



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월13일
(11) 등록번호 10-1429431
(24) 등록일자 2014년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0102111
(22) 출원일자 2012년09월14일
심사청구일자 2012년10월11일
(65) 공개번호 10-2014-0035631
(43) 공개일자 2014년03월24일
(56) 선행기술조사문헌
W02001034621 A1
KR1020100019964 A
논문1: PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS

(73) 특허권자
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
정기준
대전광역시 서구 월평선사로 65 한아름아파트 10
7동 406호
임성갑
대전광역시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생
명화학공학과
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 문동현

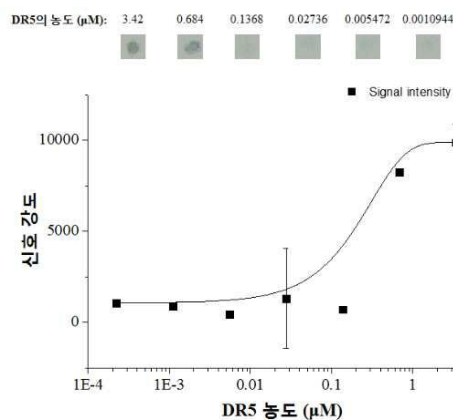
(54) 발명의 명칭 다양한 지지체에 적용 가능한, 크링글 도메인 변이체를 포함하는 단백질 칩의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 종이, 천 등 다양한 재료를 지지체로 적용 가능한, 크링글 도메인 변이체를 포함하는 단백질 칩의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 지지체에 발수성 고분자를 iCVD (initiated chemical vapor deposition; 화학기상증착) 공정으로 코팅하는 단계, 상기 발수성 고분자가 코팅된 지지체에 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자를 코팅하는 단계, 및 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와 결합물을 상기 지지체에 고정화시키는 단계를 포함하는 단백질 칩의 제조방법을 제공한다. 또한, 상기 방법으로 제조된 단백질 칩 및 이를 이용하여 질병을 진단하는 방법을 제공한다.

본 발명에 따르면, 값이 싸고 휴대가 간편한 재료들을 단백질 칩의 지지체로 이용할 수 있으며, 항체에 비하여 용해도, 열적 안정성 및 생산성이 우수하며 비용이 저렴한 크링글 도메인 변이체를 항체를 대신하여 사용할 수 있다. 또한, 티올 (thiol)기와 비닐 (vinyl) 기의 결합을 단백질 칩 제조에 적용함으로써, 크링글 도메인 변이체와 목적 분자간의 반응성을 향상시킬 수 있으므로, 기존의 단백질 칩에 비하여 저비용으로 휴대성 및 반응성이 증대된 단백질 칩을 제조할 수 있으므로 유용하다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

정구민

서울특별시 강동구 천호대로219가길 21 2층

성혜정

대전광역시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 응용공학동 6114호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0082332

부처명 교육과학기술부

연구사업명 신기술융합형 성장동력사업(바이오제약)

연구과제명 나노바이오 시스템 및 의약생물공정을 위한 새로운 scaffold 단백질의 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2009.07.10 ~ 2014.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110027538

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자 지원사업

연구과제명 아토피 정밀 진단용 3차원 나노구조체 기반 고감도 압타머 센서 개발

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

- (1) 지지체에 발수성 고분자를 iCVD (initiated chemical vapor deposition; 화학기상증착) 공정으로 코팅하는 단계;
- (2) 상기 발수성 고분자가 코팅된 지지체에 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자를 코팅하는 단계; 및
- (3) 상기 발수성 고분자와 비닐기를 포함하는 고분자가 코팅된 지지체에, 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와의 결합물을 고정화시키는 단계를 포함하는 단백질 칩의 제조방법;

여기서, 상기 크링글 도메인 변이체는 하기 아미노산 서열을 갖는 크링글 도메인 구조 기반 단백질 변이체이고,

CXxXxGXxYDGYxXxTXxGXxCQXWXxXxPHXHGXXxXxXxXxXxKNYCRNPDXxXxPWCFTXxXxXxXELCXxPRC (서열번호 7)

상기 서열에서, X는 세린, 타이로신, 프로린, 히스티딘, 쓰레오닌, 아스파라긴, 알라닌, 또는 아스파테이트인 것을 특징으로 하고, x는 글루타민, 알기닌, 라이신, 글루탐산 또는 글라이신인 것이 특징임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 지지체는 종이, 유리, 멤브레인, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 또는 폴리스티렌으로 제조된 지지체; 여과지; 아가로스; 가교된 텍스트란; 세파텍스; 폴리비닐 클로라이드; 플라스틱 비드; 실리콘 기판; 및 금속 기판으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 칩의 제조방법

청구항 3

청구항 3은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제1항에 있어서, 상기 발수성 고분자는 폴리(퍼플루오로데실아크릴레이트)(poly(perfluorodecylacrylate)) 또는 폴리(퍼플루오로데실메타크릴레이트)(poly(perfluorodecyl methacrylate))인 것을 특징으로 하는 단백질 칩의 제조방법.

청구항 4

청구항 4은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제1항에 있어서, 상기 비닐기를 포함하는 고분자는 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane)), 폴리(1,3,5,-트리메틸-1,3,5-트리비닐 시클로실록산)(poly(1,3,5-trimethyl-1,3,5-trivinyl cyclotrisiloxane)) 또는 헥사비닐디실록산(hexavinyl-disiloxane) 인 것을 특징으로 하는 단백질 칩의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와의 결합물은 자외선을 가함으로써 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자와 공유결합을 형성하여 지지체의 표면에 고정되는 것을 특징으로 하는 단백질 칩의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기는 크링글 도메인 변이체의 N-말단 또는 C-말단에 결합되는 것을 특징으로 하는 단백질 칩의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기의 결합은 링커에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 단백질 칩의 제조방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 따른 제조방법으로 제조되는, 크링글 도메인 변이체를 포함하는 단백질 칩.

청구항 9

발수성 고분자 코팅층;과 상기 발수성 고분자 코팅층 상부에 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자 코팅층이 형성된 지지체 상에 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와의 결합물이 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 단백질 칩:

여기서, 상기 크링글 도메인 변이체는 하기 아미노산 서열을 갖는 크링글 도메인 구조 기반 단백질 변이체이고,

CXxXxGXxYDGXxXxTXxGXxCQXWXxXxPHXHGXxXxXxXxXxXxKNYCRNPDXxXxPWCFTXxXxXxXELCXxPRC (서열번호 7)

상기 서열에서, X는 세린, 타이로신, 프로린, 히스티딘, 쓰레오닌, 아스파라긴, 알라닌, 또는 아스파테이트인 것을 특징으로 하고, x는 글루타민, 알기닌, 라이신, 글루탐산 또는 글라이신인 것이 특징임.

청구항 10

제9항의 단백질 칩을 이용하여 생물학적 시료 중의 표적 분자를 측정하는 방법.

청구항 11

제9항의 단백질 칩에 생물학적 시료를 주입하여 시료 중의 표적 분자가 단백질 칩에 포함되어 있는 크링글 도메인 변이체와 특이적 결합을 형성하도록 하는 단계; 및

상기 특이적 결합을 형성한 결합물을 발색 시약을 이용하여 분석하는 단계를 포함하는, 분석하고자 하는 표적 분자를 측정하여 질병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

명세서

기술 분야

본 발명은 종이, 천 등 다양한 재료를 지지체로 적용 가능한, 크링글 도메인 변이체를 포함하는 단백질 칩 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 지지체에 발수성 고분자를 iCVD (initiated chemical vapor deposition; 화학기상증착) 공정으로 코팅하는 단계, 상기 발수성 고분자가 코팅된 지지체에 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자를 코팅하는 단계, 및 상기 발수성 고분자와 비닐기를 포함하는 고분자가 코팅된 지지체에, 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와의 결합물을 고정화시키는 단계를 포함하는 단백질 칩의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 단백질 칩을 이용하여 질병을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

[0002] 최근, 질병 진단이나 약물 치료 효능 평가 등 병리학, 생명공학 등의 분야에서 시료내 단백질을 분석하기 위한 최첨단의 기술로서 단백질 칩에 대한 연구가 급속도로 이루어지고 있고, 이에 대한 관심 또한 나날이 높아지고 있다. 일반적으로, 단백질 칩은 목적 단백질에 특이적으로 결합하는 항원이나 항체 등의 단백질을 지지체의 표면에 고정시킨 후, 시료와의 반응, 주로 면역 반응을 이용하여 그 결합 결과를 분석함으로써, 시료내 특정 단백질을 측정하는 것이다.

[0003] 그런데, 현재 사용되고 있는 단백질 칩 시스템은 금과 같은 값이 비싼 표면 물질을 기반으로 한 고정화 기술을 이용하기 때문에 그 수가가 상당히 비싸다. 그리고 진단 장비 자체의 가격과 휴대성 측면에서 현장에서 사용하기에는 부적합한 것이 대부분이다. 예를 들어 SPR (surface plasmon resonance)을 이용한 진단 시스템의 경우, 높은 정확성을 가지고 진단이 가능하지만 사용되는 칩 자체의 가격과 검출 장비의 가격이 매우 높고 휴대성이 없기 때문에 간편한 현장 진단을 하기에는 부적합하다는 단점이 있다. 또한 화학적인 측면에서, 지지체로서 유리를 사용하는 경우, 사용 가능한 표면 작용기의 종류가 다양하지 않기 때문에 개발 단계에서 연구자들의 선택 폭이 좁아 새롭고 효율적인 시스템의 개발이 용이하지 않다는 문제점이 있다. 이와 같은 문제점들을 해결하기 위하여, 통상적으로 자기조립분자막법 (self-assembled monolayer, SAM), 스핀 코팅 (spin coating), 딥 코팅 (dip coating)과 같은 액상 공정을 이용하여, 유리 기판에 원하는 작용기를 가진 고분자를 코팅하여 연구자가 직접 유리 기판에 표면 처리를 하는 방법이 사용되고 있다. 하지만 이러한 액상 공정에는 용매가 이용되기 때문에 용매로 인한 고분자 코팅의 순도 저하라는 문제가 발생한다. 또한, 용매를 제거하기 위하여 기판을 어닐링 (annealing) 하는 단계가 필요한데, 이 과정은 통상적으로 12시간 이상 소요되기 때문에 기판을 준비하는 과정에 있어 상당한 시간적 손해를 야기한다는 단점이 있다. 뿐만 아니라 용매를 이용하기 때문에 종이나 비닐과 같이 유기 용매에 약한 기판 물질에 바이오 칩을 구현하기 위한 코팅을 실행하는데 어려움이 있다.

[0004] 또한, 기존의 단백질 칩은 주로 항체 또는 항체에 형광 물질을 화학적으로 결합시킨 것을 진단 탐침으로 주로 사용하였으나 (Magnusson K.E. 등, Immunol. Invest., 16:227-40, 1987), 항체는 세포 내에서의 생산성 및 용해도가 떨어지고 열적 안정성이 낮으며 탐침으로의 사용을 위해서는 화학적 수정이 필요하다는 불편함이 있다. 이에, 항체를 효율적으로 대체하기 위한 물질을 제조하기 위한 기술이 개발되고 있다. 그 중 하나가, 비항체 단백질 골격 (non-antibody protein scaffold) (이하 단백질 골격)의 개발이다. 비항체 단백질 골격은 작은 크기, 단일 아미노산 서열을 가지는 단백질로 높은 열적, 화학적 안정성을 지니며 항체와 같이 표적 분자 (target molecule)로의 강력한 특이적 결합이 가능한 것을 말한다 (Skerra A, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304, 2007; Gebauer M, Skerra A, Curr. Opin. Biotechnol., 13:245-55, 2009). 단백질 골격은 그 생산성과 용해도 측면에서 기존의 항체에 비하여 큰 장점을 가지며 항체와 비슷하게 표적 분자로의 특이적 결합이 가능하므로 항체의 효과적인 대체물질로서 각광받고 있다. 또한, 이들은 크기가 작아서 엔지니어링이 용이하므로 진단 탐침으로의 사용 가치 또한 주목받고 있다. 진단 탐침으로 사용하기 위해서는 화학적 또는 아미노산 서열상의 수정이 불가피한데, 기존에 사용되는 항체의 경우 그와 같은 수정을 가할 경우 구조상의 변형 등이 야기되어 특유의 결합 활성을 잃는 현상이 일어날 수 있는데, 단백질 골격의 경우 아미노산 서열 또는 화학적인 수정을 하여도 특유의 활성을 잃는 일이 거의 없어 진단 칩으로의 응용에 필요한 엔지니어링이 용이하기 때문이다. 그러나, 아직까지 이러한 비항체 단백질 골격을 이용한 진단 시스템에 대한 연구는 거의 이루어진 바 없으며, 진단 시스템에서 비항체 단백질 골격이 항체를 대신할 수 있는지에 대한 검증도 미흡한 실정이다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 기존의 액상 공정이 아닌 iCVD (initiated chemical vapor deposition; 화학 기상 증착) 공정을 이용하면 목적하는 작용기를 갖는 고분자를 다양한 지지체에 증착할 수 있고, 화학적, 열적 안정성이 항체보다 우수하며 표적 분자에 대하여 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체를 항체를 대신하여 사용할 수 있으며, 비닐 (vinyl)기와 티올 (thiol)기의 공유결합을 이용하면 표적 분자와 특이적으로 결합하는 크링글 도메인 변이체를 효과적으로 지지체에 고정시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다. 본 발명에 의하면, 저비용으로 휴대성 및 반응성이 증대된 단백질 칩을 제조할 수 있으므로 유용하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 저비용으로 휴대성 및 반응성이 증대된 단백질 칩을 제조하는 방법, 그 방법으로 제조된 단백질 칩 및 이를 이용하여 질병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지지체에 발수성 고분자를 iCVD (initiated chemical vapor deposition; 화학 기상 증착) 공정으로 코팅하는 단계, 상기 발수성 고분자가 코팅된 지지체에 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자를 코팅하는 단계, 및 상기 발수성 고분자와 비닐기를 포함하는 고분자가 코팅된 지지체에, 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와 결합물을 고정화시키는 단계를 포함하는 단백질 칩의 제조방법을 제공한다.

[0008] 본 발명은 또한, 발수성 고분자 코팅층;과 상기 발수성 고분자 코팅층 상부에 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자 코팅층이 형성된 지지체 상에 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와 결합물이 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 단백질 칩을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 단백질 칩에 생물학적 시료를 주입하여 시료 중의 표적 분자가 단백질 칩에 포함되어 있는 크링글 도메인 변이체와 특이적 결합을 형성하도록 하는 단계; 및 상기 특이적 결합을 형성한 결합물을 발색 시약을 이용하여 분석하는 단계를 포함하는, 분석하고자 하는 표적 분자를 측정하여 질병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 의하면, 종이, 폴리에틸렌 (poly ethylene) 등 종래의 진단 칩 분야에서 기관 물질로 사용될 수 없었던 값이 싸고 휴대가 간편한 재료들을 단백질 칩의 지지체로 이용할 수 있으며, 항체에 비하여 용해도, 열적 안정성 및 생산성이 우수하며 비용이 저렴한 크링글 도메인 변이체를 항체 대신 사용할 수 있다. 또한, 티올 (thiol)기와 비닐 (vinyl) 기의 공유결합을 단백질 칩 제조에 적용함으로써, 크링글 도메인 변이체와 표적 분자 간의 반응성을 향상시킬 수 있다. 따라서, 기존의 단백질 칩에 비하여 저비용으로 휴대성 및 반응성이 증대된 단백질 칩을 제조할 수 있으므로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 크로마토그래피 종이에 poly(perfluorodecylacrylate)와 poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane)를 증착하는 방식에 대한 모식도이다.

도 2는 크로마토그래피 종이에 poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane)를 iCVD 방법으로 증착한 후 촬영한 스캐닝 전자 현미경 (SEM)의 이미지이다 ((좌): 증착 전 종이, (우): 증착 후 종이).

도 3은 본 발명에 따라 제조된 단백질 칩에 단백질이 고정되는지 여부를 파악하기 위하여 제조된 단백질 발현 시스템을 나타낸 것이다.

도 4는 상기 도 3에 나타난 시스템에 의한 단백질 발현 결과를 12 % SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis)로 분석하여 쿠마시 브릴리언트 블루 (coomassie brilliant blue)로 염색한 결과이다.

도 5는 시스테인 (cystein) 잔기를 포함하는 mOrange와 시스테인 (cystein) 잔기를 포함하지 않는 mOrange가, poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane)로 코팅된 본 발명에 따른 단백질 칩의 표면에 고정되는지 여부를 형광 스캐너를 이용하여 확인한 것이다.

도 6은 poly(perfluorodecylacrylate)와 poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane)로 코팅된 크로마토 그래피 종이 위에 시스테인 (cystein) 잔기를 가지는 KD548을 고정화 한 후 DR5를 효소결합 흡착면역 검사 방법으로 검출한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0013] 본 발명은 일 관점에서, (1) 지지체에 발수성 고분자를 iCVD (initiated chemical vapor deposition; 화학 기상 증착) 공정으로 코팅하는 단계; (2) 상기 발수성 고분자가 코팅된 지지체에 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자를 코팅하는 단계; 및 (3) 상기 발수성 고분자와 비닐기를 포함하는 고분자가 코팅된 지지체에, 표적 분자에

특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와의 결합물을 고정화시키는 단계를 포함하는 단백질 칩의 제조방법을 제공한다.

- [0014] 종래에는 단백질 칩의 지지체 또는 기판으로서 금 등의 금속 플레이트 소재의 기판들이 주로 사용되었으나 본 발명은 iCVD (initiated chemical vapor deposition; 화학 기상 증착) 공정에 의하여 고분자를 지지체에 코팅 시키므로 종이, 옷감 등과 같은 액체에 젖음성 (wettability)이 높은 재료들도 단백질 칩의 지지체로 사용할 수 있다. 따라서 본 발명에 의하면 다양한 재료의 지지체를 이용하여 단백질 칩을 제조할 수 있다.
- [0015] 본 발명에서, “지지체”는 단백질 칩의 base가 되는 재료를 말하는 것으로 본 발명에서 단백질 칩의 “기판”과 동일한 의미로 사용된다. 지지체로는, 작은 시트, 세파텍스, 폴리비닐 클로라이드, 플라스틱 비이드, 및 96-웰 마이크로타이터 플레이트를 포함하여 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌 등으로부터 제조된 분석 플레이트 또는 시험관, 뿐만 아니라 여과지, 아가로스, 가교된 텍스트란 및 기타 다당류와 같은 입상 물질을 포함하여 사용할 수 있으며, 그 외에도 실리콘, 금, 구리 등의 금속 기판과 같은 일반적으로 단백질 칩 기판으로 사용되는 것들도 사용할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에서는, 휴대성 및 비용 절감을 위하여 크로마토그래피용 종이를 지지체로 사용하였다. 크로마토그래피는 젖음성으로 인하여 종래에는 단백질 칩의 지지체로의 이용이 어려웠으나, 본 발명에서는 iCVD 공정에 의하여 발수성 고분자를 지지체에 코팅하므로 크로마토그래피용 종이 등의 다양한 재료를 지지체로 사용하는 것이 가능하다.
- [0017] iCVD 공정은, 이미 액상 공정으로는 대단히 잘 알려져 있는, 자유 라디칼 (free radical)을 이용한 연쇄 중합 반응을 이용하는 공정으로, 개시제와 단량체를 기화하여 기상에서 고분자 반응이 이루어지게 함으로써, 고분자 박막을 기판의 표면에 증착하는 공정이다. iCVD 공정은 기상 증착 공정이기 때문에, 유기 용매를 사용하지 않는 것이 특징이다.
- [0018] 발수성 고분자로는, 폴리(퍼플루오로데실아크릴레이트)(poly(perfluorodecylacrylate)), 폴리(퍼플루오로데실메타크릴레이트)(poly(perfluorodecyl methacrylate)) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 iCVD 공정에 의하여 지지체에 코팅될 수 있는 발수성을 특성을 갖는 고분자면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 발수성 고분자인 폴리(퍼플루오로데실아크릴레이트)(poly(perfluorodecylacrylate))를 iCVD (initiated chemical vapor deposition; 화학기상증착) 공정으로 iCVD 반응기 내에서 지지체의 앞, 뒤에 코팅하였다 (도 1).
- [0019] 본 발명의 단백질 칩의 제조방법은, 항체에 비하여 생산성, 용해도, 및 열적 안정성이 우수한 크링글 도메인 변이체를 이용하여 제조되는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명에서, “크링글(Kringle)”은 인간을 포함한 다양한 생명체의 여러 단백질에 독립적으로 3차 구조를 가지고 존재하는 도메인 (domain) 또는 모듈 (module)로서, 전형적인 크링글 도메인은 약 80 여개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 3개의 다이설파이드본드 (S-S bond)로 연결된 3차 구조를 가지고 있으며, 이 3개의 다이설파이드본드 결합이 구조적으로 단단한 여러 루프구조를 제공하고 있다 (Castellino 등, J Mol Evol, 26:358-369, 1987; Ikeo 등, J Mol Evol, 40:331-336, 1995; Castellino 등, Ciba Found Symp, 212:46-60, 1997; Marti 등, Biochemistry, 38:15741-15755, 1999). 전형적인 크링글 도메인의 다이설파이드 본드 결합 양상은 1-6, 2-4, 3-5 인데, 즉 시스테인1번과 80번 잔기사이에, 시스테인 22번-63번 잔기사이에, 시스테인 51-75번 잔기사이에 형성된다 (Ikeo 등, J Mol Evol, 40:331-336, 1995; Castellino 등, Ciba Found Symp, 212:46-60, 1997; Marti 등, Biochemistry, 38:15741-15755, 1999).
- [0021] 본 발명에서, “크링글 도메인”은 자연계의 생명체에 존재하는 893개 이상의 (사람에는 31개의 이상) 단백질에 존재하는 것으로, 구조적 안정성을 부여하기 위한 일부 아미노산이 보존되어 있고, 나머지 부분은 아미노산 또는 뉴클레오타이드 수준에서는 보존되어 있지 않다. 따라서 이러한 크링글 도메인의 전형적인 구조적 특성을 부여하는 아미노산 서열은 보존하여 구조골격 (예, 3개의 분자내 다이설파이드본드 결합 (다이설파이드 본드 결합 양상은 1-6, 2-4, 3-5) 및 이로 인해 생성되는 루프구조)를 이루게 하고, 구조적으로 유연한 루프구조 부분에 의도적인 또는 무작위로 돌연변이를 도입하여 다양한 자연계에 존재하지 않는 아미노산 서열 조합을 갖도록 변이체 라이브러리를 구축하는 방법과 디자인된 라이브러리에서 다양한 표적분자에 특이적으로 결합하는 크링글 도메인 구조 골격에 기반한 변이체를 분리하여, 동정하고 특성을 규명할 필요가 명백하다. 또한 크링글 도메인 구조기반 변이체는 표적분자의 생물학적 활성을 조절하여, 다양한 질환의 예방, 탐지, 진단, 치료또는 경감하기

위한 방법 및 조성물로 개발될 수 있으므로, 본 발명에서는 크링글 도메인 구조골격 유지에 중요한 보존된 아미노산 잔기를 제외한 잔기에 인위적인 돌연변이가 유도되도록 하여 표적분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 구조 기반 단백질 골격 변이체를 제조하여 이의 형광면역 측정법에의 적용 가능 여부를 검토하였다.

[0022] 본 발명에서, “크링글 도메인 변이체” 또는 “크링글 도메인 구조 기반 단백질 변이체”는 특정의 표적 분자에 대하여 특이적인 결합능을 갖도록 크링글 도메인을 변형시킨 돌연변이체를 의미하는 것으로, 하기 아미노산 서열을 갖는 크링글 도메인 구조 기반 단백질 변이체이며,

[0023] CXxXxGXxYDGGxXxTXxGXxCQXWXxXxPHXHGxXxXxXxXxXxKNYCRNPDXxXxPWCFTXxXxXxXELCXxPRC (서열번호 7)

[0024] 상기 서열에서, X는 세린, 타이로신, 프로린, 히스티딘, 쓰레오닌, 아스파라긴, 알라닌, 또는 아스파테이트인 것을 특징으로 하고, x는 글루타민, 알기닌, 라이신, 글루탐산 또는 글라이신인 것을 특징으로 한다. 이러한 크링글 도메인 구조기반 단백질 변이체는 자연계에 존재하는 크링글 도메인이 결합하는 단백질 외에도, 다양한 표적분자에 특이적으로 결합하여 표적분자의 생물학적 활성을 조절할 수 있는데, 본 발명의 일 구체예에서는 표적분자로서 세포사멸수용체 5 (DR5)에 대하여 특이적인 크링글 도메인 구조 기반 단백질 변이체로서 KD548을 사용하였다. 이의 제조방법은 국내 공개특허 제10-2010-0019964에 기재된 바와 같다. 그러나, 이에 제한되지 않으며 크링글 도메인 변이체는 측정하고자 하는 표적 분자의 종류에 따라 제조하여 사용할 수 있다.

[0025] 본 발명에서, “KD548”은 DR4 및 DR5에 특이적으로 결합하는 비항체 단백질 골격인 크링글 도메인 (Kringle domain) 구조 기반 단백질 변형체로서 (Lee C.H. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107:9567-71, 2010)를 의미한다. KD548은 인간 플라스미노젠 크링글도메인 2 (human plasminogen Kringle domain 2)의 노출된 7개의 루프 (loop)들의 아미노산 서열을 임의화 (randomization)하여 제작된 효모 (yeast) 라이브러리 (library)에서 얻어진 단백질 골격으로 78개의 아미노산으로 구성 (서열번호 8) 되며 세포 사멸 수용체 4 (death receptor 4; DR4)와 세포사멸수용체 5 (death receptor 5; DR5)에 대하여 특이적인 결합력을 갖는다.

[0026] KD548:CHQTQGPYDGNKDKTHKGHKCSWTKNRPHHHGKNIENEDENRFQKNYCRNPDKHEPWCFTHGHRDKHELCHPEPRC (서열번호 8)

[0027] KD548은 단백질 골격의 일반적인 성질을 가지므로 세포 내에서의 생산성과 용해도가 매우 우수하므로 본 발명에서 세포 내에서의 항체를 대체할 물질로서 KD548을 선정하였다.

[0028] 본 발명에서 “세포사멸 수용체 5 (DR5) 단백질”은 종양괴사인자(TNF) 수용체 패밀리의 일원이고 TRAIL에 결합하며, C-말단에 세포내 죽음 도메인(death domain)을 갖는 수용체를 의미한다 (Pan 등, Science, 277:815-818, 1997). DR5가 TRAIL에 결합하는 경우 다양한 암세포주에 대하여 생체외 (in vitro) 또는 생체 내 (in vivo)에서 아포토시스를 유도한다. 본 발명에 있어서, DR5는 상기한 바와 같은 특성을 갖는 단백질이면 어느 것이나 포함되며, 예를 들어 미국특허 제 6,872,568호에 기재된 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 DR5 발현에 의해 야기되는 암은 유방암, 결장암, 뇌종양, 신경교종, 난소암, 자궁내막암, 골육종, 자궁경부암, 전립선암, 폐암, 혈액암, 췌장암, 육종암 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0029] 본 발명의 단백질 칩 제조방법은, 비닐 (vinyl)기와 티올 (thiol)기의 공유결합을 이용하는 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 단백질 칩의 지지체에 코팅된 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자와, 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기가 공유결합을 형성하도록 하여, 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체가 방향성을 가지고 지지체에 고정되도록 하는 것이 특징이다. 이로 인하여, 표적 분자와 크링글 도메인 변이체의 효과적인 결합이 가능한바, 우수한 반응성을 갖는 단백질 칩의 제조가 가능하다.

[0030] 이를 위하여, 상기 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자는 발수성 고분자가 코팅된 지지체에 코팅된다.

[0031] 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자로는, 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane)), 폴리(1,3,5-트리메틸-1,3,5-트리비닐 시클로실록사)(poly(1,3,5-trimethyl-1,3,5-trivinyl cyclotrisiloxane)), 헥사비닐디실록산(hexavinylidisiloxane) 등을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않으며 비닐 (vinyl)기를 포함하여 티올 (thiol)기와 공유결합을 형성할 수 있는 고분자면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자로는 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))을 iCVD 공정으로 지지체에 코팅하였다. 그러나, 상기 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자는 iCVD 공정 이외의 방법을 사용하여 지지체에 코팅될 수도 있다. 이 코팅은 지지체의 한쪽 면에만 수행되며, 발수성 고분자의 코팅이 완료된 이후에 수행한다. 상기 과

정을 통하여 제작된 종이 기반의 단백질 센싱 기판은 물리적, 화학적으로 전혀 손상이 없었으며 (도 2), 실제로 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와의 결합하지만, 티올 (thiol)기를 포함하지 않는 아미노산 잔기와의 결합하지 않았다 (실시예 2, 도 5 참조)

[0032] 상기 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자를 지지체에 코팅한 후, 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와의 결합물을 지지체에 고정화시킬 수 있다. 상기 고정화는, 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와의 결합물을 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자가 코팅된 지지체에 spotting 등의 방법으로 가한 뒤, 자외선을 가함으로써 비닐 (vinyl)기와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기가 공유결합을 형성하도록 함으로써 가능하다. 이때, 자외선으로는 365~400nm 범위의 광원이면 제한없이 사용할 수 있으며, 그 예로 UV 램프, UV 레이저 등을 사용할 수 있다.

[0033] 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기로는, 시스테인 (cystein) 잔기 등을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않으며 비닐 (vinyl)기와 공유결합을 형성할 수 있는 아미노산 잔기면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기로는 시스테인 (cystein) 잔기를 사용하였다.

[0034] 상기 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기는 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 결합시킨다. 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기는 크링글 도메인 변이체의 N-말단 또는 C-말단에 결합될 수 있으며, 상기 결합은 링커에 의하여 이루어질 수 있다. 본 발명에서 "링커"는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기를 연결하거나 결합하는 부위 또는 부위군을 의미하는 것으로, 바람직하게는 폴리펩타이드, 폴리핵산 및 그 유사체를 포함한다. 링커는 자연적으로 존재하거나 합성된 것, 또는 이들의 조합일 수 있으며 원래 서열의 일부, 그것의 변이체 또는 합성 서열일 수 있다. 그러나, 바람직하게는 단단한 링커를 사용하는 것이 좋다. 단단한 링커를 사용하면 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기가 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자와의 결합을 형성하는 경우, 표적 분자와 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체는 지지체의 하부가 아닌 쪽으로의 방향성을 가지게되므로, 표적 분자와의 우수한 반응성을 기대할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 단단한 링커로, EAAAK를 사용하였다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서는, 암 마커로 알려져 있는 세포사멸수용체 4 (DR4), 세포사멸수용체 5 (DR5)에 특이적으로 결합 가능한 크링글 도메인 변이체 KD548에 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기인 시스테인 (cystein) 잔기를 결합한 결합물을 사용하였다. KD548의 N-말단 또는 C-말단에 링커에 의하여 결합되는 시스테인 잔기는 지지체에 코팅되어 있는 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자와 결합하므로 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체는 지지체로부터 수직 상방향쪽으로의 방향성을 갖게 된다. 따라서, 표적 분자를 포함하는 생물학적 시료를 본 발명에 따른 단백질 칩에 적용한 경우, 시료 내의 표적 분자가 크링글 도메인 변이체와 효과적으로 반응할 수 있는바, 본 발명에 따라 제조된 단백질 칩에 의하면 시료 중의 표적 분자를 정량적으로, 그리고 민감하게 검출할 수 있다.

[0036] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 발수성 고분자 코팅층;과 상기 발수성 고분자 코팅층 상부에 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자 코팅층이 형성된 지지체 상에 표적 분자에 특이적 결합능을 갖는 크링글 도메인 변이체와 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기와의 결합물이 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 단백질 칩을 제공한다.

[0037] (여기서, 상기 크링글 도메인 변이체는 하기 아미노산 서열을 갖는 크링글 도메인 구조 기반 단백질 변이체이고,

[0038] CXxXxGXxYDGGXxXxTXxGXxCQXWXxXxPHXHGxXxXxXxXxKNYCRNPDXxXxPWCFTXxXxXxXELCXxPRC (서열번호 7)

[0039] 상기 서열에서, X는 세린, 타이로신, 프로린, 히스티딘, 쓰레오닌, 아스파라긴, 알라닌, 또는 아스파테이트인 것을 특징으로 하고, x는 글루타민, 알기닌, 라이신, 글루탐산 또는 글라이신인 것이 특징임.)

[0040] 또한, 본 발명의 단백질 칩을 이용하면 분석하고자 하는 표적 분자를 측정하여 질병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다.

[0041] 따라서 본 발명은 다른 관점에서, 단백질 칩에 생물학적 시료를 주입하여 시료 중의 표적 분자가 단백질 칩에 포함되어 있는 크링글 도메인 변이체와 특이적 결합을 형성하도록 하는 단계; 및 상기 특이적 결합을 형성한 결합물을 발색 시약을 이용하여 분석하는 단계를 포함하는, 분석하고자 하는 표적 분자를 측정하여 질병의 진단을

위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0042] 본 발명에서, “질병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법”은 특정 질병의 마커가 되는 단백질의 존재 유무를 확인함으로써 질병의 존재 유무를 판단할 수 있는 정보를 제공하는 것을 의미하는 것으로서, 본 발명에서는 본 발명에 따라 제조된 단백질 칩에 생물학적 시료를 주입하여 시료 중의 표적 분자가 단백질 칩에 포함되어 있는 크링글 도메인 변이체와 특이적 결합을 형성하는지를 발색 시약 등의 방법으로 확인하여 특정 질병의 유무를 진단하는 것을 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서는, 분석 대상 시료 내의 표적 분자의 존재 유무와 농도를 검출함에 있어서, 슬라이드 글래스에 색상이 있는 침전물을 생성할 수 있는 TMB ((3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)) 용액을 적용하여 비색 반응을 유도하도록 하여 신호 강도를 분석하였다 (실시예 3, 도 7 참조). 그러나 이에 제한되지 않으며, 기타의 형광물질 등을 이용할 수도 있다.

[0043] 본 발명에서 “표적 분자”는, 특정 질병의 마커가 될 수 있는 것이면 제한 없이 사용할 수 있다. 그 예로, 세포사멸수용체 4, 세포사멸수용체 5, 종양괴사인자 알파, 당단백질 II β /III α 수용체(Glycoprotein IIb/IIIa receptor) 또는 당단백질 II β /III α (Glycoprotein II β /III α), 혈관내피세포성장인자(VEGF;vascular endothelial growth factor), 혈관내피세포성장인자 수용체(VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor), 타이로신 카이네이즈 억제제 (tyrosin kinase inhibitor), 표피성장인자 수용체(Epidermal growth factor receptor), 혈소판유래 성장인자 (platelet-derived growth factor, PDGF), 혈소판유래 성장인자 수용체 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR), 줄기세포인자수용체 (c-kit), Fms-양 티로신키나제-3 (Flt-3), 인터루킨 1 (interleukin 1), 인터루킨 6 (interleukin 6), 인터루킨 32 (interleukin 32), 인터루킨 2 수용체 (interleukin 2 receptor), CD3, CD11a, CD14, CD15, CD16, CD20 CD32, CD64, 또는 Raf인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다. 본 발명의 일 실시예에서는 표적 분자로 세포사멸수용체 5를 사용하였으나 암 이외의 질병을 진단하기 위해서는 다른 표적 분자를 사용할 수 있음은 당업자에게 명백하다. 본 발명에서 항체를 대신하여 사용되는 비항체 단백질 골격인 KD548은 바람직하게는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것이나 이에 한정되지 않으며 세포사멸수용체 4 (DR4) 또는 세포사멸수용체 5 (DR5)에 대하여 특이적으로 결합할 수 있는 활성을 보유하는 범위 내에서의 서열이 변형되거나 수정된 것도 포함된다.

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0045] **실시예 1: iCVD (화학기상증착) 공정을 이용하여 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))이 코팅된 기판 제작**

[0046] 크로마토그래피용 종이 (chromatography paper)의 앞, 뒤에 poly(perfluorodecylacrylate)을 코팅하였다. 본 발수성 고분자의 코팅은 iCVD 반응기 내에서 수행하였다. 본 고분자는 perfluorodecylacrylate라는 단량체 (monomer)와 tert-butyl peroxide라는 열 개시제 (thermal initiator)의 라디칼 중합 반응 (radical polymerization)으로 제조하였다. iCVD 반응기에 주입되는 단량체와 개시제의 유량비는 sccm 단위로 1 : 1이며, 이 비율은 니들 밸브 (needle valve)나 MFC (mass flow controller)로 유지하였다. 또, 일정한 양의 단량체와 개시제를 주입하기 위해 각각의 물질은 70도와 25도 안팎으로 가열하였다. iCVD의 공정 압력은 100mTorr로 유지하며, 개시제를 분해하여 라디칼 (radical)을 만들기 위하여 공정 중 필라멘트의 온도는 200도로 가열하였다. 라디칼을 기판에 흡착하여 고분자막을 만들기 위하여 기판 온도는 40도로 유지하였다. 이러한 조건으로 만들어지는 고분자의 성장 속도는 분당 50~100nm 안팎이었다. 이는, iCVD 반응기의 공정 조건에 따라 달라질 수 있다.

[0047] 상기 발수성 고분자의 코팅을 완료한 후, 지지체의 한쪽 면을 비닐 작용기 (vinyl functional group)를 갖는 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))으로 iCVD 반응기 내에서 코팅하였다. 상기 고분자는, 2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane이라는 단량체와 tert-butyl peroxide라는 열 개시제의 라디칼 중합 반응으로 제조하였다. 단량체와 개시제의 유량비는 sccm 단위로 1.5 : 1로 유지하며, 각 물질은 70도와 25도 안팎으로 가열하였다. 공정 압력은 200mTorr로, 필라멘트의 온도는 200도로 유지하였다. 또, 고분자막이 증착되는 기판의 온도는 40도로 유지하였다. 이러한 조건으로 만들어지는 고분자의 성장 속도는 분당 2~10nm 안팎이었다.

[0048] 상기 방법으로 제조된 고분자 박막의 두께는 폴리(퍼플루오로데실아크릴레이트)(poly(perfluorodecylacrylat

e))가 앞, 뒷면 각각 100nm, 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))이 앞면만 150nm이었다. 또, 상기 과정을 통하여 제작된 종이 기반의 단백질 칩은 물리적, 화학적으로 전혀 손상이 없었다. 이는 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)으로 확인하였다(도 2).

[0049] 실시예 2: 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))이 코팅된 표면 위에서의 단백질 고정화 여부 및 활성 확인

[0050] (1) 형광단백질 mOrange 및 크링글도메인 변이체 KD548의 대장균 세포질에서의 발현

[0051] 실시예 1의 방법으로 제조된 단백질 칩에 단백질, 크링글 도메인 변이체가 결합하여 작동 가능한지 알아보기 위하여, 형광단백질 mOrange 및 크링글메인 변이체 KD548의 대장균 세포질 발현을 위한 발현 시스템을 제작하였다. 발현 시스템은 도 3과 같은 구조를 가지도록 제작하였다.

[0052] 우선, 지지체에 대한 고정화 조건을 확인하기 위하여, 추가적인 cystein 잔기를 가지는 mOrange와 cystein 잔기를 가지지 않는 mOrange의 발현 시스템을 제작하였다(도 3). 상기 두 가지 발현 시스템을 제작하기 위해 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 DNA 절편을 제작하였다. 추가적인 cystein 잔기를 가지지 않는 mOrange를 코딩하는 DNA 절편의 경우, 서열번호 1, 2의 프라이머를, 추가적인 cystein 잔기를 가지는 mOrange를 코딩하는 DNA 절편의 경우 서열번호 1, 3의 프라이머를 사용하였고 mOrange DNA를 주형으로 하여 PCR을 진행하였다. 두 가지 모두 단백질이 발현되었을 때 N-말단에 6xhistidine을 가지고 발현되도록 프라이머를 설계하였다.

[0053] 서열번호 1: 5'-ATATATATCATATGCACCACCATCACCATCACGTGAGCAAGGGCGAGG-3'

[0054] 서열번호 2: 5'-TATAAGCTTCTATTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

[0055] 서열번호 3: 5'-TATAAGCTTCTATTAACATTTAGCAGCAGCTTCCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

[0056] PCR 결과, 추가적인 cystein 잔기를 가지지 않는 단백질과 추가적인 cystein 잔기를 가지는 단백질을 코딩하는 DNA 절편이 합성되었으며, 이들은 제한효소 *NdeI*과 *HindIII*로 절단되어 발현 벡터인 pMoPacI (Andrew Hayhurst, 미국)에 라이게이션(ligation)하였다. 라이게이션이 완료된 DNA는 대장균 균주인 XL1-Blue에 형질전환(transformation)하였다.

[0057] 크링글도메인 변이체 KD548와 링커 및 추가적인 cystein 잔기를 코딩하는 DNA 절편은 하기 서열번호 4-6의 서열을 가지는 프라이머를 이용하여 제작하였다.

[0058] 서열번호 4: 5'-ATATATATCATATGCACCATCACCATCACCATGAGGAATGTACCAGACCCA-3'

[0059] 서열번호 5: 5'-GCGGCTTCTTTGGCCGCGGCTTCTTCGCGCCGCTTCTGGAGGTGTTGTCAGC-3'

[0060] 서열번호 6: 5'-TATAAGCTTCTATTAGCATTTGCGCGCGGCTTCTTTGGCCG-3'

[0061] 상기 DNA 절편 제작을 위해 KD548 DNA를 주형으로 하여 PCR이 진행되어 KD548 및 링커, 추가적인 cystein 잔기 및 발현되었을 때 N-말단에 6xhistidine tag를 발현할 수 있게 하는 DNA 절편을 합성하였다. 이와 같이 제작된 DNA 절편은 제한효소 *NdeI*과 *HindIII*로 절단되어 발현 벡터인 pMoPacI (Andrew Hayhurst, 미국)에 라이게이션(ligation)하였다. 라이게이션이 완료된 DNA는 대장균 균주인 XL1-Blue에 형질전환(transformation)시켰다.

[0062] 단백질의 발현 및 정제를 위하여, 상기와 같이 제작된 발현 시스템을 갖는 대장균 균주들을 2%의 포도당을 함유하는 LB (Luria-Bertani) 배지에 접종하여 약 12시간 동안 37 °C, 200 RPM 에서 배양한 후 신선한 LB 배지에 1/100의 부피만큼 옮겨 동일 조건에서 OD₆₀₀이 0.6에 도달할 때 까지 배양하였다. OD₆₀₀이 0.6에 도달할 때 상기 결합물의 생산을 유도하기 위하여 1mM의 IPTG (isopropyl-β -thiogalactoside)를 첨가하였고, 이후 4시간 동안 동일 조건에서 대장균을 배양하였다.

[0063] 상기 배양된 대장균들을 4 °C, 6000 RPM, 10분 조건의 원심분리에 적용하였고 상층액을 제외한 세포만을 수득하였다. 원심분리 후 수득한 세포는 바인딩 버퍼(binding buffer) (50 mM phosphate-KOH, 300 mM NaCl, pH 8.0)로 재현탁(resuspension)하고 초음파 세포 파쇄기로 세포를 파쇄하였다. 파쇄가 완료된 세포 현탁액은 4 °C,

10000 RPM, 10분 조건의 원심분리를 수행하여 상층액만을 수득하였다. 상층액은 Ni-NTA 수지를 포함하는 IMAC (immobilized metal affinity column) 으로 적용되었다. 이 과정에서 표적 단백질이 아닌 불순물들은 컬럼을 통과하여 빠져나가게 되고 6xHistidine tag를 가지는 표적 단백질만이 Ni-NTA 수지에 부착되어 컬럼에 남아있게 된다. 이 때, 세척 버퍼 (washing buffer) (50 mM phosphate-KOH, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 8.0)로 비선택적으로 (non-specifically) 부착된 단백질을 제거한 후 일루션 버퍼 (elution buffer) (50 mM phosphate-KOH, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)를 컬럼에 적용하여 Ni-NTA 수지에 부착되어있던 표적 단백질들이 컬럼 바깥으로 빠져나오게 하였다. 상기 빠져나오는 표적 단백질을 모으게 되면 순수하게 정제된 표적 단백질을 얻을 수 있다. 정제 직후의 단백질 용액은 일루션 버퍼의 조성을 따르게 되어 이미다졸 등 단백질-단백질 작용에 악영향을 미칠 수 있는 성분이 있으므로 투석막을 통한 PBS (phosphate buffer saline)으로의 버퍼 교환을 거쳐 보관하였다. 생산 및 정제된 단백질의 품질 및 상태는 환원 환경의 12 % SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis)분석을 통하여 확인할 수 있었다. 환원 환경의 12 % SDS-PAGE를 쿠마시 브릴리언트 블루 염색, 웨스턴 블로팅의 방법으로 확인하였다 (도 4). 도 4로부터, 본 발명에 따라 생산된 mOrange 변이체와, cystein 잔기를 포함하는 KD548의 용해도 및 정제 품질이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0064] (2) 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))이 코팅된 표면 위에서 단백질 고정화 여부 및 활성 확인

[0065] 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))이 코팅된 표면 위에 단백질의 고정이 가능한지 파악하기 위하여 상기 (1)에서 얻은 mOrange 및 cystein 잔기를 포함하는 mOrange를 이용하여 실험을 수행하였다. 본 실시예를 수행하기 위하여 두 종류의 mOrange를 PBS (phosphate buffer saline)에 60 µg/ml의 농도로 희석한 후 그 용액들을 각각 5 µl씩 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))이 코팅된 슬라이드 글래스 (slide glass) 위에 로딩 (loading)하였다. 로딩된 단백질과 고분자 코팅 사이의 공유결합을 유도하기 위하여 UV (ultra violet) 광을 5분간 조사하였다. UV 광 조사 이후 비특이적인 결합을 제거하기 위하여 PBS-T (phosphate buffer saline- 0.05 % Tween 20)로 슬라이드 글래스를 세척하였다. 세척된 슬라이드 글래스는 마이크로어레이 분석기 (microarray analyzer)에 적용하여 mOrange의 여기 및 발광 파장인 548 nm, 562 nm의 조건으로 형광의 검출을 확인하였다. 형광 검출 결과, 도 5와 같이 cystein 잔기를 포함하는 mOrange에 대해서만 형광이 검출되었고 cystein 잔기를 포함하지 않는 mOrange에 대해서는 형광이 검출되지 않았다.

[0066] 이 결과로부터 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기 (예컨대, cystein 잔기)를 가지는 단백질만이 비닐 (vinyl)기를 포함하는 고분자 (예컨대, 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane)))가 코팅된 표면에 공유결합을 이루어 고정화 될 수 있으며, 공유결합을 이루는 반응은 티올 (thiol)기를 포함하는 아미노산 잔기 (예컨대, cystein 잔기)에 의하여 지배됨을 증명한다. 또한 이 결과는, 간단한 UV 광원 조사에 의한 공유결합 형성 이후에도 단백질의 활성이 그대로 유지됨을 시사하며 단백질의 고정화 기반 물질로 활용이 가능함을 증명한다.

[0067] 실시예 3: 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))이 코팅된 종이 표면 위에서 단백질 진단 센서 모델로 작동가능한지를 확인

[0068] iCVD 기술을 이용하여 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane)) 코팅된 종이 표면 위에 고정화된 단백질을 이용한 진단 센서 모델이 정상적으로 작동할 수 있는지에 대해 확인하였다. 이를 위하여, 실시예 2에서 얻은 cystein 잔기를 포함하는 KD548과 그의 항원 물질인 DR5를 사용하였다. 먼저, cystein 잔기를 포함하는 KD548을 60 µg/ml의 농도로 PBS에 희석한 후, 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))이 코팅된 슬라이드 글래스 위에 5 µl씩 로딩하였다. 단백질 용액이 로딩된 슬라이드 글래스는 UV 광원 하에 5분간 노출시켜 단백질과 고분자 코팅과의 공유결합을

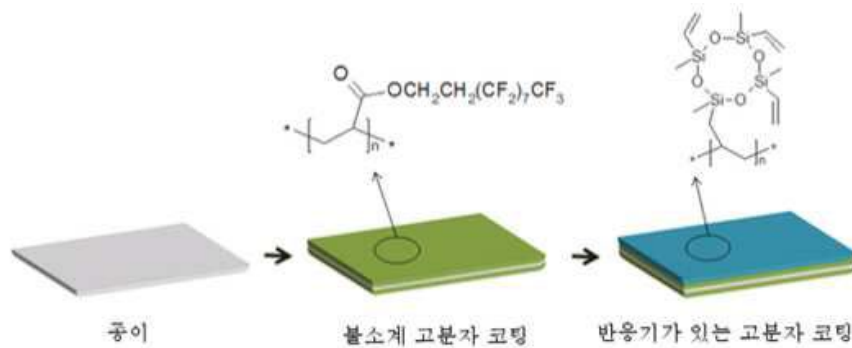
유도하였다. UV 광원에 노출된 슬라이드 글래스는 PBS-T에 의하여 세척된 후 비특이적 결합을 줄이기 위해 5 % BSA (bovine serum albumin) 용액으로 30분간 상온에서 블로킹 (blocking) 하였다. 블로킹이 완료된 슬라이드 글래스는 다시 PBS-T에 의하여 세척하고 그 후, 각각의 로딩 지점에 다른 농도의 DR5 용액을 적용하였다. KD548 과 DR5의 반응은 상온에서 30분간 진행하였으며 반응 후 PBS-T로 세척하였다. 세척된 슬라이드 글래스는 PBS-T에 부피비로 2000:1 희석된 anti-FLAG tag-HRP 항체와 30분간 상온에서 반응시키고 PBS-T로 다시 세척하였다. 마지막으로 슬라이드 글래스에 색상이 있는 침전물을 생성할 수 있는 TMB ((3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine)) 용액을 적용하여 비색 반응 (colorimetric)을 유도하고, 이를 스캐너 (scanner)와 소프트웨어 Image J를 이용하여 신호 강도를 분석하였다. 신호의 강도를 분석한 결과 도 6와 같이 DR5의 농도에 따라 신호 강도가 증가함을 확인하여 폴리(2,4,6,8,-테트라메틸-1,3,5,7-테트라비닐 시클로테트라실록산)(poly(2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetravinyl cyclotetrasiloxane))이 코팅된 종이 표면 위에서 단백질 진단 센서 모델이 성공적으로 작동함을 확인하였다.

[0069]

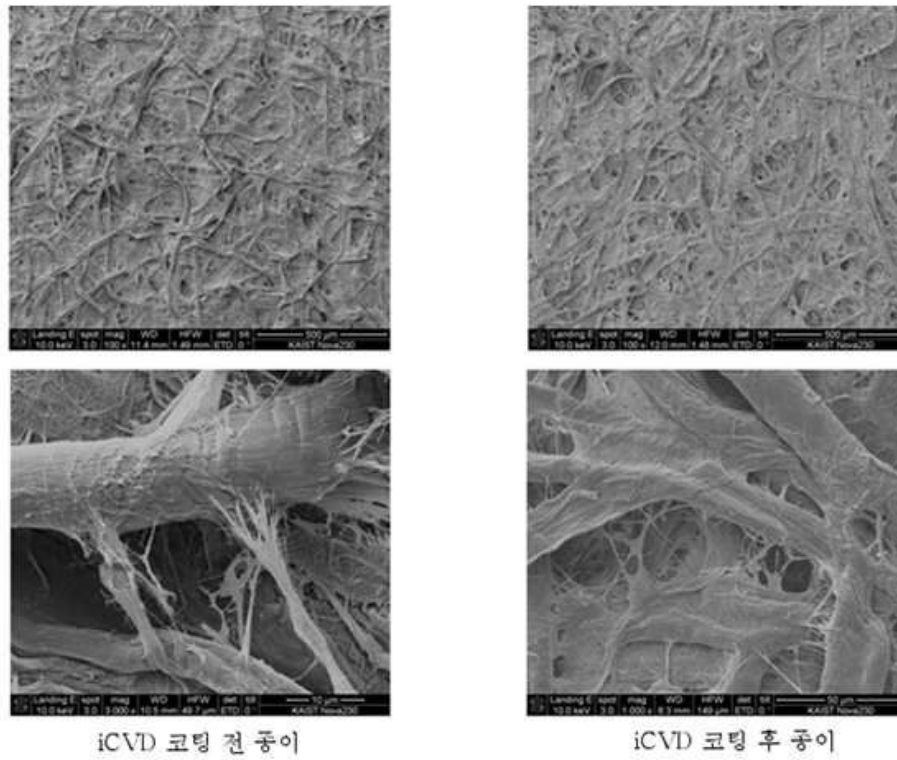
이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

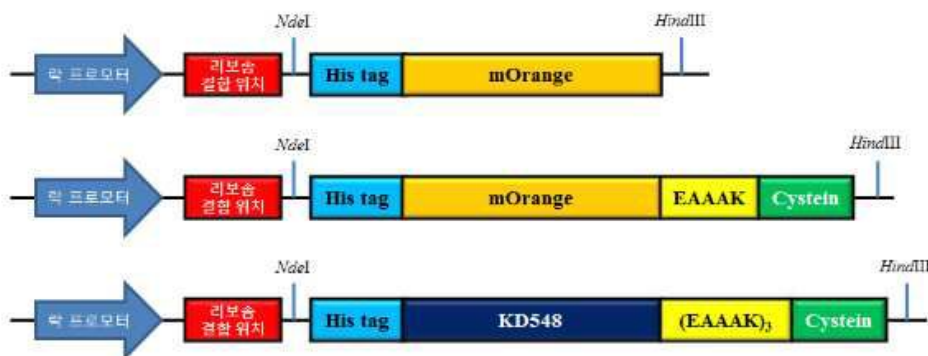
도면1



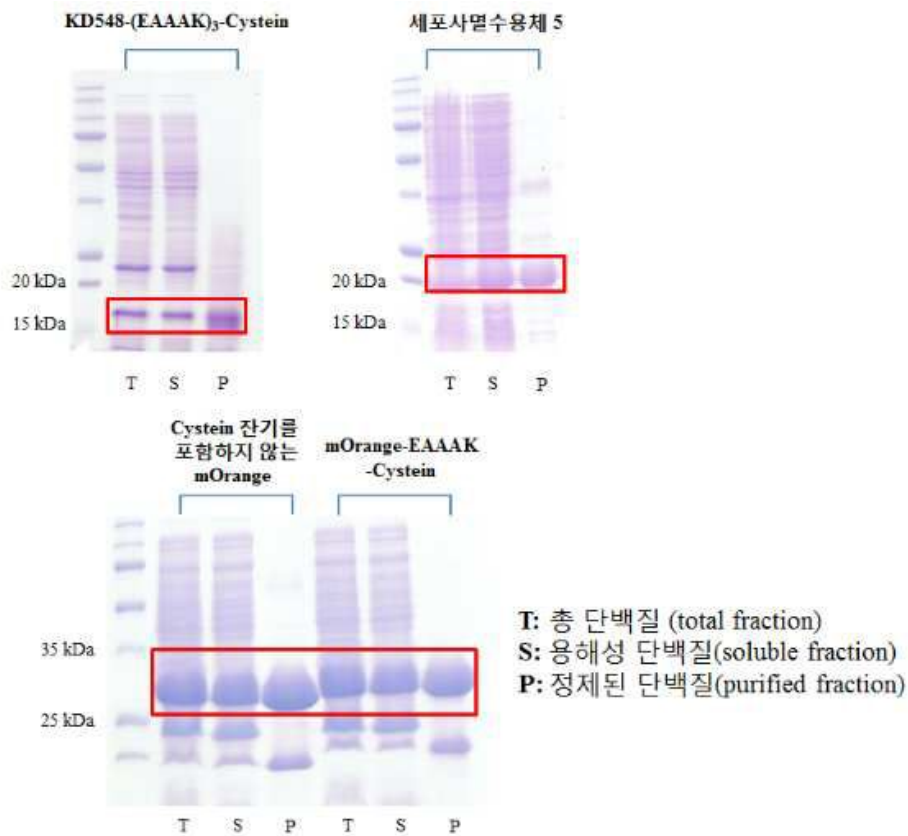
도면2



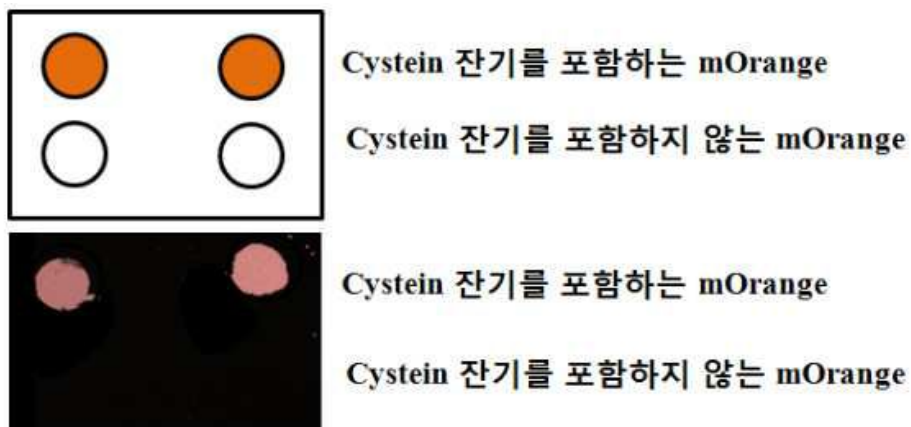
도면3



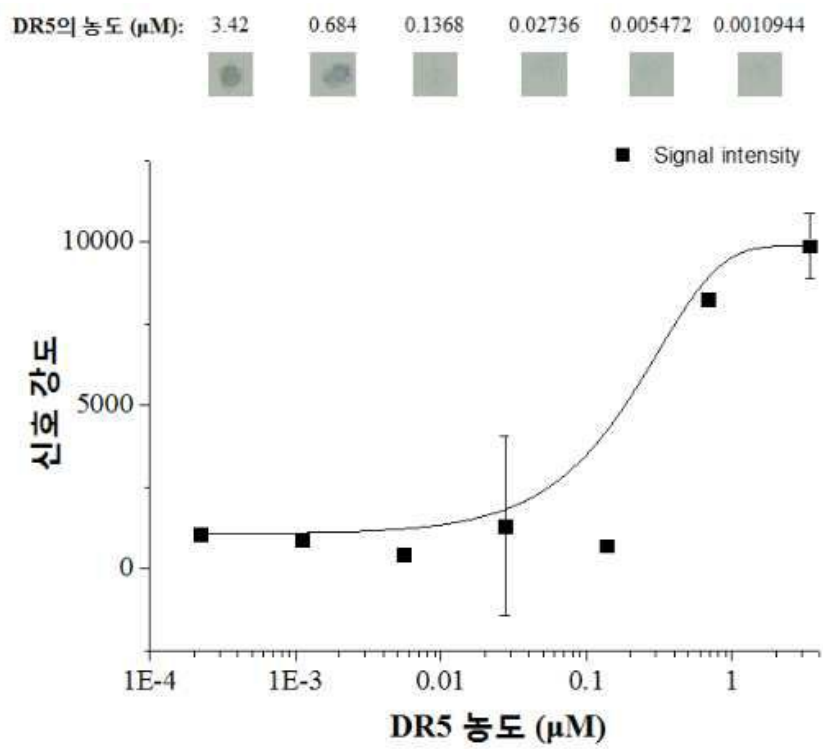
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea Institute of Science and Technology
 - <120> Protein Chip Applicable to Various Support Including Kringle Domain Mutant And the Method for Preparing the Same
 - <130> P12-B163
 - <160> 8
 - <170> KopatentIn 2.0
 - <210> 1
 - <211> 46
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> Primer
 - <400> 1
- atatatatca tatgcaccac catcaccatc acgtgagcaa gggcga
- <210> 2
- <211> 35
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

tataagcttc tattacttgt acagctcgtc catgc 35

<210> 3

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

tataagcttc tattaacatt tagcagcagc ttccttgtac agctcgcca tgc 53

<210> 4

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

atatatatca tatgcacat caccatcacc atgaggaatg tcaccagacc ca 52

<210> 5

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

gcggcttctt tggccgcggc ttctttcgcg gccgcttctg gaggtgttgt gcagc 55

<210> 6

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

tataagcttc tattagcatt tcgccgcggc ttctttggcc g 41

<210> 7

<211> 78

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutant

<400> 7

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Tyr Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Thr

1	5	10	15
Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Cys Gln Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Pro His Xaa			
20	25	30	
His Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Asn			
35	40	45	
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Trp Cys Phe Thr Xaa			
50	55	60	
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Leu Cys Xaa Xaa Pro Arg Cys			
65	70	75	

<210> 8

<211> 78

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KD548

<400> 8

Cys His Gln Thr Gln Gly Pro Lys Tyr Asp Gly Asn Lys Asp Lys Thr

1	5	10	15
His Lys Gly His Lys Cys Gln Ser Trp Thr Lys Asn Arg Pro His His			
20	25	30	
His Gly Asn Lys Ile Glu Asn Glu Asp Glu Asn Arg Phe Gln Lys Asn			
35	40	45	
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Lys His Glu Pro Trp Cys Phe Thr His			
50	55	60	
Gly His Arg Asp Lys His Glu Leu Cys His Glu Pro Arg Cys			
65	70	75	