



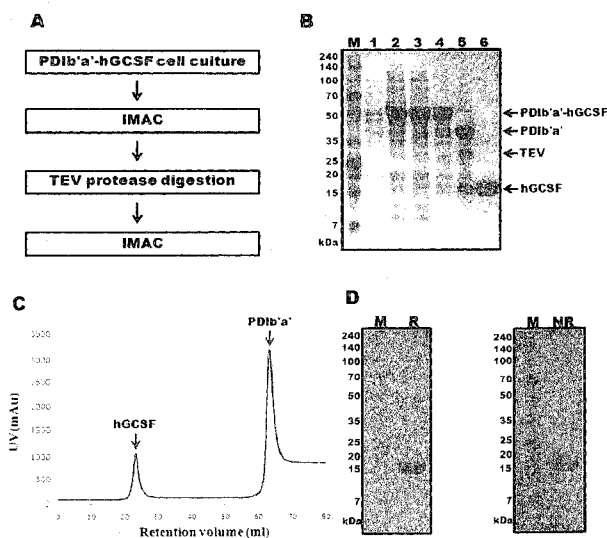
- (51) 국제특허분류: C12N 15/27 (2006.01) C07K 14/535 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/008876
- (22) 국제출원일: 2014년 9월 24일 (24.09.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2013-0114432 2013년 9월 26일 (26.09.2013) KR
- (71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 680-749 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).
- (72) 발명자: 최한석 (CHOE, Han); 138-736 서울시 송파구 올림픽로 43길 88, B동 901호, Seoul (KR). 유한봉 (RYU, Han Bong); 156-883 서울시 동작구 사당로 8길 30, 4층, Seoul (KR). 도비향 (DO, Bich Hang); 152/19B 호치민시 빈탄지구 25번구 디엔 비엔 푸, Hochiminh City (VN).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 153-803 서울시 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1차 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: WATER-SOLUBLE EXPRESSION AND PURIFICATION METHOD OF HUMAN GCSF RECOMBINANT PROTEIN HAVING BIOLOGICAL ACTIVITIES

(54) 발명의 명칭: 생물학적 활성을 가진 인간 GCSF 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법

[Fig. 3]



(57) Abstract: The present invention relates to a water-soluble expression and purification method of a human GCSF recombinant protein having biological activities using an N-terminal tag, and provides a recombinant expression vector containing a solubility enhancing tag and a human granulocyte colony-stimulating factor (hGCSF) gene. In addition, provided are: a recombinant microorganism transformed with the recombinant expression vector; a method for producing an hGCSF recombinant protein (rhGCSF); and a rhGCSF produced by the production method.

(57) 요약서: 본 발명은 N-말단 태그를 이용한 생물학적 활성을 가진 인간 GCSF 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법에 관한 것으로서, 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 과립구 생성 촉진 인자(human granulocyte colony-stimulating factor; hGCSF) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다. 또한 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하며, 상기 hGCSF 재조합 단백질(rhGCSF)의 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 hGCSF 재조합 단백질(rhGCSF)을 제공한다.



공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 생물학적 활성을 가진 인간 GCSF 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법

기술분야

- [1] 본 발명은 N-말단 태그를 이용한 생물학적 활성을 가진 인간 과립구 생성 촉진인자(human granulocyte colony-stimulating factor; hGCSF) 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 과립구 생성 촉진인자(granulocyte colony-stimulating factor; GCSF)는 플루리포이에틴(pluripoietin)으로도 알려졌으며, 백혈구의 70%를 구성하는 과립구의 생산, 분화 및 기능을 조절함으로써 조혈과정에 작용한다. 성장인자는 인터루킨-1 β , 종양 괴사 인자-알파(tumor necrosis factor-alpha), 지질다당류(lipopolysaccharide)와 같은 여러 염증 자극에 의해 대식세포(macrophages), 섬유아세포(fibroblasts) 및 내피세포(endothelials)에서 대부분 분비된다. 임상적으로, 인간 GCSF(hGCSF)는 혈액 내 호중구(neutrophils)의 수가 극히 낮아 발생하는 호중구감소증(neutropenia)의 치료를 위해 승인되었다. 보통 암 환자들은 방사선치료 또는 화학치료 후에 이와 같은 백혈구 감소증(leukopenia)으로 인해 고통 받는다. 또한, GCSF는 신경보호효과를 나타내기도 한다. 따라서, 상기 단백질은 루게릭병과 같은 다양한 신경퇴행성 질환의 마우스 모델에 치료제로서 적용되기도 하였다.
- [3] 초기에, hGCSF는 hGCSF를 계속적으로 분비하는 암세포주로부터 생산되었다. 메탄올자화(methylotrophic) 효모인 피히아 파스토리스(*Pichia Pastoris*)에서 발현시, 상기 호르몬은 수용성 형태로 분비되었으나 상당히 응집되어서 구아니딘 하이드로클로라이드 또는 요소(urea)와 같은 고농도의 변성제를 이용하여 수용화시켜야 했고, 그 후에 생물학적으로 활성화된 형태로 정제하기 위해서 변성제를 제거하여 재접힘시켜야 했다. 또한, 대장균(*Escherichia coli*; *E. coli*)과 같은 박테리아를 이용한 발현과 관련된 많은 연구들에서 세포질(cytoplasm) 내에 과발현된 단백질들이 응집되어 봉입체 형태(inclusion bodies)로 생산되는 것을 확인하였다. 많은 경우, 봉입체로부터 얻은 생물학적 활성을 가진 단백질의 전체적인 수율은 낮았다. 대신에, 단백질이 *E. coli*의 주변 세포질(periplasm)로 분비되었으나 수율은 역시 낮았다.
- [4]
- [5] 한편 한국공개특허 제2012-0057416호는 인간 G - C S F 단백질 생산을 위한 폴리뉴클레오티드 및 이의 용도에 관해 개시하고 있지만, 본원발명의 hGCSF의 수용성 발현 및 이를 분리하기 위한 hPD1b'a' 도메인과 같은 태깅 시스템에 대한 언급은 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 과립구 생성 촉진인자(human granulocyte colony-stimulating factor; hGCSF) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는데 있다.
- [7] 본 발명의 다른 목적은 상기 hGCSF 재조합 단백질(rhGCSF)의 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 hGCSF 재조합 단백질(rhGCSF)을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 과립구 생성 촉진인자(human granulocyte colony-stimulating factor; hGCSF) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 hGCSF 재조합 단백질(rhGCSF)의 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 hGCSF 재조합 단백질(rhGCSF)을 제공한다.

발명의 효과

- [11] 본 발명은 N-말단 태그를 이용한 인간 GCSF 재조합 단백질의 수용성 발현 및 정제방법에 관한 것으로서, N-말단에 PDI의 b'a' 도메인 태그를 통해 대장균 내에서 용해도 및 안정도가 증가된 인간 GCSF 단백질을 분리, 정제하는 방법에 대한 것이다. 이렇게 얻어진 인간 GCSF 단백질은 혈액 내 호중구(neutrophils)의 수가 극히 낮아 발생하는 호중구감소증(neutropenia)의 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 PDIB'a'-hGCSF 발현벡터의 제작 과정 및 도메인 구조의 모식도를 나타낸다. (A) PDIB'a'-hGCSF 벡터 맵. *E. coli*에서의 융합 단백질 발현은 IPTG-유도성 T7 프로모터에 의해 조절되고, 선별 마커는 암피실린(ampicillin)이다. (B) 7개의 융합 단백질들(His6-, Trx-, GST-, PDIB'a'-, MBP-, PDI- 및 NusA-hGCSF)의 구조 모식도를 나타낸다.
- [13] 도 2는 SDS-PAGE 젤을 사용하여 7개의 태그들로 융합된 hGCSF의 *E. coli* 발현에 대해 분석한 결과이다. 단백질 발현은 (A) 18°C 및 (B) 30°C에서 1 mM IPTG로 유도되었다. 초음파 처리 후에, 20ug의 총 단백질은 10% 트리스-트리신 젤(Tris-tricine gel)에 로딩되었다. 화살표는 각각의 태그를 가진 융합된 hGCSF 단백질을 나타낸다. M, 분자량 사이즈 마커; C, 대조군으로서 IPTG 유도 전의 총 세포 단백질; T, IPTG 유도 후의 총 세포 단백질; P, 초음파 처리 후 펠렛의 단백질; S, 초음파 처리 후 상등액의 단백질.

- [14] 도 3은 PDIB'a'-hGCSF로부터 hGCSF의 분리에 대한 것이다. (A) 정제과정의 모식도를 나타낸다. (B) 대장균으로부터 발현된 PDIB'a'-hGCSF는 SDS-PAGE에 의해 분석되었다. lane 5는 hPDIB'a'가 거의 완전하게 절단되었다는 것을 나타낸다. M, 분자량 마커; lane 1, 음성대조구로서 IPTG 유도 전 총 세포; lane 2, IPTG로 처리한 총 세포; lane 3, 세포 초음파 처리 후 수용성 분획; lane 4, His-trap HP 컬럼을 이용하여 분리한 PDIB'a'-hGCSF 융합 단백질(59.1 kDa); lane 5, TEV 단백질 분해효소로 절단된 hPDIB'a' 태그: hPDIB'a' (35.6 kDa) 및 hGCSF (18.8 kDa); lane 6, 최종 분리된 hGCSF. (C) 절단 반응 후의 hGCSF 분리를 위한 His-trap HP 컬럼 사용의 크로마토그램을 나타낸다. hPDIB'a'와 함께 절단된 hGCSF는 다른 크기로 뚜렷하게 분리된다. (D) 분리된 hGCSF의 최종 순도를 확인하기 위하여 환원 및 비환원 조건에서 실버 염색된 10% SDS 젤 전기영동을 나타낸다. M, 분자량 마커; R, 환원; NR, 비환원
- [15] 도 4는 MBP-hGCSF로부터 hGCSF의 분리에 대한 것이다. (A) hGCSF 정제 과정의 모식도를 나타낸다. (B) MBP 친화도 및 IMAC 크로마토그래피의 조합에 의해 *E. coli*로부터 hGCSF를 정제하였다. 10ug의 총 단백질은 10% 트리스-트리신 젤(Tris-tricine gel)에 로딩되었다. M, 분자량 마커; lane 1, 대조군으로서 IPTG 유도 전 총 세포 단백질; lane 2, IPTG 유도 후 총 세포 단백질; lane 3, 세포 초음파 처리 후 수용성 분획; lane 4, MBP 친화도 컬럼을 사용하여 분리한 MBP-hGCSF 융합 단백질(63.3 kDa); lane 5, TEV 단백질 분해효소에 절단된 His6-MBP 태그 : His6-MBP (40.3 kDa) 및 hGCSF (18.8 kDa); lane 6, 최종 정제된 hGCSF (18.8 kDa). (C) 정제된 hGCSF의 최종 순도를 확인하기 위하여, 환원 조건하에서 실버 염색된 10% SDS 젤 전기영동 사진이다. M, 분자량 마커; lane 1, 최종 정제된 hGCSF. (D) 젤 여과에 의한 hGCSF 단량체의 정제에 대한 결과이다. 2차 정제 단계 후 hGCSF의 Superdex 200 16/60 크로마토그램을 나타낸다. (E) 정제된 hGCSF의 실버 염색 결과를 나타낸다. M, 분자량 마커; lane 1 및 2, hGCSF는 10 mM DTT 유무에 따라 환원되었다.
- [16] 도 5는 hGCSF의 MALDI-TOF MS 분석결과를 나타낸다. (A) hGCSF (aa)의 트립신 분해 펩타이드 지도. (B) 환원 조건에서 분리된 hGCSF의 MALDI-TOF MS 결과이다.
- [17] 도 6는 정제된 hGCSF의 M-NFS 60 세포에 대한 생물학적 활성을 나타낸다. 여러 농도의 분리된 hGCSF가 골수성 백혈병 M-NFS 60 세포와 함께 72시간 동안 배양되었다. ●: commercial hGCSF, △: MBP-hGCSF로부터 정제된 hGCSF, □: PDIB'a' -hGCSF로부터 정제된 hGCSF.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [18] 본 발명자들은 *E. coli*의 세포질에서 생물학적 활성을 가진 수용성 hGCSF 단백질을 발현시키기 위한 방법을 개발하였다. 7개의 N-말단 융합 태그들, 헥사히스티딘(hexahistidine; His6), 티오레독신(thioredoxin; Trx), 글루타치온

S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST), 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA), 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI) 및 hPDI의 b'a' 도메인(b'a' domain of hPDI; hPDIB'a')을 hGCSF의 수용성과 발현을 위해 시험하였다. 이 중 4개의 태그 단백질, MBP, NusA, hPDI 및 hPDIB'a'가 30°C에서 hGCSF 용해도를 상당히 증가시킨다는 것을 확인하였으며, 골수성 백혈병 M-NFS 60 세포를 이용하여 hGCSF의 활성을 측정하고 본 발명을 완성하였다.

[19]

[20] 본 발명은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 과립구 생성 촉진인자(human granulocyte colony-stimulating factor; hGCSF) 유전자를 포함하는 재조합 발현백터를 제공한다.

[21] 본 발명에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 hGCSF 재조합 단백질을 수용성 형태로 발현시킬 수 있는 것이면 어느 것이든 제한 없이 이용가능하다. 예를 들어, 상기 수용성 향상 태그는 헥사히스티딘(hexahistidine; His6), 티오레독신(thioredoxin; Trx), 글루타치온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST), 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein, MBP), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA), 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI) 및 hPDI의 b'a' 도메인(b'a' domain of hPDI; hPDIB'a') 중 어느 하나일 수 있다.

[22] 상세하게는, 상기 hGCSF 유전자는 서열번호 1로 표시되는 핵산서열인 것을 특징으로 하고, 상기 Trx 유전자는 서열번호 2로 표시되는 핵산서열이고, 상기 GST 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 핵산서열이고, 상기 NusA 유전자는 서열번호 4로 표시되는 핵산서열이고, 상기 hPDIB'a' 유전자는 서열번호 5로 표시되는 핵산서열인 것을 특징으로 한다. 한편, 상기 hPDIB'a' 유전자는 hPDI 유전자의 일부가 제거된 것으로서, hPDI 유전자는 서열번호 6으로 표시하였다. 또한 hGCSF 아미노산 서열은 서열번호 7로 표시하였다. 보다 상세하게는 상기 재조합 발현백터는 도 1a의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 한다.

[23]

[24] 본 발명에 있어서, “백터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[25]

[26] 본 발명에서 있어서, “발현 백터”는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 백터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는

앰피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[27]

[28] 본 발명에서 사용한 Gateway Vector system은 엔트리벡터와 목적벡터로 구성되며, 상기 엔트리벡터는 목적유전자의 양말단에 attL1, attL2를 갖는 벡터이며, 목적벡터는 attR1, attR2를 포함하는 벡터이다. 상기 엔트리벡터와 상기 목적벡터는 목적벡터의 attR1 및 attR2가 엔트리벡터의 attL1 및 attL2와 재조합효소에 의해 LR반응을 일으키며, 이 과정에서 엔트리벡터에 포함되어 있던 목적유전자가 목적벡터로 전달되게 되고, attR1과 attR2는 attB1과 attB2 서열로 치환되어진다.

[29]

[30] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 상세하게는 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하고, 보다 상세하게는 대장균 BL21(DE3)인 것을 특징으로 한다.

[31]

[32] 또한, 본 발명은 수용성 향상 태그 및 hGCSF 유전자가 포함된 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기와 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.

[33] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법을 들 수 있다.

[34]

[35] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하여 수용성 향상 태그-hGCSF 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 상기 발현된 수용성 향상 태그-hGCSF 재조합 단백질에서 수용성 향상 태그를 제거하는 단계; 및 상기 수용성 향상 태그가 제거된 hGCSF 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 hGCSF 재조합 단백질(rhGCSF) 생산방법을 제공한다.

[36]

한편, 본 발명의 실시예에서는 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질 분해효소(protease)를 사용했지만, 상기 단백질 분해효소(protease)는 당업계에서 통상적으로 사용될 수 있는 Factor Xa 단백질 분해효소, 트롬빈(Thrombin), 엔테로키나제(Enterokinase), 유비퀴틴-특이적 단백질 분해효소(Ubiquitin-specific protease), 푸린(Furin), 유전자 분해효소 I(Genease I)

또는 단백질 분해효소 K(Proteinase K)등을 적용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[37]

[38] 또한, 본 발명은 상기 생산방법에 의해 생산된 hGCSF 제조합 단백질(rhGCSF)을 제공한다.

[39]

[40] 본 발명에서 사용한 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.(2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1,2,3, John Wiley & Sons, Inc.(1994)) 등을 참조할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[41] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[42]

[43] <실시예 1> 발현백터의 제작 및 발현

[44] hGCSF 유전자(NCBI Reference Sequence: NP_757373)는 코돈 최적화되었고, attB1 사이트 (5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC-3'; 서열번호 9), TEV 단백질 분해효소 인식 사이트(TEV protease recognition site; TEVrs, ENLYFQ`G) 및 attB2 (5'-ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC-3'; 서열번호 10)에 삽입되었다. 상기 DNA는 합성되었고, 플라스미드 pUC57 (Genscript, New Jersey, USA)에 서브클론되었다. 엔트리백터 pENTR-hGCSF를 제작하기 위해서, hGCSF 유전자를 포함하는 플라스미드는 pDONOR207 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 재조합되었다. 그 후, hGCSF와 각 태그들을 포함하는 발현백터를 제작하기 위해서, pENTR-hGCSF와 7개의 목적 벡터인 pDEST-HGWA, pDEST-HXGWA, pDEST-HGGWA, pDEST-HMGWA, pDEST-HNGWA, pDEST-PDI 및 pDEST-PDIb'a' 사이에 LR 재조합 클로닝을 시행하였다. 발현 플라스미드들의 서열은 DNA 서열분석에 의해 확인하였고(Macrogen, Daejeon, Korea), *E.coli* BL21 (DE3)로 형질전환되었다.

[45] *E. coli* 세포질에서 hGCSF를 수용성 형태로 발현시키기 위해서, hGCSF 서열의 N-말단에 7개의 태그 유전자(His6, Trx, GST, PDib'a', MBP, PDI 및 NusA)를 융합하는 과정은 도 1에 나타냈다. TEVrs는 정제 과정 중에 분리하기 위해서 각 태그들과 hGCSF 사이에 삽입되었다.

[46] 세포들은 50ug/ml 앰피실린이 포함된 2mL LB 배지에서 배양하였고, 37°C, 200rpm에서 배양하였다. OD₆₀₀이 약 0.4-0.6에 이르렀을 때, hGCSF 융합 단백질의 발현을 유도하기 위해서, 1mM 이소프로필-β-D-티오갈락토시드(isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG)를

첨가하였다. 30°C에서 5시간 동안과 18°C에서 12시간 동안 배양한 후에 각각 세포를 수확하였다(도 2 및 표 1). 모든 태그들에 있어서 두 발현 온도에서 hGCSF의 발현 수준은 33 - 68% 사이였고, 18°C에서 더 높은 발현 수준을 나타냈다. 용해도는 태그와 발현 온도에 따라서 상이했다. MBP, NusA, PDI 및 PDib'a'의 4개의 태그 단백질은 30°C에서 용해도를 상당히 증가시켰다(도 2A 및 표 1). 또한, 발현 온도를 18°C로 낮추면 Trx-hGCSF 및 GST-hGCSF의 용해도를 증가시켰다(도 2B 및 표 1). His6-hGCSF는 두 발현 온도 모두에서 불용성이었다. 용해도 및 태그 단백질의 크기에 기초하여, 본 발명자들은 이후 연구를 위해서 2개의 융합단백질 PDib'a'-hGCSF 및 MBP-hGCSF를 선택하였다.

[47]

[48] 표 1

[Table 1]

여러 N-말단 태그를 가진 hGCSF의 발현 수준 및 용해도

	태그	태그 크기 (kDa)	융합 단백질 크기 (kDa)	발현(%)		용해도(%)	
				18°C	30°C	18°C	30°C
hGCSF (18.8 kDa)	His6	0.8	23.5	43.8	33.6	-	-
	Trx	11.8	35.3	61.4	48.8	98.3	5.0
	GST	25.7	49.2	41.3	40.0	78.4	3.2
	PDib'a'	35.6	59.1	66.3	42.2	96.0	73.5
	MBP	40.3	63.8	61.4	58.4	96.5	88.1
	PDI	55.1	78.7	55.6	43.8	98.1	89.3
	NusA	54.9	78.4	68.0	44.8	97.5	89.5

[49]

[50] <실시예 2> 재조합 hGCSF의 분리 및 정제

[51] 1. hPDib'a'-hGCSF로부터 hGCSF의 분리 및 정제

[52] hPDib'a'-hGCSF의 발현에 있어서, 3x5 mL HisTrap HP column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)을 상기 융합 단백질을 분리하기 위한 첫 단계에서 사용하였다. 결합 완충액에 의해 컬럼을 평형화한 후에, 컬럼에 용해물(lysate) 용액을 적용하고 비특이적 결합을 모두 제거하기 위해서 세척 완충액(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 100 mM imidazole, 5% glycerol (v/v))을 흘려보냈다. hPDib'a'-hGCSF는 500mM 이미다졸(imidazole)이 포함된 완충액(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 5% glycerol (v/v))을 사용하여 용출되었고, 투석막(Viskase Corporation, Illinois, USA)을 통해 유리 NaCl 완충액(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% glycerol (v/v))으로 교환되었다. 단백질 : TEV 단백질 분해효소(protease)를 1:20의 비율로 하여 TEV 단백질

분해효소(protease)로 18°C에서 12시간 동안 절단하였다. 그 후, 절단 용액은 완충액 교환 과정에 사용되었는데, 10kDa 투석막(Viskase Corporation, Illinois, USA)을 통해 HisTrap 결합 완충액 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol (v/v))에 첨가되었다. 결합 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol (v/v))으로 완전히 채워진 미리-팩킹된 HisTrap HP column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여, 모든 처리가 완료된 샘플을 2x5 mL IMAC에 로드하였다. 용액 내의 다른 단백질들과는 다르게, hGCSF는 Ni 레진(resin)과의 친화도가 낮고, 50 mM 이미다졸(imidazole)(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 50 mM imidazole (v/v)) 세척에 의해 쉽게 HisTrap 컬럼에서 떨어졌다. 크로마토그램에 기초하여, hGCSF 단량체를 환원 및 비환원 조건하에서 10% 트리스-트리신(Tris-tricine) SDS-PAGE 분석을 통해 확인하였다.

[53]

[54] 2. MBP-hGCSF로부터 hGCSF의 분리 및 정제

[55] MBP-hGCSF 융합 단백질을 과발현시키기 위해서 18°C에서 12시간 동안 1 mM IPTG로 유도하여 MBP-hGCSF 클론을 500mL 전-배양하였다. 3,500 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 배양된 세포를 수확하였다. 그 후, 모인 펠렛(pellet)을 100mL MBP 결합 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5% glycerol (v/v))에 재현탁시켰고, 용액이 완전히 투명해질 때까지 차갑게 하여 초음파처리하였고, 15,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 원심분리 및 여과한 후의 용해물을 2x5 mL MBP Trap HP (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)에 MBP 결합 완충액으로 평형화된 AKTA Prime Plus machine (GE life science, NF, USA)을 사용하여 적용하였다. 비특이적인 결합 단백질은 결합 완충액으로 씻어냈고, MBP-hGCSF는 말토스를 포함하는 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5% glycerol, 10 mM maltose monohydrate (v/v))으로 용출하였다. 크로마토그램을 기초로, MBP-hGCSF를 모았고, 10% 트리스-트리신(Tris-tricine) SDS-PAGE 분석에 의해 확인하였다. 용출된 샘플은 NaCl의 최종 농도가 50mM이 될 때까지 희석하였고, TEV 처리 과정 및 절단된 hGCSF 정제 과정은 hPDib'a'-hGCSF로부터 hGCSF를 절단하는 방법과 동일하게 진행되었다. hGCSF 완충액을 PBS 완충액으로 교환할 뿐만 아니라 다량체로부터 hGCSF 단량체로 분리하기 위해서, 세척단계에서 모인 hGCSF를 PBS 완충액 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 5% glycerol (v/v)) 상의 gel filtration superdex 200 16/60 column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)에 로딩하였다. 크로마토그램에 기초하여, hGCSF 단량체를 환원 및 비환원 조건하에서 10% 트리스-트리신(Tris-tricine) SDS-PAGE 분석을 통해 확인하였다.

[56]

[57] 3. SDS-PAGE 분석 및 실버 염색

[58] 단백질 밴드를 확인하기 위해 coomassie blue R-250 (AMRESCO, Solon, OH,

USA) 처리하고, 10% 트리스-트리신(Tris-tricine) 젤 상에서 단백질의 존재가 가시화되었다. 발현, 용해도 및 순도는 ImageJ program에 의해 정량화하였다.

- [59] 실버 염색을 위해, 폴리아크릴아미드 젤(polyacrylamide gel)을 Fixative Enhancer Solution에 20분 동안 넣은 후, 민감도를 증가시키고 염색 차이를 확실히 하기 위해서 증류수로 씻어냈다. silver complex solution, reduction moderator solution 및 image development reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 각각 첨가하여 염색 및 발색 반응을 진행했고, 5% 아세트산 용액으로 반응을 중단시켰다.

[60]

[61] 4. 결과

[62] (1) PDib'a'-hGCSF로부터 hGCSF 정제

- [63] PDib'a'-hGCSF로부터 hGCSF를 분리하기 위해서, 두 번의 IMAC와 최종 GPC를 수행하였다(도 3A). 본 발명에 사용된 N-말단 태그들에는 모두 His6 태그를 포함하고 있으므로 IMAC가 가능하였다. PDib'a'-hGCSF 플라스미드를 포함하는 세포는 IPTG로 유도되었고, 수집되었다(도 3B, 레인 2). 세포는 용해되었고, 상등액을 모으기 위해서 원심분리되었다(도 3B, 레인 3). 그 후, 상등액을 Ni 컬럼에 로딩하였고, 세척 과정 후에 결합된 단백질을 용출하였다(도 3B, 레인 4). 상기 과정에서 다른 대부분의 단백질은 제거되었으나, 여전히 약간의 불순물 밴드들이 있었다. 다른 단백질 밴드들이 존재함에도 본 발명자들은 TEV 단백질 분해효소 절단을 수행하였다. 대부분의 PDib'a'-hGCSF는 TEV 단백질 분해효소에 의해 절단되었다(도 3B, 레인 5). PDib'a' 태그, 미절단 PDib'a'-hGCSF 및 TEV 단백질 분해효소를 제거하기 위해서, 2차 His-trap HP column을 사용하였다. 절단된 hGCSF는 Ni 컬럼에 약하게 결합하였고, 50mM 이미다졸(imidazole)에 용출하였다. 잔여 불순물을 제거하기 위해서, 샘플들을 Superdex gel filtration column에 로딩하였다(도 3C). hGCSF는 완전히 분리되었고, 순수 hGCSF를 얻을 수 있었다(도 3B, 레인 6). 순도를 측정하기 위해서, 환원 조건에서 정제된 hGCSF의 실버 염색을 수행하였고, 결과는 hGCSF가 순수하게 정제되었다는 것을 나타냈다(도 3D). 1L의 세포 배양에서 약 11.3 mg의 순수한 hGCSF를 얻었다(표 2).

[64]

[65] (2) MBP-hGCSF로부터 hGCSF 정제

- [66] 도 4A는 MBP-hGCSF로부터 hGCSF를 정제하기 위한 전체적인 과정을 나타낸다. hGCSF 정제 과정에 있어서, MBP 크로마토그래피의 첫 단계는 단백질 혼합물로부터 약 80%의 MBP-hGCSF 용합단백질을 분리하는 것이다(도 4B, 레인 4). 그 후, TEV 단백질분해효소를 낮은 농도(TEV : 표적 단백질 (1:20))로 MBP-hGCSF에 처리하여 절단하였고, hGCSF만을 분리하였다(도 4B, 레인 5). TEV 절단 후에, hGCSF 다량체가 섞여있는 혼합물(hGCSF 다량체 약 92% 포함)을 Ni NTA 크로마토그래피를 통해 50mM 이미다졸(imidazole)로 세척하는

단계를 거쳐 hGCSF 단량체를 얻었다. Superdex 200으로 hGCSF 단량체를 분리한 결과, 330-370 mL의 유지 용량(retention volume)으로 용출된 대부분의 단백질은 hGCSF 단량체였다(도 4B, 라인 6 및 도 4D). hGCSF 단량체는 환원 및 비환원 조건에서 SDS-PAGE 분석에 의해 확인되었는데, 최종 산물에서 잔여 이량체의 약 2% 정도가 발현되었다(도 4E). 실버 염색 결과, hGCSF의 순도는 약 99.8%로 확인되었다(도 4C). 1L의 세포 배양에서 약 10.2mg의 순수한 hGCSF를 얻었다(표 2).

[67]

[68] 표 2

[Table 2]

정제 과정	PD1b'a'-hGCSF로부터 hGCSF 정제				MBP-hGCSF로부터 hGCSF 정제			
	총 단백질 (mg)	순도(%)	hGCSF (mg)	수율(%)	중량 (mg)	순도(%)	hGCSF (mg)	수율(%)
Cell weight	1500	-		-	1500	-		-
Supernatant	140	69.1	30.8	-	118.8	75.9	26.6	-
1 st Chromatography(IMAC/MBP)	71.5	73.3	16.7	54	79.8	88	20.7	77.8
2 nd Chromatography	11.4	99	11.3	36.7	10.3	99	10.2	38.3

[69]

[70] <실시예 3> hGCSF 엔도톡신(endotoxin) 분석

[71] 분리된 hGCSF 용액으로부터 엔도톡신을 제거하기 위해 Triton X-114 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 최종 농도 1%로 사용하였고, 4°C에서 30분 동안 처리하였다. Triton X-114는 상온에서 샘플을 반응시킨 후 수집되었고, 12,000rpm에서 10분 동안 원심분리에 의해 제거하였다.

[72] 표적 용액 내의 잔여 엔도톡신을 측정하기 위해서, Endpoint Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 시험 (Lonza, Basel, Switzerland)을 수행하였다. 기질을 첨가하기 전에, LAL 및 hGCSF 샘플을 혼합하였고, 37°C에서 10분 동안 반응하였다. 그 후, 중단 시약(25% v/v glacial acetic acid)을 혼합물에 첨가하였다. 방출된 pNA는 405-410 nm에서 분광광도계로 측정하였다.

[73] Triton X-114 처리 후, 용액 내 잔여 엔도톡신의 양은 0.1 EU/ μ g 보다 낮았다. 이는 상업적으로 판매하는 hGCSF의 엔도톡신과 비교하여(< 1 EU/ μ g), *E.coli*로부터 분리된 단백질로서는 만족스러운 수치이다.

[74]

- [75] <실시예 4> MALDI-TOFMS 분석에 의한 재조합 hGCSF의 확인
- [76] 디설파이드 결합을 확인하고 hGCSF를 동정하기 위해서, MALDI-TOF MS 분석이 수행되었다. 10mM DTT 첨가 유무에 따라 환원 및 비환원된 조건 하에서, 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid; TCA)에 의해 hGCSF가 침전되었고, IA 완충액(0.5 M Tris-HCl, pH 8.0, 5% glycerol (v/v), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS)에 녹인 50 mM IAA로 1시간 동안 어둡게 하여 처리되었다. SDS-PAGE 수행 후, hGCSF 관련 밴드를 젤로부터 잘라냈고, 케포트립신(chemotrypsin; Promega, Madison, WI, USA)으로 37°C에서 밤새도록 절단하였다. α -시아노-4-하이드록시시나믹산(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid; CHCA)을 매트릭스(matrix)로서 사용하였고, MALDI-TOF MS 과정은 Voyager-DE™ STR (Applied Biosystems, South San Francisco, CA, USA) 및 4700 MALDI TOF/TOF™ Analyzer (AB Sciex, Framingham, MA, USA)을 이용하여 수행되었다. 펩타이드 질량은 Data Explorer™ software (Applied Biosystems, South San Francisco, CA, USA)에 의해 분석되었다.
- [77] 분리된 hGCSF를 확인하기 위해서, MALDI-TOF MS 분석을 환원 조건에서 수행하였다. 분리된 hGCSF의 MALDI-TOF MS 분석 결과는 대부분의 트립신 분해 펩타이드 질량이 hGCSF와 관련된 것으로 관측되었다(도 5). 환원조건에서, hGCSF의 5개 시스테인 잔기 중 C19가 속해있는 T2 펩타이드 단편이 이오도아세트아미드(iodoacetamide)와 결합하여 유리된 것을 확인하였다 (도 5B).
- [78]
- [79] <실시예 5> 정제된 hGCSF의 생물학적 활성 측정
- [80] 1. M-NFS60 세포 배양
- [81] M-NFS60 세포주는 김경운 박사에게서 제공받았으며, RPMI-1640 medium (GIBCO Invitrogen, CA, USA), 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 1X 페니실린(penicillin) 스트렙토마이신(streptomycin) (GIBCO Invitrogen, CA, USA) 및 0.05 mM β -머캅토에탄올(β -mercaptoethanol)이 포함된 배지에서 배양하였다. 세포들은 5% CO₂, 37°C에서 유지되었다.
- [82]
- [83] 2. 색도 분석(Colorimetric assay)
- [84] M-NFS60 세포 상에서 정제된 hGCSF의 활성분석은 WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) 분석 (Roche, IN, USA)을 기초로 하였다. 배양된 세포들을 배양 배지가 첨가된 96-웰 플레이트에 웰당 3x10⁴의 밀도로 접종하였다. M-NFS60 세포에 있어 hGCSF의 영향을 조사하기 위해서, 각각 다른 농도(0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ng/mL)의 hGCSF를 각 웰당 최종 부피 100ul로 하여 동시에 첨가하였다. 72시간 배양 후, 10ul의 Cell Proliferation Reagent WST-1을 첨가하였고, 어둡게 하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 최종적으로 450nm

과장에서의 광학 밀도를 ELISA plate reader로 측정하였다.

[85]

[86] 3. 결과

[87] 분리된 hGCSF의 생물학적 활성을 확인하기 위해서, 골수성 백혈병 M-NFS 60 세포의 증식을 WST-1 assay로 측정한 결과, PD1b'a' 혹은 MBP 태그로부터 분리된 hGCSF는 상업적으로 판매하는 hGCSF의 생물학적 활성과 유사하게 나타났다 (도 6). 활성은 1 pM 에서부터 기하급수적으로 증가하였고, 최대값은 80 pM 부근이었다. 상업적으로 시판되는 hGCSF의 EC_{50} 은 1.62 ± 0.19 pM이었고, PD1b'a' 태그로부터 분리된 hGCSF의 EC_{50} 은 2.78 ± 0.27 pM이었으며, MBP 태그로부터 정제된 hGCSF의 EC_{50} 은 3.49 ± 0.54 pM이었다(Hill 계수는 각각 0.73 ± 0.21 , 0.71 ± 0.29 , and 0.67 ± 0.21 임).

청구범위

- [청구항 1] 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 과립구 생성 촉진인자(human granulocyte colony-stimulating factor; hGCSF) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 티오레독신(Thioredoxin, Trx), 글루타치온 S-트랜스퍼라제(Glutathione S-transferase; GST), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 및 인간 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(human protein disulfide isomerase b'a' domain; hPDib'a')로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 hGCSF 유전자는 서열번호 1로 표시되는 핵산서열인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.
- [청구항 4] 제 2 항에 있어서, 상기 Trx 유전자는 서열번호 2로 표시되는 핵산서열이고, 상기 GST 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 핵산서열이고, 상기 NusA 유전자는 서열번호 4로 표시되는 핵산서열이고, 상기 hPDib'a' 유전자는 서열번호 5로 표시되는 핵산서열인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 도 1a의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.
- [청구항 6] 제 1 항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 대장균은 BL21(DE3)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 9] 수용성 향상 태그 및 hGCSF 유전자가 포함된 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 티오레독신(Thioredoxin, Trx), 글루타치온 S-트랜스퍼라제(Glutathione S-transferase; GST), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 및 인간 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(human protein disulfide isomerase b'a' domain; hPDib'a')로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.
- [청구항 11] 제 6 항 또는 제 9 항에 따른 재조합 미생물을 배양하여 수용성 향상 태그-hGCSF 재조합 단백질을 발현시키는 단계;

상기 발현된 수용성 향상 태그-hGCSF 재조합 단백질에서 수용성 향상 태그를 제거하는 단계; 및
상기 수용성 향상 태그가 제거된 hGCSF 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 hGCSF 재조합 단백질(rhGCSF) 생산방법.

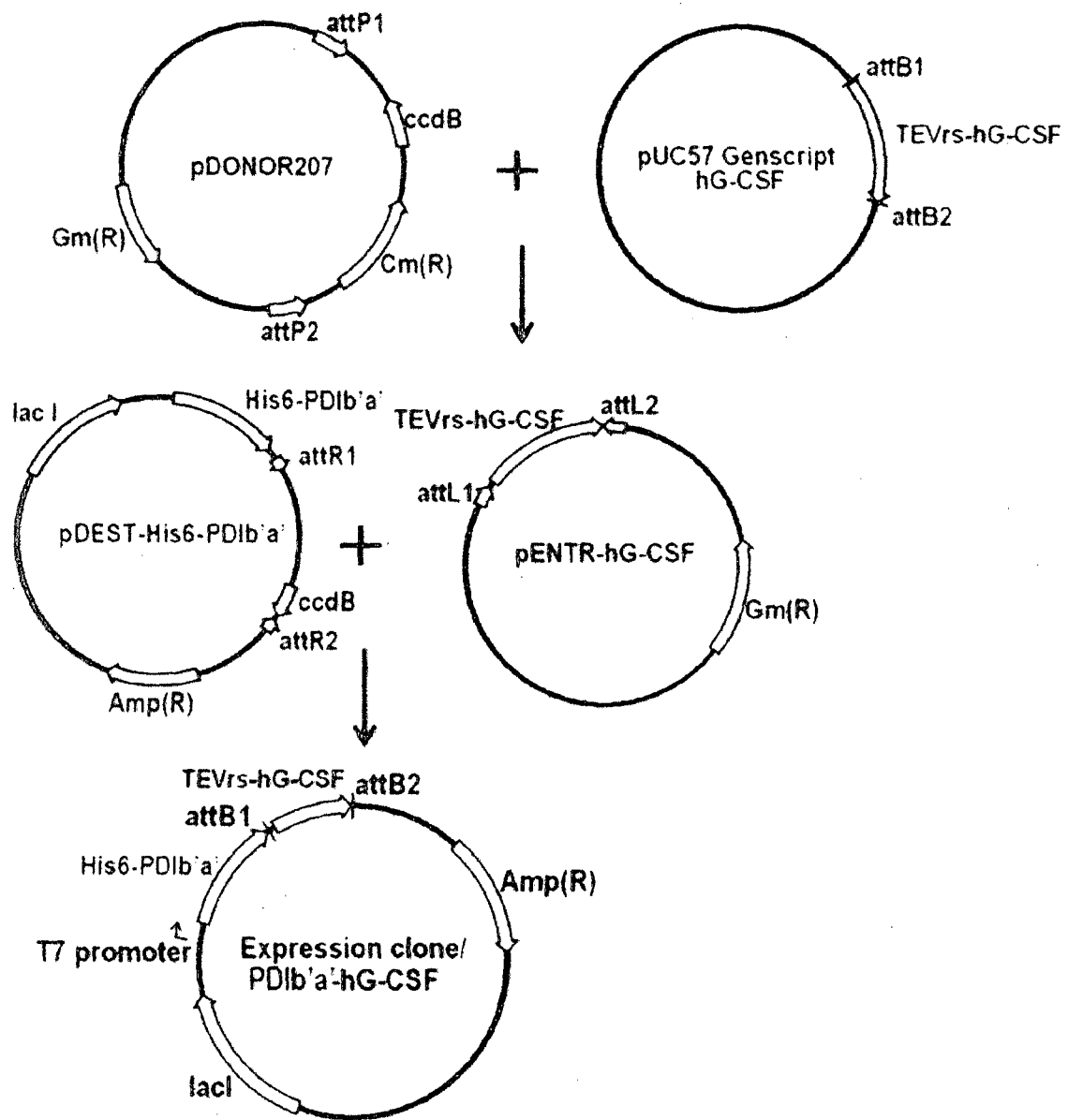
[청구항 12]

제 11 항에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 티오레독신(Thioredoxin, Trx), 글루타치온 S-트랜스퍼라제(Glutathione S-transferase; GST), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA) 및 인간 단백질 이황화물 이성질화효소 b'a' 도메인(human protein disulfide isomerase b'a' domain; hPDIb'a')로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 hGCSF 재조합 단백질(rhGCSF) 생산방법.

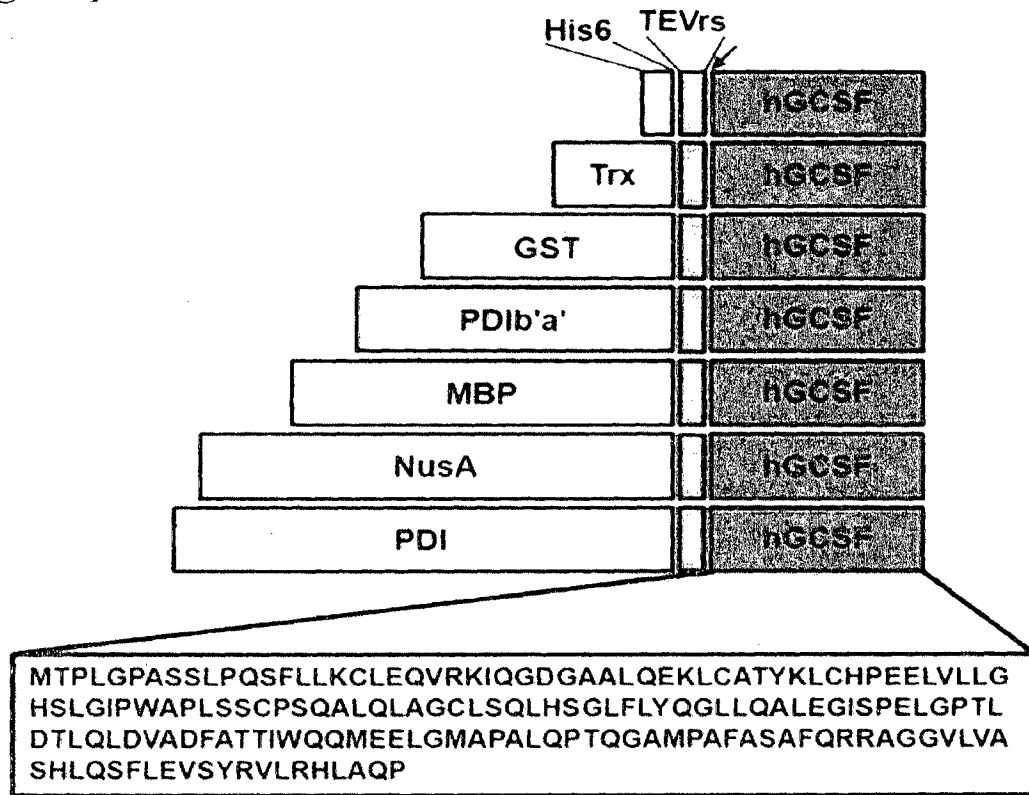
[청구항 13]

제 11 항에 따른 생산방법에 의해 생산된 hGCSF 재조합 단백질(rhGCSF).

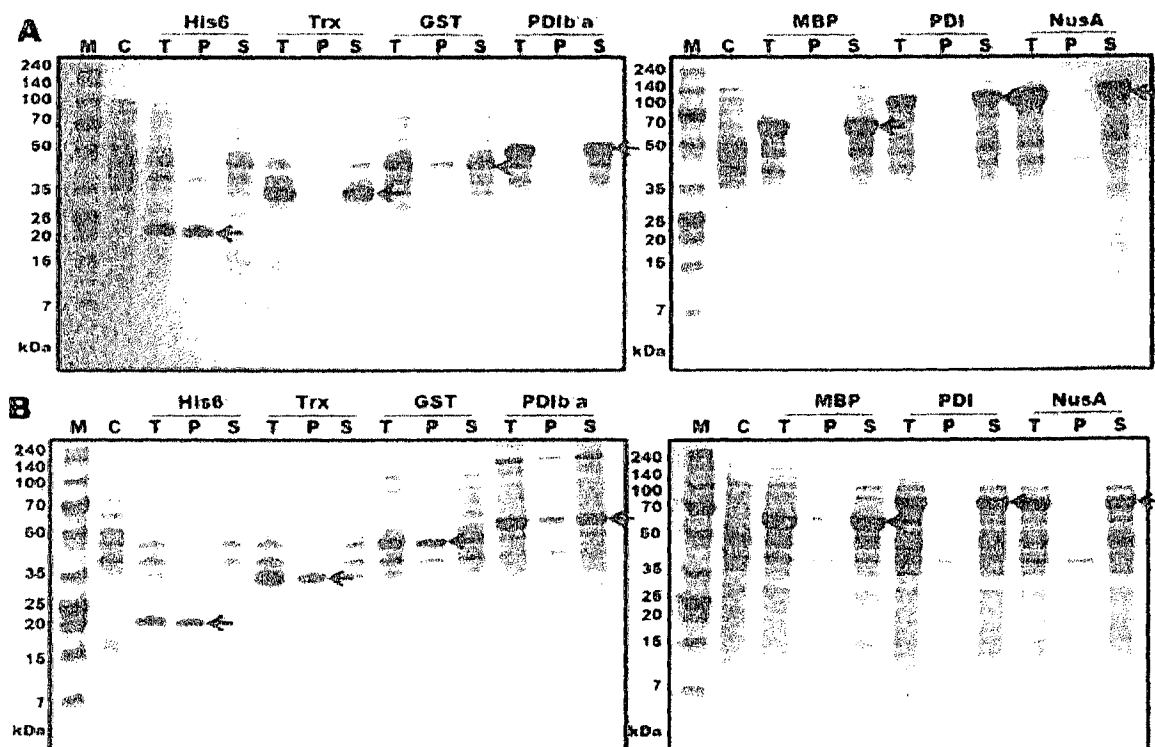
[Fig. 1a]



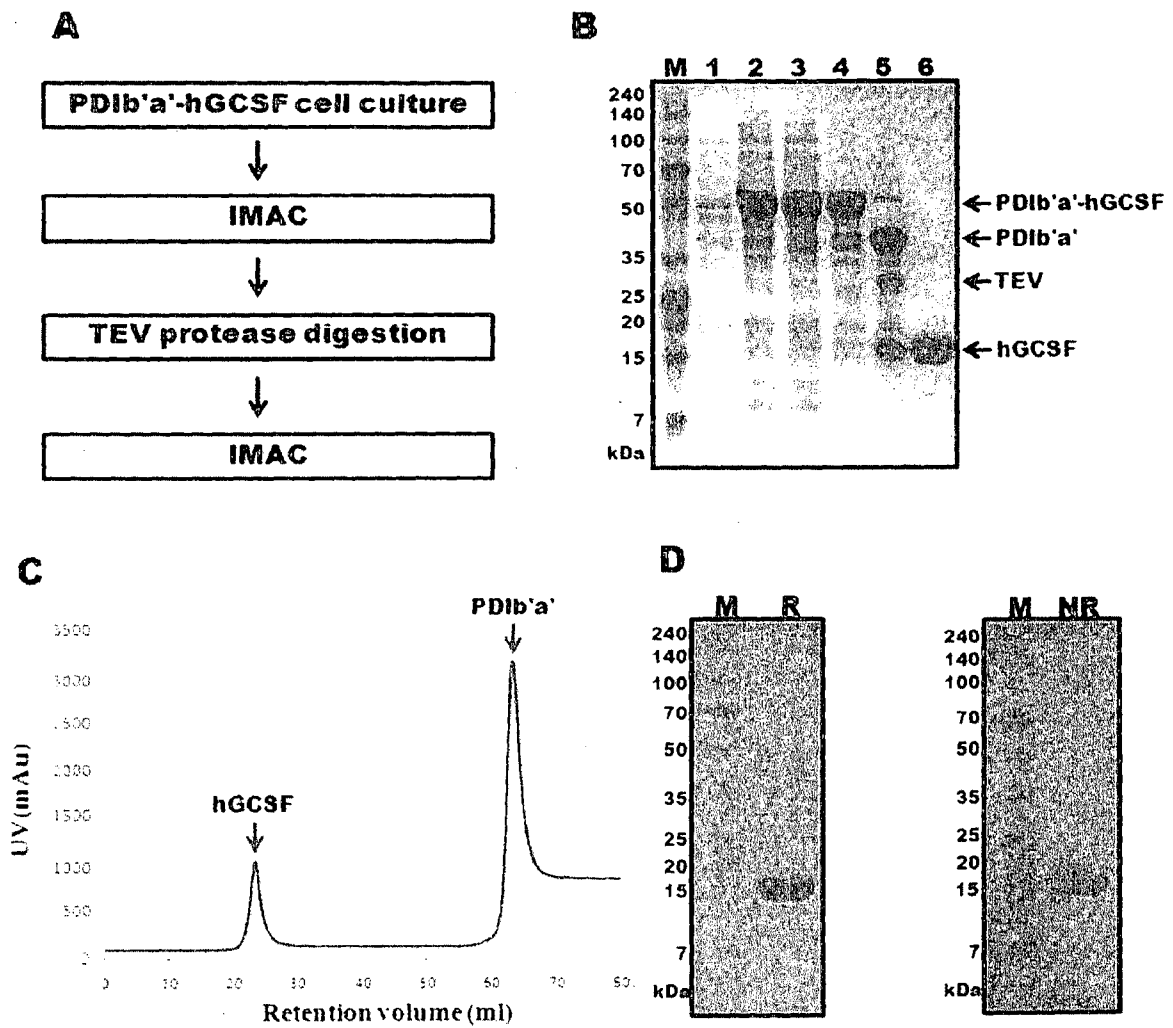
[Fig. 1b]



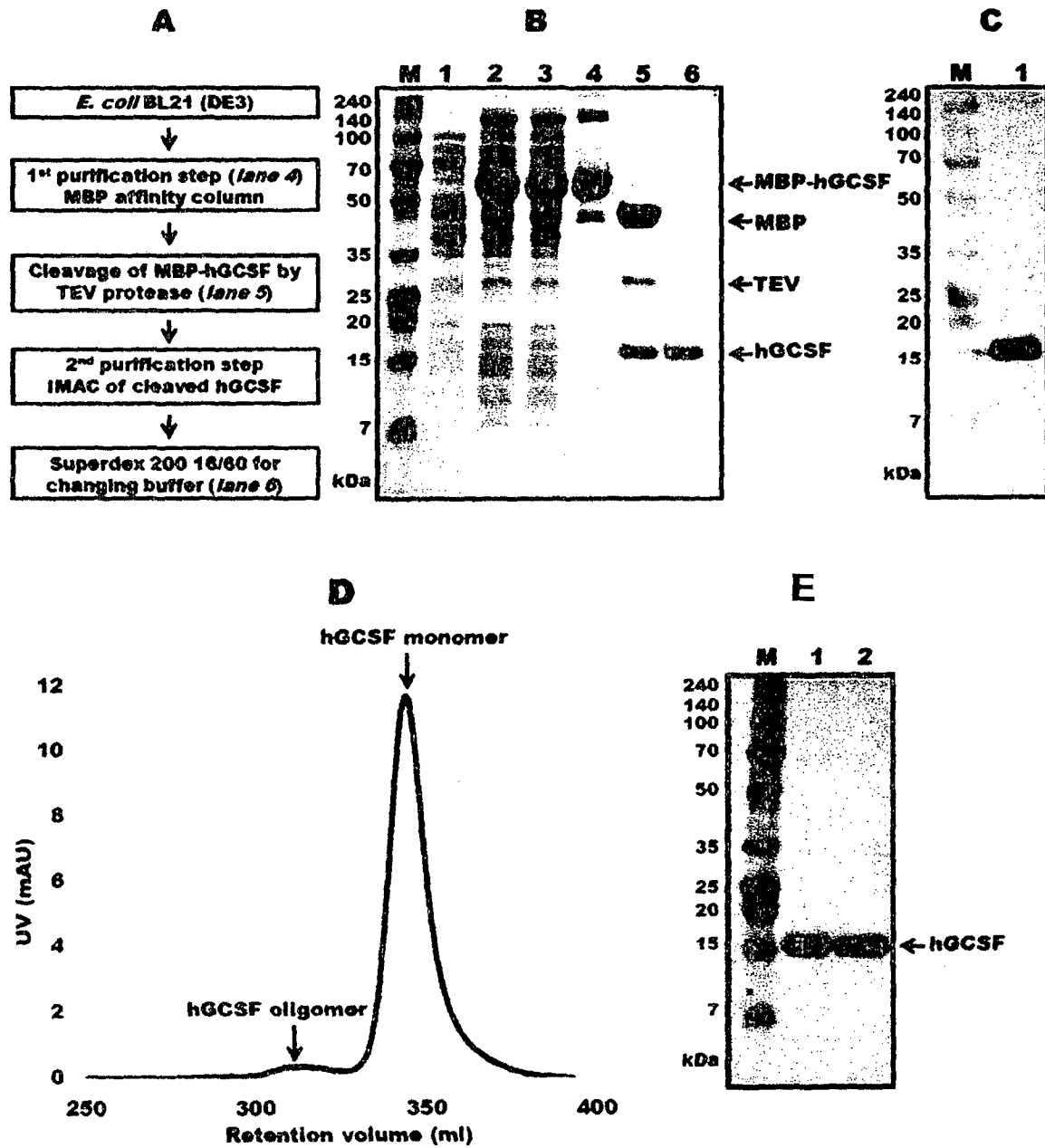
[Fig. 2]



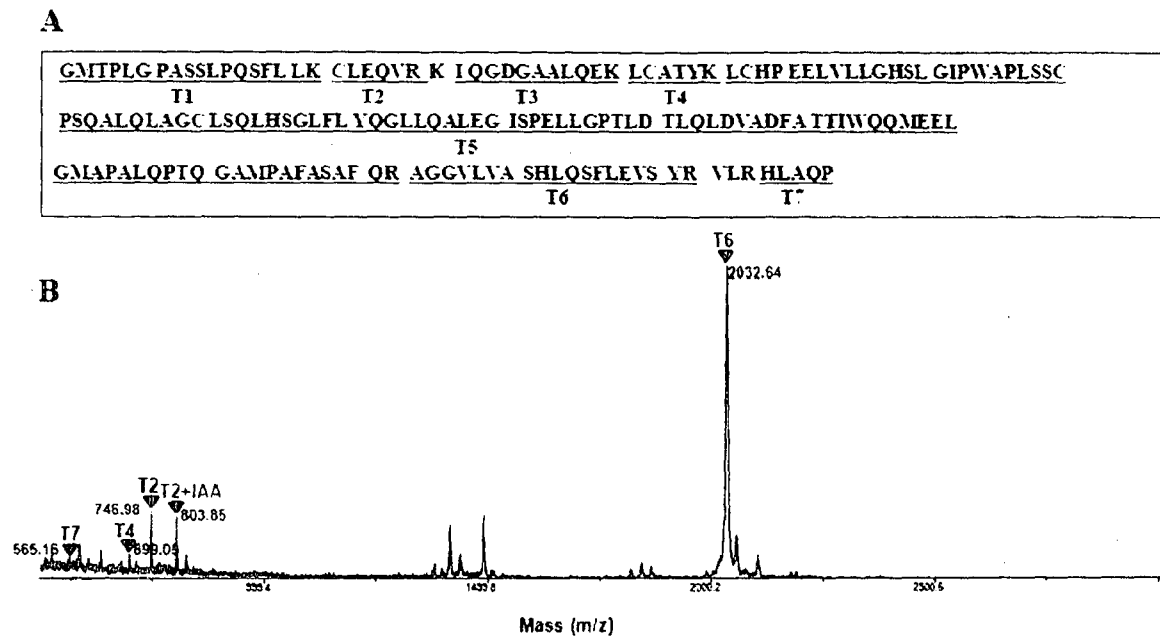
[Fig. 3]



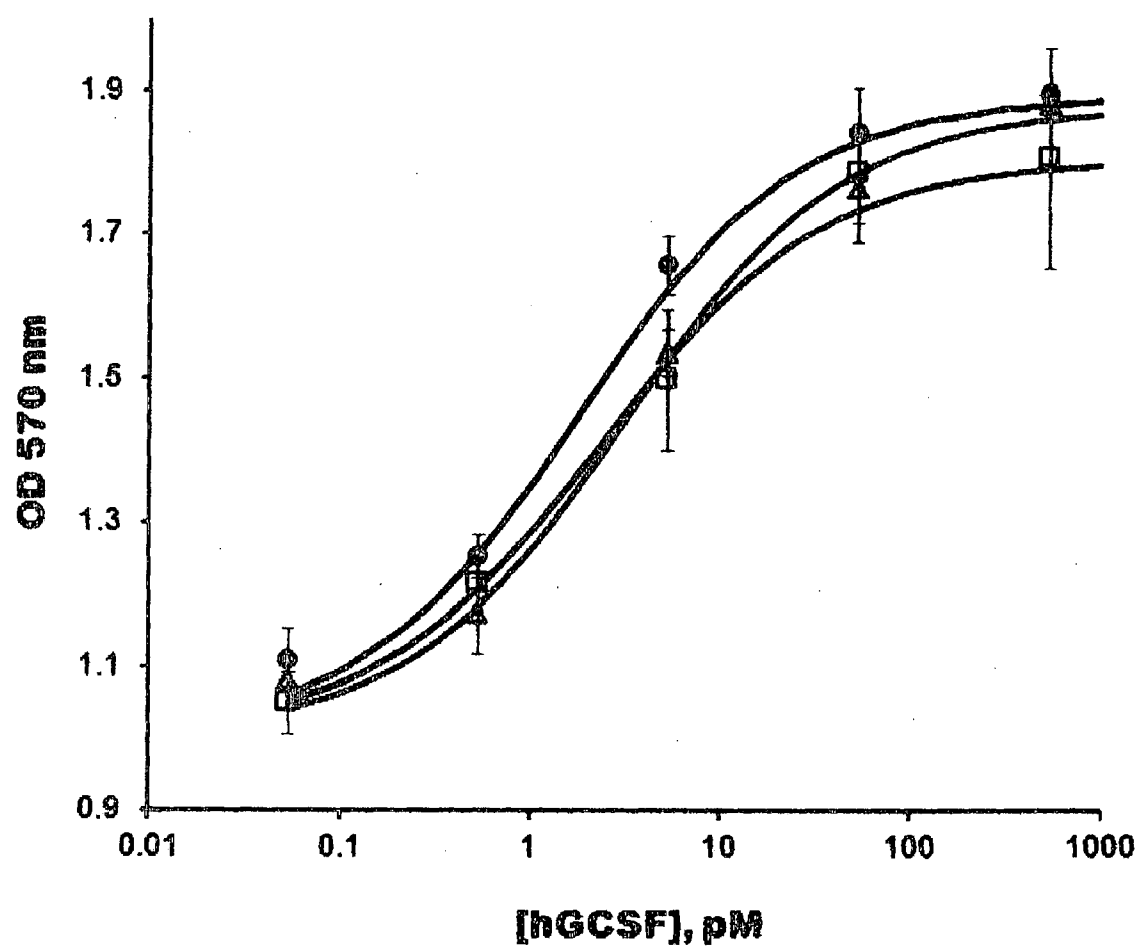
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/008876**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/27(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C07K 14/535(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)

C12N 15/27; C12N 15/63; C12N 15/12; C07K 1/107; C07K 14/535; C12N 15/70

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: solubility enhancing tags, human granulocyte colony-stimulating factor, hGCSF, Trx, GST, NusA, hPD1b'a'

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2008-0039879 A (VEXXON,INC.) 07 May 2008 See claims 1, 10, 12 etc.	1,2,5-13
A		3,4
Y	WO 2009-139784 A1 (NORA THERAPEUTICS, INC.) 19 November 2009 See the detailed description paragraphs [69], [86], [160] etc.	1,2,5-13
A		3,4
A	Das, K. M. P. et al.. Cloning, Soluble Expression and Purification of High Yield Recombinant hGMCSF in Escherichia coli. See Int. J. Mol. Sci. 12(3): 2064-2076(March 2011) abstract etc.	1-13
A	Kim, C. W. et al.. N-terminal domains of native multidomain proteins have the potential to assist de novo folding of their downstream domains in vivo by acting as solubility enhancers. See Protein Science. 16(4): 635-643(March 2007) abstract etc.	1-13
A	Sarkar, C. A et al.. Rational cytokine design for increased lifetime and enhanced potency using pH-activated "histidine switching". See Nature Biotechnology. 20(9): 908-913(2002) abstract etc.	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 JANUARY 2015 (22.01.2015)

Date of mailing of the international search report

23 JANUARY 2015 (23.01.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/008876

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0039879 A	07/05/2008	US 2009-0305351 A1	10/12/2009
		US 8080387 B2	20/12/2011
		WO 2007-049829 A1	03/05/2007
WO 2009-139784 A1	19/11/2009	EP 2274325 A1	19/01/2011
		EP 2274325 A4	25/05/2011
		US 2011-0171168 A1	14/07/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/27(2006.01)i, C12N 15/70(2006.01)i, C07K 14/535(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/27; C12N 15/63; C12N 15/12; C07K 1/107; C07K 14/535; C12N 15/70

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: solubility enhancing tags, human granulocyte colony-stimulating factor, hGCSF, Trx, GST, NusA, hPD1b'a'

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2008-0039879 A (주식회사 백손) 2008.05.07	1,2,5-13
A	청구항 1,10,12 등 참조	3,4
Y	WO 2009-139784 A1 (NORA THERAPEUTICS, INC.) 2009.11.19	1,2,5-13
A	상세한 설명 식별번호[69], [86], [160] 등 참조	3,4
A	Das, K. M. P. 등. Cloning, Soluble Expression and Purification of High Yield Recombinant hGMCSF in Escherichia coli. Int. J. Mol. Sci. 12(3): 2064-2076 (2011. 03.) 초록 등 참조	1-13
A	Kim, C. W. 등. N-terminal domains of native multidomain proteins have the potential to assist de novo folding of their downstream domains in vivo by acting as solubility enhancers. Protein Science. 16(4): 635-643(2007.03.) 초록 등 참조	1-13
A	Sarkar, C. A 등. Rational cytokine design for increased lifetime and enhanced potency using pH-activated "histidine switching". Nature Biotechnology. 20(9): 908-913(2002) 초록 등 참조	1-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 01월 22일 (22.01.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 01월 23일 (23.01.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 3473

심사관

이영기

전화번호 +82-42-481-8655



제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2008-0039879 A

2008/05/07

US 2009-0305351 A1

2009/12/10

US 8080387 B2

2011/12/20

WO 2007-049829 A1

2007/05/03

WO 2009-139784 A1

2009/11/19

EP 2274325 A1

2011/01/19

EP 2274325 A4

2011/05/25

US 2011-0171168 A1

2011/07/14