

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 11월 17일 (17.11.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/142490 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 1/36 (2006.01) C07K 14/51 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003021
- (22) 국제출원일: 2010년 5월 12일 (12.05.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0043673 2010년 5월 10일 (10.05.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 코리아본뱅크 (KOREA BONE BANK CO., LTD.) [KR/KR]; 서울 금천구 가산동 345-30 에이스테크노9차 402호, 153-782 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 심영복 (SHIM, Young-Bock) [KR/KR]; 서울 강남구 도곡동 467 타워팰리스아파트 A-4501, 135-542 Seoul (KR). 김영식 (KIM, Yeong-Schick) [KR/KR]; 경기도 수원시 팔달구 화서동 주공아파트 404동 1704호, 442-150 Gyeonggi-do (KR). 최연락 (CHOI, Yon-Rak) [KR/KR]; 경기도 수원시 장안구 천천동 566 현대아파트 304동 1301

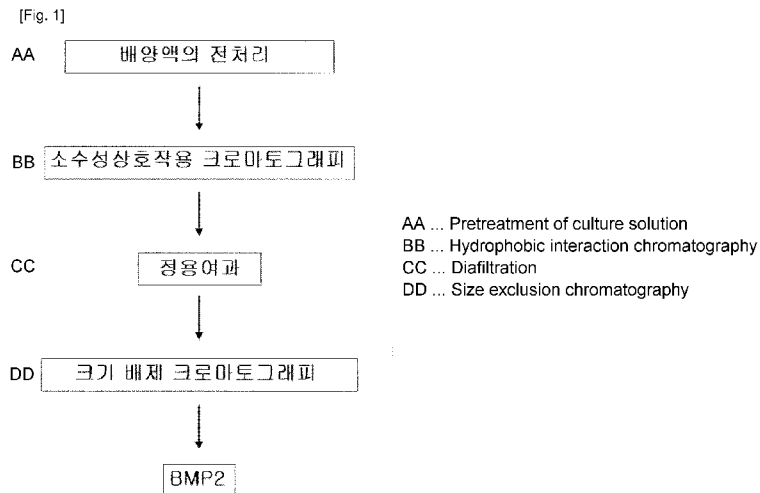
호, 440-717 Gyeonggi-do (KR). 장주용 (JANG, Ju-Woong) [KR/KR]; 서울 동작구 분당 481 신동아아파트 4동 307호, 156-060 Seoul (KR).

- (74) 대리인: 특허법인오리진 (ORIGIN PATENT & LAW FIRM); 서울 강남구 역삼동 626-30, 135-908 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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING BONE MORPHOGENETIC PROTEIN

(54) 발명의 명칭 : 골형성 단백질의 정제 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for purifying a protein belonging to the TGF-β superfamily, preferably BMP, and more preferably BMP2. In particular, a method for purifying BMP2 according to the present invention reduces and simplifies the steps as compared to conventional methods for purifying BMP2, and thus may bring about a reduction in the cost and time required for purification. In addition, the method for purifying BMP2 according to the present invention increases the final recovery ratio of BMP2 by solving the problems of taking a long time to purify BMP2 and of the final recovery ratio of BMP2 being lowered due to decomposition by protease in the intermediate steps and loss during the purification process as BMP2 is subjected to more and more purification steps. Furthermore, although the purification steps are reduced in the method for purifying BMP2 according to the present invention, the purity of recovered BMP2 is greatly improved using a filtration method, a chromatography method, columns, a buffer solution, and types and concentrations of compounds that are different from those of conventional methods for purifying BMP2, and optimizing the fractionation size of a thin film used in diafiltration.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2011/142490 A1



MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 공개:
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, — 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

본 발명은 TGF- β 상과에 속하는 단백질, 바람직하게는 BMP, 더 바람직하게는 BMP2의 정제 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명에 따른 BMP2의 정제 방법은 종래 BMP2의 정제 방법에 비해 단계를 축소 및 단순화한 것이며, 이에 따라 원가의 절감, 정제 소요시간의 단축을 가져올 수 있다. 또한, BMP2를 정제하는 시간이 오래 소요되고 정제단계를 많이 거칠수록 BMP2가 중간 단계에서 프로테아제에 의한 분해 및 정제과정상의 소실로 인해 BMP2의 최종 회수율이 낮아지는 문제점을 해결함으로써, 본 발명에 따른 BMP2의 정제 방법은 BMP2의 최종 회수율을 증가시킨다. 더욱이, 본 발명에 따른 BMP2의 정제 방법은 정제 단계가 축소되었음에도 불구하고, 종래 BMP2의 정제 방법과는 상이한 여과법, 크로마토그래피법, 컬럼, 완충액, 화합물의 종류 및 농도, 정용여과에 사용된 박막의 분획 크기를 최적화하여 사용함으로써, 회수된 BMP2의 순도가 매우 우수하다.

명세서

발명의 명칭: 골형성 단백질의 정제 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 TGF- β (Transforming growth factor- β , 형질전환성장인자-베타) 상과(superfamily)에 속하는 단백질, 바람직하게는 BMP(Bone Morphogenetic Protein, 골형성 단백질), 더 바람직하게는 BMP2(Bone Morphogenetic Protein 2, 골형성 단백질2)의 정제 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 고순도 및 고회수율로 정제된, TGF- β 상과에 속하는 단백질, 바람직하게는 BMP, 더 바람직하게는 BMP2에 관한 것이다.

배경기술

- [2] BMP(Bone Morphogenetic Protein, 골형성 단백질)는 분비 성장 및 분화 인자의 TGF- β 상과에 속하는 것이다. TGF- β 상과의 BMP 아과(subfamily)에는 15개 이상의 단백질이 포함되며, 여기에는 BMP2, BMP3, BMP3b, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP9, BMP10, BMP11, BMP12, BMP13, BMP-14, 및 BMP-15가 속한다.
- [3] BMP는 골형성 세포와 같은 유형의 세포의 성장 및 분화를 조절한다고 보고되어 있으며, 특히 BMP 2, 4, 5, 6, 7 및 8은 시험관내 및 생체내 이소성 부위에서 골 형성을 단독으로 유도할 수 있는 성장 및 분화 인자이다. 또한, BMP2는 신경관 세포로부터 신경 표현형으로 분화를 유도할 수 있으며, BMP4 및 BMP7은 교감 아드레날린 표현형을 유도할 수 있다. BMP4 및 BMP7로 구성된 이종이량체(heterodimer)는 중배엽의 잠재적 유도 인자라는 것이 보고되었다 (A. Suzuki, E. Kaneko, J. Maeda and N. Ueno, "Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 232, pp. 153-156, March 1997 참조).
- [4] 또한, BMP는 단일 BMP 상과의 단량체로 구성된 동종이량체 또는 2개의 상이한 BMP 상과의 단량체로 구성된 이종이량체를 형성할 수 있으며, 이는 헤드-투-테일(head-to-tail) 배열에서 디설피드 결합에 의해 연결된다 (K. Azari, B. A. Doll, C. Sfeir, Y. Mu and J. O. Hollinger, "Therapeutic potential of bone morphogenetic proteins," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 10, pp. 1677-1686, September 2001 참조). 또한, BMP2 동종이량체 및 BMP2/7 이종이량체와 같은 BMP 이량체는 생체 내에서 활성이라는 것이 보고되었다 (D. I. Israel, J. Nove, K. M. Kerns, I. K. Moutsatsos and R. J. Kaufman, "Expression and Characterization of Bone Morphogenetic Protein-2 in Chinese Hamster Ovary Cells," *Growth Factors*, vol. 7, pp. 139-150, 1992; M. F. Mehler, P. C. Mabie, D. M. Zhang and J. A. Kessler, "Bone morphogenetic proteins in the nervous system," *Trends Neurosci.*, vol. 20, pp. 309-317, 1997; T. K. Sampath, J. E. Coughlin and R. M.

Whetstone, "Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor- β superfamily," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, pp. 13198-13205, August 1990; D. I. Israel, J. Nove, K. M. Kerns, R. J. Kaufman, V. Rosen, K. A. Cox and J. M. Wozney, "Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo," *Growth Factors*, vol. 13, pp. 291-300, 1996 참조).

- [5] 특히, BMP2는 단백질의 TGF- β 상과(superfamily)에 속하는 것으로서, 골 및 연골의 발달에 중요한 역할을 하며, 이는 다양한 세포 유형에서 골아세포 분화를 잠재적으로 유도하는 것으로 알려져 있다 ("Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP2 signaling", Marie PJ, Debiais F, Hay E, 2002 참조). 또한, BMP2는 골 생성을 자극하는 작용을 하며, BMP2를 콜라겐 스폰지 내로 이식하여 새로운 골형성을 유도하는 제품이 시판되고 있다.
- [6] 이와 같이 골조직의 재생에 중요한 기능을 갖고 있는 BMP2와 관련하여 다양한 연구가 이루어지고 있으며, 이에 따라 BMP2를 함유하는 세포 배양액으로부터 BMP2 외의 단백질 또는 불순물을 제거하고 BMP2를 고순도 및 고회수율로 정제하여 수득하는 것이 요구되고 있다.
- [7] 종래에는, 세포 등의 배양액으로부터 BMP2를 고순도로 정제하여 높은 회수율로 수득하기 위하여, 전하, 리간드, 소수성 정도 또는 크기를 기준으로 여러 단계의 크로마토그래피를 결합하여 이용하고 있으며, 그 종류 또한 매우 다양하고 그 종류에 따라 순도 및 회수율에 많은 차이를 보인다. 그러나, BMP2를 정제하는 시간이 오래 소요될수록, 그리고 정제하는 단계를 많이 거칠수록, 최종적으로 수득하고자 하는 BMP2가 중간 단계에서 프로테아제에 의해 분해되거나 정제과정 중 소실되기 때문에, BMP2의 최종 회수율이 낮아지는 문제점이 있다. 또한, 상기 문제점을 해결하기 위하여 BMP2를 정제하는 단계의 수를 줄이고 정제에 소요되는 시간을 단축시킨다고 하더라도, 최종적으로 회수된 BMP2의 순도가 낮아져서는 안 된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자는 상기 종래기술의 문제점 등을 인식하고 이를 해결하기 위하여, BMP2의 화학적 및 물리적 특징, 다양한 종류의 크로마토그래피, 각각의 크로마토그래피에 사용되는 수지, 컬럼, 완충액, 세척액 또는 용출액의 종류 및 농도, 박막의 분획 크기 등과 관련하여 다양한 실험을 반복한 결과, 정제 단계 및 소요시간을 감축하면서도 고순도의 BMP2를 높은 회수율로 수득할 수 있는 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명은 TGF- β 상과에 속하는 단백질, 바람직하게는 BMP, 더 바람직하게는 BMP2의 정제 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법은 특히 하기 단계를

포함하는 것을 특징으로 한다:

- [10] a) TGF- β 상과에 속하는 단백질을 함유하는 용액을 전처리하는 단계로서, 상기 용액을 분획 박막 필터(cut-off membrane filter)를 이용하여 농축하는 단계;
- [11] b) 상기 a) 단계에서 수득된 용액에 소수성 상호작용 크로마토그래피를 적용하는 단계;
- [12] c) 상기 b) 단계에서 수득된 용액을 정용여과하는 단계; 및
- [13] d) 상기 c) 단계에서 수득된 용액에 크기 배제 크로마토그래피를 적용하는 단계.
- [14] 보다 바람직하게는, 상기 a) 단계에서 분획 박막 필터를 이용하여 농축된 용액에 NaCl 및 Tris를 첨가하고 pH를 5-9로 조절한 후, 여과필터를 이용하여 여과하는 것을 추가로 포함한다.
- [15] 보다 바람직하게는, 상기 a) 단계에서 첨가하는 NaCl의 농도가 0.2-5M이고, Tris의 농도가 5-500mM이다.
- [16] 보다 바람직하게는, 상기 a) 단계에서 이용된 분획 박막 필터가 30kDa 분획 박막 필터이고, 여과필터가 0.1-1.0 μ m 구멍 크기이다.
- [17] 보다 바람직하게는, 상기 b) 단계의 소수성 상호작용 크로마토그래피가 부틸 세파로스 크로마토그래피이다.
- [18] 보다 바람직하게는, 상기 부틸 세파로스 크로마토그래피에서 부틸 세파로스 4 패스트 플로우(butyl sepharose 4 fast flow) 수지를 사용한다.
- [19] 보다 바람직하게는, 상기 b) 단계의 크로마토그래피는 컬럼을 Tris, NaCl 및 이소프로판올을 함유하는 완충액으로 평형화하고, a) 단계에서 수득된 용액을 상기 컬럼에 로딩하고, Tris, NaCl 및 이소프로판올을 함유하는 완충액으로 컬럼을 세척하고, 이어서 Tris, NaCl 및 이소프로판올을 함유하는 완충액으로 용액을 용출하는 것을 포함한다.
- [20] 보다 바람직하게는, 상기 b) 단계에서 컬럼을 평형화하는 완충액, 컬럼을 세척하는 완충액 및 용출 완충액이 pH가 5-9이고, Tris의 농도가 5-500mM이고, NaCl의 농도가 0.2-5M이고, 이소프로판올의 농도가 0.1-50 중량%이다.
- [21] 보다 바람직하게는, 상기 c) 단계의 정용여과는 b) 단계에서 수득된 용액을 분획 박막 필터를 이용하여 Tris, NaCl, L-아르기닌 및 글리세롤을 함유하는 완충액으로 교환 및 농축하는 것을 포함한다.
- [22] 보다 바람직하게는, 상기 c) 단계에서 교환되는 완충액이 pH가 5-9이고, Tris의 농도가 5-500mM이고, NaCl의 농도가 0.2-5M이고, L-아르기닌의 농도가 0.2-5M이고, 글리세롤의 농도가 1-50 중량%이다.
- [23] 보다 바람직하게는, 상기 c) 단계에서 이용된 분획 박막 필터가 30kDa 분획 박막 필터이다.
- [24] 보다 바람직하게는, 상기 d) 단계의 크기 배제 크로마토그래피가 세파크릴(sephacryl) 크로마토그래피이다.
- [25] 보다 바람직하게는, 상기 세파크릴 크로마토그래피에서 세파크릴 S-100

수지를 사용한다.

- [26] 보다 바람직하게는, 상기 d) 단계의 크로마토그래피는 컬럼을 Tris 및 NaCl을 함유하는 완충액으로 평형화하고, c) 단계에서 수득된 용액을 상기 컬럼에 로딩하고, Tris 및 NaCl을 함유하는 완충액으로 용액을 용출하는 것을 포함한다.
- [27] 보다 바람직하게는, 상기 d) 단계에서 컬럼을 평형화하는 완충액 및 용출 완충액이 pH가 5-9이고, Tris의 농도가 5-500mM이고, NaCl의 농도가 0.05-5M이다.
- [28] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 정제된 단백질에 관한 것이다.
- [29] 본 발명에서 정제하고자 하는 출발물질로서 사용되는 TGF- β 상과에 속하는 단백질을 함유하는 용액은 바람직하게는 BMP가 함유된 용액이며, 특히 바람직하게는 BMP2가 함유된 용액이다. 여기에서, BMP2를 생성하는 세포의 종류, 세포를 배양하는데 사용되는 배지의 종류, 시약 및 조건에 제한이 없다. 예를 들어, BMP2가 다른 단백질 또는 불순물과 함께 함유되어 있는 CHO(Chinese hamster ovary, 중국 햄스터 난소) 세포 배양액, 미생물로부터 유래된 대장균 배양액 등을 본 발명의 방법에서 정제하고자 하는 출발물질로 사용할 수 있다.
- [30] 본원에서 분획 박막 필터(cut-off membrane filter)와 관련하여 사용되는 용어 "Da"는 단백질의 분자량을 나타내는 단위이다. 예를 들어, 30kDa 분획 박막 필터를 사용하는 경우에는 30kDa 이하의 분자량을 가지는 단백질 등을 포함한 불순물이 박막 필터를 통과한다.
- [31] 본원에서 사용된 용어 "소수성 상호작용 크로마토그래피(Hydrophobic Interaction Chromatography)"는 단백질의 소수성 특징을 이용하여 분리 정제하는 방법으로서, 소수성 상호작용에 사용되는 완충액의 염도, 종류, pH 등의 다양한 많은 인자들이 단백질의 분리능에 영향을 준다. 또한, 단백질은 고 이온 강도 조건 하에서 서로 상호작용하기 때문에 출발물질이 이미 부분적으로 정제될 때 분리능이 더 양호하다. 본 발명에서 BMP2를 고순도 및 고회수율로 정제하기 위하여 부틸 세파로스 크로마토그래피, 페닐 세파로스 크로마토그래피, 옥틸 세파로스 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 특히 부틸 세파로스 4 패스트 플로우(butyl sepharose 4 fast flow) 수지를 사용하는 크로마토그래피가 바람직하다.
- [32] 본원에서 사용된 용어 "크기 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography)"는 크기가 고르고 다공성이며 비이온성인 겔을 고정상으로 하여 분자 크기에 따라 물질을 분리하는 방법으로서, 크기가 작은 물질은 다공성인 고정상 내로 들어가 다시 빠져 나오는데 시간이 소요되므로 용출시간이 긴 반면, 크기가 큰 물질은 다공성인 고정상 내에 들어갈 수 없으므로 이동상과 함께 빠르게 이동되어 용출시간이 짧다. 따라서, 크기 배제 크로마토그래피로부터 용출되는 순서는 분자의 크기가 큰 물질이 빨리 용출되고 분자의 크기가 작은 물질은 늦게 용출된다. 본 발명에서 BMP2를

고순도 및 고회수율로 정제하기 위해서는 겔 여과 크로마토그래피, 예를 들어 세파크릴 크로마토그래피, 슈퍼텍스 크로마토그래피, 세파텍스 크로마토그래피 등이 바람직하며, 특히 세파크릴(sephacryl) S-100 수지를 사용하는 크로마토그래피가 바람직하다.

- [33] 크로마토그래피에 있어서, pH는 단백질의 안정화에 중요한 인자이다.
- [34] 압력 및 유속(flow rate)은 목적 단백질과 컬럼 상호간의 작용과 목적 단백질의 분리능을 좌우하는 중요한 인자이다.
- [35] 전도도(conductivity)는 용매 내 전해질 농도를 나타내며, 전해질의 농도에 따라 컬럼과 목적 단백질의 결합 또는 분리가 좌우된다.
- [36] CV(column volume, 컬럼 부피)는 패킹(packaging)된 컬럼의 부피를 나타내며, CV에 따라 정제 용적이 결정된다.
- [37] 평형화(equilibration)는 정제하고자 하는 단백질이 컬럼에 주입되기 전에 환경의 변화에 의해 단백질이 응집되거나 그의 활성이 소실되는 것을 방지하기 위하여, 컬럼 내부의 완충액을 샘플의 완충액 조성으로 동일하게 하는 과정이다. 목적 단백질의 종류에 따라 평형화에 사용되는 완충액의 조성이 상이하다.
- [38] 로딩(load)은 컬럼에 샘플을 주입하는 과정이다. 컬럼 용적의 약 30 내지 40%를 로딩하는 것이 통상적이지만, 본 발명자는 크로마토그래피의 세부적인 조건을 조절하여 컬럼 용적의 약 200% 이상을 로딩하는 것이 가능하도록 하였다.
- [39] 세척(wash)은 목적 단백질 외의 단백질을 제거하는 과정으로서, 정제하고자 하는 단백질의 종류에 따라 세척에 사용되는 완충액에 함유된 성분의 종류 및 농도가 상이하다.
- [40] 용출(elution)은 목적 단백질을 컬럼으로부터 분리하는 과정으로서, 완충액에 함유된 성분의 종류 및 농도가 적합하지 않은 경우에는 다량의 불순물이 동시에 용출되기 때문에 목적 단백질의 순도가 낮아지는 문제점이 있다. 따라서, 정제하고자 하는 단백질의 종류에 따라 용출에 사용되는 완충액에 함유된 성분의 종류 및 농도가 상이하다.
- [41] 정용여과(diafiltration)는 투석(dialysis) 및 한외여과(ultrafiltration)를 결합시킨 방법으로서, 일반적으로 용매 및 분자크기가 다른 2가지 이상의 용질이 포함된 유체로부터 일부 용질만 제거하는 경우에 사용된다.
- [42] 정용여과에 있어서, 공급 펌프(feed pump) 속도는 박막 필터에 완충액을 주입하는 펌프의 속도를 나타내며, BMP2의 회수율에 중요한 인자로 작용한다.
- [43] 공급 압력(feed pressure)은 공급 펌프에 의해 발생하는 주입 라인(injection line)의 압력을 나타낸다.
- [44] 보유 압력(retentate pressure)은 박막 필터를 통과하지 못하고 되돌아오는 용매의 압력을 나타내며, BMP2의 회수율에 중요한 인자로 작용한다.
- [45] 투과 압력(permeate pressure)은 박막 필터를 통과하는 용매의 압력을 나타내며, BMP2의 회수율에 중요한 인자로 작용한다.
- [46] 따라서, 최종적으로 정제하고자 하는 BMP2를 우수한 수율 및 순도로 수득하기

위해서는, 공급 펌프 속도, 공급 압력, 보유 압력, 투과 압력을 모두 함께 고려하여 종합적으로 조정하여야 한다.

- [47] 본원에서 사용된 용어 "SDS-PAGE"는 나트륨 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동의 약어로서, 전기영동 이동성 (예컨대, 폴리펩티드쇄의 길이 또는 분자량과 같은 인자) 을 이용하여 단백질을 분리하는 기술이다. 이 경우, 작은 분자량의 단백질은 이동거리가 더 멀리 나타나며, 분자량-마커를 이용하여 Rf 값을 구하면 목적 단백질의 분자량을 구하거나 목적 단백질을 동정할 수 있다.
- [48] 본원에서 사용된 용어 "Tris"는 화학식 $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ 을 가지며, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄으로 알려진 유기 화합물의 약어를 가리킨다.

발명의 효과

- [49] 본 발명에 따른 TGF- β 상과에 속하는 단백질의 정제 방법, 특히 BMP2의 정제 방법은 종래 BMP2의 정제 방법에 비해 단계를 축소 및 단순화하였으며, 이에 따라 BMP2를 정제하는데 소요되는 시간을 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라 정제 원가를 절감할 수 있다. 또한, BMP2를 정제하는 시간이 오래 소요될수록 그리고 정제하는 단계를 많이 거칠수록 BMP2가 중간 단계에서 프로테아제에 의해 분해되고 정제과정 중에 소실됨으로 인해 BMP2의 최종 회수율이 낮아지는 문제점을 해결함으로써, 본 발명에 따른 BMP2의 정제 방법은 BMP2의 최종 회수율을 증가시켰다.
- [50] 더욱이, 본 발명에 따른 BMP2의 정제 방법은 정제 단계가 축소되었음에도 불구하고, 종래 BMP2의 정제 방법과는 상이한 여과법, 크로마토그래피법, 컬럼, 완충액의 종류 및 농도, 정용여과에 사용된 박막의 분획 크기를 최적화하여 이용함으로써, 고순도의 BMP2를 고수율로 최종적으로 수득할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

- [51] 도 1은 본 발명의 정제방법의 개요를 나타낸 것이다.
- [52] 도 2는 부틸 세파로스 크로마토그래피 단계로부터 회수한 BMP2 용출액의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 여기에서, 기호 M에 해당하는 밴드는 목적 단백질의 분자량을 측정하기 위한 마커를 나타내며, 기호 B에 해당하는 밴드는 부틸 세파로스 크로마토그래피를 통하여 회수한 BMP2 용출액을 나타낸다.
- [53] 도 3은 세파크릴 크로마토그래피 단계로부터 회수한 BMP2 용출액의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 여기에서, 기호 M에 해당하는 밴드는 목적 단백질의 분자량을 측정하기 위한 마커를 나타내며, 기호 B에 해당하는 밴드는 세파크릴 크로마토그래피를 통하여 회수한 BMP2 용출액을 나타낸다.
- [54] 도 4는 본 발명의 방법에 따라 정제된 BMP2와 R&D systems사의 BMP2의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸다. 여기에서, 기호 M에 해당하는 밴드는 단백질 마커를 나타내며, 기호 K에 해당하는 밴드는 본 발명의 방법에 따라 정제된 BMP2를 나타내며, 기호 R에 해당하는 밴드는 R&D systems사의 BMP2를

나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[55] 본 발명에 따라 TGF- β 상과에 속하는 단백질을 정제하는 방법 중, BMP2를 정제하는 구체적인 실시예를 하기에 나타낸다. 단, 본 발명의 권리범위는 하기의 실시예에 의해 제한되지 않으며, 당업자라면 본 발명의 의미 내에서 다양한 변형을 할 수 있을 것이며, 이에 따라 본 발명에서 달성하고자 하는 효과를 얻을 수 있을 것이다.

[56] 1. 배양액을 전처리하는 단계

[57] BMP2가 함유되어 있는 CHO(Chinese hamster ovary, 중국 햄스터 난소) 세포 배양액 30L를 30kDa 분획 박막 필터를 이용하여 약 3L로 농축하였다. 이어서, 상기 배양액에 최종농도 1M의 NaCl 및 최종농도 50mM의 Tris를 첨가한 후 pH를 약 7.0으로 조절하였다. 그 후, 상기 배양액을 0.2 μ m 구멍(pore) 크기의 여과필터를 이용하여 여과하였다.

[58] 종래의 BMP2의 정제 공정과 달리, 본 발명에서는 BMP2가 함유된 배양액에 대해 크로마토그래피를 실시하기 전에 상기 배양액을 먼저 약 10배 정도로 농축시킴으로써, 혼합되는 화합물의 양을 1/10로 감소시켰다. 이는 이어서 실시되는 소수성 상호작용 크로마토그래피에 소요되는 시간을 단축시킬 수 있게 해준다. 또한, 이는 정제 시간이 지연되는 경우 BMP2가 분해되는 정도가 높아진다는 문제점을 해결할 수 있게 해주며, 이에 따라 본 발명에서는 최종적으로 수득된 BMP2의 회수율이 증가되었다.

[59] 종래의 BMP2의 정제 공정에서는 통상적으로 BMP2가 함유된 배양액을 직접 여과하지만, 본 발명의 상기 여과 단계에서는 BMP2가 함유된 배양액에 NaCl 및 Tris를 첨가하고 pH를 약 7.0으로 조절한 후 여과를 실시하였다.

[60] 2. 소수성 상호작용 크로마토그래피를 실시하는 단계

[61] 상기 여과된 용액에 대해 부틸 세파로스 4 패스트 플로우(butyl sepharose 4 fast flow) 수지를 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 공정을 실시하였다. 50mM의 Tris, 850mM의 NaCl 및 3-4 중량%의 이소프로판올을 함유하는 pH 약 7.0의 완충액 3CV로 평형화하였다. 이어서, 상기 여과된 용액을 컬럼 패킹 부피의 최대 약 2 CV 정도로 로딩하였다. 그 후, 50mM의 Tris, 850mM의 NaCl 및 3-4 중량%의 이소프로판올을 함유하는 pH 약 7.0의 완충액을 컬럼 패킹 부피의 3 CV로 컬럼을 세척하였다. 이어서, 50mM의 Tris, 600mM의 NaCl, 및 10-15 중량%의 이소프로판올을 함유하는 pH 약 7.0의 완충액을 2 CV 흘려주어 BMP2 함유 용액을 용출하였다.

[62] 여기에서, 부틸 세파로스 크로마토그래피는 배양액 내 BMP2를 제외한 대부분의 불순 단백질을 제거하기 위한 공정이다. 크로마토그래피를 진행하는 조건은 단백질의 종류에 따라 상이하지만, 본 발명은 부틸 세파로스 크로마토그래피에서 사용된 완충액의 조성 및 농도를 최적화함으로써, BMP2를

우수한 회수율 및 순도로 정제하였다.

[63] 상기 부틸 세파로스 크로마토그래피를 실시한 구체적인 조건을 하기 표 1에 나타내었다.

[64] 표 1

부틸 세파로스 크로마토그래피의 작동 파라미터(operating parameter)

	파라미터	목적 범위
모든 공정	압력	≤10 psi
	pH	7.0±0.2
	유속	60cm/h
평형화	부피	3 CV
	전도도	89-90 mS/cm
	유속	30cm/h
로딩	부피	2 CV
	전도도	80-90 mS/cm
	유속	60cm/h
세척	부피	3 CV
	전도도	65-66 mS/cm
	유속	30cm/h
용출	부피	2 CV
	전도도	45-46 mS/cm
	유속	30cm/h

[65] 도 2는 부틸 세파로스 크로마토그래피 단계로부터 회수한 BMP2 용출액의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 여기에서, 기호 M에 해당하는 밴드는 목적 단백질의 분자량을 측정하기 위한 마커를 나타내며, 기호 B에 해당하는 밴드는 부틸 세파로스 크로마토그래피를 통하여 회수한 BMP2 용출액을 나타낸다. 기호 B에 해당하는 밴드 중에서, 화살표로 표시된 부분이 본 발명에서 정제하고자 하는 BMP2를 가리키는 것이다.

[66] 상기 부틸 세파로스 크로마토그래피 단계로부터 회수한 BMP2 용출액을 분석한 결과, BMP2의 회수율은 약 95%였으며, 순도는 약 85%임이 확인되었다.

[67] 3. 정용여과하는 단계

[68] 상기 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 용출된 BMP2 함유 용액을 30kDa 분획 박막 필터를 사용하여 50mM의 Tris, 600mM의 NaCl, 0.5M의 L-아르기닌 및 5 중량%의 글리세롤을 함유하는 pH 약 7.0의 완충액으로 교환 및 농축하여, 약 20mL의 용액을 수득하였다.

[69] 여기에서, 정용여과(diafiltration)는 소수성 상호작용 크로마토그래피가 완료된

후에 크기배제 크로마토그래피를 진행하기 위한 준비 단계로서, 고순도의 BMP2를 정제하기 위해 샘플의 완충액 조성을 최적화하는 단계이다.

[70] 종래의 BMP2의 정제 공정에서는 통상적으로 10kDa 분획 박막 필터를 사용하였으나, 이와 같이 10kDa 분획 박막 필터를 사용할 경우에는 용액 내에 정제하려는 BMP2와 함께 10kDa 이상의 단백질 등의 불순물이 포함되어 있기 때문에 이를 추가로 정제하는 데에 단계 및 시간이 더욱 많이 요구된다는 문제점이 있다. 이에 반해, 본 발명의 정용여과 단계에서는 30kDa 분획 박막 필터를 사용함으로써 BMP2 함유 용액으로부터 30kDa 이하의 분자량을 가지는 단백질 등의 불순물을 제거하기 때문에, 본 발명의 정용여과 단계에서 사용된 30kDa 분획 박막 필터는 10kDa 분획 박막 필터에 비해 불순물을 더 많이 제거할 수 있는 장점이 있다.

[71] 다만, 본 발명에서 정제하고자 하는 BMP2 단백질은 약 28~32kDa의 분자량을 갖고 있으므로, 30kDa 분획 박막 필터를 사용할 경우에 오히려 다량의 BMP2가 소실될 수 있다. 이러한 이유 때문에 종래 기술에서는 30kDa 분획 박막 필터 대신 10kDa 분획 박막 필터를 사용한 것이지만, 본 발명자는 완충액의 종류 및 농도, 공급 펌프 속도, 공급 압력과 같은 파라미터를 최적의 조건으로 조절함으로써, 30kDa 분획 박막 필터를 사용하여 30kDa 이하의 분자량을 갖는 불순물을 제거하면서도 BMP2를 소실시키지 않을 수 있었다. 본 발명의 정용여과 단계에서 사용한 파라미터를 하기 표 2에 나타내었다.

[72] 표 2

정용여과(30kDa 분획)의 작동 파라미터

파라미터	목적 범위
공급 펌프 속도	20mL/분
공급 압력	0.8-1.2psi
보유 압력	0.1-0.2psi
투과 압력	0.1-0.2psi
TMP(trans-membrane pressure, 막간압력차)	0.4-0.6psi

[73] 4. 크기 배제 크로마토그래피를 실시하는 단계

[74] 상기 농축된 BMP2 함유 용액에 대해 세파크릴(sephacryl) S-100 수지를 사용하여 크기 배제 크로마토그래피 공정을 실시하였다. 50mM의 Tris 및 0.6M의 NaCl을 함유하는 pH 약 7.0의 완충액 1CV로 평형화하였다. 그 후, 상기 농축된 BMP2 함유 용액을 패킹된 컬럼 부피의 최대 0.04% 까지 로딩하였다. 이어서, 50mM의 Tris 및 0.6M의 NaCl을 함유하는 pH 약 7.0의 완충액 1CV로 용출하였다.

[75] 크기 배제 크로마토그래피를 진행하는 조건은 단백질의 종류에 따라 상이하며, 또한 컬럼에 주입되는 샘플의 완충액 조성 및 용출 완충액 조성에 따라 정제되는 단백질의 순도가 상이해진다. 본 발명의 세파크릴 크로마토그래피에서 사용한

특히 바람직한 파라미터를 하기 표 3에 나타내었다.

[76] 표 3

세파크릴 크로마토그래피의 작동 파라미터

	파라미터	목적 범위
모든 공정	압력	≤15 psi
	pH	7.0±0.2
	유속	10-30cm/h
평형화	부피	1 CV
	전도도	65-66 mS/cm
용출	부피	1 CV
	전도도	65-66 mS/cm

[77] 도 3은 세파크릴 크로마토그래피 단계로부터 회수된 BMP2 용출액의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 여기에서, 기호 M에 해당하는 밴드는 목적 단백질의 분자량을 측정하기 위한 마커를 나타내며, 기호 B에 해당하는 밴드는 세파크릴 크로마토그래피를 통하여 회수한 BMP2 용출액을 나타낸다. 기호 B에 해당하는 밴드 중에서 화살표로 표시된 부분이 본 발명에서 정제하고자 하는 BMP2를 가리키는 것이다.

[78] 상기 세파크릴 크로마토그래피 단계로부터 정제된 BMP2 용출액을 분석한 결과, BMP2의 회수율은 약 88% 이상이었으며, 순도는 약 95%임이 확인되었다.

[79] 본 발명의 BMP2 정제 단계에서 각각 회수된 BMP2를 정량하여 측정된 회수율 및 순도를 하기 표 4에 나타내었다.

[80] 표 4

본 발명의 각각의 정제 단계에서 회수된 BMP2의 회수율 및 순도

정제 단계	BMP2의 회수율(%)	BMP2의 순도(%)
세포 배양액	100	5.7
부틸 세파로스 크로마토그래피	95	85
정용여과	95	85
세파크릴 크로마토그래피	88	95
최종 정제된 BMP2	88	95

[81] 5. 본 발명의 방법에 따라 정제된 BMP2의 동정 및 순도 비교 실험

[82] 본 발명의 방법에 따라 정제된 단백질이 BMP2인지 여부를 확인하고, 상기 본 발명에 따른 BMP2의 순도를 R&D SYSTEM사에서 구매한 BMP2의 순도와 비교하기 위하여, 하기에 따라 웨스턴 블롯을 실시하였다.

- [83] (1) 최종 정제된 rhBMP2 1 μ g을 4X SDS-PAGE 샘플 버퍼와 1:3으로 혼합한다.
- [84] (2) 상기 혼합된 샘플을 70°C에서 10분 동안 끓인다.
- [85] (3) 상기 샘플을 10,000Xg로 10분간 원심분리한다.
- [86] (4) 상기 원심분리된 상층액을 4-12% 비스-트리스 폴리아크릴아미드 겔에 로딩한다.
- [87] (5) 이어서, 정전압(constant voltage) 100V로 2시간 동안 전기영동한다.
- [88] (6) 상기 전기영동시킨 단백질을 PVDF 막에 100V로 1시간 동안 이동시킨다.
- [89] (7) PVDF 막에 단백질이 부착되지 않은 부위는 5% 탈지유(skim milk)를 함유하는 TBST로 30분 동안 블로킹(blocking)한다.
- [90] (8) 1% 탈지유와 3000:1로 희석한 1차 항체를 포함하는 TBST에 2시간 동안 상기 막을 반응시킨다. 여기에서, 상기 1차 항체는 BMP2에 특이적으로 결합하는 항 마우스 IgG로서, 마우스로부터 유래된 것이다.
- [91] (9) 상기 막을 TBST로 각각 15분 동안 4회 세척한다.
- [92] (10) 1% 탈지유와 5000:1로 희석한 2차 항체를 포함하는 TBST에 30분 동안 상기 막을 반응시킨다. 여기에서, 상기 2차 항체는 1차 항체에 결합하는 HRP 컨쥬게이티드 염소(conjugated Goat) 항 마우스 IgG로서, 발색반응을 촉매하는 효소인 HRP가 부착되어 있으며 염소로부터 유래된 것이다.
- [93] (11) 상기 막을 TBST로 각각 15분 동안 4회 세척한다.
- [94] (12) 상기 막에 현상액을 첨가한 후 이미지 분석기로 분석한다.
- [95] 상기 웨스턴 블롯에 따른 결과가 도 4에 도시되어 있다. 도 4에서, 기호 M에 해당하는 밴드는 단백질 마커를 나타내며, 기호 K에 해당하는 밴드는 본 발명의 방법에 따라 정제된 BMP2를 나타내며, 기호 R에 해당하는 밴드는 R&D systems사의 BMP2를 나타낸다. 상기 결과로부터, 본 발명에 따라 정제된 단백질이 BMP2임이 확인되었으며, 또한 본 발명에 따라 정제된 BMP2가 R&D systems사의 BMP2에 비해 훨씬 우수한 순도로 정제되었다.

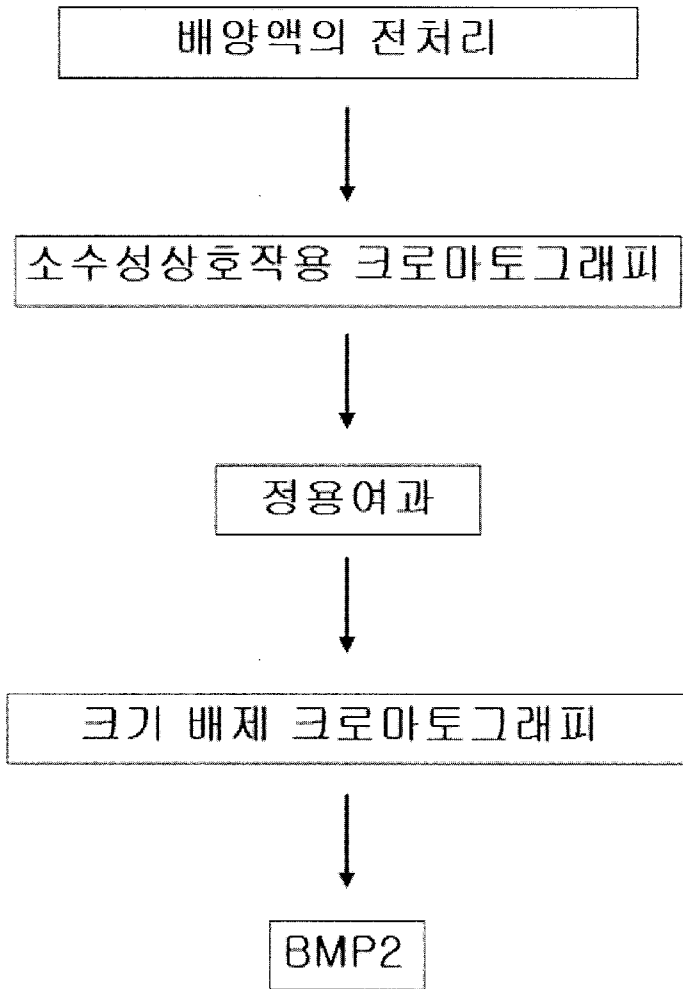
청구범위

- [청구항 1] 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, TGF- β (Transforming growth factor- β , 형질전환성장인자-베타) 상과(superfamily)에 속하는 단백질의 정제 방법:
 a) TGF- β 상과에 속하는 단백질을 함유하는 용액을 전처리하는 단계로서, 상기 용액을 분획 박막 필터(cut-off membrane filter)를 이용하여 농축하는 단계;
 b) 상기 a) 단계에서 수득된 용액에 소수성 상호작용 크로마토그래피를 적용하는 단계;
 c) 상기 b) 단계에서 수득된 용액을 정용여과하는 단계; 및
 d) 상기 c) 단계에서 수득된 용액에 크기 배제 크로마토그래피를 적용하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 TGF- β 상과에 속하는 단백질이 BMP(Bone Morphogenetic Protein, 골형성 단백질)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
 상기 BMP가 BMP2(Bone Morphogenetic Protein 2, 골형성 단백질2)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 a) 단계에서 분획 박막 필터를 이용하여 농축된 용액에 NaCl 및 Tris를 첨가하고 pH를 5-9로 조절한 후, 여과필터를 이용하여 여과하는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
 상기 a) 단계에서 첨가하는 NaCl의 농도가 0.2-5M이고, Tris의 농도가 5-500mM인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제4항에 있어서,
 상기 a) 단계에서 이용된 분획 박막 필터가 30kDa 분획 박막 필터이고, 여과필터가 0.1-1.0 μ m 구멍 크기인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 b) 단계의 소수성 상호작용 크로마토그래피가 부틸 세파로스 크로마토그래피인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
 상기 부틸 세파로스 크로마토그래피에서 부틸 세파로스 4 페스트 플로우(butyl sepharose 4 fast flow) 수지를 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

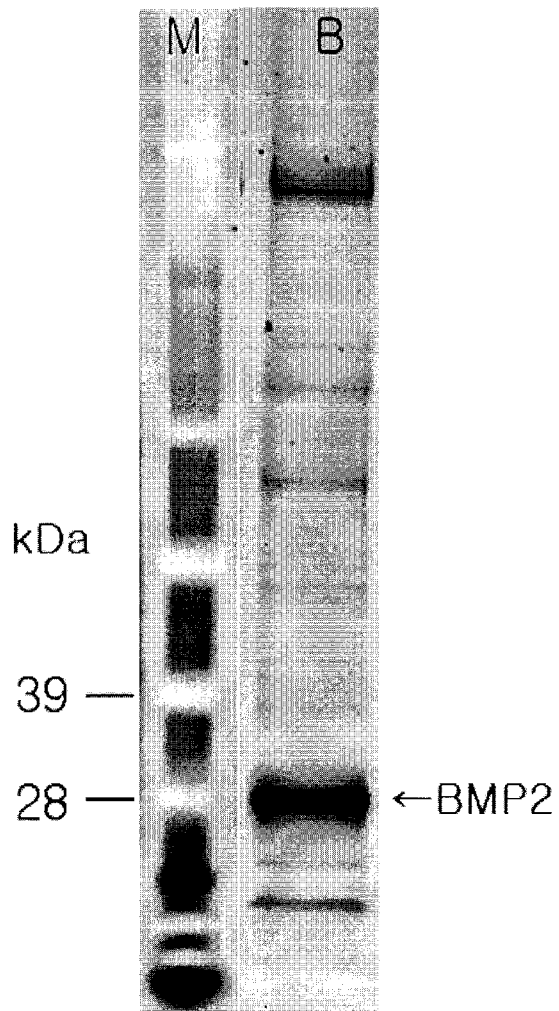
- 상기 b) 단계의 크로마토그래피는 컬럼을 Tris, NaCl 및 이소프로판올을 함유하는 완충액으로 평형화하고, a) 단계에서 수득된 용액을 상기 컬럼에 로딩하고, Tris, NaCl 및 이소프로판올을 함유하는 완충액으로 컬럼을 세척하고, 이어서 Tris, NaCl 및 이소프로판올을 함유하는 완충액으로 상기 용액을 용출하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 b) 단계에서 컬럼을 평형화하는 완충액, 컬럼을 세척하는 완충액 및 용출 완충액이 pH가 5-9이고, Tris의 농도가 5-500mM이고, NaCl의 농도가 0.2-5M이고, 이소프로판올의 농도가 0.1-50 중량%인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 c) 단계의 정용여과는 b) 단계에서 수득된 용액을 분획 박막 필터를 이용하여 Tris, NaCl, L-아르기닌 및 글리세롤을 함유하는 완충액으로 교환 및 농축하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 c) 단계에서 교환되는 완충액이 pH가 5-9이고, Tris의 농도가 5-500mM이고, NaCl의 농도가 0.2-5M이고, L-아르기닌의 농도가 0.2-5M이고, 글리세롤의 농도가 1-50 중량%인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 c) 단계에서 이용된 분획 박막 필터가 30kDa 분획 박막 필터인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 d) 단계의 크기 배제 크로마토그래피가 세파크릴(sephacryl) 크로마토그래피인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 세파크릴 크로마토그래피에서 세파크릴 S-100 수지를 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 d) 단계의 크로마토그래피는 컬럼을 Tris 및 NaCl을 함유하는 완충액으로 평형화하고, c) 단계에서 수득된 용액을 상기 컬럼에 로딩하고, Tris 및 NaCl을 함유하는 완충액으로 상기 용액을 용출하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 d) 단계에서 컬럼을 평형화하는 완충액 및 용출 완충액이 pH가 5-9이고, Tris의 농도가 5-500mM이고, NaCl의 농도가 0.05-5M인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 18] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 방법에 따라 정제된 단백질.

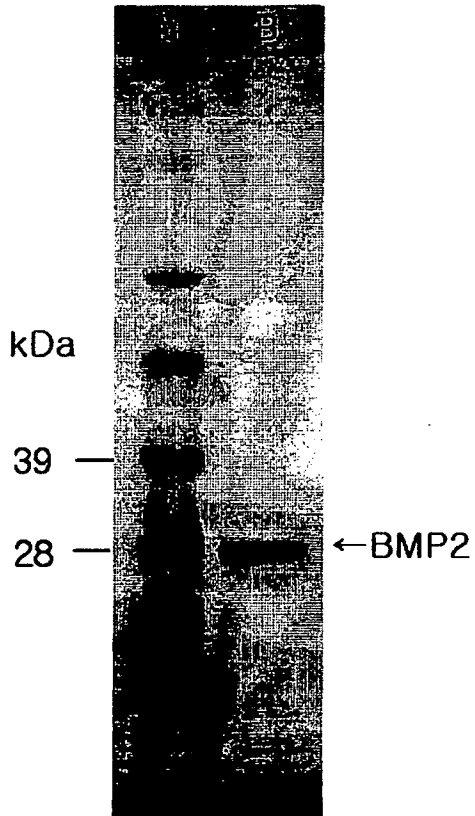
[Fig. 1]



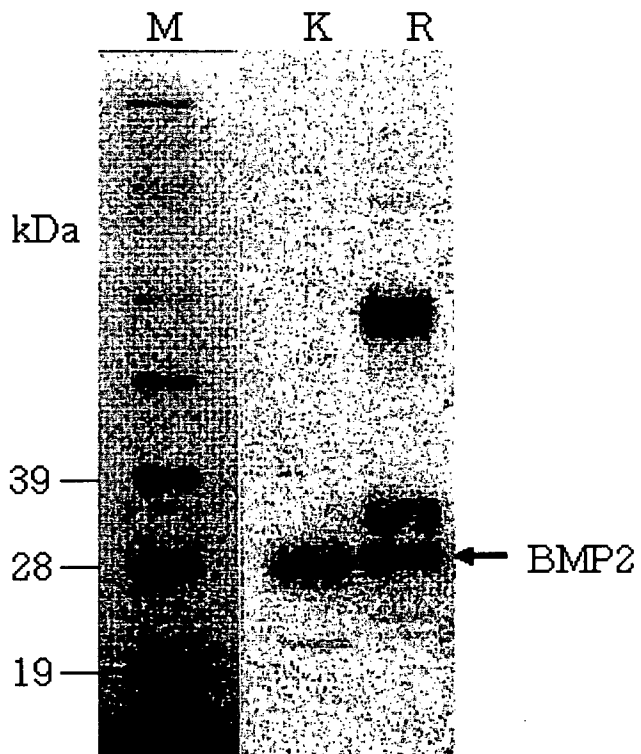
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2010/003021

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/36(2006.01)i, C07K 14/51(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 1/36; C07K 14/51; A61F 2/00; C07K 1/14; A61K 38/00; C07K 14/495; G01N 33/53; A61K 38/18

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: bone morphogenic protein, BMP, bone morphogenic protein, TGF, transforming growth factor, process, production

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5650494 A (CERLETTI et al.) 22 July 1997 See abstract, the claims, pages 5,8,10	1-17
A	US 6352972 B1 (NIMNI et al.) 05 March 2002 See abstract, the claims, pages 5,6	1-17
A	US 7354722 B1 (THOMSEN et al.) 08 April 2008 See abstract, the claims	1-17
A	US 7365051 B2 (PAULISTA et al.) 29 April 2008 See abstract, the claims	1-17

 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

"I" 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

18 JULY 2011 (18.07.2011)

Date of mailing of the international search report

19 JULY 2011 (19.07.2011)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2010/003021**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **18**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 18 which is one method among claims 1-3, relates to purified proteins. However, since claim 18 does not delimit the proteins by sequence or the like, it is unclear what subject matter claim 18 indicates. Thus, an international search has not been carried out.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2010/003021

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 5650494 A	22.07.1997	CA 2031430 C	27.05.2003
		EP 0433225 A1	19.06.1991
		EP 0433225 B1	07.04.1999
		EP 0891985 A1	20.01.1999
		JP 03-048061 B2	24.03.2000
		JP 03-191791 A	21.08.1991
		JP 3048061 B2	05.06.2000
		US 5650494 A	22.07.1997
		US 5922846 A	13.07.1999
		US 6352972 B1	05.03.2002
AU 1998-77147 B2	03.08.2000		
AU 1999-30658 A1	20.09.1999		
AU 6152996 A	24.12.1996		
CA 2284560 A1	17.12.1998		
CA 2284560 C	29.07.2003		
CA 2291635 A1	10.12.1998		
CA 2292891 A1	10.12.1998		
CN 1104322 C	02.04.2003		
CN 1259076 A	05.07.2000		
CN 1259076 C0	05.07.2000		
EP 0923330 A1	30.03.2005		
EP 0923330 A4	25.08.1999		
EP 0923330 B1	12.10.2005		
EP 0985036 A1	15.03.2000		
EP 0986700 A1	22.03.2000		
EP 0986700 A4	20.08.2003		
EP 0988140 A1	29.03.2000		
EP 1047442 A1	02.11.2000		
EP 1047442 A4	02.01.2002		
JP 2000-515450 A	21.11.2000		
JP 2000-517232 A	26.12.2000		
JP 2002-502424 A	22.01.2002		
JP 2002-527033 A	20.08.2002		
KR 10-2001-0013216 A	26.02.2001		
US 5800811 A	01.09.1998		
US 5840535 A	24.11.1998		
US 5893609 A	13.04.1999		
US 5919492 A	06.07.1999		
US 5924403 A	20.07.1999		
US 5931805 A	03.08.1999		
US 5998372 A	07.12.1999		
US 6099767 A	08.08.2000		
US 6164264 A	26.12.2000		
US 6228046 B1	08.05.2001		
WO 96-39430 A1	12.12.1996		
WO 98-55032 A1	10.12.1998		
WO 98-55137 A1	10.12.1998		
WO 98-55613 A1	10.12.1998		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2010/003021

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 98-55749 A1	10.12.1998
		WO 98-56564 A1	17.12.1998
		WO 98-58567 A1	30.12.1998
		WO 99-44512 A1	10.09.1999
US 7354722 B1	08.04.2008	AU 2000-56107 A1	02.01.2001
		AU 2000-56107 B2	21.07.2005
		CA 2376675 A1	21.12.2000
		CN 100379752 C0	09.04.2008
		CN 1409722 A0	09.04.2003
		EP 1192174 A2	03.04.2002
		JP 2003-502064 A	21.01.2003
		WO 00-77168 A2	21.12.2000
		WO 00-77168 A3	21.12.2000
		US 7365051 B2	29.04.2008
EP 0942758 A2	27.03.2002		
EP 0942758 B1	14.01.2004		
JP 03-807749 B2	26.05.2006		
JP 2001-505097 A	17.04.2001		
US 2005-0169965 A1	04.08.2005		
WO 98-21972 A2	28.05.1998		

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 1/36(2006.01)i, C07K 14/51(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 1/36; C07K 14/51; A61F 2/00; C07K 1/14; A61K 38/00; C07K 14/495; G01N 33/53; A61K 38/18 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: 골형성단백질, BMP, bone morphogenic protein, TGF, transforming growth factor, process, production		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 5650494 A (CERLETTI 외 4명) 1997.07.22 요약서, 청구항, 페이지 5,8,10 참조	1-17
A	US 6352972 B1 (NIMNI 외 4명) 2002.03.05 요약서, 청구항, 페이지 5,6 참조	1-17
A	US 7354722 B1 (THOMSEN 외 2명) 2008.04.08 요약서, 청구항 참조	1-17
A	US 7365051 B2 (PAULISTA 외 3명) 2008.04.29 요약서, 청구항 참조	1-17
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 윌리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2011년 07월 18일 (18.07.2011)	국제조사보고서 발송일 2011년 07월 19일 (19.07.2011)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 조정한 전화번호 82-42-481-5589 	

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. 청구항: 18
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제18항은 제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 방법으로 정제된 단백질을 내용으로 하고 있으나, 상기 단백질을 서열목록 등으로 한정하지 아니하여 지시하는 바가 불명확하여 선행기술조사를 수행할 수 없습니다.

3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

- 이의신청에 관한 기재
- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
 - 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
 - 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 5650494 A	1997.07.22	CA 2031430 C	2003.05.27
		EP 0433225 A1	1991.06.19
		EP 0433225 B1	1999.04.07
		EP 0891985 A1	1999.01.20
		JP 03-048061 B2	2000.03.24
		JP 03-191791 A	1991.08.21
		JP 3048061 B2	2000.06.05
		US 5650494 A	1997.07.22
		US 5922846 A	1999.07.13
		US 6352972 B1	2002.03.05
AU 1998-77147 B2	2000.08.03		
AU 1999-30658 A1	1999.09.20		
AU 6152996 A	1996.12.24		
CA 2284560 A1	1998.12.17		
CA 2284560 C	2003.07.29		
CA 2291635 A1	1998.12.10		
CA 2292891 A1	1998.12.10		
CN 1104322 C	2003.04.02		
CN 1259076 A	2000.07.05		
CN 1259076 C0	2000.07.05		
EP 0923330 A1	2005.03.30		
EP 0923330 A4	1999.08.25		
EP 0923330 B1	2005.10.12		
EP 0985036 A1	2000.03.15		
EP 0986700 A1	2000.03.22		
EP 0986700 A4	2003.08.20		
EP 0988140 A1	2000.03.29		
EP 1047442 A1	2000.11.02		
EP 1047442 A4	2002.01.02		
JP 2000-515450 A	2000.11.21		
JP 2000-517232 A	2000.12.26		
JP 2002-502424 A	2002.01.22		
JP 2002-527033 A	2002.08.20		
KR 10-2001-0013216 A	2001.02.26		
US 5800811 A	1998.09.01		
US 5840535 A	1998.11.24		
US 5893609 A	1999.04.13		
US 5919492 A	1999.07.06		
US 5924403 A	1999.07.20		
US 5931805 A	1999.08.03		
US 5998372 A	1999.12.07		
US 6099767 A	2000.08.08		
US 6164264 A	2000.12.26		
US 6228046 B1	2001.05.08		
WO 96-39430 A1	1996.12.12		
WO 98-55032 A1	1998.12.10		
WO 98-55137 A1	1998.12.10		
WO 98-55613 A1	1998.12.10		

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 98-55749 A1	1998. 12. 10
		WO 98-56564 A1	1998. 12. 17
		WO 98-58567 A1	1998. 12. 30
		WO 99-44512 A1	1999.09. 10
US 7354722 B1	2008.04.08	AU 2000-56107 A1	2001.01.02
		AU 2000-56107 B2	2005.07.21
		CA 2376675 A1	2000. 12. 21
		CN 100379752 C0	2008.04.09
		CN 1409722 A0	2003.04.09
		EP 1192174 A2	2002.04.03
		JP 2003-502064 A	2003.01.21
		WO 00-77168 A2	2000. 12. 21
		WO 00-77168 A3	2000. 12. 21
		US 7365051 B2	2008.04.29
EP 0942758 A2	2002.03.27		
EP 0942758 B1	2004.01.14		
JP 03-807749 B2	2006.05.26		
JP 2001-505097 A	2001.04.17		
US 2005-0169965 A1	2005.08.04		
WO 98-21972 A2	1998.05.28		