



- (51) 국제특허분류:
C12N 15/70 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/001063
- (22) 국제출원일: 2015년 2월 2일 (02.02.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0019086 2014년 2월 19일 (19.02.2014) KR
- (71) 출원인: 한국표준과학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) [KR/KR]; 305-340 대전시 유성구 가정로 267, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 최준혁 (CHOI, Jun-Hyuk); 305-742 대전시 유성구 배을 1로 13, 206—403, Daejeon (KR). 김숙경 (KIM, Sook-Kyung); 305-315 대전광역시 유성구 봉명로 48, 803-402, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 플러스 (PLUS INTERNATIONAL IP LAW FIRM); 302-828 대전시 서구 한밭대로 809 10층, Daejeon (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).

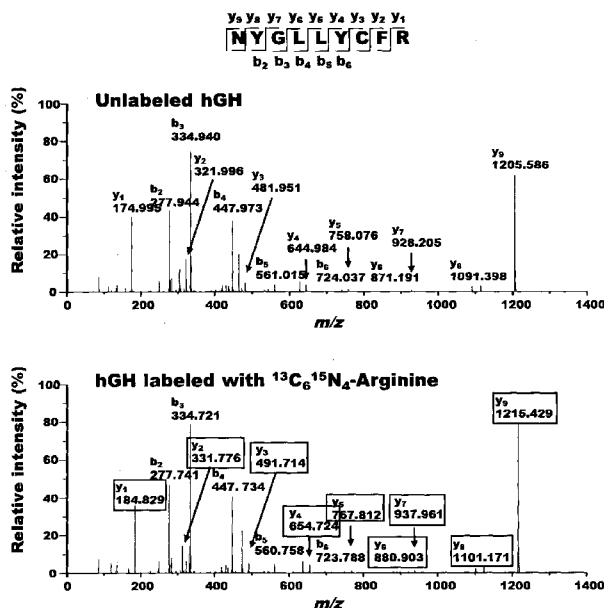
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION, PURIFICATION AND ANALYSIS OF STABLE ISOTOPE-LABELED PROTEIN

(54) 발명의 명칭: 안정동위원소 표지 단백질 생산, 정제 및 분석 방법

[Fig. 8]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for intracellular production, extraction and purification of a stable isotope-labeled protein and, more specifically, to a method for purification of a protein and analysis of the protein, the method allowing high-yield production of proteins having a biological activity while maximizing solubility in an extraction process of a target protein in the case of expressing the proteins on a large scale using an *Escherichia coli* system. A large quantity of high-purity hGH was purified according to the present invention, a stable isotope-labeled SI-His-hGH was synthesized, and whether the protein is labeled or not was successfully confirmed.

(57) 요약서: 본 발명은 안정동위원소 표지 단백질의 세포내 생산 및 추출, 정제 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 대장균 시스템에서 단백질을 대량발현시, 목적단백질의 추출 과정에서 용해도를 최대화하며, 생물학적 활성을 가지고, 다량의 수득물로 얻을 수 있는 정제방법 및 이의 분석에 관한 것이다. 본 발명을 통해 다량의 고순도 hGH를 정제하였고, 안정동위원소 표지 SI-His-hGH를 합성하여 표지 여부를 성공적으로 확인하였다.

명세서

발명의 명칭: 안정동위원소 표지 단백질 생산, 정제 및 분석 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 안정동위원소 표지 단백질의 세포 내 생산 및 추출, 정제 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 단백질의 정량분석을 위한 내부표준물질로 이용할 수 있는 안정동위원소 표지 단백질을 대장균 시스템에서 대량 발현하고 추출하는 과정에서 용해도를 최대화하여 높은 수득률로 얻을 수 있는 정제 방법 및 정제된 단백질의 분석법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인간성장호르몬(human growth hormone, hGH)은 191개의 아미노산 잔기를 가지며 뇌하수체에서 합성되는 단일사슬 폴리펩타이드이다. 인간성장호르몬은 세포증식과 신진대사를 포함한 다양한 생물학적 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 인체에 가장 중요한 호르몬 중 하나이다(Annu. Rev. Physiol., 47, 1985, 483-499). 인간성장호르몬은 재조합 단백질의 합성과 정제가 가능하며 소마트로핀(somatropin)이라 하여 인체 내 인간성장호르몬인 소마토포트로핀(somatotropin)과 구별된 명칭을 사용한다.
- [3] 단백질 정량에 관한 최근 연구는 생물학적으로 복잡한 시료에서 표적 단백질을 절대적으로 정량하기 위한 기술 개발에 초점이 맞추어져 있다. 이를 위해 내부 표준 물질(internal standard)로 안정동위원소(stable isotope)가 표지된 펩타이드(peptide)를 이용하여 펩타이드 수준으로 절단된 표적 단백질의 양을 유추하는 실험 원리가 많이 이용되고 있다. 그러나, 이러한 방법은 고비용의 펩타이드 합성이 선행되어야 하고, 표적 단백질의 절단 효율이 정량분석에 큰 영향을 미치는 단점으로 보다 나은 대안이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 재조합 DNA 기술(recombinant DNA technology)과 안정동위원소 표지 아미노산을 이용하여 동위원소 표지 단백질을 합성하고, 이를 표적 단백질의 정량분석을 위한 내부표준물질로 개발하였다. 상기 접근법의 최대 장점은 내부표준물질이 표적 단백질과 구조적, 화학적으로 매우 유사하다는 점이다. 이에 본 발명자들은 대장균(*Escherichia coli*) 발현 시스템을 이용하여 동위원소 표지된 인간성장호르몬의 최적화된 생산과 정제 과정을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [5] 본 발명의 일 양태는,
- [6] (1) 목적 단백질을 암호화하는 발현 벡터로 대장균을 형질전환하는 단계;
- [7] (2) 상기 형질전환된 대장균을 배양 배지에서 배양하는 단계;

- [8] (3) 상기 배양된 대장균을 포도당 최소 배지에 접종하는 단계;
- [9] (4) 상기 최소 배지에 접종한 대장균을 배양하는 단계;
- [10] (5) 상기 배양된 대장균에 안정동위원소로 표지된 아미노산을 포함하는 아미노산 혼합 용액을 투입하고, 동위원소표지 단백질의 발현을 유도하는 단계;
- [11] (6) 상기 아미노산 용액이 투입된 대장균 배양액을 15 내지 25 °C의 온도에서 8 내지 18 시간 동안 배양하는 단계;
- [12] 를 포함하는 안정동위원소 표지 단백질의 생산 방법에 관한 것이다.
- [13] 본 발명에서 상기 단계 (1)의 목적 단백질은 제한되지는 않지만, 인간성장호르몬(human growth hormone, hGH)일 수 있다. 상기 단계 (1)의 대장균은 제한되지는 않지만 대장균 BL21 균주를 사용할 수 있으며, 37 °C에서 OD₆₀₀ 값이 0.4 내지 0.8에 이를 때까지 배양할 수 있다. 또한 배양 배지는 제한되지는 않지만, 40 내지 60 mg/mL 카나마이신을 포함하는 5 내지 15 g/L 박토트립톤(Bacto Tryptone), 3 내지 8 g/L 효모 추출물(yeast extract) 및 5 내지 15 g/L 염화나트륨이 녹아 있는 신선한 LB(Luria-Bretanu) 배지를 사용할 수 있다. 또한 본 발명에서, 상기 단계 (5)의 안정동위원소는 제한되지는 않지만, ¹³C,¹⁵N₄-아르기닌(arginine, Arg)일 수 있다.
- [14] 본 발명의 다른 양태로는,
- [15] (1) 목적 단백질을 암호화하는 발현 벡터로 대장균을 형질전환하는 단계;
- [16] (2) 상기 형질전환된 대장균을 배양 배지에서 배양하는 단계;
- [17] (3) 상기 배양된 대장균을 포도당 최소 배지에 접종하는 단계;
- [18] (4) 상기 최소 배지에 접종한 대장균을 배양하는 단계;
- [19] (5) 상기 배양된 대장균에 안정동위원소로 표지된 아미노산 용액을 투입하고, 동위원소표지 단백질의 발현을 유도하는 단계;
- [20] (6) 상기 아미노산 용액이 투입된 대장균 배양액을 15 내지 25 °C의 온도에서 8 내지 18 시간 동안 배양하는 단계;
- [21] (7) 상기 단계 (6)의 대장균을 완충용해용액으로 용해하는 단계;
- [22] (8) 상기 대장균을 초음파 처리하고, 원심분리하여 동위원소표지 단백질을 회수하는 단계; 및
- [23] (9) 상기 안정동위원소 표지 단백질을 정제하는 단계;
- [24] 를 포함하는 안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법에 관한 것이다.
- [25] 본 발명에서 상기 단계 (1)의 목적 단백질은 제한되지는 않지만, 인간성장호르몬일 수 있으며, 바람직하게는 히스티딘 표지된 인간성장호르몬일 수 있다. 또한 상기 안정동위원소로 표지된 아미노산은 제한되지는 않지만 ¹³C,¹⁵N₄-아르기닌일 수 있다.
- [26] 본 발명에서, 상기 안정동위원소 표지 단백질의 정제는 제한되지는 않지만 친화성 크로마토그래피 및 음이온-교환 크로마토그래피 중 하나 이상을 이용할 수 있으며, 바람직하게 상기 친화성 크로마토그래피의 컬럼은 Ni-NTA 컬럼을, 상기 음이온-교환 크로마토그래피의 컬럼은 모노 큐(Mono Q) 컬럼을 이용할 수

있다.

[27]

[28] 본 발명에서 상기 단계 (7)의 용해완충용액은 제한되지는 않지만 0.3 내지 0.8 mM EDTA, 0.5 내지 1.5 mg/mL 라이소자임(lysozyme), 1x 단백질 분해효소 저해제 혼합물(protease inhibitor cocktail) 및 비이온성 변성제(detergent)를 포함하는 pH 7.5 내지 8.5의 Tris-HCl일 수 있다. 또한, 상기 비이온성 변성제는 바람직하게는 0.01 내지 2% (v/v)의 트리톤(Triton) X-100 또는 트윈(Tween) 20일 수 있다.

[29] 또한 본 발명에서, 상기 단계 (7)의 용해완충용액은 제한되지는 않지만 염이 포함되지 않을 수 있으며, 바람직하게는 상기 염은 염화나트륨 또는 염화칼륨일 수 있다.

[30] 본 발명에서 상기 용해완충용액의 사용량은 제한되지는 않지만, 대장균세포(펠렛) 30 mg에 대하여 0.25 내지 2 mL일 수 있다.

[31]

[32] *본 발명의 또 다른 양태는,

[33] (1) 목적 단백질을 암호화하는 발현 벡터로 대장균을 형질전환하는 단계;

[34] (2) 상기 형질전환된 대장균을 배양 배지에서 배양하는 단계;

[35] (3) 상기 배양된 대장균을 포도당 최소 배지에 접종하는 단계;

[36] (4) 상기 최소 배지에 접종한 대장균을 배양하는 단계;

[37] (5) 상기 배양된 대장균에 안정동위원소로 표지된 아미노산 용액을 투입하고, 동위원소표지 단백질의 발현을 유도하는 단계;

[38] (6) 상기 아미노산 용액이 투입된 대장균 배양액을 15 내지 25 °C의 온도에서 8 내지 18 시간 동안 배양하는 단계;

[39] (7) 상기 단계 (6)의 대장균을 완충용해용액으로 용해하는 단계;

[40] (8) 상기 대장균을 초음파 처리하고, 원심분리하여 동위원소표지 단백질을 회수하는 단계;

[41] (9) 상기 안정동위원소 표지 단백질을 정제하는 단계; 및

[42] (10) 정제한 안정동위원소 표지 단백질을 MALDI-TOF MS 또는 HPLC로 분석하는 단계;

[43] 를 포함하는 단백질 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 상기 MALDI-TOF MS는 제한되지는 않지만, m/z 600 내지 3,500의 범위일 수 있으며, 상기 HPLC의 컬럼의 온도는 제한되지는 않지만 20 내지 50 °C, 유속은 0.1 내지 1.0 mL/min일 수 있다.

발명의 효과

[44] 본 발명은 대장균 시스템에서 안정동위원소 표지 hGH을 생산하기 위해, 목적단백질을 암호화하는 발현벡터를 이용하여 대장균을 형질전환한 후 포도당 최소배지에 접종하여 배양하는 과정에서 안정동위원소 표지된 특정 아미노산을

투입하여 동위원소표지 hGH의 대량 발현을 유도하고, 이를 추출과정에서 hGH 용해도를 최대화하고, 이를 매우 높은 순도로 정제하는 방법 및 동위원소 표지 hGH의 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명을 통해 단백질의 정량분석을 위한 내부표준물질로 이용할 수 있는 안정동위원소 표지 단백질을 높은 효율로 대량 발현하고, 단백질 추출과정에서 용해도를 극대화하여 높은 수득률을 얻을 수 있다. 이 후 친화성 크로마토그래피와 이온-교환 크로마토그래피를 통해 매우 높은 순도의 hGH를 정제할 수 있었으며, 이를 바탕으로 다량의 고순도 안정동위원소 표지 SI-His-hGH를 생산하였고, MALDI-TOF MS를 이용하여 동위원소표지 여부를 성공적으로 확인하였다.

도면의 간단한 설명

- [45] 도 1은 대장균에서 재조합 hGH와 His-hGH의 발현을 나타낸 것이다.
- [46] M: 단백질 마커, U: 형질 전환 후, 발현 유도되지 않은 세포, I: 형질 전환 후, 발현 유도된 세포, Empty: 형질 전환되지 않은 세포, hGH: 비태그-hGH 발현 세포, His-hGH: 히스티딘 표지-hGH 발현 세포.
- [47] 도 2는 최적화되지 않은 네이티브(native) 조건에서 His-hGH의 정제를 나타낸 것이다.
- [48] L: 세포 용해물, S: 상등액(가용성 단백질), P: 펠렛(불용성 단백질), E1: elution 1, E2: elution 2, E3: elution 3, FT: flow through.
- [49] 도 3은 최적화된 네이티브 조건에서 His-hGH의 정제를 나타낸 것이다.
- [50] 1: 발현 유도되지 않은 세포, 2: 발현 유도된 세포, 3: 세포 용해물, 4: 펠렛(불용성 단백질), 5: 상등액(가용성 단백질), 6: elution 1, 7: elution 2, 8: flow through, 9: 2차 elution 1, 10: 2차 elution 2, 11: 2차 flow through.
- [51] 도 4는 대장균에서 His-hGH와 SI(stable isotope, 안정동위원소표지)-His-hGH의 발현을 비교하여 나타낸 것이다.
- [52] 도 5는 최적화된 네이티브 조건에서 SI-His-hGH의 1차 정제를 나타낸 것이다.
- [53] 1: 유도되지 않은 세포, 2: 유도된 세포, 3: 세포 용해물, 4: 펠렛(불용성 단백질), 5: 상등액(가용성 단백질), 6: elution 1, 7: elution 2, 8: elution 3, 9: flow through, 10: 비교대조군 LG-hGH (2 μ g), 11: 비교대조군 LG-hGH (10 μ g).
- [54] 도 6은 His-hGH를 트립신 처리한 후 예상되는 펩타이드를 나타낸 것이다.
- [55] 도 7은 양성 대조군 LG-hGH와 SI-His-hGH를 트립신 처리 후 발생하는 4종의 대표 펩타이드들을 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 질량측정값을 확인한 그림이다.
- [56] 도 8은 m/z 1205.574의 LG-hGH 트립신 분해 펩타이드의 Lift TOF/TOF (MS/MS) 스펙트럼과 m/z 1215.429의 SI-His-hGH 펩타이드의 스펙트럼을 비교하는 그림이다.
- [57] 도 9는 모노 큐 컬럼을 사용한 His-hGH의 이온-교환 크로마토그래피를 나타낸 것이다.

- [58] 도 10은 모노 큐 분석의 silver staining 분석 결과를 나타낸 것이다.
 [59] 도 11은 LG-hGH와 정제된 His-hGH의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [60] 이하 본 발명을 실시예와 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [61]
- [62] (실시예 1) 인간성장호르몬 발현을 위한 벡터의 제조
- [63] 재조합 인간성장호르몬 발현을 위한 인간성장호르몬 유전자(NCBI Reference: NM_000515.3: 141-719)는 (주)바이오니아(BIONEER, Daejeon, Korea)에 합성을 의뢰하였고, 5'말단에 NheI 제한효소 절단자리(GCTAGC)와 3'말단에 XhoI 제한효소 절단자리(CTCGAG)를 삽입하였다(서열번호 1). 상기 합성된 cDNA를 제한효소 NheI와 XhoI를 이용하여 pET-28a(Novagen, Madison, WI, USA)에 ligation시켜 N-말단에 6-히스티딘 표지와 트롬빈 절단 부위를 갖는 재조합 인간성장호르몬을 발현하는 His-hGH 발현 벡터를 완성하였다.
- [64] 또한, 히스티딘 표지가 없는 인간성장호르몬을 발현하는 untagged hGH 발현 벡터의 경우, 정방향 프라이머 5' -ccatggcgatgttccaaccatt-3'(서열번호 2)와 역방향 프라이머 5' -ctcgagctagaagccacagct-3'(서열번호 3)을 이용하여 상기 합성된 cDNA를 주형으로하여 중합효소 연쇄반응 하여 5'말단에 NcoI 제한효소 절단자리(CCATGG)와 3'말단에 XhoI 제한효소 절단자리(CTCGAG)를 포함하는 cDNA를 제작하였다. 이 중합효소연쇄반응의 결과물은 NcoI과 XhoI의 제한부위로 잘리고, 표지가 없는 재조합 인간성장호르몬(untagged hGH)을 발현하기 위한 pET28a 발현 벡터의 NcoI과 XhoI 제한부위들과 이어졌다. 발현하고자 하는 유전자의 뉴클레오티드 서열은 자동 순서화를 통하여 확인되었다.
- [65]
- [66] (실시예 2) 대장균 발현 시스템을 이용한 인간성장호르몬 발현 및 추출
- [67] His-hGH 발현 재조합 DNA 3종을 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하였다. 50 mg/mL 카나마이신을 포함하는 250 mL 플라스크에 상기 대장균을 접종하고 37 °C에서 하룻밤 배양하였다. 배양액 5 mL을 10,000 x g에서 5분간 원심분리한 후 0.2 중량% 포도당을 함유한 M9 배지(Cat No. M8003; Technova Co. USA)로 세척하였다. 처리한 배양액을 카나마이신을 포함한 M9 배지 500mL가 담긴 4L 플라스크에 접종하고 OD₆₀₀ 약 0.6의 값을 가질 때까지 37 °C에서 배양하였다. 아미노산 용액을 만들기 위해 200 mL 증류수에 아르기닌(Arg)을 제외한 19가지 아미노산 1g 각각을 넣어 25 x 아미노산 혼합물을 제조한 후 1 mL 증류수에 방사성동위원소로 표지된 ¹³C¹⁵N-아르기닌(Arg) 250 g을 포함하는 용액을 제조하였다. 25 x 아미노산 혼합물 20 mL과 250 mg/mL 농도의 ¹³C¹⁵

N-아르기닌(Arg) 400 μ L을 넣고 30분간 배양하였다. 상기 용액 0.5 mL는 SDS-PAGE 수행을 위해 별도로 보관하고, 상기 대장균 배양액에서 인간성장호르몬의 발현을 유도하기 위하여 0.5 M 베타-D-1-갈락토피라노사이드(β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 1 mL을 넣어 단백질을 발현시켰다. 상기 단백질을 SI-His-hGH라 명명하였다. 16 °C에서 16 시간 배양한 후 마찬가지로 0.5 mL를 SDS-PAGE 수행을 위해 별도로 보관하고, 나머지 용액을 4 °C에서 10,000 x g로 20 분간 원심분리하여 세포를 수득한 후 냉동하여 보관하였다. 회수한 대장균 세포를 25 mL 용해완충용액(1 mg/mL 라이소자임, 1 x 프로테아제 저해제 콕테일(로쉬, 스페인) 및 0.5 mM EDTA를 포함하는 50 mM Tris-HCl)과 초음파를 이용하여 파쇄한 후, 10,000 x g에서 20분 동안 원심분리하여 불용성(pellet) 및 가용성(soluble) 분획을 수득하여 SDS-PAGE를 실시하였고 코마쉬 블루 염색시약으로 염색하였다. 또한, 인간성장호르몬의 분석을 위하여 이미지퀀트™ TL 5.2 분석 소프트웨어(ImageQuant™ TL 5.2 analysis software)를 사용하여 농도계(densitometry) 분석법으로 가용성(S) 및 불용성(P) 단백질 양을 분석하였다.

[68] 도 1에서, His-hGH는 단백질 합성을 유도하는 IPTG에 의해 발현되는 것을 확인할 수 있다. 상기 결과로부터 His-hGH 발현 DNA를 이후 실시예의 대상으로 선정하였다.

[69]

[70] (실시예 3) 불용성 분획의 가용화를 위한 용해완충용액의 최적 조건

[71]

[72] 불용성 분획을 가용화하여 가용성 분획에 포함할 수 있도록 하는 용해완충용액의 최적 조성을 확인하였다. 상기 실시예 2와 동일한 방법을 수행하여 수득한 불용성 분획은 하기 표 1 조성의 용해완충용액을 이용하여 최적의 조성을 확인하였다.

[73]

[74] 표 1

[Table 1]

불용성 분획에서 가용화 단백질의 수득을 위한 용해완충용액의 조성

시료 번호	용해완충용액의 조성	
	첨가제(농도)	조성
1	트리톤 X-100 (0, 0.1, 0.5 또는 1%)	1 mg/ml 라이소자임, 1x프로테아제 저해제 각테일 및 0.5 mM EDTA를 포함하는 pH 8.0의 50 mM 염산-트리스 완충용액
2	트윈 20 (Tween 20)(0, 0.1, 0.5 또는 1%)	
3	염화 나트륨(NaCl)(0, 0.15, 0.5 또는 1 M)	
4	염화 칼륨(KCl)(0, 0.15, 0.5 또는 1 M)	
5	베타-머캅토에탄올(β -mercaptoethanol)(0, 50, 10 또는 20 mM)	

[75]

[76] (실시예 4) 재조합 단백질, 인간성장호르몬의 정제

[77] 상기 실시예 1 내지 실시예 3에서 확립한 최적의 인간성장호르몬 발현 및 추출 조건을 활용하여 인간성장호르몬의 추출 후 정제하였다. 재조합 인간성장호르몬(His-hGH 및 SI-His-hGH)을 발현시키는 *E. coli* BL21(DE3)은 250 mL 배양 배지에서 배양하였고 16 °C에서 16 시간 동안 유도되어 수확하였다. 상기 수확한 세포를 25 mL 용해완충용액(0.5 mM EDTA, 0.1% 트리톤 X-100, 1 mg/mL 라이소자임 및 1 x 프로테아제 저해제 각테일(로쉬, 스페인)을 포함하는 pH 8.0 50 mM Tris-HCl)에 녹여 초음파 처리한 후 10,000 x g로 20분 동안 원심분리한 후 수득하여 정제하였다.

[78] (1) His-hGH 및 SI-His-hGH의 정제

[79] Ni-NTA 컬럼을 사용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)로 1차 정제

[80] 원심분리 후 최적으로 용해된 His-hGH 및 SI-His-hGH 상층액을 Ni-NTA 아가로스 비즈 1mL가 있는 컬럼(Qiagen, Valencia, CA, USA)에 각각 주입하였다. 컬럼에 주입된 His-hGH 및 SI-His-hGH 단백질을 컬럼 부피의 3배 되는 표 2의 세척 완충용액으로 씻고, 표 2의 10 mL 용리완충용액(elution buffer)으로 용리하여 His-hGH 및 SI-His-hGH를 1차 정제하였다. 상기 His-hGH 및 SI-His-hGH가 포함된 분획을 각각 음이온 교환 컬럼 완충용액(pH 8.0 50 mM Tris-HCl 및 10% 글리세롤)으로 투석하였다.

[81]

[82] 표 2

[Table 2]

친화성 크로마토그래피를 위한 완충용액의 조성

조성	세척완충용액*	용리완충용액*
염화나트륨	150 mM	150 mM
이미다졸(imidazole), pH 8.0	10 mM	200 mM
트리톤 X-100	0.1%	0.1%
글리세롤	10%	10%

[83] * 세척 및 용리 완충용액으로 상기 조성을 포함하는 pH 7.4의 1x인산염완충용액(Phosphate buffered saline; PBS)을 사용하였다.

[84]

[85] 모노 큐(Mono Q) 컬럼을 사용한 음이온-교환 크로마토그래피(anion-exchange chromatography)로 2차 정제

[86] 투석한 분획들은 음이온-교환 크로마토그래피인 5/50 모노 큐 컬럼(GE Healthcare, USA)으로 0 내지 500 mM 염화나트륨 농도 구배에 따른 직선 변화도를 주며 용리하여 2차 정제하였다.

[87] 도 2의 레인 S(supernatant, soluble protein)와 레인 P(pellet, insoluble protein)를 보면, 대부분의 His-hGH가 불용성 상태인 것을 확인할 수 있었다. 따라서, Ni-NTA 컬럼 크로마토그래피를 통해 E1-E3과 같이 오직 소량의 His-hGH만을 회수할 수 있었다. 상기 실시예를 통해 최적화된 조건에서 단백질 발현과 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피를 수행한 결과는 도 3과 같다. 레인 4와 레인 5를 통해 대부분의 His-hGH가 가용성 분획(soluble fraction)에 존재한다는 것을 확인하였고, 레인 6-7 및 9-10에서 이전 실험결과의 전체 단백질 수율인 2 mg/250mL 배양액 보다 15배 이상 높은 30 mg/250mL 배양액을 얻을 수 있음을 확인하였다.

[88] 도 4는 SI-His-hGH의 발현 여부를 나타낸 것으로, 레인 2와 레인 4를 비교해 보면, $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Arg 표지 단백질과 비표지 단백질의 젤 이동성(gel mobility) 차이를 확인할 수 있었다. 상기 결과를 바탕으로 Ni-NTA 친화성 컬럼 크로마토그래피를 수행한 결과는 도 5와 같다. 레인 4와 5에서 단백질의 용해성을 확인하였고, 레인 6-8에서 높은 농도로 분리된 단백질을 확인할 수 있었다.

[89]

[90] (실시예 5) 정제된 단백질의 분석

[91] (1) MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 정제 단백질 분석

[92] MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 정제된 단백질의 분석을 위해 상기 실시예에서 수득한 정제된 단백질을 쿠마시 스테인드 젤(Coomassie stained

gel)에서 표적 단백질을 분리하여 트립신(trypsin)을 처리하는 인-젤 다이제스트(in-gel digest) 방법을 사용하여 MALDI-TOF MS를 위한 전처리를 수행하였다. His-hGH 및 SI-His-hGH를 포함하는 젤 조각을 각각 잘라낸 후에 환원과 알킬화를 유도하고, 66 °C에서 10분 동안 배양한다. 트립신은 22.5 ng/μL 농도로 25 mM 암모늄 바이카보네이트(ammonium bicarbonate, NH_4HCO_3)에 녹여서 젤 조각과 37 °C에서 밤새 반응시켜 펩타이드 형성을 유도하였다. 이렇게 추출된 펩타이드를 MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)로 분석하였다. 상기 수득한 단백질 1 mg/mL을 MALDI 매트릭스(matrix)인 알파-시아노-4-하이드록시나믹산(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)과 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하여 MALDI 질량분석 플레이트에 점적(spoting)한 다음, 오토플렉스 III 스마트 빔(Autoflex III Smartbeam, 브루커 달토닉스사, 미국) 장치에서 분석하였다. 외부 부족인 펩타이드 및 단백질 보정 키트(Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였으며, 질량분석 스펙트럼은 600 내지 3,500 m/z 범위의 양이온 모드에서 수행하여 His-hGH 및 SI-His-hGH의 질량을 확인하였다.

[93]

[94] (2) HPLC를 이용한 정제된 단백질의 순도 확인

[95] 상기 음이온-교환 크로마토그래피로 확인된 His-hGH 분획을 프로미넌스 UFLC 시스템(Prominence UFLC system, Shimadzu)과 Kinetex C18 컬럼(2.6 μm, 50 x 2.10 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA)으로 분석하였다. 양성대조군으로 LG-hGH(LG 생명과학, 대한민국)을 사용하였다. 완충용액은 A(0.1% Trifluoroacetic acid(TFA) in water) 및 B(0.1% Trifluoroacetic acid(TFA) in acetonitrile(ACN))를 사용하였으며, 용리완충용액 B의 직선변화도는 7분간 35%에서 100%로 직선기울기를 주어 40 °C에서 용리하였다. 유속은 0.4 mL/min이었으며, 220 nm 파장에서 UV 흡광도를 측정하였다.

[96]

[97] 도 6은 His-hGH을 트립신으로 처리했을 때 형성되는 예상 펩타이드들의 질량값을 나타낸 것이다. 도 7은 비교대조군 LG-hGH과 SI-His-hGH를 트립신 처리 후 발생하는 펩타이드들을 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 질량측정값을 확인한 결과로써, SI-His-hGH분석한 4종의 펩타이드들이 $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -아르기닌으로 인해 m/z 값이 약 10 정도 차이가 발생함을 확인하였고 이는 SI-His-hGH의 합성이 성공적임을 나타낸다. 이중 비교대조군의 m/z 1205.5 에서 검출된 parent 이온과 SI-His-hGH의 m/z 1215.4 에서 검출된 parent 이온을 MALDI-TOF/TOF (MS/MS)를 위한 LIFT 모드와 FlexControl(Bruker, 독일)을 이용하여 추가적으로 분석한 결과는 도 8과 같다. 도 8의 스펙트럼에서 여러 daughter 이온의 형성을 확인하였고, 이 중 $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -아르기닌을 포함하는 모든 이온들이 m/z 값에서 10 정도 차이가 발생함을 확인하였다. 또한 Mascot 소프트웨어(Matrix Science Inc, 영국)에서 분석한 결과 예상대로 hGH의 특정

펩타이드임을 확인하였다.

[98]

[99] 도 9에서 SI-His-hGH의 2차 정제를 위해 이온-교환 크로마토그래피를 실시한 후 결과를 나타낸 것으로, 용출 시간 15분경에 검출되는 SI-His-hGH의 분획을 분리하였다. 도 10에서는 Silver staining을 통해 상기 분획에서 순수하게 정제된 SI-His-hGH를 확인하였고, 다른 불순물과 잘 분리되었음을 확인하였다. 도 10에서 확인된 SI-His-hGH의 분획을 HPLC로 분석한 결과를 도 11에 도시하였다. 양성대조군인 LG-hGH과 SI-His-hGH를 분석한 결과, 정제한 SI-His-hGH이 높은 수준의 순도를 가지고 있음을 확인하였다.

서열목록 Free Text

[100] 서열목록은 서열목록 파일로 첨부하였다.

청구범위

- [청구항 1] (1) 목적 단백질을 암호화하는 발현 벡터로 대장균을 형질전환하는 단계;
 (2) 상기 형질전환된 대장균을 배양 배지에서 배양하는 단계;
 (3) 상기 배양된 대장균을 포도당 최소 배지에 접종하는 단계;
 (4) 상기 최소 배지에 접종한 대장균을 배양하는 단계;
 (5) 상기 배양된 대장균에 안정동위원소로 표지된 아미노산 용액을 투입하고, 동위원소표지 단백질의 발현을 유도하는 단계;
 (6) 상기 아미노산 용액이 투입된 대장균 배양액을 15 내지 25 °C의 온도에서 8 내지 18 시간 동안 배양하는 단계;
 를 포함하는 안정동위원소 표지 단백질의 생산 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
 상기 단계 (1)의 목적 단백질은 인간성장호르몬인 안정동위원소 표지 단백질의 생산 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
 상기 단계 (5)의 안정동위원소는 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -아르기닌인 안정 동위원소 표지 단백질의 생산 방법.
- [청구항 4] (1) 목적 단백질을 암호화하는 발현 벡터로 대장균을 형질전환하는 단계;
 (2) 상기 형질전환된 대장균을 배양 배지에서 배양하는 단계;
 (3) 상기 배양된 대장균을 포도당 최소 배지에 접종하는 단계;
 (4) 상기 최소 배지에 접종한 대장균을 배양하는 단계;
 (5) 상기 배양된 대장균에 안정동위원소로 표지된 아미노산 용액을 투입하고, 동위원소표지 단백질의 발현을 유도하는 단계;
 (6) 상기 아미노산 용액이 투입된 대장균 배양액을 15 내지 25 °C의 온도에서 8 내지 18 시간 동안 배양하는 단계;
 (7) 상기 단계 (6)의 대장균을 완충용해용액으로 용해하는 단계;
 (8) 상기 대장균을 초음파 처리하고, 원심분리하여 동위원소표지 단백질을 회수하는 단계; 및
 (9) 상기 안정동위원소 표지 단백질을 정제하는 단계;
 를 포함하는 안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
 상기 단계 (1)의 목적 단백질은 인간성장호르몬인 안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,
 상기 목적 단백질은 히스티딘 표지된 인간성장호르몬인 안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.

- [청구항 7] 제 4항에 있어서,
상기 안정동위원소 표지된 아미노산은 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -아르기닌인
안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 8] 제 4항에 있어서,
상기 안정동위원소 표지 단백질의 정제는 친화성 크로마토그래피
및 음이온-교환 크로마토그래피 중 하나 이상을 이용하는
안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서,
상기 친화성 크로마토그래피의 컬럼은 Ni-NTA 컬럼인
안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 10] 제 8항에 있어서,
상기 음이온-교환 크로마토그래피의 컬럼은 모노 큐 컬럼인
안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 11] 제 4항에 있어서,
상기 단계 (9)의 안정동위원소 표지 단백질은 생물학적 활성이
저해되지 않는 안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 12] 제 4항에 있어서,
상기 단계 (7)의 용해완충용액은 비이온성 변성제를 포함하는
안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서,
상기 비이온성 변성제는 0.01 내지 2% (v/v)의 트리톤 X-100 또는
트윈 20인 안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 14] 제 4항에 있어서,
상기 단계 (7)의 용해완충용액은 염이 포함되지 않는
안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서,
상기 염은 염화나트륨 또는 염화칼륨인 안정동위원소 표지
단백질의 정제 방법.
- [청구항 16] 제 4항에 있어서,
상기 용해완충용액의 사용량은 대장균세포(펠렛) 30 mg에 대하여
0.25 내지 2 mL인 안정동위원소 표지 단백질의 정제 방법.
- [청구항 17] (1) 목적 단백질을 암호화하는 발현 벡터로 대장균을
형질전환하는 단계;
(2) 상기 형질전환된 대장균을 배양 배지에서 배양하는 단계;
(3) 상기 배양된 대장균을 포도당 최소 배지에 접종하는 단계;
(4) 상기 최소 배지에 접종한 대장균을 배양하는 단계;
(5) 상기 배양된 대장균에 안정동위원소로 표지된 아미노산
용액을 투입하고, 동위원소표지 단백질의 발현을 유도하는 단계;

- (6) 상기 아미노산 용액이 투입된 대장균 배양액을 15 내지 25 °C의 온도에서 8 내지 18 시간 동안 배양하는 단계;
 - (7) 상기 단계 (6)의 대장균을 완충용해용액으로 용해하는 단계;
 - (8) 상기 대장균을 초음파 처리하고, 원심분리하여 동위원소표지 단백질을 회수하는 단계;
 - (9) 상기 안정동위원소 표지 단백질을 정제하는 단계; 및
 - (10) 정제한 안정동위원소 표지 단백질을 MALDI-TOF MS 또는 HPLC로 분석하는 단계;
- 를 포함하는 안정동위원소 표지 단백질의 분석 방법.

[청구항 18]

제 17항에 있어서,

상기 MALDI-TOF MS는 m/z 600 내지 3,500의 범위에서 질량 스펙트럼을 확인하는 안정동위원소 표지 단백질의 분석 방법.

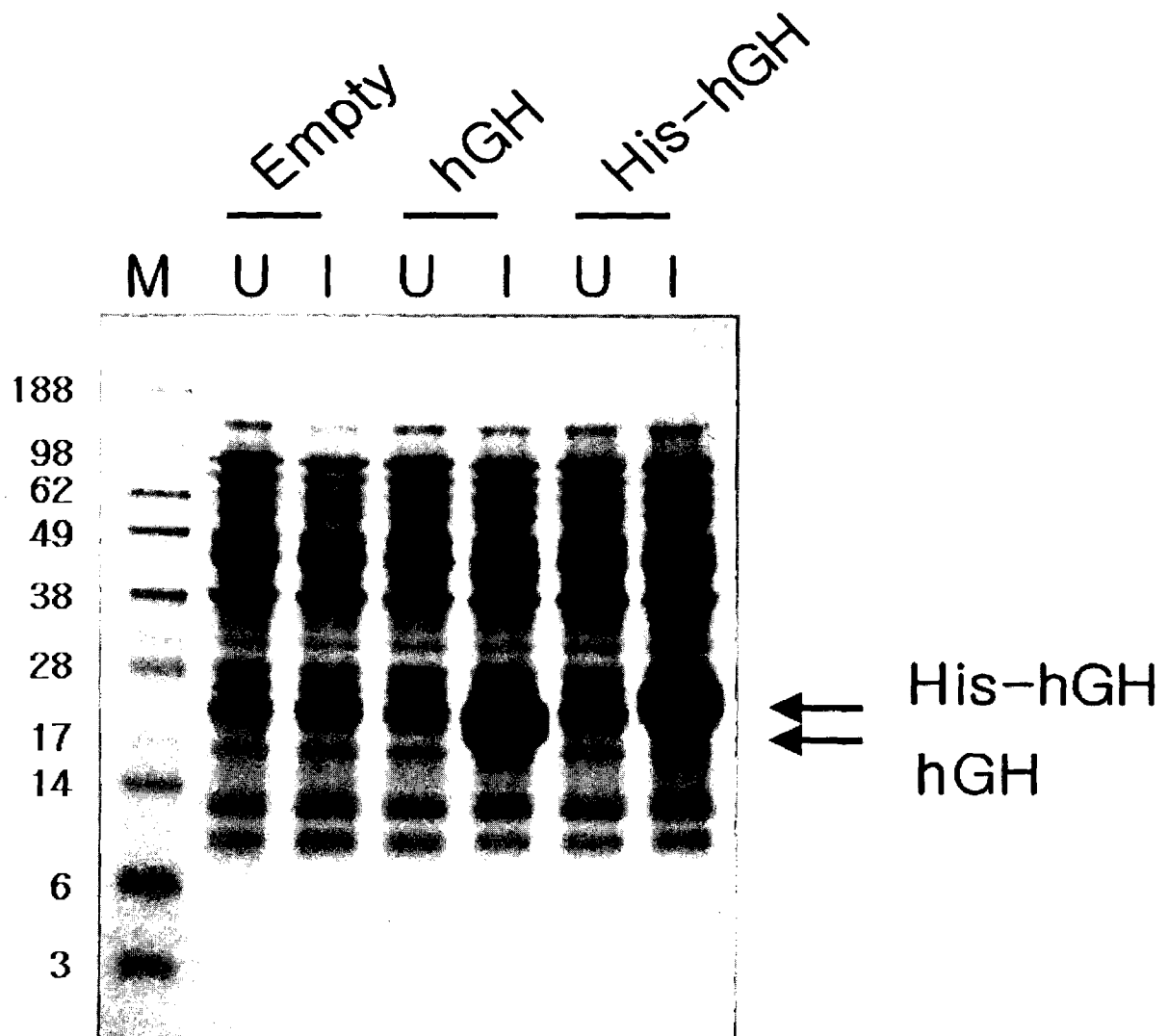
[청구항 19]

제 17항에 있어서,

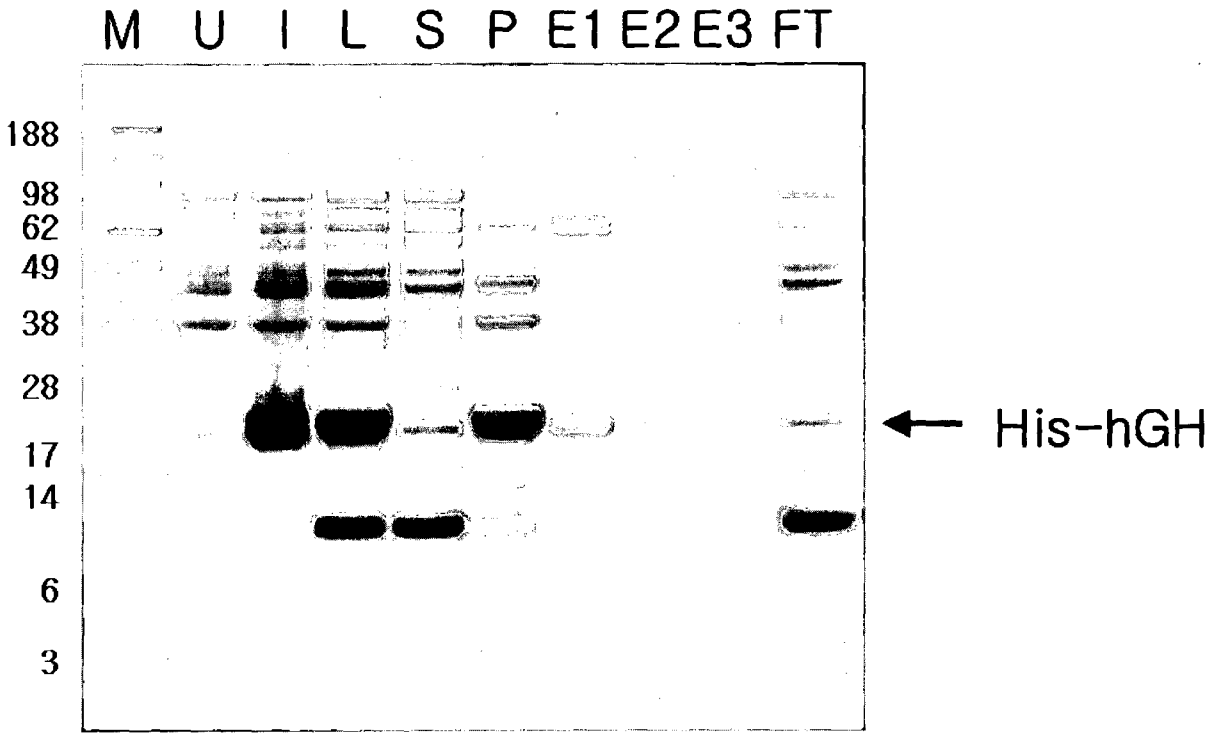
상기 HPLC의 컬럼의 온도는 20 내지 50 °C, 유속은 0.1 내지 1.0 mL/min으로 설정하여 검출하는 안정동위원소 표지 단백질의 분석 방법.

1/11

[Fig. 1]

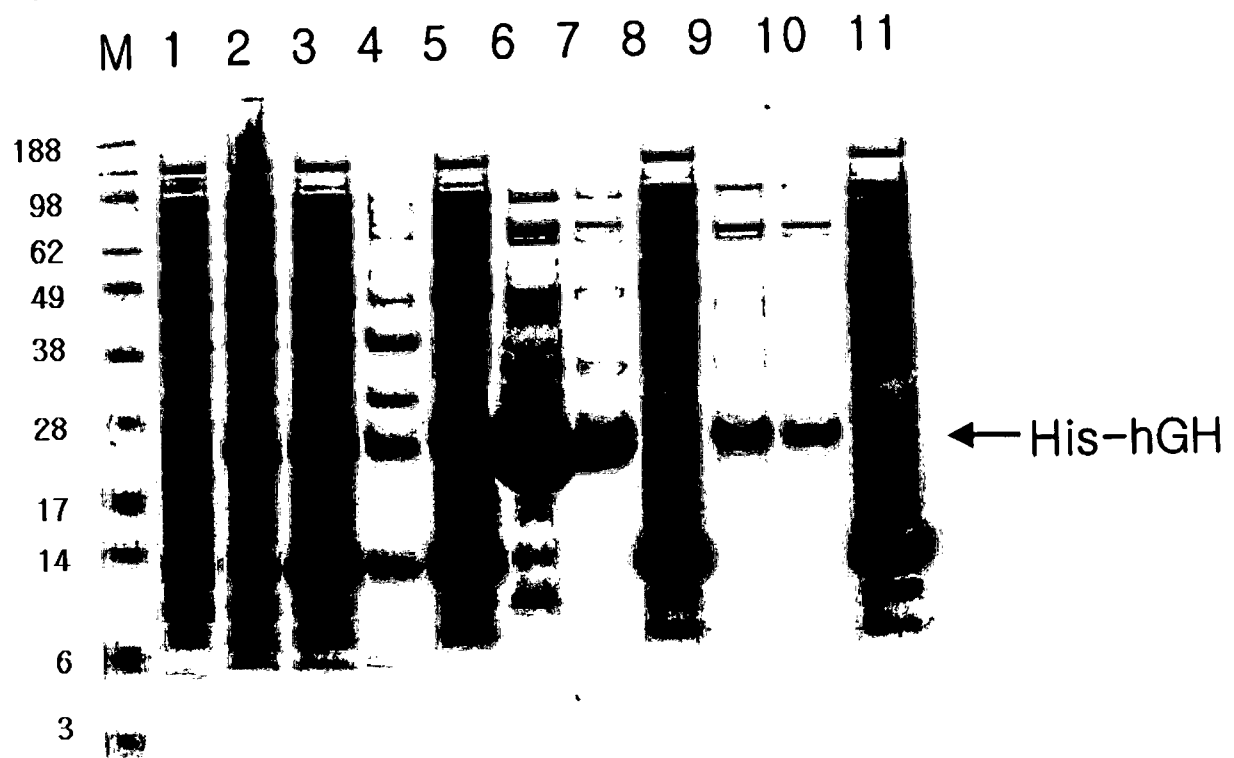


[Fig. 2]



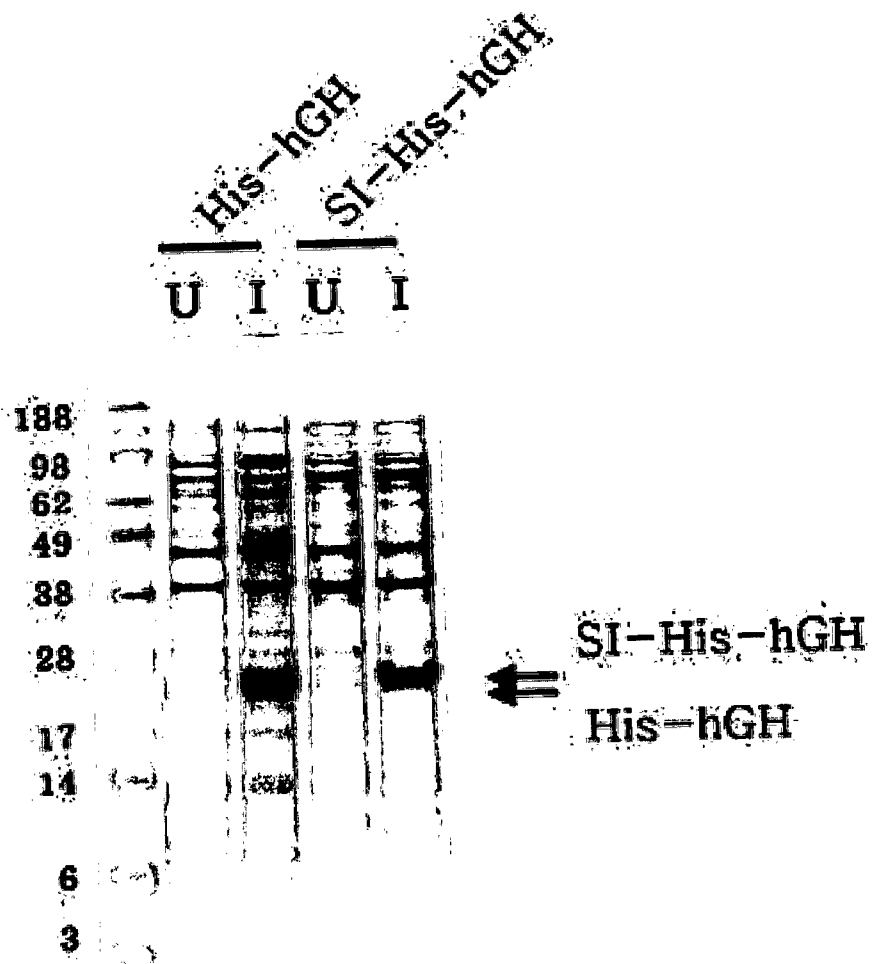
3/11

[Fig. 3]



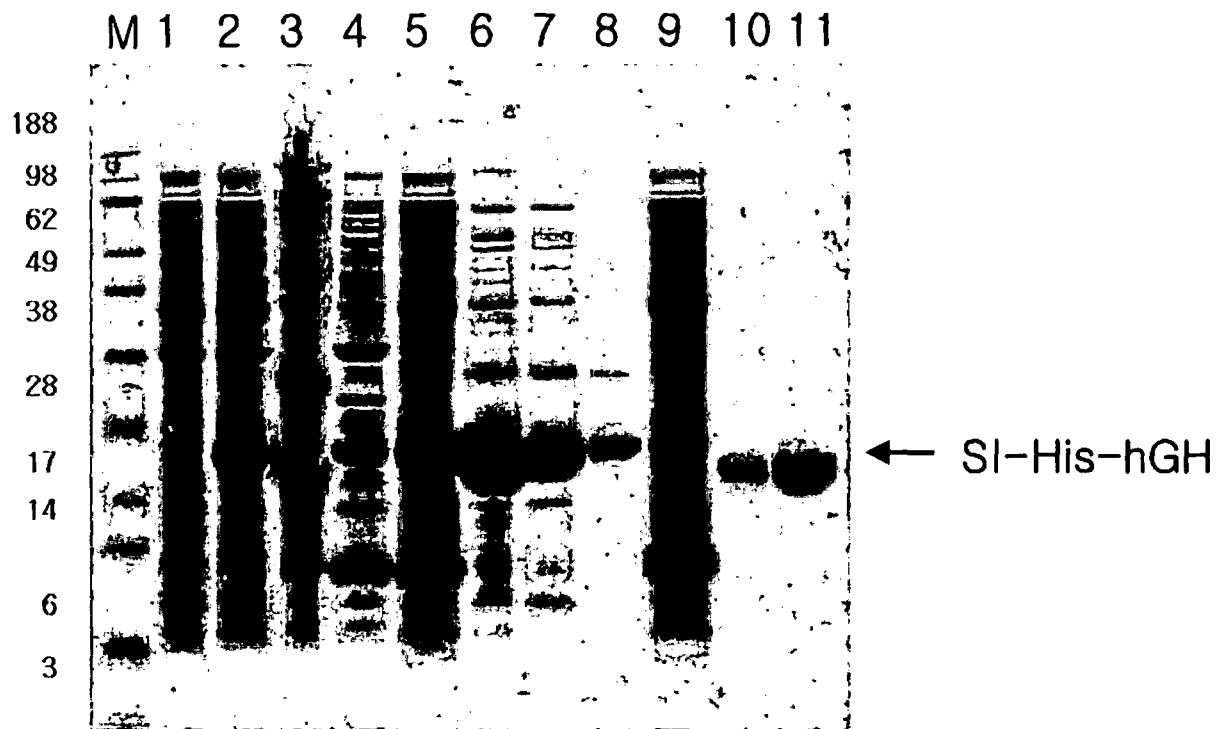
4/11

[Fig. 4]



5/11

[Fig. 5]



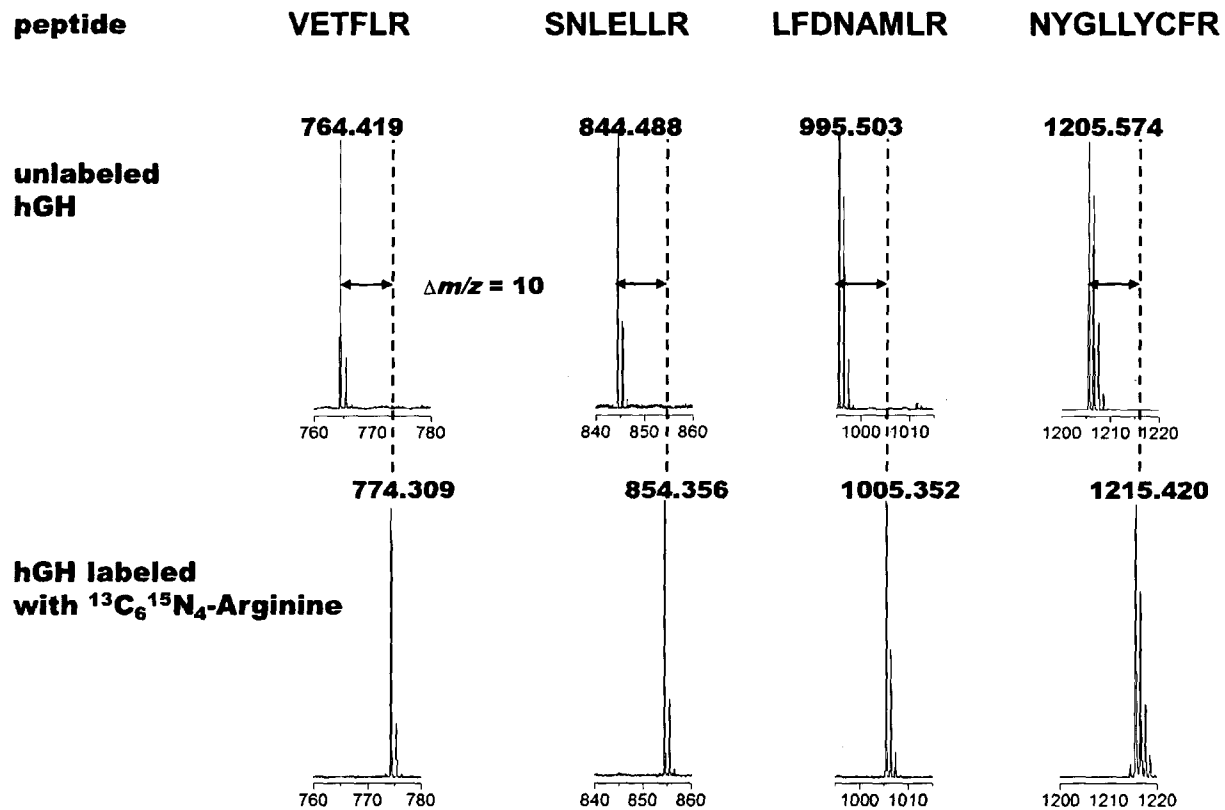
6/11

[Fig. 6]

mass	position	#MC	artf.modification(s)	modifications	peptide sequence
4388.0957	1-40	1	MSO: 1, 21, 24, 38	4452.0753	MGSSHHHHHHSSGLVPAGSH MASMFPTIPLSR LFDNAML R
4298.3110	102-139	1			ISLLIQSWLEPVQFLRSVF ANSLVYGASDSNVYDLLK
3604.7839	119-151	1	MSO: 149	3620.7788	SVFANSLVYGASDSNVYDLL KDLEEGIQTL MGR
3427.6105	1-32	0	MSO: 1, 21, 24	3475.5953	MGSSHHHHHHSSGLVPAGSH MASMFPTIPLSR
3359.5848	66-94	1	Cys_CAM: 77	3416.6063	YSFLQNPQTS LCFSES ITP SNREETQ QK
3001.4360	63-88	1	Cys_CAM: 77	3058.4574	EQKYSFLQNPQTS LCFSES I PTPSNR
2880.6709	95-118	1			SNLELLRISLLIQSWLEPV QFLR
2727.3300	44-65	1			LHQLAFD TYQEFEEAYIPKE OK
2706.3310	41-62	1			AHRLHQLAFD TYQEFEEAYI PK
2619.2296	170-191	1	Cys_CAM: 189	2676.2511	FDTN SHND DALLK NYGLLYC FR
2616.2399	66-88	0	Cys_CAM: 77	2673.2613	YSFLQNPQTS LCFSES ITP SNR
2342.1339	44-62	0			LHQLAFD TYQEFEEAYIPK
2262.1288	119-139	0			SVFANSLVYGASDSNVYDLL K
2116.0339	140-158	1	MSO: 149	2132.0288	DLEEGIQTL MGR LEDGSPR
2096.9883	165-182	1			QTYSKFD TN SHND DALLK
2055.2001	102-118	0			ISLLIQSWLEPVQFLR
1587.8336	89-101	1			EETQ QKSNLELLR
1489.6917	170-182	0			FDTN SHND DALLK
1447.7539	152-164	1			LEDGSPRTGQIFK
1384.6348	203-215	1	Cys_CAM: 206, 213	1498.6777	IVQCRSVEGSCGF
1363.7514	197-207	1	Cys_CAM: 206	1420.7729	VETFLRIVQCR
1361.6729	140-151	0	MSO: 149	1377.6678	DLEEGIQTL MGR
1343.7001	33-43	1	MSO: 38	1359.6950	LFDNAMLRAHR
1300.6896	159-169	1			TGQIFKQTYSK
1278.6507	183-192	1	Cys_CAM: 189	1333.6721	NYGLLYCFRK
1253.6194	193-202	1	MSO: 194	1269.6143	DMDKVETFLR
1148.5557	183-191	0	Cys_CAM: 189	1205.5772	NYGLLYCFR
979.5029	33-40	0	MSO: 38	995.4978	LFDNAML R
844.4887	95-101	0			SNLELLR
785.3134	208-215	0	Cys_CAM: 213	842.3349	SVEGSCGF
773.3788	152-158	0			LEDGSPR
764.4301	197-202	0			VETFLR
762.3628	89-94	0			EETQ QK
693.3930	159-164	0			TGQIFK
636.3021	192-196	1	MSO: 194	652.2970	KDMDK
626.3144	165-169	0			QTYSK
618.3392	203-207	0	Cys_CAM: 206	675.3606	IVQCR
508.2072	183-196	0	MSO: 194	524.2021	DMDK

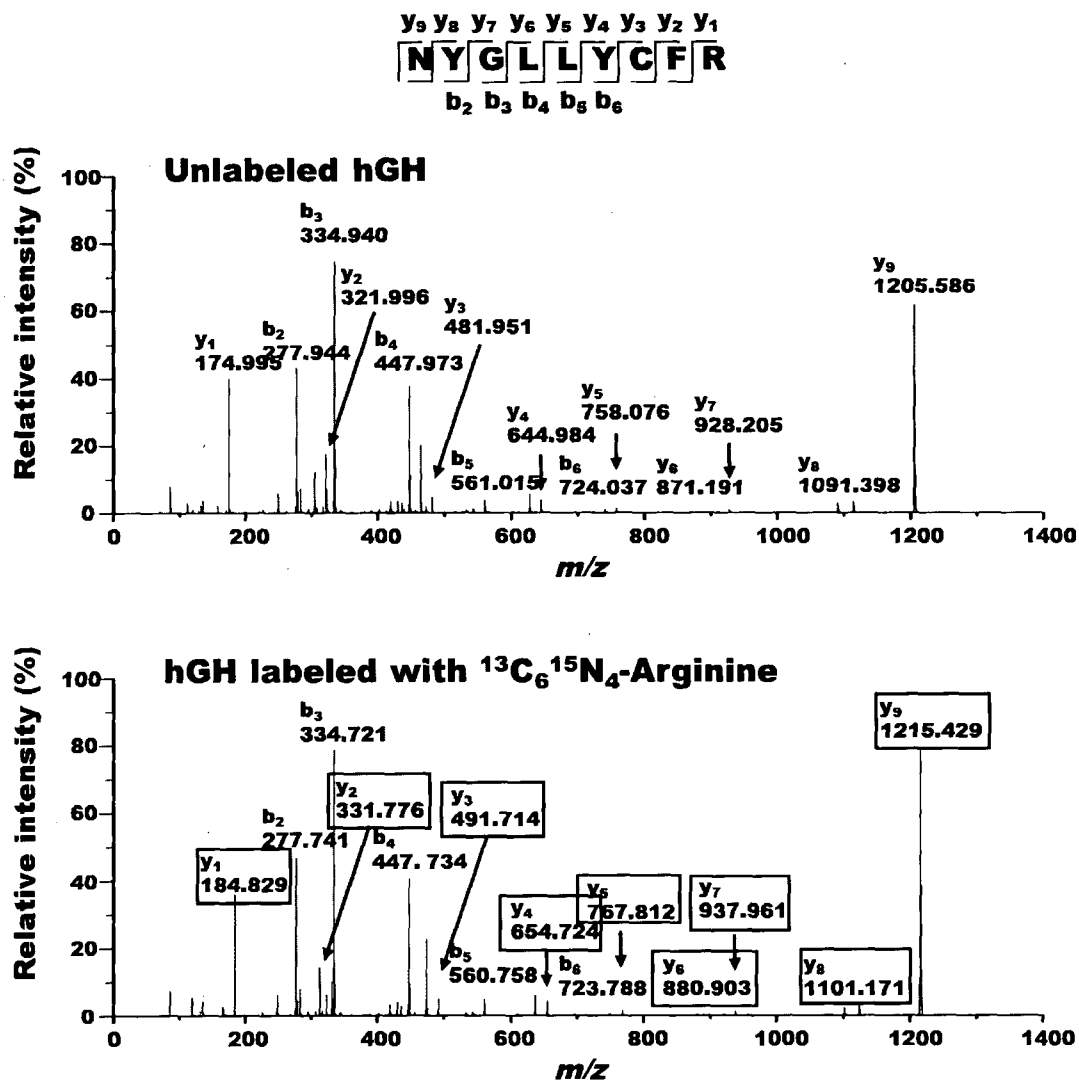
7/11

[Fig. 7]



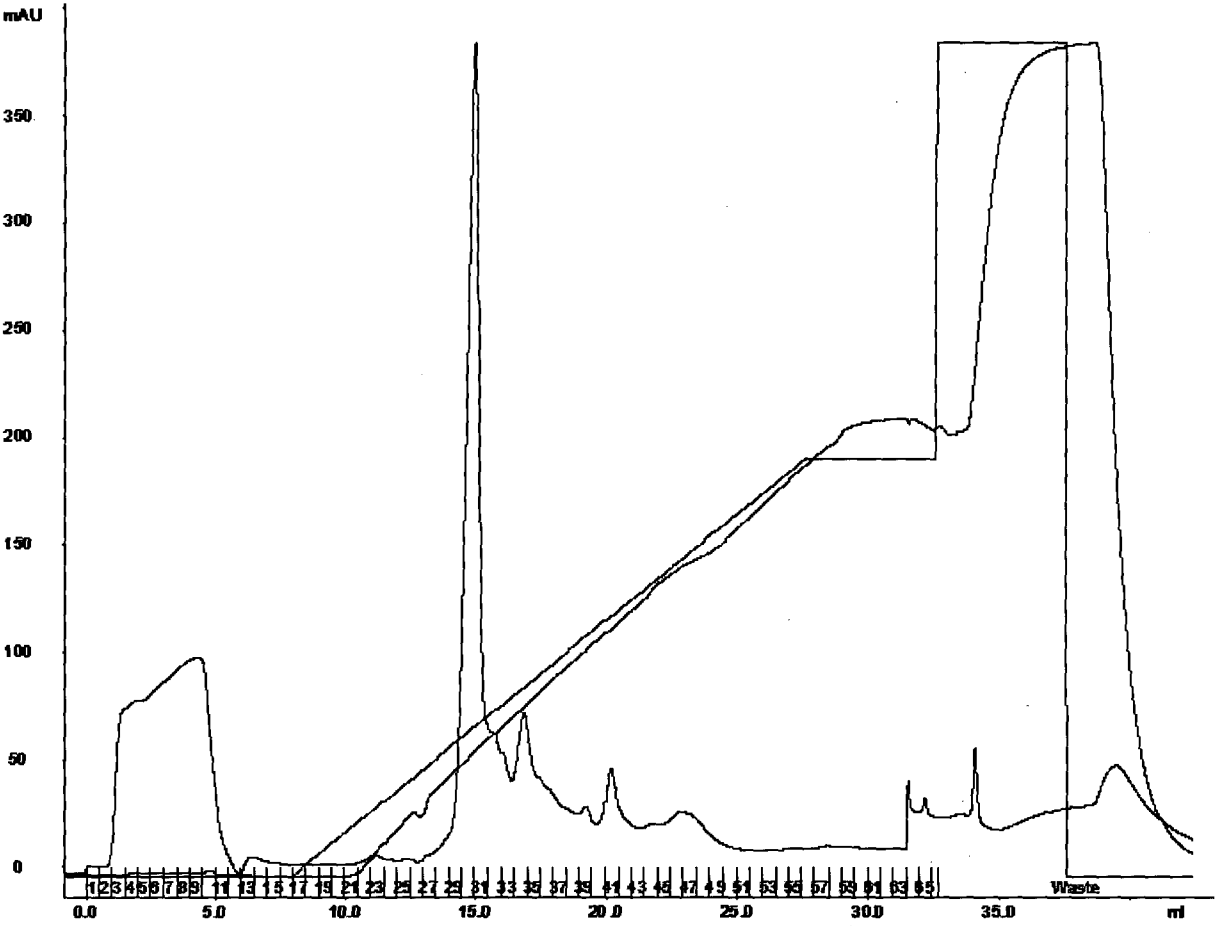
8/11

[Fig. 8]

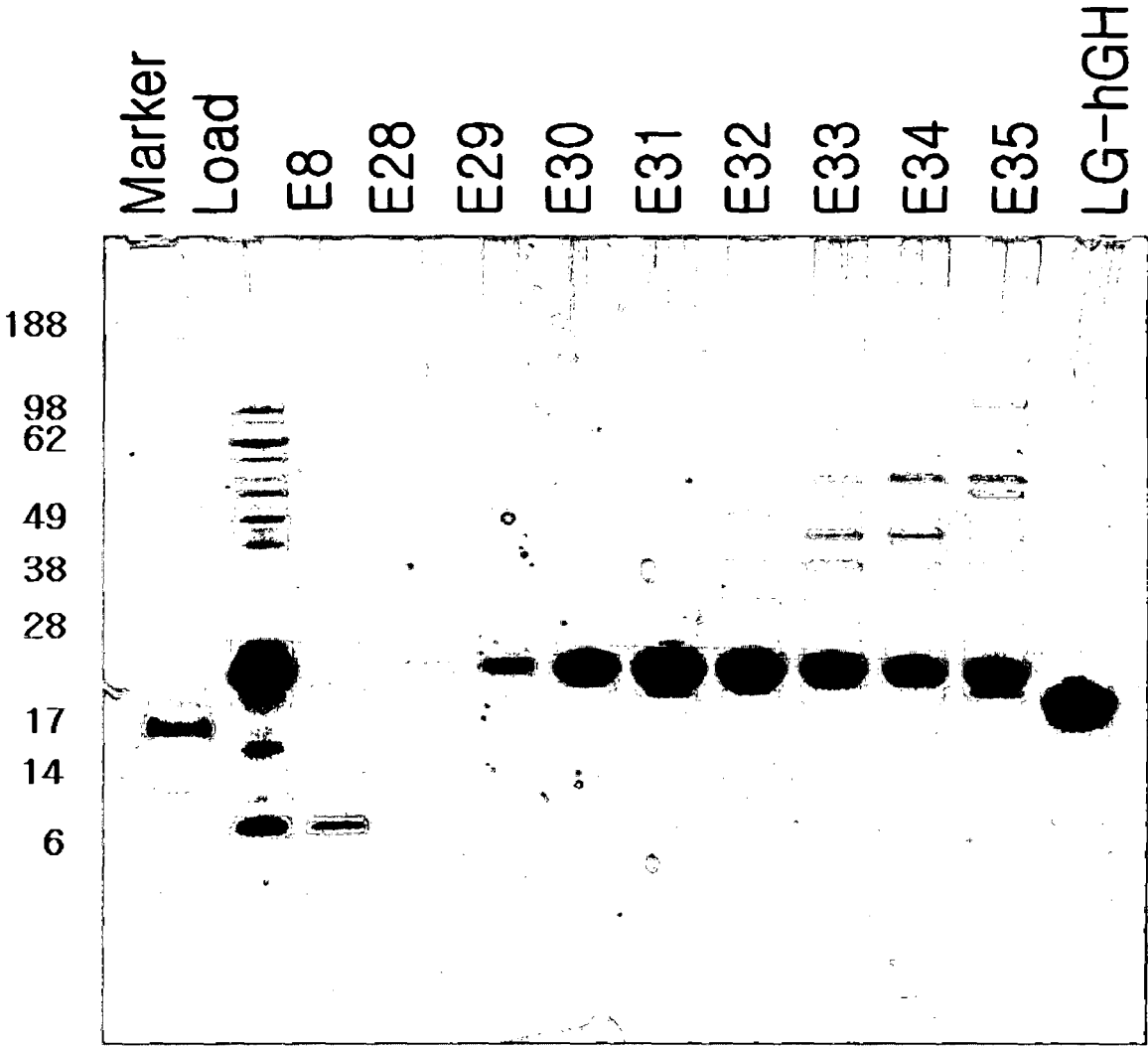


9/11

[Fig. 9]

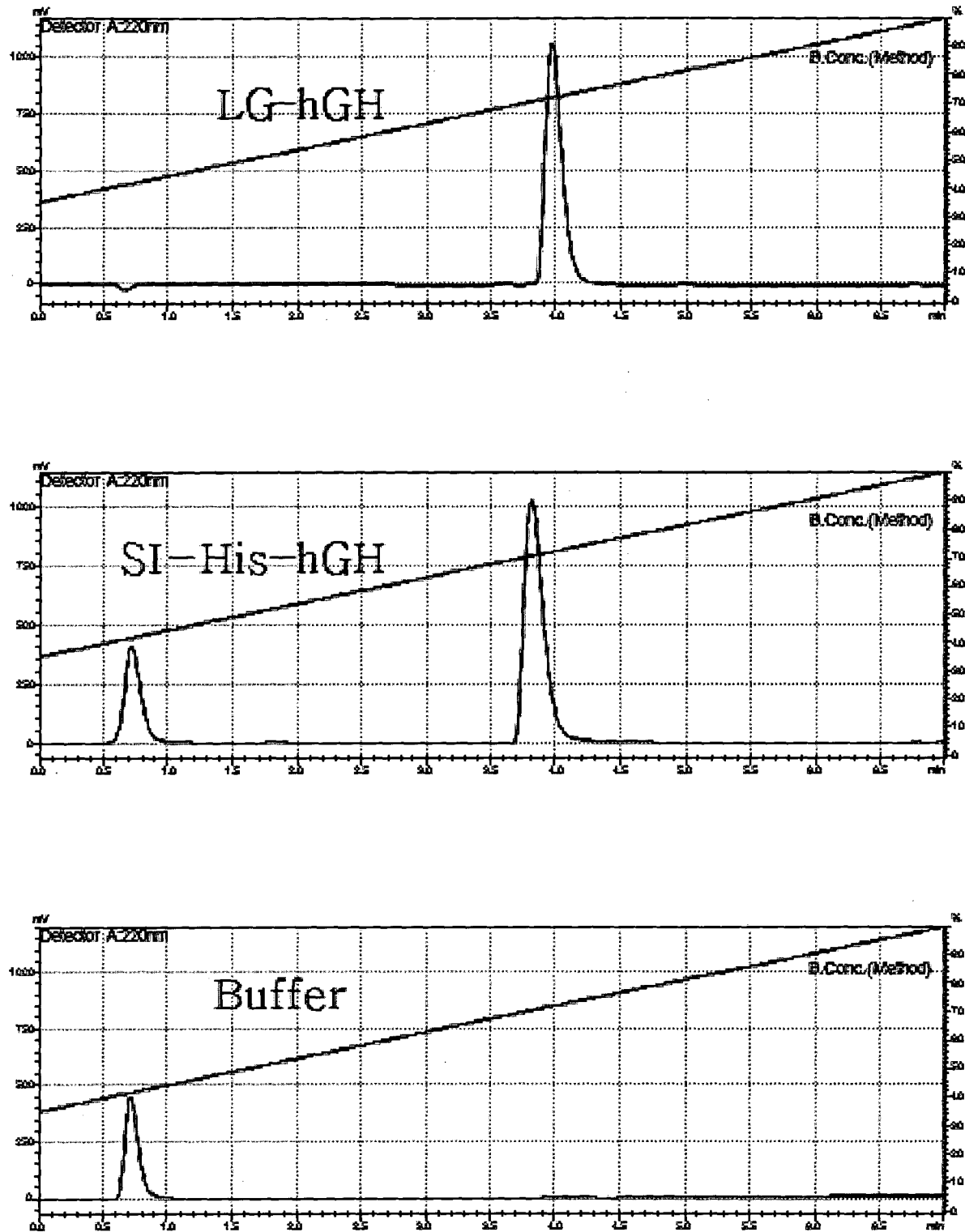


[Fig. 10]



11/11

[Fig. 11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/001063**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/70(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i, C07K 1/14(2006.01)i, G01N 33/68(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 15/70; C07K 14/475; C12N 1/21; C07K 1/14; G01N 33/68

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: stable isotope, cover, escherichia coli, conversion of formation, human growth hormone, hGH, 13C15N-arginine, refinement, chromatography, MALDI-TOF MS, HPLC**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R&D Project Report of Korea Research Institute of Standards and Science (KRISS/IR-2011-053). October 2011 Development of protein measurement standards. See pages 66-71, figures 2-4-3, 2-4-4, 2-4-5 etc.	1-13,16-19
Y		14,15
Y	KR 10-1999-0016368 A (HANIL SYNTHETICS INC.) 05 March 1999 See abstract, page 8 etc.	14,15
A	Laura Trinkle-Mulcahy etc.. J. Cell. Biol. 20 October 2008 Vol. 183, No. 2, pages 223-239. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. See the entire document	1-19
A	Junling Wang etc.. Chemistry & Biology. 28 January 2011 Vol. 18, No. 1, pages 121-130. Arginyltransferase Is an ATP-Independent Self-Regulating Enzyme that Forms Distinct Functional Complexes In Vivo. See the entire document	1-19



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

28 APRIL 2015 (28.04.2015)

Date of mailing of the international search report

28 APRIL 2015 (28.04.2015)

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

International application No.

PCT/KR2015/001063**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
 ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/001063

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1999-0016368 A	05/03/1999	KR 10-0235315 B1	15/12/1999

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/70(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i, C07K 1/14(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/70; C07K 14/475; C12N 1/21; C07K 1/14; G01N 33/68

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: 안정동위원소, 표지, 대장균, 형질전환, 인간성장호르몬, hGH, 13C15N-아르기닌, 정제, 크로마토그래피, MALDI-TOF MS, HPLC

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	한국표준과학연구원 과제보고서(KRISS/IR-2011-053). 2011.10. 단백질 측정표준 체계구축. 페이지 66-71, Figure 2-4-3, 2-4-4, 2-4-5 등 참조	1-13, 16-19
Y		14, 15
Y	KR 10-1999-0016368 A (주식회사 한일합섬) 1999.03.05 요약, 페이지 8 등 참조	14, 15
A	Laura Trinkle-Mulcahy 등. J. Cell. Biol. 2008.10.20. Vol. 183, No. 2, 페이지 223-239. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. 전체 문헌 참조	1-19
A	Junling Wang 등. Chemistry & Biology. 2011.01.28. Vol. 18, No. 1, 페이지 121-130. Arginyltransferase Is an ATP-Independent Self-Regulating Enzyme that Forms Distinct Functional Complexes In Vivo. 전체 문헌 참조	1-19

☐ 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 04월 28일 (28.04.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 04월 28일 (28.04.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



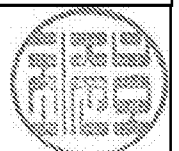
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 7140

심사관

최준호

전화번호 +82-42-481-5569



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:

국제출원번호
PCT/KR2015/001063

PCT/KR2015/001063

공개일

1999/12/15