(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월09일
(11) 등록번호 10-0836171
(24) 등록일자 2008년06월02일

(51) Int. Cl.
C07K 1/14 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0006001
(22) 출원일자 2007년01월19일
심사청구일자 2007년01월19일
(56) 선행기술조사문헌
KR1019990086127 A
KR1020010108400 A
US6437101 B1
US5882520 A

(73) 특허권자
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교
(72) 발명자
구윤모
서울 강남구 도곡2동 우성4차(아) 5동 203호
장우진
경기 안양시 동안구 비산동 샛별마을 한양(아) 204-402
박혜미
서울 구로구 신도림동 동아1차아파트 104동 704호
(74) 대리인
이원희

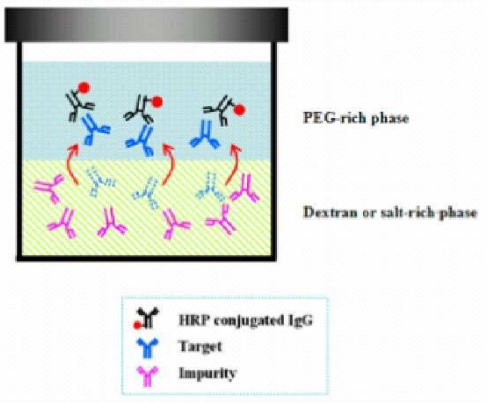
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 손영희

(54) 분배 향상 물질이 접합된 생물물질을 이용한 수성이상계추출법에서의 친화성 분리 방법

(57) 요 약

본 발명은 분배특성이 변화된 단백질-항체 결합체를 이용하여 항체에 결합하는 물질을 분리하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 항체에 단백질을 결합시켜 단백질-항체 결합체의 분배특성을 변화시킨 후, 상기 항체에 분자 특이적으로 결합하는 물질을 분리하는 친화성 분리방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 생물물질에 안전한 수성이상계 추출법과 선별성이 높은 분자 특이적 결합력을 이용하므로, 안전하고 효과적인 생물 물질 분리 기법으로 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

a) 목표 물질(T, target)에 결합하는 항체와 항원, 효소와 기질, 펩타이드(peptide), 핵산(nucleotide), 앱타머(aptamer), 염료(dye) 및금속이온(metal ion)과 같은 리간드(ligand) 및 어셉터(acceptor)로 작용 가능한 물질로 구성된 군으로부터 선택되는 분자특이적 결합력이 있는 물질(B, binding)에 HRP(horseradish peroxidase), 알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase), 베타-갈락토시다제(beta-galactosidase), 리소자임(lysozyme), 우혈청 알부민(bovine serum albumin)과 같은 폴리펩티드 및 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 분배향상 물질(P, partition)을 접합시켜 목표 물질과 다른 상(phase)에 위치하도록 B의 분배계수를 변화시킨 B-P 접합체를 제조하는 단계;

b) 단계 a)의 상기 접합체를 T가 함유된 수성이상계에 투입하는 단계; 및

c) 단계 b)에서 투입 후 생성된 T-B-P 결합체를 분리해내는 단계를 포함하는 친화도에 의한 생물물질 분리방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 단계 3의 수성이상계는 PEG(polyethylene glycol)와 인산칼륨 완충용액, PEG와 덱스트란, 폴리비닐알코올(polyvinylalcohol), 덱스트란(dextran), 폴리에틸렌 폴리프로필렌 블록 코폴리머(polyethylene polypropylene block copolymer), 올리고사카라이드(oligosaccharide), 인산칼륨(potassium phosphate), 인산나트륨(sodium phosphate), 암모늄 설페이트(ammonium sulfate) 및 마그네슘 설페이트(magnesium sulfate)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분리방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 목표물질은 항-인간 IgG이고 분자특이적 결합력이 있는 물질은 인간 IgG것을 특징으로 하는 분리방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<9> 본 발명은 분배특성이 변화된 단백질-항체 결합체를 이용하여 항체에 결합하는 물질을 분리하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 항체에 단백질을 결합시켜 단백질-항체 결합체의 분배특성을 변화시킨 후, 상기 항체에 분자 특이적으로 결합하는 물질을 분리하는 친화성 분리방법에 관한 것이다.

<10> 생물 물질의 분리는 점점 더 커져가고 있는 생물 의약품, 세포 치료제 산업에서 빼놓을 수 없는 중요한 기술이다. 그러나 생물 물질은 화학 물질에 비해 변성의 우려가 높고 유사한 물리, 화학적 성질을 갖는 수많은 물질들과 공존하기 때문에 많은 정제 공정을 거쳐야 한다는 단점을 갖고 있다. 수성이상계를 이용하는 생물분리기술은 유기 용매를 이용하지 않아 생물 물질의 안정성 확보에 유리하고 복잡한 정제 공정을 줄일 수 있으므로 이러한 생물 물질 분리에 유용하다. 수성이상계는 고분자 물질들 또는 고분자 물질과 염이 일정 농도 이상으로 존재하는 두 개의 수용액으로 구성되며, 이 때 각 물질들간의 정전기적 반발력에 의해 섞이지 않는 두 개의 층을 형성한다.

<11> 수성이상계에 의한 물질 분리의 원리는, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 고분자와 인산염을 일정비율로 혼합하면 밀도에 따라서 상층은 폴리에틸렌 글리콜, 아래층은 인산염층으로 경계가 나누어진다. 이 때 분리하고자 하는 물질을 넣어주면 두 개의 상 중에 선호하는 하나의 상으로 다량 존재하게 되는데, 이것은 각 상을 주로 구성하는 물질의 종류 및 조성에 따라 그 상의 물리, 화학적 특성이 상이하기 때문이다.

<12> 수성이상계의 구성에 주로 사용되는 고분자 물질로는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 폴리비닐알코올(polyvinylalcohol), 덱스트란(dextran) 등이 있으며 염으로는 인산칼륨(potassium phosphate), 인산나트륨(sodium phosphate), 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), 마그네슘 설페이트(magnesium sulfate) 등이 있다. 이러한 수성이상계는 물의 양이 65-80% 이상으로 생물물질의 안정성을 떨어뜨리지 않으며, 동시에 다양한 종류의 물질들로 이상계를 구성할 수 있으므로 특히 생물 물질의 분리에 유리한 장점이 있다.

<13> 지금까지 수성이상계를 이용한 생물 물질 분리에서는 분리하고자 하는 목적 물질에 따라 계를 구성하는 물질의 농도 및 고분자의 분자량 등에 변화를 주는 시도가 많았다. 특히 수성이상계 구성 이후 첨가물로 사용되는 염은 수성이상계의 소수성이나 목적 물질의 표면 특성을 변화시켜 물질의 분배특성 변화에 큰 영향을 미치므로 다양한 종류의 염을 이용하려는 시도가 많이 이뤄져왔다. 그러나 이와 같은 염의 첨가는 용액 내 삼투압을 증가시켜 생물 물질의 안정성에 저해를 줄 수 있고, 선택성이 낮아 목적 물질 뿐만이 아닌 다른 물질의 분배 계수에도 영향을 줄 수 있어 적절한 농도 조건을 찾기가 힘들다는 단점을 갖는다.

<14> 이러한 단점을 극복하기 위하여 생물학적 또는 화학적 친화성을 수성이상계에서 이용하려는 시도가 진행된 바 있다. 수성이상계에서 친화성을 부여하기 위하여 사용된 물질로는 항체, DNA, 금속 이온, 계면활성제 등이 있다.

<15> 이들 중 본 발명과 관련된 것들 중 수성이상계 내에서 항체를 이용한 친화성 분리로는 항체에 리간드로써 온도민감성 고분자를 접합시켜 특정 온도에서 동물 세포를 분리하려는 시도가 있었다(A. Kumar et al., Biotechnol. Bioeng., 75, 570-580, 2005). 그러나 이는 분리능을 높이기 위해 일정 온도를 유지해야 한다는 점에서 생물물질의 변성을 초래할 수 있고 리간드로 사용된 고분자의 유해성이 검증되지 않았다는 단점이 있다.

<16> 또 다른 예로는 항체를 PEG(polyethylene glycol)에 접합시킨 PEG화(PEGylation)된 분자를 사용한 경우로(Kim A. Sharp et al. Anal. Biochem. 154, 110-117, 1985), 이는 PEG화하기 위해 필요한 변형된 PEG의 가격이 높고, 변형된 PEG 및 항체의 종류에 따라 PEG화의 성공률이 크게 달라질 수 있다는 단점을 갖고 있다.

<17> 이에, 본 발명자들은 생물물질의 안정성을 저해하지 않으면서도 다수 존재하는 불순물로부터 목적 물질만을 선택적으로 분리하기 위한 방법으로, 항체와의 결합에 의하여 대다수의 항체들이 존재하는 상과는 반대 상으로 분배될 수 있도록 하는 단백질 및 수성이상계 조건을 선정한 후, 선정된 조건에서 불순물과 혼합된 목적 물질만을 다른 상으로 분배시켜 회수가 가능한 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<18> 본 발명의 목적은 리간드로써 생물 물질에 대해 안전하면서도 수성이상계 내에서의 분배 조절이 용이하며 항체와의 접합 효율이 높고 이를 통한 친화성 분리가 효과적으로 이루어 질 수 있는 단백질을 이용한 수성이상계 추출공정 내에서의 친화성 분리 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<19> 본 발명은

<20> a) 목표 물질(T, target)에 결합하는 분자특이적 결합력이 있는 물질(B, binding)에 분배향상 물질(P, partition)을 접합시켜 목표 물질과 다른 상(phase)에 위치하도록 B의 분배계수를 변화시킨 B-P 접합체를 제조하는 단계;

<21> b) 단계 a)의 상기 접합체를 T가 함유된 수성이상계에 투입하는 단계; 및

<22> c) 단계 b)에서 투입 후 생성된 T-B-P 결합체를 분리해내는 단계를 포함하는 친화도에 의한 생물물질 분리방법을 제공한다.

<23> 본 발명자들은 수성이상계 내에서 항체를 이용한 친화성 분리를 할 때 항체의 분배계수를 바꿀 수 있는 접합단백질을 검색하였다. 그 결과 HRP(horseradish peroxidase)의 경우, 항체와의 접합방법이 상용화 되어있고 접합효율도 높다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 실제로 분리되기 위해서는 분배계수(K, 상층에 존재하는 물질의

농도/하층에 존재하는 물질의 농도)에 차이가 있어야 하는데, HRP와 접합된 항체가 접합되지 않은 항체와 비교하여 서로 다른 분배계수를 갖지 않을 수도 있기 때문에 여러 종류의 수성이상계에서 실제로 이 둘이 서로 다른 분배 계수를 갖는지 실험하였다.

<24> 구체적으로, 목적 단백질인 래빗-항 인간 IgG를 분리하기 위하여, HRP와 항체와 항체-HRP 접합체는 인간 IgG(hIgG)와 인간 IgG HRP 접합체(hIgG-HRP)로 선택하고 수성이상계는 PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산칼륨 완충용액(15%, w/w) 또는 PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w)으로 구성하였다. 각각의 수성이상계에 HRP, hIgG, hIgG-HRP가 단독으로 존재할 때 갖는 분배계수를 알아본 결과, hIgG-HRP가 원래의 구성 단백질인 HRP와 hIgG에 비해 상층을 선호하는 것으로 나타났다(도 2 참조).

<25> 또한, 수성이상계 내에서 HRP와 접합된 항체와 목적 단백질의 몰비에 따른 분배 경향을 알아보았고 이를 통해 목적 단백질을 분리하기에 유리한 조건(수성이상계 구성물질의 종류 및 농도, 항체-HRP 접합체와 목적 단백질의 몰 비율 등)을 선정하였다.

<26> 그 결과, PEG와 인산칼륨 완충용액으로 구성된 수성이상계에서는 hIgG-HRP, 래빗 항-인간 IgG, 염소 항-마우스 IgG의 몰 비율 3:1:1, PEG와 덱스트란으로 구성된 수성이상계에서는 몰비율 1:1:1이 최적임을 확인하였다.

<27> 상기 방법들을 통하여, 본 실험에서는, 목적 항체가 불순물인 다른 항체들과 수성이상계의 하층에 존재하는 반면 상층에 존재하려는 성질이 강한 항체-HRP 접합체를 이용하여 두 물질간의 친화성 결합을 통해 목적 단백질을 수성이상계의 상층으로 유도하고, 이후 수성이상계의 상층을 분리해 내어 목적 물질과 불순물을 분리하였다.

<28> 상기 방법에서, 분자특이적 결합력이 있는 물질은 항체와 항원, 효소와 기질, 그리고 펩타이드(peptide), 핵산(nucleotide), 앱타머(aptamer), 염료(dye), 금속 이온(metal ion) 등 리간드(ligand)와 어셉터(acceptor)로 작용 가능한 모든 물질을 이용할 수 있고 분배향상 물질은 HRP(horseradish peroxidase), 알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase), 베타-갈락토시다제(beta-galactosidase), 리소자임(lysozyme), 우혈청 알부민(bovine serum albumin) 등의 모든 폴리펩티드 및 펩티드를 이용할 수 있다.

<29> 단계 3의 수성이상계는 PEG(polyethylene glycol)와 인산칼륨 완충용액 또는 PEG와 덱스트란 외에 폴리비닐알코올(polyvinylalcohol), 덱스트란(dextran), 폴리에틸렌 폴리프로필렌 블록 코폴리머(polyethylene polypropylene block copolymer), 올리고사카라이드(oligosaccharide), 인산칼륨(potassium phosphate), 인산나트륨(sodium phosphate), 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), 마그네슘 설페이트(magnesium sulfate) 등 수성이상계 구성이 가능한 모든 물질이 사용가능하다.

<30> 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용을 제한하지는 않는다.

<31> **<실시예 1> 항체-HRP 접합체와 목적 단백질, 불순물 각각의 분배계수**

<32> 본 실험에서 사용한 항체-HRP 접합체, 목적 단백질 및 불순물은 각각 HRP(horseradish peroxidase)이 접합된 인간 IgG(hIgG-HRP), 이와 친화성이 있는 래빗-항 인간 IgG 및 친화성이 없는 염소 항-마우스 IgG이다(모두 Pierce Biotechnology, Inc., USA에서 구입).

<33> 본 실험에서 사용한 수성이상계는 PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산칼륨 완충용액(potassium phosphate buffer, 15%, w/w), 또는 PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w)으로 두 수성이상계에서 hIgG-HRP는 상층을(log K가 0보다 큼), 래빗 항-인간 IgG와 염소 항-마우스 IgG는 하층을(log K가 0보다 작음) 선호하는 것으로 나타났다(표 1).

<34> 수성이상계의 구성을 위하여 최종 농도에 비하여 두 배 농축된 농도의 모액 4가지 (PEG 용액(분자량 1450, 20%, w/w), 인산칼륨 완충용액(30%, w/w), PEG 용액 (분자량 8000, 10%, w/w), 덱스트란 T500 용액(분자량 500000, 10%, w/w))를 우선 제조하였다. 이후 분자량 1450인 PEG 용액과 인산칼륨 용액 또는 분자량 8000인 PEG 용액과 덱스트란 용액을 각각 0.5 g 씩 섞음으로써 총 무게 1 g인 수성이상계 용액들(PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산칼륨 완충용액(15%, w/w), 그리고 PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w))을 제조하였다. 모액을 섞은 후에는 3000 rpm에서 15분간 원심분리를 한 후 1시간동안 상온에 두어 상을 안정화하였다.

<35> 표 1: 수성이상계 내 hIgG-HRP, 래빗 항-인간 IgG, 염소 항-마우스 IgG의 분배 계수

표 1

<36>

수성이상계	분배계수(log K)		
	hIgG-HRP	래빗 항-인간 IgG	염소 항-마우스 IgG
PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산칼륨 용액(15%, w/w)	0.59	-0.34	-0.68
PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w)	0.29	-0.04	-0.70

<37> **<실시예 2> 몰 비율에 따른 hIgG-HRP와 래빗 항-인간 IgG, hIgG-HRP와 염소 항-마우스 IgG의 분배 계수 변화**

<38> 상기 실시예 1에서 보듯이, hIgG-HRP와 래빗 항-인간 IgG, 염소 항-마우스 IgG가 서로 다른 층을 선호하는 것을 알 수 있었던 바, 본 발명에서는 hIgG-HRP와 래빗 항-인간 IgG, hIgG-HRP와 염소 항-마우스 IgG 각각의 두 물질이 섞이는 몰비가 이들의 분배계수에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

<39> **<2-1> hIgG-HRP와 래빗 항-인간 IgG의 몰 비율에 따른 친화성 분배 계수 변화**

<40> PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산 칼륨 완충용액(15%, w/w) 또는 PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w)의 두 가지 수성이상계에서 hIgG-HRP 및 항-인간 IgG의 몰농도를 달리하여 실험한 결과, hIgG-HRP의 몰농도가 높아질수록 이와 친화성이 있는 래빗 항-인간 IgG의 분배계수가 상승하였고, 반대로 래빗 항-인간 IgG의 몰농도가 높아질수록 hIgG-HRP의 분배계수는 감소하였다(도 3 및 도 4). 이를 통해 본 발명에서는 항체-HRP 접합체를 이용한 목적물질의 친화성 분리가 가능하며, 특히 두 물질간의 몰 비가 분리 효율에 영향을 주는 것을 확인하였다.

<41> 상기 결과를 고려할 때 hIgG-HRP, 래빗 항-인간 IgG, 염소 항-마우스 IgG의 몰 비율이 염기반의 수성이상계에서는 3:1:1, 덱스트란 기반의 수성이상계에서는 1:1:1일 때 분리하기에 최적의 조건임을 확인하였다.

<42> **<2-2> hIgG-HRP와 염소 항-마우스 IgG의 몰 비율에 따른 비친화성 분배계수 변화**

<43> 실시예 2-1에서와 같이 PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산칼륨 완충용액(15%, w/w) 또는 PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w)의 두 가지 수성이상계에서 hIgG-HRP 및 염소 항-마우스 IgG의 몰농도를 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10으로 달리하여 실험한 결과, hIgG-HRP의 몰농도가 높아질수록 이와 친화성이 없는 염소 항-마우스 IgG의 분배계수도 다소 상승하였고, 염소 항-마우스 IgG의 몰농도가 높아질수록 hIgG-HRP의 분배계수가 다소 감소하였다(도 5 및 도 6 참조).

<44> 이는 염소 항-마우스 IgG와 hIgG-HRP 간의 교차 반응(cross-reactivity)에 의한 것으로 원래는 친화성이 없는 물질의 경우 hIgG-HRP에 의해 수성이상계의 상층으로 물질이 이동하는 현상이 없을 것으로 예상하였으나, 두 물질간에 비 특이적인 친화성이 약하게 존재하여 상기와 같은 결과를 나타내었다. 그러나 그 경향은 앞서 살펴본 래빗 항-인간 IgG에 비해 경미하며, 용액 내에 래빗 항-인간 IgG와 동시에 존재할 경우 상호 경쟁에 의하여 결합하게 되므로 비 특이적 결합이 실제 분리 과정에 미치는 영향은 경미할 것으로 판단된다.

<45> **<실시예 3> 친화성 분배를 이용한 수성이상계 내에서의 친화성 분리**

<46> 본 발명의 최종 목적은 hIgG-HRP를 이용하여 목적 물질인 래빗 항-인간 IgG의 상층으로의 분배를 유도하고 이를 통해 보다 높은 효율과 순도의 래빗 항-인간 IgG 분리를 수행하는 것이다. 상기 결과에서 선정된 몰 농도 비율에서 래빗 항-인간 IgG의 분배계수 및 순도를 측정하기 위하여 하기와 같은 실험을 실시하였다.

<47> **<3-1> PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산칼륨 용액(15%, w/w)에서의 친화성 분리**

<48> 실시예 2-1, 2-2의 결과를 토대로 래빗 항-인간 IgG의 분배를 상층으로 유도할 수 있는 hIgG-HRP, 래빗 항-인간 IgG, 염소 항-마우스 IgG의 몰 비율을 3:1:1로 선정하였다. 이 비율에서 친화성 분리를 시도한 결과, 래빗 항-인간 IgG의 분배 계수는 hIgG-HRP에 의해 -0.35에서 0.50으로 크게 상승하여 상층에 많이 존재하였고, 반면 염소 항-마우스 IgG의 분배 계수는 -0.68에서 -0.08로 다소 상승하였으나 여전히 하층에 많이 존재하는 것으로 나타났다(도 7). 상층에 존재하는 래빗 항-인간 IgG의 순도는 72.37%로, 이를 통해 래빗 항-인간 IgG의 친화성 분리가 가능함을 확인하였다. 순도는 상층에 존재하는 래빗 항-인간 IgG의 양을 상층에 존재하는 hIgG-HRP, 래빗 항-인간 IgG, 염소 항-마우스 IgG의 합으로 나눈 후 100을 곱하여 계산하였다.

<49> **<3-2> PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w)에서의 친화성 분리**

<50> 실시예 2-1, 2-2의 결과를 토대로 래빗 항-인간 IgG의 분배를 상층으로 유도할 수 있는 hIgG-HRP, 래빗 항-인간 IgG, 염소 항-마우스 IgG의 몰 비율을 1:1:1로 선정하였다. 그 결과 래빗 항-인간 IgG의 분배 계수는 -0.30에서 0.75로 상승하였고 염소 항-마우스 IgG의 분배 계수는 -0.04에서 -0.17로 오히려 하층에 존재하는 양이 증가한 것으로 나타났다(도 8). 상층에 존재하는 래빗 항-인간 IgG의 순도는 87.68%였다.

발명의 효과

<51> 본 발명에서는 HRP가 접합된 항체를 사용한 수성이상계 내 친화성 분리 방법을 제시하였다. 본 발명에서 항체-HRP 접합체는 높은 효율의 항체, HRP 접합을 통해 항원-항체 반응에 이용되어 목적 물질의 특이적인 분리를 유도할 수 있으므로 안전하고 효과적인 수성이상계 내 물질분리에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 단백질과 접합된 항체를 이용한 수성이상계 내 친화성 분리에 대한 개괄도이고,

<2> 도 2는 PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산칼륨 용액(15%, w/w), 또는 PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w)으로 구성된 수성이상계에서 HRP, hIgG, hIgG-HRP 각각의 분배계수 차이를 나타낸 그림이고,

<3> 도 3은 PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산칼륨 용액(15%, w/w)에서 친화력이 있는 hIgG-HRP와 래빗 항-인간 IgG의 몰비에 따른 각각의 분배계수 변화를 나타낸 그림이고,

<4> 도 4는 PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w)에서 친화력이 있는 hIgG-HRP와 래빗 항-인간 IgG의 몰비에 따른 각각의 분배계수 변화를 나타낸 그림이고,

<5> 도 5는 PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산칼륨 용액(15%, w/w)에서 친화력이 없는 hIgG-HRP와 염소 항-마우스 IgG의 몰비에 따른 각각의 분배계수 변화를 나타낸 그림이고,

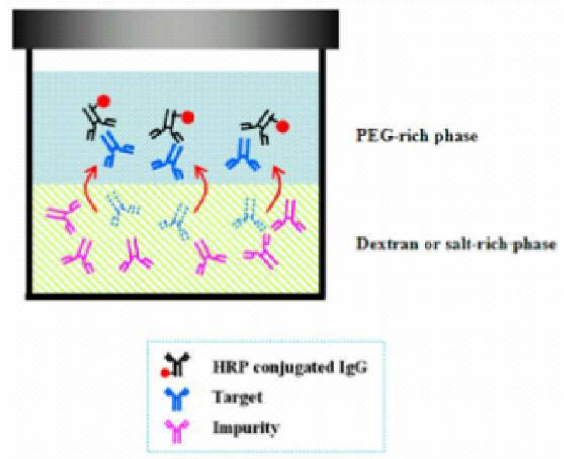
<6> 도 6은 PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w)에서 친화력이 없는 hIgG-HRP, 염소 항-마우스 IgG의 몰비에 따른 각각의 분배계수 변화를 나타낸 그림이고,

<7> 도 7은 PEG(분자량 1450, 10%, w/w)와 인산칼륨 용액(15%, w/w)에서의 친화성 분리를 나타낸 그림이고,

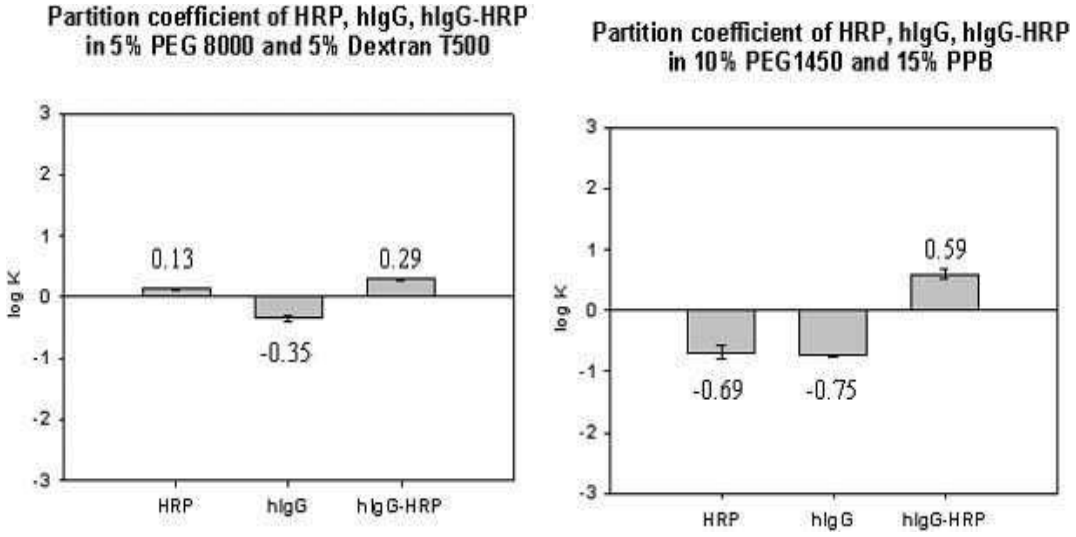
<8> 도 8은 PEG(분자량 8000, 5%, w/w)와 덱스트란 T500(분자량 500000, 5%, w/w)에서의 친화성 분리를 나타낸 그림이다.

도면

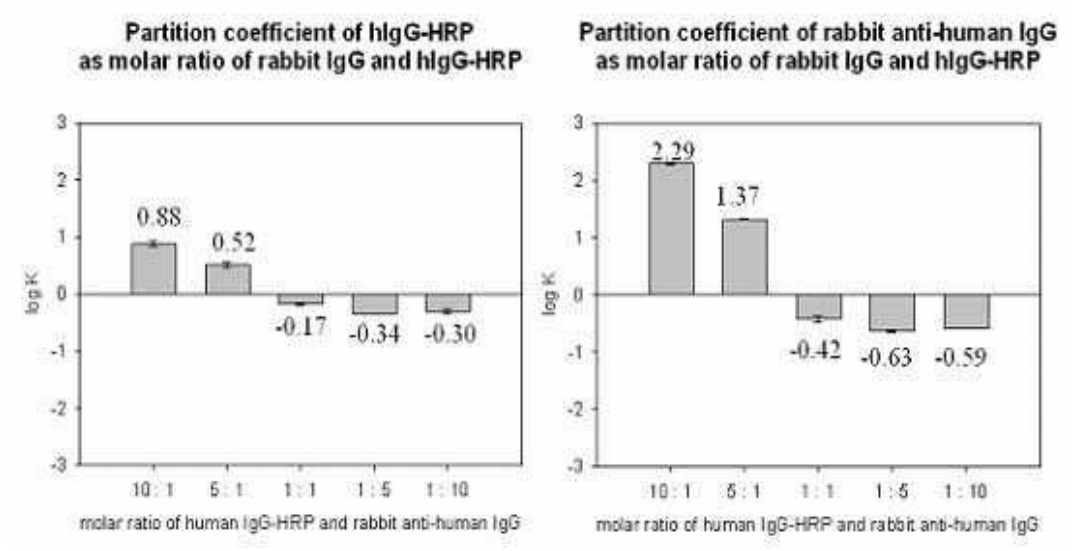
도면1



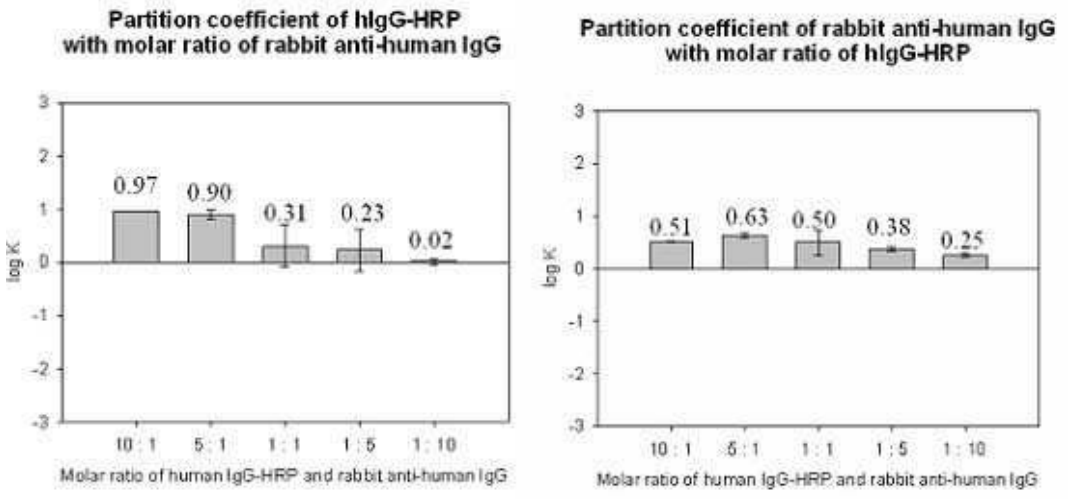
도면2


Partition coefficient of HRP, hIgG, hIgG-HRP
in 5% PEG 8000 and 5% Dextran T500
log K
0.13
-0.35
0.29
HRP
hIgG
hIgG-HRP
Partition coefficient of HRP, hIgG, hIgG-HRP
in 10% PEG1450 and 15% PPB
log K
-0.69
-0.75
0.59
HRP
hIgG
hIgG-HRP

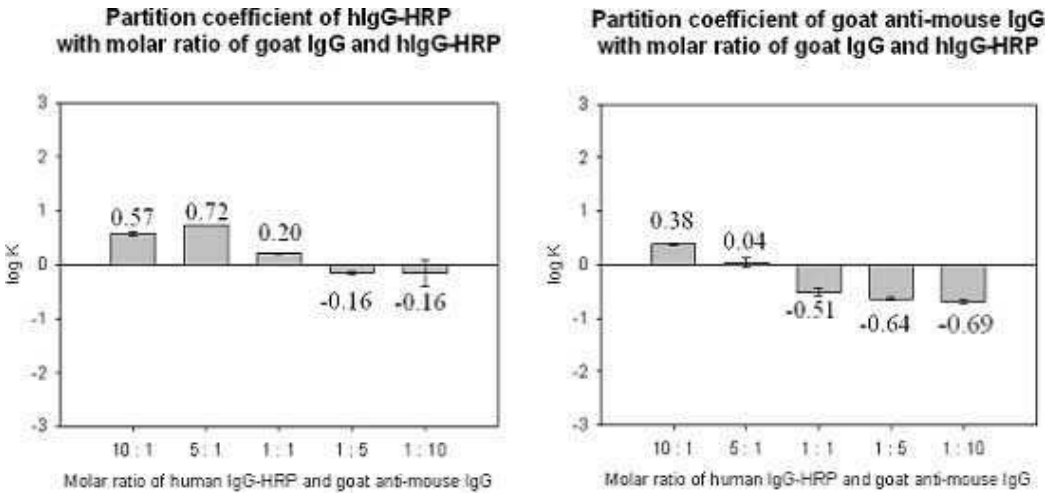
도면3


Partition coefficient of hIgG-HRP
as molar ratio of rabbit IgG and hIgG-HRP
log K
0.88
0.52
-0.17
-0.34
-0.30
10 : 1
5 : 1
1 : 1
1 : 5
1 : 10
molar ratio of human IgG-HRP and rabbit anti-human IgG
Partition coefficient of rabbit anti-human IgG
as molar ratio of rabbit IgG and hIgG-HRP
log K
2.29
1.37
-0.42
-0.63
-0.59
10 : 1
5 : 1
1 : 1
1 : 5
1 : 10
molar ratio of human IgG-HRP and rabbit anti-human IgG

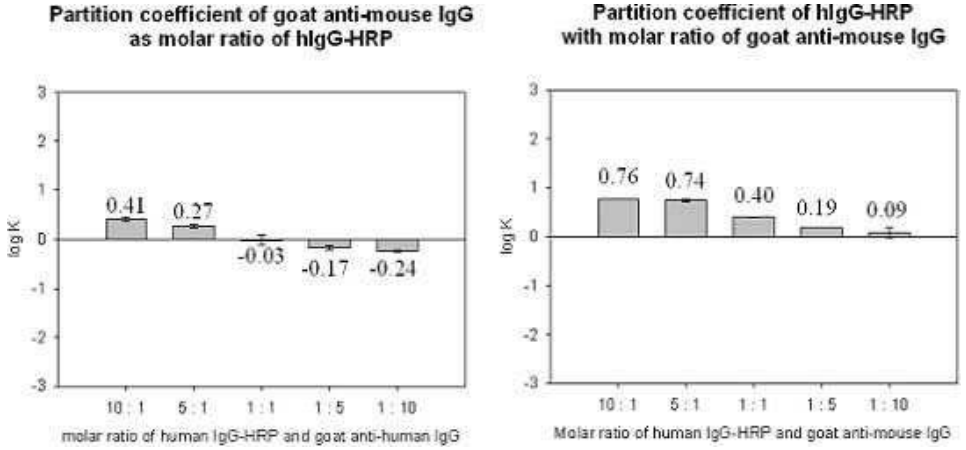
도면4


Partition coefficient of hIgG-HRP
with molar ratio of rabbit anti-human IgG
log K
0.97
0.90
0.31
0.23
0.02
10 : 1
5 : 1
1 : 1
1 : 5
1 : 10
Molar ratio of human IgG-HRP and rabbit anti-human IgG
Partition coefficient of rabbit anti-human IgG
with molar ratio of hIgG-HRP
log K
0.51
0.63
0.50
0.38
0.25
10 : 1
5 : 1
1 : 1
1 : 5
1 : 10
Molar ratio of human IgG-HRP and rabbit anti-human IgG

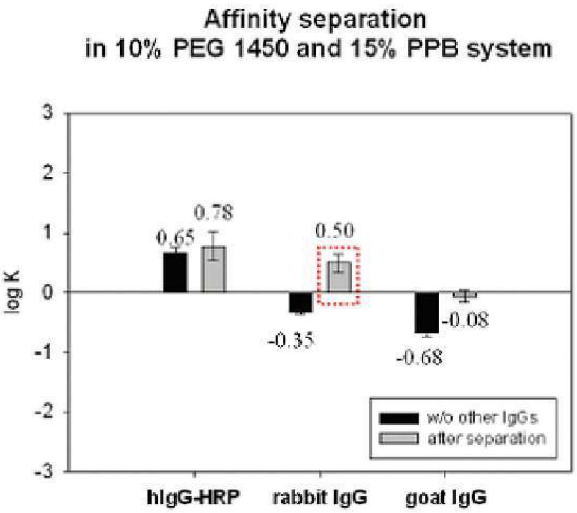
도면5


Partition coefficient of hIgG-HRP
with molar ratio of goat IgG and hIgG-HRP
log K
0.57
0.72
0.20
-0.16
-0.16
10 : 1
5 : 1
1 : 1
1 : 5
1 : 10
Molar ratio of human IgG-HRP and goat anti-mouse IgG
Partition coefficient of goat anti-mouse IgG
with molar ratio of goat IgG and hIgG-HRP
log K
0.38
0.04
-0.51
-0.64
-0.69
10 : 1
5 : 1
1 : 1
1 : 5
1 : 10
Molar ratio of human IgG-HRP and goat anti-mouse IgG

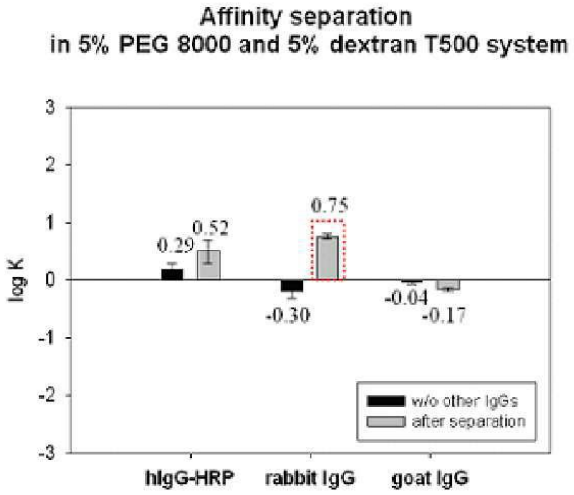
도면6


Partition coefficient of goat anti-mouse IgG
as molar ratio of hIgG-HRP
log K
0.41
0.27
-0.03
-0.17
-0.24
10 : 1
5 : 1
1 : 1
1 : 5
1 : 10
molar ratio of human IgG-HRP and goat anti-human IgG
Partition coefficient of hIgG-HRP
with molar ratio of goat anti-mouse IgG
log K
0.76
0.74
0.40
0.19
0.09
10 : 1
5 : 1
1 : 1
1 : 5
1 : 10
Molar ratio of human IgG-HRP and goat anti-mouse IgG

도면7


Affinity separation
in 10% PEG 1450 and 15% PPB system
log K
3
2
1
0
-1
-2
-3
0.65
0.78
-0.35
0.50
-0.68
-0.08
w/o other IgGs
after separation
hIgG-HRP
rabbit IgG
goat IgG

도면8


Affinity separation
in 5% PEG 8000 and 5% dextran T500 system
log K
3
2
1
0
-1
-2
-3
0.29
0.52
-0.30
0.75
-0.04
-0.17
w/o other IgGs
after separation
hIgG-HRP
rabbit IgG
goat IgG