

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 3월 5일 (05.03.2020)

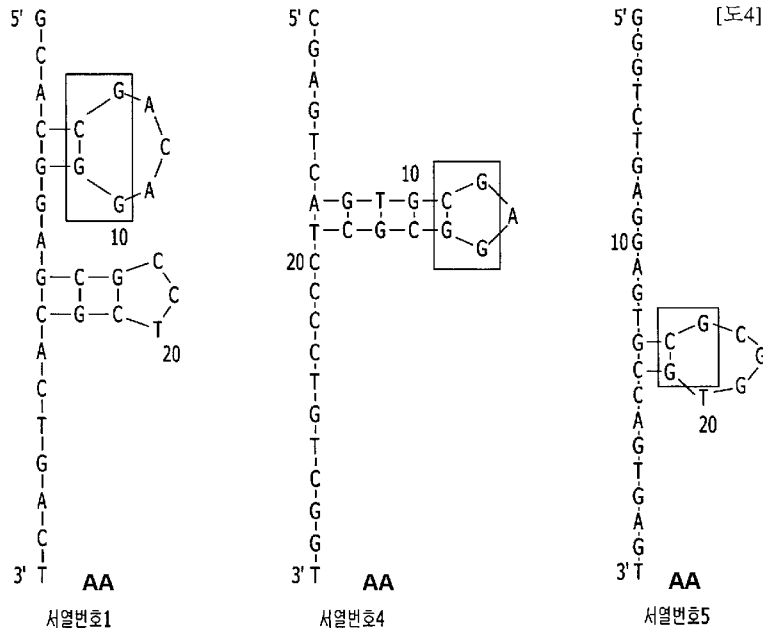


(10) 국제공개번호
WO 2020/045718 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/115* (2010.01) *A61K 8/60* (2006.01)
A23L 33/10 (2016.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/010436
- (22) 국제출원일: 2018년 9월 6일 (06.09.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0102964 2018년 8월 30일 (30.08.2018) KR
- (71) 출원인: 주식회사 넥스모스 (NEXMOS CO., LTD.)
[KR/KR]; 16827 경기도 용인시 수지구 신수로 767, 22층
2207호, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 손인식 (SON, In Sik); 13614 경기도 성남시 분당구 정자일로 72 청솔마을한라아파트 304동 1104호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 구현서 (KOO, Hyun Seo); 06253 서울시 강남구 강남대로66길 8, 9층, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

(54) Title: APTAMER SPECIFICALLY BINDING TO L-ASCORBIC ACID AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: L-아스코르브산에 특이적으로 결합하는 aptamer 및 그 용도



AA ... Sequence number

(57) Abstract: The present invention relates to a single-stranded DNA aptamer which inhibits oxidation by binding to L-ascorbic acid, the single-stranded DNA aptamer being characterized by having one or more stem-loop structures and having a CG bond at the end of the stem structures in the stem-loop structures, and the beginning parts on both sides of the loop structure are G or C and face each other. The aptamer of the present invention has the antioxidant effect of vitamin C, uses the aptamer, which selectively binds to vitamin C, to maintain a reduced state of vitamin C and maintain the antioxidant function thereof for a long time, and can thus be used in functional cosmetics of various formulations, oral nutritional supplements, foods, etc., and can be expected to provide a continuous and maximized antioxidative effect using an extremely small quantity of vitamin C, by using the aptamer selectively binding to vitamin C.



WO 2020/045718 A1

(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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 L-아스코르브산에 결합하여 산화를 억제하는 단일 가닥 DNA 압타머에 있어서, 상기 단일가닥 DNA 압타머는 하나 이상의 스템-루프(stem-loop) 구조를 가지며, 상기 스템-루프 구조 중 스템 구조 끝에 CG 결합을 가지며 루프 구조의 양쪽 시작부분이 G 나 C로 서로 마주 보고 있는 것을 특징으로 하는 단일 가닥 DNA 압타머에 관한 것이다. 본 발명의 압타머는 비타민 C의 산화방지 효과를 가지며, Vitamin C에 선택적으로 결합하는 압타머를 이용해 Vitamin C의 환원 상태를 유지해서 그 항산화 기능을 장기간 유지하게 하여 다양한 제형의 기능성 화장품과 경구용 영양보조제 및 식품 등에 이용할 수 있으며, Vitamin C에 선택적으로 결합하는 압타머를 이용해 미세량의 Vitamin C로도 지속적이고 극대화된 항산화 효과를 기대할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: L-아스코르브산에 특이적으로 결합하는 압타머 및 그 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 L-아스코르브산에 특이적으로 결합하는 압타머 및 그 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 항산화 물질들 중 대표적인 성분의 하나인 L-Ascorbic acid (Vitamin C, 이하 'AA'라고 함)는 그것의 자유기의 중성화를 통한 항산화활성으로 인하여 의약, 화장품 및 식품과 음료 산업에서 널리 사용되고 있다. 식품 보조제 및/또는 의약적 활성 성분으로 사용될 때 AA의 이점은 산업 재해(타이어 및 고무 공장 화장품 제조 공장)에서 발생할 수 있는 ZnONPs 흡입으로 인해 생기는 급성 폐 세포 산화과정에 AA를 첨가한 식수를 공급하여 억제한다고 보고되었다. 수십 조원 규모에 이르는 이들 산업에서는 주요 해결책으로 비타민 C가 공통적으로 사용되는 것으로 알려졌다.
- [3] AA는 그 항산화 능력으로 인해 본질적으로 산화에 의하여 쉽게 분해될 수 있다. AA의 산화에 영향을 미치는 주요 인자는 온도, pH, 산소, 금속 이온, 빛 및 효소 등이다. AA를 주성분으로 사용하는 산업에서는 이러한 산화 분해되는 특성으로 인해 생산품의 저장 기간 및 효과에 모두 영향을 미치기 때문에 당면한 문제로 오랫동안 인식되어 왔다. 따라서 이들 산업에서 AA의 산화적 분해에 대한 이해뿐만 아니라 새롭고 더 우수한 방법을 개발하고 발견하는 것에 많은 연구와 비용이 투자되고 있다.
- [4] 한편 노화를 촉진하는 원인들은 여러 가지가 있으나 그 중에서도 활성 산소계(Reactive Oxygen [0004] species: ROS)가 상당히 주요한 원인 중 하나인 것으로 받아들여지고 있다. 이러한 활성 산소는 에너지 대사과정, 면역 반응 등에서 필수 불가결하게 생성되며, 외부의 유해 환경에 의해서도 유발되는 피할 수 없는 자극이다. 활성 산소는 반응성이 매우 커서 체내에서 DNA 변성, 과도한 신호전달 유발 및 단백질 변성 등을 초래하여 건강에 해로운 영향을 누적하는 일련의 반응을 일으키게 된다. 그러나 이러한 유해한 반응들은 생체 내에 존재하는 항산화 물질(uric acid, vit.C, vit.E 등) 또는 항산화 효소(Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase 등)에 의해 정교하게 그 항상성을 유지하도록 되어 있다. 그러나 내인성 노화에 따른 항산화 시스템의 노쇠와 지속적인 유해 자극에 의한 활성 산소의 축적은 이러한 균형을 깨뜨려 건강을 해치게 되며 노화를 촉진시키고, 피부질환, 피부암, 동맥경화 및 혈전과 같은 각종 질병을 유발하기도 한다(Laure Rittie et al., Ageing Research Reviews, 1, 705-720, 2002; Cutler RG, Annals of the New York Academy of Sciences, 1055,

93-135, 2005).

- [5] 따라서, 활성 산소계의 형성을 억제하거나, 형성된 활성 산소계를 제거하는 항산화 물질에 대한 관심이 날로 증가하고 있다. 항산화 물질은 인체 내에 자연적으로 존재하는 것과 외부에서 투여해 주는 것으로 나눌 수 있는데 인체 내에 자연적으로 존재하는 항산화 물질로는 과산화 억제효소(superoxide dismutase, SOD), 글루타치온(glutathione), 퍼옥시다아제(oxidase) 및 카탈라아제(catalase) 등의 효소가 있으며, 외부에서 투여해 주는 것으로는 캄프페롤(kaempferol), 카테킨(catechin) 및 제니스테인(genistein) 등의 피토케미컬(phytochemical); 비타민 E, 비타민 C 및 베타카로틴; 및 셀레니움 등의 미네랄이 있다.
- [6] 햇빛으로부터 조사되는 자외선A (UVA)와 자외선B (UVB), 공해물질, 스트레스, 흡연, 음주, 지방성 음식물 등으로 인해 발생하는 유리기 (free radical)와 활성산소 (oxygen free radical) 등에 의해 세포는 공격을 받으며, 이런 물질들로부터 적절한 보호가 이루어 지지 않을 경우 세포는 노화하거나 사멸하게 된다. 피부의 경우 이런 물질들로 인해 콜라겐이나 엘라스틴 등의 물질의 생산이 줄어들거나 변성되어서 피부가 탄력을 잃고 주름이 생기게 된다. 이를 방지하기 위해 Vitamin A, C, E 등의 항산화 물질들을 포함한 제제를 피부에 도포, 피부 내로 흡수시킴으로써 이러한 유해 활성물질에 의한 산화를 막는 것이 피부의 노화를 막는 데에 중요한 것으로 공지되어 있다. 하지만 합성 Vitamin C는 공기 중에서 쉽게 산화되어 그 항산화 작용이 사라지게 되는 문제점으로 인해 보관기간이 긴 다양한 제형을 제조하는데 문제가 있다.
- [7] 또한 환원력이 매우 높은 비타민C는 산화전위가 높은 물질에 매우 민감하게 반응하여 비타민C가 급속히 산화된다. 비타민C는 산화됨으로써 그 효능이 훼손됨은 이미 잘 알려진 사실이다 물론 산화전위가 높아서 비타민C가 매우 민감하게 반응하여 급속히 산화된다.
- [8] 따라서 비타민 C를 포함하는 항산화 물질의 산화를 억제하는 새로운 방법 내지는 물질에 대한 필요성은 오랫동안 존재하여 오고 있다.
- [9] 또한 압타머를 이용하여 항산화 물질의 산화를 방지하는 것은 기존의 방법에 비교하여, 안전하고 혁신적인 새로운 개념의 접근으로서, 이를 각종 산업에 적용하여 효과를 극대화할 수 있도록 제조가 가능하다. 특히, 기존의 Chemical 기반의 화장품, 영양보조제, 식품 시장을 획기적으로 DNA(BIO) 기반의 시장으로 변화시키는 기폭제가 될 것이다. 또한 각종 산업 부분에서 다양하게 이용될 수 있다 향후, DNA 시장의 폭발적인 증가와 혁신적인 솔루션을 제공할 것으로 예상된다.
- [10] [선행 특허 문헌]
- [11] 대한민국 공개특허 제10-2018-0054508호
- 발명의 상세한 설명**

기술적 과제

- [12] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 비타민 C에 특이적으로 결합하여 산화를 방지하는 신규한 압타머를 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규 압타머의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 L-아스코르브산에 결합하여 산화를 억제하는 단일 가닥 DNA 압타머에 있어서, 상기 단일가닥 DNA 압타머는 하나 이상의 스템-루프(stem-loop) 구조를 가지며, 상기 스템-루프 구조 중 스템 구조 끝에 CG 결합을 가지며 루프 구조의 양쪽 시작부분이 G 나 C로 동일 염기가 서로 마주 보고 있는 것을 특징으로 하는 단일 가닥 DNA 압타머를 제공한다.
- [15] 본 발명의 압타머는 상기 스템 루프 구조 중 스템 구조 끝에 CG결합을 가지고 루프 구조의 시작 부분 중 한 방향의 G 또는 C 염기가 T로 치환된 2차 구조를 가진 단일가닥 DNA 압타머를 제공한다.
- [16] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 압타머는 서열번호 1 내지 29에 기재된 염기서열 중 하나로 이루어진 것이 바람직하고, 상기 압타머는 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 5, 및 서열번호 17 내지 29에 기재된 염기서열 중 하나로 이루어진 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [17] 또 본 발명은 상기 본 발명의 압타머를 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물을 제공한다.
- [18] 또한 본 발명은 비타민 C에 상기 본 발명의 압타머를 처리하여 상기 비타민 C의 산화를 억제하는 방법을 제공한다.

[19]

발명의 효과

- [20] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 압타머는 비타민C의 산화방지 효과를 가지며, Vitamin C (ascorbic acid)에 선택적으로 결합하는 압타머를 이용해 Vitamin C의 환원 상태를 유지해서 그 항산화 기능을 장기간 유지하게 하여 다양한 제형의 기능성 화장품과 경구용 영양보조제 (dietary supplements) 등에 이용할 수 있으며, Vitamin C 에 선택적으로 결합하는 압타머를 이용해 작은 양의 Vitamin C 로도 지속적이고 극대화된 항산화 효과를 기대할 수 있으며, Vitamin C (ascorbic acid)에 선택적으로 결합하는 압타머를 이용해 Vitamin C 등 생리활성 성분의 환원 상태를 유지해서 그 항산화 기능을 장기간 유지하게 하여 다양한 건강 음료, 항산화 음료 및 항산화 식품 등에 이용할 수 있다.
- [21] 또한 압타머를 이용하여 항산화 물질의 산화를 방지하는 것은 기존의 방법에 비교하여, 안전하고 혁신적인 새로운 개념의 접근으로서, 이를 각종 산업에 적용하여 효과를 볼 수 있도록 제조가 가능하다. 특히, 기존의 Chemical 기반의 화장품, 영양보조제, 식품 시장을 획기적으로 DNA(BIO) 기반의 시장으로

변화시키는 기폭제가 될 것이다. 향후, DNA 시장의 폭발적인 증가와 혁신적인 솔루션을 제공할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 단일가닥 DNA 라이브러리 분리에 이용한 12 % native gel 전기영동 사진이다. 파란색 사각형으로 표시된 밴드를 절단하여 크러쉬 앤 소크 방법으로 정제하였다.
- [23] 도 2는 단일가닥 DNA의 ascorbic acid 산화 방지 효과 확인을 위한 OPDA 측정 그래프이다. 서열번호 1과 서열번호 4, 서열번호 5의 단일가닥 DNA에서 산화 방지 효과가 관찰되었다.
- [24] 도 3은 선별된 단일가닥 DNA의 MST(Microscale Thermophoresis)측정 결과 그래프이다. Kd(결합 해리상수) 측정결과 서열번호 1과 서열번호 4, 서열번호 5의 단일가닥 DNA에서 나노몰(Nano molarity, nM)수준으로 결합력이 확인되었다.
- [25] 도 4는 M-fold 프로그램을 이용한 압타머의 2차 접힘 구조이다. 서열번호 1과 서열번호 4, 서열번호 5의 stem-loop 구조로 stem 구조 끝에 CG결합을 가지며 loop 구조의 양쪽 시작부분이 G 나 C로 서로 마주 보고 있는 공통적인 특징을 지닌다. (붉은색 사각형)
- [26] 도 5는 stem-loop 구조를 포함한 임의 서열 13개의 OPDA 측정 그래프이다. 특정 stem-loop 구조를 포함한 13개의 서열에서 ascorbic acid의 산화 방지 효과가 관찰되었다.
- [27] 도 6은 산화 방지 효과가 확인된 서열번호 1번과 4, 17, 18의 OPDA 측정 비교 그래프이다. 임의의 서열로 합성한 서열번호 17번의 압타머 서열이 산화 방지 효과가 가장 큰 것으로 관찰되었다.
- [28] 도 7은 산화 방지 효과가 확인된 서열번호 17과 18의 MST 측정 결과 그래프이다.

[29]

발명의 실시를 위한 형태

- [30] 이하 본 발명을 비한정적인 실시예를 통하여 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [31] 실시예 1: 단일가닥 DNA 라이브러리 제작
- [32] SELEX 방법을 이용하여 L-Ascorbic acid에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA 압타머를 선별하기 위해 단일가닥 DNA 라이브러리를 제작하였다. 단일가닥 DNA 라이브러리 서열은 5'과 3'에 각각 15개의 특정 프라이머 서열을 포함시키고 30개의 무작위 서열을 가지도록 설계하여 총 60개의 염기로 구성하였다.
- [33] 설계된 상기 단일가닥 DNA 라이브러리는 아래와 같다.

- [34] 5'-ATGCGGATCCCGCGC-N30-GCGCGAAGCTTGCGC-3'(단일가닥 DNA 라이브러리 서열;서열번호 30)
- [35] 합성된 상기 서열번호 30 염기서열의 단일 올리고 뉴클레오티드 단편을 주형으로 이용하여 비대칭 PCR 과정으로 단일가닥 DNA 라이브러리를 증폭하였다. 비대칭 PCR을 실시하기 위해 Primer 1과 2를 제작하였다.
- [36] 상기번호 Primer 1과 2의 염기 서열은 아래와 같다.
- [37] 5'-ATGCGGATCCCGCGC-3'(Primer 1;서열번호 31)
- [38] 5'-GCGCAAGCTTCGCGC-3'(Primer 2;서열번호 32)
- [39] 단일가닥 DNA를 대량 증폭하기 위해 10:1의 비율로 Primer 1과 Primer 2를 혼합하여 비대칭 PCR을 실시하였다. 비대칭 PCR 반응은 94 °C에서 5분간 반응한 후 94 °C,40초, 55 °C,40 초, 72 °C, 30초의 조건으로 45 사이클을 반복하여 실행한 뒤 72°C에서 10분 동안 반응시켜 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 2.5%의 아가로스 젤에 전기영동하여 육안으로 밴드를 먼저 확인한 후 크러쉬 앤 소크(Crush and Soak)방법으로 분리하였다. PCR 산물은 12% native gel에 전기영동하여 단일가닥 DNA 밴드를 절단한 뒤 크러쉬 앤 소크 버퍼(Crush and Soak buffer)(500 mM NH₄OAc, 0.1% SDS, 0.1 mM EDTA)에 용해시켜 에탄올 침전법으로 DNA를 정제하였다. (도 1) 정제된 단일가닥 DNA 라이브러리는 95 °C에서 5분간 가열한 뒤 상온에서 10분간 접힘 구조를 형성시킨 후 SELEX에 사용하였다.
- [40] 실시예 2: L-Ascorbic acid에 특이적으로 결합하는 압타머 선별을 위한 SELEX
- [41] L-Ascorbic acid에 특이적으로 결합하여 산화를 억제하는 단일가닥 DNA 압타머를 선별하기 위하여 그래핀을 이용한 SELEX(rGO-SELEX) 기술을 활용하였다.(Lee, A. Y., Ha, N. R., Jung, I. P., Kim, S. H., Kim, A. R., & Yoon, M. Y. (2017). Development of a ssDNA aptamer for detection of residual benzylpenicillin. Analytical biochemistry, 531, 1-7.)
- [42] 이하 그래핀을 활용한 SELEX 방법은 아래와 같다.
- [43] 먼저 그래핀과 1.5 ml 튜브에 비특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA를 제거하기 위하여 200 pmol의 단일가닥 DNA 라이브러리와 4 mg/mL의 그래핀을 Binding buffer(20 mM Tris, pH 8.0)에 혼합하여 30분간 반응시킨 후 두 번의 원심분리로 상층액을 제거하였다. 남아있는 단일가닥 DNA와 그래핀 혼합물에 ascorbic acid를 처리하여 30분 동안 반응시키고 ascorbic acid에 결합한 단일가닥 DNA를 비대칭 PCR 과정으로 증폭하였다. 증폭된 단일가닥 DNA는 12%의 native gel에서 크러쉬 앤 소크(Crush and Soak)방법으로 분리하여 첫번째 SELEX 산물로 얻었다. 위의 과정을 5번 반복하고 5번째 반복한 SELEX 산물을 주형으로 사용하여 대칭적 PCR을 실시하였다. 증폭된 이중가닥 DNA 단편은 NGS(Next Generation Sequencing)기술로 서열을 분석하여 많은 빈도수로 분석되는 서열번호 1 내지 16의 16개 서열을 확인하였다.
- [44] 실시예 3: Ascorbic acid의 산화 억제효과 분석

- [45] 압타머에 의한 L-ascorbic acid의 산화 방지 효과를 분석하기 위해 OPDA(O-phenylenediamine) 분석법을 실시하였다. L-ascorbic acid의 산화된 구조인 DHA가 OPDA에 결합하여 형광 발색이 나타나는 원리를 이용하여 압타머에 의한 ascorbic acid의 산화방지 효과를 분석하였다.(Vislisel, J. M., Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2007). A simple and sensitive assay for ascorbate using a plate reader. *Analytical biochemistry*, 365(1), 31-39.)
- [46] OPDA 분석 과정은 아래와 같다.
- [47] SELEX 산물에서 NGS 기술로 분석된 서열의 빈도수와 접힘 구조에 따라 16개의 서열을 합성하였다. 합성된 단일가닥 DNA는 95 °C에서 5분간 가열하고 상온에서 10분간 반응시켜 접힘구조를 형성시킨 후 1 μ M의 단일가닥 DNA와 5 mM ascorbic acid를 혼합하여 30분간 반응시켰다. 이 후 과산화수소수(H_2O_2)를 첨가하여 산화를 촉진시킨 뒤 OPDA 형광염료를 첨가하여 형광의 세기를 측정하였다. (비특허문헌 3) Control은 합성된 단일가닥 DNA를 첨가하지 않고 Vitamin C만 첨가한 시료로 16개 서열(서열번호 1 내지 16)의 단일가닥 DNA를 각각 처리한 시료보다 빠르게 산화되었다. 16개의 서열 중 서열번호 1과 서열번호 4, 및 서열번호 5의 3가지 단일가닥 DNA에서 L-ascorbic acid의 산화가 방지되는 것을 관찰하였다. (도 2).
- [48] 실시에 4: L-Ascorbic acid와 압타머 서열의 결합력 측정
- [49] L-Ascorbic acid에 결합하는 압타머의 결합력을 확인하기 위해 MST(Microscale Thermophoresis) 방법을 이용하여 결합 해리 상수(Kd)를 측정하였다. 단일가닥 DNA의 5'에 Cy5의 형광을 부착시키고 열 구배 조건에서 결합력에 따라 나타나는 신호 차이를 분석하여 결합의 세기를 측정하였다.(Entzian, C., & Schubert, T. (2016). Studying small molecule-aptamer interactions using MicroScale Thermophoresis (MST). *Methods*, 97, 27-34.)
- [50] 단일가닥 DNA 압타머의 농도는 5 nM에서 고정하고 ascorbic acid의 농도를 50 μ M에서 1.53 nM의 범위로 농도구배를 이루도록 16개의 튜브에 삽입한 후 15분 동안 반응시켰다. 반응한 단일가닥 DNA와 L-ascorbic acid를 스캐닝 모세관 튜브(4 μ l/튜브)에 흡입시켜준 후 Mnlith NT.11 기기를 이용하여 측정하였다. 상기 OPDA 방법으로 확인된 서열번호1과 서열번호 4, 서열번호 5의 압타머는 각각 280 nM과 149 nM, 685 nM의 Kd값으로 측정되어 나노몰(Nano molarity, nM) 수준의 결합력을 지니는 것으로 확인하였다. (도 3)
- [51] 실시에 5: Vitamin C에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA 압타머의 구조 유사성 분석
- [52] 결합력이 확인된 서열번호 1과 서열번호 4, 서열번호 5의 단일가닥 DNA 압타머의 2차 구조(Secondary structure)를 확인하기 위하여 M-fold 프로그램을 이용하였다. 서열번호 1의 경우 2가지 형태로 2차 구조 형성할 수 있으며, 서열번호 4와 서열번호 5는 각각 3, 2가지의 형태로 스템-루프(Stem-loop) 구조를 형성할 수 있는 것으로 확인하였다.

- [53] 이 3가지(서열번호 1과 서열번호 4, 서열번호 5)의 단일가닥 DNA 압타머는 스템-루프 구조 중 스템 구조 끝에 CG결합을 가지며 루프 구조의 양쪽 시작부분이 G 나 C로 서로 마주 보고 있는 공통적인 특징이 있다. (도 4, 붉은색 사각형) 확인된 3가지의 압타머의 구조는 -3.65와 -1.64, -0.86(kcal/mol)의 깃스 자유에너지 값을 가진 안정한 구조를 이루고 있다.
- [54] 실시에 6:13가지 변형 서열의 산화 방지 효과 측정
- [55] 압타머의 접힘 구조 분석을 통하여 확인된 특정 구조 서열을 기반으로 32개의 염기서열을 가진 임의의 서열을 설계하여 단일가닥 DNA를 합성하였다. 스템-루프 구조로 10 개의 염기 서열을 단위체로 구성하여 5'과 3' 양 끝에 1개 내지 2개씩 포함하도록 임의의 단일가닥 DNA를 제작하였다. 총 13가지로 제작한 서열번호 17 내지 29의 단일가닥 DNA의 산화방지 효과를 OPDA 측정법을 통해 확인하였다. (도 5)
- [56] 13개의 임의 서열은 모두 L-ascorbic acid에 대하여 산화 방지 효과가 있었으며, 5'과 3'의 양 끝에 스템-루프 구조를 가진 서열번호 17의 단일가닥 DNA 압타머가 총 29 가지 서열 (임의에 합성하여 확인한 13개의 서열과 SELEX 과정으로 선별한 16가지 서열) 중 산화 방지 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. (도 6)
- [57] 실시에 7: 변형된 2가지 서열의 Kd 측정 및 비교
- [58] 임의 서열(서열번호 17 내지 29) 중 산화방지 효과가 크게 확인된 2가지의 서열에 대하여 MST(Microscale Thermophoresis)분석으로 압타머의 결합력을 확인하였다. OPDA 방법으로 확인된 서열번호 17번과 18번의 서열은 각각 729 nM과 289 nM의 Kd값으로 측정값을 얻었다. (도 7) OPDA 측정법으로 확인된 바와 달리 서열번호 17의 Kd 값이 높게 측정되는 것은 서열번호 17의 압타머가 결합력 자체는 낮으나 -OH작용기에는 더 특이적으로 결합하는 것으로 보인다.
- [59]

[표1]

서열번호	5' to 3'	염기 수(mer)	비고
서열번호 1	GCACCGACAGGGGAGCGCCTCGCACTGACT	30	ABA1
서열번호 2	GGTGCAAACCAGCGCGCCTCTCTGACGTCG	30	ABA2
서열번호 3	ACGCATGCCGGGCGCGCTCCCTGTCGTCCG	30	ABA3
서열번호 4	CGAGTCAGTGCGAGGCGCTCCCCTGTCCGT	30	ABA4
서열번호 5	GGGTCTGAGGAGTGCGCGGTGCCAGTGAGT	30	AA-001
서열번호 6	GAACCAACGGAAGCGCGGCACCACAACGGT	30	AA-002
서열번호 7	CGCAACCTGTTCGGCAGTGGGCCTCCGGGT	30	AA-003
서열번호 8	GAACTTGCGCACTAGGTGATGCGGATCCCG	30	AA-005
서열번호 9	GAAGCTTGCGCACTAGGTGGTGC GGATCCC	30	AA-006
서열번호 10	GATCAACGGAAGCGCGGCACCACAACGGTA	30	AA-014
서열번호 11	CGAGTCAGGTGGGATGATGTTCGGGGAAGG	30	AA-035
서열번호 12	GGCACAACGGGCGCGCCTCCATGCTGTTCG	30	AAL-001
서열번호 13	TGAACGACGAGGCGCGTCCACTGCGTGCC	30	AAL-002
서열번호 14	CGCAGTGTGACGCGCCTCGTCGTTCACTCG	30	AAL-003
서열번호 15	CACAATCGGGGCGCGCTCGTCCTCTGGCCG	30	AAL-004
서열번호 16	GGAACAACGGGCGCGCCTCCATGCTGTTCG	30	AAL-005
서열번호 17	GTGGAGGCGGTGGCCAGTCTCGCGGTGGCG GC	32	332-2
서열번호 18	GTGGAGGCGGTGGCCGTGGAGGCGGAGGCC GC	32	332-4
서열번호 19	GTGGAGGCGGTGGCCAGTCTGCGGCGCGGC AG	32	332-8

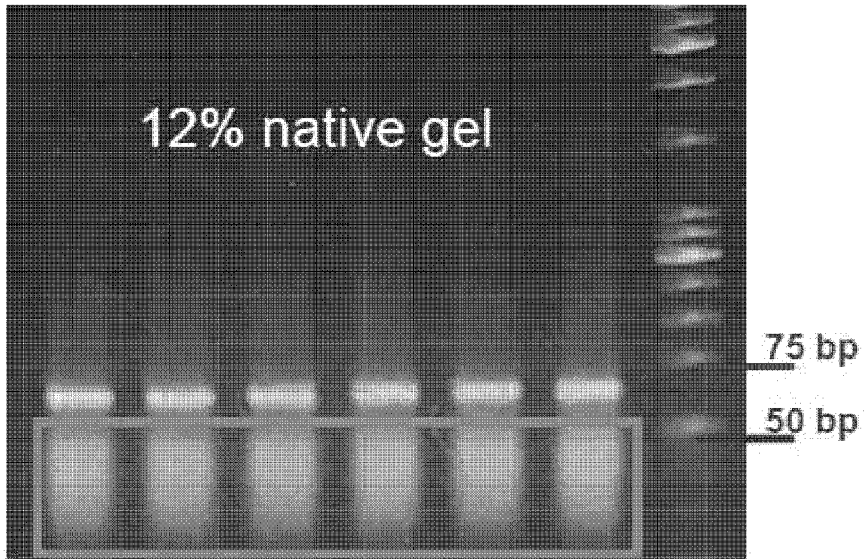
서열번호 20	GGCGGTGGCCCTGCAAGTCTCGCGGTGGCGG C	32	332-11
서열번호 21	GGCGGTGGCCCTGGAAGTCTCGCGGTGGCG GC	32	332-12
서열번호 22	GCGGCGGTGGCCAGAAGTCTCGCGGTGGCG GC	32	332-13
서열번호 23	CGGGCGGTGGCCAGAAGTCTCGCGGTGGCG GC	32	332-14
서열번호 24	GCGGCGGTGGCCTGAAGTCTGGCGGTGGCCC G	32	332-15
서열번호 25	GCGGCGGTGGCCTGAAGTCTGGCGGTGGCCC C	32	332-16
서열번호 26	GCGGCGGTGGCCTGAAGTCTGGCGGTGGCCC A	32	332-17
서열번호 27	GGCGGTGGCCCTGGAAGTCTCATGGCGGTGGC C	32	332-18
서열번호 28	GTGGCGGTGGCCAGCATAACGGGCGGTGGCC AG	32	332-19
서열번호 29	GTGGCGGTGGCCAGCATAGTGGCGGTGGCC AG	32	332-20

[60] 표 1은 본 발명의 압타머 서열을 나타낸 표이다.

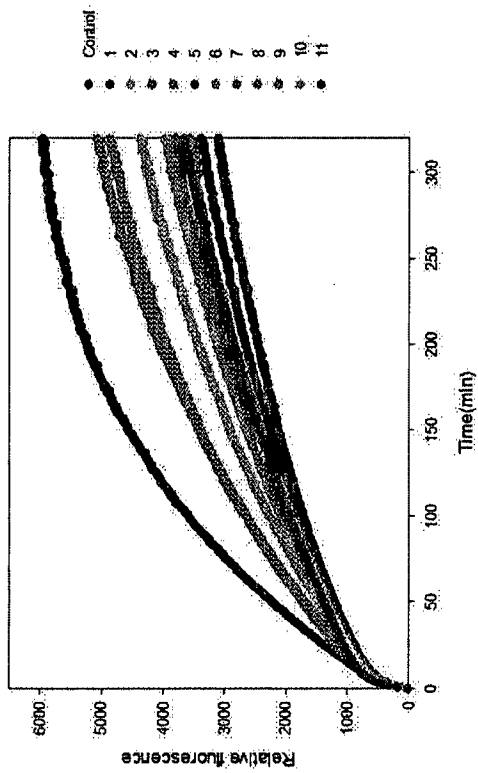
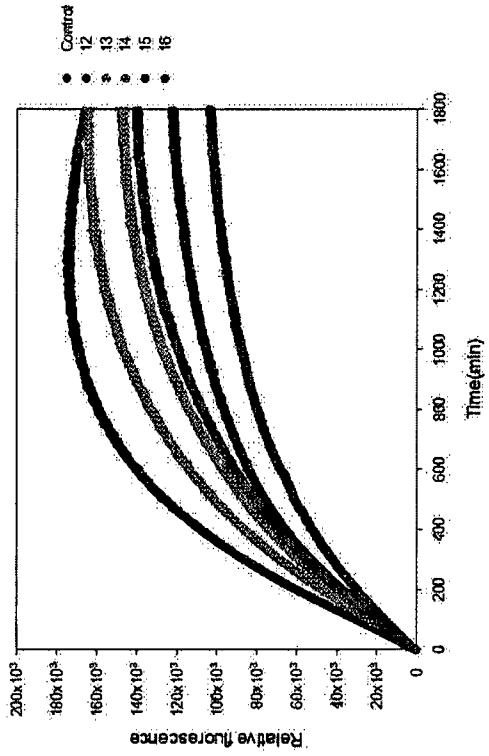
청구범위

- [청구항 1] L-아스코르브산에 결합하여 산화를 억제하는 단일 가닥 DNA 압타머에 있어서, 상기 단일가닥 DNA 압타머는 하나 이상의 스템-루프(stem-loop) 구조를 가지며, 상기 스템-루프 구조 중 스템 구조 끝에 CG 결합을 가지며 루프 구조의 양쪽 시작부분이 G 나 C로 동일 염기가 서로 마주 보고 있는 것을 특징으로 하는 단일 가닥 DNA 압타머.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 압타머는 상기 스템 루프 구조 중 스템 구조 끝에 CG결합을 가지고 루프 구조 시작 부분 중 하나의 염기가 G 또는 C 염기에서 T로 치환된 2차 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 단일가닥 DNA 압타머.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 압타머는 서열번호 1 내지 29에 기재된 염기서열 중 하나로 이루어진 것을 특징으로 하는 단일 가닥 DNA 압타머.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 압타머를 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물.
- [청구항 5] 비타민 C에 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 압타머를 처리하여 상기 비타민 C의 산화를 억제하는 방법.

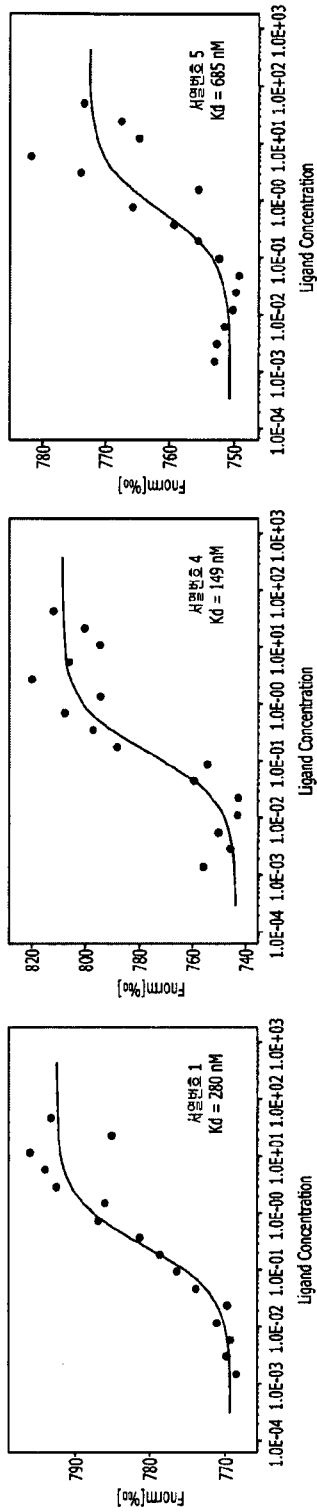
[도 1]



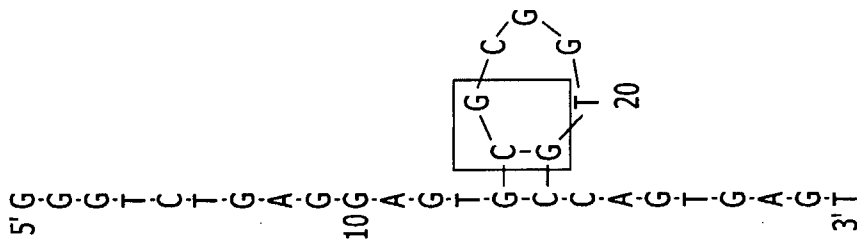
[도2]



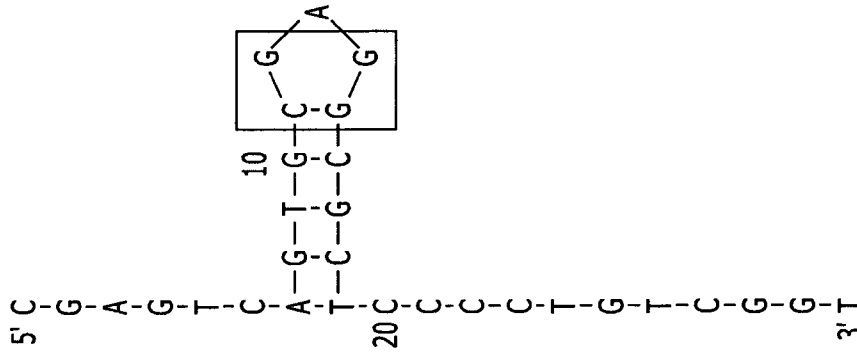
[도3]



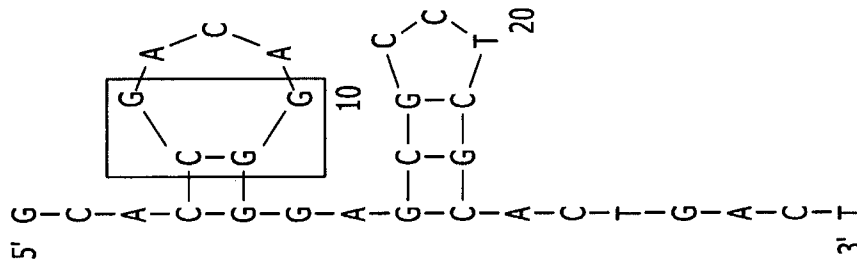
[도4]



서열번호5

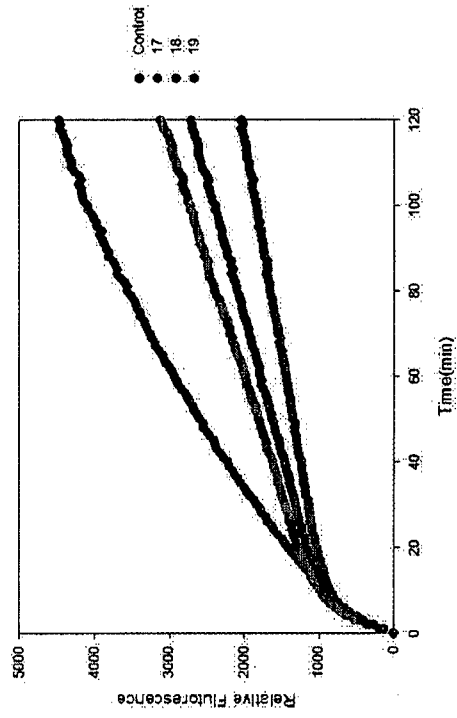
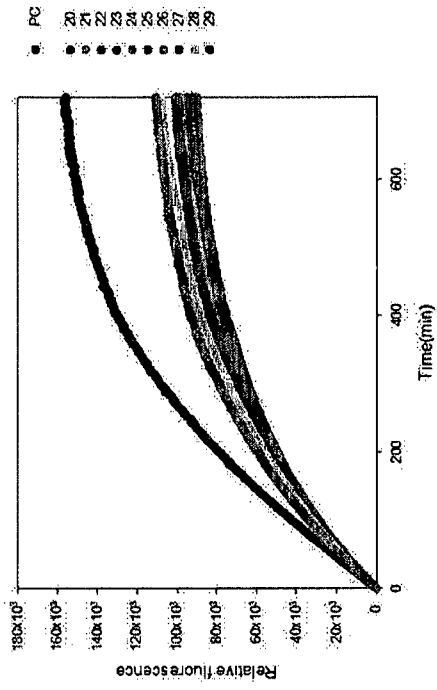


서열번호4

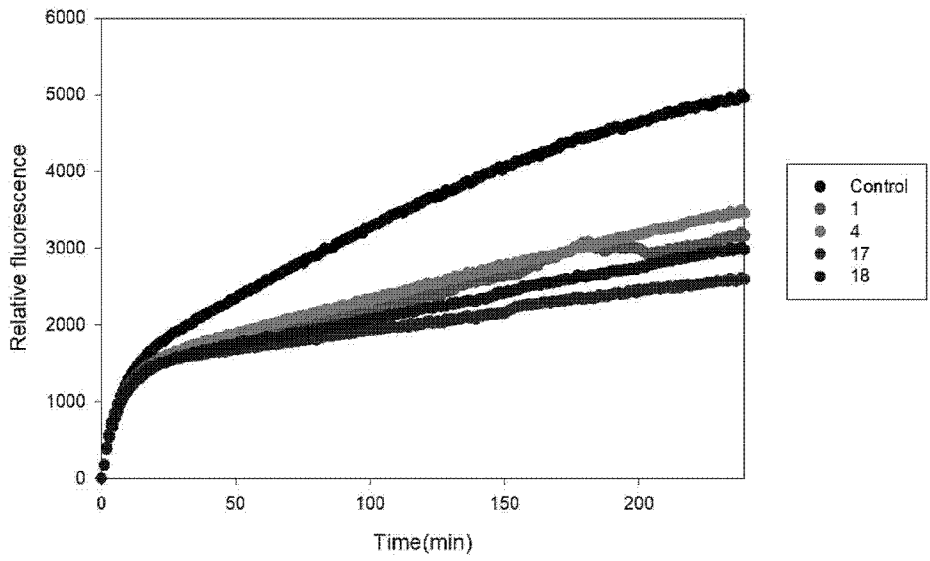


서열번호1

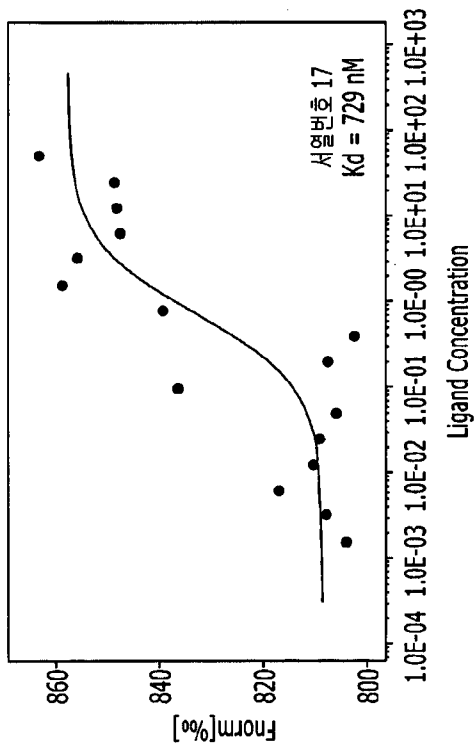
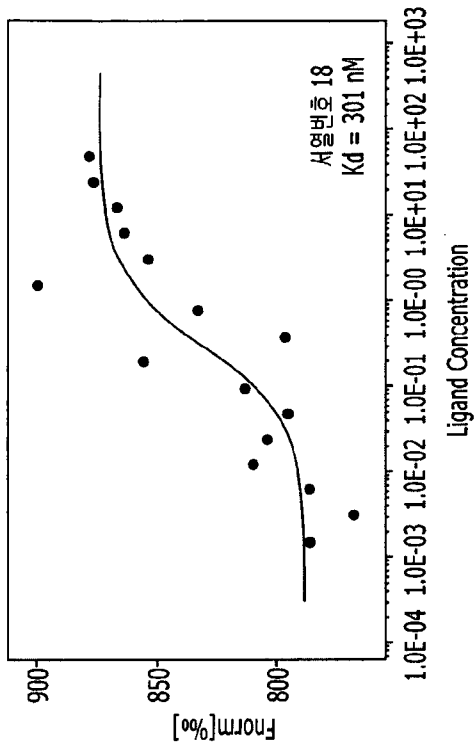
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010436

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/115(2010.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/115; A61K 31/355; A61K 31/375; A61K 8/97; C40B 20/00; C40B 30/04; A23L 33/10; A61K 8/60; A61Q 19/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: DNA aptamer, antioxidant, vitamin C, L-ascorbic acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2018-0054508 A (NEXMOS CO., LTD.) 24 May 2018 See claim 1; paragraph [0038].	1-5
A	US 9938641 B2 (WEST, J. A. A. et al.) 10 April 2018 See claim 1.	1-5
A	US 2007-0112064 A1 (LYLES, M. B.) 17 May 2007 See claim 1.	1-5
A	BARRITA, Jose Luis Silencio et al. Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases. OXIDATIVE STRESS AND CHRONIC DEGENERATIVE DISEASES - A ROLE FOR ANTIOXIDANTS. 2013, pages 449-484 See Introduction.	1-5
A	NCBI. GenBank accession no. XM_007895691.1 (09 May 2014) See the entire document.	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 MAY 2019 (16.05.2019)

Date of mailing of the international search report

16 MAY 2019 (16.05.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/010436

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2018-0054508 A	24/05/2018	CA 3038495 A1	26/04/2018
		US 0201489 B2	12/02/2019
		US 2017-0326058 A1	16/11/2017
		US 2019-0078094 A1	14/03/2019
		WO 2017-150785 A1	08/09/2017
		WO 2017-150891 A1	08/09/2017
		WO 2018-074763 A1	26/04/2018
US 9938641 B2	10/04/2018	US 2008-182759 A1	31/07/2008
US 2007-0112064 A1	17/05/2007	US 2005-0019373 A1	27/01/2005
		US 7125859 B2	24/10/2006
		US 7605141 B2	20/10/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 15/115(2010.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/115; A61K 31/355; A61K 31/375; A61K 8/97; C40B 20/00; C40B 30/04; A23L 33/10; A61K 8/60; A61Q 19/08

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:DNA 압타머, 항산화 물질, 비타민 C, L-아스코르브산


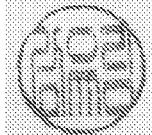
C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2018-0054508 A (주식회사 넥스모스) 2018.05.24 청구항 1; 단락 [0038] 참조.	1-5
A	US 9938641 B2 (WEST, J. A. A. 등) 2018.04.10 청구항 1 참조.	1-5
A	US 2007-0112064 A1 (LYLES, M. B.) 2007.05.17 청구항 1 참조.	1-5
A	BARRITA, JOSE LUIS SILENCIO 등, 'Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases.', OXIDATIVE STRESS AND CHRONIC DEGENERATIVE DISEASES - A ROLE FOR ANTIOXIDANTS, 2013, 페이지 449-484. Introduction 참조.	1-5
A	NCBI, GenBank accession no. XM_007895691.1 (2014.05.09) 전문 참조.	1-5

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2019년 05월 16일 (16.05.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 05월 16일 (16.05.2019)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516	
---	------------------------------------	---

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0054508 A	2018/05/24	CA 3038495 A1	2018/04/26
		US 0201489 B2	2019/02/12
		US 2017-0326058 A1	2017/11/16
		US 2019-0078094 A1	2019/03/14
		WO 2017-150785 A1	2017/09/08
		WO 2017-150891 A1	2017/09/08
		WO 2018-074763 A1	2018/04/26
US 9938641 B2	2018/04/10	US 2008-182759 A1	2008/07/31
US 2007-0112064 A1	2007/05/17	US 2005-0019373 A1	2005/01/27
		US 7125859 B2	2006/10/24
		US 7605141 B2	2009/10/20