

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

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



(10) 국제공개번호  
**WO 2020/180101 A2**

(51) 국제특허분류:  
*A01N 1/02* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/003048

(22) 국제출원일: 2020년 3월 4일 (04.03.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:  
10-2019-0025419 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-

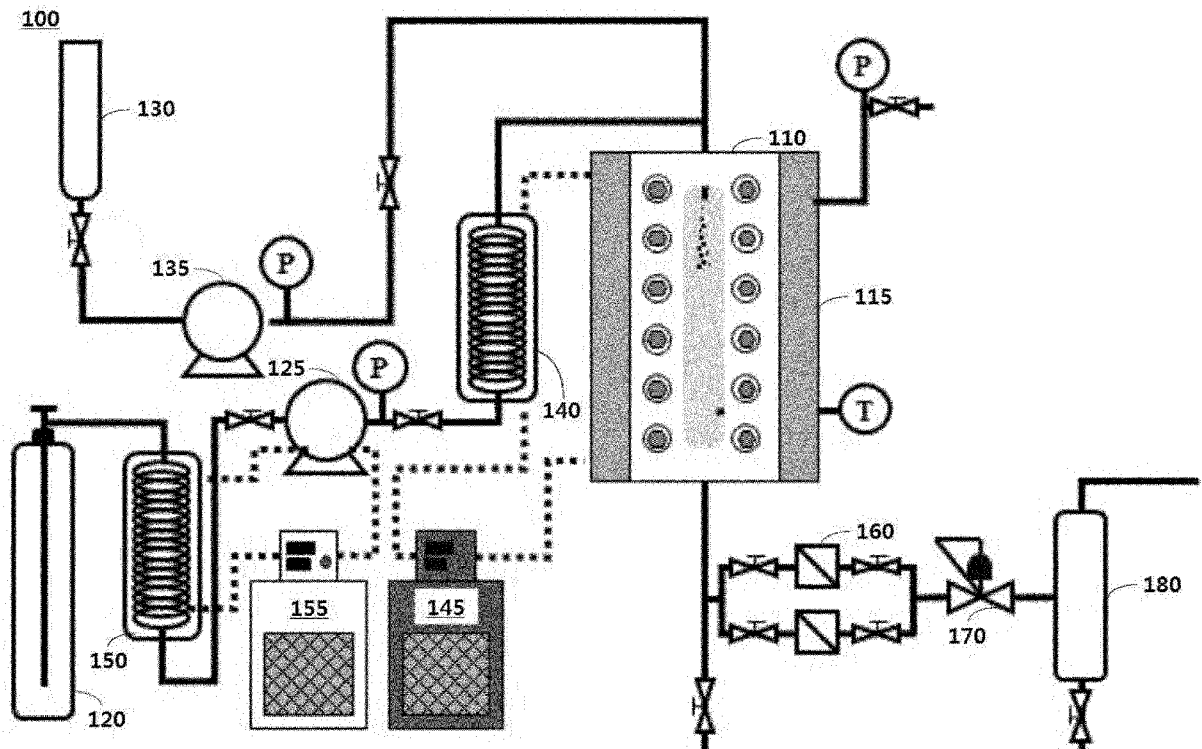
jeong); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 송순욱 (SONG, Sunuk); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 김시나 (KIM, Sina); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 이찬주 (LEE, Chanju); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(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 CRYSTALLIZING CULTURE SOLUTION USING PCA PROCESS

(54) 발명의 명칭: PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치 및 방법



(57) Abstract: Provided are an apparatus and method for crystallizing a culture solution using a PCA process. The method for crystallizing a culture solution using a PCA process comprises the steps of: supplying, to a container, a culture solution including a first solvent and a target material dissolved in the first solvent; supplying a third solvent to the container; and supplying a second solvent to the container. The first to third solvents form a multi-component mixture, and the target material precipitates. The apparatus for crystallizing a culture solution using a PCA process is an apparatus for acquiring a target material by drying a culture solution including a first solvent and the target material being dissolved in the first solvent, the apparatus comprising: a high-pressure container to which the culture solution is supplied; a first supply unit which is connected to the high-pressure container and supplies a second solvent to the

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:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별  
도 공개함 (규칙 48.2(g))

high-pressure container; a second supply unit which is connected to the high-pressure container and supplies a third solvent; a pre-cooler which is provided adjacent to the first supply unit and pre-cools the second solvent discharged from the first supply unit; and a pre-heater which is provided adjacent to the high-pressure container and pre-heats the second solvent supplied to the high-pressure container.

(57) 요약서: PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치 및 방법이 제공된다. 상기 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법은, 용기에 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 공급하는 단계, 상기 용기에 제3 용매를 공급하는 단계, 및 상기 용기에 제2 용매를 공급하는 단계를 포함한다. 상기 제1 내지 제3 용매는 다성분계 혼합물을 생성하고, 상기 타겟 물질은 석출된다. 상기 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치는, 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 건조하여 상기 타겟 물질을 획득하기 위한 장치로서, 상기 배양액이 공급되는 고압 용기, 상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제2 용매를 공급하는 제1 공급부, 상기 고압 용기에 연결되어 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 용매를 예열하는 예열기를 포함한다.

## 명세서

### 발명의 명칭: PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치 및 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 PCA(Precipitation with a Compressed Anti-solvent) 공정을 이용한 배양액의 결정화 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 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법을 제공한다.
- [6] 본 발명은 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치를 제공한다.

##### 과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 실시예들에 따른 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법은,

용기에 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 공급하는 단계, 상기 용기에 제3 용매를 공급하는 단계, 및 상기 용기에 제2 용매를 공급하는 단계를 포함한다. 상기 제1 내지 제3 용매는 다성분계 혼합물을 생성하고, 상기 타겟 물질은 석출된다.

- [8] 본 발명의 실시예들에 따른 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치는, 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 건조하여 상기 타겟 물질을 획득하기 위한 장치로서, 상기 배양액이 공급되는 고압 용기, 상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제2 용매를 공급하는 제1 공급부, 상기 고압 용기에 연결되어 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 용매를 예열하는 예열기를 포함한다.

### 발명의 효과

- [9] 본 발명의 실시예들에 따른 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치 및 방법은 타겟 물질(건조물)의 구조 및 활성이 변성되는 것을 방지하면서 타겟 물질(건조물)을 건조할 수 있다. 예를 들어, 상기 결정화 장치 및 방법은 온도에 민감하고 미세구조를 유지하여야 하는 단백질 등을 포함하는 줄기세포 배양액을 결정화를 통해 건조하는데 사용될 수 있다. 상기 결정화 장치 및 방법은 에너지 등의 공정 비용이나 공정 시간에 있어서 동결 건조보다 우수하다. 또, 상기 결정화 장치 및 방법에 의해 대량 생산이 가능하다.

### 도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법을 설명하기 위한 도면이다.
- [11] 도 2 및 도 3은 온도 변수 별 PCA 결정화 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 온도 변수 별 PCA 결정화 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 압력 변수 별 PCA 결정화 공정 건조물의 ELISA 분석 결과를 나타내며, 도 6은 같은 농도로 녹인 각 조건 별 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 나타내고, 도 7은 수율을 고려한 각 조건 별 VEGF의 총량을 나타낸다.
- [14] 도 8 및 도 9는 압력 변수 별 PCA 결정화 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 NMP/H<sub>2</sub>O ratio 변수 별 PCA 결정화 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 NMP/H<sub>2</sub>O ratio 변수 별 PCA 결정화 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 세정 시간 변수 별 PCA 결정화 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 세정 시간 변수 별 PCA 결정화 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 18은 각 공정의 최적 조건에서 얻어진 건조물의 성장 인자 어레이(Growth Factor Array)를 이용한 성장 인자의 발현 패턴을 나타낸다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 본 발명의 실시예들에 따른 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법(PCA 결정화 방법)은, 용기에 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 공급하는 단계, 상기 용기에 제3 용매를 공급하는 단계, 및 상기 용기에 제2 용매를 공급하는 단계를 포함한다. 상기 제1 내지 제3 용매는 다성분계 혼합물을 생성하고, 상기 타겟 물질은 석출되고 건조된다.
- [23] 상기 배양액과 상기 제3 용매는 혼합된 후 상기 용기에 공급될 수 있다.
- [24] 상기 제3 용매는 상기 제1 용매와 상기 제2 용매의 두 상을 단일상으로 만들 수 있다.

- [25] 상기 제1 용매는 물을 포함할 수 있고, 상기 제2 용매는 이산화탄소, DME(Dimethyl ether),  $N_2O$ , 및 HFC(Hydrofluorocarbon) 중에서 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 상기 제3 용매는 NMP(N-methyl-2-pyrrolidone), DMSO(Dimethyl sulfoxide), 및 DMF(Dimethylformamide) 중에서 적어도 하나를 포함할 수 있다. 상기 제2 용매는 액상 또는 초임계 상일 수 있다.
- [26] 상기 결정화 방법은 상기 석출된 타겟물질에 상기 제2 용매를 공급하여 상기 석출된 타겟물질을 세정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [27] 상기 용기의 온도와 압력은 각각  $0 \sim 40^{\circ}\text{C}$ ,  $35 \sim 500\text{bar}$ 일 수 있다.
- [28] 상기 제3 용매 대 상기 제1 용매의 중량비는 10:1 ~ 30:1일 수 있다.
- [29] 상기 타겟 물질은 석출된 후에 미세 구조를 유지할 수 있다. 상기 타겟 물질은 세포를 포함할 수 있다. 상기 타겟 물질은 단백질을 포함할 수 있다.
- [30] 상기 배양액은 줄기세포 배양액을 포함할 수 있고, 상기 타겟 물질은 줄기세포를 포함할 수 있다.
- [31]
- [32] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법을 설명하기 위한 도면이다.
- [33] 도 1을 참조하면, PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치(PCA 결정화 장치)(100)는 타겟 물질 및 제1 용매(예를 들어, 물)를 포함하는 건조대상 혼합물을 건조하는 장치로서, 고압 용기(110), 제1 공급부(120), 제2 공급부(130), 예열기(140), 및 예냉기(150)를 포함한다.
- [34] 고압 용기(high pressure cell)(110)는 상기 혼합물을 수용하여 건조할 수 있다. 고압 용기(110)에 열전달 재킷(115)이 결합될 수 있고, 고압 용기(110)는 열전달 재킷(115)에 의해 가열될 수 있다. 열전달 재킷(115)의 가열 매체는 열전달 재킷(115)에 연결된 가열조(145)에 의해 가열될 수 있다.
- [35] 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 상기 건조대상 혼합물과 제3 용매(예를 들어, NMP)를 공급할 수 있다. 상기 건조대상 혼합물과 상기 제3 용매는 혼합된 후 고압 용기(110)에 액적으로 분사되어 공급될 수 있다. 상기 건조대상 혼합물과 상기 제3 용매는 제2 공급부(130)와 고압 용기(110) 사이에 배치되는 제2 펌프(135)에 의해 이송될 수 있다.
- [36] 예열기(140)는 고압 용기(110)에 인접하게 배치되어 고압 용기(110)에 공급되는 상기 제2 용매를 예열할 수 있다. 예열기(140)의 가열 매체는 예열기(140)에 연결된 가열조(145)에 의해 가열될 수 있다.
- [37] 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.

- [38] PCA 결정화 장치(100)는 고압 용기(110)에 연결되는 필터(160), 백프레셔 조절기(170), 및 기액 분리기(180)를 포함할 수 있다. 필터(160)는 고압 용기(110)에서 석출되는 타겟 물질을 필터링하여 회수한다. 백프레셔 조절기(170)는 고압 용기(110)의 압력을 조절할 수 있다. 기액 분리기(180)는 상기 제1 용매 내지 제3 용매를 분리한다.
- [39]
- [40] PCA 결정화 장치(100)를 이용한 PCA 결정화 방법의 일 예는 다음과 같다.
- [41] 15°C로 유지되는 고압 용기(110)에 -20°C로 과냉각된 이산화탄소를 100mL/min의 유량으로 공급한다. 백프레셔 조절기(170)를 사용하여 고압 용기(110)의 압력을 200bar로 유지한다. 고압 용기(110) 내에서 이산화탄소는 액상이다. PCA 결정화 장치(100)의 고압 용기(110) 내에 건조하고자 하는 줄기세포 배양액을 공용매(co-solvent)인 NMP와 1:17의 중량비로 혼합하여 0.01" 노즐을 통해 고압 용기로 1mL/min의 유량으로 분사한다. 고압 용기(110) 내 물, 이산화탄소, 및 NMP는 다성분계 혼합물을 생성하고, 상기 줄기세포 배양액의 단백질을 석출된다. 이산화탄소를 30분 동안 공급하여 상기 단백질에 잔존하는 용매를 제거한다. 고압 용기(110)를 감압하여 이산화탄소를 기화시키고, 상기 석출된 단백질은 필터를 통해 회수된다. 물과 NMP(공용매)가 추출된 뒤 액상의 이산화탄소는 감압에 의해 기상으로 상전이되어 쉽게 분리될 수 있다.
- [42] 이산화탄소는 액체/기체 간 표면 장력이 공정 온도 조건(5 ~ 25°C)에 따라 0.1 ~ 3mN/m 정도인데 이는 물의 액체/기체 간 표면 장력인 72mN/m와 비교할 때 매우 낮다. 단백질의 비활성화에 큰 영향을 미치는 요소 중 하나가 기체/액체 간의 표면 장력에 의한 미세 구조 파괴인데 PCA 결정화 공정은 공정 조건에 따라 초임계 유체에서 기체로의 상전이 또는 액체에서 기체로의 상전이가 일어나 단백질의 미세 구조 파괴를 방지할 수 있다.
- [43]
- [44] [실험예 및 분석예]
- [45]
- [46] PCA 공정을 이용하여 다양한 조건에서 줄기세포 배양액을 건조하였고 건조된 고형물을 분석하였다. 비교예로 동결 건조(FD)를 이용하여 줄기세포 배양액을 건조하였고 건조된 고형물을 분석하였다. 상기 동결 건조는 -80°C의 온도와 5mTorr의 압력에서 수행되었다.
- [47] 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.

- [48] 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.

- [49] 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°C에서 보관하고 2주 뒤에 다시 ELISA 분석을 하여 건조물에 포함된 VEGF의 농도를 얻고 그 구조 유지율을 계산하였다.

- [50] 14일 후의 VEGF 구조 유지율(%) =  $\frac{14\text{일 후의 VEGF 농도 (pg/mL)}}{\text{수용액 환경에 노출된 직후의 VEGF 농도 (pg/mL)}} \times 100(\%)$

[51]

- [52] [온도 변수에 따른 단백질 구조 유지 및 안정성 비교]

- [53] PCA 결정화 공정에서 온도 조건(5, 15, 25, 35°C)만을 변화시켜가며 실험을 수행하였고, 실험 조건 및 결과를 표 1 내지 3과 도 2 내지 5에 나타내었다. 표 1은 PCA 결정화 공정에서의 온도 변수 별 실험 결과를 나타내고, 표 2는 온도 변수 별 PCA 결정화 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석 결과를 나타내며, 표 3은 온도 변수 별 PCA 결정화 공정 건조물이 14일간 수용액에 노출되었을 때의 VEGF 구조 유지율(%)을 나타낸다. FD는 동결 건조를 수행한 샘플을 나타내고, Control은 건조를 하지 않은 샘플을 나타낸다.

- [54] [표 1]

[55]

| Sample  | 온도<br>(℃) | 압력<br>(bar) | CO <sub>2</sub> 유량<br>(mL/min) | 혼합액 유량<br>(mL/min) | NMP/H <sub>2</sub> O<br>ratio(w/w, g) | 혼합액 분사<br>시간(min) | 세정 시간<br>(min) | 질량(mg) |      |      |      |
|---------|-----------|-------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------|----------------|--------|------|------|------|
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 수율(%)  |      |      |      |
| PCA1    | 5         | 200         | 100                            | 1                  | 85/5                                  | 90                | 60             | a      | b    | c    | d    |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 46.2   | 52.6 | 43.8 | 50.3 |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 80.3   | 91.5 | 76.2 | 87.5 |
| PCA2    | 15        |             |                                |                    |                                       |                   |                | a      | b    | c    | -    |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 51.0   | 52.5 | 51.1 |      |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 88.7   | 91.3 | 88.9 |      |
| PCA3    | 25        |             |                                |                    |                                       |                   |                | a      | b    | c    |      |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 43.9   | 47.3 | 44.3 |      |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 76.3   | 82.3 | 77.0 |      |
| PCA4    | 35        |             |                                |                    |                                       |                   |                | a      | b    | c    |      |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 41.4   | 43.2 | 43.6 |      |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 72.0   | 75.1 | 75.8 |      |
| FD      | -         | a           | b                              | -                  |                                       |                   |                |        |      |      |      |
|         |           | 39.6        | 34.2                           |                    |                                       |                   |                |        |      |      |      |
|         |           | 68.9        | 59.5                           |                    |                                       |                   |                |        |      |      |      |
| Control | -         | a           | -                              |                    |                                       |                   |                |        |      |      |      |
|         |           | 57.5        |                                |                    |                                       |                   |                |        |      |      |      |
|         |           | 100         |                                |                    |                                       |                   |                |        |      |      |      |

[56]

[표 2]

[57]

| Sample  | 0 Day          |     |     |      |             |      |      |      | 14 Days        |      |      |      |             |      |      |      |
|---------|----------------|-----|-----|------|-------------|------|------|------|----------------|------|------|------|-------------|------|------|------|
|         | VEGF 농도(pg/mL) |     |     |      | VEGF 총량(pg) |      |      |      | VEGF 농도(pg/mL) |      |      |      | VEGF 총량(pg) |      |      |      |
| PCA1    | a              | b   | c   | d    | a           | b    | c    | d    | a              | b    | c    | d    | a           | b    | c    | d    |
|         | 687            | 714 | 681 | 859  | 2759        | 3264 | 2592 | 3755 | 611            | 672  | 601  | 754  | 2453        | 3075 | 2290 | 3300 |
| PCA2    | a              | b   | c   | -    | a           | b    | c    | -    | a              | b    | c    | -    | a           | b    | c    | -    |
| PCA3    | 682            | 650 | 706 |      | 3025        | 2969 | 3139 |      | 624            | 568  | 583  |      | 2767        | 2595 | 2592 |      |
|         | a              | b   | c   |      | a           | b    | c    |      | a              | b    | c    |      | a           | b    | c    |      |
| PCA4    | 750            | 744 | 736 |      | 2863        | 3060 | 2835 |      | 628            | 618  | 594  |      | 2399        | 2544 | 2287 |      |
|         | a              | b   | c   |      | a           | b    | c    |      | a              | b    | c    |      | a           | b    | c    |      |
| FD      | 626            | 693 | 716 | 2252 | 2604        | 2716 | 516  | 569  | 546            | 1856 | 2138 | 2071 |             |      |      |      |
|         | a              | b   | -   | a    | b           | -    | a    | b    | -              | a    | b    | -    |             |      |      |      |
| Control | 714            | 687 |     | 2457 | 2042        |      | 367  | 373  |                | 1331 | 1110 |      |             |      |      |      |
|         | a              | -   | a   | -    | a           | -    | a    | -    |                |      |      |      |             |      |      |      |
| 897     | 4484           |     | 799 |      | 3994        |      |      |      |                |      |      |      |             |      |      |      |

[58]

[표 3]

[59]

| Sample            | PCA1 | PCA2 | PCA3 | PCA4 | FD   |
|-------------------|------|------|------|------|------|
| VEGF 구조<br>유지율(%) | 89.8 | 87.1 | 82.5 | 80.1 | 54.3 |

[60]

[61] 표 1 내지 3과 도 2 내지 5을 참조하면, VEGF의 농도는 온도에는 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 온도가 높을수록 VEGF의 구조 유지 감소 정도가 빨라질 것으로 예상되지만 공정의 시간 자체가 150분으로 길지 않기 때문에 거의 영향을 받지 않았다고 판단된다. 그러나 온도가 낮아질수록 수율이 높아지는 경향을 보인다. 이는 온도가 낮아질수록 CO<sub>2</sub>의 밀도가 높아져서 혼합액과의 단일 상(single phase)을 이루는데 유리하여 단일 상을 이루지 못한 혼합액이 단백질을 녹여 나가는 것을 방지할 수 있기 때문이다. 온도가 낮은 조건에서 건조된 샘플의 VEGF 총량이 가장 높다.

[62]

온도가 낮은 조건에서 건조된 샘플일수록 수용액 상에서의 VEGF 구조 유지율이 높다. 이는 액체 상에서 온도가 낮을수록 H<sub>2</sub>O에 대한 CO<sub>2</sub>의 용해도가

감소하는데, CO<sub>2</sub>가 H<sub>2</sub>O에 녹아서 탄산을 형성하기 때문이다. 즉, 낮은 온도 조건일수록 높은 pH의 산성 환경에 노출되는 것이고, 이는 산 촉매로 유발되는 단백질의 가수분해 속도가 낮다는 것을 의미한다. 따라서, 낮은 온도 조건일수록 VEGF의 손상 정도가 낮아서 더 오랜 시간 수용액 상에서 구조를 유지할 수 있다. PCA 결정화 공정의 비교 대상인 동결 건조 공정의 분석 결과를 보면, 동결 건조로부터 얻어진 건조물은 PCA 결정화 공정보다 수용액 상에서의 구조 유지율이 현저히 떨어져서 14일 후에는 PCA 결정화 공정의 건조물보다 VEGF 총량이 크게 감소한다.

[63] PCA 결정화 공정에서 온도 조건으로 15°C 이하의 온도를 선택하는 것이 바람직하며, 에너지 소모를 고려하여 이후 PCA 결정화 공정에서의 실험들을 15°C에서 수행하였다.

[64]

[65] [압력 변수에 따른 단백질 구조 유지 및 안정성 비교]

[66] PCA 결정화 공정에서 압력 조건(100, 150, 200bar)만을 변화시켜가며 실험을 수행하였고, 실험 조건 및 결과를 표 4 내지 6과 도 6 내지 9에 나타내었다. 표 4는 PCA 결정화 공정에서의 압력 변수 별 실험 결과를 나타내고, 표 5는 압력 변수 별 PCA 결정화 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석 결과를 나타내며, 표 6은 압력 변수 별 PCA 결정화 공정 건조물이 14일간 수용액에 노출되었을 때의 VEGF 구조 유지율(%)을 나타낸다.

[67] [표 4]

[68]

| Sample  | 온도<br>(℃) | 압력<br>(bar) | CO <sub>2</sub> 유량<br>(mL/min) | 혼합액 유량<br>(mL/min) | NMP/H <sub>2</sub> O<br>ratio(w/w, g) | 혼합액 분사<br>시간(min) | 세정 시간<br>(min) | 질량(mg) |      |   |   |  |      |      |      |   |
|---------|-----------|-------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------|----------------|--------|------|---|---|--|------|------|------|---|
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 수율(%)  |      |   |   |  |      |      |      |   |
| PCA5    | 15        | 100         | 100                            | 1                  | 85/5                                  | 90                | 60             | a      | b    | c | d |  |      |      |      |   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                |        |      |   |   |  |      |      |      |   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                |        |      |   |   |  |      |      |      |   |
| PCA6    |           | 150         |                                |                    |                                       |                   |                |        |      |   |   |  | a    | b    | c    | - |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                |        |      |   |   |  | 51.8 | 50.3 | 51.2 |   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                |        |      |   |   |  | 90.1 | 87.5 | 89.0 |   |
| PCA7    |           | 200         |                                |                    |                                       |                   |                |        |      |   |   |  | a    | b    | c    |   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                |        |      |   |   |  | 51.5 | 49.6 | 46.0 |   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                |        |      |   |   |  | 89.6 | 86.3 | 80.0 |   |
| FD      | -         |             |                                |                    |                                       |                   |                | a      | b    | - |   |  |      |      |      |   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 35.5   | 39.7 |   |   |  |      |      |      |   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 61.7   | 69.0 |   |   |  |      |      |      |   |
| Control | -         |             |                                |                    |                                       |                   |                | a      | -    |   |   |  |      |      |      |   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 57.5   |      |   |   |  |      |      |      |   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 100    |      |   |   |  |      |      |      |   |

[69] [표 5]

[70]

| Sample  | 0 Day          |      |     |      |             |      |      |      | 14 Days        |     |      |     |             |      |      |      |
|---------|----------------|------|-----|------|-------------|------|------|------|----------------|-----|------|-----|-------------|------|------|------|
|         | VEGF 농도(pg/mL) |      |     |      | VEGF 총량(pg) |      |      |      | VEGF 농도(pg/mL) |     |      |     | VEGF 총량(pg) |      |      |      |
| PCA5    | a              | b    | c   | d    | a           | b    | c    | d    | a              | b   | c    | d   | a           | b    | c    | d    |
|         | 616            | 617  | 647 | 627  | 2507        | 2649 | 2425 | 2687 | 467            | 520 | 522  | 500 | 2022        | 2233 | 1958 | 2144 |
| PCA6    | a              | b    | c   | -    | a           | b    | c    | -    | a              | b   | c    | -   | a           | b    | c    | -    |
|         | 611            | 672  | 701 |      | 2752        | 2941 | 3119 |      | 472            | 565 | 570  |     | 2128        | 2470 | 2540 |      |
| PCA7    | a              | b    | c   |      | a           | b    | c    |      | a              | b   | c    |     | a           | b    | c    |      |
|         | 697            | 803  | 810 |      | 3120        | 3465 | 3239 |      | 548            | 543 | 548  |     | 2454        | 2341 | 2192 |      |
| FD      | a              | b    | -   | a    | b           | -    | a    | b    | -              | a   | b    | -   |             |      |      |      |
|         | 870            | 1017 |     | 2688 | 3511        |      | 263  | 343  |                | 813 | 1185 |     |             |      |      |      |
| Control | a              | -    |     |      | a           | -    |      |      | a              | -   |      |     | a           | -    |      |      |
|         | 1245           |      |     |      | 6223        |      |      |      | 511            |     |      |     | 2554        |      |      |      |

[71]

[표 6]

[72]

| Sample         | PCA5 | PCA6 | PCA7 | FD   |
|----------------|------|------|------|------|
| VEGF 구조 유지율(%) | 81.4 | 81.0 | 70.9 | 32.1 |

[73]

[74]

표 4 내지 6과 도 6 내지 9를 참조하면, VEGF의 농도는 공정 압력이 증가할수록 증가하는 것으로 나타났다. 압력이 높을수록 CO<sub>2</sub>의 밀도가 높아져서 혼합액과의 단일 상을 이루는데 유리하여 세정 단계에서의 혼합액의 빠른 추출을 통한 실질적인 H<sub>2</sub>O에 대한 노출시간이 감소하여 초기 VEGF 농도가 높게 나타난다. 그러나, 수율은 압력에 영향을 받지 않는 경향을 보인다. 수율에는 영향이 없어도 초기 VEGF 농도에는 영향을 받아서 높은 압력에서 운전된 건조물의 VEGF 총량이 가장 높다.

[75]

압력이 높은 조건에서 건조된 샘플일수록 수용액 상에서의 VEGF 구조 유지율이 낮다. 이는 전단 응력(shear stress)에 의한 것으로, 전단 응력은 유체의 점도와 속도에 영향을 받는데, 압력이 높을수록 CO<sub>2</sub>의 점도가 높아지므로, 압력이 높을수록 혼합액이 분사될 때 단백질의 구조에 더 큰 스트레스를 주게 되어 비가역적인 변성을 일으킬 정도는 아니지만 상당한 단백질의 구조적 손상을 유발할 수 있다. 높은 압력일수록 VEGF의 손상 정도가 높아서 수용액 상에서 구조를 유지할 수 있는 시간이 짧아진다. 동결 건조로부터 얻어진 건조물은 수용액 상에서의 구조 유지율이 현저히 떨어져서 14일 후에는 PCA 결정화 공정의 건조물보다 VEGF 총량이 크게 감소한다.

[76]

200bar 압력 조건에서 VEGF 구조 유지율이 다른 압력 조건보다 낮아지지만 VEGF 총량에서 조금 더 우세하여 PCA 결정화 공정에서 압력 조건으로 200bar를 선택하는 것이 바람직하며, 이후 PCA 결정화 공정에서의 실험들을 200bar에서 수행하였다.

[77]

[78]

[공용매/H<sub>2</sub>O ratio에 따른 단백질 구조 유지 및 안정성 비교]

[79] PCA 결정화 공정에서 NMP/H<sub>2</sub>O ratio 조건(65/5, 75/5, 85/5, 95/5g/g)만을 변화시켜가며 실험을 수행하였고, 실험 조건 및 결과를 표 7 내지 9와 도 10 내지 13에 나타내었다. 표 7은 PCA 결정화 공정에서의 NMP/H<sub>2</sub>O ratio 변수 별 실험 결과를 나타내고, 표 8은 NMP/H<sub>2</sub>O ratio 변수 별 PCA 결정화 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석 결과를 나타내며, 표 9는 NMP/H<sub>2</sub>O ratio 변수 별 PCA 결정화 공정 건조물이 14일간 수용액에 노출되었을 때의 VEGF 구조 유지율(%)을 나타낸다.

[80] [표 7]

[81]

| Sample  | 온도<br>(℃) | 압력<br>(bar) | CO <sub>2</sub> 유량<br>(mL/min) | 혼합액 유량<br>(mL/min) | NMP/H <sub>2</sub> O<br>ratio(w/w, g) | 혼합액 분사<br>시간(min) | 세정 시간<br>(min) | 절량(mg) |      |      |
|---------|-----------|-------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------|----------------|--------|------|------|
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 수율(%)  |      |      |
| PCA8    | 15        | 200         | 100                            | 1                  | 65/5                                  | 70                | 60             | a      | b    | c    |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 18.3   | 21.5 | 24.4 |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 31.8   | 37.4 | 42.4 |
| PCA9    |           |             |                                |                    | 75/5                                  | 80                |                | a      | b    | c    |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 50.5   | 50.6 | 48.4 |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 87.8   | 83.0 | 84.2 |
| PCA10   |           |             |                                |                    | 85/5                                  | 90                |                | a      | b    | c    |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 55.5   | 51.6 | 52.4 |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 96.5   | 89.7 | 91.1 |
| PCA11   |           |             |                                |                    | 95/5                                  | 100               |                | a      | b    | c    |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 52.7   | 52.3 | 51.6 |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 91.7   | 91.0 | 89.7 |
| FD      | -         |             |                                |                    |                                       |                   |                | a      | b    |      |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 33.7   | 44.2 | -    |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 58.6   | 76.9 |      |
| Control | -         |             |                                |                    |                                       |                   |                | a      |      |      |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 57.5   | -    |      |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                | 100    |      |      |

[82] [표 8]

[83]

| Sample  | 0 Day          |     |     |             |      |      | 14 Days        |     |     |             |      |      |
|---------|----------------|-----|-----|-------------|------|------|----------------|-----|-----|-------------|------|------|
|         | VEGF 농도(pg/mL) |     |     | VEGF 총량(pg) |      |      | VEGF 농도(pg/mL) |     |     | VEGF 총량(pg) |      |      |
| PCA8    | a              | b   | c   | a           | b    | c    | a              | b   | c   | a           | b    | c    |
|         | 658            | 690 | 630 | 1048        | 1291 | 1337 | 515            | 541 | 527 | 819         | 1011 | 1117 |
| PCA9    | a              | b   | c   | a           | b    | c    | a              | b   | c   | a           | b    | c    |
|         | 630            | 637 | 710 | 2766        | 2801 | 2989 | 534            | 523 | 592 | 2343        | 2302 | 2492 |
| PCA10   | a              | b   | c   | a           | b    | c    | a              | b   | c   | a           | b    | c    |
|         | 695            | 769 | 787 | 3355        | 3453 | 3585 | 573            | 615 | 639 | 2766        | 2761 | 2910 |
| PCA11   | a              | b   | c   | a           | b    | c    | a              | b   | c   | a           | b    | c    |
|         | 704            | 750 | 661 | 3225        | 3409 | 2965 | 615            | 599 | 534 | 2818        | 2724 | 2397 |
| FD      | a              | b   | -   | a           | b    | -    | a              | b   | -   | a           | b    | -    |
|         | 798            | 803 | -   | 2339        | 3087 | -    | 402            | 482 | -   | 1179        | 1651 | -    |
| Control | a              | -   | -   | a           | -    | -    | a              | -   | -   | a           | -    | -    |
|         | 1075           | -   | -   | 5373        | -    | -    | 805            | -   | -   | 4024        | -    | -    |

[84] [표 9]

[85]

| Sample            | PCA8 | PCA9 | PCA10 | PCA11 | FD   |
|-------------------|------|------|-------|-------|------|
| VEGF 구조<br>유지율(%) | 79.9 | 83.4 | 81.1  | 82.7  | 55.2 |

[86]

[87] 표 7 내지 9와 도 10 내지 13을 참조하면, VEGF의 농도는 크게 차이나지는 않지만 NMP/H<sub>2</sub>O ratio가 증가할수록 증가하다가 85/5에서 정점을 찍고 다시 감소하기 시작한다. NMP/H<sub>2</sub>O ratio가 낮을 때는 공용매의 양이 불충분하기 때문에 CO<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O가 잘 섞이지 않아서 단일 상을 이루는데 불리하여 H<sub>2</sub>O의 추출속도가 느려진다. 단백질이 H<sub>2</sub>O와 분리가 잘 되지 않아서 H<sub>2</sub>O에 대한 노출 시간이 길어지고 그만큼 VEGF 구조 유지에서 손해를 본다. 그러다가 85/5 ratio에서 VEGF 농도의 최대값을 보이고, 그것보다 높은 ratio인 95/5가 되면 단일 상이 되는 데는 유리하지만 CO<sub>2</sub> + NMP + H<sub>2</sub>O 혼합액의 단백질에 대한 용해도가 증가하여 다시금 H<sub>2</sub>O에 대한 노출 시간이 길어진다. 이러한 경향은 수율에도 영향을 미치는데, 65/5 ratio에서는 단일 상을 이루는데 NMP 양이 부족하여 단백질의 상당수가 H<sub>2</sub>O에 녹은 상태로 손실이 된다. 75/5, 85/5, 95/5 ratio 조건에 대해서는 수율이 비슷하게 나왔으나 VEGF 농도 값에서 약간의 차이를 보이므로 결국 VEGF 총량에서는 VEGF 농도 경향성을 따라간다.

[88] NMP/H<sub>2</sub>O ratio에 관계없이 건조물의 수용액 상에서의 VEGF 구조 유지율이 비슷하다. 이는 CO<sub>2</sub>의 온도, 압력 조건이 일정하여 노출된 pH 환경이 비슷하기 때문이다. 동결 건조로부터 얻어진 건조물은 수용액 상에서의 구조 유지율이 현저히 떨어져서 14일 후에는 PCA 결정화 공정의 건조물보다 VEGF 총량이 크게 감소한다. Control 샘플 역시 배양액에 남아있는 여러 가지 첨가물들이 수용액 상에서 VEGF의 가수 분해를 촉진하여서 VEGF 구조 유지율이 PCA 결정화 공정보다 낮아진다.

[89] PCA 결정화 공정에서 NMP/H<sub>2</sub>O ratio 조건으로 85g/5g을 선택하는 것이 바람직하며, 이후 PCA 결정화 공정에서의 실험들을 85g/5g에서 수행하였다.

[90]

[91] [세정 시간에 따른 단백질 구조 유지 및 안정성 비교]

[92] PCA 결정화 공정에서 세정 시간 조건(30, 60, 90 min)만을 변화시켜가며 실험을 수행하였고, 실험 조건 및 결과를 표 10 내지 12와 도 14 내지 17에 나타내었다. 표 10은 PCA 결정화 공정에서의 세정 시간 변수 별 실험 결과를 나타내고, 표 11은 세정 시간 변수 별 PCA 결정화 공정 건조물의 시간에 따른 ELISA 분석 결과를 나타내며, 표 12는 세정 시간 변수 별 PCA 결정화 공정 건조물이 14일간 수용액에 노출되었을 때의 VEGF 구조 유지율(%)을 나타낸다.

[93] [표 10]

[94]

| Sample  | 온도<br>(℃) | 압력<br>(bar) | CO <sub>2</sub> 유량<br>(mL/min) | 혼합액 유량<br>(mL/min) | NMP/H <sub>2</sub> O<br>ratio(w/w, g) | 혼합액 분사<br>시간(min) | 세정<br>시간<br>(min) | 질량(mg) |      |      | 잔류<br>용매<br>(ppm) |
|---------|-----------|-------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------|--------|------|------|-------------------|
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 수율(%)  |      |      |                   |
| PCA12   | 15        | 200         | 100                            | 1                  | 85/5                                  | 90                | 30                | a      | b    | c    | 0.66              |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 52.7   | 52.6 | 51.4 |                   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 91.7   | 91.5 | 89.4 |                   |
| PCA13   |           |             |                                |                    |                                       |                   | 60                | a      | b    | c    | 0.56              |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 49.7   | 50.7 | 51.1 |                   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 86.4   | 88.2 | 88.9 |                   |
| PCA14   |           |             |                                |                    |                                       |                   | 90                | a      | b    | c    | 0.53              |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 50.4   | 52.3 | 50.3 |                   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 87.7   | 91.0 | 87.5 |                   |
| FD      | -         |             |                                |                    |                                       |                   |                   | a      | b    | -    | -                 |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 45.2   | 39.5 |      |                   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 78.6   | 68.7 |      |                   |
| Control | -         |             |                                |                    |                                       |                   |                   | a      | -    | -    |                   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 57.5   |      |      |                   |
|         |           |             |                                |                    |                                       |                   |                   | 100    |      |      |                   |

[95]

[표 11]

[96]

| Sample  | 0 Day          |     |     |             |      |      | 14 Days        |     |     |             |      |      |
|---------|----------------|-----|-----|-------------|------|------|----------------|-----|-----|-------------|------|------|
|         | VEGF 농도(pg/mL) |     |     | VEGF 총량(pg) |      |      | VEGF 농도(pg/mL) |     |     | VEGF 총량(pg) |      |      |
| PCA12   | a              | b   | c   | a           | b    | c    | a              | b   | c   | a           | b    | c    |
|         | 684            | 736 | 693 | 3136        | 3375 | 3096 | 614            | 669 | 651 | 2915        | 3062 | 2909 |
| PCA13   | a              | b   | c   | a           | b    | c    | a              | b   | c   | a           | b    | c    |
|         | 696            | 820 | 735 | 3010        | 3615 | 3267 | 688            | 760 | 574 | 2973        | 3353 | 2551 |
| PCA14   | a              | b   | c   | a           | b    | c    | a              | b   | c   | a           | b    | c    |
|         | 676            | 771 | 763 | 2962        | 3507 | 3337 | 581            | 682 | 700 | 2548        | 3103 | 3060 |
| 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        |      |      |

[97]

[표 12]

[98]

| Sample            | PCA12 | PCA13 | PCA14 | FD   |
|-------------------|-------|-------|-------|------|
| VEGF 구조<br>유지율(%) | 91.5  | 89.8  | 88.8  | 57.0 |

[99]

[100]

표 10 내지 12와 도 14 내지 17을 참조하면, VEGF의 농도는 30min 이상의 세정 시간을 주면 VEGF 초기 농도 값에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 초기 30min의 세정 시간 단계에서 이미 단백질의 구조 파괴에 가장 큰 영향을 줄 수 있는 잔류 용매(NMP, H<sub>2</sub>O)의 대부분이 거의 제거된다. 수율은 모든 세정 시간에서 비슷하게 관찰된다. 또, VEGF의 총량 또한 세정 시간의 차이에 영향을 받지 않는다.

[101]

세정 시간에 관계없이 건조물의 수용액 상에서의 VEGF 구조 유지율이 비슷하다. 이는 CO<sub>2</sub>의 온도, 압력 조건이 일정하여 노출된 pH 환경이 비슷하기 때문이다. 동결 건조로부터 얻어진 건조물은 수용액 상에서의 구조 유지율이 현저히 떨어져서 14일 후에는 PCA 결정화 공정의 건조물보다 VEGF 총량이 크게 감소한다. Control 샘플 역시 배양액에 남아있는 여러 가지 첨가물들이

수용액 상에서 VEGF의 가수 분해를 촉진하여서 VEGF 구조 유지율이 PCA 결정화 공정보다 낮아진다.

- [102] 얻어진 샘플들에 포함된 잔류 용매가 일정 수준 이상이 될 경우 인체에 해를 입힐 수 있다. 따라서 각 세정 시간 조건 별로 얻어진 샘플들에 대해서 기체 크로마토그래피(Gas Chromatography)를 통해 잔류 용매의 양을 측정해 보았다. 그 결과 모든 세정 시간 조건에 대해서 1ppm 미만의 잔류 용매가 측정되었다. FDA(Food and Drug Administration)에 의하면 NMP의 섭취 제한은 530ppm으로 상기 샘플들은 1ppm 미만으로 인체에 해를 미치지 않는다.
- [103] PCA 결정화 공정에서 세정 시간 조건으로 30min을 선택하는 것이 바람직하다.
- [104]
- [105] 도 18은 각 공정의 최적 조건에서 얻어진 건조물의 성장 인자 어레이(Growth Factor Array)를 이용한 성장 인자의 발현 패턴을 나타낸다.
- [106] 도 18을 참조하면, PCA 결정화 및 동결 건조(FD) 모두에 대해서 40가지의 성장 인자들이 제대로 발현되는 것으로 나타났다.
- [107]
- [108] PCA 결정화 공정의 경우, 85g NMP/5g H<sub>2</sub>O ratio의 배양액을 이용하여 15°C, 200bar, 100mL/min의 CO<sub>2</sub> 유량, 1mL/min의 혼합액(NMP+배양액) 유량, 30min의 세정 조건으로 운전하였을 때 초기 VEGF의 구조 유지율과 총량, 그리고 14일간의 수용액 환경에 노출되었을 시의 VEGF의 구조 유지율과 총량에 있어서 가장 우수한 결과를 보인다.
- [109] PCA 결정화 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 PCA 결정화 공정이 더 유리하다. 따라서 PCA 결정화 공정을 통해 단백질을 건조하는 것이 동결 건조 공정을 이용하는 것보다 단백질의 손상을 억제할 수 있다.
- [110]
- [111] 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

- [112] 본 발명의 실시예들에 따른 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치 및 방법은 타겟 물질(건조물)의 구조 및 활성이 변성되는 것을 방지하면서 타겟 물질(건조물)을 건조할 수 있다. 예를 들어, 상기 결정화 장치 및 방법은 온도에

민감하고 미세구조를 유지하여야 하는 단백질 등을 포함하는 줄기세포 배양액을 결정화를 통해 건조하는데 사용될 수 있다. 상기 결정화 장치 및 방법은 에너지 등의 공정 비용이나 공정 시간에 있어서 동결 건조보다 우수하다. 또, 상기 결정화 장치 및 방법에 의해 대량 생산이 가능하다.

## 청구범위

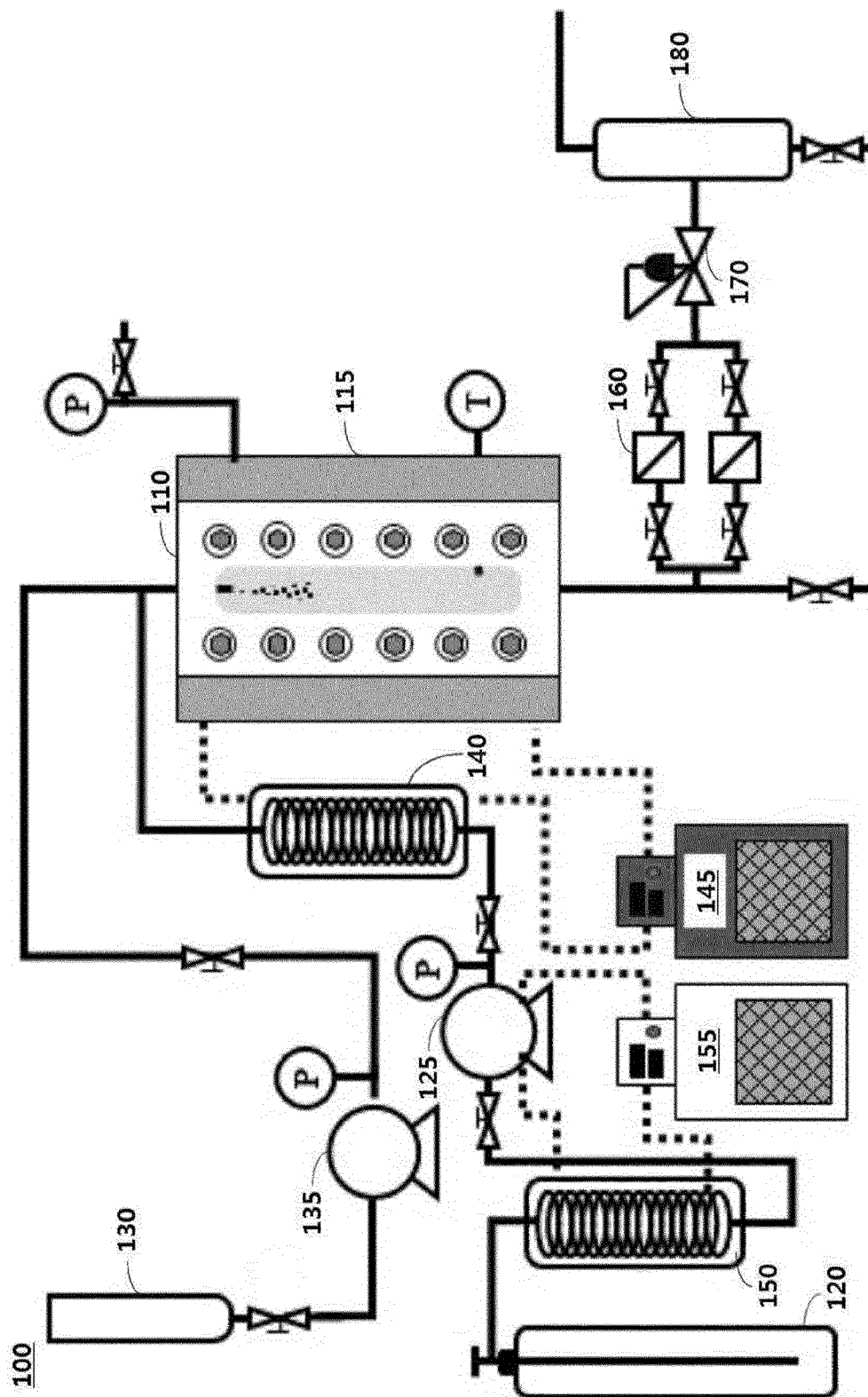
- [청구항 1] 용기에 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 공급하는 단계;  
상기 용기에 제3 용매를 공급하는 단계; 및  
상기 용기에 제2 용매를 공급하는 단계를 포함하고,  
상기 제1 내지 제3 용매는 다성분계 혼합물을 생성하고, 상기 타겟 물질은 석출되는 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,  
상기 배양액과 상기 제3 용매는 혼합된 후 상기 용기에 공급되는 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,  
상기 제3 용매는 상기 제1 용매와 상기 제2 용매의 두 상을 단일상으로 만드는 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,  
상기 제1 용매는 물을 포함하고,  
상기 제2 용매는 이산화탄소, DME(Dimethyl ether), N<sub>2</sub>O, 및 HFC(Hydrofluorocarbon) 중에서 적어도 하나를 포함하고,  
상기 제3 용매는 NMP(N-methyl-2-pyrrolidone), DMSO(Dimethyl sulfoxide), 및 DMF(Dimethylformamide) 중에서 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,  
상기 제2 용매는 액상 또는 초임계 상인 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,  
상기 석출된 타겟물질에 상기 제2 용매를 공급하여 상기 석출된 타겟물질을 세정하는 단계를 더 포함하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,  
상기 용기의 온도와 압력은 각각 0 ~ 40°C, 35 ~ 500bar인 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,  
상기 제3 용매 대 상기 제1 용매의 중량비는 10:1 ~ 30:1인 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서,  
상기 타겟 물질은 석출된 후에 미세 구조를 유지하는 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서,

상기 배양액은 줄기세포 배양액을 포함하고,  
상기 타겟 물질은 줄기세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 방법.

- [청구항 11] 제1 용매 및 상기 제1 용매에 녹아있는 타겟 물질을 포함하는 배양액을 건조하여 상기 타겟 물질을 획득하기 위한 장치로서,  
상기 배양액이 공급되는 고압 용기;  
상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에 제2 용매를 공급하는 제1 공급부;  
상기 고압 용기에 연결되어 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 용매를 예열하는 예열기를 포함하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서,  
상기 제1 공급부는 상기 제3 용매와 함께 상기 배양액을 상기 고압 용기에 공급하는 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치.
- [청구항 13] 제 11 항에 있어서,  
상기 고압 용기에 결합된 열전달 재킷을 더 포함하고,  
상기 고압 용기는 상기 열전달 재킷에 의해 가열되는 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치.
- [청구항 14] 제 11 항에 있어서,  
상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에서 석출되는 상기 타겟 물질을 필터링하여 회수하는 필터를 더 포함하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치.
- [청구항 15] 제 11 항에 있어서,  
상기 고압 용기에 연결되어 상기 고압 용기에서 배출되는 유체를 분리하는 기액 분리기를 더 포함하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치.
- [청구항 16] 제 15 항에 있어서,  
상기 고압 용기 및 상기 기액 분리기 사이에 배치되어 상기 고압 용기의 압력을 조절하는 백프레셔 조절기를 더 포함하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치.
- [청구항 17] 제 11 항에 있어서,  
상기 제3 용매는 상기 제1 용매와 상기 제2 용매의 두 상을 단일상으로 만드는 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치.
- [청구항 18] 제 11 항에 있어서,  
상기 제1 용매는 물을 포함하고,

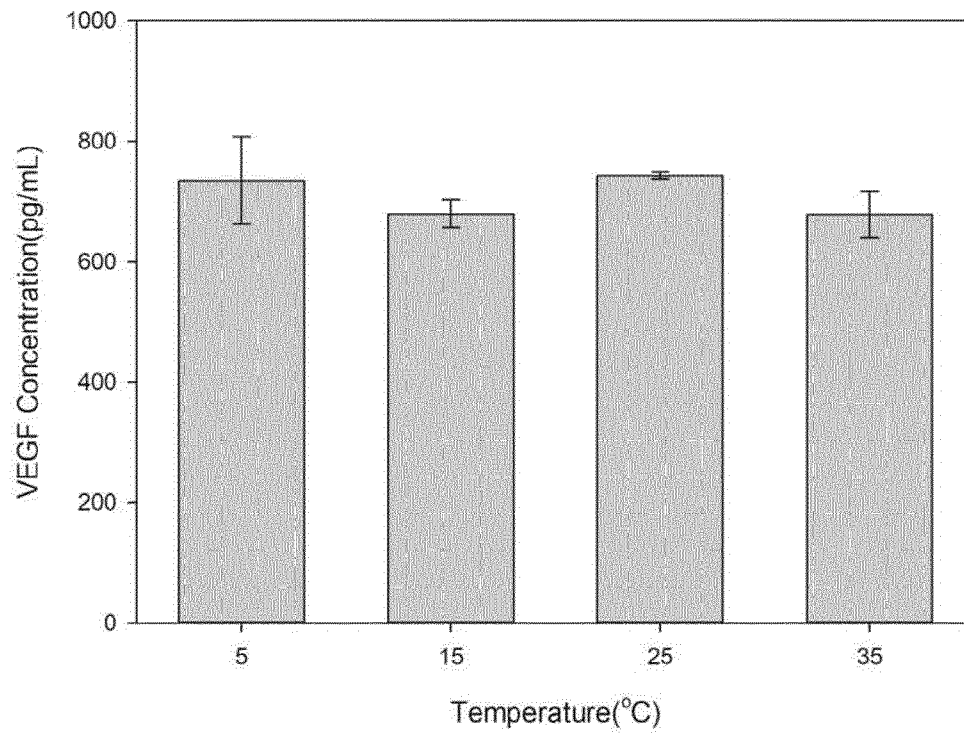
상기 제2 용매는 이산화탄소, DME(Dimethyl ether), N<sub>2</sub>O, 및 HFC(Hydrofluorocarbon) 중에서 적어도 하나를 포함하고, 상기 제3 용매는 NMP(N-methyl-2-pyrrolidone), DMSO(Dimethyl sulfoxide), 및 DMF(Dimethylformamide) 중에서 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 PCA 공정을 이용한 배양액의 결정화 장치.

[도 1]



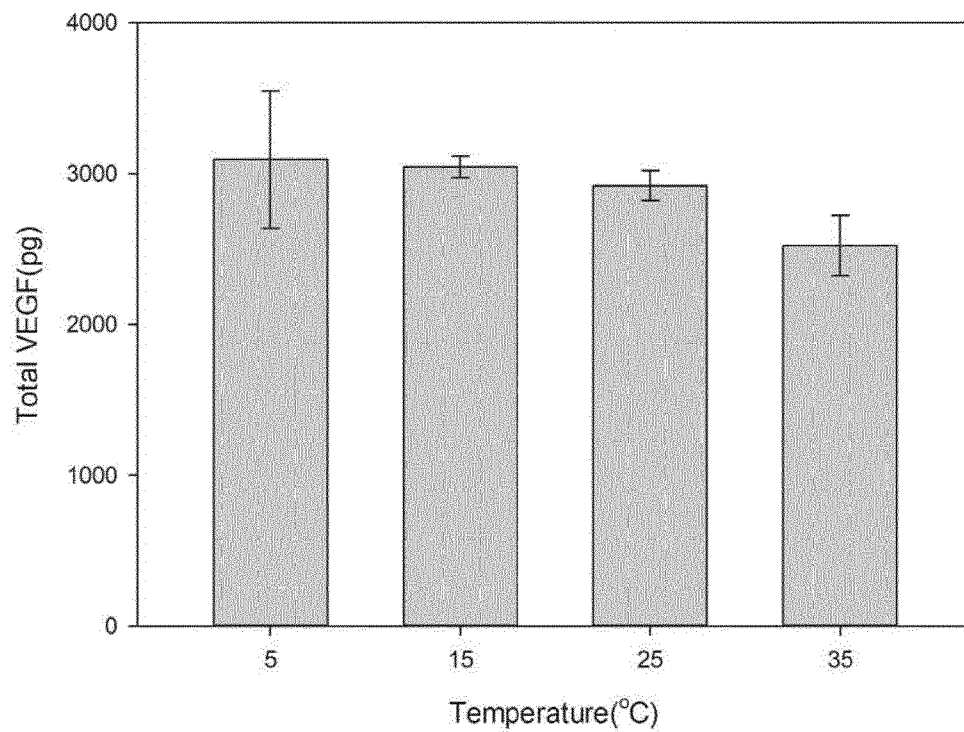
[도2]

PCA, Temperature Effect  
Concentration of Structure Preserved VEGF



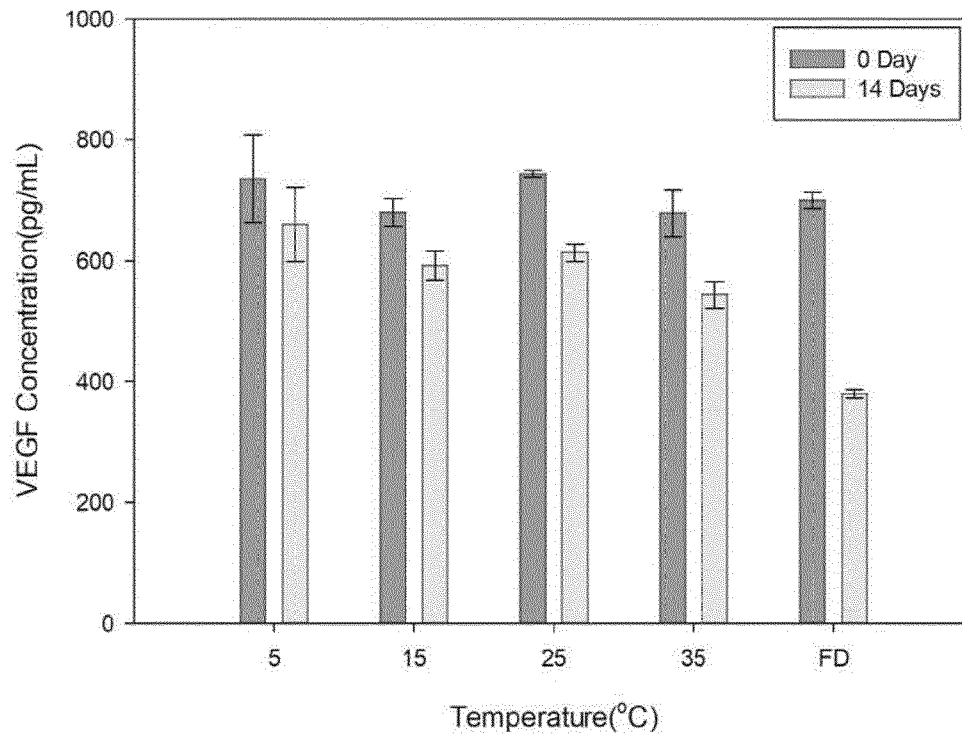
[도3]

PCA, Temperature Effect  
Total Amount of Structure Preserved VEGF



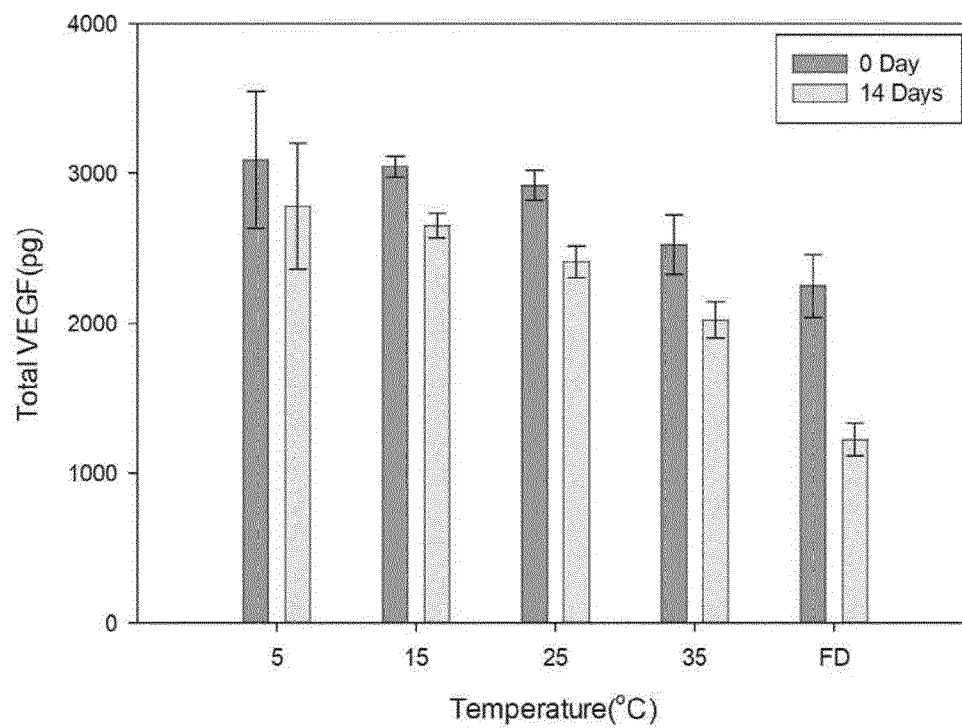
[도4]

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

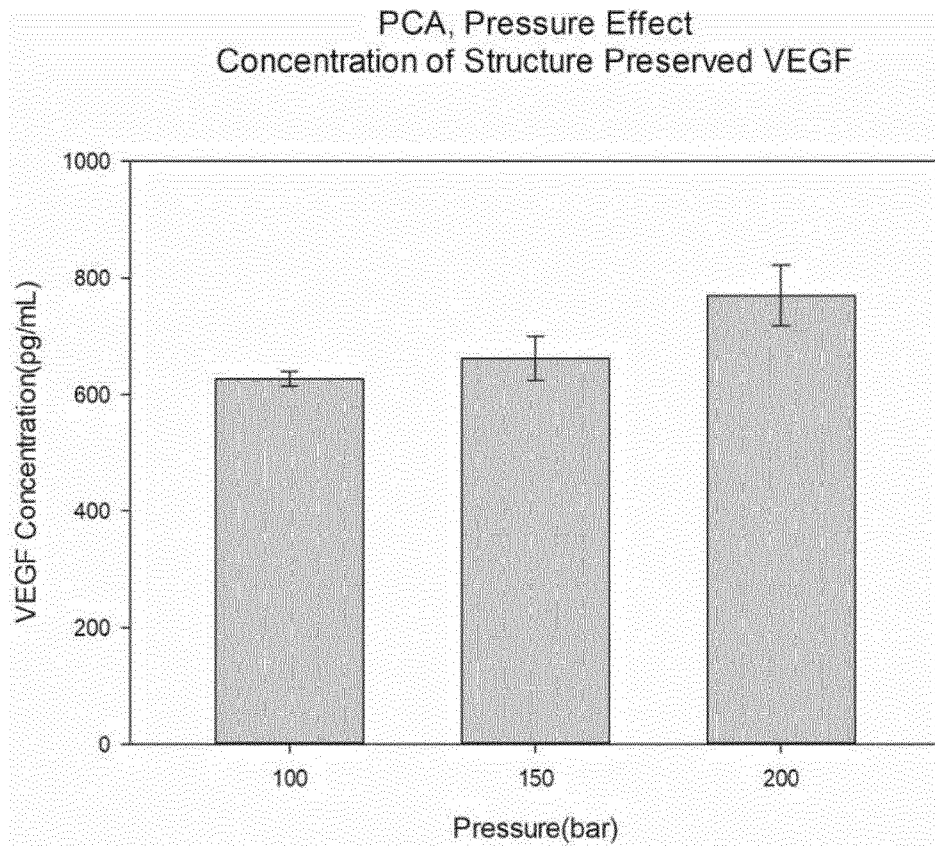


[도5]

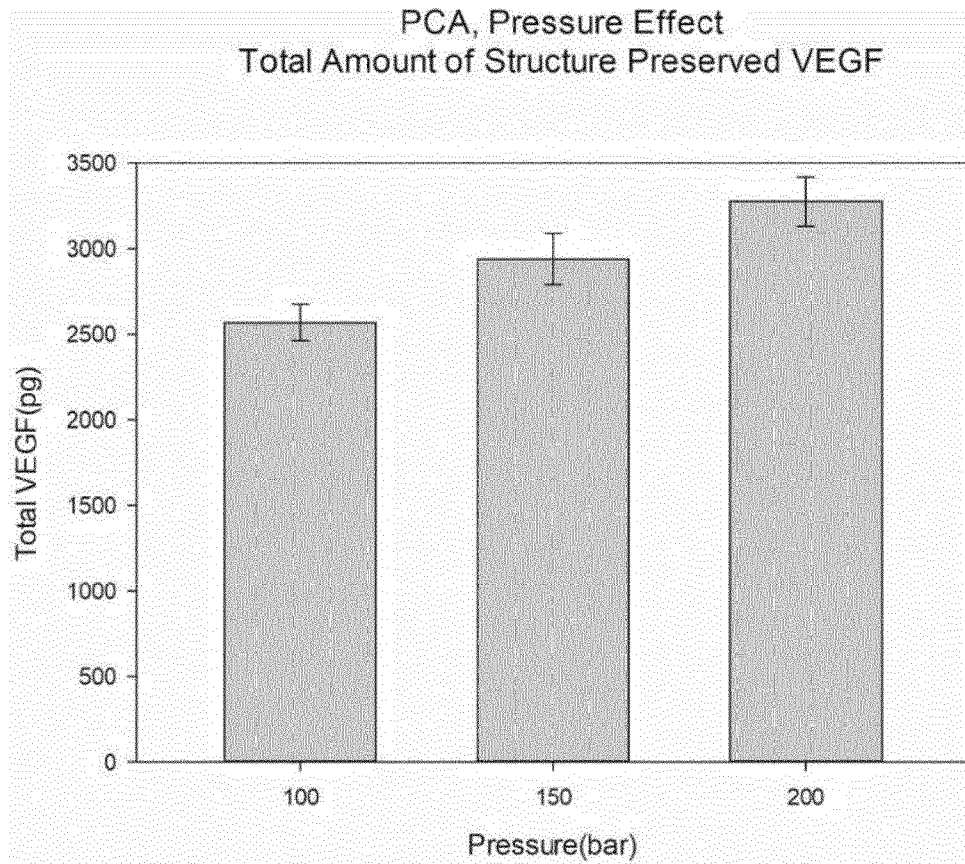
PCA, Temperature Effect - Stability Test  
Total Amount of Structure Preserved VEGF



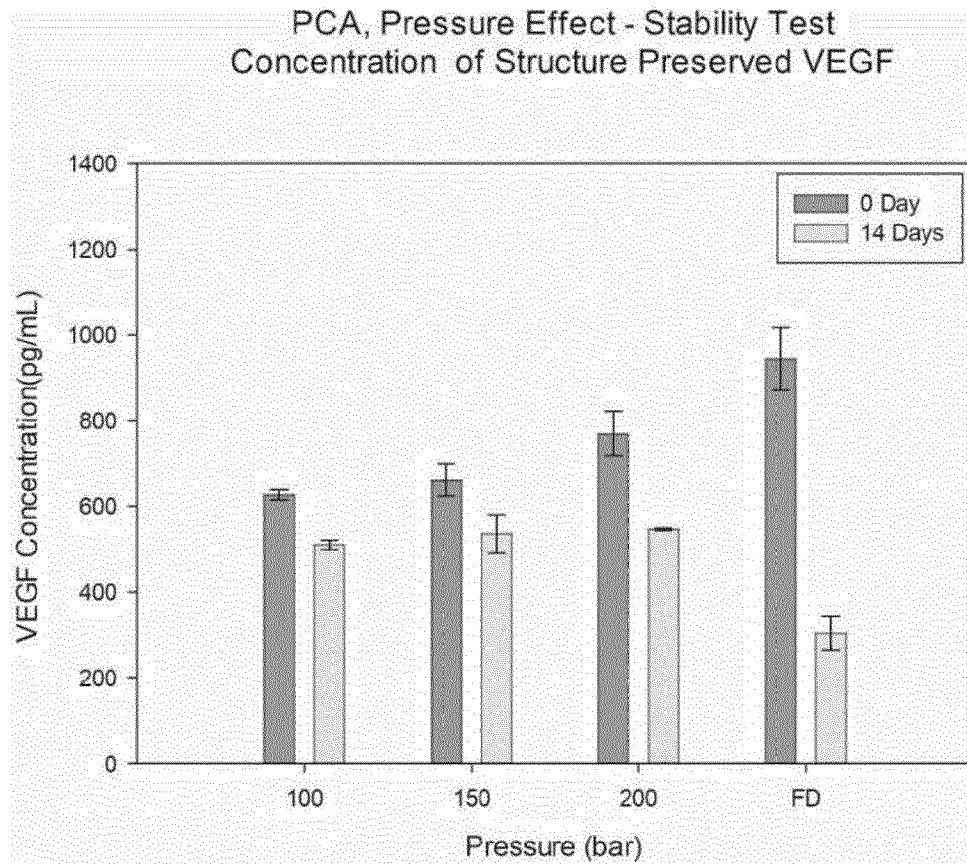
[도6]



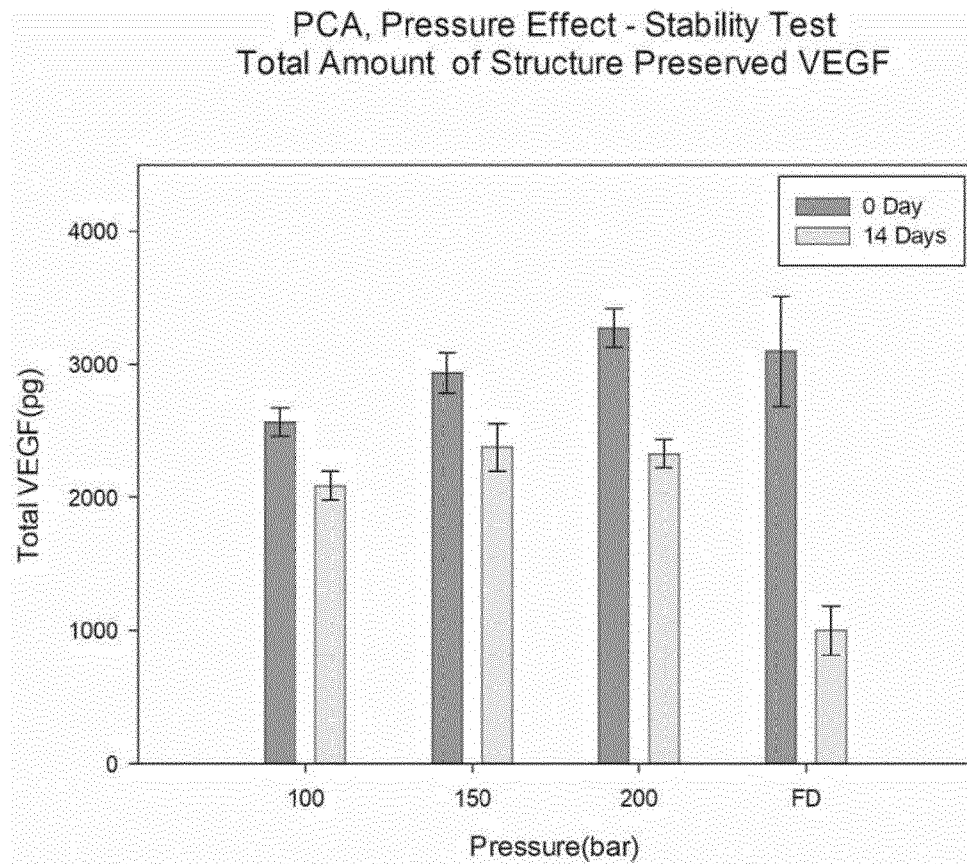
[도7]



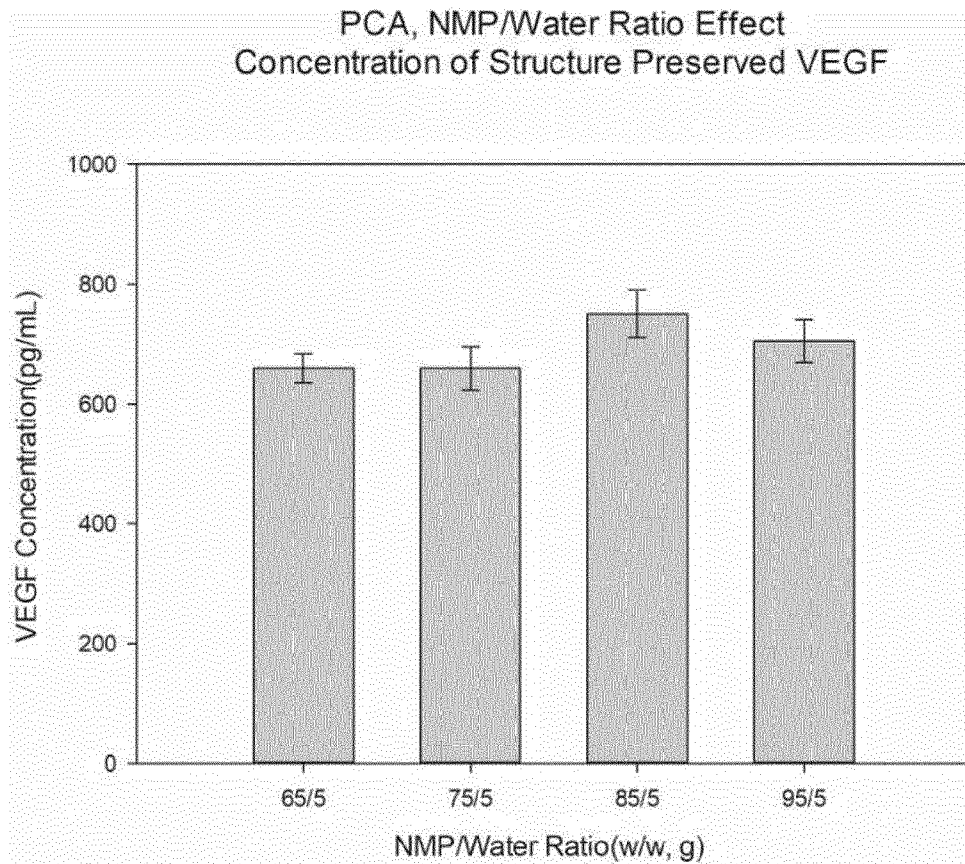
[도8]



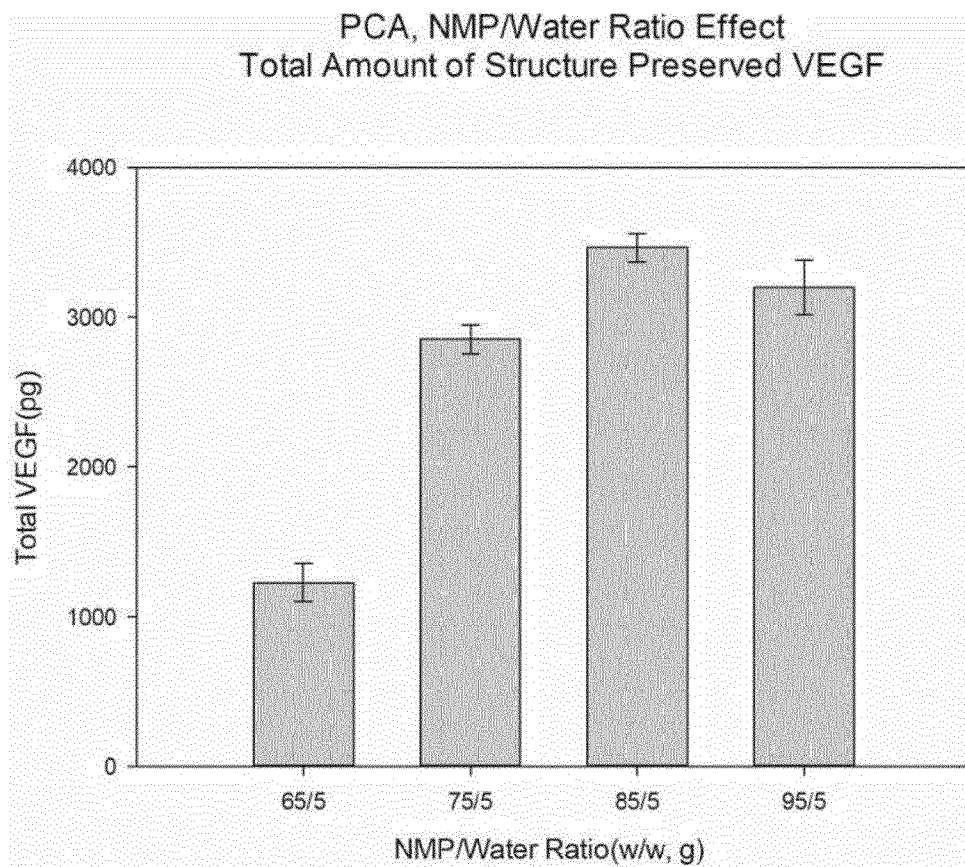
[도9]



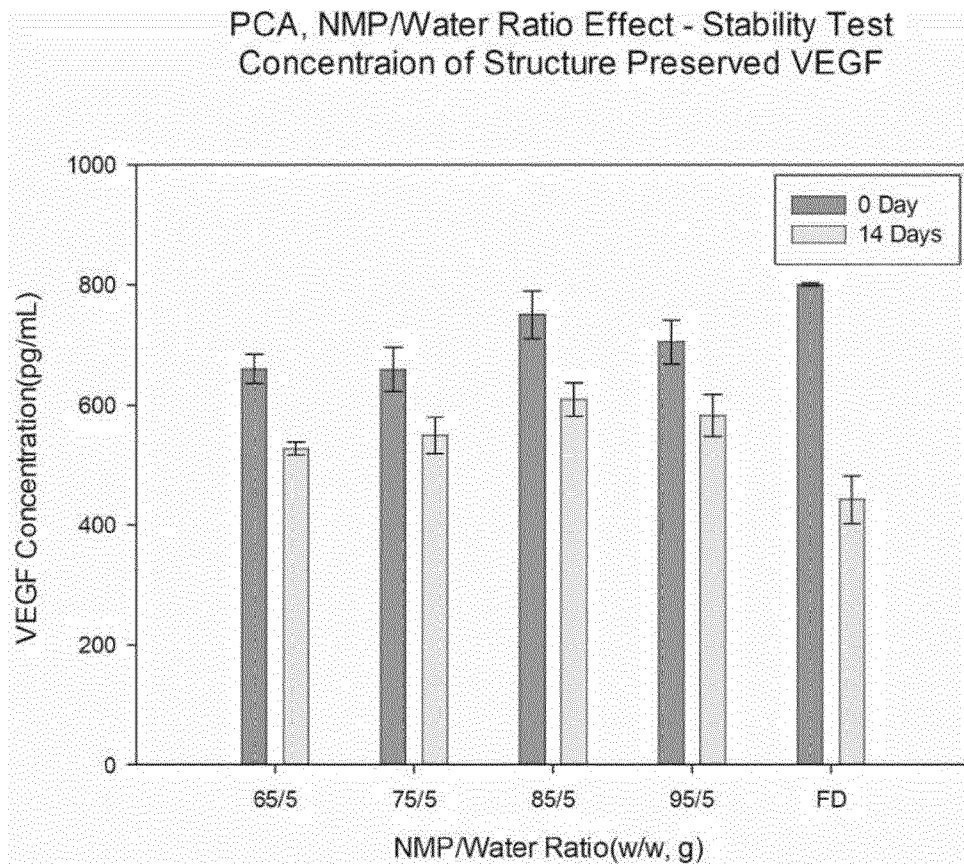
[도10]



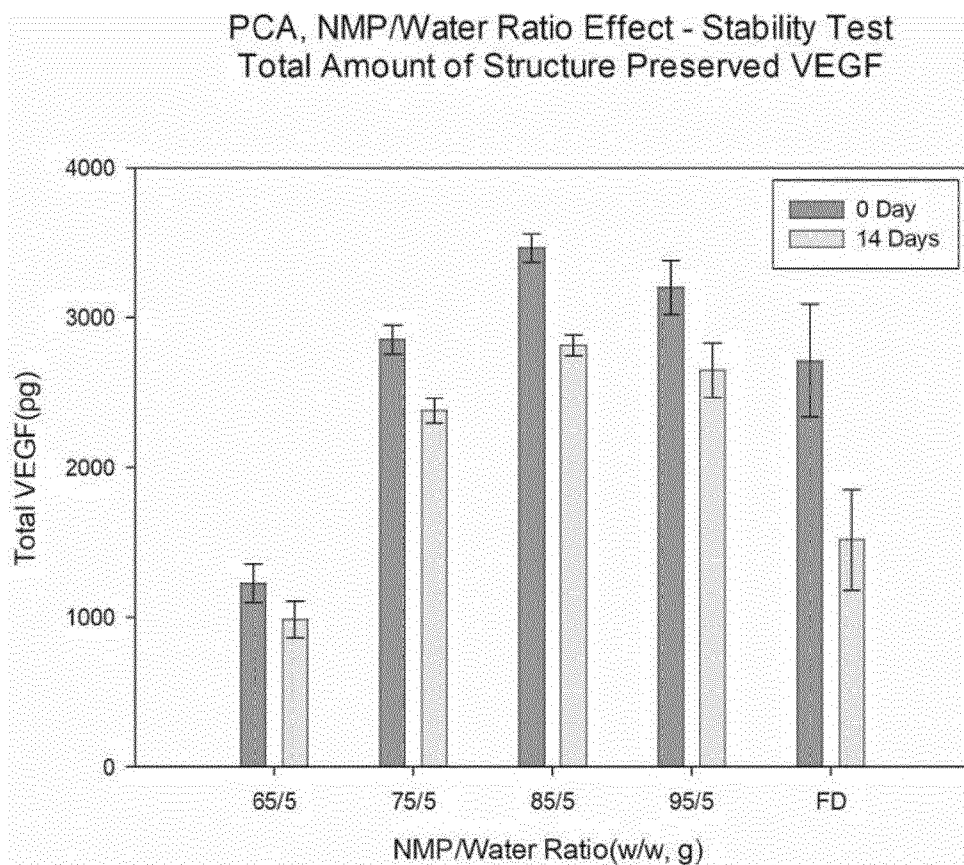
[도11]



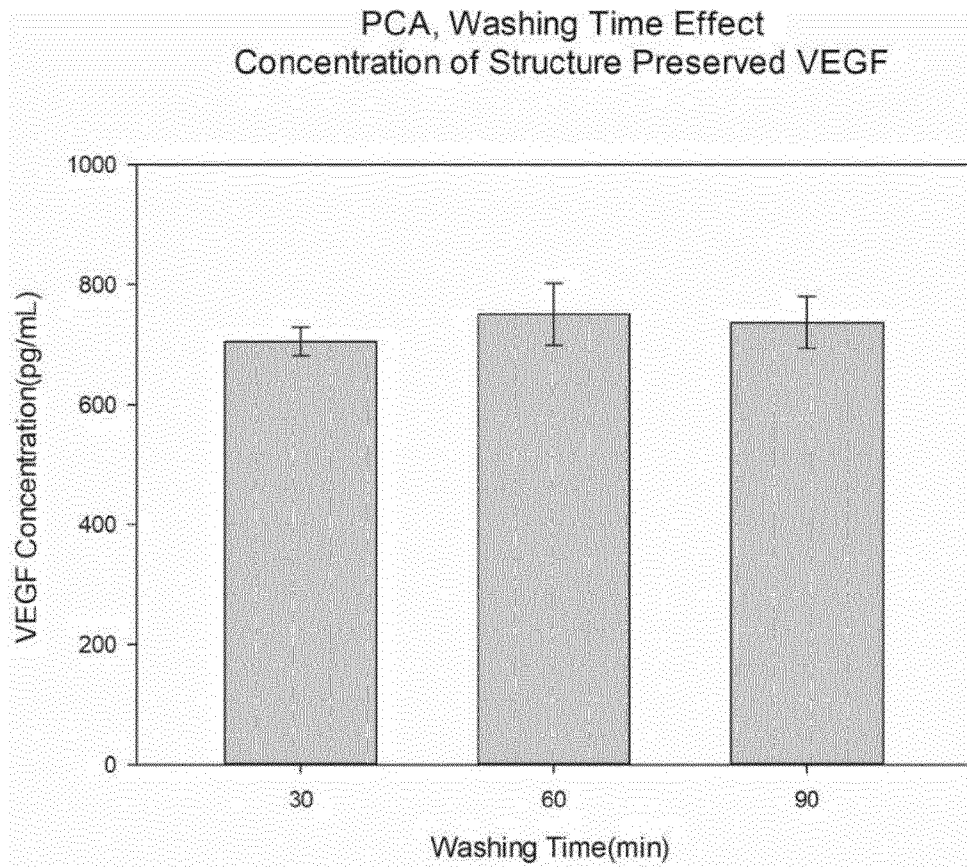
[도12]



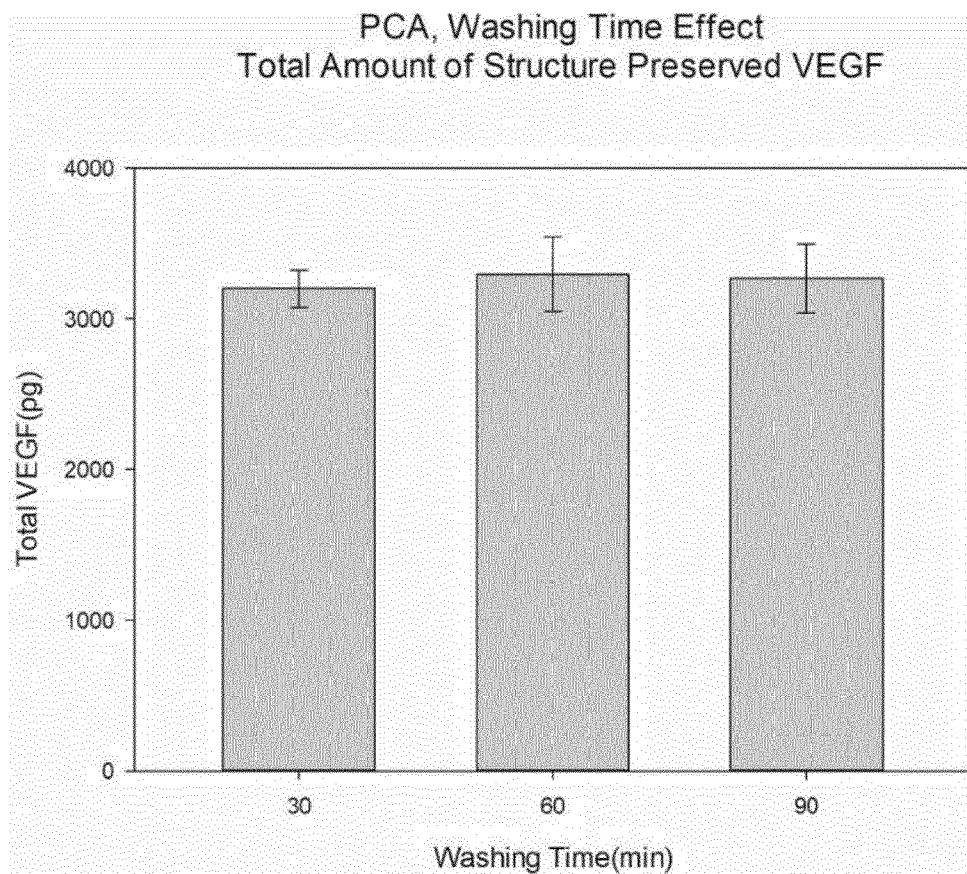
[도13]



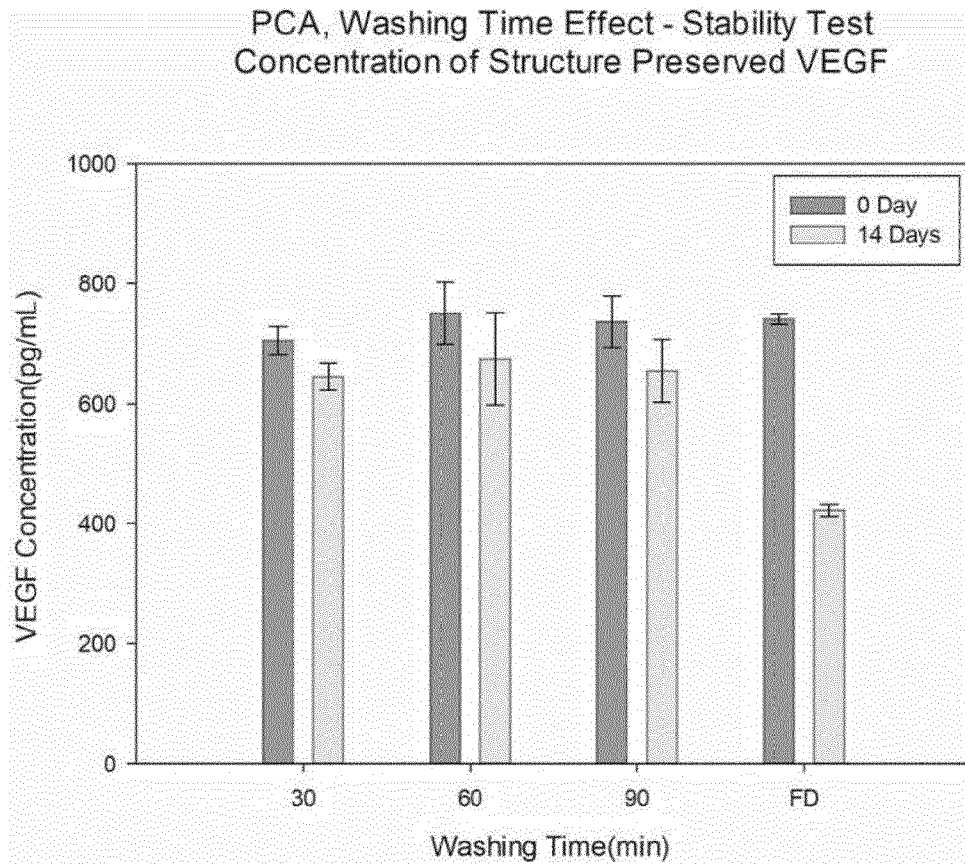
[도14]



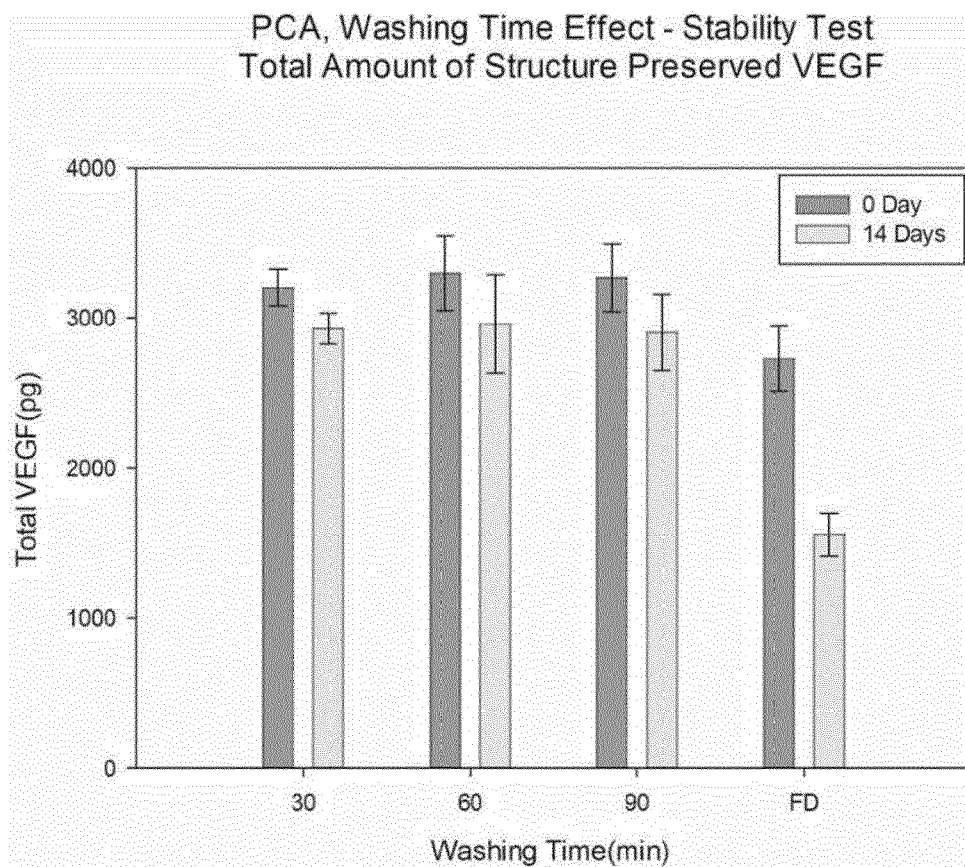
[도15]



[도16]



[도17]



[도 18]

