



- (51) 국제특허분류:
C07K 1/22 (2006.01) B01D 15/08 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/002859
- (22) 국제출원일: 2013년 4월 5일 (05.04.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0075883 2012년 7월 12일 (12.07.2012) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 정상전 (CHUNG, Sang Jeon); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 강효진 (KANG, Hyo Jin); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이영미 (LEE, Young-Mi); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 최원우 (CHOE, Weonu); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-080 서울특별시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2차 8층, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

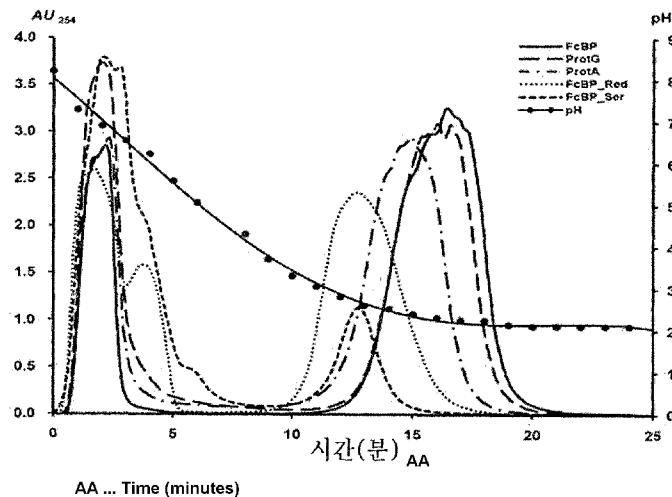
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: ADSORPTION COLUMN FOR ANTIBODY PURIFICATION USING FC BINDING PEPTIDE OF ANTIBODY

(54) 발명의 명칭: 항체의 Fc 부위 결합 펩타이드를 이용한 항체 정제용 흡착 칼럼



(57) Abstract: The present invention relates to an adsorption column for antibody purification using an Fc binding peptide (FcBP) of an antibody, and to a method for purifying an antibody using the adsorption column. More particularly, the present invention relates to an adsorption column for antibody purification, wherein the column is manufactured by developing and using FcBP of a new amino acid sequence or a hybrid where a linker binds to FcBP; the manufactured column has good binding ability for human IgG, may allow an antibody to be eluted under mild conditions, and exhibits antibody purification effectiveness at a purity of 95% or more; and the effectiveness of antibody purification does not deteriorate even when a durability test is performed on the column one hundred times or more. Thus, the present invention can solve problems such as high cost, low stability, and the possibility of contamination of a ligand having an affinity to a protein such as protein A and G.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 항체의 Fc 부위 결합 펩타이드(Fc binding peptide, FcBP)를 이용한 항체 정제용 흡착 칼럼 및 상기 흡착 칼럼을 이용하여 항체를 정제하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 새로운 아미노산 서열의 FcBP 또는 이에 링커(linker) 연결된 혼성체를 개발하여 이를 이용하여 칼럼을 제작하였으며, 제작된 칼럼은 인간 IgG에 대한 결합능력이 우수하고 온화한 조건에서 항체를 용출시킬 수 있으며 95% 이상의 순도를 가진 항체 정제 효과를 보였고, 칼럼의 내구성 실험에서 100 번 이상 사용하는 동안에도 항체 정제 효과가 저하되지 않는 것을 확인함으로써, 단백질 A 및 G와 같은 단백질 친화성 리간드의 고비용, 낮은 안정성 및 오염 가능성 등의 문제점을 해결할 수 있는 항체 정제용 흡착 칼럼에 관한 것이다.

【명세서】

【발명의 명칭】

항체의 Fc 부위 결합 펩타이드를 이용한 항체 정제용 흡착 칼럼

5 【기술분야】

본 발명은 항체의 Fc 부위에 특이적으로 결합하는 펩타이드(Fc binding peptide, FcBP)를 이용한 항체 정제용 흡착 칼럼, 및 상기 흡착 칼럼을 이용하여 항체를 정제하는 방법에 관한 것이다.

10 【배경기술】

질병의 치료 및 진단에 있어서, 항체의 사용이 증가하고 있으며, 임상시험을 마친 바이오 의약품의 약 20%가 항체 제제이다. 이에 항체의 생산 및 정제에 관련된 기술이 학문적 및 산업적 관심의 대상이 되고 있다(비특허문헌 1-5). 특히, 치료용적 항체의 제작에서 정제 등의 후속
15 과정이 전체 비용의 50 ~ 80 % 정도를 차지할 정도로 정제 단계가 비용 집약적이기 때문에 항체의 정제 기술을 개발하는데 많은 노력을 기울이고 있다(비특허문헌 5-6).

지난 20 년에 걸쳐서, 항체 정제는 일반적으로 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 이용하여 왔으며, 박테리아로부터
20 유래된 단백질 A 및 단백질 G 와 같은 천연의 IgG-결합 단백질(natural IgG-binding protein)이 친화성 리간드로서 흔히 사용되고 있다(비특허문헌 7-10). 그러나, 단백질 리간드는 생산 비용이 높고, 안정성이 낮으며, 박테리아 성분으로 인한 오염 가능성이 크다는 문제점이 있다. 더욱이 결합 항체를 용출시키기 위해 가혹한 조건이 요구되므로 항체가 변성될 가능성이 크다는
25 단점이 있다(비특허문헌 7 및 11).

이에 합성 리간드가 단백질 리간드의 대안으로 개발되어 왔다(비특허문헌 7, 12 및 13). 새로운 리간드는 티올(thiol), 염료(dyes), 트리아진계(triazine-based) 화합물(compound), 및 천연 및/또는 비천연의 펩타이드를 포함한다(비특허문헌 7, 12 및 14). 이와 같이 항체 리간드가

개발되었음에도 불구하고, 박테리아 유래 단백질이 여전히 IgG 정제를 위한 친화성 리간드로 일반적으로 사용되고 있는데 이는 주로 상기 단백질이 IgG 와 선택적이고 특이적으로 결합하여 정제의 효율이 높기 때문이다. 이러한 특이성 및 선택성은 단백질 A 및 단백질 G 의 IgG 에 대한 강한 결합 친화성($K_d = 10^{-5} \sim 10^{-8}$ M)과 관련이 있다. 이에 반하여 지금까지 보고된 대부분의 합성 리간드는 항체와의 결합 친화성이 $K_d = 10^{-3} \sim 10^{-5}$ M 정도(비특허문헌 7)로 항체와의 선택적 특이적 결합력이 낮다는 문제점이 있다.

본 발명자들은 이전 발명에서 IgG Fc-결합 펩타이드가 인간 IgG 에 대해 강한 결합 친화성($K_d = 85$ nM)을 가지고 있다는 것을 밝혔다.

본 발명자들은 IgG 와 높은 선택성 및 특이성을 가지고 결합하는 IgG Fc 도메인-결합 펩타이드(Fc domain-binding peptide, 이하 FcBP 라 함)를 개발하였고(대한민국 특허출원 제 10-2008-0060863 호), 이를 이용하여 표면 플라즈마 공명(surface plasmon resonance, SPR) 칩 위에 항체를 고정하는데 성공하였으며, 나아가 다른 고체상 표면(자서입자, 슬라이드 글라스 표면)에 항체를 고정하는데 이용하였다.

본 발명자들이 개발한 FcBP 는 면역글로불린 G 의 Fc 부위에 선택적이고 특이적으로 결합하는 저분자 펩타이드이다. 이런 FcBP 는 무작위 DNA 서열을 포함하는 단일가닥 합성 DNA 라이브러리로부터 IgG 의 Fc 단편을 포함하는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 선별하여 제작될 수 있다. 이런 FcBP 는 IgG 의 항원결합부위가 아닌 Fc 부위를 결합하기 때문에 IgG 의 항원 결합능에 영향을 미치지 않고 IgG 에 강하게 결합하기 때문에 여러 종류의 고체상 표면에서 IgG 에 배향성을 부여하여 고정시키는데 이용할 수 있다(대한민국 특허출원 제 10-2008-0060863 호).

항체를 정제하기 위해서는 우선 항체와 선택적 특이적으로 결합을 하여 시료로부터 원하는 항체를 흡착, 분리하여야 하고 그리고는 다시 이 흡착된 항체를 변성 없이 분리 용출시켜야한다.

본 발명자들은, FcBP 가 항체와의 결합력이 떨어날 뿐만 아니라, 결합된 항체를 비교적 완화된 조건에서 항체의 변성 없이 분리 용출시킬 수 있는 것을

발견하고, FcBP 를 이용한 항체 정제용 칼럼 및 이를 이용한 항체의 정제방법을 완성하였다.

다시 말하자면, 본 발명에서는 FcBP 를 이용하여 칼럼을 제작하였으며, 제작된 칼럼은 인간 IgG 에 대한 결합능력이 우수한 것을 확인하였다. 또한, 5 상기 칼럼은 온화한 조건에서 항체를 용출시킬 수 있고 95% 이상의 순도를 가진 항체 정제 효과를 보였으며, 칼럼의 내구성 실험에서 FcBP 칼럼은 100 번 이상(자료는 30 번 이상까지만 제시함) 사용하는 동안에도 효과가 저하되지 않는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

10 【선행기술문헌】

【비특허문헌】

(비특허문헌 1)S.J. Demarest, S.M. Glaser, Current Opinion in Drug Discovery and Development 11 270 (2008) 675.

(비특허문헌 2)S.J. Kim, Y. Park, H.J. Hong, Mol. Cells 20 (2005) 17.

(비특허문헌 3)D. Michaeli, Semin. Oncol. 32 (2005) 82.

(비특허문헌 4)B. Monzavi-Karbassi, T. Kieber-Emmons, Biotechniques 30 (2001) 170.

(비특허문헌 5)A.C.A. Roque, C.R. Lowe, M.A. Taipa, Biotechnol. 20 Prog. 20 (2004) 639.

(비특허문헌 6)N. Tugcu, D.J. Roush, K.E. Goklen, Biotechnol. Bioeng. 99 (2008) 599.

(비특허문헌 7)A.C.A. Roque, C.S.O. Silva, M.A. Taipa, J. Chromatogr. A 1160 (2007) 44.

25 (비특허문헌 8)A.A. Shukla, B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan, D. Low, J. Chromatogr. B 848 (2007) 278 28.

(비특허문헌 9)B. Akerstrom, T. Brodin, K. Reis, L. Bjorck, J. Immunol. 135 (1985) 2589.

(비특허문헌 10)L. Bjorck, G. Kronvall, J. Immunol. 133 (1984) 969.

(비특허문헌 11)G. Fassina, M. Ruvo, G. Palombo, A. Verdoliva, M. Marino, J. Biochem. Biophys. 282 Methods 49 (2001) 481.

(비특허문헌 12)R. Li, V. Dowd, D.J. Stewart, S.J. Burton, C.R. Lowe, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 190.

5 (비특허문헌 13)A. Verdoliva, D. Marasco, A. De Capua, A. Saporito, P. Bellofiore, V. Manfredi, R. Fattorusso, C. Pedone, M. Ruvo, ChemBioChem 6 (2005) 1307.

(비특허문헌 14)D. Low, R. O'Leary, N.S. Pujar, J. Chromatogr. B 848 (2007) 48.

10 (비특허문헌 15)Y. Jung, H.J. Kang, J.M. Lee, S.O. Jung, W.S. Yun, S.J. Chung, B.H. Chung, Anal. 288 Biochem. 374 (2008) 99.

(비특허문헌 16)W.L. DeLano, M.H. Ultsch, A.M. De Vos, J.A. Wells, Science 287 (2000) 1279.

(비특허문헌 17)K. Takatsu, T. Ishizaka, K. Ishizaka, J. Immunol. 15 114 (1975) 1838.

(비특허문헌 18)J.C. Le, P.V. Bondarenko, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16 (2005) 307.

(비특허문헌 19)N.G. Housden, S. Harrison, S.E. Roberts, J.A. Beckingham, M. Graille, E. Sutra, M.G. 293 Gore, Biochem. Soc. Trans. 31 20 (2003) 716.

(비특허문헌 20)J. Yang, M. Jin, J. Chen, Y. Yang, P. Zheng, A. Zhang, Y. Song, H. Zhou, H. Chen, J. 295 Vet. Diagn. Invest. 19 (2007) 355.

25 【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 항체의 Fc 부위와 결합하는 펩타이드(Fc binding peptide, FcBP)가 고정된 레진이 장착된 항체 정제용 흡착 칼럼을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 흡착 칼럼을 이용하여 항체를 정제하는 방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

- 5 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항체의 Fc 부위와 결합하는 펩타이드 (Fc binding peptide, FcBP)가 고정된 레진이 장착된 항체 정제용 흡착 칼럼을 제공한다.

또한, 본 발명은

- 1) 상기 FcBP가 고정된 레진이 장착된 흡착 칼럼에 항체를 포함하는 시료를 처리하여 상기 흡착 칼럼에 항체를 결합시키는 단계;
 10 2) 세척하여 결합된 항체만 남기는 단계; 및
 3) 세척된 흡착 칼럼으로부터 부착된 항체를 분리 용출시켜 항체를 회수하는 단계를 포함하는 항체의 정제 방법을 제공한다.

15 【유리한 효과】

인간 IgG의 결합 친화성(binding affinity)과 유사한, 높은 친화성을 갖는 FcBP(Fc-binding peptide)는 항체에 대한 결합 능력이 높고, 온화한 pH에서 항체를 용출시키므로 불안정한 단백질인 항체를 정제할 수 있으며, 100 번의 재사용 후에도 초기 항체 정제 능력을 그대로 가지므로 항체 정제용 칼럼에
 20 유용하게 이용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 친화성 칼럼에 결합한 허셉틴 및 pH 구배 완충용액으로의 용출을 보여주는 크로마토그램이다.

25 도 1a는 5가지 종류의 친화성 칼럼[FcBP 칼럼, FcBP-Ser(FcBP의 2개의

시스테인이 합성 동안 세린으로 치환됨) 칼럼, FcBP-Red(DTT에 의해 FcBP에서 이황화 결합을 감소시킴) 칼럼, 단백질 A 칼럼 및 단백질 G 칼럼]에서 각각 허셉틴에 대한 결합력을 보여주는 크로마토그램이다.

5 도 1b는 FcBP 칼럼과 단백질 칼럼의 허셉틴에 대한 결합력을 비교한 크로마토그램이다.

도 1c는 FcBP-red 칼럼과 단백질 칼럼의 허셉틴에 대한 결합력을 비교한 크로마토그램이다.

도 1d는 FcBP 칼럼, FcBP-Red 칼럼 및 FcBP-Ser 칼럼의 허셉틴에 대한 결합력을 비교한 크로마토그램이다.

10 도 2는 친화성 칼럼에 의한 돼지 IgG 정제의 크로마토그램이다.

도 3은 친화성 칼럼을 사용하여 정제된 돼지 IgG의 SDS-PAGE 분석을 수행한 결과를 보여주는 그림이다(IgG 중쇄(heavy chain) 및 경쇄(light chain)는 각각 * 및 ◀로 표시함).

도 3의 (A)는 단백질 G 칼럼을 사용하여 정제한 단백질들을 확인한 그림이다(레인 1: 분자량 마커, 레인 2: 전체 돼지 혈청 단백질: 레인 3 - 5: 분획물 2 - 4; 레인 6 - 10: 분획물 20 - 24)이다.

도 3의 (B)는 단백질 A 칼럼을 사용하여 정제한 단백질들을 확인한 그림이다(레인 1: 분자량 마커; 레인 2: 전체 돼지 항체 단백질; 레인 3 - 5: 분획물 2 - 4; 레인 6 - 10 분획물 19 - 23).

20 도 3의 (C)는 FcBP 칼럼을 사용하여 정제한 단백질들을 확인한 그림이다(레인 1: 분자량 마커; 레인 2: 전체 돼지 항체 단백질; 레인 3 - 5: 분획물 2 - 4; 레인 6 - 10 분획물 19 - 23).

도 3의 (D)는 FcBP 칼럼에서 정제된 돼지 IgG 항체를 웨스턴 블랏으로 확인한 결과를 보여주는 그림이다(레인 1: 분자량 마커; 레인 2: 전체 돼지 혈청 단백질; 레인 3: 분획물 3; 레인 4: 분획물 21; 레인 5 - 7: 레인 2 - 4에

25

대한 항돼지 IgG 웨스턴 블랏).

도 4는 적용된 샘플의 양에 대하여 FcBP 칼럼으로부터 IgG의 회수량을 보여주는 크로마토그램이다.

도 5는 FcBP 칼럼의 재사용에 따른 IgG 정제의 재생력을 보여주는 크로
5 마토그램이다.

도 6은 FcBP/돼지 IgG의 상호작용에 대한 SPR(surface plasmon resonance) 분석을 수행한 결과를 보여주는 그래프이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

10 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

항체를 정제하기 위해서는 항체가 칼럼(column)에 흡착되어 시료로부터 분리되어야 하며, 그리고 흡착된 항체가 변성 없이 용출되어야 한다.

본 발명은 항체의 Fc 부위와 결합하는 펩타이드(Fc binding peptide, FcBP)가 고정된 레진이 장착된 항체 정제용 흡착 칼럼을 제공한다.

15 본 발명에 있어서, 상기 FcBP는 면역글로불린 G(Immunoglobulin G, IgG)의 Fc 부위(domain)에 결합하는 올리고펩타이드는 모두 사용가능하며, 7 내지 17개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드인 것이 바람직하나 상기 아미노산의 갯수는 이에 한정되지 않는다.

상기 FcBP는 정제하고자 하는 항체의 Fc 부위에 높은
20 선택성(selectivity)과 특이성(specificity)을 가지고 결합한다. 또한, 상기 FcBP는 항체의 항원결합부위가 아닌 Fc 부위를 결합하기 때문에, 항체의 항원 결합력에 영향을 미치지 않는다. 또한, 상기 FcBP는 항체의 친화성 리간드로서 통상 수지 등의 고체상에 고정될 수 있다.

상기 FcBP는 DCHKRSFWADNCT(서열번호: 1), DCRTQFRPNQTCT(서열번호: 2),
25 DCQLCDFWRTRCT(서열번호: 3), DCFEDFNEQRTCT(서열번호: 4),

- DCLAKFLKGKDCT(서열번호: 5), DCWHRRTHKTFCT(서열번호: 6),
 DCRTIQTRSHWCT(서열번호: 7), DCIKLAQLHSVCT(서열번호: 8),
 DCWRHRNATEWCT(서열번호: 9), DCQNWIKDVHKCT(서열번호: 10),
 DCAWHLGELVWCT(서열번호: 11), DCAFHLGELVWCT(서열번호: 12),
 5 DCAYHLGELVWCT(서열번호: 13) 및 이들 아미노산 서열에서 한 개 또는 두 개의
 아미노산이 첨가, 결실 또는 치환된 아미노산 서열로 구성된 군으로부터
 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 올리고펩타이드인 것이
 바람직하다. 상기 아미노산 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

【표 1】

10 FcBP의 아미노산 서열

서열 번호	명칭	서열
1		DCHKRSFWADNCT
2		DCRTQFRPNQTCT
3		DCQLCDFWRTRCT
4		DCFEDFNEQRTCT
5		DCLAKFLKGKDCT
6		DCWHRRTHKTFCT
7		DCRTIQTRSHWCT
8		DCIKLAQLHSVCT
9		DCWRHRNATEWCT
10		DCQNWIKDVHKCT
11	FCBP-1	DCAWHLGELVWCT
12	FCBP-2	DCAFHLGELVWCT
13	FCBP-3	DCAYHLGELVWCT

14	FCBP-Ser	DSAWHLGELVWST
----	----------	---------------

상기 FcBP는 상기 아미노산 서열에서 두 개의 시스테인이 분자 내 이황화 결합을 하거나 하지 않은 올리고펩타이드가 모두 사용가능하며, 상기 아미노산 서열에서 두 개의 시스테인 잔기를 세린으로 치환시킨 FcBP-Ser은
5 DSAWHLGELVWST(서열번호: 14)인 올리고펩타이드도 사용가능하다.

본 발명에 있어서, 상기 항체 정제용 흡착 칼럼은 FcBP가 링커(linker)를 통해 레진에 연결될 수 있다.

상기 링커는 FcBP의 N-말단 또는 C-말단에 결합될 수 있고, C-말단에 결합되는 것이 바람직하다.

10 상기 링커(linker)는

1) $(\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_a\text{C}(=\text{O})-$, [여기서 n 은 1 ~ 30이고 a 는 1 ~ 10이다.]);

2) $(-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_a\text{NH}_2$, [여기서 n 은 1 ~ 50이고, a 는 2 ~ 10이]);

및

15 3) $(-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m(\text{CH}_2)_a\text{Y}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_b\text{NH}_2$, [여기서 m 및 n 은 각각 1 ~ 30이고, a 와 b 는 각각 2 ~ 10이며, Y 는 링커이고, 알킬, 산소($-\text{O}-$), 아민($-\text{NH}-$), 유레아($-\text{NHCONH}-$), 아마이드- $-\text{CONH}-$, 에스테르($-\text{COO}-$) 및 아릴로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나이다])로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 적절한 알킬,
20 펩타이드 또는 유사체일 수 있다.

상기 링커는 말단의 아민(NH_2)기가 말레이미드(maleimide), 아지드(azide) 및 알킨(alkyne)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의

기능기로 치환될 수 있으며, 그 외 다른 적절한 기능기로 치환된 것일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

이런 올리고 펩타이드에 링커 및 적절한 반응기의 도입은 항체의 용해도를 개선하고 고체기판 사이에 충분한 공간을 제공한다.

5 상기 FcBP 유도체는 하기 구조들로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 구조를 갖는 것일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

- 1) 아미노-dPEG₆-DCAWHLGELVWCT;
- 2) 아미노-dPEG₆-DCAFHLGELVWCT;
- 3) 아미노-dPEG₆-DCAYHLGELVWCT;
- 10 4) 아미노-dPEG₆-DSAWHLGELVWST;
- 5) Ac-DCAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 6) Ac-DCAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 7) Ac-DCAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 8) Ac-DSAWHLGELVWST-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 15 9) Ac-DCAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 10) Ac-DCAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 11) Ac-DCAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 12) Suc-DCAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 13) Suc-DCAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 20 14) Suc-DCAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 15) Suc-DSAWHLGELVWST-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 16) Suc-DCAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 17) Suc-DCAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 18) Suc-DCAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 25 19) Suc-CAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;

20) Suc-CAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;

21) Suc-CAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂O CH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;

22) Suc-SAWHLGELVWST-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;

23) Suc-CAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;

5 24) Suc-CAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂; 및

25) Suc-CAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂.

본 발명에 있어서, 상기 레진은 아가로스, 세파로스, 셀룰로스, 덱스트란, 폴리아크릴 레이트 및 폴리스틸렌으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 세파로스인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

10 본 발명의 실시예에서는 1) Ac-DCAWHLGELVWCT-(C-말단 링커); 2) (N-말단 링커)-DCAWHLGELVWCT-CO₂H (또는 CONH₂); 3) Ac-DCAXHLGELVWCT-(C-말단 링커)(X = F 또는 Y); 4) (N-말단 링커)-DCAXHLGELVWCT-CO₂H (또는 CONH₂)(X = F 또는 Y); 5) Ac-DSAXHLGELVWST-(C-말단 링커); 및 6) (N-말단 링커)-DSAXHLGELVWST-CO₂H (또는 CONH₂) [본 실시예에서는 N-말단 링커로는
15 NH₂(CH₂CH₂O)₆CH₂CH₂CO-를 그리고 C-말단 링커로는 NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂ 또는 NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂를 사용함]의 다양한 FcBP-링커 혼성체를 제조한 후, 이들을 각각 레진에 고정시킨 다음, 상기 레진을 칼럼에 장착하여 다양한 FcBP 친화성 흡착 칼럼을 제작하였다.

본 발명의 실시예에서는 본 발명에서 제작된 FcBP 친화성 흡착 칼럼의
20 IgG에 대한 결합력을 알아보기 위해, 상기 다양한 FcBP 친화성 흡착 칼럼을 이용하여 허셉틴에 대한 결합력을 측정한 결과, 매우 우수한 허셉틴에 대한 결합력을 나타내었다. 이런 결합력은 단백질 A 및 단백질 G를 이용한 흡착 칼럼과 유사한 수준임을 확인하였다(도 1a 및 도 1b 참조).

본 발명의 실시예에서는 FcBP의 이황화 결합이 IgG에 대한 결합력에
25 미치는 영향을 알아보기 위해, FcBP에 시스테인 잔기를 세린으로 치환한 FcBP-

Ser, 및 FcBP의 이황화 결합을 감소시킨 FcBP-red를 각각 이용한 칼럼을 제작한 후 허셉틴에 대한 결합력을 측정한 결과, 상기 FcBP 친화성 흡착 칼럼에 비해 FcBP-Ser 및 FcBP-red의 IgG에 대한 결합력은 다소 낮아졌으나 여전히 우수한 허셉틴에 대한 결합력을 나타내었다(도 1a 및 도 1b 참조).

5 본 발명의 실시예에서는 본 발명에서 제작된 FcBP 친화성 흡착 칼럼에 흡착된 IgG가 온화한 조건에서 용출이 가능한지 알아보기 위해, FcBP 흡착 칼럼, 단백질 A 칼럼, 단백질 G 칼럼, FcBP-Ser 칼럼 및 FcBP-red 칼럼에 각각 흡착된 IgG를 pH 구배 완충용액을 이용하여 용출시킨 결과, FcBP 흡착 칼럼의 경우 단백질 A 또는 단백질 G에 비해 더 온화한 조건(pH 2.5 ~ 5.0)에서 IgG가
10 분리되는 것을 확인하였다(도 1c 및 도 1d 참조).

구체적으로, 본 발명에서 제작된 FcBP 흡착 칼럼은 항체 결합 후 해리속도가 빨라서 pH 2.5 ~ 5.0의 완충용액으로 항체의 용출이 가능하였다. FcBP의 아미노산 서열 중 두 개의 시스테인이 분자내 이황화 결합을 형성한 경우에는 pH 2.5 ~ 3.0의 완충용액으로 항체의 용출이 가능하였고, FcBP의
15 아미노산 서열 중 두 개의 시스테인이 분자내 이황화 결합이 제거된 경우에는 pH 3.0 ~ 5.0의 완충용액으로 항체의 용출이 가능한 것을 확인하였다. 이는 FcBP 리간드가 IgG를 정제하는데 사용할 때, 산에 의해 유도되는 IgG 활성의 손실을 극복할 수 있는 장점을 가지는 것을 알 수 있었다. 왜냐하면 용해 완충용액이 다른 칼럼의 실험에서 요구되는 것보다 더 높은 pH의 산성에서도
20 정제할 수 있기 때문이었다.

본 발명의 실시예에서는 본 발명에서 제작된 FcBP 친화성 흡착 칼럼의 돼지 IgG의 분리 능력을 확인하기 위해, 돼지 항체를 FcBP 친화성 칼럼에 흡착시킨 후 pH 구배 완충용액을 이용하여 용출 정도를 측정하였고 정제하여 얻은 분획물을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏을 이용하여 확인한 결과, FcBP 칼럼은
25 pH 2.5 ~ pH 5.0의 온화한 조건에서 IgG가 용출되는 것을 확인하였고, FcBP

칼럼의 정제된 양이 단백질 G 및 단백질 A의 정제한 양보다 많음을 확인하였다(도 3의 A 내지 D 참조).

본 발명의 실시예에서는 본 발명에서 제작된 FcBP 친화성 흡착 칼럼의 재사용에 따른 IgG의 회수량을 알아보기 위해, 돼지 혈청 단백질을 FcBP 친화성 칼럼에 적재하여 정제된 IgG의 회수량을 확인하였으며, 30회까지 반복하여 재사용하면서 IgG의 회수량을 확인한 결과, FcBP 칼럼은 적재한 단백질 총량이 늘어날수록 IgG 회수량이 감소하였고, 반복 횟수에 상관없이 재사용이 가능한 것을 확인하였다(도 4 내지 도 6 참조).

따라서, 본 발명의 FcBP 친화성 흡착 칼럼은 IgG에 대한 높은 결합력을 가지고, 흡착된 IgG를 온화한 조건(pH= 2.5 ~ 5.0)에서도 용출할 수 있으며, 100번의 재사용 후에도 초기 IgG 정제 능력을 유지할 수 있음을 확인함으로써, 단백질 A 및 단백질 G와 같은 단백질 친화성 리간드를 이용한 흡착 칼럼을 대체하는 항체 정제용 흡착 칼럼으로 유용하게 이용될 수 있다.

또한, 본 발명은 FcBP가 고정된 레진이 장착된 항체 정제용 흡착 칼럼을 이용한 항체의 정제 방법을 제공한다.

구체적으로, 상기 방법은

- 1) 본 발명의 FcBP가 고정된 레진이 장착된 흡착 칼럼에 항체를 포함하는 시료를 처리하여 상기 흡착 칼럼에 항체를 결합시키는 단계;
- 2) 세척하여 결합된 항체만 남기는 단계; 및
- 3) 세척된 흡착 칼럼으로부터 부착된 항체를 분리 용출시켜 항체를 회수하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 항체는 IgG인 것을 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 항체의 결합은 pH 6.5 내지 pH 8.0에서 수행하는 것이 바람직하다.

상기 방법에 있어서, 상기 단계 2)의 세척은 pH 5.5 내지 pH 6.5의 완충용액을 사용하는 것이 바람직하다.

상기 방법에 있어서, 상기 단계 3)의 항체의 용출은 pH 구배 완충용액 또는 일정 pH 완충액을 이용하여 수행하는 것이 바람직하나 상기 방법에
5 한정되지 않는다. pH 구배 완충용액을 사용하는 경우, pH 2.5 내지 pH 5.0의 용출 완충용액을 사용하여 항체를 용출시키는 것이 바람직하다.

본 발명의 FcBP를 이용하여 제작된 흡착 칼럼은 인간 IgG에 대한 결합능력이 우수하고, 단백질 A 및 G를 이용한 칼럼에 비교하여 보다 온화한 조건에서 항체를 용출시킬 수 있으며, 95% 이상의 순도를 가진 항체 정제
10 효과를 보였으며, 칼럼의 내구성 실험에서 100번 이상 재사용하는 동안에도 항체 정제 효과가 저하되지 않는 것을 확인함으로써, 항체 정제용 흡착 칼럼으로 유용하게 이용될 수 있다.

【발명의 실시를 위한 형태】

15 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 더욱 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> N 말단에 링커가 도입된 FcBP 1의 제조

20 상기 [표 1]에서 나타난 FcBP들 중에서 FcBP-1, FcBP-2, FcBP-3, 그리고 FcBP-Ser의 고체상 합성 방법과 이들 펩티드의 N-말단에 아미노-dPEG₆-산(Peptide International, 미국) 링커가 도입된 아미노-dPEG₆-FcBP-1, 아미노-dPEG₆-FcBP-2, 아미노-dPEG₆-FcBP-3, 아미노-dPEG₆-FcBP-Ser의 고체상 합성법을 나타내었다. 명세서에 언급된 다른 펩티드 및 그 유도체의 합성에도
25 실시예에 나타난 고체상 펩티드 합성방법을 사용하였다.

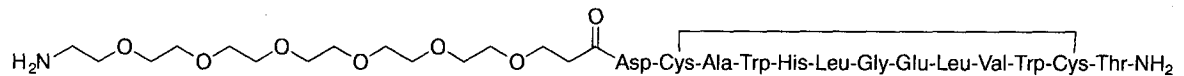
펩티드 합성에 사용된 시약은 DMF, DCM, DIPEA, 0.5 M 2-(1H-벤조티라졸(benzotriazole)-1-yl)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄
 헥사플로포스페이트(hexafluorophosphate, HBTU) 함유 DMF, 0.5 M
 하이드록시벤조티라졸(hydroxybenzotirazole, HOBt)) 함유 DMF, 20% 피페리딘
 5 함유 DMF이며, 열거된 Fmoc 아미노산 블록 및 링커를 사용하여 C-말단
 아미노산부터 고체상 펩티드 합성법에 따라 순차적으로 진행하였다.

<1-1> 아미노-dPEG₆-FcBP-1

(i) 리간드 구조

10 환원: Amino-dPEG₆-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-
 Thr-NH₂

산화:



(ii) 사용된 아미노산 전구체 목록

15 Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-
 Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L- Leucine,
 Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH,
 Fmoc-Asp(tBu)-OH 및 Fmoc-N-amido-dPEG₆-acid

(iii) 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조

20 (a) 아미노산 도입

하기 과정에서 사용된 시약의 양은 0.25 mmole에 기초하였다. 0.5 g의
 클리어 아미드 수지(Clear amide resin, 0.5 mmole/g, Peptide International,
 미국)를 합성반응기에 넣고, 각각의 Fmoc-아미노산 블록 1 mmole의 무게를
 달아 펩티드 아미노산 서열 순서대로 C-말단에서부터 N-말단까지 준비하였다.

클리어 아미드 수지로부터 Fmoc 보호를 제거하고, Fmoc-아미노산을 활성화하며, 클리어 아미드 수지에 활성화된 잔기를 부착하는 반응을 C-말단 아미노산부터 순차적으로 진행하였다. Fmoc의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF에서 수행하였고 잔기의 활성화 및 도입은 서열에 맞추어 준비한 아미노산을 2 ml 0.5 M HOBT
 5 함유 DMF용액, 2 ml 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액 그리고 174 μ l DIPEA와 5분간 혼합한 다음 수지가 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다. 도입 반응의 확인은 카이저 시험법으로 수행하였으며 미반응으로 확인되면 도입 반응을 1 회 더 반복하거나 20% Ac_2O 함유 DMF 용액으로 캡핑을 실시하였다. 각 도입 반응과 Fmoc 제거 과정에서 다음 단계로 넘어가기 전에 DMF와 DCM으로 수지를
 10 충분히 세척하였다. 이러한 과정은 FcBP-1의 펩티드 서열이 완성될 때까지 반복하였다. 합성이 끝난 후에, 보호기로 보호된 FcBP-1가 부착된 수지를 펩티드 반응기에서 건조하였고 중량을 측정하였다(H-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Trp(Boc)-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-순수 아미드 레진은 1.20 g).

15 (b) 링커의 도입

상기 <실시예 1>의 (a)과정에서 완성한 보호기로 보호된 FcBP-1가 부착된 수지에서 펩티드의 N-말단에 링커를 도입하는 과정을 실시하였다. 이때 사용한 링커는 아미노-dPEG₆-acid를 사용하였다. 아미노-dPEG₆-acid의 도입은 일반적인 고체상 펩티드 합성법에 따라 진행하였다. <실시예 1>의 a에서
 20 완성한 펩티드가 부착된 수지 중에서 250 mg을 덜어내어 반응기에 넣고 DCM을 붓고 10 분 이상 정치하여 충분히 불렸다. 0.2 mmole의 Fmoc-amido-dPEG₆-acid와 0.4 ml 0.5 M HOBT 함유 DMF용액, 0.4 ml 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액 그리고 34.8 μ l DIPEA와 5 분간 혼합한 다음 수지가 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다. 도입 반응의 확인은 카이저 시험법으로 수행하였으며
 25 미반응으로 확인되면 도입 반응을 1 회 더 반복하거나 20% Ac_2O 함유 DMF

용액으로 캡핑을 실시하였다. 링커의 도입을 확인한 다음 20% 피페리딘(piperidine) 함유 DMF 용액(3 x 5 min)으로 처리하고 DMF와 DCM으로 수지를 충분히 세척한 다음 진공에서 건조하였다(1-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oyl-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Trp(Boc)-His(Trt)-Leu-Gly-
 5 Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-순수 아미드 레진은 249 mg).

(c) 보호기의 제거와 수지의 분리

상기 <실시예 1>의 (b)과정에서 준비한 펩티드가 부착된 수지 100 mg을 TFA, TIS, 물 및 EDT(94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 ml과 함께 실온에서 120분간 교반하여 수지에서 펩티드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을
 10 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩티드를 침전시켰다. 침전된 펩티드를 에테르로 3회 더 세척하고 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% AcCN 함유 물에 녹인 다음 6시간 동안 교반한 다음 농축하였다. 농축액을 ACN:0.1 M 아세트산암모늄(ammonium acetate) 1:1 용액에 0.1 mg/ml 농도로 녹인 다음 공기에 노출된 상태로 24 시간 교반하였다.
 15 이황화 결합(Disulfide) 형성 반응의 진행은 HPLC로 관측하였으며 더 이상 진행하지 않는 것으로 판단되면 반응액을 동결건조하여 펩티드 침전물을 얻었다(29mg).

(d) 정제

상기 <실시예 1>의 (c)과정에서 동결건조하여 얻은 펩티드 침전물을
 20 prep-LC 1차 정제조건에서 분리한 다음 prep-LC 2차 정제조건으로 추가 정제하고 동결 건조하였다. 얻어진 펩티드는 각각 98% 이상의 순도임을 분석용 HPLC로 확인하였으며, 합성한 펩티드의 분자량을 말디 토프 질량 분석기로 확인하였다(아미노-dPEG₆-FcBP-1은 20 mg 얻었고 MW = 1865.08 및 M+1 1866.51이었다).

His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH 및 Fmoc-N-amido-dPEG₆-acid

(iii) 아미노-dPEG₆-FcBP-2의 제조

(a) 아미노산 도입

- 5 상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따른 아미노산 도입과 동일한 방법으로 수행한 결과, H-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Phe-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-순수 아미드 레진 1.22 g으로 측정되었다.

(b) 링커의 도입

- 10 상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따른 링커의 도입과 동일한 방법으로 수행한 결과, 1-아미노-3,6,9,12,15,18-헥사옥사헨니코산(hexaoxahenicosan)-21-oyl-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Trp(Boc)-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-순수 아미드 레진 251 mg을 얻었다.

- 15 (c) 보호기의 제거와 수지의 분리

상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따른 보호기의 제거와 수지를 분리한 동일한 방법으로 수행한 결과, 31 mg을 얻었다.

(d) 정제

- 20 상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따라 정제한 동일한 방법으로 수행한 결과, 아미노-dPEG₆-FcBP-2는 23 mg 얻었고, MW = 1826.04 및 M+1 1827.21로 확인되었다.

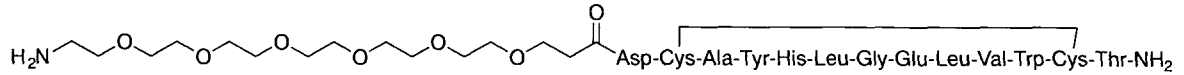
<1-3> 아미노-dPEG₆-FcBP-3

(i) 리간드 구조

- 25 환원: 아미노-dPEG₆-Asp-Cys-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-

Cys-Thr-NH₂

산화:



(ii) 사용된 아미노산 전구체 목록

- 5 Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Tyr-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Leucine, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH 및 Fmoc-N-amido-dPEG₆-acid

(iii) 아미노-dPEG₆-FcBP-3의 제조

- 10 (a) 아미노산 도입

상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따른 아미노산 도입과 동일한 방법으로 수행한 결과, H-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Tyr(tBu)-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-순수 아미드 레진 1.17 g으로 측정되었다.

- 15 (b) 링커의 도입

상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따른 링커의 도입과 동일한 방법으로 수행한 결과, 1-아미노-3,6,9,12,15,18-헥사옥사헤니코산-21-oyl-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Tyr(tBu)-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc) Cys(Trt)-Thr(tBu)-순수 아미드 레진 246 mg을
20 얻었다.

(c) 보호기의 제거와 수지의 분리

상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따른 보호기의 제거와 수지를 분리한 동일한 방법으로 수행한 결과, 29 mg을 얻었다.

(d) 정제

상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따라 정제한 동일한 방법으로 수행한 결과, 아미노-dPEG₆-FcBP-3은 22 mg 얻었고, MW = 1842.04 및 M+1 1843.36로 확인되었다.

5 <1-4> 아미노-dPEG₆-FcBP-Ser

(i) 리간드 구조

아미노-dPEG₆-Asp-Ser-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Ser-Thr-NH₂

(ii) 사용된 아미노산 전구체 목록

10 Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Leucine, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH 및 Fmoc-N-amido-dPEG₆-acid

(iii) 아미노-dPEG₆-FcBP-Ser의 제조

15 (a) 아미노산 도입

상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따른 아미노산 도입과 동일한 방법으로 수행한 결과, H-Asp(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Trp(Boc)-His(Trt)-Ple-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-순수 아미드 레진 1.23 g으로 측정되었다.

20 (b) 링커의 도입

상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따른 링커의 도입과 동일한 방법으로 수행한 결과, 1-아미노-3,6,9,12,15,18-헥사옥사헤니코산-21-oyl-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Trp(Boc)-His(Trt)-Ple-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-순수 아미드 레진 247 mg을
25 얻었다.

(c) 보호기의 제거와 수지의 분리

상기 <실시예 1>의 (b)과정에서 준비한 펩티드가 부착된 수지 100 mg을 TFA, TIS, 물 그리고 EDT(94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 ml과 함께 실온에서 120분간 교반하여 수지에서 펩티드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩티드를 침전시켰다. 침전된 펩티드를 에테르로 3회 더 세척하고 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% AcCN 함유 물에 녹인 다음 6시간 동안 교반한 다음 반응액을 동결건조하여 펩티드 침전물을 얻었다(33 mg).

(d) 정제

상기 <실시예 1-1>의 아미노-dPEG₆-FcBP-1의 제조에 따라 정제한 동일한 방법으로 수행한 결과, 아미노-dPEG₆-FcBP-Ser는 23 mg 얻었고, MW = 1834.96 및 M+1 1836.11으로 확인되었다.

<실시예 2> C-말단에 링커가 도입된 FcBP의 제조

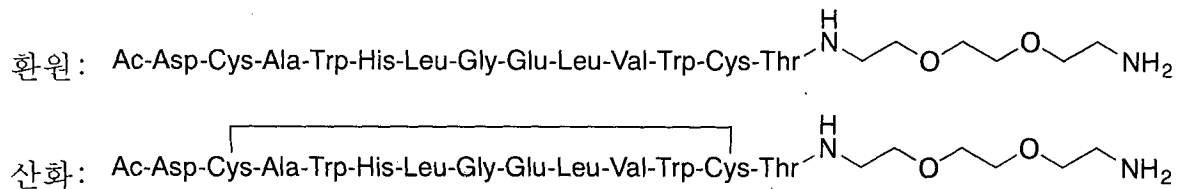
상기 [표 1]에서 나타난 FcBP 들 중에서 FcBP-1, FcBP-2, FcBP-3 및 FcBP-Ser의 고체상 합성 방법과 이들 펩티드의 N-말단은 아세틸화(Acetylation)시키고 C-말단에 1,8-diamino-3,6-디옥사옥탄(dioxaoctane) 링커가 도입된 Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂, Ac-(FcBP-2)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂, Ac-(FcBP-3)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂ 및 Ac-(FcBP-Ser)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 고체상 합성법을 나타낸다. 명세서에 언급된 다른 펩티드 및 그 유도체의 합성에도 실시예에 나타난 고체상 펩티드 합성방법을 사용하여 조달하였다.

펩티드 합성에 사용된 시약은 DMF, DCM, DIPEA, 0.5 M 2-(1H-벤조트리아졸(benzotriazole)-1-yl)-1,1,3,3-테트라메틸우료늄(tetramethyluronium)헥사플루로로인산염(hexafluorophosphat

e, HBTU) 함유 DMF, 0.5 M hydroxybenzotriazole(HOBt) 함유 DMF, 20% 피페리딘 함유 DMF이며, 열거된 Fmoc 아미노산 블록 및 링커를 사용하여 C-말단 아미노산부터 고체상 펩티드 합성법에 따라 순차적으로 진행하였다.

5 <2-1> Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂

(i) 리간드 구조



(ii) 사용된 아미노산 전구체 목록

10 Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Leucine, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH 및 Ac₂O

(iii) Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조

15 (a) 아미노산 도입

하기 과정에서 사용된 시약의 양은 0.25 mmole을 기초하였다. 0.5 g의 O-bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸 레진 (0.5 mmole/g, Novabiochem, 미국)를 합성반응기에 넣고, 각각의 Fmoc-아미노산 블록 1 mmole의 무게를 달아 펩티드 아미노산 서열 순서대로 C-말단에서부터 N-말단까지 준비하였다.

20 Fmoc-아미노산을 활성화하여 O-bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸 레진에 활성화된 잔기를 부착하는 반응을 C-말단 아미노산부터 순차적으로 진행하였다. Fmoc의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF에서 수행하였고 잔기의 활성화 및 도입은 서열에 맞추어 준비한 아미노산을 2 ml 0.5 M HOBt 함유 DMF 용액, 2 ml 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액 그리고 174 μ l DIPEA와 5분간 혼합한 다음 수지가

담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다. 도입 반응의 확인은 카이저 시험법으로 수행하였으며 미반응으로 확인되면 도입 반응을 1 회 더 반복하거나 20% Ac₂O 함유 DMF 용액으로 캡핑을 실시하였다. 각 도입 반응과 Fmoc 제거 과정에서 다음 단계로 넘어가기 전에 DMF와 DCM으로 수지를 충분히 세척하였다. 이러한 과정은 FcBP-1의 펩티드 서열이 완성될 때까지 반복하였다. 아미노산 도입이 모두 끝난 다음에 N-말단에 아세틸을 도입하기 위하여 20% Ac₂O in DMF 용액(3x10mlx10min)으로 처리하였다. 합성이 끝난 후에, 보호기로 보호된 Ac-FcBP-1가 부착된 수지를 펩티드 반응기에서 건조하였고 중량을 측정하였다(Ac-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Trp(Boc)-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH-트리틸 레진, 1.30 g).

(b) 보호기의 제거와 수지의 분리

상기 <실시에 2-1>의 (a)과정에서 준비한 펩티드가 부착된 수지 100 mg을 TFA, TIS, 물 그리고 EDT(94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 ml과 함께 실온에서 120분간 교반하여 수지에서 펩티드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩티드를 침전시켰다. 침전된 펩티드를 에테르로 3회 더 세척하고 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% AcCN 함유 물에 녹인 다음 6시간 동안 교반한 다음 농축하였다.

농축액을 ACN:0.1 M 아세트산 암모늄 1:1 용액에 0.1 mg/ml 농도로 녹인 다음 공기에 노출된 상태로 24 시간 교반하였다. 이황화 결합 형성 반응의 진행은 HPLC로 관측하였으며 더 이상 진행하지 않는 것으로 판단되면 반응액을 동결 건조하여 펩티드 침전물을 얻었다(31 mg).

(c) 정제

상기 <실시에 2-1>의 (b)과정에서 동결건조하여 얻은 펩티드 침전물을

prep-LC 1차 정제조건에서 분리한 다음 prep-LC 2차 정제조건으로 추가 정제하고 동결 건조하였다. 얻어진 펩티드는 각각 98% 이상의 순도임을 분석용 HPLC로 확인하였으며, 합성한 펩티드의 분자량을 말디 토프 질량 분석기로 확인하였다(Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂는 24 mg 얻었고 MW = 1702.91 및 M+1 1704.01으로 확인되었다.).

【표 4】

prep-LC 1차 정제조건

장비명	Schimazu, SCL-10Avp		
칼럼	증류수, XBridge Prep C18 5um OBD 19x250 mm		
이동상 A/B	0.1% TFA-30% AcCN / 0.1% TFA in 70% AcCN		
구배	0 min → 50 min : B 0% → B 20%		
유속	17 ml/min	검출파장	UV 230 nm

【표 5】

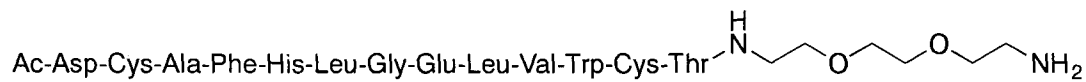
10 rep-LC 2차 정제조건

장비명	Schimazu, SCL-10Avp		
칼럼	증류수, XBridge Prep C18 5um OBD 19x250 mm		
이동상A/B	0.1% TFA-20% AcCN / 0.1% TFA in 80% AcCN		
구배	0 min → 30 min : B 0% → B 100%		
유속	17 ml/min	검출파장	UV 230 nm

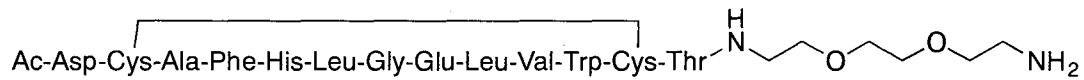


(i) 리간드 구조

환원:



산화:



(ii) 사용된 아미노산 전구체 목록

- 5 Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Leucine, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH 및 Ac₂O

(iii) Ac-(FcBP-2)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조

10 (a) 아미노산 도입

상기 <실시예2-1>에 Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조에서 아미노산 도입과 동일한 방법으로 수행한 결과, kAc-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Phe-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH-트리틸 레진 1.28 g으로 측정되었다.

15 (b) 보호기의 제거와 수지의 분리

상기 <실시예2-1>에 Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조에서 보호기의 제거와 수지의 분리와 동일한 방법으로 수행한 결과, 29 mg을 얻었다.

(c) 정제

- 상기 <실시예2-1>에 Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조에서
20 정제와 동일한 방법으로 수행한 결과, Ac-(FcBP-2)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂는 23 mg 얻었고 MW = 1663.87 및 M+1 1665.07으로 확인되었다.

<2-3> Ac-(FcBP-3)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂

(i) 리간드 구조

산화: Ac-Asp-Cys-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂

환원: Ac-Asp-Cys-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂

(ii) 사용된 아미노산 전구체 목록

- Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Tyr-OH, Fmoc-L-Val-OH,
 5 Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Leucine, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH 및 Ac₂O

(iii) Ac-(FcBP-3)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조

(a) 아미노산 도입

- 10 상기 <실시예2-1>에 Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조에서 아미노산 도입과 동일한 방법으로 수행한 결과, Ac-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Tyr(tBu)-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH-트리틸 레진 1.33 g으로 측정되었다.

(b) 보호기의 제거와 수지의 분리

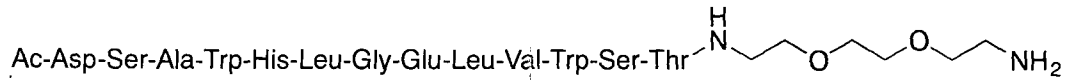
- 15 상기 <실시예2-1>에 Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조에서 보호기의 제거와 수지의 분리와 동일한 방법으로 수행한 결과, 29 mg을 얻었다.

(c) 정제

- 상기 <실시예2-1>에 Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조에서 정제와 동일한 방법으로 수행한 결과, Ac-(FcBP-3)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂는
 20 22 mg 얻었고 MW = 1679.87 및 M+1 1680.78으로 확인되었다.

<2-4> Ac-(FcBP-Ser)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂

(i) 리간드 구조



(ii) 사용된 아미노산 전구체 목록

Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Leucine,
 5 Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH 및 Ac₂O

(iii) Ac-(FcBP-Ser)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조

(a) 아미노산 도입

상기 <실시예 2-1>에 Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조에서
 10 아미노산 도입과 동일한 방법으로 수행한 결과, Ac-Asp(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Trp(Boc)-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Ser(tBu)-Thr(tBu)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH-트리틸 레진 1.21 g으로 측정되었다.

(b) 보호기의 제거와 수지의 분리

상기 <실시예 1>의 a 과정에서 준비한 펩티드가 부착된 수지 100 mg을
 15 TFA, TIS, 물 그리고 EDT(94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 ml과 함께 실온에서 120분간 교반하여 수지에서 펩티드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩티드를 침전시켰다. 침전된 펩티드를 에테르로 3회 더 세척하고 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% AcCN 함유 물에 녹인 다음 6시간
 20 동안 교반한 다음 반응액을 동결건조하여 펩티드 침전물을 얻었다(33 mg).

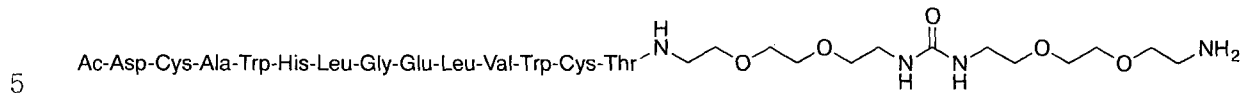
(c) 정제

상기 <실시예 2-1>에 Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조에서 정제와 동일한 방법으로 수행한 결과, Ac-(FcBP-Ser)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂은 MW = 1672.79 및 M+1 1674.31으로 확인되었다.

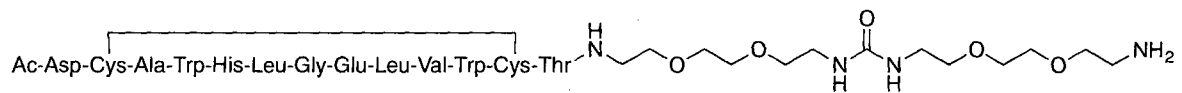
<2-5> $\text{Ac}-(\text{FcBP}-1)-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCONHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$

(i) 리간드 구조

환원:



산화:



10 (ii) 사용된 아미노산 전구체 목록

$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Leucine, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH 및 Ac_2O

15

(iii) $\text{Ac}-(\text{FcBP}-1)-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCONHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 의

제조

(a) 아미노산 도입

하기 과정에서 사용된 시약의 양은 0.25 mmole을 기초하였다. 0.5 g의 20 0-bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸 레진 (0.5 mmole/g, Novabiochem, 미국)를 합성반응기에 넣은 다음 DMF를 충분히 붓고 30 분 기다린다. 반응용기에 di(N-succinimidyl)carbonate를 640 mg을 넣고 2시간 동안 혼합한다. 반응액을 여과하여 제거하고 DMF와 DCM을 교대로 사용하여 충분히 세척한다. 반응용기에 0.25M 1,2-bis(2-aminoethoxy)ethane in DMF 용액 10

ml을 붓고 2 시간 동안 혼합한다. 반응액을 여과하여 제거하고 DMF와 DCM을 교대로 사용하여 충분히 세척한다. 그리고 나서 각각의 Fmoc-아미노산 블록 1 mmole의 무게를 달아 펩티드 아미노산 서열 순서대로 C-말단에서부터 N-말단까지 준비하였다. Fmoc-아미노산을 활성화하여 준비한 레진에 활성화된 잔기를 부착하는 반응을 C-말단 아미노산부터 순차적으로 진행하였다. Fmoc의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF에서 수행하였고 잔기의 활성화 및 도입은 서열에 맞추어 준비한 아미노산을 2 ml 0.5 M HOBT 함유 DMF용액, 2 ml 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액 그리고 174 μ l DIPEA와 5분간 혼합한 다음 수지가 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다. 도입 반응의 확인은 카이저 시험법으로 수행하였으며 미반응으로 확인되면 도입 반응을 1 회 더 반복하거나 20% Ac_2O 함유 DMF 용액으로 캡핑을 실시하였다. 각 도입 반응과 Fmoc 제거 과정에서 다음 단계로 넘어가기 전에 DMF와 DCM으로 수지를 충분히 세척하였다. 이러한 과정은 FcBP-1의 펩티드 서열이 완성될 때까지 반복하였다. 아미노산 도입이 모두 끝난 다음에 N-말단에 아세틸을 도입하기 위하여 20% Ac_2O in DMF 용액($3 \times 10 \text{ ml} \times 10 \text{ min}$)으로 처리하였다. 합성이 끝난 후에, 보호기로 보호된 Ac-FcBP-1가 부착된 수지를 펩티드 반응기에서 건조하였고 중량을 측정하였다(Ac-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Trp(Boc)-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH-트리틸 레진, 1.41 g).

20 (b) 보호기의 제거와 수지의 분리

상기 <실시예 2-5>의 (a)과정에서 준비한 펩티드가 부착된 수지 100 mg을 TFA, TIS, 물 그리고 EDT(94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 ml과 함께 실온에서 120분간 교반하여 수지에서 펩티드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩티드를 침전시켰다. 침전된 펩티드를 에테르로 3회 더 세척하고 질소 가스로

건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% AcCN 함유 물에 녹인 다음 6시간 동안 교반한 다음 농축하였다.

농축액을 ACN:0.1 M 아세트산 암모늄 1:1 용액에 0.1 mg/ml 농도로 녹인 다음 공기에 노출된 상태로 24 시간 교반하였다. 이황화 결합 형성
5 반응의 진행은 HPLC로 관측하였으며 더 이상 진행하지 않는 것으로 판단되면 반응액을 동결 건조하여 펩티드 침전물을 얻었다(21 mg).

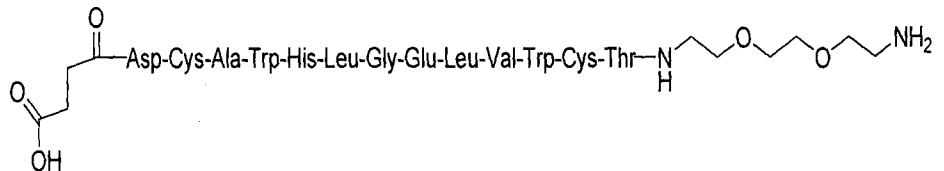
(c) 정제

상기 <실시예 2-5>의 (b)과정에서 동결건조하여 얻은 펩티드 침전물을 prep-LC 1차 정제조건에서 분리한 다음 prep-LC 2차 정제조건으로 추가
10 정제하고 동결 건조하였다. 얻어진 펩티드는 각각 98% 이상의 순도임을 분석용 HPLC로 확인하였으며, 합성한 펩티드의 분자량을 말디 토프 질량 분석기로 확인하였다(Ac-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂는 18 mg 얻었고 MW = 1875.88 및 M+1 1878.16으로 확인되었다.).

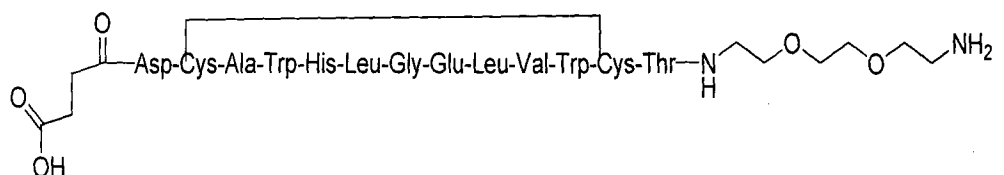
15 <2-6> Suc-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂

(i) 리간드 구조

환원:



산화:



(ii) 사용된 아미노산 전구체 목록

Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Leucine,
 5 Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH 및 Succinic anhydride

(iii) Suc-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조

(a) 아미노산 도입

하기 과정에서 사용된 시약의 양은 0.25 mmole을 기초하였다. 0.5 g의
 10 O-bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸 레진 (0.5 mmole/g, Novabiochem, 미국)를 합성반응기에 넣고, 각각의 Fmoc-아미노산 블록 1 mmole의 무게를 달아 펩티드 아미노산 서열 순서대로 C-말단에서부터 N-말단까지 준비하였다. Fmoc-아미노산을 활성화하여 O-bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸 레진에 활성화된 잔기를 부착하는 반응을 C-말단 아미노산부터 순차적으로 진행하였다.
 15 Fmoc의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF에서 수행하였고 잔기의 활성화 및 도입은 서열에 맞추어 준비한 아미노산을 2 ml 0.5 M HOBt 함유 DMF 용액, 2 ml 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액 그리고 174 μ l DIPEA와 5분간 혼합한 다음 수지가 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다. 도입 반응의 확인은 카이저 시험법으로 수행하였으며 미반응으로 확인되면 도입 반응을 1 회 더
 20 반복하거나 20% Ac₂O 함유 DMF 용액으로 캡핑을 실시하였다. 각 도입 반응과 Fmoc 제거 과정에서 다음 단계로 넘어가기 전에 DMF와 DCM으로 수지를 충분히 세척하였다. 이러한 과정은 FcBP-1의 펩티드 서열이 완성될 때까지 반복하였다. 아미노산 도입이 모두 끝난 다음에 N-말단에 숙신닐을 도입하기 위하여 10% succinic anhydride in DMF 용액(3x10mlx10min)으로 처리하였다. 합성이 끝난
 25 후에, 보호기로 보호된 Suc-FcBP-1가 부착된 수지를 펩티드 반응기에서

건조하였고 중량을 측정하였다(Suc-Asp(tBu)-Cys(Trt)-Ala-Trp(Boc)-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH-트리틸레진, 1.13 g).

(b) 보호기의 제거와 수지의 분리

5 상기 <실시예 2-6>의 (a)과정에서 준비한 펩티드가 부착된 수지 100 mg을 TFA, TIS, 물 그리고 EDT(94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 ml과 함께 실온에서 120분간 교반하여 수지에서 펩티드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩티드를 침전시켰다. 침전된 펩티드를 에테르로 3회 더 세척하고 질소 가스로
10 건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% AcCN 함유 물에 녹인 다음 6시간 동안 교반한 다음 농축하였다.

 농축액을 ACN:0.1 M 아세트산 암모늄 1:1 용액에 0.1 mg/ml 농도로 녹인 다음 공기에 노출된 상태로 24 시간 교반하였다. 이황화 결합 형성 반응의 진행은 HPLC로 관측하였으며 더 이상 진행하지 않는 것으로 판단되면
15 반응액을 동결 건조하여 펩티드 침전물을 얻었다(35 mg).

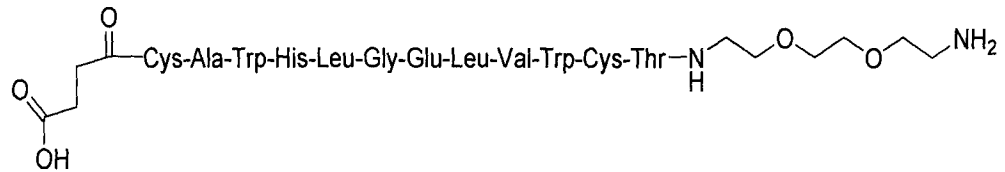
(c) 정제

 상기 <실시예 2-6>의 (b)과정에서 동결건조하여 얻은 펩티드 침전물을 prep-LC 1차 정제조건에서 분리한 다음 prep-LC 2차 정제조건으로 추가 정제하고 동결 건조하였다. 얻어진 펩티드는 각각 98% 이상의 순도임을 분석용
20 HPLC로 확인하였으며, 합성한 펩티드의 분자량을 말디 토프 질량 분석기로 확인하였다(Suc-(FcBP-1)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂는 26 mg 얻었고 MW 1759.79 및 M+1 1761.01으로 확인되었다.).

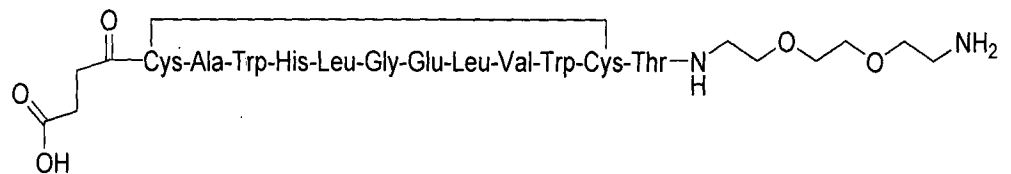
<2-7> Suc-CAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂

25 (i) 리간드 구조

환원:



산화:



5 (ii) 사용된 아미노산 전구체 목록

Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Leucine, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH 및 Succinic anhydride

10 (iii) Suc-(CAWHLGELVWCT)-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂의 제조

(a) 아미노산 도입

하기 과정에서 사용된 시약의 양은 0.25 mmole을 기초하였다. 0.5 g의 O-bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸 레진 (0.5 mmole/g, Novabiochem, 미국)를 합성반응기에 넣고, 각각의 Fmoc-아미노산 블록 1 mmole의 무게를 달아 펩티드 아미노산 서열 순서대로 C-말단에서부터 N-말단까지 준비하였다. Fmoc-아미노산을 활성화하여 O-bis-(아미노에틸)에틸렌 글리콜 트리틸 레진에 활성화된 잔기를 부착하는 반응을 C-말단 아미노산부터 순차적으로 진행하였다. Fmoc의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF에서 수행하였고 잔기의 활성화 및 도입은 서열에 맞추어 준비한 아미노산을 2 ml 0.5 M HOBt 함유 DMF용액, 2 ml

0.5 M HBTU 함유 DMF 용액 그리고 174 μ l DIPEA와 5분간 혼합한 다음 수지가 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다. 도입 반응의 확인은 카이저 시험법으로 수행하였으며 미반응으로 확인되면 도입 반응을 1 회 더 반복하거나 20% Ac_2O 함유 DMF 용액으로 캡핑을 실시하였다. 각 도입 반응과

5 Fmoc 제거 과정에서 다음 단계로 넘어가기 전에 DMF와 DCM으로 수지를 충분히 세척하였다. 이러한 과정은 FcBP-1의 펩티드 서열이 완성될 때까지 반복하였다. 아미노산 도입이 모두 끝난 다음에 N-말단에 숙신닐을 도입하기 위하여 10% Succinic anhydride in DMF 용액($3 \times 10 \text{ ml} \times 10 \text{ min}$)으로 처리하였다. 합성이 끝난 후에, 보호기로 보호된 Suc-CAWHLGELVWCT가 부착된 수지를 펩티드 반응기에서

10 건조하였고 중량을 측정하였다(Suc-Cys(Trt)-Ala-Trp(Boc)-His(Trt)-Leu-Gly-Glu(tBu)-Leu-Val-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Thr(tBu)- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ -트리틸 레진, 1.41 g).

(b) 보호기의 제거와 수지의 분리

상기 <실시예 2-7>의 (a)과정에서 준비한 펩티드가 부착된 수지 100

15 mg을 TFA, TIS, 물 그리고 EDT(94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 ml과 함께 실온에서 120분간 교반하여 수지에서 펩티드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩티드를 침전시켰다. 침전된 펩티드를 에테르로 3회 더 세척하고 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% AcCN 함유 물에 녹인 다음 6시간

20 동안 교반한 다음 농축하였다.

농축액을 ACN:0.1 M 아세트산 암모늄 1:1 용액에 0.1 mg/ml 농도로 녹인 다음 공기에 노출된 상태로 24 시간 교반하였다. 이황화 결합 형성 반응의 진행은 HPLC로 관측하였으며 더 이상 진행하지 않는 것으로 판단되면 반응액을 동결 건조하여 펩티드 침전물을 얻었다(34 mg).

25 (c) 정제

상기 <실시예 2-7>의 (b)과정에서 동결건조하여 얻은 펩티드 침전물을 prep-LC 1차 정제조건에서 분리한 다음 prep-LC 2차 정제조건으로 추가 정제하고 동결 건조하였다. 얻어진 펩티드는 각각 98% 이상의 순도임을 분석용 HPLC로 확인하였으며, 합성한 펩티드의 분자량을 말디 토프 질량 분석기로

5 확인하였다(Suc-CAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂ 25 mg 얻었고 MW = 1644.76 및 M+1 1646.01으로 확인되었다.)

<실시예 3> FcBP 친화성 레진의 제작

상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>에서 제조한 각각의 FcBP-링커 혼성체를

10 이용한 친화성 레진을 제조사의 프로토콜에 따라 제작하였다. 구체적으로, 5 mL의 N-히드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS)(Sigma-Aldrich, USA))-activated Sepharose™ 4 Fast Flow(GE 헬스케어, Uppsala, Sweden)를 30 mg FcBP가 포함된 0.2 M NaHCO₃(pH 8.5; 10 mL)과 함께 4 °C에서 하루 동안 반응시켰다. 펩타이드 용액을 제거한 후에, 비드(bead)를 블로킹

15 완충용액(blocking buffer)(150 mM NaCl)을 포함하는 0.5 M 에탄올아민(ethanolamine, pH 8.5)으로 세척한 후 상기 동일한 완충용액으로 한 시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 증류수로 세척한 후 비드(bead)를 4 °C에 보관하였다. 레진에 고정된 펩타이드의 양은 대략 2.5 ± 0.5 mg/mL 습식 레진이었으며, 이는 회복된 펩타이드의 차감에 의해 계산되었다.

20 펩타이드는 몰 흡광 계수 펩타이드는 몰 흡광 계수($\epsilon = 12,863 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (FCBP-1), $5930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (FCBP-2) 및 $7210 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (FCBP-3))를 이용하여 UV-VIS 분광광도계(spectrophotometer)에서 280 nm 흡광도를 측정하여 정량하였다. 상기 계수는 실험으로 결정되었다.

상기 <실시에 3>에서 제작된 각각의 FcBP 친화성 레진을 이용하여 칼럼을 제작하였다.

한편, FcBP는 내부에 이황화 결합을 가지고 있는 FcBP(비특허문헌 16)로서, 상기 이황화 결합이 IgG 결합에 필수적인지 아닌지를 조사하기 위하여, 추가적으로 하기 두 개의 펩타이드 칼럼을 제작하였다. FcBP-Ser 칼럼은 FcBP의 아미노산 서열에서 두 개의 시스테인 잔기를 세린(serine)으로 치환시킨 다음, 변형된 펩타이드를 칼럼에 적재하여 제작하였다. 또다른 하나인 FcBP-Red 칼럼은 FcBP 칼럼을 사용하기 전에 이황화 결합을 감소시키기 위해 50 mM의 DTT로 처리하여 제작하였다(비특허문헌 17).

10

<실험예 1> FcBP 친화성 칼럼의 IgG에 대한 정제능력 분석

상기 제작된 FcBP 칼럼, FcBP-Ser 칼럼, FcBP-Red 칼럼, 단백질 A 칼럼 및 단백질 G 칼럼의 IgG에 대한 결합 친화성을 비교분석하기 위해, 허셉틴(Herceptin, Roche)에 대한 결합력을 측정하였다.

15

이때, 사용된 FcBP 칼럼은 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-DCAWHLGELVWCT-NH}_2$ [$\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-AspCys*AlaTrpHisLeuGlyGluLeuValTrpCys*Thr-NH}_2$] (상기 이황화-결합된 시스테인은 특수기호 (*)로 표시하였음)를 사용하였고, FcBP-Ser 칼럼은 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-DSAWHLGELVWST-NH}_2$ [$\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-Asp-Ser-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-TrpSerThr-NH}_2$]를 사용하였다.

20

상기 허셉틴은 인간 IgG₁ 타입의 치료용 항체로서 알려져 있기 때문에 IgG의 모델로 선택하였다.

IgG에 대한 결합 친화성은 다음과 같이 측정하였다. 흡착 칼럼을 이용한 IgG 정제 능력을 측정하기 위하여, 칼럼을 ACTA FPLC(GE Healthcare)에 부착한 후 허셉틴 정제 실험을 수행하였다. 100 mM 인산염(phosphate) 완충용액(pH 8.0)으로 평형화시킨 후, 상기의 완충용액 5 mL에 36.5 mg 및 20

25

mg의 허셉틴을 각각 용해시켜 항체 시료를 제조한 다음, 칼럼에 흡착시켰다. 항체를 pH 구배 완충용액으로 pH 8.0에서 pH 2.0으로 순차적으로 녹여서 분리하였고, 인산염 및 구연산(citrate)(pH 2.0 및 50 mM) 완충용액의 비를 조절하여 완성하였다. 용출액은 1 mL씩 분취하였으며, UV 흡광도 254 nm에서
 5 관찰하면서 UV 흡광도를 보이는 분획을 취한 다음 바로 봉산계 완충용액(1 M 및 pH 8.5)으로 중화시킨 후, SDS-PAGE로 단백질을 분석하였다. 단백질 양은 브래드포드 분석(Bradford assay)으로 측정하였다.

그 결과, 각각의 친화성 칼럼에 허셉틴을 대량으로 적재하였을 때(36.5 mg), FcBP 칼럼이 단백질 A 및 단백질 G 칼럼에 비하여 눈에 띄게 높은
 10 결합력을 나타내었다(도 1a). 단백질 A 칼럼은 용출 완충용액이 pH 2.3일 때 결합된 항체가 최대로 용출되기 시작되었고, 단백질 G 및 FcBP 칼럼은 pH 2.1에서 결합 항체가 최대로 용출되기 시작하였다. FcBP의 결합은 단백질 A/허셉틴 결합보다 단백질 G/허셉틴 결합과 더 유사함을 확인하였다(도 1b 참조).

15 한편, FcBP 칼럼 중에서, 상기 실시예 <2-3> 및 <2-4>에서 제작된 혼성체를 이용한 칼럼은 각각 항체 결합 후 해리속도가 빨라서 pH 3.0 ~ 4.0의 완충용액으로 항체의 용출이 가능하였다. 또한, 상기 실시예 <2-1> 및 <2-4>에서 제작된 2개의 시스테인이 분자 내에 이황화 결합을 한 FcBP를 포함하는 혼성체를 이용한 칼럼은 각각 pH 2.5 ~ 3.0의 완충용액으로 항체의 용출이
 20 가능한 반면에, 2개의 시스테인이 분자내 이황화 결합이 없는 FcBP를 포함하는 혼성체를 이용한 칼럼은 pH 3.0 ~ 5.0의 완충용액으로 항체의 용출이 가능하였다.

하기 표 2에서 보는 바와 같이, FcBP 칼럼의 결합력이 단백질 A 칼럼 및 G 칼럼에 비해 인간 IgG에 대한 결합력이 우수하였다. 이는 FcBP가 인간
 25 IgG에서 단백질 G ($K_d = 20$ nM) 보다 더 낮은 결합 친화성($K_d = 85$ nM)을

가졌음에도 불구하고(Y. Jung, H.J. Kang, J.M. Lee, S.O. Jung, W.S. Yun, S.J. Chung, B.H. Chung, Anal.288 Biochem. 374 (2008) 99), 레진 표면에서 FcBP의 높은 분자 밀도를 보여주며, 이는 단백질 친화성 리간드와 비교해서 FcBP의 작은 분자량, 레진에서 단백질 G의 낮은 밀도뿐만 아니라 IgG의 결합 효율성의 증가에 기인할 수 있는 것이다. 친화성 칼럼에서 회수율을 비교하였을 때 최대 결합력보다 낮은 허셉틴의 양(20 mg)을 적용하였다. 하기 표 2에서 주어진 바와 같이 FcBP 칼럼은 단백질 칼럼보다 더 높은 회수율을 나타내었다. 게다가 FcBP-Red 칼럼도 단백질 A 칼럼 및 G 칼럼에 비해 회수율이 높았다.

10 【표 6】

FcBP의 IgG 회수율

	리간드 (mg/μmole) ^a	최대 IgG 결합 (mg/μmole)	IgG 회수율 ^c		
			적용한 양 (mg/μmole)	용출된 양 (mg/μmole) ^b	회수율(%)
실시예 <1-1>	3/1.61	26.6/0.18	20.0/0.14	18.2/0.12	91.1
실시예 <1-2>	2.5/1.37	24.3/0.16	20.0/0.14	17.9/0.12	86.4
실시예 <1-3>	2.6/1.41	25.2/0.17	20.0/0.14	17.7/0.12	85.4
실시예 <1-4>	2.5/1.36	8.1/0.05	20.0/0.14	7.8/0.05	37.6
실시예 <2-1>	2.2/1.29	23.6/0.16	20.0/0.14	17.9/0.12	86.4
실시예 <2-2>	2.1/1.26	22.3/0.15	20.0/0.14	17.7/0.12	85.4
실시예 <2-3>	2.1/1.25	22.5/0.15	20.0/0.14	17.6/0.12	84.9
실시예 <2-4>	2.0/1.20	7.9/0.05	20.0/0.14	7.2/0.05	34.7
실시예 <2-5>	2.9/1.54	24.1/0.16	20.0/0.14	18.0/0.12	86.9
실시예 <2-6>	2.7/1.47	23.2/0.16	20.0/0.14	17.8/0.12	85.9

실시에 <2-7>	2.8/1.51	22.1/0.15	20.0/0.14	17.7/0.12	85.4
FcBP-red	3/1.61	19.2/0.13	20.0/0.14	16.1/0.11	81.0
단백질 A	2/0.12	22.4/0.15	20.0/0.14	15.4/0.10	77.0
단백질 G	6/0.14	24.8/0.17	20.0/0.14	16.7/0.11	82.9

^a각각의 리간드를 1 ml 습식 레진에 고정시켰다. 단백질 G 및 단백질 A의 분자량은 각각 17,000 Da 및 42,000 Da이다(GE Healthcare). ^b허셉틴의 최대 초과량(36.5 mg)을 칼럼에 적용하였다. ^c허셉틴의 분자량은 148,000 Da이다(비특허문헌 18).

5

<실험예 2> FcBP에서 이황화 결합의 IgG 결합에 대한 영향 분석

상기 <실험예 1>에서 분석한 허셉틴에 대한 친화도를 이용하여 FcBP에서 이황화 결합의 IgG 결합에 미치는 영향을 분석하였다.

그 결과, FcBP-Red는 이황화 결합이 없음에도 불구하고 IgG에 대한
 10 상당한 결합력이 있었다. FcBP-red 칼럼은 단백질 A 또는 FcBP 칼럼을
 사용했을 때 나타나는 결과 보다 높은 pH에서 항체가 용출되기 시작하였고,
 단백질 A 또는 단백질 G보다 더 순조롭게 IgG가 분리되었다(도 1c). 한편,
 FcBP에서 시스테인 잔기가 세린으로 치환되면 결합력이 감소하였으며, 이에
 시스테인 잔기는 FcBP가 IgG 결합을 하는데 필수적인 것을 확인하였다(도 1d).

15

<실험예 3> FcBP 칼럼의 돼지 혈청 유래 IgG의 정제능 분석

미생물에 감염된 돼지가 생산한 항체는 해당 미생물에 의한 질병의
 진단에 상업적으로 널리 사용될 수 있기 때문에(J. Yang, M. Jin, J. Chen, Y.
 Yang, P. Zheng, A. Zhang, Y. Song, H. Zhou, H. Chen, J. Vet. Diagn.
 20 Invest. 19 (2007) 355), 돼지 혈청으로부터 분리된 IgG를 사용하여 정제
 수준을 분석하였다.

돼지의 혈청으로부터 얻은 IgG 정제하기 위하여 돼지 혈청을 6배의 100 mM 인산염 완충용액(pH 8.0)에 희석하였고, 상기 완충용액이 평형이 되게 칼럼에 직접 주입하였다. 주입하는 양은 2 ~ 5 mL 사이로 다양하게 하였고, 전체 혈청 단백질 양의 10 ~ 50 mg을 포함하였다. 친화성 칼럼에 내린 다음에 pH 구배 완충용액으로 용출.정제하였다. 정제된 IgG는 웨스턴 블랏으로 확인하였다. FcBP 칼럼의 안정성을 측정하기 위해, 전체 혈청 단백질의 40 mg을 포함하는 100개의 샘플(sample)을 순차적으로 정제하였다. IgG의 순도를 확인하기 위하여, SDS-PAGE를 수행하였고 상기의 결과를 멀티 게이지(Multi Guage, LAS-3000 소프트웨어 푸지 필름)로 평가하였다.

그 결과, FcBP 칼럼 및 단백질 G 칼럼의 용출 크로마토그램(elution chromatograms)은 인간 IgG를 정제할 때와 유사하였고, FcBP 및 단백질 A 칼럼의 용출 크로마토그램도 유사한 모양을 나타내었다(도 2).

돼지 IgG 항체를 상기 3가지 칼럼으로 정제하였고 SDS-PAGE 분석 및 브레드포드 분석으로 정량화한 결과 순도 및 회수율이 모두 매우 유사하였다. SDS-PAGE 분석의 도면을 확인한 결과 정제된 IgG는 친화성 칼럼의 종류에 상관없이 95% 이상의 순도로 정제되었다. FcBP 칼럼으로 정제한 것은 돼지 IgG 항체를 사용하여 웨스턴 블랏으로 시각화하였다(도 3).

또한, FcBP 칼럼으로부터 돼지 IgG의 회수량을 측정하였다. 총 혈청 단백질의 10 내지 50 mg은 FcBP 칼럼에 적재할 때 용출 크로마토그램(chromatogram)과 유사하였다(도 4). 그러나 적재한 단백질의 총량이 늘어날수록 IgG 회수율은 감소하였으나(표 3), 칼럼에서 항체의 용출시간은 그대로 유지되었다(도 4). 1차 정제에서 결합하지 않고 흘러나온 샘플은 다시 동일 칼럼에 적용하여 추가로 IgG를 다시 정제할 수 있었다.

FcBP 흡착 칼럼의 재사용에 따른 IgG의 회수량을 확인함으로써 흡착칼럼의 내구성을 실험하였다. FcBP 친화성 칼럼을 5, 10, 15, 20, 25 및

30회를 반복하여 항체정제에 사용한 후 그 결과를 분석하였다. 그 결과, FcBP 칼럼에 돼지 혈청 샘플을 사용하여 30번을 사용하는 동안에도 전체 분리 능력이 유지되는 것으로 나타났다(도 5). 상기 실험을 그 이후 100회 이상 반복되었으며, 비슷한 효과를 관찰하였다.

5 【표 7】

적재한 단백질 총량에 따른 FcBP 흡착 칼럼의 회수율

적재한 단백질 총량(mg)	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0
IgG 분리량(mg)	3.0	5.2	7.4	9.0	10.0
회수율(%)	30.0	26.0	24.7	22.5	20.0

<실험예 4> FcBP의 돼지 IgG에 대한 결합 친화성 분석

FcBP와 돼지 IgG의 결합 친화성을 확인하기 위하여, 표면 플라즈마 공명(Surface Plasma Resonance, SPR) 분석으로 돼지의 IgG에서 FcBP 결합 해리 상수를 측정하였다.

SPR 칩 표면에 돼지 IgG를 코팅한 후, 50, 100, 200 및 400 nM의 다양한 농도의 FcBP 용액을 처리하여 해리 상수(dissociation constant)를 측정하였다. 돼지의 IgG는 비아코어(Biacore AB, Uppsala, Sweden)에서 공급하고 있는 덱스트란 기질(dextran matrix)이 결합되어있는 CM5 센서 칩(sensor chip, CM-5 Au) 상에서 진행되었으며, 제조자의 프로토콜에 따라 실험을 진행하였고 SPR 분석은 비아코어 X(Biacore X)를 사용하여 진행하였다. 카르복시메틸화 덱스트란 표면에 200 mM 1-에틸-3-(3-디메틸아미노 프로필)카르보디이미드(1-ethyl-3-(3-dimethylamino) propylcarbodiimide, EDC)(Sigma-Aldrich, USA) 및 50 mM NHS의 혼합수용액을 7 μ l/min의 유속으로 7분 동안 주입하였다. FcBP-아세트이트완충액(FcBP 25 μ g/ 아세트이트 완충액

1 ml (pH 4.5, 10 mM))을 상기 활성화된 SPR칩에 주입한 후, 1 M 에탈올아민
 염산염(ethanolamine hydrochloride, pH 8.5) 수용액으로 7분 동안 처리하여
 잔존하는 NHS 에스테르를 불활성화 시킴으로써 FcBP 칩을 제작하였다.
 돼지에서 유래한 IgG를 50, 100, 200, 400 및 800 nM의 농도로 25 °C에서 30
 5 μ l/min의 유속으로 칩 표면에 주입하였고, 각각의 분석 사이클 마지막에서
 칩의 표면을 20 mM NaOH로 1분간 세척함으로써 칩표면을 재생시켰다. 상기의
 보정(background) 자료를 뺀 후에, 결합 상수는 칩 제조자로부터 제공된
 비아이밸류에이션(BIAevaluation) 소프트웨어를 사용하여
 랭뮤어(Langmuir)(1:1) 모델에서 측정한 결과 해리 상수(Kd)가 79 ± 2 nM임을
 10 밝혀내었다. 흥미롭게도 결과의 해리 상수의 값은 토끼의 IgG(Kd = 305
 nM)보다 인간 IgG(Kd = 85 nM)의 FcBP 결합과 더 유사하였다(도 6).

<실험예 5> FcBP 흡착칼럼을 이용한 간편한 항체정제 방법

상기 방법으로 제조된 FcBP 흡착 레진을 내경 1 cm 및 길이 10 mL
 15 칼럼에 충전하여 흡착칼럼을 제작하였다.

흡착칼럼을 0.1 M, pH 8.0 인산완충액(50 mL)으로 씻어 주었고
 인산완충액으로 희석한 항체용액(또는 혈청)을 0.5 ml/min의 속도로 칼럼에
 흘려주어 항체를 흡착시켰다(상기 조건에서 항체배양액의 경우 최대 44 mg의
 항체가 1 ml의 레진에 흡착된다.). 샘플의 적용이 끝난 후, pH 6.0 MES
 20 완충액(100 ml)으로 칼럼을 씻어주었다. 그런 다음 pH 3.0 구연산 완충액이나,
 pH 2.5 글리신 완충액으로 항체를 용출하였다. 이때 용출되는 항체 분액은
 바로 pH 8.0 1.0 M Tris 완충액으로 중화하여 변성을 방지하였다. 정제된
 항체분액은 SDS PAGE방법과 Bradford 시험법으로 확인 정량한 후, 그 자체로
 혹은 적절한 완충액으로 투석한 후 동결건조하여 보관 하였다. 상기 사용된
 25 완충액은 필요에 따라 유사한 pH를 가진 다른 완충액으로 변경하여도 동일한

정제효과를 얻을 수 있었다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

항체의 Fc 부위와 결합하는 펩타이드(Fc binding peptide, FcBP) 유도체가 고정된 레진이 장착된 항체 정제용 흡착 칼럼.

5

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 FcBP 유도체는 면역글로불린 G(Immunoglobulin G, IgG)의 Fc 부위(domain)에 결합하고, 7 내지 17개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드인 것을 특징으로 하는 항체 정제용 흡착 칼럼.

10

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 FcBP 유도체는 하기 1) 또는 2)의 아미노산 서열로 구성된 올리고펩타이드인 것을 특징으로 하는 항체 정제용 흡착 칼럼:

1) 서열번호 1 내지 13중 어느 하나의 아미노산 서열; 및

15 2) 서열번호 1 내지 13중 어느 하나의 아미노산 서열에서 한 개 또는 두 개의 아미노산이 첨가, 결실 또는 치환된 아미노산 서열.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 FcBP 유도체는 서열번호 1 내지 13의 아미노산 서열에서 두 개의 시스테인이 세린으로 치환된 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는 항체 정제용 흡착 칼럼.

20

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 FcBP 유도체는 펩타이드 N-말단 또는 C-말단에 링커(linker)가 결합된 혼성체인 것을 특징으로 하는 항체 정제용 흡착 칼럼.

25

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 링커(linker)는 하기 1) 내지 3)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항체 정제용 흡착 칼럼:

- 5 1) $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, 여기서 n 은 1 ~ 30임;
- 2) $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_a\text{NH}_2$, 여기서 n 은 1 ~ 50이고, a 는 2 ~ 10임; 및
- 3) $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m(\text{CH}_2)_a\text{Y}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_b\text{NH}_2$, 여기서 m 및 n 은 각각 1 ~ 30이고, a 와 b 는 각각 2 ~ 10이며, Y 는 링커이고, 알킬, 산소(-O-), 아민(-NH-),
 10 유레아(-NHCONH-), 아미드-CONH-, 에스테르(-COO-) 및 아릴로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나임.

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 링커(linker)는 말단의 아민(NH_2)기가 말레이미드(maleimide), 아지드(azide) 및 알킨(alkyne)으로 구성된
 15 군으로부터 선택된 어느 하나의 기능단으로 치환된 것을 특징으로 하는 항체 정제용 흡착 칼럼.

【청구항 8】

제 5항에 있어서, 상기 FcBP 유도체는 하기 구조들로 구성된
 20 군으로부터 선택된 어느 하나의 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 항체 정제용 흡착 칼럼:

- 1) α -미노-dPEG₆-DCAWHLGELVWCT;
- 2) α -미노-dPEG₆-DCAFHLGELVWCT;
- 3) α -미노-dPEG₆-DCAYHLGELVWCT;
- 4) α -미노-dPEG₆-DSAWHLGELVWST;
- 5) Ac-DCAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 6) Ac-DCAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 7) Ac-DCAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 8) Ac-DSAWHLGELVWST-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 9) Ac-DCAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 10) 10) Ac-DCAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 11) Ac-DCAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 12) Suc-DCAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 13) Suc-DCAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 14) Suc-DCAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 15) 15) Suc-DSAWHLGELVWST-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 16) Suc-DCAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 17) Suc-DCAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 18) Suc-DCAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 19) Suc-CAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 20) 20) Suc-CAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 21) Suc-CAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 22) Suc-SAWHLGELVWST-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 23) Suc-CAWHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂;
- 24) Suc-CAFHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂; 및
- 25) 25) Suc-CAYHLGELVWCT-NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCONHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH₂.

【청구항 9】

제 1 항에 있어서, 상기 레진은 아가로스, 세파로스, 셀룰로스, 덱스트란, 폴리아크릴 레이트 및 폴리스틸렌으로 구성된 군으로부터 선택되는
5 것을 특징으로 하는 항체 정제용 흡착 칼럼.

【청구항 10】

- 1) 제 1항의 흡착 칼럼에 항체를 포함하는 시료를 처리하여 상기 흡착
칼럼에 항체를 결합시키는 단계;
10 2) 세척하여 결합된 항체만 남기는 단계; 및
3) 세척된 흡착 칼럼으로부터 부착된 항체를 분리 용출시켜 항체를
회수하는 단계를 포함하는 항체의 정제 방법.

【청구항 11】

- 15 제 10항에 있어서, 상기 단계 1)의 항체의 결합은 pH 6.5 내지 pH
8.0에서 수행하는 것을 특징으로 하는 항체의 정제 방법.

【청구항 12】

- 제 10항에 있어서, 상기 단계 2)의 세척하여 결합된 항체만 남긴
20 단백질의 세척은 pH 5.5 내지 pH 6.5의 완충용액을 사용하는 것을 특징으로
하는 항체의 정제 방법.

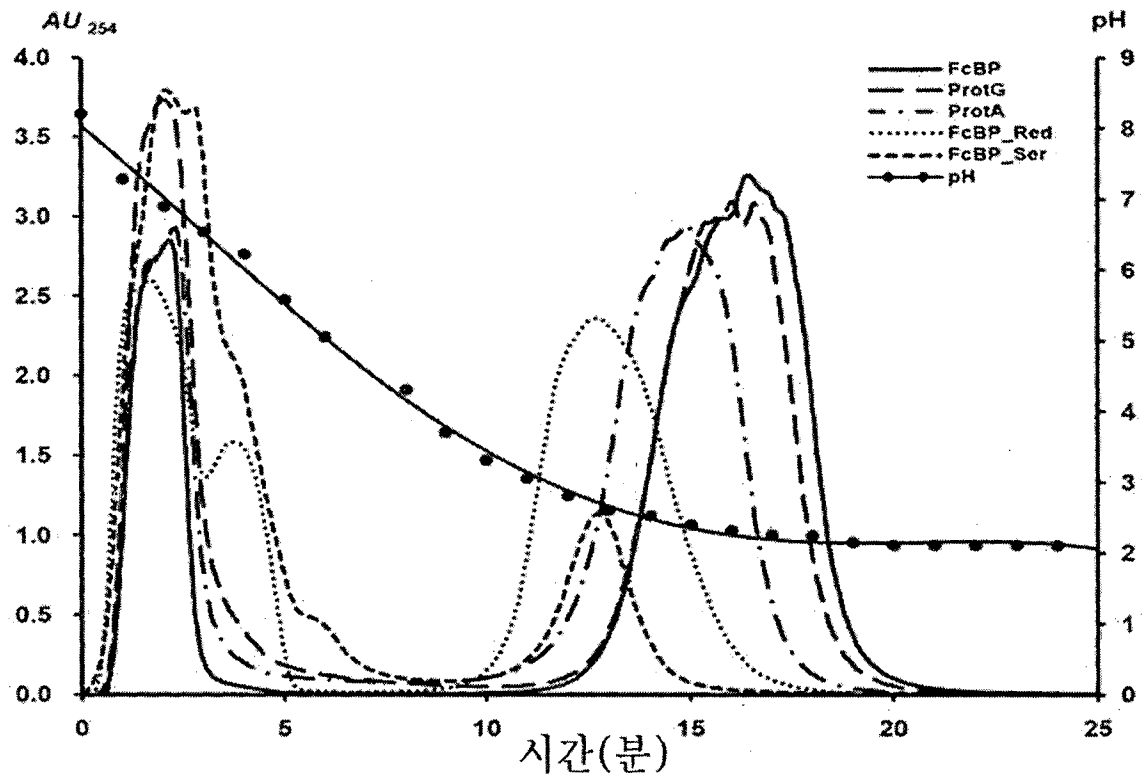
【청구항 13】

- 제 10항에 있어서, 상기 단계 3)의 항체의 용출은 pH 구배 완충용액
25 또는 일정 pH 완충액을 이용하는 것을 특징으로 하는 항체의 정제 방법.

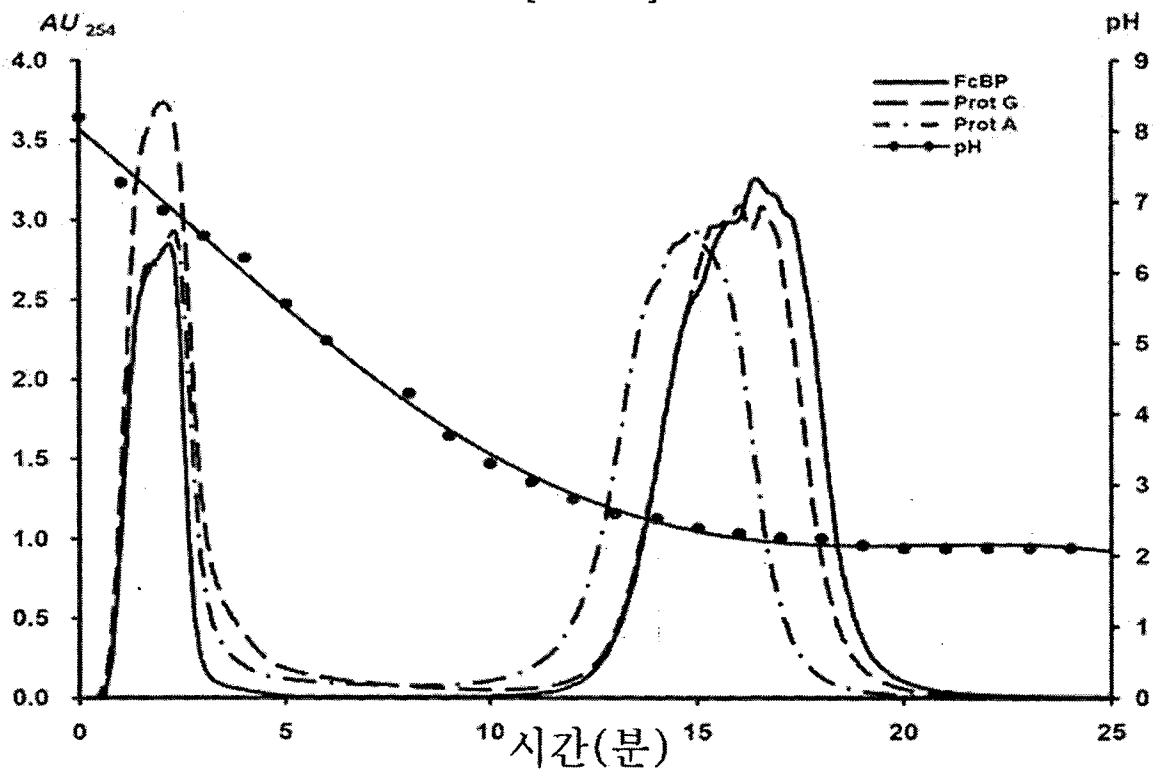
【청구항 14】

제 10항에 있어서, 상기 단계 3)의 항체의 용출은 pH 2.5 내지 pH 5.0에서 용출되는 것을 특징으로 하는 항체의 정제 방법.

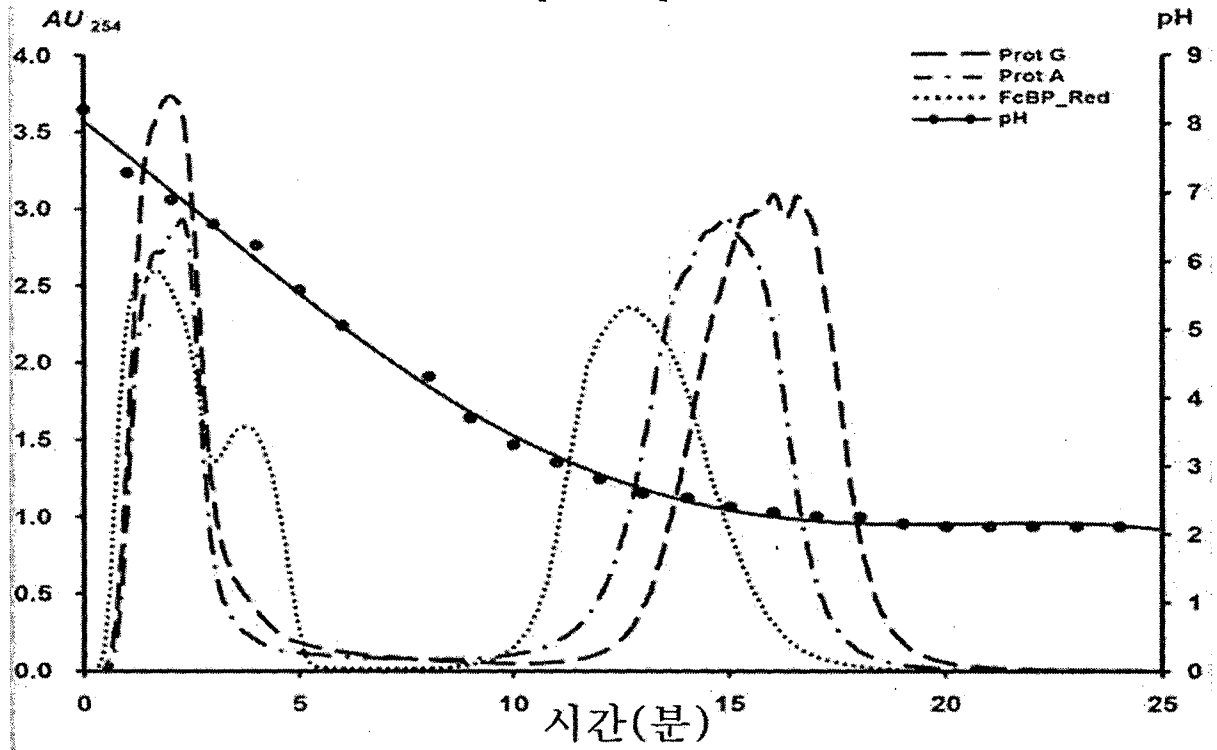
[도 1a]



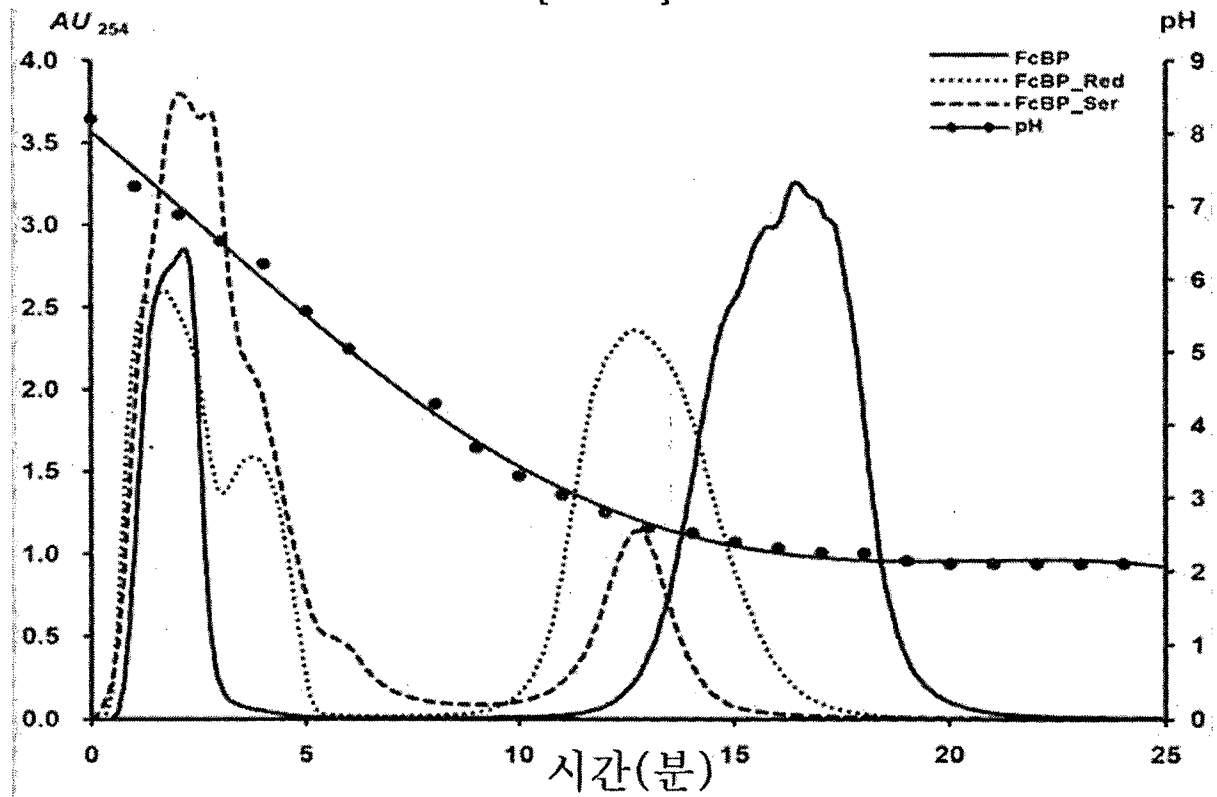
[도 1b]



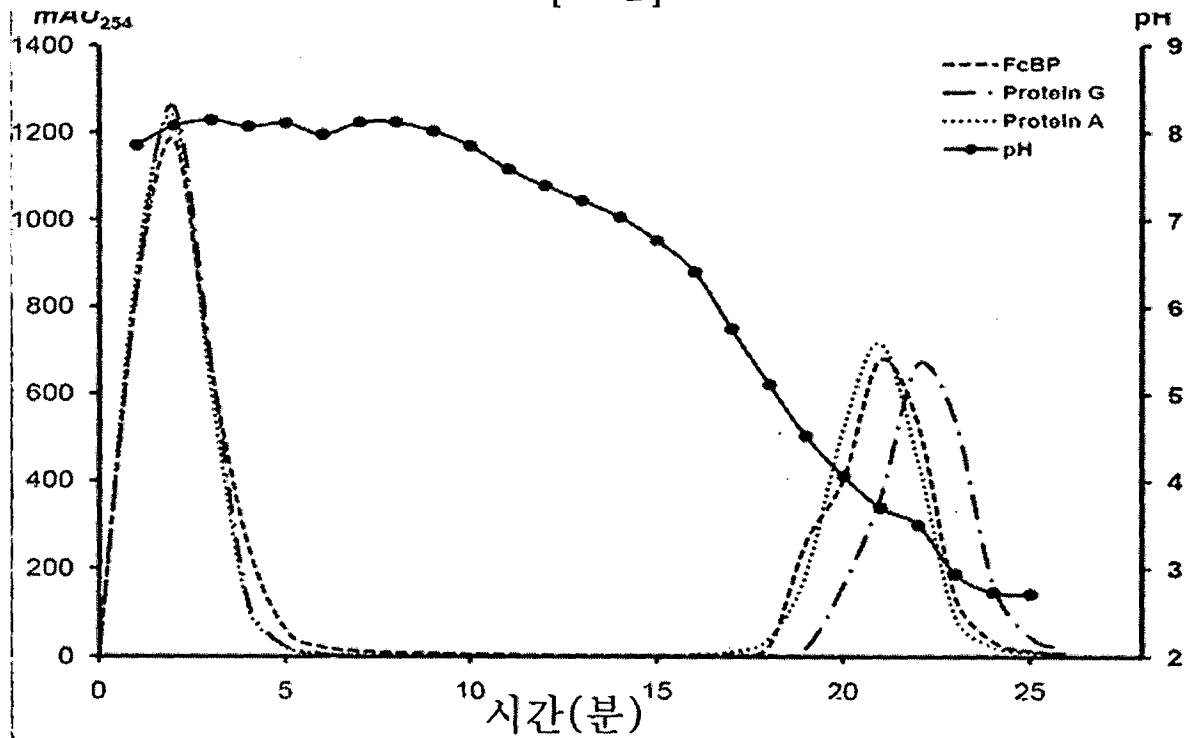
[도 1c]



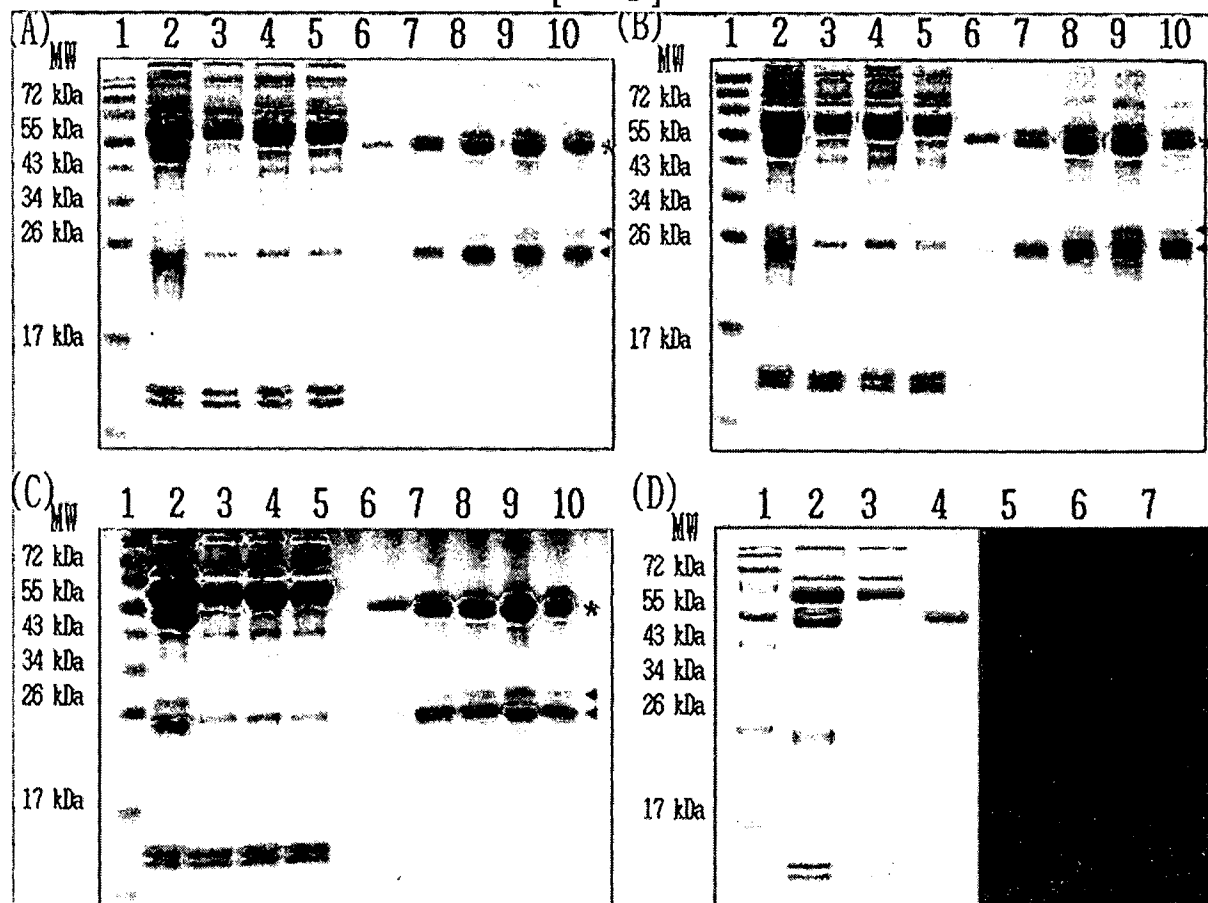
[도 1d]



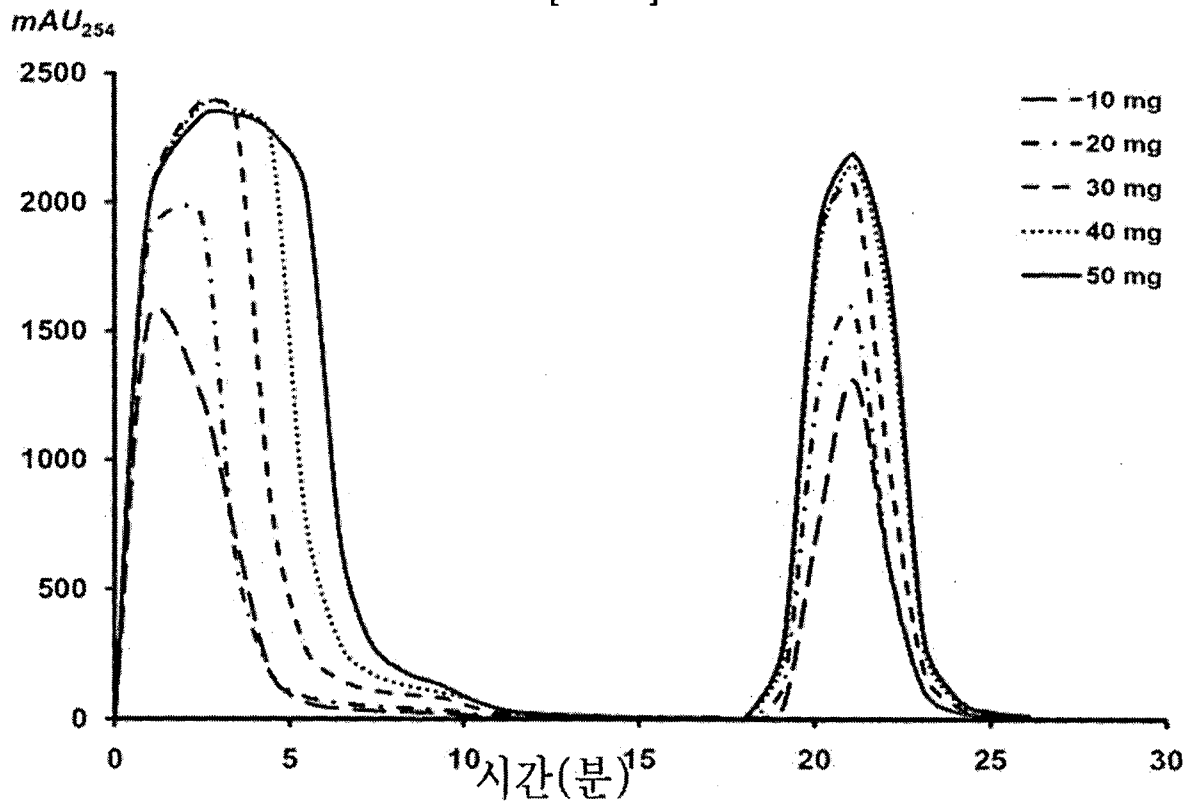
[도 2]



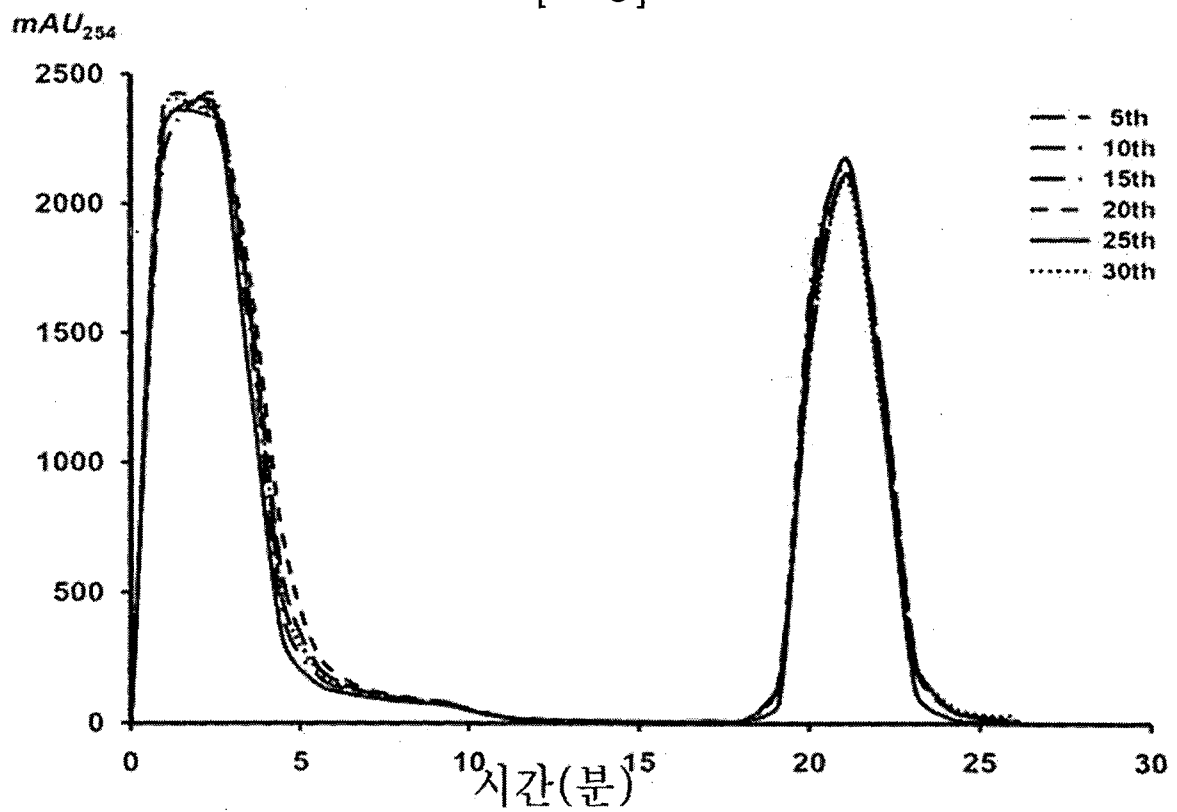
[도 3]

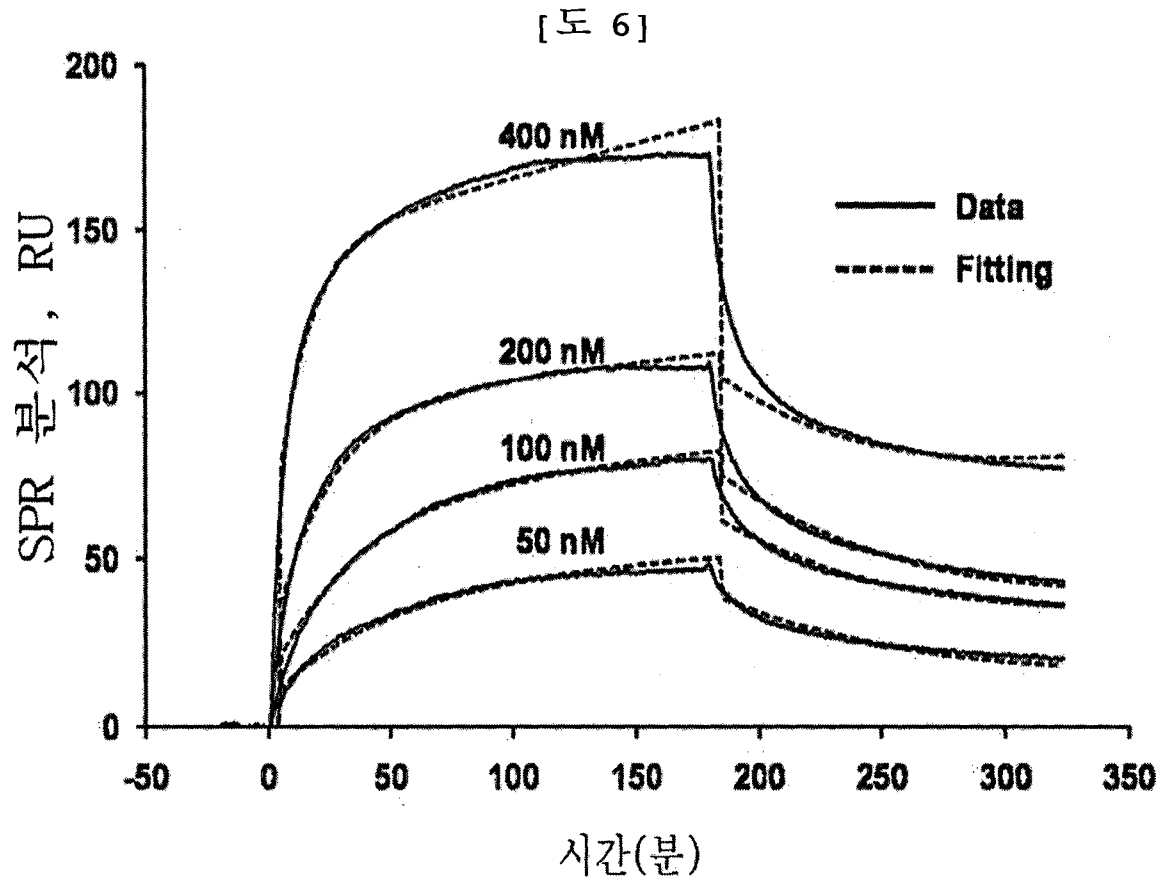


[도 4]



[도 5]





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/002859**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 1/22(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, B01D 15/08(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 1/22; C07K 16/28; A61K 39/395; C07K 1/34; C07K 19/00; A61M 1/34; C07K 16/42; C07K 16/00; C07K 17/00; B01D 15/08

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: peptide, antibody Fc, adsorbent column for refinement

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2010-0001090 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 06 January 2010	1-3,9-14
Y	See claim 1, 14 and 15; paragraph 32; table 2.	5-8
A		4
Y	KR 10-0920729 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 07 October 2009	5-8
A	See claims 1-11; paragraphs 36 and 44; figure 1; table 1.	1-4,9-14
A	KR 10-0953917 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 22 April 2010	1-14
	See claims 1 and 2.	
A	KR 10-0249572 B1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION et al.) 15 March 2000	1-14
	See page 5.	
A	KR 10-2011-0137733 A (JEON, Sook Yeong) 23 December 2011	1-14
	See the entire document.	



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

26 JUNE 2013 (26.06.2013)

Date of mailing of the international search report

27 JUNE 2013 (27.06.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/002859

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0001090 A	06.01.2010	KR 10-1247374 B1	19.03.2013
KR 10-0920729 B1	07.10.2009	EP 2205641 A1	14.07.2010
		JP 2010-540620 A	24.12.2010
		KR 10-2009-0033693 A	06.04.2009
		US 2010-0209945 A1	19.08.2010
		US 8236509 B2	07.08.2012
		WO 2009-044949 A1	09.04.2009
KR 10-0953917 B1	22.04.2010	KR 10-2010-0119486 A	09.11.2010
		WO 2010-126319 A2	04.11.2010
		WO 2010-126319 A3	03.03.2011
KR 10-0249572 B1	15.03.2000	CA 2045869 A1	29.12.1991
		CA 2045869 C	27.01.2009
		EP 0464533 A1	08.01.1992
		EP 0464533 B1	29.07.1998
		EP 0835939 A2	15.04.1998
		EP 0835939 A3	22.04.1998
		EP 0835939 B1	09.11.2005
		EP 0835939 B8	11.01.2006
		EP 1586635 A1	19.10.2005
		JP 05-247094 A	24.09.1993
		JP 2002-201200 A	16.07.2002
		KR 10-0280069 B1	15.01.2001
		KR 10-0280070 B1	15.01.2002
		US 2001-0053539 A1	20.12.2001
		US 2003-0064480 A1	03.04.2003
		US 7253264 B1	07.08.2007
KR 10-2011-0137733 A	23.12.2011	WO 2011-159074 A2	22.12.2011
		WO 2011-159074 A3	03.05.2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 1/22(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, B01D 15/08(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 1/22; C07K 16/28; A61K 39/395; C07K 1/34; C07K 19/00; A61M 1/34; C07K 16/42; C07K 16/00; C07K 17/00; B01D 15/08

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: 펩타이드, 항체 Fc, 정제용 흡착 칼럼

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2010-0001090 A (한국생명공학연구원) 2010.01.06 청구항 1, 14 및 15; 단락 32; 표 2 참조.	1-3, 9-14
Y		5-8
A		4
Y	KR 10-0920729 B1 (한국생명공학연구원) 2009.10.07 청구항 1-11; 단락 36 및 44; 도면 1; 표 1 참조.	5-8
A		1-4, 9-14
A	KR 10-0953917 B1 (고려대학교 산학협력단) 2010.04.22 청구항 1 및 2 참조.	1-14
A	KR 10-0249572 B1 (더 제너럴하스피털코퍼레이션 외 1명) 2000.03.15 페이지 5 참조.	1-14
A	KR 10-2011-0137733 A (전숙영) 2011.12.23 전체 문헌 참조.	1-14

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 06월 26일 (26.06.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 06월 27일 (27.06.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



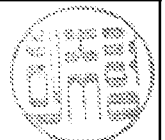
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 82-42-481-8150



국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2013/002859

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0001090 A	2010.01.06	KR 10-1247374 B1	2013.03.19
KR 10-0920729 B1	2009.10.07	EP 2205641 A1	2010.07.14
		JP 2010-540620 A	2010.12.24
		KR 10-2009-0033693 A	2009.04.06
		US 2010-0209945 A1	2010.08.19
		US 8236509 B2	2012.08.07
		WO 2009-044949 A1	2009.04.09
KR 10-0953917 B1	2010.04.22	KR 10-2010-0119486 A	2010.11.09
		WO 2010-126319 A2	2010.11.04
		WO 2010-126319 A3	2011.03.03
KR 10-0249572 B1	2000.03.15	CA 2045869 A1	1991.12.29
		CA 2045869 C	2009.01.27
		EP 0464533 A1	1992.01.08
		EP 0464533 B1	1998.07.29
		EP 0835939 A2	1998.04.15
		EP 0835939 A3	1998.04.22
		EP 0835939 B1	2005.11.09
		EP 0835939 B8	2006.01.11
		EP 1586635 A1	2005.10.19
		JP 05-247094 A	1993.09.24
		JP 2002-201200 A	2002.07.16
		KR 10-0280069 B1	2001.01.15
		KR 10-0280070 B1	2001.01.15
		US 2001-0053539 A1	2001.12.20
		US 2003-0064480 A1	2003.04.03
		US 7253264 B1	2007.08.07
KR 10-2011-0137733 A	2011.12.23	WO 2011-159074 A2	2011.12.22
		WO 2011-159074 A3	2012.05.03