(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0024551
(43) 공개일자 2013년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0088066
(22) 출원일자 2011년08월31일
심사청구일자 2011년08월31일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
구만복
서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동)
박지웅
서울특별시 송파구 오금로32길 5, 삼익아파트 201동 102호 (송파동)
라메쉬 타타바르티
서울특별시 성북구 안암로 145, 기숙사 447호 (안암동5가, 고려대학교)
(74) 대리인
특허법인다나

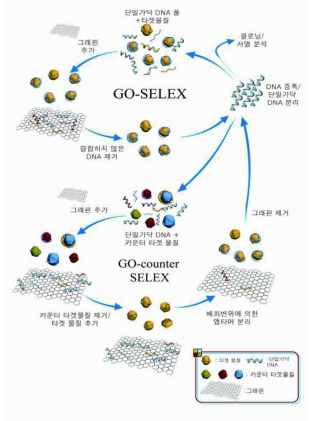
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **타겟 비고정화 방식의 그래핀을 이용한 앱타머 선별방법 및 이로부터 선별된 Nampt 특이 앱타머**

(57) 요 약

본 발명은 타겟 비고정화 방식의 그래핀을 이용한 앱타머 선별방법 및 이로부터 선별된 Nampt 특이 앱타머에 관한 것으로, 보다 상세하게는 고정되지 않은 타겟 물질(Nampt)과 단일가닥 DNA 풀을 반응시키고, 그래핀을 이용하여 타겟과 결합하지 않은 단일가닥 DNA를 제거하는 신규한 타겟 비고정화 방식의 GO-SELEX 방법을 제공한다. 또한, 상기 방법을 통해 얻은 Nampt 단백질 특이적인 앱타머는 보다 신속하고 정확하게 2형 당뇨, 암 등 Nampt 관련 질환을 진단할 수 있다..

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

양끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 염기를 가지는 단일가닥 DNA 풀(pool)과 타겟 물질의 혼합물로부터 그래핀을 이용하여 타겟 물질에 결합되지 않은 단일가닥 DNA를 제거하는 단계를 포함하는

타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

타겟 물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA에 대해 타겟 물질과 카운터 타겟 물질을 이용하여 그래핀 기반 선별(selection) 및 카운터 선별(counter selection) 과정을 반복 수행하는 단계를 더 포함하는

타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 그래핀 기반 카운터 선별 과정은

카운터 타겟 물질에 결합하는 타겟 비특이적인 단일가닥 DNA를 제거하고, 그래핀에 결합된 타겟 특이적인 단일가닥 DNA에 대해 타겟에 의한 배좌 변위(Conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앱타머를 분리하는 단계를 포함하는

타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

타겟 물질은 단백질 또는 분자량이 10 내지 2000 달톤인 저분자 물질을 포함하는

타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

타겟 물질은 남프트(Nampt, Nicotinamide phosphoribosyltransferase) 단백질을 포함하는

타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법.

청구항 6

서열목록 서열번호 4 내지 18 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머.

청구항 7

제6항에 있어서,

DNA 앱타머는 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 제조방법에 의해 제조되는 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머.

청구항 8

제6항에 기재된 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 남프트(Nampt) 단백질 검출용 조성물.

청구항 9

제6항에 기재된 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 남프트(Nampt) 관련 질환의 진단용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

남프트(Nampt) 관련 질환은 제2형 당뇨병, 대장암, 전립선암, 유방암, 위암, 다낭성 난소 증후군, 만성 신부전증, 또는 만성 폐쇄성 폐질환인 조성물.

청구항 11

제6항에 기재된 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머가 고정화된 고상 담체.

청구항 12

제11항에 있어서,

고상 담체는 기판, 수지, 플레이트, 필터, 카트리지, 컬럼 또는 다공질재인 고상 담체.

청구항 13

제12항에 있어서,

기판은 니켈-PTFE(폴리테트라플루오로에틸렌) 기판, 유리 기판, 아파타이트(apatite) 기판, 실리콘 기판, 금 기판, 은 기판 또는 알루미나 기판인 고상 담체.

청구항 14

제11항에 있어서,

고상 담체는 남프트(Nampt) 단백질 검출용 담체인 고상 담체.

청구항 15

제11항에 있어서,

고상 담체는 남프트(Nampt) 관련 질환 진단용 담체인 고상 담체.

청구항 16

제15항에 있어서,

남프트(Nampt) 관련 질환은 제2형 당뇨병, 대장암, 전립선암, 유방암, 위암, 다낭성 난소 증후군, 만성 신부전증, 또는 만성 폐쇄성 폐질환인 고상 담체.

청구항 17

제11항의 고상 담체에 남프트(Nampt) 단백질을 흡착시키고, 흡착된 남프트(Nampt) 단백질을 용출액에 의해 용출시키는 단계를 포함하는 남프트(Nampt) 단백질의 농축 및 정제 방법.

청구항 18

제6항에 기재된 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 남프트(Nampt) 단백질 검출용 키트.

청구항 19

제6항에 기재된 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 남프트(Nampt) 관련 질환의 진단용 키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고정되지 않은 타겟 물질(Nampt)과 단일가닥 DNA 풀을 반응시키고, 그래핀을 이용하여 타겟 물질과 결합하지 않은 단일가닥 DNA를 제거하는 신규한 타겟 비고정화 방식의 GO-SELEX 방법을 이용하여 얻은 Nampt 단백질 특이적인 앱타머에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 기존 바이오센서 분야에서 타겟 물질의 검출을 위해 이용하는 다양한 감지물질 중 민감도 면에서 우위에 있는 것은 항체이다. 이는 검출하고자 하는 타겟 물질(항원)을 동물의 몸에 주입하여 생체의 면역시스템을 통해 만들어지는 항체를 확보한 후 정제 과정을 거치기 때문에 시간이 많이 들고 고비용이라는 점이 첫 번째 문제점이라 할 수 있다. 또한 타겟 물질에 있어 제약이 거의 없는 앱타머에 비해 항원으로 사용할 수 있는 타겟 물질이 제한적이어서 독성물질과 같은 저분자 화학물질들에 대한 항체의 제작에 어려움이 있다. 일반적으로 항체는 그 크기가 100K Da 이상인 매우 큰 단백질이기 때문에 전기화학 기반 등의 바이오센서로 응용 시에 신호 검출 부분에 있어 제약이 있을 수 있고, 열 안전성이 DNA나 다른 화학물질에 비해 현저히 떨어지는 문제가 있다. 그러므로 기존의 혈중 바이오마커의 진단에 있어 항체를 이용한 기술은 비용과 시간 면에서 효율적이지 않고, 적용범위가 다양하지 않으며 바이오센서로 응용하는 데에 있어 제한적인 문제점들이 있다.

[0003] 이러한 문제점들을 개선하기 위한 새로운 감지물질로서 다양한 타겟 물질에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 앱타머를 이용하는 연구가 많이 이루어지고 있다.

[0004] 앱타머는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA의 구조체이다. 앱타머는 타겟에 대한 친화도가 높고 열 안정성이 우수하며 *in vitro*에서 합성이 가능하기 때문에 비용 면에서도 기존의 센서 분야에서 이용되는 감지물질들 보다 우위에 있다. 또한 타겟 물질에 제약이 없어 단백질, 아미노산 같은 생분자나 환경호르몬이나 항생제 같은 작은 유기화학 물질, 박테리아 등의 다양한 타겟에 대한 앱타머를 합성할

수 있다. 이렇게 표적 물질과 특이적으로 결합하는 앱타머의 특성으로 인해 최근 들어 앱타머를 개발하여 신약 개발, 약물전달 시스템 그리고 바이오센서 등의 연구에 적용하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0005] 앱타머 개발 방법에 있어서 가장 중요한 요소는 타겟에 결합한 DNA(혹은 RNA)와 결합하지 않은 DNA를 구별하는 것인데 이를 위하여 일반적으로 타겟을 고정하거나 DNA 랜덤 라이브러리를 고정하여 DNA를 구별하는 연구를 진행해 왔다. 그러나 이러한 고정화 방식의 가장 큰 어려움은 고정화 수율이 낮을 수 있다는 점이고 고정화 수율 자체를 분석하는데 많은 비용과 시간이 소모되고 있다는 점이다. 또한 고정화에 사용되는 분리용 물질(자성 비드, 컬럼 등)에 DNA 가 직접 결합할 가능성을 완전히 배제할 수 없다는 점과 분리용 물질에 고정된 타겟에 결합한 DNA를 다시 분리 해내는 과정에서 나타날 수 있는 DNA 풀 손실의 가능성 등은 고정화 방식의 한계이자 문제점으로 남아 있다. 특히 DNA 라이브러리를 고정하는 방식에서 발생할 수 있는 낮은 DNA 고정율 문제는 앱타머 개발 과정에서 피해야 하는 가장 중요한 손실인 DNA 풀의 손실과 직결되어 큰 한계점이 된다. 그 외에도 고정화 자체가 어려운 중금속 이온 등은 고정화 방식으로는 앱타머를 개발하기가 어려워 고정화 방식에는 타겟 선정에도 제약이 있을 수 있다. 그러나 비고정화 방식의 앱타머 개발 기술을 이용하게 되면 위에서 열거한 모든 한계를 극복할 수 있으며 타겟의 결합부위가 제한적이지 않기 때문에 앱타머 개발에 필요한 선별 과정 반복 횟수를 줄일 수 있는 장점도 가지고 있다. 그렇기 때문에 비고정화 방식으로 앱타머를 개발할 수 있는 기술 발명을 위해 종래에 미세전자기계 시스템(MEMS), 모세관 전기이동 시스템(Capillary Electrophoresis) 기술 등이 활용되었으나 고가의 장비, 장치 사용의 복잡성, 숙련된 인력의 필요성 등은 여전히 문제점으로 남아있다. 한편, 그래핀은 2차원 구조의 탄소 구조체로서 열안정성, 전기적 특성 및 강도가 매우 우수하며 단일가닥 DNA의 염기 부분과 π-스태킹을 통해 결합하기 때문에 이러한 특성들을 응용한 광범위한 연구가 실시되고 있다.

[0006] 에디포카인은 지방세포 및 조직에서 분비되는 단백질로서 대사에 중요한 역할을 한다. 에디포카인의 하나인 Nampt(Nicotinamide phosphoribosyltransferase)는 최근 새로이 발견된 내장 지방 유래 단백질로서 비만에 의해 발병되는 제2형 당뇨와 밀접한 관련이 있음이 보고되고 있다. 또한, Nampt는 암세포의 혈관생성을 유도하기 때문에 대장암, 전립선암, 위암, 유방암 등과 연관성을 가지고 있으며, 다낭성 난소 증후군, 만성 신부전증, 만성 폐쇄성 폐질환 등 여러 질환과 연관되어 있는 중요한 바이오마커이다.

[0007] 본 발명자들은 그래핀을 앱타머 개발 기술에 도입함으로써, 타겟의 고정화 과정 없이 앱타머를 개발하여 타겟 고정화 시 생길 수 있는 타겟의 결합부위 제한 등의 종래의 기술에서 발생하는 모든 문제점을 해결할 수 있는 동시에 숙련된 인력이나 고가의 복잡한 장비 없이 DNA 앱타머를 개발할 수 있으며, 모델 타겟으로 제2형 당뇨 및 암 등의 중요한 바이오마커인 Nampt의 농도를 정확하게 측정하여 관련 질환을 보다 정확하고 신속하게 진단함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 특허공개 제2009-0032285호 "레티놀 결합 단백질(RBP4)에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 그 제조방법"

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 1. Su Jin Lee et al. Analytical Chemistry, 80, 2008, pp. 2867-2873

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 비고정화 방식이면서도 별도의 장비를 사용하지 않고 그래핀 나노소재 기반의 앱타머를 개발하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 그래핀 기반의 앱타머 개발 방법을 이용하여 혈액 샘플 내의 여러 생체 물질에는 결합하지 않으며 적은 양의 Nampt 단백질에도 특이적으로 결합할 수 있는 민감도가 우수한 센싱 물질인 핵산 앱

타머 나노 구조체를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 Nampt 단백질 특이 앱타머를 이용하여 Nampt 단백질 검출뿐만 아니라 2형 당뇨, 암 등 Nampt 관련 질환을 진단하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0014] 양끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 염기를 가지는 단일가닥 DNA 풀(pool)과 타겟 물질의 혼합물로부터 그래핀을 이용하여 타겟 물질에 결합되지 않은 단일가닥 DNA를 제거하는 단계를 포함하는

[0015] 타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법을 제공한다.

[0016] 보다 구체적으로, 상기 타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법은 다음의 단계를 포함한다:

[0017] 양끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 염기를 가지는 단일가닥 DNA 풀(pool)과 타겟 물질을 완충용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 제1단계;

[0018] 상기 혼합액과 그래핀을 반응시켜 타겟 물질에 결합되지 않은 단일가닥 DNA를 제거하는 제2단계;

[0019] 상기 단계에서 얻은 타겟 물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA에 대해 상기 PCR용 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하여 증폭시키는 제3단계;

[0020] 상기 타겟 물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA에 대해 타겟 물질과 카운터 타겟 물질을 이용하여 그래핀 기반 선별(selection) 및 카운터 선별(counter selection)하는 과정을 반복 수행하는 제4단계;

[0021] 상기 그래핀 기반 카운터 선별 단계에서 카운터 타겟 물질에 결합하는 타겟 비특이적인 단일가닥 DNA를 제거하고, 그래핀에 결합된 타겟 특이적인 단일가닥 DNA에 대해 타겟에 의한 배좌 변위(Conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앱타머를 분리하는 제5단계.

[0022] 본 발명은 또한 서열목록 서열번호 4 내지 18 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 제공한다.

[0023] 본 발명은 또한 본 발명의 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 남프트(Nampt) 단백질 검출용 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 본 발명의 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 남프트(Nampt) 관련 질환의 진단용 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한 본 발명의 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머가 고정화된 고상 담체를 제공한다.

[0026] 본 발명은 또한 본 발명의 고상 담체에 남프트(Nampt) 단백질을 흡착시키고, 흡착된 남프트(Nampt) 단백질을 용출액에 의해 용출시키는 단계를 포함하는 남프트(Nampt) 단백질의 농축 및 정제 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명은 또한 본 발명의 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 남프트(Nampt) 단백질 검출용 키트를 제공한다.

[0028] 본 발명은 또한 본 발명의 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 남프트(Nampt) 관련 질환 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 그래핀을 이용하여 주요 타겟을 고정하지 않은 상태로 앱타머를 개발할 수 있는 기술을 제공한다. 타겟을 고정하지 않기 때문에 타겟의 결합 부위가 제한적이지 않아 타겟에 대한 높은 결합력을 보이는 앱타머를 개발할 수 있으며 또한 고가의 복잡한 장비, 숙련된 인력에 대한 필요성이 전혀 없기 때문에 손쉽게 앱타머를 개발할 수 있다.

[0030] 또한 모델 타겟으로 사용된 Nampt 단백질에 대해 앱타머를 이용하여 효과적으로 검출함으로써 기존에 사용되고 있는 항체 기반 분석보다 더 민감하고 일관성 있게 혈중 Nampt 단백질의 농도를 측정할 수 있다. 아울러, DNA 앱타머는 항체에 비해 생산비용이 적고 표면에 고정화하기가 쉬우므로 바이오센서 칩 제작에 유리하다. 이러한 Nampt 결합 특이적 DNA 앱타머를 이용하여 혈중 Nampt 단백질 농도를 민감하고 정확하게 측정할 수 있는 바이오센서를 통해 Nampt 관련 질환인 2형 당뇨, 대장암, 전립선암, 유방암, 위암, 다낭성 난소 증후군, 만성 신부전증, 만성 폐쇄성 폐질환 등에 대한 진단을 보다 정확히 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명의 그래핀 옥사이드를 이용한 단일가닥 DNA 앱타머 개발 방법(GO-SELEX)에 대한 모식도를 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 그래핀 옥사이드 기반의 앱타머 개발 과정에서 모델 타겟인 Nampt 단백질에 결합하는 단일가닥 DNA의 비율 증가도를 나타낸 것이다.

도 3 내지 17은 본 발명의 Nampt 단백질에 결합하는 15 종의 핵산 구조체 앱타머의 염기서열을 웹서버 기반의 m-fold 프로그램을 이용하여 분석한 DNA 앱타머 2차 구조 모식도이다.

도 18은 본 발명의 Nampt 단백질 결합 DNA 앱타머인 35, 40 및 55번 앱타머(서열번호 8, 14, 18)의 다른 에디포카인 및 HSA에 대한 특이성 분석 결과이다.

도 19는 본 발명의 결합 특이성이 큰 35, 40 및 55번, 앱타머(서열번호 8, 14, 18)의 Nampt 단백질과의 결합력 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0033] 본 발명은

[0034] 양끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 염기를 가지는 단일가닥 DNA 풀(pool)과 타겟 물질의 혼합물로부터 그래핀을 이용하여 타겟 물질에 결합되지 않은 단일가닥 DNA를 제거하는 단계를 포함하는

[0035] 타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법에 관한 것이다.

[0036] 본 명세서에서 언급된 "그래핀", "그래핀 옥사이드", "Graphene Oxide", "그래핀 옥사이드 나노 시트" 또는 "그래핀 나노 시트"는 2차원 구조를 갖는 탄소 구조체를 의미하는 것으로 명세서 전반에 걸쳐 혼용되어 사용된다.

[0037] 타겟에 선택적으로 결합하는 앱타머를 개발하기 위한 방법으로는 일반적으로 SELEX(Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) 방법이 널리 사용되고 있다. 본 발명에서는 일반적인 SELEX를 변형한 그래핀 옥사이드(GO)-SELEX 방법을 이용하여 타겟 물질 결합 특이적인 DNA 앱타머를 개발하였다.

[0038] 본 발명에 이용된 GO-SELEX 방법은 DNA 증폭단계에서 형광 표지된 프라이머(fluorescence labelled primer)를 사용함으로써 이어지는 PAGE를 이용한 PCR 산물 분리(dsDNA → ssDNA)과정에서 형광을 띠는 밴드만 취하면 되는 이점을 이용하기 위한 변형이며, 타겟과 결합하는/결합하지 않는 DNA를 구별해내는 방법으로 그래핀 옥사이드를 이용한 SELEX 방법이다. 기존의 다른 SELEX의 경우, 방사선 표지(radioactive label), 모세관 전기영동

(capillary electrophoresis), 멤브레인 필터(membrane filter) 등을 이용했는데, 경비가 많이 들고 핸들링 하기가 어려운 단점이 있다. PCR 산물을 분리하기 위해서는 크로마토그래피(chromatography), 어피니티 컬럼(affinity column) 등이 이용되었지만 가격이 비싸고, 효율이 떨어지는 문제가 있다(R.Stoltenburg *et al.*, 2005, *Anal Bioanal Chem* 383: 83-91).

[0039] 즉, 본 발명은 그래핀을 이용하여 타겟 물질에 결합되지 않은 단일가닥 DNA를 제거함으로써 타겟 물질을 특별히 특정 담체에 고정하지 않더라도 타겟 물질에 결합하는 단일가닥 DNA와 타겟 물질에 결합되지 않은 단일가닥 DNA를 분리해 낼 수 있다는 점에 특징이 있다. 이러한 방법은 종래의 타겟 고정화 방식으로부터 야기되는 문제점들을 간단하고 쉽게 해결할 수 있다. 그래핀을 이용하여 타겟 물질에 결합하지 않은 단일가닥 DNA를 제거한다는 점 이외에는 본 발명은 통상적인 타겟 고정화 방식의 SELEX 방법을 그대로 차용할 수 있다.

[0040] 한 구체예에서, 상기 타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법은 단일가닥 DNA의 양을 증가시키기 위해, 상기 타겟 물질-단일가닥 DNA 복합체로부터 분리한 단일가닥 DNA에 대해 상기 PCR용 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행함으로써 타겟 물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA를 증폭시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 상기 타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법에 있어서, 상기 타겟 특이적인 앱타머의 선별은 예를 들어, 타겟 물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA에 대해 타겟 물질과 카운터 타겟 물질을 이용하여 그래핀 기반 선별(selection) 및 카운터 선별(counter selection)을 반복 수행함으로써 수행될 수 있다.

[0042] 이때, 상기 그래핀 기반 카운터 선별(counter selection)은 카운터 타겟 물질에 결합하는 타겟 비특이적인 단일가닥 DNA를 제거하고, 카운터 타겟 물질에 결합하지 않고 그래핀에 결합하는 단일가닥 DNA를 선별해 낼 수 있다.

[0043] 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 카운터 타겟 물질에 결합하지 않고 그래핀에 결합된 단일가닥 DNA을 그래핀으로부터 분리해 내는 방법으로는 그래핀에 결합된 단일가닥 DNA에 대해 주요 타겟에 의한 배좌 변위(Conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앱타머를 분리하는 방법을 이용할 수 있다.

[0044] 상기 본 발명의 타겟 비고정화 방식의 DNA 앱타머의 제조방법을 도면 1을 참조하여 단계별로 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0045] 제1단계는 양끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 염기를 가지는 단일가닥 DNA 풀(pool)과 타겟 물질을 완충용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계이다.

[0046] 보다 구체적으로, 먼저 양 끝의 PCR 증폭을 위한 프라이머 결합 부위(각각 18-mer) 및 중간의 30 개의 임의의 염기를 가진 66 mer의 DNA 풀을 합성하며, 이 DNA 풀을 Nampt 단백질과 함께 버퍼용액에 넣고 혼합하여 결합 반응을 시킨 후 그래핀을 이용해 Nampt 단백질과 결합하지 않은 DNA를 제거한다. 이 제거에는 단일가닥 DNA가 π-스태킹을 통해 그래핀 표면에 강력하게 흡착되는 특성을 활용한다.

[0047] 상기 단일가닥 DNA 풀은 5' 말단 부분에는 서열번호 1에 기재된 프라이머 영역을, 3' 말단 부분에 서열번호 2에 기재된 프라이머 영역을 포함할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0048] 상기 타겟 물질은 분자량이 5000 내지 500000 달톤인 남프트(Nampt) 단백질 등의 단백질, 또는 분자량이 10 내지 2000 달톤인 저분자 물질 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0049] 제2단계는 상기 혼합액과 그래핀을 반응시켜 타겟 물질에 결합되지 않은 단일가닥 DNA를 제거하는 단계이다.

[0050] 이를 위해, 원심분리를 하여 그래핀과 그래핀에 흡착된 타겟 물질에 결합하지 않은 단일가닥 DNA를 분리시키고, 타겟 물질-단일가닥 DNA 복합체를 포함하는 상등액을 취하여 에탄올 침전법으로 타겟에 결합한 DNA를 확보한다.

[0051] 제3단계는 상기 단계에서 얻은 타겟 물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA에 대해 상기 PCR용 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하여 증폭시키는 단계이다.

[0052] 타겟(Nampt 단백질) 결합 특이적인 DNA의 양을 증폭하기 위해 PCR을 수행하고 PCR 반응물을 정제한 후, 고농도의 우레아가 들어있는 폴리아크릴아마이드 젤로 전기영동을 하여 이중 가닥 DNA인 PCR 결과물을 두 개의 단일가닥 DNA로 분리한다. 이 경우, PCR 생산물은 두 가닥의 DNA 이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 변성과정을

위해서 하나의 프라이머에는 형광 물질을 고정한다. 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 형광 물질이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다. 형광 물질이 붙어 있는 DNA 밴드를 폴리아크릴아마이드 젤로부터 잘라내어 추출을 실시한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보한다.

[0053] 상기 PCR을 위한 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 3에 기재된 것을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0054] 상기 형광 물질은 Cy5, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 658, 시아닌(Cyanine)-3, 시아닌-5, 플루오레세인(fluorescein), 보디피(bodipy), 텍사스 레드(Texas red), FITC(Fluorescein Isothiocyanate), 또는 로다민(rhodamine) 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0055] 제4단계는 상기 타겟 물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA에 대해 타겟 물질과 카운터 타겟 물질을 이용하여 그래핀 기반 선별(selection) 및 카운터 선별(counter selection)하는 과정을 반복 수행하는 단계이다.

[0056] 상기 단계에서 확보된 DNA 풀은 다시 처음과 같이 타겟(Nampt 단백질)과 반응시킨다. 일련의 과정을 한 번의 선별이라 하고 상기 선별을 수회 실시한다. 이후 카운터 타겟 물질을 이용하여 카운터 선별을 실시하여 비특이적으로 결합하는 DNA를 차단하고 타겟 물질에만 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA 풀을 확보하는 선별 및 카운터 선별 과정을 거친다.

[0057] 상기 카운터 선별 과정에서는 카운터 타겟 물질과 DNA 풀을 반응시킨 후 그래핀을 첨가하면 카운터 타겟 물질과 결합하지 않는 단일가닥 DNA가 그래핀 표면에 흡착하게 된다.

[0058] 제5단계는 상기 그래핀 기반 카운터 선별 단계에서 카운터 타겟 물질에 결합하는 타겟 비특이적인 단일가닥 DNA를 제거하고, 그래핀에 결합된 타겟 특이적인 단일가닥 DNA에 대해 타겟에 의한 배좌 변위(Conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앱타머를 분리하는 단계이다.

[0059] 카운터 타겟 물질에 결합하지 않는 단일가닥 DNA는 원심분리를 통해 상등액은 버리고 그래핀만 취해서 그래핀에 흡착되어 있는 단일가닥 DNA를 그래핀으로부터 확보한다. 이를 위하여 단일가닥 DNA가 흡착되어 있는 그래핀 표면에 타겟(Nampt 단백질)을 반응시키고 타겟은 그래핀에 붙어있는 단일가닥 DNA의 배좌 변위(conformational change)를 유발시켜 효과적으로 단일가닥 DNA를 그래핀 표면으로부터 분리해 낼 수 있다. 이렇게 분리된 단일가닥 DNA는 카운터 타겟에 결합하지 않는 동시에 주요 타겟(Nampt 단백질)에 강하게 결합하는 앱타머의 후보군이 된다.

[0060] 상기 카운터 타겟 물질은 타겟 물질의 종류에 따라 달라질 수 있어 특별히 제한하지는 않으며, 타겟 물질이 Nampt 단백질인 경우 카운터 타겟 물질로 아디포넥틴(adiponectin), RBP4(Retinol Binding Protein 4), 레지스틴(Resistin), 베스핀(Vaspin), 또한 HSA(Human Serum Albumin) 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0061] 상기 앱타머의 후보군은 pDrive Cloning Vector를 이용하여 클로닝하고 얻어진 콜로니로부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행한다.

[0062] 타겟에 특이적으로 결합하는 앱타머의 다른 단백질에 대한 특이적 결합능과 타겟 물질의 농도에 따른 결합력의 크기를 비교하기 위한 방법으로 표면자기공명장치(SPR)를 이용한다. 이것을 위하여 금칩(bare gold chip)의 표면을 개질하여 각각의 DNA 앱타머를 칩 위에 고정시킨 후 그 위에 타겟 물질을 농도 별로 반응시키고, 그 결합력을 확인하며 특이적 결합능 분석을 위해 다른 카운터 타겟 물질에 대한 결합력을 테스트한다.

[0063] 본 발명은 또한 서열목록 서열번호 4 내지 18 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머에 관한 것이다.

[0064] 본 발명의 앱타머는 Nampt 단백질을 타겟으로 하여 선별된 것으로, 상기 Nampt 단백질은 사람, 마우스 등의 포유동물, 보다 바람직하게는 세포외 사람의 Nampt 단백질(extracellular human Nampt(visfatin/PBEF)로, 1 내지

491 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0065] 또한, 타겟으로 사용하는 Nampt 단백질은 공지의 펩타이드 합성방법으로 합성된 펩타이드를 사용하거나, 시판되는 Nampt 단백질, 예컨대, 아디포젠사의 남프트 단백질(Prod. No. AG-40A-0031) 등을 사용하거나, 상기 단백질의 코딩 유전자를 벡터(예컨대, pAGNF 등)에 도입하여 작제된 재조합 벡터로부터 발현되는 상기 Nampt 단백질의 전장 또는 일부를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0066] 또한, "Nampt 단백질에 특이적으로 결합 가능한"은 상기 정의된 Nampt 단백질에 특이적으로 결합함을 의미한다.

[0067] 상기 DNA 앱타머는 상기 GO-SELEX 방법에 의해 선별된 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합하는 어떠한 염기서열의 DNA 앱타머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 4 내지 서열번호 18 중 어느 하나의 염기서열을 가질 수 있다.

[0068] 본 발명의 앱타머는 이 기술분야에서의 자체 공지의 방법에 의해 화학 합성할 수 있다.

[0069] 본 발명의 앱타머는, 남프트(Nampt) 단백질에 대한 결합성, 안정성 등을 높이기 위해, 각 뉴클레오티드의 당 잔기(예, 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(예컨대 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 참조).

[0070] 본 발명의 앱타머는 또한 남프트(Nampt) 단백질에 대한 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기(예, 푸린, 피리미딘)가 변형(예, 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.

[0071] 또한 뉴클레아제 및 가수분해에 대하여 내성이도록, 본 발명의 앱타머에 포함되는 인산기가 변형되어 있어도 좋다. 예컨대 P(O)O기가, P(O)S(티오에이트), P(S)S(디티오에이트), $P(O)NR_2$(아미데이트), P(O)R, R(O)OR', CO 또는 CH_2(포름아세탈) 또는 3'-아민(-NH-CH_2-CH_2-)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.

[0072] 본 발명에서의 변형은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다.

[0073] 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.

[0074] 본 발명은 또한 본 발명의 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 남프트(Nampt) 단백질 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0075] 본 발명의 앱타머와 남프트(Nampt) 단백질의 공유결합 또는 비공유결합을 통한 복합체 형성을 이용하여 남프트(Nampt) 단백질을 검출할 수 있다. 상기 검출은 항체 대신에 본 발명의 앱타머를 이용하는 것 이외는, 면역학적 방법과 같은 방법에 의해 행하여 질 수 있다. 따라서, 항체 대신에 본 발명의 앱타머를 이용함으로써, 효소 면역 측정법(EIA)(예, 직접 경합 ELISA, 간접 경합 ELISA, 샌드위치 ELISA), 방사 면역 측정법(RIA), 형광 면역 측정법(FIA), 웨스턴 블롯(blot)법(예, 웨스턴 블롯법에서의 2차 항체 대신에 사용), 면역조직 화학적 염색법, 셀 소팅(cell sorting)법 등의 방법과 같은 방법에 의해, 검출 및 정량을 행할 수 있다.

[0076] 본 발명은 또한 본 발명의 남프트(Nampt)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 남프트(Nampt) 관련 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0077] 상기 남프트(Nampt) 관련 질환은 예컨대 제2형 당뇨병, 대장암, 전립선암, 유방암, 위암, 다낭성 난소 증후군, 만성 신부전증, 또는 만성 폐쇄성 폐질환일 수 있다.

[0078] 상기 남프트(Nampt) 관련 질환의 진단은 상기 앱타머와 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 뇨 중에서 선택되는 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 시료는 포유류, 바람직하게는 인체에서 분리된 것으로, 최소 침습으로 확보가능한 시료 또는 분비체액, *in vitro* 세포배양액 성분 시료 등 바이오마커인 Nampt를 포함하고 있을 수 있는 시료이면, 상기에 한정되지 않음은 자명하다. 보다 바람직하게는 혈액일 수 있다. 상기 남프트(Nampt) 관련 질환들의 중요한 바이오마커인 남프트(Nampt)의 혈중농도를 정확하게 측정하는 것은 상기 질환들을 진단하는데 매우 중요하다. 따라서 혈액 샘플 안의 여러 생체 물질 중에서 비특이적이며 적은 양의 남프트(Nampt)에도 특이적으로 결합할 수 있는 본 발명의 DNA 앱타머를 포함하는 조성물을 이용하여 보다 신속하고 정확하게 남프트(Nampt) 관련 질환들을 진단하는 데에 사용할 수 있다.

[0079] 상기 앱타머를 시료와 접촉시키는 경우, 시료 중 존재하는 바이오마커인 Nampt와 상기 앱타머간 특이적인 결합이 일어나게 된다. 따라서, 형광 등으로 앱타머를 표지하여 결합시킨 다음 시그널의 존재여부를 확인함으로써, Nampt 관련 질환을 검출할 수 있게 된다.

[0080] 본 발명은 또한 본 발명의 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앱타머가 고정화된 고상 담체에 관한 것이다.

[0081] 상기 고상 담체로는 기판, 수지, 플레이트(예, 멀티웰 플레이트), 필터, 카트리지, 컬럼 또는 다공질재 등을 들 수 있다.

[0082] 상기 기판은 DNA 칩이나 단백질 칩 등에 사용되고 있는 것 등일 수 있고, 예컨대 니켈-PTFE(폴리테트라플루오로에틸렌) 기판이나 유리 기판, 아파타이트(apatite) 기판, 실리콘 기판, 금, 은 또는 알루미나 기판 등으로, 이들의 기판에 폴리머 등의 코팅을 실시한 것을 들 수 있다.

[0083] 상기 수지는 아가로스(agarose) 입자, 실리카입자, 아크릴아미드와 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체, 폴리스티렌 가교 디비닐벤젠입자, 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.

[0084] 본 발명의 고상 담체는 남프트(Nampt) 단백질의 정제, 남프트(Nampt) 단백질의 검출 또는 정량에 유용할 수 있다.

[0085] 본 발명의 앱타머는 공지의 방법에 의해 고상 담체에 고정할 수 있다. 예컨대, 친화성 물질이 나 소정의 관능기를 본 발명의 앱타머에 도입하고, 계속해서 이 친화성 물질이나 소정의 관능기를 이용하여 고상 담체에 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.

[0086] 앱타머가 고정화된 고상 담체를 이용하여 남프트(Nampt) 단백질을 검출하는 방법은, 예를 들어, 본 발명의 DNA 앱타머를 칩(chip)상에 형광물질, 발색물질 또는 항체 등과 함께 스팟팅 시킨 후 혈액샘플을 반응시킴으로써 검출 시료, 예를 들어, 혈액 중에 포함된 미량의 남프트(Nampt)의 수준을 신속하게 측정할 수 있다. 또 다른 방법으로는 자성 비드에 상기 DNA 앱타머를 고정화시켜 남프트(Nampt)를 결합시키게 되면 결합된 DNA 앱타머-남프트(Nampt) 복합체를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 남프트(Nampt)를 분리함으로써 남프트(Nampt)만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다. 본 발명의 실시예에 기술된 방법 이외에도 본 발명의 DNA 앱타머와 연결자로 연결된 센서를 이용하여 혈액 중의 남프트(Nampt)를 검출하는 방법 등을 사용할 수 있다.

[0087] 상기 고상 담체를 이용한 남프트(Nampt) 단백질의 검출은 남프트(Nampt) 관련 질환을 진단하는데 유용하다.

[0088] 본 발명은 또한 고상 담체에 남프트(Nampt) 단백질을 흡착시키고, 흡착된 남프트(Nampt) 단백질을 용출액에 의해 용출시키는 단계를 포함하는 남프트(Nampt) 단백질의 농축 및 정제 방법에 관한 것이다.

[0089] 본 발명의 고상 담체로의 남프트(Nampt) 단백질의 흡착은 공지의 방법에 의해 행할 수 있다. 예컨대 남프트(Nampt) 단백질을 함유하는 시료(예, 박테리아 또는 세포의 배양물 또는 배양상청, 혈액)를 본 발명의 고상 담체 또는 그 함유물에 도입한다.

[0090] 남프트(Nampt) 단백질의 용출은 중성 용액 등의 용출액을 이용하여 수행할 수 있다. 중성 용출액은 특별히 한정되는 것은 아니며, 예를 들어, pH 약 6~약 9, 바람직하게는 약 6.5~약 8.5, 보다 바람직하게는 약 7~약 8일 수 있다. 상기 중성 용액은 칼륨염(예, NaCl, KCl), 마그네슘염(예, MgCl), 계면활성제(예, 트윈 20, 트리톤, NP40), 또는 글리세린을 포함하는 것일 수 있다.

[0091] 본 발명의 정제 및 농축 방법은 남프트(Nampt) 단백질의 흡착 후, 세정액을 이용하여 고상 담체를 세정하는 과정을 포함할 수 있다. 세정액으로서는 요소, 킬레이트제(예, EDTA), Tris, 산 또는 알칼리 등을 포함하는 것을 사용할 수 있다.

[0092] 본 발명의 정제 및 농축 방법은 고상 담체를 가열 처리하는 과정을 포함할 수 있다. 이러한 공정에 의해 고상 담체의 재생, 멸균이 가능하다.

[0093] 본 발명은 또한, 상기 남프트(Nampt) 단백질에 특이적으로 결합하는 앱타머를 함유하는 남프트(Nampt) 단백질 검출용 또는 남프트(Nampt) 관련 질환 진단용 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다.

[0094] 상기 키트는 필요에 따라 완충용액 및 검출의 수행과 분석을 위한 용기들을 포함할 수 있는데, 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.

[0095] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0096] <실시예 1>

[0097] 66-mer DNA 풀로서 양 끝에 PCR을 위한 프라이머 영역이 있고 중앙에 30 개의 임의의 염기를 가진 DNA 풀을 합성하였다.

[0098] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGC-N30-GGATCCGAGCTCCACGTG-3'(서열번호 1: CGTACGGAATTCGCTAGC; 서열번호 2: GGATCCGAGCTCCACGTG)

[0099] 이 DNA 풀을 같은 양의 남프트(Nampt, 아디포젠사의 남프트 단백질, Prod. No. AG-40A-0031)와 함께 버퍼용액(pH 7.4, Tris 20 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 2 mM)에 넣고 혼합하여 30 분간 상온에서 반응시킨 후 Nampt와 결합하지 않은 DNA를 제거하기 위해 위의 혼합액과 그래핀 용액을 2시간 동안 반응시켰다. 이때 타겟과 결합하지 않은 단일가닥 DNA는 그래핀의 표면에 π-스태킹을 통해 강력하게 흡착하게 된다.

[0100] 원심분리를 통해 그래핀을 분리해 낸 후 상등액을 취하여 에탄올 침전 법을 통해 타겟에 결합한 단일가닥 DNA를 확보하였다. 이렇게 확보된 Nampt에 결합하는 DNA의 양을 분광광도계를 이용하여 측정하였다.

[0101] Nampt 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생산물은 두 가닥의 DNA 이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위해서 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.

[0102] 정방향 프라이머: 5'-fluorescein-CGTACGGAATTCGCTAGC-3'

[0103] 역방향 프라이머: 5'-CACGTGGAGCTCGGATCC-3'(서열번호 3)

[0104] PCR 반응물을 정제 키트를 이용하여 정제한 후 이중 가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이

드젤 전기영동을 실시하였다. 10 %의 폴리아크릴아마이드 젤에는 6 M의 우레아, 20 %의 포름아마이드가 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.

[0105] 플루오레세인이 붙어 있는 DNA 밴드를 폴리아크릴아마이드 젤로부터 잘라내어 추출을 실시한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보하였다. 이때 확보된 DNA 풀은 다시 처음과 같이 Nampt와 반응시켰다. 이러한 과정의 모식도를 도 1에 나타내었고, 일련의 과정을 한 번의 선별이라 하면 총 5번의 선별 과정을 거쳐 앱타머 개발을 진행하였다. 4번째 선별 후에는 각각 HSA와 다른 에디포카인인 아디포넥틴(adiponectin), RBP4(Retinol Binding Protein 4), 레지스틴(Resistin), 베스핀(Vaspin)으로 카운터 선별(counter selection)을 실시함으로써 비특이적으로 결합하는 DNA를 차단하고 Nampt 에만 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA 풀을 확보하였다. 카운터 선별 과정에서는 일반 과정과는 달리 Nampt 대신 위와 같은 카운터 타겟들을 DNA 풀과 동일한 버퍼를 이용하여 30분간 반응시킨 후 그래핀 용액을 2시간 동안 반응시켰다. 이 과정에서는 카운터 타겟에 결합하지 않는 단일가닥 DNA가 그래핀 표면에 흡착하게 된다. 원심분리를 통해서 상등액은 버리고 그래핀만 취해서 그래핀에 흡착되어 있는 단일가닥 DNA를 그래핀으로부터 확보하였다. 이를 위하여 단일가닥 DNA가 흡착되어 있는 그래핀 표면에 Nampt를 반응시켰고 주요 타겟인 Nampt는 그래핀에 붙어있는 단일가닥 DNA의 배좌 변위(conformational change)를 유발시켜 효과적으로 단일가닥 DNA를 그래핀 표면으로부터 분리해 낼 수 있었다. 이렇게 분리된 단일가닥 DNA는 카운터 타겟에 결합하지 않는 동시에 주요 타겟인 Nampt에 강하게 결합하는 앱타머의 후보군이 된다.

[0106] 도 2에서 각각의 선별에서 Nampt에 결합한 단일가닥 DNA의 퍼센트를 제시하였다.

[0107] 최종적으로 얻어진 DNA 풀을 pDrive Cloning Vector 를 이용하여 클로닝하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행한 결과 서로 다른 15 종의 Nampt 결합 특이적인 핵산 구조체를 확보하였다.

[0108] <실시예 2>

[0109] Nampt 에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 15 종의 DNA의 염기서열을 분석한 결과를 표 1에 제시하였다. 또한 이 15 종의 Nampt 앱타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 3 내지 17에 나타내었다.

[0110] Nampt 에 강하게 결합하는 15 종의 앱타머들이 다른 혈중 단백질에는 결합하지 않고 오직 Nampt 에만 특이적으로 결합함을 보여주는 실험은 금칩에 앱타머를 고정시켜서 SPR(Surface Plasmon Resonance) 장치를 이용하여 수행하였다. Nampt는 에디포카인 중의 하나이므로 Nampt 앱타머가 Nampt 에만 특이적으로 결합하는 것을 보여주기 위한 가장 좋은 대조군으로서 또 다른 에디포카인 (RBP4, 아디포넥틴, 레지스틴, 베스핀)과 HSA가 사용되었다.

[0111] 먼저 50 mM의 3,3 '-디티오디프로피온산으로 금칩의 표면에 카르복실기(-COOH)를 만든 다음 EDC/NHS를 이용하여 자기조립 단분자층(Self Assembly Monolayer)을 형성시켰다. 그 위에 스트렙타비딘을 고정시키고 바이오틴이 붙어있는 각각의 앱타머를 고정시켰다. 여기에 200 nM의 Nampt와 대조군인 RBP4, 아디포넥틴, 레지스틴, 베스핀 그리고 HSA 를 버퍼용액(100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$ 및 0.02% Tween 20을 포함하는 20 mM Tris-Cl 버퍼용액, pH 7.6)안에서 각각 30 분간 반응시킨 후 같은 버퍼용액으로 결합하지 않은 단백질을 씻어냈다.

[0112] 최종적으로 SPR 결과를 분석하여 Nampt 앱타머가 다른 단백질들보다 Nampt에 월등하게 잘 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 도 18에 제시하였다.

표 1

서열 번호	앱타머 번호	염기서열
4	56	CGTACGGAATTCGCTAGCCCGTGGGGTAGCGGGGTCGTGTGATATGTGGATCCGAGCTCCACGTG
5	12	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGTGCCGTGGCACGAGGCCGTGGTCCAGGGGATCCGAGCTCCACGTG
6	4	CGTACGGAATTCGCTAGCGTGATGTGGGGGTACGCTCGTGGCAGGCTTGGATCCGAGCTCCACGTG
7	27	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGTGGAGTACGTGGGGGTCATCCTGTGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
8	35	CGTACGGAATTCGCTAGCGGTGACGGACGTGGGGTGCACGAAGGGAGGGGATCCGAGCTCCACGTG
9	26	CGTACGGAATTCGCTAGCATCGGGTGCAGAGTCGGAGCTAACGGCAGCGGATCCGAGCTCCACGTG
10	9	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGGATGGGCCGCTCTGCAGAATGTTCTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
11	32	CGTACGGAATTCGCTAGCGTGGACTGGCGGAAATCTTGGTATGCCCATGGATCCGAGCTCCACGTG
12	21	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGTTCGGGACGGATGAACGTGATAGCTGAGGATCCGAGCTCCACGTG
13	15	CGTACGGAATTCGCTAGCAGCCGGCGGGTGCTCAATGTTGGGGGTTGGGATCCGAGCTCCACGTG
14	40	CGTACGGAATTCGCTAGCCGGGGTGGGAACCAGTCTTGCGCGGGTGACGGATCCGAGCTCCACGTG
15	54	CGTACGGAATTCGCTAGCGTGGCGGGGCGCGGGTGCCGGAGTTGATGTGGATCCGAGCTCCACGTG
16	37	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGCGATGTGCGGAATGTGGGATTGCGGGTGGATCCGAGCTCCACGTG
17	39	CGTACGGAATTCGCTAGCGGTTGCCGTGCGGCGTGCGAGTTGGGCCTTGGATCCGAGCTCCACGTG
18	55	CGTACGGAATTCGCTAGCGGACTGGAGTCTAGACCGGGTAGCTGTGGTGGATCCGAGCTCCACGTG

[0113]

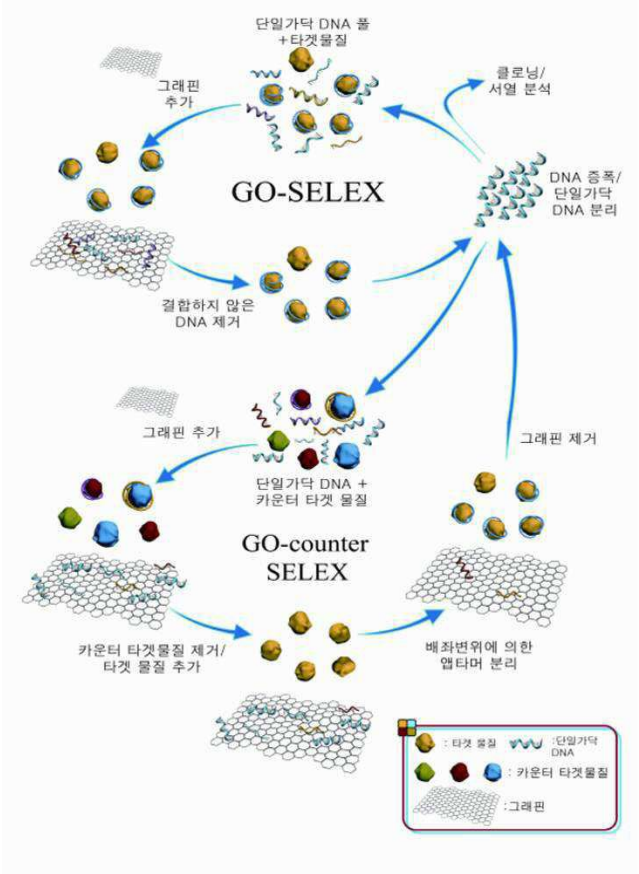
[0114] <실시예 3>

[0115] 서로 다른 15 종의 Nampt 결합 특이적인 앱타머 중에서 특이성 및 결합력이 가장 높은 No.35, 40 및 55 앱타머의 Nampt 에 대한 결합 분석(binding assay)을 실시하였다. 금칩에 위와 동일한 방법으로 앱타머를 고정시킨 후 25 nM 부터 400 nM의 서로 다른 농도의 Nampt을 버퍼용액(100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$ 및 0.02% Tween 20을 포함하는 20 mM Tris-Cl 버퍼용액, pH 7.6)에서 30 분간 반응시켰다. 해리상수를 구하기 위해서 각각의 반응 정도는 비선형 회귀법과 단일 부위 포화형 리간드 결합법으로 Graphpad Prism 5.0을 이용하여 플로팅(plotting) 되었고, 여기에 Y=Bmax*X^h/(Kd^h + X^h) 식이 이용되었다(y는 포화도, B_{max}는 최대 결합 위치, K_d는 해리상수, X 는 결합하지 않은 Nampt, h는 hill slope 상수).

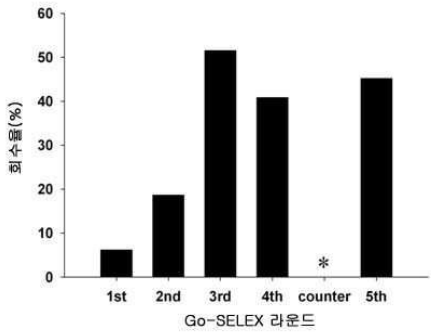
[0116] 그 결과 도출된 No.35, 40 및 55 앱타머의 Kd 값이 각각 117.4, 114.4, 71.7 nM로써 Nampt에 강력하게 결합하는 것이 확인되었고 이에 대한 분석 데이터를 도 19에 제시하였다.

도면

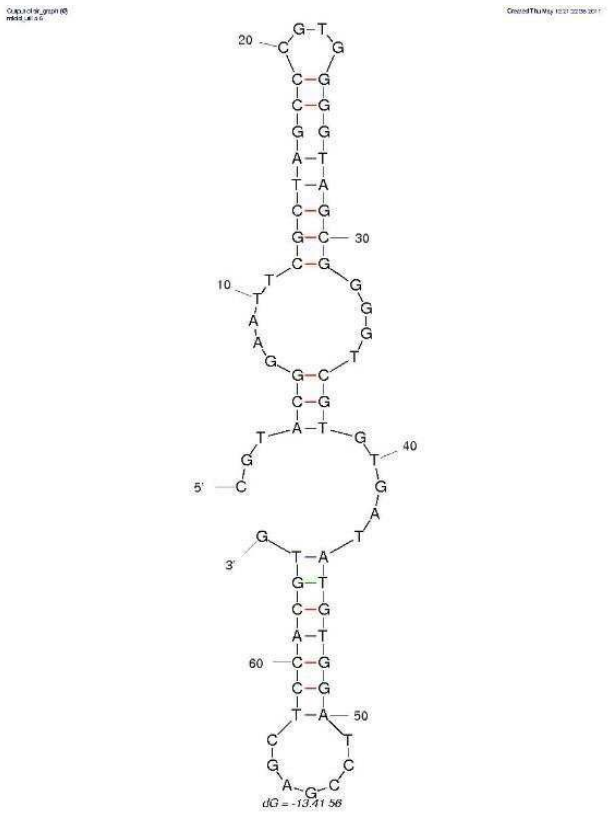
도면1


단일가닥 DNA 풀
+타겟물질
그래핀
추가
클로닝/
서열 분석
GO-SELEX
DNA 증폭/
단일가닥
DNA 분리
결합하지 않은
DNA 제거
그래핀 추가
그래핀 제거
단일가닥 DNA +
카운터 타겟 물질
GO-counter
SELEX
카운터 타겟물질 제거/
타겟 물질 추가
배좌변위에 의한
앱타머 분리
: 타겟 물질
:단일가닥
DNA
: 카운터 타겟물질
:그래핀

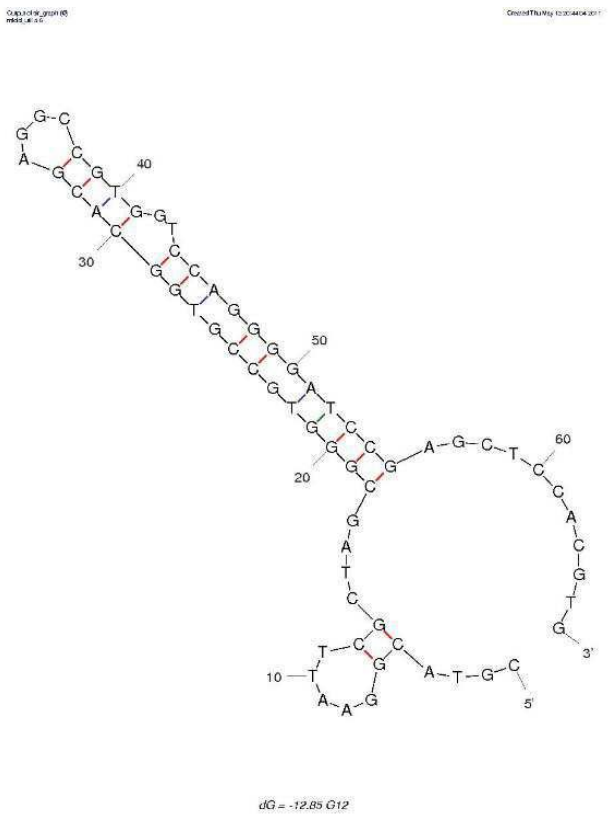
도면2


60
50
40
30
20
10
0
회수율(%)
*
1st
2nd
3rd
4th
counter
5th
Go-SELEX 라운드

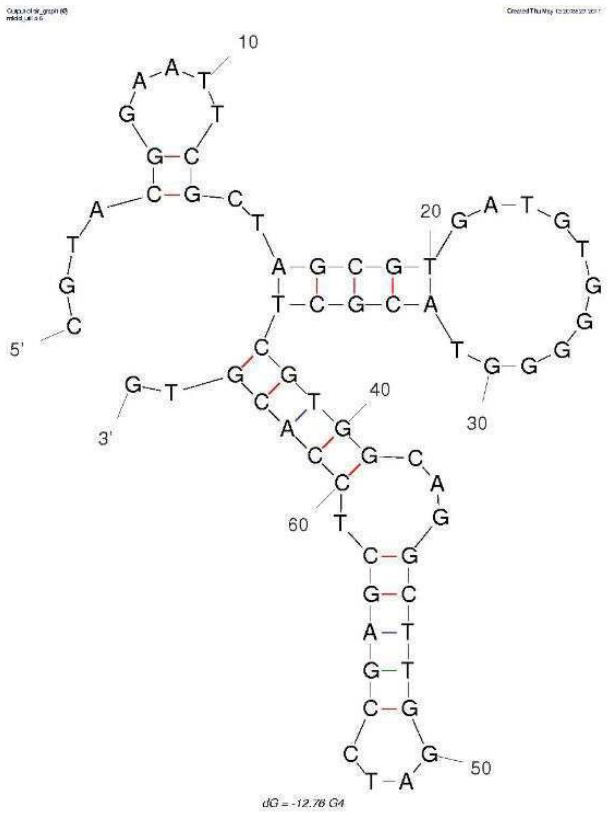
도면3



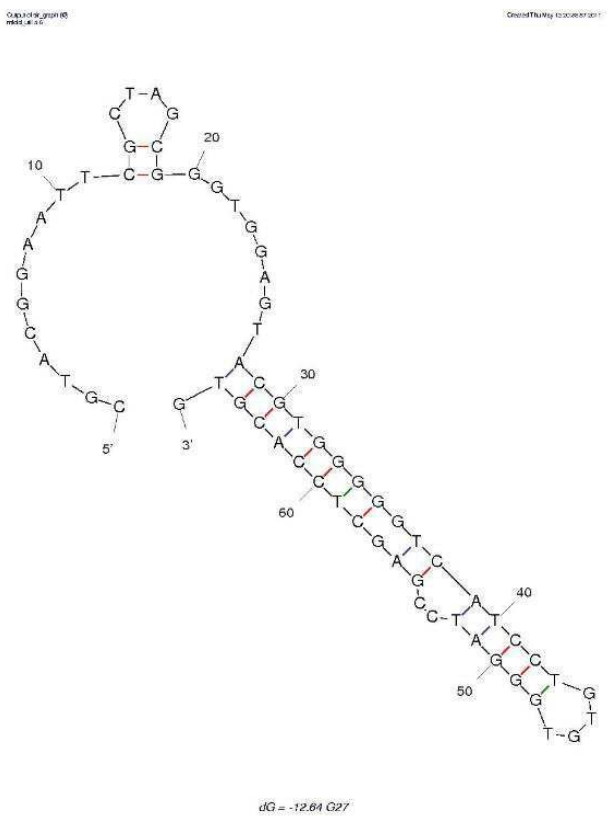
도면4



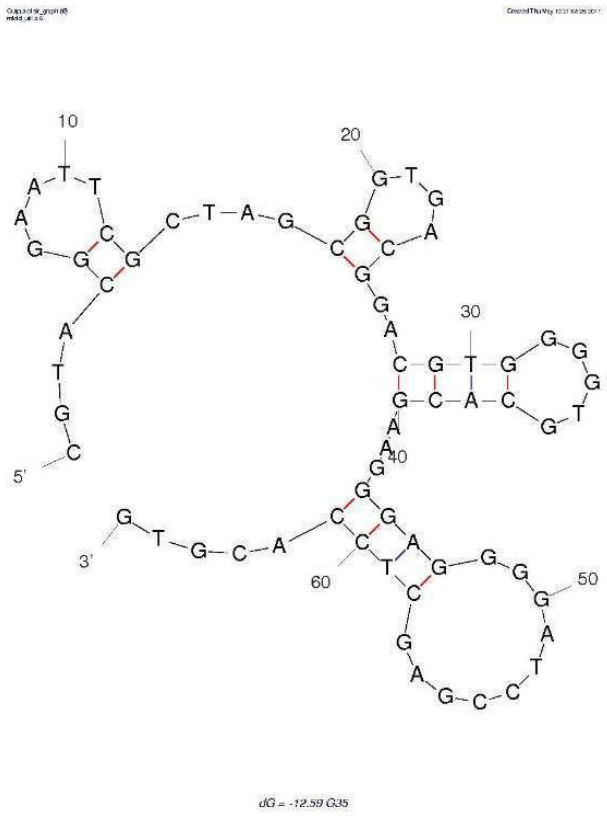
도면5



도면6

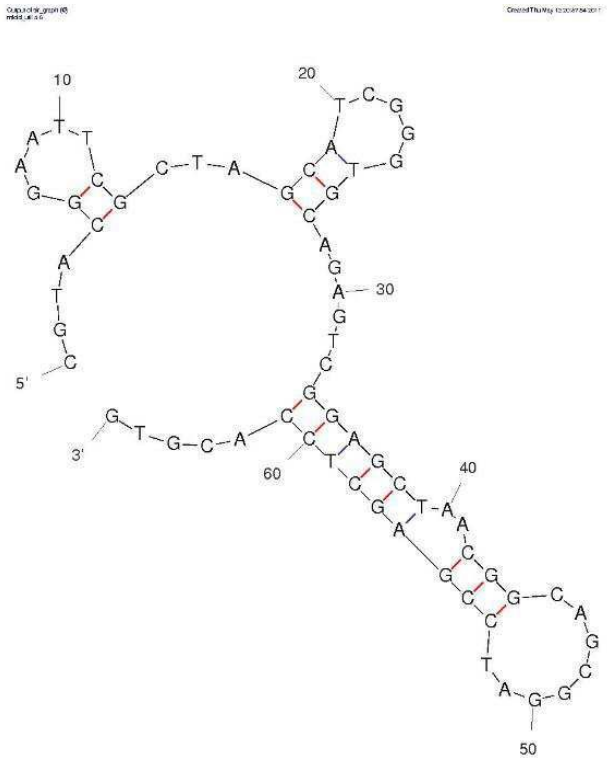


도면7



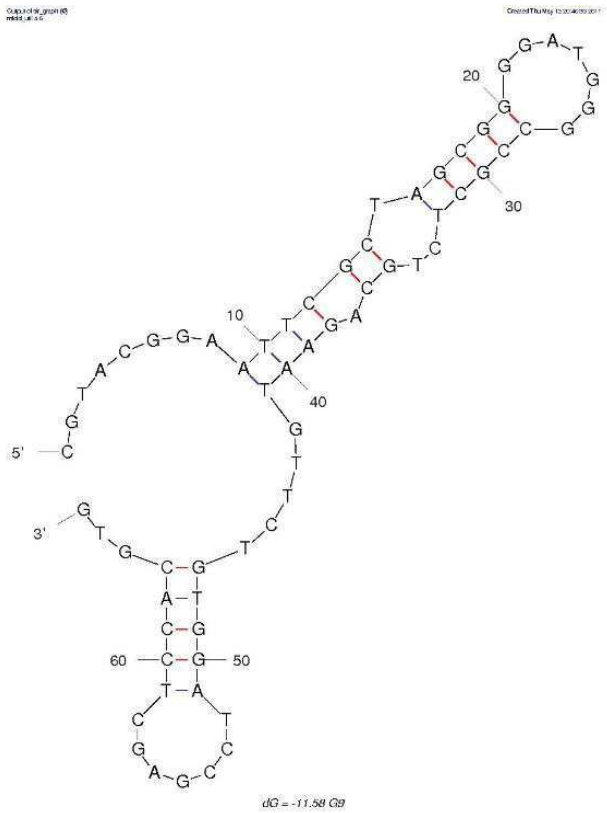
dG = -12.59 G35

도면8

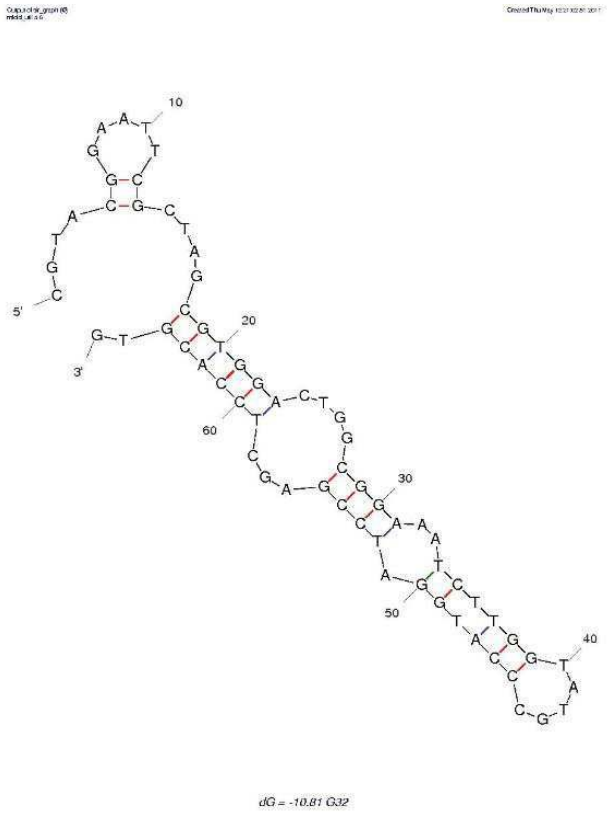


dG = -11.83 G26

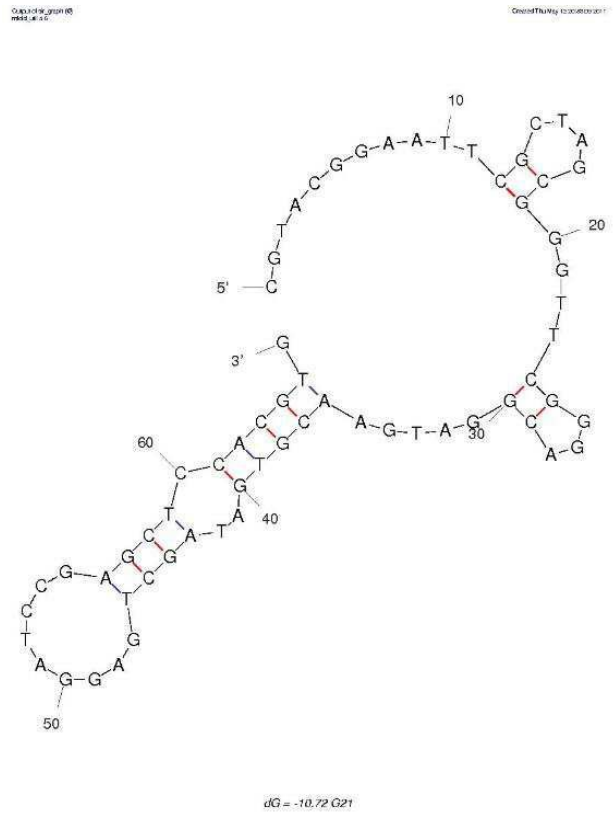
도면9



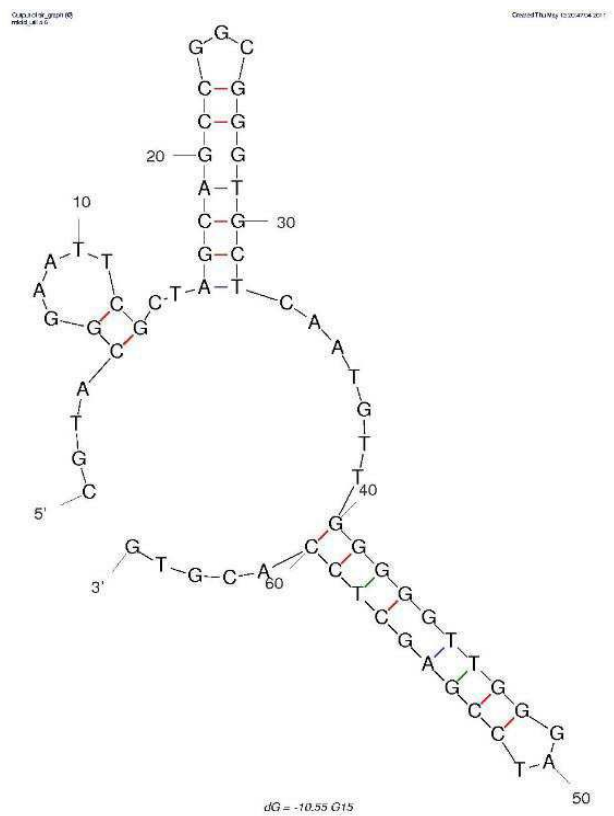
도면10



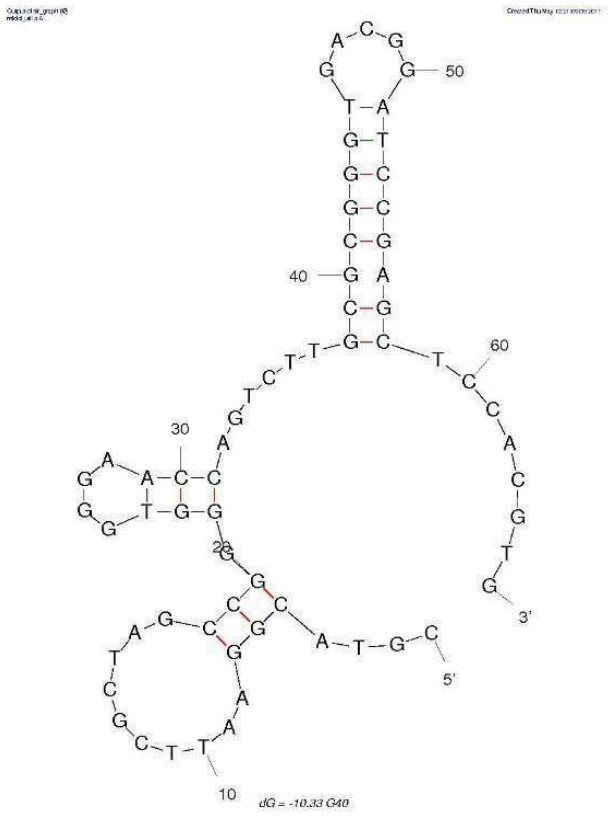
도면11



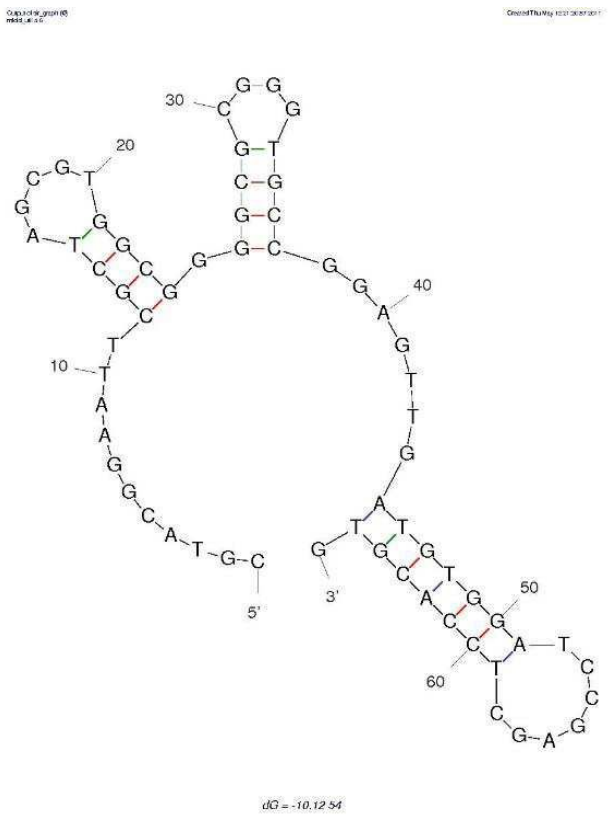
도면12



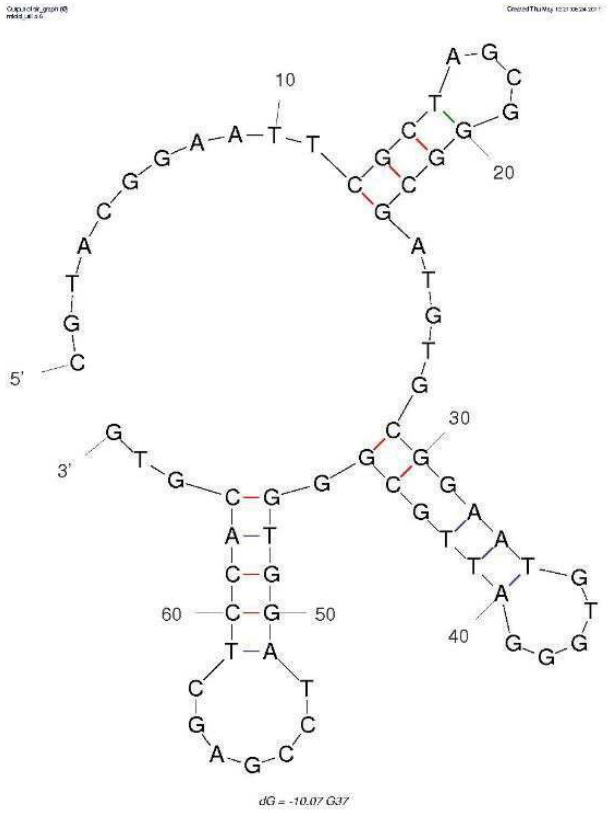
도면13



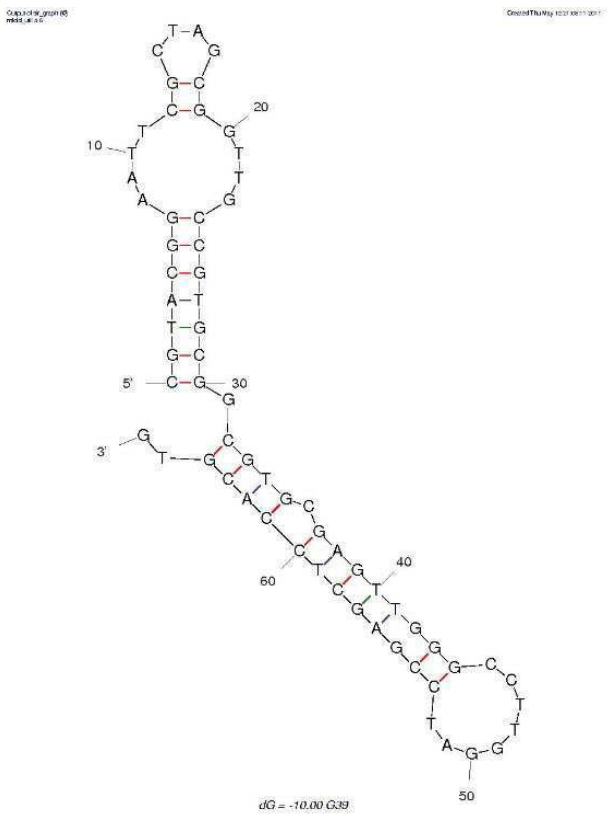
도면14



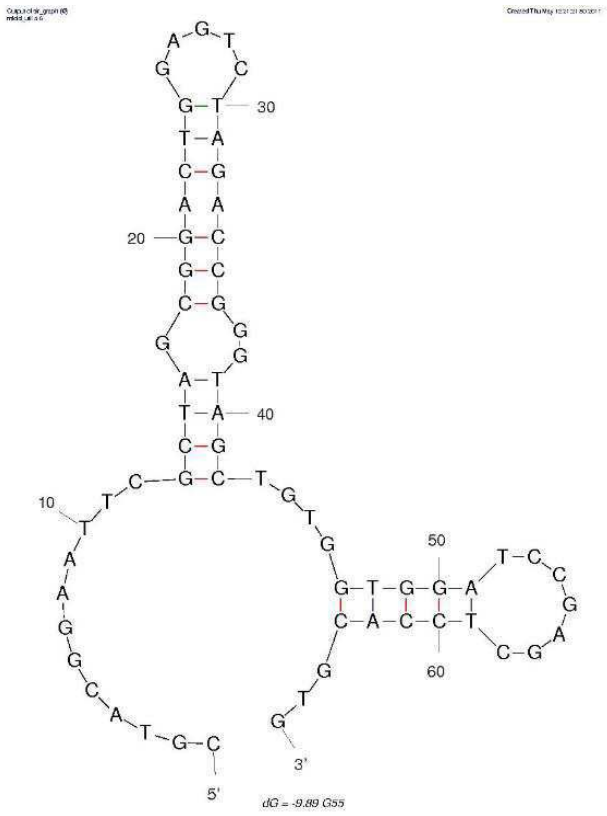
도면15



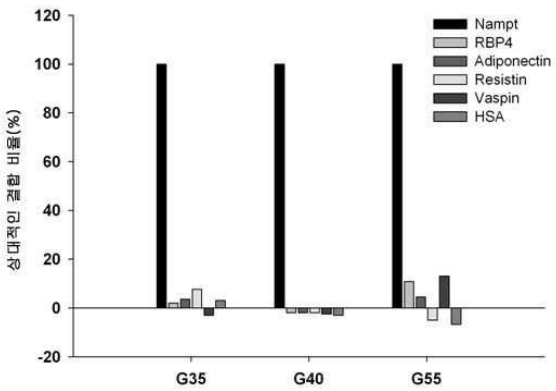
도면16



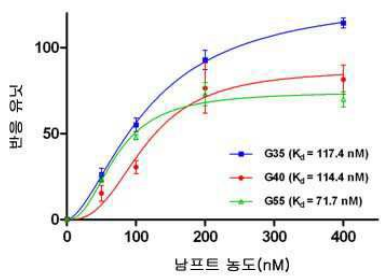
도면17



도면18



도면19



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Novel aptamer screening method based on graphene without target immobilization and the Nampt specific aptamers obtained from the above method

<160> 18

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for PCR amplification

<400> 1

cgtacggaat tcgctagc 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for PCR amplification

<400> 2

ggatccgagc tccacgtg 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reward primer for PCR amplification of Nampt binding DNA

<400> 3

cacgtggagc tcggatcc 18

<210> 4

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer 56

<400> 4

cgtacggaat tcgctagccc gtggggtagc ggggtcgtgt gatatgtgga tccgagctcc 60

acgtg 65

<210> 5

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer 12

<400> 5

cgtacggaat tcgctagcgg gtgccgtggc acgaggccgt ggtccagggg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 6

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer 4

<400> 6

cgtacggaat tcgctagcgt gatgtggggg tacgctcgtg gcaggcttgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 7

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 27

<400> 7

cgtacggaat tcgctagcgg gtggagtacg tgggggtcat cctgtgtggg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 8

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 35

<400> 8

cgtacggaat tcgctagcgg tgacggacgt ggggtgcacg aagggagggg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 9

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 26

<400> 9

cgtacggaat tcgctagcat cgggtgcaga gtcggagcta acggcagcgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 10

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 9

<400> 10

cgtacggaat tcgctagcgg ggatgggccg ctctgcagaa tgttctgtgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 11

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 32

<400> 11

cgtacggaat tcgctagcgt ggactggcgg aaatcttggt atgcccatgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 12

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 21

<400> 12

cgtacggaat tcgctagcgg gttcgggacg gatgaacgtg atagctgagg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 13

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 15

<400> 13

cgtacggaat tcgctagcag ccggcgggtg ctcaatgttg ggggttggga tccgagctcc 60

acgtg 65

<210> 14

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 40

<400> 14

cgtacggaat tcgctagccg gggtgggaac cagtcttgcg cgggtgacgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 15

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 54

<400> 15

cgtacggaat tcgctagcgt ggcggggcgc gggtgccgga gttgatgtgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 16

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 37

<400> 16

cgtacggaat tcgctagcgg gcgatgtgcg gaatgtggga ttgcgggtgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 17

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 39

<400> 17

cgtacggaat tcgctagcgg ttgccgtgcg gcgtgcgagt tgggccttgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 18

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nampt specific aptamer no. 55

<400> 18

cgtacggaat tcgctagcgg actggagtct agaccgggta gctgtggtgg atccgagctc 60

cacgtg 66