



(52) CPC특허분류

*C12Q 2525/204* (2013.01)

*C12Q 2563/131* (2013.01)

*C12Q 2565/519* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

샘플에서 올리고뉴클레오티드 이중체(duplex)의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하는 방법으로

(a) 상기 샘플을 프로브들의 세트를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계로서, 상기 프로브들의 세트는

(i) 지지 표면 상에 고정화된 제1 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 제1 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 센스 결합 부분, 및 제1 표지를 포함하는 센스 프로브; 및

(ii) 상기 지지 표면 상에 고정화된 제2 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 제2 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 안티센스 결합 부분, 및 제2 표지를 포함하는 안티센스 프로브를 포함하고,

상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결합 길이가 상기 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 더 짧으며,

상기 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안티센스 결합 길이가 상기 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 더 짧은, 상기 단계; 및

(b) 상기 프로브들을 상기 샘플과 인큐베이션하여 혼성화 복합체들을 포함하는 혼성화 혼합물을 형성하는 단계로서, 상기 혼성화 복합체들은

(i) 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥과 혼성화된 상기 센스 프로브를 포함하는 센스 복합체; 및

(ii) 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥과 혼성화된 상기 안티센스 프로브를 포함하는 안티센스 복합체를 포함하는, 상기 단계; 및

(c) 상기 지지 표면을 상기 혼성화 혼합물과 접촉시키고 - 여기서는, 상기 센스 프로브 및 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그 및 제2 올리고뉴클레오티드 태그가 상기 지지 표면 상에 고정화된 상기 제1 포획 올리고뉴클레오티드 및 제2 포획 올리고뉴클레오티드에 혼성화됨 -, 상기 혼성화 혼합물 내의 상기 혼성화 복합체들을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시키는 단계; 및

(d) 상기 지지 표면 상의 상기 표지의 존재에 기초하여 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, (c)는

(i) 상기 혼성화 복합체들의 제1 올리고뉴클레오티드 태그 및 제2 올리고뉴클레오티드 태그가 상기 지지 표면 상의 상기 제1 포획 올리고뉴클레오티드 및 제2 포획 올리고뉴클레오티드에 혼성화되는 조건 하에서 상기 지지 표면을 상기 혼성화 혼합물과 접촉시켜 상기 혼성화 복합체들을 상기 지지 표면 상에 고정화하는 단계; 및

(ii) 상기 고정화된 혼성화 복합체들을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, (c)는

(i) 상기 혼성화 혼합물을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계; 및

(ii) 상기 혼성화 복합체들의 제1 올리고뉴클레오티드 태그 및 제2 올리고뉴클레오티드 태그가 상기 지지 표면 상에 고정화된 상기 제1 포획 올리고뉴클레오티드 및 제2 포획 올리고뉴클레오티드에 혼성화되는 조건 하에서 상기 지지 표면을 (i)의 상기 반응 혼합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 각각 개별적으로 약 8 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 각각 개별적으로 약 16 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.

**청구항 6**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥은 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 7**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥은 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 8**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥은 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥은 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체는 DNA/DNA 이중체를 포함하는, 방법.

**청구항 11**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체는 RNA/RNA 이중체를 포함하는, 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체는 DNA/RNA 이중이중체를 포함하는, 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 양쪽 모두는 개별적으로 하나 이상의 변형된 핵산을 포함하는, 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 양쪽 모두는 개별적으로 5'- 또는 3'- 접합체를 포함하는, 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 접합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), N-아세틸갈락토사민(GaINAc), 세포 침투 펩티드(CPP),  $\alpha$ -토코페롤, 압타머, 항체, 콜레스테롤, 스쿠알렌, 지방산, 또는 핵지질을 포함하는, 방법.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 길이는 상기 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은, 방법.

**청구항 17**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 결합 길이는 약 10 내지 약 16개의 뉴클레오티드 길이인, 방법.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 5' 단부가 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 3' 단부와 정렬되는, 방법.

**청구항 19**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 길이는 상기 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은, 방법.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 결합 길이는 약 10 내지 약 16개의 뉴클레오티드 길이인, 방법.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 5' 단부가 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 3' 단부와 정렬되는, 방법.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 제1 올리고뉴클레오티드 태그 길이를 가지며, 상기 제1 포획 올리고뉴클레오티드는 제1 포획 올리고뉴클레오티드 길이를 가지며, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 태그 길이는 상기 제1 포획 올리고뉴클레오티드 길이와 동일한, 방법.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 제1 올리고뉴클레오티드 태그 길이를 가지며, 상기 제1 포획 올리고뉴클레오티드는 제1 포획 올리고뉴클레오티드 길이를 가지며, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 태그 길이는 상기 제1 포획 올리고뉴클레오티드 길이보다 더 짧은, 방법.

**청구항 24**

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오티드 태그는 제2 올리고뉴클레오티드 태그 길이를 가지며, 상기 제2 포획 올리고뉴클레오티드는 제2 포획 올리고뉴클레오티드 길이를 가지며, 상기 제2 올리고뉴클레오티드 태그 길이는 상기 제2 포획 올리고뉴클레오티드 길이와 동일한, 방법.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오티드 태그는 제2 올리고뉴클레오티드 태그 길이를 가지며, 상기 제2 포획 올리고뉴클레오티드는 제2 포획 올리고뉴클레오티드 길이를 가지며, 상기 제2 올리고뉴클레오티드 태그 길이는 상기 제2 포획 올리고뉴클레오티드 길이보다 더 짧은, 방법.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 프로브는 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 28**

제26항에 있어서, 상기 센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 29**

제26항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 상기 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 31**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 프로브는 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 33**

제31항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 34**

제31항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 35**

제31항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 상기 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 36**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 프로브는 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 38**

제36항에 있어서, 상기 센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 39**

제36항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 40**

제36항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 상기 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 41**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 프로브는 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 43**

제41항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 44**

제41항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함하는, 방법.

**청구항 45**

제41항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 상기 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 46**

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 프로브, 상기 안티센스 프로브 또는 둘 모두는 하나 이상의 변형된 핵산을 포함하는, 방법.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드는 고정된 핵산(locked nucleic acid, LNA)을 포함하는, 방법.

**청구항 48**

제46항에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드는 포스포다이에스테르(PO); 포스포로티오에이트(PS); 2'-O-메틸(2'OMe); 2'-O-메톡시에틸(MOE); 펩티드 핵산(PNA); 포스포로아미데이트 모르폴리노(PMO); 고정된 핵산(LNA); 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F); 또는 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 49**

제26항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-가닥 특이적 뉴클레아제는 단일-가닥 특이적 DNase를 포함하는, 방법.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 상기 단일-가닥 특이적 DNase는 S1 뉴클레아제, P1 뉴클레아제 또는 녹두(Mung Bean) 뉴클레아제인, 방법.

**청구항 51**

제36항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일-가닥 특이적 뉴클레아제는 단일-가닥 특이적 RNase를 포함하는, 방법.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 상기 단일-가닥 특이적 RNase는 RNase A, RNase H, RNase I, RNase III, RNase L, RNase P, RNase PhyM, RNase T1, RNase T2, RNase U2, RNase V, PNPase, RNase PH, RNase R, RNase D, RNase T, RNaseONE, 올리고리보뉴클레아제, 엑소리보뉴클레아제 I, 및 엑소리보뉴클레아제 II로부터 선택되는, 방법.

**청구항 53**

제1항에 있어서, (a) 내지 (c)는 동시에 수행되는, 방법.

**청구항 54**

제 항에 있어서, (a) 내지 (c)는 순차적으로 수행되는, 방법.

**청구항 55**

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, (b)에서의 상기 혼성화 조건은

- (i) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 변형시키는 제1 온도에서 인큐베이션하는 단계; 및
- (ii) 상기 프로브들을 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 변성된 센스 가닥 및 안티센스 가닥과 함께, 상기 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 상기 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하는 제2 온도에서 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 56**

제55항에 있어서, 상기 센스 복합체 및 안티센스 복합체를 약 2℃ 내지 약 8℃의 유지 온도에서 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 57**

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, (b)에서의 상기 혼성화 조건은

- (i) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 60℃ 내지 약 95℃의 제1 온도에서 약 1분 내지 약 15분 동안 인큐베이션하는 단계;
- (ii) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 10℃ 내지 약 65℃의 제2 온도에서 약 30초 내지 약 5분 동안 인큐베이션하는 단계; 및
- (iii) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 2℃ 내지 약 8℃의 유지 온도에서 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 58**

제57항에 있어서, (b)에서의 상기 혼성화 조건은

- (i) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 95℃의 제1 온도에서 약 2분 동안 인큐베이션하는 단계;
- (ii) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 65℃의 제2 온도에서 약 1분 동안 인큐베이션하는 단계; 및
- (iii) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 4℃의 유지 온도에서 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 59**

제57항 또는 제58항에 있어서, 단계 (i)과 단계 (ii) 사이의 제1 온도 전이 속도가 약 1℃/s 내지 약 2℃/s인 것을 포함하는, 방법.

**청구항 60**

제57항 또는 제58항에 있어서, 단계 (i)과 단계 (ii) 사이의 제1 온도 전이 속도가 약 1.8℃/s인 것을 포함하는, 방법.

**청구항 61**

제57항 또는 제58항에 있어서, 단계 (ii)와 단계 (iii) 사이의 제2 온도 전이 속도가 약 0.05℃/s 내지 약 1℃/s인 것을 포함하는, 방법.

**청구항 62**

제57항 또는 제58항에 있어서, 단계 (ii)와 단계 (iii) 사이의 제2 온도 전이 속도가 약 0.1℃/s인 것을 포함하는, 방법.

**청구항 63**

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브들은 희석제 54 또는 N-PLEX 혼성화 완충액 1 또는 2를 포함하는 완충액 중에서 상기 샘플과 함께 인큐베이션되는, 방법.

**청구항 64**

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 복수의 올리고뉴클레오타이드 이중체들을 포함하고, (a)에서의 상기 조성물은 복수의 프로브 세트들을 포함하며, 여기서 각각의 프로브 세트는 특유의 올리고뉴클레오타이드 이중체의 특유의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥과 혼성화되는, 방법.

**청구항 65**

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, (c)는 약 20℃ 내지 약 40℃의 온도에서 약 15분 내지 약 12시간 동안 상기 지지 표면을 상기 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 66**

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, (c)는 약 20℃ 내지 약 40℃의 온도에서 약 1시간 내지 약 2시간 동안 상기 지지 표면을 상기 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 67**

제65항 또는 제66항에 있어서, 상기 지지 표면은 진탕하면서 상기 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션되는, 방법.

**청구항 68**

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, (c)는 약 705 rpm으로 진탕하면서 약 37℃의 온도에서 약 1시간 동안 상기 지지 표면을 상기 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 69**

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, (a)에서의 상기 조성물은 약 20 pM 내지 약 10 nM 센스 프로브를 포함하는, 방법.

**청구항 70**

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, (a)에서의 상기 조성물은 약 20 pM 내지 약 10 nM 안티센스 프로브를 포함하는, 방법.

**청구항 71**

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 생물학적 샘플을 포함하는, 방법.

**청구항 72**

제71항에 있어서, 상기 샘플은 비처리된 생물학적 샘플을 포함하는, 방법.

**청구항 73**

제71항에 있어서, 상기 샘플은 전처리된 생물학적 샘플을 포함하는, 방법.

**청구항 74**

제71항에 있어서, 상기 샘플은 정제된 샘플을 포함하는, 방법.

**청구항 75**

제74항에 있어서, 상기 샘플은 침전, 원심분리, 또는 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되는, 방법.

**청구항 76**

제74항에 있어서, 상기 샘플은 추출된 샘플을 포함하는, 방법.

**청구항 77**

제71항에 있어서, 상기 샘플은 자연 발생 RNase를 포함하는, 방법.

**청구항 78**

제77항에 있어서, 상기 방법은 (a) 전에 상기 샘플을 RNase 억제제와 배합하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 79**

제71항에 있어서, 상기 샘플은 무세포 DNA를 포함하는, 방법.

**청구항 80**

제71항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 유기체로부터 획득된 유체를 포함하는, 방법.

**청구항 81**

제80항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 전혈(whole blood), 혈장, 혈청, 소변, 대변, 모유, 타액, 또는 양수를 포함하는, 방법.

**청구항 82**

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 환경 샘플을 포함하는, 방법.

**청구항 83**

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 제조 공정 샘플을 포함하는, 방법.

**청구항 84**

제1항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 약 200 pg/mL 미만의 검출 한계치를 갖는, 방법.

**청구항 85**

제1항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지지 표면은 하나 이상의 전극을 포함하는, 방법.

**청구항 86**

제85항에 있어서, 하나 이상의 전극은 탄소 전극을 포함하는, 방법.

**청구항 87**

제85항 또는 제86항에 있어서, 하나 이상의 전극은 탄소 잉크 전극을 포함하는, 방법.

**청구항 88**

제85항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 전극은 멀티-웰 플레이트 내에 포함되는, 방법.

**청구항 89**

제88항에 있어서, 상기 멀티-웰 플레이트의 각각의 웰은 전극을 포함하는, 방법.

**청구항 90**

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표지는 결합 쌍의 구성원을 포함하는, 방법.

**청구항 91**

제90항에 있어서, 상기 표지는 비오틴을 포함하는, 방법.

**청구항 92**

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표지는 전기화학발광 표지를 포함하는, 방법.

**청구항 93**

제92항에 있어서, 상기 전극들을 전기화학발광 공반응물질(co-reactant)을 포함하는 전기화학발광 판독 원층액과 접촉시키고, 전위를 상기 전극들에 인가함으로써 검정 신호를 발생시키는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 94**

제93항에 있어서, 상기 공반응물질은 3차 아민, 트라이프로필아민, N-부틸다이에탄올아민, 및 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 95**

프로브들의 세트를 포함하는 조성물로서,

상기 프로브들의 세트는

(a) 제1 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 제1 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 센스 결합 부분, 및 제1 표지를 포함하는 센스 프로브; 및

(b) 제2 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 제2 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 안티센스 결합 부분, 및 제2 표지를 포함하는 안티센스 프로브를 포함하고,

상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결합 길이가 상기 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 더 짧으며,

상기 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안티센스 결합 길이가 상기 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 더 짧은, 조성물.

**청구항 96**

조성물로서,

(a) 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오티드 이중체; 및

(b) 프로브들의 세트를 포함하며, 상기 프로브들의 세트는

(i) 제1 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 제1 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 센스 결합 부분, 및 제1 표지를 포함하는 센스 프로브; 및

(ii) 제2 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 제2 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 안티센스 결합 부분, 및 제2 표지를 포함하는 안티센스 프로브를 포함하고,

상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결합 길이가 상기 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 더 짧으며,

상기 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안티센스 결합 길이가 상기 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 더 짧은, 조성물.

**청구항 97**

하나 이상의 혼성화 복합체들을 포함하는 조성물로서,

상기 혼성화 복합체들은

(a) 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥에 혼성화된 센스 프로브를 포함하는 센스 복합체 - 여기서, 상기 센스 프로브는 제1 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 제1 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 센스 결합 부분, 및 제1 표지를 포함하고, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결합 길이가 상기 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 더 짧음 -;

(b) 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥에 혼성화된 안티센스 프로브를 포함하는 안티센스 복합체 - 여기서, 상기 안티센스 프로브는 제2 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 제2 단일-가닥 올

리고뉴클레오티드 태그, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 안티센스 결합 부분, 및 제2 표지를 포함하고, 상기 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안티센스 결합 길이가 상기 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 더 짧음 -;

및 이들의 조합을 포함하는, 조성물.

**청구항 98**

제95항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 각각 개별적으로 약 8 내지 약 50개의 뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

**청구항 99**

제95항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 각각 개별적으로 약 16 내지 약 30개의 뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

**청구항 100**

제95항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥은 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 101**

제95항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥은 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 102**

제95항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥은 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 103**

제95항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥은 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 104**

제95항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체는 DNA/DNA 이중체를 포함하는, 조성물.

**청구항 105**

제95항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체는 RNA/RNA 이중체를 포함하는, 조성물.

**청구항 106**

제95항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체는 DNA/RNA 이중이중체를 포함하는, 조성물.

**청구항 107**

제95항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 양쪽 모두는 개별적으로 하나 이상의 변형된 핵산을 포함하는, 조성물.

**청구항 108**

제95항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 양쪽 모두는 개별적으로 5'- 또는 3'- 접합체를 포함하는, 조성물.

**청구항 109**

제108항에 있어서, 상기 접합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 세포 침투 펩티드(CPP),  $\alpha$ -토코페롤, 압타머, 항체, 콜레스테롤, 스쿠알렌, 지방산, 또는 핵지질을 포함하는, 조성물.

**청구항 110**

제95항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 길이는 상기 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은, 조성물.

**청구항 111**

제95항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 결합 길이는 약 10 내지 약 16개의 뉴클레오티드 길이인, 조성물.

**청구항 112**

제95항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 5' 단부가 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 3' 단부와 정렬되는, 조성물.

**청구항 113**

제95항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 길이는 상기 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은, 조성물.

**청구항 114**

제95항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 결합 길이는 약 10 내지 약 16개의 뉴클레오티드 길이인, 조성물.

**청구항 115**

제95항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 5' 단부가 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 3' 단부와 정렬되는, 조성물.

**청구항 116**

제95항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 프로브는 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 117**

제116항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 118**

제116항에 있어서, 상기 센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 119**

제116항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 120**

제116항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 상기 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 121**

제95항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 프로브는 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 122**

제121항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 123**

제121항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 124**

제121항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 125**

제121항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 상기 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 126**

제95항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 프로브는 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 127**

제126항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 128**

제126항에 있어서, 상기 센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 129**

제126항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 130**

제126항에 있어서, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 상기 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 131**

제95항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안티센스 프로브는 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 132**

제131항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 133**

제131항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 134**

제131항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 135**

제131항에 있어서, 상기 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 상기 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함하는, 조성물.

**청구항 136**

제95항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센스 프로브, 상기 안티센스 프로브 또는 둘 모두는 하나 이상의 변형된 핵산을 포함하는, 조성물.

**청구항 137**

제136항에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드는 고정된 핵산(LNA)을 포함하는, 조성물.

**청구항 138**

제136항에 있어서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드는 포스포다이에스테르(PO); 포스포로티오에이트(PS); 2'-O-메틸(2'OMe); 2'-O-메톡시에틸(MOE); 펩티드 핵산(PNA); 포스포로아미데이트 모르폴리노(PMO); 고정된 핵산(LNA); 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F); 또는 이들의 조합으로부터 선택되는, 조성물.

**청구항 139**

제95항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표지는 결합 쌍의 구성원을 포함하는, 조성물.

**청구항 140**

제139항에 있어서, 상기 표지는 비오틴을 포함하는, 조성물.

**청구항 141**

제95항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표지는 전기화학발광 표지를 포함하는, 조성물.

**청구항 142**

제1항 내지 제94항 중 어느 한 항의 방법을 수행하기 위한 키트.

**청구항 143**

제1항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 미생물의 핵산 서열을 포함하는, 방법.

**청구항 144**

제143항에 있어서, 상기 미생물은 인간 미생물군집(microbiome)의 성분인, 방법.

**청구항 145**

제143항 또는 제144항에 있어서, 상기 미생물은 세균, 진균, 원생동물 또는 바이러스인, 방법.

**청구항 146**

제145항에 있어서, 상기 미생물은 세균인, 방법.

**청구항 147**

제146항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 세균으로부터의 16S rRNA 또는 rDNA를 포함하는, 방법.

**청구항 148**

제147항에 있어서, 상기 세균은 아크로모박테르(*Achromobacter*), 아시다미노코쿠스(*Acidaminococcus*), 아시네토박테르(*Acinetobacter*), 악티노미세탈레스(*Actinomycetales*), 아에로코쿠스(*Aerococcus*), 아나이로코쿠스(*Anaerococcus*), 아그레가티박테르(*Aggregatibacter*), 아에로모나스(*Aeromonas*), 알칼리게네스(*Alcaligenes*), 아나이로비오스피릴룸(*Anaerobiospirillum*), 아토포비움(*Atopobium*), 바실루스(*Bacillus*), 바실로타(*Bacillota*), 박테로이데스(*Bacteroides*), 박테리오네마(*Bacterionema*), 바르토넬라(*Bartonella*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 보르데텔라(*Bordetella*), 보르렐리아(*Borrelia*), 브루셀라(*Brucella*), 부르크홀데리아(*Burkholderia*), 부흐네라(*Buchnera*), 부티리비베리오(*Butyriviberio*), 캄필로박테르(*Campylobacter*), 캡노시토파가(*Capnocytophaga*), 카르디오박테리움(*Cardiobacterium*), 클라미디아(*Chlamydia*), 클라미도필라(*Chlamydomphila*), 콜린셀라(*Collinsella*), 시트로박테르(*Citrobacter*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 큐티박테리움(*Cutibacterium*), 디알리스테르(*Dialister*), 데모텍스(*Demodex*), 예게르텔라(*Eggerthella*), 에이케넬라(*Eikenella*), 엔테로코쿠스(*Enterococcus*), 엔테로박테르(*Enterobacter*),

에스케리키아(*Escherichia*), 에우박테리움(*Eubacterium*), 파이칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 피네골디아(*Finegoldia*), 피르미쿠테스(*Firmicutes*), 플라보박테리움(*Flavobacterium*), 프란시셀라(*Francisella*), 푸소박테리움(*Fusobacterium*), 가르드네렐라(*Gardnerella*), 고르도니아(*Gordonia*), 하이모필루스(*Haemophilus*), 헬리코박테르(*Helicobacter*), 킹겔라(*Kingella*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 락토바실루스(*Lactobacillus*), 레지오넬라(*Legionella*), 렙토스피라(*Leptospira*), 렙토티키아(*Leptotrichia*), 리스테리아(*Listeria*), 메가스파이라(*Megasphaera*), 메타노브레비박테르(*Methanobrevibacter*), 마이크로박테리움(*Microbacterium*), 마이크로코쿠스(*Micrococcus*), 모빌룬쿠스(*Mobiluncus*), 모르가넬라(*Morganella*), 모락셀라(*Moraxella*), 미코박테리움(*Mycobacterium*), 미코플라스마(*Mycoplasma*), 네이세리아(*Neisseria*), 펩토코쿠스(*Peptococcus*), 펩토니필루스(*Peptoniphilus*), 펩토스트렙토코쿠스(*Peptostreptococcus*), 플레시오모나스(*Plesiomonas*), 포르피로모나스(*Porphyromonas*), 프레보텔라(*Prevotella*), 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*), 프로테우스(*Proteus*), 프로비덴시아(*Providencia*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 슈도모나도타(*Pseudomonadota*), 리케치아(*Rickettsia*), 로세부리아(*Roseburia*), 로티아(*Rothia*), 루미노코쿠스(*Ruminococcus*), 사르시나(*Sarcina*), 살모넬라(*Salmonella*), 셀레노모나스(*Selenomonas*), 시겔라(*Shigella*), 슬랙키아(*Slackia*), 스네아티아(*Sneathia*), 스피로카이타(*Spirochaeta*), 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*), 스트렙토바실루스(*Streptobacillus*), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 스트렙토미세스(*Streptomyces*), 탄넬라(*Tannerella*), 트레포네마(*Treponema*), 트리코피톤(*Trichophyton*), 우레아플라스마(*Ureaplasma*), 베일로넬라(*Veillonella*), 비브리오(*Vibrio*), 울리넬라(*Wolinella*) 또는 예르시니아(*Yersinia*) 세균인, 방법.

**청구항 149**

제143항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 생물학적 샘플을 포함하는, 방법.

**청구항 150**

제149항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 인체의 일부분으로부터 단리된 샘플을 포함하는, 방법.

**청구항 151**

제150항에 있어서, 상기 인체의 일부분은 비도, 구강, 피부, 귀, 점막, 위장관, 비뇨생식로, 기도, 눈 또는 이들의 조합인, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 샘플에서 올리고뉴클레오티드를 검출 또는 정량화하기 위한 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하기 위한 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 핵산-기반 치료제는 소분자, 단백질- 또는 항체-기반 치료제와 같은 통상적인 치료제가 접근할 수 없는, 특히 생물학적 표적을 위한 약물 요법을 위한 유망한 후보들의 부류를 구성한다. 핵산-기반 치료제는, 예를 들어 질병과 관련된 비정상 단백질의 생성을 감소 또는 방지하기 위해, DNA 또는 RNA 발현을 억제하는 단일-가닥 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 분자를 포함한다. 몇몇 핵산-기반 치료제는 미국 식품 의약국(U.S. Food and Drug Administration)에 의해 승인되어 있으며, 다양한 질병의 치료를 위한 임상 시험에서 더 많은 것들이 연구 중이다.

[0003] 핵산은, 고도로 하전되고 신속하게 분해되고 신체로부터 제거되는 큰 분자이며, 이는 불량한 약리학적 특성을 초래할 수 있다. 문헌[Stoddard et al. (2018) "Editorial: Nucleic Acids Research and Nucleic Acid Therapeutics." *Nuc. Acids Res.* 46(4):1563-1564]. 결과적으로, 약동학적 특성, 조직 표적화, 및 조직 축적은 핵산-기반 치료제를 개발할 때 모두 중요한 고려사항이다. 핵산 약동학적 특성을 특징규명하기 위해 고도로 민감하고 정량적인 검정이 필요하다. 문헌[Thayer et al. (2020) "POE Immunoassay: Plate-based oligonucleotide electrochemiluminescent immunoassay for the quantification of nucleic acids in biological matrices." *Scientific Reports.* 10(1):10425 (doi.org/10.1038/s41598-020-66829-6)].

[0004] 다양한 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 기반 크기-배제 크로마토그래피(SEC), 및 액체 크로마토그래피-질량 분석법

(LC-MS) 방법이 핵산 치료제를 특징규명하기 위해 존재하지만, 이들 방법은 검정 감도 및 시간-소모적 추출 단계에 의해 제한된다. *Id.* 올리고뉴클레오타이드 치료제의 특유의 생물물리학적 특성은 비정형적인 흡수, 분포, 대사 및 제거(ADME) 과정뿐만 아니라 약동학적-약력학적(PKPD) 커플링으로 이어질 수 있다. 이들 관계를 이해하는 데 있어서의 어려움은 증가된 동물 사용을 포함하여 약물 개발 공정 전체에 걸쳐 비효율로 이어질 수 있으며, 인간 시험에서 증가된 위험으로 이어질 수 있다. *Id.* 올리고뉴클레오타이드 치료제의 양쪽 가닥의 정량화는 올리고뉴클레오타이드 치료제의 안정성 및 대사 경로를 이해하는 데 그리고 치료제의 약리학적 특성을 설명하기 위한 모델을 개발하는 데 중요할 수 있다. *Id.*

[0005] 그러한 바와 같이, 예를 들어 환자로부터 획득된 샘플로부터 올리고뉴클레오타이드 치료제의 검출 또는 정량화를 위한 민감한 검정에 대한 필요성이 남아 있다.

### 발명의 내용

[0006] 샘플에서 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하는 방법이 본 명세서에 기재된다. 일 태양에서, 상기 방법은

[0007] (a) 상기 샘플을 프로브들의 세트를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계로서, 상기 프로브들의 세트는

[0008] (i) 지지 표면 상에 고정화된 제1 포획 올리고뉴클레오타이드의 적어도 일부분에 상보적인 제1 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 태그, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 센스 결합 부분, 및 제1 표지를 포함하는 센스 프로브; 및

[0009] (ii) 상기 지지 표면 상에 고정화된 제2 포획 올리고뉴클레오타이드의 적어도 일부분에 상보적인 제2 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 태그, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 안티센스 결합 부분, 및 제2 표지를 포함하는 안티센스 프로브를 포함하고,

[0010] 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결합 길이가 상기 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 더 짧으며,

[0011] 상기 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안티센스 결합 길이가 상기 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 더 짧은, 상기 단계; 및

[0012] (b) 상기 프로브들을 상기 샘플과 인큐베이션하여 혼성화 복합체들을 함유하는 혼성화 혼합물을 형성하는 단계로서, 상기 혼성화 복합체들은

[0013] (i) 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥과 혼성화된 상기 센스 프로브를 포함하는 센스 복합체; 및

[0014] (ii) 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥과 혼성화된 상기 안티센스 프로브를 포함하는 안티센스 복합체를 포함하는, 상기 단계; 및

[0015] (c) 상기 지지 표면을, 상기 혼성화 복합체들의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 및 제2 올리고뉴클레오타이드 태그가 상기 지지 표면 상에 고정화된 상기 제1 포획 올리고뉴클레오타이드 및 제2 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화되는 조건 하에서 상기 혼성화 혼합물과 접촉시키고, 상기 혼성화 혼합물을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시키는 단계; 및

[0016] (d) 상기 지지 표면 상에 고정화된 상기 표지의 존재에 기초하여 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하는 단계를 포함한다.

[0017] 일 태양에서, (c)는

[0018] (i) 상기 혼성화 복합체들의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 및 제2 올리고뉴클레오타이드 태그가 상기 지지 표면 상의 상기 제1 포획 올리고뉴클레오타이드 및 제2 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화되는 조건 하에서 상기 지지 표면을 상기 혼성화 혼합물과 접촉시켜 상기 혼성화 복합체들을 상기 지지 표면 상에 고정화하는 단계; 및

[0019] (ii) 상기 고정화된 혼성화 복합체들을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0020] 일 태양에서, (c)는

[0021] (i) 상기 혼성화 혼합물을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시켜 반응 혼합물을 형성하는 단계; 및

[0022] (ii) 상기 센스 프로브 및 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 및 제2 올리고뉴클레오타이드 태그가 상기 지지 표면 상에 고정화된 상기 제1 포획 올리고뉴클레오타이드 및 제2 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화되

는 조건 하에서 상기 지지 표면을 (i)의 상기 반응 혼합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

- [0023] 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된다. 일 태양에서, 안티센스 복합체의 일부인 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 안티센스 복합체의 일부가 아니다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 혼성화 복합체의 일부이다. 일 태양에서, 혼성화 복합체는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥을 포함하지 않는다. 일 태양에서, 혼성화 복합체는 프로브-프로브 복합체이다. 일 태양에서, 프로브-프로브 복합체는 단일-가닥 돌출부(overhang)를 포함한다.
- [0024] 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된다. 일 태양에서, 센스 복합체의 일부인 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된다. 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 센스 복합체의 일부가 아니다. 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 혼성화 복합체의 일부이다. 일 태양에서, 혼성화 복합체는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥을 포함하지 않는다. 일 태양에서, 혼성화 복합체는 프로브-프로브 복합체이다. 일 태양에서, 프로브-프로브 복합체는 단일-가닥 돌출부를 포함한다.
- [0025] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 각각 개별적으로 약 8 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 각각 개별적으로 약 16 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0026] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥은 RNA를 포함한다.
- [0027] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체는 DNA/DNA 이중체를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체는 RNA/RNA 이중체를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체는 DNA/RNA 이중이중체를 포함한다.
- [0028] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 양쪽 모두는 개별적으로 하나 이상의 변형된 핵산을 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 양쪽 모두는 개별적으로 5'- 또는 3'- 접합체를 포함한다. 일 태양에서, 접합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 세포 침투 펩티드(CPP),  $\alpha$ -토코페롤, 압타머, 항체, 콜레스테롤, 스쿠알렌, 지방산, 또는 핵지질을 포함한다.
- [0029] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 미생물의 핵산 서열을 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 인간 미생물군집(microbiome)의 성분인 미생물의 핵산 서열을 포함한다. 일 태양에서, 미생물은 세균, 진균, 원생동물 또는 바이러스이다. 일 태양에서, 미생물은 세균이다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 세균으로부터의 16S rRNA 또는 rDNA를 포함한다.
- [0030] 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 길이는 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오타이드만큼 더 짧다. 일 태양에서, 센스 결합 길이는 약 10 내지 약 16개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 5' 단부가 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 3' 단부와 정렬된다.
- [0031] 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 길이는 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오타이드만큼 더 짧다. 일 태양에서, 안티센스 결합 길이는 약 10 내지 약 16개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 5' 단부가 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 3' 단부와 정렬된다.
- [0032] 일 태양에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 길이를 가지며, 제1 포획 올리고뉴클레오타이드는 제1 포획 올리고뉴클레오타이드 길이를 가지며, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 길이는 제1 포획 올리고뉴클레오타이드 길이와 동일하다. 일 태양에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 길이를 가지며, 제1 포획 올리고뉴클레오타이드는 제1 포획 올리고뉴클레오타이드 길이를 가지며, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 길이는 제1 포획 올리고뉴클레오타이드 길이보다 더 짧다.
- [0033] 일 태양에서, 제2 올리고뉴클레오타이드 태그는 제2 올리고뉴클레오타이드 태그 길이를 가지며, 제2 포획 올리고뉴

클레오티드는 제2 포획 올리고뉴클레오티드 길이를 가지며, 제2 올리고뉴클레오티드 태그 길이는 제2 포획 올리고뉴클레오티드 길이와 동일하다. 일 태양에서, 제2 올리고뉴클레오티드 태그는 제2 올리고뉴클레오티드 태그 길이를 가지며, 제2 포획 올리고뉴클레오티드는 제2 포획 올리고뉴클레오티드 길이를 가지며, 제2 올리고뉴클레오티드 태그 길이는 제2 포획 올리고뉴클레오티드 길이보다 더 짧다.

- [0034] 일 태양에서, 센스 프로브는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다.
- [0035] 일 태양에서, 안티센스 프로브는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다.
- [0036] 일 태양에서, 센스 프로브는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다.
- [0037] 일 태양에서, 안티센스 프로브는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다.
- [0038] 일 태양에서, 센스 프로브, 안티센스 프로브 또는 둘 모두는 하나 이상의 변형된 핵산을 포함한다. 일 태양에서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드는 고정된 핵산(LNA)을 포함한다. 일 태양에서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드는 포스포다이에스테르(PO); 포스포로티오에이트(PS); 2'-O-메틸(2'OMe); 2'-O-메톡시에틸(MOE); 펩티드 핵산(PNA); 포스포아미데이트 모르폴리노(PMO); 고정된 핵산(LNA); 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F); 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0039] 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 뉴클레아제는 단일-가닥 특이적 DNase를 포함한다. 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 DNase는 S1 뉴클레아제, P1 뉴클레아제 또는 녹두 뉴클레아제이다. 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 뉴클레아제는 단일-가닥 특이적 RNase를 포함한다. 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 DNase는 RNase A, RNase H, RNase I, RNase III, RNase L, RNase P, RNase PhyM, RNase T1, RNase T2, RNase U2, RNase V, PNPase, RNase PH, RNase R, RNase D, RNase T, RNaseONE, 올리고리보뉴클레아제, 엑소리보뉴클레아제 I, 또는 엑소리보뉴클레아제 II이다.
- [0040] 일 태양에서, (a) 내지 (c)는 동시에 수행된다. 일 태양에서, (a) 내지 (c)는 순차적으로 수행된다.
- [0041] 일 태양에서, (b)에서의 혼성화 조건은
- [0042] (i) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 변성시키는 제1 온도에서 인큐베이션하는 단계; 및
- [0043] (ii) 상기 프로브들을 상기 올리고뉴클레오티드 이중체의 변성된 센스 가닥 및 안티센스 가닥과 함께, 상기 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 상기 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하는 제2 온도에서 인큐베이션하는 단계를 포함한다.
- [0044] 일 태양에서, 혼성화는 센스 복합체 및 안티센스 복합체를 약 2°C 내지 약 8°C의 유지 온도에서 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0045] 일 태양에서, (b)에서의 혼성화 조건은
- [0046] (i) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 60°C 내지 약 95°C의 제1 온도에서 약 1분 내지 약 15분 동안 인큐베이션하는 단계;

- [0047] (ii) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 10°C 내지 약 65°C의 제2 온도에서 약 30초 내지 약 5분 동안 인큐베이션하는 단계; 및
- [0048] (iii) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 2°C 내지 약 8°C의 유지 온도에서 인큐베이션하는 단계를 포함한다.
- [0049] 일 태양에서, (b)에서의 혼성화 조건은
- [0050] (i) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 95°C의 제1 온도에서 약 2분 동안 인큐베이션하는 단계;
- [0051] (ii) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 65°C의 제2 온도에서 약 1분 동안 인큐베이션하는 단계; 및
- [0052] (iii) 상기 프로브들을 상기 샘플과 함께, 약 4°C의 유지 온도에서 인큐베이션하는 단계를 포함한다.
- [0053] 일 태양에서, 혼성화 조건은 단계 (i)과 단계 (ii) 사이의 제1 온도 전이 속도가 약 1°C/s 내지 약 2°C/s인 것을 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 단계 (i)과 단계 (ii) 사이의 제1 온도 전이 속도가 약 1.8°C/s인 것을 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 단계 (ii)와 단계 (iii) 사이의 제2 온도 전이 속도가 약 0.05°C/s 내지 약 1°C/s인 것을 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 단계 (ii)와 단계 (iii) 사이의 제2 온도 전이 속도가 약 0.1°C/s인 것을 포함한다.
- [0054] 일 태양에서, 프로브들은 희석제 54 또는 N-PLEX 혼성화 완충액 1 또는 2를 포함하는 완충액 중에서 샘플과 함께 인큐베이션된다.
- [0055] 일 태양에서, 샘플은 복수의 올리고뉴클레오티드 이중체들을 포함하고, (a)에서의 조성물은 복수의 프로브 세트들을 포함하며, 여기서 각각의 프로브 세트는 특유의 올리고뉴클레오티드 이중체의 특유의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥과 혼성화된다.
- [0056] 일 태양에서, (c)는 약 20°C 내지 약 40°C의 온도에서 약 15분 내지 약 12시간 동안 지지 표면을 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, (c)는 약 20°C 내지 약 40°C의 온도에서 약 1시간 내지 약 2시간 동안 지지 표면을 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 진탕하면서 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, (c)는 약 705 rpm으로 진탕하면서 약 37°C의 온도에서 약 1시간 동안 지지 표면을 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션하는 단계를 포함한다.
- [0057] 일 태양에서, (a)에서의 조성물은 약 20 pM 내지 약 10 nM 센스 프로브를 포함한다. 일 태양에서, (a)에서의 조성물은 약 20 pM 내지 약 10 nM 안티센스 프로브를 포함한다.
- [0058] 일 태양에서, 샘플은 생물학적 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 비처리된 생물학적 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 전처리된 생물학적 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 정제된 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 침전, 원심분리, 또는 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제된다. 일 태양에서, 샘플은 추출된 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 자연 발생 RNase를 포함한다. 일 태양에서, 상기 방법은 (a) 전에 샘플을 RNase 억제제와 배합하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 무세포 DNA를 포함한다.
- [0059] 일 태양에서, 생물학적 샘플은 유기체로부터 획득된 유체를 포함한다. 일 태양에서, 생물학적 샘플은 전혈 (whole blood), 혈장, 혈청, 소변, 대변, 모유, 타액, 또는 양수를 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 환경 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 제조 공정 샘플을 포함한다.
- [0060] 일 태양에서, 상기 방법은 약 200 pg/mL 미만의 검출 한계치를 갖는다.
- [0061] 일 태양에서, 지지 표면은 하나 이상의 전극을 포함한다. 일 태양에서, 하나 이상의 전극은 탄소 전극을 포함한다. 일 태양에서, 하나 이상의 전극은 탄소 잉크 전극을 포함한다. 일 태양에서, 하나 이상의 전극은 멀티-웰 플레이트 내에 포함된다. 일 태양에서, 멀티-웰 플레이트의 각각의 웰은 전극을 포함한다.
- [0062] 일 태양에서, 표지는 결합 쌍의 구성원을 포함한다. 일 태양에서, 표지는 비오틴을 포함한다.
- [0063] 일 태양에서, 표지는 전기화학발광(ECL) 표지를 포함한다. 일 태양에서, 상기 방법은 상기 전극들을 전기화학발광 공반응물질(co-reactant)을 포함하는 전기화학발광 관독 완충액과 접촉시키고, 전위를 상기 전극들에 인가함으로써 검정 신호를 발생시키는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 공반응물질은 3차 아민, 트라이프로필아민, N-부틸다이에탄올아민, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

- [0064] 일 태양에서, 프로브들의 세트를 포함하는 조성물이 제공된다. 일 태양에서, 프로브들의 세트는
- [0065] (a) 제1 포획 올리고뉴클레오타이드의 적어도 일부분에 상보적인 제1 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 태그, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 센스 결합 부분, 및 제1 표지를 포함하는 센스 프로브; 및
- [0066] (b) 제2 포획 올리고뉴클레오타이드의 적어도 일부분에 상보적인 제2 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 태그, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 안티센스 결합 부분, 및 제2 표지를 포함하는 안티센스 프로브를 포함하고,
- [0067] 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결합 길이가 상기 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 더 짧으며, 상기 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안티센스 결합 길이가 상기 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 더 짧다.
- [0068] 일 태양에서, 조성물이 제공되며, 상기 조성물은
- [0069] (a) 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 이중체; 및
- [0070] (b) 프로브들의 세트를 포함하며, 상기 프로브들의 세트는
- [0071] (i) 제1 포획 올리고뉴클레오타이드의 적어도 일부분에 상보적인 제1 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 태그, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 센스 결합 부분, 및 제1 표지를 포함하는 센스 프로브; 및
- [0072] (ii) 제2 포획 올리고뉴클레오타이드의 적어도 일부분에 상보적인 제2 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 태그, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 안티센스 결합 부분, 및 제2 표지를 포함하는 안티센스 프로브를 포함하고,
- [0073] 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결합 길이가 상기 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 더 짧으며, 상기 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안티센스 결합 길이가 상기 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 더 짧다.
- [0074] 일 태양에서, 하나 이상의 혼성화 복합체들을 포함하는 조성물이 제공된다. 일 태양에서, 혼성화 복합체들은
- [0075] (a) 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥에 혼성화된 센스 프로브를 포함하는 센스 복합체 - 여기서, 상기 센스 프로브는 제1 포획 올리고뉴클레오타이드의 적어도 일부분에 상보적인 제1 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 태그, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 센스 결합 부분, 및 제1 표지를 포함하고, 상기 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결합 길이가 상기 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 더 짧음 -;
- [0076] (b) 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥에 혼성화된 안티센스 프로브를 포함하는 안티센스 복합체 - 여기서, 상기 안티센스 프로브는 제2 포획 올리고뉴클레오타이드의 적어도 일부분에 상보적인 제2 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 태그, 상기 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 안티센스 결합 부분, 및 제2 표지를 포함하고, 상기 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안티센스 결합 길이가 상기 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 더 짧음 -;
- [0077] 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0078] 일 태양에서, 조성물 내의 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 각각 개별적으로 약 8 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 태양에서, 조성물 내의 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 각각 개별적으로 약 16 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0079] 일 태양에서, 조성물 내의 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 조성물 내의 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체는 DNA/DNA 이중체를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체는 RNA/RNA 이중체를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체는 DNA/RNA 이중이중체를 포함한다.
- [0080] 일 태양에서, 조성물 내의 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센

스 가닥 양쪽 모두는 개별적으로 하나 이상의 변형된 핵산을 포함한다. 일 태양에서, 조성물 내의 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 양쪽 모두는 개별적으로 5'-또는 3'-접합체를 포함한다. 일 태양에서, 접합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 세포 침투 펩티드(CPP),  $\alpha$ -토코페롤, 압타머, 항체, 콜레스테롤, 스쿠알렌, 지방산, 또는 핵지질을 포함한다.

[0081] 일 태양에서, 조성물 내의 센스 프로브의 센스 결합 길이는 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오타이드만큼 더 짧다. 일 태양에서, 조성물 내의 센스 프로브의 센스 결합 길이는 약 10 내지 약 16개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일 태양에서, 조성물 내의 센스 프로브의 센스 결합 부분은 5' 단부가 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 3' 단부와 정렬된다.

[0082] 일 태양에서, 조성물 내의 안티센스 프로브의 안티센스 결합 길이는 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오타이드만큼 더 짧다. 일 태양에서, 조성물 내의 안티센스 프로브의 안티센스 결합 길이는 약 10 내지 약 16개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일 태양에서, 조성물 내의 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 5' 단부가 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 3' 단부와 정렬된다.

[0083] 일 태양에서, 조성물 내의 센스 프로브는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함한다.

[0084] 일 태양에서, 조성물 내의 안티센스 프로브는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함한다.

[0085] 일 태양에서, 조성물 내의 센스 프로브는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함한다.

[0086] 일 태양에서, 조성물 내의 안티센스 프로브는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함한다.

[0087] 일 태양에서, 조성물 내의 센스 프로브, 안티센스 프로브 또는 둘 모두는 하나 이상의 변형된 핵산을 포함한다. 일 태양에서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드는 고정된 핵산(LNA)을 포함한다. 일 태양에서, 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드는 포스포다이에스테르(PO); 포스포로티오에이트(PS); 2'0-메틸(2'OMe); 2'0-메톡시메틸(MOE); 펩티드 핵산(PNA); 포스포로아미데이트 모르폴리노(PMO); 고정된 핵산(LNA); 2'-테옥시-2'-플루오로(2'-F); 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0088] 일 태양에서, 조성물 내의 표지는 결합 쌍의 구성원을 포함한다. 일 태양에서, 표지는 비오틴을 포함한다. 일 태양에서, 조성물 내의 표지는 전기화학발광 표지를 포함한다.

[0089] 일 태양에서, 본 명세서에 기재된 방법을 수행하기 위한 키트가 제공된다.

### 도면의 간단한 설명

[0090] 도 1a는 본 명세서에 기재된 안티센스 결합 프로브가 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열에 혼성화된 안티센스 결합 복합체의 개략도이다.

도 1b는 본 명세서에 기재된 센스 결합 프로브가 센스 올리고뉴클레오타이드 서열에 혼성화된 센스 결합 복합체의 개략도이다.

도 2a는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 결합 가닥과 "짧은" 안티센스 결합 프로브 사이에 형성된 안티센스 결합 복합체의 개략도이다.

도 2b는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 결합 가닥과 "짧은" 센스 결합 프로브 사이에 형성된 센스 결합 복합체의 개략도이다.

도 2c는 "짧은" 센스 결합 프로브와 "짧은" 안티센스 결합 프로브 사이에 형성된 "비생산적" 결합 복합체를 나타낸 개략도이다.

도 3a는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 결합 가닥과 "전장(full-length)" 안티센스 결합 프로브 사이에 형성된 안티센스 결합 복합체의 개략도이다.

도 3b는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 결합 가닥과 "전장" 센스 결합 프로브 사이에 형성된 센스 결합 복합체의 개략도이다.

도 3c는 "전장" 센스 결합 프로브와 "전장" 안티센스 결합 프로브 사이에 형성된 "비생산적" 결합 복합체를 나타낸 개략도이다.

도 4a는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그의 개략도로서, 여기서 프로브는 단일-가닥 돌출부를 갖는 안티센스 복합체 또는 센스 복합체의 일부이다.

도 4b는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그의 개략도로서, 여기서 프로브는 단일-가닥 돌출부를 갖지 않는 안티센스 복합체 또는 센스 복합체의 일부이다.

도 4c는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그의 개략도로서, 여기서 프로브는 안티센스 복합체 또는 센스 복합체의 일부가 아니다.

도 4d는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그의 개략도로서, 여기서 프로브는 단일-가닥 돌출부를 포함하는 프로브-프로브 복합체의 일부이다.

도 4e는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그의 개략도로서, 여기서 프로브는 단일-가닥 돌출부를 포함하지 않는 프로브-프로브 복합체의 일부이다.

도 5a는 희석제 54에서 혼성화된 안티센스(AS) 프로브 1x 및 4x 농도에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 5b는 혼성화 완충액에서 혼성화된 안티센스(AS) 프로브 1x 및 4x 농도에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 6a는 희석제 54에서 혼성화된 센스(SS) 프로브 1x 및 4x 농도에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 6b는 혼성화 완충액에서 혼성화된 센스(SS) 프로브 1x 및 4x 농도에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 7a는 희석제 54에서 혼성화된 16량체(FL) 및 12량체 안티센스(AS) 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 7b는 혼성화 완충액에서 혼성화된 16량체(FL) 및 12량체 안티센스(AS) 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 8a는 단독으로의 또는 이중이중체 내의 안티센스(AS) 가닥에 혼성화된 16량체(FL) 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 8b는 단독으로의 또는 이중이중체 내의 안티센스(AS) 가닥에 혼성화된 12량체 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 9a는 단독으로의 또는 이중이중체 내의 센스(SS) 가닥에 혼성화된 16량체(FL) 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 9b는 단독으로의 또는 이중이중체 내의 센스(SS) 가닥에 혼성화된 12량체 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 10a는 단독으로의 또는 이중이중체 내의 안티센스(AS) 가닥에 혼성화된 12량체 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 10b는 단독으로의 또는 이중이중체 내의 센스(SS) 가닥에 혼성화된 12량체 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

나타낸 그래프이다.

도 11a는 긴 또는 짧은 혼성화 조건 하에서 안티센스(AS) 가닥에 혼성화된 16량체(FL) 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 11b는 긴 또는 짧은 혼성화 조건 하에서 안티센스(AS) 가닥에 혼성화된 12량체 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 12a는 희석제 54에서의 그리고 혈장에서의 개별 센스(SS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 12b는 희석제 54에서의 그리고 혈장에서의 이중이중체 내의 센스(SS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 13a는 희석제 54 또는 뇌 용해물에서의 개별 센스(SS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 13b는 희석제 54 또는 뇌 용해물에서의 이중이중체의 센스(SS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 14a는 LNA를 갖거나 갖지 않는 개별 안티센스(AS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 14b는 LNA를 갖거나 갖지 않는 이중이중체의 안티센스(AS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 15a는 다양한 농도의 안티센스(AS) LNA 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 15b는 다양한 농도의 센스(SS) LNA 프로브에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 16a는 비변형된 또는 LNA 변형된 12량체 프로브에 의한 개별 안티센스(AS) 가닥의 다중화 검출(multiplex detection)에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 16b는 비변형된 또는 LNA 변형된 12량체 프로브에 의한 이중이중체의 안티센스(AS) 가닥의 다중화 검출에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 17a는 비변형된 또는 LNA 변형된 12량체 프로브에 의한 개별 센스(SS) 가닥의 다중화 검출에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 17b는 비변형된 또는 LNA 변형된 12량체 프로브에 의한 이중이중체의 센스(SS) 가닥의 다중화 검출에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 18a는 FL, 14량체, 13량체 및 12량체 프로브를 사용하여 검출된 개별 안티센스(AS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 18b는 FL, 14량체, 13량체 및 12량체 프로브를 사용하여 검출된 개별 센스(SS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 19a는 FL, 14량체, 13량체 및 12량체 프로브를 사용하여 검출된 이중이중체의 안티센스(AS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 19b는 FL, 14량체, 13량체 및 12량체 프로브를 사용하여 검출된 이중이중체의 센스(SS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 20a는 안티센스(AS) 프로브 길이와 센스(SS) 프로브 길이의 조합을 사용하여 검출될 때 이중이중체 내의 안티센스(AS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 20b는 안티센스(AS) 프로브 길이와 센스(SS) 프로브 길이의 조합을 사용하여 검출될 때 이중이중체 내의 센스(SS) 가닥에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0091] A. 정의

[0092] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 과학 용어 및 기술 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수형을 포함할 것이고 복수 용어는 단수형을 포함할 것이며, 예를 들어, 부정관사("a" 또는 "an")는 복수형, 예를 들어 "하나 이상" 또는 "적어도 하나"를 포함하고, 용어 "또는"은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미할 수 있다. 용어 "포함하는",

"포함한다" 및 "포함된"은 제한적이지 않다. 임의의 유형의 본 명세서에 제공된 범위는 기재된 특정 범위 내의 모든 값 및 특정 범위에 대한 중점 주위의 값들을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 단어 "사이"를 사용하여 표현된 범위는 범위 종점들을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 50°C와 70°C 사이의 범위는 50°C 내지 70°C를 포함하며, 즉, 이는 50°C 및 70°C의 중점을 포함한다.

[0093] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은, 예를 들어, 본 발명을 기재하는 데 사용되는 조성물 내의 성분의 양, 농도, 부피, 공정 온도, 공정 시간, 수율, 유량, 압력, 및 이들의 범위를 변경시키는 데 사용된다. 용어 "약"은, 예를 들어, 화합물, 조성물, 농축물 또는 제형을 제조하는 데 사용되는 전형적인 측정 및 취급 절차를 통해; 이들 절차에서 고의적이지 않은 오류를 통해; 방법을 수행하는 데 사용되는 출발 물질 또는 성분의 제조, 공급원, 또는 순도의 차이를 통해; 그리고 다른 유사한 고려사항을 통해 일어날 수 있는 수량의 변동을 지칭한다. 용어 "약"은 또한 특정 초기 농도를 갖는 제형 또는 혼합물의 에이징으로 인해 상이한 양, 및 특정 초기 농도를 갖는 제형 또는 혼합물의 혼합 또는 가공으로 인해 상이한 양을 포함한다. 용어 "약"에 의해 수식되는 경우, 본 명세서에 첨부된 청구범위는 그러한 등가량을 포함한다.

[0094] 일반적으로, 본 명세서에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 및 단백질 및 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법 및 이들의 기법은, 당업계에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용되는 것들이다. 본 명세서에서, 아미노산은 일반적으로 알려진 이들의 3-문자 기호에 의해 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)에 의해 권장되는 1-문자 기호에 의해 표기될 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오티드는 이들에 대해 일반적으로 받아들여져 있는 단일-문자 코드로 언급될 수 있다.

[0095] 용어 "뉴클레오티드"는 핵염기, 당, 및 하나 이상의 뉴클레오티드간 결합을 포함하는 단량체 단위를 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 뉴클레오티드는 자연 발생 뉴클레오티드 및 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 자연 발생 뉴클레오티드는 구아닌(G), 아데닌(A), 시토신(C), 티민(T), 및 우라실(U)뿐만 아니라 자연 발생 염기 유사체를 포함한다. 데옥시리보핵산(DNA)에서, 당은 데옥시리보스이다. 리보핵산(RNA)에서, 당은 리보스이다. 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 핵염기, 당 또는 뉴클레오티드간 결합에서의 변형을 포함하는 뉴클레오티드를 지칭하며, 여기서 변형된 뉴클레오티드는 상보적 자연 발생 또는 변형된 뉴클레오티드에 대한 염기쌍 형성이 가능하도록 유지된다. 용어 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드간 결합에 의해 서로 공유적으로 연결된 2개 이상의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다.

[0096] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "올리고뉴클레오티드"는 뉴클레오티드간 결합에 의해 공유적으로 연결된 2개 이상의 뉴클레오티드, 일반적으로 약 5 내지 약 100개의 뉴클레오티드를 포함하는 짧은 중합체를 지칭한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 또는 30개의 뉴클레오티드 및 최대 약 30, 35, 40, 45, 50 또는 100개의 뉴클레오티드 길이, 또는 약 8 내지 약 50개의 뉴클레오티드 길이, 약 10 내지 약 40개의 뉴클레오티드 길이, 약 12 내지 약 30개의 뉴클레오티드 길이, 또는 약 18 내지 약 30개의 뉴클레오티드 길이인 중합체이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드, 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 개별 올리고뉴클레오티드 가닥을 지칭할 수 있다. 일 태양에서, 용어 "올리고뉴클레오티드"는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 치료제를 지칭한다.

[0097] "올리고뉴클레오티드 치료제"는 표적 핵산에 적어도 부분적으로 상보적이고 그것에 혼성화될 수 있는 적어도 한 쪽 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오티드이다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 치료제는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 치료제는 표적 핵산에 혼성화되어 표적 핵산의 발현 또는 양을 조절할 수 있다. 용어 "조절한다"는 표적 핵산의 발현 또는 양을 증가 또는 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 용어 "발현"은 유전자 내의 정보가 단백질을 생성하는 데 사용되는 과정을 지칭하며, 전사, 스플라이싱, 전사 후 변형, 및 번역을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 치료제는 표적 핵산의 발현 또는 양을 증가시킨다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 치료제는 표적 핵산의 발현 또는 양을 감소시킨다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드는 화학적으로 합성되고 정제 또는 단리된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드는 고상(solid phase) 화학적 합성에 의해 제조된다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 센스 및 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프로브, 태그 또는 포획 올리고뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 제조 방법이 알려져 있다.

[0098] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "염기쌍 형성"은 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 형성으로 이어지는 퓨린과 피리미딘 사이의 특이적 수소 결합을 지칭한다. DNA에서는, 아데닌(A)은 티민(T)과 쌍을 형성하고, 구아닌(G)

은 시토신(C)과 쌍을 형성한다. RNA에서는, 아데닌(A)은 우라실(U)과 쌍을 형성하고, 구아닌(G)은 시토신(C)과 쌍을 형성한다. 임의의 특정 기전으로 한정되지는 않지만, 염기쌍 형성의 가장 일반적인 기전은 수소 결합을 수반하며, 이는 상보적 핵염기들 사이의 왓슨-크릭(Watson-Crick), 후그스틴(Hoogsteen) 또는 역후그스틴(reversed Hoogsteen) 수소 결합일 수 있다.

[0099] 용어 "키메라"는 적어도 2개의 화학적으로 구별되는 영역을 갖는 화합물을 지칭한다. 실시 형태에서, 각각의 영역은 복수의 하위단위들을 갖는다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "키메라 프로브"는 2개 이상의 생물학적 공급원으로부터 유래되는 연결된 단일-가닥 DNA 및/또는 RNA를 포함한다.

[0100] "상보적"은, 예를 들어 왓슨-크릭, 후그스틴 또는 역후그스틴 수소 결합 염기쌍 형성 모델에 따라, 수소 결합의 형성에 의해 상호작용하는 핵산 분자들 또는 올리고뉴클레오타이드들을 지칭한다. 혼성화는 2개의 상보적 DNA 분자 사이에서 일어나거나(DNA-DNA 혼성화), 2개의 RNA 분자 사이에서 일어나거나(RNA-RNA 혼성화), 또는 상보적 DNA와 RNA 분자 사이에서 일어날 수 있다(DNA-RNA 혼성화). 뉴클레오타이드와 관련하여 사용될 때, 용어 "상보적"은 서로 염기쌍을 형성할 수 있는, 예를 들어 퓨린과 피리미딘을 포함한 한 쌍의 뉴클레오타이드를 지칭한다. 뉴클레오타이드들의 상보적 쌍은 자연 발생 뉴클레오타이드 쌍, 변형된 뉴클레오타이드 쌍 또는 자연 발생 뉴클레오타이드와 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 쌍을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드와 관련하여 사용될 때, 용어 "상보적"은 하나의 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 일부분의 뉴클레오타이드들이, 상보적 뉴클레오타이드들이 정렬될 때, 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 일부분의 뉴클레오타이드들에 수소 결합할 수 있음을 의미한다. 짧은 뉴클레오타이드 서열이 더 긴 뉴클레오타이드 서열의 일부분에 상보적인 경우 이들 사이에서 혼성화가 일어날 수 있다. 100% "서열 상보성"을 갖지 않는 서열들(즉, 뉴클레오타이드들의 100% 미만이 왓슨-크릭, 후그스틴 또는 역후그스틴 수소 결합 염기쌍 형성 모델과 같은 염기쌍 형성 모델에 기초하여 정렬되는 서열들) 사이에서 혼성화가 일어날 수 있지만, 더 적은 서열 상보성을 갖는 서열들은 더 큰 서열 상보성을 갖는 서열들보다 덜 안정적이며 혼성화될 가능성이 더 적다. 일 태양에서, 상보적 서열들의 뉴클레오타이드들은 왓슨-크릭 모델에 기초하여 100% 서열 상보성을 갖는다(즉, 하나의 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 영역의 각각의 뉴클레오타이드는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥 또는 영역의 각각의 뉴클레오타이드와 수소 결합할 수 있다). 다른 태양에서, 상보적 서열들의 뉴클레오타이드들은 왓슨-크릭 모델에 기초하여 적어도 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 서열 상보성을 갖는다. 일 태양에서, "실질적인 상보성"은, 부분적으로 상보적이고 생리학적으로 관련된 조건 하에서 혼성화될 수 있는 서열들을 지칭한다. 일 태양에서, "실질적인 상보성"은, 부분적으로 상보적이고 엄격한 혼성화 조건 하에서 혼성화될 수 있는 서열들을 지칭한다. 일 태양에서, 상보성은 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 치료제의 2개의 올리고뉴클레오타이드 사이의 상보성을 지칭한다. 일 태양에서, 상보성은 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 치료제와 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 프로브 사이의 상보성을 지칭한다. 일 태양에서, 상보성은 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 태그와 단일-가닥 포획 올리고뉴클레오타이드 사이의 상보성을 지칭한다. 일 태양에서, 상보성은 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드와 키메라 프로브 사이의 상보성을 지칭한다.

[0101] 2개의 상보적 서열이 혼성화되는지의 여부는 혼성화 조건의 엄격성에 좌우될 수 있는데, 이는 온도, 용매, 이온 강도 및 다른 파라미터와 같은 조건에 따라 달라질 수 있다. 혼성화 조건의 엄격성은 잠재적으로 교차-반응하거나 간섭할 수 있는 다른 서열들의 존재 하에서 2개의 상보적 핵산 서열의 원하는 혼성화 생성물의 선택적 형성 또는 유지를 제공하도록 선택될 수 있다. 엄격한 조건은 서열-의존적이다 - 전형적으로, 더 긴 상보적 서열은 더 짧은 상보적 서열보다 더 높은 온도에서 특이적으로 혼성화된다. 일반적으로, 엄격한 혼성화 조건은 규정된 이온 강도, 화학적 변성제의 농도, pH 및 혼성화 파트너의 농도에서 특정 뉴클레오타이드 서열에 대한 열 용점( $T_m$ )(즉, 서열의 50%가 실질적으로 상보적인 서열에 혼성화되는 온도)보다 약 5°C 내지 약 10°C 더 낮다. 일반적으로, 더 높은 핵분율의 G 및 C 염기를 갖는 뉴클레오타이드 서열은 더 낮은 핵분율의 G 및 C 염기를 갖는 뉴클레오타이드 서열보다 더 엄격한 조건 하에서 혼성화된다. 일반적으로, 엄격성은 온도를 증가시키거나, pH를 증가시키거나, 이온 강도를 감소시키거나, 또는 화학적 핵산 변성제(예컨대, 포름아미드, 다이메틸포름아미드, 다이메틸설폭사이드, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 및 에틸렌 카르보네이트)의 농도를 증가시킴으로써 증가될 수 있다. 엄격한 혼성화 조건은 전형적으로 약 1 M, 약 500 mM, 또는 약 200 mM 미만의 염 농도; 약 20°C, 약 30°C, 약 40°C, 약 60°C 또는 약 80°C 초과의 혼성화 온도; 및 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40% 또는 약 50% 초과의 화학적 변성제 농도를 포함한다. 많은 인자가 혼성화의 엄격성에 영향을 줄 수 있기 때문에, 파라미터들의 조합은 임의의 파라미터 단독의 절대값보다 더 중요할 수 있다.

[0102] 일 태양에서, 상보성은 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산 서열 사이의 상보성을 지칭한다. 일 태양에서, 표적 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 표적 RNA는 mRNA, 전(pre)-mRNA, 비-코딩 RNA, 프라이(pri)-

마이크로RNA, 전-마이크로RNA, 성숙 마이크로RNA, 또는 프로모터-유도된(promoter-directed) RNA를 포함한다. 일 태양에서, 표적 핵산은 특정 장애 또는 질병과 관련된 발현을 갖는 유전자로부터 전사된 세포 유전자 또는 mRNA이다. 일 태양에서, 표적 핵산은 감염성 인자로부터의 핵산 분자이다. 일 태양에서, 표적 핵산은 바이러스 또는 세균 핵산이다.

[0103] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "혼성화되다", "혼성화되는" 또는 "혼성화"는 2개의 상보적 올리고뉴클레오타이드들 사이의 염기쌍 형성을 지칭한다. 일 태양에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 치료제의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 가닥이 표적 핵산에 혼성화될 수 있다. 일 태양에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 2개의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 가닥이 서로 혼성화된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 프로브가 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 가닥에 혼성화된다. 일 태양에서, 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 태그가 단일-가닥 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된다. "특이적으로 혼성화되다"는, 샘플에서 다른 올리고뉴클레오타이드들보다 더 큰 친화도로 그리고 이들과의 유의한 교차-혼성화 없이 일어나는 2개의 상보적 올리고뉴클레오타이드 사이의 혼성화를 지칭한다. 일 태양에서, 상보적 올리고뉴클레오타이드들은 생리학적으로 관련된 조건, 예컨대 세포의 세포질에서 발견되는 조건 하에서 특이적으로 혼성화된다. 다른 태양에서, 상보적 올리고뉴클레오타이드들은 엄격한 혼성화 조건 하에서 특이적으로 혼성화된다.

[0104] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "올리고뉴클레오타이드 이중체"는, 서로 적어도 부분적으로 상보적이고 상보적 핵염기들 사이의 염기쌍 형성을 통해 서로 혼성화되는 2개의 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드의 혼성화에 의해 형성되는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 적어도 한쪽 가닥은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 적어도 한쪽 가닥은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 양쪽 가닥은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 양쪽 가닥은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드는 DNA인 한쪽 가닥 및 RNA인 한쪽 가닥을 포함하는 이중이중체이다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥의 당-포스페이트 골격은 반대 방향으로 배향되는데(즉, 한쪽 가닥은 5' 에서 3' 으로 진행되고, 다른 한쪽 가닥은 3' 에서 5' 으로 진행됨), 이는 "역평행(antiparallel)"으로 지칭된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥은 서로 동일한 길이여서, 올리고뉴클레오타이드 이중체가 그의 전체 길이에 걸쳐 이중-가닥이 되며, 즉, 올리고뉴클레오타이드 이중체는 평활 단부(blunt end)를 갖게 된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥은 서로 동일한 길이이지만, 올리고뉴클레오타이드 이중체가 그의 전체 길이에 걸쳐 이중-가닥이 되지 않게 되는 방식으로 정렬되며, 즉, 올리고뉴클레오타이드 이중체는 이중체의 양쪽 단부에 단일-가닥 3' 돌출부 또는 단일-가닥 5' 돌출부를 갖는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥은 서로 상이한 길이여서, 올리고뉴클레오타이드 이중체가 그의 전체 길이에 걸쳐 이중-가닥이 되지 않게 되며, 즉, 올리고뉴클레오타이드 이중체는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 한쪽 또는 양쪽 단부에 단일-가닥 3' 돌출부 또는 단일-가닥 5' 돌출부를 갖는다. 일 태양에서, 단일-가닥 돌출부는 약 1 내지 약 5개, 약 1 내지 약 4개, 약 1 내지 약 3개, 또는 약 1개 내지 약 2개의 뉴클레오타이드이다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체는 한쪽의 평활 단부와, 단일-가닥 돌출부를 포함하는 한쪽 단부를 갖는다. 올리고뉴클레오타이드와 관련하여 사용될 때, 용어 "길이"는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드의 중합체 골격 내의 뉴클레오타이드 잔기의 수를 지칭한다.

[0105] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "돌출부"는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드에서 한쪽 가닥의 적어도 하나의 단부가 다른 한쪽 가닥의 상응하는 단부보다 더 긴 것을 지칭한다. 일 태양에서, 단일-가닥 돌출부는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 한쪽 또는 양쪽 가닥의 3'-말단에 위치한다. 일 태양에서, 단일-가닥 돌출부는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 한쪽 또는 양쪽 가닥의 5'-말단에 위치한다. 일 태양에서, 단일-가닥 돌출부는 약 1 내지 약 5개의 뉴클레오타이드, 약 1 내지 약 4개의 뉴클레오타이드, 약 1 내지 약 3개의 뉴클레오타이드, 또는 약 1개 또는 약 2개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 태양에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 한쪽 단부는 평활하고, 다른 한쪽 단부는 3' 또는 5' 돌출부를 포함한다. 일 태양에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 양쪽 단부는 단일-가닥 돌출부를 포함한다.

[0106] 용어 "안티센스"는 표적 핵산의 전사에 필요한 배향에 대해 역위된 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 지칭하며, 이로써 안티센스 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 왓슨-크릭 염기쌍 형성을 통해 표적 핵산에 혼성화될 수 있게 된다. 올리고뉴클레오타이드 이중체의 "센스 가닥"은 안티센스 가닥에 상보적이며, 이에 따라 표적 핵산의 적어도 일부에 대해 "감지"한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥과 센스 가닥은 적어도 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 서로 상보적이다.

[0107] 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드는 인접한 뉴클레오타이드들이 뉴클레오시드간 결합, 예컨대 이들의 5' 탄소 원자와

3' 탄소 원자 사이의 포스포다이에스테르 결합에 의해 연결되어, 말단 5' 및 3' 탄소가 올리고뉴클레오티드의 어느 단부에서도 노출되게 되기 때문에 "방향" 또는 "방향성"을 가지며, 이들은 분자의 5'-(포스포릴) 및 3'-(하이드록실) 단부로 지칭될 수 있다.

[0108] 용어 "동일한"은 올리고뉴클레오티드 서열들이 비교 창(comparison window)에 걸쳐 동일한 위치에 동일한 핵산 염기를 포함함을 의미한다. 용어 "% 서열 동일성"은 비교의 창 위로 2개의 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기가 양쪽 서열에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 매칭된 위치의 수를 산출하고, 매칭된 위치의 수를 비교 창 내의 위치의 총수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 결정될 수 있다. 비교 창은 전장 서열을 포함할 수 있거나 더 큰 서열의 하위부분일 수 있다. 2개의 서열 사이의 % 동일성을 결정하기 위한 다양한 방법 및 알고리즘이 알려져 있으며, 이에에는 MEGALIGN(미국 위스콘신주 매디슨 소재의 DNASTAR, Inc.), FASTA, BLAST, 또는 ENTREZ가 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0109] 일 태양에서, 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드는 혼성화 반응에 또한 참여할 수 있는 비자연 발생 화학 구조를 갖는 구조적 유사체를 포함한다. 한 예에서, 뉴클레오티드 또는 핵산은, 예를 들어 아민 또는 티올-변형된 뉴클레오티드 염기, 포스페이트 또는 당의 사용을 통해, 그것을 표지에 연결시키거나 표지에 연결될 수 있는 반응성 작용기를 제공하는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 용어 "반응성 작용기"는, 예를 들어 다른 작용기와의 공유 결합을 형성하기 위해 추가의 화학 반응을 거칠 수 있는 원자 또는 원자들의 회합된 군을 지칭한다. 반응성 작용기의 예에는 아미노, 티올, 하이드록실, 및 카르보닐 기가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일 태양에서, 반응성 작용기는 티올 기를 포함한다. 이러한 화학적 변형을 통해 뉴클레오티드 또는 핵산에 연결될 수 있는 표지는 검출가능한 모이어티(moiety), 예컨대 비오틴, 합텐, 형광단, 및 전기화학발광(ECL) 표지를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0110] 용어 "변형된 올리고뉴클레오티드"는 적어도 하나의 뉴클레오시드 변형, 예를 들어 당 변형 또는 핵염기 변형; 또는 뉴클레오시드간 결합 변형을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 일 태양에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 포스포다이에스테르(PO); 포스포로티오에이트(PS); 2'-O-메틸(2'OMe); 2'-O-메톡시에틸(MOE); 포스포로티오에이트 구속된 에틸(cEt); 펩티드 핵산(PNA); 포스포로아미데이트 모르폴리노(PMO); 고정된 핵산(LNA); 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F); 또는 이들의 조합을 포함하지만 이로 한정되지 않는 하나 이상의 변형을 포함한다. "고정된 핵산 뉴클레오시드" 또는 "LNA"는 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' 가교를 갖는 바이사이클릭 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다. "포스포로티오에이트"는 비-가교 산소 중 하나가 황으로 대체된 뉴클레오티드간 결합을 지칭한다.

[0111] 용어 "접합체"는 올리고뉴클레오티드에 직접 또는 간접적으로 부착되는 원자 또는 원자단을 지칭한다. 일 태양에서, 접합체는 안정한 링커 또는 절단가능한 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 연결된다. 일 태양에서, 접합체는 그것이 부착된 올리고뉴클레오티드의 하나 이상의 특성을 변경시키며, 이러한 특성에는 약력학적 특성, 약동학적 특성, 결합 특성, 흡수 특성, 세포 분포 특성, 세포 흡수 특성, 전하 특성 또는 제거율 특성이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 접합체의 예에는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), N-아세틸갈락토사민(GaINAc), 세포 침투 펩티드(CPP), 비타민 E( $\alpha$ -토코페롤로도 알려짐), 압타머, 항체, 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체, 스쿠알렌, 지방산, 핵지질, 및 구형 핵산이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0112] 용어 "뉴클레아제"는 올리고뉴클레오티드 중합체의 골격을 절단할 수 있는 효소, 예를 들어 가수분해효소를 지칭한다. 일 태양에서, 뉴클레아제는 올리고뉴클레오티드의 골격에서 포스포다이에스테르 결합을 절단하는 포스포다이에스테라제이다. "리보뉴클레아제" 또는 "RNase"는 리보핵산(RNA)을 우선적으로 절단하는 효소를 지칭한다. "데옥시리보뉴클레아제" 또는 "DNase"는 데옥시리보핵산(DNA)을 우선적으로 절단하는 효소를 지칭한다. 일 태양에서, 뉴클레아제는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 또는 단일-가닥 영역을 우선적으로 절단하는 "단일-가닥 특이적 뉴클레아제"이다. 단일-가닥 특이적 RNase는 단일-가닥 RNA를 우선적으로 절단하는 효소이다. 단일-가닥 특이적 DNase는 단일-가닥 DNA를 우선적으로 절단하는 효소이다.

[0113] "표적 핵산"은 올리고뉴클레오티드가 혼성화되도록 설계된 기지의 서열을 갖는 관심 핵산을 지칭한다. 일 태양에서, 표적 핵산은 올리고뉴클레오티드 치료제가 혼성화되도록 설계된 기지의 서열을 갖는 핵산이다. 일 태양에서, 표적 핵산은 원핵 또는 진핵 유기체의 DNA 또는 RNA에서 발견되는 서열이다. 일 태양에서, 표적 핵산은 miRNA, 치료용 RNA, mRNA, RNA 바이러스, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 태양에서, 세포 내의 표적 핵산에 대한 올리고뉴클레오티드의 혼성화는 세포에 의해 발견되는 유전자의 활성을 변경시킨다. 일 태양에서, 표적 핵산에 대한 올리고뉴클레오티드의 혼성화는 유전자의 활성을 증가시킨다. 일 태양에서, 표적 핵산에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드의 혼성화는 유전자의 활성을 감소시킨다.

- [0114] 일 태양에서, 표적 핵산은 16S 리보솜 DNA(16S rDNA) 또는 16 리보솜 RNA(16S rRNA)를 포함한다. 16s rRNA는, 단백질로의 mRNA의 번역을 통해 유전자 메시지를 기능성 세포 성분으로 전환시키는 필수 과정을 담당하는, 원핵생물의 리보솜의 작은 하위단위의 리보솜 RNA 성분이다. 유전자 16s rDNA는 16S rRNA 서열을 인코딩한다. 16S rRNA 유전자는 세균에서 보존되고, 종-특이적 시그니처 서열을 제공할 수 있는 초가변 영역을 함유하여 세균의 확인 및 계통발생학적, 확인, 분류 및 정량화 연구에 널리 사용된다.
- [0115] 용어 "대상체" 또는 "환자"는 올리고뉴클레오타이드 조성물이 실험적, 진단적, 예방적 또는 치료적 목적을 위해 투여되는 유기체를 지칭하며, 이에 는 동물, 예를 들어 포유동물, 예컨대 마우스, 래트, 토끼, 비인간 영장류, 및 인간; 곤충; 벌레; 및 식물이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일 태양에서, 대상체는 질병 또는 장애를 앓고 있거나 이에 취약할 수 있다.
- [0116] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "인간 미생물군집"은 인체 상에 그리고 인체 내에 자연적으로 살아 있는 모든 미생물, 예컨대 세균, 진균, 바이러스, 및 이들의 유전자의 집합체를 지칭한다. 일 태양에서, 인간 미생물군집의 미생물은 피부, 유선, 비도, 정액, 자궁, 난포, 폐, 타액, 구강 점막, 결막, 담도, 및 위장관을 포함한 인간 기관, 조직 및 체액 내에 또는 그 상에서 살고 있다. 일 태양에서, 인간 미생물군집은 인간에게 유해하지 않으면서 편리공생하고 공존하는 미생물들로 이루어진다. 일 태양에서, 인간 미생물군집은 인체에 도움이 되는 미생물들로 이루어진다. 일 태양에서, 인간 미생물군집은 인체에 유해한 미생물로 이루어진다. 일 태양에서, 인간 미생물군집은 인체에 도움이 되는 미생물 및 유해한 미생물의 군으로 이루어진다. 일 태양에서, 인간 미생물군집은 공생하는 미생물들로 이루어지는데, 여기서는 인체 및 미생물총 둘 모두가 이익을 얻는다.
- [0117] "프로브"는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 단일-가닥에 혼성화될 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 시약을 지칭한다. 일 태양에서, 프로브는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함한다. "센스 프로브"는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥에 혼성화될 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. "안티센스 프로브"는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 일 태양에서, 프로브는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 상보적이거나 실질적으로 상보적인 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일 태양에서, 프로브는 포획 올리고뉴클레오타이드의 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 태그(이는 표적화 서열로 지칭될 수 있음)를 포함한다. 프로브는 DNA 서열 또는 RNA 서열 또는 DNA 서열과 RNA 서열의 조합을 포함할 수 있으며, 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드간 결합을 포함할 수 있다. 프로브는 화학적 또는 효소적 합성을 포함하지만 이로 한정되지 않는 당업계에 알려진 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0118] "링커"는 하나의 화학적 모이어티를 다른 화학적 모이어티에 결합시키는 하나 이상의 원자를 지칭한다. 일 태양에서, 링커는 반응성 작용기 또는 표지를 올리고뉴클레오타이드에 결합시킨다. 링커는, 하나 이상의 원자, 예를 들어 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9 또는 약 10개의 원자 내지 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 원자를 포함하고, 탄소, 산소, 황, 질소 및 인과 같은 원자 및 이들의 조합을 포함할 수 있는 뉴클레오타이드 또는 비-뉴클레오타이드 화합물일 수 있다. 링커의 예에는 아미드, 에스테르, 카르보네이트 및 에테르 기와 같은 낮은 분자량 기뿐만 아니라, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 알킬 사슬과 같은 더 높은 분자량의 연결기가 포함된다. 링커는 하나 이상의 원자, 단위, 또는 분자를 포함할 수 있다.
- [0119] "표지"는, 화학기 또는 화학적 모이어티가 검출가능한 물리적 특성을 나타내게 할 수 있거나 검출가능한 물리적 특성을 갖는 화학기 또는 화학적 모이어티를 지칭하며, 이에 는, 예를 들어 검출가능한 생성물로의 기질의 전환을 촉매하는 효소가 포함된다. 표지는 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 전기적, 광학적, 화학적, 또는 기타 다른 방법에 의해 검출될 수 있다. 표지의 예에는 방사성 동위원소, 효소, 기질, 형광 분자, 화학발광 모이어티, 전기화학발광 모이어티, 자성 입자, 및 생물발광 모이어티가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 다른 태양에서, 표지는 결합 쌍의 구성원인 화합물이며, 여기서 결합 쌍의 제1 구성원(이는 "1차 결합 시약"으로 지칭될 수 있음)은 기질, 예를 들어 올리고뉴클레오타이드에 부착되고, 결합 쌍의 다른 하나의 구성원(이는 "2차 결합 시약"으로 지칭될 수 있음)은 검출가능한 물리적 특성을 갖거나, 또는 검출가능한 물리적 특성을 갖는 모이어티에 부착된다. 결합 쌍의 비제한적인 예에는 비오틴과 스트렙타비딘, 또는 아비딘; 상보적 올리고뉴클레오타이드들; 합텐과 합텐 결합 파트너; 및 항체/항원 결합 쌍이 포함된다.
- [0120] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 본 명세서에 기재된 방법 단계들과 관련하여 사용될 때 "동시에"는 단계들이

실질적으로 동일한 시점에서 수행되는, 즉, 하나의 방법 단계의 적어도 일부분의 실행이 다른 방법 단계의 일부분의 실행과 시간상 중첩되는 방법을 지칭한다. "동시에"는 정확한 동시 활동을 요구하지 않으며, 즉, 모든 방법 단계들은 동일한 시점에서 시작되거나 종료될 것이 요구되지 않는다. 일 태양에서, "동시에"는 방법 단계들에 필요한 모든 시약들이 동일한 반응 혼합물에서 배합되어, 반응들이 동일한 반응 용적에서 또는 동일한 인큐베이션 기간 동안 일어난다는 것을 의미할 수 있다.

[0121] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 본 명세서에 기재된 방법 단계들과 관련하여 사용될 때 "순차적으로"는 단계들이 상이한 시점에서 수행되는, 예를 들어 별개의 사건들이 상기 방법의 실시에서 일어나는 방법을 지칭한다. 일 태양에서, 순차적 단계들은 별개의 인큐베이션 기간 동안 수행된다. 일 태양에서, 순차적 단계들은 상이한 반응 혼합물에서 수행된다. 일 태양에서, 순차적 방법 단계들은 상이한 시점에서 수행된다. 일 태양에서, 순차적 방법 단계들은 상이한 시점에서 수행되지만, 동일한 반응 용기 셀에서 또는 동일한 표면 상에 수행된다.

[0122] "포획 올리고뉴클레오티드"는, 지지 표면 상에 고정화될 수 있고 상보적 올리고뉴클레오티드 태그에 혼성화되도록(그리고, 이에 따라 표면 상에 포획되도록) 설계된 올리고뉴클레오티드 시약을 지칭한다. 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어, 엄격한 혼성화 조건 하에서 올리고뉴클레오티드 프로브 상에 존재하는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그와 선택적으로 혼성화될 수 있는 단일-가닥 서열이다. 포획 올리고뉴클레오티드는 고체 형태(예를 들어, 동결건조된 상태)로 제공되거나, 용액 중에 제공되거나, 또는, 예를 들어 입자(예를 들어, 미세입자, 비드) 상의 또는 어레이 형태의 지지 표면에 고정화될 수 있다.

[0123] "검출"은 표지의 존재 또는 부재에 기초하여 올리고뉴클레오티드와 같은 물질의 존재를 검출하거나 이를 정량화하는 것을 지칭할 수 있다. 일 태양에서, "검출하는"은 올리고뉴클레오티드와 같은 물질의 존재 또는 부재가 결정되는 과정을 지칭한다. 일 태양에서, "정량화하는"은 올리고뉴클레오티드와 같은 물질의 양을 결정할 때의 과정을 지칭한다.

[0124] "상응하는"은 포획 올리고뉴클레오티드와 올리고뉴클레오티드 태그 사이의 관계를 지칭하는 데 사용될 수 있으며, 여기서 올리고뉴클레오티드 태그는 엄격한 혼성화 조건 하에서 특정 포획 올리고뉴클레오티드 서열에 특이적으로 결합하도록 설계된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 태그는 엄격한 조건 하에서 이의 상응하는 포획 올리고뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고 다른 포획 올리고뉴클레오티드들과 결합하거나 교차-반응하지 않는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 태그는 엄격한 조건 하에서 이의 상응하는 포획 올리고뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고 어레이 내의 다른 포획 올리고뉴클레오티드들과 결합하거나 교차-반응하지 않는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 태그는 이의 "상응하는" 포획 올리고뉴클레오티드의 서열의 적어도 일부에 상보적인 서열을 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드이다. 일 태양에서, "상응하는" 올리고뉴클레오티드 태그와 포획 올리고뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드들은 왓슨-크릭 모델에 기초하여 100% 서열 상보성을 갖는다. 다른 태양에서, 상응하는 서열들의 뉴클레오티드들은 왓슨-크릭 모델에 기초하여 적어도 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 상보성을 갖는다.

[0125] "상응하는"은 각각 센스 프로브의 센스 결합 부분 또는 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분과 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 사이의 관계를 지칭하는 데 사용될 수 있다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오티드 이중체의 이의 상응하는 센스 가닥에 특이적으로 결합하고, 샘플에서 다른 올리고뉴클레오티드 이중체들의 센스 가닥과, 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥과, 또는 샘플에서 올리고뉴클레오티드 태그와 결합하거나 교차-반응하지 않는다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오티드 이중체의 이의 상응하는 안티센스 가닥에 특이적으로 결합하고, 샘플에서 다른 올리고뉴클레오티드 이중체들의 안티센스 가닥과, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥과, 또는 샘플에서 올리고뉴클레오티드와 결합하거나 교차-반응하지 않는다. 일 태양에서, 각각 "상응하는" 센스 결합 부분 또는 안티센스 결합 부분과 센스 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드들은 왓슨-크릭 모델에 기초하여 100% 서열 상보성을 갖는다. 다른 태양에서, 각각 "상응하는" 센스 결합 부분 또는 안티센스 결합 부분과 센스 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드들은 왓슨-크릭 모델에 기초하여 적어도 약 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 상보성을 갖는다.

[0126] "교차-반응" 또는 "교차-반응성"은 올리고뉴클레오티드 서열이 샘플에서 하나 초과와 다른 올리고뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 능력을 지칭한다. 일 태양에서, 용어 "교차-반응"은 제1 올리고뉴클레오티드 서열이 샘플에서 제2 올리고뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 능력을 지칭하며, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 서열에 상보적이거나 실질적으로 상보적이지 않다. 일 태양에서, 용어 "교차-반응" 또는 "교차-반응성"은 포획 올리고뉴클레오티드가 샘플에서 하나 초과와 올리고뉴클레오티드 태그 또는

하나 초과와 태그된 표적 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 능력을 지칭한다. 일 태양에서, 교차-반응성 포획 올리고뉴클레오티드는 엄격한 포획 혼성화 조건 하에서 샘플에서 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 태그에 혼성화된다. "비-교차-반응성" 또는 "비-교차-반응"은 제1 올리고뉴클레오티드 서열이 샘플에서 단지 특정 올리고뉴클레오티드 서열에만 혼성화되는 것, 예를 들어 제1 올리고뉴클레오티드 서열이 샘플에서 이의 상응하는 상보적 서열에만 혼성화될 수 있는 능력을 지칭한다. 일 태양에서, 용어 "비-교차-반응성"은 포획 올리고뉴클레오티드가 하나 초과와 올리고뉴클레오티드 태그 또는 하나 초과와 태그된 표적 뉴클레오티드 서열을 포함하는 샘플에서 단지 하나의 올리고뉴클레오티드 태그에만 혼성화될 수 있는 능력을 지칭한다. 일 태양에서, 비-교차-반응성 포획 올리고뉴클레오티드는 엄격한 혼성화 조건 하에서 샘플에서 단지 하나의 올리고뉴클레오티드 태그에만 혼성화된다. 일 태양에서, 비-교차-반응성은 제1 올리고뉴클레오티드가 엄격한 혼성화 조건 하에서 샘플에서 이의 상보적 서열 이외의 서열에 결합하는 비가 0.05% 미만임을 의미한다. 일 태양에서, 엄격한 포획 혼성화 조건은 27°C 내지 47°C의 온도, 21% 내지 41%의 포름아미드 농도, 300 mM 내지 500 mM의 염 농도, 및 7.5 내지 8.5의 pH를 포함한다. 일 태양에서, 엄격한 포획 혼성화 조건은 약 37°C의 온도, 약 31%의 포름아미드 농도, 약 400 mM의 염 농도, 및 8.0의 pH를 포함한다.

[0127] "어레이"는 하나 초과와 공간적으로 구별되는(즉, 중첩되지 않는) 어드레스가능 위치를 갖는 하나 이상의 지지 표면을 지칭하는 것으로, 본 명세서에서 결합 도메인들 또는 어레이 요소들로 지칭된다. 일 태양에서, 각각의 어드레스가능 위치는, 예를 들어 포획 올리고뉴클레오티드를 포함한 검정 시약을 포함한다.

[0128] "지지 표면"은 다양한 물질, 예를 들어 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드가 상부에 고정화될 수 있는 표면 재료를 지칭한다. "지지 표면"은 평면 또는 비평면일 수 있다. 일 태양에서, 지지 표면은 편평한 표면을 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 복수의 웰들을 갖는 플레이트, 즉, "멀티-웰 플레이트"이다. 멀티-웰 플레이트는 임의의 패턴 또는 구성으로 배열된 임의의 크기 또는 형상의 임의의 수의 웰을 포함할 수 있다. 다른 태양에서, 지지 표면은 만곡된 표면을 갖는다. 일 태양에서, 지지 표면에는 하나 이상의 입자, 비드 또는 미소구체가 제공된다. 용어 입자, 비드 또는 미소구체는 달리 지시되지 않는 한 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 일 태양에서, 지지 표면은 색상 코딩된 입자, 비드 또는 미소구체를 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 검정 모듈, 예컨대 검정 플레이트, 슬라이드, 카트리지, 비드 또는 칩을 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 검정 유동 세포 또는 검정 유체를 포함한다.

[0129] 일 태양에서, 지지 표면은 복수의 어드레스가능 위치(이는 "스폿"으로 지칭될 수 있음)들을 포함하는데, 이는, 예를 들어 "유전자 칩" 디바이스에서 전형적인 바와 같다. 다른 태양에서, 어레이는 하나의 어드레스가능 위치를 각각 갖는 복수의 지지 표면들을 포함하는데, 이는 "비드 어레이" 접근법에서와 같은 것으로, 여기서는 비드들의 현탁액 중의 각각의 비드가 어드레스가능 위치(이는, 예를 들어 유세포측정 또는 현미경적 검출 기법을 사용하여 어드레스될 수 있음)를 나타낸다. 다른 태양에서, 어레이는 표면당 하나 이상의 또는 2개 이상의 어드레스가능 위치를 각각 갖는 복수의 지지 표면들을 포함한다. 지지 표면 상의 어드레스가능 위치들은 균일한 행 및 열로 배열될 수 있거나 다른 패턴을 형성할 수 있다. 어레이 상의 어드레스가능 위치들의 수는, 예를 들어 약 10개 미만부터 약 50, 약 100, 약 200, 약 500, 또는 약 1000개 초과까지 다양할 수 있다. "다중화(multiplexing)"는 단일 검정에서 하나 초과와 검정 표적의 동시 분석을 지칭한다.

[0130] 검정에서 측정되는 분석물, 또는 검정에 사용되는 시약과 관련하여, 용어 "복수"는 분석물 또는 시약의 단지 하나 초과와 카피(예를 들어, 시약 A, 및 시약 A의 다른 카피)라기보다는 하나 초과와 구조적으로 또는 기능적으로 상이한 분석물 또는 시약(예를 들어, 시약 A 및 시약 B)을 의미한다. 예를 들어, 용어 "복수의 검출 시약들"은 하나 초과와 구조적으로 또는 기능적으로 상이한 검출 시약들이 검정에 존재함을 의미하며, 예를 들어 상이한 검출 시약들이 각각 상이한 표적 분석물에 특이적으로 결합하고, 하나의 시약의 다수의 카피가 존재하는 상황을 기술하지 않는다. 그러나, 이와 관련하여 용어 "복수"의 사용은 다수의 카피가 복수의 분석물들 또는 시약들 중 임의의 것에 존재할 가능성을 배제하지 않는다. 예를 들어, 복수의 고정화된 표적화 시약 상보체들은 표적화 시약 상보체 A의 하나 이상의 카피 및 표적화 시약 상보체 B의 하나 이상의 카피를 포함하는 고정화된 표적화 시약 상보체들을 지칭할 수 있다. 복수의 분석물들 또는 시약들을 지칭할 때, 용어 "제1", "제2", "제3" 등 또는 "추가"는 특유의 분석물들 또는 시약들 사이를 구별하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, "제1" 검출 시약은 "제1" 표적 분석물에 결합하고, "제2" 검출 시약은 "제2" 표적 분석물, 또는 표적 분석물의 상이한 부분에 결합한다.

[0131] "특유의"는 조성물 또는 혼합물에 존재하는 나머지 다른 성분들에 좌우되는 상대적인 용어이다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 프로브의 분석물 결합 부분의 뉴클레오티드 서열과 관련하여 사용될 때, 용어 "특유의"는 하나의 분석물 결합 부분의 뉴클레오티드 서열이 조성물 또는 혼합물 내의 나머지 다른 프로브들의 분

석물 결합 부분의 뉴클레오티드 서열과 상이함을 의미한다. 유사하게, 표적화 시약 또는 올리고뉴클레오티드 태그와 관련하여 사용될 때, 용어 "특유의"는 표적화 시약 또는 올리고뉴클레오티드 태그의 뉴클레오티드 서열이 조성물 또는 혼합물 내의 다른 표적화 시약들 또는 태그의 뉴클레오티드 서열과 상이함을 의미한다. 용어 "특유의"는 "특유의" 분석물 또는 시약의 다수의 카피가 검정 또는 샘플에 존재할 수 있는 가능성을 배제하지 않는다.

[0132] "탄소계"는 주 성분으로서 원소 탄소(C)를 함유하는 재료를 지칭한다. 탄소-함유 또는 탄소계 재료의 예에는 탄소, 카본 블랙, 흑연질 탄소, 유리질 탄소, 탄소 나노튜브, 탄소 피브릴, 흑연, 탄소 섬유 및 이들의 혼합물이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 탄소계 재료는 원소 탄소를 포함할 수 있으며, 이에, 예를 들어 흑연, 카본 블랙 또는 탄소 나노튜브가 포함된다. 일 태양에서, 탄소계 재료는 전도성 탄소-중합체 복합체, 전도성 중합체, 또는 매트릭스 중에 분산된 전도성 입자, 예를 들어 탄소 잉크, 탄소 페이스트, 또는 금속 잉크를 포함한다. 전도성 탄소 입자에는, 예를 들어 매트릭스, 예를 들어 중합체 매트릭스, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트(EVA), 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 클로라이드 또는 아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌(ABS) 중에 분산된 탄소 피브릴, 카본 블랙, 또는 흑연질 탄소가 포함된다. 그러한 중합체 매트릭스는 또한 비닐 아세테이트, 에틸렌, 비닐 알코올, 비닐 클로라이드, 아크릴로니트릴, 부타디엔, 스티렌 또는 다른 단량체로부터 선택되는 단량체를 포함할 수 있는 하나 이상의 유형의 성분 단량체와의 공중합체를 포함할 수 있다.

[0133] **B. 개요**

[0134] 샘플에서 올리고뉴클레오티드 이중체를 검출 또는 정량화하기 위한 방법이 본 명세서에 제공된다. 일 태양에서, 샘플에서 올리고뉴클레오티드 이중체의 제1 가닥 및 제2 가닥을 검출 또는 정량화하기 위한 방법이 제공된다. 일 태양에서, 샘플에서 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하기 위한 방법이 제공된다. 일 태양에서, 상기 방법은 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 치료제의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하는 데 사용된다.

[0135] 본 명세서에 기재된 방법은 다양한 복잡한 생물학적 샘플에서 올리고뉴클레오티드 치료제를 특징규명하기 위한 강력하고 민감한 방법을 제공하며, 이러한 생물학적 샘플에는, 예를 들어, 혈장, 혈청, 진혈, 소변, 대변, 모유, 타액, 및 양수를 포함하지만 이로 한정되지 않는 생물학적 유체; 및 기관 또는 기관 균질액, 예컨대 뇌, 간, 비장, 심장, 폐, 및 신장 또는 다른 조직, 예를 들어 근육, 피부, 또는 골수를 포함하지만 이로 한정되지 않는 조직 또는 조직 균질액이 포함된다. 일 태양에서, 샘플은 환경 샘플이다. 일 태양에서, 샘플은 제조 공정 샘플이다.

[0136] 일 태양에서, 상기 방법은, 예를 들어 치료용 올리고뉴클레오티드의 약동학적 특성, 생체내분포 및 세포 흡수를 특징규명하는 데 사용될 수 있으며, 이에 약동학적 특성(PK), 약력학적 특성(PD), 제거율, 반감기, 피크 농도, 노출-반응 관계, 생체내분포, 조직 표적화, 조직 축적, 조직 생체이용률, 또는 이들의 조합이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일 태양에서, 상기 방법은, 예를 들어 이중체의 안정성뿐만 아니라, 올리고뉴클레오티드 이중체의 개별 가닥들의 약동학적 특성, 생체내분포 및 세포 흡수를 평가하기 위해, 올리고뉴클레오티드 이중체의 양쪽 가닥을 검출 또는 정량화하는 데 사용될 수 있다.

[0137] 일 태양에서, 상기 방법 또는 키트는 미생물의 하나 이상의 뉴클레오티드 서열 또는 변이체를 확인, 검출, 또는 정량화하는 데 사용된다. 일 태양에서, 상기 방법 또는 키트는 세균, 진균, 원생동물 또는 바이러스의 하나 이상의 뉴클레오티드 서열 또는 변이체를 확인, 검출, 또는 정량화하는 데 사용된다. 일 태양에서, 상기 방법 또는 키트는 인간 미생물군집의 성분인 세균, 진균, 원생동물 또는 바이러스의 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 확인, 검출, 또는 정량화하는 데 사용된다. 일 태양에서, 상기 방법 또는 키트는 세균으로부터의 16S rRNA 또는 rDNA의 하나 이상의 뉴클레오티드 서열 또는 변이체를 확인, 검출, 또는 정량화하는 데 사용된다.

[0138] 일 태양에서, 세균은 *아크로모박테르(Achromobacter)*, *아시다미노코쿠스(Acidaminococcus)*, *아시네토박테르(Acinetobacter)*, *악티노미세탈레스(Actinomycetales)*, *아에로코쿠스(Aerococcus)*, *아나이로코쿠스(Anaerococcus)*, *아그레가티박테르(Aggregatibacter)*, *아에로모나스(Aeromonas)*, *알칼리게네스(Alcaligenes)*, *아나이로비오스피릴룸(Anaerobiospirillum)*, *아토포비움(Atopobium)*, *바실루스(Bacillus)*, *바실로타(Bacillota)*, *박테로이데스(Bacteroides)*, *박테리온에마(Bacterionema)*, *바르토넬라(Bartonella)*, *비피도박테리움(Bifidobacterium)*, *보르데텔라(Bordetella)*, *보르렐리아(Borrelia)*, *브루셀라(Brucella)*, *부르크홀데리아(Burkholderia)*, *부흐네라(Buchnera)*, *부티리비베리오(Butyrivibrio)*, *캄필로박테르(Campylobacter)*, *캡노시토파가(Capnocytophaga)*, *카르디오박테리움(Cardio bacterium)*, *클라미디아(Chlamydia)*, *클라미도필라*

(*Chlamydomyces*), 콜린셀라(*Collinsella*), 시트로박테르(*Citrobacter*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 코리네 박테리움(*Corynebacterium*), 쿠티박테리움(*Cutibacterium*), 디알리스테르(*Dialister*), 데모덱스(*Demodex*), 에 게르텔라(*Eggerthella*), 에이케넬라(*Eikenella*), 엔테로코쿠스(*Enterococcus*), 엔테로박테르(*Enterobacter*), 에스케리키아(*Escherichia*), 에우박테리움(*Eubacterium*), 파이칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 피네골디아(*Finegoldia*), 피르미쿠테스(*Firmicutes*), 플라보박테리움(*Flavobacterium*), 프란시셀라(*Francisella*), 푸소박 테리움(*Fusobacterium*), 가르드네렐라(*Gardnerella*), 고르도니아(*Gordonia*), 하이모필루스(*Haemophilus*), 헬리 코박테르(*Helicobacter*), 킹겔라(*Kingella*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 락토바실루스(*Lactobacillus*), 레지오 넬라(*Legionella*), 렘토스피라(*Leptospira*), 렘토티키아(*Leptotrichia*), 리스테리아(*Listeria*), 메가스파이 라(*Megasphaera*), 메타노브레비박테르(*Methanobrevibacter*), 마이크로박테리움(*Microbacterium*), 미크로코쿠스(*Micrococcus*), 모빌룬쿠스(*Mobiluncus*), 모르가넬라(*Morganella*), 모락셀라(*Moraxella*), 미코박테리움(*Mycobacterium*), 미코플라스마(*Mycoplasma*), 네이세리아(*Neisseria*), 펩토코쿠스(*Peptococcus*), 펩토니필루스(*Peptoniphilus*), 펩토스트렙토코쿠스(*Peptostreptococcus*), 플레시오모나스(*Plesiomonas*), 포르피로모나스(*Porphyromonas*), 프레보텔라(*Prevotella*), 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*), 프로테우스(*Proteus*), 프 로비덴시아(*Providencia*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 슈도모나도타(*Pseudomonadota*), 리케치아(*Rickettsia*), 로세부리아(*Roseburia*), 로티아(*Rothia*), 루미노코쿠스(*Ruminococcus*), 사르시나(*Sarcina*), 살모넬라(*Salmonella*), 셀레노모나스(*Selenomonas*), 시겔라(*Shigella*), 슬랙키아(*Slackia*), 스네아티아(*Sneathia*), 스피로카이타(*Spirochaeta*), 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*), 스트렙토바실루스(*Streptobacillus*), 스트렙토코 쿠스(*Streptococcus*), 스트렙토미세스(*Streptomyces*), 탄넬라(*Tannerella*), 트레포네마(*Treponema*), 트리코 피톤(*Trichophyton*), 우레아플라스마(*Ureaplasma*), 베일로넬라(*Veillonella*), 비브리오(*Vibrio*), 올리넬라(*Wolinella*) 또는 예르시니아(*Yersinia*) 세균이다.

[0139] 일 태양에서, 샘플에서 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하기 위한 방법이 제공된다. 일 태양에서, 상기 방법은 샘플을 센스 프로브 및 안티센스 프로브를 포함하는 프로브들의 세트를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 센스 결합 부분, 및 표지를 포함한다. 일 태양에 서, 안티센스 프로브는 지지 표면 상에 고정화된 제2 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 단 일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화 될 수 있는 안티센스 결합 부분, 및 표지를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결 합 길이가 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 더 짧다. 일 태양에서, 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안 티센스 결합 길이가 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 더 짧다.

[0140] 일 태양에서, 상기 방법은 프로브를 샘플과 함께 인큐베이션하여 혼성화 혼합물을 형성하는 단계를 추가로 포함 한다. 일 태양에서, 혼성화 혼합물은 "생산적" 또는 "바람직한" 혼성화 복합체들을 포함하며, 여기서는 센스 프로브가 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥과 혼성화되어 센스 복합체를 형성하고, 안티센스 프로브가 올 리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥과 혼성화되어 안티센스 복합체를 형성한다. 일 태양에서, 혼성화 혼 합물은 하나 이상의 "비생산적" 또는 바람직하지 않은 혼성화 복합체들을 포함한다. 비생산적 혼성화 복합체의 한 예는, 센스 프로브가 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥에 혼성화되지 못할 때이거나, 또는 안티센스 프로브가 올리고뉴클레오티드의 안티센스 가닥에 혼성화되지 못할 때이다. 비생산적 혼성화 복합체의 다른 예는 센스 프 로브와 안티센스 프로브가 서로 혼성화되어 프로브-프로브 복합체를 형성할 때이다.

[0141] 도 1a는 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥(11) 및 안티센스 프로브(12)를 포함하는 안티센스 복합체 (10)의 개략도로서, 안티센스 프로브(12)는 올리고뉴클레오티드 태그(13), 안티센스 결합 부분(14) 및 표지(15)를 포함한다. 도 1b는 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥(21) 및 센스 프로브(22)를 포함하는 센스 복 합체(20)의 개략도로서, 센스 프로브(22)는 올리고뉴클레오티드 태그(23), 센스 결합 부분(24) 및 표지(25)를 포함한다.

[0142] 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출하려고 시도할 때 일어나는 한 가지 어려움은 프로브-프로브 혼성화로 인한 잠재적인 비생산적 결합이다. 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센 스 가닥, 및 센스 프로브 및 안티센스 프로브를 함유하는 혼성화 혼합물에서 가능한 혼성화 복합체들이 도 2a 내지 도 2c(짧은 결합 부분을 갖는 프로브를 사용함), 및 도 3a 내지 도 3c(전장 결합 부분을 갖는 프로브를 사 용함)에 나타나 있다.

[0143] 도 2a는 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥(11) 및 안티센스 프로브(12)를 포함하는 안티센스 복합체

(10)의 개략도로서, 안티센스 프로브(12)는 올리고뉴클레오티드 태그(13), "짧은" 안티센스 결합 부분(14) 및 표지(15)를 포함한다. 도 2b는 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥(21) 및 센스 프로브(22)를 포함하는 센스 복합체(20)의 개략도로서, 센스 프로브(22)는 올리고뉴클레오티드 태그(23), "짧은" 센스 결합 부분(24) 및 표지(25)를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "짧은" 결합 부분은 안티센스 프로브 및 센스 프로브의 결합 부분의 길이가 각각 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥 및 센스 가닥보다 더 짧아서(즉, 적어도 하나 더 적은 뉴클레오티드를 포함해서), 안티센스 복합체(10)에는 단일-가닥 돌출부(16)가 존재하게 되고, 센스 복합체(22)에는 단일-가닥 돌출부(26)가 존재하게 된다는 것을 의미한다.

[0144] 일 태양에서, 안티센스 복합체(10)의 안티센스 가닥(11)의 말단 부분은 단일-가닥이다. 일 태양에서, 안티센스 복합체(10)의 안티센스 가닥(11)의 3' 말단 부분은 단일-가닥이다. 일 태양에서, 안티센스 복합체(10)의 안티센스 가닥(11)의 5' 말단 부분은 단일-가닥이다. 일 태양에서, 센스 복합체(20)의 센스 가닥(21)의 말단 부분은 단일-가닥이다. 일 태양에서, 센스 복합체(20)의 센스 가닥(21)의 3' 말단 부분은 단일-가닥이다. 일 태양에서, 센스 복합체(20)의 센스 가닥(21)의 5' 말단 부분은 단일-가닥이다. 일 태양에서, 단일-가닥 돌출부는 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이, 약 1 내지 약 5개의 뉴클레오티드 길이, 약 1 내지 약 3개의 뉴클레오티드 길이, 또는 약 1개 또는 약 2개의 뉴클레오티드 길이이다. 일 태양에서, 단일-가닥 돌출부는 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0145] 도 2c는 안티센스 프로브(12)의 "짧은" 안티센스 결합 부분(14)이 센스 프로브(22)의 "짧은" 센스 결합 부분(24)에 혼성화된 프로브-프로브 결합 복합체(40)의 개략도이다. 이러한 상황에서, 안티센스 프로브(10)가 "짧은" 안티센스 결합 부분(14)을 갖고 센스 프로브(20)가 "짧은" 센스 결합 부분(24)을 가질 때, 단일-가닥 돌출부(17, 27)가 프로브-프로브 복합체(40)에서 노출된다. 일 태양에서, 프로브-프로브 복합체(40)에서의 안티센스 프로브(12)의 안티센스 결합 부분(14)의 5' 단부는 단일-가닥이다. 일 태양에서, 프로브-프로브 복합체(40)에서의 센스 프로브(22)의 센스 결합 부분(24)의 5' 단부는 단일-가닥이다. 일 태양에서, 프로브-프로브 복합체(40)에서의 안티센스 프로브(12)의 안티센스 결합 부분(14)의 5' 단부, 및 센스 프로브(22)의 센스 결합 부분(24)의 5' 단부는 각각 단일-가닥이다. 일 태양에서, 프로브-프로브 복합체(40)에서의 안티센스 프로브(12)의 안티센스 결합 부분(14)의 3' 단부는 단일-가닥이다. 일 태양에서, 프로브-프로브 복합체(40)에서의 센스 프로브(22)의 센스 결합 부분(24)의 3' 단부는 단일-가닥이다. 일 태양에서, 프로브-프로브 복합체(40)에서의 안티센스 프로브(12)의 안티센스 결합 부분(14)의 3' 단부, 및 센스 프로브(22)의 센스 결합 부분(24)의 3' 단부는 각각 단일-가닥이다. 일 태양에서, 단일-가닥 돌출부는 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이, 약 1 내지 약 5개의 뉴클레오티드 길이, 약 1 내지 약 3개의 뉴클레오티드 길이, 또는 약 1개 또는 약 2개의 뉴클레오티드 길이이다. 일 태양에서, 단일-가닥 돌출부는 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0146] 도 3a는 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥(11) 및 안티센스 프로브(12')를 포함하는 안티센스 복합체(10')의 개략도로서, 안티센스 프로브(12')는 올리고뉴클레오티드 태그(13), "전장" 안티센스 결합 부분(14') 및 표지(15)를 포함한다. 도 3b는 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥(21) 및 센스 프로브(22')를 포함하는 센스 복합체(20')의 개략도로서, 센스 프로브(22')는 올리고뉴클레오티드 태그(23), "전장" 센스 결합 부분(24') 및 표지(25)를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "전장" 결합 부분은 안티센스 프로브 및 센스 프로브의 결합 부분이 각각 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥 및 센스 가닥과 동일한 길이여서(즉, 동일한 수의 뉴클레오티드 염기를 포함해서), 안티센스 복합체(10') 또는 센스 복합체(20')에 단일-가닥 돌출부가 존재하지 않게 된다는 것을 의미한다. 도 3c는 안티센스 프로브(12')의 "전장" 안티센스 결합 부분(14')이 센스 프로브(22')의 "전장" 센스 결합 부분(24')에 혼성화된 프로브-프로브 결합 복합체(40')의 개략도로서, 여기서는 단일-가닥 돌출부가 존재하지 않는다.

[0147] 일 태양에서, 지지 표면은, 센스 프로브 또는 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그가 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오티드에 혼성화되는 조건 하에서 혼성화 혼합물과 접촉된다. 일 태양에서, 안티센스 복합체의 일부인 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오티드에 혼성화된다. 일 태양에서, 센스 복합체의 일부인 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오티드에 혼성화된다. 도 4a에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 "짧은" 형태여서 안티센스 복합체의 안티센스 가닥 부분이 단일-가닥 돌출부를 포함하게 되고, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 "짧은" 형태여서 센스 복합체의 센스 가닥 부분이 단일-가닥 돌출부를 포함하게 된다. 도 4b에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 "전장" 형태여서 안티센스 복합체의 안티센스 가닥 부분이 단일-가닥 돌출부를 포함하지 않게 되고, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 "전장" 형태여서 센스 복합체의 센스 가

닥 부분이 단일-가닥 돌출부를 포함하지 않게 된다. 안티센스 복합체 또는 센스 복합체가 각각 안티센스 프로브 또는 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그를 통해 지지 표면에 혼성화되는 상황을 본 명세서에서 "생산적"으로 지칭한다.

[0148] 일 태양에서, 안티센스 프로브 또는 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 각각 안티센스 복합체 또는 센스 복합체의 일부가 아니다. 안티센스 복합체 또는 센스 복합체가 아닌 혼성화 복합체가 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그를 통해 지지 표면에 혼성화되는 상황을 본 명세서에서 "비생산적"으로 지칭한다. 도 4c에 나타난 일 태양에서, 안티센스 프로브(12) 또는 센스 프로브(22)의 올리고뉴클레오티드 태그는 단지 안티센스 프로브(12) 또는 센스 프로브(22)만을 지지 표면(30)에 결합시킨다. 이 상황에서, 안티센스 프로브(12) 또는 센스 프로브(22)에 대해 각각 안티센스 결합 부분(14) 및 센스 결합 부분(24)은 단일-가닥 상태를 유지한다.

[0149] 일 태양에서, 안티센스 프로브 또는 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 프로브-프로브 복합체의 일부이고, 안티센스 프로브(12) 또는 센스 프로브(22)의 올리고뉴클레오티드 태그는 프로브-프로브 복합체(40')를 지지 표면(30) 상에 고정화한다. 도 4d에 나타난 일 태양에서, 프로브들의 안티센스-결합 부분 및 센스-결합 부분은 "짧은" 형태여서, 프로브-프로브 복합체(40)의 결합 부분들에 단일-가닥 돌출부가 존재하게 된다. 도 4e에 나타난 일 태양에서, 프로브들의 안티센스-결합 부분 및 센스-결합 부분은 "전장" 형태여서, 프로브-프로브 복합체(40')의 결합 부분들에 단일-가닥 돌출부가 존재하지 않게 된다.

[0150] 일 태양에서, 샘플은 복수의 올리고뉴클레오티드 이중체들을 포함하고, 조성물은 복수의 프로브 세트들을 포함하며, 여기서 각각의 프로브 세트는 특유의 올리고뉴클레오티드 이중체의 특유의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥과 혼성화된다.

[0151] 일 태양에서, 상기 방법은 스텝-다운 혼성화 조건을 포함하며, 여기서는 어닐링 온도의 충분한 감소 동안 프로브들이 이들 각각의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 혼성화된다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 변성 단계를 포함하며, 여기서는 샘플을 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 변성시키는 제1 온도에서 인큐베이션한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 어닐링 단계를 포함하며, 여기서는 프로브들을 올리고뉴클레오티드 이중체의 변성된 센스 가닥 및 안티센스 가닥과 함께, 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하는 제2 온도에서 인큐베이션한다. 일 태양에서, 상기 방법은 센스 복합체 및 안티센스 복합체를 약 2°C 내지 약 8°C의 유지 온도에서 인큐베이션하는 단계를 포함한다.

[0152] 일 태양에서, 변성 단계는 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 변성시키기 위해 약 60°C 내지 약 95°C의 제1 온도에서 샘플을 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 변성 단계는 적어도 약 60°C, 약 65°C, 약 70°C, 약 75°C, 또는 약 80°C 및 최대 약 85°C, 약 90°C, 약 95°C, 또는 약 100°C의 제1 온도에서 샘플을 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 변성 단계는 약 60°C, 약 65°C, 약 70°C, 약 75°C, 약 80°C, 약 85°C, 약 90°C, 약 95°C, 또는 약 100°C의 제1 온도에서 샘플을 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 변성시키기 위해 약 80°C 내지 약 95°C의 제1 온도에서 샘플을 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 변성시키기 위해 약 90°C 내지 약 95°C의 제1 온도에서 샘플을 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 변성시키기 위해 약 95°C의 제1 온도에서 샘플을 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 약 1분 내지 약 15분 동안 인큐베이션된다. 일 태양에서, 샘플은 적어도 약 30초, 약 1분, 약 2분, 약 3분, 약 4분 또는 약 5분 및 최대 약 10분 또는 약 15분 동안 인큐베이션된다. 일 태양에서, 샘플은 약 30초, 약 1분, 약 2분, 약 3분, 약 4분, 약 5분, 약 10분 또는 약 15분 동안 인큐베이션된다. 일 태양에서, 샘플은 약 1분 내지 약 5분 동안 인큐베이션된다. 일 태양에서, 샘플은 약 1분 내지 약 2분 동안 인큐베이션된다. 일 태양에서, 샘플은 약 2분 동안 인큐베이션한다. 일 태양에서, 변성 단계는 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 변성시키기 위해 약 60°C 내지 약 95°C의 제1 온도에서 약 1분 내지 약 15분 동안 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 변성시키기 위해 약 80°C 내지 약 95°C의 제1 온도에서 약 1분 내지 약 5분 동안 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 변성시키기 위해 약 95°C의 제1 온도에서 약 2분 동안 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다.

[0153] 일 태양에서, 어닐링 단계는 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 약 10°C 내지 약 65°C의 제2 온도에서 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일

태양에서, 어닐링 단계는 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 적어도 약 10°C, 약 15°C, 약 20°C, 약 25°C, 약 30°C, 약 35°C, 또는 약 40°C 및 최대 약 45°C, 약 50°C, 약 55°C, 약 60°C, 또는 약 65°C의 제2 온도에서 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 어닐링 단계는 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 약 10°C, 약 15°C, 약 20°C, 약 25°C, 약 30°C, 약 35°C, 약 40°C, 약 45°C, 약 50°C, 약 55°C, 약 60°C, 또는 약 65°C의 제2 온도에서 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 약 40°C 내지 약 65°C의 제2 온도에서 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 60°C 내지 약 65°C의 제2 온도에서 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 약 65°C의 제2 온도에서 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 어닐링 단계는 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 제2 온도에서 약 30초 내지 약 5분 동안 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 어닐링 단계는 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 제2 온도에서 적어도 약 30초, 약 60초, 약 90초 및 최대 약 2분, 약 3분, 약 4분 또는 약 5분 동안 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 제2 온도에서 약 1분 내지 약 2분 동안 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 제2 온도에서 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 어닐링 단계는 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 약 10°C 내지 약 65°C의 제2 온도에서 약 30초 내지 약 5분 동안 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 약 40°C 내지 약 65°C의 제2 온도에서 약 1분 내지 약 2분 동안 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 센스 프로브 및 안티센스 프로브가 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있게 하기 위해 약 65°C의 제2 온도에서 약 1분 동안 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 약 2°C 내지 약 8°C의 유지 온도에서 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 조건은 약 4°C의 유지 온도에서 프로브들을 샘플과 인큐베이션하는 단계를 포함한다.

- [0154] 일 태양에서, 어닐링 단계와 유지 사이의 온도 전이 속도는 약 0.05°C/s 내지 약 0.5°C/s이다. 일 태양에서, 어닐링 단계와 유지 사이의 온도 전이 속도는 약 0.1°C/s이다.
- [0155] 일 태양에서, 프로브들은 희석제 54 또는 N-PLEX 혼성화 완충액 1 또는 2를 포함하는 완충액 중에서 샘플과 함께 인큐베이션된다.
- [0156] 일 태양에서, 혼성화 복합체들을 함유하는 혼성화 혼합물은 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉된다. 일 태양에서, 지지 표면을 먼저 센스 프로브 및 안티센스 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 태그 및 제2 올리고뉴클레오티드 태그가 지지 표면 상의 제1 포획 올리고뉴클레오티드 및 제2 포획 올리고뉴클레오티드에 혼성화되는 조건 하에서 혼성화 혼합물과 접촉시켜 지지 표면 상에 혼성화 복합체들을 고정화하고; 이어서 지지 표면을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시킨다. 일 태양에서, 혼성화 복합체들을 함유하는 혼성화 혼합물을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시켜 반응 혼합물을 형성하고, 이어서 지지 표면을 센스 프로브 및 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그들이 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오티드들에 혼성화되는 조건 하에서 반응 혼합물과 접촉시킨다.
- [0157] 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 뉴클레아제는 단일-가닥 특이적 DNase를 포함한다. 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 DNase는 S1 뉴클레아제, P1 뉴클레아제 또는 녹두 뉴클레아제이다. 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 뉴클레아제는 단일-가닥 특이적 RNase를 포함한다. 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 DNase는 RNase A, RNase H, RNase I, RNase III, RNase L, RNase P, RNase PhyM, RNase T1, RNase T2, RNase U2, RNase V, PNPase, RNase PH, RNase R, RNase D, RNase T, RNaseONE, 올리고리보뉴클레아제, 엑소리보뉴클레아제 I, 또는 엑소리보뉴클레아제 II이다.
- [0158] 도 4c에 나타난 일 태양에서, 단일-가닥 뉴클레아제는 혼성화 복합체들에서 비결합된 단일-가닥 프로브를 절단하여, 프로브로부터 표지를 탈착시킨다. 유리하게도, 이는 프로브로부터 표지를 제거하고, 지지 표면에 대한

비결합된 프로브의 고정화에 의해 야기되는 백그라운드를 감소시킨다.

- [0159] 도 4d에 나타난 일 태양에서, 단일-가닥 뉴클레아제는 "짧은" 프로브들을 사용하여 형성된 프로브-프로브 복합체의 단일-가닥 돌출부를 절단하여, 프로브-프로브 복합체로부터 표지를 제거하고, 이로써 백그라운드 수준을 감소시킨다.
- [0160] 도 4e에 나타난 일 태양에서, 프로브-프로브 복합체는 FL 프로브들로부터 형성되며, 이로써 단일-가닥 돌출부가 없게 된다. 이러한 상황에서, 표지는 지지 표면 상에 고정화된 상태로 남아 있으며, 그 결과 높은 백그라운드 수준을 가져온다.
- [0161] 일 태양에서, 샘플을 프로브들의 세트를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계, 프로브들을 샘플과 인큐베이션하여 센스 복합체 및 안티센스 복합체를 포함하는 혼성화 복합체들을 형성하는 단계, 지지 표면을 혼성화 복합체들을 포함하는 혼성화 혼합물과 접촉시키는 단계, 및 지지 표면을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시키는 단계의 방법 단계들 중 하나 이상은 동시에 수행된다. 일 태양에서, 샘플을 프로브들의 세트를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계, 프로브들을 샘플과 인큐베이션하여 센스 복합체 및 안티센스 복합체를 포함하는 혼성화 복합체들을 형성하는 단계, 지지 표면을 혼성화 복합체들을 포함하는 혼성화 혼합물과 접촉시키는 단계, 및 혼성화 복합체들을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시키는 단계의 방법 단계들은 동시에 수행된다.
- [0162] 일 태양에서, 샘플을 프로브들의 세트를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계, 프로브들을 샘플과 인큐베이션하여 센스 복합체 및 안티센스 복합체를 포함하는 혼성화 복합체들을 포함하는 혼성화 혼합물을 형성하는 단계, 지지 표면을 혼성화 혼합물과 접촉시키는 단계, 및 혼성화 복합체들을 단일-가닥 특이적 뉴클레아제와 접촉시키는 단계의 방법 단계들은 각각 순차적으로 수행된다.
- [0163] 일 태양에서, 지지 표면은 약 15분 내지 약 12시간 동안 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 적어도 약 15분, 약 30분, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 또는 약 6시간 및 최대 약 6시간 또는 약 12시간 동안 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 30분 내지 약 3시간 동안 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 1시간 내지 약 2시간 동안 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다.
- [0164] 일 태양에서, 지지 표면은 약 20°C 내지 약 40°C의 온도에서 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 적어도 약 20°C, 약 25°C, 또는 약 30°C, 및 최대 약 25°C, 또는 약 40°C의 온도에서 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 20°C 내지 약 40°C의 온도에서 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 30°C 내지 약 40°C의 온도에서 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 35°C 내지 약 40°C의 온도에서 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 35°C, 약 36°C, 약 37°C, 약 38°C, 약 39°C, 또는 약 40°C의 온도에서 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 37°C의 온도에서 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션된다.
- [0165] 일 태양에서, 지지 표면은 약 700 rpm 내지 약 900 rpm으로 진탕하면서 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 700 rpm, 705 rpm, 710 rpm, 725 rpm, 750 rpm 및 최대 약 800 rpm, 약 850 rpm 또는 약 900 rpm으로 진탕하면서 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 705 rpm으로 진탕하면서 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다.
- [0166] 일 태양에서, 지지 표면은 약 20°C 내지 약 40°C의 온도에서 약 15분 내지 약 12시간 동안 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 20°C 내지 약 40°C의 온도에서 약 1시간 내지 약 2시간 동안 혼성화 복합체들과 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 진탕하면서 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션된다. 일 태양에서, 지지 표면은 약 705 rpm으로 진탕하면서 약 37°C의 온도에서 약 1시간 동안 센스 복합체 및 안티센스 복합체와 함께 인큐베이션된다.
- [0167] 일 태양에서, 샘플은 복수의 올리고뉴클레오타이드 이중체들을 포함하고, 프로브 조성물은 복수의 프로브 세트들을 포함하며, 여기서 각각의 프로브 세트는 특유의 올리고뉴클레오타이드 이중체의 특유의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥과 혼성화된다. 일 태양에서, 프로브 조성물은 약 20 pM 내지 약 10 nM 센스 프로브를 포함한다. 일

태양에서, 프로브 조성물은 약 20 pM, 약 50 pM, 약 100 pM, 약 150 pM, 약 200 pM, 또는 약 250 pM 및 최대 약 0.5 nM, 약 1 nM, 약 5 nM, 또는 약 10 nM 센스 프로브를 포함한다. 일 태양에서, 프로브 조성물은 약 100 pM 내지 약 500 pM 센스 프로브를 포함한다. 일 태양에서, 프로브 조성물은 약 20 pM 내지 약 200 pM 센스 프로브를 포함한다. 일 태양에서, 프로브 조성물은 약 20 pM 내지 약 100 pM 센스 프로브를 포함한다. 일 태양에서, 프로브 조성물은 약 20 pM, 약 50 pM, 약 100 pM, 약 150 pM, 약 200 pM 또는 약 250 pM, 및 최대 약 0.5 nM, 약 1 nM, 약 5 nM, 또는 약 10 nM 안티센스 프로브를 포함한다. 일 태양에서, 프로브 조성물은 약 100 pM 내지 약 500 pM 안티센스 프로브를 포함한다. 일 태양에서, 프로브 조성물은 약 20 pM 내지 약 200 pM 안티센스 프로브를 포함한다.

[0168] 일 태양에서, 상기 방법은 지지 표면 상에 고정화된 표지의 존재에 기초하여 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 상기 방법은 약 200 pg/mL 미만의 검출 하한치(LLOD)를 갖는다.

[0169] **C. 올리고뉴클레오티드 이중체**

[0170] 일 태양에서, 본 명세서에 기재된 방법은 샘플에서 올리고뉴클레오티드 이중체를 검출하는 데 사용된다. 일 태양에서, 본 명세서에 기재된 방법은 올리고뉴클레오티드 이중체의 제1 가닥 및 제2 가닥을 검출하는 데 사용된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 치료제이다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 치료제는 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함한다.

[0171] 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 양쪽 가닥은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체는 DNA/DNA 이중체이다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 양쪽 가닥은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체는 RNA/RNA 이중체이다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 한쪽 가닥은 DNA를 포함하고, 올리고뉴클레오티드 이중체의 한쪽 가닥은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체는 DNA/RNA 이중이중체이다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥은 RNA를 포함한다.

[0172] 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 한쪽 또는 양쪽 가닥은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 가닥들 중 한쪽 가닥은 DNA 및 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 가닥들 중 한쪽 가닥은 RNA 및 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥은 DNA 및 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥은 RNA 및 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥은 DNA 및 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥은 RNA 및 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 변형된 뉴클레오티드는 핵염기, 당 또는 뉴클레오티드 간 결합에서의 변형을 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 양쪽 모두는 개별적으로 하나 이상의 변형된 핵산을 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥, 안티센스 가닥, 또는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 양쪽 모두는 개별적으로 5'- 또는 3'- 바이오접합체를 포함한다. 일 태양에서, 바이오접합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 세포 침투 펩티드(CPP),  $\alpha$ -토코페롤, 압타머, 항체, 콜레스테롤, 스쿠알렌, 지방산, 또는 핵지질을 포함한다.

[0173] 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 각각의 가닥은 독립적으로 약 5 내지 약 100개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 각각의 가닥은 독립적으로 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 20, 약 25 또는 약 30개의 뉴클레오티드 및 최대 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50 또는 약 100개의 뉴클레오티드 길이를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 각각의 가닥은 약 8 내지 약 50개의 뉴클레오티드, 약 10 내지 약 40개의 뉴클레오티드, 약 10 내지 약 30개의 뉴클레오티드, 약 12 내지 약 30개의 뉴클레오티드, 약 16 내지 약 30, 또는 약 18 내지 약 30개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0174] **D. 올리고뉴클레오티드 프로브**

[0175] 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥에 혼성화될 수 있는 센스 프로브가 제공된다. 일 태양에

서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있는 안티센스 프로브가 제공된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그, 안티센스-결합 부분 및 표지를 포함하는 안티센스 프로브가 제공된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그, 센스-결합 부분 및 표지를 포함하는 센스 프로브가 제공된다.

[0176] 1. 올리고뉴클레오타이드 태그

[0177] 일 태양에서, 센스 프로브 및 안티센스 프로브는 포획 올리고뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드 서열에 혼성화되는 핵산 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 단일-가닥 포획 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 일부분에 상보적인 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 이의 상응하는 포획 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된다.

[0178] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 이의 상응하는 포획 올리고뉴클레오타이드가 아닌 포획 올리고뉴클레오타이드와 교차-반응하지 않거나 이에 혼성화되지 않는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 엄격한 혼성화 조건 하에서 이의 상응하는 포획 올리고뉴클레오타이드가 아닌 포획 올리고뉴클레오타이드와 교차-반응하지 않거나 이에 혼성화되지 않는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 혼성화되지 않는다. 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분에 혼성화되지 않거나, 또는 역으로도 성립된다. 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 생리학적으로 관련된 또는 엄격한 조건 하에서 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분에 혼성화되지 않는다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 생리학적으로 관련된 또는 엄격한 조건 하에서 센스 프로브의 센스 결합 부분에 혼성화되지 않는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 생리학적으로 관련된 또는 엄격한 조건 하에서 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 혼성화되지 않는다.

[0179] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그와 이의 상응하는 포획 올리고뉴클레오타이드는 왓슨-크릭 모델에 기초하여 100% "서열 상보성"을 갖는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그와 포획 올리고뉴클레오타이드는 왓슨-크릭 모델에 기초하여 적어도 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 서열 상보성을 갖는 서열을 갖는다.

[0180] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 재조합적으로 생성된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 화학적으로 합성된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 자연 발생 서열이 아니다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 단일-가닥 DNA 서열을 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 단일-가닥 RNA 서열을 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 DNA를 포함한다.

[0181] 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 하나 이상의 변형된 핵산을 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 포스포다이에스테르(PO); 포스포로티오에이트(PS); 2'-O-메틸(2'OMe); 2'-O-메톡시에틸(MOE); 펩티드 핵산(PNA); 포스포로아미테이트 모르폴리노(PMO); 고정된 핵산(LNA); 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F); 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 고정된 핵산(LNA)을 포함한다.

[0182] 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 하나 이상의 변형된 핵산을 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 포스포다이에스테르(PO); 포스포로티오에이트(PS); 2'-O-메틸(2'OMe); 2'-O-메톡시에틸(MOE); 펩티드 핵산(PNA); 포스포로아미테이트 모르폴리노(PMO); 고정된 핵산(LNA); 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F); 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그는 고정된 핵산(LNA)을 포함한다.

[0183] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0184] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 안티센스 프로브의 5'-단부에 부착된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 안티센스 프로브의 3'-단부에 부착된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 센스 프로브의 5'-단부에 부착된다. 다른 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 센스 프로브의 3'-단부에 부착된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 상보적이지 않으며 이와 혼성화되지 않는다.

[0185] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 적어도 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24 또는 약 25개 및 최대 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34,

약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40, 또는 약 15 내지 약 40, 또는 약 20 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이인 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 상보적 포획 올리고뉴클레오타이드 서열보다 적어도 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10 및 최대 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20, 또는 약 1 내지 약 20, 약 10 내지 약 15, 또는 약 12 내지 약 13개 뉴클레오타이드만큼 더 짧은 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일 태양에서, 태그는 적어도 약 24, 약 30 또는 약 36개의 뉴클레오타이드 길이인 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 상응하는 포획 올리고뉴클레오타이드의 길이와 동일한 길이를 갖는다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 태그는 상응하는 포획 올리고뉴클레오타이드의 길이보다 더 짧은 길이를 갖는다.

**[0186] 2. 결합 부분**

**[0187]** 일 태양에서, 안티센스 프로브는 안티센스 결합 부분을 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 핵산 서열에 상보적인 핵산 서열을 갖는다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥에 혼성화될 수 있다. 일 태양에서, 안티센스 결합 부분과 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥은 왓슨-크릭 모델에 기초하여 100% "서열 상보성"을 갖는다. 일 태양에서, 안티센스 결합 부분과 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥은 왓슨-크릭 모델에 기초하여 적어도 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 서열 상보성을 갖는 서열을 갖는다.

**[0188]** 일 태양에서, 센스 프로브는 센스 결합 부분을 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 핵산 서열에 상보적인 핵산 서열을 갖는다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥에 혼성화될 수 있다. 일 태양에서, 센스 결합 부분과 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥은 왓슨-크릭 모델에 기초하여 100% "서열 상보성"을 갖는다. 일 태양에서, 센스 결합 부분과 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥은 왓슨-크릭 모델에 기초하여 적어도 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 서열 상보성을 갖는 서열을 갖는다.

**[0189]** 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 길이는 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오타이드만큼 더 짧다. 일 태양에서, 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥보다 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오타이드만큼 더 짧은 길이를 갖는다. 일 태양에서, 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥보다 약 1 내지 약 5개의 뉴클레오타이드만큼 더 짧은 길이를 갖는다. 일 태양에서, 안티센스 결합 부분은 길이가 약 10 내지 약 25개의 뉴클레오타이드, 또는 약 10 내지 약 20개의 뉴클레오타이드, 또는 약 10 내지 약 16개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 길이의 약 50% 내지 약 99%인 길이를 갖는다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 길이의 약 75% 내지 약 95%인 길이를 갖는다.

**[0190]** 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 길이는 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오타이드만큼 더 짧다. 일 태양에서, 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥보다 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오타이드만큼 더 짧은 길이를 갖는다. 일 태양에서, 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥보다 약 1 내지 약 5개의 뉴클레오타이드만큼 더 짧은 길이를 갖는다. 일 태양에서, 센스 결합 부분은 길이가 약 10 내지 약 25개의 뉴클레오타이드, 또는 약 10 내지 약 20개의 뉴클레오타이드, 또는 약 10 내지 약 16개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 길이의 약 50% 내지 약 99%인 길이를 갖는다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 길이의 약 75% 내지 약 95%인 길이를 갖는다.

**[0191]** 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 5' 단부가 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 3' 단부와 정렬된다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 3' 단부가 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥의 5' 단부와 정렬된다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 5' 단부가 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 3' 단부와 정렬된다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 3' 단부가 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥의 5' 단부와 정렬된다.

**[0192]** 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함한다.

- [0193] 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다.
- [0194] 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다.
- [0195] 일 태양에서, 안티센스 프로브는 DNA를 포함하는 안티센스 결합 부분 및 RNA를 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 포함하는 키메라 프로브이며, 여기서 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은 안티센스 결합 길이를 갖는다. 일 태양에서, 안티센스 프로브는 RNA를 포함하는 안티센스 결합 부분 및 DNA를 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 포함하는 키메라 프로브이며, 여기서 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은 안티센스 결합 길이를 갖는다. 일 태양에서, 센스 프로브는 DNA를 포함하는 센스 결합 부분 및 RNA를 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 포함하는 키메라 프로브이며, 여기서 센스 프로브의 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은 센스 결합 길이를 갖는다. 일 태양에서, 센스 프로브는 RNA를 포함하는 센스 결합 부분 및 DNA를 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 포함하는 키메라 프로브이며, 여기서 센스 프로브의 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은 센스 결합 길이를 갖는다.
- [0196] 일 태양에서, 안티센스 프로브의 결합 부분은 하나 이상의 변형된 핵산을 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 결합 부분은 포스포다이에스테르(PO); 포스포로티오에이트(PS); 2'0-메틸(2'OMe); 2'0-메톡시에틸(MOE); 펩티드 핵산(PNA); 포스포로아미데이트 모르폴리노(PMO); 고정된 핵산(LNA); 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F); 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 결합 부분은 고정된 핵산(LNA)을 포함한다.
- [0197] 일 태양에서, 센스 프로브의 결합 부분은 하나 이상의 변형된 핵산을 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 결합 부분은 포스포다이에스테르(PO); 포스포로티오에이트(PS); 2'0-메틸(2'OMe); 2'0-메톡시에틸(MOE); 펩티드 핵산(PNA); 포스포로아미데이트 모르폴리노(PMO); 고정된 핵산(LNA); 2'-데옥시-2'-플루오로(2'-F); 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 결합 부분은 고정된 핵산(LNA)을 포함한다.
- [0198] **3. 표지**
- [0199] 일 태양에서, 프로브는 표지를 포함한다. 일 태양에서, 표지는 프로브에 직접 부착된다. 다른 태양에서, 표지는 링커를 통해 프로브에 부착된다. 일 태양에서, 표지는 프로브의 5' 단부에 부착된다. 일 태양에서, 표지는 프로브의 3' 단부에 부착된다. 일 태양에서, 표지는 1차 표지이다. 일 태양에서, 1차 표지는 검출가능한 물리적 특성을 갖는다. 1차 표지의 예에는 방사성 동위원소, 효소, 기질, 형광 분자, 화학발광 모이어티, 전기화학발광 모이어티, 자성 입자, 및 생물발광(ECL) 모이어티가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일 태양에서, 1차 표지는 전기화학발광(ECL) 표지이다. 일 태양에서, ECL 표지는 전이 금속, 예를 들어 루테튬을 포함하는 유기 금속 착물이다. 일 태양에서, 1차 표지는 MSD SULFO-TAG 표지(Meso Scale Diagnostics, LLC, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)이다.
- [0200] 일 태양에서, 표지는 결합 쌍의 구성원인 화합물이며, 여기서 결합 쌍의 제1 구성원(이는 "1차 결합 시약"으로 지칭될 수 있음)은 기질, 예를 들어 올리고뉴클레오티드에 부착되고, 결합 쌍의 다른 하나의 구성원(이는 "2차 결합 시약"으로 지칭될 수 있음)은 검출가능한 물리적 특성을 갖거나, 또는 검출가능한 물리적 특성을 갖는 모이어티에 부착된다. 결합 쌍의 비제한적인 예에는 비오틴과 스트렙타비딘, 또는 아비딘; 상보적 올리고뉴클레오티드들; 합텐과 합텐 결합 파트너; 및 항체/항원 결합 쌍이 포함된다. 일 태양에서, 표지는 비오틴을 포함하는 1차 결합제이다. 일 태양에서, 2차 결합 시약은 스트렙타비딘을 포함한다. 일 태양에서, 2차 결합 시약은 MSD SULFO-TAG 표지(Meso Scale Diagnostics, LLC, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 포함한다.

**[0201] E. 샘플**

**[0202]** 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 이중체는 샘플에 존재한다. 일 태양에서, 샘플은 관심 공급원으로부터 획득되거나 유래되는 생물학적 샘플이다. 일 태양에서, 샘플은 유기체이거나 유기체로부터 획득된다. 일 태양에서, 샘플은 식물이거나 식물로부터 획득된다. 일 태양에서, 샘플은 동물이거나 동물로부터 획득된다. 일 태양에서, 샘플은 포유동물로부터 획득된다. 일 태양에서, 샘플은 인간으로부터 획득된다. 일 태양에서, 관심 공급원은 생물반응기를 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 제조 공정 샘플이다. 일 태양에서, 샘플은 환경 샘플이다. 일 태양에서, 환경 샘플은 물 샘플을 포함하며, 이는, 예를 들어 대수층(aquifer) 샘플, 지하수 샘플, 또는 폐수 샘플이 포함된다. 일 태양에서, 환경 샘플은 토양 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 환경 샘플은 토양 미생물 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 무세포 DNA를 포함한다.

**[0203]** 일 태양에서, 샘플은 생물학적 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 비처리된 생물학적 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 전처리된 생물학적 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은, 예를 들어 하나 이상의 성분을 제거하기 위해 또는 하나 이상의 작용제를 첨가하기 위해 전처리된다. 일 태양에서, 샘플은 정제된 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플로부터 올리고뉴클레오티드를 정제하는 방법은 알려져 있으며, 예를 들어 침전, 원심 분리, 및 컬럼 크로마토그래피를 포함한다. 일 태양에서, 컬럼 크로마토그래피는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 예를 들어 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC), 음이온 교환 고압 액체 크로마토그래피(AEX HPLC) 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 추출된 샘플이다. 일 태양에서, 샘플은, 예를 들어 반투과성 막을 사용하여 여과된다. 일 태양에서, 샘플은, 샘플로부터 추출되거나 샘플에 mRNA의 증폭 또는 역전사와 같은 기법을 적용함으로써 획득된 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

**[0204]** 일 태양에서, 샘플은 하나 이상의 표적 올리고뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 하나 이상의 증폭된 표적 올리고뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 태양에서, 샘플은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 또는 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함하지만 이로 한정되지 않는 방법에 의해 획득된 하나 이상의 증폭된 표적 올리고뉴클레오티드 서열을 포함한다.

**[0205]** 일 태양에서, 생물학적 샘플은 생물학적 조직 또는 유체를 포함하며, 이는, 예를 들어 체액, 분비물, 배설물, 세포, 조직 또는 기관 또는 이들의 균질액이 포함된다. 일 태양에서, 생물학적 유체는 혈장, 혈청, 전혈, 림프, 소변, 대변, 모유, 가래, 타액, 복수, 뇌척수액, 복막액, 흉막액 및 양수를 포함한다. 일 태양에서, 생물학적 조직은 조직 또는 조직 균질액을 포함하며, 이는, 기관 또는 기관 균질액, 예컨대 뇌, 간, 비장, 심장, 폐, 및 신장 또는 다른 조직, 예를 들어 근육, 피부, 또는 골수가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일 태양에서, 생물학적 샘플은 조직 또는 미세 바늘 생검 샘플, 세포-함유 체액, 자유 부유 핵산(free floating nucleic acid), 부인과 유체, 피부 면봉, 질 면봉, 구강 면봉, 비강 면봉, 세정액 또는 세척액, 예컨대 유관 세척액 또는 기관지폐포 세척액, 흡인물, 찰과표본(scraping), 수술 검체를 포함한다.

**[0206]** 일 태양에서, 생물학적 샘플은 인체의 일부분으로부터 단리된 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 생물학적 샘플은 비도, 구강, 피부, 귀, 점막, 위장관, 비뇨생식로, 기도, 눈 또는 이들의 조합으로부터 단리된 샘플을 포함한다. 일 태양에서, 생물학적 샘플은 면봉채취, 천공 샘플링, 및 혈청 샘플링을 포함하지만 이로 한정되지 않는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 인체의 일부분으로부터 획득된 샘플을 포함한다.

**[0207]** 일 태양에서, 샘플은 자연 발생 RNase를 포함한다. 자연 발생 RNase를 포함하는 샘플의 경우, 샘플을 센스 프로브 및 안티센스 프로브와 접촉시키기 전에 샘플을 RNase 억제제와 접촉시키는 것이 바람직할 수 있다.

**[0208] F. 포획 올리고뉴클레오티드**

**[0209]** 일 태양에서, 상기 방법 또는 키트는 지지 표면 상의 별개의 결합 도메인들에 고정화되어 있거나 고정화될 수 있는 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는 자연 발생 서열이 아니다. 다른 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는 재조합적으로 생성된다. 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는 화학적으로 합성된다.

**[0210]** 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 단일-가닥 포획 올리고뉴클레오티드이다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 태그는 센스 프로브 또는 안티센스 프로브에 부착된다.

**[0211]** 일 태양에서, 상기 방법 또는 키트는 관심 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥에 대한 특유의 포획 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드들은 지지 표면 상에 고정화

된다. 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드들은 어레이 형태로 고정화된다. 일 태양에서, 어레이는 2개 이상의 포획 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 어레이는 약 2 내지 약 150개 또는 그 이상의 포획 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0212] 일 태양에서, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥 핵산 서열을 포함하며, 이에는, 예를 들어 테옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA), 또는 혼성화 반응에 또한 참여할 수 있는 비자연 발생 화학 구조를 포함한 구조적 유사체를 포함한 핵산 서열이 포함된다.

[0213] 일 태양에서, 특정 어레이에서 사용되는 포획 올리고뉴클레오티드들은 유사한 결합 에너지 또는 용융 온도( $T_m$ )를 가지며, 이때 용융 온도는, 예를 들어 서로에 대해 적어도 약 0.5°C, 약 1°C, 약 2°C, 약 3°C, 약 4°C, 또는 약 5°C 이내이며, 여기서 올리고뉴클레오티드의 용융 온도( $T_m$ )는 올리고뉴클레오티드의 50%는 이의 상보체와 혼성화되고 50%는 용액 중에서 유리 상태인 온도를 지칭한다.  $T_m$ 은 알려진 방법을 사용하여, 예를 들어 온도의 함수로서 상보체를 갖는 올리고뉴클레오티드의 흡광도 변화를 측정함으로써 결정될 수 있다. 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는 50 mM NaCl에서의 용융 온도( $T_m$ )가 약 50°C 내지 약 70°C, 약 55°C 내지 약 65°C, 또는 적어도 약 50°C, 약 55°C, 또는 약 60°C 및 최대 약 60°C, 약 65°C, 또는 약 70°C이다. 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는 GC 함량이 약 40% 내지 약 60%, 또는 약 40% 내지 약 50%이다.

[0214] 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는 약 20 내지 약 100, 약 30 내지 약 50, 또는 약 35 내지 약 40개의 뉴클레오티드 길이, 예를 들어 적어도 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 또는 약 36 및 최대 약 36, 약 37, 약 38, 약 39, 약 40, 약 41, 약 42, 약 43, 약 44, 약 45, 약 46, 약 47, 약 48, 약 49, 약 50, 약 75 또는 약 100개의 뉴클레오티드 길이이다. 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는 적어도 20, 약 24, 약 30 또는 약 36개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 어레이 내의 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드는 이의 상보적 올리고뉴클레오티드 태그의 핵산 서열과 길이가 동일하지 않다. 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는 이의 상보적 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그의 서열보다, 예를 들어 최대 약 5, 약 10, 약 15, 약 20 또는 약 25개의 염기만큼 더 긴 서열을 갖는다.

[0215] 일 태양에서, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드는 지지 표면에 공유적으로 또는 비공유적으로 고정화된다. 일 태양에서, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드는 지지 표면 상의 하나 이상의 결합 도메인에 공유적으로 또는 비공유적으로 고정화된다. 일 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어 올리고뉴클레오티드 상의 음으로 하전된 포스페이트 기와 지지 표면 상의 양전하 사이의 정전기 상호작용을 통해 지지 표면에 흡착된다. 일 태양에서, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드는 표면 상에 고정화된 제2 결합 파트너에 대한, 포획 올리고뉴클레오티드에 (직접적으로 또는 링커 모이어티를 통해) 부착된 제1 결합 파트너의 결합을 통해 지지 표면에 고정화된다. 일 태양에서, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드는 지지 표면에 공유적으로 고정화된다. 일 태양에서, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드는 지지 표면에 직접 고정화된다. 다른 태양에서, 포획 올리고뉴클레오티드는 링커를 통해 지지 표면에 고정화된다.

[0216] 포획 올리고뉴클레오티드는 발명의 명칭이 "KITS FOR DETECTING ONE OR MORE TARGET NUCLEIC ACID ANALYTES IN A SAMPLE AND METHOD OF MAKING AND USING THE SAME"인 국제 특허 출원 공개 WO 2020/227016호(Meso Scale Technologies, LLC., 미국 메릴랜드주 록빌 소재)에 개시되어 있으며, 이의 개시내용은 전체적으로 참고로 포함된다.

[0217] **G. 지지 표면**

[0218] 일 태양에서, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드가 지지 표면 상에 고정화된다. 포획 올리고뉴클레오티드는 통상적인 결합 검정에서 사용되는 지지 표면을 포함한 다양한 지지 표면 상에 고정화될 수 있다. 일 태양에서, 지지 표면은 편평한 표면을 갖는다. 다른 태양에서, 지지 표면은 만곡된 표면을 갖는다. 일 태양에서, 지지 표면은 검정 모듈, 예컨대 검정 플레이트, 슬라이드, 카트리지, 비드 또는 칩을 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 색상 코딩된 미소구체를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Yang et al. (2001) BADGE, BeadsArray for the Detection of Gene Expression, a High-Throughput Diagnostic Bioassay. *Genome Res.* 11(11):1888-1898]을 참조한다. 일 태양에서, 지지 표면은 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드가 고정화된 하나 이상의 비드를 포함한다.

[0219] 지지 표면은 중합체, 예컨대 폴리스티렌 및 폴리프로필렌, 세라믹, 유리, 복합 재료 - 예를 들어, 탄소-중합체

복합체, 예컨대 탄소계 잉크를 포함함 - 를 포함한 다양한 적합한 재료로부터 제조될 수 있다. 일 태양에서, 지지 표면은 탄소계 지지 표면이다.

[0220] 일 태양에서, 지지 표면에는 하나 이상의 입자 또는 "비드"가 제공된다. 일 태양에서, 비드는 직경이 최대 약 1 cm(또는 약 10,000  $\mu\text{m}$ ), 약 5,000  $\mu\text{m}$ , 약 1,000  $\mu\text{m}$ , 약 500  $\mu\text{m}$  또는 약 100  $\mu\text{m}$ 일 수 있다. 일 태양에서, 비드는 직경이 약 10 nm 내지 약 100  $\mu\text{m}$ , 약 100 nm 내지 약 10  $\mu\text{m}$  또는 약 0.5  $\mu\text{m}$  내지 약 5  $\mu\text{m}$ 이다. 일 태양에서, 비드는 상자성이어서 자기장의 사용을 통해 비드를 포획하는 능력을 제공한다. 일 태양에서, 지지 표면에는 스트렙타비딘 또는 아비딘-코팅된 자성 비드가 제공되고, 비오틴-표지된 포획 올리고뉴클레오티드가 비드 상에 고정화된다.

[0221] 일 태양에서, 지지 표면은 복수의 웰들을 갖는 플레이트, 즉, "멀티-웰 플레이트"이다. 멀티-웰 플레이트는 임의의 패턴 또는 구성으로 배열된 임의의 크기 또는 형상의 임의의 수의 웰을 포함할 수 있다. 일 태양에서, 멀티-웰 플레이트는 약 1 내지 약 10,000개의 웰을 포함한다. 일 태양에서, 멀티-웰 검정 플레이트는 플레이트 및 웰의 수, 크기, 형상 및 구성에 대해 산업 표준 형식을 사용한다. 표준 형식의 예에는 96웰, 384웰, 1536웰 및 9600웰 플레이트가 포함되며, 웰은 2차원 어레이로 구성된다. 다른 멀티-웰 형식에는 단일 웰, 2웰, 6웰 및 24웰 및 6144웰 플레이트가 포함된다. 일 태양에서, 지지 표면은 96웰 플레이트를 포함한다.

[0222] 일 태양에서, 지지 표면은 포획 올리고뉴클레오티드들이 기지의 위치 - 결합 도메인으로 지칭됨 - 에 인쇄되어 있는 2차원 패턴화된 어레이를 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 포획 올리고뉴클레오티드들이 고정화된 별개의, 중첩되지 않은 어드레스가능 결합 도메인의 패턴화된 어레이를 포함하며, 여기서 각각의 결합 도메인 내의 포획 올리고뉴클레오티드의 서열은 알려져 있으며 적절한 표적 분석물과 상관이 있을 수 있다. 일 태양에서, 특정 결합 도메인 내의 모든 포획 올리고뉴클레오티드는 동일한 서열을 가지며, 하나의 결합 도메인 내의 포획 올리고뉴클레오티드들은 다른 결합 도메인들 내의 포획 올리고뉴클레오티드들과 상이한 서열을 갖는다. 일 태양에서, 다수의 결합 도메인이 지지 표면 상에 순서대로 행과 열로 어레이되고, 각각의 결합 도메인의 정확한 위치 및 서열은 컴퓨터 데이터베이스에 기록된다. 일 태양에서, 어레이는 대칭 그리드 패턴으로 배열된다. 다른 태양에서, 어레이는 반경방향으로 분포된 선, 나선, 또는 정렬된 클러스터를 포함하지만 이로 한정되지 않는 다른 패턴으로 배열된다. 다른 태양에서, 각각의 결합 도메인은 하나 이상의 미세입자 또는 비드의 표면 상에 위치되며, 여기서 미세입자 또는 비드는 상이한 결합 도메인들 사이의 구별을 가능하게 하도록 코딩된다.

[0223] 일 태양에서, 지지 표면은, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드에 상응하는, 각각의 웰 내의 하나 이상의 별개의 어드레스가능 결합 도메인을 포함하는 멀티-웰 플레이트이다. 일 태양에서, 지지 표면은 야생형 뉴클레오티드 서열을 검출하기 위한 적어도 하나의 결합 도메인, 및 돌연변이체 뉴클레오티드 서열을 검출하기 위한 별도의 결합 도메인을 포함한다. 일 태양에서, 각각의 웰은 적어도 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24 또는 약 25개의 결합 도메인을 포함한다. 일 태양에서, 각각의 웰은 적어도 약 7, 약 10, 약 16, 또는 약 25개의 결합 도메인을 포함한다.

[0224] 일 태양에서, 지지 표면은 적어도 24개, 96개, 또는 384개의 웰을 포함하는 멀티-웰 플레이트이고, 각각의 웰은 최대 10개의 결합 도메인의 어레이를 포함하고, 여기서 상이한 포획 올리고뉴클레오티드들이 별개의 결합 도메인들에 고정화된다. 더 특정한 태양에서, 지지 표면은, 각각의 웰이 최대 10개의 결합 도메인을 갖는 어레이를 포함하는 96웰 플레이트이다. 일 태양에서, 96웰 플레이트의 각각의 웰은 최대 10개의 결합 도메인을 포함하며, 결합 도메인 상에는 최대 10개의 구별되는 포획 올리고뉴클레오티드가 고정화되어 있다. 일 태양에서, 각각의 웰은 동일한 포획 올리고뉴클레오티드들을 갖는 동일한 패턴화된 어레이를 포함한다. 다른 태양에서, 상이한 웰들은 포획 올리고뉴클레오티드들의 상이한 패턴화된 어레이를 포함할 수 있다.

[0225] **H. 뉴클레아제 보호 검정(NPA)**

[0226] 일 태양에서, 뉴클레아제 보호 검정을 사용하여 샘플에서 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하기 위한 방법이 제공된다. 일 태양에서, 샘플은 프로브들의 세트와 접촉되며, 프로브들의 세트는 센스 프로브 및 안티센스 프로브를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 센스 결합 부분, 및 표지를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부분에 상보적인 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 뉴클레오티드 서열에 혼성

화될 수 있는 안티센스 결합 부분, 및 표지를 포함한다. 일 태양에서, 상기 방법은 프로브들을 샘플과 인큐베이션하여 혼성화 복합체들을 함유하는 혼성화 혼합물을 형성하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 상기 방법은 혼성화 복합체들의 올리고뉴클레오티드 태그들이 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오티드들에 혼성화 되는 조건 하에서 지지 표면을 혼성화 혼합물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 상기 방법은 지지 표면 상에 고정화된 표지의 존재에 기초하여 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 상기 방법은 지지 표면 상에 고정화된, 표지된 센스 혼성화 복합체 및 안티센스 혼성화 복합체의 존재에 기초하여 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 검출 또는 정량화하는 단계를 포함한다.

- [0227] 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결합 길이가 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 더 짧다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 센스 결합 길이가 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧다. 일 태양에서, 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안티센스 결합 길이가 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 더 짧다. 일 태양에서, 안티센스 가닥의 안티센스 결합 부분은 안티센스 결합 길이가 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧다.
- [0228] 일 태양에서, 센스 프로브는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다.
- [0229] 일 태양에서, 센스 프로브는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다.
- [0230] 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 센스 프로브의 센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다.
- [0231] 일 태양에서, 안티센스 프로브는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다.
- [0232] 일 태양에서, 안티센스 프로브는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분 및 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다.
- [0233] 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 DNA를 포함하고, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 RNA를 포함한다. 일 태양에서, 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 RNA를 포함하고, 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그는 DNA를 포함한다.
- [0234] 일 태양에서, 안티센스 프로브는 DNA를 포함하는 안티센스 결합 부분 및 RNA를 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 포함하는 키메라 프로브이며, 여기서 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은 안티센스 결합 길이를 갖는다. 일 태양에서, 안티센스 프로브는 RNA를 포함하는 안티센스 결합 부분 및 DNA를 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 포함하는 키메라 프로브이며, 여기서 안티센스 프로브의 안티센스 결합 부분은 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥의 안티센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은 안티센스 결합 길이를 갖는다. 일 태양에서, 센스 프로브는 DNA를 포함하는 센스 결합 부분 및 RNA를 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 포함하는 키메라 프로브이며, 여기서 센스 프로브의 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은 센스 결합 길이를 갖는다. 일 태양에서, 센스 프로브는 RNA를 포함하는 센스 결합 부분 및 DNA를 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 포함하는 키메라 프로브이며, 여기서 센스 프로브의 센스 결합 부분은 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥의 센스 가닥 길이보다 적어도 1개의 뉴클레오티드만큼 더 짧은 센스 결합 길이를 갖는다.
- [0235] 일 태양에서, 상기 방법은 프로브들의 세트를 샘플과 함께 인큐베이션하여 혼성화 혼합물을 형성한다. 일 태양에서, 혼성화 혼합물은 센스 복합체 및 안티센스 복합체를 포함하는 혼성화 복합체들을 함유한다. 일 태양에서, 혼성화 혼합물은 올리고뉴클레오티드 이중체의 센스 가닥과 혼성화된 센스 프로브를 포함하는 센스 복합체; 및 올리고뉴클레오티드 이중체의 안티센스 가닥과 혼성화된 안티센스 프로브를 포함하는 안티센스 복합

체를 포함한다.

[0236] 일 태양에서, 혼성화 혼합물은 하기의 비생산적 혼성화 복합체들 중 하나 이상을 추가로 함유한다: 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥과 혼성화되지 않은 센스 프로브; 올리고뉴클레오타이드 이중체의 안티센스 가닥에 혼성화되지 않은 안티센스 프로브; 또는 센스 프로브와 안티센스 프로브가 서로 혼성화된 프로브-프로브 복합체. 일 태양에서, 비생산적 혼성화 복합체는 단일-가닥 돌출부를 포함한다. 일 태양에서, 비생산적 혼성화 복합체는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일 태양에서, 비생산적 혼성화 복합체는 단일-가닥 RNA 서열을 포함한다. 일 태양에서, 비생산적 혼성화 복합체는 단일-가닥 DNA 서열을 포함한다.

[0237] 일 태양에서, 비생산적 혼성화 복합체 내의 단일-가닥 돌출부 또는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열은 단일-가닥 특이적 뉴클레아제로 분해된다. 일 태양에서, 단일-가닥 돌출부 또는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열은 단일-가닥 특이적 DNase로 분해되는 DNA 서열이다. 일 태양에서, 단일-가닥 돌출부 또는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열은 단일-가닥 특이적 RNase로 분해되는 RNA 서열이다.

[0238] 일 태양에서, 비생산적 혼성화 복합체 내의 단일-가닥 돌출부 또는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열의 분해는 혼성화 복합체들이 용액 중에 있는 동안에(즉, 이들 혼성화 복합체들이 센스 프로브 또는 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그를 통해 지지 표면에 고정화되기 전에) 수행된다. 일 태양에서, 비생산적 혼성화 복합체 내의 단일-가닥 돌출부 또는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열의 분해는 혼성화 복합체들이 센스 프로브 또는 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그를 통해 지지 표면 상에 고정화된 후에 수행된다. 일 태양에서, 상기 방법은 단일-가닥 돌출부 또는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열이 단일-가닥 특이적 RNase로 분해된 후에 세척 단계를 포함한다. 일 태양에서, 상기 방법은 단일-가닥 돌출부 또는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 서열이 단일-가닥 특이적 RNase로 분해되고 지지 표면 상에 고정화된 후에 세척 단계를 포함한다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 지지 표면 상에 고정화된 표지의 존재에 기초하여 검출 또는 정량화된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥은 지지 표면 상에 고정화된 표지된 센스 복합체 또는 안티센스 복합체에 기초하여 검출 또는 정량화된다.

[0239] **I. 전극**

[0240] 일 태양에서, 올리고뉴클레오타이드 이중체의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 전기화학발광(ECL)을 사용하여 검출 또는 정량화된다. 전기화학발광을 사용하는 분석물의 다중화 측정은 미국 특허 제7,842,246호 및 제6,977,722호에 기재되어 있으며, 이들의 개시내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0241] 일 태양에서, 지지 표면은 하나 이상의 전극을 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 하나 이상의 작업 전극 및 하나 이상의 상대 전극을 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 전기화학 또는 전기화학발광 검정에 사용하기 위하여 하나 이상의 전극 상에 형성된 하나 이상의 결합 도메인을 포함한다.

[0242] 일 태양에서, 결합 도메인은 포획 올리고뉴클레오타이드로 코팅된 비드를 전극 표면 상에 수집함으로써 형성된다. 일 태양에서, 비드는 상자성이고, 비드는 자기장의 사용을 통해 전극 상에 수집된다.

[0243] 일 태양에서, 전극들은 검정 용기, 검정 유동 세포, 검정 유체, 또는 검정을 수행하는 데 유용한 다른 구성요소를 제공하는 검정 모듈 내에 제공된다. 전기화학발광 검정을 수행하기 위한 검정 모듈의 예에는, 예를 들어 멀티어레이 케이스, 검정 플레이트 케이스, 카트리지 케이스 등이 포함된다. 일 태양에서, 전극들은 검정 용기, 검정 유동 세포, 검정 유체, 또는 검정을 수행하는 데 유용한 다른 구성요소를 제공하는 검정 모듈 내에 제공된다. 전기화학발광 검정을 수행하기 위한 검정 모듈의 예는 미국 특허 제6,673,533호, 제7,842,246호, 제9,731,297호, 및 제8,298,834호에서 찾아볼 수 있다. 일 태양에서, 지지 표면은 적어도 하나의 전극을 포함하는 멀티-웰 플레이트이다. 일 태양에서, 멀티-웰 검정 플레이트의 각각의 웰은 적어도 하나의 전극을 포함한다. 일 태양에서, 멀티-웰 검정 플레이트의 적어도 하나의 웰은 작업 전극을 포함한다. 다른 태양에서, 멀티-웰 검정 플레이트의 각각의 웰은 작업 전극 및 상대 전극을 포함한다. 일 태양에서, 작업 전극은 상대 전극에 인접하지만, 그것과 전기적 접촉 상태에 있지 않다.

[0244] 일 태양에서, 전극은, 예를 들어 금속, 예컨대 금, 은, 백금, 니켈, 강, 이리듐, 구리, 알루미늄, 전도성 합금, 또는 이들의 조합을 포함한 전도성 재료로 구성된다. 다른 태양에서, 전극은 반도체성 재료, 예컨대 규소 및 게르마늄, 또는 반도체성 필름, 예컨대 인듐 주석 산화물(ITO) 및 안티몬 주석 산화물(ATO)을 포함한다. 다른 태양에서, 전극은 산화물 코팅된 금속, 예컨대 산화알루미늄 코팅된 알루미늄을 포함한다. 일 태양에서, 전극은 탄소계 재료를 포함한다. 일 태양에서, 전극은 전도성 복합체, 잉크, 페이스트, 중합체 블렌드, 및 금속/비

금속 복합체를 함유하는 재료들의 혼합물을 포함하며, 이에, 예를 들어 비전도성 재료와의 전도성 또는 반전도성 재료의 혼합물이 포함된다. 일 태양에서, 전극은 탄소계 재료, 예컨대 탄소, 유리질 탄소, 카본 블랙, 흑연질 탄소, 탄소 나노튜브, 탄소 피브릴, 흑연, 탄소 섬유 및 이들의 혼합물을 포함한다. 일 태양에서, 전극은 전도성 탄소-중합체 복합체, 전도성 중합체, 또는 매트릭스 중에 분산된 전도성 입자, 예를 들어 탄소 잉크, 탄소 페이스트, 또는 금속 잉크를 포함한다. 일 태양에서, 작업 전극은, 예를 들어, 매트릭스, 예를 들어 중합체 매트릭스, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트(EVA), 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 알코올, 아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌(ABS), 또는 이들 중합체 중 하나 이상의 공중합체 중에 분산된 전도성 탄소 입자, 예컨대 탄소 피브릴, 카본 블랙, 또는 흑연질 탄소를 포함하는 탄소-중합체 복합체로 제조된다.

[0245] 일 태양에서, 작업 전극은, 압출, 가압 또는 성형될 수 있는 하나 이상의 전도성 재료의 필름 또는 연속 전도성 시트로 제조된다. 다른 태양에서, 작업 전극은, 예를 들어 인쇄, 페인팅, 코팅, 스펀-코팅, 증발, 화학 증착, 전해 침착, 무전해 침착, 포토리소그래피 또는 다른 전자장치 미세가공 기법에 의해 기재 상에 침착되거나 패터닝된 전도성 재료로 제조된다. 일 태양에서, 작업 전극은, 예를 들어 잉크젯 인쇄, 레이저 인쇄, 또는 스크린-인쇄에 의해 중합체 지지체 상에 인쇄된 전도성 탄소 잉크를 포함한다. 탄소 잉크는 알려져 있으며, Acheson Colloids Co.(예를 들어, Acheson 440B, 423ss, PF407A, PF407C, PM-003A, 30D071, 435A, Electrodag 505SS, 및 Aquadag™), E. I. Du Pont de Nemours and Co.(예를 들어, Dupont 7105, 7101, 7102, 7103, 7144, 7082, 7861D, 및 CB050), Conductive Compounds Inc(예를 들어, C-100), 및 Ercon Inc.(예를 들어, G-451)에 의해 생산된 재료를 포함한다.

[0246] 일 태양에서, 작업 전극은 연속 필름이다. 다른 태양에서, 작업 전극은 하나 이상의 별개의 영역들, 또는 별개의 영역들의 패턴을 포함한다. 대안적으로, 작업 전극은 복수의 연결된 영역들을 포함할 수 있다. 작업 전극 상의 노출된 전극 표면의 하나 이상의 영역은, 예를 들어 작업 전극 위에 패터닝된 유전체 잉크 층을 스크린 인쇄함으로써, 또는 다이-절단 절연성 필름을 접착함으로써, 작업 전극을 덮는 패터닝된 절연층에 의해 한정될 수 있다. 노출된 영역은 작업 전극 상에 인쇄된 시약들의 어레이들의 어레이 요소들을 한정할 수 있고, 전술된 바와 같이 어레이 형상 및 패턴을 취할 수 있다. 일 태양에서, 절연층은 노출된 작업 전극 표면의 일련의 원형 영역(또는 "스폿")을 한정한다.

[0247] 상대 전극은 일반적으로 작업 전극에 대해 전술된 특성들 중 하나 이상을 가질 수 있다. 일 태양에서, 작업 전극과 상대 전극은 동일한 재료로 구성된다. 다른 태양에서, 작업 전극과 상대 전극은 동일한 재료로부터 구성되지 않으며, 예를 들어 작업 전극은 탄소 전극일 수 있고, 상대 전극은 금속 전극일 수 있다.

[0248] 일 태양에서, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드는 수동적 흡착에 의해 하나 이상의 전극 상에 고정화된다. 다른 태양에서, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드는 전극 상에 공유적으로 고정화된다. 일 태양에서, 전극은, 예를 들어 전극의 표면 상에 시약, 예컨대 포획 올리고뉴클레오티드를 고정화하기 위해 유도체화 또는 개질될 수 있다. 일 태양에서, 전극은 시약의 고정화를 개선하기 위해, 예를 들어 시약의 고정화를 위해 작용기를 도입시키기 위해 또는 이의 흡착 특성을 향상시키기 위해 화학적 또는 기계적 처리에 의해 개질된다. 도입될 수 있는 작용기의 예에는 카르복실산(COOH), 하이드록시(OH), 아미노(NH<sub>2</sub>), 활성화된 카르복실(예를 들어, N-하이드록시 석신이미드(NHS)-에스테르), 폴리-(에틸렌 글리콜), 티올, 알킬((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>) 기, 또는 이들의 조합이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일 태양에서, 하나 이상의 시약, 예를 들어 포획 올리고뉴클레오티드는 공유 수단 또는 비공유 수단 중 어느 하나에 의해 탄소-함유 전극, 예를 들어 다른 재료 중에 분산된 카본 블랙, 피브릴, 또는 탄소에 고정화된다. 티올 기를 갖는 포획 올리고뉴클레오티드는, 먼저 추가의 티올-반응성 층, 예컨대 단백질 층, 또는 화학적 가교결합 층을 침착시킬 필요 없이, 탄소-함유 전극에, 예를 들어 스크린-인쇄된 탄소 잉크 전극에 공유 결합할 수 있는 것으로 확인되었다. 일 태양에서, 티올 기를 갖는 포획 올리고뉴클레오티드, 예컨대 티올-변형된 올리고뉴클레오티드를 전극에 직접 부착하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 전극 상에 포획 표면 및 어레이를 형성하기 위한 간단하고 견고하고 효율적이고 재현가능한 공정을 제공한다. 일 태양에서, 먼저 전극에 티올-반응성 층을 추가하지 않고서, 티올과 전극의 반응을 통해, 티올 기를 갖는 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드를 탄소-함유 전극, 예컨대 스크린-인쇄된 탄소 잉크 전극 상에 직접 고정화한다.

[0249] 일 태양에서, 전극은, 예를 들어 시약, 예컨대 포획 올리고뉴클레오티드의 고정화를 돕기 위해, 또는 오염물을 감소시키거나, 다른 재료에 대한 접착력을 개선하거나, 표면의 습윤성을 변경시키거나, 재료의 침착을 촉진하거나, 패턴을 생성하거나, 균일성을 개선하기 위해, 전극의 물리적 특성, 화학 조성, 또는 표면-화학적 특성을 변경시키기 위하여 플라즈마, 예를 들어 저온 플라즈마, 예컨대 글로우-방전 플라즈마로 처리된다. 유용한 플라

즈마의 예에는 산소, 질소, 아르곤, 암모니아, 수소, 플루오로카본, 물 및 이들의 조합이 포함된다. 일 태양에서, 탄소-중합체 복합 재료 내의 탄소 입자로 전극을 처리하는 데 산소 플라즈마가 사용된다. 다른 태양에서, 시약들의 커플링을 촉진시키도록 카르복실산 또는 다른 산화된 탄소 작용기를 탄소 또는 유기 재료(예를 들어, 활성화된 에스테르 또는 아실 클로라이드) 내로 도입시키기 위해 산소가 사용된다. 다른 태양에서, 검정 시약을 커플링하는 데 사용하기 위한 아미노 기를 도입하는 데 암모니아-함유 플라즈마가 사용될 수 있다. 일 태양에서, 전극은 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드의 고정화를 돕기 위해 전처리되지 않는다.

[0250] 일 태양에서, 지지 표면은, 각각의 웰 내에 하나 이상의 작업 전극 또는 상대 전극을 갖는 멀티-웰 플레이트와 같은 검정 모듈을 포함한다. 일 태양에서, 멀티-웰 플레이트는 각각의 웰 내에 복수의 작업 전극들 또는 상대 전극들을 포함한다. 일 태양에서, 멀티-웰 플레이트의 작업 전극 또는 상대 전극은 탄소, 예를 들어 탄소 잉크의 스크린-인쇄된 층을 포함한다. 일 태양에서, 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드는 포획 올리고뉴클레오티드 상의 티올 모이티어를 통해 스크린-인쇄된 탄소 잉크 상에 고정화된다. 일 태양에서, 작업 전극은 ECL 표지로부터 ECL 신호를 유도하는 데 사용된다. 일 태양에서, ECL 신호는 공반응물질, 예컨대 3차 알킬 아민, 예를 들어 트라이프로필 아민 또는 부틸다이에탄올아민의 존재 하에서 루테늄-트리스-바이피리딘으로부터 방출된다.

[0251] 일 태양에서, 전극은 유전체 잉크(즉, 전기 절연성 잉크)에 의해 한정된, 전술된 바와 같은 결합 도메인들을 포함한다. 전극은, 전술된 결합 도메인들을 한정하는 패턴으로 유전체가 위에 인쇄된 작업 전극이다. 일 태양에서, 결합 도메인들은 노출된 작업 전극의 대략적으로 원형인 영역(또는 "스폿")들이다. 전극은 사출 성형된 96 웰 플레이트 상부를 웰의 바닥을 한정하는 Mylar 시트에 접착함으로써 형성된 96웰 플레이트 내에 있다. Mylar 시트의 상부 표면에는, 스크린 인쇄된 탄소 잉크 전극이 상부에 인쇄되어 있으며, 이로써 각각의 웰은 웰의 대략적으로 중심에 탄소 잉크 작업 전극을 포함하고, 대략적으로 웰의 2개의 에지를 향하는 2개의 탄소 잉크 상대 전극을 포함하게 된다. 전도성 스루홀(through-hole)을 통해 Mylar 시트의 상부에 연결된, 시트의 바닥 상에 인쇄된 전극들은 작업 전극 및 상대 전극에 전압을 인가하기 위한 접점을 제공한다.

[0252] **J. 검출**

[0253] 일 태양에서, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 서열의 존재는 지지 표면 상에 고정화된 표지의 검출에 기초하여 검출 또는 정량화된다. 일 태양에서, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 서열의 존재는 지지 표면 상에 고정화된 혼성화 복합체 상의 표지의 검출에 기초하여 검출 또는 정량화된다. 일 태양에서, 하나 이상의 표적 올리고뉴클레오티드 서열의 존재는 지지 표면 상에 고정화된 센스 복합체 상의 표지의 검출에 기초하여 검출 또는 정량화된다. 일 태양에서, 하나 이상의 표적 올리고뉴클레오티드 서열의 존재는 지지 표면 상에 고정화된 안티센스 복합체 상의 표지의 검출에 기초하여 검출 또는 정량화된다. 일 태양에서, 올리고뉴클레오티드 서열이 여러에서 검출 또는 정량화된다.

[0254] 일 태양에서, 혼성화 복합체, 예를 들어 안티센스 복합체 또는 센스 복합체의 존재는 표지로부터의 발광을 모니터링함으로써 검출되며, 이러한 발광에는 형광, 시간-분해 형광, 형광 공명 에너지 전달(FRET), 형광 편광(FP), 발광, 화학발광, 생물발광, 인광, 광 산란 또는 전극 유도 발광이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 다른 태양에서, 표지는 측정가능한 신호, 예컨대 광 산란, 흡광, 형광 등으로 이어지는 화학적 활성을 갖는 효소 또는 다른 화학적으로 반응성인 종을 포함한다. 효소 표지의 예에는 서양고추냉이 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일 태양에서, 표지는 검출가능한 합텐이며, 이에 비오틴, 플루오레세인 또는 디곡시게닌이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일 태양에서, 표지는 비오틴을 포함한다.

[0255] 일 태양에서, 혼성화 복합체, 예를 들어 안티센스 복합체 또는 센스 복합체는 지지 표면 상에 위치한 하나 이상의 결합 도메인 상에 고정화된다. 일 태양에서, 하나 이상의 결합 도메인이 하나 이상의 전극 상에 위치하고, 검출 또는 정량화하는 단계는 전압 파형을 하나 이상의 전극에 인가하여, 포획된 반응 생성물 상의 표지를 자극하여 전기화학 또는 발광 신호를 생성하는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 검출 또는 정량화하는 단계는 ECL 신호를 측정하는 단계, 및 상기 신호를 샘플 내의 센스 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 존재 또는 양과 상관시키는 단계를 포함한다. 일 태양에서, 방출된 광의 강도는 샘플 내의 센스 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 양에 비례하며, 이로써 방출된 광은 샘플 내의 센스 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 양의 정량적 결정을 제공할 수 있게 된다.

[0256] 일 태양에서, 지지 표면은 혼성화 복합체들이 상부에 고정화된 후에 검출 혼합물과 접촉된다. 일 태양에서, 지지 표면은 센스 복합체 또는 안티센스 복합체가 상부에 고정화된 후에 검출 혼합물과 접촉된다. 일 태양에서, 지지 표면은 임의의 비생산적 혼성화 복합체 내의 단일-가닥 돌출부를 단일-가닥 뉴클레아제로 분해한 후에 검

출 혼합물과 접촉된다. 일 태양에서, 비생산적 혼성화 복합체 내의 단일-가닥 돌출부의 분해는 혼성화 복합체들이 용액 중에 있는 동안에(즉, 이들 혼성화 복합체들이 센스 프로브 또는 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그를 통해 지지 표면에 고정화되기 전에) 수행된다. 일 태양에서, 비생산적 혼성화 복합체 내의 단일-가닥 돌출부의 분해는 혼성화 복합체들이 센스 프로브 또는 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오티드 태그를 통해 지지 표면 상에 고정화된 후에 수행된다. 일 태양에서, 검출 혼합물은 ECL 표지를 포함한다. ECL 표지의 예에는 i) 금속이, 예를 들어 VIII족의 귀금속으로부터 유래되는 유기금속 화합물 - Ru-함유 및 Os-함유 유기금속 화합물, 예컨대 트리스-바이피리딜-루테늄(RuBpy) 모이어티를 포함함 -, 및 ii) 루미놀 및 관련 화합물이 포함된다. 일 태양에서, 검출 혼합물은 또한 하나 이상의 전기화학발광 공반응물질, 및 하나 이상의 추가의 성분, 예컨대 pH 완충제, 세제, 방부제, 소포제(anti-foaming agent), 염, 금속 이온 또는 금속 킬레이화제를 포함한다. 용어 "전기화학발광 공반응물질"은 전기화학발광 표지와 함께 참여하는 종을 지칭하며, 이는 RuBpy의 경우 3차 아민, 예컨대 트라이프로필아민(TPA), 옥살레이트 이온, 아스코르브산 및 퍼셀페이트, 및 루미놀의 경우 과산화수소가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 전기화학발광을 측정하는 방법은 알려져 있으며, 측정을 수행하기 위한 기기는 구매가능하다. 예를 들어, 전기화학발광을 사용하는 분석물의 다중화 측정은 Meso Scale Diagnostics, LLC, MULTI-ARRAY® 및 SECTOR® Imager 라인 또는 제품에서 사용된다(예를 들어, 미국 특허 제 7,842,246호 및 제6,977,722호를 참조하며, 이들의 개시내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨).

[0257] 일 태양에서, 비오틴이 혼성화 복합체에 공유적으로 부착되고, 검출 혼합물은 아비딘 모이어티를 통해 고정화된 혼성화 복합체에 결합하는 스트렙타비딘-접합된 표지를 포함한다. 일 태양에서, 스트렙타비딘-접합된 표지는 전기화학발광(ECL) 표지이다. 일 태양에서, 전기화학발광 표지는 n-하이드록시석신아미드 에스테르, 예컨대 Sulfo-TAG NHS-에스테르(Meso Scale Diagnostics, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)이다.

[0258] **K. 키트**

[0259] 일 태양에서, 본 명세서에 기재된 방법을 수행하기 위한 키트가 제공된다. "키트"는, 예를 들어 조성물을 생성하거나, 디바이스를 제조하거나, 방법을 수행하기 위해, 함께 사용되도록 제공되거나 모아놓은 구성요소들의 세트 지칭한다. 키트는 하나 이상의 구성요소를 포함할 수 있다. 키트의 구성요소들은 하나의 패키지로 제공되거나 다수의 패키지로 제공될 수 있으며, 이들 각각은 구성요소들 중 하나 이상을 수용할 수 있다. 키트의 열거된 구성요소는 결국 단일 물리적 부품으로서 제공되거나, 키트 사용을 위해 조합되도록 다수의 부품으로서 제공될 수 있다. 예를 들어, 키트의 기기 구성요소가 완전 조립된 상태로 제공될 수 있거나, 사용 전에 조립되도록 다수의 기기 부품으로서 제공될 수 있다. 유사하게, 키트의 액체 시약 성분은 용기 내에 완전한 액체 제형으로서 제공되거나; 조합되어 완전 액체 제형을 제공하도록 하나 이상의 건조 시약 및 하나 이상의 액체 희석제로서 제공되거나; 또는 조합되어 완전 액체 제형을 제공하도록 2개 이상의 액체 용액으로서 제공될 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, 검정을 위한 키트 구성요소들은 상이한 저장 요구, 예를 들어 4°C vs. -70°C의 저장 온도를 갖기 때문에 종종 개별적으로 운송 및 저장된다.

[0260] 일 태양에서, 키트는 지지 표면을 포함한다. 일 태양에서, 키트는 지지 표면 상에 고정화될 수 있는 포획 올리고뉴클레오티드들을 포함한다. 일 태양에서, 키트는 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오티드들을 포함한다. 일 태양에서, 키트는 어레이 형태로 지지 표면 상에 고정화된 포획 올리고뉴클레오티드들을 포함한다. 일 태양에서, 키트는 어레이 내에 기지의 위치를 갖는 하나 이상의 별개의 결합 도메인에 고정화된 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일 태양에서, 키트는 비드 어레이 상에 고정화된 2개 이상의 포획 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0261] 일 태양에서, 키트는 탄소계 지지 표면을 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 적어도 하나의 전극을 포함한다. 일 태양에서, 전극은 탄소계 전극이다. 일 태양에서, 지지 표면은 하나 이상의 탄소 잉크 전극을 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 적어도 하나의 작업 전극 및 적어도 하나의 상대 전극을 포함한다.

[0262] 일 태양에서, 키트는 멀티-웰 검정 플레이트를 포함하는 지지 표면을 포함한다. 일 태양에서, 멀티-웰 플레이트의 하나 이상의 웰은 하나 이상의 전극을 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은, 하나 이상의 웰이 하나 이상의 작업 전극 및 하나 이상의 상대 전극을 포함하는 멀티-웰 플레이트를 포함한다. 일 태양에서, 지지 표면은 하나 이상의 기준 전극을 포함한다.

[0263] 일 태양에서, 키트는 표준 형식 멀티-웰 플레이트를 포함하며, 이는 당업계에 알려져 있고, 24웰, 96웰 및 384 웰 플레이트를 포함할 수 있지만 이로 한정되지 않는다. 일 태양에서, 키트는 하나 이상의 96웰 플레이트를 포함한다. 일 태양에서, 키트는 하나의 멀티-웰 플레이트를 포함한다. 다른 태양에서, 키트는 10개의 멀티-웰 플레이트를 포함한다. 다른 태양에서, 키트는 10개 및 100개의 멀티-웰 플레이트를 포함한다.

- [0264] 일 태양에서, 키트는, 하나 이상의 전극 상에 포획 올리고뉴클레오타이드들의 하나 이상의 어레이가 인쇄된 지지 표면을 포함한다. 일 태양에서, 키트는, 포획 올리고뉴클레오타이드들의 하나 이상의 어레이가 상부에 인쇄된 하나 이상의 멀티-웰 플레이트를 포함한다. 다른 태양에서, 키트는 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 바이알 및 하나 이상의 멀티-웰 플레이트를 포함하며, 여기서 포획 올리고뉴클레오타이드들은 멀티-웰 플레이트 상에 인쇄될 수 있다.
- [0265] 일 태양에서, 키트는 지지 표면 상의 하나 이상의 결합 도메인에 고정화된 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 태양에서, 키트는 멀티-웰 플레이트의 웰 내의 하나 이상의 결합 도메인 상에 고정화된 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 태양에서, 키트는 전극 상의 하나 이상의 결합 도메인 상에 고정화된 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 태양에서, 키트는 멀티-웰 플레이트의 하나 이상의 웰 내의 전극 상의 하나 이상의 결합 도메인 상에 고정화된 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0266] 다른 태양에서, 키트는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함한다. 일 태양에서, 키트는 용기 내에 제공된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함하며, 여기서 용기 내의 올리고뉴클레오타이드 태그들은 동일한 서열을 가지며, 각각의 용기는 나머지 다른 용기들 내의 올리고뉴클레오타이드 태그들의 서열과 상이한(그리고 그것에 상보적이지 않은) 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 태그들을 함유한다. 일 태양에서, 키트는 별개의 용기들 내에 적어도 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24 또는 약 25개 및 최대 약 64개의 특유의 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함한다. 일 태양에서, 키트는 최대 10개의 특유의 올리고뉴클레오타이드 태그의 세트를 포함한다.
- [0267] 일 태양에서, 키트는 최대 10개의 포획 올리고뉴클레오타이드가 멀티-웰 플레이트의 웰 내의 하나 이상의 결합 도메인에 고정화된 하나 이상의 멀티-웰 플레이트를 포함하며, 여기서 각각의 결합 도메인은 웰 내의 나머지 다른 결합 도메인들 내의 포획 올리고뉴클레오타이드의 서열과 상이한 서열을 갖는 포획 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일 태양에서, 키트는 적어도 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 15, 약 20, 또는 약 25개의 특유의 결합 도메인 내에 고정화된 적어도 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 15, 약 20, 또는 약 25개의 별개의 포획 올리고뉴클레오타이드를 갖는 지지 표면을 포함한다. 일 태양에서, 키트는 하나 이상의 웰 내의 적어도 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 15, 약 20, 또는 약 25개의 특유의 결합 도메인 내에 고정화된 적어도 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 15, 약 20, 또는 약 25개의 별개의 포획 올리고뉴클레오타이드를 갖는 멀티-웰 플레이트를 포함한다. 일 태양에서, 키트는, 각각의 웰이, 어레이 형태로 고정화된 최대 약 10개의 포획 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 멀티-웰 플레이트를 포함한다. 일 태양에서, 멀티-웰 플레이트는 멀티-웰 플레이트의 각각의 웰 내에 약 1 내지 약 10개의 검출 검정을 생성하도록 구성될 수 있다.
- [0268] 일 태양에서, 키트는 단일-가닥 뉴클레아제를 포함한다. 일 태양에서, 키트는 용기 내에 제공된 단일-가닥 뉴클레아제 태그를 포함한다. 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 뉴클레아제는 단일-가닥 특이적 DNase를 포함한다. 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 DNase는 S1 뉴클레아제, P1 뉴클레아제 또는 녹두 뉴클레아제이다. 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 뉴클레아제는 단일-가닥 특이적 RNase를 포함한다. 일 태양에서, 단일-가닥 특이적 DNase는 RNase A, RNase H, RNase I, RNase III, RNase L, RNase P, RNase PhyM, RNase T1, RNase T2, RNase U2, RNase V, PNPase, RNase PH, RNase R, RNase D, RNase T, RNaseONE, 올리고리보뉴클레아제, 엑소리보뉴클레아제 I, 또는 엑소리보뉴클레아제 II이다.
- [0269] 일 태양에서, 샘플에서 하나 이상의 표적 뉴클레오타이드를 검출 또는 정량화하기 위해 발광 검정, 예를 들어 전기화학발광 검정을 수행하기 위한 키트가 제공된다. 일 태양에서, 키트는 전기화학발광 검정을 수행하는 데 유용한 하나 이상의 검정 성분을 포함한다.
- [0270] 일 태양에서, 키트는 상응하는 상보적 포획 올리고뉴클레오타이드 서열에 대한 올리고뉴클레오타이드 태그의 혼성화에 적절한 조건(예를 들어, 엄격한 조건)을 제공하는 데 사용될 수 있는 혼성화 완충액을 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 완충액은 회석제 54(Meso Scale Diagnostics, LLC, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 포함한다. 일 태양에서, 혼성화 완충액은 혼성화 완충액 1 또는 혼성화 완충액 2(Meso Scale Diagnostics, LLC, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 포함한다.
- [0271] 일 태양에서, 키트는 표지를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 일 태양에서, 표지는 방사성, 형광, 화학 발광, 전기화학발광, 광 흡수, 광 산란, 전기화학, 자기 및 효소 표지로부터 선택된다. 일 태양에서, 표지는

전기화학발광 표지를 포함한다. 일 태양에서, 표지는 전이 금속을 포함하는 유기금속 착물을 포함한다. 일 태양에서, 전이 금속은 루테튬을 포함한다. 일 태양에서, 표지는 MSD SULFO-TAG™ 표지(Meso Scale Diagnostics, LLC, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)이다.

[0272] 일 태양에서, 표지는 2차 결합 시약의 결합 파트너인 1차 결합 시약을 포함한다. 일 태양에서, 2차 결합 시약은 비오틴, 스트렙타비딘, 아비딘, 또는 항체를 포함한다. 일 태양에서, 2차 결합 시약은 아비딘, 스트렙타비딘 또는 항체를 포함한다. 일 태양에서, 표지는 비오틴, 플루오레세인 및 디곡시게닌으로부터 선택되는 합텐을 포함한다. 일 태양에서, 표지는 제1 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 1차 결합제이고, 2차 결합 시약은 1차 결합제의 제1 올리고뉴클레오티드 서열에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0273] 일 태양에서, 키트는 전기화학발광 표지를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 더 특정한 태양에서, 키트는 Ru-함유 또는 Os-함유 유기금속 화합물, 예컨대 트리스-바이피리딜-루테튬(RuBpy)이 들어 있는 하나 이상의 용기를 포함한다. 일 태양에서, 표지는 전이 금속을 포함하는 유기금속 착물을 포함한다. 일 태양에서, 전이 금속은 루테튬을 포함한다. 일 태양에서, 표지는 MSD SULFO-TAG™ 표지(Meso Scale Diagnostics, LLC, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 포함한다. 다른 태양에서, 키트는 루미놀 또는 다른 관련 화합물이 들어 있는 하나 이상의 용기를 포함한다.

[0274] 일 태양에서, 키트는 하나 이상의 전기화학발광 공반응물질을 갖는 하나 이상의 용기를 포함한다. 일 태양에서, 하나 이상의 전기화학발광 공반응물질은 지지 표면 상에 공유적으로 또는 비공유적으로 고정화된다. 일 태양에서, 하나 이상의 전기화학발광 공반응물질은 지지 표면의 하나 이상의 작업 전극 상에 고정화된다.

[0275] 일 태양에서, 키트 내에 포함된 표지는 1차 결합 시약 및 2차 결합 시약을 포함한다. 일 태양에서, 2차 결합 시약은 비오틴, 스트렙타비딘, 아비딘, 또는 항체를 포함한다.

[0276] 일 태양에서, 키트는 하기의 검정 성분들 중 하나 이상을 포함한다: 하나 이상의 포획 올리고뉴클레오티드; 및 하나 이상의 완충액, 예를 들어 세척 완충액, 혼성화 완충액, 결합 완충액, 또는 판독 완충액.

[0277] 일 태양에서, 키트는 하나 이상의 검정 성분, 예컨대 표지를 포함한다. 일 태양에서, 표지는 발광 표지, 예컨대 전기화학발광 표지이다. 일 태양에서, 키트는 적어도 하나의 전기화학발광 공반응물질을 포함한다. 일 태양에서, 전기화학발광 공반응물질은 3차 아민, 트라이프로필아민, 또는 N-부틸다이에탄올아민을 포함한다.

[0278] 일 태양에서, 키트는 하나 이상의 다른 검정 성분을 포함한다. 일 태양에서, 키트는 희석제, 차단제, 안정제, 세제, 염, pH 완충액, 및 방부제를 포함하지만 이로 한정되지 않는 하나 이상의 검정을 포함한다. 일 태양에서, 키트는 하나 이상의 그러한 성분들의 용기를 포함한다. 다른 태양에서, 키트와 함께 제공된 검정 지지 표면 상에 하나 이상의 시약이 포함된다.

[0279] **L.참고문헌의 인용**

[0280] 특허, 특허 출원, 논문, 교재 등을 포함한 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌, 및 그 안에 인용된 참고문헌은, 이들이 이미 그렇지 않는 한에 있어서, 모든 목적을 위해 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0281] **실시예**

[0282] **실시예 1. 전장 프로브의 사용에 대한 RNase 보호 검정(RPA) 검출 하한치(LLOD)**

[0283] 모델 16량체 이중이중체 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)(한쪽은 DNA 가닥이고 한쪽은 RNA 가닥이며; 양쪽 가닥은 변형됨)의 센스(SS) 가닥 및 안티센스(AS) 가닥에 대한 검출 한계치를 RNase 보호 검정(RPA)을 사용하여 반대쪽 가닥의 부재 하에서 결정하였다.

[0284] 핵산-기반 치료용 분자에 상보적인 서열을 갖는 RNA 가닥 및 포획 올리고뉴클레오티드에 상보적인 서열을 갖는 DNA 가닥을 함유하는 키메라 전장 안티센스 프로브를 생성하였으며, 이는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 전장(16량체) 안티센스 결합 부분 및 비오틴 표지를 포함하였다. 핵산-기반 치료용 분자에 상보적인 서열을 갖는 RNA 가닥 및 포획 올리고뉴클레오티드에 상보적인 서열을 갖는 DNA 가닥을 함유하는 키메라 전장 센스 프로브를 생성하였으며, 이는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 전장(16량체) 센스 결합 부분 및 비오틴 표지를 포함하였다.

[0285] 간략하게 말하면, 개별 안티센스(AS) 가닥 또는 센스(SS) 가닥(10 mg/mL)을 200 µg/mL가 되도록 희석시키고, 표 1에 나타낸 바와 같이 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로

ASO를 희석제 54 내로 스파이킹함으로써 개별 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 대한 10점 보정 곡선을 생성하였다.

[0286] [표 1]

보정 곡선

보정물	농도 (pg/mL)
Cal-1	40000
Cal-2	10000
Cal-3	2500
Cal-4	625
Cal-5	156
Cal-6	39.1
Cal-7	9.77
Cal-8	2.44
Cal-9	0.610
Cal-10	0.153
블랭크	0
블랭크	0

[0287]

[0288] 양성 신호 및 백그라운드에 대한 영향을 평가하기 위해 전장 프로브의 2개의 농도를 사용하였다: 50 pM 또는 200 pM(4X). 키메라 프로브를 표 2에 나타낸 혼성화 프로토콜을 사용하여 희석제 54(Meso Scale Diagnostics, 미국 메릴랜드주 록빌 소재) 중에서 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하였다:

[0289] [표 2]

혼성화 프로토콜

단계	온도	시간	
1	80°C	2 분	
2	65°C	5 분	이어서, 매 5 분 동안마다 1°C씩 50°C까지 감소시킴.
3	37°C	유지	37°C에서 30 분, 진탕

[0290]

[0291] (키메라 센스 프로브 및 안티센스 프로브의 올리고뉴클레오타이드 태그 서열에 상보적인 서열을 갖는) 단일-가닥 포획 올리고뉴클레오타이드가 상부에 고정화된 96웰 N-PLEX<sup>®</sup> 플레이트(Meso Scale Discovery, 미국 메릴랜드주 록빌 소재 ("MSD"))를 N-PLEX<sup>™</sup> 차단 완충액(MSD)으로 차단하고, 최소 150 μL/웰의 둘베코 인산염 완충 식염수 (DPBS)로 3회 세척하였다. 프로브들을 그들의 표적 가닥에 혼성화한 후에, 프로브/분석물 복합체를 완충액 중에 희석시키고, 플레이트에 첨가하고, 진탕하면서 37°C에서 1시간 동안 혼성화되게 하였다. 다음과 같은 2개의 상이한 완충액을 사용하여 플레이트에 대한 혼성화에 미치는 영향을 결정하였다: 희석제 54, 또는 2:3 비의 NPLEX<sup>™</sup> 혼성화 완충액 1 및 2(MSD)의 블렌드.

[0292] 플레이트를 다시 세척하고(최소 150 μL/웰의 DPBS로 3회), 희석제 54 중의 RNase 콕테일(RNase A, RNase I, 및 RNase T1)을 플레이트에 첨가하고, 진탕하면서 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0293] 플레이트를 다시 세척하고, SULFO-TAG<sup>™</sup> 스트렙타비딘(MSD)을 희석제 54 + 1% 차단제(Blocker) A(MSD) 중의 플레이트에 첨가하고, 진탕하면서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, MSD GOLD<sup>™</sup> 관독 완충액 A(MSD)를 첨가하고, SECTOR<sup>®</sup> S6000 또는 MESO<sup>®</sup> SECTOR<sup>®</sup> S600 이미저(MSD)를 사용하여 플레이트를 관독 하였다.

[0294] 안티센스 가닥 및 프로브에 대한 ECL 신호는 표 3에 제시되어 있고, 센스 가닥 및 프로브에 대해서는 표 4에 제시되어 있다. 안티센스(DNA) 가닥에 대한 프로브는 희석제 54 중에서 그리고 혼성화 완충액 블렌드 중에서 센스(RNA) 가닥에 대한 프로브보다 더 높은 ECL 관독치를 가졌다. 프로브의 양의 증가는 양성 신호 및 음성 신호를 증가시켰으며, 이때 신호 포화는 약 10,000 pg/mL(10 ng/mL)였다.

[0295] 도 5a 및 도 5b는 안티센스(AS) 가닥 희석제 54 플레이트 혼성화(도 5a) 및 블렌딩된 혼성화 완충액 플레이트 혼성화(도 5b)에 대한 그리고 센스(SS) 희석제 54 플레이트 혼성화(도 6a) 및 블렌딩된 혼성화 완충액 플레이트 혼성화(도 6b)에 대한 ECL 신호 곡선을 나타낸다.

[0296] 표 5 및 표 6은 안티센스(AS) 프로브와 가닥, 및 센스(SS) 프로브와 가닥 각각에 대한 검출 하한치(LLOD)를 보여준다.

[0297] 이들 결과는 두 검정 모두가 우수한 결과를 제공함을 입증하지만, 안티센스 프로브가 센스 프로브보다 더 높은 ECL 신호 및 더 낮은 LLOD를 가지며, 백그라운드는 센스 프로브에 대해 더 높은 경향이 있다. 희석제 54와 혼성화 완충액 블렌드에 대한 결과는 유사하였다.

[0298] [표 3]

ECL 신호 - 안티센스(AS) 프로브와 가닥

보정물	농도 (pg/mL)	1x 프로브 / 희석제 54	1x 프로브 / 혼성화 완충액	4x 프로브 / 희석제 54	4x 프로브 / 혼성화 완충액
Cal-1	40000	131701	105904	396886	370824
Cal-2	10000	130806	93823	384167	332165
Cal-3	2500	118400	70690	329414	232325
Cal-4	625	53291	31619	122887	82766
Cal-5	156	15306	9263	35245	23374
Cal-6	39.1	4548	2652	10220	6558
Cal-7	9.77	1259	817	2781	2054
Cal-8	2.44	456	395	1072	1006
Cal-9	0.610	282	278	693	749
Cal-10	0.153	240	260	613	733
블랭크	0	247	261	600	720

[0299]

[0300] [표 4]

ECL 신호 - 센스(SS) 프로브와 가닥

보정물	농도 (pg/mL)	1x 프로브 / 희석제 54	1x 프로브 / 혼성화 완충액	4x 프로브 / 희석제 54	4x 프로브 / 혼성화 완충액
Cal-1	40000	16178	20896	111291	143937
Cal-2	10000	23008	26874	108890	145697
Cal-3	2500	23328	28933	57900	114503
Cal-4	625	6981	14050	10419	17989
Cal-5	156	1651	3011	2664	3127
Cal-6	39.1	661	866	1405	1199
Cal-7	9.77	425	371	1137	903
Cal-8	2.44	358	294	1010	811
Cal-9	0.610	306	247	989	750
Cal-10	0.153	329	288	955	838
블랭크	0	362	297	1015	813

[0301]

[0302] [표 5]

안티센스(AS) 프로브와 가닥의 검출 하한치(LLOD)

	1x 프로브 / 희석제 54	1x 프로브 / 혼성화 완충액	4x 프로브 / 희석제 54	4x 프로브 / 혼성화 완충액
힐 기울기	1.06	1.04	1.06	1.06
r <sup>2</sup> 값	0.990	1.00	0.989	0.998
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	0.88	1.41	0.42	0.65

[0303]

[0304] [표 6]

센스(SS) 프로브와 가닥의 검출 하한치(LLOD)

	1x 프로브 / 희석제 54	1x 프로브 / 혼성화 완충액	4x 프로브 / 희석제 54	4x 프로브 / 혼성화 완충액
힐 기울기	1.40	1.42	1.46	1.67
r <sup>2</sup> 값	0.921	0.940	0.993	0.984
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	17.9	10.3	19.6	26.6

[0305]

[0306] **실시에 2. 단축된 프로브의 혼성화**

[0307] 단축된 프로브(12량체, 11량체, 및 10량체)가 반대쪽 가닥의 부재 하에서 실시예 1로부터의 모델 16 뉴클레오티드 이중이중체 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)의 센스(SS) 가닥 및 안티센스(AS) 가닥에 혼성화될 수 있는 능력을 RNase 보호 검정(RPA)에서 평가하였다. 프로브는 3' 단부에서 단축되었다.

[0308] 간략하게 말하면, 10점 보정 곡선(+ 2개의 블랭크 웰)을 4배 연속 희석물 및 40,000 pg/mL의 최고 보정물에 의해 ASO로부터의 개별 안티센스(AS) 가닥 또는 센스(SS) 가닥을 사용하여 생성하였다.

[0309] 200 pM 프로브 농도를 사용하여, 상기 실시예 1에 기재된 방법에 따른 검출을 위해 4개의 상이한 프로브 길이를 평가하였다: 전장(FL), 12량체, 11량체 및 10량체 프로브. 프로브를 희석제 54에서 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하고, 희석제 54 또는 혼성화 완충액 1 중 어느 하나에서 플레이트에 혼성화하였다. 보정 곡선을 2개의 반복 웰에서보다는 단회로 희석제 54 또는 혼성화 완충액 1 사이에서 분할하였다.

[0310] 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 안티센스 결합 부분(전장 16량체(FL), 12량체, 11량체 또는 10량체), 및 비오틴 표지를 포함한 4개의 키메라 안티센스(AS) 프로브를 생성하였다.

[0311] 단일-가닥 올리고뉴클레오티드 태그, 센스 결합 부분(전장 16량체(FL), 12량체, 11량체 또는 10량체), 및 비오틴 표지를 포함한 4개의 키메라 센스(AS) 프로브를 생성하였다.

[0312] 표 7 및 표 8은 각각 희석제 54 또는 혼성화 완충액에서 혼성화된 안티센스 프로브와 가닥에 대한 ECL 신호를 나타낸다. 표 9 및 표 10은 각각 희석제 54 또는 혼성화 완충액에서 혼성화된 센스 프로브와 가닥에 대한 ECL 신호를 나타낸다. 표 7 내지 표 10으로부터의 데이터가 도 7a 및 도 7b에 그래프로 나타나 있다.

[0313] 표 11은 희석제 54 및 혼성화 완충액에서 16량체(FL) 프로브 및 12량체 프로브에 대한 안티센스(AS) 프로브와 가닥에 대한 검출 하한치(LLOD)를 나타낸다. 표 12 및 표 13은 각각 희석제 54 및 혼성화 완충액에서 16량체(FL), 12량체, 11량체 및 10량체 프로브에 대한 센스(SS) 프로브와 가닥에 대한 LLOD를 나타낸다.

[0314] 이 데이터는 혼성화 완충액에 의한 혼성화가 희석제 54와 비교하여 안티센스(AS) 가닥에 대해 12량체 프로브에서 신호의 손실을 가져옴을 나타낸다. 안티센스 가닥의 경우, 프로브를 단축시키는 것은 ECL 신호 및 LLOD<sub>est</sub>에 부정적인 영향을 미친다. 센스 가닥의 경우, 프로브를 단축시키는 것은 ECL 신호 및 LLOD<sub>est</sub>에 최소한의 영향을 미친다. 혼성화 완충액의 유형은 검정에 영향을 미치지 않았다.

[0315] [표 7]

희석제 54 혼성화 - 안티센스(AS) 프로브와 가닥

보정물	농도 (pg/mL)	FL 프로브	12량체 프로브	11량체 프로브	10량체 프로브
Cal-1	40000	345329	54562	1016	844
Cal-2	10000	477705	29524	905	764
Cal-3	2500	414430	5049	870	809
Cal-4	625	203586	1103	861	770
Cal-5	156	50989	749	866	781
Cal-6	39.1	8054	787	904	775
Cal-7	9.77	3574	786	864	822
Cal-8	2.44	1411	757	887	798
Cal-9	0.610	827	777	915	869
Cal-10	0.153	755	759	882	811
블랭크	0	705	784	862	894

[0316]

[0317] [표 8]

혼성화 완충액 - 안티센스(AS) 프로브와 가닥

보정물	농도 (pg/mL)	FL 프로브	12 량체 프로브	11 량체 프로브	10 량체 프로브
Cal-1	40000	230756	5368	1164	1031
Cal-2	10000	360035	1206	1114	764
Cal-3	2500	297142	1004	1112	997
Cal-4	625	115269	1018	902	921
Cal-5	156	33152	908	1128	1031
Cal-6	39.1	11240	1058	1214	986
Cal-7	9.77	3077	1063	1144	1014
Cal-8	2.44	1365	994	1087	848
Cal-9	0.610	906	927	1125	987
Cal-10	0.153	915	980	1073	965
블랭크	0	976	1131	1164	1080

[0318]

[0319] [표 9]

희석제 54 혼성화 - 센스(SS) 프로브와 가닥

보정물	농도 (pg/mL)	FL 프로브	12 량체 프로브	11 량체 프로브	10 량체 프로브
Cal-1	40000	104668	96844	79642	128029
Cal-2	10000	98109	103383	82916	133309
Cal-3	2500	76763	58215	47668	59987
Cal-4	625	15942	14514	11904	14247
Cal-5	156	3513	4357	4374	4180
Cal-6	39.1	1440	2283	2474	1472
Cal-7	9.77	1150	1782	2305	996
Cal-8	2.44	1083	1787	2044	994
Cal-9	0.610	1029	1563	2078	893
Cal-10	0.153	1025	1567	2066	926
블랭크	0	1043	1643	2105	911

[0320]

[0321] [표 10]

혼성화 완충액 - 센스(SS) 프로브와 가닥

보정물	농도 (pg/mL)	FL 프로브	12 량체 프로브	11 량체 프로브	10 량체 프로브
Cal-1	40000	138021	229349	129664	88682
Cal-2	10000	120157	188366	89150	30794
Cal-3	2500	137402	113197	52769	16766
Cal-4	625	26606	29127	12014	2849
Cal-5	156	4034	7469	3986	1169
Cal-6	39.1	1386	2670	2540	1031
Cal-7	9.77	1030	1863	1786	787
Cal-8	2.44	969	1603	1556	685
Cal-9	0.610	779	1285	1388	754
Cal-10	0.153	897	1615	1715	817
블랭크	0	921	1545	1851	789

[0322]

[0323] [표 11]

안티센스 프로브와 가닥

	희석제 54		혼성화 완충액	
	FL 프로브	12 량체 프로브	FL 프로브	12 량체 프로브
힐 기울기	1.25	1.86	1.092	2.83
r <sup>2</sup> 값	0.957	1.00	0.923	0.998
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	1.07	273.8	0.47	9077

[0324]

[0325] [표 12]

센스 프로브와 가닥(희석제 54)

	FL 프로브	12 량체 프로브	11 량체 프로브	10 량체 프로브
힐 기울기	1.51	1.32	1.36	1.24
r <sup>2</sup> 값	0.991	0.987	0.991	0.982
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	23.1	23.6	32.5	8.02

[0326]

[0327] [표 13]

센스 프로브와 가닥(혼성화 완충액)

	FL 프로브	12 량체 프로브	11 량체 프로브	10 량체 프로브
힐 기울기	1.70	1.22	1.16	1.09
r <sup>2</sup> 값	0.960	0.998	0.993	0.989
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	19.2	11.8	18.3	31.7

[0328]

[0329] **실시예 3. 안티센스 가닥 및 센스 가닥의 이중이중체 검출**

[0330] 실시예 1로부터의 모델 ASO의 안티센스(AS) 가닥 및 센스(SS) 가닥의 검출 한계치를, 실시예 2로부터의 전장(16 량체) 또는 12량체 단축된 키메라 프로브를 사용하여 RNase 보호 검정(RPA)에 대해 결정하였다.

[0331] 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 개별 AS 가닥, SS 가닥, 또는 이중이중체 가닥을 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다.

[0332] 200 pM의 농도로 다음과 같은 2개의 상이한 프로브 길이를 평가하였다: 전장 16량체(FL) 및 12량체.

[0333] 프로브를 희석제 54에서 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하고, 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이, 2개의 반복 웰에서 희석제 54에서 96웰 플레이트에 첨가하였다.

[0334] 안티센스 가닥 검출 및 센스 가닥 검출에 대한 ECL 신호는 각각 표 14 및 표 15에 제시되어 있다. 표 14로부터의 데이터는 도 8a 및 도 8b에 그래프로 나타나 있고, 표 15로부터의 데이터는 도 9a 및 도 9b에 그래프로 나타나 있다.

[0335] 표 16은 16량체(FL) 프로브 및 12량체 프로브의 사용에 대한 단독으로의 또는 이중이중체 내의 안티센스(AS) 가닥에 대한 검출 하한치(LLOD)를 나타낸다. 표 17은 16량체(FL) 프로브 및 12량체 프로브의 사용에 대한 단독으로의 또는 이중이중체 내의 센스(SS) 가닥에 대한 LLOD를 나타낸다.

[0336] 이들 결과는, 12량체 프로브가 안티센스 가닥에서는 ECL 신호를 감소시켰지만, 센스 가닥에서는 그렇지 않았음을 보여준다. 전장 프로브는, 개별 가닥들로부터 유래하거나 이중이중체 내에 있거나 어느 것이든 간에 양쪽 가닥에 대해 유사한 ECL 신호를 가졌다. 12량체 프로브는 이중이중체 내의 안티센스 가닥 및 센스 가닥 양쪽 모두에 대해 ECL 신호를 감소시켰다. 이중이중체는 안티센스 가닥 및 센스 가닥 양쪽 모두에 대해 전장 프로브를 사용할 때 ECL 신호 또는 LLOD<sub>est</sub>에 영향을 미치지 않았다. 12량체 프로브는 이중이중체 내의 안티센스 가닥 및 센스 가닥 양쪽 모두에 대해 ECL 신호를 감소시키고 LLOD<sub>est</sub>를 증가시켰다.

[0337] [표 14]

안티센스 검출

		AS 가닥 단독		이종이중체	
보정물	농도 (pg/mL)	FL 프로브	12 량체 프로브	FL 프로브	12 량체 프로브
Cal-1	40000	436522	36684	430618	5626
Cal-2	10000	413134	21066	421128	1716
Cal-3	2500	385432	3213	327599	980
Cal-4	625	180946	826	161471	726
Cal-5	156	48504	630	51140	668
Cal-6	39.1	12506	628	14699	689
Cal-7	9.77	3533	670	4164	738
Cal-8	2.44	1271	646	1476	728
Cal-9	0.610	741	607	884	673
Cal-10	0.153	731	665	748	750
블랭크	0	731	697	678	693

[0338]

[0339] [표 15]

센스 검출

		AS 가닥 단독		이종이중체	
보정물	농도 (pg/mL)	FL 프로브	12 량체 프로브	FL 프로브	12 량체 프로브
Cal-1	40000	79174	68893	69891	14864
Cal-2	10000	75868	80815	62486	15216
Cal-3	2500	65654	47818	37580	13855
Cal-4	625	13041	10549	13124	8512
Cal-5	156	3031	3727	3620	3839
Cal-6	39.1	1359	2001	1543	2153
Cal-7	9.77	962	1546	1056	1698
Cal-8	2.44	877	1471	894	1497
Cal-9	0.610	830	1400	834	1408
Cal-10	0.153	882	1413	888	1483
블랭크	0	906	1508	914	1471

[0340]

[0341] [표 16]

단독으로의 또는 이종이중체 내의 안티센스 가닥 검출

	AS 가닥 단독		이종이중체	
	FL 프로브	12 량체 프로브	FL 프로브	12 량체 프로브
힐 기울기	1.12	2.00	1.03	1.11
r <sup>2</sup> 값	0.993	1.000	0.999	0.999
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	0.42	411	0.26	945

[0342]

[0343] [표 17]

단독으로의 또는 이중이중체 내의 센스 가닥 검출

	AS 가닥 단독		이중이중체	
	FL 프로브	12 량체 프로브	FL 프로브	12 량체 프로브
힐 기울기	1.46	1.34	1.14	1.11
r <sup>2</sup> 값	0.978	0.973	1.000	0.997
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	12.1	23.4	6.99	12.8

[0344]

[0345] 실시예 4. 전장(16량체) 프로브의 사용에 대한 검출 하한치(LLOD)

[0346] 실시예 1로부터의 전체 모델 이중이중체 ASO 또는 개별 안티센스(AS) 가닥 또는 센스(SS) 가닥에 대한 검출 한계치를 16량체 전장(FL) 프로브의 사용에 대한 실시예 1로부터의 RNase 보호 검정(RPA)에 대해 결정하였다.

[0347] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 개별 안티센스 가닥, 센스 가닥, 또는 이중이중체 가닥으로부터 10점 보정 곡선을 생성하였다. 개별 가닥들에 대해서는 각각의 보정물에 대해 2개씩의 웰을 사용하고, 이중이중체에 대해서는 각각의 보정물에 대해 4개씩의 웰을 사용하였으며, 아울러 전체 LLOD 결정을 위해 24개의 개별 블랭크 웰을 사용하였다. 200 pM의 농도로 다음과 같은 2개의 프로브 길이를 평가하였다: 전장 16량체(FL) 및 12량체. 프로브를 안티센스(AS) 가닥 또는 센스(SS) 가닥에 혼성화하고, 희석제 54에서 플레이트에 혼성화하였다.

[0348] 표 18에 제시된 바와 같이, ECL 신호는 개별 안티센스 가닥 또는 센스 가닥과 이중이중체 사이에서 유사하다. 표 19에 제시된 결과는 안티센스 가닥에 대한 단일화 검정(singleplex assay)의 LLOD가 개별 가닥 및 이중이중체 둘 모두에 대해 0.5 pg/mL 미만이었음을 나타낸다 - 센스 가닥에 대한 단일 검정의 LLOD는 개별 가닥 및 이중이중체에 대해 각각 25 pg/mL 및 14 pg/mL이었다. Cal-3에 대한 변동 계수(CV)는 모두 15% 미만이었으며, 이때 안티센스 가닥에 대한 CV가 센스 가닥의 것보다 훨씬 더 낮았다.

[0349] [표 18]

ECL 신호 - 16 량체 전장(FL) 안티센스 프로브 또는 센스 프로브

보정물	농도 (pg/mL)	FL 안티센스 프로브		FL 센스 프로브	
		안티센스 가닥	이중이중체	센스 가닥	이중이중체
Cal-1	40000	411846	381867	100429	92338
Cal-2	10000	402206	345787	114521	74490
Cal-3	2500	362468	255147	89301	40525
Cal-4	625	173784	120117	17994	10785
Cal-5	156	56156	41165	4384	3590
Cal-6	39.1	15325	11862	1264	1637
Cal-7	9.77	4263	3357	1227	1142
Cal-8	2.44	1546	1163	1060	969
Cal-9	0.610	835	784	1016	881
Cal-10	0.153	696	650	928	939
블랭크	0	616	605	979	960

[0350]

[0351] [표 19]

개별 가닥 또는 이중이중체에 대한 LLOD 결정

	FL AS 프로브		FL SS 프로브	
	개별 AS	이중이중체	개별 SS	이중이중체
힐 기울기	1.04	1.02	1.53	1.08
r <sup>2</sup> 값	0.994	1.000	0.977	0.978
LLOD (pg/mL)	0.37	0.47	25.3	14.3
블랭크 CV (%)	7.71	8.07	7.11	8.40
Cal-3 CV (%)	1.71	5.75	11.3	12.0

[0352]

[0353] **실시예 5. 이중이중체의 다중화 검출**

[0354] 이 실험은 실시예 1로부터의 모델 이중이중체 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)의 안티센스(AS) 가닥 및 센스(SS) 가닥이 다중화 형식으로 실시예 1로부터의 RNase 보호 검정(RPA)을 사용하여 검출될 수 있는지의 여부를 결정하도록 설계되었다.

[0355] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 개별 안티센스(AS) 가닥, 센스(SS) 가닥 또는 이중이중체 가닥으로부터 10점 보정 곡선을 생성하였다. 단지 프로브만을 갖는 웰을 포함시켜, 안티센스 프로브와 센스 프로브에 대해 프로브-프로브 상호작용이 일어날지의 여부 및 단축된 12량체 프로브에 대해 프로브-프로브 상호작용이 제거될 수 있는지의 여부를 결정하였다.

[0356] 200 pM의 농도로 다음과 같은 2개의 프로브 길이를 평가하였다: 전장 16량체(FL) 및 12량체(프로브 서열은 실시예 2에 제시되어 있음).

[0357] 프로브를 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에, 그리고 2개의 반복 웰에서 희석제 54에서 96웰 플레이트에 혼성화하였다.

[0358] 16량체(FL) 및 12량체 프로브의 사용에 대한 안티센스 가닥 검출에 대한 ECL 신호는 각각 표 20 및 표 21에 제시되어 있다. 16량체(FL) 및 12량체 프로브의 사용에 대한 센스 가닥 검출에 대한 ECL 신호는 각각 표 22 및 표 23에 제시되어 있다. ECL 데이터는 도 10a 및 도 10b에 그래프로 나타나 있다. 표 24는 단독으로의 또는 이중이중체 내의 안티센스(AS) 가닥 및 센스(SS) 가닥에 대한 12량체 프로브의 사용에 대한 다중화 검출의 검출 하한치(LLOD)를 나타낸다.

[0359] 이들 결과는, 전장 프로브가 다중화 검정에서 사용되었을 때 안티센스 프로브와 센스 프로브가 교차-반응하여 고도로 상승된 백그라운드 신호를 발생시켰음을 보여준다. 높은 농도에서, 안티센스 가닥(개별 또는 이중이중체)에 대해서는 상가적 효과가 있지만, 안티센스 스폿 신호에 대해 센스 가닥과 역상관관계가 있으며 그 역으로도 성립된다(이는 프로브에 대한 표적 결합으로부터의 프로브-프로브 상호작용의 손실에 기인할 가능성이 높다).

[0360] 단일화(실시예 2) 또는 다중화(현재 실시예)에서의 12량체 프로브의 사용은 유사한 ECL 수준을 가져왔는데, 이는 프로브의 다중화에 유해한 영향이 없음을 나타낸다.

[0361] [표 20]

ECL 신호 - 안티센스

		FL 프로브			
보정물	농도 (pg/mL)	안티센스 가닥	센스 가닥	이종이중체	블랭크
Cal-1	40000	445564	38268	428453	253738
Cal-2	10000	417321	106092	417266	265647
Cal-3	2500	410957	188466	367584	255043
Cal-4	625	319217	235504	301552	255697
Cal-5	156	264762	250846	259345	238399
Cal-6	39.1	267705	258659	253933	247750
Cal-7	9.77	264975	259514	254619	246520
Cal-8	2.44	259803	260489	250511	256856
Cal-9	0.610	249089	247304	231383	240383
Cal-10	0.153	266104	262336	253636	252661
블랭크	0	269205	269493	260503	263732

[0362]

[0363] [표 21]

ECL 신호 - 안티센스

		12량체 프로브			
보정물	농도 (pg/mL)	안티센스 가닥	센스 가닥	이종이중체	블랭크
Cal-1	40000	43389	674	4775	624
Cal-2	10000	21803	716	1736	627
Cal-3	2500	3088	660	867	642
Cal-4	625	806	662	686	621
Cal-5	156	670	619	663	623
Cal-6	39.1	667	641	646	618
Cal-7	9.77	683	666	697	679
Cal-8	2.44	673	664	675	647
Cal-9	0.610	609	625	622	630
Cal-10	0.153	675	654	634	652
블랭크	0	703	684	664	685

[0364]

[0365] [표 22]

ECL 신호 - 센스

보정물	농도 (pg/mL)	FL 프로브			
		안티센스 가닥	센스 가닥	이종이중체	블랭크
Cal-1	40000	70169	138232	126624	265355
Cal-2	10000	124831	193101	166476	273025
Cal-3	2500	211483	251805	214333	266967
Cal-4	625	250605	246399	245508	260377
Cal-5	156	263716	266637	252830	246284
Cal-6	39.1	278373	274500	263248	259176
Cal-7	9.77	290189	282544	266020	262873
Cal-8	2.44	275351	263998	263776	256705
Cal-9	0.610	275655	255402	244191	242755
Cal-10	0.153	283794	277184	257911	267708
블랭크	0	288126	282058	276128	285388

[0366]

[0367] [표 23]

ECL 신호 - 센스

보정물	농도 (pg/mL)	12 량체 프로브			
		안티센스 가닥	센스 가닥	이종이중체	블랭크
Cal-1	40000	1485	93077	21051	1373
Cal-2	10000	1467	104926	22860	1800
Cal-3	2500	1570	58004	17875	1516
Cal-4	625	1491	13992	9372	1484
Cal-5	156	1593	4042	4201	1457
Cal-6	39.1	1583	2252	2185	2009
Cal-7	9.77	1641	1751	1733	1589
Cal-8	2.44	1584	1599	1668	1486
Cal-9	0.610	1504	1479	1517	1435
Cal-10	0.153	1544	1496	1551	1527
블랭크	0	1630	1539	1608	1567

[0368]

[0369] [표 24]

12 량체 프로브에 의한 다중화 검출에 대한 LLOD

	안티센스 스폿		센스 스폿	
	개별 안티센스	이종이중체	개별 센스	이종이중체
힐 기울기	1.99	1.25	1.34	1.10
r <sup>2</sup> 값	1.000	1.000	0.981	0.994
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	429	1083	27.0	7.71

[0370]

[0371] 실시예 6. 이종이중체의 검출에 대한 혼성화 시간의 효과

[0372] 실시예 1로부터의 모델 ASO의 안티센스(AS) 가닥 및 센스(SS) 가닥의 검출 한계치에 대한 감소된 혼성화 시간의 효과를 결정하였다.

[0373] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 이중이중체를 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. 200 pM의 농도로 다음과 같은 2개의 프로브 길이를 평가하였다: 전장 16량체(FL) 및 12량체. 프로브를 "긴 혼성화" 프로토콜(표 25) 및 "짧은 혼성화" 프로토콜(표 26)을 사용하여 희석제 54에서 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하였다. 프로브를 희석제 54에서 96 웰 플레이트의 2개의 반복 웰 내에서 혼성화하였다.

[0374] 전장(FL) 프로브는 이중이중체 내의 안티센스(AS) 가닥 및 센스(SS) 가닥 양쪽 모두의 검출에 있어서 12량체 프로브보다 더 우수한 신호를 가졌다. 결과는 도 11a 및 도 11b에 그래프로 나타나 있다. 혼성화 시간의 변화는 ECL 신호 생성에 큰 영향을 미치지 않았다.

[0375] 이중이중체의 AS0 또는 S0 가닥에 대한 검출의 감도는 프로브를 이의 상응하는 가닥에 혼성화하기 위한 시간을 감소시키는 것에 의해 영향을 받지 않는다. 검정 시간을 단축시키기 위해, 단축된 혼성화 조건 하에서 프로브/가닥 혼성화를 수행할 것을 추천한다.

[0376] [표 25]

“긴” 혼성화 조건

단계	온도	시간	
1	80°C	2 분	매 5 분 동안마다 1°C씩 50°C까지 감소시킴.
2	65°C	5 분	
3	37°C	유지	

[0377]

[0378] [표 26]

“짧은” 혼성화 조건

단계	온도	시간
1	95°C	2 분
2	65°C	1 분 (50% 램프 다운(ramp down))
3	4°C	유지 (3% 램프 다운)

[0379]

[0380] 실시예 7. 혈장에서의 안티센스 가닥 및 센스 가닥의 검출

[0381] 마우스 혈장 중에 스파이킹될 때, 실시예 1로부터의 모델 AS0의 안티센스(AS) 가닥 또는 센스(SS) 가닥에 대한 검출 한계를 결정하였다.

[0382] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 개별 안티센스 가닥 또는 센스 가닥 또는 이중이중체를 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. 마우스 혈장 및 희석제 보정 곡선은 둘 모두 60°C에서 10분 동안, 그리고 4°C에서의 유지를 가지면서 RNasecure™ RNase 불활성화 시약으로 전처리하였다.

[0383] RNasecure™ 시약을 1:1 비(20 µL의 보정물 또는 블랭크: 20 µL RNasecure™ 시약)로 희석제 54에 첨가하였다. 전장 16량체(FL) 프로브를 200 pM의 최종 농도로 사용하였다. 5x 프로브를 50 µL의 총 부피를 위해 희석제 54를 사용하여 제조된 10 µL 부피로 첨가하였다. 표 26에 제시된 단축된 혼성화 프로토콜을 사용하여 2회 반복 웰 내에서 희석제 54 또는 혈장에서 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 프로브를 혼성화하였다.

[0384] 데이터(제시되지 않음)는 안티센스 가닥 검출로부터 발생된 ECL 신호가 개별 가닥에 대해 또는 이중이중체의 일부로서 어느 것이든 간에 매트릭스로서 혈장을 사용하는 경우 많이 변화시키지 않음을 입증한다. 도 12a 및 도 12b에 나타난 바와 같이, ECL 신호는 개별 센스 가닥(RNA)을 마우스 혈장에 첨가하였을 때 손실되었고, 이중이중체의 센스 가닥을 마우스 혈장에 첨가하였을 때 감소되었다. 이는 ssRNA를 분해하는 혈장에서 내인성 RNase에 기인할 가능성이 높다. 표 27은 희석제 54 또는 혈장에서의 안티센스 가닥에 대한 검출 하한치(LLOD)를 나타낸다. 표 28은 희석제 54 또는 혈장에서의 센스 가닥에 대한 검출 하한치(LLOD)를 나타낸다.

[0385] 이들 결과는, 혈장에서 측정될 때 안티센스 가닥(DNA)을 고감도로 검출할 수 있는 능력이 변경되지 않았음을 입

증한다. 안티센스(DNA) 가닥의 경우, 개별 가닥과 이중이중체의 안티센스 가닥 둘 모두는 희석제 및 혈장에서 유사한 LLOD<sub>est</sub>를 갖는다. 그러나, 센스 가닥(RNA)을 검출할 수 있는 능력은 혈장에서 측정될 때 변경되었다: 개별 센스 가닥은 검출 불가능하였고; 이중이중체의 센스 가닥은 검출가능하였지만, 감소된 감도 및 감소된 동적 범위를 가졌다.

[0386] [표 27]

안티센스 가닥의 검출 하한치(LLOD)

	안티센스 가닥 단독		이중이중체	
	희석제 54	혈장	희석제 54	혈장
혈 기울기	1.02	0.99	1.01	0.95
r <sup>2</sup> 값	0.996	0.997	1.000	1.000
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	0.40	0.53	0.44	0.19

[0387]

[0388] [표 28]

센스 가닥 검출의 검출 하한치(LLOD)

	안티센스 가닥 단독		이중이중체	
	희석제 54	혈장	희석제 54	혈장
혈 기울기	1.32	N/A	0.96	0.93
r <sup>2</sup> 값	0.975	N/A	0.994	0.997
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	19.9	N/A	9.92	37.1

[0389]

[0390] **실시예 8. 마우스 혈장에서의 안티센스 가닥 및 센스 가닥의 단일화 검출**

[0391] 마우스 혈장에서 전장(16량체) 프로브를 사용하여, (하기에 제공된 변형을 갖는) 실시예 1에 본질적으로 기재된 RNase 보호 검정(RPA)을 사용하여 실시예 1로부터의 전체 모델 이중이중체 ASO 또는 안티센스 가닥 및 센스 가닥에 대한 검출 한계치를 결정하였다.

[0392] 간략하게 말하면, 마우스 혈장에서 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 이중이중체 가닥을 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. 전체 검출 하한치(LLOD) 결정을 위해 24개의 블랭크 웰을 사용하면서, 각각의 보정물에 대해 4개의 웰을 사용하였다. 보정물 샘플 및 블랭크를 실시예 7에 기재된 바와 같이 RNasecure™로 전처리하였다.

[0393] 하나의 변형을 주면서, 실시예 6에 기재된 단축된 혼성화 프로토콜을 사용하여 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 프로브를 혼성화하였다: 변성을 위해 95°C까지 혈장을 가열하는 것은 혈장을 용이하게 피펫팅하기에 너무 점성이 되게 하기 때문에 변성 온도를 80°C로 감소시켰다. 개정된 프로토콜은 표 29에 제시되어 있다.

[0394] [표 29]

혼성화 조건

단계	온도	시간
1	80°C	2 분
2	65°C	1 분 (50% 램프 다운)
3	4°C	유지 (3% 램프 다운)

[0395]

[0396] 이들 결과(제시되지 않음)는 ECL 신호가 실시예 7에서의 혈장 실험과 일치함을 나타낸다. 안티센스 가닥(DNA)에 대한 곡선 상부(TOC) 신호는 센스 가닥(RNA)에 비해 훨씬 더 높다. 단일화 검정에서 이중이중체의 안티센스 가닥(DNA)에 대한 LLOD는 약 1 pg/mL이고, 센스(RNA) 가닥에 대한 LLOD는 약 31 pg/mL였다. Cal-3 및 블랭크에 대한 CV는 모두 10% 미만이었는데, 이는 낮은 신호 변동성을 나타낸다.

**[0397] 실시예 9. 백그라운드에 대한 차단제 S1의 영향**

**[0398]** 차단제 S1을 N-PLEX™ 차단 완충액에 첨가한 효과를 안티센스(AS) 및 센스(SS) 단일화 검정과 관련된 백그라운드에 미치는 영향에 대해 평가하였다.

**[0399]** 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 이중중체 가닥으로부터 10점 보정 곡선을 생성하였다. 전장(16량체) 프로브를 실시예 8에 기재된 단일화 안티센스 및 센스 검정을 위한 방법에 따라 본질적으로 200 pM의 농도로 사용하였다. 차단제 S1(MSD)을 N-PLEX™ 차단제(MSD)에 첨가하였다. 프로브를 희석제 54(MSD)를 사용하여 센스 가닥 또는 안티센스 가닥에 혼성화하였다.

**[0400]** 이들 결과는 N-PLEX™ 차단제 내에 차단제 S1을 포함시키는 것이 단일화에서 AS 가닥 또는 SS 가닥 어느 것에 대해서도 양성 또는 백그라운드 신호 발생에 영향을 미치지 않았음을 나타낸다.

**[0401] 실시예 10. 백그라운드에 대한 이중 RNase 분해의 영향**

**[0402]** 2개의 RNase 분해 단계를 수행하는 것의 효과를 실시예 1에 기재된 안티센스(AS) 및 센스(SS) 단일화 검정과 관련된 백그라운드에 대한 영향에 대해 평가하였다.

**[0403]** 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 이중중체 가닥으로부터 10점 보정 곡선을 생성하였다. 전장(16량체) 프로브를 실시예 8에 기재된 단일화 안티센스 및 센스 검정을 위한 방법에 따라 본질적으로 200 pM의 농도로 사용하였다. RNase 분해 단계를 1회 또는 2회 수행하였다. RNase 분해 단계가 1회 수행된 웰을 두 번째 RNase 분해 단계 동안 희석제 54와 함께 인큐베이션 하였다. 프로브를 희석제 54를 사용하여 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하였다.

**[0404]** 이 데이터(제시되지 않음)는 추가의 RNase 분해 단계를 추가하는 것이 양성 또는 백그라운드 ECL 신호 또는 LLOD<sub>est</sub> 측정치에 거의 영향을 미치지 않았음을 나타낸다.

**[0405] 실시예 11. 뇌 용해물에서의 안티센스 가닥 및 센스 가닥의 검출**

**[0406]** 뇌 용해물에서 전장(16량체) 프로브를 사용하여, (하기에 제공된 변형을 갖는) 실시예 1에 본질적으로 기재된 RNase 보호 검정(RPA)을 사용하여 실시예 8로부터의 전체 모델 이중중체 ASO 또는 안티센스 가닥 및 센스 가닥에 대한 검출 한계치를 결정하였다.

**[0407]** 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로, 희석된 뇌 용해물 내로 스파이킹된 안티센스 가닥, 센스 가닥 및 이중중체 가닥을 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. 전장 16량체(FL) 프로브를 200 pM의 농도로 사용하였다.

**[0408]** 프로브를 실시예 8에 기재된 프로토콜에 따라 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하였다. 뇌(BioIVT, 미국 뉴욕주 웨스트베리 소재)를 균질화하고, 희석제 54 중에 용해시켰다. 균질액을 원심분리하고, 용해물을 수집하고, 희석제 54 중에 1:4로 희석시켰다.

**[0409]** 이 데이터(제시되지 않음)는 AS 가닥으로부터의 ECL 신호 발생(개별 또는 이중중체의 일부로서)이 희석제 54 또는 1:4 희석된 뇌 용해물 사이에서 매우 유사함을 나타낸다. 도 13a 및 도 13b에 나타난 바와 같이, 센스(SS) 가닥(개별 또는 이중중체의 일부로서)으로부터의 ECL 신호는 희석제 54와 비교하여 뇌 용해물에서 훨씬 더 낮았다. 혈장에서의 결과를 나타낸 실시예 8의 결과와는 대조적으로, 개별 센스(SS) 가닥은 뇌 용해물에서 이중중체의 센스(SS) 가닥보다 더 높은 ECL 신호를 발생시킨다. 이는 뇌 세포의 용해 시에 RNase H의 방출에 기인할 수 있다.

**[0410]** 희석제 54 또는 뇌 용해물에서 단독으로의 또는 이중중체 내의 안티센스(AS) 가닥 및 센스(SS) 가닥에 대한 LLOD가 표 30 및 표 31에 나타나 있다. 이들 결과는 안티센스(DNA) 가닥이 희석된 뇌 용해물에서 용이하게 측정될 수 있음을 나타낸다.

[0411] [표 30]

희석제 54 또는 뇌 용해물에서의 안티센스 가닥 검출(LLOD)

	안티센스 가닥 단독		이종이중체	
	희석제 54	뇌 용해물	희석제 54	뇌 용해물
힐 기울기	1.05	1.07	1.01	0.99
r <sup>2</sup> 값	0.996	0.996	0.999	1.000
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	0.26	0.42	0.25	0.16

[0412]

[0413] [표 31]

희석제 54 또는 뇌 용해물에서의 센스 가닥 검출(LLOD)

	센스 가닥 단독		이종이중체	
	희석제 54	뇌 용해물	희석제 54	뇌 용해물
힐 기울기	1.18	1.10	1.02	0.70
r <sup>2</sup> 값	0.985	1.000	1.000	0.995
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	11.3	226	2.70	341

[0414]

[0415] **실시예 12. 프로브에 대한 LNA의 첨가**

[0416] 12량체 RNase 보호 프로브 내에 고정된 핵산(LNA)을 포함시켰을 때의 영향을 단일화 검정에서 결정된 실시예 1로부터의 모델 ASO의 안티센스 가닥 또는 센스 가닥의 검출에 대한 영향에 대해 평가하였다. 이 방법은 본질적으로 실시예 8에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0417] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 스파이킹된 안티센스 가닥, 센스 가닥 및 이종이중체 가닥을 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. LNA를 갖는 전장 16량체(FL) 또는 12량체 프로브를 200 pM의 농도로 사용하였다. 프로브를 희석제 54를 사용하여 모델 ASO의 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하였다.

[0418] 도 14a 및 도 14b는 단독으로의 또는 이종이중체 내의 안티센스(AS) 가닥을 검출하기 위한 16량체(FL) 또는 12량체 RNase 프로브에서의 LNA의 영향을 나타낸다. 표 32는 단독으로의 또는 이종이중체 내의 센스(SS) 가닥을 검출하기 위한 16량체(FL) 또는 12량체 RNase 프로브에서의 LNA의 영향을 나타낸다. 표 33은 LNA를 갖는 상태 및 LNA가 없는 상태의 FL 또는 12량체 안티센스 프로브에 대한 LLOD를 나타낸다. 표 34는 LNA를 갖는 상태 및 LNA가 없는 상태의 FL 또는 12량체 센스 프로브에 대한 LLOD를 나타낸다.

[0419] 이들 결과는 전장 16량체(FL) 프로브가 AS 및 SS 단일화 검정 둘 모두에 있어서 더 높은 양성 신호 및 더 낮은 백그라운드 신호를 생성하였음을 보여준다. LNA 프로브에 대해 관찰된 더 높은 백그라운드는 뉴클레아제 분해에 대한 LNA 올리고의 저항성에 기인할 가능성이 높다. 프로브에서의 분해의 표적은 RNA 잔기이지만, LNA는 RNase로부터 전체 올리고를 보호하도록 도왔다.

[0420] [표 32]

ECL 신호 - FL 또는 LNA 12 량체 프로브에 의한 센스 검출

보정물	농도 (pg/mL)	센스 가닥 단독		이종이중체	
		FL 프로브	LNA 12 량체	FL 프로브	LNA 12 량체
Cal-1	40000	129219	92954	85283	81086
Cal-2	10000	117400	75898	66956	61790
Cal-3	2500	47186	37943	36465	31961
Cal-4	625	10107	10023	12307	11572
Cal-5	156	3179	4572	4335	5453
Cal-6	39.1	1559	3561	1717	3660
Cal-7	9.77	1137	3252	1138	3098
Cal-8	2.44	1043	2986	1079	2966
Cal-9	0.610	1027	3042	927	2916
Cal-10	0.153	1026	3135	917	3029
블랭크	0	1061	3220	943	3084

[0421]

[0422] [표 33]

안티센스 가닥 검출(LOD) - LNA 프로브

	안티센스 가닥 단독		이종이중체	
	FL 프로브	LNA 12 량체	FL 프로브	LNA 12 량체
힐 기울기	1.03	0.99	1.04	0.73
r <sup>2</sup> 값	0.984	0.999	0.995	1.000
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	0.42	57.8	0.48	7.17

[0423]

[0424] [표 34]

센스 가닥 검출(LOD) - LNA 프로브

	센스 가닥 단독		이종이중체	
	FL 프로브	LNA 12 량체	FL 프로브	LNA 12 량체
힐 기울기	1.24	1.35	1.01	1.03
r <sup>2</sup> 값	0.989	1.000	1.000	1.000
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	12.7	84.4	3.63	31.1

[0425]

[0426] **실시예 13. LNA 프로브의 농도 시험**

[0427] 단일화 AS 및 SS 검정의 백그라운드 수준 및 감도에 대한 LNA 프로브의 감소된 농도의 영향을 실시예 1로부터의 모델 AS0에 대해 평가하였다.

[0428] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 이종이중체 가닥을 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. AS 및 SS 검정을 단일화로 실시하였으며, LNA를 갖는 12 량체 프로브를 다음 4개의 농도로 AS 및 SS 검정 둘 모두에 대해 사용하였다: 200 pM(0.2 nM); 100 pM(0.1 nM); 50 pM(0.05 nM); 및 20 pM(0.02 nM). 프로브를 희석제 54를 사용하여 안티센스(AS) 가닥 또는 센스(SS) 가닥에 혼성화하였다.

[0429] 도 15a 및 도 15b는 이종이중체의 AS 가닥 또는 SS 가닥 중 어느 하나에 대해 LNA 프로브의 농도를 감소시키는 것은, 각각 0.02 nM 및 0.1 nM의 프로브 농도에 대해, 양성 ECL 신호 및 백그라운드 ECL 신호 둘 모두를 감소시켜, 개선된 양성 신호 및 백그라운드 신호를 제공한다는 것을 보여준다.

[0430] 표 35 및 표 36은 각각 이종이중체 내의 안티센스 가닥 또는 센스 가닥을 검출하기 위한 다양한 LNA 프로브 농

도에 대한 LLOD를 나타낸다.

[0431] [표 35]

안티센스 가닥 이중이중체 검출(LLOD)

	0.2 nM	0.1 nM	0.05 nM	0.02 nM
힐 기울기	0.92	0.71	0.81	0.79
r <sup>2</sup> 값	0.976	0.998	0.997	0.998
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	15.9	50.9	191	81.7

[0432]

[0433] [표 36]

센스 가닥 이중이중체 검출(LLOD)

	0.2 nM	0.1 nM	0.05 nM	0.02 nM
힐 기울기	1.07	0.99	1.10	1.21
r <sup>2</sup> 값	0.995	0.992	0.995	0.996
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	29.6	17.7	10.7	7.76

[0434]

[0435] **실시예 14. 안티센스 가닥 및 센스 가닥의 다중화 검출에 있어서의 LNA 프로브**

[0436] 실시예 1로부터의 모델 이중이중체의 AS 가닥 및 SS 가닥의 다중화 검출을 LNA 프로브를 사용하여 평가하였다.

[0437] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 개별 안티센스(AS) 가닥, 센스(SS) 가닥 또는 이중이중체 가닥을 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. 상기 검정은 단지 프로브만을 갖는 웰을 포함시켜 프로브-프로브 상호작용이 안티센스 프로브와 센스 프로브 사이에서 발생하는지의 여부를 결정하였다.

[0438] 다음 2개의 상이한 프로브 유형을 평가하였다: 비변형된 12량체 프로브 또는 LNA 12량체 프로브. 비변형된 12량체 프로브에 대해서는 200 pM 프로브 농도를 사용하였다. AS에 대해, 12량체 AS 프로브는 20 pM의 농도로 사용하고, 12량체 SS 프로브는 100 pM의 농도로 사용하였다. SS LNA 프로브를 또한 100 pM의 농도로 사용하였다. LNA 프로브의 농도를 변화시켜 더 높은 백그라운드를 고려하였다. 프로브를 희석제 54를 사용하여 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하였다.

[0439] 도 16a 및 도 16b는 비변형된 12량체 프로브 또는 LNA 12량체 프로브 어느 것으로부터도 표적-이탈 신호가 없었지만 - 이는 프로브-프로브 상호작용이 어느 경우에도 발생하지 않았음을 나타냄 -, LNA 프로브는 AS 가닥에 대해 비변형된 12량체 프로브보다 더 낮은 양성 ECL 신호 및 이와 유사한 백그라운드를 제공하였음을 보여준다.

[0440] 도 17a 및 도 17b는 비변형된 12량체 프로브 또는 LNA 12량체 프로브 어느 것으로부터도 표적-이탈 신호가 없음을 보여주는데, 이는 프로브-프로브 상호작용이 SS 프로브에 대해 어느 경우에도 발생하지 않았음을 나타낸다.

[0441] 표 37은 비변형된 12량체 프로브 및 LNA 변형된 12량체 프로브를 사용한 개별 안티센스(AS) 가닥 또는 이중이중체 내의 안티센스 가닥의 다중화 검출에 대한 LLOD를 나타낸다. 표 38은 비변형된 12량체 프로브 및 LNA 변형된 12량체 프로브를 사용한 개별 센스(SS) 가닥 또는 이중이중체 내의 센스 가닥의 다중화 검출에 대한 LLOD를 나타낸다.

[0442] LNA 프로브는 개별 가닥으로서의 또는 이중이중체의 일부로서의 AS 가닥 및 SS 가닥 양쪽 모두를 검출할 수 있었다. 단일화 검정에서 전장 프로브에 비하여 12량체 LNA 프로브를 사용하였을 때의 이점은 없었다. LNA 프로브는 두 검정 모두에 대해 더 높은 백그라운드를 가지며, 백그라운드가 허용가능한 수준까지 되도록 희석시켜야 한다. 특정 신호가 또한 희생된다. 비변형된 12량체 프로브는 AS 가닥 및 SS 가닥의 다중화 검출에 있어서 12량체 LNA 프로브보다 더 월등하였다.

[0443] [표 37]

안티센스 다중화 검출(LLOD)

	12 량체 안티센스 프로브		12 량체 LNA 안티센스 프로브	
	개별 안티센스	이종이중체	개별 안티센스	이종이중체
힐 기울기	1.73	0.95	1.12	0.80
r <sup>2</sup> 값	1.000	1.000	0.997	0.999
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	432	186	180	61.6

[0444]

[0445] [표 38]

센스 다중화 검출(LLOD)

	12 량체 센스 프로브		12 량체 LNA 센스 프로브	
	개별 센스	이종이중체	개별 센스	이종이중체
힐 기울기	1.36	1.33	1.18	1.10
r <sup>2</sup> 값	0.986	0.977	0.998	0.987
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	30.0	19.6	32.5	9.30

[0446]

[0447] **실시예 15. 13량체 및 14량체 프로브를 사용한 안티센스 가닥 및 센스 가닥의 단일화 검출**

[0448] 실시예 1로부터의 모델 이종이중체의 개별 안티센스(AS) 가닥 및 센스(SS) 가닥의 검출을 실시예 8에 기재된 방법에 따라 13량체 및 14량체 프로브를 사용하여 평가하였다.

[0449] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 이종이중체 가닥을 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. 200 pM의 농도로 다음과 같은 4개의 상이한 프로브 유형을 평가하였다: 비변형된 전장(FL) 프로브, 14량체, 13량체, 및 12량체 프로브. 프로브를 희석제 54를 사용하여 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하였다.

[0450] 도 18a 및 도 18b는 14량체 프로브에 대한 ECL 신호가 안티센스 가닥 및 센스 가닥 검출에 있어서 FL 프로브와 유사하였지만, 13량체 프로브에 대해서는 약간의 신호 손실이 관찰되었음을 보여준다. FL 프로브와 비교하여 12량체 프로브에 대해서는 더 현저한 손실이 관찰되었다. 백그라운드가 12량체 및 13량체 프로브에 대해 증가하였다.

[0451] 표 39 및 표 40은 전장(FL) 프로브, 14량체, 13량체, 또는 12량체 프로브에 의한 안티센스(AS) 가닥 또는 센스(SS) 가닥의 검출에 대한 LL0D를 나타낸다.

[0452] [표 39]

안티센스 검출(LL0D)

	FL 프로브	14 량체	13 량체	12 량체
힐 기울기	1.05	1.02	1.06	1.81
r <sup>2</sup> 값	0.994	0.994	0.998	1.000
LL0D <sub>est</sub> (pg/mL)	0.69	0.41	2.23	267

[0453]

[0454] [표 40]

센스 검출(LL0D)

	FL 프로브	14 량체	13 량체	12 량체
힐 기울기	1.31	1.27	1.32	1.36
r <sup>2</sup> 값	0.987	0.978	0.985	0.989
LL0D <sub>est</sub> (pg/mL)	13.6	19.9	24.6	31.20

[0455]

[0456] **실시예 16. 13량체 및 14량체 프로브를 사용한 안티센스 가닥 및 센스 가닥의 이종이중체 검출**

[0457] 실시예 1로부터의 모델 이중이중체의 안티센스(AS) 가닥 및 센스(SS) 가닥의 검출을 실시예 8에 본질적으로 기재된 13량체 및 14량체 프로브를 사용하여 평가하였다.

[0458] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 이중이중체 가닥을 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. 200 pM의 농도로 다음과 같은 4개의 상이한 프로브 유형을 평가하였다: 비변형된 전장(FL) 프로브, 14량체, 13량체, 및 12량체 프로브. 프로브를 희석제 54를 사용하여 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하였다.

[0459] 도 19a 및 도 19b에 나타낸 바와 같이, FL 및 14량체 프로브는 이중이중체의 AS 가닥을 측정할 때 유사한 신호를 제공하였다. 13량체 프로브는 신호에서 유의한 손실을 나타내었고, 12량체 프로브는 이중이중체의 AS 가닥을 측정할 때 충분한 신호를 생성할 수 없었다. 백그라운드가 13량체 프로브에 대해 증가하였다. SS 프로브와 가닥 검출의 경우, 14량체 및 13량체 프로브는 FL 프로브와 유사한 반면, 12량체 프로브에 대해서는 약간의 신호 손실이 있었다. 백그라운드가 12량체 프로브에 대해 증가하였다.

[0460] 표 41 및 표 42는 전장(FL) 프로브, 14량체, 13량체, 또는 12량체 프로브에 의한 안티센스(AS) 가닥 또는 센스(SS) 가닥의 이중이중체 검출에 대한 LLOD를 나타낸다.

[0461] [표 41]

안티센스 가닥 검출(LLOD)

	FL 프로브	14량체	13량체	12량체
힐 기울기	1.09	1.06	1.00	0.78
r <sup>2</sup> 값	1.000	0.996	0.999	0.714
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	0.94	0.91	1.98	223

[0462]

[0463] [표 42]

센스 검출(LLOD)

	FL 프로브	14량체	13량체	12량체
힐 기울기	1.02	0.94	0.98	0.90
r <sup>2</sup> 값	1.000	0.998	0.992	0.995
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	3.94	4.87	3.17	4.31

[0464]

[0465] **실시예 17. 13량체 및 14량체 프로브를 사용한 안티센스 가닥 및 센스 가닥의 다중화 검출**

[0466] 이 실험은 13량체 또는 14량체 프로브가 실시예 1로부터의 모델 이중이중체 또는 안티센스(AS) 가닥 및 센스(SS) 가닥의 다중화 검출을 가능하게 하는지의 여부를 결정하도록 설계되었다.

[0467] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 이중이중체 가닥을 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. 프로브-프로브 상호작용을 평가하기 위해 프로브-단독 웰을 포함시켰다.

[0468] 200 pM의 농도로 다음과 같은 2개의 상이한 프로브 유형을 평가하였다: 14량체 및 13량체 프로브. 프로브를 희석제 54에서 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하였다.

[0469] 표 43 및 표 44에 나타낸 바와 같이, 14량체 프로브는 개별 AS 가닥, 및 이중이중체의 AS 가닥 둘 모두의 검출을 가능하게 하였지만, 14량체 프로브는 이중이중체를 측정하였을 때 개별 가닥과 비교하여 신호의 약간의 감소를 보였다. 13량체 프로브는 또한 개별 AS 가닥 및 이중이중체의 AS 가닥의 검출을 가능하게 하였지만, 신호 약화가 관찰되었다. 중요한 점은, 14량체 프로브 및 13량체 프로브 둘 모두가 이중이중체의 AS 가닥의 다중화 검출에 적합하였으며, 프로브-프로브 상호작용을 야기하지 않았다는 것이다.

[0470] 표 45 및 표 46에 나타낸 바와 같이, 14량체 프로브 및 13량체 프로브 둘 모두는 이중이중체의 SS 가닥의 검출을 가능하게 하였지만, 14량체 프로브는 13량체 프로브보다 약간 더 높은 신호를 제공하였다. 중요한 점은, 14량체 프로브 및 13량체 프로브 둘 모두가 이중이중체의 SS 가닥의 다중화 검출에 적합하였으며, 프로브-프로브 상호작용을 야기하지 않았다는 것이다.

[0471] 표 47 및 표 48은 14량체 및 13량체 프로브에 의한, 단독으로의 또는 이중이중체의 일부로서의 안티센스(AS) 가닥 또는 센스(SS) 가닥의 검출에 대한 LLOD를 나타낸다.

[0472] 따라서, 14량체 프로브는 안티센스 가닥에 대한 최적의 프로브인 반면, 13량체 프로브 또는 14량체 프로브는 어느 것도 센스 가닥의 검출에 사용될 수 있다.

[0473] [표 43]

ECL 신호 - 14량체 프로브에 의한 안티센스(AS) 가닥의 검출

보정물	농도 (pg/mL)	AS 가닥	SS 가닥	이중이중체	블랭크 (프로브 단독)
Cal-1	40000	491963	670	409536	674
Cal-2	10000	370227	639	307180	705
Cal-3	2500	270123	674	185649	697
Cal-4	625	97312	704	75888	726
Cal-5	156	25190	678	24355	696
Cal-6	39.1	6479	681	6257	743
Cal-7	9.77	1932	638	2295	725
Cal-8	2.44	931	655	1114	721
Cal-9	0.610	718	607	775	731
Cal-10	0.153	714	650	747	728
블랭크	0	691	688	704	747

[0474]

[0475] [표 44]

ECL 신호 - 13량체 프로브에 의한 안티센스(AS) 가닥의 검출

보정물	농도 (pg/mL)	AS 가닥	SS 가닥	이중이중체	블랭크 (프로브 단독)
Cal-1	40000	280311	1628	182534	1577
Cal-2	10000	236813	1464	116301	1486
Cal-3	2500	125262	1559	65630	1448
Cal-4	625	37176	1466	26445	1379
Cal-5	156	10311	1492	7678	1434
Cal-6	39.1	3950	1458	3703	1462
Cal-7	9.77	2151	1471	1782	1384
Cal-8	2.44	1705	1486	1506	1425
Cal-9	0.610	1160	1393	1401	1343
Cal-10	0.153	1490	1450	1464	1379
블랭크	0	1547	1508	1572	1498

[0476]

[0477] [표 45]

ECL 신호 - 14량체 프로브에 의한 센스(SS) 가닥의 검출

보정물	농도 (pg/mL)	AS 가닥	SS 가닥	이중이중체	블랭크 (프로브 단독)
Cal-1	40000	1211	123111	65819	1454
Cal-2	10000	1165	121003	63842	1543
Cal-3	2500	1238	61737	41795	1478
Cal-4	625	1198	14349	15469	1473
Cal-5	156	1221	5029	5811	1478
Cal-6	39.1	1222	2355	2222	1622
Cal-7	9.77	1419	1863	1713	1535
Cal-8	2.44	1298	1403	1527	1519
Cal-9	0.610	1308	1276	1477	1476
Cal-10	0.153	1243	1401	1433	1515
블랭크	0	1270	1301	1407	1518

[0478]

[0479] [표 46]

ECL 신호 - 13량체 프로브에 의한 센스(SS) 가닥의 검출

보정물	농도 (pg/mL)	AS 가닥	SS 가닥	이종이중체	블랭크 (프로브 단독)
Cal-1	40000	967	80842	54354	1037
Cal-2	10000	1039	106108	52571	1028
Cal-3	2500	1097	59334	32456	1011
Cal-4	625	1036	12920	12531	992
Cal-5	156	1036	4100	4668	983
Cal-6	39.1	1036	1643	1967	1003
Cal-7	9.77	1118	1306	1250	1028
Cal-8	2.44	1114	1103	1113	986
Cal-9	0.610	961	1050	1038	983
Cal-10	0.153	1061	1070	1042	977
블랭크	0	1100	1082	1082	1083

[0480]

[0481] [표 47]

안티센스(AS) 가닥 검출(LLOD)

	14량체 프로브		13량체 프로브	
	AS 단독	이종이중체의 AS	AS 단독	이종이중체의 AS
힐 기울기	1.10	0.98	1.04	0.94
r <sup>2</sup> 값	0.993	0.997	0.997	0.993
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	0.77	0.43	3.85	2.32

[0482]

[0483] [표 48]

센스(SS) 가닥 검출(LLOD)

	14량체 프로브		13량체 프로브	
	SS 단독	이종이중체의 SS	SS 단독	이종이중체의 SS
힐 기울기	1.12	1.10	1.29	1.02
r <sup>2</sup> 값	0.981	0.997	0.951	0.996
LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	14.5	9.78	15.30	3.44

[0484]

[0485] **실시예 18. 다중화 검출을 위한 프로브 교차-검사**

[0486] 이 실험은 이종이중체의 양쪽 가닥의 다중화 검출을 위해 AS 프로브와 SS 프로브의 상이한 조합(들)을 평가하도록 설계되었다.

[0487] 간략하게 말하면, 4배 연속 희석물(+ 2개의 블랭크 웰)을 사용하여 40,000 pg/mL의 최고 보정물 농도로 이종이중체 가닥을 사용하여 10점 보정 곡선을 생성하였다. 200 pM의 농도로 다음과 같은 3개의 상이한 프로브 유형을 평가하였다: 14량체, 13량체 및 12량체 프로브. 프로브를 희석제 54를 사용하여 안티센스 가닥 또는 센스 가닥에 혼성화하였다.

[0488] 각각의 프로브를 다음과 같이 나머지 다른 2개의 프로브와 교차시켰다:

- [0489] • 14량체 AS vs 14량체 SS
- [0490] • 14량체 AS vs 13량체 SS
- [0491] • 14량체 AS v. 12량체 SS
- [0492] • 13량체 AS vs 14량체 SS

[0493]

● 13량체 AS vs 13량체 SS

[0494]

● 13량체 AS v. 12량체 SS

[0495]

● 12량체 AS vs 14량체 SS

[0496]

● 12량체 AS vs 13량체 SS

[0497]

12량체 AS vs 12량체 SS는 평가하지 않았다.

[0498]

도 20a에 나타낸 바와 같이, ECL 신호는 SS 프로브의 길이에 관계없이, 주어진 AS 프로브 길이에 대해 일관되었다. 14량체 AS 프로브는 13량체 및 12량체 AS 프로브보다 더 적은 신호 손실을 나타내었다. 도 20b에 나타낸 바와 같이, SS 프로브의 길이를 변화시키는 것은 AS 프로브 길이에 대한 변화와 비교하여 ECL 신호에 덜 극적인 영향을 미쳤다. SS 신호는 AS 프로브가 감소됨에 따라 감소되었으며, 이는 특히 12량체 AS 프로브에 대해 그러하였다. 중요한 점은, 14량체 또는 13량체 SS 프로브 어느 것도 다중화 검출에 있어서 잘 기능하였다는 것이다.

[0499]

표 49는 프로브 조합에 대한 LLOD 및 힐 기울기 측정치를 제공한다.

[0500]

이들 데이터는 단축된 프로브를 사용함으로써 높은 감도로 동일한 웰 내에서 이중이중체의 센스 가닥 및 안티센스 가닥 양쪽 모두를 측정하는 것이 가능함을 나타낸다.

[0501]

[표 49]

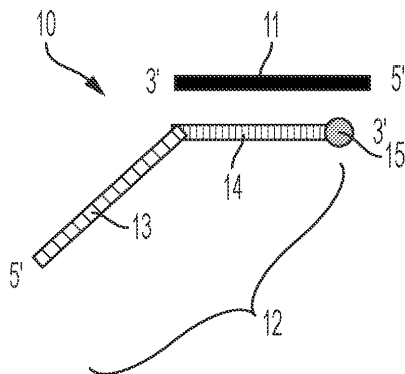
곡선 적합 및 한계치

AS 프로브 SS 프로브	14 량체			13 량체			12 량체	
	14 량체	13 량체	12 량체	14 량체	13 량체	12 량체	14 량체	13 량체
AS 힐 기울기	1.01	<b>0.99</b>	1.00	0.95	0.94	0.91	1.13	1.16
AS r <sup>2</sup> 값	0.995	<b>0.997</b>	0.999	0.997	0.990	0.995	1.000	1.000
AS LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	0.88	<b>0.54</b>	0.46	1.92	2.03	4.07	377	408
SS 힐 기울기	1.03	<b>1.00</b>	1.00	1.04	1.09	1.07	1.05	1.04
SS r <sup>2</sup> 값	0.999	<b>1.000</b>	0.999	0.999	1.000	0.996	1.000	1.000
SS LLOD <sub>est</sub> (pg/mL)	7.38	<b>3.60</b>	6.50	3.58	4.88	10.94	4.13	8.06

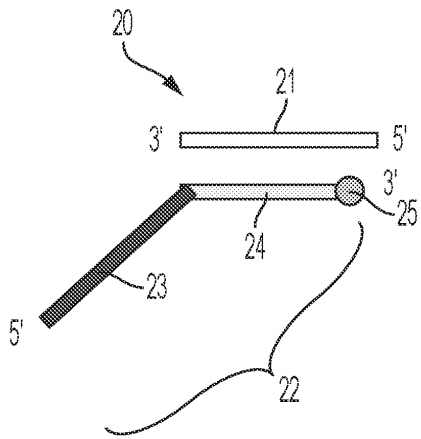
[0502]

**도면**

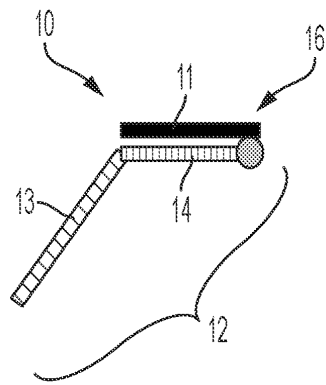
**도면1a**



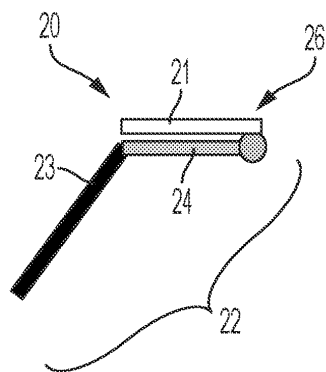
도면1b



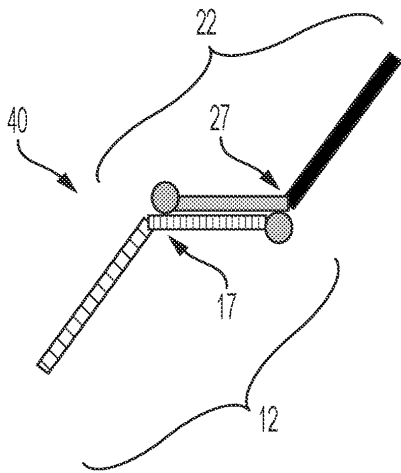
도면2a



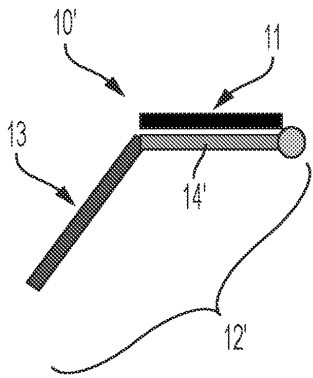
도면2b



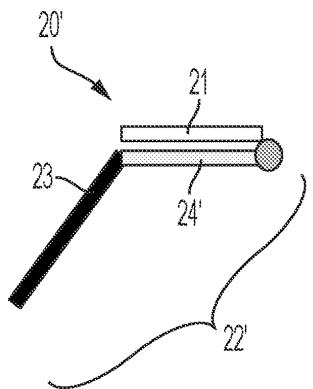
도면2c



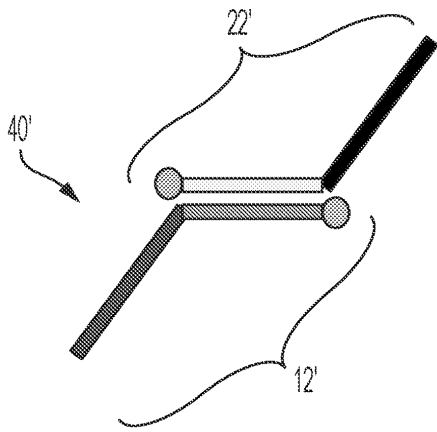
도면3a



도면3b

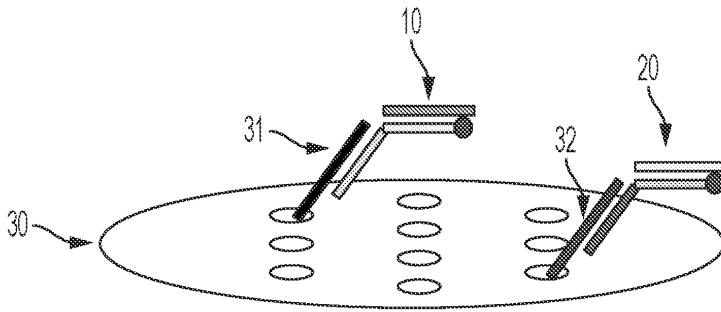


도면3c

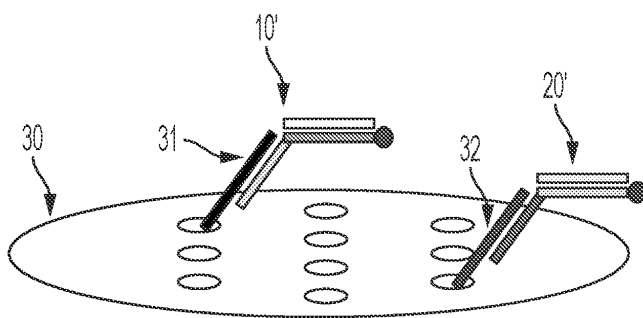


도면4a

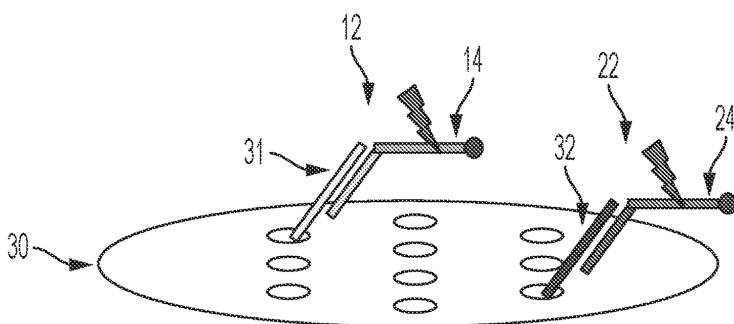
생산적: 프로브가 완전히 보호됨



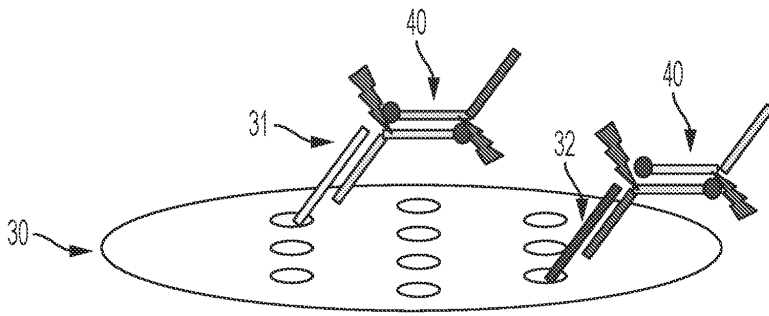
도면4b



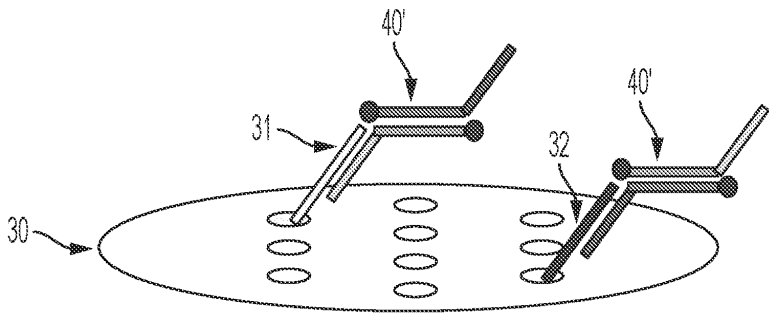
도면4c



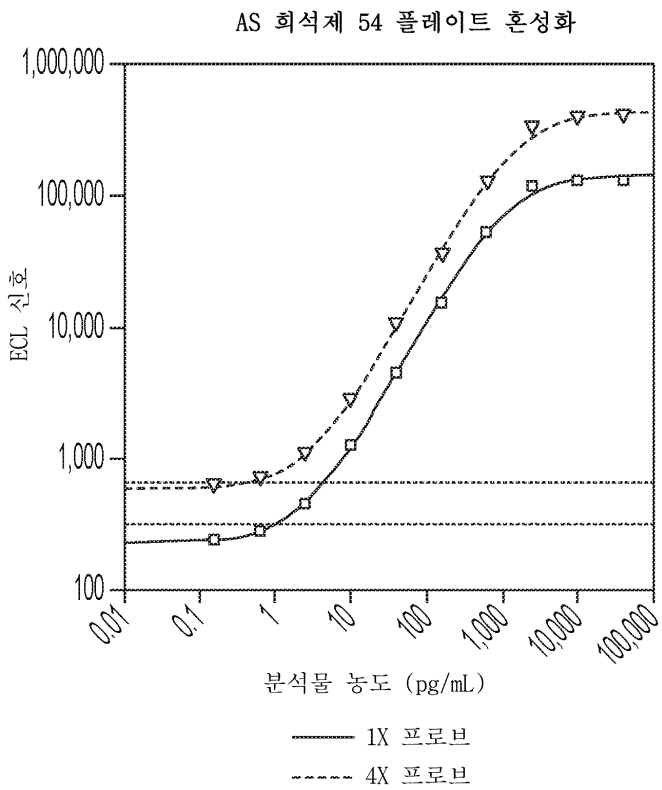
도면4d



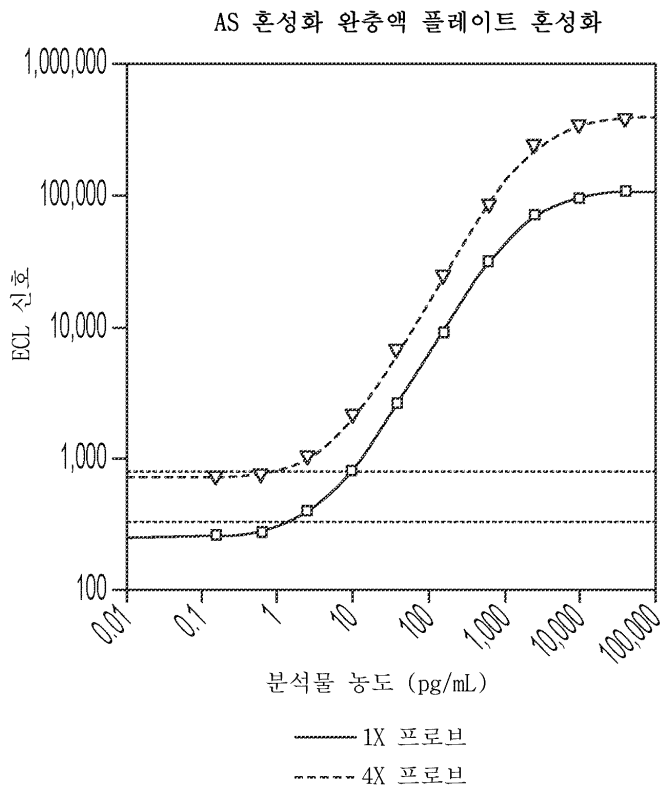
도면4e



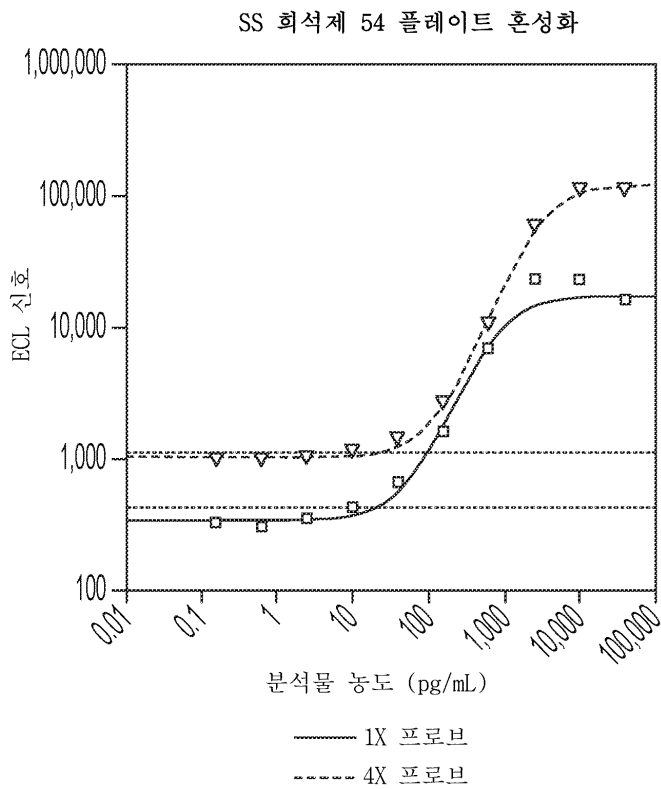
도면5a



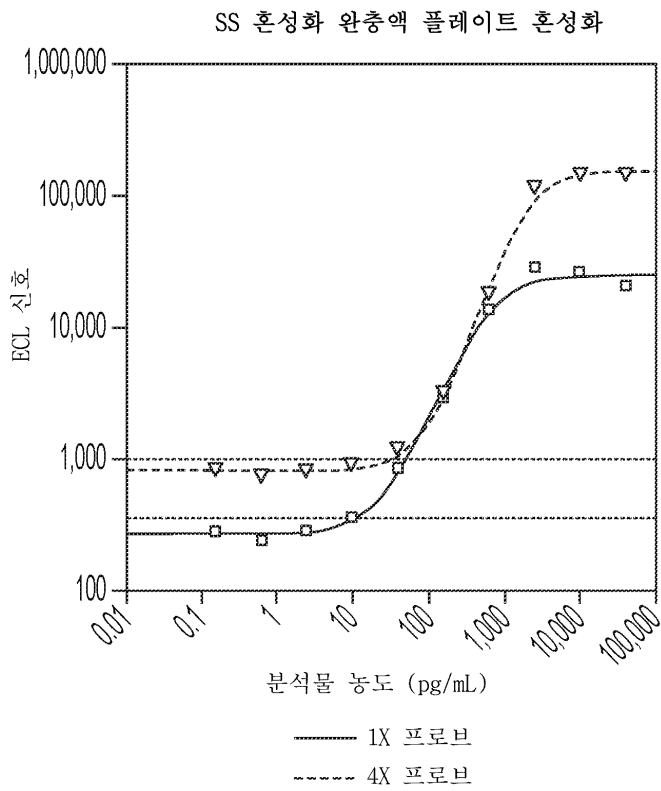
도면5b



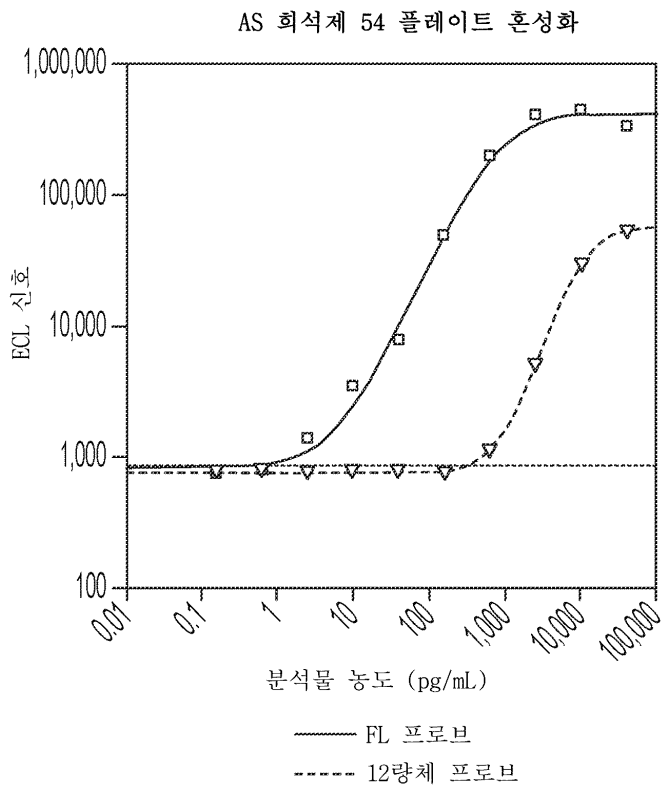
도면6a



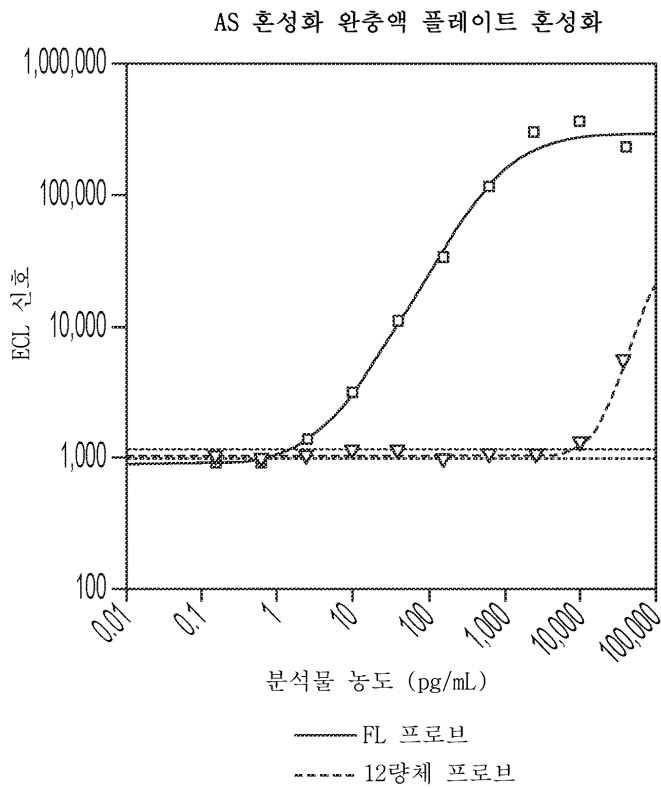
도면6b



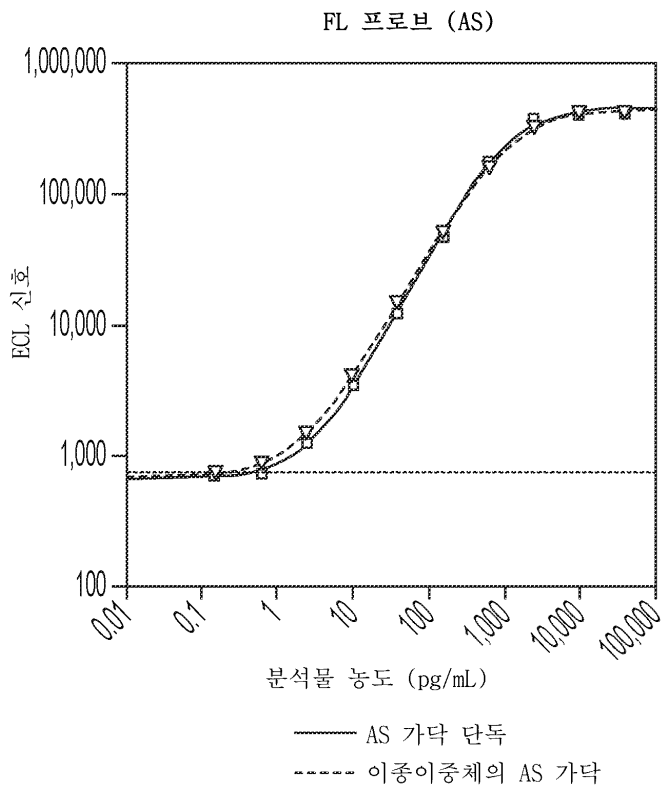
도면7a



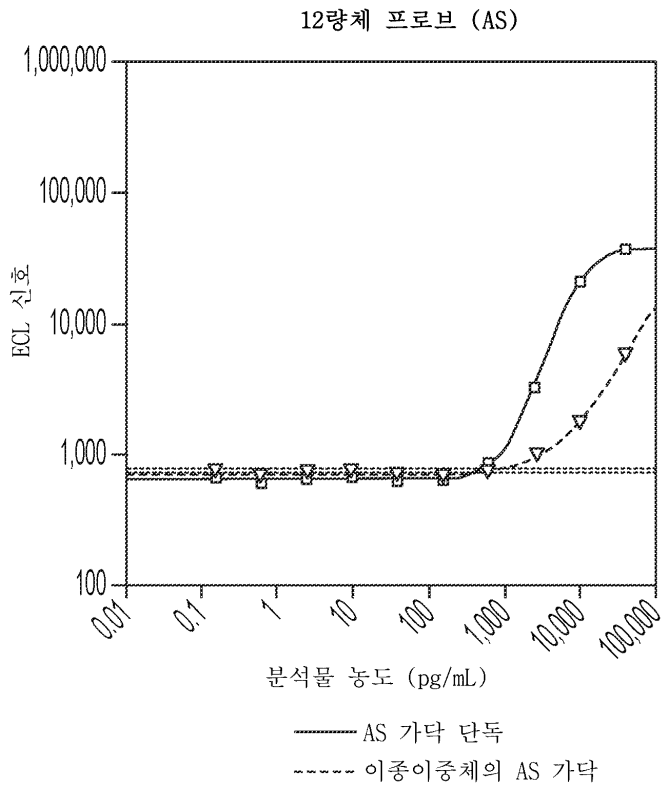
도면7b



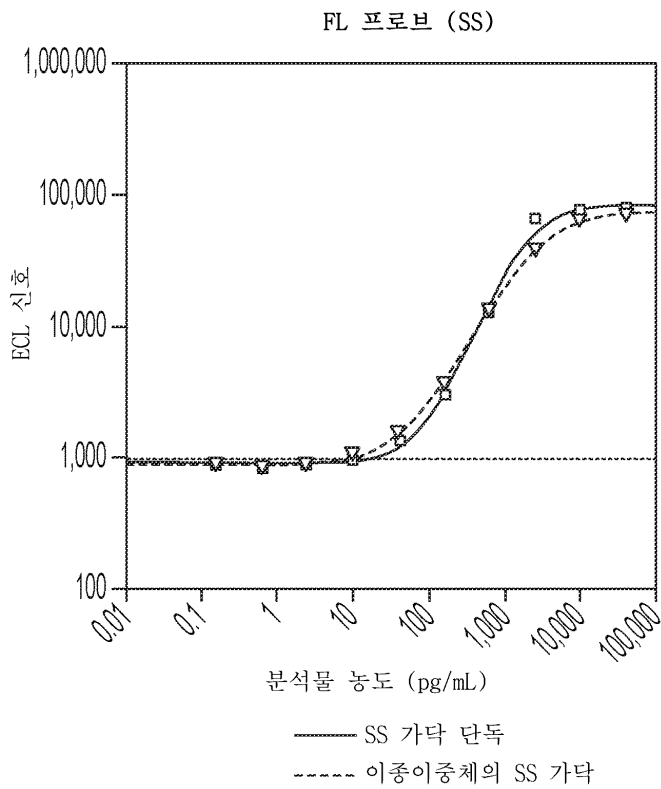
도면8a



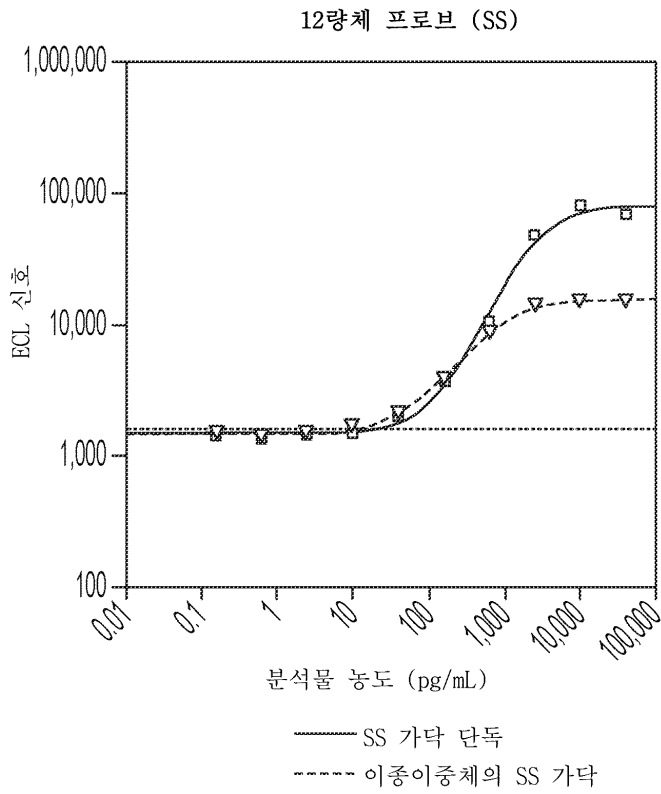
도면8b



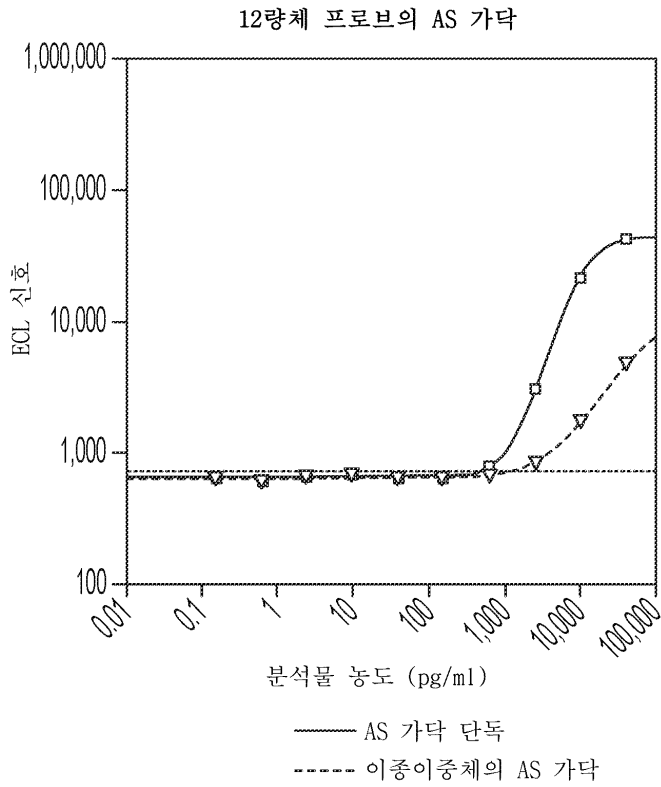
도면9a



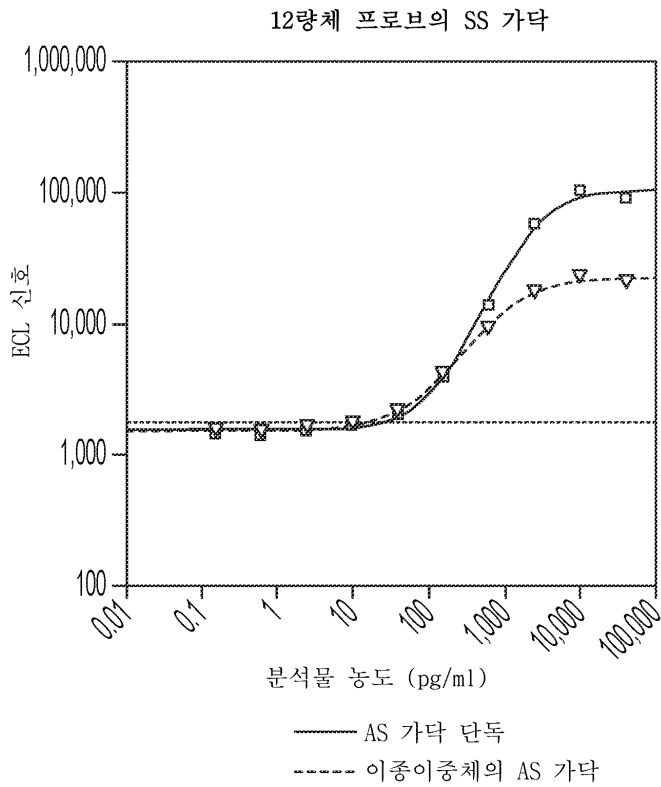
도면9b



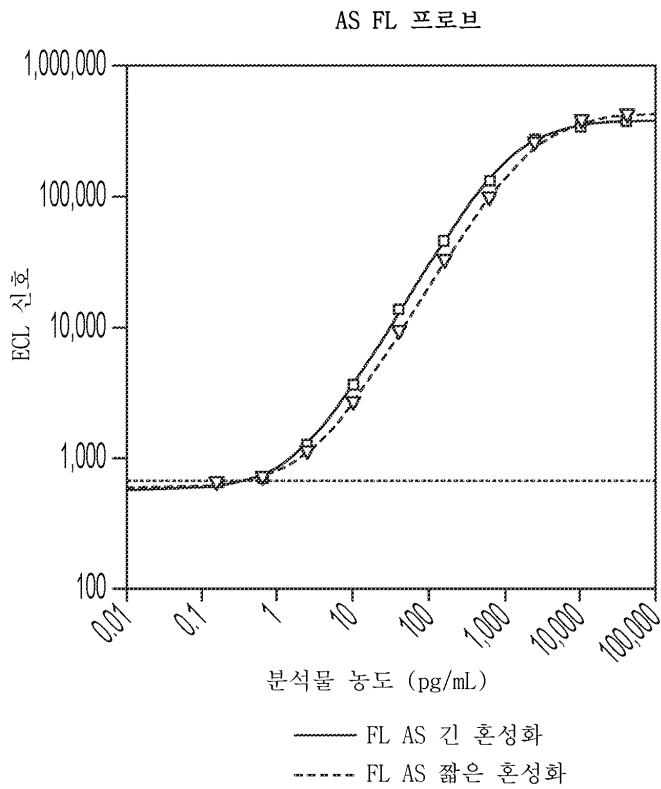
도면10a



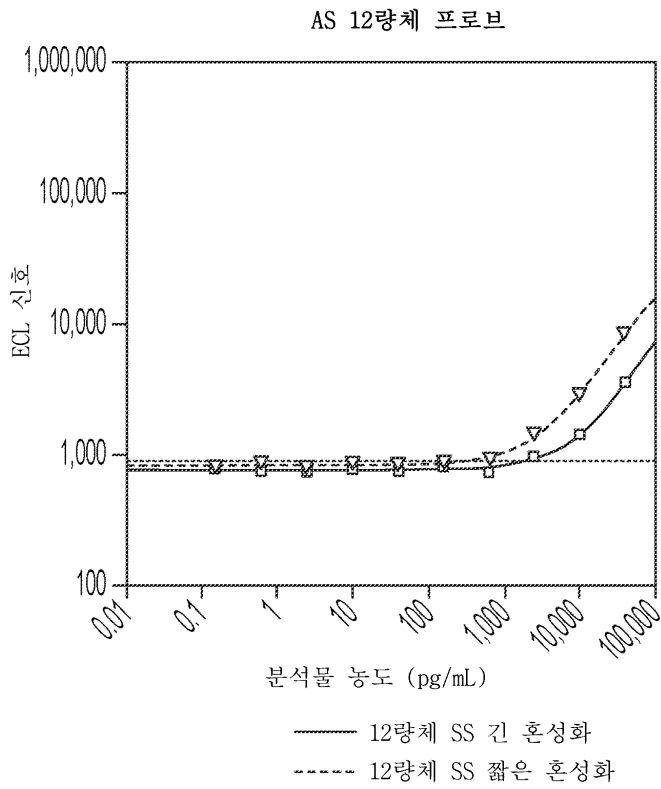
도면10b



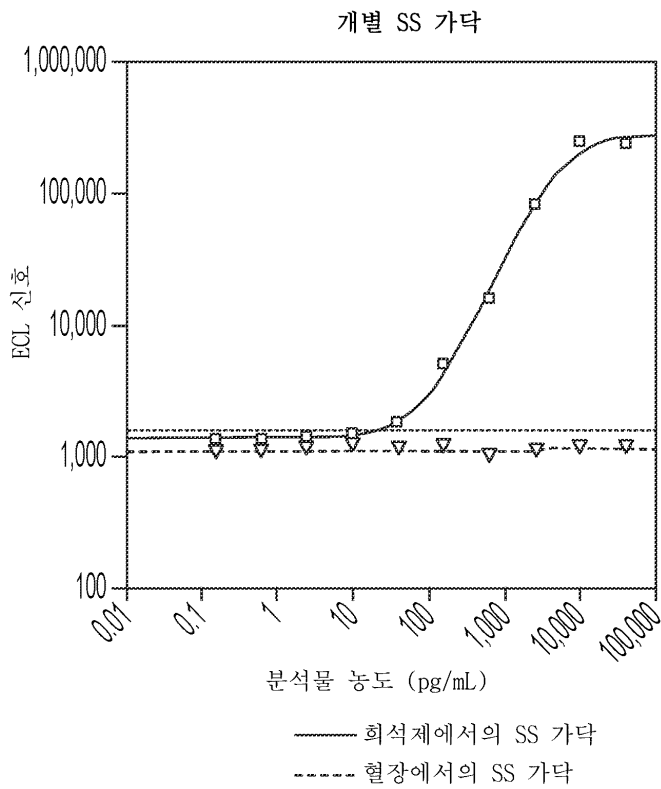
도면11a



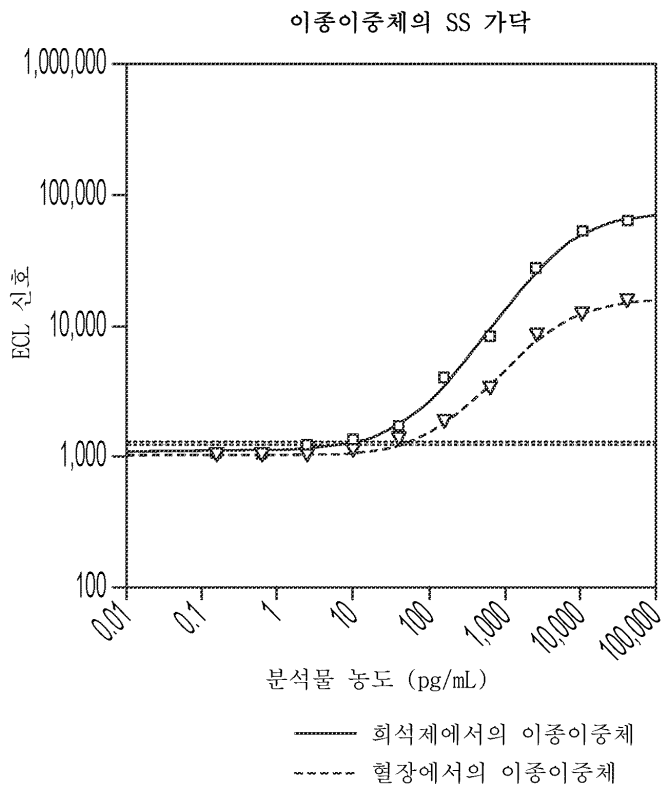
도면11b



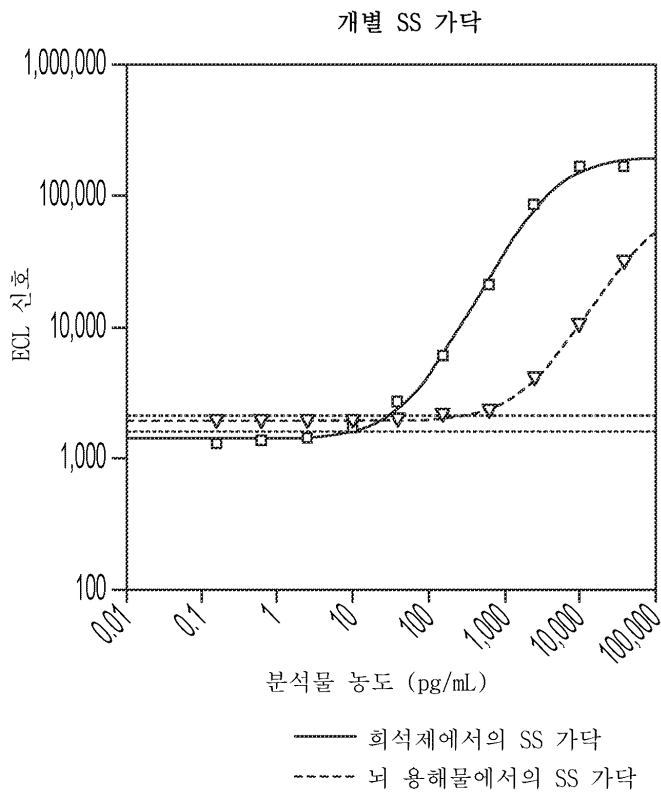
도면12a



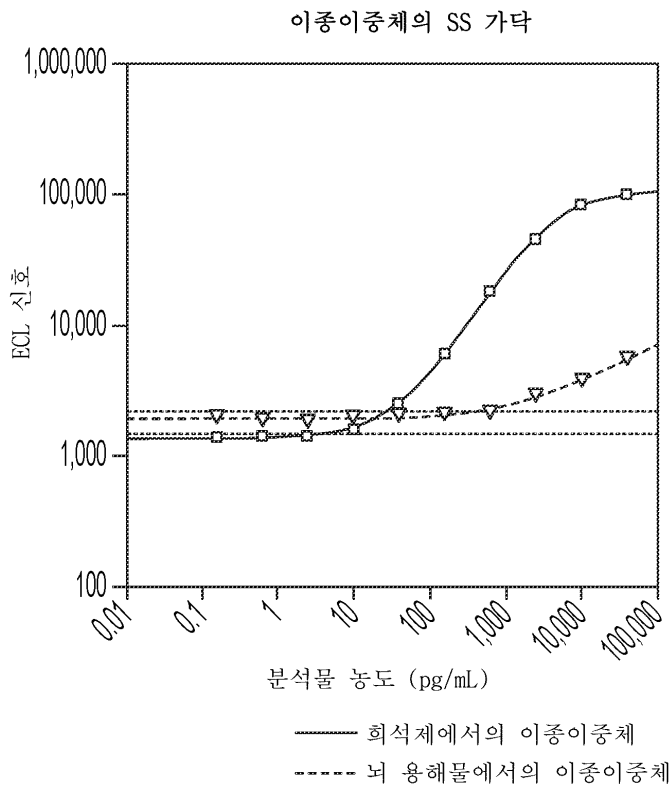
도면12b



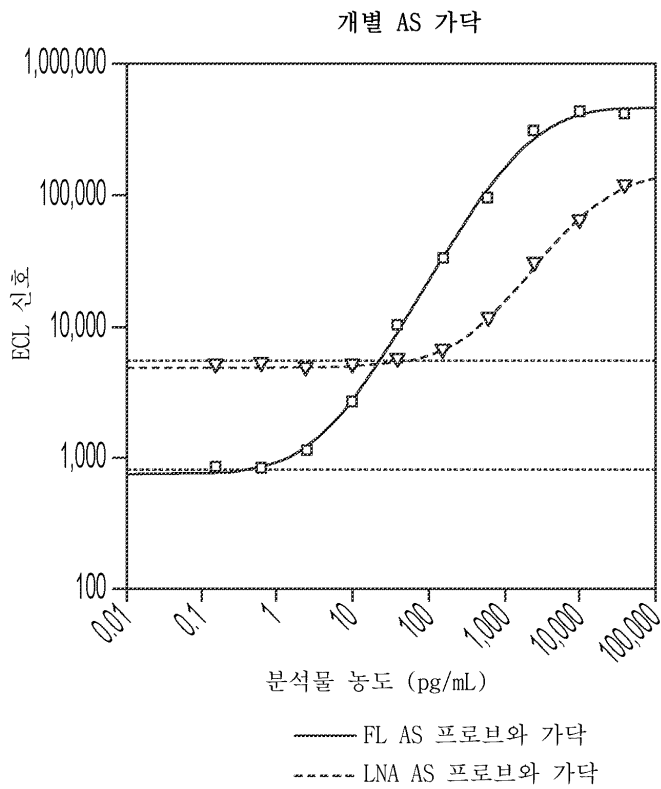
도면13a



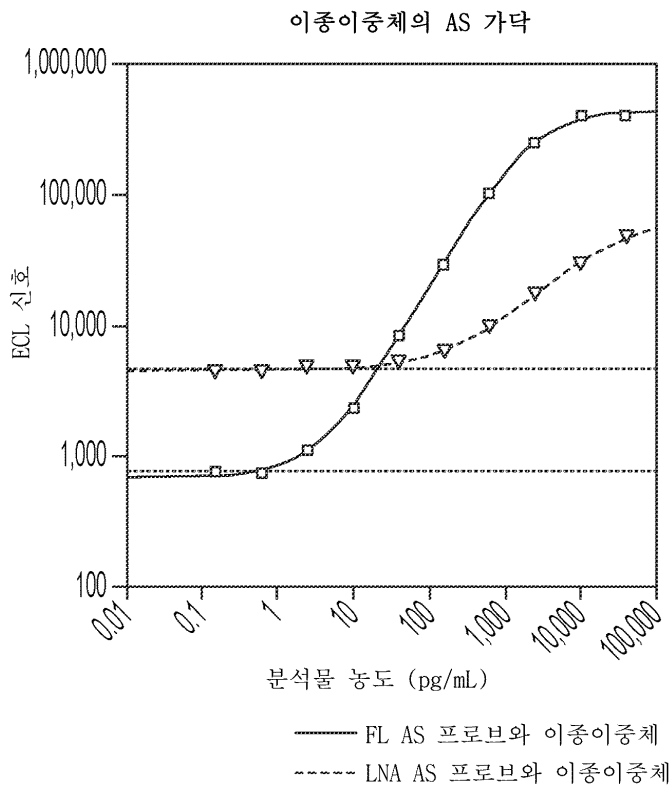
도면13b



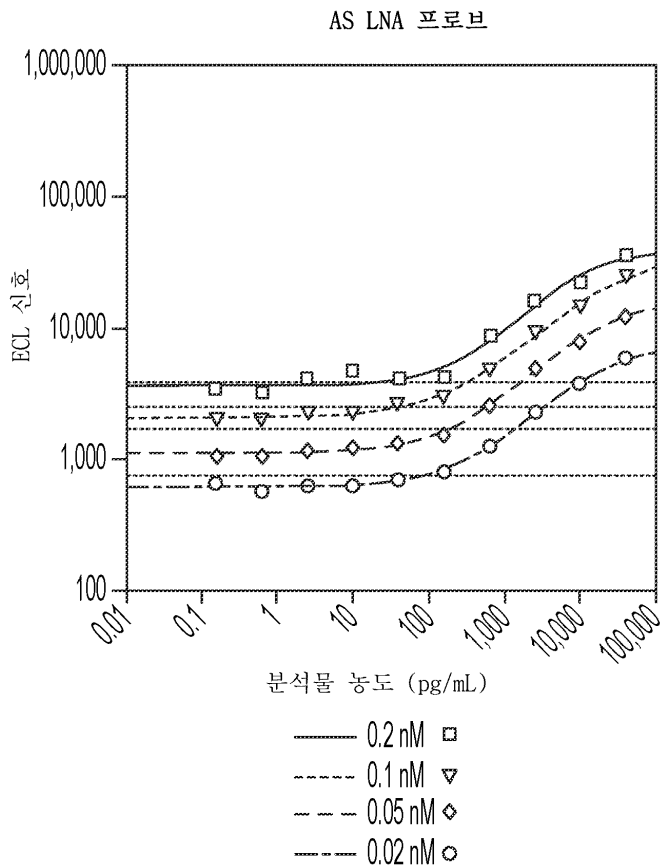
도면14a



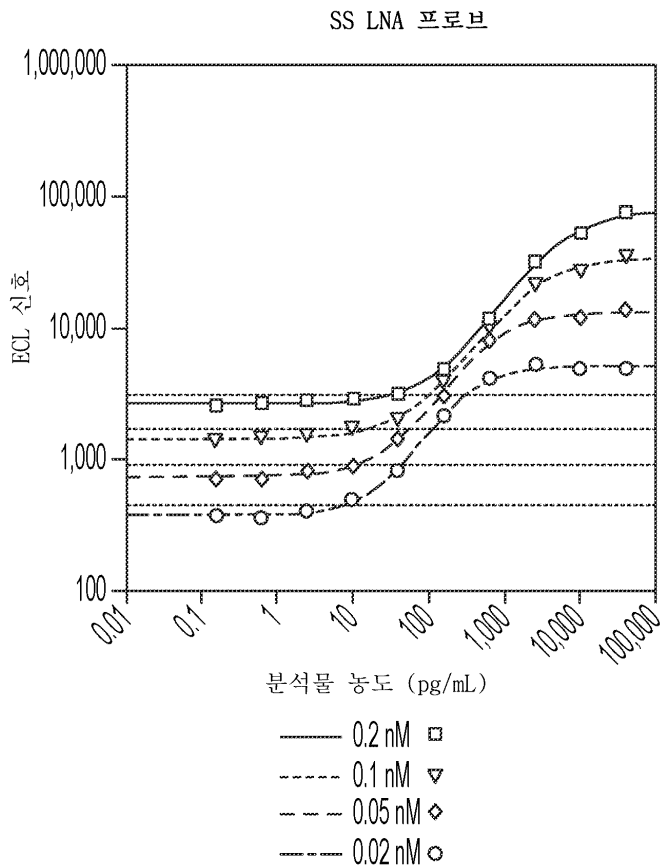
도면14b



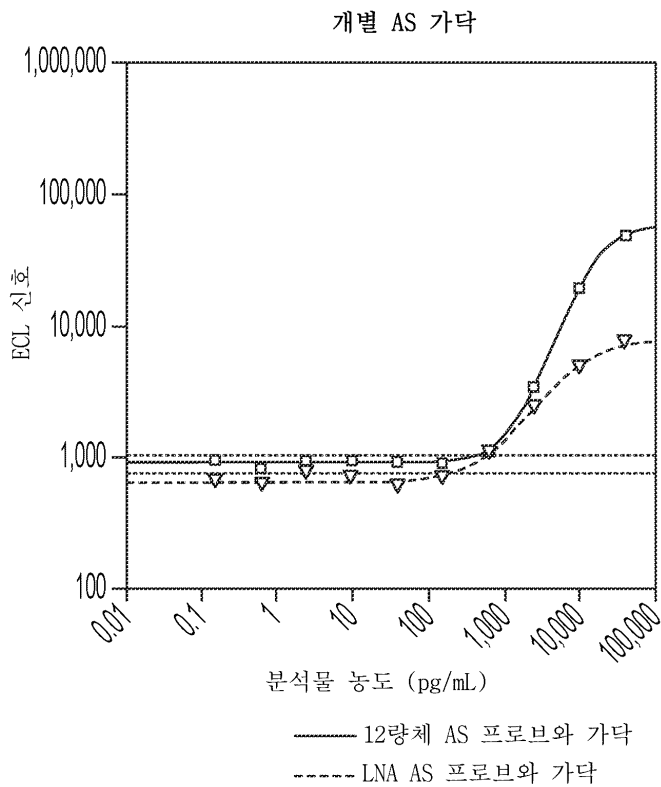
도면15a



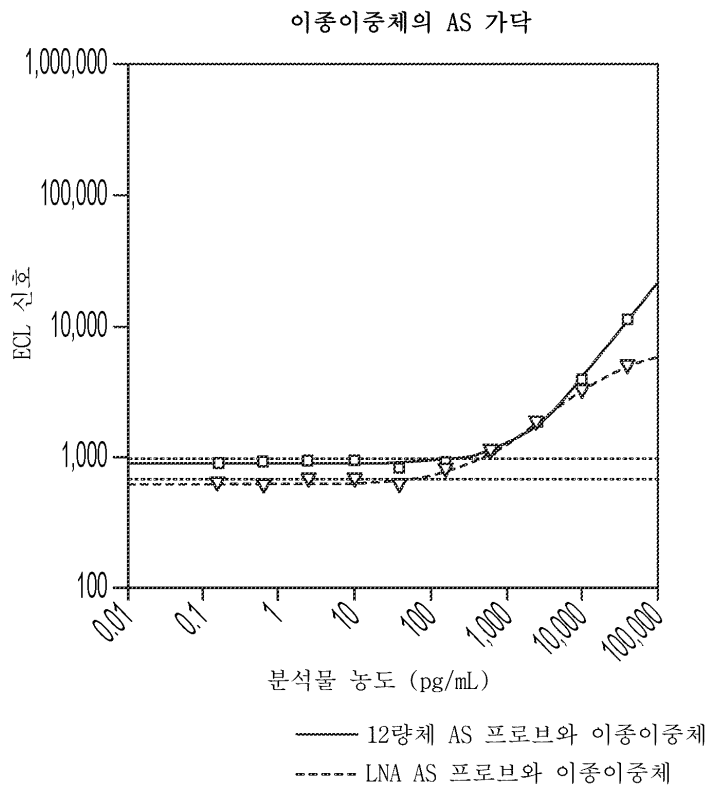
도면15b



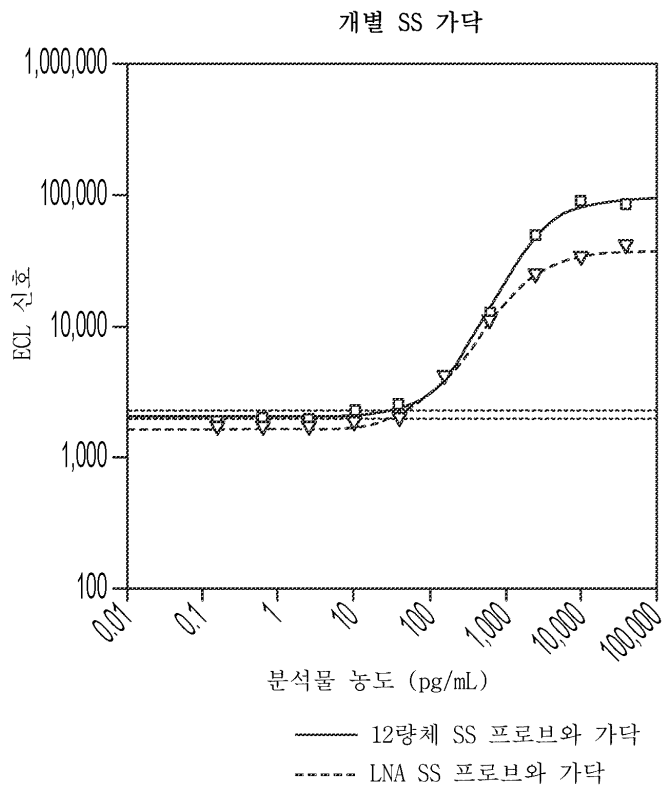
도면16a



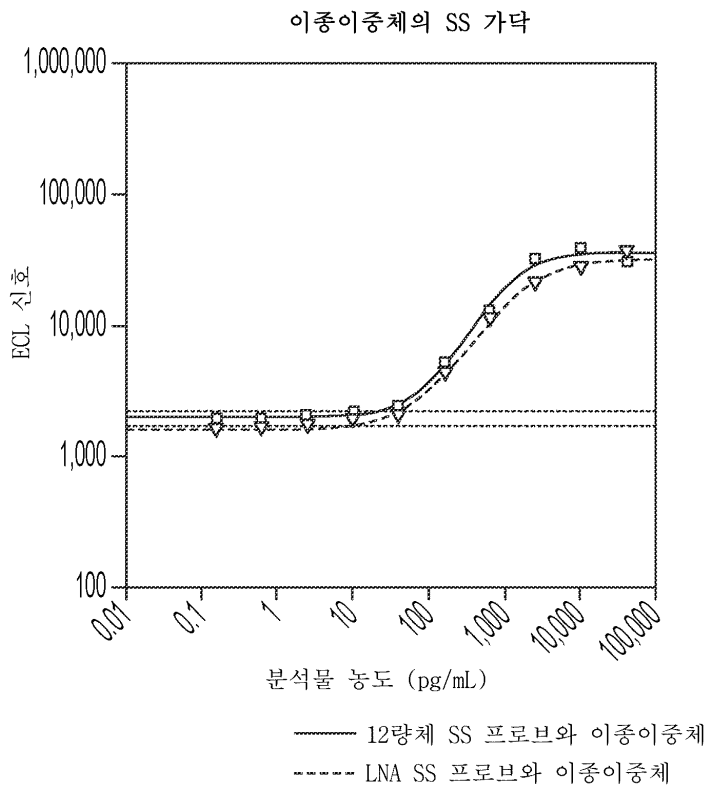
도면16b



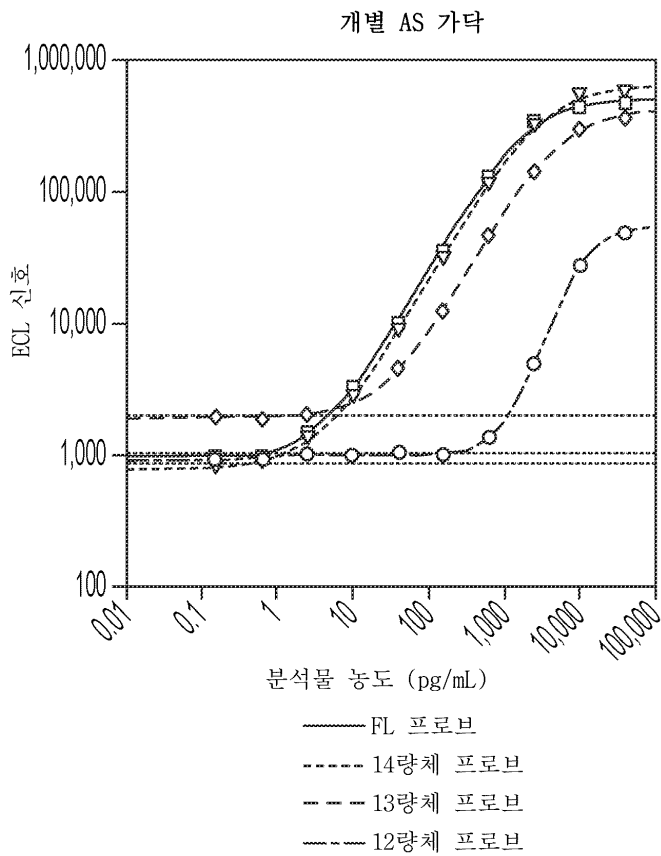
도면17a



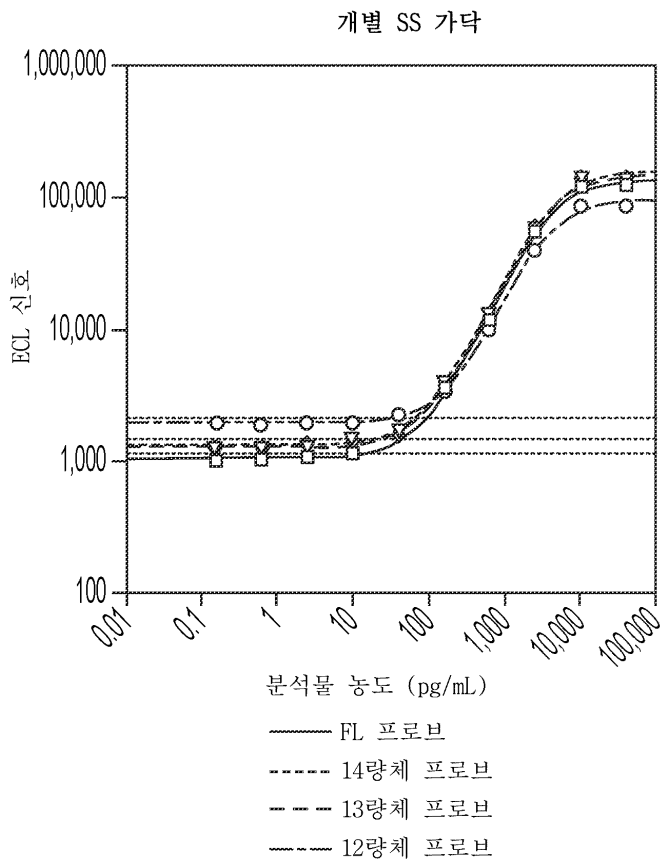
도면17b



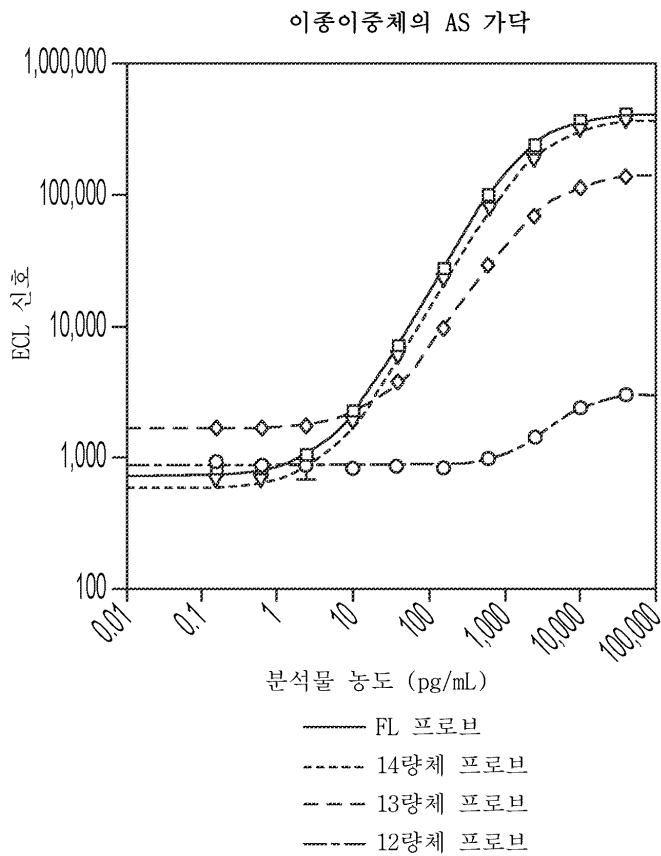
도면18a



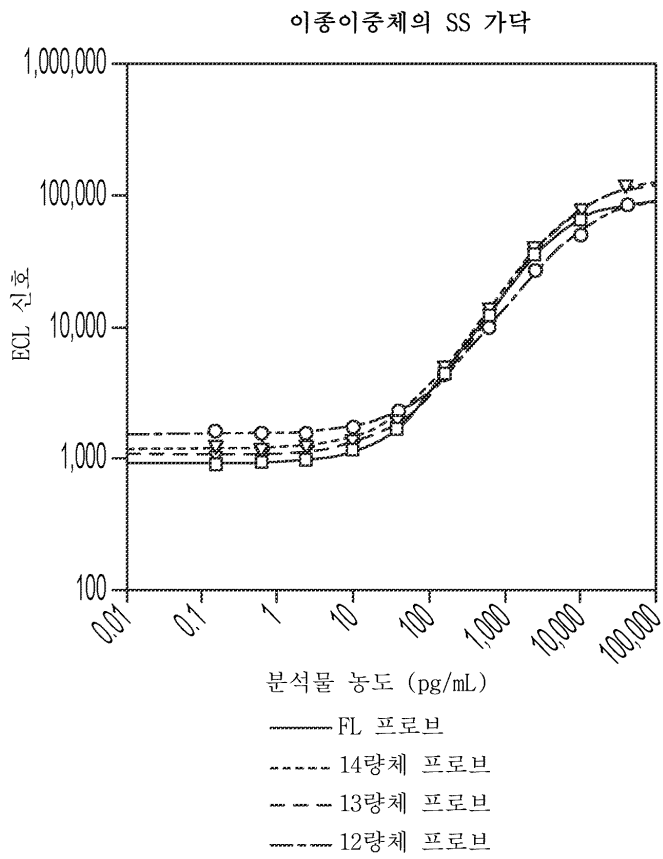
도면18b



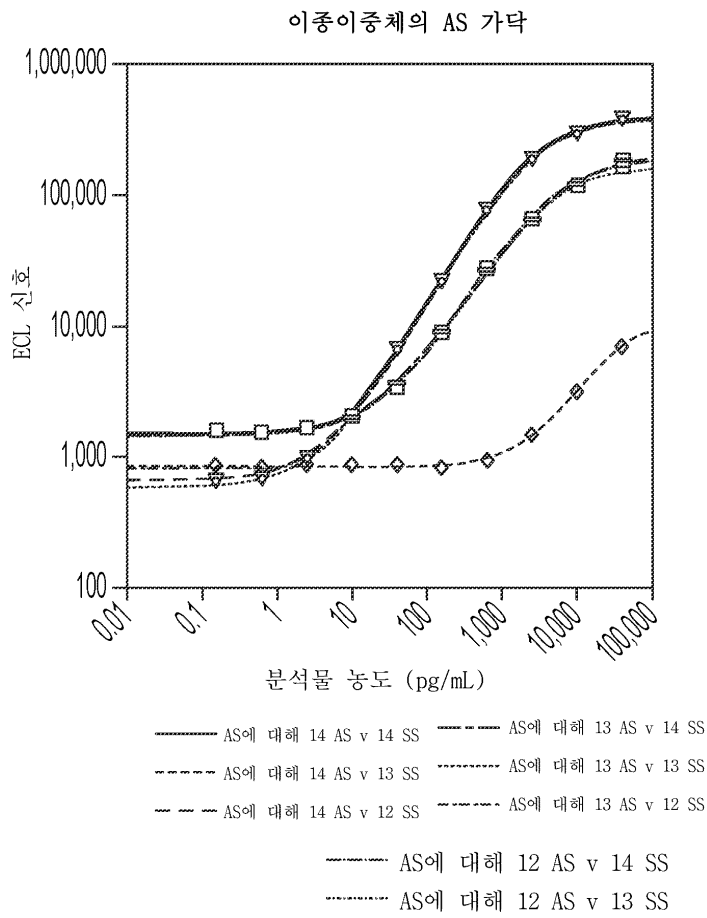
도면19a



도면19b



도면20a



도면 20b

