

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0172685
(43) 공개일자 2024년12월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) C12N 9/16 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
C12N 9/16 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0066852
- (22) 출원일자 2024년05월23일
심사청구일자 2024년05월23일
- (30) 우선권주장
1020230069947 2023년05월31일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- 재단법인 대구경북첨단의료산업진흥재단
대구광역시 동구 동내로 88 (동내동, 커뮤니케이션센터)
- (72) 발명자
구만복
서울특별시 동대문구 이문로12길 3-10 (이문동, 래미안이문2차아파트)
- 김은령
서울특별시 구로구 공원로 63 (구로동, 희훈타워빌)
- 이수진
대구광역시 동구 과학로 45 (각산동, 대구혁신에듀포레)
- (74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹

전체 청구항 수 : 총 12 항

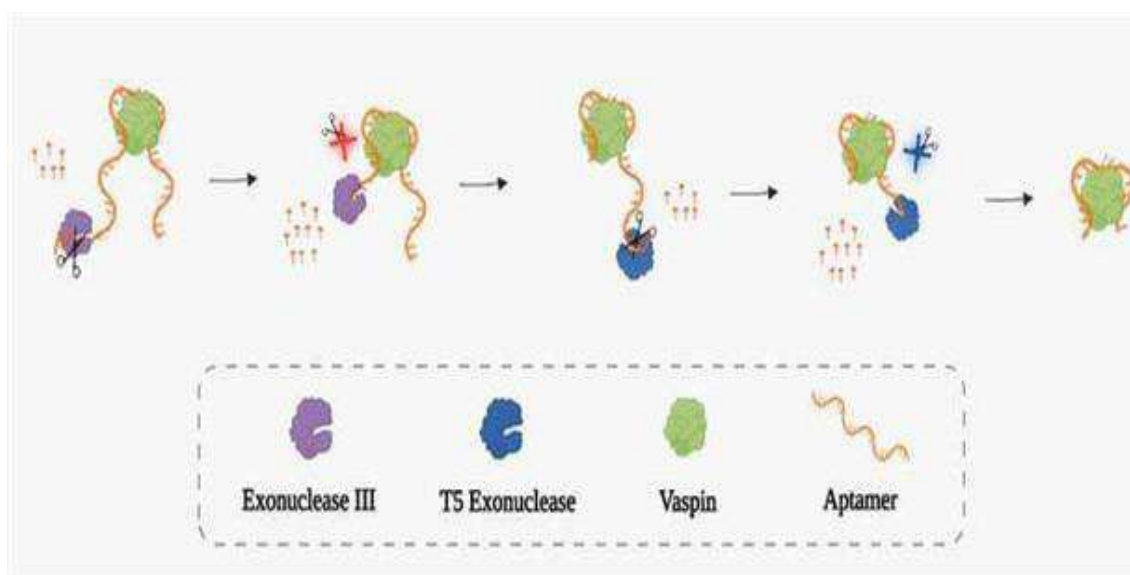
(54) 발명의 명칭 애평타머-단백질 결합체에 대한 비필수적 서열 유도 애평타머 인시츄 트런케이션 방법 및 상기 방법으로 제조된 베스핀에 고친화적으로 결합하는 트런케이션된 애평타머

(57) 요약

본 발명은 애평타머-단백질 결합체에 대한 비필수적 서열 유도 애평타머 인시츄 트런케이션 방법 및 상기 방법으로 제조된 베스핀에 고친화적으로 결합하는 트런케이션된 애평타머에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 (1) 타겟 단백질 및 상기 타겟 단백질과 결합 가능한 애평타머를 혼합하여 애평타머와 타겟 단백질의 결합체를 형성하는 단계;

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



및 (2) 상기 앵타머와 타겟 단백질의 결합체에 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)를 처리하여 타겟 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거하는 단계를 포함하는 인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션 방법, 상기 방법으로 제조된 타겟 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된 앵타머, 상기 트런케이션된 앵타머를 포함하는 타겟 단백질 검출용 키트, 인시츄 앵타머 트런케이션 방법으로 베스핀 단백질에 결합하는 트런케이션된 앵타머를 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 베스핀 단백질에 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된 DNA 앵타머에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/6863 (2013.01)

C12N 2310/16 (2013.01)

G01N 2333/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180470
과제번호	2021R1A2C2013396
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	효소-질량분석 기반 Engineered 앵타머를 통한 고성능 앵타머 바이오센서 기술 개발
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

(1) 타겟 단백질 및 상기 타겟 단백질과 결합 가능한 앵타머를 혼합하여 앵타머와 타겟 단백질의 결합체를 형성하는 단계; 및

(2) 상기 앵타머와 타겟 단백질의 결합체에 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)를 처리하여 타겟 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거하는 단계를 포함하는,

인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation) 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)는 서로 다른 2종의 핵산 외부 가수분해효소를 순차적으로 또는 동시에 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)는 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III) 및 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)를 순차적으로 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III)는 반응액에 대한 최종 농도가 $0.5\sim 1.5\text{U}/\mu\text{l}$ 가 되도록 첨가하고, 상기 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)는 반응액에 대한 최종 농도가 $0.1\sim 0.5\text{U}/\mu\text{l}$ 가 되도록 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (2) 단계 이후, 핵산 외부 가수분해효소 처리로 절단된 앵타머 서열 및 상기 타겟 단백질과 결합하고 있는 앵타머 서열에 대한 시퀀싱 분석을 수행하여, 타겟 단백질과 결합하는 트런케이션된 앵타머 서열을 결정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation)방법으로 생성된 타겟 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된(truncated) 앵타머.

청구항 7

제6항의 트런케이션된 앵타머를 포함하는, 타겟 단백질 검출용 키트.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 타겟 단백질은 베스핀(vaspin) 단백질인 것을 특징으로 하는, 트런케이션된(truncated) 앵타머.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 트런케이션된(truncated) 앵타머는 베스핀(vaspin) 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 서열번호 3 또는 서열번호 4의 앵타머인 것을 특징으로 하는, 트런케이션된(truncated) 앵타머.

청구항 10

(1) 베스핀(vaspin) 단백질 및 상기 베스핀 단백질과 결합 가능한 앵타머를 혼합하여 앵타머와 베스핀 단백질의 결합체를 형성하는 단계;

(2) 상기 앵타머와 베스핀 단백질의 결합체에 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III) 및 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)를 순차적으로 처리하여 베스핀 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거하는 단계; 및

(3) 베스핀 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된(truncated) 앵타머의 서열을 시퀀싱하는 단계를 포함하는,

인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation) 방법으로 베스핀 단백질에 결합하는 트런케이션된(truncated) 앵타머를 제조하는 방법.

청구항 11

제10항의 방법으로 제조된, 베스핀 단백질에 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된 DNA 앵타머.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 앵타머는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 베스핀 단백질에 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된 DNA 앵타머.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 기술은 앵타머 - 단백질 결합체에 대한 비필수적 서열 유도 앵타머 인 시츄 트런케이션 방법 및 상기 방법으로 제조된 베스핀에 고친화적으로 결합하는 트런케이션된 앵타머에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 앵타머(aptamer)는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일 가닥 DNA 또는 RNA 분자 구조체로서, SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)라는 알려진 앵타머 개발 방법을 통해 10^{12-14} 정도의 다양성을 가지는 랜덤 핵산 라이브러리로부터 스크리닝 된다. 기존의 감지 물질인 항체와 달리, 앵타머는 핵산 구조체로 열 안정성이 우수하며, 시험관 내(in vitro)에서 합성되기 때문에 동물이나 세포가 따로 필요하지 않아 스크리닝 시간이 짧고 변형(modification)이 쉬우며 생산 비용 면에서도 경제적이다. 또한 앵타머는 넓은 범위의 분자를 인식할 수 있는데, 그 예로 저분자, 단백질, 바이러스 및 세포 등이 있다. 타겟에 대하여 강한 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 앵타머의 특성으로 인해, 최근 들어 앵타머를 신약 개발, 약물 전달 시스템 및 바이오센서 등 다양한 분야에 응용하려는 연구가 이루어지고 있다.

[0003] 한편, 앵타머는 그 크기 및 생체 내에서의 분해(또는 저해; degradation)와 같은 문제점으로 인해 직접적인 임상 및 실험실 적용에 한계가 있다. 이를 보완하기 위한 방안으로 앵타머를 트런케이션(truncation)하거나 화학적 변형(chemical modification) 또는 변이(mutagenesis)시키는 등의 post-SELEX 연구가 진행되어 왔다.

[0004] 현재 개발된 대부분의 앵타머 서열은 통상적으로 60-100개의 뉴클레오타이드를 가지는데, 이 중에는 타겟 결합에 참여하지 않고, 셀프 스택킹(self stacking) 및 혼성화(hybridization)로 인한 구조적 방해(steric hindrance)로 결합력의 감소를 야기하는 비필수적 서열(nonessentials)이 포함되어 있다. 따라서 타겟에 대한 결합에 필요한 서열만을 남기고 비필수적 서열을 제거하는 앵타머 트런케이션(truncation)을 통해 앵타머의 결합력과 결합 특이성이 향상될 뿐만 아니라, 짧은 길이로 인해 합성 수율을 높이고, 합성 비용을 줄일 수 있다.

[0005] 지금까지 개발되어 진행되고 있는 앵타머 트런케이션(truncation) 방식은 크게 2가지로 나뉘는데, 체계적 절단(systematic truncation)과 생물정보학적 절단(bioinformatic truncation)의 방식이 있다. 체계적 절단(Systematic truncation) 방식은 불필요한 뉴클레오타이드를 앵타머 서열의 끝에서부터 하나씩 없애보는 방식이다. 반면에, 생물정보학적 절단(Bioinformatic truncation) 방식은 앵타머 서열로부터 분석한 정보를 기반으로 앵타머에서 자를 부분을 선택하는 방식이다. Clustal Omega 및 DNAMAN과 같은 프로그램을 통해 앵타머의 서열을 정렬하고 서열 간 유사성을 비교하여 공통 서열을 찾아낸 후, 이를 타겟 결합에 관여하는 서열로 간주한다. 또한, Mfold 및 RNA structure와 같은 2차 구조 예측 프로그램을 이용하여 hairpins, G-quadruplexes, T-junctions와 같이 타겟과의 결합에 주요한 역할을 할 수 있는 앵타머의 2차 구조를 분석한다. 즉, 앵타머의 서열 유사성 비교 또는 2차 구조 분석을 통해 타겟에 대한 결합 부위를 예측할 수 있으며, 이 외의 서열을 제거할 수 있다.

[0006] 그러나 앞서 언급한 이러한 방법들은 앵타머 자체의 서열 및 2차 구조는 분석하지만, 실질적인 타겟 분자의 영향력은 고려하지 않는다는 한계가 있다. 앵타머는 타겟과 결합할 때 구조 변화를 거치기 때문에 트런케이션(truncation)을 할 때 타겟 분자와의 상호작용은 반드시 고려되어야 할 요소이다. 따라서 최근에는 앵타머의 3차원에서의 폴딩(folding)과 앵타머-타겟 상호작용을 모델링할 수 있는 알고리즘을 이용한 in silico 접근법이 사용된다. RNAComposer, 3dRNA, Vfold3D 및 SimRNA와 같은 온라인 서버를 통해 앵타머의 3차 구조를 예측할 수 있다. 예측된 3차 구조는 AutoDock, AutoDock Vina, HADDOCK 및 Rosetta와 같은 분자 도킹 시뮬레이션 알고리즘을 이용하여 타겟과의 결합을 시각적으로 나타낼 수 있다. 이러한 도킹 결과에 기반하여 제시된 앵타머의 결합 구조(pose)와 결합 부위는 타겟과의 결합에 있어서 주요한 요소로 판단되고, 이를 통해 트런케이션(truncation) 할 부분을 결정할 수 있다. 그러나 이러한 3차원 구조를 통한 타겟과 결합하는 앵타머의 결정은 RNA 앵타머에 대해서만 개발되어 있을 뿐, DNA 앵타머의 3차 구조를 분석하는 예측 알고리즘은 아직까지 개발되지 못하고 있다.

[0007] 뿐만 아니라 RNA 앵타머의 3차 구조를 분석하는 알고리즘에 염기 변이(mutation) 과정을 더하여 DNA 앵타머의 3차 구조 분석에 활용한다 할지라도 이는 직접적인 결과가 아니기 때문에 그 정확도가 떨어진다. 게다가 in silico 도킹 시, 앵타머가 타겟과 결합하는 환경에서의 필요한 금속 이온 농도, 온도 및 바이오-유체(bio-fluid)와 같은 복잡한 조건들을 그대로 구현하는 데에는 어려움이 있고, 또한 프로그램 작동을 위해 상당한 하드웨어의 용량이 요구된다는 한계점이 있다.

[0008] 따라서 DNA 앵타머와 단백질 타겟의 결합 상태를 유지하면서, 결합에 관여하지 않는 비필수적 부분은 트런케이션(truncate)하고, 결합에 관여하는 부분이 앵타머 서열 중에서 어디인지를 알아낼 수 있는 간편하고 직접적이며 기술의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-1616524

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서 본 발명의 목적은, (1) 타겟 단백질 및 상기 타겟 단백질과 결합 가능한 앵타머를 혼합하여 앵타머와 타겟 단백질의 결합체를 형성하는 단계; 및 (2) 상기 앵타머와 타겟 단백질의 결합체에 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)를 처리하여 타겟 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거하는 단계를 포함하는, 인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation) 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation)방법으로 생성된 타겟 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된(truncated) 앵타머를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 본 발명의 트런케이션된 앵타머를 포함하는, 타겟 단백질 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은, (1) 베스핀(vaspin) 단백질 및 상기 베스핀 단백질과 결합 가능한 앵타머를 혼합하

여 앵타머와 베스핀 단백질의 결합체를 형성하는 단계; (2) 상기 앵타머와 베스핀 단백질의 결합체에 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III) 및 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)를 순차적으로 처리하여 베스핀 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거하는 단계; 및 (3) 베스핀 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트렁케이션된(truncated) 앵타머의 서열을 시퀀싱하는 단계를 포함하는, 인시츄(in situ) 앵타머 트렁케이션(truncation) 방법으로 베스핀 단백질에 결합하는 트렁케이션된(truncated) 앵타머를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 나아가 본 발명의 또 다른 목적은 상기 본 발명의 방법으로 제조된, 베스핀 단백질에 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트렁케이션된 DNA 앵타머를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 그러므로 본 발명은, (1) 타겟 단백질 및 상기 타겟 단백질과 결합 가능한 앵타머를 혼합하여 앵타머와 타겟 단백질의 결합체를 형성하는 단계; 및 (2) 상기 앵타머와 타겟 단백질의 결합체에 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)를 처리하여 타겟 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거하는 단계를 포함하는, 인시츄(in situ) 앵타머 트렁케이션(truncation) 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)는 서로 다른 2종의 핵산 외부 가수분해효소를 순차적으로 또는 동시에 처리할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)는 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III) 및 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)를 순차적으로 처리할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III)는 반응액에 대한 최종 농도가 0.5~1.5U/ μ l가 되도록 첨가하고, 상기 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)는 반응액에 대한 최종 농도가 0.1~0.5U/ μ l가 되도록 첨가할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (2) 단계 이후, 핵산 외부 가수분해효소 처리로 절단된 앵타머 서열 및 상기 타겟 단백질과 결합하고 있는 앵타머 서열에 대한 시퀀싱 분석을 수행하여, 타겟 단백질과 결합하는 트렁케이션된 앵타머 서열을 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0020] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 인시츄(in situ) 앵타머 트렁케이션(truncation)방법으로 생성된 타겟 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트렁케이션된(truncated) 앵타머를 제공한다.

[0021] 또한 본 발명은 본 발명의 방법으로 트렁케이션된 앵타머를 포함하는, 타겟 단백질 검출용 키트를 제공한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 타겟 단백질은 베스핀(vaspin) 단백질일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 트렁케이션된(truncated) 앵타머는 베스핀(vaspin) 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 서열번호 3 또는 서열번호 4의 앵타머일 수 있다.

[0024] 또한 본 발명은, (1) 베스핀(vaspin) 단백질 및 상기 베스핀 단백질과 결합 가능한 앵타머를 혼합하여 앵타머와 베스핀 단백질의 결합체를 형성하는 단계; (2) 상기 앵타머와 베스핀 단백질의 결합체에 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III) 및 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)를 순차적으로 처리하여 베스핀 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거하는 단계; 및 (3) 베스핀 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트렁케이션된(truncated) 앵타머의 서열을 시퀀싱하는 단계를 포함하는, 인시츄(in situ) 앵타머 트렁케이션(truncation) 방법으로 베스핀 단백질에 결합하는 트렁케이션된(truncated) 앵타머를 제조하는 방법을 제공한다.

[0025] 나아가 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된, 베스핀 단백질에 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트렁케이션된 DNA 앵타머를 제공한다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 앵타머는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에서 제공하는 인시츄(in situ) 앵타머 트렁케이션 방법은 두 가지 핵산 외부 가수분해효소 Exo III와 T5 Exo를 사용하여 앵타머가 타겟 단백질과 결합을 유지한 채로, 타겟 결합에 참여하지 않은 앵타머의 비필수적

서열을 3' 말단과 5' 말단으로부터 단일 뉴클레오타이드 단위로 가수분해함으로써 타겟 단백질과 실질적으로 결합하는 필수적 서열로 구성된 트런케이션된 앵타머를 제조할 수 있다. 이러한 본원발명의 방법은 현재까지 보고된 바 없는 방법으로서, 어떠한 앵타머 라벨링(labeling)이나 엔지니어링(engineering)이 필요하지 않다는 효과가 있으며, 또한 결합에 참여하지 않는 앵타머의 불필요한 서열을 제거할 수 있으므로, 타겟과의 결합력 및 특이성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 작아진 앵타머 크기로 인해 결합의 저해 및 방해를 감소시킬 수 있고, 다양한 질환의 진단 및 타겟물질의 검출 등을 위한 키트 또는 센서 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028]

도 1은 본 발명에 따른 앵타머-단백질 결합체에 대한 불필요한 서열 유도 앵타머 인시츄 트런케이션(truncation) 방법의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에서 V1 앵타머에 핵산 외부 가수분해효소 III 처리 시, 시간에 따른 분해 정도를 PAGE 젤 결과로 확인한 것이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에서 V1(3')-44 앵타머에 외부 핵산 가수분해 효소 T5 처리 시, 시간에 따른 분해 정도를 PAGE 젤 결과로 확인한 것이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에서 V49 앵타머에 핵산 외부 가수분해효소 III 처리 시, 시간에 따른 분해 정도를 PAGE 젤 결과로 확인한 것이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에서 V49(3')-50 앵타머에 외부 핵산 가수분해 효소 T5 처리 시, 시간에 따른 분해 정도를 PAGE 젤 결과로 확인한 것이다.

도 6은 V1 앵타머에 왼쪽부터 순서대로 버퍼, vaspin, adiponectin, nampt, HSA, Resistin, RBP4를 처리하여 결합시킨 후, 외부 핵산 가수분해 효소 III를 처리한 PAGE 젤 결과(가)와 image J 프로그램으로 이를 정량화한 그래프이다(나).

도 7은 본 발명의 방법으로 트런케이션된 V1(3'-5')-26 앵타머의 Mfold 프로그램을 이용하여 예측한 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 방법으로 트런케이션된 V49(3'-5')-30 앵타머의 Mfold 프로그램을 이용하여 예측한 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 9는 기존 V1 앵타머와 효소 처리에 의해 잘린 V1(3'-5')-26 앵타머의 결합 특이성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 기존 V49 앵타머와 효소 처리에 의해 잘린 V49(3'-5')-30 앵타머의 결합 특이성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 따른 V1(3'-5')-26 앵타머의 베스핀(vaspin)에 대한 결합 친화도를 분석한 것이다.

도 12는 본 발명에 따른 V49(3'-5')-30 앵타머의 베스핀(vaspin)에 대한 결합 친화도를 분석한 것이다.

도 13은 본 발명의 일실시예에서 각 앵타머 쌍을 이용하여 베스핀(vaspin)에 대한 결합 형태 및 결합 정도를 ELASA(Enzyme-linked aptamer-based sandwich assay) 및 CLSM으로 분석한 결과를 나타낸 것으로, A는 ELASA 분석 과정의 모식도를 나타낸 것이고, B는 200nM 베스핀 대 완충액(OD 타겟/OD 버퍼)의 광학 밀도(OD) 비율을 기준으로 1차 또는 2차 앵타머의 앵타머 쌍에 대한 ELASA 분석 결과를 나타낸 것이고, C는 트런케이션된 V49(3'-5')-30 및 V1(3'-5')-26 앵타머 쌍을 이용한 타겟 단백질과의 결합 형태에 대한 현미경 이미지를 나타낸 것이다(스케일 바: 20 μ m).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029]

본 발명은 앵타머를 타겟 단백질에 결합한 채로, 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)를 처리하여 타겟 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적인 서열을 제거하는 단계를 포함하는, 인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation) 방법에 관한 것이다.

[0030]

구체적으로 본 발명은, (1) 타겟 단백질 및 상기 타겟 단백질과 결합 가능한 앵타머를 혼합하여 앵타머와 타겟 단백질의 결합체를 형성하는 단계; 및 (2) 상기 앵타머와 타겟 단백질의 결합체에 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)를 처리하여 타겟 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거하는 단계를 포함하는,

인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation) 방법을 제공함에 특징이 있다.

- [0031] 앞서 종래 기술에서도 언급한 바와 같이, 통상적인 앵타머 서열은 60~100개의 뉴클레오타이드로 구성되어 있는데, 이 중에는 타겟에 결합하지 않는 비필수적 서열을 포함하고 있으며, 이러한 불필요한 서열로 인한 셀프 스택킹(self stacking) 및 혼성화(hybridization)로 구조적 방해(steric hindrance)에 따른 타겟과의 결합력 감소를 야기하는 문제점이 있다.
- [0032] 그러나 이러한 문제점을 실제적이면서 효과적으로 해소할 수 있는 기술이 개발되지 못하고 있어 본 발명자들은 이러한 문제점 개선을 위한 연구를 진행하던 중, 타겟에 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거, 즉 트런케이션할 수 있는 새로운 방법을 확립하였다.
- [0033] 본 발명에 따른 상기 방법은, 앵타머와 타겟 단백질의 결합체를 유지한 채로 서로 다른 2종의 핵산 외부 가수분해효소를 처리하여, 타겟 단백질과 결합하지 않는 비필수적인 앵타머 서열을 가수분해하는 과정을 통해 수행된다.
- [0034] 본 발명에서 ‘앵타머’란, 높은 친화성으로 타겟 물질을 특이적으로 인지할 수 있는 작은 단일가닥 올리고 핵산을 말한다.
- [0035] 특히 본 발명에서 트런케이션의 대상이 되는 상기 앵타머는 바람직하게는 DNA 앵타머일 수 있다. 상기 ‘DNA 앵타머(DNA aptamer)’는 특정 분자에 고친화성 및 특이성으로 결합할 수 있는 DNA 핵산 분자를 의미한다.
- [0036] 또한, 상기 DNA 앵타머는 상기 DNA 앵타머에 특이적으로 결합할 수 있는 리간드를 포함할 수 있다. 상기 리간드는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표지된 접합체, 및 스트렙타비딘 또는 아비딘이 처리된 리간드일 수 있다.
- [0037] 또한 본 발명에서 ‘핵산 외부 가수분해효소’란, 인산다이에스터 결합을 가수분해함으로써 핵산의 말단부터 뉴클레오타이드를 분해할 수 있는 효소를 말한다. 본 발명에서 사용된 핵산 외부 가수분해효소는 2가지로, 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III) 및 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)를 사용하였다. 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III)는 DNA를 3' 말단부터 순차적으로 분해하는 효소이며, T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)는 5' 말단부터 DNA를 순차적으로 분해하는 핵산 외부 가수분해효소다.
- [0038] 또한, 본 발명에서 ‘비필수적 서열(nonessential sequence)’란, 앵타머가 타겟 단백질과 결합할 때 결합에 참여하지 않는 앵타머의 일부 서열을 말하는 것이며, ‘필수적 서열(essential sequence)’이란 타겟 단백질과 실질적으로 결합에 참여하는 앵타머의 일부 서열을 말하는 것이다.
- [0039] 구체적으로 본 발명에 따른 인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation) 방법을 도 1을 참고하여 단계별로 설명하면 다음과 같다.
- [0040] 먼저, (1) 타겟 단백질 및 상기 타겟 단백질과 결합 가능한 앵타머를 혼합하여 앵타머와 타겟 단백질의 결합체를 형성한다.
- [0041] 즉, 앵타머와 타겟 단백질을 완충용액에서 혼합하여 상온에서 앵타머와 타겟 단백질의 결합을 유도하는 단계이다.
- [0042] 본 발명의 일실시예에서는 타겟 단백질로 베스핀(vaspin) 단백질을 이용하였고, 상기 베스핀 단백질에 결합하는 공지된 앵타머인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 V1 또는 V49 앵타머를 사용하였으며, 베스핀 단백질과 상기 앵타머를 완충용액에 첨가하여 혼합한 후, 상온(25℃)에서 결합 반응을 유도하였다.
- [0043] 이후, (2) 상기 앵타머와 타겟 단백질의 결합체에 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)를 처리하여 타겟 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거하는 과정을 수행한다.
- [0044] 상기 (2) 단계는 앵타머와 타겟 단백질의 결합을 유지한 채로, 핵산 외부 가수분해효소를 처리하고 반응시켜, 타겟 단백질에 결합하지 않는 앵타머의 비필수적인 염기를 가수분해 시키는 단계이다.
- [0045] 이때 상기 핵산 외부 가수분해효소(exonuclease)는 서로 다른 2종의 핵산 외부 가수분해효소를 순차적으로 또는 동시에 처리하여 반응시킬 수 있으며, 바람직하게는 서로 다른 2종의 핵산 외부 가수분해효소를 순차적으로 처리하여 반응시킬 수 있다.
- [0046] 상기 순차적 처리의 예로는, 핵산 외부 가수분해효소로서 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III)를 먼저 처리한 후, 다음으로 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)를 처리하는 과정을 수행할 수 있으며, 또는

상기 효소를 순서를 바꿔 처리할 수도 있다.

- [0047] 본 발명의 일실시예에서는, 베스핀(vaspin) 단백질과 앵타머의 결합체에 대해, 핵산 외부 가수분해효소 III(exonuclease III)을 반응액에 대한 최종 농도가 $0.5\sim 1.5\text{U}/\mu\text{l}$ 가 되도록 첨가하고 상온에서 반응시켜, 베스핀 단백질과의 결합에 참여하지 않은 앵타머의 서열을 3' 말단으로부터 가수분해시켰다. 그런 뒤, 핵산 외부 가수분해효소 III 처리로 베스핀 단백질과의 결합에 참여하지 않은 서열이 제거된 앵타머와 타겟 단백질의 결합체에 대해 다음으로 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)를 반응액에 대한 최종 농도가 $0.1\sim 0.5\text{U}/\mu\text{l}$ 가 되도록 첨가하고 상온에서 반응시켜 이번에는 베스핀 단백질과의 결합에 참여하지 않은 앵타머의 서열을 5' 말단으로부터 가수분해시켰다.
- [0048] 이러한 과정을 통해 타겟 단백질과의 결합에 참여하지 않은 앵타머의 비필수적인 서열을 앵타머의 3' 말단 및 5' 말단으로부터 제거하여 최종적으로 타겟 단백질과 결합에 실질적으로 참여하는 필수적인 서열로 이루어진 앵타머를 수득하였다.
- [0049] 또한, 이때 타겟 단백질과의 결합에 참여하는 필수적인 앵타머 서열은 상기 (2) 단계 이후, 핵산 외부 가수분해효소 처리로 절단된 앵타머 서열 및 상기 타겟 단백질과 결합하고 있는 앵타머 서열에 대한 시퀀싱 분석을 수행하여 확인 및 결정할 수 있다.
- [0050] 상기 시퀀싱 분석은 상기 핵산 외부 가수분해효소 처리 후, 일정 시간마다 반응액 일부를 취해 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 및 NGS(next generation sequencing) 분석 등을 통해 잘려진 앵타머의 길이 및 서열 정보를 확인할 수 있다.
- [0051] 앵타머와 타겟 단백질의 결합체에 대해 핵산 외부 가수분해효소를 각각 처리하면, 타겟 단백질과 결합하고 있는 앵타머 서열은 타겟 단백질에 의한 구조적 방해로 핵산 외부 가수분해효소가 작용할 수 없어 상기 효소에 의한 앵타머 서열의 가수분해효소가 중지되며, 반면 타겟 단백질과 결합에 참여하지 않은 앵타머는 핵산 외부 가수분해효소에 의해 3' 말단 또는 5' 말단으로부터 완전히 가수분해된다. 따라서 본 발명에 따른 인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation)방법을 수행할 경우, 타겟 단백질과의 결합에 실질적으로 참여하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된(truncated) 앵타머를 얻을 수 있다.
- [0052] 그러므로 본 발명은 본 발명의 인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation) 방법으로 생성된 타겟 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된(truncated) 앵타머를 제공할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명의 인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션 방법을 통해 베스핀을 타겟 단백질로 하여, 상기 베스핀 단백질의 결합에 실질적으로 참여하는 서열번호 3 및 서열번호 4의 트런케이션된 앵타머를 제조하였다.
- [0054] 상기 서열번호 3의 트런케이션된 앵타머는, 76 mer 크기의 베스핀 결합 V1 앵타머(서열번호 1)에서 핵산 외부 가수분해효소 III 처리로 비필수적인 서열이 가수분해되어 44 mer 크기의 V1(3')-44 앵타머로 절단되었고, 이후 T5 핵산 외부 가수분해효소 처리로 비필수적인 서열이 가수분해되어 최종적으로 26 mer 크기의 V1(3'-5')-26 절단된 앵타머로 제조된 것이다.
- [0055] 또한, 상기 서열번호 4의 트런케이션된 앵타머는, 66 mer 크기의 베스핀 결합 V49 앵타머(서열번호 2)에서 핵산 외부 가수분해효소 III 처리로 비필수적인 서열이 가수분해되어 50 mer 크기의 V49(3')-50 앵타머로 절단되었고, 이후 T5 핵산 외부 가수분해효소 처리로 비필수적인 서열이 가수분해되어 최종적으로 30 mer 크기의 V49(3'-5')-30 절단된 앵타머로 제조된 것이다.
- [0056] 또한 본 발명의 다른 일실시예에서는, 베스핀 타겟 단백질과 결합에 참여하는 필수적인 서열로 구성된 트런케이션된 앵타머에 대해, 결합 특이성 및 결합 친화도를 분석하였다.
- [0057] 그 결과, 트런케이션 과정을 수행하지 않은 앵타머에 비해 본 발명의 방법으로 트런케이션된 앵타머가 타겟 단백질에 대한 결합 친화도가 현저하게 높은 것으로 나타났으며, 트런케이션된 앵타머는 타겟 단백질에 대해서만 결합 특이성을 갖는 것으로 나타났고, 타겟 단백질이 아닌 단백질에 대해서는 결합하지 않는 것으로 나타났다.
- [0058] 이를 통해 본 발명자들은 본 발명의 방법으로 트런케이션된 앵타머를 이용할 경우, 타겟 단백질을 보다 높은 결합 특이성 및 결합 친화도로 타겟 단백질을 효율적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0059] 따라서 본 발명은 본 발명의 방법으로 트런케이션된 앵타머를 포함하는, 타겟 단백질 검출용 키트를 제공할 수 있다.

- [0060] 본 발명에 따른 트런케이션된 앵타머는 타겟 단백질을 직접 검출하는데 사용되거나 생물학적 시료에서 타겟 단백질을 검출하는데 사용될 수 있으며, 나아가 질병의 진단에도 사용될 수 있다.
- [0061] 상기 생물학적 시료는 타겟 단백질을 검출하고자 하는 시료라면 모든 시료를 포함할 수 있다. 일례로, 상기 시료는 포유동물 유래 시료일 수 있고, 구체적으로 인간 유래 시료일 수 있다. 또한, 상기 시료는 혈액, 체액, 타액, 누액, 요액, 활액, 점액, 세포 및 조직으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 시료는 본 발명에 따른 방법에 사용되기 전에 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피, 액체 크로마토그래피, 연속추출, 원심분리 또는 겔 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 타겟 단백질 검출용 키트는 타겟 단백질과 특이적으로 결합하는 트런케이션된 DNA 앵타머와 타겟 단백질의 복합체를 검출하는 방법에 기초한다.
- [0064] 또한 본 발명의 상기 키트는 시료 중의 타겟 단백질 검출에 키트를 사용하기 위한 설명서 또는 라벨을 추가로 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 상기 키트는 이에 포함되는 DNA 앵타머의 세척이나 복합체의 분리 등과 같은 이후 단계를 용이하게 하기 위해 고정 기질에 결합될 수 있다. 이때, 고정 기질로는 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기관, 금속기관, 유리섬유, 미세구체 또는 미세비드가 사용될 수 있다. 또한, 합성수지로는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 또는 나일론 등이 사용될 수 있다.
- [0066] 또한, 상기 키트는 당업자에게 알려진 종래의 제조방법에 의해 제조될 수 있으며, 버퍼, 안정화제, 불활성 단백질 등을 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 시약의 양을 탐색하기 위해 검출체로서 부착된 형광물질의 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법 또는 검출체로서 부착된 방사선 동위원소의 방사선을 검출함으로써 수행되는 방사선법을 통한 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템, 검출체의 표지 없이 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법 또는 SPR 시스템을 영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법 등을 이용할 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명의 트런케이션된 DNA 앵타머는 고정화된 기관(substrate)을 포함하는 바이오 센서 및 센서칩의 형태로 제작되어 타겟 단백질을 검출 하는데 사용될 수 있다.
- [0068] 상기 “바이오 센서 및 센서칩”은 기관의 특정 영역에 특정 물질이 고정되도록 부착된 센서 및 칩을 의미한다. 본 발명에서 바이오 센서 및 센서칩의 “기관”은 적합한 견고성 또는 반-견고성을 갖는 지지체를 의미하며, 예컨대, 유리, 막(membrane), 슬라이드, 필터, 칩, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명의 DNA 앵타머는 상기 기관상에 배열되고 고정화될 수 있다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유결합적 방법에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, DNA 올리고뉴클레오타이드는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 유리 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 DNA 올리고뉴클레오타이드는 링커(예를 들어, 에틸렌글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기관에 결합될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 일실시예에서는, 기관 상에 앵타머-표적(타겟 단백질)-앵타머의 샌드위치형 결합을 형성하도록 하여, 샌드위치형 검출 센서를 제조하였고, 타겟 단백질의 검출 가능성을 실험을 통해 확인하였다.
- [0071] 샌드위치 타입의 센서의 경우, 하나의 타겟물질에 대하여 서로 다른 부위에 결합하는 두 개의 다른 리셉터(또는 앵타머)가 필요하다. 샌드위치 타입의 바이오센서는 센서의 민감도를 향상시킬 수 있는 수단이 형광물질, 양자점, 방사능 표지, 금 나노입자, 효소, 효소 기질, 및 전기화학적 작용기(electrochemical functional group)로 표지함으로써 다양하여 광범위하게 사용된다. 따라서 앵타머를 사용한 샌드위치 타입의 바이오센서는 하나의 타겟물질의 다른 부위에 결합하는 2종 이상의 듀얼 앵타머가 필요하다.
- [0072] 이러한 점에서 본 발명의 일실시예에서는 베스핀 타겟 단백질에 높은 결합력으로 결합할 수 있는 트런케이션된 앵타머를 제조하였고, 제조된 2종의 서로 다른 앵타머를 샌드위치 타입의 베스핀 단백질 검출용 센서의 제조에 사용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0073] 나아가 본 발명은, (1) 베스핀(vaspin) 단백질 및 상기 베스핀 단백질과 결합 가능한 앵타머를 혼합하여 앵타머와 베스핀 단백질의 결합체를 형성하는 단계; (2) 상기 앵타머와 베스핀 단백질의 결합체에 핵산 외부 가수분해

효소 III(exonuclease III) 및 T5 핵산 외부 가수분해효소(T5 exonuclease)를 순차적으로 처리하여 베스핀 단백질과 결합하지 않는 앵타머의 비필수적 서열을 제거하는 단계; 및 (3) 베스핀 단백질과 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된(truncated) 앵타머의 서열을 시퀀싱하는 단계를 포함하는, 인시츄(in situ) 앵타머 트런케이션(truncation) 방법으로 베스핀 단백질에 결합하는 트런케이션된(truncated) 앵타머를 제조하는 방법을 제공할 수 있다.

[0074] 본 발명에서 상기 '베스핀(vaspin)'이란, 아디포사이토카인(adipocytokine)으로 알려졌으며, 폴 네임은 'visceral adipose tissue-derived serpin (vaspin)'의 단백질로서, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0075] 또한 본 발명은 상기 방법으로 제조된 베스핀 단백질에 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된 DNA 앵타머를 제공할 수 있으며, 구체적으로 상기 베스핀 단백질에 결합하는 필수적인 서열로 이루어진 트런케이션된 DNA 앵타머는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0076]

[0077] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0079] <재료 준비>

[0080] 모든 올리고뉴클레오타이드는 Bioneer Co.(대전, 한국)의 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)을 사용하여 합성 및 정제하였다. 올리고뉴클레오타이드를 PCR 등급의 물에 용해시키고 Nanodrop 2000 분광광도계(Thermo Scientific)를 사용하여 농도를 측정하여 사용하였다. 또한 vaspin, adiponectin, visfatin (nampt), retinol-bind Protein 4 (RBP4) 및 Resistin을 포함한 모든 아디포카인은 Adipogen에서 구입하여 사용하였다. 인간 혈청 알부민(HSA) 및 기타 화학 물질은 명시하지 않는 한 Sigma-Aldrich에서 구입한 것을 사용하였다. 엑소뉴클레아제 III(Exo III) 및 T5 엑소뉴클레아제(T5 Exo)(둘 다 E. coli에서 유래)는 New England Biolabs에서 구입한 것을 사용하였다.

[0082] <실시예 1>

[0083] 앵타머 - 단백질 결합체에 대한 비필수적 서열 유도 앵타머 인시츄 트런케이션 수행 및 트런케이션된 앵타머 확인

[0084] 본 발명자들은 베스핀(Vaspin) 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머인 V1 및 V49 앵타머를 이용하여 본 발명에서 고안한 비필수적 서열 유도 인시츄 트런케이션을 수행하였다. 이때 V1 및 V49 앵타머는 각각 76-mer 및 66-mer로 서열은 아래와 같다.

[0085] V1 앵타머 서열(서열번호 1):

[0086] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGGCGCCTGGGGCGGGCCGCGATGGGATCCGAGCTCCACGTG-3'

[0087] V49 앵타머 서열(서열번호 2):

[0088] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCGGTGGCTCTAGGGCCTATCGTTGCGCCGACGGATCCGAGCTCCACGTG-3'

[0090] <1-1> 핵산 외부 가수분해효소 III의 처리

[0091] 상기 앵타머는 베스핀 단백질(Vaspin, 에디포젠 사의 바스핀 단백질, Prod. No. AG-40A-0064Y)과 함께 버퍼용액(20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂)에 넣고 혼합하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 또한 베스핀 단백질 대신 동일량의 버퍼용액을 첨가한 균을 대조군으로 사용하였다. 이후, 타겟 단백질에 결합하지 않는 앵타머의 부위를 제거하기 위하여, 위의 혼합액에 핵산 외부 가수분해효소 III (Exo III)의 최종 농도가 1 U/μL 되도록 첨가한 후, 상온에서 반응시켰다. 이때, 항온조절기로 온도를 정확하게 25℃로 설정하여 수행하였다. 일정 시간마다 혼합액의 5 μL을 취하고 여기에 포름아마이드 로딩 버퍼 용액(75% formamide, 10% glycerol, 0.125% SDS, 25 mM EDTA, and 0.05% bromophenol blue) 10 μL를 첨가하여 효소 반

응을 정지시켰다.

[0092] 이후 상기 혼합액 15 μ L를 95 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 열처리 후, 20% 변성 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)에 샘플을 로딩하였다. 이때 PAGE 겔은 20% PAGE 용액(바이오솔루션 사의 DNA-PAGE 20% (19:1) ULTRA PURE, Prod. No. BD011) 12 mL에 20% APS 30 μ L와 TEMED 10 μ L를 첨가하고 유리 겔 카세트에서 1시간 동안 겔을 만들었다. 또한, 샘플 로딩 시, 직접 만든 ssDNA 사이즈 마커 15 μ L도 함께 로딩하였다. 직접 만든 ssDNA 사이즈 마커는 각각 1 μ M의 20-, 23-, 26-, 29-, 32-, 35-, 40-, 44-, 50-, 55- 및 60-nt의 가닥으로 이루어져 있으며, 이는 V1 앵타머의 뉴클레오타이드를 3' 말단으로부터 제거해서 만들어졌다(표 1 참조). 샘플을 로딩한 겔은 15 V/cm의 속도로 1X TBE 완충용액에서 2시간 30분 동안 전기영동 시켰다. 이후, 겔 염색용액(1X GelRed)에 5분 동안 염색하고, GelDoc 기기로 확인하였다.

표 1

직접 만든 ssDNA 사이즈 마커의 서열

Size (nt)	Sequence (5' - 3')
60	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGGGCGGGCCGCCGATGGG
55	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGGGCGGGCCGCCG
50	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGGGCGGGC
44	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGG
40	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCC
35	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGG
32	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGG
29	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGG
26	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTG
23	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATG
20	CGTACGGAATTCGCTAGCTG

[0093]

[0095] 전기영동 분석에서 대조군에는 아무것도 남아있지 않는 것으로 나타났고, 본 발명의 베스핀 단백질을 첨가한 실험군에는 밴드가 남아있는 시간 조건에서 남은 서열의 길이를 사이즈 마커와 비교하여 확인하였다.

[0096] 또한, NGS(Next Generation Sequencing)을 위한 샘플 준비를 위해, 상기 혼합액 20 μ L에 25mM EDTA 용액 40 μ L를 첨가하여 효소 반응을 정지시켰고, 이를 정제 및 농축 키트(Norgen Biotek 사의 oligo clean-up and concentration kit, Prod. No. 34100)를 활용하여 샘플을 준비한 후, NGS를 수행하여 염기서열 정보를 획득하였다.

[0098] 분석 결과, 베스핀(Vaspin) 단백질에 대한 앵타머 V1는 핵산 외부 가수분해효소 III의 처리에 의해 절단되어 44-mer의 크기를 갖는 것으로 나타났고, 이를 본 발명자들은 'V1(3')-44'로 명명하였으며, 다른 앵타머인 V49는 50-mer의 크기를 갖는 것으로 나타나 이를 'V49(3')-50'로 명명하였다(도 2 및 도 4 참조).

[0100] <1-2> 핵산 외부 가수분해효소 T5의 처리

- [0101] 상기 핵산 외부 가수분해효소 III (Exo III) 처리가 완료된 후, 1차로 얻어진 V1(3')-44 및 V49(3')-50 절단 앵타머에 대하여 동일 조건에서, 핵산 외부 가수분해효소 T5 (T5 Exo)의 최종 농도가 0.1 U/ μ L이 되도록 처리하여 반응시켰다. 이때 사용한 효소가 핵산 외부 가수분해효소 T5인 것을 제외하고는 <1-1>과 동일한 조건에서 실험을 수행하였다. 또한 하기 표 2에는 상기 핵산 외부 가수분해효소가 처리된 절단된 앵타머(truncated aptamer) 샘플들에 대해 NGS 후, 카운팅된 수가 가장 많은 상위 5개의 서열을 나타낸 것이다.
- [0103] 분석 결과, 대조군에서는 효소 처리 후 시간이 지남에 따라 아무것도 남아있지 않는 것으로 나타났고, 실험군(단백질 타겟 처리군)에서는 앵타머 서열의 길이가 효소 처리에 의해 절단되어 줄어들다가 특정 길이에서 멈추는 것을 확인하였다. 또한, 이를 직접 만든 사이즈 마커와 비교하여 그 길이를 분석하였다.
- [0104] 그 결과, V1 앵타머의 경우, Exo III 처리에 의해 44 mer 길이의 V1(3')-44 앵타머가 T5 Exo 처리 후 26 mer 길이를 갖는 앵타머가 가장 많이 카운팅 된 것으로 나타나 이를 본 발명자들은 'V1(3' -5')-26 절단된 앵타머' 로 명명하였고, V49 앵타머의 경우, Exo III 처리로 50 mer 길이의 V49(3')-50 앵타머가 T5 Exo 처리 후 30 mer 길이를 갖는 앵타머가 가장 많이 카운팅 된 것으로 나타나 이를 'V49(3' -5')-30 절단된 앵타머' 로 명명하였다(도 3 및 도 5 참조).

표 2

베스핀 앵타머에 핵산 외부 가수분해효소 처리 후, NGS 분석결과

Sequence (5'-3')	Length (nt)	Percentage (%)
(A) V1 aptamer with Exo III		
CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGG	44	52
CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGG	45	5
CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGGC	46	5
CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGGCGGGCC	51	3
CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGG	43	2
(B) V1(3')-44 with Exo T5		
TGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGG	26	35
GTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGG	43	33
CGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGG	40	5
CTGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGG	27	5
GATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGG	25	3
(C) V49 aptamer with Exo III		
GTACGGAATTCGCTAGCGGTGGCTCTAGGGCCTATCGTTGCGCCGACGGA	50	66
GTACGGAATTCGCTAGCGGTGGCTCTAGGGCCTATCGTTGCGCCGACG	48	4
GTACGGAATTCGCTAGCGGTGGCTCTAGGGCCTATCGT	38	2
GTACGGAATTCGCTAGCGGTGGCTCTAGGGCCTATCGTT	39	2
GTACGGAATTCGCTAGCGGTGGCTCTAGGGCCTATCGTTG	40	1
(D) V49(3')-50 with Exo T5		
GGCTCTAGGGCCTATCGTTGCGCCGACGGA	30	34
GCTAGCGGTGGCTCTAGGGCCTATCGTTGCGCCGACGGA	39	8
GGTGGCTCTAGGGCCTATCGTTG	24	4
GTGGCTCTAGGGCCTATCGTTG	23	3
GTACGGAATTCGCTAGCGGTGGCTCTAGGGCCTATCGTTGCGCCGACGGA	50	2

* Percentage refers to the proportion of sequence counts in the total reads.

표 3

V1 및 V49 앵타머에 비필수적 서열 유도 앵타머 트رن케이션 수행 후, 최종 적으로 얻은 2종의 절단된 앵타머 서열

앵타머명	서열 (5' → 3')	서열번호
V1(3' -5')-26	TGATGGTGTGGCGGGGCGGCCTGGG	3
V49(3' -5')-30	GGCTCTAGGGCCTATCGTTGCGCCGACGGA	4

또한, 표 2에서 NGS 결과 얻어진 서열 정보 중 제일 카운팅 수가 많은 서열 정보와 도 2 내지 도 5의 PAGE 분석 결과에서 얻은 길이로 유출할 수 있는 서열 정보가 일치하는 것을 확인하였다.

[0110] <실시예 2>**[0111] 본 발명에 따른 트런케이션된 앵타머의 타겟 결합 특이성 확인**

[0112] 먼저 본 발명자들은 V1 앵타머를 베스핀(vaspin) 뿐만 아니라 다른 아디포카인 단백질들(adiponectin, visfatin, RBP4, and resistin) 및 HSA와 반응시킨 후, 비필수적 서열 유도 앵타머 트런케이션(truncation) 반응을 수행하였고, 그 결과를 PAGE 전기영동으로 확인하였다.

[0114] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, V1 앵타머는 베스핀(vaspin) 단백질과 결합한 샘플에서만 밴드를 보이는 것으로 나타났고, 다른 아디포카인들 및 HSA와 반응한 실험군에서는 밴드가 나타나지 않았다. 즉, 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 핵산 외부 가수분해효소에 의한 분해가 멈춘 것은 단백질 분자 자체에서 기인한 것이 아니라, 타겟 단백질과 앵타머와의 결합에 의한 것임을 알 수 있었다.

[0116] 또한, 본 발명자들은 상기 <실시예 1>에서 Exo III 및 T5 Exo의 처리에 의해 트런케이션된 베스핀에 대한 앵타머인 V1(3' -5')-26 절단된 앵타머 및 V49(3' -5')-30 절단된 앵타머에 대한 2차 구조를 Mfold 프로그램을 이용하여 분석하였다.

[0117] 그 결과, 도 7에 V1(3' -5')-26 절단된 앵타머의 2차 구조를 나타내었고, 도 8에 V49(3' -5')-30 절단된 앵타머의 2차 구조를 나타내었다.

[0119] 나아가 본 발명자들은 본 발명의 방법으로 트런케이션하여 수득한 V1(3' -5')-26 절단된 앵타머 및 V49(3' -5')-30 절단된 앵타머에 대해, 이들 앵타머가 다른 혈중 단백질에는 결합하지 않고 오직 베스핀(vaspin)에만 특이적으로 결합하는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 금침에 앵타머를 고정시켜서 SPR (Surface Plasmon Resonance) 장치를 이용하여 분석하였는데, 구체적으로, 50 mM의 3,3 '-디티오디프로피온산으로 칩의 금 표면에 카르복실기(-COOH)를 만든 다음, EDC/NHS를 이용하여 자기조립 단분자층(Self Assembly Monolayer)을 형성시켰다. 그 위에 스트렙타비딘을 고정시키고 바이오틴이 붙어있는 각각의 앵타머를 고정시켰다. 여기에 100 nM의 베스핀과 대조군 단백질들 및 HSA를 버퍼용액(20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂)으로 준비해서 흘려 반응시킨 후, 같은 버퍼용액으로 결합하지 않은 단백질을 씻어냈다. 최종적으로 SPR 결과를 분석하였다. 이때 대조군으로는 베스핀(vaspin)이 아디포카인 중의 하나에 해당되므로, 다른 아디포카인 단백질들인 Adiponectin, Nampt, RBP4, Resistin 및 HSA를 처리한 군을 사용하였다.

[0121] 그 결과, 도 9 및 도 10에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법으로 수득한 V1(3' -5')-26 절단된 앵타머 및 V49(3' -5')-30 절단된 앵타머는 베스핀(vaspin)에만 특이적으로 잘 결합하는 것으로 나타났고, 대조군으로 사용한 아디포카인에 속하는 다른 단백질들에 대해서는 결합력이 거의 없거나 미비한 것으로 나타났다.

[0123] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 앵타머와 단백질 결합에 있어서 비필수적 서열이 트런케이션된 본 발명에 따른 V1(3' -5')-26 절단된 앵타머 및 V49(3' -5')-30 절단된 앵타머는 타겟 단백질인 베스핀(vaspin)에 대해서만 결합할 수 있는 우수한 결합 특이성이 있음을 알 수 있었다.

[0125] <실시예 3>**[0126] 본 발명의 방법으로 트런케이션된 앵타머의 타겟 단백질에 대한 높은 친화도 확인**

[0127] 나아가 본 발명자들은 본 발명의 방법으로 트런케이션시켜 수득한 2종의 앵타머인 V1(3' -5')-26 절단된 앵타머 및 V49(3' -5')-30 절단된 앵타머에 대하여, 베스핀 타겟 단백질에 대한 결합 친화도 분석을 수행하였다. 이를 위해, 상기 실시예 2에서 수행한 방법과 동일하게 금침에 앵타머를 고정시킨 후, 0 nM부터 400 nM (또는 800 nM) 까지 서로 다른 농도의 베스핀(vaspin)을 버퍼용액(20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 2 mM

MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂)에서 흘려 반응시킨 후, 같은 버퍼용액으로 결합하지 않은 단백질을 씻어냈다. 해리상수를 구하기 위해서 각각의 반응 정도는 비선형 회귀법과 단일 부위 포화형 리간드 결합법으로 SigmaPlot을 이용하여 플로팅(plotting) 하였고, $Y=B_{max} \cdot X^h / (K_d^h + X^h)$ 계산식을 이용하여 분석하였다(y는 포화도, B_{max}는 최대 결합 위치, K_d는 해리상수, X는 결합하지 않은 vaspin, h는 hill slope 상수).

[0129] 그 결과, V1(3' -5')-26 절단된 앵타머 및 V49(3' -5')-30 절단된 앵타머의 K_d 값은 각각 55nM 및 170 nM인 것으로 나타났고, 이는 베스핀(vaspin)에 강력하게 결합하는 것으로 확인되었다. 한편, 이러한 베스핀에 대한 결합 친화되는 본 발명의 방법으로 트런케이션 시키지 않은 앵타머인 V1 앵타머(K_d, 150 nM) 및 V49 앵타머(K_d, 240 nM) 보다 월등하게 향상된 결합 친화도임을 알 수 있었다(도 11 및 도 12 참조).

[0131] <실시예 4>

[0132] 본 발명의 방법으로 트런케이션된 앵타머들이 서로 다른 결합 부위에서 타겟 단백질에 대한 동시 결합 확인

[0133] 다음으로 본 발명자들은 상기 실시예에서 2종의 핵산 외부 가수분해효소를 처리하여 제조한 V1(3' -5')-26 절단된 앵타머 및 V49(3' -5')-30 절단된 앵타머에 대하여 타겟 단백질인 베스핀에 대한 결합 부위 확인을 위해 ELASA 실험을 수행하였다. 이를 위해 트런케이션을 수행하지 않은 앵타머 쌍 및 트런케이션된 앵타머 쌍을 이용하여 ELASA 분석을 통해 비교하였는데, 즉, 비오틴으로 표지된 1차 앵타머를 스트렙타비딘 코팅된 플레이트에 고정하여 표적을 포착하도록 하였고, 포획된 표적은 HRP가 결합된 2차 앵타머에 의해 결합되어 TMB 반응에 의해 생성된 신호와 함께 앵타머-표적-앵타머의 샌드위치형 결합을 형성하도록 하였다. 반응의 원리는 도 13A에 나타내었다.

[0135] 분석 결과, 트런케이션을 수행하지 않은 앵타머 쌍 및 트런케이션을 수행한 앵타머 쌍을 이용한 군들에 대한 베스핀 단백질과의 결합 신호를 분석하였는데, 도 13B에 나타난 바와 같이, 8개의 앵타머쌍을 이용한 군들 중에서 V49(3' -5')-30 절단된 앵타머를 1차 캡처 앵타머로 사용하고 V1(3' -5')-26 절단된 앵타머를 2차 앵타머로 사용한 군이 가장 높은 신호를 보이는 것으로 나타났고, 그 다음으로 V1(3' -5')-26 절단된 앵타머를 1차 앵타머로 사용하고, V49(3' -5')-30 절단된 앵타머를 2차 앵타머로 사용한 군이 높은 신호를 보이는 것으로 나타났

[0136] 도 13B의 결과를 통해 본 발명자들은 트런케이션을 수행하지 않은 앵타머를 사용하는 것에 비해 본 발명의 방법으로 트런케이션을 수행한 앵타머를 사용하는 것이 타겟 단백질을 보다 효과적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었고, V49(3' -5')-30 절단된 앵타머 및 V1(3' -5')-26 절단된 앵타머를 각각 1차 및 2차 앵타머로 사용하는 조합이 샌드위치 형태로 타겟 단백질을 가장 효과적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0137] 뿐만 아니라 본 발명의 앵타머쌍과 타겟 단백질과의 샌드위치형 결합 형태를 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM)으로 분석하였는데, 즉, 비오틴으로 표지된 V49(3'-5')-30 및 V1(3'-5')-26 절단된 앵타머는 각각 스트렙타비딘 코팅된 자성 비드(MB) 및 양자점(QD)에 접합되도록 하였으며 베스핀 타겟 단백질과 함께 배양한 경우, 강한 형광 신호를 관찰할 수 있었다. 반면, 완충액에서는 신호가 검출되지 않았다(도 13C).

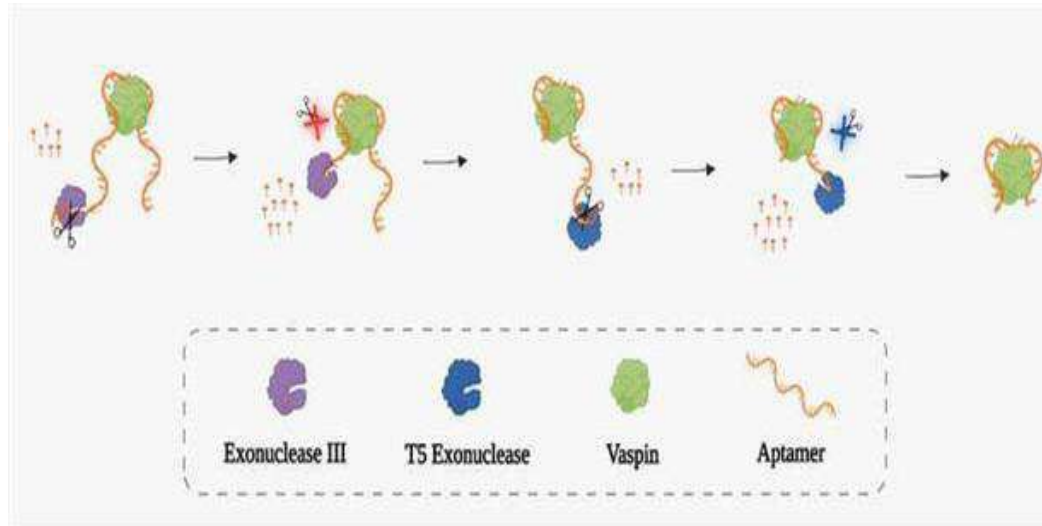
[0139] 이를 통해 본 발명자들은 본 발명의 방법으로 트런케이션된 앵타머 쌍은 타겟 단백질과 샌드위치 형태로 결합할 수 있어, 타겟 단백질과의 결합 부위가 상이하다는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 앵타머 쌍은 질병 진단을 위한 샌드위치형 전기화학적 앵타 센서 등에 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0141] 이상의 결과들을 통해 본 발명자들은 2 가지의 핵산 외부 가수분해효소를 이용하여 DNA 앵타머와 타겟 단백질의 결합 상태를 유지하면서 결합에 관여하지 않는 비필수적인 앵타머 부분을 절단시키는 본 발명의 앵타머 트런케이션 방법을 적용할 경우, 결합에 참여하지 않는 앵타머의 불필요한 서열을 제거할 수 있어 입체적인 장애를 줄일 수 있고, 앵타머의 타겟 단백질에 대한 결합력 및 친화도를 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 앵타머의 크기를 줄일 수 있어 적용 분야의 확장을 가능하게 할 수 있음을 알 수 있었다.

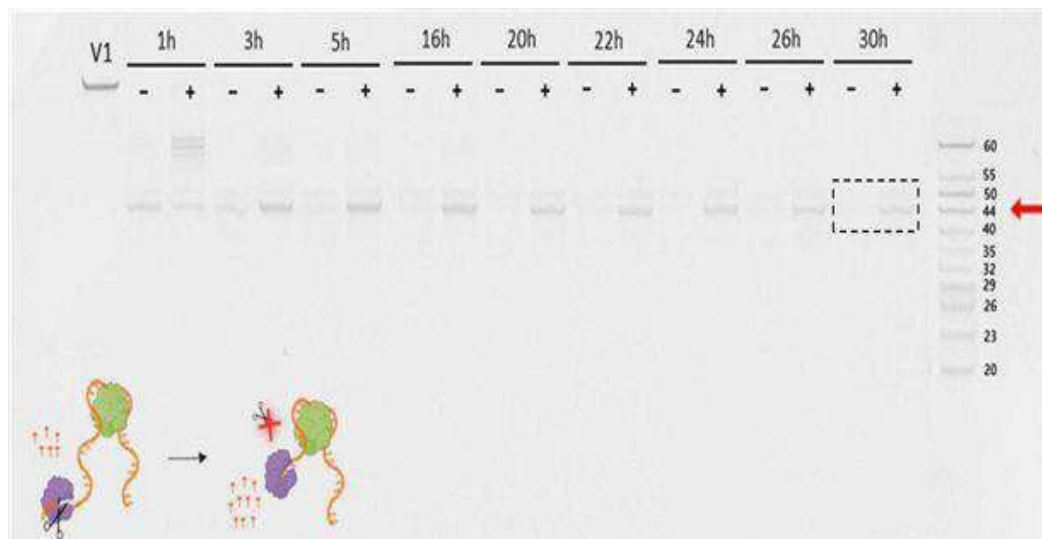
[0143] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

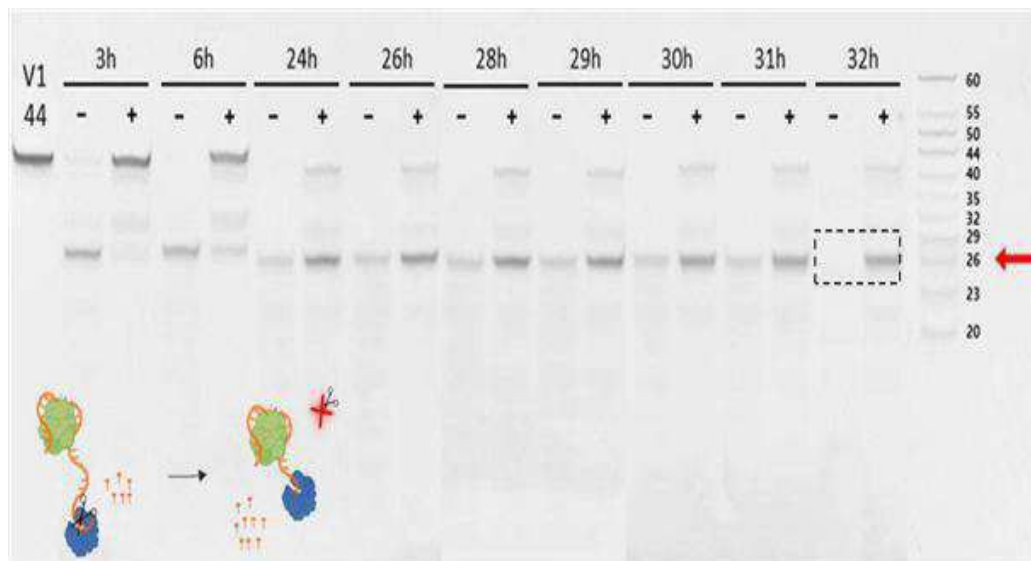
도면1



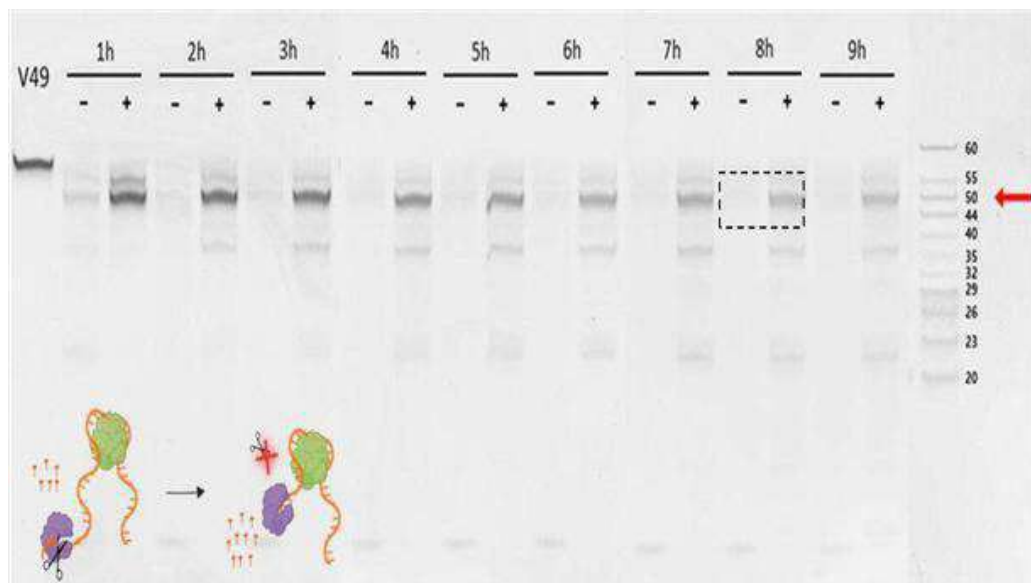
도면2



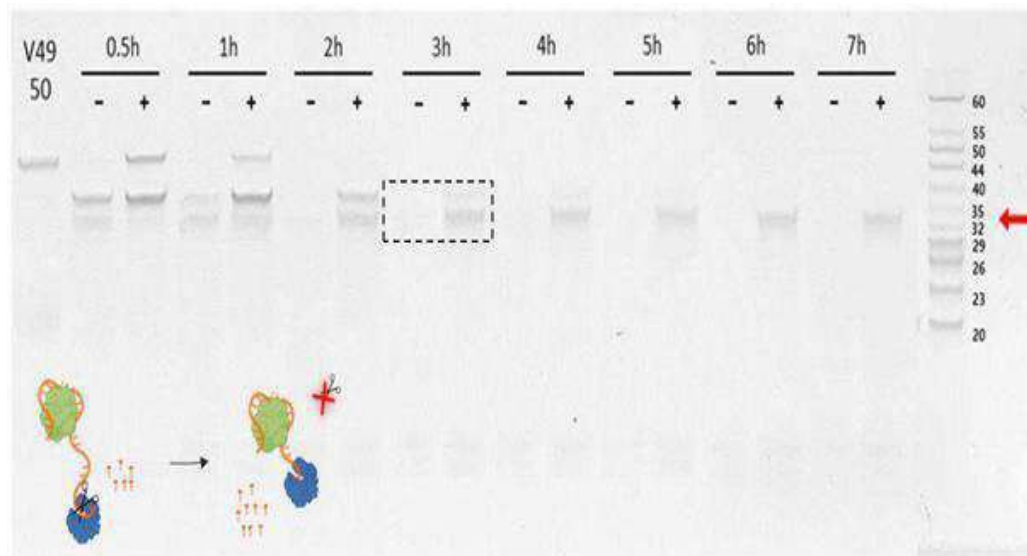
도면3



도면4

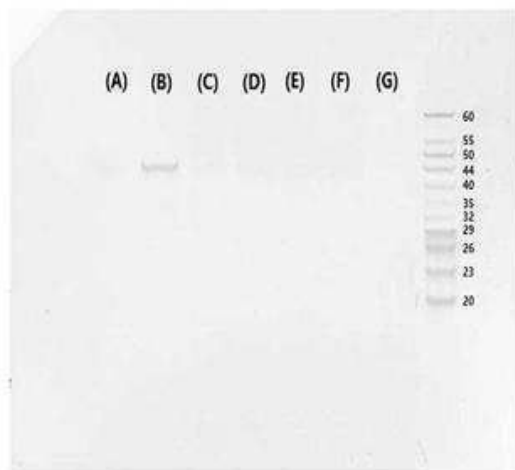


도면5

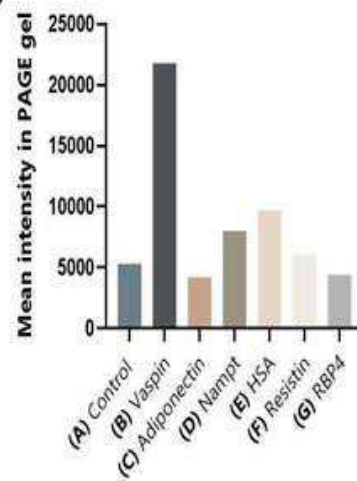


도면6

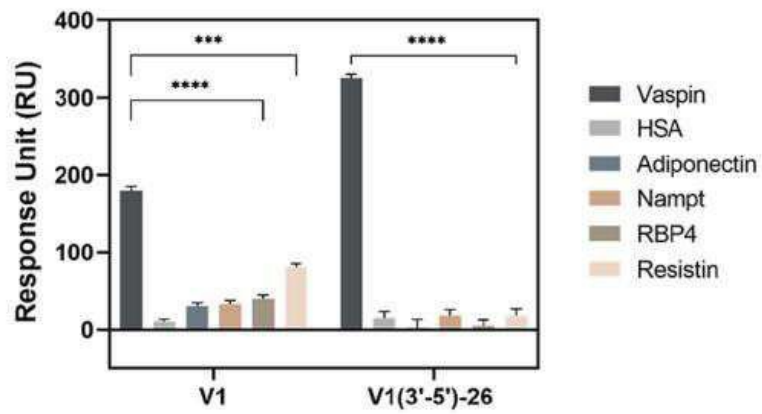
(가)



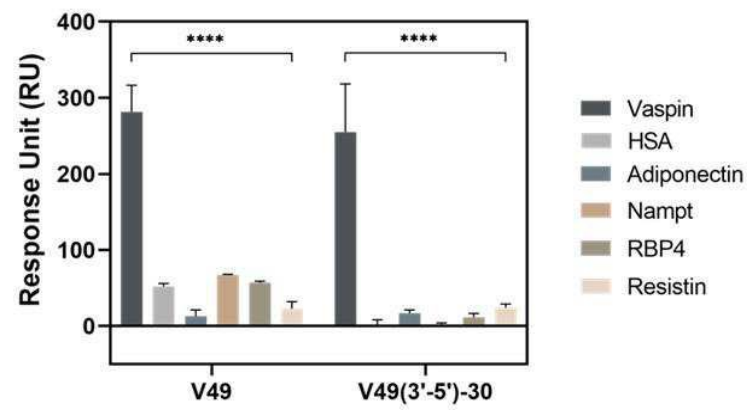
(나)



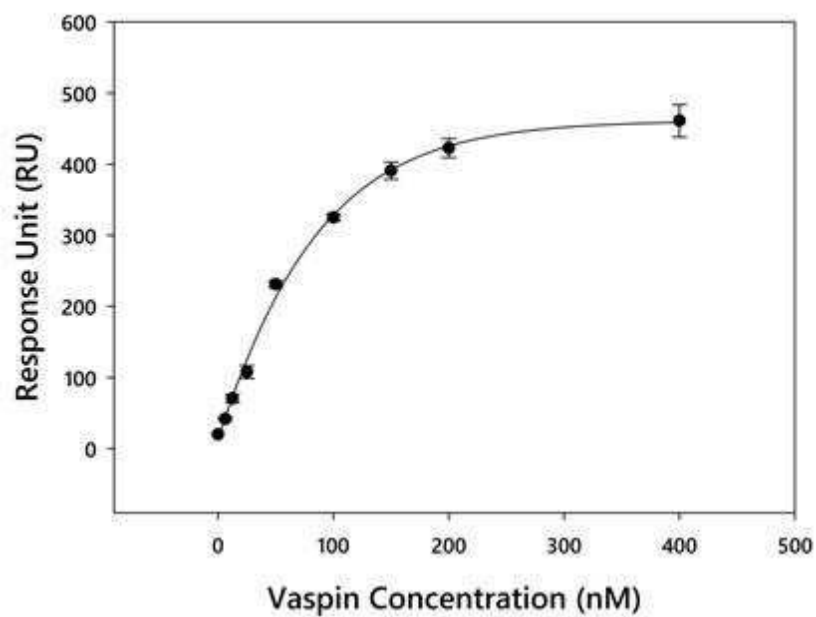
도면9



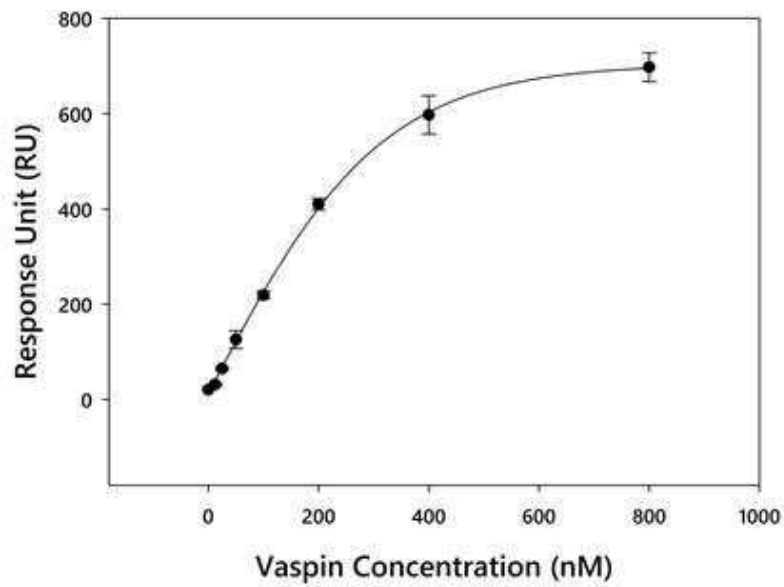
도면10



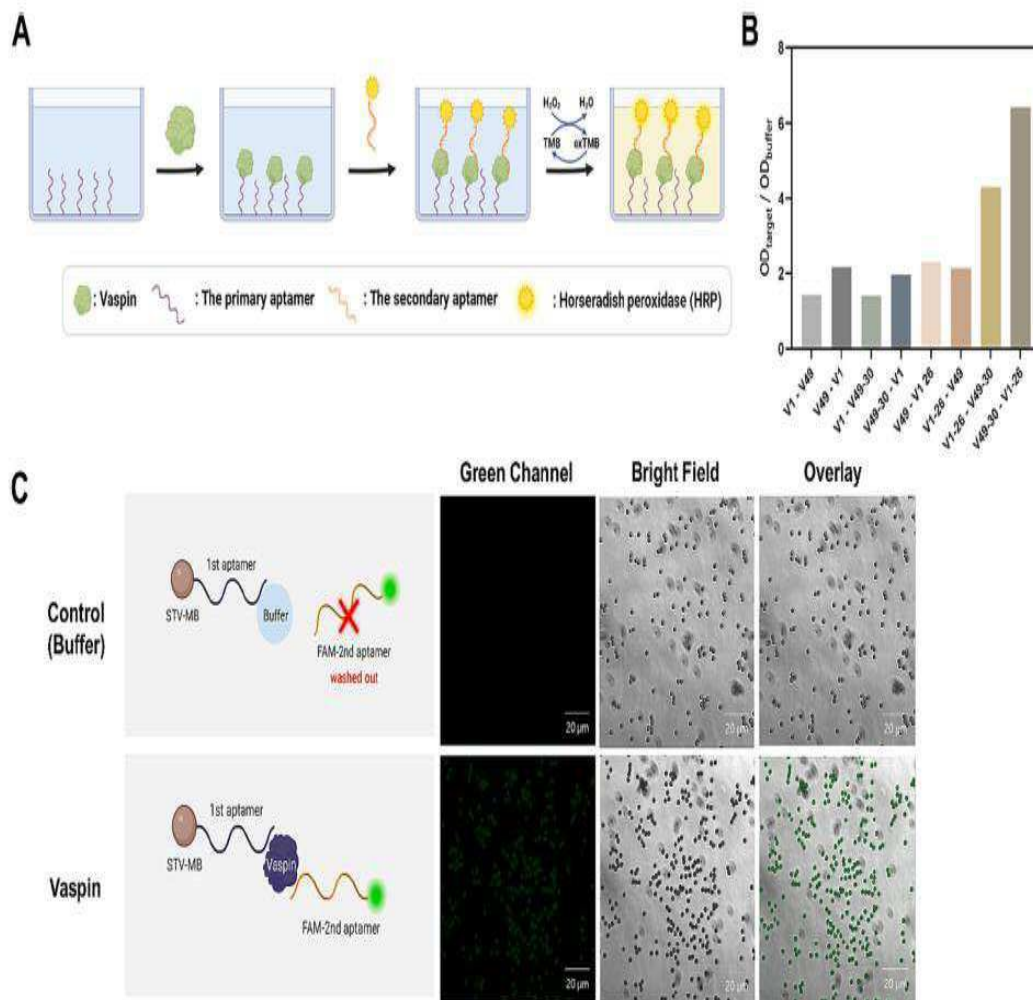
도면11



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.