

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 7월 4일 (04.07.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/144117 A1

(51) 국제특허분류:

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/30 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/021322

(22) 국제출원일:

2023년 12월 21일 (21.12.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0189348 2022년 12월 29일 (29.12.2022) KR

(71) 출원인: 주식회사 엘지화학 (LG CHEM, LTD.) [KR/
KR]; 07336 서울특별시 영등포구 여의대로 128, Seoul
(KR).

(72) 발명자: 김효주 (KIM, Hyo Ju); 34122 대전광역시
유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR).

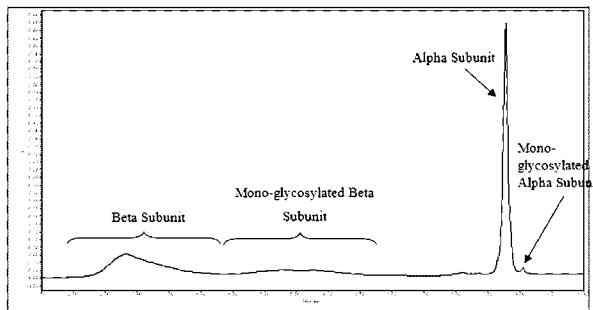
김선영 (KIM, Sun Young); 34122 대전광역시 유성구
문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 정영란
(JEONG, Yeongran); 34122 대전광역시 유성구 문지로
188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 이은정 (LEE,
Eunjeong); 34122 대전광역시 유성구 문지로 188
LG화학 기술연구원, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW
FIRM); 06134 서울특별시 강남구 테헤란로 115, Seoul
(KR).

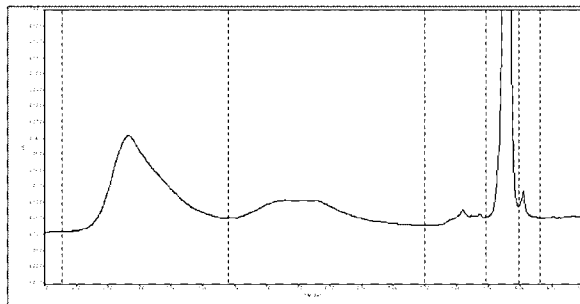
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING CONTENT OF MONO-GLYCOSYLATED FORM OF FOLLICLE-STIMULATING HORMONE (FSH)

(54) 발명의 명칭: 난포자극호르몬(FSH)의 단일 글리코실화된 형태의 함량 분석 방법



Enlargement



(57) Abstract: The present invention relates to a method for analyzing a mono-glycosylated form of follicle-stimulating hormone (FSH) using ultra-high performance liquid chromatography (UPLC). According to the present invention, ultra-high performance liquid chromatography is performed using a specific column and mobile phase, and thus the method is useful for detecting and/or quantifying a mono-glycosylated form of FSH without a separate pre-treatment.

(57) 요약서: 본 발명은 초고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC, Ultra performance liquid chromatography) 분석을 이용한 난포자극호르몬(FSH)의 단일 글리코실화된 형태의 분석방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르는 경우 특유의 컬럼 및 이동상을 사용하여 초고성능 액체 크로마토그래피를 수행하는 것을 특징으로 하여, FSH의 단일 글리코실화된 형태를 별도의 전처리 없이 검출 및/또는 정량화하는데 유용하다.

[다음 쪽 계속]

WO 2024/144117 A1



MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, 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,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 난포자극호르몬(FSH)의 단일 글리코실화된 형태의 함량 분석 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 FSH(Follicle-stimulating hormone, 난포자극호르몬)의 단일 글리코실화된 형태(Mono-glycosylated form)의 검출 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 인간 FSH의 베타 및 알파 서브유닛의 단일 글리코실화된 형태를 상대적으로 함량분석하여, FSH의 단일 글리코실화된 형태를 정확하게 함량 분석하기 위한 신규한 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] FSH(Follicle-stimulating hormone, 난포자극호르몬)은 알파와 베타 서브유닛이 서로 비공유 결합을 형성하고 있는 당단백질이다. 알파와 베타 서브유닛 각각에는 두 개의 N-글리칸 자리(N-glycan site)가 존재하는데, 알파 서브유닛은 Asn52와 Asn78에, 베타 서브유닛은 Asn7과 Asn24에 N-글리칸이 존재한다.
- [3] 이러한 N-글리칸은 알파와 베타 서브유닛의 상호작용이나 생체 내에서의 클리어런스 또는 수용체 결합 친화도(affinity) 등에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 구체적으로, FSH의 알파-서브유닛에 결합된 탄수화물은 이량체 어셈블리, 완전성, 분비 및 신호 전달을 위해 중요하며, 베타-서브유닛 탄수화물은 이량체 어셈블리, 분비 및 순환으로부터의 이종이량체의 제거를 위해 중요하다.
- [4] 종래에는 베타 서브유닛에 N-글리칸이 하나만 존재하는 단일 글리코실화된 형태를 확인하였으며, 이 형태는 FSH 수용체에 대한 결합 친화도(affinity)가 N-글리칸이 두 개 존재하는 형태에 비해 상대적으로 높다고 보고된 바 있다. 따라서, 이러한 단일 글리코실화된 형태는 FSH의 품질에 중요한 기여를 한다고 보여지는바, 이들의 함량을 정확하게 확인할 필요가 있는 요구가 있다.
- [5] 이전 선행문헌들에서 FSH의 단일 글리코실화된 형태의 존재는 인간 뇌하수체 글란드로부터 FSH를 추출하고, HPLC에서 겔 여과 컬럼을 통해 분리하여 확인하였다. 이때, HPLC 크로마토그램 결과에서 FSH 헤테로다имер 피크 뒤에 작은 자유 서브 유닛 피크가 나타나는 것을 볼 수 있으며, 이후 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏으로 대략적인 분포를 확인한 바 있다. 그 외에도 PNGase-F를 처리하여 N-글리칸에 대한 Mass Spectrometry 분석을 통해 뇌하수체와 뇨의 hFSH 글리칸 구조를 비교한 결과가 있다.
- [6] 이와 같이 이전 선행기술들에서는 주로 단일 글리코실화된 형태의 존재를 확인하는 정성분석법을 사용하였으나, 정량적인 분석법에 대해서는 현재 확립된 방법이 보고되어 있지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 좀 더 명확하게 FSH의 단일 글리코실화된 형태를 확인할 수 있는 방법을 예의 연구하여 본 발명을 완성하였다.
- [8] 따라서 본 발명은 신규한 난포자극호르몬(FSH, Follicle-stimulating hormone, 난포자극호르몬)의 단일 글리코실화된 형태(Mono-glycosylated form)을 분석하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명의 일 측면으로, 신규한 FSH(Follicle-stimulating hormone, 난포자극호르몬)의 단일 글리코실화된 형태(Mono-glycosylated form)을 분석하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 효과

- [10] 본 발명에 따르면, 종래 정량적으로 분석이 어려웠던 FSH의 단일 글리코실화된 형태를, 당을 떼어내지 않고도 정확성과 재현성을 가지고 정량적으로 평가할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 HILIC 컬럼을 이용하여 분석한 FSH의 UV 크로마토그램 결과를 나타낸 그래프이다.
- [12] 도 2는 HILIC 컬럼을 이용하여 분석한 탈시알릴화 FSH의 UV 크로마토그램 결과를 나타낸 그래프이다.
- [13] 도 3은 C3 컬럼을 이용하여 분석한 FSH의 UV 크로마토그램 결과를 나타낸 그래프이다.
- [14] 도 4는 C8 컬럼을 이용하여 분석한 FSH의 UV 크로마토그램 결과를 나타낸 그래프이다.
- [15] 도 5는 C3 컬럼을 사용하여 UPLC-Q-TOF에서 분석한 FSH의 UV 크로마토그램을 나타낸 결과이다.
- [16] 도 6는 베타-서브유닛 피크의 디콘볼루션 질량 스펙트럼(Deconvoluted mass spectrum)을 나타낸 결과이다. 초록색은 통상의 형태, 붉은 색은 N-말단(Asn-Ser) 절단된 형태(cleaved form)을 나타낸다.
- [17] 도 7a는 알파 서브유닛 및 단일 글리코실화된 알파 서브유닛 피크의 디콘볼루션 질량 스펙트럼(Deconvoluted mass spectrum)을 나타낸 결과이고, 도 7b는 산화된 알파 서브유닛 피크의 디콘볼루션 질량 스펙트럼(Deconvoluted mass spectrum)을 나타낸 결과이다.
- [18] 도 8은 C3 컬럼의 구배 시험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [19] 도 9는 컬럼 온도 조건에 따른 함량 분석 크로마토그램을 나타낸 그래프이다.
- [20] 도 10은 rhFSH의 단일 글리코실화된 형태의 함량 분석 크로마토그램을 나타낸 그래프이다.
- [21] 도 11은 본 발명에 따른 함량 분석 방법의 rhFSH에 대한 특이성(Specificity)을 확인한 그래프이다.

- [22] 도 12는 본 발명에 따른 함량 분석 방법의 rhFSH에 대한 반복가능성 (Repeatability)을 확인한 그래프이다.
- [23] 도 13은 본 발명에 따른 함량 분석 방법의 rhFSH에 대한 실험실내 정밀성 (Intermediate Precision) (일자별, Waters UPLC)을 확인한 그래프이다.
- [24] 도 14는 본 발명에 따른 함량 분석 방법의 rhFSH에 대한 실험실내 정밀성 (Intermediate Precision) (일자별, Agilent UPLC)을 확인한 그래프이다.
- [25] 도 15는 본 발명에 따른 함량 분석 방법의 rhFSH에 대한 실험실내 정밀성 (Intermediate Precision) (기기간 정밀성, Waters UPLC)을 확인한 그래프이다.
- [26] 도 16은 본 발명에 따른 함량 분석 방법의 rhFSH에 대한 실험실내 정밀성 (Intermediate Precision) (기기간 정밀성, Agilent UPLC)을 확인한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 본 발명에서 사용되는 용어는 별도로 정의되지 않는 한 다음과 같은 의미를 갖는다.
- [28] 본 발명에서 용어 "FSH" 또는 "난포 자극 호르몬" 또는 "Follicle-stimulating hormone"은, 시상하부에서 분비되는 성선자극호르몬 방출 호르몬(GnRH)에 반응하여 뇌하수체 전엽에서 분비되는 당단백 성선 자극 호르몬을 의미한다.
- [29] 본 발명에서 사용되는 용어 "rhFSH"는 재조합 인간 난포 자극 호르몬 (Recombinant Human Follicle Stimulating Hormone)을 의미한다.
- [30] 본 발명에서 사용되는 용어 "단일-글리코실화 형태" 또는 "단일-당화 형태" 또는 "Mono-glycosylated Form"은 rhFSH의 알파와 베타 각 서브 유닛에 존재하는 2개의 N-글리코실화 자리가 존재하는데, 이 중 하나의 자리에만 N-glycan이 당화되어 있는 구조체를 단일 글리코실화된 형태(Mono-glycosylated Form)이라 명명한다. 용어 "글리코실화"는 폴리사카라이드가 FSH에 부착되는 것을 의미한다. 바람직하게는, 폴리사카라이드는 글리코시드 결합을 통해 서로 결합되어 있는 2내지 12개의 단순당으로 구성된다. 용어 "N-글리코실화"는 폴리사카라이드가 아미노산 쇄의 아스파라긴 잔기에 부착되는 것을 의미한다.
- [31] 용어 "글리칸"은 모노사카라이드 잔기로 구성된 중합체를 지칭한다. 글리칸은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있다. 글리칸은 비-사카라이드 잔기, 예컨대, 지질 또는 단백질에 공유결합된 상태로 발견될 수 있다. 단백질에의 결합은 N-결합 또는 O-결합을 통해 일어난다. 글리칸을 포함하는 공유 접합체는 예를 들어, 글리코실화된 폴리펩티드, 당단백질, 당펩티드, 펩티도글리칸, 프로테오글리칸, 당지질 및 리포폴리사카라이드로 지칭된다. 글리칸이 당접합체의 일부로서 발견되는 것 이외에, 글리칸은 자유 형태(즉, 또 다른 잔기로부터 분리되어 결합되지 않은 상태)로도 존재한다.
- [32]
- [33] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [34]

- [35] 하나의 양태로서, 본 발명은 FSH의 단일 글리코실화된 형태의 함량을 분석하는 방법을 제공한다.
- [36] 구체적으로, 상기 방법은 분석대상물질을 초고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC)를 사용하여 FSH의 단일 글리코실화된 형태를 분리하는 단계를 포함한다.
- [37] 종래 FSH의 단일-글리코실화 형태에 대한 적절한 함량 분석에 대한 방법은 확립되어 있지 않다. 이에 본 발명자들은 당이 붙어있지 않는 N-글리코실화 자리가 높은 함량으로 존재한다는 FSH만의 특성에서 단일-글리코실화 형태에 대한 함량 분석법의 필요성을 인식하여 예의 연구한 결과 UPLC를 사용하는 경우 정확한 값으로 FSH의 단일 글리코실화된 형태의 함량 분석이 가능함을 확인하였다.
- [38] 본 발명은 특히 UPLC를 사용하면서 기존 당분석에 사용하는 HILIC 컬럼을 사용하지 않고 특유의 컬럼을 사용함으로써 인해, heterogenous한 복잡한 당 구조를 가지는 FSH, 특히 단일 글리코실화된 FSH를 분석할 수 있다는 특징을 가진다.
- [39] 상기 단계는 분석대상물질로부터 함량을 분석하고자 하는 FSH의 단일 글리코실화된 형태를 UPLC로 분리하는 단계이다.
- [40] 상기 분석대상물질은, FSH의 단일-글리코실레이트 형태가 포함될 수도 있는 물질이다. 바람직하게는 단일-글리코실레이트 형태가 포함될 수도 있는 FSH를 포함하는 의약 조성물일 수 있다.
- [41] 상기 UPLC는 RP-UPLC(Reversed-phase Ultra performance liquid chromatography)인 것일 수 있으나, 당업계에 알려진 UPLC 분석 방법이라면 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 UPLC 분석을 위한 장치라면 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, Agilent사 또는 Waters사의 UPLC 시스템을 사용하였으며, 이들은 모두 FSH의 단일-글리코실화된 형태를 정밀하게 분리할 수 있음을 확인하였다.
- [42]
- [43] 상기 UPLC를 통하여 FSH의 단일-글리코실레이트 형태를 분리하기 위하여는 최적의 기기조건을 설정하는 것이 무엇보다 중요하다.
- [44] 이에, 본 발명과 같이 상기 UPLC에서 사용되는 이동상(mobile phase) 용매로 (A) 물에 포함된 0.1%v/v TFA(trifluoroacetic acid) 및 (B) 바람직하게, 30 내지 50 v/v%, 35 내지 50 v/v%, 30 내지 45 v/v%, 35 내지 45 v/v%, 또는 38 내지 42 v/v% ACN(acetonitrile)에 포함된 0.1%v/v TFA를 사용할 수 있다. 상기 이동상 용매들의 구매 조건 하에서 UPLC를 수행할 수 있다.
- [45] 상기 UPLC에서 사용되는 컬럼은 C8 또는 C3 역상(RP) 컬럼일 수 있고, 바람직하게는, FSH의 단일 글리코실화된 형태는 단백질 단위로 분리되는 것을 목적으로 하기 때문에, C3 컬럼이 분리능면에서 더욱 유리한 효과를 나타낼 수 있다.
- [46] 또한, 상기 컬럼의 온도는 65 내지 80°C, 65°C, 70°C 또는 80°C로 유지하는 것이 분리능 면에서 더욱 좋다.

[47] 한편, 본 발명에 따른 방법에서, 상기 UPLC시 이동상의 용매 구매는, 초기 조건 60% 이동상 (A) 및 40% 이동상(B)에서 시작할 수 있다.

[48] 또한 상기 초기 조건에서, 점차 0% 이동상 (A) 및 100% 이동상(B)로 이동상(B)의 비율을 높여가며 분리할 수 있다.

[49] 이후 다시 상기 초기 조건과 동일하게 60% 이동상 (A) 및 40% 이동상(B)이 되도록 설정하여 안정화 시켜주는 것이 바람직하다.

[50]

[51] 본 발명의 구체적인 일 실시양태로, 시료 주입량을 3 μ l으로 하고, 210 nm의 자외선 검출기를 사용하는 조건으로 UPLC를 수행하는 것이 좋다. 특히, 상기 UPLC시 이동상 용매 구매는 처음 0-2분간 60% 이동상 (A) 및 40% 이동상(B)로, 2~3분까지는 54% 이동상 (A) 및 46% 이동상(B)로, 3~5분까지는 53% 이동상 (A) 및 47% 이동상(B)로, 5~10분까지는 48% 이동상 (A) 및 52% 이동상(B)로, 10~10.1분까지는 20% 이동상 (A) 및 80% 이동상(B)로, 10.1~17.1분까지는 0% 이동상 (A) 및 100% 이동상(B)로, 17.1~25분까지는 60% 이동상 (A) 및 40% 이동상(B)이 되도록 하며, 흐름속도는 0.4 mL/min으로 조절하는 것이 FSH의 단일 글리코실화된 형태를 분리하는데 있어 보다 바람직하다.

[52]

[53] 본 발명의 일 구현예에서, 구체적인 UPLC 수행 조건은 하기와 같다.

[54] 1. 기기: UPLC system

[55] 2. Column: C3 UPLC Column

[56]

[57] 본 발명의 일 구현예에서, 더욱 구체적인 UPLC 수행 조건은 하기와 같다.

[58] 1. 기기: UPLC System (Waters, Acquity™) 또는 UPLC System (Agilent, 1290 Series)

[59] 2. Column: C3 UPLC Column

[60] 3. Injection Volume: 3 μ l

[61] 4. UV Detection: 210 nm

[62] 5. 이동상 A: 0.1% TFA in Water

[63] 6. 이동상 B: 0.1% TFA in 40% Acetonitrile

[64] 7. Flow Rate: 0.4 mL/min

[65]

[66] 추가적인 양태로서, 본 발명에 따른 분석 방법에서는, 상기 단계 이후, 분리된 FSH의 단일 글리코실화된 형태를 함량을 측정하고 정량화하기 위하여 Q-TOF 질량분석법(Q-TOF Mass Spectrometry)을 사용할 수 있다. Q-TOF 질량분석법은 통상의 방법에 의해 수행될 수 있다.

[67]

[68] 구체적인 일 양태에서, 본 발명 따른 방법은 당 제거 공정을 사전에 거치지 않고 수행되는 것을 특징으로 한다.

[69] 구체적이고 일 양태에서, 본 발명 따른 방법은 어떠한 전처리 공정을 거치지 않고 수행되는 것을 특징으로 한다.

[70]

[71] 종래에, FSH 분석 방법으로서 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏을 사용하여 뇌하수체 및 뇨 hFSH 제제의 FSH를 분석한 결과가 보고된 바 있다(Victor Y. Butnev, 등, Molecular and Cellular Endocrinology, 2015, Vol. 405, 42-51). 상기 논문의 결과에서 확인할 수 있는 바와 같이, SDS-PAGE, 웨스턴 블랏과 같은 분석방법에 의하는 경우 나타나는 밴드의 위치로부터 대략적인 크기는 확인 가능하나, 정확한 함량과 분자량을 파악할 수 없어, FSH의 정확한 함량을 정량적으로 분석하는 것은 어렵다는 단점이 있다. 본 발명은 이와 달리 종래 정량적으로 분석이 어려웠던 FSH의 단일 글리코실화된 형태를, 당을 떼어내지 않고도 정확성과 재현성을 가지고 정량적으로 평가할 수 있다는 장점을 갖는다.

[72]

[73] 다음의 실험예를 참조하여 본 발명을 더 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되며, 달리 명시하지 않는 한, 제한하려는 것이 아니다. 따라서, 본 발명이 다음의 실시예로 제한되는 것으로 해석해서는 결코 안되며, 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 모든 변형을 포함하는 것으로 해석해야 한다.

[74] 추가의 설명없이, 당업자라면 앞서의 설명 및 다음의 예시적인 실시예를 사용하여 본 발명의 화합물을 제조하고 이용할 수 있으며, 청구된 방법을 실시할 수 있다고 생각된다. 다음의 실시예는 본 발명의 다양한 측면을 구체적으로 지적하며, 본 발명의 나머지를 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석하지 않아야 한다.

발명의 실시를 위한 형태

[75] [실시예]

[76] 본 실험에서는 rhFSH의 알파와 베타 서브유닛의 단일 글리코실화된 형태의 상대 함량 분석법을 개발하였다. 분석 Column 종류를 선정하고, UPLC 분석 조건들을 확립하였고, 각 Peak를 Mass Spectrometry를 이용하여 동정(Identification)하였다. 최종 선정된 분석법에 대한 Qualification 시험으로 Specificity, Repeatability, Intermediate Precision (Day & Equipment) 항목을 수행하였다.

[77]

[78] 참고예 1.

[79] 1-1. 시험 물질 (Samples)

[80] 시험 물질인 rhFSH는 다음 표 1과 같다.

[81] [표1]

rhFSH ¹⁾	농도 (mg/mL)	Excipient ²⁾
시험 물질 1	1.2	정제수
시험 물질 2	3.5	정제수

	시험 물질 3	7.9	정제수
[82]	1) 모든 시료는 LG화학 익산 공장에서 생산되었다.		
[83]	2) 모든 시료는 정제수로 농축 및 탈염하였다.		
[84]			
[85]	1-2. 시약 및 장비 (Reagent and Equipment)		
[86]	실험에 사용된 시약 및 장비의 정보는 다음과 같다.		
[87]	<u>시약</u>		
[88]	HPLC grade Acetonitrile (JT Baker, Cat. No. 9017-03)		
[89]	HPLC grade Water (Burdick & Jackson, Cat. No. AH365-4)		
[90]	TFA (Trifluoroacetic Acid) (Merck, Cat. No. 1.08262.0100)		
[91]	정제수		
[92]			
[93]	<u>장비 및 도구</u>		
[94]	Acquity UPLC+Q-TOF SYNAPT G2 (Waters)		
[95]	UPLC System (Waters, Acquity™)		
[96]	UPLC System (Agilent, 1290 Series)		
[97]	UPLC Glycoprotein Amide (HILIC) Column (Waters, Cat. No. 186007963)		
[98]	C3 UPLC Column (Agilent, Cat. No. 858750-909)		
[99]	C8 UPLC Column (Agilent, Cat. No. 858750-906)		
[100]			
[101]	Sonicator (Branson, 1207K56)		
[102]	Micropipette		
[103]	Volumetric Flask 또는 메스실린더		
[104]	Eppendorf Tube		
[105]			
[106]	<u>실시예 1. 분석 컬럼(Column)의 선정</u>		
[107]	각 서브유닛의 단일 글리코실화된 형태를 분리할 수 있는 적절한 분석 Column을 선정하기 위하여 총 3개의 Column을 비교 시험하였다. 분석 기기는 모두 Waters Aquity UPLC를 이용하였다.		
[108]			
[109]	<u>1-1. HILIC Column</u>		
[110]	당단백질 분석용인 HILIC Column을 이용하여 아래의 조건으로 단일 글리코실화된 형태의 분리 정도를 시험하였다.		
[111]	- Column: UPLC Glycoprotein Amide Column		
[112]	- 시료: 시험 물질 1 (0.5 mg/mL이 되도록 정제수로 희석함.)		
[113]	- 이동상 A: 0.1% TFA in Water		
[114]	- 이동상 B: 0.1% TFA in ACN		

- [115] - Injection Volume: 1 μ L
 [116] - Column 온도: 45°C
 [117] - Flow rate: 0.2 mL/min
 [118] - UV detection : 214 nm
 [119] - Gradient (표 2)
 [120] [표2]

시간 (min)	이동상 A %	이동상 B%
0.0	15	85
0.5	15	85
1.0	33	67
21.0	40	60
22.0	100	0
24.0	100	0
25.0	15	85
35.0	15	85

- [121] 위의 조건으로 분석한 UV Chromatogram을 도 1에 나타내었다. 알파와 베타 서브유닛의 N-글리칸의 Heterogeneity에 의해 매우 많은 Peak이 검출되고 이들이 서로 분리되지 않은 형태로 나타난 것을 확인할 수 있었다.
- [122] 따라서, 당의 Heterogeneity를 감소시키기 위해 뉴라미니데이즈(Neuraminidase)를 처리하여 뉴라민산(Neuraminic Acid)을 제거하고 분석하였다. 분석 조건은 아래와 같다.
- [123] - Column: UPLC Glycoprotein Amide Column
 [124] - 시료: 시험 물질 1 (2 mg/mL, 30 μ L에 Neuraminidase 1.2 μ L 넣고, 37°C에서 18 시간 반응시킴)
 [125] - 이동상 A: 0.1% TFA in Water
 [126] 이동상 B: 0.1% TFA in ACN
 [127] - Injection Volume: 1 μ L
 [128] - Column 온도: 45°C
 [129] - Flow rate: 0.2 mL/min
 [130] - UV detection : 214 nm
 [131] - Gradient(표 3)
 [132] [표3]

시간 (min)	이동상 A%	이동상 B%
0.0	20	80
0.5	20	80

1.0	35	65
46.0	43	57
47.0	100	0
49.0	100	0
50.0	20	80
60.0	20	80

[133] 위의 조건으로 분석한 UV Chromatogram을 도 2에 나타내었다. 앞부분에 베타 서브유닛에 N-글리칸이 1개 존재하는 β -1 N-글리칸 과 알파 서브유닛에 N-글리칸이 2개와 1개가 존재하는 α -1 N-글리칸 및 α -2 N-글리칸 Peak이 같이 섞여서 검출된다. 뒷부분에는 베타 서브유닛에 N-글리칸이 2개 존재하는 β -2 N-글리칸 Peak이 검출된다. 이 조건 역시 뉴라민산(Neuraminic acid)에 의한 Heterogeneity는 감소하였지만, 여전히 남은 N-글리칸에 의해 Peak가 여러 개 검출되고 서브유닛 별로 분리가 잘 되지 않아 단일 글리코실화된 형태를 정확히 정량하기가 어렵다.

[134] 1-2. RP (C3, C8) Column

[135] C3 및 C8 RP Column을 동일한 분석 조건에서 Test 하여 단일 글리코실화된 형태의 분리 정도를 확인하였다. 분석 조건은 아래와 같다.

[136] - Column: C3 UPLC Column, C8 UPLC Column

[137] - 시료: 시험 물질 2 (1.0 mg/mL이 되도록 정제수로 희석함)

[138] - 이동상 A: 0.1% TFA in Water

[139] 이동상 B: 0.1% TFA in 40% ACN

[140] - Injection Volume: 3 μ L

[141] - Column 온도: 80°C

[142] - Flow rate: 0.4 mL/min

[143] - UV detection: 210 nm

[144] - Gradient(표 4)

[145] [표4]

시간 (min)	이동상 A%	이동상 B%
0.0	60	40
2.0	54	46
3.0	53	47
5.0	49	51
7.0	49	51
10.0	0	100
17.0	0	100

17.1	60	40
25.0	60	40

[146] C3 Column으로 분석한 UV Chromatogram을 도 3에, C8 Column으로 분석한 UV Chromatogram을 도 4에 나타내었다. 우선 알파와 베타 서브유닛이 서로 분리되고 각 서브유닛은 Main Peak (Di-glycosylated form)과 그 뒤에 단일 글리코실화된 형태가 분리되어 검출된다. C3와 C8 Column 모두 전체적으로 유사한 Profile을 보이므로 단일 글리코실화된 형태를 정량 분석하는데 사용할 수 있음을 확인하였다. C8 Column은 C3 Column 보다 Peak가 Broad하게 나타나 C3 Column을 이용한 분석 결과의 피크를 동정하였다.

[147] 1-3. C3 Column을 이용한 분석 결과의 피크 동정(Peak Identification)

[148] 도 3의 C3 Column 분석 결과에서 각 Peak의 Identification을 위해 UPLC-Q-TOF을 이용하여 동일한 조건으로 UPLC로 분리하면서 Q-TOF으로 각 Peak의 분자량을 측정하였다.

[149] UPLC-Q-TOF을 이용하여 분석한 UV Chromatogram을 도 5에 나타내었고, 각 Peak의 Deconvoluted Mass Spectrum을 도 6과 도 7에 나타내었다.

[150]

[151] [표5]

베타 서브유닛 피크의 중량 수치

Peak No.	N-glycan Structure	Theoretical Mw (Da)		Delta (Da) ¹⁾	
		-NS ²⁾	+NS ³⁾	-NS	+NS
1	A2G2FS2+A2G2FS2	16976.07	17177.25	-0.40	-0.07
2	A2G2FS2+A3G3FS2	17341.39	17542.57	0.11	0.06
3	A2G2FS2+A3G3FS3	17632.65	17833.83	-0.04	-0.04
4	A3G3FS2+A3G3FS3	17997.97	18199.15	-0.44	-0.14
5	A3G3FS3+A3G3FS3	18289.23	18490.41	-0.19	-0.04
6	A3G3FS3+A4G4FS3	18654.63	18855.73	-0.12	0.02
7	A3G3FS3+A4G4FS4	18945.89	19146.99	-0.85	0.06
8	A4G4FS3+A4G4FS4	19311.21	19512.31	-0.94	-0.09

[152] 1) Delta = Experimental Mw - Theoretical Mw

[153] 2) -NS: N-terminal (Asn-Ser) cleaved Form

[154] 3) +NS: Normal Form

[155] 4) A, 안테나구조(antennary); G, 갈락토오즈(galactose); F, 푸코오즈(fucose); S, 시알산(sialic acid)

[156] [표6]

단일 글리코실화된 베타 서브유닛 피크의 중량 수치

Peak No.	N-glycan Structure	Theoretical Mw (Da)		Delta (Da) ¹⁾	
		-NS ²⁾	+NS ³⁾	-NS	+NS
1	A2G2FS1	14332.73	14533.91	0.43	0.22
2	A2G2FS2	14623.99	14825.17	-0.02	0.08
3	A3G3FS2	14989.31	15190.49	0.10	-0.12
4	A3G3FS3	15280.57	15481.75	0.18	-0.10
5	A4G4FS3	15645.89	15847.07	-0.15	-0.21
6	A4G4FS4	15937.15	16138.33	-0.74	-0.19
7	A4G4FS4+1LN	16302.47	16503.65	-0.14	-0.10
8	A4G4FS4+2LN	16667.79	16868.97	0.08	-0.55

[157] 1) Delta = Experimental Mw - Theoretical Mw

[158] 2) -NS: N-terminal (Asn-Ser) cleaved Form

[159] 3) +NS: Normal Form

[160] 4) A, 안테나구조(antennary); G, 갈락토오스(galactose); F, 푸코오스(fucose); S, 시알산(sialic acid)

[161]

[162] [표 7]

알파 서브유닛 피크의 중량 수치

Peak No.	N-glycan Structure	Theoretical Mw (Da)	Delta (Da) ¹⁾
1	A2G2S1+Man6P	13569.53	0.89
2	A2G2S2+Man5P	13698.65	1.42
3	A2G2S2+Man6P	13860.79	0.84
4	A2G2S1+A2G2S1	14025.03	-0.52
5	A2G2S1+A2G2S2	14316.29	0.00
6	A2G2S2+A2G2S2	14607.54	-0.18
7	A2G2S2+A3G3S1	14681.61	0.07
8	A2G2S2+A3G3S2	14972.87	-0.16
9	A2G2S2+A3G3S3	15264.12	-0.56
10	A3G3S2+A3G3S2	15338.19	0.69
11	A3G3S2+A3G3S3	15629.44	-0.08

12	A3G3S3+A3G3S3	15920.70	0.82
----	---------------	----------	------

[163] 1) Delta = Experimental Mw - Theoretical Mw

[164] 2) A, 안테나구조(antennary); G, 갈락토오즈(galactose); F, 푸코오즈(fucose); S, 시알산(sialic acid)

[165] [표8]

단일 글리코실화된 알파 서브유닛 피크의 중량 수치

Peak No.	N-glycan Structure	Theoretical Mw (Da)	Delta (Da) ¹⁾	
			Mono1	Mono2
1	Man5P	11492.88	N.D. ²⁾	1.62
2	Man6P	11655.02	N.D.	1.68
3	A2G2S1	12110.55	-0.14	-0.56
4	A2G2S2	12401.81	-0.77	-0.40
5	A3G3S1	12476.15	-1.55	-0.96
6	A3G3S2	12767.15	-0.11	-0.19
7	A4G2FS2	12954.34	0.07	N.D.
8	A3G3S3	13058.40	-0.41	-0.68

[166] 1) Delta = Experimental Mw - Theoretical Mw

[167] 2) N.D.: Not detected

[168] 3) A, 안테나구조(antennary); G, 갈락토오즈(galactose); F, 푸코오즈(fucose); S, 시알산(sialic acid)

[169]

[170] [표9]

산화된 알파 서브유닛 피크의 중량 수치

Peak No.	N-glycan Structure	Theoretical Mw (Da)	Delta (Da) ¹⁾	
			Oxi1	Oxi2
1	A2G2S1+Man6P	13585.53	1.65	0.24
2	A2G2S2+Man5P	13714.65	0.81	1.86
3	A2G2S2+Man6P	13876.79	N.D. ²⁾	-0.10
4	A2G2S1+A2G2S1	14041.03	0.49	3.06
5	A2G2S1+A2G2S2	14332.29	-0.30	0.53
6	A2G2S2+A2G2S2	14623.54	0.57	-1.13
7	A2G2S2+A3G3S1	14697.61	3.09	N.D.

8	A2G2S2+A3G3S2	14988.87	-0.64	1.32
9	A2G2S2+A3G3S3	15280.12	0.89	1.89
10	A3G3S2+A3G3S2	15354.19	0.72	1.36
11	A3G3S2+A3G3S3	15645.44	1.46	N.D.
12	A3G3S3+A3G3S3	15936.70	N.D.	N.D.

[171] 1) $\Delta = \text{Experimental Mw} - \text{Theoretical Mw}$

[172] 2) N.D.: Not detected

[173] 3) A, 안테나구조(antennary); G, 갈락토오스(galactose); F, 푸코오스(fucose); S, 시알산(sialic acid)

[174]

[175] **실시예 2. 구배 시험(Gradient Test)**

[176] C3 컬럼을 이용하여 단일 글리코실화된 형태가 가장 잘 분리되는 조건을 찾기 위해 구배를 변경하여 시험하였다. 총 4개의 구배 조건(표 10)을 시험하였고, 각 조건으로 분석한 UV Chromatogram 결과는 도 8에 나타내었다. 4개의 구배 조건 모두 알파 서브유닛(Alpha)과 베타 서브유닛(Beta)에서 단일 글리코실화된 형태가 잘 분리되는 것을 확인하였다. 구배 3과 4는 베타 서브유닛(Beta)과 단일 글리코실화된 베타 서브유닛(Beta-Mono) 피크가 구배 1과 2 보다 Sharp 하지만, 베타 서브유닛(Beta)과 단일 글리코실화된 베타 서브유닛(Beta-Mono) Peak의 해상도(Resolution)는 구배 1과 2에서 더 좋은 것으로 보여졌다. 구배 1과 2 중에서는 구배 1의 베타 서브유닛(Beta)과 단일 글리코실화된 베타 서브유닛(Beta-Mono)의 피크가 구배 2에 비교하여 Broad 하게 나타났다.

[177]

[178] [표10]

1) Gradient 1

Time	Flow(mL/min)	A %	B %
Initial	0.4	60	40
2	0.4	54	46
3	0.4	53	47
5	0.4	49	51
7	0.4	49	51
10	0.4	0	100
17	0.4	0	100
17.1	0.4	60	40
25	0.4	60	40

2) Gradient 2

Time	Flow(mL/min)	A %	B %
Initial	0.4	60	40
2	0.4	54	46
3	0.4	53	47
5	0.4	48	52
7	0.4	48	52
10	0.4	20	80
10.1	0.4	0	100
17	0.4	0	100
17.1	0.4	60	40
25	0.4	60	40

3) Gradient 3

Time	Flow(mL/min)	A %	B %
Initial	0.4	60	40
2	0.4	51	49
3	0.4	47	53
3.5	0.4	47	53
8	0.4	10	90
8.1	0.4	0	100
15	0.4	0	100
15.1	0.4	60	40
25	0.4	60	40

4) Gradient 4

Time	Flow(mL/min)	A %	B %
Initial	0.4	60	40
2	0.4	51	49
2.5	0.4	47	53
3	0.4	46	54
8	0.4	10	90
8.1	0.4	0	100
15	0.4	0	100
15.1	0.4	60	40
25	0.4	60	40

[179]

[180]

[181]

실시예 3. 컬럼 온도 시험(Column Temperature Test)

C3 컬럼을 이용하여 단일 글리코실화된 형태가 가장 잘 분리되는 조건을 찾기 위해 컬럼 온도 시험을 진행하였다. 제조사에서 안내하는 컬럼의 사용 가능한 최대 온도는 80°C이다. 그에 따라 총 60°C, 65°C, 70°C, 80°C 4개의 온도 조건을 시험하였고, 각 조건으로 분석한 UV Chromatogram 결과는 도 9에 나타내었다. 4개의 컬럼 온도 조건 모두 알파 서브유닛(Alpha) 및 단일 글리코실화된 알파 서브유닛은(Alpha-mono)는 분리가 잘 되었으나, 베타 서브유닛(Beta)에서는 60°C의 경우 해상도(Resolution)가 좋지 않아 단일 글리코실화된 베타 서브유닛(Beta-Mono) 피크가 명확하지 않았다. 65°C, 70°C, 80°C에서는 모두 단일 글리코실화된 형태가 분리되어 검출되는 것을 확인하였고, 온도가 높아질수록 더 높은 분리능으로 보였다. 이로부터 65°C ~ 80°C 범위에서의 컬럼 온도 조건에서 본 분석은 가능할 것으로 판단되었다.

[182]

[183]

[184]

실시예 4. 최종 분석법

시험 결과에 따라 도출된 본 발명에 따른 분석 방법은 다음과 같이 정리되었다.

[185]

[186] 4-1. 실험 방법

[187] 4-1-1. 시료 준비

[188] 시료는 정제수를 이용하여 최종 농도 1.0 mg/mL, 총 부피는 50 μ L가 되도록 희석한다.

[189] 4-1-2. UPLC 분석 조건

[190] - Column: C3 UPLC Column

[191] - Column 온도: 80°C

[192] - Injection Volume: 3 μ L

[193] - UV Detection: 210 nm

[194] - 이동상 A: 0.1% TFA in Water

[195] - 이동상 B: 0.1% TFA in 40% Acetonitrile

[196] - Flow Rate: 0.4 mL/min

[197] - Gradient (표 11)

[198] [표11]

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)
0	60	40
2	54	46
3	53	47
5	48	52
7	48	52
10	20	80
10.1	0	100
17	0	100
17.1	60	40
25	60	40

[199]

[200] 4-1-3. 최종 분석법 결과

[201] 최종 분석법으로 분석한 시험 물질 2의 UV chromatogram을 도 10에 나타내었고, 베타와 알파 서브유닛의 각 단일 글리코실화된 형태의 상대 함량을 계산하여 표 12에 정리하였다. 시험 물질 2의 베타 단일 글리코실화된 형태의 함량은 31.0%, 알파 단일 글리코실화된 형태의 함량은 2.5%이었다.

[202]

[203] [표12]

베타 및 알파 서브유닛의 단일 글리코실화된 형태의 상대적인 함량

샘플	상대적인 함량(Relative Content) (%)			
	베타 서브유닛		알파 서브유닛	
	Main peak	단일 글리코 실화된 형태	Main peak	단일 글리코 실화된 형태
시험 물질 2	69.0	31.0	97.5	2.5

[204]

[205] 실시예 5. 분석법의 검정(Qualification)

[206] 최종 분석법의 Qualification을 위해 특이성(Specificity), 반복가능성(Repeatability), 실험실내 정밀성(Intermediate Precision) 항목에 대한 시험을 수행하였다. 특이성과 반복가능성은 Waters 사 UPLC를 이용하여 수행하였고, 실험실내 정밀성은 시험 일자별, 기기간 정밀성을 Waters 사 UPLC와 Agilent 사 UPLC를 이용하여 수행하였으며, 컬럼 온도는 모두 80°C를 적용하였다.

[207]

[208] 5-1. 특이성(Specificity)

[209] 최종 분석법의 특이성을 확인하기 위해 rhFSH (시험 물질 2)와 시료 희석 시 사용되는 정제수를 같이 분석하였고, 각 UV Chromatogram을 도 11에 정리하였다.

[210] rhFSH 시료에서는 베타 및 알파 서브유닛 피크와 단일 글리코실화된 베타/알파 서브유닛 피크가 각각 나타났고, 정제수만 주입한 UV Chromatogram에서는 rhFSH 시료 Peak에 간섭을 주는 Peak가 검출되지 않았다.

[211]

[212] 5-2. 반복가능성(Repeatability)

[213] 분석법의 반복가능성을 확인하기 위해 rhFSH (시험 물질 2) 시료를 각각 세 번 희석하여 분석하였다. UV Chromatogram은 도 12에 정리하였고, 각 펩타이드 피크에 대한 머무름 시간(Retention Time)과 상대 함량은 표 13 및 14에 각각 정리하였다. 세 번의 실험에서 전체 Peak Profile은 서로 유사하였고, 주요 Peak들의 머무름 시간(Retention Time)은 1 분 이내에서 일치하였다. 베타와 알파의 단일 글리코실화된 형태의 함량은 각각 30.8%, 2.5% 이었고, %RSD는 1.4%, 0.0% 이었다.

[214]

[215] [표13]

반복가능성 시험 결과(머무름시간)

샘플		머무름 시간(min)			
		베타 서브유닛		알파 서브유닛	
		Main peak	단일 글리코 실화된 형태	Main peak	단일 글리코 실화된 형태
시험 물질 2	1	2.82	5.29	8.78	9.05

	2	2.82	5.23	8.78	9.05
	3	2.81	5.23	8.78	9.05
Average		2.82	5.25	8.78	9.05
%RSD		0.2	0.7	0.0	0.0

- [216] [표14]
반복가능성 시험 결과(상대 함량)

샘플		상대 함량(Relative Content) (%)			
		베타 서브유닛		알파 서브유닛	
		Main peak	단일 글리코 실화된 형태	Main peak	단일 글리코 실화된 형태
시험 물질 2	1	68.7	31.3	97.5	2.5
	2	69.5	30.5	97.5	2.5
	3	69.3	30.7	97.5	2.5
Average		69.2	30.8	97.5	2.5
%RSD		0.6	1.4	0.0	0.0

- [217]
- [218] 5-3. 실험실내 정밀성(Intermediate Precision)
- [219] 5-3-1. 시험 일자별 정밀성
- [220] 시험 일자에 따른 정밀성을 확인하기 위하여 rhFSH (시험 물질 2) 시료를 Waters UPLC (Acquity™) 기기를 이용하여 서로 다른 세 날짜에 실험을 진행하였고, 그 결과를 도 13에 나타내었다.
- [221] 추가로 Agilent UPLC (1290 Series) 에서도 시험 일자별 정밀성을 확인하였고, 그 결과는 도 14에 나타내었다.
- [222] 각 기기에서의 시험 일자별 UV Chromatogram은 전체적으로 Peak들의 머무름 시간 (RT) 차이는 존재하지만, 대체적으로 서로 유사하였다. 각 Peak들의 RT는 표 14 및 15에 정리하였는데, Waters UPLC는 0.3~2.6%의 %RSD를 보였고, Agilent UPLC는 0.5~2.1%의 %RSD를 보였다. 또한, 산화된 알파 서브유닛 피크 (Oxidized Alpha Subunit Peak)의 앞에서 검출되는 단일 글리코실화된 베타 피크와 뒤에서 검출되는 알파 서브유닛 주 피크 (Alpha Subunit Main Peak)와의 상대적 머무름 시간 (Relative Retention Time) RRT를 각각 계산하였고, 표 14 및 15에 같이 정리하였다. Waters UPLC의 경우 산화된 알파/단일 글리코실화된 베타와 산화된 알파/알파 주 피크의 RRT의 %RSD는 2.3%이었고, Agilent 가 각각 0.9%, 1.3%으로 큰 차이를 보이지 않았다. 표 15 및 16에서와 같이 상대 함량(%)을 계산한 결과, Waters UPLC의 각 Peak 상대 함량의 %RSD는 0.2~6.0% 이었고, Agilent

UPLC는 0.0~1.2%로 나타나, 두 기기 모두 6.0% 이내의 %RSD를 보여 시험 일자에 따른 정밀성은 유지되는 것으로 확인되었다.

[223] [표15]

실험실내 정밀성 시험 결과(일, 머무름시간) - Waters (Acquity)

샘플		머무름 시간 (min)					상대적 머무름 시간	
		베타 서브유닛		알파 서브유닛			산화된 알파/단일 글리코실화된 베타	산화된 알파/알파 주 피크
		Main peak	단일 글리코실화된 형태	산화된 알파 서브유닛 ^{a)}	Main peak	단일 글리코실화된 형태		
시험 물질 2	Day-1	2.76	5.70	7.74	8.70	8.99	1.36	0.89
	Day-2	2.74	5.64	7.50	8.66	8.95	1.33	0.87
	Day-3	2.70	5.64	7.35	8.63	8.93	1.30	0.85
	Average	2.73	5.66	7.53	8.66	8.96	1.33	0.87
%RSD		1.1	0.6	2.6	0.4	0.3	2.3	2.3

[224] a) Waters에서 분석시 산화된 알파 서브유닛은 두 개 피크가 검출되고 이 중 먼저 용출(Elution) 되는 피크의 머무름시간만 정리하였다.

[225] [표16]

실험실내 정밀성 시험 결과(일, 머무름시간) - Agilent (1290 Series)

샘플		머무름 시간(min)					상대적 머무름 시간	
		베타 서브유닛		알파 서브유닛			산화된 알파/단일 글리코실화된 베타	산화된 알파/알파 주 피크
		Main peak	단일 글리코실화된 형태	산화된 알파 서브유닛	Main peak	단일 글리코실화된 형태		
시험 물질 2	Day-1	2.69	5.65	6.54	8.39	8.88	1.16	0.78
	Day-2	2.75	5.83	6.72	8.50	8.95	1.15	0.79
	Day-3	2.73	5.84	6.81	8.53	8.97	1.17	0.80

Average	2.72	5.78	6.69	8.47	8.94	1.16	0.79
%RSD	1.1	1.9	2.1	0.9	0.5	0.9	1.3

[226] [표17]

실험실내 정밀성 시험 결과(일, 상대 함량) - Waters (Acquity)

샘플		상대 함량 (%)			
		베타 서브유닛		알파 서브유닛	
		Main peak	단일 글리코 실화된 형태	Main peak	단일 글리코 실화된 형태
시험 물질 2	Day-1	69.0	31.0	97.6	2.4
	Day-2	67.8	32.2	97.5	2.5
	Day-3	67.4	32.6	97.3	2.7
Average		68.1	31.9	97.5	2.5
%RSD		1.2	2.6	0.2	6.0

[227] [표18]

실험실내 정밀성 시험 결과(일, 상대 함량) - Agilent (1290 Series)

샘플		상대 함량 (%)			
		베타 서브유닛		알파 서브유닛	
		Main peak	단일 글리코 실화된 형태	Main peak	단일 글리코 실화된 형태
시험 물질 2	Day-1	66.4	33.6	97.2	2.8
	Day-2	66.5	33.5	97.1	2.9
	Day-3	66.4	33.6	97.2	2.8
Average		66.4	33.6	97.1	2.9
%RSD		0.1	0.1	0.0	1.2

[228]

[229] 5-3-2. 분석 기기간 정밀성

[230] 동일한 시료 및 이동상을 이용하여 Waters UPLC 와 Agilent UPLC 간의 기기간 정밀성을 측정하였다. 시료는 rhFSH (시험 물질 3)을 이용하였고, Waters UPLC (Acquity™)와 Agilent UPLC (1290Series) 기기를 이용하여 분석하였다.

[231] 각 UV Chromatogram은 도 15 및 도 16에 나타내었고, 각 Peak의 상대 함량은 표 19에 정리하였다.

[232] UV Chromatogram 상에서 Waters 와 Agilent UPLC 간에 각 Peak의 Profile은 대체적으로 유사하나 해상도(Resolution) 및 산화된 알파 서브유닛 피크의 위치에

서 차이를 보였다. 이는 기기의 Void Volume 혹은 Injection 방식에 의한 차이로 생각된다. 표 19에서 베타와 알파의 단일 글리코실화된 서브유닛의 상대 함량은 Waters UPLC 가 각각 33.6~37.0%, 3.1~4.0 %로 나타났고, Agilent UPLC 가 각각 33.4~33.5%, 2.7%로 확인되었다. 베타와 알파 단일 글리코실화된 서브유닛 상대 함량의 전체 평균은 각각 34.3%, 3.1% 이었고, %RSD는 각각 4.2%, 16.6%로 나타나 분석 기기간 정밀성이 확보되어 본 분석법은 두 기기에서 모두 적용 가능함을 증명하였다.

[233]

[234]

[표19]

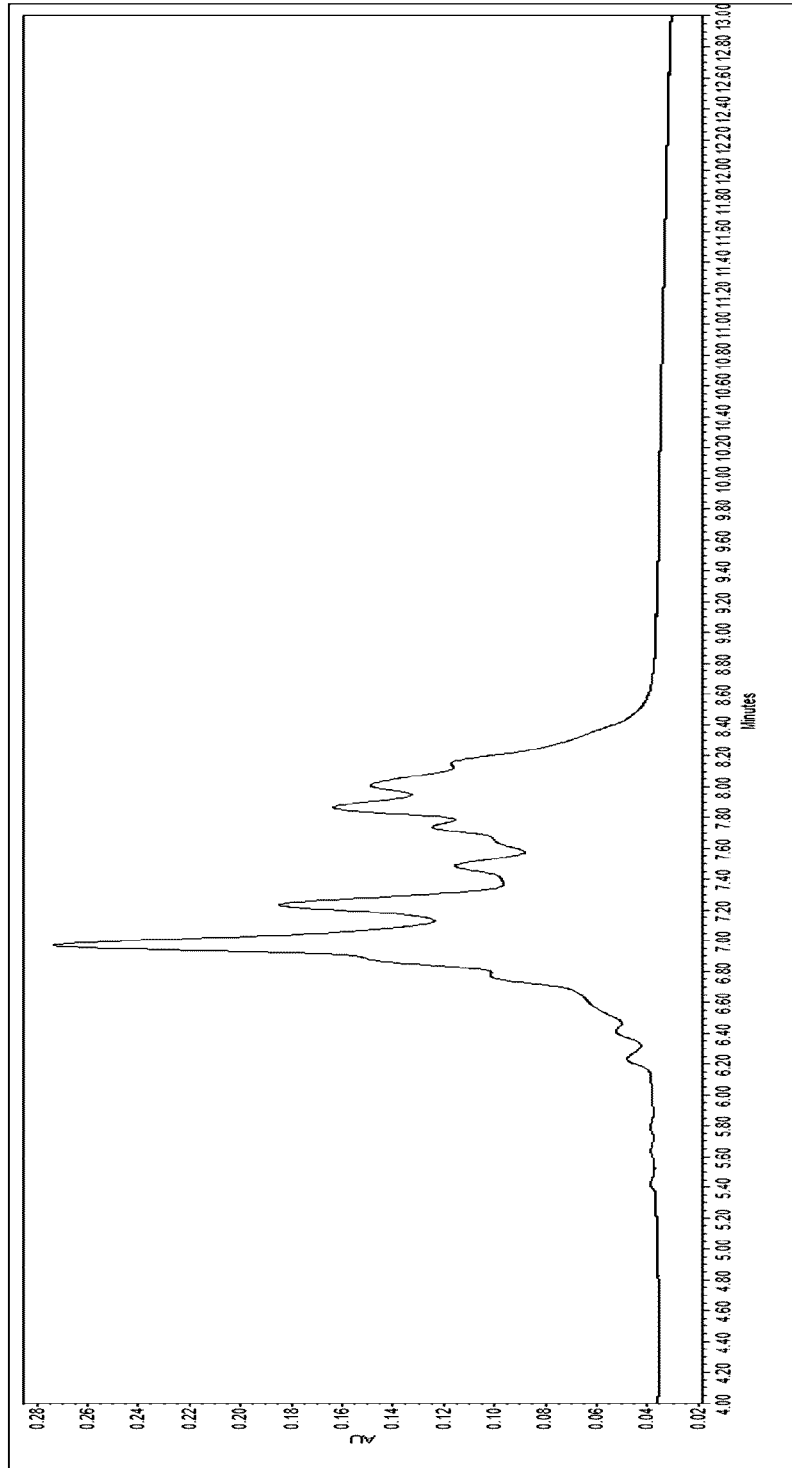
실험실내 정밀성 시험 결과(분석기기)

샘플 (시험 물질 3)		상대 함량(%)			
		베타 서브유닛		알파 서브유닛	
		Main peak	단일 글리코 실화된 형태	Main peak	단일 글리코 실화된 형태
Waters (Acquity)	1	63.0	37.0	96.0	4.0
	2	65.1	34.9	96.8	3.2
	3	66.4	33.6	96.9	3.1
Agilent (1290 Series)	1	66.6	33.4	97.3	2.7
	2	66.5	33.5	97.3	2.7
	3	66.5	33.5	97.3	2.7
Average		65.7	34.3	96.9	3.1
%RSD		2.2	4.2	0.5	16.6

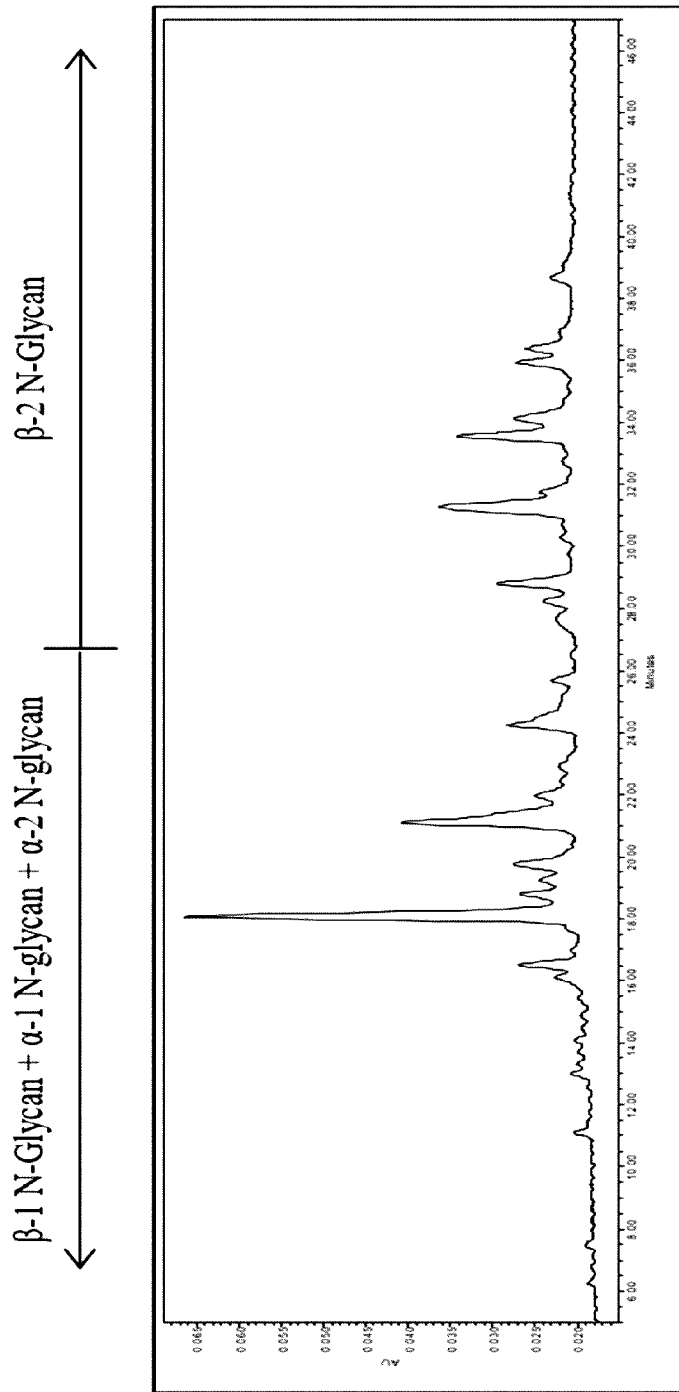
청구범위

- [청구항 1] 분석대상물질을 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC)를 사용하여 난포 자극 호르몬(FSH)의 단일 글리코실화된 형태를 분리하는 단계를 포함하며 상기 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC)는 C3 RP 컬럼 또는 C8 RP 컬럼을 사용하는 것인, 난포 자극 호르몬(FSH)의 단일 글리코실화된 형태의 함량을 분석하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC)는 역상 초고성능 액체 크로마토그래피(RP-UPLC)인 것인, 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC)는 이동상(mobile phase) 용매로 (A) 물에 포함된 0.1%v/v TFA(trifluoroacetic acid) 및 (B) 35 내지 45%v/v ACN(acetonitrile)에 포함된 0.1%v/v TFA를 사용하는 것인, 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC)시 이동상의 용매 구배는, 초기 조건 60% 이동상 (A) 및 40% 이동상(B)에서, 점차 0% 이동상 (A) 및 100% 이동상(B)로 이동상(B)의 비율을 높여가며 분리하며, 이후 다시 초기 조건과 동일하게 60% 이동상 (A) 및 40% 이동상(B)이 되도록 설정하여 안정화 시켜주는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 난포 자극 호르몬(FSH)의 단일 글리코실화된 형태는 FSH의 알파-서브유닛 또는 베타-서브유닛이 단일 글리코실화된 형태인 것인, 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
어떠한 전처리 공정을 거치지 않고 수행하는 것을 특징으로 하는 것인, 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
당 제거 공정을 거치지 않고 수행하는 것을 특징으로 하는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 컬럼의 온도는 65 내지 80°C인 것을 특징으로 하는 것인, 방법.

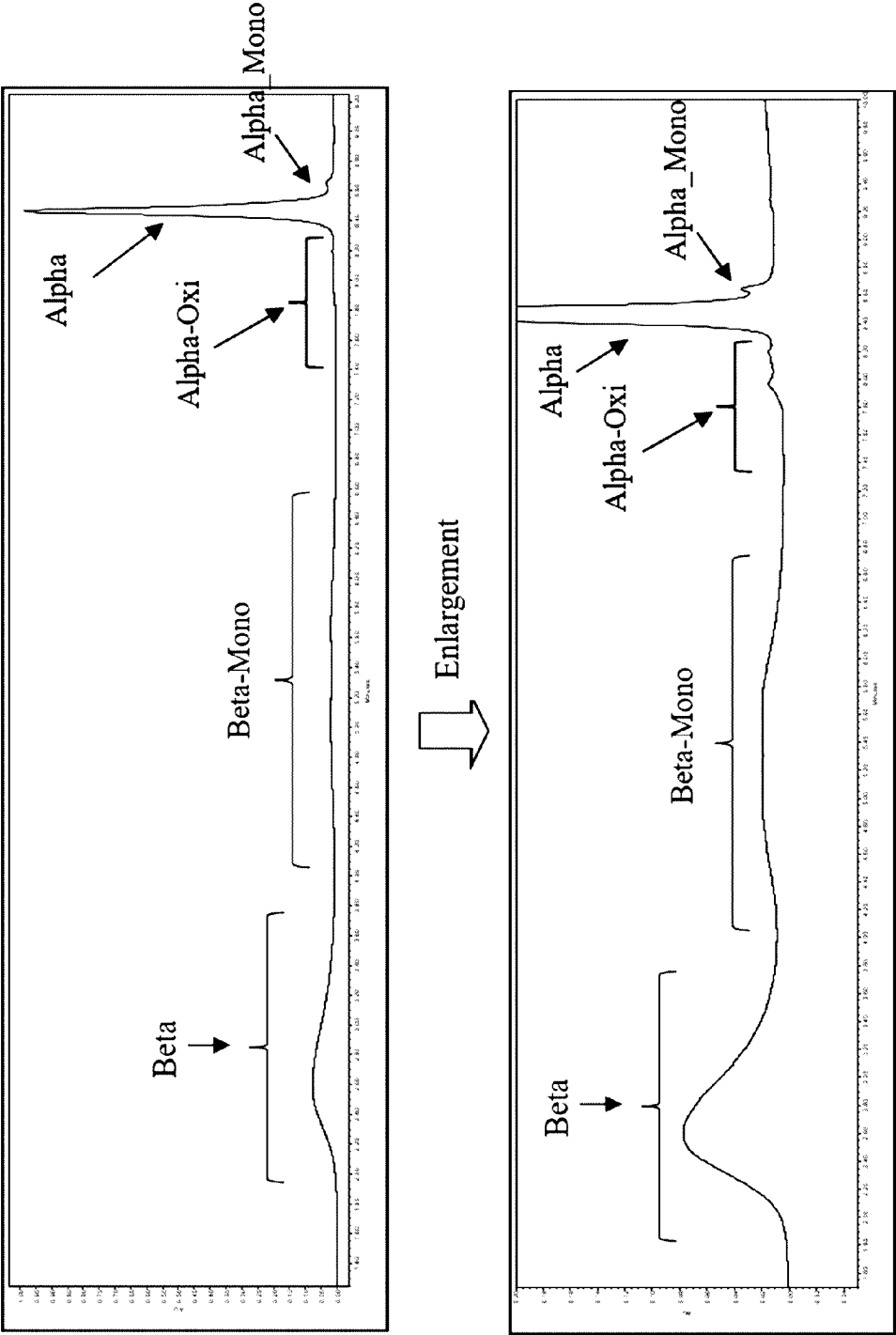
[도 1]



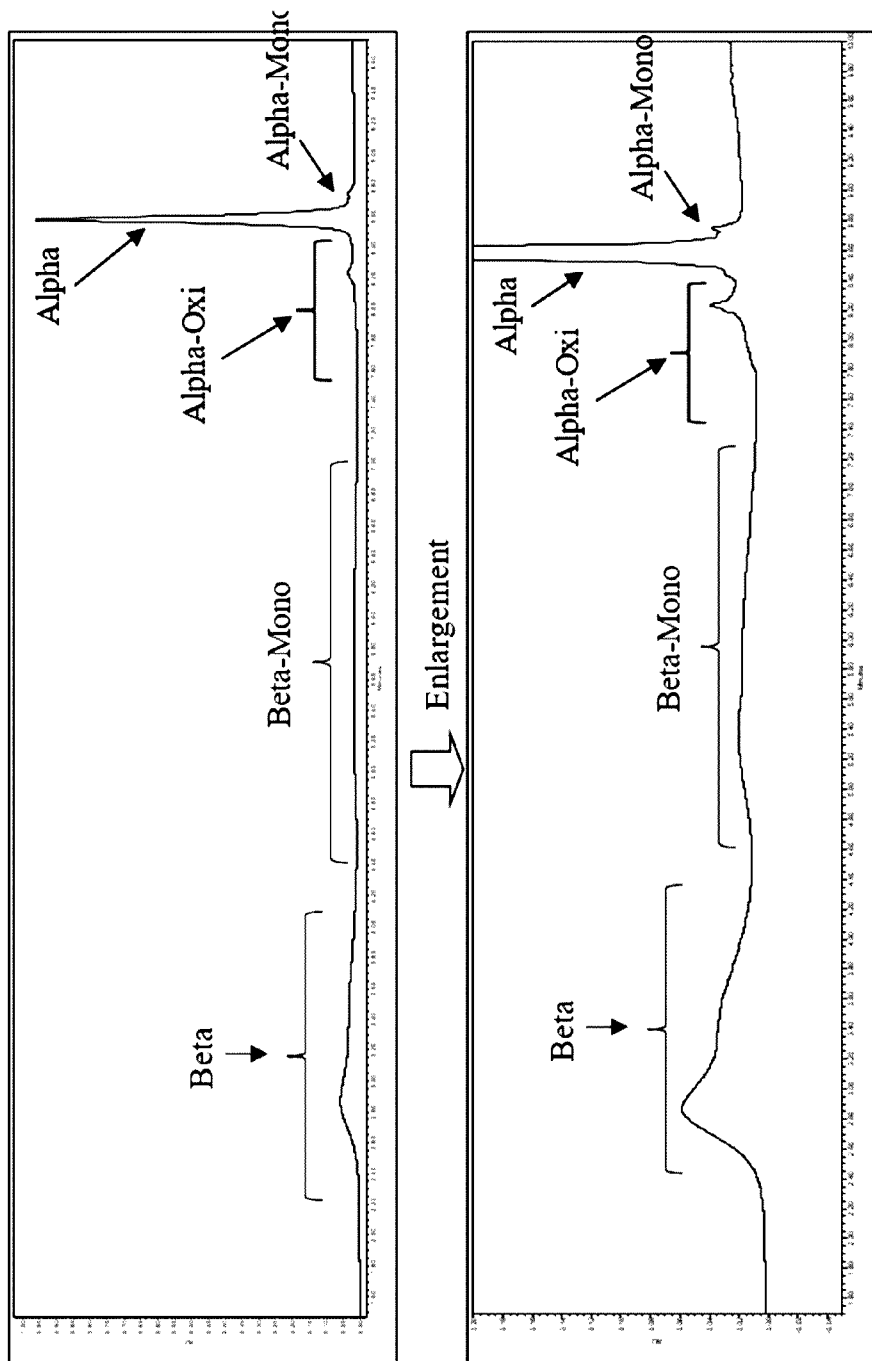
[도2]



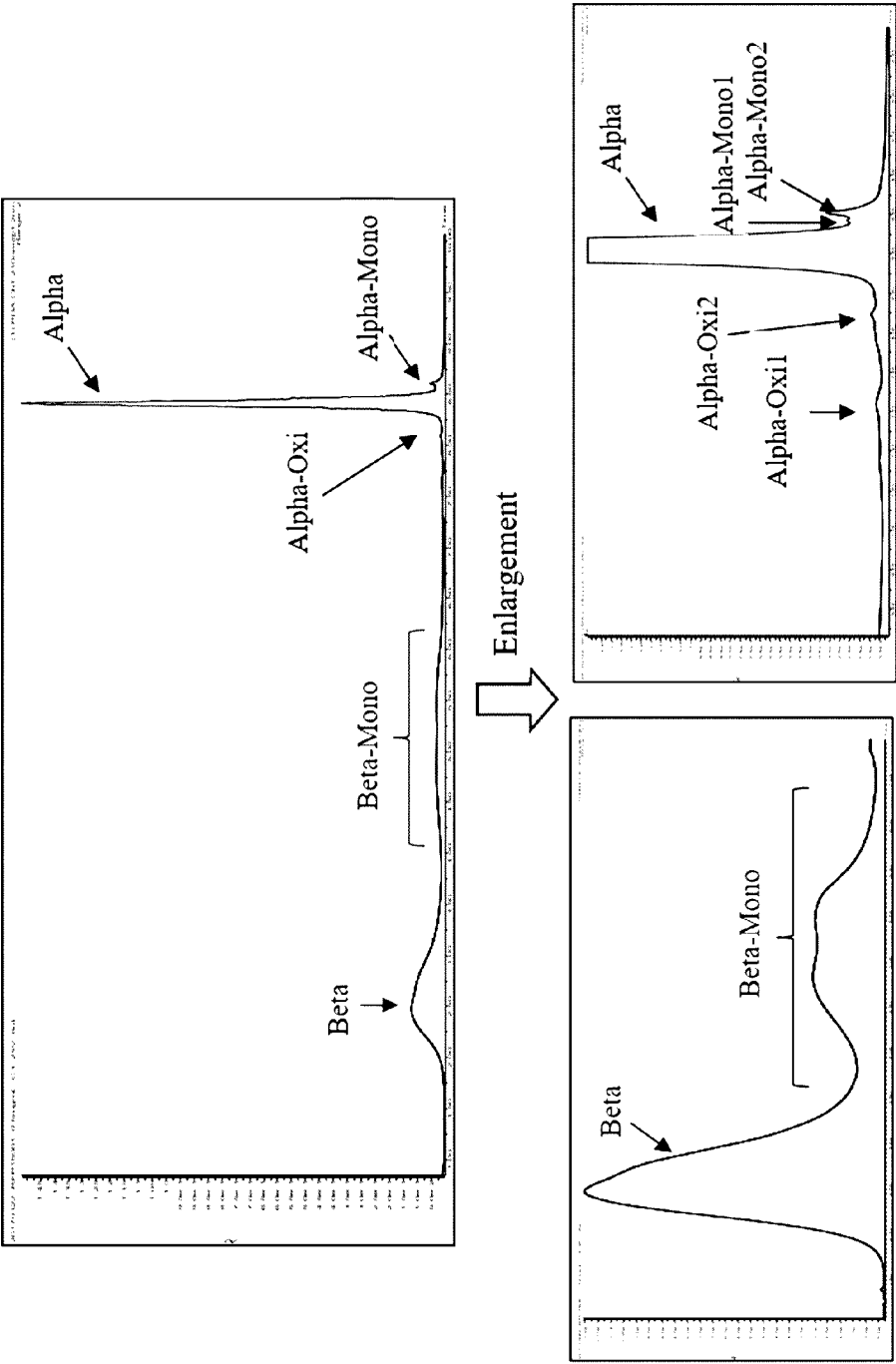
[도3]



[도4]

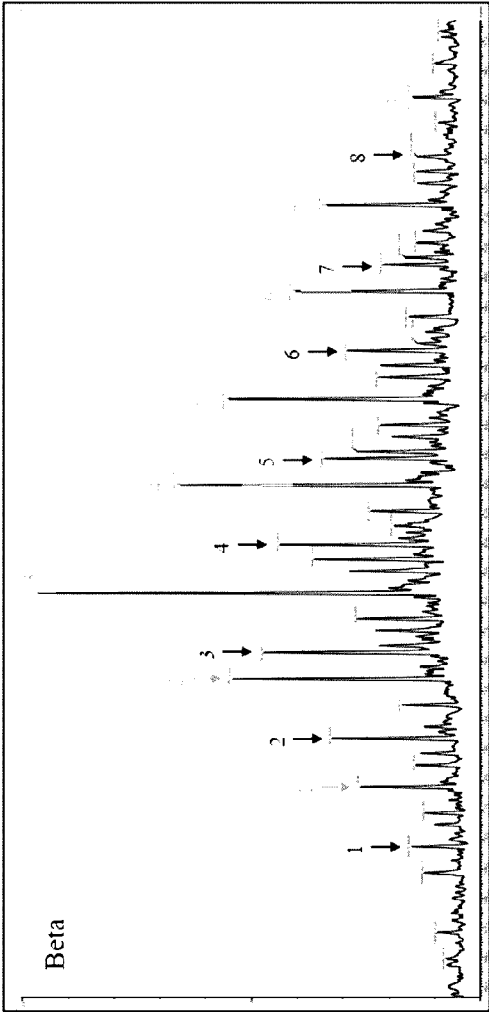


[도5]

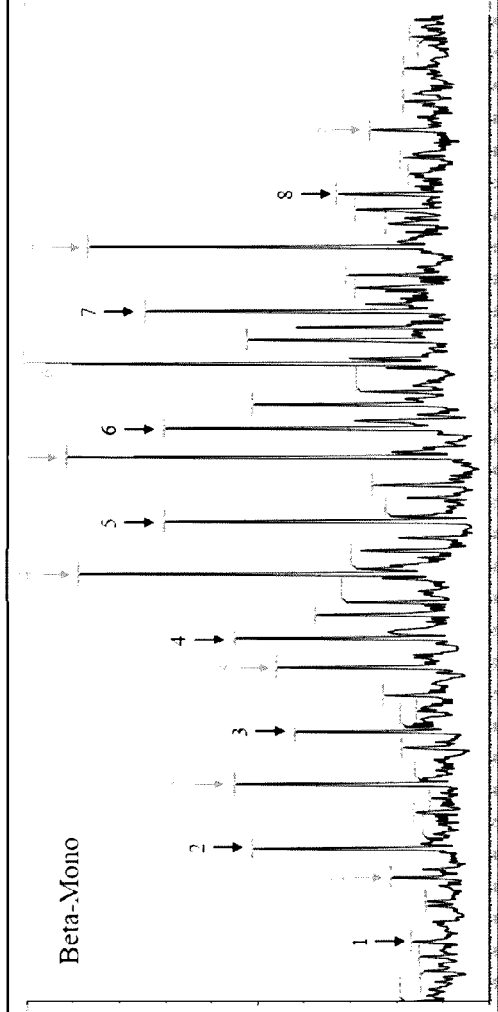


[도6]

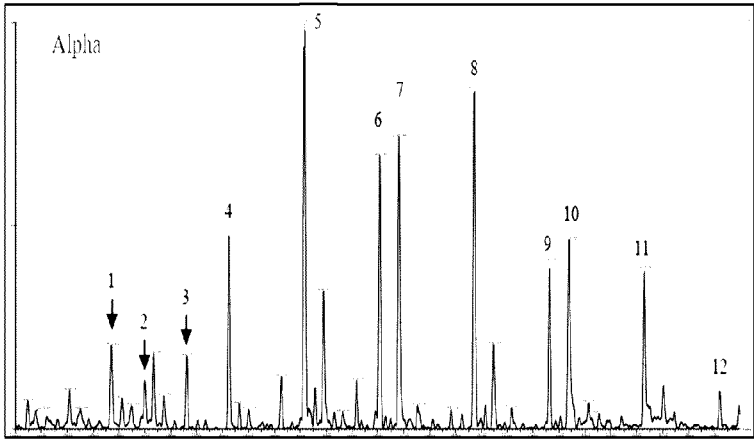
Beta Subunit	
Peak No.	N-glycan Structure
1	A2G2FS2-A2G2FS2
2	A2G2FS2-A3G3FS2
3	A2G2FS2-A3G3FS3
4	A3G3FS2-A3G3FS3
5	A3G3FS3-A3G3FS3
6	A3G3FS3-A4G4FS3
7	A3G3FS3-A4G4FS4
8	A4G4FS3-A4G4FS4



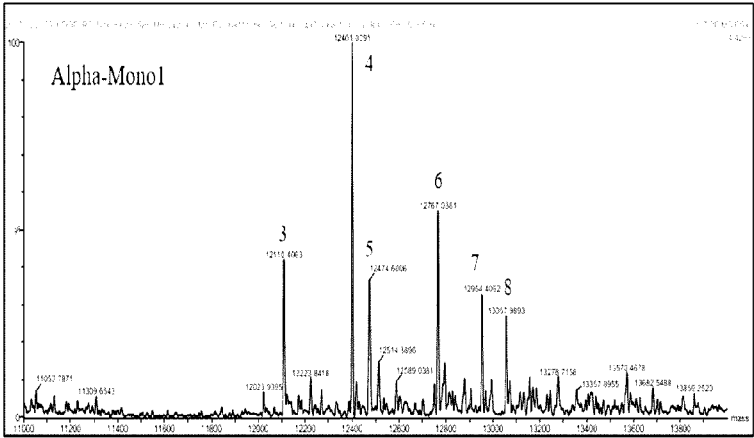
Mono-glycosylated beta Subunit	
Peak No.	N-glycan Structure
1	A2G2FS1
2	A2G2FS2
3	A3G3FS2
4	A3G3FS3
5	A4G4FS3
6	A4G4FS4
7	A4G4FS4-1LN
8	A4G4FS4-2LN



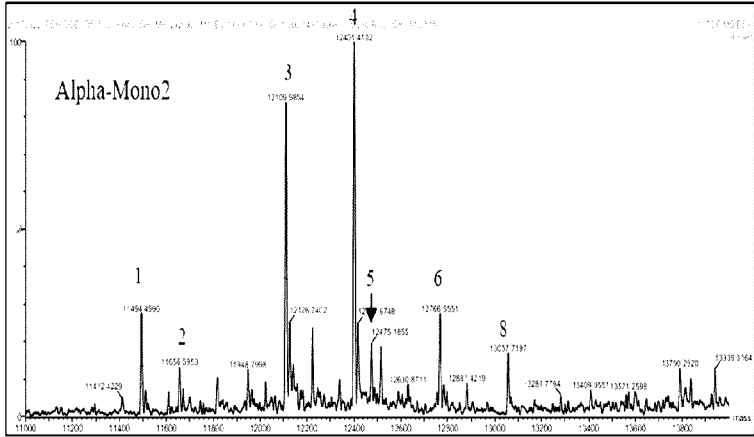
[도7a]



Alpha Subunit	
Peak No.	N-glycan Structure
1	A2G2S1+Man6P
2	A2G2S2+Man5P
3	A2G2S2+Man6P
4	A2G2S1+A2G2S1
5	A2G2S1+A2G2S2
6	A2G2S2+A2G2S2
7	A2G2S2+A3G3S1
8	A2G2S2+A3G3S2
9	A2G2S2+A3G3S3
10	A3G3S2+A3G3S2
11	A3G3S2+A3G3S3
12	A3G3S3+A3G3S3

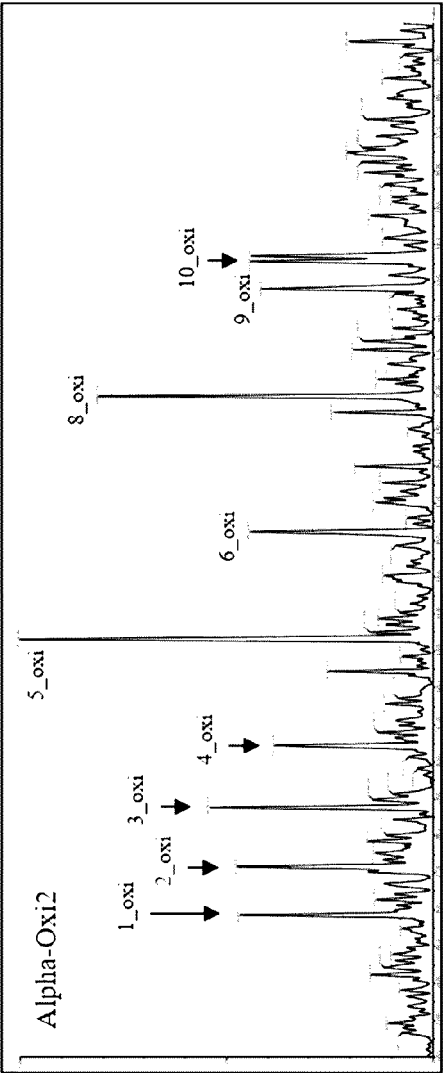
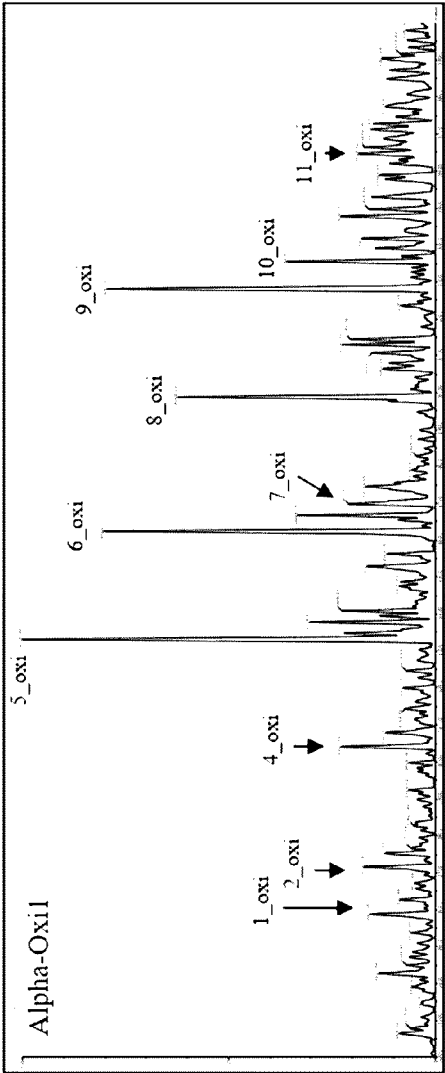


Mono-glycosylated alpha Subunit	
Peak No.	N-glycan Structure
1	Man5P
2	Man6P
3	A2G2S1
4	A2G2S2
5	A3G3S1
6	A3G3S2
7	A4G2FS2
8	A3G3S3

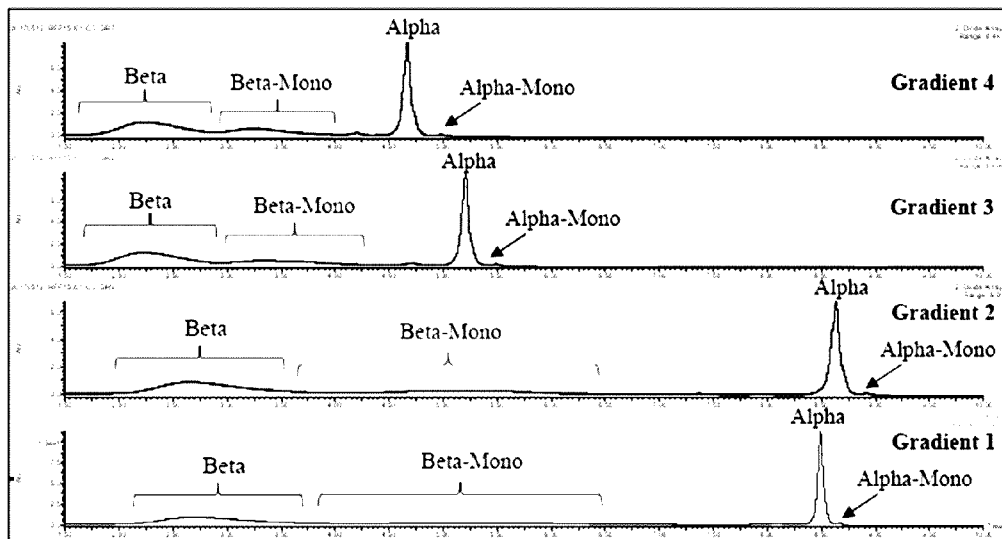


[도7b]

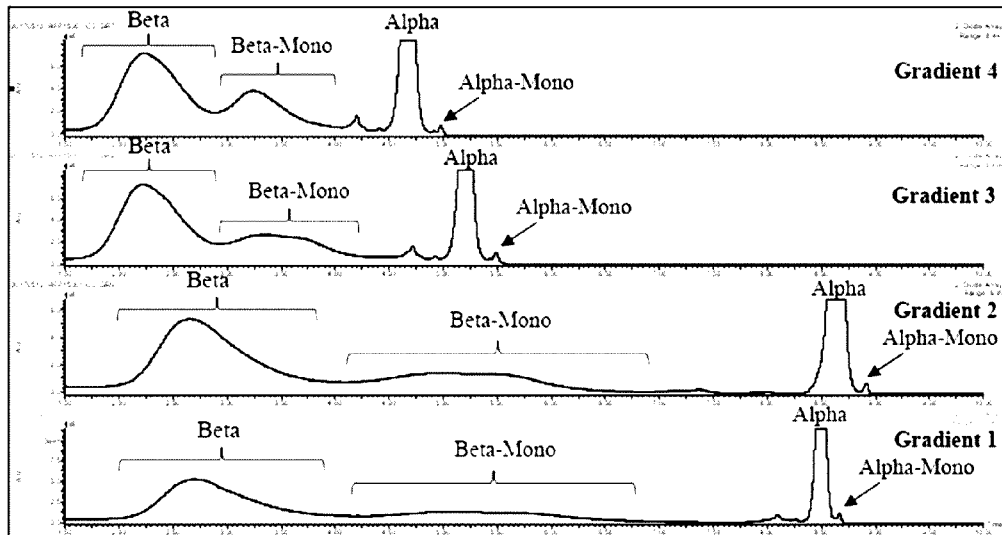
Oxidized alpha Subunit	
Peak No.	N-glycan Structure
1	A2G2S1+Man6P
2	A2G2S2+Man5P
3	A2G2S2+Man6P
4	A2G2S1-A2G2S1
5	A2G2S1-A2G2S2
6	A2G2S2-A2G2S2
7	A2G2S2-A3G3S1
8	A2G2S2-A3G3S2
9	A2G2S2-A3G3S3
10	A3G3S2-A3G3S2
11	A3G3S2-A3G3S3
12	A3G3S3-A3G3S3



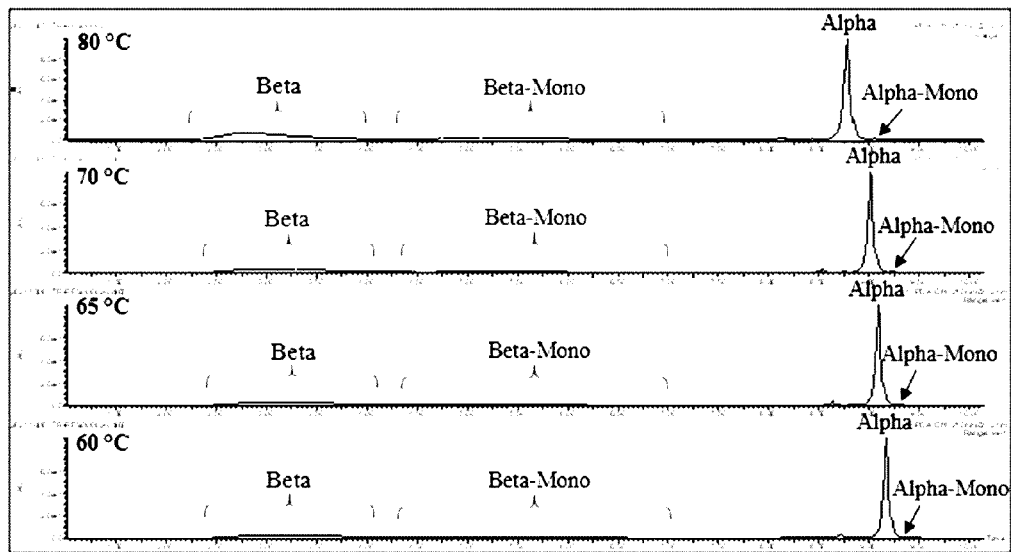
[도8]



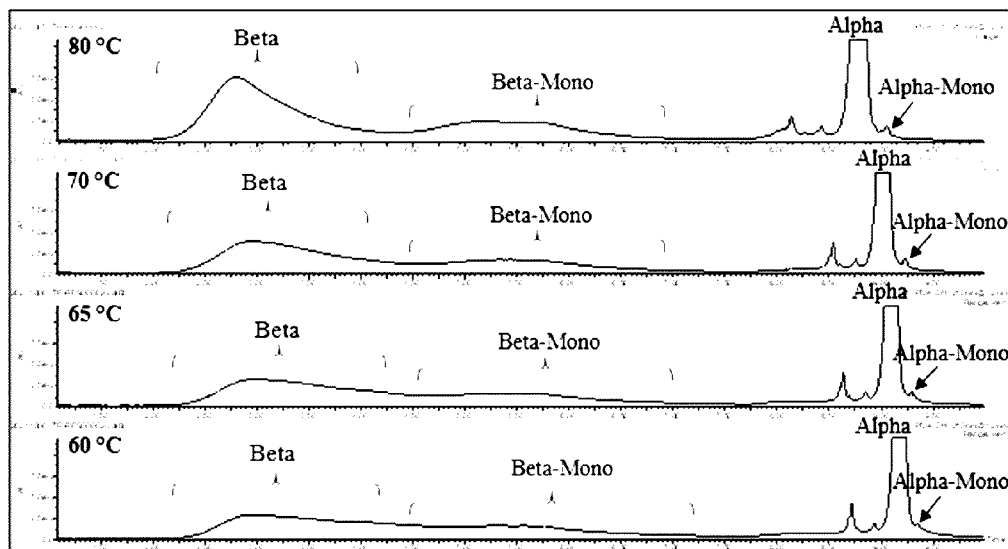
↓ Enlargement



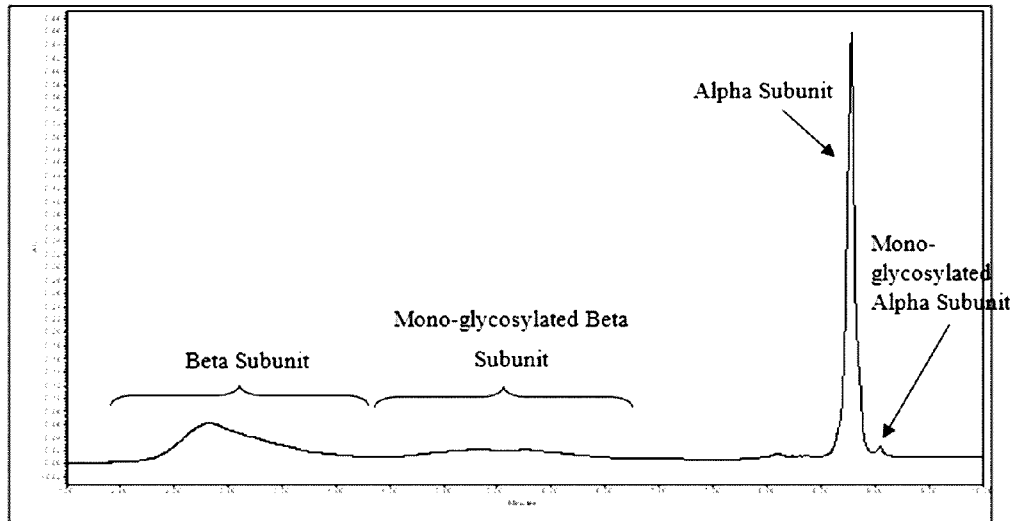
[도9]



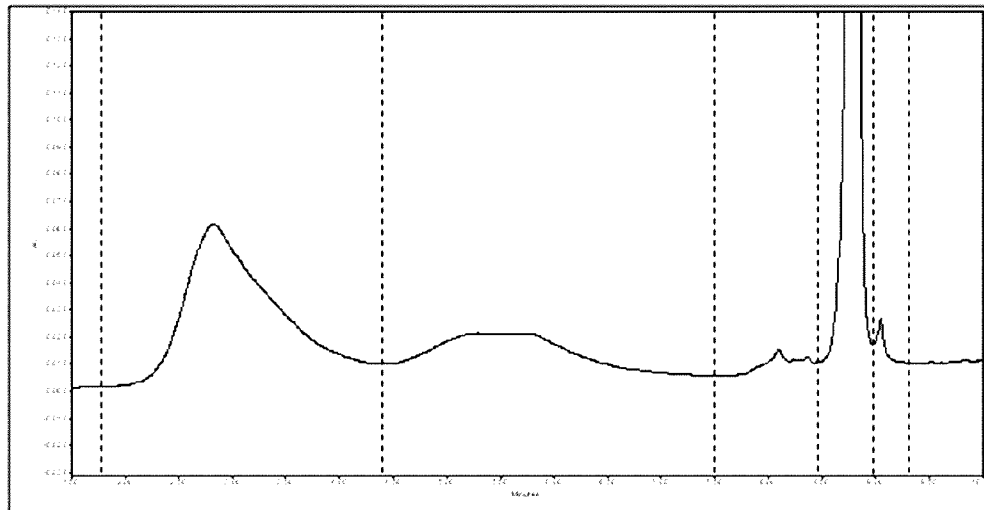
↓ Enlargement



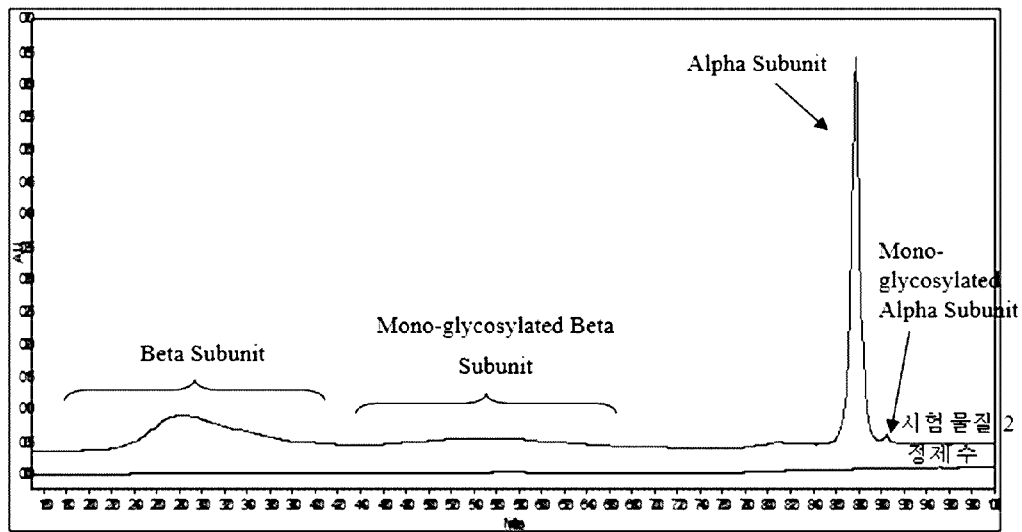
[도 10]



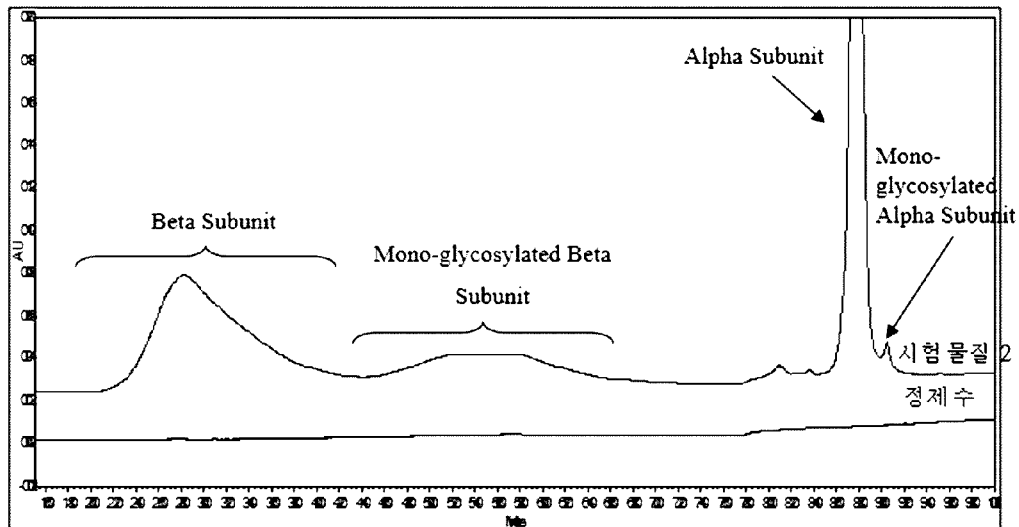
↓ Enlargement



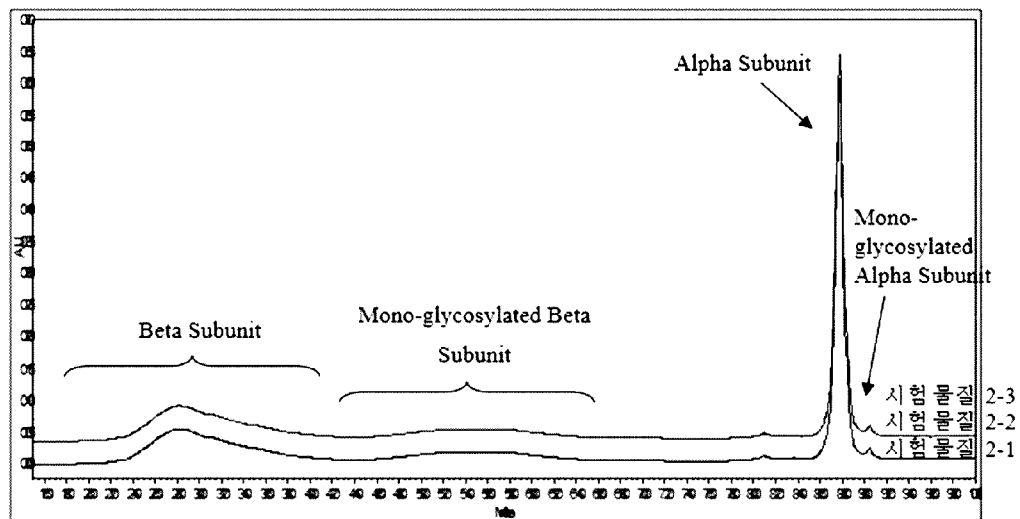
[도11]



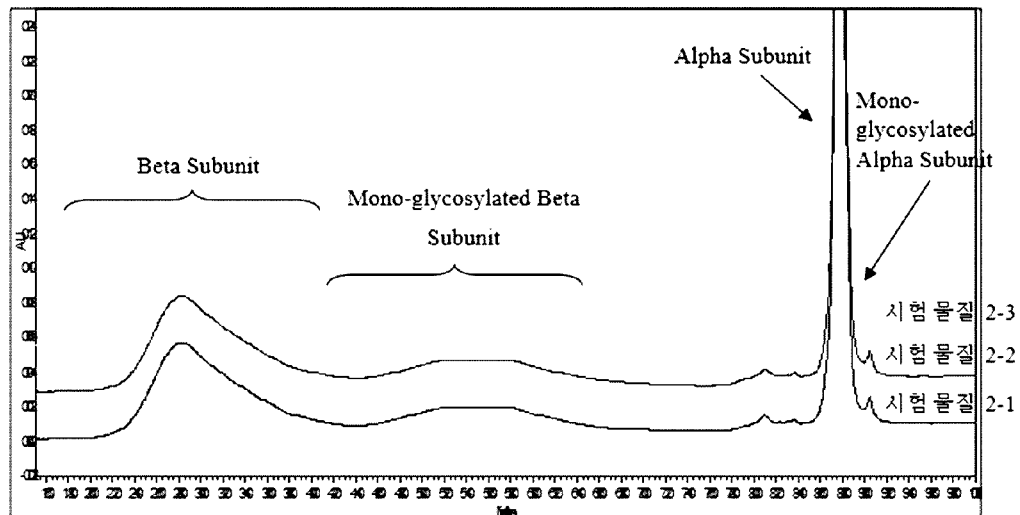
↓ Enlargement



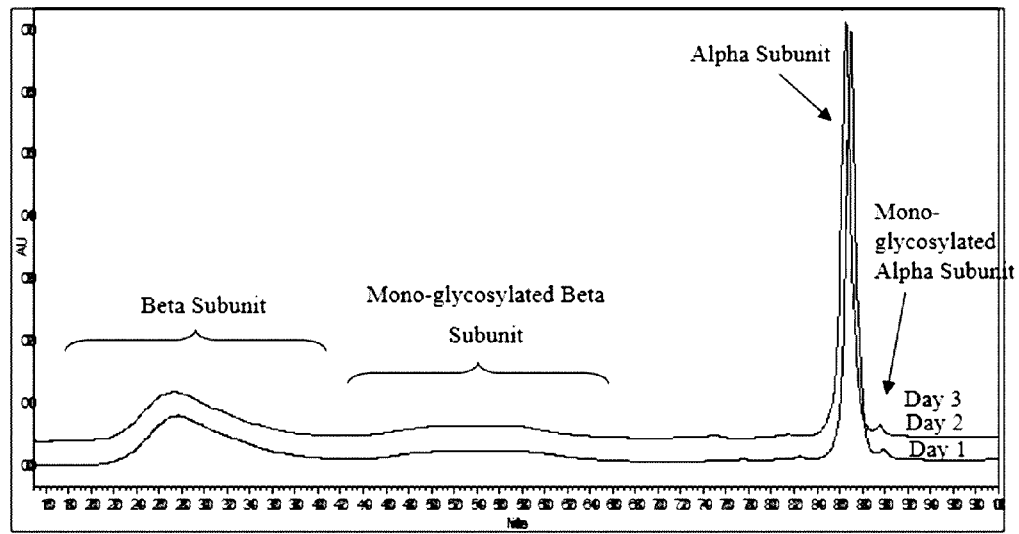
[도 12]



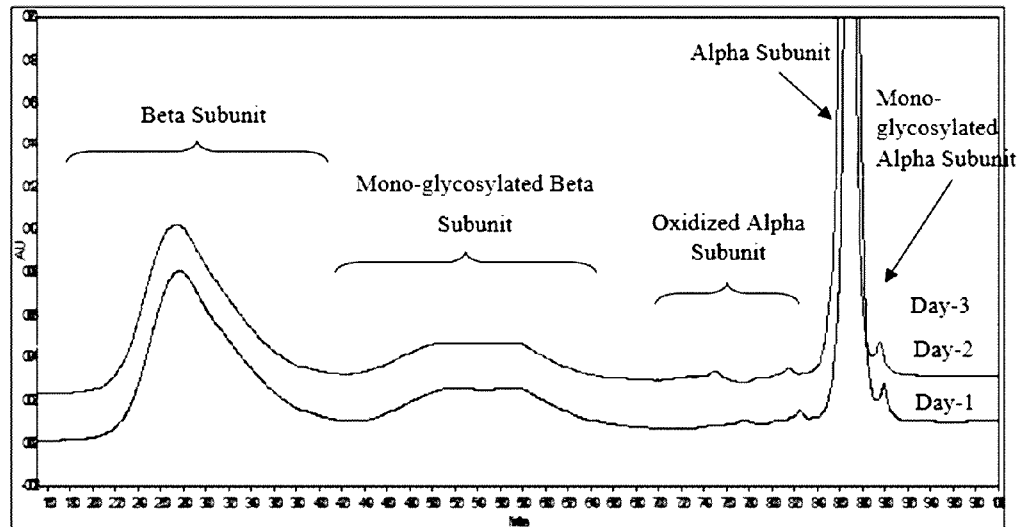
Enlargement



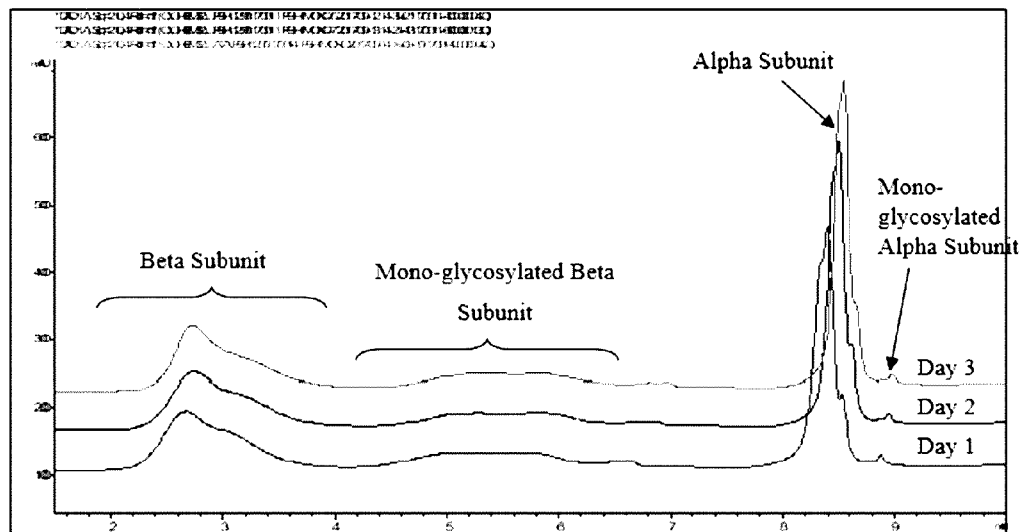
[도 13]



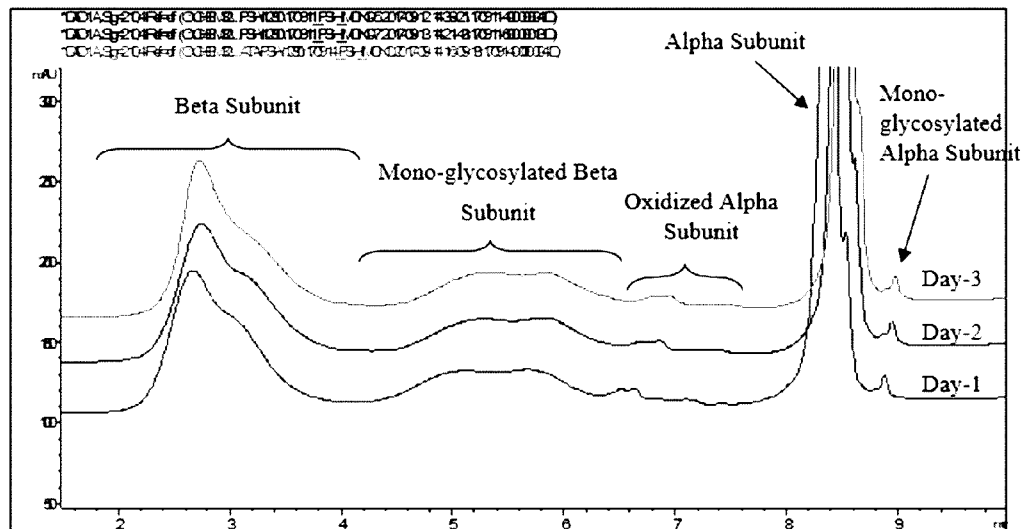
Enlargement



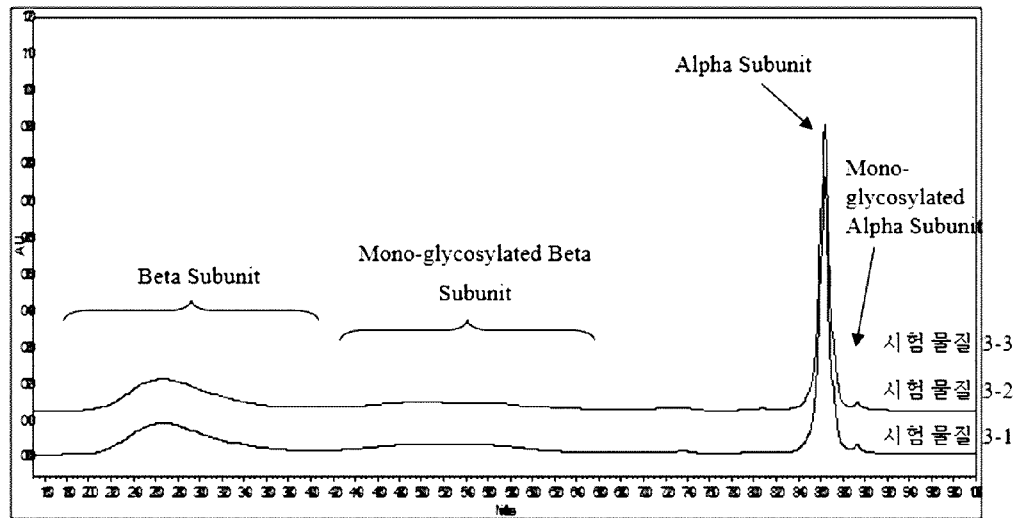
[도14]



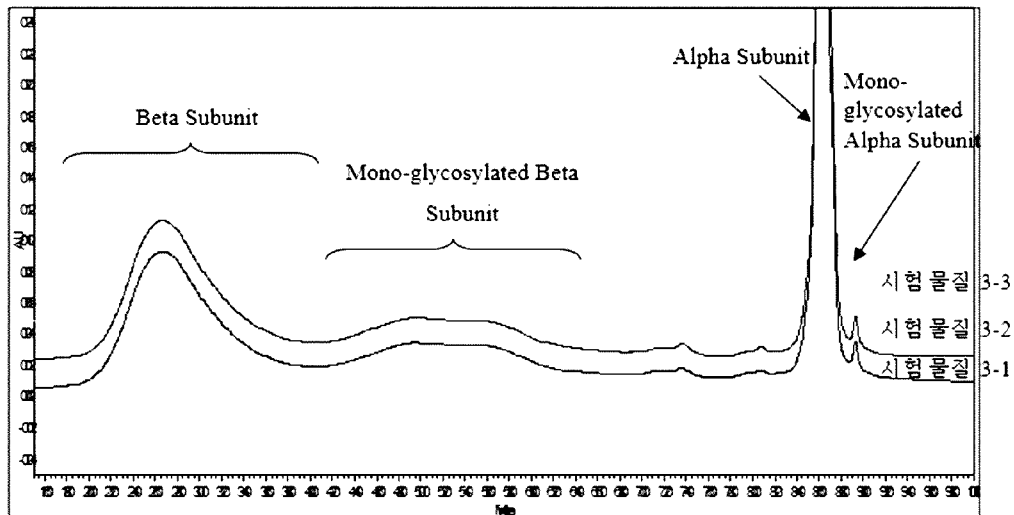
Enlargement



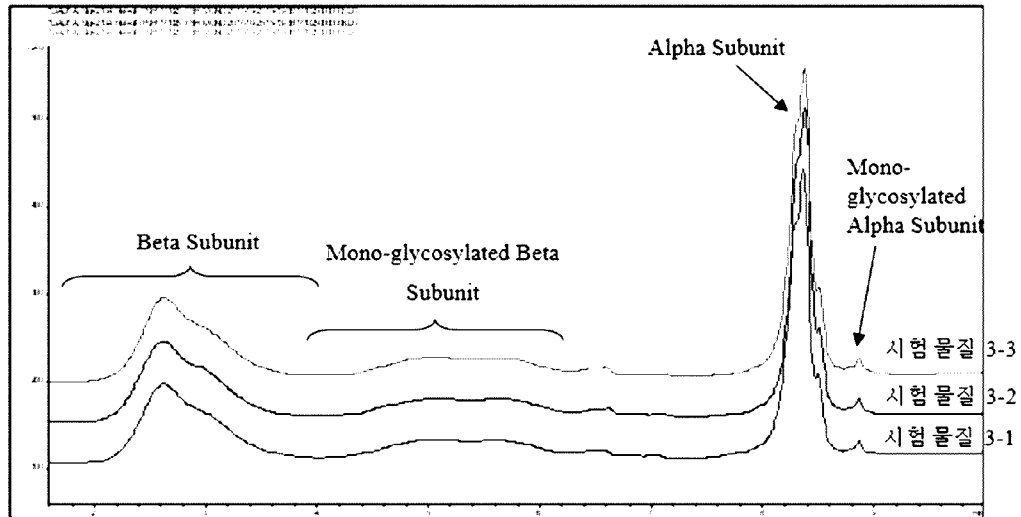
[도15]



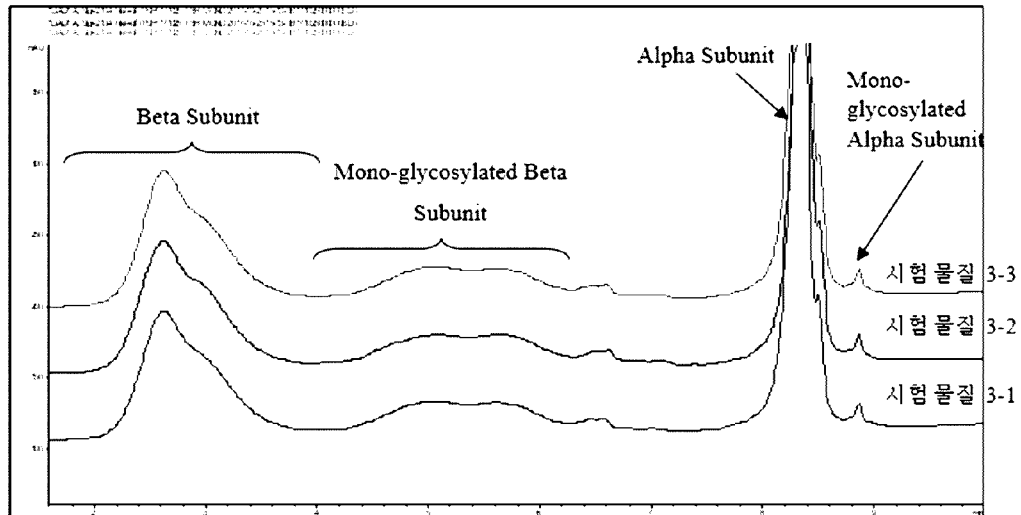
Enlargement



[도16]



Enlargement



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/021322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/34(2006.01)i; G01N 30/30(2006.01)i; G01N 30/02(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)

G01N 30/34(2006.01); C07K 1/18(2006.01); C07K 14/59(2006.01); C12P 21/02(2006.01)

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: 초고성능 액체 크로마토그래피(ultra performance liquid chromatography, UPLC), 컬럼(column), 난포 자극 호르몬(follicle stimulating hormone, FSH), 서브유닛(subunit), 글리코실화(glycosylation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BUTNEV, V. Y. et al. Human FSH glycoform α -subunit asparagine52 glycans: major glycan structural consistency, minor glycan variation in abundance. Frontiers in endocrinology. 2022, vol. 13, thesis no. 767661, inner pp. 1-24 (publication: 18 October 2022). See inner page 2, left column and inner page 12, right column - inner page 13, left column, and Figure 4.	1-8
A	BOUSFIELD, G. R. et al. Hypo-glycosylated human follicle-stimulating hormone (hFSH21/18) is much more active in vitro than fully-glycosylated hFSH (hFSH24). Molecular and cellular endocrinology. 2014, vol. 382, pp. 989-997 (published online: 01 December 2013). See abstract, page 993, and Figure 6.	1-8
A	LOUREIRO, R. F. et al. Analysis of intact human follicle-stimulating hormone preparations by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography A. 2006, vol. 1136, pp. 10-18 (published online: 17 October 2006). See abstract, page 12, right column, and Figure 1.	1-8
A	JP 2013-153770 A (JCR PHARMACEUTICALS CO., LTD.) 15 August 2013 (2013-08-15) See claims 1 and 6, and paragraph [0058].	1-8

☒ 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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

08 April 2024

Date of mailing of the international search report

09 April 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/021322

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2006-0135656 A (ARES TRADING S.A.) 29 December 2006 (2006-12-29) See claim 22.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/021322

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2013-153770	A	15 August 2013	JP	5750471	B2	22 July 2015
KR	10-2006-0135656	A	29 December 2006	AU	2004-309040	A1	14 July 2005
				AU	2004-309040	B2	16 December 2010
				BR	PI0417992	A	27 April 2007
				BR	PI0417992	B1	02 January 2019
				BR	PI0417992	B8	25 May 2021
				CA	2544333	A1	14 July 2005
				CN	100554277	C	28 October 2009
				CN	1890265	A	03 January 2007
				EA	008924	B1	31 August 2007
				EA	200601029	A1	27 October 2006
				EP	1697412	A1	06 September 2006
				EP	1697412	B1	21 October 2009
				ES	2333128	T3	17 February 2010
				HK	1099031	A1	03 August 2007
				IL	176328	A	05 October 2006
				IL	176328	B	30 April 2013
				JP	04763616	B2	31 August 2011
				JP	2008-500273	A	10 January 2008
				NO	20063304	A	17 July 2006
				NO	330774	B1	11 July 2011
				UA	90664	C2	25 May 2010
				US	2007-0129295	A1	07 June 2007
				US	7754860	B2	13 July 2010
				WO	2005-063811	A1	14 July 2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 30/34(2006.01)i; G01N 30/30(2006.01)i; G01N 30/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 30/34(2006.01); C07K 1/18(2006.01); C07K 14/59(2006.01); C12P 21/02(2006.01) 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: 초고성능 액체 크로마토그래피(ultra performance liquid chromatography, UPLC), 컬럼(column), 난포 자극 호르몬(follicle stimulating hormone, FSH), 서브유닛(subunit), 글리코실화(glycosylation)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	BUTNEV, V. Y. 등, Human FSH glycoform α -subunit asparagine52 glycans: major glycan structural consistency, minor glycan variation in abundance, <i>Frontiers in endocrinology</i> , 2022년, 13권, 논문번호 767661, 내부페이지 1-24 (공개: 2022.10.18) 내부페이지 2 왼쪽 칼럼, 내부페이지 12 오른쪽 칼럼-내부페이지 13 왼쪽 칼럼, Figure 4	1-8
A	BOUSFIELD, G. R. 등, Hypo-glycosylated human follicle-stimulating hormone (hFSH21/18) is much more active in vitro than fully-glycosylated hFSH (hFSH24), <i>Molecular and cellular endocrinology</i> , 2014년, 382권, 페이지 989-997 (온라인 공개: 2013.12.01) 요약, 페이지 993, Figure 6	1-8
A	LOUREIRO, R. F. 등, Analysis of intact human follicle-stimulating hormone preparations by reversed-phase high-performance liquid chromatography, <i>Journal of chromatography a</i> , 2006년, 1136권, 페이지 10-18 (온라인 공개: 2006.10.17) 요약, 페이지 12 오른쪽 칼럼, Figure 1	1-8
A	JP 2013-153770 A (JCR PHARMACEUTICALS CO., LTD.) 2013.08.15 청구항 1, 6, 단락 [0058]	1-8
☒ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 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 2024년04월08일(08.04.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년04월09일(09.04.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2006-0135656 A (아레스 트레이딩 에스.에이.) 2006.12.29 청구항 22	1-8

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2013-153770 A	2013/08/15	JP 5750471 B2	2015/07/22
KR 10-2006-0135656 A	2006/12/29	AU 2004-309040 A1	2005/07/14
		AU 2004-309040 B2	2010/12/16
		BR PI0417992 A	2007/04/27
		BR PI0417992 B1	2019/01/02
		BR PI0417992 B8	2021/05/25
		CA 2544333 A1	2005/07/14
		CN 100554277 C	2009/10/28
		CN 1890265 A	2007/01/03
		EA 008924 B1	2007/08/31
		EA 200601029 A1	2006/10/27
		EP 1697412 A1	2006/09/06
		EP 1697412 B1	2009/10/21
		ES 2333128 T3	2010/02/17
		HK 1099031 A1	2007/08/03
		IL 176328 A	2006/10/05
		IL 176328 B	2013/04/30
		JP 04763616 B2	2011/08/31
		JP 2008-500273 A	2008/01/10
		NO 20063304 A	2006/07/17
		NO 330774 B1	2011/07/11
		UA 90664 C2	2010/05/25
		US 2007-0129295 A1	2007/06/07
		US 7754860 B2	2010/07/13
		WO 2005-063811 A1	2005/07/14