



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0124705  
(43) 공개일자 2010년11월29일

(51) Int. Cl.

*C12N 15/10* (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7015189

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년09월12일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년07월09일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2008/002789

(87) 국제공개번호 WO 2009/083763

국제공개일자 2009년07월09일

(30) 우선권주장

07025148.3 2007년12월27일

유럽특허청(EPO)(EP)

61/009,145 2007년12월27일 미국(US)

(71) 출원인

뿔리뿔뤼스-트랑스펙씨옹

프랑스 67401 일끼르슈 그라펜슈타덴 셰텍스 베베  
90018 볼르바르 셰바스띠앵 브랑뜨 비오빠르끄

유니베르시떼 드 스트라스부르

프랑스 에프-67081 스트라스부르 셰텍스 셰에스  
90032 튀 블레즈 파스칼 4

상뜨르 나쇼날 드 라 러쉴쉬 샹띠피끄 (제엔알  
에스)

프랑스, 에프-75794 파리, 셰텍스 16, 튀 미셀-앙  
즈 3

(72) 발명자

렌느 나탈리

프랑스 에프-67600 뫼테르스홀 튀 드 일세넝 12

에르바셰르 파트릭

프랑스 에프-67230 뽕펠 튀 퐁 네프 6

(74) 대리인

김진희, 김성기

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 핵산 하이브리드화 방법

(57) 요약

본 발명은 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체와의 하이브리드화에 의해 샘플 중 표적 핵산을 조작, 단리, 검출 또는 증폭하는 방법에 관한 것으로서, 상기 핵산을, 직접 또는 링커를 통해 함께 연결된 적어도 A<sub>i</sub> 및 B<sub>j</sub> 부분을 포함하는 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체와 반응시키는 것을 포함하며, 여기서,

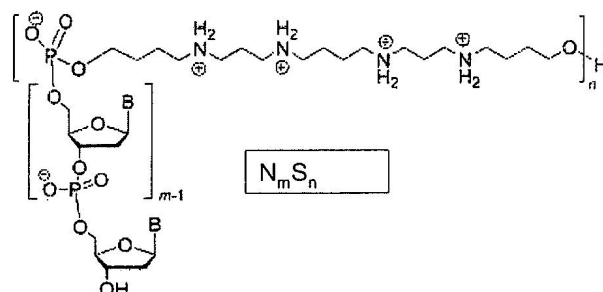
A<sub>i</sub>는 i량체 올리고뉴클레오타이드이고, i=3 내지 50이며, 이 때 A<sub>i</sub>는 자연 또는 비자연 발생 핵염기 및/또는 펜타푸라노실기 및/또는 천연 포스포디에스테르 결합을 가지며, 경우에 따라 마커기를 포함하는 올리고머이다.

B<sub>j</sub>는 j량체 유기 올리고양이온 부분이고, j=1 내지 50이며, 이 때 B는

- HPO<sub>3</sub>-R<sub>1</sub>-(NH-R<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-R<sub>3</sub>-O-[여기서, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 동일하거나 상이한 저급 알킬렌기이고, n > 1인 경우 NH-R<sub>2</sub> 부분은 동일하거나 상이함];

- HPO<sub>3</sub>-R<sub>1</sub>-CH(X)-R<sub>3</sub>-O-[여기서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>3</sub>은 동일하거나 상이하며, 저급 알킬렌기이고, X는 푸트레신, 스퍼미딘 또는 스퍼민 잔기임]이다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

샘플 중의 표적 핵산을 조작, 단리, 검출 또는 증폭하는 방법으로서, 적어도 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체  $A_i-B_j$ 를 포함하고,

- 주형으로서 상기 표적 핵산을 이용하여 화학식 I 내지 III의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체  $A_i-B_j$ 를 연장시키는 단계, 또는

- 화학식 I 내지 X의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체  $A_i-B_j$ 로 상기 표적 핵산을 검출하는 단계를 포함하며,

상기 접합체  $A_i-B_j$ 에서

.  $A_i$ 는  $i$ 량체 올리고뉴클레오타이드이고,  $i=3$  내지 50이며, 여기서  $A_i$ 는 자연 또는 비자연 발생 핵염기 및/또는 펜타푸라노실기 및/또는 천연 포스포디에스테르 결합을 가지며, 경우에 따라 마커기를 포함하는 올리고머이고,

.  $B_j$  부분은  $A_i$  부분에 또는 포스포디에스테르 결합을 통해  $A_i$ 에의 링커에 연결되고,

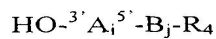
.  $B_j$ 는  $j$ 량체 유기 올리고양이온 부분이고,  $j=1$  내지 50이며, 여기서  $B$ 는

-  $-HPO_3-R_1-(NH-R_2)_n-NH-R_3-O-$  [여기서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 는 동일하거나 상이하며, C1-C6 알킬렌 라디칼이고,  $n > 1$ 인 경우  $NH-R_2$  부분은 동일하거나 상이함];

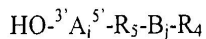
-  $-HPO_3-R_1-CH(X)-R_3-O-$  [여기서,  $R_1$  및  $R_3$ 는 동일하거나 상이하며, C1-C6 알킬렌 라디칼이고,  $X$ 는 푸트레신, 스퍼미딘 또는 스퍼민 잔기임]이며,

상기 화학식 I 내지 X는 다음과 같은 것인 방법:

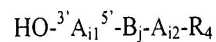
화학식 I



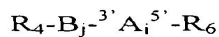
화학식 II



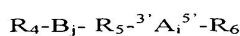
화학식 III



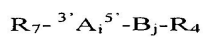
화학식 IV



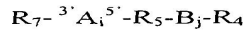
화학식 V



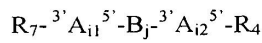
화학식 VI



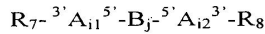
화학식 VII



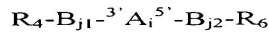
화학식 VIII



화학식 IX



화학식 X



[상기 식에서,

- $A_{i1}$  및  $A_{i2}$ 는 동일하거나 상이하며, 상기  $A_i$ 에 대해 정의된 바와 같고;
- $R_4$  및  $R_6$ 은 동일하거나 상이하며, H 또는 링커, 소광기(quencher), 마커, 예컨대 발색단 또는 형광단 기, 또는 화학적 부분, 예컨대 바이오틴, 소수성 사슬, 콜레스테롤 유도체, 항원, 단백질, 펩티드, 당 또는 포스페이트 기이며;
- $R_5$ 는 H,  $A_i$  및  $B_j$ 와 다르며,  $A_i$ 와  $B_j$ 사이의, 화학적으로 안정하거나 또는 절단 가능한 링커이고,
- $B_{j1}$  및  $B_{j2}$ 는 동일하거나 상이하며, 상기  $B_j$ 에 대해 정의된 바와 같고;
- $R_7$  및  $R_8$ 은 동일하거나 상이하며, H가 아니고, 링커, 소광기, 마커, 예컨대 발색단 또는 형광단 기, 또는 화학적 부분, 예컨대 바이오틴, 소수성 사슬, 콜레스테롤 유도체, 항원, 단백질, 펩티드, 포스페이트기 또는 당을 포함하는 군에서 선택된다.]

**청구항 2**

제1항에 있어서,  $A_i$ 는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 및 비자연 발생 핵염기, 예컨대 잠금 뉴클레오타이드(LNA), PNA 뿐 아니라 화학적 변형체 또는 치환체, 예컨대 포스포로티오에이트, 2'-플루오로 또는 2'-O-알킬 기를 포함하는 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화학식 I 내지 III의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 DNA 또는 RNA 폴리머라제용 프라이머로서 사용되는 것인 방법.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체 하나 이상을 이용하여 핵산을 증폭시키는 것인 방법.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체가 역전사용 프라이머로서 사용되는 것인 방법.

**청구항 6**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화학식 IV 내지 X의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체  $A_i$ - $B_j$ 는 적어도 프라이머 연장 단계를 포함하는 분석에서 상기 표적 핵산을 검출하기 위한 프로브로서 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 핵산 증폭 분석에서 표적 핵산을 검출하기 위한 프로브로서 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 PCR, 실시간-PCR, 또는 역전사 분석에서 프로브로서 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 9

제6항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 핵산 합성 단계를 포함하는 분석에서 프로브로서 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화학식 IV 내지 X 중 하나 이상이 표적 핵산의 검출 또는 증폭을 억제하기 위한 클램프(clamp)로서 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 표적 핵산을 증폭 및 검출하기 위한 것인 방법.

#### 청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 상기 화학식 I 내지 X의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체가 핵산 합성 단계를 포함하는 분석에서 표적을 검출하기 위해 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 상기 화학식 I 내지 X의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체가 핵산 합성 단계를 포함하는 분석에서 야생형 및 돌연변이 표적 핵산을 구분하기 위해 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 상기 화학식 I 내지 X의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체가 다중(multiplex) 분석에서 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 상기 화학식 I 내지 X의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체가 적어도 핵산 합성 단계를 포함하는 분석에서 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 상기 화학식 I 내지 X의 분자를 이용하는, 상기 표적 핵산을 정제, 포집 및 변형시키는 것과 같은 조작 단계를 더 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 상기 화학식 I 내지 X의 분자가 야생형 및 돌연변이 표적 핵산을 구분하기 위해 사용되는 것인 방법.

### 명세서

### 기술분야

본 발명은 핵산을 조작, 단리, 검출 또는 증폭시키기 위해 사용되는 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체와

[0001]

핵산의 하이브리드화와, 분자 생물학 및 진단 분야에서의 이의 용도에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 핵산 기반의 기법은 세포 및 분자 연구와 진단에 널리 사용되고 있다. 이 기법은 합성 올리고뉴클레오타이드와 그 상보성 핵산 가닥 사이의 서열 인식에 의존한다. 친화도와 특이성은 임의의 핵산 하이브리드화 기반 분석의 효율을 결정하는 2가지 주요 특성이다.
- [0003] 핵산 하이브리드화를 개선하기 위해 상이한 방법이 개발되어 왔다. 이 중 하나는 음으로 하전된 핵산 가닥 사이의 정전기적 반발을 감소시키는 것이다. 최근, 올리고뉴클레오타이드에 양이온 기를 그래프팅하고, 올리고뉴클레오타이드 합성을 위해 사용되는 포스포르아미디트 화학에 전적으로 기초한 자동화 고상 합성이 WO 2007/069092호에 개시되었다. 생성된 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 가닥 사이의 포스페이트 반발을 감소시켜 짧은 상보 서열과의 하이브리드화를 안정화시키는 것으로 확인되었다(Pons et al, 2006).
- [0004] 건조 더미에서 바늘 찾기처럼, 전체 게놈과 같은 복합 핵산 생물 시료에서 고유 서열 특이적 검출을 향상시키는 것은 더욱 어려운 과제이다. 그러한 상황에서는, 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체의 양이온 부분이 게놈 DNA의 포스페이트 기에 특이적으로 부착되지 않아서, 표적화된 서열의 특이적 인식이 감소될 것으로 예상된다. 이러한 염려는 WO 2007/069092호 및 문헌(Pons et al, 2006)에 예시된 바와 같이, 다가양이온이 폴리아민인 경우 더욱 심해질 수 있다. 실제로, 스퍼민 또는 스퍼미딘과 같은 폴리아민은 원핵 및 진핵 세포의 게놈 DNA와 천연적으로 상호작용한다(리뷰: 문헌[Tabor and Tabor, 1984]; 문헌[Pegg et al., 1986]). 또한, 결합 친화도와 서열 특이성은, 핵산 염기쌍 상호작용을 지배하는 기전으로 인해 일반적으로 음의 관계가 있는 것으로 알려져 있다(Demidov and Frank-Kamenetskii, 2004). 따라서, 전체 게놈 내의 특정 서열을 표적으로 하는데 사용되는 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 미스매치를 허용하여 특이성을 감소시킬 것으로 예상된다.

## 발명의 내용

- [0005] 본 발명은 WO 2007/069092호에 개시된 분자로부터 얻은 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체의 특정 선택이 표적 서열에 대해 놀랍게 엄격한 특이성과 매우 높은 친화도를 나타내어, 하이브리드화 기반 방법을 일반적으로 개선시키는 예상 밖의 발견을 개시한다. 상기 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 폴리머라제 연쇄 반응을 특별히 개선시키는 것으로 확인되었다.
- [0006] 유리하게는, 상기 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 프라이머 및 프로브로서 표준 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 특히 효과적이다. "표준 올리고뉴클레오타이드"는 천연 핵염기(nucleobase)를 포함하는 비변형 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0007] 본 발명의 목적은 핵산을 표적화하는데 있어서 특정 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체를 사용하는 하이브리드화 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 프라이머 또는 프로브로서의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체의 용도에 관한 것이다.
- [0009] 또 다른 목적에 따르면, 본 발명은 상기 접합체의 생물학적 적용에 관한 것이다.
- [0010] 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체와의 하이브리드화에 의해 샘플 중 표적 핵산을 검출, 단리, 증폭 또는 조작하는 방법은 상기 핵산을, 직접 또는 링커를 통해 함께 연결된 적어도  $A_i$  및  $B_j$  부분을 포함하는 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체와 반응시키는 것을 포함하며,
- [0011] 여기서,
- [0012] .  $A_i$ 는  $i$ 량체 올리고뉴클레오타이드이고,  $i=3$  내지 50이며, 이 때  $A_i$ 는 자연 또는 비자연 발생 핵염기 및/또는 헤택타푸라노실기 및/또는 천연 포스포디에스테르 결합을 가지며, 경우에 따라 마커기를 포함하는 올리고머이다.
- [0013] .  $B_j$ 는  $j$ 량체 유기 올리고양이온 부분이고,  $j=1$  내지 50이며, 이 때  $B$ 는
- [0014] -  $HPO_3-R_1-(NH-R_2)_nNH-R_3-O$ -[여기서,  $R_1$ ,  $R_2$  및  $R_3$ 는 동일하거나 상이한 저급 알킬렌이고,  $n > 1$ 인 경우  $NH-R_2$  부분은 동일하거나 상이함];
- [0015] -  $HPO_3-R_1-CH(X)-R_3-O$ -[여기서,  $R_1$  및  $R_3$ 는 동일하거나 상이하며, 저급 알킬렌이고,  $X$ 는 푸트레신, 스퍼미딘 또

는 스퍼민 잔기임]이다.

- [0016] 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 바와 같은 "저급 알킬렌"은 임의 치환된 C1-C6 선형, 분지형 또는 환형 알킬렌 라디칼을 의미한다.
- [0017] A<sub>i</sub>는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 및 비자연 발생 핵염기, 예컨대 잠금 뉴클레오타이드(LNA), PNA 뿐 아니라 화학적 변형체 또는 치환체, 예컨대 포스포로티오에이트(티오포스페이트라고도 명명함), 2'-플루오로 또는 2'-O-알킬 기를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0018] A<sub>i</sub>는 발색단/형광단 기 및/또는 소광(quencher)기, 또는 화학적 부분, 예컨대 아미노 또는 티올 변형체, 스페이서기, 바이오틴, 소수성 사슬, 콜레스테롤 유도체, 항원, 단백질, 펩티드, 포스페이트기 또는 당을 포함할 수 있다.
- [0019] 제1 구체예에서, 자유 -OH기는 A<sub>i</sub>의 3'번 위치에 존재한다. 따라서, 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 DNA 또는 RNA 폴리머라제용 기질로서 유용하다.
- [0020] 제1 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 핵산 합성용 프라이머로서 유용하다.
- [0021] 상기 제1 구체예에 따른 혼합 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는 하기 화학식 I, II 또는 III을 가진다:
- [0022] 화학식 I
- [0023] 
$$\text{HO}-3'\text{A}_i5'-\text{B}_j\text{-R}_4$$
- [0024] 화학식 II
- [0025] 
$$\text{HO}-3'\text{A}_i5'-\text{R}_5\text{-B}_j\text{-R}_4$$
- [0026] 화학식 III
- [0027] 
$$\text{HO}-3'\text{A}_{i1}5'-\text{B}_j\text{-A}_{i2}\text{-R}_4$$
- [0028] 상기 식에서,
- [0029] - A<sub>i1</sub> 및 A<sub>i2</sub>는 동일하거나 상이하며, 상기 A<sub>i</sub>에 대해 정의된 바와 같고; A<sub>i2</sub>는 3'-5' 또는 5'-3' 방향이고,
- [0030] - R<sub>4</sub>는 H 또는 링커, 소광기, 마커, 예컨대 발색단 또는 형광단 기, 또는 화학적 부분, 예컨대 바이오틴, 소수성 사슬, 콜레스테롤 유도체, 항원, 단백질, 펩티드, 당 또는 포스페이트 기이며,
- [0031] - R<sub>5</sub>는 H, A<sub>i</sub> 및 B<sub>j</sub>와 다르며, A<sub>i</sub>와 B<sub>j</sub>사이의 링커이고, 화학적으로 안정하거나 또는 절단 가능한 링커로 이루어진다.
- [0032] 따라서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 방법에 관한 것으로서, 화학식 I, II 또는 III의 분자는 표적 핵산에 결합한 후에 프라이머로서 사용된다.
- [0033] 상기 방법은 유리하게는,
- [0034] - 프라이머 분자가 표적 핵산 분자에 결합하도록 하는 조건 하에 상기 정의된 바와 같은 프라이머와 상기 표적 핵산 분자를 향온처리하는 단계, 및
- [0035] - 주형으로서 상기 표적 핵산 분자를 이용하여 상기 프라이머를 연장시키는 단계를 포함한다.
- [0036] 상기 구체예에서, 상기 분자는 핵산 합성을 촉진하는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 대한 기질이다.
- [0037] 실시예에 제시된 바와 같이, 상기 분자에 상응하는 프라이머는, 천연 핵염기를 포함하는 표준 비변형 올리고뉴클레오타이드와 비교하여, 예상 외의 높은 서열 특이성과 함께 표적 핵산에 대한 친화도를 유의적으로 향상시킬 수 있다.

- [0038] 특히, 상기 분자는 폴리머라제 연쇄 반응과 같은 역전사 및 핵산 증폭 방법을 위한 강력한 도구이다.
- [0039] 실제로 상기 프라이머로 PCR과 같은 매우 효율적이고, 특이적이며 감도가 높은 증폭 반응을 실시할 수 있다.
- [0040] 표적에 대한 뛰어난 친화도로 인해서, 표준 프라이머(비변형 올리고뉴클레오타이드)와 비교하여 최대 10배로 감소시킨 매우 낮은 농도에서 본 발명의 프라이머를 사용할 수 있다. 또한, 낮은 염 농도, 더욱 특별하게는  $MgCl_2$  농도에서 효과적으로 실시할 수 있다.
- [0041] 하이브리드화 온도는 표준 프라이머와 비교하여 어느 정도 증가될 수 있다. 이는 올리고양이온의 길이에 따라서 조정할 수 있다.
- [0042] 따라서, 하이브리드화 온도 및 염 농도, 더욱 구체적으로는  $MgCl_2$  농도의 조정 규제를 없앨 수 있다.
- [0043] 상기 프라이머는 멀티플렉스 PCR 또는 고처리량 PCR과 같은 적용에 유용하다.
- [0044] 상기 프라이머는 또한 PCR에 의한 증폭이 곤란한 것으로 알려져 있는 AT-풍부 영역의 증폭을 향상시킬 수 있다.
- [0045] 특히, 본 발명의 분자로, 변이성이 높은 게놈 보존 영역의 증폭과 같은 특정 적용에 유용한 더 짧은 프라이머를 디자인할 수 있다.
- [0046] 실시예에 제시된 바와 같이, 상기 프라이머는 올리고(dT), 헥사머 또는 특이적 프라이머로서 역전사와 같은 적용에도 유용하다. 이들의 뛰어난 친화도로 인하여, 이들은 저 발현 유전자를 검출하기 위해 특히 유용할 수 있다.
- [0047] 상기 프라이머를 DNA 서열결정을 위해 사용할 수도 있다.
- [0048] 일부 경우에, 올리고뉴클레오타이드와 올리고양이온 부분 사이의 절단가능한 링커를 가지는 본 발명의 분자를 사용하는 것이 유용할 수 있다. 증폭 산물의 전기영동 분리가 필요한 방법에 있어서, 분리 이전의 다가양이온의 증폭후 분해가 유용할 수 있다.
- [0049] 제2 구체예에서,  $A_i$ 의 3' 위치에서의 -OH기가 차단되며, 따라서  $A_i$ 는 폴리머라제의 존재 하에 연장될 수 없다.
- [0050] 상기 제2 그룹의 분자는 하기 화학식을 가진다:
- [0051] 화학식 IV
- [0052]  $R_4-B_j-3'A_i5'-R_6$
- [0053] 또는 화학식 V
- [0054]  $R_4-B_j-R_5-3'A_i5'-R_6$
- [0055] 또는 화학식 VI
- [0056]  $R_7-3'A_i5'-B_j-R_4$
- [0057] 또는 화학식 VII
- [0058]  $R_7-3'A_i5'-R_5-B_j-R_4$
- [0059] 또는 화학식 VIII
- [0060]  $R_7-3'A_{i1}5'-B_j-3'A_{i2}5'-R_4$
- [0061] 또는 화학식 IX
- [0062]  $R_7-3'A_{i1}5'-B_j-5'A_{i2}3'-R_8$
- [0063] 또는 화학식 X
- [0064]  $R_4-B_{j1}-3'A_i5'-B_{j2}-R_6$



- [0065] 상기 식에서,
- [0066] -  $A_{i1}$  및  $A_{i2}$ 는 동일하거나 상이하며, 상기  $A_i$ 에 대해 정의된 바와 같고;
- [0067] -  $B_{j1}$  및  $B_{j2}$ 는 동일하거나 상이하며, 상기  $B_j$ 에 대해 정의된 바와 같고;
- [0068] -  $R_4$  및  $R_6$ 은 동일하거나 상이하며,  $R_4$ 는 상기 정의한 바와 같고  $R_6$ 은 상기  $R_4$ 에 대해 정의한 바와 같으며;
- [0069] -  $R_7$  및  $R_8$ 은 동일하거나 상이하며, H는 아니고, 링커, 소광기, 마커, 예컨대 발색단 또는 형광단 기, 또는 화학적 부분, 예컨대 바이오틴, 소수성 사슬, 콜레스테롤 유도체, 항원, 단백질, 펩티드, 포스페이트기 또는 당을 포함하는 군에서 선택된다.
- [0070] 상기 제2 구체예의 분자는 DNA 또는 RNA 폴리머라제를 포함하는 분석에서 표적 핵산을 검출하는데 사용된다. 이들은 PCR과 같은 시험관내 핵산 증폭 과정에 의해 생성된 상보성 핵산을 검출하기 위한 프로브로서 특히 더 유용하다.
- [0071] 상기 제2 구체예의 분자는 실시간 핵산 증폭을 모니터링하기 위한 프로브로서 특히 더 유용하다.
- [0072] 본 발명은 표적 핵산의 검출 방법에 관한 것으로서, 여기서 화학식 IV 내지 X의 분자는 표적 핵산에의 하이브리드화를 위한 프로브로서 사용될 수 있다.
- [0073] 따라서, 본 발명은 표적 핵산을 검출하기 위한 상기 정의된 바와 같은 방법에 관한 것으로서,
- [0074] - 프로브가 표적 핵산 분자에 하이브리드화하는 조건 하에서 RNA 또는 DNA 폴리머라제의 존재 하에 상기 정의된 바와 같은 프로브와 상기 표적 핵산을 향온처리하는 단계; 및
- [0075] - 상기 하이브리드화를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0076] 유리하게는, 상기 분자는 실시간 PCR을 위한 유용한 하이브리드화 프로브 및 이중 표지 프로브이다. 실시예에 제시된 바와 같이, 본 발명의 프로브는 형광 배경을 감소시켜, 앰플리콘 검출 성능을 향상시킨다.
- [0077] 특히, 본 발명의 이중 표지 프로브는 표준 프로브(천연 핵염기를 함유하는 이중 표지 프로브)와 비교하여, 증폭 부재 하의 형광 방출을 더 크게 소광시킨다. 또한, 실시예에 제시된 바와 같이, 접합된 프로브는 고 감도로 표적을 검출한다.
- [0078] 따라서, 본 발명은 야생형과 돌연변이 표적 핵산을 구분하기 위한 상기 정의된 바와 같은 방법에 관한 것이다.
- [0079] 유리하게는, 상기 분자로, 프라이머/프로브 세트의 디자인을 용이하게 하여 PCR과 같은 증폭 과정에서 유용한 더 짧은 프로브를 고안할 수 있다. 짧은 프로브는 구분력이 더 크다. 특히, 상기 분자는 대립유전자 구분을 위한 강력한 도구이다.
- [0080] 실시예에 제시된 바와 같이, 본 발명의 분자에 상응하는 프로브는, 표준 올리고뉴클레오티드와 비교하여, SNP (단일 염기 다형성)와 같은 돌연변이를 검출 분석하는데 특히 유용하다.
- [0081] 또 다른 측면에서, 상기 제2 구체예의 분자는 표적 핵산의 증폭 및/또는 검출을 억제하는 방법을 제공하는 클램프로써 유리하게 사용된다.
- [0082] 제3 구체예에서, 본 발명의 분자는 표적 핵산이 폴리머라제용 주형이 아닌 하이브리드화 기반 분석에서 더욱 일반적으로 이용된다.
- [0083] 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 화학식 I 내지 X의 분자가 표적 핵산에 결합한 후에 하나 이상의 효소에 대한 기질로 이용되는 핵산 조작 방법에 관한 것이다.
- [0084] 본 발명은 효소가 표적 핵산을 변형시키는 조건 하에서 하나 이상의 효소의 존재 하에 상기 정의된 바와 같은 화학식 I 내지 X 분자가 표적 핵산에 결합하는 핵산 조작 방법에 관한 것이다.
- [0085] 본 발명은 표적 핵산에 하이브리드화시키기 위한 상기 정의된 바와 같은 화학식 I 내지 X의 분자를 포함하는 표적 핵산의 조작, 검출, 포집 방법에 관한 것이다.
- [0086] 따라서, 본 발명은 표적 핵산을 검출하기 위한 상기 정의된 바와 같은 방법에 관한 것으로서,
- [0087] - 프로브가 표적 핵산 분자에 하이브리드화하는 조건 하에서 상기 정의된 바와 같은 본 발명의 프로브와 상기



표적 핵산을 항온처리하는 단계; 및

- [0088] - 상기 하이브리드화를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0089] 상기 제3 구체예의 분자는 고체 지지체 또는 고정 조직 상에서와 같은 고정화된 표적 핵산을 검출하기 위한 프로브로서 특히 더 유용하다. 상기 프로브는 동일계(In Situ) 하이브리드화 방법에 유용하다.
- [0090] 실시예에 제시된 바와 같이, 본 발명의 짧은 프로브는 표준 프로브로서 가능하지 않은 엄격한 조건 하에 매우 특이적으로 지지체 상에 고정된 표적 핵산을 검출할 수 있다.
- [0091] 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드와 같이  $A_i$  함유 변형 뉴클레오타이드를 포함하는 분자가 생물학적 적용 측면에서 매우 유용한데, 그 이유는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 세포 용해물 또는 체액 중에서 가수분해되지 않기 때문이다.
- [0092] 상기 정의된 혼합 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체는, 상기 WO 2007/069092호의 방법에 따른 포스포르아미디트 경로를 통해 올리고뉴클레오타이드 합성기 상에서 단계적으로 합성하는 것이 유리하다.
- [0093] 활성화되고 보호된 올리고양이온 B는 폴리아민의 아미노기를 보호한 후에,  $\alpha$ ,  $\omega$ -비스히드록실알킬화시켜, 올리고뉴클레오타이드 합성에 적합한 디올을 유도하여 얻는 것이 유리하다.
- [0094] 전형적인 DMT 및 포스포르아미디트 신장 화학은, 염기-불안정한 TFA 보호기를 함께 이용하여 실시하는 것이 유리하다.

### 도면의 간단한 설명

- [0095] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 하기 실시예에 제시되어 있으며, 이는 도 1 내지 9를 참조하여 설명된다.
- 도 1: 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체의 구조;
  - 도 2: 통상적인 구매 PCR에서 본 발명의 프라이머를 이용하여 얻은 결과;
  - 도 3: 실시간 PCR 실험에서 높은 어닐링 온도 및 낮은 염( $MgCl_2$ ) 농도에서 본 발명의 프라이머를 이용하여 얻은 결과;
  - 도 4: 실시간 PCR 실험에서 낮은 농도로 상기 프라이머를 이용하여 얻은 결과;
  - 도 5: 실시간 PCR 실험에서 AT-풍부 상황에서 상기 프라이머를 이용하여 얻은 결과;
  - 도 6: 본 발명의 프라이머로 프라이밍한 cDNA 상의 RT-qPCR로 얻어진 결과;
  - 도 7: 5' 뉴클레아제 분석으로 본 발명의 이중 표지 형광 프로브를 이용하여 얻은 형광 특성 및 결과;
  - 도 8: 실시간 PCR로 본 발명의 형광 하이브리드화 프로브를 이용하여 얻은 결과;
  - 도 9: 고체 지지체 상에 고정된 표적 핵산의 검출에 사용되는 본 발명의 형광 프로브로 얻은 결과.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0096] 하기 실시예에서, "S"는 하기 구조의 스퍼민 잔기를 나타낸다:
- [0097] -  $HPO_3-(CH_2)_4-NH_2^+-(CH_2)_3-NH_2^+-(CH_2)_4-NH_2^+-(CH_2)_3-NH_2^+-(CH_2)_4-O-$ 이고,  $S_n$ 은 스퍼민 잔기의 수를 나타내며,  $n=1$  내지 10이다.
- [0098] - "Nm"은 m량체 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0099] 실시예 1: 본 발명의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체의 구조
- [0100] 합성은 WO 2007/069092호에 따라 실시하고, 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체의 구조는 도 1에 예시되어 있다.
- [0101] 실시예 2: PCR 프라이머로서의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체의 용도
- [0102] 인간 파필로마바이러스 타입 16(HPV16)의 유전자 E7 및 L1에 특이적인 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 프라이머 2 커플을 그 표준 대응쌍(비접합 올리고뉴클레오타이드)과 비교하였다. 또한 본 발명의 분자를 잠금 핵산(LNA)

변형 프라이머와 비교하였다.

- [0103] E7 프라이머의 서열은 문헌[Hesselink et al., 2005]으로부터 얻었다. L1 프라이머의 서열은 문헌[de Roda Husman et al, 1995]으로부터 개조하였다.
- [0104] E7 프라이머쌍(46% 및 48% GC) 및 L1 프라이머쌍(30% 및 20% GC)은 2개의 상이한 GC 함량을 예시한다.
- [0105] 통합 HPV 16의 1 내지 2 카피를 포함하는 SiHa 세포(자궁경부암, ATCC HTB35)의 게놈 DNA를 표적 게놈 DNA로 사용하였다. 상기 바이러스를 포함하지 않는 A549 세포(폐암, ATCC CCL185)의 게놈 DNA를 음성 대조군으로 사용하였다.
- [0106] 본 발명의 프라이머는 화학식 I의 예이다.
- [0107] · 표준 올리고뉴클레오티드 서열(E7 프라이머)
- [0108] 서열 번호 1의 정방향 프라이머(E7F): 5'-GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT-3'
- [0109] 서열 번호 2의 역방향 프라이머(E7R): 5'-GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA-3'
- [0110] · 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드-올리고양이온 접합체의 서열(S4-E7 프라이머)
- [0111] 서열 번호 3의 정방향 프라이머(S4-E7F): 5'-S<sub>4</sub>-GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT
- [0112] GGT-3'
- [0113] 서열 번호 4의 역방향 프라이머(S4-E7R): 5'-S<sub>4</sub>-GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA-3'
- [0114] · LNA 함유 올리고뉴클레오티드 서열(LNA-E7 프라이머)
- [0115] 서열 번호 5의 정방향 프라이머(LNA-E7F): 5'-G<sub>a</sub>G G<sub>a</sub>G GAG GAT GAA ATA GAT GGT-3'
- [0116] 서열 번호 6의 역방향 프라이머(LNA-E7R): 5'-G<sub>C</sub>C CAT<sub>t</sub>AA CAG GTC TTC CAA-3'
- [0117] LNA 뉴클레오티드는 밑줄 소문자로 표시하였으며,
- [0118] S<sub>4</sub> = 4개의 스퍼민 부분
- [0119] · 표준 올리고뉴클레오티드 서열(L1 프라이머)
- [0120] 서열 번호 7의 정방향 프라이머(L1F): 5'-TTT GTT ACT GTT GTT GAT ACT AC-3'
- [0121] 서열 번호 8의 역방향 프라이머(L1R): 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'
- [0122] · 본 발명에 따른 프라이머의 서열(Sn-L1 프라이머)
- [0123] 서열 번호 9의 정방향 프라이머(S<sub>n</sub>-L1F): 5'-S<sub>n</sub>-TTT GTT ACT GTT GTT GAT ACT AC-3'
- [0124] 서열 번호 10의 역방향 프라이머(S<sub>n</sub>-L1R): 5'-S<sub>n</sub>-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'
- [0125] S<sub>n</sub>= n개의 스퍼민 부분; n = 4 및 5
- [0126] · LNA 함유 올리고뉴클레오티드의 서열(LNA-L1 프라이머)
- [0127] 서열 번호 11의 정방향 프라이머(L1F): 5'-TT<sub>t</sub>GTT<sub>a</sub>CT GTT GTT GAT ACT AC-3'
- [0128] 서열 번호 12의 역방향 프라이머(L1R): 5'-GA<sub>a</sub>AAA<sub>t</sub>AA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'
- [0129] LNA 뉴클레오티드는 밑줄친 소문자로 표시된다.
- [0130] 도 2는 통상적인 PCR에서의 본 발명의 프라이머의 사용을 도시한다. 증폭 성능은 구배 PCR 절차를 이용하여 어

닐링 온도에 따라서 PCR의 종점에서 평가하였다.

- [0131] 표적 및 대조군 게놈 DNA를 25  $\mu$ l의 반응 부피로 증폭시켰다. 각 샘플은 0.4 mM DNA, 10 mM Tris-HCl(pH 9), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 200  $\mu$ M dNTP (각각), 0.04 U/ $\mu$ l EconoTaq DNA 폴리머라제 (Lucigen) 및 하기의 프라이머쌍의 존재 하에 증폭시켰다:
- [0132] - 100 nM의 E7 표준 프라이머(도 2a: 상부 패널) 또는 S4-E7 프라이머(도 2a: 하부 패널), 또는
- [0133] - 500 nM의 L1 표준 프라이머(도 2b: 상부 패널); LNA-L1 프라이머(도 2b: 중간 패널); 및 5개의 스퍼민 부분을 포함하는 S5-L1 프라이머(도 2b: 하부 패널),
- [0134] - 500 nM의 L1 표준 프라이머(도 2c: 상부); 4개의 스퍼민 부분을 포함하는 S4-L1 프라이머(도 2c: 중간부); 및 5개의 스퍼민 부분을 포함하는 S5-L1 프라이머(도 2c: 하부).
- [0135] 구배 증폭은 iCycler 썬더 사이클러(Biorad)에서 다음과 같이 실시하였다: 초기 변성: 95°C에서 3분, 사이클링: 35(a, c) 및 30(b) 사이클: 20초 동안 94°C, 20초 동안 60°C-69°C(a) 또는 20초 동안 52°C-61°C(b, c), 15초 동안 72°C; 최종 연장: 72°C에서 5분. 최종 PCR 반응물은 아가로스 겔 4%에서 분석하였다. E7 및 L1 산물 크기는 각각 159 bp 및 142 bp이다.
- [0136] 도 2a에 도시된 바와 같이, 5' 말단에서 4개의 스퍼민 잔기를 가지는 본 발명에 따라 선택된 접합체는 그 표적을 특이적으로 증폭시킨다. 표준 프라이머와 같이, 이들은 실제로 표적 SiHa 세포의 게놈 DNA에서 유래한 159 bp의 예상 크기를 가지는 바이러스 서열 단편을 증폭시킨다. 반대로, 동일한 증폭 조건 하에서 A549 세포의 게놈 DNA로부터는 증폭이 이루어지지 않는다.
- [0137] 유리하게는, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 접합체를 사용하여 하이브리드화 반응을 더 높은 온도에서 실시할 수 있다(프라이머쌍에 따라서 4 내지 7°C)(도 2a 및 2b).
- [0138] 유리하게는, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 접합체를 사용하여 하이브리드화 반응을 LNA 함유 프라이머보다 높은 온도에서 실시할 수 있다(4-5°C, 도 2b 참조).
- [0139] 도 2c에 제시된 결과는 올리고뉴클레오타이드에 접합된 스퍼민의 수로 온도 이득을 조정할 수 있다는 것을 보여준다.
- [0140] 본 발명의 분자를 실시간 PCR 실험에서 프라이머로서 사용하기 위해 평가하였다. 프라이머 접합체를 비변형 표준 대응부 및 LNA 함유 프라이머와 비교하였다.
- [0141] 모든 반응은 최종 부피 10  $\mu$ l로 Rotor-gene 6000 기기(Corbett)에서 실시하였다. 0.5X의 최종 농도로 Sensimix NoRef DNA 키트(Quantace)를 사용하여 반응을 실시하였다.
- [0142] 대조군 게놈 DNA 10 ng, 즉 HPV 음성 세포(A549 세포) 3000 게놈에 스파이킹된 표적 HPV 16 양성 세포(SiHa 세포)의 게놈 DNA의 연속 희석물을 증폭시켜 효율 및 감도를 평가하였다.
- [0143] 하이브리드화 온도, MgCl<sub>2</sub> 농도 또는 프라이머 농도의 여러 조건 하에서, 검출을 위해 SYBR Green I를 이용하여 샘플을 증폭시켰다.
- [0144] 도 3: 실시간 증폭시 MgCl<sub>2</sub> 농도 및 어닐링 온도의 효과
- [0145] 표적 게놈 DNA 10 ng상에서 각 프라이머 100 nM을 이용하여 반응을 실시하였다. 최종 MgCl<sub>2</sub> 농도는 지시된 대로 1.5 mM 또는 3 mM이었다. 95°C에서 10분의 고온 출발 이후 20초 동안 94°C, 20초 동안 63°C(a) 또는 66°C(b) 및 15초 동안 72°C의 45 사이클을 실시하였다.
- [0146] 도 3a에 도시된 바와 같이, 본 발명의 분자(S4-E7)는 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 중 63°C에서 어닐링시킨 경우 최적이다. 비교하면, 표준 프라이머와 LNA 함유 프라이머는 사이클 한계값의 증가에 의해 확인되는 바와 같이 비효율적이다(본 발명의 접합체의 경우 16, 표준 프라이머의 경우 33 및 LNA 함유 프라이머의 경우 24). MgCl<sub>2</sub> 농도 증가는 표준 및 LNA 함유 프라이머 성능을 개선시킨다. 상기 도 3의 결과, 표준 프라이머 및 LNA 함유 프라이머를 이용할 때에는 더 낮은 어닐링 온도가 필요한 반면, 상기 S4-E7 접합체는 63°C에서 효과적으로 수행된다.
- [0147] 도 3b 및 3c에 제시된 바와 같이, 프라이머 고정 농도(100 nM) 및 낮은 MgCl<sub>2</sub> 농도(1.5 mM)에서 상기 S4-E7 접합체를 이용하면 최대 3카피의 표적이 검출가능하며, 66°C의 하이브리드화 온도에서 재현성, 특이성 및 효율이

높다.

- [0148] 특이적이고 효율적이며 민감한 증폭물을, 표준 프라이머 및 LNA 함유 프라이머에 대해 일반적으로 최적이지 아닌  $MgCl_2$  조건 또는 온도 하에서, 본 발명의 프라이머 접합체를 사용하여 얻었다.
- [0149] 프라이머 농도의 효과는 도 4에 의해 예시되어 있다.
- [0150] 도 4a: 표적 게놈 DNA의 10배 연속 회석물을 1.5 mM  $MgCl_2$ 에서 본 발명의 프라이머 접합체 10 nM로 증폭시켰다.
- [0151] 도 4b: 10 ng의 대조군 게놈 DNA 중에 스파이킹된 표적 게놈 DNA 2 ng을, 변화량의 프라이머를 사용하여 증폭시켰다: 10, 20 및 30 nM의 본 발명의 프라이머 접합체(상부 패널); 10, 25 및 50 nM의 표준 프라이머(중간 패널) 및 LNA 함유 프라이머(하부 패널).  $MgCl_2$  농도는 본 발명의 접합체의 경우 1.5 mM이고 표준 프라이머 및 LNA 함유 프라이머의 경우 3 mM이었다.
- [0152] 증폭을 다음과 같이 실시하였다. 10분간 95°C, 이후 10초간 95°C, 1분간 60°C의 45 사이클.
- [0153] 도 4a는 본 발명의 프라이머 분자 10 nM이 2 단계 PCR 반응에서 효과적이고 민감한 증폭을 유도한다는 것을 보여준다. 실제 3 카피의 표적이 정량적으로 검출된다. 도 4b에 제시된 바와 같이, 프라이머 농도 감소는 Ct 값의 증가를 유도하지 않는다. 반응 종점에서의 최종 앰플리콘의 양만 감소한다. 비교하여,  $MgCl_2$  3mM 중 표준 올리고뉴클레오티드 또는 LNA 함유 프라이머 50 nM은 접합된 프라이머와 같이 최적의 방식으로 표적을 증폭시키는데 충분하지 않다.
- [0154] 유리하게는, 본 발명의 프라이머 접합체는 표준 올리고뉴클레오티드 및 LNA 함유 프라이머와 비교하여 표적에 대한 더 높은 친화도를 나타내어 낮은  $MgCl_2$  농도에서 사용할 수 있다. 상기 분자는, 민감성, 효율, 특이성 또는 재현성을 상실하지 않고 표준 올리고뉴클레오티드 및 LNA 함유 프라이머와 비교하여 최대 10배의 프라이머 농도 감소를 허용한다.
- [0155] 도 5에 제시된 바와 같이, 본 발명의 프라이머 분자는 AT 풍부 서열의 PCR을 향상시킨다. 유리하게는, 상기 분자로 표준 조건(1.5 mM  $MgCl_2$ , 60°C에서의 어닐링)에서 효과적인 반응을 실시할 수 있다.
- [0156] 도 5a에서, 표적 게놈 DNA의 5배 연속 회석물을 본 발명의 프라이머 접합체 100 nM로 증폭시켰다. 최종  $MgCl_2$  농도는 1.5 mM이었다. 반응물을 10분 동안 95°C에서 항온처리한 후 20초간 94°C, 20초간 60°C 및 15초간 72°C에서의 45 사이클을 실시하였다. 이들 조건 하에서, 본 발명의 접합체는 표적 1카피의 검출에 의해 확인되는 바와 같이 효과적이고(표준 곡선( $E = 0.89$ ;  $R^2 = 0.992$ ) 참조) 민감한 증폭을 유도한다.
- [0157] 비교하여(도 5b), 표적 600 카피는 표준 및 LNA 함유 프라이머에 의해 비효율적으로 증폭된다. 조건은 다음과 같았다: 대조군 게놈 DNA 10 ng 중에 스파이킹된 2 ng의 표적 게놈 DNA(표적 600 카피를 나타냄)를, 150 nM의 본 발명의 접합체(4개 또는 5개 스퍼민)(상부 패널); 150 nM, 500 nM 및 1  $\mu$ M의 표준 프라이머(중간 패널) 및 LNA 함유 프라이머(하부 패널)를 이용하여 2단계 증폭 프로토콜(10분 동안 95°C 이후 10초간 95°C, 1분간 60°C의 45 사이클)을 사용하여 증폭시켰다.  $MgCl_2$  농도는 본 발명의 접합체의 경우 1.5 mM이고 표준 프라이머 및 LNA 함유 프라이머의 경우 3 mM이었다.
- [0158] 실시예 3: 역전사용 프라이머로서 올리고뉴클레오티드-올리고양이온 접합체의 용도
- [0159] 본 발명의 분자를 역전사용 프라이머로서 사용하기 위해 평가하였다. 4개의 스퍼민 부분과 접합된 20개 잔기를 함유하는 폴리테옥시리보티미딘(S4-올리고(dT)<sub>20</sub>) 또는 이의 미접합 대응부(올리고(dT)<sub>20</sub>)를 사용하여 총 RNA로부터의 cDNA를 합성하였다. 사이클린 B1 전사체의 증폭을 위한 후속 RT-qPCR 반응을 실시하여 역전사 효율을 비교하였다.
- [0160] · 프라이머의 서열
- [0161] 서열 번호 13의 올리고(dT)<sub>20</sub>: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
- [0162] 서열 번호 14의 S4-올리고(dT)<sub>20</sub>: 5'-S4- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
- [0163] S<sub>4</sub> = 4개의 스퍼민 부분

- [0164] 서열 번호 15의 사이클린 B1 정방향 프라이머: 5'-TCTGGATAATGGTGAATGGACA-3'
- [0165] 서열 번호 16의 사이클린 B1의 역방향 프라이머: 5'-CGATGTGGCATACTTGTCTTG-3'
- [0166] 세포 HCT116(ATCC CCL-247)의 총 RNA는 SV 총 RNA 분리 키트(프로메가)를 사용하여 추출하였다. 1 마이크로그램 RNA를, 공급자가 설명한 바와 같이 RT-PCR(Invitrogen)을 위한 SuperScript III First-Strand Synthesis System을 사용하여 역전사시켰다. 50  $\mu$ M의 본 발명의 분자(S4-올리고(dT)<sub>20</sub>) 또는 이의 미접합 대응부(올리고(dT)<sub>20</sub>)를 이용하여 반응물(RT+)을 프라이밍시켰다. 역전사 효소가 없는 반응물(RT-)을 대조군으로서 실시하였다.
- [0167] 도 6은 총 RNA 5 ng에 상응하는 cDNA 합성 반응물(RT+ 및 RT-)을 이용하여 실시한 사이클린 B1 전사체의 RT-qPCR 증폭을 도시한다. PCR 반응은 최종 부피 10  $\mu$ l로 Rotor-gene 6000 기기(Corbett)에서 실시하였다. 최종 반응 혼합물은 2.5  $\mu$ l Sensimix NoRef PCR 키트(Quantace), SYBR Green 0.5x, 100 nM의 각 사이클린 B1 특이적 프라이머 및 3 mM MgCl<sub>2</sub>를 함유하였다.
- [0168] 반응물을 10분간 95°C에서 항온처리한 후 10초간 95°C, 1분간 60°C의 45 사이클을 실시하였다.
- [0169] 4% 아가로스 겔에서 전기 영동하여 PCR 산물을 분석하였다(도 6b).
- [0170] 도 6a는 본 발명의 분자 또는 이의 표준 대응부로 프라이밍한 cDNA 샘플로부터 얻은 동일한 사이클린 B1 증폭 곡선을 도시한다. 예상 크기(157 bp)의 동일한 PCR 산물을 합성하였다(도 6b). 후기-표적 산물(late off-target)은 모든 샘플 중 역전사 효소의 부재 하에 생겼다.
- [0171] 본 발명의 접합된 올리고(dT)-OH 분자는 역전사를 위한 프라이머로서 사용되는 경우 효과적인 cDNA 합성을 가능하게 한다.
- [0172] 실시예 4: 실시간 PCR에서 이중 표지된 PCR 프로브로서 올리고뉴클레오티드-올리고양이온 접합체의 용도
- [0173] 이중 표지된 프로브가 실시간 PCR의 증폭을 모니터링하기 위한 프로브로서 가장 널리 사용된다. 또한, TaqMan<sup>TM</sup> 프로브라고 불리는 것은, 5' 말단에 결합된 형광단과 3' 말단의 소광기를 가지는 앰플리콘과 내부적으로 하이브리드화하는 올리고뉴클레오티드 서열로 이루어진다(Livak et al., 1995). 양 표지가 용액 중에서 충분히 근접한 경우, 여기된 형광단이 방출하는 에너지는 FRET(형광 에너지 전달) 과정을 통해 소광기가 흡수하여, 낮은 형광 신호를 일으킨다. 5' 뉴클레아제 방법에 기초한 PCR 반응 과정에서(Holland et al, 1991), 프로브는 각 어닐링 단계에서 앰플리콘에 결합한다. 프라이머들 중 하나가 Taq DNA 폴리머라제에 의해 연장되는 경우, 프로브는 주형 가닥으로부터 제외되어 폴리머라제 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성에 의해 가수분해된다. 분해는 형광 리포터의 방출을 유도하며, 생성된 PCR 산물의 양에 비례하는 형광 강도 증가를 유발한다.
- [0174] 본 발명의 올리고뉴클레오티드-올리고양이온 접합체를, 인간 인자 V 유전자를 증폭시키기 위해 고안된 5' 뉴클레아제 분석에서 실시간 PCR 검출 프로브로서 사용하기 위해 평가하였다. SNP(단일 염기 다형성) 유전자형에 대한 상기 프로브의 능력을 평가하기 위한 모델로서 인간 인자 V 유전자의 Leiden G1691A 돌연변이를 이용하였다.
- [0175] 프로브 및 프라이머 서열은 문헌[Luderer et al., 2004]으로부터 개조하였다.
- [0176] 17개 및 22개 뉴클레오티드 잔기를 함유하는 2종의 올리고뉴클레오티드를 3' 말단에서 4개의 스퍼민 부분과 접합시켰다. 6 카르복시플루오로세인(6-FAM, Sigma) 및 올리고양이온에 결합된 Black Hole Quencher<sup>TM</sup> (BHQ-1<sup>TM</sup>, Glen Research)로 상기 접합체를 표지하였다. 본 발명의 이들 이중 표지된 형광 프로브를 올리고양이온-접합되지 않은 대응부와 비교하였다.
- [0177] 모든 프로브는 야생형 대립유전자를 검출하도록 고안되었다. 인자 V 야생형 및 Leiden DNA를 각각 세포주 A549(ATCC CCL-185) 및 GM14899(Coriell Institute)로부터 추출하였다.
- [0178] 본 발명의 이중 표지된 프로브는 화학식 IV의 예이다.
- [0179] · 프라이머 서열
- [0180] 서열 번호 15의 정방향 프라이머: 5'-GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT-3'
- [0181] 서열 번호 16의 역방향 프라이머: 5'-TT CTG AAA GGT TAC TTC AAG GAC AA-3'



- [0182] · 프로브의 서열
- [0183] - 본 발명에 따른 프로브의 서열
- [0184] 서열 번호 15 (F-N17S4): 5' 6-FAM - ACC TGT ATT CCT CGC CT -S4 BHQ-1
- [0185] S = 4개의 스퍼민 부분
- [0186] - 표준 프로브의 서열
- 서열 번호 17 (F-N17): 5' 6-FAM - ACC TGT ATT CCT CGC CT -BHQ-1
- [0187] 서열 번호 18 (F-N22): 5' 6-FAM - ACC TGT ATT CCT CGC CTG TCC A- BHQ-1
- [0188] SNP 부위는 밑줄로 표시되어 있다.
- [0189] PCR 반응은, 최종 부피 10  $\mu$ l로 Rotor-gene 6000 기기(Corbett)에서 실시하였다. 10 ng의 야생형 DNA (b), 대조군 DNA 10 ng 중에 스파이킹된 야생형 게놈 DNA의 10배 연속 희석물 (c) 및 10 ng의 야생형 또는 돌연변이체 게놈 DNA (d)를 주형으로서 사용하였다. 최종 반응 혼합물은 2.5  $\mu$ l Sensimix NoRef PCR 키트(Quantace), 200 nM의 각 프라이머 및 200 nM의 프로브를 포함하였다. 최종 MgCl<sub>2</sub> 농도는 3 mM이었다. 연어 정자 DNA를 음성 대조군으로서 사용하였다(표적 DNA 없음).
- [0190] 상기 기기에 의해 PCR 반응 초기에 측정된 있는 그대로의(raw) 배경 형광은 이중 표지된 프로브의 자가-소광 효율을 나타낸다. 도 7a에 도시된 바와 같이, 본 발명의 접합 프로브(F-N22S4)는 표준 대응부(F-N22)보다 형광 소광이 더 양호하다(배경 형광값 4.8 대비 24 단위). 소광은 2개의 염료 사이의 물리적 근접성에 따라 달라진다. 정전기적 상호작용으로 인한 올리고뉴클레오타이드에서의 폴딩으로, 다가양이온은 말단 부착된 형광단/소광기 쌍을 근접시킨다. 본 발명의 분자는 소광 특성이 개선된 가치있는 이중 표지된 프로브이다.
- [0191] 도 7b는 5' 뉴클레아제 분석에서 본 발명에 따른 프로브와 이의 표준 대응부의 성능 비교를 나타낸다. 접합된 프로브는 신호-대-노이즈 비가 높으므로, 검출이 초기에 이루어지고(2.5 사이클), 종점 형광이 더 크다.
- [0192] 따라서, 본 발명에 따른 프로브는 이의 표적을 검출하기 위한 더 높은 감도를 나타낸다. 이 후 짧은 접합된 프로브(17량체, F-N<sub>17</sub>)를 긴 표준 프로브(22량체, F-N<sub>22</sub>)와 비교하였다. 도 7c에 도시된 바와 같이, 본 발명의 짧은 프로브(F-N<sub>17</sub>S<sub>4</sub>)는 긴 표준 프로브(F-N<sub>22</sub>)와 동일한 효율 및 감도로 야생형 앰플리콘을 검출한다. 실제로, 사이클 한계값과 최종 형광값은 유사하다. 동일한 조건 하에서, 짧은 표준 프로브(F-N<sub>17</sub>)는 불량하게 작동한다(도 7d).
- [0193] 도 7d는 대립유전자 구분 문제를 해결한다. 주형으로서 인자 V Leiden DNA를 함유하는 샘플에서, 돌연변이된 앰플리콘은 긴 야생형 표준 프로브로 검출되지만, 접합된 짧은 프로브 및 표준 짧은 프로브를 이용한 경우 신호가 관찰되지 않는다.
- [0194] 따라서, 본 발명에 따른 짧은 프로브는 더 긴 종래의 표준 프로브와 동일한 성능을 나타낸다. 또한, 이들은 구별력이 더 크다.
- [0195] 실시예 5: 실시간 PCR에서 형광 하이브리드화 프로브로서의 올리고뉴클레오타이드-올리고양이온 접합체의 용도
- [0196] 실시간 PCR에서 인접 형광 프로브로서의 사용을 위해 본 발명의 분자를 평가하였다(Bernard 등, 1998). 검출 방식은 앰플리콘 상에 하나가 다른 하나에 인접한 2개의 프로브의 하이브리드화에 의존한다. 하나의 프로브는 3' 공여체 표지이고, 다른 하나는 5' 수용체 표지이다. 양쪽 프로브를 특정 앰플리콘에 결합시키면, 여기된 3' 공여체 표지가 그 에너지를 FRET 기전에 의해 수용 표지에 전달하여, 형광이 방출된다. 공여체 발광된 형광의 증가는 PCR 산물의 증가에 비례한다.
- [0197] 2개의 인접 프로브는 qPCR의 어닐링 단계 과정에서 이미 개시된 바 있는 인간 파필로마바이러스 16형(HPV 16) E7 앰플리콘에 결합하도록 고안하였다. 공여체 프로브는 3' 말단에서 6-FAM으로 표지하고, 수용체 프로브는 5' 말단에서 ROX 염료(카르복시-x-로다민)로 표지하였다.
- [0198] 표준 공여체 프로브를 본 발명의 분자와 비교하였다.
- [0199] 공여체 프로브는 화학식 VII의 예이다.
- [0200] 대조군 게놈 DNA(A549 세포 유래) 10 ng 중에 스파이킹된 (SiHa 세포 유래의) 표적 게놈 DNA 300 카피(a) 또는

연속 희석물(3000에서 30 카피)을 최종 부피 10  $\mu$ l로 하여 Rotor-gene 6000 기기(Corbett)에서 증폭시켰다. 최종 반응 혼합물은 2.5  $\mu$ l Sensimix NoRef PCR 키트(Quantace), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM 정방향 프라이머, 300 nM 역방향 프라이머, 200 nM 프로브 E7-R0X 프로브(Eurogentec)를 포함하였다. 프로브 E7-N25F, E7-S4N25F 및 E7-S4N20F는 200 nM (a) 및 50 nM (b)이었다.

[0201] 반응물은 10분 동안 95°C에서 항온처리한 후 5초 동안 95°C, 10초 동안 55°C, 10초 동안 72°C의 45 사이클을 실시하였다.

[0202] 도 8a에 도시된 바와 같이, 접합된 프로브로 앰플리콘을 효율적으로 검출할 수 있다.

[0203] 양쪽 표지의 범위가 중복되기 때문에, 앰플리콘의 부재 하에 고 배경 신호가 관찰된다. 올리고뉴클레오티드-올리고양이온 접합체는, 그 높은 친화도로 인해서 낮은 농도에서 효율적인 검출을 유도하여 형광 배경 수준을 감소시킬 것으로 예상된다. 또한, 올리고뉴클레오티드-올리고양이온 접합체로 인해 짧은 프로브를 효율적으로 고안하여 미스매치 구분의 개선을 이끌어낼 것으로 예상된다.

[0204] 도 8b에 도시된 바와 같이, 본 발명의 짧은 프로브(E7-S<sub>4</sub>N<sub>20</sub>F)는 실제로 표준 프로브(E7-N<sub>25</sub>F)보다 낮은 농도에서의 성능이 더욱 양호하다.

[0205] 본 발명의 분자는 실시간 PCR을 위한 유용한 하이브리드화 프로브이다.

[0206] · E7 프라이머의 서열

서열 번호 1의 정방향 프라이머 (E7F): 5'- GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT- 3'

[0207] 서열 번호 2의 역방향 프라이머 (E7R): 5'- GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA- 3'

[0208] · 프로브의 서열

서열 번호 19 (E7-R0X): 5'- R0X-TGCGTACAAAGCACACGCTAGACAT 3'

서열 번호 20 (E7N25F): 5' - GCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTT-6-FAM 3'

서열 번호 21 (E7N25F): 5' -S4-GCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTT-6-FAM 3'

[0209] 서열 번호 22 (E7S4N20F): 5' -S4-TGTGACTCTACGCTTCGGTT -6-FAM 3'

[0210] S4 = 4개의 스퍼민 잔기

[0211] 실시예 6: 고상 지지체 상에서 고정된 표적 핵산을 검출하기 위한 형광 프로브로서의 올리고뉴클레오티드-올리고양이온 접합체의 용도

[0212] 고정된 표적 핵산의 검출 및/또는 유전자형 결정을 위한 하이브리드화 프로브로서의 사용을 위해 본 발명의 분자를 평가하였다.

[0213] 도 9는 도트-블롯 DNA 하이브리드화 실험 결과를 제시한다. 표적 핵산은 pGL2 및 pGL3 루시퍼라제 리포터 벡터(Promega)였다. pGL3 벡터에 완벽하게 매칭시키기 위한 짧은 프로브(14량체)를 고안하였다. pGL2와의 하이브리드화에 의해 상기 서열은 미스매치를 형성한다. 본 발명의 프로브를 표준 대응부와 비교하였다. 양쪽 프로브는 플루오레세인으로 5' 표지하였다.

[0214] pGL2 및 pGL3 벡터 1  $\mu$ g을 60분간 80°C에서 소성하여 양으로 하전된 나일론 막(Roche)에 고정하고 이 막을 5분 동안 NaOH 0.4 M 중에서 항온처리하여 변성시켰다. 그 다음 막을 2X SSC(구연산나트륨염 완충액)에서 간단히 세척하고, 공기 건조하였다. 5X SSC, 5X 덴하르트 용액 중에서 55°C에서 60분간 사전하이브리드화 단계를 실시하였다. 1X SSC에서 10 nM의 프로브와 함께 120분 동안 55°C에서 상기 막을 항온처리하였다. 5분간 55°C의 1X SSC에서 3회 세척한 후에, Typhoon 이미징 시스템(Amersham Bioscience) 상에서 막을 스캐닝하였다.

[0215] 도 9에 도시된 바와 같이, 본 발명의 프로브로 엄격한 조건(55°C 및 저염) 하에서 본표적 핵산을 검출할 수 있으나, 표준 프로브로는 검출하지 못하였다. 미스매치 표적 상에서 신호가 검출되지 않았으며, 이는 본 발명의 프로브의 높은 특이성을 보여준다.

[0216] · 프로브의 서열

서열 번호 23 (N14): 5'-플루오레세인 -AAG ATG GAA CCG CT-3'

[0217] 서열 번호 25 (S4N14): 5'-플루오레세인 -S4-AAG ATG GAA CCG CT-3'



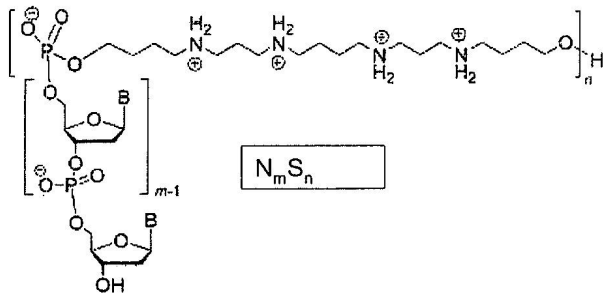
- [0218] S4 = 4개 스퍼민 잔기
- [0219] 미스매치 부위는 밑줄로 표시되어 있다.

#### 참조 문헌

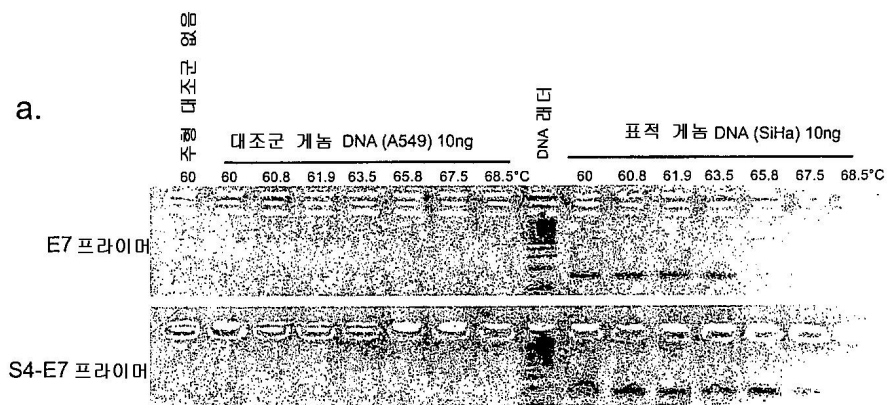
- Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, Wittwer CT. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol.* 1998 Oct;153(4):1055-61.
- Demidov VV, Frank-Kamenetskii MD. Two sides of the coin: affinity and specificity of nucleic acid interactions. *Trends Biochem Sci.* 2004 Feb;29(2):62-71. Review
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995 Apr;76 ( Pt 4):1057-62.
- Hesselink AT, van den Brule AJ, Groothuismink ZM, Molano M, Berkhof J, Meijer CJ, Snijders PJ. Comparison of three different PCR methods for quantifying human papillomavirus type 16 DNA in cervical scrape specimens. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4868-71.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;88(16):7276-80.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995 Jun;4(6):357-62.
- Luderer R, Verheul A, Kortlandt W. Rapid detection of the factor V Leiden mutation by real-time PCR with TaqMan minor groove binder probes. *Clin Chem.* 2004 Apr;50(4):787-8.
- Pegg AE. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J.* 1986 Mar 1;234(2):249-62. Review.
- Pons B, Kotera M, Zuber G, Behr JP. Online synthesis of diblock cationic oligonucleotides for enhanced hybridization to their complementary sequence. *ChemBiochem.* 2006 Aug;7(8):1173-6.
- [0220] Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 1984;53:749-90. Review.

도면

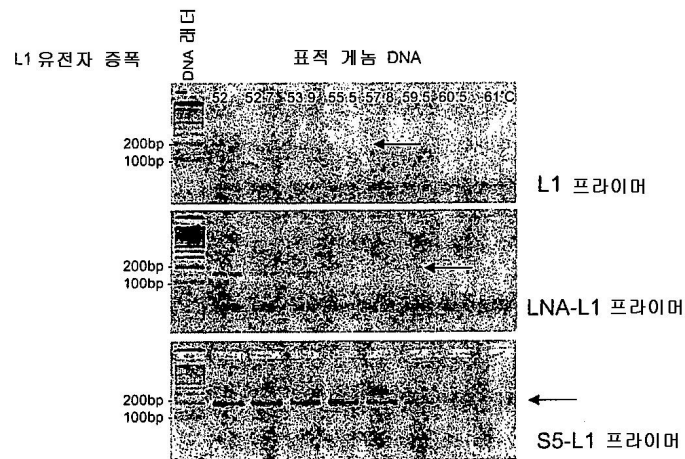
도면1



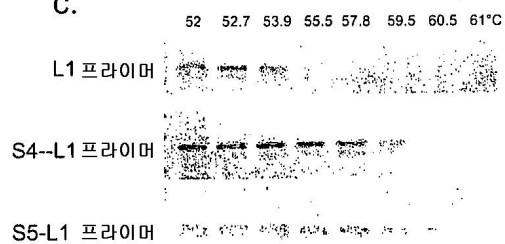
도면2



b.

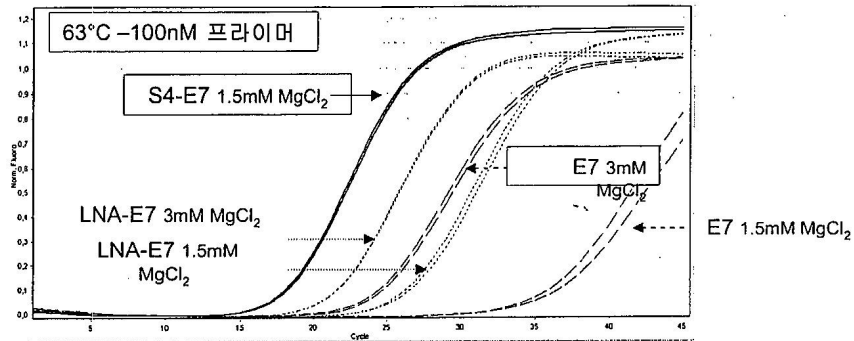


c.

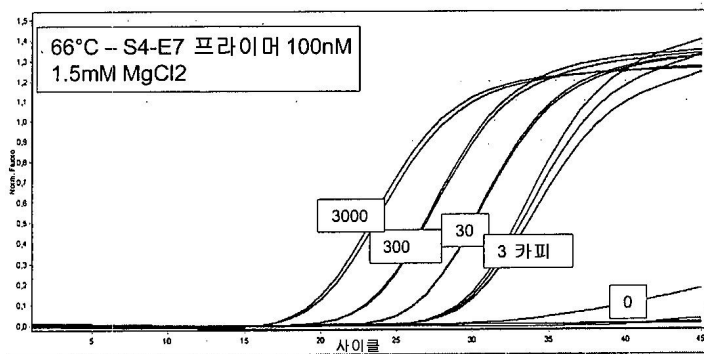


도면3

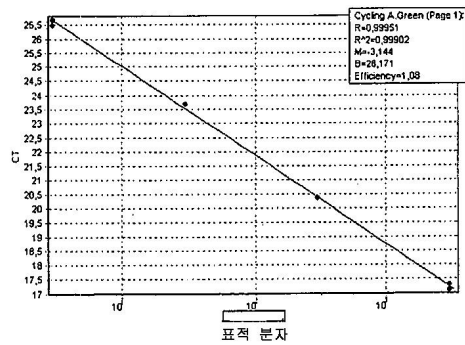
a.



b.

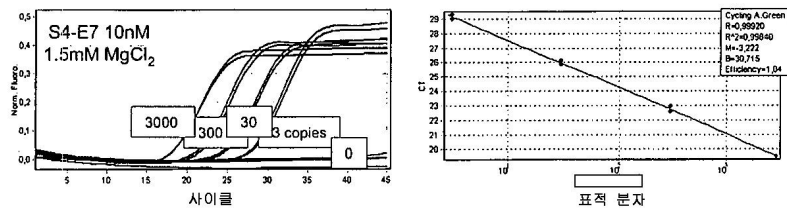


c.

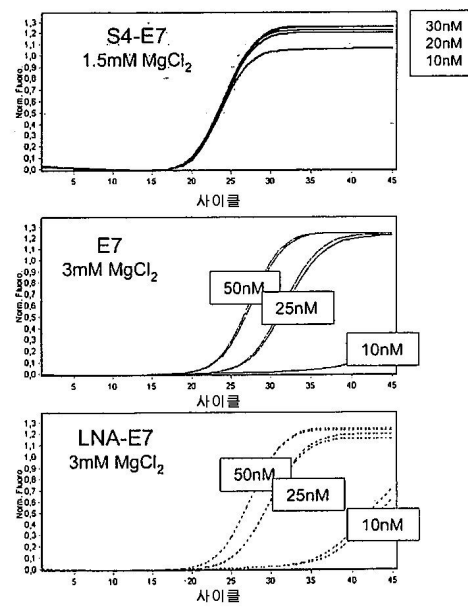


도면4

a.

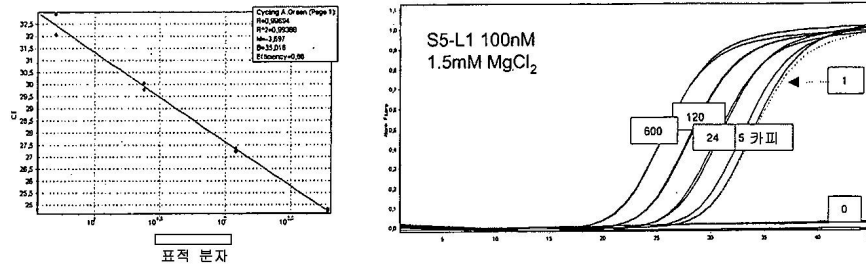


b.

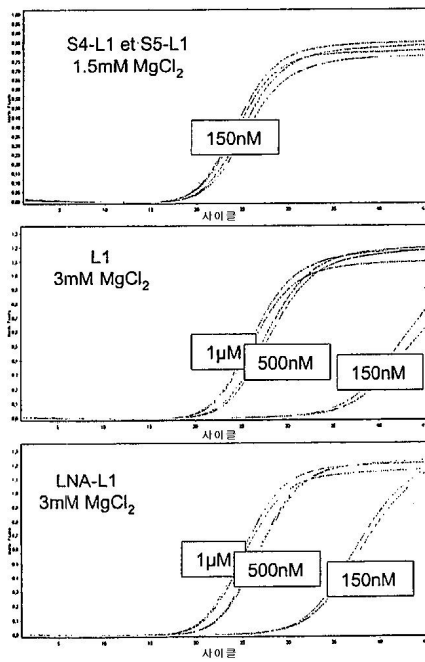


도면5

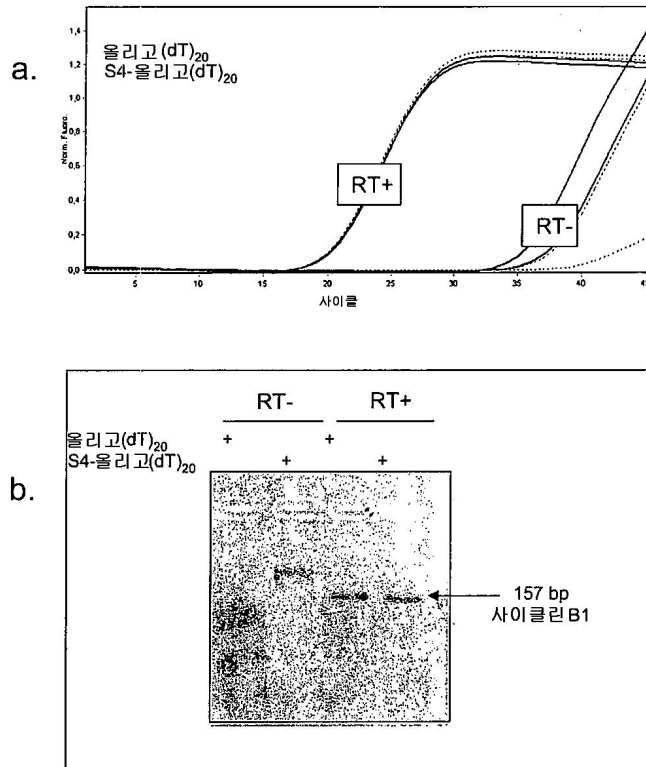
a.



b.



도면6



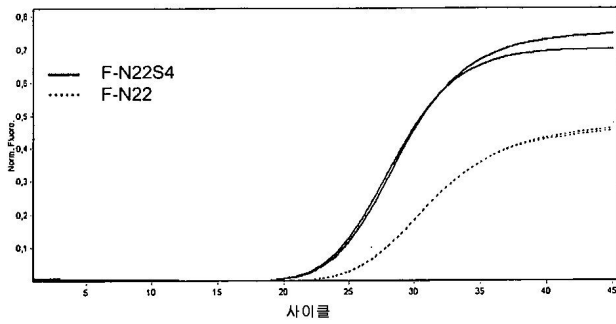


도면7

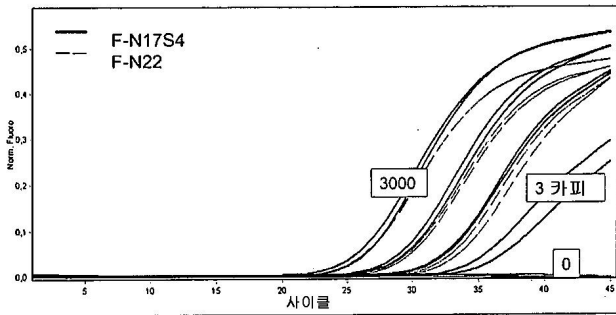
a.

프로브	그대로의 배경 형광
F-N22S4	4.8
F-N22	24

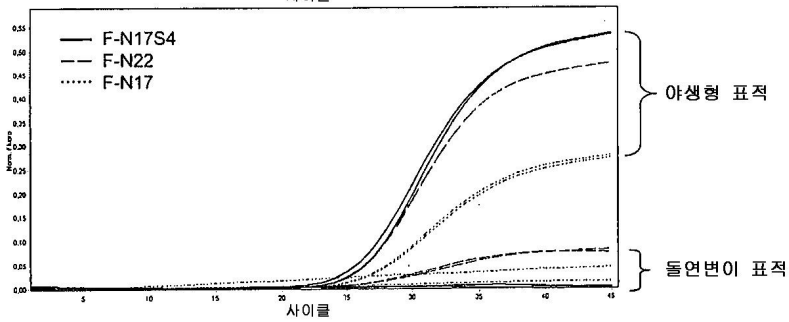
b.



c.

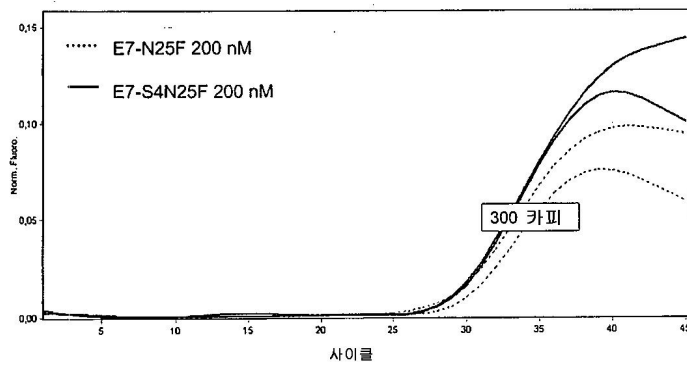


d.

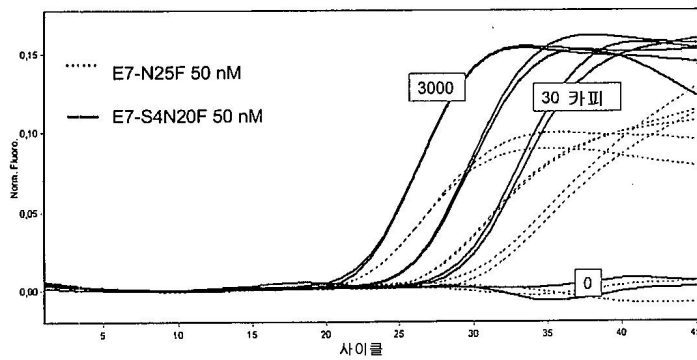


도면8

a.



b.



도면9

플라스미드 :	미스매치	매치	미스매치	매치
프로브 :	N14	S4N14		

## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Polyplus Transfection

Centre National de la Recherche Scientifique

Universit Louis Pasteur

<120> MEANS FOR DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS ACTIVE FOR GENE  
SILENCING

USING SYNTHETIC POLYMERS

<130> CP/BB 62715-3159

<140> PCT/IB2008/055256

<141> 2008-12-12

<150> EP 07 025 148.3  
 <151> 2007-12-27  
 <150> US 61/009 145  
 <151> 2007-12-27  
 <160> 19  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 24  
 <  
 212> DNA  
 <213> Artificial sequences  
 <220><223> Oligonucleotides  
 <400> 1  
 gaggaggagg atgaaataga tggt 24  
 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequences  
 <220><223> Oligonucleotides  
 <400> 2  
 gccattaac aggtcttcca a 21  
 <210> 3  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequences  
 <220><223> Oligonucleotides  
 <400> 3  
 gaggaggagg atgaaataga tggt 24  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequences  
 <220><223> Oligonucleotides  
 <400> 4

gcccattaac aggtcttcca a	21
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 5	
gaggaggagg atgaaataga tggt	24
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 6	
gcccattaac aggtcttcca a	21
<210> 7	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 7	
tttggttactg ttgttgatac tac	23
<210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 8	
gaaaaataaa ctgtaaatca tattc	25
<210> 9	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	

<400> 9	
tttgttactg ttgttgatac tac	23
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 10	
gaaaaataaa ctgtaaatca tattc	25
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 11	
tttgttactg ttgttgatac tac	23
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 12	
gaaaaataaa ctgtaaatca tattc	25
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 13	
gcctctgggc taataggact actt	24
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	

<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 14	
ttctgaaagg ttacttcaag gacaa	25
<210> 15	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 15	
acctgtattc ctcgcct	17
<210> 16	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 16	
acctgtattc ctcgcct	17
<210> 17	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 17	
acctgtattc ctcgcctgtc ca	22
<210> 18	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial sequences	
<220><223> Oligonucleotides	
<400> 18	
aagatggaac cgct	14
<210> 19	

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial sequences

<220><223> Oligonucleotides

<400> 19

aagatggaac cgct

14