



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년02월09일
(11) 등록번호 10-2360517
(24) 등록일자 2022년02월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 471/06 (2006.01) C07D 471/04 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 471/06 (2013.01)
C07D 471/04 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7034525
- (22) 출원일자(국제) 2015년05월11일
심사청구일자 2020년04월29일
- (85) 번역문제출일자 2016년12월08일
- (65) 공개번호 10-2017-0003984
- (43) 공개일자 2017년01월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/030097
- (87) 국제공개번호 WO 2015/172134
국제공개일자 2015년11월12일
- (30) 우선권주장
61/990,913 2014년05월09일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020140023755 A
KR1020130008283 A
US20110178280 A1
WO2013036743 A1

- (73) 특허권자
바이오서치 테크놀로지즈, 인크.
미국, 94954-6904 캘리포니아, 페탈루마, 사우스 맥도웰 블러버드 2199
- (72) 발명자
레딩턴, 마크
미국, 캘리포니아 94118, 샌프란시스코, 395 유클 리드 애비뉴, 아파트 102
쿡, 로날드, 엠.
미국, 캘리포니아 94947, 노바토, 7 메도 레인
소위스, 벤
미국, 캘리포니아 94952, 페탈루마, 101 2가, 아파트 206
- (74) 대리인
한라특허법인(유한)

전체 청구항 수 : 총 20 항

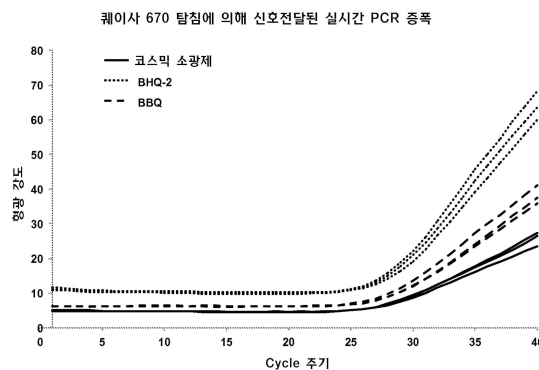
심사관 : 김영국

(54) 발명의 명칭 코스믹 소광제

(57) 요약

본 발명은 여기 상태 에너지의 소광제, 상기 소광제를 포함하는 탐침 및 다른 접합체, 및 이들의 사용 방법을 제공한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6818 (2018.05)

C12Q 1/686 (2018.05)

C12Q 2561/113 (2019.08)

C12Q 2565/101 (2013.01)

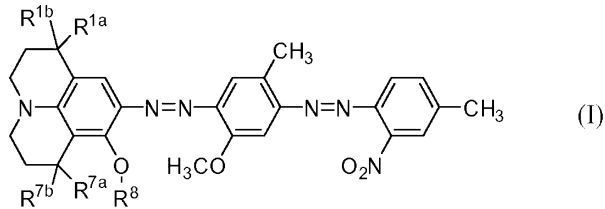
명세서

청구범위

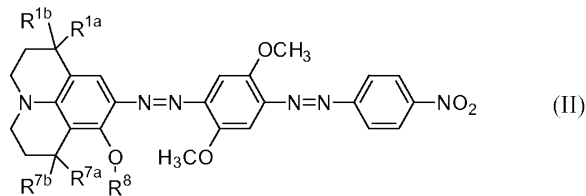
청구항 1

하기 화학식 I 또는 II에 따른 구조를 갖는 화합물:

[화학식 I]



[화학식 II]



상기 식들에서,

R^{1a} , R^{1b} , R^{7a} , 및 R^{7b} 은 각각 독립적으로 H, 치환되거나 비치환된 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 및 C_6 알킬이며;

R^8 은 H, $\text{---}L^X-R^X$ 및 $\begin{matrix} R^S \\ | \\ \text{---}C^X \\ | \\ R^X \end{matrix}$ 중에서 선택되고; 여기에서

L^X 는 결합, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬 및 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬 중에서 선택되고;

L^{XS} 는 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬 및 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬 중에서 선택되고;

R^S 는 보호되거나 비보호된 반응성 작용기, 결합 부위 및 고체 지지체 중에서 선택되고;

R^X 는 보호되거나 비보호된 반응성 작용기 및 결합 부위 중에서 선택되고;

각각의 결합 부위는 뉴클레오사이드, 뉴클레오사이드에 대한 링커, 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드에 대한 링커, 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드에 대한 링커, 핵산, 핵산에 대한 링커, 담체 분자, 담체 분자에 대한 링커, 고체 지지체, 및 고체 지지체에 대한 링커 중에서 독립적으로 선택된 일원에 공유 결합된다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

R^{1a} 및 R^{1b} 가 비치환된 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 및 C_6 알킬 중에서 독립적으로 선택되는 화합물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

R^{1a} 및 R^{1b} 가 각각 메틸인 화합물.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

R^{7a} 및 R^{7b} 가 각각 H인 화합물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

R^{7a} 및 R^{7b} 가 비치환된 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 및 C_6 알킬 중에서 독립적으로 선택되는 화합물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

R^{7a} 및 R^{7b} 가 각각 메틸인 화합물.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

R^{1a} 및 R^{1b} 가 각각 H인 화합물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

R^{1a} , R^{1b} , R^{7a} 및 R^{7b} 가 비치환된 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 및 C_6 알킬 중에서 독립적으로 선택되는 화합물.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

R^{1a} , R^{1b} , R^{7a} 및 R^{7b} 가 각각 메틸인 화합물.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

L^X 가 비치환된 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 및 C_{10} 알킬 중에서 선택되는 화합물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

L^{XS} 가 치환된 헤테로알킬인 화합물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

R^X 가 포스포아미다이트, -OH, -ODMT, -COOH, 활성 에스테르 및 -NH₂ 중에서 선택되는 화합물.

청구항 13

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

R^S 가 -OH, -ODMT, 및 고체 지지체에 대한 링커에 공유 결합된 결합 부위 중에서 선택되는 화합물.

청구항 14

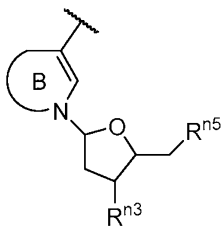
제 13 항에 있어서,

R^X 가 포스포아미다이트, -OH, -ODMT, -COOH, 활성 에스테르 및 $-NH_2$ 중에서 선택되는 화합물.

청구항 15

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

R^X 가 뉴클레오사이드에 대한 링커에 공유 결합된 결합 부위이며, 상기 뉴클레오사이드가 하기의 구조를 갖는 화합물:



상기 식에서,

고리 표지된 B는 핵염기이고;

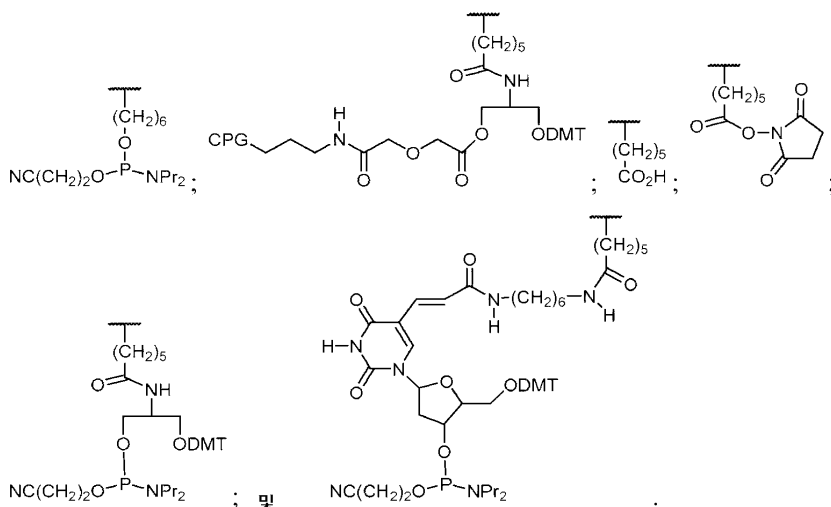
R^{n3} 은 -OH 또는 포스포아미다이트이고;

R^{n5} 는 -OH 또는 -ODMT이다.

청구항 16

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

R^8 이 하기 중에서 선택되는 화합물:



청구항 17

핵산 표적 서열의 검출 방법으로,

(a) 상기 표적 서열을 단일 가닥 표적 결합 서열을 포함하는 검출제 핵산과 접촉시키고, 상기 검출제 핵산은 상

기 핵산에 결합된

i) 형광단; 및

ii) 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 화합물[여기에서 R⁸은 상기 검출제 핵산에 공유 결합된(직접적으로 또는 링커를 통해) 결합 부위를 포함한다]

을 가지며; 상기 검출제 핵산은 상기 형광단이 여기될 때 상기 형광단과 상기 화합물 간의 공여체-수용체 에너지 전달을 허용하는 입체구조로 존재하고;

(b) 상기 표적 결합 서열을 상기 표적 서열에 하이브리드시키고, 이에 의해 상기 검출제 핵산의 입체구조를 변경시켜 형광 매개변수의 변화를 유발시키고;

(c) 상기 형광 매개변수의 변화를 검출하고, 이에 의해 상기 핵산 표적 서열을 검출할 수 있는 방법을 포함하는 방법.

청구항 18

제1 핵산 및 제2 핵산이 하이브리드화하는지를 확인하는 방법으로, 상기 제1 핵산이 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 화합물[여기에서 R⁸은 상기 제1 핵산에 공유 결합된(직접적으로 또는 링커를 통해) 결합 부위를 포함한다]을 포함하며,

(a) 상기 제1 핵산을 상기 제2 핵산과 접촉시키고;

(b) 상기 제1 핵산, 상기 제2 핵산 및 이들의 조합 중에서 선택된 일원의 형광 성질의 변경을 검출하고, 이에 의해 상기 하이브리드화가 발생하는지의 여부를 확인함

을 포함하는 방법.

청구항 19

핵산 증폭 반응을 모니터링하는 방법으로,

(a) i) 형광단; 및

ii) 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 화합물[여기에서 R⁸은 검출제 핵산에 공유 결합된(직접적으로 또는 링커를 통해) 결합 부위를 포함한다]

이 결합된 검출제 핵산을 포함하는 증폭 반응 혼합물을 제조하고;

(b) 상기 증폭 반응 혼합물에 증폭 조건을 가하고;

(c) 상기 검출제 핵산으로부터의 형광 신호에 대해서 상기 반응 혼합물을 모니터링하여 분석 결과를 획득하고;

(d) 상기 분석 결과를 사용하여 핵산 증폭 반응을 모니터링함

을 포함하는 방법.

청구항 20

표적 서열의 증폭을 검출하는 방법으로,

(a) 상기 표적 서열을 포함하는 샘플 핵산을 상기 표적 서열에 인접한 PCR 프라이머와 하이브리드화시키고;

(b) 상기 하이브리드화된 프라이머를 폴리머라제로 연장시켜 PCR 생성물을 생성시키고, 상기 PCR 생성물의 2개 가닥을 분리시켜 상기 표적 서열의 센스 및 안티센스 가닥을 접근이 용이하게 만들고;

(c) 검출제 핵산을 상기 PCR 생성물 중의 표적 서열의 센스 또는 안티센스 가닥에 하이브리드화시키며, 여기서 상기 검출제 핵산은

i) 상기 PCR 생성물 중의 표적 서열의 센스 또는 안티센스 가닥의 적어도 일부에 상보성이고 상기 PCR 프라이머 사이의 영역에 하이브리드화하는 단일 가닥 표적 결합 서열;

ii) 형광단; 및

iii) 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 화합물[여기에서 R⁸은 상기 검출제 핵산에 공유 결합된(직접적으로 또는 링커를 통해) 결합 부위를 포함한다]

을 포함하고; 상기 검출제 핵산이 상기 표적 서열에 하이브리드화하기에 앞서, 상기 형광단이 여기될 때 상기 형광단과 상기 화합물 간의 공여체-수용체 에너지를 전달을 허용하는 입체구조로 존재하며;

상기에 의해, 상기 검출제 핵산의 입체구조를 변경시켜 형광 매개변수의 변화를 유발시키고;

(d) 상기 형광 매개변수의 변화를 측정하여 상기 표적 서열 및 그의 증폭을 검출할 수 있는 방법을 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호참조

[0002] 본 출원은 35 USC 119(e) 하에서 2014년 5월 9일자로 출원된 미국 가 출원 제 61/990,913 호의 이점을 청구하며, 상기 출원은 모든 목적을 위해 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.

배경 기술

[0003] .

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 여기 상태 에너지의 소광제, 상기 소광제를 포함하는 탐침 및 다른 접합체, 및 이들의 사용 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 여기 상태 에너지의 소광제, 상기 소광제를 포함하는 탐침 및 다른 접합체, 및 이들의 사용 방법을 제공한다. 본 발명의 다른 목적, 이점 및 태양들은 하기의 상세한 기재로부터 자명하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0006] 도 1은 본 발명의 예시적인 화합물들을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 예시적인 화합물들의 합성을 개략하는 도해이다.

도 3은 실시간 PCR 분석에서 웨이사 670-코스믹 소광제, 웨이사 670-BHQ2 및 웨이사 670-BBQ 탐침에 대한 증폭 자취를 나타낸다.

도 4는 실시간 PCR 분석에서 웨이사 705-코스믹 소광제 및 웨이사 705-BHQ2 탐침에 대한 증폭 자취를 나타낸다.

도 5a 내지 도 5b. 도 5a는 뉴클레아제 절단 분석에서 웨이사 670-코스믹 소광제, 웨이사 670-BHQ2, 웨이사 670-BBQ, 웨이사 705-코스믹 소광제 및 웨이사 705-BHQ2 탐침에 대한 형광 강도를 나타낸다. 도 5b는 뉴클레아제 절단 분석에서 웨이사 670-코스믹 소광제, 웨이사 670-BHQ2, 웨이사 670-BBQ, 웨이사 705-코스믹 소광제 및 웨이사 705-BHQ2 탐침에 대한 신호 대 소음 비를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0007] 약어

[0008] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "BHQ"는 일반적으로 하나 이상의 다이아조 결합을 포함하는 다크(dark) 소광제, 및 구체적으로 "블랙홀 소광제(상표)"를 지칭한다. 예시적인 BHQ는 미국특허 제 7,019,129 호에 기재되어 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "FET"는 "형광 에너지 전달"을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는

바와 같은 "FRET"는 "형광 공명 에너지 전달"을 지칭한다. 이들 용어는 본 명세서에서 복사 및 비-복사 에너지 전달 과정을 모두 지칭하는데 사용된다. 예를 들어, 광자가 방출되는 과정 및 긴 범위의 전자 전달을 수반하는 과정이 이들 용어내에 포함된다. 본 명세서 전체를 통해서, 이들 현상은 모두 "공여체-수용체 에너지 전달"이란 일반적인 용어하에 포함된다. "SNP"는 "단일 뉴클레오타이드 다형성"을 지칭한다.

[0009] 정의

[0010] 하기의 정의들을 본 명세서에서 하기에 제시되는 본 발명의 각각의 실시태양에 광범위하게 적용한다. 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 통상적인 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에 사용되는 명명법 및 하기에 기재되는 세포 배양, 분자 유전학, 유기 화학 및 핵산 화학 및 하이브리드화의 실험 과정들은 당해 분야에 주지되고 통상적으로 사용되는 것들이다. 핵산 및 펩타이드 합성에 표준 기법이 사용된다. 분자 생물학 기법 및 과정은 당해 분야의 통상적인 방법 및 다양한 일반적인 참고문헌들에 따라 일반적으로 수행된다(일반적으로 문헌 [Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.](본 발명에 참고로 인용된다)을 참조하시오). 본 명세서에 사용되는 명명법 및 분석 화학 및 유기 합성의 실험 과정들은 당해 분야에 주지되고 통상적으로 사용되는 것들이다. 화학 합성 및 화학 분석에 표준 기법 또는 그의 변형이 사용된다.

[0011] "알킬"이란 용어는 단독으로 또는 또 다른 치환체의 부분으로서, 달리 서술되지 않는 한, 지시된 수의 탄소 원자(즉 C₁-C₁₀은 1 내지 10개의 탄소를 의미한다)를 갖는, 완전히 포화되거나, 단일- 또는 다중불포화될 수 있고 1-, 2- 3- 및 4-가 라디칼을 포함할 수 있는 직쇄- 또는 분지-쇄, 또는 환상 탄화수소 라디칼, 또는 이들의 조합을 의미한다. 포화된 탄화수소 라디칼의 예는 비제한적으로 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소프로필, n-부틸, t-부틸, 아이소부틸, 2급-부틸, 사이클로헥실, (사이클로헥실)메틸, 사이클로프로필메틸, 예를 들어 n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등의 동족체 및 이성질체와 같은 기를 포함한다. 불포화된 알킬기는 하나 이상의 이중결합 또는 삼중결합을 갖는 것이다. 불포화된 알킬기의 예는 비제한적으로 비닐, 2-프로페닐, 크로틸, 2-아이소펜테닐, 2-(부타다이에닐), 2,4-펜타다이에닐, 3-(1,4-펜타다이에닐), 에틸닐, 1- 및 3-프로피닐, 3-부티닐, 및 보다 고급의 동족체 및 이성질체를 포함한다. "알킬"이란 용어는 달리 나타내지 않는 한, 하기에 보다 상세히 정의되는 알킬의 유도체들, 예를 들어 "헤테로알킬"을 또한 임의로 포함한다. 탄화수소기로 제한되는 알킬기는 "호모알킬"을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "알킬"이란 용어는 알킬, 알케닐 및 알킬닐 부분들을 지칭하며, 이들은 각각 적합한 경우 원자가 요건을 충족시키기 위해 1-, 2- 또는 다가 종들일 수 있다. 알킬기는 예를 들어 본 명세서에서 "알킬기 치환체"로서 지칭되는 하나 이상의 기로 임의로 치환된다.

[0012] "알킬렌"이란 용어는 단독으로 또는 또 다른 치환체의 부분으로서 알킬 부분으로부터 유도된 2가 라디칼을 의미하며, 비제한적으로 -CH₂CH₂CH₂CH₂-에 의해 예시되고 하기에 "헤테로알킬렌"으로서 기재되는 기를 추가로 포함한다. 전형적으로, 알킬(또는 알킬렌)기는 1 내지 24개의 탄소 원자를 가질 것이며, 10개 이하의 탄소 원자를 갖는 기가 본 발명에서 바람직할 것이다. 알킬렌 및 헤테로알킬렌 링커기의 경우, 상기 링커기의 배향은 임의로 상기 링커기의 화학식이 작성된 방향에 의해 암시되지 않는다. 예를 들어, 화학식 -C(O)₂R'-는 -C(O)₂R'- 및 임의로 -R'(CO)₂-를 나타낸다. "저급 알킬" 또는 "저급 알킬렌"은 일반적으로 8, 7, 6, 5 이하의 탄소 원자를 갖는 단쇄 알킬 또는 알킬렌기이다.

[0013] "알콕시", "알킬아미노" 및 "알킬티오"(또는 티오알콕시)란 용어들은 그들의 통상적인 의미로 사용되며, 각각 산소 원자, 아미노기 또는 황 원자를 통해 분자의 나머지에 부착된 알킬기들을 지칭한다.

[0014] "헤테로알킬"이란 용어는 단독으로 또는 또 다른 용어와 함께, 달리 서술되지 않는 한, 서술된 수의 탄소 원자 및 B, O, N, Si 및 S로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 적어도 하나의 헤테로원자로 이루어지는 안정한 직쇄- 또는 분지-쇄, 또는 환상 알킬 라디칼을 의미하며, 여기에서 상기 헤테로원자는 임의로 산화될 수 있고 상기 질소 원자는 임의로 4급화될 수 있다. 상기 헤테로원자(들)는 헤테로알킬기의 임의의 내부 위치에 또는 쇠의 말단에, 예를 들어 상기 알킬기가 상기 분자의 나머지에 부착되는 위치에 놓일 수 있다. "헤테로알킬"기의 예는 비제한적으로 -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃, 및 -CH=CH-N(CH₃)-CH₃을 포함한다. 2개 이상의 헤테로원자가 연속될 수 있다, 예를 들어 -CH₂-NH-OCH₃ 및 -CH₂-O-Si(CH₃)₃이 있을 수 있다. 유사하게, "헤테로알킬렌"이란 용어는 단독으로 또는 또 다른 치환체의 부분으로서 치환되거나 비치환된 2가 헤테로알킬 라디칼을 지

칭하며, 비제한적으로 $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ 및 $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ 에 의해 예시된다. 헤테로알킬렌기의 경우, 헤테로원자는 또한 쇠 말단 중 어느 하나 또는 양쪽 말단 모두를 차지할 수 있다(예를 들어 알킬렌옥시, 알킬렌다이옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌다이아미노 등).

[0015] "사이클로알킬" 및 "헤테로사이클로알킬"이란 용어는 단독으로 또는 다른 용어들과 함께, 달리 서술되지 않는 한, 각각 "알킬" 및 "헤테로알킬"의 환상 버전을 나타낸다. 추가로, 헤테로사이클로알킬의 경우, 헤테로원자가 상기 헤테로사이클이 분자의 나머지에 부착되는 위치를 차지할 수 있다. 사이클로알킬의 예는 비제한적으로 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 1-사이클로헥세닐, 3-사이클로헥세닐, 사이클로헵틸 등을 포함한다. 헤테로사이클로알킬의 예는 비제한적으로 1-(1,2,5,6-테트라하이드로피리디닐), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-모르폴리닐, 3-모르폴리닐, 테트라하이드로퓨란-2-일, 테트라하이드로퓨란-3-일, 테트라하이드로티엔-2-일, 테트라하이드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐 등을 포함한다.

[0016] "할로" 또는 "할로겐"이란 용어는 단독으로 또는 또 다른 치환체의 부분으로서, 달리 서술되지 않는 한, 불소, 염소, 브롬 또는 요오드 원자를 의미한다. 추가로, "할로알킬"과 같은 용어는 모노할로알킬 및 폴리할로알킬을 포함하고자 한다. 예를 들어, "할로(C₁-C₄)알킬"이란 용어는 비제한적으로 트라이플루오로메틸, 2,2,2-트라이플루오로에틸, 4-클로로부틸, 3-브로모프로필 등을 포함하고자 한다.

[0017] "아릴"이란 용어는 달리 서술되지 않는 한, 함께 축합되거나 또는 공유 결합되는 단일 고리 또는 다중 고리(바람직하게는 1 내지 3개의 고리, 이 중 하나 이상은 임의로 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬이다)일 수 있는 다중불포화된 방향족 치환체를 의미한다. "헤테로아릴"이란 용어는 N, O 및 S 중에서 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하는 아릴기(또는 고리)를 지칭하며, 여기에서 상기 질소 및 황 원자는 임의로 산화되고 상기 질소 원자(들)는 임의로 4급화된다. 헤테로아릴기는 헤테로원자를 통해 분자의 나머지에 부착될 수 있다. 아릴 및 헤테로아릴기의 비제한적인 예는 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-바이페닐, 1-피롤릴, 2-피롤릴, 3-피롤릴, 3-피라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 피라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-아이소옥사졸릴, 4-아이소옥사졸릴, 5-아이소옥사졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-퓨릴, 3-퓨릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-피리디닐, 3-피리디닐, 4-피리디닐, 2-피리미디닐, 4-피리미디닐, 5-벤조티아졸릴, 퓨리닐, 2-벤즈이미다졸릴, 5-인돌릴, 1-아이소퀴놀릴, 5-아이소퀴놀릴, 2-퀴놀살리닐, 5-퀴놀살리닐, 3-퀴놀릴 및 6-퀴놀릴을 포함한다. 상기 나타난 아릴 및 헤테로아릴 고리 시스템 각각의 치환체는 하기에 기재된 "아릴기 치환체"의 그룹 중에서 선택된다.

[0018] 간략히, "아릴"이란 용어는 다른 용어와 함께 사용될 때(예를 들어 아릴옥시, 아릴티옥시, 아릴알킬) 상기에 정의된 바와 같은 호모아릴 및 헤테로아릴 고리를 모두 임의로 포함한다. 따라서, "아릴알킬"이란 용어는 아릴기가, 탄소 원자(예를 들어 메틸렌기)가 예를 들어 산소 원자(예를 들어 페녹시메틸, 2-피리디닐옥시메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필 등)에 의해 치환된 알킬기를 포함하여 알킬기(예를 들어 벤질, 펜에틸, 피리디메틸 등)에 부착된 라디칼들을 임의로 포함한다.

[0019] 상기 알킬 및 헤테로알킬 라디칼(중중 알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 사이클로알케닐 및 헤테로사이클로알케닐로서 지칭되는 것들을 포함한다)에 대한 치환체는 일반적으로 "알킬기 치환체"로서 지칭되며, 비제한적으로 0 내지 (2m'+1) 범위의 수(여기에서 m'는 상기와 같은 라디칼 중의 전체 탄소 원자 수이다)로 -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -할로겐, -SiR'R'R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R"', -NR'C(O)₂R', -NR-C(NR'R'R'')=NR"', -NR-C(NR'R'R'')=NR"', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R", -NRSO₂R', -CN 및 -NO₂ 중에서 선택되는 다양한 기 중 하나 이상일 수 있다. R', R", R"' 및 R''''는 각각 바람직하게는 독립적으로 수소, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 예를 들어 1 내지 3개의 할로겐으로 치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시기, 또는 아릴알킬기를 지칭한다. 본 발명의 화합물이 하나 초과 R기를 포함하는 경우, 예를 들어 상기 각각의 R기는 하나 초과 R기 존재하는 경우의 각각의 R', R", R"' 및 R''''기와 같이 독립적으로 선택된다. R' 및 R"가 동일한 질소 원자에 부착되는 경우, 이들은 상기 질소 원자와 함께 5-, 6- 또는 7-원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, -NR'R"는 비제한적으로 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하고자 한다. 상기 치환체의 논의로부터, 당해 분야의 숙련가는 "알킬"이란 용어가 수소 이외의 기에 결합된 탄소 원자를 갖는 기, 예를 들어 할로알킬(예를 들어 -CF₃ 및 -CH₂CF₃) 및 아실(예를 들어 -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ 등)을 포함하는 것으로 이해할 것이다. 예시적인 알킬기 치환체는 본 명세서에서 "반응성 작용기" 및 "결합 부위"로서 언급되는 것들을 포함한다. 다양한 실시태양에서, 상기 알킬기 치환

체는 인-함유 부분, 예를 들어 포스포다이에스테르 또는 포스포다이에스테르 변형, 예를 들어 본 명세서에 기재된 것들이다.

[0020] 알킬 라디칼에 대해 기재된 치환체들과 유사하게, 상기 아릴 및 헤테로아릴기에 대한 치환체를 일반적으로 "아릴기 치환체"라 칭한다. 예시적인 치환체는 방향족 고리 시스템상의 0 내지 개방 원자간의 총 수 범위의 수소 알킬기 치환체 및 다른 것들, 예를 들어 할로겐, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -SiR'R'R'", -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R", -NR"C(O)₂R', -NR-C(NR'R'R")=NR", -NR-C(NR'R')=NR", -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R", -NRSO₂R', -CN 및 -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, 플루오로(C₁-C₄)알콕시, 및 플루오로(C₁-C₄)알킬의 목록 중에서 선택되며, 이때 R', R", R"' 및 R""는 바람직하게는 독립적으로 수소, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬, 치환되거나 비치환된 아릴 및 치환되거나 비치환된 헤테로아릴 중에서 독립적으로 선택된다. 본 발명의 화합물이 하나 초과 R기를 포함하는 경우, 예를 들어 상기 각각의 R기는 하나 초과 R기가 존재하는 경우의 각각의 R', R", R"' 및 R""기와 같이 독립적으로 선택된다.

[0021] 상기 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접한 원자상의 치환체들 중 2개는 화학식 -T-C(O)-(CRR')_q-U(여기에서 T 및 U는 독립적으로 -NR-, -O-, -CRR'- 또는 단일 결합이고, q는 0 내지 3의 정수이다)의 치환체에 의해 임의로 치환될 수 있다. 한편으로, 상기 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접 원자상의 치환체들 중 2개는 화학식 -A-(CH₂)_r-B(여기에서 A 및 B는 독립적으로 -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- 또는 단일 결합이고, r은 1 내지 4의 정수이다)의 치환체로 임의로 치환될 수 있다. 그렇게 형성된 새로운 고리의 단일 결합들 중 하나는 이중 결합으로 임의로 치환될 수 있다. 한편으로, 상기 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접 원자상의 치환체들 중 2개는 화학식 -(CRR')_s-X-(CR'R'')_d(여기에서 s 및 d는 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, X는 -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂- 또는 -S(O)₂NR'-이다)의 치환체로 임의로 치환될 수 있다. 치환체 R, R', R" 및 R"'는 바람직하게는 독립적으로 수소 또는 치환되거나 비치환된 (C₁-C₁₆)알킬 중에서 선택된다. 예시적인 아릴기 치환체는 본 명세서에서 "반응성 작용기" 및 "결합 부위"로서 언급되는 것들을 포함한다.

[0022] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "헤테로원자"란 용어는 산소(O), 질소(N), 황(S) 및 규소(Si)를 포함한다.

[0023] 기호 "R"은 H, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 및 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴기 중에서 선택된 치환기를 나타내는 일반적인 약어이다. R은 또한 알킬기 치환체 및 아릴기 치환체를 지칭할 수 있다.

[0024] "염(들)"이란 용어는 본 명세서에 기재된 화합물상에서 발견되는 특정 치환체에 따라, 비교적 무독성인 산 또는 염기에 의해 제조되는 화합물의 염을 포함한다. 본 발명의 화합물이 비교적 산성인 작용기를 함유하는 경우, 상기와 같은 화합물의 중성 형태를 충분한 목적하는 염기와, 순수하게 또는 적합한 불활성 용매 중에서 접촉 시킴으로써 염기 부가염을 수득할 수 있다. 염기 부가염의 예는 나트륨, 칼륨, 칼슘, 암모늄, 유기 아미노 또는 마그네슘 염, 또는 유사한 염을 포함한다. 본 발명의 화합물이 비교적 염기성인 작용기를 함유하는 경우, 상기와 같은 화합물의 중성 형태를 충분한 목적하는 산과, 순수하게 또는 적합한 불활성 용매 중에서 접촉 시킴으로써 산 부가염을 수득할 수 있다. 산 부가염의 예는 염산, 브롬화 수소산, 질산, 카본산, 일수소카본산, 인산, 일수소인산, 이수소인산, 황산, 일수소황산, 요오드화 수소산 또는 아인산 등과 같은 무기산으로부터 유도된 염뿐만 아니라 아세트산, 프로피온산, 아이소부티르산, 부티르산, 말레산, 말산, 말론산, 벤조산, 숙신산, 수베르산, 푸마르산, 락트산, 만델산, 프탈산, 벤젠설폰산, p-톨릴설폰산, 시트르산, 타르타르산, 메탄설폰산 등과 같은 비교적 무독성인 유기산으로부터 유도된 염을 포함한다. 또한 알기네이트 등과 같은 아미노산의 염, 및 글루쿠론산 또는 갈락투론산 등과 같은 유기산의 염이 포함된다(예를 들어 문헌[Berge *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Science*, 66: 1-19 (1977)]을 참조하시오). 본 발명의 몇몇 특정한 화합물은 상기 화합물을 염기 또는 산 부가염으로 전환되게 하는 염기성 및 산성 작용기를 모두 함유한다. 상기 염의 수화물이 또한 포함된다.

[0025] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "핵산"은 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 단일 가닥이거나, 이중 가닥인 DNA, RNA, 또는 보다 고도로 응집된 하이브리드화 동기, 및 이들의 임의의 화학적 변형을 의미한다. 변형은 비제한적으로 추가적인 전하, 극성, 수소 결합, 정전기 상호작용, 및 핵산 리간드 핵염기 또는 핵산 리간드 전체에 대한 반응성이 편입된 화학 그룹을 제공하는 것들을 포함한다. 상기와 같은 변형은 비제한적으로 포스포다이에스테르기 변형(예를 들어 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트), 당 변

형, 5번 위치 피리미딘 변형, 8번 위치 퓨린 변형, 고리밖 아민에서의 변형, 비-표준 또는 비-천연 핵염기, 예를 들어 4-티오유리딘, 5-브로모 또는 5-요오도-우라실에 의한 치환; 주쇄 변형, 예를 들어 펩타이드 핵산 (PNA), 글리콜 핵산(GNA), 모르폴리노; 메틸화, 예를 들어 2'-O-메틸 뉴클레오사이드, 5-메틸-2'-데옥시시티딘; 통상적이지 않은 염기-쌍 조합, 예를 들어 아이소염기, 아이소시티딘 및 아이소구아니딘 등을 포함한다. "핵단량체"는 단일 핵산 단위를 지칭하며, 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드 또는 이들의 변형일 수 있다.

[0026] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "핵염기"는 공지된 퓨린 및 피리미딘 헤테로사이클 및 본 발명의 피리미딘뿐만 아니라 이들의 헤테로사이클 유사체 및 토오토머를 함유하는 부분들을 포함한다. 퓨린은 아데닌 및 구아닌을 포함하며, 예시적인 퓨린 유사체는 8-옥소-N⁶-메틸아데닌 및 7-데아자잔틴을 포함한다. 피리미딘은 티민, 유라실 및 시토신, 및 이들의 유사체, 예를 들어 5-메틸시토신, 5-메틸유라실 및 4,4'-에타노시토신을 포함한다. 상기 용어는 또한 비-천연 핵염기를 포함한다. 전형적인 비-천연 핵염기는 5-플루오로유라실, 5-브로모유라실, 5-클로로유라실, 5-요오도유라실, 하이포잔틴, 잔틴, 4-아세틸시토신, 5-(카복시하이드록시메틸)유라실, 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오유리딘, 5-카복시메틸아미노메틸유라실, 다이하이드로유라실, 베타-D-갈락토실케오신, 이노신, N⁶-아이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-다이메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N⁶-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸유라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오유라실, 베타-D-만노실케오신, 5'-메톡시카복시메틸유라실, 5-메톡시유라실, 2-메틸티오-N⁶-아이소펜테닐아데닌, 유라실-5-옥시아세트산(v), 와이부톡소신, 슈도유라실, 케오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오유라실, 2-티오유라실, 4-티오유라실, 5-메틸유라실, 유라실-5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 유라실-5-옥시아세트산(v), 5-메틸-2-티오유라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카복시프로필)유라실, (acp3)w, 나이트로인돌, 및 2,6-다이아미노퓨린을 포함한다.

[0027] 다양한 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 5번 위치에서 유도체화된 피리미딘을 포함한다. 상기 유도체는 1-알케닐-, 1-알킬닐-, 헤테로방향족- 및 1-알킬닐-헤테로방향족 변형이다. "1-알케닐"은 올레핀형-불포화된(이중 결합 함유) 비환상기를 의미한다. "1-알킬닐"은 아세틸렌형-불포화된(삼중 결합 함유) 비환상기를 의미한다.

[0028] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "뉴클레오사이드"는 핵염기가 당 또는 당 유사체에 공유 부착되고 임의로 포스파이트, 포스포아미다이트 또는 포스핀을 포함하는 핵산의 부분집합을 의미한다. 뉴클레오사이드란 용어는 리보뉴클레오사이드, 데옥시리보뉴클레오사이드, 또는 핵염기의 N-글리코사이드 또는 C-글리코사이드인 임의의 다른 뉴클레오사이드를 포함한다. 상기 당 탄소의 입체화학은 D-리보스의 입체 화학과 다를 수 있다. 뉴클레오사이드는 또한 당 부분의 변형을 함유하는 종들을 포함하며, 예를 들어 여기에서 하이드록실기 중 하나 이상이 할로겐, 헤테로원자, 지방족기로 치환되거나, 또는 에테르, 아민, 티올 등으로서 작용화된다. 펜토스 부분이 핵소스 또는 교번 구조, 예를 들어 사이클로펜탄 고리, 6-원 모르폴리노 고리 등에 의해 치환될 수 있다. 본 명세서에 정의된 바와 같은 뉴클레오사이드는 또한 유리 카복실기 및/또는 유리 아미노기 및/또는 그의 보호된 형태를 갖는 아미노산 및/또는 아미노산 유사체에 결합된 핵염기를 포함한다. 뉴클레오사이드는 또한 임의로, 예를 들어 플루오로카빌, 알케닐 또는 알킬닐 부분으로 변형된 하나 이상의 핵염기 변형을 포함한다. 포스포다이에스테르 또는 포스포다이에스테르 변형을 포함하는 핵염기를 본 명세서에서 뉴클레오타이드라 칭한다. 본 명세서에 정의된 바와 같은 뉴클레오사이드는 또한 유리 카복실기 및/또는 유리 아미노기 및/또는 그의 보호된 형태를 갖는 아미노산 및/또는 아미노산 유사체에 결합된 핵염기를 포함하고자 한다.

[0029] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "당 변형"은 2'-데옥시리보스 이외의 임의의 펜토스 또는 핵소스 부분을 의미한다. 변형된 당은 예를 들어 D-리보스, 2'-O-알킬, 2'-아미노, 2'-할로 작용화된 펜토스, 핵소스 등을 포함한다. 예시적인 당 변형은 하이드록실기 중 하나 이상이 할로겐, 헤테로원자, 알킬 부분으로 치환되거나, 또는 에테르, 에스테르 등으로서 작용화된 당을 포함한다. 펜토스 부분이 핵소스 또는 교번 구조, 예를 들어 사이클로펜탄 고리, 6-원 모르폴리노 고리 등에 의해 치환될 수 있다. D-리보스의 입체 화학 이외의 입체 화학을 갖는 당들도 또한 포함된다.

[0030] "포스포다이에스테르기 변형"은 핵단량체에 인접하여 공유 결합하는 고유 포스포다이에스테르기의 임의의 유사체를 의미한다. 치환체 결합은 포스포다이에스테르 유사체, 예를 들어 포스포로티오에이트 및 메틸포스포네이트, 및 비-인 함유 결합, 예를 들어 아세탈 및 아미드를 포함한다.

[0031] 핵산 변형은 또한 3',5' 및 염기 변형, 예를 들어 소광제(예를 들어 BHQ), 형광단, 삽입제, 작은 홈 결합제, 플루오로카본, 안정화 그룹 또는 또 다른 부분에 의한 표지를 포함한다. 다양한 실시태양에서, 상기 변형 또는 표지를 링커기를 통해 상기 올리고머에 공유적으로 접합시킨다.

- [0032] 올리고머는 본 명세서에서 포스포다이에스테르 또는 변형된 포스포다이에스테르 부분에 의해 서로 공유적으로 커플링된 2개 이상의 핵단량체로서 정의된다. 따라서, 올리고머는 2개 정도로 적은 핵단량체(이량체)를 가질 수 있으며 핵단량체의 상한이 반드시 있는 것은 아니다. 올리고머는 결합 능력이 있을 수 있으며, 따라서 동족 단일-가닥 또는 이중-가닥(또는 보다 고도의 응집) 핵산 서열과 염기쌍을 이룰 수 있다. 올리고머는 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 보다 긴 올리고머에 대한 합성단위체로서 유용하다. 올리고머는 또한 무염기 부위 및 슈도뉴클레오사이드를 함유할 수 있다. 다양한 실시태양에서, 본 발명의 올리고머는 작용화된다. 상기 올리고머를 작용화하는 부분은 하기에 논의된다. 몇몇 실시태양의 기재에서, "올리고머"란 용어는 상기 올리고머의 핵산 서열, 본 발명의 탐침을 제공하는 변형된 핵산 서열 또는 본 발명의 고체 지지체를 제공하는 변형된 핵산 서열을 지칭하는데 호환적으로 사용된다.
- [0033] "펩타이드"는 단량체들이 아미노산이고 아미드 결합을 통해 함께 결합되는 올리고머를 지칭하며, 선택적으로 폴리펩타이드라 지칭된다. 상기 아미노산이 α-아미노산인 경우, L-광학 이성질체 또는 D-광학 이성질체를 사용할 수 있다. 추가로, 비천연 아미노산, 예를 들어 β-알라닌, 페닐글리신 및 호모아르기닌이 또한 포함된다. 유전자-암호화되지 않는 통상적으로 접하는 아미노산을 또한 본 발명에 사용할 수 있다. 본 발명에 사용되는 모든 아미노산은 D- 또는 L-이성질체일 수 있다. 상기 L-이성질체가 일반적으로 바람직하다. 또한, 다른 펩티드 유사물질이 또한 본 발명에 유용할 수 있다. 일반적인 고찰을 위해서, 문헌[Spatola, A. F., in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983)]을 참조하시오.
- [0034] "고체 지지체"는 분자, 화합물, 세포 또는 다른 존재의 부착을 위한 표면 또는 상기와 같은 중들이 부착되는 표면을 갖는 고체 물질이다. 고체 지지체의 표면은 편평하거나 또는 달리 형성될 수 있다. 고체 지지체는 다공성이거나 비-다공성일 수 있다. 고체 지지체는, 표면을 포함하고 유리, 구소, 나일론, 중합체, 플라스틱, 세라믹 또는 금속을 포함할 수 있는 칩 또는 배열일 수 있다. 고체 지지체는 또한 막, 예를 들어 나일론, 나이트로셀룰로스 또는 중합체 멤브레인, 또는 플레이트 또는 디쉬일 수 있으며 유리, 세라믹, 금속 또는 플라스틱으로 구성될 수 있다, 예를 들어 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리카보네이트 또는 혼성중합체로 제조된 96-웰 플레이트일 수 있다. 고체 지지체는 또한 임의의 모양의 비드 또는 입자일 수 있으며 바람직하게는 구형 또는 거의 구형이며, 바람직하게는 비드 또는 입자는 1 밀리미터 이하, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 마이크론의 직경 또는 최대 너비를 갖는다. 상기와 같은 입자 또는 비드는 임의의 적합한 물질, 예를 들어 유리 또는 세라믹, 및/또는 하나 이상의 중합체, 예를 들어 나일론, 폴리테트라플루오로에틸렌, 테플론(상표), 폴리스티렌, 폴리아크릴아미드, 세파로스, 아가로스, 셀룰로스, 셀룰로스 유도체, 또는 텍스트란으로 구성되고/되거나 금속, 특히 상자성 금속, 예를 들어 철로 구성될 수 있다.
- [0035] 고상 합성을 위한 지지체는 당해 분야에 공지되어 있으며 비제한적으로 고 가교결합체 폴리스티렌(문헌 [McCollum, et al., *Tetrahedron Lett.* 32: 4069-4072 (1991)]), 폴리스티렌/PEG 공중합체(문헌[Gao, et al., *Tetrahedron Lett.* 32: 5477-5480 (1991)]), 실리카젤(문헌[Chow, et al., *Nucl. Acids Res.* 9: 2807-2817 (1981)]), 폴리아미드 결합된 실리카젤(문헌[Gait, et al., *Nucl. Acids Res.* 10: 6243-6254 (1982)]), 셀룰로스(문헌[Crea, et al., *Nucl. Acids Res.* 8: 2331-2348 (1980)]), 및 조절된 기공 유리(CPG)(문헌[Koster, et al., *Tetrahedron Lett.* 24: 747-750 (1983)])를 포함한다. 예시적인 고체 지지체는 CPG 비드이다. CPG 비드는 핵단량체 또는 올리고머의 부착을 위해 다양한 방식으로 유도체화될 수 있다. 예를 들어, CPG 비드를 3-아미노프로필트라이에톡시실란으로 처리하여 올리고뉴클레오타이드 유사 단량체 또는 이량체의 부착을 위한 아미노 프로필 링커 손잡이를 가하거나(문헌[Koster, et al., *Tetrahedron Lett.* 24: 747-750 (1983)]), 또는 바람직하게는 장쇄 알킬아민기, 가장 바람직하게는 말단 뉴클레오사이드를 포함하는 기를 CPG에 부착시킬 수 있다(문헌[Adams, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 105: 661-663 (1983)]). 올리고뉴클레오타이드 합성 또는 펩타이드 합성을 위한 지지체, 예를 들어 dT-LCAA-CPG(어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems))를 상업적으로 입수할 수 있다.
- [0036] "삽입체"는 인접한 핵염기 사이에 부분적인 삽입 및 중첩이 가능한 평면 방향족 또는 헤테로방향족 부분을 지칭한다. 상기 부분은 소분자 또는 단백질과 같은 보다 큰 존재의 부분일 수 있다. 삽입체의 비제한적인 예는 아크리딘, 안트라센, 안트라사이클린, 안트라사이클리논, 메틸렌 블루, 인돌, 안트라퀴논, 퀴놀린, 아이소퀴놀린, 다이하이드로퀴논, 테트라사이클린, 소랄렌, 쿠마린, 에티디움 할라이드, 에티디움 동종이량체, 동종이량체성 옥사졸 엘로우(YOYO), 티아졸 오렌지(TOTO), 다이네미신, 1,10-페난트롤린-구리, 칼키아미신, 포르피린, 디스타마이신, 네트롭신, 및 비올로젠을 포함한다.
- [0037] "작은 홈 결합체"는 전형적으로 대략 150 내지 대략 2000 달톤의 분자량을 갖는 부분을 지칭한다. 상기 부분은

비-삽입 방식으로 이중 가닥(또는 보다 고도의 응집) DNA, RNA 또는 그의 하이브리드의 작은 홈에, 바람직하게는 대략 10^3 M^{-1} 초과와 결합 상수로 결합한다. 작은 홈 결합 화합물은 광범위하게 다양한 화학 구조를 갖지만, 예시적인 작은 홈 결합체는 초승달 모양의 3차원 구조를 갖는다. 예로는 몇몇 천연 화합물, 예를 들어 네트롭신, 디스타마이신 및 텍시트롭신, 미트라마이신, 크로모마이신 A₃, 올리보마이신, 안트라마이신, 시비로마이신뿐만 아니라 추가로 관련된 항생제 및 합성 유도체가 있다. 몇몇 비스4급 암모늄 헤테로사이클릭 화합물, 다이아릴아미딘, 예를 들어 펜타미딘, 스틸바미딘 및 베레닐, CC-1065 및 관련된 피롤로인돌 및 인돌 폴리펩타이드, 웨스트(Hoechst) 33258, 4'-6-다이아미디노-2-페닐인돌(DAPI)뿐만 아니라 천연 또는 합성 아미노산으로 이루어지는 다수의 올리고펩타이드가 작은 홈 결합체 화합물이다. 예시적인 작은 홈 결합체들이 미국특허 제 6,804,102 호에 개시되어 있다. 이러한 유형의 결합은 충분히 확립된 분광광도측정 방법, 예를 들어 자외선(u.v.) 및 핵자기 공명(NMR) 분광학 및 또한 젤 전기영동에 의해 검출될 수 있다. 작은 홈 결합체 분자의 결합 시 u.v. 스펙트럼의 이동, 및 "핵 오버하우저"(NOSEY) 효과를 이용하는 NMR 분광학이 특히 주지되어 있으며 상기 목적에 유용한 기법이다. 젤 전기영동은 이중 가닥 DNA 또는 그의 단편에 대한 작은 홈 결합체의 결합을 검출하는데, 상기와 같은 결합 시 상기 이중 가닥 DNA의 이동성이 변하기 때문이다.

[0038] 상기 작은 홈 결합체는 전형적으로 약 20, 약 15 원자, 약 10 또는 약 5 원자의 쇄를 포함하는 링커를 통해 상기 올리고머 또는 고체 지지체에 부착된다.

[0039] 삽입 부분 또는 삽입체는, 상기 삽입체가 편평한 방향족(바람직하게는 다환상) 분자인데 비해 상기 작은 홈 결합체는 "초승달 모양" 또는 유사한 외형이라는 점을 근거로 상기 작은 홈 결합체와 쉽게 구별된다. 실험적 구별이 또한 상기 핵 오버하우저 효과를 이용하는 NMR 분광학에 의해 이루어질 수 있다.

[0040] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "링커" 또는 "L"이란 용어는 본 발명 화합물의 성분들을 함께 공유 결합시키는 C, N, O, S, Si 및 P로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 1 내지 30개의 비수소 원자를 통합시키는, 예를 들어 고체 지지체를 본 발명의 안정화제, 소광제, 핵단량체 또는 올리고머에 결합시키거나; 또는 소광제 또는 안정화 부분을 본 발명의 아미다이트 중의 핵염기에 결합시키는 단일 공유 결합("0-차") 또는 일련의 안정한 공유 결합을 지칭한다. 예시적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30 개의 비-수소 원자를 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, "결합하는", "결합된", "결합", "접합하는", "접합된" 및 부착과 관련된 유사 용어들은 링커를 사용하는 기법 및 링커를 포함하는 중들을 지칭한다. 예시적인 링커는 본 명세서에 정의된 바와 같은 결합 부위를 포함한다. 더욱이, 링커는 올리고머 또는 발생기 올리고머(올리고머 합성 중)를 본 발명의 고체 지지체에 부착시키는데 유용하다. 따라서, 본 발명은 또한 링커를 통해 고체 지지체(예를 들어 본 발명의 고체 지지체)에 공유 부착된 본 발명의 올리고머를 제공한다. 본 발명의 고체 지지체 및 올리고머는 상기 고체 지지체의 2개 성분과 올리고머 사이에(예를 들어 상기 올리고머와 고체 지지체 사이에, 형광단과 올리고머 사이에, 소광제와 올리고머 사이에, 형광단과 소광제 사이 등에) 절단성 링커를 임의로 포함한다. 다양한 실시태양에서, 상기 고체 지지체를 상기 올리고머에 결합시키는 링커는 절단성 링커이다.

[0041] "절단성 링커"는 반응 또는 조건의 결과에 의해 파괴될 수 있는 하나 이상의 절단성 그룹을 갖는 링커이다. 예시적인 절단성 링커는 화학식 I 또는 II의 R⁸내에 위치하여, 본 발명의 합성된 올리고머를 상기의 합성 시 상기 고체 지지체로부터 편리하게 분리되게 한다. 상기 "절단성 그룹"이란 용어는, 방출되는 부분을 접합체의 나머지 지에 결합시키는 결합을 절단함으로써 본 발명의 고체 지지체 또는 올리고머의 성분의 방출을 허용하는 부분을 지칭한다. 본 발명의 올리고머 및 고체 지지체의 제조 및 사용 모두에 사용되는 예시적인 절단 기전은 효소적으로 또는 달리 화학적으로 매개된다.


[0042] 효소적 절단성 그룹 외에, 효소 이외의 작용제의 작용에 의해 절단되는 하나 이상의 부위를 포함하는 것이 본 발명의 범위내에 있다. 예시적인 비-효소적 절단체는 비제한적으로 산, 염기, 광(예를 들어 나이트로벤질 유도체, 펜아실기, 오쏘-하이드록시신나메이트 에스테르, 벤조인 에스테르), 및 열을 포함한다. 다수의 절단성 그룹은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어 문헌[Jung et al., Biochem. Biophys. Acta, 761: 152-162 (1983)]; 문헌[Joshi et al., J. Biol. Chem., 265: 14518-14525 (1990)]; 문헌[Zarling et al., J. Immunol., 124: 913-920 (1980)]; 문헌[Bouizar et al., Eur. J. Biochem., 155: 141-147 (1986)]; 문헌[Park et al., J. Biol. Chem., 261: 205-210 (1986)]; 문헌[Browning et al., J. Immunol., 143: 1859-1867 (1989)]을 참조하시오. 더욱이 광범위한 절단성, 이작용성(호모- 및 헤테로-이작용성 모두의) 이격자 가치를 상업적으로 입수할 수 있다.

- [0043] 예시적인 절단성 그룹은 시약, 예를 들어 수산화 나트륨, 암모니아 또는 다른 아민에 의해 절단 가능하다. 다양한 실시태양에서 상기 절단성 링커는 실온에서 또는 가열하에서 쉽게 절단된다. 하나의 실시태양에서, 화학식 I 또는 II의 R⁸은 유기 용매 중의 아민, 예를 들어 암모니아 또는 필수적으로 무수인 아민에 의한 처리에 의해 절단되는 절단성 링커를 포함한다.
- [0044] "결합 부위"는 2개 이상의 성분(예를 들어 작용성 성분, 고체 지지체, 올리고뉴클레오타이드, 또는 링커)을 연결하는 부분이다. 상기 용어는 상보적인 반응 짝들의 반응에 의해 형성되는 공유 결합을 지칭하며, 이들은 각각 그의 짝에 대해 상보성 반응성을 갖는 작용기를 갖는다. 본 발명의 고체 지지체 및 올리고머 중의 결합 부위는 독립적으로 선택된다. 예시적인 결합 부위는 비제한적으로 S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH 및 NHC(O)O, 및 OC(O)NH, CH₂S, CH₂O, CH₂CH₂O, CH₂CH₂S, (CH₂)_oO, (CH₂)_oS 또는 (CH₂)_oY^x-PEG(여기서 Y^x는 S, NH, NHC(O), C(O)NH, NHC(O)O, OC(O)NH, 또는 O이고, o는 1 내지 50의 정수이다)를 포함한다. 이들 예시적인 각각의 결합 부위에서, NH는 NR¹(여기에서 R¹는 치환되거나 비치환된 알킬 또는 치환되거나 비치환된 헤테로알킬이다)일 수 있다. 결합 부위는 또한 포스포다이에스테르기일 수 있다. 다양한 실시태양에서, 상기 결합 부위는 링커와 형광단 사이, 링커와 소광제 사이, 링커와 안정화 부분 사이 또는 링커와 고체 지지체 사이이다. 본 발명의 올리고머 및 고체 지지체의 예시적인 실시태양에서, 각각의 결합 부위는 상이하다.
- [0045] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "형광단"이란 용어는 본래 형광성이거나 또는 생물학적 화합물 또는 금속 이온에 결합시 또는 효소에 의한 대사시 형광 변화를 나타내는, 즉 형광발생성인 부분을 지칭한다. 형광단을 상기 형광단의 용해도, 분광 특성 또는 물성을 변경시키기 위해 치환시킬 수도 있다. 다수의 형광단이 당해 분야의 숙련가들에게 공지되어 있으며 비제한적으로 쿠마린, 아크리딘, 퓨란, 단실, 시아닌, 피렌, 나프탈렌, 벤조퓨란, 퀴놀린, 퀴나졸리논, 인돌, 벤즈아졸, 보라폴리아자인다센, 옥사진 및 잔텐을 포함하며, 후자는 플루오레세인, 로다민, 로사민 및 로돌을 포함한다. 본 발명에 유용한 상기 및 다른 형광단은 문헌[Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals]에 개시되어 있다. 추가로 유용한 형광단은 공동 소유된 미국 특허 출원 공보 제 2005/0214833 호 및 제 2005/0170363 호, 및 본 명세서 하기에 기재되어 있다.
- [0046] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "소광제"는 형광단에 의해 방출된 빛을 적어도 부분적으로 약화시킬 수 있는 본 발명의 임의의 형광-변형 부분을 지칭한다. 상기 약화를 본 명세서에서는 "소광"이라 칭한다. 따라서, 다양한 실시태양에서, 상기 소광 그룹의 존재하에서 상기 형광단의 여기는 예상된 경우보다 덜 강한, 또는 심지어 완전히 없는 방출 신호를 유도한다. 소광은 전형적으로 여기된 형광단과 소광 그룹간의 에너지 전달을 통해 발생한다.
- [0047] 상기 형광단 또는 소광제는 바람직한 성질, 예를 들어 수용해도, 세포 투과성 또는 변경된 흡수 및 방출 스펙트럼을, 치환체가 없는 "모" 화합물에 비해 향상시키는 치환체를 포함할 수 있다. 이와 같이 본 발명에 유용한 형광단 또는 소광제는 치환체 부재하의 동일한 모 화합물에 비해 바람직한 성질을 증대시키는 상기 개선 치환체를 포함한다.
- [0048] "작용성 성분"은 소광제, 형광단 또는 안정화 부분(비제한적으로 삽입제, 작은 홈 결합 부분, 안정화 부분(예를 들어 알킬 부분 및 플루오로알킬 부분)에 의해 변형된 핵염기, 및 입체구조 안정화 부분, 예를 들어 공동 소유된 미국특허 출원 공보 제 2007/0059752 호에 기재된 것들) 중에서 선택된 구조를 갖는 본 발명의 화합물 중의 부분에 대한 일반적인 용어이다.
- [0049] "폴리뉴클레오타이드의 증폭"이란 표현은 비제한적으로 폴리머라제 쇄 반응(PCR), 이어맞추기 증폭(또는 리가제 쇄 반응, LCR) 및 Q-베타 복제효소의 사용에 기반한 증폭 방법과 같은 방법들을 포함한다. 이들 방법은 주지되어 있으며 당해 분야에서 널리 실행된다. 미국특허 제 4,683,195 호 및 제 4,683,202 호 및 문헌[Innis et al., 1990](PCR에 대해서) 및 문헌[Wu et al., 1989a](LCR에 대해서)을 참조하시오. PCR을 수행하기 위한 시약 및 기기를 상업적으로 입수할 수 있다. 특정한 유전자 영역으로부터 서열을 증폭시키는데 유용한 프라이머는 바람직하게는 표적 영역 또는 그의 인접 영역 중의 서열에 상보성이며, 상기 서열에 특이적으로 하이브리드화된다. 증폭에 의해 생성된 핵산 서열을 직접 서열분석할 수 있다. 선택적으로 상기 증폭된 서열(들)을 서열 분석 전에 클로닝할 수도 있다. 효소에 의해 증폭된 게놈 분절의 직접적인 클로닝 및 서열 분석 방법은 샤프(Scharf)(1986)에 의해 개시되었다. 본 발명은 증폭 공정에 유용한 올리고머성 프라이머를 제공한다. 더욱이, 상기와 같은 프라이머의 합성에 유용한 고체 지지체를 제공한다. 프라이머 외에, 본 발명은 증폭 산물의 검출,

특성화 및/또는 정량분석을 위한 탐침, 및 상기와 같은 탐침의 사용 방법을 제공한다: 또한 이들 올리고머성 탐침의 합성에 유용한 고체 지지체를 제공한다.

- [0050] "염기-중첩 섭동"이란 용어는 염기-중첩에서 섭동을 유발하는 임의의 사건, 예를 들어 염기-쌍 불합치, 단백질의 인식 부위에의 결합, 또는 올리고뉴클레오타이드 부가물을 형성하는 임의의 다른 존재를 지칭한다. 본 발명의 다양한 탐침은 상기와 같은 염기-중첩 섭동을 검출, 특성화 및/또는 정량분석할 수 있다. 더욱이, 본 발명은 상기와 같은 염기-중첩 섭동을 검출, 특성화 및/또는 정량분석할 수 있는 탐침의 합성에 유용한 고체 지지체를 제공한다.
- [0051] "하이브리드화된"이란 용어는 완전히 염기-쌍을 이루거나 또는 이를 수 없는 서로 결합된 2개의 핵산 가닥을 지칭한다: 일반적으로, 상기 용어는 고체 지지체에 결합되든지 또는 용액 중에 있든지 간에 본 발명의 올리고머를 포함하는 결합을 지칭한다.
- [0052] "변성하는"이란 용어는 핵산 듀플렉스(또는 보다 고도의 응집체)의 가닥이 수소 결합에 의해 더이상 염기-쌍을 이루지 않고 단일-가닥 분자로 분리되는 과정을 지칭한다. 변성 방법은 당해 분야의 숙련가들에게 주지되어 있으며 열 변성 및 알칼리 변성을 포함한다. 상기 용어는 일반적으로 본 발명의 탐침의 그의 표적 핵산으로부터의 해리를 지칭한다.
- [0053] "불합치"란 용어는 100% 상보성이 아닌 하이브리드화된 핵산 듀플렉스(또는 보다 고도의 응집체)내의 핵산 핵염기를 지칭한다. 불합치는 왓슨-크리크 염기-쌍, 예를 들어 A:T 또는 G:C가 아닌 핵산의 상보성 가닥상에 위치한 2개 핵염기의 핵염기들간의 임의의 올바르게 맞지 않는 짝짓기를 포함한다. 완전한 상동성의 결여는 결실, 삽입, 역위, 치환 또는 프레임쉬프트 돌연변이에 기인할 수 있다. 다양한 실시태양에서, 본 발명의 올리고머는 그의 표적 핵산에 대한 불합치를 포함하여, 바람직하게는 그의 표적 중 상응하는 불합치의 검출 및/또는 특성화 및/또는 정량분석을 허용한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 불합치는 단일 뉴클레오타이드 불합치이다.
- [0054] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "다형성"이란 용어는 유전자의 서열 변이를 지칭하며 "돌연변이"는 표현형과 관련되거나 관련되는 것으로 여겨지는 유전자 중의 서열 변이를 지칭한다. "유전자"란 용어는 기능성 산물 단백질 조절 영역을 암호화하는 게놈의 분절을 지칭한다. 피실험자 확인을 위해 본 발명에 따라 사용되는 다형성 마커를 상기 게놈의 암호화 또는 비-암호화 영역 중에 배치할 수 있으며, 본 발명의 다양한 탐침을 상기 마커를 포함하는 핵산 영역에 하이브리드화되도록 설계한다. 본 명세서에 사용되는 "피실험자"란 용어는 유전자 검사를 위한 표적 핵산이 획득되는 시험 샘플을 제공하는 피실험자를 지칭한다. 본 발명의 올리고머는 다형성 및 돌연변이의 검출 및/또는 특성화 및/또는 정량분석에 유용하다. 더욱이, 본 발명의 고체 지지체는 다형성 및 돌연변이의 검출 및/또는 특성화 및/또는 정량분석에 유용한 올리고머의 합성에 유용하다.
- [0055] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "탐침"이란 용어는 본 발명의 고체 지지체 또는 아마다이트를 사용하여 제조되는 핵산 올리고머를 지칭한다. 다양한 실시태양에서, 상기 탐침은 결합 짝과 상호작용시 검출 가능한 응답을 생성시킨다. 상기 탐침은 적어도 하나의 검출성 부분, 또는 결합 짝과의 상호작용에 응답하여 상기 탐침의 상태가 일부 변화될 때 검출 가능한 에너지 전달 쌍을 형성하는 부분들의 쌍을 포함한다. 본 발명은 탐침 및 탐침 합성에 유용한 아마다이트 및 고체 지지체를 제공한다. 본 발명의 예시적인 탐침은 다형성을 검출하는데 유용하다. 다양한 실시태양에서, 상기 다형성은 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)이다.
- [0056] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "검출 가능한 응답"이란 용어는 관찰에 의해 또는 기계류 및 시험 샘플 중 탐침에 대한 표적 결합 짝의 존재 또는 바람직하게는 상기 존재의 함수인 그의 크기에 의해서 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 신호의 변화 또는 발생을 지칭한다. 전형적으로, 상기 검출 가능한 응답은 파장 분포 패턴 또는 흡광도 또는 형광의 강도 또는 광 산란의 변화, 형광 양자 수율, 형광 수명, 형광 편광, 여기 또는 방출 파장의 이동 또는 상기 매개변수들의 조합을 생성시키는 형광단으로부터의 광학적 응답이다. 상기 주어진 분광 성질의 검출 가능한 변화는 일반적으로 형광 강도의 증가 또는 감소이다. 그러나, 형광 방출 또는 여기의 파장 이동을 생성시키는 분광 변화가 또한 유용하다. 상기 형광 또는 이온 결합의 변화는 대개 상기 형광단의 여기 또는 접지 상태로 발생할 수 있는 표시기의 입체구조 또는 전자적 변화, 이온 결합 부위에서의 전자 밀도의 변화, 결합된 표적 금속 이온에 의한 형광의 소광, 또는 이들 또는 다른 효과들의 임의의 조합에 기인한다. 한편으로, 상기 검출 가능한 응답은 신호의 발생이며, 여기에서 상기 형광단은 본래 형광성이고 금속 이온 또는 생물학적 화합물에 결합시 신호 변화를 생성시키지 않는다. 본 발명은 검출 가능한 응답을 제공하는 탐침 및 상기와 같은 탐침의 합성에 유용한 고체 지지체를 제공한다.
- [0057] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "담체 분자"란 용어는 본 발명의 화합물이 부착되는 임의의 분자를 지칭한다.

전형적인 담체 분자는 비제한적으로 단백질(예를 들어 효소, 항체), 당단백질, 펩타이드, 사카라이드(예를 들어 모노-, 올리고- 및 폴리-사카라이드), 호르몬, 수용체, 항원, 기질, 대사산물, 전이상태 유사체, 보조인자, 억제제, 약물, 염료, 영양분, 성장 인자 등을 포함한다. "담체 분자"는 또한 "분자"의 고전적인 정의에 들어가는 것으로 간주될 수 없는 종들, 예를 들어 고체 지지체(예를 들어 합성 지지체, 크로마토그래피 지지체, 멤브레인), 바이러스 및 미생물을 지칭한다.

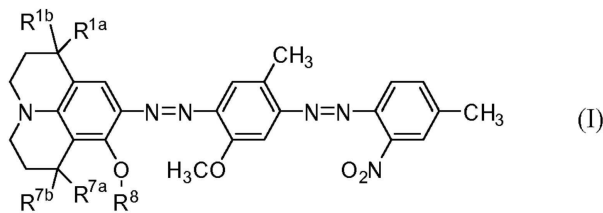
[0058] 결합에 수직으로 표시되는  는 상기 표시된 부분이 분자의 나머지에 부착되는 지점을 가리킨다.

[0059] 일부 실시태양에서, 본 명세서에 사용되는 용어의 정의는 IUPAC에 따른다.

[0060] 코스믹 소광제

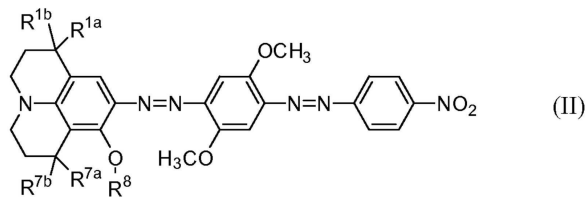
[0061] 하나의 태양에서, 본 발명은 하기 화학식 I 또는 II에 따른 구조를 갖는 화합물(소광제)을 제공한다:

[0062] [화학식 I]



[0063]

[0064] [화학식 II]



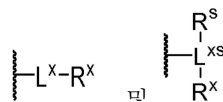
[0065]

[0066] R^{1a}, R^{1b}, R^{7a}, 및 R^{7b}은 독립적으로 H, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬, 및 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된다.

[0067] R^{1a} 및 R^{1b}는 이들이 결합된 탄소 원자와 함께 임의로 결합하여, 치환되거나 비치환된 C₃-C₇ 사이클로알킬 및 치환되거나 비치환된 3- 내지 7-원 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된 일원인 고리를 형성한다.

[0068] R^{7a} 및 R^{7b}는 이들이 결합된 탄소 원자와 함께 임의로 결합하여, 치환되거나 비치환된 C₃-C₇ 사이클로알킬 및 치환되거나 비치환된 3- 내지 7-원 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된 일원인 고리를 형성한다.

[0069] R^{1a}, R^{1b}, R^{7a}, 및 R^{7b} 중 적어도 하나는 H가 아니다.

[0070] R⁸은 H,  중에서 선택된다. L^x, L^{xs}, R^s 및 R^x는 본 명세서에서 정의된 바와 같다.

[0071] R^{1a}, R^{1b}, R^{7a}, R^{7b} 및 R⁸의 조합들 중 어느 하나는 본 명세서에 의해 포함되며 본 발명에 의해 구체적으로 제공된다.

[0072] 일부 실시태양에서, R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 H이다. 일부 실시태양에서, R^{1a} 및 R^{1b}는 비치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 및 C₆ 알킬 중에서 독립적으로 선택된다. 일부 실시태양에서, R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 메틸이다.

[0073] 일부 실시태양에서, R^{7a} 및 R^{7b}는 각각 H이다. 일부 실시태양에서, R^{7a} 및 R^{7b}는 비치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 및

C₆ 알킬 중에서 독립적으로 선택된다. 일부 실시태양에서, R^{7a} 및 R^{7b}는 각각 메틸이다.

[0074] 일부 실시태양에서, R^{1a} 및 R^{1b}는 비치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 및 C₆ 알킬 중에서 독립적으로 선택되고, R^{7a} 및 R^{7b}는 각각 H이다. 일부 실시태양에서, R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 메틸이고, R^{7a} 및 R^{7b}는 각각 H이다. 일부 실시태양에서, R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 H이고, R^{7a} 및 R^{7b}는 비치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 및 C₆ 알킬 중에서 독립적으로 선택된다. 일부 실시태양에서, R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 H이고, R^{7a} 및 R^{7b}는 각각 메틸이다. 일부 실시태양에서, R^{1a}, R^{1b}, R^{7a} 및 R^{7b}는 비치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 및 C₆ 알킬 중에서 독립적으로 선택된다. 일부 실시태양에서, R^{1a}, R^{1b}, R^{7a} 및 R^{7b}는 각각 메틸이다.

[0075] 일부 실시태양에서, L^x는 결합, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬 및 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된다. 일부 실시태양에서, L^x는 비치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ 및 C₁₀ 알킬 중에서 선택된다.

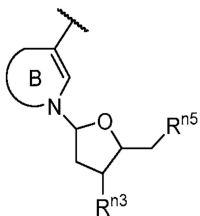
[0076] 일부 실시태양에서, L^{xs}는 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬 및 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된다. 일부 실시태양에서, L^{xs}는 치환된 헤테로알킬이다.

[0077] 일부 실시태양에서, R^s는 보호되거나 비보호된 반응성 작용기, 결합 부위 및 고체 지지체 중에서 선택된다. 일부 실시태양에서, R^s는 -OH, -ODMT, 및 고체 지지체에 대한 링커에 공유 결합된 결합 부위 중에서 선택된다. "DMT"는 4,4'-다이메톡시트리틸을 지칭한다. 일부 실시태양에서, 상기 고체 지지체는 조절된 기공 유리(CPG)이다.

[0078] 일부 실시태양에서, R^x는 보호되거나 비보호된 반응성 작용기 및 결합 부위 중에서 선택된다. 일부 실시태양에서, R^x는 포스포아미다이트, -OH, -ODMT, -COOH, 활성 에스테르(예를 들어 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 에스테르), 및 -NH₂ 중에서 선택된다. "DMT"는 4,4'-다이메톡시트리틸을 지칭한다.

[0079] 일부 실시태양에서, 상기 결합 부위는 뉴클레오사이드, 뉴클레오사이드에 대한 링커, 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드에 대한 링커, 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드에 대한 링커, 핵산, 핵산에 대한 링커, 담체 분자, 담체 분자에 대한 링커, 고체 지지체, 및 고체 지지체에 대한 링커 중에서 독립적으로 선택된 일원에 공유 결합된다.

[0080] 일부 실시태양에서, R^x는 뉴클레오사이드에 대한 링커에 공유 결합된 결합 부위이며, 여기에서 상기 뉴클레오사이드는 하기의 구조를 갖는다:



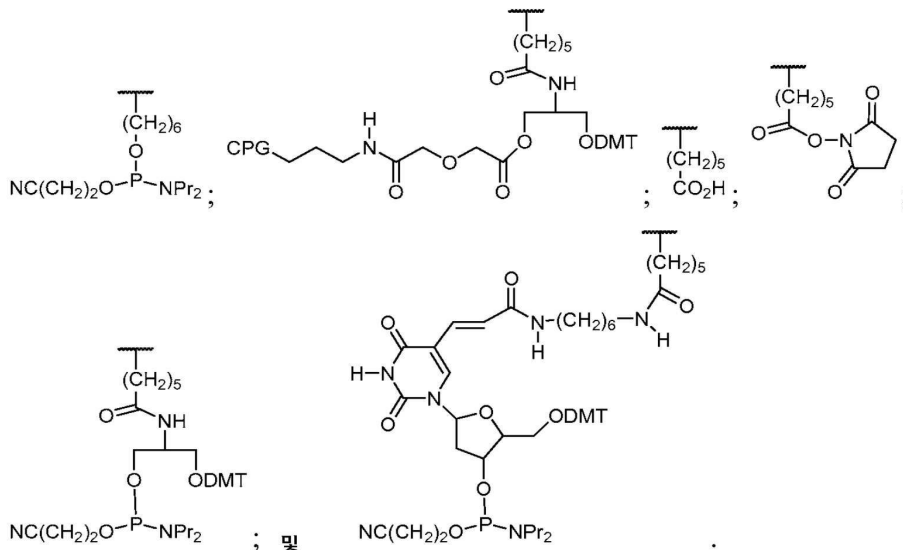
[0081] 상기 식에서, 고리 표지된 B는 핵염기이고;

[0083] Rⁿ³은 -OH 또는 포스포아미다이트이고;

[0084] Rⁿ⁵는 -OH 또는 -ODMT이다.

[0085] "DMT"는 4,4'-다이메톡시트리틸을 지칭한다.

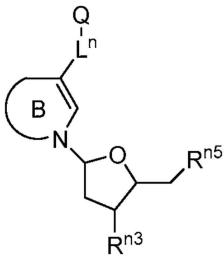
[0086] 일부 실시태양에서, R⁸은 하기 중에서 선택된다:



[0087]

[0088] 단량체

[0089] 다양한 실시태양에서, 본 발명은 내부 변형을 갖는 올리고머의 합성에 유용한 단량체성 핵산을 제공한다. 전형적인 실시태양에서, 상기 단량체성 핵산은 소광제 부분을 갖는다. 본 실시태양에 따른 예시적인 단량체성 핵산은 하기의 화학식을 갖는다:



[0090]

[0091] 상기 식에서,

[0092] Q는 소광제 부분이고;

[0093] Ln은 링커이고;

[0094] 고리 표지된 B는 핵염기이고;

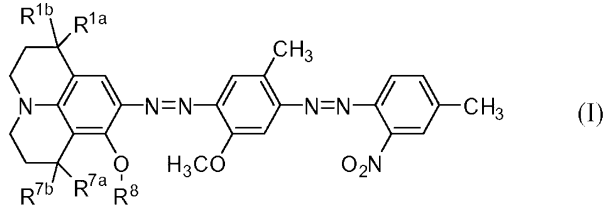
[0095] Rⁿ³은 -OH 또는 포스포아미데이트이고;

[0096] Rⁿ⁵는 -OH 또는 -ODMT이다.

[0097] "DMT"는 4,4'-다이메톡시트리틸을 지칭한다.

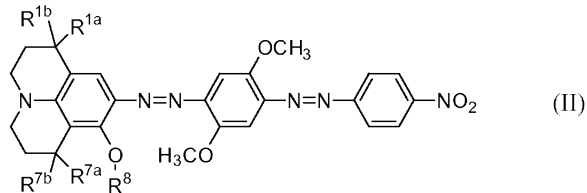
[0098] 일부 실시태양에서, 상기 소광제 부분(Q)은 하기 화학식 I 또는 II에 따른 구조를 갖는다:

[0099] [화학식 I]



[0100]

[0101] [화학식 II]

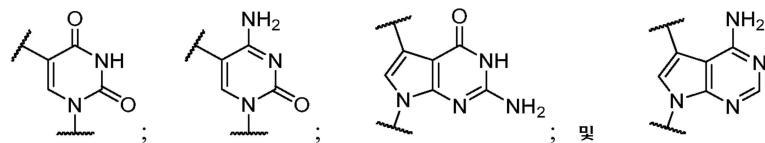


[0102]

[0103] 상기 식에서, R^{1a}, R^{1b}, R^{7a}, R^{7b} 및 R⁸은 본 명세서에 정의된 바와 같고; R⁸은 Lⁿ에 공유 결합된 결합 부위를 포함한다.

[0104] 일부 실시태양에서, Lⁿ은 결합, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬 및 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된다.

[0105] 예시적인 핵염기는 하기를 포함한다:



[0106]

[0107] 올리고머

[0108] 본 발명의 단량체를 사용하여 제조되고 상기 단량체의 성분들을 포함하는 핵산 올리고머, 예를 들어 탐침(상기 단량체의 성분들로부터 합성된다)을 또한 제공한다.

[0109] 예시적인 올리고머는 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오사이드, 올리고데옥시리보뉴클레오타이드(2'-데옥시-D-리보스 또는 그의 변형된 형태를 함유한다), 즉 DNA, 올리고리보뉴클레오타이드(D-리보스 또는 그의 변형된 형태를 함유한다), 즉 RNA, 및 퓨린 또는 피리미딘 핵염기 또는 변형된 퓨린 또는 피리미딘 핵염기의 N-글리코사이드 또는 C-글리코사이드인 임의의 다른 유형의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 올리고머는 또한 인접한 핵단량체들이 앞서 기재된 바와 같이(문헌[Nielsen et al., *Science* (1991) 254:1497-1500]) 아마이드 결합을 통해 결합되는 화합물을 포함한다. 올리고머에서 통상적으로 발견되는 요소들, 예를 들어 퓨라노스 고리 및/또는 포스포다이에스테르 결합을 임의의 적합한 작용상 동등한 요소로 치환시킬 수 있다. 따라서 "올리고머"는 상기 핵염기에 대한 스캐폴드 또는 지지체로서 작용하는 임의의 구조를 포함하고자 하며, 여기에서 상기 스캐폴드는 서열-의존적인 방식으로 표적 핵산에의 결합을 허용한다.

[0110] 본 발명의 올리고머에서 핵단량체들을 결합시키는 예시적인 그룹은 (i) 포스포다이에스테르 및 포스포다이에스테르 변형(포스포포티오에이트, 메틸포스포네이트 등), (ii) 비-인 등배전자체(포름아세탈, 리보아세탈, 카바메이트 등)를 함유하는 치환체 결합, (iii) 모르폴리노 잔기, 카보사이클릭 잔기 또는 다른 퓨라노스 당, 예를 들어 리보스 또는 데옥시리보스 대신에 아라비노스 또는 핵소스 및 (iv) 아마이드 결합을 통해 결합된 핵단량체 또는 임의의 적합한 대체 결합을 통해 결합된 비환상 핵단량체를 포함한다.

[0111] 본 발명의 올리고머를 변형된 및 통상적인 핵단량체를 사용하여 형성시키고 표준 고상(또는 용액상) 올리고머 합성 기법(현재 상업적으로 입수할 수 있다)을 사용하여 합성할 수 있다. 일반적으로, 상기 올리고머를, 보호기 및 핵염기 및 핵단량체 또는 올리고머에 커플링할 수 있는 커플링기를 갖는 핵단량체 또는 올리고머 합성단

위체를 합성하고; 상기 핵단량체 또는 올리고머 합성단위체를 수용체 핵단량체 또는 수용체 올리고머에 커플링 시키고; 상기 보호기를 제거하고; 상기 주기를 목적하는 올리고머가 합성될 때까지 필요한 대로 반복하는 단계를 포함하는 방법에 의해 합성할 수 있다.

- [0112] 본 발명의 올리고머는 40, 50 또는 100개를 초과하는 핵단량체를 포함하여 임의의 길이를 가질 수 있다. 다양한 실시태양에서, 올리고머는 2 내지 100개의 핵단량체를 함유한다. 약 10 내지 40개 이상 길이의 핵단량체가 치료학적 또는 진단학적 용도에 유용하다. 2, 3, 4 또는 5개의 핵단량체를 함유하는 짧은 올리고머가 본 발명에 특별히 포함되며 이는 예를 들어 합성단위체로서 유용하다.
- [0113] 랜덤화된 서열을 갖고 20개 미만, 15개 미만 또는 10개 미만의 핵단량체를 함유하는 올리고머가, 예를 들어 랜덤 서열 프라이머를 사용하는 클로닝 또는 증폭 프로토콜에 프라이머용으로 유용하나, 단 상기 올리고머는 폴리머라제 또는 역 전사효소용 프라이머로서 작용할 수 있는 잔기를 함유해야 한다.
- [0114] 올리고머는 통상적인 포스포다이에스테르 결합을 함유하거나 또는 포스포다이에스테르 변형, 예를 들어 포스포아미데이트 결합을 함유할 수 있다. 이들 대체 결합은 비제한적으로 화학식 $-O-P(O)(S)-O-$ ("포스포로티오에이트"), $-O-P(S)(S)-O-$ ("포스포로다이트오에이트"), $-O-P(O)-(NR_2^o)-X-$, $-O-P(O)(R^o)-O-O-P(S)(R^o)-O-$ ("티오노알킬포스포네이트"), $-P(O)(OR^p)-X-$, $-O-C(O)-X-$, 또는 $-O-C(O)(NR_2^o)-X-$ (여기에서 R^o 는 H(또는 염) 또는 알킬(1-12C)이고, R^p 는 알킬(1-9C) 및 결합이다)의 부분이 상기 핵단량체의 탄소에 결합된 $-O-$ 또는 $-S-$ 를 통해 인접한 단량체들에 결합되는 실시태양들을 포함한다. 다양한 실시태양에서, 본 발명의 올리고머에 유용한 대체 결합은 포스포다이에스테르, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트 및 티오노메틸포스포네이트 결합을 포함한다. 포스포로티오에이트 및 메틸포스포네이트 결합은 생리학적 환경에서 상기 올리고머에 가증된 안정성을 부여한다. 같은 올리고머에서 상기와 같은 모든 결합이 동일할 필요는 없지만, 본 발명의 특히 바람직한 올리고머는 균일하게 포스포로티오에이트 결합 또는 균일하게 메틸포스포네이트 결합을 함유한다.
- [0115] 올리고머 또는 그의 분절은 통상적으로 합성되며, 본 발명의 화합물을 사용하여 제조될 수 있다. 당해 분야에 공지되고 본 명세서에 기재된 합성 방법을 사용하여, 적합하게 보호된 핵단량체로 본 발명의 화합물뿐만 아니라 당해 분야에 공지된 다른 핵염기를 함유하는 올리고머를 합성할 수 있다. 올리고머의 합성 방법은 예를 들어 하기의 문헌들에서 발견된다: Froehler, B., et al., *Nucleic Acids Res.* (1986) 14:5399-5467; *Nucleic Acids Res.* (1988) 16:4831-4839; *Nucleosides and Nucleotides* (1987) 6:287-291; Froehler, B., *Tetrahedron Lett.* (1986) 27:5575-5578; Caruthers, M. H. in *Oligodeoxynucleotides-Antisense Inhibitions of Gene Expression* (1989), J. S. Cohen, editor, CRC Press, Boca Raton, p7-24; Reese, C. B. et al., *Tetrahedron Lett.* (1985) 26:2245-2248. 메틸 포스포아미다이트 화학을 통한 메틸포스포네이트 결합된 올리고머의 합성이 또한 기재되어 있다(문헌[Agrawal, S. et al., *Tetrahedron Lett.* (1987) 28:3539-3542]; 클렘 알 이(Klem, R. E.) 등의 국제 공보 제 WO 92/07864 호).
- [0116] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 본 발명은 올리고머의 "접합체"를 제공한다. 예를 들어, 상기 올리고머를 다양한 작용성 성분들, 예를 들어 안정화 부분, 형광단, 소광제, 삽입제, 및 DNA 이중 나선의 작은 홈과 특이적으로 상호작용하는 물질(작은 홈 결합체, "MGB")에 공유 결합시킬 수 있다. 다른 선택된 접합체 부분은 표지, 예를 들어 방사성, 형광, 효소, 또는 절단 링커 등을 사용하여 세포 결합을 촉진하는 부분일 수 있다. 적합한 방사성표지는 ^{32}P , ^{35}S , 3H 및 ^{14}C 를 포함하고; 적합한 형광 표지는 플루오레세인, 레소루핀, 로다민, BODIPY(몰레큘라 프로브스(Molecular Probes)) 및 텍사스 레드를 포함하며; 적합한 효소는 알칼리성 포스파타제 및 양고추냉이 퍼옥시다제를 포함한다. 추가적인 형광단들을 본 명세서에 제시하며 이들은 당해 분야에서 일반적으로 인정된다. 다른 공유 결합된 부분은 비오틴, 항체 또는 항체 단편, 및 단백질, 예를 들어 트랜스페린 및 HIV Tat 단백질을 포함한다.
- [0117] 본 명세서에 논의되고 당해 분야에서 인정되는 바와 같이, 상기 올리고머는 임의의 편리한 결합을 통해 유도체 화될 수 있다. 예를 들어, 작은 홈 결합체, 형광단, 소광제 및 삽입제, 예를 들어 아크리딘 또는 소랄렌을 임의의 이용 가능한 $-OH$ 또는 $-SH$ 를 통해, 예를 들어 상기 올리고머의 말단 5'-위치, RNA의 2'-위치에서, 또는 피리미딘의 5번 위치에 통합된 OH , NH_2 , $COOH$ 또는 SH 를 통해 본 발명의 올리고머에 결합시킬 수 있다. 예를 들어 상기 5번 위치에 $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2OH$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2SH$ 를 함유하는 유도체화된 형태가 본 발명에 유용하다. 폴리리신 또는 리신을 포함하는 접합체를 기재된 바와 같이 합성할 수 있으며 상기 접합체는 올리고머의 그의 표적 핵산 서열에의 결합 친화성을 추가로 증대시킬 수 있다(문헌[Lemaitre, M. et al., *Proc Natl Acad*

Sci (1987) 84:648-652]; 문헌[Lemaitre, M. et al., *Nucleosides and Nucleotides* (1987) 6:311-315]).

[0118] 결합 또는 대체 결합을 통해 결합된 것들을 포함하여 광범위하게 다양한 치환체들을 부착시킬 수 있다. 상기 올리고머의 포스포다이에스테르 결합 중의 -OH 부분을 표준 보호기 또는 커플링기에 의해 보호된 포스페이트기에 의해 치환시켜 다른 핵단량체들에 대한 추가적인 결합을 제조하거나, 또는 상기 접합된 치환체에 결합시킬 수 있다. 상기 5'-말단 OH를 인산화시킬 수 있으며; 3'-말단의 2'-OH 또는 OH 치환체를 또한 인산화시킬 수 있다. 상기 하이드록실을 또한 표준 보호기로 유도체화할 수 있다.

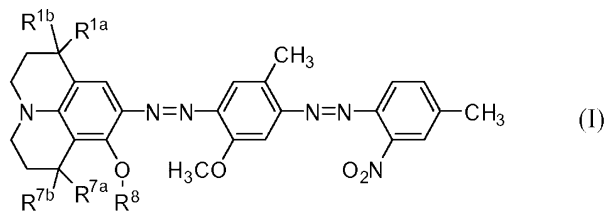
[0119] 본 발명의 올리고머를 절단성 링커를 사용하여 세포 결합을 촉진하는 부분으로 공유적으로 유도체화할 수 있다. 상기와 같은 접합에 사용되는 링커는 다이설파이드 결합을 포함할 수 있으며, 상기 결합은 상기 올리고머-수용체 접합체가 세포에 진입된 후에 환원된다. 이러한 유형의 다이설파이드-함유 링커는 조절가능한 반감기를 갖는다. 상기와 같은 링커는 상기 다이설파이드 결합의 산화환원 전위로 인해 세포내 조건에 비해 세포외 조건에서 안정성이다.

[0120] 공여체 및 수용체 부분

[0121] 소광제

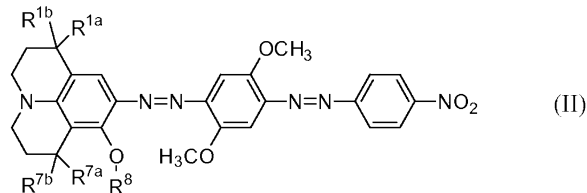
[0122] 본 발명의 예시적인 고체 지지체 및 올리고머는 임의로 링커를 통해 공유적으로 부착된 소광제를 포함한다. 다양한 실시태양에서, 상기 소광제는 하기 화학식 I 또는 II에 따른 구조를 갖는 부분이다:

[0123] [화학식 I]



[0124]

[0125] [화학식 II]



[0126]

[0127] 상기 식에서, R^{1a}, R^{1b}, R^{7a}, R^{7b} 및 R⁸은 본 명세서에 정의된 바와 같고; R⁸은 고체 지지체에 공유 결합된(직접 또는 링커를 통해) 결합 부위, 올리고머에 공유 결합된(직접 또는 링커를 통해) 결합 부위, 또는 이 둘 모두를 포함한다.

[0128] 본 발명 화합물의 이점들 중 하나는 광범위한 에너지 공여체 분자를 소광제-작용화된 고체 지지체 및 올리고머와 함께 사용할 수 있다는 것이다. 방대한 배열의 형광단들이 당해 분야의 숙련가들에게 공지되어 있다. 예를 들어 하기의 문헌들을 참조하시오: Cardullo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8790-8794 (1988); Dexter, D.L., *J. of Chemical Physics* **21**: 836- 850 (1953); Hochstrasser *et al.*, *Biophysical Chemistry* **45**: 133-141 (1992); Selvin, P., *Methods in Enzymology* **246**: 300-334 (1995); Steinberg, I. *Ann. Rev. Biochem.*, **40**: 83- 114 (1971); Stryer, L. *Ann. Rev. Biochem.*, **47**: 819-846 (1978); Wang *et al.*, *Tetrahedron Letters* **31**: 6493-6496 (1990); Wang *et al.*, *Anal. Chem.* **67**: 1197-1203 (1995).

[0129] 본 발명의 소광제와 함께 사용될 수 있는 예시적인 공여체의 비제한적인 목록을 표 1 및 표 2에 제공한다.

표 1

[0130]

<p>공여체-수용체 에너지 전달 쌍에서 공여체 또는 수용체로서 선택될 수 있는 적합한 부분들</p> <p>4-아세트아미도-4'-아이소티오시아네이토스틸벤-2,2'-다이설포산 아크리딘 및 유도체: 아크리딘 아크리딘 아이소티오시아네이트</p> <p>5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-설포산(EDANS) 4-아미노-N-[3-비닐설포닐]페닐]나프탈이미드-3,5 다이설포네이트 N-(4-아닐리노-1-나프틸)말레이미드 안트라닐아미드 BODIPY 브릴리언트 옐로우 쿠마린 및 유도체: 쿠마린 7-아미노-4-메틸쿠마린(AMC, 쿠마린 120) 7-아미노-4-트라이플루오로메틸쿠마린(쿠마린 151)</p> <p>시아닌 염료 시아노신 4'6-다이아미니디노-2-페닐인돌(DAPI) 5',5"-다이브로모피로갈롤-설포나프탈레인(브로모피로갈롤 레드) 7-다이에틸아미노-3-(4'-아이소티오시아네이토펜)-4-메틸쿠마린 다이에틸렌트리아민 펜타아세테이트 4,4'-다이아이소티오시아네이토타다이하이드로-스틸벤-2,2'-다이설포산 4,4'-다이아이소티오시아네이토타스틸벤-2,2'-다이설포산 5-[다이메틸아미노]나프탈렌-1-설포닐 클로라이드(DNS, 단실클로라이드) 4-(4'-다이메틸아미노페닐아조)벤조산(DABCYL) 4-다이메틸아미노페닐아조페닐-4'-아이소티오시아네이트(DABITC) 에오신 및 유도체: 에오신 에오신 아이소티오시아네이트</p> <p>에리쓰로신 및 유도체: 에리쓰로신 B 에리쓰로신 아이소티오시아네이트</p> <p>에티디움 플루오로세인 및 유도체: 5-카복시플루오레세인(FAM) 5-(4,6-다이클로로트리아진-2-일)아미노플루오레세인(DTAF) 2',7'-다이메톡시-4',5'-다이클로로-6-카복시플루오레세인(JOE) 플루오레세인 플루오레세인 아이소티오시아네이트 QFITC(XRITC)</p> <p>플루오레스카민 IR144 IR1446 말라카이트 그린 아이소티오시아네이트 4-메틸움벨리페론 오쏘 크레졸프탈레인 나이트로티로신 파라로사닐린</p>

[0131]

표 2

[0132]

공여체-수용체 에너지 전달 쌍에서 공여체 또는 수용체로서 선택될 수 있는 적합한 부분들
페놀 레드
B-피코에리쓰린
o-프탈다이알데하이드
피렌 및 유도체:
피렌
피렌 부티레이트
숙신이미딜 1-피렌 부티레이트
양자 점
반응성 레드 4(시바크론(Cibacron)(상표) 브릴리언트 레드 3B-A)
로다민 및 유도체:
6-카복시-X-로다민(ROX)
6-카복시로다민(R6G)
리사민 로다민 B 설포닐 클로라이드 로다민(Rhod)
로다민 B
로다민 123
로다민 X 아이소티오시아네이트
설포로다민 B
설포로다민 101
설포로다민 101의 설포닐 클로라이드 유도체(텍사스 레드)
N,N,N',N'-테트라메틸-6-카복시로다민(TAMRA)
테트라메틸 로다민
테트라메틸 로다민 아이소티오시아네이트(TRITC)
리보플라빈
로술산
금속 킬레이트, 예를 들어 란타나이드 킬레이트(예를 들어 유로피움 테르븀 킬레이트), 루테튬 킬레이트

[0133]

[0134]

하기의 참고문헌들에 의해 예시되는 바와 같이, 특정 탐침에 적합한 공여체-수용체 쌍의 선택을 위해 이용할 수 있는 다수의 실제 지침이 문헌 중에 존재한다: *Pesce et al.*, Eds., *Fluorescence Spectroscopy* (Marcel Dekker, New York, 1971); *White et al.*, *Fluorescence Analysis: A Practical Approach* (Marcel Dekker, New York, 1970); 등. 상기 문헌은 또한 형광 및 색원성 분자의 총망라된 목록 및 리포터-소광제 쌍의 선택에 대한 그의 관련된 광학 특성을 제공하는 참고문헌들을 포함한다(예를 들어 문헌[Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971)]; 문헌[Griffiths, *Colour and Constitution of Organic Molecules* (Academic Press, New York, 1976)]; 문헌[Bishop, Ed., *Indicators* (Pergamon Press, Oxford, 1972)]; 문헌[Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes*, Eugene, 1992) Pringsheim, *Fluorescence and Phosphorescence* (Interscience Publishers, New York, 1949)] 등을 참조하시오). 더욱이, 하기의 참고문헌들에 의해 예시되는 바와 같이, 핵산에 첨가될 수 있는 공통 반응기를 통한 공유 부착을 위해 리포터 및 소광제 분자를 유도체화하는 것에 대해서 문헌에 광범위한 지침이 존재한다: 상기 허그랜드(Haugland) 문헌; 울만(Ullman) 등의 미국특허 제 3,996,345 호; 카나(Khanna) 등의 미국특허 제 4,351,760 호. 따라서, 특정 용도를 위해 에너지 교환쌍을 선택하고 탐침 분자, 예를 들어 핵산, 펩타이드 또는 다른 중합체에 상기 쌍의 일원을 접합시키는 것은 당해 분야의 숙련가들의 능력내에 있다.

[0135]

일반적으로, 상기 소광제의 흡수 밴드가 공여체의 형광 방출 밴드와 실질적으로 겹치는 것이 바람직하다. 상기 공여체(형광단)가 공여체-수용체 에너지 전달을 이용하는 탐침의 성분인 경우, 본 발명의 공여체 형광 부분 및 상기 소광제(수용체)를 바람직하게는 상기 공여체 부분이 여기될 때 상기 공여체 및 수용체 부분이 공여체-수용체 에너지 전달을 나타내도록 선택한다. 상기 형광단-소광제 쌍의 선택에서 고려해야 하는 한 가지 인자는 이들 간의 공여체-수용체 에너지 전달 효율이다. 바람직하게, 상기 공여체와 수용체 부분간의 FRET의 효율은 적

어도 10%, 보다 바람직하게는 적어도 50% 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 80%이다. 상기 FRET의 효율을 본 명세서에 기재되고 당해 분야에 공지된 방법들을 사용하여 실험적으로 시험할 수 있다.

[0136] 상기 공여체-수용체 쌍 간의 에너지 전달의 효율을 또한, 이량체화하고 가깝게 결합하는 상기 공여체 및 수용체 간의 능력을 변화시킴으로써 조절할 수 있다. 상기 공여체 및 수용체 부분이 가깝게 결합하는 것으로 공지되거나 측정된 경우, 결합의 증가 또는 감소를, 상기 공여체와 수용체간의 링커 부분 또는 탐침 자체의 길이를 조절함으로써 촉진시킬 수 있다. 공여체-수용체 쌍의 결합 능력을 소수성 또는 이온성 상호작용, 또는 상기 탐침 구조물 중의 입체 반발력의 조절에 의해 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 공여체-수용체 쌍의 결합을 맡고 있는 분자내 상호작용이 증대되거나 약화될 수 있다. 따라서, 예를 들어 상기 공여체-수용체 쌍 간의 결합을 예를 들어 전체적으로 음전하를 갖는 공여체와 전체적으로 양전하를 갖는 수용체를 사용함으로써 증가시킬 수 있다.

[0137] 탐침에 직접 부착되는 형광단 외에, 상기 형광단을 간접적인 수단에 의해 또한 부착시킬 수 있다. 이 실시태양에서, 리간드 분자(예를 들어 비오틴)를 탐침 중에 일반적으로 공유 결합시킨다. 이어서 상기 리간드를 또 다른 분자(예를 들어 스트렙타아비딘) 분자(상기는 본래 검출성이거나 또는 신호 시스템, 예를 들어 형광 화합물에 공유 결합된다), 또는 비-형광 화합물의 전환에 의해 형광 화합물을 생성시키는 효소에 결합시킨다. 표지로서 유용한 관심 효소는 예를 들어 하이드롤라제, 특히 포스파타제, 에스테라제 및 글리코시다제, 하이드롤라제, 펩티다제 또는 옥시다제, 특히 퍼옥시다제를 포함한다. 형광 화합물은 상기에 논의된 바와 같은 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 움벨리페론 등을 포함한다. 사용될 수 있는 다양한 표지화 또는 신호 생성 시스템의 고찰에 대해서 미국특허 제 4,391,904 호를 참조하시오.

[0138] 본 발명의 소광제와 함께 사용되는 공여체는 예를 들어 잔텐 염료, 예를 들어 플루오레세인, 시아닌 염료 및 로다민 염료를 포함한다. 이들 화합물의 다수의 적합한 형태를 그의 페닐 부분(핵산에의 부착을 위한 결합 부위로서 또는 결합 작용기로서 사용될 수 있다)상의 치환체에 따라 광범위하게 상업적으로 입수할 수 있다. 본 발명의 소광제와 함께 사용되는 형광 화합물의 또 다른 그룹은 알파 또는 베타 위치에 아미노기를 갖는 나프틸아민이다. 상기와 같은 나프틸아미노 화합물 중에는 1-다이메틸아미노나프틸-5-설포네이트, 1-아닐리노-8-나프탈렌 설포네이트 및 2-p-토우이디닐-6-나프탈렌 설포네이트가 포함된다. 다른 공여체는 3-페닐-7-아이소시아네이토쿠마린, 아크리딘, 예를 들어 9-아이소티오시아네이토아크리딘 및 아크리딘 오렌지; N-(p-(2-벤즈옥사졸릴)페닐)말레이미드; 벤즈옥사다이아졸, 스틸벤, 피렌 등을 포함한다.

[0139] 명확히 예시하기 위해서, 하기의 논의는 소광제 및 형광단의 핵산에의 부착에 집중한다. 핵산 탐침에 대한 집중은 소광제가 부착될 수 있는 탐침 분자의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다. 당해 분야의 숙련가들은 소광제를 또한 표준 합성 화학을 사용하여 소분자, 단백질, 펩타이드, 합성 중합체, 고체 지지체 등에 부착시킬 수 있음을 알 것이다.

[0140] 탐침이 핵산 탐침인 예시적인 실시태양에서, 형광단은 퀘이사(등록상표)(바이씨치 테크놀로지스 인코포레이티드 (Biosearch Technologies, Inc.))이다. 상기 형광단을, 내부 부위가 또한 이용될 수 있고 선택된 목적에 유용하지만, 바람직하게는 핵산의 3'- 또는 5'-말단에 부착시킨다. 상기 형광단을 어느 말단에 부착시키든, 상기 소광제를 일반적으로 그의 대척점에, 또는 상기 핵산 쇄의 내부 위치에 부착시킬 것이다. 공여체 그룹을 바람직하게는 상기 공여체의 아미다이트 유도체를 사용하여 도입시킨다. 한편으로, 반응성 작용기(예를 들어 아이소티오시아네이트, 활성 에스테르 등)를 포함하는 공여체 그룹을 상기 핵산에 부착된 사슬 또는 링커 가지(예를 들어 핵실 아민)상에 반응성 작용기와의 반응을 통해 도입시킬 수 있다.

[0141] 더욱 또 다른 바람직한 실시태양에서, 상기 공여체 부분을 유도체화된 합성 지지체의 사용에 의해 핵산의 3'-말단에 부착시킬 수 있다. 예를 들어, TAMRA(테트라메틸로다민 카복실산)를, 상기 형광단(바이씨치 테크놀로지스 인코포레이티드)의 유사체로 유도체화된 고체 지지체를 사용하여 3'-말단에서 핵산에 부착시킨다.

[0142] 소분자의 핵산에의 접합에 관한 문헌의 충분히 전개된 본문에 비추어, 공여체/수용체 쌍의 핵산에의 부착에 대한 다수의 다른 방법들은 당해 분야의 숙련가들에게 자명할 것이다. 예를 들어, 로다민 및 플루오레세인 염료를 편의상 포스포아미다이트 부분으로 유도체화된 염료에 의해 고상 합성의 종결시 핵산의 5'-하이드록실에 부착시킨다(예를 들어 우(Woo) 등의 미국특허 제 5,231,191 호; 및 홉스 주니어(Hobbs, Jr.)의 미국특허 제 4,997,928 호를 참조하시오).

[0143] 보다 구체적으로, 하기의 참고문헌들에 예시되는 바와 같이, 핵산의 5'- 또는 3'-말단에 그룹을 부착시키기 위한 다수의 링커 부분 및 방법들이 존재한다: Eckstein, editor, Nucleic acids and Analogues: A Practical

Approach (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman *et al.*, *Nucleic Acids Research*, **15**: 5305-5321 (1987)(핵산상의 3'-티올기); Sharma *et al.*, *Nucleic Acids Research*, **19**: 3019 (1991)(3'-설프하이드릴); Giusti *et al.*, *PCR Methods and Applications*, **2**: 223-227 (1993) 및 펑(Fung) 등의 미국특허 제 4,757,141 호(피이 바이오시스템스(P.E. Biosystems), 미국 캘리포니아 소재)로부터 입수할 수 있는 아미노링크(Aminolink) TM II를 통한 5'-포스포아미노기) 스타빈스키(Stabinsky)의 미국특허 제 4,739,044 호(3-아미노알킬포스포릴기); Agrawal *et al.*, *Tetrahedron Letters*, **31**: 1543-1546 (1990)(포스포아미데이트 결합을 통한 부착); Sproat *et al.*, *Nucleic Acids Research*, **15**: 4837 (1987)(5-머캡토기); Nelson *et al.*, *Nucleic Acids Research*, **17**: 7187-7194 (1989)(3'-아미노기) 등.

[0144] 형광 표지의 검출 수단은 당해 분야의 숙련가들에게 주지되어 있다. 따라서, 예를 들어 형광 표지를, 적합한 파장의 빛으로 형광단을 여기시키고 생성되는 형광을 검출함으로써 검출할 수 있다. 상기 형광을 사진 필름에 의해, 전자 검출기, 예를 들어 전하 커플링된 장치(CCD) 또는 광전자증배관 등을 사용하여 시각적으로 검출할 수 있다. 유사하게, 효소 표지를, 상기 효소에 대한 적합한 기질을 제공하고 생성되는 반응 생성물을 검출함으로써 검출할 수 있다.

[0145] 반응성 작용기

[0146] 본 발명 화합물의 성분들(예를 들어 링커, 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 핵산, 담체 분자 및 고체 지지체)을 제1 및 제2 반응성 작용기의 반응에 의해 형성된 결합 부위를 통해서 결합시킬 수 있다. 상기 반응성 작용기들은 상보적인 반응성을 가지며, 반응하여 상기 화합물의 2개 성분 사이에 공유 결합(본 명세서에서 결합 부위로서 지칭된다)을 형성시킨다. 예를 들어, 화학식 I 또는 II에 따른 화합물(여기에서 R^X 또는 R^S가 반응성 작용기이다)을 또 다른 성분(예를 들어 링커, 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 핵산, 담체 분자 및 고체 지지체)상의 상보성 반응성의 반응성 작용기와 반응시켜 생성되는 결합 부위를 통해 상기 성분들을 공유 결합시킬 수 있다. 상기 상보성 반응성의 반응성 작용기는 다른 성분(링커, 뉴클레오사이드 등)의 임의의 위치, 예를 들어 알킬 또는 헤테로알킬 아릴 또는 헤테로아릴 핵 또는 아릴 또는 헤테로아릴 핵상의 치환체에 위치할 수 있다. 다양한 실시태양에서, 상기 반응성 기가 알킬(또는 헤테로알킬) 또는 치환된 알킬(또는 헤테로알킬) 쇠에 부착되는 경우, 상기 반응성 기는 바람직하게는 상기 쇠의 말단 위치에 위치한다.

[0147] 본 발명의 실시예에 유용한 반응성 기 및 반응 부류는 일반적으로 생물접합 화학 분야에 주지된 것들이다. 본 발명의 올리고머의 반응성 전구체에 이용 가능한 현재 유리한 반응 부류는 비교적 순한 조건하에서 진행되는 것들이다. 여기에는 비제한적으로 친핵성 치환(예를 들어 아민 및 알콜과 아실 할라이드, 활성 에스테르와의 반응), 친전자성 치환(예를 들어 엔아민 반응) 및 탄소-탄소 및 탄소-헤테로원자 다중 결합에의 부가(예를 들어 마이클 반응, 딜스-알더 부가)가 포함된다. 상기 및 다른 유용한 반응들은 예를 들어 하기의 문헌에 논의되어 있다: March, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; and Feeney *et al.*, *Modification of Proteins: Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

[0148] 예로서, 본 발명에 유용한 반응성 작용기는 비제한적으로 올레핀, 아세틸렌, 알콜, 페놀, 에테르, 옥사이드, 할라이드, 알데하이드, 케톤, 카복실산, 에스테르, 아마이드, 시아네이트, 아이소시아네이트, 티오시아네이트, 아이소티오시아네이트, 아민, 하이드라진, 하이드라존, 하이드라지드, 다이아조, 다이아조늄, 나이트로, 나이트릴, 머캡탄, 설파이드, 다이설파이드, 설폭사이드, 설피드, 설피드산, 설피드산, 아세탈, 케탈, 무수물, 설페이트, 설피드산 아이소나이트릴, 아마이드, 이미드, 이미데이트, 나이트론, 하이드록실아민, 옥심, 하이드록실아민 티오하이드록실아민, 알렌, 오쏘 에스테르, 설파이트, 엔아민, 인아민, 유레아, 슈도유레아, 세미카바지드, 카보다이이미드, 카바메이트, 이민, 아지드, 아조 화합물, 아족시 화합물, 및 니트로소 화합물을 포함한다. 반응성 작용기는 또한 생물접합체의 제조에 사용되는 것들, 예를 들어 N-하이드록시숙신이미드 에스테르, 말레이미드 등을 포함한다. 각각의 이들 작용기의 제조 방법은 당해 분야에 주지되어 있으며 특정한 목적을 위한 그의 용도 또는 변형은 당해 분야의 숙련가의 능력안에 있다(예를 들어 문헌[Sandler and Karo, eds. *ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS*, Academic Press, San Diego, 1989]을 참조하시오).

[0149] 유용한 반응성 작용기 전환은 예를 들어 하기를 포함한다:

[0150] (a) 비제한적으로 활성 에스테르(예를 들어 N-하이드록시숙신이미드 에스테르, N-하이드록시벤조트라이아졸 에

스테르, 티오에스테르, p-나이트로페닐 에스테르), 산 할라이드, 아실 이미다졸, 알킬, 알케닐, 알키닐 및 방향족 에스테르를 포함한 다양한 유도체로 쉽게 전환되는 카복실기;

- [0151] (b) 에스테르, 에테르, 할라이드, 알데하이드 등으로 전환될 수 있는 하이드록실기;
- [0152] (c) 할로알킬기, 여기에서 상기 할라이드는 나중에 친핵성기, 예를 들어 아민, 카복실레이트 음이온, 티올 음이온, 탄소 음이온, 또는 알콕사이드 이온으로 치환되어, 상기 할로겐 원자의 부위에 새로운 기의 공유 부착을 생성시킬 수 있다;
- [0153] (d) 딜스 알더 반응에 참여할 수 있는 친디엔체기, 예를 들어 말레이미도기;
- [0154] (e) 후속의 유도체화가 카보닐 유도체, 예를 들어 이민, 하이드라존, 세미카바존 또는 옥심의 형성을 통해서 또는 그리냐르 부가 또는 알킬리튬 부가와 같은 기전을 통해서 가능하게 하는 알데하이드 또는 케톤기;
- [0155] (f) 예를 들어 아민과의 후속 반응으로 설포아미드를 형성하는 설포닐 할라이드기;
- [0156] (g) 예를 들어 다이설파이드로 전환되거나 또는 아실 할라이드와 반응할 수 있는 티올기;
- [0157] (h) 예를 들어 아실화되거나, 알킬화되거나 또는 산화될 수 있는 아민 또는 설프하이드릴기;
- [0158] (i) 예를 들어 환부가, 아실화, 마이클 부가 등을 겪을 수 있는 알켄;
- [0159] (j) 예를 들어 아민 및 하이드록실 화합물과 반응할 수 있는 에폭사이드; 및
- [0160] (k) 포스포아미다이트 및 핵산 합성에 유용한 다른 표준 작용기.

[0161] 상기 반응성 작용기를, 상기가 본 발명의 올리고머 조립에 필요한 반응에 참여하지 않거나 또는 상기 반응을 간섭하도록 선택할 수 있다. 한편으로, 반응성 작용기를, 보호기의 존재에 의해 상기 반응에 참여하는 것을 방지할 수 있다. 당해 분야의 숙련가들은 특정한 작용기가, 선택된 반응 조건 세트를 방해하지 않도록 상기 작용기를 어떻게 보호하는지를 안다. 예를 들어 문헌[Greene *et al.*, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991]을 참조하시오.

[0162] 공유 결합 부분

[0163] 본 발명의 올리고머 중 일부에, 상기 올리고머와 표적 서열간에 적어도 하나의 공유 결합을 수행할 수 있는 반응성 작용기 부분이 포함된다. 다중 공유 결합을 또한 다수의 상기와 같은 부분을 제공함으로써 형성시킬 수 있다. 상기 공유 결합은 바람직하게는 표적 가닥 중의 핵염기 잔기에 대한 것이나, 또한 상기 표적의 다른 부분, 예를 들어 당 또는 포스포다이에스터와도 이루어질 수 있다. 가교결합을 수행하는 부분의 반응 특성은 상기 듀플렉스 중의 표적의 특성을 결정한다. 바람직한 가교결합제 부분은 아실화 및 알킬화제, 및 특히 가닥 중 표적 위치와의 반응을 허용하도록 서열 특이성-제공 부분에 대해 위치하는 것들을 포함한다.

[0164] 상기 가교결합제 부분을 편의상 상기 올리고머의 서열 중에 유사한 피리미딘 또는 퓨린 잔기로서 배치할 수 있다. 상기 배치는 5'- 및/또는 3'-단부, 상기 서열의 내부 부분, 또는 상기의 조합일 수 있다. 증대된 용통성을 허용하는 말단예의 배치가 바람직하다. 유사한 부분들을 또한 펩타이드 주쇄에 부착시킬 수 있다.

[0165] 본 발명에 유용한 알킬화 부분의 예는 N⁴,N⁴-에타노시토신 및 N⁶,N⁶-에타노아데닌을 포함한다.

[0166] 상기 핵염기가 퓨린이거나 피리미딘일 필요가 없음은 분명하며; 실제로 반응성 작용기가 부착되는 부분은 전혀 핵염기일 필요가 없고 당, 링커, 소광제, 안정화 부분, 형광단 또는 본 발명의 올리고머의 상기 성분들 중 일부 조합일 수 있다. 상기 반응기의 임의의 부착 수단은 상기 배치가 올바른 한 만족스럽다.

[0167] 합성

[0168] 본 발명의 화합물(예를 들어 고체 지지체, 단량체(예를 들어 포스포아미다이트) 및 본 발명의 올리고머 또는 그의 분절)을 일반적으로는 통상적으로 합성한다. 예를 들어 미국특허 제 7,019,129 호; 미국특허 제 8,466,266 호; 및 미국특허 제 7,879,986 호를 참조하시오. 당해 분야에 공지되고 본 명세서에 기재된 합성 방법을 사용하여, 적합하게 보호된 핵단량체로 본 발명의 화합물을 함유하는 올리고머뿐만 아니라 당해 분야에 공지된 다른 핵염기들을 합성할 수 있다. 올리고머의 합성 방법은 예를 들어 하기의 문헌에서 발견된다: Froehler, B., et

al., *Nucleic Acids Res.* (1986) 14:5399-5467; *Nucleic Acids Res.* (1988) 16:4831-4839; *Nucleosides and Nucleotides* (1987) 6:287-291; Froehler, B., *Tetrahedron Letters* (1986) 27:5575-5578; Caruthers, M. H. in *Oligodeoxynucleotides-Antisense Inhibitions of Gene Expression* (1989), J. S. Cohen, editor, CRC Press, Boca Raton, p7-24; Reese, C. B. et al., *Tetrahedron Letters* (1985) 28:2245-2248. 메틸 포스포아미다이트 화학을 통한 메틸포스포네이트 결합된 올리고머의 합성이 또한 기재되었다(문헌[Agrawal, S. et al., *Tetrahedron Letters* (1987) 28:3539-3542]; 클렘 알 이 등의 국제 공보 제 WO 92/07864 호).

- [0169] 본 발명의 다양한 화합물들의 예시적인 합성을 도 2 및 실시예 1에 제시한다.
- [0170] 예시적인 실시태양에서, 핵단량체를 표준 합성 조건 및 시약을 사용하여 올리고머 또는 그의 편의상 단편에 직접 통합시킨다. 상기 방법에 의해 제조되는 예시적인 결합은 포스포다이에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트, 메틸포스포네이트, 포스포로다티오에이트, 카보네이트, 모르폴리노 카바메이트 및 설포네이트를 포함한다.
- [0171] 다양한 실시태양에서, 합성은 적합한 전구체로 출발하는 짧은 합성단위체(이량체, 삼량체 등)의 합성을 수반한다. 상기 접근법은 N-메틸하이드록실아민, 다이메틸하이드라조, 설포메이트, 카바메이트, 설포네이트, 설폰아미드, 포름아세탈 티오포름아세탈 및 카보네이트를 포함한 결합의 합성에 적합하다.
- [0172] 본 발명의 올리고머를 임의의 적합한 화학, 예를 들어 아미다이트, 트라이에스테르 또는 수소 포스포네이트 커플링 방법 및 조건에 의해 합성할 수 있다. 상기 올리고머를, 바람직하게는 5-위치에서 DMT, MMT, Fmoc(9-플루오레닐메톡시카보닐), PACO(페녹시아세틸), 실릴 에테르, 예를 들어 TBDMS(t-부틸다이페닐실릴) 또는 TMS(트라이메틸실릴)로 보호되고 3'-위치에서 활성화되는 적합한 출발 합성단위체, 에스테르, H-포스포네이트, 아미다이트, 예를 들어 β-시아노에틸포스포아미다이트, 실릴 에테르, 예를 들어 TBDMS 또는 TMS 또는 t-부틸다이페닐로부터 합성한다. 한편으로, 적합한 유리딘 또는 시티딘 전구체, 예를 들어 차단된 5-요오도-2'-데옥시유리딘, 5-요오도-2'-O-알킬유리딘, 5-브로모-2'-데옥시유리딘, 5-트라이플루오로메탄설포네이트-2'-데옥시유리딘, 5-브로모-2'-O-알킬유리딘 또는 차단 및 보호된 5-요오도-2'-데옥시시티딘, 5-브로모-2'-데옥시시티딘, 5-트라이플루오로메탄설포네이트-2'-데옥시시티딘, 5-요오도-2'-O-알킬시티딘, 5-브로모-2'-O-알킬시티딘을 편의상 짧은 올리고머, 예를 들어 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체 또는 보다 긴 합성단위체에 통합시키고, 후속으로 유도체 화시켜 적합한 합성단위체 및 보다 긴 올리고머를 생성시킬 수 있다.
- [0173] 약 4개 이상의 핵단량체 잔기를 함유하는 올리고머의 예시적인 합성을, 아미다이트, H-포스포네이트 또는 트라이에스테르 화학과 함께 사용하기에 적합한 커플링기를 운반하는 합성단위체, 예를 들어 단량체, 이량체 또는 삼량체를 사용하여 수행한다. 상기 합성단위체를 사용하여 상기 올리고머의 성분들을 포스포다이에스테르 또는 포스포다이에스테르 이외의 인-함유 결합(예를 들어 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 티오노메틸포스포네이트, 포스포아미데이트 등)을 통해 결합시킬 수 있다.
- [0174] 다른 비-인-함유 치환된 결합의 합성을 당해 분야에 공지된 바와 같은 적합한 전구체를 사용하여 수행할 수 있다.
- [0175] 일단 목적하는 핵산이 합성되면, 바람직하게는 상기 핵산을 당해 분야에 공지된 방법에 의해, 상기 핵산이 합성되고 존재하는 임의의 보호기를 제거하도록 처리된 고체 지지체로부터 절단시킨다(예를 들어 60 °C, 5시간, 농축된 암모니아). 염기-민감성을 상기 핵산에 부착시키는 실시태양(예를 들어 TAMRA)에서, 상기 탈보호는 바람직하게는 보다 순한 조건(예를 들어 부탈아민:물 1:3, 8시간, 70 °C)을 사용할 것이다. 이러한 조건하에서의 탈보호는 빠른 탈보호 아미다이트(예를 들어 dC-아세틸, dG-dmf)의 사용에 의해 촉진된다.
- [0176] 상기 지지체로부터의 절단 및 탈보호에 이어서, 상기 핵산을 당해 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 크로마토그래피, 추출 및 젤 정제에 의해 정제시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 핵산을 HPLC를 사용하여 정제시킨다. 상기 단리된 핵산의 농도 및 순도를 바람직하게는 분광광도계에서 260 nm에서 광학 밀도를 측정함으로써 측정한다.
- [0177] 본 발명의 분석 및 올리고머성 탐침
- [0178] 다양한 실시태양에서, 본 발명은 하나 이상의 분석 포맷에 유용한 올리고머를 제공한다. 선택된 실시태양에서, 상기 올리고머는 그의 표적과의 결합 및 상기 표적으로부터의 해리시 검출성 신호의 발생에 관여한다. 본 발명의 올리고머성 탐침을 임의의 특정한 분석 포맷으로 그 사용을 제한하지 않는다. 상응하게, 하기의 기재는 본

발명의 올리고머의 용도가 발견되는 예시적인 분석 포맷을 예시하고자 하며, 상기 올리고머가 사용되는 분석 포맷을 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0179]

분석

[0180]

하기의 논의는 일반적으로 본 명세서에 기재된 분석에 관한 것이다. 본 논의는 본 발명을 몇몇 바람직한 실시태양을 참조하여 예시하고자 하며 본 발명의 화합물이 사용되는 탐침 및 분석 유형의 범위를 제한하는 것으로서 해석해서는 안 된다. 본 발명의 화합물을 사용하는 다른 분석 포맷들은 당해 분야의 숙련가들에게 자명할 것이다.

[0181]

일반적으로, 표적 분자, 예를 들어 미지량의 핵산의 농도를 측정하기 위해서, 먼저 일정량의 탐침을 기지량의 범위에 걸쳐 있는 핵산 표준과 접촉시킨 참조 데이터를 획득하는 것이 바람직하다. 상기 각각의 참조 혼합물로부터의 형광 방출 강도를 사용하여 그래프 또는 표준 곡선을 유도하고, 여기에서 상기 미지의 농도를 상기 기지의 표준의 강도와 비교한다. 예를 들어, a) 상기 표적 핵산내 서열에 하이브리드화하고; b) 표지 부위인 5' 및 3' 단부상에 형광단 및 소광제 변형을 가지며; c) 결합되지 않은 입체구조에서 소광되고 이어서 표적 핵산에 결합시 신호를 방출하는 형광원성 특성을 갖는 탐침을 사용하여 상기와 같은 참조 데이터를 획득할 수 있다. 상기와 같은 탐침은 상기 신호가 표적 핵산 농도의 증가에 따라 증가하는 특징적인 형광 방출을 제공한다. 이어서, 미지량의 표적을 갖는 샘플을 상기 탐침과 접촉시키고, 상기 혼합물로부터의 형광 강도를 측정한다. 이어서 상기 형광 방출의 강도를 참조 표준과 비교하여 시험 혼합물 중의 표적의 농도를 획득한다.

[0182]

다중 분석

[0183]

또 다른 실시태양에서, 본 발명의 고체 지지체 및 올리고머를 혼합물 중의 하나 이상의 종을 검출하기 위해 다중 분석에 사용되는 하나의 탐침 또는 하나 이상의 탐침의 성분으로서 사용한다.

[0184]

본 발명의 고체 지지체 또는 올리고머를 기본으로 하는 탐침이 다중-유형 분석 및 평가를 수행하는데 특히 유용하다. 전형적인 다중 분석에서, 2개 이상의 별개의 종들(또는 하나 이상의 종의 영역들)을 2개 이상의 탐침을 사용하여 검출하며, 여기에서 상기 각각의 탐침을 상이한 형광단으로 표지한다. 공여체-수용체 에너지 전달에 따라 다중 분석에 사용되는 바람직한 종들은 적어도 2개의 기준을 충족시킨다: 상기 형광 종은 밝고 분광학적으로 잘-분해되며; 상기 형광 종과 소광제간의 에너지 전달이 효율적이다.

[0185]

본 발명의 고체 지지체 및 올리고머는 하나보다 많은 형광 리포터가 하나 이상의 소광제 구조와 짝이 되는 다중 분석의 설계를 허용한다. 본 발명의 고체 지지체 또는 올리고머를 사용하는 다수의 상이한 다중 분석은 당해 분야의 숙련가에게 자명할 것이다. 하나의 예시적인 분석에서, 적어도 2개의 별개의 형광 리포터가 각각 그들 각각의 올리고머상의 동일한 유형의 소광제 구조와 짝이 되어 FRET 또는 접촉 소광을 통해 신호를 조절한다. 한편으로, 적어도 2개의 별개의 형광 리포터가 별개의 소광제 구조(형광 성질이 보다 양호하게 "합치된다")와 짝이 되는 분석을 실행할 수 있다. 상기 형광단을 상기 소광제와 동일한 분자 또는 상이한 분자에 결합시킬 수 있다. 더욱이, 상기 소광제 및 형광단과 유사하게, 특정한 분석 시스템에 유용한 담체 분자, 예를 들어 상기 형광단 및 소광제를 공유적으로 구속하는 올리고 서열은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0186]

상술한 혼합물 외에, 본 발명은 또한 특정한 분자 종의 존재를 검출하기 위한 정성적인 방법을 제공한다. 상기 방법은 (a) 상기 종을 본 발명의 고체 지지체 또는 올리고머를 함유하는 혼합물과 접촉시키고; (b) 생성되는 혼합물의 하나 이상의 성분의 형광 성질의 변화를 검출하여, 상기 분자 종의 존재를 검출함을 포함한다.

[0187]

공여체-수용체 에너지 전달을 사용하는 2개 이상의 탐침의 동시 사용은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어 상이한 서열 특이성을 갖는 핵산 탐침들을 사용하는 다중 분석이 개시되었다. 형광 탐침을 사용하여 개체가 특정 돌연변이에 대해 동종접합성 야생형인지, 동종접합성 돌연변이체인지 또는 이종접합성인지를 측정하였다. 예를 들어, 야생형 서열을 인식하는 하나의 소광된-플루오레세인 분자 비콘 및 돌연변이 대립유전자를 인식하는 또 다른 로다민-소광된 분자 비콘을 사용하여, 개체를 β -케모킨 수용체에 대해서 유전형질 분석하는 것이 가능하다(문헌[Kostrakis *et al. Science* **279**:1228-1229 (1998)]). 단지 플루오레세인만의 신호의 존재는 상기 개체가 야생형임을 암시하고, 단지 로다민만의 신호의 존재는 상기 개체가 동종접합성 돌연변이체임을 암시한다. 로다민 및 플루오레세인 신호 모두의 존재는 이종접합체를 진단한다. 문헌[Tyagi *et al. Nature Biotechnology* **16**: 49-53 (1998)]은 대립유전자 식별을 위한 4개의 상이하게 표지된 분자 비콘의 동시 사용을 개시하였고, 문

현[*Lee et al., BioTechniques 27: 342-349 (1999)*]은 6개의 PCR 산물의 7개 색상의 균일 검출을 개시하였다.

[0188] 본 발명의 소광제를, 예를 들어 완전 세포, 바이러스, 단백질(예를 들어 효소, 항체, 수용체), 당단백질, 지단백질, 세포내 입자, 유기체(예를 들어 살모넬라), 핵산(예를 들어 DNA, RNA 및 그의 유사체), 폴리사카라이드, 리포폴리사카라이드, 지질, 지방산, 비-생물학적 중합체 및 소분자(예를 들어 독소, 약물, 살충제, 대사산물, 호르몬, 알칼로이드, 스테로이드)를 포함한 임의의 중들을 실질적으로 검출하고/하거나 정량분석하도록 설계된 다중 분석에 사용할 수 있다.

[0189] 핵산 탐침

[0190] 본 발명의 고체 지지체 및 올리고머는 유용한 핵산 탐침이며, 이들은 예를 들어 5'-뉴클레아제 분석, 가닥 치환 증폭(SDA), 핵산 서열-기반 증폭(NASBA), 회전환형 증폭(RCA)을 포함한 다양한 DNA 증폭/정량분석 전략뿐만 아니라 용액상 또는 고상(예를 들어 배열) 분석에서 직접적인 표적 검출에 검출제의 성분으로서 사용될 수 있다. 더욱 또한, 상기 고체 지지체 및 올리고머를, 예를 들어 분자 비콘, 스콜피온(Scorpion) 탐침(상표), 선라이즈(Sunrise) 탐침(상표), 입체구조적으로 지원되는 탐침, 라이트업 탐침, 인베이더 디텍션(Invader Detection) 탐침, 및 TaqMan(상표) 탐침 중에서 선택된 포맷을 포함한 실질적으로 임의의 포맷의 탐침에 사용할 수 있다. 예를 들어 하기 문헌들을 참조하시오: Cardullo, R., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:8790-8794 (1988); Dexter, D.L., *J. Chem. Physics*, **21**:836-850 (1953); Hochstrasser, R.A., *et al., Biophysical Chemistry*, **45**:133-141 (1992); Selvin, P., *Methods in Enzymology*, **246**:300-334 (1995); Steinberg, I., *Ann. Rev. Biochem.*, **40**:83-114 (1971); Stryer, L., *Ann. Rev. Biochem.*, **47**:819-846 (1978); Wang, G., *et al., Tetrahedron Letters*, **31**:6493-6496 (1990); Wang, Y., *et al., Anal. Chem.*, **67**:1197-1203 (1995); Debouck, C., *et al., in supplement to nature genetics*, **21**:48-50 (1999); Rehman, F.N., *et al., Nucleic Acids Research*, **27**:649-655 (1999); Cooper, J.P., *et al., Biochemistry*, **29**:9261-9268 (1990); Gibson, E.M., *et al., Genome Methods*, **6**:995-1001 (1996); Hochstrasser, R.A., *et al., Biophysical Chemistry*, **45**:133-141 (1992); Holland, P.M., *et al., Proc Natl. Acad. Sci USA*, **88**:7276-7289 (1991); Lee, L.G., *et al., Nucleic Acids Resch.*, **21**:3761-3766 (1993); Livak, K.J., *et al., PCR Methods and Applications*, Cold Spring Harbor Press (1995); Vamosi, G., *et al., Biophysical Journal*, **71**:972-994 (1996); Wittwer, C.T., *et al., Biotechniques*, **22**:176-181 (1997); Wittwer, C.T., *et al., Biotechniques*, **22**:130-38 (1997); Giesendorf, B.A.J., *et al., Clinical Chemistry*, **44**:482-486 (1998); Kostrikis, L.G., *et al., Science*, **279**:1228-1229 (1998); Matsuo, T., *Biochemica et Biophysica Acta*, **1379**:178-184 (1998); Piatek, A.S., *et al., Nature Biotechnology*, **16**:359-363 (1998); Schofield, P., *et al., Appl. Environ. Microbiology*, **63**:1143-1147 (1997); Tyagi S., *et al., Nature Biotechnology*, **16**:49-53 (1998); Tyagi, S., *et al., Nature Biotechnology*, **14**:303-308 (1996); Nazarenko, I.A., *et al., Nucleic Acids Research*, **25**:2516-2521 (1997); Uehara, H., *et al., Biotechniques*, **26**:552-558 (1999); D. Whitcombe, *et al., Nature Biotechnology*, **17**:804-807 (1999); Lyamichev, V., *et al., Nature Biotechnology*, **17**:292 (1999); Daubendiek, *et al., Nature Biotechnology*, **15**:273-277 (1997); Lizardi, P.M., *et al., Nature Genetics*, **19**:225-232 (1998); Walker, G., *et al., Nucleic Acids Res.*, **20**:1691-1696 (1992); Walker, G.T., *et al., Clinical Chemistry*, **42**:9-13 (1996); 및 Compton, J., *Nature*, **350**:91-92 (1991).

[0191] 따라서, 본 발명은 핵산 표적 서열을 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (a) 상기 표적 서열을 검출제 핵산(예를 들어 본 발명의 올리고머)과 접촉시키고; (b) 상기 표적 결합 서열을 상기 표적 서열에 하이브리드화시키고, 이에 의해 상기 검출제 핵산의 입체구조를 변경시켜 형광 매개변수의 변화를 유발시키고; (c) 상기 형광 매개변수의 변화를 검출하고, 이에 의해 상기 핵산 표적 서열을 검출함을 포함한다.

[0192] 본 명세서에 기재된 방법에서, 달리 나타내지 않는 한, 바람직한 검출제 핵산은 단일 가닥 표적 결합 서열을 포함한다. 상기 결합 서열은 상기에 결합된 i) 형광단 및 ii) 소광제를 갖는다. 상기 결합 서열은 상기에 결합된 안정화 부분을 임의로 추가로 갖는다. 더욱이, 상기 검출제 핵산의 상보성 서열에의 하이브리드화에 앞서, 상기 핵산은 바람직하게는 상기 형광단이 여기될 때 상기 형광단과 상기 소광제 간의 공여체-수용체 에너지 전달을 허용하는 입체구조로 존재한다. 더욱 또한, 본 섹션에 기재된 각각의 방법에서, 형광 변화는 표적 서열의 존재에 대한 표시로서 검출된다. 상기 형광 변화는 바람직하게는 실시간 검출된다.

[0193] 현재 바람직한 핵산 탐침은 상기 탐침이 기능을 위해 2차 구조를 채용하는 핵산을 요구하지 않는다. 상기 방법, 및 달리 나타내지 않는 한, 본 섹션에 기재된 다른 방법에서, 상기 검출제 핵산은 실질적으로 임의의 분

자내 결합된 2차 구조를 나타내지만, 상기 구조는 바람직하게는 헤어핀, 줄기-고리 구조, 위매듭, 3중 나선 및 입체구조적으로 지원되는 구조 중에서 선택된 일원이다. 더욱이, 상기 분자내 염기-쌍 2차 구조는 바람직하게는 상기 표적 결합 서열의 일부를 포함한다.

- [0194] 또 다른 태양에서, 본 발명은 표적 서열의 증폭을 검출하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 PCR와 같은 증폭 반응의 사용을 수반한다. 예시적인 증폭 반응은 하기의 단계들 중 하나 이상을 포함한다:
- [0195] (a) 관심 표적 서열을 포함하는 샘플 핵산을 상기 표적 서열에 인접한 PCR 프라이머와 하이브리드화시키고;
- [0196] (b) 상기 하이브리드화된 프라이머를 폴리머라제로 연장시켜 PCR 생성물을 생성시키고, 상기 PCR 생성물의 2개 가닥을 분리시켜 상기 표적 서열의 센스 및 안티센스 가닥을 접근이 용이하게 만들고;
- [0197] (c) 검출제 핵산을 상기 PCR 생성물 중의 표적 서열의 센스 또는 안티센스 가닥에 하이브리드화시키며, 여기에서 상기 검출제 핵산은
 - [0198] i) 상기 PCR 생성물 중의 표적 서열의 센스 또는 안티센스 가닥의 적어도 일부에 상보성이고 상기 PCR 프라이머 사이의 영역에 하이브리드화하는 단일 가닥 표적 결합 서열;
 - [0199] ii) 형광단; 및
 - [0200] iii) 본 발명의 소광제
- [0201] 를 포함하고; 여기에서 상기 검출제 핵산은 상기 표적 서열에 하이브리드화하기에 앞서, 상기 형광단이 여기될 때 상기 형광단과 상기 소광제 간의 공여체-수용체 에너지 전달을 허용하는 입체구조로 존재하며;
- [0202] 상기에 의해, 상기 검출제 핵산의 입체구조를 변경시켜(예를 들어 소광 효율에 기여하는 임의의 2차 구조 또는 랜덤 코일 입체구조의 선형화) 형광 매개변수(예를 들어 신호 강도)의 변화를 유발시키고;
- [0203] (d) 상기 형광 매개변수의 변화를 측정하여 상기 표적 서열 및 그의 증폭을 검출한다.
- [0204] 임의로, 상기 폴리머라제가 프라이머 연장 동안(상기 단계 (b)) 상기 하이브리드화된 검출제 핵산과 만나고, 예를 들어 상기 폴리머라제의 2차 뉴클레아제 활성을 통해 상기 형광단 및 소광제를 구속하는 올리고머를 가수분해하는 경우, 상기 형광 매개변수의 변화는 영구적이 될 수 있다.
- [0205] 더욱 추가의 태양에서, 본 발명은 제1 핵산 및 제2 핵산이 하이브리드화하는 지를 확인하는 방법을 제공한다. 이 방법에서, 상기 제1 핵산은 본 발명에 따른 올리고머(용액 중의 또는 고체 지지체에 부착된)이다. 상기 방법은 (a) 상기 제1 핵산을 상기 제2 핵산과 접촉시키고; (b) 상기 제1 핵산, 상기 제2 핵산 및 이들의 조합 중에서 선택된 일원의 형광 성질의 변경을 검출하고, 이에 의해 상기 하이브리드화가 발생하는지의 여부를 포함한다.
- [0206] 다양한 실시태양에서, 본 발명은 핵산 표적 서열 중의 다형성을 검출하는데 유용한 탐침 및 방법을 제공한다. 다형성은 집단 중 2개 이상의 유전적으로 결정된 선택적 서열 또는 대립유전자의 발생을 지칭한다. 다형성 마커 또는 부위는 분기가 발생하는 유전자좌이다. 바람직한 마커는 적어도 2개의 대립유전자를 가지며, 이들 각각은 선택된 집단의 1% 초과, 및 보다 바람직하게는 10% 또는 20% 초과와 빈도로 발생한다. 다형성 유전자좌는 1 염기쌍 정도로 작을 수 있다. 다형성 마커는 제한 단편 길이 다형성, 가변수의 나란한 반복부(VNTR), 고가변성 영역, 미소부수체, 다이뉴클레오타이드 반복부, 트라이뉴클레오타이드 반복부, 테트라뉴클레오타이드 반복부, 단순 서열 반복부, 및 삽입 요소, 예를 들어 Alu를 포함한다. 상기 첫 번째 확인된 대립유전자 형태를 참조 형태로서 임의로 표시하고 다른 대립유전자 형태를 선택적 또는 변체 대립유전자로서 표시한다. 선택된 집단에서 가장 빈번하게 발생하는 대립유전자 형태를 때때로 야생형 형태라 칭한다. 2배성 유기체는 대립유전자 형태에 대해서 동종접합성이거나 이종접합성일 수 있다. 이종대립유전자 다형성은 2개의 형태를 갖는다. 삼중대립유전자 다형성은 3개의 형태를 갖는다.
- [0207] 예시적인 실시태양에서, 본 발명의 탐침을 사용하여 단일 뉴클레오타이드 다형성을 검출한다. 단일 뉴클레오타이드 다형성은 단일 뉴클레오타이드가 차지하는 다형성 부위에서 발생하며, 상기 부위는 대립유전자 서열간의 변화 부위이다. 상기 부위는 대개 상기 대립유전자의 고도로 보존된 서열(상기 집단의 1/100 또는 1/1000 구성원 미만으로 변하는 서열)이 선행하고 이어진다. 단일 뉴클레오타이드 다형성은 대개 상기 다형성 부위에서 하나의 뉴클레오타이드의 또 다른 것에 대한 치환으로 인해 발생한다. 전이는 하나의 퓨린의 또 다른 퓨린에 의

한 치환 또는 하나의 피리미딘의 또 다른 피리미딘에 의한 치환이다. 변위는 퓨린의 피리미딘에 의한 또는 이와 역의 치환이다. 단일 뉴클레오타이드 다형성은 또한 참조 대립유전자에 대한 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입으로부터 발생할 수 있다.

- [0208] 소광제 및 형광단을 모두 갖는 본 발명의 올리고머를 사용하거나, 또는 한편으로, 상기 핵산 중 하나 이상을 에너지 전달 쌍의 단일 구성원(예를 들어 소광제 또는 형광단)으로 단일 표지할 수 있다. 소광제로 단일 표지된 핵산이 탐침인 경우, 상기 제1 및 제2 핵산간의 상호작용을, 상기 소광제와 상기 핵산간의 상호작용을 관찰하거나, 또는 보다 바람직하게는 상기 제2 핵산에 부착된 형광단의 형광의 상기 소광제에 의한 소광에 의해 검출할 수 있다.
- [0209] 일부 실시태양에서, 본 발명의 소광제와 형광단간의 접지 상태 복합체가 형성된다. 예시적인 실시태양에서, 상기 소광제 및 형광단을 모두 동일한 핵산 올리고머에 접합시킨다.
- [0210] 핵산 증폭, 다형성 및 검출 및 정량분석을 조사하기 위해 설계된 탐침에서의 일반적인 유용성 외에, 본 발명의 고체 지지체 및 올리고머를 현재 공지되어 있거나 나중에 발견되는 실질적으로 임의의 핵산 탐침 포맷에 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 고체 지지체 및 올리고머를 탐침 동기, 예를 들어 Taqman(상표) 탐침(Held et al., *Genome Res.* **6**: 986-994 (1996), Holland et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**: 7276-7280 (1991), Lee et al., *Nucleic Acids Res.* **21**: 3761-3766 (1993)), 분자 비콘(Tyagi et al., *Nature Biotechnology* **14**:303-308 (1996), Jayasena et al., U.S. Patent No. 5,989,823, issued November 23, 1999)), 스크리온 탐침(Whitcomb et al., *Nature Biotechnology* **17**: 804-807 (1999)), 선라이즈 탐침(Nazarenko et al., *Nucleic Acids Res.* **25**: 2516-2521 (1997)), 입체구조적으로 지원된 탐침(쿡 알(Cook, R.), 1999년 6월 9일자 출원된, 동시 계류중이고 통상적으로 허여된 미국특허 출원 2007/0059752), 펩타이드 핵산(PNA)-기재 라이트업 탐침(Kubista et al., WO 97/45539, 1997년 12월), 이중-가닥 특이성 DNA 염료(Higuchi et al., *Bio/Technology* **10**: 413-417 (1992), Wittwer et al., *BioTechniques* **22**: 130-138 (1997)) 등에 통합시킬 수 있다. 본 발명의 소광제와 사용될 수 있는 상기 및 다른 탐침 동기들은 문헌[Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, Inc. 1992]에 재고찰되어 있다.
- [0211] 본 발명의 탐침에 사용하기 위한 올리고머는 임의의 적합한 크기일 수 있으며, 바람직하게는 약 2 내지 약 100 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 약 10 내지 약 80 뉴클레오타이드 및 보다 바람직하게는 약 10 내지 약 40 뉴클레오타이드의 범위이다. 이중 표지된(형광단-소광제) 탐침에서, 상기 공여체 부분은 바람직하게는 상기 소광제로부터 적어도 약 6, 바람직하게는 적어도 약 8, 바람직하게는 적어도 약 10 뉴클레오타이드, 및 보다 바람직하게는 적어도 약 15 뉴클레오타이드까지 분리된다. 다양한 실시태양에서 공여체 부분은 바람직하게는 상기 탐침의 3'- 또는 5'-말단 뉴클레오타이드에 부착된다. 상기 소광제 부분은 또한 바람직하게는 상기 탐침의 3'- 또는 5'-말단 뉴클레오타이드에 부착된다. 보다 바람직하게, 상기 공여체 및 수용체 부분은 각각 상기 탐침의 3'- 및 5'- 또는 5'- 및 3'-말단 뉴클레오타이드에 부착되지만, 내부 배치도 또한 유용하다.
- [0212] 본 발명의 핵산 탐침의 정확한 서열 및 길이는 부분적으로 상기 탐침이 결합하는 표적 폴리뉴클레오타이드의 성질에 따라 변한다. 상기 결합 위치 및 길이를 특정 실시태양에 적합한 어닐링 및 용융 성질을 성취하기 위해 변화시킬 수 있다. 상기와 같은 디자인 선택을 위한 지침을 다수의 당해 분야-인식된 참고문헌들에서 찾을 수 있다.
- [0213] 일부 실시태양에서, 상기 핵산 탐침의 3'-말단 뉴클레오타이드를 핵산 폴리머라제에 의해 차단하거나 연장할 수 없게 만든다. 상기와 같은 차단을 편의상 상기 핵산 탐침의 말단 3'-위치에의 공여체 또는 수용체 부분의 부착에 의해 직접적으로 또는 링커 부분에 의해 수행한다.
- [0214] 상기 핵산은 DNA, RNA 또는 이들의 키메라 혼합물 또는 유도체 또는 변형된 버전을 포함할 수 있다. 상기 탐침 및 표적 핵산은 모두 단일 가닥, 듀플렉스, 트리플렉스 등으로서 존재할 수 있다. 더욱이, 상기 핵산을 핵염기 부분, 당 부분, 또는 포스페이트 주쇄에서 다른 그룹, 예를 들어 방사성 표지, 작은 홈 결합제, 삽입제, 아세틸렌형 불포화된 탄화수소, 플루오르알킬기, 공여체 및/또는 수용체 부분 등으로 변형시킬 수 있다.
- [0215] 본 발명의 올리고머는 별개 서열인 프라이머로서 또는 랜덤 서열을 갖는 프라이머로서 유용하다. 랜덤 서열 프라이머는 일반적으로 길이가 약 6 또는 7 핵단량체이다. 상기와 같은 프라이머는 다양한 핵산 증폭 프로토콜(PCR, 리가제 쇠 반응 등)에 또는 클로닝 프로토콜에 사용될 수 있다. 본 발명의 5' 단부상의 치환은 일반적으로 프라이머로서 작용하는 상기 올리고머의 능력을 방해하지 않는다. 3'-말단 잔기 이외의 부위에서 2'-변형을 갖는 본 발명의 올리고머, 상기 올리고머 RNase H를 무능하게 만들거나 달리 뉴클레아제 안정성으로 만드는 다

른 변형이, 뉴클레아제를 함유하는 세포 추출물 또는 다른 용액 중의 RNA 또는 DNA 서열에 대한 탐침 또는 프라이머로서 유리하게 사용될 수 있다. 따라서, 상기 올리고머를 표적 핵산을 함유하는 샘플과 혼합한 다음 상기 올리고머를 상기 표적 핵산과 하이브리드화시키고 상기 표적 핵산을 PCR, LCR 또는 다른 적합한 방법에 의해 증폭시킴으로써 샘플 중의 핵산을 증폭시키는 프로토콜에 사용할 수 있다.

[0216] 킬레이트제, 예를 들어 EDTA, DTPA 또는 1,2-디아미노사이클로헥산 아세트산의 유사체로 유도체화된 올리고머를 기재된 바와 같이 다양한 시험관내 진단 분석에 사용할 수 있다(미국특허 제 4,772,548 호, 미국특허 제 4,707,440 호 및 미국특허 제 4,707,352 호). 한편으로, 본 발명의 올리고머를 가교결합제, 예를 들어 5-(3-요오도아세트아미도프로프-1-일)-2'-테옥시유리딘 또는 5-(3-(4-브로모부티르아미도)프로프-1-일)-2'-테옥시유리딘으로 유도체화하고 기재된 바와 같은 다양한 분석 방법 또는 키트에 사용할 수 있다(국제 공보 제 WO 90/14353 호).

[0217] 상기 용도 외에, 유전자 발현을 억제하는 상기 올리고머의 능력을, 임의의 적합한 방법에 의해 피실험 세포 또는 재조합 시스템에서 발현 수준을 측정함으로써 시험관내 시스템에서 확인할 수 있다(문헌[Graessmann, M., et al., *Nucleic Acids Res.* (1991) 19:53-59]).

[0218] 본 발명의 올리고머와 표적 핵산 분자간의 하이브리드화를 촉진하는 조건은 당해 분야의 숙련가들에 의해 경험적으로 결정될 수 있으며, 최적 배양 온도, 염 농도, 올리고뉴클레오타이드 유사 탐침의 길이 및 핵염기 조성, 및 샘플의 올리고머 및 핵산 분자의 농도를 포함한다. 바람직하게, 하이브리드화를 적어도 1 밀리몰 마그네슘의 존재하에 6.0 이상의 pH에서 수행한다. 일부 실시태양에서, 샘플 중 핵산 분자를 하이브리드화 전에 단일-가닥으로 되도록 상기 샘플을 처리하는 것이 필요하거나 바람직할 수 있다. 상기와 같은 처리의 예는 비제한적으로 염기에 의한 처리(바람직하게는 이어서 중화), 고온에서의 배양, 또는 뉴클레아제에 의한 처리를 포함한다.

[0219] 또한, 핵산에 대한 하이브리드화의 염 의존성은 주로 하이브리드화하는 올리고뉴클레오타이드 유사체의 주쇄의 전하 밀도에 의해 결정되기 때문에, 본 발명의 올리고머에 비표준 뉴클레오타이드 유사체를 통합시키는 것은 하이브리드화의 염 의존성을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 상기 조절을 본 발명의 방법에 유리하게 사용할 수 있는데, 일부 태양에서, 예를 들어 염 조건을 변화시킴으로써 하이브리드화의 엄격성을 증가시키거나 또는 상기 염 농도를 감소시킴으로써 하이브리드화된 핵산을 방출시킬 수 있는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 더욱 다른 태양에서, 매우 낮은 염에서 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 유사체가 핵산에 고-친화성으로 결합하는 것이 바람직할 수 있다. 이 경우에, 하전되지 않은 주쇄 부분을 갖는 뉴클레오타이드 단량체를 본 발명의 올리고뉴클레오타이드에 위치시키는 것이 유리하다.

[0220] 표적 핵산 분자에서의 결합에서 본 발명의 올리고머의 고도의 특이성은 실행자로 하여금, 하나 이상의 올리고머의 적어도 일부에 완전히 상보성인 서열 신장부를 포함하는 표적 핵산과 실질적으로 상보성 서열내에 소수의 비-상보성 핵염기를 포함하는 서열 신장부를 포함하는 표적 핵산 분자간의 식별을 촉진할 수 있는 하이브리드화 조건을 선택할 수 있게 한다. 예를 들어, 하이브리드화 또는 세척 온도를, 본 발명의 올리고머와, 서열 신장부를 따라 완전히 상보성이지만 본 발명의 올리고머와 완전히 상보성이지는 않은 표적 핵산 분자(상보성 서열의 신장부를 따라 하나 또는 2개의 핵염기 미스매치를 포함하는 것들을 포함한다) 간의 하이브리드의 해리를 촉진하는 표적 핵산 분자간에 안정한 하이브리드화를 허용하도록 선택할 수 있다. 하이브리드화 및 세척 온도의 선택은 적어도 부분적으로 다른 조건들, 예를 들어 염 농도, 올리고머 및 표적 핵산 분자의 농도, 올리고머 대 표적 핵산 분자의 상대적인 비율, 하이브리드화되는 올리고머의 길이, 상기 올리고머 및 표적 핵산 분자의 핵염기 조성, 상기 올리고뉴클레오타이드 유사체 분자의 단량체 조성 등에 따라 변할 수 있다. 또한, 완전히 상보성인 분자의 안정한 하이브리드에 유리하고 하나 이상의 핵염기에 의해 미스매치된 올리고머와 표적 핵산 분자간의 안정한 하이브리드에는 불리한 조건들을 선택할 때, 추가적인 조건들, 예를 들어 비제한적으로 하이브리드화되는 올리고뉴클레오타이드 유사체의 길이, 올리고머와 표적 핵산 분자간의 상보성 서열 신장부의 길이, 상보성 서열 신장부 내 비-상보성 핵염기의 수, 미스매치된 핵염기의 정체, 상기 미스매치된 핵염기 부근의 핵염기의 정체, 및 상보성 신장부를 따라 있는 임의의 미스매치된 핵염기의 상대적인 위치를 고려할 수 있으며, 바람직한 경우, 변경시킬 수 있다. 핵산 하이브리드화 분야의 숙련가들은 특정한 용도에 따라, 표적 핵산 분자에서의 하이브리드화를 위한 본 발명의 올리고머의 사용에 있어서 유리한 하이브리드화 및 세척 조건을 결정할 수 있을 것이다. "유리한 조건"은 올리고머와, 적어도 부분적으로 실질적으로 상보성인 표적 핵산 분자, 예를 들어 하나 이상의 미스매치를 포함하는 것들 간의 안정한 하이브리드에 유리한 조건들일 수 있다.

[0221] 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여, 상이한 서열의 표적 핵산 분자에 하이브리드화된 본 발명의 올

리고머의 용융 온도를 측정할 수 있으며 주어진 용도에 유리한 조건을 결정하는데 사용할 수 있다. 예를 들어 표적 핵산 분자를 고체 지지체 부착되는 올리고머에 하이브리드화시키고 하이브리드화된 복합체를 검출함으로써 유리한 하이브리드화 조건을 실험적으로 측정하는 것도 또한 가능하다.

[0222] 본 발명의 고체 지지체 또는 올리고머 탐침에 결합된 표적 핵산 분자를 고체 지지체에의 올리고머의 직접적인 또는 간접적인 부착에 의해, 조사 집단의 결합되지 않은 핵산 분자로부터 편리하고 효율적으로 분리시킬 수 있다. 고체 지지체를 고도의 엄격성으로 세척하여 올리고머 탐침에 결합되지 않은 핵산 분자를 제거할 수 있다. 그러나, 고체 지지체에 대한 올리고머 탐침의 부착은 본 발명의 요건이 아니다. 예를 들어, 일부 용도에서 결합된 및 결합되지 않은 핵산 분자를 기질을 통한 원심분리에 의해 또는 상 분리에 의해 또는 일부는 상기 올리고머 탐침에 결합된 화학기에 의해 임의로 지원될 수 있는 다른 형태의 분리(예를 들어 차별 침전)에 의해 분리시킬 수 있다(예를 들어 2000년 5월 9일자로 니(Nie) 등에게 허여된 미국특허 제 6,060,242 호를 참조하시오).

[0223] 핵산 포획 탐침

[0224] 하나의 실시태양에서, 소광제를 포함하는 고정화된 핵산을 포획 탐침으로서 사용한다. 상기 고정화된 핵산은 안정화 부분을 임의로 추가로 포함한다. 상기 핵산 탐침을 예를 들어 고체 지지체에의 상기 탐침의 3'- 또는 5'-말단 뉴클레오타이드의 부착에 의해 상기 고체 지지체에 직접 부착시킬 수 있다. 그러나, 보다 바람직하게는 상기 탐침을 링커(상기)에 의해 상기 고체 지지체에 부착시킨다. 상기 링커는 상기 탐침을 상기 고체 지지체로부터 떼어내는 작용을 한다. 상기 링커는 가장 바람직하게는 약 5 내지 약 30 원자 길이, 보다 바람직하게는 약 10 내지 약 50 원자 길이이다.

[0225] 다양한 실시태양에서, 상기 고체 지지체를 또한 상기 올리고머(탐침)의 제조에 합성 지지체로서 사용한다. 상기 고체 지지체와 핵산의 처음 3'-단위 사이의 상기 링커의 길이 및 화학 안정성은 지지체 결합된 핵산의 효율적인 합성 및 하이브리드화에 중요한 역할을 한다. 상기 링커 가지는 바람직하게는 자동화된 합성 중에 고수율(>97%)이 성취될 수 있기에 충분히 길다. 상기 링커의 필요한 길이는 사용되는 특정 고체 지지체에 따라 변할 것이다. 예를 들어 6원자 링커면 고도로 가교결합된 폴리스티렌이 고체 지지체로서 사용될 때 핵산의 자동화된 합성 중에 >97% 수율을 성취하기에 일반적으로 충분하다. 상기 링커 가지는 CPG가 고체 지지체로서 사용될 때 자동화된 합성 중에 고수율(>97%)을 획득하기 위해 적어도 20 원자 길이가 바람직하다.

[0226] 고체 지지체상에 고정화된 탐침의 하이브리드화는 일반적으로 상기 탐침을 상기 고체 지지체로부터 적어도 30 원자, 보다 바람직하게는 적어도 50 원자까지 분리시킬 것이 요구된다. 상기 분리를 성취하기 위해서, 상기 링커는 일반적으로 상기 링커와 3'-말단 사이에 위치한 이격자를 포함한다. 핵산 합성을 위해서, 상기 링커 가지는 대개 에스테르 결합(이는 염기성 시약으로 절단되어 상기 고체 지지체로부터 핵산을 유리시킬 수 있다)에 의해 상기 3'-말단의 3'-OH에 부착된다.

[0227] 광범위하게 다양한 링커가 당해 분야에 공지되어 있으며, 핵산 탐침을 고체 지지체에 부착시키는데 사용될 수 있다. 상기 링커는, 표적 서열이 고체 지지체에 부착된 탐침에 하이브리드화하는 것을 그다지 방해하지 않는 임의의 화합물로 형성될 수 있다. 상기 링커는 예를 들어 동중중합체성 핵산으로 형성될 수 있으며, 상기 핵산은 자동화된 합성에 의해 상기 링커에 쉽게 첨가될 수 있다. 한편으로, 작용화된 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체를 링커로서 사용할 수 있다. 상기와 같은 중합체는 현재 표적 핵산에 대한 탐침의 하이브리드화를 그다지 방해하지 않기 때문에 동중중합체성 핵산보다 바람직하다. 폴리에틸렌 글리콜은 상업적으로 입수가 가능하고, 유기 및 수성 매질 모두에 용해성이며, 작용화가 용이하고, 핵산 합성 및 합성-후 조건하에서 전적으로 안정성이므로 특히 바람직하다.

[0228] 상기 고체 지지체, 링커 및 탐침 사이의 결합 부위는 바람직하게는 고온 염기성 조건하에서 핵염기 보호기의 합성 또는 제거 중에 절단되지 않는다. 그러나, 상기 결합은 다양한 조건하에서 절단성인 그룹 중에서 선택될 수 있다. 현재 바람직한 결합의 예는 카바메이트, 에스테르 및 아마이드 결합을 포함한다.

[0229] 샘플 중 핵산의 검출

[0230] 본 발명의 고체 지지체 및 올리고머를 핵산의 검출에 사용할 수 있다. 상기와 같은 검출 방법은 샘플을 제공하고, 본 발명의 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 유사체를, 올리고머의 핵산 분자에의 하이브리드화를 허용하는 조건하에서 상기 샘플과 접촉시키고, 본 발명의 하나 이상의 올리고머에 하이브리드화된 상기 샘플의 하나

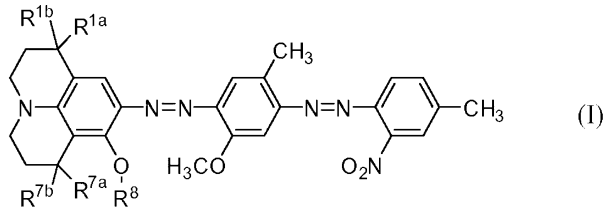
이상의 핵산 분자를 검출함을 포함한다.

- [0231] 샘플은 임의의 출처로부터 있을 수 있으며 생물학적 샘플, 예를 들어 동일하거나 상이한 종으로부터의 유기체 또는 유기체들의 그룹으로부터의 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 체액의 샘플, 예를 들어 혈액 샘플, 혈청 샘플, 림프 샘플, 골수 샘플, 복수, 흉수, 골반 세척액, 안액, 소변, 정액, 가래, 또는 타액일 수 있다. 생물학적 샘플은 또한 피부, 코, 목구멍, 또는 생식기 표본으로부터의 추출물, 또는 대변 추출물일 수 있다. 생물학적 샘플은 또한 종양을 포함한 기관 또는 조직의 샘플일 수 있다. 혈액 샘플은 또한 원핵생물 및 진핵생물 세포 모두의 세포주 및 1차 배양물 모두를 포함한 세포 배양물의 샘플일 수 있다.
- [0232] 샘플은 주변환경으로부터, 예를 들어 물줄기 또는 토양, 또는 식품, 음료 또는 수원, 산업적인 출처, 작업장, 공중 장소, 또는 생활 영역으로부터 있을 수 있다. 샘플은 추출물, 예를 들어 토양 또는 식품 샘플의 액체 추출물일 수 있다. 샘플은 도구와 같은 물품, 의류품, 가공품 또는 다른 물질로부터의 먼지표본의 세척 또는 침지 또는 현탁으로부터의 용액일 수 있다.
- [0233] 샘플은 처리되지 않거나 처리된 샘플일 수 있으며; 처리는 상기 샘플의 성분들의 순도, 농도 또는 접근성을 증가시켜 상기 샘플의 분석을 용이하게 하는 단계들을 수반할 수 있다. 비제한적인 예로서, 처리는 샘플의 부피를 감소시키고, 샘플의 성분들을 제거하거나 분리시키고, 샘플 또는 하나 이상의 샘플 성분을 용해시키거나, 또는 샘플의 성분들을 붕괴, 변형, 노출, 방출 또는 단리시키는 단계들을 포함할 수 있다. 상기와 같은 과정의 비제한적인 예는 원심분리, 침전, 여과, 균질화, 세포 용해, 항체의 결합, 세포 분리 등이다. 예를 들어 본 발명의 일부 바람직한 실시태양에서, 상기 샘플은, 예를 들어 적혈구의 제거, 농축, 하나 이상의 세포 또는 바이러스 유형(예를 들어 백혈구 또는 병원성 세포)의 선택, 또는 세포 용해 등에 의해서 적어도 부분적으로 처리된 혈액 샘플이다.
- [0234] 예시적인 샘플은 적어도 부분적으로 정제된 핵산 분자의 용액을 포함한다. 상기 핵산 분자는 단일 공급원 또는 다수의 공급원으로부터 있을 수 있으며 DNA, RNA 또는 둘 다 포함할 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자의 용액은 세포 용해, 농축, 추출, 침전, 핵산 선택(예를 들어 폴리 A RNA 선택 또는 Alu 요소를 포함하는 DNA 서열의 선택), 또는 하나 이상의 효소에 의한 처리의 단계들 중 어느 하나가 가해진 샘플일 수 있다. 상기 샘플은 또한 합성 핵산 분자를 포함하는 용액일 수 있다.
- [0235] 본 발명의 올리고머 또는 고체 지지체는 본 명세서에 기재된 임의의 올리고머 포맷 또는 본 명세서에 기재된 단량체, 이량체 또는 비핵산 성분(예를 들어 링커, 형광단, 소광제, 안정화 부분)을 포함하는 임의의 올리고머일 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 올리고뉴클레오타이드 유사체는 임의의 길이 및 임의의 핵염기 조성을 가질 수 있으며, 하나 이상의 핵산 부분, 펩타이드, 단백질 지지, 탄수화물, 스테로이드, 및 다른 생화학적 및 화학적 부분을 포함할 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 유사체를 용액 중에서 또는 고체 지지체에 결합시켜 제공할 수 있다. 본 발명의 일부 바람직한 실시태양에서, 상기 올리고머는 비-표준 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다.
- [0236] 결합된 핵산에 대한 검출 방법은 당해 분야에 주지되어 있으며, 조사 집단의 핵산 분자에 부착되거나 통합된 또는 하이브리드화된 표적 핵산 분자 또는 하이브리드화된 표적 핵산 분자 복합체에 결합되거나 통합되는 검출성 표지의 사용을 포함할 수 있다. 핵산 분자용 검출성 표지는 당해 분야에 주지되어 있으며, 형광 분자, 예를 들어 형광단(본 명세서에 제시된 것들 포함), 방사성동위원소, 질량-변경된 화학그룹, 특이적인 결합 구성원, 예를 들어 신호-발생 분자에 의해 검출될 수 있는 비오틴 등을 포함한다. 검출성 표지를 또한, 예를 들어 신호 올리고머를 사용하는 샌드위치 하이브리드화가 검출에 사용되거나 또는 검출을, 올리고머/표적 핵산 분자 복합체를 인식하는 항체와 같은 특이적인 결합 구성원을 사용하여 수행하는 경우에, 본 발명의 올리고머에 통합시키거나 부착시킬 수 있다. 고체 지지체를 스캐닝하거나, 필름에 노출시키거나, 시각적 검사 등을 수행하여 검출성 표지의 존재를 측정하고 이에 의해 본 발명의 고체 지지체와 같은 고체 지지체에 고정화된 올리고머에 대한 표적 핵산 분자의 결합을 측정할 수 있다.
- [0237] 키트
- [0238] 본 발명의 하나의 태양은 상술한 바와 같은 본 발명의 화합물(예를 들어 본 발명의 고체 지지체 또는 본 발명의 단량체)을 사용하는 합성의 실행 및 본 발명의 올리고머를 사용하는 분석을 용이하게 하는 키트의 제형이다. 본 발명의 키트는 전형적으로 접합체의 제조에 유용한 화학적으로 반응성인 종으로서 존재하거나 또는 완전한 올리고머(이때 상기 올리고머는 특이적인 결합쌍의 일원이다)로서 존재하는 본 발명의 화합물(예를 들어 본 발

명의 고체 지지체 또는 본 발명의 올리고머)을 포함한다. 상기 키트는 전형적으로 수용액으로서 존재하는 하나 이상의 완충제를 임의로 추가로 포함한다. 본 발명의 키트는 추가적인 검출 시약, 생성된 표지된 물질의 정제를 위한 정제 매질, 발광 표준, 효소, 효소 억제제, 유기 용매, 또는 본 발명의 분석을 수행하기 위한 설명서를 임의로 추가로 포함한다. 키트의 다른 포맷들은 당해 분야의 숙련가들에게 자명할 것이며 본 발명의 범위내에 있다.

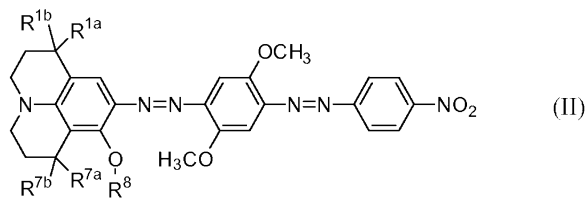
[0239] 요약으로서, 예시적인 실시태양에서, 본 발명은 하기 화학식 I 또는 II에 따른 구조를 갖는 화합물을 제공한다:

[0240] [화학식 I]



[0241]

[0242] [화학식 II]



[0243]

[0244] R^{1a} , R^{1b} , R^{7a} , 및 R^{7b} 은 독립적으로 H, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬, 및 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된다. R^{1a} 및 R^{1b} 는 이들이 결합된 탄소 원자와 함께 임의로 결합하여, 치환되거나 비치환된 C_3 - C_7 사이클로알킬 및 치환되거나 비치환된 3- 내지 7-원 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된 일원인 고리를 형성한다. R^{7a} 및 R^{7b} 는 이들이 결합된 탄소 원자와 함께 임의로 결합하여, 치환되거나 비치환된 C_3 - C_7 사이클로알킬 및 치환되거나 비치환된 3- 내지 7-원 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된 일원인 고리를 형성한다. R^{1a} , R^{1b} , R^{7a} , 및 R^{7b} 중 적어도 하나는 H가 아니다. R^8 은

H, $\begin{matrix} | \\ \text{---} \text{L}^x \text{---} \text{R}^x \end{matrix}$ 및 $\begin{matrix} \text{R}^s \\ | \\ \text{---} \text{L}^{xs} \\ | \\ \text{R}^x \end{matrix}$ 중에서 선택된다. L^x 는 결합, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬 및 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된다. L^{xs} 는 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로알킬 및 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬 중에서 선택된다. R^s 는 보호되거나 비보호된 반응성 작용기, 결합 부위 및 고체 지지체 중에서 선택된다. R^x 는 보호되거나 비보호된 반응성 작용기 및 결합 부위 중에서 선택된다. 각각의 결합 부위는 뉴클레오사이드, 뉴클레오사이드에 대한 링커, 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드에 대한 링커, 올리고 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드에 대한 링커, 핵산, 핵산에 대한 링커, 담체 분자, 담체 분자에 대한 링커, 고체 지지체, 및 고체 지지체에 대한 링커 중에서 독립적으로 선택된 일원에 공유 결합된다.

[0245] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^{1a} 및 R^{1b} 는 비치환된 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 및 C_6 알킬 중에서 독립적으로 선택된다.

[0246] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 메틸이다.

[0247] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^{7a} 및 R^{7b} 는 각각 H이다.

[0248] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^{7a} 및 R^{7b} 는 비치환된 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 및 C_6 알킬 중에서 독립적으로

선택된다.

[0249] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^{7a} 및 R^{7b}는 각각 메틸이다.

[0250] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 H이다.

[0251] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^{1a}, R^{1b}, R^{7a} 및 R^{7b}는 비치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 및 C₆ 알킬 중에서 독립적으로 선택된다.

[0252] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^{1a}, R^{1b}, R^{7a} 및 R^{7b}는 각각 메틸이다.

[0253] 선행 단락에 따른 화합물에서, L^x는 비치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ 및 C₁₀ 알킬 중에서 선택된다.

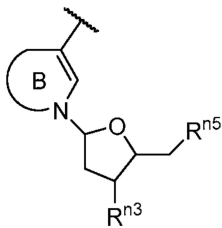
[0254] 선행 단락에 따른 화합물에서, L^{xS}는 치환된 헥테로알킬이다.

[0255] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^x는 포스포아미다이트, -OH, -ODMT, -COOH, 활성 에스테르 및 -NH₂ 중에서 선택된다.

[0256] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^S는 -OH, -ODMT, 및 고체 지지체에 대한 링커에 공유 결합된 결합 부위 중에서 선택된다.

[0257] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^x는 포스포아미다이트, -OH, -ODMT, -COOH, 활성 에스테르 및 -NH₂ 중에서 선택된다.

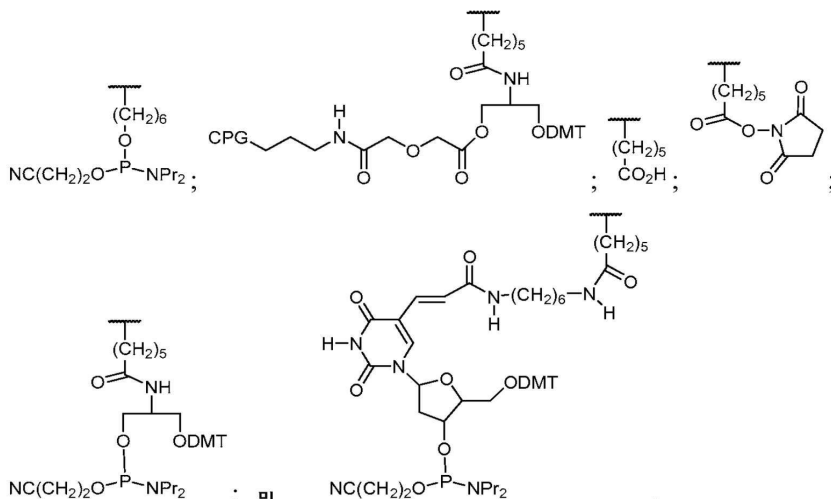
[0258] 선행 단락에 따른 화합물에서, R^x는 뉴클레오사이드에 대한 링커에 공유 결합된 결합 부위이며, 여기에서 상기 뉴클레오사이드는 하기의 구조를 갖는다:



[0259]

[0260] 상기 식에서, 고리 표지된 B는 핵염기이다. Rⁿ³은 -OH 또는 포스포아미다이트이다. Rⁿ⁵는 -OH 또는 -ODMT이다.

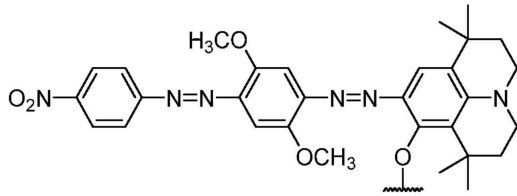
[0261] 선행 단락에 따른 화합물에서, R⁸은 하기 중에서 선택된다:



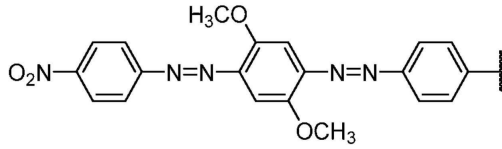
[0262]

- [0263] 핵산 표적 서열의 검출 방법으로, 상기 방법은
- [0264] (a) 상기 표적 서열을 단일 가닥 표적 결합 서열을 포함하는 검출제 핵산과 접촉시키고, 상기 검출제 핵산은 상기 핵산에 결합된
- [0265] i) 형광단; 및
- [0266] ii) 임의의 선행 단락에 따른 화합물[여기에서 R^8 은 상기 검출제 핵산에 공유 결합된(직접적으로 또는 링커를 통해) 결합 부위를 포함한다]
- [0267] 을 가지며; 여기에서 상기 검출제 핵산은 상기 형광단이 여기될 때 상기 형광단과 상기 화합물 간의 공여체-수용체 에너지 전달을 허용하는 입체구조로 존재하고;
- [0268] (b) 상기 표적 결합 서열을 상기 표적 서열에 하이브리드화시키고, 이에 의해 상기 검출제 핵산의 입체구조를 변경시켜 형광 매개변수의 변화를 유발시키고;
- [0269] (c) 상기 형광 매개변수의 변화를 검출하고, 이에 의해 상기 핵산 표적 서열을 검출함
- [0270] 을 포함한다.
- [0271] 제1 핵산 및 제2 핵산이 하이브리드화하는지를 확인하는 방법으로, 상기 제1 핵산은 임의의 선행 단락에 따른 화합물[여기에서 R^8 은 상기 제1 핵산에 공유 결합된(직접적으로 또는 링커를 통해) 결합 부위를 포함한다]을 포함하며, 상기 방법은
- [0272] (a) 상기 제1 핵산을 상기 제2 핵산과 접촉시키고;
- [0273] (b) 상기 제1 핵산, 상기 제2 핵산 및 이들의 조합 중에서 선택된 일원의 형광 성질의 변경을 검출하고, 이에 의해 상기 하이브리드화가 발생하는지의 여부를 확인함
- [0274] 을 포함한다.
- [0275] 핵산 증폭 반응을 모니터링하는 방법으로, 상기 방법은
- [0276] (a) i) 형광단; 및
- [0277] ii) 임의의 선행 단락에 따른 화합물[여기에서 R^8 은 검출제 핵산에 공유 결합된(직접적으로 또는 링커를 통해) 결합 부위를 포함한다]
- [0278] 이 결합된 검출제 핵산을 포함하는 증폭 반응 혼합물을 제조하고;
- [0279] (b) 상기 증폭 반응 혼합물에 증폭 조건을 가하고;
- [0280] (c) 상기 검출제 핵산으로부터의 형광 신호에 대해서 상기 반응 혼합물을 모니터링하여 분석 결과를 획득하고;
- [0281] (d) 상기 분석 결과를 사용하여 핵산 증폭 반응을 모니터링함
- [0282] 을 포함한다.
- [0283] 표적 서열의 증폭을 검출하는 방법으로, 상기 방법은
- [0284] (a) 표적 서열을 포함하는 샘플 핵산을 상기 표적 서열에 인접한 PCR 프라이머와 하이브리드화시키고;
- [0285] (b) 상기 하이브리드화된 프라이머를 폴리머라제로 연장시켜 PCR 생성물을 생성시키고, 상기 PCR 생성물의 2개 가닥을 분리시켜 상기 표적 서열의 센스 및 안티센스 가닥을 접근이 용이하게 만들고;
- [0286] (c) 검출제 핵산을 상기 PCR 생성물 중의 표적 서열의 센스 또는 안티센스 가닥에 하이브리드화시키며, 여기에서 상기 검출제 핵산은
- [0287] i) 상기 PCR 생성물 중의 표적 서열의 센스 또는 안티센스 가닥의 적어도 일부에 상보성이고 상기 PCR 프라이머 사이의 영역에 하이브리드화하는 단일 가닥 표적 결합 서열;
- [0288] ii) 형광단; 및

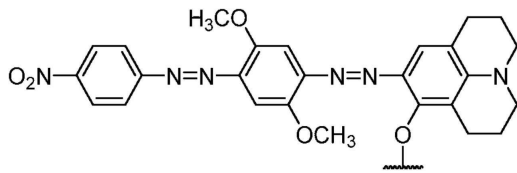
- [0289] iii) 임의의 선행 단락에 따른 화합물[여기에서 R⁸은 상기 검출제 핵산에 공유 결합된(직접적으로 또는 링커를 통해) 결합 부위를 포함한다]
- [0290] 을 포함하고; 여기에서 상기 검출제 핵산은 상기 표적 서열에 하이브리드화하기에 앞서, 상기 형광단이 여기될 때 상기 형광단과 상기 화합물 간의 공여체-수용체 에너지 전달을 허용하는 입체구조로 존재하며;
- [0291] 상기에 의해, 상기 검출제 핵산의 입체구조를 변경시켜 형광 매개변수의 변화를 유발시키고;
- [0292] (d) 상기 형광 매개변수의 변화를 측정하여 상기 표적 서열 및 그의 증폭을 검출한다.
- [0293] 본 발명의 물질 및 방법을 하기의 실시예에 의해 추가로 예시한다. 이들 실시예는 예시를 위해 제공되며, 특허 청구된 발명을 제한하지 않는다.
- [0294] [실시예]
- [0295] 실시예 1: 본 발명의 예시적인 화합물들의 합성
- [0296] 본 발명의 다양한 예시적인 화합물들의 합성을 도 2에 개략한다.
- [0297] 하이드록시테트라메틸줄롤리딘(2)을 크로마토그래피의 필요 없이, 2개의 단계(Dyes and Pigments 2003, 59, 63)에 대해서 약 50%의 전체 수율로 하이드록시아닐린(1)을 통해 제조하였다. 규모 확대는 비교적 용이하게 95 g의 (2)를 제공하였다. (2)와 패스트 블랙(Fast Black) K(FBK) 염의 시험 반응은 짙은 청색 염료(3)를 생성시켰다. (2)의 C₆-하이드록실 화합물(4)로의 전환을 무수 조건하에서 DMF 중의 과잉의 클로로핵산을 및 칼륨 카보네이트를 사용하여 수행하였다. 무수 DMF 중의 수소화 나트륨을 사용하는 알킬화에 대한 문헌 방법은 대규모 생산 중 어려움을 최소화하기 위해 피하였다. (4)의 메탄올 용액에 패스트 블랙 K 염의 메탄올-수 용액의 첨가는 아조 염료 알콜(5)을 제공하였으며, 이는 아마다이트(6)로 전환되었다. 규모 확대는 약 13 g의 아마다이트를 제공하였다. 상기 아마다이트를 사용하여 5'-표지된 폴리 T 올리고를 제조하였으며, 이를 이중 HPLC 정제하고 이어서 상기 염료에 대한 소광계수를 측정하는데 사용하였다.
- [0298] 브로모핵산산과 상기와 같은 (2)의 반응은 목적하는 화합물(7)을 제공하지 않았다. 브로모핵산산을 그의 메틸 에스테르(8)로 전환시키고, 이어서 (2)에 커플링시켜 각각의 C₆-에스테르 화합물(9)을 제공하였으며 이를 분리하지 않았다. THF 중의 2M 수성 황산을 사용하는 메틸 에스테르의 절단은 C₆-산 화합물(7)을 제공하였다. FBK 염에 대한 커플링은 산-아조 염료(10)를 제공하였으며, 이를 사용하여 DMT 보호된 세리놀 유도체(11)를 제조하였다. 이를 연속적으로 글리콜레이트(12) 및 이어서 CPG(13)로 전환시켰다. 상기 CPG를 사용하여 3'-표지된 폴리 T 올리고를 제조하고, 이를 이중 HPLC 정제하고 이어서 상기 염료에 대한 소광 계수를 측정하는데 사용하였다. 상기 5'-표지된 올리고뉴클레오타이드의 경우와 같이, 염료 분해 또는 부산물의 잔량은, 염기성 조건하에서 탈보호 후 조 올리고뉴클레오타이드 샘플 중에서 HPLC에 의해 그다지 관찰되지 않았다. 상기 산 아조 염료(10)를 활성 에스테르(14)로 전환시켰다.
- [0299] 실시예 2: BHQ2, BBQ 및 코스믹 소광제 성능 비교
- [0300] 도입
- [0301] 상기 성능을 보다 긴 파장에서 빛을 방출하는 염료를 소광시키는 코스믹 소광제(하기에 나타냄)로 평가하였다. 구체적으로, 형광단 케이사 670 및 케이사 705로부터의 신호를 소멸시키는 상기 소광제의 능력을 검사하였다. 참조로서, BHQ2 및 블랙베리(BlackBerry) 소광제(BBQ-650(등록상표)); 베리 & 어쏘시에이즈 인코포레이티드(Berry & Associates, Inc.); 미국특허 제 7,879,986 호에 기재됨)의 성능을 또한, 이들 동일한 형광단과 짝을 이루어 검사하였다. 각각의 이들 소광제를 함유하는 TaqMan 탐침을 실시간 PCR 및 뉴클레아제 절단 분석 모두에 의해 평가하였다.



Cosmic Quencher



BHQ2



BBQ-650

[0302]

[0303] 방법

[0304] 모델 TaqMan 분석을 본 연구의 모든 비교를 위해 사용하였으며, 콜린성 수용체에 대한 인간 유전자, 무스카리닉 3(Gene ID CHR3, 수납 번호 nm_000740)을 검출하도록 설계하였다. 탐침 서열은 5'-[형광단]-TCCTTGGGCTCCTGCCATCT-[소광제]-3'이고 PCR 프라이머 5'-TTGGGTCATCTCCTTG-3' 및 5'-GCACAGTTCTCTTCCA-3'의 증폭 생성물을 신호전달한다. 상기 탐침 서열을 5개의 각각의 상이한 형광단 소광제 조합들로 합성하였다: 퀘이사 670-코스믹 소광제, 퀘이사 670-BHQ2, 퀘이사 670-BBQ, 퀘이사 705-코스믹 소광제 및 퀘이사 705-BHQ2. 각각의 탐침을 동일한 프라이머 세트와 짝짓고 이들의 소광 효율을 25 ng의 인간 게놈 DNA로부터의 PCR 증폭의 3회 증폭 반응으로 평가하였다. 각 반응의 조성은 하기와 같다:

[0305]	성분(모액 농도)	부피	최종 농도
[0306]	· 뉴클레아제-자유 수	10.25 μ l	N/A
[0307]	· 백금 Taq PCR 완충제(10X)	5.00 μ l 1X	
[0308]	· TaqMan 탐침(10 μ M)	0.50 μ l 100 nM	
[0309]	· MgCl ₂ (50 mM)	2.00 μ l 2.0 mM	
[0310]	· dNTPs(각각 2.5 mM)	4.00 μ l 각각 200 μ M	
[0311]	· 인간 게놈 DNA(150 pg/ μ l)	25.0 μ l 3.75 ng/반응	
[0312]	· 백금 Taq 폴리머라제(1 U/ μ l)	0.25 μ l 1.25 ng/반응	
[0313]	· 순방향 프라이머(10 μ M)	1.50 μ l 300 nM	
[0314]	· 역방향 프라이머(10 μ M)	1.50 μ l 300 nM	
[0315]		총 부피 50.0 μ l	

[0316] 상기 실시간 PCR 반응을 로터진(RotorGene) 6000(코르벳 리서치(Corbett Research))상에서 순환시켰으며, 이때 퀘이사 670은 "적색" 채널(625 nm 소스, 660 nm 검출기, 증가 = 5)에서 검출되었고 퀘이사 705는 "심홍색" 채널(680 nm 소스, 710 nm 검출기, 증가 = 10)에서 검출되었다. 이어서 상기 5개 탐침을 뉴클레아제 절단 분석에

의해 검사하였으며, 상기 분석에서 1.5 단위의 미세구균 뉴클레아제를 400 nM의 농도로 탐침이 있는 뉴클레아제 완충제 100 μ l 용액에 가한다. 상기 절단을 10분 간격으로 진행시킨다. 상기 간격에 이어서, 신호 강도를 하기의 설정으로 테칸 사파이어(Tecan Safire) 형광계상에서 측정한다:

[0317]	설정	웨이사 670	웨이사 705
[0318]	측정 방식:	형광 탐	형광 탐
[0319]	여기 파장:	641 nm	680 nm
[0320]	방출 파장:	676 nm	715 nm
[0321]	여기 대역폭:	12 nm	12 nm
[0322]	방출 대역폭:	12 nm	12 nm
[0323]	증가:	150	150
[0324]	섬광의 수:	20	20
[0325]	지체 시간:	0 μ s	0 μ s
[0326]	적분 시간:	20 μ s	20 μ s

[0327] 신호 대 소음값을, 먼저 하기 각각으로부터 완충제 블랭크 신호를 공제한 후에, 뉴클레아제로 처리된 반응에서 탐침의 형광 강도를 처리되지 않은 반응에서 동일한 탐침의 강도로 나누어 계산하였다.

[0328] 실시간 PCR 결과

[0329] 웨이사 670 플롯(도 3)내에서, 실선 증폭 자취는 코스믹 소광제 탐침을 나타내고, 파선 자취는 블랙베리 소광제 (BBQ) 탐침을 나타내고, 점선 자취는 BHQ2 탐침을 나타낸다. 상기 웨이사 705 플롯(도 4) 내에서, 실선 자취는 코스믹 소광제 탐침을 나타내는 반면 점선 자취는 BHQ2 탐침을 나타낸다. 어느 형광단을 사용하든, 코스믹 소광제는 증폭의 개시전 기준선 신호 강도에 의해 입증되는 바와 같이, BHQ2 또는 BBQ보다 더 효율적인 소광을 나타낸다.

[0330] 뉴클레아제 절단 결과

[0331] 상기 뉴클레아제 분석은 상기 2개의 형광단이 모두 코스믹 소광제, 특히 BHQ2의 경우보다 1/6의 배경 형광을 나타내는 웨이사 705에 의해 가장 효율적으로 소광됨을 밝힌다. 코스믹 소광제는 그의 우수한 소광 효율로 인해, 웨이사 705에 의해 최고의 신호 대 소음비 및 웨이사 670에 의해 두 번째로 가장 높은 비를 나타낸다.

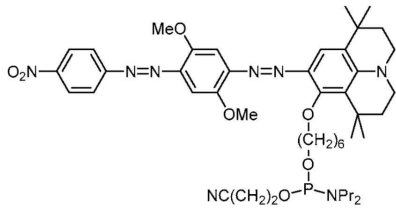
[0332] 도 5a는 뉴클레아제 분석에서 웨이사 670-코스믹 소광제, 웨이사 670-BHQ2, 웨이사 670-BBQ, 웨이사 705-코스믹 소광제 및 웨이사 705-BHQ2로 표지된 탐침들의 절단과 함께 및 상기 절단 없이 측정된 형광 강도를 나타낸다. 도 5b는 뉴클레아제 절단 분석에서 웨이사 670-코스믹 소광제, 웨이사 670-BHQ2, 웨이사 670-BBQ, 웨이사 705-코스믹 소광제 및 웨이사 705-BHQ2로 표지된 탐침들의 절단된 및 절단되지 않은 형광으로부터 계산된 신호 대 소음비를 나타낸다.

[0333] 본 명세서에 기재된 실시예 및 실시태양은 단지 예시를 위한 것이며 이에 비추어 다양한 변경 또는 변화가 당해 분야의 숙련자에게 제시되고 본 출원의 진의 및 범위내에 포함될 것으로 이해된다. 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.

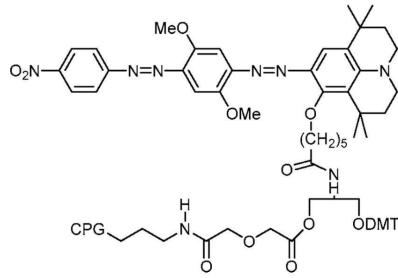
도면

도면1

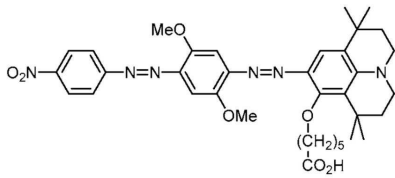
코스믹 소광제 종결 아마이드이트



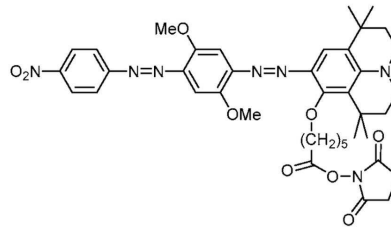
코스믹 소광제 CPG



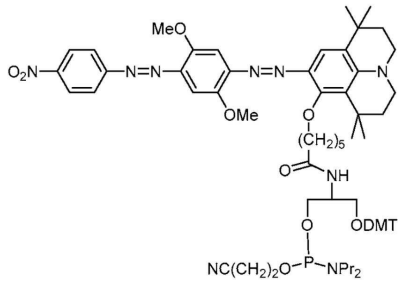
코스믹 소광제 산



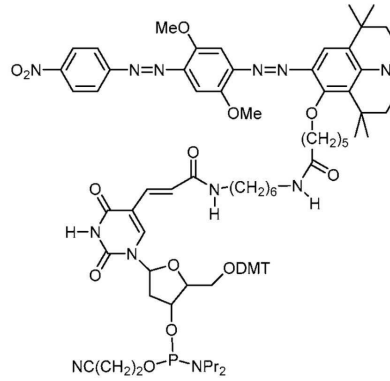
코스믹 소광제 활성 에스테르



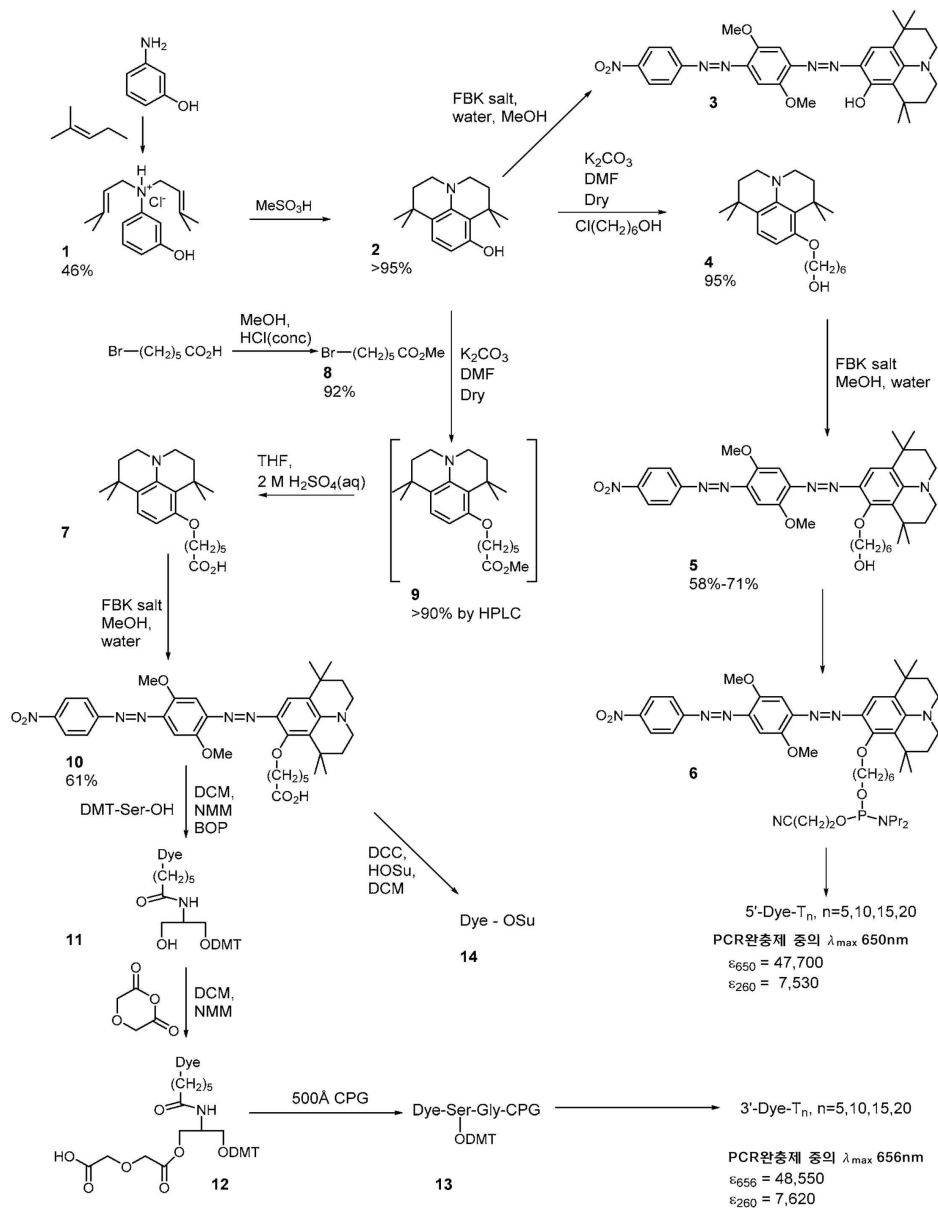
코스믹 소광제 내부 아마이드이트 1



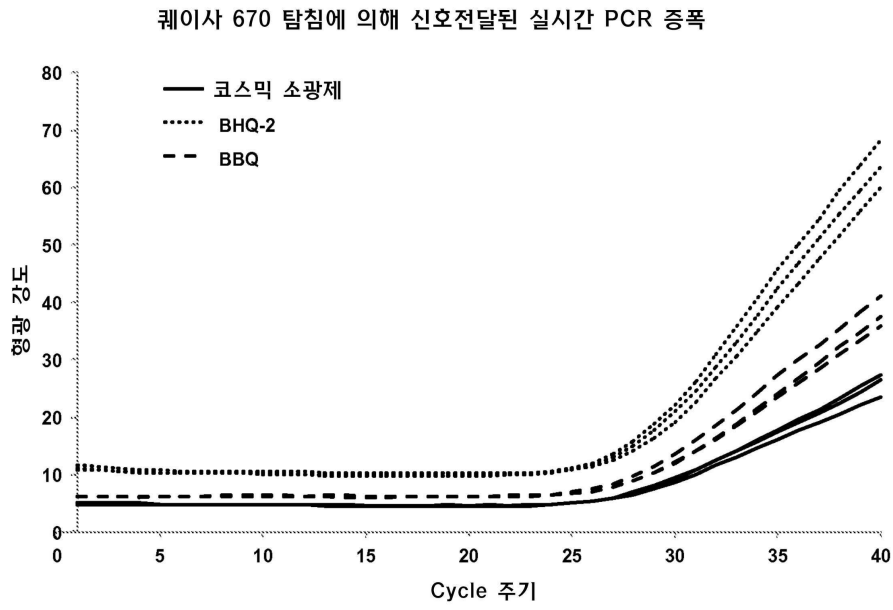
코스믹 소광제 내부 아마이드이트 2



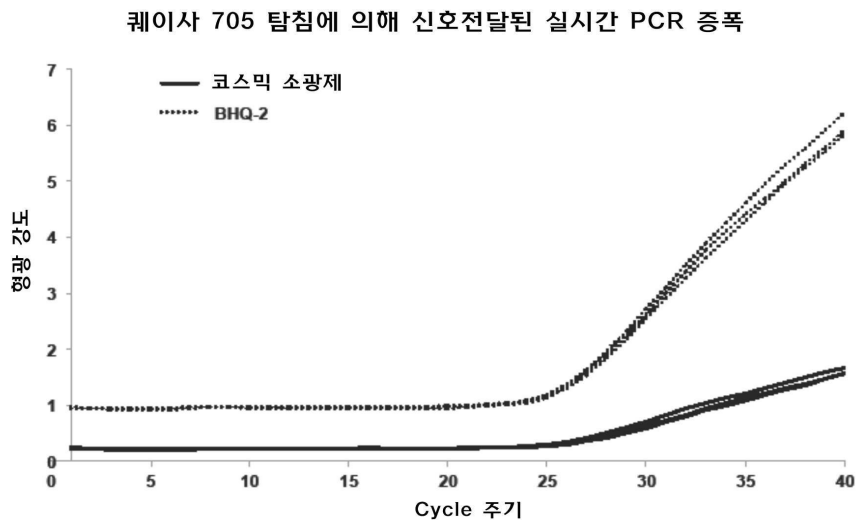
도면2



도면3

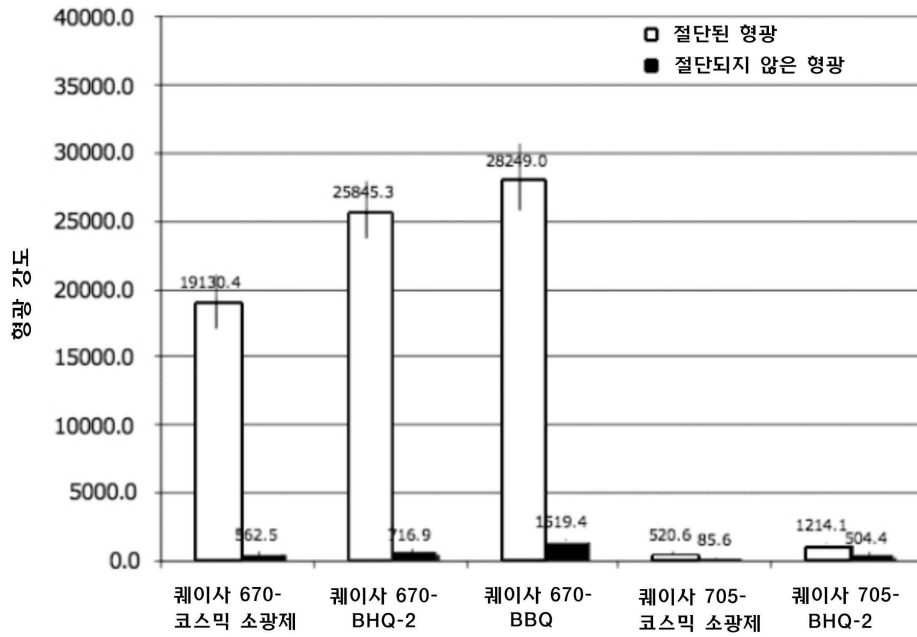


도면4



도면5a

뉴클레아제 분석: 코스믹 소광제, BBQ 및 BHQ-2 표지된 탐침의 절단된 및 절단되지 않은 신호



도면5b

뉴클레아제 분석: 코스믹 소광제, BBQ 및 BHQ-2 표지된 탐침의 뉴클레아제 절단에 따른, 신호 대 소음 비

