



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0127878
(43) 공개일자 2012년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 5/083 (2006.01) C40B 40/10 (2006.01)
C07K 1/113 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0045639
(22) 출원일자 2011년05월16일
심사청구일자 2011년05월16일

(71) 출원인
강릉원주대학교산학협력단
강원도 강릉시 죽헌길 7(지변동)
(72) 발명자
최석정
강원도 강릉시 화부산로111번길 24, 롯데캐슬아파트 203동 503호 (교동)
(74) 대리인
이덕록

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **합성 펩티드 문고 기술**

(57) 요약

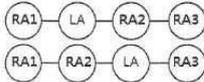
본 발명은 새로운 합성 펩티드 문고의 제조방법에 관한 것으로서 몇 종류의 대표 아미노산과 연결 아미노산으로만 펩티드를 구성함으로써 종래의 방법들에 비해 더 경제적이고 간편한 방법으로 목표 물질에 결합하는 펩티드를 검색할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도2

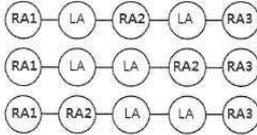
1. 대표 아미노산(RA)으로만 구성



2. 대표 아미노산(RA)에 한 개의 연결 아미노산(LA) 추가



3. 대표 아미노산(RA)에 두 개의 연결 아미노산(LA) 추가



특허청구의 범위

청구항 1

아미노산들 중에서 곁사슬이 양전하를 갖는 것, 음전하를 갖는 것, 방향족인 것들 가운데 각각 하나씩 선정된 3 종류의 대표 아미노산(representative amino acids)만 가지고 그 순서를 무작위로 배열하여 펩티드의 종류를 제한함으로써 각 펩티드를 개별적으로 분석할 수 있게 제작된 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고(synthetic peptide library).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 3 종류의 대표 아미노산에 지방족 곁사슬을 갖는 아미노산들 가운데 하나를 추가하여 4 종류의 대표 아미노산을 사용하는 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 3 종류의 대표 아미노산에 아미드 작용기를 갖는 아미노산들 가운데 하나를 추가하여 4 종류의 대표 아미노산을 사용하는 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 4 종류의 대표 아미노산에 아미드 작용기를 갖는 아미노산들 가운데 하나를 추가하여 5 종류의 대표 아미노산을 사용하는 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대표 아미노산들 사이의 거리를 변화시킴으로써 위치 다양성(positional diversity)을 증가시킨 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 위치 다양성을 증가시키기 위해 대표 아미노산 사이에 하나 또는 그 이상의 연결 아미노산(linker amino acid)을 삽입하는 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대표 아미노산 중 어느 한 가지로만 구성된 펩티드를 제외함으로써 펩티드의 종류를 제한하는 것을 특징으로 하는 펩티드 문고.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대표 아미노산 중에서 소수성 아미노산으로만 구성된 펩티드는 제외함으로써 펩티드의 종류를 제한하는 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노산 중에서 아미노 말단부터 읽은 아미노산 서열이 카르복시 말단부터 읽은 아미노산 서열과 동일한 경우 두 펩티드 가운데 어느 하나를 제외함으로써 펩티드의 종류를 제한하는 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 양전하를 갖는 아미노산, 음전하를 갖는 아미노산, 방향족 아미노산들의 대표 아미노산으로 각각 아르기닌, 글루탐산, 티로신을 사용하는 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 11

제2항에 있어서, 상기 지방족 결사슬을 갖는 대표 아미노산으로 류신을 사용하는 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 12

제3항에 있어서, 상기 아미드 작용기를 갖는 대표 아미노산으로 글루타민을 사용하는 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 13

제6항에 있어서, 상기 연결 아미노산은 글리신, 알라닌, 류신, 세린 또는 프롤린 가운데 어느 하나를 사용하는 것을 특징으로 하는 합성 펩티드 문고.

청구항 14

제1항에 따라 제작된 합성 펩티드 문고를 이용하여 목표 물질을 고체 표면에 흡착시키고 염기성 완충용액으로 결합한 펩티드를 해리시킨 다음 펩티드의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 목표 물질의 검색방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 목표 물질이 유기물, 무기물 및 세포 중 어느 하나인 검색방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 펩티드 문고의 새로운 제작 방법 및 응용에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 합성 펩티드로 문고를 제작하고 목표 세포 또는 분자에 결합하는 펩티드를 효과적으로 검색하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 펩티드 문고 기술(peptide library technique)은 다양한 아미노산 서열을 갖는 펩티드들로 이루어진 집단으로부터 특정 활성을 갖는 펩티드를 찾아내는 기술이다. 펩티드 문고 기술을 이용하여 검색할 수 있는 활성의 대표적인 예로는 특정 세포 또는 분자에 결합하는 활성을 들 수 있으며 이러한 활성을 갖는 펩티드는 항체 대신 사용될 수 있다.

[0003] 이러한, 펩티드 문고 기술은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데 한 가지는 생물학적으로 제작된 펩티드 문

고를 이용하는 것이고 또 하나는 화학적으로 합성된 펩티드 문고를 이용하는 것이다.

[0004] 생물학적으로 제작된 펩티드 문고에서는 펩티드가 박테리아나 박테리오파지 표면에 표현된다. 이 방법에서는 표현되는 펩티드의 아미노산 서열이 박테리아나 바이러스 유전체에 포함되어 있기 때문에 분석이 용이한 장점과 생물학적인 배양을 이용함으로써 문고의 다양성을 높일 수 있는 장점이 있지만, 문고의 제작이나 검색 과정에 생물학적인 요소들이 개입되기 때문에 친화도가 높은 펩티드를 찾는 것이 어렵다. 예를 들면, 박테리오파지를 이용하는 경우 파지의 껍질 단백질에 펩티드를 융합시켜 표면에 표현하게 되는데 전체 파지의 크기에 비해 펩티드의 크기가 너무 작기 때문에 펩티드의 결합력보다 파지의 다른 부분이 검색에 더 큰 영향을 미칠 수 있다. 뿐만 아니라 파지의 증식 과정에서 잘 자라는 파지가 우선적으로 선택될 수도 있다. 따라서 검색된 펩티드를 다시 화학적으로 합성하여 그 활성을 다시 확인하는 것이 필요하다.

[0005] 화학적으로 제작된 합성 펩티드 문고는 화학적 조성이 명확하고 펩티드 외의 다른 요소들이 검색에 큰 영향을 미치지 않는 장점이 있는 반면에 아미노산 서열이 무작위로 구성된 펩티드들을 혼합하여 사용하는 경우 목표 물질에 결합한 펩티드의 아미노산 서열을 분석하는 것이 어려운 단점이 있다.

[0006] 이러한 문제를 해결하기 위해 한 종류의 펩티드를 한 개의 비드에 고정시킨 상태로 합성하는 "One-Bead One-Peptide Library (OBOPL)" 방법이 사용되고 있다. 이 방법에 의하면 특정 활성을 나타내는 비드를 골라 그 비드에 고정된 펩티드를 분석함으로써 원하는 펩티드의 아미노산 서열을 알 수 있다. 그러나 펩티드를 비드에 고정된 상태에서만 사용할 수 있기 때문에 실험에 많은 제약이 따르고 또한 문고를 구성하는 펩티드의 다양성이 너무 높아 많은 비용이 소요된다는 단점이 있다. 예를 들어 시스테인(cystein)을 제외한 19 종류의 아미노산을 이용하여 다섯 개의 아미노산 잔기로 구성된 펩티드 문고를 제작하기 위해서는 19^5 즉 2,476,099 종류의 펩티드를 합성해야 하기 때문에 막대한 비용이 필요하다.

[0007] "Positional-Scanning Synthetic Peptide Combinatorial Library (PS-SPCL)"는 합성해야 하는 펩티드의 종류를 줄이기 위해 고안된 방법으로 한 위치의 아미노산을 정한 상태에서 나머지 위치를 무작위로 배열한 문고를 사용한다. 여섯 개의 잔기로 이루어진 펩티드 문고를 예로 들면 첫 번째 잔기를 시스테인을 제외한 19 종류의 아미노산 가운데 하나로 정하고 나머지 다섯 잔기를 무작위로 배열한 19종류의 펩티드 혼합물을 만든다. 다음으로 두 번째 잔기를 역시 19 종류의 아미노산 가운데 하나로 정하고 나머지 다섯 잔기를 무작위로 배열한 19종류의 펩티드 혼합물을 만든다. 이와 같은 방법으로 여섯 번째 잔기까지 펩티드 혼합물을 만들면 모두 $19 \times 6 = 114$ 종류의 펩티드 혼합물을 얻게 된다. 이 114 종류의 혼합물 가운데 특정 활성을 나타내는 혼합물을 검색하면 각 위치에서 활성에 중요한 역할을 하는 아미노산이 19 종류 가운데 어떤 것인지 알 수 있다. 따라서 각 위치에서 중요한 아미노산들을 조합하여 최적의 펩티드를 찾을 수 있다는 것이 이 방법의 원리이다. 이 방법은 114 종류의 펩티드 혼합물만 합성하면 되기 때문에 비용을 크게 줄일 수 있지만 펩티드의 활성에는 여러 잔기들이 협동적으로 작용하기 때문에 이 방법으로 얻어진 펩티드가 최적의 아미노산 서열이 아닐 가능성이 매우 높다.

[0008] 이와 같이 지금까지 공개된 펩티드 문고 기술들은 최적의 펩티드를 찾기 어렵거나 너무 많은 비용이 소요되는 단점을 가지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출한 것으로 목표 분자 또는 세포에 결합하는 펩티드를 간편하게 검색할 수 있도록 최소한의 다양성을 갖는 합성 펩티드 문고를 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 목표 분자 또는 세포에 결합하는 펩티드를 간편하게 검색할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 상기 목적은, 아미노산의 종류를 제한하여 펩티드의 종류를 제한하고 필요한 경우 아미노산들 사이의 간격을 변화시킴으로써 최소한의 다양성을 갖는 펩티드 문고를 제공함으로써 달성하였다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 새로운 펩티드 문고를 이용할 경우에는 목표 분자 또는 세포에 결합하는 펩티드를 간편하고 효율적으로 검색하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명 합성 펩티드 문고 제작시 역으로 동일한 아미노산 서열을 제외함으로써 서열 다양성을 줄이는 원리적 접근법을 예시한 그림이다.

도 2는 본 발명 합성 펩티드 문고 제작시 대표 아미노산만 사용함으로써 결사율 다양성을 줄이고 연결 아미노산을 이용하여 위치 다양성을 증가시키는 원리적 접근법을 예시한 그림이다.

도 3은 본 발명에 따라 합성된 펩티드 문고를 이용하여 목표 물질인 살모넬라 박테리아와 리스테리아 박테리아에 결합하는 펩티드를 검색한 결과 형광값을 보인 그림이다.

도 4는 여시니아 박테리아에 결합하는 펩티드 23개를 선택하여 친화도를 분석한 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 박테리아 대신 암 표지 단백질(CEA)에 결합하는 펩티드를 검색하여 얻어진 친화도가 높은 8 종류의 펩티드를 분석한 결과를 보여주는 그림이다.

도 6은 본 발명에 따른 또 다른 암 표지 단백질(AFP)에 결합하는 펩티드를 검색하여 얻어진 친화도가 높은 8 종류의 펩티드를 분석한 결과를 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명의 구체적인 내용을 상세히 설명한다.

[0015] 본 발명에 따르면, 목표 물질(target material)에 결합할 수 있는 펩티드를 검색하는데 바람직한 합성 펩티드 문고(synthetic peptide library)와 이를 이용한 검색방법을 제공한다.

[0016] 상기 목표 물질이라 함은 펩티드가 결합하는 대상이 되는 물질이며 유기물, 무기물, 세포 등이 모두 그 대상이 될 수 있다. 유기물의 예로는 단백질, 탄수화물, 핵산, 지질 등 생물체의 분자들과 유기 고분자를 비롯한 유기 화합물 등을 들 수 있다. 무기물의 예로는 금이나 철과 같은 금속, 유리나 반도체와 같은 세라믹 등을 들 수 있다. 세포의 예로는 암세포를 비롯한 질병 세포, 병원균이나 식중독 균과 같은 박테리아, 바이러스 등을 들 수 있다. 이러한 목표 세포에 결합하는 펩티드는 질병 진단과 치료, 식품 검사와 같은 다양한 용도로 사용할 수 있다.

[0017] 이러한 목표 물질 중, 단백질의 예로는 암 표지 단백질(cancer marker protein)을 비롯하여 각종 질병을 진단할 수 있는 질병 표지 단백질, 암의 원인이 되는 발암 단백질(onco-protein)을 비롯하여 각종 질병의 원인 되는 단백질, 세포 표면의 수용체(receptor) 단백질 등을 들 수 있다. 이들 목표 분자에 결합하는 펩티드는 질병의 진단, 치료, 약물, 전달, 단백질 연구 등 다양한 목적에 사용할 수 있다.

[0018] 본 발명에서 합성 펩티드 문고(synthetic peptide library)는 생물체를 사용하지 않고 화학적인 방법에 의해 합성된 펩티드로 정의한다. 화학적으로 합성되는 펩티드는 생물학적인 펩티드 문고에 비해 분자조성이 명확하고 대량생산이 용이한 장점을 갖는다. 또한 생물학적인 펩티드 문고에서는 큰 세포나 바이러스 표면에 펩티드가 표현되기 때문에 펩티드 이외의 다른 부분이 결합에 많은 영향을 미치지만 합성 펩티드는 거의 펩티드 자체로만 구성되어 있기 때문에 목표 물질과의 상호작용이 명확한 장점도 있다.

[0019] 그러나 최소한 세 개의 잔기를 갖는 합성 펩티드 문고를 제작할 경우라도 만약 20 종류의 아미노산을 무작위로 사용한다면 20^3 종류, 즉 8,000 종류의 펩티드가 만들어지기 때문에 이 많은 펩티드를 따로 합성하여 검색하는 것은 현실적으로 매우 어려운 일이다. 이런 문제점을 해결하기 위해 종래에는 PS-SPCL과 같은 방법이 사용되었다. 그러나 상기 PS-SPCL 방법은 최적의 아미노산 서열을 찾기가 어렵다는 단점이 있었다.

[0020] 따라서 본 발명자들은 상기 펩티드 문고의 문제점들을 해결하기 위해 세 가지 접근법을 시도하였다. 첫 번째는, 문고에 사용하는 아미노산의 종류를 대표 아미노산(representative amino acids)으로 제한함으로써 결

사슬 다양성(side chain diversity)을 줄이는 것이고, 두 번째는 단순한 서열이나 역으로 동일한 서열을 제외함으로써 서열 다양성(sequence diversity)을 줄이는 것이고, 세 번째는 대표 아미노산 아미노산들 사이에 연결 아미노산(linker amino acids)을 삽입하여 위치 다양성(positional diversity)을 증가시키는 것이다.

[0021] 첫 번째 접근법으로 결사슬 다양성을 줄일 수 있는 근거는 다음과 같다. 펩티드가 목표 물질과 결합할 때 가능한 상호작용은 정전기적인 인력, 수소결합, 소수성 상호작용 등이 있다. 이와 같이 상호작용의 종류가 많지 않다는 사실은 각 상호작용을 할 수 있는 아미노산들 가운데 대표 아미노산만 가지고 펩티드 문고를 만들 수 있는 근거가 된다. 실제로 전체 아미노산의 종류는 20 종류이지만 지방족 결사슬을 갖는 아미노산, 방향족 결사슬을 갖는 아미노산, 양전하를 띤 결사슬을 갖는 아미노산, 음전하를 띤 결사슬을 갖는 아미노산, 히드록시기나 아미드처럼 수소결합을 할 수 있는 결사슬을 갖는 아미노산 등으로 나눌 수 있다. 따라서 각 특성을 갖는 아미노산들 가운데 하나를 대표 아미노산(representative amino acid)으로 선정하여 그 대표 아미노산들로만 펩티드 문고를 만들 수 있다. 특히 양전하와 음전하를 갖는 아미노산들은 정전기적인 인력뿐만 아니라 수소결합에도 참여할 수 있는 티로신(tyrosine)은 소수성 상호작용과 수소결합에 모두 참여할 수 있기 때문에 다양성을 더 줄일 수도 있다.

[0022] 최근, vascular endothelial growth factor(VEGF)에 결합하는 항체가 항원과 결합할 때 상호작용을 하는 아미노산의 종류가 티로신, 알라닌, 아스파르트산, 세린의 네 종류로 매우 단순하다는 사실이 밝혀졌다. 또한 박테리오파지 표면에 다양한 항체를 표현하는 항체 문고를 제작할 때 항체 표면의 무작위 아미노산 서열을 티로신과 세린의 두 가지 아미노산으로만 구성해도 높은 친화도를 갖는 항체를 얻을 수 있다는 사실도 밝혀졌다. 이와 같은 연구결과 역시 합성 펩티드 문고에서도 동일하게 대표 아미노산으로 펩티드 문고를 제작할 수 있는 근거를 제공한다.

[0023] 결사슬 다양성을 제한할 수 있는 또 하나의 근거는 단백질과 펩티드의 구조적이 차이점에 있다. 단백질의 경우에는 각 아미노산 잔기들이 삼차원 구조 내의 일정한 공간에 위치하고 있기 때문에 같은 성질을 갖는 아미노산이라도 다양한 구조가 필요하다. 예를 들면, 음전하를 갖는 아스파르트산(aspartic acid)과 글루탐산(glutamic acid)은 결사슬의 길이가 서로 다르기 때문에 단백질의 구조에 따라 서로 다른 아미노산이 필요할 수 있다. 그러나 펩티드의 구조는 단백질에 비해 구조적인 자유도가 높기 때문에 사슬 길이의 차이가 큰 영향을 끼치지 않을 것으로 예상되었다.

[0024] 이와 같이 결사슬 다양성을 줄이기 위해 대표 아미노산을 선택하는 방법으로는 다음과 같은 네 가지를 들 수 있다. 첫째, 결사슬의 특성에 따라 양전하를 갖는 아미노산, 음전하를 갖는 아미노산, 방향족 아미노산, 지방족 아미노산, 그리고 아미드 작용기를 갖는 아미노산 그룹에서 각각 하나씩을 선택한다. 여기에서 양전하를 갖는 아미노산으로는 아르기닌이 더 다양한 상호작용을 할 수 있기 때문에 바람직하다. 음전하를 갖는 아미노산으로는 글루탐산이 작용기의 자유도가 더 높기 때문에 바람직하다. 아미드 작용기를 갖는 아미노산 역시 동일한 이유로 글루타민이 더 바람직하다. 지방족 아미노산으로는 강한 소수성 상호작용을 할 수 있는 류신이 바람직하다. 시스틴은 이황화 결합을 할 가능성이 있기 때문에 제외한다. 방향족 아미노산으로 티로신을 선택할 경우 티로신이 히드록시기를 가지고 있기 때문에 히드록시기를 갖는 다른 아미노산들인 세린과 트레오닌은 제외한다.

[0025] 이러한 방법에 의해 아미노산 잔기 세 개로 구성되는 펩티드 문고를 만든다면 펩티드의 다양성은 125 종류가 되고($5 \times 5 \times 5 = 125$), 네 개로 구성되는 문고를 만든다면 다양성은 625 종류가 된다($5 \times 5 \times 5 \times 5 = 625$).

[0026] 둘째, 전하를 갖는 아미노산들도 수소결합을 비롯한 각종 극성 상호작용을 할 수 있기 때문에 아미드 작용기를 갖는 아미노산 그룹을 제외하고 나머지 네 그룹에서만 각각 하나씩을 선택한다. 두 번째 방법에 의해 아미노산 잔기 네 개로 구성되는 펩티드 문고를 만든다면 펩티드의 다양성은 256 종류가 되고($4 \times 4 \times 4 \times 4 = 256$), 다섯 개로 구성되는 문고를 만든다면 다양성 1,024 종류가 된다($4 \times 4 \times 4 \times 4 = 1,024$).

[0027] 셋째, 티로신이 소수성 상호작용에도 참여할 수 있기 때문에 지방족 아미노산 그룹을 제외하고 나머지 네 그룹에서만 각각 하나씩을 선택한다. 세 번째 방법에 의한 다양성은 두 번째 방법과 동일하다.

[0028] 넷째, 아미드 작용기를 갖는 아미노산 그룹과 지방족 아미노산 그룹을 모두 제외하고 나머지 세 그룹에서만 각각 하나씩을 선택한다. 두 번째 방법에 의해 아미노산 잔기 네 개로 구성되는 펩티드 문고를 만든다면 펩티드의 다양성은 81 종류가 되고($3 \times 3 \times 3 \times 3 = 81$), 네 개로 구성되는 문고를 만든다면 다양성은 243 종류가 된다($3 \times 3 \times 3 \times 3 \times 3 = 243$).

[0029]

한편, 상기 두 번째 접근법으로 서열 다양성을 줄이는 원리는 다음과 같다. 삼차원 구조에 의해 활성이 결정되는 단백질의 경우에는 아미노산 서열이 역전되면 완전히 다른 기능을 갖게 된다. 그러나 펩티드의 경우에는 도 1에서 보는 것처럼, H₂N-RDYL-CO₂H 서열을 갖는 펩티드와 H₂N-LYDR-CO₂H 서열을 갖는 펩티드는 결사슬의 선상 배열이 동일하다. 물론, 양쪽 끝에 있는 아미노기와 카르복시기 그리고 폴리펩티드 뼈대(polypeptide backbone)에 있는 작용기들의 상대적인 위치가 다르기는 하지만 펩티드의 결합에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 예상된다. 서열 다양성을 줄일 수 있는 또 한 가지 방법은 단순한 서열을 제외하는 것이다. 예를 들면, 한 가지 아미노산으로만 구성된 서열을 제외하거나 소수성 아미노산으로만 구성된 서열을 제외할 수 있다. 특히, 소수성 아미노산으로만 구성된 펩티드는 물에 잘 녹지 않는 문제점도 있다. 네 종류 대표 아미노산, R, E, L, Y 만 선택하고 단순한 서열, 역으로 동일한 서열, 소수성 서열을 제외함으로써 종류를 제한한 잔기 5개짜리 펩티드 문고의 예를 [표 1]에 제시하였다. 이 문고는 잔기의 수가 5개임에도 불구하고 전체 펩티드의 종류가 354개 밖에 되지 않기 때문에 개별적인 합성과 분석이 가능하다.

[표 1] 네 종류 대표 아미노산으로 구성하고 단순한 서열, 역으로 동일한 서열, 소수성 서열을 제외함으로써 종류를 제한한 잔기 5개짜리 펩티드 문고의 예

RRERL	RELRY	RLYEE	ERLRY	ELEYL	YRREY
RRERY	RELER	RLYEL	ERLEE	ELEY Y	YRRLY
RREEL	RELEE	RLY EY	ERLEL	ELLRL	YRERY
RREEY	RELEL	RLYLR	ERLEY	ELLRY	YREEY
RREL R	RELEY	RLYLE	ERLLE	ELLE Y	YRELY
RRELE	RELLR	RLYYR	ERLLL	ELLYE	YREYY
RRELL	RELLE	RLYYE	ERLLY	ELYRL	YRLRY
RRELY	RELLY	RYRRE	ERLYE	ELYRY	YRLEY
RREYR	RELYR	RYRRL	ERLYL	ELYEL	YRYEY
RREYE	RELYE	RYREE	ERLYY	ELYEY	YERRY
RREYL	RELYL	RYREL	ERYRE	ELYLE	YEREY
RREYY	RELYY	RYREY	ERYRL	ELYYE	YERLY
RRLRE	REYRE	RYRLE	ERYRY	EYRRL	YERYY
RRLRY	REYRL	RYRLL	ERYEE	EYRRY	YEERY
RRLER	REYRY	RYRLY	ERYEL	EYREL	YEELY
RRL EE	REYER	RYRYE	ERYEY	EYREY	YELRY
RRL EL	REYEE	RYRYL	ERYLE	EYRL L	YELEY
RRLEY	REYEL	RYERE	ERYLL	EYRL Y	Y EYRY
RRLLE	REY EY	RYERL	ERYLY	EYRYE	YLRRY
RRLLY	REYLR	RYERY	ERYYE	EYRYL	YLREY
RRLYR	REYLE	RYEEL	ERYYL	LRREL	RYYEE

[0030]

RRLYE	REYLL	RYEEY	EERRL	LRREY	RYYEL
RRLYL	REYLY	RYELE	EERRY	LRRLY	RYYEY
RRLYY	REYYR	RYELL	EEREL	LRRYL	RYYLE
RRYRE	REYYE	RYELY	EEREY	LRRYY	EYRYY
RRYRL	REYYL	RYEYR	EEERL	LRERL	EYERL
RRYER	RLRRE	RYEYE	EEERL	LRERY	EYERY
RRYEE	RLRRY	RYEYL	EEERLY	LREEL	EYEEL
RRYEL	RLREE	RYEYY	EEERYE	LREEY	EYELL
RRYEY	RLREL	RYLRE	EEERYL	LRELL	EYELY
RRYLR	RLREY	RYLRL	EEERYY	LRELY	EYEYE
RRYLE	RLRLE	RYLRY	EELRL	LREYL	EYEYL
RRYLL	RLRLY	RYLEE	EELRY	LREYY	EYLRL
RRYLY	RLRYR	RYLEL	EELEB	LRLRY	EYLRV
RRYYE	RLRYE	RYLEY	EEELLY	LRLBL	EYLEL
RRYYL	RLRYL	RYLLE	EEELYE	LRLEY	EYLEY
REERRL	RLRYY	RYLYR	EEELYL	LRYRL	EYLYE
REERY	RLERE	RYLYE	EEELYY	LRYRY	EYYRL
REREL	RLERL	RYYRE	EEYRL	LRYEL	EYYRY
REREY	RLERY	RYYRL	EEYRY	LRYEY	EYYEL
RERLR	RLEEL	ERREL	EEYEL	LERRY	EYYEY
REBLE	RLEEY	ERREY	EEYLE	LEREL	LLYEL
RERL	RLELR	ERRLE	EEYLL	LEREY	LLYEY
RERLY	RLELE	ERRLL	EEYLY	LERLL	LYRRY
RERYR	RLELL	ERRLY	EEYYL	LERLY	LYREY
RERYE	RLELY	ERRYE	ELRRL	LERYL	LYRLY
RERYL	RLEYR	ERRYL	ELRRY	LERYY	LYRYL
RERYY	RLEYB	ERRYY	ELREL	LEERY	LYRYY
REERL	RLEYL	ERERL	ELREY	LEELY	LYERY
REERY	RLEYY	ERERY	ELRLE	LEEYL	LYEYY
REELR	RLLRE	EREEL	ELRLL	LEEYY	YLERV
REBLE	RLLRY	EREEL	ELRLL	LEEYY	YLEEY
REELL	RLLLE	ERELE	ELRYE	LELEY	YYREY
REELY	RLLEL	ERELL	ELRYL	LEYRY	YVERV
REEYR	RLLEY	ERELY	ELRYY	LEYEL	
REEYE	RLLYR	EREYE	ELERL	LEYEY	
REEYL	RLLYE	EREYL	ELERY	LLRRY	
REEYY	RLYRE	EREYY	ELEEY	LLREY	
RELRE	RLYRL	ERLRE	ELELY	LLERY	
RELRL	RLYRY	ERLRL	ELEYE	LLEEY	

[0031]

[0032]

이와 같이 결사슬 다양성과 서열 다양성을 줄이면 펩티드 문고에서 불필요한 다양성이 크게 줄어들기 때문에 각 펩티드를 따로 합성하여 개별적으로 검색하고 분석하는 것이 가능하게 된다.

[0033]

끝으로, 세 번째 접근법으로 대표 아미노산들 사이에 연결 아미노산(linker amino acids)을 삽입함으로써 위치 다양성(positional diversity)을 증가시키는 방법은 다음과 같다. 위치 다양성을 증가시키는 이유는 대표 아미노산들이 목표 물질의 작용기들과 상보적인 위치에 놓일 확률을 높이기 위해서이다. 연결 아미노산으로는 글리신(glycine), 알라닌(alanine), 류신(leucine), 세린(serine), 프롤린(proline) 가운데 한 가지를 사용할 수 있다. 글리신은 결사슬이 수소이기 때문에 가장 유연한 연결 구조를 제공할 수 있다. 알라닌과 류신은 지방족 결사슬을 가지고 있어 소수성 상호작용에 참여할 수 있는데 알라닌은 유연성이 높은 반면 류신은 소수성 상호작용이 강하다. 세린은 유연성이 있는 동시에 수소결합을 할 수 있다. 프롤린은 펩티드의 자유도를 제한하는 특성이 있다.

[0034]

이러한 연결 아미노산은 한 개의 펩티드에 한 개를 삽입할 수도 있고 여러 개를 삽입할 수도 있다. 또 두 대표 아미노산 사이에 한 개 또는 그 이상의 연결 아미노산을 삽입할 수도 있다. 이렇게 다양한 방식으로 대표 아미노산 사이의 간격을 조절한 펩티드 문고를 제작함으로써 목표 물질에 상보적으로 결합하는 펩티드를 찾을 수 있는 확률이 높아진다. 대표 아미노산과 연결 아미노산을 이용하여 펩티드 문고를 만드는 방법의 예를 도 2에 도시하였다.

[0035]

이상 설명한 바와 같이, 세 가지 접근법의 가능성을 확인하기 위해 본 발명자들은 양전하를 갖는 아르기닌(arginine, R), 음전하를 갖는 아스파르트산(aspartic acid, D), 그리고 페놀 결사슬을 갖는 티로신(tyrosine, Y) 세 종류의 대표 아미노산으로만 이루어진 펩티드 문고를 합성하였다. 양전하를 갖는 아미노산 가운데 아르기닌을 선택한 이유는 리신(lysine)의 아미노기보다 아르기닌의 구아니디늄 그룹(guanidinium group)이 더 다양한 상호작용을 할 수 있기 때문이다. 티로신을 선택한 이유는 히드록시기를 이용한 수소결합, 방향족 고리를 이용한 소수성 상호작용을 할 수 있을 뿐만 아니라 항체와 항원의 결합에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다기 때문이다. 이와 같이 세 종류 아미노산만 이용하면 세 개의 잔기를 갖는 펩티드의 종류는 27 종류

이고 네 개의 잔기를 갖는 펩티드는 81 종류로 결사슬 다양성을 극히 제한할 수 있다. 또한 DDD나 YYY와 같이 한 종류의 아미노산으로만 구성된 단순한 서열은 제외하였고 DRY와 YRD와 같이 반대로 읽었을 때 서열이 같은 것이 있을 경우 둘 가운데 하나만 합성하였다(YRD는 제외하고 DRY만 합성함).

[0036] 이와 같이 결사슬 다양성을 제한하는 대신 세 종류의 대표 아미노산 사이에 글리신(glycine, G)을 삽입하여 간격을 다양하게 함으로써 위치 다양성(positional diversity)을 증가시켰다. 그리고 DGRY와 같이 글리신을 하나만 삽입한 것, DGGRY와 같이 두 개를 연속으로 삽입하거나 DGGRY와 같이 하나씩 삽입하는 등 삽입 방법을 다양하게 하였다. 각 펩티드에 대표 아미노산의 수는 3개 또는 4개로 하였으며 연결 아미노산의 수는 3개 또는 4개로 하였으며 연결 아미노산의 수는 하나도 없는 것부터 최대 3개가 있는 것까지 합성하였다. 또한 검색을 용이하게 하기 위해 각 펩티드의 아미노 말단에 형광 분자인 플루오레신(fluorescein)을 결합시켜 합성하였다. 이와 같이 합성한 펩티드 문고는 따로 합성된 145 종류의 펩티드로 구성되어 있으며 그 아미노산 서열은 [표 2]에 정리되어 있다.

[표 2] 세 종류 대표 아미노산과 연결 아미노산으로 합성한 펩티드 문고

A 그룹 (15 종류)	B 그룹 (19 종류)	C 그룹 (24 종류)	D 그룹 (24 종류)	E 그룹 (15 종류)	F 그룹 (24 종류)	G 그룹 (24 종류)
DDR	DDRY	DGDR	DGGDR	DGDGR	DGGGDR	DGGDGR
DDY	DDYR	DGDY	DGGDY	DGDGY	DGGGDY	DGGDGY
DRD	DRDY	DGRD	DGGRD	DGRGD	DGGGRD	DGGRGD
DRR	DRRY	DGRR	DGGRR	DGRGR	DGGGRR	DGGRGR
DRY	DRYD	DGRY	DGGRY	DGRGY	DGGGRY	DGGRGY
DYD	DRYR	DGYD	DGGYD	DGYGD	DGGGYD	DGGYGD
DYR	DRYY	DGYR	DGGYR	DGYGR	DGGGYR	DGGYGR
DYY	DYDR	DGYD	DGGYD	DGYGY	DGGGYD	DGGYGD
RDR	DYRR	RGDD	RGGDD	RGDGR	RGGGDD	RGGDGD
RDY	DYRY	RGDR	RGGDR	RGDGY	RGGGDR	RGGDGR
RRY	DYYR	RGDY	RGGDY	RGRGY	RGGGDY	RGGDGY
RYR	RDDY	RGRD	RGGRD	RGYGR	RGGGRD	RGGRGD
RYY	RDRY	RGRY	RGGRY	RGYGY	RGGGRY	RGGRGY
YDY	RDYR	RGYD	RGGYD	YGDGY	RGGGYD	RGGYGD
YRY	RDYY	RGYR	RGGYR	YGRGY	RGGGYR	RGGYGR
	RRDY	RGYD	RGGYD		RGGGYD	RGGYGD
	RYDY	YGDD	YGGDD		YGGGDD	YGGDGD
	YDRY	YGDR	YGGDR		YGGGDR	YGGDGR
	YRDY	YGDY	YGGDY		YGGGDY	YGGDGY
		YGRD	YGGRD		YGGGRD	YGGRGD
		YGRR	YGGRR		YGGGRR	YGGRGR
		YGRY	YGGRY		YGGGRY	YGGRGY
		YGYD	YGGYD		YGGGYD	YGGYGD
		YGYR	YGGYR		YGGGYR	YGGYGR
3 대표 아미노산	4 대표 아미노산	3 대표 + 1 연결 아미노산	3 대표 + 2 연속 연결 아미노산	3 대표 + 2 불연속 연결 아미노산	3 대표 + 3 연속 연결 아미노산	3 대표 + 3 불연속 연결 아미노산

[0037]

[0038] 상기와 같이 제작된 합성 펩티드 문고를 살모넬라(Salmonella typhimurium)와 리스테리아(Listeria monocytogenes) 박테리아에 결합하는 펩티드를 검색하는데 응용하였다. 두 종류의 박테리아는 모두 배양 후 FKC(formalin-killed cell)를 약 10^{10} cells/ml 정도의 농도로 만들어 실험에 사용하였다. 마이크로튜브에 1 mM 농도의 펩티드 1 μ l, 박테리아 50 μ l, PBS(phosphate-buffered saline) 250 μ l를 넣고 실온에서 한 시간 흔들어서 주었다. 원심분리 하여 상층액을 버리고 다시 PBS 1 ml을 넣어 박테리아를 씻어주었다. 이렇게 씻는 과정을 3회 반복한 후 마지막에 PBS 100 μ l에 suspension시켜 excitation wavelength와 emission wavelength를 각각 485 nm와 528 nm로 설정한 상태에서 형광을 측정하였다.

[0039] 이와 같은 방법을 145 종류 펩티드의 결합 정도를 측정한 결과 도 3과 같은 결과를 얻었다. 펩티드의 박테리아에 대한 친화도가 높을수록 더 많이 결합하기 때문에 형광의 강도가 높다는 것은 그 펩티드의 친화도가 높다는 것을 의미한다.

[0040] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 펩티드마다 형광 값이 큰 차이를 보이는 것을 볼 수 있는데 이는 각 펩티

드의 박테리아에 대한 친화도가 서로 다르다는 것을 의미한다. 또 두 박테리아에 대해 친화도가 높은 펩티드가 서로 다르게 나타난 것은 각 펩티드가 선택적으로 결합한다는 것을 보여준다.

[0041] 여시니아(*Yersinia enterocolitica*)에 대해서도 유사한 방법으로 펩티드를 검색하여 가장 강하게 결합하는 펩티드 23개를 선택하였다. 면역 플레이트를 이용한 분석을 위해 여시니아 FKc 약 10^8 개를 각 면역 플레이트에 흡착시키고 1mg/ml농도의 BSA(bovine serum albumin)과 0.1% Tween-20를 포함하는 완충용액으로 blocking하였다. 비교실험을 위해 여시니아를 넣지 않고 blocking만 시킨 플레이트도 함께 만들었다. 다음으로 선택된 23 종류의 펩티드를 1 μ g씩 여시니아를 흡착시킨 플레이트와 blocking만 시킨 플레이트에 각각 넣어주었다. 결합하지 않은 펩티드를 PBS로 씻어내고 결합한 펩티드를 pH를 12로 조정된 NaOH-NaCl 완충용액으로 해리시켰다. 그리고 excitation wavelength와 emission wavelength를 각각 485nm와 528nm로 설정한 상태에서 형광을 측정하였다.

[0042] 그 결과 도 4에서 보는 것처럼 모든 펩티드가 blocking만 한 플레이트에 비해 여시니아를 흡착시킨 플레이트에 훨씬 더 많이 결합하는 것이 확인되었다. 또한 blocking만 한 플레이트와 여시니아를 흡착시킨 플레이트를 펩티드를 넣지 않고 형광을 측정했을 때는 차이가 없었기 때문에 형광이 여시니아로 인한 것이 아니고 펩티드로 인한 것임을 알 수 있었다.

[0043] 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대해서도 유사한 방법으로 펩티드를 검색하여 모두 네 가지 식중독균에 대해 가장 강하게 결합하는 펩티드 6개씩을 선택하였다. [표 3]에 펩티드 번호와 서열을 정리하였다.

[표 3] 네 종류 박테리아에 결합하는 펩티드들

순위	리스테리아	살모넬라	포도상구균	여시니아
1	E15 YGRGY	B13 RDRY	C18 YGDR	C07 DGYR
2	B09 DYRR	C10 RGDR	A13 RYY	C10 RGDR
3	D04 DGGRR	G06 DGGYGD	B06 DRYR	B13 RDRY
4	A13 RYY	C07 DGYR	B04 DRRY	A13 RYY
5	A11 RRY	B04 DRRY	B07 DRYY	B04 DRRY
6	B04 DRRY	B10 DYRY	D19 YGGDY	B14 RDYR

[0044]

[0045] 상기 결과를 보면 박테리아마다 서로 다른 peptide가 결합한다는 것을 알 수 있다. 그리고 같은 그람 음성균인 살모넬라와 여시니아는 가장 높은 결합력을 보이는 B13, C07, C10이 모두 비교적 잘 결합하는 것으로 나타났는데 이는 아마도 박테리아의 유사성 때문일 것으로 생각되었다. 특히 4개의 잔기를 가진 B 시리즈에서 가장 많이 선택되었는데 세 개보다는 네 개가 더 강하게 결합할 수 있기 때문인 것으로 추측된다. 따라서 4개 또는 5개의 잔기로 구성된 펩티드 문고를 만든다면 더 강하게 결합하는 펩티드를 찾을 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 C 시리즈에서도 높은 결합력을 갖는 펩티드들이 많이 나타난 것으로 볼 때 결합에 참여하는 잔기들 사이의 거리도 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

[0046] 또한 본 발명자들은 암 표지 단백질인 CEA(carcinoembryonic antigen)에 결합하는 펩티드를 검색하였다. CEA 0.5 μ g을 각 면역 플레이트에 흡착시키고 1mg/ml농도의 BSA(bovine serum albumin)과 0.1% Tween-20를 포함하는 완충용액으로 blocking하였다. 그리고 선택된 각 펩티드 1 μ g을 CEA를 흡착시킨 플레이트와 blocking만 한 플레이트에 각각 넣어주었다. 결합하지 않은 펩티드를 PBS로 씻어내고 결합한 펩티드를 pH를 12로 조정된 NaOH-NaCl 완충용액으로 해리시켰다. 그리고 excitation wavelength와 emission wavelength를 각각 485nm와 528nm로 설정한 상태에서 형광을 측정하였다. 이와 같은 방법으로 선택된 8 종류 펩티드의 결합이 도 5에 제시되었다.

[0047] 상기 도 5에서 보는 것처럼 모든 펩티드가 blocking만 한 플레이트에 비해 CEA를 흡착시킨 플레이트에 훨씬 더 많이 결합하는 것이 확인되었다. 그리고 blocking만 한 플레이트와 CEA를 흡착시킨 플레이트에 펩티드를 넣지 않고 형광을 측정했을 때는 차이가 없었기 때문에 형광이 CEA 단백질 자체로 인한 것이 아니고 펩티드로 인하여 발생한 것임을 알 수 있었다. 또한 마지막 단계에서 PBS를 넣고 형광을 측정하는 것보다 pH를 12로 조정된 완충용액을 측정할 때 형광 값이 더 높게 나타났다. 이는 pH 12에서는 펩티드가 해리되어 용액 중에 녹

아 있을 뿐만 아니라 높은 pH로 인하여 플루오레신의 형광이 강해지기 때문인 것으로 생각된다.

[0048] 도 6은 또 다른 암 표지 단백질인 α -fetoprotein(AFP)에 결합하는 펩티드를 검색한 결과이다. 전체 펩티드를 검색한 후 가장 강하게 결합하는 8개를 선정하여 blocking만 한 플레이트와 AFP를 흡착시킨 플레이트에서 결합 정도를 비교하였다. 그 결과 C-07은 CEA와 AFP 모두에 잘 결합하는 것으로 나타났으나 E-08과 D-05는 AFP에 E-07, F01, F-09는 CEA에 선택적으로 결합하는 것으로 나타났다.

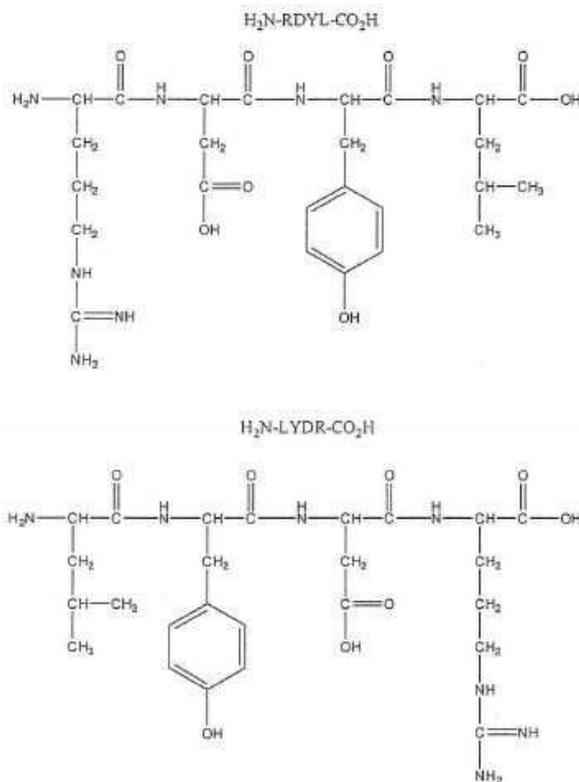
[0049] 이상의 결과를 통해 본 발명에 따른 소수의 대표 아미노산으로만 펩티드 문고를 만들어도 특정 박테리아나 단백질에 선택적으로 결합하는 펩티드를 찾을 수 있다는 사실과 대표 아미노산이 동일한 순서로 배열된 경우에도 그 사이에 연결 아미노산이 삽입되면 친화도가 달라진다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 여기에서 사용한 합성 펩티드 문고는 주로 세 개의 대표 아미노산 잔기만 포함하고 있기 때문에 친화도가 낮은 단점이 있다. 따라서 [표 1]에 제시한 것과 같이 잔기의 수를 5개 또는 6개로 확장한 펩티드 문고를 제작하여 사용한다면 친화도가 훨씬 높은 펩티드들도 간단한 방법으로 찾을 수 있다는 장점이 있다.

산업상 이용가능성

[0050] 본 발명은 목표 분자 또는 세포에 결합하는 펩티드를 검색하는 방법으로 유용하게 이용할 수 있는 뛰어난 효과가 있으므로 생물의약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면

도면1

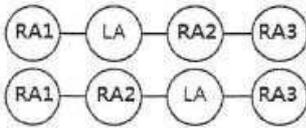


도면2

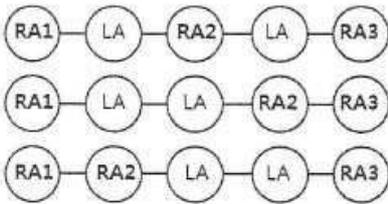
1. 대표 아미노산(RA)으로만 구성



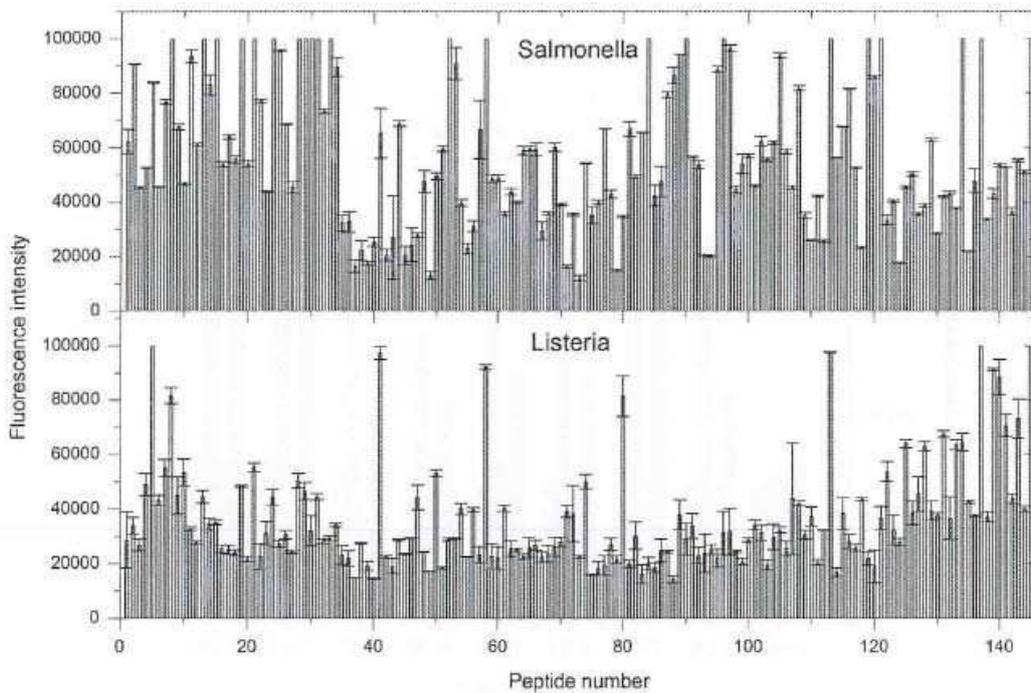
2. 대표 아미노산(RA)에 한 개의 연결 아미노산(LA) 추가



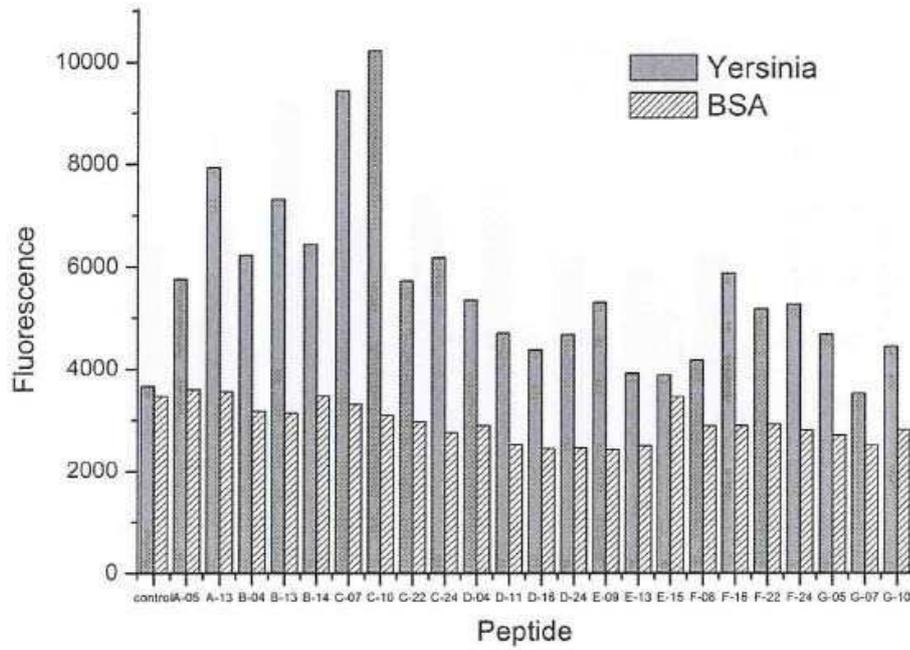
3. 대표 아미노산(RA)에 두 개의 연결 아미노산(LA) 추가



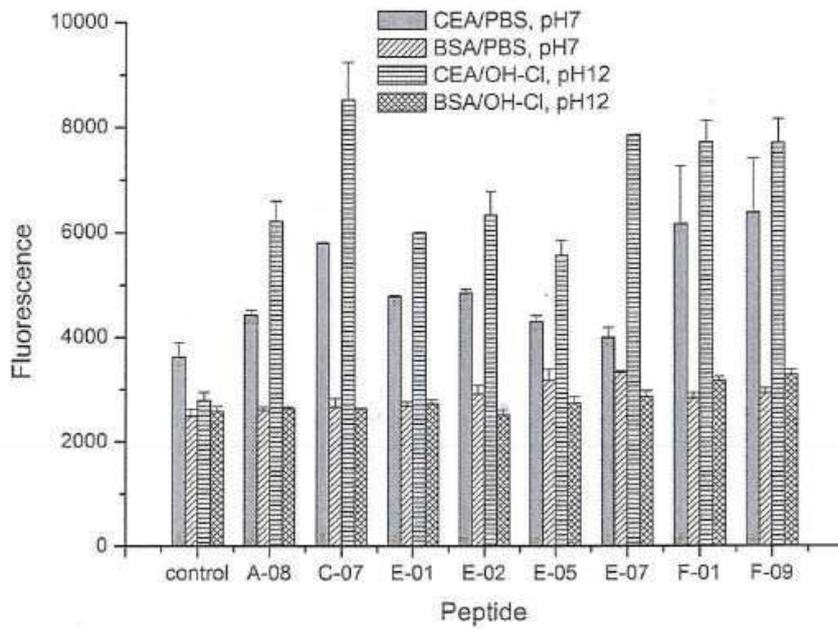
도면3



도면4



도면5



도면6

