



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0085386
(43) 공개일자 2017년07월24일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 33/68</i> (2006.01) <i>C12N 15/115</i> (2010.01)
 <i>G01N 33/543</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>G01N 33/6887</i> (2013.01)
 <i>C12N 15/115</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0004954
 (22) 출원일자 2016년01월14일
 심사청구일자 2016년01월14일</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 구만복
 서울특별시 용산구 이촌로 100-8, 105동 1301호 (이촌동, 동아그린아파트)</p> <p>김소연
 충청북도 청주시 청원구 주성로118번길 28, 103동 1005호 (울량동, 삼성아파트)</p> <p>(74) 대리인
 이처영, 장제환</p> |
|---|---|

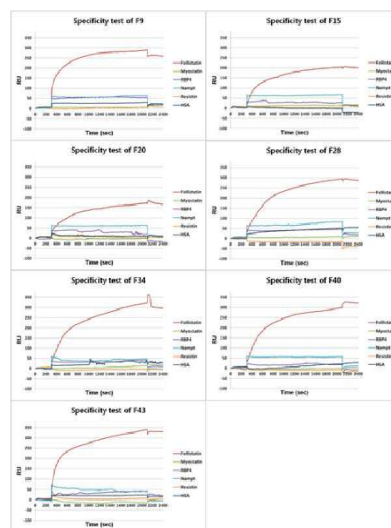
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머 및 그 용도**

(57) 요약

본 발명은 폴리스타틴 (follistatin)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 폴리스타틴 검출용 핵산 앵타머, 이를 포함하는 폴리스타틴의 검출방법, 검출용 조성물, 검출용 센서 및 검출용 키트는 폴리스타틴 앵타머의 폴리스타틴에 대한 높은 특이성과 결합력을 바탕으로 시료내 존재하는 폴리스타틴의 검출에 유용하다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

G01N 33/54306 (2013.01)

G01N 2800/10 (2013.01)

G01N 2800/36 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 가지는, 폴리스타틴 (follistatin)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머:

여기서, 상기 핵산 앵타머가 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U임을 특징으로 함.

청구항 2

제1항의 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 폴리스타틴 (follistatin)의 검출방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 뇨로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 폴리스타틴 (follistatin)의 검출방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 검출은 금 나노입자 기반의 색도 분석 방식으로 검출하는 것을 특징으로 하는 폴리스타틴 (follistatin)의 검출방법.

청구항 5

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 폴리스타틴 (follistatin) 관련 질환의 진단용 조성물.

청구항 6

제6항에 있어서, 폴리스타틴 (follistatin) 관련 질환은 근육병 또는 임신합병증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항의 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 고상 담체는 기관, 수지, 플레이트, 필터, 카트리지, 컬럼 및 다공재질인 고상 담체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 기관은 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기관, 유리 기관, 아파타이트 (apatite) 기관, 실리콘 기관, 금 기관, 은 기관 및 알루미늄 기관으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합

체.

청구항 10

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 폴리스타틴 (follistatin) 검출용 조성물.

청구항 11

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 폴리스타틴 (follistatin) 검출용 센서.

청구항 12

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 폴리스타틴 (follistatin) 검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리스타틴 (follistatin)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 폴리스타틴에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 7종의 핵산 앵타머와 이를 이용한 폴리스타틴 검출방법 및 검출용 조성물, 센서, 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폴리스타틴 (follistatin)은 액티빈-결합 단백질로도 명명되며, 액티빈 (activin)에 결합하여 이의 작용을 억제하는 것으로 잘 알려져 있다. 그런데, 폴리스타틴은 액티빈뿐만 아니라 마이오스타틴 (myostatin) 및 GDF11 (growth differentiation factor 11)에도 결합하여 이들의 작용을 억제한다는 것이 알려져 폴리스타틴에 대한 관심이 커지고 있다. 마이오스타틴과 GDF11은 근육 성장을 억제하는 단백질이며, 이들의 수준이 낮은 경우 심장근이 비대해진다는 것이 보고되어있다. 이에, 심장질환 환자에서, 건강상의 혜택이 위험보다 더 크다고 보이면, 폴리스타틴을 제거하여 폴리스타틴과 결합하지 않은 상태의 마이오스타틴 및 GDF11의 수준을 높이는 것이 하나의 치료방법으로 제안되었다. 한편, 폴리스타틴은 배아 발생 및 생식에도 관여하는 것으로 보고된 바, 혈청내 폴리스타틴의 농도는 임신 초기부터 임신 경과에 따라 증가하는 것으로 나타나 임신상태의 유지에도 관여할 것으로 제안되었다 (Wakatsuki M et al., J Clin Endocrinol Metab, 81(2):630-4, 1996). 또한, 폴리스타틴은 뇌하수체, 자궁, 신장, 폐, 뇌, 흉선, 부신, 소화관, 심장, 골, 간, 비장, 췌장 등의 여러 조직에서 검출되므로 근육 성장 및 생식뿐만 아니라 다양한 생명 활동에 관여할 것으로 보여 앞으로 지속적인 연구가 필요한 실정이다.

[0003] 바이오센서 분야에서 이용되는 감지물질 중에서 항체는 민감도가 탁월하다는 장점이 있다. 그러나 항체를 이용하기 위해서는 타겟물질(항원)을 동물에 주입한 후 생체의 면역시스템을 통해 만들어진 것을 정제해야하므로, 상당한 시간과 비용이 필요하다. 또한 앵타머가 타겟물질에 대한 제약을 받지 않고 합성할 수 있는 것에 비해, 독성물질과 같은 저분자 화합물질에 대한 항체의 제작에는 한계가 있다는 것도 감지물질로써 항체가 가진 단점이다. 그리고 일반적으로 항체의 크기는 100 KDa 이상의 큰 단백질이므로 전기화학 기반의 바이오센서로 응용시에 신호 검출 부분에 있어 제약이 있고, DNA나 다른 화합물질에 비해 열안정성이 현저히 떨어진다는 문제가 있다. 정리하면, 바이오마커의 진단에 있어 항체를 이용한 기술은 시간과 비용면에서 효율적이지 않고, 적용범위가 다양하지 않으며, 바이오센서로 응용하기에 제한적이라는 단점들이 있다. 이에, 새로운 감지물질로서 핵산 구조체인 앵타머에 관한 연구가 이루어지고 있다.

[0004] 앵타머 (aptamer)는 10^{12-14} 정도의 다양성을 가지는 랜덤 핵산 라이브러리로부터 얻어지며, 특정 타겟물질에 대한 높은 특이성과 친화성을 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA 분자 구조체를 말한다. 앵타머는 핵산 구조체이므로 열안정성이 우수하며, 시험관내 (in vitro)에서 합성되기 때문에, 동물이나 세포가 필요하지 않아 생산 비용면

에서도 경제적이며, 타겟물질에 제약이 없어, 바이러스, 단백질, 아미노산과 같은 생분자 물질부터 환경호르몬, 항생제, 잔류 의약품 등의 저분자 유기화학 물질 등의 다양한 타겟에 대한 합성이 가능하다. 이에 따라, 최근 들어, 여러 타겟물질에 대한 앵타머가 만들어지고 있으며, 앵타머를 이용한 신약 개발, 약물 전달 시스템 그리고 바이오센서 등의 다양한 분야에서 연구가 이루어지고 있다.

[0005] 앵타머 개발 방법에 있어서 가장 중요한 요소는 타겟물질에 결합한 DNA (혹은 RNA)와 결합하지 않은 DNA를 구별하는 것인데, 이를 위하여 타겟을 고정하거나 DNA 랜덤 라이브러리를 고정하여 DNA를 구별하는 방법이 시도되었다. 그러나 이러한 고정화 방식은 고정화 수율이 낮고 고정화 수율 자체를 분석하는데 많은 비용과 시간이 소모된다. 또한 고정화에 사용되는 분리용 물질 (자성 비드, 컬럼 등)에 DNA가 비특이적으로 결합할 가능성을 완전히 배제할 수 없으며 고정된 타겟에 결합한 DNA를 다시 분리해내는 과정에서 DNA 풀의 손실이 일어날 수 있다는 것 등이 여전히 문제이다. 그 외에도 중금속 이온 등은 고정화 자체가 어려워 고정화 방식을 이용한 앵타머의 합성은 타겟 선정에도 제약이 있을 수 있다. 이에, 고정화 방식의 한계를 극복하는 비고정화 방식의 앵타머 개발 기술이 시도되었다. 그러나 비고정화 방식의 미세전자기계 시스템 (MEMS), 모세관 전기이동 시스템 (Capillary Electrophoresis) 기술은 고가의 장비, 장치 사용의 복잡성, 숙련된 인력의 필요성 등의 문제점이 나타났다. 한편, 그래핀은 2차원 구조의 탄소 구조체이므로 열안정성, 전기적 특성 및 강도가 매우 우수하며, 단일가닥 DNA의 염기 부분과 -스태킹을 통해 결합하기 때문에 이런 특성을 응용한 광범위한 연구가 진행되고 있다.

[0006] 기존의 폴리스타틴의 검출에는 주로 폴리스타틴에 대한 항체가 이용되었다. 그러나, 폴리스타틴 항체를 이용한 검출은 고비용을 지불해야하며, 항체의 낮은 열안정성을 고려하여야 하며, 검출 결과를 얻기까지 비교적 오랜 시간이 필요하다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 종래기술의 문제점을 개선하고자 예의 노력한 결과, 비고정화방식 그래핀 SELEX를 이용하여 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머를 개발하였으며, 상기 폴리스타틴 핵산 앵타머가 폴리스타틴에 특이적으로 결합한다는 것을 폴리스타틴 앵타머가 고정된 금칩 (gold chip)과 자기공명장치인 SPR (Surface Plasmon Resonance) 분석을 통하여 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 핵산 앵타머를 이용한 폴리스타틴의 검출방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산 앵타머를 포함하는 폴리스타틴 관련 질환의 진단용 조성물을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산 앵타머를 포함하는 폴리스타틴 검출용 조성물, 센서, 및 검출용 키트를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 7중 어느하나의 염기서열을 가지는, 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 이용한 폴리스타틴의 검출방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 폴리스타틴 관련 질환의 진단용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 폴리스타틴 검출용 조성물, 센서, 및 검출용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따르면 폴리스타틴 검출용 핵산 앵타머, 이를 포함하는 폴리스타틴의 검출방법, 검출용 조성물, 검출용 센서 및 검출용 키트는 폴리스타틴 앵타머의 폴리스타틴에 대한 높은 특이성과 결합력을 바탕으로 시료내 존재하는 폴리스타틴의 검출에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 폴리스타틴에 특이적으로 결합 가능한 핵산 앵타머의 제조 과정을 나타낸 모식도이다.
 도 2는 각 선별과정에서 얻어진 폴리스타틴에 결합하는 ssDNA의 양이 증가함을 보여주는 그래프이다.
 도 3은 본 발명에 따른 서열번호 1의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
 도 4는 본 발명에 따른 서열번호 2의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
 도 5는 본 발명에 따른 서열번호 3의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
 도 6은 본 발명에 따른 서열번호 4의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
 도 7은 본 발명에 따른 서열번호 5의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
 도 8은 본 발명에 따른 서열번호 6의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
 도 9는 본 발명에 따른 서열번호 7의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
 도 10은 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머의 특이성을 SPR (Surface Plasmon Resonance) 장비로 분석하는 과정의 모식도이다.
 도 11은 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머의 특이성을 시간별로 SPR 분석한 결과이다.
 도 12는 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머의 특이성을 폴리스타틴을 기준으로 백분율로 환산한 SPR 분석 결과이다.
 도 13은 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 F43 앵타머의 결합력을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0021] 본 발명에서는, 폴리스타틴 (follistatin)에 특이적으로 결합이 가능한 핵산 앵타머를 선별하기 위하여 GO SELEX 프로세스를 수행하였다. 그 결과 서열번호 1 내지 7로 표시되는 핵산 앵타머가 상기 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명의 일 실시예에서는, 폴리스타틴에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 GO SELEX 프로세스를 이용하여 선별하였다.

[0022] 본 발명의 용어 "GO SELEX 프로세스"란 임의로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법 (J.W. Park, R.Tatavarty, D.W.Kim, H.T.Jung and M.B.Gu (2012), Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide, Chemical Communications, 48,15,2071-2073)을 말한다.

[0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 가지는, 폴리스타틴 (follistatin)에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머에 관한 것이다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 앵타머가 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U임을 특징으로 할 수 있다.

- [0025] 본 발명의 핵산 앵타머는, 폴리스타틴에 대한 결합성, 안정성 등을 높이기 위해, 각 뉴클레오타이드의 당 잔기 (예를 들어, 리보오스나 디옥시리보스)가 수식된 것이어도 좋다. 당잔기에서 수식되는 부위로서는, 예컨대 당잔기의 2'부위, 3'부위 및/또는 4'부위의 산소원자를 다른 원자로 치환한 것 등을 들 수 있다. 수식의 종류로서는, 예컨대 플루오로화, O-알킬화(예, O-메틸화, O-에틸화), O-알릴화, S-알킬화(예, S-메틸화, S-에틸화), S-알릴화, 아미노화(예, -NH)를 들 수 있다. 이러한 당잔기의 변형은, 자체 공지의 방법에 의해 행할 수 있다 (Sproat et al., (1991) Nucle. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145).
- [0026] 본 발명의 핵산 앵타머는 또한 폴리스타틴에 대한 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기 (예를 들면, 푸린, 피리미딘)가 변형 (예를 들면, 화학적 치환)된 것이어도 좋다. 이러한 변형으로서는, 예컨대, 5부위 피리미딘 변형, 6 및/또는 8부위 푸린 변형, 환외(環外) 아민에서의 변형, 4-티오우리딘으로의 치환, 5-브로모 또는 5-요오드-우리실으로의 치환을 들 수 있다.
- [0027] 또한, 뉴클레아제 및 가수분해에 대하여 내성을 갖도록, 본 발명의 핵산 앵타머에 포함되는 인산기가 변형되어 있어도 좋다. 예컨대, P(O)O기가, P(O)S(티오에이트), P(S)S(디티오에이트), P(O)NR2(아미데이트), P(O)R, R(O)OR', CO 또는 CH2(포름아세탈) 또는 3'-아민(-NH-CH2-CH2-)으로 치환되어 있어도 좋다. 여기서 각각의 R 또는 R'은 독립적으로, H이거나, 또는 치환되어 있거나, 또는 치환되어 있지 않은 알킬 (예, 메틸, 에틸)이다. 연결기로서는, -O-, -N- 또는 -S-가 예시되고, 이들의 연결기를 통하여 인접하는 뉴클레오타이드에 결합할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서의 변형은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다. 변형은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오시드, 미리스토일 (Myristoyl), 리소콜릭-올레일 (Lithocolic-oleyl), 도코사닐 (Docosanyl), 라우로일 (Lauroyl), 스테아로일 (Stearoyl), 팔미토일 (Palmitoyl), 올레오일 (Oleoyl), 리놀레오일 (Linoleoyl), 그 외 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 항암제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등을 말단에 부가함으로써 행해질 수 있다. 이러한 변형에 대해서는, 예컨대 미국특허 제5,660,985호, 미국특허 제5,756,703호를 참조한다.
- [0029] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 폴리스타틴에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 제조방법을 제공한다:
- [0030] a) 양끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 염기를 가지는 단일가닥 핵산 풀(pool)과 카운터 타겟물질을 완충용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;
- [0031] b) 상기 혼합액에 그래핀을 첨가하여 카운터 타겟물질에 결합하지 않는 단일가닥 핵산이 그래핀 표면에 흡착하도록 유도하는 단계;
- [0032] c) 상기 카운터 타겟물질에 결합하는 타겟 비특이적인 단일가닥 핵산을 제거하고, 폴리스타틴을 첨가하여 그래핀에 결합된 타겟 특이적인 단일가닥 핵산에 대해 타겟에 의한 배좌 변위(conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앵타머를 분리하는 단계;
- [0033] d) 상기 단계에서 얻은 타겟물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 핵산에 대해 상기 PCR용 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 증폭시키는 단계; 및
- [0034] e) 상기 단계에서 얻은 PCR 생산물로부터 단일가닥 핵산을 분리하고 상기 단일가닥 핵산을 a) 단계의 혼합액에 첨가하여 그래핀 기반 선별과정을 반복 수행하는 단계.
- [0035] 본 발명의 방법에서, 상기 d) 단계에서 프라이머 쌍 중 하나에 플루오레세인(fluorescein)이 붙여진 프라이머를 사용하는 것을 특징으로 한다.
- [0036] 또 다른 관점에서는, 본 발명의 핵산 앵타머를 치료와 접촉시키는 단계를 포함하는 폴리스타틴의 검출방법에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 치료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 뇨로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 치료는 포유류, 바람직하게는 인체에서 분리된 것으로, 최소 침습으로 확보가능한 치료 또는 분비체액, in vitro 세포배양액 성분 치료 등 폴리스타틴을 포함하

고 있을 수 있는 시료이면, 상기에 한정되지 않음은 자명하다. 보다 바람직하게는 혈액일 수 있다.

- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 검출은 금 나노입자 기반의 색도 분석 방식으로 검출하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 검출은 금 나노입자 표면을 변형하여 앵타머를 금 나노입자 표면에 공유결합 등으로 고정하여 타겟 물질이 있을 때 두 개 이상의 금 나노입자 거리가 서로 가까워짐으로 인해 응집(aggregation)이 일어나서 금 나노입자 용액의 색이 붉은색에서 푸른색 계열로 변하는 특징을 이용하거나, 변형되지 않은 금 나노입자 표면에 앵타머가 물리적으로 흡착되어 있다가 타겟 물질이 있을 때 흡착되어 있던 앵타머와 타겟과의 결합으로 인해 금 나노입자의 표면에서 떨어져 나오는 현상에 의해 색이 변하는 특성을 이용하여 폴리스타틴을 검출할 수 있다. 상기 검출은 또한, 금칩(gold chip)을 이용한 자기공명분석 SPR (Surface Plasmon Resonance) 장비로 폴리스타틴을 검출할 수 있다. 즉, 금칩 (gold chip)에 앵타머를 공유결합 등으로 고정하여 타겟 물질이 있을 때 증가하는 response unit 값을 측정하는 방식을 이용하여 폴리스타틴을 검출할 수 있다.
- [0039] 또 다른 관점에서는, 본 발명의 핵산 앵타머를 포함하는 폴리스타틴 관련 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 폴리스타틴 관련 질환은 근육병 또는 임신합병증인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 폴리스타틴은 근육 성장, 배아 발생 및 생식 등에 참여한다는 점으로 미루어 볼 때, 각종 질병과의 연관성 또한 높다. 특히, 자궁외임신이나 계류 유산인 경우에 정상 임신에 비해 혈중 폴리스타틴의 농도가 낮은 것으로 나타나 있다 (Daponte A *et al.*, *Dis Markers*, 35(5):497-503, 2013). 따라서, 본 발명의 폴리스타틴 진단용 조성물은 폴리스타틴 관련 질환을 진단하기 위해 사용할 수 있다.
- [0042] 상기 폴리스타틴 관련 질환의 진단은 상기 앵타머와 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 뇨 중에서 선택되는 시료와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 시료는 포유류, 바람직하게는 인체에서 분리된 것으로, 최소 침습으로 확보가 가능한 시료 또는 분비체액, in vitro 세포배양액 성분 시료 등 폴리스타틴을 포함하고 있을 수 있는 시료이면, 상기에 한정되지 않음은 자명하다.
- [0043] 또 다른 관점에서는, 본 발명의 핵산 앵타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체에 관한 것이다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 고상 담체는 기관, 수지, 플레이트, 필터, 카트리지, 컬럼 및 다공재질인 고상 담체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 기관은 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기관, 유리 기관, 아파타이트 (apatite) 기관, 실리콘 기관, 금 기관, 은 기관 및 알루미늄 기관으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 기관은 칩이나 단백질 칩 등에 사용되고 있는 것 등일 수 있고, 예컨대 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기관이나 유리 기관, 아파타이트 (apatite) 기관, 실리콘 기관, 금, 은 또는 알루미늄 기관 등으로, 이들의 기관에 폴리머 등의 코팅을 실시한 것을 들 수 있다.
- [0047] 상기 수지는 아가로스 (agarose) 입자, 실리카 입자, 아크릴아미드와 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체, 폴리스티렌 가교 디비닐벤젠 입자, 텍스트란을 에피클로로히드린으로 가교한 입자, 셀룰로오스파이버, 알릴텍스트란과 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 가교폴리머, 단분산계 합성폴리머, 단분산계 친수성폴리머, 세파로오스 (Sephrose) 또는 토요펄(Toyopearl) 등을 들 수 있고, 또한 이들의 수지에 각종 관능기를 결합시킨 수지를 사용할 수 있다.
- [0048] 상기 고상담체는 폴리스타틴의 정제, 폴리스타틴의 단백질의 검출 또는 정량에 유용할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 핵산 앵타머는 공지의 방법에 의해 고상담체에 고정할 수 있다. 예컨대, 친화성 물질이나 소정의 관능기를 본 발명의 앵타머에 도입하고, 계속해서 이 친화성 물질이나 소정의 관능기를 이용하여 고상담체에 고정화하는 방법을 들 수 있다. 소정의 관능기는 커플링 반응에 제공하는 것이 가능한 관능기일 수 있고, 예컨대 아미노기, 티올기, 히드록실기, 카르복실기를 들 수 있다. 예를 들어, 상기 앵타머의 말단에 바이오틴을 결합시켜 복합체를 형성하고, 상기 칩 등의 기관 표면에 스트렙타비딘을 고정화시켜, 상기 바이오틴과 기관 표면에 고정화된 스트렙타비딘의 상호작용에 의하여 상기 앵타머를 기관 표면에 고정화시킬 수 있다.

- [0050] 앵타머가 고정화된 고상담체를 이용하여 폴리스타틴 단백질을 검출하는 방법은, 예를 들어, 본 발명의 DNA 앵타머를 칩(chip)상에 형광물질, 발색물질 또는 항체 등과 함께 스팟팅 한 후 혈액샘플을 반응시킴으로써 검출 시료, 예를 들어, 혈액 중에 포함된 미량의 폴리스타틴의 수준을 신속하게 측정할 수 있다. 또 다른 방법으로는 자성 비드에 상기 DNA 앵타머를 고정화시켜 폴리스타틴을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-폴리스타틴 복합체를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 폴리스타틴을 분리함으로써 폴리스타틴만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.
- [0051] 또 다른 관점에서는, 본 발명의 핵산 앵타머를 포함하는 폴리스타틴 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명의 폴리스타틴 검출용 조성물은 폴리스타틴을 검출하기 위한 것으로, 폴리스타틴의 검출을 위해 본 발명의 핵산 앵타머를 이용하여 어떠한 형태로도 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산 앵타머를 자성비드에 고정화시켜 폴리스타틴을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-폴리스타틴 복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 폴리스타틴을 분리함으로써 폴리스타틴만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.
- [0053] 본 발명의 조성물을 이용하는 폴리스타틴의 제거방법의 한 예를 들면, 상기 핵산 앵타머가 고정화된 자성비드를 컬럼(column)에 채운 후 폴리스타틴을 포함하는 시료를 통과시켜 폴리스타틴만을 선택적으로 제거할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 다른 실시 예에서는 상기 서열번호 1 내지 7으로 표시되는 핵산 앵타머 중 가장 높은 친화도를 보인 서열번호 7로 표시되는 핵산서열인 앵타머 F43에 대하여 SPR (Surface Plasmon Resonance) 분석을 수행한 결과, 폴리스타틴에 특이적으로 결합함을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 상기 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 폴리스타틴의 검출센서에 관한 것이다.
- [0055] 상기 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 검출 센서 시스템은, 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. 폴리스타틴 검출용 키트는 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있으며 이들은 부분적으로 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 용기는, 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있다. 용기는 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는, 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 따른 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 앵타머는 또한, 폴리스타틴만을 특이적으로 검출하는바, 이를 포함하여 폴리스타틴의 검출 또는 제거용 조성물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.
- [0057] 본 발명은 또 다른 관점에서, 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용한 폴리스타틴의 제거방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 양태에 따르면, 바람직하게는 상기 앵타머가 고정된 비드를 컬럼에 충전하고 폴리스타틴이 포함된 시료를 통과시켜 폴리스타틴을 제거할 수 있다.
- [0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 것이다.
- [0059] **실시예 1: 임의의 염기서열을 가지는 DNA pool 합성**
- [0060] 66mer DNA pool로서 양 끝에 PCR을 위한 프라이머 영역(primer region)이 있고 중앙에 임의의 염기를 가진 DNA pool을 아래와 같은 방법으로 합성하였다. 본 발명에 사용된 DNA pool은 Genotech Inc. Korea에 화학적으로 합성을 의뢰하였다.
- [0061] GCATTCAGAGCCATCCAC -random region- CCTGTTGCGTACGAATGG
- [0062] 서열번호 8: GCATTCAGAGCCATCCAC

[0063] 서열번호 9: CCATTCGTACGCAACAGG

[0064] **실시예 2: 폴리스타틴 (follistatin)에 특이적인 DNA 앵타머의 선별**

[0065] 상기 실시예 1에서 합성된 랜덤 DNA pool을 카운터 타겟 [Myostatin, Nampt (Nicotinamide phosphoribosyltransferase), RBP4 (Retinol-Binding Protein 4), Resistin, HSA (Human Serum Albumin)]과 버퍼용액 (20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.6, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.02% Tween20)에 넣고 혼합하여 30분간 상온에서 반응시킨 후 카운터 타겟과 결합하지 않은 DNA를 확보하기 위해 위의 혼합액과 그래핀 옥사이드 용액을 2시간 상온에서 반응시킨다. 이때 카운터 타겟과 결합하지 않은 단일가닥 DNA는 그래핀의 표면에 -스태킹을 통해 강력하게 흡착하게 된다. 원심분리를 통해 카운터 타겟과 결합한 DNA를 제거한다. 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 DNA를 확보하기 위해 그래핀만 있는 위 튜브에 폴리스타틴을 첨가한 후 2시간 상온에서 반응시킴으로서, 배좌 변위(conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앵타머를 분리한 후 에탄올 침전법으로 타겟 특이적 DNA를 확보하였다 (도 1). 이렇게 얻어진 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 DNA의 양을 측정하였다. 도 2에 개시된 바와 같이, 매 선별단계(selection round)에서, 주입 DNA의 양에 대비하여 선별 후 DNAR양이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0066] **실시예 3: 폴리스타틴에 결합 가능한 DNA 앵타머 pool의 제조**

[0067] 폴리스타틴과 특이적으로 결합하는 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생산물은 두 가닥의 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위하여, 아래와 같이 정방향 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.

[0068] forward (FP) 5'-fluorescein-GCATTTCAGAGCCATCCAC-3'

[0069] reverse (RP) 5'- CCATTCGTACGCAACAGG-3'

[0070] PCR 반응물을 정제키트 (purification kit)를 이용하여 정제한 후 이중가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드젤 전기영동을 실시하였다. 10%의 폴리아크릴아마이드 겔에는 6 M의 요소(urea), 20%의 포름아마이드(formamaid)가 포함되어 있어 전기영동 후에는 두 개의 밴드가 생기는데, 이는 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 플루오레세인이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다. 플루오레세인이 붙어 있는 DNA 밴드를 잘라내어 겔 추출(gel extraction)을 실시한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보하였다. 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음의 카운터 타겟 [Myostatin, Nampt (Nicotinamide phosphoribosyltransferase), RBP4 (Retinol-Binding Protein 4), Resistin, HSA (Human Serum Albumin)]이 녹아있는 버퍼용액과 혼합하여 새로운 선별과정을 시작한다. 이러한 과정의 모식도를 도 1에 나타내었고, 일련의 과정 (GO-SELEX process)을 한 번의 선별 (selection)이라 하면 총 3번의 선별과정을 거쳐 폴리스타틴에 결합하는 DNA pool을 얻었다. 최종적으로 얻어진 DNA pool을 Quiagen cloning kit를 이용하여 클로닝(cloning)하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행할 결과, 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 서로 다른 7종의 핵산 구조체를 확보하였다.

[0071] **실시예 4: 7종의 DNA 앵타머의 염기서열 분석 및 특이성 분석**

[0072] 폴리스타틴에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 7종의 DNA 염기서열을 분석한 결과를 하기 [표 1]에 제시하였다. 또한, 이 7종의 폴리스타틴 앵타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 3 내지 9에 나타내었다.

표 1

[0073] 폴리스타틴에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 7종의 DNA 앵타머의 염기서열

서열번호	앵타머	염기서열 (5'-3')
1	F9	GCATTTCAGAGCCATCCACCAGGGTCATTAATCTGGGGTATTATCGATGCCTGTTGCGTACGAATGG
2	F15	GCATTTCAGAGCCATCCACTATAATGAGTAAATAGTGCCAAACATATAACCTGTTGCGTACGAATGG

3	F20	GCATTCAGAGCCATCCACTAGGAGGGGTGGAAGGCCATATGGAACGCCTGTTGCGTACGAAT GG
4	F28	GCATTCAGAGCCATCCACGGGCCGTGCTGGAACATTCGATCAAGAGGTCCTGTTGCGTACGAAT GG
5	F34	GCATTCAGAGCCATCCACTGCTACTATGTACTTACTAAGCCTGTGCCACCTGTTGCGTACGAAT GG
6	F40	GCATTCAGAGCCATCCACGAAAGGTAGTGTGCACCTATGGCTCGACATCCTGTTGCGTACGAAT GG
7	F43	GCATTCAGAGCCATCCACGAGTAGGTGCGATTGGAATGTGTCGTCTGGCCTGTTGCGTACGAAT GG

[0074] 폴리스타틴에 결합하는 7종의 앵타머들이 카운터 타겟과는 결합하지 않고 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는지 알아보기 위하여 금칩 (bare gold chip)에 앵타머를 고정하고 SPR (Surface Plasmon Resonance)장치를 이용하여 조사하였다 (도 10). 먼저, 50 mM의 3,3'-디티오디프로피온산(3,3'-dithiodipropionic acid)으로 금칩의 표면에 카르복실기 (-COOH)를 만든 다음 EDC/NHS (EDC, N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimide, Sigma Co.; NHS, N-hydroxysuccinimid, Sigma Co.)를 이용하여 자기조립 단분자막 (Self Assembly Monolayer)을 형성시켰다. 그 위에 스트렙타비딘을 고정하고 바이오틴이 붙어있는 서로 다른 7종의 앵타머를 1 M 로 각각의 금칩에 코팅시켰다. 여기에 0.5 M 폴리스타틴 용액을 완충용액(20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.6, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.02% Tween20)안에서 각각 30분간 반응시킨 후 결합하지 않은 폴리스타틴을 동일한 완충용액으로 씻어내었다. 카운터 타겟 [Myostatin, Nampt (Nicotinamide phosphoribosyltransferase), RBP4 (Retinol-Binding Protein 4), Resistin, HSA (Human Serum Albumin)]도 같은 방법으로 수행하였다. 최종 SPR 결과를 분석한 결과, 7종의 폴리스타틴 앵타머들이 카운터 타겟에 비해 폴리스타틴에 월등하게 잘 결합하는 것을 확인할 수 있었다 (도 11, 도12, 표2). 즉, 특이성을 RU로 나타내었을 경우, F43이 339.9의 값으로 7종의 앵타머 중에서 가장 높은 특이성을 가진 것으로 나타났다. 이외의 6종의 앵타머 (F9, F15, F20, F28, F34 및 F40)는 모두 205.4 RU 이상의 수치를 보였는데, 이것은 카운터 타겟이 15.5 ~ 82.5 RU에 그치는 것과 비교하여 본 발명의 앵타머들이 특이성이 높다는 것을 확인시켜준다 (표 2).

표 2

[0075] 7종의 DNA 앵타머의 특이성 분석

Aptamer	Follistatin	Myostatin	RBP4	Nampt	Resistin	HSA
F9	290.034	6.035	53.832	63.877	7.106	31.356
F15	205.438	15.783	29.167	67.650	5.929	-2.808
F20	299.718	0.455	17.034	57.159	-7.783	20.168
F28	294.174	9.084	45.395	82.417	-15.504	51.230
F34	324.037	14.508	40.089	47.966	-5.449	30.473
F40	299.718	0.455	17.034	57.159	-7.783	20.168
F43	339.863	-15.501	40.003	42.825	9.071	22.429

[0076] 실시예 5: DNA 앵타머의 폴리스타틴과의 결합력 분석

[0077] 폴리스타틴에 각각 특이적으로 결합하는 서로 다른 7종의 앵타머 중에서 특이성이 가장 높은 F43 앵타머에 대한 폴리스타틴과의 결합 분석(binding assay)을 실시하였다.

[0078] 실시예 4에서와 같이 금칩(gold chip)에 1 M로 앵타머를 고정시킨 후 0 nM부터 200 nM의 서로 다른 농도의 폴리스타틴(follistatin) 용액을 완충용액 (20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.6, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.02% Tween20)에서 30분간 반응시켰다. 해리상수를 구하기 위해서 각각의 반응 정도는 비선형 회귀법과 단일 부위 포화형 리간드 결합법으로 Sigmaplot 8.0을 이용하여 플롯팅하고, 여기에 $y = B_{max} \cdot X / (K_d + X)$ 식을 이용하였다 (y는 포화도, B_{max}는 최대 결합 위치, K_d는 해리상수, X 는 결합하지 않은 폴리스타틴).

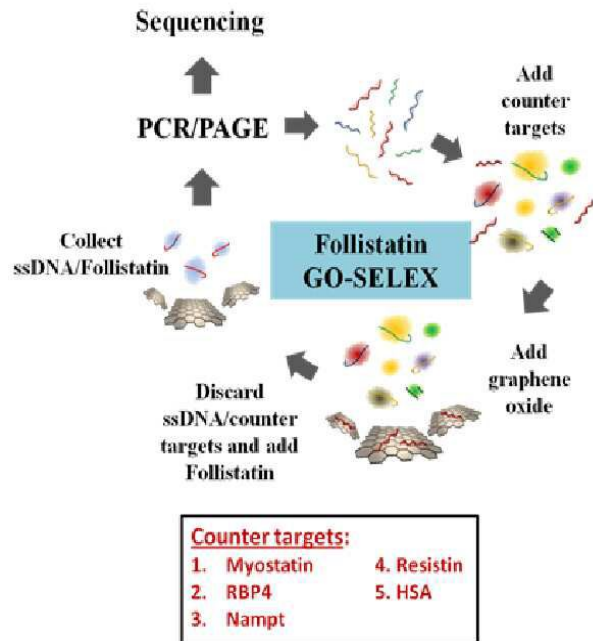
[0079] 도 13에 나타난 바와 같이, F43 앵타머의 K_d 값이 0.148 M로서 타겟과 매우 강력하게 결합하는 것으로 확인되었다.

[0080]

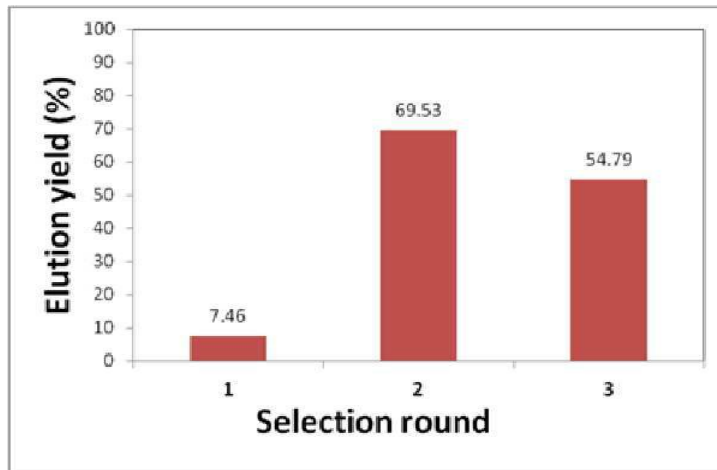
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

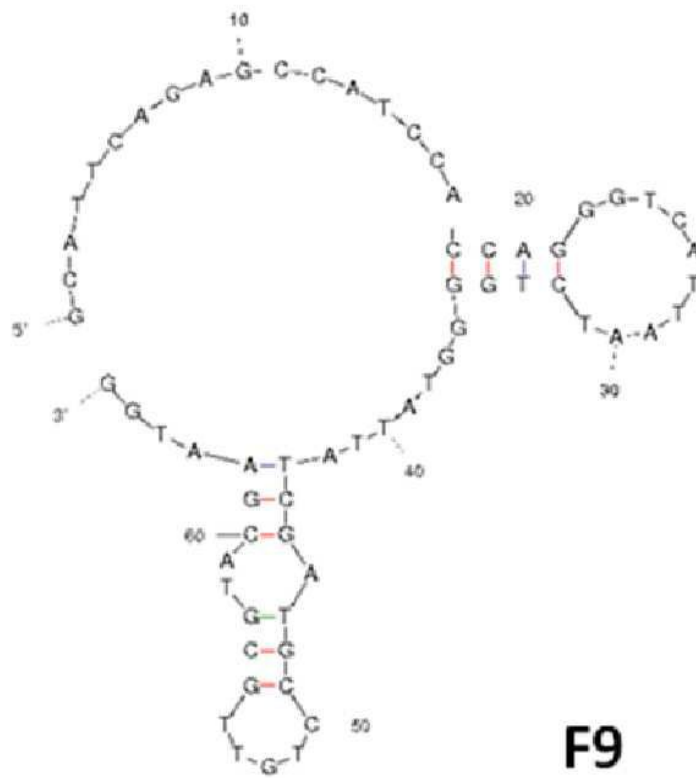
도면1



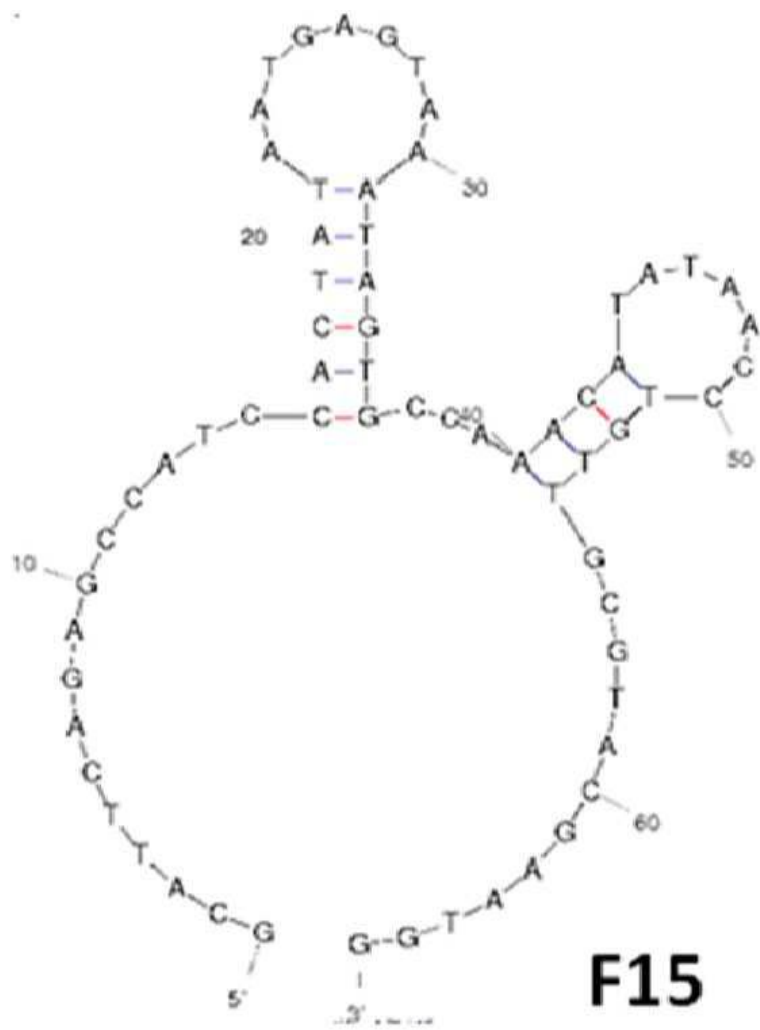
도면2



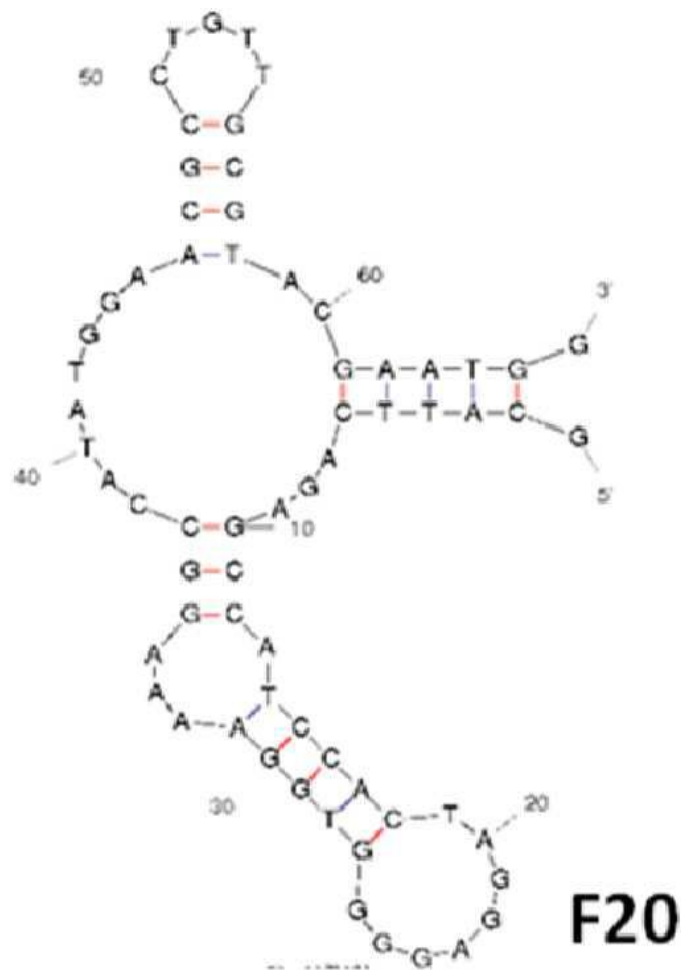
도면3



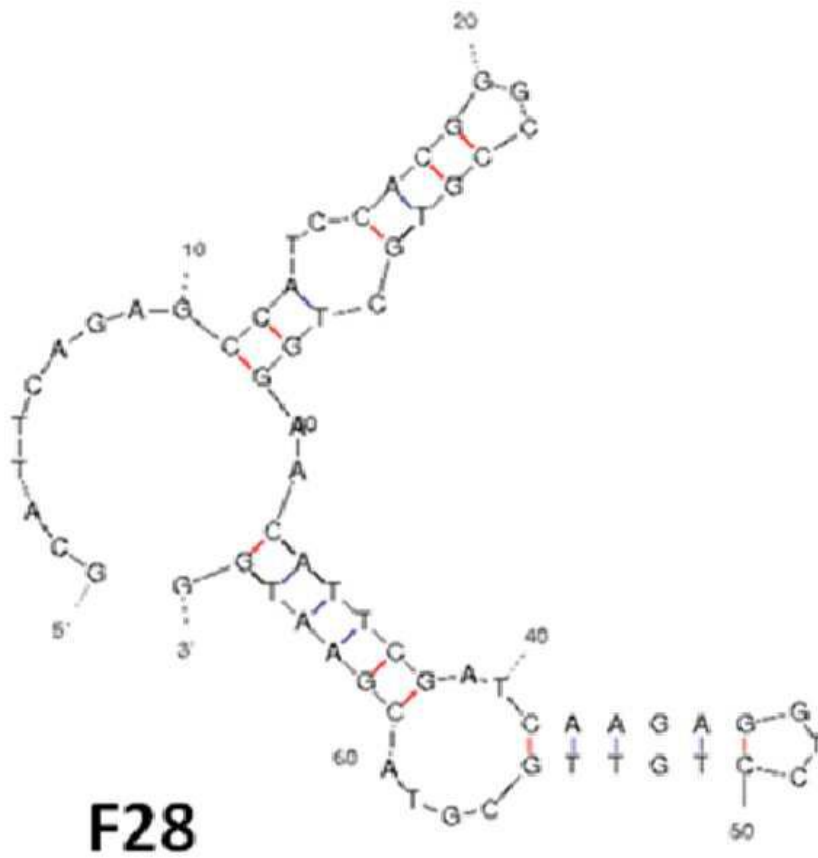
도면4



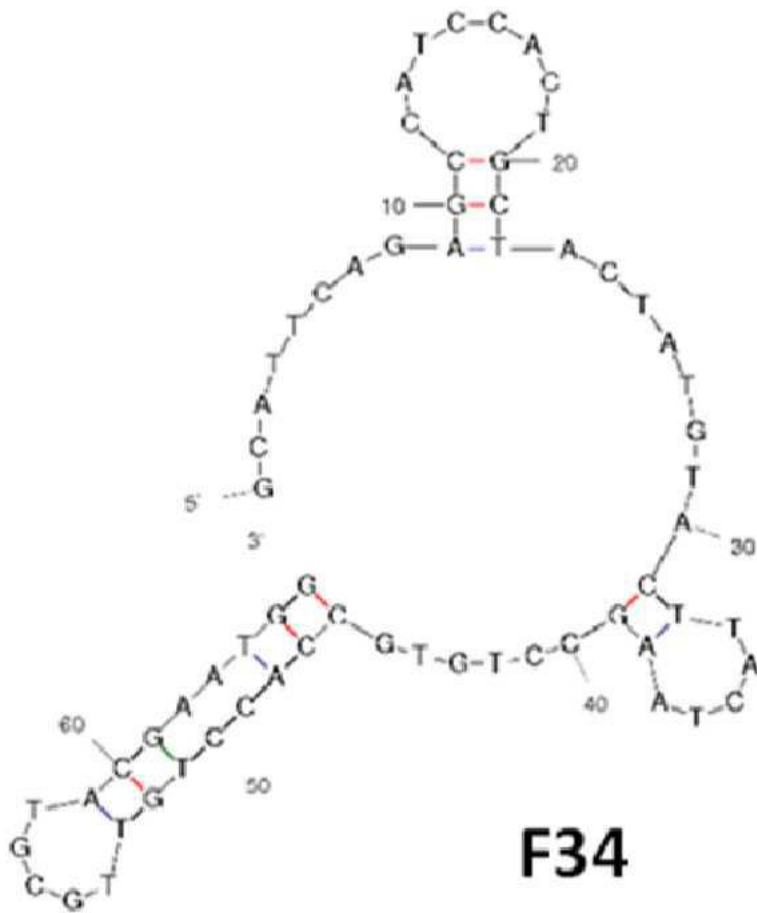
도면5



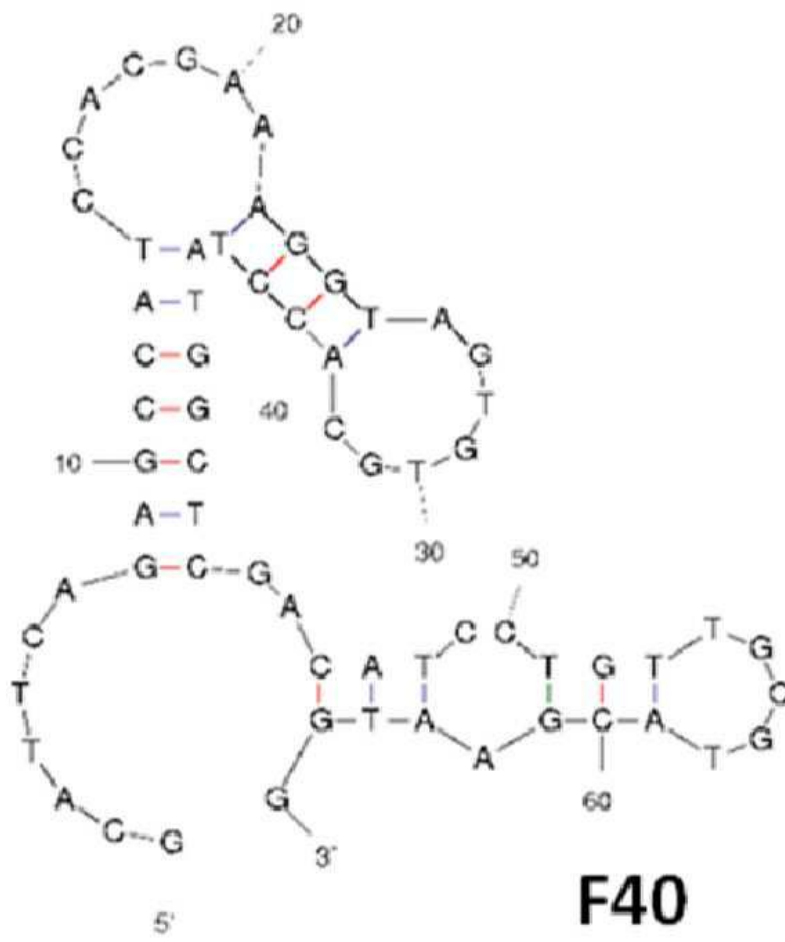
도면6



도면7

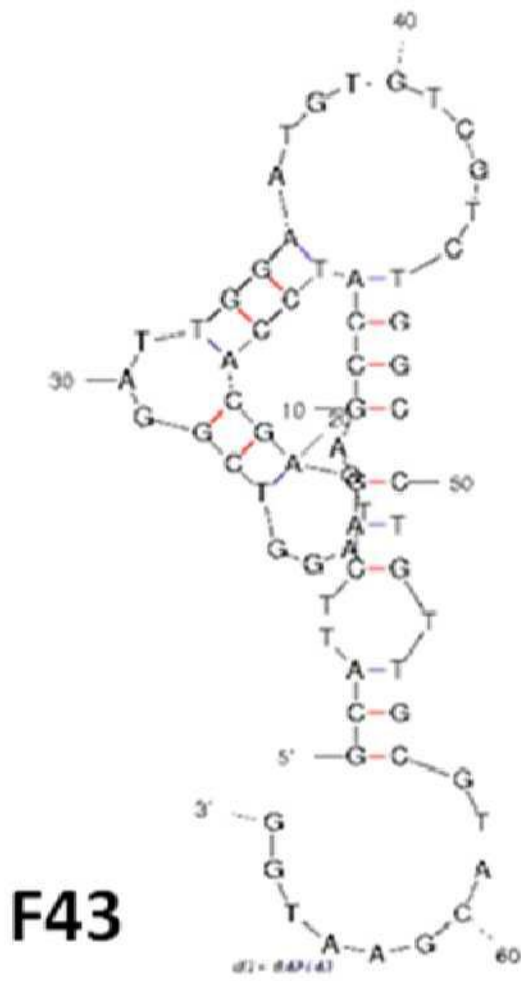


도면8

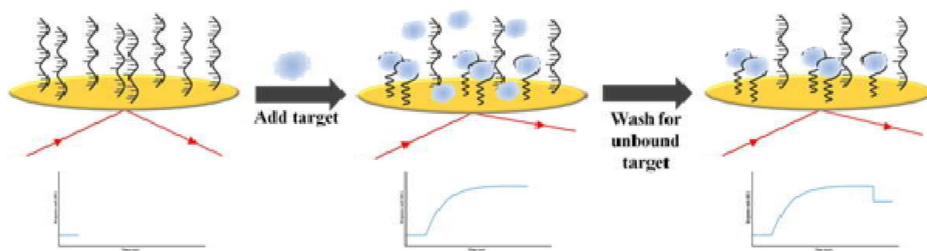


도면9

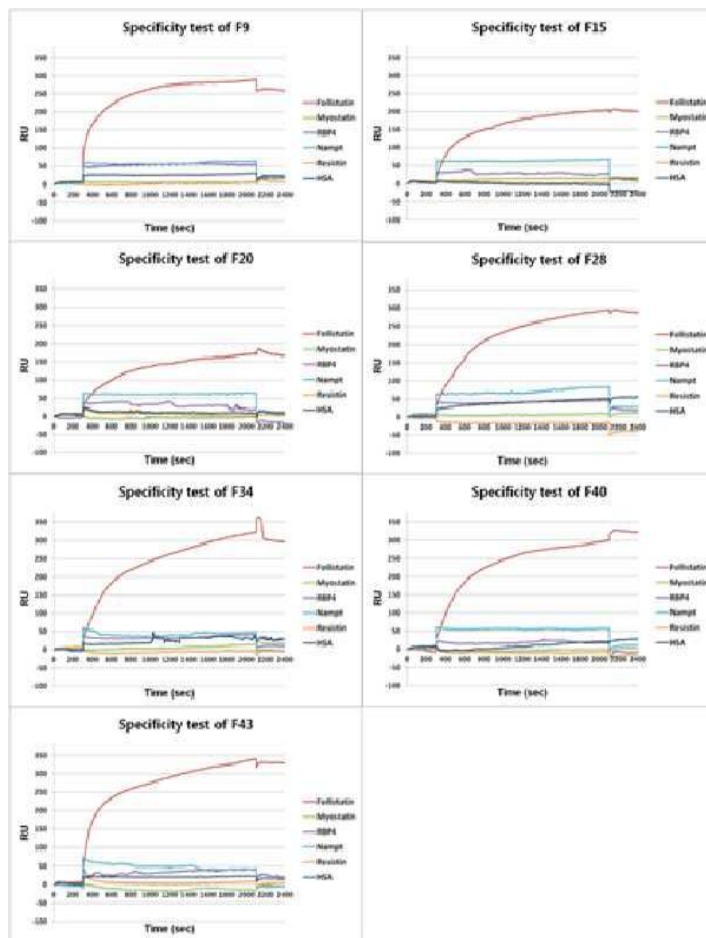
Figure 9



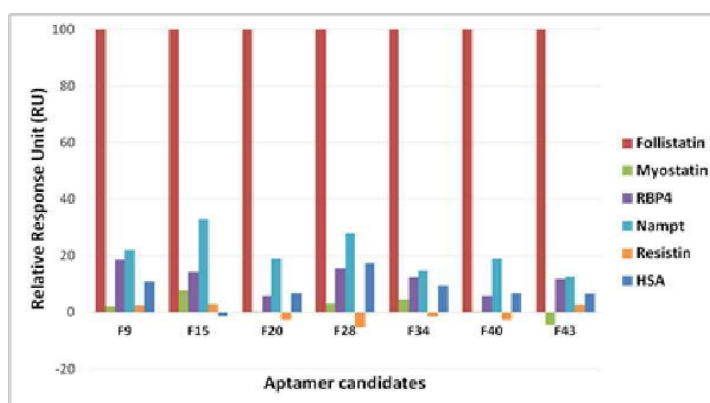
도면10



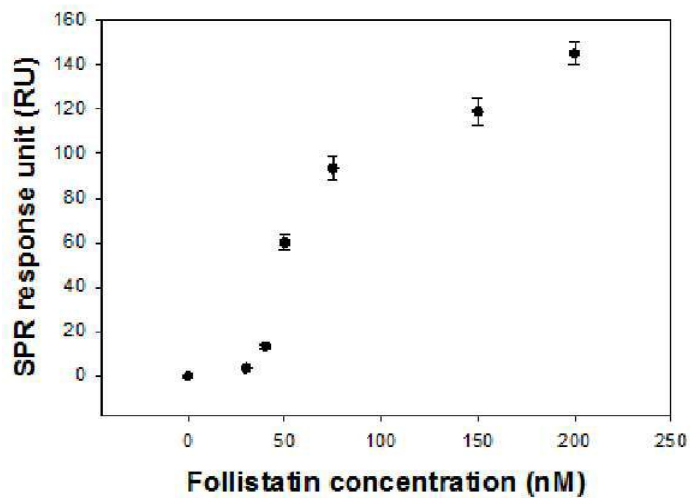
도면11



도면12



도면13



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Nucleic Acid Aptamer Capable of Specifically Binding to Follistatin and Uses Thereof

<130> P15-B353

<160> 9

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer_F9

<400> 1

gcattcagag ccattccacca gggtcattaa tctgggggtat tatcgatgcc tgttgcgtag 60

gaatgg 66

<210> 2

<211>

> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer_F15

<400> 2

gcattcagag ccattccacta taatgagtaa atagtgcacaa acatataacc tgttgcgtag 60

gaatgg	66
<210> 3	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> aptamer_F20	
<400> 3	
gcattcagag ccatccacta ggaggggtgg aaaaggccat atggaacgcc tgttcgtac	60
gaatgg	66
<210> 4	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> aptamer_F28	
<400> 4	
gcattcagag ccatccacgg gccgtgctgg aacattcgat caagaggtcc tgttcgtac	60
gaatgg	66
<210> 5	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> aptamer_F34	
<400> 5	
gcattcagag ccatccactg ctactatgta ctactaagc ctgtgccacc tgttcgtac	60
gaatgg	66
<210> 6	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> aptamer_F40	
<400> 6	
gcattcagag ccatccacga aaggtagtgt gcacctatgg ctgcacatcc tgttcgtac	60
gaatgg	66

<210> 7
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aptamer_F43
 <400> 7
 gcattcagag ccatccacga gtaggtcgga ttggaatgtg tcgtctggcc tgttgcgtac 60
 gaatgg 66

<210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer_seq8
 <400> 8
 gcattcagag ccatccac 18

<210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer_seq9
 <400> 9
 ccattcgtac gcaacagg 18