

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2022/012583

(22) 국제출원일:

2022년 8월 23일 (23.08.2022)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0134066 2021년 10월 8일 (08.10.2021) KR

(71) 출원인: 울산과학기술원 (UNIST(ULSAN NATIONAL

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY))

[KR/KR]; 44919 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).

(72) 발명자: 기정민 (KEE, Jung-Min); 44919 울산광역시 울

주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 정호영 (JUNG,

Hoyoung); 44919 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).

(74) 대리인: 특허법인(유한)아이시스 (ISIS IP LAW LLC);

06162 서울특별시 강남구 선릉로 94길 14, 12층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국

내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역

내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

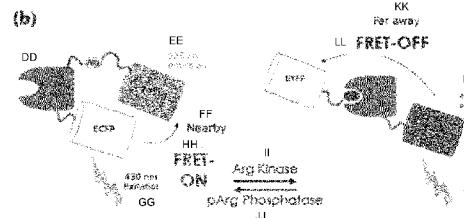
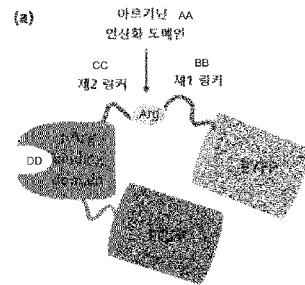
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: FRET BIOSENSOR FOR MEASURING ARGININE PHOSPHORYLATION AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 아르기닌 인산화 측정용 FRET 바이오센서 및 이의 용도



AA ... Arginine phosphorylation domain
BB ... First linker
CC ... Second linker
DD ... pArg binding domain
EE ... 525 nm emission
FF ... Nearby
GG ... 430 nm Excitation
HH ... FRET-ON
II ... Arg Kinase
JJ ... pArg Phosphatase
KK ... Far away
LL ... FRET-OFF
MM ... 450 nm emission

(57) Abstract: The present invention relates to a FRET biosensor for measuring arginine phosphorylation and the use thereof. Particularly, the present invention provides a sensor for measuring the activity of arginine kinase or phosphoarginine phosphatase on the basis of FRET, the sensor comprising a fluorescence donor protein, a phosphoarginine-binding domain, an arginine phosphorylation domain, a first linker linked to the arginine phosphorylation domain, and a fluorescence receptor protein. Further, the present invention provides a method for detecting arginine phosphorylation characterized by using the sensor, a kit for screening an arginine kinase inhibitor, and a method for screening an arginine kinase inhibitor.

(57) 요약서: 본 발명은 아르기닌 인산화 측정용 FRET 바이오센서 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 공여 형광체 단백질, 인산화 아르기닌 결합 도메인, 아르기닌 인산화 도메인, 상기 아르기닌 인산화 도메인에 연결된 제1 링커, 및 수용 형광체 단백질을 포함하는, FRET에 기반한 아르기닌 인산화 효소 또는 인산화 아르기닌 탈인산화 효소의 활성 측정용 센서를 제공한다. 또한, 본 발명에 따르면 상기 센서를 사용하는 것을 특징으로 하는 아르기닌 인산화의 검출 방법, 아르기닌 인산화효소 저해제의 스크리닝용 키트, 및 아르기닌 인산화효소 저해제의 스크리닝 방법이 제공된다.

명세서

발명의 명칭: 아르기닌 인산화 측정용 FRET 바이오센서 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 아르기닌 인산화 측정용 FRET 바이오센서 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 아르기닌 인산화효소 또는 인산화 아르기닌 탈인산화효소의 활성을 측정하기 위한 FRET 바이오센서, 이를 사용하여 아르기닌 인산화를 검출하는 방법, 및 아르기닌 인산화효소 저해제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 단백질 인산화(phosphorylation)은 타겟 단백질의 기능을 조절하는 핵심적인 기작 중 하나로서, 기초과학뿐 아니라 의학 및 약학에서도 큰 의미가 있다. 지금까지의 단백질 인산화 연구는 pSer, pThr, pTyr 등 3가지 형태의 단백질 O-인산화에 집중되어 있었다. 그러나 생체에는 인산화 아르기닌(Phosphoarginine, pArg)과 같은 단백질의 N-인산화 현상도 존재한다. N-인산화는 세포 신호 전달, 암세포 대사와 같은 현상에 관여한다는 것이 밝혀졌으나, pSer/pThr/pTyr 연구에 비하면 그 후속 연구는 상대적으로 부진한 상황이다. 이는 pArg이 매우 불안정하여 이를 정량적으로 검출할 수 있는 효과적인 방법이 없었기 때문이다.
- [3] 한편, 아르기닌 인산화효소(Arg kinase) 및 인산화 아르기닌 탈인산화효소(pArg phosphatase)는 특히 그람 양성균의 스트레스 조절과 병독성 조절에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌으며 이에 따라 아르기닌 인산화의 측정이 항생제 개발에서 후보물질 발굴의 기반이 된다.
- [4] 기존의 아르기닌 인산화효소 및 인산화 아르기닌 탈인산화효소의 활성 측정 방법은 주로 방사성 동위원소 표지법이나 면역블롯팅법 등에 의존하였다. 그러나 이들 방법은 위험하거나 실시가 번거롭고 복잡하였으며 효율도 낮고, 실시간 관찰도 불가능하였다. 이에 따라 최근에는 펩티드에 기반한 아르기닌 인산화효소 형광 센서가 개발되기도 하였으나 이는 살아있는 세포에서의 인산화 관찰이 불가능하다는 단점이 있었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 방사성 동위원소 또는 항체와 같이 고가의 시약 등이 없어도 아르기닌 인산화효소 또는 인산화 아르기닌 탈인산화효소의 활성을 쉽고 빠르게, 그리고 정확히 측정할 수 있으며, 시험관내 뿐만 아니라 살아있는 세포 내에서도 실시간으로 아르기닌 인산화/탈인산화를 관찰할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [6] 본 발명의 일 양태에 따르면, 공여 형광체 단백질, 인산화 아르기닌 결합 도메인, 아르기닌 인산화 도메인, 상기 아르기닌 인산화 도메인에 연결된 제1 링커, 및 수용 형광체 단백질을 포함하는, 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 기반한 아르기닌 인산화 효소 또는 인산화 아르기닌 탈인산화 효소의 활성 측정용 센서가 제공된다.
- [7] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 전술한 센서를 사용하는 것을 특징으로 하는 FRET에 기반하여 아르기닌의 인산화를 검출하는 방법이 제공된다.
- [8] 본 발명의 또다른 일 양태에 따르면, 전술한 센서를 포함하는, FRET에 기반하여 아르기닌 인산화를 측정하기 위한 키트가 제공된다.
- [9] 본 발명의 또다른 일 양태에 따르면, 전술한 센서를 사용하는 것을 특징으로 하는, 아르기닌 인산화효소 저해제의 스크리닝 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [10] 본 발명에 따르면 기존에는 화학적 불안정성으로 인하여 활성의 측정이 어려웠던 아르기닌 인산화효소 및 인산화 아르기닌 탈인산화효소의 활성을 간단하고 쉽게 측정할 수 있다. 특히, 본 발명의 센서는 재조합 단백질에 기반한 형광 센서이므로 E.coli 등을 이용하거나 합성 형광 물질을 합성할 필요없이 유전자 발현만으로 쉽게 얻을 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면 아르기닌의 인산화에 따른 형광 변화를 통해 인산화 반응 정도를 상대적인 정량으로 및 실시간으로 측정할 수 있으므로 인산화효소 저해제의 고속 스크리닝에 쉽게 적용하여 새로운 항생제 후보물질을 발굴하는데 활용될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 센서는 살아있는 세포에 적용이 가능하므로 시험관내 측정 뿐만 아니라 살아있는 세포 내에서의 아르기닌 인산화 측정에도 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1에서 (a)는 본 발명의 일 구현예에 따른 센서를 모식적으로 나타낸 그림이고 (b)는 본 발명의 일 구현예에 따른 센서가 작동하는 메커니즘을 모식적으로 나타낸 그림이다.
- [12] 도 2는 제2 링커와 제1 링커의 길이에 따른 FRET 강도를 나타내는 그래프이다.
- [13] 도 3은 제1 링커에 아르기닌을 추가하지 않거나(#0), 1 또는 2개 추가한(#1', #1, #2) FRET 센서에 있어서 시간에 따른 형광 변화를 나타내는 그래프이다.
- [14] 도 4는 탈인산화효소 YwIE, ADP, 또는 PK+PEP 처리와 같은 다양한 조건에서 FRET 강도의 변화를 관찰한 그래프이다.
- [15] 도 5는 살아있는 세포 내에서 FRET 센서를 사용하였을 때 형광 발생 여부를 확인하는 공초점 현미경 사진이다.
- [16] 도 6 및 도 7은 아르기닌 인산화 효소에 열 스트레스를 가해 활성화 시켰을 때 FRET 신호의 변화를 보여주는 그래프이다.
- [17] 도 8은 아르기닌 인산화 효소에 에탄올 스트레스를 가해 활성화 시켰을 때

FRET 신호의 변화를 보여주는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [18] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [19] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 구현예를 설명하기 위해 사용된 것으로서 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다.
- [20] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다, "함유"한다, "가지다"라고 할 때, 이는 특별히 달리 정의되지 않는 한, 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [21] 제1, 제2 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 전술한 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [22] 본 발명의 일 양태에 따르면, FRET에 기반한 아르기닌 인산화 효소 또는 인산화 아르기닌 탈인산화 효소의 활성 측정용 센서가 제공된다. 상기 센서에 대해 도 1을 참조하여 보다 구체적으로 설명하겠다.
- [23] 본 명세서에서 FRET(형광 공명 에너지 전이, fluorescence resonance energy transfer)은, 단파장 형광 단백질인 공여체(donor)가 외부에서 에너지를 흡수하면, 상기 공여체의 여기 에너지가 빛 에너지로 방출되는 대신, 소정의 거리 안에 위치한 장파장 형광 단백질인 수용체(acceptor)에 발광 없이 전달되어, 수용체의 장파장 형광만이 방출되는 현상을 의미한다. FRET에 의한 수용체 형광의 발생 또는 공여체 방출광의 소멸 현상(photobleaching)이 나타나려면 상기 공여체와 수용체가 매우 짧은 거리(10 nm 미만)에 위치해야 한다. 특정 파장의 빛을 내는 형광 단백질인 상기 공여체와 이 발광 에너지와 공명을 일으켜 에너지를 흡수할 수 있는 형광 단백질인 상기 수용체가 소정의 거리 이내로 가까워지면, 외부에서 상기 공여체를 여기시키기 위해 조사된 빛 에너지가 상기 공여체로부터 상기 수용체로 발광 없이 전달되어 공여체의 고유한 파장의 발광이 감소하고, 공여체로부터 에너지를 전달받은 수용체가 자신의 고유한 파장대의 빛을 발광하는 FRET 현상이 일어난다.
- [24] 본 발명의 일 양태에 따르면 아르기닌 인산화효소 또는 인산화 아르기닌 탈인산화효소 활성 측정용 FRET 센서는 공여 형광체 단백질, 인산화 아르기닌 결합 도메인, 아르기닌 인산화 도메인, 상기 아르기닌 인산화 도메인에 연결된 제1 링커, 및 수용 형광체 단백질을 포함한다.
- [25] 상기 센서는 아르기닌 인산화효소(Arg kinase)에 의해 아르기닌이 인산화되면 인산화 아르기닌(pArg)과 인산화 아르기닌 결합 도메인(pArg binding domain) 사이가 가까워지면서 두 형광체 단백질(예를 들어 ECFP, EYFP) 사이의 거리가 멀어지고 이러한 형광체 단백질들 사이의 거리 변화에 따라 FRET이 변화한다.

이러한 FRET 변화량을 이용하여 효소의 활성을 측정할 수 있다. 예를 들어 도 1의 (b)에서 보는 바와 같이 아르기닌 인산화효소에 의해 아르기닌이 인산화되어 인산화 아르기닌 결합 도메인과의 결합이 일어나면 두 형광체 단백질 사이의 거리가 멀어져서 FRET이 감소 (형광 감소)하고, 이와 반대로 인산화 아르기닌 탈인산화효소에 의해 인산화 아르기닌이 탈인산화되면 두 형광체 단백질 사이의 거리가 가까워져서 FRET이 증가 (형광 증가)한다. 이러한 FRET의 감소 및 증가 여부에 의해 효소 활성의 유무를 측정 가능하며 상기 감소량, 증가량을 측정함으로써 효소 활성을 상대적 정량으로 측정할 수 있게 된다.

- [26] 본 발명의 FRET 센서에서 공여 형광체 단백질, 인산화 아르기닌 결합 도메인, 아르기닌 인산화 도메인, 상기 아르기닌 인산화 도메인에 연결된 제1 링커, 및 수용 형광체 단백질은 반드시 앞서 기재한 순서에 따라 구성될 필요는 없다. 예를 들어 센서에서 아미노산 말단 측으로부터 수용 형광체 단백질, 인산화 아르기닌 결합 도메인, 아르기닌 인산화 도메인, 제1 링커, 및 공여 형광체 단백질의 순서에 따라 구성되어 있어도 된다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, FRET 센서는 아미노산 말단 측으로부터 공여 형광체 단백질, 인산화 아르기닌 결합 도메인, 아르기닌 인산화 도메인, 제1 링커, 및 수용 형광체 단백질이 순서대로 연결된 구조를 포함할 수 있다. 보다 구체적인 예로, 본 발명의 일 구현예에 따르면 FRET 센서는 서열번호 13을 포함하거나 서열번호 13으로 이루어진 것일 수 있다.
- [27] 본 발명에서 "공여 형광체 단백질"은 외부에서 흡수한 에너지를 전달하는 물질로서 FRET의 원리상 단파장 형광 단백질 또는 단파장 형광 단백질과 융합된 융합 단백질을 말하며, "수용 형광체 단백질"이란 공여 형광체 단백질로부터 에너지를 받는 물질로서, 장파장 형광 단백질 또는 장파장 형광체 단백질과 결합된 융합 단백질을 말한다.
- [28] 이러한 형광체 단백질의 예로는 녹색 형광체 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광체 단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색 형광체 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광체 단백질(RFP), 증강된 적색 형광체 단백질(ERFP), 청색 형광체 단백질(BFP), 증강된 청색 형광체 단백질(EBFP), 황색 형광체 단백질(YFP), 증강된 황색체 형광 단백질(EYFP), 남색 형광체 단백질(CFP), 또는 증강된 남색 형광체 단백질(ECFP) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 이 중 단파장의 형광 단백질이 공여 형광체 단백질로 장파장의 형광체 단백질이 수용 형광체 단백질로 사용될 수 있다. 여기서, 용어 "단파장" 및 "장파장"은 상대적으로 결정된다. 즉, 공여 형광체 단백질에 사용되는 형광 단백질이 발광하는 빛의 파장은 수용 형광체 단백질에 사용되는 형광단백질이 발광하는 빛의 파장에 비해 상대적으로 파장이 짧다는 것을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 공여 형광체 단백질은 ECFP이고 상기 수용 형광체 단백질은 EYFP일 수 있다.
- [29] 본 발명에서 "인산화 아르기닌 결합 도메인"은 인산화 아르기닌을

탈인산화하는 활성은 없으면서 인산화 아르기닌에 결합하는 것이라면 특별히 제한되지 않다. 예를 들어 CtsR, McsB, ClpP와 같이 인산화 아르기닌에 결합하는 것으로 알려진 단백질에서 유래된 도메인이거나 YwIE와 같이 인산화 아르기닌 탈인산화효소에서 유래된 도메인 (예를 들어, YwIE의 활성 자리 포인트 돌연변이 YwIE_C9A)일 수 있다. 이에, 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 인산화 아르기닌 결합 도메인은 인산화 아르기닌에 결합하는 CtsR, McsB, ClpP, 및 인산화 아르기닌 탈인산화효소 YwIE 중 어느 하나에서 유래된 것일 수 있으며, 보다 구체적인 예로는 서열번호 11을 포함하거나 서열번호 11로 이루어진 것일 수 있다.

- [30] 본 발명에서 "아르기닌 인산화 도메인"은 센서에 의해 인산화/탈인산화가 일어날 수 있는 아르기닌을 포함하는 도메인이다. 즉, 상기 도메인은 아르기닌을 포함하여, 아르기닌 인산화효소(kinase)에 의해 인산화되고 인산화 아르기닌 탈인산화효소(phosphatase)에 의해 탈인산화될 수 있는 도메인이다. 이에, 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 아르기닌 인산화 도메인은 아르기닌 인산화효소의 기질에서 유래한 것, 예를 들어 McsB (Arg kinase)의 실제 기질로 알려진 CtsR에서 유래한 것일 수 있다. 보다 구체적인 예로는 상기 아르기닌 인산화 도메인은 서열번호 12를 포함하거나 서열번호 12로 이루어진 것일 수 있다.
- [31] FRET 센서에서 링커(linker)는 FRET 센서를 구성하는 형광체 단백질이나 도메인들을 연결시키기 위한 것이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명의 FRET 센서는 상기 아르기닌 인산화 도메인에 연결된 "제1 링커"를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 링커는 상기 아르기닌 인산화 도메인과 상기 수용 형광체 단백질의 사이를 연결하는 것일 수 있다.
- [32] 본 발명에 따르면 상기 제1 링커의 길이나 구성에 따라 FRET 센서의 효율이 달라질 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 제1 링커는 6개 아미노산 잔기 이상 내지는 36개 아미노산 잔기 이하의 길이, 예를 들어 6개 아미노산 잔기 이상 내지는 30개 아미노산 잔기 이하의 길이를 갖는 것일 수 있다. 본 발명의 실시예에 따르면 상기 제1 링커는 12개 아미노산 잔기의 길이를 가질 때 FRET 변화량이 가장 컸으며 이는 센서 성능이 가장 우수하다는 것을 의미한다.
- [33] 또한, 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 제1 링커는 아르기닌을 포함하는 것일 수 있다. 이와 같이 제1 링커에 아르기닌을 포함시킴으로써 아르기닌 인산화/탈인산화에 따른 신호 감도가 개선될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 제1 링커는 1 내지 3개의 아르기닌을 포함할 수 있으며, 예를 들어 SGIR의 아미노산 서열을 전체 아미노산 서열 중의 임의 위치에 포함하는 것, 구체적으로 SGIR의 아미노산 서열을 제1 링커의 전체 아미노산 서열의 말단, 예컨대 아르기닌 인산화 도메인에 연결되는 말단에 포함하거나 상기 제1 링커의 전체 아미노산 서열의 임의 중간부에 포함하는 것일 수 있다. 구체적인 예로서, 상기 제1 링커는 GGSGGS의 아미노산 서열을 1회 또는 2 내지 3회 반복하여

포함하는 것일 수 있으며, 더 구체적으로는, 상기 제1 링커는 서열번호 1 내지 서열번호 9 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 서열번호 1 내지 서열번호 9 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있다.

- [34] 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명의 FRET 센서는 상기 인산화 아르기닌 결합 도메인에 연결된 제2 링커를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제2 링커는 상기 인산화 아르기닌 결합 도메인과 상기 아르기닌 인산화 도메인의 사이를 연결하는 것일 수 있다. 상기 제2 링커는 반드시 포함될 필요는 없으나, 포함될 경우라면 상기 제1 링커에 비해 길이가 짧은 것이 센서 성능 측면에서 더 바람직하다. 구체적인 예로서, 상기 제2 링커는 GGS의 아미노산 서열을 1회 내지 2 내지 4회 반복하여 포함하는 것일 수 있다. 더 구체적인 예로서, 상기 제2 링커는 서열번호 1, 2, 및 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.
- [35] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 전술한 바와 같은 FRET 센서를 사용하는 것을 특징으로 하는, FRET에 기반하여 아르기닌의 인산화를 검출하는 방법이 제공된다.
- [36] 상기 아르기닌의 인산화 검출 방법은 본 발명에 따른 FRET 센서를 측정 대상 시료와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 도 1의 (b)에서 볼 수 있듯이 본 발명에 따른 FRET 센서는 아르기닌 인산화에 의해 FRET 강도가 감소한다. 아르기닌 인산화효소의 활성화에 따라 아르기닌기의 인산화 정도가 변화하므로, 인산화에 따른 FRET 변화량, 즉, 초기 FRET 강도 (예를 들어 측정 대상 시료와의 접촉 전의 초기 FRET 강도)에 비하여 FRET 강도가 감소한 정도로부터 아르기닌의 인산화 정도를 상대적 정량으로 측정할 수 있다. 이에, 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명의 아르기닌 인산화 검출 방법은 FRET 강도의 감소량으로부터 아르기닌 인산화를 상대적 정량으로 검출하는 단계를 포함할 수 있다. FRET의 커짐에 의해 인산화를 측정하는 센서의 경우, 초기에 FRET 이 없기 때문에 실험시 인산화에 의한 FRET 증가가 없다고 하더라도 이것이 인산화가 이루어지지 않은 환경으로 인한 것인지 센서가 불량하기 때문인지를 확인하기가 어렵다. 그러나 본 발명에서와 같이 FRET 감소량으로부터 인산화를 측정하는 방법의 경우, 초기에 FRET이 있는 상태에서 실험을 실시하므로 FRET 센서가 불량하여 작동하지 않는 것인지 여부를 쉽게 판별할 수 있다는 장점이 있다.
- [37] 또한, 본 발명에 따른 FRET 센서는 인산화 아르기닌의 탈인산화에 의해 FRET 강도가 증가한다. 인산화 아르기닌 탈인산화효소의 활성화에 따라 인산화 아르기닌기의 탈인산화 정도가 변화하므로, 탈인산화에 따른 FRET 변화량으로부터 탈인산화 정도를 상대적 정량으로 측정할 수 있다. 이에 본 발명에 따른 FRET 센서는 인산화 아르기닌의 탈인산화 검출 방법에 사용될 수 있으며, 상기 방법은 FRET 강도의 증가량으로부터 인산화 아르기닌의 탈인산화를 상대적 정량으로 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

- [38] 또한, 이러한 본 발명의 FRET 센서는 in vitro 환경 뿐만 아니라 in vivo 환경에서도 작동하므로, 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명의 아르기닌 인산화 검출 방법은 살아있는 세포에서 아르기닌 인산화를 검출하는데 사용될 수 있다.
- [39]
- [40] 또한, 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 전술한 바와 같은 FRET 센서를 사용하는 것을 특징으로 하는, 아르기닌 인산화효소 저해제의 스크리닝 방법이 제공된다. 또한, 본 발명의 또다른 일 양태에 따르면 전술한 바와 같은 FRET 센서를 사용하는 것을 특징으로 하는, 아르기닌 인산화효소 저해제의 스크리닝용 키트가 제공된다.
- [41] 상기 스크리닝 방법 및 스크리닝용 키트는 아르기닌 인산화효소 저해제 후보물질과 아르기닌 인산화효소를 본 발명의 FRET 센서와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아르기닌 인산화효소 저해제 후보물질과 상기 아르기닌 인산화효소를 먼저 접촉시킨 후, 상기 FRET 센서와 접촉시킬 수 있다. 여기서, 상기 저해제 후보물질과 상기 아르기닌 인산화효소의 접촉은 인큐베이팅일 수 있다. 본 발명의 FRET 센서에 의하면 인산화를 형광에 의해 쉽게 판별할 수 있으므로 96 well-plate 등을 사용하여 다량의 샘플을 동시에 측정하는데 이용될 수 있다. 따라서, 상기 스크리닝 방법 및 스크리닝용 키트는 고속 스크리닝 방법 및 키트일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [42] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 참고하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[43]

[실시예 1] FRET 센서의 제조

- [44]
- [45] 서열번호 13의 FRET 센서를 코딩하는 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)-pLys 균주에 형질전환시켰다. 암피실린 (50 mg/mL)을 첨가한 5 mL LB 배지에서 37°C에서 하룻밤동안 성장시켰다. 200 mL의 배지에 2 mL를 접종하여 하룻밤 동안 배양하고 O.D.600가 0.2에 이를때까지 성장시켰다. 박테리아를 0.1 mM IPTG 으로 18°C, 200 rpm에서 20 시간 동안 유도한 후 원심분리 (4000 g, 30 min at 4°C)하여 수확하였다. 세포 펠릿을 4 mL의 pH 7.5 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 및 2 mM PMSF 중에 재현탁하고 3분 동안 초음파 처리하였다 (45% amplitude, 2초 펄스와 3초 휴지기를 36회). 불용성 세포 부산물은 4°C에서 30분 동안 4,000 g에서 원심분리하여 제거하였다. pH 7.5 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl 및 20 mM 이미다졸을 포함한 평형 버퍼를 사용하여 Ni-NTA (ThermoFisher)를 안정화시켰다. 상층액을 2mL의 Ni-NTA슬러리에 로딩하고 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. Ni-NTA 칼럼을 10 칼럼 부피의 평형 버퍼로 세척하였다. FRET

단백질을 5 ml의 pH 7.5 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 및 200 mM 이미다졸 버퍼로 용리하였다. 160분에 걸쳐 pH 7.5 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl 버퍼, 1 ml/min 로 사이즈 배제 크로마토그래피(HiLoad® 16/600 Superdex® 75 pg, Cytiva)로 추가 정제하였다. 목적 분획을 수집하고 농축하였다 (Amicon Ultra centrifugal filter units, Ultra-15, MWCO 10 kDa, Millipore). FRET 단백질을 분주하고 -80°C에서 보관하였다.

[46]

[47] **[실시예 2] FRET 센서에 의한 아르기닌 인산화 측정**

[48] 제1 링커 및 제2 링커의 서열이 다음의 표 1에서 보는 바와 같은 것을 제외하고는 전술한 실시예 1 에서와 동일한 방식으로 FRET 센서를 준비하고, 이를 McsB (아르기닌 인산화효소), ATP 및 Mg^{2+} 와 함께 60분간 30°C에서 배양하여 FRET 변화량 (즉, 인산화에 의한 FRET 감소 비율)을 측정하였다.

[49] **[표1]**

센서 번호	링커 내의 아미노산 잔기수 (제2 링커/제1 링커)	제2 링커의 서열	제1 링커의 서열	인산화에 의한 FRET 감소 비율 (초기 FRET과 비교하였을 때) ^a
1	12/0	(GGSGGS)*2	-	0.95
2	6/6	(GGSGGS)	(GGSGGS)	0.92
3	0/16-K	-	SGIK (GGSGGS)*2	0.92
4	0/16-R	-	SGIR (GGSGGS)*2	0.84
5	12/16	(GGSGGS)*2	SGIR (GGSGGS)*2	0.89
6	6/22	(GGSGGS)	GGSGSSGIR (GGSGGS) *2	0.87
7	3/25	GGG	GGSGSSGGS SGIR (GGSGGS)*2	0.86

^a이 값이 작을수록 FRET 변화량이 크므로 sensor의 감도 향상

[50] 센서 1번, 2번 (아미노산 잔기 총수 12개)를 비교하면 센서 2의 감도가 더 우수한데 이로부터 제1 링커의 길이가 FRET 변화를 이용한 센서의 감도를 높이는데 더 중요하다는 것을 알 수 있다.

[51] 또한, 센서 3번과 4번 (아미노산 잔기 총수 16개)는 센서 내에 인산화될 수 있는 Arg(아르기닌)을 링커에 추가함으로써 센서의 인산화 정도를 늘어나서 감도에 변화가 발생하는지를 알아보기 위한 것이다. 센서 3번은 Arg 이 없는 4개 아미노산 서열을 추가한 것 (SGIK 추가)인데 4개의 아미노산 서열을 추가하더라도 아미노산 길이 12개인 센서 2번과 FRET 변화량의 차이가 없음을 알 수 있고, 이는 해당 아미노산 서열 추가에 의해 아미노산 길이가 변화하더라도 인산화에 의한 FRET 변화에 영향이 없다는 것을 의미한다. 한편, Arg을 포함하는 4개 아미노산 서열을 추가하였을 때 (센서 4번, SGIR 추가), 인산화에 의한 FRET 변화가 더 극적으로 일어나는 것이 관찰된다 (센서 3번과 센서 4번의 비교). 이로부터 링커에 추가적인 아르기닌을 도입함으로써 센서의 감도가 향상된다는 것을 알 수 있다.

- [52] 센서 5번, 6번, 7번은 링커의 총 길이를 늘려서 유연성(flexibility)을 높인 것이다. 이들은 링커 길이가 더 짧은 센서 4번에 비해 효율이 떨어진다는 것을 확인할 수 있다. 따라서 링커의 총 길이가 이보다 짧은 것이 더 유리함을 알 수 있다. 여기에서도 제1 링커의 길이가 늘어날수록 인산화 효소의 센서 감도가 더 좋아지는 것을 확인할 수 있다.
- [53] 본 실험으로부터 제1 링커와 제2 링커를 포함하는 링커 전체의 길이는 짧을수록, 같은 링커 총 길이를 가지는 경우 제1 링커가 길어질수록, 또한 링커에 아르기닌이 추가될수록 센서의 감도가 좋아진다는 것을 알 수 있다.
- [54]
- [55] **[실시예 3] 링커 길이의 최적화**
- [56] 본 실시예에서는 제1 링커와 제2 링커에서 아미노산 잔기수, 즉, 링커 길이에 따른 FRET 강도를 측정하였다. 동일한 아미노산 서열 반복 단위를 포함하도록 링커 서열을 구성하고, 각 링커에서의 아미노산 잔기수만 변화한 FRET 센서를 사용하였으며 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 0/12, 12/0, 6/6 등은 제2 링커에서의 아미노산 잔기수/제1 링커에서의 아미노산 잔기수를 의미한다. "FRET-linker 0/12 + inactive McsB"가 불활성 인산화효소를 사용한 초기 FRET을 나타내며, 이와 비교하여 FRET 이 감소하면 인산화가 이루어졌다는 것을 의미한다.
- [57] "FRET linker-0/12 + McsB"가 가장 큰 변화량을 나타내었으며, 이는 "FRET linker-12/0 + McsB", "FRET linker-6/6 + McsB"에 비하여 FRET 효율이 현저히 더 우수하였고, 이로부터 제1 링커의 길이가 FRET 효율에 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.
- [58] 다만, 제2 링커와 제1 링커의 총 길이가 "FRET linker-12/12 + McsB", "FRET linker-9/15 + McsB" 등에서의 길이와 같이 길어지면 FRET 효율이 저하되므로 전체 링커의 길이는 짧은게 더 유리하다는 것을 알 수 있다.
- [59] 최적의 "제2 링커/제1 링커" 길이는 "0/12" 였다.
- [60]
- [61] **[실시예 4] 링커에서의 아르기닌 개수/위치에 따른 영향**
- [62] 본 실시예에서는 실시예 3에서 사용한 "FRET linker-0/12" 링커를 사용하되, 제1 링커에 아르기닌을 추가하지 않거나(#0), 1 또는 2개 추가한(#1', #1, #2) FRET 센서에 있어서 시간에 따른 형광 변화를 알아보았다.
- [63] "#2 + inactive McsB"가 기준이며, 아르기닌을 추가하지 않은 경우에 비해 아르기닌을 추가함으로써 형광이 더 많이 감소하여 FRET 센서가 잘 작동한다는 것을 알 수 있다. 다만, 아르기닌을 추가하는 위치를 다르게 한 경우끼리는 FRET 변화량의 차이가 크지 않았다.
- [64] 이로부터 링커에 아르기닌을 추가하는 것이 FRET 효율을 증가시킬 수 있으며 이 때 아르기닌의 추가 개수가 많을수록 효율이 더 크게 개선될 수 있어서 효소 활성 측정에 유리한 것을 알 수 있다. 링커 내에서 아르기닌의 위치는 FRET

효율에 큰 영향을 주지 않았다.

[65]

[66] [실시예 5] (in vitro) 다양한 조건에서의 인산화 활성 측정

[67] 본 실시예에서는 실시예 3에서 사용한 "FRET linker-0/12" 링커를 포함하는 FRET 센서를 사용하되, 탈인산화효소 YwlE, ADP, 또는 PK+PEP 처리와 같은 다양한 조건에서 FRET 강도의 변화를 관찰하였다.

[68] 도 4에서 보는 바와 같이 인산화의 진행 (형광 감소) 중에 YwlE, ADP, 또는 PK-PEP 처리를 실시하였다. YwlE 첨가에 의해 형광이 증가하였으며 이는 YwlE와 같은 탈인산화효소 처리시 탈인산화 정도를 본 발명의 FRET 센서로 측정 가능하다는 것을 의미한다. 또한, ADP 처리에 의한 형광 증가로부터 아르기닌 인산화효소인 McsB의 reversibility 도 본 발명의 FRET 센서로 관찰 가능하다는 것을 알 수 있다. PK-PEP 처리로 반응 부산물인 ADP로부터 ATP의 재생산에 의한 추가적 인산화도 관찰되었다.

[69]

[70] [실시예 6] (in vivo) 살아있는 세포에서의 아르기닌 인산화 효소 활성 실시간 관찰

[71] 살아있는 세포 내에서 FRET 센서가 작동하는지 여부 및 FRET 센서에 의해 살아있는 세포 내에서의 인산화를 실시간으로 관찰할 수 있는지 여부를 알아보기 위해 실험을 실시하였다.

[72] 본 실시예에서는 실시예 3에서 사용한 "FRET linker-0/12" 링커를 포함하는 FRET 센서를 사용하였으며, 이를 살아있는 세포 내에서 투입하고 형광이 발생하는지 여부를 공초점 현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 5에 나타낸다. 도 5로부터 FRET이 작동하여 형광이 발생한다는 것을 확인할 수 있다.

[73] 한편, 아르기닌 인산화효소는 열 스트레스(Heat stress)를 부여할 경우 활성화된다는 것이 알려져 있다. 실제 세포 내에 있는 endogenous McsB의 활성을 관찰하기 위해 FRET 센서를 세포 내에서 발현시켰다. endogenous McsB를 활성화시키기 위해 세포에 50°C의 열 스트레스를 가하였다. 열 스트레스를 가하기 전과 후의 FRET 효율 변화를 도 6과 도 7에 나타내었다. 도 6과 7로부터 열 스트레스를 가할 경우 FRET 시그널이 감소된다는 것을 확인할 수 있다. 이는 인산화 아르기닌 효소가 활성화되었음을 살아있는 세포에서 실시간으로 측정할 수 있다는 것을 의미한다.

[74]

[75] [실시예 7] (in vivo) 살아있는 세포에서의 아르기닌 인산화 효소 활성 실시간 관찰

[76] 살아있는 세포 내에서 FRET 센서가 작동하는지 여부 및 FRET 센서에 의해 살아있는 세포 내에서의 인산화를 실시간으로 관찰할 수 있는지 여부를 알아보기 위해 실험을 실시하였다.

[77] 본 실시예에서는 실시예 3에서 사용한 "FRET linker-0/12" 링커를 포함하는

FRET 센서를 사용하였으며, 이를 살아있는 세포 내에서 투입하고 형광이 발생하는지 여부를 마이크로플레이트 리더를 사용하여 측정하였다.

- [78] *B. Subtilis* 의 아르기닌 인산화효소인 McsB는 에탄올 스트레스(ethanol stress)를 부여할 경우 활성화된다는 것이 알려져 있다.
- [79] 실제 세포 내에 있는 endogenous McsB의 활성을 관찰하기 위해 FRET 센서를 세포 내에서 발현시켰다.
- [80] endogenous McsB를 활성화시키기 위해 세포에 4% ethanol을 투여하여 에탄올 스트레스를 가하였다. 에탄올 스트레스를 가하기 전과 후의 FRET 효율 변화로도 8에 나타내었다. 도 8로부터 에탄올 스트레스를 가할 경우 인산화 아르기닌 탈인산화 효소인 ywIE가 삭제된 세포에서만 FRET 시그널이 감소되는 것을 확인할 수 있다.
- [81] 이는 인산화 아르기닌 효소가 활성화되었음을 살아있는 세포에서 실시간으로 마이크로플레이트를 이용하여 측정할 수 있다는 것을 의미한다.
- [82] 따라서 이 센서를 이용한다면 살아있는 세포를 이용하여 아르기닌 인산화효소의 저해제 고속스크리닝 (HTS)에 이용할 수 있다는 것을 의미한다.

청구범위

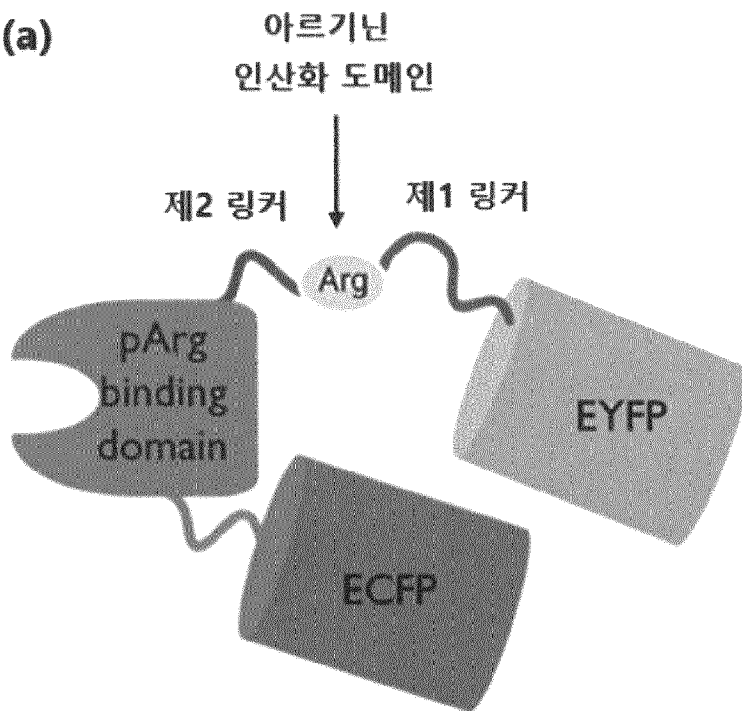
- [청구항 1] 공여 형광체 단백질, 인산화 아르기닌 결합 도메인, 아르기닌 인산화 도메인, 상기 아르기닌 인산화 도메인에 연결된 제1 링커, 및 수용 형광체 단백질을 포함하는, 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 기반한 아르기닌 인산화 효소 또는 인산화 아르기닌 탈인산화 효소의 활성 측정용 센서.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제1 링커는 6개 아미노산 잔기 이상 36개 아미노산 잔기 이하의 길이를 가지는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 제1 링커는 GGSGGS의 아미노산 서열을 1회 또는 2 내지 3회 반복하여 포함하는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 제1 링커는 1 내지 3개의 아르기닌을 포함하는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 제1 링커는 SGIR의 아미노산 서열을 제1 링커의 전체 아미노산 서열 중의 임의 위치에 포함하는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 제1 링커는 서열번호 1 내지 서열번호 9 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 제1 링커는 상기 아르기닌 인산화 도메인과 상기 수용 형광체 단백질의 사이를 연결하는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 인산화 아르기닌 결합 도메인과 상기 아르기닌 인산화 도메인의 사이를 연결하는 제2 링커를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 제2 링커는 상기 제1 링커에 비해 길이가 짧은 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 제2 링커는 서열번호 1, 서열번호 2, 및 서열번호 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 인산화 아르기닌 결합 도메인은 인산화 아르기닌에 결합하는 CtsR, McsB, ClpP, 및 인산화 아르기닌 탈인산화효소 YwIE 중 어느 하나에서 유래된 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 인산화 아르기닌 결합 도메인은 서열번호 11을 포함하는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 아르기닌 인산화 도메인은 아르기닌 인산화효소의 기질에서 유래한 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 아르기닌 인산화 도메인은 서열번호 12를 포함하는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 센서는 서열번호 13으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 센서.
- [청구항 16] 제1항에 기재된 센서를 사용하는 것을 특징으로 하는, FRET에 기반하여

아르기닌의 인산화를 검출하는 방법.

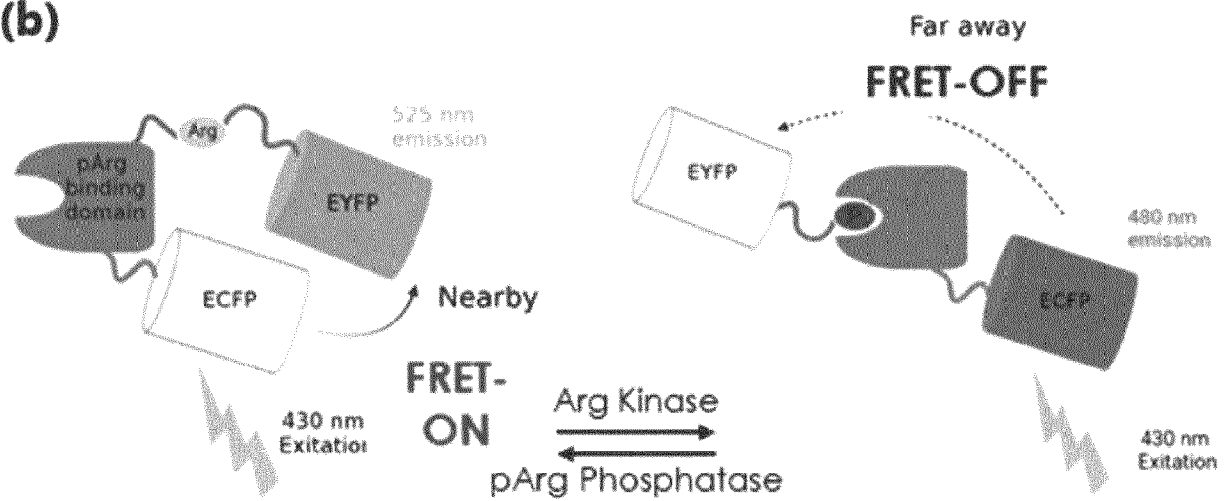
- [청구항 17] 제16항에 있어서, FRET 강도의 감소량으로부터 아르기닌 인산화를 상대적 정량으로 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제16항에 있어서, 살아있는 세포에서 아르기닌 인산화를 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 제1항에 기재된 센서를 포함하는, 아르기닌 인산화효소 저해제의 스크리닝용 키트.
- [청구항 20] 제1항에 기재된 센서를 사용하는 것을 특징으로 하는, 아르기닌 인산화효소 저해제의 스크리닝 방법.

[도1]

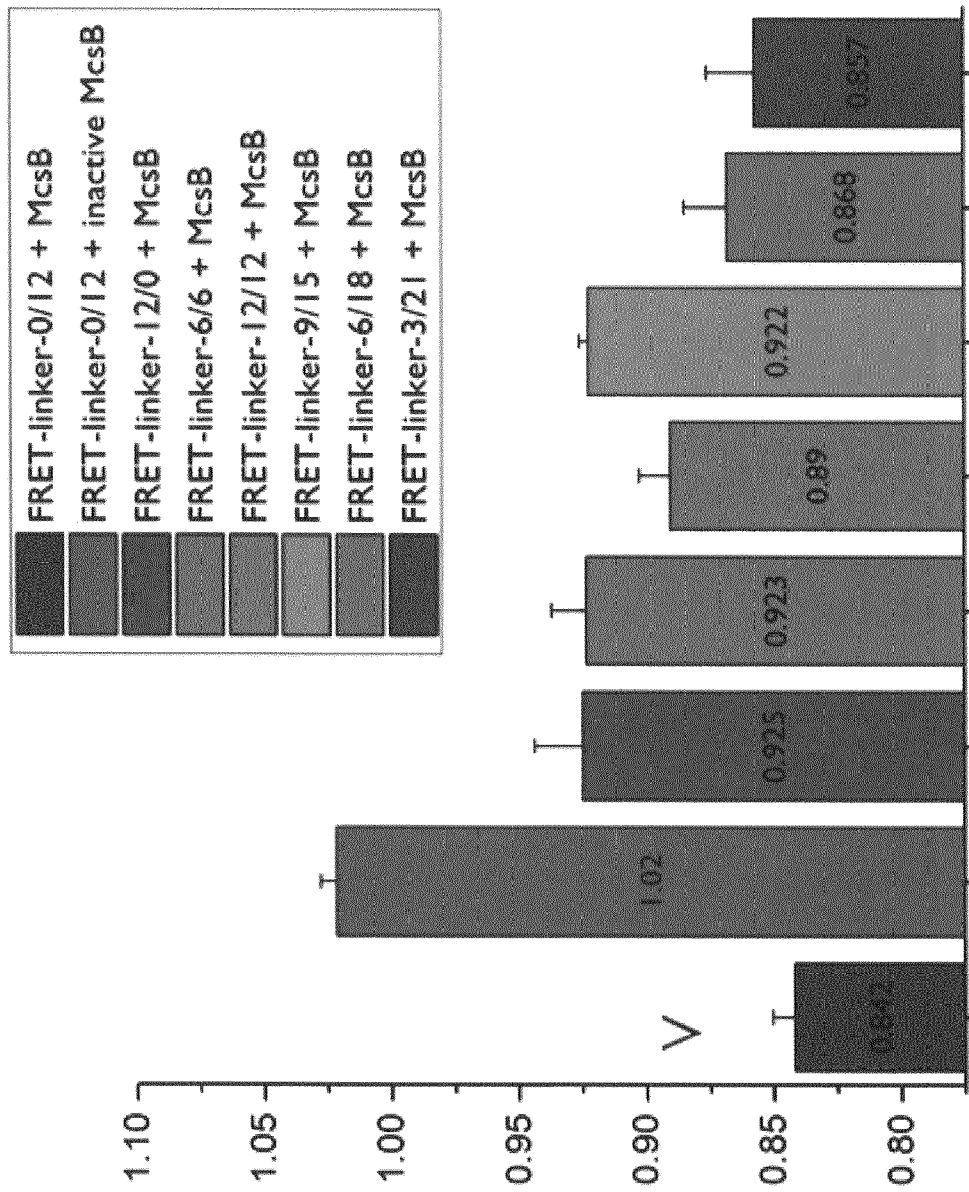
(a)



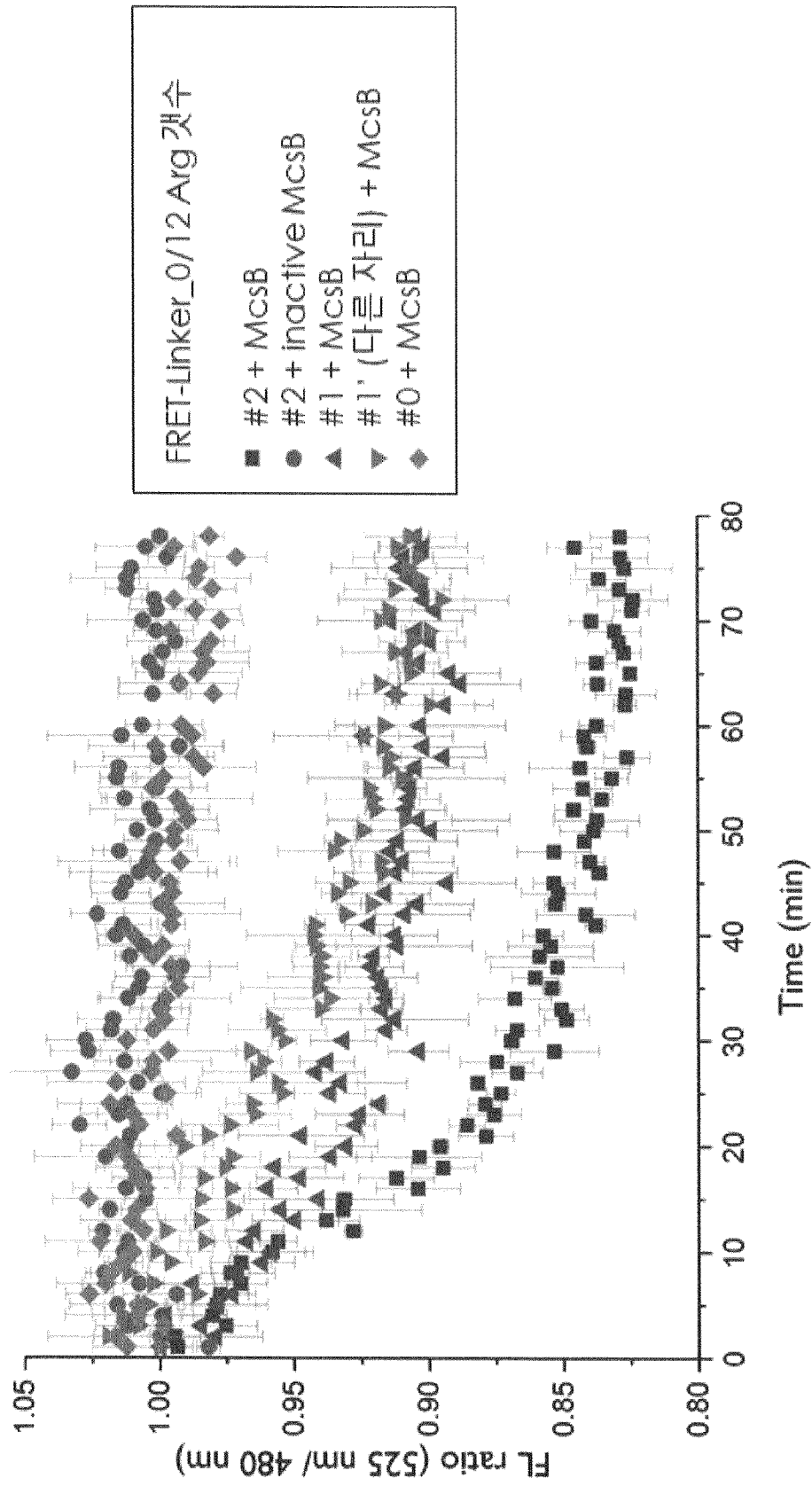
(b)



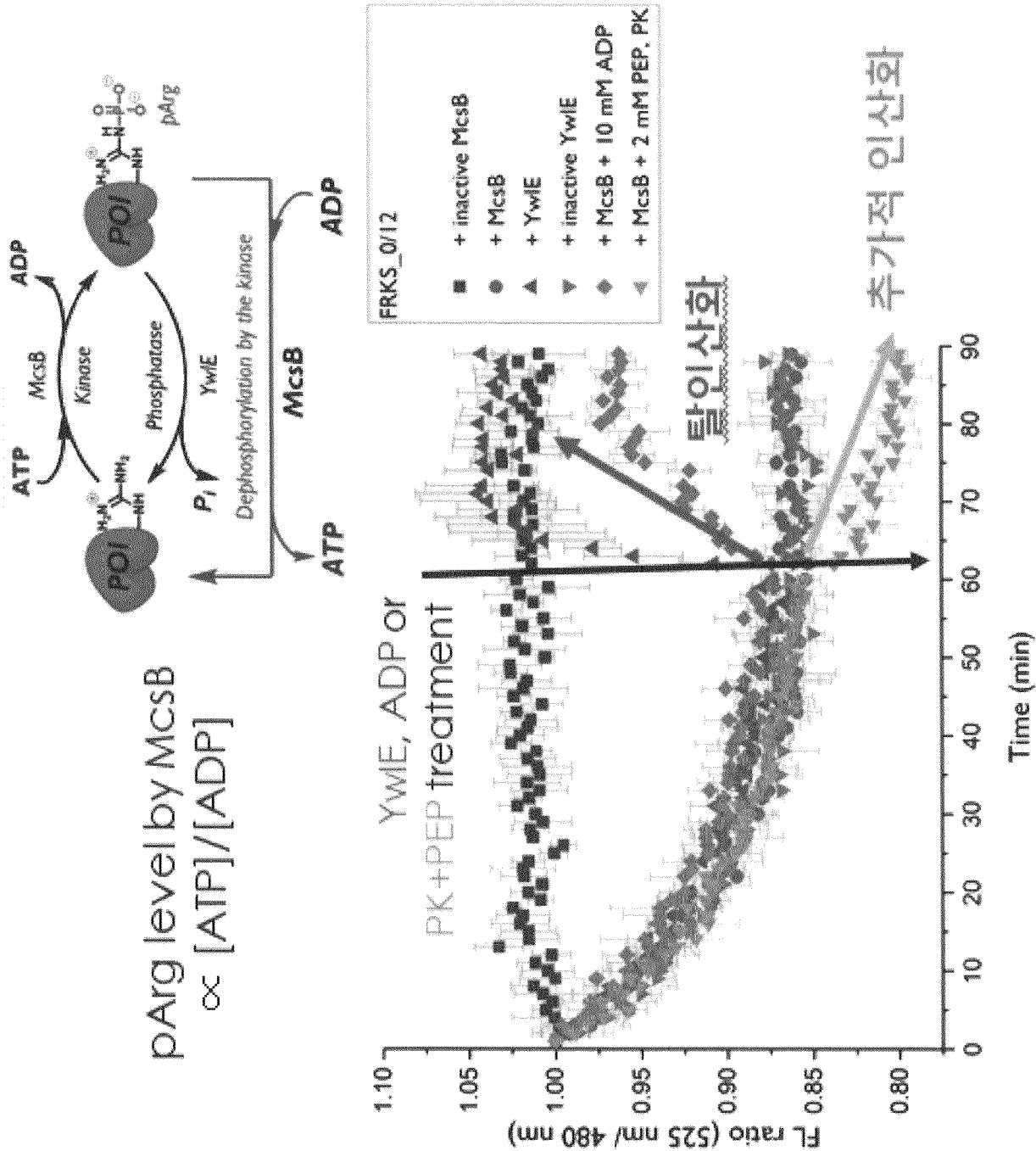
[도2]



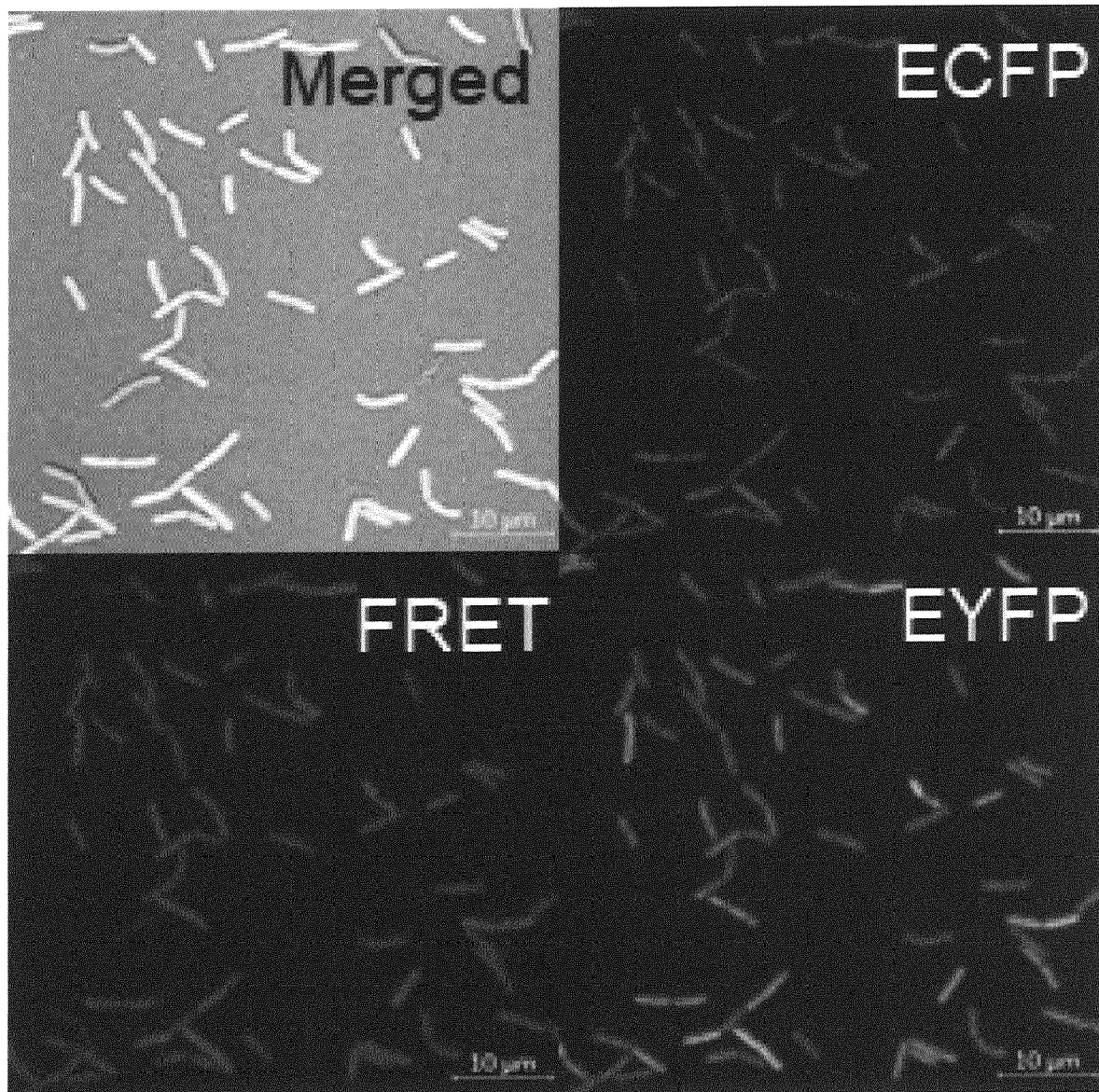
[도3]



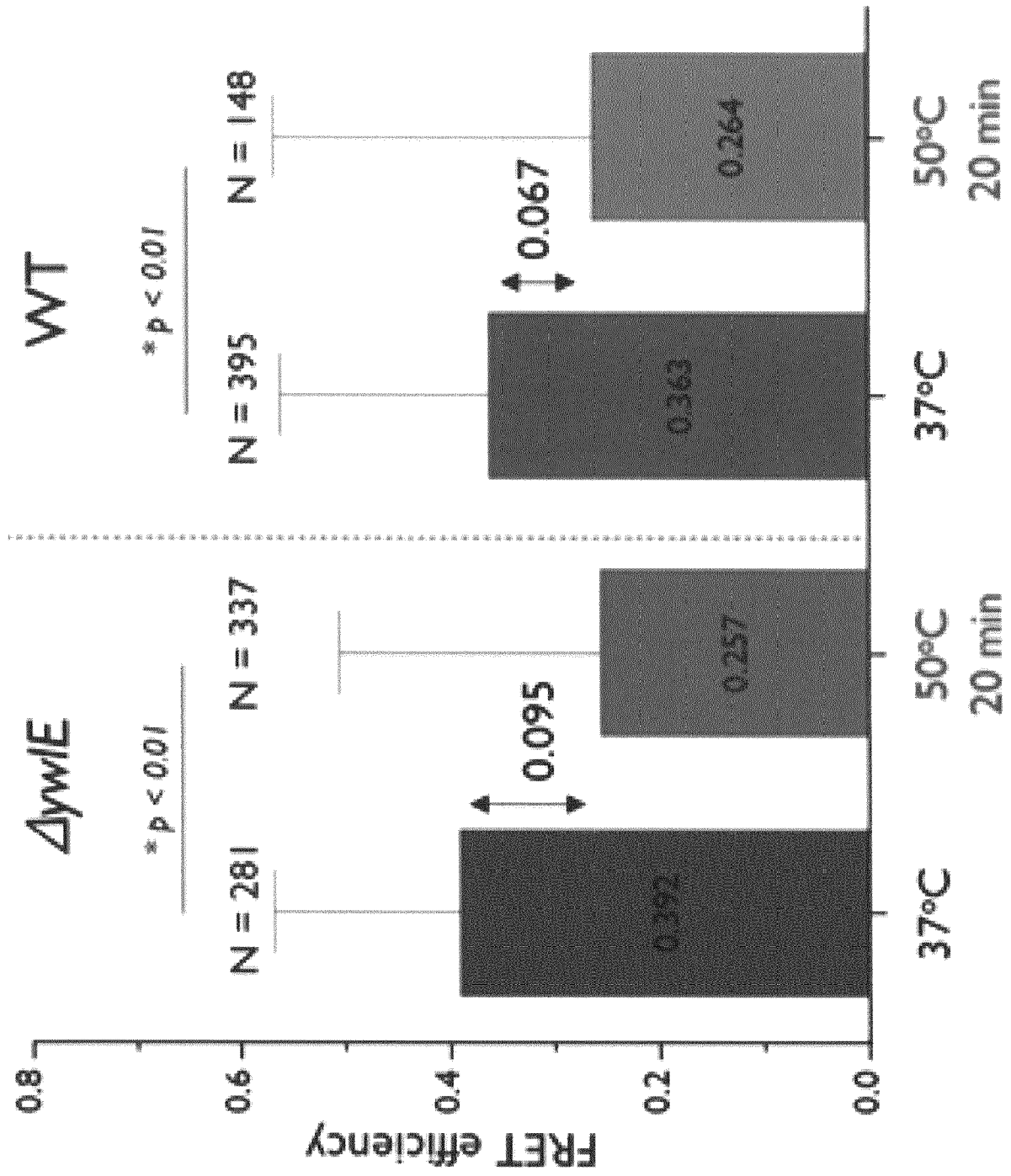
[도4]



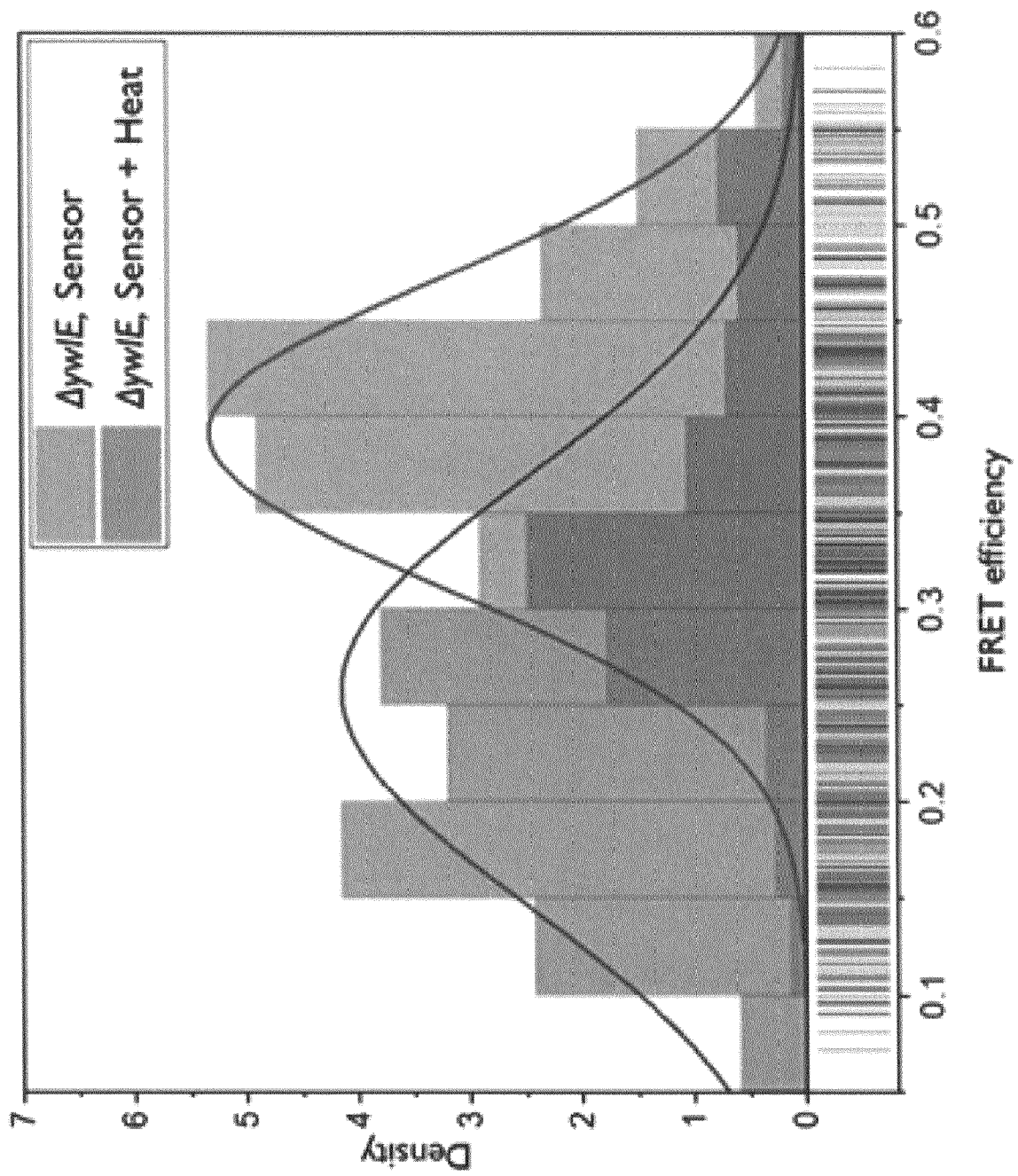
[도5]



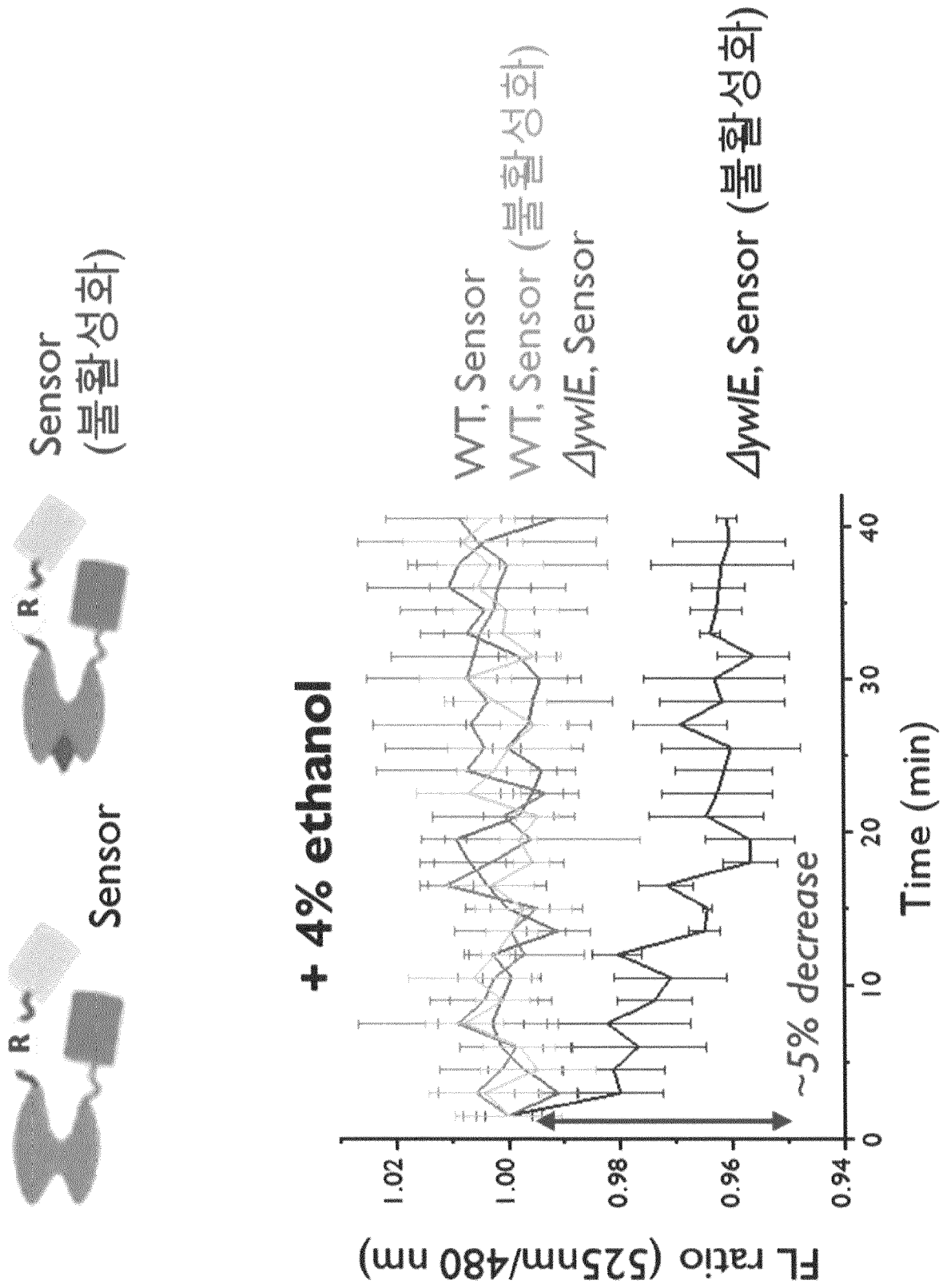
[도6]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/012583

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/48(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/48(2006.01); A01K 67/027(2006.01); C07K 14/00(2006.01); C12M 1/42(2006.01); C12Q 1/42(2006.01);
G01N 21/64(2006.01); G01N 33/58(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 아르기닌 인산화효소(Arginine kinase), 인산화아르기닌 탈인산화효소 (phosphoarginine phosphatase), FRET, 센서(sensor), 링커(linker)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	KR 10-2013-0103538 A (KYOTO UNIVERSITY et al.) 23 September 2013 (2013-09-23) See paragraphs [0035]-[0036], [0039], [0043]-[0044] and [0068].	1-4,6-11,13-14,16-20 5,12,15
Y	JUNG, Hoyoung et al. Distinct phosphorylation and dephosphorylation dynamics of protein arginine kinases revealed by fluorescent activity probes. Chemical Communications. 2019, vol. 55, pp. 7482-7485. See pages 7483-7485.	1-4,6-11,13-14,16-20
Y	EP 1264897 A2 (EUROPAISCHES LABORATORIUM FUR MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL)) 11 December 2002 (2002-12-11) See paragraph [0015]; and claims 1 and 3-4.	4
A	US 2013-0059314 A1 (GOOCH, Jennifer L. et al.) 07 March 2013 (2013-03-07) See entire document.	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 December 2022

Date of mailing of the international search report

09 December 2022

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/012583

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, Yanbo et al. A sensitive immunosensor based on FRET between gold nanoparticles and InP/ZnS quantum dots for arginine kinase detection. Food Chemistry. 11 March 2021 (online publication date), vol. 354, article no. 129536, pp. 1-7. See entire document.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/012583

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/012583

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2013-0103538	A	23 September 2013	CN	103228669	A	31 July 2013
				EP	2623514	A1	07 August 2013
				EP	2623514	B1	26 July 2017
				JP	5802674	B2	28 October 2015
				US	2013-0227718	A1	29 August 2013
				US	9103790	B2	11 August 2015
				WO	2012-043477	A1	05 April 2012
EP	1264897	A2	11 December 2002	EP	1392851	A2	03 March 2004
				WO	02-102834	A2	27 December 2002
US	2013-0059314	A1	07 March 2013	CN	102712948	A	03 October 2012
				EP	2521792	A2	14 November 2012
				WO	2011-085176	A2	14 July 2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/48(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/48(2006.01); A01K 67/027(2006.01); C07K 14/00(2006.01); C12M 1/42(2006.01); C12Q 1/42(2006.01); G01N 21/64(2006.01); G01N 33/58(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 아르기닌 인산화효소(Arginine kinase), 인산화아르기닌 탈인산화효소(phosphoarginine phosphatase), FRET, 센서(sensor), 링커(linker)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2013-0103538 A (고쿠리츠 다이가쿠 호진 교토 다이가쿠 등) 2013.09.23 단락 [0035]-[0036], [0039], [0043]-[0044], [0068] 참조.	1-4,6-11,13-14,16-20
A		5,12,15
Y	JUNG, HOYOUNG 등, 'Distinct phosphorylation and dephosphorylation dynamics of protein arginine kinases revealed by fluorescent activity probes', Chemical Communications, 2019, 55권, 페이지 7482-7485 페이지 7483-7485 참조.	1-4,6-11,13-14,16-20
Y	EP 1264897 A2 (EUROPAISCHES LABORATORIUM FUR MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL)) 2002.12.11 단락 [0015]; 청구항 1, 3-4 참조.	4
A	US 2013-0059314 A1 (GOOCH, JENNIFER L. 등) 2013.03.07 전체 문헌 참조.	1-20
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년12월08일(08.12.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년12월09일(09.12.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WANG, YANBO 등, 'A sensitive immunosensor based on FRET between gold nanoparticles and InP/ZnS quantum dots for arginine kinase detection', Food Chemistry, 2021.03.11(온라인 공개일), 354권, article no. 129536, 페이지 1-7 전체 문헌 참조.	1-20

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0103538 A	2013/09/23	CN 103228669 A	2013/07/31
		EP 2623514 A1	2013/08/07
		EP 2623514 B1	2017/07/26
		JP 5802674 B2	2015/10/28
		US 2013-0227718 A1	2013/08/29
		US 9103790 B2	2015/08/11
		WO 2012-043477 A1	2012/04/05
EP 1264897 A2	2002/12/11	EP 1392851 A2	2004/03/03
		WO 02-102834 A2	2002/12/27
US 2013-0059314 A1	2013/03/07	CN 102712948 A	2012/10/03
		EP 2521792 A2	2012/11/14
		WO 2011-085176 A2	2011/07/14