

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0006145 (43) 공개일자 2013년01월16일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/115 (2010.01) C12Q 1/68 (2006.01) B82B 1/00 (2006.01) B82Y 15/00 (2011.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1	
(21) 출원번호 10-2011-0068015	(72) 발명자 구만복 서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동) 김지훈 서울특별시 성북구 북악산로27길 28, 105호 (종암동) 황이택 서울특별시 성북구 안암로9나길 14, 대광아파트 7동 757호 (안암동3가)	
(22) 출원일자 2011년07월08일 심사청구일자 2011년07월08일	(74) 대리인 이처영	

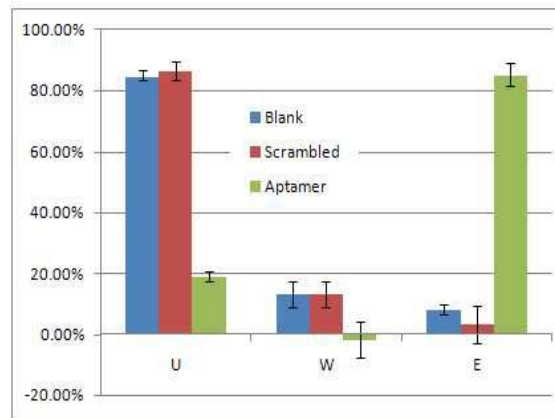
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **애타머가 고정화된 나노섬유 복합체 및 이를 이용한 단백질 분리/정제의 용도**

(57) 요약

본 발명은 애타머가 고정화된 나노섬유 복합체 및 이를 이용한 단백질 분리/정제의 용도에 관한 것으로 더욱 상세하게는 애타머가 고정화된 폴리스틸렌-폴리(스틸렌-코-말레익 언하이드라이드)나노섬유 복합체와 이를 이용한 단백질 분리/정제 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

애타머가 폴리스틸렌(PS)-폴리(스틸렌-코-말레익 언하이드라이드)에 고정화된 애타머-나노섬유 복합체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 애타머는 두 종류의 애타머인 것을 특징으로 하는 애타머-나노섬유 복합체.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 두 종의 애타머는 서열번호 1 및 2에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 애타머-나노섬유 복합체.

청구항 4

샘플로부터 하나 이상의 단백질을 정제하거나 분리하기 위한 방법으로서, 상기 단백질을 정제 또는 분리하기에 충분한 시간 동안, 상기 샘플을 제 1항 내지 제2항 중 어느 한 항의 애타머-나노섬유 복합체와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 5

제 1항 내지 제2항 중 어느 한 항의 애타머-나노섬유 복합체를 포함하는 단백질 정제용 키트.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 단백질은 트롬빈인 것을 특징으로 하는 단백질 정제용 키트.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 애타머는 서열번호 1 및 2에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 단백질 정제용 키트.

청구항 8

스트랩타비딘을 코팅한 폴리스틸렌(PS)-폴리(스틸렌-코-말레익 언하이드라이드) 나노섬유에 바이오틴화된 애타머를 고정화하는 단계를 포함하는 제1항 또는 제2항의 애타머-나노섬유 복합체의 제조방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 애타머는 두 종류의 애타머인 것을 특징으로 하는 애타머-나노섬유 복합체의 제조방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 두 종의 애타머는 서열번호 1 및 2에 기재된 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 애타머-나노섬유 복합체의 제조방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 애타머가 고정화된 나노섬유 복합체 및 이를 이용한 단백질 분리/정제의 용도에 관한 것으로 더욱 상세하게는 애타머가 고정화된 폴리스틸렌-폴리(스틸렌-코-말레익 언하이드라이드)나노섬유 복합체와 이를 이용한 단백질 분리/정제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 전자방사로 제조된(electrospun) 기능성 나노섬유는 화학 센서, 효소 고정화, 조직 공학, 약물 전달

막 필터 및 섬유 분야 등에서 다양하게 적용되어 왔다. (H. S. Yoo, T. G. Kim and T. G. Park, Adv. Drug Deliv. Rev., 61 (2009) 1033-1042; J. Yoon, S. K. Chae and J.-M. Kim, J. Am. Chem. Soc., 129 (2007) 3038-3039; A. Greiner and J. Wendorff, Angew. Chem.-Int. Edit., 46 (2007) 5670-5703; J. Y. Lee, C. A. Bashur, A. S. Goldstein and C. E. Schmidt, Biomaterials, 30 (2009) 4325-4335; A. Campos, F. D. Benedetto, R. Stabile, A. A. R. Neves, R. Cingolani and D. Pisignano, Small, 5 (2009), 562-566; G. Ren, X. Xu, Q. Liu, J. Cheng, X. Yuan, L. Wu and Y. Wan, React. Funct. Polym., 66 (2006), 1559-1564; L. Wannatong and A. Sirivat, React. Funct. Polym., 68 (2008), 1646-1651; A. Senecal, J. Magnone, P. Marek and K. Senecal, React. Funct. Polym., 68 (2008), 1492-1434).

[0003] 이러한 기능성 나노섬유는 나노 범위의 크기로 이루어져 매우 높은 표면 면적을 제공하며 언하이드라이드 그룹을 가진 까닭에 앵타머와 같은 리간드가 쉽게 높은 비율로 고정화 될 수 있어 앵타머를 이용한 다양한 응용에 이용될 수 있다.

[0004] 단백질 분리/정제에 이용되는 친화성 컬럼의 리간드로써 항체가 주로 이용되어 왔다. (L. Hsiung, A. N. Barclay, N. R. Brandon, Biochem. J. 1982, 203, 293-298; R. Scott Hansen & J. A. Beavo, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1982, 79, 2788-2792; Lars S. Nielsen, Jan G. Hansen, Lars Skriver, Elaine L. Wilson, Keld Kaltoft, Jesper Zeuthen, and Keld Dana, Biochemistry, 1982, 21, 6410-6415). 하지만 항체의 경우 생산단가가 높으며 화학적으로 불안정한 특성 때문에 고정화과정 중 혹은 재사용시 표적에 대한 친화력이 감소할 때가 많으며, 큰 분자량 때문에 단위 면적당 고정화할 수 있는 양이 제한적이다.

[0005] 한편 앵타머는 셀렉트라 불리우는 일련의 선택과정을 통해 얻어진 올리고뉴클레오타이드로 특정 표적 물질에 친화력을 가진다. 그들은 의약품, 치료, 진단, 바이오센서 적용될 수 있으며(Dzau, V. J., Mann, M. J., Morishita, R. & Kande, Y. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1996, **93**, 11421-11425; Brockstedt, U., Uzaro, A., Montpetit, A., Pfau, W. & Labuda, D. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, **313**, 1004-1008; Liu, J. & Lu, Y. Fast. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2006, **45**, 90-94), 단백질의 분리/정제에도 응용되고 있다. (Romig, T. S., Bell, C. & Drolet, D. W. J. Chromat. 1999, **731**, 275-284; A.C. Connor, L.B. McGown, J. Chromatogr. A 2006, 1111, 215; S. Cho, S. Lee, W. Chung, Y. Kim, Y. Lee, B. Kim, Electrophoresis, 2004, 25, 3730; Qiang Zhao, Xing-Fang Li, Yuanhua Shao & X. Chris Le, Anal. Chem. **2008**, 80, 7586-7593)

[0006] 일반적으로 단백질 분리/정제시 앵타머 고정화용 물질로 사용되는 마이크로 비드 혹은 관형태의 컬럼은 생산과정이 복잡하거나 비싸며 또는 앵타머 고정화 과정이 까다롭다. 마이크로 비드형태를 사용할 경우에는 비드 표면에만 앵타머가 고정화되는 까닭에 capacity가 높지 않고 void 부피 또한 커서 효율적이지 못하다.

[0007] 한편 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제10-2007-0066902호는 증폭성 및 내부 관능성이 증진된 수지상 중합체에 관한 것으로 특정한 구조의 화학식의 수지상 중합체에서 (C)는 코어(core)를 뜻하고; (FF)는 코어의 초점 관능기 성분을 뜻하고; x는 독립적으로 0 또는 정수 1 내지 Nc-1이고; (BR)은 분지 셀(branch cell)을 뜻하고, p가 1보다 크면 (BR)은 동일하거나 상이한 잔기일 수 있고; FF의 성분으로 앵타머가 선택될 수 있다고 기재되어 있으며,

[0008] 또 다른 관련 선행특허인 대한민국 특허공개번호 제 10-2008-003618호는 고체 지지체 매트릭스로서 이온성 액체 재구성된 셀룰로오스 복합체에 관한 것으로, 그 선행기술의 주요 내용은 재생 셀룰로오스 매트릭스, 상기 재생 셀룰로오스 매트릭스 내에 실질적으로 균일하게 분산된 1차 활성 물질, 링커, 및 2차 활성 물질을 포함하고, 상기 링커가 1차 및 2차 활성 물질과 결합되어 있는 셀룰로오스/활성 기질 복합체에 관한 것으로, 상기 2차 활성물질의 예로 앵타머가 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 새로운 복합체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 복합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 효율적인 단백질 분리/정제용 복합체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 앵타머가 고정화된 앵타머-나노섬유 복합체를 제공한다.
- [0013] 본 발명에서 기재된 앵타머-나노섬유 복합체는 특정표적에 친화력을 가진 올리고뉴클레오타이드 (앵타머)가 결합된 나노파이버(나노섬유)를 의미한다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 나노섬유는 폴리스틸렌(PS)-폴리(스틸렌-코-말레익 언하이드라이드) 나노섬유인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 앵타머는 두 종류의 앵타머인 것이 바람직하고, 상기 두 종의 앵타머는 서열번호 1 및 2에 기재된 염기서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 또 본 발명은 샘플로부터 하나 이상의 단백질을 정제하거나 분리하기 위한 방법으로서, 상기 단백질을 정제 또는 분리하기에 충분한 시간 동안 상기 샘플을 상기 본 발명의 앵타머-나노섬유 복합체와 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 앵타머-나노섬유 복합체를 포함하는 단백질 정제용 키트를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 키트는 단백질 정제에 필요한 컬럼, 버퍼, 사용 설명서 등을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 단백질은 트롬빈인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 또한 본 발명은 스트렙타비딘을 코팅한 폴리스틸렌(PS)-폴리(스틸렌-코-말레익 언하이드라이드) 나노섬유에 바이오틴화된 앵타머를 고정화하는 단계를 포함하는 상기 본 발명의 앵타머-나노섬유 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 폴리스틸렌(PS)과 폴리(스틸렌-코-말레익 언하이드라이드)를 용기에 혼합하고, 상기 용기에 다이메틸포름아마이드(DMF), 테트라하이드로푸란 또는 트라하이드로푸란과 아세톤의 혼합 용매를 첨가하고, 폴리스틸렌(PS)-폴리(스틸렌-코-말레익 언하이드라이드) 나노섬유 복합체를 제조하고,
- [0022] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 있어서 상기 폴리스틸렌(PS)과 폴리(스틸렌-코-말레익 언하이드라이드)의 혼합비는 전기방사 및 용매를 넣는 양에 대한 조건이 달라질 수 있어서 다양한 조합이 가능하고, 본 발명의 실시예에서는 2:1 중량비인 것을 채택하였으나 이에 한정되지 아니한다.
- [0023] 본 발명에서, Polystyrene (PS) 및 Polystyrene-co-maleic anhydride (PSMA)의 2:1의 비율로 그 섬유 내에 육안 상 비드 형성없이 성공적으로 제조되었고 얻어진 나노섬유를 주사형 전자현미경 (SEM) 특성화하였다.
- [0024] 앵타머-나노섬유 복합체는 나노섬유의 표면상에서 나노섬유의 언하이드라이드 그룹과 아민 그룹간의 공유결합에 의해 제조된다. 본 발명자들은 나노섬유 표면상에 앵타머를 고정화하는 여러 방법 중 단백질 분리/정제에 가장 효율적인 방법을 연구하였으며, 그 결과 바이오틴을 붙인 앵타머를 스트렙타비딘을 코팅한 나노섬유에 고정화한 방식이 가장 높은 효율을 보였다. 또한 한가지 앵타머를 사용하는 것보다 두 가지의 앵타머를 동시에 고정화하여 단백질 분리 정제에 이용한 전략이 더 효율적임을 알수 있었다. 본 발명에서 개발된 앵타머-나노섬유 복합체는 단백질 분리/정제에 성공적으로 적용될 수 있었고, 나노섬유는 기존에 사용되던 마이크로 비드나 관형태의 컬럼에 비해 높은 capacity를 제공해 앵타머 기반 단백질/분리 정제를 위한 매력적인 담체로 보인다.
- [0025] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0026] 앵타머-나노섬유 복합체의 특성
- [0027] 도 5의 a 및 b의 이미지는 $400\text{nm} \pm 100\text{nm}$ 의 두께로 균일하게 합성된 PS-PSMA 나노섬유의 SEM 이미지를 나타낸다. 나노섬유 및 앵타머-나노섬유 복합체의 표면 형태는 유사하고, 나노섬유 상에 공유 결합된 앵타머는 얇은 작은 형태이다.
- [0028] 나노섬유 상 앵타머의 고정화의 정도는 도 5 c 및 d에서 나타내었다. 앵타머-나노섬유 복합체의 CLSM 이미지는 TAMRA 표지된 앵타머를 사용하여 얻었다. 도 5 c 및 d에서 명확하게 나타낸 것과 같이, 앵타머 상 TAMRA로부터 적색 형광이 나노섬유 모두 또는 나노섬유 상에서 관찰되었고, 그것은 앵타머가 나노섬유의 어떤 부분이 아니라 그들의 전 지역에서 고정화되었다는 것을 시사한다. 두 복합체 사이의 이 높은 커플링 효율 및 잘 분포되는 현상은 단순한 알코올 전처리를 통해서 얻었다. 그 고정화된 앵타머는 비분산된 PS-PSMA 나노섬유에서 0.5~0.6

nmole/0.5 mg의 나노섬유인 반면에, 알코올 분산된 PS-PSMA 나노섬유에서는 0.9~1.1nmole/0.5mg의 나노섬유이었다. 이 높은 나노섬유 상의 앵타머 능력은 나노크기의 물질에 기인한 높은 표면적에 기인하고 그 전에 보고된 다른 서포팅 물질인 sepharose, magnetic bead, 비드 패킹된 컬럼이 각각 0.068nmole, 0.077nmole, 0.238nmole의 앵타머/mg의 서포트의 값을 가지는 것(T. S. Romig, C. Bell and D. W. Drolet, *Journal of Chromatography B*, 1999, **731**, 275-284; M. Y. Arica, H. A. Oktem, G. Bayramoglu and V. C. Ozalp, *Biotechnol Progr*, 2007, **23**, 146-154; V. Pichon, B. Madru, F. Chapuis-Hugon and E. Peyrin, *Anal Chem*, 2009, **81**, 7081-7086.)에 비하여 매우 높은 값이다.

[0029] 앵타머-나노섬유 복합체 상에서 트롬빈의 특이적인 정제

[0030] 트롬빈에 대하여 바이오틴화된 앵타머, TBA29 (5' -AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT-3')를 앵타머의 타입(TBA15, TBA29) 및 앵타머와 나노섬유 사이의 커플링 방법의 효과를 조사한 후에 선택하였다(도 6). 나노섬유 상에서 아민-변형된 앵타머를 가지는 바이오틴화된 앵타머의 정제 효율을 비교하여 흥미로운 발견을 하였다. biotin-streptavidin 상호작용을 통하여 나노섬유 상에 고정화된 TBA15로부터 유래한 트롬빈의 회수 수율은 비록 TBA15가 TBA29 ($K_d \sim 0.5\text{nM}$)보다 트롬빈에 대하여 더 낮은 친화도 ($K_d \sim 100\text{nM}$)를 가지지만 amine-maleic anhydride 상호작용을 통하여 나노섬유 상에 고정화된 TBA29에 비하여 더 높았다. 올리고뉴클레오타이드의 내부 염기의 아미노기가 나노섬유 상에서 maleic anhydride 그룹과 어느 정도 상호작용을 하여서 불완전한 3차 구조를 야기하여 트롬빈에 대한 결합 친화도를 감소시키는 것 같다.

[0031] 나노섬유 상에서 트롬빈과 TBA29 사이의 특이적인 상호작용을 보여주기 위하여, 인간 혈청 알부민(HSA), IgG 및 피브리노겐과 같은 혈청에 풍부한 단백질을 트롬빈과 함께 테스트하였다. 도 1에 나타난 것과 같이, HSA, IgG 및 피브리노겐은 바인딩 버퍼로 2회 세척 후에 거의 없었지만 80% 이상의 트롬빈은 앵타머-나노섬유 복합체 상에 강하게 유지되었고 이것은 앵타머-나노섬유 복합체가 단지 트롬빈만을 특이적으로 정제한다는 것을 시사한다. 트롬빈과 streptavidin 코팅된 PS-PSMA 나노섬유 사이에 비특이적인 상호작용의 가능성을 앵타머만 없이 동일한 프로토콜로 제조된 streptavidin 코팅된 PS-PSMA 나노섬유에 대하여 동시에 동일한 실험을 수행하여 평가하였다. 또, 트롬빈 정제에 대한 올리고뉴클레오타이드의 영향을 체크하기 위하여, 비특이적인 올리고뉴클레오타이드를 가지는 나노섬유 복합체를 합성하였다. 대조군 및 앵타머-나노섬유 복합체 사이에 정제 프로파일의 비교 결과를 도 2에서 요약하였다. 10% 이하의 트롬빈이 대조군 나노섬유로부터 유래한 용출 분획에서 회수된 반면에, 85% 이상의 트롬빈이 앵타머-나노섬유 복합체로부터 정제되었다. 이 비교는 앵타머-나노섬유 복합체에 대한 트롬빈의 매우 특이적인 정제를 나타낸다. 최적화된 정제 프로토콜의 반복가능성도 수행하여 도 2에 나타내었다. 앵타머-나노섬유 복합체의 회수 수율의 표준 편차 값은 약 6%인 반면에, 앵타머 없는 나노섬유를 사용한 경우 약 3%이었다.

[0032] 앵타머-나노섬유 복합체 능력의 결정

[0033] 그 복합체의 능력을 동시에 브랭크 서포트와 비교하여 늘어나는 양의 트롬빈을 포함하는 여러 샘플로 조사하였다. 2M의 NaClO_4 로 용출한 후 앵타머-나노섬유 복합체 및 브랭크로부터 유래한 트롬빈의 절대 양을 도 3에서 보고하였다. 브랭크 서포트로부터 얻은 그 결과들은 7% 정도의 완전한 기울기를 나타내고, 그것은 트롬빈에 대한 나노섬유의 비특이적인 결합 특성이 거의 없다는 것을 나타낸다. 반면에 앵타머-나노섬유 복합체에 고정된 트롬빈의 양은 직선 행태로 실질적으로 증가하고 이것은 그것의 양과 무관하게 이 복합체를 통해서 트롬빈을 정제할 수 있다는 것을 시사한다. 투여된 트롬빈이 $20\mu\text{g}$ 이상일 경우, 그 복합체로부터 얻어진 곡선은 평탄형(plateau)에 도달하였다. 앵타머-나노섬유 복합체의 능력은 0.547nmole의 트롬빈, 즉 $1.1\mu\text{moles}$ /나노섬유 그램에 해당하는 $20\mu\text{g}$ 부근으로 결정되었다. 평균 1nmole의 앵타머가 0.5mg의 나노섬유 상에 고정될 수 있어서, 0.55 분자의 트롬빈이 한 앵타머에 의하여 캡쳐되었고 이 포화 지점에서 트롬빈/앵타머 비율은 SPR 기반으로부터 얻은 것 보다 더 높았다.

[0034] 앵타머-나노섬유 복합체의 안정성 및 재사용성(Reusability)

[0035] 트롬빈 정제에 대한 앵타머-나노섬유 복합체의 저장 안정성 및 재사용성을 7개월 동안 조사하였다. 앵타머-나노섬유 복합체를 사용하지 않을 경우에, 그것을 10 mM NaN_3 를 포함하는 TE0.1에서 pH 7.4, 4°C에서 저장하였고 그것을 사용하기 전에 4ml의 결합 버퍼로 충분히 조건화하였다. 나노섬유에 고정화된 앵타머에 의한 트롬빈의 초기 회수 수율은 트롬빈의 상대적인 회수 수율은 초기 수율에 대한 수율의 비율로 정의할 때 100%이었다. 도 4는 앵타머-나노섬유 복합체의 저장 안정성 및 재사용성을 나타낸다. 그 고정화된 앵타머는 7회 재사용 동안 높은 안정한 안정성을 나타내었다; 또 그들은 4%의 표준 편차를 가지고 7개월 이상 동안 트롬빈의 보존된 초기 회

수 수율을 유지하였다. 트롬빈의 회수 수율의 큰 감소도 없었고 관찰된 최대 수율의 감소는 7개월 동안 상온에서 앵타머-나노섬유 복합체의 여섯 번 재사용 동안 초기 수율의 9% 미만이었다. NaN_3 를 포함하는 TE0.1의 첨가는 뉴클레아제와 박테리아 성장을 억제하여 앵타머의 저장 안정성 증가를 가능하게 한다.

[0036]

본 발명자들은 새로운 앵타머-나노섬유 복합체를 트롬빈 정제에 사용하였다. 친화 리간드의 우수한 능력은 전 자방사된 고분자 PS-PSMA 나노섬유에 고정화된 앵타머를 통하여 성공적으로 달성되었다. 본 발명에서 앵타머-나노섬유 복합체는 85%의 회수 수율을 가지는 트롬빈의 매우 효과적인 정제를 나타내었다. 또 이 시스템은 매우 안정한 장기간 저장 및 반복된 사용을 나타내었다. 이들 결과는 앵타머에 대한 서포팅 물질로 나노섬유의 사용은 단백질 정제에 대한 서포팅 물질로서의 문제점을 극복하는데 기여한다는 것을 확인하였다. 컬럼에 패킹 물질로서 나노섬유의 사용 가능성에 대하여 이 시스템은 단백질 정제에 널리 적용될 수 있다.

발명의 효과

[0037]

발명에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 앵타머가 고정화된 PS-PSMA 나노섬유를 이용한 단백질 분리 /정제 방법은 기존에 사용된 마이크로 비드나 관 형태의 컬럼 형태에 비해 높은 capacity를 가지므로 효율성 측면에서 우수하다. 또한 정기방사법을 통해 쉽게 나노섬유가 대량생산이 가능하며 나노섬유에 있는 하이드라이드 그룹을 통해 쉽게 앵타머를 고정화할 수가 있어 생산 속도 및 가격적 측면에서도 매우 우수하므로 앵타머-나노섬유 복합체를 이용한 단백질/분리 정제방법이 보편화적으로 적용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0038]

도 1은 앵타머-나노섬유 복합체 및 대조군의 정제 프로파일을 나타낸 그림. U: 1ml의 결합 버퍼에 $10\mu\text{g}$ 의 트롬빈을 각 샘플에 첨가하였다. W: 비특이적인 결합을 제거하기 위하여 1ml의 버퍼로 2회 세척하였다. E: 2M의 NaClO_4 로 결합된 트롬빈을 용출하였다. 모든 실험은 상온에서 수행하였다.

도 2는 트롬빈에 대한 앵타머-나노섬유 복합체의 특이성을 나타내는 그림. 용출 프로파일은 앵타머-나노섬유 복합체에 대한 HSA, IgG 및 fibrinogen의 보유가 거의 없다는 것을 보여준다. $10\mu\text{g}$ 의 각 단백질을 1mL의 결합 버퍼에서 스파이크하였다.

도 3은 앵타머-나노섬유 복합체 및 브랭크 서포트의 Capacity 곡선을 나타낸 그림.

도 4는 앵타머-나노섬유 복합체의 재사용성 및 저장 안정성을 나타낸 그림. (a) 앵타머-나노섬유 복합체의 6회 재사용성. 상대적인 회수 수율을 0 일에서 초기에 발견된 것에 대하여 각 시점에서 잔류 수율을 사용하여 계산하였음.(b) 7 개월간 앵타머-나노섬유 복합체의 저장 안정성을 나타냄.

도 5는 본 발명에서 앵타머-나노섬유 복합체의 특성을 나타낸 그림. 앵타머 고정 전(a) 및 후(b) PS-PSMA 나노섬유의 SEM 이미지. (c) 얽힌(entangled) 나노섬유 및 (d) 단일 나노섬유에 대한 TAMRA-표지된 앵타머의 CLSM 이미지.

도 6은 Blank 및 각 앵타머-나노섬유 복합체로부터 얻은 정제 프로파일을 나타냄. 'Amine'은 bare PS-PSMA 나노섬유 amine-anhydride 커플링에 아민-변형된 앵타머의 직접 고정화를 나타내고 'Biotin'은 streptavidin 코팅 후 PS-PSMA 나노섬유에 바이오틴화된 앵타머의 고정화를 나타냄.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039]

이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0040]

본 발명에서 사용된 Polystyrene (PS) ($M_w \sim 900,000$, Pressure Chemicals), Poly (styrene-co-maleic anhydride) (PSMA) ($M_w \sim 240,000$, Aldrich), N, N-dimethylformamide (DMF) (99.8%, Sigma-Aldrich), Streptavidin (Streptomyces avidinii 유래, Sigma-Aldrich), Fibrinogen(인간 혈장 유래, Sigma-Aldrich), IgG (인간 혈청 유래, Sigma-Aldrich)은 구입하였고 추가적인 정제없이 사용하였다. MicroBCA protein assay kit (Pierce)를 정량화에 사용하였다.

[0041]

트롬빈에 대한 모든 바이오틴화된, 아민-변형되고 형광성 앵타머는 GenoTech (GenoTech Co., Korea)에서 합성되

고 정제되었다. The 29- 및 15-mer DNA 앵타머 타겟팅 트롬빈(5' -AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGGTGA CT-3' (서열번호 1), TBA29로 명명; 5' -GGT TGG TGT GGT TGG- 3' (서열번호 2), TBA15로 명명)은 15-deoxythymine(dT) 스페이서 암을 통해서 5' 변형된 dTT 앵타머에서 바이오틴화 또는 아민변형되었다(L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas and J. J. Toole, *Nature*, 1992, **355**, 564-566). 트롬빈에 대한 형광단 표지된 29 앵타머는 Apt 29의 5' 말단에 TAMRA를 부착하여 달성하였다 (TAMRA-TBA29로 명명). 대조군 실험을 위한 바이오틴화된 앵타머는 열려진 서열을 가졌다: 5'CCA GCG CTG GGG TGT GTG TAG ATA GCA ATC T- 3' (서열번호 3). 그들은 또한 스페이서 암으로 oligo(dT)의 변형을 가졌다. 모든 앵타머는 GenoTech에 의하여 PAGE정제되었다. 앵타머들은 Milli-Q (Millipore)로 정수된 탈이온수에 녹였다.

[0042] 실시예 1: PS-PSMA 나노섬유의 제조 및 알코올 분산

[0043] PS-PSMA 나노섬유를 M. B. Gu, E. T. Hwang, R. Tatavarty, H. Lee and J. Kim, *J Mater Chem*, 2011, **21**, 5215-5218 논문을 일부 변형하여 제조하였다. 요약하면 120 mg PS 및 60 mg의 PSMA를 1.5 mL의 DMF에 혼합하고 상온에서 완전하게 녹였다; 그 녹은 용액을 25 °C에서 1시간 소니케이션하였다.. 그 제조된 폴리머로부터 얻은 앨리콰트(aliquot)를 각각 10 mL 주사기에 로딩하였다. 전자방사(Electrospinning)를 tip에서 collector 사이가 10cm 거리를 가지고 10 kV 고 전압 파워 서플라이(Gamma high voltage Research, ES series)에서 수행하고, 23게이지 주사기 바늘은 2.5 mL/h 유속으로 수직으로 고정되었다. 그 얻어진 전자방사된 PS-PSMA 나노섬유는 알루미늄 호일 상에 모았다. 물에서 완전하게 나노섬유를 분산시키기 위하여, 전자방사된 나노섬유를 수용성 알코올 용액(50%, v/v)에 넣어서 250 rpm에서 적어도 30분간 교반하였다. 그 다음 그것들을 1x PBS 버퍼(pH 7.4)로 세척하고 그들을 앵타머 고정화에 사용될 때까지 동일한 버퍼 용액에 보관하였다.

[0044] 실시예 2: 나노섬유 상에 앵타머 고정화

[0045] 나노섬유 상에 부착된 streptavidin을 제조하기 위하여, streptavidin 용액을 1x PBS 버퍼 (pH 7.4)에서 50µg/mL로 제조하였다. 배양을 위하여, 0.5mg의 PS-PSMA 나노섬유를 절단하여 EP 튜브에서 1 mL의 streptavidin 용액에 혼합하고 상온에서 30분간 교반하고 최대 커플링을 위하여 4 °C에서 밤새 교반(30rpm)하였다.그 후 그 나노섬유를 새로운 EP 튜브로 옮긴 후 1x PBS + 0.05% tween 20 (pH 7.4)으로 세척하였다.

[0046] 그 미반응 maleic anhydride 그룹들을 2시간 동안 100 mM ethanolamine (pH 8.0)에서 streptavidin 코팅된 나노섬유를 배양하여 소멸시켰다. Streptavidin 코팅된 나노섬유 1x PBS + 0.05% tween 20 (pH 7.4)로 세척하고 추가 사용시까지 10 mM Na₃(pH7.4)를 포함하는 TE0.1 (0.1M NaCl을 가지는 TE버퍼)에서 저장하였다.

[0047] 실시예 3: 앵타머 고정화된 PS-PSMA 나노섬유의 특성규명

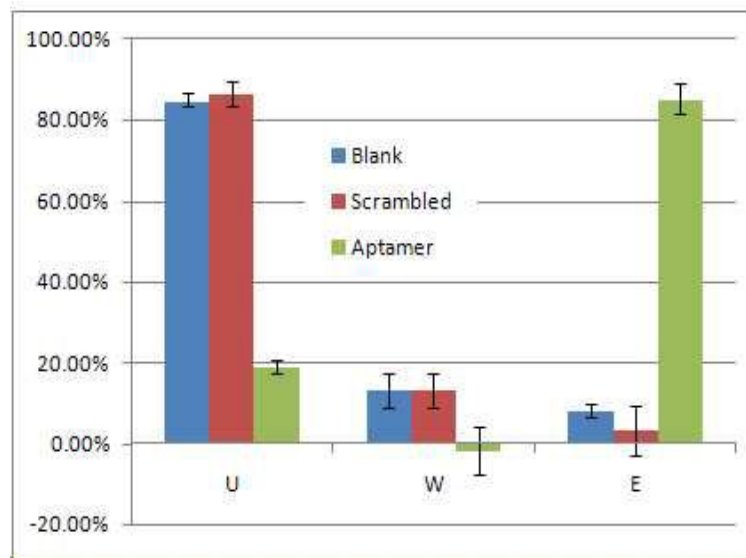
[0048] 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (CLSM) 및 Zeiss LSM 510 스캐닝 장치(Carl Zeiss Co. Ltd., Germany)가 구비된 Zeiss Axiovert 200 현미경을 형광 현미경에 의한 앵타머 나노섬유 조성물을 조사하기 위하여 사용하였다. 나노섬유 상에 존재하는 TAMRA-표지된 앵타머를 여기시키기 위하여, 543nm UV diode 레이저를 사용하였다. 앵타머 고정화된 나노섬유의 형태는 주사 전자 현미경(SEM;S-2360N, Hitachi Co.)으로 조사하였다.

[0049] 실시예 4: 단백질 정제 과정

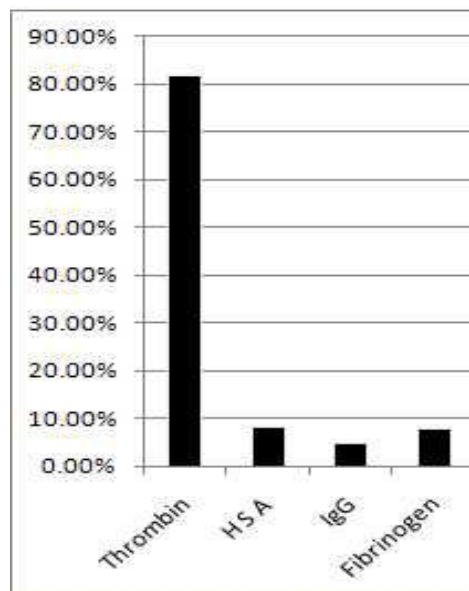
[0050] 단백질 정제를 EP 튜브를 이용하여 상온에서 수행하였다. 그 앵타머-나노섬유 복합체를 1mL의 Binding Buffer (140mMNaCl, 20mM Tris-HCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 0.02% Tween 20, pH 7.4)로 조건화하였다. 그 앵타머-나노섬유 복합체를 30분 동안 다양한 양의 트롬빈으로 배양한 후 1mL의 바인딩 버퍼로 2회 세척하였다. 그 다음 트롬빈을 2M NaClO₄로 용출하였다. 정제 효율성을 체크하기 위하여, 매 분획에서 트롬빈의 농도를 MicroBCA protein assay kit (Pierce)를 통하여 측정하였다. 안정성 및 재사용성(reusability)을 결정하는 실험을 위하여 그 앵타머-나노섬유 복합체를 10 mM Na₃(pH7.4)를 포함하는 TE0.1로 3회 세척하고 다음 사용을 위하여 4 °C에서 저장하였다. 동일한 실험 프로토콜을 그 앵타머-나노섬유 복합체의 저장 안정성 및 재사용성을 체크하기 위하여 수반하였다.

도면

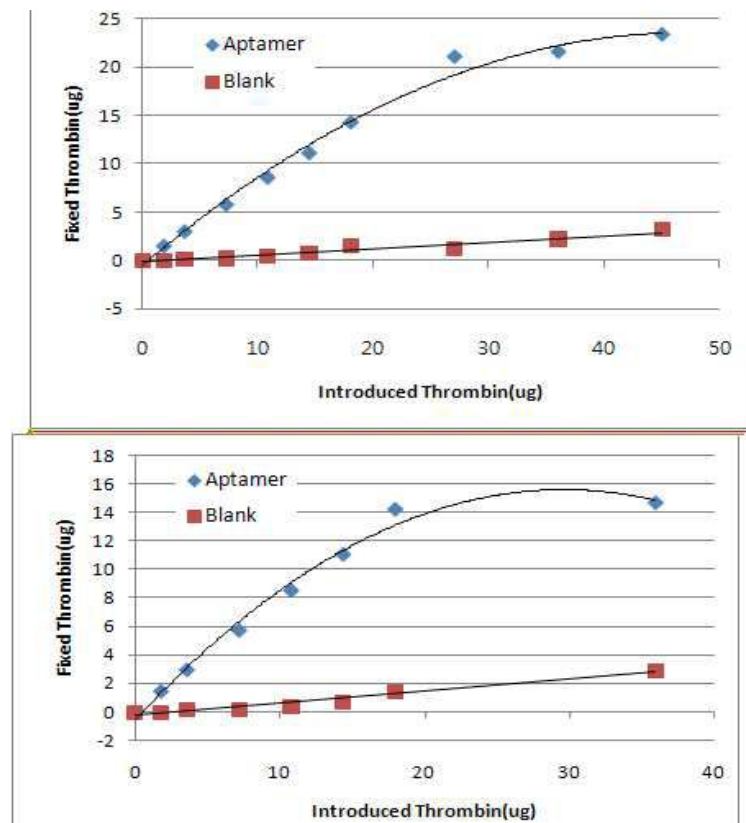
도면1



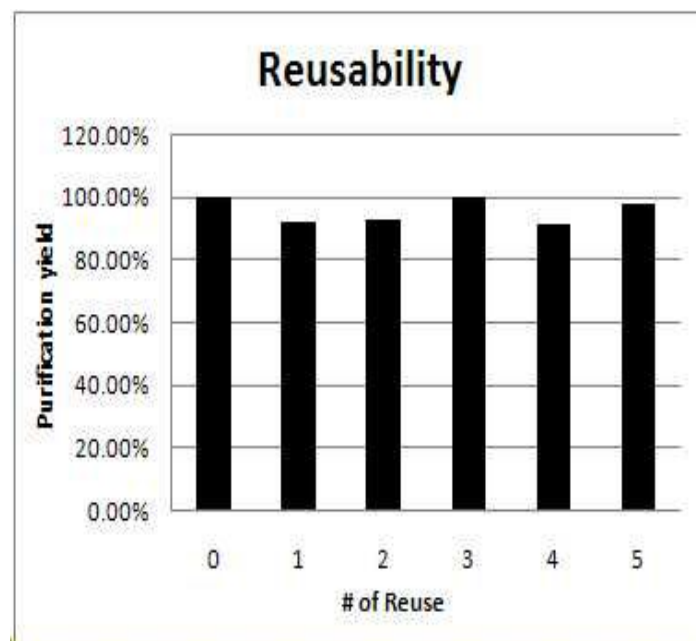
도면2



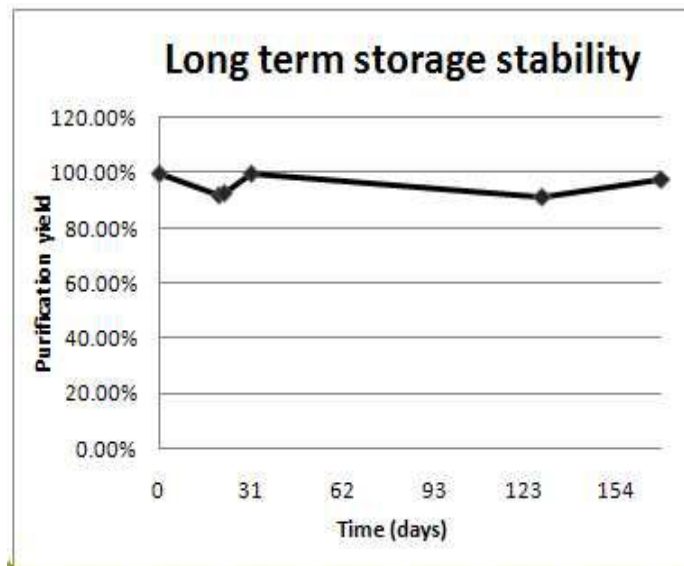
도면3



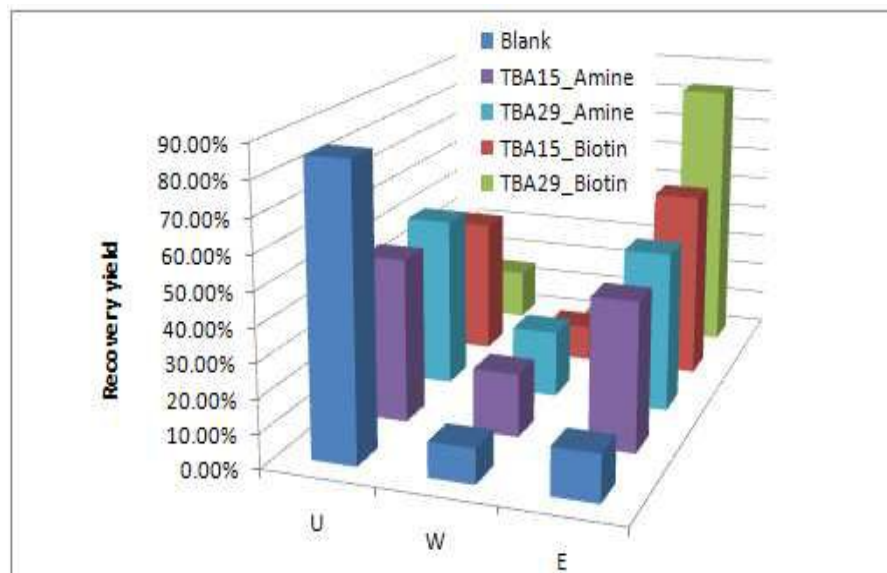
도면4a



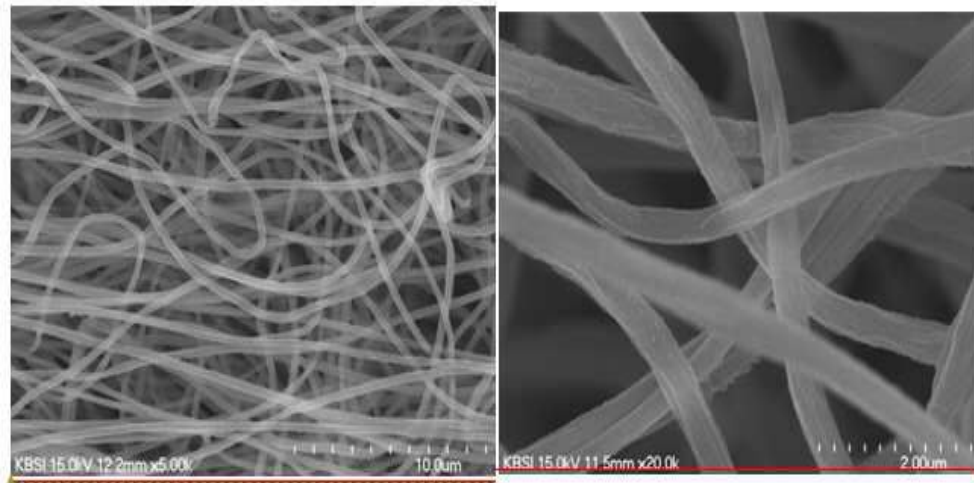
도면4b



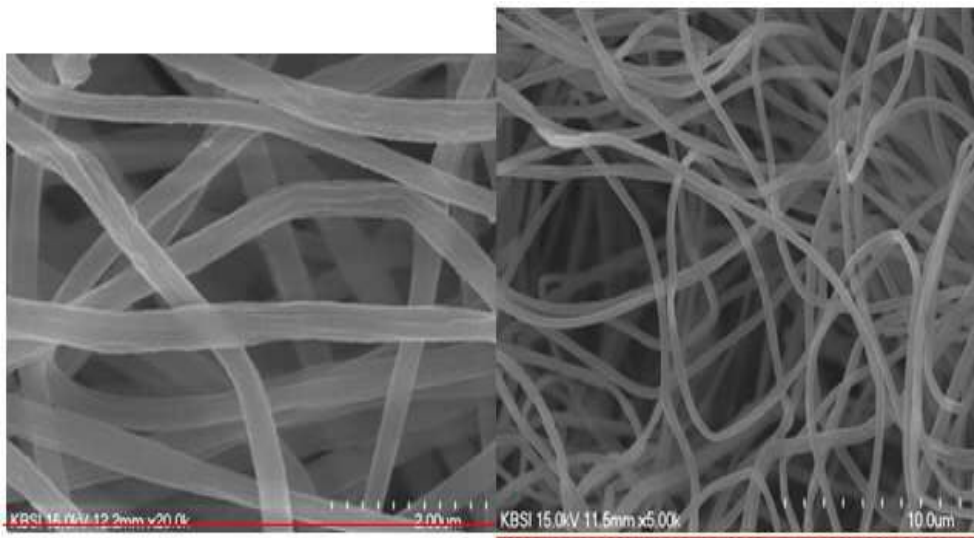
도면5



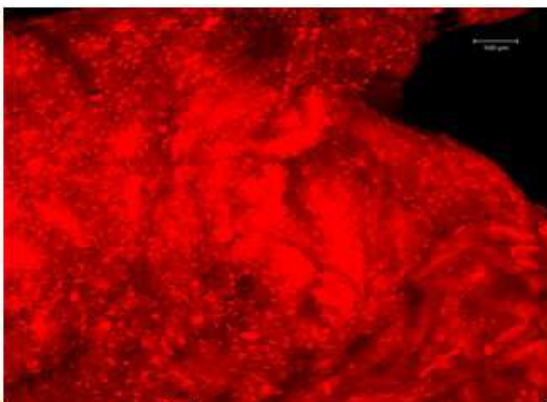
도면6a



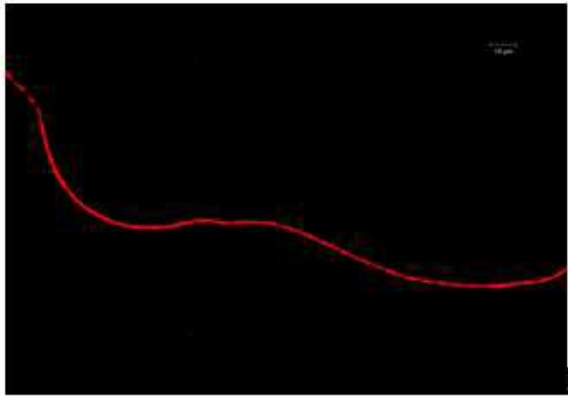
도면6b



도면6c



도면6d



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Aptamer immobilized Nanofibers composite and use of separation and purification of protein using the same
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Aptamer
- <400> 1
- agtcctgtggt agggcaggtt ggggtgact 29
- <210> 2
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> aptamer
- <400> 2
- ggttggtgtg gttgg 15
- <210> 3
- <211> 31
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> control aptamer

<400> 3

ccagcgctgg ggtgtgtgta gatagcaatc t

31