



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0161067
(43) 공개일자 2023년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) C12Q 1/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
C12Q 1/70 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2022-0060621
(22) 출원일자 2022년05월18일
심사청구일자 2022년05월18일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
김석준
경기도 부천시 범안로96번길 23, 405동 304호(범
박동, 부천범박힐스테이트 4단지)
김웅
광주광역시 동구 산수길35번길 22, 301호(계림동)
(74) 대리인
최규환

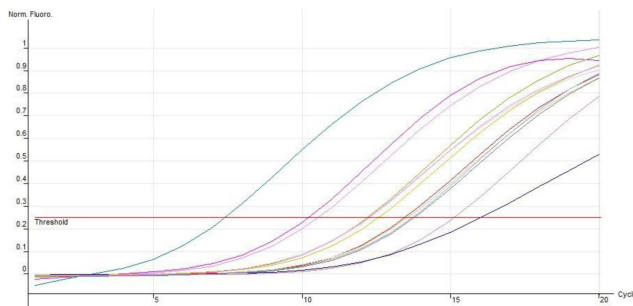
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 SARS-CoV-2에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)에 특이적으로 결합하며, 서열번호 2 내지 4의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 핵산 압타머 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 핵산 압타머는 SARS-CoV-2의 현장 진단 등에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



No.	Colour	Name	Ct
1	Red	SC2_R4_1	13.51 ± 0.23
2	Pink	SC2_R4_3	10.57 ± 0.72
3	Teal	SC2_R4_4	7.51 ± 0.19
4	Magenta	SC2_R4_5	10.75 ± 0.53
5	Gold	SC2_R4_8	13.83 ± 0.27
6	Blue	SC2_R4_10	13.83 ± 0.20
7	Purple	SC2_R4_13	15.00 ± 0.31
8	Green	SC2_R4_14	12.94 ± 0.86
9	Dark Blue	SC2_R4_16	14.84 ± 2.29
10	Grey	SP6	12.72 ± 0.53
11	Dark Grey	CoV2-RBD-1	14.58 ± 0.97
12	Yellow	CoV2-RBD-4	12.57 ± 0.18
13	Pink	nCoV-S1-A1	12.21 ± 0.06

(52) CPC특허분류

C12N 2310/16 (2013.01)

C12Q 2525/205 (2013.01)

C12Q 2563/00 (2019.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425161578
과제번호	S3046049
부처명	중소벤처기업부(P73)
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	창업성장기술개발
연구과제명	실시간 호흡기 바이러스 감지가 가능한 공간방역 로봇개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	주식회사 유니컴퍼니(위탁:조선대학교 산학협력단)
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.05.23

명세서

청구범위

청구항 1

SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)에 특이적으로 결합하며, 서열번호 2 내지 4의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는, 핵산 압타머.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 핵산 압타머는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 핵산 압타머.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 핵산 압타머는 검출가능한 표지가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 핵산 압타머.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 검출가능한 표지는 광학적 표지, 전기화학적 표지, 방사성 동위원소 또는 이들의 조합인 것인 특징으로 하는 핵산 압타머.

청구항 5

제1항의 핵산 압타머를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 조성물.

청구항 6

제1항의 핵산 압타머를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 센서.

청구항 7

제1항의 핵산 압타머를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 키트.

청구항 8

제1항의 핵산 압타머와 SARS-CoV-2 감염 의심 개체의 분리된 생물학적 시료를 반응시키는 단계;를 포함하는, SARS-CoV-2 감염을 검출하는 방법.

청구항 9

제1항의 핵산 압타머와 SARS-CoV-2 감염 의심 개체의 분리된 생물학적 시료를 반응시키는 단계;를 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)의 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는, 서열번호 2 내지 4의 염기서열로 이루어진 핵산 압타머 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)는 2019년 12월 중국 우한에서 처음 발생한 이후 중국 전역과 전 세계로 확산된 새로운 유형의 코로나바이러스로, SARS-CoV-2에 감염되면 발열, 권태감, 기침, 호흡곤란 및 폐렴 등 경증에서 중증까지 다양한 호흡기 감염증상이 나타난다. SARS-CoV-2로 인한 코로나 바이러스감염증-19 (COVID-19)로 세계적으로 290만 명 이상의 사망자가 발생하면서 1918년 인플루엔자 대유행

시대 이후 가장 큰 글로벌 보건위기로 부상했다.

[0003] 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스로 지정된 SARS-CoV-2는 외피 바이러스로, 30kb의 포지티브 센스 단일 가닥 RNA 게놈을 가지며, 베타 코로나 바이러스 속에 속한다. SARS-CoV-2는 4종류의 주요 구조 단백질(S-spike, E-envelope, M-membrane, N-nucleocapsid)과 16종류의 비구조 단백질(NSP 1-16), 5 내지 8 종류의 보조 단백질로 구성되어 있다.

[0004] 압타머(aptamer)는 특정 목표 물질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 저분자 물질을 의미하며, 일반적으로 약 20~60개의 뉴클레오타이드로 구성된 작은 핵산 구조체이다. 서열에 따라 다양한 줄기(stem) 고리 구조를 가지게 되며, 접힘 구조를 형성하여 목표 물질과 결합하게 된다. 압타머는 무작위적인 서열 풀(pool)에서 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라는 일련의 과정을 거쳐 선별된다. 압타머는 항체에 비해 크기가 작기 때문에 보다 더 유연하게 목표 물질에 결합할 수 있으며, 항체보다 빠른 시간 안에 합성할 수 있는 장점이 있다. 또한, 생체 내의 조건에서 안정한 형태로 존재하는 항체에 비해 압타머는 일반적인 핵산과 같이 어느 정도 높은 온도, pH 등의 환경에서 안정하다는 이점이 있어, 키트로 개발할 때 항체를 이용한 경우보다 안정성이 높은 장점이 있다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2012-0139512호에는 '중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스를 검지할 수 있는 압타머 및 그를 포함하는 약학적 조성물'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제2287960호에는 '중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2 검출용 등은 단일 반응 프로브 세트 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 SARS-CoV-2에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 SELEX 과정을 통해 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질에 우수한 결합력을 보이는 핵산 압타머를 선발하였다, 그 후 본 발명에서 선발된 압타머와 공지된 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 특이적 압타머의 결합력을 비교한 결과, 본 발명에서 선발된 핵산 압타머의 우수한 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 결합능을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)에 특이적으로 결합하며, 서열번호 2 내지 4의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는, 핵산 압타머를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 핵산 압타머를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 핵산 압타머를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 센서를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 핵산 압타머를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 핵산 압타머와 SARS-CoV-2 감염 의심 개체의 분리된 생물학적 시료를 반응시키는 단계;를 포함하는, SARS-CoV-2 감염을 검출하는 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 핵산 압타머와 SARS-CoV-2 감염 의심 개체의 분리된 생물학적 시료를 반응시키는 단계;를 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 핵산 압타머는 SARS-CoV-2에 대한 우수한 결합력을 가지고 있으며, 항체 대비 다양한 이점을 가지고 있으므로 SARS-CoV-2의 현장 진단 등에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 DNA 압타머의 구조이다.

도 2는 본 발명에서 선발한 압타머(표 3)의 SARS-CoV-2에 대한 결합력 비교 결과이다.

도 3은 이전에 공개된 SARS-CoV-2 결합 압타머(표 4)와 본 발명에서 선발한 압타머 간의 SARS-CoV-2에 대한 결

합력 비교 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)에 특이적으로 결합하며, 서열번호 2 내지 4의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는, 핵산 압타머를 제공한다.
- [0016] 본 발명에서 용어 "압타머(aptamer)"는 그 자체로 안정한 삼차 구조를 가지고, 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 핵산 분자를 의미하며, 용어 "특이적으로 결합(specifically binding)"은 상기 압타머가 SARS-CoV-2의 표면 단백질인 스파이크 단백질과 결합하고 SARS-CoV-2 바이러스 이외의 다른 바이러스를 포함하는 비표적 물질에는 실질적으로 결합하지 않거나 친화도에서 큰 차이를 보이는 것을 의미한다. 용어, "핵산(nucleic acid)"은 뉴클레오티드(nucleotide)의 중합체(polymers)를 의미하는 것으로, "올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)" 또는 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"와 동일한 의미로 사용될 수 있다. 상기 핵산은 디옥시리보뉴클레오티드(DNA), 리보뉴클레오티드(RNA) 및/또는 PNA (peptide nucleic acid) 분자를 포함한다. 뉴클레오티드는 핵산 분자의 기본 구성 단위로서, DNA 또는 RNA 를 포함하며, 자연의 뉴클레오티드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함할 수 있다. 따라서, 상기 "단일가닥 핵산"은 상기 뉴클레오티드 중합체가 단일 가닥으로 존재하는 형태의 핵산을 의미한다.
- [0017] 본 발명에 따른 상기 압타머는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 압타머는 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 가지며, 또한 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열과 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 상기 압타머는 검출가능한 표지가 결합될 수 있다. 상기 검출가능한 표지는 당업계에 알려진 검출 방법에 의하여 검출될 수 있는 모이어티(moiety) 일 수 있다. 예를 들면, 상기 검출가능한 표지는 광학적 표지, 전기화학적 표지, 방사성 동위원소 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 검출가능한 표지는 압타머의 특정 염기, 특정 구조 예를 들면, 헤어핀-루프(hairpin-loop) 구조의 특정 부위 또는 압타머의 3' 말단 또는 5' 말단에 부착될 수 있다.
- [0020] 상기 광학적 표지는 예를 들면, 형광물질일 수 있다. 상기 형광물질은 플로로세인(fluorescein), 6-FAM, 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 테트라메틸로다민, 카르복시로다민, 카르복시로타민6G, 카르복시로돌, 카르복시로다민110, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), 캐스케이드 옐로우(Cascade Yellow), 코마린, Cy2 (cyanine 2), Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy-크롬, 피코에리트린, PerCP(페리딘 클로로필-a 단백질), PerCP-Cy5.5, JOE (6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시폴루오레신), NED, ROX (5-(및-6)-카르복시-X-로다민), HEX, 루시퍼 옐로우(Lucifer Yellow), 마리나 블루(Marina Blue), 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 오레곤 그린 500, 오레곤 그린 514, 알렉사 플로어, 7-아미노-4-메틸코마린-3-아세트산, 보디피(BODIPY) FL, 보디피 FL-Br 2, 보디피 530/550, 이의 컨쥬게이트드화물 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 상기 광학적 표지는 효소일 수 있으며, 상기 효소는 효소결합면역흡착검정(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에 사용되는 효소일 수 있다. 상기 ELISA에 사용되는 효소는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase), 홀스레디쉬 페록시다제(horseradish peroxidase), 루시페라제 또는 글루코즈 옥시다제(glucose oxidase) 등일 수 있다. 상기 광학적 표지로 효소를 사용할 경우, 화학 발광 반응을 유도하기 위하여 바람직하게는 화학발광물질로서 루미놀(luminol), 이소루미놀(isoluminol), 루시페린(luciferin), 루시게닌(lucigenin), AMPPD [3-(4'-Methoxyspiro[adamantane-2,3'-[1,2]dioxetan]-4'-yl)phenyl dihydrogen phosphate] 또는 CSPD [3-(2'-(Spiro-5-chloroadamantane))-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetane] 등이 사용될 수 있으며, 또한 이외에도 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0022] 또한, 상기 광학적 표지는, 적절한 거리에 의하여 이격되어 있는 형광 도너 발색소 및 형광 수용자 발색소를 포함하고 도너의 형광 발광이 수용자에 의하여 억제되어 있는 형광공명에너지전달(fluorescence resonance energy transfer: FRET) 쌍일 수 있다. 도너 발색소는 FAM, TAMRA, VIC, JOE, Cy3, Cy5 및 Texas Red를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 수용자 발색소는 그의 여기 스펙트럼이 도너의 발광 스펙트럼과 겹치도록 선택될

수 있다. 또한, 상기 형광 수용자는 넓은 범위의 도너를 퀀칭(quenching)하는 비형광 수용자일 수 있다.

- [0023] 상기 전기화학적 표지는 당업계에 알려진 전기화학적 표지를 포함하는데, 예를 들면, 상기 전기화학적 표지는 메틸렌 블루일 수 있다.
- [0024] 본 발명은 또한, 본 발명의 핵산 압타머를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명에 따른 SARS-CoV-2 검출용 조성물에 있어서, 상기 핵산 압타머는 전술한 것과 같다.
- [0026] 또한, 상기 SARS-CoV-2 검출용 조성물은 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질과 압타머가 결합하는 결합체 형성을 보조하기 위한 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 물질은 예를 들면, 연어 정자 DNA, BSA (bovine serum albumin), Tween-20 및/또는 PEG (polyethylene glycol) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명은 또한, 본 발명의 핵산 압타머를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 센서를 제공한다.
- [0028] 본 발명에 따른 SARS-CoV-2 검출용 센서는 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 압타머를 포함하며, 상기 센서에 포함되는 압타머는 상술한 검출가능한 표지가 부착되어 있는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 전기화학적 표지를 포함하는 압타머가 사용된 센서에서는 표적 물질과 결합한 압타머의 구조 변화로 인해 표지 물질이 전극으로부터 멀어지거나, 가까워지거나 또는 압타머로부터 분리되어 전기화학적 신호가 변화하게 된다.
- [0029] 또한, 상기 SARS-CoV-2 검출용 센서는, 상기 압타머가 고정화되어 있는 기판을 포함하는, 어레이 형태일 수 있다. 어레이는 복수 개의 특정 분자가 기판상의 일정 부분에 고정화되어 있는 것을 말하는데, 상기 어레이는 기판 및 상기 기판에 형성된 SARS-CoV-2 바이러스와 결합할 수 있는 압타머를 포함하는 고정화 영역을 포함할 수 있다. 상기 압타머는 상기 고정화 영역 내에 공유적으로 부착된 것일 수 있으며, 상기 압타머는 공유적으로 부착시킬 수 있는 관능기를 갖는 복수의 화합물을 더 포함할 수 있다. 상기 관능기는 상기 압타머를 부착할 수 있도록 하는 것이면 어느 것이나 사용될 수 있다. 예를 들면, 알데히드, 에폭시, 카르복시 또는 아민기가 될 수 있으며, 상기 화합물은 말단에 알데히드, 에폭시, 카르복시 또는 아민기를 갖는 실록산이 될 수 있다. 상기 어레이의 기판 재질은 예를 들면, 유리, 실리콘, 폴리프로필렌 및 폴리에틸렌과 같은 물질이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명은 또한, 본 발명의 핵산 압타머를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 키트를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 키트는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 압타머를 포함하며, 상기 키트에 포함된 압타머는 전술한 검출가능한 표지가 부착되어 있는 것일 수 있다.
- [0032] SARS-CoV-2 검출용 키트는 본 발명에 따른 상기 압타머가 칩 상에 고정화된 칩 형태, 또는 압타머가 기판상에 고정화된 어레이 형태일 수 있다. 핵산 압타머를 칩이나 기판상에 고정화시키는 것은 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있는데, 예컨대 칩 또는 기판을 스트렙타비딘(streptavidin)으로 개질하고, 압타머의 말단을 비오틴화(biotinylation) 시킨 후, 압타머의 비오틴과 지지체의 스트렙타비딘과의 결합을 이용하여 고정화할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 또한, 본 발명의 핵산 압타머와 SARS-CoV-2 감염 의심 개체의 분리된 생물학적 시료를 반응시키는 단계;를 포함하는, SARS-CoV-2 감염을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명은 또한, 본 발명의 핵산 압타머와 SARS-CoV-2 감염 의심 개체의 분리된 생물학적 시료를 반응시키는 단계;를 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명에 따른 SARS-CoV-2 감염증의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 생물학적 시료는 개개인으로부터 얻어지는 폭넓은 범위의 모든 생물학적 체액을 포함하고, 바람직하게는 SARS-CoV-2 감염 의심 개체 또는 진단 대상 개체 유래의 세포, 조직, 생검, 파라인조직, 혈액, 혈청, 혈장, 소변 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 코 면봉법(nasal swab)으로 채취한 검체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 포유동물로부터 체액 및 조직, 생검 등을 획득하는 방법은 당업계에 알려진 통상의 방법을 이용할 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 SARS-CoV-2 감염증의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 압타머와 생물학적 시료의 반응은 반응 용액 중에서 수행될 수 있다. 구체적으로는, 상기 압타머가 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질과 잘 결합할 수 있는 염의 조성, 반응성을 극대화하기 위한 적정 수소이온농도(pH), 균질성을 확보하기 위한 용매의 혼합물과 비특이적 결합을 방지하는 요소가 포함된 반응 용액 중에서 수행될 수 있다. 상기 용매는 예를 들면,

정제수, 메탄올 또는 아세토니트릴 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 비특이적 결합을 방지하는 요소는 예를 들면, 염어 정자 DNA, BSA 및/또는 Tween-20 또는 PEG 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 적절한 pH는 예를 들면, 4 내지 8, 5 내지 7.5, 6 내지 7일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 반응 온도는 예를 들면, 15 내지 50℃, 25 내지 45℃, 또는 30 내지 40℃일 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 압타머를 이용한 SARS-CoV-2 감염증의 진단 정보 제공은 시료 내 존재하는 SARS-CoV-2와 본 발명의 핵산 압타머의 결합 여부 확인을 통해 이루어질 수 있으며, 상기 결합 여부 확인은 검출가능한 표지가 결합된 핵산 압타머를 사용하여 수행될 수 있는데, 구체적으로는 SARS-CoV-2와 핵산 압타머의 결합체로부터 신호를 측정하여 수행될 수 있다.

[0039] 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 재료 및 방법

[0042] 1. DNA 압타머(aptamer) 라이브러리 준비

[0043] 단일가닥 DNA 올리고뉴클레오타이드로 구성된 압타머 라이브러리를 합성하였다. 본 발명의 압타머 라이브러리는 "ATGCGAATTCATCAGTGCCAGTCAT (서열번호 14)-N40-GATTAGCATAGATGAGGATCCATGC (서열번호 15)"과 같이 구성되는데 (도 1), 양 말단은 프라이머 세트가 어닐링되는 고정된 염기서열 영역이며, 중앙에는 무작위로 배열된 염기서열 영역(N40) 이다. 여기서, N40은 일반적으로 40개의 임의의 A, G, T, C 염기로 이루어지는 것을 의미하나, 40개에만 제한되는 것은 아니며, SELEX 공정의 반복적인 PCR 및 클로닝 과정에 의해 40개에서 임의의 수의 염기가 추가 또는 생략될 수 있다.

표 1

[0044] Aptamer library 제작에 사용된 프라이머 세트

Name	서열(5'→3')	서열번호	GC 함량	Tm
ATM-F	ATGCGAATTCATCAGTGCCAGTCAT	14	44%	56℃
ATM-R	GATTAGCATAGATGAGGATCCATGC	15	44%	56℃
밑줄: 제한효소 자리				

[0046] 2. 표적 단백질 준비

[0047] 압타머의 결합 표적인 SARS-CoV-2 스파이크 단백질은 히스티딘 태그가 결합되어 있는 Recombinant Human coronavirus SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 (cat no. ab275927, Abcam)을 구매하여 사용하였다.

[0049] 3. SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)

[0050] SARS-CoV-2의 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머를 선별하기 위한 SELEX를 수행하였다.

[0051] DNA 압타머 라이브러리를 정제수에 녹여 95℃에서 10분간 반응시켜 변성을 유도한 후 얼음(ice)에 10분간 처리하였다. 그 후, 상기 DNA 압타머 라이브러리와 100 mg/ml (10%(v/v))의 Ni-NTA 자성비드(magnetic nanobead; MagListo™ His-tagged Protein Purification Kit (BIONEER, Korea))를 4℃에서 30분간 반응시킨 후 침전시켜 자성비드와 비특이적으로 결합하는 DNA 압타머를 제거(pre-clearing)하였다. 표적 단백질과 특이적으로 결합하

는 DNA 압타머를 선별하기 위해 pre-clearing한 DNA 압타머와 표적 단백질($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 반응버퍼(50 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) 내에서 4°C , 30 분간 로테이터(rotator)에서 반응시켰다. 표적 단백질과 결합된 DNA 압타머를 Ni-NTA 자성비드와 30분간 4°C 에서 반응시켰다. 자석을 활용하여 자성비드를 침전시키고 반응버퍼를 이용하여 세척과정을 5회 반복하였다. 용리버퍼(50 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 자성비드와 결합된 표적단백질과 DNA 압타머의 결합체를 분리하였다. 그 후, 표적 단백질과 결합된 DNA 압타머는 Proteinase K ($25 \text{ mg}/\text{ml}$) 처리 후 상온에서 30분간 배양하여 단백질을 제거한 후 남은 DNA 압타머는 이소프로판올(isopropanol)로 침전시켰다. 이후 75% 에탄올을 활용하여 남은 버퍼를 세척하고 증류수 $50 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 DNA 압타머를 획득하였고, PCR을 통하여 DNA 압타머를 증폭하였다. 상기 증폭된 DNA 압타머를 이용하여 전술한 과정을 1~4회 반복하였으며, 결합력이 우수한 DNA 압타머를 선별하기 위하여 표적 단백질의 양을 줄여가며($1 \mu\text{g}/\text{ml} \rightarrow 0.5 \mu\text{g}/\text{ml} \rightarrow 0.2 \mu\text{g}/\text{ml} \rightarrow 0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 반복 수행하였다.

[0052] 상기 증폭된 DNA 압타머 단편은 pGEM[®] T Easy Vector Systems (Promega, USA)를 사용하여 TA 클로닝을 진행하였으며, DNA 압타머가 삽입된 벡터를 *E. coli*에 형질전환 하였다. 형질전환된 *E. coli*는 선별배지를 통해 형질전환 유무 확인 및 단일균주 확보를 진행하였으며, 액체 배양 후 Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen)를 활용하여 벡터를 확보하였다. 확보된 벡터는 (주)마크로젠에 의뢰하여 염기서열 분석을 진행하였다.

[0054] 4 압타머 결합력 확인

[0055] 선별된 DNA 압타머와 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 결합 유무와 결합력을 확인하기 위해 동일한 농도($1 \mu\text{M}$)의 DNA 압타머를 사용하여 전술한 SELEX 과정을 1회 진행하였다. $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 표적 단백질을 이용한 SELEX로 구획된 DNA 압타머를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였고, Ct 값 산출을 통해 결합력을 분석하였다.

표 2

Real-time PCR mixture	
EzAmp Real-Time qPCR 2x Master Mix	7.5 ul
Forward primer	1
Reverse primer	1
DNA Aptamer	1ul
DW	4.5ul
Total	20

Real-time PCR condition
[95°C , 10 min- (95°C , 10 sec - 48°C , 15 sec - 72°C , 20 sec) X 20 cycles]

[0056]

[0057] 동일한 농도의 DNA 압타머를 사용하여 SELEX를 진행할 경우, 결합력이 높은 압타머가 더 높은 농도로 구획된다. 또한, 구획된 압타머의 농도가 높을수록 Ct 값은 낮게 확인된다. 따라서, Ct 값이 낮을수록 SARS-CoV-2 스파이크 단백질과의 결합력이 높은 것으로 해석할 수 있다.

[0059] 실시예 1. SARS-CoV-2 특이적인 DNA 압타머의 선발

[0060] 본 발명자는 재조합 스파이크 단백질(Abcam, cat no. ab275927)을 이용하여 압타머 라이브러리로부터 총 9개의 DNA 압타머를 선발하였다(표 3). 선발된 압타머의 결합력을 Real-time PCR을 통해 확인한 결과, 도 2에 개시된 것과 같이 SC2_R4_4 (서열번호 3) 압타머가 가장 우수한 결합력을 보여주었으며, SC2_R4_3 및 SC2_R4_5의 압타머 또한 결합력이 우수한 것으로 확인되었다.

표 3

[0061] 선택된 DNA 압타머 정보

서열번호	Oligo name	서열(5'→3')
1	SC2_R4_1	ATGCGAATTCATCAGTGCCAGTCATTTCGGGTGGTCTTCGCATACGGCTTGATTGATGCGGATTAGCA TAGATGAGGATCCATGC
2	SC2_R4_3	GCATGGATCCTCATCTATGCTAATCCGTAGACGCGTGAGGCAGCCGTATGCGAATCGGCACTCCCAACG ATGACTGGCACTGATGAATTCGCAT
3	SC2_R4_4	GCATGGATCCTCATCTATGCTAATCGTTGACACCAGCATATGCGAATCGGAGATAAGAGGATGACTGGC ACTGATGAATTCGCAT
4	SC2_R4_5	ATGCGAATTCATCAGTGCCAGTCATTTCGGGTGTGTGCTCGTCTTCGCATAGGTGGCGCGTTGGATT AGCATAGATGAGGATCCATGC
5	SC2_R4_8	GCATGGATCCTCATCTATGCTAATCAGACCCATACGTCGTGGCTAGTATGCGAAGACCCCAAGATGAC TGGCACTGATGAATTCGCAT
6	SC2_R4_10	GCATGGATCCTCATCTATGCTAATCCCAATGACGCGGACGTATGCGAAGGCGGATCAAATAGATGACTG GCACTGATGAATTCGCAT
7	SC2_R4_13	ATGCGAATTCATCAGTGCCAGTCATTTCGGGTGTGTGCTCGTCTTCGCATAGGTGGCGCGTTGGAT TAGCATAGATGAGGATCCATGC
8	SC2_R4_14	ATGCGAATTCATCAGTGCCAGTCATTTCGGGTGCGTATTTCGCATAAGCCCCATCTTCAGACCAGATT AGCATAGATGAGGATCCATGC
9	SC2_R4_16	ATGCGAATTCATCAGTGCCAGTCATGCGTTTCGGTCTTCGCATACGTTCTGTCTGCTGGCTTGATTAG CATAGATGAGGATCCATGC

[0063] 실시예 2. 기존 압타머와 결합력 비교

[0064] 본 발명자는 이전에 공개된 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 특이적 압타머(표 4)를 합성하여 본 발명에서 선별된 압타머 후보들과 결합력을 비교하였다. 방법은 전술한 결합력 측정 방법과 동일하게 수행하였다.

표 4

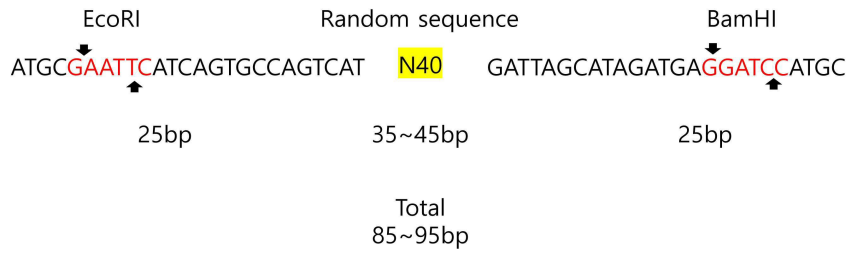
[0065] 공개된 SARS-CoV-2 특이적 압타머 정보

서열번호	Oligo name	서열(5'→3')
10	nCoV-S1-A1 ¹⁾	AGCAGCACAGAGGTCAGATGCCGAGGCAGCTGCCATTAGTCTCTATCCGTGACGGTATGCCTATG CGTGCTACCGTGAA
11	SP6 ²⁾	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAACCCATGGTAGGTATTGCTTGGTAGGGATAGTGGGCTTGATG TTTCGTGGATGCCACAGGAC
12	CoV2-RBD-1 ³⁾	ATCCAGAGTGACGCAGCACCGACCTTGTGCTTGGGAGTGCTGGTCCAAGGGCGTTAATGGACACG GTGGCTTAGT
13	CoV2-RBD-4 ³⁾	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTTCATCGGGTCCAAAAGGGGCTGCTCGGGATTGCGGATATGGACACG GTGGCTTAGT
1) Yang, Ge, et al. Signal Transduct. Target. Ther. (2021), 6(1):1-4 2) Schmitz, Anton, et al. Angew Chem Weinheim Bergstr Ger. (2021), 133(18):10367-10373 3) Song, Yanling, et al. Anal Chem. (2020), 92(14):9895-9900		

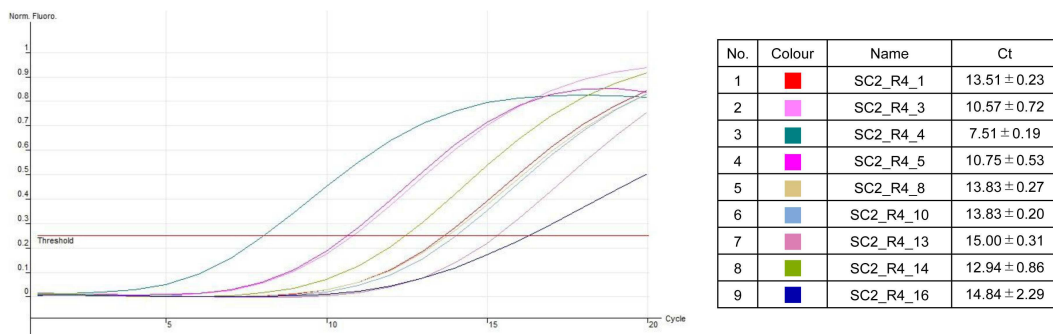
[0066] 그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 본 발명에서 선별된 SC2_R4_4, SC2_R4_3 및 SC2_R4_5의 압타머가 기존에 발표된 압타머보다 낮은 Ct 값을 나타내어 SARS-CoV-2에 대한 보다 높은 결합력을 가지고 있음을 확인하였다.

도면

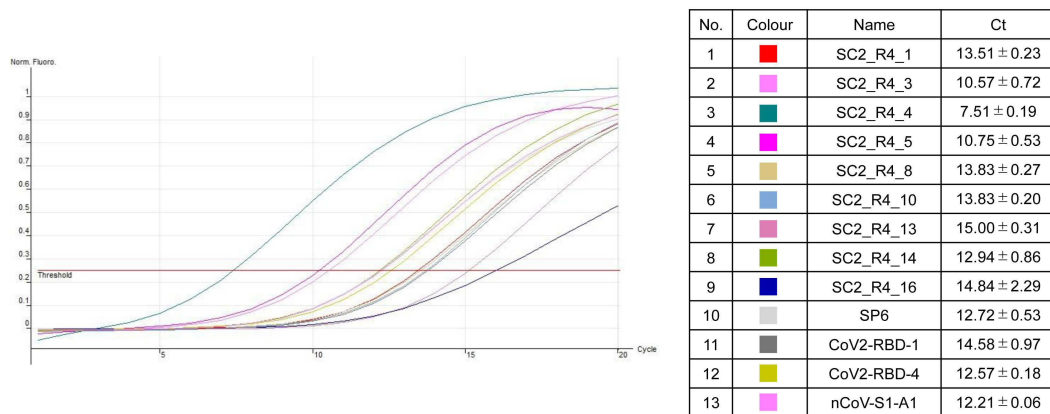
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Nucleic acid aptamer specifically binding to SARS-CoV-2 and uses thereof
- <130> PN22175
- <160> 15
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_SC2_R4_1
 <400> 1
 atgcgaattc atcagtgcc gtcatttccg gtggtcttcg catacggctt gatttgatgc 60
 ggattagcat agatgaggat ccatgc 86
 <210> 2
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_SC2_R4_3
 <400> 2
 gcatggatcc tcactatgc taatccgtag acgcgtgagg cagccgtatg cgaatcggca 60
 ctcccaacga tgactggcac tgatgaattc gcat 94
 <210> 3
 <211> 85
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_SC2_R4_4
 <400> 3
 gcatggatcc tcactatgc taatcgttga caccagcata tgcgaatcgg agataagagg 60
 atgactggca ctgatgaatt cgcatt 85
 <210> 4
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_SC2_R4_5
 <400> 4
 atgcgaattc atcagtgcc gtcatttgcg ggtgtgtcgc tcgtcttcgc atagggtggcg 60
 cgttggatta gcatagatga ggatccatgc 90
 <210> 5

<211> 89
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_SC2_R4_8
 <400> 5
 gcatggatcc tcatctatgc taatcacgac ccatacgtcg tggctagtat gcgaagaccc 60
 caagatgact ggcatgatg aattcgcat 89

<210> 6
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_SC2_R4_10
 <400> 6
 gcatggatcc tcatctatgc taatcccaat gacgcggacg tatgcgaagg cggatcaaat 60
 agatgactgg cactgatgaa ttcgcat 87

<210> 7
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_SC2_R4_13
 <400> 7
 atgcgaattc aatcagtgcc agtcatttgc ggggtgtgtcg ctcgtcttcg cataggtggc 60
 gcgttggatt agcatagatg aggatccatg c 91

<210> 8
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_SC2_R4_14
 <400> 8
 atgcgaattc atcagtgcc gtcattctcg ggggtgcgtat tcgcataagc cccatcttca 60
 gaccagatta gcatagatga ggatccatgc 90

<210> 9
 <211> 88

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_SC2_R4_16
 <400> 9
 atgcgaattc atcagtgccca gtcatgcgtt tccggtcttc gcatacgttc tctgtcctgg 60
 cttgattagc atagatgagg atccatgc 88

<210> 10
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_nCoV-S1-A1
 <400> 10
 agcagcacag aggtcagatg ccgcaggcag ctgccattag tctctatccg tgacggtatg 60
 cctatgcgtg ctaccgtgaa 80

<210> 11
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_SP6
 <400> 11
 gggagaggag ggagatagat atcaacccat ggtaggtatt gcttggtagg gatagtgggc 60
 ttgatgtttc gtggatgccca caggac 86

<210> 12
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA aptamer_CoV2-RBD-1
 <400> 12
 atccagagtg acgcagcacc gaccttgtgc ttgggagtg ctggccaag ggcgttaatg 60
 gacacggtgg cttagt 76
 <210> 13
 <211> 76
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA aptamer_CoV2-RBD-4

<400> 13

atccagagtg acgcagcatt tcatcgggtc caaaaggggc tgctcgggat tgcggatatg 60

gacacggtgg cttagt 76

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

atgcgaattc atcagtgcca gtcac 25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gattagcata gatgaggatc catgc 25