



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월08일

(11) 등록번호 10-2382892

(24) 등록일자 2022년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6804 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6804 (2018.05)

C12Q 2537/143 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7032767(분할)

(22) 출원일자(국제) 2015년03월11일

심사청구일자 2021년11월11일

(85) 번역문제출일자 2021년10월12일

(65) 공개번호 10-2021-0127799

(43) 공개일자 2021년10월22일

(62) 원출원 특허 10-2016-7021588

원출원일자(국제) 2015년03월11일

심사청구일자 2020년02월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/020034

(87) 국제공개번호 WO 2015/138653

국제공개일자 2015년09월17일

(30) 우선권주장

61/951,461 2014년03월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Jungmann 등, Nature methods. Vol.11, No. 3,
페이지 313-318 (2014.02.02.)

(73) 특허권자

프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지

미합중국, 메사추세츠 02138, 캠브리지, 퀸시스트
리트17

(72) 발명자

인, 펴

미국 02445 매사추세츠주 브루클라인 윈스롭 로드
51

아가스티, 사리트

미국 02135 매사추세츠주 브라이턴 #16 서덜랜드
로드 18

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 22 항

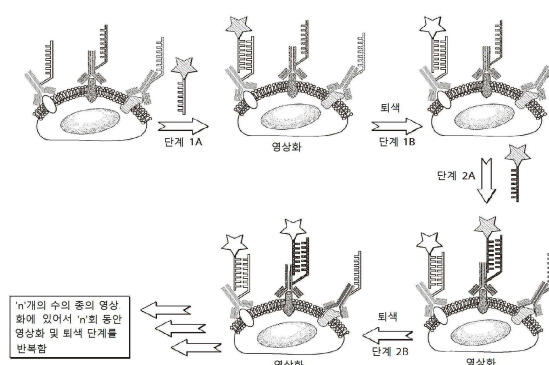
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 프로그램가능한 핵산 프로브를 이용한 고처리량 고도 다중 영상화

(57) 요약

본 발명은 특히, 관심 대상의 표적을 높은 공간 해상도로 영상화하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/179 (2013.01)

C12Q 2565/601 (2013.01)

(72) 발명자

첸, 시

미국 02466 매사추세츠주 뉴턴 아파트먼트 203 아
일랜드 힐 애비뉴 8

정만, 칼프

미국 02138 매사추세츠주 캠프리지 아파트먼트 1
프레스콧 스트리트 85

명세서

청구범위

청구항 1

1가지 이상의 표적을 검출하는 방법으로서,

- (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적 특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계로서, 여기서, 각각의 표적 특이적 결합 파트너는 도킹 핵산에 연결되고, 상이한 특이성의 표적 특이적 결합 파트너들은 상이한 도킹 핵산들에 연결되는 단계,
- (2) 샘플을, 화학적 또는 광화학적으로 절단가능한 링커를 통해 시그널 방출 모이어티에 연결되고, 도킹 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산과 접촉시키는 단계,
- (3) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계,
- (4) 화학적 또는 광화학적으로 링커를 절단하여, 상기 이미지 핵산을 전체적으로 제거하지 않고 그의 시그널 방출 모이어티를 제거 또는 변형시키는 단계, 및
- (5) 모든 다른 표지된 이미지 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산을 매번 이용하여 단계 (2) 내지 (4)를 반복하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (4)는 절단제를 첨가하여 이미지 핵산 및 시그널 방출 모이어티 사이의 화학적으로 절단가능한 링커를 절단하는 것을 포함하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 화학적으로 절단가능한 링커는 디설피드 결합을 포함하며, 절단제는 환원제인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 환원제는 디티오프레이톨(DTT) 또는 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 단계 (4)는 UV 노출에 의해 이미지 핵산 및 시그널 방출 모이어티 사이의 광절단가능한 링커를 절단하는 것을 포함하는 방법.

청구항 6

1가지 이상의 표적을 검출하는 방법으로서,

- (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적 특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계로서, 여기서, 각각의 표적 특이적 결합 파트너는 도킹 핵산에 연결되고, 상이한 특이성의 표적 특이적 결합 파트너들은 상이한 도킹 핵산들에 연결되는 단계,
- (2) 샘플을 도킹 핵산에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산과 접촉시키는 단계,
- (3) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계,
- (4) 결합된 표지된 이미지 핵산을 온도, 완충제 조건, 또는 둘 다의 변경에 의해 도킹 핵산으로부터 제거하는 단계, 및
- (5) 모든 다른 표지된 이미지 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산을 매번 이용하여 단계 (2) 내지 (4)를 반복하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 표지된 이미저 핵산을 온도의 증가에 의해 도킹 핵산으로부터 제거하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 표지된 이미저 핵산을 염 농도의 감소에 의해 도킹 핵산으로부터 제거하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 염은 Mg^{2+} 를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 표지된 이미저 핵산을 변성제의 첨가 또는 이의 농도의 증가에 의해 도킹 핵산으로부터 제거하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 변성제는 포름아미드, 우레아 또는 디메틸 술폭시드(DMSO)인 방법.

청구항 12

제1항 또는 제6항에 있어서, 비결합된 표적 특이적 결합 파트너를 제거하는 단계를 단계 (1) 및 (2) 사이에 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제1항 또는 제6항에 있어서, 비결합된 표지된 이미저 핵산을 제거하는 단계를 단계 (2) 및 (3) 사이에 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제1항 또는 제6항에 있어서, 단계 (1)에서 샘플을 1가지 초과 표적 특이적 결합 파트너와 접촉시키는 방법.

청구항 15

제1항 또는 제6항에 있어서, 표지된 이미저 핵산들이 동일하게 표지된 방법.

청구항 16

제1항 또는 제6항에 있어서, 표지된 이미저 핵산들이 각각 특유한 표지체를 포함하는 방법.

청구항 17

제1항 또는 제6항에 있어서, 표지된 이미저 핵산이 형광 표지된 이미저 핵산인 방법.

청구항 18

제1항 또는 제6항에 있어서, 단계 (3)에서 샘플이 공초점 또는 표면 형광 현미경 검사법을 이용하여 영상화되는 방법.

청구항 19

제1항 또는 제6항에 있어서, 1가지 이상의 표적이 단백질인 방법.

청구항 20

제1항 또는 제6항에 있어서, 표적 특이적 결합 파트너가 항체 또는 항체 단편인 방법.

청구항 21

제1항 또는 제6항에 있어서, 표적 특이적 결합 파트너가 천연 또는 엔지니어링된 리간드, 소분자, 압타머, 펩티드 또는 올리고뉴클레오타이드인 방법.

청구항 22

제1항 또는 제6항에 있어서, 샘플이 세포, 세포 용해물 또는 조직 용해물인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2014년 3월 11일자로 출원된 미국 가출원 제61/951,461호의 이익을 청구하는데, 이의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 일반적으로 본 발명은 분석물 (예를 들어, 표적)의 검출 및 정량화 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 형광 현미경 검사법은 예를 들어 생물계에서 분자를 탐구하기 위한 강력한 도구이다. 그러나, 구별가능하게 그리고 동시에 가시화될 수 있는(즉, 다중화 능력) 특유한 종의 수는 형광단들 사이의 스펙트럼 중첩에 의해 제한된다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 특히, 관심 대상의 표적 (예를 들어, 생체 분자)의 검출, 영상화 및/또는 정량화를 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본원에 제공된 방법 중 일부는 (1) 분석할 샘플 (예를 들어, 관심 대상의 1가지 이상의 표적을 함유할 것으로 의심되는 샘플)을 그 표적에 특이적으로 결합하는 모이어티(moiety) (각각의 모이어티는 주어진 표적의 결합 파트너임)와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 모이어티는 핵산 (본원에서 도킹(docking) 가닥으로 칭해짐)에 콘주게이션되며(conjugated), 상이한 특이성의 결합 파트너들은 상이한 도킹 가닥들에 콘주게이션됨), (2) 임의로, 비결합된 결합 파트너를 제거하는 단계, (3) 샘플을 1개의 도킹 가닥에 상보적이고 따라서 이에 특이적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 (예를 들어, 형광 표지된) 핵산 (그러한 표지된 핵산은 본원에서 표지된 이미지 가닥(imager strand)으로 칭해짐)과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 이미지 가닥을 제거하는 단계, (5) 전체적으로 또는 부분적으로 샘플을 영상화하여 결합된 이미지 가닥의 위치 및 수를 탐지하는 단계, (6) 샘플로부터의 표지된 이미지 가닥으로부터의 시그널(signal)을 (예를 들어, 광퇴색(photobleaching)을 포함하는 퇴색에 의해) 소거하는 단계, 및 (7) 본 방법에서 사용되는 모든 다른 이미지 가닥에 비하여 독특한 뉴클레오티드 서열을 갖는 이미지 가닥을 이용하여 단계 (3) 내지 (6)을 매번 반복하는 단계를 포함한다.

[0006] 이미지 가닥은 동일하게 형광 표지되는 것을 비롯하여 동일하게 표지될 수 있다. 다른 실시 양태에서, 동일한 서열을 갖는 이미지 가닥은 동일하게 표지될 수 있다. 첫 번째 접근법이 더 편리할 수 있으며, 그 이유는 이것이 단일한 여기 파장 및 검출기를 필요로 하기 때문이다.

[0007] 이러한 방식으로, 샘플 중 2가지 이상의 표적을, 샘플 중 그의 위치에 상관 없이 (상기 2가지 이상의 표적을 동시에 관찰할 경우 샘플 중 그의 위치가 서로 너무도 가까워서 구별할 수 없는지에 상관 없는 것을 포함함) 검출하고/하거나, 영상화하고/하거나 정량화하는 것이 가능하다. 따라서, 2가지 이상의 표적 사이의 거리는 표적을 검출하는 데 사용되는 영상화 시스템의 해상 거리 미만일 수 있으며, 여전히 본원에 제공된 방법을 이용하여 상기 2가지 이상의 표적을 서로와 구별함으로써 그러한 표적들의 더 정확하고 확고한 검출 및 정량화를 용이하게 하는 것이 가능하다. 일부 예에서, 해상 거리는 한 예로서 약 50 nm일 수 있다.

[0008] 샘플의 "표적 함량"은 본 방법을 수행하기 전에 공지되거나 추정된 것이거나, 또는 비공지된 그리고 알려진 것일 수 있음이 이해되어야 한다. 샘플과 접촉하는 결합 파트너는 표적이 존재하는지 부재하는지에 따라 샘플에 결합할 수 있거나, 또는 이는 그렇지 않을 수 있다 (예를 들어, 표적이 존재할 때, 결합 파트너는 샘플에 결합할 수 있다). 샘플과 접촉하는 이미지 가닥은 표적이 존재하는지 부재하는지에 따라 샘플에 결합할 수 있거나, 또는 이는 그렇지 않을 수 있다 (예를 들어, 표적이 존재할 때, 이미지 가닥은 표적에 결합된 상응하는 도킹 가닥에 결합할 수 있다). "샘플에 결합하는"은 결합 파트너 또는 이미지 가닥이 그의 각각의 표적 또는 도킹 가닥에 결합됨을 의미한다.

[0009] 결합 파트너는 사실상 단백질, 예컨대 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 항체 또는 항체 단편인 결합 파트너의

맥락에서, 도킹 가닥은 불변 영역에서 이에 콘주게이션될(conjugated) 수 있다. 결합 파트너는 항체, 예컨대 단클론(monoclonal) 항체일 수 있거나, 이것은 항원-결합 항체 단편, 예컨대 단클론 항체로부터의 항원-결합 단편일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 결합 파트너는 수용체이다.

- [0010] 결합 파트너는 중간 링커를 통하여 도킹 가닥에 연결될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 중간 링커는 비오틴 및/또는 스트렙타비딘을 포함한다.
- [0011] 이미지 가닥은 형광 표지될 수 있다 (즉, 이것은 형광단에 콘주게이션된다). 상이한 뉴클레오티드 서열의 이미지 가닥에 콘주게이션되는 형광단은 서로와 동일할 수 있거나, 이것은 다른 형광단의 발광 프로파일과 중첩되거나 중첩되지 않는 발광 프로파일을 가질 수 있다. 형광 표지된 이미지 가닥은 1개 이상의 형광단을 포함할 수 있다.
- [0012] 일부 예에서, 형광 표지된 이미지 핵산, 예컨대 이미지 가닥은 1개, 2개, 3개 또는 이보다 더 많은 형광단을 포함할 수 있다.
- [0013] 샘플은 세포, 세포 집단, 또는 세포 또는 세포 집단으로부터의 세포 용해물(lysate)일 수 있다. 표적은 단백질을 일 수 있다.
- [0014] 따라서, 본 발명은 분석물을 그의 각각의 결합 파트너에 결합시키고 그러한 결합 파트너의 존재를, 임의로 동일하게 표지된 (예를 들어, 동일하게 형광 표지된) 이미지 가닥의 반복적 결합, 검출 및 소거 (예를 들어, 퇴색, 예컨대 광퇴색)에 의해 그러한 결합 파트너들의 존재를 순차적으로 결정함으로써 분석물을 검출하는 방법을 제공함이 인식된다.
- [0015] 따라서, 본 발명은 (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-특이적 결합 파트너는 도킹 가닥에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-특이적 결합 파트너들은 상이한 도킹 가닥들에 결합됨), (2) 임의로, 비결합된 표적-특이적 결합 파트너를 제거하는 단계, (3) 샘플을 도킹 가닥에 상보성인 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 가닥과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 가닥을 제거하는 단계, (5) 결합된 표지된 이미지 가닥의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계, (6) 결합된 표지된 이미지 가닥으로부터의 시그널(signal)을 소거하는 단계, 및 (7) 모든 다른 표지된 이미지 가닥에 비하여 독특한 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 가닥을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0016] 일부 실시 양태에서, 단계 (1)에서 샘플을 1가지 초과 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시킨다.
- [0017] 일부 실시 양태에서, 표적-특이적 결합 파트너는 항체 또는 항체 단편이다.
- [0018] 일부 실시 양태에서, 표지된 이미지 가닥들은 동일하게 표지된 것이다. 일부 실시 양태에서, 표지된 이미지 가닥 각각은 특유한 표지체를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 표지된 이미지 가닥은 형광 표지된 이미지 가닥이다.
- [0019] 일부 실시 양태에서, 상기 1가지 이상의 표적은 단백질이다. 일부 실시 양태에서, 샘플은 세포, 세포 용해물(lysate) 또는 조직 용해물이다.
- [0020] 일부 실시 양태에서, 샘플은 공초점 또는 표면-형광 현미경 검사법을 이용하여 단계 (5)에서 영상화된다.
- [0021] 일부 실시 양태에서, 단계 (6)에서 시그널을 소거하는 것은 광퇴색을 포함한다.
- [0022] 추가로 본 발명은 1가지 초과 표적-인식 모이어티, 예컨대 표적-특이적 결합 파트너에 결합된 샘플 (각각의 표적-인식 모이어티는 도킹 핵산, 예컨대 도킹 가닥에 결합됨), 및 표지된 이미지 핵산, 예컨대 이미지 가닥에 안정하게 결합된 1가지 이상의 도킹 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0023] 추가로 본 발명은 1가지 초과 표적-특이적 결합 파트너에 결합된 샘플 (각각각의 결합 파트너는 도킹 가닥에 결합됨), 및 표지된 이미지 가닥에 안정하게 결합된 1가지 이상의 도킹 가닥을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0024] 추가로 본 발명은 (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-인식 모이어티, 예컨대 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-인식 모이어티는 도킹 핵산, 예컨대 도킹 가닥에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-인식 모이어티들은 상이한 도킹 핵산들에 결합됨), (2) 임의로, 비결합된 표적-인식 모이어티를 제거하는 단계, (3) 샘플을 도킹 핵산에 상보성인 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산, 예컨대 이미지 가닥과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, (5) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단

계, (6) 온도 및/또는 완충제 조건을 변경시킴으로써 도킹 핵산으로부터 결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, 및 (7) 모든 다른 표지된 이미지 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0025] 추가로 본 발명은 (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-특이적 결합 파트너는 도킹 핵산에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-특이적 결합 파트너들은 상이한 도킹 핵산들에 결합됨), (2) 임의로, 비결합된 표적-특이적 결합 파트너를 제거하는 단계, (3) 샘플을 도킹 핵산에 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, (5) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계, (6) 온도 및/또는 완충제 조건을 변경시킴으로써 도킹 핵산으로부터 결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, 및 (7) 모든 다른 표지된 이미지 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 이미지 핵산은 그러한 조건 하에서 자발적으로 도킹 핵산으로부터 해리된다.

[0026] 일부 실시 양태에서, 표지된 이미지 핵산은 염 농도의 감소, 변성제의 첨가, 또는 온도의 증가에 의해 도킹 핵산으로부터 제거된다. 일부 실시 양태에서, 염은 Mg^{++} 이다. 일부 실시 양태에서, 변성제는 포름아미드, 우레아 또는 DMSO이다.

[0027] 추가로 본 발명은 (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-인식 모이어티, 예컨대 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-인식 모이어티는 도킹 핵산, 예컨대 도킹 가닥에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-인식 모이어티들은 상이한 도킹 핵산들에 결합됨), (2) 임의로, 비결합된 표적-인식 모이어티를 제거하는 단계, (3) 샘플을 도킹 핵산에 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산, 예컨대 이미지 가닥과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, (5) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계, (6) 도킹 핵산으로부터 결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, 및 (7) 모든 다른 표지된 이미지 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0028] 추가로 본 발명은 (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-특이적 결합 파트너는 도킹 핵산에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-특이적 결합 파트너들은 상이한 도킹 핵산들에 결합됨), (2) 임의로, 비결합된 표적-특이적 결합 파트너를 제거하는 단계, (3) 샘플을 도킹 핵산에 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, (5) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계, (6) 도킹 핵산으로부터 결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, 및 (7) 모든 다른 표지된 이미지 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0029] 일부 실시 양태에서, 단계 (6)에서, 표지된 이미지 핵산은 경쟁 핵산의 존재 하에서는 가닥 치환에 의해 도킹 핵산으로부터 제거되지 않는다.

[0030] 일부 실시 양태에서, 단계 (6)에서, 표지된 이미지 핵산은 표지된 이미지 핵산의 화학적, 광화학적 또는 효소적 절단, 변형 또는 분해에 의해 도킹 핵산으로부터 제거된다.

[0031] 일부 실시 양태에서, 표지된 이미지 핵산이 그의 각각의 도킹 핵산에 결합되어 있을 때, 이미지 핵산 또는 도킹 핵산에는 단일 가닥 영역이 없다. 일부 실시 양태에서, 도킹 핵산은 토홀드(toehold) 서열을 갖지 않는다. 일부 실시 양태에서, 이미지 핵산은 토홀드 서열을 갖지 않는다.

[0032] 일부 실시 양태에서, 표지된 이미지 핵산은 자가-퀀칭성(self-quenching)이 아니다.

[0033] 추가로 본 발명은 (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-인식 모이어티, 예컨대 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-인식 모이어티는 도킹 핵산, 예컨대 도킹 가닥에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-인식 모이어티들은 상이한 도킹 핵산들에 결합됨), (2) 임의로, 비결합된 표적-인식 모이어티를 제거하는 단계, (3) 샘플을 도킹 핵산에 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산, 예컨대 이미지 가닥과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, (5) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계, (6) 결합된 표지된 이미지 핵산을, 상기 이미지 핵산을 전체적으로 제거하지 않고서 그의 시그널-방출 모이

어티의 제거 또는 변형에 의해 불활성화시키는 단계, 및 (7) 모든 다른 표지된 이미저 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미저 핵산을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

- [0034] 추가로 본 발명은 (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-특이적 결합 파트너는 도킹 핵산에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-특이적 결합 파트너들은 상이한 도킹 핵산들에 결합됨), (2) 임의로, 비결합된 표적-특이적 결합 파트너를 제거하는 단계, (3) 샘플을 도킹 핵산에 상보성인 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미저 핵산과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미저 핵산을 제거하는 단계, (5) 결합된 표지된 이미저 핵산의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계, (6) 결합된 표지된 이미저 핵산을, 상기 이미저 핵산을 전체적으로 제거하지 않고서 그의 시그널-방출 모이어티의 제거 또는 변형에 의해 불활성화시키는 단계, 및 (7) 모든 다른 표지된 이미저 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미저 핵산을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0035] 다양한 실시 양태가 진술한 방법에 동등하게 적용된다. 이러한 실시 양태는 하기와 같다:
- [0036] 일부 실시 양태에서, 단계 (1)에서 샘플을 1가지 초과와 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시킨다. 일부 실시 양태에서, 표적-특이적 결합 파트너는 항체 또는 항체 단편이다. 일부 실시 양태에서, 표적-특이적 결합 파트너는 천연 또는 엔지니어링된(engineered) 리간드, 소분자, 압타머(aptamer), 펩티드 또는 올리고뉴클레오티드이다.
- [0037] 일부 실시 양태에서, 표지된 이미저 핵산들은 동일하게 표지된다. 일부 실시 양태에서, 표지된 이미저 핵산 각각은 특유한 표지체를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 표지된 이미저 핵산은 형광 표지된 이미저 핵산이다.
- [0038] 일부 실시 양태에서, 상기 1가지 이상의 표적은 단백질이다. 일부 실시 양태에서, 샘플은 세포, 세포 용해물 또는 조직 용해물이다.
- [0039] 일부 실시 양태에서, 단계 (5)에서 샘플은 공초점 또는 표면-형광 현미경 검사법을 이용하여 영상화된다.
- [0040] 일부 실시 양태에서, 비결합된 도킹 핵산은 부분 이중 가닥이다. 일부 실시 양태에서, 비결합된 이미저 핵산은 부분 이중 가닥이다.
- [0041] 일부 실시 양태에서, 이미저 핵산은 분자 비컨(molecular beacon)이거나 헤어핀(hairpin) 이차 구조를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이미저 핵산은 분자 비컨이거나, 자가-켄칭성인 헤어핀 이차 구조를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이미저 핵산은 헤미듀플렉스(hemiduplex)이다. 일부 실시 양태에서, 헤미듀플렉스는 자가-켄칭성이다. 일부 실시 양태에서, 이미저 핵산은 덴드리머(dendrimeric) 구조 또는 중합체 구조를 통하여 다수의 시그널-방출 모이어티에 결합된다. 이미저 핵산은 선형 또는 분지형일 수 있다.
- [0042] 일부 실시 양태에서, 도킹 핵산은 헤어핀 이차 구조를 포함한다.
- [0043] 이러한 실시 양태 및 기타 실시 양태는 본원에서 더 상세하게 기술될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 본 발명에서 제공되는 고처리량의 본질적으로 확장가능한 다중 영상화 접근법의 일 실시 양태의 개략도이다. 세포는 프로브 혼성화 후 영상화되며, 그 후, 후속적인 라운드(round)의 영상화 전에 광퇴색된다.
- 도 2는 약간의 변성 특성을 갖는, 예컨대 감소된 염 농도, 증가된 포름아미드 농도, 또는 더 높은 온도를 갖는 용액을 이용한 완충제 교환을 기반으로 한 고처리량의 본질적으로 확장가능한 다중 영상화 접근법의 일 실시 양태의 개략도이다.
- 도 3은 본 발명에서 제공되는 방법을 이용한 이미저 가닥의 제거에 의한 이미저 가닥의 불활성화의 일 실시 양태의 개략도이다.
- 도 4는 이미저 가닥의 핵산 부분의 제거 없이 형광단을 불활성화시킴에 의한 이미저 가닥의 불활성화의 일 실시 양태의 개략도이다.
- 도 5는 분자 비컨-유사 자가-켄칭성 이미저 가닥의 일 실시 양태의 개략도이다.
- 도 6은 헤미듀플렉스 자가-켄칭성 이미저 가닥의 일 실시 양태의 개략도이다.
- 도 7은 비-단일 가닥 도킹 가닥의 일 실시 양태의 개략도이다.

도 8은 도킹 가닥의 시그널-방출 모이어티의 다수의 카피(multiple)를 모집하는 이미지 가닥의 일 실시 양태의 개략도이다.

도 9는 비-단일 가닥 이미지 가닥의 일 실시 양태의 개략도이다.

도 10은 3가지의 상이한 조건에서 각각의 역상보성 가닥을 갖는 10가지의 상이한 올리고뉴클레오타이드의 예상 해리 상수를 나타내는 그래프이다. 서열 a1: 5'-CATCTAAAGCC-3' (서열 번호 1); 서열 a2: 5'-GAATTCCTCG-3' (서열 번호 2); 서열 a3: 5'-GTTTAATTGCG-3' (서열 번호 3); 서열 a4: 5'-ACAATCTTCG-3' (서열 번호 4); 서열 a5: 5'-TTTCTGCTTC-3' (서열 번호 5); 서열 a6: 5'-GCATTGTTACT-3' (서열 번호 6); 서열 a7: 5'-ATATACAAGCG-3' (서열 번호 7); 서열 a8: 5'-GCTGTCTATTG-3' (서열 번호 8); 서열 a9: 5'-TCTTTATGCTG-3' (서열 번호 9); 서열 a10: 5'-CAATCTCATCC-3' (서열 번호 10).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 본 발명은 특히, 예를 들어 세포 환경에서의 핵산 기반의 영상화용 프로브 (예를 들어, DNA-기반의 영상화용 프로브)를 사용한 다중 형광 영상화를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본원에 제공된 방법은 부분적으로 핵산 도킹 가닥 및 이미지 가닥의 프로그램 가능성(programmability)을 기반으로 한다. 즉, 예를 들어, 도킹 가닥 및 이미지 가닥은 이들이 특정한 조건 하에서 특정한 시간 기간 동안 서로에게 결합하도록 설계될 수 있다. 이러한 프로그램 가능성은 이미지 가닥의 도킹 가닥에의 안정한 결합을 가능케 하며, 이는 본원에 제공된 바와 같다. 일반적으로, 본원에 제공된 방법은 특정한 샘플 (예를 들어, 생물 샘플)에서 1가지 이상의 표적(들) (예를 들어, 생분자(들), 예컨대 단백질 또는 핵산)을 확인하는 것에 관한 것이다. 일부 예에서, 1가지 이상의 표적(들)이 샘플에 존재하는지의 여부는 공지되어 있지 않다. 따라서, 본 발명의 방법은 1가지 이상의 표적의 존재 또는 부재를 상기 표적(들)을 함유할 것으로 의심되는 샘플에서 결정하는 데 사용될 수 있다. 본원에 제공된 측면들 및 실시 양태들 중 어느 하나에서, 샘플은 1가지 이상의 표적(들)을 함유할 수 있거나 함유할 것으로 의심될 수 있다.
- [0046] 따라서, 본 발명은 프로그램가능한 핵산 (예를 들어, DNA) 프로브를 기반으로 하여 고처리량 고도 다중 영상화 및 분석물/표적 검출을 수행하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 항체와 같은 결합 파트너 상에 고정된 상보성 도킹 가닥에 안정하게 부착될 수 있는 오르토고날(orthogonal) 이미지 가닥을 이용한 순차적 영상화 접근법에 의존한다 (도 1). 이미지 가닥을 이용한 혼성화 및 영상화 후, 소거 단계 (예컨대 광퇴색 단계)를 수행하여, 혼성화된 (결합된) 이미지 가닥으로부터의 형광을 제거하고/하거나 감소시킨다.
- [0047] 또 다른 실시 양태에서, 본 방법은 시그널을 제거하기 위하여 도킹 가닥과 영상화 가닥 사이의 더 약한 결합을 이용한다. 예를 들어, 혼성화 조건은 도킹 가닥 또는 이미지 가닥 사이에 형성되는 이중 가닥의 융점이 영상화 온도 또는 실온보다 약간 더 높은 온도 (예를 들어, 25℃)가 되도록 변화될 수 있다. 표지 단계(즉, 이미지 가닥을 그의 각각의 도킹 가닥에 결합시키는 단계) 및 영상화 단계는 상기에 기술된 바와 같이 수행된다. 예로서, 제1 표적을 영상화한 후, 샘플은 변성 조건이 수행된다. 변성 조건은 예를 들어 염 농도가 더 낮거나, 변성제, 예컨대 포름아미드가 존재하거나 이의 농도가 증가되거나, 온도가 증가된 용액을 이용하여 완충제 교환 단계에서 제공될 수 있다 (도 2). 샘플은 대안적으로 또는 부가적으로, 증가된 온도에 노출될 수 있다. 전술한 증가 또는 감소는 표지 단계에서(즉, 이미지 가닥을 도킹 가닥에 결합시킬 때) 존재하는 조건에 관련된다. 완충제 교환의 경우, 샘플이 세척될 수 있으며, 완충제 교환이 반복될 수 있고, 샘플이 다시 세척될 수 있으며, 그 후 다음 이미지 가닥이 샘플에 첨가될 수 있다.
- [0048] 다중화를 위하여, 무한한 수의 표적을 잠재적으로 영상화하기 위하여 예를 들어 시그널의 소거를 위한 광퇴색 또는 다른 방법 또는 이미지 가닥의 불활성화 또는 제거의 매 단계 후 오르토고날 이미지 가닥의 상이한 저장체들이 동일 샘플에 순차적으로 적용된다. 컬러 채널(color channel)들 사이의 스펙트럼 중첩에 의해 다중화가 제한되는 전통적인 영상화 접근법과는 달리, 본원에 제공된 방법은 (도킹 가닥 또는 대안적으로 이미지 가닥의) 가능한 오르토고날 뉴클레오타이드 서열의 수에 의해서만 제한된다. 더 많은 수의 오르토고날 뉴클레오타이드 서열이 손쉽게 설계될 수 있기 때문에, 이러한 접근법은 단지 단일 형광단의 사용에 의해 본질적으로 확장가능한 다중화 능력을 갖는다. 이러한 방법은 손쉽게 표준 현미경 검사법용 셋업(setup) (예를 들어, 공초점 또는 표면-형광 현미경)과 통합되어 샘플의 고처리량 분석을 허용할 수 있다.
- [0049] 본 방법은 예를 들어 고처리량 스크리닝 분석법, 예컨대 약물 스크리닝 분석법에서 응용가능성을 갖는다. 이러한 영상화 접근법은 표준 공초점 또는 표면-형광 현미경을 이용하여 영상화하면서 극도로 다중화된 포맷으로 세포 (대략 1,000개 내지 10,000개)의 큰 집단 또는 조직 샘플을 분석하는 것을 허용한다. 고처리량 방식으로 동

일 샘플로부터 다수의 표적, 예컨대 단백질을 스크리닝하는 것은 세포 이중성 정보를 제공하면서 새로운 약물 또는 변형자(modifier)에 관한 정보를 제공한다. 고처리량 및 극도로 다중화된 영상화 능력을 이용한 조직 샘플의 대규모 스크리닝은 병리 분석에서, 예를 들어 병원 또는 기타 서비스 제공 장소에서 유용하다.

- [0050] 본원에 제공된 방법은 단일 표적 (예를 들어, 특정 단백질과 같은 것을 예로 들)의 절대적인 양, 또는 1가지 이상의 다른 표적에 대한 단일 표적의 양을 확인하는 데 또한 사용될 수 있다.
- [0051] 또한, 본원에 제공된 방법은 샘플 내에서의 표적의 위치 또는 샘플 중 다른 표적에 대한 표적의 위치를 확인하는 데 사용될 수 있다.
- [0052] 따라서 본 발명은 (1) 샘플을 복수의 서열-표지된 표적-인식 모이어티와 동시에 접촉시키는 단계, (2) 서열-표지된 표적-인식 모이어티 내에 도킹 가닥과 같은 도킹 핵산의 이미지 가닥 인식 하위세트(subset)와 같은 이미지 핵산을 서열 상보성을 통하여 도입하는 단계, (3) 이미지 핵산을 제거하거나 불활성화시키거나, 또는 이미지 핵산으로부터 시그널을 소거하는 단계, 및 (4) 1가지 이상의 추가의 도킹 핵산을 영상화하여 탐지하기 위하여 단계 (2) 및 임의로 단계 (3)을 1회 이상 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0053] 본 방법은 복수의 표적-인식 모이어티를 도킹 핵산, 예컨대 도킹 가닥으로 표지하여 서열-표지된 표적-인식 모이어티를 형성하는 것을 임의로 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명은 추가로, (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-특이적 결합 파트너는 도킹 가닥에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-특이적 결합 파트너들은 상이한 도킹 가닥들에 결합됨), (2) 임의로, 비결합된 표적-특이적 결합 파트너를 제거하는 단계, (3) 샘플을 도킹 가닥에 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 가닥과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 가닥을 제거하는 단계, (5) 결합된 표지된 이미지 가닥의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계, (6) 결합된 표지된 이미지 가닥으로부터의 시그널을 소거하는 단계, 및 (7) 모든 다른 표지된 이미지 가닥에 비하여 독특한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 가닥을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0055] 단계 (3) 내지 단계 (6)은 1회 또는 다회 반복될 수 있다. 예를 들어, 단계 (3) 내지 단계 (6)은 1 내지 10회 또는 이보다 더 많이 반복될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 단계 (3) 내지 단계 (6)은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 반복된다.
- [0056] 본 발명은 추가로, (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-인식 모이어티, 예컨대 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-인식 모이어티는 도킹 핵산에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-인식 모이어티들은 상이한 도킹 핵산들에 결합됨), (2) 임의로, 비결합된 표적-인식 모이어티를 제거하는 단계, (3) 샘플을 도킹 핵산에 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산, 예컨대 이미지 가닥과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, (5) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계, (6) 결합된 표지된 이미지 핵산을 도킹 핵산으로부터 제거하는 단계, 및 (7) 모든 다른 표지된 이미지 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0057] 단계 (3) 내지 단계 (6)은 1회 또는 다회 반복될 수 있다. 예를 들어, 단계 (3) 내지 단계 (6)은 1 내지 10회 또는 이보다 더 많이 반복될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 단계 (3) 내지 단계 (6)은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 반복된다.
- [0058] 본 발명은 추가로, (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-인식 모이어티, 예컨대 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-인식 모이어티는 도킹 핵산, 예컨대 도킹 가닥에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-인식 모이어티들은 상이한 도킹 핵산들에 결합됨), (2) 임의로, 비결합된 표적-인식 모이어티를 제거하는 단계, (3) 샘플을 도킹 핵산에 상보성인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산, 예컨대 이미지 가닥과 접촉시키는 단계, (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계, (5) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계, (6) 결합된 표지된 이미지 핵산을, 상기 이미지 핵산을 전체적으로 제거하지 않고서 그의 시그널-방출 모이어티의 제거 또는 변형에 의해 불활성화시키는 단계, 및 (7) 모든 다른 표지된 이미지 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

- [0059] 단계 (3) 내지 단계 (6)은 1회 또는 다회 반복될 수 있다. 예를 들어, 단계 (3) 내지 단계 (6)은 1 내지 10회 또는 이보다 더 많이 반복될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 단계 (3) 내지 단계 (6)은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 반복된다.
- [0060] 일부 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법은 가닥 치환 이외의 방법을 이용하여, 도킹 핵산, 예컨대 도킹 가닥에 결합된 이미저 핵산, 예컨대 이미저 가닥을 제거하는 단계를 포함한다.
- [0061] 일부 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법은 이미저 핵산은 도킹 핵산에의 결합 이전에 시그널을 방출하는(즉, 그러한 시그널은 켜지지 않음), 도킹 핵산, 예컨대 도킹 가닥에 결합된 이미저 핵산, 예컨대 이미저 가닥을 제거하는 단계를 포함한다.
- [0062] 일부 실시 양태에서, 본원에 제공된 방법은 이미저 핵산이 켜쳐(quencher)를 포함하지 않는 핵산을 이용하여 제거되는, 도킹 핵산, 예컨대 도킹 가닥에 결합된 이미저 핵산, 예컨대 이미저 가닥을 제거하는 단계를 포함한다.
- [0063] 전술한 방법 각각에서, 도킹 가닥을 포함하는 도킹 핵산은 단일 가닥 도킹 핵산 또는 도킹 가닥일 수 있거나, 이것은 이중 가닥 도킹 핵산 또는 도킹 가닥일 수 있거나, 이것은 부분 이중 가닥 도킹 핵산 또는 도킹 가닥 (예를 들어, 단일 가닥 및 이중 가닥 영역을 포함함)일 수 있다.
- [0064] 일부 실시 양태에서, 복수의 결합 파트너를 포함하는 복수의 표적-인식 모이어티가 사용되는 경우, 상기 복수의 것은 샘플과 접촉될 수 있으며, 따라서 관심 대상의 표적들과 동시에 접촉될 수 있다. 표적-인식 모이어티들, 예컨대 결합 파트너들은 샘플과 순차적으로 접촉될 필요는 없지만, 이들은 그렇게 접촉될 수 있다.
- [0065] 이러한 다양한 방법은 회전 디스크 공초점 현미경 검사법을 이용한 고처리량 영상화를 용이하게 한다. 단색 전체 세포 3D 영상화 과정은 평균 약 30초가 걸릴 것으로 추정된다. 이 방법은 호환형 10X 또는 20X 대물렌즈를 이용한 큰 면적 (예를 들어, mm 규모까지의 것)의 영상화를 허용한다. 약 30 내지 50 마이크로미터의 영상화 깊이가 성취될 수 있다. 본원에 제공된 방법은 특히 액틴, Ki-67, 클라트린, 시토케라틴의 염색에 사용되어 왔다 (데이터는 예시되어 있지 않음).
- [0066] 결합 파트너
- [0067] 본 방법은 핵산 (예를 들어, 도킹 핵산, 예컨대 도킹 가닥)에 콘주게이션된 결합 파트너를 이용한다. 이것은 본원에서 결합 파트너-핵산 콘주게이트("BP-NA 콘주게이트")로 지칭될 수 있다. 또한 이것은 서열-표지된 표적-인식 모이어티로 지칭될 수 있다. 본원에서 사용될 때, "결합 파트너-핵산 콘주게이트", 또는 "BP-NA 콘주게이트"는 단일 가닥 핵산 (예를 들어, DNA) 도킹 가닥에 결합된 분자 (예를 들어, N-히드록시숙신이미드(NHS) 링커를 통하여)를 나타낸다.
- [0068] 콘주게이트의 결합 파트너는 관심 대상의 표적, 예컨대 생물분자 (예를 들어, 단백질 또는 핵산)에 대하여 친화성을 갖는 (예를 들어, 이에 결합하는) 임의의 모이어티 (예를 들어, 항체 또는 애타머)일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 결합 파트너는 단백질이다. 도킹 가닥에 결합된 단백질 (또는 펩티드)을 포함하는 BP-NA-콘주게이트는 본원에서 "단백질-핵산 콘주게이트" 또는 "단백질-NA 콘주게이트"로 지칭될 수 있다. 본 발명의 콘주게이트에서 사용하기 위한 단백질의 예는, 제한 없이, 항체 (예를 들어, 단클론 항체), 항원-결합 항체 단편 (예를 들어, Fab 단편), 수용체, 펩티드 및 펩티드 애타머를 포함한다. 다른 결합 파트너가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 예를 들어, 정전기적 상호작용 (예를 들어, 정전기 입자), 소수성 상호작용 또는 자기 상호작용 (예를 들어, 자기 입자)을 통하여 표적에 결합하는 결합 파트너가 본원에서 고려된다.
- [0069] 본원에서 사용될 때, "항체"는 전장 항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편 (예를 들어, "항원-결합 부분") 또는 단쇄를 포함한다. "항체"라는 용어는 제한 없이, 디설피드 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중쇄(H chain) 및 2개의 경쇄(L chain)를 포함하는 당단백질 또는 이의 항원 결합 부분을 포함한다. 항체는 다클론 또는 단클론; 이중체, 동중체 또는 동계; 또는 이의 변형된 형태 (예를 들어, 인간화 형태, 키메라 형태)일 수 있다.
- [0070] 본원에서 사용될 때, 항체의 "항원-결합 부분"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 1개 이상의 단편을 나타낸다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다. 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) V_H , V_L , C_L 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 1가 단편, Fab 단편; (ii) 힌지(hinge) 영역에서 디설피드 가교체에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편, $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암(arm)의 V_H 및 V_L 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (문헌[Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546, 1989]);

및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(isolated complementarity determining region; CDR) 또는 (vii) 합성 링커에 의해 임의로 연결될 수 있는 2개 이상의 단리된 CDR의 조합을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 2개의 도메인, V_H 및 V_L 은 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들이 V_H 영역과 V_L 영역이 쌍을 형성하여 1가 분자 (단쇄 Fv(scFv)로 공지됨)를 형성한 단백질 단쇄로 만들어지게 할 수 있는 합성 링커에 의해 재조합적 방법을 이용하여 이들을 연결시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌[Bird *et al.* *Science* 242:423-426, 1988]; 및 문헌[Huston *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988] 참조). 그러한 단쇄 항체가 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 내에 또한 포함된다. 이러한 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 수득되며, 상기 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대하여 스크리닝된다.

[0071] 본원에서 사용될 때, "수용체"는 예를 들어 펩티드 또는 소분자 (예를 들어, 저 분자량 (900 달톤 미만) 유기 또는 무기 화합물)와 같은 리간드에 결합하는 세포-유래된 분자 (예를 들어, 단백질)를 나타낸다.

[0072] 본원에서 사용될 때, "펩티드 압타머"는 불변 스캐폴드(scaffold) 단백질 내로 삽입된 가변 펩티드 서열을 갖는 분자를 나타낸다 (예를 들어, 문헌[Baines IC, *et al.* *Drug Discov. Today* 11:334-341, 2006] 참조).

[0073] 일부 실시 양태에서, BP-NA 콘주게이트의 분자는 예를 들어 핵산 압타머와 같은 핵산이다. 본원에서 사용될 때, "핵산 압타머"는 단백질 또는 기타 세포 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 이차 및 삼차 구조를 형성할 수 있는 작은 RNA 또는 DNA 분자를 나타낸다 (예를 들어, 문헌[Ni X, *et al.* *Curr Med Chem.* 18(27): 4206-4214, 2011] 참조). 따라서, 일부 실시 양태에서, BP-NA 콘주게이트는 압타머-핵산 콘주게이트일 수 있다.

[0074] 본 발명의 일부 실시 양태는 표적-인식 모이어티를 이용하여 표적을 확인하고 표지한다. 표적-인식 모이어티는 샘플 중 관심 대상의 표적을 특이적으로 인식하는 에이전트(agent)이다. 표적-인식 모이어티의 예는 본원에 열거된 것과 같은 결합 파트너를 포함한다. 표적-인식 모이어티는 항체, 항체 단편 및 항체 유도체, 예컨대 단쇄 항체, 단쇄 Fv 도메인, Fab 도메인, 나노바디(nanobody) 등, 펩티드, 압타머 및 올리고뉴클레오타이드를 포함한다 (예를 들어, 형광 원위치 혼성화(fluorescence in situ hybridization) 또는 FISH와 같은 절차에서 관심 대상의 핵산을 탐지하기 위하여).

[0075] 도킹 가닥과 같은 도킹 핵산

[0076] 본 발명의 특정 실시 양태는 도킹 핵산을 나타낼 수 있다. 도킹 핵산은 본원에 기술된 도킹 가닥을 포함한다. 도킹 핵산은 상보성 서열을 갖는 핵산 (예컨대 이미지 핵산)에 결합할 수 있는 선형 핵산이다. 도킹 핵산은 다른 포스페이트-당 골격 (예를 들어, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오랄 RNA, LNA, XNA) 또는 비-포스페이트-당 모이어티 (예를 들어, 펩티드 핵산 및 모르폴리노)를 포함하는 골격을 포함하는 DNA, RNA, 또는 핵산-유사 구조로 구성될 수 있거나 이루어질 수 있다. 핵염기는 천연 핵염기, 예컨대 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신, 이노신 및 그 유도체와, 비천연 핵염기, 예컨대 이소C, 이소G, dP 및 dZ를 포함할 수 있다. 도킹 핵산은, 그의 상보성 이미지 핵산에 결합되어 있지 않을 때, 안정한 이차 구조가 없는 단일-가닥일 수 있다. 대안적으로, 도킹 핵산은 헤어핀 루프(hairpin loop)와 같은 이차 구조를 포함할 수 있다 (도 7, 상부). 도킹 핵산은 다중-가닥 복합체의 일부일 수 있다 (도 7, 하부).

[0077] 본원에서 사용될 때, "도킹 가닥"은 그의 상보성 이미지 가닥에 안정하게 결합할 수 있는 단일 가닥 핵산 (예를 들어, DNA)을 나타낸다. 안정한 결합은 도킹 가닥 (및 역으로 이미지 가닥)의 길이의 결과일 수 있거나 이것은 혼성화가 일어나는 특정 조건 (예를 들어, 염 농도, 온도 등)의 결과일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 도킹 가닥은 길이가 약 20 내지 약 60개, 또는 이보다 더 많은 뉴클레오타이드이다. 도킹 가닥은 1가지 이상의 동일한 이미지 가닥 (동일한 서열의 것이고 동일하게 표지됨)에 결합할 수 있다.

[0078] 이미지 가닥과 같은 이미지 핵산

[0079] 본 발명의 특정 실시 양태는 이미지 핵산을 나타낼 수 있다. 이미지 핵산은 본원에 기술된 이미지 가닥을 포함한다. 이미지 핵산은 (1) 서열-특이적 상보성을 통하여 도킹 핵산과 상호작용할 수 있는 그리고 (2) 공유적 또는 비-공유적 상호작용에 의해 시그널-방출 모이어티 또는 시그널-방출 모이어티의 다수의 카피(copy)를 모집할 수 있는 핵산이다. 이미지 핵산은 본원에 기술된 바와 같이 선형 또는 분지형일 수 있다. 하나의 이미지 핵산은 중합체 (도 8, 상부) 또는 덴드리머 구조 (도 8, 하부)를 통하여 시그널-방출 모이어티의 다수의 카피를 모집할 수 있다. 예를 들어, 중합체 또는 덴드리머 구조는 문헌[Nazemi A. *et al.* *Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications*, Published Online: 13 Feb. 2014)] 및 그 안에 제공된 참고 문헌에서 논의된 것과 같은 방법을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 대안적으로, 중합체 또는 덴드리머 구조는 예를 들어, 문헌[Dirks R. *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004;1010(43):15275-78]

및 문헌[Um S.H. *et al. Nat. Protocols* 2006;1:995-1000]에 예시된 바와 같이 DNA 혼성화에 의해 형성될 수 있는데, 상기 문헌 각각은 본원에 참고로 포함된다.

- [0080] 이미저 핵산은 다른 포스페이트-당 골격 (예를 들어, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오랄 RNA, LNA, XNA) 또는 비-포스페이트-당 모이어티 (예를 들어, 펩티드 핵산 및 모르폴리노)를 포함하는 골격을 포함하는 DNA, RNA, 또는 핵산-유사 구조로 구성될 수 있거나 이루어질 수 있다. 핵염기는 천연 핵염기, 예컨대 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신, 이노신 및 그의 유도체와, 비천연 핵염기, 예컨대 이소C, 이소G, dP 및 dZ를 포함할 수 있다.
- [0081] 일부 실시 양태에서, 이미저 핵산은 길이가 약 30 내지 약 60개 뉴클레오티드이거나 이보다 더 많은 뉴클레오티드이며, 이는 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60개 뉴클레오티드의 길이를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이미저 핵산은 길이가 30 내지 40개, 30 내지 50개, 40 내지 50개, 40 내지 60개, 또는 50 내지 60개 뉴클레오티드이다.
- [0082] 이미저 핵산은, 그의 상보성 도킹 핵산에 결합되어 있지 않을 때, 안정한 이차 구조가 없는 단일-가닥일 수 있다. 대안적으로, 이미저 핵산은 헤어핀 루프와 같은 이차 구조를 포함할 수 있다 (도 9, 상부). 이미저 핵산은 다중-가닥 복합체의 일부일 수 있다 (도 9, 하부).
- [0083] 일부 실시 양태에서, 이미저 가닥은, 비결합된 이미저 핵산이 형광단과 같은 시그널-방출 모이어티와 근접하여 있는 켄처 모이어티를 지닐 수 있음을 의도하는 자가-켄칭성일 수 있다. 이를 성취하기 위하여, 이미저 핵산은 분자 비컨-유사 구조 (도 5) 또는 헤미듀플렉스(hemiduplex) 구조 (도 6) 중 어느 하나를 채용하도록 설계될 수 있다.
- [0084] 이러한 자가-켄칭성 변형은 배경을 감소시키고/시키거나 세척 단계를 회피하기 위하여 사용될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 결합 및 영상화용 완충제는 비-특이적 결합을 감소시키기 위하여 FISH, 노던 블로팅 (Northern Blotting) 및 서던 블로팅(Southern Blotting)에서 일상적으로 사용되는 첨가제 (예를 들어, 음으로 하전된 중합체, 예컨대 텍스트란 술페이트 및 헤파린)를 함유할 수 있다.
- [0085] 본원에서 사용될 때, "시그널-방출 모이어티"는 특정한 조건 하에서 광자, 방사선, 양전자, 전자기파, 및 자기-핵 공명과 같은 검출가능한 시그널을 방출하는 모이어티이다.
- [0086] 본원에서 사용될 때, "이미저 가닥"은 길이가 약 30 내지 약 60개 뉴클레오티드, 또는 이보다 더 많은 뉴클레오티드인 단일 가닥 핵산 (예를 들어, DNA)이다. 본 발명의 이미저 가닥은 도킹 가닥에 상보성이며 도킹 가닥에 안정하게 결합한다. 안정한 결합은 이미저와 도킹 가닥이 분석의 길이 동안, 또는 적어도 30분 동안, 또는 적어도 60분 동안, 또는 적어도 2시간 동안, 또는 이보다 더 오랫동안 서로에게 여전히 결합된 채로 있음을 의도한다. 그러한 결합은 가역적 또는 비가역적일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다.
- [0087] 일부 실시 양태에서, 도킹 핵산은 이미저 핵산, 예컨대 이미저 가닥에, 상기 두 핵산들이 서로에게 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60분(min) 동안 (또는 적어도 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60분(min) 동안) 여전히 결합된 채로 있을 경우, 안정하게 결합된 것으로 간주된다. 일부 실시 양태에서, 도킹 핵산은 이미저 핵산에, 상기 핵산들이 서로에게 30 내지 60분, 30 내지 120분, 40 내지 60분, 40 내지 120분, 또는 60 내지 120분 동안 (또는 적어도 30 내지 60분, 30 내지 120분, 40 내지 60분, 40 내지 120분, 또는 60 내지 120분 동안) 여전히 결합된 채로 있을 경우, 안정하게 결합된 것으로 간주된다. 그러한 결합은 가역적일 수 있거나 가역적이지 않을 수 있거나, 또는 비가역적일 수 있거나 비가역적이지 않을 수 있다.
- [0088] 본원에서 사용될 때, "결합"은, 임의로 생리학적 조건 하에서의, 예를 들어 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용, 이온 상호작용 및/또는 수소 결합 상호작용으로 인한, 적어도 2가지의 분자 사이의 회합을 나타낸다.
- [0089] 두 핵산 또는 핵산 도메인은, 이들이 염기쌍을 형성하거나 서로와 결합하여 왓슨-크릭(Watson-Crick) 상호작용을 통하여 이중 가닥 핵산 분자를 형성할 경우 서로에 대하여 "상보성"이다.
- [0090] 일부 실시 양태에서, 도킹 핵산 및 이미저 핵산과 같은 본 발명의 핵산은 서로에게 "완벽한 상보성"으로 결합하며, 이는 100% 상보성임을 나타낸다 (예를 들어, 5' - ATTCG - 3'는 5' GCGAAT - 3'에 완벽하게 상보성이다).
- [0091] 본 발명의 이미저 가닥은 검출가능한 표지체 (예를 들어, 형광 표지체)로 표지될 수 있다 (따라서 이는 "형광 표지된" 것으로 간주된다). 예를 들어, 일부 실시 양태에서, 이미저 가닥은 적어도 하나의(즉, 하나 이상의) 형광단을 포함할 수 있다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 형광단의 예는 제한 없이, 잔텐 유도체 (예를 들어, 플루오레세인, 로다민, 오레곤 그린(Oregon green), 에오신 및 텍사스 레드(Texas red)), 시아닌 유도체 (예를 들어, 시아닌, 인도카르보시아닌, 옥사카르보시아닌, 티아카르보시아닌 및 메로시아닌), 나프탈렌 유도체 (예를

들어, 단실 및 프로단 유도체), 쿠마린 유도체, 옥사디아졸 유도체 (예를 들어, 피리딜옥사졸, 니트로벤족사디아졸 및 벤족사디아졸), 피렌 유도체 (예를 들어, 캐스케이드 블루(cascade blue)), 옥사진 유도체 (예를 들어, 나일 레드(Nile red), 나일 블루(Nile blue), 크레실 바이올렛(cresyl violet) 및 옥사진 170), 아크리딘 유도체 (예를 들어, 프로플라빈, 아크리딘 오렌지(acridine orange) 및 아크리딘 옐로우(acridine yellow)), 및 아릴메틴유도체 (예를 들어, 오라민(auramine), 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 및 말라카이트 그린(malachite green)), 및 테트라피롤 유도체 (예를 들어, 포르핀, 프탈로시아닌 및 빌리루빈)를 포함한다.

[0092] 이미지 가닥을 포함하는 이미지 핵산은 본원에서 인용되거나 본 기술 분야에 공지된 것과 같은 검출가능한 표지체로 공유 결합에 의해 표지될 수 있다. 일부 예에서, 이미지 가닥을 포함하는 이미지 핵산은 2, 3, 4가지의, 또는 이보다 더 많은 검출가능한 표지체, 예컨대 형광단을 포함할 수 있다.

[0093] 이미지 가닥을 포함하는 오르토고날 이미지 핵산은 특유한 표지체 (예를 들어, 적색 형광단, 청색 형광단 또는 녹색 형광단)를 포함할 수 있거나, 이들 전부는 이들의 뉴클레오타이드 서열이 상이할지라도 동일한 표지체 (예를 들어, 적색 형광단)를 포함할 수 있다.

[0094] 결합 파트너 및 도킹 가닥 콘주게이트와 같은 서열-표지된 표적 인식 모이어티

[0095] 일부 실시 양태에서, 본 발명의 BP-NA 콘주게이트 (예를 들어, 단백질-핵산 콘주게이트)는 결합 파트너를 도킹 가닥에 연결시키는 (예를 들어, 공유 결합에 의해 또는 비-공유 결합에 의해) 중간 링커를 포함한다. 중간 링커는 비오틴 및/또는 스트렙타비딘을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 양태에서, 항체 및 도킹 가닥은 각각 비오틴닐화될 수 있으며(즉, 적어도 하나의 비오틴 분자에 결합됨), 중간 스트렙타비딘 분자의 비오틴의 결합을 통하여 서로에게 결합될 수 있다. 다른 중간 링커가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 상기 분자가 핵산인 것과 같은 일부 실시 양태에서, 중간 링커는 요구되지 않을 수 있다. 예를 들어, BP-NA 콘주게이트의 도킹 가닥은 예를 들어 핵산 압타머와 같이, 핵산 분자의 연장체 (예를 들어, 5' 또는 3' 연장체)일 수 있다. 유사한 접근법을 이용하여 본원에 제공된 바와 같은 서열-표지된 표적 인식 모이어티를 생성할 수 있다.

[0096] 복수의 BP-NA 콘주게이트 (예를 들어, 단백질-핵산 콘주게이트) 및 이미지 가닥이 본원에서 제공된다. 복수의 것은 동일한 종 또는 특유한 종의 집단을 수 있다. 동일한 종의 복수의 BP-NA 콘주게이트는 전부가 동일 표적 (예를 들어, 생물분자) (예를 들어, 동일한 에피토프 또는 영역/도메인)에 결합하는 콘주게이트를 포함할 수 있다. 역으로, 특유한 종의 복수의 BP-NA 콘주게이트는 각각의 콘주게이트 또는 콘주게이트 하위세트가 동일 표적 상의 특유한 에피토프에 또는 특유한 표적에 결합하는 콘주게이트 또는 콘주게이트 하위세트를 포함할 수 있다. 동일한 종의 복수의 이미지 가닥은 동일한 뉴클레오타이드 서열 및 동일한 형광 표지체 (예를 들어, Cy2, Cy3 또는 Cy4)를 갖는 이미지 가닥을 포함할 수 있다. 역으로, 특유한 종의 복수의 이미지 가닥은 특유한 뉴클레오타이드 서열 (예를 들어, DNA 서열) 및 특유한 형광 표지체 (예를 들어, Cy2, Cy3 또는 Cy4)를 갖는 또는 특유한 뉴클레오타이드 서열 및 동일한 형광 표지체 (예를 들어, 모두 Cy2)를 갖는 이미지 가닥을 포함할 수 있다. 주어진 복수의 BP-NA 콘주게이트에 있어서의 특유한 종의 수는 결합 파트너 (예를 들어, 항체)의 수 및 상이한 뉴클레오타이드 서열의 도킹 가닥 (그리고 이에 따라 상보성 이미지 가닥)의 수에 의해 한정된다. 일부 실시 양태에서, 복수의 BP-NA 콘주게이트 (예를 들어, 단백질-핵산 콘주게이트)는 적어도 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 10^4 , 50000, 10^5 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} 가지의 BP-NA 콘주게이트를 포함한다. 마찬가지로, 일부 실시 양태에서, 복수의 형광 표지된 이미지 가닥은 적어도 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 10^4 , 50000, 10^5 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} 가지의 형광 표지된 이미지 가닥을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 복수의 것은 1 내지 약 200가지의 또는 이보다 더 많은 특유한 종의 BP-NA 콘주게이트 및/또는 이미지 가닥을 포함할 수 있다. 예를 들어, 복수의 것은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200가지의 또는 이보다 더 많은 특유한 종을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 복수의 것은 약 5 내지 약 200가지보다 적은 특유한 종의 BP-NA 콘주게이트 및/또는 이미지 가닥을 함유할 수 있다. 예를 들어, 복수의 것은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175 또는 200가지 미만의 특유한 종을 함유할 수 있다. 이러한 실시 양태는 본원에 제공된 바와 같은 서열-표지된 표적 인식 모이어티에 적용된다.

[0097] 시그널 또는 이미지 핵산의 불활성화

[0098] 본원에 제공된 방법 중 일부에서 이미지 핵산 불활성화를 성취하기 위하여, 이미지 가닥을 포함하는 이미지 핵산은 온도의 증가; 반대 이온 (예를 들어, 유리 Mg^{++})의 농도의 감소; 변성제 (예를 들어, 포름아미드, 우레아,

DMSO 등)의 도입 또는 이의 농도의 증가; 및 이미지 가닥의 화학적, 광화학적 또는 효소적 절단, 변형 또는 분해 또는 이의 임의의 조합과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 수단에 의해 결합 파트너를 포함하는 표적-인식 모이어티로부터 제거될 수 있다 (도 3).

[0099] 본원에 제공된 방법 중 일부에서 이미지 핵산 불활성화를 성취하기 위하여, 이미지 가닥을 포함하는 이미지 핵산은 이미지 핵산의 핵산 부분 전체를 도킹 가닥으로부터 제거하지 않고서 시그널-방출 모이어티를 제거하고/하거나 변형시킴으로써 불활성화될 수 있다. (도 4).

[0100] 예로서, 이미지 핵산의 제거는 이미지 가닥을 다수의 부분으로 절단함으로써 용이해지게 될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 이미지 핵산은 화학적으로 절단가능한 모이어티를 포함하는데, 상기 모이어티는 그러한 절단가능한 모이어티에 작용하는 화합물의 도입에 의해 절단될 수 있다. 그러한 화학적으로 절단가능한 모이어티의 예는 특정한 Pd계 시약에 의해 절단될 수 있는 알릴기 (본원에 참고로 포함된 문헌[Ju J. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 26;103(52):19635-40]); TCEP와 같은 특정한 인계 시약에 의해 절단될 수 있는 아지도기 (본원에 참고로 포함된 문헌[Guo J *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 8;105(27):9145-50]); 은계 시약에 의해 절단될 수 있는 가교 포스포로티올레이트 (본원에 참고로 포함된 문헌[Mag M. *et al.* *Nucleic Acids Res.* 1991 Apr 11;19(7):1437-41]); DTT 및 TCEP와 같은 환원제에 의해 절단될 수 있는 디설피드 결합; 및 히드록시드 및 이미다졸과 같은 다양한 친핵체에 의해 절단될 수 있는 리보스를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0101] 일부 실시 양태에서, 이미지 핵산은 광화학적으로 (예를 들어, UV 노출에 의해) 절단될 수 있는 광절단가능한 링커를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이미지 핵산은 효소에 의해 절단될 수 있는 모이어티를 함유한다. 효소적으로 절단가능한 그러한 모이어티의 예는 다양한 RNase에 의해 절단될 수 있는 리보뉴클레오티드; USER (뉴잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))과 같은 효소 조합에 의해 절단될 수 있는 테옥시우리딘; 및 서열-특이적 니킹(nicking) 효소 또는 제한 효소에 의해 절단될 수 있는 제한효소 부위를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 양태에서, 제한 효소는 이미지 핵산 및 도킹 핵산 둘 모두를 절단할 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 이미지 핵산의 제거는 이미지 핵산을 안정성이 감소된 (또는 용융 온도가 더 낮은) 이중가닥을 형성하도록 도킹 핵산에 결합하는 형태로 변형시킴으로써 용이해지게 될 수 있다.

[0102] 예로서, 이미지 핵산은 광이성질체화될 수 있는 아조벤젠을 포함하며, 여기서, 상이한 이성질체들은 도킹 핵산에의 이미지 핵산의 결합의 강도에 상이하게 영향을 준다 (본원에 참고로 포함된 문헌[Asanuma H. *et al.* *Angew Chem Int Ed Engl.* 2001 Jul 16;40(14):2671-2673]). 일부 실시 양태에서, 이미지 핵산은 테옥시우리딘을 포함하며, 여기서, 우라실기는 우라실-DNA 글리코실라아제에 의해 절단될 수 있다. 우라실이 제거된 후, 이미지 가닥의 결합 강도는 약화된다.

[0103] 대안적으로, 시그널-방출 모이어티의 제거는 이미지 핵산과 시그널-방출 모이어티 사이의 링커를 (그러한 링커가 존재할 경우) 절단함으로써 성취될 수 있다. 본원에 기술된 화학적 특성을 이 목적을 위하여 또한 사용할 수 있다.

[0104] 시그널-방출 모이어티의 불활성화는 시그널-방출 모이어티의 화학적 또는 광화학적 변형에 의해 성취될 수 있다. 예를 들어, 시그널-방출 모이어티가 형광단일 때, 이것은 (예를 들어 과산화수소와 같은) 화학적 에이전트(agent)에 의해 퇴색될 수 있거나 (본원에 참고로 포함된 문헌[Gerdes M. *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jul 16;110(29):11982-87]), 또는 (예를 들어, 본원에 참고로 포함된 문헌[Schubert W. *et al.* *Nat. Biotech.* 2006;24:1270-78]에 기술된 소프트(soft) 다파장 여기를 이용하여) 광퇴색될 수 있다.

[0105] 본 기술 분야에서 이해되는 바와 같이, "광퇴색"은 염료 또는 형광단 분자가 형광이 불가능해지도록 하는 염료 또는 형광단 분자의 광화학적 변형을 나타낸다. 이는 형광단과 주위 분자 사이의 비-특이적 반응 또는 공유 결합의 절단에 의해 야기된다. 일부 실시 양태에서, 광퇴색에 의해 야기되는 활성의 손실은 광 노출의 강도 또는 기간의 감소에 의해, 형광단의 농도의 증가에 의해, 입력 광의 진동수 및 그에 따라 광자 에너지의 감소에 의해, 또는 퇴색에 덜 취약한 더 강한 형광단 (예를 들어, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 또는 다이라이트 플루오르(DyLight Fluor)의 사용에 의해 제어될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ghauharali R. *et al.* *Journal of Microscopy* 2001;198: 88-100]; 및 문헌[Eggeling C. *et al.* *Analytical Chemistry* 1998;70:2651-59]을 참조한다.

[0106] 따라서, 광퇴색은 시그널-방출 모이어티로부터 시그널을 제거하거나, 변형시키거나 또는 일부의 예에서 소거하는 데 사용될 수 있다. 광퇴색은 적합한 파장의 광의 파장, 에너지 및 지속 시간에 형광단을 노출시켜 형광단이

추가 시그널을 방출하는 능력을 영구적으로 그리고 비가역적으로 소거함으로써 수행될 수 있다. 광퇴색 기술은 본 기술 분야에 공지되어 있다.

[0107] 일반적으로 생리학적 온도보다 낮은 넓은 범위의 온도(즉, 0℃ 내지 37℃)에서 표적에 결합할 수 있으며 염 농도의 온화한 변화(즉, 10 mM 내지 1 M의 1가 양이온 농도; 0 내지 10 mM의 2가 양이온)를 견딜 수 있는 항체와는 달리, 짧은 핵산의 혼성화의 친화성은 온도 및 염 농도에 의존적임이 또한 밝혀졌다. 예를 들어, ssDNA 5'-CATCTAAAGCC-3'와 그의 역상보성 가닥 5'-GGCTTAGATG-3' 사이의 예상 해리 상수 (참고 문헌 PMID 15139820에 약술된 파라미터 세트를 사용함)는 500 mM [Na⁺] 및 10 mM [Mg⁺⁺]에서 23℃에서 대략 90 pM이다. 환언하면, 이 조건에서, 결합은 매우 강하다. ssDNA의 이러한 쌍의 예상 해리 상수는 150 mM [Na⁺] 및 0 mM [Mg⁺⁺]에서 37℃에서 대략 500 nM만큼 높다. 환언하면, 이 조건에서, 결합은 상당히 약하다. 이러한 두 조건의 해리 상수는 대부분의 항체가 상기 둘 모두의 조건에서 그의 표적에 강하게 결합할지라도 거의 10⁴만큼 변한다. 유사한 성향이 다른 DNA 서열에 대하여 관찰된다 (도 10). 추가 예로서, 영상화 조건은 500 mM [Na⁺] 및 10 mM [Mg⁺⁺]에서 23℃일 수 있으며, 염료-불활성화 조건은 150 mM [Na⁺] 및 0 mM [Mg⁺⁺]에서 37℃일 수 있다.

[0108] 일부 실시 양태에서, 분석되는 샘플은 배양된 세포, 조직 박편, 또는 살아 있는 유기체로부터의 기타 샘플이다.

[0109] 일부 실시 양태에서, 샘플은 개별적으로 고정된 것을 포함하여, 고체 표면 (예를 들어, 유리 슬라이드(glass slide) 또는 커버 슬립(cover slip))에 고정된 해리 세포이다. 예를 들어, 샘플은 혈중 세포일 수 있다. 예를 들어, 샘플은 혈액에서 순환하는 암세포 (순환 종양 세포(circulating tumor cell) 또는 CTC로도 공지됨)를 함유할 수 있다. 샘플은 현탁 상태로 성장시킨 세포일 수 있다. 샘플은 고형 조직으로부터 전파된 세포일 수 있다.

[0110] 샘플

[0111] "샘플"은 세포들 (또는 세포), 조직, 또는 체액, 예컨대 혈액 (혈청 및/또는 혈장), 소변, 정액, 림프액, 뇌척수액 또는 양수를 포함할 수 있다. 샘플은 제한 없이, 인간, 동물, 세균, 바이러스, 미생물 및 식물을 포함하는 임의의 공급원으로부터 취득될 수 있다 (또는 유래될 수 있다). 일부 실시 양태에서, 샘플은 세포 용해물 또는 조직 용해물이다. 샘플은 또한 하나의 공급원 또는 상이한 공급원들로부터의 물질의 혼합물을 함유할 수 있다. 샘플은 공간적 영역 또는 볼륨 (예를 들어, 어레이(array) 상의 격자판, 또는 플레이트 또는 디쉬 내의 웰)일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 샘플은 표적(들), BP-NA 콘주게이트(들) 및 이미지 가닥(들)을 포함한다. 세포는 전파된 (또는 해리된) 세포일 수 있다.

[0112] 표적

[0113] "표적"은 관찰하거나 정량화하기를 바라는 그리고 결합 파트너가 존재하는 임의의 모이어티이다. 일부 실시 양태에서, 표적은 비천연일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 표적은 생물분자일 수 있다. 본원에서 사용될 때, "생물분자"는 살아 있는 유기체에 의해 생성되는 임의의 분자로서, 이는 큰 거대분자, 예컨대 단백질, 다당류, 지질 및 핵산 (예를 들어, DNA 및 RNA, 예컨대 mRNA)과, 소분자, 예컨대 일차 대사산물, 이차 대사산물 및 천연 생성물을 포함한다. 생물분자의 예는 제한 없이, DNA, RNA, cDNA, 또는 역전사가 수행된 RNA의 DNA 생성물, A23187 (칼시마이신(Calcimycin), 칼슘 이오노포어(Calcium Ionophore)), 아바멕틴(Abamectine), 아비에트산(Abietic acid), 아세트산, 아세틸콜린, 액틴, 악티노마이신(Actinomycin) D, 아데노신, 아데노신 디포스페이트(ADP), 아데노신 모노포스페이트(AMP), 아데노신 트리포스페이트(ATP), 아데닐레이트 사이클라아제(Adenylate cyclase), 아도니톨(Adonitol), 아드레날린(Adrenaline), 에피네프린, 부신 피질 자극 호르몬(Adrenocorticotrophic hormone; ACTH), 에퀴린(Aequorin), 아플라톡신(Aflatoxin), 한천(Agar), 알라메티신, 알라닌, 알부민, 알도스테론, 알류론(Aleurone), 알파-아마니틴, 알란토인, 알레트린(Allethrin), α-아마나틴(Amanatin), 아미노산, 아밀라아제, 아나볼릭 스테로이드(Anabolic steroid), 아네톨(Anethole), 안지오텐시노젠(Angiotensinogen), 아니소마이신(Anisomycin), 항이뇨 호르몬(Antidiuretic hormone; ADH), 아라비노스, 아르기닌, 아스코마이신(Ascomycin), 아스코르브산(비타민 C), 아스파라긴, 아스파르트산, 비대칭 디메틸아르기닌, 심방 나트륨 이뇨 펩티드(Atrial-natriuretic peptide; ANP), 옥신(Auxin), 아비딘(Avidin), 아자디라크틴(Azadirachtin) A - C₃₅H₄₄O₁₆, 박테리오신(Bacteriocin), 뷰베리신(Beauvericin), 비쿠쿨린(Bicuculline), 빌리루빈(Bilirubin), 생체고분자 물질(Biopolymer), 비오틴(비타민 H), 브레펠딘(Brefeldin) A, 브라시놀리드(Brassinolide), 브루신(Brucine), 카다베린(Cadaverine), 카페인, 칼시페롤(Calciferol) (비타민 D), 칼시토닌(Calcitonin), 칼모듈린(Calmodulin), 칼모듈린, 칼레티쿨린, 캄포르(Camphor) - (C₁₀H₁₆O), 칸나비놀(Cannabinol), 캅사이신(Capsaicin), 카보하이드라아제(Carbohydrase), 탄수화물, 카르니틴(Carnitine), 카라기난(Carrageenan), 카제인(Casein), 카스파아제(Caspase), 셀룰라아제(Cellulase), 셀룰로

오스 - (C6H10O5), 세룰레닌(Cerulenin), 세트리모늄 브로마이드(Cetrimonium bromide) (세트리마이드 (Cetrimide)) - C19H42BrN, 켈레리트린(Chelerythrine), 크로모마이신(Chromomycin) A3, 샤페론인(Chaperonin), 키틴, α-클로랄로스(Chloralose), 엽록소, 콜레시스토키닌(Cholecystokinin; CCK), 콜레스테롤, 콜린, 콘드로이틴 술페이트, 신남알데히드, 시트랄(Citral), 시트르산, 시트린(Citrinin), 시트로넬랄(Citronellal), 시트로넬롤(Citronellol), 시트룰린(Citrulline), 코발아민(Cobalamin)(비타민 B12), 조효소, 조효소 Q, 콜히친(Colchicine), 콜라겐, 코니인(Coniine), 코르티코스테로이드, 코르티코스테론, 부신 피질 자극 호르몬 방출 호르몬(Corticotropin-releasing hormone; CRH), 코르티솔(Cortisol), 크레아틴, 크레아틴 키나아제, 크리스탈린(Crystallin), α-시클로텍스트린, 시클로텍스트린 글리코실트랜스퍼라아제, 시클로파민, 시클로피아존산, 시스테인, 시스틴, 시티딘, 시토칼라신, 시토칼라신 E, 시토크롬, 시토크롬 C, 시토크롬 c 옥시다아제, 시토크롬 c 퍼옥시다아제, 시토카인, 시토신 - C4H5N3O, 테옥시콜산, DON(테옥시니발레놀(DeoxyNivalenol)), 테옥시리보푸라노스, 테옥시리보스, 테옥시리보스 핵산(DNA), 텍스트란, 텍스트린, DNA, 도파민, 효소, 에페드린, 에피네프린 - C9H13NO3, 에루식산 - CH3(CH2)7CH=CH(CH2)11COOH, 에리트리트, 에리트로포이에틴(EPO), 에스트라디올, 유제놀(Eugenol), 지방산, 피브린, 피브로넥틴, 폴산(비타민 M), 난포 자극 호르몬(Follicle stimulating hormone; FSH), 포름알데히드, 포름산, 포름노시(Formnoci), 프록토스, 푸모니신(Fumonisin) B1, 감마 글로불린, 갈락토스, 감마 글로불린, 감마-아미노부티르산, 감마-부티로락톤, 감마-히드록시부티레이트(Gamma-hydroxybutyrate; GHB), 가스트린, 젤라틴, 제라니올, 글로불린, 글루카곤, 글루코사민, 글루코스 - C6H12O6, 글루코스 옥시다아제, 글루텐, 글루탐산, 글루타민, 글루타티온, 글루텐, 글리세린 (글리세롤), 글리세린, 글리코젠, 글리콜산, 당단백질, 생식소 자극 호르몬 방출 호르몬(Gonadotropin-releasing hormone; GnRH), 그랜자임(Granzyme), 녹색 형광 단백질, 성장 호르몬, 성장 호르몬-방출 호르몬(Growth hormone-releasing hormone; GHRH), GTPase, 구아닌, 구아노신, 구아노신 트리포스페이트(+GTP), 합토글로빈(Haptoglobin), 헤마톡실린(Hematoxylin), 헴(Heme), 헤메리트린(Hemerythrin), 헤모시아닌, 헤모글로빈, 헤모프로테인(Hemoprotein), 해파란 술페이트, 고밀도 리포단백질, HDL, 히스타민, 히스티딘, 히스톤, 히스톤 메틸트랜스퍼라아제, HLA 항원, 호모시스테인, 호르몬, 인간 융모막성 성선 자극 호르몬(human chorionic gonadotropin; hCG), 인간 성장 호르몬, 히알루로네이트, 히알루로니다아제, 과산화수소, 5-히드록시메틸시토신, 히드록시포플린, 5-히드록시트리프타민, 인디고 염료(Indigo dye), 인돌, 이노신, 이노시톨, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자, 내재성 막 단백질, 인테그라아제, 인테그린, 인테인, 인터페론, 이눌린, 이오노마이신, 이오논, 이소류신, 철-황 클러스터(cluster), K252a, K252b, KT5720, KT5823, 케라틴, 키나아제, 락타아제, 락트산, 락토스, 라놀린, 라우르산, 랩틴, 랩토마이신 B, 류신, 리그닌, 리모넨, 리날로올, 리놀레산, 리놀렌산, 리파아제, 지질, 지질 고정된 단백질, 리포아미드, 리포단백질, 저밀도 리포단백질, LDL, 황체 형성 호르몬(Luteinizing hormone; LH), 리코펜, 라이신, 라이소자임(Lysozyme), 말산, 말토스, 멜라토닌, 막 단백질, 메탈로프로테인(Metalloprotein), 메탈로티오네인(Metallothionein), 메티오닌, 미모신, 미트라마이신(Mithramycin) A, 미토마이신 C, 단량체, 마이코페놀산, 미오글로빈, 마이오신, 천연 페놀, 핵산, 오크라톡신(Ochratoxin) A, 오에스트로겐(Oestrogen), 올리고펩티드, 올리고마이신, 오르신(Orcin), 오렉신(Orexin), 오르니틴, 옥살산, 옥시다아제, 옥시토신, p53, PABA, 파클리탁셀, 팔미트산, 판토텐산(비타민 B5), 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone; PTH), 파라프로테인(Paraprotein), 파르다신(Pardaxin), 파르테놀리드(Parthenolide), 파툴린(Patulin), 팍실린(Paxilline), 페니실릭산(Penicillic acid), 페니실린, 페니트렘(Penitrem) A, 펩티다아제, 펩신, 펩티드, 페리마이신(Perimycin), 외재성 막 단백질, 페로사민(Perosamine), 페네틸아민, 페닐알라닌, 포스포겐, 포스포파타아제, 인지질, 페닐알라닌, 피트산, 식물 호르몬, 폴리펩티드, 폴리페놀, 다당류, 포르피린, 프라이온, 프로게스테론, 프로락틴(Prolactin; PRL), 프롤린, 프로피온산, 프로타민, 프로테아제, 단백질, 프로테이노이드, 푸트레신(Putrescine), 피레트린(Pyrethrin), 피리독신 또는 피리독사민(비타민 B6), 피로라이신(Pyrrolysine), 피루브산, 퀴논, 라디시콜(Radicicol), 라피노스, 레닌, 레티넨, 레티놀(비타민 A), 로돕신(시홍), 리보플라빈(비타민 B2), 리보푸라노스, 리보스, 리보자임(Ribozyne), 리신, RNA - 리보핵산, RuBisCO, 사프롤(Safrole), 살리실알데히드, 살리실산, 살비노린(Salvinorin)-A - C23H28O8, 사포닌, 세크레틴(Secretin), 셀레노시스테인, 셀레노메티오닌, 셀레노프로테인, 세린, 세린 키나아제, 세로토닌, 스카톨(Skatole), 시그널 인식 입자, 소마토스타틴(Somatostatin), 소르브산, 스쿠알렌, 스타우로스포르린, 스테아르산, 스테리그마토시스틴, 스테롤, 스트리크닌, 수크로스 (당), 당류 (일반적), 수퍼옥사이드, T2 독소, 탄닌산, 탄닌, 타르타르산, 타우린, 테트로도톡신(Tetrodotoxin), 타우마틴(Thaumatococin), 토포이소머라아제, 타이로신 키나아제, 타우린, 테스토스테론, 테트라히드로칸나비놀(Tetrahydrocannabinol; THC), 테트로도톡신, 탐시가르긴(Thapsigargin), 타우마틴(Thaumatococin), 티아민(비타민 B1) - C12H17CIN4OS · HCl, 트레오닌, 트롬보포이에틴, 티미딘, 티민, 트리아신(Triacsin) C, 갑상선 자극 호르몬(Thyroid-stimulating hormone; TSH), 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(Thyrotropin-releasing hormone; TRH), 티록신(T4), 토코페롤(비타민

E), 토포이소머라아제, 트리오도티로닌(T3), 막관통 수용체, 트리코스타틴(Trichostatin) A, 영양 호르몬(Trophic hormone), 트립신, 트립토판, 튜블린, 투니카마이신(Tunicamycin), 타이로신, 유비퀴틴, 우라실, 우레아, 우레아제, 요산 - $C_5H_4N_4O_3$, 우리딘, 발린, 발리노마이신, 바나빈, 바소프레신, 베르루콜로겐(Verruculogen), 비타민 (일반), 비타민 A(레티놀), 비타민 B, 비타민 B1(티아민), 비타민 B2(리보플라빈), 비타민 B3(니아신 또는 니코틴산), 비타민 B4(아데닌), 비타민 B5(판토텐산), 비타민 B6(피리독신 또는 피리독사민), 비타민 B12(코발라민), 비타민 C(아스코르브산), 비타민 D(칼시페롤), 비타민 E(토코페롤), 비타민 F, 비타민 H(비오틴), 비타민 K(나프토킨), 비타민 M(폴산), 워트만닌(Wortmannin) 및 자일로스를 포함한다.

[0114] 일부 실시 양태에서, 표적은 단백질 표적, 예컨대 세포 환경의 단백질 (예를 들어, 세포내 또는 막 단백질)일 수 있다. 단백질의 예는 제한 없이, 섬유 단백질, 예컨대 세포골격 단백질 (예를 들어, 액틴, arp2/3, 코로닌, 디스트로핀(dystrophin), FtsZ, 케라틴, 미오신, 네블린, 스펙트린, tau, 티틴, 트로포미오신, 튜블린 및 콜라겐) 및 세포외 매트릭스 단백질 (예를 들어, 콜라겐, 엘라스틴, f-스폰딘, 피카쿠린 및 피브로넥틴); 구상 단백질, 예컨대 혈장 단백질 (예를 들어, 혈청 아밀로이드 P 성분 및 혈청 알부민), 응고 인자 (예를 들어, 보체 단백질, C1-억제자 및 C3-컨버타아제(convertase), 인자 VIII, 인자 XIII, 피브리, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제자, 트롬빈, 폰 빌레브란트 인자(Von Willebrand Factor)) 및 급성기 단백질, 예컨대 C-반응성 단백질; 헤모프로테인; 세포 유착 단백질 (예를 들어, 카드헤린, 에펜디민, 인테그린, Ncam 및 셀렉틴); 막관통 수송 단백질 (예를 들어, CFTR, 글리코포린(glycophorin) D 및 스크램블라아제), 예컨대 이온 채널 (예를 들어, 리간드-게이트형(ligand-gated) 이온 채널, 예컨대 니코틴 아세틸콜린 수용체 및 GABA_A 수용체, 및 전압-게이트형 이온 채널, 예컨대 칼륨, 칼슘 및 나트륨 채널), 시냅스(synport)/안티포트(antiport) 단백질 (예를 들어, 글루코스 수송자); 호르몬 및 성장 인자 (예를 들어, 표피 성장 인자(epidermal growth factor; EGF), 섬유모세포 성장 인자(fibroblast growth factor; FGF), 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 펩티드 호르몬, 예를 들어 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 및 옥시토신, 및 스테로이드 호르몬, 예컨대 안드로겐, 에스트로겐 및 프로게스테론); 수용체, 예컨대 막관통 수용체 (예를 들어, G-단백질-커플링된 수용체, 로돕신) 및 세포내 수용체 (예를 들어, 에스트로겐 수용체); DNA-결합 단백질 (예를 들어, 히스톤, 프로타민, CI 단백질); 전사 조절자 (예를 들어, c-myc, FOXF2, FOXF3, MyoD 및 P53); 면역 단백질 (예를 들어, 면역글로불린, 주요 조직 적합 항원 및 T 세포 수용체); 영양소 저장/수송 단백질 (예를 들어, 페리틴); 사페론 단백질; 및 효소를 포함한다.

[0115] 일부 실시 양태에서, 표적은 예를 들어 세포 환경의 핵산과 같은 핵산 표적일 수 있다. 표적, 도킹 가닥 및 이미지 가닥과 관련하여 본원에서 사용될 때, "핵산"은 임의의 길이의 중합체 형태의 뉴클레오타이드, 예컨대 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 또는 이의 유사체를 나타낸다. 예를 들어, 핵산은 DNA, RNA 또는 역전사가 수행된 RNA의 DNA 생성물일 수 있다. 핵산의 비제한적 예는 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 연관 분석에 의해 규정된 유전자좌(들), 엑손, 인트론, 메신저(messenger) RNA(mRNA), 트랜스퍼(transfer) RNA, 리보솜 RNA, 리보자임(ribozyme), cDNA, 재조합 핵산, 분지형 핵산, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머를 포함한다. 핵산의 다른 예는 제한 없이, cDNA, 압타머, 펩티드 핵산(peptide nucleic acid; "PNA"), 2'-5' DNA (DNA의 A 배좌에 매치되는 염기-이격을 갖는 짧아진 골격을 갖는 합성 물질; 2'-5' DNA는 B 형태의 DNA와는 보통 혼성화되지 않지만, 이것은 RNA와는 손쉽게 혼성화됨), 록 핵산(locked nucleic acid; "LNA"), 및 변형된 골격을 갖는 핵산 (예를 들어, 천연 핵산의 염기- 또는 당-변형된 형태)을 포함한다. 핵산은 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체 (퓨린 및 피리미딘의 "유사" 형태는 본 기술 분야에 잘 알려져 있음)를 포함할 수 있다. 존재할 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 그 중합체의 조립 전 또는 후에 주어질 수 있다. 핵산은 단일 가닥, 이중 가닥, 부분 단일 가닥 또는 부분 이중 가닥 DNA 또는 RNA일 수 있다.

[0116] 일부 실시 양태에서, 핵산 (예를 들어, 핵산 표적)은 천연이다. 본원에서 사용될 때, "천연"은 인간 개입의 부재 하에 자연에 존재하는 유기체 또는 바이러스에 존재하는 핵산을 나타낸다. 일부 실시 양태에서, 핵산은 유기체 또는 바이러스에서 천연적으로 나타난다. 일부 실시 양태에서, 핵산은 게놈 DNA, 메신저 RNA, 리보솜 RNA, 마이크로-RNA, 프리-마이크로(pre-micro)-RNA, 프로-마이크로(pro-micro)-RNA, 바이러스 DNA, 바이러스 RNA 또는 piwi-RNA이다. 일부 실시 양태에서, 핵산 표적은 합성 DNA 나노구조 (예를 들어, 2가지 이상의 핵산이 왓슨-크릭 상호작용에 의해 서로에게 혼성화되어 2-D 또는 3-D 나노구조를 형성한 것을 포함하는 2차원(2-D) 또는 3차원(3-D) DNA 나노구조)가 아니다.

[0117] 본원에 기술된 핵산 도킹 가닥 및 이미지 가닥은 상기에 기술된 핵산들 (예를 들어, DNA, RNA, 변형 핵산, 핵산 유사체, 천연 핵산, 합성 핵산) 중 어느 하나일 수 있다.

- [0118] 조성물
- [0119] 본원에 제공된 것은 적어도 1가지 또는 적어도 2가지의 (예를 들어, 복수의) 본 발명의 BP-NA 콘쥬게이트(들) (예를 들어, 단백질-핵산 콘쥬게이트(들))를 포함하는 조성물이다. BP-NA 콘쥬게이트는 관심 대상의 표적 (예를 들어, 생물분자)에 결합될 수 있고/있거나 상보성의 형광 표지된 이미저 가닥에 안정하게 결합될 수 있다. 조성물은 복수의 동일한 종의 또는 특유한 종의 BP-NA 콘쥬게이트를 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 조성물은 적어도 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 10^4 , 50000, 10^5 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} 가지의 BP-NA 콘쥬게이트를 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 조성물은 적어도 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 10^4 , 50000, 10^5 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} 개의 상보성의 형광 표지된 이미저 가닥을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 조성물은 1 내지 약 200가지의 또는 이보다 더 많은 특유한 종의 BP-NA 콘쥬게이트 및/또는 이미저 가닥을 함유할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200가지의 또는 이보다 더 많은 특유한 종을 함유할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 조성물은 약 5 내지 약 200가지보다 더 적은 특유한 종의 BP-NA 콘쥬게이트 및/또는 이미저 가닥을 함유할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175 또는 200가지보다 더 적은 특유한 종을 함유할 수 있다.
- [0120] 조성물 중의 상보성의 형광 표지된 이미저 가닥 이미저 가닥의 수는 조성물 중의 BP-NA 콘쥬게이트의 수보다 더 적거나, 이와 동일하거나 또는 이보다 더 많을 수 있음이 이해되어야 한다.
- [0121] 키트
- [0122] 본 발명은 추가로, 본 발명의 1가지 이상의 구성요소를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 예를 들어 BP-NA 콘쥬게이트 및/또는 형광 표지된 이미저 가닥을 포함할 수 있다. 또한 키트는 BP-NA 콘쥬게이트의 생성을 위한 또는 이미저 가닥의 표지를 위한 구성요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 결합 파트너 (예를 들어, 항체), 도킹 가닥 및 중간 링커, 예컨대 비오틴 및 스트렙타비딘 분자, 및/또는 이미저 가닥을 포함할 수 있다. 본 키트는 상기에 설명된 것을 포함하여 당업자에게 자명한 임의의 목적을 위하여 사용될 수 있다.
- [0123] 본 키트는 또한 다른 시약, 예를 들어 혼성화 반응을 수행하기 위한 완충제를 포함할 수 있다. 또한 본 키트는 키트의 구성요소의 사용 설명서, 및/또는 BP-NA 콘쥬게이트 및/또는 표지된 이미저 가닥의 제조 및/또는 사용 설명서를 포함할 수 있다.
- [0124] 응용
- [0125] 본 발명의 BP-NA 콘쥬게이트 (예를 들어, 단백질-핵산 콘쥬게이트 또는 항체-핵산 콘쥬게이트)는 특히, 기존의 표적 탐지 기술이 이용되는 임의의 분석법에서 이용될 수 있다.
- [0126] 전형적으로, 분석은 진단적 분석, 예지적 분석, 환자 모니터링 분석, 스크리닝 분석, 생물진 분석, 법의학적 분석의 분석, 산전 계능 진단 분석 등을 포함하는 탐지 분석을 포함한다. 분석은 시험관 내 분석 또는 생체 내 분석일 수 있다. 본 발명은 본 발명의 방법을 이용하여 많은 상이한 표적을, 심지어 그러한 표적이 종래 기술의 영상화 방법을 이용해서는 공간적으로 해상될 수 없는 (그리고 이에 따라 공간적으로 구별되지 않는) 경우에도, 단일 샘플로부터 한번에 분석될 수 있다는 강점을 제공한다. 이는 예를 들어 몇몇 진단적 테스트가 하나의 샘플에서 수행되게 한다.
- [0127] 또한 BP-NA 콘쥬게이트는 소정의 영역 또는 구역을 단순히 관찰하는 데 사용될 수 있다.
- [0128] 본 발명의 방법은 병든 세포 유형이 샘플에 존재하는지를 결정하도록 및/또는 질환의 병기를 결정하도록 환자로부터 획득되거나 유래된 샘플을 분석하는 데 적용될 수 있다. 예를 들어, 혈액 샘플은 샘플 중 암성 세포 유형의 마커의 양 및/또는 존재를 결정함으로써 암을 진단하거나 암의 병기를 결정하기 위하여 본원에 기술된 방법 중 임의의 것에 따라 분석될 수 있다.
- [0129] 대안적으로, 본원에 기술된 방법은 병원체 감염, 예를 들어, 세포내 세균 및 바이러스에 의한 감염을, 샘플 중의 각각 세균 또는 바이러스의 마커의 양 및/또는 존재의 결정에 의해 진단하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여 탐지되는 표적은 환자 마커 (예컨대 암 마커) 또는 세균 또는 바이러스 마커와 같은 외래 에이전트에 의한 감염의 마커 중 어느 하나일 수 있다.
- [0130] 본 발명의 정량적 영상화 방법은 예를 들어, 풍부성이 생물학적 상태 또는 질환 상태 (예를 들어, 질환 상태의

결과로서 상향조절되거나 하향조절되는 혈액 마커)를 나타내는 표적 (예를 들어, 표적 생물분자)을 정량화하는데 사용될 수 있다.

- [0131] 또한, 본 발명의 조성물 및 방법은 환자의 치료 과정의 결정을 돕는 예지적 정보를 제공하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 종양 마커의 양은 심지어 환자로부터의 적은 샘플로부터 정확하게 정량화될 수 있다. 유방암과 같은 특정한 질환에 있어서, 특정한 단백질, 예컨대 Her2-neu의 과발현은 더 공격적인 치료 과정이 필요함을 나타낸다.
- [0132] 또한 본 발명의 방법은 다양한 표적에서 화합물, 돌연변이, 온도 변화, 성장 호르몬, 성장 인자, 질환, 또는 배양 조건 변화를 포함하는 교란의 영향을 결정함으로써 표적의 존재, 부재 또는 수준이 특정한 생물학적 상태를 나타내는 표적을 확인하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 본 발명은 질환 상태의 구성요소 및 경로를 해명하고 발견하는 데 사용된다. 예를 들어, 질환 조직에 존재하는 표적의 양을 "정상" 조직과 비교하는 것은 이 질환에 연루된 중요한 표적을 해명함으로써 질환 치료에 사용될 수 있는 새로운 약물 후보의 발견/스크리닝을 위한 표적을 확인하는 것을 허용한다.
- [0133] 분석되는 샘플은 생물 샘플, 예컨대 혈액, 객담, 림프, 점액, 대변, 소변 등일 수 있다. 샘플은 환경 샘플, 예컨대 물 샘플, 공기 샘플, 식품 샘플 등일 수 있다. 분석은 고정된 결합 반응물의 1가지 이상의 구성요소를 이용하여 실시될 수 있다. 따라서, 표적 또는 BP-NA 콘주게이트는 고정될 수 있다. 분석은 비-고정된 결합 반응물의 1가지 이상의 구성요소를 이용하여 실시될 수 있다. 분석은 본 발명의 BP-NA 콘주게이트 및 형광 표지된 이미지 거각에 의해 제공되는 다중화 가능성을 고려하여, 샘플 중 표적의 수를 본질적으로 동시에 탐지하는 것을 포함할 수 있다. 예로서, 분석은 특정한 세포 유형 (예를 들어, 특정한 세포 표면 수용체를 기반으로 함) 및 그 특정 세포 유형에서의 특정한 유전자 돌연변이를 탐지하는 데 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 최종 사용자는 예로서, 얼마나 많은 특정한 유형의 세포가 관심 대상의 돌연변이를 지니는지를 결정할 수 있다.
- [0134] 다양한 실시 양태
- [0135] 본 발명은 하기의 넘버링된 실시 양태를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 실시 양태를 제공한다:
- [0136] 1. (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-특이적 결합 파트너는 도킹 가닥에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-특이적 결합 파트너들은 상이한 도킹 가닥들에 결합됨),
- [0137] (2) 임의로, 비결합된 표적-특이적 결합 파트너를 제거하는 단계,
- [0138] (3) 샘플을 도킹 가닥에 상보성인 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 가닥과 접촉시키는 단계,
- [0139] (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 가닥을 제거하는 단계,
- [0140] (5) 결합된 표지된 이미지 가닥의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계,
- [0141] (6) 결합된 표지된 이미지 가닥으로부터의 시그널을 소거하는 단계, 및
- [0142] (7) 모든 다른 표지된 이미지 가닥에 비하여 독특한 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 가닥을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법.
- [0143] 2. 단계 (1)에서 샘플을 1가지 초과 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는, 실시 양태 1의 방법.
- [0144] 3. 표적-특이적 결합 파트너는 항체 또는 항체 단편인, 실시 양태 1 또는 2의 방법.
- [0145] 4. 표지된 이미지 가닥들은 동일하게 표지된, 실시 양태 1 내지 3 중 어느 하나의 방법.
- [0146] 5. 표지된 이미지 가닥 각각은 특유한 표지체를 포함하는, 실시 양태 1 내지 3 중 어느 하나의 방법.
- [0147] 6. 표지된 이미지 가닥은 형광 표지된 이미지 가닥인, 실시 양태 1 내지 5 중 어느 하나의 방법.
- [0148] 7. 상기 1가지 이상의 표적은 단백질인, 실시 양태 1 내지 6 중 어느 하나의 방법.
- [0149] 8. 샘플은 세포, 세포 용해물 또는 조직 용해물인, 실시 양태 1 내지 7 중 어느 하나의 방법.
- [0150] 9. 단계 (5)에서 샘플을 공초점 또는 표면-형광 현미경 검사법을 이용하여 영상화하는, 실시 양태 1 내지 8 중 어느 하나의 방법.
- [0151] 10. 단계 (6)에서 시그널의 소거는 광퇴색을 포함하는, 실시 양태 1 내지 9 중 어느 하나의 방법.

- [0152] 11. 1가지 초과 표적-특이적 결합 파트너에 결합된 샘플 (각각의 결합 파트너는 도킹 가닥에 결합됨), 및
- [0153] 표지된 이미지 가닥에 안정하게 결합된 1가지 이상의 도킹 가닥을 포함하는 조성물.
- [0154] 12. (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-특이적 결합 파트너는 도킹 핵산에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-특이적 결합 파트너들은 상이한 도킹 핵산들에 결합됨),
- [0155] (2) 임의로, 비결합된 표적-특이적 결합 파트너를 제거하는 단계,
- [0156] (3) 샘플을 도킹 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산과 접촉시키는 단계,
- [0157] (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계,
- [0158] (5) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계,
- [0159] (6) 결합된 표지된 이미지 핵산을 도킹 핵산으로부터 제거하는 단계, 및
- [0160] (7) 모든 다른 표지된 이미지 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법.
- [0161] 13. 단계 (1)에서 샘플을 1가지 초과 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는, 실시 양태 12의 방법.
- [0162] 14. 표적-특이적 결합 파트너는 항체 또는 항체 단편인, 실시 양태 12 또는 13의 방법.
- [0163] 15. 표적-특이적 결합 파트너는 천연 또는 엔지니어링된 리간드, 소분자, 압타머, 펩티드 또는 올리고뉴클레오타이드인, 실시 양태 12 또는 13의 방법.
- [0164] 16. 표지된 이미지 핵산들은 동일하게 표지된, 실시 양태 12 내지 15 중 어느 하나의 방법.
- [0165] 17. 표지된 이미지 핵산 각각은 특유한 표지체를 포함하는, 실시 양태 12 내지 15 중 어느 하나의 방법.
- [0166] 18. 표지된 이미지 핵산은 형광 표지된 이미지 핵산인, 실시 양태 12 내지 17 중 어느 하나의 방법.
- [0167] 19. 상기 1가지 이상의 표적은 단백질인, 실시 양태 12 내지 18 중 어느 하나의 방법.
- [0168] 20. 샘플은 세포, 세포 용해물 또는 조직 용해물인, 실시 양태 12 내지 19 중 어느 하나의 방법.
- [0169] 21. 단계 (5)에서 샘플을 공초점 또는 표면-형광 현미경 검사법을 이용하여 영상화하는, 실시 양태 12 내지 20 중 어느 하나의 방법.
- [0170] 22. 표지된 이미지 핵산을 염 농도의 감소, 변성제의 첨가 또는 온도의 증가에 의해 도킹 핵산으로부터 제거하는, 실시 양태 12 내지 21 중 어느 하나의 방법.
- [0171] 23. 염은 Mg^{++} 인, 실시 양태 22의 방법.
- [0172] 24. 변성제는 포름아미드, 우레아 또는 DMSO인, 실시 양태 22의 방법.
- [0173] 25. 표지된 이미지 핵산은 경쟁 핵산의 존재 하에서는 가닥 치환에 의해 도킹 핵산으로부터 제거되지 않는, 실시 양태 12 내지 21 중 어느 하나의 방법.
- [0174] 26. 표지된 이미지 핵산의 화학적, 광화학적 또는 효소적 절단, 변형 또는 분해에 의해 표지된 이미지 핵산을 도킹 핵산으로부터 제거하는, 실시 양태 12 내지 21 중 어느 하나의 방법.
- [0175] 27. 표지된 이미지 핵산이 그의 각각의 도킹 핵산에 결합되어 있을 때, 이미지 핵산 또는 도킹 핵산에는 단일 가닥 영역이 없는, 실시 양태 12 내지 21 중 어느 하나의 방법.
- [0176] 28. 표지된 이미지 핵산은 자가-켄칭성이 아닌, 실시 양태 12 내지 21 중 어느 하나의 방법.
- [0177] 29. 비결합된 도킹 핵산은 부분 이중 가닥인, 실시 양태 12 내지 28 중 어느 하나의 방법.
- [0178] 30. 비결합된 이미지 핵산은 부분 이중 가닥인, 실시 양태 12 내지 28 중 어느 하나의 방법.
- [0179] 31. 이미지 핵산은 분자 비컨이거나 헤어핀 이차 구조를 포함하는, 실시 양태 12 내지 28 중 어느 하나의 방법.
- [0180] 32. 이미지 핵산은 분자 비컨이거나, 자가-켄칭성인 헤어핀 이차 구조를 포함하는, 실시 양태 12 내지 27 및 실시 양태 29 내지 31 중 어느 하나의 방법.

- [0181] 33. 이미지 핵산은 헤미듀플렉스인, 실시 양태 12 내지 28 중 어느 하나의 방법.
- [0182] 34. 헤미듀플렉스는 자가-퀀칭성인, 실시 양태 33의 방법.
- [0183] 35. 도킹 핵산은 헤어핀 이차 구조를 포함하는, 실시 양태 12 내지 34 중 어느 하나의 방법.
- [0184] 36. 이미지 핵산은 덴드리머 구조 또는 중합체 구조를 통하여 다수의 시그널-방출 모이어티에 결합된, 실시 양태 12 내지 35 중 어느 하나의 방법.
- [0185] 34. (1) 1가지 이상의 표적의 존재에 대하여 테스트되는 샘플을 1가지 이상의 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는 단계 (여기서, 각각의 표적-특이적 결합 파트너는 도킹 핵산에 결합되며, 상이한 특이성의 표적-특이적 결합 파트너들은 상이한 도킹 핵산들에 결합됨),
- [0186] (2) 임의로, 비결합된 표적-특이적 결합 파트너를 제거하는 단계,
- [0187] (3) 샘플을 도킹 핵산에 상보성인 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산과 접촉시키는 단계,
- [0188] (4) 임의로, 비결합된 표지된 이미지 핵산을 제거하는 단계,
- [0189] (5) 결합된 표지된 이미지 핵산의 위치 및 수를 탐지하기 위하여 샘플을 영상화하는 단계,
- [0190] (6) 결합된 표지된 이미지 핵산을, 상기 이미지 핵산을 전체적으로 제거하지 않고서 그의 시그널-방출 모이어티의 제거 또는 변형에 의해 불활성화시키는 단계, 및
- [0191] (7) 모든 다른 표지된 이미지 핵산에 비하여 독특한 뉴클레오티드 서열을 갖는 표지된 이미지 핵산을 매번 이용하여 단계 (3) 내지 단계 (6)을 반복하는 단계를 포함하는 방법.
- [0192] 35. 단계 (1)에서 샘플을 1가지 초과 표적-특이적 결합 파트너와 접촉시키는, 실시 양태 34의 방법.
- [0193] 36. 표적-특이적 결합 파트너는 항체 또는 항체 단편인, 실시 양태 34 또는 35의 방법.
- [0194] 37. 표적-특이적 결합 파트너는 천연 또는 엔지니어링된 리간드, 소분자, 압타머, 펩티드 또는 올리고뉴클레오티드인, 실시 양태 34 또는 35의 방법.
- [0195] 38. 표지된 이미지 핵산들은 동일하게 표지된, 실시 양태 34 내지 37 중 어느 하나의 방법.
- [0196] 39. 표지된 이미지 핵산 각각은 특유한 표지체를 포함하는, 실시 양태 34 내지 37 중 어느 하나의 방법.
- [0197] 40. 표지된 이미지 핵산은 형광 표지된 이미지 핵산인, 실시 양태 34 내지 39 중 어느 하나의 방법.
- [0198] 41. 상기 1가지 이상의 표적은 단백질인, 실시 양태 34 내지 40 중 어느 하나의 방법.
- [0199] 42. 샘플은 세포, 세포 용해물 또는 조직 용해물인, 실시 양태 34 내지 41 중 어느 하나의 방법.
- [0200] 43. 단계 (5)에서 샘플을 공초점 또는 표면-형광 현미경 검사법을 이용하여 영상화하는, 실시 양태 34 내지 42 중 어느 하나의 방법.
- [0201] 44. 비결합된 도킹 핵산은 부분 이중 가닥인, 실시 양태 34 내지 43 중 어느 하나의 방법.
- [0202] 45. 비결합된 이미지 핵산은 부분 이중 가닥인, 실시 양태 34 내지 43 중 어느 하나의 방법.
- [0203] 46. 이미지 핵산은 분자 비컨이거나 헤어핀 이차 구조를 포함하는, 실시 양태 34 내지 45 중 어느 하나의 방법.
- [0204] 47. 이미지 핵산은 분자 비컨이거나, 자가-퀀칭성인 헤어핀 이차 구조를 포함하는, 실시 양태 34 내지 45 중 어느 하나의 방법.
- [0205] 48. 이미지 핵산은 헤미듀플렉스인, 실시 양태 34 내지 45 중 어느 하나의 방법.
- [0206] 49. 헤미듀플렉스는 자가-퀀칭성인, 실시 양태 48의 방법.
- [0207] 50. 도킹 핵산은 헤어핀 이차 구조를 포함하는, 실시 양태 34 내지 49 중 어느 하나의 방법.
- [0208] 51. 이미지 핵산은 덴드리머 구조 또는 중합체 구조를 통하여 다수의 시그널-방출 모이어티에 결합된, 실시 양태 34 내지 50 중 어느 하나의 방법.
- [0209] 등가물

- [0210] 몇몇의 본 발명의 실시 양태가 본원에서 설명되고 예시되었지만, 당업자라면 본원에 기술된 강점 중 1가지 이상 및/또는 결과를 수득하고/하거나 기능을 수행하기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 손쉽게 구상할 것이며, 그러한 변화 및/또는 변형 각각은 본원에 기술된 본 발명의 실시 양태의 범주 내에 있는 것으로 여겨진다. 더 일반적으로, 당업자라면 본원에 기술된 모든 파라미터, 치수, 재료 및 구성이 예시적인 것을 의미하며 실제 파라미터, 치수, 재료 및/또는 구성은 본 발명의 교시가 사용되는 특정한 응용(들)에 의존함을 손쉽게 인지할 것이다. 당업자라면 고작 일상적인 실험을 이용하여 본원에 기술된 특정한 본 발명의 실시 양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 규명할 수 있다. 따라서, 전술한 실시 양태는 단지 예로서 제시된 것이며 첨부된 청구 범위 및 이의 등가물의 범주 내에서 본 발명의 실시 양태가 구체적으로 기술되고 청구된 것과 달리 실시될 수 있음이 이해되어야 한다. 본 발명의 실시 양태는 본원에 기술된 각각의 개별 특징, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 게다가, 2가지 이상의 그러한 특징, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법의 임의의 조합은, 그러한 특징, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법이 상호간에 모순되는 것이 아닐 경우, 본 발명의 범주 내에 포함된다.
- [0211] 본원에서 정의되고 사용되는 모든 정의는 사전적 정의, 참고로 포함된 문헌에서의 정의 및/또는 정의된 용어의 보통의 의미를 통제하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0212] 본원에 개시된 모든 참고 문헌, 특허 및 특허 출원은 각각에서 인용된 요지와 관련하여 참고로 포함되는데, 이는 일부의 경우에 그 문헌 전체를 포함한다.
- [0213] 본원에서 사용될 때, 본 명세서에서 그리고 청구범위에서, 단수형 ("a" 및 "an"은, 명백하게 반대로 나타내지 않으면, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0214] 본원에서 사용될 때, 본 명세서에서 그리고 청구범위에서, "및/또는"이라는 어구는 그렇게 연합된 요소 중 "어느 하나 또는 이들 둘 모두", 즉, 일부의 경우에는 공동으로 존재하고 다른 경우에는 분리적으로 존재하는 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는"을 이용하여 열거된 다수의 요소는 동일한 방식으로, 즉, 그렇게 연합된 "1가지 이상"의 요소로 해석되어야 한다. "및/또는"이라는 구절에 의해 구체적으로 확인되는 요소 이외의 다른 요소가, 구체적으로 확인되는 요소에 관련되든지 관련되지 않든지 간에 임의로 존재할 수 있다. 따라서, 일 실시 양태에서, 비제한적 예로서, "A 및/또는 B"라는 언급은, "포함하는"과 같은 개방형 언어와 함께 사용될 때, 단지 A (임의로, B 이외의 요소를 포함함)를 나타낼 수 있으며; 또 다른 실시 양태에서, 단지 B (임의로, A 이외의 요소를 포함함)를 나타낼 수 있으며; 또 다른 실시 양태에서, A 및 B 둘 모두 (임의로, 다른 요소를 포함함)를 나타낼 수 있으며; 기타 등등이다.
- [0215] 본 명세서 및 청구범위에서 본원에서 사용될 때, "또는"은 상기에 정의된 바와 같이 "및/또는"과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목들을 분리할 때, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것으로 해석되며, 즉, 요소들, 및 임의로 추가의 열거되지 않은 항목들의 수 또는 목록의 적어도 하나를 포함할 뿐만 아니라 하나 초과도 포함하는 것으로 해석된다. 명백하게 반대로 표시되는 유일한 용어, 예컨대 "단지 하나의" 또는 "정확하게 하나의", 또는, 청구범위에서 사용될 때 "이루어진"은 요소들의 수 또는 목록의 정확하게 하나의 요소를 포함함을 나타낸다. 일반적으로, 본원에서 사용될 때, "또는"이라는 용어는 "어느 하나", "~중 하나", "~ 중 단지 하나" 또는 "~의 정확하게 하나"와 같은 배타적인 용어가 뒤에 나올 때 배타적인 대안(즉, "하나 또는 다른 하나, 그러나 둘 모두는 아님")을 나타내는 것으로만 해석된다. 청구범위에서 사용될 때, "본질적으로 ~로 이루어진"은 특허법 분야에서 사용되는 그의 일상적인 의미를 갖는다.
- [0216] 본 명세서 및 청구범위에서 본원에서 사용될 때, 하나 이상의 원소들의 목록의 언급에서 "적어도 하나"라는 어구는 요소들의 목록에서 요소들 중 임의의 하나 이상으로부터 선택되는 적어도 하나의 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 하지만, 이는 요소의 목록 내에 구체적으로 열거된 각각의 그리고 모든 요소 중 적어도 하나를 반드시 포함할 필요는 없으며 요소들의 목록 내의 요소들의 임의의 조합을 반드시 배제할 필요는 없음을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 또한 이러한 정의는, "적어도 하나"라는 어구가 지칭하는 요소들의 목록 내에 구체적으로 확인된 요소 이외의 요소가, 구체적으로 확인된 요소에 관련되든지 관련되지 않든지 간에 임의로 존재할 수 있음을 허용한다. 따라서, 비제한적 예로서, 일 실시 양태에서, "A 및 B 중 적어도 하나" (또는 이와 동등하게, "A 또는 B 중 적어도 하나" 또는 이와 동등하게 "A 및/또는 B 중 적어도 하나")는 B가 존재하지 않는 (그리고 임의로, B 이외의 요소를 포함함), 하나 초과를 임의로 포함하여 적어도 하나의 A를 나타낼 수 있으며; 또 다른 실시 양태에서, A가 존재하지 않는 (그리고 임의로, A 이외의 요소를 포함함), 하나 초과를 임의로 포함하여 적어도 하나의 B를 나타낼 수 있으며; 또 다른 실시 양태에서, 하나 초과를 임의로 포함하여 적어도 하나의 A, 및 하나 초과를 임의로 포함하여 적어도 하나의 B (그리고 임의로, 다른 요소를 포함함)를 나타낼 수

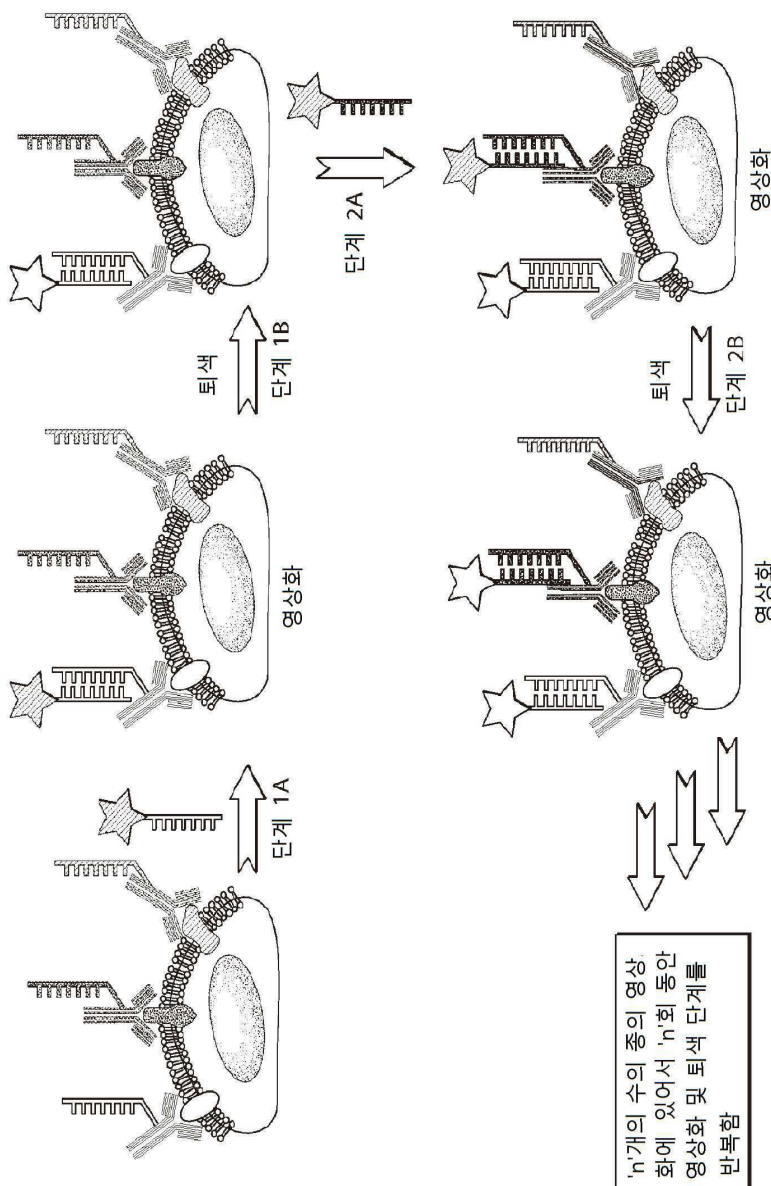
있으며; 기타 등등이다.

[0217] 달리 명백하게 반대로 나타내지 않으면, 하나 초과 단계 또는 행위를 포함하는 본원에 청구된 임의의 방법에서, 방법의 단계 또는 행위의 순서는 방법의 단계 또는 행위를 진술하는 순서에 반드시 한정될 필요는 없음이 또한 이해되어야 한다.

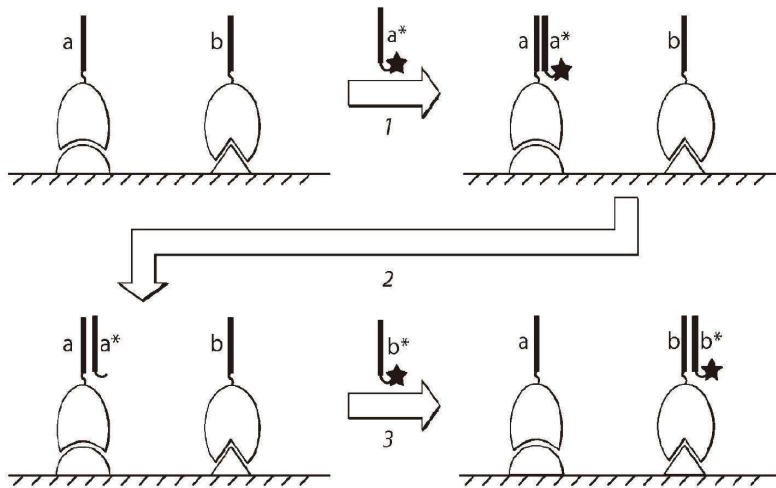
[0218] 상기 명세서에서뿐만 아니라 청구범위에서도, 모든 연결구, 예컨대 "포함하는", "포함하고 있는", "지니는", "갖는", "함유하는", "수반하는", "유지하는", "구성된" 등은 개방형인 것으로 이해되어야 하며, 즉, 포함하지만 그에 한정되지는 않음을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "~으로 이루어진" 및 "~으로 본질적으로 이루어진"이라는 연결구만이 미국 특허청 특허 심사 지침서(Manual of Patent Examining Procedures), 섹션(Section) 2111.03에 개시된 바와 같이, 각각 폐쇄형 또는 반폐쇄형 연결구이다.

도면

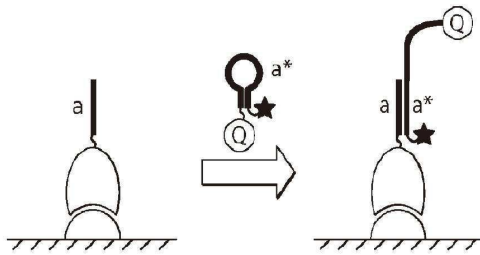
도면1



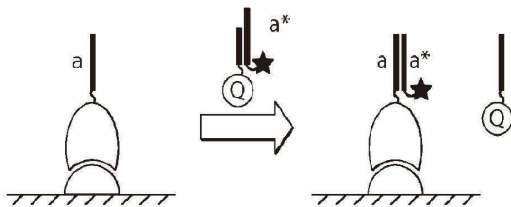
도면4



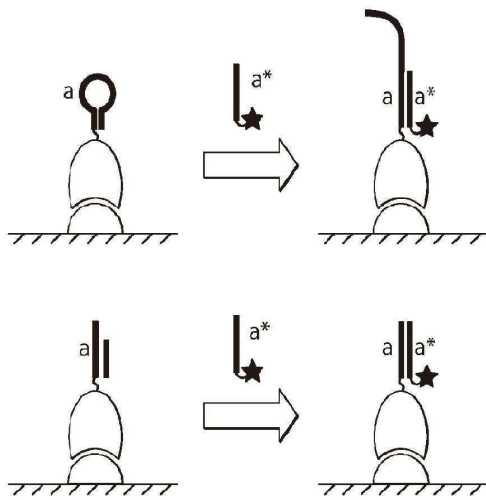
도면5



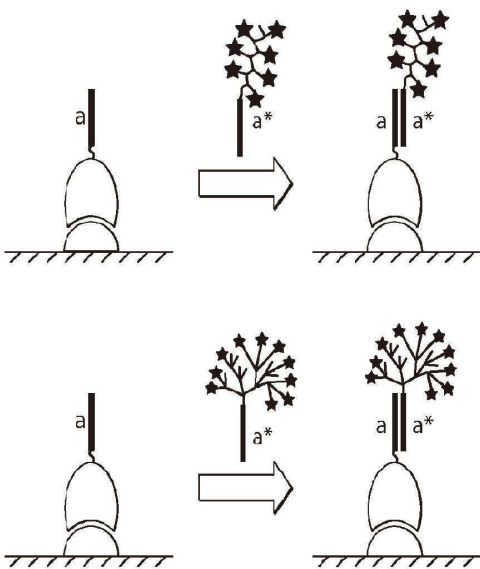
도면6



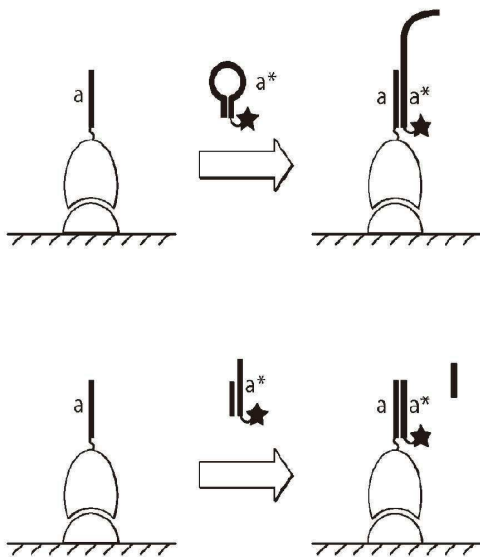
도면7



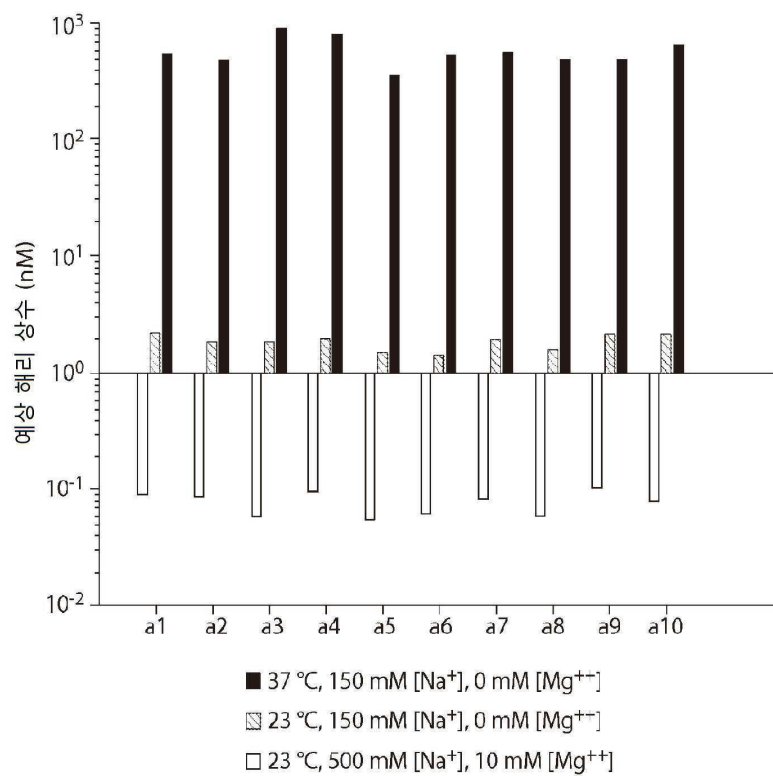
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> President and Fellows of Harvard College

<120> HIGH-THROUGHPUT AND HIGHLY MULTIPLEXED IMAGING WITH PROGRAMMABLE
NUCLEIC ACID PROBES

<130> H0498.70501W000

<140> TBD

<141> 2015-03-11

<150> US 61/951,461

<151> 2014-03-11

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 1

catctaaagc c 11

<210> 2

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 2

gaatttcctc g 11

<210> 3

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 3

gtttaattgc g 11

<210> 4

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 4

acaattcttc g	11
<210> 5	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 5	
tttcttgctt c	11
<210> 6	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 6	
gcattgttac t	11
<210> 7	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 7	
atatacaagc g	11
<210> 8	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 8	
gctgtctatt g	11
<210> 9	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 9

tctttatgct g

11

<210> 10

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 10

caatctcatc c

11