압타머를 활용한 유해물질 검출칩 개발

Aptamer Chips for Detecting Hazard Chemicals

김 소 연

Soyoun Kim

동국대학교 화학과

Departmant of Chemistry, Dongguk University

최근 들어 압타머에 대한 관심이 높아 지고 있다. 기존의 질병치료제로서의 압타머 개발 뿐 만 아니라 각종 질병진단에도 활용도가 높아 지고 있다. 이러한 압타머는 항체를 대신 할 수 있는 단일가닥 핵산 분자로 질병 뿐 아니라 각종 화학물질, 특히 환경 및 식품 유해성 물질 검출 등 앞으로의 활용도는 무궁무진 할 수 있다. 본 기고에서는 이러한 압타머에 대한 기본적인 설명과 함께 압타머를 마커로 한 바이오칩 개발 동향에 대해서 소개 하겠다.

1. 압타머의 소개

Aptamer란 저분자 화합물로부터 단백질까지 다양한 종류의 표적 리간드에 높은 affinity 와 specificity로 결합할 수 있는 특성을 가지는 작은 (20~60 nucleotides) 핵산 (DNA 혹은 RNA) 조각을 뜻한다. (Aptamer라는 이름은 '꼭 들어맞다' 라는 뜻의 라틴어 'aptus' 에서 유래되었다.[1]) 압타머 분자의 개발은 SELEX라는 방법을 통해 *in vitro* 에서 이루어진다. SELEX는 'systematic evolution of ligands by exponential enrichment' 의 약자로서 1990년에 처음으로 개발되었는데[2], 이 방법을 이용하여 특정 분자에 높은 결합력을 갖는 핵산 압타머를 얻게 된다.

Aptamer는 표적 물질에 대해 높은 선택성과 결합력을 가진다는 점에서 항체의 특성을 가지는 핵산 분자로 여겨지고 있다. 한편 항체와 비교할 때 다음과 같은 여러가지 장점을 가지고 있다.

(1) 만드는 과정에서 조건이 까다롭지 않고 또한 비교적 작고 단순한 분자이므로 여러 가지 필요한 변형이 가능하다.
(2) 셀렉스 과정을 통해 더 선택성과 민감성이 높은 압타머를 개발할 수 있고 대량 생산도 가능하다.
(3) 화학적 합성으로 만들어지므로 순도가 높다.
(4) 동물에 주입하여 항체를 생성하기 어려운 toxin 등에 대한 압타머도 만들 수 있다.
(5) 미생물이나 단백질 제재와 달리 핵산 제재는 안정하여 실온에서 장기간 보존도 가능하다.

Corresponding author : Soyoun Kim
Departmant of Chemistry, Dongguk University 26,3 pil-dong, chung gu, seoul 100-715, korea
Tel: 82-2-2260-3840 Fax: 82-2-2268-8204
E-mail: skim99@paran.com
Home page: www.nanobiolab.com

(6) 압타머의 약물동력학적 성질을 크기의 변화 (다양한 길이의 PEG 부착등을 통한) 및 소수성의 변화 (리포좀을 이용한) 등을 통해 쉽게 변형시킬 수 있다.

(7) 현재까지의 연구를 통해 압타머는 단백질 제재에 비해 생체 내 면역반응을 거의 일으키지 않는 것으로 밝혀졌다. 이는 압타머를 이용한 부작용이 적은 분자치료제 개발이 용이함을 의미한다.

이러한 장점을 바탕으로 aptamer는 항체를 대체할 수 있는 진단 및 치료제 기술로 사료되어 현재 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 2006년 노인성 황반변성증 (age-related macular degeneration)의 치료제로 Macugen 이라는 vascular endothelial growth factor (VEGF) 에 결합, 활성을 억제하는 aptamer가 FDA 승인을 받으면서 aptamer가 단순히 유망한 미래기술이 아닌 실제 적용 가능한 기술임을 입증한 바 있다[3].

본 강의에서는 *in vitro* selection 을 통한 압타머 개발의 기본적인 개념과 그 응용의 예에 대해 기술하고자 한다. 압타머의 *in vitro* selection에 대한 구체적인 방법 및 시약/재료 등은 Marshall *et al.*[4] 과 Fitzwater and Polisky[5] 에 잘 기술되어 있다.

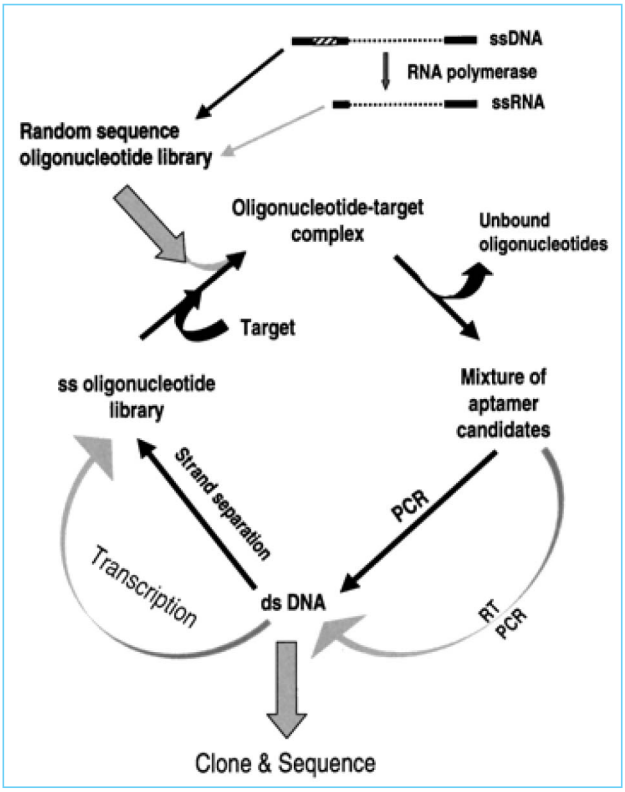


그림 1. 맨 위에 나타낸 polynucleotide 그림에서 점선부분은 만들어진 임의서열, ▬는 그 양 말단에 붙여진 공통적인 서열, ▨는 전사를 위한 primer region이다. 검은 화살표는 DNA aptamer, 밝은 화살표는 RNA aptamer의 경우의 cycle이다.[6]

2. SELEX 방법을 통한 aptamer의 선별

Aptamer는 SELEX 방법을 통해 *in vitro* 에서 선별하게 된다. SELEX 방법의 중심 원리는 많은 수의 무작위적으로 존재하는 개체 중에서 특정한 형질을 지니는 개체만이 생존하게 되고, 이렇게 생존한 개체는 그 집단 내에서 차지하는 비중이 점점 높아져 마침내 집단을 지배하게 되는 진화의 개념과 매우 유사하다. 단 SELEX 에서의 개체는 ss (single stranded)DNA 나 ssRNA 등 단일 가닥 핵산이며, selection pressure는 특정 리간드에 대한 결합력이 된다. 따라서, 먼저 많은 수의 무작위 (random) 서열을 가지는 핵산 library를 만들어야 하며, 이 library 내에 존재할 것으로 기대되는 특정 리간드에 대해 높은 결합력을 가지는 개체를 골라낼 수 있는 partitioning process 가 필요하며, 골라낸 aptamer를 증폭하여 핵산 pool 내에서의 portion을 증가시키고 다음 round의 selection을 진행할 수 있게 amplification step이 필요하게 된다. SELEX의 일반적인 과정은 그림 1에 도식화로 나타내었다.

G, A, T, C 4가지 염기의 혼합물로 solid-phase phosphoramidite chemistry를 통해 random sequence의 DNA oligomer library를 만들 수 있다. 이 때, 각 nucleotide 에 대한 phosphoroamadite 간 coupling efficiency가 조금씩 다르기 때문에 G:A:T:C = 1.15:1.5:1:1.25 의 비율로 섞은 후 합성한다. 또한, 이론적으로는 40 mer의 random sequence를 합성할 경우 $4^{20}=1.2\times10^{24}$가지의 서로 다른 서열이 존재할 것이나 실제로는 일반적인 DNA 합성 scale인 100 ug-1 mg 단위로 합

성하게 되어 10^{14}~10^{15}가지 정도의 서로 다른 서열, 즉 complexity를 가지는 라이브러리를 얻게 된다. 이렇게 만들어진 ss DNA는 수 cycle의 PCR (polymerase chain reaction)을 통해 ds(double stranded)DNA로 증폭, 변환된다.

3. 다양한 SELEX 방법의 소개

3-1: Counter-SELEX

Aptamer의 target specificity를 높이기 위해 counter-SELEX 라는 방법이 개발되었다. counter-SELEX란, 앞서 기술한 SELEX 방법을 통해 얻어낸 aptamer들 중에서 target과 거의 비슷한 구조를 가지는 표적에 대해 친화성을 가지는 aptamer 들을 제거하는 작업이다. Polisky group은 theophylline 이라는 small molecule에 선택적으로 결합하는 aptamer를 counter-SELEX 방법을 이용하여 선별하였다[11]. 이들은 40 nucleotide region의 random sequence를 가지는 library로부터 출발하여 10^{14}의 complexity를 가지는 RNA pool을 제조하였다. 이 RNA pool을 1-carboxypropyl (CP) theophylline이 cross-link 되어 있는 Sepharose 컬럼에 흘린 후 컬럼에 결합한 RNA를 0.1 M theophylline solution 으로 elution 시켰다. 이러한 방법에 보다 높은 stringency를 도입하기 위하여 이들은 0.1 M theophylline 으로 elution 하기 바로 전 단계에 theophylline과 구조가 매우 유사한 caffeine 0.1 M solution 으로 washing 하는 과정을 추가하였다. Theophylline과 caffeine 은 methyl (CH_3-) group 하나의 구조적 차이밖에 가지지 않으나 counter-SELEX 방법을 통해 이들은 두 분자에 대한 결합력(dissociation constant로 측정)이 10,000배 이상 차이 나는 aptamer를 선별할 수 있었다. 이러한 방법으로 *in vitro* selection의 modification이 가능하므로 항체 등의 고전적 reagents에 비해 target-specificity가 증가된 aptamer를 획득할 수 있다.

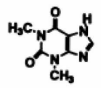
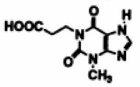
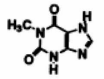
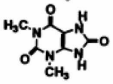
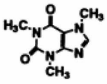
Compound	Structure	K_d(c) (μM)	K_d(c)/K_d(t)
Theophylline		0.32 ± 0.13	1
CP-theophylline		0.93 ± 0.20	2.9
Xanthine		8.5 ± 0.40	27
1-Methylxanthine		9.0 ± 0.30	28
3-Methylxanthine		2.0 ± 0.7	6.3
7-Methylxanthine		> 500	>1500
3,7-Dimethylxanthine		> 500	> 1500
1,3-Dimethyluric acid		> 1000	>3100
Hypoxanthine		49 ± 10	153
Caffeine		3500 ± 1500	10,900

그림 2. Theophylline-binding aptamer의 substrate specificity[11]

3-2: Toggle SELEX

일반적으로 SELEX 과정을 통해 선별된 aptamer는 표적물질에 대해 높은 선택성을 지니게 된다. 예를 들어 사람의 단백질에 대해 선별된 aptamer의 경우 생쥐에 존재하는 homologous 한 단백질은 잘 인지하지 못할 수도 있다. 이러한 점은 실제 aptamer 기반 drug development 과정에서 pre-clinical animal model study 를 수행할 때 그 in vivo efficacy 를 감소시키는 결과로 나타날 수 있다. 따라서 종(species)간 cross-reactivity를 가지는 aptamer의 개발이 시도되었다. Sullenger 그룹은 Toggle SELEX 라는 방법을 이용하여 human thrombin과 porcine thrombin을 동시에 인지할 수 있는 aptamer를 선별하였다[12].

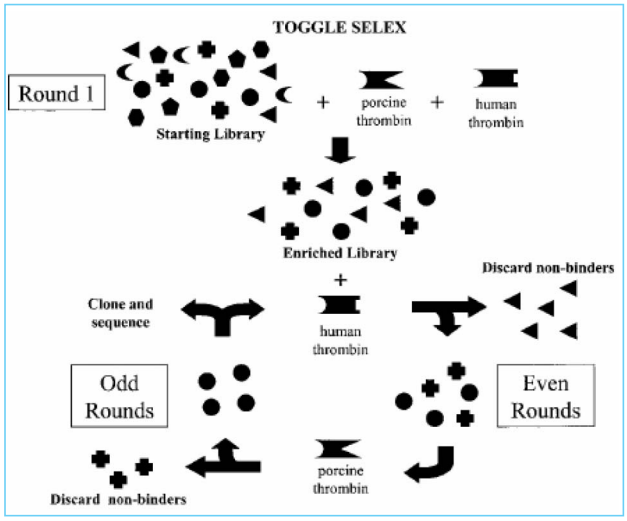


그림 3. Toggle SELEX[12].

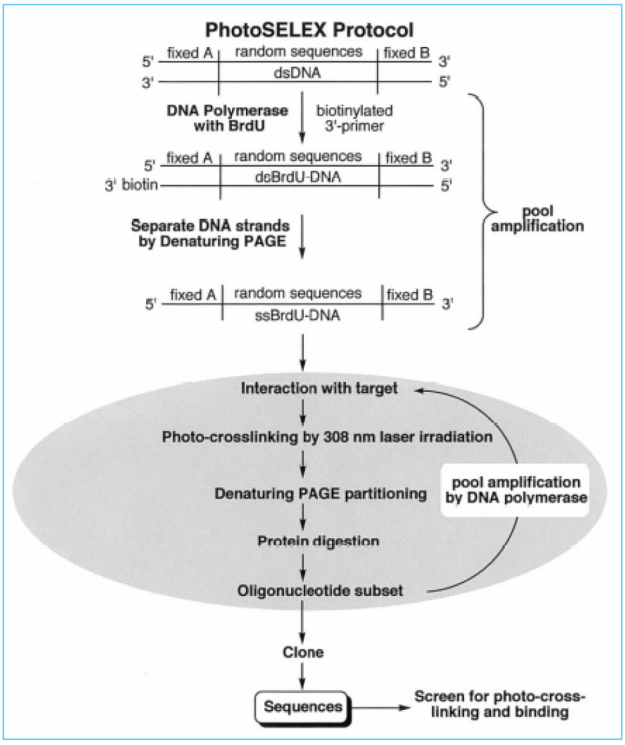


그림 4. PhotoSELEX 의 Scheme[13]

Toggle SELEX 방법에서는 표적 단백질로 human origin과 porcine origin 을 round 별로 번갈아 가며 사용함으로써 ("toggling") homologous한 이종간의 단백질에 동시에 높은 친화도로 결합할 수 있는 aptamer를 선별할 수 있었다. 이러한 방법은 *in vitro* assay 와 in vivo animal model study 상에서 동일한 aptamer molecule을 사용 가능하게 함으로써 aptamer 기반 신약 개발 과정의 단순화 및 효율성을 향상시킬 것으로 기대된다.

3-3: PhotoSELEX

Gold *et al.*[14] 및 Koch *et al.*[13] 은 ssDNA를 이용한 SELEX 방법을 변형시킨 photoSELEX 방법을 개발하고 이를 통해 photoaptamer를 선별하였다. Photoaptamer란 특정 파장(UV range)의 빛을 쬐어 줄 경우 aptamer와 표적 단백질 간에 crosslinking이 일어나 공유 결합이 형성될 수 있는 aptamer를 말한다. Photoaptamer를 찾기 위한 photoSELEX 방법에서는 deoxythymidine (dT)이 5-iododeoxyuridine (IdU)나 5-bromodeoxyuridine (BrdU)로 치환된 단일 가닥 DNA library를 사용하여 SELEX를 진행한다. 이들 modified base를 가지고 있는 random DNA library와 표적 단백질을 섞은 후 308 nm의 빛을 쬐어 주면 aptamer의 modified base와 단백질의 reactive amino acid (Tyr, Trp, His, Phe, Cys, Met or Thr) 간에 crosslinking이 일어나 공유 결합을 형성하게 된다. 일단 공유 결합이 형성되면 harsh washing condition에서도 aptamer와 단백질간의 결합이 유지되기 때문에 photoaptamer를 표적 단백질 검출 sensor로 활용할 경우 매우 높은 signal-to-noise ratio를 구현할 수 있는 장점이 있다. 현재 다양한 종류의 photoaptamer들이 개발되고 있으며 이들을 이용한 질병 진단 chip/sensor의 개발 또한 진행되고 있다.

3-4: Cell SELEX

Cell SELEX 란 정제된 단백질을 대상으로 하는 SELEX 방법과 달리 세포 전체를 대상으로 SELEX를 수행함으로써 세포의 표면에 존재하는 단백질이나 구조에 가장 결합력이 높은 aptamer를 선별하는 방법을 말한다. 이 방법

은 주로 특정한 질병 세포를 인지하고자 하나 그와 관련된 표적 단백질을 알지 못하는 경우에 유용하게 활용될 수 있다. Goringer 그룹은 trypanosome 세포 전체를 표적으로 SELEX를 수행하여 유충에는 결합하지 않고 성충 trypanosome에 강한 결합력을 보이는 aptamer를 확보할 수 있었다[15]. 현재 이 그룹은 확보한 압타머를 이용하여 trypanosome의 진단 및 선택적 약물전달의 도구로 활용하기 위한 연구를 계속 수행 중이다. Gold 그룹은 glioblastoma 세포주인 U251 세포 전체를 타겟으로 한 cell SELEX를 수행하여 높은 결합력을 보이는 aptamer를 골라낸 후 이 aptamer의 표적 단백질을 affinity chromatography 방법으로 찾음으로써 세포 표면의 단백질인 tenascin-C가 aptamer에 의해 인지되는 단백질이라는 것을 밝혀내었다[16].

현재 대부분의 세포 표면 수용체에 대한 aptamer 개발은 대장균등에서 과 발현을 통해 정제된 단백질을 이용하여 이루어지고 있다. 그러나 치료제로서 이상적인 aptamer는 post-translational modification등이 이루어진 상태인 생체 내 단백질의 원형을 인지할 수 있어야 한다. 현재는 이를 위해 표적 단백질을 insect cell등에서 발현시킴으로써 glycosylation등의 modification을 어느 정도 가진 표적에 대한 셀렉스를 수행하고 있으나 가장 이상적인 것은 실제 인간세포에서의 변형을 완벽하게 갖춘 표적 단백질에 대한 aptamer를 개발하는 것이다. 이와 같은 세포내 원형 그대로의 표적 단백질에 대한 압타머를 확보하는 방법으로 앞에서 언급한 cell SELEX 방법을 사용할 수 있다. 그러나 단순히 cell SELEX를 수행할 경우 세포 표면에 포진한 수용체 및 표면 단백질들의 종류가 너무나 복잡, 다양하여 원하는 표적 수용체 단백질에 결합하는 압타머를 골라내기 어렵다. Cerchia *et al.*[17] 은 RET receptor tyrosine kinase에 결합하는 aptamer를 선별하기 위하여 RET receptor를 overexpression 시키는 세포를 먼저 제조한 후 이 세포에는 결합하나 동일한 세포이면서 RET receptor를 발현하지 않는 세포에는 결합하지 않는 aptamer를 counter SELEX 방법을 이용하여 확보하였다. 이러한 방법은 glycosylation등이 정상적으로 이루어진 표적 단백질에 대한 aptamer를 얻을 수 있기 때문에 향후 많은 응용이 이루어질 것으로 예상된다.

4. 압타머를 활용한 바이오칩의 개발

압타머는 항체와 마찬가지로 바이오칩의 마커로서 binding-based assay 을 이용하여 질병진단 및 유해물질 detection 의 특이도를 증가 시키는 센서로 이용될 수 있다. 이를 위해서는 우선 다양한 검출 물질에 대한 다양한 방법으

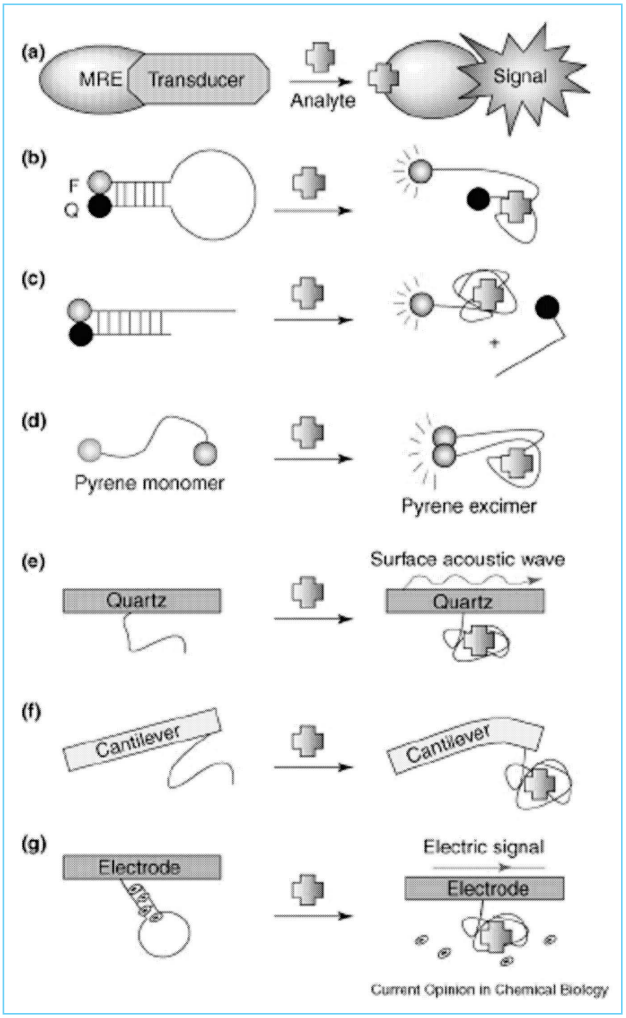


그림 5. 압타머를 이용한 다양한 센서의 예 [18]

로의 압타머 based assay 을 개발 하여야 한다. 아래 그림은 그 에세이들의 일 예를 보여주고 있다. [18]

참고 문헌

[1] A.D. Ellington, and J.W. Szostak, *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature 346 (1990) 818-22.

[2] C. Tuerk, and L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science 249 (1990) 505-10.

[3] N.S. Que-Gewirth, and B.A. Sullenger, Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers. Gene Ther 14 (2007) 283-91.

[4] K.A. Marshall, and A.D. Ellington, *In vitro* selection of RNA aptamers. Methods Enzymol 318 (2000) 193-214.

[5] T. Fitzwater, and B. Polisky, A SELEX primer. Methods Enzymol 267 (1996) 275-301.

[6] S.D. Jayasena, Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. Clin Chem 45 (1999) 1628-50.

[7] P.E. Burmeister, S.D. Lewis, R.F. Silva, J.R. Preiss, L.R. Horwitz, P.S. Pendergrast, T.G. McCauley, J.C. Kurz, D.M. Epstein, C. Wilson, and A.D. Keefe, Direct *in vitro* selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. Chem Biol 12 (2005) 25-33.

[8] A.D. Ellington, and J.W. Szostak, Selection *in vitro* of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. Nature 355 (1992) 850-2.

[9] N.C. Pagratis, Rapid preparation of single stranded DNA from PCR products by streptavidin induced electrophoretic mobility shift. Nucleic Acids Res 24 (1996) 3645-6.

[10] R. Beinoraviciute-Kellner, G. Lipps, and G. Krauss, *In vitro* selection of DNA binding sites for ABF1 protein from Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett 579 (2005) 4535-40.

[11] R.D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky, High-resolution molecular discrimination by RNA. Science 263 (1994) 1425-9.

[12] R. White, C. Rusconi, E. Scardino, A. Wolberg, J. Lawson, M. Hoffman, and B. Sullenger, Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX. Mol Ther 4 (2001) 567-73.

[13] M.C. Golden, B.D. Collins, M.C. Willis, and T.H. Koch, Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers. J Biotechnol 81 (2000) 167-78.

[14] K.B. Jensen, B.L. Atkinson, M.C. Willis, T.H. Koch, and L. Gold, Using *in vitro* selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein to high-affinity RNA ligands. Proc Natl Acad Sci U S A 92 (1995) 12220-4.

[15] M. Homann, and H.U. Goringer, Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. Nucleic Acids Res 27 (1999) 2006-14.

[16] D.A. Daniels, H. Chen, B.J. Hicke, K.M. Swiderek, and L. Gold, A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003) 15416-21.

[17] L. Cerchia, F. Duconge, C. Pestourie, J. Boulay, Y. Aissouni, K. Gombert, B. Tavitian, V. de Franciscis, and D. Libri, Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase. PLoS Biol 3 (2005) e123.

[18] Camille L.A. Hamula; Jeffrey W. Guthrie; Hongquan Zhang; Xing-Fang Li; X. Chris Le, Selection and analytical applications of aptamers Trends in Analytical Chemistry 25 (2006) 681-91.