(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 6 월 13 일 (13.06.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/112178 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/115 (2010.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/012958

(22) 국제출원일: 2018 년 10 월 30 일 (30.10.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0166589 2017 년 12 월 6 일 (06.12.2017) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: **구만복 (GU, Man Bock)**; 06505 서울시 서초구 신반포로19길 10 22-1209, Seoul (KR). **이방현 (LEE, Bang-Hyun)**; 06276 서울시 강남구 선릉로 221 101-907, Seoul (KR).

(74) 대리인: **이처영 등 (LEE, Cheo Young** et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).

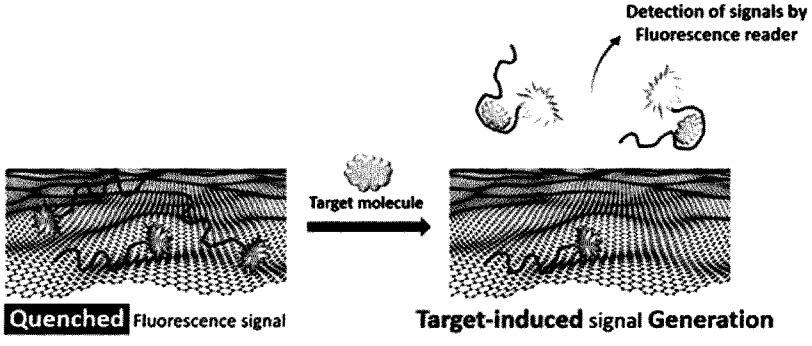
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, 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.

(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))
— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** DNA APTAMER BINDING SPECIFICALLY TO ODAM AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 오담에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 그의 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to a nucleic acid aptamer binding specifically to odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) and a use thereof. According to the present invention, a nucleic acid aptamer for detecting ODAM, and a method, a composition, a sensor, and a kit for detecting ODAM, each comprising the same aptamer, are useful for detecting ODAM present in a sample on the basis of the high specificity and affinity of the ODAM aptamer for ODAM.

(57) **요약서:** 본 발명은 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합하는 핵산 앱타머 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 오담 검출용 핵산 앱타머, 이를 포함하는 오담의 검출방법, 검출용 조성물, 검출용 센서 및 검출용 키트는 오담 앱타머의 오담에 대한 높은 특이성과 결합력을 바탕으로 시료 내 존재하는 오담의 검출에 유용하다.

WO 2019/112178 A1

명세서

발명의명칭: 오담에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 그의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합하는 핵산 앱타머 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 오담에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 핵산 앱타머와 이를 이용한 오담 검출방법 및 검출용 조성물, 센서, 키트에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)은 잇몸(치은)의 접합상피가 치아에 부착하는데 있어 필수적인 단백질이다. 잇몸에 치주염이 발생하여 치아와 상피간의 부착이 상실되면, 상피에 있던 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 이 치주낭으로 유리되어 구강 내 치은열구액 및 타액에서 검출된다. 이를 바탕으로 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)을 초기 잇몸질환 (치주질환, 임플란트 주위염)을 조기에 진단할 수 있는 초기 치주염 특이 바이오마커로 활용하고자 한다(KR 10-2016-0060288). 치주염은 환자 스스로의 자각증상이 늦게 나타나는 만성질환으로, 환자가 느끼지 못하는 사이에 염증이 진행되어 치아 주변 조직의 심한 파괴를 야기한다(Lee et al., J Biol Chem. Vol. 290(23), PP. 14740-53, 2015). 따라서 발치가 요구되는 상태로 뒤늦게 치과에 내원하는 경우가 흔하며 이는 임플란트 및 틀니 치료를 요구하여 막대한 경제적 손실을 가져온다. 이에 대해 현재 사용되고 있는 진단 방법은 질환의 결과만을 보여줄 수 있기 때문에 현재 질환의 활성화 상태를 보여줄 수는 없으며, 더불어 높은 거짓 양성을 보이는 한계점을 지닌다. 따라서 치과 혹은 다른 내과 영역에서의 이용이 용이한 형태의 진단 도구, 더 나아가서는 환자 스스로 집에서 손쉽게 자가 진단할 수 있는 진단 키트의 개발이 필요한 실정이다.

[4] 앱타머(aptamer)는 10^{12-14} 정도의 다양성을 가지는 랜덤 핵산 라이브러리로부터 얻어지는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA 분자 구조체를 말한다. 또한, 앱타머는 센서 분야에서 이용되는 기존의 감지물질인 항체와는 달리 핵산구조체 이므로 열 안정성이 우수하며, 시험관내(in vitro)에서 합성되기 때문에, 동물이나 세포가 따로 필요하지 않아 생산 비용 면에서도 경제적이며, 타겟 물질에 제약이 없어 단백질, 아미노산 같은 생분자 물질부터 환경호르몬, 항생제, 잔류 의약품 등의 저분자 유기화학 물질, 박테리아, 바이러스 등의 다양한 타겟에 대한 앱타머를 합성할 수 있다.

따라서 다양한 타겟 물질에 대한 앱타머가 만들어지고 있으며, 표적 물질과 특이성과 강한 친화도를 가지고 결합하는 앱타머의 특성으로 인해 최근 들어 앱타머를 신약 개발, 약물 전달 시스템 그리고 바이오센서 등에 응용하는 많은 연구가 이루어지고 있다. 따라서, 앱타머는 인체 유래물 내 극미량의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 농도 측정에 매우 적절한 물질이며, 이를 활용한 나노 바이오 기술을 통해 치주염 관련 질환과 연관된 특정 단백질을 검출하는데도 응용할 수 있다.

[5] 앱타머 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 앱타머의 합성은 타겟 선정에도 제약이 있을 수 있다. 이에, 고정화 방식의 한계를 극복하는 비고정화 방식의 앱타머 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 π-스태킹을 통해 결합하기 때문에 이런 특성을 응용한 광범위한 연구가 진행되고 있다.

[6] FRET(fluorescence resonance energy transfer) 진단법은 그 준비의 편리성과 간단한 작동법으로 인해 앱타머의 작동여부를 빠르고 간단하게 확인하는데 적합하다. 그래핀옥사이드는 소광물질(quencher)로서 FAM이라는 형광물질과 특정 거리 내에 존재할 때 520nm 근처에서 방출하는 FAM의 빛 에너지를 흡수한다. 이러한 현상을 FRET이라고 하며 이 실험은 다음과 같은 원리로 이루어진다. FAM으로 단일 가닥 DNA의 3'끝을 표지하고 이를 그래핀옥사이드와 반응시킨다. 그래핀옥사이드는 단일 가닥 DNA와 π-π 결합을 통해 비특이적으로 결합하고 이에 의해 FAM의 형광은 그래핀옥사이드에 의해 소광된다. 이 후 타겟을 넣어주면 단일 가닥 DNA와 타겟 간의 친화도가 그래핀옥사이드와의 친화도보다 큰 경우에 DNA가 그래핀 옥사이드로부터 떨어져 나와 다시 FAM의 형광이 나타난다. 반면 DNA와 타겟 사이 친화도가 더 낮은 경우에는 표적 단백질이 그래핀옥사이드에서 DNA 를 분리하지 못해 형광은 소광된 상태를 유지한다. 결합력의 차이가 형광의 방출량 차이로 나타나는 이러한 특성을 바탕으로 형광을 측정함으로써 단일 가닥 DNA과 타겟

간의 결합력을 확인할 수 있다(Zhu Y et al., ACS Appl Mater Interfaces, Vol 7(14, pp. 7492-7496, 2015). 또한, 앱타머를 사용하여 타겟의 유무를 판단하는데도 사용할 수 있다.

[7] SPR(surface plasmon resonance) 진단법은 매우 민감한 진단법으로 타겟의 존재 양을 민감하게 확인하는데 유용하다. SPR 칩의 금속 표면에 일정 질량 이상이 결합하게 되면 이는 금속표면에 형성되는 플라스몬(plasmon)을 동요시켜 공명 파장 변화를 일으키는데 이는 결과적으로 표면 위 굴절률 변화로 나타난다. SPR 칩 위에 스트렙타아비딘(streptavidin)-비오틴(biotin) 결합을 이용해 앱타머를 고정시키고 그 위로 타겟을 흘려주면 앱타머와 결합한 타겟의 양에 비례하여 SPR 신호가 증가한다. 이러한 특성을 바탕으로 SPR을 통해 타겟 단백질을 정량적으로 검출할 수 있다(Lee et al., Anal Chem, Vol 80(8), pp. 2867-2873, 2008). 뿐만 아니라, 하나의 타겟 단백질의 서로 다른 부위 혹은 여러 개의 동일한 부위에 결합할 수 있는 앱타머 듀오를 스크리닝하고 이를 타겟 검출법에 활용함으로써, 타겟에 대한 앱타머의 민감도를 향상시킬 수 있다.

[8]

[9] 이에, 본 발명자들은 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 검출 방법의 개선을 위해 예의 연구 노력한 결과, 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 DNA 앱타머를 SELEX를 통해 개발하였다. 또한, 상기 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 SPR 칩을 제조하여 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)을 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[10]

[11] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[12]

[13] **발명의 요약**

[14] 본 발명의 목적은 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)을 특이적으로 검출할 수 있는 핵산 앱타머 및 그 용도를 제공하는 것이다.

[15] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 18 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는, 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합하는 핵산 앱타머를 제공한다.

[16] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앱타머를 이용한 오담의 검출방법을 제공한다.

[17] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앱타머를 포함하는 오담 관련 질환의 진단용 조성물을 제공한다.

[18] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앱타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앱타머 또는 상기 복합체를 포함하는 오담 검출용 조성물, 센서, 및 검출용 키트를 제공한다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 앱타머를 이용한 FRET 분석법을 나타낸 것이다.

[22] 도 2는 그래핀옥사이드를 이용하여 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머 제조 과정의 모식도이다.

[23] 도 3은 selection round 에서부터 얻어진 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 결합하는 ssDNA 의 양이 증가함을 보여주는 그래프이다

[24] 도 4 내지 도 21은 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 서열번호 18의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

[25] 도 22는 DNA 앱타머의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 대한 친화도에 대한 FRET 분석 결과를 나타낸 것이다.

[26] 도 23은 DNA 앱타머 OD 5R-35 및 OD 5R-64를 이용한 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)과 타액 내에 가장 많이 존재하며 오담 단백질과 구분되어야 할 대표 단백질인 알파 아멜라아제(alpha amylase)와의 앱타머 반응정도를 SPR 로 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[27] 도 24는 DNA 앱타머 OD 5R-64를 이용한 다양한 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 농도에 대해 OD 5R-35 앱타머 듀오를 샌드위치 방식으로 반응시킨 후 SPR 분석 결과를 나타낸 것이다.

[28]

[29] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**

[30] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[31]

[32] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 GO-SELEX 프로세스를 이용하여 선별하였다. 그 결과, 서열번호 1 내지 18의 염기서열로 표시되는 핵산 앱타머가 상기 오담에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명의 일 실시예에서는, 오담에 특이적으로 결합 가능한

DNA 앱타머를 GO-SELEX 프로세스를 이용하여 선별한 것이다.

[33] 본 발명의 용어 "GO-SELEX 프로세스"란 임의적으로 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.

[34] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 내지 18 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는, 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합하는 핵산 앱타머에 관한 것이다.

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

[36] 본 발명의 핵산 앱타머는 GO-SELEX 공정에 의해 선택된, 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합하는 임의의 염기서열의 핵산 앱타머일 수 있다.

[37] 더욱 구체적으로, 본 발명의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 핵산 앱타머는 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다:

[38] 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;

[39] b) 상기 혼합액에 그래핀을 첨가하여 카운터 타겟물질에 결합하지 않는 단일가닥 핵산이 그래핀 표면에 흡착하도록 유도하는 단계;

[40] c) 상기 카운터 타겟물질에 결합하는 타겟 비특이적인 단일가닥 핵산을 제거하고, 오담을 첨가하여 그래핀에 결합된 타겟 특이적인 단일가닥 핵산에 대해 타겟에 의한 배좌 변위(conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앱타머를 분리하는 단계;

[41] d) 상기 단계에서 얻은 타겟물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 핵산에 대해 상기 PCR용 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 증폭시키는 단계; 및

[42] e) 상기 단계에서 얻은 PCR 생산물로부터 단일가닥 핵산을 분리하고 상기 단일가닥 핵산을 a) 단계의 혼합액에 첨가하여 그래핀 기반 선별과정을 반복 수행하는 단계.

[43] 상기 핵산 앱타머 제조방법의 d) 단계에서, 프라이머 쌍 중 하나에 플루오레세인(fluorescein)이 붙여진 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동을 통해 기 변성된 단일가닥 DNA를 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[44]

[45] 본 발명은 다른 관점에서, 본 발명의 핵산 앱타머를 시료와 접촉시키는 단계를

포함하는 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)의 검출방법에 관한 것이다.

[46] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 뇨로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 시료는 포유류, 바람직하게는 인체에서 분리된 것으로, 최소 침습으로 확보 가능한 시료 또는 분비체액, *in vitro* 세포배양액 성분 시료 등 오담을 포함하고 있을 수 있는 시료이면, 상기에 한정되지 않음은 자명하다. 보다 바람직하게는 타액 일 수 있다.

[47] 본 발명에 있어서, 상기 검출은 표면 플라스몬 공명(SPR, Surface Plasmon Resonance), FRET(Fluorescence resonance energy transfer) 및 금 나노입자 기반 색도 분석으로 구성된 군에서 선택되는 방법으로 검출하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[48] 본 발명에서 상기 검출은 금 나노입자 표면을 변형하여 앱타머를 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 앱타머가 물리적으로 흡착되어 있다가 타겟 물질이 있을 때 흡착되어 있던 앱타머과 타겟과의 결합으로 인해 금 나노입자의 표면에서 떨어져 나오는 현상에 의해 색이 변하는 특성을 이용하여 오담을 검출할 수 있다.

[49] 상기 검출은 또한, 금 칩(gold chip)을 이용한 자기공명분석 SPR (Surface Plasmon Resonance) 장비로 오담을 검출할 수 있다. 즉, 금 칩 (gold chip)에 앱타머를 공유결합 등으로 고정하여 타겟 물질이 있을 때 증가하는 response unit 값을 측정하는 방식을 이용하여 오담을 검출할 수 있다.

[50] 상기 검출은 또한, 그래핀옥사이드 기반 FRET 방법으로 오담을 검출할 수 있다. 즉, 그래핀옥사이드는 소광물질(quencher)로서 FAM이라는 형광물질과 특정 거리 내에 존재할 때 520nm 근처에서 방출하는 FAM의 빛 에너지를 흡수한다. 이러한 현상을 FRET이라고 하며 이 실험은 다음과 같은 원리로 이루어진다. FAM으로 단일 가닥 DNA(본원 발명의 앱타머)의 3'끝을 표지하고 이를 그래핀옥사이드와 반응시킨다. 그래핀옥사이드는 단일 가닥 DNA(본원 발명의 앱타머)와 π-π 결합을 통해 비특이적으로 결합하고 이에 의해 FAM의 형광은 그래핀옥사이드에 의해 소광된다. 이 후 시료 내 오담이 존재할 경우, 단일 가닥 DNA(본원 발명의 앱타머)와 오담 간의 친화도가 그래핀옥사이드와의 친화도보다 큰 경우에 DNA가 그래핀 옥사이드로부터 떨어져 나와 다시 FAM의 형광이 나타난다. 반면 DNA(본원 발명의 앱타머)와 오담 사이 친화도가 더 낮은 경우에는 오담이 그래핀옥사이드에서 DNA 를 분리하지 못해 형광은 소광된 상태를 유지한다. 결합력의 차이가 형광의 방출량 차이로 나타나는 이러한 특성을 바탕으로 형광을 측정함으로써 단일 가닥 DNA과 오담 간의 결합력을

확인할 수 있다.

[51]

[52] 본 발명의 앱타머는 이 기술분야에서 이미 공지된 방법에 의해 화학 합성할 수도 있다.

[53] 본 발명의 핵산 앱타머는, 오담에 대한 결합성, 안정성 등을 높이기 위해, 각 뉴클레오티드의 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).

[54] 본 발명의 핵산 앱타머는 또한 오담에 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.

[55] 또한, 뉴클레아제 및 가수분해에 대하여 내성을 갖도록, 본 발명의 핵산 앱타머에 포함되는 인산기가 변형되어 있어도 좋다. 예컨대, P(0)0기가, P(0)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 뉴클레오티드에 결합할 수 있다.

[56] 본 발명에서의 변형은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다.

[57] 변형은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오시드, 미리스토일 (Myristoyl), 리쏘콜릭-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.

[58]

[59] 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 서열번호 1 내지 18로 표시되는 핵산 앱타머 중 가장 높은 친화도를 보인 서열번호 4로 표시되는 핵산 앱타머인 OD 5R-35 및 서열번호 6으로 표시되는 핵산 앱타머인 OD 5R-64에 대하여, SPR 칩 기반

결합력 분석을 수행한 결과, 오담에 해당 앱타머가 특이적으로 결합함을 확인하였다.

[60] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산 앱타머를 포함하는 오담 관련 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[61] 본 발명에 있어서, 오담 관련 질환은 오담의 농도가 정상 범위를 벗어나게 되어 발생하는 질환이면 모두 이용 가능하나, 바람직하게는 치주염, 치은염, 상피성 치주암, 두개내 동맥류 및 임플란트 주위염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며 이에 제한되는 것은 아니다.

[62] 상기 오담 관련 질환의 진단은 상기 앱타머와 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 오담을 포함하고 있을 수 있는 시료이면, 상기에 한정되지 않음은 자명하다.

[63]

[64] 본 발명은 또 다른 관점에서 본 발명의 핵산 앱타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체에 관한 것이다.

[65] 본 발명에 있어서, 상기 고상 담체는 기판, 수지, 플레이트, 필터, 카트리지, 컬럼 및 다공재질인 고상 담체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[66] 본 발명에 있어서, 상기 기판은 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기판, 유리 기판, 아파타이트 (apatite) 기판, 실리콘 기판, 금 기판, 은 기판, 그래핀 옥사이드 기판 및 알루미나 기판으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[67] 본 발명의 기판은 칩이나 단백질 칩 등에 사용되고 있는 것 등일 수 있고, 예컨대 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기판이나 유리 기판, 아파타이트 (apatite) 기판, 실리콘 기판, 금, 은, 그래핀 옥사이드 또는 알루미나 기판 등으로, 이들의 기판에 폴리머 등의 코팅을 실시한 것을 들 수 있다.

[68] 상기 수지는 아가로스 (agarose) 입자, 실리카 입자, 아크릴아미드와 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체, 폴리스티렌 가교 디비닐벤젠 입자, 덱스트란을 에피클로로히드린으로 가교한 입자, 셀룰로오스파이버, 알릴덱스트란과 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 가교폴리머, 단분산계 합성폴리머, 단분산계 친수성폴리머, 세파로오스 (Sepharose) 또는 토요펄(Toyopearl) 등을 들 수 있고, 또한 이들의 수지에 각종 관능기를 결합시킨 수지를 사용할 수 있다.

[69] 상기 고상담체는 오담의 정제, 오담 단백질의 검출 또는 정량에 유용할 수 있다.

[70] 본 발명의 핵산 앱타머는 공지의 방법에 의해 고상담체에 고정할 수 있다. 예컨대, 친화성 물질이나 소정의 관능기를 본 발명의 앱타머에 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 앱타머의 말단에 바이오틴을 결합시켜 복합체를 형성하고, 상기 칩 등의 기판 표면에 스트렙타비딘을 고정화시켜, 상기 바이오틴과 기판 표면에 고정화된 스트렙타비딘의 상호작용에 의하여 상기 앱타머를 기판 표면에 고정화시킬 수 있다.

[71] 앱타머가 고정화된 고상담체를 이용하여 오담 단백질을 검출하는 방법은, 예를 들어, 본 발명의 DNA 앱타머를 칩 (chip)상에 형광물질, 발색물질 또는 항체 등과 함께 스팟팅 한 후 혈액샘플을 반응시킴으로써 검출 시료, 예를 들어, 혈액 중에 포함된 미량의 오담의 수준을 신속하게 측정할 수 있다. 또 다른 방법으로는 자성 비드에 상기 DNA 앱타머를 고정화시켜 오담을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앱타머-오담 복합체를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 오담을 분리함으로써 오담만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.

[72]

[73] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 핵산 앱타머 또는 상기 핵산 앱타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 포함하는 오담 검출용 조성물에 관한 것이다.

[74] 본 발명의 오담 검출용 조성물은 오담을 검출하기 위한 것으로, 오담의 검출을 위해 본 발명의 핵산 앱타머를 이용하여 어떠한 형태로도 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산 앱타머를 자성비드에 고정화시켜 오담을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앱타머-어딤 복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 오담을 분리함으로서 오담만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.

[75] 본 발명의 조성물을 이용하는 오담의 제거방법의 한 예를 들면, 상기 핵산 앱타머가 고정화된 자성비드를 컬럼 (column)에 채운 후 오담을 포함하는 시료를 통과시켜 오담만을 선택적으로 제거할 수 있다.

[76]

[77] 본 발명의 다른 실시 예에서는 상기 서열번호 1 내지 18로 표시되는 핵산 앱타머 중 가장 높은 친화도를 보인 서열번호 6으로 표시되는 핵산 앱타머 OD 5R-64에 대하여 SPR 칩 및 금 나노입자로 표지된 OD 5R-35 기반의 샌드위치 분석을 수행한 결과, 상기 샌드위치 방식을 사용할 경우, 오담에 대한 민감도가 증가함을 확인하였다.

[78] 따라서 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 서열번호 6으로 표시되는 앱타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체, 또는 서열번호 6으로 표시되는 앱타머를 함유하는 키트 또는 센서에 시료를 접촉시키는 단계; 및 (b) 서열번호 4로 표시되는 앱타머를 추가로 접촉시키는 단계; 를 포함하는 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein) 검출방법에 관한 것이다.

[79] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 4로 표시되는 앱타머는 금 나노입자로 표지되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[80]

[81] 본 발명은 또한, 상기 오담에 특이적으로 결합하는 앱타머 또는 상기 핵산 앱타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 함유하는 오담의 검출센서에 관한 것이다.

[82] 상기 오담에 특이적으로 결합하는 앱타머 또는 상기 핵산 앱타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 함유하는 검출 센서 시스템은, 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. 오담 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, 스토퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.

[83] 본 발명에 따른 오담에 특이적으로 결합하는 앱타머는 또한, 오담만을 특이적으로 검출하는바, 이를 포함하여 오담의 검출 또는 제거용 조성물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.

[84] 본 발명은 또 다른 관점에서, 오담에 특이적으로 결합하는 앱타머 또는 상기 핵산 앱타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체를 이용한 오담의 제거방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 양태에 따르면, 바람직하게는 상기 앱타머가 고정된 비드를 컬럼에 충진하고 오담이 포함된 시료를 통과시켜 오담을 제거할 수 있다.

[85]

[86] 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 자명할 것이다.

[87]

[88] **실시예 1: 임의의 염기서열을 가지는 DNA pool 합성**

[89] 56mer 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.

[90] CCATTCGTACGCAACAGG -random region- GTGGATGGCTCTGAATGC

[91] 서열번호 19: CCATTCGTACGCAACAGG

[92] 서열번호 20: GCATTCAGAGCCATCCAC

[93]

[94] **실시예 2: GO-SELEX 프로세스를 이용한 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이 DNA 앱타머의 선별**

[95] 실시예 1에서 합성한 랜덤 DNA pool을 버퍼용액(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na2HPO4, 1.8mM KH2PO4)에 넣고 그래핀옥사이드 용액과 혼합하여 30분간 상온에서 반응시켰으며, 그래핀옥사이드와 결합하지 않은 DNA를 원심분리 후 상층액을 제거함으로써 제거하였다. 본 혼합액에 타겟을 혼합하여 30 분간 4 ℃에서 반응시킨 다음, 원심분리를 통해 그래핀옥사이드를 제거한 후, 에탄올 침전법으로 타겟에 의해 그래핀옥사이드에서 분리된 DNA를 확보하였다.

[96] 수득한 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합하는 DNA의 양을 측정한 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 각 선별단계 (selection round) 에서 수득한 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 에 결합하는 DNA의 양이 증가하는 것을 확인하였다.

[97] GO-Counter SELEX에서는 랜덤 DNA pool과 그래핀옥사이드를 반응시킨 후 카운터 타겟[타액]을 혼합하여 30분간 4 ℃에서 반응시킨 후, 원심분리하여 상층액을 제거함으로써 카운터 타겟에 의해 그래핀옥사이드로부터 분리된 DNA를 제거한 다음, 타겟[오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)]를 넣고 30분간 4 ℃에서 반응시키고 나서, 원심분리를 통해 그래핀옥사이드를 제거한 후 에탄올 침전법으로 타겟에 얻어진 그래핀옥사이드에서 분리된 DNA를 확보하였다.

[98]

[99] **실시예 3: 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 에 결합 가능한 DNA 앱타머 pool의 제조**

[100] 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)과 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다.

[101] PCR 생산물은 두 가닥의 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위하여, 아래와 같이 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.

[102] forward (APTFf) 5-fluorescein- CCATTCGTACGCAACAGG-3: 서열번호19

[103] reverse (APTR) 5- GCATTCAGAGCCATCCAC-3: 서열번호 20

[104] PCR 반응물을 정제키트(purification kit)를 이용하여 정제한 후, 이중가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드젤 전기영동을 실시하였다.

[105] 10%의 폴리아크릴아마이드 젤에는 6M의 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 젤 추출(gel extraction)을 실시한 후, 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보하였다.

[106] 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음의 타겟이 들어 있는 버퍼용액과 혼합하여 새로운 선별과정을 시작한다. 이러한 과정의 모식도를 도 2 에 나타내었고, 일련의 과정(SELEX process)을 한 번의 선별 (selection)이라 하면 GO-SELEX 는 총 4번의 선별과정과 2번의 카운터 선별과정을 거쳐 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 결합하는 DNA pool을 얻었다.

[107] 최종적으로 얻어진 DNA pool을 Qiagen cloning kit를 이용하여 클로닝(cloning)하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행할 결과 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합하는 핵산 구조체를 확보하였다.

[108]

[109] **실시예 4: DNA 앱타머의 염기서열 분석 및 특이성 분석**

[110] 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA의 염기서열을 분석한 결과를 하기 표 1에 제시하였다. 또한, 이 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 앱타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 4 내지 도 21에 나타내었다.

[111] [표1]

오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머의 염기서열과 PCR primer

서열 번호	앱타머	염기서열
1	OD 5R-17	CCATTCGTACGCAACAGGGCGTGCGATATCGGACCCCCGTGGATGGCTCTGAATGC
2	OD 5R-29	CCATTCGTACGCAACAGGGAGCAATCAATTCGACAACCGTGGATGGCTCTGAATGC
3	OD 5R-32	CCATTCGTACGCAACAGGCTAGAGCGAAGACACCGAAAGTGGATGGCTCTGAATGC
4	OD 5R-35	CCATTCGTACGCAACAGGCGACCTAAACAACGCATCAGGTGGATGGCTCTGAATGC
5	OD 5R-39	CCATTCGTACGCAACAGGGACGTATGAATCACTCGCGTGTGGATGGCTCTGAATGC
6	OD 5R-64	CCATTCGTACGCAACAGGGATGCATCGACTGTAAACACGTGGATGGCTCTGAATGC
7	OD 5R-78	CCATTCGTACGCAACAGGTAACCTCACTCATGCTAGGCGTGGATGGCTCTGAATGC
8	OD 5R-82	CCATTCGTACGCAACAGGACAGCTGGCATCCTAACACCGTGGATGGCTCTGAATGC
9	OD 8R-9	CCATTCGTACGCAACAGGGACGTATGAACCACTCGCGTGTGGATGGCTCTGAATGC
10	OD 8R-13	CCATTCGTACGCAACAGGGACGTATGAATCACTCGCGTGTGGATGGCTCTGAATGC
11	OD 8R-14	CCATTCGTACGCAACAGGGAGCAATCAATCGACAACCGTGGATGGCTCTGAATGC
12	OD 8R-18	CCATTCGTACGCAACAGGGAGCAATCAATTCGACAACCGTGGATGGCTCTGAATGC
13	OD 8R-37	CCATTCGTACGCAACAGGCGCAGAACAAGCATTCCTTGTGGATGGCTCTGAATGC
14	OD 8R-55	CCATTCGTACGCAACAGGTCCAATCAGAAATAAACCTGGTGGATGGCTCTGAATGC
15	OD 8R-58	CCATTCGTACGCAACAGGCCAATGTAGACATAGTCCAGTGGATGGCTCTGAATGC
16	OD 8R-61	CCATTCGTACGCAACAGGCGCAGGCCAAGGATCATACAGTGGATGGCTCTGAATGC
17	OD 8R-64	CCATTCGTACGCAACAGGCCGCACCATGCAGCAAACTAGTGGATGGCTCTGAATGC
18	OD 8R-65	CCATTCGTACGCAACAGGTCTACACCATGCCACAACGCGTGGATGGCTCTGAATGC

[112] 상기의 DNA 앱타머가 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 대한 특이성이 있는지를 확인하였다.

[113] 3'말단에 FAM을 연결한 DNA 16nM과 20분간 초음파처리한 그래핀옥사이드 6.4ug/ml를 각 125ul을 상온에서 30분간 로테이터 상에서 반응시킨 후, 64 nM의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 250ul를 첨가해 추가로 30분간 반응시킨 다음, 검은 96-well 플레이트 상에서 멀티플레이트 리더기를 이용하여 형광 값을 측정하였다. 이 때 여기파장(excitation wavelength)은 480nm를 사용하였다. DNA와 그래핀옥사이드 두 가지 만을 반응 시켰을 때 나타나는 형광값을 F0로 하고 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 와 반응했을 때 형광값을 F라고 정의하였으며, (F-F0)/F0 결과 값을 측정한 결과, 도 22에 개시된 바와 같이, 모든 압타머의 (F-F0)/F0 값이 타겟이 존재할 경우가 그렇지 않을 때 보다 증가하는 것을 통해, 각각의 앱타머가 오담에 특이적으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[114]

[115] **실시예 5: DNA 앱타머의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated**

protein) 과의 결합력 분석

[116] 서로 다른 18종의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)과 결합하는 앱타머 중에서 OD 5R-35 및 OD 5R-64 의 타겟에 대한 Dose-dependency 및 Specificity 를 다음과 같이 SPR 분석법을 통하여 확인하였다.

[117] SPR 금칩(gold chip)을 DTPA(Dithiophosphoric acid)로 처리 후, 칩의 금 표면을 200mM EDC/50mM NHS (Carbodiimide/ N-Hydroxysuccinimide)에서 1시간, 100ug/ml 스트렙타아비딘 1시간 30분, 50mM 에탄올아민 30분, 비오틴 표지한 앱타머 1uM 1시간, 50ug/ml BSA 1시간을 차례로 상온에서 반응시켰다. 매 단계 3차 증류수로 금 표면을 씻어내고 질소 건을 이용해 건조 시켜주는 과정을 반복하였다.

[118] 상기 과정을 통해 앱타머를 고정시킨 SPR 칩을 SPR 기계에 삽입하고 칩 위로 버퍼 용액 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na2HPO4, 1.8mM KH2PO4) 10분, 타겟 단백질[오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)], 혹은 카운터 타겟 [alpha-amylase] 10분, 버퍼용액 10분을 30ul/sec로 흘려주어 측정한 Response Unit (RU) 값은 도 23에 개시된 바와 같이, 두 종류의 앱타머 모두 오담의 농도에 비례하여 RU 값이 증가하는 것을 확인하였으며, 알파 아밀라아제에는 결합하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[119]

[120] **실시예 6: DNA 앱타머의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 과의 앱타머 듀오로서의 결합력 분석**

[121] 서로 다른 18종의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합하는 앱타머 중 OD 5R-35 및 OD 5R-64가 앱타머 듀오로서 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)과 결합할 수 있는지의 여부를 SPR 장비를 통해 분석하였다.

[122] 실시예 5의 방법으로 앱타머 OD 5R-64를 고정시킨 SPR 칩을 SPR 기계에 삽입 후, PBS 10분, 샘플 10분, PBS 10분을 차례로 흘려주었다. 이 때 샘플은 0 nM, 1 nM, 2 nM, 4 nM, 8 nM, 16 nM, 32 nM, 64 nM 의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)이고, PBS 10분을 흘려 OD 5R-64 에 붙지 못한 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)을 씻어낸 다음, 차례로 금 나노입자로 표지한 OD 5R-35 를 10분간 흘려주었다. 동일하게 PBS 10분을 다시 흘려줌으로써 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 붙지 못한 금 나노입자로 표지된 OD 5R-35 를 씻어내었다.

[123] 즉, OD 5R-64를 포함하는 SPR 칩과, 금 나노입자로 표지한 OD 5R-35를 동시에 듀오로서 이용하여, 결합력을 측정한 결과, 도 24에 개시된 바와 같이, 앱타머 듀오를 샌드위치 방식으로 이용할 경우, 그 민감도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[124]

[125] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 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.

[126]

산업상 이용가능성

[127] 본 발명에 따르면 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 이용하여 체내의 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein)을 보다 간편하게 검출할 수 있다. 또한, 본 발명의 DNA 앱타머를 포함하는 오담 검출 방법 및 장치에 이용하여 극소량의 오담이 포함되어 있는 시료에서 타겟을 선택적으로 측정할 수 있다. 따라서, 인간의 혈중 내에 존재하는 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 농도를 쉽고 빠르게 측정함으로써 오담 (ODAM, Odontogenic AMeloblast-Associated protein) 관련 질병 진단에 유용하다.

[128]

서열목록 Free Text

[129] 첨부파일로 입력함

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1 내지 18 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는, 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein)에 특이적으로 결합하는 핵산 앱타머:
여기서, 상기 핵산 앱타머가 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U임을 특징으로 함.

[청구항 2] 제1항의 핵산 앱타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein)의 검출방법.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 뇨로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein)의 검출방법.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 검출은 표면 플라스몬 공명(SPR, Surface Plasmon Resonance), FRET(Fluorescence resonance energy transfer) 및 금 나노입자 기반 색도 분석으로 구성된 군에서 선택되는 방법으로 검출하는 것을 특징으로 하는 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein)의 검출 방법.

[청구항 5] 제1항의 핵산 앱타머를 포함하는 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein) 관련 질환의 진단용 조성물.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein) 관련 질환은 치주염, 치은염, 상피성 치주암, 두개내 동맥류 및 임플란트 주위염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 7] 제1항의 핵산 앱타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 고상 담체는 기판, 수지, 플레이트, 필터, 카트리지, 컬럼 및 다공재질인 고상 담체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 기판은 니켈-PTFE (폴리테트라플루오로에틸렌) 기판, 유리 기판, 아파타이트 (apatite) 기판, 실리콘 기판, 금 기판, 은 기판 그래픽 옥사이드 기판 및 알루미나 기판으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 복합체.

[청구항 10] 제1항의 핵산 앱타머 또는 제7항의 복합체를 포함하는 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein) 검출용 조성물.

[청구항 11] 제1항의 핵산 앱타머 또는 제7항의 복합체를 포함하는 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein) 검출용 센서.

[청구항 12] 1항의 핵산 앱타머 또는 제7항의 복합체를 포함하는 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein) 검출용 키트.

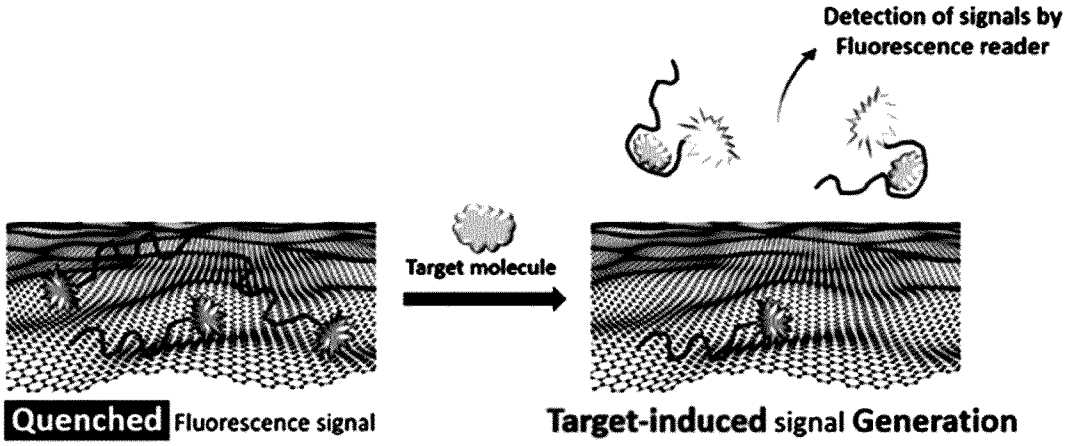
[청구항 13] (a) 서열번호 6으로 표시되는 앱타머가 고상담체에 고정되어 있는 복합체, 또는 서열번호 6으로 표시되는 앱타머를 함유하는 키트 또는 센서에

시료를 접촉시키는 단계; 및

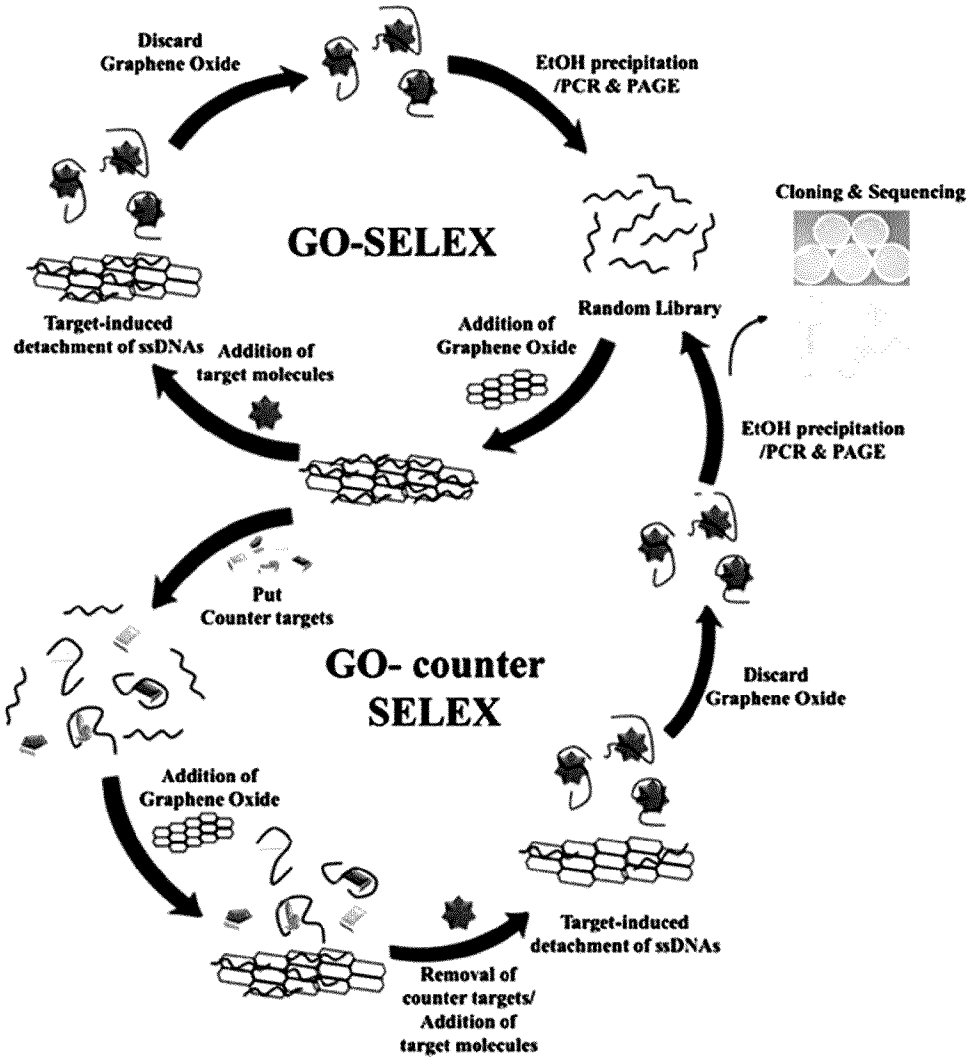
(b) 서열번호 4로 표시되는 앱타머를 추가로 접촉시키는 단계;

를 포함하는 오담(ODAM, Odontogenic Ameloblast-Associated protein) 검출방법.

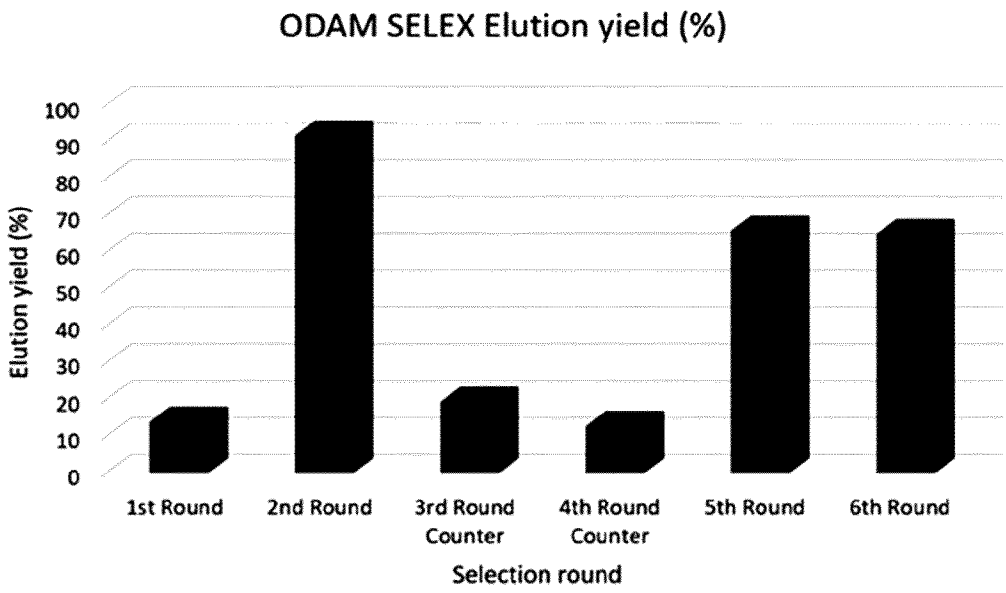
[도1]


Detection of signals by
Fluorescence reader
Target molecule
Quenched Fluorescence signal
Target-induced signal Generation

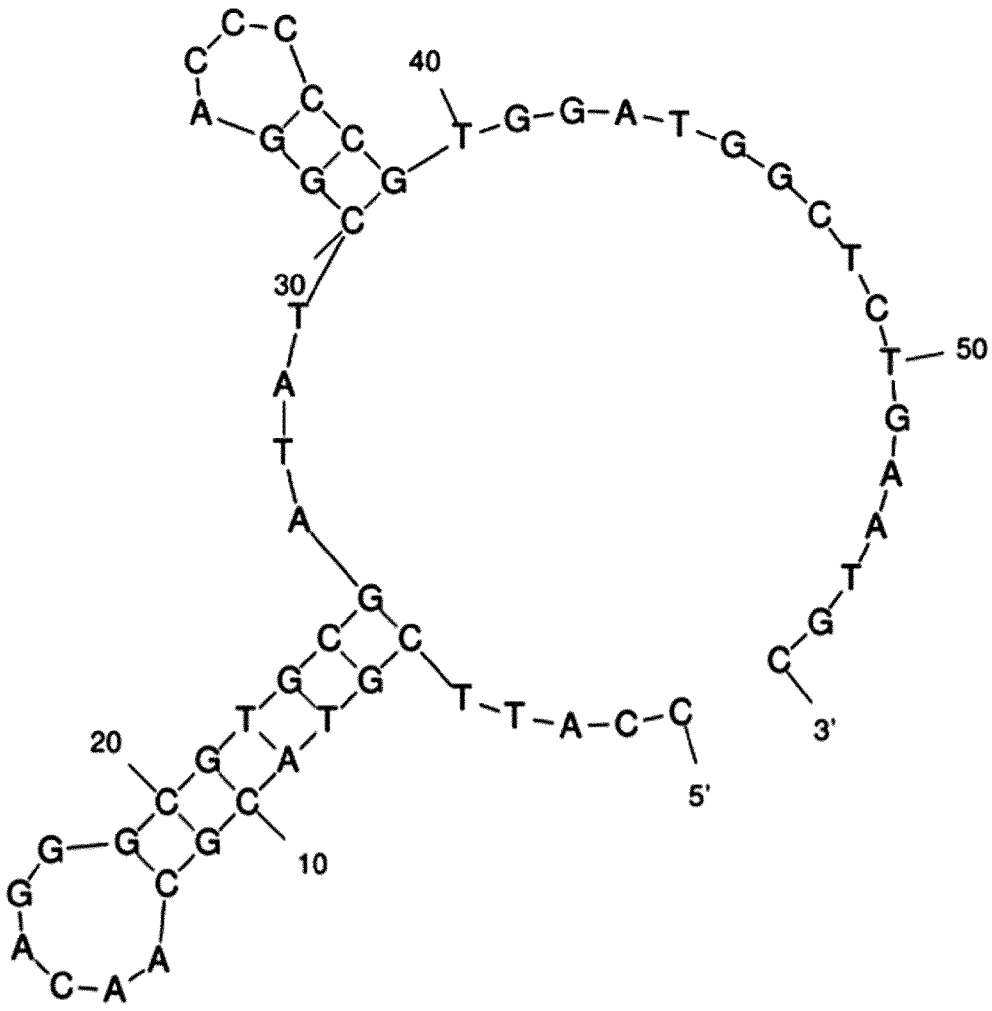
[도2]


Discard
Graphene Oxide
EtOH precipitation
/PCR & PAGE
GO-SELEX
Cloning & Sequencing
Random Library
Target-induced
detachment of ssDNAs
Addition of
target molecules
Addition of
Graphene Oxide
EtOH precipitation
/PCR & PAGE
Put
Counter targets
GO- counter
SELEX
Discard
Graphene Oxide
Addition of
Graphene Oxide
Target-induced
detachment of ssDNAs
Removal of
counter targets/
Addition of
target molecules

[도3]

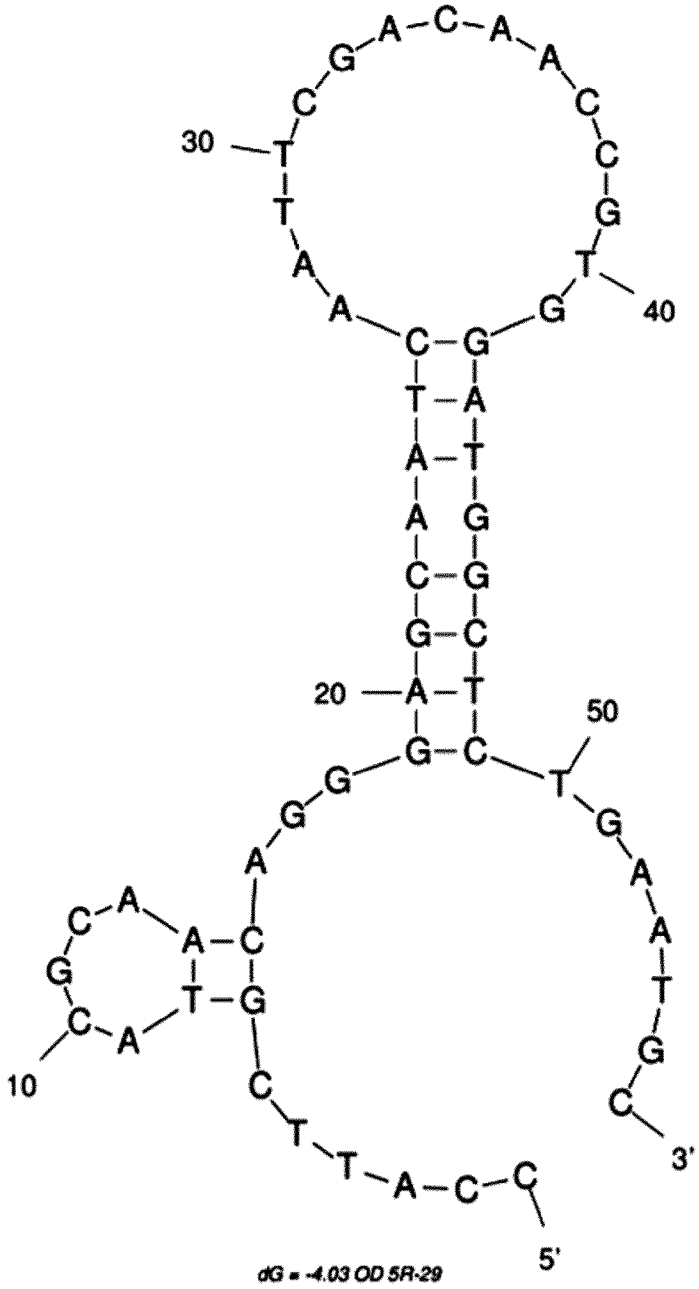

ODAM SELEX Elution yield (%)
Elution yield (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1st Round
2nd Round
3rd Round Counter
4th Round Counter
5th Round
6th Round
Selection round

[도4]

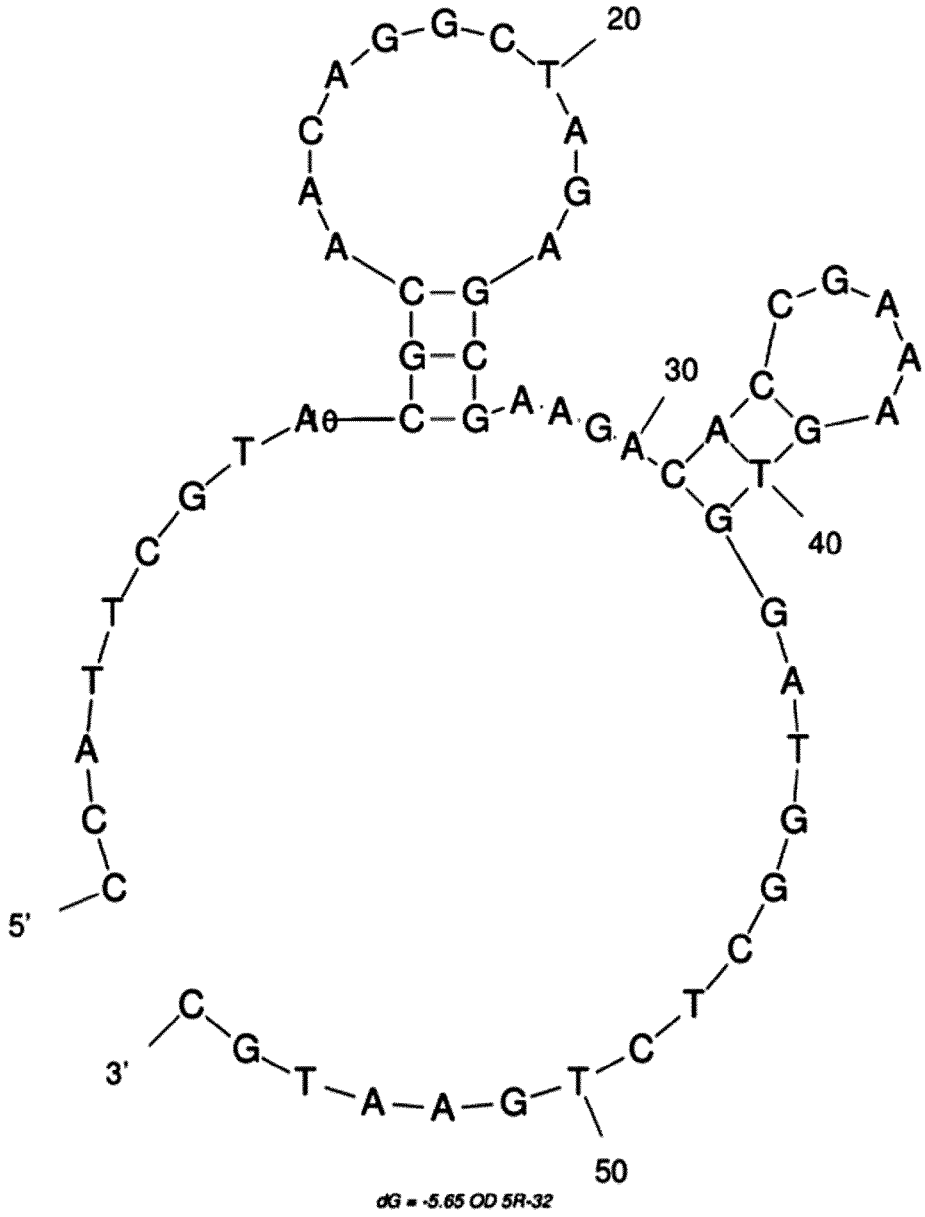


dG = -9.60 OD 5R-17

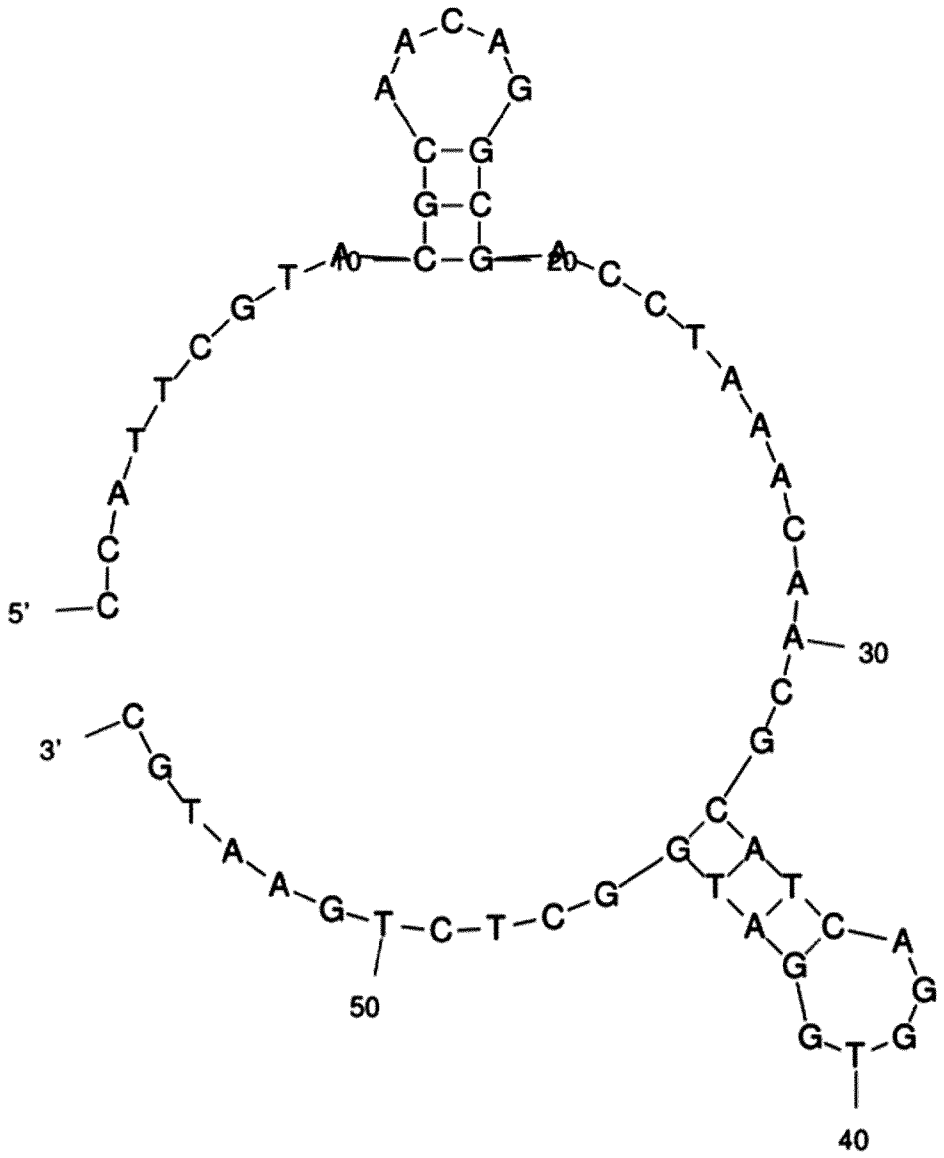
[도5]



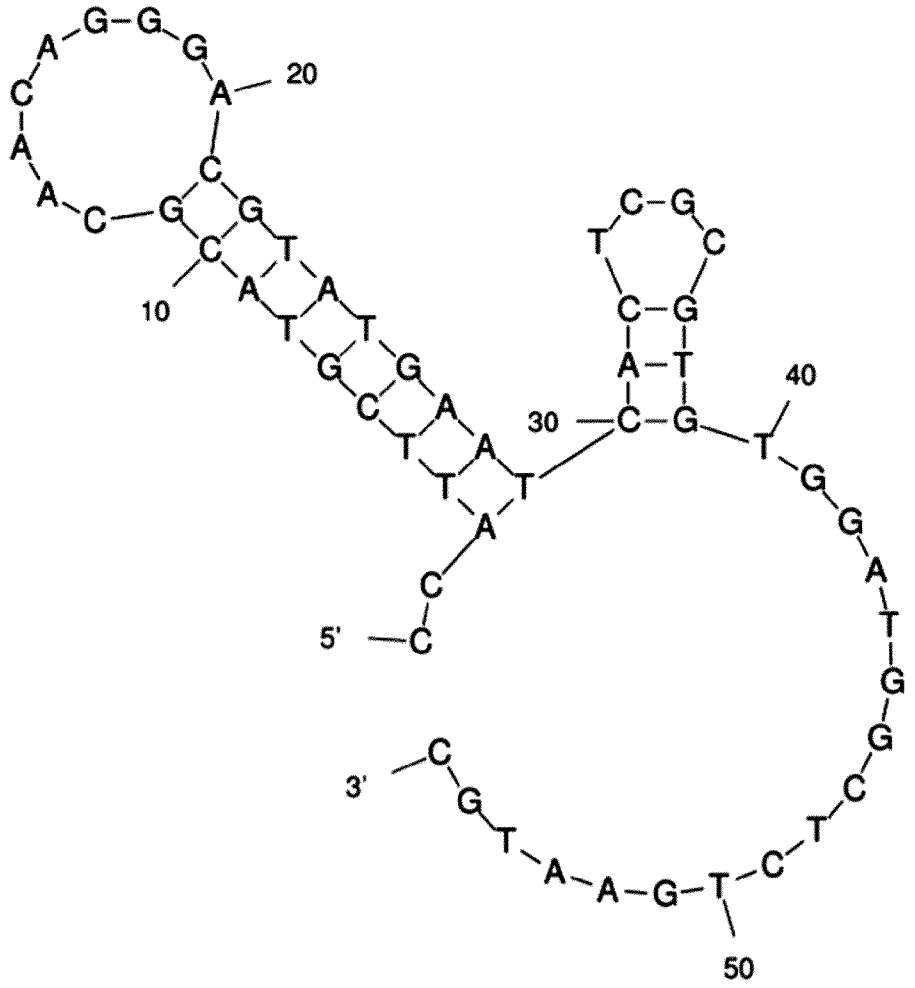
[도6]



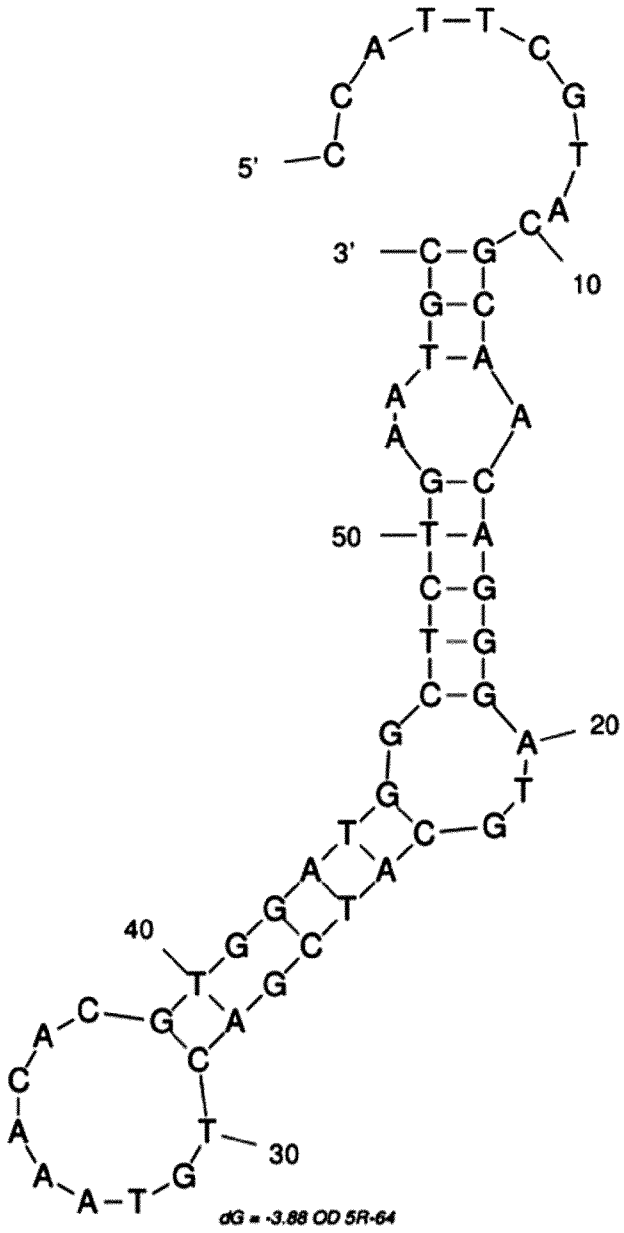
[도7]



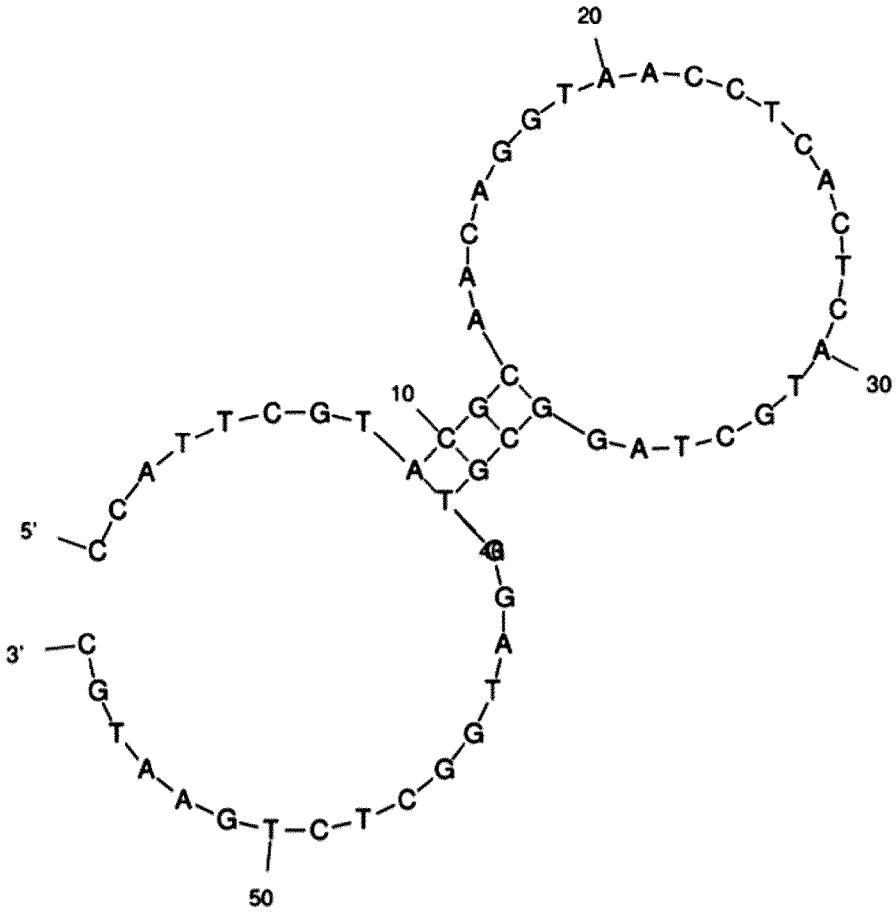
[도8]



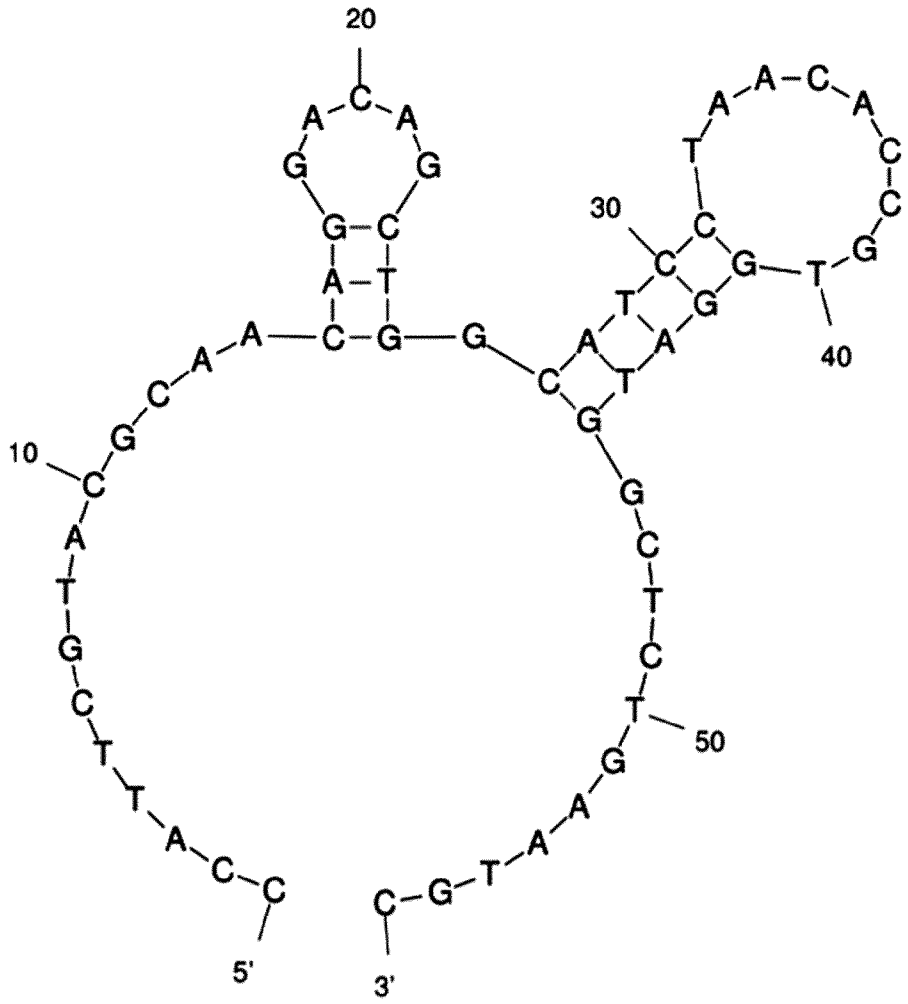
[도9]



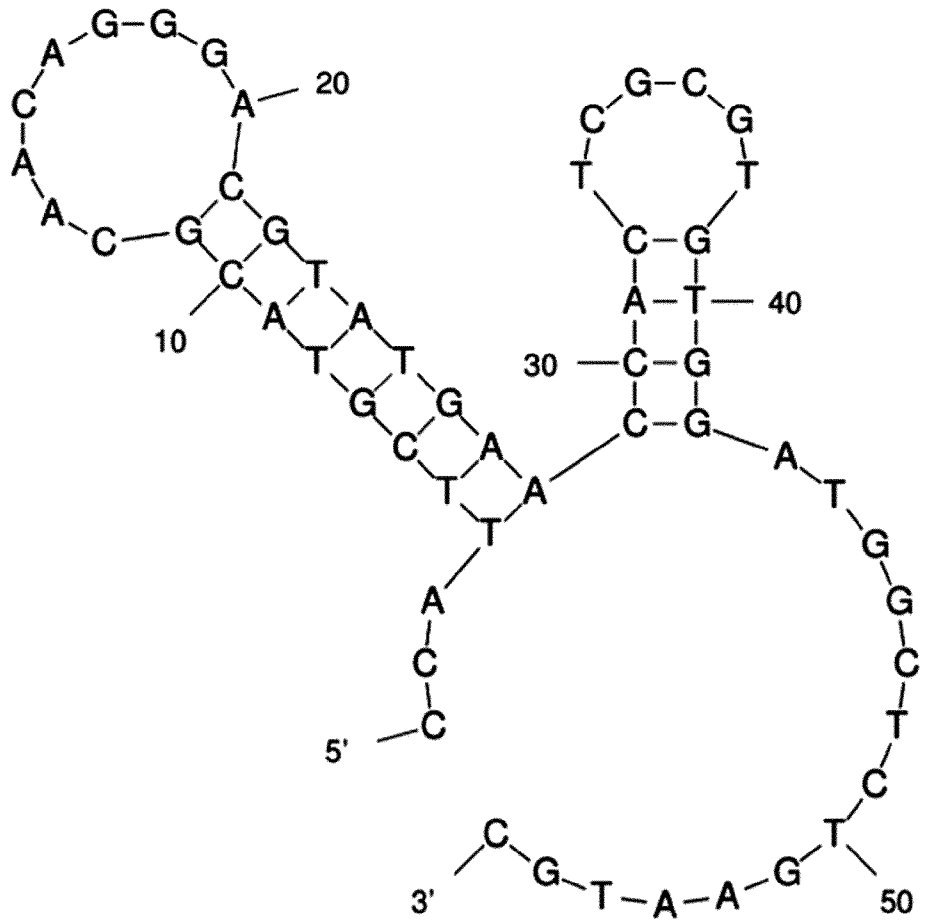
[도10]



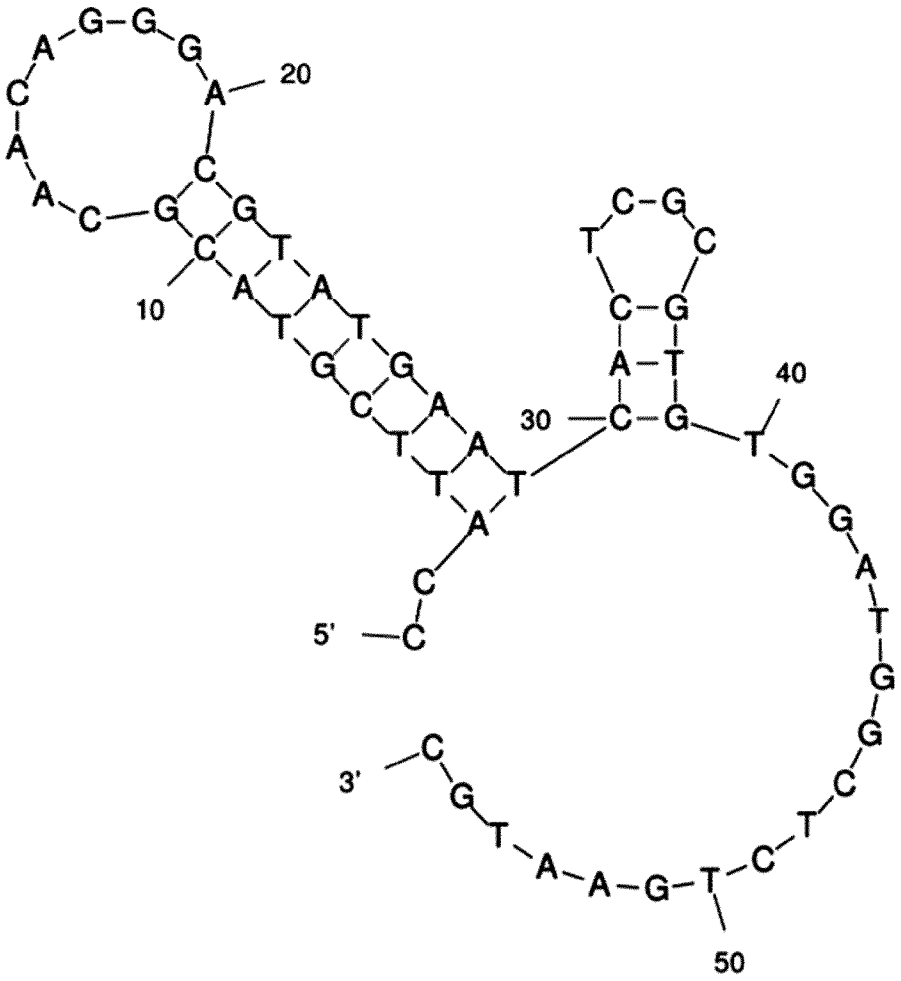
[도11]



[도12]

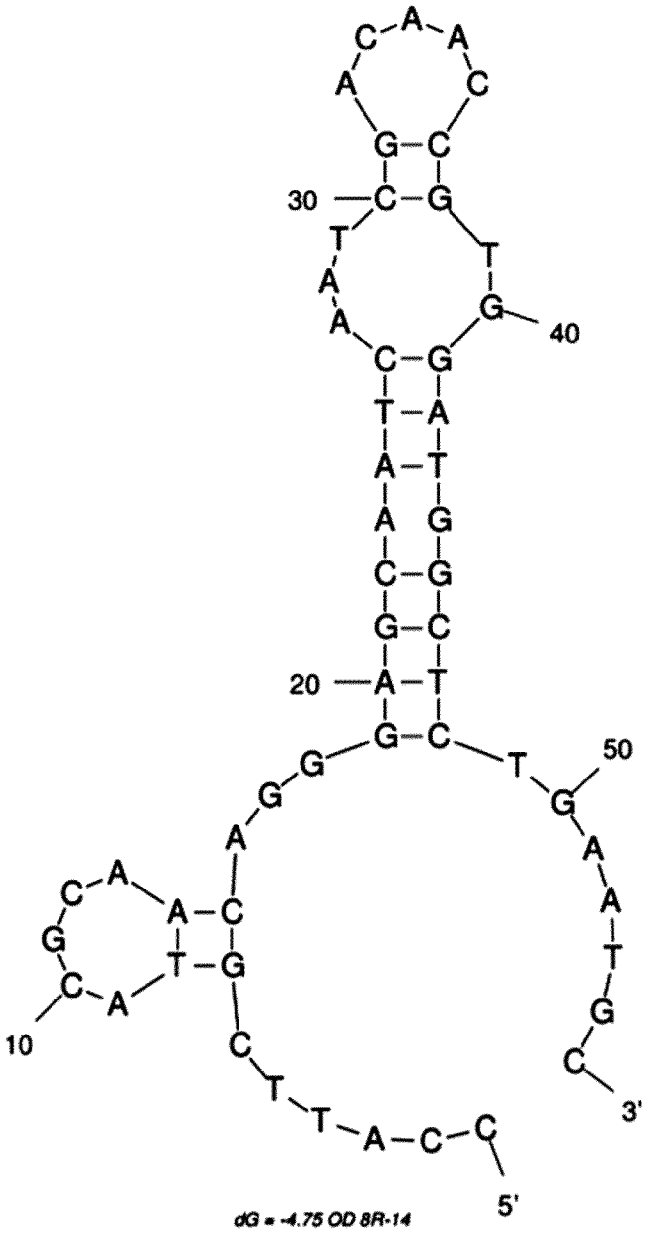


[도13]

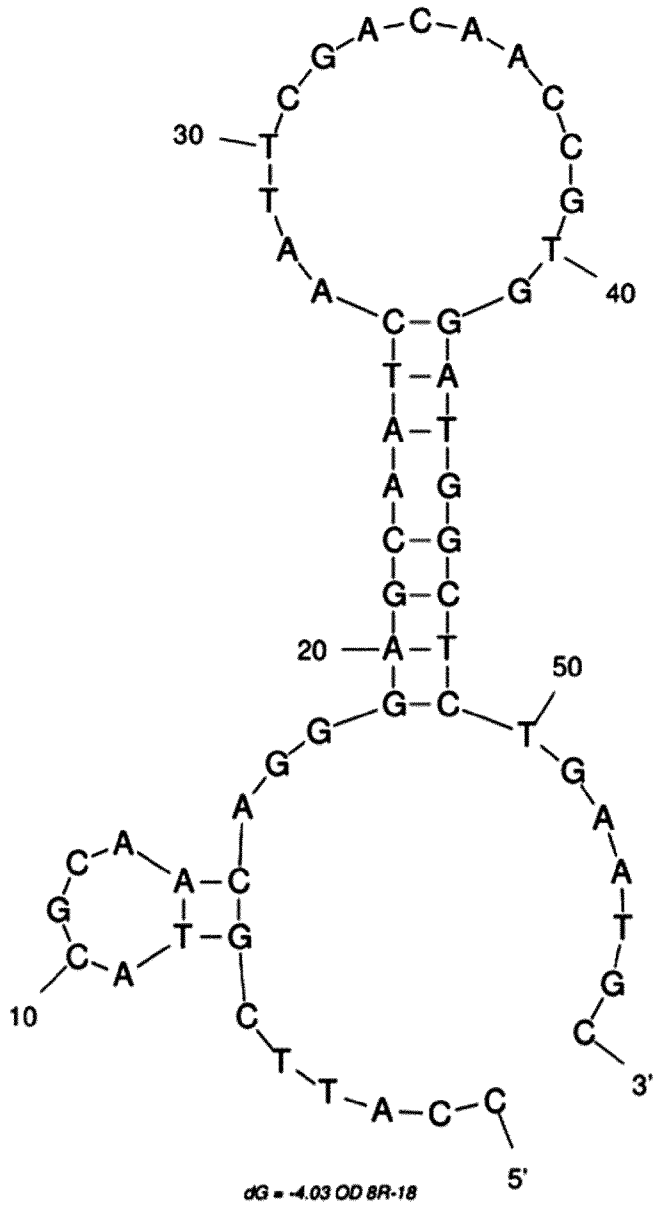


dG = -5.88 OD 8R-13

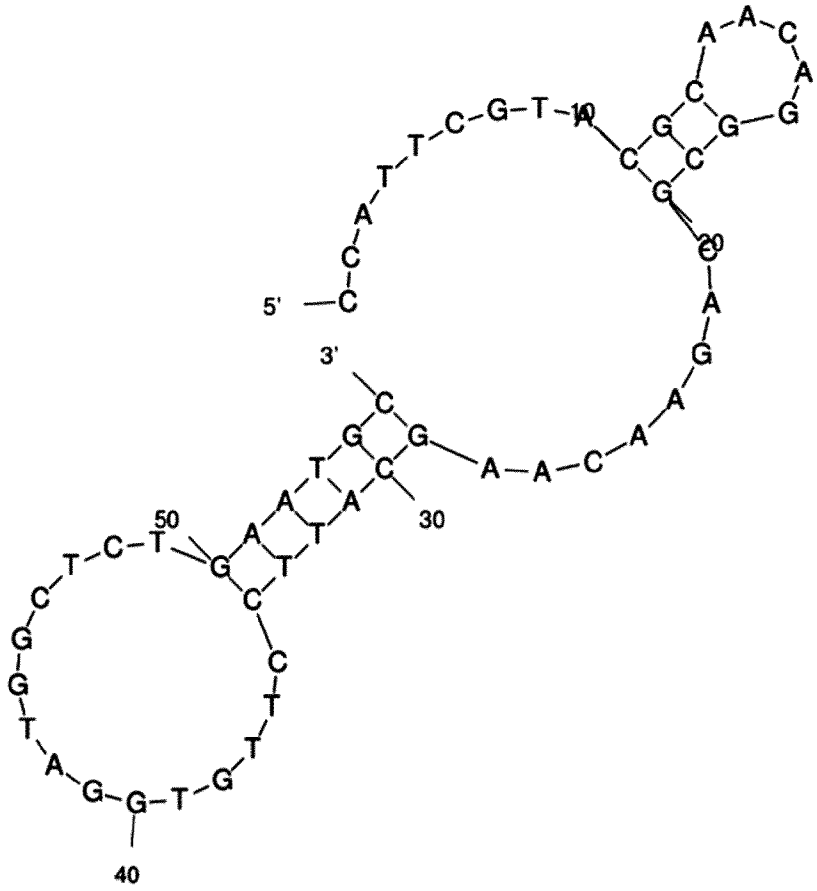
[도14]



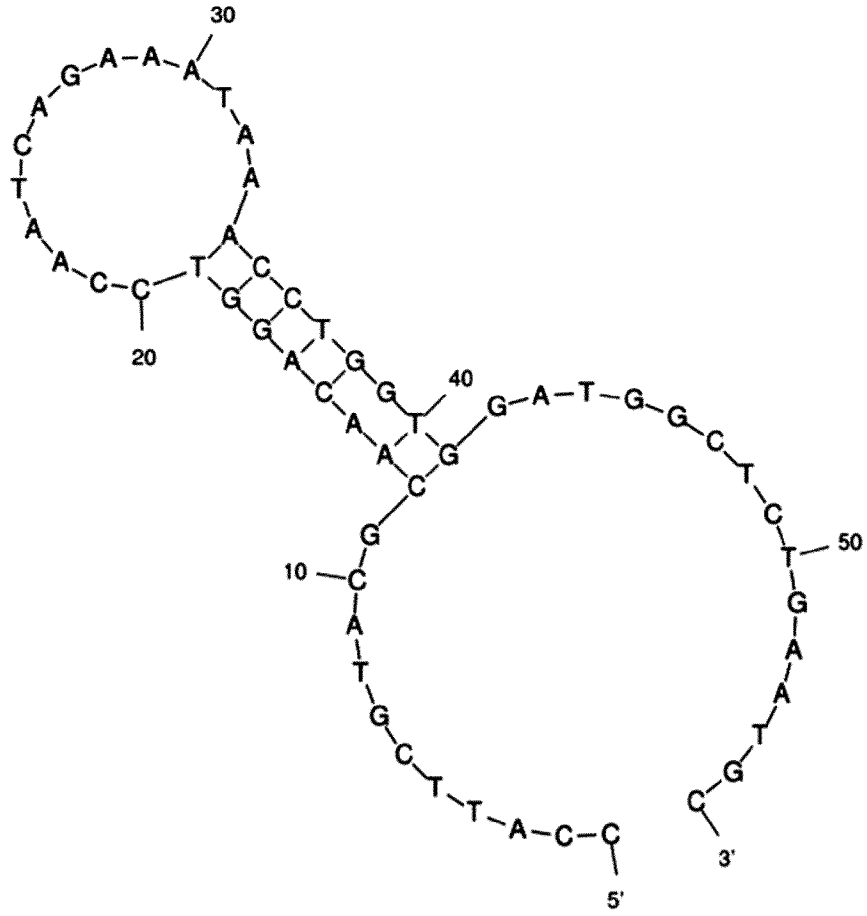
[도15]



[도16]

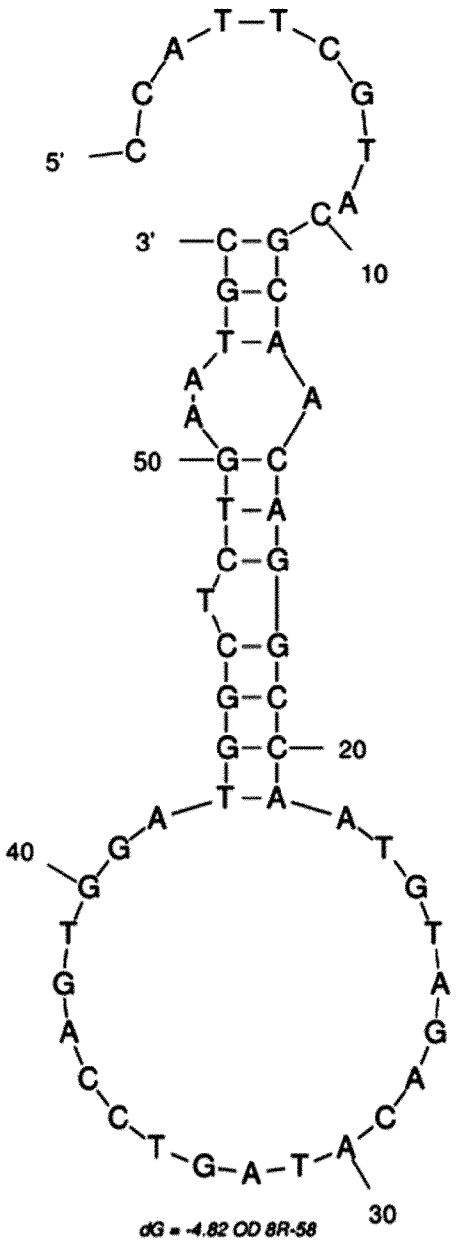


[도17]

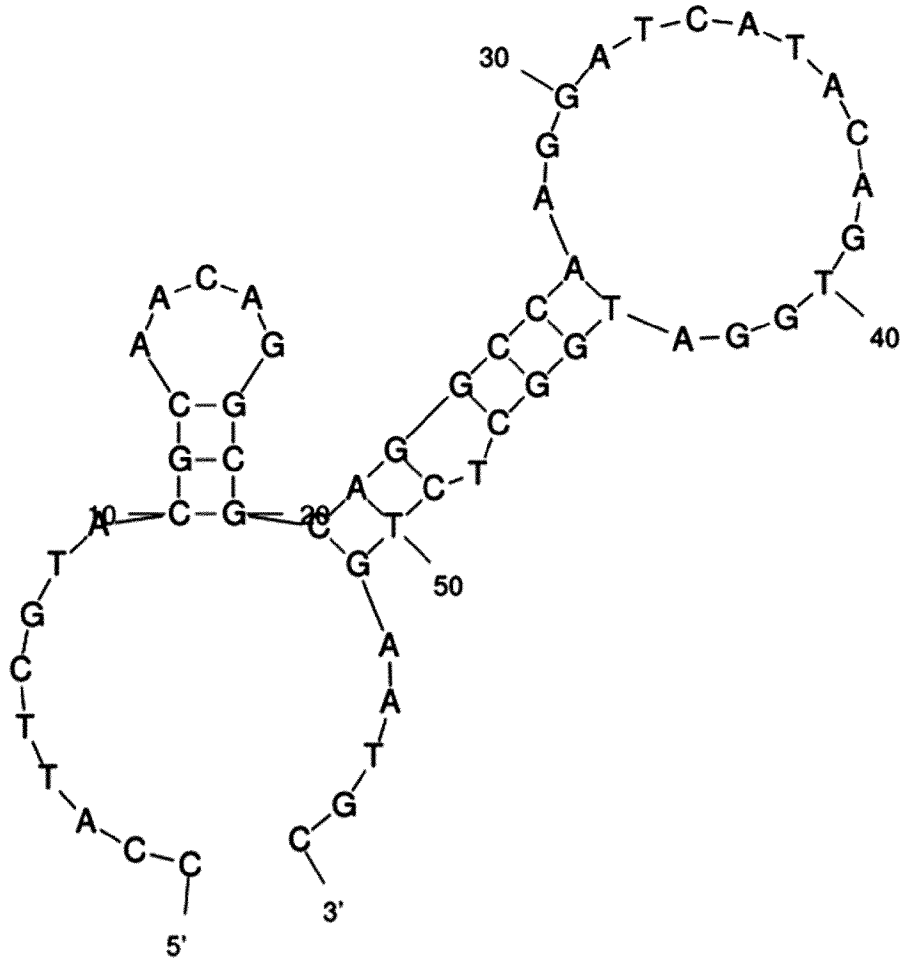


dG = -5.14 OD 8R-55

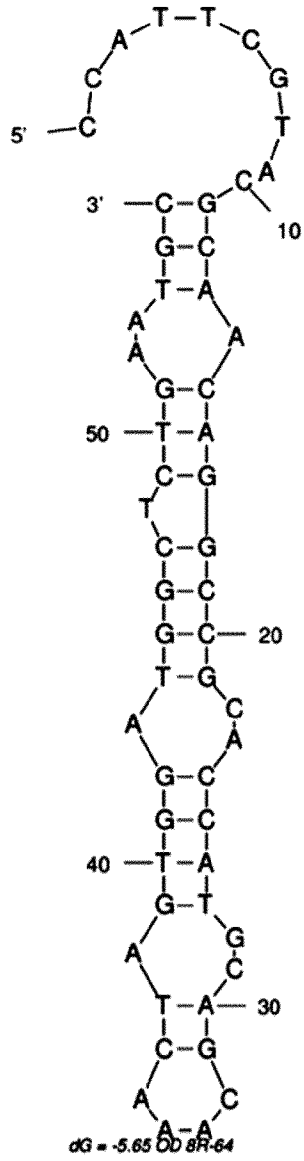
[도18]



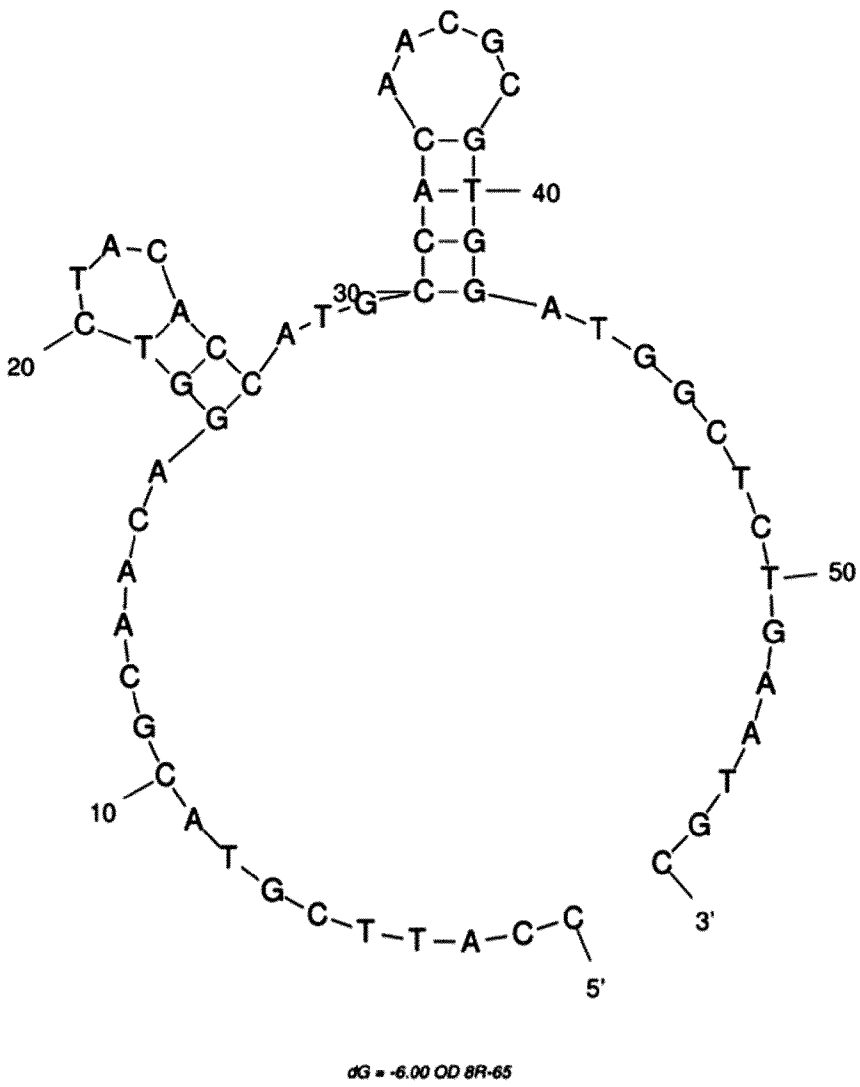
[도19]



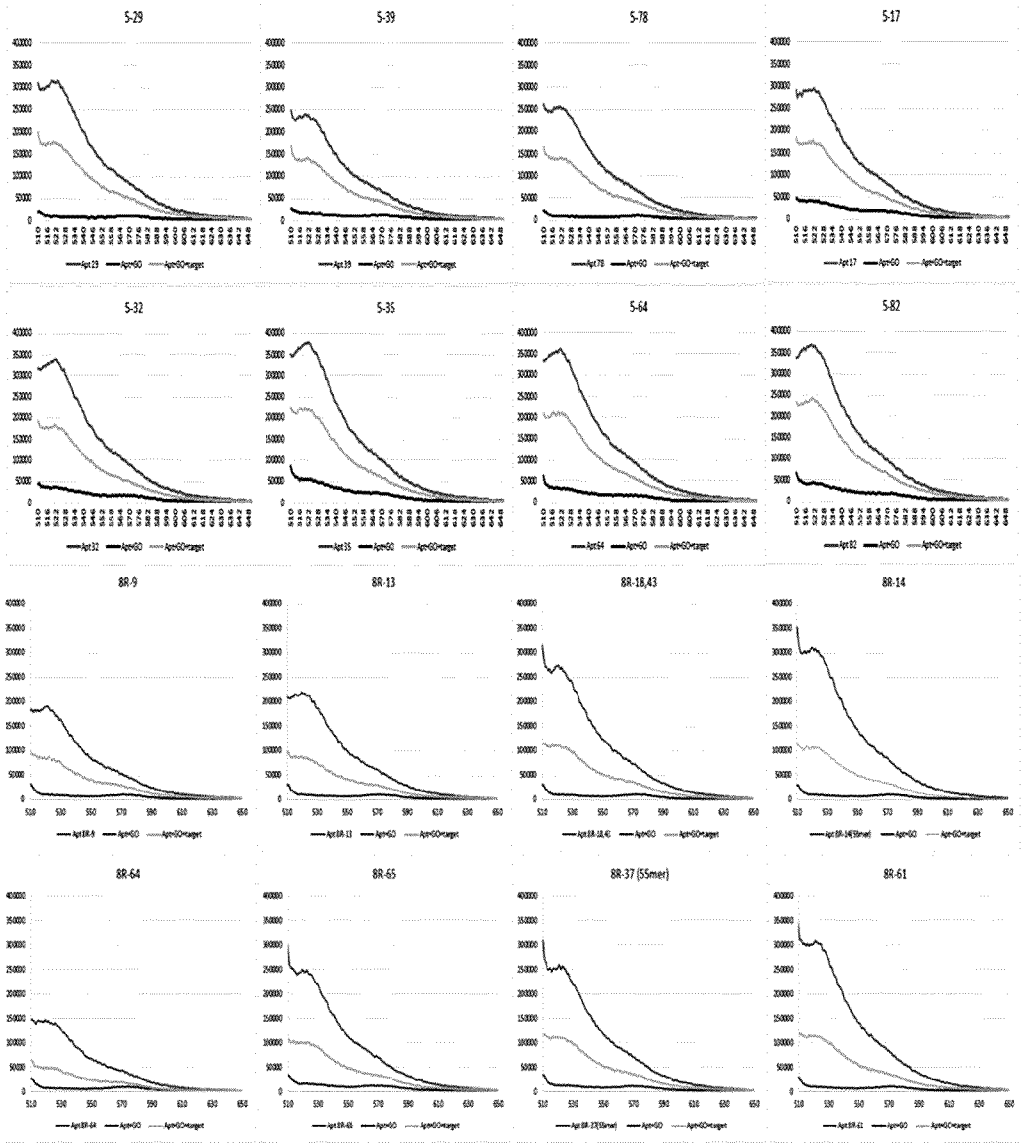
[도20]



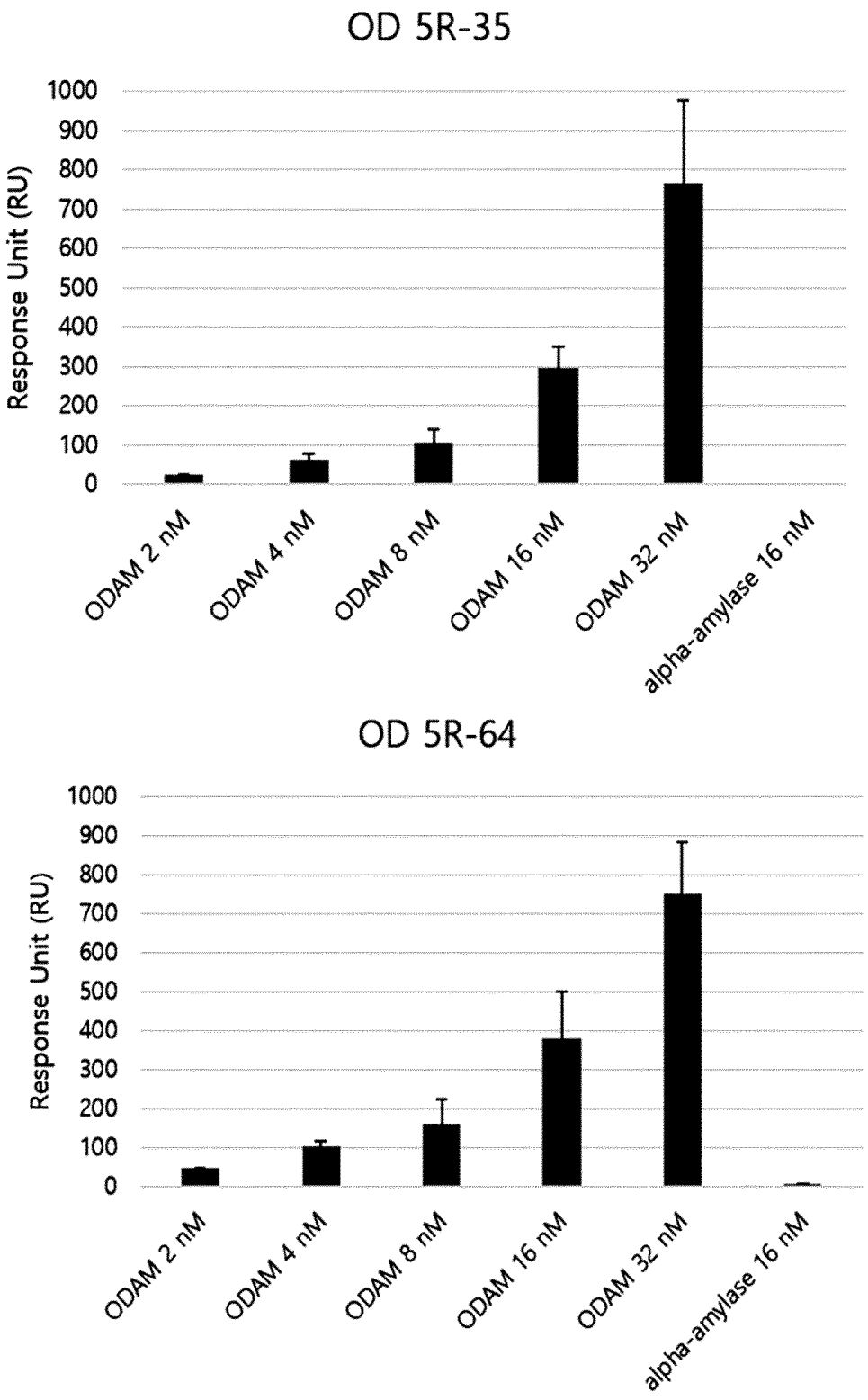
[도21]


A C G
A C
C G
A T 40
C G
C G 30
A T G G C T C T 50
G A A T G C 3'
A C T C A T C C A A C G C A T G C T T A C C 5'
10
20
dG = -6.00 OD 8R-65

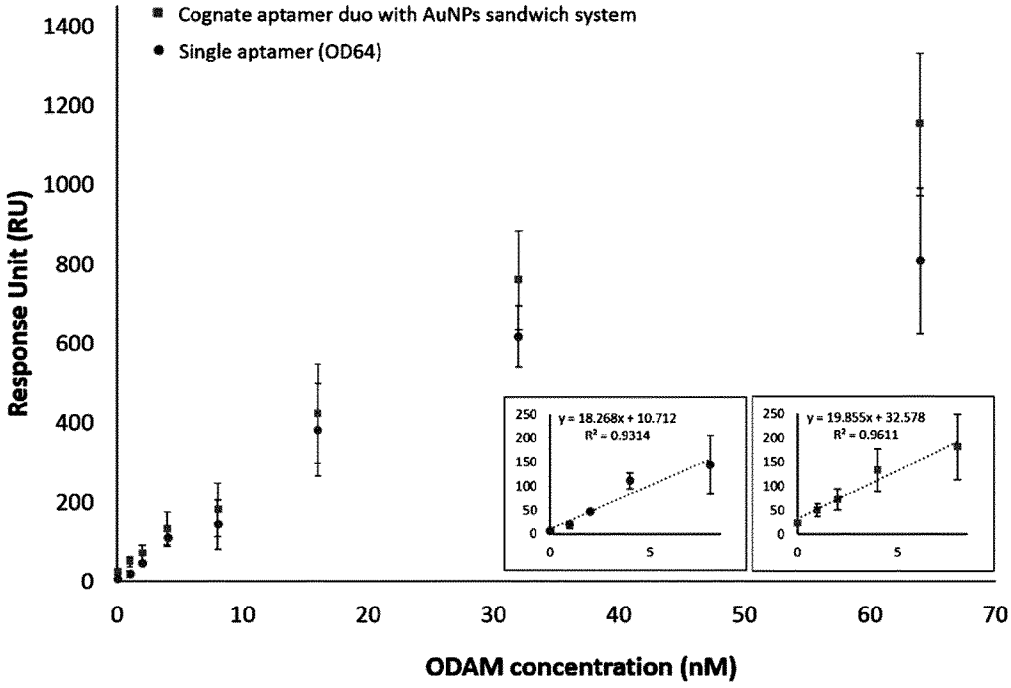
[도22]


5-29
5-39
5-78
5-17
5-32
5-35
5-64
5-82
8R-9
8R-13
8R-18,43
8R-14
8R-64
8R-65
8R-37 (55mer)
8R-61

[도23]


OD 5R-35
Response Unit (RU)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
ODAM 2 nM
ODAM 4 nM
ODAM 8 nM
ODAM 16 nM
ODAM 32 nM
alpha-amylase 16 nM
OD 5R-64
Response Unit (RU)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
ODAM 2 nM
ODAM 4 nM
ODAM 8 nM
ODAM 16 nM
ODAM 32 nM
alpha-amylase 16 nM

[도24]


Cognate aptamer duo with AuNPs sandwich system
Single aptamer (OD64)
Response Unit (RU)
ODAM concentration (nM)
y = 18.268x + 10.712
R² = 0.9314
y = 19.855x + 32.578
R² = 0.9611

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/012958

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/115(2010.01)i, G01N 33/543(2006.01)i, G01N 33/68(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; A01K 67/027; C07K 14/47; C12N 5/10; C12Q 1/68; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 33/543

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: ODAM, aptamer, solid carrier, periodontal disease, detection

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2016-0101889 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 26 August 2016 See abstract; paragraphs [0014], [0016], [0051]; and claims 2, 5.	1-3,5,6
Y		4,7-13
Y	KR 10-2013-0024551 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 08 March 2013 See paragraphs [0023], [0027], [0030], [0062]; example 2; and claims 11-13.	4,7-13
A	WO 2012-122640 A1 (UNIVERSITE DE MONTREAL) 20 September 2012 See the entire document.	1-13
A	KR 10-2011-0104805 A (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 23 September 2011 See the entire document.	1-13
A	KR 10-2015-0052311 A (KONINKLIJKE PHILIPS N.V.) 13 May 2015 See the entire document.	1-13
PX	LEE, Bang Hyun et al., "The Sensitive Detection of ODAM by Using Sandwich-type Biosensors with a Cognate Pair of Aptamers for the Early Diagnosis of Periodontal Disease", Biosensors and Bioelectronics, 2019(online publication date: 23 October 2018), vol. 126, pages 122-128 and Supporting Information See abstract; pages 123, 124, 126, 127; and Table S1.	1-13

☐ 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	Date of mailing of the international search report
22 APRIL 2019 (22.04.2019)	**24 APRIL 2019 (24.04.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
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	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/012958

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0101889 A	26/08/2016	KR 10-1731764 B1	02/05/2017
		KR 10-2016-0060288 A	30/05/2016
		WO 2016-080777 A1	26/05/2016
KR 10-2013-0024551 A	08/03/2013	KR 10-1297417 B1	19/08/2013
		KR 10-1322882 B1	29/10/2013
		US 2014-0363808 A1	11/12/2014
		US 2016-0202262 A1	14/07/2016
		US 9322024 B2	26/04/2016
		US 9562907 B2	07/02/2017
		WO 2013-032242 A2	07/03/2013
		WO 2013-032242 A3	11/07/2013
WO 2012-122640 A1	20/09/2012	NONE	
KR 10-2011-0104805 A	23/09/2011	KR 10-1222437 B1	15/01/2013
		KR 10-2011-0135911 A	20/12/2011
KR 10-2015-0052311 A	13/05/2015	BR 112015004881 A2	04/07/2017
		CA 2884089 A1	13/03/2014
		CN 104620110 A	13/05/2015
		EP 2893353 A2	15/07/2015
		EP 3396383 A1	31/10/2018
		JP 2015-529333 A	05/10/2015
		JP 6402106 B2	10/10/2018
		RU 2015-113089 A	27/10/2016
		US 2015-0219665 A1	06/08/2015
		WO 2014-037924 A2	13/03/2014
		WO 2014-037924 A3	22/05/2014

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2018/012958

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/115(2010.01)i, G01N 33/543(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/115; A01K 67/027; C07K 14/47; C12N 5/10; C12Q 1/68; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 33/543

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: 오담, 앱타머, 고상 담체, 치주 질환, 검출

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2016-0101889 A (서울대학교산학협력단) 2016.08.26 요약; 단락 [0014], [0016], [0051]; 및 청구항 2, 5 참조.	1-3,5,6
Y		4,7-13
Y	KR 10-2013-0024551 A (고려대학교 산학협력단) 2013.03.08 단락 [0023], [0027], [0030], [0062]; 실시예 2; 및 청구항 11-13 참조.	4,7-13
A	WO 2012-122640 A1 (UNIVERSITE DE MONTREAL) 2012.09.20 전체 문헌 참조.	1-13
A	KR 10-2011-0104805 A (경북대학교 산학협력단) 2011.09.23 전체 문헌 참조.	1-13
A	KR 10-2015-0052311 A (코닌클리케 필립스 엔.브이.) 2015.05.13 전체 문헌 참조.	1-13
PX	LEE, BANG HYUN 등, 'The sensitive detection of ODAM by using sandwich-type biosensors with a cognate pair of aptamers for the early diagnosis of periodontal disease', Biosensors and Bioelectronics, 2019(온라인 공개일: 2018.10.23), 126권, 페이지 122-128 및 Supporting Information 요약; 페이지 123, 124, 126, 127; 및 Table S1 참조.	1-13

☐ 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 신규성 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	국제조사보고서 발송일
2019년 04월 22일 (22.04.2019)	2019년 04월 24일 (24.04.2019)

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

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/012958

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0101889 A	2016/08/26	KR 10-1731764 B1	2017/05/02
		KR 10-2016-0060288 A	2016/05/30
		WO 2016-080777 A1	2016/05/26
KR 10-2013-0024551 A	2013/03/08	KR 10-1297417 B1	2013/08/19
		KR 10-1322882 B1	2013/10/29
		US 2014-0363808 A1	2014/12/11
		US 2016-0202262 A1	2016/07/14
		US 9322024 B2	2016/04/26
		US 9562907 B2	2017/02/07
		WO 2013-032242 A2	2013/03/07
		WO 2013-032242 A3	2013/07/11
WO 2012-122640 A1	2012/09/20	없음	
KR 10-2011-0104805 A	2011/09/23	KR 10-1222437 B1	2013/01/15
		KR 10-2011-0135911 A	2011/12/20
KR 10-2015-0052311 A	2015/05/13	BR 112015004881 A2	2017/07/04
		CA 2884089 A1	2014/03/13
		CN 104620110 A	2015/05/13
		EP 2893353 A2	2015/07/15
		EP 3396383 A1	2018/10/31
		JP 2015-529333 A	2015/10/05
		JP 6402106 B2	2018/10/10
		RU 2015-113089 A	2016/10/27
		US 2015-0219665 A1	2015/08/06
		WO 2014-037924 A2	2014/03/13
		WO 2014-037924 A3	2014/05/22