((N-methyl-2-pyrrolidone, NMP), 및 디메틸 설펡사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO) 중에서 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [35] 상기 타겟 물질은 상기 초임계 건조 후에 구조 안정성을 유지할 수 있다. 상기 타겟 물질은 줄기세포 등의 세포를 포함할 수 있다. 상기 타겟 물질은 단백질을 포함할 수 있다.
- [36]
- [37] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치를 나타낸다.
- [38] 도 1을 참조하면, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치(100)는 타겟 물질 및 제1 용매(예를 들어, 물)를 포함하는 혼합물을 건조하는 초임계 건조 장치로서, 고압 용기(110), 제1 공급부(120), 제2 공급부(130), 예열기(140), 및 예냉기(150)를 포함한다.
- [39] 고압 용기(110)(high pressure cell)는 상기 혼합물을 수용하여 결정화 및 건조할 수 있다. 제1 공급부(120)는 고압 용기(110)에 연결되어 제2 용매(예를 들어, 이산화탄소)를 공급할 수 있다. 상기 제2 용매는 제1 공급부(120)와 고압 용기(110) 사이에 배치되는 제1 펌프(125)에 의해 이송될 수 있다. 제2 공급부(130)는 고압 용기(110)에 연결되어 제3 용매(예를 들어, 무수 에탄올)를 공급할 수 있다. 상기 제3 용매는 제2 공급부(130)와 고압 용기(110) 사이에 배치되는 제2 펌프(135)에 의해 이송될 수 있다.
- [40] 예열기(140)는 고압 용기(110)에 인접하게 배치되어 고압 용기(110)에 공급되는 상기 제2 용매 및 상기 제3 용매를 예열할 수 있다. 예열기(140)의 가열 매체는 예열기(140)에 연결된 가열조(145)에 의해 가열될 수 있다.
- [41] 고압 용기(110)와 예열기(140)는 수조(115) 내에 배치될 수 있고, 고압 용기(110)는 타겟 물질, 제1 용매, 제2 용매, 및 제3 용매의 공정 온도를 효과적으로 제어할 수 있다.
- [42] 예냉기(150)는 제1 공급부(120)에 인접하게 배치되어 제1 공급부(120)에서 배출되는 상기 제2 용매를 예냉할 수 있다. 예냉기(150)의 냉각 매체는 예냉기(150)에 연결된 냉각조(155)에 의해 냉각될 수 있다.
- [43] 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치(100)는 모세관 튜브(111)를 포함할 수 있다. 모세관 튜브(111)는 고압 용기(110) 내에 배치되고, 상기 제2 용매 및 상기 제3 용매를 고압 용기(110) 내로 이송시킨다. 모세관 튜브(111)에 의해 상기 제2 용매 및 상기 제3 용매는 잘 혼합된 후 고압 용기(110) 내 혼합물에 효과적으로

공급될 수 있다.

- [44] 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치(100)는 고압 용기(110)에 연결되어 고압 용기(110)에서 배출되는 유체를 분리하는 기액 분리기(170)를 포함할 수 있고, 고압 용기(110) 및 기액 분리기(170) 사이에 배치되어 고압 용기(110)의 백프레셔를 조절하는 백프레셔 조절기(160)를 포함할 수 있다.
- [45]
- [46] 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치(100)를 이용한 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법의 일 예는 다음과 같다.
- [47] 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치(100)의 고압 용기(110) 내에 건조하고자 하는 줄기세포 배양액을 5mL 넣는다. 고압 용기(110)를 25°C의 온도와 250bar 압력을 유지하면서 -5°C로 과냉각된 액체 이산화탄소를 고압 펌프(125)를 통해 10mL/min의 유량으로 공급한다. 동시에 무수 에탄올을 고압 펌프(135)를 이용해 상온에서 0.475mL/min의 유량으로 공급한다. 공급되는 이산화탄소와 무수 에탄올의 혼합 용액은 25°C로 예열된 뒤 0.02" 내경의 노즐(모세관 튜브)을 통해 고압 용기(110) 내 줄기세포 배양액에 분사되어 작은 액적으로 쪼개어진다. 이산화탄소와 무수 에탄올의 혼합액은 단백질을 녹이고 있는 물을 조금씩 추출하여 제거한다. 160분간 액상 치환 단계를 거쳐 물을 완전히 제거하여 배양액에 녹아있던 물질을 결정화시킨 뒤에는 고압 용기(110)의 온도를 36°C로 상승시킴과 동시에 무수 에탄올의 공급을 중단하여 고압 용기(110) 내의 유체를 액체 이산화탄소로 교체한다. 45분간의 승온 시간 및 무수 에탄올의 제거 시간을 보낸 뒤 온도가 31°C보다 떨어지지 않도록 유지하면서 감압하여 초임계 이산화탄소를 기체 이산화탄소로 상전이 시켜 결정화된 물질을 건조한다.
- [48] 초임계 건조(Supercritical Drying, SCD)는 초임계 유체-액체, 초임계 유체-기체 간의 계면에는 표면 장력이 존재하지 않으므로 단백질의 미세구조 파괴를 방지하면서 건조할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 사용되는 줄기세포 배양액의 용매인 물의 임계온도가 374°C로 매우 높아서 물을 초임계 건조를 할 경우, 온도에 의한 단백질의 비활성화를 피할 수 없다. 따라서 임계 온도가 낮은 용매로 치환(displacement)을 하고 초임계 건조를 하는 것이 바람직하다. 단백질의 변성온도보다 낮은 임계 온도를 가지는 유체가 적합하며, CO₂가 물리화학적 성질, 가격, 독성 면에서 가장 적합하다. 그러나 초임계 건조 공정에서 CO₂만으로 물을 치환하기에는 서로 섞이지 않으므로 공용매를 이용해 물을 빠르게 치환할 수 있다. 공용매로 무수 에탄올(Ethyl alcohol anhydrous, EtOH)을 사용할 수 있다. 초임계 건조 공정은 CO₂와 EtOH의 혼합물이 물을 치환하여 배양액에 녹아있는 물질을 결정화하는 단계인 액상 단계(용매 치환 단계), EtOH의 제거 및 임계점 이상으로의 승온 또는 승압을 통한 초임계 상으로의 상전이가 일어나는 초임계 단계, 및 초임계 CO₂를 기화시키는 감압 단계를 포함할 수 있다. 감압 단계에서는 온도가 임계 온도 아래로 감소하지 않도록 주의하며 감압한다. 초임계 건조 공정은 동결 건조 공정에 비해서 공정

시간이 짧고 온화한 온도 조건에서 수행된다. 또, 초임계 건조 공정은 동결 건조와 달리 배양액을 얼릴 필요가 없기 때문에 물 분자의 결정화 과정에 수반되는 부피 팽창으로 인한 단백질의 미세구조 파괴도 방지할 수 있다.

[49]

[50] [실험예 및 분석예]

[51]

[52] 초임계 건조(SCD)을 이용하여 다양한 조건에서 줄기세포 배양액을 결정화 및 건조하였고 건조된 고형물을 분석하였다. 비교예로 동결 건조(FD)를 이용하여 줄기세포 배양액을 건조하였고 건조된 고형물을 분석하였다. 상기 동결 건조는 -80°C 의 온도와 5mTorr의 압력에서 수행되었다.

[53] 상기 건조된 고형물은 일정한 농도로 물에 녹여 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)를 이용하여 분석되었다. 특정 단백질의 구조 유지 정도를 측정하고 각 조건 별 결과를 비교하였다. 수율이 100%일 때의 질량 값을 57.5mg으로 하고 5mL 당 57.5mg이 녹아 있도록 각 공정에서 얻어진 건조물의 질량에 맞춰서 물을 넣어 녹여 ELISA 분석을 수행하였다. 해당 질량 값은 여러 차례의 오븐 건조를 통해 얻어진 건조물의 질량 평균값을 통해 얻었다. 오븐 건조는 60°C 이상의 고온에서 이루어지며, 증발 건조가 진행되면서 미세구조의 파괴도 수행된다. 따라서 이렇게 얻어진 건조물은 활성을 잃게 된다. 단, 해당 온도에서 배양액이 포함하는 유기물이 이산화탄소와 물 등으로 분해되지 않는 건조물의 질량 손실을 고려할 필요가 없으므로 오븐 건조에서 얻어진 건조물은 ELISA 분석 없이 다른 건조 공정의 수율 계산을 위해 질량만 측정되었다.

[54] 건조물의 질량에 비례하여 물에 녹이면 각 조건에서 얻어진 건조물을 같은 농도로 만들 수 있다. 같은 농도로 녹인 건조물에서 분석을 통해 얻은 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor) 농도 값은 100% 수율 기준에서 해당 조건의 공정 중에 손실이 나거나 구조 변형 등을 통해 비활성화가 된 VEGF를 제외한 구조를 유지하고 있는 VEGF의 농도이다. 구해진 VEGF 농도 값의 상대적인 수치를 통해 어떠한 공정 조건이 VEGF의 구조를 유지할 수 있는 최적 조건인지 판단할 수 있다. 이렇게 구한 각 공정에서의 VEGF 농도 값도 중요하지만 각 공정의 수율을 고려하여 얻어진 목표 단백질의 총량을 계산하는 것도 중요하다. 5mL 당 57.5mg이 녹아 있도록 건조물의 농도를 맞추었으므로 수율을 고려한 VEGF의 총량을 계산할 때는 ELISA 분석을 통해 얻어진 VEGF 농도 값에 건조물의 질량(mg)/(57.5mg/5mL)을 곱하여 계산할 수 있다.

[55] 이렇게 얻어진 단백질들이 상업적으로 이용될 때는 수분이 존재하는 환경에 노출되게 된다. 따라서 얻어진 건조물이 얼마나 단백질의 구조를 유지하고 있는가도 중요하지만 얼마나 수용액 상에서 오래 구조를 유지하는 가도 중요하다. ELISA 분석에 사용한 건조물 수용액을 4°C 에서 보관하고 2주 뒤에 다시 ELISA 분석을 하여 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 얻고 그 구조

유지율을 계산하였다.

$$[56] \quad 14\text{일 후의 VEGF 구조 유지율}(\%) = \frac{14\text{일 후의 VEGF 농도 (pg/mL)}}{\text{수용액 환경에 노출된 직후의 VEGF 농도 (pg/mL)}} \times 100(\%)$$

[57]

[58] [노즐 내경 변수에 따른 단백질 구조 유지 및 안정성 비교]

[59] 초임계 건조 공정에서 노즐 내경 조건(0.01"~0.02")만을 변화시켜가며 실험을 수행하였고, 실험 조건 및 결과를 표 1 내지 3과 도 2 내지 5에 나타내었다. 표 1은 초임계 건조 공정에서의 노즐 내경 변수 별 실험 결과를 나타내고, 표 2는 노즐 내경 변수 별 초임계 건조 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석 결과를 나타내며, 표 3은 CO₂/EtOH ratio 변수 별 초임계 건조 공정 건조물이 14일간 수용액에 노출되었을 때의 VEGF 구조 유지율(%)을 나타낸다.

[60] [표 1]

Sample	노즐 내경	온도 (°C)	압력 (bar)	CO ₂ 유량 (mL/min)	EtOH 유량 (mL/min)	CO ₂ /EtOH ratio(v/v, mL)	액상 단계 시간(min)	초임계상 단계 시간(min)	질량(mg)	
									수율(%)	
SCD1	0.01"	15	150	10	0.350	10/0.350	200	55	a	b
									9.8	10.4
									17.0	18.1
SCD2	0.02"	15	150	10	0.350	10/0.350	290	55	a	b
									44.1	45.2
									76.7	78.6
FD									a	b
									39.6	34.2
									68.9	59.5
Control									a	-
									57.5	-
									100	-

[62] [표 2]

Sample	0 Day				14 Days			
	VEGF 농도(pg/mL)		VEGF 총량(pg)		VEGF 농도(pg/mL)		VEGF 총량(pg)	
	a	b	a	b	a	b	a	b
SCD1	988	889	842	804	0	0	0	0
SCD2	719	714	2758	2806	556	592	2131	2327
FD	714	687	2457	2042	387	373	1331	1110
Control	a	-	a	-	a	-	a	-
	897		4484		799		3994	

[64] [표 3]

Sample	SCD1	SCD2	FD
VEGF 구조 유지율(%)	0	80.1	54.3

[66]

[67] 표 1 내지 3과 도 2 내지 5를 참조하면, VEGF의 농도는 노즐 내경이 작을수록 감소하는 것으로 나타났다. 노즐 내경이 작을수록 CO₂와 EtOH의 혼합 유체가 분사될 때 더 작은 액적을 형성하여 H₂O와 접촉하는 표면적이 증가하여 물질 전달 속도가 향상되어 용매를 치환하는 액상 단계의 시간을 줄일 수 있다.

0.01"내경 노즐을 이용할 경우 액적이 너무 작아져서 깨어지지 않고 에멀전(emulsion)이 형성되고, 이렇게 형성된 에멀전은 초임계 건조기를 빠져나갈 때까지 사라지지 않아서 상당수의 H₂O이 CO₂와 EtOH에 혼합되지 않은 상태로 단백질을 녹인 채 빠져나가기 때문에 수율이 떨어질 수 있다. 따라서 VEGF 총량에 대해서는 0.02"내경의 노즐이 유리하다.

[68] 0.01"내경의 노즐 조건에서 건조된 샘플은 수용액 상에서의 VEGF 구조를 유지하지 못하는 것으로 나타났다. 이것은 단백질에 가해지는 전단 응력의 차이에 의한 것으로 판단된다. 전단 응력은 연속 상의 유속에 비례하는데, 0.01"내경 노즐의 경우 0.02"내경 노즐보다 분사 순간의 유속이 4배이므로 전단 응력도 4배 높게 작용하게 된다. 이러한 0.01"내경 노즐 환경에 노출되어서 VEGF의 구조가 상당히 손상이 진행된 상태로 건조될 수 있다. 0.02"내경 노즐을 이용한 초임계 건조의 경우에는 상당히 높은 구조 유지율을 보인다. 동결 건조 공정의 건조물은 수용액 상에서의 구조 유지율이 현저히 떨어져서 14일 후에는 초임계 건조 공정의 건조물보다 VEGF 총량이 크게 감소한다.

[69] VEGF 총량과 구조 유지율에서 더 유리한 0.02"내경의 노즐을 이용하여 이후 초임계 건조 공정에서의 실험들을 수행하였다.

[70]

[71] [CO₂ 유량 + EtOH 유량에 따른 단백질 구조 유지 및 안정성 비교]

[72] 초임계 건조 공정에서 CO₂ 유량과 EtOH 유량의 합(10.350, 15.525, 20.700, 25.875mL/min)만을 변화시켜가며 실험을 수행하였고, 실험 조건 및 결과를 표 4 내지 6과 도 6 내지 9에 나타내었다. 표 4는 초임계 건조 공정에서의 총 유량(CO₂ + EtOH) 별 실험 결과를 나타내고, 표 5는 총 유량(CO₂ + EtOH) 별 초임계 건조 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석 결과를 나타내며, 표 6은 총 유량(CO₂ + EtOH) 별 초임계 건조 공정 건조물이 14일간 수용액에 노출되었을 때의 VEGF 구조 유지율(%)을 나타낸다.

[73] [표 4]

[74]

Sample	노즐 내경	온도 (℃)	압력 (bar)	CO ₂ 유량 (mL/min)	EtOH 유량 (mL/min)	CO ₂ /EtOH ratio(v/v, mL)	액상 단계 시간(min)	초임계상 단계 시간(min)	질량(mg)	
									수율(%)	
SCD2	0.02"	15	150	10	0.350	10/0.350	290	55	a	b
SCD3				15	0.525		150		a	b
SCD4				20	0.700		100		a	b
SCD5				25	0.875		70		a	b
FD	-								a	b
Control	-								a	-

[75]

[표 5]

[76]

Sample	0 Day				14 Days			
	VEGF 농도(pg/mL)		VEGF 총량(pg)		VEGF 농도(pg/mL)		VEGF 총량(pg)	
SCD2	a	b	a	b	a	b	a	b
	719	714	2758	2806	556	592	2131	2327
SCD3	a	b	a	b	a	b	a	b
	759	762	2177	2029	554	677	1591	1801
SCD4	a	b	a	b	a	b	a	b
	690	734	1440	1424	632	604	1319	1171
SCD5	a	b	a	b	a	b	a	b
	758	722	996	1048	528	614	693	892
FD	a	b	a	b	a	b	a	b
	714	687	2457	2042	387	373	1331	1110
Control	a	-	a	-	a	-	a	-
	897	-	4484	-	799	-	3994	-

[77]

[표 6]

[78]

Sample	SCD2	SCD3	SCD4	SCD5	FD
VEGF 구조 유지율(%)	80.1	80.9	86.8	77.2	54.3

[79]

[80]

표 4 내지 6과 도 6 내지 9를 참조하면, VEGF의 농도는 총 유량에 관계없이 비슷한 값으로 나타났다. 이는 CO₂의 온도, 압력 조건에서의 차이가 없어서 단백질이 노출된 산성 환경에 차이가 없기 때문이다. 그러나, 수율은 총 유량이 증가할수록 감소한다. 총 유량이 증가하면 노즐에서 유체가 분사될 때 발생하는

제트 기류(jet stream)에 의해 CO₂ + EtOH 혼합 유체에 섞이지 않은 미세한 H₂O 액적이 발생하게 되는데 이 액적에는 단백질이 녹아 있다. 액적은 유체의 흐름에 따라 올라가게 되는데 총 유량이 많을수록 유속이 증가하게 되고, 유속이 증가하면 미세한 H₂O 액적이 단백질을 상당히 녹인 상태로 초임계 건조기를 빠져나가기 때문에 수율이 급감하게 된다. 따라서 VEGF 총량에 대해서는 낮은 유량이 유리하다.

[81] 총 유량의 차이는 건조된 샘플의 수용액 상에서의 VEGF 구조를 유지하는 정도에는 크게 영향을 주지 못한다. 총 유량이 20.700mL/min일 때의 구조 유지율이 가장 높게 나오지만 다른 조건과 크게 차이 나지 않으며, 수율에서 10.350mL/min에 비해 불리하기 때문에 낮은 유량 조건이 바람직하다. 동결 건조 공정의 건조물은 수용액 상에서의 구조 유지율이 현저히 떨어져서 14일 후에는 초임계 건조 공정의 건조물보다 VEGF 총량이 크게 감소한다.

[82] 이후 초임계 건조 공정 실험들은 VEGF 총량에서 더 유리한 10.350 mL/min의 총 유량으로 수행하였다.

[83]

[84] [온도에 따른 단백질 구조 유지 및 안정성 비교]

[85] 초임계 건조 공정에서 온도(10, 15, 20, 25°C)만을 변화시켜가며 실험을 수행하였고, 실험 조건 및 결과를 표 7 내지 9와 도 10 내지 13에 나타내었다. 표 7은 초임계 건조 공정에서의 온도 변수 별 실험 결과를 나타내고, 표 8은 온도 조건 별 초임계 건조 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석 결과를 나타내며, 표 9는 온도 변수 별 초임계 건조 공정 건조물이 14일간 수용액에 노출되었을 때의 VEGF 구조 유지율(%)을 나타낸다.

[86] [표 7]

[87]

Sample	노즐 내경	온도 (℃)	압력 (bar)	CO ₂ 유량 (mL/min)	EtOH 유량 (mL/min)	CO ₂ /EtOH ratio(v/v, mL)	액상 단계 시간(min)	초임계상 단계 시간(min)	질량(mg)	
									수율(%)	
SCD6	0.02"	10	150	10	0.350	10/0.350	360	60	a	-
		47.3								
		82.3								
SCD7		15					290	55	a	b
		44.9							51.2	
		78.1							89.0	
SCD8		20					270	50	a	b
		51.0							47.9	
		88.7							83.3	
SCD9		25					255	45	a	b
		46.1							49.9	
		80.2							86.8	
FD	-								a	b
									33.7	44.2
									58.6	76.9
Control	-								a	-
									57.5	
									100	

[88] [표 8]

[89]

Sample	0 Day				14 Days			
	VEGF 농도(pg/mL)		VEGF 총량(pg)		VEGF 농도(pg/mL)		VEGF 총량(pg)	
SCD6	a	-	a	-	a	-	a	-
	849		3493		597		2456	
SCD7	a	b	a	b	a	b	a	b
	857	812	3345	3614	567	578	2213	2572
SCD8	a	b	a	b	a	b	a	b
	843	833	3740	3470	577	560	2558	2333
SCD9	a	b	a	b	a	b	a	b
	914	876	3664	3799	614	622	2460	2697
FD	a	b	a	b	a	b	a	b
	870	1017	2686	3511	263	343	813	1185
Control	a	-	a	-	a	-	a	-
	1022		6223		511		2554	

[90]

[표 9]

[91]

Sample	SCD6	SCD7	SCD8	SCD9	FD
VEGF 구조 유지율(%)	70.3	68.6	67.8	69.0	32.1

[92]

[93]

표 7 내지 9와 도 10 내지 13을 참조하면, VEGF의 농도는 온도에 크게 영향 받지 않는 것으로 나타났다. 이는 온도가 높을수록 액상 단계에서 CO₂의 H₂O에 대한 용해도가 증가하여 낮은 pH의 산성 환경에 단백질이 노출되지만 온도가 높음으로써 빠른 치환이 진행되어 노출 시간 자체가 감소하는 상반되는 영향이 서로 상쇄되기 때문이다. 25°C일 때 가장 높은 농도 수치를 보였다. 수율에 있어서도 온도 조건 별로 크게 다른 결과가 나오지는 않았다. 이는 제트 기류에 의한 미세 H₂O 액적 형성에 영향을 주는 유량 조건이 변하지 않았기 때문에 수율이 비슷한 것으로 판단된다. VEGF의 총량은 25°C일 때 미세하지만 높게 나왔다.

[94]

온도의 차이는 건조된 샘플의 수용액 상에서의 VEGF 구조를 유지율에도 크게 영향을 주지 못한다. 전술한 바와 같이, 온도가 높을수록 액상 단계에서 CO₂의 H₂O에 대한 용해도가 증가하여 낮은 pH의 산성 환경에 단백질이 노출되지만 온도가 높음으로써 빠른 치환이 진행되어 노출 시간 자체가 감소하는 상반되는 영향이 서로 상쇄되기 때문이다. 동결 건조 공정의 건조물은 수용액 상에서의 구조 유지율이 현저히 떨어져서 14일 후에는 초임계 건조 공정의 건조물보다 VEGF 총량이 크게 감소한다.

[95]

이후 초임계 건조 공정 실험들은 VEGF 총량에서 미세하게 더 높게

관찰되었으며, 상온에 가까워 에너지 소모 측면에서 유리한 25°C의 온도 조건으로 수행하였다.

[96]

[97] [압력에 따른 단백질 구조 유지 및 안정성 비교]

[98] 초임계 건조 공정에서 압력(100, 150, 200, 250bar)만을 변화시켜가며 실험을 수행하였고, 실험 조건 및 결과를 표 10 내지 12와 도 14 내지 17에 나타내었다. 표 10은 초임계 건조 공정에서의 압력 변수 별 실험 결과를 나타내고, 표 11은 압력 조건 별 초임계 건조 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석 결과를 나타내며, 표 12는 압력 변수 별 초임계 건조 공정 건조물이 14일간 수용액에 노출되었을 때의 VEGF 구조 유지율(%)을 나타낸다.

[99]

[표 10]

[100]

Sample	노즐 내경	온도 (°C)	압력 (bar)	CO ₂ 유량 (mL/min)	EtOH 유량 (mL/min)	CO ₂ /EtOH ratio(v/v, mL)	액상 단계 시간(min)	초임계상 단계 시간(min)	질량(mg)		
									수율(%)		
SCD10	0.02"	25	100	10	0.350	10/0.350	255	45	a	b	-
									52.3	49.3	
									91.0	85.7	
									a	b	
SCD11			150						50.2	48.3	-
									87.3	84.0	
									a	b	
									48.9	47.6	
SCD12			200						85.0	82.8	86.3
									a	b	-
SCD13			250						48.7	50.9	
									84.7	88.5	
									a	b	
									33.7	44.2	
FD									58.6	76.9	
									a		-
Control									57.5		
									100		

[101]

[표 11]

[102]

Sample	0 Day						14 Days					
	VEGF 농도(pg/mL)			VEGF 총량(pg)			VEGF 농도(pg/mL)			VEGF 총량(pg)		
SCD10	a	b	-	a	b	-	a	b	-	a	b	-
	735	676		3342	2898		578	582		2628	2493	
SCD11	a	b	-	a	b	-	a	b	-	a	b	-
	746	840		3256	3529		594	652		2592	2740	
SCD12	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
	798	800	725	3393	3311	3126	661	704	595	2811	2915	2567
SCD13	a	b	-	a	b	-	a	b	-	a	b	-
	790	803		3344	3554		629	631		2665	2795	
FD	a	b	-	a	b	-	a	b	-	a	b	-
	798	803		2339	3087		402	482		1179	1851	
Control	a	-	-	a	-	-	a	-	-	a	-	-
	1075			5373			805			4024		

[103]

[표 12]

[104]

Sample	SCD10	SCD11	SCD12	SCD13	FD
VEGF 구조 유지율(%)	82.2	78.6	84.4	79.2	55.2

[105]

[106]

표 10 내지 12와 도 14 내지 17을 참조하면, VEGF의 농도는 100bar 일 때를 제외하고는 압력에 크게 영향받지는 않는 것으로 나타났다. 100bar에서 다른 압력 조건보다 약간 낮은 VEGF 농도를 보이는 이유는 초임계 상에 도달하기 위해서는 임계 온도와 임계 압력보다 높은 온도, 압력 조건이 주어져야 하는데, 해당 CO₂와 EtOH의 혼합물 조건에서 혼합물 임계 압력은 100 bar보다 높기 때문이다. 즉, 초임계 상 단계에서의 압력이 충분하게 주어지지 않았기 때문에 감압 시에 초임계 건조가 제대로 이루어지지 않았을 것으로 판단된다. 이는 VEGF의 구조 유지에 악영향을 줄 수 있다. 수율은 압력 조건에 크게 영향을 받지 않았다. 이는 제트 기류에 의한 미세 H₂O 액적 형성에 영향을 주는 유량 조건이 변하지 않았기 때문에 수율이 비슷한 것으로 판단된다. VEGF의 총량은 100bar일 때를 제외하고는 나머지 압력 조건에 대해서는 비슷하게 나왔다.

[107]

건조된 샘플의 수용액 상에서의 VEGF 구조 유지율은 압력에 크게 영향을 받지 않는다. 초임계 건조 공정에서는 물과 에탄올 혼합물의 지속적인 전달로 인해 단백질이 장기간 전단 응력에 노출된다. 따라서 한 번에 단백질의 구조를 비가역적으로 변형시킬 정도의 전단 응력이 아니더라도 손상을 조금씩 시킬 수 있는 정도의 전단 응력 이상으로만 올라가면 구조 손상이 진행하게 된다. 0.01"내경의 노즐 실험에서는 전단 응력 값이 그 이상으로 올라가서 손상이 진행할 수 있지만 250bar 이하의 0.02"내경 노즐 실험에서는 그 정도의 전단 응력이 발생하지는 않는다. 동결 건조 공정의 건조물은 수용액 상에서의 구조 유지율이 현저히 떨어져서 14일 후에는 초임계 건조 공정의 건조물보다 VEGF 총량이 크게 감소한다. 아무런 건조 공정을 거치지 않은 샘플(Control)보다도 초임계 건조를 통한 건조물이 높은 VEGF 구조 유지율을 나타내는데 이는 배양액 내 단백질의 가수 분해 속도를 촉진할 가능성이 있는 첨가물의 유무가 영향을 주었을 것으로 판단된다.

[108]

150, 200, 250bar 조건의 실험 결과가 상당히 유사하여 이후 초임계 건조 공정 실험들은 실험 오차 범위가 더 좁은 250bar 조건으로 수행하였다.

[109]

[110]

[CO₂/EtOH ratio에 따른 단백질 구조 유지 및 안정성 비교]

[111]

초임계 건조 공정에서 CO₂/EtOH ratio(10/0.225, 10/0.350, 10/0.475 mL/mL)만을 변화시켜가며 실험을 수행하였고, 실험 조건 및 결과를 표 13 내지 15와 도 18 내지 21에 나타내었다. 표 13은 초임계 건조 공정에서의 CO₂/EtOH ratio 변수 별 실험 결과를 나타내고, 표 14는 CO₂/EtOH ratio 조건 별 초임계 건조 공정

건조물의 시간에 따른 ELISA 분석 결과를 나타내며, 표 15는 CO₂/EtOH ratio 변수별 초임계 건조 공정 건조물이 14일간 수용액에 노출되었을 때의 VEGF 구조 유지율(%)을 나타낸다.

[112] [표 13]

[113]

Sample	노즐 내경	온도 (℃)	압력 (bar)	CO ₂ 유량 (mL/min)	EtOH 유량 (mL/min)	CO ₂ /EtOH ratio(v/v, mL)	액상 단계 시간(min)	초임계상 단계 시간(min)	질량(mg)		잔류 용매 (ppm)
									수율(%)		
SCD14	0.02"	25	250	10	0.225	10/0.225	435	45	a	b	-
					45.2	47.2					
					78.6	82.1					
SCD15					0.350	10/0.350	255		a	b	-
					51.8	48.4					
					90.1	84.2					
SCD16					0.475	10/0.475	160		a	b	1.62
					51.7	49.3					
					89.9	85.7					
FD	-								a	b	-
									45.2	39.5	
									78.6	68.7	
Control	-								a		-
									57.5		
									100		

[114] [표 14]

[115]

Sample	0 Day				14 Days			
	VEGF 농도(pg/mL)		VEGF 총량(pg)		VEGF 농도(pg/mL)		VEGF 총량(pg)	
SCD14	a	b	a	b	a	b	a	b
	657	681	2583	2797	603	664	2370	2725
SCD15	a	b	a	b	a	b	a	b
	728	673	3279	2833	713	661	3210	2782
SCD16	a	b	a	b	a	b	a	b
	728	706	3275	3026	580	694	2610	2976
FD	a	b	a	b	a	b	a	b
	749	732	2944	2515	432	412	1697	1415
Control	a	-	a	-	a	-	a	-
	867	-	4333	-	677	-	3383	-

[116] [표 15]

[117]

Sample	SCD14	SCD15	SCD16	FD
VEGF 구조 유지율(%)	94.6	98.0	88.9	57.0

[118]

[119] 표 13 내지 15와 도 18 내지 21을 참조하면, VEGF의 농도는 EtOH 비율이 증가할수록 미세하게 증가하지만 큰 차이를 나타내지 않는다. 이것은 공정 온도, 압력이 각 조건 실험에서 동일하기 때문에 H₂O에 포화되는 CO₂의 양도 동일하여 같은 pH의 환경을 조성하지만 EtOH 비율이 증가할수록 H₂O의 치환 속도가 빨라져

액상 단계의 시간이 감소하기 때문이다. 수율의 경우, 10mL/0.225mL ratio 조건에서 다른 조건보다 약간 낮게 나오긴 했지만 전체적으로 80 ~ 90%의 수율을 보인다.

[120] EtOH 비율이 증가할수록 초임계 건조기 내부에서 건조물을 회수할 때 건조물이 회수되는 최대 높이가 점점 높아져서 10mL/0.475mL ratio 조건에서는 거의 건조기 최상단까지 올라가는 것을 확인할 수 있다. 이것보다 EtOH 비율이 높아지면 단백질의 손실이 일어날 수 있다. 배양액 수면 위로 CO₂와 EtOH의 연속 상이 흐르게 되는데 이때 CO₂와 EtOH의 밀도차이 때문에 높이에 따른 EtOH의 농도 구배가 형성된다. H₂O와 EtOH의 인력이 CO₂와 EtOH의 인력보다 높기에 배양액 근처에서는 높이가 올라갈수록 EtOH 농도가 감소하는 쪽으로 농도구배가 형성된다. CO₂ + EtOH + H₂O의 삼성분계에서 EtOH가 감소하면 단일 상에 포함될 수 있는 H₂O의 양이 줄어들기 때문에 섞여있던 일부 H₂O이 미세한 액적으로 분리되게 된다. EtOH가 CO₂보다 가볍기 때문에 배양액 수면에서 일정이상 떨어지면 H₂O와의 인력에 영향을 받지 않아서 높이가 올라갈수록 EtOH의 농도가 증가하는 쪽으로 농도 구배가 형성된다. 따라서 EtOH의 농도 구배가 밀도에 영향을 받기 시작하는 지점까지 미세 H₂O 액적이 형성되어 분산 상태로 존재하게 되는데, EtOH 비율이 증가할수록 해당 지점이 건조기 내의 더 높은 위치에서 형성되게 된다. 이렇게 형성된 H₂O 액적은 시간이 지남에 따라 결국은 CO₂ + EtOH 혼합 유체에 의해 추출이 되고 H₂O 액적에 녹아있던 단백질 입자들이 석출되어 건조기 벽면에 붙는다. EtOH 비율이 너무 높아지면 CO₂ + EtOH + H₂O의 단일 상이 형성되어 수율 손상이 커질 수 있다. 따라서 10mL/0.475 mL가 H₂O가 완전히 치환되기 전에 단일 상이 형성되어 단백질을 손실하는 결과를 방지할 수 있는 최대 CO₂/EtOH ratio 값으로 판단된다. VEGF의 총량은 VEGF의 농도와 동일하게 10mL/0.475mL의 CO₂/EtOH ratio 조건에서 가장 좋은 결과를 나타낸다.

[121] 건조된 샘플의 수용액 상에서의 VEGF 구조 유지율은 CO₂/EtOH 비율이 10/0.350일 때 가장 높고 증가하거나 감소할 때 다시 약간 감소하지만 10/0.475일 때의 샘플 중 하나는 구조 유지율이 98.3%인 것에 반해 하나는 79.7%를 보여 큰 차이를 나타낸다. CO₂의 온도, 압력, 총 유량 조건이 일정하여 단백질에 가해지는 스트레스는 비슷하기 때문에 구조 유지율이 낮은 샘플을 제외하고 EtOH의 비율에 영향을 받지 않는다. 동결 건조 공정의 건조물은 수용액 상에서의 구조 유지율이 현저히 떨어져서 14일 후에는 초임계 건조 공정의 건조물보다 VEGF 총량이 크게 감소한다. 아무런 건조 공정을 거치지 않은 샘플(Control)보다도 초임계 건조를 통한 건조물이 높은 VEGF 구조 유지율을 나타내는데, 이는 배양액 내 단백질의 가수 분해 속도를 촉진할 가능성이 있는 첨가물의 유무가 영향을 주었을 것으로 판단된다.

[122] 일련의 실험 결과를 통해 초임계 건조 공정에서의 최적 CO₂/EtOH 비율은 공정 시간을 절약할 수 있는 10mL/min/0.475mL/min으로 나타난다.

- [123] 최적 조건에 대하여 샘플에 포함된 잔류 용매가 인체에 해가 되는 수준인지 판단하기 위해서 기체 크로마토그래피를 통해 그 양을 측정하였다. FDA에 의하면 EtOH의 섭취 제한량은 16,670ppm인데, 측정 결과는 1.62 ppm으로 인체에 해가 되지 않는다.
- [124]
- [125] 도 22는 각 공정의 최적 조건에서 얻어진 건조물의 성장 인자 어레이(Growth Factor Array)를 이용한 성장 인자의 발현 패턴을 나타낸다.
- [126] 도 22를 참조하면, 초임계 건조(SCD)와 동결 건조(FD) 모두에 대해서 40가지의 성장 인자들이 제대로 발현되는 것으로 나타났다.
- [127]
- [128] 초임계 건조 공정의 경우, 0.02"내경의 노즐을 이용하여 25°C, 250bar, 10mL/min의 CO₂ 유량, 0.475mL/min의 EtOH 유량 조건으로 액상 단계 160분, 온도 상승을 포함한 초임계 단계 45분 동안 건조를 수행하였을 때 초기 VEGF의 구조 유지율과 총량, 그리고 14일간의 수용액 환경에 노출되었을 시의 VEGF의 구조 유지율과 총량에 있어서 가장 우수한 결과를 보인다.
- [129] 초임계 건조 공정을 통해 얻은 VEGF는 동결 건조 공정을 통해 얻은 VEGF에 비해 14일간 수용액 환경에 노출되더라도 상대적으로 더 높은 구조 유지율을 보인다. 시간이 지날수록 VEGF 총량에 있어서 동결 건조보다 초임계 건조가 더 유리하다. 따라서 초임계 건조 공정을 통해 단백질을 건조하는 것이 동결 건조 공정을 이용하는 것보다 단백질의 손상을 억제할 수 있다.
- [130]
- [131] 이제까지 본 발명에 대한 구체적인 실시예들을 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

산업상 이용가능성

- [132] 본 발명의 실시예들에 따른 배양액의 결정화 및 초임계 건조는 배양액에 녹아있는 타겟 물질(건조물)의 구조 안정성 및 활성이 변성되는 것을 방지하면서 배양액을 건조할 수 있다. 상기 타겟 물질은 결정화되고 건조될 수 있다. 예를 들어, 상기 결정화 및 초임계 건조는 단백질 등 온도에 민감하고 미세구조를 유지하여야 하는 세포나 단백질을 결정화하고 건조하는데 사용될 수 있다. 상기 결정화 및 초임계 건조는 에너지 등의 공정 비용이나 공정 시간에 있어서 동결 건조보다 우수하다. 상기 결정화 및 초임계 건조에 의해 대량 생산이 가능하다.

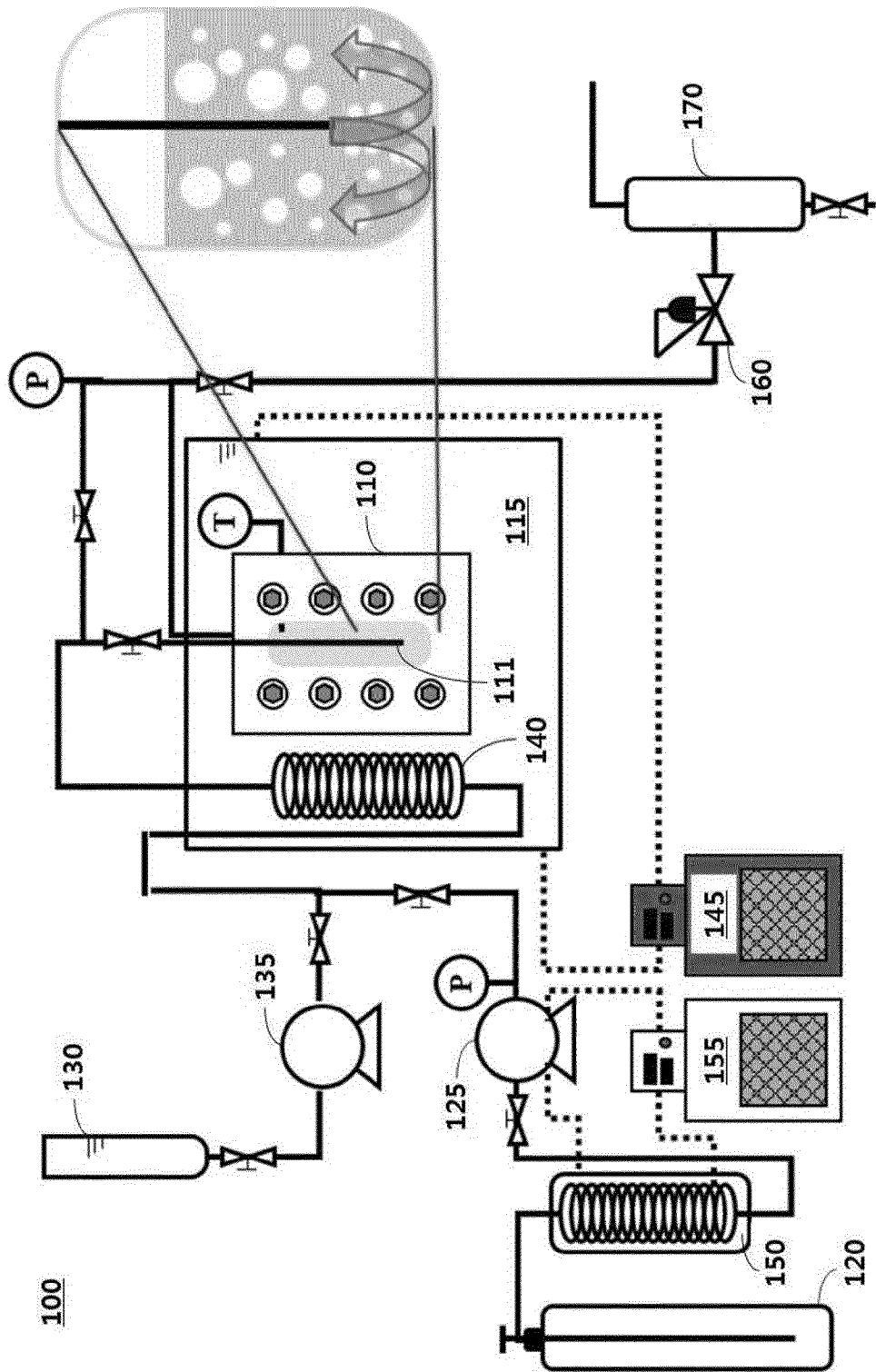
청구범위

- [청구항 1] 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 건조하여 상기 타겟 물질을 획득하기 위한 방법으로서, 상기 배양액에서 상기 제1 용매를 제2 용매로 치환하여 상기 타겟 물질을 결정화하는 단계; 및 상기 제2 용매를 초임계 상으로 상전이 시키는 단계를 포함하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 용매 치환 단계는 상기 배양액에서 상기 제1 용매를 상기 제2 용매와 제3 용매로 치환하는 단계를 포함하고, 상기 상전이 단계는 상기 제3 용매를 제거하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서, 상기 제2 용매는 상기 타겟 물질의 변성 온도보다 낮은 임계 온도를 갖는 것을 특징으로 하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법.
- [청구항 4] 제 2 항에 있어서, 상기 제3 용매는 상기 제1 용매 및 상기 제2 용매와 섞이는 것을 특징으로 하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법.
- [청구항 5] 제 2 항에 있어서, 상기 제1 용매는 물을 포함하고, 상기 제2 용매는 이산화탄소 및 아산화질소 중에서 적어도 하나를 포함하고, 상기 제3 용매는 에탄올, 아세톤, 노말 메틸 피롤리돈((N-methyl-2-pyrrolidone, NMP), 및 디메틸 설펡사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO) 중에서 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 타겟 물질은 상기 초임계 건조 후에 구조 안정성을 유지하는 것을 특징으로 하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 타겟 물질은 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서, 상기 타겟 물질은 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 초임계 상의 상기 제2 용매를 기화시키는 단계를 더 포함하는,

- 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서,
상기 배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법은,
0 ~ 40°C의 온도와 35 ~ 500bar의 압력에서 수행되는 것을 특징으로 하는,
배양액의 결정화 및 초임계 건조 방법.
- [청구항 11] 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을
건조하여 상기 타겟 물질을 획득하기 위한 장치로서,
상기 배양액을 수용하는 고압 용기;
상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제2 용매를 공급하는 제1
공급부;
상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제3 용매를 공급하는 제2
공급부;
상기 제1 공급부에 인접하게 배치되어 상기 제1 공급부에서 배출되는
상기 제2 용매를 예냉하는 예냉기; 및
상기 고압 용기에 인접하게 배치되어 상기 고압 용기에 공급되는 상기
제2 용매 및 상기 제3 용매를 예열하는 예열기를 포함하는, 배양액의
결정화 및 초임계 건조 장치.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 고압 용기 내에 배치되고, 상기 제2 용매 및 상기 제3 용매를 상기
고압 용기 내로 이송시키는 모세관 튜브를 더 포함하는, 배양액의 결정화
및 초임계 건조 장치.
- [청구항 13] 제 11 항에 있어서,
상기 고압 용기 및 상기 예열기를 수용하는 수조를 더 포함하는, 배양액의
결정화 및 초임계 건조 장치.
- [청구항 14] 제 11 항에 있어서,
상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에서 배출되는 유체를
분리하는 기액 분리기를 더 포함하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조
장치.
- [청구항 15] 제 11 항에 있어서,
상기 고압 용기 및 상기 기액 분리기 사이에 배치되어 상기 고압 용기의
백프레셔를 조절하는 백프레셔 조절기를 더 포함하는, 배양액의 결정화
및 초임계 건조 장치.
- [청구항 16] 제 11 항에 있어서,
상기 제2 용매는 상기 타겟 물질의 변성 온도보다 낮은 임계 온도를 갖는
것을 특징으로 하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치.
- [청구항 17] 제 11 항에 있어서,
상기 제3 용매는 상기 제1 용매 및 상기 제2 용매와 섞이는 것을 특징으로
하는, 배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치.

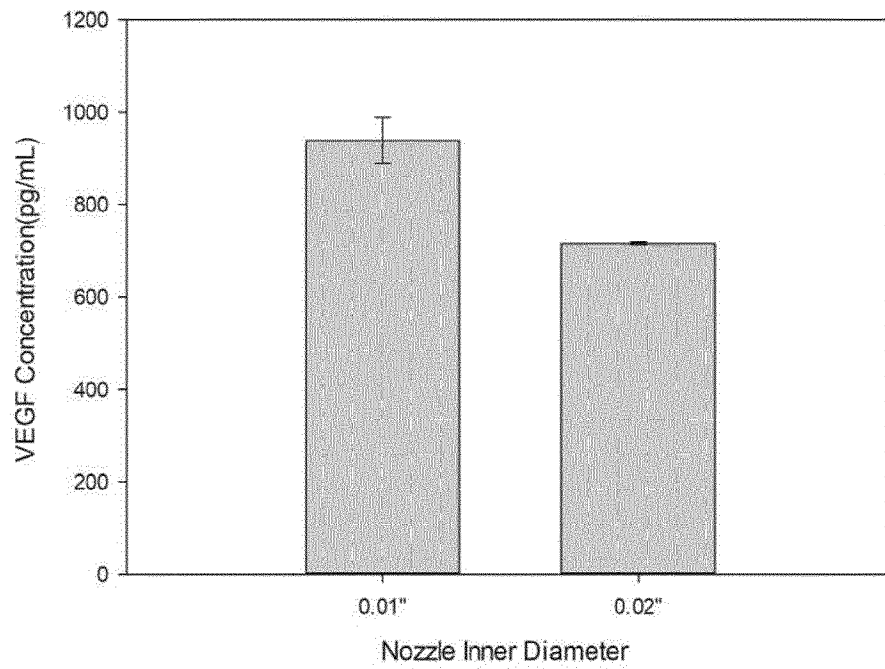
[청구항 18] 제 11 항에 있어서,
상기 제1 용매는 물을 포함하고,
상기 제2 용매는 이산화탄소 및 아산화질소 중에서 적어도 하나를
포함하고,
상기 제3 용매는 에탄올, 아세톤, 노말 메틸
피롤리돈((N-methyl-2-pyrrolidone, NMP), 및 디메틸 설펍사이드(Dimethyl
sulfoxide, DMSO) 중에서 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는,
배양액의 결정화 및 초임계 건조 장치.

[도1]



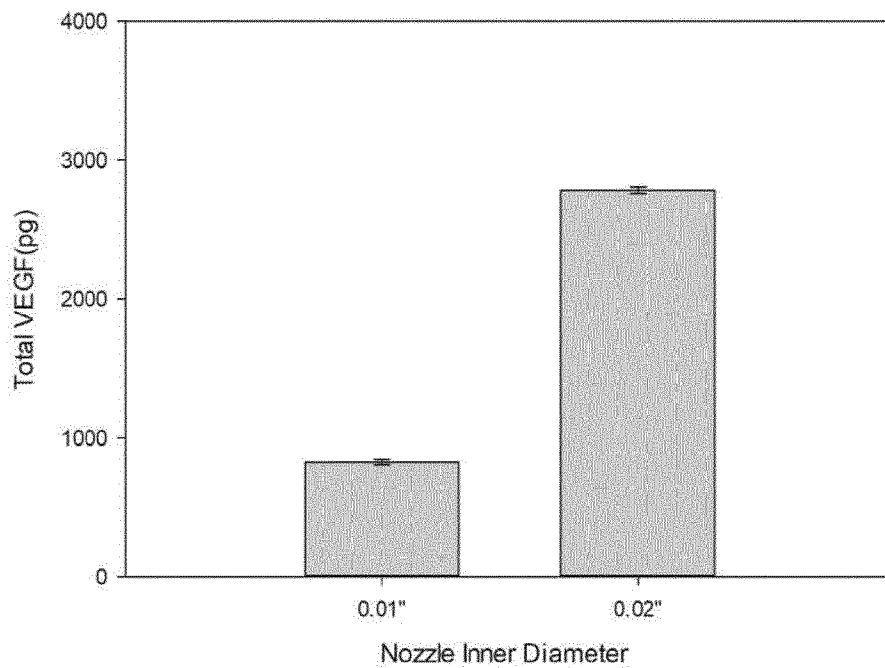
[도2]

SCD, Nozzle Inner Diameter Effect
Concentration of Structure Preserved VEGF

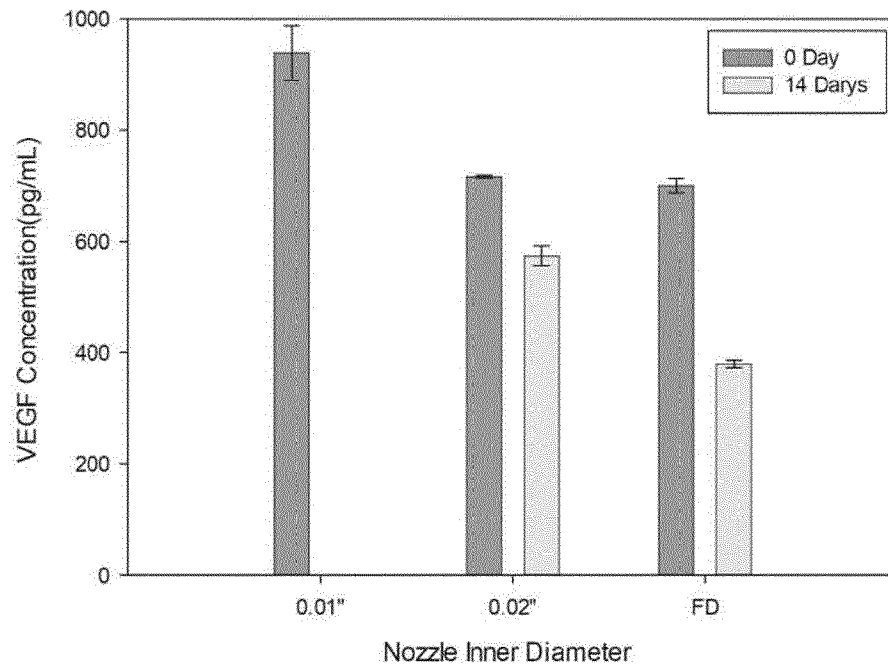


[도3]

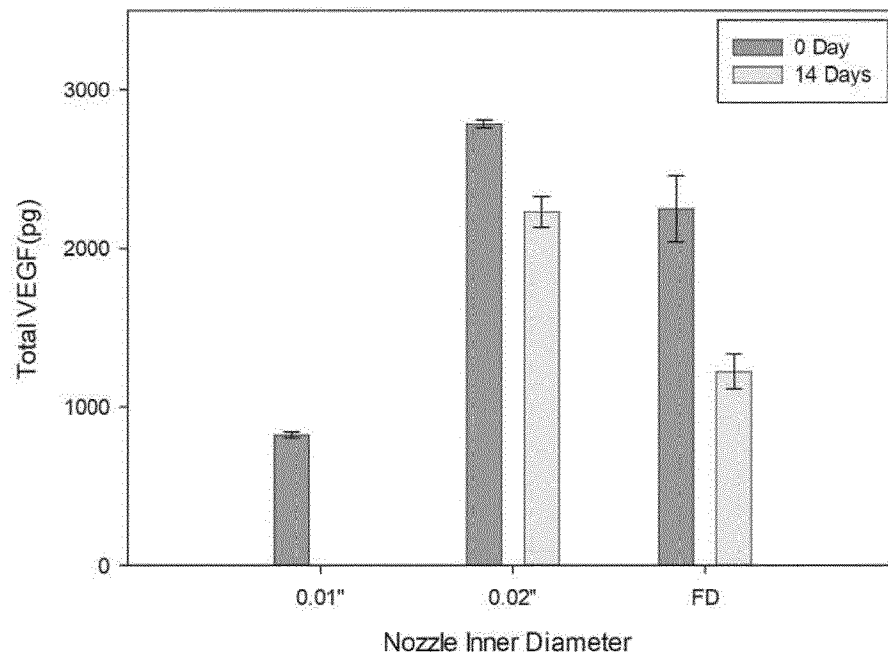
SCD, Nozzle Inner Diameter Effect
Total Amount of Structure Preserved VEGF



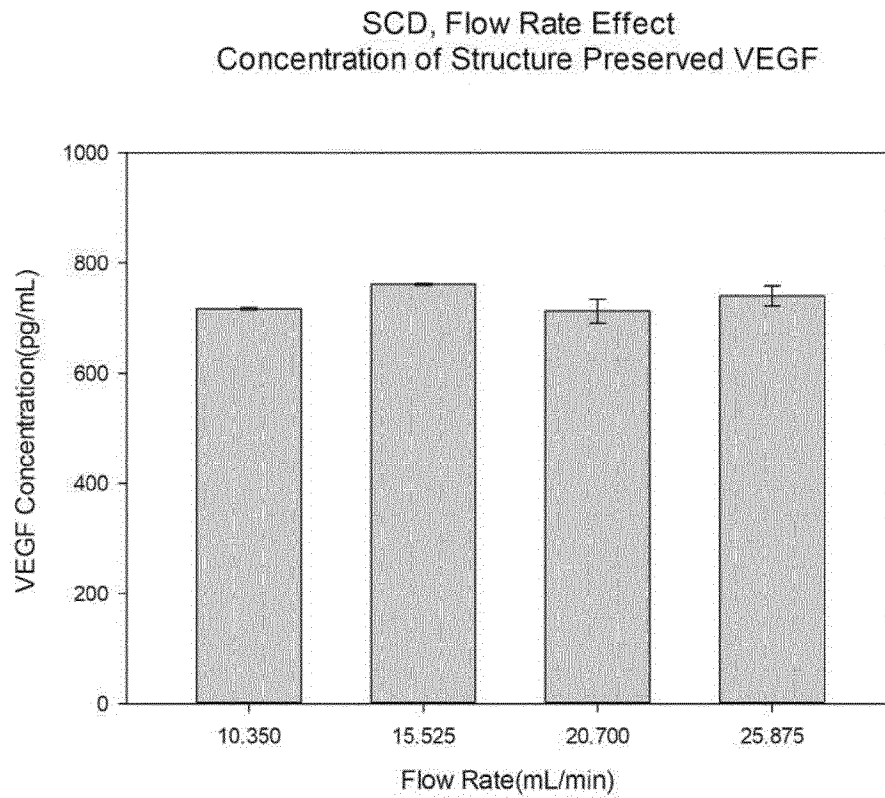
[도4]

SCD, Nozzle Inner Diameter Effect - Stability Test
Concentration of Structure Preserved VEGF

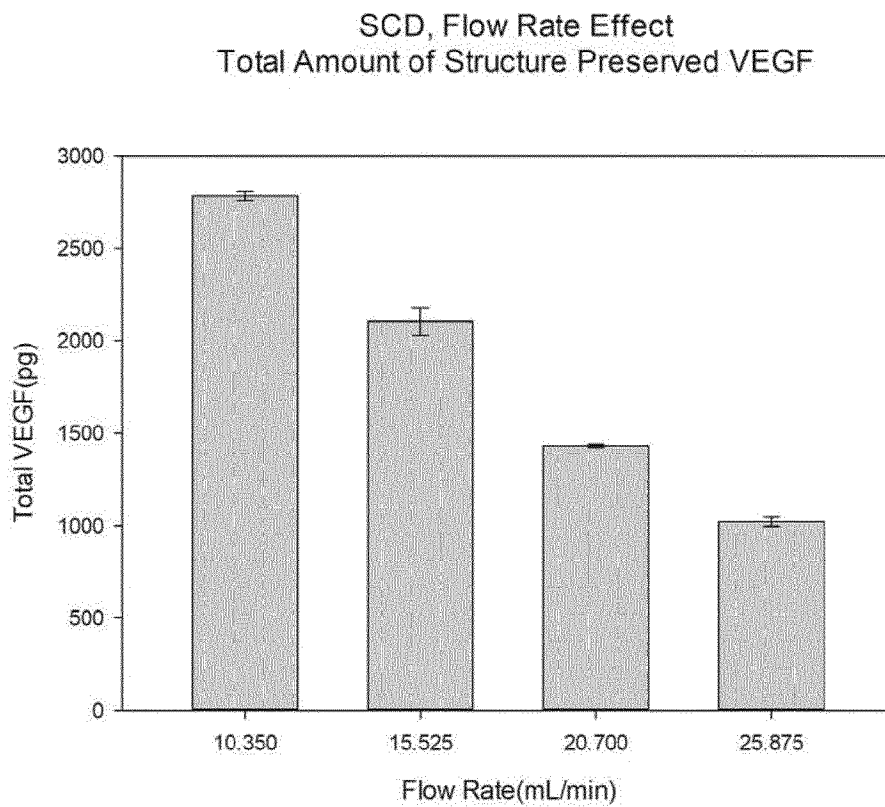
[도5]

SCD, Nozzle Inner Diameter Effect - Stability Test
Total Amount of Structure Preserved VEGF

[도6]

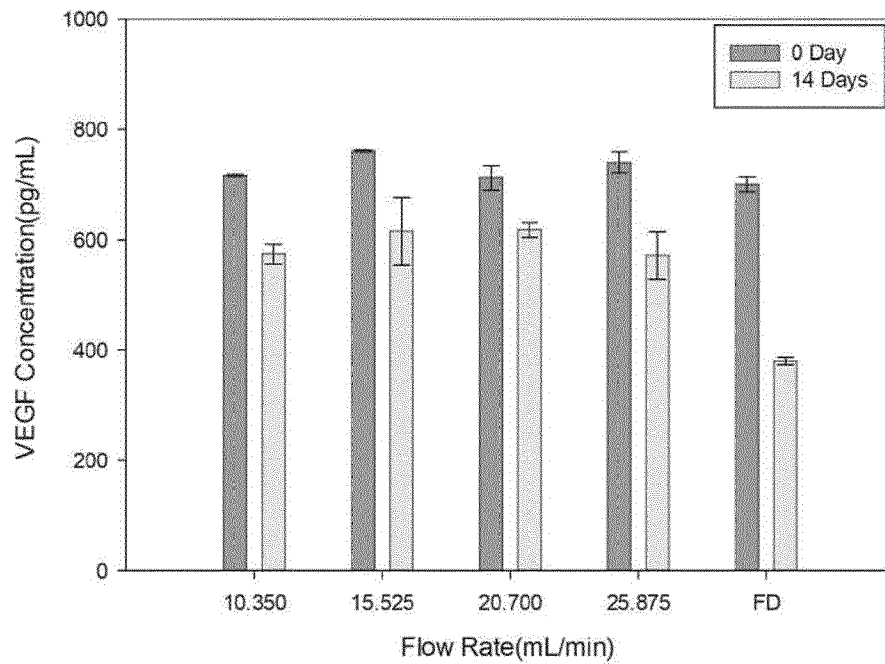


[도7]



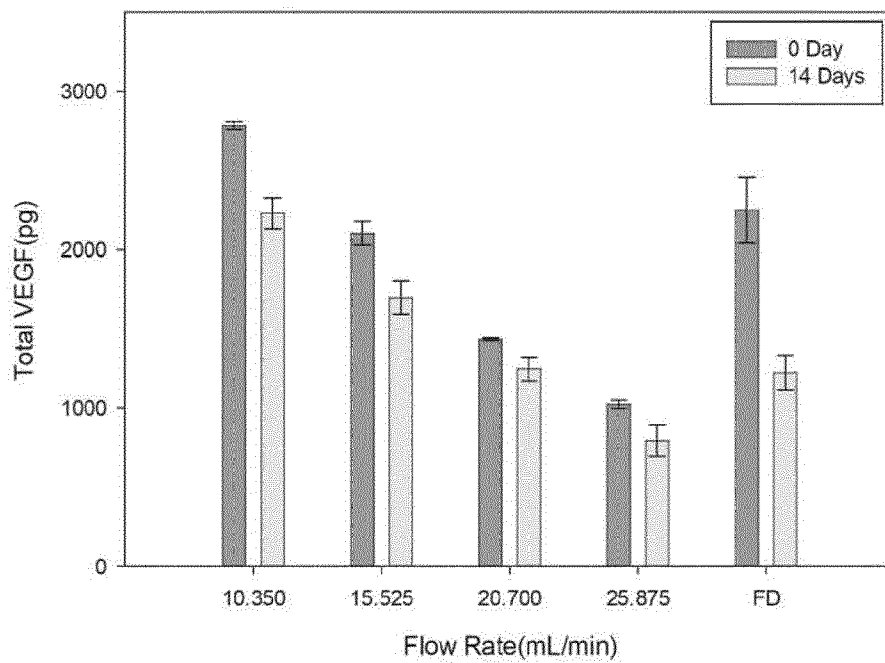
[도8]

SCD, Flow Rate Effect - Stability Test
Concentration of Structure Preserved VEGF



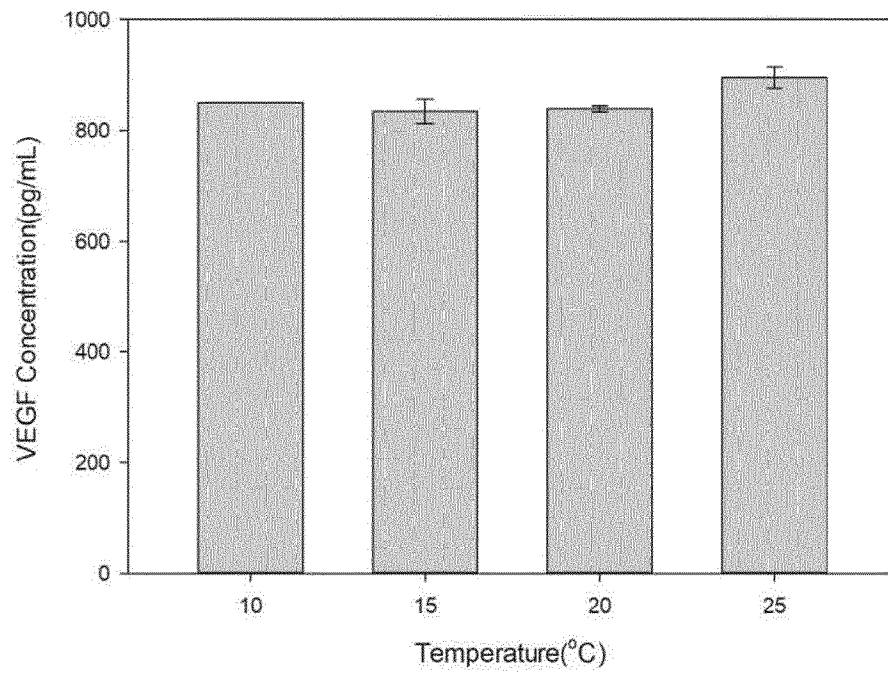
[도9]

SCD, Flow Rate Effect - Stability Test
Total Amount of Structure Preserved VEGF



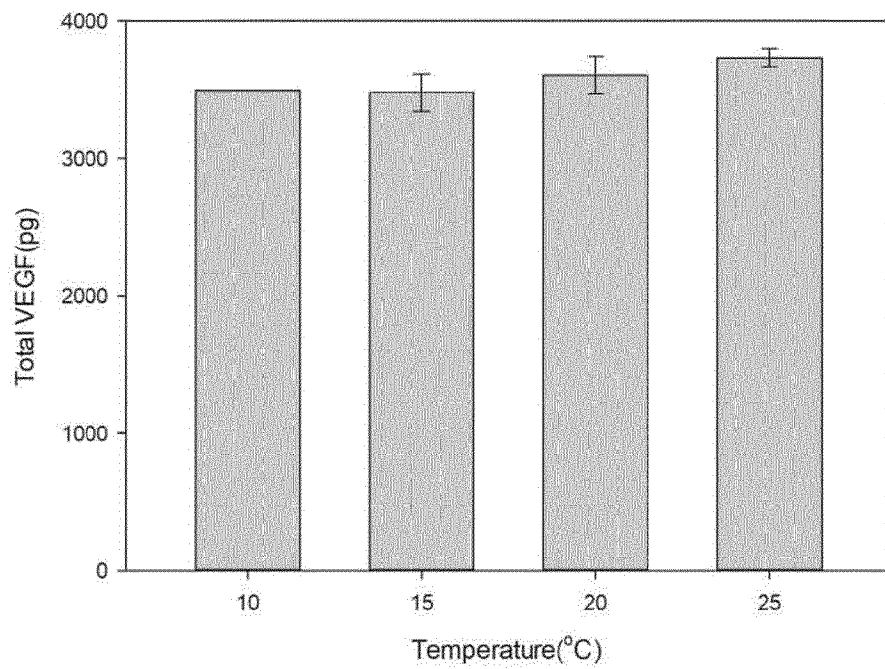
[도10]

SCD, Temperature Effect
Concentration of Structure Preserved VEGF



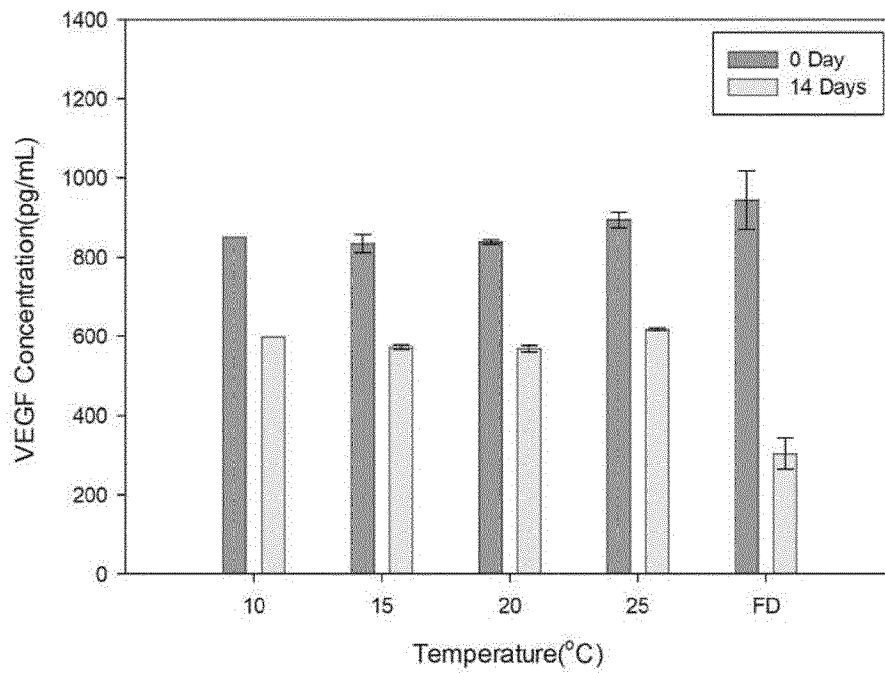
[도11]

SCD, Temperature Effect
Total Amount of Structure Preserved VEGF



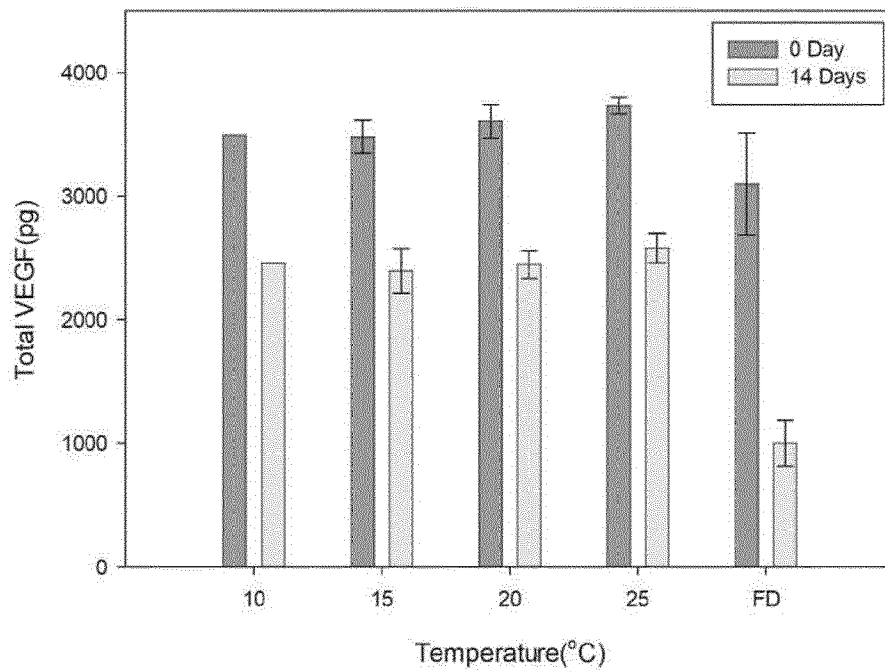
[도12]

SCD, Temperature Effect - Stability Test
Concentration of Structure Preserved VEGF



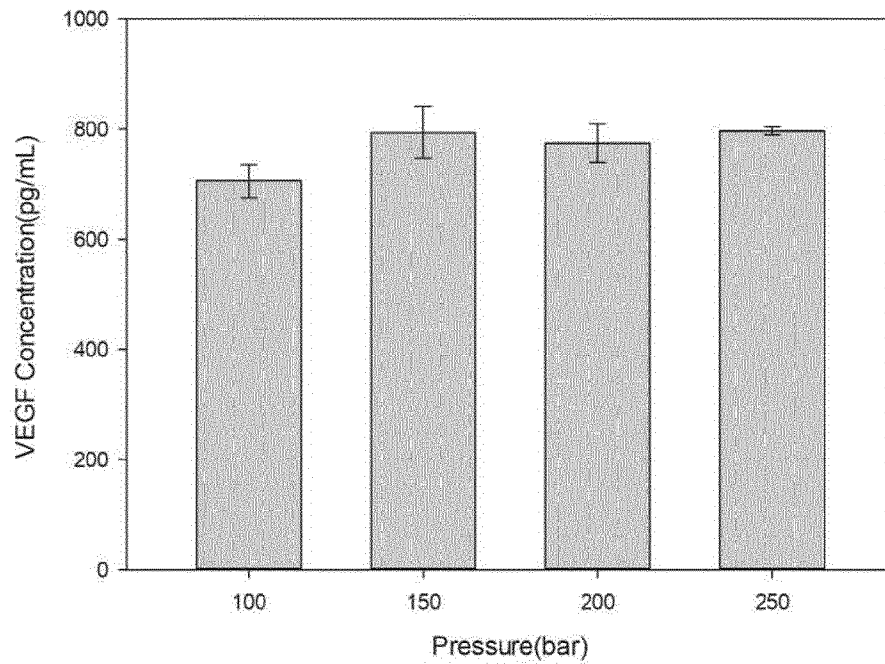
[도13]

SCD, Temperature Effect - Stability Test
Total Amount of Structure Preserved VEGF



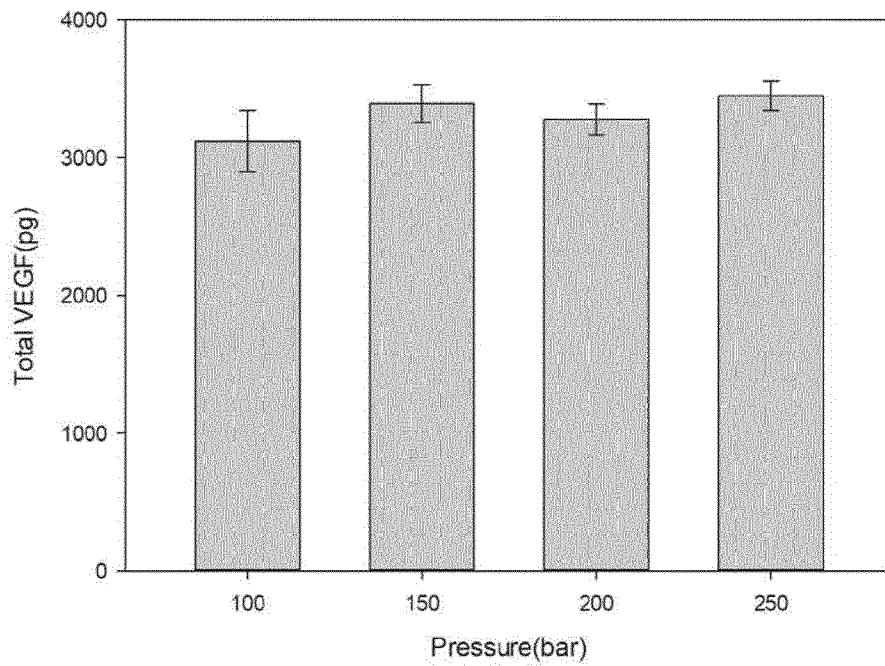
[도14]

SCD, Pressure Effect
Concentration of Structure Preserved VEGF



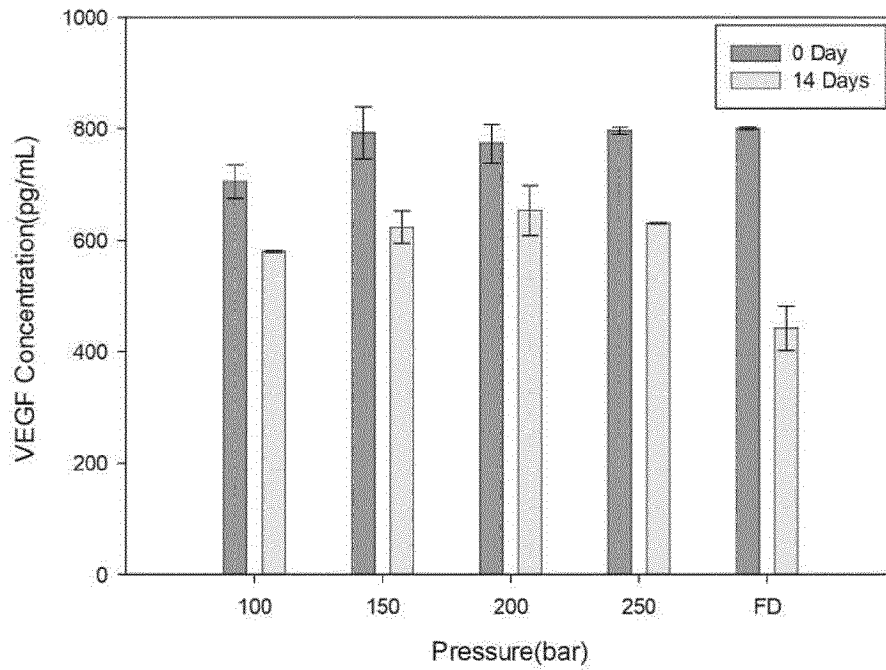
[도15]

SCD, Pressure Effect
Total Amount of Structure Preserved VEGF



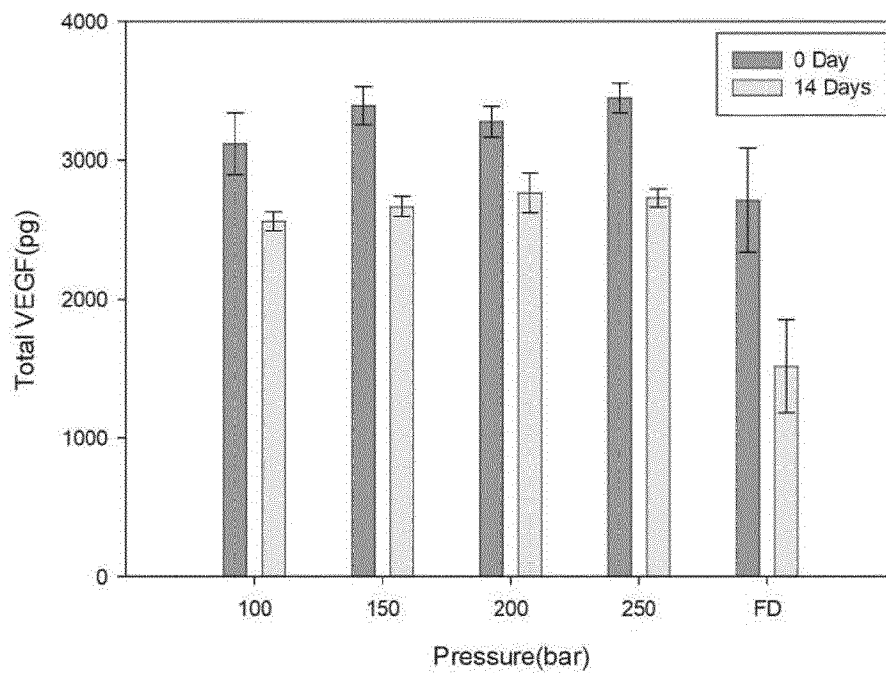
[도16]

SCD, Pressure Effect - Stability Test
Concentration of Structure Preserved VEGF

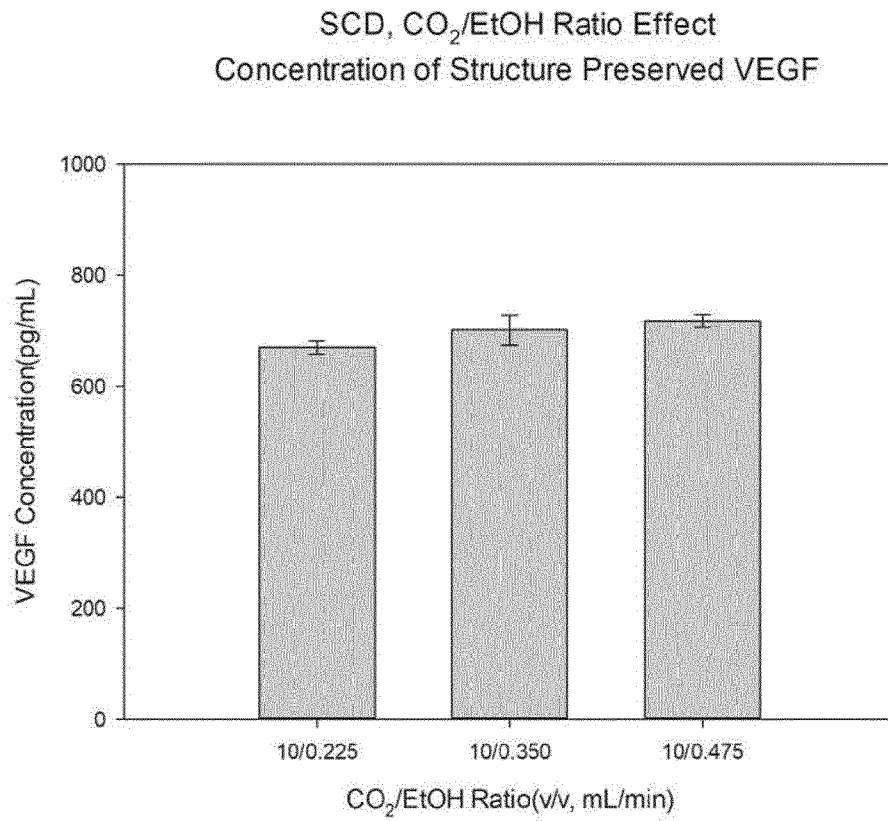


[도17]

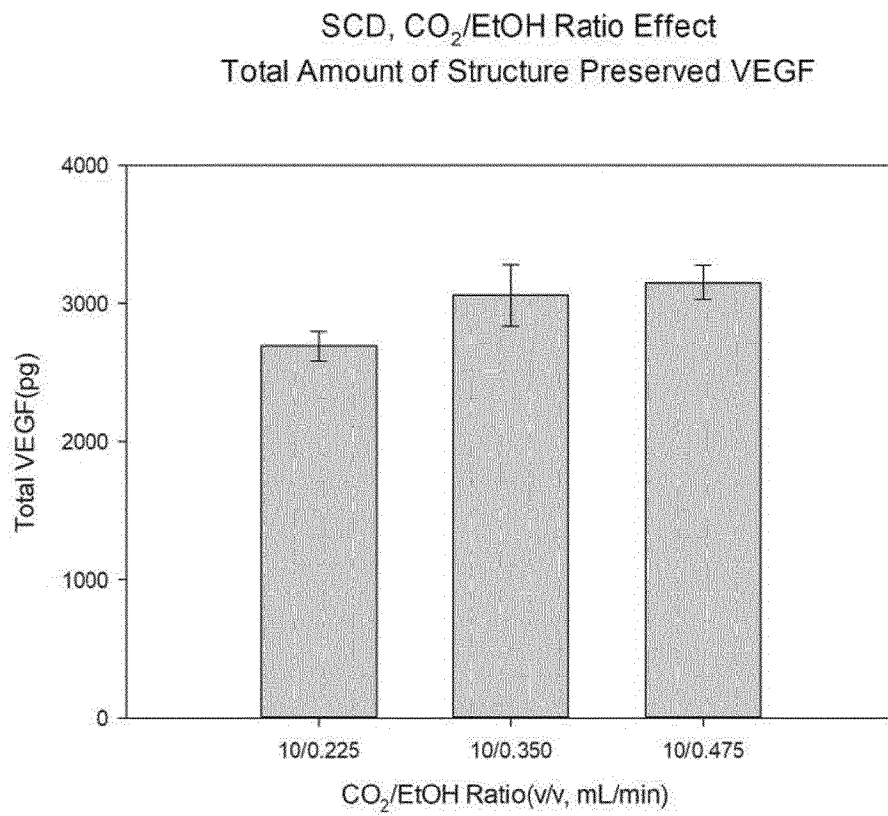
SCD, Pressure Effect - Stability Test
Total Amount of Structure Preserved VEGF



[도18]

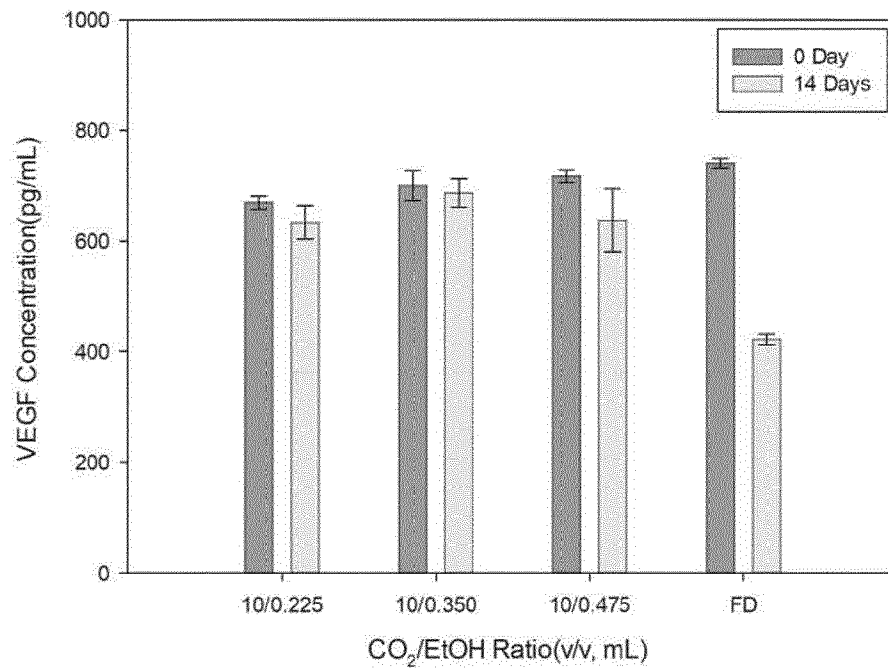


[도19]



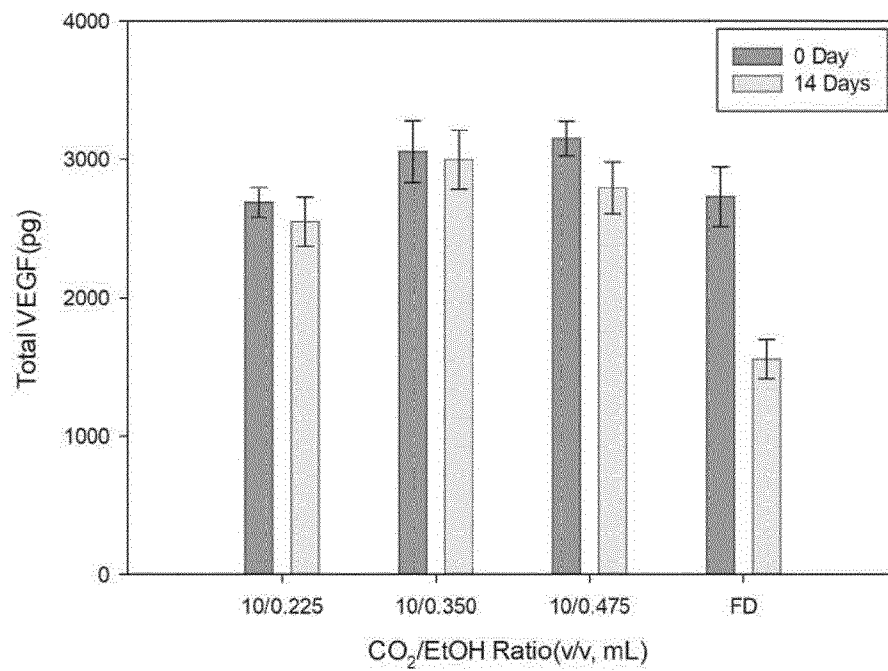
[도20]

SCD, CO₂/EtOH Ratio Effect - Stability Test
Concentration of Structure Preserved VEGF

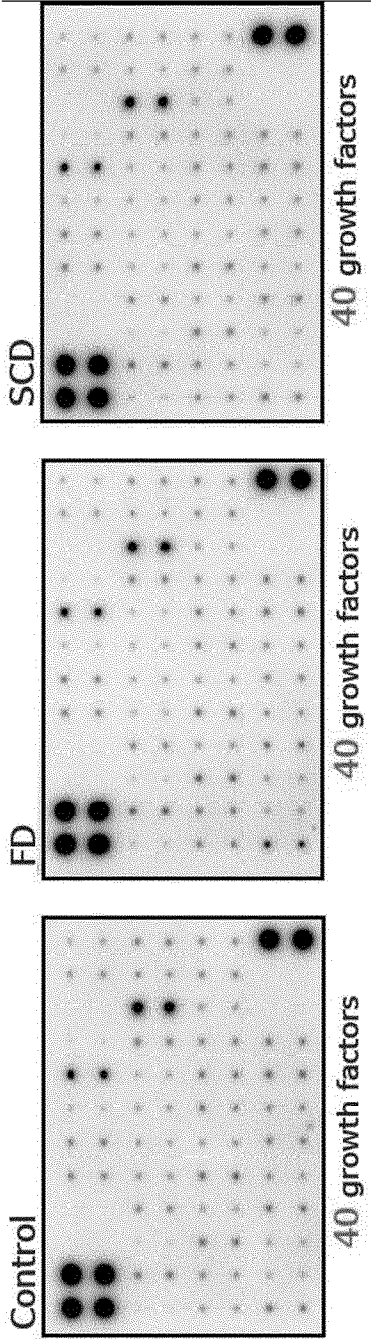


[도21]

SCD, CO₂/EtOH Ratio Effect - Stability Test
Total Amount of Structure Preserved VEGF



[도22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/003058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 1/02(2006.01);

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)

A01N 1/02; A61K 8/98; A61K 9/127; A61K 9/14; C07K 1/02; C07K 1/30; C12M 1/00; C12M 1/40; C12N 15/00

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: supercritical, dry, culture, crystallization, phase transition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-0887429 B1 (DOMPE' PHA.R.MA S.P.A.) 09 March 2009 See abstract; paragraphs [0018], [0026], [0040]-[0041], [0044], [0050], [0052], [0067]-[0069], [0079]; claims 1, 11; figure 1.	1-18
X	KR 10-0963164 B1 (REGERON, INC.) 15 June 2010 See example 2; claims 1-7.	1-18
A	KR 10-2005-0011741 A (MEDIMMUNE VACCINES, INC.) 29 January 2005 See the entire document.	1-18
A	KR 10-2006-0110915 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 26 October 2006 See the entire document.	1-18
A	KR 10-2011-0139644 A (PHARMICELL CO., LTD.) 29 December 2011 See the entire document.	1-18



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

"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

19 JUNE 2020 (19.06.2020)

Date of mailing of the international search report

19 JUNE 2020 (19.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/003058

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0887429 B1	09/03/2009	CN 1575298 A	02/02/2005
		EP 1440082 A1	28/07/2004
		EP 1440082 B1	28/09/2011
		JP 2005-514341 A	19/05/2005
		JP 4374249 B2	02/12/2009
		KR 10-2004-0075856 A	30/08/2004
		US 2005-0065063 A1	24/03/2005
		US 2007-0293655 A1	20/12/2007
		US 7250152 B2	31/07/2007
		WO 03-035673 A1	01/05/2003
KR 10-0963164 B1	15/06/2010	EP 1866407 A1	19/12/2007
		JP 2008-537738 A	25/09/2008
		KR 10-2008-0011277 A	01/02/2008
		US 2009-0053314 A1	26/02/2009
		WO 2006-101352 A1	28/09/2006
KR 10-2005-0011741 A	29/01/2005	CN 101287449 A	15/10/2008
		EP 1572915 A2	14/09/2005
		JP 2006-512102 A	13/04/2006
		KR 10-2010-0112206 A	18/10/2010
		US 2003-0215515 A1	20/11/2003
		US 2007-0259334 A1	08/11/2007
		US 2008-0131514 A1	05/06/2008
		US 2012-0009248 A1	12/01/2012
		US 7258873 B2	21/08/2007
		US 7700130 B2	20/04/2010
		US 8012507 B2	06/09/2011
		US 8273374 B2	25/09/2012
		WO 03-087335 A2	23/10/2003
KR 10-2006-0110915 A	26/10/2006	KR 10-0728997 B1	14/06/2007
KR 10-2011-0139644 A	29/12/2011	KR 10-1047873 B1	08/07/2011
		KR 10-1321346 B1	22/10/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01N 1/02(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01N 1/02; A61K 8/98; A61K 9/127; A61K 9/14; C07K 1/02; C07K 1/30; C12M 1/00; C12M 1/40; C12N 15/00

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: 초임계(supercritical), 건조(dry), 배양액(culture), 결정(crystallization), 상전이(phase transition)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-0887429 B1 (뮌헨 파르마 에스.피.에이.) 2009.03.09 요약; 단락 [0018], [0026], [0040]-[0041], [0044], [0050], [0052], [0067]-[0069], [0079]; 청구항 1, 11; 도면 1 참조.	1-18
X	KR 10-0963164 B1 (주식회사 리제론) 2010.06.15 실시예 2; 청구항 1-7 참조.	1-18
A	KR 10-2005-0011741 A (메드이문 백신즈 인코포레이티드) 2005.01.29 전체 문헌 참조.	1-18
A	KR 10-2006-0110915 A (한미약품 주식회사) 2006.10.26 전체 문헌 참조.	1-18
A	KR 10-2011-0139644 A (파미셀 주식회사) 2011.12.29 전체 문헌 참조.	1-18

☐ 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 이후 “X”에 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

2020년 06월 19일 (19.06.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 06월 19일 (19.06.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

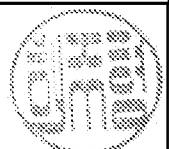
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0887429 B1	2009/03/09	CN 1575298 A EP 1440082 A1 EP 1440082 B1 JP 2005-514341 A JP 4374249 B2 KR 10-2004-0075856 A US 2005-0065063 A1 US 2007-0293655 A1 US 7250152 B2 WO 03-035673 A1	2005/02/02 2004/07/28 2011/09/28 2005/05/19 2009/12/02 2004/08/30 2005/03/24 2007/12/20 2007/07/31 2003/05/01
KR 10-0963164 B1	2010/06/15	EP 1866407 A1 JP 2008-537738 A KR 10-2008-0011277 A US 2009-0053314 A1 WO 2006-101352 A1	2007/12/19 2008/09/25 2008/02/01 2009/02/26 2006/09/28
KR 10-2005-0011741 A	2005/01/29	CN 101287449 A EP 1572915 A2 JP 2006-512102 A KR 10-2010-0112206 A US 2003-0215515 A1 US 2007-0259334 A1 US 2008-0131514 A1 US 2012-0009248 A1 US 7258873 B2 US 7700130 B2 US 8012507 B2 US 8273374 B2 WO 03-087335 A2	2008/10/15 2005/09/14 2006/04/13 2010/10/18 2003/11/20 2007/11/08 2008/06/05 2012/01/12 2007/08/21 2010/04/20 2011/09/06 2012/09/25 2003/10/23
KR 10-2006-0110915 A	2006/10/26	KR 10-0728997 B1	2007/06/14
KR 10-2011-0139644 A	2011/12/29	KR 10-1047873 B1 KR 10-1321346 B1	2011/07/08 2013/10/22