

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. <sup>6</sup> C12Q 1/68 C07H 21/00	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2005년09월12일 10-0482915 2005년04월04일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-1998-0705637	(65) 공개번호	10-1999-0081924
(22) 출원일자	1998년07월23일	(43) 공개일자	1999년11월15일
번역문 제출일자	1998년07월23일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/001046	(87) 국제공개번호	WO 1997/27325
국제출원일자	1997년01월23일	국제공개일자	1997년07월31일

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 알바니아, 오스트레일리아, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 케냐,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 벨라루스, 키르기스스탄,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 오스트리아, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 영국,

(30) 우선권주장	60/014,536	1996년01월23일	미국(US)
	60/020,487	1996년06월04일	미국(US)

(73) 특허권자      쿼아진 지노믹스, 인코포레이티드  
미국 워싱턴주 98021 보텔 220번 스트리트 사우쓰이스트 1631

(72) 발명자      반 네스 제프리  
미국 워싱턴주 98125 시애틀 49번 애비뉴 노쓰이스트 10020

    데이본 존 씨  
미국 워싱턴주 98011 보텔 노쓰이스트 166번 플레이스 12117

    하우버트 제이 제프리  
미국 워싱턴주 98005 벨레뷰 노쓰이스트 30번 스트리트 12740

    멀리건 존 티  
미국 워싱턴주 98105 시애틀 17번 애비뉴 노쓰이스트 5823

(74) 대리인      김영관  
                  이병호  
                  홍동오

심사관 : 백경업

## (54) 크기기술을사용하여핵산분자를분석하기위한방법및조성물

### 요약

크기에 근거한 핵산 분자의 분리를 필요로 하는 각종 핵산 반응에 적합한, 각종 핵산 반응을 위해 특별히 고안되는 태그 및 링커가 기술되어 있다.

### 대표도

도 4

### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 일반적으로 핵산 분자를 분석하기 위한 방법 및 조성물, 더욱 구체적으로는 크기에 근거한 핵산 분자의 분리가 필요한, 광범위한 핵산 반응에 사용될 수 있는 태그(tag)에 관한 것이다.

#### 배경기술

핵산 분자의 검출 및 분석은 생물학에 있어서 가장 중요한 기술에 속한다. 이러한 기술은 분자 생물학의 심장부에 존재하고 나머지 생물학에 신속하게 확장되는 역할을 수행한다.

일반적으로, 핵산 반응의 분석중의 하나의 형태는 길이에 근거하는 핵산 분자의 분리를 포함한다. 예를 들어, 널리 사용되는 하나의 기술인 폴리머라제 연쇄반응(PCR)(참조: 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호)은 샘플에 존재하는 서열을 확인하고 추가의 조작을 위한 DNA 분자를 합성하기 위해 널리 사용되는 기술이 되어왔다.

간단하게, PCR에 있어서, DNA 서열은 기하학적 방식 또는 선형 방식으로 새로운 DNA 쇄를 합성하는 효소반응에 의해 증폭된다. 증폭 후, DNA 서열을 검출하고 확인한다. 분석을 혼란하게 하는 비특이적인 증폭 또는 순도에 대한 필요로 인해, PCR 반응 생성물은 일반적으로 검출에 앞서 분리된다. 생성물의 크기(즉, 길이)에 근거하는 분리는 가장 유용한 정보를 제공한다. 핵산 분자의 가장 높은 분해성능을 제공하는 방법은 전기영동 분리이다. 이러한 방법에 있어서, 각각의 개별적인 PCR 반응을 적합한 겔에 적용하고 전압을 부여한다. 가공될 수 있는 샘플의 수는 겔내 웰의 수에 의해 한정된다. 대부분의 겔 장치에 있어서, 약 10 내지 64개의 샘플은 단일 겔에서 분리될 수 있다. 따라서, 다수의 샘플을 가공하는 것은 노동 집약적이고 물질 집약적이다.

전기이동적 분리는 데이터를 수득하기 위해 몇몇 검출 시스템과 결부되어야 한다. 핵산의 검출 시스템은 통상 및 거의 배타적으로 삽입 염료 또는 방사활성 표지를 사용하고, 드물게는 비방사활성 표지를 사용한다. 에티디움 브로마이드 같은 삽입 염료가 사용하기 간편하다. 염료는 전기영동중 겔 매트릭스에 포함되거나, 전기영동 후, 겔은 염료를 함유하는 용액에 침액된다. 염료는 몇몇 경우, 그러나 더욱 빈번하게 직접 눈에 보일 수 있고, 특히 에티디움 브로마이드의 경우, 광(예를 들어, UV)에 의해 여기되어 형광을 나타낸다. 이러한 명백한 사용상의 용이성에도 불구하고, 상기 염료는 몇몇 주목할 만한 단점이 있다. 첫째, 상기 염료는 둔감하고 생성물을 보이게 하기 위해서는 다량의 핵산 분자가 존재해야 한다. 둘째, 상기 염료는 전형적으로 돌연변이를 유발하거나 암을 유발한다.

염료보다 더 민감한 검출 기술은 방사활성(또는 비방사활성) 표지를 사용하는 것이다. 전형적으로, 방사선 표지된 뉴클레오타이드 또는 방사선 표지된 프라이머는 PCR 반응에 포함된다. 분리 후, 방사선 표지는 자동 방사선 사진술에 의해 "가시화"된다. 더욱 민감함에도 불구하고, 상기 검출은 상호 감퇴 및 비선형성과 같은 필름 한계로 제약을 받는다. 이러한 한계는 인의 화학 분석에 의해 표지를 검출함으로써 극복될 수 있다. 그러나, 방사표지는 자체 사용량을 증가시키고 특성화된 장치 및 인력 훈련을 필요로 하는 안전성 요건을 필요로 한다. 이러한 이유 때문에, 비방사활성 표지의 사용은 대중화되고 있다. 이러한 시스템에 있어서, 뉴클레오타이드는 색원체 기질과 반응하는 효소로 표지되는 항체 또는 기타의 분자(예를

들어, 기타의 리간드 쌍의 멤버)에 의해 검출될 수 있는 형광단, 바이오틴 또는 디곡신과 같은 표지를 함유한다. 이러한 시스템은 위에서 기술한 바와 같은 안전성의 문제는 없지만, 종종 불안정하고 비특이적인 반응을 일으킬 수 있는 성분을 사용하여 높은 배경값(즉, 낮은 시그널 대 노이즈 비)을 생성한다.

본 발명은 광범위한 핵산 반응에 사용될 수 있는 신규한 조성물 및 방법을 제공하고, 기타의 관련된 이점을 제공한다.

간단히 언급하면, 본 발명은 핵산 분자와 같은 관심 대상의 분자를 크기에 근거하여 분리하는 것을 필요로 하는, 광범위한 리간드 쌍 반응에 사용할 수 있는 조성물 및 방법을 제공한다. 본원에 제공되는 기재내용에 있는 향상될 수 있는 방법의 대표적인 예는 PCR, 차등 디스플레이, RNA 핑거프린팅(RNA fingerprinting), PCR-SSCP, 올리고 연결 검정(oligo ligations assays), 뉴클레아제 분해 방법(예를 들어, 엑소- 및 엔도-뉴클레아제에 근거하는 검정), 및 디데옥시 핑거프린팅을 포함한다. 본원에 기술된 방법은 예를 들어, 임상 진단 또는 조사 진단, 다형성 결정 및 유전자 맵(map)의 개발을 포함하는 광범위한 분야에 활용될 수 있다.

본 발명의 한 양태에 있어서, (a) 하나 이상의 선택된 표적 핵산 분자로부터 택이 핵산 단편과 상호 관계가 있고 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그가 부착된, 선택된 표적 핵산 분자에 상보적인 핵산 분자(MOD)인 태그된 핵산 분자를 형성하고, (b) 태그된 단편을 크기에 의해 분리하고; (c) 태그된 단편으로부터 태그를 절단하고; (d) 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 핵산 분자의 존재를 결정함을 포함하여, 핵산 분자의 존재를 결정하는 방법이 제공된다.

본 발명의 관련된 한 양태에 있어서, (a) 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그된 핵산 프로브의 상보적으로 선택된 표적 핵산 서열로의 하이브리드화를 허용하기에 충분한 조건하 및 시간 동안 태그된 핵산 프로브를 표적 핵산 분자와 배합하고; (b) 하이브리드화된 태그되고 프로브의 크기, 하이브리드화되지 않은 프로브 또는 표적 분자의 크기, 또는 프로브:타겟 하이브리드의 크기를 변화시키고; (c) 태그된 프로브를 크기에 의해 분리하고; (d) 태그된 프로브로부터 태그를 절단하고; (e) 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 선택된 핵산 분자를 검출함을 포함하여, 선택된 핵산 분자를 검출하는 방법이 제공된다.

추가 양태에 있어서, (a) 선택된 표적 분자로부터 특정 핵산 단편과 상호 관계가 있고 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그가 부착된 태그된 핵산 분자를 형성하며; (b) 태그된 핵산 분자를 서열의 길이에 의해 분리하고; (c) 태그된 핵산 분자로부터 태그를 절단하고; (d) 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 선택된 유기체의 유전자형을 결정함을 포함하여, 선택된 유기체의 유전자형을 결정하는 방법이 제공된다.

또 다른 양태에 있어서, (a) 특정 핵산 단편과 상호 관계가 있고 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그를 포함하는 태그된 분자의 선택된 표적 분자로의 하이브리드화를 허용하기에 충분한 조건하 및 시간 동안 태그된 핵산 분자를 선택된 표적 분자와 배합하며; (b) 태그된 핵산 단편을 서열의 길이에 의해 분리하고; (c) 태그된 핵산 단편으로부터 태그를 절단하고; (d) 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 선택된 유기체의 유전자형을 결정함을 포함하여, 선택된 유기체의 유전자형을 결정하는 방법이 제공된다.

본 발명의 내용에 있어서, "생물학적 샘플"은 살아있는 유기체(예를 들어, 포유류, 어류, 세균, 기생충, 바이러스, 진균 등)로부터 또는 환경(예를 들어, 공기, 물 또는 고체 샘플)으로부터 수득되는 샘플뿐만 아니라, 인공적으로 또는 합성에 의해 제조될 수 있는 생물학적 물질(예를 들어, 파아지 라이브러리, 유기 분자 라이브러리, 게놈성 클론, cDNA 클론 및 RNA 클론의 풀 등)도 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 생물학적 샘플의 대표적인 예는 생물학적 유액(예를 들어, 혈액, 정액, 뇌척수액, 뇨), 생물학적 세포(예를 들어, 줄기(stem) 세포, B 또는 T 세포, 간(liver) 세포, 섬유아세포 등) 및 생물학적 조직을 포함한다. 최종적으로, 유전자형을 결정할 수 있는 유기체의 대표적인 예는 사실상 모든 단세포성 유기체 또는 다세포성 유기체, 예를 들어, 온혈 동물, 포유 동물 또는 척추동물(예를 들어, 사람, 침팬지, 짧은 꼬리 원숭이, 말, 암소, 돼지, 양, 개, 고양이, 래트 및 마우스 뿐만 아니라 이들중의 임의의 동물로부터의 세포), 세균, 기생충, 바이러스, 진균 및 식물을 포함한다.

위에서 기술한 방법들의 다양한 실시양태에 있어서, 본 발명의 핵산 프로브 및/또는 분자는 예를 들어, 연결, 절단 또는 신장(예를 들어, PCR) 반응에 의해 형성될 수 있다. 기타의 관련된 양태에 있어서, 핵산 프로브 또는 분자는 5'-태그된 올리고뉴클레오타이드 프라이머(예를 들어, 5'-태그된 올리고뉴클레오타이드 프라이머) 또는 디데옥시뉴클레오타이드 터미네이터에 의해 태그될 수 있다.

본 발명의 기타의 실시양태에 있어서, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 250, 300, 400, 450, 또는 500 이상의 상이하고 독특한, 태그된 분자가 제공되는 반응에서 동시에 사용될 수 있으며, 이때 각각의 태그는 선택되는 핵산 분자 또는 단편, 또는 프로브에 대해 독특하고, 개별적으로 확인될 수 있다.

본 발명의 추가의 실시양태에 있어서, 태그는 형광 분석법, 질량 분광 분석법, 적외선 분광 분석법, 자외선 분광 분석법 또는 정전위 전류법(예를 들어, 전기 검출기 또는 전류 검출기를 사용하는)에 의해 검출될 수 있다. 적합한 분광 분석 기술의 대표적인 예는 비행 시간형(time-of-flight) 질량 분광 분석, 4중극 질량 분광 분석, 자기 부문 질량 분광 분석 및 전기 부문 질량 분광 분석을 포함한다. 이러한 기술의 구체적인 실시양태는 이온-트랩 질량 분광 분석, 전기부문 이온화 질량 분광 분석, 이온분무 질량 분광 분석, 액체 이온화 질량 분광 분석, 대기압 이온화 질량 분광 분석, 전자 이온화 질량 분광 분석, 고속 원자 충격 이온화 질량 분광 분석, MALDI 질량 분광 분석, 광-이온화 비행 시간형 질량 분광 분석, 레이저 점적(droplet) 질량 분광 분석, MALDI-TOF 질량 분광 분석, APCI 질량 분광 분석, 나노-분무 질량 분광 분석, 연무되는 분무 이온화 질량 분광 분석, 화학 이온화 질량 분광 분석, 공명 이온화 질량 분광 분석, 2급 이온화 질량 분광 분석 및 열분무 질량 분광 분석을 포함한다.

본 발명의 기타의 실시양태에 있어서, 표적 분자, 하이브리드화되고 태그된 프로브, 하이브리드화되지 않은 프로브 또는 표적 분자, 프로브:표적 하이브리드 또는 태그된 핵산 프로브 또는 분자는 분자의 크기(실질적인 선형 크기 또는 3차원 크기 중의 하나) 사이를 식별하는 방법을 사용하여 기타의 분자로부터 분리될 수 있다. 이러한 방법의 대표적인 예는 겔 전기영동법, 모세관 전기영동법, 마이크로-채널 전기영동법, HPLC, 크기 배제 크로마토그래피, 여과, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법, 액체 크로마토그래피, 역 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 액체 크로마토그래피, 펄스장 전기영동법, 장-역전 전기영동법, 투석, 및 형광-활성화된 액체 점적 분류법을 포함한다. 또한, 표적 분자, 하이브리드화되고 태그된 프로브, 하이브리드화되지 않은 프로브 또는 표적 분자, 프로브:표적 하이브리드, 또는 태그된 핵산 프로브 또는 분자는 고체 지지체[예를 들어, 중공섬유(제조사: Amicon Corporation, Danvers, Mass.), 비드(제조사: Polysciences, Warrington, Pa.), 자기 비드(제조사: Robbin Scientific, Mountain View, Calif.), 플레이트, 접시 및 플라스크(제조사: Corning Glass Works, Corning, N. Y.), 메쉬(제조사: Becton Dickinson, Mountain View, Calif.), 스크린 및 고체 섬유(참조: Edelman et al., 미국 특허 제3,843,324호; Kuroda et al., 미국 특허 제4,416,777호), 막(제조사: Millipore Corp., Bedford, Mass.), 및 덩스틱]에 결합될 수 있다. 제1 또는 제2의 구성원, 또는 노출된 핵산이 고체 지지체에 결합되는 경우, 본 발명의 특정한 실시양태에 있어서, 본원에 기술된 방법들은 결합되지 않은 물질의 고체 지지체를 세척하는 단계를 추가로 포함한다.

실시양태에 있어서, 태그된 핵산 분자 또는 프로브는 화학적 방법, 산화 방법, 환원 방법, 산 불안정성 방법, 염기 불안정성 방법, 효소 방법, 전기 화학적 방법, 열적 방법 및 광 불안정성 방법과 같은 방법에 의해 절단될 수 있다. 추가의 실시양태에 있어서, 분리, 절단 및 검출 단계는 예를 들어, 자동화될 수 있는 단일 장치에서 연속적인 방식으로 수행될 수 있다.

본 발명의 특정한 실시양태에 있어서, 하이브리드화되고 태그된 프로브, 하이브리드화되지 않은 프로브 또는 표적 분자 또는 프로브:표적 하이브리드의 크기는 폴리머라제 연장, 연결, 엑소뉴클레아제 분해, 엔도뉴클레아제 분해, 제한 효소 분해, 부위 특이적 재결합효소 분해, 연결, 부정합 특정 뉴클레아제 분해, 메틸화-특정 뉴클레아제 분해, 표적에 대한 프로브의 공유 부착 및 하이브리드화로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법에 의해 변화시킨다.

본원에 기술된 방법 및 조성물은 진단학, 법의학, 확인, 발생 생물학, 생물학, 분자 의학, 독성학, 동물 육종에 대해 예를 들어, PCR 앰플리콘, RNA 핑거프린팅, 차등 디스플레이, 일본쇄 확인 다형성 검출, 디데옥시 핑거프린팅, 제한 맵 및 제한 단편 길이 다형성, DNA 핑거프린팅, 유전자 형태결정, 돌연변이 검출, 올리고뉴클레오타이드 연결 분석, 서열 특이적 증폭을 확인하는 것을 포함하는 광범위한 적용분야에 사용될 수 있다.

본 발명의 이러한 양태 및 기타의 양태는 하기 상세한 기술 및 첨부하는 도면을 참조로 하여 분명해질 것이다. 또한, 특정한 과정 또는 조성물(예를 들어, 플라스미드 등)을 상세히 기술하는 다양한 참조문헌들을 하기하며 전체적으로 참조 문헌으로 인용한다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 카복실 아미드 말단을 갖는 태그를 분리하기 위해, 화학적으로 절단할 수 있는 질량 분광 분석 태그의 펜타플루오로페닐 에스테르의 합성을 위한 작업 공정도이다.

도 2는 카복실산 말단을 갖는 태그를 분리하기 위해, 화학적으로 절단할 수 있는 질량 분광 분석 태그의 펜타플루오로페닐 에스테르의 합성을 위한 작업 공정도이다.

도 3 내지 도 6 및 도 8은 광화학적으로 절단할 수 있는 36개의 질량 분광 분석 태그의 한 세트의 테트라플루오로페닐 에스테르의 합성을 위한 작업 공정도이다.

도 7은 아민 말단 종결된 광화학적으로 절단할 수 있는 36개의 질량 분광 분석 태그의 한 세트의 합성을 위한 작업 공정도이다.

도 9는 광화학적으로 절단할 수 있는 질량 분광 분석 태그 산의 36개의 테트라플루오로페닐 에스테르의 상응하는 세트로부터 제조되는 광화학적으로 절단할 수 있는 질량 분광 분석 태그된 36개의 올리고뉴클레오타이드의 합성도이다.

도 10은 아민 말단 종결된 광화학적으로 절단할 수 있는 36개의 질량 분광 분석 태그의 상응하는 세트로부터 제조되는 광화학적으로 절단할 수 있는 질량 분광 분석 태그된 36개의 올리고뉴클레오타이드의 합성도이다.

도 11은 질량 분광 분석에 의한 다중 태그의 동시 검출을 나타낸다.

도 12는 알파-시아노 매트릭스 하나만의 질량 분광도를 나타낸다.

도 13은 모듈에 의해 구축된 태그된 핵산 단편을 나타낸다.

위에서 지적한 바와 같이, 본 발명은 크기에 근거하는 핵산 분자의 분리가 필요한, 핵산 분자를 분석하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 핵산 및 단편, 단백질, 펩타이드 등을 포함하는 관심대상 분자의 동시 검출을 허용한다.

간단히 언급하면, 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 관심 대상의 분자 또는 이의 전구체가 불안정한 결합(또는 불안정한 결합들)에 의해 태그에 결합되는 화합물을 제공한다. 따라서, 본 발명의 화합물은 다음 화학식 1과 같이 나타낼 수 있다:

[화학식 1]

T-L-X

상기식에서,

T는 태그 성분이고,

L은 불안정한 결합이거나 불안정한 결합을 함유하는 링커 성분이고,

X는 관심대상의 분자(MOI) 성분 또는 작용성 그룹 성분(L<sub>n</sub>)으로서 이를 통해 MOI가 T-L에 결합될 수 있다.

따라서, 본 발명의 화합물은 더욱 구체적으로는 다음 화학식 2 및 3으로 나타낼 수 있다.

[화학식 2]

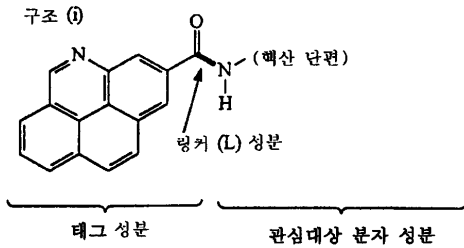
T-L-MOI

[화학식 3]

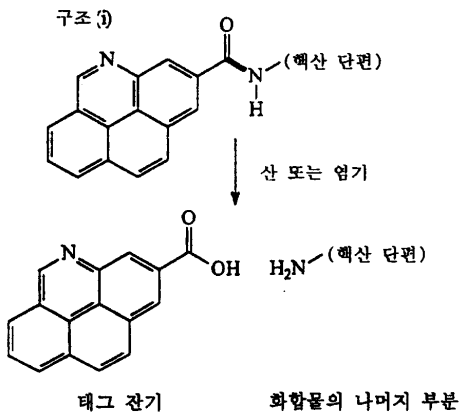
T-L-L<sub>n</sub>

다음에 상세하게 기술되는 이유로 인해, T-L-MOI 화합물 세트는 의도적으로 불안정성 결합(들)을 절단시키는 조건에 처하여, 화합물의 나머지 부분으로부터 태그 잔기를 분리시킬 수 있다. 이어서, 태그 잔기는 태그 잔기의 구조에 관한 직접적인 정보 및 (가장 중요하게는) 상응하는 MOI의 정체에 관한 간접적인 정보를 제공하는 하나 이상의 분석 기술에 의해 특성화된다.

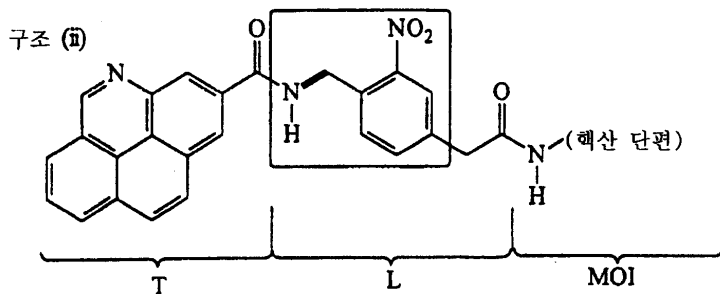
L이 직접 결합인 본 발명의 대표적인 화합물의 단순한 예시적인 예로서 다음 구조(i)를 참조한다:



구조(i)에 있어서, T는 카보닐 그룹에 결합된 질소를 함유하는 폴리사이클릭 방향족 잔기이고, X는 MOI( 및 구체적으로 아민 그룹에서 중결되는 핵산 단편)이고, L은 아마이드 그룹을 형성하는 결합이다. 아마이드 결합은 선행 문헌에서 밝혀진 바와 같이, T에 있어서의 결합에 대해 불안정하기 때문에, 아마이드 결합은 태그 성분 내의 결합을 변화시키지 않고 남겨두는 산성 또는 염기성 조건에 의해 화학적으로 분해(파괴)될 수 있다. 따라서, 태그 잔기(즉, T를 함유하는 절단 생성물)는 다음에 나타내는 바와 같이 방출될 수 있다:

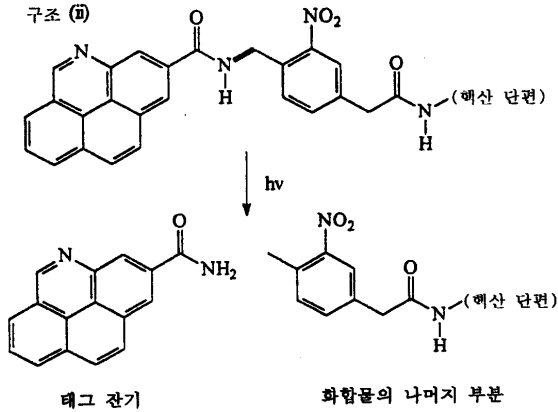


그러나, 링커(L)은 다음의 예시적인 예에 나타내는 바와 같이 단순한 직접 결합 이상일 수 있고, 이때 다음에 나타내는 구조(ii)를 갖는 본 발명의 기타의 대표적인 화합물을 참조한다.



오르토-니트로벤질아민 잔기(참조: 구조(ii)중의 네모 표시된 원자들)를 갖는 화합물은 광분해적으로 불안정하여 이러한 화합물을 특정한 파장의 방사선에 노출시키면 벤질아민 결합(참조: 구조(ii)중 굵은 선으로 표시된 결합)의 선택적인 절단

을 일으킬 수 있다는 것은 익히 공지되어 있다. 따라서, 구조(ii)는 구조(i)에서와 동일한 T 및 MOI 그룹을 갖지만, 링커 그룹은 특히 불안정한 결합이 존재하는 다중 원소 및 결합을 함유한다. 따라서, 다음에 나타내는 바와 같이 구조(ii)의 광분해에 의해 화합물의 나머지 부분으로부터 태그 잔기(T-함유 잔기)를 방출한다.



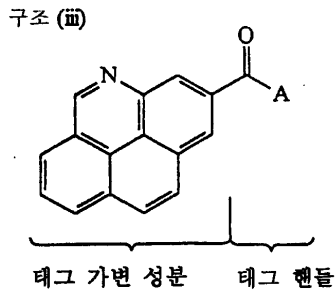
따라서, 본 발명은 적합한 절단 조건에 노출되는 경우, 절단 반응이 일어나서 화합물의 나머지 부분으로부터 태그 잔기를 방출하는 화합물을 제공한다. 본 발명의 화합물은 태그 잔기, MOI(또는 이에 대한 전구체,  $L_n$ ), 및 상기 2개의 그룹을 함께 결합시키는 불안정성 결합(들)과 관련하여 기술할 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 이들이 형성되는 성분 측면에서 기술될 수 있다. 즉, 본 발명의 화합물은 다음과 같은 태그 반응물, 링커 반응물 및 MOI 반응물의 반응 생성물로서 기술할 수 있다.

태그 반응물은 화학 핸들( $T_h$ ) 및 각종 성분( $T_{vc}$ )으로 이루어지며, 태그 반응물은 다음 화학식 4의 구조를 갖는다:

[화학식 4]

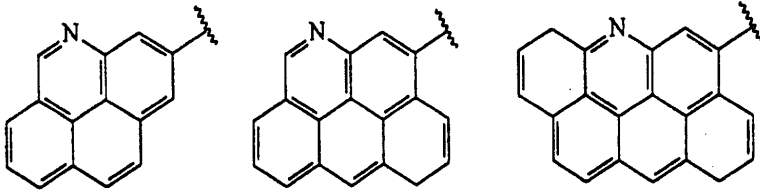


이러한 명명법을 예시하기 위해, 구조(ii)의 화합물을 제조하기 위해 사용될 수 있는 태그 반응물을 나타내는 구조(iii)를 참조할 수 있다. 구조(iii)를 갖는 태그 반응물은 다음에 나타내는 바와 같이 태그 가변 성분 및 태그 핸들을 함유할 수 있다:



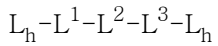
구조(iii)에 있어서, 태그 핸들( $-C(=O)-A$ )은 간단하게 태그 반응물을 링커 반응물과 반응시켜 T-L 잔기를 형성하기 위한 경로를 제공한다. 구조(iii)에 있어서 그룹 "A"는 카복실 그룹이 화학적 활성 상태에 존재하여 기타의 핸들과 커플링되기 위한 준비가 되어 있는 것을 나타낸다. "A"는 예를 들어, 기타 다수의 가능성 중에서 하이드록시 그룹 또는 펜타플루오로페녹시일 수 있다. 본 발명은 다음에 상세하게 논의되는 바와 같이 태그 가변 성분과 결합될 수 있는 다수의 가능한 태그 핸들을 제공한다. 태그 가변 성분은 화학식 T-L-X중 "T"의 부분이고, 또한 L을 절단하는 반응으로부터 형성되는 태그 잔기의 일부일 수 있다.

다음에 상세하게 논의되는 바와 같이, 태그 가변 성분은 본 발명에 따른 화합물의 세트를 제조함에 있어서 세트의 구성원이 독특한 가변 성분을 보유하여 개별적인 구성원이 분석기술에 의해 서로로부터 구별될 수 있는 것을 목적으로 하기 때문에 그렇게 명명된다. 하나의 실시예로서, 구조(iii)의 태그 가변 성분은 다음의 세트중의 하나의 구성원일 수 있으며, 이때 세트의 구성원은 이의 UV 또는 질량 스펙트럼에 의해 구별될 수 있다:



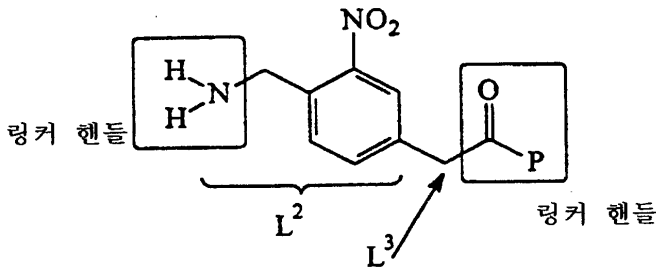
유사하게, 링커 반응물은 링커 불안정성 성분의 측면에 있는 화학적인 핸들과 관련하여(필수적으로 2개 이상이 존재하고 이들 각각은  $L_h$ 로서 나타낼 수 있다) 기술할 수 있으며, 이때 링커 불안정성 성분은 필수 불안정성 잔기( $L^2$ ) 및 임의의 불안정성 잔기( $L^1$  및  $L^3$ )로 이루어지고, 임의의 불안정성 잔기는 핸들  $L_h$ 로부터  $L^2$ 를 효율적으로 분리시키고, 필수 불안정성 잔기는 링커 불안정성 성분내에서 불안정성 결합을 제공한다. 따라서, 링커 반응물은 다음 화학식 5의 화합물로 나타낼 수 있다:

[화학식 5]



링커 반응물을 기술하기 위해 사용되는 명명법은 구조(ii)의 화합물로부터 다시 도시하는 구조(iv)의 관점에서 나타낼 수 있다:

구조 (iv)



구조(iv)를 나타낸 바와 같이, 원자는 하나 이상의 작용성 역할에 기여할 수 있다. 따라서, 구조(iv)에 있어서, 벤질 질소는 링커 반응물이 아마이드 형성 반응에 의해 태그 반응물에 결합하는 것을 허용하는 화학적 핸들로서 작용하고, 연속적으로 벤질계 탄소-질소 결합이 특히 광분해 절단되는, 불안정성 잔기  $L^2$ 의 구조중 필수 부분으로서 기여한다. 또한, 구조(iv)는 링커 반응물이 비록  $L^1$  그룹은 갖지 않더라도  $L^3$  그룹(이러한 경우 메틸렌 그룹)을 보유할 수 있음을 나타낸다. 유사하게, 링커 반응물은  $L^1$  그룹을 보유할 수 있지만  $L^3$  그룹을 갖지 않거나,  $L^1$  그룹 및  $L^3$  그룹을 보유할 수 있거나  $L^1$  그룹도  $L^3$  그룹도 보유하지 못할 수도 있다. 구조(iv)에 있어서, 카보닐 그룹 다음에 그룹 "P"의 존재는 카보닐 그룹이 반응으로부터 보호되는 것을 나타낸다. 이러한 배치가 제공되는 경우, 태그 반응물(iii)의 활성화된 카복실 그룹은 링커 반응물(iv)의 아민 그룹과 반응하여 아마이드 결합을 형성할 수 있고 화학식  $T-L-L_h$ 의 화합물을 제공할 수 있다.

MOI 반응물은 관심대상 분자의 적절한 반응성 형태이다. 관심대상의 분자가 핵산 단편인 경우, 적합한 MOI 반응물은 이의 5' 하이드록시 그룹을 통해 포스포디에스테르 그룹에 이어서 아미노 그룹에서 말단 종결하는 알킬렌 쇠에 결합된 핵산 단편이다. 이러한 아미노 그룹은 구조(iv)의 카보닐 그룹과 반응하여, (물론 카보닐 그룹을 탈보호시킨 후, 바람직하게는 연속적으로 카보닐 그룹을 아민 그룹과의 반응 쪽으로 활성화시킨 후) MOI를 링커에 결합시킬 수 있다.

시간상의 순서에서 살펴볼 때, 본 발명은 태그 반응물(화학적 태그 핸들 및 태그 가변 성분을 갖는), 링커 반응물(2개의 화학적 링커 핸들 및 필수 불안정성 잔기 및 0 내지 2개의 임의의 불안정성 잔기를 갖는) 및 MOI 반응물(관심대상 성분의 분자 및 관심대상 핸들의 화학적 분자를 갖는)을 취하여  $T-L-MOI$ 를 형성하는 것으로 보인다. 따라서,  $T-L-MOI$ 를 형성하기 위해, 태그 반응물 및 링커 반응물을 우선 함께 반응시켜  $T-L-L_h$ 를 제공하고, MOI 반응물을  $T-L-L_h$ 와 반응시켜  $T-L-MOI$ 를 제공하거나, (보다 덜 바람직하긴 하지만) 링커 반응물 및 MOI 반응물을 우선 함께 반응시켜  $L_h-L-MOI$ 를 제



공한 다음,  $L_n$ -L-MOI를 태그 반응물과 반응시켜 T-L-MOI를 제공한다. 편의성을 위해, 화학식 T-L-MOI를 갖는 화합물은 이러한 반응물을 형성하기 위해 사용될 수 있는 태그 반응물, 링커 반응물 및 MOI 반응물과 관련하여 기술할 수 있다. 물론, 화학식 T-L-MOI의 동일한 화합물은 (전형적으로 더욱 힘들게) 기타의 방법에 의해 제조될 수 있고, 여전히 본 발명의 T-L-MOI 화합물의 범주내에 속한다.

어쨌든, 본 발명은 T-L-MOI 화합물을 절단 조건에 위치시켜 태그 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 방출되도록 하는 것을 제공한다. 태그 잔기는 적어도 태그 가변 성분을 포함할 수 있고, 전형적으로 태그 핸들로부터의 일부 또는 전체의 원자, 태그 반응물을 링커 반응물에 결합시키기 위해 사용되는 링커 핸들로부터의 일부 또는 모든 원자, T-L-MOI중에 존재하는 경우 임의의 불안정성 잔기  $L^1$ 을 추가로 포함할 수 있고,  $L^2$ 의 정확한 구조 및 절단 화학의 특성에 의존하는 필수 불안정성 잔기  $L^2$ 의 일부를 함유할 수 있다. 편리하게, 태그 잔기는 T가 전형적으로 태그 잔기의 주요 부분(질량의 관점에서)을 구성하기 때문에 T-함유 잔기라고 언급할 수 있다.

본 발명의 하나의 양태에 대한 이러한 소개를 제공하는 경우, 여러 가지 성분들 T, L 및 X를 상세하게 기술할 수 있다. 이러한 기술은 이후 T, L 및 X를 기술하는데 사용될 수 있는 특정한 용어의 정의로 시작한다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "핵산 단편"은 선택된 표적 핵산 분자에 상보적인(즉, 이의 전체 또는 일부를 상보적인) 분자를 의미하고, 천연적으로 또는 비천연적으로 존재하는 분자를 포함하는, 합성에 의해 또는 재조합에 의해 제조되는 것으로부터 유도될 수 있고, 적합한 경우 이본쇄 또는 일본쇄 형태일 수 있고; 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, DNA 또는 RNA), 프라이머, 프로브, 핵산 동족체(예를 들어, PNA), 폴리머라제에 의해 5'에서 3' 방향으로 연장되는 올리고뉴클레오타이드, 화학적으로 또는 효소에 의해 절단되는 핵산, 디데옥시 터미네이터로 말단 종결되거나 5' 또는 3' 말단에서의 중합을 방지하는 화합물로 3' 또는 5' 말단에서 캡핑된 핵산, 및 이들의 배합물일 수 있다. 선택된 표적 핵산 분자에 대한 핵산 단편의 상보성은 일반적으로 단편의 길이를 통해 약 70% 이상의 특정한 염기 쌍 형성을 나타냄을 의미한다. 바람직하게는, 핵산 단편은 약 80% 이상의 특정한 염기 쌍 및 가장 바람직하게는 약 90% 이상을 나타낸다. 부정합의 백분율(및 특정한 염기쌍의 백분율)을 측정하기 위한 분석법은 당해 기술분야에 익히 공지되어 있고 완전하게 염기쌍을 형성하는 대조군에 대해 참조하는 경우  $T_m$ 의 함수로서 부정합 백분율에 근거한다.

본원에 사용된 바와 같이, 단독으로 또는 조합되어 용어 "알킬"은 탄소수 1 내지 10, 바람직하게는 1 내지 6, 및 더욱 바람직하게는 1 내지 4를 함유하는 포화된, 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 언급하는 것이다. 이러한 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, n-부틸, 이소-부틸, 2급-부틸, 3급-부틸, 펜틸, 이소-아밀, 헥실, 데실 등을 포함한다. 용어 "알킬렌"은 탄소수 1 내지 10, 바람직하게는 1 내지 6, 및 더욱 바람직하게는 1 내지 4를 함유하는 포화된, 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 이라디칼을 언급하는 것이다. 이러한 이라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만 메틸렌, 에틸렌(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 프로필렌 등을 포함한다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알케닐"은 탄소수 2 내지 10, 바람직하게는 2 내지 6, 및 더욱 바람직하게는 2 내지 4에 있어서 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 언급하는 것이다. 이러한 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만, 에틸렌, E- 및 Z-프로페닐, 이소프로페닐, E- 및 Z-부테닐, E- 및 Z-이소부테닐, E- 및 Z-펜테닐, 데세닐 등을 포함한다. 용어 "알케닐렌"은 탄소수 2 내지 10, 바람직하게는 2 내지 6, 및 더욱 바람직하게는 2 내지 4에 있어서 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 이라디칼을 언급하는 것이다. 이러한 이라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만, 메틸리텐(=CH<sub>2</sub>), 에틸리텐(-CH=CH-), 프로필리텐(-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) 등을 포함한다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알키닐"은 탄소수 2 내지 10, 바람직하게는 2 내지 6, 및 더욱 바람직하게는 2 내지 4에 있어서 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 언급하는 것이다. 이러한 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만 에틸닐(아세틸레닐), 프로피닐(프로파길), 부티닐, 헥시닐, 데시닐 등을 포함한다. 단독으로 또는 조합되어 용어 "알키닐렌"은 탄소수 2 내지 10, 바람직하게는 2 내지 6, 및 더욱 바람직하게는 2 내지 4에 있어서 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 직쇄 또는 측쇄 탄화수소 라디칼을 언급하는 것이다. 이러한 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만 에틸닐렌(-C≡C-), 프로피닐렌(-CH<sub>2</sub>-C≡C-) 등을 포함한다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "사이클로알킬"은 탄소수 3 내지 8, 및 바람직하게는 3 내지 6의 탄소원자의 포화된 환식 배열을 언급하는 것이다. 이러한 사이클로알킬 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 등을 포함한다. 용어 "사이클로알킬렌"은 사이클로알킬의 이라디칼 형태를 언급하는 것이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "사이클로알케닐"은 탄소수 4 내지 8, 바람직하게는 5 또는 6을 함유하고 하나 이상의 이중 결합을 갖는 사이클릭 카보사이클을 언급하는 것이다. 이러한 사이클로알케닐 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만, 사이클로펜테닐, 사이클로헥세닐, 사이클로펜타디에닐 등을 포함한다. 용어 "사이클로알케닐렌"은 사이클로알케닐의 이라디칼 형태를 언급하는 것이다.

용어 "아릴"은 페닐, 나프틸, 인데닐, 인다닐, 아줄레닐, 플루오레닐 및 안트라세틸로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 카보사이클릭(전체적으로 탄소 및 수소로 이루어진) 방향족 그룹; 또는 푸릴, 티에닐, 피리딜, 피롤릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 2-피라졸리닐, 피라졸리디닐, 이속사졸릴, 이소티아졸릴, 1, 2, 3-옥사디아졸릴, 1, 2, 3-트리아졸릴, 1, 3, 4-트리아졸릴, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 1, 3, 5-트리아지닐, 1, 3, 5-트리티아닐, 인돌리지닐, 인돌릴, 이소인돌릴, 3H-인돌릴, 인돌리닐, 벤조[b]푸라닐, 2, 3-디하이드로벤조푸라닐, 벤조[b]티오펜, 1H-인다졸릴, 벤즈이미다졸릴, 벤즈티아졸릴, 푸라닐, 4H-퀴놀리지닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 신놀리닐, 프탈라지닐, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 1, 8-나프티리디닐, 프테리디닐, 카바졸릴, 아크리디닐, 페나지닐, 페노티아지닐 및 페녹사지닐로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 헤테로사이클릭 방향족 그룹을 언급하는 것이다.

본원에 정의한 바와 같이 "아릴"은 독립적으로 수소, 할로젠, 하이드록실, 아미노, 니트로, 트리플루오로메틸, 트리플루오로메톡시, 알킬, 알케닐, 알키닐, 시아노, 카복시, 카보알콕시, 1,2-디옥시에틸렌, 알콕시, 알케녹시 또는 알키녹시, 알킬아미노, 알케닐아미노, 알키닐아미노, 지방족 또는 방향족 아실, 알콕시-카보닐아미노, 알킬설폰닐아미노, 모르폴리노카보닐아미노, 티오모르폴리노카보닐아미노, N-알킬 구아니디노, 아르알킬아미노설폰일로 이루어진 그룹 중에서 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 치환체; 아르알콕시알킬; N-아르알콕시우레아; N-하이드록실우레아; N-알케닐우레아; N,N-(알킬, 하이드록실)우레아; 헤테로사이클릴; 티오아릴옥시-치환된 아릴; N,N-(아릴, 알킬)하이드라지노; Ar'-치환된 설폰닐 헤테로사이클릴; 아르알킬-치환된 헤테로사이클릴; 사이클로알킬 및 사이클로알케닐-치환된 헤테로사이클릴; 사이클로알킬-융합된 아릴; 아릴옥시-치환된 알킬; 헤테로사이클릴아미노; 지방족 또는 방향족 아실아미노카보닐; 지방족 또는 방향족 아실-치환된 알케닐; Ar'-치환된 아미노카보닐옥시; Ar', Ar'-이치환된 아릴; 지방족 또는 방향족 아실-치환된 아실; 사이클로알킬카보닐알킬; 사이클로알킬-치환된 아미노; 아릴옥시카보닐알킬; 포스포로디아미드산 또는 에스테르로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1 내지 4개의 치환체를 함유할 수 있다.

"Ar'"은 수소, 할로젠, 하이드록시, 아미노, 니트로, 트리플루오로메틸, 트리플루오로메톡시, 알킬, 알케닐, 알키닐, 1,2-디옥시에틸렌, 1,2-디옥시에틸렌, 알콕시, 알케녹시, 알키녹시, 알킬아미노, 알케닐아미노 또는 알키닐아미노, 알킬카보닐옥시, 지방족 또는 방향족 아실, 알킬카보닐아미노, 알콕시카보닐아미노, 알킬설폰닐아미노, N-알킬 또는 N,N-디알킬 우레아로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 1 내지 3개의 치환체를 갖는, 위에서 정의한 바와 같은 카보사이클릭 또는 헤테로사이클릭 아릴 그룹이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알콕시"는 용어 "알킬"이 위에서 정의한 바와 같은 알킬 에테르 라디칼을 언급하는 것이다. 적합한 알킬 에테르 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소-프로폭시, n-부톡시, 이소-부톡시, 2급-부톡시, 3급-부톡시 등을 포함한다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알케녹시"는 라디칼이 에놀 에테르가 아닌 것을 조건으로 용어 "알케닐"이 위에서 정의한 바와 같은 알케닐-O-의 라디칼을 언급하는 것이다. 적합한 알케녹시 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만 알릴옥시, E- 및 Z-3-메틸-2-프로페녹시 등을 포함한다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알키닐옥시"는 라디칼이 이놀 에테르가 아닌 것을 조건으로 용어 "알키닐"이 위에서 정의한 바와 같은 알키닐-O-의 라디칼을 언급하는 것이다. 적합한 알키닐옥시 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만 프로파길옥시, 2-부틸닐옥시 등을 포함한다.

용어 "티오알콕시"는 알킬이 위에서 정의한 바와 같은 알킬-S-의 티오에테르 라디칼을 언급하는 것이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알킬아미노"는 용어 "알킬"이 위에서 정의한 바와 같은 모노- 또는 디-알킬-치환된 아미노 라디칼(즉, 알킬-NH- 또는 (알킬)<sub>2</sub>-N-의 라디칼)을 언급하는 것이다. 적합한 알킬아미노 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만 메틸아미노, 에틸아미노, 프로필아미노, 이소프로필아미노, t-부틸아미노, N,N-디에틸아미노 등을 포함한다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알케닐아미노"는 라디칼이 엔아민이 아닌 것을 조건으로 용어 "알케닐"이 위에서 정의한 바와 같은 알케닐-NH- 또는 (알케닐)<sub>2</sub>N-의 라디칼을 언급하는 것이다. 이러한 알케닐아미노 라디칼의 예는 알릴아미노 라디칼이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알킬닐아미노"는 라디칼이 인아민이 아닌 것을 조건으로 용어 "알킬닐"이 위에서 정의한 바와 같은 알킬닐-NH- 또는 (알킬닐)<sub>2</sub>N-의 라디칼을 언급하는 것이다. 이러한 알킬닐아미노 라디칼의 예는 프로파질 아미노 라디칼이다.

용어 "아미드"는 -N(R<sup>1</sup>)-C(=O)- 또는 -C(=O)-N(R<sup>1</sup>)-(여기서, R<sup>1</sup>은 수소뿐만 아니라 기타의 그룹을 포함하는 것으로 본원에서 정의된다)을 언급하는 것이다. 용어 "치환된 아미드"는 R<sup>1</sup>이 수소가 아닌 상태를 언급하는 반면, 용어 "치환되지 않은 아미드"는 R<sup>1</sup>이 수소인 상태를 언급하는 것이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "아릴옥시"는 아릴이 위에서 정의한 바와 같은 아릴-O-의 라디칼을 언급하는 것이다. 아릴 옥시 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만 페녹시, 나프톡시, 피리딜옥시 등을 포함한다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "아릴아미노"는 아릴이 위에서 정의한 바와 같은 아릴-NH-의 라디칼을 언급하는 것이다. 아릴아미노 라디칼의 예는 이에 한정되진 않지만 페닐아미노 (아닐리도), 나프틸아미노, 2-, 3- 및 4-피리딜아미노 등을 포함한다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "아릴-융합된 사이클로알킬"은 용어 "사이클로알킬" 및 "아릴"이 위에서 정의한 바와 같은, 2개의 인접한 원소를 아릴 라디칼과 공유하는 사이클로알킬 라디칼을 언급하는 것이다. 아릴-융합된 사이클로알킬 라디칼의 예는 벤조-융합된 사이클로부틸 라디칼이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알킬카보닐아미노"는 용어 "알킬"이 위에서 정의한 바와 같은, 알킬-CONH-의 라디칼을 언급하는 것이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알콕시카보닐아미노"는 용어 "알킬"이 위에서 정의한 바와 같은, 알킬-CONH-의 라디칼을 언급하는 것이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "알킬설폰아미노"는 용어 "알킬"이 위에서 정의한 바와 같은, 알킬-SO<sub>2</sub>NH-의 라디칼을 언급하는 것이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "아릴설폰아미노"는 용어 "아릴"이 위에서 정의한 바와 같은, 아릴-SO<sub>2</sub>NH-의 라디칼을 언급하는 것이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "N-알킬우레아"는 용어 "알킬"이 위에서 정의한 바와 같은, 알킬-NH-CO-NH-의 라디칼을 언급하는 것이다.

단독으로 또는 조합되어 용어 "N-아릴우레아"는 용어 "아릴"이 위에서 정의한 바와 같은, 알킬-NH-CO-NH-의 라디칼을 언급하는 것이다.

용어 "할로젠"은 불소, 염소, 브롬 및 요오드를 의미한다.

용어 "탄화수소 라디칼"은 독립적으로 안정한 분자가 되기 위해서 단지 단일 수소원자가 필요한 탄소원자와 수소원자의 배열을 언급하는 것이다. 따라서, 탄화수소 라디칼은 탄소원자상에서 하나의 개방된 원자가 부위를 갖고 이를 통해 탄화수소 라디칼은 기타의 원자(들)에 결합될 수 있다. 탄화수소 라디칼의 예는 알킬, 알케닐, 사이클로알킬 등이다.

용어 "탄화수소 이라디칼"은 독립적으로 안정한 분자가 되기 위해서 2개의 수소원자가 필요한 탄소원자와 수소원자의 배열을 언급하는 것이다. 따라서, 탄화수소 이라디칼은 1 또는 2개의 탄소원자상에서 2개의 개방된 원자가 부위를 갖고 이를 통해 탄화수소 이라디칼은 기타의 원자(들)에 결합될 수 있다. 탄화수소 디라디칼의 예는 알킬렌, 알케닐렌, 알킬닐렌, 사이클로알킬렌 등이다.

용어 "하이드로카빌"은 다른 잔기와 결합되는 단일 원자가 부위를 갖는 탄소원자와 수소원자만으로 이루어진 임의의 안정한 배열을 언급하는 것이므로, 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 아릴(아릴 환에 헤테로원자가 혼입되지 않은), 아릴알킬, 알킬아릴 등을 포함한다. 탄화수소 라디칼은 하이드로카빌에 대한 다른 명칭이다.

용어 "하이드로카빌렌"은 다른 잔기와 결합되는 2개의 원자가 부위를 갖는 탄소원자와 수소원자만으로 이루어진 임의의 안정한 배열을 언급하는 것이므로, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 사이클로알킬렌, 사이클로알케닐렌, 아릴렌(아릴렌 환에 헤테로원자가 혼입되지 않은), 아릴알킬렌, 알킬아릴렌 등을 포함한다. 탄화수소 이라디칼은 하이드로카빌렌의 또다른 명칭이다.

용어 "하이드로카빌-O-하이드로카빌렌"은 산소원자에 결합된 하이드로카빌 그룹을 언급하는 것으로서, 이때 산소원자는 하이드로카빌렌 그룹이 기타의 잔기에 결합하는 2개의 원자가 부위중의 하나에서 하이드로카빌렌 그룹에 유사하게 결합한다. 용어 "하이드로카빌-S-하이드로카빌렌", "하이드로카빌-NH-하이드로카빌렌" 및 "하이드로카빌-아미드-하이드로카빌렌"은 동일한 의미를 나타내며, 이때 산소는 각각 황, -NH- 또는 아미드 그룹으로 대체된다.

용어 N-(하이드로카빌)하이드로카빌렌은 2개의 원자가 부위중의 하나가 질소원자에 결합하고, 질소원자가 동시에 수소 및 하이드로카빌 그룹에 결합하는 하이드로카빌렌 그룹을 언급하는 것이다. 용어 N,N-디(하이드로카빌)하이드로카빌렌은 2개의 원자가 부위중의 하나가 질소원자에 결합하고, 질소원자가 동시에 2개의 수소 및 2개의 하이드로카빌 그룹에 결합하는 하이드로카빌렌 그룹을 언급하는 것이다.

용어 "하이드로카빌아실-하이드로카빌렌"은 아실(-C(=O)-)그룹을 통해 하이드로카빌렌 그룹의 2개의 원자가 부위중의 하나에 결합되는 하이드로카빌 그룹을 언급하는 것이다.

용어 "헤테로사이클릴하이드로카빌" 및 "헤테로실릴"은 탄소원자와, 산소, 질소, 인 및 황으로부터 선택되는 (헤테로 원자로서 언급되는) 4개 이하의 원자를 포함하는 원자들의 안정한 사이클릭 배열을 언급하는 것이다. 사이클릭 배열은 3 내지 7원 모노사이클릭 환 또는 8 내지 11원 비사이클릭 환의 형태일 수 있다. 환은 포화되거나 불포화될 수 있고(방향족 환을 포함하여), 임의로 벤조융합될 수 있다. 환에 있어서 질소 및 황 원자는 질소의 4급화된 형태를 포함하여 임의의 산화 형태로 존재할 수 있다. 헤테로사이클릴하이드로카빌은 안정한 구조를 형성시키는 임의의 엔도사이클릭 탄소 또는 헤테로 원자에 부착될 수 있다. 바람직한 헤테로사이클릴하이드로카빌은 1 또는 2개의 질소 헤테로원자를 함유하는 5 내지 7원 모노사이클릭 헤테로사이클을 포함한다.

치환된 헤테로사이클릴하이드로카빌은 위에서 정의한 바와 같은 헤테로사이클릴하이드로카빌을 언급하며, 이때 이의 하나 이상의 환원자는 환을 연장시키는 지시된 치환체에 결합된다.

하이드로카빌 및 하이드로카빌렌 그룹을 언급함에 있어서, 용어 "하나 이상의 수소가 동일한 수의 불소로 대체된 임의의 전술한 유도체"는 탄소, 수소 및 불소원자를 함유하지만 기타의 원자는 함유하지 않는 분자를 언급하는 것이다.

용어 "활성화된 에스테르"는 아민과 같은 친핵체 및 알콜 친핵체나 티올 친핵체에 의해 용이하게 대체될 수 있는 "이탈 그룹"을 함유하는 에스테르이다. 이러한 이탈 그룹은 익히 공지되어 있고, 이에 제한되지는 않지만, N-하이드록시석신이미드, N-하이드록시벤조트리아졸, 할로겐(할로겐화물), 테트라플루오로페놀레이트와 티오알콕시를 포함하는 알콕시 등을 포함한다. 용어 "보호된 에스테르"는 차폐되거나 달리 반응성이 없는 에스테르 그룹을 언급하는 것이다(참조: Greene, "Protecting Groups In Organic Synthesis").

상술한 정의와 관련하여, 본원을 통해 사용되는 기타의 화학 용어는 당해 기술 분야의 숙련가들에겐 쉽게 이해될 수 있는 것이다. 용어들은 단독으로 사용되거나 임의로 조합되어 사용될 수 있다. 바람직한 및 더욱 바람직한 라디칼의 쇠 길이를 이러한 모든 조합에 적용한다.

#### A. 태그된 핵산 단편의 형성

위에서 지적한 바와 같이, 본 발명의 하나의 양태는 각각의 레인에서 16개 이상의 태그를 사용할 수 있는 DNA의 서열분석을 위해 일반적인 방식을 제공하고; 연속적인 검출에 의해 태그를 검출할 수 있고 통상적인 형광계 서열분석에서와 같이 크기의 분리에 따라 서열을 판독하는 것을 제공한다. 이러한 방식은 태그된 분자의 크기의 분리에 근거하는 임의의 DNA 서열분석 기술에 적용할 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 적합한 태그 및 링커 뿐만 아니라 핵산을 서열분석하는 방법은 이후 더욱 상세하게 논의된다.

1. 태그

본원에 사용된 바와 같은 "태그"은 일반적으로 "관심대상의 분자"를 독특하게 확인하기 위해 사용되는 화학적 잔기를 언급하는 것이며, 더욱 구체적으로는 태그 가변 성분 뿐만 아니라 태그 반응물, 태그 성분 및 태그 잔기중의 어느 하나에서 가장 밀접하게 결합될 수 있는 것을 언급한다.

본 발명에 유용한 태그는 다음과 같은 몇몇 기능을 보유한다:

1) 기타의 모든 태그로부터 구별될 수 있는 것이다. 기타의 화학적 잔기로부터의 이러한 차별성은 태그의 크로마토그래피 거동(특히 절단 반응 후), 분광 분석적 특성 또는 전위차적 특성 또는 이들의 조합에 근거할 수 있다. 태그가 유용하게 구별되는 분광 분석 방법은 질량 분광분석(MS), 적외선(IR), 자외선(UV), 및 형광(여기서, MS, IR 및 UV가 바람직하고, MS가 가장 바람직하다) 분석 방법을 포함한다. 전위차 방법으로는 전위차 전류계가 가장 바람직하다.

2) 태그는  $10^{-22}$  내지  $10^{-6}$ 몰로 존재하는 경우 검출할 수 있다

3) 태그는 태그가 독특하게 확인되도록 MOI에 부착될 수 있는 화학적 핸들을 보유한다. MOI에 직접 부착될 수 있거나, "링커" 그룹을 통해 간접적으로 부착될 수 있다.

4) 태그는 부착 및 MOI로부터의 절단을 포함하는 적용되는 모든 조작 및 태그가 부착되는 임의의 MOI의 조작에 대해 화학적으로 안정하다.

5) 태그는 MOI에서 이루어지는 조작을 현저히 간섭하지 않으면서 이에 부착된다. 예를 들어, 태그가 올리고뉴클레오타이드에 부착되는 경우, 태그는 올리고뉴클레오타이드에서 이루어지는 임의의 하이브리드화 또는 효소 반응(예를 들어, PDR 서열분석 반응)을 현저히 간섭하지 않아야 한다. 유사하게, 태그가 항체에 부착되는 경우, 항체에 의한 항원 인식을 현저히 간섭하지 않아야 한다.

특정한 분광 분석 또는 전위차 방법에 의해 검출하고자 하는 태그 잔기는 그러한 방법에 의한 검출 민감성 및 특이성을 향상시키는 특성을 보유해야 한다. 전형적으로, 태그 잔기는 전형적으로 태그 잔기의 주요 부분을 구성하는 태그 가변 성분으로 설계되었기 때문에 이러한 특성을 보유할 것이다. 이후의 논의에 있어서, 단어 "태그"의 사용은 전형적으로 태그 잔기(즉, 태그 가변 성분을 함유하는 절단 생성물)를 언급하는 것이지만, 또한 전형적으로 독특하게 검출할 수 있는 특성을 제공하는 태그 잔기의 부분이기 때문에 태그 가변 성분 자체를 언급하는 것으로 여겨질 수도 있다. 화학식 T-L-X의 화합물에 있어서, "T" 부분은 태그 가변 성분을 함유할 수 있다. 태그 가변 성분이 예를 들어, 질량 분광 분석법에 의해 특성화 되도록 설계된 경우, T-L-X의 "T" 부분은  $T^{ms}$ 로서 언급될 수 있다. 유사하게, T를 함유하는 T-L-X로부터의 절단 생성물은  $T^{ms}$ -함유 잔기로서 언급될 수 있다. 다음의 분광 분석방법 및 전위차 방법은  $T^{ms}$ -함유 잔기를 특성화하기 위해 사용될 수 있다.

a. MS 태그의 특징

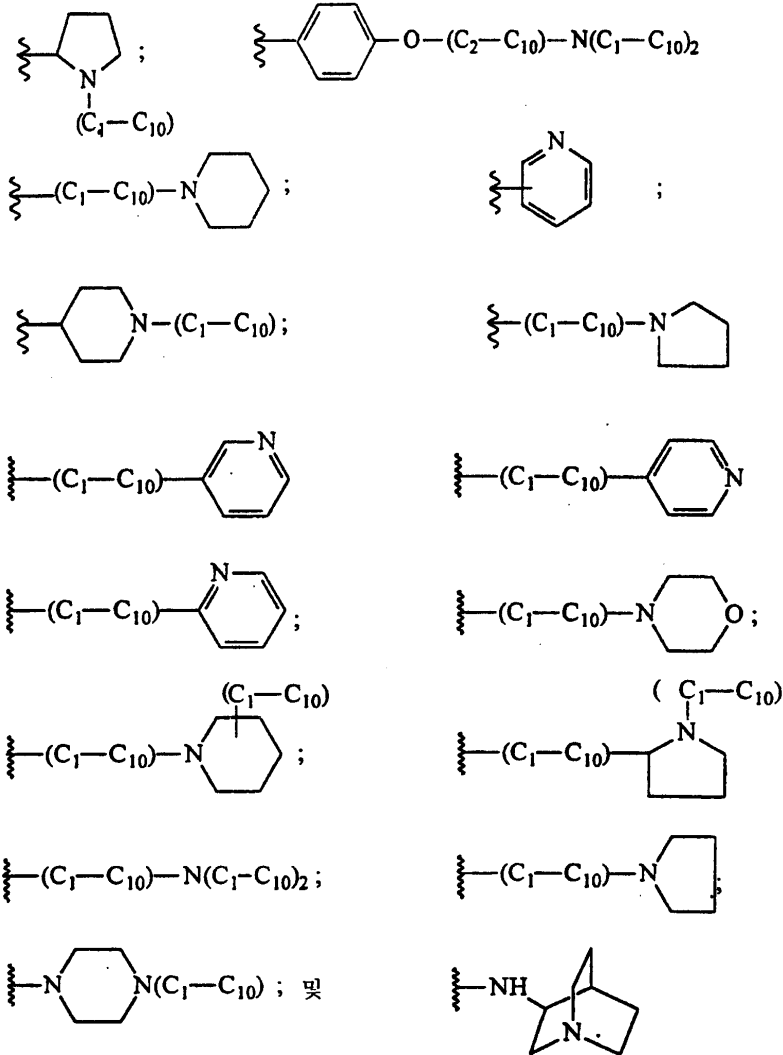
태그를 질량 분광 분석에 의해 분석할 수 있는 경우(즉, MS-판독 가능한 태그이고, 또한 여기서 MS 태그 또는  $T^{ms}$ -함유 잔기로서 언급되는 경우), 태그의 필수적인 특징은 이를 이온화시킬 수 있다는 것이다. 따라서, MS에 있어서 이온화 조건하에 포지티브 또는 네가티브 전하를 보유할 수 있는 화학적 작용기를 혼입시키는 것은 MS 판독 가능한 태그의 설계에 바람직한 요소이다. 이러한 특징은 개선된 효율의 이온 형성 및 특히 전기 분무 이온화에 있어서 전체적으로 더욱 큰 검출의 민감성을 제공한다. 이온화된 전하를 지지하는 화학적 작용기는  $T^{ms}$  또는 L 또는 둘 다로부터 유도할 수 있다. 질량 분광 분석에 의해 검출되는 분석물질의 상대적인 민감성을 증가시킬 수 있는 요인은 문헌[참조: Sunner, J., et al., Anal. Chem. 60:1300-1307(1988)]에 논의되어 있다.

네가티브 전하를 보유하는 것을 용이하게 하기 위한 바람직한 작용기는 페놀계 하이드록실, 카복실산, 포스포네이트, 포스페이트, 테트라졸, 설폰일 우레아, 퍼플루오로 알콜 및 황산과 같은 유기산이다.

이온화 조건하에 포지티브 전하를 보유하는 것을 용이하게 하기 위한 바람직한 작용기는 지방족 또는 방향족 아민이다. MS 태그의 향상된 검출성능을 제공하는 아민 작용성 그룹의 예는 4급 아민[즉, 각각 탄소 원자에 대한 4개의 결합을 갖는

아민, 애버솔드(Aebersold)의 미국 특허 제5,240,859호 참조] 및 3급 아민[즉, 피리딘에 존재하는 바와 같은 C=N-C 그룹을 포함하는, 각각 탄소 원자에 대한 3개의 결합을 갖는 아민, 참조: Anal. Biochem. 224:373, 1995; Bures et al., Anal. Biochem. 224:364, 1995)을 포함한다. 방해된 3급 아민이 특히 바람직하다. 3급 및 4급 아민은 알킬 또는 아릴일 수 있다. T<sup>ms</sup>-함유 잔기는 적어도 하나 의 이온화 가능한 종을 보유해야 하지만, 하나 이상의 이온화 가능한 종을 보유할 수 있다. 바람직한 전하 상태는 태그 당 하나의 이온화된 종이다. 따라서, 각각의 T<sup>ms</sup>-함유 잔기(각각의 태그 가변 성분)가 단지 하나의 방해된 아민 또는 유기산 그룹을 함유하는 것이 바람직하다.

T<sup>ms</sup>-함유 잔기의 부분을 형성할 수 있는 적합한 아민 함유 라디칼은 다음을 포함한다:



질량 분광 분석에 의한 태그의 정체확인 은 바람직하게는 이의 분자량 대 전하의 비(m/z)에 근거한다. MS 태그의 바람직한 분자량 범위는 약 100 내지 2,000달톤이고, 바람직하게는 T<sup>ms</sup>-함유 잔기의 질량은 약 250 달톤 이상, 더욱 바람직하게는 약 300 달톤, 및 가장 바람직하게는 약 350 달톤 이상이다. 일반적으로 질량 분광 분석기는 약 200 내지 250 달톤 미만으로 존재하는 이온을 갖는 잔기 중에서 구별하기가 곤란하고(정밀한 기구에 따라), 따라서 바람직한 본 발명의 T<sup>ms</sup>-함유 잔기의 질량은 이 범위를 초과한다.

위에서 설명한 바와 같이, T<sup>ms</sup>-함유 잔기는 태그 가변 성분에 존재하는 원자 이외의 원자를 함유할 수 있고, 실제로 T<sup>ms</sup> 자체에 존재한다. 따라서, T<sup>ms</sup> 자체의 질량은 T<sup>ms</sup>-함유 잔기의 질량이 약 250 달톤 이상인 한, 약 250 달톤 미만일 수 있다. 따라서, T<sup>ms</sup>의 질량은 15(즉, 메틸 라디칼) 내지 10,000 달톤의 범위, 바람직하게는 100 내지 약 5,000 달톤의 범위, 더욱 바람직하게는 약 200 내지 약 1,000달톤의 범위일 수 있다.

태그가 현저한 양으로 하나 이상의 동위원소를 갖는 원자를 혼입하는 경우 질량 분광 분석법에 의해 태그를 구별하는 것은 비교적 곤란하다. 따라서, 질량 분광 분석에 의한 정체 확인( $T^{ms}$  그룹)을 의도하는 바람직한 T 그룹은 탄소, 수소와 불소 중 하나 이상, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택되는 임의의 원소를 함유한다. 기타의 원소가  $T^{ms}$ 에 존재할 수 있는 반면, 이들의 존재는 질량 분광 데이터의 분석을 약간 더 어렵게 할 수 있다. 바람직하게  $T^{ms}$  그룹은 수소 및/또는 불소 이외에 단지 탄소, 질소 및 산소원자를 갖는다.

불소는  $T^{ms}$  그룹에 있는 임의의 바람직한 원소이다. 수소에 비해 불소는 물론 훨씬 더 무겁다. 따라서, 수소원자 보다는 불소원자가 존재함으로써  $T^{ms}$  그룹의 질량이 더욱 커지고, 이에 의해 위에서 설명한 바와 같이 바람직한  $T^{ms}$  그룹이 250 달톤을 초과하는 질량에 도달하고 초과하는 것을 허용한다. 또한, 수소를 불소로 대체함으로써  $T^{ms}$ -함유 잔기에 있어서 더욱 큰 휘발성을 제공하고, 분석물질의 더욱 큰 휘발성은 질량 분광 분석법이 검출 방법으로서 사용되는 경우에 향상된다.

분자식  $T^{ms}$ 은  $C_{1-500}N_{0-100}O_{0-100}S_{0-10}P_{0-10}H_{\alpha}F_{\beta}I_{\delta}$ (여기서,  $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\delta$ 의 총합은 만족스럽지 못한 원자수의 C, N, O, S 및 P 원자를 만족시키기 위해 충분하다)의 범위 내에 속한다. 명칭  $C_{1-500}N_{0-100}O_{0-100}S_{0-10}P_{0-10}H_{\alpha}F_{\beta}I_{\delta}$ 는  $T^{ms}$ 가 하나 이상의 탄소원자를 함유하고, 100개의 질소원자, 100개의 산소원자 및 10개의 황원자 및 10개의 인원자를 임의로 함유하는 이외에 1 내지 500개 중 임의의 수의 탄소원자를 함유할 수 있음을 의미한다("N<sub>0</sub>"은  $T^{ms}$ 이 임의의 질소원자를 함유할 필요가 없음을 의미한다). 기호  $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\delta$ 는  $T^{ms}$ 에 있어서 수소, 불소 및 요오드의 수를 나타내며, 이때 이들 수치중의 임의의 둘은 0일 수 있고, 이들 수치의 총합은 C, N, O, S 및 P 원자의 만족스럽지 못한 전체 원자수와 동일하다. 바람직하게  $T^{ms}$ 은  $C_{1-50}N_{0-10}O_{0-10}H_{\alpha}F_{\beta}$ (여기서,  $\alpha$  및  $\beta$ 의 총합은 잔기에 존재하는 각각의 수소 및 불소 원자의 수에 일치한다)의 범위 내에 속하는 분자식을 갖는다.

#### b. IR 태그의 특징

유기 화학 그룹의 IR 검출의 2개의 주요 형태가 있다: 라만 산란 IR(Raman scattering IR) 및 흡착 IR. 라만 산란 IR 스펙트럼 및 흡착 IR 스펙트럼은 상보적인 분광 분석 방법이다. 일반적으로, 라만 여기는 결합의 편극성 변화에 의존하는 반면 IR 흡착은 결합의 쌍극자 모멘트 변화에 의존한다. 약한 IR 흡착 라인은 강한 라만 라인이 되고 그 반대도 또한 같다. 파장 수치는 IR 스펙트럼의 특성 단위이다. 개별적인 적용, 12500 내지 4000 $cm^{-1}$ 에서의 근 IR, 4000 내지 600 $cm^{-1}$ 에서의 중 IR, 600 내지 30 $cm^{-1}$ 에서의 원 IR을 갖는 IR 태그에 대한 3개의 스펙트럼 영역이 있다. 화합물이 MOI, 프로브 또는 프라이어머를 정체확인을 위해 태그로서 기여할 수 있는 경우 본원에 언급한 용도를 위해 중 스펙트럼 영역이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 카보닐 연장(1850 내지 1750 $cm^{-1}$ )이 카복실산, 카복실산 에스테르 및 아마이드, 및 알킬과 아릴 카보네이트, 카바메이트 및 케톤에 대해 측정될 수 있다. N-H 벤딩(1750 내지 160 $cm^{-1}$ )은 아민, 암모늄 이온, 및 아마이드의 정체확인을 위해 사용될 수 있다. 1400 내지 1250 $cm^{-1}$ 에서, R-OH 벤딩뿐만 아니라 아마이드에서의 C-N 연장이 검출된다. 방향족 치환 페턴은 900 내지 690 $cm^{-1}$ 에서 검출된다(C-H 벤딩, ArNH<sub>2</sub>에 대한 N-H 벤딩). 포화된 C-H, 올레핀, 방향족 환, 이중 및 삼중 결합, 에스테르, 아세탈, 케탈, 암모늄염, 옥심과 같은 N-O 화합물, 니트로, N-옥사이드, 및 니트레이트, 아조, 하이드라존, 퀴논, 카복실산, 아마이드, 및 락탐은 모두 진동성 적외선 상관관계 데이터를 보유한다[참조: Pretsch et al., Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds, Springer-Verlag, New York, 1989]. 바람직한 화합물은 2230 내지 2210 $cm^{-1}$ 에서 매우 강한 니트릴 연장 진동을 나타내는 방향족 니트릴을 포함할 수 있다. 기타 유용한 형태의 화합물은 2140 내지 2100 $cm^{-1}$  사이에서 예리한 흡착 밴드를 일으키는 강한 연장 진동을 갖는 방향족 알킨이다. 제3의 화합물 형태는 2160 내지 2120 $cm^{-1}$  영역에서 집중적인 흡착 밴드를 나타내는 방향족 아지드이다. 티오시아네이트는 2275 내지 2263 $cm^{-1}$ 에서 강하게 흡착되는 대표적인 화합물이다.

#### c. UV 태그의 특징

유기 발색단 형태 및 이들의 각각의 UV-가시적 특성에 대한 기재는 문헌[참조: Scott, Interpretation of the UV Spectra of Natural Products, Pergamon Press, New York, 1962]에 제공되어 있다. 발색단은 특별한 광을 흡수하는 원

자, 또는 원자들 또는 전자들의 그룹이다. 경험상의 규칙은 결합 시스템에 있어서  $\pi$  내지  $\pi^*$  최대값을 위해 존재한다[참조: Pretsch et al., Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds, p. B65 및 B70, Springer-Verlag, New York, 1989]. 바람직한 화합물(결합된 시스템을 갖는)은  $n$  내지  $\pi^*$  및  $\pi$  내지  $\pi^*$  전이를 보유한다. 이러한 화합물의 예는 산 마이올릿 7, 아크리딘 오렌지, 아크리딘 옐로우 G, 브릴리언트 블루 G, 콩고 레드, 크리스탈 마이올릿, 말라카이트 그린 옥살레이트, 메틸렌 옐로우, 메틸렌 블루, 메틸 오렌지, 메틸 바이올렛 B, 나프톨 그린 B, 오일 블루 N, 오일 레드 O, 4-페닐아조페놀, 사프라니 O, 솔벤트 그린 3, 및 수단 오렌지 G이고, 이들 모두는 시판중이다(제조원: Aldrich, Milwaukee, WI). 기타의 적합한 화합물을 예를 들어, 문헌[참조: Jane, I., et al., J. Chrom. 323:191-225(1985)]에 나열되어 있다.

#### d. 형광 태그의 특징

형광 프로브는 이들의 흡수성 및 형광 방출 파장 및 강도에 의해 대부분 직접적으로 확인되거나 정량화된다. 방출 스펙트럼(형광 및 인광)은 훨씬 더 민감하고 흡착 스펙트럼 보다 더욱 구체적인 측정을 허용한다. 여기 상태의 수명 및 형광 이방성과 같은 기타의 광물리학적 특성은 덜 광범위하게 사용된다. 가장 일반적으로 유용한 강도 파라미터는 흡착을 위한 몰 흡수 계수( $\epsilon$ ) 및 형광을 위한 양자 수율(QY)이다.  $\epsilon$ 의 값은 단일 파장(통상적으로 프로브의 최대 흡수)에서 구체화되는 반면, QY는 전체적인 형광 스펙트럼 프로필에 걸쳐 전체 광자 방출의 측정치이다. 좁은 광학 밴드의 폭(20nm 미만)은 통상적으로 형광 여기(흡수를 통한)를 위해 사용되는 반면, 형광 검출 밴드폭은 최대 민감도에 대한 전체 스펙트럼으로부터 최대 분해를 위한 좁은 밴드(20nm 이하)에 걸쳐 더욱 다양할 수 있다. 프로브 분자에 대한 형광 강도는  $\epsilon$  및 QY의 생성물에 비례한다. 현재 실질적으로 중요한 형광단 중에서 이러한 파라미터의 범위는  $\epsilon$ 에 대해 약 10,000 내지 100,000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  이고 QY에 대해 0.1 내지 1.0이다. 형광 태그로서 사용될 수 있는 화합물은 다음과 같다: 플루오레세인, 로다민, 람다 블루 470, 람다 그린, 람다 레드 664, 람다 레드 665, 아크리딘 오렌지, 및 프로피듐 요오다이드이며, 이들은 시판중이다(제조사: Lambda Fluorescence Co., Pleasant Gap, PA). 나일 레드, 텍사스 레드, 리싸민(lissamine<sup>TM</sup>) 및 보디피(BODIPY<sup>TM</sup>)와 같은 형광 화합물은 시판중이다[제조원: Molecular Probes(Eugene, OR)].

#### e. 전위차 태그의 특징

전기 화학적 검출(ECD)의 원리는 특정하게 적용되는 전압에서 전자가 제공되거나 수용되어 측정할 수 있는 전류를 형성하는 화합물의 산화 또는 환원에 근거한다. 특정한 화합물이 전위차에 적용되는 경우, 분자는 조작 전극 표면에서 전자의 감소(산화) 또는 전자의 수득(환원)과 함께 분자의 재배열이 수행되고, 이러한 화합물은 전자적이며, 전기화학적 반응을 수행하는 것이 된다. EC 검출기는 HPLC 용출제가 이동하는 전극의 표면에 전압을 가한다. 칼럼으로부터 용출하는 전기 활성 화합물은 전자를 제공하거나(산화) 전자를 수용하여(환원) 동시에 전류 피크를 형성한다. 형성되는 전류량은 산화 또는 환원이 시작되는 특정 전압을 갖는 각각의 화합물과 함께 분석물의 농도 및 적용되는 전압 둘 다에 의존한다. 현재 가장 대중적인 전기화학적 검출기는 전위차가 일정하게 유지되고 전기화학적 반응으로부터 생성되는 전류를 측정하는 전류계 검출기이다. 이러한 형태의 분광 분석법은 현재 "정전위 전류법"으로 일컬어진다. 전류계는 시판중이다(제조사: ESA, Inc., Chelmsford, MA).

검출 효율이 100%인 경우, 특성화된 검출기는 "전기량분석 검출기"로 명명된다. 배열에 유용한 이러한 유형의 검출기의 선별성 및 민감성과 관련하여 다수의 실질적인 이점을 갖는 전기량분석 검출기가 민감하다. 전기량분석 검출기에 있어서, 제공되는 분석물질의 농도에 대해 시그널 전류는 조작 전극에 적용되는 전위차(전압)의 함수로서 플롯팅된다. 수득되는 S자형 그래프는 전류-전압 곡선 또는 수력학적 볼타마그램(HDV)으로 명명된다. HDV는 관측되는 시그널을 최대화하는 것을 허용하는 조작 전극에 적용되는 전위차의 최선의 선택을 허용한다. ECD의 중요한 이점은 서브펩토 몰 범위에서 전류 수준의 검출을 갖는 고유 민감도이다.

다수의 화학물질 및 화합물은 다수의 생화학물질, 약제 및 제조제를 포함하여 전기화학적으로 활성이다. 크로마토그래프에 의해 공용출되는 화합물은 심지어 이들의 반파장 전위차(절반의 시그널 최대치에서의 전위차)가 단지 30 내지 60mV 상이한 경우에도 유효하게 분해될 수 있다.

최근에 개발된 전기량분석 센서는 액체 크로마토그래피계 분리에서 검출기로서 사용되는 경우 공용출 화합물의 선택성, 정체확인 및 분해를 제공한다. 따라서, 이렇게 배열된 검출기들은 검출기 자체에 수반되는 또다른 세트의 분리를 추가한다. 현재의 기구는 원칙적으로 단지 데이터를 수득할 수 있는 속도에 의해서만 제한되는 16개의 채널을 보유한다. EC 배열 상에서 분해될 수 있는 화합물의 수는 크로마토그래피에 의해 한정된다(즉, 한정된 플레이트 카운트). 그러나, 크로마토그



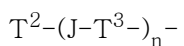
래피에 의해 공용출하는 2개 이상의 화합물이 반과장 전위차 30 내지 60mV에서 전위차를 갖는 경우, 당해 배열은 화합물을 구별할 수 있게 한다. 전기화학적으로 활성적일 수 있는 화합물의 성능은 EC 활성 그룹(즉, -OH, -O, -N, -S)의 보유에 의존한다.

전기량분석 검출기를 사용하여 성공적으로 검출되는 화합물은 5-하이드록시트립타민, 3-메톡시-4-하이드록시페닐-글리콜, 호모젠티스산, 도파민, 메타네프린, 3-하이드록시키누레닌, 아세토미노펜, 3-하이드록시트립토폴, 5-하이드록시인돌아세트산, 옥탄설펜산, 페놀, o-크레졸, 피로갈롤, 2-니트로페놀, 4-니트로페놀, 2,4-디니트로페놀, 4,6-디니트로클레졸, 3-메틸-2-니트로페놀, 2,4-디클로로페놀, 2,6-디클로로페놀, 2,4,5-트리클로로페놀, 4-클로로-3-메틸페놀, 5-메틸페놀, 4-메틸-2-니트로페놀, 2-하이드록시아닐린, 4-하이드록시아닐린, 1,2-페닐렌디아민, 벤조카테킨, 부투론, 클로르톨루론, 디오론, 이소프로투론, 리누론, 메토브로무론, 메톡스우론, 모놀리누론, 모누론, 메티오닌, 트립토판, 티로신, 4-아미노벤조산, 4-하이드록시벤조산, 4-하이드록시쿠마르산, 7-메톡시쿠마린, 아피게닌 바이칼레인, 카페산, 카테킨, 세타우레인, 클로로겐산, 다이드제인, 다티세틴, 디오스메틴, 에피카테킨 갈레이트, 에피갈로 카테킨, 에피갈로 카테킨 갈레이트, 유게놀, 유파토티, 페룰산, 피제틴, 갈랑인, 갈산, 가르데닌, 게니스테인, 겐티스산, 헤스페리딘, 이리게닌, 캠페롤, 류코아니딘, 루테올린, 만고스틴, 모린, 미리세틴, 나링인, 나리루틴, 펠라르곤딘, 페오니딘, 플로레틴, 프라텐세인, 프로토카테츄산, 램네티, 쿠에르세틴, 사쿠라네티, 스쿠텔라레인, 스코폴레틴, 시링알데히드, 시링산, 탄제리틴, 트록세루틴, 움벨리페론, 바닐산, 1,3-디메틸 테트라하이드로이소퀴놀린, 6-하이드록시도파민, r-살솔리놀, N-메틸-r-살솔리놀, 테트라하이드로이소퀴놀린, 아미트립틸린, 아포모르핀, 캅사이신, 클로르디아제폭사이드, 클로르파로마진, 다우노루비신, 데지프라민, 독세핀, 플루옥세틴, 플루라제팜, 이미프라민, 이소프로테레놀, 메톡사민, 모르핀, 모르핀-3-글루쿠로나이드, 노르트립틸린, 옥사베팜, 페닐레프린, 트리미프라민, 아스코르브산, N-아세틸 세로토닌, 3,4-디하이드록시벤질아민, 3,4-디하이드록시만델산(DOMA), 3,4-디하이드록시페닐아세트산(DOPAC), 3,4-디하이드록시페닐알라닌(L-DOPA), 3,4-디하이드록시페닐글리콜(DHPG), 3-하이드록시안트라닐산, 2-하이드록시페닐아세트산(2HPAC), 4-하이드록시벤조산(4HBAC), 5-하이드록시인돌-3-아세트산(5HIAA), 3-하이드록시키누레닌, 3-하이드록시만델산, 3-하이드록시-4-메톡시페닐에틸아민, 4-하이드록시페닐아세트산(4HPAC), 4-하이드록시페닐락트산(4HPLA), 5-하이드록시트립토판(5HTP), 5-하이드록시트립토폴(5HTOL), 5-하이드록시트립타민(5HT), 5-하이드록시트립타민 설페이트, 3-메톡시-4-하이드록시페닐글리콜(MHPG), 5-메톡시트립타민, 5-메톡시트립토폴, 5-메톡시트립토폴, 3-메톡시티라민(3MT), 3-케녹시티로신(3-OM-DOPA), 5-메틸시스테인, 3-메틸구아닌, 부포테닌, 도파민, 도파민-3-글루쿠로나이드, 도파민-3-설페이트, 도파민-4-설페이트, 에피네프린, 에피닌, 폴산, 글루타타온(환원된), 구아닌, 구아노신, 호모젠티스산(HGA), 호모바닐산(HVA), 호모바닐릴 알콜(HVOL), 호모베라트산, 호바 설페이트, 하이포크산틴, 인돌, 인돌-3-아세트산, 인돌-3-락트산, 키누레닌, 펠라토닌, 메타네프린, N-메틸트립타민, N-메틸티라민, N,N-디메틸트립타민, N,N-디메틸티라민, 노르에피네프린, 노르메타네프린, 옥도파민, 피리독살, 피리독살 포스페이트, 피리독사민, 시네프린, 트립토폴, 트립타민, 티라민, 유르산, 바닐릴만델산(vma), 크산틴 및 크산토신을 포함한다. 기타의 적합한 화합물은 예를 들어, 문헌[참조: Jane, I., et al. J. Chrom. 323:191-225(1985) and Musch, G., et al., J. Chrom. 348:97-110(1985)]에 나타나 있다. 이러한 화합물들은 당해 기술분야에 공지된 방법에 의해 화학식 T-L-X의 화합물에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 카복실산 그룹을 갖는 화합물은 아민, 하이드록실 등과 반응하여 T와 L 사이에 amid, 에스테르 및 기타의 결합을 형성할 수 있다.

위의 특성 이외에 및 의도하는 검출방법과 상관없이, 모듈의 화학적 구조를 갖는 태그가 바람직하다. 이는 배합 화학의 기술을 사용하는, 구조적으로 관련된 다수의 태그의 작제에 도움이 된다. 예를 들어, T<sup>ms</sup> 그룹은 바람직하게 몇몇 특성을 갖는다. 바람직하게는, T<sup>ms</sup>을 함유하는 잔기가 질량 분광 분석되는 경우(더욱 간단하게는 "질량 스펙트럼 민감성 증진제" 그룹 또는 MSSE로 언급되는), 단일 이온화된 전하 상태를 지지하는 작용성 그룹을 함유한다. 또한, 바람직하게는 페밀리 중의 각각의 구성원들의 질량/전하 비가 상이하지만 질량 분광 분석기에 있어서 대략 동일한 민감성을 갖는 경우, T<sup>ms</sup>을 함유하는 잔기 페밀리중의 하나의 구성원으로서 사용할 수 있다. 따라서, 페밀리의 구성원들은 동일한 MSSE를 갖는다. 화합물의 페밀리들의 형성을 허용하기 위해, 모듈의 합성 도식을 통해 태그 반응물을 형성하여 태그 성분 자체가 모듈을 포함하는 것으로서 나타날 수 있게 하는 것이 편리함을 발견하였다.

T<sup>ms</sup> 그룹의 구조에 대한 바람직한 모듈의 접근 방법에 있어서, T<sup>ms</sup> 그룹은 다음 화학식 6과 같다:

[화학식 6]



상기식에서,

$T^2$ 는 질량 범위가 15 내지 500 달톤인, 탄소 및 하나 이상의 수소, 불소, 요오드, 산소, 질소, 황 및 인으로부터 형성되는 유기 잔기이고,

$T^3$ 은 질량 범위가 50 내지 1000 달톤인, 탄소 및 하나 이상의 수소, 불소, 요오드, 산소, 질소, 황 및 인으로부터 형성되는 유기 잔기이고,

J는 직접 결합 또는 아마이드, 에스테르, 아민, 설파이드, 에테르, 티오에스테르, 디설파이드, 티오에테르, 우레아, 티오우레아, 카바메이트, 티오카바메이트, 쉬프 염기, 환원된 쉬프 염기, 이민, 옥심, 하이드라존, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포르아미드, 포스폰아미드, 설포네이트, 설포아미드 또는 탄소-탄소 결합과 같은 작용성 그룹이고,

n은 1 내지 50 범위의 정수로서 n이 1 보다 큰 경우 각각의  $T^3$  및 J가 독립적으로 선택된다.

모듈의 구조  $T^2-(J-T^3)_n$ -는 T-L-X의 패밀리에 대한 편리한 도입을 제공하며, 이때 각각의 그룹의 구성원은 상이한 T 그룹을 갖는다. 예를 들어, T가  $T^{ms}$ 인 경우, 그리고 각각의 패밀리 구성원이 바람직하게 동일한 MSSE를 갖는 경우,  $T^3$  그룹 중의 하나는 MSSE 구조를 제공할 수 있다.  $T^{ms}$ 의 질량과 관련하여 패밀리의 구성원들 사이에 다양성을 제공하기 위해,  $T^2$  그룹은 패밀리 구성원 중에서 다양할 수 있다. 예를 들어, 하나의 패밀리 구성원이  $T^2$ 가 메틸일 수 있는 반면, 또 다른 구성원은  $T^2$ 가 에틸이고 또 다른 구성원은  $T^2$ 가 프로필 동일 수 있다.

질량에 있어서 "대형" 또는 큰 도약을 제공하기 위해,  $T^3$  그룹은 T-L-X에 현저한(예를 들어, 백 또는 수백의) 질량 단위를 부가하도록 고안될 수 있다. 이러한  $T^3$  그룹은 분자량 범위 조절제 그룹("WRA")으로 언급될 수 있다. WRA는 단일 세트의  $T^2$  그룹을 사용하여 작업하는 경우 매우 유용하며, 한정된 범위에 걸쳐 질량이 연장될 수 있다. 단일 세트의  $T^2$  그룹은 단순히 하나 이상의 WRA  $T^3$  그룹을  $T^{ms}$ 에 혼입함으로써 넓은 질량 범위를 갖는  $T^{ms}$  그룹을 형성하는데 사용될 수 있다. 따라서, 간단한 예를 사용하여, 한 세트의  $T^2$  그룹의  $T^{ms}$ 에 대한 질량 범위가 250 내지 340 달톤인 경우,  $T^3$  그룹으로서 예를 들어, 100 달톤을 갖는 단일 WRA를 가함으로써 동일한 세트의  $T^2$  그룹을 사용하는 동안 350 내지 440 달톤의 질량 범위에 접근하는 것을 제공한다. 유사하게, 100 달톤의 2개의 MWA 그룹을 (각각  $T^3$  그룹으로서) 가함으로써 450 내지 540 달톤의 질량 범위에 접근하는 것을 제공하며, 이때 이러한 WRA 그룹을 점진적으로 가함으로써 계속해서  $T^{ms}$  그룹에 대한 매우 큰 질량 범위에 접근하는 것을 제공할 수 있다. 화학식  $T^2-(J-T^3)_n$ -L-X의 바람직한 화합물은 화학식  $R_{VWC}-(R_{WRA})_w-R_{MSSE}$ -L-X(여기서, VWC는 " $T^2$ " 그룹이고, 각각의 WRA 및 MSSE 그룹은 " $T^3$ " 그룹이다)를 갖는다. 이러한 구조는 도 12에 나타나 있고  $T^{ms}$ 의 제조에 대한 하나의 모듈 접근방식을 나타낸다.

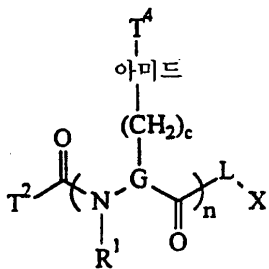
화학식  $T^2-(J-T^3)_n$ -에 있어서,  $T^2$  및  $T^3$ 은 바람직하게는 하이드로카빌, 하이드로카빌-O-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-S-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-NH-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-아미드-하이드로카빌렌, N-(하이드로카빌)하이드로카빌렌, N,N-디(하이드로카빌)하이드로카빌렌, 하이드로카빌아실-하이드로카빌렌, 헤테로사이클릴하이드로카빌[여기서, 헤테로원자(들)는 산소, 질소, 황 및 인으로부터 선택된다], 치환된 헤테로사이클릴하이드로카빌[여기서, 헤테로원자(들)는 산소, 질소, 황 및 인으로부터 선택되고 치환체는 하이드로카빌, 하이드로카빌-O-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-NH-하이드로카빌렌, 하이드로카빌-S-하이드로카빌렌, N-(하이드로카빌)하이드로카빌렌, N,N-디(하이드로카빌)하이드로카빌렌 및 하이드로카빌아실-하이드로카빌렌으로부터 선택된다]로부터 선택된다. 또한,  $T^2$  및/또는  $T^3$ 은 하나 이상의 수소가 불소화물로 대체되도록 위에서 나열한 잠재적인  $T^2/T^3$  그룹중의 임의의 유도체일 수 있다.

또한, 화학식  $T^2-(J-T^3)_n$ -와 관련하여, 바람직한  $T^3$ 는 화학식  $-G(R^2)$ - (여기서, G는 단일  $R^2$  치환체를 갖는  $C_{1-6}$  알킬렌 쇠이다)를 갖는다. 따라서, G가 에틸렌( $-CH_2-CH_2-$ )인 경우, 2개의 에틸렌 탄소중의 어느 하나는  $R^2$  치환체를 가질 수 있고,  $R^2$ 는 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 아릴-융합된 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 아릴, 아르알킬, 아릴-치환된 알케닐 또는 알키닐, 사이클로알킬-치환된 알킬, 사이클로알케닐-치환된 사이클로알킬, 비아릴, 알콕시, 알케녹시, 알키녹시, 아르알콕시, 아릴-치환된 알케녹시 또는 알키녹시, 알킬아미노, 알케닐아미노 또는 알키닐아미노, 아릴-치환된

알킬아미노, 아릴-치환된 알케닐아미노 또는 알키닐아미노, 아릴옥시, 아릴아미노, N-알킬우레아-치환된 알킬, N-아릴우레아-치환된 알킬, 알킬카보닐아미노-치환된 알킬, 아미노카보닐-치환된 알킬, 헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴-치환된 알킬, 헤테로사이클릴-치환된 아미노, 카복시알킬-치환된 아르알킬, 옥소카보사이클릴-융합된 아릴 및 헤테로사이클릴알킬; 사이클로알케닐, 아릴-치환된 알킬 및, 아르알킬, 하이드록시-치환된 알킬, 알콕시-치환된 알킬, 아르알콕시-치환된 알킬, 알콕시-치환된 알킬, 아르알콕시-치환된 알킬, 아미노-치환된 알킬, (아릴-치환된 알킬옥시카보닐아미노)-치환된 알킬, 티올-치환된 알킬, 일킬설포닐-치환된 알킬, (하이드록시-치환된 알킬티오)-치환된 알킬, 티오알콕시-치환된 알킬, 하이드로카빌아실아미노-치환된 알킬, 헤테로사이클릴아실아미노-치환된 알킬, 하이드로카빌-치환된 헤테로사이클릴아실아미노-치환된 알킬, 알킬설포닐아미노-치환된 알킬, 아릴설포닐아미노-치환된 알킬, 모르폴리노-알킬, 티오모르폴리노-알킬, 모르폴리노 카보닐-치환된 알킬, 티오모르폴리노카보닐-치환된 알킬, [N-(알킬, 알케닐 또는 알키닐)- 또는 N,N-[디알킬, 디알케닐, 디알키닐 또는 (알킬, 알케닐)-아미노]카보닐-치환된 알킬, 헤테로사이클릴아미노카보닐, 헤테로사이클릴알킬렌아미노카보닐, 헤테로사이클릴아미노카보닐-치환된 알킬, 헤테로사이클릴알킬렌아미노카보닐-치환된 알킬, N,N-[디알킬]알킬렌아미노카보닐, N,N-[디알킬]알킬렌아미노카보닐-치환된 알킬, 알킬-치환된 헤테로사이클릴카보닐, 알킬-치환된 헤테로사이클릴카보닐-알킬, 카복실-치환된 알킬, 디알킬아미노-치환된 아실아미노알킬 및 아르기닌, 아스파라긴, 글루타민, S-메틸 시스테인, 메티오닌 및 상응하는 설폭사이드 및 이의 설포 유도체, 글리신, 류신, 이소류신, 알로-이소류신, 3급-류신, 노르류신, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 프롤린, 알라닌, 오르니틴, 히스티딘, 글루타민, 발린, 트레오닌, 세린, 아스파르트산, 베타-시아노알라닌, 및 알로트레오닌; 알리닐 및 헤테로사이클릴카보닐, 아미노카보닐, 아미도, 모노- 또는 디알킬아미노카보닐, 모노- 또는 디아릴아미노카보닐, 알킬아릴아미노카보닐, 디아릴아미노카보닐, 모노- 또는 디아실아미노카보닐, 방향족 또는 지방족 아실, 임의로 아미노, 카복시, 하이드록시, 머캅토, 모노- 또는 디알킬아미노, 모노- 또는 디아릴아미노, 알킬아릴아미노, 디아릴아미노, 모노- 또는 디아실아미노, 알콕시, 알케녹시, 아릴옥시, 티오알콕시, 티오알케녹시, 티오알키녹시, 티오아릴옥시 및 헤테로사이클릴로부터 선택되는 치환체에 의해 치환된 알킬로부터 선택되는 아미노산 측쇄로부터 선택된다.

화학식 T<sup>2</sup>-(J-T<sup>3</sup>-)<sub>n</sub>-L-X의 바람직한 화합물은 다음 화학식 7과 같다:

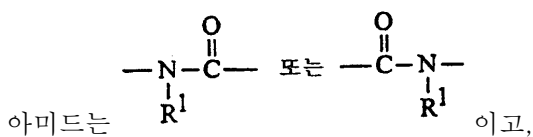
[화학식 7]



상기식에서,

G는 단일 "G"에 의해 나타낸 CH<sub>2</sub> 그룹의 하나 및 단지 하나의 수소가 -(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-아미드-T<sup>4</sup>에 의해 대체되는 (CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>이고,

T<sup>2</sup> 및 T<sup>4</sup>는 α 및 β의 총합이 만족스럽지 못한 원자개의 C, N 및 O 원자를 만족시키기 위해 충분한 화학식 C<sub>1-25</sub>N<sub>0-9</sub>O<sub>0-9</sub>H<sub>α</sub>F<sub>β</sub>의 유기 잔기이고,



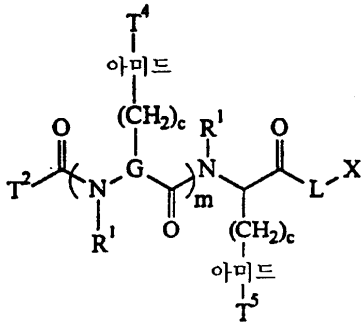
R<sup>1</sup>은 수소 또는 C<sub>1-10</sub> 알킬이고,

c는 0 내지 4의 정수이고,

n은 1 내지 50의 정수로서 n이 1보다 큰 경우, G, c, 아미드, R<sup>1</sup> 및 T<sup>4</sup>는 각각 독립적으로 선택된다.

추가적 바람직한 실시양태에 있어서, 화학식 T<sup>2</sup>-(J-T<sup>3</sup>-)<sub>n</sub>-L-X의 화합물은 다음 화학식 8과 같다:

[화학식 8]



상기식에서,

T<sup>5</sup>는 α 및 β의 총합이 만족스럽지 못한 원자의 C, N 및 O원자를 만족시키기에 충분한 화학식 C<sub>1-25</sub>N<sub>0-9</sub>O<sub>0-9</sub>H<sub>α</sub>F<sub>β</sub>의 유기 잔기이고,

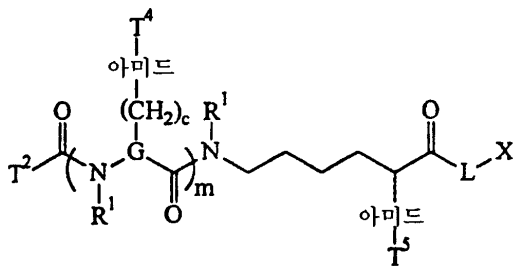
T<sup>5</sup>는 3급 또는 4급 아민 또는 유기산을 포함하고,

m은 0 내지 49의 정수이고,

T<sup>2</sup>, T<sup>4</sup>, R<sup>1</sup>, L 및 X는 위에서 정의한 바와 같다.

화학식 T<sup>2</sup>-(J-T<sup>3</sup>-)<sub>n</sub>-L-X를 갖는 또다른 바람직한 화합물은 다음 화학식 9와 같다:

[화학식 9]



상기식에서,

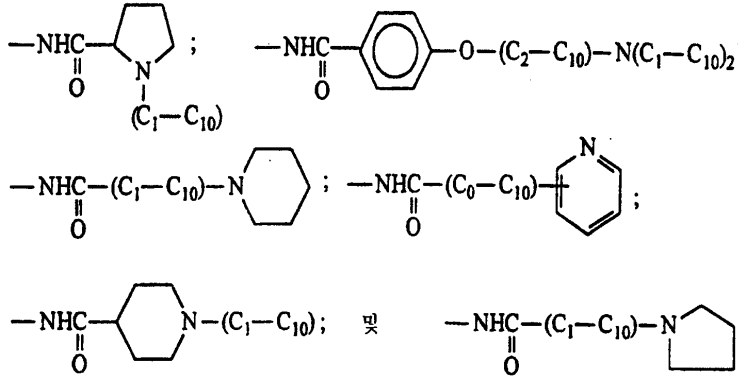
T<sup>5</sup>는 α 및 β의 총합이 만족스럽지 못한 원자의 C, N 및 O원자를 만족시키기에 충분한 화학식 C<sub>1-25</sub>N<sub>0-9</sub>O<sub>0-9</sub>H<sub>α</sub>F<sub>β</sub>의 유기 잔기이고,

T<sup>5</sup>는 3급 또는 4급 아민 또는 유기산을 포함하고,

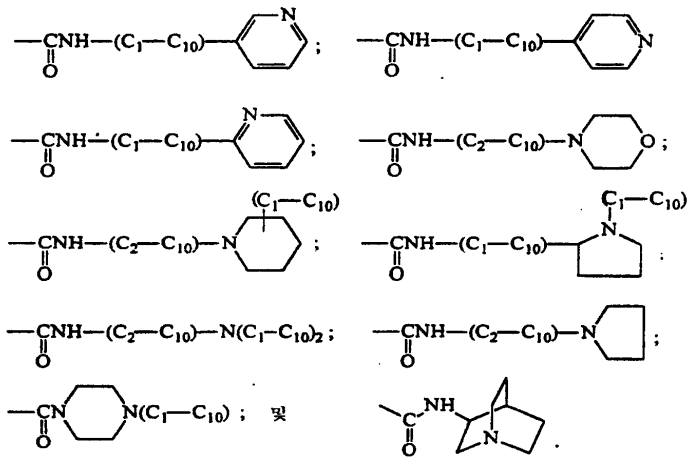
m은 0 내지 49의 정수이고,

T<sup>2</sup>, T<sup>4</sup>, c, R<sup>1</sup>, "아미드", L 및 X는 위에서 정의한 바와 같다.

T<sup>5</sup> 그룹을 갖는 위의 구조에 있어서, -아미드-T<sup>5</sup>는 바람직하게는 유기산을 G로부터 연장되는 유리 아미노 그룹과 반응시킴으로써 편리하게 제조되는 다음중의 하나이다:

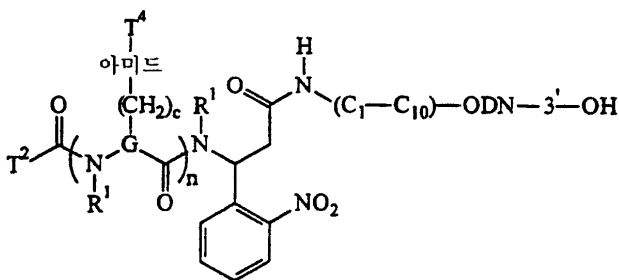


위의 화합물이 T<sup>5</sup> 그룹을 갖는 경우, "G" 그룹은 유리 카복실 그룹(또는 이의 반응성 등가물)을 갖고, 적합한 유기 아민을 "G" 그룹으로부터 연장되는 유리 카복실 그룹과 반응시킴으로써 편리하게 제조되는 다음과 같은 -아미드-T<sup>5</sup> 그룹이 바람직하다:

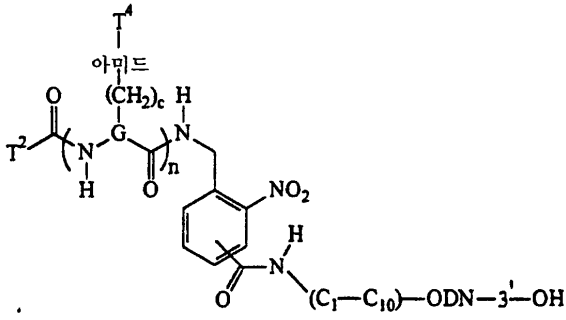


3개의 바람직한 본 발명의 실시양태에 있어서, T-L-MOI의 구조는 다음 화학식 10, 11 또는 12와 같다:

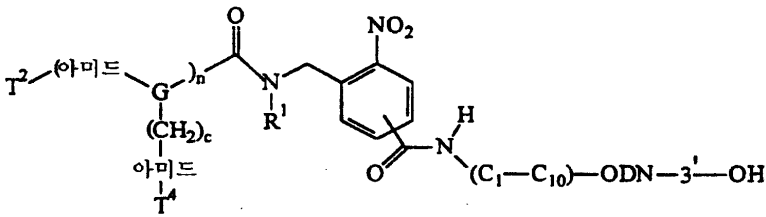
[화학식 10]



[화학식 11]



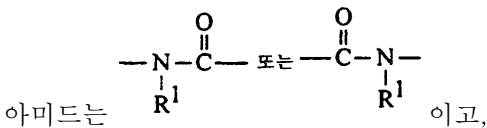
[화학식 12]



상기식에서,

T<sup>2</sup> 및 T<sup>4</sup>는 α, β 및 δ의 총합은 만족스럽지 못한 원자개의 C, N, O, S 및 P 원자를 만족시키기에 충분한 화학식 C<sub>1-25</sub>N<sub>0-9</sub>O<sub>0-9</sub>S<sub>0-3</sub>P<sub>0-3</sub>H<sub>α</sub>F<sub>β</sub>I<sub>δ</sub>의 유기 잔기이고,

G는 각각 G로 나타낸 CH<sub>2</sub> 그룹에 있어서 하나 및 단지 하나의 수소가 -(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-아미드-T<sup>4</sup>에 의해 대체되는 (CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>이고,



R<sup>1</sup>은 수소 또는 C<sub>1-10</sub> 알킬이고,

c는 0 내지 4의 정수이고,

"C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>"은 탄소수 2 내지 10의 하이드로카빌렌 그룹이고,

"ODN-3'-OH"는 말단의 3' 하이드록시 그룹을 갖는 핵산 단편(즉, 핵산 단편의 3' 이외에서 (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)에 결합되는 핵산 단편)을 나타내고,

n은 1 내지 50의 정수로서 n이 1보다 큰 경우, G, c, 아미드, R<sup>1</sup> 및 T<sup>4</sup>는 각각 독립적으로 선택된다. 바람직하게는 단일 탄소 원자에 결합된 3개의 헤테로원자는 존재하지 않는다.

T<sup>2</sup>-C(=O)-N(R<sup>1</sup>)- 그룹을 함유하는 위에서 나타낸 바와 같은 구조에 있어서, 이러한 그룹은 화학식 HM(R<sup>1</sup>)-의 아민을 단지 예시적이고 잠재적인 유기산의 전체적인 목록을 구성하지 않는, 다음으로부터 선택되는 유기산과 반응시킴으로써 형성할 수 있다: 포름산, 아세트산, 프로피올산, 프로피온산, 플루오로아세트산, 2-부티노산, 사이클로프로판카복실산, 부티르산, 메톡시아세트산, 디플루오로아세트산, 4-펜티노산, 사이클로부탄카복실산, 3,3-디메틸아크릴산, 발레르산, N,N-디메틸글리신, N-포르밀-Gly-OH, 에톡시아세트산, (메틸티오)아세트산, 피롤-2-카복실산, 3-푸로산, 이속사졸-5-카

복실산, 트란스-3-헥세노산, 트리플루오로아세트산, 헥사노산, Ac-Gly-OH, 2-하이드록시-2-메틸부티르산, 벤조산, 니코틴산, 2-피라진카복실산, 1-메틸-2-피롤카복실산, 2-사이클로펜텐-1-아세트산, 사이클로펜틸아세트산, (S)-(-)-2-피롤리돈-5-카복실산, N-메틸-L-프롤린, 헵타노산, Ac-b-Ala-OH, 2-에틸-2-하이드록시부티르산, 2-(2-메톡시에톡시)아세트산, p-톨루산, 6-메틸니코틴산, 5-메틸-2-피라진카복실산, 2,5-디메틸피롤-3-카복실산, 4-플루오로벤조산, 3,5-디메틸이속사졸-4-카복실산, 3-사이클로펜틸프로피온산, 옥타노산, N,N-디메틸석신암산, 페닐프로피올산, 신남산, 4-에틸벤조산, p-아니스산, 1,2,5-트리메틸피롤-3-카복실산, 3-플루오로-4-메틸벤조산, Ac-DL-프로파길글리신, 3-(트리플루오로메틸)부티르산, 1-피페리딘프로피온산, N-아세틸프롤린, 3,5-디플루오로벤조산, Ac-L-Val-OH, 인돌-2-카복실산, 2-벤조푸란카복실산, 벤조트니아졸-5-카복실산, 4-n-프로필벤조산, 3-디메틸아미노벤조산, 4-에톡시벤조산, 4-(메틸티오)벤조산, N-(2-푸로일)글리신, 2-(메틸티오)니코틴산, 3-플루오로-4-메톡시벤조산, Tfa-Gly-OH, 2-나프토산, 퀴날딘산, Ac-L-Ile-OH, 3-메틸리덴-2-카복실산, 2-퀴놀살린카복실산, 1-메틸인돌-2-카복실산, 2,3,6-트리플루오로벤조산, N-포르밀-L-Met-OH, 2-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]아세트산, 4-n-부틸벤조산, N-벤조일글리신, 5-플루오로인돌-2-카복실산, 4-n-프로폭시벤조산, 4-아세틸-3,5-디메틸-2-피롤카복실산, 3,5-디메톡시벤조산, 2,6-디메톡시니코틴산, 사이클로헥산펜타노산, 2-나프틸아세트산, 4-(1H-피롤-1-일)벤조산, 인돌-3-프로피온산, m-트리플루오로메틸벤조산, 5-메톡시인돌-2-카복실산, 4-펜틸벤조산, Bz-b-Ala-OH, 4-디에틸아미노벤조산, 4-n-부톡시벤조산, 3-메틸-5-CF<sub>3</sub>-이속사졸-4-카복실산, (3,4-디메톡시페닐)아세트산, 4-비페닐카복실산 피발로일-Pro-OH, 옥타노일-Gly-OH, (2-나프톡시)아세트산, 인돌-3-부티르산, 4-(트리플루오로메틸)페닐아세트산, 5-메톡시인돌-3-아세트산, 4-(트리플루오로메톡시)벤조산, Ac-L-Phe-OH, 4-펜틸옥시벤조산, Z-Gly-OH, 4-카복시-N-(푸르-2-일메틸)피롤리딘-2-온, 3,4-디에톡시벤조산, 2,4-디메틸-5-CO<sub>2</sub>Et-피롤-3-카복실산, N-(2-플루오로페닐)석신암산, 3,4,5-트리메톡시벤조산, N-페닐안트라닐산, 3-페녹시벤조산, 노나노일-Gly-OH, 2-페녹시피리딘-3-카복실산, 2,5-디메틸-1-페닐피롤-3-카복실산, 트란스-4-(트리플루오로메틸)신남산, (5-메틸-2-페닐옥사졸-4-일)아세트산, 4-(2-사이클로헥세닐옥시)벤조산, 5-메톡시-2-메틸인돌-3-아세트산, 트랜스-4-코티닌카복실산, Bz-5-아미노발레르산, 4-헥실옥시벤조산, N-(3-메톡시페닐)석신암산, Z-Sar-OH, 4-(3,4-디메톡시페닐)부티르산, Ac-o-플루오로-DL-Phe-OH, N-(4-플루오로페닐)글루타르암산, 4'-에틸-4-비페닐카복실산, 1,2,3,4-테트라하이드로아크리딘카복실산, 3-페녹시페닐아세트산, N-(2,4-디플루오로페닐)석신암산, N-데카노일-Gly-OH, (+)-6-메톡시-a-메틸-2-나프탈렌아세트산, 3-(트리플루오로메톡시)신남산, N-포르밀-DL-Trp-OH, (R)-(+)-a-메톡시-a-(트리플루오로메틸)페닐아세트산, Bz-DL-Leu-OH, 4-(트리플루오로메톡시)페녹시아세트산, 4-헵틸옥시벤조산, 2,3,4-트리메톡시신남산, 2,6-디메톡시벤조일-Gly-OH, 3-(3,4,5-트리메톡시페닐)프로피온산, 2,3,4,5,6-펜타플루오로페녹시아세트산, N-(2,4-디플루오로페닐)글루타르암산, N-운데카노일-Gly-OH, 2-(4-플루오로벤조일)벤조산, 5-트리플루오로메톡시인돌-2-카복실산, N-(2,4-디플루오로페닐)디글리콜암산, Ac-L-Trp-OH, Tfa-L-페닐글리신-OH, 3-인도벤조산, 3-(4-n-펜틸벤조일)프로피온산, 2-페닐-4-퀴놀린카복실산, 4-옥틸옥시벤조산, Bz-L-Met-OH, 3,4,5-트리에톡시벤조산, N-라우로일-Gly-OH, 3,5-비스(트리플루오로메틸)벤조산, Ac-5-메틸-DL-Trp-OH, 2-요오도페닐아세트산, 3-요오도-4-메틸벤조산, 3-(4-n-헥실벤조일)프로피온산, N-헥사노일-L-Phe-OH, 4-노닐옥시벤조산, 4'-(트리플루오로메틸)-2-비페닐카복실산, Bz-L-Phe-OH, N-트리데카노일-Gly-OH, 3,5-비스(트리플루오로메틸)페닐아세트산, 3-(4-n-헵틸벤조일)프로피온산, N-헵타노일-L-Phe-OH, 4-데실옥시벤조산, N-(a,a,a-트리플루오로-m-톨릴)안트라닐산, 니플롬산, 4-(2-하이드록시헥사플루오로이소프로필)벤조산, N-미리스토일-Gly-OH, 3-(4-n-옥틸벤조일)프로피온산, N-옥타노일-L-Phe-OH, 4-운데실옥시벤조산, 3-(3,4,5-트리메톡시페닐)프로피오닐-Gly-OH, 8-요오도나프토산, N-펜타데카노일-Gly-OH, 4-도데실옥시벤조산, N-팔미토일-Gly-OH, 및 N-스테아로일-Gly-OH. 이들 유기산은 하나 이상의 제조업자[Advanced ChemTech, Louisville, KY; Bachem Bioscience Inc., Torrance, CA; Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA; Farchan Laboratories Inc., Gainesville FL; Lancaster Synthesis, Windham NH; and MayBridge Chemical Company(c/o Ryan Scientific), Columbia, SC]로부터 시판중이다. 이들 제조사로부터의 카탈로그는 산을 정의하기 위해 위에서 사용한 약어를 사용하고 있다.

f. 태그를 제조하기 위한 수단으로서의 조합 화학

조합 화학은 다수의 화학 물질 라이브러리의 제조를 유도하는 합성 방법의 한 형태이다(예를 들어, 국제 특허출원 제WO 94/08051호). 이러한 조합 라이브러리는 관심대상 분자(MOI)의 정체 확인을 위한 태그로서 사용될 수 있다. 조합 화학은 서로에 대해 구조를 변화시켜 역 분자체의 대형 배열을 형성할 수 있는 "형성 블록"의 세트의 전체적이고 반복되는 공유 연결로서 정의된다. 형성 블록은 친핵물질, 친전자물질, 디엔, 알킬화제 또는 아실화제, 디아민, 뉴클레오타이드, 아미노산, 당, 지질, 유기 단량체, 신티온 및 위의 이들의 배합물과 같은 천연 및 합성 둘 다의 다수의 형태를 취할 수 있다. 형성 블록을 연결하기 위해 사용되는 화학 반응은 알킬화, 아실화, 산화, 환원, 가수분해, 치환, 제거, 부가, 폐환, 축합 등을 포함할 수 있다. 이러한 공정에 의해 올리고머성, 비올리고머성 또는 이들이 배합된 화합물 라이브러리를 제조할 수 있다. 올리고머성인 경우, 화합물은 측쇄, 비측쇄, 또는 사이클 형태일 수 있다. 조합 방법에 의해 제조될 수 있는 올리고머성 구조물의 예

는 올리고펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 올리고당, 폴리지질, 폴리에스테르, 폴리아미드, 폴리우레탄, 폴리우레아, 폴리에테르, 폴리(인 유도체), 예를 들어, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포르아미드, 포스포아미드, 포스파이트, 포스핀아미드 등, 및 폴리(황 유도체), 예를 들어, 설펜, 설펜네이트, 설펜아미드, 설펜아미드 등을 포함한다.

올리고머성 조합 라이브러리의 하나의 통상적인 형태는 펩타이드 조합 라이브러리이다. 최근의 펩타이드 화학과 분자생물학의 발전에 따라 수천만 내지 수억종의 상이한 펩타이드 서열로 이루어진 라이브러리를 제조 및 사용할 수 있게 되었다. 이러한 라이브러리는 3개의 큰 범주로 분류될 수 있다. 하나의 범주의 물질은 가용성 비지지체 결합된 펩타이드 라이브러리의 화학적 합성을 포함한다[참조: Houghten et al., Nature 354:84, 1991]. 제2의 범주는 플라스틱 핀, 수지 비드, 또는 면과 같은 고체 지지체 상에 존재하는 지지체-결합된 펩타이드 물질의 화학적 합성을 포함한다[참조: Geysen et al., Mol. Immunol. 23:709, 1986; Lam et al., Nature 354:82, 1991; Eichler and Houghten, Biochemistry 32:11035, 1993]. 이러한 첫 번째 2개의 범주에 있어서, 형성 블록은 전형적으로 L-아미노산, D-아미노산, 비천연 아미노산, 또는 이들의 몇몇 혼합물 또는 배합물이다. 제3의 범주는 필라멘트성 파아지 입자 또는 플라스미드의 표면에서 펩타이드 또는 단백질을 제조하기 위한 분자 생물학적 방식을 사용한다[참조: Scott and Craig, Curr. Opinion Biotech. 5:40, 1994]. 가용성의 비지지체-결합된 펩타이드 라이브러리는 태그로서의 용도를 포함하는 다수의 적용분야에 적합한 것으로 나타난다. 펩타이드 라이브러리에 있어서의 시판중인 화학적 유도 형태의 목록은 과메틸화와 같은 단계에 의해 증폭될 수 있다[참조: Ostresh et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:11138, 1994].

펩타이드 조합 라이브러리의 다수의 변형이 가능하며, 이때 펩타이드 주쇄가 개질되고/되거나 아미드 결합은 유사 그룹에 의해 대체된다. 사용될 수 있는 아미드 유사 그룹은 우레아, 우레탄, 및 카보닐메틸렌 그룹을 포함한다. 측쇄가 알파-탄소보다 각각의 아미노산의 아미드 질소로부터 발생하도록 하는 주쇄의 재구성에 의해 펩타이드로 공지된 화합물의 라이브러리가 제공한다[참조: Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:9367, 1992].

올리고머성 조합 라이브러리의 또다른 통상적인 형태는 각종 유기 및 무기 그룹이 포스페이트 결합을 대체할 수 있고 질소 또는 황이 에테르 결합중의 산소를 대체할 수 있는 경우를 포함하여, 형성 블록이 천연 또는 합성 뉴클레오타이드 또는 다당류 유도체의 몇몇 형태인 경우의 올리고뉴클레오타이드 조합 라이브러리이다[참조: Schneider et al., Biochem. 34:9599, 1995; Freier et al., J. Med. Chem. 38:344, 1995; Frank, J. Biotechnology 41:259, 1995; Schneider et al., Published PCT WO 942052; Ecker et al., Nucleic Acids Res. 21:1853, 1993].

보다 최근에는, 비올리고머성, 저분자 화합물의 수집 조합 생성물이 기술되었다[참조: DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:690, 1993; Bunin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:4708, 1994]. 저분자 라이브러리의 합성을 위해 적합한 구조는 광범위한 유기 분자, 예를 들어, 헤테로사이클, 방향족, 지환족, 지방족, 스테로이드, 항생제, 효소 억제제, 리간드, 호르몬, 약물, 알칼로이드, 오피오이드, 테르펜, 포르피린, 독소, 촉매 뿐만 아니라 이들의 배합물을 포함한다.

g. 태그의 조합 합성을 위한 구체적인 방법

아민을 함유하는 MS 태그의 다양한 세트의 제조 및 용도를 위한 2개의 방법은 다음에 개괄한다. 두 방법에 있어서, 고체상 합성을 사용하여 조합 화학의 기술을 사용하여 태그된 다수의 링커의 동시 병행 합성을 이룰 수 있다. 첫 번째 방법에 있어서, 올리고뉴클레오타이드로부터 궁극적으로 태그를 절단함으로써 카복실 아미드의 분리를 야기한다. 두 번째 방법에 있어서, 태그를 절단함으로써 카복실산을 제조한다. 이러한 방법에 있어서 사용되는 화학적 성분 및 링커 요소는 다음과 같이 약어를 사용한다:

R 수지

FMOC 플루오레닐메톡시카보닐 보호 그룹

All 알릴 보호 그룹

CO<sub>2</sub>H 카복실산 그룹

CONH<sub>2</sub> 카복실산 아미드 그룹

NH<sub>2</sub> 아미노 그룹



OH 하이드록실 그룹

CONH 아마이드 결합

COO 에스테르 결합

$\text{NH}_2\text{-Rink-CO}_2\text{H}$  4-[( $\alpha$ -아미노)-2,4-디메톡시벤질]-페녹시부티르산

(Rink 링커)

$\text{OH-1MeO-CO}_2\text{H}$  (4-하이드록시메틸)페녹시부티르산

$\text{OH-2MeO-CO}_2\text{H}$  (4-하이드록시메틸-3-메톡시)페녹시아세트산

$\text{NH}_2\text{-A-COOH}$  측쇄에 지방족 또는 방향족 아민 작용기를 갖는 아미노산

$\text{X1} \dots \text{Xn-COOH}$  고유의 분자량을 갖는 n개의 다양한 카복실산의 세트

올리고1....올리고(n) n개의 올리고뉴클레오타이드의 세트

HBTU O-벤조트리아졸-1-일-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄

헥사플루오로포스페이트

방법 1에 있어서의 단계들의 순서는 다음과 같다:

$\text{OH-2MeO-CONH-R}$

↓  $\text{FMOC-NH-Rink-CO}_2\text{H}$ ; 커플링(예를 들어, HBTU)

$\text{FMOC-NH-Rink-COO-2MeO-CONH-R}$

↓ 피페리딘(FMOC 제거)

$\text{MH}_2\text{-Rink-COO-2MeO-CONH-R}$

↓  $\text{FMOC-NH-A-COOH}$ ; 커플링(예를 들어, HBTU)

$\text{FMOC-NH-A-CONH-Rink-COO-2MeO-CONH-R}$

↓ 피페리딘(FMOC 제거)

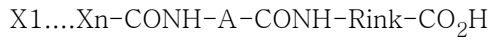
$\text{MH}_2\text{-A-CONH-Rink-COO-2MeO-CONH-R}$

↓ n개의 분취량으로 분할

↓↓↓↓↓ n개의 상이한 산  $\text{X1} \dots \text{Xn-COOH}$ 에 커플링

$\text{X1} \dots \text{Xn-CONH-A-CONH-Rink-COO-2MeO-CONH-R}$

↓↓↓↓↓ 1%의 TFA로 수지로부터 태그된 링커의 절단



↓↓↓↓↓ n개의 올리고(올리고1...올리고(n))에 커플링

(예를 들어, Pfp 에스테르를 통해)



↓ 태그된 올리고의 수거

↓ 서열분석 반응 수행

↓ 서열분석 반응으로부터 상이한 길이의 단편의 분리

(예를 들어, HPLC 또는 CE를 통해)

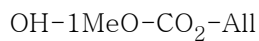
↓ 25 내지 100%의 TFA로 링커로부터 태그된 절단



↓

질량 분광 분석에 의한 분석

방법 2에 있어서의 단계들의 순서는 다음과 같다:



↓ Fmoc-NH-A-CO<sub>2</sub>H; 커플링(예를 들어, HBTU)



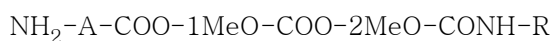
↓ 팔라듐(알릴 제거)



↓ OH-2MeO-CONH-R; 커플링(예를 들어, HBTU)



↓ 피페리딘(Fmoc 제거)

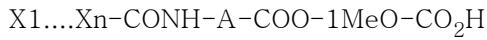


↓ n개의 분취량으로 분할

↓↓↓↓↓ n개의 상이한 산 X1...Xn-CO<sub>2</sub>H에 커플링



↓↓↓↓↓ 1%의 TFA로 수지로부터 태그된 링커의 절단



↓↓↓↓↓ n개의 올리고(올리고1...올리고(n))에 커플링

(예를 들어, Pfp 에스테르를 통해)



↓ 태그된 올리고의 수거

↓ 서열분석 반응 수행

↓ 서열분석 반응으로부터 상이한 길이의 단편의 분리

(예를 들어, HPLC 또는 CE를 통해)

↓ 25 내지 100%의 TFA로 링커로부터 태그의 절단



↓

질량 분광 분석에 의한 분석

## 2. 링커(linker)

본원에 사용된 바와 같은 "링커" 성분(또는 L)은 직접 공유결합 또는 "태그"(또는 T)을 공유 화학 결합을 통해 "관심대상 분자"(또는 MOI)에 결합시키기 위해 사용되는 유기 화학 그룹을 의미한다. 또한, 직접 결합 자체 또는 결합 성분 내의 하나 이상의 결합은 T를 T-L-X 화합물(MOI 성분을 포함하여)의 나머지 부분으로부터 분리(즉, 절단)되도록 하는 조건하에 절단할 수 있다. T 내에 존재하는 태그 가변 성분은 절단 조건에 안정해야 한다. 바람직하게는, 절단은 수분 내에 및 약 15초 이내에 신속하게 수행할 수 있다.

일반적으로, 링커는 각각의 대형 세트의 태그를 각각의 유사한 대형 세트의 MOI에 연결시키기 위해 사용된다. 전형적으로, 단일 태그-링커 배합물이 각각의 MOI에 부착되지만(다양한 T-L-MOI를 제공하기 위해), 몇몇 경우에 있어서, 하나 이상의 태그-링커 배합물이 각각의 개별적인 MOI에 부착될 수 있다(다양한 (T-L)<sub>n</sub>-MOI를 제공하기 위해). 본 발명의 또다른 실시양태에 있어서, 2개 이상의 태그는 링커상의 다수의 독립적인 부위를 통해 단일 링커에 결합되고, 이러한 다수의 태그-링커 배합물은 개별적인 MOI에 결합된다(다양한 (T)<sub>n</sub>-L-MOI를 제공하기 위해).

태그된 MOI 세트의 다양한 조작 후, 특별한 화학적 및/또는 물리적 조건을 사용하여 링커내 하나 이상의 공유결합을 절단함으로써 MOI로부터 태그를 분리시킨다. 절단할 수 있는 결합(들)은 태그, 링커 및 MOI가 함께 연결되는 경우 형성되는 동일한 결합의 일부일 수 있거나 아닐 수 있다. 링커의 디자인은 많은 부분에 있어서 절단할 수 있는 조건을 결정할 것이다. 따라서 링커는 특별히 수용할 수 있는 절단 조건에 의해 정체가 확인될 수 있다. 링커가 광 불안정성(즉, 화학선에 노출됨으로써 절단되는 경향이 있는)일 경우, 링커를 L<sup>hv</sup>로 나타낼 수 있다. 유사하게, L<sup>acid</sup>, L<sup>base</sup>, L<sup>[O]</sup>, L<sup>[R]</sup>, L<sup>enz</sup>, L<sup>elc</sup>, L<sup>△</sup> 및 L<sup>ss</sup>는 각각 산, 염기, 화학적 산화, 화학적 환원, 효소의 촉매활성(더욱 간단하게는 "촉매"), 전기화학적 산화 또는 환원, 승온("열적") 및 티올 교환에 의한 절단을 허용하는 링커를 언급하는데 사용될 수 있다.

특정한 형태의 링커는 단일 형태의 절단 조건에 불안정한 반면, 기타의 형태는 몇몇 형태의 절단 조건에 불안정하다. 또한, ((T)<sub>n</sub>-L-MOI 형태의 구조를 제공하기 위해) 다수의 태그를 결합시킬 수 있는 링커에 있어서, 각각의 태그-결합 부위는 상이한 절단 조건에 불안정할 수 있다. 예를 들어, 링커에 결합된 2개의 태그를 갖는 링커에 있어서, 태그 중 하나는 단지 염기에만 불안정할 수 있고, 다른 하나는 단지 광분해에만 불안정할 수 있다.

본 발명에 유용한 링커는 다음의 몇몇 장점을 보유한다:

1) 링커는 MOI에 부착될 수 있는 화학 핸들( $L_n$ )을 갖는다.

2) 링커는 태그를 링커에 부착시키는 제2의 개별적인 화학 핸들( $L_n$ )을 갖는다. 다수의 태그가 단일 링커에 부착되는 경우 ((T) $n$ -L-MOI 형태의 구조), 개별적인 핸들이 각각의 태그에 존재한다.

3) 링커는 절단을 허용하여 T-함유 잔기가 MOI를 포함하는 화합물의 나머지 부분으로부터 방출되도록 하는 조건을 제외하고는, 수행되는 모든 조작에 대해 안정하다. 따라서, 링커는 태그를 링커에 부착하는 동안, 링커를 MOI에 부착하는 동안 안정하고, 태그 및 링커(T-L)을 이에 부착하는 동안 임의의 MOI의 조작시 안정하다.

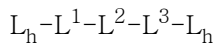
4) 링커는 T-L이 부착되는 동안 MOI에 수행되는 조작을 현저히 방해하지 않는다. 예를 들어,, T-L이 올리고뉴클레오타이드에 부착되는 경우, T-L은 올리고뉴클레오타이드에서 수행되는 임의의 하이브리드화 또는 효소반응(예를 들어, PCR)을 현저히 방해하지 말아야 한다. 유사하게, T-L이 항체에 부착되는 경우, 이는 항체에 의한 항원 인식을 현저히 방해하지 말아야 한다.

5) 화합물의 나머지 부분으로부터의 태그는 태그의 검출성능에 역효과를 미치지 않은 물리적 또는 화학적 공정을 사용하여 고도로 조절된 방식으로 절단된다.

임의의 주어진 링커에 있어서, 링커가 각종 MOI에 부착될 수 있고, 각종 태그가 링커에 부착될 수 있는 것이 바람직하다. 이러한 유연성은 일단 제조되는 경우 T-L 결합체의 라이브러리가 몇몇 상이한 세트의 MOI와 함께 사용될 수 있는 것을 허용하기 때문에 유리하다.

위에서 예시한 바와 같이, 바람직한 링커는 화학식 5와 같다:

화학식 5



상기식에서,

각각의  $L_n$ 는 링커를 태그 반응물 및 관심대상의 분자 반응물에 결합시키기 위해 사용할 수 있는 반응성 핸들이고,

$L^2$ 는 링커에 대해 불안정성을 부여하기 때문에 링커의 필수 부분이고,

$L^1$  및  $L^3$ 은 핸들  $L_n$ 로부터  $L^2$ 를 분리하는데 효과적으로 사용되는 임의의 그룹이다.

$L^1$ (정의에 의해  $L^3$ 보다 T에 더 가까운)은 필요한 불안정성 잔기  $L^2$ 로부터 T를 분리하기 위해 사용된다. 이러한 분리는 절단 반응이 T-함유 잔기의 구조중 불규칙한 변화를 유발할 수 있는 특별한 반응성의 종(예를 들어, 유리 라디칼)을 형성하는 경우 유용할 수 있다. 절단 부위가 T-함유 잔기로부터 추가로 분리됨에 따라, 절단 부위에서 형성되는 반응성 종이 T-함유 잔기의 구조를 분열시킬 수 있는 가능성이 감소된다. 또한,  $L^1$ 에 있어서의 원자가 전형적으로 T-함유 잔기에 존재할 수 있기 때문에,  $L^1$  원자는 T-함유 잔기에 목적하는 특성을 부여할 수 있다. 예를 들어, T-함유 잔기가 T<sup>ms</sup>-함유 잔기인 경우 및 방해된 아민이 T<sup>ms</sup>-함유 잔기의 구조중의 부분으로서 바람직하게 존재하는 경우(예를 들어, MSSE로서 사용되기 위해), 방해된 아민은  $L^1$  불안정성 잔기에 존재할 수 있다.

기타의 경우, L<sup>1</sup> 및/또는 L<sup>3</sup>은 단순히 링커의 시판 제공자가 링커를 L<sup>1</sup> 및/또는 L<sup>3</sup> 그룹을 갖는 형태로 시판하도록 선택하기 때문에 링커에 존재할 수 있다. 이러한 경우, L<sup>1</sup> 및/또는 L<sup>3</sup> 그룹을 갖는 링커를 사용함에 있어서, (이러한 그룹이 절단 반응을 억제하지 않는 한) 심지어 이들에 혼입되는 화합물에 임의의 특별한 성능상의 이점을 부여할 수 없음에도 불구하고 하고 해롭지는 않다. 따라서, 본 발명은 L<sup>1</sup> 및/또는 L<sup>3</sup> 그룹이 링커 성분에 존재하는 것을 허용한다.

L<sup>1</sup> 및/또는 L<sup>3</sup> 그룹은 직접 결합(이 경우, 그룹은 유효하게 존재하지 않는다), 하이드로카빌렌 그룹(예를 들어, 알킬렌, 아릴렌, 사이클로알킬렌, 등), -O-하이드로카빌렌(예를 들어, -O-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)- 등) 또는 사이드로카빌렌-(O-하이드로카빌렌)<sub>w</sub>-(여기서, w는 1 내지 약 10의 정수이다)(예를 들어, -CH<sub>2</sub>-O-Ar-, -CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- 등)일 수 있다.

고체상 합성의 출현으로, 특정한 반응 조건에 불안정한 링커와 관련하여 다수의 논문이 발표되었다. 전형적인 고체상 합성에 있어서, 고체 지지체는 불안정성 링커를 통해 반응성 부위에 결합하고, 합성할 분자는 반응성 부위에서 형성된다. 분자가 완전히 합성되는 경우, 고체 지지체-링커-분자 작제물을 고체 지지체로부터 분자를 방출시키는 절단 조건에 위치시킨다. 이러한 문헌에 있어서 사용하기 위해 개발된 불안정성 링커(또는 이러한 문헌에 사용될 수 있는)은 본 발명에 링커 반응물로서 용이하게 사용될 수 있다.

문헌[참조: Lloyd-Williams, P., et al., "Convergent Solid-Phase Peptide Synthesis", Tetrahedron Report No. 347, 49(48):11065-11133(1993)]은 화학선(예를 들어, 광분해) 뿐만 아니라, 산, 염기 및 기타의 절단 조건에 대해 불안정한 링커의 다양한 논의를 제공한다. 불안정성 링커에 관한 추가의 정보원은 쉽게 수득할 수 있다.

위에서 기술한 바와 같이, 상이한 링커의 디자인은 상이한 특정한 물리적 또는 화학적 조건하에 절단성능("불안정성")을 부여할 수 있다. 다양한 디자인의 링커를 절단하기 위해 사용되는 조건의 예는 산, 염기, 산화, 환원, 불소, 티올 교환, 광분해, 및 효소에 의한 조건을 포함한다.

위에서 나열한 링커에 대한 일반적인 표준을 만족시키는 절단 가능한 링커의 예는 당해 기술분야의 숙련자들에게 익히 공지되어 있고 피어스(Pierce, Rockford, IL)로부터 입수할 수 있는 카탈로그에 나타나 있는 것을 포함한다. 이들의 예는 다음을 포함한다:

- 에틸렌 글리코비스(석신이미딜석시네이트)(EGS), 하이드록실아민에 의해(1M 37°C에서 3 내지 6시간 동안) 절단할 수 있는 아민 반응성 가교 결합제;
- 디석신이미딜 타르타레이트(DST) 및 설포-DST, 0.015M의 과요오드화나트륨에 의해 절단할 수 있는 아민 반응성 가교 결합제
- 비스[2-(석신이미딜옥시카보닐옥시)에틸]설포(BSOCOES) 및 설포-BSOCOES, 염기(pH 11.6)에 의해 절단할 수 있는 아민 반응성 가교 결합제;
- 1,4-디-[3'-(2'-피리딜디티오(프로피온아미도))부탄(DPDPB), 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 피리딜디티올 가교 결합제;
- N-[4-(p-아지도살리실아미도)-부틸]-3'-(2'-피리딜디티오(프로피온아미드(APDP), 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 피리딜디티올 가교결합제;
- 비스-[베타-4-(이지도티올살리실아미도)에틸]디설파이드, 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 광 반응성 가교 결합제;
- N-석신이미딜-(4-아지도페닐)-1,3'-디티오프로피오네이트(SADP), 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 광 반응성 가교 결합제;
- 설포석신이미딜-2-(7-아지도-4-메틸쿠마린-3-아세트아미드)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(SAED), 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 광 반응성 가교 결합제;

· 설포석신이미딜-2-(m-아지도-o-니트로벤즈아미도)-에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(SAND), 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 광 반응성 가교 결합제.

절단할 수 있는 링커의 기타의 예 및 태그를 방출하기 위해 사용할 수 있는 절단 조건은 다음과 같다. 실릴 결합 그룹은 불소에 의해 또는 산성 조건하에 절단될 수 있다. 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-니트로벤질옥시 또는 2-, 3-, 5- 또는 6-치환된-4-니트로벤질옥시 결합 그룹은 광자 공급원(광분해)에 의해 절단될 수 있다. 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-알콕시페녹시 또는 2-, 3-, 5- 또는 6-치환된-4-알콕시페녹시 결합 그룹은  $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ (산화)에 의해 절단될 수 있다.  $NCO_2$ (우레탄) 링커는 수산화물(염기), 산 또는  $LiAlH_4$ (환원)에 의해 절단될 수 있다. 3-펜테닐, 2-부테닐 또는 1-부테닐 결합 그룹은  $O_3$ ,  $O_5O_4/IO_4^-$ , 또는  $KMnO_4$ (산화)에 의해 절단될 수 있다. 2-[3-, 4- 또는 5-치환된-푸릴]옥시 결합 그룹은  $O_2$ ,  $Br_2$ , MeOH 또는 산에 의해 절단될 수 있다.

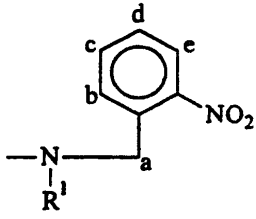
기타의 불안정성 결합 그룹의 절단 조건은 다음을 포함한다: t-알킬옥시 결합 그룹은 산에 의해 절단될 수 있다; 메틸(디알킬)메톡시 또는 4-치환된-2-알킬-1,3-디옥솔란-2-일 결합 그룹은  $H_3O^+$ 에 의해 절단될 수 있다; 2-실릴에톡시 결합 그룹은 불소 또는 산에 의해 절단될 수 있다; 2-(X)-에톡시(여기서, X는 케토, 에스테르, 아미드, 시아노,  $NO_2$ , 설파이드, 설포사이드, 설폰이다) 결합 그룹은 알칼리성 조건하에 절단될 수 있다; 2-, 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-벤질옥시 결합 그룹은 산 또는 환원 조건하에 절단될 수 있다; 2-부테닐옥시 결합 그룹은  $(Ph_3P)_3PhCl(H)$ 에 의해 절단될 수 있다; 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-브로모페녹시 결합 그룹은 Li, Mg 또는 BuLi에 의해 절단될 수 있다; 메틸티오메톡시 결합 그룹은  $Hg^{2+}$ 에 의해 절단될 수 있다; 2-(X)-에틸옥시(여기서, X는 할로젠이다) 결합 그룹은 Zn 또는 Mg에 의해 절단될 수 있다; 2-하이드록시에틸옥시 결합 그룹은 산화(예를 들어,  $Pb(OAc)_4$ )에 의해 절단될 수 있다;

바람직한 링커는 산 또는 광분해에 의해 절단되는 링커이다. 고체상 펩타이드 합성을 위해 개발되어 온 몇몇 산-불안정성 링커는 태그를 MOI에 결합시키는데 유용하다. 이들 링커중의 몇몇은 최근의 문헌[참조: Lloyd-Williams et al. Tetrahedron 49:11065-1113, 1993]에 기술되어 있다. 링커의 하나의 유용한 형태는 p-알콕시벤질 알콜에 근거하며, 이중에 2개의 4-하이드록시메틸페녹시아세트산 및 4-(4-하이드록시메틸-3-메톡시페녹시)부티르산은 시판중이다[제조사: Advanced ChemTech, Louisville, KY]. 두 링커 모두는 벤질알콜에 대한 에스테르 결합을 통해 태그에 부착될 수 있고, 카복실산에 대한 아미드 결합을 통해 아민을 함유하는 MOI에 부착될 수 있다. 이들 분자에 의해 결합된 태그는 트리플루오로아세트산의 농도를 변화시키면서 MOI로부터 방출된다. 이들 링커의 절단에 의해 태그상에서 카복실산이 방출된다. 2,4-디메톡시-4'-(카복시메틸옥시)-벤즈하이드릴아민(제조사: Advanced ChemTech, FMOC-보호된 형태)과 같은 관련된 링커를 통해 부착된 태그의 산 절단에 의해 방출된 태그에서 카복실 아미드의 방출을 유도한다.

또한, 이러한 적용분야에 유용한 광불안정성 링커는 대부분이 고체상 펩타이드 합성을 위해 개발되었다(참조: Lloyd-Williams review). 이들 링커는 통상적으로 2-니트로벤질에스테르 또는 2-니트로벤질아미드에 근거한다. 최근에 문헌에 보고된 광불안정성 링커의 2개의 예는 4-(4-(1-Fmoc-아미노)에틸)-2-메톡시-5-니트로페녹시)부타노산[참조: Holmes and Jones, J. Org. Chem. 60:2318-2319, 1995] 및 3-(Fmoc-아미노)-3-(2-니트로페닐)프로피온산(참조: Brown et al., Molecular Diversity 1:4-12, 1995)이다. 이들 두 링커 모두는 카복실산을 통해 MOI중의 아민에 부착된다. 태그의 링커에 대한 부착은 태그 상의 카복실산과 링커상의 아민 사이에 아미드를 형성함으로써 이루어진다. 광불안정 링커의 절단은 통상적으로 당해 기술분야에 공지된 강도 및 시간에서 파장 350nm의 UV 광을 사용하여 수행된다. 링커가 절단됨으로써 태그 상의 1그 아미드가 방출된다. 광 절단 가능한 링커의 예는 니트로페닐 글리신 에스테르, 엑소- 및 엔도-2-벤조노르보르네일 클로라이드 및 메탄 설포네이트 및 3-아미노-3(2-니트로페닐)프로피온산을 포함한다. 효소 절단의 예는 에스테르 결합을 절단할 수 있는 에스테라제, 포스포디에스테르 결합을 절단할 수 있는 뉴클레아제, 펩타이드 결합을 절단하는 프로테아제 등을 포함한다.

바람직한 링커 성분은 다음 화학식 13에 나타낸 오르토-니트로벤질 구조를 갖는다:

[화학식 13]



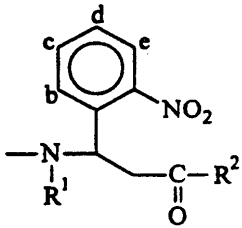
상기식에서,

a, b, c, d 또는 e 위치에서의 하나의 탄소원자는  $-L^3-X$ 로 대체되고  $L^1$ (바람직하게는 직접 결합이다)은 위의 구조에 있어서  $N(R^1)$ 의 좌측에 존재한다.

이러한 링커 성분은 탄소 표지된 "a" 및  $N(R^1)$  사이에서 결합을 선별적으로 광에 의해 절단할 수 있다.  $R^1$ 의 정체 확인은 절단 반응에 대해 전형적으로 중요하지 않지만,  $R^1$ 은 바람직하게는 수소 및 하이드로카빌로부터 선택된다. 본 발명은 위의 구조에 있어서,  $-N(R^1)-$ 이  $-O-$ 로 대체될 수 있음을 제공한다. 또한, 위의 구조에 있어서, 하나 이상의 b, c, d 또는 e 위치는 임의로 알킬, 알콕시, 불소, 염소, 하이드록실, 카복실레이트 또는 아마이드로 대체될 수 있으며, 이러한 치환체들은 각각의 경우에 독립적으로 선택된다.

화학적 핸들  $L_n$ 을 갖는 추가의 바람직한 링커 성분은 다음 화학식 14의 구조를 갖는다:

[화학식 14]



상기식에서,

하나 이상의 b, c, d 또는 e 위치는 수소, 알킬, 알콕시, 불소, 염소, 하이드록실, 카복실레이트 또는 아마이드로 대체될 수 있으며,

$R^1$ 은 수소 또는 하이드로카빌이고,

$R^2$ 는 OH 또는 또다른 잔기와의 커플링을 위해 카복실산을 보호하거나 활성화시키는 그룹이다.

플루오로카본 및 하이드로플루오로카본 그룹은 또다른 잔기와의 커플링을 위해 카복실산을 활성화시키는 바람직한 그룹이다.

### 3. 관심대상의 분자(MOI)

MOI의 예는 핵산 또는 핵산 동족체(예를 들어, PNA), 핵산의 단편(예를 들어, 핵산 단편), 합성 핵산 또는 단편, 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, DNA 또는 RNA), 단백질, 펩타이드, 항체 또는 항체 단편, 수용체, 수용체 리간드, 리간드 쌍의 구성원, 사이토킨, 호르몬, 올리고당, 합성 유기 분자, 약물 및 이들의 배합물을 포함한다.

바람직한 MOI는 핵산 단편을 포함한다. 바람직한 핵산 단편은 염기의 서열분석을 위해 벡터가 사용되는 경우, 벡터에 존재하는 서열을 상보적인 프라이머 서열이다. 바람직하게, 핵산 단편은 단편의 3' 말단 이외의 위치에서 태그에 직접 또는

간접적으로 부착되고; 가장 바람직하게는 단편의 5' 말단에 부착된다. 핵산 단편은 구매할 수 있거나 유전자 데이터베이스에 근거하여 제조될 수 있고[참조: Dib et al., Nature 380:152-154, 1996 and CEPH Genotype Database, <http://www.cephb.fr>] 및 시판중이다(예를 들어, Promega, Madison, WI).

본원에 사용된 바와 같이, MOI는 MOI를 T-L-L<sub>n</sub> 화합물에 결합시킴에 있어서 유용한 작용기를 함유하는 MOI의 유도체를 포함한다. 예를 들어, 포스포디에스테르가 알킬렌아민에 결합된 경우, 5' 말단에서 포스포디에스테르를 갖는 핵산 단편은 MOI이다. 이러한 MOI는 예를 들어, 본원에 참조문헌으로 인용된 미국 특허 제4,762,779호에 기재되어 있다. 또한 내부 변형된 핵산 단편도 MOI이다. 예를 들어, 핵산 단편의 내부 변형은 염기(예를 들어, 아데닌, 구아닌, 사이토신, 티미딘, 우라실)가 반응성 작용 그룹을 가하기 위해 변형된 경우이다. 이와 같이 내부적으로 변형된 핵산 단편은 시판중이다(제조사: Glen Research, Herndon, VA). 핵산 단편의 내부 변형의 또다른 예는 포스포르아미데이트가 핵산 단편의 당과 포스페이트 그룹 사이에 위치하는 변형된 포스포디에스테르를 합성하기 위해 사용되는 경우이다. 포스포르아미데이트는 이러한 포스포르아미데이트-유도된 잔기를 함유하는 핵산 단편이 예를 들어, T-L-L<sub>n</sub> 화합물과 같은 또다른 잔기에 결합되는 것을 허용하는 반응성 그룹을 함유한다. 이러한 포스포르아미데이트는 시판중이다(제조사: Clonetech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA).

#### 4. 화학적 핸들(L<sub>n</sub>)

화학적 핸들은 제1 분자의 부분으로서 존재하는 안정한 반응성 원자 배열부로서, 이때 핸들은 제2 분자의 부분으로서 존재하는 상보적인 화학적 핸들과 화학적으로 반응하여 두 분자 사이에 공유 결합을 형성할 수 있는 것이다. 예를 들어, 화학적 핸들은 하이드록실 그룹일 수 있고, 보충적인 화학적 핸들은 카복실산 그룹(또는 예를 들어, 하이드로플루오아릴 에스테르와 같은 이의 활성화된 유도체)일 수 있으며, 이들 두 핸들 사이의 반응에 의해 두 분자를 함께 결합시키는 공유 결합(특히, 에스테르 그룹)을 형성한다.

화학적 핸들은 태그를 링커에 부착시키고, 링커를 MOI에 부착시키기에 적합한 다양한 수의 공유결합 형성 반응에 사용될 수 있다. 이러한 반응은 알킬화(예를 들어, 에테르, 티오에테르를 형성하기 위해), 아실화(예를 들어, 에스테르, 아마이드, 카바메이트, 우레아, 티오우레아를 형성하기 위해), 포스포릴화(예를 들어, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포르아미드, 포스폰아미드를 형성하기 위해), 설폰닐화(예를 들어, 설폰네이트, 설폰아미드를 형성하기 위해), 축합(예를 들어, 이민, 옥심, 히드라존을 형성하기 위해), 실릴화, 디설파이드 형성, 및 광분해에 의해 니트렌 또는 카르벤과 같은 반응성 중간체의 형성을 포함한다. 일반적으로 핸들 및 태그를 링커에 부착시키기에 적합한 결합을 형성하는 반응은 링커를 MOI에 부착시키고, 그 반대로 부착시키기에 적합하다. 몇몇 경우, MOI는 변형 또는 유도화 전에 링커를 부착시키기 위해 필요한 핸들을 제공할 수 있다.

링커를 MOI에 부착시키기 위해 특히 유용한 결합의 한 형태는 디설파이드 결합이다. 이를 형성하기 위해서는 링커에 티올 그룹("핸들")의 존재가 필요하고, MOI에 또다른 티올 그룹의 존재가 필요하다. 온화한 산화 조건은 디설파이드로서 2개의 티올을 함께 결합시킬 수 있다. 또한, 디설파이드의 형성은 예를 들어, 피리딜 디설파이드와 같은 과량의 적합한 디설파이드 교환제를 사용함으로써 유도될 수 있다. 디설파이드의 형성은 쉽게 가역적일 수 있기 때문에, 목적하는 경우 디설파이드는 태그를 방출시키기 위한 절단 가능한 결합으로서 사용할 수 있다. 이는 전형적으로 디티오트레이톨과 같은 과량의 적합한 티올 교환제를 사용하는 유사한 온화한 조건하에 성취된다.

아미드 결합을 형성하는 것은 태그를(또는 링커를 갖는 태그를) 올리고뉴클레오타이드에 결합시키기 위해 특별히 흥미롭다. 1급 지방족 아민 핸들은 6-모노메톡시트리틸헥실시아노에틸-N,N-디이소프로필 포스포르아미다이트(제조사: Glenn Research, Sterling, VA)와 같은 포스포르아미다이트를 사용하여 합성 올리고뉴클레오타이드상에 신속하게 도입될 수 있다. 아데노신 및 구아노신과 같은 천연 뉴클레오타이드에서 발견되는 아민은 도입되는 1급 아민과 비교하는 경우 사실상 비반응성이다. 반응도에 있어서의 이러한 차이는 아마이드, 및 뉴클레오타이드 아민이 아니라 도입된 1급 아민과 관련된 결합 그룹(예를 들어, 우레아, 티오우레아, 설폰아미드)을 선택적으로 형성하는 능력의 기초를 형성한다.

분자 프로브 카탈로그(Molecular Probes catalog, Eugene, OR)에 나열된 바와 같이, 아민 반응성 작용성 그룹의 부분적인 목록은 활성 카복실 에스테르, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 설폰닐 할라이드, 및 디클로로트리아젠을 포함한다. 활성 에스테르는 형성되는 아마이드 생성물이 매우 안정하기 때문에 아민의 형성을 위한 탁월한 제제이다. 또한, 이러한 제제는 지방족 아민과의 양호한 반응성을 보유하고 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 아민과의 낮은 반응성을 보인다. 활성 에스테르의 예는 N-하이드록시설파신아미드 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스



테르 및 p-니트로페닐 에스테르를 포함한다. 활성 에스테르는 카복실산을 함유하는 사실상 모든 분자로부터 제조할 수 있기 때문에 유용하다. 활성 에스테르를 제조하는 방법은 문헌[참조: Bodansky, Principles of Peptide Chemistry (2d ed.), Springer Verlag, London, 1993]에 기재되어 있다.

## 5. 링커의 부착

전형적으로, 링커의 단일 형태는 태그의 특별한 세트 또는 패밀리를 MOI의 특별한 세트 또는 패밀리에 연결시키기 위해 사용된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에 있어서, 단일의 균일한 과정은 다양한 모든 T-L-MOI 구조를 형성하기 위해 진행될 수 있다. 이는 특히 T-L-MOI 구조의 세트가 큰 경우, 이는 조합 화학 또는 기타의 병행 공정 기술의 방법을 사용하여 셋트를 제조하는 것을 허용하기 때문에 특히 유리하다. 유사한 방식으로, 단일 형태의 링커를 사용하면 다양한 모든 T-L-MOI 구조를 절단하기 위해 단일의 균일한 과정을 사용할 수 있다. 또한, 이는 병행해서, 반복적으로 및/또는 자동화된 방식으로 세트를 가공할 수 있기 때문에 T-L-MOI 구조의 대형 세트에 대해 유리하다.

그러나, 태그의 상이한 서브세트를 상응하는 MOI의 서브세트에 연결시키기 위해 2개 이상의 링커가 사용되는 본 발명의 기타의 실시양태가 존재한다. 이러한 경우, 선택적인 절단 조건을 사용하여 기타의 MOI의 서브세트상에 존재하는 링커를 절단하지 않고, 각각의 링커를 독립적으로 절단할 수 있다.

공유결합을 형성하는 다수의 반응은 태그를 링커에, 링커를 MOI에 부착시키기에 적합하다. 이러한 반응은 알킬화(예를 들어, 에테르, 티오에테르를 형성하기 위해), 아실화(예를 들어, 에스테르, 아마이드, 카바메이트, 우레아, 티오우레아를 형성하기 위해), 포스포릴화(예를 들어, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포르아미드, 포스폰아미드를 형성하기 위해), 설폰닐화(예를 들어, 설폰네이트, 설폰아미드를 형성하기 위해), 축합(예를 들어, 이민, 옥심, 히드라존을 형성하기 위해), 실릴화, 디설파이드 형성, 및 광분해에 의해 니트렌 또는 카르벤과 같은 반응성 중간체의 형성을 포함한다. 일반적으로, 핸들 및 태그를 링커에 부착시키기에 적합한 결합을 형성하는 반응은 링커를 MOI에 부착시키고, 그 반대로 부착시키기에 적합하다. 몇몇 경우, MOI는 변형 또는 유도화 전에 링커를 부착시키기 위해 필요한 핸들을 제공할 수 있다.

링커를 MOI에 부착시키기 위해 특히 유용한 결합의 한 형태는 디설파이드 결합이다. 이를 형성하기 위해서는 링커상에 티올 그룹("핸들")의 존재가 필요하고, MOI 상에 또다른 티올 그룹의 존재가 필요하다. 온화한 산화 조건은 디설파이드로서 2개의 티올을 함께 결합시킬 수 있다. 또한, 디설파이드의 형성은 예를 들어, 피리딜 디설파이드와 같은 과량의 적합한 디설파이드 교환제를 사용함으로써 유도될 수 있다. 디설파이드의 형성은 쉽게 가역적일 수 있기 때문에, 목적하는 경우 디설파이드는 태그를 방출시키기 위한 절단 가능한 결합으로서 사용할 수 있다. 이는 전형적으로 디티오프라이톨과 같은 과량의 적합한 티올 교환제를 사용하는 유사한 온화한 조건하에 성취된다.

아미드 결합을 형성하는 것은 태그를 올리고뉴클레오타이드에 결합시키기 위해 특별히 흥미롭다. 1급 지방족 아민 핸들은 6-모노메톡시트리틸헥실시아노에틸-N,N-디이소프로필 포스포르아미다이트(제조사: Glenn Research, Sterling, VA)와 같은 포스포르아미다이트를 사용하여 합성 올리고뉴클레오타이드상에 용이하게 도입될 수 있다. 아데노신 및 구아노신과 같은 천연 뉴클레오타이드에서 발견되는 아민은 도입되는 1급 아민과 비교하는 경우 사실상 비반응성이다. 반응성에 있어서의 이러한 차이는 아미드, 및 뉴클레오타이드 아민이 아니라 도입된 1급 아민과 관련된 결합 그룹(예를 들어, 우레아, 티오우레아, 설폰아미드)을 선택적으로 형성하는 능력의 기초를 형성한다.

분자 프로브 카탈로그(Molecular Probes catalog, Eugene, OR)에 나열된 바와 같이, 아민 반응성 작용성 그룹의 부분적인 목록은 활성 카복실 에스테르, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 설폰일 할라이드, 및 디클로로트리아젠을 포함한다. 활성 에스테르는 형성되는 아미드 생성물이 매우 안정하기 때문에 아민의 변형을 위한 탁월한 제제이다. 또한, 이러한 제제는 지방족 아민과의 양호한 반응성을 보유하고 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 아민과의 낮은 반응성을 보유한다. 활성 에스테르의 예는 N-하이드록시석신이미드 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르 및 p-니트로페닐 에스테르를 포함한다. 활성 에스테르는 카복실산을 함유하는 사실상 모든 분자로부터 제조할 수 있기 때문에 유용하다. 활성 에스테르를 제조하는 방법은 문헌[참조: Bodansky, Principles of Peptide Chemistry (2d ed.), Springer Verlag, London, 1993]에 기재되어 있다.

다수의 시판중인 가교결합제가 존재하고, 이는 링커로서 작용할 수 있다(참조: Pierce Cross-linkers, Pierce Chemical Co., Rockford, IL). 이들 중에서 예를 들어, 호모 이작용성(homobifunctional) 이미도에스테르 및 N-하이드록시석신이미드(NHS) 에스테르와 같은 호모 이작용성 아민 반응성 가교 결합제가 있다. 또한 순차적인 반응을 허용하는 2개 이상의 상이한 반응성 그룹을 갖는 헤테로 이작용성 가교 결합제가 있다. 이미도에스테르는 알칼리성 pH에서 아민과 용이하게 반응한다. NHS-에스테르는 1급 또는 2급 아민과 반응하는 경우 안정한 생성물을 제공한다. 말레이미드, 알킬 및 아릴 할라이드, 알파-할로아실 및 피리딜 디설파이드는 티올 반응성이다. 말레이미드는 pH 범위 6.5 내지 7.5에서 티올(설프하이드

릴) 그룹에 대해 특이적이고, 알칼리성 pH에서는 아민 반응성이 될 수 있다. 티오에테르 결합은 생리학적 조건하에 안정하다. 알파-할로아세틸 가교 결합체는 요오도아세틸 그룹을 함유하고 설프하이드릴에 대해 반응성이다. 이미다졸은 요오도아세틸 잔기와 반응할 수 있지만, 반응은 매우 느리다. 피리딜 디설파이드는 티올 그룹과 반응하여 디설파이드 결합을 형성한다. 카보디이미드는 아실-하이드라진 결합의 형성을 일으키는 하이드라지드의 1급 아민에 카복실을 커플링시킨다. 아릴아지드는 UV 또는 가시광선에 노출될 때까지 화학적으로 불활성인 광 친화제이다. 이러한 화합물이 250 내지 460nm에서 광분해되는 경우, 반응성 아릴 니트렌이 형성된다. 반응성 아릴 니트렌은 비교적 비특이적이다. 클리옥살은 아르기닌의 구아니디닐 부분에 대해 반응성이다.

본 발명의 하나의 전형적인 실시양태에 있어서, 태그는 우선 링커에 결합시킨 다음 태그와 링커의 배합물을 MOI에 결합시켜 T-L-MOI 구조를 형성한다. 또한, 동일한 구조는 우선 링커를 MOI에 결합시킨 다음 링커와 MOI의 배합물을 태그에 결합시킴으로써 형성된다. 이는 MOI가 DNA 프라이머 또는 올리고뉴클레오타이드인 경우의 예이다. 이러한 경우에 있어서, 태그는 전형적으로 우선 링커에 결합된 다음 T-L을 DNA 프라이머 또는 올리고뉴클레오타이드에 결합되며, 이는 예를 들어, 서열분석 반응에 사용된다.

태그가 역으로 MOI에 부착되는 하나의 유용한 형태(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 또는 DNA 서열분석 프라이머)는 화학적으로 불안정한 링커를 통해 이루어진다. 링커에 대한 바람직한 디자인은 예를 들어, 트리플루오로아세트산(TFA)과 같은 휘발성 유기산에 노출되는 경우 링커가 절단되는 것을 허용한다. 특히 TFA는 전기분무를 포함하는 대부분의 MS 이온화 방법과 양립할 수 있다.

다음에 상세하게 기술하는 바와 같이, 본 발명은 유전자형 결정을 위한 방법을 제공한다. 유전자형 결정 방법에 유용한 조성물은 다음 화학식 15의 화합물을 다수 포함한다:

[화학식 15]

T<sup>ms</sup>-L-MOI

상기식에서,

T<sup>ms</sup>는 탄소, 수소 및 불소 중 하나 이상, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택되는 임의의 원소를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 T<sup>ms</sup>-함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되는 것을 허용하는 유기 그룹이며, 이때 T<sup>ms</sup>-함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 지지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며, 이때 L은 MOI의 3'말단 이외의 위치에서 MOI에 결합된다. 조성물에 있어서, 2개 이상의 화합물은 동일한 T<sup>ms</sup>를 갖지만, 이러한 분자의 MOI 그룹은 동일하지 않은 뉴클레오타이드 길이를 갖는다.

유전자형 결정 방법에 유용한 또다른 조성물은 다음 화학식 15의 화합물을 다수 포함한다:

화학식 15

T<sup>ms</sup>-L-MOI

상기식에서,

T<sup>ms</sup>는 탄소, 수소 및 불소 중 하나 이상, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택되는 임의의 원소를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 T<sup>ms</sup>-함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되는 것을 허용하는 유기 그룹이며, 이때 T<sup>ms</sup>-함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 지지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며, 이때 L은 MOI의 3'말단 이외의 위치에서 MOI에 결합된다. 조성물에 있어서, 2개 이상의 화합물은 동일한 T<sup>ms</sup>를 갖지만 이러한 화합물은 컬럼 크로마토그래피에 의해 동일하지 않은 용출 시간을 갖는다.

유전자형 결정 방법에 사용할 수 있는 또다른 조성물은 다음 화학식 15의 화합물을 다수 포함한다:

화학식 15

T<sup>ms</sup>-L-MOI

상기식에서,

T<sup>ms</sup>는 탄소, 수소 및 불소 중 하나 이상, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택되는 임의의 원소를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 T<sup>ms</sup>-함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되는 것을 허용하는 유기 그룹이며, 이때 T<sup>ms</sup>-함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 지지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며, 이때 L은 MOI의 3'말단 이외의 위치에서 MOI에 결합된다. 조성물에 있어서, 동일한 MOI 뉴클레오타이드의 길이를 갖는 2개의 화합물은 동일한 T<sup>ms</sup>를 갖지 않는다.

위의 조성물에 있어서, 다수는 바람직하게는 2를 초과하고, 더욱 바람직하게는 4를 초과한다. 또한, MOI에 있어서의 핵산 단편은 벡터의 일부분을 상보적인 서열을 갖고, 이때 단편은 폴리뉴클레오타이드 합성을 자극할 수 있다. 바람직하게는 다수의 구성원중의 T<sup>ms</sup> 그룹은 2amu 이상 상이하고, 4amu 이상 상이할 수 있다.

또한, 본 발명은 다음 화학식 15인 화합물들의 각각의 세트를 다수 포함하는 조성물을 제공한다:

화학식 15

T<sup>ms</sup>-L-MOI

상기식에서,

T<sup>ms</sup>는 탄소, 수소 및 불소 중 하나 이상, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택되는 임의의 원소를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 T<sup>ms</sup>-함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되는 것을 허용하는 유기 그룹이며, 이때 T<sup>ms</sup>-함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 지지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며, 이때 L은 MOI의 3'말단 이외의 위치에서 MOI에 결합된다. 조성물에 있어서, 화합물의 제1 세트 내의 구성원은 동일한 T<sup>ms</sup> 그룹을 갖지만 MOI중 뉴클레오타이드의 상이한 구성원을 갖는 동일하지 않은 MOI 그룹을 갖고 제1 세트 내에 10개 이상의 구성원이 존재하며, 이때 세트들 사이에서 T<sup>ms</sup> 그룹은 2amu 이상 상이하다. 다수는 바람직하게는 3 이상이고 더욱 바람직하게는 5 이상이다.

또한, 본 발명은 다음 화학식 15인 화합물들의 각각의 세트를 다수 포함하는 조성물을 제공한다:

화학식 15

T<sup>ms</sup>-L-MOI

상기식에서,

T<sup>ms</sup>는 탄소, 수소 및 불소 중 하나 이상, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택되는 임의의 원소를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 T<sup>ms</sup>-함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되는 것을 허용하는 유기 그룹이며, 이때 T<sup>ms</sup>-함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 지지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며, 이때 L은 MOI의 3'말단 이외의 위치에서 MOI에 결합된다. 조성물에 있어서, 세트 내의 화합물은 용출시간이 동일하지만 T<sup>ms</sup> 그룹은 동일하지 않다.

또한, 본 발명은 하나 이상의 프라이머가 다음 화학식 15의 화합물이고, 각각의 프라이머 쌍이 상이한 위치에 결합하는, 다수의 증폭 프라이머 쌍을 포함하는, 유전자형을 결정하기 위한 키트를 제공한다:

화학식 15

T<sup>ms</sup>-L-MOI

상기식에서,

T<sup>ms</sup>는 탄소, 수소 및 불소 중 하나 이상, 및 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택되는 임의의 원소를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 T<sup>ms</sup>-함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되는 것을 허용하는 유기 그룹이며, 이때 T<sup>ms</sup>-함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 지지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며, 이때 L은 MOI의 3'말단 이외의 위치에서 MOI에 결합된다. 키트에 있어서, 다수는 바람직하게는 3 이상이고, 더욱 바람직하게는 5 이상이다.

위에서 지적한 바와 같이, 본 발명은 핵산 분자의 서열을 결정하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 간단하게, 이러한 방법은 일반적으로 (a) 핵산 분자의 제1 말단 내지 제2 말단으로부터 선택되는 핵산 분자(예를 들어, 태그된 단편)에 상보적인 태그된 핵산을 형성하며, 이때 태그가 특별한 또는 선택된 뉴클레오타이드와 상호 관계가 있고 임의의 다양한 방법에 의해 검출될 수 있고;

(b) 이러한 태그된 단편을 서열의 길이에 의해 분리하고;

(c) 태그된 단편으로부터 태그를 절단하고;

(d) 태그를 검출한 다음, 이로부터 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계를 포함한다. 이를 양태 각각은 하기에서 더욱 상세히 기술한다.

B. 진단 방법

1. 도입

위에서 언급한 바와 같이, 본 발명은 매우 다양한 방법을 제공하는데, 위에서 기술한 태그 및/또는 링커는 주어진 방법 내에서 동시에 분석할 수 있는 샘플의 특이성, 민감성 또는 숫자를 증진시키기 위해 통상적인 표지(예를 들어, 방사선 활성화

또는 효소) 대신에 사용할 수 있다. 증진될 수 있는 이러한 방법의 대표적인 예는 예를 들어, RNA 증폭[참조: Lizardi et al., Bio/Technology 6:1197-1202, 1988; Kramer et al., Nature 339:401-402, 1989; Lomeli et al., Clinical Chem. 35(9):1826-1831, 1989; 미국 특허 제4,786,600호], 및 LCR 또는 폴리머라제 연쇄 반응("PCR")을 사용하는 DNA 증폭 [참조: 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호]를 포함한다.

본 발명의 하나의 양태 내에서, (a) 하나 이상의 선택된 표적 핵산 분자로부터 특정 핵산 단편과 상호 관계가 있고 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그가 부착된, 선택된 표적 핵산 분자에 상보적인 핵산 분자(MOD)인 태그된 핵산 분자를 형성하고; (b) 태그된 분자를 크기에 의해 분리하고; (c) 태그된 분자로부터 태그를 절단하고; (d) 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 핵산 분자의 존재를 결정함을 포함하여, 핵산 분자 또는 단편의 정체를 결정하거나, 선택된 핵산 분자 또는 단편의 존재를 검출하는 방법을 제공한다.

본 발명의 관련된 양태 내에서, (a) 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그된 핵산 프로브의 상보적으로 선택된 표적 핵산 서열로의 하이브리드화를 허용하기에 충분한 조건하 및 시간 동안 태그된 핵산 프로브를 표적 핵산 분자와 배합하며; (b) 하이브리드화되고 태그된 프로브의 크기, 하이브리드화되지 않은 프로브 또는 표적 분자의 크기, 또는 프로브: 표적 하이브리드의 크기를 변화시키고; (c) 태그된 프로브를 크기에 의해 분리하고; (d) 태그된 프로브로부터 태그를 절단하고; (e) 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 선택된 핵산 분자를 검출함을 포함하여, 선택된 핵산 분자를 검출하는 방법을 제공한다. 이들 및 기타 관련 기술은 이후 더욱 상세히 설명한다.

## 2. PCR

PCR은 임의의 생물체(바이러스, 세균, 식물 또는 사람)의 목적하는 DNA 서열을 시간에 따라 수억배로 증폭할 수 있다. PCR은 특히 반응이 고도로 특이적이고 특히 자동화되며, 극미량의 샘플을 증폭할 수 있기 때문에 유용하다. 이들 이유로 인해, PCR은 임상 의학, 유전성 질환 진단학, 법과학 및 진화생물학에 중요한 역할을 한다.

간단하게, PCR은 특별한 폴리머라제에 근거하는 공정으로서, 4개의 DNA 염기 및 2개의 DNA 단편(프라이머, 각각 약 20개의 염기 길이)을 함유하는 혼합물에서 표적 서열을 플랭킹하는 제공된 DNA 쇠에 대한 상보적인 쇠를 합성할 수 있다. 혼합물을 가열하여 표적 서열을 함유하는 이분쇄 DNA의 쇠를 분리한 다음 냉각시킴으로써 (1) 프라이머가 분리된 쇠상에서 이들의 상보적인 서열을 찾아 결합하고 (2) 폴리머라제가 프라이머를 새로운 상보적인 쇠로 연장시키는 것을 허용한다. 반복된 가열과 냉각 사이클은 각각의 새로운 이분쇄가 추가의 합성을 위해 2개의 주형(template)이 되도록 분리하기 때문에 표적 DNA를 지수적으로 증가시킨다. 약 1시간이 경과하여 20회의 PCR 사이클은 표적일 백만배 정도로 증폭시킬 수 있다.

본 발명의 하나의 실시양태 내에서, 예를 들어, 생물학적 샘플에서 PCR 기술을 사용하여 핵산 분자의 정체를 결정하거나, 선택된 핵산 분자를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 간단하게, 이러한 방법은 일련의 태그된 핵산 단편 또는 분자를 PCR하는 동안 형성하는 단계 및 제조된 단편을 크기에 의해 분리하는 단계를 포함한다. 크기 분리 단계는 예를 들어, 겔 전기영동(예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동) 또는 바람직하게는 HPLC를 포함하는 임의의 본원에 기재된 기술을 사용하여 성취할 수 있다. 이어서, 태그는 분리된 단편으로부터 절단되고 각각의 검출 기술에 의해 검출된다. 이러한 기술의 예는 본원에 기재되어 있고, 예를 들어, 질량 분광 분석법, 적외선 분광 분석법, 정전위 전류법 또는 UV 분광 분석법을 포함한다.

## 3. RNA 핑거프린팅 및 차등 디스플레이

주형이 RNA인 경우 핑거프린팅에 있어서의 제1단계는 역 전사이다. 문헌[참조: Liang and Pardee, Science 257:967, 1992]은 올리고(dT)에 근거하지만, 5' 말단(예를 들어, 올리고 5'-(dT<sub>11</sub>)CA-3'에서 2개의 염기의 '앵커'를 갖는 역 전사를 위한 프라이머를 사용하는 RNA 핑거프린팅 프로토콜을 기술한다. 12개의 폴리아데닐화 RNA 중에서 하나에 접근하는 선택성과 함께, 주로 폴리(rA) 부분의 5' 말단 및 주로 5'-UpG-폴리(rA)-3' 말단에서 개시된다. 역 전사 및 변성 후, cDNA의 제조되는 제1 쇠를 수득하는 독자적인 자극을 수행한다. PCR은 이제 프라이머와 가장 잘 짝을 이루고 mRNA 및 폴리아데닐화된 이중 RNA의 3' 말단으로부터 유도되는 생성물의 핑거프린팅을 형성하기 위해 사용할 수 있다. 이 프로토콜을 '차등 디스플레이(differential display)'라 명명한다.

또한, 독자적인 프라이머는 6 내지 8개의 염기가 프라이머의 3' 말단과 일치하는 RNA에 대한 내부의 영역을 선택하는 역 전사의 제1단계에 사용할 수 있다. 이는 동일하거나 상이한 독자적인 프라이머를 PCR을 사용하는 cDNA의 제1 쇠의 독자적인 자극 및 이어서 PCR에 의해 이루어진다. 이러한 특별한 프로토콜 샘플은 개방 판독 프레임[참조: Welsh et al.,

Nuc. Acids. Res. 20:4965, 1992]을 포함하는 RNA중의 어디에나 존재한다. 또한, 다수의 세균 RNA와 같이, 폴리아세틸화되지 않은 RNA에서 사용될 수 있다. 이러한 독자적으로 자극된 PCR에 의한 RNA 핑거프린팅의 변형은 RAP-PCR로 언급된다.

RNA의 독자적으로 자극된 PCR 핑거프린팅이 상이하게 실험 처리되거나 상이하게 발생된 세포, 조직 또는 기타의 생물학적 물질로부터 유도된 샘플에서 수행되는 경우, 샘플들 사이에서 유전자의 표현에 있어서의 차이가 관측될 수 있다. 각각의 경우에 있어서, 동일한 수의 유효한 PCR 이중화 현상이 일어나고 cDNA 생성물의 초기 농도에 있어서의 임의의 차이는 최종 핑거프린팅에 있어서의 강도의 비로서 유지된다. 짝이름과 남음의 함수인 겔에 있어서의 단일 레인 내에서 밴드의 강도 사이에는 어떠한 중요한 관계도 없다. 그러나, 레인 사이의 비는 각각의 샘플링된 RNA에 대해 상이하게 표현된 RNA를 검출하는 것을 허용한다. 샘플사이의 출발 물질의 비는 심지어 사이클의 횟수가 충분하여 포화시키기 위해 PCR 반응을 허용하는 경우에도 유지된다. 이는 포화에 도달하기 위해 필요한 이중화의 수가 대다수의 핑거프린트를 형성하는 불변하는 생성물에 의해 거의 완전하게 조절된다. 이와 관련하여, PCR 핑거프린팅은 샘플들 사이의 출발 물질의 비가 생성물을 증폭의 지수상태에서 샘플링하지 않으면 유지되지 않는 단일 생성물의 통상적인 PCR과는 상이하다.

본 발명에 따른 방법의 하나의 실시양태내에서, 예를 들어, 생물학적 샘플에서 RNA 핑거프린팅 기술을 사용하여 핵산 분자의 정체를 결정하거나, 선택되는 핵산 분자를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 간단하게, 이러한 방법은 일련의 태그된 핵산 단편을 형성하는 단계를 포함한다. PCR에 의해 또는 유사한 증폭 도식에 의해 제조되는 단편은 연속적으로 크기에 의해 분리된다. 크기 분리 단계는 예를 들어, 겔 전기영동(예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동) 또는 바람직하게는 HPLC를 포함하는 임의의 본원에 기재된 기술을 사용하여 성취할 수 있다. 이어서 태그는 분리된 단편으로부터 절단되고, 각각의 검출 기술에 의해 검출된다. 적합한 기술의 예는 예를 들어, 질량 분광 분석법, 적외선 분광 분석법, 정전위 전류법 또는 UV 분광 분석법을 포함한다. 임의의 제공된 핵산 단편의 상대적인 양은 중요하지 않지만, 밴드의 크기는 대조 샘플에 대해 참조하는 경우, 정보를 제공한다.

#### 4. 형광계 PCR 일본쇄 구조 다형성(PCR-SSCP)

RFLP 방식 이외에 다수의 방법이 염기 치환 다형성을 분석하는데 이용할 수 있다. 오리타(Orita) 등은 변성 DNA에 있어서 구조적 차이에 기초하여 이들 다형성을 분석하는 방식을 제공하고 있다. 간단하게, 제한 효소 절단 또는 PCR을 사용하여 비교적 작은 DNA 단편을 제조한 다음 변성시키고 미변성된 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동에 의해 분리시킨다. 염기 치환으로부터 제조되는 일본쇄 DNA 단편에 있어서의 구조적 차이는 전기영동 이동성 변화에 의해 검출된다. 쇠내 염기쌍 형성은 고도의 서열-특이적이고 전기영동 이동성에 있어서 구별되는 일본쇄 구조를 형성한다. 그러나, 통상적인 SSCP를 사용하는 상이한 연구에 있어서 검출율은 대부분 수개의 상이한 조건을 필요로 하는 가장 높은 검출율과 함께 35% 내지 거의 100%의 범위이다. 원칙적으로 이 방법은 짧은 삽입 또는 결실에 근거하는 다형성을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법은 DNA에 있어서 점 돌연변이 및 결실을 검출하는 가장 강력한 도구중의 하나이다(참조: SSCP-PCR Dean et al., Cell 61:863, 1990).

본 발명에 따른 하나의 실시양태 내에서, 예를 들어, 생물학적 샘플에서 PCR-SSP 기술을 사용하여 핵산 분자의 정체를 결정하거나, 선택되는 핵산 분자를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 간단하게, 이러한 방법은 일련의 태그된 핵산 단편을 형성하는 단계를 포함한다. 이어서 PCR에 의해 형성되는 단편은 연속적으로 크기에 의해 분리된다. 바람직하게 크기 분리 단계는 비변성이고 핵산 단편은 분리 방법에 앞서 변성된다. 크기 분리 단계는 예를 들어, 겔 전기영동(예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동) 또는 바람직하게는 HPLC 기술을 사용하여 성취할 수 있다. 이어서 태그는 분리된 단편으로부터 절단되고, 이어서 태그는 각각의 검출 기술(예를 들어, 질량 분광 분석법, 적외선 분광 분석법, 정전위 전류법 또는 UV 분광 분석법)에 의해 검출된다.

#### 5. 디데옥시 핑거프린팅(ddF)

문헌[참조: ddF, Sarkar et al., Genomics 13:441, 1992]에 기술된 또다른 방법은 후진 및 전진 방식으로 시험되는 경우 사람의 IX 인자 유전자에서 100%의 단일-염기 변화를 검출한다. 게놈성 DNA가 헤모필리아 B를 사용하여 환자로부터 분석되는 경우 전체적으로 84개의 상이한 서열 변화 중의 84개가 검출된다.

간단하게, 유전자형 결정 또는 기타의 목적을 위해 태그를 적용함에 있어서, 사용할 수 있는 하나의 방법은 디데옥시-핑거프린팅이다. 이러한 방법은 생거(Sanger)의 서열분석 반응에 있어서 디데옥시-터미네이터를 사용한다. 이러한 방법의 원리는 다음과 같다: 서열분석할 표적 핵산을 표적 핵산에서 돌연변이되는 공지된 염기에 상보적인 보충하는 디데옥시-터미네이터를 보유하는 반응에 위치시킨다. 예를 들어, 돌연변이에 의해 A→G 변화가 일어나는 경우, 반응은 C 디데옥시-터미네이터 반응에서 수행될 수 있다. PCR 프라이머를 사용하여 관심대상의 표적 서열을 위치시키고 증폭한다. 추정되는 표

적 서열이 A→G 변화를 함유하는 경우, 서열 집단의 크기는 디데옥시-터미네이터를 증폭된 서열에 혼입시키기 때문에 변화한다. 이러한 태그의 특별한 적용에 있어서, 돌연변이의 경우 예측할 수 있는 크기를 보유하는 단편을 형성할 수 있다. 태그는 PCR 프라이머의 5'-말단에 부착시킬 수 있고 샘플의 형태 및 디데옥시-터미네이터 형태에 "맵"을 제공할 수 있다. PCR 증폭 반응을 수행하여 수득된 단편은 예를 들어, HPLC 또는 PAGE에 의해 크기에 의해 분리할 수 있다. 분리 과정의 마지막에, DNA 단편을 임시 참조 프레임에서 수집하고, 태그를 절단한 다음 돌연변이의 출현 또는 부재는 제공되는 디데옥시-터미네이터의 혼입에 의한 때 이른 쉐 터미네이터로 인해 쉐 길이에 의해 결정된다.

중요하게는 ddF가 디데옥시-중결 절편의 수득 또는 손실, 또는 하나 이상의 중결 절편 또는 생성물의 이동성 변화를 일으키는 것을 발견하였다. 따라서, 이러한 방법에 있어서, 기타의 분자량 단편의 고도의 배경값에서 하나의 단편의 이동성 변화를 조사한다. 제공된 돌연변이와 관련된 단편의 길이를 미리 알리는 이점이 있다.

본 발명에 따른 하나의 실시양태 내에서, 예를 들어, 생물학적 샘플에서 ddF 기술을 사용하여 핵산 분자의 정체를 결정하거나, 선택되는 핵산 분자를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 간단하게, 이러한 방법은 일련의 태그된 핵산 단편을 형성하는 단계에 이어서 크기에 따라 분리하는 단계를 포함한다. 바람직하게, 크기 분리 단계는 비변성이고 핵산 단편은 분리 방법에 앞서 변성된다. 크기 분리 단계는 예를 들어, 겔 전기영동(예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동) 또는 바람직하게는 HPLC 기술을 사용하여 성취할 수 있다. 이어서 태그는 분리된 단편으로부터 절단되고 이어서 태그는 각각의 검출 기술(예를 들어, 질량 분광 분석법, 적외선 분광 분석법, 일정 전위 전류법 또는 UV 분광 분석법)에 의해 검출된다.

## 6. 제한 맵 및 RFLP

제한 엔도뉴클레아제는 짧은 DNA 서열을 인식하고 이들의 특정한 부위에서 DNA 분자를 절단한다. 몇몇 제한 효소(희귀한 절단제)는 매우 종종 DNA를 절단하여, 소수의 매우 큰 단편(수천 내지 수백만의 bp)을 형성한다. 대부분의 효소는 더욱 빈번하게 DNA를 절단하여, 대다수의 작은 단편(백 내지 천의 bp)을 형성한다. 평균적으로 4-염기 인식 부위를 갖는 제한 효소는 조각의 길이 256염기를 형성하고 6-염기 인식 부위를 갖는 제한 효소는 조각의 길이 4000염기를 형성하며, 8-염기 인식 부위를 갖는 제한 효소는 64,000염기 길이를 형성한다. 수백의 상이한 제한 효소가 특징화되기 때문에, DNA는 다수의 상이한 작은 단편으로 절단될 수 있다.

DNA 다형성을 분석하기 위한 매우 다양한 기술이 개발되어져 왔다. 가장 광범위하게 사용되는 방법인 제한 단편 길이 다형성(RFLP) 방법은 제한 효소 분해, 겔 전기영동, 막에 대한 블롯팅 및 클로닝된 DNA 프로브에 대한 하이브리드화를 조합한다. 다형성은 블롯상의 표지된 단편의 길이에 있어서의 변화로서 검출된다. RFLP 방식을 사용하여 서열의 변화가 제한 효소 부위에 속하는 경우 염기 치환을 분석할 수 있거나 반복 단위의 외부를 절단하는 제한 효소를 선택함으로써 소위 성체(minisatellites)/VNTR을 분석할 수 있다. 아가로즈 겔은 통상적으로 단일 반복단위에 의해 달라지는 소위성체/VNTR 대립형질을 구별하기 위해 필요한 분해능을 허용하지 않지만, 다수의 소위성체/VNTR은 고도로 유익한 마커를 수득할 수 있을 정도로 가치가 있다.

본 발명에 따른 방법의 실시양태 내에서, 예를 들어, 생물학적 샘플에서 제한 맵형 또는 RFLP 기술을 사용하여 핵산 분자의 정체를 결정하거나, 선택되는 핵산 분자를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 간단하게, 이러한 방법은 형성되는 단편이 제한 효소에 의해 분해되는 일련의 태그된 핵산 단편을 형성하는 단계를 포함한다. 태그된 단편은 분해된 표적 핵산을 사용하여 태그된 프로브의 하이브리드화 단계를 수행함으로써 형성된다. 하이브리드화 단계는 제한 뉴클레아제 분해에 앞서 또는 후에 수행할 수 있다. 제조되는 분해된 핵산 단편은 크기에 의해 분리된다. 크기 분리 단계는 예를 들어, 겔 전기영동(예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동) 또는 바람직하게는 HPLC 기술을 사용하여 성취할 수 있다. 이어서 태그는 분리된 단편으로부터 절단되고, 이어서 태그는 각각의 검출 기술(예를 들어, 질량 분광 분석법, 적외선 분광 분석법, 일정 전위 전류법 또는 UV 분광 분석법)에 의해 검출된다.

## 7. DNA 핑거프린팅

DNA 핑거프린팅은 특정한 DNA 샘플로부터의 DNA 단편의 한 세트의 디스플레이를 포함한다. 현재 이용할 수 있는 다양한 DNA 핑거프린팅 기술은 대부분 단편을 형성하기 위해 PCR을 사용한다[참조: Jeffries et al., Nature 314:67, 1985; Welsh and McClelland, Nuc. Acids, Res. 19:861, 1991]. 사용할 핑거프린팅 기술은 예를 들어, DNA 타이핑, DNA 마커 맵핑 및 예를 들어, 원핵생물, 식물, 동물 및 사람과 같은 조사조건하의 유기체와 같은 적용에 의존하여 선택된다. 이러한 요건을 충족시키는 다수의 핑거프린팅 방법은 랜덤 증폭 다형성 DNA(RAPD), DNA 증폭 핑거프린팅(DAF) 및 임의로 자극된 PCR(AP-PCR)를 포함하여 과거 수년에 걸쳐 개발되어 왔다. 이들 방법은 모두 임의로 선택된 PCR 프라이머에 의한 랜덤 게놈성 DNA 단편의 증폭에 근거한다. DNA 단편 패턴은 사전의 서열에 관한 지식 없이 임의의 DNA중에 형성

될 수 있다. 형성되는 패턴은 PCR 프라이머의 서열 및 주형 DNA의 특성에 의존한다. PCR은 낮은 어닐링 온도에서 수행하여 프라이머가 DNA에서 다중 좌위에 어닐링되게 한다. DNA 단편은 프라이머 결합 부위가 증폭을 허용하는 거리 이내에 존재하는 경우 형성된다. 원칙적으로, 단일 프라이머는 밴드의 패턴을 형성하기에 충분하다.

DNA 핑거프린팅을 위한 신규한 기술은 AFLP로 명명되어 기술되어 왔다[참조: Voc et al., Nuc. Acids Res. 23:4407, 1995]. AFLP 기술은 PCR 증폭에 의한 게놈 제한 단편의 검출에 근거하고, 임의의 공급원 또는 복합물의 DNA를 위해 사용할 수 있다. 간단하게, 핑거프린팅은 제한된 세트의 유전자 프라이머를 사용하는 사전 서열 지식 없이 형성된다. 단일 반응에서 검출되는 단편의 수는 특정한 프라이머 세트의 선택에 의한 "동조(turn)"일 수 있다. 프라이머의 어닐링을 위해 엄격한 반응 조건이 사용되기 때문에 AFLP 기술은 강하고 믿을만 하다: RFLP 기술의 신뢰성은 PCR 기술력과 함께 조합된다.

본 발명에 따른 하나의 실시양태 내에서, 예를 들어, 생물학적 샘플에서 DNA 핑거프린팅 기술을 사용하여 핵산 분자의 정체를 결정하거나, 선택되는 핵산 분자를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 간단하게, 이러한 방법은 일련의 태그된 핵산 단편을 형성하는 단계에 이어서 크기에 따라 분리하는 단계를 포함한다. 크기 분리 단계는 예를 들어, 겔 전기영동(예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동) 또는 바람직하게는 HPLC 기술을 사용하여 성취할 수 있다. 이어서 태그는 분리된 단편으로부터 절단되고, 이어서 태그는 각각의 검출 기술(예를 들어, 질량 분광 분석법, 적외선 분광 분석법, 일정 전위 전류법 또는 UV 분광 분석법)에 의해 검출된다.

## 8. 유전자형 결정 및 다형성 검출에 대한 절단 가능한 태그의 적용

### a. 도입

소수의 공지된 사람의 DNA 다형성이 반복되지 않는 서열의 삽입, 결실 또는 기타의 재배열에 근거함에도 불구하고, 대다수는 단일 염기 치환 또는 직렬 반복의 수 변화에 근거한다. 염기 치환은 사람의 게놈에서 매우 충분하여 평균 매 200 내지 500bp마다 한번 발생한다. 직렬 반복체의 블록에 있어서의 길이의 변화는 산재된 다형성 부위(좌위로 명명된)의 수만큼 이상과 함께 게놈에 있어서 통상적이다. 직렬 반복체 다형성에 대한 반복 길이는  $(dA)_n(dT)_n$  서열에 있어서의 1bp로부터  $\alpha$ -부수체 DNA에 있어서의 170bp 이상의 범위이다. 직렬 반복 다형성은 10개 염기쌍의 전형적인 반복 길이 및 수만큼의 전체 반복 단위체를 갖는 소위성체/다양한 수의 직렬 반복체(VNTR=variable number of tandem repeat), 및 반복 길이가 6bp 이하이고 최대의 전체 길이가 약 70bp인 미세위성체로 이루어진 2개의 주요 그룹으로 분할될 수 있다. 최근까지 확인된 대부분의 미세위성체 다형성은  $(dC-dA)_n$  또는  $(dG-dT)_n$  디뉴클레오타이드 반복 서열에 근거한다. 미세위성체의 다형성의 분석은 반복 블록을 함유하는 DNA의 작은 단편의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 이어서 변성 폴리아크릴아미드 겔상에서의 증폭된 DNA의 전기영동에 의한 증폭을 포함한다. PCR 프라이머는 반복 블록을 플랭크하는 독특한 서열에 상보적이다. 아가로즈 겔이 아닌 폴리아크릴아미드 겔이, 통상적으로 대립 형질이 단지 단일 반복에 의해 크기에 있어서만 상이하기 때문에 미세위성체를 위해 사용된다.

따라서, 본 발명의 하나의 양태 내에서, (a) 선택되는 표적 분자로부터 특정 핵산 단편과 상호 관계가 있고 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그가 부착된 태그된 핵산 분자를 형성하며; (b) 태그된 분자를 서열의 길이에 의해 분리하고; (c) 태그된 분자로부터 태그를 절단하고; (d) 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 유기체의 유전자형을 결정함을 포함하여, 선택된 유기체의 유전자형을 결정하는 방법이 제공된다.

또다른 양태 내에서, (a) 특정 핵산 단편과 상호 관계가 있고 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그를 포함하는 태그된 분자의 표적 분자로서의 하이브리드화를 허용하는 조건하 및 충분한 시간 동안 태그된 핵산 분자를 선택된 표적 분자와 배합하며; (b) 태그된 분자를 서열의 길이에 의해 분리하고; (c) 태그된 분자로부터 태그를 절단하고; (d) 비형광 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 유기체의 유전자형을 결정함을 포함하여, 선택된 유기체의 유전자형을 결정하는 방법이 제공된다.

### b. 유전자형 결정에 대한 절단 가능한 태그의 적용

제한 단편 길이 다형성(REPL)을 확인하기 위한 PCR 방식은 특정한 PCR 프라이머와 관련된 겔 전기영동 및 태그의 검출을 조합한다. 일반적으로, 하나의 PCR 프라이머는 하나의 특정 태그를 보유할 수 있다. 따라서, 태그는 PCR 프라이머의 하나의 세트 및 미리 결정된 DNA 단편의 길이를 나타낼 수 있다. 다형성은 겔에 있어서 또는 겔로부터 용출하는 표지된 단편의 길이상의 변화로서 검출된다. 폴리아크릴아미드 겔 전기영동은 통상적으로 단일 반복 단위체에 의해 달라지는 소위성체/VNTR 대립형질을 구별하기 위해 필요한 분해능을 제공한다. 미세위성체 다형성의 분석은 반복 블록을 함유하는 DNA



의 작은 단편의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 이어서 변성 폴리아크릴아미드 겔 상에서의 증폭된 DNA의 전기영동 또는 HPLC에 의한 DNA 단편의 분리에 의한 증폭을 포함한다. 증폭된 DNA는 프라이머의 5' 말단에서 절단 가능한 태그를 갖는 프라이머를 사용하여 표지될 수 있다. 프라이머는 쇠 연장에 의해 새로 합성된 쇠에 혼입된다. PCR 프라이머는 반복 블록을 플랭크하는 독특한 서열을 상보적이다. 소위성체/VNTR 다형성은 위에서 기술된 미세위성체를 사용하는 경우만큼 증폭될 수 있다.

DNA 서열 다형성의 많은 형태에 관해 사람의 게놈 구조를 이해하기 위한 근본적인 기본을 기술하고 있다[참조: Botstein et al., Am. J. Human Genetics 32:p314, 1980; Donis-Keller, Cell 51:319, 1987; Weissenbach et al., Nature 359:794]. 연장된 구조의 연관 맵의 작제는 이러한 DNA 다형성을 사용함으로써 촉진되고 연관에 의한 질환 유전자의 국부화를 위한 실용적인 수단을 제공한다. 미세위성체의 디뉴클레오타이드 마커는 돌연변이를 함유하고 몇몇의 경우 질병을 유발하는 것으로 나타나는 사람의 유전자 확인에 있어서 매우 강력한 도구임을 증명한다. 게놈 디뉴클레오타이드 반복체는 다형성이고[참조: Weber, 1990, Genomic Analysis, Vol 1, pp 159-181, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Weber and Wong, 1993, Hum. Mol. Genetics, 2, p1123], 24개 이하의 대립형질을 보유할 수 있다. 미세위성체 디뉴클레오타이드 반복체는 PCR에 의해 디뉴클레오타이드 반복부를 둘러싼 독특한 영역을 상보적인 프라이머를 사용하여 증폭될 수 있다. 증폭 후, 크기 분리 단계에 앞서 몇몇 증폭된 좌위는 배합된다(복합된다). 증폭된 미세위성체 단편을 크기 분리 단계에 적용하고 크기 및 대립형질을 확인하는 공정은 유전자형 결정으로서 공지되어 있다. 고도의 복잡화를 허용하는 염색체 특이성 마커는 연관 분석을 위한 전체적인 게놈 스캔을 수행하기 위해 보고되어 왔다[참조: Davies et al., 1994, Nature, 371, p130].

태그는 미세위성체를 사용하여 유전자형을 결정하는데 효과적으로 사용될 수 있다. 간단하게, PCR 프라이머는 태그를 보유하도록 작제되고 주의 깊게 선택된 PC 반응에 사용되어 디-, 트리- 또는 테트라-뉴클레오타이드 반복체를 증폭시킨다. 이어서, 증폭 생성물을 HPLC 또는 PAGE와 같은 방법에 의해 크기에 따라 분리시킨다. DNA 단편은 일시적인 방식으로 수집하고, 각각의 DNA 단편으로부터 태그를 절단하고 크기 분리 단계에 있어서의 내부 표준에 대한 비교로부터 길이를 유추한다. 대립형질의 정체확인 은 증폭된 생성물의 크기에 대한 참조로부터 이루어진다.

유전자형의 결정에 대한 절단 가능한 태그를 사용하여 단일 분리 단계중 다중 샘플을 배합할 수 있다. 이를 수행할 수 있는 2개의 일반적인 방식이 있다. 고처리량 스크리닝을 위한 첫 번째 일반적인 방식은 개별물질의 큰 그룹으로 단일 다형성을 검출하는 것이다. 이러한 방식에 있어서 단일 또는 세트의 PCR 프라이머를 사용하고 각각의 증폭은 반응당 하나의 DNA 샘플 형태를 사용하여 이루어진다. 분리 단계에서 배합될 수 있는 샘플의 수는 검출 기술 상 형성될 수 있는 절단 가능한 태그의 수에 비례한다(예를 들어, 질량 분광 분석 태그에 대해 400 내지 600개). 따라서 동시에 개별 물질의 대형 그룹내에서 1 내지 수개의 다형성을 확인할 수 있다. 두 번째 방식은 단일 DNA 샘플상의 다수의 다형성을 정체확인할 수 있는 다중 세트의 PCR 프라이머를 사용하는 것이다(예를 들어, 개별적인 유전자형 결정). 이러한 방식에 있어서, PCR 프라이머는 상이한 길이의 PCR 생성물을 형성하는 단일 증폭 반응에서 배합된다. 각각의 프라이머 쌍 또는 세트는 각각의 PCR 단편을 특정 태그로 암호화할 수 있는 특정 절단 가능한 태그에 의해 암호화된다. 반응은 단일 분리 단계(하기 참조)에서 수행된다. 분리 단계에서 배합할 수 있는 샘플의 수는 검출기술 당 형성될 수 있는 절단 가능한 태그의 수에 비례한다(예를 들어, 질량 분광 분석 태그에 대해 400 내지 600개).

c. 돌연변이의 효소에 의한 검출 및 태그의 적용

이러한 특별한 적용분야 및 방법에 있어서, 이형이합체에서의 미스매치는 제공되는 핵산 이합체에 있어서 미스매치된 염기쌍의 효소에 의한 절단에 의해 검출된다. 돌연변이의 존재에 대해 실험할 DNA 서열은 특별한 세트의 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 증폭되고, 증폭된 생성물은 변성되고 변성된 참조 단편과 혼합되며 하이브리드화되어 이형이합체를 형성한다. 이어서, 이형이합체는 미스매치가 존재하는 경우 이합체를 인식하고 절단하는 효소로 처리한다. 이러한 효소는 뉴클레아제 S1, 녹두 뉴클레아제, "레졸바제", T4 엔도뉴클레아제 IV 등이다. 본질적으로 실험관 내에서 미스매치를 인식하는 임의의 효소를 사용할 수 있고 형성되는 미스매치를 절단할 수 있다. 적합한 효소를 사용하는 처리 후, DNA 이합체는 예를 들어, HPLC 또는 PAGE에 의해 크기에 의해 분리된다. DNA 단편을 임의로 수집한다. 태그를 절단하고 검출한다. 돌연변이의 존재는 야생형 참조 단편에 대해 단편의 이동성 변화에 의해 검출된다.

d. 올리고뉴클레오타이드 연결 검정(OLA)을 위한 태그의 적용

본래 문헌[참조: Landegren et al., Science 241:487, 1988]에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 연결 검정은 매우 크고 복잡한 게놈에 있어서의 (공지된) 서열의 정체확인을 위해 유용한 기술이다. OLA 반응의 원리는 제공된 DNA 표적상에서 서로 인접하여 하이브리드화하는 경우 2개의 진단 올리고뉴클레오타이드를 공유 결합시키는 리가아제의 성능에 근거한다. 프로브 접합부에서의 서열은 완전히 염기쌍이 형성되지 않는 경우, 프로브는 리가아제에 의해 결합될 수 없다."

상부(upstream)" 프로브의 3' 말단에 위치하는 경우 잠재적인 단일 염기 쌍 차이를 구별하는 열 안정성 리가아제의 성능은 단일 염기쌍 분해를 위한 기회를 제공한다[참조: Barony, PNAS USA 88:189, 1991]. 태그의 적용에 있어서, 태그는 증폭된 생성물에 연결되는 프로브에 부착될 수 있다. OLR의 완결 후, 단편을 크기에 근거하여 분리하고, 태그를 절단한 다음 질량 분광 분석에 의해 검출한다.

e. 서열 특이적 증폭

돌연변이 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 정상적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 보충하는 3' 말단을 갖는 PCR 프라이머를 사용하여 하나의 또는 기타의 대립형질을 선택적으로 증폭할 수 있다[참조: Newton et al., Nuc. Acids Res., 17, p2503; et al., 1989, Genomics, 5, p535; Okayama et al., 1989, J. Lab. Clin. Med., 114, p105; Sommer et al., 1989, Mayo Clin. Proc., 64, 1361; Wu et al., PNAS USA, 86, p2757]. 통상적으로, PCR 생성물은 PAGE에 의한 증폭 후 가시화되지만, 서열 특이성 증폭의 원리는 고체상 형식에 적용할 수 있다.

f. 몇몇 증폭에 근거하는 검정에 대한 태그의 잠재적인 적용

바이러스의 유전자형 결정: 태그의 잠재적인 적용은 태그된 프로브를 사용하는 하이브리드화에 의한 바이러스의 유전자형 결정 또는 정체확인이다. 예를 들어, F+ RNA 대장균 분해 과아지(coliphage)는 장내의 바이러스 오염을 위한 지시체로서 유용한 물질일 수 있다. 핵산 하이브리드화 방법에 의한 유전자형 결정은 신뢰할만하고, 신속하고, 간단하며, 저렴한 혈청형 결정에 대한 대안이다[참조: Kafatos et al., Nucleic Acids Res. 7:1541, 1979]. 증폭 기술 및 핵산 하이브리드화 기술은 이. 콜라이[E. coli; Feng, Mol. Cell Probes 7:151, 1993], 로타바이러스[rotavirus; Sethabutr et. al., J. Med Virol. 37:192, 1992], C형 간염 바이러스[hepatitis C virus; Stuyver et. al., J. Gen Virol. 74:1093, 1993] 및 단순포진 바이러스[herpes simplex virus; Matsumoto et. al., J. Virol. Methods 40:119, 1992]를 포함하는 각종 미생물을 분류하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다.

암에 있어서의 돌연변이 분석의 예후 적용: 다양한 실험상의 포유동물 및 사람의 신생물에 있어서 유전자의 변화가 기술되어 왔고 발암현상에서 관측되는 형태학적 변형의 순서에 대한 형태학적 기본을 나타낸다[참조: Vogelstein et al., NEJM 319:525, 1988]. 최근에 분자 생물학 기술의 발전으로, 특정한 염색체상의 대립형질 상실 또는 종양 억제 유전자의 돌연변이 뿐만 아니라 몇몇 발암 유전자(예를 들어, c-myc, c-jun 및 ras 패밀리에 있어서의 돌연변이가 대부분의 연구의 본질이 되었다. 이전의 작업[참조: Finkelstein et al., Arch Surg. 128:526, 1993]은 K-ras 발암 유전자에 있어서의 점 돌연변이의 특정한 형태 및 결장직장의 암종중 진단 단계 사이의 상호 관련성을 확인하였다. 결과는 돌연변이 분석에 의해 전이의 패턴 및 분산을 포함하는 종양 공격성에 대한 중요한 정보를 제공할 수 있는 것을 제안한다. 결장의 3기 암에서의 TP53 및 K-ras-2 돌연변이 분석의 예후 값은 보다 최근에 입증되었다(참조: Pricolo et al., Am. J. Surg. 171:41, 1996). 따라서, 종양 및 예비 암종 세포의 유전자형 결정 및 특정 돌연변이 검출이 사람에게 있어서의 암의 치료시 더욱 중요해질 것임은 분명하다.

C. 핵산 단편의 분리

분석이 필요한 샘플은 종종 복합 매트릭스중의 다수의 성분들의 혼합물이다. 공지되지 않은 성분을 함유하는 샘플에 있어서, 성분들은 각각 소로부터 분리되어 각각의 개별적인 성분들을 기타의 분석 방법에 의해 정체확인할 수 있어야 한다. 혼합물에 있어서의 성분들의 분리 특성은 일정한 조건하에 일정하고, 따라서 일단 결정되면 이들은 각각의 성분을 확인하고 측정하는데 사용될 수 있다. 이러한 과정은 크로마토그래피 및 전기영동 분석 분리에 있어서 전형적이다.

1. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 용액에 용해되는 화합물을 분리하기 위한 크로마토그래피 분리 기술이다. HPLC 장치는 이동상의 저장부, 펌프, 주입기, 분리 칼럼 및 검출기로 이루어진다. 화합물은 칼럼상에 샘플 혼합물의 분취량을 주입함으로써 분리된다. 혼합물에 있어서 상이한 성분은 이동 액체상과 고정상 사이에서의 이들의 분배 거동에 있어서의 차이로 인해 상이한 속도로 칼럼을 통과한다.

최근에 화학적으로 결합된 알킬 쇠를 갖는 비다공성 PS/DVB 입자상의 IP-RO-HPLC는 유사한 정도의 분해능을 제공하는 일 및 이분쇄 핵산의 분석에 있어서 모세관 전기영동에 대해 신속한 대안이 되는 것으로 나타난다[참조: Huber et al, Anal. Biochem. 212:351, 1993; Huber et al., 1993, Nuc. Acids Res. 21:1061; Huber et al., Biotechniques 16:898,

1993]. 쉐 길이의 함수로서 이분쇄 DNA를 항상 보유하지는 않는 이온-교환 크로마토그래피(AT 염기 쌍이 포지티브 하전된 고정상과 GC 염기쌍보다 더욱 강하게 상호 반응하기 때문에)에 대조적으로, IP-RO-HPLC는 엄격한 크기-의존 분리가 가능하다.

이온-쌍 제제로서 트리에틸암모늄 아세테이트 100mM을 사용하여 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드를 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 알킬화된 비다공성의 2.3 $\mu$ M 폴리(스티렌-디비닐벤젠) 입자상에서 성공적으로 분리할 수 있는 방법이 개발되었다[참조: Oefner et al., Anal. Biochem. 223:39, 1994]. 기재된 기술은 크기 범위 50 내지 200의 뉴클레오타이드 범위 내에 길이에 있어서 단지 4 내지 8의 염기 쌍이 차이 나는 PCR 생성물의 분리를 허용한다.

## 2. 전기영동

전기영동은 전기장에서 이온(또는 본원에 기술된 경우와 같이 DNA)의 이동성에 근거하는 분리 기술이다. 네가티브 하전된 DNA는 포지티브 전극 쪽으로 움직이고 포지티브-하전된 이온은 네가티브 전극 쪽으로 움직인다. 안전성의 이유로 인해, 하나의 전극은 통상적으로 지면에 있고 다른 하나는 포지티브 또는 네가티브로 바이어스된다. 하전된 종은 이들의 전체적인 전하, 크기 및 형태에 의존하여 상이한 이동 속도를 갖고 이에 따라 분리될 수 있다. 전극 장치는 고 전압 전력 공급원, 전극, 완충제 및 폴리아크릴아미드 겔 또는 모세관 튜브와 같은 완충제용 지지체로 이루어진다. 개방된 모세관 튜브는 많은 형태의 샘플을 위해 사용되고 기타의 겔 지지체는 통상적으로 단백질 혼합물 또는 DNA 단편과 같은 생물학적 샘플을 위해 사용된다.

## 3. 모세관 전기영동(CE)

다양한 조작(유리 용액, 이소타코포레시스, 등전점 포커싱, 폴리아크릴아미드 겔, 미셀 전동 "크로마토그래피")에 있어서 모세관 전기영동(CE)은 매우 적은 용적의 복합 혼합물의 신속한 고 분해 분리를 위한 방법으로서 개발되고 있다. MS의 고유의 민감성 및 선택성의 배합으로, CE-MS는 생분석을 위한 잠재적인 강력한 기술이다. 본원에 기술된 신규한 적용분야에 있어서, 이들 두 방법의 접촉에 의해 몇몇 정도로 현재 속도의 서열분석 방법을 능가하는 더욱 우수한 DNA 서열분석 방법을 유도할 수 있다.

CE 및 전기 분무 이온화(ESI) 유속 사이의 대응 및 이들 모두는 용액중의 이온 종에 의해 촉진된다는 (및 이를 위해 주로 사용되는) 사실은 매우 효과적인 배합에 대한 기본을 제공한다. 모세관 영역 전기영동(CZE) 및 ESI에 근거하는 모세관 4 중극 질량 분광 분석계를 사용하는 이소타코포레시스 둘 다의 배합은 기재되어 있다[참조: Olivares et al., Anal. Chem. 59:1230, 1987; Smith et al., Anal. Chem. 60:436, 1988; Loo et al., Anal. Chem. 179:404, 1989; Edmonds et al., J. Chroma. 474:21, 1989; Loo et al., J. Microcolumn Sep. 1:223, 1989; Lee et al., J. Chromatog. 458:313, 1988; Smith et al., J. Chromatog. 480:211, 1989; Grese et al., J. Am. Chem. Soc. 111:2835, 1989). 작은 펩타이드는 우수한(펩토몰) 민감성으로 용이하게 CZE 분석할 수 있다.

DNA 단편에 대한 가장 강력한 분리 방법은 일반적으로 슬랩 겔 형태로 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)이다. 그러나, 현재의 기술의 대부분의 한계는 서열분석 반응에서 제조되는 DNA 단편의 겔 전기영동을 수행하는데 비교적 긴 시간이 필요하다는 것이다. 매우 얇은 겔을 사용하는 모세관 전기영동을 사용하여 증가된 배수(10배)로 성취할 수 있다. 첫 번째 어려움에 대한 유리용액에 있어서, 모든 DNA는 염기를 가함으로써 질량 및 전하가 보상됨에 따라 동일한 이동성으로 움직인다. 폴리아크릴아미드 겔에 있어서, DNA 단편은 길이의 함수로서 걸러지고 이동하며, 이러한 방식은 CE에 적용된다. 이제 가교 결합된 폴리아크릴아미드를 사용하여 미터당 현저한 플레이트 수가 성취된다[참조: 미터당  $10^{+7}$  플레이트, Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:9660, 1988]. 기술된 바와 같이 이러한 CE 칼럼은 DNA 서열분석을 위해 사용할 수 있다. CE의 방법은 원칙적으로 표준 서열 분석기에서 슬랩 겔 전기영동보다 25배 더 빠르다. 예를 들어, 약 300개의 염기가 시간당 관독될 수 있다. 분리 속도는 과도하게 열을 형성하지 않고 겔에 적용할 수 있는 전기장을 증폭시킴으로써 슬랩 겔 전기영동에 한정된다. 따라서, CE의 더욱 빠른 속도는 더욱 높은 전기장의 세기를 사용함으로써 성취된다(CE에 있어서 300V/cm 대 슬랩 겔 전기영동에 있어서 10V/cm). 모세관의 형태는 전류량 및 전력을 감소시키고 열의 형성을 감소시킨다.

문헌[참조: Smith et al., Nuc. Acide. Res. 18:4417, 1990]은 처리량을 증가시키기 위해 다중 모세관을 병렬로 사용하는 것을 제안하고 있다. 유사하게, 문헌[참조: Mathies and Huang, Nature 359:167, 1992]은 모세관들의 병렬 배열상에서 분리가 수행되고 고도의 처리량의 서열 분석을 나타내는 모세관 전기영동을 소개하고 있다[참조: Huang et al., Anal. Chem. 64:967, 1992, Huang et al., Anal. Chem. 64:2149, 1992]. 모세관 전기영동의 주요 단점은 모세관에 가할 수 있는 샘플의 양이 제한된다는 것이다. 분리에 앞서 다량의 샘플을 모세관의 개시시 농축시킴으로써 부하량이 증가되고, 검출

농도를 수배 저하시킬 수 있다. CE에 있어서 가장 대중적인 예비농축 방법은 샘플의 스택킹(stack)이다. 샘플 스택킹은 최근에 검토되었다[참조: Chien and Burgi, Anal. Chem. 64:489A, 1992]. 샘플 완충액 및 모세관 완충제 사이에서 샘플 스택킹은 매트릭스 차이. (pH, 이온강도)에 의존하여, 샘플 영역을 가로지르는 전기장은 모세관 영역에서보다 더 강하다. 샘플의 스택킹에 있어서, 저농도의 완충제중 대형 용적의 샘플을 모세관 칼럼의 선단에서 예비 농축을 위해 도입한다. 모세관은 조성이 동일하지만 농도는 더 높은 완충액으로 충전된다. 샘플 이온이 모세관 완충액 및 더욱 낮은 전기장에 도달하는 경우, 이들은 농축 영역내로 스택킹된다. 샘플의 스택킹은 검출성능이 1 내지 3배 증가시킨다.

예비 농축의 또다른 방법은 분석물질의 유리영역 CE 분리에 앞서 이소타코포레시스(ITP)를 적용하는 것이다. ITP는 전형적으로는 CE와 관련된 낮은 nL 주입 용적을 대조적으로 마이크로리터 용적의 샘플을 모세관에 부하하는 것을 허용하는 전기영동 기술이다. 이 기술은 샘플을 각각 분석물질 보다 더욱 높은 가동성 및 더욱 낮은 가동성의 2개의 완충액(전해질을 유도하고 끌어내리는) 사이에 삽입하는 것에 의존한다. 이 기술은 본래 농축 기술로서, 동일한 속도로 순수한 영역 속으로 분석물질을 농축시킨다. 현재 이 기술은 전해질을 유도하고 끌어내리는 몇몇 선택을 필요로 하고 분리공정시 단지 양이온성 또는 음이온성 물질만을 분리시키는 성능을 필요로 하고 때문에, 위에서 기술한 스택킹 방법보다는 덜 대중적이다.

DNA 서열분석 공정의 주요사항은 DNA 또는 올리고뉴클레오타이드 단편의 주목할만 하게 선택적인 전기영동 분리이다. 이는 예를 들어, 각각의 단편이 분리되고 단지 하나의 뉴클레오타이드가 상이하게 때문에 주목할만하다. 1000개 단편(1000bp)에 이르는 분리를 수득한다. 절단 가능한 태그를 사용하는 서열 분석의 추가의 이점은 다음과 같다. 절단 가능한 태그가 사용되는 경우, DNA 단편이 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리되면 슬랩 겔 형태를 사용할 필요가 없다. 다수의 샘플이 배합되기 때문에(4 내지 2000), 염료-프라이머 또는 염료-터미네이터 방법(즉 ABI373 서열 분석기)을 사용하는 경우와 같이 샘플을 병렬로 수행할 필요가 없다. 병렬 레인을 수행할 이유가 없기 때문에, 슬랩 겔을 사용할 이유가 없다. 따라서, 전기영동 분리 방법에 대한 튜브 겔 형태를 사용할 수 있다. 문헌[참조: Grossman et al., Genet. Anal. Tech. Appl. 9:9, 1992]은 튜브 겔 형태가 슬랩 겔 형태 대신 사용되는 경우 수득되는 상당한 이점을 나타낸다. 이는 더욱 신속한 수행시간(50%까지)을 초래하는 슬랩 겔에 비해 튜브 형태에서 줄 열(Joule heat)을 분산시키는 성능이 더 크고 고분자량 DNA 단편(1000nt 이상)의 더욱 높은 분해능으로 인한 것이다. 긴 관독은 게놈 서열 분석에 있어서 중요하다. 따라서, 서열분석에 있어서 절단 가능한 태그를 사용함으로써 사용자가 가장 높은 분해능을 보유하는 가장 유효하고 민감한 DNA 분리 방법을 사용하는 것을 허용하는 추가의 이점을 갖는다.

#### 4. 미세 조립된 장치

모세관 전기 영동(CE)은 DNA 서열분석, 범의학적 분석, PCR 생성물의 분석 및 제한 단편의 크기화를 위한 강력한 방법이다. CE는 모세관 겔을 사용시 훨씬 높은 전위장을 적용할 수 있기 때문에, 통상적인 슬랩 PAGE 보다 훨씬 더 빠르다. 그러나, CE는 겔당 단지 하나의 샘플만이 처리된다는 단점이 있다. 본 방법은 CE의 더욱 빠른 분리 시간과 다중 샘플을 병렬로 분석하는 성능을 조합한다. 미세 조립된 장치를 사용하는 근처에 중요한 개념은 레인의 크기를 약 100 $\mu$ m로 최소화함으로써 전기영동에 있어서의 정보 밀도를 증가시키는 성능이다. 전자 산업분야는 통상적으로 미세 조립을 사용하여 크기가 1 $\mu$  미만의 특성을 갖는 회로를 제조한다. 모세관 배열의 전류 밀도는 모세관 튜브의 외부 직경에 제한된다. 채널의 미세 조립은 고밀도의 배열을 형성한다. 또한, 미세 조립은 유리섬유를 사용하는 경우 가능하지 않은 물리적 조립을 허용하고 채널을 직접 칩상의 기타의 장치에 결합시킨다. 분리 기술을 위해 마이크로칩상에 구성되는 장치는 거의 없다. 가스 크로마토그래피[참조: Terry et al., IEEE Trans. Electron Device, ED-26:1880, 1979] 및 액체 크로마토그래피[참조: Manz et al., Sens. Actuators B1:249, 1990]는 실리콘 칩상에서 조립되지만, 이들 장치는 광범위하게 사용되지 않는다. 몇몇 그룹은 미세 조립된 장치상에서 형광 염료 및 아미노산을 분리하는 것에 대해 보고하였다[참조: Manz et al., J. Chromatography 593:253, 1992, Effenhauser et al., Anal. Chem. 65:2637, 1993]. 최근에는 광 리소그래피 및 화학적 에칭을 사용하여 유리 기판상에 다수의 분리 채널을 제조하는 것을 나타내고 있다[참조: Woolley and Mathies, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:11348, 1994]. 채널은 하이드록시에틸 셀룰로즈(HEC) 분리 매트릭스로 충전된다. 이는 DNA 제한 단편이 2분 정도의 단시간에 분리될 수 있음을 나타낸다.

#### D. 태그의 절단

위에서 기술한 바와 같이, 상이한 링커의 디자인으로 상이한 특정한 물리적 또는 화학적 조건하에 절단성능("불안정성")을 부여할 수 있다. 다양한 디자인의 링커를 절단하기 위해 사용되는 조건의 예는 산, 염기, 산화, 환원, 불소, 티올 교환, 광분해, 및 효소에 의한 조건을 포함한다.

위에서 나열한 링커에 대한 일반적인 표준을 만족시키는 절단 가능한 링커의 예는 당해 기술분야의 숙련자들에게 익히 공지되어 있고 제조업체(Pierce, Rockford, IL)로부터 입수할 수 있는 카탈로그에 나타나 있는 것을 포함한다. 이들의 예는 다음을 포함한다:

- 에틸렌 글리코비스(석신이미딜석시네이트)(EGS), 하이드록실아민에 의해(1M 37°C에서 3 내지 6시간 동안) 절단할 수 있는 아민 반응성 가교 결합제;
- 디석신이미딜 타르타레이트(DST) 및 설폰-DST, 0.015M의 과요오드화나트륨에 의해 절단할 수 있는 아민 반응성 가교 결합제;
- 비스[2-(석신이미딜옥시카보닐옥시)에틸]설폰(BSOCOES) 및 설폰-BSOCOES, 염기(pH 11.6)에 의해 절단할 수 있는 아민 반응성 가교 결합제;
- 1,4-디-[3'-(2'-피리딜디티오(프로피온아미도))부탄(DPDPB), 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 피리딜디티올 가교 결합제;
- N-[4-(p-아지도살리실아미도)-부틸]-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미드(APDP), 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 피리딜디티올 가교결합제;
- 비스-[베타-4-(이지도살리실아미도)-에틸]디설파이드, 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 광 반응성 가교 결합제;
- N-석신이미딜-(4-아지도페닐)-1,3'-디티오프로피오네이트(SADP), 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 광 반응성 가교 결합제;
- 설폰석신이미딜-2-(7-아지도-4-메틸쿠마린-3-아세트아미드)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(SAED), 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 광 반응성 가교 결합제;
- 설폰석신이미딜-2-(m-아지도-o-니트로벤즈아미도)-에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(SAND), 티올 교환 또는 환원에 의해 절단할 수 있는 광 반응성 가교 결합제.

절단할 수 있는 링커 및 태그를 방출하기 위해 사용할 수 있는 절단 조건의 기타의 예는 다음과 같다. 실릴 결합 그룹은 불소화물에 의해 또는 산성 조건하에 절단될 수 있다. 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-니트로벤질옥시 또는 2-, 3-, 5- 또는 6-치환된-4-니트로벤질옥시 결합 그룹은 광자 공급원(광분해)에 의해 절단될 수 있다. 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-알콕시페녹시 또는 2-, 3-, 5- 또는 6-치환된-4-알콕시페녹시 결합 그룹은  $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ (산화)에 의해 절단될 수 있다.  $NCO_2$ (우레탄) 링커는 수산화물(염기), 산 또는  $LiAlH_4$ (환원)에 의해 절단될 수 있다. 3-펜테닐, 2-부테닐 또는 1-부테닐 결합 그룹은  $O_3$ ,  $O_5O_4/IO_4^-$ , 또는  $KMnO_4$ (산화)에 의해 절단될 수 있다. 2-[3-, 4- 또는 5-치환된-푸릴]옥시 결합 그룹은  $O_2$ ,  $Br_2$ , MeOH 또는 산에 의해 절단될 수 있다.

기타의 불안정성 결합 그룹의 절단 조건은 다음을 포함한다: t-알킬옥시 결합 그룹은 산에 의해 절단될 수 있다; 메틸(디알킬)메톡시 또는 4-치환된-2-알킬-1,3-디옥솔란-2-일 결합 그룹은  $H_3O^+$ 에 의해 절단될 수 있다; 2-실릴에톡시 결합 그룹은 불소화물 또는 산에 의해 절단될 수 있다; 2-(X)-에톡시(여기서, X는 케토, 에스테르, 아미드, 시아노,  $NO_2$ , 설파이드, 설폭사이드, 설폰이다) 결합 그룹은 알칼리성 조건하에 절단될 수 있다; 2-, 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-벤질옥시 결합 그룹은 산 또는 환원 조건하에 절단될 수 있다; 2-부테닐옥시 결합 그룹은  $(Ph_3P)_3PhCl(H)$ 에 의해 절단될 수 있다; 3-, 4-, 5- 또는 6-치환된-2-브로모페녹시 결합 그룹은 Li, Mg 또는 BuLi에 의해 절단될 수 있다; 메틸티오메톡시 결합 그룹은  $Hg^{2+}$ 에 의해 절단될 수 있다; 2-(X)-에틸옥시(여기서, X는 할로젠이다) 결합 그룹은 Zn 또는 Mg에 의해 절단될 수 있다; 2-하이드록시에틸옥시 결합 그룹은 산화(예를 들어,  $Pb(OAc)_4$ )에 의해 절단될 수 있다;

바람직한 링커는 산 또는 광분해에 의해 절단되는 링커이다. 고체상 썬타이드 합성을 위해 개발되어 온 몇몇 산-불안정성 링커는 태그를 MOI에 결합시키기 위해 유용하다. 이들 링커중의 몇몇은 최근의 문헌[참조: Lloyd-Williams et al., Tetrahedron 49:11065-1113, 1993]에 기술되어 있다. 링커의 하나의 유용한 형태는 p-알콕시벤질 알콜에 근거하며, 이들중 2개의 4-하이드록시메틸페녹시아세트산 및 4-(4-하이드록시메틸-3-메톡시페녹시)부티르산은 시판중이다[제조사: Acvanced ChemTech(Louisville, KY)]. 두 링커 모두는 벤질알콜에 대한 에스테르 결합을 통해 태그에 부착될 수 있

고, 카복실산에 대한 아미드 결합을 통해 아민을 함유하는 MOI에 부착될 수 있다. 이들 분자에 의해 결합된 태그를 트리플루오로아세트산의 농도를 변화시키면서 MOI로부터 방출된다. 이들 링커의 절단에 의해 태그상의 카복실산이 방출된다. 2,4-디메톡시-4'-(카복시메틸옥시)-벤즈하이드릴아민(제조사: Advanced ChemTech, Fmoc-보호된 형태)과 같은 관련된 링커를 통해 부착된 태그의 산 절단은 방출된 태그상의 카복실 아미드의 방출을 유도한다.

또한, 이러한 적용 분야에 유용한 광불안정성 링커는 대부분의 고체상 펩타이드 합성을 위해 개발되었다[참조: Lloyd-Williams review]. 이들 링커는 통상적으로 2-니트로벤질에스테르 또는 2-니트로벤질아미드에 근거한다. 최근에 문헌에 기록된 광불안정성 링커의 2개의 예는 4-(4-(1-Fmoc-아미노)에틸)-2-메톡시-5-니트로페녹시)부탄산[참조: Holmes and Jones, J. Org. Chem. 60:2318-2319, 1995] 및 3-(Fmoc-아미노)-3-(2-니트로페닐)프로피온산[참조: Brown et al., Molecular Diversity 1:4-12, 1995]이다. 이들 두 링커 모두는 카복실산을 통해 MOI중의 아민에 부착된다. 태그의 링커에 대한 부착은 태그상의 카복실산과 링커상의 아민 사이에 아미드를 형성함으로써 이루어진다. 광불안정 링커의 절단은 통상적으로 당해 기술분야에 공지된 강도 및 시간에서 파장 350nm의 UV 광을 사용하여 수행된다. 광화학적 절단을 위한 장치의 제조원의 예는 Aura Industries Inc.(Staten Island, NY) 및 Agrenetics(Wilmington, WA)이다. 링커가 절단됨으로써 태그상의 1급 아미드가 방출된다. 광 절단 가능한 링커의 예는 니트로페닐 글리신 에스테르, 엑소- 및 엔도-2-벤조노르보르네일 클로라이드 및 메탄 설포네이트 및 3-아미노-3(2-니트로페닐)프로피온산을 포함한다. 효소에 의한 절단의 예는 에스테르 결합을 절단할 수 있는 에스테라제, 포스포디에스테르 결합을 절단할 수 있는 뉴클레아제, 펩타이드 결합을 절단하는 프로테아제 등을 포함한다.

#### E. 태그의 검출

전형적으로 검출 방법은 분광장의 몇몇 형태로 흡수 및 방출에 의존한다. 원자 또는 분자가 광을 흡수하는 경우, 도입되는 에너지는 양자화된 구조를 더욱 고도의 에너지 수준으로 여기시킨다. 여기의 형태는 광의 파장에 의존한다. 전자는 자외선 또는 가시광선에 의해 더욱 높은 궤도로 촉진되고, 분자 진동은 적외선에 의해 여기되며, 회전은 전자파에 의해 여기된다. 흡수 스펙트럼은 파장의 함수로서 흡광도이다. 원자 또는 분자의 스펙트럼은 이의 에너지 수준의 구조에 의존한다. 흡수 스펙트럼은 화합물의 정체 확인에 유용하다. 특정한 흡수 분광 분석법은 전자 흡수 분광 분석(AA), 적외선 분광 분석(IR) 및 UV-가시광 분광 분석(uv-vis)을 포함한다.

높은 에너지 수준으로 여기되는 원자 또는 분자는 방사선을 방출함에 따라 더욱 낮은 수준으로 감퇴될 수 있다. 이러한 광의 방출은 동일한 스핀 상태 사이에서 전이가 존재하는 경우에는 형광으로, 상이한 스핀 상태 사이에서 전이가 존재하는 경우에는 인광으로 불리운다. 분석물질의 방출 강도는 농도(저농도에서)에 선형으로 비례하고, 방출 종을 정량화하는데 유용하다. 특정한 방출 분광 분석 방법은 원자 방출 분광 분석(AES), 원자 형광 분광 분석(AFS), 분자 레이저 유도된 형광(LIF) 및 X-레이 형광(XRF)을 포함한다.

전자기 방사선이 물질을 통과하는 경우, 대부분의 방사선은 이의 본래의 방향으로 계속되지만, 소량의 단편이 다른 방향으로 산란된다. 동일한 파장에서 도입 광으로서 산란되는 광은 라이레이(Rayleigh) 산란으로 불리운다. 진동(음향양자)으로 인해 투명한 고체에서 산란되는 광은 브릴루인(Brillouin) 산란으로 불리운다. 브릴루인 산란은 전형적으로 입사광으로부터 0.1 내지 1파수 만큼 이동한다. 불투명한 고체에서 분자 또는 광학 음향양자에 있어서의 진동으로 인해 산란하는 광은 라만(Raman) 산란으로 불리운다. 라만 산란된 광은 입사광으로부터 4000파수 만큼 이동한다. 특정한 산란 분광 분석 방법은 라만 분광 분석을 포함한다.

IR 분광 분석은 샘플에 의해 중-적외선의 흡수파장 및 강도를 측정한다. 중-적외선(2.5 내지 50 $\mu\text{m}$ , 4000 내지 200 $\text{cm}^{-1}$ )은 분자 진동을 더욱 높은 에너지 수준으로 여기시키기에 충분히 강력하다. IR 흡수 밴드의 파장은 화학 결합의 특정한 형태에 특성이고 IR 스펙트럼은 일반적으로 유기분자 및 유기금속 분자의 정체확인을 위해 가장 유용하다.

근-적외선 흡수 분광 분석(NIR)은 샘플에 의해 근-적외선의 흡수파장 및 강도를 측정한다. 중-적외선은 800nm 내지 2.5 $\mu\text{m}$ (12,500 내지 4000 $\text{cm}^{-1}$ )의 범위이고 분자 진동의 상응 및 조합을 더욱 높은 에너지 수준으로 여기시키기에 충분히 강력하다. NIR 분광 분석은 전형적으로 유기 작용성 그룹, 특히 O-H, N-H 및 C=O의 양적 측정을 위해 사용된다. NIR 기구의 성분 및 디자인은 uv-vis 흡수 분광 분석기와 유사하다. 광 공급원은 통상적으로 텅스텐 램프이고 검출기는 통상적으로 PbS 고체-상태 검출기이다. 샘플 홀더는 유리 또는 석영일 수 있고 전형적인 용매는  $\text{CCl}_4$  및  $\text{CS}_2$ 이다. NIR 분광 분석의 편리한 기구조작은 온-라인 모니터링 및 공정 제어에 적합하다.

자외선 및 가시광선 흡수 분광 분석(uv-vis=Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy)은 샘플에 의해 근-자외선 및 가시광선의 흡수파장 및 강도를 측정한다. 진공 UV에서 흡수는 100 내지 200nm에서 일어나고; ( $10^5$  내지  $50,000\text{cm}^{-1}$ ) 석영 UV는 200 내지 350nm에서; ( $50,000$  내지  $28,570\text{cm}^{-1}$ ) 및 가시광은 350 내지 800nm에서; ( $28,570$  내지  $12,500\text{cm}^{-1}$ ) 비어-램버트-보겟 법칙(Beer-Lambert-Bouguet law)에 의해 기술된다. 자외선 및 가시광선은 외부 전자를 더욱 높은 에너지 수준으로 촉진시키기에 충분히 강력하다. uv-vis 분광 분석은 통상적으로 분자 및 무기 이온 또는 용액중의 복합물에 적용된다. uv-vis 스펙트럼은 스펙트럼의 넓은 형태에 의해 제한된다. 광 공급원은 통상적으로 uv 측정을 위해 수소 또는 중수소 램프이고 가시광선 측정을 위해 텅스텐 램프이다. 이러한 연속 광 공급원의 파장은 프리즘 또는 그레이팅 모노크로미터와 같은 파장 분리기를 사용하여 선택된다. 스펙트럼은 파장 분리기를 스캐닝함으로써 취득되고 양적인 측정은 스펙트럼으로부터 또는 단일 파장에서 이루어질 수 있다.

질량 분광 분석기는 각각 서로로부터 분리하기 위해 이온화 원자 또는 분자의 질량 대 전하 비(m/z)에 있어서의 차이를 사용한다. 질량 분광 분석은 원자 또는 분자의 정량화에 유용하고 분자에 관한 화학적 및 구조적 정보를 결정하는데 유용하다. 분자는 화합물의 정체를 확인하는 구조 정보를 제공하는 독특한 단편화 패턴을 갖는다. 질량 분광 분석기의 일반적인 조작은 다음과 같다. 기체상 이온을 형성하고, 이온을 이들의 질량 대 전하 비에 근거하는 공간 또는 시간으로 분리하고, 각각의 질량 대 전하의 비의 이온 양을 측정한다. 질량 분광 분석기의 이온 분리력은  $R=m/\Delta m$ 으로서 정의되는 분해능에 의해 기술되며, 이때 m은 이온 질량이고  $\Delta m$ 은 질량 스펙트럼에서 2개의 분해 가능한 피크사이의 질량에 있어서의 차이이다. 예를 들어, 분해능이 1000인 질량 분광 분석기는 m/z가 100.1인 이온으로부터 m/z가 100.0인 이온을 분해할 수 있다.

일반적으로 질량 분광 분석기(MS)는 이온 공급원, 질량 선택적 분석기 및 이온 검출기로 이루어진다. 자기 부문, 4중극 및 비행 시간형 디자인도 이온을 공급원의 영역으로부터 질량 분석기로 이동시키기 위한 연장 및 가속 이온 광학을 필요로 한다. 몇몇 질량 분석기 디자인(예를 들어, 자기 부문 MS, 4중극 MS 또는 비행 시간형 MS)의 세부사항은 다음에 논의된다. 자기 부문 MS에 대한 단일 포커싱 분석기는 입자 빔 경로 180, 90 또는 60도를 사용한다. 입자에 영향을 미치는 다양한 힘이 상이한 질량 대 전하의 비로 이온을 분리시킨다. 2중 포커싱 분석기를 사용하여 정전 분석기를 이러한 형태의 기구에 부착하여 동적 에너지가 상이한 입자를 분리한다.

4중극 MS를 위한 4중극 질량 필터는 병렬로 배열된 4개의 금속 봉으로 이루어져 있다. 적용되는 전압은 4개의 봉들 사이에 집중된 비행 경로 하부로 이동하는 이온의 궤도에 영향을 미친다. 제공되는 DC 및 AC 전압에 대해, 4중극 필터를 통과하는 특정한 질량 대 전하의 비의 이온 및 기타의 모든 이온은 그들의 본래의 경로를 이탈한다. 질량 스펙트럼은 봉상의 전압이 변함에 따라 4중극 필터를 통과하는 이온을 모니터링함으로써 취득된다.

비행 시간형 질량 분광 분석기는 "드리프트 영역(drift region)"을 통한 이동시간에 있어서의 차이를 사용하여 상이한 질량의 이온을 분리한다. 이는 펄스 모드에서 작동하여 이온을 펄스에서 제조 및/또는 펄스에서 추출시켜야 한다. 펄스 전기장은 모든 이온을 동적 에너지 qV를 갖는 장-유리 드리프트 영역으로 가속시키고, 이때 q는 이온 전하이므로 V는 적용되는 전압이다. 이온의 동적 에너지가  $0.5\text{mV}^2$ 이기 때문에, 더욱 가벼운 이온은 무거운 이온 보다 더 높은 전압을 갖고 더욱 신속하게 드리프트 영역의 말단에서 검출기에 도달한다. 이온 검출기의 출력은 시간의 함수로서 오실로스코프상에 디스플레이되어 질량 스펙트럼을 형성한다.

이온의 형성공정은 질량 분광 분석을 위한 출발점이다. 화학적 이온화는 분석물질의 분자(태그)와 반응하는 제제 이온을 사용하여 광자 또는 하이브리드 전이에 의해 이온을 형성하는 방법이다. 제제 이온은 과량의 메탄(태그에 대해)을 전자 충격(EI)이온 공급원에 도입함으로써 제조된다. 전자의 충돌은 메탄과 추가로 반응하여  $\text{CH}_5^+$  및  $\text{C}_2\text{H}_5^+$ 를 형성하는  $\text{CH}_4^+$  및  $\text{CH}_3^+$ 를 생성시킨다. 태그를 이온화하는 또다른 방법은 플라즈마 및 글로우 방전에 의한 것이다. 플라즈마는 원자를 효과적으로 여기시키고 이온화시키는 뜨겁고 부분적으로 이온화된 기체이다. 글로우 방전은 2개의 전극 사이에 유지되는 저압 플라즈마이다. 전자 충격 이온화는 통상적으로 텅스텐 필라멘트로부터 생성되는 전자 빔을 사용하여 기체상 원자 또는 분자를 이온화시킨다. 빔으로부터의 전자는 전자를 분석물의 원자 또는 분자로부터 분리시켜 이온을 형성한다. 전기 분무 이온화는 매우 세밀한 니들 및 일련의 스키머를 사용한다. 샘플 용액은 공급원 챔버속에 분무되어 점적을 형성한다. 점적은 출구가 모세관인 경우 전하를 보유하고 용매가 증발함에 따라 점적은 고도로 하전된 분석물질의 분자를 이탈하면서 사라진다. ESI는 증발 또는 이온화시키기 곤란한 대형 생물학적 분자에 대해 유용하다. 고속 원자의 충격(FAB)은 고체 샘플에 충돌하여 탈착 및 이온화를 일으키는, 중성원자, 전형적으로는 Xe 또는 Ar의 고에너지 빔을 사용한다. 이는 기체상을 형성하기가 곤란한 대형 생물학적 분자에 사용된다. FAB는 거의 단편화를 유발하지 않고 통상적으로 대형 분자의 이온 피

크를 제공하여 분자량 결정에 유용하게 된다. 원자 빔은 이온 공급원으로부터 전하 교환 셀을 통해 이온을 가속시킴으로써 제조된다. 이온은 중성 원자와의 충돌에서 전자를 회복하여 고에너지 원자의 빔을 형성한다. 레이저 이온화(LIMS)는 레이저 펄스가 샘플의 표면으로부터 물질을 제거하고 샘플 구성 성분의 일부를 이온화하는 마이크로플라즈마를 형성하는 방법이다. 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화(MALDI)는 단백질 또는 DNA 단편과 같은 대형 생물학적 분자를 증발 또는 이온화시키는 LIMS 방법이다. 생물학적 분자는 니코틴산과 같은 고체 매트릭스에 분산된다. UV 레이저 펄스는 몇몇 대형 분자를 기체상 속으로 이온화된 형태로 이동시키는 매트릭스를 제거하여 질량 분광 분석기 속으로 이들을 추출할 수 있게 한다. 플라즈마-탈착 이온화(PD)는 반대 방향으로 이동하는 2개의 핵분열 단편을 생성하는  $^{252}\text{Cf}$ 의 붕괴를 활용한다. 하나의 단편은 샘플에 충돌하여 1 내지 10개의 분석물질 이온으로 떨어진다. 기타의 단편은 검출기를 충돌하여 데이터의 입수 개시를 촉발한다. 이러한 이온화 방법은 특히 대형 생물학적 분자에 대해 유용하다. 공명 이온화(RIMS)는 하나 이상의 레이저 빔이 기체상 원자 또는 분자의 전이에 대한 공명시 조율되어 이온을 형성하기 위한 이온화 전위 이상으로 단계적인 방식으로 촉진되는 방법이다. 이차 이온화(SIMS)는  $^3\text{He}^+$ ,  $^{16}\text{O}^+$ , 또는  $^{40}\text{Ar}^+$ 과 같은 이온 빔을 사용하고; 샘플의 표면에 집중되고 물질을 기체상으로 스퍼터링한다. 스파크 공급원은 분석물질을 고체 샘플에서 2개의 전극을 가로질러 전류를 펄스시킴으로써 이온화시키는 방법이다.

태그는 부착되는 분자로부터 절단하기 전에, 절단하는 동안 또는 절단한 후에 하전될 수 있다. 이온 "탈착"에 근거하는 이온화 방법, 고체 또는 액체 표면으로부터 이온의 직접 형성 또는 방출은 비휘발성이고 열적으로 불안정한 화합물에 대한 증가된 적용을 허용한다. 이러한 방식은 중성 분자를 이온화에 앞서 휘발시킬 필요를 제거하고 일반적으로 분자 종의 열변성을 최소화한다. 이러한 방법은 장 탈착[참조: Becky, Principles of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry, Pergamon, Oxford, 1977], 플라즈마 탈착[참조: Sunkqvist and Macfarlane, Mass Spectrom. Rev. 4:421, 1985], 레이저 탈착[참조: Karas and Hillenkamp, Anal. Chem. 60:2299, 1988; Karas et al., Angew. Chem. 101:805, 1989], 고속 입자 충격[참조: 예를 들어, 고속 원자 충격, FAB, 및 이차 이온 질량 분광 분석, SIMS, Barber et al., Anal. Chem. 54:645A, 1982], 및 열 분무(TS) 이온화[참조: Vestal, Mass Spectrom. Rev. 2:447, 1983]를 포함한다. 열분무는 온-라인 배합을 위해 액체 크로마토그래피와 함께 넓게 적용된다. 연속 유동 FAB 방법[참조: Caprioli et al., Anal. Chem. 58:2949, 1986]도 유의한 전위를 나타낸다. 이온화/질량 분광 분석 조합의 보다 완전한 목록은 이온-트랩 질량 분광 분석, 전기분무 이온화 질량 분광 분석, 이온 분무 질량 분광 분석, 액체 이온화 질량 분광 분석, 대기압 이온화 질량 분광 분석, 전자 이온화 질량 분광 분석, 준안정성 원자 충돌 이온화 질량 분광 분석, 고속 원자 충돌 이온화 질량 분광 분석, MALDI 질량 분광 분석, 광-이온화 비행 시간형 질량 분광 분석, 레이저 점적 질량 분광 분석, MALDI-TOF 질량 분광 분석, APCI 질량 분광 분석, 나노-분무 질량 분광 분석, 성운형 분무 이온화 질량 분광 분석, 화학적 이온화 질량 분광 분석, 공명 이온화 질량 분광 분석, 이차 이온화 질량 분광 분석, 열분무 질량 분광 분석이다.

비휘발성 생물학적 화합물에 대해 개량 가능한 이온화 방법은 적용 가능한 범위를 포괄한다. 이온화 효율은 매트릭스 조성 및 화합물의 형태에 매우 의존한다. 현재 이용할 수 있는 결과는 TS에 대한 상한 분자량이 약 800 달톤임을 나타낸다 [참조: Jones and Krolik, Rapid Comm. Mass Spectrom. 1:67, 1987]. TS는 주로 4중극 질량 분광 분석기를 사용하여 실험되기 때문에, 민감성은 전형적으로 더욱 높은 질량 대 전하의 비( $m/z$ )에서 불규칙하다. 비행 시간형(TOF) 질량 분광 분석기는 시판중이고  $m/z$ 의 범위가 단지 검출기의 효율에 의해서만 제한되는 이점을 보유한다. 최근에, 추가의 2개의 이온화 방법이 도입되었다. 이들 두 방법은 현재 매트릭스 보조된 레이저 탈착[참조: MALDI, Karas and Hillenkamp, Anal. Chem. 60:2299, 1988; Karas et al., Angew. Chem. 101:805, 1989] 및 전기분무 이온화(ESI)로서 언급되고 있다. 두 방법은 매우 높은 이온화 효율을 갖는다(즉, 매우 높은 [생성된 분자이온]/[소모된 분자]). 기술의 최종적인 성능을 정의하는 민감성은 샘플의 크기, 이온의 양, 유동율, 검출 효율 및 실질적인 이온화 효율에 의존한다.

전기 분무-MS는 1960년대에 처음으로 제안된 생각에 근거한다[참조:Dole et al., J. Chem. Phys. 49:2240, 1968]. 전기분무 이온화(ESI)는 질량 분광 분석에 의해 분석하기 위한 하전된 분자를 생성하는 하나의 수단이다. 간략하면, 전기 분무 이온화는 강한 정전기장에서 액체를 분무함으로써 고도로 하전된 점적을 생성한다. 일반적으로 대기압에서 무수 용액의 기체 속에서 형성된 고도로 하전된 점적은 전하의 반발이 응집력을 극복하여 "쿨롱 폭발"을 유발할 때까지 중성 용매의 증발에 의해 수축된다. 이온화의 정확한 메커니즘은 논의의 여지가 있고 몇몇 그룹은 가설을 제공하고 있다[참조:Blades et al., Anal. Chem. 63:2109-14, 1991; Kebarle et al., Anal. Chem. 65:A972-86, 1993; Fenn, J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 4:524-35, 1993]. 이온 형성의 궁극적인 공정과는 상관없이, ESI는 온화한 조건하에 용액으로부터 하전된 분자를 생성한다.

소량의 유기분자에 대한 유용한 질량 스펙트럼 데이터를 수득하는 성능은 이온의 효과적인 생성에 좌우된다. ESI에 대한 이온화의 효율은 분자와 관련된 포지티브 전하의 정도와 관계가 있다. 실험상 이온화를 개선하는 것은 통상적으로 산성 조건을 사용하는 것을 포함한다. 이온화를 개선하기 위한 또다른 방법은 가능한 경우 4급 아민을 사용하는 것이다[참조: Aebersold et al., Protein Science 1:494-503, 1992; Smith et al., Anal. Chem. 60:436-41, 1988].



전기분무 이온화는 다음에 더욱 상세하게 기술된다. 전기분무 이온 형성은 2개의 단계를 필요로 한다: 대기압 근처에 있어서 증발을 유도하는 조건에서 고도로 하전된 점적을 분산시킨다. 분석물질 분자의 용액을 높은 전기적 저위에서 유지시킨 니들을 통해 통과시킨다. 니들의 말단에서, 용액은 분석물질 분자를 함유하는, 소량으로 고도로 하전된 점적 속으로 분산된다. 소량의 점적이 신속하게 증발하고 장 탈착 또는 잔류 증발 과정에 의해 양자화된 단백질 분자가 기체상 속으로 방출된다. 전기분무는 일반적으로 모세관으로부터 소량의 유동 액체(일반적으로 1 내지 10 $\mu$ L/min)에 대해 높은 전기장을 적용함으로써 제조된다. 3 내지 6kV의 전위차는 전형적으로 모세관과 0.2 내지 2cm이격되어 위치하는 대 전극사이에 적용된다(여기서 탈용매화의 정도에 의존하는 이온, 하전된 클러스터 및 심지어 하전된 점적은 작은 구멍을 통해 MS에 의해 샘플링될 수 있다). 전기장은 모세관의 말단에서 액체 표면에 전하의 축적을 유발하고; 따라서 액체 유속을, 저항, 및 표면장력은 점적의 제조에 있어서 중요한 요인이다. 높은 전기장은 액체 표면의 붕괴 및 고도로 하전된 액체 점적의 형성을 유발한다. 포지티브 또는 네거티브 하전된 점적은 모세관의 바이어스에 의존하여 제조될 수 있다. 네거티브 이온 모드는 전기적 방전을 억제하기 위해 산소와 같은 전자 스캐빈저의 존재를 필요로 한다.

다양한 범위의 액체를 진공중에 또는 분무제의 도움으로 정전기적으로 분무시킬 수 있다. 단지 분무를 위한 전기장의 사용으로 인해 액체 전도성 및 유전 상수의 범위에 약간의 실질적인 제한을 유발한다. 10<sup>-5</sup>ohm 미만의 용액의 전도성은 실온에서 수성 전해액 10<sup>-4</sup>M 미만에 상응하는 유용한 액체 유속에서 안정한 전기분무를 위해 필요하다. ESI-MS에 대해 가장 유용하게 발견되는 모드에 있어서, 적합한 액체 유속은 미세한 연무로서 액체의 분산을 일으킨다. 모세관으로부터의 짧은 거리에서 점적 직경은 종종 매우 균일하고 1 $\mu$ m 정도이다. 전체적인 전기분무 이온 전류가 단지 더 높은 액체의 유속을 위해 약간 증가하는 것은 특히 중요하다. 가열이 전기 분무를 조작하는데 유용함을 입증되었다. 예를 들어, 약간의 가열은 감소된 점도 및 표면장력으로 인하여 수용액을 신속하게 전기분무되게 한다. 열적 보조 및 기체-분무-보조 전기분무는 더 높은 액체 유속을 사용할 수 있게 하지만, 점적 하전의 정도를 감소시킨다. 분자 이온을 형성하기 위해서는 초기의 점적 집단의 증발을 수행하는 조건이 필요하다. 이는 고압에서 무수 기체의 유동에 의해 온화한 온도(60 $^{\circ}$ C 미만)에서 계면을 통해 이동하는 동안 가열함으로써 및 (특히 이온 트랩 방법의 경우) 비교적 저압에서 강력한 충돌에 의해 성취할 수 있다.

ESI하에 세부공정이 불명확하게 남아있음에도 불구하고, ESI에 의해 생성되는 매우 작은 점적은 용액중 네트 전하를 보유하는 거의 모든 물질이 잔류 용매의 증발 후 기체상으로 이동하는 것을 허용하는 것으로 나타난다. 이어서, 질량 분광 분석 검출은 이온이 탈용매화 후에 조작 가능한 m/z 범위(4중극 기구에 대해 4000 달톤 미만)를 갖고, 제조되며 충분한 효율로 이동할 필요가 있다. ESI-MS에 사용할 수 있는 것으로 발견된 다양한 범위의 용출제 및 사실상 분자량에 대한 이온화 효율의 의존성의 부족은 매우 비차별적이고 광범위하게 적용할 수 있는 이온화 공정을 제안한다.

전기분무 이온 "공급원"은 대기압 근처에서 기능한다. 전기분무 "공급원"은 전형적으로 대 전극에 대해 액체 용액을 전기적으로 바이어스하기 위한 방법을 혼입하는 금속 또는 유리 모세관이다. 분석물질 및 종종 아세트산과 같은 기타의 부가제를 함유하는 물-메탄올 혼합물인 용액은 모세관 말단으로 유동한다. ESI 공급원은 문헌[참조: Smith et al., Anal. Chem. 62:885, 1990]에 기재되어 있는 이는 본질적으로 모든 용매계에 적용될 수 있다. ESI에 대한 전형적인 유속은 1 내지 10 $\mu$ L/min이다. ESI-MS 계면의 중요한 요건은 고압 영역으로부터 가능한 한 효율적으로 MS 내로 이온을 샘플링하고 이동시키는 것이다.

ESI의 효율은 매우 높아서, 본원에 기술된 본 발명에 유용한, 매우 민감한 측정을 위한 기본을 제공한다. 현재의 기구를 사용하여 검출기에서 단일 하전된 종에 대해 전체적인 이온 전류 약 2 x 10<sup>-12</sup>A 또는 10<sup>7</sup> 계수/s를 제공할 수 있다. 기구의 성능을 기준으로 하여, 단일 하전된 종의 농도 10<sup>-10</sup>M 또는 약 10<sup>-18</sup>mol/s는 분석물질이 완전히 이온화되는 경우 검출할 수 있는 이온 전류(약 10 계수/s)를 제공할 수 있다. 예를 들어, 낮은 원자물 검출 한계는 모세관 영역 전기영동을 사용하는 ESI 계면을 사용하여 4급 암모늄 이온에 대해 수득되었다[참조: Smith et al., Anal. Chem. 59:1230, 1988]. 분자량 1000의 화합물에 대해 평균 전하수는 1이고, 대략적인 전하상태의 수는 1이며, 피크 폭(m/z)은 1이고 최대 강도(이온/s)는 1 x 10<sup>12</sup>이다.

주목할만하게는, ESI 질량 스펙트럼을 수득함에 있어서 샘플이 사실상 거의 소모되지 않는다는 것이다[참조: Smith et al., Anal. Chem. 60:1948, 1988]. 사실상 스펙트럼의 부분들의 동시 검출을 허용하는 섹터 기구를 갖는 배열 검출기의 사용에 의해 수득할 수 있다. 현재 ESI에 의해 형성되는 모든 이온 약 10<sup>-5</sup>이 검출되기 때문에, 기구의 성능을 제한하는 요인에 대해 주목함으로써 개선된 민감성을 위한 기본을 제공할 수 있다. 이는 본 발명을 참조하고 이온화 및 검출 방법에 있어서 개선을 위해 도모하는 당해 기술분야의 숙련가들에게는 명백할 것이다.

계면은 바람직하게는 분리 기구(예를 들어, 켈)와 검출기(예를 들어, 질량 분광 분석기)사이에 위치할 수 있다. 계면은 바람직하게는 다음의 특성을 보유한다: (1) 신중한 시간간격에서 DNA 단편을 수집하는 성능, (2) DNA 단편을 농축시키는 성능, (3) DNA 단편을 전기영동 완충제 및 환경으로부터 제거하는 성능, (4) 태그를 DNA 단편으로부터 절단하는 성능, (5) 태그를 DNA 단편으로부터 분리하는 성능, (6) DNA 단편을 폐기시키는 성능, (7) 태그를 휘발성 용액에 위치시키는 성능, (8) 태그를 휘발시키고 이온화시키는 성능, 및 (9) 태그를 전기분무 장치에 위치시키고 이동시켜 태그를 질량 분광 분석기에 도입하는 성능.

또한, 계면은 이들이 켈의 하부로부터 용출함에 따라 DNA 단편을 "수집"하는 성능을 갖는다. 켈은 슬랩 켈, 튜브형 켈, 모세관으로 구성될 수 있다. DNA 단편은 몇몇 방법에 의해 수집할 수 있다. 첫 번째 방법은 전기장을 사용하는 것으로서 여기서, DNA 단편은 전극상에 또는 전극 근처에서 수집된다. 두 번째 방법은 DNA 단편이 켈의 하부로 액체 스트림을 유동 시킴으로써 수집하는 방법이다. 두 방법의 양태는 차후 전기장을 사용하여 농축시킬 수 있는 유동 스트림 속으로 DNA가 수집되도록 배합될 수 있다. 최종 결과는 DNA 단편을 분리방법이 수행되는 환경으로부터 제거하는 것이다. 즉, DNA 단편을 한 용액 형태로부터 전기장을 사용하여 또다른 형태로 옮길 수 있다.

일단 DNA 단편이 적합한 용액(전기분무 및 질량 분광 분석과 병행할 수 있는) 속에 존재하는 경우, 태그는 DNA 단편으로부터 절단될 수 있다. DNA 단편(또는 이의 잔류물)을 전기장을 적용하여(바람직하게는, 태그는 DNA 태그의 전하의 반대 전하로 되어 있다) 태그로부터 분리할 수 있다. 이어서 태그를 전기장 또는 유동 액체를 사용하여 전기분무 장치에 도입한다.

대부분 이들의 흡수 및 형광 방출 파장 및 강도에 의해 직접적으로 형광 태그의 정체를 확인하고 양을 결정할 수 있다.

연속적인 범위의 여기 및 방출 파장( $I_{EX}$ ,  $I_{S1}$ ,  $I_{S2}$ )을 제공하는 통상적인 분광 형광 측정계가 매우 용이한 반면, 유동 세포 계수기 및 레이저 스캐닝 현미경과 같은 더욱 특별한 기구는 단일 고정된 파장에서 여기될 수 있는 프로브를 필요로 한다. 보충 기구에 있어서, 이는 통상적으로 아르곤 레이저의 488-nm 라인이다.

프로브 분자당 형광 강도는  $e$  및 QY의 생성물에 비례한다. 사실상 현재 중요한 형광단 중에서 이들 파라미터의 범위는  $\epsilon$ 에 대해 약 10,000 내지  $100,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 이고 QY에 대해 0.1 내지 1.0이다. 고강도 조명에 의해 흡수가 포화를 유도하는 경우, 여기 형광단의 비가역적 변성(광표백)은 형광 검출성능을 제한하는 요인이 된다. 광표백의 실질적인 영향은 문제가 되는 형광 검출 기술에 좌우된다.

하나의 장치(하나의 계면)가 분리 단계 및 검출 단계 사이에 위치하여 크기 분리 및 태그의 검출의 연속적인 조작(실제 시간)을 허용할 수 있다는 것을 당해 기술분야의 숙련자들에게는 명백할 것이다. 이는 분리 방법과 검출방식을 갖는 기구 및 단일 장치를 형성하는 기구를 연합시킨다. 예를 들어, 계면은 질량 분광 분석법 또는 정전위 전류법에 의해 분리기술과 검출 사이에 위치한다.

계면의 기능은 주로 (예를 들어, 질량 분광 분석법) 태그를 분석물질로부터 방출시키는 것이다. 계면의 몇몇 대표적인 도구가 있다. 계면의 디자인은 절단 가능한 링커의 선택에 좌우된다. 광-절단 가능한 링커의 경우 에너지 또는 양자 공급원이 필요하다. 산 불안정성 링커, 염기 불안정성 링커 또는 디설파이드 링커의 경우에 있어서, 계면사이에 제제를 가할 필요가 있다. 열 불안정성 링커의 경우, 열 에너지원이 요구된다. 특정한 프로테아제 및 펩타이드 링커와 같은 효소 민감성 링커, 뉴클레아제 및 DNA 또는 RNA 링커, 글리코실라제, HRP 또는 포스파타제 및 절단 후 불안정한 링커(예를 들어, 화학 발광 물질과 유사한)에 대해서는 효소의 부가가 필요하다. 계면의 기타의 특성은 최소의 밴드 증폭, 질량 분광 분석기에 주입하기 전 태그로부터 DNA의 분리를 포함한다. 분리기술은 전기영동 방법 및 기술에 근거하는 기술, 친화도 기술, 크기 유지(투석), 여과 등의 기술을 포함한다.

또한, 태그(또는 핵산-링커-태그 작제물)를 농축시키고, 전기영동에 의해 포획하고 선택되는 이온화 방법의 특별한 형태와 양립할 수 있는 기타의 제제 스트림 속으로 방출시킬 수 있다. 또한, 계면은 마이크로비드상에서 태그(또는 핵산-링커-태그 작제물)를 포획할 수 있고 비드를 챔버 속에 넣고 레이저 탈착/증발을 수행할 수 있다. 또한, 또다른 완충제 속으로 유동하여 추출시킬 수 있다(예를 들어, 모세관 전기영동 완충제로부터 투과막을 가로질러 소수성 완충제 속으로). 또한, 몇몇 용도에 있어서 태그를 계면의 추가의 기능을 포함할 수 있는 질량 분광 분석기로 간헐적으로 이동시키는 것이 바람직할 수 있다. 계면의 또다른 기능은 각각의 칼럼에 대해 회전시간의 슬롯과 함께 태그를 다중 칼럼으로부터 질량 분광 분석기로 운반하는 것이다. 또한, 태그를 단일 칼럼으로부터 다중 MS 검출기로 운반하고 시간에 의해 분리시키고 각각의 세트의 태그를 수 밀리초 동안 수집하고 질량 분광 분석기에 운반할 수 있다.

다음은 본원에 사용될 수 있는 분리 기술 및 검출 기술에 대한 대표적인 제조자들의 목록이다: 서열분석에 적용하기 위한 전기영동 장치(Two Step™, Poker Face™ II)를 제조한다[제조사: Hoefer Scientific Instruments(San Francisco, CA)]. DNA 분리 및 서열분석을 위한 전기영동 장치(PhastSystem for PDR-SSCP analysis, MacroPhor System for DNA sequencing)를 제조한다[Pharmacia Biotech(Piscataway, NJ)]. 형광-염료에 근거하는 반자동 서열 분석기(ABI373 and ABI377)를 제조한다[제조사: Perkin Elmer/Applied Biosystems Division(ABI, Foster City, CA)]. UV 분광 분석기를 제조한다[제조사: Analytical Spectral Devices(Boulder, CO)]. 자동 흡수 분광 분석기, 형광 분광 분석기, LC 및 GC 질량 분광 분석기, MNR 분광 분석기 및 UV-VIS 질량 분광 분석기를 제조한다[제조사: Hitachi Instruments(Tokyo, Japan)]. 질량 분광 분석기를 제조한다[제조사: PerSeptive Biosystems(Framingham, MA)]. FTIR 분광 분석기(벡터 22), FT-Raman 분광 분석기, 비행 시간형 질량 분광 분석기(Reflex II™), 이온 트랩 질량 분광 분석기(Esquire™) 및 Maldi 질량 분광 분석기를 제조한다[제조사: Bruker Instruments Inc. Manning Park, MA)]. 모세관 겔 전기영동 단위, UV 검출기, 및 다이오드 배열 검출기를 제조한다[제조사: Analytical Technology Inc.(ATI, Boston, MA)]. 이온 트랩 질량 분광 분석기(3DQ Discovery™ 및 3DQ Apogee™)를 제조한다[제조사: Teledyne Electronic Technologies(Mountain View, CA)]. 전기분무와 화합성인 Sciex 질량 분광 분석기(삼중극 LC/MS/MS, API 100/300)를 제조한다[제조사: Perkin Elmer/Applied Biosystems Division(Foster City, CA)]. 질량 선택적 검출기(HP 5972A), MALDI-TOF 질량 분광 분석기(HP G2025A), 다이오드 배열 검출기, CE 단위, HPLC 단위(HP1090) 뿐만 아니라 UV 분광 분석기를 제조한다[제조사: Hewlett-Packard(Santa Clara, CA)]. 질량 분광 분석기(자기 섹터(MAT 95 S™), 4중극 분광 분석기(MAT 95 SQ™) 및 4개의 기타 관련된 질량 분광 분석기)를 제조한다[제조사: Finigan Corporation(San Jose, CA)]. HPLC 기구를 제조한다[제조사: Rainin(Emeryville, CA)].

본원에 기술된 방법 및 조성물은 특별한 샘플 형태 및 뉴클레오타이드 정체에 대한 맵으로서 작용하는 절단된 태그를 사용하는 것을 허용한다. 각각의 서열분석 방법의 개시시에, 특별한 (선택된) 프라이머는 특별한 독특한 태그로 할당된다. 샘플의 형태, 디데옥시 터미네이터 형태(생거의 서열분석 반응의 경우) 또는 바람직하게는 둘 다의 형태에 대해 태그가 맵을 형성한다. 특히, 태그는 순서대로 샘플의 정체에 대해 맵을 형성하는 벡터 형태에 대해 맵을 형성하는 프라이머 형태에 대해 맵을 형성한다. 태그는 또한 디데옥시 뉴클레오타이드 반응 속에서 태그된 프라이머를 위치시키는 것을 참조하여 디데옥시 터미네이터 형태(ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP)에 대해 맵을 형성할 수 있다. 서열분석 반응을 수행한 다음 수득되는 단편을 정확한 시간에 크기에 의해 분리한다.

태그는 임시 프레임에서 단편으로부터 절단되고 임시 프레임에서 기록된다. 서열은 임시 프레임에 대한 태그 맵의 비교에 의해 구성된다. 즉, 모든 태그의 정체는 정확한 시간에 크기화 단계후 기록되고 임시 프레임에서 서로 관련을 맺는다. 크기화 단계는 하나의 뉴클레오타이드 증식에 의해 핵산 단편을 분리하고 이에 따라 관련된 태그의 정체가 하나의 뉴클레오타이드 증식에 의해 분리된다. 디데옥시-터미네이터 또는 뉴클레오타이드 맵 및 샘플의 형태에 관한 사전 지식에 의해, 서열은 선형 방식으로 용이하게 추론된다.

다음의 실시예는 한정하고자 하는 것이 아니라 예시를 위해서 제공한다.

달리 언급하지 않는 한, 실시예에 사용되는 바와 같은 화학물질은 제조자(Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI)로부터 수득할 수 있다. 다음의 약어는 지시된 의미로 본원에서 사용된다:

ANP = 3-(Fmoc-아미노)-3-(2-니트로페닐)프로피온산

NBA = 4-(Fmoc-아미노메틸)-3-니트로벤조산

HATU = O-7-아미벤조트리아졸-1-일-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트

DIEA = 디이소프로필에틸아민

MCT = 모노클로로트리아진

NMM = 4-메틸모르폴린

NMP = N-메틸피롤리돈

ACT357 = ACT357 펩타이드 합성기(제조사: Advanced Chem Tech, Inc., Louisville, KY)

ACT = Advanced Chem Tech, Inc., Louisville, KY

NovaBiochem = CalBiochem-NovaBiochem International, San Diego, CA

TFA = 트리플루오로아세트산

Tfa = 트리플루오로아세틸

iNIP = N-메틸이소니페코트산

Tfp = 테트라플루오로페닐

DIAEA = 2-(디이소프로필아미노)에틸아민

MCT = 모노클로로트리아젠

5'-AH-ODN = 5'-아미노헥실-말단 부착된 올리고데옥시뉴클레오타이드

## 실시예

### 실시예 1

절단할 수 있는-MW-식별자 서열분석에서 사용하기 위한 산 불안정성 링커의 제조.

A. 카복실 아마이드 말단을 갖는 태그의 방출을 위한, 화학적으로 절단할 수 있는 질량 분광분석 태그의 펜타플루오로페닐 에스테르의 합성

도 1은 반응도를 나타낸다.

#### 단계 A

텐타겔(TentaGel) S AC 수지(화합물 II; 제조자: ACT; 1당량)를 DMF와 함께 ACT357 펩타이드 합성기(ACT)의 수집 용기에 현탁시킨다. DMF중의 화합물 I (3당량), HATU(3당량) 및 DIEA(7.5당량)를 가하고, 수집용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. I의 수지에 대한 커플링과 세척 단계를 반복하고, 화합물 III을 수득한다.

#### 단계 B

수지(화합물 III)를 DMF중 25%의 피페리딘과 혼합하고, 5분 동안 진탕시킨다. 수지를 여과한 후 DMF중 25%의 피페리딘과 함께 혼합하고, 10분 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척하며, 단계 C에 직접 사용한다.

#### 단계 C

단계 B로부터의 탈보호된 수지는 DMF에 현탁시키고, 이에 DMF중 아민 작용기를 측쇄에 함유하는 FMOC-보호된 아미노산(화합물 IV, 예를 들면 알파-N-FMOC-3-(3-피리딜)-알라닌, 제조자: Synthetech, Albany, OR; 3당량), HATU(3당량) 및 DIEA(7.5당량)를 가한다. 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(2X), MeOH(2X), 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지에 대한 IV의 커플링과 세척단계를 반복하고, 화합물 V를 수득한다.

#### 단계 D

수지(화합물 V)를 단계 B에서 기술한 바와 같이 피페리딘으로 처리하여 FMOC그룹을 제거한다. 이어서 탈보호된 수지를 ACT357에 의해 수집용기로부터 16개의 반응용기에 동등하게 분배한다.

단계 E

단계 D로부터의 탈보호된 수지의 16개의 분취량을 DMF에 현탁시킨다. 각각의 반응용기에 DMF중 적절한 카복실산 VI<sub>1-16</sub> (R<sub>1-16</sub>CO<sub>2</sub>H; 3당량), HATU(3당량) 및 DIEA(7.5당량)을 가한다. 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지의 분취량을 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지의 분취량에 대한 VI<sub>1-16</sub>의 커플링과 세척단계를 반복하고, 화합물 VII<sub>1-16</sub>을 수득한다.

단계 F

수지(화합물 VII<sub>1-16</sub>)의 분취량을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3X)로 세척한다. 각각의 반응용기에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 중 1%의 TFA를 가한 후 용기를 30분 동안 진탕시킨다. 용매를 반응용기로부터 개별 튜브로 여과한다. 수지의 분취량을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2X) 및 MeOH(2X)로 세척하고, 여액을 개별 튜브에 배합한다. 개별 튜브를 진공상태에서 증발시켜 화합물 VIII<sub>1-16</sub>을 수득한다.

단계 G

각각의 유리 카복실산 VIII<sub>1-16</sub>을 DMF에 용해시킨다. 각각의 용액에 피리딘(1.05당량)을 가하고, 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트(1.1당량)를 가한다. 혼합물을 45분 동안 실온에서 교반시킨다. 용액을 EtOAc로 희석시키고, 1M의 수성 시트르산(3X) 및 5%의 수성 NaHCO<sub>3</sub>(3X)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고, 진공상태에서 증발시켜 화합물 IX<sub>1-16</sub>을 수득한다.

B. 카복실산 말단을 갖는 태그의 방출을 위한, 화학적으로 절단할 수 있는 질량 분광분석 태그의 펜타플루오로페닐 에스테르의 합성.

도 2는 반응도를 나타낸다.

단계 A

4-(하이드록시메틸)페녹시부티르산(화합물 I ; 1당량)을 CHCl<sub>3</sub>중의 DIEA(2.1당량) 및 알릴 보로마이드(2.1당량)와 배합하고, 2시간 동안 가열하여 환류시킨다. 화합물을 EtOAc로 희석하고, 1 N HCl(2X), pH 9.5 카보네이트 완충제(2X) 및 염수(1X)로 세척하며, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 진공상태에서 증발시켜 화합물 I의 알릴 에스테르를 수득한다.

단계 B

A단계로부터의 화합물 I의 알릴 에스테르(1.75당량)를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>내에, 측쇄에 아민 작용기를 함유한 FMOC-보호된 아미노산(화합물 II, 예를 들면 알파-N-FMOC-3-(3-피리딜)-알라닌: 제조사 Synthetech, Albany, OR; 1당량), N-메틸모르폴린(2.5당량) 및 HATU(1.1당량)와 배합하고, 실온에서 4시간 동안 교반시킨다. 화합물을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 희석하고, 1M의 수성 시트르산(2X), 물(1X) 및 5% 수성 NaHCO<sub>3</sub>(2X)로 세척하며, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 진공상태에서 증발시킨다. 화합물 III은 플래쉬 크로마토그래피(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> --> EtOAc)에 의해 분리된다.

단계 C

화합물 III을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>에 용해시키고, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(0.07당량) 및 N-메틸아닐린(2당량)을 가하고, 화합물을 실온에서 4시간 동안 교반시킨다. 혼합물을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 희석하고, 1M의 수성 시트르산(2X) 및 물(1X)로 세척하며, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 진공상태에서 증발시킨다. 화합물 IV는 플래쉬 크로마토그래피(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> --> EtOAc + HOAc)에 의해 분리된다.

#### 단계 D

텐타겔 S AC 수지(화합물 V; 1당량)를 DMF 와 함께 ACT357 펩타이드 합성기(제조사: Advanced ChemTech Inc. (ACT), Louisville, KY)의 수집용기에 현탁시킨다. DMF의 화합물 IV(3당량), HATU(3당량) 및 DIEA(7.5당량)를 가하고, 수집용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. IV의 수지에 대한 커플링과 세척 단계를 반복하고, 화합물 IV를 수득한다.

#### 단계 E

수지(화합물 IV)를 DMF 중 25%의 피페리딘과 함께 혼합하고, 5분 동안 진탕시킨다. 수지를 여과한 후 DMF 중 25%의 피페리딘과 함께 혼합하고, 10분 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한 후, 탈보호된 수지를 ACT357에 의해 수집용기로부터 16개의 반응용기로 동등하게 분리한다.

#### 단계 F

E 단계로부터 얻어진 탈보호된 수지의 16개의 분취량을 DMF에 현탁시킨다. 각각의 반응용기에 DMF중 적절한 카복실산 VII<sub>1-16</sub> (R<sub>1-16</sub>CO<sub>2</sub>H; 3당량), HATU(3당량) 및 DIEA(7.5당량)를 가한다. 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지의 분취량을 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지의 분취량에 대한 VII<sub>1-16</sub>의 커플링과 세척 단계를 반복하고, 화합물 VIII<sub>1-16</sub>을 수득한다.

#### 단계 G

수지(화합물 VIII<sub>1-16</sub>)의 분취량을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3X)로 세척한다. 각각의 반응용기에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>중 1%의 TFA를 가한 후 용기를 30분 동안 진탕시킨다. 용매를 반응용기로부터 개별 튜브로 여과한다. 수지의 분취량을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2X) 및 MeOH(2X)로 세척하고, 여액을 개별튜브에 배합한다. 개별튜브를 진공상태에서 증발시켜 화합물 IX<sub>1-16</sub>를 수득한다.

#### 단계 H

각각의 유리 카복실산 IX<sub>1-16</sub>을 DMF에 용해시킨다. 각각의 용액에 피리딘(1.05당량)을 가하고, 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트(1.1당량)를 가한다. 혼합물을 45분 동안 실온에서 교반한다. 용액을 EtOAc로 희석시키고, 1M의 수성 시트르산(3X) 및 5%의 수성 NaHCO<sub>3</sub>(3X)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고, 진공상태에서 증발시켜 화합물 X<sub>1-16</sub>을 수득한다.

#### 실시예 2

##### T-L-X의 광분해에 의한 절단 입증

실시예 11에 따라 제조된 T-L-X 화합물을 근 UV 광에 7분 동안 실온에서 조사시킨다. 350nm에서 방출 피크를 갖는 레이오넷(Rayonett) 형광 UV 램프(제조사: Southern New England Ultraviolet Co., Middletown, CT)를 UV 광 공급원으로서 사용한다. 램프는 샘플의 페트리 디쉬로부터 15cm 거리에 위치시킨다. SDS겔 전기영동은 이러한 조건하에 접합부의 85% 초과량이 절단되었음을 나타낸다.

#### 실시예 3

##### 형광 표지된 프라이머의 제조 및 형광단의 절단 입증

##### 올리고뉴클레오타이드의 합성과 정제

상업적으로 공급되는 표준 포스포라미다이트 화학 또는 H-포스포네이트 화학(제조사: Glenn Research Sterling, VA)을 사용하는 자동화된 DNA 합성기에서 올리고뉴클레오타이드(ODNs)를 제조한다. 적절하게 차단된 dA, dG, dC 및 T 포

스포라미다이트는 이러한 형태로 시판중이며, 합성 뉴클레오시드는 다른 적절한 형태로 용이하게 전환될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 상업적으로 공급되는 표준 포스포라미다이트 화학 또는 H-포스포네이트 화학을 사용하여 제조한다. 올리고뉴클레오타이드는 표준 방법의 적용에 의해 정제된다. 5'-트리틸 그룹을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 HPLC 및 0.1N의 Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>OAc<sup>-</sup>, pH 7.0 중 15% 내지 55%의 MeCN의 구배를 사용하는 12 $\mu$ m, 300 # 라인인(제조사: Rainin Emeryville, CA) 다이내믹스(Dynamax) C-8 4.2x250mm의 역상 칼럼 상에서 20분에 걸쳐 크로마토그래피한다. 탈트리틸화가 수행되는 경우, 올리고뉴클레오타이드는 겔 배제 크로마토그래피에 의해 추가로 정제된다. 올리고뉴클레오타이드의 품질에 대한 분석 점검은 알칼리성 pH에서 PRP-칼럼(제조사: Alltech, Deerfield, IL) 및 PAGE에 의해 수행된다.

2,4,6-트리클로로트리아진 유도된 올리고뉴클레오타이드의 제조: 5'-말단 종결된 아민 결합된 올리고뉴클레오타이드 10 내지 1000 $\mu$ g을 10%의 n-메틸-피롤리돈중의 과량의 재결정화된 시아누르산 염화물과 알칼리성(바람직하게는 pH 8.3 내지 8.5) 완충제 속에서 19 $^{\circ}$ C 내지 25 $^{\circ}$ C에서 30분 내지 120분 동안 반응시킨다. 최종 반응조건은 pH 8.3에서 0.15M의 붕산나트륨, 재결정화된 시아누르산 염화물 2 mg/ml 및 개별 올리고뉴클레오타이드 500 $\mu$ g/ml로 구성된다. 반응하지 않는 시아누르산 염화물은 G-50 세파덱스(Sephadex; 제조사: Pharmacia, Piscataway, NJ) 칼럼의 크기 배출 크로마토그래피에 의해 제거한다.

활성 정제된 올리고뉴클레오타이드는 이어서 0.15M의 붕산나트륨중 100배의 몰과량 시스타민과 pH 8.3에서 1시간 동안 실온에서 반응시킨다. 반응하지 않는 시스타민은 G-50 세파덱스 칼럼상의 크기 배제 크로마토그래피에 의해 제거한다. 이어서 유도된 ODN을 아민-반응성 형광색소와 반응시킨다. 유도된 ODN 제제를 3개의 부분으로 분배하고, 각각의 부분을 (a) 텍사스 레드(Texas Red) 설포닐 클로라이드(제조사: Molecular Probes, Eugene, OR) 20배 몰과량, (b) 리사민(Lissamine) 설포닐 클로라이드(제조사: Molecular Probes, Eugene, OR) 20배 몰과량, (c) 플루오레세인 이소티오시아네이트의 20배 몰과량 중의 어느 하나와 반응시킨다. 최종 반응조건은 pH 8.3에서 1시간 동안 실온에서 0.15M의 붕산나트륨으로 구성된다. 반응하지 않는 형광색소는 G-50 세파덱스 칼럼의 크기 배제 크로마토그래피에 의해 제거한다.

올리고뉴클레오타이드로부터 형광색소를 절단하기 위해 ODN을 1 x 10<sup>-5</sup> 몰로 조정하고 이어서 TE(TE는 0.01M 트리스, pH 7.0, EDTA 5mM)에서 희석시킨다(12, 3배 희석). ODN 100 $\mu$ l 용적에 0.01M 디티오프레이트(DTT) 25 $\mu$ l를 가한다. 대조군의 동일한 세트에는 DDT를 가하지 않는다. 혼합물을 실온에서 15분 동안 항온처리한다. 검정색 미세역가 플레이트에서 형광을 측정한다. 용액을 배양 튜브(150 $\mu$ l)로부터 제거하고, 검정색 미세역가 플레이트(제조사: Dynatek Laboratories, Chantilly, VA)에 위치시킨다. 이어서 플레이트를 플루오레세인에 대해 여기과장 495nm을 사용하고 방출과장 520nm에서 모니터링하고, 텍사스 레드에 대해 여기과장 591nm을 사용하고 방출과장 612nm에서 모니터링하며 리사민에 대해 여기과장 570nm을 사용하고 방출과장 590nm에서 모니터링하는 형광스캔 II 형광측정계(제조사: Flow Laboratories, Mclean, VA)를 사용하여 직접 판독한다.

형광색소(몰)	RFU 절단되지 않음	RFU 절단됨	RFU 유리
1.0 × 10 <sup>9</sup> M	6.4	1200	1345
3.3 × 10 <sup>9</sup> M	2.4	451	456
1.1 × 10 <sup>10</sup> M	0.9	135	130
3.7 × 10 <sup>10</sup> M	0.3	44	48
1.2 × 10 <sup>11</sup> M	0.12	15.3	16.0
4.1 × 10 <sup>11</sup> M	0.14	4.9	5.1
1.4 × 10 <sup>12</sup> M	0.13	2.5	2.8
4.5 × 10 <sup>12</sup> M	0.12	0.8	0.9

자료는 형광색소가 ODN으로부터 절단되는 경우 상대적인 형광이 약 200배 증가함을 나타낸다.

실시예 4

태그된 M13 서열 프라이머의 제조 및 태그 절단의 입증

2,4,6-트리클로로트리아진 유도된 올리고뉴클레오타이드의 제조: 5'-말단 종결된 아민 결합된 올리고뉴클레오타이드 (5'-헥실아민-TGTAACGACGCGGCCAGT-3'')(서열 1) 1000 $\mu$ g을 과량의 재결정화된 시아누르산 염화물과 10%의 n-메틸-피롤리돈과 알칼리성(바람직하게는 pH 8.3 내지 8.5) 완충제 속에서 19 $^{\circ}$ C 내지 25 $^{\circ}$ C에서 30분 내지 120분 동안 반응시킨다. 최종 반응조건은 pH 8.3에서 0.15M의 붕산나트륨, 재결정화된 시아누르산 염화물 2 mg/ml 및 개별 올리고뉴클레오타이드 500 $\mu$ g/ml로 구성된다. 반응하지 않는 시아누르산 염화물은 G-50 세파텍스 칼럼의 크기 배제 크로마토그래피에 의해 제거한다.

이어서 활성 정제된 올리고뉴클레오타이드를 0.15M의 붕산나트륨중 100배의 물과량 시스타민과 pH 8.3에서 1시간 동안 실온에서 반응시킨다. 반응하지 않는 시스타민은 G-50 세파텍스 칼럼 상에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 제거한다. 이어서 유도된 ODN을 각종 아미드와 반응시킨다. 유도된 ODN 제제를 12개의 분취량으로 분배하고, 각각의 분취량(25몰과량)을 (1) 4-메톡시벤조산, (2) 플루오로벤조산, (3) 툴루엔산, (4) 벤조산, (5) 인돌-3-아세트산, (6) 2,6-디플루오로벤조산, (7) 니코틴산 N-옥사이드, (8) 2-니트로벤조산, (9) 5-아세틸살리실산, (10) 4-에톡시벤조산, (11) 신남산, (12) 3-아미노니코틴산 중 어느 하나의 펜타플루오로페닐-에스테르와 반응시킨다. 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 0.2 M Na붕산염 pH 8.3으로 반응시킨다. 유도된 ODN은 G-50 세파텍스 칼럼의 겔 배제 크로마토그래피에 의해 정제한다.

올리고뉴클레오타이드로부터 태그를 절단하기 위해, ODN을  $1 \times 10^{-5}$  몰로 조정하고 TE(TE는 0.01M 트리스, pH 7.0, EDTA 5mM)에서 50%의 EtOH(V/V)로 희석시킨다(12, 3배 희석). ODN 100 $\mu$ l 용적에 0.01M의 디티오트레이톨(DTT) 25 $\mu$ l를 가한다. 대조군의 동일한 세트에는 DDT를 가하지 않는다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 항온처리한다. 0.1M의 NaCl을 가하고, ODN을 침전시키기 위해 2용적의 EtOH를 가한다. 용액으로부터 ODN을 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 14000 x G의 원심분리에 의해 제거한다. 상청액을 보존하고, 완전히 건조시킨다. 펠릿을 25 $\mu$ l의 MeOH에 용해시킨다. 이어서 질량 분광 분석법에 의해 태그의 존재에 대해 펠릿을 실험한다.

이 작업의 사용된 질량 분광분석기는 외부 이온 공급원 푸리어-변형 질량 분광분석기(FTMS: Fourier-transform mass spectrometer)를 사용한다. MALDI 분석을 위해 제조된 샘플은 직접 프로브의 침단에 침전시키고 이온 공급원에 삽입한다. 샘플에 레이저파를 조사시킬 경우, 이온은 공급원에서 추출되어 긴 4중극 이온 가이드에 통과하여 초전도 자석의 구멍에 위치한 FTMS 분석기 셀로 집중되고 이동된다.

스펙트럼은 다음 정보를 도출한다. 다음 분자량에서 25 내지 100의 상대강도 단위 내에서 피크는 다양하다: (1) 4-메톡시벤조산 유도체를 나타내는 212.1amu(원자 질량 단위; atomic mass unit). (2) 4-플루오로벤조산 유도체를 나타내는 200.1amu (3) 툴루엔산 유도체를 나타내는 196.1amu, (4) 벤조산 유도체를 나타내는 182.1amu, (5) 인돌-3-아세트산 유도체를 나타내는 235.2amu, (6) 2,6-디플루오로벤조산 유도체를 나타내는 218.1amu, (7) 니코틴산 N-옥사이드 유도체를 나타내는 199.1amu, (8) 2-니트로벤즈아미드를 나타내는 227.1amu, (9) 5-아세틸살리실산 유도체를 나타내는 179.18amu, (10) 4-에톡시벤조산 유도체를 나타내는 226.1amu, (11) 신남산 유도체를 나타내는 209.1amu, (12) 3-아미노니코틴산 유도체를 나타내는 198.1amu.

결과는 MW-식별자가 프라이머로부터 절단되고 질량 분광 분석법에 의해 검출될 수 있음을 나타낸다.

### 실시예 5

화학식 R<sub>1-36</sub>-LYS( $\epsilon$ -T<sub>1</sub>NIP)-ANP-TFP의 화합물 세트의 제조

도 3은 36개의 T-L-X 화합물(X = L<sub>n</sub>) 세트의 병렬합성을 나타내는데, 이때, L<sub>n</sub>는 활성 에스테르(특히, 테트라플루오로페닐 에스테르)이고, L<sup>2</sup>는 L<sub>n</sub>와 L<sup>2</sup>를 결합하는 메틸렌 그룹이 되는 L<sup>3</sup>를 갖는 오르토-니트로벤질아민 그룹이고, T는 라이신의 카복실산 그룹이 L<sup>2</sup> 벤질아민 그룹의 질소원자와 결합하는 경우 아미드 결합을 형성하는 모듈구조를 가지며, 가변 중량 성분 R<sub>1-36</sub>(여기서, R 그룹이 본원에서 정의한 바와 같이 T<sup>2</sup>에 상응하는 경우 및 본원에 기재된 어떠한 특정 카복실산을 통해서도 도입될 수 있을 경우)은, 질량 분광 감도 증진제 그룹(N-메틸이소니페코트산을 통하여 도입된)이 라이신의  $\epsilon$ -아미노 그룹을 통하여 결합하는 반면, 라이신의  $\alpha$ -아미노 그룹을 통해 결합한다.

### 도 3 참조



## 단계 A

NovaSyn HMP 수지(제조사: NovaBiochem; 1당량)를 DMF와 함께 ACT357의 수집용기에 현탁시킨다. DMF중의 화합물 I (ANP, 제조자: ACT; 3당량), HATU(3당량) 및 NMM(7.5당량)을 가하고, 수집용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. I의 수지에 대한 커플링과 세척 단계를 반복하고, 화합물 II를 수득한다.

## 단계 B

수지(화합물 II)를 DMF중 25%의 피페리딘과 혼합하고, 5분 동안 진탕시킨다. 수지를 여과한 후, DMF중 25%의 피페리딘과 함께 혼합하고, 10분 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척하며, 단계 C에 직접 사용한다.

## 단계 C

단계 B로부터의 탈보호된 수지는 DMF에 현탁시키고, DMF중 보호된 아민 작용기를 측쇄에 함유하는 FMOC-보호된 아미노산(Fmoc-Lysine(Aloc)-OH, 제조자: PerSeptive Biosystems; 3당량), HATU(3당량) 및 NMM(7.5 당량)을 가한다. 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(2X), MeOH(2X), 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지에 대한 Fmoc-Lys(Aloc)-OH의 커플링과 세척단계를 반복하여, 화합물 IV를 수득한다.

## 단계 D

수지(화합물 IV)를  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2X)로 세척하고,  $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}(0)$ (0.3당량)의 용액 및  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 중  $\text{PhSiH}_3$ (10과량)에 현탁시킨다. 혼합물을 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2X)로 세척한다. 팔라듐 단계를 반복한다. 용매를 제거하고, 수지를  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2X), DMF(2X)중 N,N-디이소프로필레틸암모늄 디에틸디티오카바메이트, DMF(2X)로 세척하여 화합물 V를 수득한다.

## 단계 E

단계 D로부터의 탈보호된 수지를 N-메틸이소니페코트산과 단계 C에서 기술한 바와 같이 커플링하여 화합물 VI를 수득한다.

## 단계 F

Fmoc 보호된 수지 VI을 ACT357에 의해 수집용기로부터 36개의 반응용기에 동등하게 분배하여 화합물  $\text{VI}_{1-36}$ 을 수득한다.

## 단계 G

수지(화합물  $\text{VI}_{1-36}$ )를 단계 B에서 기술한 바와 같이 피페리딘으로 처리하여 FMOC그룹을 제거한다.

## 단계 H

단계 G로부터의 탈보호된 수지의 36개의 분취량을 DMF에 현탁시킨다. 각각의 반응용기에 DMF중 적절한 카복실산( $\text{R}_{1-36}\text{CO}_2\text{H}$ ; 3당량), HATU(3당량) 및 NMM(7.5당량)을 가한다. 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지의 분취량을 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지의 분취량에 대한  $\text{R}_{1-36}\text{CO}_2\text{H}$ 의 커플링과 세척단계를 반복하여, 화합물  $\text{VIII}_{1-36}$ 을 수득한다.

## 단계 I

수지(화합물 VIII<sub>1-36</sub>)의 분취량을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3X)로 세척한다. 각각의 반응용기에 TFA:H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 90:5:5로 가하고, 용기를 120분 동안 진탕시킨다. 용매를 반응용기로부터 개별 튜브로 여과한다. 수지의 분취량을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2X) 및 MeOH(2X)로 세척하고, 여액을 개별 튜브에 배합한다. 개별 튜브를 진공상태에서 증발시켜 화합물 IX<sub>1-36</sub>을 형성한다.

#### 단계 J

각각의 유리 카복실산 IX<sub>1-36</sub>을 DMF에 용해시킨다. 각각의 용액에 피리딘(1.05당량)을 가하고, 테트라플루오로페닐 트리플루오로아세테이트(1.1당량)를 가한다. 혼합물을 45분 동안 실온에서 교반한다. 용액을 EtOAc로 희석하고, 5%의 수성 NaHCO<sub>3</sub>(3X)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고, 진공상태에서 증발시켜 화합물 X<sub>1-36</sub>을 수득한다.

#### 실시에 6

화학식 R<sub>1-36</sub>-LYS( $\epsilon$ -<sub>1</sub>NIP)-NBA-TFP의 화합물 세트의 제조

도 4는 36개의 T-L-X 화합물(X = L<sub>n</sub>) 세트의 병렬합성을 나타내는데, 이때, L<sub>n</sub>는 활성 에스테르(특히, 테트라플루오로페닐 에스테르)이고, L<sup>2</sup>는 L<sub>n</sub>가 L<sup>2</sup>그룹의 방향족 환과 직접 결합하는 경우 L<sub>n</sub>와 L<sup>2</sup>의 직접결합이 되는 L<sup>3</sup>을 갖는 오르토-니트로벤질아민 그룹이며, T는 라이신의 카복실산 그룹이 L<sup>2</sup> 벤질아민 그룹의 질소원자와 결합하는 경우 아마이드 결합을 형성하는 모듈구조를 가지며, 가변 중량 성분 R<sub>1-36</sub>(여기서, R 그룹이 본원에서 정의한 바와 같이 T<sup>2</sup>에 상응하는 경우 및 본원에 기재된 어떠한 특정 카복실산을 통해서도 도입될 수 있을 경우)은, 질량 분광 감도 증진제 그룹(N-메틸이소니페코트산을 통하여 도입된)이 라이신의  $\epsilon$ -아미노 그룹을 통하여 결합하는 반면, 라이신의  $\alpha$ -아미노 그룹을 통해 결합한다.

#### 도 4 참조

#### 단계 A

NovaSyn HMP 수지를 실시예 5의 단계 A에서 기술한 과정과 같이 화합물 I ([참조: Brown et al., Molecular Diversity, 1, 4 (1995)]의 과정에 따라 NBA 제조된)과 커플링하여 화합물 II를 수득한다.

#### 단계 B-J

수지(화합물 II)를 실시예 5의 B-J 단계에서 기술한 바와 같이 처리하여 화합물 X<sub>1-36</sub>을 수득한다.

#### 실시에 7

화학식 <sub>1</sub>NIP-LYS( $\epsilon$ -R<sub>1-36</sub>)-ANP-TFP의 화합물 세트의 제조

도 5는 36개의 T-L-X 화합물(X = L<sub>n</sub>) 세트의 병렬합성을 나타내는데, 이때, L<sub>n</sub>는 활성 에스테르(특히, 테트라플루오로페닐 에스테르)이고, L<sup>2</sup>는 L<sub>n</sub>와 L<sup>2</sup>를 결합시키는 메틸렌 그룹이 되는 L<sup>3</sup>을 갖는 오르토-니트로벤질아민 그룹이며, T는 라이신의 카복실산 그룹이 L<sup>2</sup> 벤질아민 그룹의 질소원자와 결합하는 경우 아마이드 결합을 형성하는 모듈구조를 가지며, 가변 중량 성분 R<sub>1-36</sub>(여기서, R 그룹이 본원에서 정의한 바와 같이 T<sup>2</sup>에 상응하는 경우 및 본원에 기재된 어떠한 특정 카복실산을 통해서도 도입될 수 있을 경우)은, 질량 분광 감도 증진제 그룹(N-메틸이소니페코트산을 통하여 도입된)이 라이신의  $\alpha$ -아미노 그룹을 통하여 결합하는 반면, 라이신의  $\epsilon$ -아미노 그룹을 통해 결합한다.

#### 도 5 참조

#### 단계 A-C.

실시에 5와 동일함.

단계 D

수지(화합물 IV)를 실시예 5의 단계 B에 기술한 바와 같이 피페리딘으로 처리하여 Fmoc 그룹을 제거한다.

단계 E

단계 D에서 수지상의 탈보호된 α-아민을 실시예 5의 단계 D에 기술한 바와 같이 N-메틸이소니페코트산으로 커플링하여 화합물 V를 수득한다.

단계 F

실시에 5와 동일함.

단계 G

수지(화합물 VI<sub>1-36</sub>)를 실시예 5의 단계 D에 기술한 바와 같이 팔라듐으로 처리하여 Alloc 그룹을 제거한다.

단계 H-J

화합물 X<sub>1-36</sub>을 실시예 5와 동일한 방식으로 제조한다.

실시에 8

화학식 R<sub>1-36</sub>-GLU(γ-DIAEA)-ANP-TFP의 화합물 세트의 제조

도 6은 36개의 T-L-X 화합물(X = L<sub>n</sub>) 세트의 병렬합성을 나타내는데, 이때, L<sub>n</sub>는 활성 에스테르(특히, 테트라플루오로페닐 에스테르)이고, L<sup>2</sup>는 L<sub>n</sub>와 L<sup>2</sup>를 결합시키는 메틸렌 그룹이 되는 L<sup>3</sup>을 갖는 오르토-니트로벤질아민 그룹이며, T는 글루탐산의 α-카복실산 그룹이 L<sup>2</sup> 벤질아민 그룹의 질소원자와 결합하는 경우 아마이드 결합을 형성하는 모듈구조를 가지며, 가변 중량 성분 R<sub>1-36</sub>(여기서, R 그룹이 본원에서 정의한 바와 같이 T<sup>2</sup>에 상응하는 경우 및 본원에 기재된 어떠한 특정 카복실산을 통해서도 도입될 수 있을 경우)은, 질량 분광 감도 증진제 그룹(2-(디이소프로필아미노)에틸라민)이 글루탐산의 γ-카복실산을 통하여 결합하는 반면, 글루탐산 그룹의 α-아미노 그룹을 통해 결합한다.

도 6 참조

단계 A-B.

실시에 5와 동일함.

단계 C

탈보호된 수지(화합물 III)를 실시예 5의 단계 C에 기술한 커플링 방법을 사용하여 Fmoc-Glu-(OAI)-OH에 커플링하여 화합물 IV를 수득한다.

단계 D

수지(화합물 IV)상의 알릴 에스테르를  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2X)로 세척하고,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 중의  $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}(0)$ (0.3당량)과 N-메틸아닐린(3당량)의 용액과 혼합한다. 혼합물을 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2X)로 세척한다. 팔라듐 단계를 반복한다. 용매를 제거하고, 수지를  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2X), DMF(2X)중의 N,N-디이소프로필에틸암모늄 디에틸디티오카바메이트, DMF(2X)로 세척하여 화합물 V를 수득한다.

단계 E

단계 D로부터의 탈보호된 수지를 DMF에 현탁시키고, HATU(3당량) 및 NMM(7.5 당량)을 혼합하여 활성화시킨다. 용기를 15분 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(1X)로 세척한다. 수지를 2-(디이소프로필아미노)에틸아민(3당량) 및 NMM(7.5당량)과 혼합한다. 용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 수지에 대한 2-(디이소프로필아미노)에틸아민의 커플링과 세척단계를 반복하고, 화합물 VI를 수득한다.

단계 F-J

실시에 5와 동일함.

실시에 9

화학식  $\text{R}_{1-36}$ -LYS( $\epsilon$ -INIP)-ANP-LYS( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>의 화합물 세트의 제조

도 7은 36개의 T-L-X 화합물( $X = L_n$ ) 세트의 병렬합성을 나타내는데, 이때,  $L_n$ 는 아민(특히, 라이신-유도된 잔기의  $\epsilon$ -아미노 그룹)이고,  $L^2$ 는  $L_n$ 와  $L^2$ 를 결합시키는 카복시아미도 치환된 알킬렌아미노아실알킬렌 그룹이 되는  $L^3$ 을 갖는 오르토-니트로벤질아민 그룹이며, T는 라이신의 카복실산 그룹이  $L^2$  벤질아민 그룹의 질소원자와 결합하는 경우 아마이드 결합을 형성하는 모듈구조를 가지며, 가변 중량 성분  $\text{R}_{1-36}$ (여기서, R 그룹이 본원에서 정의한 바와 같이  $T^2$ 에 상응하는 경우 및 본원에 기재된 어떠한 특정 카복실산을 통해서도 도입될 수 있을 경우)은, 질량 분광 감도 증진제 그룹(N-메틸이소니페코트산을 통하여 도입된)이 라이신의  $\epsilon$ -아미노 그룹을 통하여 결합하는 반면, 라이신의  $\alpha$ -아미노 그룹을 통해 결합한다.

도 7 참조

단계 A

Fmoc-Lys(Boc)-SRAM 수지(제조사: ACT; 화합물 I)를 DMF중의 25% 피페리딘과 혼합하여 5분간 진탕시킨다. 수지를 여과한 후, DMF중의 25% 피페리딘과 혼합하고, 10분간 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척하고, 단계 B에 직접 사용한다.

단계 B

DMF내의 수지(화합물 II), ANP(제조사: ACT; 3당량), HATU(3당량) 및 NMM(7.5당량)을 가하고, 수집용기를 1시간 동안 진탕시킨다. 용매를 제거하고, 수지를 NMP(2X), MeOH(2X) 및 DMF(2X)로 세척한다. 수지에 대한 I의 커플링과 세척단계를 반복하고, 화합물 III를 수득한다.

단계 C-J

수지(화합물 III)를 실시에 5의 단계 B- I 과 같이 처리하여 화합물  $\text{X}_{1-36}$ 을 수득한다.

실시에 10

화학식  $\text{R}_{1-36}$ -LYS( $\epsilon$ -TFA)-LYS( $\epsilon$ -INIP)-ANP-TFP의 화합물 세트의 제조

도 8은 36개의 T-L-X 화합물( $X = L_n$ ) 세트의 병렬합성을 나타내는데, 이때,  $L_n$ 는 활성 에스테르(특히, 테트라플루오로페닐 에스테르)이고,  $L^2$ 는  $L_n$ 와  $L^2$ 를 결합시키는 메틸렌 그룹이 되는  $L^3$ 을 갖는 오르토-니트로벤질아민 그룹이며, T는 첫 번째 라이신의 카복실산 그룹이  $L^2$  벤질아민 그룹의 질소원자와 결합하는 경우 아마이드 결합을 형성하는 모듈구조를 가지며, 질량 분광 감도 증진제 그룹(N-메틸이소니페코트산을 통하여 도입된)은 첫 번째 라이신의  $\alpha$ -아미노 그룹을 통하여 결합하며, 두 번째 라이신 분자는 첫 번째 라이신의  $\epsilon$ -아미노 그룹을 통해 첫 번째 라이신에 결합하며, 분자 중량 조절제 그룹(트리플루오로아세틸 구조를 갖는)은 두 번째 라이신의  $\epsilon$ -아미노 그룹을 통해 결합하고, 가변 중량 성분  $R_{1-36}$ (여기서, R 그룹이 본원에서 정의한 바와 같이 T<sup>2</sup>에 상응하는 경우, 및 본원에 기재된 어떠한 특정 카복실산을 통해서도 도입될 수 있을 경우)은 두 번째 라이신의  $\alpha$ -아미노 그룹을 통해 결합한다.

도 8 참조

단계 A-E

이들 단계는 실시예 5의 단계 A-E와 동일함.

단계 F

수지(화합물 VI)를 실시예 5의 단계 B에 기술한 바와 같이 피페리딘으로 처리하여 Fmoc 그룹을 제거한다.

단계 G

탈보호된 수지(화합물 VII)를 실시예 5의 단계 C에 기술한 커플링 방법을 사용하여 Fmoc-Lys(Tfa)-OH에 커플링하여 화합물 VIII를 수득한다.

단계 H-K

수지(화합물 VIII)를 실시예 5의 단계 F-J와 같이 처리하여 화합물  $XI_{1-36}$ 을 수득한다.

실시예 11

화학식  $R_{1-36}$ -LYS( $\epsilon$ -INP)-ANP-5'-AH-ODN의 화합물 세트의 제조

도 9는 실시예 5(X가 활성 에스테르인 경우 기타 T-L-X 화합물과 같은 과정이 사용될 수 있다)의 에스테르로부터 유도된 36개의 T-L-X 화합물 세트( $X=MOI$ , 이때, MOI는 핵산 단편, ODN)의 병렬합성을 나타낸다. MOI는 포스포디에스테르-알킬벤아민 그룹을 통하여 MOI의 5' 말단을 통해 T-L에 결합된다.

도 9 참조

단계 A

화합물  $XII_{1-36}$ 을 문헌[참조:Van Ness et al., Nucleic Acids Res., 19, 3345(1991)]에 제공되어 있는 개질된 바이오틴화 과정에 따라 제조한다. 200mM의 붕산나트륨(pH 8.3, 250mL)중의 5'-아미노핵심 올리고뉴클레오타이드(화합물  $XII_{1-36}$ , 1mg)중 하나의 용액에 테트라플루오로페닐 에스테르(실시예 A로부터의 화합물  $X_{1-36}$ , NMP의 250mL 중 100배의 몰과량) 중 하나의 용액을 가한다. 반응물을 밤새 주의 온도에서 항온처리한다. 반응하지 않고 가수분해된 테트라플루오로페닐 에스테르는 세파텍스 G-50 크로마토그래피에 의해 화합물  $XII_{1-36}$ 으로부터 제거한다.

실시예 12

화학식  $R_{1-36}$ -LYS( $\epsilon$ -INP)-ANP-LYS( $\epsilon$ -(MCT-5'AH-ODN))-NH<sub>2</sub>의 화합물 세트의 제조

도 10은 실시예 11(X가 아민인 경우 기타 T-L-X 화합물과 같은 과정이 사용될 수 있다)의 아민으로부터 유도된 36개의 T-L-X화합물 세트(X = MOI, 이때, MOI는 핵산 단편, ODN)의 병렬합성을 나타낸다. MOI는 포스포디에스테르-알킬렌아민 그룹을 통하여 MOI의 5' 말단을 통해 T-L에 결합된다.

도 10 참조

단계 A

5'-[6-(4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-2-일아미노)헥실]올리고뉴클레오타이드XII<sub>1-36</sub>을 문헌[참조:Van Ness et al., Nucleic Acids Res., 19,3345(1991)]에 따라 제조한다.

단계 B

100mM의 붕산나트륨(pH 8.3)중의 1mg/ml 농도의 5'-[6-(4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-2-일아미노)헥실]올리고뉴클레오타이드(화합물 XII<sub>1-36</sub>)중 하나의 용액에 R<sub>1-36</sub>-Lys(e-iNIP)-ANP-Lys(e-NH<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>(실시예 11로부터의 화합물 X<sub>1-36</sub>)로부터 선택된 1급 아민 100배의 몰과량을 가한다. 용액을 밤새 주위 온도에서 혼합한다. 반응하지 않는 아민을 세척 용액으로 H<sub>2</sub>O를 사용하여 3000MW 크기배제 막(제조자: Amicon, Beverly, MA)을 통해 한외여과에 의해 제거한다. 화합물 XIII<sub>1-36</sub>을 100mL로 용적을 감소시켜 분리한다.

실시예 13

질량 분광분석법에 의한 다수의 태그의 동시 검출의 입증

이 실시예는 질량 분광분석에 의해 동시에 다수의 화합물(태그)을 검출하는 능력에 대해 기술하고 있다. 이러한 특정 실시예에서, 31개의 화합물을 매트릭스와 혼합하고, 침전시키고 고체 지지체상에 건조시킨 후, 레이저로 탈착시킨다. 이어서 생성된 이온을 질량 분광분석기에 도입한다.

다음 화합물(Aldrich, Milwaukee, WI로부터 구매)을 동물로 혼합하여 한 화합물 당 최종 농도 0.002M(기준)이 되게 한다: 벤즈아미드(121.14), 니코틴아미드(122.13), 피라진아미드(123.12), 3-아미노-4-피라졸카복실산(127.10), 2-티오펜카복시아미드(127.17), 4-아미노벤즈아미드(135.15), 톨루미드(135.17), 6-메틸니코틴아미드(136.15), 3-아미노니코틴아미드(137.14), 니코틴아미드 N-옥사이드(138.12), 3-하이드로피콜린아미드(138.13), 4-플루오로벤즈아미드(139.13), 신남아미드(147.18), 4-메톡시벤즈아미드(151.17), 2,6-디플루오르벤즈아미드(157.12), 4-아미노-5-이미다졸-카복시아미드(162.58), 3,4-피리딘-디카복시아미드(165.16), 4-에톡시벤즈아미드(165.19), 2,3-피라진디카복시아미드(166.14), 2-니트로벤즈아미드(166.14), 3-플루오로-4-메톡시벤조산(170.4), 인돌-3-아세트아미드(174.2), 5-아세틸살리실아미드(179.18), 3,5-디메톡시벤즈아미드(181.19), 1-나프탈렌아세트아미드(185.23), 8-클로로-3,5-디아미노-2-피라진카복시아미드(187.59), 4-트리플루오로메틸-벤즈아미드(189.00), 5-아미노-5-페닐-4-피라졸-카복시아미드(202.22), 1-메틸-2-벤질-말로나메이트(207.33), 4-아미노-2,3,5,6-테트라플루오로벤즈아미드(208.11), 2,3-나프탈렌디카복실산(212.22). 화합물은 상기 기술된 농도의 DMSO 내에 위치시킨다. 이어서 물질의 1 $\mu$ l를 알파-시아노-4-하이드록시 신남산 매트릭스(1:10000 희석 후)와 혼합하고, 고체 스테인레스 강철 지지체상에 침전시킨다.

이어서 물질은 프로틴(Protein) TOF 질량 분광분석기(제조자: Bruker, Manning Park, MA)를 이용하는 레이저로 탈착시키고 형성되는 이온은 선형모드와 반사모드 둘 다로 측정한다. 다음 m/z 값이 관찰된다.(도 11)

121.1 ---->벤즈아미드(121.14)

122.1 ---->니코틴아미드(122.13)

123.1 ---->피라진아미드(123.12)

124.1

- 125.2
- 127.3 ----->3-아미노-4-피라졸카복실산(127.10)
- 127.2 -----> 2-티오펜카복스아미드(127.17)
- 135.1 ----->4-아미노벤즈아미드(135.15)
- 135.1 ----->톨루미드(135.17)
- 136.2 ----->6-메틸니코틴아미드(136.15)
- 137.1 ----->3-아미노니코틴아미드(137.14)
- 138,2 ----->니코틴아미드 N-옥사이드(138.12)
- 138.2 ----->3-하이드로피콜린아미드(138.13)
- 139.2 ----->4-플루오로벤즈아미드(139.13)
- 140.2
- 147.3 ----->신남아미드(147.18)
- 148.2
- 149.2
- 4-메톡시벤즈아미드(151.17)
- 152.2
- 2,6-디플루오르벤즈아미드(157.12)
- 158.3
- 4-아미노-5-이미다졸-카복시아미드(162.58)
- 163.3
- 165.2 ----->3,4-피리딘-디카복시아미드(165.16)
- 165.2 ----->4-에톡시벤즈아미드(165.19)
- 166.2 ----->2,3-피라진디카복시아미드(166.14)
- 166.2 ----->2-니트로벤즈아미드(166.14)
- 3-플루오로-4-메톡시벤조산(170.4)
- 171.1
- 172.2

173.4

인돌-3-아세트아미드(174.2)

178.3

179.3 ---->5-아세틸살리실아미드(179.18)

181.2 ---->3,5-디메톡시벤즈아미드(181.19)

182.2 ---->

1-나프탈렌아세트아미드(185.23)

186.2

8-클로로-3,5-디아미노-2-피라진카복시아미드(187.59)

188.2

189.2 ---->4-트리플루오로메틸-벤즈아미드(189.00)

190.2

191.2

192.3

5-아미노-5-페닐-4-피라졸-카복시아미드(202.22)

203.2

203.4

1-메틸-2-벤질-말로나메이트(207.33)

4-아미노-2,3,5,6-테트라플루오로벤즈아미드(208.11)

212.2 ---->2,3 나프탈렌디카복실산(212.22)

219.3

221.2

228.2

234.2

237.4

241.4



데이터는 예측 질량을 갖는 스펙트럼에 나타난 31개 혼합물중 22개를 나타내며, 31개 혼합물중 9개는 n + H 질량(1 분자 질량 단위, amu)을 갖는 스펙트럼에서 예측 질량을 초과하여 나타난다. 후자의 현상은 화합물중 아민의 양자화에 기인할 수도 있다. 따라서, 31개중 31개의 화합물은 MALDI 질량 분광분석에 의해 검출된다. 더욱 중요하게는, 실시예는 다수의 태그가 분광분석 방법에 의해 동시에 검출될 수 있음을 설명한다.

알파-시아노 매트릭스는 단독으로(도 11) 146.2, 164.1, 172.1, 173.1, 189.1, 190.1, 191.1, 192.1, 212.1, 224.1, 228.0, 234.3에서 피크를 제공한다. 스펙트럼중의 기타 정체 확인된 질량은 구매한 화합물중의 오염물질에 기인하며, 이는 화합물을 추가로 정제하는데 노력을 기울이지 않았기 때문이다.

#### 실시예 14

미세위성체 마커: PCR 증폭

미세위성체 마커는 다음의 표준 PCR 조건을 사용하여 증폭시킨다. 요약하면, PCR 반응은 40ng의 게놈 DNA, 각각의 프라이머에 50 pmol, 0.125mM dNTP 및 1 단위의 Taq 중합효소를 함유하는 50 $\mu$ l의 총 용적 내에서 수행된다. 1X 증폭 완충액은 10mM 트리스 염기, pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1%의 트리톤 X-100 및 0.01%의 젤라틴을 함유한다. 반응은 "열 개시" 단계를 사용하여 수행된다: Taq 중합효소를 96°C에서 5분간 최초의 변성단계 후에만 가한다. 증폭은 35 사이클 동안 수행된다: 변성(94°C에서 40초간) 및 어닐링(55°C에서 30초간). 연장단계(72°C에서 2분간)는 최종 어닐링 후에 공정을 끝낸다. 수득하고자 하는 증폭 생성물은 짧고(90 내지 350 염기쌍의 길이) 55°C에서 94°C(1°C/초의 램핑비율로 수득됨)까지 온도를 상승시키기 위해서 시간 간격이 충분히 길기 때문에, DNA 연장의 완결은 72°C에서의 어떤 단계 없이 달성될 수 있다.

전술한 바로부터, 본 발명의 특정한 실시예는 본원에서 예시를 위한 목적으로 기술되었지만, 본 발명의 취지 및 범주를 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

- (a) 선택된 표적 핵산 분자로부터, 특정 핵산 단편과 상호 관계가 있고 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그가 부착된 태그된(tagged) 핵산 분자를 형성하는 단계;
- (b) 태그된 분자를 크기에 의해 분리하는 단계;
- (c) 태그된 분자로부터 태그를 절단하는 단계; 및
- (d) 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 핵산 분자의 존재를 결정하는 단계를 포함하는, 핵산 분자의 존재를 결정하는 방법.

#### 청구항 2.

- (a) 특정 단편과 상호 관계가 있고 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그를 포함하는 태그된 핵산 프로브의 상보적으로 선택된 표적 핵산 서열로의 하이브리드화를 허용하기에 충분한 조건하 및 시간 동안 태그된 핵산 프로브를 표적 핵산 분자와 배합하는 단계;
- (b) 하이브리드화되고 태그된 프로브의 크기, 하이브리드화되지 않은 프로브 또는 표적 분자의 크기, 또는 프로브:표적 하이브리드의 크기를 변화시키는 단계;
- (c) 태그된 프로브를 크기에 의해 분리하는 단계;
- (d) 태그된 프로브로부터 태그를 절단하는 단계; 및

(e) 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 선택된 핵산 분자를 검출하는 단계를 포함하는, 선택된 핵산 분자의 검출 방법.

### 청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 태그의 검출이 질량 분광 분석, 적외선 분광 분석, 자외선 분광 분석 또는 정전위 전류법에 의해 이루어지는 방법.

### 청구항 4.

제1항 또는 제2항에 있어서, 4개 내지 450개의 태그된 핵산 단편이 생성되고 각각의 태그가 선택된 핵산 단편에 대해 독특한 것인 방법.

### 청구항 5.

제1항 또는 제2항에 있어서, 태그된 분자가 겔 전기영동법, 모세관 전기영동법, 마이크로-채널 전기영동법, HPLC, 크기 배출 크로마토그래피 및 여과로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법에 의해 분리되는 방법.

### 청구항 6.

제1항 또는 제2항에 있어서, 태그된 분자가 산화 방법, 환원 방법, 산불안정화 방법, 염기 불안정화 방법, 효소 방법, 전기 화학적 방법, 열적 방법 및 광 불안정화 방법으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법에 의해 절단되는 방법.

### 청구항 7.

(a) 선택된 표적 분자로부터, 특정 핵산 단편과 상호 관계가 있고 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그가 부착된 태그된 핵산 분자를 형성하는 단계;

(b) 태그된 분자를 크기에 의해 분리하는 단계;

(c) 태그된 분자로부터 태그를 절단하는 단계; 및

(d) 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 선택된 유기체의 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는, 선택된 유기체의 유전자형을 결정하는 방법.

### 청구항 8.

(a) 특정 단편과 상호 관계가 있고 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 검출될 수 있는 태그를 포함하는 태그된 핵산 분자의 선택된 표적 분자로서의 하이브리드화를 허용하기에 충분한 조건하 및 시간 동안 태그된 핵산 분자를 선택된 표적 분자와 배합하는 단계;

(b) 태그된 분자를 크기에 의해 분리하는 단계;

(c) 태그된 분자로부터 태그를 절단하는 단계; 및

(d) 분광 분석법 또는 전위차법에 의해 태그를 검출한 다음, 이로부터 선택된 유기체의 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는, 선택된 유기체의 유전자형을 결정하는 방법.

### 청구항 9.

제7항 또는 제8항에 있어서, 태그의 검출이 질량 분광 분석, 적외선 분광 분석, 자외선 분광 분석 또는 정전위 전류법에 의해 이루어지는 방법.

### 청구항 10.

제7항 또는 제8항에 있어서, 4개 내지 450개의 태그된 핵산 분자가 생성되고 각각의 태그는 선택된 핵산 단편에 대해 독특한 것인 방법.

### 청구항 11.

제7항 또는 제8항에 있어서, 태그된 분자가 겔 전기영동법, 모세관 전기영동법, 마이크로-채널 전기영동법, HPLC, 크기 배제 크로마토그래피 및 여과로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법에 의해 분리되는 방법.

### 청구항 12.

제7항 또는 제8항에 있어서, 태그된 분자가 산화 방법, 환원 방법, 산 불안정화 방법, 염기 불안정화 방법, 효소 방법, 전기 화학적 방법, 열적 방법 및 광 불안정화 방법으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법에 의해 절단되는 방법.

### 청구항 13.

화학식 15의 화합물을 다수 포함하는 조성물.

화학식 15

$T^{ms}$ -L-MOI

상기식에서,

$T^{ms}$ 는 (i) 탄소, (ii) 수소 및 불소 중의 하나 또는 이들 둘 다 및 (iii) 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 독특한  $T^{ms}$ -함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 하는 유기 그룹이며, 이때  $T^{ms}$ -함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 유지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며;

이때 2개 이상의 화합물은 동일한  $T^{ms}$ 를 갖지만 이들 분자의 MOI 그룹은 동일하지 않은 뉴클레오타이드 길이를 가지며, MOI 단편은 ddAMP, DDCMP, ddGMP 및 ddTMP로부터 선택되는 동일한 디데옥시뉴클레오타이드로 종결되지 않는다.

**청구항 14.**

화학식 15의 화합물을 다수 포함하는 조성물.

화학식 15

T<sup>ms</sup>-L-MOI

상기식에서,

T<sup>ms</sup>는 (i) 탄소, (ii) 수소 및 불소 중의 하나 또는 이들 둘 다 및 (iii) 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 독특한 T<sup>ms</sup>-함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 하는 유기 그룹이며, 이때 T<sup>ms</sup>-함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 유지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며;

이때 2개 이상의 화합물은 동일한 T<sup>ms</sup>를 갖지만 이들 화합물은 비다공성 2.3 $\mu$ m의 폴리(스티렌-디비닐벤젠)-C<sub>18</sub> 입자의 칼럼 및 100mM 트리에틸암모늄 아세테이트를 포함하는 수성 완충액을 사용하는 HPLC에 의해 측정된 바와 같이 동일하지 않은 용출시간을 갖는다.

**청구항 15.**

화학식 15의 화합물을 다수 포함하는 조성물.

화학식 15

T<sup>ms</sup>-L-MOI

상기식에서,

T<sup>ms</sup>는 (i) 탄소, (ii) 수소 및 불소 중의 하나 또는 이들 둘 다 및 (iii) 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 독특한 T<sup>ms</sup>-함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 하는 유기 그룹이며, 이때 T<sup>ms</sup>-함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 유지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며;

이때 동일한 MOI의 뉴클레오타이드 길이를 갖는 2개의 화합물은 동일한 T<sup>ms</sup>를 갖지는 않는다.

**청구항 16.**

화학식 15의 화합물들의 세트를 다수 포함하는 조성물.

화학식 15

$T^{ms}$ -L-MOI

상기식에서,

$T^{ms}$ 는 (i) 탄소, (ii) 수소 및 불소 중의 하나 또는 이들 둘 다 및 (iii) 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은  $T^{ms}$ -함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 하는 유기 그룹이며, 이때  $T^{ms}$ -함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 유지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며;

이때, 화합물의 제1 세트 내의 구성원은 동일한  $T^{ms}$  그룹을 갖지만 MOI의 뉴클레오타이드의 수가 상이한, 동일하지 않은 MOI 그룹을 갖고 제1 세트 내에 10개 이상의 구성원이 존재하며, 이때 세트들 사이에서  $T^{ms}$  그룹은 2amu 이상 상이하다.

#### 청구항 17.

화학식 15의 화합물들의 세트를 다수 포함하는 조성물.

화학식 15

$T^{ms}$ -L-MOI

상기식에서,

$T^{ms}$ 는 (i) 탄소, (ii) 수소 및 불소 중의 하나 또는 이들 둘 다 및 (iii) 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 독특한  $T^{ms}$ -함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 하는 유기 그룹이며, 이때  $T^{ms}$ -함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 유지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

MOI는 핵산 단편이며;

이때, 세트 내의 화합물들은 동일하지 않은  $T^{ms}$  그룹을 갖지만 비다공성 2.3 $\mu$ m의 폴리(스티렌-디비닐벤젠)- $C_{18}$  입자의 칼럼 및 100mM 트리에틸암모늄 아세테이트를 포함하는 수성 완충액을 사용하는 HPLC에 의해 측정된 바와 같은 동일한 용출시간을 갖는다.

#### 청구항 18.

증폭 프라이머 쌍 다수를 포함하고 프라이머 쌍에서 하나의 프라이머 또는 프라이머 둘 다가 화학식 15의 화합물이고, 각각의 프라이머 쌍이 상이한 좌위와 관련이 있는, 유전자형을 결정하기 위한 키트.

화학식 15

$T^{ms}$ -L-MOI

상기식에서,

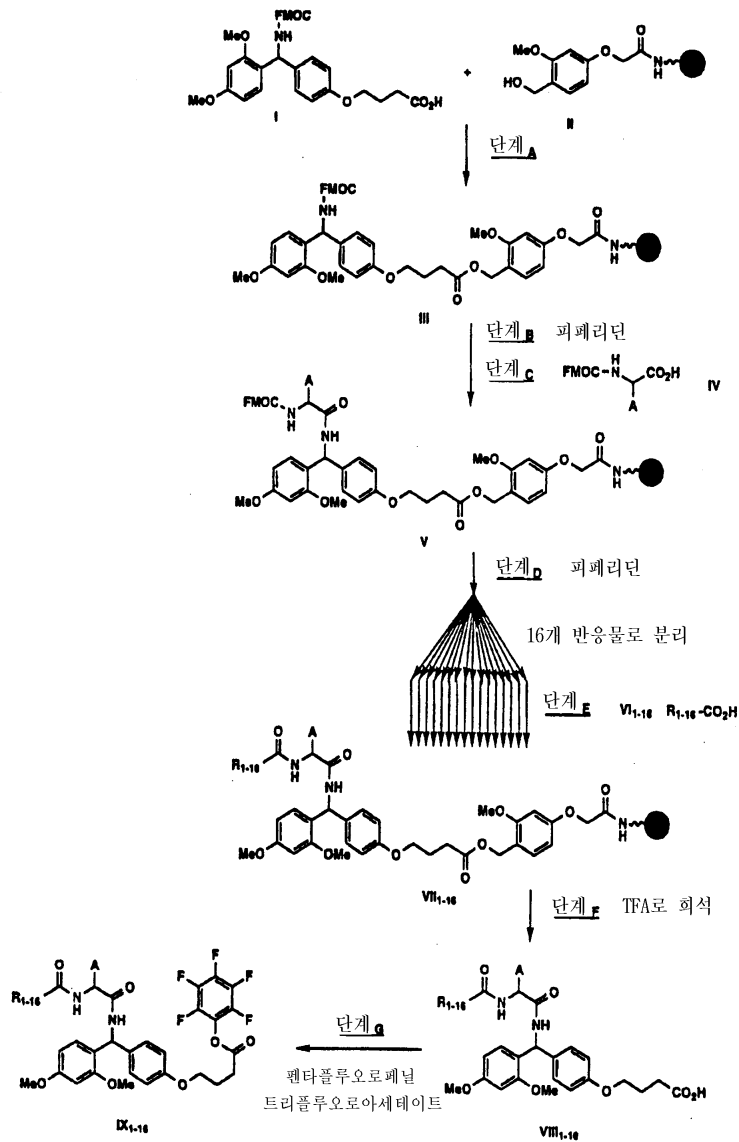
$T^{ms}$ 는 (i) 탄소, (ii) 수소 및 불소 중의 하나 또는 이들 둘 다 및 (iii) 산소, 질소, 황, 인 및 요오드로부터 선택된 임의의 원자를 포함하는, 질량 분광 분석에 의해 검출할 수 있는 유기 그룹이고;

L은 독특한  $T^{ms}$ -함유 잔기가 화합물의 나머지 부분으로부터 절단되도록 하는 유기 그룹이며, 이때  $T^{ms}$ -함유 잔기는 화합물을 질량 분광 분석하는 경우 단일 이온화된 전하상태를 유지하며 3급 아민, 4급 아민 및 유기산으로부터 선택되는 작용성 그룹을 포함하고;

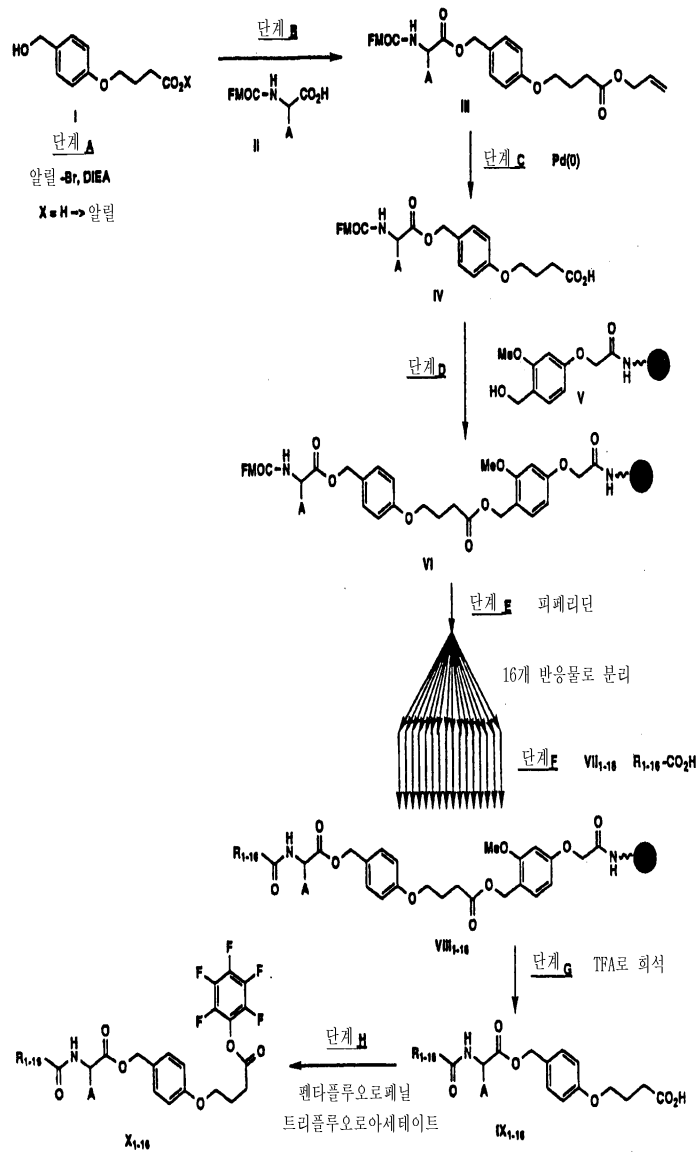
MOI는 핵산 단편이다.

도면

도면1

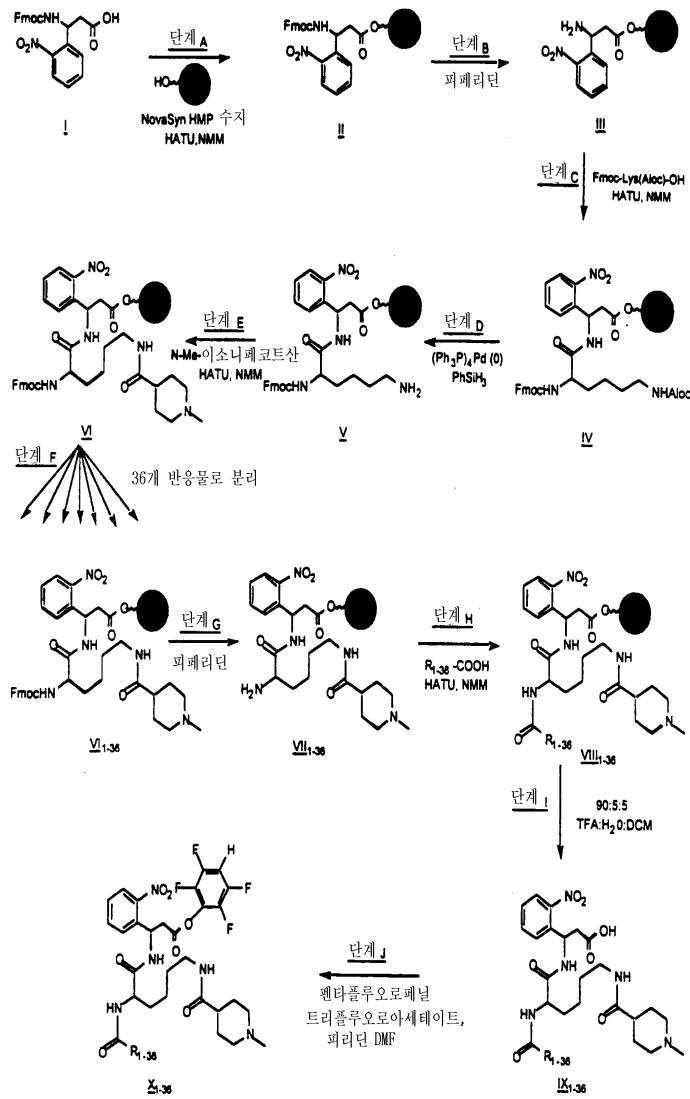


도면2

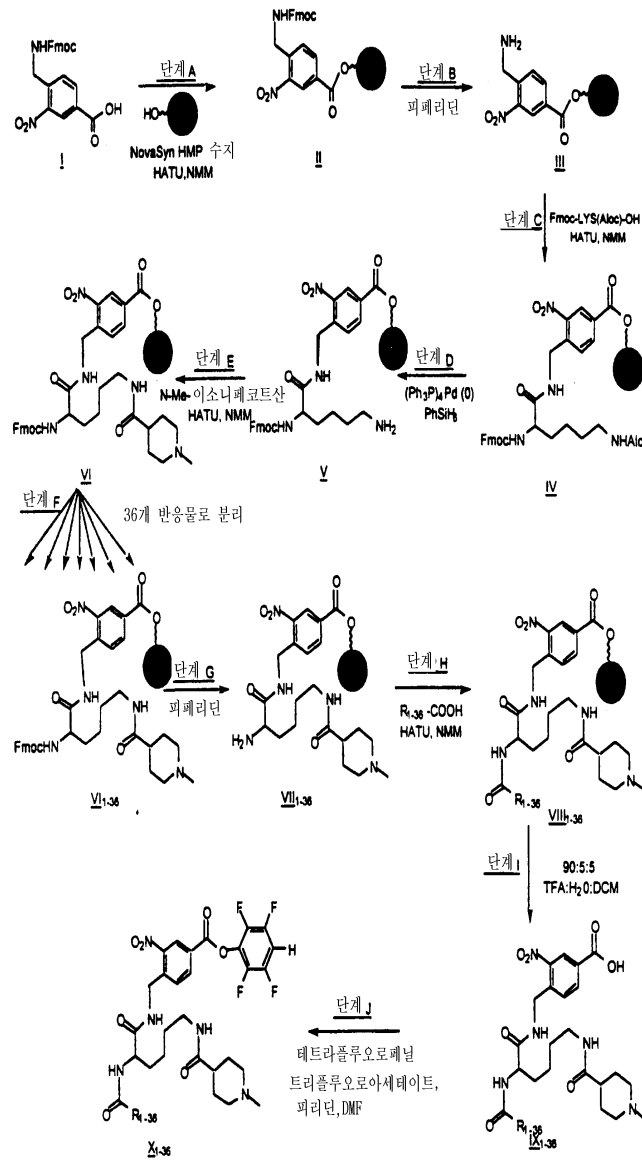




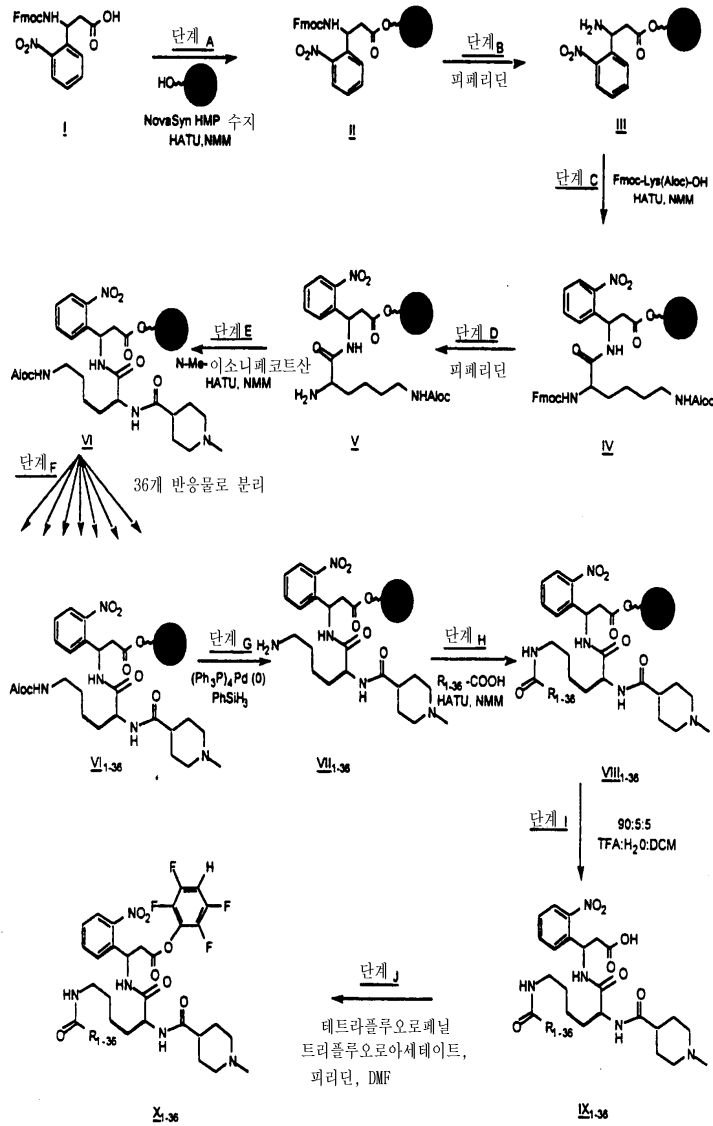
도면3



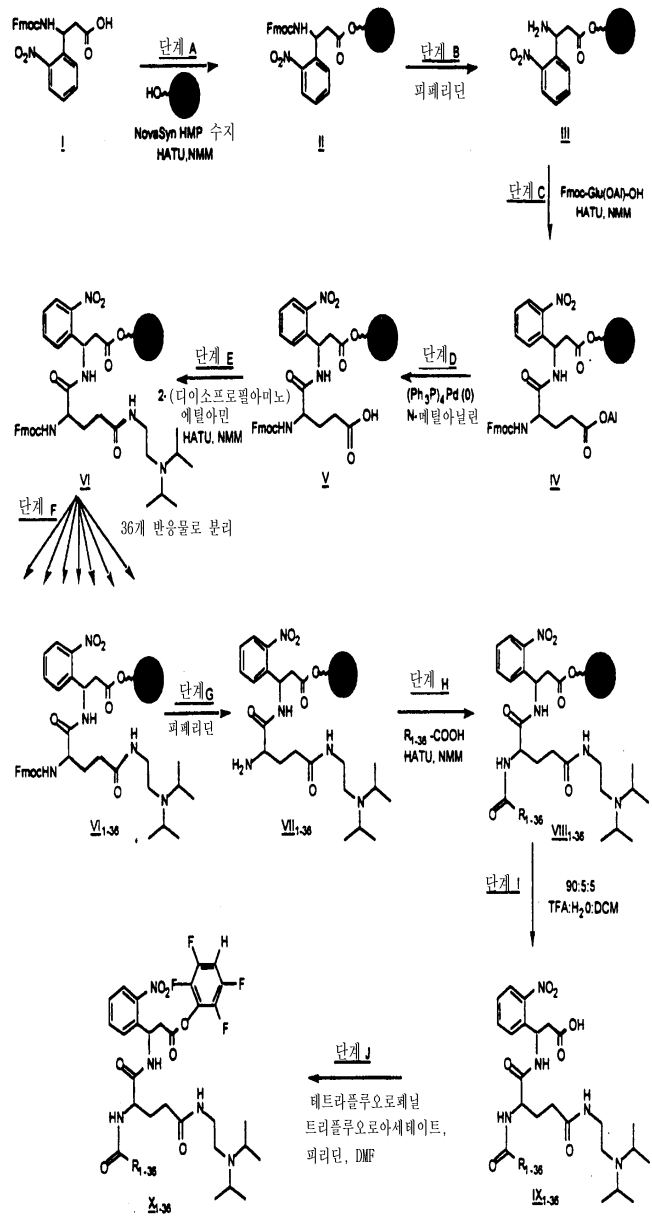
도면4



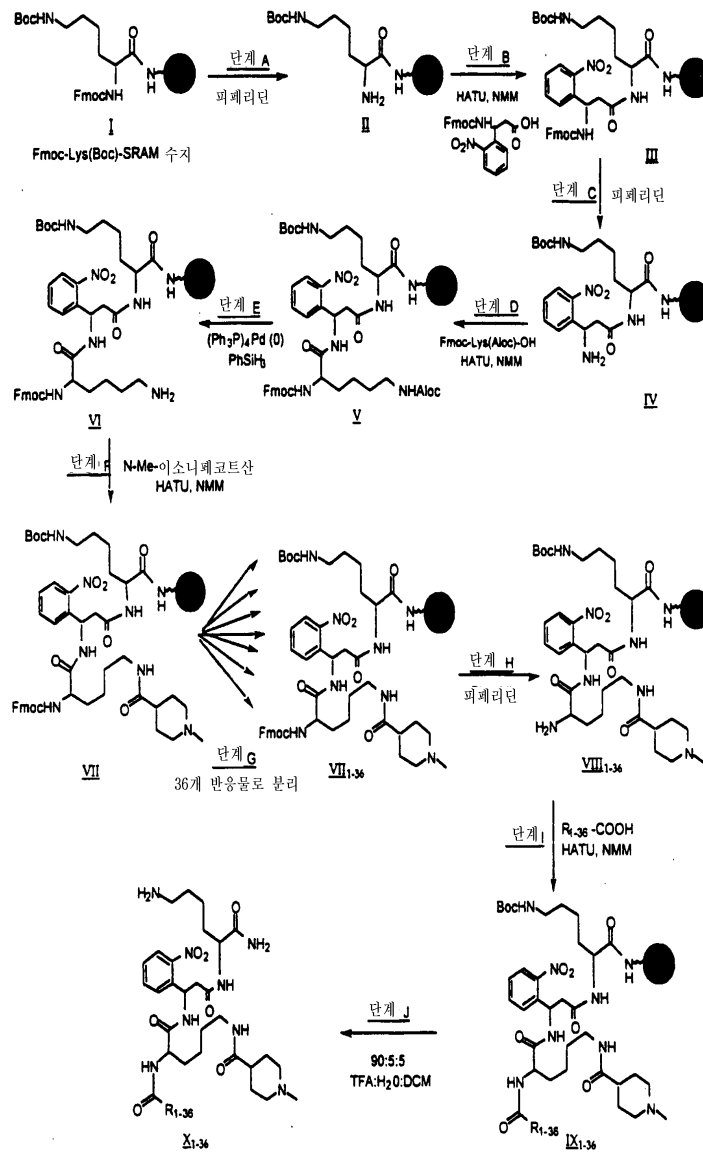
도면5



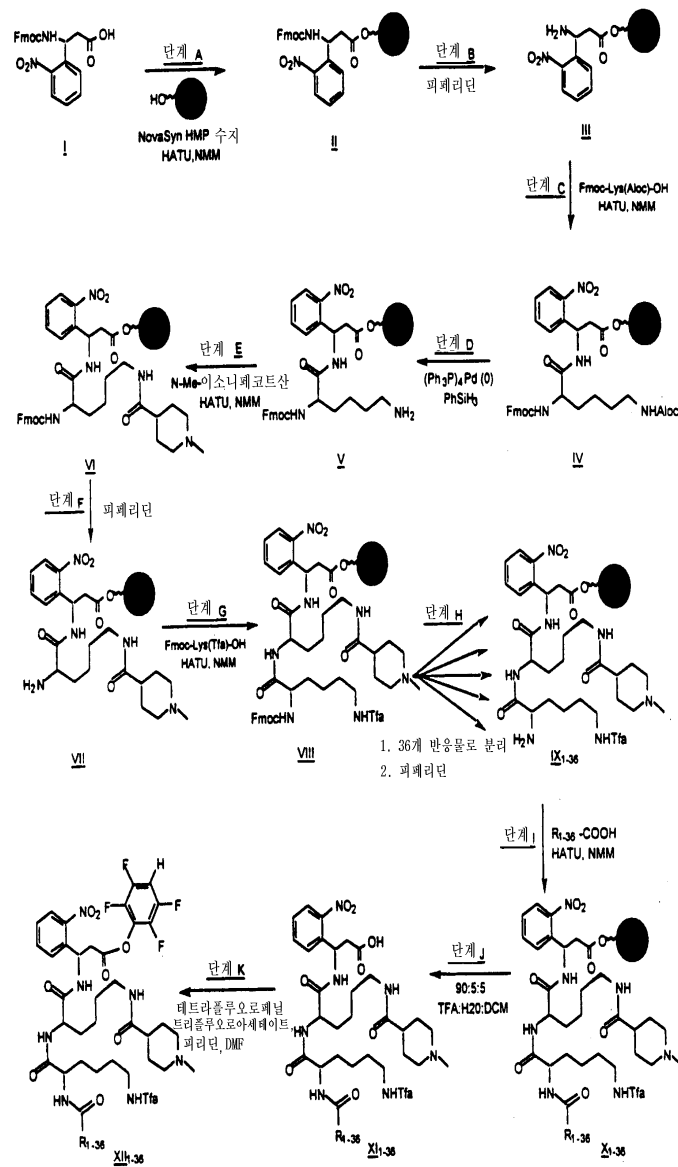
도면6



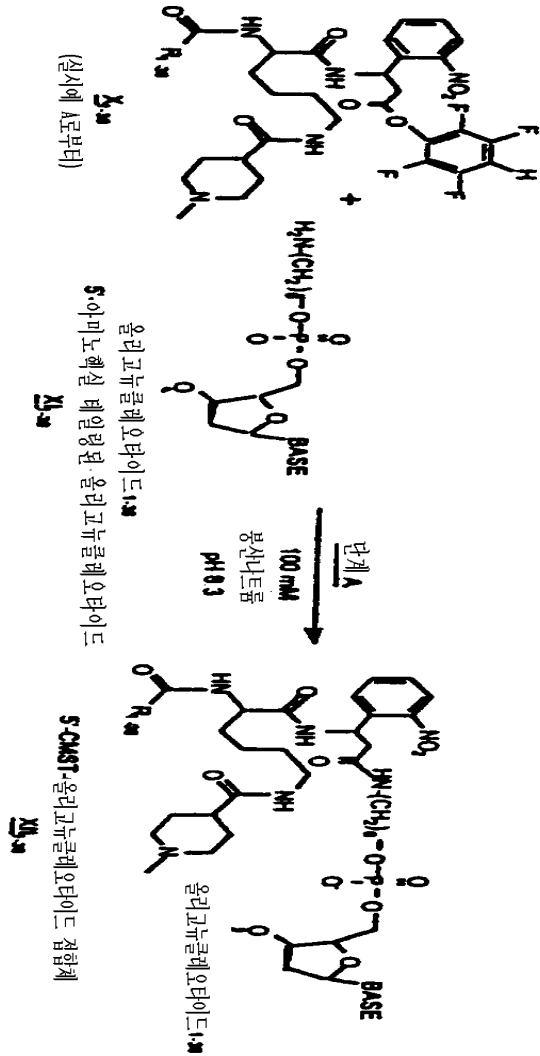
도면7



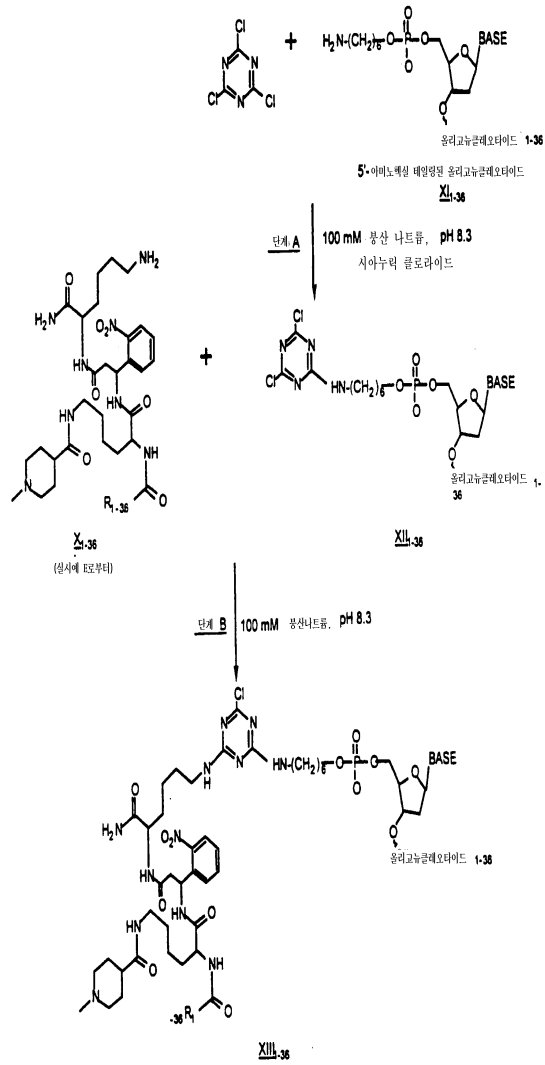
도면8



도면9



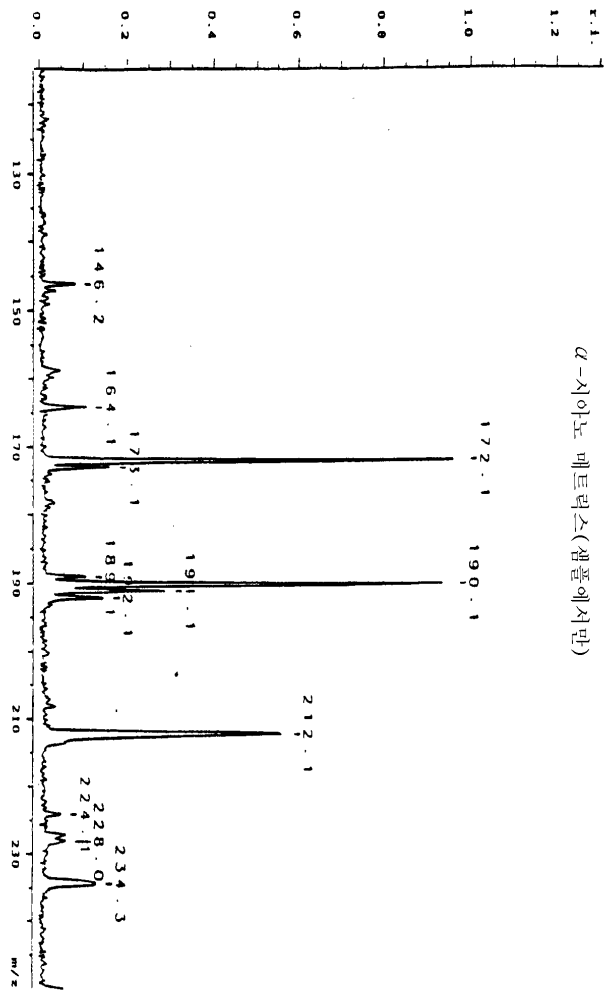
도면10







도면12



도면13

가변적 질량 성분    중량 범위 조절부위    질량 스펙트럼 감도 증진부위    광분해성 링커    5'-아미노핵심 테일링된 올리고뉴클레오타이드

