(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0079618
(43) 공개일자 2015년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/34 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
A61K 38/40 (2006.01) *A61K 38/46* (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01) *C07K 14/475* (2006.01)
C07K 14/79 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/34 (2013.01)
A61K 38/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7010221
(22) 출원일자(국제) 2013년10월08일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년04월21일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2013/001154
(87) 국제공개번호 WO 2014/056026
국제공개일자 2014년04월17일
(30) 우선권주장
2012904391 2012년10월08일 오스트레일리아(AU)
2013204850 2013년04월12일 오스트레일리아(AU)

(71) 출원인
머레이 걸번 코-어퍼러티브 컴퍼니 리미티드
오스트레일리아 3006 사우쓰뱅크 브이아이씨 사우쓰뱅크 불리바드 2 레벨 15 프레시워터 플레이스
(72) 발명자
브라운 앤드류
오스트레일리아 빅토리아 3030 포인트 쿡 드라이즈데일 크레슨트 58
(74) 대리인
리앤목특허법인

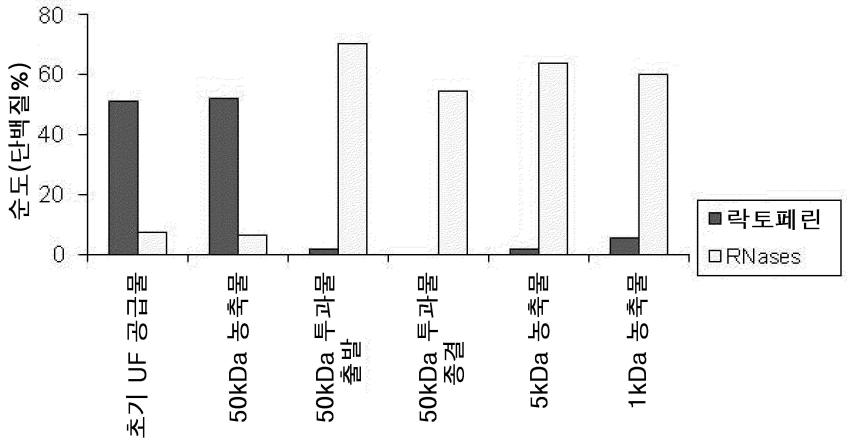
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **우유로부터 성장 인자를 정제하기 위한 개선된 방법 및 이의 제품**

(57) 요 약

본 발명은 우유 또는 락토페린을 여과에 적용시켜 이를 락토페린을 포함하는 농축물 분획과, 성장 인자 및/또는 RNAse를 포함하는 투과물 분획으로 분리함을 포함하여, 우유 또는 락토페린으로부터 RNAse 및 성장 인자를 정제하기 위한 공정을 제공하며, 여기서 여과 전 및/또는 여과 동안에 우유 또는 락토페린을 염 처리에 적용시킴으로써 성장 인자 및/또는 RNAse가 투과물내로 유동하도록 한다. 본 발명은 또한 본 발명의 공정으로부터 수득된 RNAse 및 성장 인자를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 38/40 (2013.01)
A61K 38/46 (2013.01)
C07K 1/303 (2013.01)
C07K 14/475 (2013.01)
C07K 14/79 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

우유 또는 락토페린으로부터 RNAse들 및 성장 인자들을 정제하기 위한 방법으로서, 상기 우유 또는 락토페린을 여과에 적용시켜 이를 락토페린을 포함하는 농축물 분획(retentate fraction)과, 성장 인자들 및/또는 RNAse들을 포함하는 투과물 분획(permeate fraction)으로 분리함을 포함하며, 여기서 여과 전 및/또는 여과 동안에 상기 우유 또는 락토페린을 염 처리에 적용시킴으로써 성장 인자들 및/또는 RNAse들을 상기 투과물 내로 유동하도록 하는, 방법.

청구항 2

우유 또는 락토페린으로부터 RNAse들 및 성장 인자들을 정제하기 위한 방법으로서, 상기 우유 또는 락토페린을 여과에 적용시켜 이를 락토페린을 포함하는 농축물 분획과, 성장 인자들 및/또는 RNAse들을 포함하는 투과물 분획으로 분리시킴을 포함하며, 여기서 여과 전 및/또는 여과 동안에 상기 우유 또는 락토페린을 RNAse들 또는 성장 인자들의 어떠한 덩어리도 분해 또는 붕해시킬 수 있는 염 처리에 적용시킴으로써 성장 인자들 및/또는 RNAse들이 상기 투과물 내로 유동하도록 하는, 방법.

청구항 3

우유 또는 락토페린으로부터 RNAse들 및 성장 인자들을 정제하기 위한 방법으로서, 상기 우유 또는 락토페린을 막 여과에 적용시켜 이를 락토페린을 포함하는 농축물 분획과, 성장 인자들 및/또는 RNAse들을 포함하는 투과물 분획으로 분리함을 포함하며, 여기서 여과 전 및/또는 여과 동안에 상기 우유 또는 락토페린을 어떠한 RNAse들 또는 성장 인자들도 상기 막으로부터 분리할 수 있는 염 처리에 적용시킴으로써 성장 인자들 및/또는 RNAse들이 상기 투과물 내로 유동하도록 하는, 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중의 어느 한 항의 방법으로부터 수득된 RNAse들 및 성장 인자들.

청구항 5

바이러스, 세균, 또는 진균 및 이들의 독소에 의해 유발된 질병의 치료를 위한 청구항 4의 RNAse들 및 성장 인자들의 용도로서, 사람 점막 표면의 감염을 유발하는 병원체를 표적화하고, 혈관형성을 촉진하며, 상승된 마이오스타틴에 의해 특징화되는 질환을 치료하고, 폴리스타틴과 안지오게닌 사이의 상호작용을 사용하여 조직내 기능을 개선시킬 수 있는 질환을 치료하며, 근육 성장을 촉진하고, 손상 또는 사용으로부터 근육의 회복을 개선하고, 근육 강도를 개선하며, 운동 내성을 개선하고, 근육의 비율을 증가하며, 지방을 감소하고, 개인의 지방 대 근육 비율을 감소하며, 신경학적 질병 또는 질환을 치료하고, 척추 손상들 또는 질병을 치료하며, 골 질병 또는 질환을 치료하고, 글루코즈 항상성을 포함하는 질병을 치료하며, 상처를 치유하고, 또는 신경 보호, 신경계 기능적 지지체를 제공하며, 대사 질병을 관리하고/하거나 개인의 골 밀도를 증가하고, 염증을 치료하며, 암을 치료하고, 암 악액질을 치료하며, 그리고 치주염을 치료하기 위하여, 그리고 성장 인자들 및 RNAse들의 모든 다른 용도에서 사용하기 위한, 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 우유로부터 목적한 단백질을 정제하기 위한 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 가축으로부터의 우유는 단백질의 공급원 및 식품과 약제 산업용의 다른 제품의 공급원으로서 오랜 세월동안 사

용되어 왔으며, 이들 제품을 분리하기 위한 다양한 기술이 알려져 있다. 우유는 물 속에 주로 지방, 락토즈 및 단백질로 구성된 콜로이드성 현탁액이다. 반추동물 및 실험 동물 중에서, 우유는 종류에 따라 리터당 평균 30 내지 140 그램, 또는 약 4 내지 17 중량%의 단백질을 함유한다. 다량의 이들 단백질은 미셀(micelle)로서 공지된 초분자 구조의 칼슘 및 인산염과 착화된 카제인이다. 유 단백질의 다른 주요 부류는 주로 베타-락토글로불린 및 알파-락트알부민으로 구성되지만, 또한 락토페린, 면역글로불린, 및 혈청 알부민을 포함하는 유장(whey) 단백질이다.

[0003] 유 단백질은 일반적으로 막 여과 기술뿐만 아니라 이온 교환 흡착 과정을 포함하는 공정의 조합으로 분리된다.

[0004] 락토페린은 타액, 담즙, 기관지 점액, 위장액, 경부-질 점액, 정액, 및 우유와 같은 생물학적 유액 속에서 천연적으로 발견되는 80kD 철-결합 당단백질이다. 락토페린의 가장 농축된 공급원은 포유동물 우유 및 초유이다. 소 탈지 우유 중의 락토페린의 농도는 일반적으로 작은데, 탈지 우유의 다른 전-처리 이력 및 저온살균(pasteurisation)을 포함하는 요인에 따라 전형적으로 80 내지 200mg/ml이다. 우유 속에 존재하는 카제인의 침전 후 소 유장 속의 락토페린의 농도는 유장의 물리적 및 화학적 전-처리에 따라 전형적으로 10 내지 100mg/ml이다.

[0005] 성장 인자는 우유 속에 다양한 정도로, 특히 락토페린을 함유하는 분획 속에 존재한다. 소 우유는 RNAse 5 및, IGF-1, IGF-2, PDGF, FGF-염기성, EGF, FGF-산성 및 VEGF를 포함하는 성장 인자를 함유한다. 이러한 성장 인자 각각은, 분자량이 30kDa 이하(RNAse 5는 분자량이 17kD이다)이다. 성장 인자 및 RNAse가 농축된 우유 분획은 당해 분야에서 이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 제조한다(예를 들면, 국제 특허출원 제PCT/AU91/00303호 및 제PCT/AU2007/001719호에 기술된 바와 같음).

[0006] RNAse 5 및 성장 인자가 농축된 우유 분획은 근육 성장의 촉진, 신경보호, 골 생성의 촉진 및 신경학적 질병 또는 질환, 척추 손상 또는 질병, 골 질병 또는 질환, 글루코즈 항상성을 포함하는 질병의 치료, 상처 치유, 또는 신경계 기능성 지지체의 제공 및 대사 질병의 조절을 포함하는 다수의 가정된 생물학적 역할을 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 바람직한 구현예의 목적은 우유, 특히 소 우유로부터 성장 인자 및 RNAse를 정제하여 순도를 개선시키는 개선된 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 명세서에서 인용된 어떠한 특허 또는 특허출원을 포함하는 모든 참고 문헌은 본원에 참조로 포함되어 있다. 다수의 선행 기술의 공보가 본원에 언급되어 있지만, 이러한 참조 문헌은, 이들 서류 어느 것도 당해 기술분야에서 일반적인 상식의 일부를 형성하는 것을 용인하지 않는다.

과제의 해결 수단

[0009] **요지**

[0010] 제1의 측면은 우유 또는 락토페린을 여과시켜 이를 락토페린을 포함하는 농축물 분획(retentate fraction) 및 성장 인자 및/또는 RNAse를 포함하는 투과물 분획(permeate fraction)으로 분리시킴을 포함하여, 우유 또는 락토레린으로부터 RNAse 및 성장 인자를 정제하는 공정을 제공하며, 여기서 여과 전 및/또는 여과 동안 우유를 염처리함으로써 성장 인자 및/또는 RNAse가 투과물로 유동하도록 한다.

[0011] 락토페린을 우유로부터 30 kD 또는 50 kD 컷 오프(cut off)의 막 여과를 사용하여 정제하는 경우, 본 발명자들은, 락토페린 농축물이 성장 인자와 RNAse로 오염된 것을 발견하였다. 이들 성장 인자 및 RNAse는, 분자량이 30kD 미만이므로, 이들은 막을 통과하여 투과물로 이동하며 농축물 락토페린 분획 속에 불순물로서 존재하지 않는다. 따라서, 농축물 속에서 성장 인자 및 RNAse의 발견은 놀라운 것이었다. 본 발명자들은, 여과 전에 우유에 다량의 염을 첨가하는 것이 농축물로부터 성장 인자 및 RNAse를 제거하고 이들을 투과물 속에 농축함을 발견하였다.

[0012] 이론에 얽매일 필요없이, 본 발명자들은, 정상 조건하에서, 우유 속의 RNAse 및 성장 인자가 응집하거나 그렇지

않으면 이들 개개의 분자량보다 더 큰 덩어리를 형성함을 제안한다. 염 처리는, RNAse 및 성장 인자가 분해되거나 분리되도록 한다는 것이 제안되어 있다.

[0013] 대안적인 형태에서 제1 측면의 공정은 우유 또는 락토페린을 여과시켜 이를 락토페린을 포함하는 농축물 분획 및 성장 인자 및/또는 RNAse를 포함하는 투과물 분획으로 분리시킴을 포함하는, 우유 또는 락토페린으로부터 RNAse 및 성장 인자를 정제하는 공정을 제공하며, 여기서 여과 전 및/또는 여과 동안 우유 또는 락토페린은 어떠한 덩어리의 RNAse 또는 성장 인자도 분해시키거나 분리시킬 수 있는 염 처리에 적용시켜 성장 인자 및/또는 RNAse가 투과물로 흐르도록 한다.

[0014] 이론에 얽매일 필요없이 발명자들은, 그렇지 않으면 저 이온 강도의 조건 하에서, 단백질 응집물이 막과 연합하게 됨으로써 막의 공극 크기보다 명확하게 더 작은 층을 형성함으로써, 우유 속의 RNAse 및 성장 인자가 막을 통과하는 것을 방지함을 제안한다. 염 처리는 단백질 층의 형성을 방지하거나 단백질 층을 제거하여, 어떠한 RNAse 및 성장 인자도 막을 통해 투과물 내로 통과하도록 함이 제안된다.

[0015] 따라서, 대안적인 형태에서 제1 측면의 공정은 우유 또는 락토페린을 막 여과에 적용시켜 이를 락토페린을 포함하는 농축물 분획과 성장 인자 및/또는 RNAse를 포함하는 투과물 분획으로 분리함을 포함하여, 우유 또는 락토페린으로부터 RNAse 및 성장 인자를 정제하는 공정을 제공하며, 여기서 여과 전 및/또는 여과 동안 우유 또는 락토페린을 RNAse 또는 성장 인자의 어떠한 덩어리도 분해하거나 분리할 수 있는 염 처리에 적용시킴으로써 성장 인자 및/또는 RNAse가 투과물 내로 유동하도록 한다.

[0016] 제2의 측면은 제1의 측면의 공정으로부터 수득된 RNAse 및 성장 인자를 제공한다.

[0017] 하나의 구현예에서, 제2 측면의 RNAse 및 성장 인자는 추가의 정제에 적용시킨다.

[0018] 제3의 측면은 바이러스, 세균, 또는 진균 및 이들의 독소에 의해 유발된 질병의 치료를 위한 청구항 4의 RNAse들 및 성장 인자들의 용도로서, 사람 점막 표면의 감염을 유발하는 병원체를 표적화하고, 혈관형성을 촉진하며, 상승된 마이오스타틴에 의해 특징화되는 질환을 치료하고, 폴리스타틴과 안지오게닌 사이의 상호작용을 사용하여 조직내 기능을 개선시킬 수 있는 질환을 치료하며, 근육 성장을 촉진하고, 손상 또는 사용으로부터 근육의 회복을 개선하고, 근육 강도를 개선하며, 운동 내성을 개선하고, 근육의 비율을 증가하며, 지방을 감소하고, 개인의 지방 대 근육 비율을 감소하며, 신경학적 질병 또는 질환을 치료하고, 척추 손상들 또는 질병을 치료하며, 골 질병 또는 질환을 치료하고, 글루코즈 항상성을 포함하는 질병을 치료하며, 상처를 치유하고, 또는 신경 보호, 신경계 기능적 지지체를 제공하며, 대사 질병을 관리하고/하거나 개인의 골 밀도를 증가하고, 염증을 치료하며, 암을 치료하고, 암 악액질을 치료하며, 그리고 치주염을 치료하기 위하여, 그리고 성장 인자들 및 RNAse들의 모든 다른 용도에서 사용하기 위한, 용도를 제공한다.

[0019] 대안적인 형태에서, 제3 측면은 제3 측면에서 제안된 바와 같이 사용하거나 제3 측면에서 제안된 바와 같이 사용하기 위한 의약의 제조시 사용하기 위한 제1 측면의 공정으로부터 수득된 RNAse 및 성장 인자를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은, 염화나트륨(100mS)의 존재하에서, 50kDa 막을 통한 양이온성 우유 단백질의 혼합물의 한외여과가, RNAse 및 다른 성장 인자의 투과를 선택적으로 허용함을 나타낸다.

도 2는, 염화나트륨(20 또는 40mS)의 존재하에서, 50kDa 막을 통한 양이온성 우유 단백질의 혼합물의 한외여과가, 염화나트륨의 부재(0mS) 하에서 투과하지 않는 RNAse 및 다른 성장 인자의 투과를 선택적으로 허용함을 나타낸다.

도 3은, RNAse와 같은, 성장 인자의 증가된 투과를 나타낸다. 성장 인자 투과는 0mS 내지 20mS에서 신속하게 증가한다.

상세한 설명

본 발명은 우유 또는 락토페린으로부터 RNAse 및 성장 인자를 정제하거나 이러한 생성물을 위해 우유 또는 락토페린을 농축시키는 개선된 방법을 제공한다.

본 발명자는 농축된 RNAse 및 성장 인자 분획을 효율적인 방식으로 제조하는 것을 허용하는 공정에 대한 필요성을 인식해 왔다.

RNAse 또는 성장 인자와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "정제된" 또는 "농축된"은, 투과물 속에 존재하는 RNAse/성장 인자:총 단백질 비가 여과 단계 전에 우유 또는 락토페린 속에 존재하는 비에 비해 증가함을 의미한다. 농축되거나 정제된 것으로 고려될 분획의 경우, 이는, RNAse/성장 인자 함량이 여과 단계 전에 우유 또는 락토페린 속에서 보다 더 높은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 28, 또는 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 98, 또는 99% w/w일 수 있다.

제1 측면의 공정은 투과물 속에서 RNAse 및 성장 인자의 순도를 증가시키는 것을 추구한다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "분획"은 우유의 부분적으로 정제된 부위, 특히 락토페린을 포함하는 분획를 말한다.

용어 "효율적인"의 사용은, 단백질을 농축시키기 위해 현재 사용되는 방법과 비교하는 경우 값싸고 신속한 공정을 의미하기 위해 사용된다.

본원의 우유에 대한 참조는 전유(whole milk), 탈유, 버터유(butter milk), 유장(예를 들면, 산 또는 치즈/레넷 유장) 또는 유장 유도체(예를 들면, 유장 단백질 농축액 또는 유장 단백질 분리 유동 통과액), 및 초유를 포함한다. 이는 또한 우유 분획, 예를 들면, 양이온 교환 크로마토그래피와 같은 정제 단계에 적용된 분획을 포함한다. 이러한 분획은 우유 기본 단백질 및 락토페린을 포함하는 분획을 포함한다.

우유가 어떠한 수유 동물, 예를 들면, 소, 양, 버팔로, 염소, 및 사슴과 같은 반추동물, 사람과 같은 영장류를 포함하는 비-반추동물, 및 돼지와 같은 단위 동물로부터 수득될 수 있음은 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 소 전유로부터 기원하는 탈지유가 본 발명의 공정에 사용되는 것이 바람직하다.

제1 측면의 공정에 사용된 여과는 막 여과를 포함한다. 하나의 구현예에서, 막은, 25kD, 30kD, 35kD, 40kD, 45kD, 50kD, 55kD, 60kD, 65kD, 70kD 또는 75kD 크기 컷오프(size cut off)를 갖는다. 당해 컷 오프는 바람직하게는 30kD 이상이거나 50kD 이하이다.

여과는 한외여과 또는 디아필트레이션(diafiltration) 또는 둘 다를 포함할 수 있다.

제1 측면의 공정에 사용된 염 처리는 충분한 염을 가하여 우유 또는 락토페린의 이온 강도가 적어도 0.2M(1.1%) NaCl 또는 대등하게 되도록 함을 포함한다. 하나의 구현예에서 이온 강도는 투과물 중에서 RNAse 및/또는 성장 인자의 농도에 있어서 요구되는 증가를 수득하는데 필요한 기간 동안 적어도 당해 수준에서 유지된다. 이러한 기간은 공급물 및 요구되는 농도 또는 순도에서의 증가에 따라서 적어도 10분, 15분, 20분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간 이상일 수 있다.

대안으로서 제1 측면의 방법에서 사용된 염 처리는 충분한 염을 가하여 우유또는 락토페린의 전도도가 적어도 20mS가 되도록 하는 것을 포함한다. 하나의 구현예에서, 전도도는 전체 여과 단계 동안에 적어도 당해 수준에서 유지된다.

일반적으로, 우유 또는 락토페린은 실질적으로 0.2M NaCl 이하 또는 20mS 미만의 전도도를 가질 것이므로 염 처리는 우유 또는 락토페린의 이온 강도 또는 전도도를 바람직한 수준으로 증가시키기 위한 염의 첨가를 포함한다. 그러나, 일부 상황에서, 예를 들면, 우유가 양이온 교환에 적용되는 분획인 경우, 우유는 적어도 0.2M NaCl 또는 대등일 수 있는 이온 강도를 가질 것이거나 전도도는 20mS 이상일 것이다. 일반적으로, 양이온 교환으로부터의 분획을 처리에 적용시켜 염을 제거한다(예를 들면, 물을 사용한 디아필트레이션). 그러나, 제1 측면의 공정에 따라서, 염 처리는 우유의 이온 강도가 여과 단계 동안에 적어도 0.2M(1.1%) NaCl 또는 대등으로 유지되거나 우유의 전도도가 여과 단계 동안에 적어도 20mS로 유지되도록 한다.

본원에 사용된 것으로서, "전도도"는 전류를 전도하는 물질의 능력이다. 전도도는 일반적으로 전도계, 예를 들면, Hach Sension 5를 사용하여 측정한다. 당해 분야의 숙련가는 전도도를 측정하기 위한 적합한 대안적인 수단을 인식할 수 있을 것이다. 나트륨 이온 농도와 전도도 사이에는 일반적으로 선형 관계가 존재한다.

염 처리에 사용된 염은 제한되지 않으며 NaCl에 대한 대안은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있을 수 있다. 예를 들면, 염화물, 시트르산염, 인산염, 아세트산염, 황산염, 중탄산염, 수산화물, 이미다졸, 또는 말레이트의 가용성 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그세슘 또는 리튬 염과 같은 어떠한 가용성의 무독성 완충액도 사용할 수 있다. 트리즈마(Trizma), HEPES 또는 트리신과 같은 합성의 양쪽성 이온 완충액을 또한 사용할 수 있다.

락토페린으로부터 RNAse 및 성장 인자가 분리되도록 하기 위하여, 우유 또는 락토페린의 이온 강도는 여과 단계 전에 적어도 0.2M(1.1%) NaCl 이상이 되어야 한다. 하나의 구현예에서 우유의 이온 강도는 1.1% 염, 1.5% 염,

2% 염, 2.5% 염, 3% 염, 3.5% 염, 4% 염, 4.5% 염, 5% 염, 5.5% 염, 6% 염 이상을 가하여 증가시킨다. 다른 구현예에서, 우유 또는 락토페린의 이온 강도는 0.2M, 0.22M, 0.24M, 0.26M, 0.28M, 0.30M, 0.32M, 0.34M, 0.36M, 0.38M, 0.40M, 0.42M, 0.44M, 0.46M, 0.48M, 0.50M, 0.6M, 0.7M, 0.8M, 0.9M, 1.0M NaCl 이상까지 증가된다. 다른 구현예에서, 전도도는 20mS, 30mS, 40mS, 50mS, 60mS, 70mS. 80mS, 90mS, 100mS, 110mS, 120mS 이상이다.

바람직한 구현예에서 염 처리는 여과 단계 전에 우유 또는 락토페린에 0.2 내지 0.5M NaCl 또는 KCl의 첨가를 포함한다.

하나의 구현예에서, 염 처리는 4 내지 10도에서 수행한다.

하나의 구현예에서, 염 처리는 10 내지 30도에서 수행한다.

하나의 구현예에서, 염 처리는 30 내지 50도에서 수행한다.

하나의 구현예에서, 염 처리는 50 내지 70도에서 수행한다.

하나의 구현예에서, 염 처리는 20도 미만에서 수행한다.

다른 구현예에서 염 처리는, 50도 초과의 온도에서 대장균 형성이 감소되므로 50도 이상에서 수행한다. 그러나, 락토페린은 대략 70도에서 변성하므로 60도 이상의 염 처리를 수행하는 것은 수율의 감소를 초래할 수 있다.

하나의 구현예에서, 여과 단계는 4 내지 10도에서 수행한다.

하나의 구현예에서, 여과 단계는 10 내지 30도에서 수행한다.

하나의 구현예에서, 여과 단계는 30 내지 50도에서 수행한다.

하나의 구현예에서, 여과 단계는 50 내지 70도에서 수행한다.

하나의 구현예에서, 염 처리는 대기압에서 수행한다.

하나의 구현예에서, 여과 단계는, 비록 0.0 내지 1.0 바아의 압력이 또한 허용가능하게 작동하지만 보다 낮은 막관통 유량을 가질 수 있으나, 막당 2.5 바아 미만, 보다 바람직하게는 2.0 바아 미만, 보다 더 바람직하게는 1.5 바아 미만에, 그러나 이상적으로는 1.0 내지 1.4 바아 미만의 막관통압(transmembrane pressure)에서 수행한다.

"치료하는" 또는 "치료"는 치료학적 치료 및 예방학적 또는 방지적인 척도 둘 다를 말하며, 여기서 당해 목표는 상태, 질병 또는 질환을 방지하거나, 완화시키거나 경감시키거나 지연시키거나(저하시키거나) 개선시키는 것이다.

본원에 사용된 바와 같은 "치료하는" 또는 "치료"는 척추동물, 포유동물, 특히 사람에서 상태의 어떠한 치료, 또는 예방을 포함한다.

"방지하는", "방지", "방지되는" 또는 "예방학적"은 비정상 또는 증상을 포함하는 상태, 질병, 질환, 또는 표현형이 발생하는 것을 유지시키거나, 이의 발생을 차단하거나, 이를 방해하거나 보호하는 것을 말한다. 방지가 요구되는 피검자는 당해 상태를 발달시키는 경향이 있을 수 있다.

용어 "완화시키다" 또는 "완화"는 비정상성 또는 증상을 포함하는 상태, 질병, 질환, 또는 표현형의 감소, 경감 또는 완화를 말한다. 치료가 요구되는 피검자는 이미 상태를 가지고 있을 수 있거나, 상태를 가지는 경향이 있을 수 있거나, 상태가 방지되어야 할 대상일 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "유지하다"는 상태를 치료 전 수준으로 지속시키는 것을 말한다.

제2 측면의 RNAse 또는 성장 인자는 약제학적, 수의학적 또는 영양학적 조성물로서 또는 식품으로서 제공될 수 있다.

약제학적 조성물은 사람에게 투여하기에 적합한 것이다. 수의학적 조성물은 동물에게 투여하기에 적합한 것이다. 일반적으로 이러한 조성물은 정제된 RNAse 또는 성장 인자를 함유할 것이거나 조성물의 매우 적은 모든 성분도 입증할 수 있을 것이다.

약제학적 또는 수의학적 조성물은 하나 이상의 담체 및 임의로 다른 치료제를 포함할 수 있다. 각각의 담체,

희석제, 보조제 및/또는 부형제도 "허용가능"할 수 있다.

"허용가능한"은 생물학적이거나 그렇지 않으면 부적당한 것인 아닌 물질을 의미하는데, 즉, 당해 물질은 어떠한 바람직하지 않은 생물학적 효과를 유발하지 않거나 이것이 함유된 약제학적 또는 수의학적 조성물의 다른 성분들 중 어느 것과도 유해한 방식으로 상호작용하지 않고 선택된 활성제와 함께 개인에게 투여될 수 있음을 의미한다. 유사하게, 본원에 제공된 바와 같은 신규 화합물의 "허용가능한" 염 또는 에스테르는 생물학적이거나 그렇지 않으면 부적당한 것인 아닌 염 또는 에스테르이다.

본원에 사용된 것으로서, "담체"는 제제를 피검자에게 전달하기 위한 허용가능한 용매, 현탁화제 또는 비히클이다. 담체는 액체 또는 고체일 수 있으며 계획된 투여 방식을 사용하여 선택된다. 각각의 담체는 생물학적이거나 그렇지 않으면 부적당한 것인 아닌 의미에서 "허용가능"하여야만 하는데, 즉, 담체는 어떠한 또는 실질적인 부작용을 유발하지 않고 제제와 함께 피검자에게 투여될 수 있다.

약제학적 또는 수의학적 조성물은 통상의 무-독성의 허용가능한 담체, 보조제 및 비히클을 함유하는 제형 속에서 경구적으로, 국소적으로, 또는 비경구적으로 투여될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 비경구는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 결막하, 공동내(intracavity), 경피 및 피하 주사, 폐 또는 비강에 투여하거나 예를 들면, 삼투압 펌프에 의해, 주입으로 투여하기 위한 에어로졸을 포함한다.

약제학적 또는 수의학적 조성물은 정제, 수성 또는 유성 현탁액, 로젠지(lozenge), 트로키(troche), 분말, 과립, 유액, 캅셀(capsule), 시럽(syrup) 또는 엘릭서르(elixir)로서 경구 투여될 수 있다. 경구용 조성물은 약제학적으로 우아하고 삼키기 쉬운 제제를 생산하기 위하여 감미제, 풍미제, 착색제 및 보존제의 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 제제를 함유할 수 있다. 적합한 감미제는 슈크로즈, 락토즈, 글루코즈, 아스파르탐 또는 사카린을 포함한다. 적합한 붕해제는 옥수수 전분, 메틸셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 크산탄 검, 벤토나이트, 알긴산 또는 아가를 포함한다. 적합한 풍미제는 페퍼민트 오일, 노루발풀(wintergreen), 체리, 오렌지 또는 라스베리 풍미를 포함한다. 적합한 방부제는 벤조산나트륨, 비타민 E, 알파토코페롤, 아스코르브산, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤 또는 아황산나트륨을 포함한다. 적합한 윤활제는 스테아르산마그네슘, 스테아르산, 올레산나트륨, 염화나트륨 또는 활석을 포함한다. 적합한 시간 지연제는 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트를 포함한다. 정제는 정제의 제조에 적합한 무독성의 약제학적으로 허용되는 부형제와 혼합된 제제를 함유할 수 있다.

이들 부형제는 예를 들면, (1) 탄산칼슘, 락토즈, 인산칼슘 또는 인산나트륨과 같은 불활성 희석제; (2) 옥수수 전분 또는 알긴산과 같은 과립화제 및 붕해제; (3) 전분, 젤라틴 또는 아카시아와 같은 결합제; 및 (4) 스테아르산마그네슘, 스테아르산 또는 활석과 같은 윤활제일 수 있다. 이들 정제는 피복시키지 않거나 공지된 기술로 피복시켜 위장관 속에서 붕해 및 흡수를 지연시킴으로써 보다 긴 기간에 걸쳐 지속적인 작용을 제공할 수 있다. 예를 들면, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트와 같은 시간 지연 물질을 사용할 수 있다.

비경구 투여용 제제는 멸균 수성 또는 비-수성 용액, 현탁액, 및 유액을 포함한다. 비-수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 야채 오일, 및 에틸 올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르이다. 수성 담체는 물, 알코올성/수성 용액, 염수 및 완충된 매질을 포함하는, 유액 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 덱스트로즈, 덱스트로즈 및 염화나트륨, 락테이트화된 링거 정맥내 비히클(lactated Ringer's intravenous vehicle)은 유액 및 영양 보충물, 전해질 보충제(예를 들면, 링거 덱스트로즈를 기반으로 하는 것들) 등을 포함한다. 예를 들면, 항-미생물제, 항-산화제, 킬레이트제, 성장 인자 및 불활성 가스 등과 같은, 방부제 및 다른 첨가제가 또한 존재할 수 있다.

약제학적 또는 수의학적 조성물은 또한 보충적, 첨가적, 또는 향상된 치료학적 작용을 제공하는 다른 활성 화합물을 함유할 수 있다. 약제학적 또는 수의학적 조성물은 또한 투여용 지시사항과 함께 용기, 팩(pack), 또는 디스펜서 속에 포함될 수 있다.

약제학적 또는 수의학적 조성물은 1회 투여량으로, 또는 1일 1회, 주당 1회, 및 1개월당 1회와 같은 간격으로 투여될 수 있다.

용량 스케쥴은 활성 제제의 반감기, 또는 피검자 상태의 중증도에 따라 조절될 수 있다.

일반적으로, 약제학적 또는 수의학적 조성물은 볼루스 용량으로 투여되어, 투여 후 최대 길이의 시간 동안 활성

제의 순환 수준을 최대화한다. 연속 주입을 또한 볼루스 용량 후 사용할 수 있다.

제2 측면의 RNAse 또는 성장 인자는 영양 조성물 또는 식품 속에 제공될 수 있다.

본원에 사용된 것으로서 용어 "기능성 식품(nutraceutical)"은 식품으로부터, 이 경우에는 유제품으로부터 분리되거나 정제된 식용가능한 제품을 말하며, 이는 생리학적 이점을 가지거나 경구 투여되는 경우 급성 또는 만성 질병 또는 손상의 보호 또는 약화를 제공함이 입증되어 있다. 따라서, 기능성 식품은 단독으로 또는 식용가능한 식품 또는 음료와 혼합되어 식이 제제 또는 보충물의 형태로 제공될 수 있다.

기능성 식품 조성물은 가용성 분말, 액체 또는 즉석 음료 제형의 형태일 수 있다. 그렇지 않으면, 기능성 식품 조성물은 식품과 같은 고체 형; 예를 들면, 즉석 섭취 바아(ready-to eat bar) 또는 아침 시리얼의 형태일 수 있다. 각종 풍미제, 섬유, 감미제, 및 다른 첨가제가 또한 존재할 수 있다.

기능성 식품은 바람직하게는 허용가능한 감각적 특성(예를 들면, 허용가능한 냄새, 맛 및 식미성)을 가질 수 있으며, 비타민 A, B1, B2, B3, B5, B6, B11, B12, 바이오틴, C, D, E, H 및 K 및 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 아연 및 철 중의 적어도 하나로부터 선택된 비타민 및/또는 광물을 추가로 포함할 수 있다.

기능성 식품 조성물은 통상적으로 생산될 수 있으며; 예를 들면, 당해 조성물은 단백질 및 다른 첨가제를 함께 배합함으로써 제조할 수 있다. 사용되는 경우, 유화제가 배합물 속에 포함될 수 있다. 추가의 비타민 및 광물을 이 시점에 가할 수 있으나 일반적으로 후에 첨가하여 열적 분해를 피한다.

분말 기능성 식품 조성물을 생산하는 것이 바람직한 경우, 단백질을 분말 형태의 추가의 성분과 혼합할 수 있다. 분말은, 수분 함량이 약 5 중량% 미만이어야 한다. 물, 바람직하게는 삼투압을 역전시키기 위해 적용된 물을 이후에 혼합하여 액체 혼합물을 형성시킬 수 있다.

기능성 식품 조성물이 즉석 소비 액체형으로 제공되어야 하는 경우, 이를 가열하여 세균의 양(bacterial load)을 감소시킬 수 있다. 액체 기능성 식품 조성물을 생산하는 것이 바람직한 경우, 액체 혼합물은 바람직하게는 적합한 용기 속에 무균적으로 충전된다. 용기의 무균적 충전은 당해 분야에서 일반적으로 이용가능한 기술을 사용하여 수행할 수 있다. 이러한 특성의 무균성 충전을 수행하기에 적합한 장치는 시판되고 있다.

바람직하게는 기능성 식품 조성물은 또한 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 함유한다. 기능성 식품 조성물은 중성의 완충 염수, 인산염 완충된 염수 등과 같은 완충제; 글루코즈, 만노즈, 슈크로즈 또는 덱스트란과 같은 탄수화물; 만니톨; 단백질; 폴리펩타이드 또는 글리신과 같은 아미노산; 항산화제; EDTA와 같은 킬레이트제; 보조제 및 방부제를 포함할 수 있다.

기능성 식품은 유아용 제형, 특히, 유아에게 투여하기 위한 인체 적응된 우유 제형일 수 있다.

식품으로서 제공되는 경우 제2 측면의 RNAse 또는 성장 인자는 식품 보충제, 기능성 식품 제형, 운동 영양 보충물 또는 유아 제형의 형태를 취할 수 있다. 하나의 구현예에서, 식품은 동물 사료이다.

본 명세서 전반에 걸쳐서, 내용이 달리 요구하지 않는 한, 어휘 "복수형으로 포함하다(comprise)" 또는 "단수형으로 포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"의 변형은 기술된 성분 또는 정수 또는 성분들 또는 정수들의 그룹을 포함할 뿐 아니라 어떠한 다른 성분 또는 정수 또는 성분들 또는 정수들의 그룹도 배제하지 않는 것을 내포하는 것으로 이해될 것이다.

본 명세서내에서 사용된 바와 같은, 단수형의 '하나', '그의, 및 '이의'("a", "an" 및 "the")는, 내용이 달리 명확하게 기술하지 않는 한, 복수 측면을 포함함에 또한 주목하여야만 한다.

본 발명은 명확성 및 이해의 목적으로 일부 상세히 기술되어 왔지만, 본원에 기술된 구현예 및 방법에 대한 각종 변형 및 변경이 본 명세서에 개재된 본 발명의 개념의 영역으로부터 벗어남이 없이 이루어질 수 있음이 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] **실시예:**

[0022] 본 발명을 이제 다음의 실시예를 참조로 상세히 설명한다. 실시예는 단지 설명할 목적으로 제공되며, 달리 명시하지 않는 한 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 본 발명은 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 어떠한 그리고 모든 변화를 포함한다.

[0023] **실시예 1:** *성장 인자를 분리하기 위한 양이온성 우유 단백질의 혼합물의 한외여과*

[0024] 락토페린, 락토퍼옥시다제, RNAse, 면역글로불린 및 성장 인자를 포함하는 양이온성 우유 단백질의 혼합물을 함유하는 우유 분획을 6 인치의, 50kDa 막을 지닌 한외여과에 적용시켰다. 한외여과 플랜트를 안정화시킴으로써 기본선 압력이 3.2 내지 3.4 바아(Bar)가 되도록 하였고, 관통막 압력이 1.2 내지 1.4 바아가 되도록 하였다. 공급물은 10mg/mL 단백질, 100mS와 대등한 염화나트륨 및 물을 함유하였다. 농축의 출발 및 말기에 공급물, 50kDa 농축물, 50kDa 투과물을 시료채취하였다. 50kDa 투과물을 혼주(pooling)시키고 농축시키며 5kDa 한외여과 막(제조원: Sartorius Vivacell) 또는 1kDa 나노여과 막(2.5" Koch 막)으로 탈염시켰다. 1kDa 농축물을 RNAse(도 1) 및 IGF-1, TGF-β2 및 기타를 포함하는 성장 인자 속에 농축시킨다. 순도를 양이온 교환 HPLC로 평가하였다.

[0025] **실시예 2**: *성장 인자를 분리하기 위한 양이온성 우유 단백질의 혼합물의 한외여과*

[0026] 락토페린, 락토퍼옥시다제, RNAse, 면역글로불린 및 성장 인자를 포함하는 양이온성 우유 단백질의 혼합물을 함유하는 우유 분획을 6 인치의, 50kDa 막을 사용하여 한외여과에 적용시켰다. 한외여과 플랜트를 안정화시켜 기본선 압력이 3.2 내지 3.4 바아가 되도록 하였고 투과막 압력이 1.2 내지 1.4 바아가 되도록 하였다. 공급물은 10mg/mL 단백질, 100mS과 대등한 염화나트륨 및 물을 함유하였다. 한외여과 공정을 0, 20 및 40mS에서 시험하였다. 투과물을 수집하고 양이온 교환 HPLC로 분석하였다. 20mS 이상의 전도도에서, 성장 인자(단백질 예로서 사용된 RNAse)는 막을 통과하였지만, 큰 분자량 단백질(단백질 예로서 사용된 락토퍼옥시다제)는 통과하지 않았다(도 2). IGF-1, IGF-2, PDGF, FGF-염기성, EGF, FGF-산성, VEGF를 포함하는(당해 목록에 한정되지는 않지만), 다른 성장 인자도 또한 락토페린 및 락토퍼옥시다제와 같은 고 분자량 단백질에 대해 농축될 수 있음이 예측될 수 있을 것이다.

[0027] **실시예 3:** *소 분자를 제거하고 락토페린 순도를 증가시키기 위한 락토페린의 한외여과*

[0028] 한외여과 플랜트에 단일의 6 인치의 50kDa 막(제조원: Synder)을 장착한 후 안정화시켜 기준 압력이 3.2 내지 3.4 바아 및 투과막 압력이 1.2 내지 1.4 바아가 되도록 하였다. 락토페린 용액(2 mg/mL)을 2L의 6개 로트(lot)로 나누었다. 전도도(0, 20, 40 또는 60mS)를 제외하고는, 동일한 6회의 실험에서, 2L의 락토페린 용액을 UF 공급물 탱크에 가하고, 물로 170L로 채우고 염화나트륨 용액을 가하여 지정된 전도도로 조절하였다. 농축물을 공급물 탱크로 재순환시키고 투과물을 수집하였다. 제거된 투과물을 전도도가 동일한 디아필트레이션 용액으로 교체하였다. 순도를 양이온 교환 HPLC로 평가하였다.

[0029] 락토페린 순도는 90.9%(0mS)로부터 93.5%(60mS)로 증가하였으며, 이는 순도에 있어서 2.5% 증가를 나타낸다. 락토페린 순도에 있어서의 증가는 성장 인자의 선택적인 제거(예로서 사용된 RNAse, 도 3)에 의해 달성되었다.

[0030] **실시예 4**: 한외여과 막

[0031] MWCO의 타당성:

[0032] -30kDa 막은 수거된 락토페린(막을 통과한 단백질 전달로 0.6%의 단백질이 존재한다)을 성공적으로 보유하며, 이는, 주요 오염물질, 특히 RNase가 막을 통과하도록 함으로써 순도를 증가시킨다.

[0033] - 염화나트륨(58Da)은 30kDa 막에 의해 보유되지 않는 반면, 락토페린(80kDa)은 보유되므로 이러한 이유로 저농도(0.1% 단백질)에서 컬럼으로부터 용출되는 락토페린은 염 농도에 있어서의 증가 또는 단백질의 손실과 일치하지 않으면서, 3% 단백질로 농축될 수 있다.

[0034] *UF5*

[0035] 유형: 나선형으로 권취된 폴리에테르 설폰(PES) MWCO: 5 kDa

[0036] 상표명: Synder 모델: MT2B-6338

[0037] UF5로서 공지된 한외여과 플랜트를 사용하여:

[0038] 1. 양이온 교환 컬럼으로부터 용출된 비-락토페린 단백질을 농축시키고,

[0039] 2. 크로마토그래피 공정에서 재사용하기 위해 2.5% 염을 2.5% 염 탱크로 재순환시켰다.

[0040] 광범위한 락토페린 제조 공정내에서 공정의 타당성:

[0041] - 염화나트륨(배취당 2,000kg)은 락토페린 제조 공정에서 유의적으로 비용이 많이 들며(배취당 $1,200) 염화나트륨을 재순환시키는 능력은 생산 비용을 현저히 감소시킨다.

[0042] - 환경적 손상은 염화나트륨을 재순환시킴으로써 감소된다. 레온가타에서 3차 처리하여 유기 고체를 제거한 후, 염화나트륨을 함유하는 유출물을 해양 방류관을 사용하여 처분하고 모든 단계를 취하여 생성된 폐기물의 양을 감소시킨다. 염 재순환 공정은 필요한 염의 양을 80%까지 감소시키며, 이는, 환경 내로 방출된 염화나트륨의 양이 배취당 8,000kg까지 감소됨을 의미한다(UF5로 인하여 1/3).

[0043] 막 유형의 타당성

[0044] - 나선형 막은 큰 면적의 막을 수득하는 비교적 저렴한 방법이며, 이는 작은 공간이 있는 플랜트내에서 높은 유출을 허용한다.

[0045] - PES는 신속하게 젖어서 우수한 유동 속도와 높은 배출율로 신속한 여과를 완전하게 야기하는 고유의 친수성 막이다. PES 막은 또한 표적 단백질 결합의 경향성을 최소화는 극도로 낮은 단백질 결합이며, 이는 높은 수율, 안정한 투과막 유출 및 일정하게 뚜렷한 막 다공성을 의미한다.

[0046] MWCO의 타당성:

[0047] -5kDa 막은 비-락토페린 불순물을 보유하며, 이는, 이러한 불순물이 크로마토그래피 공정으로 되돌려져서 후속적인 락토페린 유출 동안 락토페린을 오염시키는 것을 방지한다. 단백질 혼합물은 다수의 작은 단백질(이들 중 많은 것이 성장인자이다)을 함유하므로 보다 작은 막이 요구된다.

[0048] - 염화나트륨(58Da)은 5kDa 막에 의해 보유되지 않는 반면, 락토퍼옥시다제(80kDa), 면역글로불린(150 내지 420kDa) 및 성장 인자(5 내지 17kDa)는 보유되므로 이러한 이유로 저 농도(0.1% 단백질)에서 컬럼으로부터 용출되는 단백질은 염 농도에 있어서의 증가 또는 단백질의 손실과 일치하지 않으면서, 3% 단백질로 농축될 수 있다.

[0049] *UF7*

[0050] 유형: 나선형으로 권취된 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) MWCO: 50 kDa

[0051] 상표명: Synder 모델: BN4B-6338

[0052] UF7로서 공지된 한외여과 플랜트를 사용하여:

[0053] 1. 비-락토페린 단백질을 제거함으로써 락토페린 순도를 증가시키고;

[0054] 2. 염화나트륨 및 잔류 락토즈를 제거함으로써 단백질을 >95% 고체까지 증가시킨다.

[0055] 광범위한 락토페린 제조 공정내에서 공정의 타당성:

[0056] - 페리틴(Ferritin) OB의 제조용으로 의도된 락토페린은 표준 락토페린보다 더 높은 락토페린 순도를 가진다. 보다 높은 순도는 전통적으로 사용된 5kDa 막을 50kDa 막으로 치환시켜 수득한다.

[0057] 막 유형의 타당성:

[0058] - 나선형 막은 큰 면적의 막을 수득하는 비교적 저렴한 방식이며, 이는 작은 공간을 차지하는 플랜트에서 높은 유출 및 비교작 짧은 공정 시간을 허용한다.

[0059] - 친수성 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막은 단백질에 대해 높은 투과막 유출물 및 낮은 친화도를 갖는다. 이러한 이유로, 유출물은 공정의 지속 동안 높게 잔존하며, 수율은 막 대량유출(membrane pour)을 방해하는 단백질이 거의 없으므로 수율이 높게 유지된다.

[0060] MWCO의 타당성:

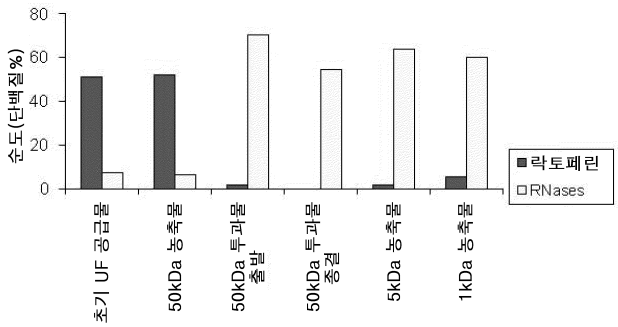
[0061] - 50kDa 막은 비-락토페린 단백질(RNase, 성장 인자)의 개선된 투과를 허용하나, 락토페린을 보유하므로 보다 작은 막(전통적으로 5kDa 막)보다 선호하여 사용된다. 비-락토페린 단백질의 증가된 투과는 보다 높은 락토페린 순도(순도에 있어서 1.8% 단백질의 평균적인 증가, P<0.001)를 생성한다. 추가의 세부사항은 문헌[참조: 'Increasing Lactoferrin Purity by Diafiltration with Salt Solution in an Ultrafiltration Plant Fitted with 50 kDa Membranes'(JR0010)]으로부터 얻을 수 있다.

[0062] - 염화나트륨(58Da)은 50kDa 막에 의해 보유되지 않는 반면, 락토페린(80kDa)은 보유되며 이러한 이유로 저 농도(3% 단백질)에서 컬럼으로부터 용출되는 락토페린은 염 농도에 있어서의 증가 또는 단백질의 손실과 일치하지 않으면서, >20% 단백질로 농축될 수 있다.

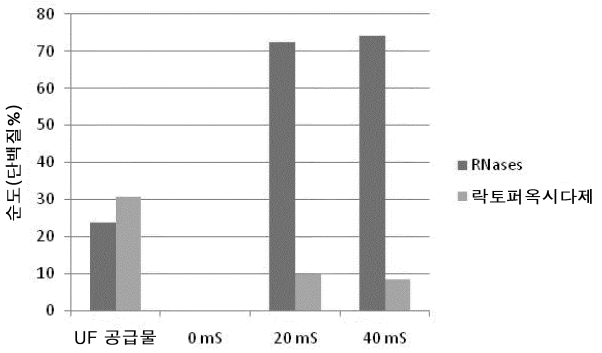
[0063] - 물의 제거에 의해 총 고체가 증가하므로 동결-건조기 고체 처리량은 최대화된다.

도면

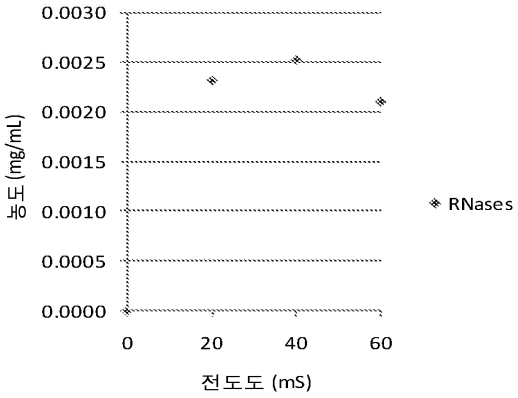
도면1



도면2



도면3


0.0030
0.0025
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
농도 (mg/mL)
0
20
40
60
전도도 (mS)
RNases