

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년07월20일 10-0603115 2006년07월12일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2000-7006567	(65) 공개번호	10-2001-0033184
(22) 출원일자	2000년06월15일	(43) 공개일자	2001년04월25일
번역문 제출일자	2000년06월15일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/026515	(87) 국제공개번호	WO 1999/31275
국제출원일자	1998년12월14일	국제공개일자	1999년06월24일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 인도, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

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

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 08/990,436 1997년12월15일 미국(US)

(73) 특허권자 소마로직, 인크.
미국, 콜로라도 80301, 보울더, 38TH 스트리트 1775

(72) 발명자 골드, 레리
미국콜로라도80302,보울더,스트리트5가1033

드로렛,다니엘
미국콜로라도80301,보울더,버글코트6844

지치,도미닉,에이.
미국콜로라도80304,보울더,칼미아애버뉴2200

자야세나,수미다
미국콜로라도80301,보울더,노스오차드크릭썬클5875

크레이튼,스티브
미국콜로라도80231, 덴버, #204, 이스트쥬얼에버뉴9799

길,스텐리
미국콜로라도80302,보울더,그랜트플레이스1004

(74) 대리인 조인제

심사관 : 신경아

(54) 핵산 리간드 진단용 바이오칩

요약

하나 이상의 특이적인 핵산 리간드들이 공간적으로 구획되어 결합되어 있는 고체 지지체로 이루어진 핵산 리간드 "바이오칩"이 개시된다. 각각의 핵산 리간드는 체액과 같은 테스트 혼합물에 함유된 구체적인 표적 분자와 특이적으로 결합한다. 표적 분자는 단백질들(세포 단백질, 박테리아 단백질, 바이러스 단백질 등), 호르몬들, 당들, 대사 부산물들, 보조인자, 중간체들, 약물들 및 독성 물질들을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 테스트 혼합물을 바이오칩에 접촉시키면 표적 분자가 그와 특이적인 핵산 리간드에 결합한다. 표적이 핵산 리간드에 결합하면, 바이오칩상의 각 특이적인 부위에서 검출 가능한 변화를 유발한다. 이 검출가능한 변화는 바이오칩상의 각 부위에서 형광성의 변화, 또는 물리적 패러미터, 예컨대 전기 전도성, 굴절률의 변화를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그다음, 바이오칩상의 각 부위에서의 변화의 크기를 측정할 수 있는 형광성 스캐너(scanner) 또는 표면 플라즈몬 공명 검출기와 같은 기구로 바이오칩을 판독할 것이다. 이 변화의 부위로 무슨 표적 분자가 검출되었는지를 알 수 있고, 변화의 크기로 표적 분자의 현존하는 양을 알 수 있다. 상기 신호 유형들을, 진단된 질병이 있는 개체의 체액으로부터 얻은 신호 유형들과 비교할 경우 상기 두 가지의 정보의 조합으로부터 진단적이고 예후적인 의학적 정보들을 얻을 것이다. 원칙적으로, 화학적 복합 혼합물에 존재하는 것으로 예측되는 성분들에 결합하는 핵산 리간드가 바이오칩에 부착되어 있다면, 그 혼합물을 테스트하기 위하여 그 바이오칩을 사용할 수 있을 것이다. 따라서 핵산 리간드 바이오칩은 환경 시험 등에 있어서 광범위한 용도를 지니게 될 것이다.

대표도

도 1

색인어

바이오칩, 핵산 리간드

명세서

기술분야

본 발명은 테스트 용액내에 있는 표적(target) 분자들, 특히 체액에 함유된 의학적으로 관련된 분자들을 검출하는 방법들에 관한 것이다. 본원에서 개시된 방법들은, 공간적으로 구분된 구역들에 있는 고체 지지체(support)들에 부착된 특이적인 핵산 리간드(ligand)들을 사용한다. 본 발명은, 표적 분자들의 핵산 리간드들에의 결합을 검출하는 방법들과 진단 의학 용도에 핵산 리간드들의 배열(array)들을 이용하는 방법들을 제공한다.

배경기술

표적 분자들에 고도로 특이적 결합을 하는 핵산 분자들의 시험관내(in vitro) 진화에 대한 방법이 개발되었다. 셀렉스(SELEX) 방법이라 이름 붙여진 이 방법, 즉 지수적 증식에 의한 리간드의 체계적인 진화(Systematic Evolution of

Ligands by Exponential Enrichment)는, 현재는 포기되었으나 발명의 명칭이 "지수적인 증식에 의한 리간드의 체계적인 진화"인 미국 특허 출원 제07/536,428호, 1991.6.10에 출원되고 현재는 미국 특허 제5,475,096호이며 발명의 명칭이 "핵산 리간드"인 미국 특허출원 제07/714,131호 및 1992.8.17에 출원되고 현재는 미국 특허 제5,270,163호(또한 WO 제91/19813호를 참조할 것)이며 발명의 명칭이 "핵산 리간드들을 동정하는 방법"인 미국 특허 출원 제07/931,473호에 개시되어 있으며, 상기 각각의 미국 특허출원들은 본원에 참고로서 특별히 삽입된다. 본원에서 집합적으로 셀렉스 특허출원으로서 언급되어 있는 이들 출원들의 각각은, 어떤 바람직한 표적 분자에 대한 핵산 리간드를 만드는 매우 신규한 방법을 개시하고 있다.

셀렉스 방법은, 결합 친화성 및 선택성의 바람직한 기준(criterion)을 실질적으로 달성하기 위하여, 동일한 일반적인 선택 방식(scheme)을 사용하여 후보(candidate) 올리고뉴클레오타이드들의 혼합물로부터의 선택 단계, 및 결합, 분리 및 증폭의 순차적인 반복 단계를 포함한다. 셀렉스 방법은, 핵산들의 혼합물, 바람직하게는 랜덤한(random)화된 서열 분절을 포함하는 핵산들의 혼합물에서 출발하여, 결합하기에 유리한 상태하에서 표적을 상기 혼합물과 접촉시키는 단계; 표적분자들에 특이적으로 결합된 핵산들에서 결합되지 않은 핵산들을 분리하는 단계; 핵산-표적물 복합체를 해리시키는 단계; 핵산-표적물 복합체들로부터 해리된 핵산 분자들을 증폭시켜 리간드가 풍부한 핵산 혼합물을 생성하는 단계; 및 표적 분자에 매우 특이적이고 친화성이 높은 핵산 리간드들을 생성하는 데 필요한 정도의 많은 사이클 동안 결합, 분리, 해리 및 증폭 단계를 재반복시키는 단계들을 포함한다.

셀렉스 방법은, 리간드에, 향상된 생체내 안정성이나 향상된 전달 특성들과 같은, 향상된 특성들을 부여하는 변형된 뉴클레오타이드들을 함유하는 높은 친화성을 가진 핵산 리간드의 동정을 포함한다. 이러한 변형의 예로는 리보오스 및/또는 포스페이트(phosphate) 및/또는 염기 위치에서의 화학적 치환들을 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드들을 함유하는 셀렉스-동정 핵산 리간드들은 미국 특허 출원 제08/117,991호에 개시되어 있는데, 발명의 명칭이 "변형된 뉴클레오타이드들을 함유하는 고도의 친화성을 가진 핵산 리간드들"인 이 특허 출원은 1993.9.8에 출원되었고, 피리미딘들의 5-위치 및 2'-위치에서 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드 유도체들을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 개시하고 있다. 미국 특허 출원 제08/134,028호는 2'-아미노(2'-NH₂), 2'-플루오로(2'-F) 및/또는 2'-O-메틸(2'-OMe)로 변형된 뉴클레오타이드들을 하나 이상 함유하는 고도로 특이적인 핵산 리간드들을 개시하고 있다. 1994.6.22에 출원되고 발명의 명칭이 "분자내 친핵성(nucleophilic) 치환반응에 의한 공지 및 신규한 2'변형 뉴클레오시드들의 신규한 제조방법"인 미국 특허 출원 제08/264,029호는 다양한 2'-변형 피리미딘을 함유하는 올리고뉴클레오타이드들을 개시하고 있다.

다수의 상이한 표적 분자들에 대하여 제조된 핵산 리간드들의 능력이 탁월하다면, 상기 리간드들을 진단 도구로서 사용하는 방법들이 바람직할 것이다. 특히, 다수의 상이한 핵산 리간드들을 미세하게 제조된 고체 지지체("바이오칩")에 부착시킨 후, 체액내에 있는 표적 분자들의 상기 리간드들에의 결합을 분석하는 것이 바람직할 것이다. 본원은 그런 방법들을 제공한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은, 진단성 및 예후성(prognostic) 핵산 리간드들을 수득하는 방법, 상기 리간드들을 바이오칩에 부착시키는 방법, 및 체액에 있는 표적 분자들이 상기 바이오칩-결합된 핵산 리간드들에 결합하는 것을 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명의 한 구체예에서는, 어떤 질병에 대해 진단성이나 예후성이 있는 것으로 알려진 분자들과 결합하는 하나 이상의 핵산 리간드들을 선택한 후, 이런 리간드들을 바이오칩에 부착시킨다. 핵산 리간드들을 바이오칩에 부착시키는 구체적인 방법들은 제목이 "핵산 바이오칩의 제작"인 하기의 문단에 기재되어 있다. 이 바이오칩은 (i) 단일의 표적 분자에 대하여 선택된 핵산 리간드들; 또는 더 바람직하게는 (ii) 다수의 표적 분자들에 대하여 선택된 핵산 리간드들을 포함할 수 있다. 본 발명에서는, 구분된 공간상의 구역에 있는 핵산 리간드들에 결합하는 표적 분자의 레벨(level)을, 표적분자가 예후성이나 진단성이 있다고 알려진 질병을 가진 것이 밝혀진 개체들의 체액을 사용하고 또한 건강한 개체들의 체액을 사용하여 결정할 것이다. 그 후, 바이오칩을 사용하여 예후적인 보고(report)를 추구하는 개체의 체액을 분석할 수 있고, 그리고 이 세가지 세트(set)의 데이터를 비교하여 그 개체에 대하여 예후적이거나 진단적인 정보를 산출할 수 있다.

다른 구체예에서는, 바이오칩에 부착된 특이적인 핵산 리간드들이, 건강한 개체의 혈장이나 다른 체액들내의 모든 성분들 또는 많은 성분들에 특이적으로 결합한다. 그 후에 이런 리간드들이 그들의 표적들에 결합하는 유형과 레벨을, 건강한 개체들에 대해서 그리고 다양한 의학적인 상태를 가진 것으로 진단된 개체들에 대해서 하기에 기재된 방법들을 사용하여 결정할 수 있다. 그 후, 각각의 질병이 특유한 "서명(signature)" 결합 유형을 야기하여, 바이오칩 결합 데이터에 대한 컴퓨터 데이터베이스가 구축될 것이다. 그 후, 진단적이거나 예후적인 보고를 필요로 하는 개체들의 체액을 바이오칩과 접촉시키고, 여기서 얻어진 결합 유형을 기준(reference) 데이터베이스와 비교하게 될 것이다.

관련된 구체예에서, 부착된 핵산 리간드는, 특정 질병을 앓고 있는 것으로 알려진 개체의 혈장이나 다른 체액내의 모든 성분 또는 많은 성분들에 특이적으로 결합할 것이다. 일단, 그 질병을 앓고 있는 개체에 대해서 이 바이오칩에 결합하는 표적 분자의 유형과 레벨이 결정되면, 이 바이오칩은 동일한 질병을 앓을 위험이 있는 것으로 알려진 개체를 스크리닝하는 데 사용될 수 있다. 이 구체예는, 건강한 개체들의 체액에서는 발견되지 않는 표적 분자가 존재하고 그 표적 분자 자체가 아직 동정되지 않은 질병(예컨대, 아직 원인물질의 특성을 분자적 수준에서 밝히지 못한 바이러스, 박테리아 또는 기생균의 감염)에 대해 유용할 것이다.

본 발명에서 개시된 모든 방법에 있어서, 각각의 핵산 리간드가 무엇에 결합하는가를 반드시 알 필요는 없다. 전술한 2개의 구체예가 특히 바람직한데, 그 이유는 현재까지는 알려진 분석법이 없는 질병들, 및 전통적으로 명백한 질병 증상의 출현에 의해 진단되는 질병들에 대한 초기 진단을 가능케하기 때문이다. 그 후, 관련있는 표적 분자들에 결합하는 핵산 리간드들을 동정할 수 있을 것이고, 그럼으로써 이 표적 분자들을 동정할 수 있을 것이다. 이런 구체예들은 질병에 대한 연구를 크게 촉진할 것이며, 직접적인 진단 프로그램과 약물 발견 프로그램에 사용될 수 있는 많은 새로운 표적 분자들을 제공할 것이다. 게다가 이들 표적 분자들에 결합하는 바이오칩상의 동정된 핵산 리간드들은 그 자체가 치료제로 사용될 수 있는 잠재성을 지닐 수 있다.

가장 바람직한 구체예에서, 바이오칩은 상기의 2개의 구체예에서 개시된 두가지 유형의 핵산 리간드를 모두 포함한다. 이러한 바이오칩은, 진단적이거나 예후적인 기준(criterion)이 (i) 체액에서 정상적으로 발견되는 분자(들)의 농도의 변화; 및/또는 (ii) 건강한 개체의 체액에서 정상적으로는 발견되지 않는 분자(예컨대, 바이러스 단백질)의 존재에 있는 질병들을 검출 또는 예측할 수 있게 할 것이다.

도 1은 이런 바이오칩의 사용을 나타낸다. 전형적으로는 100x100 이상의 배열을 사용할 수 있으나, 본원에서는 명확히 하기 위해서, 간단한 4x4 배열만을 예시하였다.

목차

I. 용어 해설

II. 바이오칩에 사용될 핵산 리간드의 수득

III. 핵산 리간드 바이오칩의 제작

IV. 형광 기술을 이용한 핵산 리간드에서의 표적 분자의 결합의 검출

A. 일반적인 검출 기술

B. 핵산 리간드에 상보적인 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드를 이용한 검출

C. 표적 분자 결합의 검출을 용이하게 하기 위한 핵산 리간드에서의 작은 분자의 결합 사이트의 형성

D. 혼성화 캐스케이드(cascade)를 통한 검출

E. 분광학적으로 검출가능한 핵산 리간드들에서의 표적 분자들의 직접적인 결합

F. 표적분자의 결합에 따른 이중나선 변화의 검출

G. 간접측정계를 이용한 검출

H. 공유결합된 표적분자들의 검출

V. 형광성과 무관한 방법을 통한 표적분자 결합의 검출

A. 화학 전계 효과 트랜지스터

B. 표면 플라즈몬 공명을 통한 검출

C. 질량 분광계를 이용한 검출

D. 원자력 현미경(AMP)과 스캐닝-터널링 현미경(STM)을 이용한 검출

VI. 실시예

I. 용어해설

본원에서 하기의 용어들이 사용될 때 다음과 같은 일반적인 의미들을 갖는다.

1. "셀렉스(SELEX)" 방법학은, 상기 및 셀렉스 특허출원에서 상세히 설명된 바와 같이, 바람직한 방식으로 표적 분자와 상호 작용하는(예를 들면, 단백질에 결합하는) 핵산 리간드들의 선택 및 그런 선택된 핵산들의 증폭을 의미한다. 상기 선택/증폭 단계의 반복적인 순환이, 매우 많은 수의 핵산을 함유하는 풀(pool)로부터 표적분자와 가장 강하게 상호작용하는 하나 또는 적은 수의 핵산의 선택을 가능하게 한다. 이런 선택/증폭 과정의 순환은 정해진 목표가 달성될 때까지 계속된다.

2. 본원에서 "셀렉스 표적" 또는 "표적 분자" 또는 "표적"은, 핵산이 예정된(predetermined) 바람직한 방식으로 작용할 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. 셀렉스 표적 분자는, 단백질, 펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질(lipid), 다당류, 당단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 병원균, 독성 물질, 기질, 대사 산물, 전이 상태 유사체(transition state analog), 보조 인자(cofactor), 저해제, 약, 염료, 영양분, 성장 인자, 세포, 조직 등일 수 있고, 제한이 없다. 거의 모든 화학적 또는 생물학적 작동체(effector)가 적당한 셀렉스 표적이 될 것이다. 어떤 크기의 분자들이든 셀렉스 표적으로서 사용될 수 있다. 표적은 또한 표적과 핵산의 상호작용의 가능성을 증가시키도록 일정한 방법으로 변형될 수 있다.

3. 본원에서 "조직(tissue) 표적" 또는 "조직"은 상기한 셀렉스 표적의 일정한 부분집합을 의미한다. 이 정의에 따르면, 조직들은 이질적인 환경내에 있는 거대분자들이다. 본원에서 조직은 단일 세포 유형, 세포 유형들의 수집물(collection), 세포들의 집합체(aggregate), 또는 거대분자들의 집합체를 의미한다. 이것은, 단백질과 같은 통상적으로 분리된 가용성 분자인 보다 단순한 셀렉스 표적들과는 다르다. 바람직한 구체예에서, 조직들은 보다 단순한 셀렉스 표적보다 큰 크기의 차수를 갖는 불용성 거대분자들이다. 조직들은 많은 거대분자들로 이루어진 복합 표적들이며, 여기서 각각의 거대분자들은 많은 잠재성의 에피토프(epitope)들을 갖는다. 많은 에피토프들을 포함하는 상이한 거대 분자들은, 단백질, 지질, 탄수화물 등이거나 또는 그것들의 조합물(combination)일 수 있다. 일반적으로 조직들은, 구조와 조성의 면에서 유동적이거나 단단할 수 있는 물리적 배열의 거대분자들이다. 세포외 매트릭스(matrix)은 구조적으로 및 조성적으로 더 단단한 조직의 예이며, 반면, 막 이중층은 구조 및 조성에 있어 더 유동적인 조직의 예이다. 조직은 일반적으로 불용성이고 고체상으로 존재하며, 따라서 상대적으로 쉽게 분리될 수 있다. 조직은, 신장 조직, 뇌 조직과 같이 일정한 기관의 일반적인 세포 구조물을 나타내기 위해 흔히 사용되는 구조 물질들 중의 하나를 형성하는 세포 간극물질들과 특정 종류의 세포들의 집합체를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 조직들의 일반적인 네가지 부류는 상피 조직, 연결 조직, 신경 조직 및 근육 조직이다.

상기 정의에 포함되는 조직들의 예는, 비세포인 피브린(fibrin) 덩어리와 같은 거대분자들의 이종(heterogeneous) 집합체; 세포들의 동종(homogeneous) 또는 이종 집합체; 기관, 종양, 림프절, 동맥 등과 같이 특정 기능을 갖는 세포들을 포함하는 더 조직화된 구조들; 및 개개의 세포들을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 조직들 또는 세포들은 천연적인 상태로 있을 수도 있고, 분리되어 있을 수도 있으며, 또는 조직 배열의 상태로 있을 수도 있다. 조직들은 변형될 수도 있고 원형 그대로일 수도 있다. 변형은 많은 변화, 예컨대, 형질전환, 형질감염, 활성화 및 하부구조(substructure)(예, 세포막, 세포핵, 세포소기관 등)의 분리를 포함할 수 있다.

세포하부구조, 세포 또는 조직의 원천(source)들을 진핵생물에서 뿐만아니라 원핵생물에서도 얻을 수 있다. 이것은 사람, 동물, 식물, 박테리아, 진균류 또는 바이러스의 구조들을 포함한다.

4. "핵산"은 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA와 단일 가닥 또는 이중 가닥 RNA 및 그것들의 화학적인 변형체들을 의미한다. 변형은 다른 화학기(chemical group)들을 제공하는 변형을 포함하지만 그렇다고 이에 한정되는 것은 아니며, 여기서 다른 화학기는, 개개의 핵산 염기 또는 핵산 전체에 부가의 전하, 분극성(polarizability), 수소결합, 정전기적 상호작용 및 유동성(fluxionality)을 부여한다. 이런 변형은, 변형된 염기들, 예컨대, 2'-위치에서의 당 변형들, 5'-위치에서의 피리미딘 변형들, 8'-위치에서의 퓨린 변형들, 시토신의 사이클밖(exocyclic)의 아민들에서의 변형들, 5-브로모(bromo)-우라실의 치환; 백본(backbone)의 변형들, 메틸화, 이소베이스(isobase)인 이소시티딘과 이소구아니딘 등과 같은 특이한 염기 쌍의

결합들을 포함하지만 그렇다고 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 변형은 캡핑(capping)과 같은 3' 및 5'의 변형들을 포함할 수 있다. 각각의 증폭후에 일어나는 변형도 본 발명에 포함된다. 증폭후의 변형은 각각의 증폭후에 가역적 또는 비가역적으로 일어날 수 있다. 핵산의 거의 모든 변형이 본 발명에 포함된다.

5. 본원에서 "핵산 테스트 혼합물" 또는 "핵산 후보(candidate) 혼합물"은, 서로 상이하고 랜덤화된 서열을 지닌 핵산들의 혼합물을 의미한다. "핵산 테스트 혼합물"은, 자연-발생적 핵산들 또는 그것들의 단편들, 화학적으로 합성된 핵산들, 효소적으로 합성된 핵산들 또는 상기 기술들의 조합에 의해서 만들어진 핵산들로부터 유래할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 각각의 핵산은 증폭 과정을 용이하게 하기 위하여 랜덤화된 영역 주위에 고정 서열을 갖는다. 핵산의 랜덤화된 분절의 길이는 일반적으로 8내지 250 뉴클레오티드이고, 바람직하게는 8내지 60 뉴클레오티드이다.

6. 본원에서 "핵산 리간드"는, 바람직한 방식으로 표적에 작용하는 핵산 후보 혼합물로부터 분리된 핵산을 의미한다. 바람직한 방식으로 표적에 작용하는 것의 예는, 표적에 결합하는 것, 표적을 촉매적으로 변화시키는 것, 표적을 변형시키거나 표적의 기능적 활성을 변화시키는 방식으로 표적과 반응하는 것, 자가불활성화 저해제(suicide inhibitor)로서 표적에 공유적으로 결합하는 것, 및 표적과 다른 분자와의 반응을 용이하게 하는 것을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 모든 경우에 있어서는 아니지만 대부분의 경우에서, 상기 바람직한 방식은 표적에 결합하는 것이다. 가장 바람직한 구체예에서, 핵산 리간드는, 표적 분자에 대하여 특이적인 결합 친화성을 갖는 비-자연적으로 발생한 핵산 서열이고, 이 핵산 리간드는 표적 분자에 결합한다는 공지의 생리적 기능을 가지는 핵산이 아니며, 상기 표적 분자는, 왓슨-크릭 염기쌍 또는 삼중 나선 결합에 주로 의존하는 메카니즘을 통해 상기 핵산 리간드에 결합하는 폴리뉴클레오티드가 아니라 삼차원적인 화학 구조이다. 핵산 리간드는, 셀렉스 방법에 의해서 실질적으로 분리된 핵산 리간드와 매우 유사한 핵산 서열을 포함한다. 여기서 매우 유사하다는 것은 70% 이상 일차(primary)서열이 유사함을 의미하고 가장 바람직하게는 80% 이상 일차서열이 유사함을 의미한다. 과거에 일차서열이 거의 유사하지 않거나 완전히 유사하지 않은 다양한 핵산 리간드들이 특정 표적에 대해 실질적으로 동일한 결합 능력을 가질 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이런 이유로, 본 발명은 셀렉스 방법에 의해서 동정된 핵산 리간드와 실질적으로 동일한 표적 결합능력을 갖는 핵산 리간드들을 또한 포함한다.

표적에 대한 결합능력이 실질적으로 동일하다는 것은, 그 친화성이 본원에서 개시된 리간드들의 친화성의 크기와 같은 차수내에 있다는 의미이다. 어떤 서열-본원에서 구체적으로 개시된 것과 매우 유사한 서열-이 실질적으로 동일한 표적 결합능력을 갖는가의 여부의 결정은 당해분야의 당업자의 기술 범위내에 있다.

7. 본원에서 "체액"은, 유기체에서 수득한 거대분자들의 혼합물을 의미한다. 이것은 혈장, 소변, 정액, 타액, 림프액, 뇌막액(meningial fluid), 양수, 선액(glandular fluid) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함하지만 그렇다고 이에 한정되는 것은 아니다. 이것은 또한 상기의 것들의 실험적으로 분리된 분획(fraction)들을 포함한다. "체액"은, 또한 변(fece)과 같은 균질화된 고체물질을 함유하는 혼합물들 또는 용액들, 조직들, 생체검사 샘플(sample)들을 포함한다.

8. 본원에서 "테스트 혼합물"은 그 중 적어도 몇몇은 핵산 리간드 바이오칩을 사용하여 검출될 수 있는 여러 분자들을 함유하는 샘플을 의미한다. 이것은 상기에서 정의된 체액, 및 환경 및 독성 시험을 위한 임의의 샘플(예컨대, 산업 폐기물, 오염된 물)을 포함하지만 그렇다고 이에 한정되는 것은 아니다.

9. "바이오칩"은, 분자들이 공유결합 또는 비공유결합을 통해 부착될 수 있는 미세하게 제조된 고체 표면이다. 이것은 랑그뮐르-바젯트(Langmuir-Bodgett)필름, 작용성화된 유리(functionalized glass), 게르마늄, 실리콘, PTFE, 폴리스티렌, 비소화 갈륨, 금 및 은을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 그것의 표면에 결합된 작용기(예, 아미노기, 카르복실기, 티올기, 히드록실기)를 지닐 수 있는 당해 기술분야에서 공지된 다른 물질들도 포함된다. 이것은 평면 및 구면을 포함한다.

II. 바이오칩에 사용될 핵산 리간드의 수득

많은 특정 목적들을 이루기 위하여 기본 셀렉스 방법을 변형하여 왔다. 예컨대, 1995.5.18에 출원된 미국 특허출원 제08/443,959호를 위하여 포기되었지만, 1993.9.17에 출원된 발명의 명칭이 "핵산 리간드의 광선별(photoselection)"인 미국 특허출원 제08/123,935호는 표적 분자에 결합 및/또는 광교차결합 하고/하거나 표적분자를 광불활성화시킬 수 있는 광반응성기를 포함하는 핵산 리간드의 선별을 위한 셀렉스에 기초한 방법을 개시하고 있다. 1995.5.18에 출원되고 현재는 미국 특허 제5,580,737호인 미국 특허출원 제08/443,957호를 위하여 포기되었지만, 1993.10.7에 출원되고 발명의 명칭이 "테오펜린(Theophylline)과 카페인(Caffeine)을 구분하는 고-친화성 핵산 리간드"인 미국 특허출원 제08/134,028호는 밀접하게 관련된 분자들을 구분할 수 있는 고도로 특이적인 핵산 리간드를 동정하는 방법, 즉 카운터(Counter)-셀렉스라 명명된 방법을 개시하고 있다. 1995.6.5에 출원되고 현재는 미국 특허 5,567,588호인 미국 특허출원 제08/461,069호를 위하여 포기되었지만, 1993.10.25에 출원되어 발명의 명칭이 "지수적인 증식에 의한 리간드의 체계적인 진화:솔루션(solution) 셀렉스"인 미국 특허출원 제08/143,564호는 표적 분자에 대한 높은 친화성을 갖는 올리고뉴클레오티드와 낮은

친화성을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 매우 효율적인 분리를 달성하는 셀렉스에 기초한 방법을 개시하고 있다. 1995.5.16에 출원되고 현재는 미국 특허 제5,595,877호이며 발명의 명칭이 "핵산 리간드를 생산하는 방법"인 미국 특허출원 제08/442,062호는 셀렉스를 수행한 후 향상된 핵산 리간드를 수득하는 방법을 개시하고 있다. 1995.3.8에 출원되고 현재는 미국 특허 제5,705,337호이며 발명의 명칭이 "지수적인 증식에 의한 리간드의 체계적인 진화:케미(Chemi)-셀렉스"인 미국 특허출원 제08/400,440호는 표적에 리간드를 공유결합시키는 방법에 대해서 개시하고 있다. 본원과 특히 관련하여, 1995.5.3에 출원되고 현재는 미국 특허 제5,789,157호이며 발명의 명칭이 "조직 셀렉스"인 미국 특허출원 제08/434,425호는 전체(entire) 조직에 대항하여 핵산 리간드를 제조하고 동정하는 방법을 개시하고 있으며, 여기서 조직은 단일 세포 유형, 세포유형들의 수집물(collection), 세포들의 집합체 또는 거대분자들의 집합체로 정의된다. 후보 조직들의 예는 종양과 혈장을 포함한다. 이런 방법들은 또한 미국 특허출원 제08/434,425호, 제08/437,667호, 제08/434,001호, 제08/433,585호, 제08/906,955호, 제08/433,124호 및 제08/433,126호에 상세히 개시되어 있다.

1994.8.2에 출원되고 현재는 미국 특허 제5,637,459호이며 발명의 명칭이 "지수적인 증식에 의한 리간드의 체계적인 진화:키메릭(Chimeric)-셀렉스"인 미국 특허출원 제08/284,063호 및 1994.4.28에 출원되고 현재는 미국 특허 제5,683,867호이며 발명의 명칭이 "지수적인 증식에 의한 리간드의 체계적인 진화:혼합된(Blended)-셀렉스"인 미국 특허출원 제08/234,997호에 각각 개시된 바와 같이, 셀렉스 방법은 선별된 올리고뉴클레오타이드를 선별된 다른 올리고뉴클레오타이드 및 비-올리고뉴클레오타이드 작용 유닛(non-oligonucleotide functional unit)와 결합시키는 것을 포함한다. 이들 출원은 모양 및 다른 성질들의 광범위한 배열과 올리고뉴클레오타이드의 효율적인 증폭 및 복제 성질들을 다른 분자들의 바람직한 성질들과 조합하는 것을 가능하게 한다. 기본적인 셀렉스 방법의 변형들을 개시하고 있는 상기 특허출원들 각각은 그 전체가 본원에 참고로서 특별히 삽입되어 있다. 검출가능한 기(detectable group)(예컨대, 형광성 화합물질, 항체에 의해 인식되는 디고옥시제닌(digoxigenin)과 같은 기(group)), 친화기(affinity group)(예컨대, 바이오틴) 및 반응성기(reactive group)(예컨대, 광반응성기, 또는 바이오칩 표면에 대한 리간드의 부착을 허용하는 화학기(chemical group))의 삽입을 허용하거나 다른 셀렉스 표적의 결합사이트 서열의 삽입을 허용하는 셀렉스 방법의 임의의 변형도 또한 본 발명에 포함된다.

바람직한 구체예에서, 혈장의 다른 분자들과 교차반응할 가능성이 없이 표적 분자에 특이적으로 결합하는 핵산 리간드를 궁극적으로 얻기 위하여 혈장의 존재하에서 셀렉스 방법을 수행한다. 바이오칩에 사용할 수 있는 핵산 리간드의 몇가지 예는 HIV-1 tat단백질(미국 특허 제5,527,894호 및 제 5,637,461호), HIV-1 gag(미국 특허 제5,726,017호), HIV-1 삽입 효소(integrase)(미국 특허 제5,587,468호), HIV-1 핵단백질 구성분(미국 특허 제5,654,151호 및 제5,635,615호), HIV-1 역전사효소(미국 특허 제5,496,938호 및 제5,503,978호), 트롬빈(미국 특허 제5,476,766호 및 제 5,543,293호), 기본 섬유아세포 성장 인자(미국 특허 제5,459,015호 및 제5,639,868호), 혈관 내피세포 성장인자(미국 특허 제 5,811,533호), 인슐린 수용체 항체(현재는 포기된 미국 특허출원 제08/248,632호), 타키키닌(tachykinin) 물질 P(미국 특허 제5,648,214호 및 제5,637,682호), IgE(미국 특허 제5,629,155호 및 제5,686,592호), 분비성의(secretory) 포스포리파제 A₂(미국 특허 제5,622,828호), TGFβ(미국 특허 제5,731,144호 및 제5,731,424호), 혈소판 유래(derived) 성장인자(미국 특허 제5,668,264호, 제5,723,594호 및 세계 특허 WO 96/38579), 사람 케로티노사이트(keratinocyte) 성장인자(세계 특허 WO 96/38579, 미국특허 제5,846,713호), 용모막성 고나도트로핀 (미국 특허 제5,837,456호 및 제 5,849,890호), 렉틴(lectin)들(미국 특허 제5,780,228호 및 미국 특허출원 제08/477,829호 및 제08/472,256호), 사이토카인(미국 특허출원 제08/477,527호 및 제08/481,710호), 낭창(lupus) 항체들(현재는 포기된 미국 특허출원 제08/520,932호) 및 보체계 단백질(현재는 포기된 미국 특허출원 제08/595,335호)에 대한 리간드들을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

셀렉스 특허출원들에서 개시된 바와 같이, 항구적(constant) 서열과 랜덤한 서열 부위를 갖는 핵산 리간드를 만드는 것이 가능하다. 특별히 바람직한 구체예에서, 미리정해진(predetermined) 위치에서 공통적인 짧은 서열(서열 A)을 갖는 핵산 리간드들을 합성할 것이다. 그 다음, 핵산의 초기 후보 혼합물은, 각각의 리간드상에 있는 공통적인 짧은 서열에 상보적인 서열을 갖는 고정된(immobilized) 핵산(서열 A')을 포함하는 고체 지지체, 바람직하게는 칼럼(column)과 접촉될 것이다. 그 다음, 리간드들의 풀(pool)은 A와 A'사이의 상보적인 염기쌍 결합에 의해서 칼럼과 결합할 것이다. 표적 분자(들)을 함유하고 있는 혼합물이 칼럼을 통과하게 될 것이고, 칼럼으로부터 치환된 리간드들이 모아질 것이다. 이런 리간드들의 치환은, 표적 분자가 결합하면 리간드들의 공통적인 짧은 서열이 더이상 그것의 상보적인 서열과 결합할 수 없도록 리간드의 배좌(conformation)가 변형된다는 것을 나타낸다. 관련된 구체예에서, 핵산 리간드의 초기의 후보 혼합물이 표적 분자와 접촉할 것이고, 용액 상(phase)내에서 결합이 일어날 것이다. 그 다음, 핵산 리간드들이 상기의 칼럼과 접촉할 것이다. 서열 A가 칼럼-결합된 서열 A'과 혼성화될 수 없는 방식으로 표적에 결합한 핵산 리간드는 칼럼을 통과하게 될 것이고 그리고 모아질 수 있다. 제목이 "형광 기술을 이용한 핵산 리간드에서의 표적 분자의 결합의 검출"인 하기의 문단에서 상세히 설명되는 바와 같이, 이런 두개의 구체예에서 얻어진 핵산 리간드들이 바이오칩에 이용될 것이다.

본 발명의 가장 뛰어난 점 중 하나는, 생물학적 샘플에 있는 많은 표적물들을 그들에 상응하여 인식하는 매우 많은 수의 핵산 리간드들을 동정하는 것이 가능한 점에 있다. 본 발명의 많은 구체예에서, 용액 또는 혼합물에 있는 동정될 수 있는 표적들의 숫자가 클수록 더 좋다. 핵산 리간드들이 어떤 분자 표적에 결합하는가를 알지 못하더라도 셀렉스 방법으로 핵산 리간드를 선별하는 것이 가능하다. 진단 및 예후적 목적을 위해서는, 표적의 존재의 어떤 유형이 어떤 특정한 상태를 가르는 한, 특이적 표적들은 거의 필요가 없을 수 있다. 이 방법에 의해서, 관련이 없는 것으로 보이는 다중 표적물들의 존재가 결정되면 어떤 상태를 예후 또는 진단할 수 있다. 본 발명은 연구자들에게 어떤 생물학적 샘플안에서 어떤 표적을 검출할 것인가를 결정할 필요가 없게 해준다. 셀렉스가 복합 샘플안에 있는 매우 많은 에피토프에 대하여 리간드들을 동시에 동정할 수 있게 해주기 때문에, 어떤 표적이 결정적인가에 대한 선행 지식에 의존하지 않는 새로운 진단 방법이 이용될 수 있다.

따라서, 본 발명의 어떤 면에서, 바이오칩은 불확정적인 표적들에 대하여 실로 수천개의 핵산 리간드들로 구성될 수 있다. 본 발명의 다른 구체예에서, 바이오칩에 결합된 각각의 핵산 리간드에 대한 표적물들은, 채택된 셀렉스 프로토콜(protocol)의 성질에 기초해서 미리 결정되거나, 또는 핵산 리간드가 결정되고 난후에 결정될 수 있다.

III. 핵산 리간드 바이오칩의 제작

핵산이 고정되는 바이오칩의 제작은, 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있다. 바이오칩은 랑그뮈르-바젯트(Langmuir-Bodgett)필름, 작용성화된 유리, 게르마늄, 실리콘, PTFE, 폴리스티렌, 비소화 갈륨, 금, 은, 막, 나일론, PVP, 또는 표면 상에 아미노기, 카르복실기, 디엘즈-알더(Diels-Alder) 반응물들, 티올기 또는 히드록실기와 같은 작용기들을 지닐 수 있는 당해분야에서 잘 알려진 다른 임의의 물질일 수 있다. 그 후, 이런 작용기들이 교차결합제와 공유결합을 하여서, 핵산 리간드들의 차후의 결합과 핵산 리간드들의 표적 분자들과의 상호작용이 바이오칩에 의한 장애없이 용액내에서 일어나는 것이 바람직하다. 전형적인 교차결합기들은 에틸렌 글리콜 올리고머, 디아민(diamine)들 및 아미노산들을 포함한다. 본 발명은 핵산 리간드를 바이오칩에 고정화시키는 데 유용한 모든 적합한 기술을 포함한다.

한 구체예에서, 하나 이상의 핵산 리간드들이, 결합제(coupling agent)상에 존재하는 광반응성 보호기(protecting group)를 이용한 사진평판법(photolithography)에 의해 지지체에 결합할 것이다. 그런 기술은 맥갈(McGall) 등의 미국 특허 제 5,412,087호에 개시되어 있다. 광화학적으로 제거될 수 있는 보호기(protecting group)를 지닌 티올프로피오네이트(thiolpropionate)가 바이오칩의 표면에 있는 작용기들에 공유결합된다. 그후 적당한 파장의 빛을 미리 정해진 표면 부위에 조사하면, 티올기의 광탈보호(photodeprotection)가 초래된다. 원하는 부위에서 또는 구획(address)에서만 광탈보호가 일어나도록 하기 위하여 마스크(mask)가 사용될 것이다. 그후 말레이미드(maleimide)들과 같은 티올 반응성기를 함유한 핵산 리간드가 상기 탈보호된 부위에 결합한다. 결합되지 않은 핵산 리간드는 씻겨져나갈 것이고, 그리고 다른 핵산 리간드를 지닌 다른 위치에서 이 과정을 반복한다. 이와 유사한 방법은, 3'-히드록실기와의 결합을 통하여, 아민화된(aminated) 바이오칩에 결합한 5'-니트로버라트릴(nitroveratryl)로 보호된 티미딘(thymidine)을 이용하는 것이다(포더(Fodor) 등, (1991) 사이언스 251:767-773).

이 티미딘 유도체의 광탈보호로 인해 포스포아미디트(phosphoramidite) 활성화된 단량체(또는 올리고머)가 이 위치에서 반응하게 된다. 다른 방법은 광활성화 될 수 있는 바이오틴 유도체를 이용하여 아비딘(avidine) 결합을 공간적으로 위치시키는 것이다. 아비딘은 동시에 하나 이상의 바이오틴기와 결합할 수 있기 때문에, 차후에 바이오틴-결합된 핵산 리간드를 바이오칩에 공간적으로 위치시키기 위한 수단으로서 이용될 것이다(바렛트(Barrett)와 다수, 미국 특허 제5,252,743호 및 PCT91/07807). 원칙적으로, 케이지된(caged) 결합제(binding agent)의 광탈보호는, 리간드-수용체 쌍의 한쪽 구성물이 포토라빌(photo-labile)기에 의해 보호될 수 있는 작은 분자인 임의의 리간드-수용체 쌍에 사용될 수 있다. 이러한 리간드-수용체 쌍의 다른 예는 만노오스와 콘카나발린 A(concanavalin A), cAMP와 안티-cAMP 항체들, 및 테트라하이드로 폴레이트와 폴레이트에 결합하는 단백질을 포함한다(미국 특허 제5,252,743호).

다른 구체예에서, 각각의 결합 광활성화 단계에서 핵산 리간드와 접촉하게 되는 바이오칩의 부위는 공간적으로 제한되어 있다. 이것은 핵산 리간드가 주입될 채널(channel)을 포함하는 블럭(block)상에 지지체를 위치시킴으로써 행해질 수 있으며, 여기서 각각의 채널은 핵산 리간드가 바이오칩의 작은 부위에만 접근하도록 한다. 이것은 핵산 리간드가 광활성화되지 않은 부위에 결합하는 것을 방지한다. 또한 이것의 사용으로 다수의 상이한 핵산 리간드가 지지체에 동시에 결합하도록 하는 것이 가능할 것이다. 이 구체예에서 마스크는, 바이오칩의 여러 부위에서 유형화된 조명(illumination)과 그로인한 광활성화를 동시에 가능하게 한다. 각각의 광활성화된 부위 주변의 부위가 전술한 채널에 의해 그 이웃한 부위로부터 분리된 후, 각각의 핵산 리간드들을 상이한 채널을 통해 주입함으로써 상이한 핵산 리간드들이 이 광활성화된 부위들로 전달될 것이다(원클러(Winkler) 등, 미국 특허 제5,384,261호).

상기한 방법에 있어서 광활성화된 부위는 적어도 50mm² 정도일 것이다. 1센티미터 스퀘어(square)당 250,000 이상의 결합 사이트가 가시광선으로 용이하게 성취될 수 있다는 것이 밝혀졌다; 상한 한계(upper limit)는 광선의 회절 한계에 의해서만 결정된다(포더(Fodor) 등, (1991) 사이언스 251:767-773). 그러므로 더 짧은 파장의 전자기방사선(electromagnetic radiation)을 사용한 광활성화가 더 밀집한 결합 배열을 만드는 데 사용될 것이다. 바이오칩이 입사방사선에 대해서 투명하다면, 바이오칩을 수직으로 쌓고 이 방법을 동시에 수행하는 것이 가능하여 바이오칩의 제작효율을 크게 증가시킬 수 있을 것이다.

대안적으로는, 주형-스탬핑(template-stamping)의 형태가 고려되는데, 여기서 핵산 리간드의 정돈된 배열을 포함하는 (그리고 상기한 바와 같이 제조될 수 있는) 주형을 사용하여 동일한 정돈된 배열을 다중 바이오칩상에 위치시킬 것이다.

또 다른 구체예에서, 핵산 리간드 배열은 "잉크-젯(ink-jet)"방법에 의해서 바이오칩상에 형성될 것이다. 여기서 리간드들은 전기-기계식 분배기(electro-mechanical dispenser)에 의하여 정해진 위치에 놓여진다. 1센티미터 스퀘어(square)당 1000에 달하는 밀도를 가진 프로브(probe)의 배열을 형성할 수 있는 잉크-젯 분배기가 하이에스(Hayes) 등의 미국 특허 제5,658,802호에 개시되어 있다.

IV. 형광 기술을 이용한 핵산 리간드에서의 표적 분자의 결합의 검출

A. 일반적인 검출 기술

한 구체예에서, 바이오칩의 표면상에서 핵산 리간드에 결합한 단백질 표적분자들은, 핵산에는 결합하지 않으면서 모든 단백질에 비특이적으로 결합하는 화학 물질의 첨가에 의해서 검출될 것이다. 더 일반적으로, 그런 작용인자는 바람직하게는 핵산위에 있는 단백질들에 결합한다. 당해 기술 분야에서 단백질들에 비특이적으로 결합하는 것으로 알려진 임의의 형광성의 화학 물질이 적합할 것이다. 적절한 예로서 몰레큘러 프로브 사(Molecular Probes, Inc.)에서 구입할 수 있는 염료인 난오렌지(Nanorange)와 시토프로브(Cytoprobe)를 들 수 있다.

바람직한 구체예에서, 고정된 애프탐머(aptamer)에 공유결합된(또는 비공유결합된) 단백질을, 핵산과 단백질의 작용기들의 반응성이 다르다는 점을 이용하여 특이적으로 검출할 수 있다. 핵산은 강한 친핵체(nucleophile)를 보유하지 않는 반면, 리신 및 시스테인 측쇄들은 활성인 친핵체를 단백질에 제공한다. 리신은 대부분의 단백질들의 4-6%의 측쇄를 이루는 비교적 풍부한 아미노산이다. 시스테인은 리신보다 그 양이 매우 다양하고 다른 시스테인 잔기와 디설파이드(disulfide)결합을 통하여 격리되어 있어 반응에 대한 이용가능성이 비교적 낮다.

따라서, 리신 잔기를 이용한 단백질 변형 화학이 매우 발달하였다. 리신과 반응하는 많은 수의 플루오로포어(fluorophore) 또는 다른 표지제(tagging agent)들이 개발되었다. 가장 일반적인 화학은 리신과 N-하이드록시숙시이미드(hydroxysuccinimide)(NHS)에스테르, 또는 이소티오시아네이트(isothiocyanate)의 반응에 의존하거나 다양한 알데히드 반응에 의존한다.

다른 구체예에서, 바이오칩 표면상에서 핵산 리간드에 결합한 표적 분자들을 샌드위치 분석법을 이용하여 검출할 것이다. 이 방법은 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 샌드위치 분석법은 특이적 결합된 표적 분자들을 인식하는 항체, 바람직하게는, 핵산 리간드에 의해 인식되는 사이트와 다른 사이트에 결합하여 표적 분자들을 인식하는 항체들을 이용한다. 그런 샌드위치 분석법에서, 항체는 형광 표지(labeling)될 수 있거나, 또는 모든 면역글로불린과 결합하는 형광 표지된 단백질 A를 바이오칩에 접촉시킴에 의해, 결합된 항체 자체가 검출될 수 있다. 대안적으로는 일차 항체의 면역글로불린 아형(subtype)에 특이적인 이차 항체들이 바이오칩과 접촉할 것이다. 이차 항체들이 형광 표지될 수 있거나 또는 보고(reporter) 효소와 결합할 수 있는 데, 여기서 효소는 검출할 수 있는 화합물의 생산을 촉매한다. 이 경우에 있어서는 이차 항체가 일차 항체상의 다중 사이트에 결합할 수 있기 때문에 샌드위치 분석법은 검출가능한 신호를 크게 증폭시킬 수 있는 잠재성을 갖는다. 당해 기술 분야에서 공지된 샌드위치분석법의 모든 변형들이 본 발명에 포함된다.

관련된 샌드위치분석법의 구체예에서는, 결합된 표적 분자가 이차 핵산 리간드의 사용에 의해서 검출될 것이며, 여기서 이차 핵산 리간드는 바이오칩에 결합된 핵산 리간드에 의해 인식되는 사이트와는 다른 표적 분자상의 사이트에 결합한다. 상기의 단락에서 서술한 바와 같이, 이차 핵산 리간드는 형광 표지될 수 있거나 또는 바이오틴에 접합될 수 있어, 그 다음, 형광 표지된 아비딘이 또는 보고 효소에 접합된 아비딘이, 표적 분자와 결합한 이차 핵산 리간드에 결합할 수 있게 된다. 대

안적으로는, 제목이 "핵산 리간드에 상보적인 서열을 가진 올리고뉴클레오티드를 이용한 검출"인 하기 문단에 서술되는 바와 같이, 일차 및 이차 핵산 리간드들이 적당한 방식으로 표지되어, 에너지 전달 쌍(energy transfer pair)을 형성할 수 있다.

다른 구체예에서, 표적 분자의 결합은 당해 기술분야의 당업자들에게 잘 알려진 경쟁(competition) 분석법을 사용하여 검출할 것이다. 바이오칩-결합된 핵산 리간드를 테스트 혼합물과 접촉시킨 후에, 결합 테이터를 얻고자하는 각각의 표적 물질의 예정된 양이 함유된 용액을 첨가한다. 이런 표적 분자들은 검출이 가능하도록 당해분야에서 공지된 임의의 방식으로 형광 표지된다. 표지된 표적 분자들은 고정된 핵산 리간드들과의 결합에 있어서 경쟁한다. 평형이 이루어질 것이고, 각각의 사이트에 결합한 표지된 분자들의 양을 이용하면 본래의 테스트 혼합물에 함유된 각각의 표적 분자들의 양이 계산될 것이다.

다른 구체예에서, 애트탐머에 결합한 단백질 효소들을 효소 활성 분석법(assay of enzyme activity)에 의해서 검출할 수 있다.

B. 핵산 리간드에 상보적인 서열을 가진 올리고뉴클레오티드를 이용한 검출

어떤 바람직한 구체예(도 2)에서, 표적 분자에 대한 결합 사이트와 관련된 항구적 서열을 지니는 핵산 리간드들(21)이 바이오칩(22)의 특이적 부위에 위치할 것이다. 그런 핵산 리간드들의 합성이 "바이오칩에 사용될 핵산 리간드의 수득"이라는 제목의 상기 문단에 개시되어 있다. 그 다음, 바이오칩에 결합된 핵산 리간드는, 상기의 항구적 서열에 상보적인 서열을 가진 올리고뉴클레오티드(23)와 혼성화를 형성할 것이다. 이 바이오칩을 테스트 혼합물과 접촉시키면, 표적 분자(25)에 결합한 핵산 리간드들로부터 올리고뉴클레오티드의 치환(24)에 이르게 될 것이다. 또 다른 구체예(도 3)에서, 바이오칩(31)이 합성될 것이고, 이 바이오칩상에서 상보적인 올리고뉴클레오티드(32)가 당해기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해서 고정될 것이다. 그러면 핵산 리간드들(33)이 바이오칩상의 특이적인 부위에 위치할 것이고 거기에서 핵산 리간드들은 염기쌍에 의해서 올리고뉴클레오티드와 결합하게 될 것이다. 다음, 바이오칩이 테스트 혼합물과 접촉될 것이다. 표적 분자의 결합(34)은 지지체에 결합된 올리고뉴클레오티드(35)와 핵산 리간드 사이의 염기쌍의 붕괴를 초래하게 될 것이고 따라서 바이오칩으로부터 핵산 리간드의 치환이 일어날 것이다.

상기의 구체예에서, 치환된 핵산은 플루오레신(fluorescein), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), 텍사스 레드(Texas Red) 또는 당해 기술 분야에서 알려진 다른 임의의 형광성 분자로 표지되어 있어서(26,36), 그 결과 표적 분자가 결합한 사이트에서 형광성의 강도가 감소하게 된다. 따라서 바이오칩상의 각각의 구획(address)에서 검출된 표지성의 레벨은, 분석되는 혼합물에 있는 표적분자의 양과는 역함수관계가 될 것이다. 대안적으로는, 핵산 리간드와 올리고뉴클레오티드는 에너지 전달 쌍을 구성한다. 예컨대, 그 쌍의 한쪽 구성물은 테트라메틸로다민으로 표지될 것이고 다른쪽 구성물은 플루오레신으로 표지될 것이다. 청색(blue) 광을 조사하면 플루오레신에 의해 방사된 녹색 광이 테트라메틸로다민기에 의해 흡수되기 때문에 상기 복합물의 플루오레신-기초한 형광성은 소멸한다; 이 복합물의 로다민-기초한 형광성은 소멸하지 않는다. 표적 분자가 결합하면 이 에너지 전달 쌍의 두 절반의 분리가 발생하고 바이오칩상의 그런 사이트에서 방사 프로파일(emission profile)에 있어서의 변화를 유발한다. 테트라메틸로다민 표지된 분자의 치환은, 바이오칩상의 이 부위에서 플루오레신-기초한 형광성의 갑작스런 출현과, 그것과 동시에 로다민-기초한 형광성의 소멸을 초래할 것이다. 이 두 개의 상이한 방사 프로파일에 있어서의 동시적인 변화로 인해, 각각의 사이트에서 래티오메트릭 이미징(ratiometric imaging)을 수행할 수 있게 되고, 표적 분자의 결합을 민감하게 측정할 수 있게 될 것이다. 여기(excitation) 및 방사 스펙트럼을 적당히 매치(match)시킨다면 임의의 에너지 전달 쌍이 이런 구체예에서 사용될 수 있다는 것은 당해 기술 분야의 당업자들에게 명확한 것이다.

대안적인 구체예에서, 치환된 핵산이 친화쌍(affinity pair)의 한쪽 구성물, 예컨대, 바이오틴에 접합한다. 그다음, 검출될 수 있는 분자가 친화쌍의 다른쪽 구성물, 예컨대, 아비딘에 접합한다. 테스트 혼합물을 바이오칩에 넣어주고 난 후에, 접합된 검출가능한 분자들이 첨가된다. 바이오칩의 각각의 사이트에서 검출가능한 분자의 양은, 테스트 혼합물에 존재하는 표적 분자의 양과 역함수관계를 이룰 것이다. 다른 구체예에서, 치환된 핵산은 바이오틴으로 표지될 것이고, 그리고 치환된 핵산은 형광 표지된 아비딘을 첨가함에 의해서 검출될 수 있다; 그다음, 아비딘 자체가, 다른 형광 표지된 바이오틴-접합 화합물에 결합될 것이다. 치환된 올리고뉴클레오티드상의 바이오틴기가 또한 아비딘-결합된 보고 효소와 결합하는 데 사용될 수 있다; 그다음, 그 효소는 검출가능한 화합물의 침전(deposition)을 초래하는 반응을 촉매할 것이다. 대안적으로는, 보고 효소가 불용성 생성물의 생산을 촉매할 것이며, 여기서 불용성 생성물은 본질적으로-형광성인 바이오칩의 형광성을 국소적으로 소멸시킬 것이다. 치환 분석법의 다른 구체예에서, 치환된 올리고뉴클레오티드는 디고옥시게닌(digoxigenin)과 같은 면역학적으로-검출가능한 프로브로 표지될 것이다. 그다음, 치환된 올리고뉴클레오티드는 그 프로브를 특이적으

로 인식하는 한 세트의 일차 항체들에 의해 결합될 것이다. 그다음, 보고 효소에 접합되거나 형광 표지된 한 세트의 이차 항체들이 이 일차 항체들을 인식하고 결합할 것이다. 이런 예시의 많은 변형들은 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다.

상기 구체예의 변형들에 있어서, 핵산 리간드는 상기한 바와 같이 항구적 서열 부위를 포함하지 않을 것이다. 이런 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 핵산 리간드의 전체 또는 일부에 상보적인 서열을 지닐 것이다. 따라서 각각의 핵산 리간드는 특유한 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드에 결합할 것이다. 올리고뉴클레오타이드는 표적 분자가 결합하면 상기한 바와 같이 바이오칩-국제화된 핵산 리간드들로부터 치환될 것이다. 대안적으로는, 올리고뉴클레오타이드들이 상기한 바와 같이 바이오칩상의 특정 위치에 국제화될 것이고 그럼으로써, 다음에는 핵산 리간드가 올리고뉴클레오타이드와의 상보적인 염기쌍을 통하여 특정 부위에 국제화될 것이다. 이 경우에 상기한 바와 같이, 표적 분자가 결합하면 바이오칩으로부터 핵산 리간드가 치환될 것이다. 각각의 경우에, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 핵산 리간드가 상기한 바와 같이 표지될 것이다.

다른 구체예에서, 핵산 리간드들은 바이오칩의 특정 부위에 국제화될 것이다. 바이오칩이, 테스트 혼합물과 접촉하고 난 후 (i)핵산 리간드의 항구적 서열에 상보적인 서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드; 또는 (ii)이 단락에서 상기한 바와 같이 항구적 서열을 포함하지 않는 각각의 핵산 리간드의 전체 또는 일부에 상보적인 서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함하고 있는 용액과 접촉할 것이다. 이들 경우들에 있어서, 표적 분자의 결합으로 차후의 올리고뉴클레오타이드의 결합이 차단될 것이다. 본 단락에서 상기한 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드의 결합을 모니터링하기 위해 핵산 리간드와 올리고뉴클레오타이드는 표지될 수 있다.

C. 표적 분자 결합의 검출을 용이하게 하기 위한, 핵산 리간드에의 작은 분자의 결합 사이트의 형성

다른 구체예에서, 특정한 작은 분자에 대한 결합 사이트를 지닌 핵산들의 풀(pool)을 사용하여 셀렉스를 수행할 것이다. 그런 작은 분자의 예로서 카페인과 유사한 테오필린(theophylline)을 들 수 있다. 이 분자에 대하여 단일 가닥 핵산 리간드는, 분자의 5'말단과 3'말단이 서로 인접한 머리핀의 고리 모양(hairpin loop)을 한 이중 가닥 줄기(stem)를 형성한다. 이 구조는 테오필린의 존재하에서만 형성된다. 이 구체예에서, 머리핀 고리 부위에서 랜덤(random)화된 서열을 가진 테오필린 리간드의 후보 혼합물이 합성될 것이고, 그리고 그후에 이 후보 혼합물이 테오필린이 부착되어 있는 고체 지지체, 바람직하게는 칼럼을 통과할 것이다. 후보 리간드들이 테오필린에 단단히 결합하여 칼럼상에 고정될 것이다. 표적 분자들을 포함한 혼합물이 칼럼에 첨가되고, 그러면 핵산 리간드들이 용출되어 모아질 것이다. 이것이, 리간드가 더 이상 테오필린에 결합하지 않게 되는 방식으로 표적 분자들에 결합한 리간드들을 선별한다. 표적 분자에 결합하는 구조가 채택됨으로써 테오필린에 결합하는 구조가 붕괴되기 때문에 이 리간드들은 치환되는 것이다. 이 리간드들은 셀렉스 특허출원에서 개시된 표준 방식에 의해서 정제될 것이다. 그후에, 테오필린(42)이 결합된 바이오칩(도 4)이 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해서 제조(41)될 것이다. 그후에, 하나 이상의 종(species)의 핵산 리간드들(43)이 바이오칩상의 정해진 부위에 결합될 것이고 이 부위에서 핵산 리간드들은 테오필린과 단단하게 결합한다. 테스트 혼합물을 바이오칩과 접촉시키면, 동종의(cognate) 표적 분자(45)와 결합한 핵산 리간드들이 바이오칩에서 치환(44)되게 된다. 상기에서 상술한 임의의 수단에 의해서 치환 여부를 검출할 수 있다(46). 이 기술은, 테오필린과 유사한 머리핀-모양의 구조를 형성하는 다른 임의의 핵산 리간드에 대해서도 사용할 수 있고, 또는 부가적인 랜덤(random)화된 서열을 지니게 합성될 수 있고 한 화합물이 결합하면 다른 화합물이 치환되도록 2개의 다른 화합물에 상호 배제 방식으로 결합하는 다른 임의의 핵산 리간드에 대해서도 사용될 수 있다.

관련 구체예(도 5)에서, 테오필린과 같은 특정한 작은 분자에 대한 결합사이트 및 랜덤(random)화된 분절을 지닌 핵산 리간드가 상기 단락에서 개시된 바와 같이 합성될 것이다. 이 리간드들(51)은 에너지 전달 쌍의 양쪽 구성물(52,53) 모두에서 표지되어 작은 분자의 존재하에서 이런 기(group)들이 서로 가까워져서 형광성이 소멸하게 된다. 그후에, 리간드들이 바이오칩(54)의 특정 부위에 놓여질 것이고 작은 분자(55)가 바이오칩에 첨가될 것이다. 리간드들은 작은 분자에 결합하는 구조를 채택하고 있으며 형광성은 소멸할 것이다. 그후, 테스트 혼합물이 바이오칩에 첨가되고 표적 분자들(56)이 적절한 핵산 리간드에서 작은 분자를 치환하게 될 것이다. 표적 분자에 결합하기 위해서는 핵산 리간드가 배좌적(conformational) 변화를 하게 되고 이로 인해 에너지 전달 쌍의 두 절반들이 더 이상 인접할 수 없게 된다(57). 이것이 표적 분자가 결합한 바이오칩상의 각각의 사이트에서 형광성 프로파일에서의 변화를 초래한다. 표적 분자가 작은 분자를 치환할 때 리간드가 배좌적 변화를 하게 된다면, 이 구체예는 임의의 작은 분자에 대한 결합 부위를 지닌 리간드에 대해서도 사용될 것이다.

다른 치환 방식은, 지지체에 결합된 핵산 리간드로부터 표지된 단일-가닥 DNA-결합 단백질(single-stranded DNA-binding protein)의 표적-분자-의존적 치환(target-molecule-dependent displacement)을 이용한다.

상기의 맥갈 등은 다중 프로브들을 이용하여 다중 표적 핵산 서열들을 동시에 동정하는 기술을 제시하고 있다. 이 방법에 있어서, 특정 표적 분자에 대항하여 한 세트의 표지된 일차 프로브가 합성된다. 여기서 각각의 프로브는 그 특정 프로브에 특유한 부가 서열을 포함하고 있다. 이 특유한 서열들이 바이오칩에 고정된 한 세트의 이차 올리고뉴클레오타이드에 대해 상보적이다. 이 저자들은 일차 프로브가 표적과 용액내에서 접촉할 것이라 기대하고 이 복합체를 바이오칩에 첨가했다. 각각 프로브의 특유한 부가 서열이 바이오칩상의 특정 구획(address)에 결합된 이차 프로브와의 상호작용을 통해 상기 복합체를 그 특정 구획에 국재화시킨다. 결합된 핵산 리간드를 비결합 핵산 리간드로부터 분리시키는 방법들이 당해 기술 분야에서 공지되어 있기 때문에, 이 기술은 본 발명에 적용될 수 있다. 특히, 각각의 종(species)의 핵산 리간드에 대해서 다른 부가 서열, 바람직하게는 특이적 결합 상호작용에 있어서 중요한 잔기들과는 다른(distant) 부가 서열을 지닌 핵산 리간드들이 합성될 것이다. 바이오칩은 각각의 종의 핵산 리간드의 특유한 서열에 상보적인 서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함할 것이다. 각각의 핵산 리간드는 또한 플루오로포어(fluorophore)와 같은 검출가능한 기(group) 및/또는 상기한 바와 같이 그 핵산 리간드를 다른 검출가능한 분자에 결합시키는 수단을 지닐 것이다. 대안적으로, 상기한 바와 같이 바이오칩-국재화된 이차 세트의 핵산들과 핵산 리간드들 자체가 상기한 바와 같이 에너지 전달 쌍을 형성하는 방식으로 표지될 수 있다.

D. 신호-증폭 혼성화 캐스케이드를 통한 결합의 검출

본 발명의 다른 일련의 구체예들은 한 세트의 상호-상보적인 핵산들의 사용을 포함한다. 모든 방법에 있어서, 핵산 리간드가 표적 분자에 결합하면, 핵산 리간드는 다른 핵산들이 그 결합부위에서 혼성화될 수 있게 배좌 변화를 일으킨다. 표적 분자가 결합된 핵산 리간드에 혼성화된 그 다른 핵산들도 혼성화되는 동안 배좌변화를 일으켜서, 유사하게 또 다른 핵산들이 그 혼성화된 부위에서 혼성화될 수 있게 한다. 이런 배좌 변화와 혼성화의 일련의(chain) 반응이 계속되면, 바이오칩상의 핵산 리간드가 표적 분자에 결합하는 각각의 사이트에서 점차적으로 커지는 분자간 혼성화 복합체가 형성된다. 표적 분자와 결합하면 및/또는 다른 핵산과 혼성화되면, 혼성화-촉진 배좌 변화를 일으키는 어떤 핵산 구조도 이 구체예에서의 사용에 적합하다. 1997.12.15에 출원되고 발명의 명칭이 "혼성화 캐스케이드를 통한 형광 신호의 증폭을 위한 시스템"인 출원에서 캐스케이드 혼성화의 사용을 개시하고 있다. 이 출원은 본원에서 참고로서 특별히 삽입된다.

혼성화되는 핵산은, 핵산이 혼성화 반응에 관여하지 않을 때만 공간적으로 인접해있는 위치에서 형광기와 소광기(quenching group)로 표지되어 있다. 따라서 분자간 복합체가 형성됨과 동시에 표적 분자가 핵산 리간드에 결합하는 각각의 사이트에서 점차적으로 커지는 형광 신호가 형성되게 된다. 이 신호는 당해 분야에서 알려진 형광 기술에 의해서 검출될 수 있다.

바람직한 구체예에서, 한 세트의 상호-상보적인 줄기-고리(stem-loop)형 핵산이 합성된다. 핵산 리간드는 줄기-고리 구조로 디자인되고, 표적 분자의 결합 부위는 고리 부위에 위치하게 된다. 상기 각각의 종의 핵산 리간드는 바이오칩상의 구분된 위치에 고정되어 있다. 줄기 부위는 서열 A와 B(도 6)에서 두개의 부분적으로 상보적인 "팔(arm)들"을 포함하고 있다. 여기서 서열 A와 B는 제한적인 염기쌍을 일으켜 불완전한 분자내 이중나선(61)을 형성하게 된다. 이 핵산 리간드는, 표적 분자가 결합하면 구조적 변화를 일으켜 줄기 부분이 완전히 붕괴된다(62). 세개 이상의 여분의 세트의 불완전한 줄기-고리형 핵산이 또한 합성된다. 첫번째의 여분의 세트는 바이오칩에 결합한 핵산 리간드와 동일하지만 고리 부분(63)에 표적 분자 결합 사이트는 지니고 있지 않다. 나머지 두개의 세트의 줄기 부분의 서열들은, C'/A'(64)과 B'/C(65)로 표현되어 있으며, (i)핵산 리간드 줄기의 팔들중 하나와 완전히 결합할 수 있고(A'은 A와 완전한 쌍을 이루고, B'은 B와 완전한 쌍을 형성한다) 그리고 (ii)두번째 세트의 팔들은 세번째 세트의 팔들과 완전히 결합할 수 있게(C'은 C와 완전한 쌍을 형성한다) 선정된다. 세개의 세트들은 불완전한 줄기 구조가 형성될 때만 공간적으로 인접하게 되는 위치에 형광기(66)와 소광기(67)를 포함하고 있다. 줄기-고리 핵산 리간드들을 지닌 바이오칩은 테스트 혼합물과 접촉될 것이고, 표적 분자의 결합은 상기 핵산 리간드의 줄기 부분의 붕괴를 초래하게 될 것이다. 서열 A와 서열 B 모두 염기쌍을 형성할 수 있게 될 것이다. 그후에, 바이오칩이 세개의 모든 세트의 핵산들의 용액과 접촉될 것이다. 그후에, 세개 세트의 핵산의 줄기의 팔들이, 표적 분자-결합 반응(68)을 일으키는 핵산 리간드와 혼성화될 것이다. 두번째 및 세번째 세트의 핵산들의 줄기 부분들이 핵산 리간드 팔들과 결합하자 마자 유사하게 붕괴되고 그후에, 혼성화되지 않은 팔들이 그들에 상보적인 서열과 혼성화를 형성할 수 있다. 이 과정은 완전한 이중나선과 불완전한 이중나선사이의 유리한(favorable) 자유에너지의 차이에 의해서 촉진되며, 핵산들중의 하나가 용액상에서 고갈될 때까지 진행될 것이다. 각각의 혼성화 단계에서, 다른 팔의 서열이 상보적인 염기쌍을 형성할 수 있게 되어, 궁극적으로 분자간 이중나선의 다중분자 복합체의 형성을 초래하게 된다. 각각의 혼성화 단계후에 소광기와 형광기의 공간적인 분리가 있게 되고, 이것은 본래 하나의 표적 분자가 하나의 핵산 리간드에 결합하게 되는 바이오칩상의 사이트에서 높은 형광 신호(69)의 발생을 유발한다. 이 구체예에서 본래의 형광 신호는 혼성화 캐스케이드에 의해 크게 증폭된다.

E. 분광학적으로 검출가능한 핵산 리간드들에의 표적 분자들의 직접적인 결합

다른 구체예에서, 분광학적으로 검출될 수 있게 표지된 하나이상의 핵산 리간드들이 바이오칩상에 고정된다. 그런 리간드들의 합성이 피트너(Pittner)등의 미국 특허 제5,641,629호와 미국 특허 제5,650,275호에 개시되어 있다. 이 두가지 특허 모두 본원에서 참고로서 특별히 삽입된다. 핵산 리간드가 그것의 표적 분자와 결합하였을 때 상기 리간드상의 이 표지들은 형광 강도(intensity), 형광 분극(polarization) 또는 형광 수명에 있어서 검출가능한 변화를 일으킨다. 적당한 표지들의 예로서, 형광성 표지들(예컨대, 플루오레신, 텍사스 레드), 발광성 표지들(예컨대, 루시페린, 아크리디니움(acridinium) 에스테르), 에너지 전달 표지들(예컨대, 플루오레신과 테트라메틸로다민), 및 유사한(near) IR 표지들(예컨대, 디시아닌(dicyanines), 라 줄라 블루(La Jolla Blue) 염료)을 들 수 있다. 형광성에서의 변화를 측정함으로써 표적 분자의 표지된 리간드에의 결합을 검출할 수 있을 것이다. 이런 것들은 형광 분극(polarization), 형광 비등방성, 형광 강도(intensity) 및 형광 수명에서의 변화를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 이런 측정들을 연속적으로 하거나 동적인 방식으로 할 수 있다. 그후에, 결합된 표적 분자가, 차이가 검출될 수 있는 바이오칩상의 위치에 존재함을 알 수 있게 될 것이고, 테스트 혼합물에 있는 각 표적 분자의 정량화가 가능해질 것이다.

바람직한 구체예에서, 바이오칩에 결합된 핵산 리간드들은 하나이상의 인광기(phosphorescent group)로 표지될 것이다. 이런 기들은 핵산 리간드에 형성되어 그들중 적어도 몇몇은 표적 분자의 결합 사이트내에 위치하게 될 것이다. 인광기들은 부적절한 표적 분자의 핵산 리간드에의 비특이적 결합의 반감기보다 예정된(predetermined) 양만큼 긴 방사(emission)반감기를 갖도록 당해 기술 분야에서 공지된 것들중에서 선정될 것이다. 바이오칩이 인큐베이션되는 배지는 인광성을 효과적으로 소멸시킬 수 있는 예정된(predetermined) 양의 소광제(quenching agent)를 함유할 것이다. 표적 분자들이 핵산 리간드에 특이한 방식으로 결합하면 인광기들은 소광제로부터 보호될 것이다. 바이오칩에 적당한 파장의 빛을 조사하면 표적 분자와 특이적으로 결합한 핵산 리간드들의 인광기들은 인광을 발할 것이고, 따라서 빛이 리간드가 결합한 바이오칩상의 사이트에서 검출될 것이다. 결합되지 않은 핵산 리간드의 인광성은 소멸할 것이고, 따라서 바이오칩상의 그런 사이트에서는 어떤 빛도 검출되지 않을 것이다. 부적절한 비동종(non-cognate) 표적 분자에 결합한 핵산 리간드들의 인광성도, 이런 복합체의 형성에 대한 반감기가 인광기들의 방사 반감기보다 훨씬 짧기 때문에 또한 소멸할 것이다. 즉 비특이적 복합체에 있는 개개의 인광기들은 특이적 복합체에 있는 인광기들보다 용매에서 광자 방사(emission)이전에 소광기(quenching group)와 마주치게 될 가능성이 몇배 더 높다. 특이적 핵산 리간드-표적 분자 복합체의 형성에 대한 반감기보다 큰 방사 반감기를 갖는 임의의 적절한 인광기들도 본 발명에 포함된다. 인광성의 검출이 여기방사(excitation illumination)후의 예정된(predetermined) 길이의 시간만큼 지연되면, 인광성의 신호는 배경의 형광성의 신호와 구별될 수 있게 되는 데, 이는 배경의 형광성의 신호가 매우 짧은 방사 반감기를 갖기 때문이다. 단단하게 결합된 핵산 리간드만이 소광으로부터 보호될 것이기 때문에 이런 지연으로 검출의 특이성을 높일 수 있다. 또한, 각각의 노출사이에서 바이오칩의 임의의(optional) 짧은 세정으로 바이오칩의 일련의 인광성 상(image)들이 얻어질 것이다; 그 결과 얻어진 일련의 상들은 통합될 것이다. 특이적 결합이 노출들 사이에서도 지속되는 반면 비특이적 결합은 그렇지 않으므로, 이것에 의해서 비특이적 신호와 특이적 신호의 보다 확실한 구분이 가능해진다.

다른 구체예에서, 핵산 리간드상의 인광기이외에 형광기들을 사용하여 상기 단락에서 서술된 기술을 수행할 수 있을 것이다.

F. 표적 분자의 결합에 따른 이중나선 변화의 검출

다른 구체예에서, 각각의 핵산 리간드의 이중나선성의 정도에서의 변화를 모니터링함으로써 표적 분자의 결합을 측정하게 될 것이다. 표적 분자가 결합하게 되면 핵산 리간드들은 이중 가닥 부분의 형성 또는 팽창(expansion)과 같은 구조적인 변화를 일으킨다는 것이 알려져있다. 본 발명에서, 이런 변화들은 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)와 같은 형광성의 삽입(intercalating) 염료를 바이오칩에 첨가하고 테스트 혼합물의 존재하에서 및 부재(不在)하에서 바이오칩상의 각각의 위치에서 형광성의 수준을 측정함으로써 검출할 수 있다. 록하트(Lockhart)등(미국 특허 제5,556,752호)은 표적 핵산 서열에서 올리고뉴클레오타이드 프로브의 혼성화를 결정하는 것에 대한 유사한 기술을 제시하고 있다.

G. 간섭측정계를 이용한 검출

다른 구체예에서, 표적 분자의 결합을 간섭측정감지계(interferometric sensing system)를 이용하여 검출할 수 있다. 적당한 시스템이 린(Lin)등의 문헌(1997), 사이언스 278:840-842에 개시되어 있다. 핵산 리간드가 미세구멍이 형성되어 있는(microporous) 바이오칩의 표면에 결합한다. 이런 표면에 백색 광을 비추면 간섭 무늬가 형성된다. 이것은 구멍이 형성되어 있는 바이오칩 표면의 밀면과 윗면에서 반사되는 빛에 기인하는 것이다. 표적 분자와 핵산 리간드의 상호작용이 바이오칩 표면의 굴절률을 국소적으로 바꾸고, 이것이 그 후에는 간섭 무늬 유형의 파장을 국소적으로 변화시킨다. 이것은 예컨대, 고체촬상소자카메라(charge coupled device camera)에 의해 측정될 수 있다.

H. 공유결합된 표적 분자들의 검출

다른 구체예에서, 요도우리딘(iodouridine)과 같은 하나 이상의 광반응성기들을 포함하는 핵산 리간드들의 합성이 가능하게 하는 당해 기술 분야의 공지의 기술을 사용할 것이다. 이런 리간드들은 그들의 표적 분자와 결합할 수 있고, 따라서 적당한 파장의 빛으로 반응성기(reactive group)가 광활성화되면 표적 분자와 공유결합을 형성한다.

가장 바람직한 구체예에서, 이런 리간드들은 핵산의 광선별(photoselection)에 의해 개발되었고(photoSELEX)(미국 특허 제5,763,177호 참조) 그리고 표적과 결합할 수 있다. 광분해시에 이런 리간드들이 표적 분자에 공유결합한다. 공유적(covalent)광교차결합이 부가되면 이차 특이성이 형성되는데, 이것은 진단에 있어서는 보통 보이지 않는다. 결합이외에, 화학적 반응성인 전자 공여(dominating) 아미노산이 광친화성 표지와 인접해 있을때만 단백질과 애프탐머사이에 공유적(covalent)교차결합이 형성될 수 있다. 교차결합할 수 있는 아미노산이 교차결합 형성할 수 있는 배향으로 놓여있을때 및 그럴때만 특정 표적 단백질에 광교차결합할 수 있는 능력에 기초하여 애프탐머를 선별함으로써, 이런 특이성을 성취할 수 있다. 그러므로, 애프탐머는 단백질에 교차결합을 형성하지 않을 것이다. 즉 그것이 비특이적 방식으로 결합할 수는 있다 할지라도 교차결합하도록 특별히 선정되지는 않았다. 교차결합의 바로 그 공유 성질이, 친화성에 기초한 검출을 정상적으로 붕괴시키는 엄격한 상태하에서 교차결합된 복합체가 세정되도록 한다는 점에서 또한 특이성을 부여하는 것이다. 엄격하게 세정함으로써, 검출에 있어서 잡음(noise)을 감소시킬 수 있고, 그럼으로써 잡음에 대한 신호의 비를 높일 수 있다.

광반응적인 애프탐머의 배열을 공간적으로 구획된 방식으로 바이오칩이나 다른 표면에 부착시키고, 그후에, 테스트혼합물과 접촉시킬 것이다. 이 바이오칩은 직접 방사될 수 있거나, 방사전에 부드럽게 세정되어 비-결합 단백질들이 제거될 수 있다. 효과에 있어, 방사가 정확한 단백질만을 광활성이 있는 정확한 애프탐머에 공유 결합시킬 것이며, 이 애프탐머는 바이오칩의 표면에 깔려있는 매트릭스의 구획된 부위에 존재한다. 애프탐머에 공유 결합된 단백질은 샌드위치분석법이나 제목이 "일반적인 검출 기술"인 상기 문단에서 언급된 바와 같이 형광성 또는 방사성(radioactive) 단백질 염료에 의해서 검출될 수 있다. 그 공유 결합의 부가로, 단백질에는 특유하지만 애프탐머나 바이오칩에는 특유하지 않은 반응성기들의 화학적 변형을 통하여 그 단백질을 검출할 수 있다. 또한, 공유 결합이 복합체의 해리에 의하여 제한되지 않는 무수한 단백질의 검출 방법들, 예컨대, 유기 용매, 온도, 변성 또는 일반적으로 비공유결합을 해리시키는 다른 방법들이 가능하게 된다.

대안적으로는 바이오칩상의 공유결합된 복합체들을 핵산 리간드 서열의 전체 또는 일부에 상보적인 올리고뉴클레오타이드와 접촉시킬 것이다. 표적과 공유결합된 핵산 리간드들은 그들에 상보적인 올리고뉴클레오타이드와 혼성화를 형성할 수 없다. 그 상보적인 올리고뉴클레오타이드들은 쉽게 검출될 수 있도록 상기한 바와 같이 당해 기술 분야에서 알려진 임의의 방법에 의해서 표지될 것이다.

V. 형광성과 무관한 방법을 통한 표적 분자 결합의 검출

바람직한 구체예들에서 표적 분자의 결합을 측정하기 위하여 형광성과 인광성 검출 기술을 사용하고 있지만, 본원에서 사용될 수 있는 당해 기술 분야에서 공지된 다른 방법들이 있다.

A. 화학 전계 효과 트랜지스터

화학 전계 효과 트랜지스터(CHEM-FET) 기술은 표적 분자가 그것의 리간드에 결합할 때 형성되는 화학 포텐셜에 있어서의 국소적인 차이를 이용한다. 이 기술에 있어서, 절연 실리카(silica)인 "게이트(gate)"가 바이오칩을 형성하면서 2개의 n-형 반도체들 사이에 위치한다. 전도 채널이 게이트내에 형성되고 포텐셜의 차이가 형성되면 전류가 한쪽 반도체에서 다른 쪽 반도체로 흐르게 될 것이다. 이온종들이 실리카 게이트에 결합하면 이런 채널들이 열리게 될 것이다.(센크(Schenk) 등, 미국 특허 제4,238,757호). 다른 방법(로우에(Lowe) 등, 미국 특허 제4,562,157호)에 있어서, 리간드들은 유도체기(derivatizing group)의 광활성화를 통해 반도체들중 하나의 불연속(discrete) 부분들에 결합한다. 그후에, 바이오칩이 표적 분자들을 함유한 혼합물과 접촉하게 된다. 표적 분자가 리간드에 결합하면, 바이오칩의 그 위치에서 이온의 순수(net) 연음 또는 순수 손실이 초래된다. 이 이온들이 이 위치에서 국소적으로 전도성을 변화시키고, 그럼으로써 이번에는 바이오칩의 이 위치에서 드레인(drain) 전류상에서의 변화를 유발하게 된다. 바이오칩상의 불연속 위치들에서 드레인 전류가 측정될 수 있게 바이오칩이 배치되면(다중게이트화된 CHEM-FET), 표적 결합의 공간적이고 양적인 측정이 이루어질 것이다. 당해 분야의 기술의 발전으로, 드레인 전류상에서의 공간적으로 불연속인(discrete) 수천의 변화들을 독립적이고 정확하게 측정하도록 이 기술의 대형화(scaling-up)가 가능해졌다.

CHEM-FET를 이용하여 측정할 수 있는 다른 생체전류(bioelectric)의 변화는 이중 가닥 DNA에서 발생하는 광유도된 전자 전이(electron transfer)이다(머피(Murphy) 등, (1993) 사이언스 262:1025-1029). 상기한 바와 같이, 표적 분자가 결

합하면 각각의 핵산 리간드의 이중 가닥성의 정도가 변화될 수 있다. 이중 나선성의 정도가 변화하면, 광선이 조사되는 CHEM-FET 바이오칩상에서 드레인 전류의 국소적인 변화들이 유발된다. 표적 혼합물과의 접촉전과 후에 CHEM-FET 바이오칩이 판독되면, 이런 차이들을 검출함으로써 표적 분자의 결합의 정도와 결합 사이트를 밝힐 수 있다.

B. 표면 플라즈몬(plasmon) 공명을 통한 검출

바람직한 구체예에서, 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 통해 표적 분자의 결합을 검출할 것이다. 이 기술에서 핵산 리간드가 프리즘(prism)의 표면상에서 금 또는 은 필름에 고정된다; 그후에, 금속 필름이 적당한 액체 배지에서 인큐베이션된다. 그러므로 금속 필름은 프리즘-액체 계면이 된다. 빛이 배지 방향으로 프리즘을 통과하며, 그리고 임계각 이상으로 통과하면, 빛의 전체적인 내부반사(internal reflection)가 일어난다. 이 임계각 이상으로 입사되면, 입사광의 파장과 거의 같은 거리로 배지내로 순간적인(evanescent) 파장이 확장된다. 이 순간적인 파장이 금속 필름내에서 표면 플라즈몬이라 명명된 자유 진동(oscillating) 전자들을 여기시켜 그것들의 공명을 일으킨다. 이 과정동안 그 전자들이 순간적인 파장으로부터 에너지를 흡수하고 그럼으로써 내부적으로 반사되는 빛의 강도를 감소시킨다. 전체적인 내부반사가 일어남으로써 공명이 일어나는 각도는, 금속 필름에 매우 근접한 배지의 굴절률에서의 변화에 매우 민감하다. 표적 분자가 필름의 표면상에서 핵산 리간드와 결합하면 이 사이트에서 굴절률이 변화하고 또한 공명을 일으키는 데 필요한 각도도 변화한다. 따라서 표적 분자의 결합을 검출하기 위해서는, 검출계를 입사광의 각도가 변화되게 배열하고, 반사광의 강도가 측정되게 한다. 공명은 반사광의 강도가 최소일 때 일어난다. 테스트 혼합물의 존재하에서 필름상의 특정 사이트에서 공명을 일으키는 데 필요한 입사광의 각도 변화를 측정하면, 결합 반응이 필름 표면상의 어느 부위에서 일어나는가에 대한 정보를 얻을 수 있다. 비아코어7(BIAcore7)라 명명되는 SPR를 측정하는 기구는 파마시아 바이오센서(Pharmacia Biosensors)로부터 구입할 수 있다.

C. 질량 분광계를 이용한 검출

다른 구체예에서, 핵산 리간드-표적 분자 복합체의 형성 여부를 질량 분광계를 이용하여 검출할 것이다. 바이오칩상의 생물학적 물질을 이온화시킬 수 있는 레이저를, 공간적으로 제한되고 연속적인 방식으로 바이오칩의 표면에 방사시킬 것이다. 이온화된 생산물의 질량이 질량 분광계에 의해 검출될 것이고, 이를 동일한 비결합 리간드의 이온화된 생산물의 질량과 비교함으로써 표적 분자가 어디에 결합하였는가를 밝혀낼 수 있다. 이 기술은 당해분야에서 플라이트 질량 분광계의 매트릭스 흡수/레이저 탈착 및 이온화 시간(Matrix Absorption/Laser Desorption and Ionization(MALDI) Time of Flight Mass Spectroscopy)로 알려져 있다. 제목이 "공유결합된 표적 분자들의 검출"인 상기의 문단에서 개시된 바와 같이, 이 구체예에서 핵산 리간드들과 표적 분자들은 핵산 리간드상의 광활성화될 수 있는 교차결합기들을 이용하여 공유결합될 수 있다.

D. 원자력(atomic force) 현미경(AFM)과 스캐닝-터널링 현미경(STM)을 통한 검출

이런 관련 방법들이 나노미터 수준에서 표면의 위상(topology)을 묘사하는 데 유용한 기술로서 당해분야에서 잘 알려져 있다. 따라서 이런 기술들의 진보로 인해 핵산 리간드가 표적 분자와 결합하는 바이오칩상의 사이트를 검출하는 데, 이런 기술들을 이용할 수 있게 될 것이다.

원자력 현미경(AFM)은 관심있는 표면, 이 경우에는 바이오칩을 스캐닝하는 비-금속 프로브를 이용한다. 프로브가 표면 가까이로 이동해서 표면에 결합되어 있는 물질과 전자-반발 상호작용을 하게 된다. 반발로 인해 프로브가 놓여진 캔틸레버(cantilever)의 편향이 유발되고, 이 편향은 레이저-포토다이오드(laser-photodiode) 검출계에 의해 측정된다. 검사되는 표면은 스테이지(stage)위에 놓이게 되고, 이 스테이지는 컴퓨터에 의해 편향 검출기에 연결되어 있다. 프로브가 편향되면 스테이지가 낮추어지고 프로브가 표면에 대하여 전자밀도의 "등고선(contour map)"을 그리게 된다. 이 기술을 이용하여 버퍼(buffer)내에 있는 핵산 바이오칩에 대한 참고(reference)지도가 제작될 것이다. 테스트 혼합물과 함께 인큐베이션된 핵산 바이오칩으로부터 얻어진 지도와 상기의 지도를 비교하게 될 것이다. 두개의 지도를 비교하면 표적 분자가 결합하는 바이오칩상의 사이트를 검출할 수 있을 것이다.

스캐닝-터널링 현미경(STM)은 관심 대상인 표면을 스캐닝하는 데 금속 프로브를 사용한다. 프로브가 표면과 결합된 물질에 접근하면 전자들이 그 물질과 프로브사이에 터널을 형성할 수 있고, 그 결과 전류가 검출될 수 있다. 프로브가 표면을 스캐닝하고, 그리고 프로브의 수직(vertical) 위치가 계속적으로 변화하여 전자가 터널을 형성할 수 있게 된다. 이것이 AFM 에서처럼, 전자 밀도의 지도를 제공하고 이 지도가 상기 단락에서 설명한 바와 같이 핵산 리간드 바이오칩상에 결합한 표적분자의 결합을 검출하는 데 사용된다.

VI. 실시예.

A. 실시예 1

발명의 명칭이 "조직 셀렉스"이고 95.3.5에 출원된 미국 특허 출원 제08/434,425호에 개시된 바와 같이, U251 글리오마(glioma) 세포주에 대한 핵산 리간드 GB41이 셀렉스 실험으로부터 분리되었다. 여기에서, 핵산 리간드는 5'바이오틴을 지니고 있으며 스트렙타비딘(streptavidin)으로 코팅된 카르복실메틸 텍스트란 바이오칩 표면(BIACORE2000)에 고정되어 있다. 뉴클레오티드 서열이 섞여있는 GB41 또는 GB41 이형(version)을 함유하고 있는 플로셀(flowcell)을 통해 단백질을 주입한다. 섞여있는 서열이 핵산 리간드에 대한 결합 특이성 테스트를 제공한다. 특이적 결합이 전장(full-length)의 텐나신(tenascin)과 피브로넥틴(fibronectin) III형 반복 3-5를 나타내는 박테리아에 의해 발현된 단백질인 것으로 검출되었다. 피브로넥틴 III형 반복 3-5는 전장의 텐나신의 질량의 12%를 구성한다. 이런 단백질들은 섞여있는 서열 올리고뉴클레오티드에 결합하지 않았다. 전장의 텐나신, 즉 헥사머(hexamer)의 느린 해리는 표면상에서 다면적인(multivalent) 상호작용에 기인하는 것인지도 모른다. 이 단백질-핵산 리간드의 상호작용에 대한 결합과 해리의 속도 상수들이 실험에 의해서 결정되었다. 결합 단계(0-125 sec)은 텐나신의 큰 크기(120만 dalton) 때문에 선형적이고 따라서 텍스트란(dextran) 매트릭스로 느린 확산을 일으킨다(질량 전달-속도결정(limited) 결합). 느린 해리(125-300sec)는 헥사머 단백질과 텍스트란-결합 핵산 리간드사이에 형성될 수 있는 다면적인(multivalent) 상호작용 때문인 것으로 추측되었다.

B. 실시예 2

NHS와 알데히드 시약을 사용하여, 핵산에 관련된 단백질과의 그들의 반응성을 시험하였다. 사람 혈청 알부민 또는 알파-1 HS 당단백질(두개의 풍부한 혈장 단백질)에 5000배이상의 몰(mol)의 플루오레신-NHS(분자 프로브)를 첨가했다. 상기 단백질과 관련된 0-1000배이상의 몰의 42-mer DNA가 첨가되었다. 이 반응을 pH8 및 실온에서 30분간 진행되도록 방치해두었다. 단백질과 DNA 및 반응하지 않은 플루오로포어(fluorophore)가 겔 전기영동에 의해서 분석되었고, 각 생산물의 상관(relative) 강도가 분자 동역학 형광형상기(Molecular Dynamics FluorImager)상의 스캐닝과 정량화에 의해서 결정되었다. 플루오레신-NHS는 몰:몰 기준에서 보면 DNA보다 혈청 알부민과 2.1×10^4 배 더 반응성이 있었고 질량 기준에서 보면 4400배 더 반응성이 있었다. 알파-1 HS 당단백질은 몰기준에서 보면 DNA보다 8000배 더 반응성이 있었고 질량 기준에서 보면 3700배 더 반응성이 있었다.

아토택(AttoTag) CBQCA(분자 프로브), 알데히드 커플링 시약과 사람 혈청 알부민의 반응에 대해서 유사한 실험을 수행하였다. 여기서 알데히드 커플링 시약은 일차 아민 및 시안네이트(cyanate)와 반응하여 형광성의 벤조이소인돌(benzoisoinsole) 생산물을 형성한다. 이 경우에 단백질은 알부민과 쉽게 반응하지만 DNA와의 반응은 DNA가 알부민보다 1000배 많더라도 전혀 검출되지 않았다. 알부민은 이 시약에 대해서 DNA보다 적어도 3×10^4 배 더 반응성이 있는 것으로 계산되었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 핵산 리간드의 유형화된 배열의 사용을 도시하고 있다. 바이오칩을 테스트 혼합물과 접촉시키면 질병의 진단 또는 예측에 사용될 수 있는 결합 유형이 형성된다.

도 2는 핵산 리간드의 전부 또는 일부에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 표적 분자의 결합에 의해서 핵산 리간드로부터 치환되는, 검출 메커니즘을 도시하고 있다.

도 3은 바이오칩에 공유결합되어 있고 핵산 리간드의 서열 전부 또는 일부에 상보적인 서열을 갖고 있는 올리고뉴클레오티드와 상호작용을 통하여 핵산 리간드가 바이오칩에 결합하는, 검출 메커니즘을 도시하고 있다.

도 4는 작은 분자가 바이오칩의 표면에 결합하고, 핵산 리간드가 이 작은 분자에 대한 결합사이트를 형성하는, 검출 메커니즘을 도시하고 있다.

도 5는 작은 분자에 대한 부가의 결합사이트를 갖는 핵산 리간드가 바이오칩상에 고정된, 표적 분자의 결합의 검출 메커니즘을 도시하고 있다.

도 6은 핵산 혼성화의 캐스케이드(cascade)를 사용한 검출 시스템을 도시하고 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

테스트 혼합물에 있는 하나 이상의 표적 분자를 검출하기 위한 바이오칩으로서,

상기 바이오칩은 고체 지지체를 포함하여 이루어지며,

상기 고체 지지체는 다수의 공간적으로 구분된 구획(address)들을 포함하며,

각각의 상기 구획은, 그 구획에 부착된 단일의 종(species)의 핵산 리간드 중 적어도 하나의 카피(copy)를 포함하며,

각각의 상기 핵산 리간드는 상기 테스트 혼합물에 함유된 것으로 예상되는 상기 표적 분자들 중 하나에 특이적인 친화성을 각각 가지며, 또한

상기 핵산 리간드 각각은 비(non)-왓슨-크릭 상호작용을 통해 상기 표적 분자에 결합되거나 결합될 수 있는 것을 특징으로 하는 바이오칩.

청구항 2.

고체 지지체의 다수의 공간적으로 구분된 구획(address)들에 부착된 핵산 리간드들을 포함하여 이루어지는 바이오칩에 있어서,

각각의 상기 공간적으로 구분된 구획은, 표적 분자에 특이적인 친화성을 가지는 핵산 리간드를 포함하며 또한,

각각의 상기 공간적으로 구분된 구획에 부착된 다수의 상기 핵산 리간드 각각은 비(non)-왓슨-크릭 상호작용을 통해 상기 표적 분자에 결합되거나 결합될 수 있는 것을 특징으로 하는 바이오칩.

청구항 3.

바이오 칩의 제조방법에 있어서,

(1) 표적에 대한 핵산 리간드를 동정하는 방법으로서:

(a) 핵산 서열들의 후보(candidate) 혼합물을 얻는 단계;

(b) 상기 핵산들의 후보 혼합물과 생물학적 용액을 접촉시키는 단계로서, 후보 혼합물과 관련이 있는 상기 생물학적 용액 내에 함유된 표적 분자들에 대해 증가된 친화성을 갖는 핵산들이 나머지 후보 혼합물과 분리되며, 상기 각각의 핵산은 비-왓슨-크릭 상호작용을 통해 상기 각각의 표적 분자들과 결합하는 단계;

(c) 증가된 친화성을 갖는 핵산들을 상기 후보 혼합물의 나머지에서 분리시키는 단계;

(d) 상기 표적 분자의 핵산 리간드가 동정될 수 있도록 하기 위하여, 상기 표적 분자들에 대해 상대적으로 높은 결합친화성 및 결합특이성을 가지는 핵산 서열들이 풍부한 핵산들의 혼합물을 생산하기 위하여 증가된 친화성을 갖는 핵산들을 증폭시키는 단계; 및

(e) 상기 핵산 리간드가 상기 생물학적 용액에 함유된 상기 표적 분자들에 대하여 소정의 친화성을 가질 때까지 상기 (b), (c) 및 (d) 단계를 반복하는 단계; 를 포함하며,

(2) 상기 핵산 리간드들을 고체 지지체 위의 공간적으로 분리된 위치에 부착하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 4.

의학적인 진단 또는 예후를 가능하게 하는 방법에 있어서,

(a) 개체(individual)로부터 얻어진 테스트 혼합물내의 하나 이상의 표적 분자들을 검출하는 것이 가능한 바이오칩을 얻는 단계로서,

상기 바이오칩은 고체 지지체를 포함하여 이루어지며, 상기 지지체는 하나 이상의 공간적으로 구분된 구획을 포함하며, 각각의 상기 구획은 그 구획에 부착된 단일의 종의 핵산 리간드 중 적어도 하나의 카피를 포함하며, 각각의 상기 핵산 리간드 종은 상기 하나 이상의 표적 분자들 중 하나에 특이적인 친화성을 각각 가지며, 그리고, 각각의 상기 핵산 리간드 종은 비(non)-왓슨-크릭 상호작용을 통해 상기 표적 분자에 결합될 수 있는 것을 특징으로 하는 상기 단계;

(b) 상기 테스트 혼합물을 얻는 단계;

(c) 상기 바이오 칩을 시험관 내(*in vitro*)에서 상기 테스트 혼합물과 접촉시키는 단계;

(d) 상기 하나 이상의 각각의 공간적으로 구분된 구획에서, 상기 표적 분자의 양을 측정하는 단계;

(e) 표적 분자들의 농도에 따른 상기 개체의 결합 유형을 결정하는 단계; 및

(f) 상기 결합 유형을 하나 이상의 서명(signature) 결합 유형들과 비교하는 단계;

를 포함하여 이루어지며, 상기 개체의 결합 유형이, 특정 의학적 상태와 관련된 서명 결합 유형과 높은 수준의 유사성을 가지는 경우, 상기 비교 단계의 결과를 통하여 의학적인 진단이나 예후를 가능하게 하는 방법.

청구항 5.

의학적인 진단 또는 예후를 가능하게 하는 방법에 있어서,

(a) 고체 지지체의 다수의 공간적으로 구분된 구획에 부착된 핵산 리간드들을 포함하여 이루어지는 바이오칩을 얻는 단계로서,

각각의 상기 공간적으로 구분된 구획은 표적 분자 하나에 대하여 특이적인 친화성을 가지는 핵산 리간드를 포함하여 이루어지며, 각각의 상기 공간적으로 구분된 구획에 있는 각각의 다수의 상기 핵산 리간드들은 비(non)-왓슨-크릭 상호작용을 통해 상기 표적 분자에 결합되며, 그리고, 상기 표적 분자는 하나의 개체(individual)로부터 얻어진 테스트 혼합물로부터 시험관 내(*in vitro*)에서 얻어지는 것을 특징으로 하는 상기 단계;

(b) 상기 다수의 공간적으로 구분된 구획 각각에서, 상기 표적 분자의 양을 측정하는 단계;

(c) 표적 분자들의 농도에 따른 상기 개체의 결합 유형을 결정하는 단계; 및

(d) 상기 결합 유형을 하나 이상의 서명(signature) 결합 유형들과 비교하는 단계;

를 포함하여 이루어지며, 상기 개체의 결합 유형이, 특정 의학적 상태와 관련된 서명 결합 유형과 높은 수준의 유사성을 가지는 경우, 상기 비교 단계의 결과를 통하여 의학적인 진단이나 예후를 가능하게 하는 방법.

청구항 6.

테스트 혼합물내에 존재하는 하나 이상의 표적 분자들의 검출 방법에 있어서,

(a) 바이오 칩을 얻는 단계로서,

상기 바이오 칩은 고체 지지체를 포함하여 이루어지며, 상기 지지체는 다수의 공간적으로 구분된 구획들을 포함하며, 각각의 상기 구획은 부착된 단일의 종의 핵산 리간드의 적어도 하나의 카피를 포함하며, 각각의 상기 종의 핵산 리간드는 테스트 혼합물에 함유된 것으로 예상되는 표적 분자들 중 하나에 특이적인 친화성을 가지며, 그리고, 각각의 상기 종의 핵산 리간드는 비-왓슨-크릭 상호작용을 통해 상기 표적 분자에 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 상기 단계;

(b) 테스트 혼합물을 상기 바이오칩과 접촉시키는 단계로서,

이에 따라 상기 표적 분자들이 상기 구분된 구획들에 결합된 하나 이상의 상기 종의 핵산 리간드에 결합하게 되는 단계; 및

(c) 하나 이상의 상기 구획들에서 상기 바이오 칩에 결합된 상기 각각의 상기 표적 분자들의 양을 측정하는 단계;

를 포함하여 이루어지며, 이에 따라, 상기 구획들에 결합된 상기 표적 분자들 각각의 양이 상기 테스트 혼합물내의 상기 표적 분자의 농도를 표시하는 것을 특징으로 하는 테스트 혼합물내에 존재하는 하나 이상의 표적 분자들의 검출 방법.

청구항 7.

테스트 혼합물내에 존재하는 하나 이상의 표적 분자들의 검출 방법에 있어서,

(a) 고체 지지체의 다수의 공간적으로 구분된 구획에 부착된 핵산 리간드들을 포함하여 이루어지는 바이오칩을 얻는 단계로서,

각각의 상기 공간적으로 구분된 구획은 표적 분자 하나에 대하여 특이적인 친화성을 가지는 핵산 리간드를 포함하여 이루어지며, 각각의 상기 공간적으로 구분된 구획에 있는 각각의 다수의 상기 핵산 리간드들은 비(non)-왓슨-크릭 상호작용을 통해 상기 표적 분자에 결합되며, 그리고, 상기 표적 분자는 테스트 혼합물로부터 얻어지는 것을 특징으로 하는 상기 단계; 및

(b) 상기 다수의 공간적으로 구분된 구획 각각에서, 상기 표적 분자의 양을 측정하는 단계;

를 포함하여 이루어지며, 이에 따라, 상기 표적 분자의 양이 상기 테스트 혼합물내의 상기 표적 분자의 농도를 표시하는 것을 특징으로 하는 테스트 혼합물내에 존재하는 하나 이상의 표적 분자들의 검출 방법.

청구항 8.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 RNA인 것을 특징으로 하는 바이오 칩.

청구항 9.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 DNA인 것을 특징으로 하는 바이오 칩.

청구항 10.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 단일 가닥인 것을 특징으로 하는 바이오 칩.

청구항 11.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 이중 가닥인 것을 특징으로 하는 바이오 칩.

청구항 12.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 적어도 하나의 화학적인 변형체를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 칩.

청구항 13.

제12항에 있어서,

상기 적어도 하나의 화학적인 변형체가,

리보오스(ribose) 위치, 포스페이트(phosphate) 위치 및 염기(base) 위치로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 위치에서의 화학적 치환에 의한 것임을 특징으로 하는 바이오 칩.

청구항 14.

제12항에 있어서,

상기 적어도 하나의 화학적인 변형체가,

2'-위치에서의 당 변형, 2'-아미노(2'-NH₂), 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메틸(2'-OMe), 5-위치에서의 피리미딘 변형, 8-위치에서의 퓨린 변형, 시토신의 사이클밖(exocyclic)의 아민에서의 변형, 5-브로모(bromo)-우라실의 치환, 백본(backbone)의 변형, 메틸화, 3' 캡핑 및 5' 캡핑으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 것임을 특징으로 하는 바이오 칩.

청구항 15.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 표적 분자에 결합되거나 및/또는 가교될 수 있는 광반응성기를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 칩.

청구항 16.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 고체 지지체가 평면 또는 구면인 것을 특징으로 하는 바이오 칩.

청구항 17.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 고체 지지체가

(a) 랑그뮈르-바젯트(Langmuir-Bodgett)필름;

(b) 작용성화된 유리(functionalized glass);

(c) 게르마늄;

(d) 실리콘;

(e) PTFE;

(f) 폴리스티렌;

(g) 비소화 갈륨;

(h) 금; 및

(i) 은

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오 칩.

청구항 18.

제3항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 RNA인 것을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 19.

제3항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 DNA인 것을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 20.

제3항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 단일 가닥인 것을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 21.

제3항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 이중 가닥인 것을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 22.

제3항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 적어도 하나의 화학적인 변형체를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 23.

제22항에 있어서,

상기 적어도 하나의 화학적인 변형체가,

리보오스(ribose) 위치, 포스페이트(phosphate) 위치 및 염기(base) 위치로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 위치에서의 화학적 치환에 의한 것임을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 24.

제22항에 있어서,

상기 적어도 하나의 화학적인 변형체가,

2'-위치에서의 당 변형, 2'-아미노(2'-NH₂), 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메틸(2'-OMe), 5-위치에서의 피리미딘 변형, 8-위치에서의 퓨린 변형, 시토신의 사이클밖(exocyclic)의 아민에서의 변형, 5-브로모(bromo)-우라실의 치환, 백본(backbone)의 변형, 메틸화, 3' 캡핑 및 5' 캡핑으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 것임을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 25.

제3항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 표적 분자에 결합되거나 및/또는 가교될 수 있는 광반응성기를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 26.

제3항에 있어서,

상기 고체 지지체가 평면 또는 구면인 것을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 27.

제3항에 있어서,

상기 고체 지지체가

(a) 랑그뮈르-바젯트(Langmuir-Bodgett)필름;

(b) 작용성화된 유리(functionalized glass);

(c) 게르마늄;

(d) 실리콘;

(e) PTFE;

(f) 폴리스티렌;

(g) 비소화 갈륨;

(h) 금; 및

(i) 은

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오 칩의 제조방법.

청구항 28.

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 DNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 단일 가닥인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31.

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 이중 가닥인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 적어도 하나의 화학적인 변형체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33.

제32항에 있어서,

상기 적어도 하나의 화학적인 변형체가,

리보오스(ribose) 위치, 포스페이트(phosphate) 위치 및 염기(base) 위치로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 위치에서의 화학적 치환에 의한 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 34.

제32항에 있어서,

상기 적어도 하나의 화학적인 변형체가,

2'-위치에서의 당 변형, 2'-아미노(2'-NH₂), 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메틸(2'-OMe), 5-위치에서의 피리미딘 변형, 8-위치에서의 퓨린 변형, 시토신의 사이클밖(exocyclic)의 아민에서의 변형, 5-브로모(bromo)-우라실의 치환, 백본(backbone)의 변형, 메틸화, 3' 캡핑 및 5' 캡핑으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 35.

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 표적 분자에 결합되거나 및/또는 가교될 수 있는 광반응성기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36.

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 고체 지지체가 평면 또는 구면인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37.

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 고체 지지체가

- (a) 랑그뮈르-바젯트(Langmuir-Bodgett)필름;
- (b) 작용성화된 유리(functionalized glass);
- (c) 게르마늄;
- (d) 실리콘;
- (e) PTFE;
- (f) 폴리스티렌;
- (g) 비소화 갈륨;
- (h) 금; 및
- (i) 은

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38.

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39.

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 DNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40.

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 단일 가닥인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41.

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 이중 가닥인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42.

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 적어도 하나의 화학적인 변형체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43.

제42항에 있어서,

상기 적어도 하나의 화학적인 변형체가,

리보오스(ribose) 위치, 포스페이트(phosphate) 위치 및 염기(base) 위치로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 위치에서의 화학적 치환에 의한 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 44.

제42항에 있어서,

상기 적어도 하나의 화학적인 변형체가,

2'-위치에서의 당 변형, 2'-아미노(2'-NH₂), 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메틸(2'-OMe), 5-위치에서의 피리미딘 변형, 8-위치에서의 퓨린 변형, 시토신의 사이클밖(exocyclic)의 아민에서의 변형, 5-브로모(bromo)-우라실의 치환, 백본(backbone)의 변형, 메틸화, 3' 캡핑 및 5' 캡핑으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 45.

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 핵산 리간드가 표적 분자에 결합되거나 및/또는 가교될 수 있는 광반응성기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46.

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 고체 지지체가 평면 또는 구면인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47.

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 고체 지지체가

- (a) 랑그뮈르-바젯트(Langmuir-Bodgett)필름;
- (b) 작용성화된 유리(functionalized glass);
- (c) 게르마늄;
- (d) 실리콘;

(e) PTFE;

(f) 폴리스티렌;

(g) 비소화 갈륨;

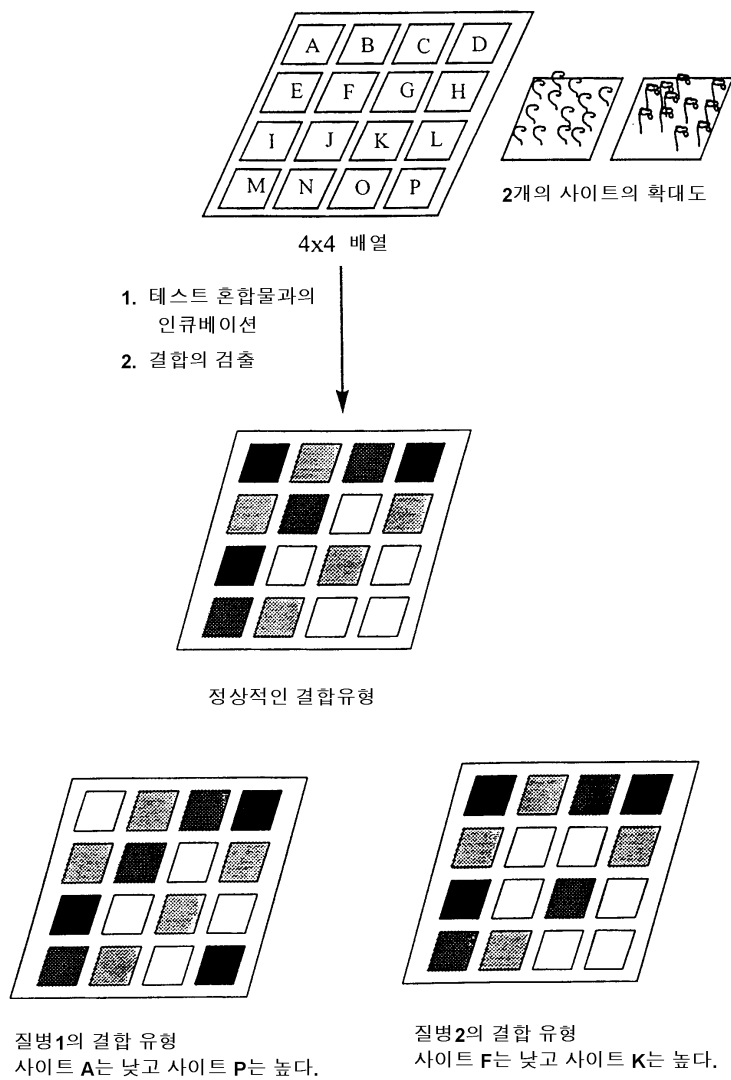
(h) 금; 및

(i) 은

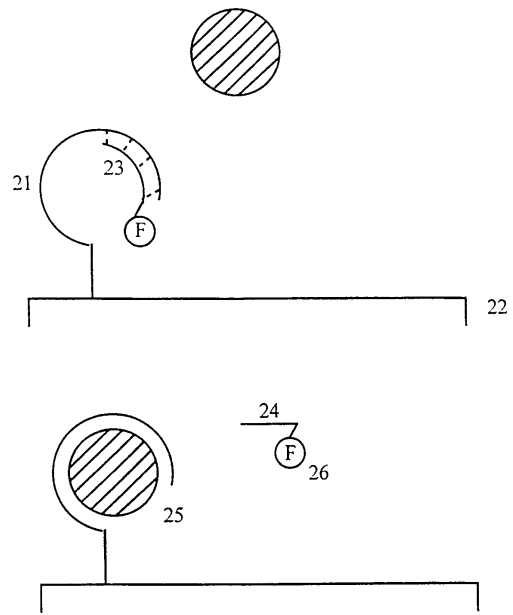
으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

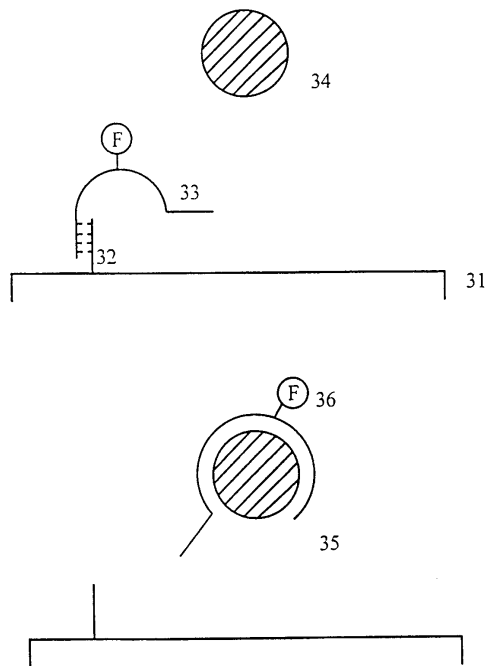
도면1



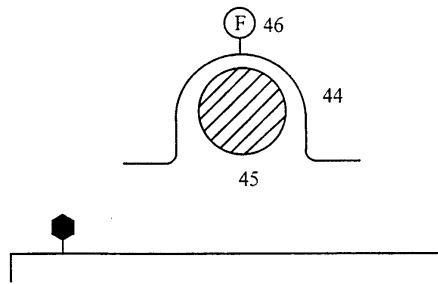
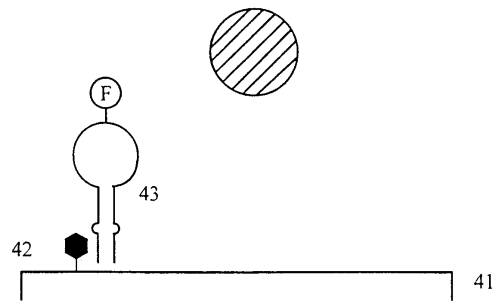
도면2



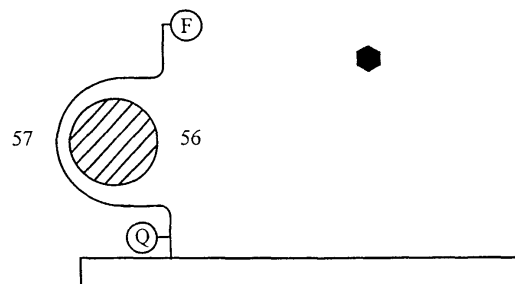
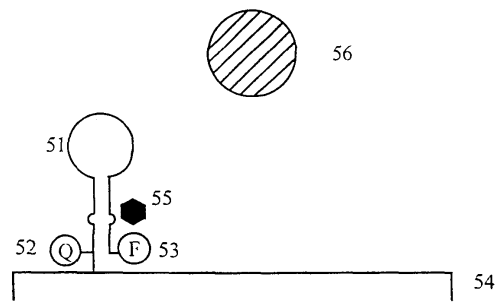
도면3



도면4



도면5



도면6

