



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0021793
(43) 공개일자 2022년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
G01N 33/533 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0102779
(22) 출원일자 2020년08월14일
심사청구일자 2020년08월14일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
변재철
서울특별시 서초구 잠원로 46-38, 101동 301호(잠원동, 브라운스톤잠원)
(74) 대리인
남건필, 박종수, 정지향, 차상윤

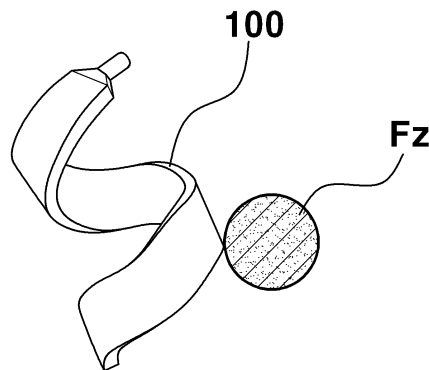
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 플루오레세인에 결합하는 펩타이드, 이를 암호화하는 핵산 분자, 단백질 발현 벡터, 이를 이용한 바이오 진단 프로브 및 바이오 진단 키트

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 플루오레세인(Fluorescein)에 선택적으로 결합하는 펩타이드, 이를 암호화하는 핵산 분자, 단백질 발현 벡터, 이를 이용한 진단 프로브 및 진단 키트가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 2319/60 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1: ARYLR NRGLV RDFWG의 아미노산 서열을 가지며,
상기 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 플루오레세인(Fluorescein)에 선택적으로 결합하는 펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
상기 펩타이드는 상기 플루오레세인의 리셉터인 펩타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
상기 펩타이드에 로다민-B가 결합된 펩타이드.

청구항 4

제 3 항에 있어서,
상기 플루오레세인에 여기파장 494 nm 조사 시, 상기 로다민-B의 방출 파장이 580 nm 인 펩타이드.

청구항 5

제 1 항 기재의 펩타이드의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 6

제 5 항 기재의 핵산 분자를 포함하는 단백질 발현 벡터.

청구항 7

제 6 항에 있어서,
상기 단백질 발현 벡터는, 플라스미드 벡터, 파지 벡터, 또는 바이러스 벡터 중 적어도 어느 하나인 단백질 발현 벡터.

청구항 8

서열번호 1: ARYLR NRGLV RDFWG의 아미노산 서열을 가지며,
상기 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 플루오레세인에 선택적으로 결합하는 펩타이드; 및
상기 펩타이드 중 적어도 어느 일부 아미노산 잔기에 결합되는 상기 플루오레세인을 포함하는 바이오 진단 프로브.

청구항 9

제 8 항에 있어서,
상기 펩타이드는 상기 플루오레세인의 리셉터인 바이오 진단 프로브.

청구항 10

제 8 항에 있어서,
상기 펩타이드에 로다민-B가 결합된 바이오 진단 프로브.

청구항 11

서열번호 1: ARYLNRGLVRDFWG의 아미노산 서열을 가지며,

상기 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 플루오레세인에 선택적으로 결합하는 펩타이드; 및

상기 펩타이드 중 적어도 어느 일부 아미노산 잔기에 결합되는 상기 플루오레세인을 포함하는 바이오 진단 키트.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 펩타이드에 로다민-B가 결합된 바이오 진단 키트.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

상기 바이오 진단 키트는 면역분석(immunoassay)용 진단 키트인 바이오 진단 키트.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 면역분석용 진단 키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로 어레이 키트 또는 엘리사(ELISA) 키트인 바이오 진단 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오 센싱 기술에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 플루오레세인에 결합하는 펩타이드, 이를 암호화하는 핵산 분자, 단백질 발현 벡터, 이를 이용한 바이오 진단 프로브 및 바이오 진단 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이오 기술 분야에서 다양한 면역진단검사 또는 환경 모니터링 같은 바이오 검사를 위해 임류노어세이와 같은 다양한 바이오 분석 방법이 사용되고 있다. 상기 바이오 분석에 있어서, 널리 사용되고 있는 형광 분자로서, 플루오레세인(Fluorescein)이 있다. 종래에는 상기 플루오레세인에 결합하는 형광 결합 단백질이 바이오 분석 방법에 활용되었다. 이 경우, 상기 형광 결합 단백질은 수십 kDa의 큰 분자량을 가지기 때문에, 바이오 분석에서 분자량이 큰 형광 단백질의 동시 발현이 어려운 문제가 있어, 정확한 바이오 진단이 어렵고, 표적 단백질의 기능을 저해하는 문제가 있다.

[0003] 또한, 임류노어세이를 위해 항체에 형광 레이블을 필요로 하는 경우에, 화학 반응을 수반하여 항체와 형광 결합 단백질의 연결 반응이 진행되므로, 항체의 활성 저하 및 반응 또는 정제 과정에 있어서 문제가 있다.

[0004] 따라서, 플루오레세인에 결합 가능하고, 결합 시 표적 단백질의 기능을 저해하지 않고, 저 분자량을 갖는 소정의 물질이 필요하며, 상기 물질을 통해, 바이오 분석을 보다 신속하고, 정확하게 할 수 있는 개선된 방법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는, 저 분자량을 갖고, 플루오레세인에 결합 시 표적 단백질의 기능을 저해하지 않는 펩타이드로서, 바이오 분석에 있어서, 신속하고 정확한 분석을 가능하게 하는 플루오레세인에 결합 가능한 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 다른 기술적 과제는, 전술한 이점을 갖는 펩타이드를 암호화하는 핵산분자를 제공하는 것이다.

- [0007] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 상기 핵산 분자를 포함하는 단백질 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 전술한 이점을 갖는 펩타이드를 이용한 진단 프로브를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 전술한 이점을 갖는 펩타이드를 이용한 진단 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 서열번호 1: ARYLNRGLVRDFWG의 아미노산 서열을 가지며, 상기 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 플루오레세인(Fluorescein)에 선택적으로 결합할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 펩타이드는 플루오레세인의 리셉터일 수 있다.
- [0011] 일 실시예에서, 상기 펩타이드에 로다민-B가 결합될 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 펩타이드는 상기 플루오레세인에 여기파장 494 nm 조사 시, 상기 로다민-B의 방출파장이 580 nm 일 수 있다.
- [0012] 상기 다른 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 분자는 서열번호 1: ARYLNRGLVRDFWG의 아미노산 서열을 가지며, 상기 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 플루오레세인(Fluorescein)에 선택적으로 결합할 수 있는 펩타이드의 아미노산 서열을 암호화할 수 있다.
- [0013] 상기 또 다른 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 단백질 발현 벡터는 서열번호 1: ARYLNRGLVRDFWG의 아미노산 서열을 가지며, 상기 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 플루오레세인(Fluorescein)에 선택적으로 결합할 수 있는 펩타이드의 아미노산 서열을 암호화할 수 있는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 단백질 발현 벡터는 플라스미드 벡터, 파지 벡터, 또는 바이러스 벡터 중 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0014] 상기 또 다른 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 진단 프로브는 서열번호 1: ARYLNRGLVRDFWG의 아미노산 서열을 가지며, 상기 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 플루오레세인에 선택적으로 결합하는 펩타이드와 상기 펩타이드 중 적어도 어느 일부 아미노산 잔기에 결합되는 플루오레세인을 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 바이오 진단 프로브는 상기 펩타이드에 로다민-B가 결합될 수 있다.
- [0015] 상기 또 다른 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 진단 키트는 서열번호 1: ARYLNRGLVRDFWG의 아미노산 서열을 가지며, 상기 아미노산 서열 중 일부 아미노산 잔기가 플루오레세인에 선택적으로 결합하는 펩타이드와 상기 펩타이드 중 적어도 어느 일부 아미노산 잔기에 결합되는 플루오레세인을 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 바이오 진단 키트는 상기 펩타이드에 로다민-B가 결합될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 바이오 진단 키트는 면역 분석(immunoassay)용 진단 키트일 수 있으며, 상기 면역분석용 진단 키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로 어레이 키트 또는 엘리사(ELISA) 키트 일 수 있다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 형광 물질인 플루오레세인(Fluorescein)에 선택적으로 결합하는 특성을 이용하여, 신속하고 신뢰도 높은 바이오 진단에 활용될 수 있고, 종래 결합 단백질과 달리 저 분자로, 퓨전 단백질의 발현에 용이하게 쓰일 수 있는 펩타이드, 상기 펩타이드를 암호화하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 단백질 발현 벡터를 제공할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 형광 효율을 높여 형광 레이블이 필요한 임류노어세이와 같은 다양한 생명 분야에 활용될 수 있는 바이오 진단 프로브 및 바이오 진단 키트를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 플루오르세인(fluorescein)과 펩타이드의 결합을 도시한 도면이다.
- 도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 플루오르세인(fluorescein)에 결합된 펩타이드가 발현된 실험군 대장균과 대조군 대장균에 대해 갖는 형광 세기 차이를 측정한 그래프이며, 도 2b는 도 2a에 따른, 형광 세기를 도표로 나타낸 그래프이다.
- 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 펩타이드와 로다민-B를 결합시킨 후, 플루오레세인

(fluorescein)의 결합에 대한 FRET 측정에 대한 과정을 도시한 도면이며, 도 3b는 도 3a에 대한 FRET 신호 값을 도시한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 펩타이드와 컨트롤 펩타이드에 플루오레세인(fluorescein)을 혼합하였을 때 나타나는 FRET 신호 값을 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.
- [0020] 본 발명의 실시예들은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위하여 제공되는 것이며, 하기 실시예는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 오히려, 이들 실시예는 본 개시를 더욱 충실하고 완전하게 하고, 당업자에게 본 발명의 사상을 완전하게 전달하기 위하여 제공되는 것이다.
- [0021] 도면에서 동일 부호는 동일한 요소를 지칭한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 해당 열거된 항목 중 어느 하나 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.
- [0022] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예를 설명하기 위하여 사용되며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다. 또한, 본 명세서에서 단수로 기재되어 있다 하더라도, 문맥상 단수를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprise)" 및/또는 "포함하는(comprising)"이란 용어는 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.
- [0023] 본 명세서에서 기관 또는 다른 층 "상에(on)" 형성된 층에 대한 언급은 상기 기관 또는 다른 층의 바로 위에 형성된 층을 지칭하거나, 상기 기관 또는 다른 층 상에 형성된 중간 층 또는 중간 층들 상에 형성된 층을 지칭할 수도 있다. 또한, 당해 기술 분야에서 숙련된 자들에게 있어서, 다른 형상에 "인접하여(adjacent)" 배치된 구조 또는 형상은 상기 인접하는 형상에 중첩되거나 하부에 배치되는 부분을 가질 수도 있다.
- [0024] 본 명세서에서, "아래로(below)", "위로(above)", "상부의(upper)", "하부의(lower)", "수평의(horizontal)" 또는 "수직의(vertical)"와 같은 상대적 용어들은, 도면들 상에 도시된 바와 같이, 일 구성 부재, 층 또는 영역들이 다른 구성 부재, 층 또는 영역과 갖는 관계를 기술하기 위하여 사용될 수 있다. 이들 용어들은 도면들에 표시된 방향뿐만 아니라 소자의 다른 방향들도 포괄하는 것임을 이해하여야 한다.
- [0025] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산"은 모든 생명체에 필수적인 생체 고분자 또는 작은 생체 분자로, DNA 또는 RNA를 포함한다. 핵산은 뉴클레오타이드 단위체로 구성되어 있고, 상기 뉴클레오타이드는 인산, 5탄당, 핵염기의 3 가지 구성 성분으로 이루어진 단위체이다. RNA(리보핵산)은 오탄당이 리보스이며, DNA(디옥시리보핵산)는 5탄당이 디옥시리보스이다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아미노산"은 광의적 개념으로 자연적으로 발생하는 아미노산과 그 잔기뿐만 아니라, 화학적으로 변형된 아미노산 즉, 아미노산 모방체 및 유사물을 포함하며, 본 발명에서 상기 모방체 및 유사물은 기능적 등가물을 포함할 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 "펩타이드"는, 아미노산 중합체 체로, 제 1 아미노산의 아미노기와 상기 제 1 아미노산에 인접하는 제 2 아미노산의 카복시기가 물 분자를 잃으면서 축합하여 중합되는 아미드이다. 본 명세서에 설명되는 모든 펩티드 서열은 관례에 따라서 왼쪽으로 N-말단 끝과 오른쪽으로 C-말단 끝을 가지는 순서로 기재된다. 또한, 본 발명에서 "펩타이드"라는 용어는 천연 또는 합성 단백질, 단백질 단편, 단백질 서열의 펩타이드 유사체를 지칭할 수 있다. 상기 유사체는 절절한 공간적 배향에서 이에 상응하는 아미노산 또는 펩타이드가 나타내는 크기, 전하 또는 소수성 등의 유사한 물리적 특성을 나타내는 물질로서 정의된다. 예를 들어, 펩타이드 유사체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 사이에 존재하는 아미드 결합이 탄소-탄소 결합 또는 당업계에 공지된 다른 결합으로 치환된 화합물일 수 있다. 또한, 본 발명에서 용어 "펩타이드(peptide)"는 "단백질(protein)" 및 "폴리펩타이드(polypeptide)"라는 용어와 호환적으로 사용될 수 있으며, 이는 여러 개의 아미노산이 펩타이드 결합에 의해 연결된 화합물로 아미노산 잔기들의 개수가 10 개 이상 50 개 이하인 분자 구조체를 지칭할 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Da(dalton)"는 원자질량 단위로, 1 원자 질량 단위는 대략 핵자 하나의 질량이고, 수치적으로 1 g/mol과 동등하다. 원자 질량 단위는 결합이 없고 핵과 전자가 바닥상태이며 정지질량

일 때 탄소 원자 질량의 1/12로 정의하며 $1.660539040 \times 10^{-27}$ kg이다. 또한, 1 kDa는 1000 Da를 의미한다.

- [0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 형광 공명 에너지 전이(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)"는 도너(donor)와 억셉터(acceptor) 두 개의 형광 물질 중 도너 분자의 발광 스펙트럼이 다른 억셉터 분자의 여기 스펙트럼에 해당하는 경우, 두 개의 분자가 수 나노미터(nm) 정도로 가까워지면 도너가 여기되어서 발광하는 에너지가 거리에 따라서 억셉터로 전달되어 도너는 여기 빛이 꺼지고 억셉터가 여기되어 발광하게 되는 현상을 말한다. 이러한 FRET 현상 원리는 분자간의 거리나 상호 작용을 연구하는데 널리 사용될 수 있다.
- [0030] 이하에서, 본 발명의 실시예들은 본 발명의 이상적인 실시예들(및 중간 구조들)을 개략적으로 도시하는 단면도들을 참조하여 설명될 것이다. 이들 도면들에 있어서, 예를 들면, 부재들의 크기와 형상은 설명의 편의와 명확성을 위하여 과장될 수 있으며, 실제 구현시, 도시된 형상의 변형들이 예상될 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시예는 본 명세서에 도시된 영역의 특정 형상에 제한된 것으로 해석되어서는 아니 된다. 또한, 도면의 부재들의 참조 부호는 도면 전체에 걸쳐 동일한 부재를 지칭한다.
- [0032] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 플루오레세인(Fluorescein; Fz)과 펩타이드(100)의 결합을 도시한 도면이다.
- [0033] 도 1을 참조하면, 일 실시예에 따른 펩타이드(100)는 형광 물질, 특히, 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합할 수 있다. 펩타이드(100)는 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합하여, 면역진단검사 또는 환경 모니터링 같은 다양한 바이오 분석에 활용될 수 있다.
- [0034] 펩타이드(100)는 아미노산 서열의 특유의 구조적 특징에 의해 플루오레세인(Fz)에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 아미노산 서열은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는다. 상기 서열번호 1은 N 터미널부터 C 터미널까지 ARYLNRGLVRDFWG의 15개의 아미노산으로 구성된다.
- [0035] 이러한 아미노산 서열은 인공적으로 합성되어 얻어질 수 있다. 상기 서열번호 1의 펩타이드(100)는 유전자 재조합 기법, 고체상 펩타이드 합성법(solid phase peptide synthesis) 또는 액체상 펩타이드 합성법이 사용될 수 있다. 예시적으로 통상의 펩타이드 라이브러리 서비스가 이용될 수 있으며, 전술한 펩타이드 합성 방법들은 비제한적 예시이며, 공지된 다양한 종류의 펩타이드 합성 방법에 의해 펩타이드(100)가 합성될 수 있다.
- [0036] 형광 분자인 플루오레세인(Fz)은 알칼리성 용액 중에서 강한 형광 발광을 나타내는 등적색 화합물로서, $C_{20}H_{12}O_5$ 의 화학식을 가지며, 트레이서, 진단 목적용 약제와 같은 다양한 바이오 분석에 사용될 수 있다. 플루오레세인(Fz)은 465 내지 500 nm의 여기파장을 가할 때, 발광 파장이 520 내지 530 nm에 해당한다.
- [0037] 일 실시예에서, 펩타이드(100)는 플루오레세인의 리셉터일 수 있다. 펩타이드(100)는 분자량 3000 Da 이하의 소형 단백질일 수 있다. 이에 따라, 종래 플루오레세인 결합 단백질에 비해 표적 단백질의 3차원적 구조 형성을 방해하지 않아 기능을 해치지 않는 효과를 제공하고, 다양한 단백질 및 펩타이드에 응용할 수 있으며, 다른 단백질에 붙여 표적 단백질로 이용할 수 있는 본 발명의 펩타이드(100)가 제공될 수 있다.
- [0038] 일 실시예에 따르면, 펩타이드(100)의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자가 제공될 수 있다. 상기 핵산 분자는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 통칭하며, 상기 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 천연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 핵산 분자의 서열은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 치환에 따라 변형될 수 있다.
- [0039] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈(예를 들면, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다.) 또는 생물학적 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 또한, 뉴클레오타이드에서의 변이가 본 발명의 플루오르세인(Fz)에 선택적으로 결합하는 펩타이드(100)의 아미노산 서열에 변화를 가져올 수 있고, 펩타이드(100)의 아미노산에 변화를 가져오는 변이인 경우에도 본 발명의 아미노산 서열 1을 가지는 펩타이드(100)와 거의 동일한 성질을 나타내는 것이 얻어질 수 있다.
- [0040] 일 실시예에 따르면, 상기 핵산 분자를 포함하는 단백질 발현 벡터가 제공될 수 있다. 상기 벡터를 이용해 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합하는 펩타이드를 포함하는 표적 단백질로 발현시킬 수 있다. 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예를 들면, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79,

pUC19 및 pET 등), 파지(예를 들면, λ gt4· λ B, λ -Charon, λ Δz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0041] 본 발명의 벡터는 단백질 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들면, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것을 포함할 수 있다. 숙주 세포로서 E. coli가 이용되는 경우, E. coli 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 그리고 파지 λ 의 좌향 프로모터가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 유전자로부터 유래된 프로모터(예를 들면, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들면, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0043] 본 발명에 이용되는 벡터는 그로부터 발현되는 재조합 펩타이드 또는 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, PAS 인자-코딩 뉴클레오타이드 서열의 5'- 또는 3'-말단에 인접한 위치에 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 말토스 결합 단백질(MBP), FLAG, 6x His (hexahistidine), NusA (N utilization substance A) 또는 Trx(Thioredoxin)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 정제를 위한 추가적인 서열 때문에, 숙주에서 발현된 단백질은 친화성 크로마토그래피를 통하여 신속하고, 용이하게 정제될 수 있다.

[0044] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 본 발명의 단백질 발현 벡터를 통해 퓨전 단백질을 암호화하는 유전 물질의 일단에 특이적으로 형광 분자인 플루오레세인(Fz)에 결합할 수 있는 펩타이드(100)를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 퓨전 단백질을 생산할 수 있다.

[0045] 일 실시예에 따르면, 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합하는 펩타이드(100)와 상기 펩타이드(100) 중 적어도 어느 일부에 결합되는 플루오레세인(Fz)을 포함하는 바이오 진단 프로브를 제공할 수 있다. 펩타이드(100)와 플루오레세인(Fz)에 관한 상세한 설명은 전술한 바와 동일하며, 상기 바이오 진단 프로브는 전술한 바와 같이, 저 분자 펩타이드로서 크기가 작아 3차원적으로 안정화되어 있고, 점막을 쉽게 통과하며 조직 깊은 곳에서도 목표 분자에 대한 인지가 높은 특성을 가진다.

[0046] 일 실시예에 따르면, 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합하는 펩타이드(100)와 상기 펩타이드(100) 중 적어도 어느 일부에 결합되는 플루오레세인(Fz)을 포함하는 바이오 진단 키트를 제공할 수 있다. 펩타이드(100)은 기관에 고정되거나, 기관에 고정되지 않고 용매 내에 존재할 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드(100), 또는 이를 암호화하는 핵산 분자를 포함할 수 있으며 펩타이드(100), 핵산 분자, 또는 플루오레세인(Fz)에 대한 상세한 설명은 전술한 바와 동일하다. 상기 바이오 진단 키트는 임무노어세이와 같은 바이오 분석에서 형광 표지를 필요로 하는 진단 키트에 다양하게 이용될 수 있다.

[0047] 일 실시예에 따르면, 바이오 진단 키트는 기관(plate), 병(bottle), 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelop), 튜브(tube), 또는 앰플(ampoule)과 같은 형상을 가질 수 있다. 또한, 상기 바이오 진단 키트는 금속, 플라스틱, 세라믹, 또는 고분자와 같은 재질로 구성될 수 있으며, 상기 예시는 비제한적이다.

[0048] 일 실시예에 따른 바이오 진단 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트를 포함할 수 있으며, 예를 들면, 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 엘리사(ELISA) 키트일 수 있다. 다양한 실시예에서는, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA, 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석용 키트들에 관하여 상용화된 분석 방법에 관한 설명이 적용될 수 있다. 상기 바이오 진단 키트를 활용해, 형광 효율이 높아 면역분석 시 다양한 분석물들의 식별 또는 정량이 용이할 수 있다.

[0050] 도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 플루오르세인(Fz)에 결합된 펩타이드(100)가 발현된 실험군 대장균과 대조군 대장균에 대해 갖는 형광 세기 차이를 측정한 그래프이며, 도 2b는 도 2a에 따른, 형광 세기를 도표로 나타낸 그래프이다.

- [0051] 도 2a를 참조하면, 좌측 그래프(A)는 형광 물질인 플루오레세인(Fz)에 특이적으로 결합하는 펩타이드(100)가 발현된 실험군 대장균의 형광 세기를 측정한 그래프이고, 우측 그래프(B)는 대조군 대장균의 형광 세기를 측정한 그래프이다. 구체적으로, 플루오레세인(Fz)에 특이적으로 결합하는 펩타이드(100)가 발현된 대장균과 대조군인 일반 대장균에 플루오레세인(Fz)을 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M을 처리하는 경우 521 nm의 파장에서 발생하는 형광 세기를 측정한 것이다. 플루오레세인(Fz)에 특이적으로 결합하는 펩타이드(100)가 표면에 발현된 대장균의 경우, 형광 물질인 플루오레세인(Fz)을 처리한 농도에 대해 플루오레세인(Fz)에 의해 521 nm의 파장에서 발생하는 형광이 정량적으로 발생함을 확인할 수 있다. 이에 반해, 일반 대장균의 경우, 형광 물질인 플루오레세인(Fz)을 처리한 농도에 대해 플루오레세인에 의해 521 nm의 파장에서 발생하는 형광이 거의 없음을 확인할 수 있다.
- [0052] 도 2b를 참조하면, 그래프 A는 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합하는 펩타이드(100)가 발현된 실험군 대장균에 농도에 따른 플루오레세인(Fz)을 가한 후 나타나는 형광 세기를 나타낸 그래프이고, 그래프 B는 대조군인 일반 대장균에 농도에 따른 플루오레세인(Fz)을 가한 후 나타나는 형광 세기를 나타낸 그래프이다. 그래프 A에서 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합하는 펩타이드(100)가 표면에 발현된 대장균의 경우, 형광 물질인 플루오레세인(Fz)을 처리한 농도에 대해 플루오레세인(Fz)에 의해 521 nm의 파장에서 발생하는 형광이 정량적으로 발생하며, 결합계수(Kd)가 100 μ M로 계산되었다. 이에 반해, 그래프 B에서 일반 대장균의 경우, 형광 물질인 플루오레세인(Fz)을 처리한 전 범위의 농도에 대해 플루오레세인(Fz)에 의해 521 nm의 파장에서 발생하는 형광이 거의 없음을 확인할 수 있다. 도 2a 및 도 2b를 토대로, 본 발명의 펩타이드(100)는 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합한다는 점을 확인할 수 있다. 다만, 상기 대장균은 비제한적 예시로, 펩타이드(100)가 결합될 수 있는 다양한 피분석 물질에 적용될 수 있음은 분명하다.
- [0054] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 펩타이드(100)와 로다민-B(Rb)를 결합시킨 후, 형광 물질인 플루오레세인(Fz)의 결합에 대한 FRET 측정 과정을 도시한 도면이고, 도 3b는 본 발명의 펩타이드(100)가 결합되지 않은 로다민-B(Rb)에 형광 물질인 플루오레세인(Fz)의 결합에 대한 FRET 측정 과정을 도시한 도면이며, 도 3c는 도 3a 및 도 3b에 대한 FRET 신호 값을 나타낸 그래프이다.
- [0055] 도 3a를 참조하면, 플루오레세인(Fz)에 특이적으로 결합하는 펩타이드(100)를 로다민-B(Rhodamine-B, Rb)와 결합, 예를 들어 화학 결합시킨 후 형광 물질인 플루오레세인(Fz)의 결합을 FRET에 따라 측정하는 과정을 도시한 도면이다. 일 실시예에서, 본 발명의 펩타이드(100)는 로다민-B(Rb)가 결합될 수 있다. 로다민-B(Rb)는 트리 아릴 메탄 염료로 크산텐의 유도체로서, $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ 의 화학식을 가진다. 또한, 로다민-B(Rb)의 레이저 광원에 따른 파장은 580 nm 내지 690 nm에서 나타난다. 플루오레세인의 여기파장 (λ_{ex})은 494 nm, 발광파장 (λ_{em})은 521 nm이며, 로다민의 여기파장 (λ_{ex})은 555 nm, 발광파장 (λ_{em})은 580 nm이다. 따라서, 플루오레세인(Fz)이 펩타이드(100)에 결합하는 경우, 여기파장 494 nm를 가할 때 521 nm가 나타나며, 이를 로다민-B(Rb)가 여기파장으로 흡수하여 최종적으로 로다민-B의 발광파장인 580 nm의 형광이 나타난다. 이에 반해, 도 3b를 참조하면, 플루오레세인(Fz)에 결합하는 펩타이드(100)가 없는 경우, 여기파장 494 nm를 가할 때, 521 nm가 나타나고 또한 로다민-B(Rb)가 근처에 존재하지 않아 플루오레세인(Fz)의 발광파장인 521 nm의 형광이 나타난다. 이를 통해, 본 발명의 펩타이드(100)는 선택적으로 플루오레세인(Fz)에 결합하는 것을 확인할 수 있다.
- [0056] 도 3c를 참조하면, 도 3a 및 도 3b에서 상술한 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합하는 펩타이드(100)를 로다민-B(Rb)와 결합시킨 형태로 형광 물질인 플루오레세인(Fz)의 결합으로 발생하는 파장에 따른 형광 세기를 보여주는 그래프(A)와 펩타이드(100)이 결합되지 않은 경우 로다민-B(Rb)와 플루오레세인(Fz)에 발생하는 파장에 따른 형광 세기를 보여주는 그래프(B)이다. 상기 그래프는 도 3a 및 도 3b의 개시 사항을 실험적으로 뒷받침하는 자료이며, 본 발명의 펩타이드(100)가 결합된 경우에 한하여, 580 nm 파장에서 형광세기가 크게 나타나는 것을 그래프 A를 통해 확인할 수 있고, 펩타이드(100)가 결합되지 않은 경우, 580 nm에서 형광 세기가 그래프 A와 비교하여 낮은 것을 그래프 B를 통해 확인할 수 있다.
- [0058] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 펩타이드(100)와 컨트롤 펩타이드에 플루오레세인(Fz)을 혼합하였을 때 나타나는 FRET에 따른 형광 세기를 도시한 그래프이다.
- [0059] 도 4를 참조하면, 그래프 A는 본 발명에 따른 특이적으로 형광 물질인 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합하는

펩타이드(100)를 로다민-B(Rb)와 결합시킨 형태로 합성, 예를 들어, 화학합성 후, 각기 다른 농도의 펩타이드(100)와 형광물질인 플루오레세인(Fz)의 결합으로 발생하는 FRET에 따른 형광 세기를 나타내는 그래프이며, 그래프 B는 플루오레세인(Fz)에 결합하지 않는 컨트롤 펩타이드에 형광 물질인 플루오레세인(Fz)를 첨가하였을 때 FRET에 따른 형광 세기를 보여주는 그래프이다. 본 발명의 펩타이드(100), 플루오레세인(Fz), 또는 로다민-B(Rb)에 대한 상세한 설명은 전술한 바와 동일하다. 상기 컨트롤 펩타이드는 N 터미널부터 C 터미널까지 ARYAG SLESG ADDW의 아미노산 서열을 가지며, 본 발명의 펩타이드(100)과 아미노산 서열이 상이하여 플루오레세인(Fz)에 결합하지 않는 특징을 갖는다.

[0060] 일 실시예에서, 일반 대장균과 본 발명의 플루오레세인(Fz)에 선택적으로 결합하는 펩타이드(100)와 형광물질인 플루오레세인(Fz)이 발현된 대장균에 플루오레세인(Fz)의 농도를 50 μM 로 고정하고, 로다민-B(Rb)가 결합된 펩타이드의 농도를 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 μM 로 처리하여 여기파장 494 nm를 가할 때 521 nm의 파장에서 발생하는 FRET 현상에 의한 형광을 측정하였다. 도 4의 그래프와 같이, 펩타이드(100)의 농도가 증가함에 따라, FRET에 의한 형광 신호가 정량적으로 증가함을 A 그래프를 통해 확인할 수 있다. 이에 반해, 컨트롤 펩타이드를 동일한 농도로 플루오레세인(Fz)와 혼합하였을 경우, FRET에 따른 신호가 작게 관찰되는 것을 확인할 수 있다. 상기 결과를 통해 본 발명의 펩타이드(100)에 형광 물질인 플루오레세인(Fz)이 선택적으로 결합함을 확인할 수 있다.

[0061] 이상에서 설명한 본 발명이 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

부호의 설명

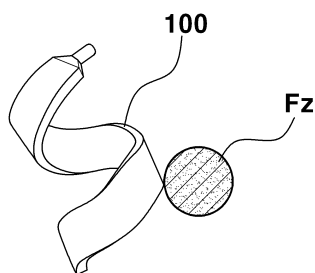
[0062] 100: 펩타이드

Fz: 플루오르세인(fluorescein)

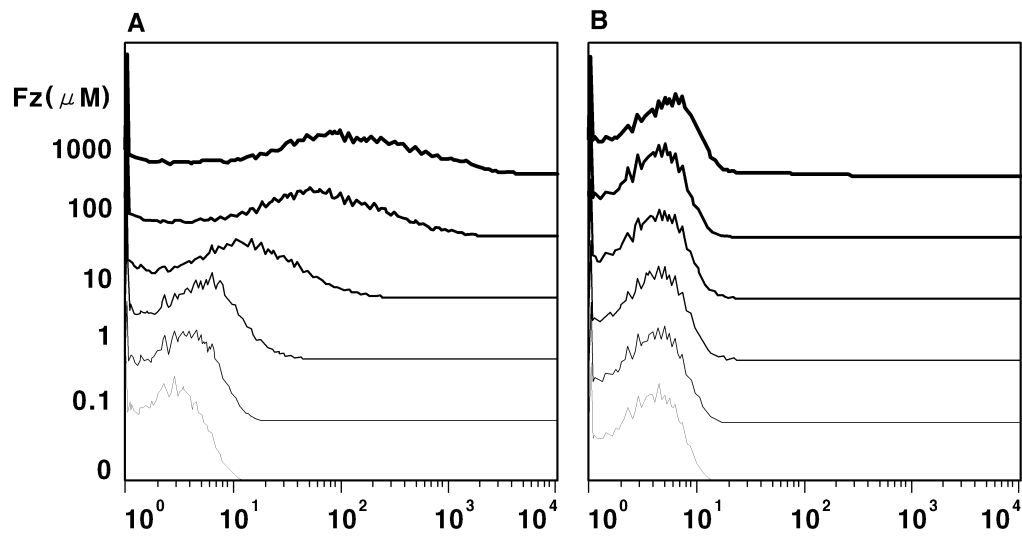
Rb: 로다민-B(Rhodamine-B)

도면

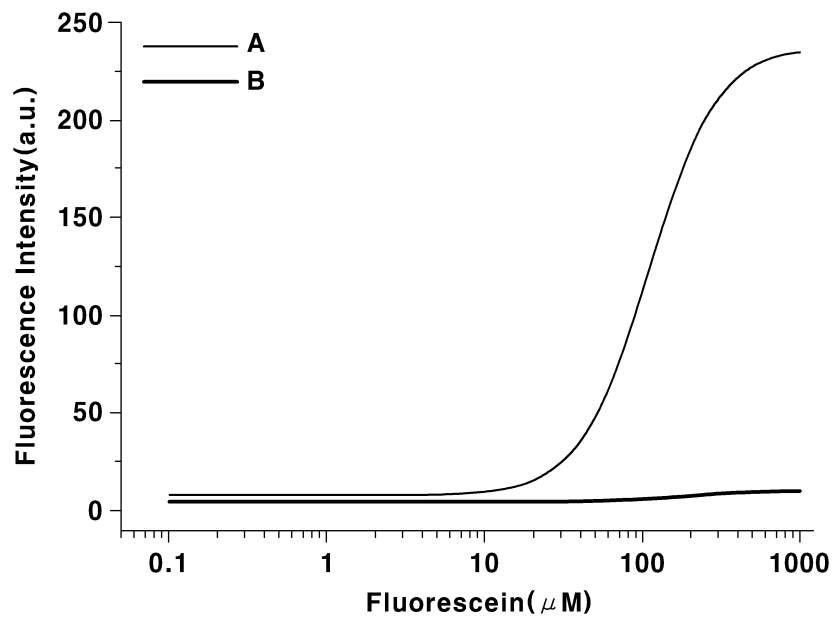
도면1



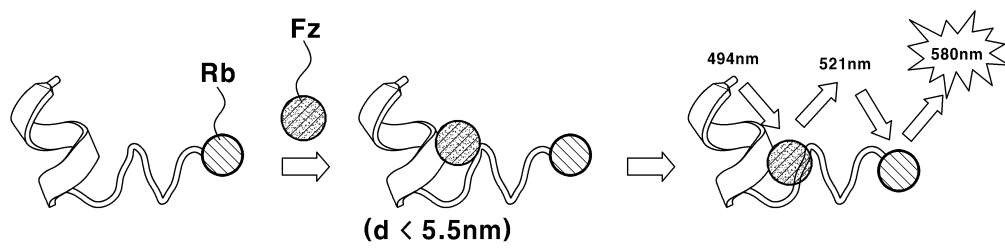
도면2a



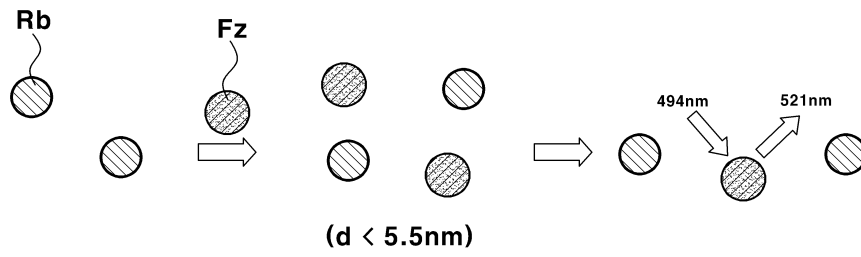
도면2b



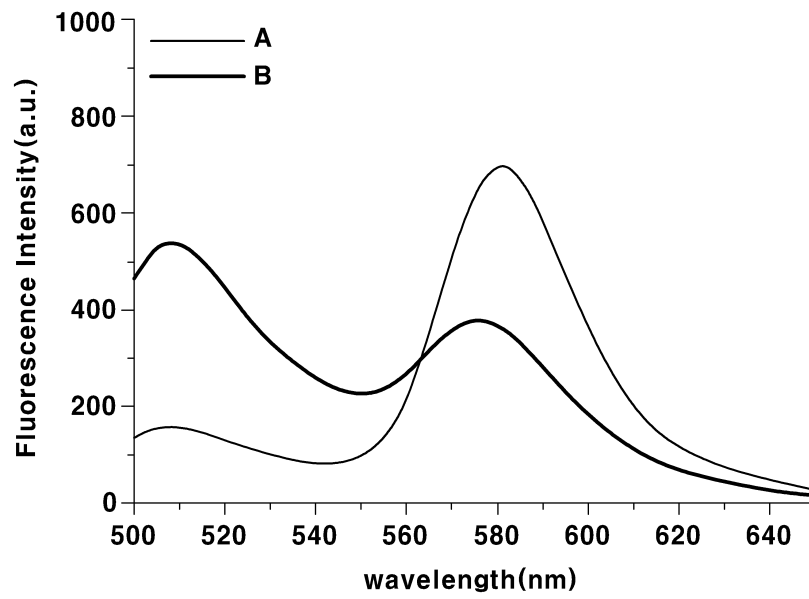
도면3a



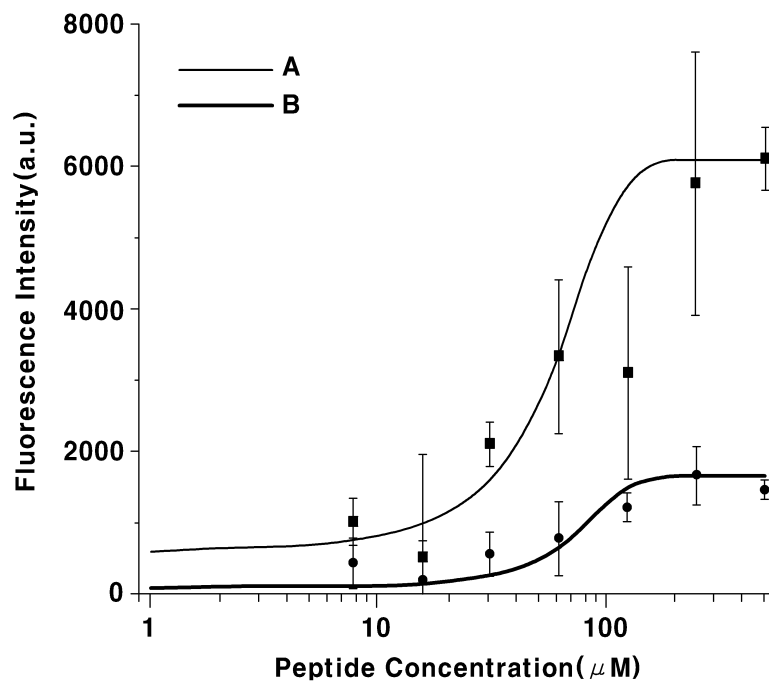
도면3b



도면3c



도면4



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION YONSEI UNIV

<120> Peptide binding to fluorescein and nucleic acid molecules
encoding it, protein expression vectors, bio-diagnostic probes
using it, and bio-diagnostic kits

<130> DP-2020-0746

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide1

<400> 1

Ala Arg Tyr Leu Arg Asn Arg Gly Leu Val Arg Asp Phe Trp Gly

1 5 10 15