



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0095794
(43) 공개일자 2017년08월23일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 31/22</i> (2006.01) <i>C12Q 1/34</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/52</i> (2006.01) <i>G01N 33/573</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/58</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>G01N 31/221</i> (2013.01)
 <i>C12Q 1/34</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0102601(분할)
 (22) 출원일자 2017년08월11일
 심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2016-0078259
 원출원일자 2016년06월22일
 심사청구일자 2016년06월22일</p> | <p>(71) 출원인
 한국과학기술연구원
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)</p> <p>(72) 발명자
 안대로
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)</p> <p>(74) 대리인
 리앤목특허법인</p> |
|--|--|

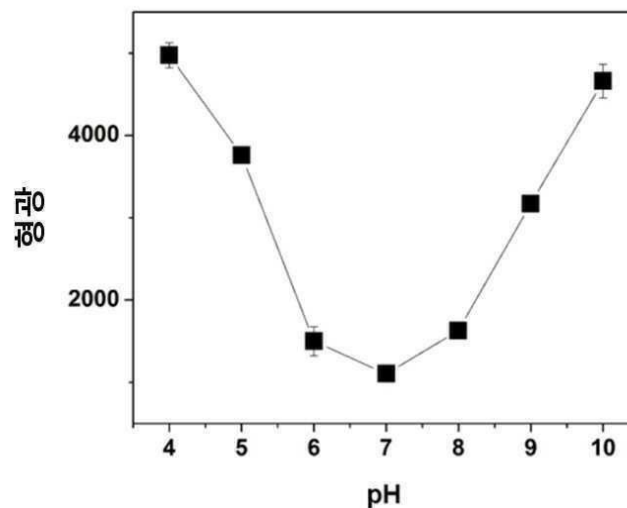
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 신규한 산성 및 염기성 pH-반응성 턴-온 프로브 컨쥬게이트 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 효소 어세이용 신규 턴-온 프로브 컨쥬게이트 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 프로브 컨쥬게이트는 중성 pH에서의 시그널과 비교하여 산성 pH(예컨대, pH 4 내지 pH 6) 및 염기성 pH(예컨대, pH 8 내지 pH 10) 모두에서 더 높은 형광/발광 시그널을 나타낸다. 이에 따라, 본 발명의 프로브 컨쥬게이트는 형광 시그널 변화를 통해 pH-변화 효소(예컨대, 페니실리나제 같은 베타-락타마제, 또는 아데노신 디아미나제) 또는 이를 포함하는 약물-저항성 박테리아의 존재 유무를 간편하고 효율적으로 검출할 수 있다. 따라서, 본 발명의 프로브 컨쥬게이트를 포함하는 조성물은 pH-변화 효소에 대한 어세이 시스템을 제공할 뿐 아니라, 상기 효소를 포함하는 약물-저항성 박테리아에 의해 유발되는 감염 질환의 검출에 효과적으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12Y 305/02006 (2013.01)

C12Y 305/04004 (2013.01)

G01N 33/52 (2013.01)

G01N 33/573 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

G01N 2333/978 (2013.01)

G01N 2333/986 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A121191

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 다제내성감염병대응기술 개발

연구과제명 신규 베타락탐아제 어세이 개발 및 이를 이용한 다제내성균 신속 감별법 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한국과학기술연구원

연구기간 2012.11.01 ~ 2015.10.30

명세서

청구범위

청구항 1

(a) pH-반응성 모이어티(moiety)인 폴리히스티딘; (b) 형광성 모이어티; 및 (c) 상기 pH-반응성 모이어티와 형광성 모이어티 사이를 연결하는 전이금속 복합체(transition metal complex)를 포함하는 턴-온 프로브 컨쥬게이트(turn-on probe conjugate)를 포함하는, 산성 또는 염기성-유발 효소를 포함하는 약물-저항성 박테리아 감염 질환의 진단에 이용하기 위한 산성 또는 염기성-pH 검출용 조성물로서,

상기 전이금속 복합체는 최소 하나 이상의 전이금속 원자와 최소 하나 이상의 리간드 분자로 이루어져 있으며, 상기 전이금속 원자는 상기 pH-반응성 모이어티 및 상기 리간드 분자와 배위결합으로 연결되고, 상기 리간드 분자는 상기 형광성 모이어티와 공유결합으로 연결된 것이고, 상기 턴-온 프로브 컨쥬게이트는 산성 또는 염기성 pH에서 상기 pH-반응성 모이어티를 해리시켜 형광을 나타내는 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효소 어레이용 신규 턴-온 프로브 컨쥬게이트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 효소 어레이는 촉매성 단백질의 활성을 동정하고 정량하는 데 중요하다. 측정가능한 효소적 활성의 변환을 위해, 효소적 반응들에 대한 시그널을 발생시키는 형광발광성(fluorogenic) 프로브들이 널리 이용되고 있다[1]. 상술한 프로브들 중에서, pH-민감성 지시인자들이 촉매성 반응 후에 pH 변화들을 유발하는 에스테라제, 디아미나제 및 락타마제 같은 효소들에 대한 어레이들에서 매우 유용하다[2]. 이전에, 많은 바이오어레이들이 염기성 조건에서 턴-온(turn-on) 형광 시그널을 나타내도록 활성화된 지시인자들을 이용하였다[3]. 비록 염기성-활성화된 프로브들보다 덜 알려져 있을 지라도, 산성 pH에 반응하는 형광발광성 지시인자들도 상기 어레이들을 위해 이용되어 왔었다[4]. 하지만, 상술한 프로브들은 항상 중성 pH로부터 시작하는 한-방식의 턴-온 특성을 보이는 데, 이것은 프로브들이 산-유발 효소들 및 염기-유발 효소들 모두에 대한 일반적인 프로브로서 사용되는 것을 불가능하게 만든다. 프로브가 산성 용액 뿐 아니라 염기성 용액을 센싱하는 턴-온 시그널을 생산한다면, 상기 프로브는 pH-변화 효소들의 어레이에서 보편적으로 이용될 수 있는 보다 바람직한 수단일 것이다(예컨대, 도 1a).

[0003] 따라서, 효소 어레이들에 적합한 산성 및 염기성 조건 모두에서 효과적으로 기능할 수 있는 단일 프로브의 동정/발굴이 당업계에서 시급히 요구되고 있다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Raymond et al., Enzyme assays. Chem Commun. 2009 Jan 7;(1):34-46

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 폭넓은 pH 범위에서 시그널 턴-온 활성을 가지는 신규한 효소 어세이용 프로브를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 산성 및 염기성 pH 모두에서 형광 활성을 가지는 신규한 턴-온 프로브 컨쥬게이트(turn-on probe conjugate)를 고안하여 제조하였으며, 상기 턴-온 프로브 컨쥬게이트가 중성 pH에서의 시그널과 비교하여 산성 pH(예컨대, pH 4 내지 pH 6) 및 염기성 pH(예컨대, pH 8 내지 pH 10) 모두에서 더 높은 형광/발광 시그널 특성을 나타내고 pH-변화 효소(예컨대, 페니실리나제 같은 베타-락타마제, 또는 아데노신 디아미나제)를 포함하는 약물-저항성 박테리아의 검출에 효과적으로 이용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 턴-온 프로브 컨쥬게이트를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 효소 어세이용 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 시료 내 박테리아 감염 진단용 키트를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 시료 내 효소 또는 이를 포함하는 박테리아의 존재를 검출 또는 진단하는 방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) pH-반응성 모이어티(moiety); (b) 형광성 모이어티; 및 (c) 상기 pH-반응성 모이어티와 형광성 모이어티 사이를 연결하는 전이금속 복합체(transition metal complex)를 포함하는 턴-온 프로브 컨쥬게이트(turn-on probe conjugate)를 제공한다.

[0013] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 턴-온 프로브 컨쥬게이트를 포함하는 효소 어세이용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 폭넓은 pH 범위에서 시그널 턴-온 활성을 가지는 신규한 효소 어세이용 프로브를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 산성 및 염기성 pH 모두에서 형광 활성을 가지는 신규한 턴-온 프로브 컨쥬게이트를 고안하여 제조하였으며, 상기 턴-온 프로브 컨쥬게이트가 중성 pH에서의 시그널과 비교하여 산성 pH(예컨대, pH 4 내지 pH 6) 및 염기성 pH(예컨대, pH 8 내지 pH 10) 모두에서 더 높은 형광/발광 시그널 특성을 나타내고 pH-변화 효소(예컨대, 페니실리나제 같은 베타-락타마제, 또는 아데노신 디아미나제)를 포함하는 약물-저항성 박테리아의 검출에 효과적으로 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0015] 통상적으로, 배위 화합물들은 화학적, 생물학적, 환경적 및 촉매적 중요성으로 인해 광범위하게 연구되어 왔다. 금속(예컨대, 산소, 질소, 등)-포함 공여체 리간드들로 구성되는 3차 금속 복합체(complexone)가 다양한 생물학 분야(예컨대, 배위 결합된 금속을 통한 친화도 크로마토그래피 같은 단백질 정제)에서 채택되어 사용되어 왔지만, 중성 pH 또는 약염기성 pH에서 기능하는 복합체들에 대한 연구가 주로 이루어졌고 일부 산성 pH에서 기능하는 복합체들에 대한 보고가 있었다. 이와 관련하여, 효소 어세이를 위한 형광발광성 프로브들이 다양하게 사용되어 왔지만 종래의 프로브들은 pH에 따라 사용되는 프로브가 달라 적용 상에 큰 어려움이 존재한다. 종래의 효소 어세이용 프로브의 pH 조건에 따른 적용의 어려움 및 비효율성을 극복하기 위해, 본 발명자들은 산성 및 염기성 pH 조건 모두에서 작동가능한 턴-온 프로브 컨쥬게이트를 고안하였다.

[0016] 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트는 (a) pH-반응성 모이어티(moiety); (b) 형광성 모이어티; 및 (c) 상기 pH-반응성 모이어티와 형광성 모이어티 사이를 연결하는 전이금속 복합체(transition metal complex)를 포함하며, 산성 및 염기성 pH 조건 모두에서 효과적으로 작동가능하다.

[0017] 본 발명의 전이금속 복합체는 최소 하나 이상의 전이금속 원자와 최소 하나 이상의 리간드 분자를 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 전이금속 복합체 내 전이금속 원자(즉, 중앙 금속 원자)는 Co(II), Cu(II), Ni(II) 또는 Zn(II)이며, 보다 더 구체적으로는 Co(II) 또는 Cu(II)이고, 가장 구체적으로는 Co(II)이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “전이금속 원자(transition metal atom)”는 상기 전이금속 복합체 내 중앙의 전이금속 원자를 나타내고, 이의 산화 상태는 0 내지 +4일 수 있으며 구체적으로는 +2 또는 +3이고 보다 구체적으로는 +2이다.

[0019] 상기 최소 하나 이상의 리간드 분자는 상기 전이금속 원자와 배위 결합을 형성할 수 있는 하나 이상의 원자들,

보다 구체적으로는 2-8개의 원자들, 보다 더 구체적으로는 3-5개의 원자들 및 가장 구체적으로는 4-5개의 원자들을 포함한다.

[0020] 본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 리간드 분자 내 원자는 산소 원자, 질소 원자, 황 원자 또는 탄소 원자를 포함하고, 보다 구체적으로는 산소 원자 또는 질소 원자를 포함한다. 상기 산소 원자를 포함하는 적합한 작용기의 예는 알코올레이트($R-O^-$), 카르복실레이트($R-COO^-$), 퍼록사이드($R-O-O^-$), 또는 이와 유사한 작용기를 포함한다. 상기 질소 원자를 포함하는 적합한 작용기의 예는 1차, 2차 또는 3차 아민 기능을 포함하는 지방족 아민 작용기를 포함하거나, 또는 피롤, 이미다졸, 디아졸 또는 트리아졸 고리, 또는 이와 유사한 것을 포함하는 방향족성 또는 포화된 고리 시스템의 일부로 포함될 수 있으며, 예를 들어 히스티딘 모이어티 또는 His-태그(tag)의 일부로 포함된다.

[0021] 본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 리간드 분자는 멀티자리수(multidentate) 리간드 분자로 중앙의 전이금속 원자와 배위결합을 형성하는 2-6개의 리간드 원자들(예컨대, 산소 원자 또는 질소 원자)을 포함하고 상기 배위결합을 형성하는 리간드 원자는 상기 중앙의 전이금속 원자의 모든 가능한 배위결합 위치들을 점유하지 않는다. 예를 들어, 항상 5-6개의 배위수(coordination number)를 가지는 중앙 코발트 원자($Co(II)$)에 대해 상기 배위결합을 형성하는 리간드 원자는 3-5개의 잠재적인 배위(결합) 위치들을 가질 수 있다.

[0022] 본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 리간드 분자는 아미노폴리카르복실산(aminopolycarboxylic acid)이다. 아미노폴리카르복실산은 2개 이상의 카르복실기 내 탄소 원자를 통해 연결되는 하나 이상의 질소 원자들을 포함하는 화합물로, 금속 이온들(예컨대, Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , 등)과 강력한 복합체를 형성한다. 아미노폴리카르복실산은 NTA(nitrilotriacetic acid), MIDA((methylimino)diacetic acid), IDA(iminodiacetic acid), Fura-2, EDTA(ethylene diamine mono acetate), DTPA(diethylene triamine pentaacetate), BAPTA, NOTA((1,4,7-triazonane-1,4,7-triyl)triacetic acid), DOTA((1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid), TTHA(3,6,9,12-tetrakis(carboxymethyl)-3,6,9,12-tetraazatetradecanedioic acid), TETA((1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetrayl)tetraacetic acid) 등을 포함한다.

[0023] 본 발명의 어떤 구현예에서, 본 발명에서 이용될 수 있는 리간드 분자는 4개의 배위수를 가지는 NTA로, 형광성 모이어티와 공유결합적으로 연결되고 $Co(II)$ 와 배위결합을 통해 전이금속 복합체를 형성하며 $Co(II)$ 의 나머지 배위수를 통해 pH-반응성 모이어티와 결합한다.

[0024] 본 명세서에서 사용되는 용어 “연결(link)” 또는 화학적 결합은 최소 하나의 화학적 결합을 통해 두 개의 구성요소들을 연결하는 것을 의미하며, 상기 화학적 결합은 배위 결합, 수소 결합, 이온 결합, 공유 결합, 등과 같이 당업계에 알려진 어떠한 결합을 포함할 수 있고, 구체적으로는 배위 결합(coordination bond) 및 공유 결합을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 연결은 최소 하나 이상의 화학적 결합을 통해 이루어지며, 보다 구체적으로는 전이금속 복합체와 형광성 모이어티는 공유 결합을 통해 연결되고 전이금속 복합체와 pH-반응성 모이어티는 배위 결합을 통해 연결된다. 또한, 상기 연결에서 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트의 구성요소들 간의 결합을 방해하지 않는 한, 추가적인 결합을 포함할 수도 있다.

[0026] 따라서, 전이금속 복합체를 이용하여 pH-반응성 모이어티와 형광성 모이어티를 배위결합적 및 공유결합적으로 연결시킨 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트는 pH-반응성 모이어티의 결합/해리에 따라 다양한 pH 조건 하에서의 형광 시그널 측정을 통해 pH-변화를 유발하는 효소의 어세이에 간편하고 효율적으로 적용가능하다.

[0027] 본 발명의 어떤 구현예에서, 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트는 산성 또는 염기성 pH에서 형광을 나타낸다.

[0028] 본 발명의 어떤 구현예에서, 본 발명의 pH-반응성 모이어티는 산성 또는 염기성 pH 하에서 상기 턴-온 프로브 컨쥬게이트로부터 해리되고, 보다 구체적으로는 산성 pH 하에서 해리되었다가 중성 pH 하에서 다시 결합된다(참고: 도 6).

[0029] 본 발명에서 산성 pH의 범위는 pH 2.0 내지 pH 6.5이며, 보다 구체적으로는 pH 3.0 내지 pH 6.3이며, 보다 더 구체적으로는 pH 3.5 내지 pH 6.1이다. 본 발명에서 염기성 pH의 범위는 pH 7.5 내지 pH 11.0이며, 보다 구체적으로는 pH 7.8 내지 pH 10.5이며, 보다 더 구체적으로는 pH 8.0 내지 pH 10.0이다.

[0030] 본 발명의 어떤 구현예에서, 본 발명의 pH-반응성 모이어티는 산성 및 염기성 pH 하에서 상기 프로브 컨쥬게이트로부터 해리됨으로써 상기 프로브의 형광을 유발시킬 수 있는 물질이라면 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 보

다 구체적으로는 폴리-L-히스티딘(poly-L-His)을 이용할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 폴리-L-히스티딘은 10개 이상의 히스티딘, 보다 구체적으로는 50개 이상의 히스티딘, 및 보다 더 구체적으로는 약 50-200개의 히스티딘으로 이루어진 혼합물을 포함한다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 “형광성 모이어티(fluorescent moiety)”는 상기 pH-반응성 모이어티가 프로브 컨쥬게이트로부터 해리됨에 따라 형광 시그널을 창출하는 형광 분자 또는 이의 유도체 또는 컨쥬게이트를 의미한다.

[0032] 본 발명의 어떤 구현예에서, 본 발명의 형광성 모이어티는 로다민, 쿠마린, 시아닌, EvoBlue, 옥사진, 카르보피로닌(carbopyronin), 나프탈렌, 바이페닐, 안트라센(anthracene), 페난트렌, 파이렌, 카르바졸 등을 기본 백본으로 가지는 형광 색소 또는 이의 유도체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 형광성 모이어티는 ATTO 390TM (479), ATTO 425TM (484), ATTO 465TM (508), ATTO 488TM (523), ATTO 495TM (527), ATTO 520TM (538), ATTO 532TM (553), ATTO Rho6GTM (570), ATTO 550TM (576), ATTO 565TM (592), ATTO Rho3BTM (565), ATTO Rho11TM (608), ATTO Rho12TM (532), ATTO Thio12TM (579), ATTO 610TM (634), ATTO 611 XTM (681), ATTO 620TM (643), ATTO Rho14TM (625), ATTO 633TM (657), ATTO 647TM (669), ATTO 647 NTM (669), ATTO 655TM (684), ATTO Oxa12TM (663), ATTO 700TM (719), ATTO 725TM (752), ATTO 740TM (764), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), EvoBlue10TM, EvoBlue30TM, MR121, Cy2TM (506), YO-PROTM-1 (509), YOYOTM-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorXTM (519), AlexaTM (520), 로다민(Rhodamine) 110 (520), 5-FAM (522), Oregon GreenTM 500 (522), Oregon GreenTM 488 (524), RiboGreenTM (525), 로다민 GreenTM (527), 로다민 123 (529), Magnesium GreenTM (531), Calcium GreenTM (533), TO-PROTM-1 (533), TOT01 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), DiI (565), Cy3TM (570), AlexaTM 546 (570), TRITC (572), Magnesium OrangeTM (575), 피코에리트린 R&B (575), 로다민 팔로이딘(Phalloidin) (575), Calcium OrangeTM (576), 피로닌 Y (580), 로다민 B (580), TAMRA (582), 로다민 RedTM (590), Cy3.5TM (596), ROX (608), Calcium CrimsonTM (615), AlexaTM 594 (615), Texas Red(615), Nile Red (628), YO-PROTM-3 (631), YOYOTM-3 (631), R-피코시아닌 (642), C-피코시아닌 (648), TO-PROTM-3 (660), TOT03 (660), DiD DiI(5) (665), Cy5TM (670), 티아디카르보시아닌 (671), Cy5.5(694), Biosearch Blue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610 (610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), Fluorescein (520), Fluorescein-C3 (520), Pulsar 650 (566), Quasar 570 (667), Quasar 670 (705), Quasar 705 (610) 및 이의 유도체 또는 컨쥬게이트를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 괄호의 숫자는 나노미터 단위로 표시한 발광 최대 파장이다. 또한, 본 발명의 형광성 모이어티 유도체는 자유 카르복실기, 에스테르(예컨대, N-하이드로숙신이미드(NHS) 에스테르) 또는 말레이미드 유도체를 추가적으로 포함할 수 있으며, 본 발명의 형광성 모이어티의 컨쥬게이트는 스트렙타비딘, 바이오틴, 팔로이딘, 아민, 아자이드 또는 이오도아세트아미드 컨쥬게이트를 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 어떤 구현예에서, 본 발명의 형광성 모이어티는 옥사진(oxazine)-기반 표지를 포함하고, 보다 구체적으로는 ATTO 488TM이다.

[0034] 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트는 pH-변화 유발 효소를 효과적으로 어세이할 수 있다. 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트는 pH-변화(즉, 산성 또는 염기성 pH로의 변화)에 따라 pH-반응성 모이어티가 상기 프로브 컨쥬게이트로부터 해리되어 형광 시그널이 턴-온 된다. 예를 들어, 산성 pH 4에서는 pH-반응성 모이어티가 Co(II)와의 배위 결합이 파괴되어 상기 컨쥬게이트로부터 해리되고, 이에 따라 형광성 모이어티가 형광을 나타낸다. 또한, 중성 pH 7로의 변화는 pH-반응성 모이어티와 전이금속 복합체 내 리간드 분자가 Co(II)와 배위 결합을 형성함으로써 형광 시그널을 나타내지 않게 된다(참고; 도 1b, 도 4 및 도 6). 이에 반해, 염기성 pH 10에서는 산성 pH4와 마찬가지로 pH-반응성 모이어티의 해리에 따라 형광 시그널을 나타내지만, 중성 pH 7로 회귀시키는 경우 턴-온 프로브 컨쥬게이트의 형성을 이루지 못 하였는데, 이는 염기성 pH 하에서 불용성 Co(II) 하이드록사이드가 형성되어 리간드-형광성 모이어티가 Co(II)와 결합할 수 없기 때문이다. 결과적으로, 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트는 산성 및 염기성 pH 모두에서 형광 시그널을 나타낼 수 있다. 따라서, 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트를 포함하는 조성물은 pH-변화를 유발하는 효소를 검출하는 데 효과적으로 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 pH-변화를 유발하는 효소는 산성- 또는 염기성-유발 효소라면 어떠한 것도 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 베타-락타마제 및 아데노신 디아미나제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 유사하게, 본 발명의 조성물은 산성- 또는 염기성-유발 효소를 포함하는 약물-저항성 박테리아 감염 질환의 진

단에 이용될 수 있다.

- [0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 “감염 질환(infectious disease)”은 대상자(subject) 또는 환자 내에 또는 이와 접촉하는 생물체(감염성 제제)의 존재와 관계되는 질환 또는 상태를 의미한다. 상기 생물체는 박테리아, 곰팡이, 바이러스 또는 다른 미생물을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “박테리아 감염 질환(bacterial infectious disease)”은 생물체가 박테리아인 것을 특징으로 하는 감염 질환이다. 예를 들어, “항생제-저항성 박테리아 감염 질환”은 상기 생물체가 하나 이상의 박테리아의 비-항생제 저항성 스트레인들에 의해 야기되는 질환의 치료에서 효과적인 하나 이상의 항생제에 대해 저항성을 가지는 박테리아인 것을 특징으로 하는 감염 질환이다. 특히, “베타-락탐 항생제 저항성 박테리아 감염 질환”은 베타-락탐 포함 항생제들에 의해 효과적으로 치료되지 않는 항생제 저항성 박테리아 감염 질환을 의미한다.
- [0038] 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트가 이용될 수 있는 약물-저항성 박테리아는 엔테로박터(*Enterobacter*), 시트로박터(*Citrobacter*), 세라티아(*Serratia*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 에스체리시아(*Escherichia*), 살모넬라(*Salmonella*), 해모필러스(*Haemophilus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 스타필로코커스(*Staphylococcus*), 쉬겔라(*Shigella*), 마이코박테리움(*Mycobacterium*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 리스테리다(*Listeria*), 스테노트로포모나스(*Stenotrophomonas*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 박테로이데스(*Bacteroides*), 보르데텔라(*Bordetella*), 보렐리아(*Borrelia*), 브루셀라(*Brucella*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 클라미디아(*Chlamydia*), 클라미도필라(*Chlamydophila*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 프란시셀라(*Francisella*), 헬리코박터(*Helicobacter*), 레기오넬라(*Legionella*), 랩토스피라(*Leptospira*) 및 예시니아(*Yersinia*) 속에 속하는 박테리아를 포함하고, 보다 구체적으로는 엔테로박터, 시트로박터, 세라티아, 슈도모나스, 에스체리시아, 살모넬라, 해모필러스, 스트렙토코커스, 스타필로코커스, 쉬겔라, 마이코박테리움, 클로스트리디움 및 리스테리다 속에 속하는 박테리아를 포함하며, 보다 더 구체적으로는 대장균(*E. coli*), 장독소형 대장균(ETEC), 장출혈성 대장균(EHEC), 장병원성 대장균(EPEC), 대장균 0157:H7, 시트로박터 프레운디아(*C. freundii*), 세라티아 티피무리움(*S. typhimurium*), 세라티아 마르세센스(*S. marcescens*), 엔테로박터 클로아카에(*E. cloacae*), 슈도모나스 에루기노사(*P. aeruginosa*), 살모넬라 티피(*S. typhi*), 살모넬라 티피무리움(*S. typhimurium*), 해모필러스 인플루엔자(*H. influenzae*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*S. pneumoniae*), 스트렙토코커스 피오게네스(*S. pyogenes*), 스트렙토코커스 아갈락티아(*S. agalactiae*), 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*), 스타필로코커스 에피데미디스(*S. epidermidis*), 스타필로코커스 사프로피티쿠스(*S. saprophyticus*), 쉬겔라 소나이(*S. sonnei*), 마이코박테리움 레프레(*M. leprae*), 마이코박테리움 튜버클로시스(*M. tuberculosis*), 클로스트리움 디피실(*C. difficile*) 및 리스테리다 모노시토게네스(*L. monocytogenes*)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 약물-저항성 박테리아에 의해 유발되는 감염 질환은 피부 및 연조직 감염, 발열성 호중구감소증, 요로 감염증(UTI), 복강내 감염, 기도관 감염, 상기도관 감염, 폐렴(병원성), 뇌수막염, 수술 중 감염, 전염성 부비동염, 탄저병, 라임병, 브루셀라병(Brucellosis), 급성 장염, 공동체-획득성 호흡감염, 비특이성요도염(NGU), 성병성 림프 육아종(LGV), 임질, 트라코마, 신생아의 봉입체결막염, 보툴리눔 식중독, 급성식중독, 설사, 출혈성 대장염, 기관지염, 위궤양, 심장 내막염, 살모넬라증, 위장염, 적리, 기회 감염, 중이염, 부비동염, 인두염, 여드름, 모공성각화증(keratosis pilaris), 주사비, 할리퀸 어린선, 색소성 건피증, 각화증, 습진, 뇌사성 근막염 및 결핵을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 턴-온 프로브 컨쥬게이트를 포함하는 시료 내 박테리아 감염 진단용 키트를 제공한다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상술한 턴-온 프로브 컨쥬게이트와 목적 시료(sample of interest)를 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 시료에서 형광을 검출하는 단계를 포함하는 시료 내 효소 또는 이를 포함하는 박테리아의 존재를 검출 또는 진단하는 방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 키트 및 방법은 상술한 턴-온 프로브 컨쥬게이트를 유효성분으로 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0043] 본 발명의 프로브 컨쥬게이트에 의해 발생되는 형광은 시료 내 효소 또는 이를 포함하는 박테리아의 존재에 대한 지표가 될 수 있으며, 이를 통해 상기 박테리아에 의해 유발되는 감염 질환의 진단에 이용될 수 있다.
- [0044] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객

체의 예후(prognosis)(예컨대, 감염 질환 또는 상태의 동정, 상기 질환의 치료에 대한 반응성 및 이의 효과 판단)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함할 수 있다.

[0045] 목적 시료와 접촉(반응)시켜 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트의 해리/결합에 따른 형광 변화를 측정함으로써 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써 pH-변화를 유발시키는 약물-저항성 박테리아에 의한 감염 질환을 진단할 수 있다. 상기 형광 시그널 분석은 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 실시될 수 있다(참고: 실험방법). 즉, 형광 시그널은 당업계에서 이용가능한 적합한 장치(apparatus)에 의해 관측되고 프로세싱된다. 예를 들어, 형광 분석기, 마이크로플레이트 판독기, 로봇 장치들을 이용한 자동화 프로세싱, 레이저 스캐닝 시스템을 포함하는 당업계에 알려진 프로토콜 및 과정들이 이용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 어떤 구현예에서, 상기 (목적) 시료는 박테리아 세포의 용해물로부터 얻어지는 생물학적 시료들 또는 박테리아 세포 배양액의 상층액, 또는 동물 기관 또는 세포의 추출물(예컨대, 혈액, 혈청, 분비물, 림프액, 투석액(dialysate), 체액(sap), 단백질, 등)을 포함한다.

[0047] 본 발명의 키트는 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 분석의 결과, 본 발명의 턴-온 프로브 컨쥬게이트-유래된 형광 시그널이 대조군(즉, 정상군)과 비교하여 시료에서 2-5배 정도로 검출되는 경우 상기 시료 내에 효소 또는 박테리아가 존재하는 것으로 판단된다(참고: 도 4 및 도 6).

발명의 효과

[0048] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0049] (a) 본 발명은 효소 어세이용 신규 턴-온 프로브 컨쥬게이트 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0050] (b) 본 발명의 프로브 컨쥬게이트는 중성 pH에서의 시그널과 비교하여 산성 pH(예컨대, pH 4 내지 pH 6) 및 염기성 pH(예컨대, pH 8 내지 pH 10) 모두에서 더 높은 형광/발광 시그널을 나타낸다.

[0051] (c) 이에 따라, 본 발명의 프로브 컨쥬게이트는 형광 시그널 변화를 통해 pH-변화 효소(예컨대, 베타-락타마제 또는 아데노신 디아미나제) 또는 이를 포함하는 약물-저항성 박테리아의 존재 유무를 간편하고 효율적으로 검출할 수 있다.

[0052] (d) 따라서, 본 발명의 프로브 컨쥬게이트를 포함하는 조성물은 pH-변화 효소에 대한 어세이 시스템을 제공할 뿐 아니라, 상기 효소를 포함하는 약물-저항성 박테리아에 의해 유발되는 감염 질환의 검출에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1a는 pH 변화를 유발하는 효소 반응을 보여준다. 도 1b는 본 발명의 이준 턴-온 프로브(위쪽)의 활성 기작 및 상기 쥘처와 상기 형광단 NTA-Atto488의 화학적 구조(아래쪽)에 대한 도시적 예시를 보여준다.

도 2a는 NTA-Atto488(1 μ M, 파란색 선), Co-NTA-Atto488 (1 μ M, 빨간색 선), 및 폴리-L-His-Co-NTA-Atto488(1 μ M, 검은색 선)에 대해 기록된 UV-Vis 흡광도 스펙트럼을 보여주고, 도 2b는 NTA-Atto488(100 nM, 파란색 선), Co-NTA-Atto488(100 nM, 빨간색 선), 및 폴리-L-His-Co-NTA-Atto488(100 nM, 검은색 선)에 대해 기록된 형광 방출 스펙트럼을 보여준다. 여기 파장은 488 nm였다.

도 3은 다른 온도들에서 폴리-L-His에 의한 Co-NTA-Atto488의 쥘칭에 관한 스테른-볼머 플롯 결과이다: ■, 25℃; ●, 30℃; 및 ▲, 37℃. Fo 및 F는 각각 폴리-L-His의 부존재 및 존재 하에서 Co-NTA-Atto488의 형광 강도를 표시한다.

도 4는 폴리-L-His/Co-NTA-Atto488 프로브(100 nM)의 이중 pH-민감도를 보여준다.

도 5는 다른 pH 값에서 100 nM의 NTA-Atto488(●) 및 Co-NTA-Atto488(■)의 형광 강도(FI)를 보여준다.

도 6은 pH 4.0 및 pH 7.0 사이에서 폴리-L-His/Co-NTA-Atto488의 pH 가역성 연구를 보여준다. 본 실험은 10 mM 시트르산-나트륨 시트레이트 완충액(pH 7.0)에서 100 nM 프로브로 실시되었다. 상기 pH 조정은 NaOH 및 HCl로 적정하여 실시되었다.

도 7a는 본 발명의 이중-반응성 프로브에 의해 모니터링되는 페니실리나제에 대한 억제 어세이를 보여주며, 도 7b는 본 발명의 이중-반응성 프로브에 의해 모니터링되는 ADA에 대한 억제 어세이를 보여준다. 효소들의 활성

은 억제제의 부재(-) 및 낮은 농도의 억제제 존재(+, 0.01 μM 클라불란산칼륨 및 0.01 mM EHNA) 대 높은 농도의 억제제 존재(++ , 500 μM 클라불란산칼륨 및 2 mM EHNA) 하에서 측정되었다.

도 8a는 페니실리나제에 대한 클라불란산칼륨의 IC_{50} 값(3.25 μM)의 결정을 보여준다. 도 8b는 ADA에 대한 이리트로-9-(2-하이드록시-3-논일)아데닌(EHNA)의 IC_{50} 값(1.23 mM)의 결정을 보여준다.

도 9는 프로브를 이용한 페니실린 저항성 분리주들의 검출을 보여준다. 프로브와 분리주들의 0분부터 90분까지의 반응 시간에 의해 형광 시그널이 변화한다.

도 10은 환자들로부터 분리된 β -락타마제 비-생산자들(음성)(파란색 막대들) 및 24개의 β -락타마제 생산자들(보라색 막대들)이 본 발명의 이중-반응성 프로브를 이용하여 스크리닝된다는 것을 보여준다. 상대적인 형광은 (a) 30분, (b) 60분, 또는 (c) 90분에서의 형광 강도에서 백그라운드 시그널을 차감함으로써 결정되었다(참고: 도 9).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0055] **실시예**

[0056] **실험재료 및 실험방법**

[0057] **실험재료 및 장치들:**

[0058] 특별히 다르게 기재되지 않는 한, NTA-Atto488을 포함하는 모든 물질들은 시그마 알드리치(USA)로부터 구매되었고 추가적인 정제 없이 사용되었다. UV 흡수 스펙트럼 및 형광 방출 스펙트럼의 프로파일은 각각 Libra S22 UV/Vis 분광 광도계(Biochrom, UK) 및 F-7000 형광 분광기(Hitachi, Japan)에서 측정되었다. pH-의존성 실험들 및 효소 어세이들에서 이용되는 이중-반응성(dual-responsive) 프로브의 형광 강도는 Appliskan™ 멀티모드 마이크로플레이트 판독기(Thermo Scientific, USA)에서 측정되었다. pH 측정치들은 Orion 3 Star pH 미터(Thermo Scientific, USA)로 실시되었다.

[0059] **이중-반응성 프로브의 제조 및 특징 확인:**

[0060] Co-NTA-Atto488은 1:1 몰 비율로 CoSO_4 및 NTA-Atto488을 상온 압 조건 하에서 10분 동안 혼합하여 제조하였다. 상기 이중-반응성 프로브는 1 당량의 폴리-L-히스티딘(poly-L-His)(Sigma-Aldrich, 미국)을 첨가하여 최종적으로 얻었다. 결과적인 용액을 약하게 교반시키고 상온에서 10분 동안 추가적으로 반응시킨 후, 상기 프로브의 UV-Vis 흡광도(10 mM Tris-HCl(pH 7.0)에 1 μM 로 녹여짐) 및 형광 강도(10 mM Tris-HCl(pH 7.0)에 100 nM로 녹여짐; 488 nm에서 여기)가 측정되었다. 또한, 다른 pH 완충액들(pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10)에서 상기 프로브의 형광 강도가 측정되었다. 상기 프로브의 형광 강도는 각각 485/535 nm의 여기/방출 필터 세팅된 Appliskan™을 이용하여 측정되었다. 각 값은 3개의 독립적인 측정치들의 평균을 의미한다.

[0061] **베타-락타마제 어세이:**

[0062] 베타-락타마제 활성 어세이들이 10 mM Tris-HCl(100 μL , pH 7.0)에서 실시되었다. 페니실리나제(0.5 unit)의 부존재 또는 존재 하에서 페니실린 G(1 mM) 및 프로브(100 nM)를 포함하는 반응 혼합물을 상온에서 10분 동안 반응시킨 후, 상기 혼합물의 형광 강도가 측정되었다.

[0063] 억제 어세이를 위해, 페니실리나제(0.5 unit)가 다양한 농도의 클라불란산칼륨(0-500 μM)과 함께 처리되었다. 15분 동안 반응시킨 후, 페니실린 G(1 mM) 및 프로브(100 nM)가 상기 혼합물에 첨가되었다. 추가적으로 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, 상기 혼합물의 형광 강도가 측정되었다. 각 값은 3개의 독립적인 어세이들의 평균을 의미한다.

[0064] **아데노신 디아미나제 어세이:**

[0065] 아데노신 디아미나제(ADA)에 대한 어세이는 β -락타마제 어세이들에서 이용되는 것과 유사한 방식을 채택하여 실시되었다. 간략하게는, 아데노신 디아미나제(0.001 unit)의 존재 또는 부존재 하에서 아데노신(1 mM), 프로

브(100 nM)을 포함하는 반응 혼합물이 30℃에서 30분 동안 반응되었다.

[0066] 억제 어세이를 위해, ADA(0.001 unit)가 다양한 농도의 에리트로-9-(2-하이드록시-3-논일)아데닌(EHNA)(0-10 mM)과 함께 나트륨 포스페이트 완충액(10 mM, pH 7.0)에 처리되었다. 30℃에서 15분 동안 반응시킨 후, 아데노신(1 mM) 및 프로브(100 nM)가 상기 혼합물에 첨가되었다. 추가적으로 30℃에서 30분 동안 반응시킨 후, 상기 혼합물의 형광 강도가 측정되었다. 각 값은 3개의 독립적인 어세이들의 평균을 의미한다.

[0067] 스테른-볼머 플롯(Stern-Volmer plot):

[0068] *스테른-볼머 방정식($F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$)이 이분자 퀀칭을 계산하는 데 이용되었다. F_0 및 F 는 각각 퀀치인 폴리-L-히스티딘(Q)의 부존재 및 존재 하에서 관찰되는 형광 시그널이다. $[Q]$ 는 퀀치 농도이고 K_{sv} 는 스테른-볼머 상수이다. Co-NTA-Atto488(100 nM)의 형광 강도는 세 개의 다른 온도(25, 30 및 37℃)에서 다양한 농도의 퀀치(0, 25, 40, 50, 및 80 nM)와 함께 측정되었다.

[0069] 박테리아 스트레인들:

[0070] 확장된-스펙트럼 β-락타마제(ESBL)을 검출하는 데 상기 이중-반응성 프로브를 이용하는 형광 테스트의 실행을 평가하기 위해 총 44개의 스트레인들이 이용되었다; 상기 스트레인들은 여러 한국 병원들 및 노르만 박사(Switzerland)로부터 제공된 선물들로부터 유래되었다. 상술한 스트레인들은 디스크 강화 방법을 이용하여 ESBL에 대해 이전에 스크리닝되었으며[5], blaCTX-M에 대한 멀티플렉스 PCR 및 시퀀싱을 이용하여 분자 레벨에서 이들의 β-락타마제 함량이 규명되었다. 이러한 스트레인 수집은 24개의 CTX-M 타입 ESBL-양성 스트레인들을 포함하였다(CTX-M 그룹 1의 17개 스트레인들: 1, 3, 12, 15 및 32, 그룹 2의 2개 스트레인: 2, 그룹 9의 다섯 개 스트레인들: 9 및 14, 20개의 ESBL-음성 분리체들)(표 1). 모든 ESBL-생산자들은 CLSI 가이드라인에 따라 세포타심($MIC \geq 4 \mu g/ml$)에 대해 저항성을 나타냈다.

표 1

[0071]

그룹	이름	종	세포타심(Cefotaxime; $\mu g/ml$)의 최소억제농도(MIC)
그룹 1	CTX-M-1	S. 티피부리움	>64
그룹 1	CTX-M-3	S. 마르세센스	64
그룹 1	CTX-M-3	S. 마르세센스	64
그룹 1	CTX-M-3	S. 마르세센스	64
그룹 1	CTX-M-3	S. 마르세센스	64
그룹 1	CTX-M-3	대장균(<i>E. coli</i>)	16
그룹 1	CTX-M-3	E. 클로아카에	64
그룹 1	CTX-M-3	E. 클로아카에	64
그룹 1	CTX-M-3	E. 클로아카에	64
그룹 1	CTX-M-3	K. 뉴모니에	32
그룹 1	CTX-M-12	K. 뉴모니에	32
그룹 1	CTX-M-15	E. 클로아카에	64
그룹 1	CTX-M-15	대장균	64
그룹 1	CTX-M-15	K. 뉴모니에	64
그룹 1	CTX-M-15	C. 프레운디이	64
그룹 1	CTX-M-15	대장균	64
그룹 1	CTX-M-32	대장균	64
그룹 2	CTX-M-2	대장균	64
그룹 2	CTX-M-2	대장균	64
그룹 9	CTX-M-9	C. 프레운디이	32
그룹 9	CTX-M-14	S. 마르세센스	64
그룹 9	CTX-M-14	대장균	32
그룹 9	CTX-M-14	C. 프레운디이	64
그룹 9	CTX-M-14	대장균	64

[0072] 베타-락타마제-양성 박테리아 스트레인들의 특성 및 30분, 60분 및 90분째 이들의 형광의 % 차이.

[0073] 스트레인들은 물러-힌톤 아가(Asan, Korea) 상에서 분리되었고 형광 테스트를 실시하기 전에 37℃에서 16-24시간

간 동안 배양되었다. 박테리아 단백질의 추출은 이전에 기재된 대로 실시되었다[6]. 간략하게는, 하나의 계산된 접종 루프(1 μ l)의 테스트된 스트레인이 150 μ l의 200 mM Tris-HCl 용해 완충액(B-PER II, 박테리아 단백질 추출 시약; Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA)에 재현탁되어 1분 동안 볼텍싱된 후, 추가적으로 상온에서 30분 동안 반응되었다. 상기 박테리아 현탁액을 상온에서 5분 동안 10,000 x g로 원심분리시켰다. 30 μ l의 상층액이 96-웰 트레이에서 100 nM의 이중-반응성 프로브 용액을 포함하는 세포탁심 나트륨 염(Sigma-Aldrich, USA)으로 구성된 100 μ l의 용액과 혼합되었다.

[0074] 형광 측정:

[0075] 형광 시그널은 동적 모드를 가지는 Infinite F200pro(TecanGroup Ltd., Mannedorf, Switzerland) 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 측정되었다. 여기 파장 및 방출 파장은 각각 485 nm(대역폭 20 nm) 및 535 nm(대역폭 25 nm)로 셋팅되었다. 각 웰에 130 μ l의 최대 용량을 가지는 폴리스티렌 블랙 96 편평-바닥 웰 마이크로플레이트(Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)가 이용되었다. 형광 시그널은 0, 30, 60 및 90분에 측정되었다. 70,000보다 큰 형광 강도는 계산의 용이성을 위해 70,000으로 정의되었다.

[0076] 실험결과

[0077] 본 발명의 프로브는 폴리히스티딘(폴리-L-His)와 Atto488로 표지된 니트릴로트리아세트산으로 전-킬레이팅된 코발트(II) 이온(Co-NTA-Atto488)과 복합체를 이뤄 제조되었다. 상기 컨쥬게이션(poly-L-His/Co-NTA-Atto488)은 멀티머성 히스티딘 잔기들과 상기 금속 이온 간의 잘-알려진 상호작용으로 인해 형성되었다(도 1b).

[0078] 도 2a에서 볼 수 있듯이, Co-NTA-Atto488 용액은 UV-Vis 스펙트럼에서 501 nm에서 최대 흡광도 피크를 보인다. 폴리-L-His의 첨가 하에서, 상기 Atto488 모이어티의 흡광도는 λ_{max} 에서 작은 쉬프트를 가지면서 감소하였다. 흡광도 피크에서 그러한 변화는 Co(II)-NTA 공동작용에 의해 매개되는 염료와 His 잔기들 간의 바닥 상태 상호작용에 기인한 것일 수 있으며, 상기 바닥 상태 상호작용은 상기 염료의 형광 방출의 퀀칭을 야기하였다(도 2b).

[0079] 이미다졸 고리에 의한 이러한 퀀칭 효과가 이전 문헌[7] 상에 알려져 있었을 지라도, 상기 복합체 내 폴리-L-His에 의한 퀀칭 기작에 대한 추가적인 정보를 얻기 위해 스테른-볼머 플롯이 폴리-L-His에 대해 실시되었다(도 3). 결합이 증가된 온도에서 실시되는 경우 상기 스테른-볼머 플롯의 기울기가 감소하였는데, 이는 상기 복합체의 감소된 형광 강도가 정적 퀀칭(static quenching)에 기반한다는 것을 의미한다. 세 개의 다른 온도에서 스테른-볼머 방정식으로부터 계산되는 관련된 스테른-볼머 상수(K_{sv})가 표 2에 요약되었다.

표 2

T(°C)	$K_{sv} \times 10^{-7}$ (L/몰)
25	9.76
30	7.55
37	5.97

[0080] 다른 온도들에서 스테른-볼머 퀀칭 상수 K_{sv} .

[0082] 상기 복합체의 pH 민감성에 있어서, His 내 이미다졸의 pK_a 가 약 6.2이기 때문에, 상기 폴리펩타이드 내 이미다졸의 질소는 상기 pK_a 값보다 더 낮은 pH를 가지는 산성 조건 하에서 양성자화되므로 폴리-L-His로부터 Co-NTA-Atto488의 해리를 초래한다. pH의 증가와 함께, 리간드들은 3×10^{-16} 의 용해도 산물 상수(K_{sp})를 가지는 성긴 물-가용성 $Co(OH)_2$ 의 형성으로 인해 상기 금속 이온으로부터 해리될 것이다. 동시에, His 잔기들은 탈양성자화되며, 염기성 pH 하에서 소수성을 띄어 상기 폴리펩타이드의 응집을 초래하고 이는 또한 상기 복합체로부터 형광단(fluorophore)의 배출을 유도할 것이다. 중성 범위로부터 쉬프트된 pH에 의한 이러한 형광단의 배출은 산성 및 염기성 조건 모두에서 턴-온 시그널로서 이용될 수 있는 형광 강도를 회복시킨다. 따라서, 상기 프로브의 형광 강도가 다양한 pH 조건들 하에서 측정되는 경우, 도 4에서 보여지듯이 pH 7 근처에서 가장 낮은 시그널을 가지는 V-형태 곡선이 얻어졌는데, 이는 상기 Co-NTA-Atto488/폴리-L-His 복합체가 이중 턴-온 프로브로서 이용될 가능성을 가진다는 것을 의미한다. 이와 대조적으로, Co-NTA-Atto488 또는 NTA-Atto488 단독의 형광 방출은 그러한 이중 pH-민감도를 나타내지 않았다(도 5). 상기 pH-의존적 시그널 변화의 가역성은 산성 영역에서

순환하는 두 개의 pH 상태들(pH 4 및 pH 7)에서의 형광 강도를 모니터링하면서 평가되었다. 상기 프로브 복합체의 pH-유발된 결합/해리 과정은 4번의 사이클 동안 합리적인 가역성을 나타냈다(도 6). 하지만, 상기 시그널 가역성은 염기성 영역에서는 관찰되지 않았다. 이것은 금속 이온이 공동작용 산물의 형성에 대해 NTA-Atto488에 의해 접근가능하지 않는 불용성 코발트(II) 하이드록사이드의 형성으로 인한 것으로 추정된다.

[0083] 상기 프로브의 pH-의존적 턴-온 시그널을 관찰한 후, 본 발명자들은 상기 프로브를 이용한 효소 어세이들을 실시하였다. 페니실리나제가 산성-발생 효소에 대한 모델 효소로서 선택되었다. 항생제-저항성 박테리아에서 관찰되었던 페니실리나제는 β -락탐-기반된 항생제들의 락탐 고리를 절단하는 β -락타마제로 상기 항생제를 무력화시킨다. 베타-락타마제에 의한 페니실린 G의 페니실린 산으로의 가수분해는 용액의 pH를 낮추어 박테리아의 약물 저항성을 검출하기 위한 pH 지시인자들에 의해 모니터링될 수 있다[8]. 상기 효소, 상기 프로브 및 항생제를 포함하는 반응 혼합물의 형광 강도가 상온에서 30분 동안의 반응 후 측정되었다. 효소가 없는 대조군 반응에서 관찰되는 강도와 비교하여, 효소 반응에서의 시그널은 현저하게 증가하였다(도 7a). 억제된 형광 강도는 반응 동안 상기 효소 억제제(글라볼란산)의 존재 하에서 기록되었는데, 이는 상기 시그널의 증가가 효소 활성화에 대해 특이적이라는 것을 나타냈다. 상기 프로브를 이용하여 결정된 클라볼란산칼륨의 IC_{50} 값은 $3.25 \mu M$ 이었는데, 상기 값은 이전에 보고된 값에 필적하였다(도 8a)[9].

[0084] 상기 프로브를 이용하여 산성-발생 효소의 성공적인 어세이 후, 본 발명자들은 염기성-발생 효소인 아데노신 디아미나제(ADA)의 어세이에 상기 프로브를 이용할 수 있는지를 조사하였다. ADA는 하이드록시기를 가지는 아데닌 염기의 외향 고리 아민을 대체하여 이노신을 생산하고, 암모니아를 배출하여 용액의 pH를 증가시킨다. ADA의 활성화는 결핵성 늑막 유출의 진단을 위해 일반적으로 이용되는 마커이다. ADA, 아데노신 및 상기 프로브를 포함하는 반응 혼합물을 30분 동안 반응시키는 경우, 형광 강도의 두드러진 증가가 관찰되었다(도 7b). 이와 대조적으로, ADA 억제제인 에리트르-9-(2-하이드록시-3-논일)아데노신(EHNA)의 존재 하에서의 반응 혼합물 또는 효소의 부재 하에서의 반응 혼합물은 발광 시그널의 어떠한 두드러진 증가를 보이지 않았는데, 이는 상기 프로브가 ADA 활성을 모니터링하는 데 이용될 수 있다는 것을 의미한다. 상기 프로브를 이용하여 결정된 억제제의 IC_{50} 값은 $1.23 mM$ 이었다(도 8b). 이러한 IC_{50} 값은 ADA1 이소형을 이용하여 결정된 이전에 공개된 IC_{50} 값보다 더 높았으나, EHNA-불감성 ADA2 이소형의 값에 근접하였다[10].

[0085] 본 발명자들의 프로브가 완충액 용액에서 효소 활성을 측정하는 데 이용될 수 있다는 것을 보여주는 상술한 결과들에 힘입어, 본 발명자들은 환자 시료로부터 분리된 β -락타마제-함유 박테리아의 검출에 상기 프로브를 사용하고자 시도함으로써 상기 프로브의 실제적 유용성을 추가적으로 테스트하였다. 베타-락타마제-양성 및 -음성 스트레인들의 용해물이 β -락탐-유래된 항생제 및 프로브와 반응된 후, 각 시료의 형광 강도가 측정되었다. 상기 β -락타마제 활성화는 상기 프로브의 시그널 증가에 의해 증명되었다(도 9). 모든 20개의 음성 스트레인들은 측정 포인트와 무관하게 음성 결과들을 나타냈다. 24개의 β -락타마제-양성 스트레인들 중에서, 20, 21, 및 21개의 스트레인들이 30분, 60분 및 90분에서 각각 83.3%, 87.5% 및 87.5%의 민감도로 구별된 양성 결과들을 명확하게 산출하였다(도 10). 60분 전에 양성 결과들을 나타내지 않았던 스트레인들은 3개의 K. 뉴모니에 스트레인들이었다. 본 연구에서 상기 테스트된 CTX-M 타입들[11], 예컨대 그룹 1, 그룹 2 및 그룹 9 스트레인들은 60분에 각각 82.4%, 100% 및 100%의 민감도를 나타냈다(표 1). 상술한 결과들은 본 발명자들의 프로브가 β -락타마제-생산 스트레인들을 구별하는 데 이용될 수 있음을 보여준다.

[0086] 요약하면, 본 발명자들은 산성 및 염기성 용액 모두에서 형광 시그널의 증가를 나타내는 폴리-L-His/Co-NTA-Atto488 복합체를 고안하여 제조하였다. 상기 프로브의 pH-민감성 이중 턴-온 특성을 확인한 후, 본 발명자들은 산도 및 염기도를 발생시키는 모델 효소들의 활성을 모니터링하는 데 상기 프로브를 이용하였고, 상기 프로브가 양 타입의 효소들에서 공통적으로 신규한 시그널 보고 시스템으로서 채택될 수 있다는 것을 증명하였다. 상술한 결과들에 기반하여, 상기 프로브를 포함하는 신규한 어세이 방법의 추가적인 실제 적용가능성이 pH-변화 효소를 포함하는 약물-저항성 박테리아의 검출에서 성공적으로 확인되었다. 따라서, 본 발명자들은 본 연구에서 제시되는 이중 턴-온 프로브가 pH-변화 효소들에 대한 다양한 어세이에 보편적으로 이용될 수 있고 연구 적용 뿐 아니라 임상적 진단학 및 병원체 동정을 포함하는 다양한 분야들에서 유용할 수 있다고 예상한다.

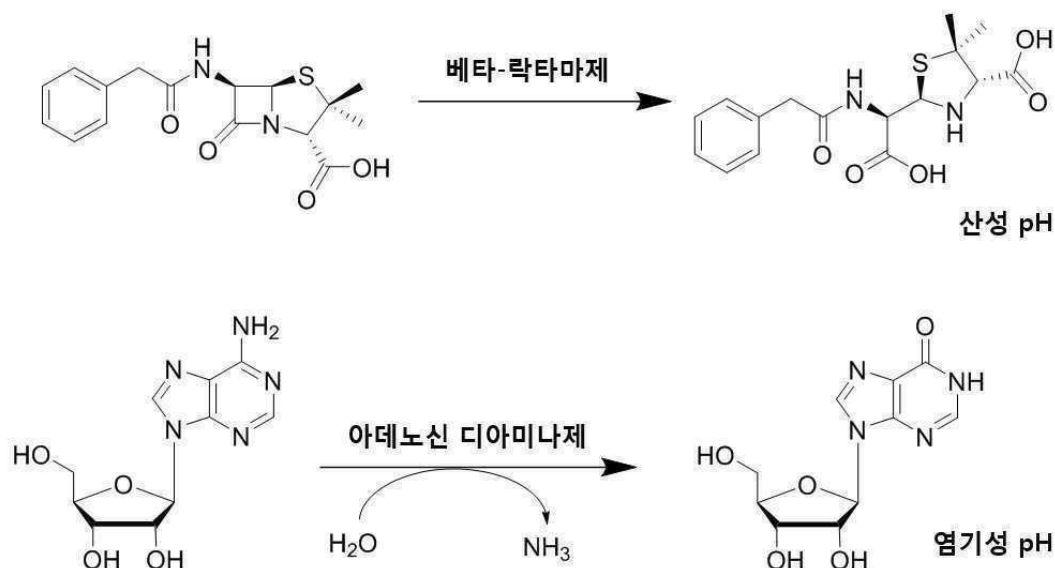
[0087] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 일 구현예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백한 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0088] **참고문헌**

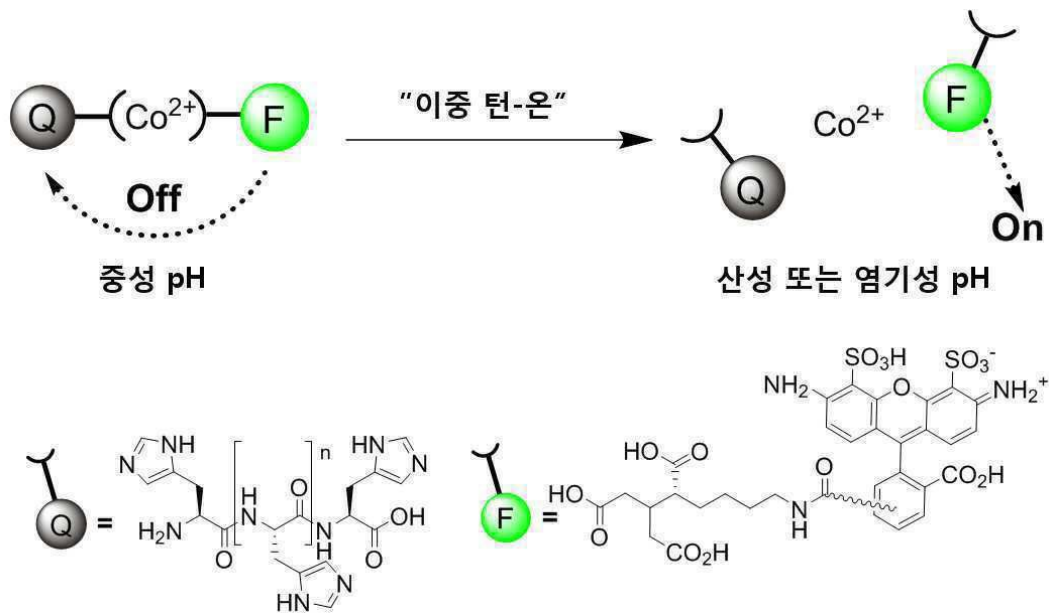
- [0089] [1] a) J. -L. Reymond, V. Fluxa, N. Mailard, Chem. Commun. 2009, 45, 34-46; b) E. Kisin-Finter, S. Ferber, R. Blau, R. Satchi-Fainaro, D. Shabat, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014, 24, 2453-2458; c) C. Wang, S. Yan, R. Huang, S. Feng, B. Fu, X. Weng, X. Zhou, Analyst 2013, 138, 2825-2828.
- [0090] [2] a) U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, H. H. Meyer, Bioorg. Med. Chem. 1999, 7, 2169-2173; b) L. Yao, Y. Li, Y. Wu, A. Liu, H. Yan, Biochemistry 2005, 44, 5940-5947; c) P. Nordmann, L. Dortet, L. Poirel, J Clin Microbiol 2012, 50, 3016-3022.
- [0091] [3] a) J. Han, K. Burgess, Chem. Rev. 2010, 110, 2709-2728; b) M. F. Abad, G. Di Benedetto, P.J. Magalhaes, L. Filippin, T. Pozzan, J. Bio. Chem. 2004, 279, 11521-11529.
- [0092] [4] a) K. Zhou, H. Liu, S. Zhang, X. Huang, Y. Wang, G. Huang, B. Sumer, J. Gao, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 7803-7811; b) A. Bender, Z. R. Woydziak, L. Fu, M. Branden, Z. Zhou, B. Ackley, B. Peterson, ACS Chem. Biol. 2013, 8, 636-642.
- [0093] [5] Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. 2007.Detection of extended-spectrum beta-lactamases by using boronic acid as an AmpC beta-lactamase inhibitor in clinical isolates of Klebsiella spp. and Escherichia coli. J ClinMicrobiol 45:1180-4.
- [0094] [6] Nordmann P, Poirel L, Dortet L. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.Emerg Infect Dis 18: 1503-1507.
- [0095] [7] a) S. Arai, S.-I. Yoon, A. Murata, M. Takabayashi, X. Wu, Y. Lu, S. Takeoka, M. Ozaki, Biochem. Biophys. Res. Comm. 2011, 404, 211-216; b) V. C. Rucker, A. R. Dunn, S. Sharma, P. B. Dervan, H. B. Gray, J. Phy. Chem. B2004, 108, 7490-7494.
- [0096] [8] a) D.M Livermore, D.F. Brown, J.Antimicrob.Chemother.2001, 48, 59-64; b) P. Nordmann, L. Poirel, L. Dortet, Emerg. Infect. Dis.2012, 18, 1503-1507.
- [0097] [9] D.J. Payne, R. Cramp, D.J. Winstanley, D.J. Knowles, Antimicrob. Agents.Chemother.1994, 38, 767-772; b) J. P. Durkin, T. Viswanatha, J. Antibiotics1978, 31, 1162-1169.
- [0098] [10] T. Muraoka, T. Katsuramaki, H. Shiraishi, M. M. Yokoyama, Anal. Biochem.1990, 187, 268-272.
- [0099] [11] R. Bonnet, Antimicrob. Agents Chemother. 2004, 48, 1-14.

도면

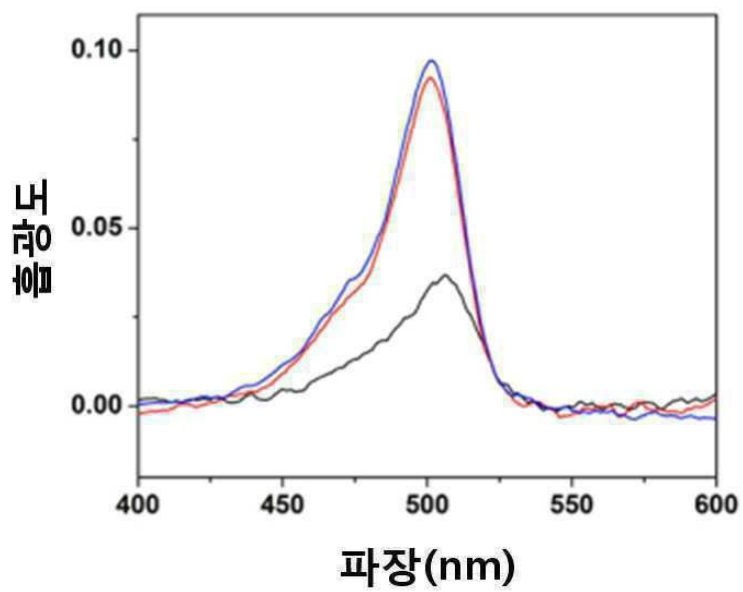
도면1a



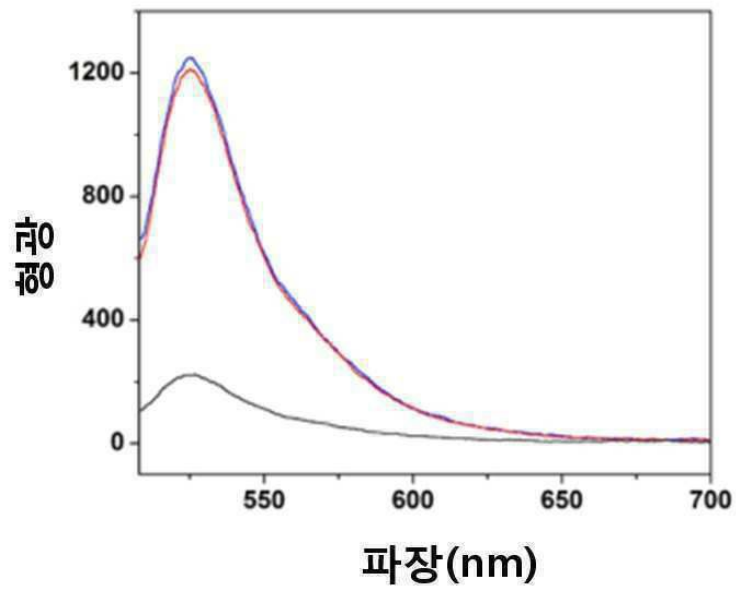
도면1b



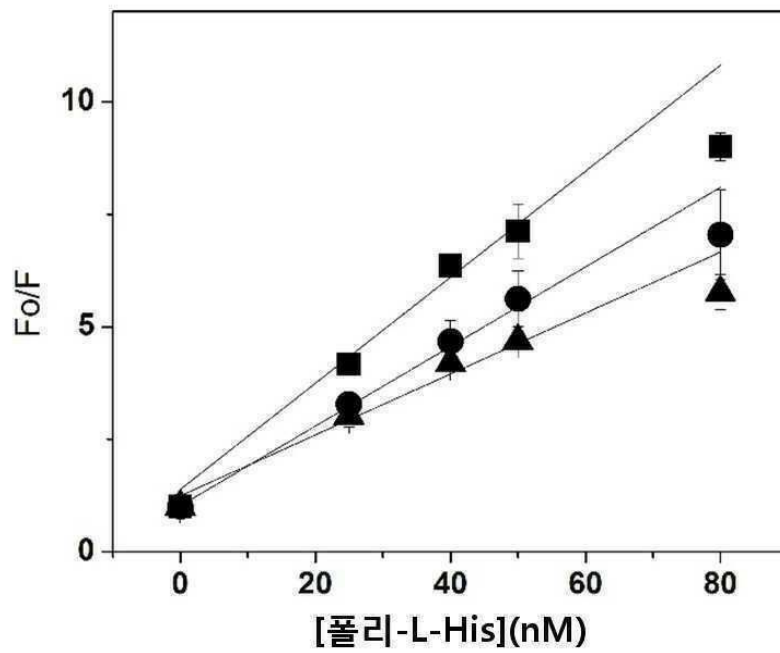
도면2a



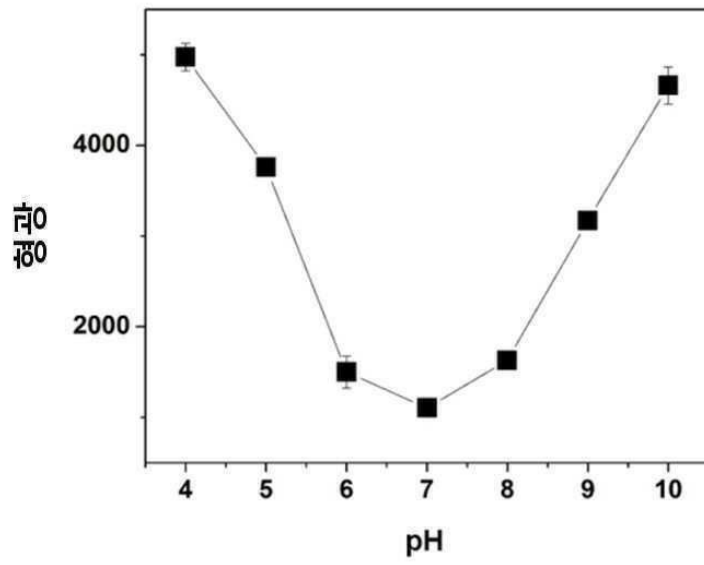
도면2b



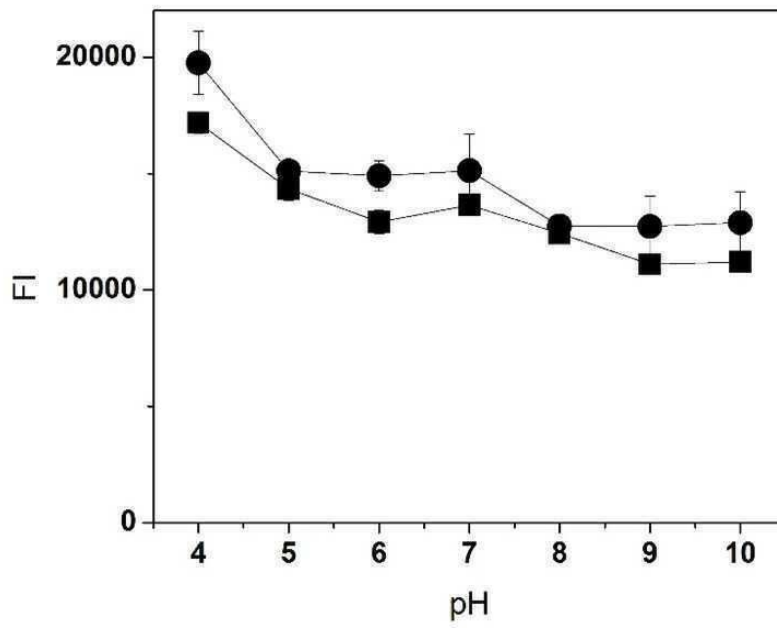
도면3



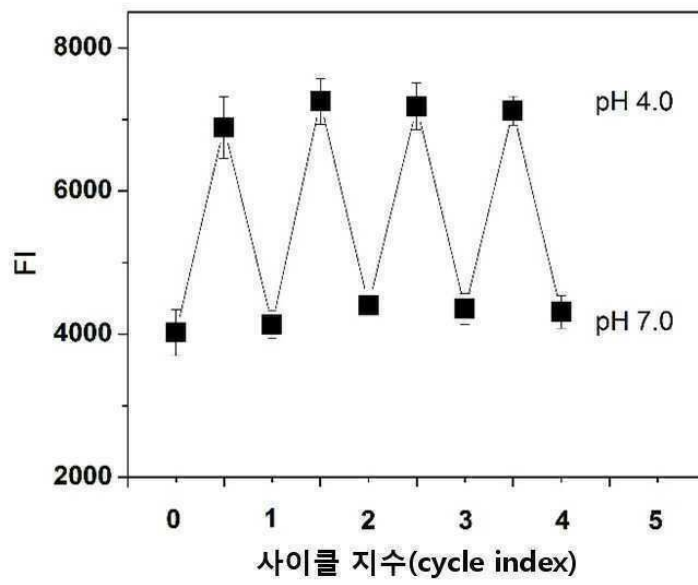
도면4



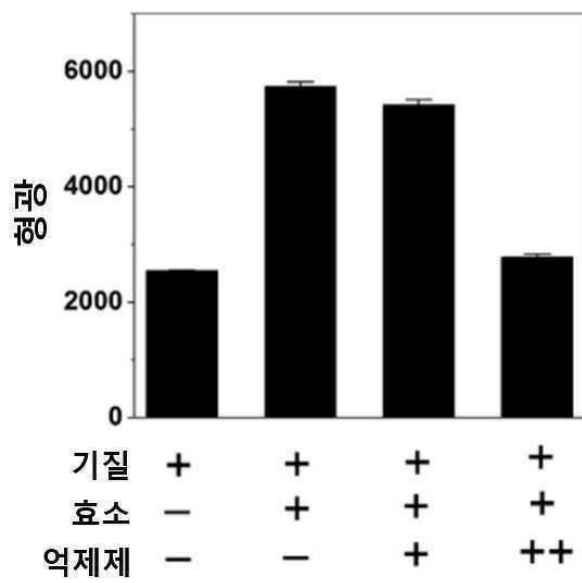
도면5



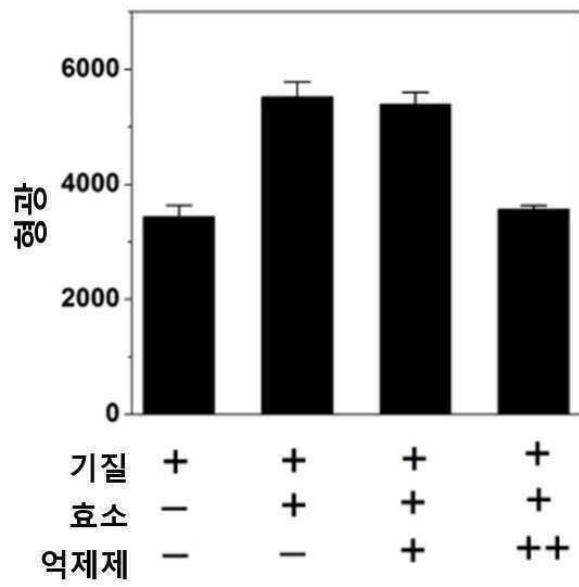
도면6



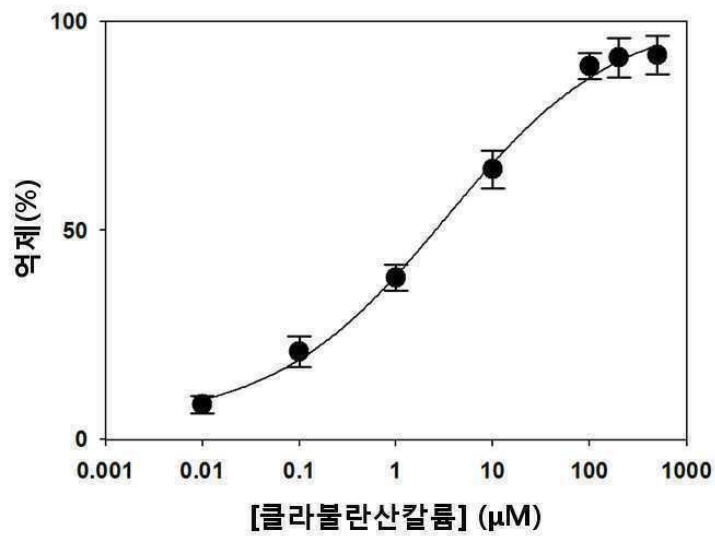
도면7a



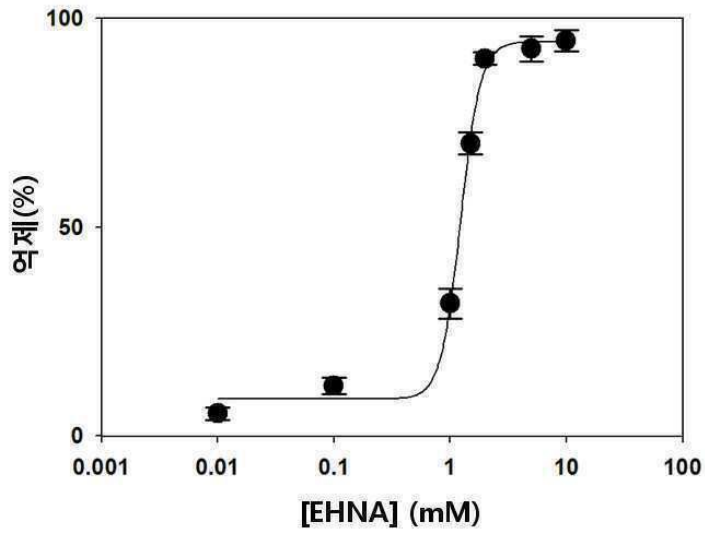
도면7b



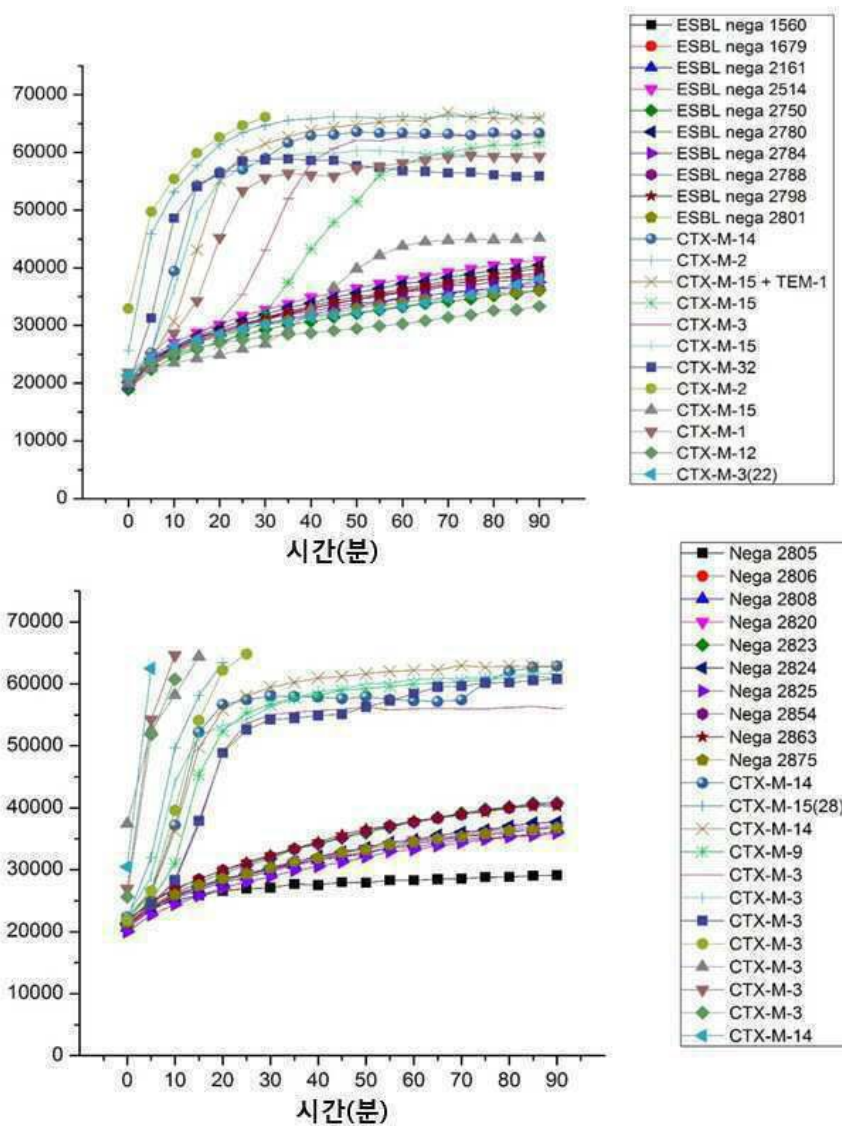
도면8a



도면8b



도면9



도면10

