

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2017 년 10 월 5 일 (05.10.2017)



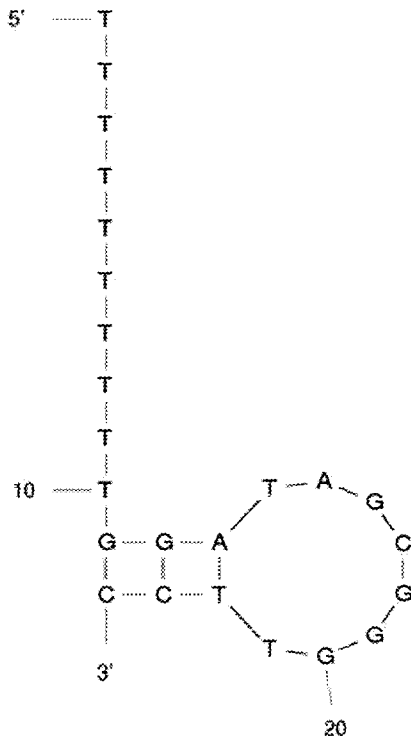
(10) 국제공개번호  
**WO 2017/171461 A1**

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/115* (2010.01) *G01N 33/58* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/003540
- (22) 국제출원일: 2017 년 3 월 31 일 (31.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0038955 2016 년 3 월 31 일 (31.03.2016) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 손아정 (SON, Ah Jeong); 04354 서울시 용산구 새창로 70 113 동 1103 호, Seoul (KR). 이은희 (LEE, Eun Hee); 08325 서울시 구로구 구일로 2 길 60 201 동 703 호, Seoul (KR). 임현정 (LIM, Hyun Jeong); 03721 서울시 서대문구 청산로 547 305 호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6 층 한일국제특허사무소, 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, 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),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL APTAMER FOR DETECTING BISPHENOL A

(54) 발명의 명칭 : 신규한 비스페놀 A 검출용 앵타머



(57) Abstract: The present invention relates to: a novel aptamer for detecting bisphenol A, having a length of 14 bp; a composition for detecting bisphenol A, containing the aptamer; a kit for detecting bisphenol A, comprising the composition; and a method for detecting bisphenol A by using the aptamer. The novel aptamer of the present invention has a relatively small size compared to that of a conventional aptamer capable of detecting bisphenol A, so as to exhibit a simple two-dimensional structure, thereby exhibiting the same level of selectivity as that of a conventional aptamer while enabling bisphenol A to be detected with relatively high detection sensitivity, and thus the aptamer can be widely used in the effective detection of bisphenol A.

(57) 요약서: 본 발명은 14bp의 길이를 갖는 신규한 비스페놀 A 검출용 앵타머, 상기 앵타머를 포함하는 비스페놀 A 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 비스페놀 A 검출용 키트 및 상기 앵타머를 이용하여 비스페놀 A를 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 앵타머는 비스페놀 A를 검출할 수 있는 종래의 앵타머에 비하여, 상대적으로 작은 크기를 갖고, 이로 인하여 단순한 2차원적 구조를 나타내어, 비스페놀 A를 상대적으로 높은 검출감도로 검출할 수 있으면서도, 종래의 앵타머와 동일한 수준의 선택성을 나타내므로, 비스페놀 A의 효과적인 검출에 널리 활용될 수 있을 것이다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

## 명세서

### 발명의 명칭: 신규한 비스페놀 A 검출용 앵타머

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 비스페놀 A 검출용 앵타머에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 14bp의 길이를 갖는 신규한 비스페놀 A 검출용 앵타머, 상기 앵타머를 포함하는 비스페놀 A 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 비스페놀 A 검출용 키트 및 상기 앵타머를 이용하여 비스페놀 A를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 비스페놀 A는 폴리카보네이트나 에폭시 수지 같은 플라스틱 제조의 원료로서, 젖병, 치과에서 사용하는 레진, 음료수 캔의 코팅 등에 널리 사용되고 있다. 그러나, 최근들어 상기 비스페놀 A는 합성 에스트로겐으로 작용할 수 있는 내분비계 교란물질(endocrine disrupter)로서 확인되었는데, 이것이 유리되어 생물체에 흡수되면 내분비계의 정상적인 기능을 방해하거나 혼란케 하며, 극미량 존재하는 경우에도 생물축적으로 생식기능 저하, 성장장애, 기형 또는 암 등을 유발하는 심각한 장애를 일으킬 수 있는 환경호르몬의 일종으로 확인되었으므로, 이를 검출하는 방법이 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [4] 예를 들어, 한국공개특허 제2002-0041713호에는 유기용매를 사용하여 식품 및 식품 포장재에 포함된 비스페놀 A를 추출하고, 수산화나트륨으로 처리하며 일정한 반응 시간 및 온도 하에서 무수 초산을 반응시켜 비스페놀-에이를 유도체화한 후, 이를 분석하는 단계를 포함하는 비스페놀 A 검출방법이 개시되어 있다. 그러나, 상기 방법은 검출에 소요되는 시간이 길고, 검출결과에서 노이즈가 심하여, 검출결과에 대한 신뢰도가 낮은 수준이라는 단점이 있었다.
- [5] 상기 단점을 해결하는 한가지 방안으로서, 앵타머를 사용하는 기술이 제안되었다. 앵타머는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미하는데, 상기 앵타머는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩타이드, 화합물, 중합체 등의 다양한 물질을 표적분자로서 사용할 수 있고, 단백질보다 안정성이 우수하며, 구조가 간단하면서도, 핵산으로 구성되어 합성이 용이하기 때문에, 다양한 표적분자를 검출하는 방법에 이용되고 있다.
- [6] 상기 표적분자로서 비스페놀 A를 검출하기 위한 앵타머가 개발되고 있는데, 예를 들어, 한국공개특허 제2010-0093205호에는 BPA와 특이적으로 결합하는 두

개의 앵타머를 포함하는 비스페놀 A 검출용 키트가 개시되어 있다. 그러나, 구조적으로 두개의 페놀 화합물이 결합된 형태를 나타내는 비스페놀 A는 비교적 단순한 구조를 나타내는데 반하여, 이를 검출하기 위한 앵타머는 대체로 다수의 스템-루프(stem-loop) 구조를 갖는 복잡한 2차원적 구조를 나타내므로, 상기 앵타머에 의한 비스페놀 A의 검출감도가 낮다는 문제점이 제기되었다. 그러나, 아직까지는 이러한 문제점의 해결방안이 도출되지 않고 있는 실정이다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 보다 높은 검출감도로 비스페놀 A를 검출할 수 있는 기술을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 14개의 뉴클레오티드로 구성된 신규한 앵타머를 이용할 경우, 비스페놀 A를 보다 높은 검출감도로 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[8]

### 과제 해결 수단

- [9] 본 발명의 하나의 목적은 신규한 비스페놀 A 검출용 앵타머를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 앵타머를 포함하는 비스페놀 A 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 비스페놀 A 검출용 키트를 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 앵타머를 이용하여 비스페놀 A를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

### 발명의 효과

- [13] 본 발명의 신규한 앵타머는 비스페놀 A를 검출할 수 있는 종래의 앵타머에 비하여, 상대적으로 작은 크기를 갖고, 이로 인하여 단순한 2차원적 구조를 나타내어, 비스페놀 A를 상대적으로 높은 검출감도로 검출할 수 있으면서도, 종래의 앵타머와 동일한 수준의 선택성을 나타내므로, 비스페놀 A의 효과적인 검출에 널리 활용될 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [14] 도 1a는 본 발명에서 제공하는 앵타머의 2차원 구조를 분석한 결과를 나타내는 개략도이다.
- [15] 도 1b는 비스페놀 A를 검출할 수 있다고 알려진 앵타머의 2차원 구조를 분석한 결과를 나타내는 개략도이다.
- [16] 도 2a는 대조군의 앵타머를 이용하여 비스페놀 A 정량분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [17] 도 2b는 본 발명의 앵타머를 이용하여 비스페놀 A 정량분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

- [18] 도 2c는 비스페놀 A의 농도변화에 따른 대조군의 앵타머와 본 발명의 앵타머의 검출감도의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [19] 도 3a는 대조군의 앵타머를 이용하여 비스페놀 A(BPA), 비스페놀 B(BPB), 비스페놀 C(BPC) 또는 디에틸스틸베스트롤(DES)의 검출특이성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [20] 도 3b는 본 발명의 앵타머를 이용하여 비스페놀 A(BPA), 비스페놀 B(BPB), 비스페놀 C(BPC) 또는 디에틸스틸베스트롤(DES)의 검출특이성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [21] 본 발명자들은 보다 높은 검출감도로 비스페놀 A를 검출할 수 있는 기술을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 앵타머에 주목하게 되었다. 앵타머는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩타이드, 화합물, 중합체 등의 다양한 물질을 표적분자로서 사용할 수 있고, 단백질보다 안정성이 우수하며, 구조가 간단하면서도, 핵산으로 구성되어 합성이 용이하기 때문에, 다양한 표적분자를 검출하는 방법에 이용되고 있으며, 비스페놀 A를 검출하기 위한 다수의 앵타머가 알려져 있다. 그러나, 상기 비스페놀 A를 검출하기 위한 앵타머는 검출 표적인 비스페놀 A에 비하여 과도하게 거대한 크기를 갖고 있고, 이들이 다수의 스템-루프(stem-loop) 구조를 갖는 복잡한 2차원적 구조를 나타내므로, 비스페놀 A의 검출감도가 낮다는 단점이 있었다.
- [22] 이러한 단점을 극복하기 위하여, 다양한 연구를 수행한 결과, 비스페놀 A에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 종래의 앵타머 보다는 작은 크기와 단순한 2차원적 구조를 갖는 신규한 앵타머를 개발하고, 이의 비스페놀 A에 대한 검출감도를 종래의 앵타머와 비교한 결과, 상기 신규한 앵타머가 종래의 앵타머 보다는 비스페놀 A에 대하여 높은 검출감도를 나타냄을 확인하였다.
- [23] 상술한 바와 같이, 종래의 앵타머 보다는 작은 크기와 단순한 2차원적 구조를 갖으면서도, 종래의 앵타머 보다는 비스페놀 A에 대하여 높은 검출감도를 나타내는 앵타머와 동일한 염기서열을 갖는 앵타머는 지금까지 보고되지 않았으며, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.
- [24] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 서열번호 1의 염기서열로 구성되고, 비스페놀 A와 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머를 제공한다.
- [25] 본 발명의 용어 "앵타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상기 앵타머는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩타이드, 화합물, 중합체 등의 다양한 물질을 표적분자로서 사용할 수 있고, 단백질보다 안정성이 우수하며, 구조가 간단하면서도, 핵산으로 구성되어

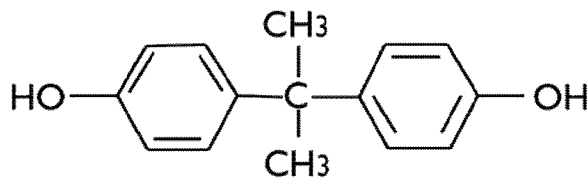
합성이 용이하기 때문에, 다양한 표적분자를 검출하는 방법에 이용되고 있다.

[26] 본 발명에 있어서, 상기 앵타머는 서열번호 1의 염기서열로 구성되고, 비스페놀 A와 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

[27] 상기 서열번호 1의 염기서열을 갖는 앵타머는 종래의 앵타머(도 1b)에 비하여 단순한 2차원적 구조를 나타내고(도 1a), 이로 인하여 표적물질인 비스페놀 A에 대하여 증가된 검출감도를 나타낼 수 있다.

[28] 본 발명의 용어 "비스페놀 A(Bisphenol A, BPA)"란, 폴리카보네이트나 에폭시 수지 같은 플라스틱 제조의 원료로 사용되는 하기 화학식 1의 화합물을 의미한다. 상기 비스페놀 A는 환경호르몬의 일종으로 확인되어, 이를 효과적으로 검출하여야 할 필요성이 대두되고 있다.

[29] [화학식1]



[30]

[31] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 비스페놀 A를 검출할 수 있는 서열번호 1의 앵타머를 합성하고, 이의 구조를 분석한 결과, 비스페놀 A를 검출하기 위한 종래의 앵타머에 비하여, 상대적으로 작은 크기를 갖고, 이로 인하여 단순한 2차원적 구조를 나타냄을 확인하였다(도 1a 및 1b).

[32] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 앵타머를 포함하는 비스페놀 A 검출용 조성물을 제공한다.

[33] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 앵타머는 종래의 앵타머에 비하여 작은 크기와 단순한 구조를 갖고, 이로 인하여 비스페놀 A에 대하여 증가된 검출감도를 나타낼 수 있으므로, 상기 앵타머를 포함하는 조성물은 비스페놀 A를 검출하는데 사용될 수 있다.

[34] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 서열번호 1의 염기서열로 구성된 본 발명의 앵타머의 효과를 공지된 서열번호 2의 비스페놀 A 검출용 앵타머(대조군)와 비교한 결과, 본 발명의 앵타머는 0.2 pg/mL의 검출한계값을 보인 반면, 대조군의 앵타머는 0.57 ng/mL로서, 발명된 앵타머의 검출한계값이 대조군의 검출한계보다 약 1000배 정도의 낮은 검출한계값을 보였다. 이것으로보아 본 발명의 앵타머가 비스페놀 A 검출 감도가 월등히 우수한 것을 확인하였다(도 2a 및 2b). 뿐만 아니라, 비스페놀 A 농도 증가에 따른, 형광신호의 변화폭이 본 발명의 앵타머가 대조군의 앵타머에 비하여 약 10배 높은 수준을 나타내었으므로(도 2c), 본 발명의 앵타머는 대조군의 앵타머에 비하여 우수한 비스페놀 A 검출감도를 나타냄을 알 수 있었다. 아울러, 본 발명의 앵타머가 비스페놀 A에 대한 선택성을 나타내는지를 비교한 결과, 본 발명의 앵타머와 대조군의 앵타머는 비스페놀 A에 대한 선택성을 나타내었으나 검출감도의

측면에서 본 발명의 앵타머가 대조군의 앵타머에 비하여 높은 수준을 나타냄을 확인하였다(도 3a 및 3b).

- [35] 따라서, 본 발명의 앵타머는 비스페놀 A를 검출할 수 있다고 알려진 종래의 앵타머에 비하여, 검출능이 향상되고 선택성은 유사한 수준을 나타내므로, 더욱 효과적으로 비스페놀 A를 검출할 수 있음을 알 수 있었다.
- [36] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 조성물을 포함하는 비스페놀 A 검출용 키트를 제공한다.
- [37] 본 발명의 키트는 상기 앵타머를 포함하고, 상기 앵타머로 인하여 비스페놀 A를 검출하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 앵타머를 이용하여 비스페놀 A를 검출하는데 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다. 이때, 사용될 수 있는 키트로 는 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트 등이 될 수 있다.
- [38] 구체적인 일 예로서, 본 발명의 비스페놀 A 검출용 키트는 ELISA 키트가 될 수 있다. 상기 키트는 상기 앵타머가 부착된 기관, 비스페놀 A에 결합가능한 표지물질, 상기 앵타머와 비스페놀 A의 결합을 수행하는데 사용되는 완충액 등을 포함할 수 있다.
- [39] 구체적인 다른 예로서, 본 발명의 비스페놀 A 검출용 키트는 변형된 ELISA 키트가 될 수 있다. 상기 키트는 상기 앵타머가 부착된 기관, 표지물질이 결합되고 비스페놀 A에 결합가능한 다른 앵타머, 상기 앵타머와 비스페놀 A의 결합을 수행하는데 사용되는 완충액 등을 포함할 수 있다.
- [40] 본 발명의 용어 "기관(substrate)"이란, 앵타머를 부착시킬 수 있는 지지체를 의미한다. 상기 기관의 종류는 당업계에 통상적으로 사용되는 앵타머를 고정시킬 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄, 화합물 반도체, 실리콘 등이 될 수 있다. 상기 기관은 앵타머를 결합시키기 위하여 표면 처리될 수 있는데, 상기 표면 처리는 앵타머를 고정화시키기 위한 관능기를 포함할 수 있도록 수행될 수 있으며, 바람직하게는 알데히드기, 카르복실기, 아민기 또는 티올기로 개질될 수 있다. 예를 들어, 유리 기관이나 반도체 기관을 사용할 경우, 실란 처리를 하여 아미노기(-NH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub> 등) 또는 티올기를 형성할 수 있고, 상기 실란 처리를 효과적으로 하기 위해 실란 처리 전에 하이드록실(hydroxyl) (-OH)기를 만들기 위한 처리를 할 수도 있다.
- [41] 본 발명의 용어 "표지물질"이란, 본 발명의 비스페놀 A 검출용 키트에 포함된 앵타머에 비스페놀 A가 결합될 경우, 상기 결합된 비스페놀 A에 추가로 결합되어 상기 앵타머와 비스페놀 A의 결합여부를 확인할 수 있게 하는 수단을 의미한다.
- [42] 본 발명에 있어서, 상기 표지물질은 특별히 이에 제한되지 않으나, Q dot(Quantum dot), 효소, 콜로이드 금(Colloid gold), 형광물질(Fluorescein), 방사성 물질 및 색소(Dye) 등이 사용될 수 있다. 상기 효소는 표지물질로서 사용될 수

있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, HRP(Horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(Alkaline phosphatase), 글루코오즈 옥시다아제(Glucose Oxidase), 루시페라아제(luciferase), 베타-디-갈락토시다아제( $\beta$ -D-galactosidase), 말산탈수소효소(MDH: malate dehydrogenase), 아세틸콜린에스터라아제(acetylcholinesterase), 또는 이들과 유사한 활성을 나타내는 유사체 등이 될 수 있고, 상기 유사체는  $H_2O_2$ 를 생성하는 나노물질 등이 될 수 있다.

- [43] 또한, 형광물질 역시 표지물질로서 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 플루오르신이소티옥시아네이트(fluoresceine isothiocyanate), 피코빌리프로테인(phycobili proteins), 6-카르복시플루오레세인(6-carboxyfluorescein), 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(hexachloro-6-carboxyfluorescein), 테트라클로로-6-카르복시플루오레세인(tetrachloro-6-carboxyfluorescein), FAM(5-carboxy fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichloroflorescein), Cy3(cyanine-3), Cy5(cyanine-5), 6-카르복시테트라메틸-로다민(6-carboxytetramethyl-rhodamine), TAMRA(5-Carboxytetramethylrhodamine), BHQ3(black hole quencher 3) 등을 사용할 수 있다.
- [44] 끝으로, 방사성 물질 역시 표지물질로서 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{14}C$ ,  $^3H$  등을 사용할 수 있다.
- [45] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 앵타머를 이용하여 비스페놀 A를 검출하는 방법을 제공한다.
- [46] 구체적으로, 본 발명의 비스페놀 A의 검출방법은 (a) 비스페놀 A가 존재할 것으로 예상되는 시료에 상기 앵타머를 가하여 반응물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 반응물로부터 앵타머-비스페놀 A 복합체를 검출하는 단계를 포함한다.
- [47] 상기 방법에 있어서, (a) 단계의 앵타머는 기관 등의 지지체에 결합된 형태의 앵타머가 될 수 있다.
- [48] 상기 방법에 있어서, (b) 단계의 앵타머-비스페놀 A 복합체는 상기 반응물로부터 앵타머가 결합된 지지체를 회수한 후, 상기 회수된 지지체에 비스페놀 A에 결합될 수 있는 표지물질을 가하는 방법에 의해 검출할 수 있는데, 상기 표지물질은 비스페놀 A에 결합할 수 있는 다른 앵타머에 표지된 형태의 것을 사용할 수 있다.

[49]

#### 발명의 실시를 위한 형태

- [50] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[51]

[52] 실시예 1: 비스페놀 A 검출용 앵타머의 제조

[53]

[54] 한국공개특허 제2010-0093205호에 공개된 비스페놀 A를 검출할 수 있다고 알려진 앵타머(서열번호 2)의 2차원적 구조를 Mfold 프로그램을 이용하여 도출하고(도 1b), 상기 도출된 2차원 구조를 바탕으로 앵타머를 절단하면서, 이와 동시에 앵타머의 2차원적 구조(스텝-루프형태)를 유지할 수 있도록, 앵타머의 염기서열을 치환시켜서, 다양한 형태의 앵타머를 수득하였다. 상기 수득한 다양한 앵타머를 대상으로 비스페놀 A와의 검출감도 및 선택성을 분석하여, 가장 효과적으로 비스페놀 A를 검출할 수 있는 하기 서열번호 1의 앵타머를 합성하였다.

[55] 5'-GGATAGCGGG TTCC-3'(서열번호 1)

[56] 상기 합성된 앵타머의 5' 말단에 NanoAptamer Assay에 적용하는데 사용할 수 있도록 10개의 티민(T)염기를 부가하고, 상기 10개의 티민(T)염기가 부가된 전체 앵타머의 2차원 구조를 분석하였다(도 1a). 이때, 대조군으로는 상기 한국공개특허 제2010-0093205호에 공개된 앵타머(서열번호 2)를 사용하였다.

[57] 도 1a는 본 발명에서 제공하는 앵타머의 2차원 구조를 분석한 결과를 나타내는 개략도이고, 도 1b는 비스페놀 A를 검출할 수 있다고 알려진 앵타머의 2차원 구조를 분석한 결과를 나타내는 개략도이다. 도 1a 및 1b에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 앵타머는 종래의 앵타머에 비하여 상대적으로 단순한 2차원 구조를 나타냄을 확인하였다.

[58]

[59] 실시예 2: 앵타머를 이용한 비스페놀 A 검출특성 분석

[60]

[61] 실시예 1에서 제조한 서열번호 1의 앵타머와 대조군인 서열번호 2의 앵타머를 이용하여 NanoAptamer Assay를 통한 비스페놀 A 정량분석을 수행하였다(도 2a 내지 2b). 이때, 비스페놀 A 정량분석은 비스페놀 A를 최종농도가 0.0005 내지 5 ng/mL가 되도록 각 반응 용액에 첨가하고 16시간 동안 반응시킨 후, 반응액의 형광신호 값을 측정하여 표준곡선을 제작하고, 상기 제작된 표준곡선을 이용하여 비스페놀 A 정량 분석을 수행하였다.

[62] 도 2a는 대조군의 앵타머를 이용하여 비스페놀 A 정량분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 2b는 본 발명의 앵타머를 이용하여 비스페놀 A 정량분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다

[63] 도 2a 및 2b에서 보듯이, 대조군의 앵타머와 본 발명의 앵타머를 사용하여 검출할 수 있는 비스페놀 A의 농도범위는  $10^{-3}$  내지 1 ng/mL(ppb)임을 확인하였다. 또한, 대조군 앵타머의 검출한계값은 0.57 ng/mL에 불과한 반면, 본 발명의 앵타머 검출한계값은 0.2 pg/mL 이므로, 본 발명에서 제공하는 앵타머가 비스페놀 A에 대한 민감성이 현저히 향상된 것임을 알 수 있었다.

- [64] 또한, 비스페놀 A의 농도변화에 따른 대조군의 앵타머와 본 발명의 앵타머의 검출감도의 변화를 비교하였다(도 2c). 이때, 검출감도 역시 NanoAptamer Assay를 통해 측정하였다. 구체적으로, NanoAptamer Assay에서 사용되는 두개의 형광신호(QD565 및 QD655) 중에서, QD655의 형광신호값은 비스페놀 A가 앵타머에 결합하는 수준에 비례하여 감소됨을 이용하여, 비스페놀 A의 결합수분에 따른 형광신호의 감소율을 선형 회귀분석을 통해 도출하고, 상기 감소율을 분석하여 검출감도를 산출하였다.
- [65] 도 2c는 비스페놀 A의 농도변화에 따른 대조군의 앵타머와 본 발명의 앵타머의 검출감도의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2c에서 보듯이, 본 발명의 앵타머를 이용하여 비스페놀 A를 검출할 경우, 비스페놀 A 농도 증가에 따른, 형광신호의 변화폭(회귀 분석결과에서 기울기 값, -0.27)이 대조군의 앵타머에서 얻어진 값(-0.022)에 비해 약 10배 높았으므로, 본 발명의 앵타머는 대조군의 앵타머에 비하여 우수한 비스페놀 A 검출감도를 나타냄을 알 수 있었다.
- [66]
- [67] 실시예 3: 앵타머를 이용한 비스페놀 A 유사체의 검출특성 비교
- [68]
- [69] 본 발명에서 제공하는 앵타머가 비스페놀 A에 특이적으로 결합하여 검출할 수 있는지 아니면, 비스페놀 A와 유사한 구조를 갖는 화합물에도 결합하여 검출할 수 있는지를 확인하고자 하였다.
- [70] 즉, 비스페놀 A(BPA)와 그의 유사체로서 비스페놀 B(BPB), 비스페놀 C(BPC) 또는 디에틸스틸베스트롤(diethylstilbestrol, DES)을 대상으로, 본 발명의 앵타머와 대조군의 앵타머를 사용하여 검출하고, 검출 특이성(selectivity)를 비교분석하였다(도 3a 및 3b). 이때, 대조군으로는 아무런 화합물로 처리하지 않은 것을 사용하였다. 또한, 검출 특이성은 비스페놀 A과 구조적 유사성을 갖는 물질을 최종 농도가 1 ng/mL가 되도록 반응용액에 첨가하고, 이에 따른 형광 신호 변화를 측정한 다음, 양성 대조군으로서 비스페놀 A (1 ng/mL)을 동일하게 첨가하여 얻어진 형광값의 변화를 비교 분석하여 도출하였다.
- [71] 도 3a는 대조군의 앵타머를 이용하여 비스페놀 A(BPA), 비스페놀 B(BPB), 비스페놀 C(BPC) 또는 디에틸스틸베스트롤(DES)의 검출특이성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 3b는 본 발명의 앵타머를 이용하여 비스페놀 A(BPA), 비스페놀 B(BPB), 비스페놀 C(BPC) 또는 디에틸스틸베스트롤(DES)의 검출특이성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [72] 도 3a 및 3b에서 보듯이, 대조군의 앵타머와 본 발명의 앵타머는 모두 BPB, BPC 및 DES는 대조군과 유사한 수준을 나타내었으나, BPA는 현저하게 감소된 형광값을 나타냄을 확인하였다. 또한, 상기 BPA에 대하여는 대조군의 앵타머 보다 본 발명의 앵타머가 다른 화합물에 비하여 더욱 현저한 수준으로 검출됨을 확인하였다.

[73] 따라서, 본 발명의 앵타머는 비스페놀 A를 검출할 수 있다고 알려진 종래의 앵타머에 비하여, 검출능이 향상되고 선택성은 유사한 수준을 나타내므로, 더욱 효과적으로 비스페놀 A를 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

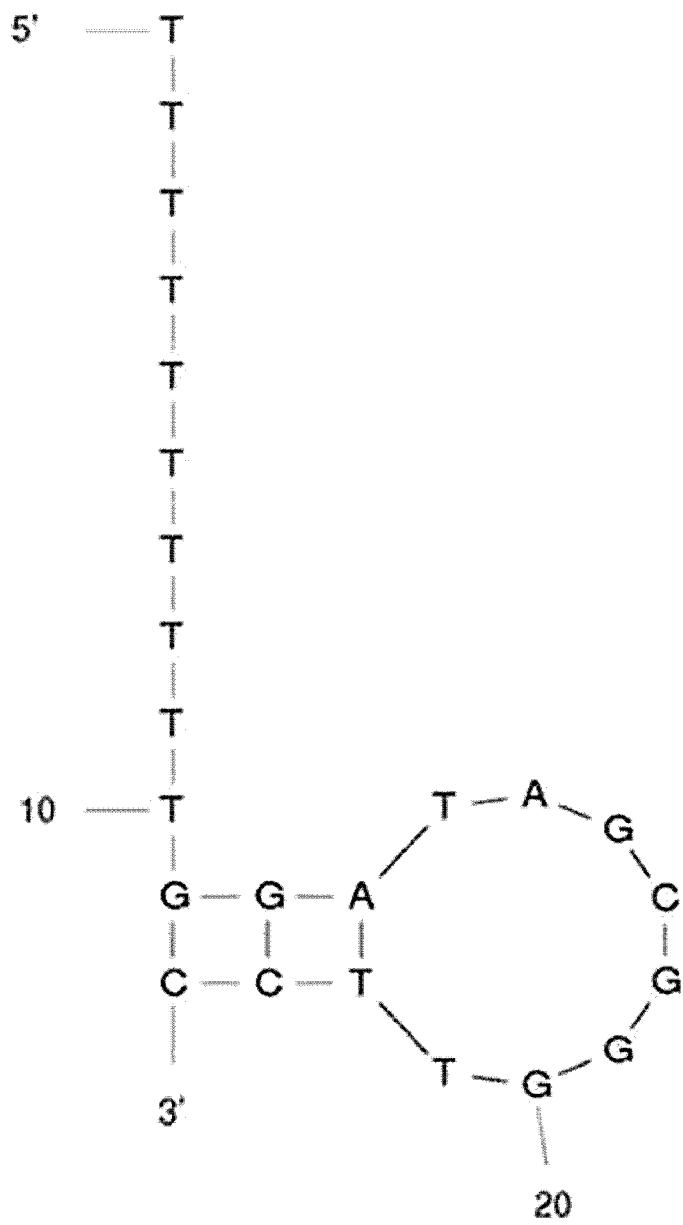
[74]

[75]

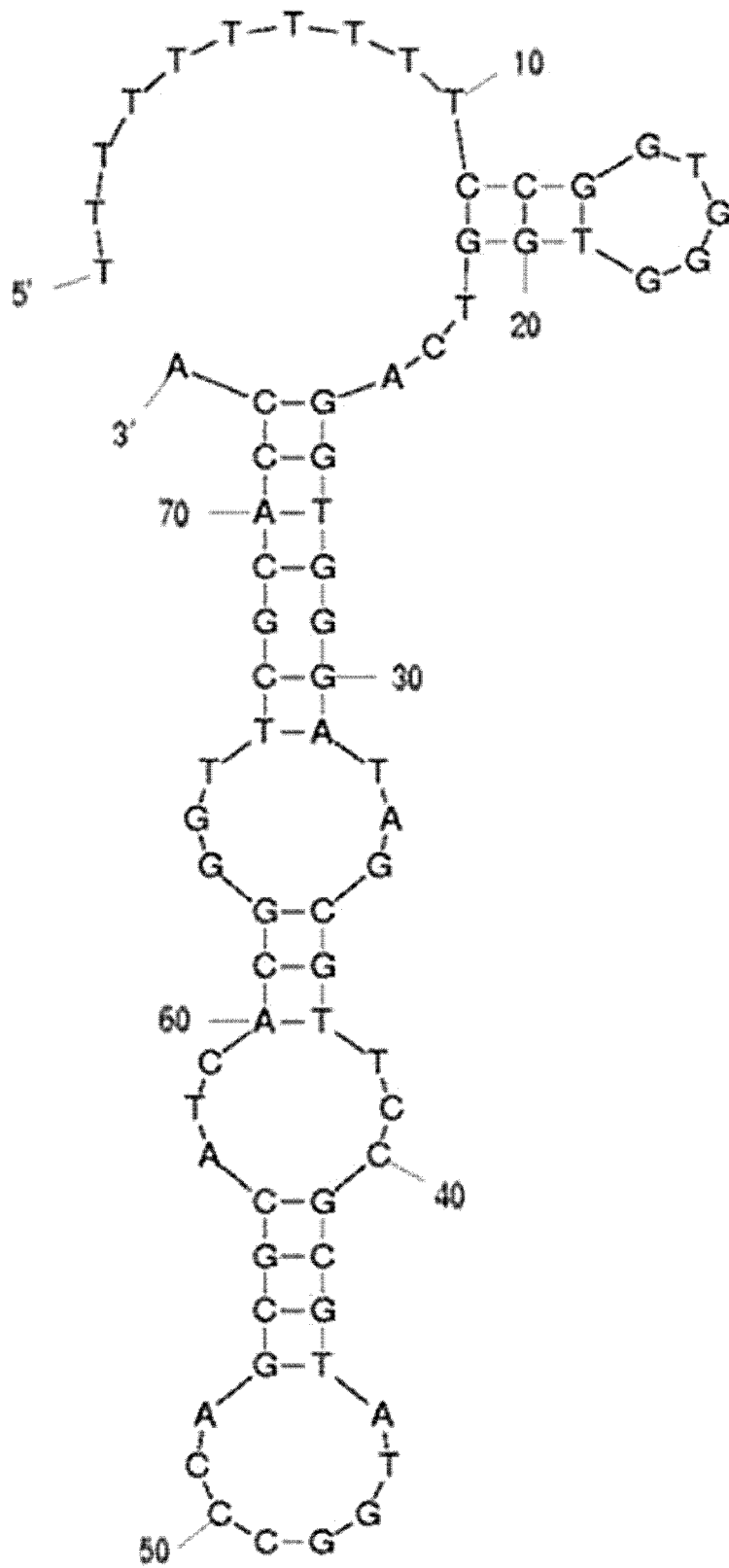
## 청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 염기서열로 구성되고, 비스페놀 A(Bisphenol A)와 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머.
- [청구항 2] 제1항의 앵타머를 포함하는 비스페놀 A 검출용 조성물.
- [청구항 3] 제2항의 조성물을 포함하는 비스페놀 A 검출용 키트.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,  
상기 키트는 상기 앵타머가 부착된 기관, 비스페놀 A에 결합가능한 표지물질 및 상기 앵타머와 비스페놀 A의 결합을 수행하는데 사용되는 완충액을 포함하는 ELISA 키트인 것인, 키트.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,  
상기 키트는 상기 앵타머가 부착된 기관, 표지물질이 결합되고 비스페놀 A에 결합가능한 다른 앵타머 및 앵타머와 비스페놀 A의 결합을 수행하는데 사용되는 완충액을 포함하는 변형된 ELISA 키트인 것인, 키트.
- [청구항 6] (a) 비스페놀 A가 존재할 것으로 예상되는 시료에 상기 앵타머를 가하여 반응물을 수득하는 단계; 및  
(b) 상기 반응물로부터 앵타머-비스페놀 A 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 비스페놀 A의 검출방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,  
상기 (a) 단계의 앵타머는 지지체에 결합된 형태인 것인, 방법.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,  
상기 (b) 단계의 앵타머-비스페놀 A 복합체는 (a) 단계의 반응물로부터 앵타머가 결합된 지지체를 회수한 후, 상기 회수된 지지체에 비스페놀 A에 결합될 수 있는 표지물질을 가하는 방법에 의해 검출되는 것인, 방법.

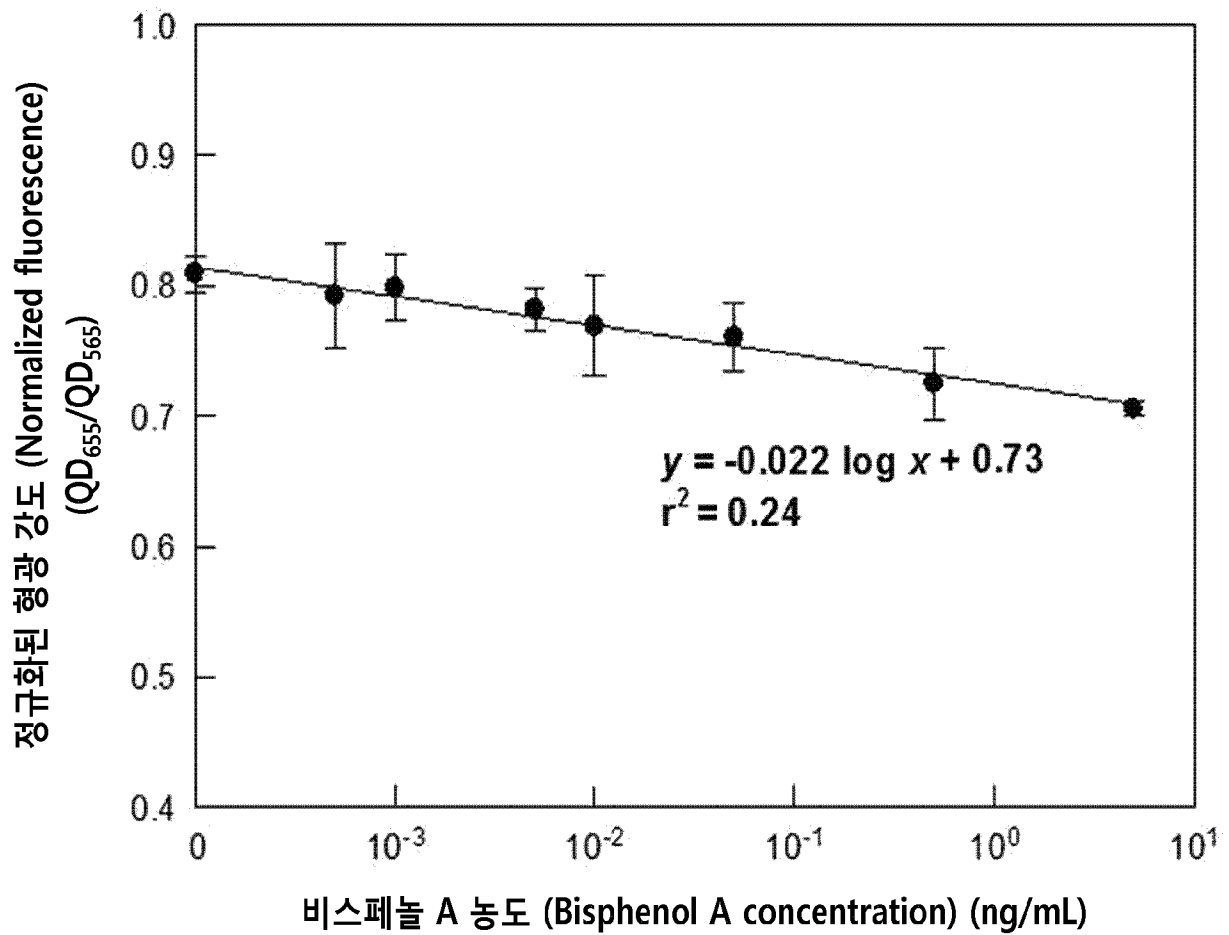
[도 1a]



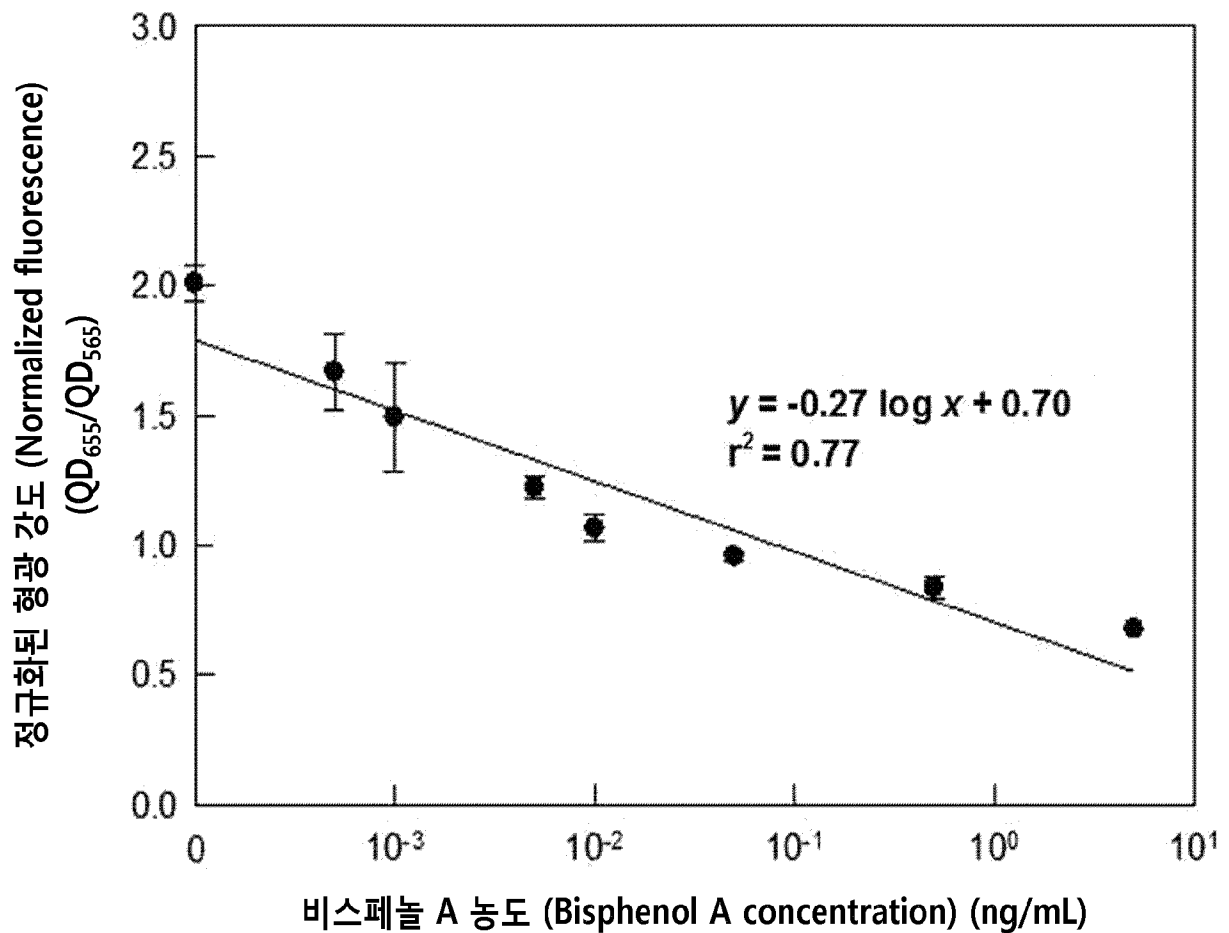
[51b]



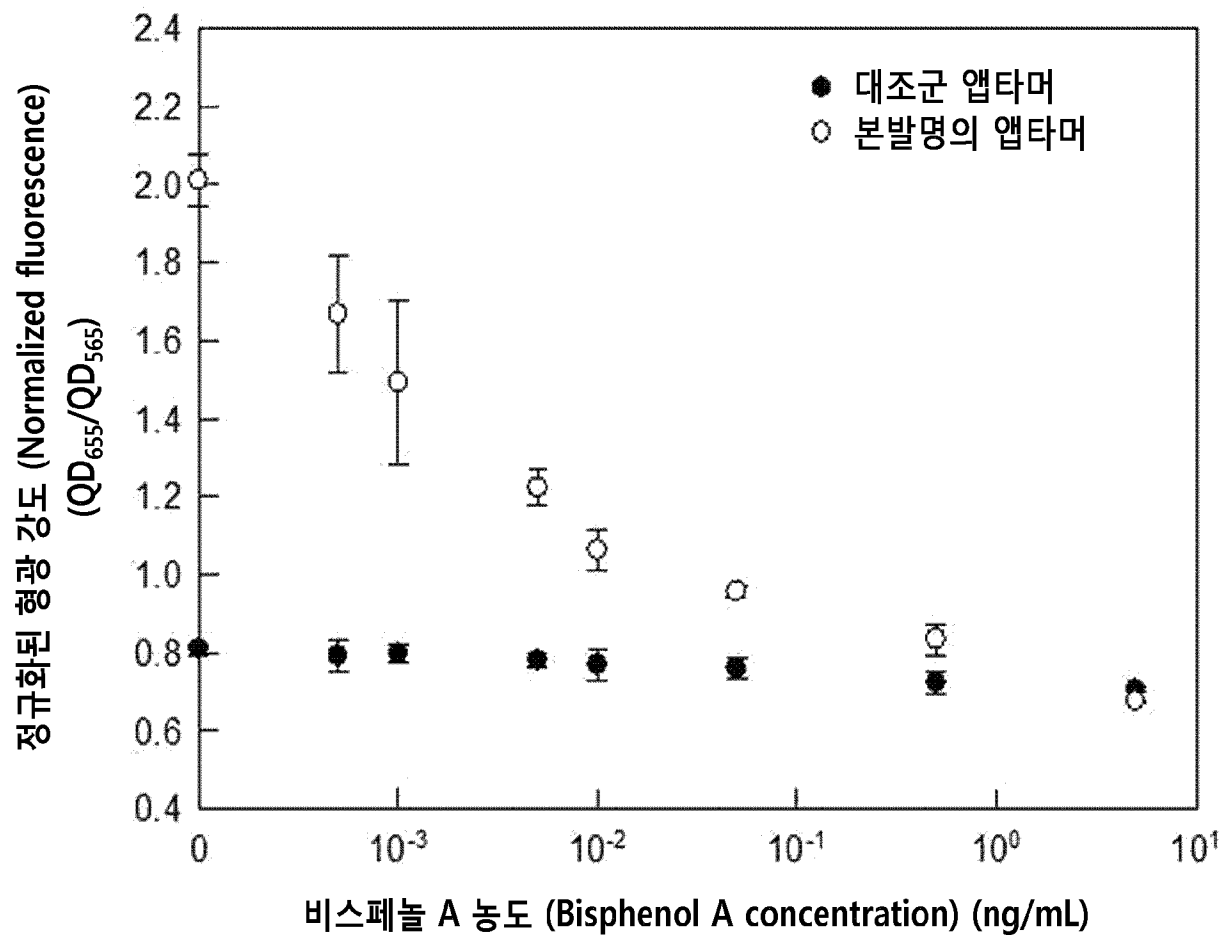
[도2a]



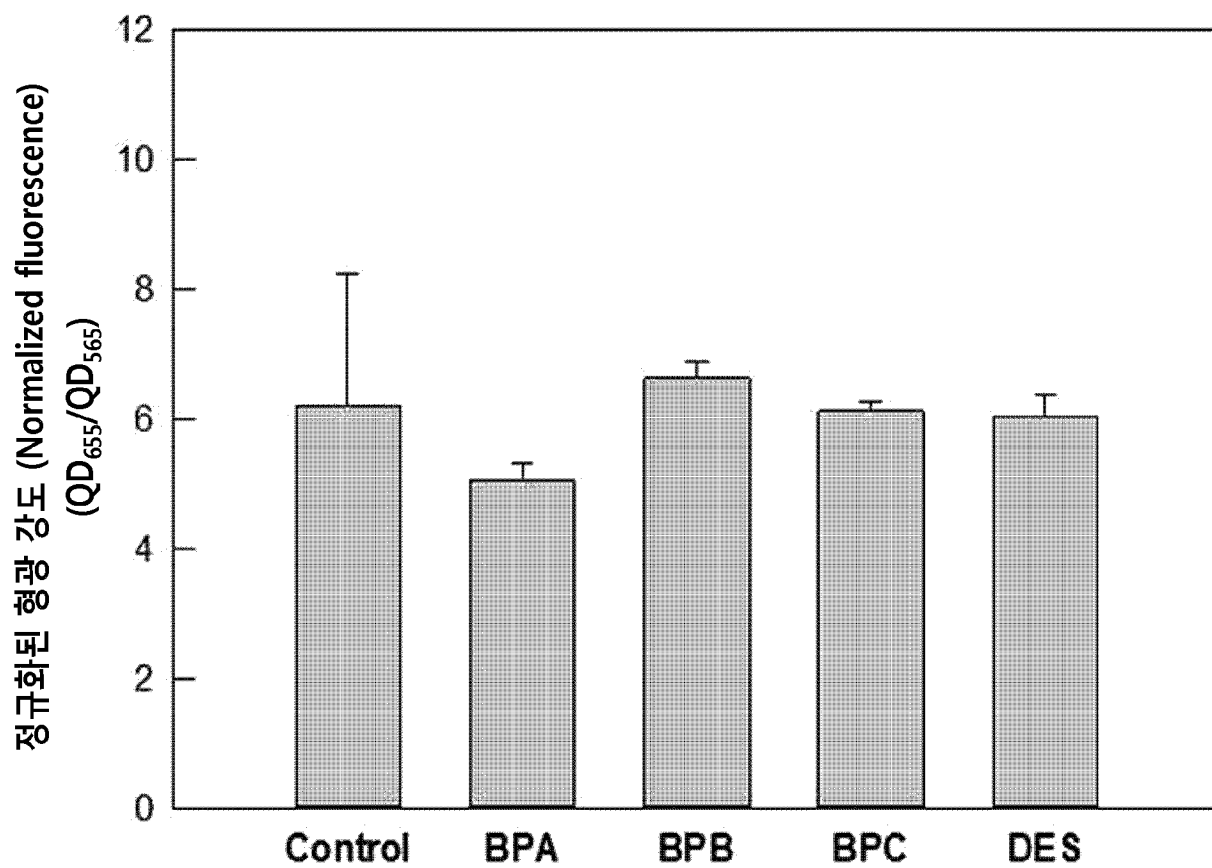
[도2b]



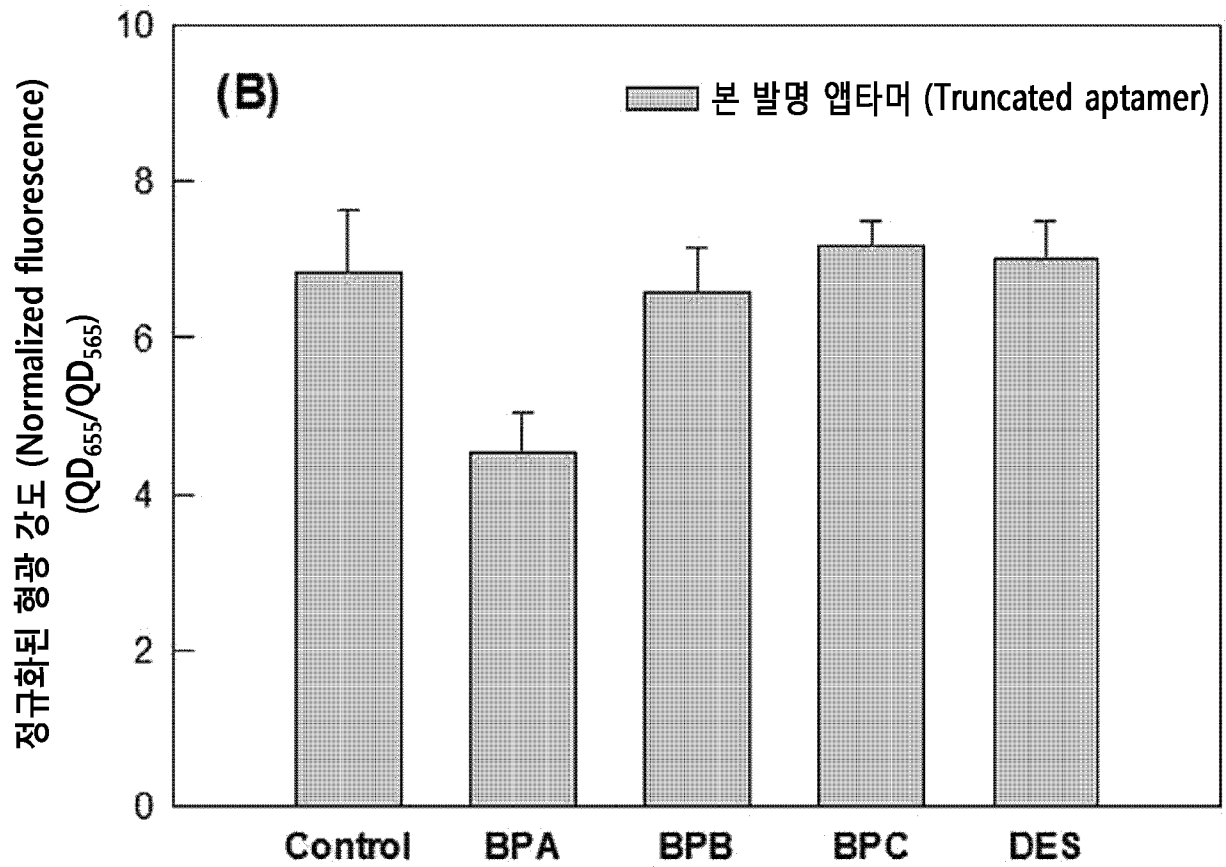
[도2c]



[도3a]



[도3b]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2017/003540****A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/115(2010.01)i, G01N 33/58(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; G01N 33/558; G01N 21/31; G01N 33/58

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) &amp; Keywords: aptamer, bisphenol A, composition, kit

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | KR 10-2010-0093501 A (DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 25 August 2010<br>See paragraphs [0031]-[0037]; claims 1, 13, 15, 26 and examples 3-4.                                    | 1-8                   |
| X         | KR 10-2010-0093502 A (DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 25 August 2010<br>See claims 1, 6-7, 13 and example 1.                                                                    | 6-8                   |
| X         | JO et al., "Development of Single-stranded DNA Aptamers for Specific Bisphenol A Detection", Oligonucleotides, vol. 21, no. 2, pages 85-91 (2011)<br>See page 88, left column, first paragraph and figure 1. | 6-8                   |
| A         | CN 105158182 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 16 December 2015<br>See claims 1-2.                                                                                                                           | 1-8                   |
| A         | CN 103983774 A (HEFEI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 13 August 2014<br>See claims 1-3.                                                                                                                            | 1-8                   |



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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 JUNE 2017 (28.06.2017)

Date of mailing of the international search report

**28 JUNE 2017 (28.06.2017)**

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/003540**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| KR 10-2010-0093501 A                      | 25/08/2010          | EP 2397550 B1           | 25/03/2015          |
|                                           |                     | JP 2012-517805 A        | 09/08/2012          |
|                                           |                     | JP 5456796 B2           | 02/04/2014          |
|                                           |                     | KR 10-1300233 B1        | 26/08/2013          |
|                                           |                     | US 2012-0015354 A1      | 19/01/2012          |
|                                           |                     | US 8410256 B2           | 02/04/2013          |
|                                           |                     | WO 2010-093106 A1       | 19/08/2010          |
|                                           |                     | WO 2010-093222 A2       | 19/08/2010          |
|                                           |                     | WO 2010-093222 A3       | 03/03/2011          |
| KR 10-2010-0093502 A                      | 25/08/2010          | CN 102395684 B          | 03/06/2015          |
|                                           |                     | KR 10-1332847 B1        | 27/11/2013          |
|                                           |                     | KR 10-1437616 B1        | 04/09/2014          |
|                                           |                     | KR 10-2010-0093205 A    | 25/08/2010          |
|                                           |                     | US 2012-0040865 A1      | 16/02/2012          |
|                                           |                     | US 2015-0212038 A1      | 30/07/2015          |
|                                           |                     | US 9075053 B2           | 07/07/2015          |
|                                           |                     | US 9329178 B2           | 03/05/2016          |
|                                           |                     | WO 2010-093223 A2       | 19/08/2010          |
|                                           |                     | WO 2010-093223 A3       | 24/02/2011          |
| CN 105158182 A                            | 16/12/2015          | NONE                    |                     |
| CN 103983774 A                            | 13/08/2014          | NONE                    |                     |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

C12N 15/115(2010.01)i, G01N 33/58(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/115; G01N 33/558; G01N 21/31; G01N 33/58

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) &amp; 키워드: 앵타머, 비스페놀 A, 조성물, 키트

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                | 관련 청구항 |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| X     | KR 10-2010-0093501 A (동국대학교 산학협력단) 2010.08.25<br>단락 [0031]-[0037]; 청구항 1, 13, 15, 26 및 실시예 3-4 참조.                                                                        | 1-8    |
| X     | KR 10-2010-0093502 A (동국대학교 산학협력단) 2010.08.25<br>청구항 1, 6-7, 13 및 실시예 1 참조.                                                                                               | 6-8    |
| X     | JO 등, "Development of single-stranded DNA aptamers for specific bisphenol A detection"<br>Oligonucleotides, 21권, 2호, 페이지 85-91 (2011)<br>페이지 88, 좌측 컬럼, 첫번째 단락 및 도면 1 참조. | 6-8    |
| A     | CN 105158182 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 2015.12.16<br>청구항 1-2 참조.                                                                                                  | 1-8    |
| A     | CN 103983774 A (HEFEI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 2014.08.13<br>청구항 1-3 참조.                                                                                                 | 1-8    |

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&amp;” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 06월 28일 (28.06.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 06월 28일 (28.06.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

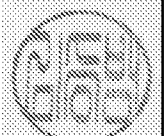
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

|                      |            |                      |            |
|----------------------|------------|----------------------|------------|
| KR 10-2010-0093501 A | 2010/08/25 | EP 2397550 B1        | 2015/03/25 |
|                      |            | JP 2012-517805 A     | 2012/08/09 |
|                      |            | JP 5456796 B2        | 2014/04/02 |
|                      |            | KR 10-1300233 B1     | 2013/08/26 |
|                      |            | US 2012-0015354 A1   | 2012/01/19 |
|                      |            | US 8410256 B2        | 2013/04/02 |
|                      |            | WO 2010-093106 A1    | 2010/08/19 |
|                      |            | WO 2010-093222 A2    | 2010/08/19 |
|                      |            | WO 2010-093222 A3    | 2011/03/03 |
| KR 10-2010-0093502 A | 2010/08/25 | CN 102395684 B       | 2015/06/03 |
|                      |            | KR 10-1332847 B1     | 2013/11/27 |
|                      |            | KR 10-1437616 B1     | 2014/09/04 |
|                      |            | KR 10-2010-0093205 A | 2010/08/25 |
|                      |            | US 2012-0040865 A1   | 2012/02/16 |
|                      |            | US 2015-0212038 A1   | 2015/07/30 |
|                      |            | US 9075053 B2        | 2015/07/07 |
|                      |            | US 9329178 B2        | 2016/05/03 |
|                      |            | WO 2010-093223 A2    | 2010/08/19 |
|                      |            | WO 2010-093223 A3    | 2011/02/24 |
| CN 105158182 A       | 2015/12/16 | 없음                   |            |
| CN 103983774 A       | 2014/08/13 | 없음                   |            |