(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0130092
(43) 공개일자 2010년12월10일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0048759
(22) 출원일자 2009년06월02일
심사청구일자 2009년06월02일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
구만복
서울특별시 동대문구 이문2동 426 삼성래미안아파트 202동 602호
김연서
서울특별시 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 (녹지) 543호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 13 항

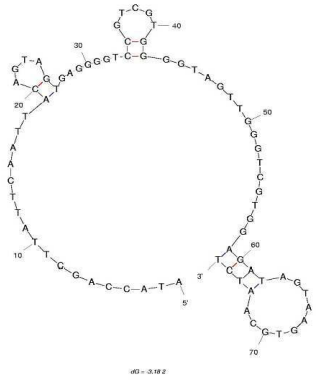
(54) 키랄 구조의 이부프로펜에 입체선택적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 그 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 키랄 구조의 이부프로펜(ibuprofen)에 입체선택적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 랜덤 DNA 라이브러리로부터 선택된 이부프로펜에 입체선택적으로 결합하는 DNA 앱타머, 그 제조방법 및 그를 이용한 (R)- 또는 (S)-이부프로펜의 선택적 분리정제방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 DNA 앱타머는 키랄 의약품인 이부프로펜에 대해 높은 친화도와 입체선택성을 가지고 있으므로, 상기 DNA 앱타머는 capturing probe로 사용되어 이부프로펜 검출용 바이오센서 개발에 활용될 수 있으며 chiral solid phase (CSP)에 리간드로서 사용되어 라세믹 형태의 이부프로펜으로부터 특정 이성질체만을 분리/정제할 수 있는 공정 개발 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도4a



IBA-2

(72) 발명자

현창준

서울특별시 서초구 잠원동 59-3 현대훼미리아파트 101동 104호

김인애

서울특별시 광진구 자양3동 현대아파트 1004동 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 GR070045

부처명 서울시

연구관리전문기관

연구사업명 서울시 기술기반 구축사업

연구과제명 안전한 식수확보를 위한 신속 정확한 휴대형 유해물질 검출시스템 개발

기여율

주관기관 고려대학교 생명공학연구소

연구기간 2007년 8월 1일 ~2009년 7월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

키랄 구조의 이부프로펜(ibuprofen)에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 DNA 앱타머.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 (R)-이성질체의 이부프로펜(ibuprofen)에 선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 서열번호 6 또는 7의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 (S)-이성질체의 이부프로펜(ibuprofen)에 선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머.

청구항 5

하기 단계를 포함하는 키랄 구조의 이부프로펜(ibuprofen)에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머의 제조방법:

a) 이부프로펜과 자성비드(magnetic beads)를 버퍼용액에서 반응시켜 공유결합을 유도하는 단계;

b) 양 끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30-50개의 임의의 염기를 가지는 DNA pool과 상기 공유결합으로 얻은 이부프로펜-자성비드를 버퍼용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;

c) 상기 이부프로펜-자성비드에 결합된 DNA를 자석을 이용하여 분리하는 단계;

d) 상기 분리된 이부프로펜-자성비드로부터 DNA를 분리하는 단계; 및

e) 상기 PCR용 프라이머 영역에 상보적인 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 이부프로펜에 특이적으로 결합하는 DNA를 증폭시키는 단계.

청구항 6

담체에 결합된 이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 키랄 고정상(chiral stationary phase, CSP)

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 키랄 고정상.

청구항 8

기판에 결합된 이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 바이오센서.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 10

이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 라세믹형태의 이부프로펜에서 (R)-이부프로펜 또는 (S)-이부프로펜의 선택적 분리정제용 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 선택적 분리정제용 조성물.

청구항 12

이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 라세믹형태의 이부프로펜을 준비하는 단계; 상기 라세믹형태의 이부프로펜과 키랄구조의 이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 결합시키는 단계; 및 상기 결합된 (R)- 또는 (S)-이성질체의 이부프로펜을 분리하는 단계를 포함하는, 라세믹형태의 이부프로펜에서 (R)-이부프로펜 또는 (S)-이부프로펜의 선택적 분리정제 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 선택적 분리정제방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 키랄 구조의 이부프로펜(ibuprofen)에 입체선택적으로 결합하는 DNA 앱타머 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 랜덤 DNA 라이브러리로부터 선택된 이부프로펜에 입체선택적으로 결합하는 DNA 앱타머, 그 제조방법 및 그를 이용한 (R)- 또는 (S)-이부프로펜의 선택적 분리정제방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자연계에 존재하는 약효 성분물질은 대부분 키랄 구조를 가지고 있으며 한 가지 거울상 이성질체로 존재하는데 반해, 화학합성에 의해 생산되는 많은 의약품들은 같은 몰농도로 두 가지 거울상이성질체(enantiomer)가 혼합된 형태의 라세믹 물질(racemate)이 얻어지게 된다. 대부분 이들은 생체 내에서 각기 다른 활성을 보이며, 키랄 물질 중 한 형태가 약리활성을 보이는 경우, 다른 하나는 독성을 일으키거나 효능을 저해하는 등의 부작용을 나타낸다고 보고되고 있다. 이에 대해 미국식약청(FDA)에서는 1992년 키랄 의약품의 생산에 대한 새로운 가이드라인을 통해 키랄 의약품의 경우 단일 이성질체 형태로 생산하거나 라세믹 물질로 생산할 경우 엄격한 독성 검사를 통과할 것을 제시하였다. 이에 따라 최근 제약업계에서는 라세믹 혼합물에서 약리활성을 갖는 단일 이성질체만을 선택적으로 제조하거나 분리하는 연구에 대한 관심이 크게 증가하고 있으며, 실제로 2005년도에 미국에서 가장 많이 팔린 전체 10개의 의약품 중 6개 또는 키랄 화합물을 원료로 하는 의약품 7개중 6개가 단일 이성질체 형태로 생산되어 판매된 제품이었다. 이와 같이 최근 제약 산업의 추세는 기존의 라세믹 의약품을 약리활성이 있는 단일 이성질체로 전환시키는 것이며 앞으로 새롭게 개발될 의약품 역시 순수한 형태만을 가진 키랄 의약품을 생산하는 것이어서 키랄 의약품을 개발하고자 할 때 단일 이성질체만을 생산하는 방법을 개발하거나 아니면 키랄 의약품을 분리/정제할 수 있는 기술을 개발하여야 할 것이다. 키랄 물질의 분리/정제를 위해서는 무엇보다도 키랄 고정상 (chiral stationary phase, CSP)의 개발이 가장 중요하며 이를 위해 다양한 연구들이 진행되고 있다.

[0003] 앱타머는 다양한 표적물질에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA를 말한다. 초기 치료제로써 주로 연구되어졌던 앱타머가 최근에는 의료 진단기술, 바이오센서, 바이오이미징, 의약전달시스템, 분석 및 분리기술 등의 다양한 분야에서 활발히 활용되어지고 있는데 이는 항체나 molecular imprinted polymer (MIP) 등과 같은 다른 분자인식물질들에 비해 앱타머가 1) 열에 대한 안정성이 우수하며 2) in vitro selection을 통해 빠르게 개발할 수 있고 3) 화학적으로 합성 가능해 저비용으로 batch-to-batch variation 없이 대량 생산이 가능하고 4) 독성물질이나 금속 이온과 같은 저분자의 표적에 대한 앱타머 개발이 가능하는 등 표적에 대한 제한이 없으며 5) 기능화하거나 변형시키기가 쉬워 다양한 활용이 가능하는 등의 여러 가지 장점을 가지고

있기 때문이다. 특히 앱타머는 선별과정에서 표적과 유사한 구조이거나 실제 샘플에 많이 존재하는 다양한 물질들에 대한 counter selection을 수행함으로써 비특이성을 줄여 표적물질에 대한 선택성을 증가시킬 수 있어 실제로 케미컬 표적에 대한 앱타머의 경우 기능기 하나의 차이에 대해서도 선별적으로 인식이 가능할 정도로 높은 특이성을 갖는다. 따라서 이러한 높은 선택성과 친화도를 기반으로 앱타머를 물질 분리 및 분석 기술에 활용하고자 하는 연구들이 많이 이루어지고 있다.

[0004] 키랄 물질은 각 성분들 간의 물리화학적 성질이 매우 비슷하기 때문에 일반적인 방법으로는 분리할 수 없으며 일반적인 물질 분리기술과는 다른 다양한 방법들이 사용되고 있는데 기존에 많이 사용되었던 효소를 이용한 광학분할 방법의 경우 이론적 수율은 최대 50 % 밖에 되지 않고 고가의 장비를 사용해야 하고 시간이 오래 걸리는 등의 생산 수율이 매우 낮은 단점이 있다.

[0005] 지금까지 이성체 의약품 분리를 위해 가장 많이 사용되고 있는 기술은 combinatorial chemistry 등의 기술을 기반으로 하여 선택된 amino acid나 polysaccharide, crown ether 등의 화학물질을 cellulose나 amylose 등의 메트릭스에 고정화시켜 chiral separation을 위한 고정상으로 사용하는 HPLC 방법인데 각각의 이성체 의약품에 대한 고정상의 개발이 어렵고 단일 공정의 경우 분리 효율이 높지 않은 것으로 보고되고 있다. 또한 항체나 molecular imprint (MIP) 물질을 chiral separation의 고정상으로 사용하려는 연구들도 보고되고 있는데 이러한 방법은 항체나 MIP 물질이 키랄 의약품에 대한 특이적 반응성이 강하지 않는 등의 한계를 가지고 있다.

[0006] 공정 설계 측면에서는 다중 컬럼을 이용한 연속 분리기술 등의 개발을 통해 분리의 효율을 높이기 위한 방법들이 연구되고 있는데 여기서도 고정상으로는 대부분 combinatorial chemistry 기반의 achiral 물질을 사용하고 있어 효율이 높은 새로운 고정상의 개발을 통해 전체 분리 공정의 효율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 널리 사용되고 있는 비스테로이드계 항염증제인 이부프로펜에 대한 DNA 앱타머를 개발하고자 하며 특히 키랄 의약품인 이부프로펜에 대해서 각각의 광학이성질체에 대한 선택적 분리 및 분석 기술 개발에 활용될 수 있는 입체선택적 앱타머를 개발하고자 연구노력한 결과, (R)- 또는 (S)-이부프로펜에 대해 높은 친화도와 입체선택성을 가지는 DNA 앱타머를 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 키랄 구조의 이부프로펜(ibuprofen)에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머 및 그 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 이부프로펜에 입체선택적으로 결합하는 DNA 앱타머를 이용한 (R)- 또는 (S)-이부프로펜의 선택적 분리정제방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0010] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 키랄 구조의 이부프로펜(ibuprofen)에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 제공한다. 본 발명에서는 상기 이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 SELEX process를 이용하여 타겟물질에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 선택하였다.

[0011] 본 발명에 사용된 용어 'SELEX(Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) process'는 임의적으로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법 (Louis C. Bock, et al., 1992. Nature 355, 564-566)을 말한다.

[0012] 또한 본 발명에 사용된 'FluMag-SELEX process'는 DNA 증폭단계에서 형광 표지된 프라이머를 사용함으로서 이어지는 폴리아크릴아마이드 겔을 이용한 PCR product 분리과정(이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로)에서 형광을 띠는 밴드만 취하면 되는 이점을 이용하기 위한 변형된 방법이며, 타겟과 결합하는/결합하지 않는 DNA를 구별해내는 방법으로 자석(magnet)을 이용한 SELEX 방법이다. 기존의 다른 SELEX의 경우, 방사선 표지(radioactive label), capillary electrophoresis, membrane filter 등을 이용했었는데, 경비가 많이 들고 핸들링 하기가 어려운 단점이 있다. PCR product를 분리하기 위해서는 chromatography, affinity column 등이 이용되었지만 가격이 비싸고, 효율이 떨어지는 문제가 있다(R. Stoltenburg, et al., (2005) Anal Bioanal Chem 383: 83-91).

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 앱타머는 상기 SELEX process에 의해 선택된 이부프로펜에 입체선택적으로 결합하는 어떠한 염기서열의 DNA 앱타머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 7 중 어느 하나의 염기서열을 가질 수 있다. 본 발명의 실시예 2에서, 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 DNA 앱타머는 (R)-이성질체의 이부프로펜(ibuprofen)에 선택적으로 결합 가능하고, 서열번호 6 또는 7의 염기서열을 갖는 DNA 앱타머는 (S)-이성질체의 이부프로펜(ibuprofen)에 선택적으로 결합 가능하다는 것을 실험적으로 증명하였다.

[0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 키랄 구조의 이부프로펜(ibuprofen)에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머의 제조방법을 제공한다:

[0015] a) 이부프로펜과 자성비드(magnetic beads)를 버퍼용액에서 반응시켜 공유결합을 유도하는 단계;

[0016] b) 양 끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30-50개의 임의의 염기를 가지는 DNA pool과 상기 공유결합으로 얻은 이부프로펜-자성비드를 버퍼용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;

[0017] c) 상기 이부프로펜-자성비드에 결합된 DNA를 자석을 이용하여 분리하는 단계;

[0018] d) 상기 분리된 이부프로펜-자성비드로부터 DNA를 분리하는 단계; 및

[0019] e) 상기 PCR용 프라이머 영역에 상보적인 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 이부프로펜에 특이적으로 결합하는 DNA를 증폭시키는 단계.

[0020] 본 발명의 방법에서, 상기 a)단계의 공유결합은 이부프로펜의 카복실기(carboxyl group)와 자성비드의 아민기(amine group)의 공유결합인 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 방법에서, 상기 a)단계 후, 공유결합된 이부프로펜-자성비드에서 이부프로펜과 결합하지 않은 자성비드의 아민기를 에탄올아민(ethanol amine) 용액으로 20-30℃에서 10-50분간 반응시켜 불활성화 시키는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다. 상기 불활성화 단계를 수행함으로써, 이후 수행되는 DNA 앱타머 제조과정에서 이부프로펜-자성비드 결합체에 다른 DNA 또는 타물질이 비특이적으로 결합하거나, 또는 결합력이 약한 DNA의 결합 또는 타물질의 오염을 방지할 수 있다.

[0022] 본 발명의 방법에서, 상기 d)단계에서 DNA의 분리는 70-90℃에 3-10분간 두어 DNA를 이부프로펜-자성비드로부터 분리하는 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명의 방법에서, 상기 e)단계에서 프라이머 쌍 중 하나에 플루오레세인(fluorescein)이 붙여진 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동을 통해 상기 플루오레세인에 의해 변성된 단일가닥 DNA를 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 상기 전기영동에 사용된 폴리아크릴아마이드 젤에는 요소(urea)와 포름아마이드가 포함되어 있어 전기영동 후에는 두 개의 밴드가 생기게 되는데, 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 플루오레세인이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다. 따라서 상기 플루오레세인이 붙어있는 DNA 밴드를 잘라내어 젤 추출(gel extraction)을 실시하고 다시 에탄올 침전법으로 분리하면 변성된 단일가닥 DNA를 확보할 수 있다.

[0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 담체에 결합된 이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 키랄 고정상(chiral stationary phase, CSP)을 제공한다. 상기 DNA 앱타머는 바람직하게는 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 가질 수 있다. 상기 담체는 DNA 앱타머가 결합될 수 있는 종래 크로마토그래피의 고정상 담체로 사용되어 왔던 어떤 담체도 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 기판에 결합된 이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 바이오센서를 제공한다. 상기 DNA 앱타머는 바람직하게는 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 가질 수 있다. 상기 기판은 DNA 앱타머가 결합될 수 있는 종래 바이오센서에 알려진 어떤 기판도 사용될 수 있다. 상기 바이오센서에 결합된 이부프로펜은 전기화학 또는 광학적 검출기를 이용하여 정성/정량적으로 분석할 수 있다.

[0027] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 라세믹형태의 이부프로펜에서 (R)-이부프로펜 또는 (S)-이부프로펜의 선택적 분리정제용 조성물을 제공한다. 상기

DNA 앱타머는 바람직하게는 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 가질 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 DNA 앱타머를 이용하여 (R)-이성질체의 이부프로펜(ibuprofen)을 선택적으로 분리정제할 수 있으며, 서열번호 6 또는 7의 염기서열을 갖는 DNA 앱타머를 이용하여 (S)-이성질체의 이부프로펜(ibuprofen)을 선택적으로 분리정제할 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 포함하는 라세믹형태의 이부프로펜을 준비하는 단계; 상기 라세믹형태의 이부프로펜과 키랄구조의 이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머를 결합시키는 단계; 및 상기 결합된 (R)- 또는 (S)-이성질체의 이부프로펜을 분리하는 단계를 포함하는, 라세믹형태의 이부프로펜에서 (R)-이부프로펜 또는 (S)-이부프로펜의 선택적 분리정제 방법을 제공한다. 상기 DNA 앱타머는 바람직하게는 서열번호 1 내지 7 중 어느 하나의 염기서열을 가질 수 있다.

[0029] 본 발명의 방법에서, 상기 분리 단계의 한 구현예는 본 발명의 DNA 앱타머를 자성비드에 고정화시켜 이부프로펜을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앱타머-이부프로펜 복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 이부프로펜을 분리함으로써 (R)- 또는 (S)-이성질체의 이부프로펜을 선택적으로 분리할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 DNA 앱타머가 고정화된 자성비드를 컬럼(column)에 채운 후 라세믹형태의 이부프로펜을 포함하는 시료를 통과시켜 (R)- 또는 (S)-이성질체의 이부프로펜을 선택적으로 분리할 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명의 이부프로펜에 입체선택적으로 결합 가능한 DNA 앱타머의 제조방법 및 특성 분석방법을 단계별로 보다 구체적으로 설명한다.

[0031] 본 발명은 이부프로펜이 표면에 고정화되어있는 자성 비드를 이용하여 10^{15}개의 랜덤 시퀀스의 ssDNA 라이브러리에서부터 이부프로펜에만 선택적으로 결합할 수 있는 DNA 앱타머를 선별한 후 라세믹(racemic) 및 (S)- 이성질체(isomer) 형태의 이부프로펜과 구조가 유사한 profen 계열의 다른 항염증제들을 이용하여 앱타머의 입체선택성 및 특이성, 친화성을 분석하였다. 본 발명 과정을 좀 더 자세히 설명하면 다음과 같다.

[0032] 1) 자성 비드에 라세믹 형태의 이부프로펜 고정

[0033] (R)-ibuprofen과 (S)-ibuprofen에 대한 입체선택적 앱타머를 동시에 선별하기 위해 라세믹 형태의 이부프로펜을 자성 비드에 고정화하였다. 고정화 방법으로는 이부프로펜 끝 부분의 카르복실기와 자성비드 표면에 기능화 되어있는 아미노기를 펩타이드 결합 반응을 통해 공유결합을 형성케 하는 방법을 사용하였다. 이를 위해 먼저 이부프로펜을 특정 버퍼용액에 분산되어있는 자성비드 용액과 함께 반응 시킨 후 자성비드에 결합하지 않은 이부프로펜은 자석을 이용하여 분리하고 그 농도를 특정하여 얼마만큼의 이부프로펜이 자성비드표면에 고정화되었는지 계산하였다.

[0034]

[0035] 2) 이부프로펜(Ibuprofen) 결합 특이적 DNA 앱타머 선별

[0036] 이부프로펜 결합 특이적 DNA 앱타머 선별을 위해 이부프로펜이 고정화된 자성비드를 이용하여 FluMag-SELEX(Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment) 방법으로 10^{15}개의 서로 다른 시퀀스의 랜덤 ssDNA 라이브러리에서부터 이부프로펜에만 결합하는 ssDNA를 스크리닝하였다.

[0037] 구체적으로는 먼저 중앙에 40 개의 임의의 염기서열과 양 끝에 각각 18개의 동일 염기서열을 가지는 랜덤 ssDNA 라이브러리를 합성하고 이 랜덤 ssDNA 라이브러리를 이부프로펜이 고정화된 자성비드 용액에 넣어주고 상온에서 반응이 잘 일어날 수 있도록 일정 시간 혼합하였다. 그 후 자석을 이용하여 이부프로펜에 결합하지 않는 ssDNA들은 씻어냈다. 다음으로 자성비드를 이부프로펜과 결합하고 있는 ssDNA들이 이부프로펜으로부터 잘 해리될 수 있는 버퍼로 다시 분산시킨 후 열을 가하여 이부프로펜과 결합하고있는 ssDNA들을 이부프로펜으로부터 떨어뜨리고 다시 자석을 이용하여 분리하였다.

[0038] 분리된 ssDNA는 에탄올 침천법을 통해 정제, 농축한 후 ssDNA pool을 증가시키기 위해 PCR 방법을 이용하여 증

폭하였다. PCR 반응물을 정제한 후 고농도의 urea가 들어있는 폴리아크릴아마이드 젤로 전기영동을 하여 이중나선 구조의 PCR 반응물을 두 개의 단일 가닥 DNA로 분리하였다. 두 개의 ssDNA 밴드 중 원래의 단일사슬 부분의 ssDNA 밴드를 gel extraction과 에탄올 침전법으로 농축/정제하여 ssDNA를 확보한다. 이 때 확보된 DNA pool은 다시 이부프로펜이 고정되어 있는 자성비드 용액과 혼합되고 이부프로펜에 결합하는 ssDNA들은 자석을 이용하여 분리하였다. 이러한 일련의 분리/증폭 과정을 반복하면 이부프로펜이 고정되어 있는 자성비드 용액과 혼합되는 ssDNA pool 중 이부프로펜에 결합하는 ssDNA의 양이 점점 증가하게 되어 결국 ssDNA pool 중 대부분이 이부프로펜과 결합하는 결과를 얻었다. 자성비드 표면에 흡착하거나 구조가 유사한 profen 계열의 다른 케미컬에 결합하는 ssDNA를 배제하기 위해 4번째와 8번째 분리단계 다음에 아무 타겟이 고정화되어있지 않은 자성비드와 페노프로펜, 플러비프로펜, 나프록신이 표면에 고정화되어있는 자성비드를 이용하여 counter selection을 수행하였다.

[0039] 위의 과정을 통해 선별된 ssDNA들을 PCR한 후 TOPO TA cloning kit를 이용하여 cloning하여 각각의 ssDNA로 분리한 후 얻어진 콜로니에서부터 플라스미드 DNA를 추출하여 염기분석을 시행하였다. 염기분석 결과 최종적으로 8개의 서로 다른 시퀀스의 ssDNA를 얻을 수 있었다.

[0040] 3) 앱타머의 특이성, 친화도, 이성질체에 대한 입체선택성 분석

[0041] 선별된 8개의 ssDNA들의 특이성, 친화도, 입체선택성 분석을 위해 상업적으로 구입가능한 형태의 이부프로펜인 라세믹 및 (S)-이성질체 형태의 이부프로펜과 profen 계열의 항염증제인 페노프로펜(Fenoprofen), 플러비프로펜(Flubiprofen),나프록신(Naproxen) 그리고 대조군으로 항생제의 일종은 옥시테트라싸이클린(Oxytetracycline)을 테스트 하였다.

[0042] 먼저 각각의 케미컬을 여러 가지 농도 조건에서 일정농도의 ssDNA와 반응시킨 후 필터(Microcon YM10)를 이용하여 ssDNA에 결합하지 않은 케미컬을 프리상태의 ssDNA, ssDNA-케미컬 혼합체로부터 분리하였다. 필터링된 ssDNA와 결합하지 않은 각각의 케미컬들은 HPLC 분석을 통해 농도를 분석하였다. 최종적으로 ssDNA에 대한 각각의 케미컬들의 친화도(해리상수, K_d)는 시그마플랏(SigmaPlot) 프로그램을 통해 분석하였다.

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0044] **실시예 1**

[0045] 이부프로펜을 자성비드에 고정화시킨 방법은 다음과 같다. 먼저 아민기가 표면에 기능화되어 있는 1 X 10^9 개의 자성비드(Dynabeads, M270 Amine) 500 ul를 0.1 M PBS 버퍼 (pH 6.5)로 3회 씻어주었다. 다음으로 동일 버퍼에 녹아있는 5 mg/ml 농도의 라세믹 이부프로펜 500 ul를 자성비드와 섞어주었다. 여기에 10 mg/ml 농도의 EDC (*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide) 용액 200 ul를 섞은 후 상온에서 2시간 동안 잘 혼합해주었다. 이때 EDC 용액은 사용전 바로 만들어 사용하였다. 반응이 끝난 후 1 M의 hydroxylamine 용액 12 ul를 넣은 후 상온에서 15분간 잘 혼합해 주었다. 마지막으로 자성비드 표면의 아민기와 결합하지 않은 이부프로펜은 자석을 이용하여 분리한 후 HPLC를 이용하여 농도를 분석하였다. 최종적으로 0.36 umole Ibuprofen / 100 ul 자성비드 용액의 농도로 이부프로펜이 자성비드에 고정화되었다. 이부프로펜이 고정화된 자성비드는 0.1 M PBS 버퍼 (pH 7.5)로 4회 씻어준 후 4℃에서 보관하면서 SELEX를 위해 사용하였다.

[0046] 이부프로펜 특이적 앱타머 스크리닝을 위해 먼저 76mer 길이의 랜덤 ssDNA 라이브러리로서 양 끝에 PCR을 위한 고정 시퀀스 영역이 있고 중앙에 40 개의 임의의 염기서열을 가진 ssDNA 라이브러리를 합성하였다.

[0047] 5'-ATACCAGCTTATTCAATT-N_{40}-AGATAGTAAGTGCAATCT-3'

[0048] 이부프로펜이 고정화된 자성비드 용액 100 ul 를 바인딩 버퍼용액 (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM $MgCl_2$,

5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 0.02 % Tween 20, pH 7.6)으로 씻어준 후 다시 바인딩버퍼 100 ul로 분산시켜 사용하였다. 10^{15}개의 서로 다른 염기서열을 가지는 랜덤 ssDNA 라이브러리를 90 ℃에서 10분, 4 ℃ 에서 15분, 25 ℃ 에서 5분 동안 처리한 후 자성비드 용액에 넣어주었다. 상온에서 30분 동안 잘 혼합한 후 이부프로펜에 결합하지 않은 ssDNA는 바인딩버퍼로 5번 씻어주었다. ssDNA가 이부프로펜에 결합되어있는 자성비드를 200 ul의 용리버퍼 (40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 3.5 M Urea, 0.02 % Tween 20, pH 8.0)에 분산시키고 80 ℃ 에서 10분 동안 열을 가한 후 이부프로펜으로 부터 떨어져 나온 ssDNA를 자석을 이용하여 자성비드로부터 분리해 냈다. 이러한 용리(elution) 과정을 3회 반복하였다. 용리된 ssDNA는 에탄올 침전법을 이용하여 농축 정제한 후 광학분석기를 이용하여 농도를 측정하여 넣어준 ssDNA pool중 몇 %의 ssDNA가 이부프로펜에 결합하는지 분석하였다.

[0049] 용리된 ssDNA는 PCR 반응을 통해 양을 증폭하였다. PCR을 위해 두 개의 프라이머는 다음과 같이 하나에는 형광물질이 표지되어있고 다른 하나에는 스페이서(hexaethylenglycol)를 사이에 두고 20개의 아데닌 염기가 더 연결되어 있는 것을 사용하였는데 이는 후에 PCR 생산물이 이중나선 구조의 dsDNA 이므로 이를 단일가닥의 DNA로 분리하기 위한 것이다.

[0050] forward: 5 '-fluorescein-ATACCAGCTTATTCAATT-3'

[0051] reverse: 5'-poly A_{20}-HEGL-AGATTGCACTTACTATCT-3'

[0052] 100-300 ng 상당의 ssDNA 3 ul, 10 uM의 프라이머 각각 2.5 ul, PCR master mix (Dakara) 25 ul, DW 17 ul를 혼합하여 총 50 ul의 양으로 PCR을 수행하였고 온도 조건은 94℃ (5분), 94℃ (30초), 47℃ (30초), 72℃ (30초), 72℃ (10분) 하에서 수행하였으며 반복 횟수는 30번으로 하였다. PCR이 제대로 수행되었는지 확인하기 위해 PCR 생산물은 2%의 아가로즈 젤 (agarose gel)에서 전기영동 방법으로 분석되었다. PCR 생산물은 최종적으로 PCR Purification kit를 이용하여 정제한 후 이중나선 구조의 dsDNA중 필요로 하는 하나의 단일사슬 부분만을 분리하기 위해 폴리아크릴아마이드젤 (PAGE) 전기영동을 실시하였다. 10 %의 폴리아크릴아마이드 젤에서는 6 M의 urea, 20 %의 포름아마이드가 포함되어 있어 전기영동 후에는 두 개의 밴드가 생기는데, 이는 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 fluorescein이 붙어있는 DNA 가닥은 아래에, 20개의 아데닌 염기가 더 붙어있는 DNA 가닥은 위에 각각 위치하게 된다. Fluorescein이 붙어 있는 DNA 밴드를 잘라내어 gel extraction을 실시한 후 다시 에탄올 침전법으로 DNA를 분리/정제하였다. 이 ssDNA pool은 다시 처음의 이부프로펜이 고정 되어 있는 자성비드 용액과 혼합하여 이부프로펜에 결합하는 ssDNA를 다시 분리하였다. 이러한 분리와 증폭과정은 도 2에서와 같이 여러 번 반복되었으며 총 10번의 분리 과정을 거쳐 이부프로펜이 고정화되어있는 자성비드와 혼합한 ssDNA 중 98 % 의 ssDNA가 이부프로펜에 결합하는 결과를 얻었다. (도 3) 이 SELEX 과정 중간에 자성비드 표면에 흡착하거나 구조가 유사한 profen 계열의 다른 케미컬에 결합하는 ssDNA를 배제하기 위해 4번째와 8번째 분리단계 다음에 어떠한 케미컬도 고정화되어있지 않은 자성비드와 페노프로펜, 플러비프로펜, 나프록신이 표면에 고정화되어있는 자성비드를 이용하여 똑같은 방법으로 반응을 수행하였다. 이 때는 다른 케미컬들과 결합하거나 자성비드 표면에 비특이적으로 흡착하는 ssDNA는 버리고 나머지 결합하지 않은 ssDNA를 분리하여 다음 과정에 사용하였다. 최종적으로 얻어진 DNA pool을 TOPO TA cloning kit를 이용하여 cloning하여 총 17개의 콜로니를 획득하였다. 각각의 콜로니에서 플라스미드를 추출하여 시퀀싱을 수행하여 총 8개의 서로 다른 염기서열 정보를 획득하였다. 이를 8개의 ssDNA를 웹서버 기반의 mfold 프로그램을 이용하여 분석한 2차 구조는 도4와 같다. 하기 표 1은 SELEX 방법에 의해 선별된 총 8종의 ssDNA 염기서열 (sequence)이다.

[0053] [표 1]

이름	염기서열 (5' -> 3')
IBA2	ATACCAGCTTATTCAATTACAGTAGTGAGGGGTCCGTCGTGGGGTAGTTGG GTCGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT
IBA4	ATACCAGCTTATTCAATTCCACAGACCCTTAGCTTTCCTATTATTCTGCGC GACGCTGAGATAGTAAGTGCAATCT
IBA8	ATACCAGCTTATTCAATTGCGAACGACTTCATAAAATGCTATAAGGTTGCC CTCTGTCAGATAGTAAGTGCAATCT
IBA11	ATACCAGCTTATTCAATTACAGTAGTGAGGGGTCCGTCGTGGGGTAGTTGG GTCGTGGAGATATGTAAGTGCAATCT
IBA12	ATACCAGCTTATTCAATTGGATCGGCGACGTGGGTGTCGTGATTCGGGGTG AGATAGTAAGTGCAATCT
IBA17	ATACCAGCTTATTCAATTACAGCGTGGGCGGTGTCGGATTTTCGTATGGAT GGGGATGAGATAGTAAGTGCAATCT
IBA20	ATACCAGCTTATTCAATTGCGAACGACGTCATAAAATGCTATAAGGTTGCC CTCTGTCAGATAGTAAGTGCAATCT
IBA22	ATACCAGCTTATTCAATTACAGTAGTGAGGGGTCCGTCGTGGGGTAGTTGG GTCGTGGAGATAGTAAGTGCAAACT

[0054]

[0055] **실시예 2**

[0056] 선별된 8개의 ssDNA들의 특이성, 친화도, 입체선택성 분석을 위해 상업적으로 구입 가능한 형태의 이부프로펜인 라세믹 및 (S)-이성질체 형태의 이부프로펜과 profen 계열의 항염증제인 페노프로펜, 플러비프로펜, 나프록신 및 대조군으로 항생제의 일종은 옥시테트라싸이클린을 테스트 하였다.

[0057] 먼저 이부프로펜과의 결합력 분석을 위해 바인딩버퍼에 용해된 0.1, 0.5, 1, 5, 10 uM의 라세믹 이부프로펜 50 ul에 1 uM의 ssDNA를 섞은 후 상온에서 30분간 혼합한 후 필터(Microcon, YM10)를 이용하여 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 ssDNA에 결합하지 않은 이부프로펜을 프리상태의 ssDNA, ssDNA-이부프로펜 혼합체로부터 분리하였다. 필터링된 ssDNA와 결합하지 않은 이부프로펜은 HPLC 분석을 통해 농도를 분석하였다. 이부프로펜의 HPLC (Waters) 분석 조건은 다음과 같은 조건에서 수행하였다. 이동상; DW(pH3):아세토니트릴=34:66, 분리시간 10분, 유속 1 ml/min, 컬럼; C18-XD, 형광분석 파장; Ex/Em=225/290 nm. 각각의 이부프로펜 농도 조건에서의 이부프로펜-앱타머 복합체 농도는 비선형 회귀법과 단일 부위 포화형 리간드 결합법으로 SigmaPlot 프로그램을 이용하여 plotting 되었고, 여기에 $y=B_{max}* X/K_d + X$ 식이 이용되었다 (y는 포화도, B_{max}는 최대 결합 위치, K_d는 해리상수, X 는 이부프로펜 농도).

[0058] 페노프로펜, 플러비프로펜, 나프록신엔 대한 HPLC 분석 조건은 검출기 조건을 제외한 다른 조건은 이부프로펜과 동일하며 형광검출기 조건은 다음과 같다. 페노프로펜 (Ex/Em=280/320 nm), 플러비프로펜 (Ex/Em=250/315 nm), 나프록신 (Ex/Em=280/350 nm) 옥시테트라싸이클린은 acetonitrile:MeOH:oxalic acid(10 mM, pH2)=15:15:70의 이동상을 이용하여 Ex/Em=380/520 nm 조건하에서 분석하였다. 각각의 ssDNA에 대한 케미컬들의 친화도 분석 결과는 도 5와 같다.

[0059] IBA4 (Ibuprofen binding aptamer No4), IBA17은 라세믹 형태의 이부프로펜에도 친화성을 보였고 동시에 (S)-이성질체의 이부프로펜에도 친화성을 보였으며 해리상수로 표현되는 친화도는 (S)-이성질체의 이부프로펜에 대해서 거의 2배 정도 높게 나타났다. 이는 라세믹 형태의 이부프로펜에는 실제로 (S)-이성질체의 이부프로펜이 절반정도만 포함되어있기 때문이며 따라서 IBA4, IBA17은 (S)-이성질체의 이부프로펜에만 선택적으로 결합하는 앱타머이다. 라세믹 형태의 이부프로펜과 (S)-이성질체의 이부프로펜 모두에게 친화성을 보이지 않는 IBA20을 제외한 나머지 5개의 앱타머들(IBA2, IBA8, IBA11, IBA12, IBA22)은 (S)-이성질체의 이부프로펜에는 친화도를 보이지 않고 라세믹 형태의 이부프로펜에만 친화도를 보였으며 따라서 이 앱타머들은 (R)-이성질체의 이부프로펜에 선택적으로 결합하는 앱타머이다. 친화도(해리상수)는 1.5 - 6.8 uM 수준에서 분석되었다. 상기 (R)- 또는 (S)-이성질체의 이부프로펜에 선택적으로 결합하는 총 7종의 앱타머의 염기서열을 하기 표 2에 나타내었다.

[0060] [표 2]

이름	염기서열 (5' -> 3')	특이성	서열번호
IBA2	ATACCAGCTTATTCAATTACAGTAGTGAGGGG TCCGTCGTGGGGTAGTTGGGTCGTGGAGATAG TAAGTGCAATCT	(R)-Ibuprofen 특이적 앱타머	1
IBA8	ATACCAGCTTATTCAATTGCGAACGACTTCAT AAAATGCTATAAGGTTGCCCTCTGTCAGATAG TAAGTGCAATCT	(R)-Ibuprofen 특이적 앱타머	2
IBA11	ATACCAGCTTATTCAATTACAGTAGTGAGGGG TCCGTCGTGGGGTAGTTGGGTCGTGGAGATAT GTAAGTGCAATCT	(R)-Ibuprofen 특이적 앱타머	3
IBA12	ATACCAGCTTATTCAATTGGATCGGCGACGTG GGTGTCGTGATTCGGGGTGAGATAGTAAGTGC AATCT	(R)-Ibuprofen 특이적 앱타머	4
IBA22	ATACCAGCTTATTCAATTACAGTAGTGAGGGG TCCGTCGTGGGGTAGTTGGGTCGTGGAGATAG TAAGTGCAAACT	(R)-Ibuprofen 특이적 앱타머	5
IBA4	ATACCAGCTTATTCAATTCCACAGACCCTTAGC TTTCCTATTATTCTGCGCGACGCTGAGATAGT AAGTGCAATCT	(S)-Ibuprofen 특이적 앱타머	6
IBA17	ATACCAGCTTATTCAATTACAGCGTGGGCGGT GTCGGATTTTCGTATGGATGGGGATGAGATAG TAAGTGCAATCT	(S)-Ibuprofen 특이적 앱타머	7

[0061]

산업이용 가능성

[0062] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 DNA 앱타머는 키랄 의약품인 이부프로펜에 대해 높은 친화도와 입체선택성을 가지고 있으므로, 상기 DNA 앱타머는 capturing probe로 사용되어 이부프로펜 검출용 바이오센서 개발에 활용될 수 있으며 chiral solid phase (CSP)에 리간드로서 사용되어 라세믹 형태의 이부프로펜으로부터 특정 이성질체만을 분리/정제할 수 있는 공정 개발 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 Ibuprofen과 카운터 타겟으로 사용된 profen 계열의 다른 의약품들의 화학 구조를 도시한 것이다.

[0064] 도 2는 Ibuprofen 특이적 DNA 앱타머를 개발하기 위한 FluMag-SELEX 방법 모식도이다.

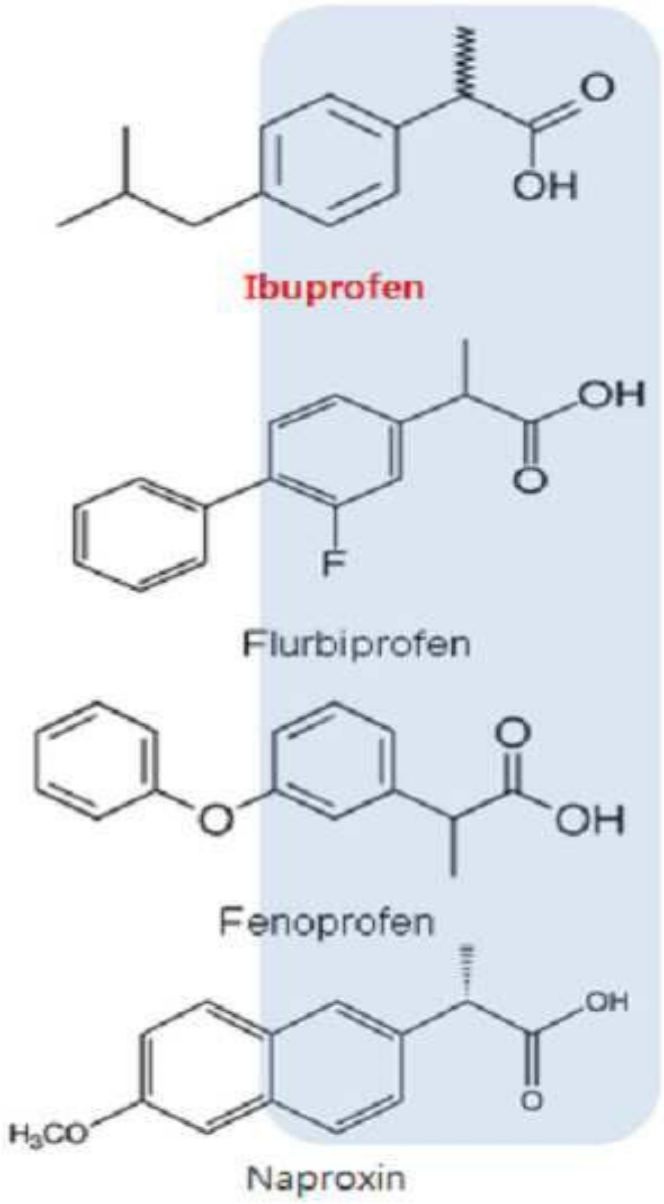
[0065] 도 3은 각각의 Selection round에서 사용된 ssDNA pool 중 Ibuprofen에 결합하는 ssDNA의 퍼센트 그래프이다.

[0066] 도 4a 내지 4h는 mfold program을 이용하여 예측한 Ibuprofen 결합 특이적 DNA 앱타머 8종에 대한 2차 구조 모식도이다.

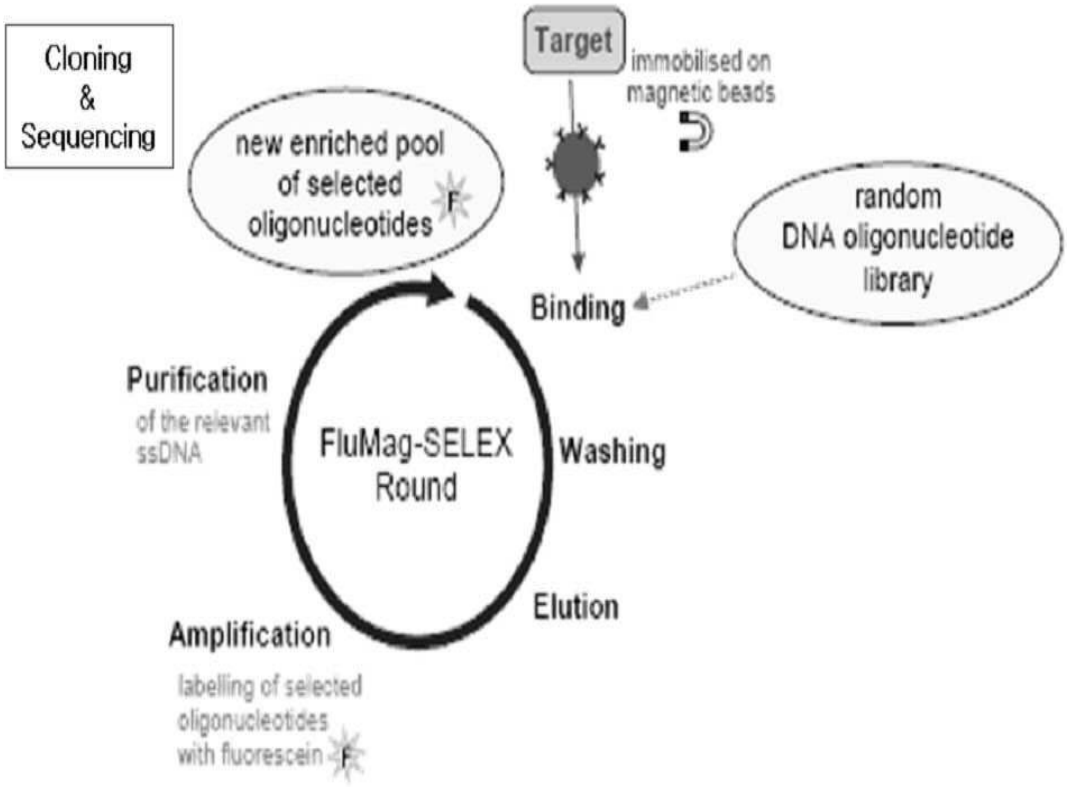
[0067] 도 5a 내지 5h는 선별된 Ibuprofen 결합 특이적 DNA 앱타머 8종에 대한 결합력 및 선택성 분석 결과 그래프이다.

도면

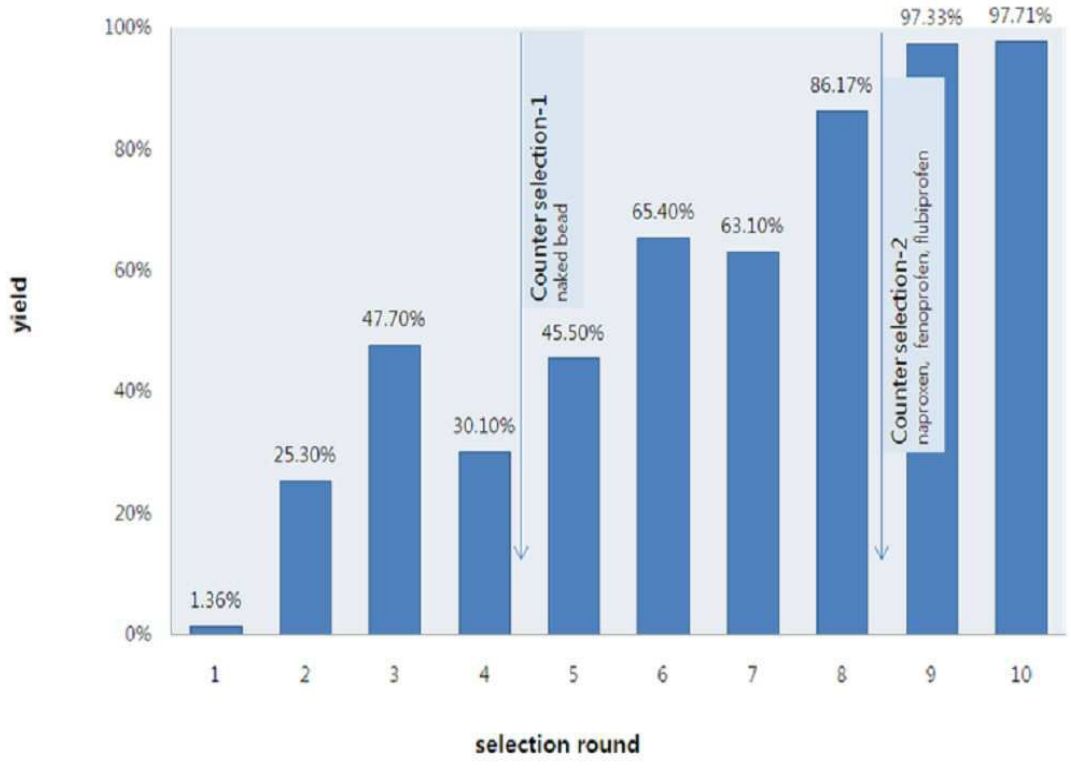
도면1


O
OH
Ibuprofen
OH
O
F
Flurbiprofen
O
O
OH
Fenoprofen
OH
O
H3CO
Naproxin

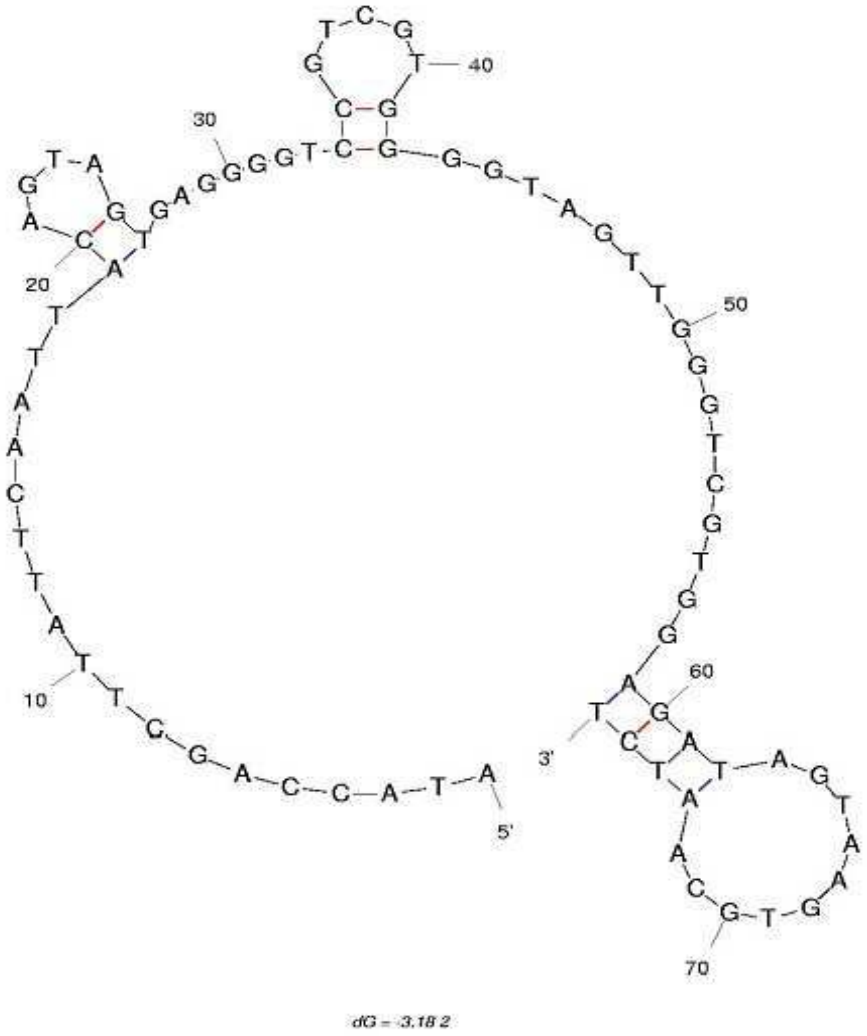
도면2


Cloning
&
Sequencing
Target
immobilised on
magnetic beads
new enriched pool
of selected
oligonucleotides
F
random
DNA oligonucleotide
library
Binding
Purification
of the relevant
ssDNA
FluMag-SELEX
Round
Washing
Elution
Amplification
labelling of selected
oligonucleotides
with fluorescein
F

도면3

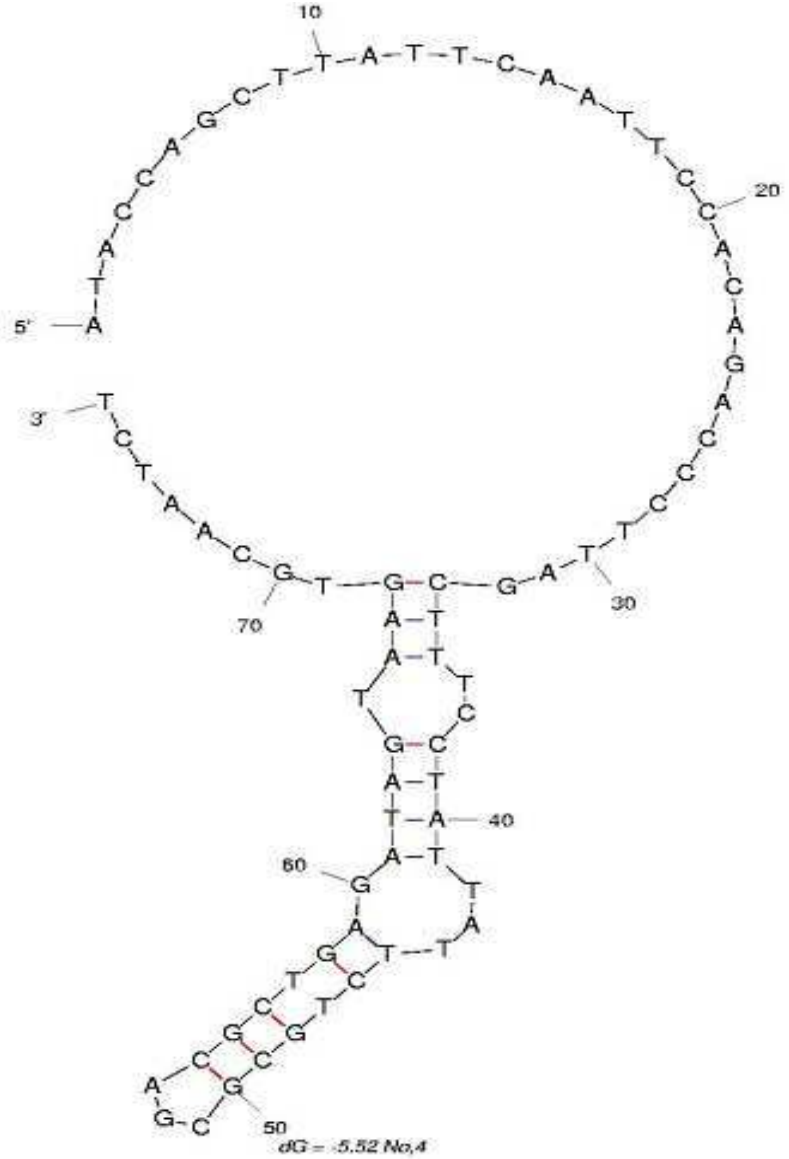

100%
80%
60%
40%
20%
0%
yield
1.36%
25.30%
47.70%
30.10%
45.50%
65.40%
63.10%
86.17%
97.33%
97.71%
Counter selection-1
naked bead
Counter selection-2
naproxen, fenoprofen, flubiprofen
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
selection round

도면4a



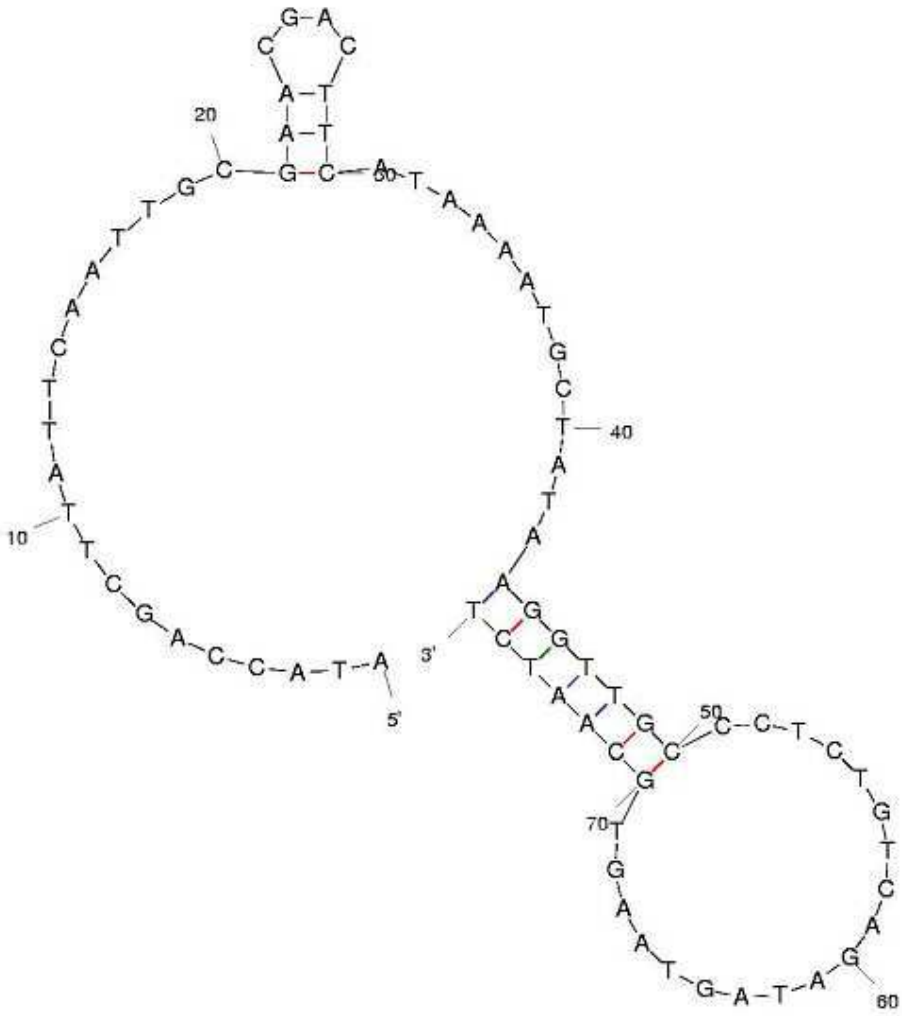
IBA-2

도면4b



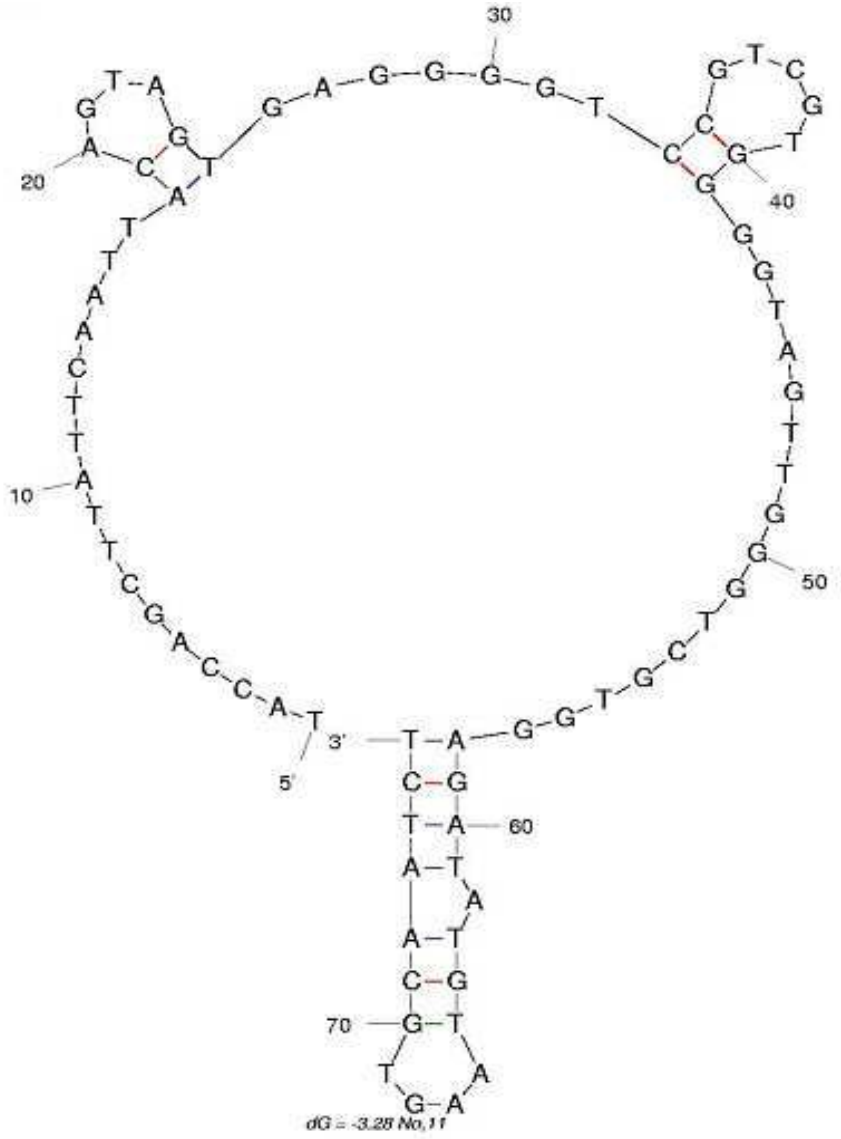
IBA-4

도면4c



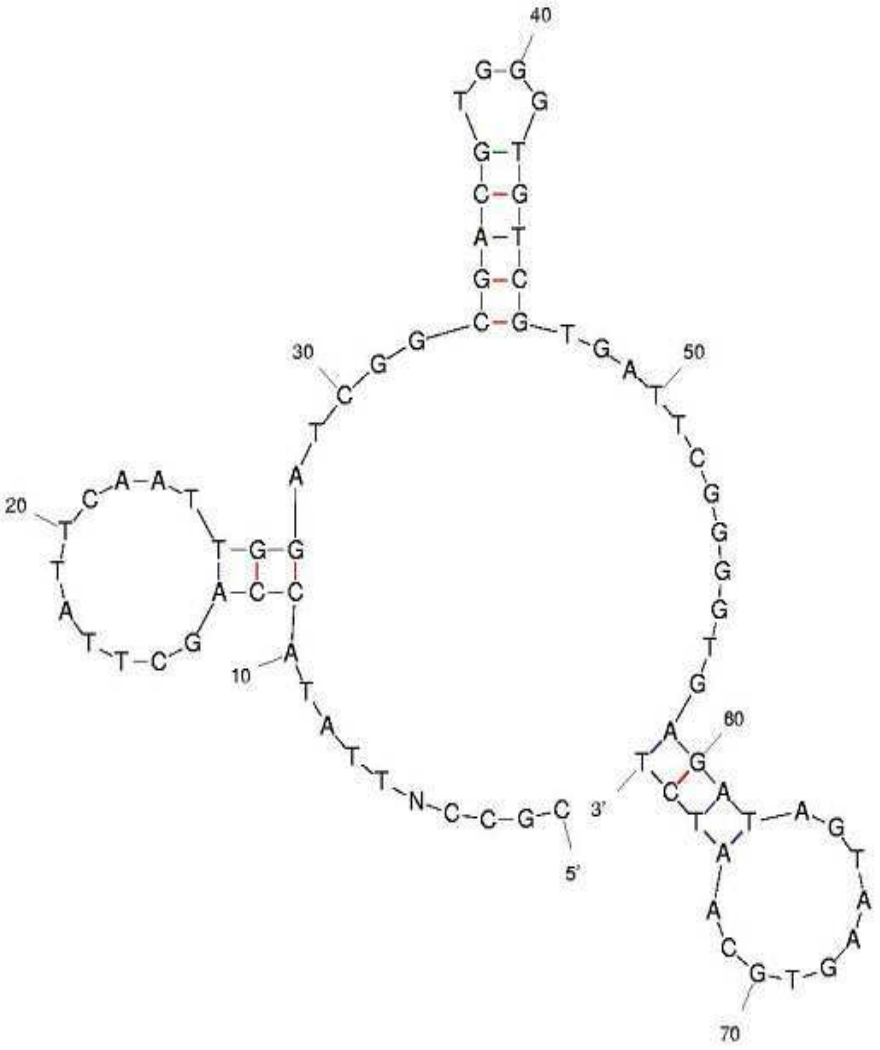
IBA-8

도면4d



IBA-11

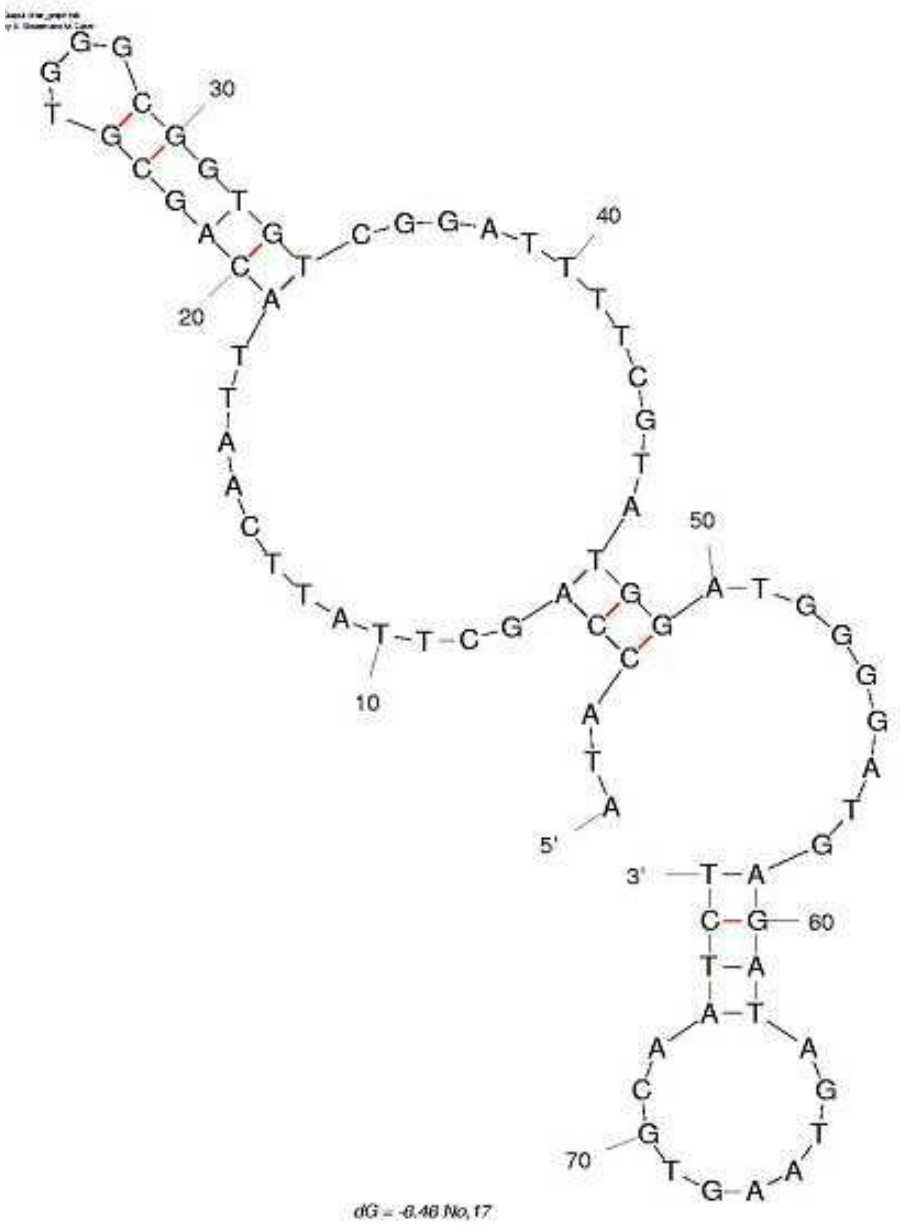
도면4e



dG = -7.43 No.12

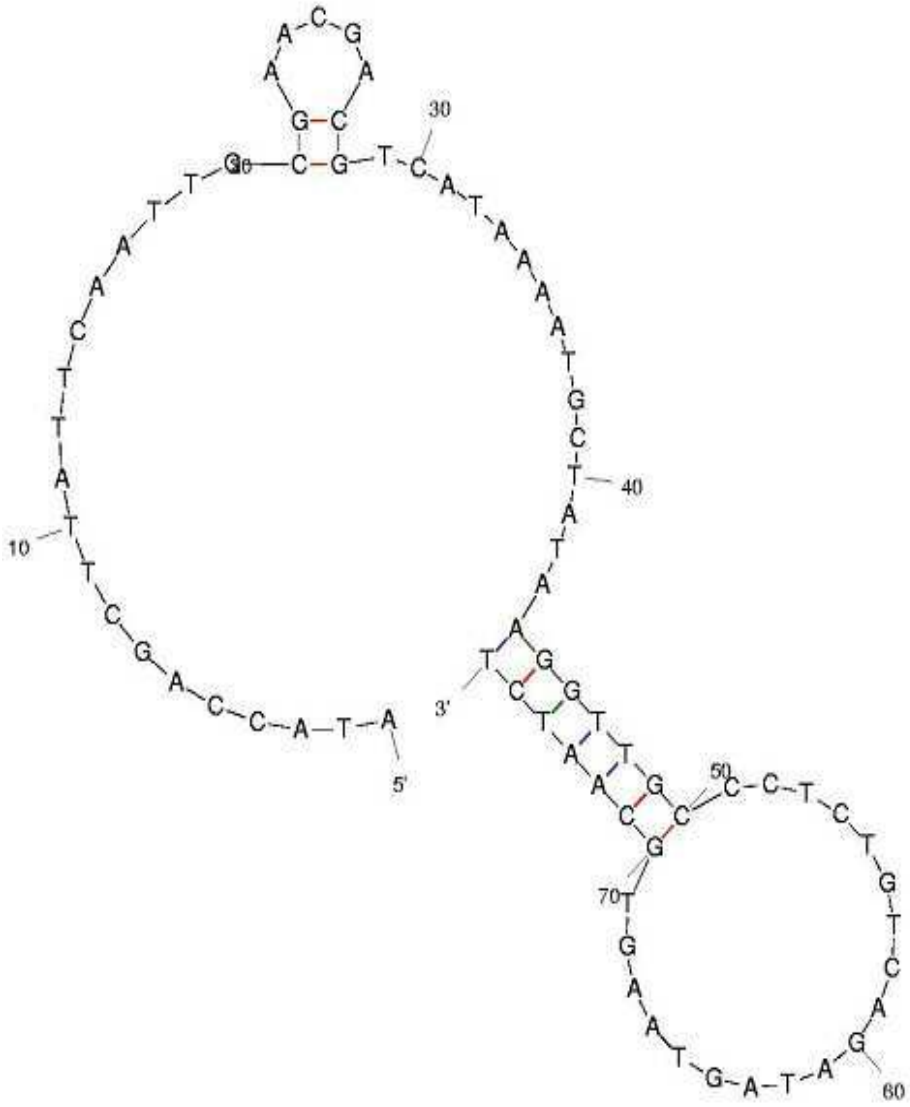
IBA-12

도면4f



IBA-17

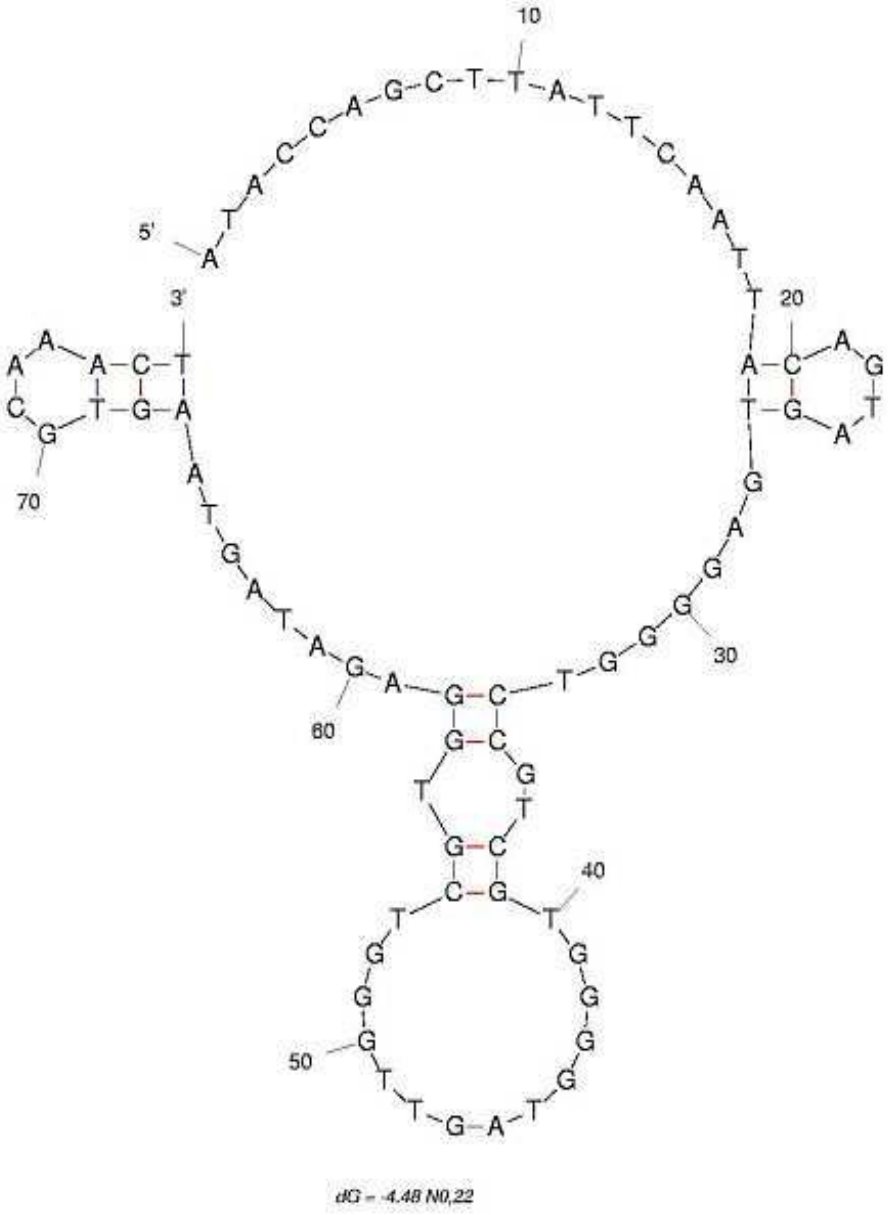
도면4g



dG = -4.26 No.20

IBA-20

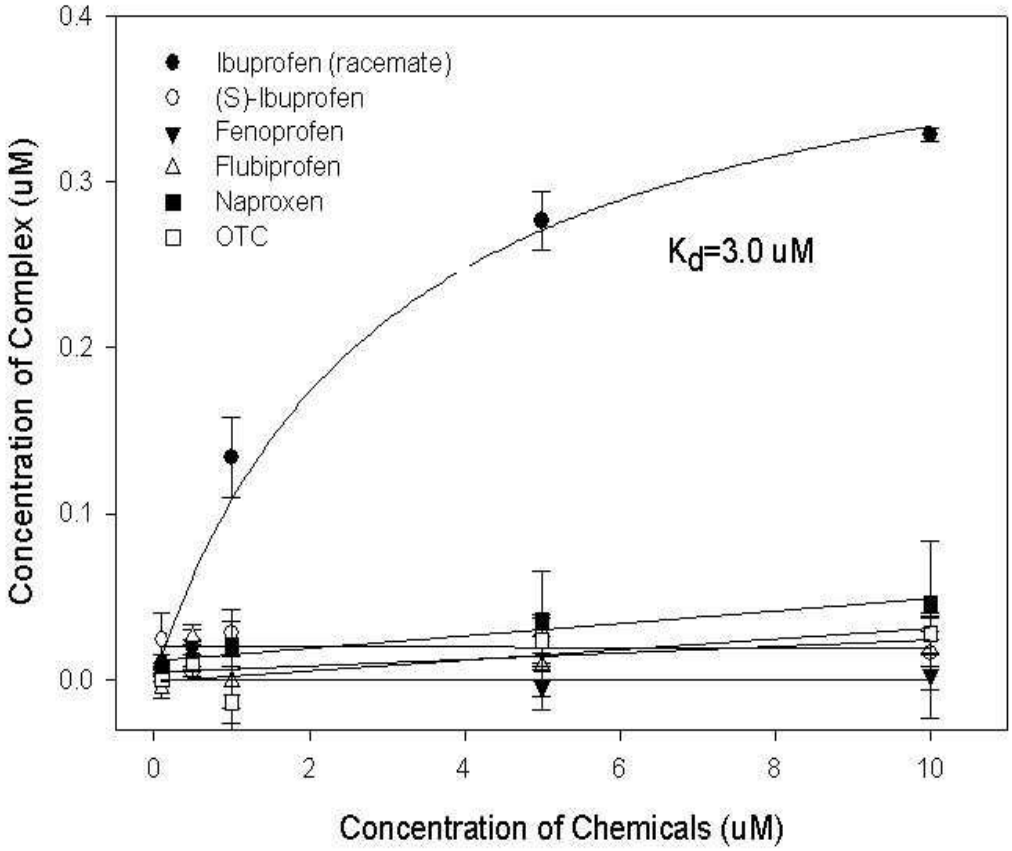
도면4h



IBA-22

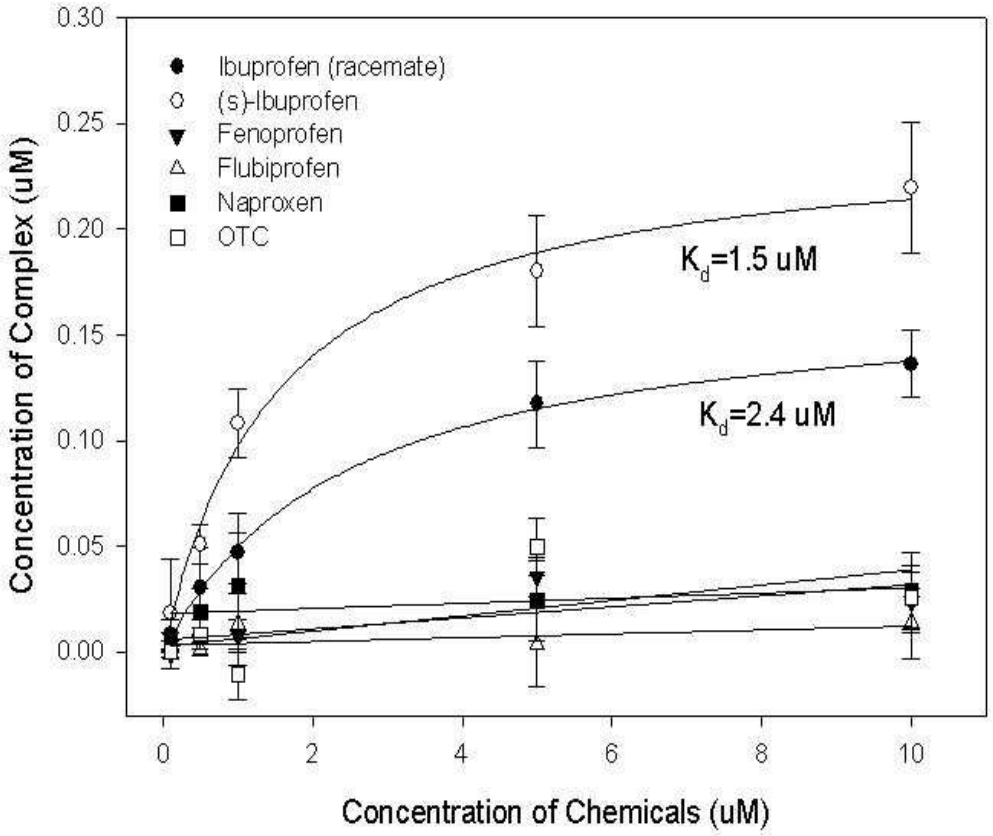
도면5a

IBA-2


Ibuprofen (racemate)
(S)-Ibuprofen
Fenoprofen
Flubiprofen
Naproxen
OTC
K_d=3.0 uM
Concentration of Complex (uM)
Concentration of Chemicals (uM)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0
2
4
6
8
10

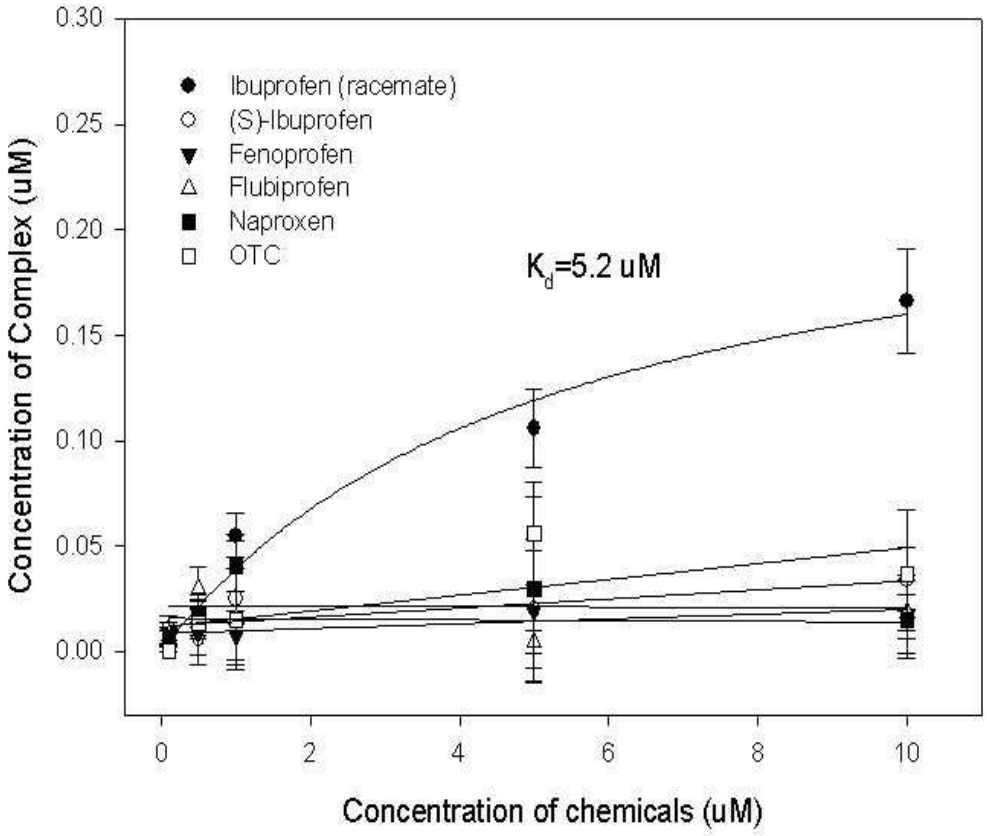
도면5b

IBA-4


Ibuprofen (racemate)
(s)-Ibuprofen
Fenoprofen
Flubiprofen
Naproxen
OTC
K_d=1.5 uM
K_d=2.4 uM
Concentration of Complex (uM)
Concentration of Chemicals (uM)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
2
4
6
8
10

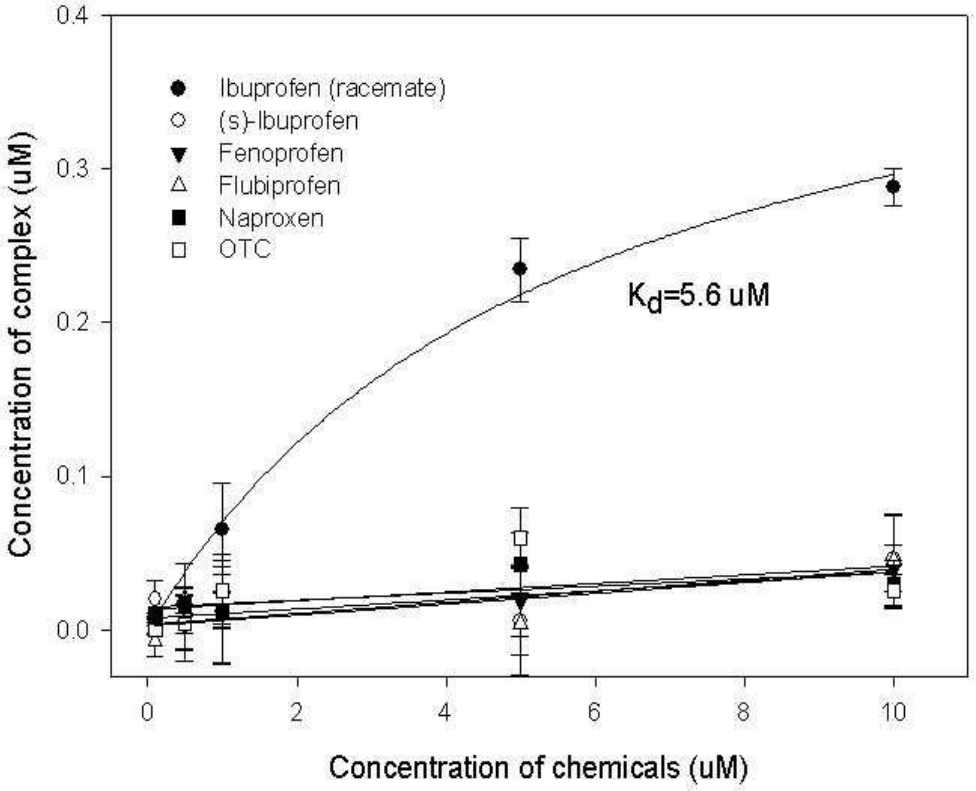
도면5c

IBA-8


0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Concentration of Complex (uM)
Ibuprofen (racemate)
(S)-Ibuprofen
Fenoprofen
Flubiprofen
Naproxen
OTC
K_d=5.2 uM
0
2
4
6
8
10
Concentration of chemicals (uM)

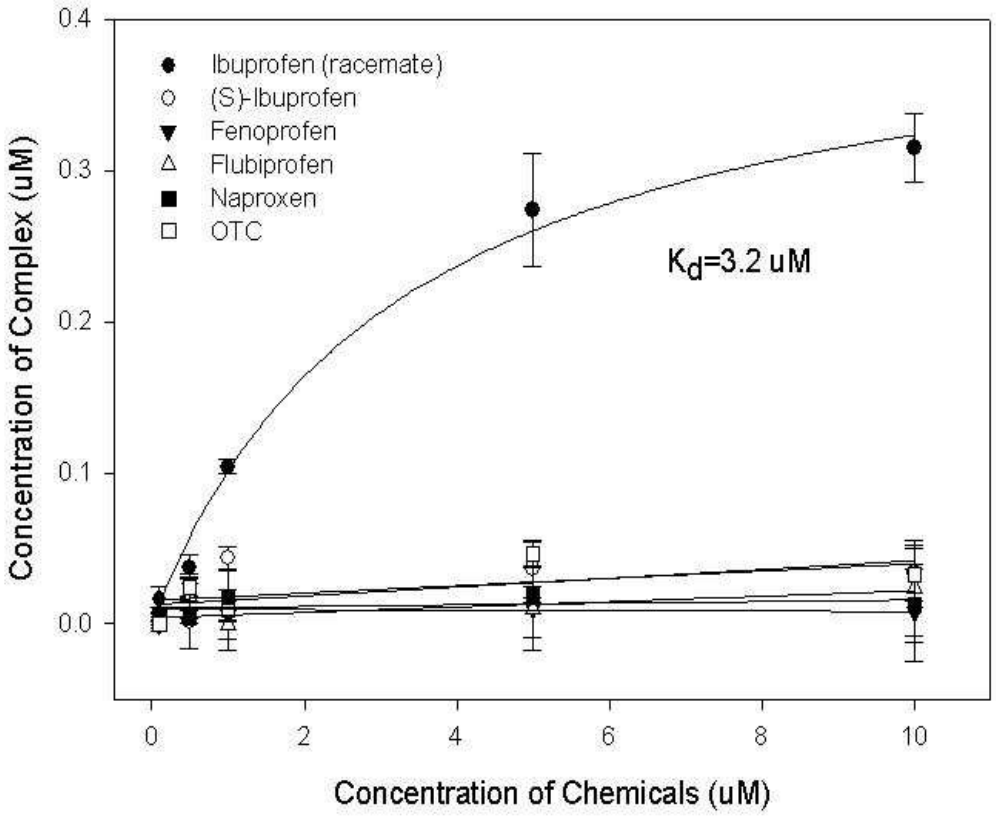
도면5d

IBA-11

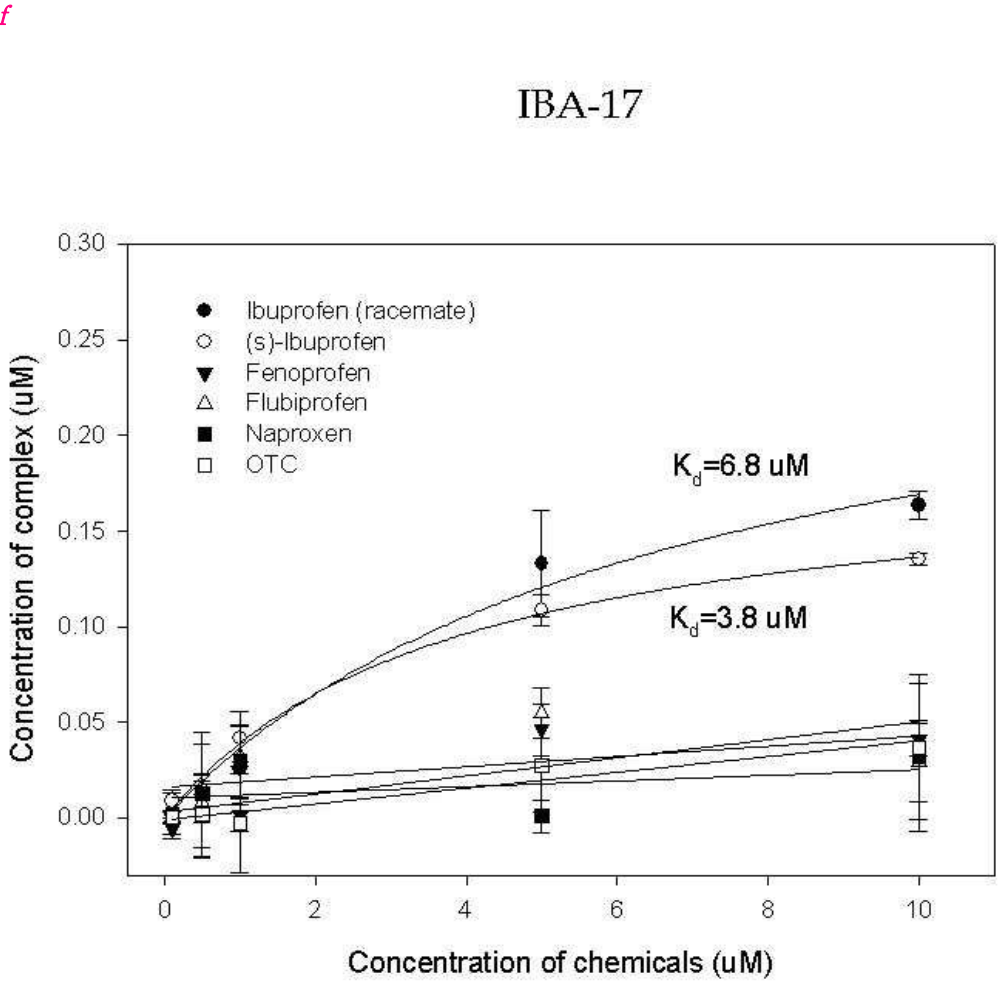

Ibuprofen (racemate)
(s)-Ibuprofen
Fenoprofen
Flubiprofen
Naproxen
OTC
K_d=5.6 uM
Concentration of complex (uM)
Concentration of chemicals (uM)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0
2
4
6
8
10

도면5e

IBA-12

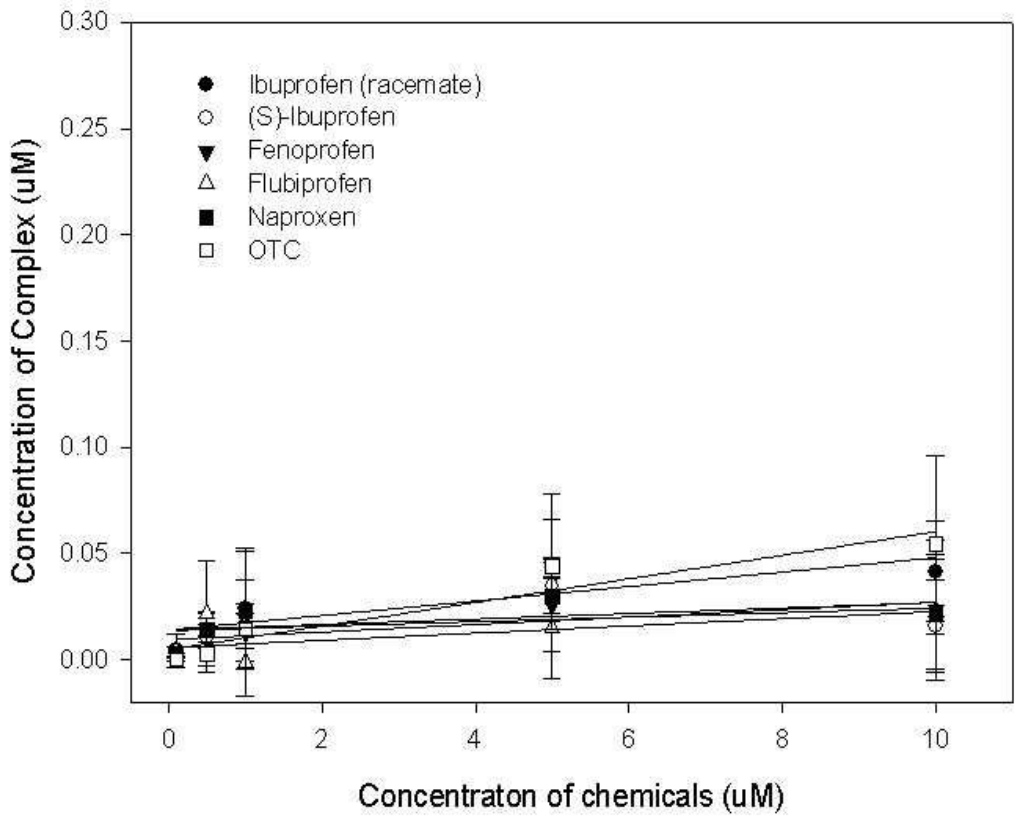

Ibuprofen (racemate)
(S)-Ibuprofen
Fenoprofen
Flubiprofen
Naproxen
OTC
K_d=3.2 uM
Concentration of Complex (uM)
Concentration of Chemicals (uM)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0
2
4
6
8
10

도면5f

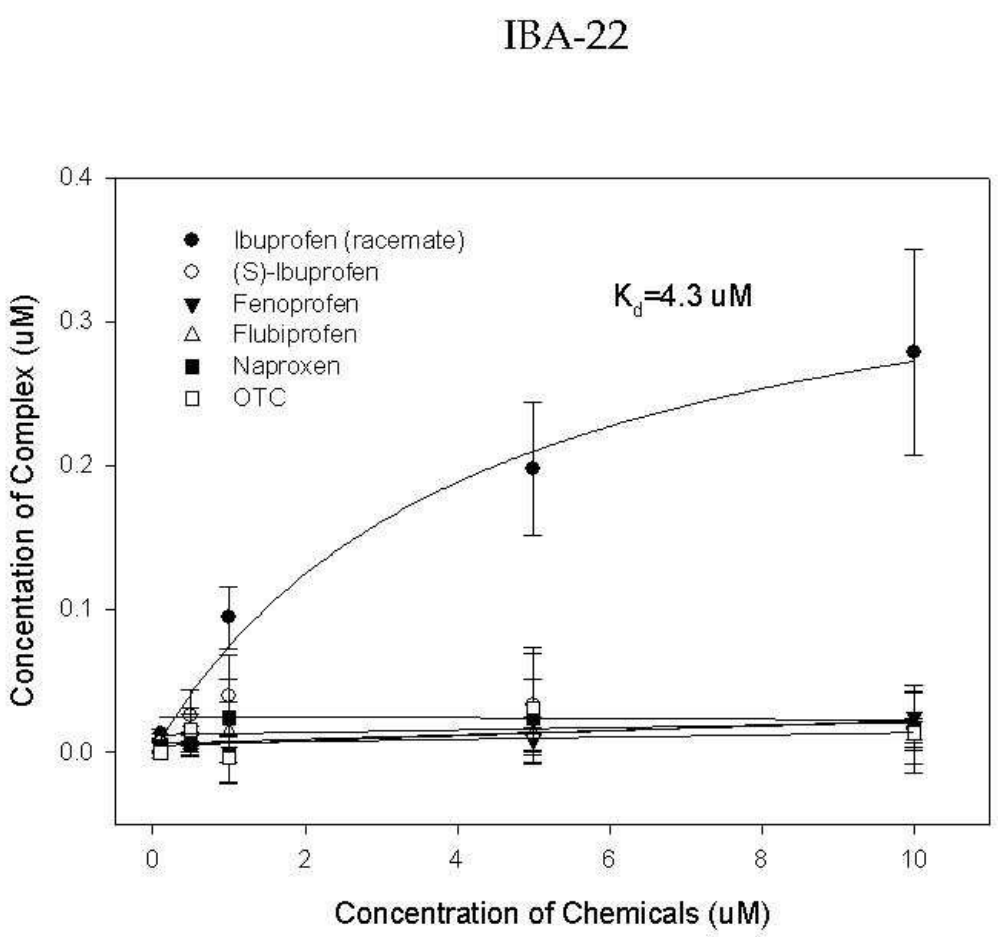

IBA-17
Ibuprofen (racemate)
(s)-Ibuprofen
Fenoprofen
Flubiprofen
Naproxen
OTC
K_d=6.8 uM
K_d=3.8 uM
Concentration of complex (uM)
Concentration of chemicals (uM)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
2
4
6
8
10

도면5g

IBA-20


0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Concentration of Complex (uM)
Ibuprofen (racemate)
(S)-Ibuprofen
Fenoprofen
Flubiprofen
Naproxen
OTC
0
2
4
6
8
10
Concentraton of chemicals (uM)

도면5h



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
<120> Enantioselective DNA aptamers for binding to ciral ibuprofen and production method thereof

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 1
ataccagctt attcaattac agtagtgagg ggtccgtcgt ggggtagttg ggtcgtggag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 2
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 2
ataccagctt attcaattgc gaacgacttc ataaaatgct ataaggttgc cctctgtcag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 3
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 3
ataccagctt attcaattac agtagtgagg ggtccgtcgt ggggtagttg ggtcgtggag 60

atatgtaagt gcaatct 77

<210> 4
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 4
ataccagctt attcaattgg atcggcgacg tgggtgtcgt gattcggggt gagatagtaa 60

gtgcaatct 69

<210> 5
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 5
ataccagctt attcaattac agtagtgagg ggtccgtcgt ggggtagttg ggtcgtggag 60

atagtaagtg caaact 76

<210> 6
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA aptamer

<400> 6
ataccagctt attcaattcc acagaccctt agctttccta ttattctgcg cgacgctgag 60

atagtaagtg caatct 76

<210> 7
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA aptamer

<400> 7
ataccagctt attcaattac agcgtgggcg gtgtcggatt ttcgtatgga tggggatgag 60

atagtaagtg caatct 76