



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0065475
(43) 공개일자 2025년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0150730
(22) 출원일자 2023년11월03일
심사청구일자 2023년11월03일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
이창환
서울특별시 서초구 서초대로64길 83, 101동 502호(서초동, 월드 메르디앙)
진준오
서울특별시 강동구 고덕로80길 99, 513동 1401호(상일동, 고덕센트럴 IPARK)
(74) 대리인
특허법인지평

전체 청구항 수 : 총 11 항

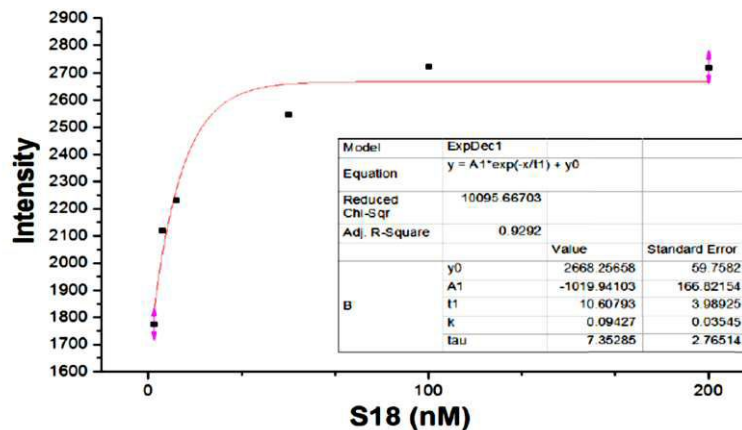
(54) 발명의 명칭 USE1 표적 압타머 및 이를 이용한 고형암의 진단을 위한 정보제공방법

(57) 요약

본 발명은 고형암(예컨대, 폐암)을 진단 또는 예후예측하기 위한 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서는 고형암의 발병과 USE1의 발현량 증가와 연관이 있음을 확인하고, USE1을 높은 특이도로 검출할 수 있는 압타머 서열을 제공한다. 본 발명의 압타머를 이용하는 경우, USE1를 높은 특이도로 검출하여 비침습적으로 고형암을 빠르고 간편하게 진단할 수 있다.

대표도 - 도4

4. 10nM



(52) CPC특허분류

G01N 33/57423 (2019.01)

C12N 2310/16 (2013.01)

C12Q 2525/205 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711192817
과제번호	00207868
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	유비쿼터 네트워크 조절을 통한 폐암 제어 연구실
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산대학교산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711195306
과제번호	00208173
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	TRIM28-SOCS3 복합체의 작용기작 규명을 통한 폐암 진단 및 제어 기술 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산대학교산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 4로 표시되는 유전자 서열 중 어느 하나의 유전자 서열을 포함하는, USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 단백질에 특이적인 압타머.

청구항 2

USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 단백질에 특이적인 압타머를 포함하는, 고형암의 진단 또는 예후예측용 조성물.

청구항 3

제2 항에 있어서,

상기 고형암은 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 결장암, 방광암, 혈액암 및 췌장암으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 질환인, 고형암의 진단 또는 예후예측용 조성물.

청구항 4

제2 항에 있어서,

상기 USE1 단백질에 특이적인 압타머는 서열번호 1 내지 3의 유전자 서열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 유전자 서열을 포함하는, 고형암의 진단 또는 예후예측용 조성물.

청구항 5

제2 항에 있어서,

상기 USE1 단백질에 특이적인 압타머는 서열번호 1로 표시되는 유전자 서열 또는 이의 일부서열을 포함하는, 고형암의 진단 또는 예후예측용 조성물.

청구항 6

제5 항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 유전자 서열의 일부 서열은 30 내지 40mer의 크기를 갖는 것인, 고형암의 진단 또는 예후예측용 조성물.

청구항 7

제2 항의 조성물을 포함하는, 고형암의 진단용 키트.

청구항 8

- a) 서열번호 1 내지 4로 표시되는 유전자 서열 중 어느 하나의 유전자 서열을 포함하는 USE1 표적 압타머를 제작하는 단계;
- b) 상기 a) 단계의 압타머를 이용하여 대상체로부터 분리된 시료에서 USE1 유전자 또는 단백질의 발현량을 측정하는 단계;
- c) 대상체로부터 분리된 시료에서 USE1 단백질의 발현량을 정상 대조군 시료의 발현량과 비교하는 단계; 및
- c) 대상체에서 측정된 USE1 단백질의 발현량이 정상 대조군 시료의 수준보다 높은 경우, 고형암 환자로 판단하는 단계를 포함하는, 고형암 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 9

제8 항에 있어서,

상기 b) 단계에서, USE1 유전자의 발현 수준의 측정은 중합효소반응(PCR), 실시간 중합효소반응(Real-time PCR), 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 래피드(rapid) 키트, DNA 칩측면 유동 분석(lateral flow assay, LFA) 유형 테스트, 면역 흡착 분석(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 유형 테스트, 전계 효과 트랜지스터(field-effect transistor, FET) 유형 테스트 및 방사 면역 분석(radioimmunoassay, RIA) 유형 테스트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 방법을 이용한 것인, 정보 제공 방법.

청구항 10

제8 항에 있어서,

상기 b) 단계에서, USE1 단백질의 발현 수준의 측정은 효소 결합 면역 침강법(enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴 블롯팅(Western blotting), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 방사선면역분석(radioimmunosorbent test) 또는 질량 분석법 중 선택되는 방법으로 측정하는 것인, 정보 제공 방법.

청구항 11

제8 항에 있어서,

상기 a) 단계의 시료는 조직, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 뇌척수액 및 세포액으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 시료인, 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 USE1 단백질이 고형암(바람직하게는 폐암)의 발병과 연관된 바이오마커임을 확인하고, USE1 단백질을 표적으로 하는 압타머를 제공한다. 본 발명의 USE1 단백질 표적 압타머를 이용하는 경우, USE1 단백질의 발현량을 높은 정확도로 측정할 수 있어, 고형암의 진단 또는 예후 예측에 효과적이다.

배경 기술

[0002] 암(cancer)은 매년 전 세계적으로 1,000만 명의 새로운 환자가 발생하고 있는 주요 질병 중에 하나로, 우리나라의 경우 암으로 인한 사망률은 1위로 전체 사망자의 약 25.5 %를 차지하고 있다. 이러한 경향성은 계속 지속될 것으로 전망되고 있다.

[0003] 그 중에서도 폐암은 폐에 발생하는 암으로, 흡연, 공해 등이 가장 큰 원인인 선진국형 암으로, 20세기에 들어서면서 구미 각 국에서 급격히 증가하기 시작하여 전 세계적으로 매년 130만 명 이상이 폐암으로 사망하며, 암으로 인한 사망에서 가장 높은 비중을 차지하고 있다. 한국의 경우에도, 매년 10여 만 명의 암 환자가 새로 발생하고 5만여명의 암 환자가 사망하고 있는 것으로 보고되었다. 더욱이 암의 발생 빈도는 최근 들어 더욱 증가하는 추세로 현재 암은 우리나라 성인 사망 원인의 2위를 차지하고 있다. 특히, 폐암은 한국 성인에서 발생하는 암중에서 약 12%를 차지하며 위암, 간암에 이어 제3위의 발생률을 보이며 매년 남녀 모두에서 발생률이 증가하고 있다. 폐암의 발생률은 여성보다 남성에서 현저히 높으며 상대적으로 45세 미만의 젊은 환자의 비율이 높은 것으로 보고되었다. 더구나 폐암은 진단 당시 이미 다른 장기로 전이를 하였거나 전이가 없는 경우에도 국소적으로 진행되어 근 치적절제술, 항암 화학 요법, 방사선 치료 등의 다양한 치료법에도 불구하고 치료 후 재발과 전이에 의해 5년 생존율이 5% 정도에 머무르는 완치율이 매우 낮은 종양으로 암에 의한 사망률 1위를 차지하고 있다.

[0004] 폐암은 소세포폐암 (small cell lung cancer)과 비소세포폐암 (non-small cell lung cancer)로 나뉘어진다. 그 중에서 비소세포폐암은 폐암의 약 80%에 해당하는 가장 대표적인 암으로, 선암(adenocarcinoma), 편평상피세포암(squamous cell carcinoma), 대세포 폐암 (large cell carcinoma)으로 나뉘어진다. 폐암 종류에 따라 조직학

적 특성이 차이가 날뿐 아니라 예후와 치료 방법에서도 차이가 보이므로 정확한 진단이 중요하다. 비소세포폐암의 경우, 최근의 암 치료법의 발달에도 불구하고 10년 생존률이 10% 이하로 매우 낮다. 이는 대부분의 비소세포폐암이 진행된 단계(advanced stage)까지 진단이 어려운데 원인이 있다.

[0005] 현재로서는 조기 진단이 환자의 생존 가능성을 높이는 가장 좋은 방법이다. 이에, 바이오마커들을 이용하여 폐암을 진단하기 위한 다양한 시도들이 진행되었다. 분자 진단법의 발전과 유전체학에 대한 이해로 인해, 현재의 검진 기준을 보완할 잠재력이 있는 몇 가지 폐암 바이오마커가 발견된 바 있다(Hasan N, Kumar R, Kavuru MS (2014) Lung cancer screening beyond low-dose computed tomography: the role of novel biomarkers. Lung 192: 639-648.; Bigbee WL, Gopalakrishnan V, Weissfeld JL, Wilson DO, Dacic S, et al. (2012) A multiplexed serum biomarker immunoassay panel discriminates clinical lung cancer patients from high-risk individuals found to be cancer-free by CT screening. J Thorac Oncol 7: 698-708.; Daly S, Rinewalt D, Fhied C, Basu S, Mahon B, et al. (2013) Development and validation of a plasma biomarker panel for discerning clinical significance of indeterminate pulmonary nodules. J Thorac Oncol 8: 31-36.; 등 참고). 특히, USE1의 과발현(overexpression)이 세포와 동물 모두에서 증식, 이동 및 침윤을 유의하게 증가시켰으며, 폐암 세포에 USE1 수준의 감소는 이러한 영향을 역전시켰는바, 이는 USE1이 암 치료를 위한 새로운 타겟임을 시사한다.

[0006] 한편, 압타머(aptamer)는 새로운 생체 분자로서, 대단위 올리고(oligo) 라이브러리 풀로부터 선별된다. 일련의 셀렉스 동작을 통해, 특이 리간드(ligand) 대상 압타머들을 확장하고 최종적으로 선정한다. 압타머는 화학적으로 합성 가능하고 다양한 목적을 위해 변형이 잘 되는 단일 가닥 핵산이다. 또한, 압타머는 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction) 방법에 의해 증폭하여 분석할 수 있고, 고용량 DNA 어레이 기술에 적용할 수도 있다.

[0007] 압타머 기반 고용량 정량적 검정법은 질병 상태를 진단하기 위해 다변량 단백질 특징을 가려내기 위한 훌륭한 플랫폼으로 보고되고 증명되었으나, 압타머를 이용한 고형암 특히, 폐암의 진단 방법은 현재로서 부족한 실정이므로, 이에, 본 발명자들은 USE1 단백질을 높은 정확도로 타겟하는 압타머를 개발하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 USE1의 발현이 고형암의 발병과 연관되어 있음을 확인하고, USE1을 표적으로 하는 압타머를 제공하고자 함에 있다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에서 본 발명의 목적은, USE1 표적 압타머를 이용한 고형암의 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공함에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 실시예에서 본 발명의 목적은, USE1 표적 압타머를 이용한 고형암의 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 단백질에 특이적인 압타머 및 이를 이용한 고형암의 진단 또는 예후예측용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명에서 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 단백질에 특이적인 압타머는 서열번호 1 내지 4로 표시되는 유전자 서열 중 어느 하나의 유전자 서열을 포함한다.

[0013] 본 발명에서, 상기 USE1 단백질에 특이적인 압타머는 서열번호 1로 표시되는 유전자 서열 또는 이의 일부 서열을 포함한다. 여기서, 상기 서열번호 1로 표시되는 유전자 서열의 일부 서열은 30 내지 40mer의 크기를 갖는 것이며, 바람직하게는 36mer의 크기를 갖고, 서열번호 1로 표시되는 유전자 서열의 시스틴 결합 부위를 포함하는 서열이다.

[0014] 본 발명에서, 상기 고형암은 간암, 간내담관암(Intrahepatic cholangiocarcinoma), 대장암(Colon cancer), 대장선암(Colorectal adenocarcinoma), 자궁경부암, 신장암, 위암(Stomach cancer), 위선암(Stomach adenocarcinoma), 전립선선암(Prostate adenocarcinoma), 유방암, 유방침습성유관암종(Breast invasive ductal carcinoma), 뇌종양, 폐암(Lung cancer), 폐선암(Lung adenocarcinoma), 폐편평세포암종(Lung squamous cell

carcinoma), 자궁암, 고등급장액성난소암(High grade serous ovarian cancer), 결장암, 결장선암(Colon adenocarcinoma), 방광암(Bladder cancer), 방광요로피암종(Bladder urothelial carcinoma), 피부흑색종(Cutaneous melanoma), 원발부위불명암(Cancer of unknown primary), 혈액암, 췌장암, 췌장도관선암종(Pancreatic adenocarcinoma), 교모세포종(Glioblastoma multiforme), 위선암(Stomach adenocarcinoma), 신세포암종(Renal clear cell carcinoma), 식도암(Esophageal adenocarcinoma) 및 고환암 (Testicular cancer) 으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 질환을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 가장 바람직하게는 폐암이다.

[0015] 본 발명은 또한 상기 진단 또는 예후예측용 조성물을 포함하는, 고형암의 진단용 키트를 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 실시예에서는 a) 서열번호 1 내지 4로 표시되는 유전자 서열 중 어느 하나의 유전자 서열을 포함하는 USE1 표적 압타머를 제작하는 단계; b) 상기 a) 단계의 압타머를 이용하여 대상체로부터 분리된 시료에서 USE1 유전자 또는 단백질의 발현량을 측정하는 단계; c) 대상체로부터 분리된 시료에서 USE1 단백질의 발현량을 정상 대조군 시료의 발현량과 비교하는 단계; 및 c) 대상체에서 측정된 USE1 단백질의 발현량이 정상 대조군 시료의 수준보다 높은 경우, 고형암 환자로 판단하는 단계를 포함하는, 고형암 진단을 위한 정보제공 방법이 제공된다.

[0017] 상기 정보제공 방법 중 b) 단계에서, USE1 유전자의 발현 수준의 측정은 중합효소반응(PCR), 실시간 중합효소반응(Real-time PCR), 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 래피드(rapid) 키트, DNA 칩측면 유동 분석(lateral flow assay, LFA) 유형 테스트, 면역 흡착 분석(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 유형 테스트, 전계 효과 트랜지스터(field-effect transistor, FET) 유형 테스트 및 방사 면역 분석(radioimmunoassay, RIA) 유형 테스트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 방법을 이용할 수 있다.

[0018] 또한, 상기 b) 단계에서, USE1 단백질의 발현 수준의 측정은 효소 결합 면역 침강법(enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴 블롯팅(Western blotting), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 방사선면역분석(radioimmunosorbent test) 또는 질량 분석법 중 선택되는 방법으로 측정할 수 있다.

[0019] 상기 정보제공 방법에서 대상체로부터 수득하는 시료는 조직(폐조직 등), 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 뇌척수액 또는 세포액을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 USE1의 발현이 고형암의 발병과 연관이 있음을 확인하고 이를 바이오마커로 이용한다. 본 발명에서는 USE1에 특이적인 압타머 서열을 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한, 상기 압타머 서열을 이용하여 고형암을 진단 또는 예후를 예측하기 위한 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명에 따른 USE1 표적 압타머는 USE1에 높은 특이도로 결합하는 바, 상기 조성물을 이용하는 경우, 비침습적으로 간단하고, 정확하게 고형암이 발생하였는지 여부를 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 USE1 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 압타머를 개발하기 위한 SELEX 순환과정의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 진행된 형광 퀀칭 시스템을 나타내는 모식도이다.

도 3은 형광 퀀칭 시스템을 이용하여 USE1 표적 압타머 후보서열의 결합력을 분석한 결과이다.

도 4는 형광 퀀칭 시스템을 이용하여 서열번호 1의 유전자 서열을 포함하는 USE1 압타머의 결합력을 분석한 결과이다.

도 5는 형광 퀀칭 시스템을 이용하여 서열번호 2의 유전자 서열을 포함하는 USE1 압타머의 결합력을 분석한 결과이다.

도 6은 형광 퀀칭 시스템을 이용하여 서열번호 3의 유전자 서열을 포함하는 USE1 압타머의 결합력을 분석한 결과이다.

도 7a 내지 도 7d는 각각 서열번호 1의 유전자 서열을 포함하는 USE1 압타머의 3차원의 예상 구조 모델 이미지이다.

도 8a 내지 도 8d는 각각 서열번호 2의 유전자 서열을 포함하는 USE1 압타머의 3차원의 예상 구조 모델 이미지이다.

도 9a 및 도 9b는 각각 서열번호 3의 유전자 서열을 포함하는 USE1 압타머의 3차원의 예상 구조 모델 이미지이다.

도 10a는 서열번호 1로 표시되는 압타머의 예상 구조 모델에서 시스템 결합 부위를 포함하는 부분을 절단하는 과정을 나타낸 도식도이다. 도 10b는 본 발명에 따른 압타머의 예상 구조 모델에서 시스템 결합 부위를 나타내는 이미지(도 10b 상단)와, ELONA (enzyme-linked oligonucleotide assay) 분석법으로 압타머 1e서열의 결합력을 분석한 결과(도 10b 하단)이다.

도 11은 서열번호 1로 표시되는 압타머(도 11에서 aptamer1), 이의 일부서열(도 11에서 1e)의 농도에 따른 His-USE1와 A549 폐암세포에 대한 결합력 (ELISA) 분석결과이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 선별된 USE1 표적 압타머 1e번의 폐암환자에서 USE1 검출을 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 선별된 USE1 표적 압타머 1e번의 폐암환자에서 USE1 검출을 확인한 ELISA 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 후술되어 있는 실시 예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 게시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 게시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. 명세서 전체에 걸쳐 동일 참조 부호는 동일 구성 요소를 지칭한다.
- [0025] 다른 정의가 없다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어(기술 및 과학적 용어를 포함)는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공통적으로 이해될 수 있는 의미로 사용될 수 있을 것이다. 또 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 용어들은 명백하게 특별히 정의되어 있지 않는 한 이상적으로 또는 과도하게 해석되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다.
- [0026] 본 발명자들은 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1)의 과발현(overexpression)이 세포 증식, 이동 및 침윤을 유의하게 증가시키고 폐암 세포의 USE1 발현 억제가 폐암 세포의 감소에 영향을 준다는 사실을 바탕으로 USE1을 표적으로 하는 압타머를 연구하던 중, USE1과 높은 특이도로 결합하는 유전자 서열을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0027] 본 발명에서 용어, "압타머"는 "Chemical Antibody"로서 특정 화합물부터 단백질까지 다양한 종류의 표적 리간드에 높은 특이도와 친화도로 결합할 수 있는 특성을 가지는 짧은 길이(20~80개 염기)의 단일 가닥 핵산 분자를 의미한다. 압타머는 SELEX(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)를 통해 생체 외(in vitro)에서 개발할 수 있다.
- [0028] 압타머는 표적 단백질에 대해 나노몰(nM) 내지 펩토몰(fM) 수준의 높은 결합력과 선택성을 지니고 있다는 점에서 항체와 유사한 특성을 가지는 올리고 핵산 분자로 여겨진다. 화학 합성법으로 제조되는 압타머는 항체와 같은 단백질 기반의 물질보다 목적하는 화학적 변형이 용이하며, SELEX 과정을 통해 선택성과 친화도를 극대화할 수 있고, 화학적 합성으로 만들어지므로 순도가 높으며, 기기 분석을 통해 만들어진 물질을 동정할 수 있고, 열에 안정하여 실온에서 장기간 보존이 가능하다.
- [0029] 본 발명에서 용어, "SELEX(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)"는 표적 물질과 결합하는 압타머를 선별하는 방법이다. 일반적으로 공지된 방법의 경우, 표적 단백질을 무작위적인 염기서열을 가진 올리고 뉴클레오타이드 라이브러리(DNA 또는 RNA)와 함께 일정 온도에서 반응시킨 후에, 표적과 결합하지 않은 DNA/RNA 라이브러리는 제거한다. 표적과 결합한 뉴클레오타이드를 분리한 후 유전자 증폭 방법을 통해 증폭시켜 위 과정을 여러 차례 반복하여 표적에 높은 결합력을 가지는 압타머를 선별해낸다.

- [0030] 본 발명의 압타머는 상기와 같은 일반적인 SELEX 방법을 이용하여 제조한 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 용어, "표적 분자"는 본 발명의 압타머로 검출할 수 있는 물질을 의미한다. 구체적으로, 상기 표적 분자는 분리된 시료 내에 존재하는 것으로 포획 압타머가 결합할 수 있는 단백질, 펩티드, 탄수화물, 다당류, 당단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 보조인자(cofactor), 약물, 염료, 성장인자 및 규제 물질(controlled substance)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 목적상, 상기 표적 분자는 USE1 유전자 또는 단백질일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서의 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therapeutics), 예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것을 포함한다. 본 발명의 일 실시예로서, 상기 진단은 고형암(바람직하게는 폐암)의 발병 여부 및 암의 진행 단계, 즉, 병기(stage)를 확인하는 것이다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "예후예측"이란, "예후"와 동일한 의미로 사용되는데, 질환의 경과 및 결과를 미리 예측하는 행위를 의미한다. 보다 구체적으로, 예후예측이란 질환의 치료 후 경과를 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 후 병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 목적상 상기 예후예측은 고형암의 치료 후, 질환의 경과를 미리 예상하여 암의 진행, 암의 재발 및/또는 암의 전이의 위험도를 예측하는 행위로 해석될 수 있다. 예를 들어, 용어 "좋은 예후"는 고형암 치료 후 환자의 암의 진행, 암의 재발 및/또는 암의 전이의 위험도가 1보다 낮은 값을 나타내어, 고형암 환자가 생존할 가능성이 높다는 것을 의미하고, 다른 의미로 "긍정적 예후"로도 표현된다. 용어 "나쁜 예후"는 고형암 치료 후 환자의 암의 진행, 암의 재발 및/또는 암의 전이의 위험도가 1보다 높은 값을 나타내어, 고형암 환자가 사망할 가능성이 높다는 것을 의미하고, 다른 의미로 "부정적 예후"로도 표현된다.
- [0035] 본 발명에서 용어 "위험도"란, 암의 치료 후, 환자가 암의 진행, 재발 및/또는 암의 전이 등이 나타날 확률에 대한 오즈비, 위험비 등을 의미한다.
- [0036] 본 발명에서, 상기 고형암은 방광암(Bladder cancer), 대장암(Colon cancer), 위암(Stomach cancer), 폐암(Lung cancer), 폐선암(Lung adenocarcinoma), 유방침습성유관암종(Breast invasive ductal carcinoma), 결장선암(Colon adenocarcinoma), 전립선선암(Prostate adenocarcinoma), 방광요로피암종(Bladder urothelial carcinoma), 폐편평세포암종(Lung squamous cell carcinoma), 피부흑색종(Cutaneous melanoma), 원발부위불명암(Cancer of unknown primary), 췌장도관선암종(Pancreatic adenocarcinoma), 교모세포종(Glioblastoma multiforme), 대장선암(Colorectal adenocarcinoma), 고등급장액성난소암(High grade serous ovarian cancer), 위선암(Stomach adenocarcinoma), 신세포암종(Renal clear cell carcinoma), 식도암(Esophageal adenocarcinoma), 고환암 (Testicular cancer) 및 간내담관암(Intrahepatic cholangiocarcinoma)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 폐암이다.
- [0037] 본 명세서에서 용어 "마커"는 정상인 개체와 고형암(바람직하게는 폐암)인 개체를 구분하여 진단할 수 있는 물질로서, 본 발명의 고형암(폐암)이 유발된 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드, 단백질, 또는 핵산, 유전자, 지질, 당지질, 당 단백질과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다. 특히 본 명세서에서는 폐암을 가지는 개체로부터 검출한 생체 시료로부터 발현량이 변화된 USE1 유전자 또는 단백질을 바이오마커로 사용하였다.
- [0038] 본 발명의 상기 생체시료에서 바이오마커(USE1)는 웨스턴 블롯, 효소-면역화학 검출법(ELISA), 면역조직화학 염색법, 면역침강 또는 면역형광법 등 USE1의 발현량 및 활성을 측정하는 알려진 방법에 의하여 검출할 수 있으며, 이를 머신러닝 기법으로 분석하여 발현 정도를 분석할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서는 USE1을 검출하기 위해 상기 생물학적 시료를 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 분리, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서, "정량 장치"는 생물학적 시료 내에 특정 대사체의 존재 여부뿐 아니라 이의 상대적 또는 절대적 양에 대한 정량적인 수치 정보를 제공하는 장치를 의미한다. 구체적으로는 상기 정량 장치는 크로마토그래피(chromatography), 질량분석기(mass spectroscopy; MS), 또는 핵자기 공명 분광 분석기(nuclear magnetic resonance; NMR)이다.

- [0041] 본 발명에서, "크로마토그래피"는 고성능 액체 크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography; HPLC), 액체-고체 크로마토그래피 (Liquid-Solid Chromatography; LSC), 종이크로마토그래피 (Paper Chromatography; PC), 박층 크로마토그래피 (Thin-Layer Chromatography; TLC), 기체-고체 크로마토그래피 (Gas-Solid Chromatography; GSC), 액체-액체 크로마토그래피 (Liquid-Liquid Chromatography; LLC), 포말 크로마토그래피 (Foam Chromatography; FC), 유화 크로마토그래피 (Emulsion Chromatography; EC), 기체-액체 크로마토그래피 (Gas-Liquid Chromatography; GLC), 이온 크로마토그래피 (Ion Chromatography; IC), 겔 여과 크로마토그래피 (Gel Filtration Chromatography; GFC) 또는 겔 투과 크로마토그래피 (Gel Permeation Chromatography; GPC)를 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 정량용 크로마토그래피를 사용할 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서 "질량 분석 (MS)"은 시료의 화학적 조성을 분석하기 위해 대상 물질의 질량을 측정하는 과정을 의미한다. 질량 분석은 시료에 존재하는 대상 물질의 이온화를 통해 하전된 분자나 분자조각을 생성하고 질량 대 전하비(m/z) 및 기체상 이온의 존재 비를 측정하여 질량에 대한 정보를 제공한다. 이러한 질량 분석 장치는 예를 들어 MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight), SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight), ESI-TOF (Electrospray ionization Time of Flight), 액체 크로마토그래피-질량분석기 (liquid chromatographyMass Spectrometry; LC-MS) 또는 LC-MS/MS (liquid chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에서 "대상체"는 통상 인간을 포함할 뿐 아니라 다른 동물, 예를 들어 다른 영장류, 설치류, 개, 고양이, 말, 양, 돼지 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 '환자'는 고형암으로 판정되거나, 의심되는 인간을 제외한 대상을 포함한다.
- [0044] 본 발명은 상기 USE1 표적 압타머를 포함하는, 고형암의 진단 또는 예후예측용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 상기 압타머 외에 약리학적으로나 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제, 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제, 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0045] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0046] 또한, 본 발명은 상기 DNA 압타머를 포함하는, 고형암 진단 키트를 제공한다.
- [0047] 상기 키트는 USE1에 특이적으로 결합하는 본 발명의 압타머를 포함하고 있으며, 압타머에는 당업계에 널리 사용되는 검출 표지들, 예를 들어 바이오틴 잔기가 부착될 수 있다. 바이오틴이 부착된 압타머에 표지물질들을 도입한 다음, 이의 분석을 통해 USE1의 검출, 정량 및 진단에 이용할 수 있다. 바이오틴에 사용되는 표지물질로서 다양한 공지된 분석용 표지물질이 사용될 수 있으며, 예를 들면, 스트렙타비딘, 아비딘, Cy3, Cy5, Alexa, BODIPY, Rhodamine 또는 Q-dot 등을 사용하여 형광분석을 할 수 있다. 또한, USE1 검출을 위한 압타머에는 바이오틴 잔기 외에도, 기타 형광물질, 자성체, 염색물질, 효소, 방사성동위원소 등과 같은 통상의 표지 물질로 표지할 수 있으며, 통상의 검출 수단, 예를 들어, 형광 현미경, Radioimmunoassay(RAID) 등을 통하여 검출할 수 있다.
- [0048] 또한, 상기 키트는 압타머와 시료 내 USE1의 결합 여부를 정성 또는 정량적으로 측정하는데 사용할 수 있는 각종 도구 또는 시약으로서, 지지체(기재), 완충용액, 반응 정지제, 용해제, 세척제 또는 안정화제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 압타머가 고정된 기재는, 예컨대 고체 기재로서 고분자, 유리, 금, 종이 및 생체막(membrane)으로 이루어진 군에서 선택된 것을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는, 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 텍스트란, 세파텍스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 금속, 유리, 글래스 비드, 또는 자성 입자 등을 사용할 수 있다. 그 외의 다른 고체 기질로는 세포 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막 등을 사용할 수 있다. 상기 기재는 임의의 가능한 형태,

예를 들어 구형(비드), 원통형(시험관 또는 웰 내면), 평면형(시트, 시험 스트립)을 가질 수 있으며, 보다 바람직하게는 멀티 웰 플레이트(예를 들어, 24웰, 96웰, 192웰, 384웰, 576웰 등)를 사용할 수 있다.

- [0050] 또한, 본 발명은 USE1 표적 압타머; 및 상기 압타머가 고정되어 있는 기판을 포함하는 고정압 진단용 바이오센서를 제공한다.
- [0051] 상기 USE1 표적 압타머가 고정되어 있는 기판은 표면 인쇄 전극칩(Screen Printed Gold Electrode)의 금속 전극층 및 금속 나노입자층으로 이루어지며, 상기 전극층 및 나노입자 재질은 전기장 또는 자기장에 의해 유인될 수 있고, 전기장의 특성을 변화시킬 수 있는 어떠한 재질도 사용할 수 있으며, 바람직하게는 금(Au)로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명의 일 측면에서, 압타머는 영상을 통하여 고정압을 진단하기 위하여 분자 영상용 형광체와 결합할 수 있으며, 상기 진단 또는 예후예측용 조성물은 상기와 같은 물질들을 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 고정압 진단 또는 예후예측용 조성물은, 검출용 프로브인 상기 압타머를 USE1의 검출용 프로브로서 이용할 수 있다. 압타머의 표식방법으로는 특별히 제한되지 않고, 자체 공지의 방법이 적용 가능하다. 이와 같은 방법으로는, 예를 들면 방사성 동위 원소에 의한 표식, 형광 색소 또는 염료나 형광 단백질에 의한 표식 등을 들 수 있다.
- [0054] 상기 분자 영상용 형광체는 형광을 발생시키는 모든 물질을 말하며, 예를 들면 적색이나 근적외선(near infrared)의 형광을 발광하는 것일 수 있고, 양자 수득량(quantum yield)이 높은 형광체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 상기 분자 영상용 형광체는 상기 압타머에 특이적으로 결합할 수 있는 형광체는 예를 들면, 형광 단백질 또는 기타 영상용 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 상기 형광체는 예를 들면, 플루오레신(fluorescein), 보디피(BODIPY), 테트라메틸로르다민(Tetramethylrhodamine), 알렉사(Alexa), 시아닌(Cyanine), 알로피코시아닌(allophycocyanine) 또는 이들의 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 상기 형광 단백질은 예를 들면, Dronpa 단백질, 녹색 형광 단백질(EGFP), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, DsRFP), 근적외선 형광을 나타내는 시아닌 형광체인 Cys3, Cy5.5 또는 기타 형광 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 상기 기타 영상용 물질은 예를 들면 산화철, 방사성 동위원소 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, MRI, PET 과 같은 영상 장비에 응용될 수 있다.

[0060] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

실시예 1

[0061] USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 압타머의 제작 및 이의 USE1 단백질 결합력 확인

[0062] 1-1. USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 압타머의 제작

[0063] USE1 압타머는 압타머를 발굴하는 일반적 프로세스인 SELE(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)를 통하여 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 단백질에 결합하는 압타머를 발굴하였다(도 1 참조).

[0064] 우선 10^{14} 개 이상의 무작위 압타머 핵산서열 라이브러리를 정제된 USE1 단백질과 결합을 시킨 후 결합하지 못한 압타머들은 제거하였다. USE1 단백질에 결합한 압타머들을 용출한 뒤 정제하여 다시 USE1 단백질과 결합시키고, 이러한 과정을 8~15번 정도 반복하여 USE1 특이적 압타머 서열을 분리 정제하였다. 분리 정제된 압타머는 해당 핵산 종류에 따라 RT-PCR이나 PCR 과정을 통해 증폭시키고, 염기 서열 분석(sequencing)과 결합력 분석(binding assay)을 통해 특성 감별(characterization)을 진행하였다.

[0065] 선택된 서열에 대한 화학적인 합성을 통해 서열번호 1 내지 3과 같이 제작하였다(하기 표 1 참고). 제작된 압타머는 각각 95mer, 98mer, 90mer의 길이를 나타냈다.

표 1

서열번호	크기(mer)	염기서열 (5' - 3')
1	95	CACCTAATACGACTCACTATAGCGGATCCGATGGGTGGGGGGTGGGTAGGATCCGTTCCGGGTTTGGCATAGG GTCTGGCTCGAACAAGCTTGC
2	98	CACCTAATACGACTCACTATAGCGGACAGGGCTGGTGTGGCTGGCGTCCGGCTCGAACAAGGCTGGTGTGGCTG GCGTTCTGGCTCGAACAAGCTTGC
3	90	CACCTAATACGACTCACTATAGCGGATCCGACAGAATGCCATCACCATGTCTAGACCTATTGGCTTTGCGACTG GCTCGAACAAGCTTGC

1-2. 압타머 후보서열의 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 결합력 분석

상기 실시예 1-1의 SELEX 과정을 통해 선별된 3개의 압타머 서열의 USE1 특이적 결합력을 확인하기 위해 형광 켄칭 시스템을 도입하였다 (도 2). USE1 단백질에 압타머가 결합하게 되면, 상보적으로 결합되어 있던 QDNA에 있는 켄처 (3IABkFQ) 조각이 떨어져나가게 된다. 이를 통해 켄칭되어있던 FDNA에 있는 형광 (6-FAM) 이 활성화 되고, 이 형광 신호 세기를 통해 USE1에 결합한 압타머의 양을 정량적으로 분석 가능하다. 이렇게 분석한 결과, 서열번호 1의 압타머의 해리상수 (K_d)가 가장 낮게 나타났다 (도 3, 도 4 내지 6). 도 4 이하에서 S18은 서열번호 1 (k_d :약 10nM), S1는 서열번호 2 (k_d : 약 32nM), S2은 서열번호 3 (k_d : 약 90nM) 압타머에 대한 결과이다.

압타머 후보서열 중 서열번호 1의 압타머가 USE1에 대한 결합력이 가장 강한 것으로 확인되어, 서열번호 1의 유전자서열을 포함하는 압타머가 USE1에 가장 특이적임을 알 수 있다.

실시예 2

USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 압타머의 구조 분석 및 추가 압타머 제작

2-1. 선별된 압타머의 2차 구조 예상 모델링

압타머의 경우 기본적으로는 단일 가닥의 올리고핵산염 (oligonucleotide)이지만, 상보적인 서열간의 결합 등으로 독특한 3차원 구조를 형성하는 특징을 갖는다. 이러한 특징을 기반으로, 공개된 데이터베이스들을 통해 압타머의 염기서열을 입력하면 대략적으로 예상되는 3차원 구조를 모델링할 수 있다.

서열번호 1의 유전자 서열을 포함하는 압타머의 경우 도 7a 내지 7d와 같은 3차원의 예상 구조 모델이 형성되었으며, 서열번호 2의 유전자 서열을 포함하는 압타머의 경우 도 8a 내지 8d와 같은 3차원의 예상 구조 모델이 형성되었다. 서열번호 3의 유전자 서열을 포함하는 압타머의 경우 도 9a 및 9b와 같은 3차원의 예상 구조 모델이 형성되었다.

2-2. 선별된 USE1 압타머의 절삭 (truncation) 및 결합력 분석

상기 실시예 1-1에 따라 SELEX를 통해 1차적으로 선별된 압타머들은 90mer 이상의 크기를 갖는 것으로 나타났다. 90mer 이상의 크기는 치료나 진단에 적용하기에는 다소 부적절한 측면이 있으므로, 가능한 작게 절삭하는 것이 유리하다. 이러한 절삭 과정을 통해 합성 비용과 비특이적인 결합반응을 줄일 수 있고, 특히 추가적인 변형을 용이하게 하여 핵산분해효소 (nuclease)에 대한 저항성 등을 획득할 수 있다.

후보 압타머 유전자 서열의 절삭을 위해 먼저 USE1 단백질에 가장 결합력이 강했던 1번 압타머의 USE1 결합 구조 예측 모델을 분석하였다. 그 결과, USE1에 유비퀴틴이 결합하는 시스틴 (cysteine) 부위에 1번 압타머가 결합할 것으로 예측되는 결합 구조 모델 분석 결과를 확인하였다 (도 10a).

1번 압타머의 시스틴 결합 부위를 포함하면서 적정한 크기를 갖는 여러 압타머 서열을 합성한 뒤, ELISA 방법을 응용한 ELONA (enzyme-linked oligonucleotide assay) 분석법으로 결합력을 분석하였다. 기존 ELISA는 발색에 효소가 부착된 항체를 사용하지만, ELONA의 경우 USE1 단백질에 결합할 수 있는 oligonucleotide, 즉 aptamer에 효소를 부착하여 사용하게 된다. 그 중 가장 강한 결합력을 보이는 36mer 크기의 압타머(이하, 압타머 1e 또는 Aptamer 1e로 지칭한다)를 선별하여 이후 실험에 사용하였다 (도 10b).

[0081] 본 실험에서 비교 대조군으로 이용된 aptamer 서열은 aptamer 1b(서열번호 5), aptamer 1c(서열번호 6), aptamer 1d(서열번호 7)다. 도 10b를 참조하면, aptamer 1에서 결합력이 가장 높으며, aptamer 1e에서도 높은 결합력을 확인할 수 있다.

실시예 3

[0083] **A549 폐암세포에서의 USE1 검출 검증**

[0084] **3-1. A549 폐암세포에서 선별된 USE1 표적 aptamer의 USE1 검출 확인**

[0085] A549 폐암세포를 단백질 추출 용액으로 용해하고 균질화하여 단백질 농도를 정량하였다. 0.1M Sodium Carbonate 코팅 용액을 사용해 세포로부터 추출한 단백질 50ng, 10ng을 각각 Microtiter plate에 코팅하고 PBST (PBS-Tween 0.1%) 용액으로 세척하였다. 1% BSA (Bovine serum albumin) 용액으로 Blocking 후 Biotin 이 결합된 aptamer(Aptamer) 1 혹은 1e를 1μM 부터 10배씩 희석하여 1pM 농도까지 처리하고 마찬가지로 PBST 용액으로 세척한다. 이 후 HRP (Horse-radish peroxidase)- conjugated Streptavidin을 1시간 처리하고 다시 PBST 용액으로 세척한다. 발색반응을 일으키기 위해 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 기질 용액을 처리하고 암실에서 30 분간 반응시킨다. 0.5M 황산 용액으로 반응을 정지시키고 456nm에서 흡광도를 측정하였다(도 11 참조).

[0086] 도 11을 참조하면, 본 발명에 따라 제작된 aptamer 1, aptamer 1e 모두 USE1(UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1) 단백질, A549에 결합하여 높은 발색반응을 일으키는 것을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명의 aptamer 1, aptamer 1e는 USE1에 특이적으로 결합하여, 고형암 진단에 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있다.

[0088] **3-2. 폐암 환자 조직에서 ELISA 분석**

[0089] 실제 폐암 환자의 폐암 및 주변 정상 조직들을 각각 균질화하여 단백질 추출 용액으로 용해하였다. 해당 샘플들에서 고속 원심분리기를 통해 단백질이 포함된 상층액을 분리하고, 0.1M Sodium Carbonate 코팅 용액을 사용해 조직으로부터 추출한 단백질 500ng을 각각 Microtiter plate에 코팅하고 PBST (PBS-Tween 0.1%) 용액으로 세척하였다. 1% BSA (Bovine serum albumin) 용액으로 Blocking 후 Biotin 이 결합된 aptamer(Aptamer) 1e를 1μM 농도로 처리하고 마찬가지로 PBST 용액으로 세척한다. 이 후 HRP (Horse-radish peroxidase)- conjugated Streptavidin을 1시간 처리하고 다시 PBST 용액으로 세척한다. 발색반응을 일으키기 위해 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 기질 용액을 처리하고 암실에서 30 분간 반응시킨다. 0.5M 황산 용액으로 반응을 정지시키고 456nm에서 흡광도를 측정하였다(도 12 참조).

[0090] 도 12를 참조하면, aptamer(Aptamer) 1e를 처리하였을 때, 33개의 샘플 모두 정상조직(N)보다 폐암조직(T)에서 USE1의 검출이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 aptamer(Aptamer) 1e는 USE1에 특이적이며, 고형암(바람직하게는, 폐암)의 진단에 효과적이다.

[0092] **3-3. 웨스턴 블롯팅**

[0093] 실제 폐암 환자의 폐암 및 주변 정상 조직들을 각각 균질화하여 단백질 추출 용액으로 용해하였다. 해당 샘플들에서 고속 원심분리기를 통해 단백질이 포함된 상층액을 분리하여 단백질 농도를 정량하였다. 이 단백질 샘플을 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 과정을 통해 분리하고 항-USE1 항체 및 HRP-conjugated 2차 항체를 반응시켰다. 이 후 ECL 용액을 처리하여 발광시키고 이를 X-ray film에 감광하여 USE1 단백질을 검출하였고, 대조 단백질로 tubulin을 이용하였다(도 13 참조).

[0094] 도 13을 참조하면, 실시예 3-2의 결과와 마찬가지로, aptamer(Aptamer) 1e를 처리하였을 때 정상조직(N) 보다 폐암조직(T)에서 USE1의 검출이 더 높음을 확인할 수 있다. 즉 본 발명의 aptamer 1, aptamer 1e는 모두 USE1에 특이적이어서, 고형암(바람직하게는, 폐암) 진단 또는 예후 예측을 위하여 이용될 수 있다.

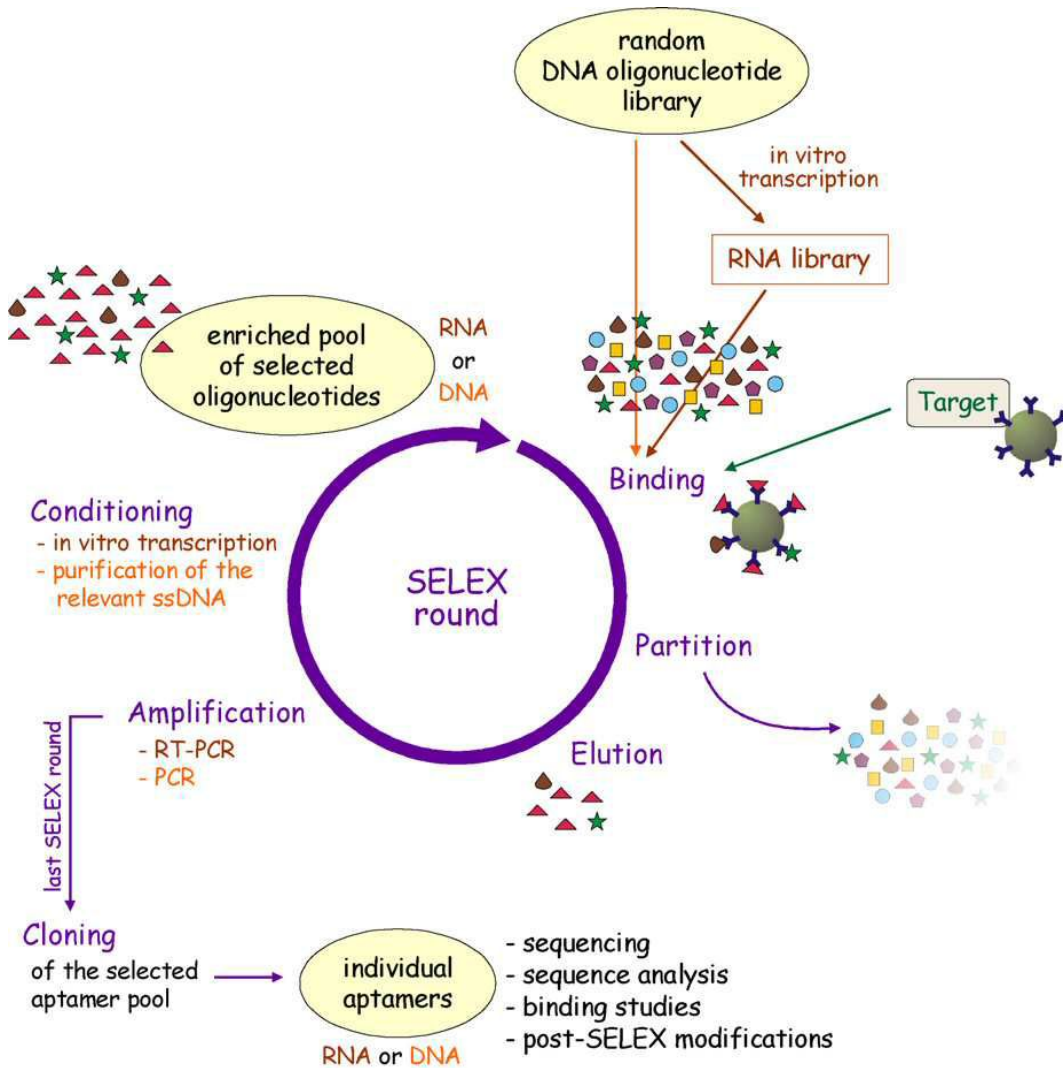
[0096] <본 발명에 이용된 서열목록>

[0097] 서열번호 1

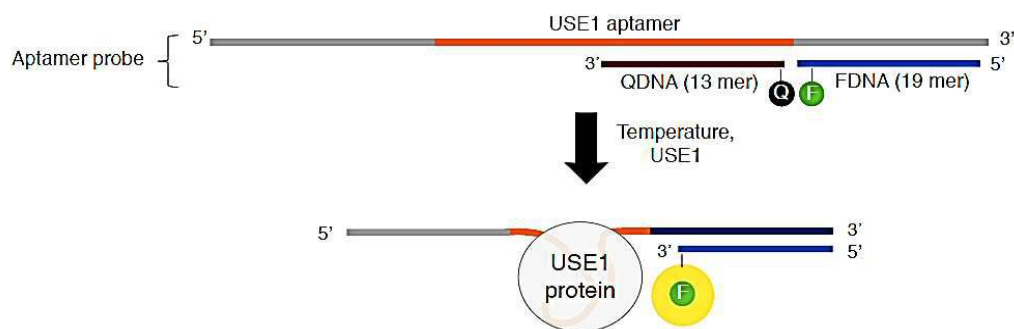
- [0098] USE1 Aptamer 1
- [0099] CACCTAATACGACTCACTATAGCGGATCCGATGGGTGGGGGGTGGGTAGGATCCGTTTCGGGGTTTGGCATAGGGTCTGGCTCGAACAAGCTTGC
- [0101] 서열번호 2
- [0102] USE1 Aptamer 2
- [0103] CACCTAATACGACTCACTATAGCGGACAGGGCTGGTGTGGCTGGCGTCCGGCTCGAACAAGGCTGGTGTGGCTGGCGTTCTGGCTCGAACAAGCTTGC
- [0105] 서열번호 3
- [0106] USE1 Aptamer 3
- [0107] CACCTAATACGACTCACTATAGCGGATCCGACAGAATGCCATCACCATGTCTAGACCTATTGGCTTTGCGACTGGCTCGAACAAGCTTGC
- [0109] 서열번호 4
- [0110] USE1 Aptamer 1e
- [0111] CACCTAACACGATTCACTATAGCTCGGGGTTTGGCA
- [0113] 서열번호 5
- [0114] USE1 Aptamer 1b
- [0115] GCATAGGGTCTGGCTCGAACAAGCTTGC
- [0117] 서열번호 6
- [0118] USE1 Aptamer 1c
- [0119] CCTAACACGATTCACTATAGCTCGGGGTTTGG
- [0121] 서열번호 7
- [0122] USE1 Aptamer 1d
- [0123] CACCTAATACGACTCACTATAGTTTCGGGGTTTGGCA
- [0125] 상기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 상기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

도면

도면1



도면2



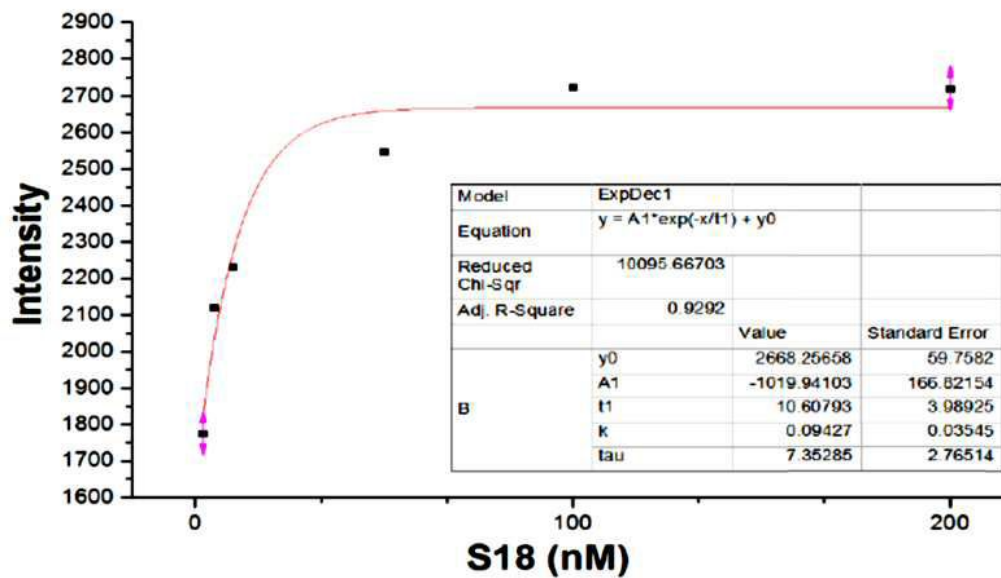
도면3

5. 형광세기

종류	S1	S2	S11	S18
농도(nM)	형광세기			
2	2056	1852	1965	1775
5	2338	1893	2128	2121
10	2716	1963	2253	2232
50	3790	2383	2542	2547
100	4318	2676	3413	2724
200	4360	2977	3901	2721

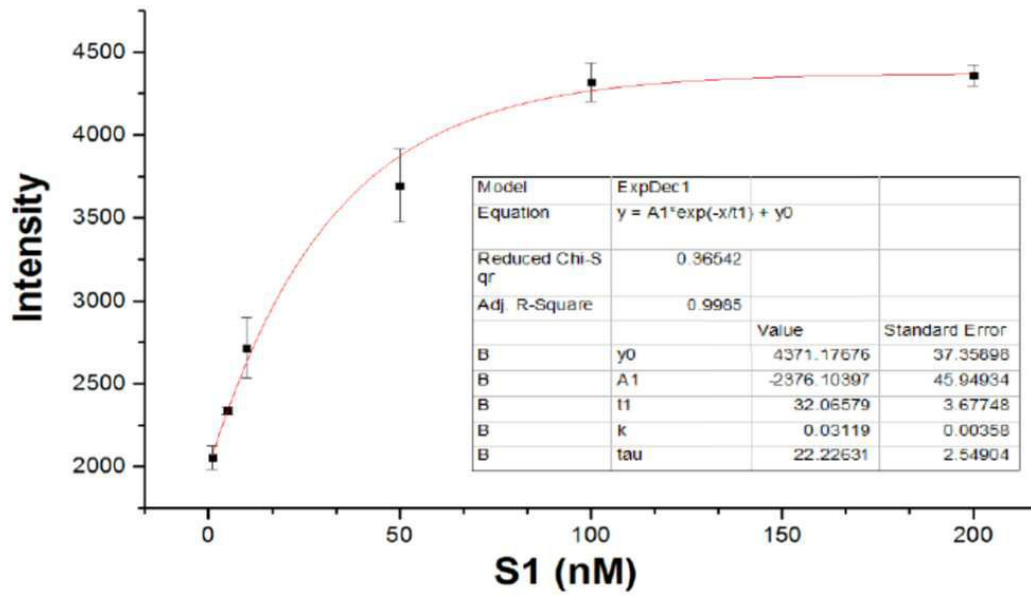
도면4

4. 10nM



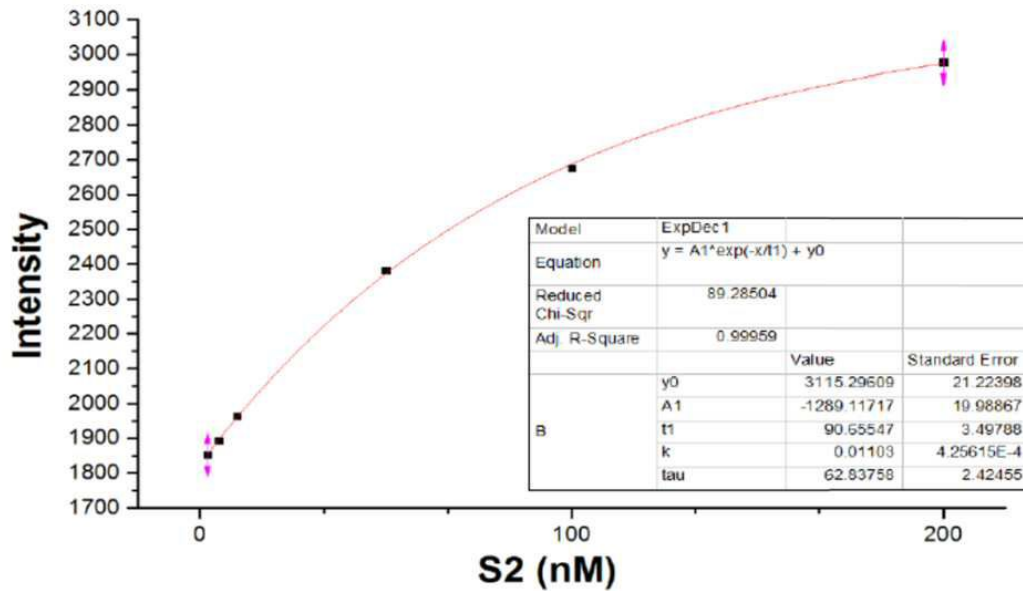
도면5

1. 32nM

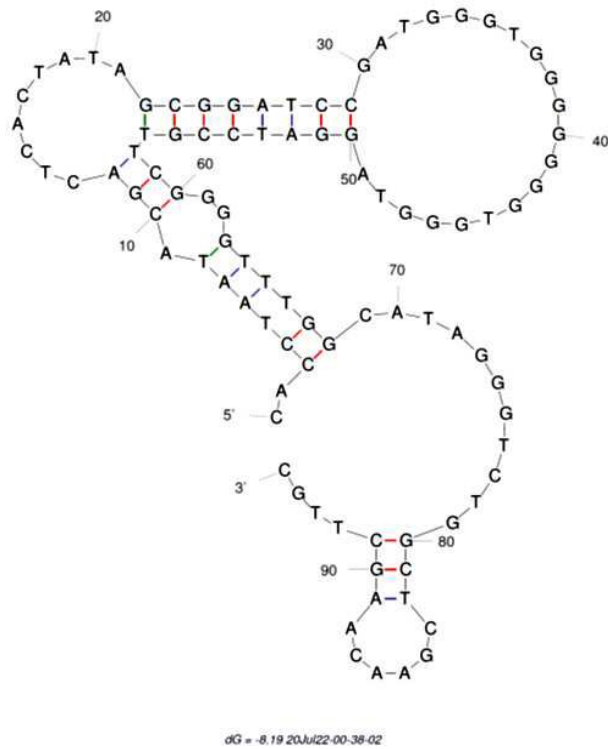


도면6

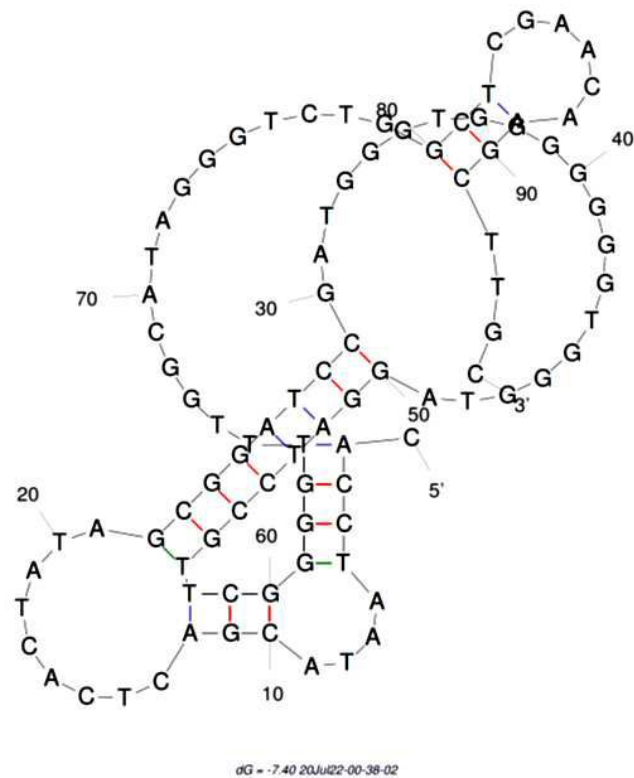
2. 90nM



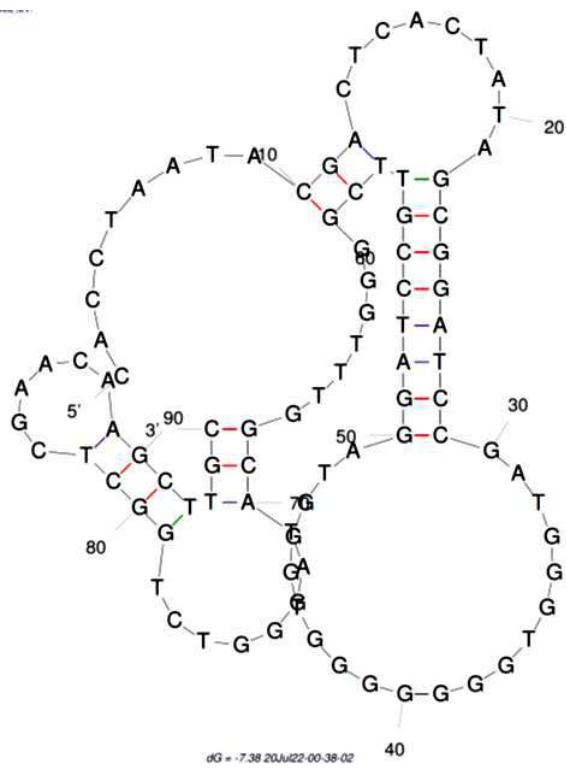
도면7a



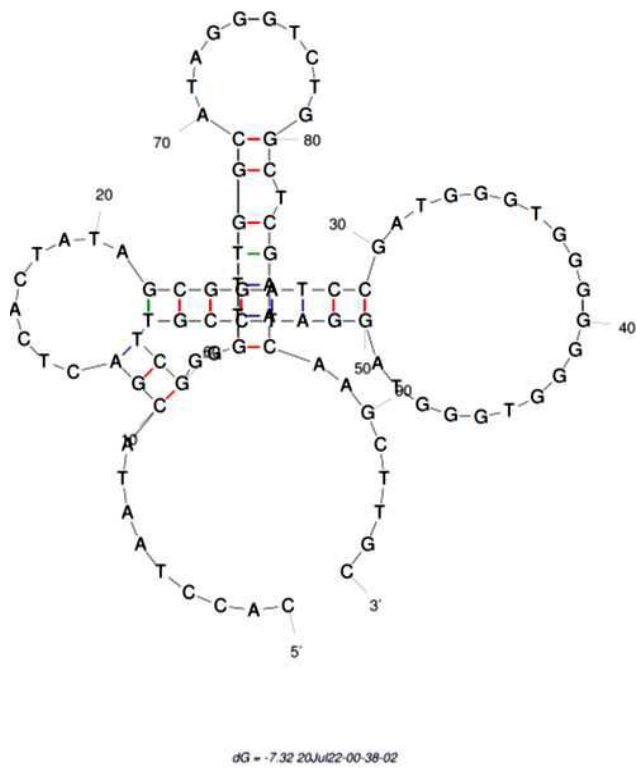
도면7b



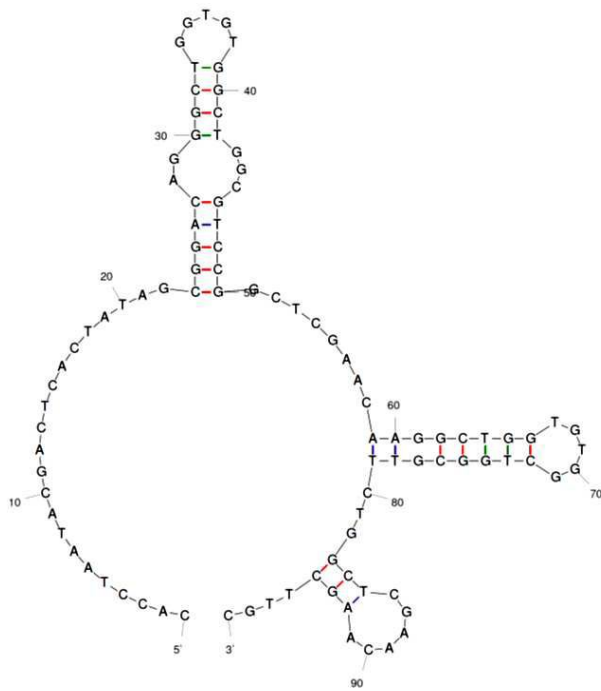
도면7c



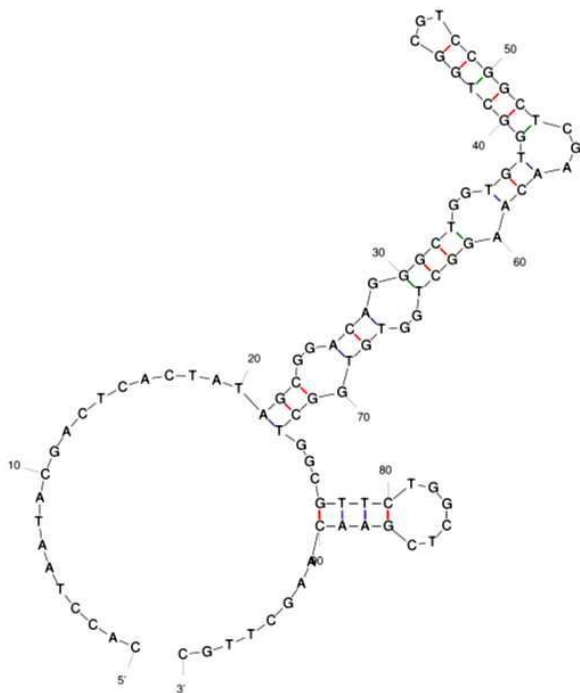
도면 7d



도면8a

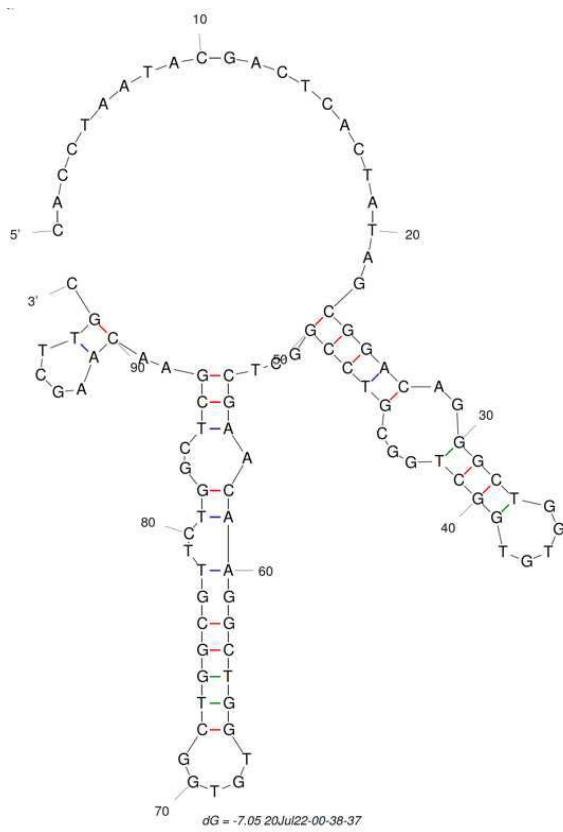


도면8b

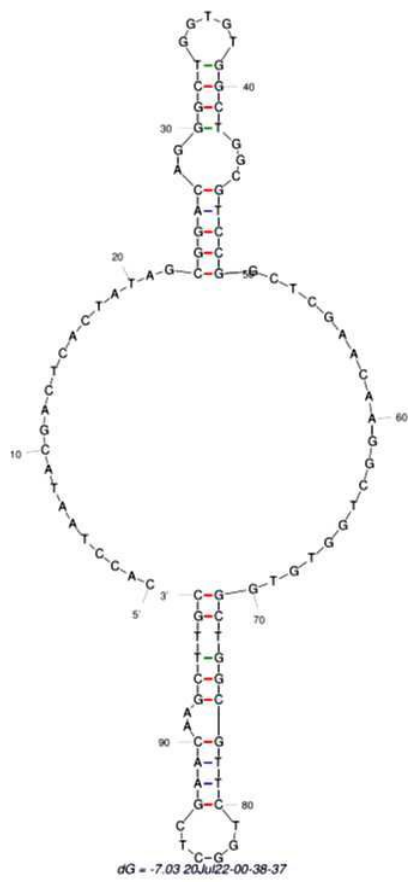


dG = -7.73 20Jul22-00:38:37

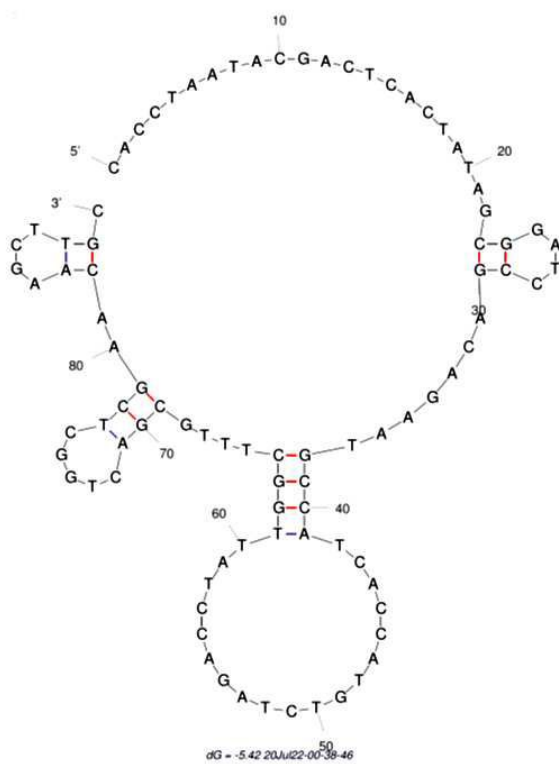
도면8c



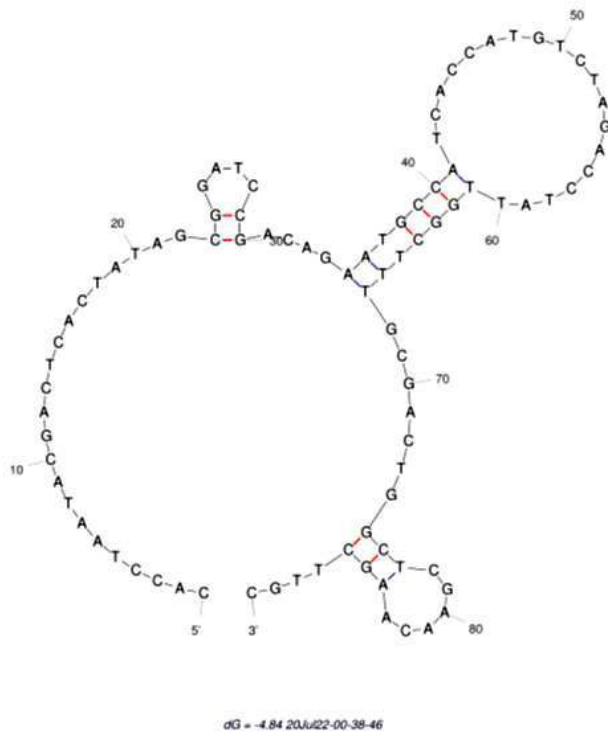
도면8d



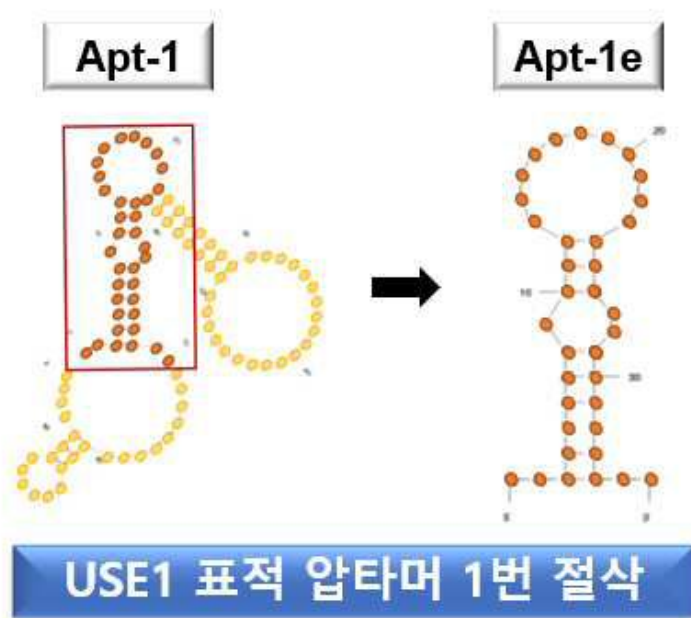
도면9a



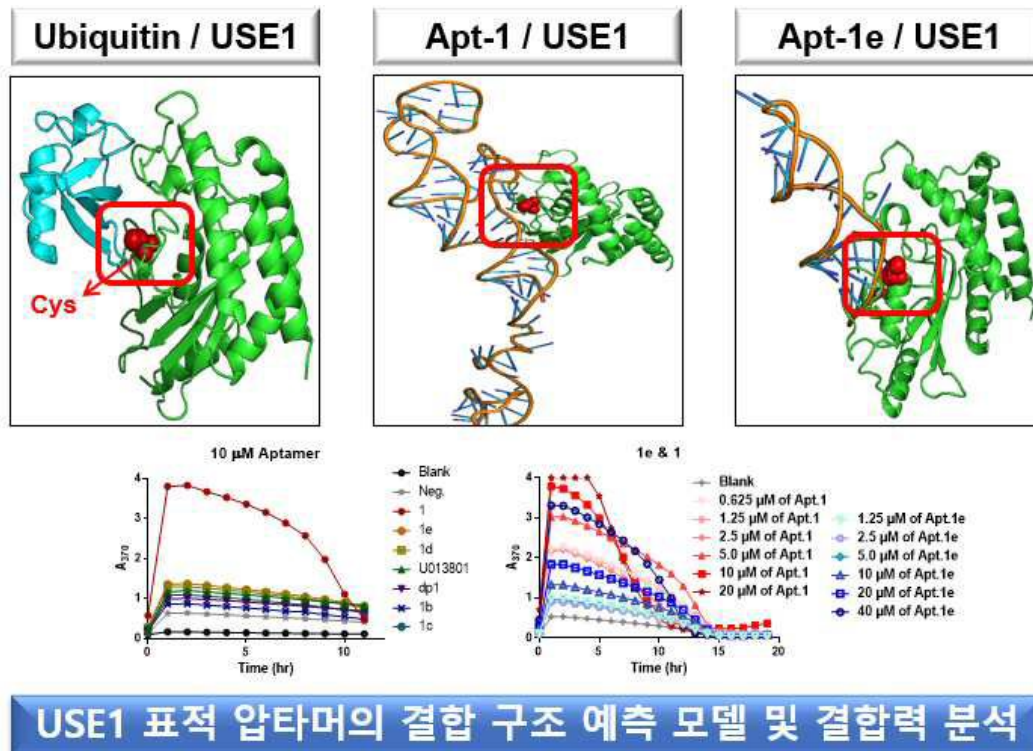
도면9b



도면10a

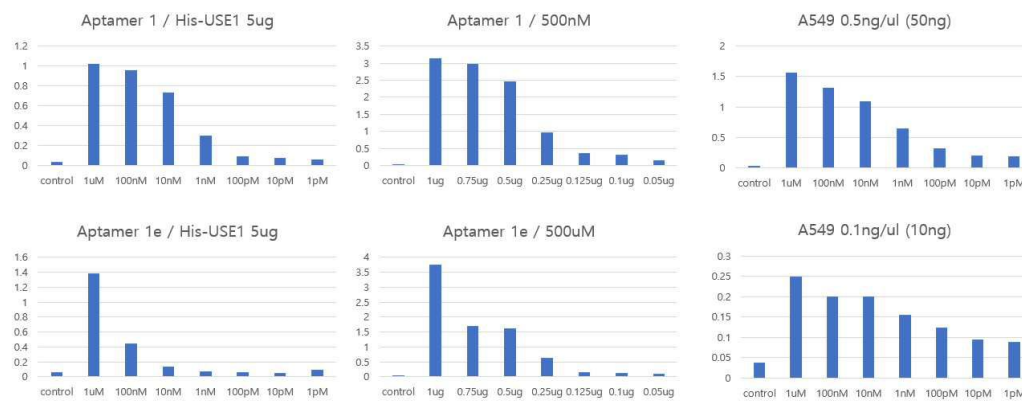


도면 10b

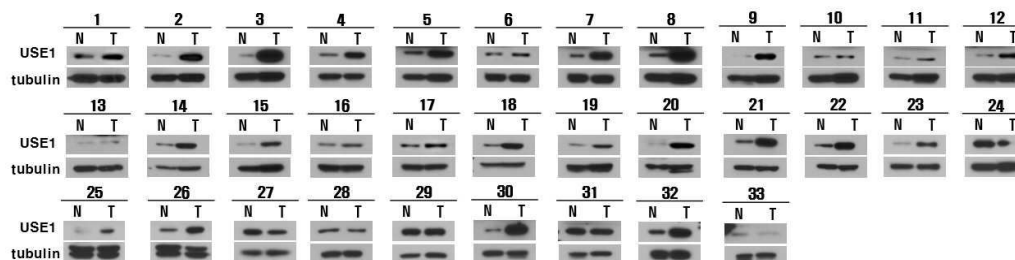


도면11

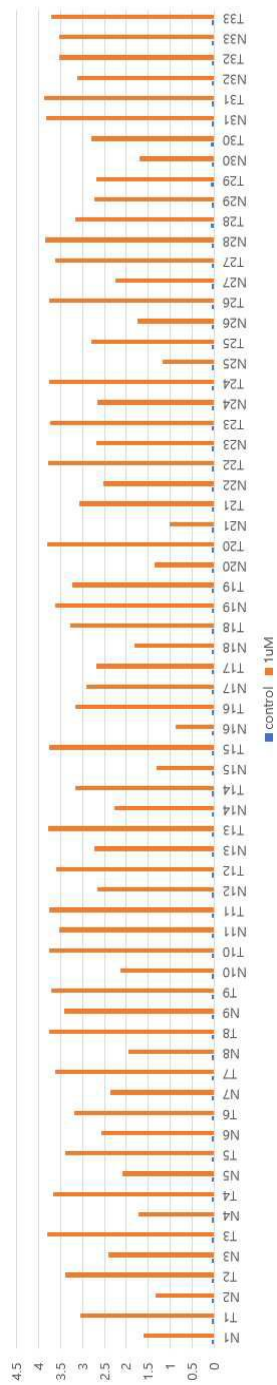
ELISA – His-USE1(aptamer1,1e), A549(aptamer1)



도면12



도면13



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.