



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0167973
(43) 공개일자 2022년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/26 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/26 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0077412
(22) 출원일자 2021년06월15일
심사청구일자 2021년06월15일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
조주현
경상남도 진주시 강변길 31, 103동 1401호(가좌동, 가호 에일린의 뜰 아파트)
김현
경상남도 사천시 정동면 읍동길 27, 102동 1205호(사천청구타운)
(74) 대리인
김순웅

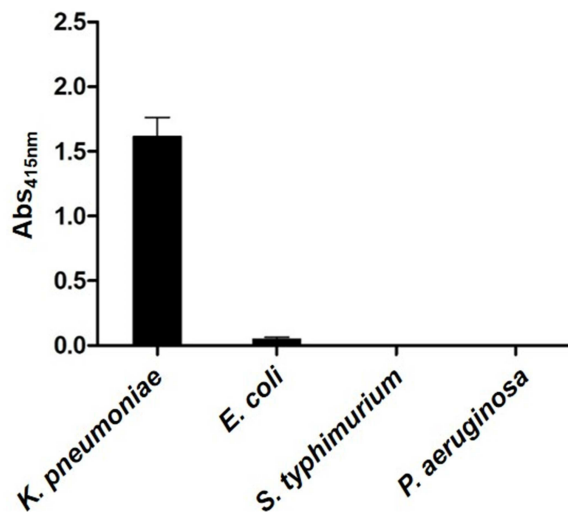
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 폐렴간균 검출용 신규한 펩타이드

(57) 요약

본 발명은 박테리오파지 디스플레이 스크리닝을 이용하여 발굴한 신규한 펩타이드에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 상기 펩타이드는 폐렴간균의 LPS(lipopolysaccharide)의 핵심 다당류(core oligosaccharide) 또는 O항원(O-antigen)에 결합하여, 폐렴간균을 특이적으로 검출하며, 높은 특이성 및 민감도를 보이는 바, 이를 폐렴간균 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환의 진단을 위하여 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/56916 (2013.01)

(72) 발명자

장주혜

경상남도 사천시 정동면 읍동길 27, 102동 1205호
(사천청구타운)

오창재

경상남도 사천시 용현면 진삼로 580, 101동 701호
(용현휴먼시아)

정인영

경상남도 진주시 모덕로223번길 5, 2층 (하대동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345323139
과제번호	2020R1I1A3051795
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	장관감염 치료용 live biotherapeutics 개발
기 여 율	6/10
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345320035
과제번호	2020R1I1A1A01051710
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	여드름 치료용 다기능 항균펩타이드 개발
기 여 율	4/10
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출 또는 동정용 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 D형, L형, 펩토이드 모노머를 포함한 펩타이드 모방체 또는 비천연 아미노산 중의 어느 하나의 아미노산을 갖는 것을 특징으로 하는, 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 이중체(dimer), 삼중체(trimer) 또는 다중체(multimer)인 것을 특징으로 하는, 펩타이드.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 발색효소, 방사선 동위원소, 크로모포어(chromopore), 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 하는, 폐렴간균 검출 또는 동정용 펩타이드.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 바이오칩.

청구항 7

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 키트.

청구항 8

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 펩타이드는 시료 내 폐렴간균의 LPS(lipopolysaccharide)에 결합하는 것을 특징으로 하는, 정보 제공 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 펩타이드는 시료 내 폐렴간균 LPS(lipopolysaccharide)의 핵심 다당류(core oligosaccharide) 및 O항원(O-antigen)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상에 결합하는 것을 특징으로 하는, 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폐렴간균 검출용 신규한 펩타이드 및 이의 용도에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 폐렴간균(*Klebsiella Pneumoniae*)은 장내세균속(*Enterobacteriaceae*)에 속하는 균주로, 직경 약 0.5 μm , 길이 약 2 μm 크기이며, 약 160 nm의 두터운 캡슐(capsule)을 형성하는 그람음성균이다. 상기 폐렴간균은 주로 인체의 구강, 피부 및 장관에 정상세균총으로 상재할 수 있다.

[0004] 폐렴간균은 기회감염성 병원균(opportunistic pathogen)으로 원내감염의 주요 원인균 중 하나로 알려져 있으며, 주로 신생아, 당뇨병, 암환자 및 노인 등의 면역력이 약한 환자에게 폐렴, 기관지염, 요로감염, 균혈증(bacteremia), 간농양(liver abscess) 및 상처감염을 유발한다. 특히 최근 고병원성(hypervirulent) 폐렴간균의 출현 및 항생제 내성 균주(extended spectrum β -lactamase, carbapenemase 생성 균주)가 증가함에 따라 폐렴구균에 의한 감염 치료는 어려워지는 추세이다.

[0005] 이러한 병원균 감염의 적절한 치료와 발병의 통제를 위해서는 신속하고 민감한 병원균 검출이 필요하다. 기존의 감염 원인 미생물에 대한 검사는 세균배양검사를 통해 이루어져 왔으나 정확도가 낮으며 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 이를 극복하기 위하여 최근에는 병원균의 신속한 진단을 위해 분자진단법과 면역-화학진단법이 많이 사용되고 있다. 상기 분자진단법은 대부분 미생물의 특정 유전자를 PCR 및 real-time PCR등의 기기를 이용하여 확인하는 것으로 세포배양법에 비해 짧은 시간 내에 고감도로 검출이 가능하다는 장점이 있으나, 고가의 기기 및 전문인력이 필요한 단점이 있다. 상기 면역-화학진단법은 질병의 원인이 되는 특정 물질을 항원-항체 반응을 통해 측정하는 방법으로, 정확도가 비교적 높고, 빠른 결과를 얻을 수 있어 현재 질병진단에 광범위하게 사용되고 있으나 항체제작의 고비용, 주위 환경에 대한 낮은 안정성, 교차반응 가능성, 낮은 민감도 등의 문제가 있다.

[0006] 따라서 기존 폐렴간균 진단 방법의 문제점을 보완한, 보다 높은 물리화학적 안정성, 민감도, 응용성 등의 특징을 가진 폐렴간균 검출 기술의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여, 폐렴간균 진단을 위해 사용되는 항체를 대체할 수 있는 새로운 진단 물질에 대하여 연구하던 중, 폐렴간균에 특이적으로 결합하는 신규한 펩타이드를 발굴하고 상기 펩타이드가 폐렴간균만 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출 또는 동정용 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 바이오칩을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출 또는 동정용 펩타이드를 제공한다.
- [0016] 또한 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 포함하는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 포함하는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 바이오칩을 제공한다.
- [0018] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 포함하는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0019] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 생물학적 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 신규한 폐렴간균 검출용 펩타이드는 폐렴간균의 LPS(lipopolysaccharide)의 핵심 다당류(core oligosaccharide) 또는 O항원(O-antigen)에 결합하여, 폐렴간균을 특이적으로 검출하며, 높은 특이성 및 민감도를 보이는 바, 이를 폐렴간균 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환의 진단을 위한 조성물에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명에 따라 선별된 파지의 폐렴간균에 대한 결합 특이성을 확인한 결과이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 펩타이드의 폐렴간균에 대한 결합 특이성을 ELISA를 이용하여 확인한 결과이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 펩타이드의 폐렴간균에 대한 결합 특이성을 공초점 주사 레이저 현미경을 이용하여 확인한 결과이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 펩타이드의 폐렴간균에 대한 타겟 물질을 확인한 결과이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 펩타이드와 기존 항-폐렴간균 항체(anti-*Klebsiella* antibody)의 폐렴간균에 대한 특이성(specificity) 및 민감도(sensitivity)를 확인하여 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

- [0025] 본 발명은 폐렴간균 진단을 위해 사용되는 항체를 대체할 수 있는 새로운 진단 물질에 대한 것으로, 하기 서열 번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출 또는 동정용 펩타이드를 제공한다.
- [0026] TSATKFMNLS(서열번호 1).
- [0027] 상기 서열번호 1로 표시되는, 본 발명에 따른 펩타이드의 아미노산 서열은 박테리오파지 랜덤 펩타이드 라이브러리(M13 파지 pIII 마이너 코트 단백질에 융합된 선형 12개의 아미노산으로 구성된 무작위 배열을 통하여 10억 개의 다양한 아미노산 서열을 가지도록 제작된 파지 펩타이드 라이브러리-Ph.DTM(Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs, UK)를 이용하여 폐렴간균에 결합하는 서열을 찾아낸 것이다.
- [0028] 본 발명에 따른 펩타이드는 저분자 펩타이드로서 그 크기가 작아서 3차원적으로 안정화되어 있고 접막을 쉽게 통과하며 조직 깊은 곳에서도 분자 목표물을 인지할 수 있는 장점이 있다. 또한 본 발명에 따른 저분자 펩타이드는 대량 생산이 항체에 비해 상대적으로 간단하고, 독성이 거의 없다. 이외에도 본 발명에 따른 저분자 펩타이드는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다.
- [0029] 본 발명에 따른 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로는 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC(9-fluorenylmethoxycarbonyl) 또는 T-BOC(tert-butyloxycarbonyl) 화학법이 포함되나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 펩타이드는 유전공학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 우선, 통상적인 방법에 따라 상기 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열을 작제한다. DNA 서열은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 작제할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(예: Biosearch 또는 Applied Biosystems사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 제작된 DNA 서열은 이 DNA 서열에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 그 DNA 서열의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 DNA 서열에 의해 코딩된 실질적으로 순수한 펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 이 기술분야에서 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 '실질적으로 순수한 펩타이드'라 함은 본 발명에 따른 펩타이드가 숙주로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다. 더불어 본 발명에 따른 펩타이드는 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위해서 N 말단 또는 C 말단을 변형하거나 여러 유기단으로 보호한 형태일 수 있다. 즉, 상기 펩타이드의 C 말단은 안정성을 증가시키기 위해서 변형될 수 있는 형태라면, 특별한 제한은 없으나 바람직하게는 히드록시기(-OH) 또는 아미노기(-NH₂)로 변형되는 것일 수 있다. 또한 상기 펩타이드의 N 말단은 안정성을 증가시키기 위해서 변형될 수 있는 형태라면, 특별한 제한은 없으나 바람직하게는 아세틸(Acetyl)기, 플루오레닐 메톡시카르보닐(Fmoc)기, 포르밀(Formyl)기, 팔미토일(Palmitoyl)기, 미리스틸(Myristyl)기, 스테아릴(Stearyl)기 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 이루어진 군에서 선택되는 기로 변형되는 것일 수 있다.
- [0030] 또한 본 발명에 따른 펩타이드는 D형, L형, 펩타이드 모노머를 포함한 펩타이드 모방체 또는 비천연 아미노산 중의 어느 하나의 아미노산을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 또한 본 발명에 따른 펩타이드는 이중체(dimer), 삼중체(trimer) 또는 다중체(multimer)인 것을 특징으로 하며, N 말단 혹은 C 말단에 다양한 기능기를 포함할 수 있다.
- [0032] 상기 다양한 기능기의 예시로서, N 말단의 기능기는 자유아민(free amine), 아세틸화(acetylation), 비오틴(biotin) 및 형광단(fluorophore)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있고, C 말단의 기능기는 유리산(free acid), 아미드화(amidation), 비오틴(biotin) 및 형광단(fluorophore)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 더불어 본 발명에 따른 펩타이드는 검출 또는 동정을 위하여 표지될 수 있으며, 발색효소, 방사선 동위원소, 크로모포어(chromophore), 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로 표지될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 발색효소는 예를 들어, 퍼옥시다제(oxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase)일 수 있고, 상기 방사성 동위원소는 예를 들어, 124I, 125I, 111In, 99mTc, 32P, 35S일 수 있으며, 상기 발광물질 또는 형광물질은 예를 들어, FITC, RITC, 로다민(rhodamine), 텍사스레드(Texas Red), 플루레신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 퀀텀닷(quantum dots) 등일 수 있다.

- [0034] 유사하게, 상기 검출 가능한 표지는 항체 에피토프(epitope), 기질(substrate), 보조인자(cofactor), 저해제 또는 친화 리간드일 수 있다. 이러한 표지는 본 발명의 펩타이드를 합성하는 과정 중에 수행할 수도 있고, 이미 합성된 펩타이드에 추가로 수행될 수도 있다.
- [0035] 만약 검출가능한 표지로 형광물질을 이용하는 경우에는 형광단층촬영(Fluorescence mediated tomography, FMT)으로 폐렴간균에 결합한 펩타이드의 형광 패턴을 관찰할 수 있고, 형광이 관찰되는 패턴에 따라, 폐렴간균을 검출 또는 동정할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 폐렴간균 검출 또는 동정용 펩타이드 범위에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 펩타이드와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이를 포함하는데에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0037] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [0038] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신 (+4.5); 발린 (+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글라이신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 타이로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5).
- [0039] 펩타이드의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유했을 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0040] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 펩타이드를 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스파르테이트(+3.0 $\pm$ 1); 글루타메이트 (+3.0 $\pm$ 1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글라이신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 $\pm$ 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 루이신 (-1.8); 아이소루이신 (-1.8); 타이로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4).
- [0041] 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0042] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [0043] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 폐렴간균 검출 또는 동정용 펩타이드는 서열 목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 펩타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열 비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있는 어떤 방법이라도 제한없이 사용할 수 있다.
- [0044] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 포함하는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 "바이오마커"는 생체 내 변화를 알아낼 수 있는 지표로서, 생명체의 정상 또는 병리적

인 상태, 타겟 균주의 존재 여부, 약물에 대한 반응 정도 등을 객관적으로 측정할 수 있다.

- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 "진단"은 특정 질병 또는 질환, 또는 이의 원인에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함한다.
- [0047] 따라서 본 발명의 바이오마커 조성물은 폐렴간균의 존재 여부, 또는 폐렴간균에 의해 발생할 수 있는 폐렴(pneumonia), 패혈증(septicemia), 기관지염, 비뇨기감염, 연부조직감염과 같은 기회감염(opportunistic infection), 균혈증(bacteremia) 및 간농양(liver abscess) 등의 질환을 진단하는데 사용할 수 있다.
- [0048] 더불어 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 포함하는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 바이오칩을 제공한다.
- [0049] 본 발명에 따른 펩타이드는 바이오칩으로 사용 가능한 다양한 칩 (gold, silver, magnetic bead, silica, graphene, carbon nanotube 등) 상에 특이적으로 고정될 수 있다. 다만, 본 발명의 특징은 전술한 펩타이드의 특징과 관련되며 이와 같이 펩타이드를 바이오칩으로 제조하는 것은 공지기술에 따라 할 수 있는 부분이다. 또한 상기 검출은 표지 혹은 비표지체를 이용하여 수행할 수 있다.
- [0050] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 포함하는 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0051] 본 발명의 폐렴간균 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단용 키트에는 폐렴간균 검출을 위한 펩타이드의 분석 방법에 적합한 하나 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물 또는 장치가 포함될 수 있고, 펩타이드의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액이 추가로 포함될 수 있다. 또한, 안정성을 유지하기 위해, 4℃로 유지된 상태로 제공될 수 있다.
- [0052] 폐렴간균에 결합한 본 발명에 따른 펩타이드의 확인, 검출 및 정량을 용이하게 하기 위하여, 본 발명의 키트에 포함되는 펩타이드는 상술한 바와 같이 표지된 상태로 제공될 수 있다. 한편, 본 발명의 펩타이드가 표지되지 않은 채로 제공되는 경우에는, 본 발명의 키트는 본 발명의 펩타이드의 시험관 내 또는 생체 내에서 폐렴간균과의 결합 정도 또는 그 위치를 탐색하기 위한 성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분은 본 발명의 펩타이드의 표지를 위한 공지의 화합물이거나, 항원-항체반응을 통한 탐색을 위하여 본 발명의 펩타이드 또는 본 발명의 펩타이드와 결합하는 특정 수용체에 대한 항체 또는 이들에 대한 2차 항체 및 이의 검출을 위한 시약일 수 있다. 구체적으로 본 발명의 진단은 종래의 면역분석(immunoassay) 방식 또는 프로토콜을 변형하여 실시될 수 있다. 예컨대, 종래 면역분석에서 항체 대신에, 본 발명의 펩타이드를 사용하고, 프로세스는 동일하게 하여 본 발명의 진단을 실시할 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0054] 본 발명에 있어서 상기 "시료"는 가장 광범위한 의미로 사용된다. 한편으로 이는 검체 또는 배양물(예를 들어 미생물 배양물)을 포함하는 의미이다. 다른 한편으로는 생물학적 및 환경적 시료 양자 모두를 포함하는 의미이다. 더불어 시료는 합성 기원의 검체를 포함할 수 있다. 상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 폐렴간균 검출 또는 동정용 펩타이드는 폐렴간균의 LPS(lipopolysaccharide)의 지질A(lipid A)가 아닌 LPS의 핵심 다당류(core oligosaccharide) 또는 O항원(O-antigen)에 결합하는 것을 확인할 수 있다. 상기 LPS(lipopolysaccharide)는 외막(outer membrane)의 필수적인 부분으로, 지질 A, 핵심 다당류 및 O항원으로 구성된다. 상기 지질 A는 외막과 결합되었으며 내독소 활성을 나타낸다. 더불어 상기 핵심 다당류는 9~12개의 당으로 구성된, 분지된 다당류로 LPS(lipopolysaccharide) 구조와

세균 활성화에 필수적이며, 상기 O항원은 상기 핵심 다당류에 연결되어 군체로부터 뺄어나와 있다.

[0056] 따라서 기존 LPS(lipopolysaccharide)에 결합하는 펩타이드가 그람음성균 외막에 결합된 지질A와 결합하는 것과 달리, 본 발명의 폐렴간균 검출 또는 동정용 펩타이드는 폐렴간균 세포막의 외부로 뺄어나온 핵심 다당류 및 O항원에 결합함으로써 폐렴간균을 빠르고 정확하게 검출할 수 있다. 특히 상기 지질A는 그람음성균의 LPS에서 구조적으로 잘 보존된 반면, 상기 핵심 다당류 및 O항원은 박테리아의 속(genus) 또는 종(species)간에 구조적인 차이를 보이는 바, 본 발명의 폐렴간균 검출 또는 동정용 펩타이드는 기존 LPS 결합 펩타이드 대비 폐렴간균에 대하여 매우 향상된 특이성을 가짐을 특징으로 한다.

[0057] 그러므로 본 발명의 폐렴간균 검출, 동정 또는 진단하는 방법에 있어서, 시료 내 폐렴간균의 LPS(lipopolysaccharide)와 결합된 본 발명에 따른 펩타이드를 측정하여 폐렴간균의 존재를 검출, 동정 또는 폐렴간균에 의한 질환의 발생 여부를 진단하는 것이다. 보다 바람직하게는 폐렴간균 LPS(lipopolysaccharide)의 핵심 다당류(core oligosaccharide) 및 O항원(O-antigen)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상에 결합된 본 발명의 펩타이드를 측정하는 것을 특징으로 한다.

[0059] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0061] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0063] 실시예 1. 폐렴간균에 특이적인 펩타이드의 발굴

[0064] 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae*)에 특이적인 펩타이드를 발굴하기 위하여 폐렴간균을 대상으로 박테리오파지 랜덤 펩타이드 라이브러리 스크리닝을 수행하였다. 상기 박테리오파지 랜덤 펩타이드 라이브러리는 Ph.DTM-12 (New England Biolab)를 사용하였으며, 총 6회의 패닝(panning)을 수행하였다.

[0065] 보다 구체적으로, 폐렴간균(*K. pneumoniae* KCTC2208)을 PBS(phosphate buffered saline)를 이용하여 3회 세척한 후, OD_{600nm}=1이 되도록 희석하였다. 이를 96-웰 플레이트(Nunc Maxisorp, Thermofisher Scientific, USA) 웰당 100 μ l씩 넣고 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켜 폐렴간균을 코팅하였다. 그런 후 3% 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 포함하는 TBS[50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl]를 상기 플레이트에 넣고 상온에서 1시간 동안 처리하여 웰을 블로킹(blocking)하였다. 그 후 TBST[TBS, 0.05% 트윈-20(Tween-20)]를 이용해 웰을 세척하였다. 랜덤화된 펩타이드를 포함하는 박테리오파지(10^{11} PFU/100 μ l)를 웰에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, TBST를 이용하여 폐렴간균에 결합하지 않은 박테리오파지를 제거하였다. 100 μ l의 0.2 M 글리신-HCl(glycine-HCl (pH 2.2))을 이용하여 폐렴간균에 특이적으로 결합하는 박테리오파지를 용출하고, 15 μ l의 Tris-HCl(pH 9.0)을 첨가하여 중화(neutralization)하였다. 그 후, 제조사의 지침에 따라서 20 ml의 ER2738 박테리아로 증폭하였다. 상기 과정을 통하여 폐렴간균에 결합하는 박테리오파지 후보군을 선별하였고, 20개 이상의 파지 클론에서 DNA를 분리한 후 DNA 시퀀싱(sequencing)을 수행하여 아미노산 서열을 확인하였다(표 1).

표 1

후보군	아미노산 서열	서열번호
KP	TSATKFMNLS	1

[0068] 실시예 2. 선별된 파지의 폐렴간균에 대한 결합 특이성 확인

[0069] 파지 결합 ELISA를 통해 상기 실시예 1을 통해 선별된 파지의 폐렴간균에 대한 결합 특이성을 측정하였다. 먼저 폐렴간균(*K. pneumoniae* KCTC2208), 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*, KCTC2223), 살모넬라 티피머리움(*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*, KCTC2370), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*, ATCC27853), 포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, KCTC1621), 고초균(*Bacillus subtilis*, *B.*

subtilis, ATCC6633), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*, *L. lactis*, ATCC11454), 효모(*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*, ATCC44774)를 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 96웰 플레이트에 코팅하고 5% BSA를 포함하는 TBS를 이용하여 블로킹한 다음, TBST를 이용해 웰을 3회 세척하였다. 실시예 1의 선별된 파지 클론(10^{10} pfu)을 100 μ l의 TBS에 넣은 후 상기 세균 또는 효모가 코팅된 웰에 처리하여 상온에서 1시간 반응시켰다. TBST로 상기 웰을 세척한 후, HRP-결합 항-M13 항체(HRP-conjugate anti-M13 antibody(1:5000 희석), New England Biolabs)와 반응시킨 후, ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))를 이용하여 415 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 그 결과 도 1에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 선별된 파지 클론이 폐렴간균에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다.

[0071] 실시예 3. 선별된 펩타이드의 폐렴간균에 대한 결합 특이성 확인

[0072] 3-1. 펩타이드 합성

[0073] 상기 실시예 1의 선별된 파지 클론에 삽입된 TSATKFMNLSNP 아미노산 서열의 펩타이드(이하, KP 펩타이드라 기재(서열번호 1))를 펩타이드 자동화합성기(PeptiEx-R48, 펩트론사)를 이용하여 F-MOC 고체상 방법으로 합성하였다. 합성된 KP 펩타이드는 C18 분석 RP 칼럼(Shiseido capcell pak)을 사용한 역상 HPLC(Prominence LC-20AB, Shimadzu, Japan)로 정제하고, 질량분석기(HP 1100 Series LC/MSD, Hewlett-Packard, USA)를 이용하여 동정 및 확인하였다. 한편, KP 펩타이드의 카복시말단(C 말단)에 비오틴(biotin)을 표지하였다.

[0074] 합성된 KP 펩타이드의 폐렴간균에 대한 결합 특이성은 폐렴간균 및 폐렴간균과 유사한 그람음성균인 대장균, 살모넬라, 녹농균을 대상으로 확인하였다.

[0076] 3-2. ELISA를 이용한 펩타이드 결합 확인

[0077] 폐렴간균 및 그람음성균(대장균, 살모넬라, 녹농균)을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 96웰 플레이트에 1×10^7 CFU/well의 농도로 코팅하고 3% BSA를 포함하는 TBS를 이용하여 블로킹하였다. 바이오틴이 표지된 KP 펩타이드(10μ M)를 세균이 코팅된 웰에 처리하여 상온에서 1시간 반응시킨 다음 TBST로 웰을 씻어준 후, 스트렙타아비딘-HRP(streptavidin-HRP, 1:2000 희석)와 ABTS를 이용하여 415 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

[0078] 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 KP 펩타이드는 유사균종인 다른 그람음성균에는 결합하지 않고 폐렴간균에만 특이적으로 결합함을 확인하였다.

[0080] 3-3. 공초점 주사 레이저 현미경을 이용한 펩타이드 결합 확인

[0081] 먼저 PBS를 이용해 희석한 세균(1×10^7 CFU/ml, 500 μ l)을 poly-L-lysine(폴리-L-리신)이 코팅된 슬라이드 챔버 표면에 고정된 다음, 바이오틴이 표지된 KP 펩타이드(10μ M)를 처리하여 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 그 후 TBS를 이용하여 세균에 부착하지 않은 KP 펩타이드를 제거한 후, 2 μ g/ml의 스트렙타아비딘-알렉사-플루오르 488(streptavidin-Alexa fluor 488)(Invitrogen, USA)을 처리하여 1시간 동안 반응시켰다. 그런 후 FV1000 공초점 주사 레이저 현미경(confocal laser scanning microscopy)(Olympus, Japan))을 이용하여 세균 표면에 존재하는 KP 펩타이드를 확인하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0082] 그 결과 본 발명에 따른 KP 펩타이드는 대장균, 살모넬라 티피머리움 및 녹농균에는 거의 결합하지 않은 반면, 폐렴간균에는 강하게 결합하여 폐렴간균 표면에 높은 농도로 존재하는 것을 확인하였다.

[0084] 실시예 4. 본 발명에 따른 펩타이드의 타겟 물질 동정

[0085] 본 발명에 따른 KP 펩타이드의 타겟 물질을 확인하기 위하여, 그람음성균의 대표적인 표면 물질인 LPS(lipopolysaccharide)와 KP 펩타이드의 결합 여부를 ELISA를 통해 확인하였다. LPS 추출 키트(iNtRON biotechnology, Korea)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 상기 실시예 3에서 사용한 세균으로부터 LPS를 추출하여 그람음성균의 LPS로 사용하였다. LPS 추출 여부를 확인하기 위해 시중에 판매되는 LPS[*K. pneumoniae* ATCC15380, *E. coli* 0111:B4, *S. typhimurium* ATCC7823, *P. aeruginosa* ATCC27316 및 살모넬라 미네소타

(*Salmonella minnesota*, *S. minnesota*) 균주 Re 595(Re 돌연변이(mutant))(Sigma-aldrich)를 함께 사용하였다.

[0086] 탄산염 코팅 버퍼(carbonate coating buffer)를 이용하여 2 μ g/100 μ l로 희석한 LPS를 96웰 플레이트에 코팅한 다음, LPS와 KP펩타이드의 결합 여부를 상기실험에 3과 동일한 방법으로 ELISA를 수행하여 확인하였다. 이때 대조군으로 LPS의 지질 A(lipid A)와 결합한다고 알려진 바이오틴이 표지된 폴리믹신 B(biotinylated polymyxin B, (Hycult biotech, Netherland))를 사용하였다.

[0087] 그 결과 도 4에 나타낸 바와 같이, 폴리믹신 B는 그람음성균의 LPS 및 Re 돌연변이(mutant) LPS와 결합하는 반면, 본 발명에 따른 KP 펩타이드는 다른 그람음성균의 LPS 또는 Re 돌연변이(지질 A)와는 결합하지 않았으며 폐렴간균의 LPS와 결합하는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명에 따른 KP 펩타이드는 폐렴간균의 LPS와 결합하여 특이성을 나타내며, 특히 LPS의 지질 A가 아닌 핵심 다당류(core oligosaccharide) 또는 O-항원(O-antigen)과 특이적으로 결합함을 확인하였다.

[0089] 실시예 5. 본 발명에 따른 펩타이드의 폐렴간균에 대한 특이성 및 민감도 확인

[0090] 본 발명에 따른 KP펩타이드의 폐렴간균에 대한 특이성 및 민감도를 확인하고, 시중에 판매되는 항-폐렴간균 항체(anti-Klebsiella antibody)의 특이성 및 민감도와 비교하였다.

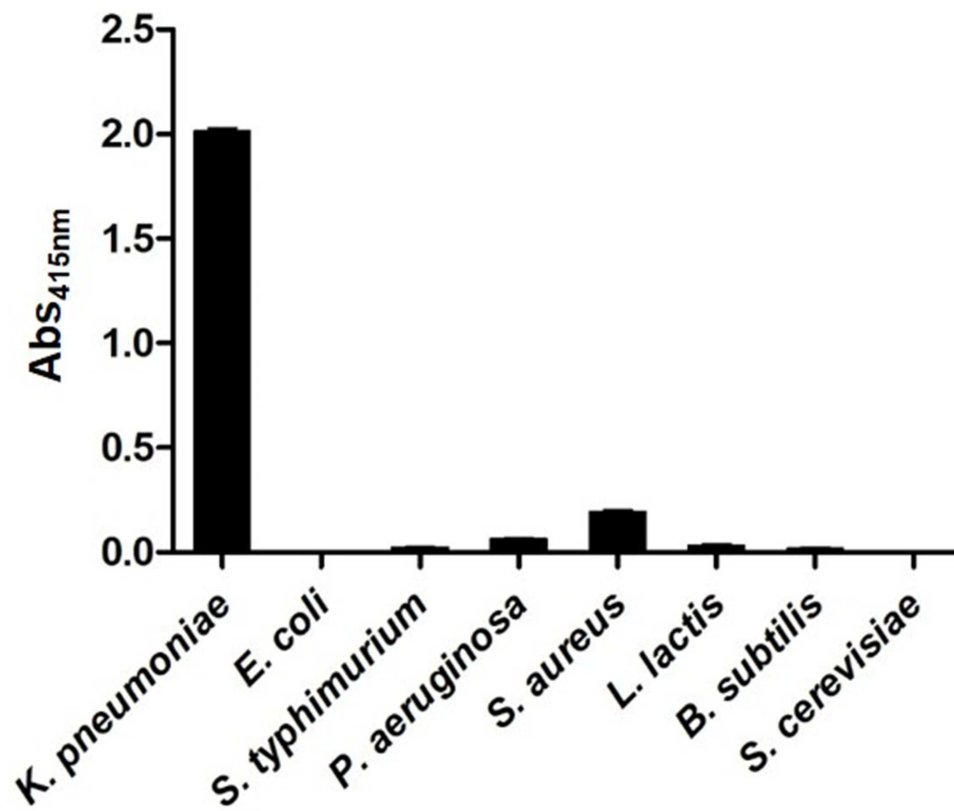
[0091] 이를 위하여 다음과 같이 ELISA를 수행하였다. 10^1 - 10^6 CFU의 폐렴간균 및 그람음성균(대장균, 살모넬라, 녹농균)을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 96웰 플레이트에 코팅한 다음, 3% BSA를 포함하는 TBS를 이용하여 블로킹하였다. 바이오틴이 표지된 본 발명에 따른 KP 펩타이드(10 μ M) 및 항-폐렴간균 항체(anti-Klebsiella antibody)[1:5000 희석, Biotin Anti-Klebsiella spp antibody (Abcam, UK) 또는 Klebsiella Sp. Antibody (biotin)(GeneTex, USA)] 100 μ l를 코팅된 웰에 처리하여 상온에서 1시간 반응시킨 다음 TBST로 웰을 세척하였다. 그 후, 스트렙타아비딘-HRP와 ABTS를 이용하여 415 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

[0092] 그 결과 도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 KP 펩타이드는 기존 항-폐렴간균 항체(anti-Klebsiella antibody)에 비해 폐렴간균에 대하여 높은 특이성(specificity)을 나타내었으며, 10^3 CFU의 폐렴간균도 검출할 수 있는 바, 훨씬 우수한 민감도(sensitivity)를 나타냄을 확인하였다.

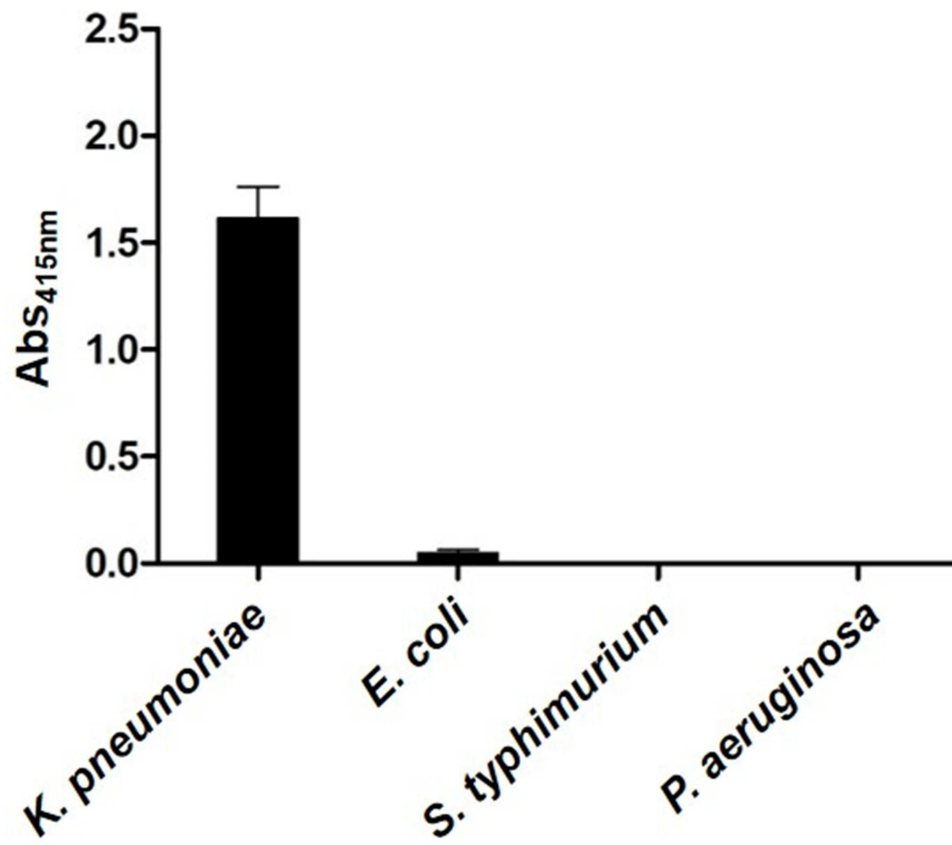
[0094] 종합적으로, 박테리오파지 디스플레이 스크리닝을 이용하여 발굴한 본 발명의 펩타이드는 폐렴간균의 LPS, 특히 LPS의 핵심 다당류(core oligosaccharide) 또는 O-항원(O-antigen)과 특이적으로 결합할 수 있어 폐렴간균에 대한 특이성을 나타낸다. 또한 본 발명에 따른 펩타이드는 기존의 항-폐렴간균 항체(anti-Klebsiella antibody)에 비해 훨씬 우수한 특이성과 민감도를 가지는 것을 확인하였다.

도면

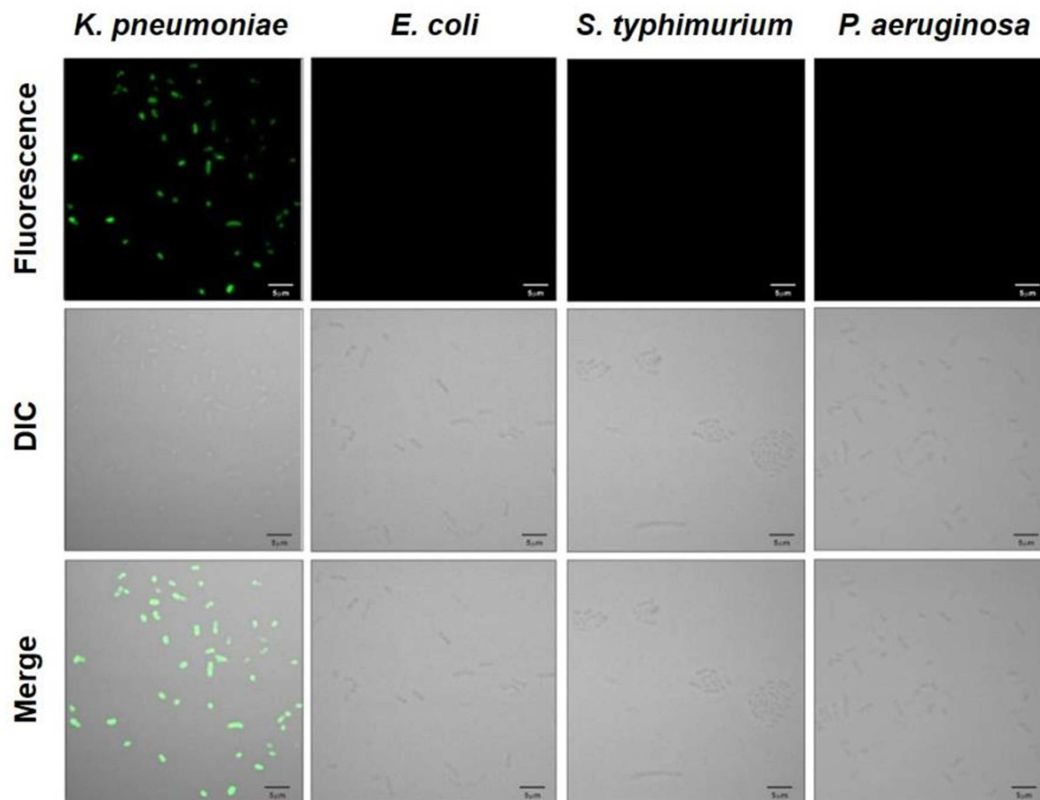
도면1



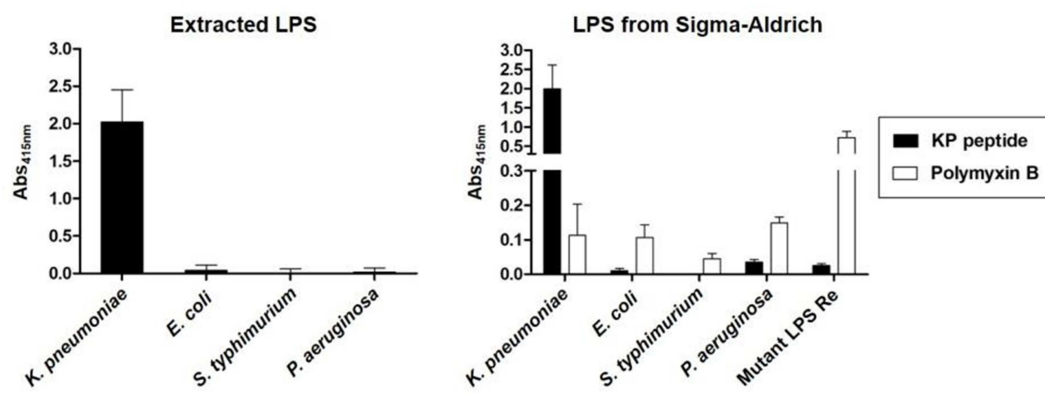
도면2



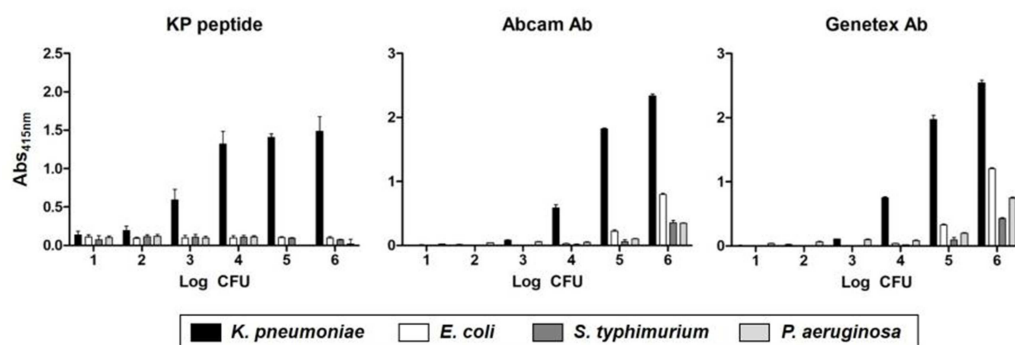
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Novel peptide for specific detection of *Klebsiella pneumoniae*

<130> 1-258P

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KP peptide

<400> 1

Thr Ser Ala Thr Lys Phe Met Met Asn Leu Ser Pro

1

5

10