

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 4월 8일 (08.04.2021)

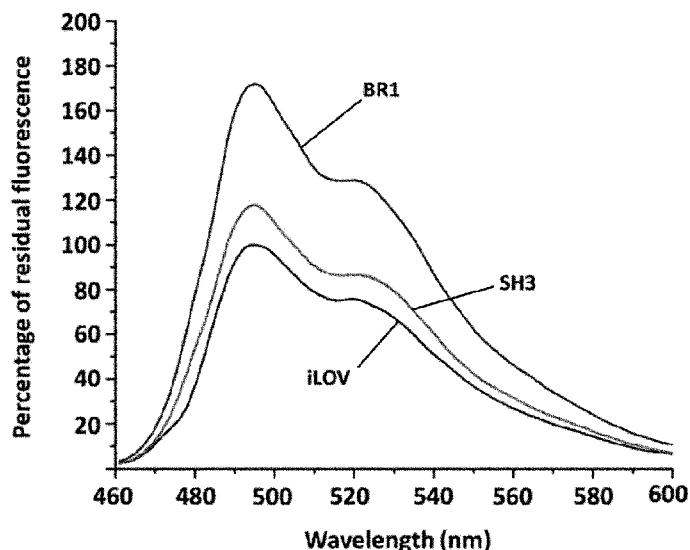


(10) 국제공개번호
WO 2021/066528 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 14/415 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/013355
- (22) 국제출원일: 2020년 9월 29일 (29.09.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2019-0120443 2019년 9월 30일 (30.09.2019) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
국민대학교 산학협력단 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 02707 서울시 성북구 정릉로 77, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 정상택 (JUNG, Sang Taek); 13562 경기도 성남시 분당구 정자일로 100, A동 1907호, Gyeonggi-do (KR).
고상환 (KO, Sanghwan); 02709 서울시 성북구 솔샘로 16길 11, 302호, Seoul (KR). 황보라 (HWANG, Bora); 10264 경기도 고양시 덕양구 통일로 1060-13, Gyeonggi-do (KR). 나정현 (NA, Jung-Hyun); 04759 서울시 성동구 마조로 57, 106동 301호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베텔회관 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, 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 국내 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), 유

(54) Title: FLAVIN MONONUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN VARIANTS HAVING IMPROVED FLUORESCENCE INTENSITY DERIVED FROM ARABIDOPSIS THALIANA

(54) 발명의 명칭: 형광세기가 향상된 애기장대 유래 플라빈 모노뉴클레오타이드 결합 단백질 변이체들



(57) Abstract: The present invention relates to a flavoprotein improved LOV (iLOV) variant with increased fluorescence intensity compared to iLOV. In addition, the present invention relates to a method for screening an iLOV variant. The iLOV variant of the present invention has increased fluorescence intensity and quantum yield compared to existing LOV proteins or iLOV proteins, such that the iLOV variant can be utilized to confirm the expression of a target protein or to separate and purify the expressed target protein regardless of whether or not oxygen is present.

(57) 요약서: 본 발명은 iLOV(flavoprotein improved LOV) 대비 형광세기가 증가된 iLOV 변이체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 iLOV 변이체의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 iLOV 변이체는 기존의 LOV 단백질 또는 iLOV 단백질 보다 형광세기 및 양자수율이 증가되어 산소의 존재 유무에 상관없이 목적 단백질의 발현 여부를 확인하거나 발현된 목적 단백질을 분리정제하는데 유용하게 활용할 수 있다.

럼 (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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 형광세기가 향상된 애기장대 유래 플라빈 모노뉴클레오타이드 결합 단백질 변이체들

기술분야

- [1] 본 발명은 형광 세기가 향상된 플라빈 모노뉴클레오타이드 결합 형광 단백질 변이체에 관한 것으로, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 유래의 형광 단백질 변이체 발굴에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 형광 단백질은 생명과학, 의학, 약학 연구를 위한 유전자에 코딩될 수 있는 표지자 (reporter)로써 다양한 연구분야에 널리 응용되고 있으며, 특히 세포나 동물, 식물에서 단백질의 발현, 활성, 분비 등을 실시간으로 분석하는데 유용하게 이용되고 있다. 형광 단백질은 특정 파장의 빛에 의해 활성화되었다가 낮은 에너지 수준으로 변화되는 과정에서 다른 파장의 빛을 방출하는 단백질이며, 대표적인 예로 GFP (Green fluorescent protein)는 바다에 사는 해파리에게서 발견된 것으로 생명과학 연구에 필수적인 도구로 사용되고 있으며, 해당 기술 연구에 대해 2008년 노벨상이 수여되었다.
- [3] 단백질 유전자에 GFP를 생성하는 유전자를 결합시키면, 세포나 조직에서의 유전자 발현을 GFP 형광을 이용하여 추적 관찰할 수 있으며, 암을 일으키는 특정 단백질의 유전자에 녹색 형광 단백질의 유전자를 삽입해서 실험용 생물체의 세포에 주입할 경우, 시간이 흐르면서 암의 크기나 위치를 추적할 수 있어서 생물체를 해부할 필요 없이 청색 빛을 비추어 육안으로 확인할 수도 있다.
- [4] 또한, 의약 단백질 연구에서 목적 단백질 유전자에 녹색 형광 단백질 유전자를 융합한 후 동물에게 삽입하면 녹색 형광 단백질을 통해 목적 단백질의 삽입 여부를 쉽게 확인할 수도 있다.
- [5] 이외에도 GFP 유전자 결합을 통해 신경회로의 분석, 세포막 연구, 바이러스 감염 메커니즘 등의 생명과학적 연구들이 매우 활발하게 수행되고 있으며, 살아있는 동물에 GFP를 도입한 형광성 동물 개발도 보고되었다.
- [6] 현재 이용되고 있는 GFP를 포함한 대부분의 형광 단백질들은 형광 빛을 방출할 수 있는 형광 발색단 (chromophore) 형성을 위해 산소 존재가 필수적이라는 한계점을 가지고 있다. 따라서 산소가 결핍된 세포내 환경, 산소가 없는 조건에서 생존을 유지하는 혐기성 미생물 (anaerobic bacteria), 세포의 과도한 성장으로 주위의 산소가 결핍된 환경 등에서는 사용하기가 어렵다.
- [7] 반면, 산소의 존재나 산소결핍 유무에 관계없이 생명과학, 의학, 약학 분야에 적용하여 형광 표지자로 이용이 가능한 플라빈 기반 형광 단백질 (Flavin-based fluorescent proteins (FbFPs))이 발견되었으나, 상기 플라빈 기반 형광 단백질(Flavin-based fluorescent proteins (FbFPs))은 형광의 세기가 높지 않아

사용하기가 어렵다는 단점이 있다.

[8]

[9] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명자들은 산소의 존재나 산소결핍 유무에 관계없이 생명과학, 의학, 약학 등의 분야에서 널리 활용될 수 있는 플라빈 기반 형광 단백질 (Flavin-based fluorescent proteins (FbFPs))을 발굴하고자 예의 노력을 하였다. 그 결과, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)로부터 유래한 LOV 단백질의 변이체인 iLOV 단백질을 기반으로 일부 아미노산 서열을 다른 아미노산 서열로 치환하여 최적화함으로써 LOV 또는 iLOV 단백질 보다 형광세기가 크게 향상된 변이체를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[11]

[12] 따라서, 본 발명의 목적은 iLOV(flavoprotein improved LOV) 대비 형광세기가 증가된 iLOV 변이체를 제공하는데 있다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 상기 iLOV 변이체를 코딩하는 핵산분자를 제공하는데 있다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공하는데 있다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하는데 있다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 iLOV 변이체, 핵산분자 또는 벡터를 포함하는 형광 발색용 조성물을 제공하는데 있다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는 목적 단백질의 발현을 분석하는 방법을 제공하는데 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 발현시켜 목적 단백질을 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 목적 단백질을 분리하는 단계;를 포함하는 목적 단백질의 분리정제 방법을 제공하는데 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 iLOV 변이체의 제조방법을 제공하는데 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 iLOV 변이체의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

[21]

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

과제 해결 수단

[23] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 iLOV(flavoprotein improved LOV) 대비 형광세기가 증가된 iLOV 변이체를 제공한다.

[24]

- [25] 본 발명자들은 산소의 존재나 산소결핍 유무에 관계없이 생명과학, 의학, 약학 등의 분야에서 널리 활용될 수 있는 플라빈 기반 형광 단백질 (Flavin-based fluorescent proteins (FbFPs))을 발굴하고자 예의 노력을 한 결과, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)로부터 유래한 LOV 단백질의 변이체인 iLOV 단백질을 기반으로 일부 아미노산 서열을 다른 아미노산 서열로 치환하여 최적화함으로써 LOV 또는 iLOV 단백질 보다 형광세기가 크게 향상된 변이체를 확인하였다.
- [26]
- [27] 본 명세서에서 용어 “LOV 단백질” 또는 “LOV protein”은 고등식물, 미세조류(microalgae), 곰팡이 및 박테리아 등에 있어서 환경 조건을 감지하는 센서 도메인을 의미하며, Light-oxygen-voltage의 약자에 해당한다. 본 발명에서는 상기 LOV 단백질은 바람직하게는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 플라빈 기반 형광 단백질 (Flavin-based fluorescent proteins (FbFPs))이며, 보다 바람직하게는 서열목록 제1서열을 포함한다.
- [28] 본 명세서에서 용어 “iLOV 단백질”, “iLOV protein” 또는 “flavoprotein improved LOV”은 상기 LOV 단백질의 변이체를 의미하며, 바람직하게는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열에서 8번째, 23번째, 40번째, 66번째, 84번째 및 89번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것이며, 보다 바람직하게는 서열목록 제2서열을 포함한다.
- [29] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열의 일부를 포함하며, 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 5번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 Y(Tyrosine)로 치환된 것을 포함한다.
- [30] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 5번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 Y(Tyrosine)로 치환 및 추가적으로 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 79번째 아미노산인 K(Lysine)가 E(Glutamate)로; 84번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 L(Leucine)로; 91번째 아미노산인 D(Aspartate)가 N(Asparagine)으로; 및 104번째 아미노산인 L(Leucine)이 Q(Glutamine)로 치환된 것을 포함한다.
- [31] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 5번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 Y(Tyrosine)로 치환 및 추가적으로 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 29번째 아미노산인 E(Glutamate)가 G(Glycine)로, 78번째 아미노산인 K(Lysine)가 R(Arginine)로; 및 109번째 아미노산인 H(Histidine)가 R(Arginine)로 치환된 것을 포함한다.
- [32] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체는 서열목록 제3서열 또는 제4서열의 아미노산 서열을 포함한다.

- [33] 본 발명의 iLOV 변이체는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 LOV 단백질의 변이체인 iLOV 단백질과 비교하여 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 더 바람직하게는 40% 이상, 가장 바람직하게는 50% 이상 형광 세기가 증가된 것을 특징으로 한다.
- [34] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체들은 iLOV 단백질과 비교하여 93% 내지 277% 증가된 형광세기를 나타내었다(도 4).
- [35] 본 발명의 iLOV 변이체는 또한 상기 LOV 단백질 또는 iLOV 단백질과 비교하여 증가된 양자수율을 나타낸다.
- [36] 양자수율(quantum yield)은 빛의 흡수에 이어 일어나는 발광 또는 광전자 방출 등에서, 흡수한 광자의 수에 대하여 방출한 광자의 수 또는 광전자 수의 비율을 나타내는 값이다. 즉 양자수율이 높을수록 흡수한 빛 광자가 다시 방출되는 광자로 전환율이 높은 것을 의미한다. 따라서 양자수율이 높은 단백질은 결국 밝은 형광단백질임을 나타낸다. 양자수율이 높은 형광단백질은 적은양이 있어도 형광이 상대적으로 높게 측정될 수 있으며 이는 민감도 증가로 연결된다.
- [37] 본 발명의 iLOV 변이체는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 LOV 단백질 또는 변이체인 iLOV 단백질과 비교하여 4% 이상, 바람직하게는 5% 이상, 보다 바람직하게는 6% 이상, 보다 더 바람직하게는 7% 이상, 가장 바람직하게는 8% 이상 양자수율이 증가된 것을 특징으로 한다.
- [38] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체들은 iLOV 단백질과 비교하여 8% 내지 22% 증가된 양자수율을 나타내었다(도 7).
- [39] 또한, 본 발명의 iLOV 변이체는 상기 LOV 단백질 또는 iLOV 단백질과 비교하여 증가된 열적 안정성을 나타낸다.
- [40] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체는 온도가 크게 증가(45°C)되었음에도 불구하고, 높은 열적 안정성을 나타내어(도 8), 높은 온도 조건에서도 활용이 가능한 장점을 갖는다.
- [41] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 iLOV 변이체를 코딩하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [42] 본 발명의 핵산분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. "단리된 핵산"은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게

연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 "작동가능하게 연결된"은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

- [43] 본 명세서에서 용어 "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생(exogenous) 또는 이종(heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코스미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지, AAV 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).
- [44] 본 명세서에서 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.
- [45] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 벡터는 상기 핵산분자를 리포터 유전자로서 포함하며, 발현하고자 하는 목적 단백질을 추가로 포함한다.
- [46] 본 명세서에서 용어 "목적 단백질" 또는 "target protein"은 적당한 숙주세포를 이용하여 이를 확인 또는 생산하고자 하는 단백질을 의미한다.
- [47] 본 발명의 핵산분자를 리포터 유전자로 활용할 경우, 상기 목적 단백질의 발현 여부를 형광으로 분석함으로써 상기 목적 단백질의 발현을 분석하거나 목적 단백질을 생산하여 이를 용이하게 분리정제하는데 활용할 수 있다.
- [48] 본 명세서에서 용어 "숙주세포"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.
- [49] 본 발명의 숙주세포는 바람직하게는 세균(bacteria)세포, 이스트(yeast), 포유동물 세포(CHO 세포, HeLa 세포, HEK293 세포, BHK 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, NIH3T3 세포, MDCK 세포, WI38 세포 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[50]

- [51] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 iLOV 변이체, 상기 핵산분자 또는 상기 벡터를 포함하는 형광 발색용 조성물을 제공한다.
- [52]
- [53] 상기 형광발생용 조성물은 목적 단백질의 발현 여부를 확인하거나 발현된 목적 단백질을 분리정제거나, 특정 조직, 세포 또는 분자를 이미징하기 위한 키트에 포함되어 제작될 수도 있다.
- [54]
- [55] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는 목적 단백질의 발현을 분석하는 방법을 제공한다.
- [56]
- [57] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 벡터를 발현시켜 목적 단백질을 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 목적 단백질을 분리하는 단계;를 포함하는 목적 단백질의 분리정제 방법을 제공한다.
- [58]
- [59] 상술한 바와 같이, 본 발명의 핵산분자를 리포터 유전자로 활용할 경우, 목적 단백질의 발현 여부를 확인하거나 발현된 목적 단백질을 분리정제하는데 활용할 수 있으며, 본 발명의 iLOV 변이체를 다른 단백질이나 분자에 결합 또는 융합하여 형광을 이용하여 이들의 위치를 확인하거나 정량하는데 활용할 수 있다.
- [60]
- [61] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 iLOV 변이체의 제조방법을 제공한다:
- [62] a) 상기 iLOV 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
- [63] b) 상기 숙주세포에 의해 발현된 iLOV 변이체를 회수하는 단계.
- [64]
- [65] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 iLOV 변이체의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [66] a) 상기 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자에 추가적으로 무작위적인 점 돌연변이를 가한 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자의 라이브러리를 구축하는 단계; 및
- [67] b) 상기 라이브러리에서 서열목록 제2서열의 iLOV 단백질 보다 형광세기가 증가된 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자를 선별하는 단계.
- [68]
- [69] 본 발명의 스크리닝 방법은 형광표지세포분리(FACS) 스크리닝, 또는 유세포 분석 기술을 사용할 수 있다. 유세포 분석을 실시하기 위한 기기는 당업자에게 공지이다. 그러한 기기의 예로는 FACS Aria, FACS Star Plus, FACScan 및 FACS Sort 기기(Becton Dickinson, Foster City, CA), Epics C(Coulter Epics Division, Hialeah,

FL), MOFLO(Cytomation, Colorado Springs, Colo.), MOFLO-XDP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN)를 들 수 있다. 일반적으로 유세포 분석 기술에는 액체 시료 중의 세포 또는 다른 입자의 분리가 포함된다. 전형적으로는 유세포 분석기의 목적은 분리된 입자를 이들의 하나 이상의 특성(예를 들면 표지된 리간드 또는 다른 분자의 존재)에 대해서 분석하는 것이다. 입자는 센서에 의해 하나씩 통과되며, 크기, 굴절, 광산란, 불투명도, 조도, 형상, 형광 등에 기초하여 분류된다.

발명의 효과

- [70] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [71] (i) 본 발명은 iLOV(flavoprotein improved LOV) 대비 형광세기가 증가된 iLOV 변이체를 제공한다.
- [72] (ii) 또한, 본 발명은 iLOV 변이체의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [73] (iii) 본 발명의 iLOV 변이체는 기존의 LOV 단백질 또는 iLOV 단백질 보다 형광세기 및 양자수율이 증가되어 산소의 존재 유무에 상관 없이 목적 단백질의 발현 여부를 확인하거나 발현된 목적 단백질을 분리정제하는데 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [74] 도 1은 iLOV 1, 2차 라이브러리를 이용하여 sorting한 과정을 나타낸다.
- [75] 도 2는 iLOV 1차 스크리닝 결과로 나온 라이브러리의 enrichment test를 나타낸다.
- [76] 도 3은 iLOV 2차 스크리닝 결과로 나온 라이브러리의 enrichment test를 나타낸다.
- [77] 도 4는 iLOV 1, 2차 라이브러리에서 선별된 SH3 및 BR1의 FACS 형광 세기를 나타낸다.
- [78] 도 5는 iLOV 변이체들의 돌연변이가 도입된 위치를 나타낸다.
- [79] 도 6은 SH3 및 BR1의 발광형광 패턴 분석을 나타낸다.
- [80] 도 7은 SH3 및 BR1의 양자 수득률을 나타낸다.
- [81] 도 8은 SH3 및 BR1의 열적안정성 분석을 나타낸다.
- [82] 도 9는 SH3 및 BR1의 열적안정성 분석에서 실제 형광 세기를 나타낸다.
- [83] 도 10은 iLOV 변이체들과 iLOV 및 야생형 LOV의 서열을 비교한 결과를 나타낸다.
- [84] 도 11은 Homology modeling 분석을 통한 SH3 및 BR1의 향상된 스펙트럼 특성에 대한 구조 해석 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [85] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은

당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[86]

[87] 실시예

[88] <실시예 1> iLOV 변이체 라이브러리 (library) 제작

[89] 애기장대(*arabidopsis thaliana*) 유래의 FMN-based fluorescent protein (iLOV)을 합성하여 *Bam*HI, *Hind*III (New England Biolab) restriction enzyme들 site들을 이용하여 PEQ-80 vector (Qiagen)로 옮겨 iLOV 발현용 플라스미드를 완성하였다. 이 플라스미드를 template로 하고 error prone PCR 기법을 이용하여 각각에 변이를 도입하였다. Error prone PCR을 위한 Primer는 5'-CATCACCATCACCATCACGGATCC-3', 5'-AAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTG-3'를 사용하였고 Error rate은 0.5% error가 들어 갈 수 있도록 조정하여 library insert를 제조하였다. 제조된 library insert를 발현용 vector에 넣기 위해 *Bam*HI, *Hind*III (New England Biolab) 제한효소 처리를 하여 같은 제한효소로 처리된 PEQ-80L vector와 ligation을 하였다. 그 후 대장균 Jude1 ((F' [Tn10(Tet^r) proAB⁺lacI^qΔ(lacZ)M15] *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)f80ΔlacZΔM15 ΔlacX74 *deoR recA1 araD139* Δ(*ara leu*)7697 *galU galK*rpsLendA1nupG)에 transformation 하여 거대 iLOV 변이체 라이브러리를 구축하였다. 또한 1차 발굴한 변이체를 이용하여 2차 라이브러리를 구축하였다.

[90]

[91] <실시예 2> 박테리아 배양 및 유세포 분리기 (flow cytometry)를 이용한 iLOV 변이체 라이브러리 탐색

[92] 구축된 iLOV 변이체 라이브러리 탐색을 위하여 대장균 Jude1 세포에 형질전환되어 있는 변이체 라이브러리 세포 1 ml을 37°C 250 rpm shaking 조건으로 2% (w/v) glucose에 Antibiotics는 ampicillin (40 μg/mL)이 포함된 Terrific Broth(TB) 배지에 각각 넣어 주고 4시간 배양을 하였다. 진탕배양된 라이브러리 세포를 TB 배지에 1:100으로 접종한 후 37°C 250 rpm shaking 으로 OD₆₀₀가 0.5에 도달할 때까지 배양 하였다. 그 후 cooling을 위해 20분 동안 25°C에서 배양한 후 1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG)를 넣어 발현유도를 하였다. 배양이 끝난 후 세포를 회수하여 PBS로 두 번 세척한 후 유세포 분리기 (Flow cytometry: S3 sorter (Bio-rad))를 이용하여 높은 형광을 보이는 상위 2% 세포들을 회수하기 위해 sorting을 진행 하였고 형광이 높은 세포들의 순도를 높이기 위해서 sorting 받은 세포들을 다시 resorting하였다. resorting 받은 sample을 바로 ampicillin (40 μg/mL)이 포함된 TB+2% (w/v) glucose에 접종하여 overnight 배양을 하였고 다음 날 ampicillin (40 μg/mL)이 포함된 TB 배지에 1:100으로 접종하여 다음 라운드의 형광이 높은 세포들의 분류작업을 진행하였다. 이와 같은 방법으로 각각의 라이브러리를 4번에 걸쳐 sorting 및 resorting을 진행 하였다(도 1). 라운드가 진행됨에 따라 detector의 민감도를 낮추어서 측정하였다(유세포 분리기 detector의 민감도를 낮추어 좀 더 형광의 세기가 높은 것을 찾을 수

있다). 또한 위와 같은 방법으로 1차 라이브러리에서 발굴된 SH3 기반으로 2차 라이브러리를 구축하여 4번에 걸쳐 sorting 및 resorting을 진행 하였다(도 1).

[93]

[94] <실시예 3> 형광의 향상된 iLOV 변이체 선별

[95] iLOV의 1차 2차 라이브러리에서 4라운드의 sorting 및 resorting 과정으로 형광 세기가 향상된 그룹을 얻었는지 확인하였고(도 2 및 3), 확인된 그룹에서 개별 클론들을 분석하여 높은 형광을 보이는 iLOV 변이체들을 유세포 분리기를 이용한 형광 신호를 통하여 확인하였다. 그 중 iLOV의 형광세기 보다 높은 2개의 iLOV 변이체 (SH3, BR1)를 확보할 수 있었다(도 4 및 도 5).

[96]

[97] <실시예 4> 선별된 iLOV 변이체들의 발광패턴 분석

[98] iLOV 변이체들의 발광 패턴을 조사 하였다. 3 μ M의 각 정제된 단백질에 450nm의 파장을 이용하여 전자를 들뜨게 하고, 그로 인해서 방출 되는 파장을 측정하였다. 470에서부터 600 nm 사이에 방출 파장을 측정한 결과 495 nm와 520 nm에서 두 개의 피크가 관찰 되었다. iLOV와 그 변이체의 전체적인 형광 패턴은 비슷했으며 SH3 및 BR1의 방출세기가 각각 20%, 70% 향상되었다(도 6).

[99]

[100] <실시예 5> iLOV 변이체들의 양자수율(quantum yield) 분석

[101] 양자수율(quantum yield)은 빛의 흡수에 이어 일어나는 발광 또는 광전자 방출 등에서, 흡수한 광자의 수에 대하여 방출한 광자의 수 또는 광전자 수의 비율을 나타내는 값이다. 즉 양자수율이 높을수록 흡수한 빛 광자가 다시 방출되는 광자로 전환율이 높은 것을 의미한다. 따라서 양자수율이 높은 단백질은 결국 밝은 형광단백질임을 나타낸다. 양자수율이 높은 형광단백질은 적은양이 있어도 형광이 상대적으로 높게 측정될 수 있으며 이는 민감도 증가로 연결된다. Fluorescein을 기준 물질로 이용하여 iLOV 변이체의 양자수율을 측정하였다. 야생형 iLOV는 양자수율이 0.37인 것과 비교하여 SH3 및 BR1은 각각 0.40 및 0.45로 향상된 양자수율을 보였다(도 7).

[102]

[103] <실시예 6> iLOV 변이체들의 열적안정성 분석

[104] 선별된 iLOV 변이체들의 열적 안정성을 측정해 보았다. 열적 안정성 실험은 단백질을 3 μ M에서 37°C 또는 45°C에서 노출시킨 뒤, 일정한 시간이 지나면 샘플을 취한 뒤 남아있는 형광단백질의 밝기를 측정하였다. 이때 형광단백질의 밝기가 온도에 의해서 영향을 받기 때문에 모든 측정에서 각 샘플은 25°C의 항온조에 30초간 인큐베이션 한 뒤 25°C로 온도가 고정된 큐벳에서 형광의 밝기를 측정하였다. 이때 샘플은 450 nm의 파장으로 들뜨게 하였고 495 nm의 발광을 측정하였다. iLOV와 비교하여 SH3는 열적안정성이 향상된 결과를 보였고 BR1은 낮은 열적안정성을 보였다(도 8). 하지만 BR1은 여전히 높은 형광 세기를 보였다(도 9).

[105]

[106] <실시예 7> Homology modeling 분석을 통한 SH3 및 BR1의 향상된 스펙트럼 특성에 대한 구조 해석

[107] SH3 및 BR1은 iLOV의 서열과 비교하여 각각 5 개의 추가 돌연변이 (F391Y, K465E, L470F, D477N 및 L490Q)와 4 개의 추가 돌연변이 (F391Y, E415G, K464R 및 H495R)를 포함하고 있다 (도 11A). 이 중 SH3는 Phe-470 (iLOV의 Lue-470)은 야생형 LOV와 같은 아미노산으로 보존되어 있다. 선행연구에 따르면 iLOV의 F470L는 Leu-472를 FMN의 isoalloxazine ring 쪽으로 flipping 하여 형광 세기를 개선하였다. 야생형 LOV에서는 Phe-470에 의해 Lue-472가 FMN isoalloxazine ring과 멀리 떨어져 있는 구조를 가지고 있다. 그러나 SH3 변이체의 형광 강도는 L470F 치환을 포함 함에도 불구하고 iLOV의 형광세기보다 높았다. 이에 SH3의 F470 위치에 어떤 아미노산으로 대체 되었을 때 형광세기 향상 효과에 대한 통찰력을 얻기 위해 SWISS-MODEL을 사용하여 인실 리코 모델을 생성하였다. SH3의 모델에 따르면 470 위치에 Phe 또는 Lue에 상관 없이 Lue-472는 여전히 FMN isoalloxazine ring 쪽으로 회전되어 있으며 (도 11B) SH3에서 Lue-472를 flipping하는 원인은 D477N로 예상되었다. iLOV의 Asp-477은 Arg-397과 함께 salt bridge를 형성하여 FMN과의 결합을 증가시킨다. 하지만 SH3에서 D477N 치환에 의한 salt bridge의 제거는 Lue-472가 FMN isoalloxazine ring 쪽으로 뒤집힐 수 있게 하였다 (도 11B). 또한 SH3의 470 위치에 페닐알라닌보다 FMN 고리에 대한 친화성이 낮은 더 작은 소수성 잔기 (이소류신, 류신, 메티오닌 및 발린)로의 치환은 SH3의 형광세기를 오히려 감소시키는 것으로 보아 SH3의 Phe-470에 대한 모델링 해석을 뒷받침한다 (도 11C). 따라서 우리는 SH3에 L470F 및 D477N 치환에 의한 FMN isoalloxazine ring의 증가된 구조적 안정성이 SH3가 iLOV보다 향상된 형광세기를 가지는 것을 뒷받침 할 것이다. Y391F 치환을 제외하고 SH3와 비교하여 BR1만이 가지고 있는 세 가지 확인 된 돌연변이는 (E415G, K464R 및 H495R)는 BR1이 iLOV 보다 큰 양전하를 가지게 한다 (도 11D 및 E). BR1에 대한 인실 리코 모델에 따르면 E415G, K464R 및 H495R은 FMN isoalloxazine ring의 친수성면과 가까워 졌다(도 11E). 선행연구에서 산화 조건에서 LOV 단백질은 FMN isoalloxazine ring의 친수성 측면에 의해 생성된 세미 퀴논 라디칼이 단백질의 광 안정성을 저해하여 형광 감소가 되었다는 보고가 있다. 음전하를 띤 아미노산이 세미 퀴논 라디칼을 생성하고 양성자가 세미 퀴논 라디칼을 하이드로 퀴논으로 전환하는 데 관여한다는 사실을 바탕으로, 세 가지 치환 돌연변이로 인한 BR1의 상대적으로 양전하를 띤 환경은 세미 퀴논 라디칼에 의한 광 환원을 감소시켜 BR1의 형광 세기를 향상시킬 수 있었다. SH3는 야생형 iLOV 또는 BR1에 비해 향상된 열 안정성을 나타 냈는데, 이는 SH3의 모델링 결과에서 L490Q가 Asn-390 (도 11F)과 물 매개 전하 상호 작용을 생성 함으로써 열안정성이 향상된 것으로 예상된다.

[108]

- [109] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

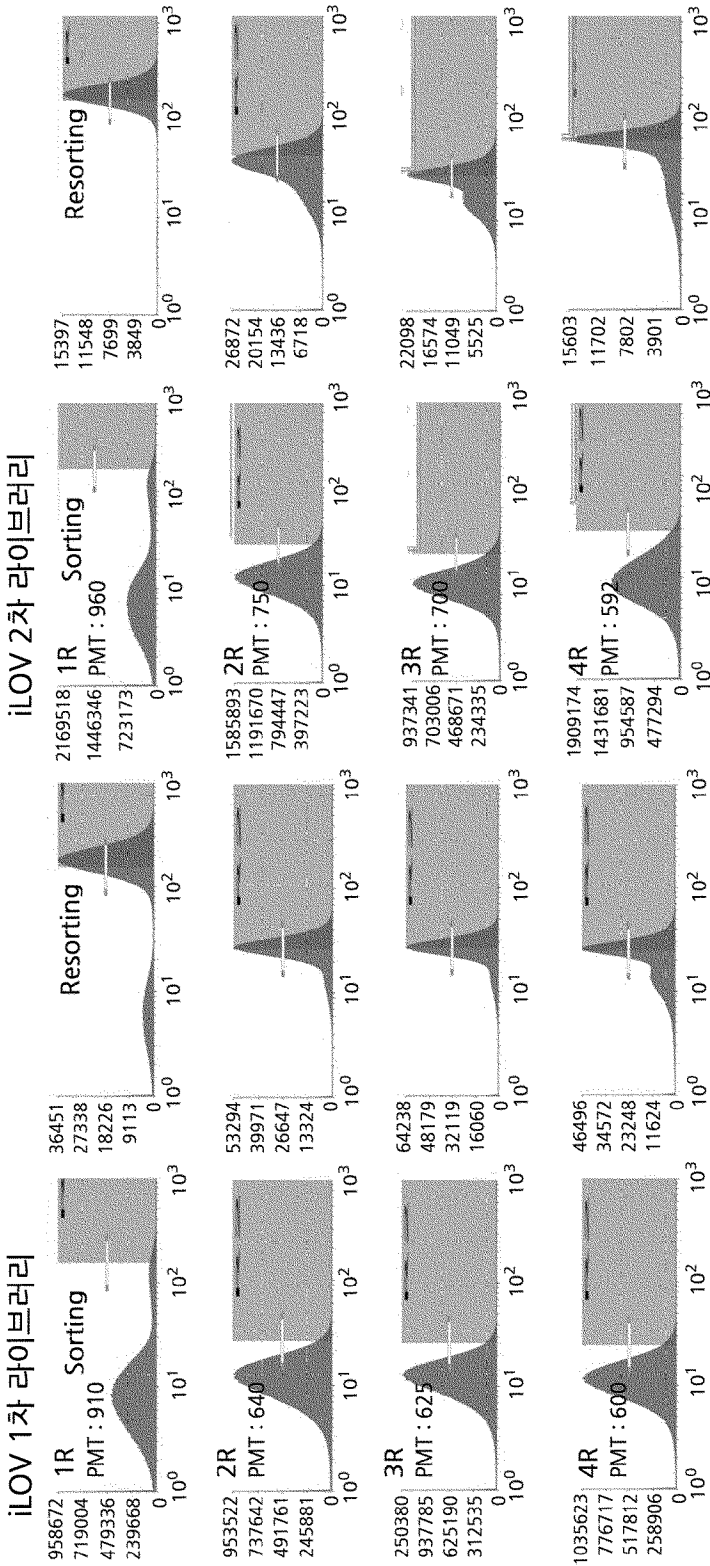
청구범위

- [청구항 1] iLOV(flavoprotein improved LOV) 대비 형광세기가 증가된 iLOV 변이체로서, 상기 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열의 일부를 포함하며, 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 5번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 Y(Tyrosine)로 치환된 것을 포함하는 iLOV 변이체.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 iLOV 및 iLOV 변이체는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래인 것을 특징으로 하는 iLOV 변이체.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 야생형 iLOV의 아미노산 서열 중 79번째 아미노산인 K(Lysine)가 E(Glutamate)로; 84번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 L(Leucine)로; 91번째 아미노산인 D(Aspartate)가 N(Asparagine)으로; 및 104번째 아미노산인 L(Leucine)이 Q(Glutamine)로 치환된 것을 추가적으로 포함하는 iLOV 변이체.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 야생형 iLOV의 아미노산 서열 중 29번째 아미노산인 E(Glutamate)가 G(Glycine)로, 78번째 아미노산인 K(Lysine)가 R(Arginine)로; 및 109번째 아미노산인 H(Histidine)가 R(Arginine)로 치환된 것을 추가적으로 포함하는 iLOV 변이체.
- [청구항 5] 제 1 항의 iLOV 변이체를 코딩하는 핵산분자.
- [청구항 6] 제 5 항의 핵산분자를 포함하는 벡터.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 벡터는 상기 핵산분자를 리포터 유전자로서 포함하며, 발현하고자 하는 목적 단백질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.
- [청구항 8] 제 6 항의 벡터를 포함하는 숙주세포.
- [청구항 9] 제 1 항의 iLOV 변이체, 제 5 항의 핵산분자 또는 제 6 항의 벡터를 포함하는 형광 발색용 조성물.
- [청구항 10] 제 7 항의 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는 목적 단백질의 발현을 분석하는 방법.
- [청구항 11] 제 7 항의 벡터를 발현시켜 목적 단백질을 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 목적 단백질을 분리하는 단계;를 포함하는 목적 단백질의 분리정제 방법.
- [청구항 12] 하기의 단계를 포함하는 iLOV 변이체의 제조방법:
a) 제 1 항의 iLOV 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및
b) 상기 숙주세포에 의해 발현된 iLOV 변이체를 회수하는 단계.
- [청구항 13] 하기의 단계를 포함하는 iLOV 변이체의 스크리닝 방법:
a) 제 1 항의 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자에 추가적으로

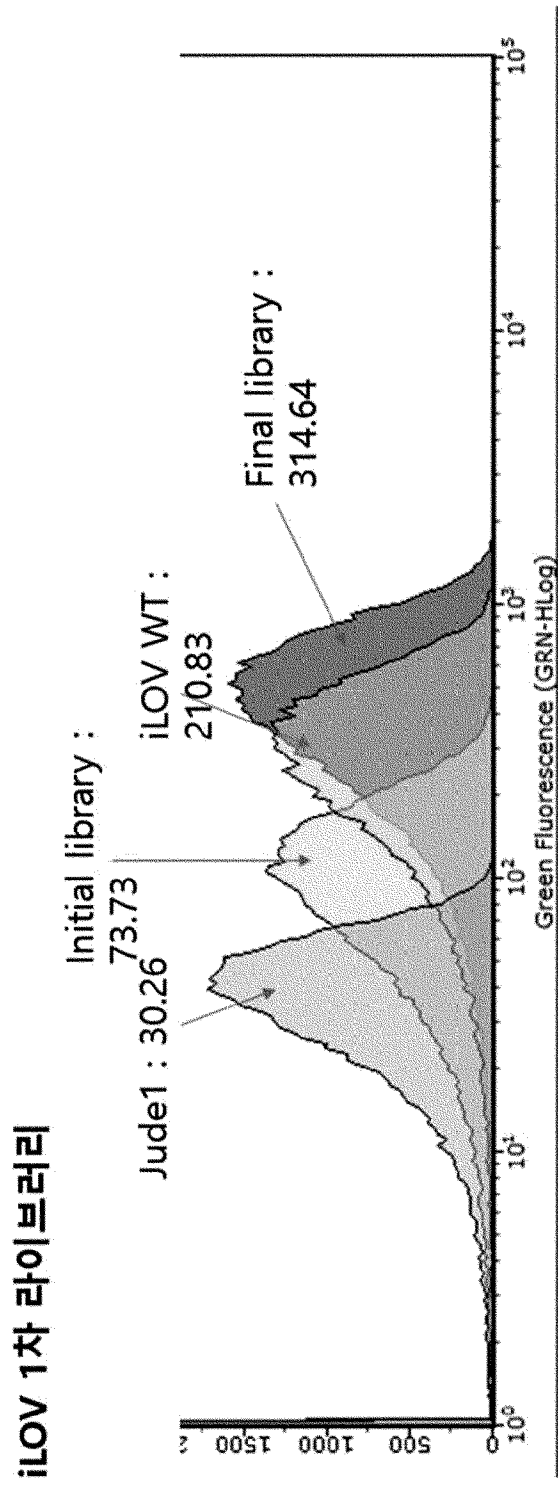
무작위적인 점 돌연변이를 가한 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자의 라이브러리를 구축하는 단계; 및

b) 상기 라이브러리에서 서열목록 제2서열의 iLOV 단백질 보다 형광세기가 증가된 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자를 선별하는 단계.

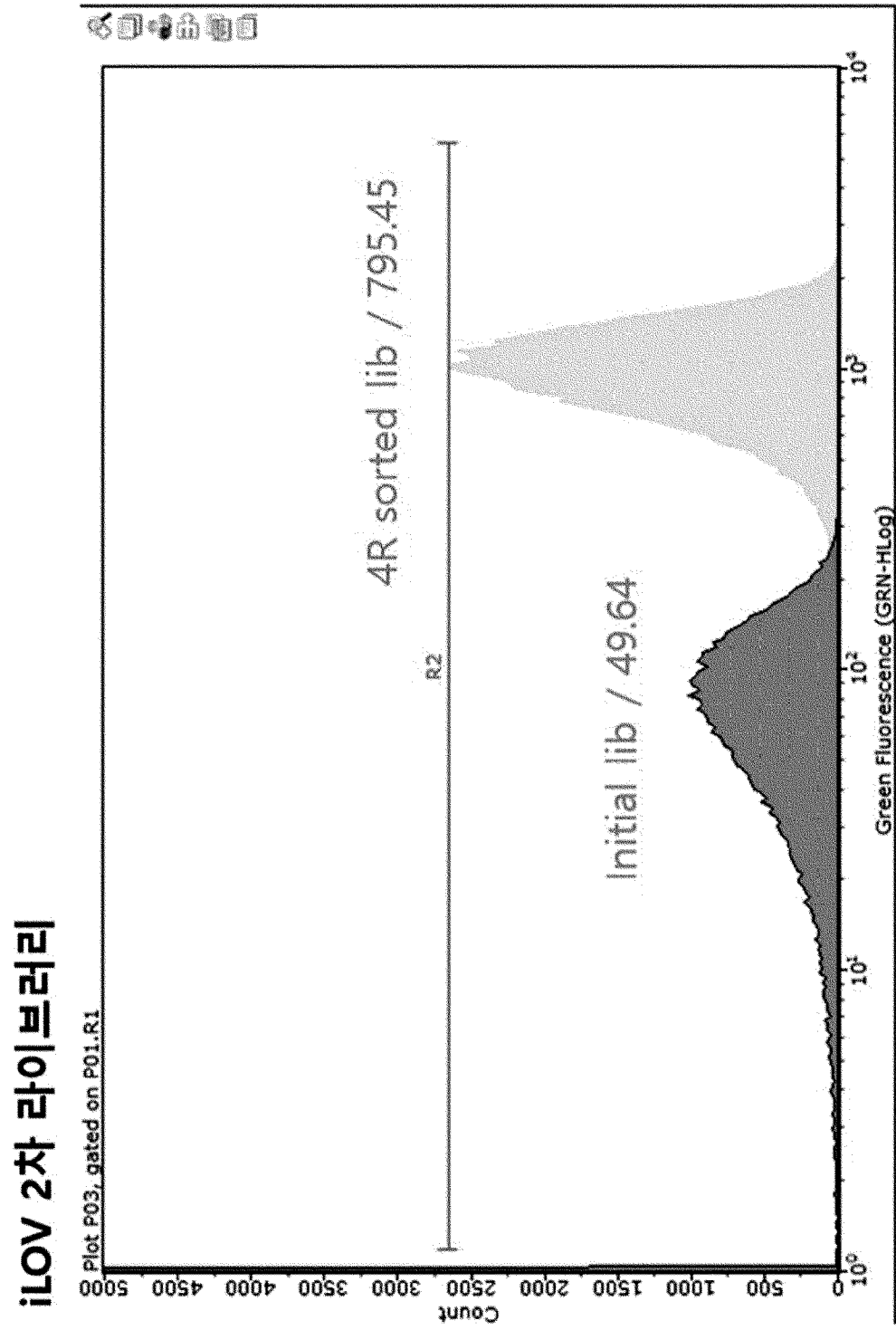
[도 1]



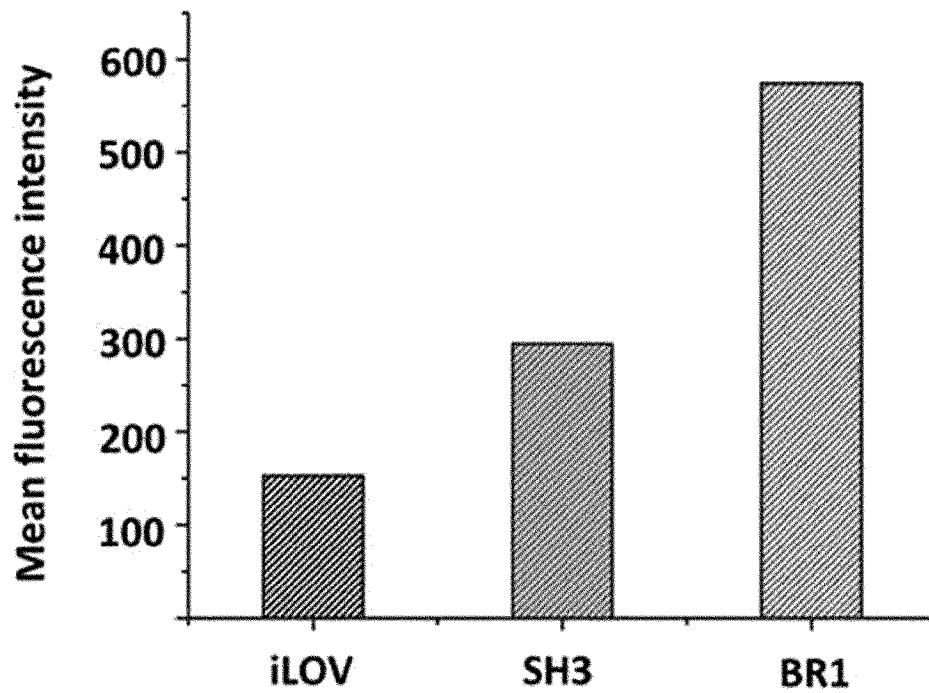
[도2]



[도3]



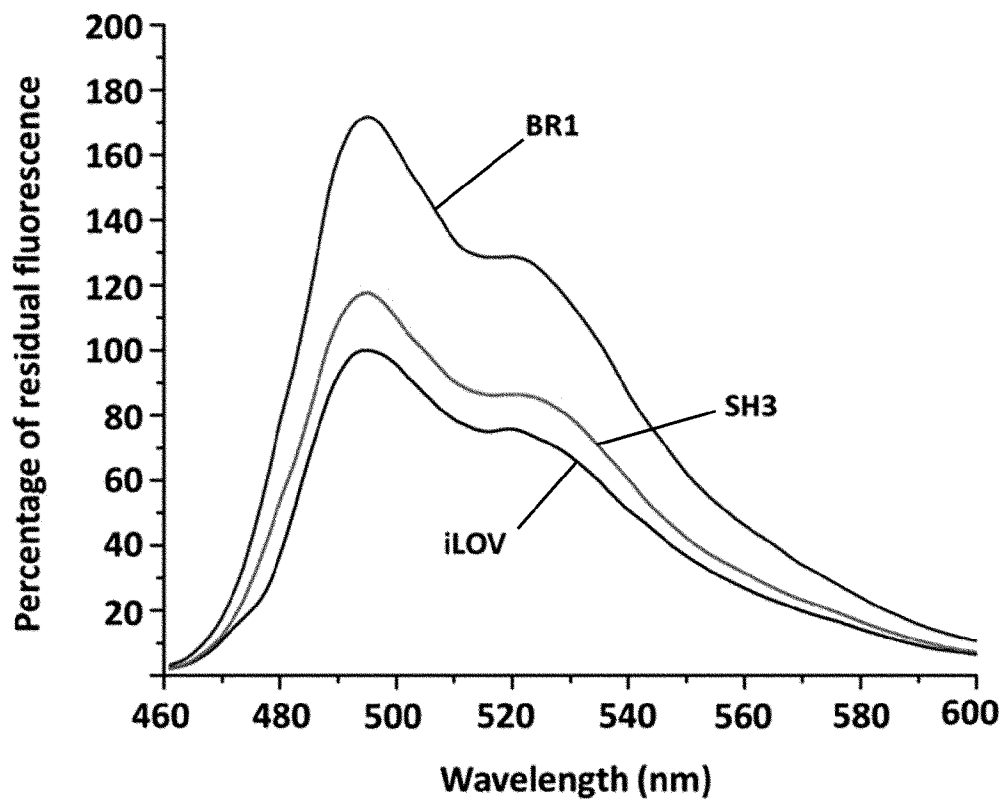
[도4]



[도5]

돌연변이가 도입된 부분	
SH3	F5Y, S8T, S23G, C40A, I66T, K79E, M89V, D91N, L104Q
BR1	F5Y, S8T, S23G, E29G, C40A, I66T K78R, F84L, M89V, H109R

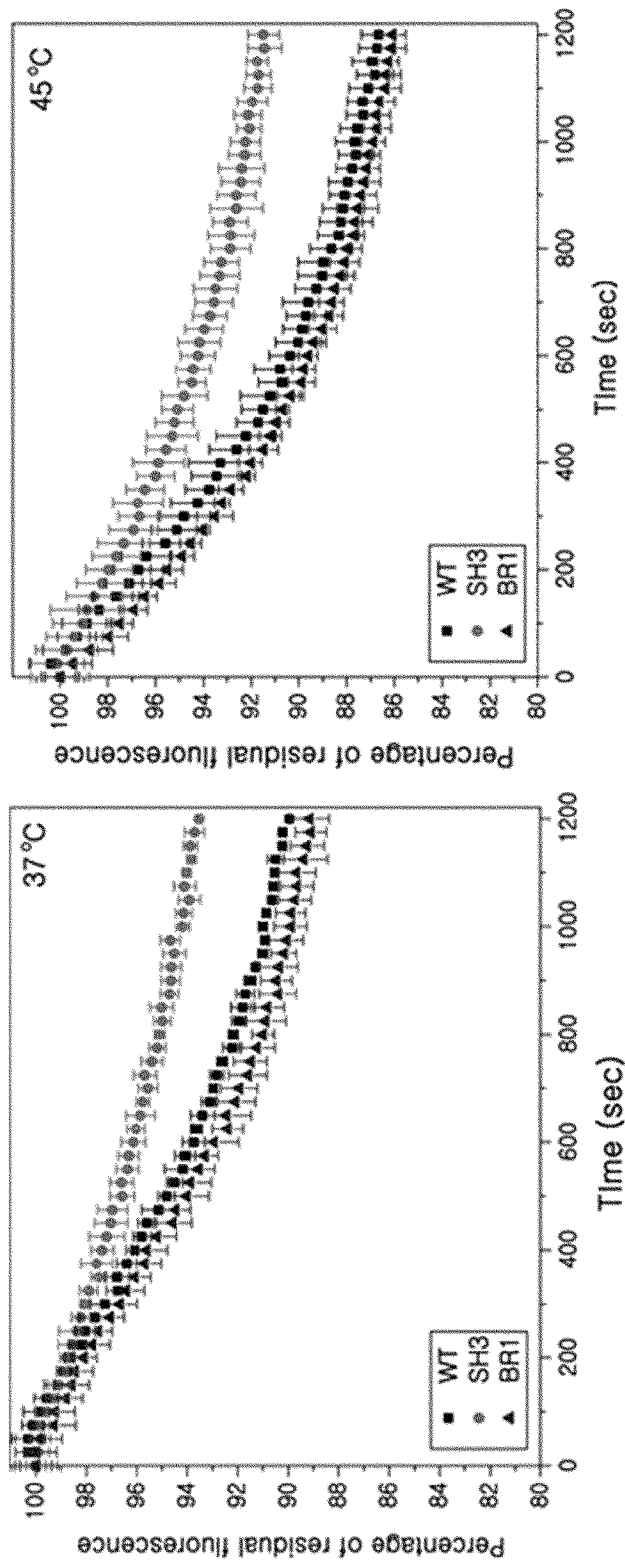
[도6]



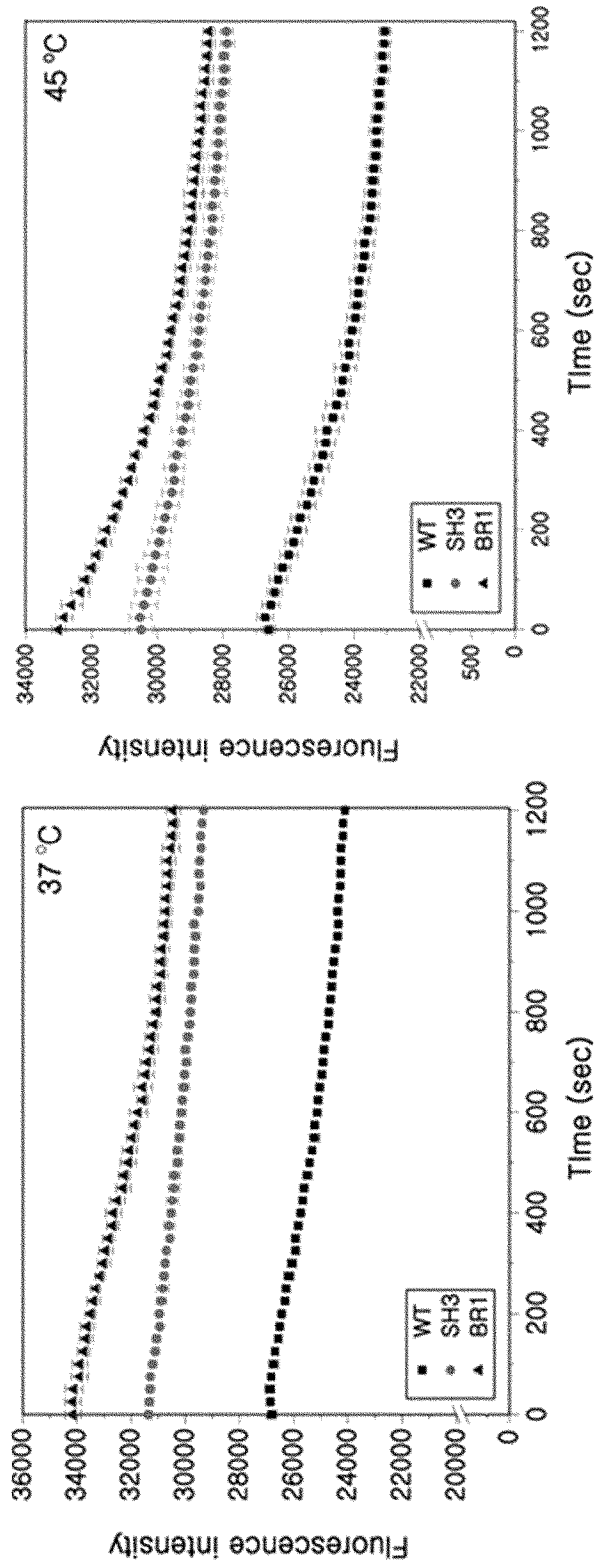
[도7]

Name	Quantum Yield	Brightness
iLOV	0.37	4625
SH3	0.40	5000
BR1	0.45	5625

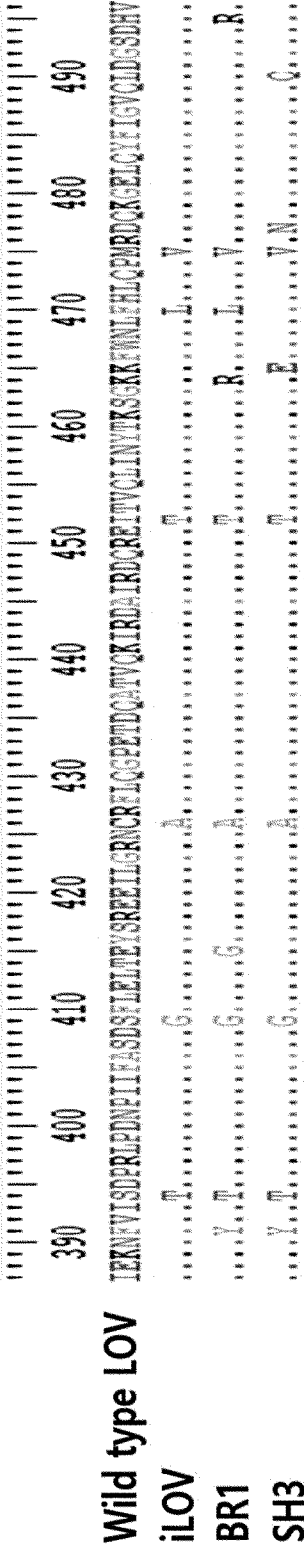
[도8]



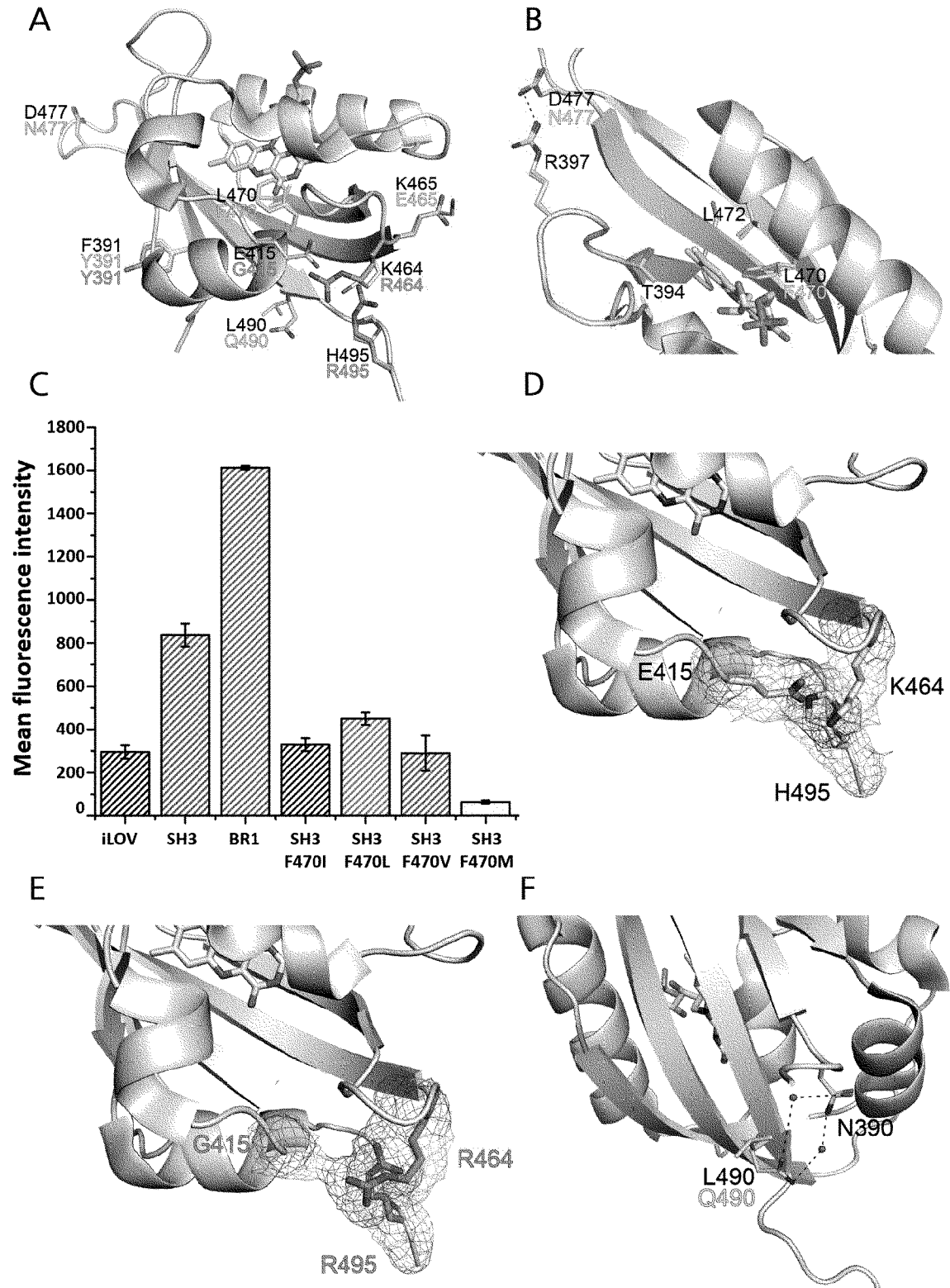
[도9]



[도10]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/013355

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 14/415(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) C07K 14/415(2006.01); C07H 21/04(2006.01); C07K 14/00(2006.01); C07K 14/21(2006.01); C12P 21/00(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: iLOV(flavoprotein improved LOV), 형광(fluorescent), 변이(mutation), 플라빈(flavin)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HINGGINS, S. A. et al. Rapid and Programmable Protein Mutagenesis Using Plasmid Recombineering. ACS Synth. Biol. 20 October 2017, vol. 6, no. 10, pp. 1825-1833. HHS Public Access Author Manuscript Version. inner pp. 1-17. See abstract; and figure 4.	1-13
A	MUKHERJEE, A. et al. Engineering and Characterization of New LOV-Based Fluorescent Proteins from Chlamydomonas reinhardtii and Vaucheria frigida. ACS Synth. Biol. 2015, vol. 4, no. 4, pp. 371-377. See abstract.	1-13
A	KR 10-1833896 B1 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION et al.) 05 March 2018 (2018-03-05) See claims 1-10.	1-13
A	KHRENOVA, M. G. et al. Mutants of the Flavoprotein iLOV as Prospective Red-Shifted Fluorescent Markers. J. Phys. Chem. B. 2017, vol. 121, no. 43, pp. 10018-10025. See entire document.	1-13
A	US 2010-0304435 A1 (EGGERT, T. et al.) 02 December 2010 (2010-12-02) See entire document.	1-13
☐ 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 05 February 2021		Date of mailing of the international search report 08 February 2021
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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/013355

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-1833896	B1	05 March 2018	None			
US	2010-0304435	A1	02 December 2010	DE	102009024281	A1	09 December 2010
				EP	2311858	A1	20 April 2011
				US	8536314	B2	17 September 2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/415(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/415(2006.01); C07H 21/04(2006.01); C07K 14/00(2006.01); C07K 14/21(2006.01); C12P 21/00(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: iLOV(flavoprotein improved LOV), 형광(fluorescent), 변이(mutation), 플라빈(flavin)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	HINGGINS, S. A. 등, 'Rapid and Programmable Protein Mutagenesis Using Plasmid Recombineering', ACS Synth. Biol., 2017.10.20, 6권, 10호, 페이지 1825-1833, HHS Public Access Author Manuscript Version 내부 페이지 1-17 초록; 도면 4	1-13
A	MUKHERJEE, A. 등, 'Engineering and Characterization of New LOV-Based Fluorescent Proteins from Chlamydomonas reinhardtii and Vaucheria frigida', ACS Synth. Biol., 2015, 4권, 4호, 페이지 371-377 초록	1-13
A	KR 10-1833896 B1 (국민대학교산학협력단 등) 2018.03.05 청구항 1-10	1-13
A	KHRENOVA, M. G. 등, 'Mutants of the Flavoprotein iLOV as Prospective Red-Shifted Fluorescent Markers', J. Phys. Chem. B, 2017, 121권, 43호, 페이지 10018-10025 전체 문헌	1-13
A	US 2010-0304435 A1 (EGGERT, T. 등) 2010.12.02 전체 문헌	1-13
☐ 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 2021년02월05일(05.02.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년02월08일(08.02.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1833896 B1	2018/03/05	없음	
US 2010-0304435 A1	2010/12/02	DE 102009024281 A1	2010/12/09
		EP 2311858 A1	2011/04/20
		US 8536314 B2	2013/09/17