



- (51) 국제특허분류:
C12N 15/115 (2010.01) G01N 33/20 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/000897
- (22) 국제출원일: 2012년 2월 7일 (07.02.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0010930 2011년 2월 8일 (08.02.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY CO-OPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY)** [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교), 446-701 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **하상수 (HAH, Sang Soo)** [KR/KR]; 경기도 남양주시 도농로 34, 210-1201(도농동, 부영그린타운아파트), 472-792 Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 테헤란로 87길 36, 6층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), 135-973 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

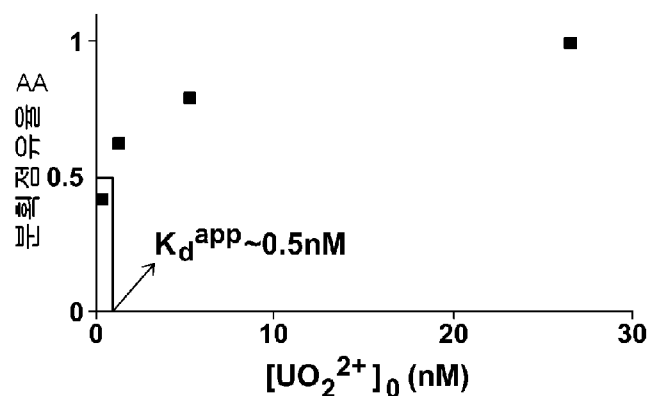
공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PNA APTAMER ABLE TO ISOLATE A METAL

(54) 발명의 명칭 : 금속 분리 가능한 PNA 앵타머

[Fig. 3]



AA ... Fraction proportion

(57) Abstract: The present invention relates to a single-strand PNA aptamer having a specific three-dimensional structure due to complementary base binding, to a production method for the PNA aptamer, and to a method for isolating a target metal by using a PNA aptamer that binds specifically to the target metal. More specifically, the production method for the PNA aptamer comprises: a first step of designing the base sequence of a PNA aptamer so as to be able to form two or more complementary base bonds; and a second step of synthesising the PNA aptamer designed in accordance with the first step; while the method for isolating a target metal comprises a step of bringing a sample containing the target metal into contact with a PNA aptamer that is specific to the target metal; a step of isolating a target metal-PNA aptamer complex from the sample; and a step of recovering the target metal.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 염기의 상보적 결합에 의해 특이적인 3 차원 구조를 가지는 단일가닥 PNA 앵타머, 상기 PNA 앵타머의 제조 방법 및 표적 금속에 특이적으로 결합하는 PNA 앵타머를 이용하여 표적 금속을 분리하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로 PNA 앵타머의 제조 방법은 염기의 상보적 결합이 두 개 이상 형성될 수 있도록 PNA 앵타머의 염기서열을 설계하는 제 1 단계; 및 상기 제 1 단계에 따라 설계된 PNA 앵타머를 합성하는 제 2 단계를 포함하며, 표적 금속을 분리하는 방법은 표적 금속을 함유하는 시료와 표적 금속에 특이적인 PNA 앵타머를 접촉시키는 단계; 표적 금속-PNA 앵타머 착물을 시료로부터 분리하는 단계; 및 표적 금속을 회수하는 단계를 포함한다.

명세서

발명의 명칭: 금속 분리 가능한 PNA 앵타머

기술분야

- [1] 본 발명은 염기의 상보적 결합에 의해 특이적인 3차원 구조를 가지는 단일가닥 PNA 앵타머, 상기 PNA 앵타머의 제조 방법 및 표적 금속에 특이적으로 결합하는 PNA 앵타머를 이용하여 표적 금속을 분리하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로 PNA 앵타머의 제조 방법은 염기의 상보적 결합이 두 개 이상 형성될 수 있도록 PNA 앵타머의 염기서열을 설계하는 제1단계; 및 상기 제1단계에 따라 설계된 PNA 앵타머를 합성하는 제2단계를 포함하며, 표적 금속을 분리하는 방법은 표적 금속을 함유하는 시료와 표적 금속에 특이적인 PNA 앵타머를 접촉시키는 단계; 표적 금속-PNA 앵타머 착물을 시료로부터 분리하는 단계; 및 표적 금속을 회수하는 단계를 포함한다.

[2]

배경기술

- [3] 물 속의 금속의 킬레이트화는 환경 보호 및 자원 회수를 위해 중요하다. 특히 금속-특이적 킬레이팅 수지는 금속 킬레이트화에 있어서 단순한 이온 교환 수지보다 훨씬 더 효과적인데, 그 이유는 그들이 표적 금속에 대해 더 높은 선택성과 더 큰 착물화 상수를 나타내며 음용수 또는 폐수 처리 및 해수로부터 표적 금속 이온의 추출과 같은 실용적 용도에서 유용하기 때문이다. 이러한 관점에서, 우라늄은 해수에서 주로 우라닐 이온의 트리카르보나토(tricarbonato) 착물로서 전세계 원전이 약 6만년간 사용할 수 있는 양인 40억 톤 가량이 약 3 ppb의 농도로 존재한다. 따라서, IAEA(국제원자력기구)가 2008년 5월 기준으로 발표한 자료(세계 우라늄 확인매장량 474만 톤, 그리고 추정매장량 1055만 톤으로서 이는 세계 연간 사용량이 6.4만 톤임을 감안할 때 약 70년간 사용할 수 있을 정도의 양)를 고려할 때, 우라닐 이온(UO_2^{2+})에 대한 효과적인 호스트 분자의 디자인은 해수로부터 우라늄의 선택적 추출의 경제적 중요성과 연결된다. 그러나, 우라닐 이온 결합을 위해 지금까지 개발된 시스템은 다른 금속 이온의 간섭으로 인하여 우라닐 이온에 대해 요구되는 특이성이 결여되는 것으로 밝혀졌다. 그 결과, 크라운 에테르(crown ethers) 및 칼릭사렌(calixarenes)을 포함하는 거대 환식 호스트 분자를 이용한 우라닐 이온의 선택적인 분자 인식에 대한 연구가 이루어졌으나, 이러한 거대 환식 호스트 분자는 합성하기 위해 많은 노동을 필요로 하며, 고체 지지체에 연결시키기 어려운 변형 때문에 바람직하지 못하다.
- [4] 해수로부터 우라늄의 선택적 추출과 함께, 중요하게도, 바닷물 속에는 인듐(0.1 내지 2.0 pM) 또는 팔라듐(약 2.1 pM)과 같은 희소금속이 존재한다. 인듐과 같은 희소금속의 해수로부터의 선택적 추출은 세계적으로 첨단산업분야에서 기존

용도의 수요뿐만 아니라, 신규 첨단 소재와 관련된 반도체(InP), LCD(ITO), 태양전지 등 다양한 연구개발이 진행되고 있어 지속적으로 실용화 가능성이 확대되고 있다는 점에서, 그리고 Hi-Tech 산업계의 폭발적인 수요증가에 기인한 최근의 인듐의 수급 불안정과 함께 급격한 가격상승이 초래됨으로써 IT, NT 산업계에서는 인듐의 안정 공급을 위한 자원 확보전에 접어들고 있다는 점에서 매우 중요하다. 즉, 인듐 소비량에 대한 통계자료(Roskill Information Services; Carlin, 2006)에서 제시된 바와 같이 인듐 수요가 1987년까지 약 100 톤 미만으로 보고되었으나, 2000년 약 220 톤, 2005년에는 약 920 톤으로 대폭 증가하는 추세를 보이고 있으며, 2003년부터의 다양한 LCD 용 소재개발은 급격한 수요확대를 유도하고 있다. 이러한 인듐 금속가격은 2006년도 은(약 \$400/kg)과 비교하여 인듐이 약 \$1000 내지 800/kg으로서 2배 이상 높은 가격대가 형성되어 있다. 인듐과 함께 팔라듐 역시 다른 재료에 약간만 첨가하여도 물질의 성질을 바꿀 수 있다는 점에서 전자부품이나 연료전지, 배기가스 정화용 촉매제 등의 제조에 필수적이므로 첨단산업분야에서의 수요가 지속적으로 증가하고 있다. 2009년 기준으로 세계 인듐 추정매장량은 약 2700 톤이며, 세계 연간 수요는 약 1200 톤(ITO 수요량: 약 1000 톤)으로, ITO 재활용 과정에서 연간 회수 가능한 약 600 톤을 감안하더라도 이미 공급부족 현상이 나타나고 있으며 2005년부터 급격한 가격변동 양상을 보이고 있다. 팔라듐의 경우 인듐보다는 자원고갈 염려는 덜 하지만, 매장 집중도(98.7%)와 생산 집중도(90.1%)가 모두 높아 공급 불안정성이 매우 높다. 이에 따라 인듐 또는 팔라듐을 더 간단하고 빠르게 찾아내고 회수하는 것이 필요하게 되었다.

- [5] 한편, 앵타머(aptamer)는 DNA, RNA, 소분자, 펩티드 및 단백질 등에 특이적으로 결합할 수 있는 비-천연 발생의 구조화된 올리고뉴클레오타이드이다. 일반적으로, 앵타머는 셀렉스(SELEX; systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라는 시험관 내(in vitro) 선택 과정에 의해 선별되며, 단백질, 금속 이온 및 소분자의 특이적 검출 및 표적-특이적 전달과 같은 많은 생물분석의 용도로 사용되고 있다.
- [6] PNA(펩티드 핵산; peptide nucleic acid)는 인공적으로 합성한 DNA 또는 RNA의 유사체이다. 당 골격을 갖는 DNA 또는 RNA와 달리 펩티드 결합에 의해 연결된 반복되는 N-(2-아미노에틸)-글리신 단위를 골격으로 가지며, DNA 또는 RNA와 동일한 다양한 퓨린 및 피리미딘 염기를 측쇄에 갖는다. 이러한 PNA는 DNA 또는 RNA와 유사한 특성을 가지면서도 열이나 pH 등의 자극에 보다 안정한 것으로 알려져 있다. 그러나 자연적으로 생성될 수 없고 합성으로만 제조될 수 있어 비용이 높다는 단점이 있어서 아직은 널리 상용화되지는 못하고 있다. 또한, DNA 또는 RNA 앵타머는 특이적인 표적 분자 인식 능력으로 바이오 칩 등으로 널리 활용되고 있는 반면 앵타머로서 PNA 분자는 그 활용이 아직 보고된 바 없다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은 해수로부터 우라늄, 인듐, 팔라듐 등을 비롯한 금속을 효과적으로 추출하기 위한 방법을 찾기 위해 예의 연구하던 중, DNA 앵타머와 동일한 염기서열을 갖는 PNA가 DNA 앵타머와 같이 금속 이온에 특이적으로 결합할 수 있음을 처음으로 확인하여 앵타머로서의 기능을 할 수 있음을 밝혔다. 나아가 이로부터 PNA 앵타머가 동일한 염기서열을 갖는 DNA 앵타머와 유사한 3차원 구조를 형성할 수 있음을 제시하였다. 이에 금속 이온에 높은 특이성을 가지고 결합할 수 있는 PNA 앵타머를 이용하여 표적 금속이온을 분리할 수 있는 방법을 고안하고 이에 본 발명을 완성하였다.

[9]

과제 해결 수단

- [10] 본 발명의 하나의 목적은 염기의 상보적 결합에 의해 특이적인 3차원 구조를 가지는 단일가닥 PNA 앵타머를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 염기의 상보적 결합이 두 개 이상 형성될 수 있도록 PNA 앵타머의 염기서열을 설계하는 제1단계; 및 상기 제1단계에 따라 설계된 PNA 앵타머를 합성하는 제2단계를 포함하는 상기 염기의 상보적 결합에 의해 특이적인 3차원 구조를 가지는 단일가닥 PNA 앵타머의 제조 방법을 제공한다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 표적 금속을 함유하는 시료와 표적 금속에 특이적인 PNA 앵타머를 접촉시키는 단계; 표적 금속-PNA 앵타머 착물을 시료로부터 분리하는 단계; 및 표적 금속을 회수하는 단계를 포함하는, 표적 금속에 특이적으로 결합하는 PNA 앵타머를 이용하여 표적 금속을 분리하는 방법을 제공한다.
- [13]
- [14] 이하 본 발명을 자세히 설명한다.
- [15]
- [16] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 염기의 상보적 결합에 의해 특이적인 3차원 구조를 가지는 단일가닥 PNA 앵타머를 제공한다.
- [17]
- [18] 본 발명자들은 우라닐 이온에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 및 이의 염기서열을 개시한 바 있다. 그러나 DNA는 다양한 미생물 등이 존재하는 자연 환경하에서 충분히 안정하지 않을 수 있으므로(Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53: 170-179), 상기 DNA 앵타머는 해수로부터 우라닐 이온을 분리하여 우라늄을 회수하는 등의 목적에 사용되기에 적합하지 못할 수 있다. 이에 PNA가 DNA와 유사한 특성을 가지면서도 열, pH 등에 대한 안정성이 뛰어나고, DNase 등의 효소에 의한 가수분해의 영향을 받지 않으므로, 상기 우라닐 이온 특이적 DNA 앵타머와 동일한 염기서열을 갖는 PNA를 이용하여 우라닐 이온에 특이적으로

결합하는지 확인하였다.

- [19] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, N-말단에 시스테인을 도입한 서열번호 1의 Cys-PNA 1(N terminal-Cys-CTGCA GAATT CTAAT ACGAC TCACT ATAGG AAGAG ATGGC GACAT CTCTG CAGTC GGGTA GTTAA ACCGA CCTTC AGACA TAGGC AGGCG TATAT CTTGT GACGG TAAGC TTGGC AC-C terminal)을 고형 지지체인 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트-아미노폴리스티렌 수지에 결합시키고 이를 이용하여 우라닐 이온 용액에서 우라닐 이온 특이적 분리능을 확인하였다. 그 결과 상기 본 발명의 PNA는 우라닐 이온과 높은 비율로 결합하여 분리해 낼 수 있음을 확인하였다(도 3). 즉, 특정 표적 물질에 대한 DNA 앵타머와 동일한 서열의 PNA도 해당 표적 물질의 앵타머로 작용할 수 있음을 처음으로 확인하였다. 또한 서열번호 1의 우라닐 이온 특이적 DNA 앵타머와 동일한 서열을 갖는 서열번호 1의 PNA는 우라닐 이온 특이적 PNA 앵타머임을 또한 최초로 확인하였다. 따라서, 상기 본 발명의 서열번호 1의 우라닐 이온 특이적 PNA 앵타머는 우라닐 이온에 특이적으로 결합할 뿐 아니라, PNA 특징적인 온도, pH, 염 및 각종 분해효소에 대한 안정성을 가지므로 해수에서 우라닐 이온을 분리 회수하여 자원으로 활용하는데 이용될 수 있을 것이다. 또한 pH에 대한 안정성으로 우라닐 이온 회수 후 세척과정을 통해 반복하여 사용할 수 있을 것이다.

[20]

- [21] 본 발명의 용어 "PNA(peptide nucleic acid; 펩티드 핵산)"는 DNA 또는 RNA와 유사하게 인공적으로 합성된 중합체이다. 그러나 이름과는 달리 산이 아니다. DNA 및 RNA는 각각 인산기를 포함하는 데옥시리보오스 및 리보오스 당 골격을 갖는 반면, PNA의 골격은 펩티드 결합에 의해 연결된 반복되는 N-(2-아미노에틸)-글리신 단위로 이루어 진다. 도 1에 나타난 바와 같이 다양한 퓨린 및 피리미딘 염기가 메틸렌 카보닐 결합에 의해 골격에 결합할 수 있다. PNA는 펩티드처럼 도시되어, N-말단이 좌측에, 그리고 C-말단이 우측에 표시된다. DNA 또는 RNA와는 달리 PNA 골격은 음으로 하전된 인산기(phosphate group)를 함유하지 않으므로 가닥 사이의 정전기적 반발력이 부재하므로 PNA/DNA 가닥 간의 결합이 DNA/DNA 가닥의 결합보다 강한 것으로 알려져 있다. 혼합 염기 PNA 분자는 염기쌍 인식 면에서 DNA 분자의 진정한 모사체이다. 이러한 합성 PNA 소중합체는 뛰어난 결합력으로 인해 분자 생물학적 과정, 진단 분석, 및 안티센스 치료에 사용되고 있다. 또한 PNA는 상보적인 염기서열의 DNA에 대한 높은 특이성을 갖는다. 이로 인해 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥 보다 염기 불일치에 보다 민감하게 반응한다. 상기 결합력과 서열 특이적 인식력은 PNA/RNA 이중가닥에도 적용된다. 또 다른 PNA의 장점은 핵산분해효소 또는 단백질분해효소에 의해 쉽게 인식되지 못하므로 이들 효소에 의한 분해로부터 안정하다는 것이다. 더불어 넓은 범위의

pH 영역에 대해서도 안정하다. 다만 소수성 골격으로 인해 인체에 적용시 세포 내 침투가 용이하지 않다는 것이 단점이나 이는 세포투과성 펩타이드를 공유결합시키는 등의 변형을 가하여 개선할 수 있다.

- [22] 본 발명의 용어 "앱타머(aptamer)"는 그 자체로 안정된 3차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산((DNA, RNA 또는 변형핵산) 또는 펩티드이다. 앱타머는 무작위적인 서열을 가지는 핵산 라이브러리인 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 과정을 통해 얻을 수 있다. 상기 앱타머에 특이적으로 결합할 수 있는 분자는 소분자, 단백질, 핵산, 세포, 조직 등으로 매우 다양하다. 현재로서는 항체에 대한 좋은 대안으로 여겨지고 있으나, 금속이온들과 작은 화학 분자들까지도 나노몰 내지 피코몰 수준의 해리상수를 가질 만큼 특이적으로 결합한다고 알려져 있다.
- [23] 본 발명의 용어 "염기(base)"는 DNA 또는 RNA의 당 골격의 곁가지에 결합되어 반복적으로 나타나는 퓨린 또는 피리미딘 염기를 의미한다. DNA 분자를 구성하는 아데닌(adenine; A), 시토신(cytosine; C), 구아닌(guanine; G), 및 티민(thymine; T)의 4가지 염기, RNA 분자를 구성하는 상기 아데닌, 시토신, 구아닌과 티민을 대신하는 우라실(uracil; U), 및 이들의 유도체를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [24] 본 발명의 용어 "상보적 결합"은 상기 언급된 염기들의 서열 특이적 결합을 의미한다. 즉, 아데닌은 대응 가닥의 티민 또는 우라실과, 구아닌은 시토신과 각각 결합하며, 이들의 역쌍의 결합도 성립한다. 바꾸어 말하면, 예를 들어 아데닌은 또 다른 아데닌, 구아닌 또는 시토신과 결합하지 않는다. 이러한 서열 특이적 결합은 수소 결합에 염기 쌍 간의 수소 결합에 의한 것으로 이러한 상보적 결합에 의해 DNA 또는 RNA는 음전하를 띠는 골격 간의 정전기적 반발력에도 불구하고 이중가닥 구조를 형성할 수 있다. 그러나 이러한 상보적 결합은 이중가닥 구조에 한정되는 것이 아니라 상기 대응되는 염기의 조합 즉, 아데닌과 티민 또는 우라실, 구아닌과 시토신 또는 이들의 역조합 간에 형성되는 결합을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.
- [25] 본 발명의 용어 "특이적인 3차원 구조"는 단일가닥의 핵산 또는 핵산 유사체(DNA, RNA, PNA 등) 내에서 염기들 간의 상보적 결합에 의해 형성되는 서열에 따른 특이적인 3차원적 구조를 의미하며, 이러한 특이적인 3차원 구조에 의해 표적 분자를 특이적으로 인식할 수 있다. 단일가닥 핵산 상에서 서열상으로 근접하여 위치하지 않은 즉 하나 또는 그 이상의 염기로 분리되어있는 상보적 염기들이 쌍을 이루어 결합하면서 특이적인 3차원적 구조를 형성한다. 이러한 구조는 환경에 따라 결합과 풀림을 반복할 수 있으며, 서열이 동일하면 같은 환경에서는 재현성있게 동일한 구조를 형성한다. 즉, 서열 특이성을 갖는다.
- [26] 앱타머는 소분자, 단백질, 핵산, 세포, 조직 등과 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명의 단일가닥 PNA는 소분자, 단백질, 핵산, 세포, 조직 등과

특이적으로 결합할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 금속에 특이적으로 결합할 수 있으며, 보다 바람직하게는 우라늄에 결합할 수 있고, 더욱 바람직하게는 우라닐 이온에 결합할 수 있다.

- [27] 앵타머의 염기서열은 SELEX 과정을 통해 무작위적 염기서열로부터 선택될 수 있으나, 바람직하게 본 발명의 우라닐 이온 특이적 PNA 앵타머는 서열번호 1의 염기서열을 가질 수 있다. 상기 PNA 앵타머는 고형 지지체에 연결된 것일 수 있으며, 바람직하게 고형 지지체는 아미노폴리스티렌 수지일 수 있으며, 보다 바람직하게는

4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트-아미노폴리스티렌 수지일 수 있다.

[28]

- [29] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 염기의 상보적 결합에 의해 특이적인 3차원 구조를 가지는 단일가닥 PNA 앵타머의 제조 방법으로서, 염기의 상보적 결합이 두 개 이상 형성될 수 있도록 PNA 앵타머의 염기서열을 설계하는 제1단계; 및 상기 제1단계에 따라 설계된 PNA 앵타머를 합성하는 제2단계를 포함하는 단일가닥 PNA 앵타머의 제조 방법을 제공한다.

- [30] 상기 제1단계는 본 발명의 PNA가 앵타머의 특징인 서열 특이적 3차원 구조를 형성할 수 있도록 하기 위한 것으로, 두 개 이상의 분자 내 상보적 결합을 형성할 수 있는 서열을 가지도록 하여 동일한 서열을 갖는 PNA는 동일한 환경에서 재현성있게 특이적인 3차원 구조를 갖도록 결정할 수 있다. 상보적 결합을 형성하는 염기의 수가 많을 수록 결합력이 높으나 필수적인 요소는 아니다. 재현성있게 서열 특이적 3차원 구조를 형성하여 특정 표적 분자를 인식할 수 있는 서열이면 제한없이 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 용어 "설계"는 목적에 따라 PNA가 적절한 3차원 구조를 형성할 수 있도록 염기의 배열 순서를 결정하는 것을 의미한다. 바람직하게는 공지된 DNA 앵타머의 염기서열과 동일하게 또는 상보적으로 PNA 앵타머의 염기서열을 설계할 수 있다.

- [31] 상기 제2단계는 상기 제1단계에서 설계된 염기서열에 따라 PNA 단량체로부터 원하는 서열의 PNA 다량체를 합성하는 단계이다. 본 발명의 용어 "합성"은 PNA 단량체를 차례로 결합시켜 다량체를 제조하는 과정을 의미한다. 공지의 방법으로 합성될 수 있다. 주식회사 파나진은 PNA 단량체 및 이의 제조방법, 및 PNA 다량체의 제조방법을 공개한 바 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[32]

- [33] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 표적 금속을 함유하는 시료와 표적 금속에 특이적인 PNA 앵타머를 접촉시키는 단계; 표적 금속-PNA 앵타머 착물을 시료로부터 분리하는 단계; 및 표적 금속을 회수하는 단계를 포함하는, 표적 금속 분리 방법을 제공한다.

- [34] 상기 표적 금속을 함유하는 시료와 표적 금속 특이적인 PNA 앵타머를 접촉시키는 단계는 시료 중 표적 금속만을 PNA 앵타머에 특이적으로

결합시키기 위해 수행된다.

- [35] 이후 분리 및 회수를 위하여 PNA 앵타머는 고정지지체에 연결시킬 수 있다. 바람직하게 고정 지지체는 아미노폴리스티렌 수지일 수 있고, 보다 바람직하게는

4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트-아미노폴리스티렌 수지일 수 있다.

- [36] 상기 표적 금속-PNA 앵타머 착물을 분리하는 단계는 산용액으로 세척하여 수행할 수 있다. 바람직하게 염산 수용액을 이용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 1 N 농도의 염산 수용액을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[37]

- [38] 본 발명의 구체적인 실시예에 사용된 우라닐 이온과 PNA 앵타머의 결합 자리(binding site; BS) 간의 착물형성을 수식으로 나타내면 하기와 같이 설명될 수 있다.

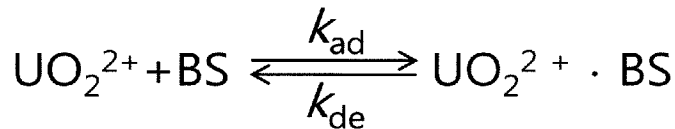
- [39] [반응식 1]

$$[40] \quad \text{분획점유율} = \frac{[\text{리간드}]}{[\text{리간드}] + K_d}$$

- [41] 상기 K_d 는 해리 상수를 의미한다. 그러나, 우라닐 이온의 불용성 킬레이팅제의 경우, 우라닐 착물의 형성 상수(K_f)는 고체 표면에서의 기체 흡착을 위한 랑뮈르 등온선을 이용한 유추에 의해 정확하게 k_{ad}/k_{de} (식 2)로 표현될 수 있다. 우라닐 착물 ($\text{UO}_2^{2+} \cdot \text{BS}$)을 형성하기 위한 결합 부위(BS)에 의한 우라닐 이온의 착물형성은 후속 결합과 독립적임이, 다시 랑뮈르 등온선을 이용한 유추에 의해 추가로 가정될 수 있다. K_f 가 매우 클 때 착물형성되지 않은 우라닐 이온의 평형 농도로부터 직접 K_f 를 측정하는 것은 가능하지 않다. 대신, K_f 는 하기 식 2와 식 4의 평형 과정의 조합인 식 3에 의해 나타난 교환 반응을 위한 평형 상수($K_{ex} = k_1/k_{-1}$)를 측정함으로써 간접적으로 추정될 수 있으며, 그 이유는 K_f 가 K_{ex} 및 K_f^{carb} ($10^{21.54}$)로부터 계산될 수 있기 때문이다. 하기 식에서, $[\text{BS}]$, $[\text{BS}]_0$, 및 $[\text{UO}_2^{2+} \cdot \text{BS}]$ 는 BS 및 $\text{UO}_2^{2+} \cdot \text{BS}$ 가 용해되는 것으로 가정될 때 얻을 수 있는 BS의 농도, BS의 처음에 첨가된 농도, 및 $\text{UO}_2^{2+} \cdot \text{BS}$ 의 농도를 각각 나타낸다. 우라닐 이온의 처음 첨가된 농도는 $[\text{UO}_2^{2+}]_0$ 로 표현된다. $[\text{HCO}_3^-] \gg [\text{UO}_2^{2+}]_0$ 의 조건하에서 실험적으로 측정된 $[\text{UO}_2^{2+} \cdot \text{BS}]$ 로부터, 그리고 측정에 이용된 $[\text{CO}_3^{2-}]$, $[\text{UO}_2^{2+}]_0$, 및 $[\text{BS}]_0$ 의 값으로부터, K_{ex} 의 값은, $[\text{HCO}_3^-]$ 이 $[\text{HCO}_3^-]_0$ 와 근사할 수 있다는 가정을 기초로 하기 식 5에서 계산될 수 있다. pH 8.01 및 25°C에서 21 mM 바이카보네이트 이온의 존재하에서 PNA 앵타머-MCC-PS를 위한 $\log K_f$ 의 추정치는 20이었다. K_d^{app} 와 K_f 의 추정치 사이의 차이는 저농도의 $[\text{UO}_2^{2+}]_0$ 에서 ICP-MS의 상대적으로 열등한 민감성에 의해 야기된 실험 오차로 인한 것으로 생각된다.

- [42] [반응식 2]

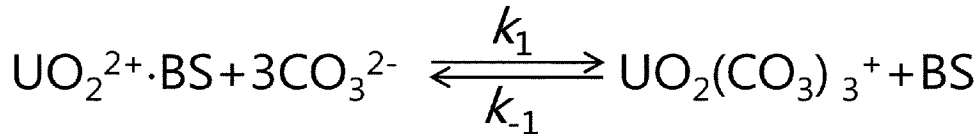
[43]



[44]

[반응식 3]

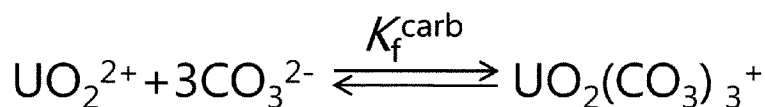
[45]



[46]

[반응식 4]

[47]



[48]

[반응식 5]

[49]

$$K_{\text{ex}} = \frac{([\text{BS}]_0 - [\text{UO}_2^{2+} \cdot \text{BS}])([\text{UO}_2^{2+}]_0 - [\text{UO}_2^{2+} \cdot \text{BS}])}{[\text{UO}_2^{2+} \cdot \text{BS}][\text{CO}_3^{2-}]^3}$$

[50]

경제적 용이성을 만족하기 위해서는 하루에 수지 1 그램 당 500 mg 이상의 우라늄의 추출이 필요한 것으로 추정되었다. 또한, 킬레이팅제는 여러번 재사용되어야 한다. 본 발명의 결과는 수지의 표면 상의 Cys-PNA 1의 mol%를 증가시키기 위하여, 앱타머-MCC-PS 수지에서 PNA 앱타머의 함량을 상승시키는 것이 필요하지만, 높은 $\log K_f$ 값 및 PNA의 안정성으로 인하여 PNA 앱타머를 이용한 우라닐 이온의 분리가 해수 등으로부터 우라늄의 추출에 요구되는 경제적 기준을 충족시킬 수 있음을 잘 보여준다.

[51]

또한, 종래의 SELEX(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)를 이용하여, 표적 금속 이온을 위한 임의의 PNA 앱타머가 실용적으로 개발될 수 있으므로, 본 발명의 방법에 따라 PNA 앱타머를 이용하여 분리할 수 있는 금속은 특별히 제한되지 않으며, 특이적 앱타머가 개발될 수 있는 금속이라면 어떤 금속이든지 그 금속에 특이적인 PNA 앱타머를 이용하여 시료로부터 안정적으로 분리할 수 있을 것이며, 그에 따라 해수에 존재하는 인듐, 팔라듐 등도 효과적으로 분리할 수 있을 것이다.

[52]

발명의 효과

[53]

본 발명은 PNA 분자가 앱타머로 작용할 수 있음을 최초로 밝혔으며, 특히 특정 표적 분자에 대한 공지의 서열의 DNA 앱타머와 동일한 서열을 갖는 PNA 앱타머는 동일한 표적 분자에 대해 특이성을 가짐을 또한 최초로 밝혔다. 서열번호 1의 우라닐 이온 특이적 PNA 앱타머는 해당 이온에 대한 특이성과 PNA 특유의 안정성으로 인해 해수로부터 우라늄 자원을 회수하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 또한 재사용도 가능하므로 높은 비용에 대한 부담을

줄일 수 있다.

[54]

도면의 간단한 설명

[55] 도 1은 PNA의 화학 구조를 일반화하여 나타낸 도이다.

[56] 도 2는 PNA 앵타머-MCC-PS 수지의 제조 방법을 나타낸 도이다.

[57] 도 3은 PNA 앵타머-MCC-PS 수지의 우라닐 이온에 대한 결합 실험 결과를 나타낸 도이다. 결과로서 계산된 우라닐 이온에 대한 PNA 앵타머-MCC-PS 수지의 겔보기 해리상수는 21 mM 바이카보네이트 이온 존재 하에서 약 0.5 nM이다.

[58]

발명의 실시를 위한 형태

[59] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[60]

[61] 실시예 1: 아미노PS(amino-polystyrene) 수지와 연결된 PNA-기반 앵타머의 제조

[62]

[63] 모든 시약은 판매사로부터 구입하여 추가 정제없이 사용하였으며, 모든 실험을 위해 2차 증류수를 사용하였다. 서열번호 1의 염기서열을 가지는 PNA 1의 일 말단에 폴리스티렌 수지와 결합을 위해 시스테인을 결합시킨 Cys-PNA 1의 형태로 제작하였다. 아미노폴리스티렌은 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였으며, 우라닐 이온 공급원으로는 Merck로부터 우라닐 아세테이트 디하이드레이트($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99.0%)를 구입하여 사용하였다. 가교결합제로는 설포석신이미딜

4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트(sulfosuccinimidyl

4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate; sulfo-SMCC, Sigma)를

사용하였다. PNA의 농도는 에질런트(Agilent) 8453 UV/VIS 분광광도계를

이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였고, 우라늄의 농도는 Perkin

Elmer ELAN6100 모델을 이용한 ICP-MS(inductively coupled plasma-mass

spectroscopy)로 측정하였다.

[64]

Cys-PNA 1을 이용하여 효과적인 고정된 우라노필(uranophile)을 구축하기 위하여, PNA 앵타머를 고품 지지체에 도입하여, 도 2에 나타낸 바와 같이 PNA 앵타머-MCC-PS를 제조하였다. 구체적으로, 고품 지지체로 사용된 아미노폴리스티렌(aminoPS) 수지 즉,

폴리스티렌-코-비닐벤질아민-코-다이비닐벤젠(polystyrene-co-vinylbenzylamine-co-divinylbenzene, 메쉬: 100 내지 200, 1.0 mmol N/그램 수지, Sigma)를

가교결합제인 sulfo-SMCC로 표면을 개질시켜 제조하였다. 상기 표면 개질을 위하여 아미노PS에 첨가된 sulfo-SMCC의 양은 과량으로 반응하도록 노출되는 아미노기의 5 mol%로 하였다(Zhang *et al.*, *Org. Lett.*, 2001, 3: 275-278; Derfus *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 2007, 18: 1391-1396). 수지와 연결된 Cys-PNA 1의 양은 약 2 nmol/g 수지로 측정되었다. 즉, 0.2 mol%의 아미노기가 Cys-PNA 1과 공유결합을 형성하였다.

[65]

[66] **실시예 2: 우라닐 이온 결합 실험**

[67]

[68] PNA 앵타머-MCC-PS에 결합될 수 있는 우라닐 이온의 양은 고정량의 앵타머-MCC-PS에서 측정하였다(도 3). 약 20 mg의 표면을 개질하고 PNA 앵타머를 공유결합시킨 아미노폴리스티렌 수지를 1 ml의 우라닐 아세테이트 용액, NaHCO₃(21 mM) 및 HEPES(0.1 M; pH 8.01)에 현탁시켰다. 혼합물을 2일 동안 25°C에서 50 xg로 진탕시켰다. 상기 우라닐 용액과 반응시킨 PNA 앵타머-MCC-PS를 여과하여 수집하고 3시간에 걸쳐 버퍼용액(0.55 M NaCl, HEPES 0.01 M, pH 8.01) 1 ml로 3회 세척하여 단순 흡착에 의해 수지에 결합된 UO₂(CO₃)₃⁴⁻를 제거하였다. ICP-MS에 의해 확인한 결과, 상기 NaCl 용액으로 3회에 걸쳐 세척하는 과정을 통해 흡착으로 느슨하게 결합된 우라늄 화학종은 충분히 제거되었다. 상기 세척한 PNA 앵타머-MCC-PS를 2 ml의 증류수로 3회 추가 세척하였다. 마지막으로 1 N 농도의 HCl 수용액 2 ml로 세척하여 PNA 앵타머에 특이적으로 결합된 우라닐 이온을 회수하고 ICP-MS로 정량하였다.

[69] 그 결과, 1 g의 수지에 약 0.1 마이크로그램의 우라늄이 착물화되었음을 확인하였다. 이는 상기 표면을 개질한 수지에 도입된 모든 PNA 앵타머가 우라닐 이온과 강하게 결합하였음을 의미한다.

[70] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 우라닐 이온에 대한 표면을 개질한 아미노PS 수지와 연결시킨 PNA-기반 앵타머의 겉보기 해리 상수(K_{dapp})는 pH 8.01의 21 mM 바이카보네이트(bicarbonate) 이온 존재하에서 약 0.5 nM이었으며, 이는 DNA 앵타머-MCC-PS를 이용하였을 때 보다 약 5배 더 높은 값이다. DNA 앵타머가 자연상태에서 충분히 안정하지 못함을 고려할 때, 본 발명의 고형 지지체에 연결시킨 PNA-기반 앵타머는 매우 효과적인 고정된 우라노필로 사용될 수 있으며, 높은 log K_f 값 및 해수 환경에서의 안정성으로 우라늄 추출을 위해 요구되는 경제적 기준을 충족시킬 수 있음을 제시한다.

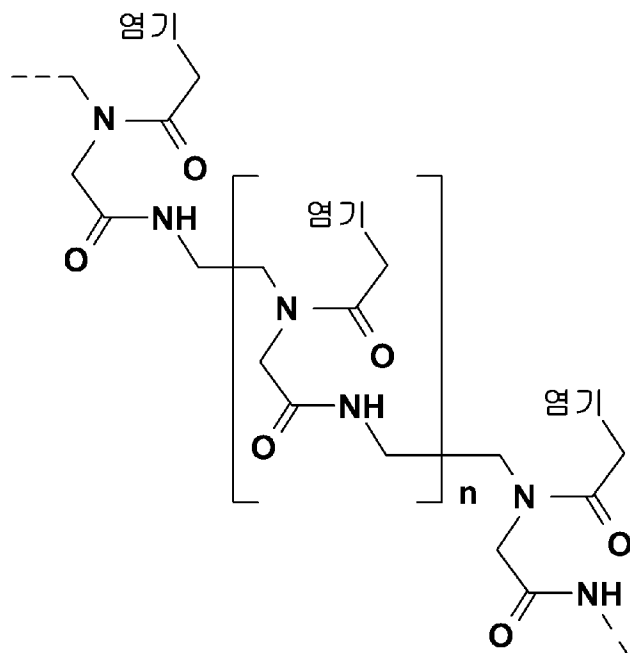
[71]

청구범위

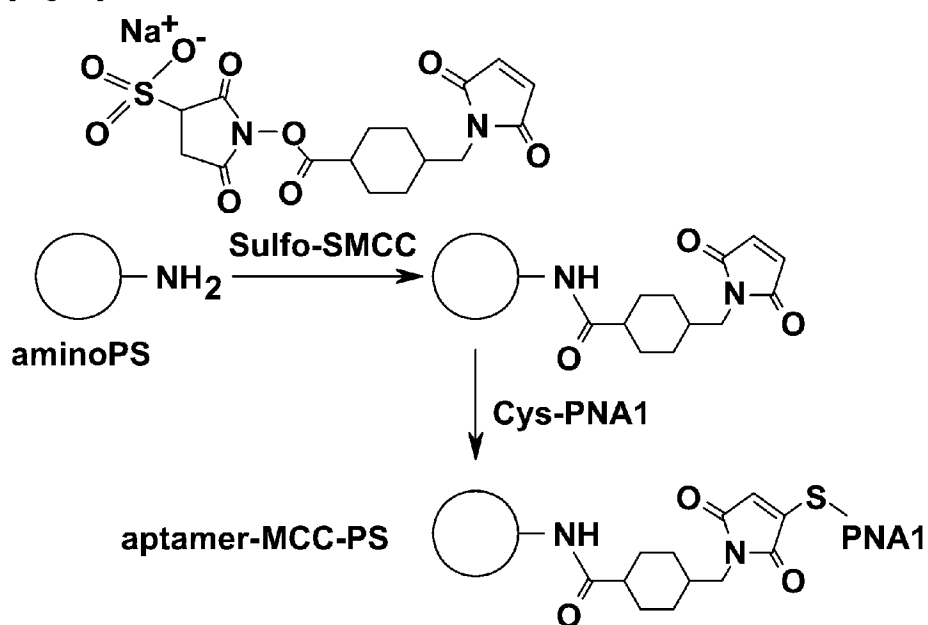
- [청구항 1] 염기의 상보적 결합에 의해 특이적인 3차원 구조를 가지는 단일가닥 PNA 앵타머.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 단일가닥 PNA는 금속에 특이적으로 결합하는 것인 PNA 앵타머.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 금속은 우라늄인 것인 PNA 앵타머.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 우라늄은 우라닐 이온의 형태인 것인 PNA 앵타머.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
서열번호 1의 염기서열을 갖는 것인 PNA 앵타머.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 PNA 앵타머는 고형 지지체에 연결된 것인 PNA 앵타머.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 고형 지지체는 아미노폴리스티렌 수지인 것인 PNA 앵타머.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 아미노폴리스티렌 수지는
4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트-아미노폴리스티렌 수지인 것인 PNA 앵타머.
- [청구항 9] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된, 염기의 상보적 결합에 의해 특이적인 3차원 구조를 가지는 단일가닥 PNA 앵타머의 제조 방법으로서,
염기의 상보적 결합이 두 개 이상 형성될 수 있도록 PNA 앵타머의 염기서열을 설계하는 제1단계; 및
상기 제1단계에 따라 설계된 PNA 앵타머를 합성하는 제2단계를 포함하는 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 제1단계는 DNA 앵타머의 염기서열과 동일하게 또는 상보적으로 PNA 앵타머의 염기서열을 설계하는 것이 특징인 방법.
- [청구항 11] 표적 금속을 함유하는 시료와 표적 금속에 특이적인 PNA 앵타머를 접촉시키는 단계; 표적 금속-PNA 앵타머 착물을 시료로부터 분리하는 단계; 및 표적 금속을 회수하는 단계를 포함하는, 표적 금속 분리 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 PNA 앵타머는 고형 지지체에 연결된 것인 방법.

- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 고형 지지체는 아미노폴리스티렌 수지인 것인 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 아미노폴리스티렌 수지는
4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트-아미노폴리스티렌 수지인 것인 방법.
- [청구항 15] 제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 표적 금속은 우라늄인 것인 방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 표적 금속이 우라늄인 PNA 앵타머는 서열번호 1의
염기서열을 갖는 것인 방법.
- [청구항 17] 제11항에 있어서,
상기 표적 금속-PNA 앵타머 착물을 분리하는 단계는 여과하여
수행되는 것인 방법.
- [청구항 18] 제11항에 있어서,
상기 표적 금속을 회수하는 단계는 산용액을 이용하여 세척하는
방법으로 수행되는 것인 방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 산용액은 염산 수용액인 것인 방법.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

