(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0002387
(43) 공개일자 2024년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/533 (2006.01) *G01N 33/52* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/533 (2013.01)
G01N 33/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0079520
(22) 출원일자 2022년06월29일
심사청구일자 2022년06월29일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
윤미용
서울특별시 성북구 화랑로 214, 109동 203호(석관동, 래미안석관)
장대혁
서울특별시 성동구 무학봉12길 2(하왕십리동)
이선영
서울특별시 도봉구 도봉로136길 19, 201동 401호(창동)
(74) 대리인
특허법인리채

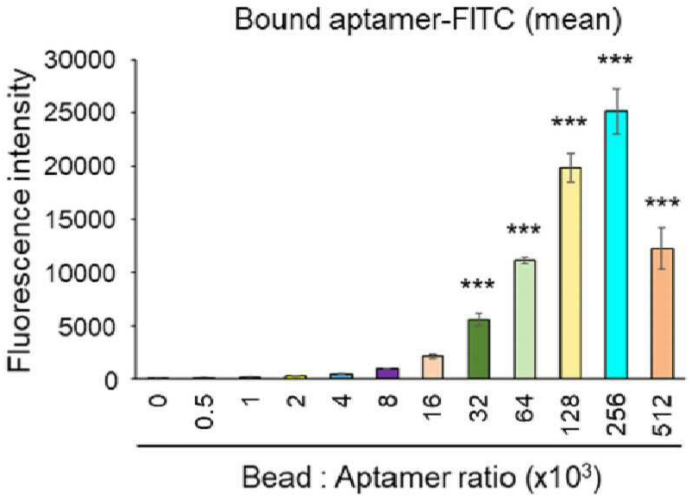
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **앱타머-비드 복합체 결합 비율 결정 방법**

(57) 요 약

본 발명은 앱타머-비드 복합체의 결합 비율을 효율적으로 결정하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 서로 다른 혼합 비율로 포함된 앱타머 및 비드 조성물의 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 분석함으로써 최적의 앱타머-비드 혼합비를 선택할 수 있다.

대 표 도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415174360
과제번호	20203210100390
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국에너지기술평가원
연구사업명	원전해체방폐물안전관리기술개발(R&D)
연구과제명	원전 해체발생 방사성폐액 처리 성능 향상을 위한 친환경 바이오 소재 공정 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2021.04.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 서로 다른 혼합비로 포함하는 복수개의 각 조성물에서 얻어진 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 확인하여, 가장 높은 형광 강도를 나타내는 조성물의 앱타머-비드 혼합비를 선택하는 단계를 포함하는 앱타머-비드 복합체 결합 비율 결정 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 서로 다른 혼합비로 포함하는 복수개의 각 조성물을 유세포 분석하여 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 얻는 단계를 더 포함하는 앱타머-비드 복합체 결합 비율 결정 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 형광 표지는 FAM(5-carboxy fluorescein), 로다민, 알렉사, 플로로세인, FITC(fluorescein isothiocyanate), 텍사스 레드 및 시아닌으로 이루어진 군에서 선택된 것인 앱타머-비드 복합체 결합 비율 방법.

청구항 4

형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 서로 다른 혼합비로 포함하는 복수개의 각 조성물에서 얻어진 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 확인하여, 가장 높은 형광 강도를 나타내는 조성물의 앱타머-비드 혼합비를 선택하는 단계; 및

상기 선택된 혼합비로 앱타머와 비드를 혼합하는 단계;를 포함하는 앱타머-비드 복합체의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 앱타머-비드 복합체의 결합 비율 결정 방법에 관한 것으로, 앱타머-비드 복합체가 대상 물질의 검출 분리 목적으로 사용되는 식품, 의약품 분야 등에서 활용될 수 있다.

배 경 기 술

[0003] 앱타머는 치료와 바이오 이미징, 진단 목적으로 폭넓게 활용되는 물질이다. 앱타머는 단백질인 항체보다 열적, 화학적 안정성이 뛰어날 뿐만 아니라 재사용 과정이 매우 간단하고 앱타머의 손상이 일어나지 않아 진단 분야 응용에 있어 매우 뛰어난 성질을 가진다. 또한, 앱타머는 민감한 진단을 위한 형광 표지등의 수정이 항체보다 매우 쉬우며 신호 증폭에 가장 유용한 PCR에 적용 가능하다는 점 때문에 초고감도 진단에 있어 유리한 고지를 점하고 있다.

[0004] 한편 대부분의 앱타머는 고정상에 연결하여 활용되는데 그중 비드(bead)는 사용이 간편하여 가장 많이 활용되는 고정상이다. 이에 많은 분야에서 앱타머-비드 복합체를 사용하고 있지만, 이를 제조하기 위해 사용되는 앱타머와 비드의 비율을 결정하기 위한 방법에 대해서는 명확한 기준이 없는 실정이다.

[0005] 이에 본 발명자들은 유세포 분석 기술을 활용하여 앱타머-비드 복합체의 결합 비율을 효율적으로 구할 수 있는

방법을 제공하고자 한다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) P. PORSCHEWSKI, MIRA A, M. GRATTINGER, K. KLENZKE, A. ERPENBACH, MICHAEL R. BLIND, F. SCHAFER. 2006. Using Aptamers as Capture Reagents in Bead-Based Assay Systems for Diagnostics and Hit Identification. Journal of Biomolecular Screening 11(7).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 정확하고 효율적인 앱타머-비드 복합체 결합 비율 결정 방법을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 목적은 앱타머-비드 복합체 결합 비율 결정 방법을 이용하여 효율적인 앱타머-비드 복합체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 1. 형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 서로 다른 혼합비로 포함하는 복수개의 각 조성물에서 얻어진 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 확인하여, 가장 높은 형광 강도를 나타내는 조성물의 앱타머-비드 혼합비를 선택하는 단계를 포함하는 앱타머-비드 복합체 결합 비율 결정 방법.

[0011] 2. 위 1에 있어서, 형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 서로 다른 혼합비로 포함하는 복수개의 각 조성물을 유세포 분석하여 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 얻는 단계를 더 포함하는 앱타머-비드 복합체 결합 비율 결정 방법.

[0012] 3. 위 1에 있어서, 상기 형광 표지는 FAM(5-carboxy fluorescein), 로다민, 알렉사, 플로로세인, FITC(fluorescein isothiocyanate), 텍사스 레드 및 시아닌으로 이루어진 군에서 선택된 것인 앱타머-비드 복합체 결합 비율 방법.

[0013] 4. 형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 서로 다른 혼합비로 포함하는 복수개의 각 조성물에서 얻어진 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 확인하여, 가장 높은 형광 강도를 나타내는 조성물의 앱타머-비드 혼합비를 선택하는 단계; 및 상기 선택된 혼합비로 앱타머와 비드를 혼합하는 단계;를 포함하는 앱타머-비드 복합체의 제조 방법.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 방법을 이용하여 앱타머-비드 복합체의 최적 결합 비율을 정확하고 효율적으로 구할 수 있다.

[0016] 본 발명의 방법을 이용하여 앱타머-비드 복합체 제조를 위한 앱타머 및 비드 비율을 효율적으로 결정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 FACS가 앱타머 부착 비드만을 인식함을 나타낸 것이다.

도 2는 5'-NH_2 및 3'-FAM 표지된 앱타머를 도식화한 것이다.

도 3은 EDC/NHS coupling 방식으로 결합된 혼합비율별 앱타머-비드 복합체를 도식화한 것이다.

도 4는 FACS를 이용하여 앱타머-비드 혼합비율별로 형광강도를 측정하는 방법을 나타낸 것이다.

도 5는 앱타머-비드 혼합비율별로 형광 강도를 측정한 FACS 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 앱타머-비드 혼합비율별로 형광 강도를 측정한 FACS 분석 결과의 평균값을 나타낸 그래프이다.

도 7은 실시예의 FACS 결합 비율을 실제 Co^{2+} 에 적용하여 앱타머 활성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 앱타머-비드 복합체의 결합 비율을 결정하는 방법에 관한 것이다. 상기 결합 비율은 상기 앱타머와 비드가 상호간에 최대로 결합 가능한 비율일 수 있고, 또는 본 방법을 적용하는 데 있어 가능한 후보들 중에서 선택된 최적 결합 비율일 수 있다.

[0022] 구체적으로 본 발명은 형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 서로 다른 혼합비로 포함하는 복수개의 각 조성물에서 얻어진 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 확인하여, 가장 높은 형광 강도를 나타내는 조성물의 앱타머-비드 혼합비를 선택하는 단계를 포함하는 앱타머-비드 복합체 결합 비율 결정 방법에 관한 것이다.

[0023] 상기 앱타머는 특정 표적분자에 결합하는 용도의 물질을 통칭하고, 핵산이나 펩타이드로 이루어진 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 상기 형광 표지는 사용하려는 앱타머에 결합 및 검출 가능한 것이면 특별히 제한되지 아니하며, 예를 들면 FAM(5-carboxy fluorescein), 로다민, 알렉사, 플로로세인, FITC(fluorescein isothiocyanate), 텍사스 레드 및 시아닌으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 상기 비드는 상기 앱타머를 고정 가능한 것이면 그 소재, 형태, 크기, 또는 상기 결합의 종류 등이 특별히 제한되지 아니한다.

[0026] 예를 들면 상기 앱타머 및 비드는 서로 결합이 가능하도록 통상의 기술자에 의해 적절히 변형된 것일 수 있고, 구체적으로 앱타머의 한쪽 말단을 아미노 변형하여 카복실기가 코팅된 비드에 결합하거나, 앱타머의 한쪽 말단을 바이오틴으로 변형하여 스트렙트아비딘이 코팅된 비드에 결합시킬 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 포함하는 조성물에서 상기 비드의 표면에 상기 앱타머가 결합 가능한 만큼 결합된다.

[0028] 비드에 결합 가능한 앱타머의 수는 앱타머의 부피, 비드의 표면적 등에 따라 달라질 수 있는 것으로, 조성물에서 앱타머의 수가 비드에 결합 가능한 개수 보다 적다면, 비드에 빈 공간이 남을 것이고, 앱타머의 수가 상기 개수보다 더 많다면 비드에 결합된 앱타머가 포화되어 여분의 앱타머가 조성물에 남게 될 수 있고, 여분의 앱타머로 인해 비드와 앱타머 간의 결합이 방해되어 더 적은 수의 앱타머가 비드에 결합하게 될 수 있다.

[0029] 본 발명의 방법은 형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 서로 다른 혼합비로 포함하는 복수개의 각 조성물에서 얻어진 형광 강도를 확인한다.

[0030] 상기 복수개의 각 조성물에서 형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드는 서로 다른 혼합비로 포함되어, 앱타머-비드 복합체에 결합된 앱타머의 수가 다를 수 있고, 이에 형광 강도가 다를 수 있다.

[0031] 상기 조성물들이 포함하는 앱타머 및 비드의 혼합비 범위는 본 발명이 속한 분야의 통상의 기술자에 의해 적절한 범위로 형성될 수 있다.

[0032] 상기 조성물의 혼합비의 범위는 예를 들면 앱타머 비율이 비드의 1배, 10배, 10^2배, 10^3배, 10^4배 이상일 수 있다.

[0033] 사용된 비드의 직경, 표면적에 비례하여 조성물의 앱타머 비율을 높게 형성하는 것이 바람직하다. 예를 들면 하기 표 1에서와 같이 통상의 기술자는 기존에 본 발명이 속한 분야에서 사용되는 앱타머-비드 비율을 기준으로 조성물의 범위를 형성할 수 있다. 사용하고자 하는 비드와 유사한 직경, 표면적을 사용한 사례를 참고하는 것이 바람직하다.

[0034] 상기 기준 혼합비율에서 조성물이 더 낮은 앱타머 비율, 더 높은 앱타머 비율을 포함하도록 혼합비 범위를 형성

할 수 있다. 예를 들면 기준 비율에 대하여 앱타머가 $1/2^{10}$ 내지 2^{10}배, 예를 들면 2^{10}, 2^{9}, 2^{8}, 2^{7}, 2^{6}, 2^{5}, 2^{4}, 2^{3}, 2^{2}, 2, 1/2, $1/2^{2}$, $1/2^{3}$, $1/2^{4}$, $1/2^{5}$, $1/2^{6}$, $1/2^{7}$, $1/2^{8}$, $1/2^{9}$, $1/2^{10}$, $1/2^{11}$, $1/2^{12}$, $1/2^{13}$, $1/2^{14}$ 및 $1/2^{15}$ 배 비율로 포함된 혼합비를 사용할 수 있다.

표 1

	논문 1	논문 2	논문 3
Bead	0.5μm (2.5wt 200μL): 5μL	1.3μm (2.5wt 125μL): 3μL	1.25μm (5wt 10μL): 0.5μL
Aptamer	100μM 30μL → 3nmol	100μM 10μL → 1nmol	100μM 2μL → 0.2nmol
부피 (bead number)	(5/1)=5	(3/17.576)=0.171	(0.5/15.625)=0.032
표면적	1	6.76	6.25
Bead : Aptamer	5 : 3nmol	1.156 : 1nmol	0.2 : 0.2nmol

- 논문 1: Aptamer 1-step conjugation protocol
- 논문 2: Using Aptamers as Capture Reagents in Bead-Based Assay Systems for Diagnostics and Hit Identification
- 논문 3: Development of an aptamer-based affinity purification method for vascular endothelial growth factor

[0035]

[0037] 각 조성물마다 사용된 앱타머와 비드는 동일한 것일 수 있다.

[0038] 상기 형광 강도는 상기 조성물에서 형성된 앱타머-비드 복합체에서 발생하고, 따라서 비드마다 결합된 앱타머 양에 비례하여 형광 강도가 증가할 수 있다. 상기 확인된 형광 강도가 가장 높은 가능한 후보들에서 또는 실제로 앱타머가 비드에 최대 비율로 결합한 경우를 의미한다.

[0039] 상기 형광 강도는 각 조성물의 복수개의 형광 강도의 분포로부터 얻어지는 평균값, 중앙값, 최빈값, 대푯값 등을 의미할 수 있다.

[0040] 상기 가장 높은 형광 강도는 사용된 조성물 중에서 앱타머가 비드에 최대 비율로 결합된 경우를 의미한다.

[0041] 상기 가장 높은 형광 강도를 나타낸 앱타머-비드 복합체가 포함된 조성물의 혼합비를 선택함으로써 앱타머와 비드의 최적 혼합비를 결정할 수 있다.

[0042] 예를 들어, 실험에서 사용한 조성물 중, 하나의 조성물에서 다른 조성물 대비 가장 높은 형광 강도가 얻어진다면, 그 특정 조성물에서의 앱타머와 비드의 혼합비를 앱타머와 비드의 최적 혼합비로 결정할 수 있다.

[0043] 본 발명의 방법은 형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 서로 다른 혼합비로 포함하는 복수개의 각 조성물을 유세포 분석하여 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 얻는 단계를 포함할 수 있다.

[0044] 상기 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 확인하는 방법은 통상의 기술자에게 공지된 방법이 제한 없이 적용 가능하다. 예를 들면 상기 조성물에서 각 앱타머-비드 복합체에 대해 용이하게 검사가 가능한 유세포 분석(flow cytometry)이 사용될 수 있다.

[0045] 유세포 분석은 레이저를 기반으로 유동적으로 흐르는 앱타머-비드 복합체의 형광성을 선별하거나 계수할 수 있다. 상기 유세포 분석에는 당업자가 사용 가능한 통상의 방법이나 유세포분석기, FACS(Fluorescence activated cell sorting) 기계 등이 제한 없이 사용될 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명은 형광 표지된 앱타머 및 상기 앱타머와 결합 가능한 비드를 서로 다른 혼합비로 포함하는 복수개의 각 조성물에서 얻어진 앱타머-비드 복합체의 형광 강도를 확인하여, 가장 높은 형광 강도를 나타내는 조성물의 앱타머-비드 혼합비를 선택하는 단계; 및 상기 선택된 혼합비로 앱타머와 비드를 혼합하는 단계;를 포함하는 앱타머-비드 복합체의 제조 방법에 관한 것이다.

[0048] 상기 앱타머-비드 혼합비를 선택하는 단계에 대한 상세한 설명은 전술한 바와 같다.

[0049] 상기 선택된 혼합비로 앱타머 및 비드를 혼합함으로써, 앱타머 및 비드를 낭비하지 않고 최적의 혼합비를 사용하여 앱타머-비드 복합체를 경제적으로 제조하는 것이 가능하다. 상기 방법은 특히 앱타머-비드 복합체를 대량 생산하는 경우에 효과적이다.

[0051] **실시예**

[0052] **1. 앱타머 및 비드 혼합비율별 유세포 분석**

[0053] 먼저 FACS(flow-cytometry analysis)를 이용한 앱타머-비드 복합체 측정이 가능함을 확인하였다. 하기 표 2의 세 종류의 비드를 사용한 실험 결과, FACS에서 비드만 넣었을 경우는 인식하지 않고, 앱타머-비드 복합체만을 인식하였다(도 1). 사용된 앱타머는 5' -아미노 변형되었으며, 3' -FAM으로 표지되었다(도 2).

표 2

[0054]

	Bead 1	Bead 2	Bead 3
직경	0.5μm	0.9μm	1.4μm
표면 코팅	carboxyl	carboxyl	streptavidin
결합 앱타머	NH_2-aptamer	NH_2-aptamer	Biotin-aptamer
비드 재질	Latex	Polystyrene	Polystyrene

[0056] 하기 표 3의 standard 그룹을 기준으로 다양한 앱타머-비드 혼합비율에서 앱타머-비드 복합체를 제조하였다. 앱타머는 카복실기가 코팅된 비드에 EDC/NHS coupling 방식으로 결합되었다(도 3).

표 3

[0057]

Bead	Diameter	Group	Bead number	Aptamer number
Sigma CLB9	0.9μm	4	$1.25x10^{10}$	4 x ($1.8x10^{15}$)
		2	$1.25x10^{10}$	2 x ($1.8x10^{15}$)
		standard	$1.25x10^{10}$	$1.8x10^{15}$
		1/2	$1.25x10^{10}$	1/2 x ($1.8x10^{15}$)
		1/4	$1.25x10^{10}$	1/4 x ($1.8x10^{15}$)
		1/8	$1.25x10^{10}$	1/8 x ($1.8x10^{15}$)
		1/16	$1.25x10^{10}$	1/16 x ($1.8x10^{15}$)
		1/32	$1.25x10^{10}$	1/32 x ($1.8x10^{15}$)
		1/64	$1.25x10^{10}$	1/64 x ($1.8x10^{15}$)
		1/128	$1.25x10^{10}$	1/128 x ($1.8x10^{15}$)
		1/256	$1.25x10^{10}$	1/256 x ($1.8x10^{15}$)

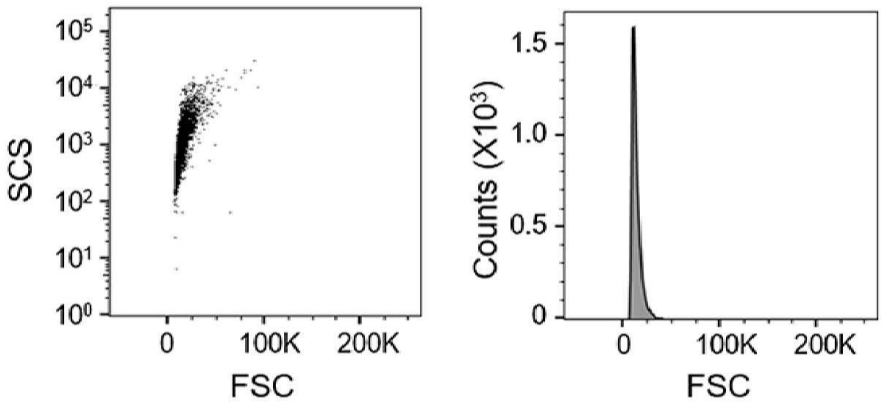
[0059] 상기 혼합비율별 앱타머-비드 복합체의 FACS 분석 결과를 도 5에 나타내었다. 도 6은 도 5의 측정값을 평균값으로 나타낸 그래프로, 형광 강도가 높을수록 비드에 더 많은 앱타머가 부착되었음을 의미한다. 앱타머를 비드의 256 $x10^3$배로 사용했을 경우 형광 강도가 가장 높고, 앱타머를 512 $x10^3$배로 증가시킨 경우의 형광 강도는 오히려 감소하였으며, 이는 비드에 대해 앱타머의 양을 무조건적으로 증가시키는 것이 특정 비율 이상에서는 오히려 비드-앱타머의 결합이 방해되어 비효율적일 수 있음을 의미한다. 즉 상기 방법을 통해 형광 강도가 가장 높은 경우를 선택함으로써 앱타머-비드 복합체를 효율적으로 형성하기 위한 최적의 앱타머-비드 비율을 얻을 수 있다.

[0061] **2. 앱타머 활성 분석**

[0062] 실시예 1을 통해 얻어진 FACS 실험 결합 비율을 실제 Co2+ 앱타머에 적용하여 앱타머 활성을 측정함으로써 상기 결과를 검증하였다. 실험 결과, 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이 실험으로 결정된 최적 비율에서 앱타머의 제거율이 가장 높음을 확인하였다.

도면

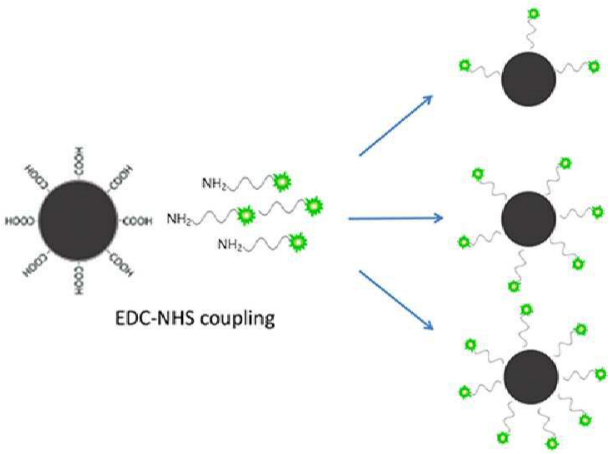
도면1



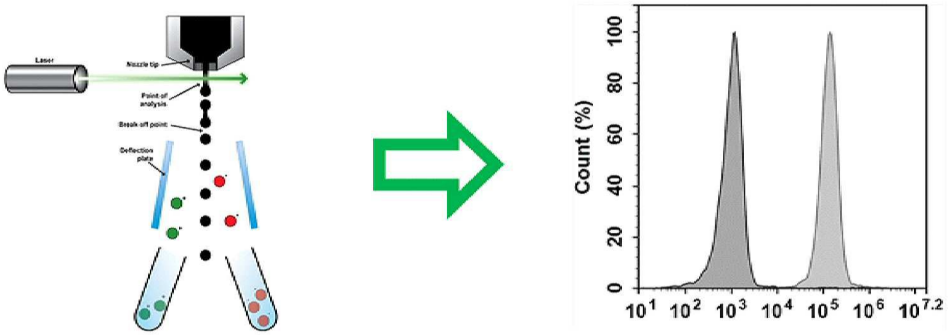
도면2



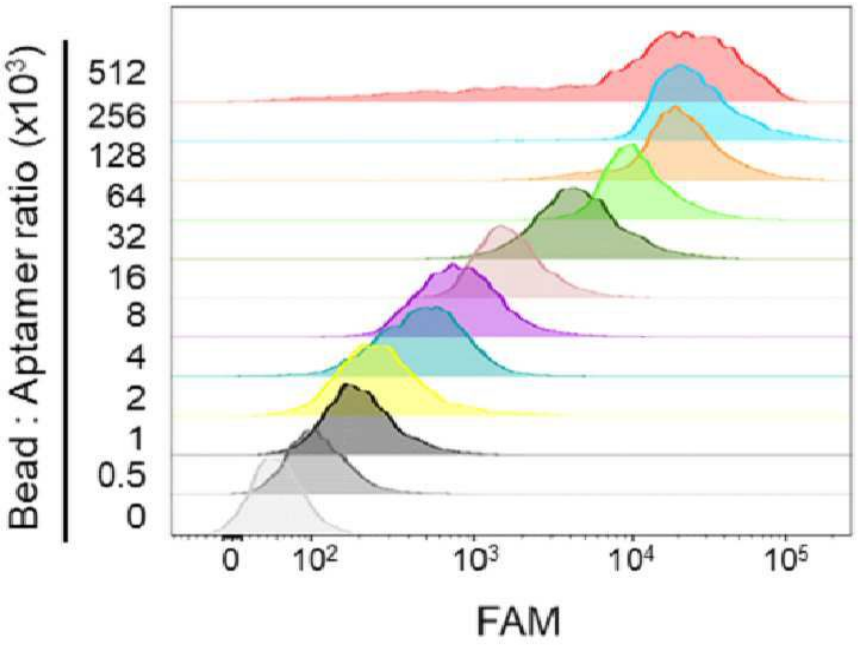
도면3



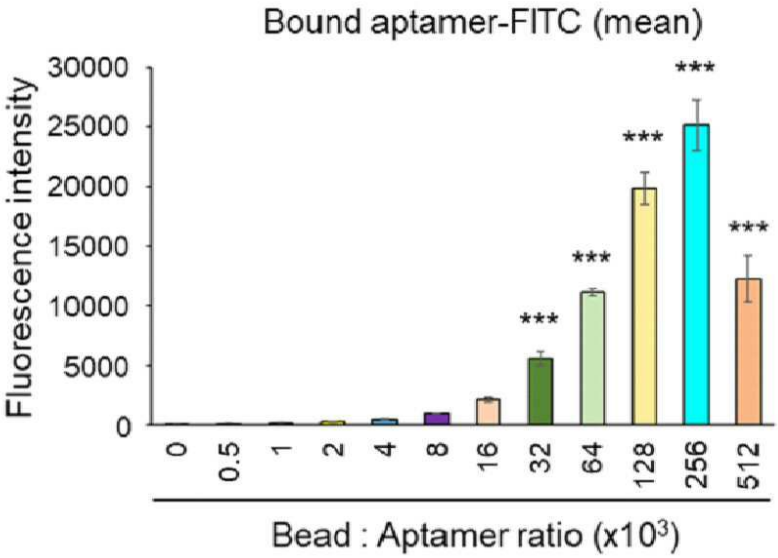
도면4


Laser
Nozzle tip
Point of analysis
Break off point
Deflection plate
Count (%)
0
20
40
60
80
100
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 $10^{7.2}$

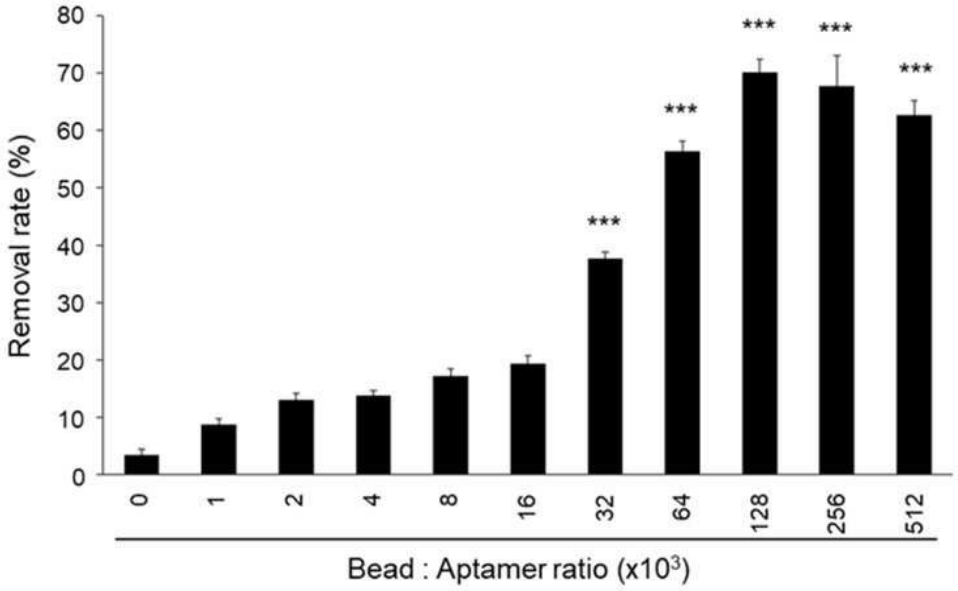
도면5


Bead : Aptamer ratio (x10^3)
512
256
128
64
32
16
8
4
2
1
0.5
0
0
10^2
10^3
10^4
10^5
FAM

도면6


Bound aptamer-FITC (mean)
Fluorescence intensity
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
***
0
0.5
1
2
4
8
16
32
64
128
256
512
Bead : Aptamer ratio (x10³)

도면7


Removal rate (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
***
0
1
2
4
8
16
32
64
128
256
512
Bead : Aptamer ratio (x10³)