



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년03월14일
C12Q 1/00 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0694914
	(24) 등록일자	2007년03월07일

(21) 출원번호	10-2001-7000159	(65) 공개번호	10-2001-0074672
(22) 출원일자	2001년01월05일	(43) 공개일자	2001년08월08일
심사청구일자	2004년06월30일		
변역문 제출일자	2001년01월05일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/014969	(87) 국제공개번호	WO 2000/02899
국제출원일자	1999년07월01일	국제공개일자	2000년01월20일

(81) 지정국                      국내특허 : 오스트레일리아, 캐나다, 일본, 대한민국, 싱가포르,  
  
EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

(30) 우선권주장                      09/113,211                      1998년07월09일                      미국(US)

(73) 특허권자                      바이오셉트 인코포레이티드  
미국 캘리포니아 92121 샌 디에고 낸시 리지 드라이브 5810

(72) 발명자                      한순캅  
미국캘리포니아92672샌클레멘테비아텔폰511  
  
패트론앤드류  
미국캘리포니아92122샌디에고포르테드메라노4130넘버72  
  
파그나니로베르토  
미국캘리포니아92037라졸라카미니토프레스코8972

(74) 대리인                      차윤근

심사관 : 조경주

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 디엔에이 서열 하이브리드화를 최적화하기 위한 개선된펩티드 핵산 유니버셜 라이브러리의 사용방법

(57) 요약

치료, 진단 및/또는 유전자 특징분석 수단으로 유용한 펩티드 핵산 올리고머를 빠르게 확인하는 세가지 주된 통합 성분을 포함하는 시스템이 제공됨. 제1 성분은 쉽고도 효과적으로 합성될 수 있고, 가장 바람직하게는 라이브러리의 각 올리고머 종내의 주의깊게 선택된 위치 중으로 1 이상의 유니버셜 뉴클레오티드 염기를 도입하는 유니버셜 펩티드핵산 라이브러리

로서, 이는 상응하는 다량의 개개 종의 합성이 필요없고 보다 큰 라이브러리의 선별 능력을 지닌 라이브러리를 제공한다. 이 시스템에서 제2 성분은 표적 뉴클레오티드 서열(일반적으로, DNA 또는 RNA 서열)에 대한 여러 서열의 펩티드핵산의 결합 활성에 대한 정보를 제공하기 위해 고안된 다수의 분석을 포함하는 고 처리량 선별 시스템이다. 본 발명의 제3 성분은 고 처리량 선별 시스템에서 모아진 데이터를 빠르게 분석하고 이로부터 표적 뉴클레오티드 분자에 부착하고 이에 적절히 작용하는 펩티드핵산 올리고머의 염기서열 및 서열 길이를 결정하도록 특별히 고안된 소프트웨어 시스템이다.

## 대표도

도 6

## 특허청구의 범위

### 청구항 1.

삭제

### 청구항 2.

삭제

### 청구항 3.

삭제

### 청구항 4.

삭제

### 청구항 5.

삭제

### 청구항 6.

삭제

### 청구항 7.

삭제

### 청구항 8.

삭제

### 청구항 9.

삭제

### 청구항 10.

삭제

### 청구항 11.

삭제

### 청구항 12.

삭제

### 청구항 13.

삭제

청구항 14.  
삭제

청구항 15.  
삭제

청구항 16.  
삭제

청구항 17.  
삭제

청구항 18.  
삭제

청구항 19.  
삭제

청구항 20.  
삭제

청구항 21.

사이클릭 피페라진은 고리내 4번 위치의 질소에 뉴클레오티드 염기가 공유결합되어 있고 상기 고리내 1번 위치의 질소에 보호기가 공유결합된, 가수분해에 의해 펩티드 핵산을 형성할 수 있는 피페라진은 중간체.

청구항 22.

제 21 항에 있어서, 뉴클레오티드 염기가 (a) 티민, 사이토신, 구아닌 및 아데닌인 통상의 뉴클레오티드 염기 및 (b) 상기 네 가지 통상의 뉴클레오티드 염기 중 어느 것에도 결합할 수 있는 유니버설 염기로 이루어진 그룹에서 선택되고, 뉴클레오티드 염기의 아세틸 잔기가 상기 사이클릭 피페라진은 고리내 4번 위치의 질소와 아미드 결합을 형성함으로써 뉴클레오티드 염기와 결합된 피페라진은 중간체.

청구항 23.  
삭제

청구항 24.  
삭제

청구항 25.  
삭제

청구항 26.

하기 단계를 포함하는 4개 이상의 뉴클레오티드 염기 길이를 갖는 펩티드 핵산의 라이브러리를 제조하는 방법:

a) 제 21 항에 따른 피페라진은 중간체를 아미노산 수지와 반응시켜 첫 번째 펩티드 핵산 서브유닛을 수지와 커플링시키는 단계;

- b) 상기 커플링된 첫 번째 펩티드 핵산 서브유닛을 탈보호시키는 단계;
- c) 또 하나의 제 21 항에 따른 피페라지는 중간체와의 반응에 의해 두 번째 펩티드 핵산을 상기 수지가 부착된 첫 번째 펩티드 핵산과 커플링시켜, 수지가 부착된 펩티드 핵산 이량체를 제공하는 단계;
- d) 상기 두 번째 펩티드 핵산을 탈보호시키는 단계;
- e) (a) 내지 (d) 단계를 반복하여 수지가 부착된 펩티드 핵산 이량체들의 유니버설 라이브러리를 형성하는 단계.

## 청구항 27.

제 26 항에 있어서, 수지가 부착되지 않은 다수의 펩티드 핵산 이량체를 제공하는 단계 및 상기 펩티드 핵산 이량체를 수지가 부착된 펩티드 핵산 이량체와 커플링시켜 4개 이상의 뉴클레오타이드 길이를 갖는 펩티드 핵산 라이브러리를 형성하는 단계를 포함하는 방법.

## 청구항 28.

제 27 항에 있어서, 두 개의 이량체가 각각의 수지에 추가적으로 첨가되어 옥타머의 라이브러리가 형성되는데, 각각의 옥타머는 네개의 통상의 뉴클레오타이드 염기와 네개의 유니버설 염기를 함유하며, 이들 염기들은 올리고머 서열 내에서 서로 번갈아 위치하며, 유니버설 염기는 이오신, 니트로피롤, 및 5-니트로인돌로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

## 청구항 29.

에틸렌 디아민 용액을 제공하는 단계;

브로모아세트산, 브로모메틸 아세테이트 또는 브로모아세틸 브로마이드의 용액을 에틸렌 디아민 용액에 첨가하는 단계;

상기 용액을 가열하여 옥소피페라진을 형성하는 단계;

활성 뉴클레오타이드 염기 에스테르를 첨가하여 사이클릭 피페라지는 중간체를 형성하는 단계; 및

상기 중간체를 보호기와 반응시켜 고리내 4번 위치의 질소에서 아미드를 형성하는 단계를 포함하는, 제 21 항의 사이클릭 피페라지는 중간체를 제조하는 방법.

## 명세서

### 배경기술

DNA 또는 RNA와 선택적으로 결합하는 시제는 이를 진단 및 치료 목적의 유전자-표적화된 약제로 개발하고 DNA의 서열-특이적 변형을 위한 수단으로 이용될 수 있다는 점에서 분자 생물학과 약제 화학에서 상당한 관심이 되고있다. 지금까지는, 이러한 시약 개발에 대한 연구는 주로 각종 올리고뉴클레오타이드와, 변형된 백본, 예를 들면 천연 포스포디에스테르 백본대신 포스포로티오에이트 또는 메틸 포스포네이트 백본을 지닌 이의 유사체에 초점이 모아져 왔다. 그러나, 이들 시약은 특히 생분해에 대한 안정성, 용해도, 세포 흡수성 및 합성의 용이함 측면에서 볼때 심각한 단점이 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 이유로 인해, 올리고뉴클레오타이드 미믹(mimic)으로의 대체 개념이 관심을 끌고있다.

펩티드 핵산은 전체 데옥시리보스 포스페이트 백본이 (2-아미노에틸)글라이신 단위로 구성된 화학적으로 상이하고, 구조상 단일형태인 백본으로 대체되는 최근에 개발된 올리고뉴클레오타이드 미믹의 일 부류이다. 화학적 구성에서 이러한 극적인 변화에도 불구하고, 펩티드핵산은 왓슨-크릭 염기쌍에 의해 상보성 DNA와 RNA를 인식한다. 또한, 펩티드핵산은 DNA와 RNA 올리고머보다 다수의 이점을 가지는 것으로 밝혀졌다. 예를 들면, 펩티드핵산은 3' → 5' 극성이 결여되어있

어 평행 또는 역평행 배향으로 DNA 또는 RNA에 결합할 수 있다 (Egholm, M. et al., Nature 365:566, 1993). 펩티드핵산이 이중 가닥 DNA와 결합할 수 있어 DNA 이중나선으로 들어가 한 가닥을 치환하여 안정한 D-루프 구조를 형성함이 밝혀졌다(Peffer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10648, 1993). 펩티드핵산의 추가 이점은 효소 분해에 덜 민감하고 (Demidov et al., Biochem. Pharmacol. 48:1310, 1994) 유사한 DNA 올리고머보다 높은 친화성으로 RNA와 결합한다는 점이다(Norton et al., Nature Biotechnology 14:615, 1996). 상당히 유리하게는, 펩티드핵산-DNA의 선택적 하이브리드화는 DNA-DNA 하이브리드화보다 염기쌍 미스매치에 덜 관대하다. 예를 들어, 16 염기쌍의 펩티드핵산-DNA 이중나선에서 한 염기의 미스매치는  $T_m$ 을 15°C로 감소시킬 수 있지만, 16 염기쌍의 DNA-DNA 이중나선의 경우는  $T_m$ 을 10°C로 감소시킨다(Egholm, M. et al., Nature 365:566, 1993). 마지막으로, 적어도 일 예에서, 펩티드핵산 분자는 전사 인자를 모방하고 프로모터로 작용할 수 있는 것으로 확인되었으며, 유전자-특이적 활성화제로서 펩티드핵산의 잠재적 사용이 입증되었다(Mollegaard et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:3892, 1994).

올리고뉴클레오타이드 유사체의 안티센스 약제로서의 성공은 세포가 올리고뉴클레오타이드를 다량으로 섭취해 원하는 효과를 야기하기에 충분한 농도로 표적에 이를 것을 요한다. 지금까지 펩티드핵산가 낮은 인지질 막 투과성을 보이고(Wittung et al., FEBS Letters 365:27, 1995) 세포에 의한 섭취가 매우 불량한 것(Hanvey et al. Science 258:1481, 1992; Nielsen et al. Bioconjugate Chem. 5:3, 1994; Bonham et al. Nucleic Acid Res. 23:1197, 1995)으로 보고되었는데, 이는 안티-유전자 및 안티-센스제로서 이의 잠재적 용도의 초기 제안을 상당히 제한한다.

펩티드핵산 서열을 운반 분자에 접합시켜 펩티드핵산의 세포 섭취를 개선시키는 방법은 몇몇 제한된 성과를 얻었다(Basu et al., Bioconjugate Chem. 8:481, 1997). 펩티드핵산 분자를 수용체 리간드 분자로 접합은 펩티드핵산의 세포 섭취를 증가시키지만; 표적 세포 내부의 생물 활성에 영향을 미치는 수용체 리간드-접합된 펩티드핵산 올리고머의 능력이 아직 입증되지 않고 있다. 또한, 이러한 접합법을 이용하면 펩티드핵산 올리고머를 특정 표적화 수용체를 발현시키는 세포에만 진입시킬 수 있다. 이에 따라, 관련 개개 세포 타입에 따라 적절한 리간드 분자가 고안되어야 한다.

그러나, 최근에 세포의 투여된 비접합 (즉, "네이티브") 펩티드핵산 올리고머가 세포막을 통과하고(Gray, G.D. Biochem. Pharmacol. 53:1465, 1997) 리빙 세포에서 서열-특이적 생물 반응을 유발할 수 있음이 밝혀졌다(Richelson, E. FEBS Letters 421:280, 1998). 이에 따라, 펩티드핵산은 치료 및 진단 후보자로서 매우 적당함을 암시하는 하기 특성을 가진다: 생체내 세포 투과성; 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 유사체보다 큰 특이성과 상보성 DNA 또는 RNA에 보다 강한 결합; 긴 생물학적 반감기를 보이는 효소형 뉴클레아제 및 프로테아제에 대한 내성; 광범위한 pH 범위에서 화학적 안정성; 프라이머로서 작용 안함; 및 유전자 프로모터로서 작용하는 능력.

계놈 조사에서 개선점은 다수의 인간 유전자의 존재, 구조 및 기능에 대한 정보 제공을 가속시켜, 치료 및 진단 목적의 각종 그룹의 신규 분자 표적물을 생성한다. 그러나, 오늘날 전체 인간 게놈의 단 3%만이 서열 분석되었다는 사실로 입증되듯이 유전자 서열분석과 특징 분석은 여전히 느리고 종종 고된 작업이다. 펩티드핵산이 치료 및 진단용으로 유용함과 동시에 유리한 결합 및 화학적 안정성은 이러한 화합물이 DNA와 RNA의 서열, 구조 및/또는 기능을 결정하는데 유용할 것임을 암시한다.

유전자를 완전히 특징 분석하는 것 이외에, DNA 결합 단백질과 유전자의 상호작용 해독 및, 이러한 단백질이 유전자 발현, 복제 및 형질도입을 매개하는 메카니즘 결정은 굉장한 시간과 노력을 요한다. 추가로, 인간에서 발견된 다수의 복잡한 유전 질환을 야기하는 기능장애 유전자의 유전 기능 이상에 대한 해석도 여전히 광범위한 조사를 요한다. 이에 따라, 펩티드핵산이 유용할 수 있다.

펩티드핵산이 진단, 치료 및/또는 조사 수단으로 이용하는데 특히 적당한 것 같지만, 특정 목적으로 적절한 펩티드핵산의 존재확인 어렵고, 시간 소모적이면서 비용이 많이 들 수 있다. 예를 들어, 원하는 효과, 예를 들면 전사 블로킹을 제공하기 위해 어떠한 유전자 영역이 표적화되어야 하는지, 전사를 촉진하기 위해서는 어떠한 영역(존재한다면)이 활성화될 수 있는지를 확인하기 위해 일반적으로 전부는 아니더라도 유전자의 대부분을 서열 분석한 다음, 이에 상보적인 각종 펩티드핵산 분획을 시험할 필요가 있다.

최근에, 랜덤-서열 올리고뉴클레오타이드, 폴리펩티드 및/또는 합성 올리고머의 조합 라이브러리를 이용하여 원하는 생물학적 효과를 생성하거나 진단용 시약으로 유용할 수 있는 화합물의 분리 및 확인을 촉진해 왔다. 이렇게 확인된 화합물은 천연 리간드를 모방하거나 블로킹하고, 표적 분자의 본래 상호작용을 방해하거나 단순히 좀더 바람직한 성질의 기타 분자를 고안 및 개발하는 수단으로 유용할 수 있다.

이러한 일반적인 용도로 유용한 조합 라이브러리는 각종 용액-상 또는 고체-상 방법에 의해 원하는 올리고머 크기에 이를 때까지 여러 서브유닛의 혼합물을 단계적으로 성장중인 올리고머에 첨가하여 형성될 수 있다. 달리, 라이브러리는 라이브러리를 형성하는 여러 서열의 올리고머를 함유한 비드가 교대로 혼합되어 분리되는 고체-상 합성법에 의해 형성될 수 있으며, 선택된 여러 서브유닛 중 하나는 각 단계에서 분리된 비드의 각 그룹에 첨가된다. 이러한 방법의 이점은 각 비드가 단지 하나의 올리고머 종을 함유하고 있어, 비드 자체가 올리고머 선별에 이용될 수 있다는 것이다(Furka, et al., Int. J. Pept. Protein Res. 37:487-493 (1991); Sebestyen, et al., Bioorg. Med. Chem. Letter 3:413-418 (1993)).

제안된 또다른 방법은 공간을 두고 배열된 조합 라이브러리의 합성을 수반한다(Fodor, et al., Science, 251:767-773 (1991) 참조). 이러한 접근법은 일반적으로 생성될 수 있는 여러 라이브러리 서열의 수에 한정된다.

유용한 리간드의 발견 기회는 조합 라이브러리의 크기에 따라 증가하기 때문에, 다량의 상이한 서열의 올리고머로 이루어진 라이브러리를 생성함이 바람직하다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 미믹, 예를 들어 펩티드 핵산의 경우, 4-염기 변이 및 8-올리고머 잔기 위치(옥타머)를 지닌 라이브러리는 완전한(유니버설) 라이브러리가 되기 위해  $4^8(65,536)$ 개의 상이한 서열을 함유할 것이다. 10개의 올리고머 잔기 위치(데카머) 펩티드핵산 또는 올리고뉴클레오타이드 유니버설 라이브러리의 경우, 1,048,576개의 여러 서열이 합성되어야 한다.

다수의 라이브러리에서 각각의 여러 서열종이 소량으로 존재할 수 있기 때문에, 조합 라이브러리 선별 과정에서 도전자항 중 하나는 원하는 결합성 또는 기타 선택성을 지닌 종의 서열(들)을 분리 및 결정하는 일이다. 이에 따라, 라이브러리는 유니버설이어야 하고 동시에 그러한 라이브러리 선별에 이용된 방법(들)이 유효한 소량의 각 종을 고려하면서 비-활성 종으로부터 활성 종을 구별하기에 적합해야 한다.

이에 따라, 유전자를 특징 분석하기에 유용하고, 잠재적 치료제 및/또는 진단제로서 유용한 제제, 특히 펩티드핵산의 빠른 확인을 위한 개선된 기술 및 수단 시스템이 필요하다. 특히, 수만 또는 수백만 개의 여러 서열 종을 합성할 필요없이, 옥타머 또는 데카머 라이브러리와 같은 대형 종의 라이브러리와 결합되는 특이성의 이점을 가질 것을 원한다. 추가 시험 및/또는 개발을 위해 라이브러리로부터 "최상의 후보자"를 빠르게 확인할 수 있는 빠른 선별법을 원하고, 치료, 진단 및/또는 조사 수단으로 유용한 염기서열 및 길이 측면에서 최적의 펩티드핵산을 결정하는 수단을 원한다.

## 발명의 요약

본 발명은 표적 뉴클레오타이드 서열을 부위-특이적으로 인식할 수 있어 치료, 진단 및/또는 유전자 특징 분석 수단으로 유용한 펩티드 핵산의 빠른 확인 및/또는 고안을 가능케 하는 세가지 주요 통합 성분을 수반하는 시스템을 제공함으로써 이들 및 기타 필요성을 해결한다. 이러한 시스템의 제1 성분은 쉽고도 효과적으로 합성될 수 있고 가장 바람직하게는 옥타머 라이브러리와 같은 대형 라이브러리의 선별 능력을 지니면서 다수의 개개 종의 합성을 요구하지 않는 유니버설 펩티드핵산 라이브러리이다. 제2 성분은 유니버설 펩티드핵산 확인(UPID™) 시스템으로 불리는 고 처리량 선별 시스템으로, 이는 표적 뉴클레오타이드 서열에 대한 여러 서열 펩티드핵산의 결합 활성에 대한 정보를 제공하기 위해 고안된 다수의 분석을 포함한다. 본 발명의 제3 성분은 (UPID™) 시스템에서 모아진 데이터를 빠르게 분석하여 이로부터 최적 펩티드핵산 올리고머의 염기서열 및 길이를 확인하기 위해 고안된 소프트웨어 시스템이다.

일 측면에서 유니버설 라이브러리는 유니버설 뉴클레오타이드 염기를 각 종에 주입시켜 개개 종에 대해 엄청난 수의 요구없이 라이브러리의 선별 능력을 증가시킨다. 유니버설 라이브러리는 개선된 고 처리량 선별 공정에 의해 인간 질환과 관련된 유전자와 같은 선택 유전자의 특정 조절에 의해 작용하는 신규 조절자를 확인한다. 이러한 신규 조절자의 최적화는 소프트웨어 시스템에 의해 관리되어, 서열 길이 및 염기서열 동질성 모두에서 최대 적절한 치료 및/또는 진단 후보자를 예측한다. 또한, 본 발명은 새로이 발견된 유전자의 구조적/기능적 특징을 분석하고, 질환 상태의 유전적 진단과 위험에 처한 집단의 빠른 선별을 위한 게놈 DNA 또는 PCR-증폭된 DNA에서, 단일 뉴클레오타이드 다형성(polymorphism)과 같은 게놈 돌연변이를 확인할 수 있다.

## 발명의 상세한 설명

본원에서 고려된 유니버설 펩티드핵산 라이브러리가 임의 길이의 펩티드핵산, 예를 들어 테트라머 내지 도데카머로 구성될 수 있지만, 펩티드핵산의 서열이 길수록 상보적 DNA 또는 RNA 유전자 분획에 대한 특이성이 높다. 그러나 약 8개 이상 염기의 펩티드핵산 서열의 라이브러리 합성이 경제적으로 쉽지 않은데, 이유는 다량의 화합물이 합성될 필요가 있기 때

문이다. 예를 들어, 도데카머 유니버설 펩티드핵산 라이브러리는 16백만개 이상( $4^{12}$ )의 별도 화합물의 합성을 요구한다. 이에 따라, 일 양태에서, 펩티드핵산의 옥타머 라이브러리는 표준 고체-상 커플링 및 보호/탈보호 반응을 이용하여 합성된다.

그러나, 옥타머 라이브러리 조차도 65,000개 이상의 다수의 개개 종의 합성을 요구한다. 이에 따라, 바람직한 양태에서, 1 이상의 유니버설 뉴클레오타이드 염기가 기본적으로 플레이스홀더(placeholder)로서 라이브러리에 도입되어, 부가적인 종의 합성 필요없이 라이브러리의 효용을 증가시킨다. 예를 들어, 본원에서 예시된 대부분의 바람직한 양태에서, 옥타머 유니버설 라이브러리의 서열 분석 능력을 지닌 라이브러리는 단지 약 256개의 개개 화합물의 합성을 요구한다. 이는 옥타머의 모든 기타 뉴클레오타이드 위치에 유니버설 뉴클레오타이드 염기를 도입시켜 달성된다.

펩티드 핵산의 합성을 위한 최근의 방법은 선택된 보호 그룹 방법에 따라 두 표준 합성 프로토콜 중 하나에 의해 적절히 보호된 펩티드핵산 단량체의 단계적 첨가를 수반한다. 이러한 작업은 문헌[참조: Dueholm, et al., J. Org. Chem., 59:5767 (1994); Thomson, et al., Tetrahedron, 51:6179 (1995); Will, et al. Tetrahedron, 51:12069 (1995); Breipohl, et al., Biorg. Med. Chem. Lett. 6:665 (1996); Koch, et al. J. Peptide Res., 49:80(1997); Jordan, S., Bioorg. Med. Chem. Lett., 7:681 (1997); Breipohl, et al. Tetrahedron, 53:14671 (1997)]을 포함한 다수의 최신 논문에 상세히 기재되어 있다. 전형적인 과정에서, 고체 상 합성을 위한 수지는 반응 용기에 넣고 제1 펩티드핵산 단량체의 활성화 산으로 처리된다. 커플링 반응이 수행되고, 반응 혼합물은 여과되거나 배수되며; 수지는 다음 합성 단계를 위해 세척 및 탈보호된다. 다수의 경우, 캐핑 단계가 이용되어 반응하지 않은 아미노 말단이 추가 체인 연장을 행하지 않게 해준다. 수지를 세척한 후, 반응 서열은 원하는 완전한 길이의 올리고머 미믹이 얻어질 때까지 이러한 사이클을 여러번 수행하면서 반복된다. 완전한 길이의 올리고머가 합성되어, 원한다면 방사성 동위원소와 같은 검출 프로브와 추가 접합되면, 형광 크로모포어 또는 안정한 금속 동위원소가 업계의 숙련인에게 익히 알려진 메탈로티오네인에 결합한다.

## I. 펩티드핵산 올리고머의 개선된 합성법

본원에서 고려중인 유니버설 펩티드핵산 라이브러리의 합성에는 예를 들어 본원에서 참고된 미국 특허 5,539,083과 5,539,082에 기재된 표준 반응이 이용될 수 있다. 그러나, 본원에 기재된 개선된 합성법이 바람직하다. 이러한 개선된 합성법은 반응하지 않은 출발 물질의 증진된 회수를 제공하고, 원하는 서열 길이에 이르는데 필요한 단계를 줄여준다. 이러한 방법은 1) 고유 활성화된 단량체 서브유닛의 사용(이로 인해 커플링 과정에서 활성화제가 필요없고, 활성화된 단량체는 유일한 고리 개방 반응에 의해 기타 단량체와 커플링될 수 있음); 2) 펩티드핵산 이량체와 삼량체 서로간의 커플링을 수반하는 집중식 합성 (이로 인해 서열 합성에 필요한 단계를 상당히 줄이고 순도와 전체 수율을 개선시킴); 및 3) 역 합성 프로토콜 (다음 펩티드핵산 단량체의 도입 이전에 수지상에 카복실산의 활성화에 의해 N-말단에서 C-말단으로 펩티드핵산 분자의 합성을 가능케하고, 이로 인해 재순환을 위해 용액내에서 반응하지 않은 펩티드핵산 단량체를 회수함)을 포함한다.

활성화된 단량체 서브유닛의 합성이 도 1에 주어진다. 합성은 에틸렌 디아민(10)과 브로모아세트산 또는 브로모아세트산과 같은 클로로아세트산 등가물(12), 브로모메틸 아세테이트, 클로로메틸 아세테이트 또는 브로모아세틸 브로마이드로부터 백본 서브유닛의 형성을 개시한다. 브로모아세트산 등가물 용액을 에틸렌 디아민 용액에 느리게 첨가한 다음 가열하면 원하는 사이클릭 중간산물(14)이 얻어진다. 활성화된 뉴클레오타이드 염기 에스테르(16)로 처리한 다음 생성된 디아미드를 보호시키면 원하는 피페라지는 중간체(18)가 얻어진다. 이러한 사이클릭 피페라지는 중간체(18)는 N-Boc산(20)으로 쉽게 가수분해되어 전형적인 펩티드핵산 단량체를 생성한다. 달리, 피페라지는 중간체(18)는 친핵체의 첨가를 위한 예비 활성화된 커플링제로 이용되어 각종 산물(22,24,26 및 28)을 형성한다.

도 2의 경우, 달리 유리하게는 예비활성화되고, 치환된 펩티드핵산 단량체 서브유닛은 원하는 아미노산(44)을 이용한 아미노 알데히드(40) 또는 케톤(42)의 환원성 아민화에 의해 제조될 수 있다. R, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 지방족, 방향족, 치환 지방족 또는 치환 방향족 사이드 체인을 나타낸다. 차후 탈보호 및 사이클화에 의해 치환 피페라지(46)이 생성되고, 이는 활성화된 뉴클레오타이드 염기 에스테르(16)의 첨가에 의해 예비 활성화된 치환 펩티드핵산 단량체(48)로 전환된다. 이러한 사이클릭 피페라지는 중간체(48)는 N-Boc산으로 쉽게 가수분해되어 유리 산 펩티드핵산 단량체(50)를 형성하거나, 친핵체의 첨가를 위한 예비-활성화된 커플링제로 이용되어 기타 산물(52,54,56 및 58)을 형성할 수 있다.

도 3은 펩티드핵산 삼량체의 합성에 대한 개략도를 제공한다. 적당히 보호된 예비활성화된 펩티드핵산 단량체(18)를 수지 또는 기타 친핵체에 첨가한 다음 탈보호시키면 (70)이 생성된다. 제2의 펩티드핵산 단량체(72)의 첨가에 이어 탈보호시키면 (74)가 생성된다. 원하는 체인 길이의 펩티드핵산이 얻어질 때까지, 예를 들어 도 3에 도시된 펩티드핵산 삼량체(76)가 얻어질 때까지 이러한 사이클을 반복한다. 도 4와 5는 펩티드핵산 분자의 집중적 합성을 설명한다. 이러한 접근법에서 적당히 보호된 펩티드핵산 이량체 또는 삼량체의 라이브러리는 합성을 위한 출발 물질로 이용된다. 펩티드핵산 이량체(100)

는 수지에 커플링되고 탈보호되어 (102)를 생성한다. 제2 이량체는 사이클을 반복하면서 첨가되어 테트라머(104)를 형성한다. 공정은 다시 반복되고, 단지 3 커플링 사이클에서, 헥사머(106)가 제조된다. 이러한 공정은 커플링 단계를 상당히 줄여주고 부산물의 생성을 줄여준다. 달리, 도 5에 도시된 바와 같이, 적당히 보호된 삼량체는 이러한 집중식 합성법에 이용되어 단 2 커플링 단계로 펩티드핵산 헥사머(106)를 형성할 수 있다. 마찬가지로, 삼량체와 이량체 라이브러리 모두가 본원에 기재된 집중식 합성에 이용되어 각종 길이, 예를 들어 펜타머, 헵타머, 및 운데카머의 펩티드핵산을 제조할 수 있지만, 이량체 또는 삼량체 라이브러리 단독으로는 제조되기가 어렵다.

펩티드핵산 분자의 역 합성은 도 6에 제시된다. 적당히 보호된 단량체(120)는 적절한 링커에 의해 수지에 커플링되어 122로 표시되는 화합물을 생성한다. 말단 산의 탈보호에 이어, 제2 단량체 서브유닛의 활성화 및 첨가는 124로 표시되는 화합물을 생성한다. 커플링 사이클을 반복하여 삼량체(126)를 생성할 수 있고 연속된 사이클링을 통해 원하는 펩티드핵산 체인 길이가 얻어진다. 수지상에서 산을 활성화시킴으로써, 이러한 접근법은 펩티드핵산 단량체의 회수를 단순화시킬 수 있어 합성 비용을 상당히 줄인다.

방금 기재된 합성 공정이 고체 수지에 대해 상세히 기재되고 있지만, 업계의 숙련인은 펩티드핵산의 용액 상 합성도 단순히 수지를 적당한 말단 작용 그룹 또는 사이드 체인으로 대체시켜 달성될 수 있음을 안다(Farese, A. et al., 37:1413, 1996).

## II. 유니버설 펩티드핵산 라이브러리의 합성

### A. 유니버설 뉴클레오타이드 염기의 사용

본원에 고려된 바람직한 양태에서, 4개의 뉴클레오타이드 염기 어느 것에도 결합할 수 있는 이노신, 니트로피롤, 및/또는 5-니트로인돌 등의 유니버설 뉴클레오타이드 염기는 유니버설 라이브러리에 각 올리고머내의 특정의 선택된 위치에 도입된다. 이러한 유니버설-염기-함유 라이브러리는 보다 적은 개개 펩티드핵산 종의 합성을 요구하지만, 크기면에서 보다 큰 대응물에 필적할만한 규모와 기능을 가진다. 예를 들어, 대부분의 바람직한 양태에서, 적어도 4개의 염기 위치 및 통상적인 뉴클레오타이드 염기(A, C, T 또는 G)가 차지하는 염기 위치의 총 수의 적어도 반을 지니면서, 나머지 염기 위치가 선택된 유니버설 염기로 채워지는 유니버설 라이브러리가 제조된다.

이에 따라, 예를 들면, 나노머 라이브러리의 단 두 위치 - 예를 들면 제3 및 제7 위치에 위치한 통상적인 뉴클레오타이드 염기를 유니버설 뉴클레오타이드 염기로 치환시키면, 단지  $16,384(4^7)$ 개의 여러 펩티드핵산 종의 유니버설 라이브러리가 합성될 필요가 있다. 이러한 "가(pseudo)-헵타머" 라이브러리는 262,144개 종의 통상적인 나노머 펩티드핵산 라이브러리에 필적할만한 규모와 기능을 가지지만, 나노머 대응물보다 제조시에 비용면에서 상당히 효과적이다.

또다른 양태에서, 통상적인 뉴클레오타이드 염기를 유니버설 염기로 치환은 펩티드핵산내의 모든 기타 뉴클레오타이드 염기 위치를 수반하도록 확대될 수 있다. 이러한 방법으로 특히 작은 크기의 "미니-라이브러리"가 유니버설 라이브러리의 유연성을 더욱 증진시키면서 빠르고, 쉬우면서 값싸게 제조될 수 있다. 예를 들어, 가장 바람직한 양태에서, 단 4개의 통상적인 뉴클레오타이드 염기와 4개의 유니버설 뉴클레오타이드 염기를 지닌 옥타머 라이브러리가 제조된다. 이러한 유니버설 라이브러리는 전적으로 통상적인 옥타머 펩티드핵산 라이브러리의 경우에 요구되는 65,536개의 펩티드핵산 서열과는 달리 단 256개의 여러 펩티드핵산 서열의 합성을 요구한다. 또한, 이러한 라이브러리의 하이브리드화 능력은 통상적인 대응물의 것과 유사하다. 추가로, 개개 펩티드핵산 종의 안정성은 테트라머에서보다 옥타머에서 보다 크다. 이에 따라, 유니버설 뉴클레오타이드 염기를 함유한 유니버설 옥타머 라이브러리의 사용은 통상적인 뉴클레오타이드 염기만을 함유한 유니버설 테트라머 라이브러리의 사용보다 상당히 우수한 결과를 제공해야 한다.

펩티드핵산 라이브러리에서 통상적인 염기를 유니버설 뉴클레오타이드 염기로 증가된 치환이 특정 목적을 위한 라이브러리의 효용을 감소시킬 것으로 기대되지만, 이러한 유니버설-염기-함유 라이브러리는 화합물의 초기 선별을 위해 빠르면서도, 정확한 값싼 수단을 제공한다. 하기에 추가로 논의되듯이, 이러한 라이브러리 선별에서 모아진 데이터와 정보를 이용하여 추가 선별 및 시험을 위해 펩티드핵산 올리고머의 최적 염기서열을 결정할 수 있다.

### B. 라이브러리 합성 장치 - 하이드로겔

본 발명에 따른 비교적 큰 펩티드핵산 라이브러리는 표준 멀티웰 플레이트, 마이크로칩 또는 스폿 막을 포함한 다수의 장치 중 하나를 이용하여 작제될 수 있다. 예를 들어, 옥타머 펩티드핵산 칩은 광-지향, 공간적 어드레싱 가능한 화학 합성에 의해 작제될 수 있다(Fodor, et al., Nature 364:555 (1993)). 이러한 접근법은 평행 공정을 이용하는데 여기서 실리카 칩



상의 부위는 사진석판 마스크의 틈을 통해 조명이 비춰져, 보호된 펩티드핵산과의 화학적 커플링을 위해 활성화된다. 보호 그룹은 순차적 각 단계에서 조명에 의해 말단 펩티드핵산으로부터 떨어져 나가, 새로운 세트의 보호된 펩티드핵산, 즉, 바람직하게는 성장중인 펩티드핵산에 첨가되도록 선택된 이량체 또는 삼량체와의 연결을 위해 또다른 부위를 활성화시킨다. 이러한 접근법에서, 펩티드핵산은 조명의 패턴과 사용된 화학 커플링제의 수에 따른 위치와 부위의 조성에 따라 실리카 칩상에 생겨난다. 각 부위에서 펩티드핵산 서열이 알려진 고-밀도의 배열이 이루어진다. 특정 부위로 형광-라벨링된 DNA 또는 RNA 분획의 결합은 형광 현미경에 의해 검출될 수 있다. 이는 예를 들면 결합하는 상보성 펩티드핵산 서열을 기초로 하여 DNA 또는 RNA 분획의 존재를 확인할 수 있다.

본 발명에 따른 펩티드핵산 라이브러리의 생성에서 이러한 광-지향, 공간적 어드레싱 가능한 화학 합성법과 다양한 기타 장치 및 방법이 이용될 수 있지만, 본원에서는 개선된 라이브러리 합성법이 제시된다. 이러한 바람직한 양태에서, 펩티드핵산은 비-접합 말단에 유리 아민을 지닌 링커 분자에 접합된다. 이러한 아민을 이용하여, 펩티드핵산은 활성 이소시아네이트 작용기를 지닌 프리(pre)-하이드로겔(예, Hampshire Chemical Corporation에서 제조된 Hypol)에 결합된다. DNA 계 올리고뉴클레오타이드와는 달리, 펩티드핵산은 유기 용매에 용해되어 이러한 유기 용매를 이용하여 프리-하이드로겔에 커플링될 수 있다. 생성된 펩티드핵산-하이드로겔 용액은 수용액과 수-혼화성 유기 용매, 예를 들어 아세톤으로 처리될 수 있다. 유리 이소시아네이트가 물과 반응하면, 펩티드핵산-결합된 프리-하이드로겔이 가교결합하고 CO<sub>2</sub>를 방출한다. CO<sub>2</sub> 생성 양과 속도를 조절하기 위해 가교결합동안 수-혼화성 유기 용매를 첨가하면 생성된 하이드로겔은 투명한 상태로 존재한다.

가장 바람직하게는, 본 발명에 따른 유니버설 펩티드핵산 라이브러리는 랜덤하게 합성되지 않고 체계적으로 합성된다. 본원에서 사용된 체계적 합성은 라이브러리의 개개 종의 위치 및 염기서열이 알려져 있어, 양성 선별이 펩티드핵산 올리고머의 서열분석을 요구치 않는 방식의 라이브러리 합성을 말한다. 이에 따라, 라이브러리 합성이 자동적으로 수행될 수 있고, 바람직하게는 자동적으로 수행되지만, 라이브러리의 각 종은 별도 용기, 예를 들면 별도 마이크로리터 웰에서 합성된다.

펩티드핵산 라이브러리, 또는 (완전한 라이브러리보다 적다면) 시험될 개개 펩티드핵산 올리고머가 투명한 하이드로겔상에서 분리되면, 라벨링된 DNA 또는 RNA 분획을 이용한 라이브러리 선별이 상당히 촉진된다. 이에 따라, 예를 들어, 용매는 펩티드핵산-하이드로겔 막에서 제거되고 막은 수성 매질에서 형광-, 방사성동위원소-, 금속 또는 다르게-라벨링된 DNA 또는 RNA 분획으로 처리된다. 팽윤된 하이드로겔을 세척하여 비특이적으로 결합된 DNA 또는 RNA 분획을 철저히 제거한 후, 라벨링된 DNA 또는 RNA 분획이 특정 부위에 결합되도록 모니터링될 수 있다. 세척 과정을 촉진하기 위해, 마이크로전극으로 전기장을 가할 수 있다.

하이드로겔 막에 결합된 유니버설 펩티드핵산 라이브러리를 만든 다음 이를 이용하여 라벨링된 화합물을 선별하는 공정은 마이크로칩 방법보다 단순하고 값이 싸서 다른 방법보다 바람직하다. 또한, 하이드로겔에 부착된 펩티드핵산의 양은 고밀도의 펩티드핵산을 제공하도록 쉽게 조절될 수 있어; 보다 많은 양의 라벨링된 DNA 또는 RNA 분획이 포착되어, 분석의 감도를 증가시킨다. 펩티드핵산-하이드로겔 제형은 마이크로웰 플레이트에 부착되거나, 나일론 또는 유사한 폴리머와 같은 직물로 제조된 막상에 스폿팅될 수 있다. 가장 바람직하게는, 어떠한 지지체를 선택하든지, 하기에 기재된 멀티-스팟 배열 분석이 쉽게 수행될 수 있음은 자명하다.

### C. 막 어레이상에 펩티드핵산의 고정화

예를 들어 문헌[참조: Weiler J. et al., Nuc Acid Res 25:2792, 1997]에 기재된 막 어레이상에 분리된 펩티드핵산 올리고머를 선별하는 DNA 다형성의 빠른 평가에 특히 유용한 또다른 고정화 방법이 제공된다. 이러한 방법은 다량의 DNA 샘플을 빠르게 분석한다. 예를 들어, 문헌[참조: Frank, R. for parallel oligopeptide synthesis (Tetrahedron 48:9217, 1992)]에 의해 개발된 로봇 장치를 이용하여 폴리머 막상에 1,000개에 이르는 여러 펩티드핵산 올리고머의 어레이를 합성할 수 있다. 펩티드핵산을 막에 부착시키기 위해 효소적으로 절단가능한 여러 링커를 이용하여, 개개 펩티드핵산 서열을 추가 분석을 위해 고체 지지체로부터 선택적으로 분리할 수 있다.

#### 1. 막 어레이에 링커 부착

표준 Fmoc-화학을 이용하여 막을 펩티드 스페이서, 글루탐산-(-tert-부틸에스테르)-(ε-아미노핵사노산)-(ε-아미노핵사노산)으로 유도화시켜 링커를 아미노-작용화 막에 부착시킨다. 개개 아미노산 유도체는 1.2 당량의 디이소프로필카보디이미드(DIC)와 1 당량의 HOAt를 첨가하여 활성화되고 N-메틸-2-피롤리돈(NMP)에서 0.2 M의 최종 농도로 이용된다. 막을 15분간 이 용액에 담궈두고, 디메틸포름아미드(DMF)로 세척한 다음, Fmoc-그룹을 DMF중 20% 피페리딘에서 5분간 배양하여 제거한다. 막을 DMF에서 다시 세척하고, 에탄올로 세정한 다음 건조시킨다. 스페이서 첨가 후, 막을 자동

화 SPOT ROBOT에 마운팅시키고(Frank, R. Tetrahedron 48:9217, 1992) 원하는 포맷의 그리드를 활성화 Fmoc-라이신-( $\epsilon$ -tert-부틸옥시카보닐) 0.3  $\mu$ L를 이용하여 각 위치에 스폿팅한다. 30분간 반응한 후, 막을 건조 NMP에서 5% 아세트산 무수물로 처리하여 스폿팅된 영역 외부의 모든 아미노 그룹을 캐핑한다. 막을 세척하고 탈보호시킨 다음, 스폿을 DMF에서 0.01% 브로모페놀 블루 용액으로 가시화한다(Krchnak V. et al. Int. J. Pep. Protein Res., 32:415, 1988).

## 2. 펩티드핵산을 막 어레이에 접합

ASP 222 자동화 SPOT ROBOT를 이용하여 막 어레이상의 개개 스폿에 펩티드핵산 포착 서열을 놓아둔다. 완전한 합성 사이클은 하기를 포함한다: 커플링(활성화된 유도체의 스폿팅에 이어 마지막 스폿에 물질을 둔 후 20분간 반응); DMF중의 5% 아세트산 무수물에서 5분간 아세틸화; 각각 10 mL DMF에서 1분간 5회 세척; DMF중의 20% 피페리딘으로 5분간 탈보호; DMF에서 0.01% 브로모페놀 블루로 염색; 10 mL 에탄올에서 3회 세정 및 차후 건조. 합성 완료 후, 펩티드핵산 올리고머를 90% 트리플루오로아세트산, 5% 물 및 5% 트리에틸실란의 혼합물에서 1시간 동안 배양하여 탈보호시킨다. 일단 어레이상에 고정화되면, 펩티드핵산은 고 처리량 선별 공정에 즉시 이용된다.

## III. 개선된 고 처리량 선별 분석

유니버설 펩티드핵산 라이브러리를 합성했다면 본 발명에 따른 다음 단계는 표적 뉴클레오티드 분자(들)에 결합할 수 있는 펩티드핵산 올리고머에 대한 라이브러리 선별이다. 이에 따라, 일 측면에서, 하기 분석은 잠재적 진단 및/또는 치료 후보자로서 생물학적 활성 서열의 선택이다. 부가적으로, 유니버설 라이브러리로부터 펩티드핵산 프로브를 이용하여 새로이 발견된 유전자의 구조 및/또는 기능을 확인할 수 있는 분석이 제공된다. 마지막으로, 질환 상태의 유전적 진단을 위한 게놈 DNA 또는 PCR-증폭된 DNA에서 단일 뉴클레오티드 다형성과 같은 게놈 돌연변이를 확인하고, 위험에 처한 집단의 빠른 선별을 가능케 하는 분석이 제공된다. 이러한 선별은 유전자 카운셀링에 특히 유용하다.

본원에 기재된 분석은 고체 지지체에 부착된 DNA 분획에 펩티드핵산을 하이브리드화시키거나, 펩티드핵산을 고정화시켜 이를 DNA-포착체로서 이용하여 시험 DNA 서열을 포착함으로써 수행될 수 있다. 시험 DNA 또는 RNA 분획에 펩티드핵산 하이브리드화를 검출하는 다수의 방법이 존재한다.

### A. 펩티드핵산 프로브와 DNA의 하이브리드화

#### 1. 시그널 증폭없이 하이브리드화

펩티드핵산 라이브러리의 선별을 위해 본원에서 고려중인 일 방법은 시그널 증폭없이 관련 DNA와 펩티드핵산 프로브의 하이브리드화이다. 이러한 방법은 새로이 발견된 유전자의 기능 분석에 특히 적당하다. 관련 유전자 서열은 멀티-웰 마이크로플레이트 또는 나일론 막과 같은 고체 지지체상에 고정화된다. 하이브리드화 반응은 바람직하게는 10 mM 나트륨 포스페이트 완충액, 또는 등가물에서 pH 7.4 및 약 80°C에서 수행되어, 저염 및 고온 조건하에 상보성 DNA 서열과 하이브리드화하는 펩티드핵산의 능력의 이점을 취한다. 비-특이적 결합 부위는 바람직하게는 소 혈청 알부민(BSA) 1 mg/mL 용액, 또는 pH 7.4에서 10 mM 나트륨 포스페이트 완충액에서 0.1% SDS 용액으로 블로킹된 다음 철저히 세척된다. 펩티드핵산 프로브는 바람직하게는 하이브리드화 이전에 방사성 동위원소 또는 바이오틴으로 라벨링된다. 라벨링된 프로브를 지지체-부착된 DNA에 하이브리드화한 다음, 라벨을 활성화시킨다. 라벨이 방사성 동위원소이면, 물론 활성화가 필요없다. 바이오틴-라벨링된 펩티드핵산 프로브의 경우, 형광 방출물이 라벨링된 아비딘으로 바이오틴을 판독하여 특정 시그널을 검출할 수 있다. 형광 검출법은 업계의 숙련인에게 익히 알려져 있다. 일반적으로, 형광 판독기에 의해 측정되는 선택 파장은 바이오틴을 라벨링하는데 사용된 특정 형태의 형광, 예를 들어 플루오레신, 로다민 등에 상응하는 것일 것이다.

#### 2. 시그널 증폭을 이용한 하이브리드화

몇몇 경우, 예를 들어, 관련 DNA 샘플이 단지 소량으로 유용하거나 DNA의 긴 가닥의 단지 적은 부위가 관심이 있는 경우, 시그널:노이즈 비를 증진시키고 분석 감도를 추가로 증가시키는데 특정 시그널 증폭이 요구될 수 있다. 이는 DNA의 PCR 증폭이 불가능하거나 바람직하지 않는 경우에 특히 적절하다. 시그널 증폭의 바람직한 방법에서, 펩티드핵산 프로브는 바이오틴에 연결된 제2의 특정 프로브에 의해 인식되는 인식 태그와 접합된다. 이러한 복합체는 앞서 기재된 형광-라벨링된 아비딘으로 검출될 수 있다. 시그널은 현재 다중층 샌드위치 효소-연결된 면역분석에 이용되는 다중-인식 단계와 유사한 복수 인식 단계를 추가하여 부가적으로 증폭될 수 있다. 앞서 개설했듯이, 하이브리드화는 가장 바람직하게는 pH 7.4 및 약 80°C에서 10 mM 나트륨 포스페이트 완충액에서 일어난다. 하이브리드화에 이어, 시스템은 시그널 증폭을 위해 37°C로 냉각된다.

본원에서 고려된 시그널 증폭 공정에 유용한 인식 태그의 예는 니트로-벤질-DOTA와 같은 염기성 13(ane)N4 제형의 거대사이클릭 테트라자사이클로도데칸 킬레이트의 이작용성 유도체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다(Moi M.K. et al. J. Am. Chem. Soc. 110:6266, 1988; Renn O. and Meares C.F. Bioconj. Chem. 3:563, 1992; 및 미국 특허 4,678,667 (1987) 참조). 이작용성 DOTA 유도체는 12-원자 고리 구조에 4개의 NH 그룹을 함유한다. N-결합된 수소는  $-CH_2-COOH$  또는  $-CH_2-COOCH_3$  와 같은 작용 그룹으로 쉽게 치환될 수 있고; 질소와 치환된 카복실 그룹은 인듐, 갈륨 또는 루테튬과 같은 비-방사능 란타나이드를 포함한 희 토금속 이온과 공유 결합을 형성하여, 견고한 금속 착물을 만들 수 있다.

본원에서 참고된 미국 특허 5,435,990에 기재된 PA-DOTA(알파-[2-(4-아미노페닐)에틸]-1,4,7,10-테트라아조-사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산), 및 PA-DOTMA(알파-[2-(4-아미노-페닐)에틸]-1,4,7,10-테트라아조-사이클로도데칸-1-아세트-4,7,10-트리(메틸아세트산)을 포함한 다수의 기타 이작용성 거대사이클릭 킬레이트도 본원에 이용될 수 있다. 염기성 13(ane)N4 제형의 기타 이작용성 거대사이클릭 킬레이트는 TRITA, TETA 및 HETA를 포함한다(본원에서 참고된 미국 특허 4,678,667). 부가적으로, EDTA 또는 DTPA와 같은 선형 킬레이트가 이용될 수 있다.

펩티드핵산 프로브에 연결되어 본 발명에 따라 사용될 수 있는 인식 태그의 또다른 예는 앞서 기재된 이작용성 거대사이클릭 킬레이트에 접합된 제2의 DNA 또는 RNA 프로브 세트에 특이적으로 하이브리드화할 수 있는 DNA 서열이다. 이러한 인식 태그는 특정 펩티드핵산-DNA 하이브리드화를 차단하여 분석 특이성을 방해하는 표면-부착된 DNA와의 비-특이적 펩티드핵산-DNA 하이브리드화를 차단하도록 세심하게 고안되어야 한다. 본원에 적당한 프로브의 예는 박테리오파아지 람다-특이적 서열이다. 이러한 특정 인식 태그를 함유한 DNA-부착 펩티드핵산은 하기에 기재된 시그널 증폭을 이용하여 검출될 수 있다.

킬레이트 인식 태그는 바람직하게는 예를 들어 3 내지 6개의 탄소 원자를 함유한 지방족 체인을 포함하는 스페이스 링커에 의해 각 펩티드핵산 또는 (DNA) 프로브에 연결되어, 킬레이트가 상보성 DNA 서열에 펩티드핵산 프로브의 결합을 방해, 예를 들면 이러한 결합을 입체 장애하지 못하도록 한다. 킬레이트 인식 태그와 접합된 DNA-부착 펩티드핵산 프로브는 특정 안티-킬레이트 모노클로날 항체(MoAb), 예를 들어 MoAb 인식 비-방사능 인듐-라벨링된 DOTA를 이용하여 검출될 수 있고, 바람직하게는 검출된다. 항체는 바이오틴과 접합되고, DNA-부착 펩티드핵산은 형광-라벨링된 아비딘으로 검출된다.

추가 시그널 증폭은 DOTA-접합 펩티드핵산 프로브를 쥐 안티-DOTA MoAb와 반응시켜 달성될 수 있다. 이러한 항체는 제2의 항체, 예를 들면 염소 안티-마우스 항체로 프로빙되고, 이는 교대로 제3의 항체, 예를 들면 양 안티-염소 항체로 프로빙될 수 있으며, 이는 다시 제4의 항체, 예를 들면 말 안티-양으로 프로빙될 수 있다. 마지막 항체 프로브는 반응 용기에 첨가되기 이전에 바이오틴-접합되고, 상기 항체와의 하이브리드화에 이어, 이는 형광-라벨링된 아비딘과 반응하며 앞서 기재된 바와 같이 생성된 시그널이 검출된다.

분석 시그널을 증폭시키기 위해 모노클로날 항체를 사용하면서, 앞서 개요된 말-안티 양 항체와 같은 항체를 분자량 대략 40,000의 측쇄 텍스트란을 지닌 개 안티-말과 같은 항체로 프로빙할 수 있다. 이는 폴리비닐 알콜 또는 폴리비닐 피롤리돈과 같은 측쇄형 수용성 폴리머에 접합된 안티-텍스트란 항체로 프로빙되고, 여기서 폴리머는 추가로 바이오틴에 접합된다. 바이오틴은 앞서 기재된 바와 같이 형광-라벨링된 아비딘과 반응하고 앞서와 같이 상당히 증폭된 시그널이 검출된다.

유리하게도, 인식 태그에 접합된 펩티드핵산 프로브를 이용한 DNA 분획 선별 방법을 변형하여 동일한 웰에서 복수 DNA 서열을 연속 검출할 수 있다. 이러한 변형법에서 여러 펩티드핵산 프로브는 상응하는 MoAb가 인식할 수 있는 여러 킬레이트로 라벨링된다. 각 항체는 여러 형광-방출물에 접합된 아비딘으로 프로빙된다. 이러한 방법으로 각 프로브는 이것이 방출하는 빛의 특징적인 파장에 의해 개별적으로 검출될 수 있다.

#### B. 펩티드핵산 프로브를 이용한 또다른 검출 방법

본원에서 고려된 일 또다른 검출 시스템은 형광보다 발광을 이용하는 것이다. 이러한 방법에 따르면, 최종 인식 단계에 사용된 항체는 바이오틴 대신 알칼라인 포스파타제와 같은 효소와 접합된다. 시그널은 발광 포스파타제 기질을 첨가하여 생겨나며 표준 루미노미터를 이용하여 검출된다.

본원에서 고려중인 또다른 검출 시스템은 예를 들어 BIAcore(생물분자 상호작용 분석) 표면-플라스몬 공명 검출 장치(Pharmacia, 우살라)를 이용하여 DNA-RNA 하이브리드의 결합( $k_a$ ) 또는 해리( $k_d$ )의 속도상수 검출에 기초한다. 이 방법

에 따르면, 검출 장치내의 금으로 덮힌 센서 칩은 아비딘에 연결된 텍스트란 층으로 처리된다. 링커에 의해 바이오틴에 결합된 펩티드핵산 프로브는 아비딘-텍스트란 코팅된 표면에 고정화되어 상보성 DNA 서열을 포착한다. 장치에 의해 측정된 시그널은 칩의 표면에서 굴절율의 변화에 비례하고 일반적으로는 칩에 부착된 물질의 질량에 비례하는 것 같다 (Jonsson 1991; Karlsson 1993). 시간의 함수로서 부착된 물질의 양을 측정함으로써, 상보성 가닥을 함유한 용액이 칩 위를 통과할 때, 고정화된 펩티드핵산 프로브로 DNA의 결합 속도 상수를 측정할 수 있다. 이러한 시스템은 단지 단일 판독 모드로 작동하여, 다량의 샘플 분석에는 적절하지 않을 수 있다. 그러나, 이는 특정 펩티드핵산-DNA 상호작용의 자세한 속도 상수 결정을 원하거나 요구할 때 적당할 수 있다.

#### C. 펩티드핵산 프로브를 이용한 다형성 검출

본원에서 고려된 변형된 검출 분석에서, 단일 뉴클레오티드 다형성을 함유한 DNA 영역 또는 관련 기타 영역에 이웃한 보존된 서열에 상보적인 서열을 지닌 펩티드핵산이 고체 지지체상에 고정된다. 고정화된 펩티드핵산은 관련 DNA 분획에 노출되고 특정 펩티드핵산-DNA 하이브리드화가 일어난다. 비-하이브리드화된 DNA를 제거한 후, 상술된 방법 중 하나를 이용하여 펩티드핵산-부착 DNA를 검출한다. 관련 돌연변이를 함유한 DNA 분획만을 선택적으로 포착함으로써, 이러한 변형된 분석은 시그널:노이즈 비를 추가로 증가시키면서 DNA 샘플을 농축시킨다.

#### D. 생물학적 활성 분석

각종 방법에 의해 선택된 펩티드핵산의 생물 활성을 세포 유리 시스템에서 초기에 분석할 수 있다. 예를 들어, 단백질 합성의 직접적 억제는 m-RNA의 첨가시 단백질 합성을 수행할 수 있는 세포 추출물을 이용하여 시험될 수 있다. 이러한 분석에서, 펩티드핵산이 해독될 m-RNA 이외에 세포 추출물에 첨가된다. 펩티드핵산이 없는 대조 분석과 펩티드핵산을 함유한 추출물의 해독 산물을 비교함으로써, 억제성 펩티드핵산 서열을 확인할 수 있다. 마찬가지로, m-RNA 전사의 억제도 관련 유전자로부터 첨가된 DNA에 반응하는 특정 m-RNA를 합성하는 추출물을 이용하여 분석될 수 있다. 펩티드핵산을 추출물에 첨가하고 이로부터 생성된 m-RNA 산물을 DNA만을 지니고 펩티드핵산이 없는 추출물로부터 생성된 RNA 산물과 비교한다. 달리, 억제보다 유전자 전사의 활성화는 상술한 동일한 시스템을 이용하면서, 세포-유리 전사 시스템에서 감소된 수준이 아닌 증가된 수준의 m-RNA를 측정함으로써 평가될 수 있다. 달리, 유전자 전사의 활성화는 전사-활성 추출물로 평가될 수 있다. 이들 추출물은 적절한 전사 억제자 또는 감쇄자를 암호화하는 유전자를 포함한다. 관련 DNA 분획이 반응에 첨가된다. 특정 펩티드핵산의 첨가가 전사 억제를 차단하면, 예를 들어 전사 억제자를 암호화하는 DNA와 결합함으로써, m-RNA 생성이 증가될 것이다. 이들 방법에 의해 확인된 활성 서열은 하기에 기재된 개선된 소프트웨어 시스템에 의해 평가되어 표적 뉴클레오티드 서열(일반적으로, DNA 또는 RNA 서열)에 작용하는 최적 펩티드핵산 염기서열 및 서열 길이를 결정할 수 있다.

### IV. 염기 서열과 서열 길이를 최적화하는 방법

본 발명에 따라 펩티드핵산의 염기서열을 정하고 서열 길이의 최적화함으로써 표적 뉴클레오티드 서열에 작용하는 가장 적절한 펩티드핵산 올리고머(들)을 고안하는 방법이 제공된다. 이 방법은 잠재적 치료 및/또는 진단 후보자로서 유용한 펩티드핵산의 최적 염기 서열 존재 및 서열 길이를 예측하기 위해 특정 펩티드핵산의 결합 상수, 구조 및/또는 서열간의 상관관계에 대한 데이터를 조작하는 알고리즘을 사용한다. 또한, 본원에서 고려된 소프트웨어 시스템은 새로이 발견되거나 부적절하게 특징 분석된 유전자의 빠른 서열 분석을 수행할 수 있다. 부가적으로, 표적 유전자의 서열이 알려진 경우, 본원에 고려된 알고리즘은 생물 활성이 시험되어야 하는 유니버설 라이브러리로부터 모든 가능한 상보성 펩티드핵산을 쉽고도 빠르게 확인할 수 있다. 이는 물론 시험되는 개개 펩티드핵산 서열의 수를 현저히 줄여주어 선별 공정을 상당히 단순화시킨다.

바람직하게는, 공지된 서열을 지닌 이중 가닥 DNA가 표적화될 때, 평행 및 역평행 가닥 모두의 서열을 선별하고 시험하여, 선별시 노력을 배가시키지만, 본원에 제공된 새로운 알고리즘에 의한 추가 분석을 위해 두 세트의 데이터가 주어진다. 이 상적으로, 물론, 평행 가닥에서 유도된 펩티드핵산 후보자는 역평행 가닥에서 유도된 것과 상보적이어야 한다. 그러나, 그러한 정도는 시험 방법의 고유 한계로 인해 일어나지 않기 때문에, 본원에서 고려된 소프트웨어 시스템은 잘못된 결과를 배제하면서 적절한 각종 데이터를 포함하도록 분석을 적절히 조절할 것이다. 작동시, 개개 펩티드핵산 올리고머의 고 처리량 선별에서 나온 한 세트의 데이터를 평가하여 표적 분자에 결합하고 원하는 표적 기능을 수행하는 이상적인 염기서열 및 서열 길이를 측정한다. 우선, 활성 히트를 확인한다(예, 하기 표의 B4 - B11, 여기서 "B#"은 특정 염기의 순차적 위치를 나타냄). 다음, 초기 활성 히트의 서열과 중첩되는 라이브러리로부터 부가적인 펩티드핵산 서열을 확인하고 초기 히트의 좌측 또는 우측으로 하나의 염기를 이동시킨다. 서열 시험에서 얻어진 데이터로부터 각 서열에 대한 활성의 질과 양을 알 수 있다. 하기 표에 예시된 바와 같이, B4-B11 서열의 좌측으로 제1의 중첩 서열은 B3-B10이고 활성이지만 제2의 중첩 서

열 B2-B9는 비활성인데, 이는 최적 활성 펩티드핵산 서열에 대한 좌측 가장자리가 B3임을 나타낸다. 마찬가지로, 우측으로 이동하면, 서열 B5-B12가 활성인 반면 서열 B6-B13이 비활성인데, 이는 최적 펩티드핵산 서열의 우측 가장자리가 B12임을 나타낸다. 이러한 예에서, 최적 펩티드핵산 서열은 데카머, B3-B12이다.

<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>	<b>A6</b>	<b>A7</b>	<b>A8</b>	<b>A9</b>	<b>A10</b>	<b>A11</b>	<b>A12</b>	<b>A13</b>	<b>A14</b>	표적 초기 히트
			<b>B4</b>	<b>B5</b>	<b>B6</b>	<b>B7</b>	<b>B8</b>	<b>B9</b>	<b>B10</b>	<b>B11</b>				
		<b>B3</b>	<b>B4</b>	<b>B5</b>	<b>B6</b>	<b>B7</b>	<b>B8</b>	<b>B9</b>	<b>B10</b>					활성
	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>	<b>B5</b>	<b>B6</b>	<b>B7</b>	<b>B8</b>	<b>B9</b>						비활성
				<b>B5</b>	<b>B6</b>	<b>B7</b>	<b>B8</b>	<b>B9</b>	<b>B10</b>	<b>B11</b>	<b>B12</b>			활성
					<b>B6</b>	<b>B7</b>	<b>B8</b>	<b>B9</b>	<b>B10</b>	<b>B11</b>	<b>B12</b>	<b>B13</b>		비활성

본원에서는 관련 유전자 서열을 결정하기 위해 라벨링된 유전자 분획이 펩티드핵산 유니버설 라이브러리에 하이브리드화하는 패턴을 추적하는 소프트웨어 시스템의 사용을 추가로 고려한다. 예를 들어, 미지 서열을 지닌 DNA 분획을 검출가능한 프로브로 라벨링한 다음 특정 법칙에 따라 추적가능한 방법으로 지지체상에 위치된 개개 펩티드핵산과 하이브리드화시킨다. 초기 펩티드핵산 올리고머와 하이브리드화하면, 소프트웨어는 관련 펩티드핵산 서열이 여기에 부착된 유전자 분획의 정도를 측정한다. 이러한 공정은 분획에 대한 총-길이의 서열이 결정될 때까지 계속된다. 이러한 분석은 단일 유전자로부터 다수 분획의 경우에 동시에 수행되어 이들 분획과 유전자를 빠르게 서열 분석한다.

본원에 기재된 발명이 특정 양태와 적용에 의해 기재되고 있지만, 업계의 숙련인은 첨부된 청구항의 범위내에서 다수의 수정 및 변형을 행할 수 있다.

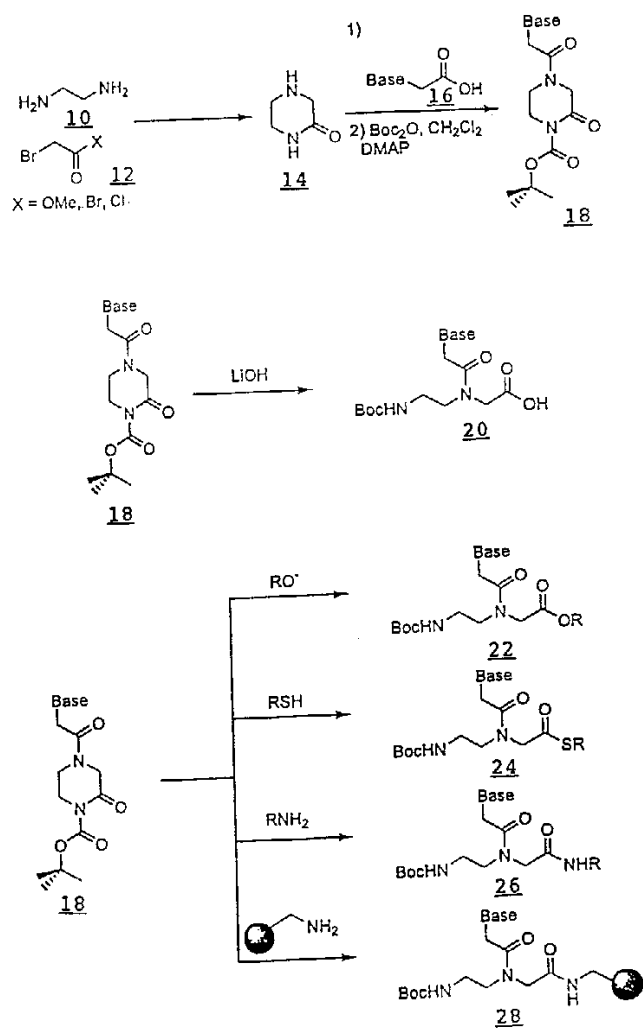
도면의 간단한 설명

본 발명의 상기 및 기타 측면, 특징 및 이점은 하기 도면과 함께 제시된 상세한 설명에 의해 좀더 분명해 질 것이다:

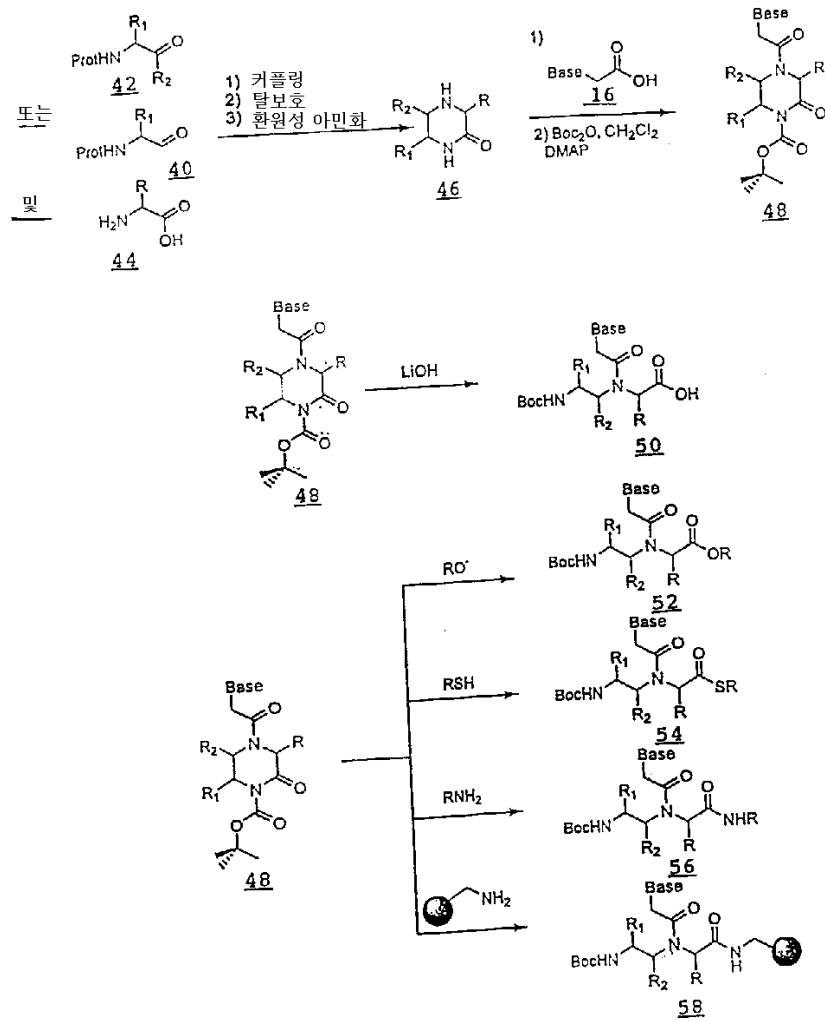
- 도 1은 본 발명에 따른 활성화된 펩티드핵산 단량체 서브유닛의 합성 개략도이고;
- 도 2는 본 발명에 따른 활성화된 펩티드핵산 단량체 서브유닛의 또다른 합성의 개략이며;
- 도 3은 본 발명에 따른 수지-결합 펩티드핵산 삼량체의 합성 개략도이며;
- 도 4는 본 발명에 따른 헥사머 펩티드핵산 올리고머의 개선된 합성법의 개략도이며;
- 도 5는 헥사머 펩티드핵산 올리고머의 또다른 개선된 합성법의 개략도이며;
- 도 6은 본 발명에 따른 펩티드핵산 분자의 역 합성의 개략도이다.

도면

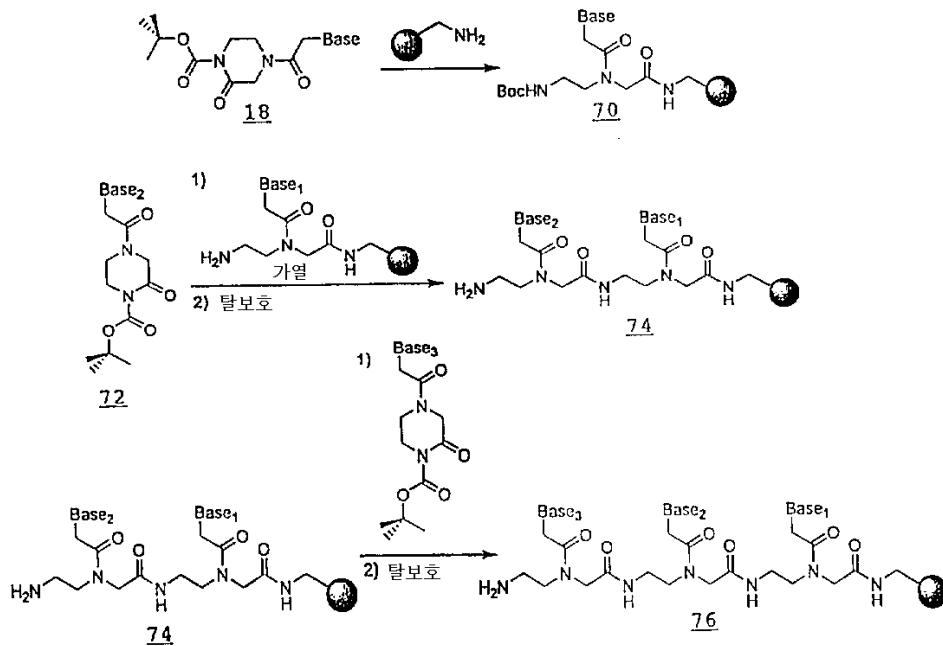
도면1



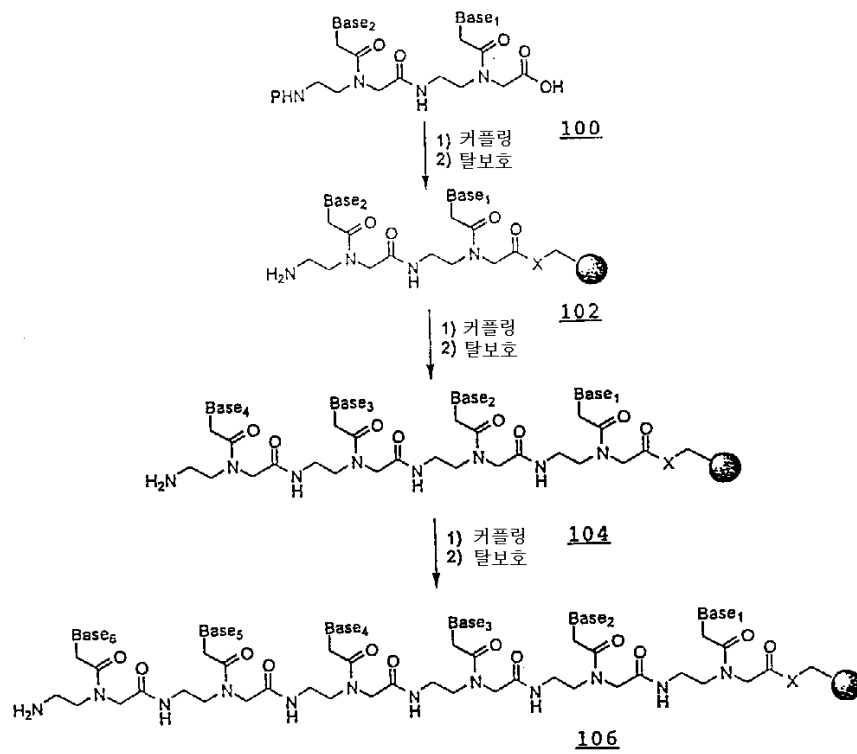
도면2



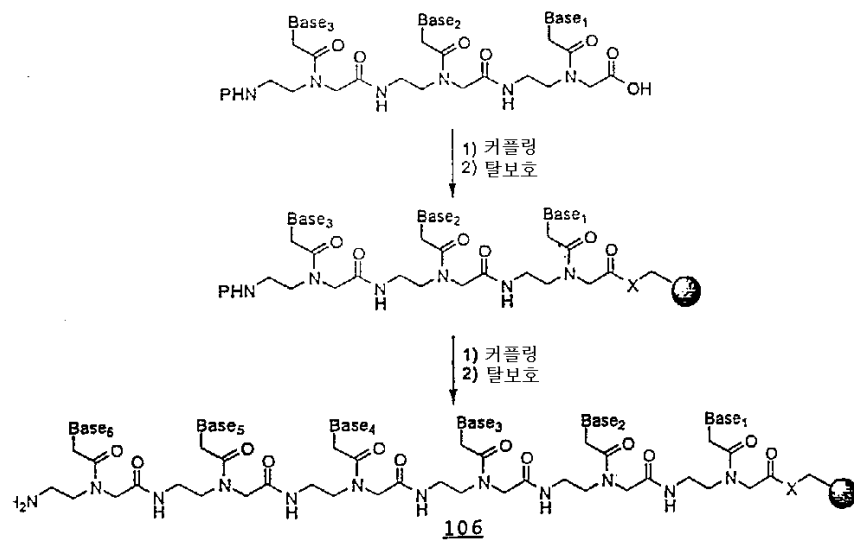
도면3



도면4



도면5





도면6

