

압타머 개발 및 활용에 대한 최근 동향



KAIST 정기준 교수, 정구민 박사

1. 개요

압타머 (Aptamer)는 “fitting”이라는 뜻을 가지는 라틴어 “aptus”와 그리스 접미사 “-mer”의 합성어로, 특정 물질에 대해 특이적 결합 능력을 가지는 DNA를 일컫는다 [1]. Stem, loop, hairpin, quadraplex 등 고유의 3차 구조를 가지며 조합된 구조에 따라 단백질, 바이러스, 펩타이드 뿐만 아니라 저분자 유기물에도 결합능을 가진다 [2]. 압타머는 주로 1990년 Larry Gold 연구팀과 Andrew Ellington 연구팀에 의해 개발된 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 방법을 이용하여 발굴되어 왔다 [3]. 이와 같은 방법을 통해 발굴된 압타머는 항체와 비교될 수 있을만한 높은 친화도를 ($K_D \sim pM$) 가지기 때문에 항체의 대체물질로서 각광받아왔다 [4]. DNA 또는 RNA인 압타머는 단백질인 항체 분자에 비해 열적, 화학적 안정성이 높으며 내구성 역시 뛰어나기 때문에 의약적 목적뿐만 아니라 진단 등의 체외 활용에도 쉽게 이용될 수 있다는 장점을 가지고 있다 [5]. 그리고 주로 동물세포에서 생산이 진행되기 때문에 생산성이 낮은 항체에 비해 대량 생산이 용이하기 때문에 생산 용이성과 수가 측면에서 우위에 있다고 할 수 있다. 압타머는 화학적인 합성을 통해 생산될 수 있기 때문에 배양 및 정제를 통해 생산되는 항체에 비해 생산 시간이 짧아 생산 용이성이 크게 증대될 수 있다. 또한 배양 과정에 따라 항체의 성질이 달라질 수 있는 것에 비하여 화학적 합성을 통해 주로 생산되는 압타머의 경우 거의 변함 없는 품질을 유지할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그리고 압타머의 경우 개발 중 생체를 이용하지 않아도 되기 때문에 생체에 유해한 표적 물질에 대해 결합 능력을 가지는 압타머 개발이 용이하다. 이러한 개발 및 생산 측면에

서의 장점들과 동시에 압타머는 임상 적용시에도 많은 가치를 가지고 있다. 기존의 단백질 기반 의약품에서 빈번히 나타나는 면역 거부반응을 거의 일으키지 않는 것으로 알려져 있기 때문에 치료용 의약품 개발에 있어 기존 단백질 의약품에 비해 큰 우위를 가진다고 할 수 있다 [6].

2014년 기준 전세계 의약품 시장 규모는 약 7810억 달러로 추산되고, 바이오 의약품은 그 중에 1790억 달러의 규모를 가지는 것으로 나타났다 [7]. 특히 항체 의약품 시장 규모의 경우 2015년 기준으로 600억 달러를 상회하는 것으로 나타나 의약품 시장에서 차지하는 비중이 상당히 높음을 알 수 있다. 기존 항체를 효과적으로 대체할 수 있는 물질인 압타머에 대한 관심이 증대되고, 개발 및 실용화에 대한 연구가 활발히 진행되고있는 시점이기 때문에 본 보고서에서는 압타머의 개발 및 활용 동향에 대해 고찰해보고자 한다.

2. 압타머 개발 연구 동향

개요에서 밝힌 바와 같이 압타머는 주로 SELEX와 같은 방법을 통해 개발되어 왔다. 고전적인 SELEX의 경우 합성을 통한 압타머 라이브러리를 구축하고, 해당 라이브러리를 표적 물질이 코팅된 비드에 노출하여 결합 능력을 가진 압타머의 결합을 유도하는 것으로 시작된다 (그림 1) [4]. 다음으로, 압타머가 결합된 비드 (bead)만을 선별적으로 취한 후, 압타머를 다시 분리 (elution)하여 회수한

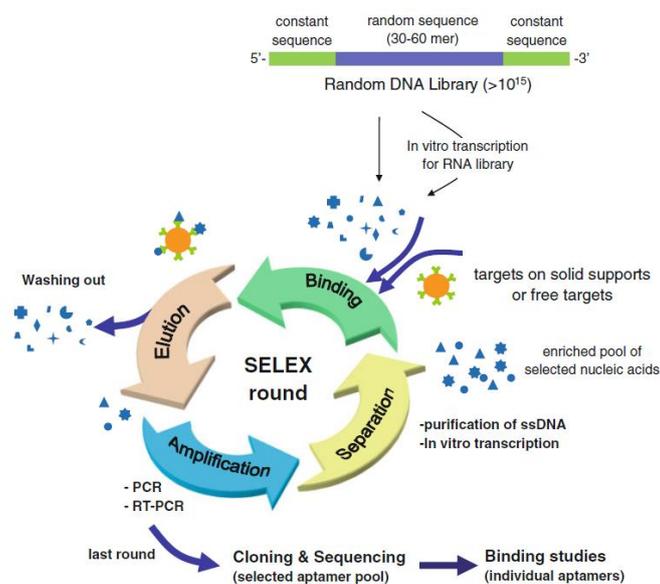


그림 1 압타머 발굴을 위한 일반적인 SELEX 과정 [4]

다. 회수된 압타머는 PCR을 통해 다시 증폭되며, 증폭된 DNA를 다시 표적 물질에 노출하여 앞선 과정을 10~20회 가량 반복하여 표적 물질에 대해 강력한 결합 활성을 가지는 압타머를 선별하게 된다. 최종적으로 얻어진 압타머는 PCR을 통해 증폭된 후, 염기 서열 분석과 결합 활성 분석에 적용됨으로써 발굴이 이루어질 수 있다.

하지만 이와 같은 고전적인 SELEX 방법은 여러가지 단점을 가지고 있다. 우선 강력한 활성을 지니는 압타머의 발굴을 위해 지나치게 많은 반복 횟수가 요구되기 때문에 실험이 매우 복잡하고, 많은 시간과 노력을 요구한다는 단점이 있다. 새로운 표적 물질이 제시되었을 때 신속한 대처를 위해 빠른 시일 내에 새로운 압타머가 개발되어야 하는 상황에서 큰 약점으로 작용할 수 있기 때문에 개선이 요구되는 점으로 알려져 있다. 또한 그와 같은 복잡한 실험 방법과 작은 오류도 PCR에 의해 크게 증폭될 수 있기 때문에 숙달된 연구자만이 원활히 진행할 수 있다는 점 역시 단점으로 지적되어 왔다. 그리고 표적 물질을 비드에 코팅 또는 결합하기 위하여 표적 물질에 대한 수정이 불가피하다는 점 역시 고전적인 SELEX의 문제점으로 알려져 있다. 특히 저분자 물질의 경우 비드에 대한 결합을 위해 수정이 이루어질 경우 물성이 크게 바뀔 수 있어 기존의 SELEX를 활용하기 어려울 수 있다.

위와 같은 고전적인 SELEX의 문제점을 보완하기 위해 많은 연구자들이 개선된 SELEX에 대한 연구를 진행하였다. 그 성과로 FluMag SELEX, capillary electrophoresis SELEX (CE SELEX), Single microbead SELEX, MonoLEX, Cell SELEX등이 개발되었고, 최근에는 Graphene oxide SELEX (GO SELEX)가 개발되었다 [8-13]. 우선 FluMag SELEX의 경우 기존 SELEX에서 분리 단계 중 압타머의 양을 정량하는것에 활용되었던 방사성 물질 대신 형광 물질을 표지하여 정량을 쉽고 빠르게 개량한 SELEX 방식이다. 때문에 각 라운드마다 비드에 축적된 압타머의 양을 쉽게 정량할 수 있고, 그로부터 추가적인 스크리닝 라운드 진행 여부를 쉽게 결정할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 더불어 자성을 가지는 비드를 이용하여 스크리닝을 진행하였기 때문에 기존의 원심분리에 의존한 스크리닝에 비해 편리하고 빠르게 결합 능력을 가지는 압타머를 분리할 수 있다. 또 다른 방식인 CE SELEX는 압타머가 표적 물질과 결합하였을 때 모세관 상의 전기영동에서 이동성이 변화함을 이용하여 원하는 압타머와 원하지 않는 압타머를 효과적으로 분리할 수 있는 방법이다 (그림 2). 표적 물질에 결합할 수 있는 압타머와 그렇지 않은 것을 명확히 구분하여 취할 수 있기 때문에 압타머 발굴에 요구되는

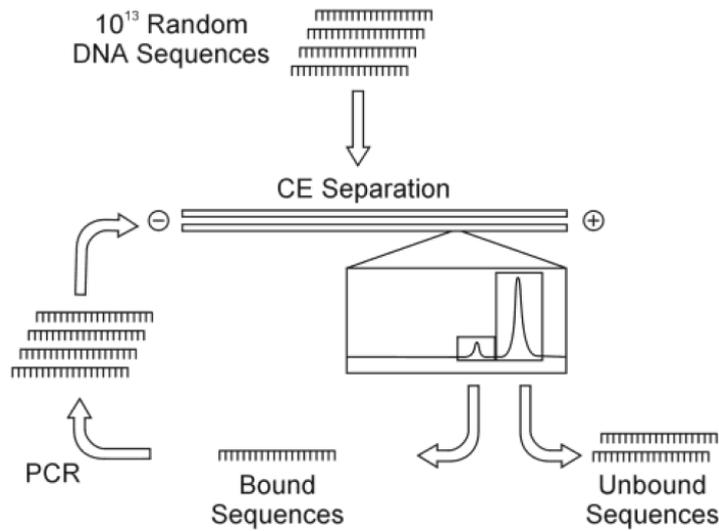


그림 2 CE SELEX를 이용한 aptamer 발굴 과정 [9]

스크리닝 라운드의 숫자를 현격히 줄일 수 있다는 장점을 가지고 있다. 다른 aptamer 개발 기술인 MonoLEX의 경우도 CE SELEX와 유사하게 표적물질에 결합할 수 있는 aptamer를 선택적으로 취할 수 있다는 장점을 가지는 기술로 보고되었다. 표적 물질이 코팅된 레진 (resin)을 컬럼 (column)에 충전한 후, 그것에 aptamer 라이브러리를 적용하여 레진에 결합된 aptamer만을 효과적으로 회수하여 CE SELEX와 유사하게 스크리닝 라운드를 현격히 줄이는 효과를 얻을 수 있었다. 또 다른 aptamer 발굴 방법인 Cell SELEX는 치료용 aptamer 발굴에 있어 유용한 기술로 사용될 수 있는 방법이다. 기존 SELEX의 경우 특정 항원 또는 세포막 단백질에 결합할 수 있는 aptamer를 발굴하기 위해 고순도로 정제된 표적 단백질을 필요로 하지만 Cell SELEX의 경우 표적으로 하는 세포 자체를 사용하여 스크

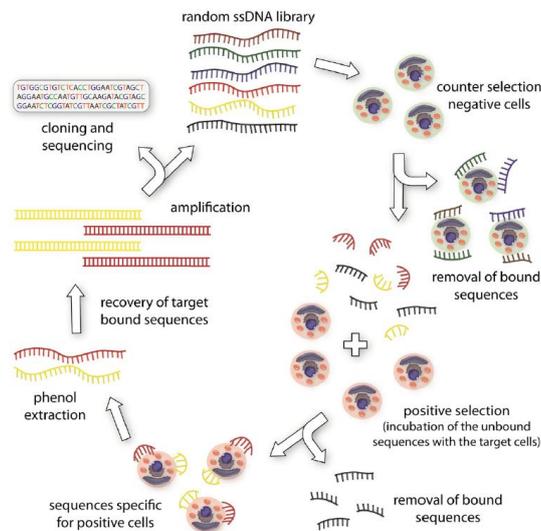


그림 3 치료 목적의 aptamer 발굴을 위한 Cell SELEX 과정 [12]

리닝이 진행되기 때문에 발굴된 압타머를 향후 실제 치료 목적으로 사용하였을 때 실현 가능성이 높은 발굴 방식이라 할 수 있다 (그림 3). 최근 개발된 방식으로는 GO SELEX가 있는데, 이는 graphene oxide와 DNA 또는 RNA에 존재하는 방향족 고리 사이에서 일어나는 π - π stacking을 이용하여 표적 물질에 더욱 특이적이고, 강력한 결합 능력을 가지는 압타머를 빠른 시간 안에 효율적으로 발굴해낼 수 있는 방법이다. 압타머 라이브러리를 표적 물질과 graphene oxide에 동시에 노출시켜 graphene oxide에 의한 흡착력을 이겨내고 표적 물질과 강력한 결합을 이룰 수 있는 압타머만을 손쉽게 분리할 수 있기 때문에 기존의 다른 SELEX 방식보다 강력하고 특이적인 결합 능력을 가지는 압타머를 분리하기에 용이하다 (그림 4). 덧붙여 언급된 방식을 변형하여 표적 물질 유사체에 대한 결합 능력을 가지지 않는 경우에 대해서도 스크리닝이 가능하다.

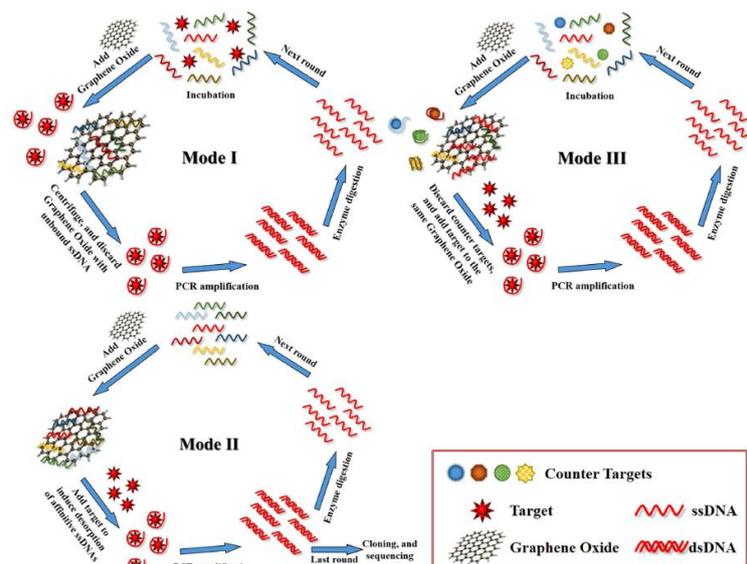


그림 4 Graphene oxide를 이용한 SELEX [13]

최근에는 SELEX를 개량하는 대신 초고속 스크리닝 시스템인 flow cytometry를 이용한 새로운 압타머 발굴 기술이 활발히 연구되고 있다 [14,15]. 그와 같은 기술들은 에멀전 (emulsion) PCR이라는 방식에 크게 의존하고 있다. 에멀전 PCR은 물 속에 미세한 기름 에멀전을 형성한 후, 에멀전 내에서 PCR을 진행하여 비드 표면에 압타머를 다수 디스플레이 하는 방법이다. 이 방법을 이용하여 제작된 압타머-비드 복합체를 형광 표지된 표적 물질에 노출한 후, flow cytometry를 이용하여 높은 형광을 가지는 압타머만을 회수할 수 있다 (그림 5). 각각의 압타머-비드 복합체에 대한 형광값을 실시간으로 모니터링 할 수 있으며 수많은 복합체에 대해 빠른 속도로 스크리닝을 진행할 수 있는 방법이다. 본 방법 외에도 금속 이온을 표적 물질로 선정하여 별도의 수정 과정 없이 바로 flow

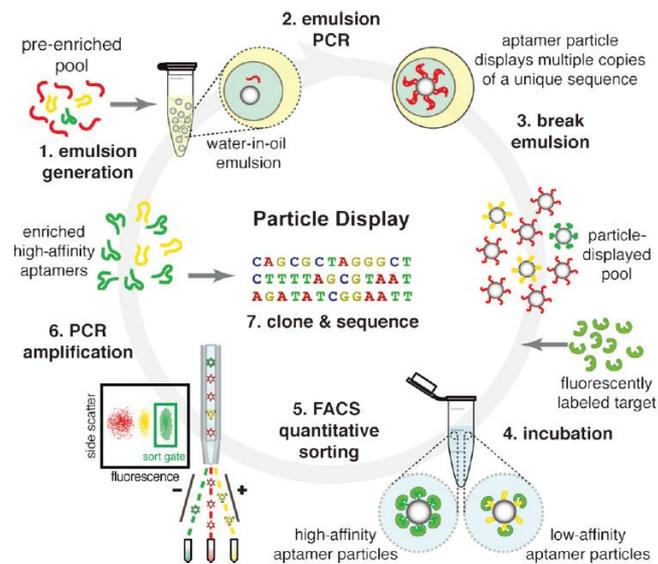


그림 5 Emulsion PCR과 flow cytometry를 이용한 aptamer 개발 과정 [14]

cytometry를 이용하여 스크리닝 할 수 있는 방법도 개발되었다. 이는 분자량이 극히 작은 물질에 대한 스크리닝을 진행할 때 약점을 보였던 기존의 SELEX에 비해 매우 큰 장점을 가지는 방법이라 할 수 있다.

3. aptamer의 활용

aptamer는 앞서 언급된 바와 같이 항체와 같은 표적 물질에 대한 특이적 결합 능력을 가지기 때문에 항체가 응용되는 분야에 거의 동일하게 사용될 수 있다. 때문에 aptamer는 항체가 사용되는 조직 염색, 바이오 이미징 (bioimaging), 의약품, 그리고 진단 용도로 쉽게 응용될 수 있다.

특히 치료 목적으로서 이용되는 경우 Cell SELEX 방법을 이용하여 개별적인 질병 치료에 유용하게 활용될 수 있다. 일례로, 암 치료에 있어 Cell SELEX 방법을 도입하여 aptamer를 선별하게 되면 기존에 알려진 바이오마커 외에 종양 세포 표면에 디스플레이 된 다양한 바이오마커를 표적으로 하는 aptamer를 선별할 수 있다 [12]. 그리고 비교적 작은 크기를 가지는 aptamer는 생체내, 생체외 환경에서의 바이오 이미징을 진행하는것에 있어 항체에 비해 큰 장점을 가진다. aptamer는 높은 조직 투과능력을 가지며, 신장을 통해 배출되는 속도가 빠르기 때문에 기존 항체가 가지는 낮은 조직 투과능력과 낮은 배출속도로 인해 발생하는 면역학적 문제와 부작용을 방지할 수 있다 [16]. aptamer를 이용

한 바이오 이미징은 aptamer와 형광 리포터 (reporter)가 결합된 aptamer-리포터 복합체를 이용하여 진행되는데, 대표적인 예시로 aptamer의 양 끝 말단에 형광 리포터와 형광을 흡수할 수 있는 소광 물질 (quencher)을 결합한 복합체를 이용한 방식이 있다. 표적 종양 세포에 결합하지 않았을 경우 소광 물질이 형광을 흡수하기 때문에 형광을 띄지 않다가 aptamer가 종양 세포에 결합하여 세포 내의 리소좀 (lysosome)에 의해 분해되면 형광 리포터가 소광 물질로부터 해방되어 형광을 나타내는 방식이다 (그림 6).

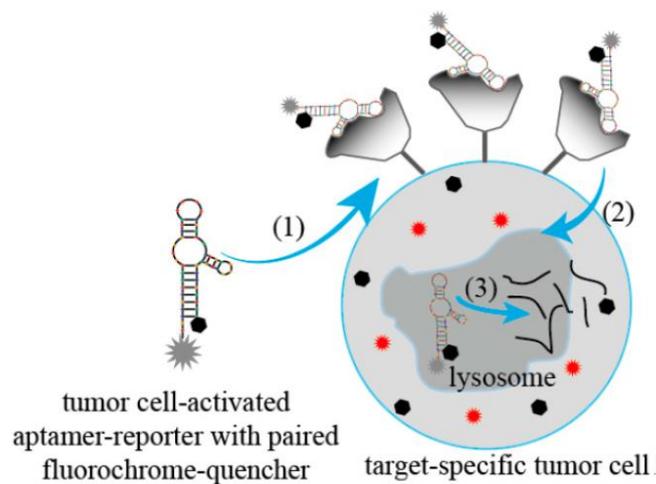


그림 6 aptamer를 이용한 종양 세포 표적 바이오 이미징 방법 [5]

이들 aptamer를 통한 새로운 바이오 이미징 기술을 개발한 결과 aptamer-리포터 복합체가 길게는 24 시간이 넘는 시간 동안 신체 내에서 안정적으로 존재하며 신호를 낼 수 있는 것을 확인하였다.

치료와 바이오 이미징 목적으로의 응용 외에 aptamer가 진단 목적으로 활용되는 것에 대한 연구 역시 매우 활발히 진행되고 있다. 체외 진단에 대한 세계 시장 규모는 2014년 기준 약 522억달러에 이르고 있으며 연평균 8.24%의 높은 성장률을 보이며 증가하고 있는 추세이다 [17]. 특히 항체-항원 반응에 의존하는 면역 화학적 진단에 대한 시장은 진단 시장에서 40%의 시장 점유율을 차지하고 있기 때문에 항체에 비해 큰 장점을 가지고 있는 aptamer를 사용할 경우 그 파급 효과가 매우 클 것이라 예상되어 활발한 연구가 진행되고 있다. aptamer는 단백질인 항체보다 열적, 화학적 안정성이 뛰어나며 재생 (regeneration) 과정이 매우 간단하며 aptamer에 손상을 입히지 않기 때문에 진단 분야에 응용함에 있어 매우 뛰어난 성질을 가지고 있다고 할 수 있다. 또한 민감한 진단을 위한 형광 표지 등의 수정이 항체보다 매우 용이하며 신호 증폭에 가장 유용한 PCR에 적용 가능하다는 점 때문에

초고감도 진단에 있어 유리한 고지를 점하고 있다. 지금까지 이와 같은 특징을 가지는 압타머를 활용한 다양한 방식의 진단 시스템이 개발되어 왔는데, 그들 중 가장 대표적인 사례들을 간략히 언급 하도록 하겠다.

우선 가장 간단하지만 압타머의 특성을 가장 잘 살릴 수 있는 방법으로는 형광 리포터와 소광 물질을 이용한 진단 방식이다. 압타머 분자내 결합 또는 분자간 결합을 이용하여 소광 상태로 머물던 탐침 (probe)을 표적 물질에 노출하였을 때 소광 물질로부터 해방된 형광 리포터가 형광을 냄으로써 진단이 이루어질 수 있다 (그림 7).

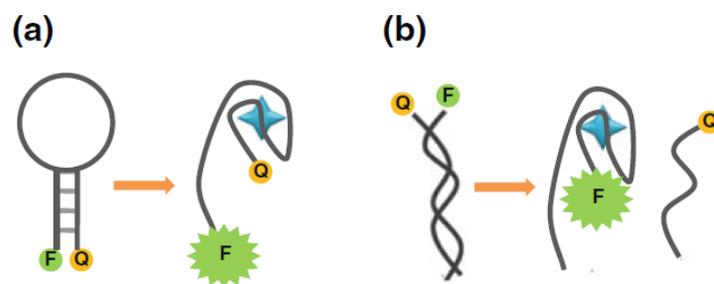


그림 7 형광 리포터와 소광 물질을 이용한 진단 시스템 [4]

형광을 이용한 진단 시스템은 고감도의 진단이 가능하지만 신호 검출을 위한 장비가 대부분 복잡하고 부피가 크다는 단점을 가지고 있다. 때문에 육안으로 확인될 수 있는 비색 반응 (colorimetric reaction)을 이용한 진단 시스템에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 비색 반응을 이용한 진단 시스템은 다양한 방법으로 제작될 수 있는데, 압타머를 이용하였을 때 가장 유용하게 사용할 수 있는 수단으로 DNAzyme이 있다. DNAzyme은 DNA임에도 불구하고 효소와 같은 촉매 반응을 일으킬 수 있는 것을 일컫는데, 이를 이용하여 표적 물질에 대해 결합함과 동시에 비색 반응을 유도할 수 있는 압타머 복합체를 만들어 진단에 응용할 수 있다. 이와 다른 방식으로는 압타머-금속 나노파티클 (metal nanoparticle) 복합체를 이용한 진단 시스템이 있다. 압타머의 말단에 화학적 합성 방법을 통해 다양한 작용기를 추가하여 압타머를 금속 나노파티클에 부착하고, 그를 이용하여 표적 물질을 시각적으로 검출하는 시스템을 구축할 수 있다. 표적 물질과의 결합 후에 금속 나노파티클의 응집 현상을 이용하여 상당히 높은 감도를 가지는 진단 시스템을 구축할 수 있기 때문에 다양한 연구 및 개발 활동이 진행 중인 분야라고 할 수 있다.

4. 고찰

지금까지 논의한 바와 같이 압타머의 개발 방법과 개발된 압타머를 활용한 치료 및 진단 목적으로의 활용 방안에 대한 연구가 매우 활발히 이루어지고 있다. 하지만 여전히 개발 단계에 존재하는 비효율성과 실제 치료 및 진단에 적용하는것에 있어 최적화 과정이 필요한 실정이기 때문에 이에 대한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것이다. 기존 항체에 비해 생산 수가가 낮고 안정성이 높은 압타머에 대한 연구가 완벽하게 이루어졌을 때, 압타머가 치료와 진단 시장에 미치는 파급효과는 매우 대단할 것으로 예측된다.

5. 참고문헌

1. 정기준, 장승훈 (2008) 압타머 (Aptamer) 개발의 최근 연구 동향
2. Patel DJ, Suri AK, Jiang F, Jiang LC, Fan P, Kumar RA, Nonin S (1997) Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *Journal of molecular biology* 272(5):645-664
3. Ellington AD, Szostak JW (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346(6287):818-822
4. Kim YS, Gu MB (2014) Advances in aptamer screening and small molecule aptasensors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 140:29-67
5. Sun H, Zu Y (2015) A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules* 20(7):11959-11980
6. Eyetech Study G (2002) Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* 22(2):143-152
7. EvaluatePharma (2016) World Preview 2016, outlook to 2022
8. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B (2005) FluMag-SELEX as an advantageous method for

DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem* 383(1):83-91

9. Mendonsa SD, Bowser MT (2004) In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Analytical chemistry* 76(18):5387-5392

10. Tok JBH, Fischer NO (2008) Single microbead SELEX for efficient ssDNA aptamer generation against botulinum neurotoxin. *Chem Commun* 28(16):1883-1885

11. Nitsche A, Kurth A, Dunkhorst A, Panke O, Sielaff H, Junge W, Muth D, Scheller F, Stocklein W, Dahmen C, Pauli G, Kage A (2007) One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX. *BMC biotechnology* 7: 48-59

12. Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T (2015) Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv* 33(6):1141-1161

13. Gu HJ, Duan N, Wu SJ, Hao LL, Xia Y, Ma XY, Wang ZP (2016) Graphene oxide-assisted non-immobilized SELEX of okadaic acid aptamer and the analytical application of aptasensor. *Scientific reports* 6:21665-21673

14. Wang JP, Gong Q, Maheshwari N, Eisenstein M, Arcila ML, Kosik KS, Soh HT (2014) Particle Display: A Quantitative Screening Method for Generating High-Affinity Aptamers. *Angew Chem Int Edit* 53(19):4796-4801

15. Qu H, Csordas AT, Wang JP, Oh SS, Eisenstein MS, Soh HT (2016) Rapid and Label-Free Strategy to Isolate Aptamers for Metal Ions. *ACS nano* 10(8):7558-7565

16. Xiang DX, Shigdar S, Qiao G, Wang T, Kouzani AZ, Zhou SF, Kong LX, Li Y, Pu CW, Duan W (2015) Nucleic Acid Aptamer-Guided Cancer Therapeutics and Diagnostics: the Next Generation of Cancer Medicine. *Theranostics* 5(1):23-42

17. 연구성과실용화진흥원 (2016) 체외 진단기기 시장 동향