



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월09일

(11) 등록번호 10-2042182

(24) 등록일자 2019년10월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/573 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/573 (2013.01)
G01N 33/68 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0080937
- (22) 출원일자 2018년07월12일
 심사청구일자 2018년07월12일
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2010503617 A
 (뒷면에 계속)

- (73) 특허권자
 울산과학기술원
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (72) 발명자
 기정민
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 정호영
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 7 항

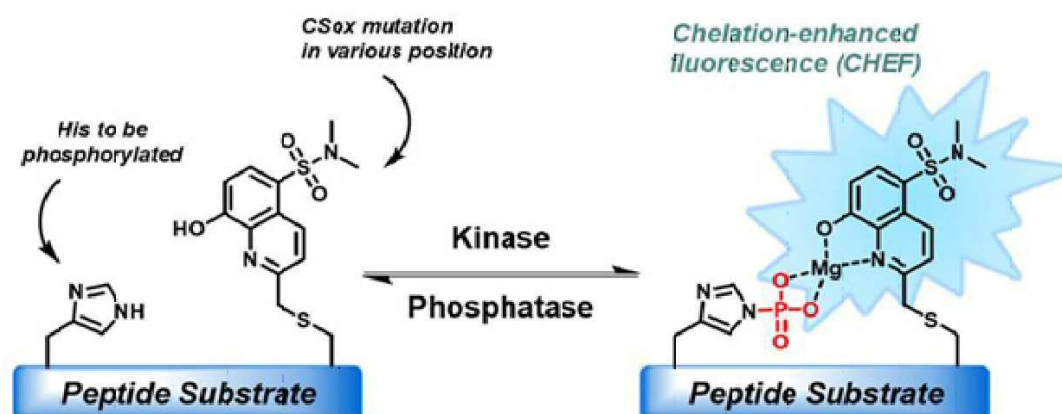
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 강화된 킬레이트화 형광(CHEF; chelation-enhanced fluorescence) 효과를 통해 포스포히스티딘 포스파타아제 1를 실시간으로 검출할 수 있는 프로브 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1) 검출용 프로브는 PHPT1에 대하여만 특이적으로 반응하고, 생물학적 샘플에서 PHPT1 활성을 실시간으로 손쉽게 검출할 수 있으며, 종래 알려진 PHPT1 검출 물질보다 훨씬 적은 양을 사용하여도 PHPT1의 검출이 가능하다. 또한, 암, 당뇨 등의 질병과 관련된 PHPT1를 선택적으로 쉽게 측정함으로써 PHPT1의 활성을 억제 또는 저해할 수 있는 신약 물질을 스크리닝 하는 방법에 적용될 수 있다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
G01N 2333/914 (2013.01)
- (72) 발명자
최이건
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
신선혜
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
권오현
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (56) 선행기술조사문헌
US20110053180 A1
Beck JR et al, ACS Chem Biol (2016), vol 11(1), pp 284-290.
Beck JR et al, ACS Chem Biol (2016), vol 11(12), pp 3284-3288.
Beckman-Sundh U et al, Ups J Med Sci et al (2011), vol 116, pp 161-168.
Zhang XQ et al, Ups J Med Sci et al (2009), vol 114(2), pp 65-72.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711057090
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(미래부)
연구과제명 고에너지 인산화아미노산의 화학생물학적 연구
기 여 율 1/1
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2017.07.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드(peptide)를 포함하고,
상기 펩타이드의 아미노산 서열 중 시스테인(Cys) 잔기에는 설폰아미도 옥신(Sox; sulfonamido-oxine)이 결합되고,
상기 아미노산 서열 중 히스티딘(His) 잔기는 인산화된, 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1; Phosphohistidine Phosphatase 1) 검출용 프로브.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
상기 아미노산 서열의 N-말단에 아세틸기가 결합되고, C-말단에 아민기가 결합된, 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브.

청구항 3

제 2 항에 있어서,
상기 설폰아미도 옥신과 상기 인산화된 히스티딘 잔기 사이에 Mg^{2+} 가 킬레이트 결합된, 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브.

청구항 4

(S1) 모노메톡시트리틸(MMT; Monomethoxytrityl)이 결합된 시스테인(Cys)를 이용하여 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제조하는 단계;
(S2) 제조된 펩타이드를 수지상에서 약산으로 처리하여 상기 모노메톡시트리틸을 제거하는 단계;
(S3) 설폰아미도 옥신 브로마이드(Sox-Br) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민(DIPEA; *N,N*-diisopropylethylamine)을 첨가하여, 수지상 알킬화를 실시하는 단계; 및
(S4) 수지로부터 펩타이드를 절단하고 정제하는 단계;
를 포함하는, 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브의 제조방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,
(S5) 상기 (S4) 단계 후 정제된 펩타이드의 히스티딘 잔기를 인산화하는 단계를 더 포함하는, 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브의 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 프로브를 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 포스포히스티딘 포스파타아제 1을 검출하는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,
상기 프로브는 포스포히스티딘 포스파타아제 1의 탈인산화에 의하여 형광이 감소되는 것을 특징으로 하는, 포스포히스티딘 포스파타아제 1을 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 킬레이트-강화 형광(CHEF; chelation-enhanced fluorescence) 효과를 통해 포스포히스티딘 포스파타아제 1을 실시간으로 검출할 수 있는 프로브 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질 히스티딘 인산화 반응(Protein histidine phosphorylation)은 세포 신호 및 대사 과정에서 중요한 역할을 하며, 특히 박테리아, 진균 및 식물에서 중요한 역할을 한다. 포유동물에서 포스포히스티딘 포스파타아제 (PHPT1; Phosphohistidine phosphatase 1)는 포스포히스티딘(pHis; phosphohistidine) 즉, 인산화된 히스티딘에 특이적으로 반응하는 단백질 포스파타아제 중 하나이며, 대사 단백질뿐만 아니라 다양한 이온 채널(ion channel)의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다. PHPT1은 신장 암, 간세포 암종 및 폐암 세포에서 과발현되며, 그 활성은 암 전이 및 당뇨병과 관련이 있다고 알려져 있다. PHPT1의 발현을 억제하면 세포 증식이나 종양 형성을 감소시킬 수 있기 때문에 PHPT1은 항암 치료법의 잠재적인 표적이 될 수 있다. PHPT1은 산성 불안정성이 높고, 다른 유형의 인산화를 연구하기 위해 사용되는 대부분의 생화학적 방법으로는 측정하기 쉽지 않기 때문에 PHPT1의 히스티딘 인산화 정도를 측정하는 것은 기술적인 어려움이 따른다.

[0003] 종래의 측정 방법으로는 방사선표지(radiolabeling)를 이용한 방법(Baumer, N.; Maurer, A.; Krieglstein, J.; Klumpp, S. Expression of protein histidine phosphatase in *Escherichia coli*, purification, and determination of enzyme activity. Methods Mol. Biol. 2007, 365, 247-260.)이 있으나, 위험하고 기술적으로 어렵다는 문제가 있다. 발색성 또는 형광성을 갖는 소분자 기질들이 또한 사용되기도 하지만(McCullough, B. S.; Barrios, A. M. A Facile, Fluorogenic assay for protein histidine phosphatase activity. *Biochemistry* 2018, Just Accepted Manuscript), 이들은 PHPT1에 대하여 비특이적으로 반응하며, 상기 기질들의 동역학적 매개변수(parameter)는 천연기질들의 그것과는 상이하다는 문제가 있다.

[0004] 따라서, PHPT1 특이적 억제제(PHPT1-specific inhibitor)를 포함하여 PHPT1을 편리하고 정확하게 검출할 수 있는 적절한 방법은 아직까지 많이 알려져 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이와 같은 문제를 해결하기 위해, 본 발명자는 여러 포스파타아제들 중에서 PHPT1에 대하여만 특이적으로 반응하고, 생물학적 샘플에서 PHPT1 활성을 실시간으로 손쉽게 검출할 수 있는 형광성 프로브 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여,

[0007] 본 발명은 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드(peptide) 및 상기 펩타이드의 아미노산 서열 중 시스테인(Cys) 잔기에 결합된 설포아미도 옥신(Sox; sulfonamido-oxine)을 포함하고, 상기 아미노산 서열 중 히스티딘(His) 잔기는 인산화된, 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1; Phosphohistidine Phosphatase 1) 검출용 프로브를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 모노메톡시트리틸(MMT; Monomethoxytrityl)이 결합된 시스테인(Cys)를 이용하여 고체상 펩타이드 합성법(SPPS)으로 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제조하는 단계, 제조된 펩타이드를 약산으로 처리하여 상기 모노메톡시트리틸을 제거하는 단계, 설포아미도 옥신 브로마이드(Sox-Br) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민(DIPEA; *N,N*-diisopropyl ethylamine)을 첨가하여, 수지상 알킬화를 실시하는 단계 및 수지로부터 펩타이드를 절단하고 정제하는 단계를 포함하는 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브의 제조방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 프로브를 시료에 처리하는 단계를 포함하는 포스포히스티딘 포스파타아제 1을 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1) 검출용 프로브는 PHPT1에 대하여만 특이적으로 반응하고, 생물학적 샘플에서 PHPT1 활성을 실시간으로 손쉽게 검출할 수 있으며, 종래 알려진 PHPT1 검출 물질보다 훨씬 적은 양을 사용하여도 PHPT1의 검출이 가능하다. 또한, 암, 당뇨 등의 질병과 관련된 PHPT1를 선택적으로 쉽게 측정함으로써 PHPT1의 활성을 억제 또는 저해할 수 있는 신약 물질을 스크리닝 하는 방법에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 본 발명에 따른 강화된 킬레이트화 형광(CHEF; chelation-enhanced fluorescence) 효과를 이용한 프로브의 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1; Phosphohistidine Phosphatase 1)의 검출원리를 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브의 제조 단계를 도시한 것이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브의 탈인산화 전(Sox-H4P(-2))과 후(Sox-H4(-2))의 Mg^{2+} 농도에 따른 해리상수를 측정한 결과이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브의 탈인산화 전(Sox-H4P(-2))과 후(Sox-H4(-2))의 Mg^{2+} 농도에 따른 형광성의 차이(Fluorescence fold)를 측정한 결과이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브인 Sox-H4(-2)의 인산화 정도와 형광 강도의 선형성을 나타낸 결과이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브인 Sox-H4(-2) 및 Sox-H4P(-2)의 농도에 따른 형광 강도의 선형성을 나타낸 결과이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1) 검출용 프로브인 Sox-H4P의 PHPT1에 대한 특이적 반응성을 시험한 결과이다.
- 도 8은 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1) 검출용 프로브인 Sox-H4P의 농도별 PHPT1 검출능을 시험한 결과이다.
- 도 9는 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1) 검출용 프로브인 Sox-H4P의 탈인산화 반응을 미하엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 포화도로 정량화하여 나타낸 것이다.
- 도 10은 본 발명에 따른 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1) 검출용 프로브인 Sox-H4P에 대한 다양한 종류의 포스파타아제의 탈인산화 반응 여부를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 네 번째 아미노산인 라이신(Lys), 다섯 번째 아미노산인 아르지닌(Arg), 일곱 번째 아미노산인 아르지닌(Arg), 여덟 번째 아미노산인 라이신(Lys) 및 아홉 번째 아미노산인 발린(Val) 중 어느 하나가 시스테인(Cys)으로 치환된 펩타이드(peptide)를 포함하고, 상기 치환된 시스테인(Cys) 잔기에는 설펜아미도 옥신(Sox; sulfonamido-oxine)이 결합되고, 상기 아미노산 서열 중 히스티딘(His) 잔기는 인산화된, 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1; Phosphohistidine Phosphatase 1) 검출용 프로브를 제공한다.
- [0013] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 히스톤 H4의 아미노산 서열에서 유도된 것이다. 히스톤 H4의 18번 위치 히스티딘이 암세포에서 많이 인산화되어 있으며, PHPT1은 상기 18번 위치에 인산화된 히스톤 H4 펩타이드를 탈인산화시킬 수 있다.
- [0014] 하나의 구체적인 실시예로, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서 네 번째 아미노산인 라이신(Lys)이 시스테인(Cys)으로 치환된 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0015] 다른 하나의 구체적인 실시예로, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서 다섯 번째 아미노산인 아르지닌(Arg)이 시스테인(Cys)으로 치환된 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0016] 또 다른 하나의 구체적인 실시예로, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서 일곱 번째 아미노산인 아르지닌(Arg)이 시스테인(Cys)으로 치환된 펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

- [0017] 또 다른 하나의 구체적인 실시예로, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서, 여덟 번째 아미노산인 라이신(Lys)이 시스테인(Cys)으로 치환된 펩타이드는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0018] 또 다른 하나의 구체적인 실시예로, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아홉 번째 아미노산인 발린(Val)이 시스테인(Cys)으로 치환된 펩타이드는 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0019] 본 발명은 상기 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드(peptide)를 포함하고, 상기 펩타이드의 아미노산 서열 중 시스테인(Cys) 잔기에는 설펜아미도 옥신(Sox; sulfonamido-oxine)이 결합되고, 상기 아미노산 서열 중 히스티딘(His) 잔기는 인산화된, 포스포히스티딘 포스파타아제 1(PHPT1; Phosphohistidine Phosphatase 1) 검출용 프로브를 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브의 제조방법을 제공한다:
- [0021] (S1) 모노메톡시트리틸(MMT; Monomethoxytrityl)이 결합된 시스테인(Cys)을 이용하여 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제조하는 단계;
- [0022] (S2) 제조된 펩타이드를 수지상에서 약산으로 처리하여 상기 모노메톡시트리틸을 제거하는 단계;
- [0023] (S3) 설펜아미도 옥신 브로마이드(Sox-Br) 및 *N*, *N*-디이소프로필에틸아민(DIPEA; *N,N*-diisopropylethylamine)을 첨가하여, 수지상 알킬화를 실시하는 단계; 및
- [0024] (S4) 수지로부터 펩타이드를 절단하고 정제하는 단계.
- [0025] 상기 (S1) 단계는 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제조하는 단계로, 히스톤 H4의 18번 히스티딘 서열의 위치를 기준으로 -2, -1, +1, +2 또는 +3 위치의 아미노산 서열로 시스테인을 도입한 펩타이드 서열을 제조하는 단계이다. 상기 서열번호 2 내지 6의 아미노산 서열은 히스톤 H4의 아미노산 서열에서 유도된 것이다. 상기 서열의 합성은 Fmoc 기반 고체상 펩타이드 합성법(SPPS)을 이용할 수 있다.
- [0026] 상기 (S2) 단계는 제조된 펩타이드를 수지상에서 약산으로 처리하여 상기 모노메톡시트리틸을 제거하는 단계이다. 상기 모노메톡시트리틸은 시스테인 단량체의 보호기로 약산에서도 쉽게 탈보호될 수 있다. 합성된 펩타이드를 수지상에서 약산 조건으로 20 내지 40℃에서 10 내지 60 분 정도로 4 내지 6 회 반응시키면 모노메톡시트리틸기만 선택적으로 탈보호될 수 있다. 탈보호시 상기 약산의 당량은 크게 중요하지 않고, 디메틸포름아마이드(DMF; *N,N*-dimethylformamide)와 같은 유기용매와 혼합하여 수지가 충분히 잠길 수 있을 만큼의 양을 사용할 수 있다.
- [0027] 상기 약산은 디페닐 포스페이트(DPP) 또는 염산/디에틸에테르, 트리플루오로 아세트산, 트리클로로아세트산, 말레산, 타르타르산, 푸마르산, 시트르산, 펜타플로오로페닐비스(트리플릴)메탄(Pentafluorophenylbis(triflyl)methane) 등의 유기 약산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이며, 바람직하게는 트리플루오로 아세트산, 트리클로로아세트산이며, 보다 바람직하게는 트리플루오로 아세트산이다.
- [0028] 상기 (S3) 단계는 설펜아미도 옥신 브로마이드(Sox-Br) 및 *N*, *N*-디이소프로필에틸아민(DIPEA; *N,N*-diisopropylethylamine)을 첨가하여, 수지상 알킬화를 실시하는 단계로, 상기 (S2) 단계에서 탈보호된 펩타이드 시스테인 잔기의 티올에 9 내지 11 당량의 디이소프로필에틸아민(DIPEA; *N,N*-diisopropylethylamine)과 0.5 내지 2 당량의 Sox-Br을 20 내지 40℃에서 0.5 내지 2 시간 동안 실시한다. 상기과 같이 반응시키면 약 90% 이상의 펩타이드가 알킬화될 수 있다.
- [0029] 상기 (S4) 단계는 수지로부터 펩타이드를 절단하고 정제하는 단계로, 수지상 알킬화가 완료된 후, 일반적인 고체상 펩타이드 합성법을 따라 수지로부터 펩타이드를 절단하고 정제하면 본 발명의 비인산화된 포스파타아제 1(PHPT1; Phosphohistidine Phosphatase 1) 검출용 프로브를 수득할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 (S5) 상기 (S4) 단계 후 정제된 펩타이드의 히스티딘 잔기를 인산화하는 단계를 더 포함하는 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브의 제조방법을 제공한다. 상기 (S4) 단계에서 제조된 비인산화된 PHPT1 검출용 프로브 수용액을 pH 7 내지 9로 맞추어준 뒤, 200 내지 300 당량의 포타슘 포스포르아미데이트를 첨가하고, 20 내지 40℃에서 6 내지 24시간 동안 반응시킴으로써, 인산화된 PHPT1 검출용 프로브를 수득할 수 있다.
- [0031] 상기 인산화된 PHPT1 검출용 프로브가 포함된 용액에 마그네슘을 첨가함으로써 상기 프로브를 마그네슘으로 킬레이트화할 수 있다. 구체적으로 예를 들어, 96-다중 홈 플레이트에 본 발명의 프로브인 Sox-H4P 10 μM과 염화 마그네슘 20 mM을 pH 7.5 트리스염산완충액(트리스염산 50 mM, 염화나트륨 150 mM, 에틸렌디아민테트라아세트산

(EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid))에 녹인 후 10 nM의 PHPT1을 첨가한다.

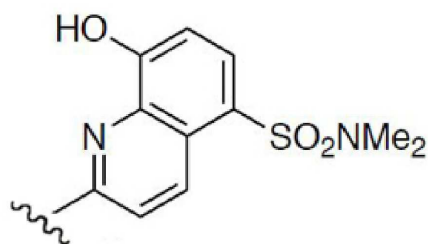
[0032] 또한, 본 발명은 상기 프로브를 시료에 처리하는 단계를 포함하는 포스포히스티딘 포스파타아제 1을 검출하는 방법을 제공한다.

[0033] 하나의 구체적인 실시예로, PHPT1에 의한 탈인산화 반응은 25℃에서 반응 시간에 따라 360 nm의 여기파장, 500 nm의 방출파장에 해당하는 형광을 측정하여 검출할 수 있다. 측정기기의 성능에 따라 프로브의 농도를 조절할 수 있으며, 효소의 효율에 따라 효소의 농도도 조절하여 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명의 상기 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브는 설펜아미도 옥신(Sox; sulfonamido-oxine) 형광단의 강화된 킬레이트화 형광(CHEF; chelation-enhanced fluorescence) 효과를 이용한다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 형광단에 인접한 아미노산의 히스티딘 잔기가 인산화되지 않으면 Sox는 형광을 나타내지 않는다. 상기 인산화된 히스티딘 잔기와 Sox 사이에 Mg^{2+} 양이온이 결합되어 분자내 킬레이트 결합이 발생하게 되고, 이로 인해 Sox는 강한 형광을 나타낸다. 본 발명의 프로브는 펩타이드 기질인 히스톤 H4 서열로부터 유도된 펩타이드에 Sox를 부착한 것으로, 상기 프로브는 이와 같은 원리를 사용하여 포스포히스티딘(pHis) 포스파타아제인 PHPT1의 활성을 검출할 수 있다.

[0035] 본 발명에서 “설펜아미도 옥신(Sox; sulfonamido-oxine)”은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 것이다.

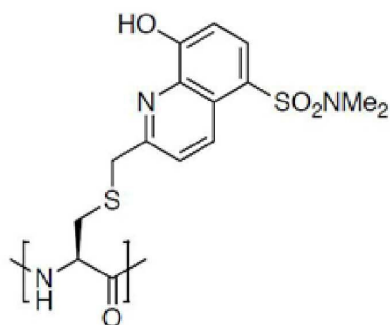
화학식 1



[0036]

[0037] 본 발명에서 “C-Sox”는 시스테인(Cys) 잔기에 설펜아미도 옥신(Sox; sulfonamido-oxine)이 결합된 것으로 하기 화학식 2의 구조를 갖는다.

화학식 2



[0038]

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브는 상기 설펜아미도 옥신과 상기 인산화된 히스티딘 잔기 사이에 Mg^{2+} 가 킬레이트 결합된 것일 수 있다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브는 아미노산 서열의 N-말단에 아세틸기가 결합된 것일 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브는 아미노산 서열의 C-말단에 아민기가

결합된 것일 수 있다.

- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브의 제조방법은 상기 (S4) 단계 후 정제된 펩타이드의 히스티딘 잔기를 인산화하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 검출방법은 상기 포스포히스티딘 포스파타아제 1 검출용 프로브가 포스포히스티딘 포스파타아제 1의 탈인산화에 의하여 형광이 감소되는 것을 측정하는 것일 수 있다.
- [0045] 본 발명자들은 실시예를 통해 본 발명의 프로브가 PHPT1의 활성을 검출할 수 있고, 또한 다른 포스파타아제와는 탈인산화 반응을 일으키지 않아 PHPT1에 대하여만 특이적으로 반응함을 실험적으로 확인하였다.
- [0046] 본 발명의 실시예에서는, CHEF 기반 인산화 프로브 물질에서, 분자내 킬레이트화는 Sox와 인산화 그룹 사이의 거리와 기하구조가 프로브 물질의 형광 특성에 영향을 미친다는 것을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [0047] 본 발명의 다른 실시예에서는, 본 발명의 프로브 물질인 Sox-H4P는 실제로 PHPT1과 반응하여 탈인산화가 일어나며, 실시간으로 PHPT1의 활성을 모니터링하는데 사용될 수 있음을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0048] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명의 프로브 물질인 Sox-H4P는 다른 포스파타아제와 PHPT1 활성을 구별할 수 있으며, PHPT1에 대하여 특이적으로 반응한다는 것을 확인하였다(실시예 5 참조).
- [0050] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[0053] 실시예 1. 프로브 제조

- [0054] 일반적인 Fmoc 기반 고체상 펩타이드 합성법(SPPS)을 이용하였다. 도 2에 도시한 바와 같이, 알킬화(alkylation)를 통해 시스테인(Cys) 잔기에 Sox를 선택적으로 결합하여 Cys-Sox(C-Sox)를 형성하기 위해, 약산에서도 쉽게 탈보호되는 보호기인 4-모노메톡시트리틸(Mmt; monomethoxytrityl)을 갖는 Cys 유도체를 사용하였다.
- [0055] 히스톤 H4의 18번 히스티딘 서열의 위치를 기준으로 -2, -1, +1, +2 또는 +3 위치의 아미노산 서열에 상기 시스테인이 도입된 서열번호 2 내지 6의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 제조하였다. 제조된 펩타이드를 수지상에서 1% 트리플루오르아세트산 조건 하에 상온에서 20분씩 5회 반응시켜 4-모노메톡시트리틸기만 선택적으로 탈보호하였다. 트리플루오르아세트산은 디메틸포름아마이드(DMF; *N,N*-dimethylformamide)에 트리플루오르아세트산을 녹여 정확히 1%를 맞춘 후, 수지가 충분히 잠길 수 있을 만큼의 양을 사용하였다.
- [0056] 탈보호된 펩타이드 시스테인 잔기의 티올에 10 당량의 디이소프로필에틸아민(DIPEA; *N,N*-diisopropylethylamine)과 1 당량의 Sox-Br을 상온에서 1 시간씩 2 회 수지상에서 반응시켜 펩타이드를 알킬화하였다. 본 실시예 1에서는 약 90%의 펩타이드가 알킬화되었다. 이 때 Sox-Br 용액이 너무 희석되지 않도록 수십 mM 정도의 농도가 되게끔 디메틸포름아마이드의 양을 조절하였다.
- [0057] 수지상 알킬화가 완료된 후, 표준 고체상 펩타이드 합성법을 따라 수지로부터 펩타이드를 절단하고 정제하여 Sox-H4로 명명한 비인산화된 포스파타아제 1(PHPT1; Phosphohistidine Phosphatase 1) 검출용 프로브 물질을 52%의 수율로 수득하였다.

[0059] 실시예 2. 프로브의 인산화

- [0060] 상기 실시예 1에 따라 제조된 Sox-H4 수용액을 10 mM 농도에서 pH 8로 맞춘 뒤, 약 250 당량의 포타슘 포스포르아미데이트를 첨가하였다. 상온에서 8시간 이상 반응을 시킨 후, 고성능액체크로마토그래프를 이용해 정제하여 Sox-H4P로 명명한 인산화된 포스파타아제 1(PHPT1; Phosphohistidine Phosphatase 1) 검출용 프로브 물질을 약 90%의 수율로 수득하였다.

[0062] 실시예 3. 프로브 기하구조 결정

- [0063] CHEF 기반 인산화 프로브 물질에서, 분자 내 킬레이트화는 Sox와 인산화 그룹 사이의 거리와 기하구조에 의존하기 때문에, 프로브 물질의 최상의 형광 특성을 위해서는 C-Sox 부분(moiety)의 위치를 최적화하는 것이 중요하다. 따라서, 본 실시예 2에서는 본 발명에 따른 프로브의 기하구조를 결정하기 위해 인산화될 His 부분 주변의 Sox 위치를 변화시킨 일련의 펩타이드 프로브를 준비한 다음 형광 특성을 측정하였다.

[0064] 상기 일련의 펩타이드 프로브는 포타슘 포스포라미데이트(PPA; potassium phosphoramidate)를 사용하여 히스티딘 잔기에 특이적으로 인산화된 것으로, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)로 정제하여 Sox-H4P(26% 수율)로 명명된 인산화된 프로브 물질을 수득하였다. 각 펩타이드 프로브의 C-Sox와 pHis의 존재와 정확한 위치는 액체 크로마토그래피-탠덤 질량분석기(LC-MS/MS)(Supporting Information)로 확인하였다. ¹H-NMR 및 ³¹P-NMR 데이터에서 각 펩타이드 프로브는 모두 3-pHis 이성질체인 것으로 나타났다. 이는 1-pHis보다 열역학적으로 더 안정하다. pHis의 알려진 불안정성에도 불구하고 최적 조건인 -80℃, pH9의 조건에서 탈인산화 반응 없이 본 실시예 2의 펩타이드 프로브인 Sox-H4P를 상당량으로 보존할 수 있었다.

[0065] 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 이들 Sox-H4P 펩타이드 프로브는 모두 비인산화된 Sox-H4와 비교하여 형광 특성이 증가한 것으로 나타났다. 하기 표 1의 Sox-H4P 펩타이드 프로브 중 C-Sox가 pHis의 (-2) 위치에 있는 Sox-H4P(-2)가 가장 명확한 형광성의 변화를 나타내었다.

표 1

Entry	Peptide substrate sequence												Fold fluorescence increase
	N	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	C	
Sox-H4(-2)	Ac	G	G	A	C-Sox	R	H	R	K	V	L	NH ₂	3.0 ± 0.1
Sox-H4(-1)	Ac	G	G	A	K	C-Sox	H	R	K	V	L	NH ₂	1.6 ± 0.1
Sox-H4(+1)	Ac	G	G	A	K	R	H	C-Sox	K	V	L	NH ₂	1.5 ± 0.1
Sox-H4(+2)	Ac	G	G	A	K	R	H	R	C-Sox	V	L	NH ₂	2.6 ± 0.2
Sox-H4(+3)	Ac	G	G	A	K	R	H	R	K	C-Sox	L	NH ₂	2.0 ± 0.1

[0066] 도 3에 나타난 바와 같이, Sox-H4P(-2)는 177 ± 30 mM의 K_d값을 나타내는 Sox-H4(-2) 보다 Mg²⁺에 대해 더 낮은 K_d값(102 ± 9 mM)을 나타내었다. 이는 Sox-H4P(-2)의 인산화가 실제로 Mg²⁺에 대한 높은 친화성을 유도한다는 것을 의미한다. 도 4에 나타난 바와 같이 Sox-H4(-2)와 Sox-H4P(-2) 사이의 형광성의 차이는 20 mM 농도의 MgCl₂에서 가장 크게 나타났다. 상기 MgCl₂의 농도는 또한 생리학적 조건에서도 적용 가능한 것이다.

[0068] 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 프로브의 형광성은 인산화 및 프로브 농도의 증가량과 우수한 선형 관계를 나타내었다. 이로써 HPLC 피크 면적과 독립적으로 정량화되어 인산화 및 탈인산화 반응을 본 기술의 프로브 물질을 이용하여 직접적으로 광학 정량할 수 있음을 알 수 있었다.

[0070] 실시예 4. PHPT1 활성 확인

[0071] 본 발명에 따른 프로브(Sox-H4P)를 사용하여 포스포히스티딘(pHis) 포스파타아제의 효소 활성 분석을 진행하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, Sox-H4P는 PHPT1로 항온 처리할 때 시간이 지남에 따라 명확한 형광 붕괴를 나타내었다. 또한, 본 발명에 따른 프로브(Sox-H4P)는 음성대조군으로 사용한 비활성 돌연변이체인 PHPT1 H53A에 대하여는 활성을 나타내지 않았다. 상기 결과로부터 본 발명의 프로브인 Sox-H4P는 실제로 PHPT1과만 반응하여 탈인산화가 일어나며, 실시간으로 PHPT1의 활성을 모니터링하는데 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0072] 한편, 본 발명의 프로브를 사용하여 PHPT1에 의한 pHis의 탈인산화의 반응 속도 파라미터를 쉽게 얻을 수 있다. 도 8 및 도 9에 나타난 바와 같이, 각각의 탈인산화 그래프는 유사 일차 반응 속도론(pseudo-first order kinetics)과 잘 맞았으며(도 8), 전형적인 미하엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 포화도(K_M = 16.13 ± 3.94 μM, kcat = 3.06 ± 0.32 sec⁻¹, kcat/K_M = 1.90 × 10⁵ ± 5.04 × 10⁴ M⁻¹sec⁻¹)를 나타내었다(도 9).

[0073] 종래에 알려진 Michaelis-Menten 파라미터는 pHis를 사용하지 않은 소분자 기질인 pNPP(K_M = 8.81 mM, kcat = 0.10 sec⁻¹, kcat/K_M = 11.35 M⁻¹sec⁻¹) 또는 DiFUMP(K_M = 220 μM, kcat = 0.39 sec⁻¹, kcat/K_M = 1800 M⁻¹sec⁻¹)를 이용하여 얻은 것이다. 이와 같이 종래 상기 소분자 기질을 사용하는 경우와 비교하여 본 발명의 프로브는 탈인산화의 동역학 파라미터를 매우 우수하고 쉽게 측정할 수 있음을 알 수 있었다.

[0074] 또한, 본 기술에 따른 표준 분석 조건은 또한 100-200 10 nM 의 PHPT1을 사용하는 종래의 소분자 기반의 분석법보다 훨씬 적은 양인 10 nM 의 PHPT1만을 필요로 한다. 상기 데이터로부터 PHPT1이 촉매 작용을 하는 pHis 탈인산화는 포스포펩타이드 기질 쪽 단백질 티로신 포스파타아제 1B(protein tyrosine phosphatase 1B)와 동등하며, 인간 세린 트레오닌 포스파타아제 2C-알파(human serine threonine phosphatase 2C-alpha)보다 더 효율적임을 알 수 있었다.

[0076] **실시예 5. PHPT1에 대한 특이성 확인**

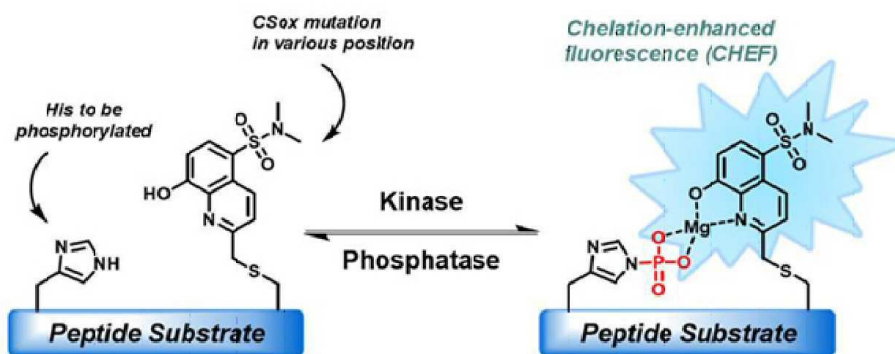
[0077] 본 발명의 프로브 물질의 PHPT1에 대한 특이성을 실험하기 위해 다른 포스파타아제의 pHis 포스파타아제 활성을 실험하였다. 특히 간암 종양 억제 단백질로 알려진 포스포리신 포스포히스티딘 무기 피로포스페이트 포스파타아제 (LHPP; phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase)에 대하여 실험하였다. LHPP는 또한 우울증의 주요 위험 요소로도 알려져 있다. 시험관 내에서, LHPP는 숙신산 티오키나아제 및 뉴클레오사이드 디포스페이트 키나아제를 비롯한 인산화된 His단백질 기질을 탈인산화시킨다.

[0078] 도 10에 나타난 바와 같이, 본 실시예에서 LHPP는 히스톤 H4를 기반으로 하는 Sox-H4P를 탈인산화시키지 않아 본 발명의 프로브에 대하여는 활성을 갖지 않음을 알 수 있었다. pHis 포스파타아제 활성을 갖는 것으로 알려진 단백질 포스파타아제 2C 이소형 알파(PP2C)를 비롯하여, 알칼리 포스파타아제(ALPP), 단백질 티로신 포스파타아제 1B(PTP1B) 및 단백질 아르기닌 포스파타아제(Yw1E) 등 다른 포스파타아제 또한 본 발명의 Sox-H4P를 탈인산화시키지 못하는 것으로 나타났다. 이로써, 본 발명의 프로브 물질인 Sox-H4P는 다른 포스파타아제와 PHPT1 활성을 구별할 수 있으며, PHPT1에 대하여 특이적으로 반응한다는 것을 알 수 있었다. 상기 결과는 본 기술의 프로브가 생물학적 시료에서 PHPT1활성을 모니터링하는 것에 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다.

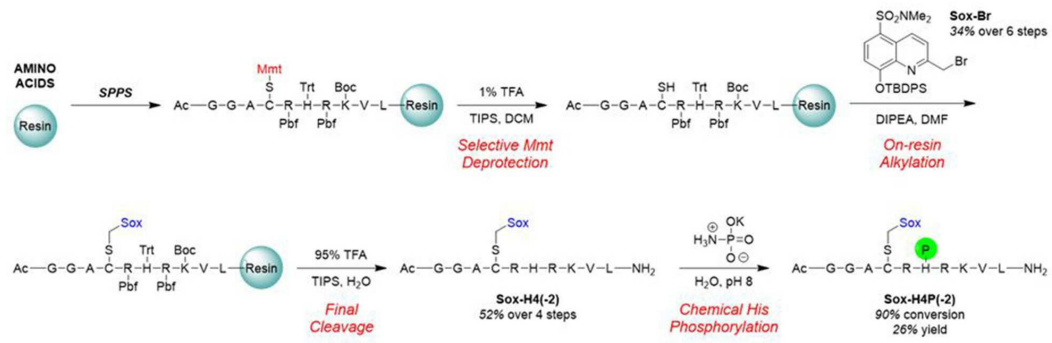
[0080] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

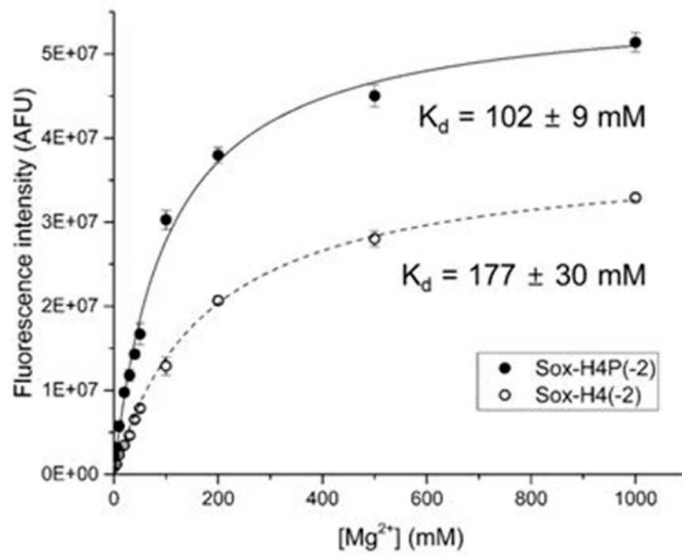
도면1



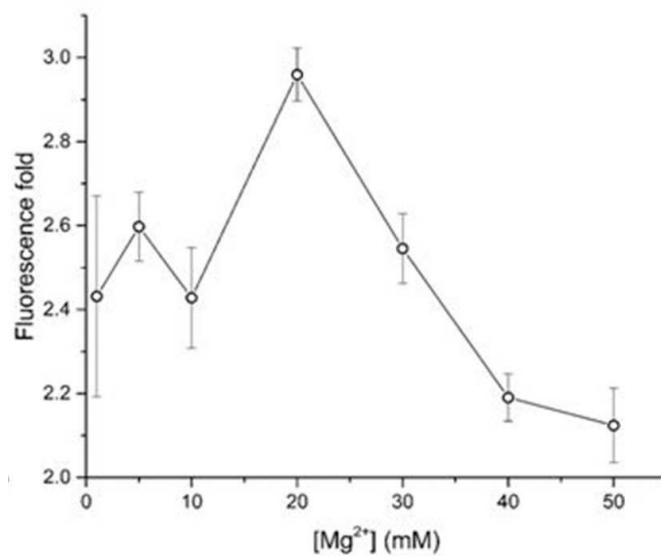
도면2



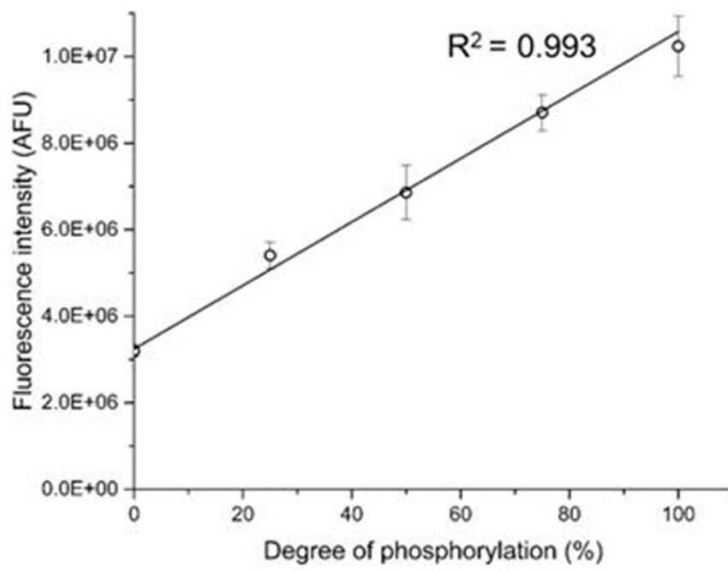
도면3



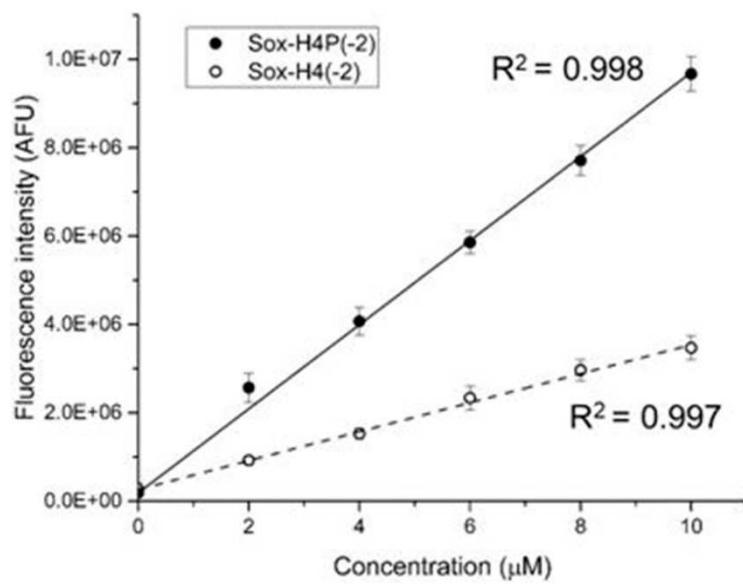
도면4



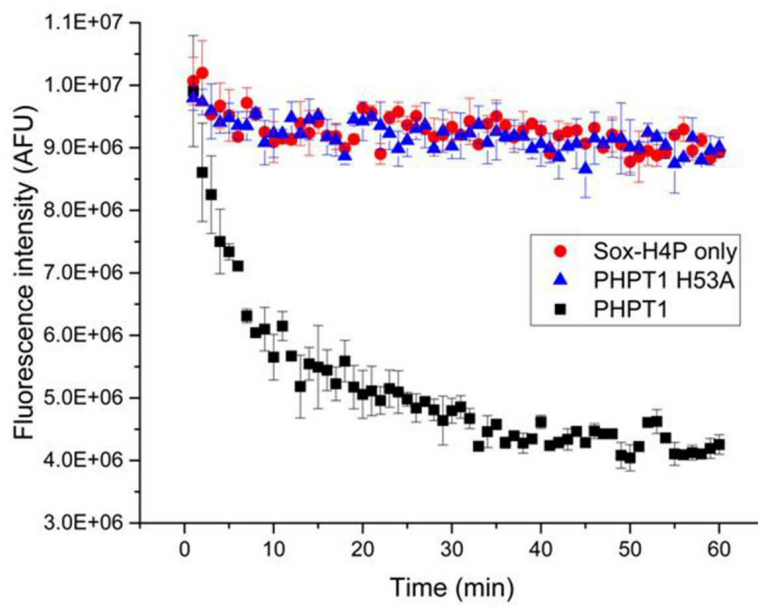
도면5



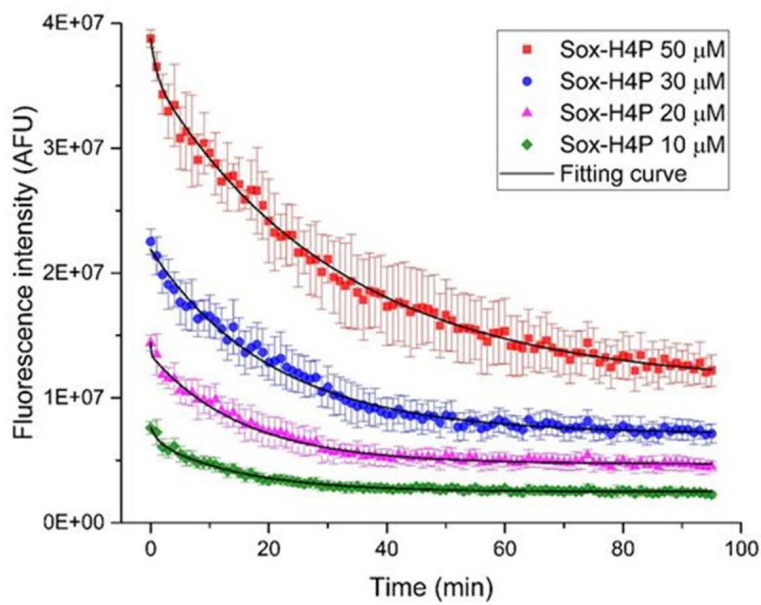
도면6



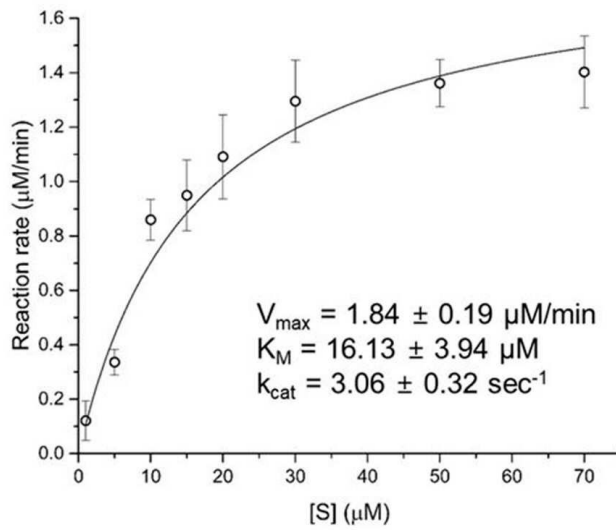
도면7



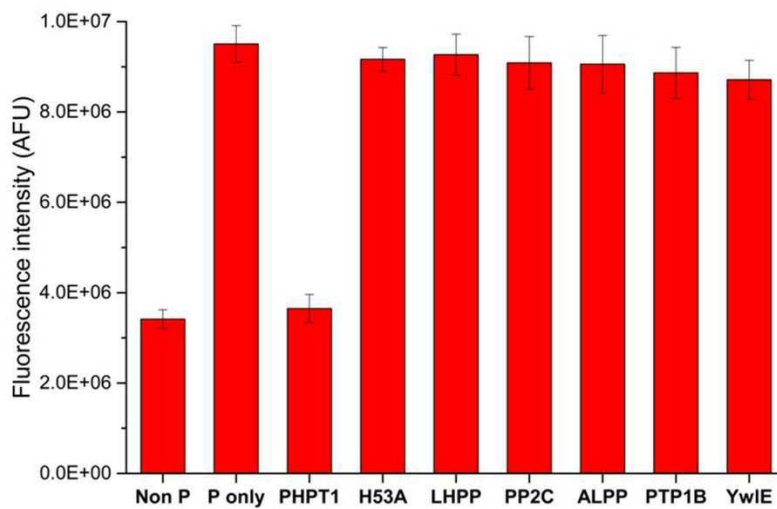
도면8



도면9



도면10



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 제6항

【변경전】

제1항 내지 제3항의 프로브

【변경후】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 프로브