



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년05월24일
(11) 등록번호 10-1149688
(24) 등록일자 2012년05월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2008-7017428
(22) 출원일자(국제) 2007년01월16일
심사청구일자 2008년08월27일
- (85) 번역문제출일자 2008년07월17일
(65) 공개번호 10-2008-0104116
(43) 공개일자 2008년12월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2007/060557
(87) 국제공개번호 WO 2007/084886
국제공개일자 2007년07월26일
- (30) 우선권주장
60/759,675 2006년01월17일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
US20030219801 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
소마로직, 인크.
미국, 콜로라도 80301, 보울더, 월더니스 플레이스 2945
- (72) 발명자
헤일, 제임스, 알
미국, 엠아이 48108, 안 아버 3027 포레스트 크리크 코트
슈나이더, 다니엘, 제이
미국, 콜로라도 80005, 아바다, 19023 웨스트 84번가 플레이스
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
조인제

전체 청구항 수 : 총 14 항

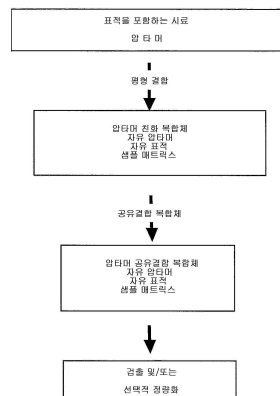
심사관 : 퇴-한상수

(54) 발명의 명칭 시료의 다중 분석

(57) 요약

본 발명은 시료 내에 존재할 수 있는 하나 또는 그 이상의 표적 분자를 검출하기 위한 방법, 기구, 시약 및 키트에 대한 것이다. 한 실시예에서, 시료는 태그를 포함하고 표적 분자에 대하여 특이적인 친화력을 가지는 압타머와 접촉된다. 표적 분자와 결합된 압타머를 포함하는 압타머 친화 복합체가 형성된다. 만일 시료가 표적 분자를 포함한다면, 압타머 친화 복합체는 일반적으로 시료 내에 형성될 것이다. 상기 압타머 친화 복합체는 표적 분자와 공유적으로 결합된 압타머를 포함하는 압타머 공유결합 복합체로 선택적으로 전환된다. 상기 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 그 후 고체 지지체의 사용, 질량 분석계의 사용 및 정량적 중합효소 연쇄반응(Q-PCR)의 사용을 포함하는 당업자에게 잘 알려진 임의의 다양한 방법을 사용하여 검출되고/되거나 정량화될 수 있다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

놀란트, 다니엘, 티

미국, 콜로라도 80501, 롱먼트, 1340 셋머셋 서클

쥐히, 도미닉

미국, 콜로라도 80304, 보울더, 2200 칼미아 애비뉴

젠더, 토드

미국, 콜로라도 80027, 루이스빌, 110 웨스트 파인 스트리트

골드, 래리

미국, 콜로라도 80302, 보울더, 1300 5번가 스트리트

윌콕스, 셰리, 케이

미국, 콜로라도 80501, 롱먼트, 303 캣테일 코트

이튼, 브루스

미국, 콜로라도 80503, 롱먼트, 8434 브리타니 플레이스

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 표적 분자에 대하여 특이적인 친화력을 가지는 압타머와 시료를 접촉시키는 것, 여기에서 만일 상기 표적 분자가 상기 시료 내에 존재한다면, 그 표적 분자와 압타머의 상호작용에 의해 압타머 친화 복합체가 형성된다;

(b) 상기 시료의 성분을 동적으로 유발시키는 조건에 상기 시료를 노출시키는 것;

(c) 시료의 잔여물로부터 분리된 압타머 친화 복합체를 검출, 또는 검출하고 정량하는 것,

을 포함하고, 여기에서 상기 동적 유발은 (i) 상기 시료에 경쟁 분자를 도입하는 것, 또는 (ii) 상기 시료를 희석하는 것, 또는 (iii) 고체 지지체 상의 압타머 친화 복합체를 포획한 후 경쟁 분자의 존재 여부에 관계없이 세척액으로 세척하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는, 시료 내에 존재할 수 있는 표적 분자를 검출하기 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 시료 내에 존재하는 상기 압타머 및 비-표적 분자 사이의 비특이적 복합체가 분리 후 재형성(re-form)되지 않을 조건에 (a)의 시료를 노출시키는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 시료의 성분을 동적으로 유발하는 조건은 적어도 하나의 경쟁 분자와 상기 시료를 접촉시키는 것을 포함하며, 여기에서 상기 시료의 성분은 압타머이고 상기 경쟁 분자는 다중음이온(polyanion)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 다중음이온은 덱스트란 설페이트(dextran sulphate)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 방법은 (a) 이전에 적어도 하나의 경쟁 분자와 시료를 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기에서 만일 상기 시료가 표적 분자, 비표적 분자 또는 표적 분자 및 비표적 분자를 모두 포함한다면, 적어도 하나의 비표적 복합체가 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 적어도 하나의 경쟁 분자는 올리고뉴클레오타이드, 다중음이온, 비염기성 포스포디에스테르 폴리머(abasic phosphodiester polymers), dNTPs 및 피로포스페이트(pyrophosphate), 헤파린(heparin) 또는 폴리덱스트란(polydextran)으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 다중음이온은 덱스트란 설페이트(dextran sulphate)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 시료의 성분을 동적으로 유발하는 조건은 상기 시료를 희석하는 것을 포함하고, 여기에서 상기 시료의 성분은 압타머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 압타머는 단일가닥 핵산(single-stranded nucleic acid), 이중가닥 핵산(double-stranded nucleic acid), DNA 또는 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 압타머는 단일가닥 핵산(single-stranded nucleic acid), 이중가닥 핵산(double-stranded nucleic acid), DNA 또는 RNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 표적 분자는 단백질, 탄수화물, 과당, 글리코당, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 기질, 대사물질, 보조인자, 저해제, 약물, 염료, 영양분, 성장 인자 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제5항에 있어서,

상기 표적 분자는 단백질, 탄수화물, 과당, 글리코당, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 기질, 대사물질, 보조인자, 저해제, 약물, 염료, 영양분, 성장 인자 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells), 혈장(plasma), 혈청(serum), 가래(sputum), 입김(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 뇌막액(meningial fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 림프액(lymph fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 세포(cells), 세포 추출물(cellular extract), 대변(stool), 조직(tissue), 조직 생검(tissue biopsy) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)으로부터 선택되는 생물학적 샘플인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제5항에 있어서,

상기 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells), 혈장(plasma), 혈청(serum), 가래(sputum), 입김(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 뇌막액(meningial fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 림프액(lymph fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 세포(cells), 세포 추출물(cellular extract), 대변(stool), 조직(tissue), 조직 생검(tissue biopsy) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)으로부터 선택되는 생물학적 샘플인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 샘플에서 표적 분자(target molecule)를 검출하기 위한 방법, 기구, 시약 및 키트에 관한 것이며, 보다 상세하게는 시료(test sample)에 함유될 수 있는 하나 또는 그 이상의 표적 분자의 검출 및/또는 정량에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 하기의 기술은 본 발명에 관련된 정보의 개요를 제공하며, 본원에 제공된 임의의 정보 또는 언급된 간행물들은 본 발명에 현재 청구된 것에 대한 종래기술일 뿐 특허에 관한 것은 아니다.

[0003] 생물학적 샘플들 및 다른 샘플들에서 생리학적으로 중요한 분자들의 검출 및 정량을 유도하는 검정법(assay)은 과학적 연구 및 건강관리 분야에서의 중요한 수단이다. 이러한 검정법의 종류 중 하나는 고체 지지체상에 고정된 하나 또는 그 이상의 압타머(aptamers)를 포함하는 마이크로어레이(microarray)의 이용을 포함한다. 상기 압타머들은 각각 매우 특이적인 방식과 매우 높은 친화력으로 표적 분자에 결합할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허등록번호 제5,475,096호("Nucleic Acid Ligands") 참조. 또한, 미국 특허등록번호 제6,242,246호, 미국 특허등록번호 제6,458,543호 및 미국 특허등록번호 제6,503,715호(각각 "Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip") 참조. 일단 마이크로어레이가 샘플과 접촉하면, 압타머들은 샘플 내에 존재하는 각각의 표적 분자들에 결합하고, 그것에 의하여 샘플 내 표적 분자들의 부재, 존재, 양 및/또는 농도를 측정할 수 있다.

[0004] 이 검정법의 변종은 압타머들이 표적 분자들에 공유적으로 결합하거나 광교차결합(photocrosslink)을 할 수 있게 하는 광반응성 작용기를 포함하는 압타머들을 사용한다. 예를 들어, 미국 특허등록번호 제6,544,776호("Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip") 참조. 이러한 광반응성 압타머들은 또한 광압타머(photoaptamers)라고도 칭해진다. 예를 들어, 미국 특허등록번호 제5,763,177호, 미국 특허등록번호 제6,001,577호 및 미국 특허등록번호 제6,291,184호(각각 "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX") 참조. 또한, 미국 특허등록번호 제6,458,539호("Photoselection of Nucleic Acid Ligands") 참조. 마이크로어레이를 샘플과 접촉시킨 후 광압타머들은 표적 분자들에 결합할 기회를 가지게 되고, 상기 광압타머들은 광활성화되며, 임의의 비특이적으로 결합한 분자들을 제거하기 위하여 고체 지지체는 세척하였다. 광압타머 상의 광활성화된 작용기들에 영향을 받은 공유결합 때문에, 광압타머들에 결합된 표적 분자들은 일반적으로 잘 제거되지 않으므로

엄격한 세척 조건이 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 상기 검정법은 시료 내 표적 분자들의 부재, 존재, 양 및/또는 농도를 측정할 수 있다.

[0005] 이러한 검정법의 형식들 모두에서, 압타머들은 샘플과 접촉되기 전에 고체 지지체 상에 고정된다. 그러나 어떤 환경 하에서는, 샘플과 접촉하기 전의 압타머의 고정화는 최적의 검정을 제공하지 않을 수 있다. 예를 들어, 압타머의 전고정화(pre-immobilization)는 고체 지지체의 표면상에서 표적 분자들과 압타머들의 비효율적 혼합을 야기할 수 있으며, 아마도 반응시간이 길어지게 되므로 표적 분자들에 압타머들이 효율적으로 결합할 수 있도록 배양 기간이 늘어나게 된다. 게다가, 광압타머들이 검정법에 사용되고 고체 지지체로서 사용된 물질에 좌우되는 경우, 상기 고체 지지체는 광압타머와 표적 분자들간의 공유결합 형성에 영향을 주기 위하여 사용된 빛을 산란시키거나 흡수하는 경향이 있을 수 있다. 더욱이, 사용된 방법에 의존하는 압타머에 결합된 표적 분자들의 검출은 고체 지지체의 표면이 또한 사용된 임의의 표지 시약에 노출될 수 있고 영향을 받을 수 있기 때문에 부정확해질 수 있다. 결론적으로, 고체 지지체 상의 압타머의 고정화는 일반적으로 샘플에 압타머를 노출시키기 전 압타머-준비 단계(aptamer-preparation step; 즉, 고정화)를 포함하며, 이 준비 단계는 압타머의 활성 또는 기능성에 영향을 줄 수 있다.

[0006] 따라서, (1) 압타머의 활성, (2) 압타머-표적 분자 복합체에 대한 결합 평형상태 달성의 효율, (3) 압타머와 표적 분자간의 공유결합 형성 및 (4) 압타머-표적 분자 복합체의 검출에 영향을 주는 조건을 최적화시킴으로써, 시료 내 표적 분자들의 검출 및/또는 정량을 위한 높은 민감도의 검정법을 제공하는 방법, 기구, 시약 및 키트가 필요하다.

[0007] 본 명세서는 시료에 존재할 수 있는 하나 또는 그 이상의 표적 분자들의 검출 및/또는 정량을 위한 방법, 기구, 시약 및 키트를 포함한다. 한 실시예에서, 시료는 태그(tag)를 포함하고 표적 분자에 대하여 특이적인 친화력을 가지는 압타머와 접촉된다. 표적 분자에 결합된 압타머를 포함하는 압타머 친화 복합체(aptamer affinity complex)가 형성된다. 만일 시료가 표적 분자를 함유하고 있다면, 압타머 친화 복합체는 일반적으로 시료 내에서 형성될 것이다. 압타머 친화 복합체는 표적 분자와 공유적으로 결합된 압타머를 포함하는 압타머 공유결합 복합체(aptamer covalent complex)로 선택적으로 전환된다. 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 그 후 고체 지지체를 사용하고, 질량 분석법을 사용하고 정량 중합효소 연쇄반응법(quantitative polymerase chain reaction; Q-PCR)을 사용하는 것을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는 당업자에게 잘 알려져 있는 임의의 다양한 방법을 사용하여 검출되고/되거나 정량화될 수 있다.

[0008] 한 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 고체 지지체의 사용을 통하여 검출되고/되거나 정량화된다. 이 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 고체 지지체에 부착된다. 상기 부착은 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)와 고체 지지체를 접촉시키고, 고체 지지체에 부착된 프로브와 직접 또는 간접적으로 결합시키기 위하여 압타머 상에 포함된 태그와 접촉하게 함으로써 달성된다. 고체 지지체 상에 프로브와 결합된 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 그 후 검출되고 선택적으로 정량화된다. 검출 및 선택적 정량 전의 어떤 시점, 즉 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)가 고체 지지체에 부착되기 전 또는 후라면 언제라도 상기 복합체는 결합된 표적 분자의 검출을 가능하게 하기 위한 표지 시약과 접촉된다.

[0009] 또 다른 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 공유결합 복합체)는 질량 분석법을 사용하여 검출되고/되거나 정량화된다. 이 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 공유결합 복합체)는 압타머 친화 복합체(또는 선택적 공유결합 복합체)를 고체 지지체와 접촉시키고, 압타머 상에 포함된 태그가 직접 또는 간접적으로 고체 지지체에 부착되는 프로브와 접촉하게 함으로써 고체 지지체에 부착된다. 이는 시료의 잔여물로부터 압타머 친화 복합체(또는 선택적 공유결합 복합체)의 분리(partitioning)를 용이하게 하므로, 그것에 의해 질량 분석계 분석 전에 표적 분자를 농축하고, 이 분석 수단을 사용하여 복합체 혼합물로부터 분석체의 검출 및 정량화를 향상시키는데 용이하다. 고체 지지체 상의 프로브와 결합된 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 그 후 용리되고, 표적 분자를 확인하기 위하여 사용될 수 있는 피크의 스펙트럼을 만드는 질량 분석계를 사용하여 분석되고 검출된다. 일단 표적 분자가 검출되면, 선택적으로 그것은 또한 당업자에게 잘 알려져 있는 표준 기술에 의해 정량화될 수 있다. 한 실시예에서 표적 분자가 단백질인 경우, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)를 분석하기 위하여 질량 분석계를 사용하기 전, 표적 분자를 확인하기 위해 사용될 수 있는 결합 표적 분자의 분획을 생산하기 위해 예를 들어, 프로테이나아제 K(proteinase K) 또는 트립신과 같은 프로테아제 효소를 사용하여 절단될 수 있고, 그것에 의해 표적 분자의 검출 및 선택적 정량이 가능하다.

[0010] 또 다른 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 Q-PCR을 사용하여 검출되고

/되거나 정량화될 수 있다. 이 실시예에서, 시료 내의 자유 압타머(free aptamer)는 검출 및/또는 정량 전에 압타머 친화 복합체(또는 압타머 공유결합 복합체)로부터 분리된다. 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 PCR을 수행하고, 시료 내의 표적 분자와 결합한 압타머의 양 또는 농도를 직접 또는 간접적으로 측정함으로써 정량화된다. 시료 내 표적 분자의 양 또는 농도는 일반적으로 Q-PCR을 사용하여 정량화된 압타머의 양 또는 농도에 대하여 정비례한다. 이 방법에서 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)를 정량하기 위해 사용될 수 있는 대표적인 방법은 TaqMan® 검정법(PE Biosystems, Foster City, Calif.; 또한 U.S. Pat. No. 5,210,015 참조)이다.

발명의 상세한 설명

- [0011] 본원에 기재된 본 발명의 실시는 다른 언급이 없는 한 당업자의 수준 내의 화학, 미생물학, 분자 생물학 및 재조합 DNA 기술의 전통적인 방법을 사용한다. 이러한 기술들은 문헌에 충분히 설명되어 있다(Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Current Edition); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D.Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., Current Edition); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition)).
- [0012] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 공개된 특허 문헌 및 특허 출원서는 발명에 관련된 당업자들의 수준을 나타내는 것이다. 본원에 인용된 모든 간행물, 공개된 특허 문헌 및 특허 출원서는 여기서 각 간행물, 공개된 특허 문헌 또는 특허 출원서가 특별하고 개별적으로 참고로서 통합됨을 나타내는 동일한 정도로 참고로 통합된다.
- [0013] 첨부된 청구항을 포함한 본 명세서에서 사용된 것으로서, 단수 형태인 "하나("a", "an" 및 "the")"는 별다른 명확한 지시가 없는 한 복수를 포함하며, "적어도 하나(at least one)" 및 "하나 또는 그 이상(one or more)"과 상호교환적으로 사용된다. 따라서, "압타머"는 압타머의 혼합체를 포함하고, "프로브"는 프로브의 혼합물을 포함한다는 것을 참고한다.
- [0014] 본원에서 사용된 것으로서, 용어 "포함하는("comprises", "comprising", "includes", "including", "contains", "containing")" 및 그것들의 임의의 변화는
- [0015] 본 명세서에서는 시료 내 존재할 수 있는 하나 또는 그 이상의 표적 분자의 검출 및/또는 정량을 위한 방법, 기구, 시약 및 키트를 포함한다. 기재된 방법, 기구, 시약 및 키트는 (1) 압타머의 활성화, (2) 압타머-표적 분자 복합체에 대한 결합 평형상태 달성의 효율, (3) 압타머와 표적 분자간의 공유결합 형성 및 (4) 압타머-표적 분자 복합체의 검출에 영향을 주는 조건을 최적화시킴으로써, 시료 내 표적 분자의 검출 및/또는 정량에 대하여 높은 민감도의 검정법을 제공한다.
- [0016] 도 1A 및 1B를 참고하면, 시료 내 표적 분자의 존재는 표적 분자에 대하여 특이적 친화도를 가지는 압타머와 시료를 처음 접촉시킴으로써 검출되고/되거나 정량화된다. 표적 분자와 결합된 압타머를 포함하는 압타머 친화 복합체가 형성된다. 만일 시료가 표적 분자를 함유하고 있다면, 압타머 친화 복합체가 일반적으로 시료 내에 형성될 것이다. 압타머 친화 복합체는 사용될 압타머에 적합한 방법을 이용하여, 표적 분자와 공유적으로 결합된 압타머를 포함하는 압타머 공유결합 복합체로 선택적으로 전환된다. 그 후 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)가 검출되고/되거나 정량화된다.
- [0017] 한 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 고체 지지체에 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)를 접촉시킴으로써 검출되고/되거나 정량화된다. 도 2A, 2B 및 2C를 참고하면, 시료 내 존재할 수 있는 표적 분자의 검출 및/또는 정량을 위한 예시적인 방법에서, 시료는 태그를 포함하고 표적 분자에 대하여 특이적 친화도를 가지는 압타머와 접촉된다. 표적 분자와 결합된 압타머를 포함하는 압타머 친화 복합체가 형성된다. 만일 시료가 표적 분자를 함유하고 있다면, 압타머 친화 복합체는 일반적으로 시료 내에 형성될 것이다. 압타머 친화 복합체는 사용될 압타머에 적합한 방법을 이용하여, 표적 분자에 공유적으로 결합된 압타머를 포함하는 압타머 공유결합 복합체로 선택적으로 전환된다. 압타머 친화 복합체(또는 선택적 공유결합 복합체)는 고체 지지체에 부착된다. 상기 부착은 압타머 친화 복합체(또는 선택적 공유결합 복합체)를 고체 지지체와 접촉시키고, 압타머 상에 포함된 태그가 직접 또는 간접적으로 고체 지지체에 부착되는 프로브와 접촉하게 함으로써 달성된다. 그 후, 고체 지지체 상의 프로브와 결합되어 있는 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)가 검출되고, 선택적으로 정량화된다. 검출 및 선

택적 정량 전의 어떤 시점, 즉 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)가 고체 지지체에 부착되기 전 또는 후라면 언제라도, 상기 복합체는 결합된 표적 분자를 검출 가능하게 하는 표시 시약과 접촉된다.

[0018] 본원에서 사용된 것으로서, "핵산", "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 폴리머를 칭하는 것으로 상호교환적으로 사용되며, 이러한 뉴클레오타이드들은 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 및/또는 아날로그 또는 화학적으로 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0019] 만약 존재한다면, 뉴클레오타이드의 화학적 변형체는 단독으로 또는 임의의 조합으로 2'-위치의 당 변형, 5-위치의 피리미딘 변형(예를 들어, 5-(N-벤질카복시아미드)-2'-데옥시우리딘, 5-(N-이소부틸카복시아미드)-2'-데옥시우리딘, 5-(M-[2-(1H-인돌-3일)에틸]카복시아미드)-2'-데옥시우리딘, 5-(N-[1-(3-트리메틸암모늄)프로필]카복시아미드)-2'-데옥시우리딘 클로라이드, 5-(N-나프틸카복시아미드)-2'-데옥시우리딘, 및 5-(N-[1-(2,3-디하이드록시프로필)]카복시아미드)-2'-데옥시우리딘), 8-위치의 퓨린 변형, 엑소시클릭 아민(exocyclic amines)에서의 변형, 4-티오우리딘의 치환, 5-브로모- 또는 5-이오도-우라실(5-iodo-uracil)의 치환, 기본골격(backbone) 변형, 메틸화, 이소베이스 이소시티딘(isobases isocytidine) 및 이소구아니딘(isoguanidine) 등과 같은 비정상적 염기쌍 조합(unusual base-pairing combinations)을 포함할 수 있다. 변형은 또한 캡핑(capping)과 같은 3' 및 5' 변형을 포함할 수 있다. 다른 변형은 아날로그와 함께 하나 또는 그 이상의 자연적으로 생성되는 뉴클레오타이드의 치환, 예를 들어, 비전하 결합(uncharged linkage)된

[0020] 또한, 보통 당에 존재하는 임의의 하이드록실기는 포스포네이트기(phosphonate group) 또는 포스페이트기(phosphate group)에 의해 치환될 수 있고; 표준 보호기(protecting groups)에 의해 보호될 수 있거나; 추가적인 뉴클레오타이드 또는 고체 지지체에 부가 결합을 만들기 위해 활성화될 수 있다. 5' 및 3' 말단의 OH기는 인산화될 수 있거나, 아민, 약 1 내지 약 20개의 탄소 원자로부터의 유기 캡핑기 부분(organic capping group moieties), 또는 약 1 내지 약 20개의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 폴리머들 또는 다른 친수성 또는 소수성의 생물학적 또는 합성 폴리머들로부터의 유기 캡핑기 부분으로 치환될 수 있다. 만일 존재한다면, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리머 어셈블리 전 또는 후에 첨가된다. 뉴클레오타이드의 서열은 비뉴클레오타이드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 표지된 성분과 함께 결합되는 것과 같은 폴리머화(polymerization) 후에 더 변형될 수 있다.

[0021] 폴리뉴클레오타이드는 또한 2'-O-메틸(2'-O-methyl-), 2'-O-알릴(2'-O-allyl), 2'-플루오로-(2'-fluoro-) 또는 2'-아지도-리보오스(2'-azido-ribose), 카보시클릭 당 아날로그(carbocyclic sugar analogs), α-아노메릭 당(α-anomeric sugars), 아라비노스, 자일로스 또는 릭소오스(lyxoses)와 같은 에피메릭 당(epimeric sugars), 피라노오스 당(pyranose sugars), 퓨라노오스 당(furanose sugars), 세도헵툴로오스(sedoheptuloses), 아시클릭 아날로그(acyclic analogs) 및 메틸 리보사이드와 같은 어베이직 뉴클레오타이드 아날로그(abasic nucleotide analogs)를 포함하는 당염자에게 일반적으로 잘 알려져 있는 리보오스 또는 데옥시리보오스의 아날로그 형태를 포함할 수 있다. 상기에 언급한 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 포스포디에스테르 결합들은 대안적 연결기(alternative linking group)로 대체될 수 있다. 이러한 대안적 연결기들은 포스페이트가 P(O)S("티오에이트(thioate)"), P(S)S("디티오에이트(dithioate)"), (O)NR₂("아미테이트(amidate)"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂("포름아세탈(formacetal)")로 대체되고, 각 R 또는 R'는 독립적으로 H 이거나 에테르(-O-) 결합, 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아랄딜(araldyl)을 선택적으로 포함하는 치환되거나 비치환된 알킬(1-20C)이다. 폴리뉴클레오타이드의 모든 결합이 동일할 필요는 없다. 당, 퓨린 및 피리미딘의 형태의 치환은 예를 들어, 폴리아미드 중앙골격과 같은 대체적 중앙골격 구조와 같이 최종 제품을 설계하는데 유리할 수 있다.

[0022] 본원에서 사용된 것으로서, "압타머" 및 "핵산 리간드"는 표적 분자에 대하여 특이적 결합 친화도를 가지는 핵산을 말하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. 친화성 상호작용은 정도의 문제(matter of degree)라고 인식되고 있으나, 이 문맥에서 표적에 대한 압타머의 "특이적 결합 친화도"는 압타머가 시료 내의 다른 성분과 결합하는 것보다 일반적으로 더욱 높은 친화도로 표적과 결합하는 것을 의미한다. "압타머"는 특정 뉴클레오타이드 서열을 가지는 한 형태 또는 종류의 핵산 분자의 복제쌍이다. 압타머는 임의의 적절한 수의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. "압타머"는 많은 이러한 분자쌍을 말한다. 서로 다른 압타머들은 동일하거나 서로 다른 수의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 본원에 기재된 임의의 방법들은 하나 또는 그 이상의 압타머의 사용을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 방법들은 또한 특히 동일한 표적 분자에 결합하는 두개 또는 그 이상의 압타머의 사용을 포함할 수 있다. 하기에 더 기재한 바와 같이, 압타머는 태그를 포함할 수 있다.

만일 압타머가 태그를 포함한다면, 모든 압타머의 복제들은 동일한 태그를 가질 필요가 없다. 게다가, 만일 서로 다른 압타머들이 각각 태그를 포함한다면, 이러한 서로 다른 압타머들은 동일한 태그 또는 서로 다른 태그를 모두 가질 것이다.

[0023] 압타머는 SELEX 방법을 포함한 임의의 공지의 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허등록번호 제 5,475,096("Nucleic Acid Ligands") 참조. 일단 확인되면, 압타머는 화학적 합성 방법 및 효소적 합성 방법을 포함하는 임의의 공지의 방법에 따라 제조되거나 합성될 수 있다.

[0024] 용어 "SELEX" 및 "SELEX 방법"은 일반적으로 (1) 예를 들어, 단백질에 대해 높은 친화도로 결합하는 바람직한 방법으로 표적 분자와 결합하는 핵산의 선택과 (2) 선택된 핵산의 증폭의 조합을 말하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어, 미국 특허등록번호 제 5,475,096("Nucleic Acid Ligands")을 참조. SELEX 방법은 표적과 비공유적으로 결합하는 압타머 뿐만 아니라 표적과 공유적으로 결합하는 압타머를 만드는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허등록번호 제 5,705,337("Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX")을 참조.

[0025] 본원에 기재된 바와 같이, 압타머는 고체 지지체에 압타머(및 그것에 결합되어 있는 임의의 표적 분자)를 부착하거나 고정하기 위한 수단을 제공하는 성분을 말하는 "태그"를 더 포함할 수 있다. "태그"는 프로브와 결합할 수 있는 한 형태 또는 종류의 성분의 ____이다. "태그"는 많은수 의 이러한 성분의 세트를 말한다. 태그는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 압타머에 부착되거나 포함될 수 있다. 일반적으로, 태그는 압타머가 고체 지지체에 부착된 프로브와 직접적 또는 간접적으로 결합할 수 있도록 한다. 태그는 고체 지지체 상의 공간적으로 한정된 곳에 압타머 공유결합 복합체를 위치시킬 수 있다. 따라서, 서로 다른 태그들은 서로 다른 압타머 공유결합 복합체를 고체 지지체 상의 서로 다른 공간적으로 한정된 곳에 위치시킬 수 있다. 태그는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 펩티드 핵산, 잠금 핵산(locked nucleic acid), 올리고당, 다당, 항체, 애피바디(affibody), 항체 모조체, 세포 수용체, 리간드, 지질, 이러한 구조들의 임의의 단편 또는 유도체, 앞서 기재한 것들의 임의의 조합 또는 특이도를 가지도록 설계되거나 특이도를 가지고 결합하도록 만들거나 특이도를 가지고 결합될 수 있는 프로브(또는 하기에 기재된 것과 같은 연결 분자)일 수 있고, 태그는 ____만일 압타머를 확인하기 위하여 SELEX를 사용한다면, 태그는 SELEX 전 또는 후에 압타머에 추가될 수 있다. 한 실시예에서, 태그는 SELEX 후 압타머의 5' 말단 상에 포함된다. 한 실시예에서, 태그는 SELEX 후 압타머의 3' 말단 상에 포함된다.

[0026] 한 실시예에서, 태그는 프로브 서열과 직접적으로 혼성화됨으로써 상보적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 프로브와 직접적으로 결합되도록 설계된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이 실시예에서, 태그는 일반적으로 태그가 프로브와 혼성화되지 않는 조건 하에서 수행된 형성 반응 및 혼성화 반응 완벽한 보완체(perfect complement)를 포함하는 태그

[0027] 어떤 실시예에서, 태그는 압타머 자체의 일부분인 뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 만약 압타머를 확인하기 위하여 SELEX를 사용한다면, 압타머는 일반적으로 압타머에 의존하는 즉 가변 영역(variable region)을 변경하는 뉴클레오티드 서열에 의해 3'-고정 말단으로부터 분리된 5'-고정 말단을 포함한다. 한 실시예에서, 태그는 예를 들어, 고정 말단에 내재하는 뉴클레오티드를 포함하는 전체 고정 말단 또는 고정 말단의 임의의 부분과 같은, 압타머의 고정 말단에 포함된 임의의 적절한 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 태그는 예를 들어, 전체 가변 영역 또는 가변 영역의 임의의 부분과 같은, 압타머의 가변 영역 내에 포함된 임의의 적절한 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 태그는 고정 말단 중의 하나 및 가변 영역 모두와 일치하는 임의의 적절한 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 즉 태그는 가변 영역의 임의의 부분(모두를 포함) 및 고정 말단의 임의의 부분(모두를 포함)을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0028] 다른 실시예에서, 태그는 프로브와 직접적으로 결합할 수 있고 프로브에 공유적으로 결합되므로, 압타머와 고체 지지체의 표면은 공유적으로 결합된다. 이 실시예에서, 프로브와 태그의 결합 상에 적절한 반응기를 포함할 수 있는 태그 및 프로브는 공유 결합을 만드는 화학 반응을 위해 서로 충분히 근접한다. 상기 반응은 자발적으로 일어날 수 있거나 예를 들어, 광-활성화 또는 화학적 활성화와 같은 활성화를 필요로 한다. 대표적인 실시예에서, 태그는 디엔(diene) 부분을 포함하며 프로브는 친디엔체(dienophile)를 포함하고, 디엔과 친디엔체의 자발적 딜스-알더(Diels-Alder) 결합 반응에 의해 공유 결합이 형성된다. 임의의 적절한 보완적인 화학반응, 예를 들어, N-만니치 반응(N-Mannich reaction), 이황화물 형성(disulfide formation), 쿠르티우스스 반응(Curtius reaction), 알돌 축합(Aldol condensation), 시프 염기 형성(Schiff base formation) 및 마이클

부가반응(Michael addition)과 같은 것들이 사용될 수 있다.

- [0029] 다른 실시예에서, 태그는 예를 들어, 하기에 더 기재된 것과 같은 연결 분자를 통하여 프로브와 간접적으로 연결된다. 이 실시예에서, 태그는 연결 분자의 특정 영역 또는 성분에 대해 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 태그는 일반적으로 형성되고, 혼성화 반응은 연결 분자에 포함된 폴리뉴클레오티드 서열 이외의 폴리뉴클레오티드 서열과 혼성화되지 않도록 수행된다.
- [0030] 만일 태그가 폴리뉴클레오티드를 포함한다면, 상기 폴리뉴클레오티드는 임의의 적절한 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 한 실시예에서, 태그는 적어도 약 10개의 뉴클레오티드를 포함한다. 한 실시예에서, 태그는 약 10개 내지 약 45개의 뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 태그는 적어도 약 30개의 뉴클레오티드를 포함한다. 폴리뉴클레오티드를 포함하는 서로 다른 태그들은 동일한 수의 뉴클레오티드 또는 서로 다른 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0031] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "약(about)"은 수치에 관련된 항목의 기본 함수가 변하지 않게 하기 위한 대수롭지 않은 변형 또는 수치의 변동을 나타낸다.
- [0032] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "결합하다(associate or associates)" 및 그것들의 임의의 변형은 태그와 프로브 간의 상호작용 또는 복합체 형성(complexation)으로 인해, 예를 들어, 주어진 복합체 형성 또는 반응 조건 하에서 태그-프로브 복합체로부터 시료의 비결합된 성분과 같은 "비결합된(unassociated or unbound)" 물질의 해리를 가능하게 하기 위하여 충분히 안정한 복합체를 형성하는 것을 말한다. 태그 및 프로브는 특이도를 가지고 서로 상호작용하고 결합함으로써 서로 직접적으로 결합될 수 있다. 태그 및 프로브는 또한 복합체 형성이 연결 분자에 의해 매개되는 경우와 같이 서로 간접적으로 결합될 수 있다.
- [0033] 본원에서 사용된 것으로서, "프로브"는 태그와 직접적으로 또는 간접적으로 결합하기 위하여 형성된 분자를 말한다. "프로브"는 압타머를 태그와 직접적 또는 간접적으로 결합시킴으로써 고체 지지체에 고정시킬 수 있는 한 형태의 분자 또는 한 형태의 복합-분자(multi-molecular) 구조의 복제 세트이다. "프로브"는 하나 이상의 이러한 분자 세트를 말한다. 프로브는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 펩티드 핵산, 잠금 핵산, 올리고당, 다당, 항체, 애피바디, 항체 모조체, 세포 수용체, 리간드, 지질, 이러한 구조의 임의의 단편 또는 유도체, 앞서 기재한 것들의 임의의 조합 또는 특이도를 가지도록 설계되거나 특이도를 가지고 결합하도록 형성되거나 그렇지 않으면 특이도를 가지고 결합될 수 있는 태그(또는 연결 분자)를 가진 임의의 다른 구조일 수 있다. 프로브는 당업계의 임의의 방법에 의해 공유적 또는 비공유적으로 고체 지지체에 부착될 수 있다.
- [0034] 한 실시예에서, 프로브는 폴리뉴클레오티드 태그 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이 실시예에서, 프로브 서열은 일반적으로 형성되며, 혼성화 반응은 프로브가 상보적 서열을 포함하는 프로브에 대한 태그 이외의 뉴클레오티드 서열과 혼성화되지 않도록 하기 위한 조건 하에서 수행된다(즉, 프로브는 일반적으로 형성되며, 혼성화 반응은 프로브가 서로 다른 태그 또는 압타머와 혼성화되지 않도록 하기 위한 조건 하에서 수행된다).
- [0035] 다른 실시예에서, 프로브는 예를 들어, 연결 분자를 통하여 태그와 간접적으로 결합한다. 이 실시예에서, 프로브는 연결 분자의 특정 영역 또는 성분에 대하여 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 프로브는 일반적으로 형성되며, 혼성화 반응은 프로브가 연결 분자 내에 포함된 폴리뉴클레오티드 서열 이외의 폴리뉴클레오티드 서열과 혼성화되지 않도록 하기 위한 조건 하에서 수행된다.
- [0036] 만일 프로브가 폴리뉴클레오티드를 포함한다면, 상기 폴리뉴클레오티드는 임의의 적절한 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 한 실시예에서, 프로브는 적어도 약 10개의 뉴클레오티드를 포함한다. 다른 실시예에서, 프로브는 약 10개 내지 약 45개의 뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 프로브는 적어도 약 30개의 뉴클레오티드를 포함한다. 폴리뉴클레오티드를 포함하는 서로 다른 프로브는 동일한 수의 뉴클레오티드 또는 서로 다른 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0037] 본원에서 사용된 것으로서, "연결 분자(linker molecule)"는 프로브와 태그의 결합을 매개하기 위하여 형성된 하나 또는 그 이상의 분자를 말한다. 일반적으로, 연결 분자는 태그에 연결하기 위한 기능성 및 프로브에 연결하기 위한 기능성을 포함한다는 점에서 두가지 기능을 가진다. "연결 분자"는 프로브와 태그를 결합시킬 수 있는 한 형태 또는 종류의 분자 또는 복합 분자 구조의 복제 세트이다. "연결 분자"는 하나 이상의 이러한 분자 또는 복합 분자 구조의 세트를 말한다. 연결 분자는 임의의 적절한 구성을 가질 수 있으며, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 펩티드 핵산, 잠금 핵산, 올리고당, 다당, 항체, 애피바디, 항체 모조체, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자, 세포 수용체, 리간드, 지질, 이러한 구조의 임의의 단편 또는 유도체, 특이도를 가지고

태그와 프로브 간의 결합을 매개하기 위해 설계될 수 있거나 형성될 수 있는 임의의 다른 구조 또는 화학적 성분을 포함하는 임의의 적절한 성분을 포함할 수 있다. 연결 분자는 지방성(aliphatic) 또는 방향성(aromatic)일 수 있다.

[0038] 연결 분자의 구성은 본원에 기재된 임의의 방법에 있어서 중요하지 않다. 때때로, 연결분자는 친수성인 것이 바람직하다. 일반적으로, 특정 연결 분자의 길이는 합성의 편의성 및 프로브와 태그의 결합을 매개하는데 용이성을 제공하기 위해 선택될 수 있다. 연결 분자는 본원에 기재된 방법에 따른 바람직한 반응을 방해할 수 있는 기능성 또는 길이를 포함해서는 안된다.

[0039] 도 2A, 2B 및 2C를 참고하면, 연결 분자를 본원에 기재된 임의의 방법에 사용하는 경우, 연결 분자는 검정법의 수행 도중 임의의 적절한 시간에 사용될 수 있고, 태그 또는 프로브와 첫번째로 접촉될 수 있다. 예를 들어, 압타머 상에 포함된 태그는 압타머 공유결합 복합체가 고체 지지체 상의 프로브와 접촉하기 전의 임의의 시간에 연결 분자와 접촉될 수 있다. 다른 실시예에서, 고체 지지체에 부착된 프로브는 프로브가 압타머 공유결합 복합체 상의 태그에 노출되기 전의 임의의 시간에 연결 분자와 접촉될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 예를 들어, 수행된 특정 검정법의 복잡성과 반응 조건에 의존하는 프로브는 연결 분자 및 압타머 공유결합 복합체 상의 태그 모두와 동시에 접촉될 수 있다.

[0040] 연결 분자는 일반적으로 태그 결합 성분(tag association component) 및 프로브 결합 성분(probe association component)을 포함한다. 태그 결합 성분 및 프로브 결합 성분은 특정 검정법에 사용되는 특정 태그 및 프로브에 기초하여 독립적으로 선택된다. 한 실시예에서, 태그 결합 성분은 태그에 포함된 폴리뉴클레오티드 서열에 상보적인 폴리뉴클레오티드이다. 다른 실시예에서, 프로브 결합 성분은 프로브에 포함된 폴리뉴클레오티드 서열에 상보적인 폴리뉴클레오티드이다. 또 다른 실시예에서, 태그 결합 성분은 폴리뉴클레오티드이고, 프로브 결합 성분 또한 폴리뉴클레오티드이다.

[0041] 또 다른 실시예에서, 연결 분자는 제3의 성분에 의해 프로브 결합 성분으로부터 분리된 태그 결합 성분을 포함한다. 이 실시예에서, 제3의 성분은 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 펩티드 핵산, 잠금 핵산, 올리고당, 다당, 항체, 에피바디, 항체 모조체, 지방성 탄소 분자, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자, 세포 수용체, 리간드, 지질. 이러한 구조의 임의의 단편 또는 유도체, 앞서 기재한 것들의 임의의 조합, 또는 예를 들어, 태그 결합 성분과 프로브 결합 성분 간의 유연성을 증가시키기 위한 것과 같이 프로브와 태그의 결합에 도움을 줄 수 있는 임의의 화학적 구조 또는 성분을 포함하는 하나 또는 그 이상의 분자 또는 보조 성분(sub-component)을 포함할 수 있다.

[0042] 연결 분자의 폴리뉴클레오티드 성분은 임의의 적절한 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 한 실시예에서, 연결 분자의 폴리뉴클레오티드 성분은 적어도 약 10개의 뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 연결 분자의 폴리뉴클레오티드 성분은 적어도 약 10개 내지 약 45개의 뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 연결 분자의 폴리뉴클레오티드 성분은 적어도 약 30개의 뉴클레오티드를 포함한다. 본원에 기재된 임의의 방법에 사용된 연결 분자는 동일한 수의 뉴클레오티드 또는 서로 다른 수의 뉴클레오티드로서 가지는 폴리뉴클레오티드 성분을 포함할 수 있다.

[0043] 본원에 사용된 것으로서, "광압타머(photoaptamer)", "광반응성 핵산 리간드(photoreactive nucleic acid ligand)" 및 "광반응성 압타머(photoreactive aptamer)"는 표적 분자와 공유적으로 결합할 수 있거나 "교차결합(crosslink)"할 수 있는 하나 또는 그 이상의 광반응성 작용기를 포함하는 압타머를 말하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. 예를 들면, 자연적으로 생성되는 핵산 잔기는 적절한 파장의 방사선원(radiation source)에 노출시키면 핵산 잔기에 광반응성을 제공하는 화학적 작용기를 포함하도록 변경될 수 있다. 광압타머는 임의의 공지의 방법을 사용하여 확인되고/되거나 제조될 수 있다. 어떤 실시예에서, 광반응성 압타머는 광SELEX 방법을 사용하여 확인된다. 예를 들어, 미국 특허등록번호 제5,763,177호, 미국 특허등록번호 제6,001,577호 및 미국 특허등록번호 제6,291,184호 참조("Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligand by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX"). 또한 예를 들어, 미국 특허등록번호 제6,468,539호("Photoselection of Nucleic Acid Ligand") 참조. 다른 실시예에서, 압타머가 제조되고, 그 후 하나 또는 그 이상의 광반응성 작용기를 포함하도록 변경됨으로써 광압타머가 생성된다. 이 실시예들에서, 하나 또는 그 이상의 광반응성 핵산 잔기들은 예를 들어, 압타머 내의 하나 또는 그 이상의 티미딘 및/또는 시티딘 뉴클레오티드와 같은 하나 또는 그 이상의 다른 뉴클레오티드 대신에 광반응성 핵산 잔기로 치환시키거나, 광반응성 작용기를 포함하도록 하나 또는 그 이상의 핵산을 변경시킴으로써 압타머 내로 포함될 수 있다.

- [0044] 광압타머 내로 포함될 수 있는 대표적인 광반응성 작용기는 5-브로모우라실(5-bromouracil), 5-이오도우라실(5-iodouracil), 5-브로모비닐우라실(5-bromovinyluracil), 5-이오도비닐우라실(5-iodovinyluracil), 5-아지도우라실(5-azidouracil), 4-티오우라실(thiouracil), 5-티오우라실(5-thiouracil), 4-티오시토신(4-thiocytosine), 5-브로모시토신(5-bromocytosine), 5-이오도시토신(5-iodocytosine), 5-브로모비닐시토신(5-bromovinylcytosine), 5-이오도비닐시토신(5-iodovinylcytosine), 5-아지도시토신(5-azidocytosine), 8-아지도아데닌(8-azidoadenine), 8-브로모아데닌(8-bromoadenine), 8-이오도아데닌(8-iodoadenine), 8-아지도구아닌(8-azidoguanine), 8-브로모구아닌(8-bromoguanine), 8-이오도구아닌(8-iodoguanine), 8-아지도하이포크산틴(azidohypoxanthine), 8-브로모하이포크산틴(8-bromohypoxanthine), 8-이오도하이포크산틴(8-iodohypoxanthine), 8-아지도크산틴(azidoxanthine), 8-브로모크산틴(8-bromoxanthine), 8-이오도크산틴(8-iodoxanthine), 5-[(4-아지도페나실)티오]시토신(5-[(4-azidophenacyl)thio]cytosine), 5-[(4-아지도페나실)티오]우라실(5-[(4-azidophenacyl)thio]uracil), 7-데아자-7-이오도아데닌(7-deaza-7-iodoadenine), 7-데아자-7-이오도구아닌(7-deaza-7-iodoguanine), 7-데아자-7-브로모아데닌(7-deaza-7-bromoadenine) 및 7-데아자-7-브로모구아닌(7-deaza-7-bromoguanine)을 포함한다.
- [0045] 이러한 대표적인 뉴클레오시드에 기초한 광반응성 작용기 이외에도, 적절한 연결 분자를 사용하여 압타머의 말단(terminal end)에 첨가될 수 있는 다른 광반응성 작용기 또한 사용될 수 있다. 이러한 광반응성 작용기는 벤조페논(benzophenone), 안트라퀴논(anthraquinone), 4-아지도-2-니트로-아닐린(4-azido-2-nitro-aniline), 소랄렌(psoralen), 이러한 것들의 임의의 유도체 등을 포함한다.
- [0046] 광압타머 내에 포함된 광반응성 작용기는 임의의 적절한 방법에 의해 활성화될 수 있다. 한 실시예에서, 광반응성 작용기를 포함하는 광압타머는 광압타머 친화 복합체를 전자기 방사선원(source of electromagnetic radiation)에 노출시킴으로써 표적에 교차결합된다. 적절한 형태의 전자기 방사선은 자외선, 가시광선, X-레이 및 감마선을 포함한다. 적절한 방사선원은 단색광(monochromatic light) 또는 여과된 다색광(filtered polychromatic light) 중 어느 하나를 사용하는 광원을 포함한다.
- [0047] 한 실시예에서, 예를 들어 4-아지도-2-니트로-아닐린과 같은 광반응성 뉴클레오티드가 광압타머 내로 포함될 수 있으며, 이 광압타머를 포함하는 광압타머 친화 복합체에 방사선을 조사하기 위해 약 325nm 내지 약 470nm 사이 범위의 파장을 가지는 광원이 사용될 수 있다. 이러한 파장에서 여기(excitation)는 소비 전력(power requirement)이 적당하기 때문에 단일 LED 또는 다수의 LED들 중 어느 하나를 사용하는 비싸지 않은 발광 다이오드(light emitting diodes; LEDs)를 사용하여 달성될 수 있다. 465 내지 475nm 범위의 파장, 화각(degree of viewing angle) 100도를 가지며 38루멘의 광원을 제공하는 단색광은 거의 하나 또는 그 이상의 고전력 LED들에 의해 공급된다. 원하는 광반응성 작용기가 LED에 의해 만들어진 파장에서 여기될 수 없는 경우에는, LED에 의해 만들어진 파장에서 광반응성 작용기의 여기를 가능하게 하도록 광반응성 작용기의 여기 파장을 약간 바꾸기 위하여 전자를 끌어당기거나(electron withdrawing) 전자를 제공하는(electron donating) 기의 적절한 치환을 종종 사용할 수 있다.
- [0048] 한 실시예에서, 광반응성 뉴클레오티드는 광압타머 내에 포함되며, 광압타머 친화 복합체를 광압타머 공유결합 복합체로 전환시키기 위하여 이 광압타머를 포함하는 광압타머 친화 복합체에 방사선을 조사하기 위하여 약 300nm 내지 약 350nm 범위의 파장을 가지는 광원을 사용할 수 있다.
- [0049] 한 실시예에서, 예를 들어 5-이오도우라실 또는 5-이오도시토신과 같은 광반응성 뉴클레오티드가 광압타머 내에 포함될 수 있고, 이 광압타머를 포함하는 광압타머 친화 복합체에 방사선을 조사하기 위하여 약 320nm 내지 약 325nm 범위의 파장을 가지는 광원을 사용할 수 있다. 이 조합은 다른, 비-특이적 광반응을 유도하지 않고 표적 분자와 발색단(chromophore) 함유 광압타머의 선택적 광교차결합을 용이하게 한다. 예를 들면, 표적 단백질의 경우, 표적 단백질 내에 포함될 수 있는 임의의 트립토판 잔기 및 광압타머 내에 포함될 수 있는 임의의 티민 및 우라실 염기 또한 광반응성일 수 있다. 5-이오도우라실 또는 5-이오도시토신이 약 235nm의 파장을 가지는 광원은 흡수하지만 트립토판 및 자연적으로 생성되는 핵산 염기는 흡수하지 못하므로, 이 파장의 광원을 사용하는 것이 광압타머 친화 복합체 내의 5-이오도우라실(들) 또는 5-이오도시토신(들)에서의 선택적 광반응을 가능하게 한다. 약 320nm 내지 약 325nm 범위의 파장을 가지는 단색광은 예를 들어, 약 320nm의 파장에서 광원을 방사하는 배가된 주파수의 파장 가변 색소 레이저(frequency double tunable dye laser)에 의하거나 약 325nm의 파장에서 광원을 방사하는 헬륨 카드뮴 레이저(helium cadmium laser)에 의해 제공될 수 있다.
- [0050] 다른 실시예에서, 광압타머 친화 복합체는 약 308nm의 파장에서 광원을 방사하도록 셋팅된 크세논 클로라이드 엑시머 레이저(xenon chloride(XeCl) excimer laser)에 노출될 수 있다. 이 실시예에서, 광압타머는 광반응성

작용기(예를 들면, 5-브로모우라실 또는 5-브로모시토신)를 포함할 수 있고, 광압타머가 표적 분자와 교차결합하여 광압타머 공유결합 복합체가 형성되도록, 광반응성 작용기를 광활성화시키기에 충분한 광원을 사용하여 광압타머 친화 복합체를 처리하는 것을 포함할 수 있다.

[0051] 또 다른 실시예에서, 약 313nm의 파장에서 광원을 방사하도록 셋팅된 고압 수은 램프(high-pressure mercury lamp)에 광압타머 친화 복합체를 노출시킴으로써 광압타머는 표적과 교차결합될 수 있다. 다른 실시예에서, 광압타머 친화 복합체 내에 포함된 것들을 제외한 발색단의 활성화를 최소화시키기 위하여, 약 300nm 보다 더 크게 방사된 광원을 제한하기 위한 파장 필터(wavelength filters)가 사용될 수 있다.

[0052] 다른 실시예에서, 약 254nm의 파장에서 광을 방사하도록 설정된 저압 수은 램프에 광압타머 친화 복합체를 노출시킴으로써 광압타머는 표적과 교차결합될 수 있고, 방사된 그 광은 인광체(phosphor)에 의해 흡수되고, 약 300nm 내지 약 325nm 범위의 파장에서 재방사(re-emitted)된다. 이 실시예에서, 재방사된 광은 표적 단백질에 손상을 줄 수 있는 약 290nm 내지 약 305nm 범위의 파장을 가지는 임의의 광원 뿐만 아니라 인광체에 의해 흡수되지 않은 약 254nm의 임의의 광원 또한 제거하기 위하여 여과된다.

[0053] 또 다른 실시예에서, 예를 들어, 아오도우라실 또는 브로모시토신과 같은 할로겐 광반응성 작용기가 광압타머에 포함될 수 있으며, 이 광압타머를 포함하는 광압타머 친화 복합체는 약 350nm 내지 약 400nm 범위의 파장을 가지는 광으로 처리될 수 있다. 예를 들면, 약 355nm로 셋팅된 제3고조파 네오디뮴 야그 레이저(the third harmonic of a Neodymium YAG laser)로부터의 단색광 또는 약 351nm 에서 제1고조파 크세논 플루오라이드 엑시머레이저(the first harmonic of a xenon fluoride(XeF) excimer laser)로부터의 단색광이 사용될 수 있다.

[0054] 본원에 사용된 것으로서, "표적 분자(target molecule)" 및 "표적"은 압타머가 높은 친화도 및 특이도를 가지고 결합할 수 있으며 시료 내에 존재할 수 있는, 관심있는 임의의 분자를 말하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. "관심있는 분자(molecule of interest)"는 단백질의 경우, 예를 들어, 아미노산 서열에서의 미미한 변화, 이황화 결합 형성, 당화(glycosylation), 지질화(lipidation), 아세틸화(acetylation), 인산화(phosphorylation) 또는 분자의 본질을 실질적으로 변경하지 않는 표지된 성분을 사용한 결합과 같은 임의의 다른 조작 또는 변경과 같은 특정 분자의 임의의 미미한 변화를 포함한다. "표적 분자" 또는 "표적"은 압타머에 결합할 수 있는 한 형태 또는 종류의 분자 또는 복합 분자 구조의 복제 세트이다. "표적 분자" 또는 "표적"은 하나 이상의 이러한 분자 세트를 말한다. 대표적인 표적 분자는 단백질, 폴리펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질, 다당, 당단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 애피바디, 항체 모조체, 바이러스, 병원체, 독성 물질, 기질, 대사 산물, 전이 유사물(transition state analogs), 보조인자(cofactors), 저해제, 약물, 염료, 영양소, 성장 인자, 세포, 조직 및 앞서 말한 임의의 것들에 대한 임의의 단편 또는 부분을 포함한다. 압타머는 사실상 임의의 크기를 가지는 임의의 화학적 또는 생물학적 분자로 확인될 수 있으므로, 사실상 임의의 크기를 가지는 임의의 화학적 또는 생물학적 분자는 적절한 표적이 될 수 있다. 표적은 또한 표적과 압타머 간의 상호작용의 가능성 또는 세기를 강화시키기 위해 변경될 수 있다. 대표적 실시예에서, 표적 분자는 단백질이다. SELEX 표적이 펩티드인 방법에 대한 미국 특허등록번호 제6,376,190호("Modified SELEX Processes Without Purified Protein")를 참조.

[0055] "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이를 가지는 아미노산의 폴리머를 말하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 폴리머는 직선이거나 분지될 수 있고, 변경된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비-아미노산에 의해 중단될 수 있다. 상기 용어들은 또한 자연적으로 변경되거나 예를 들어, 이황화 결합 형성, 당화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 표지된 성분으로 사용한 결합과 같은 임의의 다른 조작 또는 변경과 같은 조정(intervention)에 의한 아미노산 폴리머를 포함한다. 또한 정의 내에는 예를 들어, 당업계에 공지된 다른 변경 뿐만 아니라 아미노산(예를 들어, 비천연 아미노산 등을 포함)의 하나 또는 그 이상의 유사물을 포함하는 폴리펩티드도 포함된다. 폴리펩티드는 단일 사슬 또는 연결된 사슬(associated chains)일 수 있다.

[0056] 본원에 사용된 것으로서, "비-표적 분자(non-target molecule)" 및 "비-표적"은 압타머와 비특이적인 복합체를 형성할 수 있는 시료 내에 포함된 분자를 말하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. "비-표적 분자" 또는 "비-표적"은 압타머와 결합할 수 있는 하나의 형태 또는 종류의 분자 또는 복합 분자 구조의 복제 세트이다. "비-표적 분자" 또는 "비-표적"은 하나 이상의 이러한 분자 세트를 말한다. 1차 압타머에 대한 비-표적 분자는 2차 압타머에 대한 표적이 될 수 있음을 확인할 수 있을 것이다. 마찬가지로, 1차 압타머에 대한 표적 분자는 2차 압타머에 대한 비-표적이 될 수 있다.

[0057] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "압타머 친화 복합체(aptamer affinity complex)"는 표적 분자와 압타머의 상

호작용에 의해 형성된 비공유결합성 복합체를 말한다. "압타머 친화 복합체"는 압타머가 대응하는 표적 분자에 결합됨으로써 형성된 하나의 형태 또는 종류의 복합체의 복제 세트를 말한다. "압타머 친화 복합체"는 하나 이상의 이러한 복합체의 세트를 말한다. 압타머 친화 복합체는 일반적으로 주위 조건의 변화, 예를 들어, 온도의 증가, 염 농도의 증가 또는 변성제의 첨가에 의해 전환(reversed)되거나 해리(dissociated)될 수 있다.

[0058] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "압타머 공유결합 복합체(aptamer covalent complex)"는 압타머가 표적 분자와 공유 결합을 형성하도록 유도되거나 또는 그렇지 않으면 표적 분자와 공유 결합을 형성한 압타머 친화 복합체를 말한다. "압타머 공유결합 복합체"는 압타머가 대응하는 표적 분자에 공유적으로 결합됨으로써 형성된 하나의 형태 또는 종류의 복합체의 복제 세트이다. "압타머 공유결합 복합체"는 하나 이상의 이러한 복합체 세트를 말한다. 압타머와 표적 분자간의 공유 결합 또는 결합은 상기에 기재된 광압타머에 관한 부분들을 포함하는 압타머 상에 있는 화학적 부분의 광활성화에 의해 유도될 수 있다. 압타머와 표적 분자간의 공유 결합 또는 결합은 또한 화학적으로 유도될 수 있다. 압타머 내에 포함될 수 있고 표적과 공유 결합을 유도하는데 사용될 수 있는 화학적기(chemical group)는 알데히드(aldehydes), 말레이미드(maleimides), 아크릴릴 유도체(acrylic derivatives), 디아조늄 유도체(diazonium derivatives), 티올(thiols) 등을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 어떤 실시예에서, 예를 들어 말레이미드 또는 디아조늄 염과 같은 화학적 공유결합기는 특이적이고 충분히 강화된 화학적 반응이 일어나는데 요구되는 적절한 환경 및 반응성기의 병렬(juxtaposition)을 제공함으로써 압타머 친화 복합체를 압타머 공유결합 복합체로 간단히 전환시킬 수 있다. 다른 실시예에서, 알데히드기와 같은 화학적 가교제(crosslinker)는 압타머 친화 복합체를 안정하게 불가역적인 압타머 공유결합 복합체로 전환시키기 위하여 다른 성분, 예를 들어, 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride)의 첨가가 필요할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 화학적 가교제 같은 것은 압타머 내에 포함되지 않고; 오히려 압타머와 표적간의 공유적 결합을 용이하게 함으로써 압타머 친화 복합체가 압타머 공유결합 복합체로 전환되도록 하기 위하여 제3의 시약이 사용된다. 예를 들면, 아민 반응성 부분(예를 들면, N-하이드록시 석시니미딜 에스테르(N-hydroxy succinimidyl ester), 알데히드 또는 이미데이트(imide))와 뉴클레오사이드-반응기(nucleoside-reactive group)(예를 들면, 이오도아세트아마이드 또는 활성화된 알데히드) 모두를 포함하는 호모- 또는 헤테로-의 두가지 기능을 가진 시약은 압타머와 표적 단백질에 의해 형성된 친화 복합체와 같은 압타머 친화 복합체의 공유 결합성 복합체 형성(covalent complexation)을 유도할 수 있다.

[0059] 본원에서 용어 "시료(test sample)"는 임의의 물질, 용액 또는 다수의 분자를 포함하는 혼합물을 말하며, 적어도 하나의 표적 분자를 포함할 수 있다. 상기 용어 시료는 하기에 정의된 것과 같은 생물학적 샘플과, 예를 들어, 오염되거나 오염된 가능성이 있는 물 및 공업폐수와 같은 환경 또는 독물 검사를 위하여 사용될 수 있는 샘플을 포함한다. 시료는 또한 최종 생성물(end product), 중간 생성물(intermediate product) 또는 예를 들어, 제조 공정과 같은 준비하는 과정에서의 부산물일 수 있다. 시료는 생물 또는 어떤 다른 원(source)(예를 들어, 환경 또는 공업원)으로부터 얻어진 물질, 용액 또는 혼합물이 첨가된 임의의 적절한 검정 배지, 완충액 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0060] 용어 "생물학적 샘플"은 생물로부터 얻어진 임의의 물질, 용액 또는 혼합물을 말한다. 이것은 혈액(전혈(whole blood), 백혈구, 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells), 혈장 및 혈청), 가래(sputum), 입김(breath), 소변, 정액, 침(saliva), 뇌막액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 림프액(lymph fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 세포, 세포 추출물 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함한다. 이것은 또한 대표적으로 앞서 말한 모든 것들의 분리된 단편들을 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 또한 예를 들어, 대변(stool) 샘플, 조직 샘플 또는 조직 생검과 같은 물질, 용액 또는 균질화된 고형 물질을 포함하는 혼합물을 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 또한 조직 배양, 세포 배양, 세균 배양 또는 바이러스 배양으로부터 유래된 물질, 용액 또는 혼합물을 포함한다.

[0061] "고체 지지체(solid support)"는 분자가 공유결합 또는 비공유결합을 통하여 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있는 표면을 가지는 임의의 기질을 말한다. 상기 고체 지지체는 표면에 부착되는 프로브에 대하여 물리학적 지지체를 제공할 수 있는 임의의 기질 물질(substrate material)를 포함할 수 있다. 상기 물질은 일반적으로 표면에 대한 프로브의 부착에 관련된 조건 및 검정법의 수행 동안에 겪게되는 임의의 뒤따른 처리, 조작 또는 공정을 견딜 수 있다. 상기 물질은 자연적으로 생성된 것, 합성물 또는 자연적으로 생성된 물질의 변경된 것일 수 있다. 적절한 고체 지지체 물질은 실리콘(silicon), 그래파이트(graphite), 거울 표면(mirrored surface), 라미네이트(laminates), 세라믹(ceramics), 플라스틱(plastics)(예를 들어, 폴리(비닐클로라이드), 시클로-올레핀 공중합체, 폴리아크릴아마이드, 폴리아크릴레이트, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리(4-메틸부

텐), 폴리스티렌, 폴리메타크릴레이트, 폴리(에틸렌테레프탈레이트), 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE 또는 테플론®), 나일론, 폴리(비닐 부티레이트)과 같은 폴리머를 포함), 게르마늄(germanium), 갈륨 비소(gallium arsenide), 금, 은 등을 포함할 수 있으며, 그것들 자체 또는 다른 물질과 함께 사용된다. 실리카를 포함하고, 예를 들어, 생체 유리(bioglass)로서 이용할 수 있는 유리를 더 포함하는 유리나 같은 부가적인 단단한 재료가 고려될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 물질은 예를 들어, 조절 공극 유리 비드(controlled pore glass beads)와 같은 다공성 물질을 포함한다. 예를 들어, 표면에 결합된 임의의 아미노, 카복실, 티올 또는 하이드록실 작용기와 같은 하나 또는 그 이상의 작용기를 가질 수 있는 당업계에 잘 알려져 있는 임의의 다른 물질 또한 고려된다.

[0062] 고체 지지체를 위해 사용된 물질은 단순한 것에서부터 복잡한 것에 이르기까지 임의의 다양한 구성을 사용할 수 있다. 상기 고체 지지체는 비드, 튜브, 우물같은 모양을 포함하는 긴 조각(strip), 판(plate), 원반(disk), 봉(rod)을 포함하는 다수의 형태 중 하나일 수 있다. 일반적으로, 상기 물질은 예를 들어, 슬라이드와 같이 상대적으로 평면이지만, 예를 들어, 비드 또는 원통형(예를 들면, 컬럼(column))과 같은 구형일 수도 있다. 많은 실시예에서, 상기 물질은 일반적으로 직육면체(rectangular solid) 모양이다. 예를 들어, 프로브 배열과 같은 다중의 예정된 배열(multiple predetermined arrangements)은 얇은 판(sheet) 상에 합성될 수 있고, 그 후 주사위 모양, 즉 단일 배열 기질(single array substrate)로 새겨진 선을 따라 나눔으로써 잘라진다. 사용될 수 있는 대표적인 고체 지지체는 미량역가 웰(microtitre wells), 현미경용 슬라이드, 막(membranes), 상자성 비드(paramagnetic beads), 대전된 종이(charged paper), 랭뮤어-블러짓 필름(Langmuir-Blodgett films), 실리콘 웨이퍼 칩(silicon wafer chips), 유통 칩(flow through chips) 및 마이크로 비드를 포함한다.

[0063] 고체 지지체의 표면은 일반적으로 고체 지지체를 형성하는 기질 물질의 바깥 부분이다. 프로브가 결합되는 고체 지지체의 표면은 매끄럽거나 실질적으로 평면상일 수 있거나, 함몰(depressions), 홈(grooves), 고도(elevations) 또는 다른 구조(textures)와 같은 불규칙성을 가질 수 있다. 상기 표면은 바람직한 방법에서 표면의 특성을 변경하는데 도움이 되는 화합물의 하나 또는 그 이상의 서로 다른 층을 사용하여 변경될 수 있다. 다양한 실시예에서, 존재하는 경우, 이러한 표면 변경 층(surface modification layers)은 일반적으로 단분자 두께(monomolecular thickness) 내지 약 1mm 또는 단분자 두께 내지 약 0.1mm 또는 단분자 두께 내지 약 0.001mm의 두께 범위일 수 있다.

[0064] 관심있는 표면 변경 층은 금속, 금속 옥사이드, 폴리머, 작은 유기 분자 등과 같은 무기 및 유기 층을 포함한다. 관심있는 중합 층(polymeric layers)은 메타크릴레이트 공중합체, 폴리아크릴아마이드, 다당, 인지질, 폴리우레탄, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 폴리우레아, 폴리아마이드, 폴리에틸렌 아민, 폴리아릴렌 설퍼아이드, 폴리실록산, 폴리이미드, 폴리아세테이트 등을 포함하며, 여기에서 폴리머는 헤테로- 또는 호모-중합성일 수 있고, 폴리머에 부착된 분리된 작용부분(예를 들어, 결합된 부분)을 가지거나 가지지 않을 수 있다. 관심있는 다른 표면 변경 층은 예를 들어, 히드로겔(hydrogels)과 같은 3차원 네트워크를 포함한다. 당업계에 공지된 임의의 적절한 히드로겔을 사용할 수 있다. 예를 들면, 미국 공개 특허번호 제2003/0218130호("Biochips with Surfaces Coated with Polysaccharide-Based Hydrogels"), 미국 공개특허번호 제2005/0147994호("Method for Immobilizing a Biologic in a Polyurethane-Hydrogel Composition, a Composition Prepared from the Method, and Biomedical Applications"), 미국 공개특허번호 제2005/005908호("Photocrosslinked Hydrogel Blend Surface Coatings") 및 이 간행물들에 인용된 임의의 참고문헌을 참조.

[0065] 한 실시예에서, 고체 지지체의 표면은 하이드로겔을 포함한다. 상기 하이드로겔은 예를 들어 폴리머 매트릭스를 포함할 수 있다. 상기 하이드로겔은 고체 지지체의 표면에 화학적으로 부착될 수 있고, 프로브가 하이드로겔에 직접적 또는 간접적으로 부착할 수 있는 결합 기능성(binding functionality)을 포함할 수 있다. 대표적인 결합 기능성은 알데히드, 에폭시, 카보네이트 등, 카복실, 티올, 설포네이트, 설페이트, 아미노, 치환된 아미노, 인산, 금속 킬레이트기, 티오에테르, 비오틴, 보로네이트와 같은 소수성기, 친수성기, 반응성기를 포함한다.

[0066] 유전자 발현 또는 SNP 분석에 적합한 임의의 표면이 또한 사용될 수 있으며, 예를 들어, 애피매트릭스(Affymetrix), 제너럴 일렉트릭(General Electric, 예를 들어, Codelink), 애질런트(Agilent) 및 스코트 넥스테리온(Schott Nexterion)에 의해 제공된 기질 및 표면을 포함한다.

[0067] 프로브는 예를 들어, 비특이적 복합체들을 제거하기 위하여 표면을 세척하는 것과 같은 기재된 방법에 따른 후속 배양 및 제조 단계 동안 프로브가 비결합되지 않는 한 임의의 적절한 방법으로 고체 지지체의 표면에 결

합할 수 있다. 상기 프로브는 비공유적으로 연결, 예를 들어, 부착(adhered), 흡수(adsorbed), 흡착(adsorbed)됨으로써 또는 고체 지지체의 표면에 공유적으로 연결됨으로써 결합될 수 있다. 고체 지지체에 대한 프로브의 공유적 결합에 있어서, 고체 지지체의 표면은 프로브에 연결되는 작용기를 포함할 수 있다. 사용된 작용기의 특성은 프로브의 특성에 좌우된다. 표면에 대한 분자의 공유적 부착에 대하여 다양한 방법이 보고되어 있다. 전형적으로, 이러한 반응들은 표면상의 활성화된 작용기와 함께 분자상의 활성 작용기의 반응에 의해 수행된다. 예로서, 아민을 포함하는 화합물은 N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide) 유도체와 같은 카복실산의 활성화된 에스테르를 형성함으로써 표면을 포함하는 카복실산에 부착될 수 있다. 상기 아민은 안정한 아마이드 결합을 형성하기 위하여 즉시 이 활성화된 에스테르와 반응한다. 이 반응은 바람직한 아민과의 반응이 시스템에서 다른 친핵체(nucleophiles)와의 반응보다 현저하게 빠른 조건 하에서 유용하다.

[0068] 당업계에 이미 기재되어 있는 대표적 방법은 시아노젠 브로마이드(cyanogen bromide), N-하이드록시숙신이미드 에스테르, 카보닐 디이미다졸, 카보디이미드, 아자락톤(azlactones), 시아누릭 클로라이드(cyanuric chlorides), 유기 설폰일 클로라이드, 디비닐 술폰(divinyl sulphone), 니트로페닐 에스테르(nitrophenyl ester), 이오도아세틸(iodoacetyl), 말레이미드(maleimide), 에폭시, 하이드라지드(hydrazide), 환원성 아미노화(reductive amination), 디아조늄염 및 만니치 축합을 이용한 표면의 활성화를 포함한다. 활성화된 표면과 반응하는 분자들은 아민, 알콜, 카복실산, 티올, 카보닐 및 활성 수소를 포함하는 화합물을 포함한다.

[0069] 한 실시예에서, 상기 프로브는 특정 위치에서의 프로브의 정체성이 알려져 있는 표면상의 어떠한 배열을 의미하는 미리 예정된 공간적 배열 또는 패턴으로 고체 지지체의 표면에 결합된다. 한 실시예에서, 미리 예정된 배열은 어레이(array)이다. 어레이는 일반적으로 위치를 지정할 수 있는 영역(addressable regions)과 결합된 특정 프로브를 제공하는 임의의 1차, 2차 또는 3차원 배열의 영역을 포함한다. 어레이는 어레이 상의 특정의 미리 예정된 위치(location or adress)에서 어레이의 영역(region) 또는 부분(feature) 또는 장소(spot)가 특정 압타머 공유결합 복합체를 검출하고, 이러한 압타머 공유결합 복합체 상의 태그와 특이적으로 결합함으로써 특정 표적 분자를 검출할 수 있도록 서로 다른 프로브의 다중 영역을 가지도록 위치를 지정할 수 있다.

[0070] 고체 지지체의 표면상의 어레이 어셈블리는 각각의 고체 지지체의 표면을 따라 배열된 하나 또는 그 이상의 어레이를 말하며, 내부 어레이 부분(inter-array areas)으로 나뉜다. 일반적으로, 고체 지지체의 표면은 어떠한 어레이도 가지고 있지 않은 어레이의 표면(반대 표면)과 정반대이다. 상기 어레이는 임의의 형태의 시료에 대한 테스트를 위하여 설계될 수 있다. 상기 고체 지지체의 표면은 적어도 1개, 2개, 4개, 20개, 100개 또는 적어도 500개의 어레이를 가질 수 있다. 발명의 용도에 의존하여, 임의의 또는 모든 어레이는 서로 동일하거나 다를 수 있으며, 각각은 어레이상에 배열된 프로브의 다중 장소 또는 부분을 포함할 수 있다. 전형적인 어레이는 약 20cm^2 이하 또는 약 10cm^2 이하의 영역에서 10개 이상, 100개 이상, 1000개 이상 또는 10000개의 부분 또는 심지어 1000000개 이상의 부분을 포함할 수 있다. 예를 들면, 부분들은 약 $10\mu\text{m}$ 내지 약 1.0cm 범위의 너비(즉, 동그란 부위에 대한 지름)를 가질 수 있다. 다른 실시예에서, 각각의 부분은 약 $1.0\mu\text{m}$ 내지 약 1.0nm 또는 약 $5.0\mu\text{m}$ 내지 약 $500\mu\text{m}$ 또는 약 $10\mu\text{m}$ 내지 약 $200\mu\text{m}$ 범위의 너비를 가질 수 있다. 비원형 부분은 앞서 기술한 너비(지름) 범위를 가지는 원형 부분의 것들과 동일한 영역 범위를 가질 수 있다.

[0071] 고체 지지체 상의 임의의 다양한 구조의 어레이가 사용될 수 있다. 상기에 언급한 바와 같이, 개개의 고체 지지체는 단일 어레이 또는 다중 어레이를 포함할 수 있다. 어레이의 부분들은 직선의 줄(rectilinear rows)과 컬럼을 포함할 수 있다. 이것은 특히 고체 지지체 상의 단일 어레이에 유리하다. 다중 어레이가 존재하는 경우, 이러한 어레이는 예를 들어, 고체 지지체의 표면을 가로지르는 곡선의 줄(curvilinear rows) 등의 연속(즉, 동심원 또는 반원형 부위의 연속)으로 배열될 수 있다. 유사하게는, 부분(features)의 패턴은 예를 들어, 고체 지지체의 표면을 가로지르는 곡선의 줄의 연속(예를 들면, 동심원 또는 반원형 부위의 연속)을 포함하는 직선의 줄 및 컬럼 부위까지 다양할 수 있다. 어레이의 구성과 그것들의 부분들은 제조, 조작 및 사용 요건에 따라 선택될 수 있다.

[0072] 어레이 내에서의 각각의 부분 또는 요소는 고체 지지체 표면의 작고, 규칙적인 형태의 영역으로 정의된다. 상기 부분은 미리 예정된 방법으로 배열된다. 어레이의 각 부분은 일반적으로 미리 예정된 프로브 또는 프로브의 혼합물을 가진다. 분자 어레이(molecular array) 내에서의 각 부분은 서로 다른 프로브를 포함할 수 있고, 주어진 부분 내의 프로브는 어레이의 남아있는 부분 내의 프로브와 서로 다를 수 있다. 일부 또는 전체의 부분들은 서로 다른 조성일 수 있다. 각 어레이는 다중 부위 또는 부분들을 포함할 수 있으며, 각 어레이

는 공간 또는 영역에 의해 다른 어레이들로부터 분리될 수 있다. 다른 하나의 어레이로부터 어레이를 분리하는 어떠한 공간도 필요하지 않음을 또한 확인할 수 있을 것이다. 내부 어레이(interarray) 영역과 내부 부분(interfeature)의 영역은 일반적으로 존재하지만 필수적이지는 않다. 다른 넓은 영역을 가지는 것으로서, 이러한 내부 어레이와 내부 영역은 어떠한 프로브도 가지지 않는다. 내부 어레이 영역 및 내부 부분 영역이 존재하는 경우, 그것은 다양한 크기와 구성을 가질 수 있다는 것을 확인할 수 있을 것이다.

[0073] 어떤 실시예에서, 어레이는 예를 들어, 비드와 같은 1차 고체 지지체에 프로브를 부착시킨 후, 예를 들어, 미세역가 플레이트와 같은 2차 고체 지지체 상의 어레이 형식으로 1차 고체 지지체를 배열함으로써 형성될 수 있다. 다른 실시예에서, 어레이는 프로브가 위치를 지정할 수 있는 비드에 부착됨으로써 형성될 수 있다. "위치를 지정할 수 있는 비드(Addressable beads)"는 염료(dyes), 바코드(barcodes) 및 트랜스폰더(transponders)를 포함한다.

[0074] 어떤 실시예에서, 상기 표면은 선택된 고체 지지체의 표면에 따라 분자가 고체 지지체의 표면에 비특이적으로 결합하는 것을 감소시키거나 저해하기 위하여 "차단(blocked)" 되거나 "부동태화(passivated)"될 수 있다. 차단 또는 부동태화 시약은 분유, 카제인, 혼합혈청(pooled serum), 혼합혈장(pooled plasma), BSA, PEG-PLL, PEG-실란, 슈퍼블록(SuperBlock) 또는 스타터블록(StarterBlock)(Pierce Biotechnology, Rockford, Ill) 및 임의의 앞서 서술한 것들의 임의의 조합을 포함한다.

[0075] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "표지 시약(labeling agent)"은 압타머 공유결합 복합체에서 압타머에 결합된 표적 분자를 검출하기 위하여 사용될 수 있는 하나 또는 그 이상의 시약을 말한다.

[0076] 표적 분자를 검출하기 위한 한 실시예에서, 압타머 공유결합 복합체는 압타머에 결합된 표적 분자에 대하여 특이적인 결합 파트너(binding partner)를 포함하는 표지 시약과 접촉된다. 특이적 결합 파트너는 항체, 항체 단편, 합성 항체 모조체, 생체 모조체(biomimetic), 압타머, 분자 각인 리간드(molecular imprinted ligand) 등을 포함하는 임의의 적절한 부분일 수 있다. 상기 특이적 결합 파트너는 다른 표지 시약 성분, 일반적으로는 검출가능한 부분 또는 표지(label)에 결합되거나 연결된다. 특이적 결합 파트너와 표지의 결합은 프로브를 고체 지지체의 표면에 결합시키기 위한 임의의 전술된 방법에 의해 수행될 수 있다. 다중 표적 분자를 검출하는 경우에 있어서, 다중 압타머 공유결합 복합체들은 존재한다고 생각되는 표적 분자에 대하여 각각 특이적인 특이적 결합 파트너의 혼합물에 접촉될 수 있다. 사용된 표지들은 다중 표적 분자들의 복합 검출을 위한 당업계에 공지된 것들 일 수 있다.

[0077] 검출가능한 부분 또는 표지는 직접적 또는 간접적으로 검출 될 수 있다. 일반적으로, 검출 가능한 임의의 리포터 분자(reporter molecule)가 표지될 수 있다. 표지들은 예를 들면, (i) 시그널을 생성함으로써 직접적으로 검출될 수 있는 리포터 분자, (ii) 리포터 분자를 함유하는 동족(cognate)에 후속 결합함으로써 간접적으로 검출될 수 있는 특이적 결합쌍 구성원(binding pair members), (iii) 질량 분석계에 의해 검출가능한 질량 태그(mass tags), (iv) 증폭 또는 연결(ligation)을 위한 주형(template)을 제공할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 및 (v) 예를 들어, 억제 단백질(repressor protein)과 같은 리간드로서 작용할 수 있는 특정 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 인식 서열(recognition sequence), 여기에서 후자의 두 경우인 올리고뉴클레오타이드 프라이머 또는 억제 단백질은 리포터 분자 등등을 가지거나 가질 수 있다. 상기 리포터 분자는 효소와 같은 촉매, 촉매를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 프로모터, 염료, 형광성 분자, 양자점(quantum dot), 화학발광 분자(chemiluminescent molecule), 조효소, 효소 기질(enzyme substrate), 방사성기(radioactive group), 작은 유기 분자, 증폭 가능한 폴리뉴클레오타이드 서열, 라텍스 또는 탄소 입자와 같은 입자, 금속 졸(metal sol), 미소결정(crystallite), 리포솜, 세포 등일 수 있으며, 이는 염료, 촉매 또는 다른 검출 가능한 기(group), 질량 분석계 용으로 결합된 분자의 질량을 변경하는 질량 태그 등으로 더 표지되거나 표지되지 않는다. 상기 표지는 전자기성 또는 전기 화학성 물질로부터 선택될 수 있다. 한 실시예에서, 검출 가능한 표지는 형광성 염료이다. 다른 표지들 및 표지 기법(labeling schemes)들은 본원에 기재된 것에 기초하여 당업자들에게 자명할 것이다.

[0078] 표적 분자를 검출하기 위한 다른 실시예에서, 표적 분자는 단백질이며, 압타머 공유결합 복합체는 일반적인 단백질 착색제(universal protein stain)를 포함하는 표지 시약과 접촉된다. 본원에서 사용된 것으로서, "일반적인 단백질 착색제" 및 "UPS"는 고체 지지체와 같은 검정법의 핵산 또는 다른 성분인, 검출 가능한 부분이지만 표지되지 않거나 단지 최소한으로 표지되는 경향이 있는 시료 내에 존재하는 단백질을 대부분, 모든 것이 그런 것은 아닐지라도, 표지하는 임의의 표지 시약을 말하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. 단백질 상에서 발견되지만 핵산 또는 기질 표면상에서는 발견되지 않는 임의의 반응성 화학기가 공유성 부착(covalent attachment) 부위로서 제공될 수 있다. 대표적인 반응성 화학기는 일차 아민(primary amine; 예를 들어, 라

이신 잔기), 티올(예를 들어, 이황화 결합의 환원에 의해 생성될 수 있는 시스테인), 알콜(예를 들어, 세린, 쓰레오닌, 티로신 및 당단백질(이러한 당 상에서의 시스-디올(cis-diols)의 산화 생성물을 포함) 및 카르복시산염(예를 들어, 글루탐산 및 아스파르트산)을 포함한다.

[0079] 상기 검출 가능한 부분은 상기에 기재된 임의의 리포터 분자 및 검출 가능한 신호를 생성하기 위하여 임의의 방법으로 사용될 수 있는 임의의 다른 화학 제품 또는 성분을 포함할 수 있다. 상기 검출 가능한 부분은 상기 부분의 본질에 따라 형광성 시그널, 화학발광 시그널 또는 임의의 다른 검출 가능한 시그널을 통해 검출될 수 있다. 검출 가능한 부분이 효소(예를 들어, 알칼라인 포스파타아제)인 경우에는, 시그널은 효소 기질 및 효소 활성화에 필요한 임의의 추가 인자의 존재 하에서 생성될 수 있다. 검출 가능한 부분이 효소 기질인 경우에는, 시그널은 효소 및 효소 활성화에 필요한 임의의 추가 인자의 존재 하에서 생성될 수 있다. 표적 단백질에 검출 가능한 부분(moiety)을 결합시키기에 적합한 시약 구성은 표적 단백질에 대한 검출 가능한 부분(moiety)의 공유적 결합, 표적 단백질에 공유적으로 결합된 다른 표지 시약 성분을 사용한 검출 가능한 부분(moiety)의 비공유적 결합 및 검출 가능한 부분(moiety)과 표적 단백질과 비-공유적으로 결합된 표지 시약 성분의 공유적 결합을 포함한다. 일반적인 단백질 착색제는 2004년 8월 12일에 출원된 미국 특허출원번호 제 10/504,696("Methods and Reagents for Detecting Target Binding by Nucleic Acid Ligands")에 상세하게 기재되어 있다.

[0080] 어떤 실시예에서, 상기 UPS는 검출 가능한 부분을 포함하고, 단백질의 특성을 가지지만 애타머는 아닌 작용기와 공유적으로 반응하며, 검출 가능한 부분이 표적 단백질에 반응하고, 공유적으로 결합하는 것을 포함하는 단일 화학 시약이다. 이 실시예에 따른 UPS는 단백질에 특이적인 작용기와 공유적으로 반응할 수 있는 기를 사용한 염료를 포함한다. 이러한 기는 유도체화(derivatization)에 의해 염료에 추가될 수 있거나, 변경되지 않은 염료상에 존재할 수 있다. 한 실시예에서, UPS는 예를 들어, NHS-Alexa 647과 같은 NHS-알렉사 형광체(Alexa fluorophores)를

[0081] 포함하는 N-하이드록시석시니미드 활성화 형광체(N-hydroxysuccinimide-activated fluorophores)와 같은 아민기와 반응하는 N-하이드록시석시니미드 활성화 염료를 포함한다. 사용될 수 있는 다른 UPS는 높은 형광성 이소인돌(isoindoles)을 형성하기 위하여 시안화물(cyanide) 또는 티올의 존재하에서 아민과 또한 반응하는 CBQCA(3-(4-카복시벤조일)퀴놀린-2-카복시알데히드)이다. UPS 시약에 사용하기에 적합한 다른 아민 반응성은 이소시아네이트(isocyanates), 이소티오시아네이트(isothiocyanates), 아실아자이드(acylazides), 설폰일 클로라이드(sulfonyl chlorides); 알데히드, 4-설폰-2,3,5,6-테트라플로로오로페놀(STP) 에스테르(4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorophenol ester), TFP-알렉사 647(TFP-Alexa 647) 및 NBD(7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸) 클로라이드(NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole) chloride), NBD 플루오라이드(NBD fluoride) 및 디클로로트리아진(dichlorotriazines)과 같은 아릴화(aryllating)를 포함한다.

[0082] 다른 실시예에서, UPS는 다수의 시약을 포함한다. 예를 들면, 상기 UPS는 표적 단백질과 공유적으로 반응하는 1차 시약 및 1차 시약에 의해 유도된 화학기 또는 다른 기능성을 통하여 표적 단백질과 직접적 또는 간접적으로, 및 공유적 또는 비공유적으로 검출 가능한 부분과 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 시약을 포함할 수 있다. UPS가 복합 시약을 포함하는 경우, 시약이 연속적으로 추가되는 어떤 경우 및 시약이 동시에 추가되는 다른 경우를 확인할 수 있을 것이다.

[0083] 한 실시예에서, 적절한 UPS는 (a) 표적 단백질과 반응하는 비오틴 유도체(biotin derivative); 및 (b) 예를 들어, 형광성 스트렙타비딘 유도체(streptavidin derivative) 또는 스트렙타비딘-효소 접합체(streptavidin-enzyme conjugate)와 같은 스트렙타비딘-검출가능 부분 접합체를 포함한다. 상기 비오틴 유도체는 아민기와 반응하기 때문에 비오틴은 표적 단백질에 공유적으로 결합하고; 스트렙타비딘-검출가능 부분 접합체는 고정화된 비오틴 기에 결합하므로 표적 단백질이 결합되어 있는 고체 지지체 상의 부위에 검출가능한 부분을 위치시킨다. 이 실시예에서, 적절한 시약은 PFP-비오틴, NHS-PEO₄-비오틴(스페이서 암(spacer arm) 29 Å), 설폰-NHS-LC-비오틴(스페이서 암 22.4 Å) 및 TFP-PEO₃-비오틴(스페이서 암 32.6 Å)을 포함한다.

[0084] 다른 실시예에서, 적절한 UPS는 (a) 표적 단백질에 결합하기 위하여 비오틴 또는 비오틴 유도체에 공유적으로 결합할 수 있는 반응성 기와 접합된 비오틴 또는 비오틴 유도체; (b) 아비딘(avidin) 및/또는 스트렙타비딘; 및 (c) 예를 들어, 형광성 비오틴 유도체와 같은 비오틴-검출가능 부분 접합체를 포함한다. 상기 (a)에서 비오틴은 예를 들어, NHS-비오틴과 같은 아민 반응성 비오틴 유도체일 수 있으며, 여기에서 상기 비오틴은 스페이서 원자(spacer atoms; Calbiochem, Inc.)에 의해 NHS로부터 선택적으로 분리된다. 결합된 표적 단백질 상에서의 1차 아민과 NHS기의 반응은 비오틴이 대응 애타머에 결합된 표적 단백질에 공유적으로 결합되도록 한

다. 그 후, 상기 대응 압타머와 복합체를 형성한 표적 단백질은 스트렙타비딘 또는 아비딘으로 처리될 수 있다. 스트렙타비딘 및 아비딘은 각각 4개의 비오틴과 결합할 수 있기 때문에, 이러한 단백질의 추가는 NHS-비오틴에 의해 결합된 표적 단백질에 처음부터 결합되어 있는 각각의 비오틴에 3개의 비오틴 결합 부위를 제공한다. 그 후, 상기 (c)의 비오틴-검출가능 부분 유도체가 첨가될 수 있고, 그 결과 그것은 스트렙타비딘 또는 아비딘 상의 비어있는 비오틴 결합 부위에 강하게 결합한다. 이 실시예에서, 적절한 시약은 PFP-비오틴, NHS-PEO₄-비오틴(스페이서 암 29 Å), 설폰-NHS-LC-비오틴(스페이서 암 22.4 Å) 및 TFP-PEO₃-비오틴(스페이서 암 32.6 Å)을 포함한다.

[0085] 표지 시약의 특성, 표적 분자의 특성과 표적 분자에 대한 최적 판별 수치(cut-off levels), 특정 표적 수준의 생물학적 중요성 등과 같은 고려 사항들은 일반적으로 사용될 수 있는 특정 시약의 개별 농도를 포함하는 표지 시약의 농도를 결정한다. 각 시약의 최종 농도는 일반적으로 방법의 민감도를 최적화시키기 위하여 경험적으로 결정될 것이다. 한 실시예에서, 표지 시약의 농도는 일반적으로 적어도 약 1%의 표적 분자를 검출하는데 충분하다. 다른 실시예에서, 표지 시약의 농도는 일반적으로 적어도 약 10%의 표적 분자를 검출하는데 충분하다. 또 다른 실시예에서, 표지 시약의 농도는 적어도 약 90%의 표적 분자를 검출하는데 충분하다.

[0086] 표지 시약의 활성화는 사용되는 시약의 특성에 좌우된다. 예를 들면, 빛을 사용하여 활성화되는 시약을 위하여 상기 시약은 적절한 파장의 빛에 조사된다. 다른 활성화 방법은 본원에 기재된 것을 고려하여 당업자에게 제안될 것이다. 방사성 표지, 효소 등을 포함하는 표지 시약과 같은 어떤 표지 시약을 위한 활성화제는 필요하지 않다. 효소 시스템을 위해서는, 기질 및/또는 보조인자의 첨가가 필요할 것이다.

[0087] 표지 시약에 의해 생성된 시그널의 존재 및/또는 양에 대한 고체 지지체의 검사는 일반적으로 단지 시그널이 읽혀지는 단계인 시그널의 검출을 포함한다. 상기 시그널은 일반적으로 기구를 사용하여 읽혀지며, 기구의 특성은 시그널의 특성에 좌우된다. 상기 기구는 분광 광도계(spectrophotometer), 형광계(fluorometer), 흡광 광도계(absorption spectrometer), 발광 분석계(luminometer), 화학발광 분석계(chemiluminometer), 광량계(actinometer), 사진 기구(photographic instrument) 등일 수 있다. 검출된 시그널의 존재 및/또는 양은 미리 예정된 최적 판별 수치를 넘는 시료 내에 존재하는 임의의 표적 분자의 존재 및 양과 관련이 있다. 측정하는 동안의 온도는 일반적으로 약 10°C 내지 약 70°C, 또는 약 20°C 내지 약 45°C, 또는 약 20°C 내지 약 25°C의 범위일 수 있다. 한 접근법에서, 표준 곡선은 테스트될 표준 분자의 알려진 농도를 사용하여 형성된다. 눈금 측정기(calibrators) 및 다른 조절기구 또한 사용될 수 있다.

[0088] 한 실시예에서, 예를 들어, 어레이를 포함하는 고체 지지체는 고체 지지체의 표면이 임의의 결합된 표적 분자의 존재에 대하여 신호를 보내는 경우 검사 장치(examining device)로 이동된다. 상기 검사 장치는 광학 시스템을 포함하는 스캐닝 장치일 수 있다. 상기 어레이는 예를 들어, 어레이를 빛나게하고 상기 어레이의 각 부분에서 나오는 시그널(예를 들어, 형광)의 위치 및 세기를 읽음으로써 검사되거나 읽혀질 수 있다. 상기 스캐너는 예를 들어, 테칸 시스템즈(Tecan Systems, San Jose, California)로부터 구입할 수 있는 TECAN LS 300 스캐너와 일치하는 것일 수 있다. 그러나, 어레이는 다른 광학 기술(예를 들어, 화학발광 또는 전장발광 표지를 검출) 및 전기 기술을 포함하는 어레이를 검사하는 다른 방법으로 앞서 말한 것들을 제외한 방법 또는 기구를 사용하여 검사되거나 읽혀질 수 있다.

[0089] 어레이의 검사로부터 생성된 결과는 (하나 또는 그 이상의 칼라 채널에서 각 부분(feature)에 대하여 읽은 형광 세기와 같은) 가공하지 않은 결과일 수 있거나, 미리 정해진 임계값 아래에 있는 어떤 특징(feature)에 대하여 읽은 값을 버리고 그리고/또는 (특정 표적 분자가 시료 내에 존재했는지의 여부와 같은) 어레이로부터 읽어낸 패턴에 기초하여 결론을 형성함에 의하여 얻어지는 결론과 같은 가공된 결과일 수 있다. 가공 여부에 관계없이 검사의 결과는 만일 원한다면 보조작업 현장(remote location)으로 통신과 같은 것에 의해 전송될 것이고, 추가적인 처리와 같은 추가 이용을 위하여 받아들여질 것이다.

[0090] 다른 실시예에서, 상기 방법은 컴퓨터 제어 하에서, 즉 컴퓨터의 도움을 받아 수행된다. 예를 들면, IBM[®] 호환 개인용 컴퓨터(IBM[®] compatible personal computer)가 사용될 수 있다. 상기 컴퓨터는 본원에 기재된 방법에 특수한 소프트웨어에 의해 구동된다. 본원에 기재된 방법의 수행을 도울 수 있는 컴퓨터 하드웨어는 하기 사항을 가지는 시스템을 포함할 수 있다: 예를 들어, 마이크로소프트 윈도우즈[®] 95 또는 마이크로소프트 윈도우즈 NT[®] 4.0 운영 체제(또는 그것들의 후속제품) 중 하나에서 구동하는 펜티엄[®] 프로세서 또는 적어도 100MHz 보다 나은 클럭 속도(clock speed)를 가지는 펜티엄[®] 프로세서, 적어도 32 메가바이트의 랜덤 액세스 메모리(RAM) 및 적어도 80 메가바이트의 가상기억 장치.

- [0091] 상기 방법을 수행하기 위해 사용될 수 있는 소프트웨어는 예를 들어, 사용자 정의 기능(user-written function) 및 템플릿(template)을 통해 적절히 확장되며 원하는 독립형 프로그램(stand-alone programs)이 필요할 때 연결되는 마이크로소프트 엑셀 또는 마이크로소프트 액세스[®]이다.
- [0092] 본 발명의 방법의 실시를 돕는데 사용된 대표적인 소프트웨어 또는 컴퓨터 프로그램은 비주얼 베이직(Visual BASIC[®]), 포트란(FORTRAN), C, C++, 자바(Java), 파이톤(Python) 또는 현재 또는 미래에 이용가능한 임의의 다른 적절한 프로그래밍 언어로 쓰여질 수 있다. 본원에서 사용된 상기 컴퓨터 정보 및 소프트웨어는 단지 예시일 뿐 제한을 의미하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 본원에 기재된 임의의 방법들은 다른 컴퓨터, 컴퓨터 시스템 및 소프트웨어에 적용될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 언어들은 예를 들어, 파스칼(PASCAL), 펄(PERL) 또는 어셈블리 언어(assembly language)를 포함한다.
- [0093] 다른 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 질량 분석계를 사용하여 검출되고/되거나 정량화된다. 도 1B를 참고하면, 시료 내에 존재할 수 있는 표적 분자의 검출 및/또는 정량을 위한 대표적 방법에서, 시료는 태그를 포함하고 표적 분자에 특이적 친화력을 가지는 압타머와 접촉된다. 표적 분자와 결합된 압타머를 포함하는 압타머 친화 복합체가 형성된다. 만일 시료가 표적 분자를 포함한다면, 압타머 친화 복합체는 일반적으로 시료 내에 형성될 것이다. 상기 압타머 친화 복합체는 사용될 압타머에 적합한 방법을 사용하여, 표적 분자에 공유적으로 결합된 압타머를 포함하는 압타머 공유결합 복합체로 선택적으로 전환된다. 상기 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 고체 지지체에 부착된다. 상기 부착은 상기 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)와 고체 지지체를 접촉시키고, 압타머 상에 포함된 태그가 고체 지지체에 부착된 프로브와 직접 또는 간접적으로 결합하도록 함으로써 달성된다. 그 후, 고체 지지체 상의 프로브와 결합된 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)가 질량 분석계를 사용한 검출(및 선택적 정량화)을 위해 제조된다.
- [0094] 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 임의의 다양한 방법을 사용하여 질량 분석계에 의한 검출 및 선택적 정량화를 위해 제조될 수 있다. 예를 들면, 한 실시예에서 표적 분자가 단백질인 경우, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 고체 지지체로부터 복합체를 제거하기 전 또는 후에 프로테아제 분해에 의해 제조된다. 다른 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 고체 지지체로부터 방출된 후 매트릭스상 레이저 탈리 이온화(matrix-assisted laser desorption ionization; MALDI), 표면 확장 레이저 탈리 이온화(surface enhanced laser desorption ionization; SELDI), 전자 분사 이온화(electrospray ionization) 또는 전자 충돌 이온화(electron impact ionization)을 포함하는 당업계에 공지된 임의의 다수의 방법을 사용하여 질량 분석을 위해 제조된다. 한 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 전자 분사 이온화 질량 분석계 내로 직접 용리될 수 있다. 한 실시예에서, 용리된 시료는 예를 들어, 질량 분석 전에 효소적 분해 또는 화학적 변형과 같은 추가 공정으로 처리될 수 있다. 상기 질량 스펙트럼은 예를 들면, 전자 분사 이온화, 매트릭스상 레이저 탈리 이온화 또는 전자 충돌 이온화에 의해 얻어질 수 있다.
- [0095] 전형적으로, 질량 분석에 의한 표적 분자의 정량화는 내부 표준 물질(internal standard), 즉 분석될 시료 내에 들어있는 알고 있는 농도의 화합물을 필요로 한다. 이상적인 내부 표준 물질은 표적 분자의 용리 및 이온화 특성과 유사한 특성을 가질 것이지만, 서로 다른 질량 대 전하 비율(mass-to-charge ratios)을 가지는 이온을 생성할 것이다. 일반적인 내부 표준 물질은 안정한 동위원소로 표지된 표적 분자이다. 한 실시예에서, 안정한 동위원소로 표지된 표적 분자는 내부 표준 물질로서 시료에 첨가된다. 그 후, 시료 내의 다양한 성분 에 대응하는 스펙트럼 피크를 내부 표준 물질의 피크 높이 또는 영역과 비교함으로써 표적 분자의 정량화가 가능해진다.
- [0096] 다른 실시예에서, 표적 분자의 정량화는 알려진 농도의 표적 분자를 가지는 샘플 세트로부터 생성된 스펙트럼 피크와 표적 분자에 대응하는 스펙트럼 피크의 피크 높이 또는 영역을 비교함으로써 달성된다. 알려진 농도의 표적 분자를 가지는 샘플로부터 얻어진 스펙트럼 피크의 피크 높이 또는 영역은 시료 내의 알려지지 않은 농도의 표적 분자가 컴퓨터로부터 계산될 수 있는 표준 곡선을 만들어 낸다.
- [0097] 다른 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 Q-PCR을 사용하여 검출되고/되거나 정량화될 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, "Q-PCR"은 검정 결과가 양으로 계산되는(quantitative), 즉 검정법이 시료 내에 존재하는 압타머의 양 또는 농도를 정량할 수 있는 방법과 제한된 조건 하에서 수행된 PCR 반응을 말한다. 도 1B를 참고하면, 시료 내에 존재할 수 있는 표적 분자의 검출 및/또는 정량화를 위한 대표적 방법에서, 시료는 태그를 포함할 수 있고 표적 분자에 대해 특이적 친화력을 가지는 압타머와 접촉된

다. 표적 분자와 결합된 압타머를 포함하는 압타머 친화 복합체가 형성된다. 만일 시료가 표적 분자를 포함한다면, 압타머 친화 복합체는 일반적으로 시료 내에 형성될 것이다. 상기 압타머 친화 복합체는 사용될 압타머에 적합한 방법을 이용하여, 표적 분자에 공유적으로 결합된 압타머를 포함하는 압타머 공유결합 복합체로 선택적으로 전환된다. 본원에 더 기재된 것으로서, 압타머 친화 복합체의 형성 및 임의의 압타머 공유결합 복합체로의 선택적 전환 후, 시료 내에 존재할 수 있는 자유 압타머(free aptamer)가 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)로부터 분할된다. 그 후, 상기 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)는 폴리뉴클레오티드의 정량적 복제를 위해 공지의 기술을 이용하여 정량화된다.

[0098] 한 실시예에서, 시료 내의 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)의 양 또는 농도는 TaqMan® PCR을 사용하여 측정된다. 이 기술은 일반적으로 표적화된 서열로부터 시그널을 발생시키기 위하여 올리고뉴클레오티드 복제 효소의 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성화에 의존한다. TaqMan 프로브는 유전자 증폭 기술(polymerase chain reaction; PCR)을 이용하여 증폭된 압타머 서열과 같이 시그널을 발생시키기 위하여 정량화될 압타머의 서열에 기초하여 선택되고, 일반적으로 예를 들어 6-카복시플루오레세인(6-carboxyfluorescein)과 같은 5'-말단 플루오르(fluor), 예를 들어 6-카복시테트라메틸플루오레세인(6-carboxytetramethylfluorescein)과 같은 3'-말단 퀸처(quencher)를 포함한다. 폴리머라아제가 압타머 서열을 복제함에 따라, 엑소뉴클레아제 활성이 PCR 프라이머로부터 하부(downstream)에서 어닐링된 프로브로부터 플루오르를 유리시킴으로써 시그널을 발생시킨다. 증식 산물(replicative product)로서 증가된 시그널이 생산된다. PCR 산물의 양은 압타머의 시작 농도 뿐만 아니라 수행된 복제 주기의 수 모두에 좌우된다.

[0099] 다른 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)의 양 또는 농도는 복제 공정 동안 삽입성 형광 염료(intercalating fluorescent dye)를 사용하여 측정된다. 예를 들어, SYBR® 그린(SYBR® green)과 같은 삽입성 염료는 단일가닥 DNA의 존재 하에서 생성된 형광 시그널에 비해 이중가닥 DNA의 존재 하에서 큰 형광 시그널을 생성한다. 이중가닥 DNA 산물이 PCR 동안에 형성되는 것과 같이, 염료에 의해 생성된 시그널도 증가한다. 생성된 시그널의 크기는 PCR 주기 및 압타머의 시작 농도 모두에 의존한다.

[0100] 다른 실시예에서, 압타머 친화 복합체(또는 선택적 압타머 공유결합 복합체)의 양 또는 농도는 복제 공정 동안에 "분자 비콘(molecular beacon)"을 사용하여 측정된다(Tyagi et al., Nat. Biotech. 16:49-53, 1998; U.S. Pat. No. 5,925,517). 분자 비콘은 헤어핀 루프 안으로 접힌 특정 핵산 프로브이며, 헤어핀이 형성될 때 플루오르에 의해 시그널이 거의 생성되지 않거나 생성되지 않도록, 헤어핀 구조의 하나의 말단에는 플루오르를 함유하고 다른 하나의 말단에는 퀸처를 함유한다. 상기 루프 서열은 표적 폴리뉴클레오티드 서열에 특이적이며, 압타머 서열과 혼성화하자마자 헤어핀이 펼쳐지기 때문에 형광 시그널을 발생시킨다.

[0101] 컴퓨터 프로그램은 본원에 기재된 임의의 방법의 하나 또는 그 이상의 단계를 수행하기 위하여 사용될 수 있다. 본 발명의 다른 양상은 컴퓨터에 로딩시켰을 때, 본원에 기재된 임의의 방법의 작업을 수행하거나 돕는 컴퓨터 판독 가능 저장 매체(computer readable storage medium)에 저장된 컴퓨터 프로그램을 가지는, 컴퓨터 판독 가능 저장 매체를 포함하는 컴퓨터 프로그램 제품이다.

[0102] 본 발명의 한 양상은 본원에 기재된 임의의 방법의 제품이고, 즉 테스트 장소에서 평가될 수 있는 검정 결과이거나, 만일 원한다면 그것은 평가 및 원격지에 있는 관계자와의 의사소통을 위하여 다른 장소로 이송될 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, "보조작업 현장(remote location)"은 결과가 얻어진 곳과 물리적으로 다른 장소를 말한다. 따라서, 상기 결과는 서로 다른 방, 서로 다른 빌딩, 서로 다른 도시의 일부, 서로 다른 도시 등으로 보내질 수 있다. 데이터는 예를 들어, 팩스, 우편, 일일배달(overnight delivery), 이메일, ftp, 보이스 메일 등과 같은 표준 수단에 의해 전달될 수 있다.

[0103] 정보를 "전달(Communicating)"하는 것은 적절한 전달 경로(예를 들면, 사설 또는 공중 네트워크)를 통하여 전자 시그널로서 정보를 나타내는 데이터의 전달을 말한다. 아이템을 "운송(Forwarding)"하는 것은 아이টে를 물리적으로 또는 (가능하다면) 다른 방법으로 수송하는 것이든 간에, 한 장소에서 다음 장소로 아이টে를 이송하는 임의의 수단을 말하고, 최소한 데이터인 경우에는, 그 데이터를 이송하거나 의사소통하는 매체를 물리적으로 수송하는 것을 포함한다.

[0104] 도 3을 참고하면, 시료 내에 존재할 수 있는 하나 또는 그 이상의 표적 분자의 검출 및/또는 정량화를 위한 다른 대표적 방법에서, 표적 분자 및 적어도 하나의 비표적 분자를 포함할 수 있는 시료는 경쟁 분자(competitor molecule; 도 3에서 옵션 A로 나타냄)과 선택적으로 접촉된다. 하나 또는 그 이상의 비특이적 복합체들이 형성될 수 있다. 그 후, 상기 시료는 태그를 포함하고 표적 분자에 대하여 특이적 친화력을 가지

는 압타머와 접촉된다. 표적 분자와 결합된 압타머를 포함하는 압타머 친화 복합체가 형성된다. 만일 시료가 표적 분자를 함유한다면, 압타머 친화 복합체는 일반적으로 시료 내에 형성될 것이다. 시료의 특성에 따라, 압타머와 하나 또는 그 이상의 비 표적 분자간의 하나 또는 그 이상의 비특이적 복합체들 또한 형성될 수 있다. 만일 시료가 경쟁 분자와 접촉된다면, 경쟁자들을 포함하는 다양한 비특이적 복합체들 또한 형성될 수 있으며, 시료 내에 존재할 수 있다.

[0105] 그 후 시료는 시료의 성분을 동력학적으로 유발(kinetically challenge)하는 조건에 선택적으로 노출될 수 있다(도 3에 옵션 B로 나타냄). 하기에 추가로 기재한 바와 같이, 동력학적 유발은 시료를 희석하고, 시료에 경쟁 분자를 넣거나 고체 지지체 상의 압타머 친화 복합체를 포획한 후, 세척 용액 내에 존재하는 경쟁 분자의 존재 여부에 관계없이 세척하는 것을 포함할 수 있다. 만약 동력학적 유발이 사용된다면, 압타머와 임의의 비표적 분자간의 비특이적 복합체들은 분리 후 재형성되지는 않을 것이다. 비특이적 복합체들은 일반적으로 압타머 친화 복합체보다 더욱 빠르게 분리되기 때문에, 동력학적 유발은 압타머가 비표적과 비특이적 복합체에 관련될 가능성을 감소시킨다. 효과적인 동력학적 유발은 초기 압타머 결합반응의 특이도와 후속 공유결합성 상호작용 이상의 부가적인 특이도를 가진 검정법을 제공할 수 있다.

[0106] 동력학적 유발의 사용 여부에 관계없이, 형성된 압타머 친화 복합체는 그 후 사용될 압타머에 적합한 방법을 이용하여, 표적 분자에 공유적으로 결합된 압타머를 포함하는 압타머 공유결합 복합체로 전환된다. 압타머 공유결합 복합체 형성에 이어, 시료 내에 존재할 수 있는 임의의 자유 또는 비복합(non-complexed) 압타머는 시료로부터 선택적으로 분리될 수 있다(도 3에 옵션 C로 나타냄). 선택적으로, 시료 내에 존재할 수 있는 임의의 자유 또는 비복합 비-표적 및 표적 분자는 시료로부터 분리될 수 있다(도 3에 옵션 D로 나타냄). 선택적으로, 자유 압타머 및 자유 비표적 및 표적 분자 모두는 압타머 공유결합 복합체의 형성 후에 _____ 제거될 수 있다.

[0107] 만약 동력학적 유발을 도입하기 위해 희석을 사용한다면, 압타머 공유결합 복합체를 포함하는 이후의 시료는 바람직하게는 농축된다. 만일 가능하다면, 이 농축은 시료로부터 임의의 자유 압타머의 선택적 분할 및/또는 표지 시약과 반응할 수 있는 시료의 다른 성분의 선택적 제거에 관하여 하기에 기재된 방법을 사용하여 달성할 수 있다.

[0108] 시료 내의 압타머 공유결합 복합체는 그 후 본원에 기재된 임의의 방법 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 적당한 방법을 사용하여 검출되고/되거나 정량화될 수 있다. 예를 들면, 압타머 공유결합 복합체는 시료와 고체 지지체를 접촉시킴으로써 고체 지지체의 표면에 부착될 수 있고, 압타머 상의 태그와 고체 지지체의 표면에 고정된 프로브는 직접 또는 간접적으로 결합하게 된다. 고체 지지체 상의 프로브와 결합된 압타머 공유결합 복합체는 그 후 검출되고, 선택적으로 정량화된다. 검출 및 선택적 정량화 전의 임의의 지점, 즉 압타머 공유결합 복합체가 고체 지지체에 부착되기 전후라면 언제라도, 상기 압타머 공유결합 복합체는 결합된 표적 분자의 검출을 가능하게 하는 표지 시약과 접촉된다. 당업자가 인식할 수 있는 것 중 하나로서, 압타머 공유결합 복합체는 또한 질량 분석계, Q-PCR 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 적당한 방법을 사용하여 검출되고/되거나 정량화될 수 있다.

[0109] 본원에 사용된 것으로서, "경쟁 분자(competitor molecule)" 및 "경쟁자(competitor)"는 비표적 분자와 비특이적 복합체를 형성할 수 있는 임의의 분자를 말하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. "경쟁 분자" 또는 "경쟁자"는 하나의 형태 또는 종류의 분자의 복제 세트이다. "경쟁 분자" 또는 "경쟁자"는 하나 이상의 이러한 분자 세트를 말한다. 경쟁 분자는 올리고뉴클레오타이드, 다중 음이온(예를 들어, 헤파린, 단일가닥 연어 정자 DNA 및 폴리텍스트란(예를 들어, 텍스트란 셀페이트)), 비염기성 포스포디에스테르 폴리머(abasic phosphodiester polymers), dNTPs 및 피로포스페이트(pyrophosphate)를 포함한다. 경쟁자를 사용하는 동력학적 유발의 경우에 있어서, 상기 경쟁자는 또한 압타머와 비특이적 복합체를 형성할 수 있는 임의의 분자일 수 있다. 이러한 경쟁 분자는 다중 양이온(예를 들어, 스페르민(spermine), 스페르미딘(spermidine), 폴리라이신(polylysine) 및 폴리아르기닌(polyarginine)) 및 아미노산(예를 들어, 아르기닌 및 라이신))일 수 있다.

[0110] 본원에 사용된 것으로서, "비특이적 복합체(non-specific complex)"는 압타머와 그것의 표적 분자를 제외한 두개 또는 그 이상의 분자간의 비-공유적 결합을 말한다. 비특이적 복합체는 그것의 구성 분자간의 친화성 상호작용(affinity interaction)을 기반으로 선택되는 것이 아니라 분자의 종류간의 상호작용을 나타내는 것이므로, 비특이적 복합체에 결합된 분자들은 평균적으로 서로 더욱 낮은 친화력을 나타낼 것이며, 압타머와 표적 분자보다 상대적으로 높은 해리율을 가질 것이다. 비특이적 복합체는 압타머와 비표적 분자, 경쟁자와 비표적 분자, 경쟁자와 표적 분자 및 표적 분자와 비표적 분자간에 형성된 복합체를 포함한다.

- [0111] 본원에 사용된 것으로서, "동력학적 유발(kinetically challenge)" 및 "동적 유발(kinetic challenge)"은 운동압(kinetic pressure)을 사용하고, 해리율을 포함하는 이러한 분류의 복합체들 구성요소의 서로 다른 친화 특성을 사용함으로써 압타머 친화 복합체와 비특이적 복합체를 포함하는 한 세트의 복합체들에서의 압타머 친화 복합체 강화 공정을 말한다. 압타머-비표적 복합체는 전형적으로 압타머-표적 복합체에 비하여 감소되기 때문에, 동적 유발은 일반적으로 특이도를 증가시킨다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "운동압"은 복합체의 자연적인 분리를 위한 기회를 제공하고/하거나 복합체로부터 자연적으로 분리되는 분자의 재결합을 저해하기 위한 수단을 말한다. 운동압은 경쟁 분자의 첨가에 의해, 또는 샘플의 희석에 의해, 또는 복합체가 고체 지지체에 결합된 경우 광범위한 세척에 의해, 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 방법에 의해 적용될 수 있다. 당업자가 인식할 수 있는 것 중 하나로서, 동적 유발은 일반적으로 압타머 친화 복합체 및 압타머-비표적 복합체의 다른 해리율에 의존하므로, 동적 유발의 지속기간은 다수의 압타머-비표적 복합체를 실질적으로 감소시키는 동안 압타머 친화 복합체를 높은 비율로 유지시키기 위하여 선택된다. 동적 유발을 효과적이기 위해서, 압타머 친화 복합체의 해리율은 압타머-비표적 복합체의 해리율보다 현저하게 낮은 것이 바람직하다. 압타머는 특정 특성을 포함하도록 선택될 수 있기 때문에, 압타머 친화 복합체의 구성요소는 비교적 낮은 해리율을 가지도록 설계될 수 있다.
- [0112] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "분할(partition)"은 시료로부터 하나 또는 그 이상의 분자 종류의 분리(separation) 또는 제거를 말한다. 분할(partitioning)은 민감도를 증가시키고/시키거나 백그라운드(background)를 감소시키는데 사용될 수 있다. 분할은 압타머 친화 복합체가 공유 결합 때문에 변경될 수 없는(irreversible) 경우, 다음의 압타머 공유결합 복합체 형성에 가장 효과적이다.
- [0113] 예를 들면, 압타머 공유결합 복합체가 고체 지지체 표면상의 프로브와 결합하는 동안 자유 압타머는 압타머 공유결합 복합체와 경쟁할 수 있기 때문에, 시료로부터 자유 압타머의 제거는 검정법의 민감도를 증가시킬 수 있다. 검출 및 선택적 정량화를 위해 QPCR을 사용하는 경우, 자유 압타머의 제거는 표적 분자의 검출 및 정량화를 용이하게 한다. 한 실시예에서, 상기 표적 분자는 단백질이며, 자유 압타머는 단백질 및 압타머 공유결합 복합체와 같은 단백질을 포함한 복합체를 침전시키지만 시료 내의 핵산은 유리지키지 않는 시약을 사용함으로써 압타머 공유결합 복합체(및 시료의 잔여물)로부터 분할된다. 이러한 시약은 K^+ /SDS, 아세톤, $(NH_4)_2SO_4$, 프로시피테이트(ProCipitate) 및 당업계에 공지된 다른 대전된 폴리머르르 포함할 수 있다.
- [0114] 한 실시예에서, 예를 들어 표적 분자(이 경우에는, 표적 단백질)에 대하여 특이적 친화력을 가지는 태그된 광압타머와 같은 압타머를 시료에 넣는다. 본원에 더 기재된 바와 같이, 압타머 친화 복합체의 형성 및 압타머 공유결합 복합체로의 전환에 이어, 압타머-단백질 공유결합 복합체 및 비복합 단백질은 상기에 기재된 임의의 시약 또는 임의의 다른 적절한 시약과 같은 적절한 시약을 사용하여 시료로부터 침전된다. 시료의 침전된 성분은 원심분리에 의해 펠릿화되고, 자유 압타머를 함유하는 상층액은 폐기된다. 자유 단백질 및 압타머-단백질 공유결합 복합체를 포함하는 펠릿은 그 후 예를 들어, 검정 결합 희석제(assay binding diluent)와 같은 적절한 용액으로 현탁시키고, 그 후 압타머 공유결합 복합체는 압타머 공유결합 복합체가 고체 지지체에 부착되기 전 또는 후에 표지 시약과 접촉될 수 있다. 만약 시료 내에 존재한다면, 표적 분자는 그 후 압타머 공유결합 복합체 상의 표지 시약을 검출함으로써 검출되고/되거나 정량화된다.
- [0115] 검정 백그라운드를 감소시키기 위하여, 표지 시약과 반응할 수 있으며 압타머와 공유적으로 결합하지 않는 분자는 시료로부터 제거될 수 있다. 한 실시예에서, 이것은 시료로부터 자유 및 복합 압타머 모두를 침전시키고, 버릴 상층액에 표지 시약과 반응할 수 있는 다른 분자를 남김으로써 달성된다. 이러한 핵산 침전은 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide; CTAB), 도데실트리메틸암모늄 브로마이드(dodecyltrimethylammonium bromide; DTAB) 및 예를 들어, 에탄올과 같은 유기 용매를 포함하는 시약을 사용하여 달성될 수 있다. 다른 실시예에서, 자유 및 복합 압타머 모두는 압타머를 고체 지지체에 혼성화시킴으로써 샘플로부터 분할된다. 이 경우에서 상기 고체 지지체는 마이크로비드(예를 들어, 상자성 비드), 본원에 기재된 임의의 다른 적절한 고체 지지체 등을 포함할 수 있다. 압타머를 적절한 고체 지지체의 표면에 혼성화시킨 후, 표지 시약과 반응할 수 있는 분자를 함유하는 용액은 쉽게 제거되며, 그 결과 압타머 공유결합 복합체는 농축된다. 당업자가 인식할 수 있는 것 중 하나로서, 이 방법에서 압타머의 분할은 압타머를 고체 지지체에 부착된 적당하게 상보적인 뉴클레오티드 서열과 혼성화시키기 위하여, 압타머 상에 포함된 태그 또는 압타머 상의 어떤 다른 핵산 서열 중 하나를 사용할 수 있다.
- [0116] 한 실시예에서, 표적 단백질에 대하여 특이적 친화력을 가지는 태그된 광압타머와 같은 태그된 압타머가 시료에 사용된다. 본원에 더 기재된 바와 같이, 압타머 친화 복합체의 형성 및 압타머 공유결합 복합체로의 전환

에 이어, 압타머-단백질 공유결합 복합체 및 자유 압타머는 상기에 기재된 임의의 시약 또는 임의의 다른 적당한 시약과 같은 적절한 시약을 사용하여 시료로부터 침전된다. 시료의 침전된 성분은 원심분리에 의해 펠릿화되고, 비복합된 표적 및 시료의 잔여물을 함유하는 상층액은 폐기된다. 그 후, 자유 압타머와 압타머 공유결합 복합체를 포함하는 펠릿은 검정 결합 희석제와 같은 적절한 용액으로 현탁되고, 압타머 공유결합 복합체와 자유 압타머는 그 후 압타머 공유결합 복합체가 고체 지지체에 부착되기 전 또는 후에 표지 시약과 접촉될 수 있다. 만약 시료 내에 존재한다면, 표적 분자는 그 후 압타머 공유결합 복합체 상의 표지 시약을 검출함으로써 검출되고/되거나 정량화된다.

[0117] 다른 실시예에서, 표적 분자에 대하여 특이적 친화력을 가지는 태그된 광압타머와 같은 태그된 압타머가 시료에 사용된다. 본원에 더 기재된 바와 같이, 압타머 친화 복합체의 형성 및 압타머 공유결합 복합체로의 전환에 이어, 압타머-단백질 공유결합 복합체 및 자유 압타머는 예를 들어, 압타머 태그에 상보적인 프로브를 포함하는 비드를 사용하여 고체 지지체 상에 포획된다. 상기 비드는 상자성 비드의 경우에는 자기력(magnetic force) 또는 비상자성 비드를 위한 원심분리에 의해 펠릿화되고, 비복합된 표적 및 시료를 포함하는 상층액은 폐기된다. 상기 펠릿은 그 후 예를 들어, 검정 결합 희석제와 같은 적절한 용액으로 현탁되고, 압타머 공유결합 복합체 및 자유 압타머는 예를 들어, 열, 높은 pH, 증류수, 이러한 것들의 어떤 조합 또는 임의의 다른 공지된 방법을 포함하는 혼성화 상호작용을 붕괴시키기 위한 임의의 적당한 방법을 사용하여 용출된다. 상기 비드는 다시 펠릿화되고, 자유 압타머와 압타머 공유결합 복합체를 함유하는 상층액은 압타머 공유결합 복합체가 고체 지지체에 부착되기 전 또는 후에 표지 시약과 접촉될 수 있다. 만약 시료 내에 존재한다면, 표적 분자는 그 후 압타머 공유결합 복합체 상의 표지 시약을 검출함으로써 검출되고/되거나 정량화된다.

[0118] 다른 실시예에서, 검정법은 비복합된 표적과 시료를 함유하는 상층액을 폐기한 후에 비드가 현탁되는 경우의 단계를 포함하여, 상기에 약술된 것과 같이 수행된다. 그 후, 자유 압타머와 압타머 공유결합 복합체가 비드로부터 용리되기 전에 상기 압타머 공유결합 복합체는 표지 시약과 접촉되고, 표적 분자의 검출 및/또는 정량화를 위하여 압타머 공유결합 복합체와 고체 지지체를 접촉시키기 전에 미반응 표지 시약을 제거하기 위하여 펠릿화 및 세척을 반복한다.

[0119] 본원에 기재된 임의의 방법에서, 상기 시료는 표적 분자가 시료 내에 존재할 수 있고 본원에 기재된 방법에 의해 검출되는 농도의 동적 범위(dynamic range)를 증가시킬 수 있는 두 번 또는 그 이상의 희석 시료로 제조될 수 있다. 개개의 희석 시료들은 압타머 공유결합 복합체 형성을 포함하여 개별적으로 검정되고, 압타머 공유결합 복합체 형성 이후에 희석 시료는 검정 잔여물로서 모여질 수 있으며, 동시에 단일 고체 지지체 상에서 검출될 수 있다. 한 실시예에서, 각각의 희석 시료는 고유(unique)한 압타머를 포함하므로, 표적에 대응하는 단일 측정이 가능하다. 다른 실시예에서, 압타머는 두 번 또는 그 이상의 희석물에 첨가될 수 있으며, 각 희석물은 특정 표적에 대해 명백하게 태그된 압타머와 접촉하고, 단일 지지체 상의 서로 다른 각각의 단일 희석 샘플에 대한 특정 압타머 시그널을 검출한다. 이 방법에서 희석 샘플과 함께 연쇄화(chaining)하는 것은 수백, 수천배 이상으로 단일 표적 분자의 동적 범위를 확장시킬 수 있고, 정량화의 겹치는 부분이 단일 표적의 농도를 다중 측정하게 하는 경우에 정확성을 더해준다.

[0120] 한 실시예에서, 시료의 한 세트는 표적 분자에 대해 특이적인 친화력을 가지는 태그된 광압타머와 같은 사용되는 태그된 압타머를 연속 희석하여 제조된다. 서로 다른 태그를 가지는 동일한 압타머가 각각의 시료 희석물에 첨가될 수 있다. 본원에 더 기재된 바와 같이, 압타머 친화 복합체의 형성과 압타머 공유결합 복합체로의 전환에 이어, 개개의 시료들이 모여질 수 있고, 압타머 공유결합 복합체가 고체 지지체에 부착되기 전 또는 후에 표지 시약과 접촉될 수 있다. 만약 시료 내에 존재한다면, 표적 분자는 그 후 압타머 공유결합 복합체 상의 표지 시약을 검출함으로써 검출되고/되거나 정량화된다. 서로 다른 태그를 가지는 각각의 압타머에 대하여 측정된 결과 시그널들은 원 시료 내의 표적 분자의 양 또는 농도를 정확히 정량하기 위해 조합될 수 있다. 예를 들면, 1차 희석은 단지 반정량적 정보(semi-quantitative information)를 산출하는 표적에 대한 최대 시그널을 산출하는 반면, 2차 희석은 원 시료 내 표적의 정확한 정량화를 허용하는 포화상태(saturating)에도 못미치는 시그널을 산출할 수 있다.

[0121] 다른 실시예에서, 시료의 한 세트는 표적 분자에 대하여 특이적인 친화력을 가지는 태그된 광압타머와 같은 사용되는 태그된 압타머를 연속 희석하여 제조된다. 고유의 태그를 가지는 서로 다른 압타머들이 각각의 샘플 희석물에 첨가될 수 있다. 본원에 더 기재된 바와 같이, 압타머 친화 복합체의 형성 및 압타머 공유결합 복합체로의 전환에 이어, 개개의 시료들이 모여질 수 있고 고체 지지체에 압타머 공유결합 복합체가 부착되기 전 또는 후에 표지 시약과 접촉될 수 있다. 시료 내에 존재하는 표적 분자들은 그 후 압타머 공유결합 복합체 상에서 표지 시약을 검출함으로써 검출되고/되거나 정량화된다. 결과 시그널들은 원 샘플의 서로 다른 연

속 희석물에 의존하는 수백, 수천배 이상의 표적 범위에 대하여 정량화될 수 있다.

[0122] 본원에 기재된 임의의 방법에서, 시료는 대조 샘플(reference sample)과 비교될 수 있다. "대조 샘플"은 본원에서 다수의 분자를 함유하며 적어도 하나의 표적 분자를 포함한다고 알려져 있는 임의의 물질, 용액 또는 혼합물을 말한다. 대조 샘플 내에 존재하는 임의의 표적 분자의 정확한 양 또는 농도 또한 잘 알려져 있을 수 있다. 용어 대조 샘플은 본원에 정의된 바와 같은 생물학적 샘플 및 예를 들어, 오염되거나 오염되었을 가능성이 있는 물 및 공업폐수와 같은 환경 또는 독소 테스트를 위해 사용될 수 있는 샘플을 포함한다. 대조 샘플은 또한 최종 산물, 중간 산물 또는 제조 공정, 예를 들어 준비 과정의 부산물일 수 있다. 대조 샘플은 생물 또는 다른 어떤 원(예를 들어, 환경원 또는 공업원)으로부터 얻어진 물질, 용액 또는 혼합물에 첨가될 수 있는 임의의 적절한 검정 배지, 버퍼 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0123] 한 실시예에서, 대조 샘플은 단지 이 실시예에서만 압타머 공유결합 복합체가 고체 지지체에 부착하기 전에 일어나야만 하는 표지 시약에 대한 노출단계 까지 그러나 그 노출단계를 포함하지 않는 동일한 방법으로 시료로부터 개별적으로 처리된다. 두개의 서로 다른 표지 시약들이 대조 샘플 내의 표적 농도를 시료 내의 표적 농도와 구별하기 위해 사용된다. 샘플들을 표지 시약과 접촉시킨 후, 그것들은 균일하게 혼합될 수 있고, 동시에 고체 지지체와 접촉될 수 있다. 그 후, 대조 샘플과 시료간의 임의의 발현 차이(즉, 샘플 내 표적의 양 또는 농도 차이)의 직접 비교는 각각의 표지 시약으로부터 시그널을 개별적으로 측정함으로써 가능하다. 상기 두개의 표지 시약은 Cy3 와 Cy5 한쌍 및 알렉사555(Alexa555) 및 알렉사647(Alexa647) 한쌍을 포함할 수 있다. 한 실시예에서, 대조 샘플은 대조군을 나타내는 생물학적 샘플로 모여질 수 있다. 다른 실시예에서, 대조 샘플은 1차로 수집된 개체로부터 얻어진 생물학적 샘플일 수 있고, 시료는 동일하지만 2차로 수집된 개체로부터 얻어진 것일 수 있으므로, 오랜 시간 개체에 의해 제공된 다중의 생물학적 샘플 내의 하나 또는 그 이상의 표적 분자의 양 또는 농도에서의 임의의 변화를 측정하고 평가함으로써 개체의 장기적 연구를 용이하게 한다.

[0124] 한 실시예에서, 표적 분자에 대하여 특이적인 친화력을 가지는 태그된 광압타머와 같은 태그된 압타머는 대조 샘플 및 시료 양쪽 모두로 사용된다. 본원에 더 기재된 바와 같이, 압타머 친화 복합체의 형성과 압타머 공유결합 복합체로의 전환에 이어, 두개의 샘플들은 두개의 서로 다른 검출 분자를 함유하는 두개의 다른 표지 시약과 접촉될 수 있다. 압타머 공유결합 복합체를 함유하는 두개의 개별적으로 표지된 샘플들은 그 후 고체 지지체에 부착될 수 있다. 만약 샘플 중의 하나 또는 모두에 존재한다면, 표적 분자는 예를 들어, 검출 표지가 형광성 분자인 경우, 전형적으로 서로 다른 여기(excitation) 및 방사(emission) 파장에서 다중 스캔을 수행함으로써 압타머 공유결합 복합체 상의 두개의 표지 시약을 검출함으로써 검출되고/되거나 정량화된다. 이러한 정량화는 대조 샘플과 시료 내에서의 표적의 양 또는 농도의 차이의 더욱 정확하게 평가할 수 있게 하고, 사용된 대조 샘플이 동일한 경우 서로 다른 시료 간의 비교를 용이하게 할 수 있다.

[0125] 본원에 기재된 임의의 방법에서, 단일 시료를 분석하기 위하여 다중 표지 시약이 사용될 수 있다. 한 실시예에서, 서로 다른 표적 분자 부분과 선택적으로 서로 다른 검출기를 표지하기 위하여 각각 별개의 화학적 성질을 사용한 두개 또는 그 이상의 표지 시약이 단일 시료에 사용될 수 있다. 서로 다른 화학적 성질들은 추가 정보가 유래될 수 있는 표적 분자 상의 서로 다른 작용기를 표지할 것이다. 예를 들면, 표적 단백질의 경우, 첫번째 표지는 1차 아민(예를 들면, 라이신)과 반응하는 화학적 성질을 이용한 표적에 부착될 수 있는 반면, 두번째 표지는 예를 들어, 전형적으로 글리코실화된 단백질과 결합되는 탄수화물기와 반응하는 화학적 성질을 통해 표적에 부착된다. 공통의 압타머에 의해 인식되는 동일한 표적 분자 상의 이러한 두가지 부분의 상대적 정량화는 시료 내의 표적에 대한 글리코실화의 정도에 대한 유용한 정보를 제공할 수 있다.

[0126] 한 실시예에서, 표적 분자에 대하여 특이적인 친화력을 가지는 태그된 광압타머와 같은 태그된 압타머가 시료에 사용된다. 본원에 더 기재된 바와 같이, 압타머 친화 복합체의 형성 및 압타머 공유결합 복합체로의 전환에 이어, 시료는 압타머 복합체가 고체 지지체에 접촉하기 전 또는 후에 두개의 서로 다른 검출 분자를 함유하는 두개의 다른 표지 시약과 접촉될 수 있다. 한 실시예에서, 검출 표지 및 화학적 성질은 고유하며, 압타머 공유결합 복합체를 함유하는 동일한 시료의 연속 표지를 가능하게 한다. 다른 실시예에서, 상기 화학적 성질들은 하나의 반응에서 동시에 수행될 수 있다. 다중 표지된 압타머 공유결합 복합체는 그 후 예를 들어, 검출 표지가 형광성 분자인 경우 전형적으로 서로 다른 여기 및 방사 파장에서 다중 스캔을 수행함으로써 압타머 공유결합 복합체 상의 두개의 표지 시약을 검출함으로써 검출되고/되거나 정량화될 수 있다.

[0127] 다른 실시예에서, 두개 또는 그 이상의 다른 표지 시약은 동일한 검출 표지를 사용한다. 검정은 압타머 공유결합 복합체로의 전환까지 그리고 그것을 포함하여 위에서 서술한 바와 같이 진행되고, 그 후에 시료를 다른 표지 시약을 가진 많은 엘리쿼트(eliquot)으로 나눈 후, 각 시료의 엘리쿼트를 압타머 공유결합 복합체가 고체 지

지체에 부착되기 전 또는 후에 표지 시약과 개별적으로 접촉시키는 것까지를 포함한다. 압타머 공유결합 복합체를 함유하는 시료의 개별적으로 표지된 엘리컷은 개별적으로 검출되고/되거나 정량화될 수 있다.

[0128] 본원에 기재된 임의의 방법은 시료의 다중화된 분석을 실시하기 위해 사용될 수 있다. 임의의 이러한 다중화된 분석은 예를 들어, 생물학적 샘플과 같은 시료 내의 동일한 수의 표적 분자를 동시에 검정하기 위해서 적어도 2개, 적어도 10개, 적어도 100개 또는 적어도 천개의 압타머를 이용하는 것을 포함할 수 있다. 이 실시예에서, 표적 분자에 대하여 특이적인 친화력을 각각 가지는 태그된 광압타머와 같은 다수의 태그된 압타머들이 시료에 사용된다. 본원에 더 기재된 바와 같이, 압타머 친화 복합체의 형성과 압타머 공유결합 복합체로의 전환에 이어, 압타머 공유결합 복합체는 고체 지지체 상에 고정된 다수의 대응 프로브를 통하여 고체 지지체에 부착된다. 압타머 공유결합 복합체는 압타머 공유결합 복합체가 고체 지지체에 부착되기 전 또는 후에 표지 시약과 접촉될 수 있다. 시료 내에 존재하는 표적 분자들은 그 후 압타머 공유결합 복합체 상의 검출 시약을 검출함으로써 검출되고/되거나 정량화된다.

[0129] 본 발명의 다른 양상은 시료를 분석하기 위하여 본원에 기재된 임의의 방법을 알맞게 수행하는데 유용한 키트에 관한 것이다. 본 발명의 다목적성(versatility)을 강화시키기 위하여, 시약은 시약의 비율이 방법 및 검정의 실질적인 최적화를 제공하기 위한 동일 또는 개별 용기에 패키징된 조합으로 제공될 수 있다. 시약은 각각의 개별 용기에 담겨질 수 있거나, 여러 시약들은 시약의 교차 반응성 및 안정성에 의존하여 하나 또는 그 이상의 용기에 조합될 수 있다.

[0130] 키트는 적어도 하나의 태그된 압타머; 적어도 하나의 프로브를 포함하는 고체 지지체; 및 적절한 표지 시약을 패키징된 조합 내에 포함한다. 상기 키트는 또한 어레이 세척, 샘플 준비 시약 등 뿐만 아니라 샘플 희석을 위한 완충된 수성 매질(aqueous medium)도 포함할 수 있다. 키트 내 다양한 시약의 상대적 양은 검정 중에 발생할 필요가 있는 반응을 실질적으로 최적화시키고 검정의 민감도를 실질적으로 최적화시키는 시약의 농도를 제공하기 위해 크게 달라질 수 있다. 적절한 환경 하에서, 키트 내의 하나 또는 그 이상의 시약들은 첨가제를 포함하는 일반적으로는 감압하에 동결건조된 건조 분말로서 제공될 수 있고, 이것의 용해는 본 발명에 따른 방법 또는 검정을 수행하기 위한 적절한 농도를 가지는 시약 용액을 제공할 것이다. 상기 키트는 본원에 기재된 것과 같은 본 발명에 따른 방법의 설명서를 더 포함할 수 있다.

[0131] 대표적 실시예에서, 시료에 존재할 수 있는 하나 또는 그 이상의 표적 분자의 검출 및/또는 정량을 위한 키트는 표적 분자에 대하여 특이적인 친화력을 가지는 적어도 하나의 압타머를 포함하고, 태그; 표지 시약 및 고체 지지체를 포함하며, 여기에서 상기 고체 지지체는 고체 지지체 상에 배열된 적어도 하나의 프로브를 포함하고, 여기에서 상기 프로브는 압타머 상의 태그와 결합할 수 있다.

실시예

[0146] 하기의 예는 단지 실례를 목적으로 제공되며, 추가된 청구항에 정의된 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0147] **실시예 1 : 검출 및 정량을 위하여 고체 지지체 상에 고정화된 프로브에 의한 혼성화 포획을 사용하여 버퍼에 연속 희석된 VEGF 및 혈장을 측정하는 광압타머 검정법**

[0148] 이 실시예는 도 2A, 2B 및 2C에 도시한 단일 광압타머 및 그것의 표적 단백질에 대한 검정법의 단계를 나타낸다. 상기 검정법은 두개의 서로 다른 시료, 버퍼 및 혈장을 사용하여 수행하였다.

[0149] A. 올리고뉴클레오타이드 제조

[0150] 이 실시예에서는 광압타머의 3' 말단 상에 DNA 올리고뉴클레오타이드 태그가 포함된 것을 사용하였다. 이 경우, 상기 태그는 SELEX 프로토콜 동안에 사용된 3' 고정 영역(3' fixed region)이다. 전형적인 합성장치(synthesizer)를 사용하여 고체 지지체 상에 포스포라미다이트 DNA 합성(phosphoramidite DNA synthesis)을 위한 표준 프로토콜을 사용하여 VEGF 광압타머 509-80을 합성하였다. 광압타머를 함유하는 5-BrdU를 절단하고, 70°C에서 5시간 동안 1:1:2의 비율로 t-부틸아민:메탄올:물을 사용하여 DNA 합성에서의 표준 조건 보다 온화한 조건으로 비보호하여, 여과하고 건조를 위해 증발시켰다. 상기 압타머를 에탄올 침전을 사용하여 정제하고, 역상 HPLC(reverse-phase HPLC)를 수행하였다. DNA 프로브들은 광압타머 상의 태그에 상보적이고, 상기에 기재된 것과 같이 합성된 아민 반응기를 포함하며, DNA에 대한 표준 프로토콜을 사용하여 절단되고 비보호되었다. 상기 프로브를 에탄올 침전만을 사용하여 정제하였다.

[0151] B. 아민 반응 표면 상의 포획 프로브의 고정화

- [0152] 포획 태그의 역-상보서열을 5'-아민을 사용하여 상기에 기재된 것과 같이 합성하고, 2006년 3월 14일 출원된 국제출원번호 제PCT/US2006/008877호(WO 2006/101798; "Polymer Compound for Biochemical Use and Biochip Substrate Using Such a Polymer Compound")에 더 기재되어 있으며 본원에서는 "메타크릴레이트 공중합체 표면(methacrylate copolymer surface)"으로 언급된 메타크릴레이트 공중합체로 코팅된 시클릭-올레핀 공중합체(cyclic-olefin copolymer; COC) 기질로 구성된 아민 반응성 슬라이드에 결합시켰다. 포획 프로브의 마이크로어레이를 표면 상에 프린트하였다. 간단히 말하면, 포획 프로브를 함유하는 아민을 표면에 묻힌 활성 에스테르기와 반응시켰다. 포획 프로브를 300mM 인산 나트륨, 25mM 붕산 나트륨(21℃에서 pH 9.5), 0.01% 트윈® 20(Tween® 20) 및 1mM 4-디메틸아미노피리딘(4-dimethylaminopyridine; DMAP)로 이루어진 버퍼에 20 μM로 희석하였다. 진머신즈 옴니그리드 악센트 마이크로어레이(GeneMachines OmniGrid Accent microarrayer)를 이용하여 포획 프로브를 어레이 내 슬라이드 표면상의 세군트에 250pL 스폿으로 두었다. 배열된 슬라이드를 상온에서 1시간 동안 65%의 습도에서 배양한 후 65℃에서 1시간 동안 배양하고, 마지막으로 상온에서 하루동안(over night) 배양하였다. 남아있는 아민 반응기를 20mM NaOH에 5분간 가수분해시키고, 물로 10번 세척한 후, N₂ 스트림 하에서 건조시켰다. 이용 전, 슬라이드를 상온의 어두운 탈수 챔버 내에 보관하였다.
- [0153] VEGF 압타머 509-80을 100 μL의 검정 용액(1XSB17 (40mM HEPES, 102mM NaCl, 5mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA), 0.1% 트윈® 20, 0.05% BSA, 100 μg/mL 청어 정액 DNA) 또는 10% 혈장(1XSB18(40mM HEPES, 102mM NaCl, 5mM KCl, 5mM MgCl₂), 200 μg/mL 청어 정액 DNA, 0.1% 트윈® 20)에서 5nM에서 1.6pM 까지 시리즈로 희석된 표적 단백질 VEGF와 함께 1nM 농도로 배양하였다. 샘플들을 부드럽게 혼합하고, 37℃에서 30분간 배양하였다. 샘플들을 엑시머레이저(Tui Laser ExciStar S200, 10ns pulse length μ, 200Hz, 0.8mJ per pulse)에 의해 전달되는 1줄의 308nm의 빛으로 방사선 조사하였다. 각 샘플에 DMSO에 10mg/mL로 녹인 1 μg의 석시니미달-알렉사 647를 첨가함으로써 염색을 시작하였다. 상기 용액을 혼합하고 4℃에서 하루동안 반응시켰다. 5 μL의 10% BSA를 첨가하고 2시간 동안 배양함으로써 상기 염색 반응을 중단시켰다. 마지막으로, 18 μL의 5M NaCl과 4.5 μL의 10% 트리톤(Triton)을 90 μL의 10% 혈장 샘플에 첨가하고, 18 μL의 5M NaCl과 0.9 μL의 10% 트리톤을 90 μL의 버퍼 샘플에 첨가하였다. 고정화된 프로브를 함유하고 16개의 웰을 가지는 슬라이드에 그레이스 프로플레이트 개스킷(Grace Proplate gasket)을 부착하였다. 각각의 웰에 600 μL의 5M NaCl, 30 μL의 10% 트리톤 및 3mL의 검정 용액으로 구성된 80 μL의 용액을 넣어 42℃에서 15분간 배양하였다. 그 후 이 용액을 제거하고, 80 μL의 샘플로 교체하였다. 상기 웰을 마이크로셀 'F'(Microseal 'F') 필름으로 봉하고, 상기 슬라이드를 에펜도르프 써모믹서 R(Eppendorf Thermomixer R) 상에서 3시간 동안 37℃에서 600rpm으로 혼합하였다. 상기 혼성화 용액을 제거하고, 상기 웰을 SB17, 0.5% 트리톤, 100 μg/mL 청어 정액 DNA(herring sperm DNA) 및 1M NaCl로 구성된 용액으로 3번 세척하였다. 그 후 개스킷을 제거하고, SB17, 0.5% 트리톤 및 1M NaCl로 구성된 30mL의 용액을 넣은 팍모양 병(pap jar)에 전체 슬라이드를 30분간 놓아둔 후, 1XSB17, 0.05% 트윈® 20으로 2분간 세척하고, 0.5XSB17로 30초간 세척하였다. 상기 슬라이드를 N₂ 스트림 하에서 건조시키고, TECAN LS300 형광 스캐너(TECAN LS300 fluorescent Scanner; 여기 633nm/방사 670nm)로 스캔하였다. 마이크로어레이 이미지를 처리하기 위한 표준 기술을 사용하여 특성을 분리하고 그것들의 표준 세기를 계산하기 위하여, 얻어진 TIF 이미지를 이미징 리서치사(Imaging Research, Inc.)의 어레이비전 소프트웨어(ArrayVision Software)를 사용하여 분석하였다.
- [0154] 그 결과를 도4에 나타내었으며, 여기에서 버퍼(도 4A) 및 혈장(도 4B)의 결과는 VEGF 압타머 포획 프로브에 대하여 상기에 기재된 바와 같이 정량화하였다. 각각의 반응으로부터 단백질을 포함하지 않는 버퍼 대조군을 뺌으로써 얻어진 두 매질에서의 연속 희석에 대한 선형 반응(linear response)은 VEGF 농도에서 2pM 에서 5nM 까지를 포함한다.
- [0155] **실시예 2 : 버퍼에서의 다중 표적 단백질의 검출 및 정량화를 위하여 표면 상에 고정화된 프로브에 의한 혼성화 포획을 사용한 광압타머 검정법**
- [0156] 이 실시예는 버퍼에서 10개의 광압타머 및 그것들의 표적 단백질을 이용한 다중 형식으로 도 2A, 2B 및 2C에 도시한 바와 같은 검정법의 단계를 나타낸다.
- [0157] **A. 태그된 광압타머의 제조**

- [0158] 고유의 올리고뉴클레오타이드 태그를 애피메트릭스 유전자칩® 테스트3 어레이(Affymetrix GeneChip® Test3 Array)로부터 얻어진 한 세트의 유전자 발현 프로브의 역-상보서열로부터 각각의 광압타머에 지칭하였다. 아민기를 광압타머의 5' 말단에 첨가하는 것을 제외하고는 실시예 1에 기재된 것과 같이 태그된 광압타머를 제조하였다. 이용 전, 압타머 용액을 95℃에서 3분간 가열한 후, 1초당 0.1℃의 비율로 37℃까지 제어냉각(controlled cooling)시켰다.
- [0159] **B. 아민 반응 표면 상의 포획 프로브의 고정화**
- [0160] 프로브에 대해 3' 아민을 사용하고, 0.0025% 트윈® 20을 사용함과 동시에 DMAP를 프린트 버퍼(print buffer)로부터 제거하는 것을 제외하고는, 포획 태그의 역-상보서열을 실시예 1에 기재된 것과 같이 고정화시켰다. 프린트된 슬라이드를 2시간 동안 65℃에서 배양하고, 데시케이터에 하룻동안 보관하였다. 그 후, 비결합된 프로브를 제거하고 표면상의 과다 활성 에스테르기를 소멸시키기 위하여, 슬라이드들을 메톡시 에틸 아민(37℃에서 pH 0.5) 용액으로 처리하였다.
- [0161] 상기 검정법은 도 2A, 2B 및 2C에 약술한 도식을 따른다. 실시예 1에 기재된 기초 프로토콜을 사용하였다. 그러나, 41개의 광압타머를 복합체를 형성하게 하고, 이러한 압타머들의 서브셋(subset)에 대한 10개의 표적 단백질을 샘플로 연속 희석하였다. 이 샘플에서 정량화된 단백질:광압타머는 bFGF:6-7, ERBB4:1797-38, IL-1, R4:1472-3, MCP-3:851-90, PAI-1:1921-52, TIMP-1:90536, tPA:987-51, uPA:1-1162-70, VEGF:509-80, VEGF sR2:1546-23을 포함한다.
- [0162] 각각 2nM의 농도에서 41개의 광압타머들을 100 µL의 검정 버퍼(SB17, 0.1% 트윈® 20)에서의 10개의 표적 단백질과 단백질이 첨가되지 않은 대조군의 6차 연속 희석물과 함께 37℃에서 30분간 배양하였다. 상기 샘플에 방사선 조사를 하였고, 2.1 µL의 석시니미딜-알렉사647을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1에 기재된 것과 같이 염색하였으며, 상기 반응물을 어두운 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 25 µL의 5M NaCl, 5 µL의 트리톤 X-100, 13.5 µL의 100mM 글라이신 및 1.5 µL의 10mg/mL의 청어 정자 DNA를 첨가함으로써 상기 염색 반응을 중단시키고, 어두운 상온에서 40분간 배양시킨 후 70℃에서 2분간 배양하였다. 혼성화 전에, 혼성화 프로브가 배열된 개스킷된 슬라이드들을 실시예 1에 기재된 것과 같이 제조하였다. 전-혼성화 용액을 제거하고, 혼성화 샘플을 웰에 첨가한 후 항습기(humid chamber)에서 2시간 동안 45℃에서 배양하였다. 상기 혼성화 용액을 제거하고, 상기 웰을 1XSB17, 0.33% 트리톤 X-100 및 1M 구아니디늄 하이드로클로라이드(guanidinium hydrochloride)로 구성된 45℃의 세척 용액으로 3번 세척하였다. 그 후, 개스킷을 제거하고, 각각의 전체 슬라이드를 45℃에서 20분간 세척 버퍼를 넣은 펌프용 병에 놓아둔 후, 1XSB17, 0.1% 트윈® 20으로 2분간 세척하고, 0.25XSB17로 마지막 세척을 하였다. 상기 슬라이드를 실시예 1에 기재된 것과 같이 건조시키고, 스캔하고 정량화하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었으며, 상기 도면은 10개의 표적 단백질에 대하여 버퍼 내의 10 pM에서 1nM까지의 단백질 농도에 대한 다중화된 검정으로부터 생성된 시그널을 나타낸다.
- [0163] **실시예 3 : 세럼에서의 다중 표적 단백질의 검출 및 정량화를 위하여 표면 상에 고정화된 프로브에 의한 혼성화 포획을 사용한 광압타머 검정법**
- [0164] 이 실시예는 혈청 샘플에서의 측정을 위하여 57개의 광압타머를 사용한 다중화된 형식으로 도 2A, 2B 및 2C에 나타낸 검정법의 활용을 설명한다.
- [0165] **A. 태그된 광압타머의 제조**
- [0166] 실시예 2에 기재된 것과 같이 태그된 광압타머를 제조하였다.
- [0167] **B. 아민 반응성 표면 상의 포획 프로브의 고정화**
- [0168] 포획 태그의 역-상보서열을 실시예 2에 기재된 것과 같이 고정화시켰다.
- [0169] 다중화를 위하여 57개의 광압타머를 두 세트, 인간의 혈청 또는 혈장에서 미량으로 존재하는 표적에 대한 27개의 압타머와 다량으로 존재하는 표적에 대한 30개의 압타머로 나누었다. 14개의 혈청 샘플을 2배 희석하여 제조하고, 두 세트의 압타머와 혼합하여 각 압타머에 대하여 1nM의 최종 농도가 되게 하였고, 27개의 압타머 세트에 대하여 10% 혈청, 0.9XSB1m 0.1% 트윈® 20, 50mg/mL lghs DNA, 10mg/mL (BrdU)₃₀ 으로 1nM의 최종 농도가 되게 하였고, 30개의 압타머 세트에 대하여 1% 혈청, 0.99XSB1, 0.1% 트윈® 20, 5mg/mL lghs DNA, 1mg/mL

(BrdU)₃₀ 으로 1nM의 최종 농도가 되게 하였다. 상기 샘플을 실시예 2에 기재된 것과 같이 평형화시키고, 교차결합시키고 염색하였다. 10 μ L의 10% 저지방산(FA) BSA, 25 μ L의 5nM NaCl, 5 μ L의 10% 트리톤 X100 및 7 μ L의 100mM 글리신을 첨가하고, 상온에서 40분간 배양함으로써 상기 염색반응을 중단시켰다. 퀀칭 후, 1.5 μ L의 10% SDS를 첨가하고, 샘플을 2분간 45℃에서 가열하였다.

[0170] 개스킷된 슬라이드를 실시예 1에 기재된 것과 같이 제조하고, 1XSB1, 0.1% 트윈[®]20, 0.66% 저지방산 BSA, 830mM NaCl, 0.33% 트리톤 X-100, 0.1% SDS, 50mg/mL의 큰 청어 정액 DNA 및 10mg/mL (BrdU)₃₀ 을 사용하거 15분간 배양하였다. 상기 전혼성화 용액을 제거하고, 염색된 샘플을 2시간 동안 60℃의 항습기에서 배양하였다. 혼성화 후, 상기 슬라이드들을 실시예 2에 기재된 것과 같이 세척하고, 건조시키고, 스캔하고, 정량화하였다.

[0171] 도 6은 두개 각각으로부터 혈청 샘플에 대한 57개의 광압타머의 반복 측정에 대한 스캔된 이미지로부터의 정량화된 시그널을 나타낸다. 상기 측정결과는 반복된 샘플간의 압타머 측정에 대하여 0.99 보다 더 나은 상관계수를 가지며, 매우 재현가능성이 높음을 나타낸다.

[0172] **실시예 4 : 표면에 고정화된 프로브에 의한 혼성화 포획을 이용한 광압타머 검정법에서 희석을 이용한 동적 유발**

[0173] 이 실시예는 동적 유발 후 자유 단백질의 제거에 대한 도 3에 도식화된 검정법에서의 두개의 선택적 단계의 용도를 나타낸다. 희석에 의해 달성되는 동적 유발은 혈장에서 압타머-표적 친화성 복합체의 유지성(retention)을 가지는 압타머-단백질 비특이적 복합체의 소실을 나타낸다. 이 실시예는 또한 희석 후에 샘플을 농축시키고 염색 전에 자유 단백질을 제거하기 위한 비드 포획의 용도를 나타낸다.

[0174] **A. 태그된 광압타머 987-51의 제조**

[0175] 실시예 2에 기재된 것과 같이 태그된 광압타머를 제조하였다.

[0176] **B. 아민 반응성 표면 상의 포획 프로브의 고정화**

[0177] 포획 태그의 역-상보서열을 실시예 2에 기재된 것과 같이 고정화시켰다.

[0178] 20nM의 농도에서 광압타머 987-51을 두개의 단백질을 첨가하지 않은 대조군과 혼합시키고, 검정 버퍼(SB17, 0.1% 트윈[®]20) 또는 혈장(SB18, 0.1% 트윈[®]20에 용해시킨 10% 혈장) 중 하나에서 표적 단백질 tPA의 농도를 10배 연속으로 희석하였다. 동적 유발 없는 반응을 평가하기 위하여, 버퍼와 혈장 모두에서 하나는 비단백질을 가지고 다른 하나는 가장 높은 단백질 농도를 가지는 두개의 추가 대조 샘플을 제조하였다. 버퍼와 혈장에 대한 각각 14개의 10 μ L의 부피를 가지는 이 28개의 샘플들을 37℃에서 30분간 배양하였다. 버퍼와 혈장 샘플 모두에서 첫번째 12개의 샘플들을 SB17, 0.1% 트윈[®]20을 첨가하여 50배로 희석하고, 5분간 배양시킨 후, 모든 28개의 샘플들을 1J의 UV 빛(OAI Hg lamp filtered light source)으로 방사선 조사하였다. 방사선 조사 후, 버퍼 및 혈장에 남아있는 각각의 2개의 샘플들을 상기에 기재된 것과 같이 50배로 희석하였다.

[0179] 각 샘플들을 1M NaCl로 조절하고, 압타머 987-51의 3' 말단에 대해 상보적인 올리고뉴클레오티드와 결합된 25 μ L의 다이날 상자성 비드(Dynal paramagnetic beads)를 사용하여 45℃에서 90분간 배양하였다. 샘플들을 2분간 1000g에서 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다. 상기 비드를 100 μ L SB17, 0.1% 트윈[®]20을 사용하여 3번 세척하였다. 비드를 100mM 탄화수소 나트륨, 1mM EDTA, 0.02% 트윈[®]20, 0.2mg/mL 알렉사447-NHS 염료로 현탁시키고, 1시간 동안 상온에서 흔들려 섞어주었다. 상기 염색 용액을 제거하고, 염색 반응을 중단시키기 위하여 100 μ L SB17, 0.1% 트윈[®]20, 10mM 글라이신으로 교환하였다. 그 다음, 비드를 70 μ L의 0.33% 트리트론 X-100, 1mg/mL 텍스트란 설페이트에 현탁시킨 100 μ L 부피의 구아니딘 세척 버퍼(SB17, 0.1% 트윈-20, 0.33% 트리톤 X-100, 1M 구아니딘 하이드로클로라이드)로 3번 세척하고, 자성 비드로부터 압타머를 용리시키기 위하여 95℃에서 5분간 가열하였다. 실시예 2에 기재된 것과 같이 개스킷된 슬라이드를 제조하고 전혼성화시켰다. 용리된 압타머를 포함하는 65 μ L의 각 상층액을 25 μ L의 3.6M NaCl, 144mM HEPES, 0.33% 트리톤 X-100을 포함하는 웰로 옮겼다. 상기 슬라이드를 하루동안 45℃의 항습기에서 배양시킨 후, 실시예 2에 기재된 것과 같이 세척하고, 건조시키고, 스캔하고 정량화하였다.

[0180] 도 7은 50배 희석 후의 버퍼(●)와 혈장(▲)에서의 결과에 대한 그래프적 표현을 나타낸다. 희석을 하지 않

은 고단백질 대조 샘플(○:버퍼, △:혈장)로부터 얻은 시그널은 동적 유발 동안에 표적 시그널의 손실이 거의 없음을 나타내는 희석된 값과 완전하게 일치한다. 희석을 한 것과 하지 않은 비단백질 혈장 RFU는 각각 838 RFU(0.1 pM에서 □)과 131 RFU(△)이고, 아마도 동적 유발 동안의 압타머 비특이적 복합체의 제거 때문에 시그널이 84%로 떨어지게 된다.

실시예 5 : 표면상에 고정화된 프로브에 의한 혼성화 포획을 이용한 광압타머 검정법에서 경쟁자를 사용한 동적 유발

이 실시예는 도 3에 도시한 검정법에서 동적 유발을 도입하는 선택적 단계를 나타낸다. 이 실시예에서 경쟁 분자를 첨가함으로써 달성되는 동적 유발은 혈장에서 압타머-표적 친화 복합체를 유지함과 동시에 압타머-단백질 비특이적 복합체의 소실을 나타낸다.

A. 태그된 광압타머 987-51의 제조

실시예 2에 기재된 것과 같이 태그된 광압타머를 제조하였다.

B. 아민 반응성 표면 상의 포획 프로브의 고정화

포획 태그의 역-상보서열을 실시예 2에 기재된 것과 같이 고정화시켰다.

20nM 농도에서 광압타머 987-51을 단백질을 포함하지 않는 대조군과 혼합시키고, SB18, 0.1% 트윈®20으로 희석시킨 10%의 혈장으로 표적 단백질 tPA의 농도를 6번 연속으로 희석하였다. 경쟁자를 첨가 여부에 따른 샘플간의 비교를 용이하게 하기 위하여 두 세트의 샘플을 제조하였다. 각각의 용액을 37℃에서 30분간 배양하였다. 30분간의 평형화 후, 한 세트로부터의 각 샘플의 반을 37℃에서 SB17, 0.1% 트윈®20에 용해시킨 동일한 부피의 550 μM dN₁₅ 경쟁자에 첨가하고 9분간 배양한 후, 실시예 4에 기재된 것과 같이 방사선 조사하였다. 방사선 조사 후, 동일한 부피의 경쟁자 첨가를 위하여 SB17, 0.1% 트윈®20을 경쟁자를 첨가하지 않은 샘플 세트에 첨가하였다. 상기 샘플을 배양 시간이 2시간인 것을 제외하고는 실시예 4에 기재된 것과 같이 염색하였다. 45 μL의 0.83M NaCl, 0.33% 트리톤 X-100, 0.1mg/mL의 큰 청어 정액 DNA 및 9mM 글라이신의 첨가로 상기 염색 반응을 중단시켰다. 상기 샘플을 혼합시키고, 어두운 실온에서 40분간 배양한 후, 70℃에서 2분간 가열하였다.

게스킷된 슬라이드를 실시예 2에 기재된 것과 같이 제조하고, SB18, 0.1% 트윈®20, 0.33% 트리톤 X-100 및 100 μg/mL의 큰 청어 정액 DNA 용액으로 배양하였다. 샘플들을 슬라이드 웰에 첨가하고, 하루동안 45℃의 항습기에서 배양한 후, 실시예 2에 기재된 것과 같이 세척하고, 건조시키고, 스캔하고 정량화하였다.

경쟁자 첨가 여부에 대하여 혈장 내 tPA에 대한 용량 반응 곡선이 존재하는 경우의 결과를 도 8에 나타내었다. 단백질을 첨가하지 않은 혈장 값은 경쟁자 첨가 때문에 70%로 감소하였으며, 여기에서 가장 높은 표적 농도에 대한 반응은 경쟁자의 존재에서도 변하지 않았다.

실시예 6 : 표면상에 고정화된 프로브에 의한 혼성화 포획을 이용한 광압타머 검정법에서 압타머 친화 복합체의 비드 포획과 세척을 이용한 동적 유발

이 실시예는 도 3에 도시한 검정법에서 동적 유발 도입의 선택적 단계를 나타낸다. 이 실시예에서 동적 유발은 비드 상의 압타머 친화 복합체를 포획하고, 교차 결합 전에 분리된 표적 단백질을 제거하기 위하여 고정화된 복합체를 세척함으로써 달성된다.

A. 태그된 광압타머 987-51, 1152-46 및 1920-1의 제조

실시예 2에 기재된 것과 같이 태그된 광압타머를 제조하였다.

B. 아민 반응성 표면 상의 포획 프로브의 고정화

포획 태그의 역-상보서열을 실시예 2에 기재된 것과 같이 고정화시켰다.

4nM 농도의 광압타머 987-51, 1152-46 및 1920-1을 각 광압타머의 고유 태그 서열에 대하여 상보적인 8nM 농도의 비오틴화된 프로브와 함께 혼합하고, 95℃에서 15초간 배양한 후, 37℃에서 1초당 0.1℃씩 천천히 냉각

시켰다. 0.2nM 광압타머 : 0.4nM 프로브의 농도로 된 광압타머 : 비오틴화된 프로브 복합체를 단백질을 첨가하지 않은 대조군 그리고 검정 버퍼(SB17, 0.1% 트윈®20) 또는 혈장(SB18, 0.1% 트윈®20에 용해시킨 10% 혈장) 중 하나에 표적 단백질 tPA, PAI-1 및 IL-6를 6 연속 희석한 희석물과 함께 혼합하였다. 버퍼와 혈장에 대하여 각각 7개씩, 100 µL 부피의 14개의 샘플을 37℃에서 30분간 배양하고, 각각의 샘플에 다이날 마이원 스트렙타비딘 비드(Dynal MyOne Streptavidin beads)를 첨가한 후, 비공유적 광압타머:비오틴화된 프로브:단백질 복합체를 포획하기 위하여 혼합하면서 37℃에서 2분간 배양하였다. 상기 비드를 100 µL SB17, 0.1% 트윈®20, 0.1mg/mL 청어 정액 DNA를 사용하여 30초 동안 3번 세척하고, 상기와 동일한 100 µL의 용액에 현탁시키고, 혼합과 함께 4J의 UV 빛(OAI Hg lamp filtered light source)로 방사선 조사하였다.

[0197] 상기 비드를 100mM 탄산수소 나트륨, 1mM EDTA, 0.02% 트윈®20로 한번 세척하고, 100mM 탄산수소 나트륨, 1mM EDTA, 0.02% 트윈®20, 0.2mg/mL 알렉사647-NHS 염료에 현탁시키고, 1시간 동안 상온에서 흔들어 섞었다. 그 다음, 비드를 100 µL SB17, 0.1% 트윈®20, 0.33% 트리톤 X-100, 1M 구아니딘 하이드로클로라이드, 25mM 글라이신으로 3번 세척하고, 100 µL SB17, 0.1% 트윈®20, 0.33% 트리톤 X-100으로 한번 세척하고, 95 µL의 40mM HEPES, pH 7.5, 0.33% 트리톤 X-100에 현탁시킨 후, 자성 비드로부터 압타머를 용리시키기 위하여 70℃에서 5분간 가열하였다. 실시예 2에 기재된 것과 같이 개스킷 슬라이드를 제조하고 전혼성화시켰다. 용리된 압타머를 포함하는 90 µL의 각 상층액을 30 µL의 40mM HEPES, pH 7.5, 3M NaCl, 0.33% 트리톤 X-100과 혼합시키고, 70℃에서 2분간 배양시킨 후, 각각 110 µL을 슬라이드 웰로 옮겼다. 상기 슬라이드를 하루동안 45℃의 항습기에서 배양하였다. 샘플들을 제거하고, 45℃에서 150 µL SB17, 0.1% 트윈®20, 0.33% 트리톤 X-100, 1M 구아니딘 하이드로클로라이드로 3번 세척하였다. 개스킷된 슬라이드를 분해하여 30mL SB17, 0.1% 트윈®20, 0.33% 트리톤 X-100, 1M 구아니딘 하이드로클로라이드가 든 펌프용기에 놓아두고, 45℃에서 20분간 회전시키면서 혼합하였다. 그 후, 슬라이드를 30mL SB17, 0.1% 트윈®20이 든 펌프용기로 옮기고, 20℃에서 2분간 회전시키면서 혼합한 후, 30mL의 0.2X SB17, 0.02% 트윈®20이 든 펌프용기로 옮겨 혼합하지 않고 15분간 놔둔 후, 실시예 2에 기재된 것과 같이 건조시키고, 스캔하고 정량화하였다.

[0198] 도 9는 버퍼(●)와 혈장(▲)에서의 tPA 압타머 987-51(도 9A), PAI-1 압타머 1152-46(도 9B) 및 IL-6 압타머 1920-1(도 9C)에 대한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 각각의 압타머에 대하여 단백질을 첨가하지 않은 버퍼 RFH 값을 뺀으로써 RFU 값을 보정하였다. 이 압타머들(1pM에서의 △)에 대한 상기 보정된 단백질을 포함하지 않는 혈장 RFU 값은 각각 66, 26 및 49 RFU이다.

[0199] **실시예 7 : 표면상에 고정화된 프로브에 의한 혼성화 포획을 사용한 광압타머 검정법에서 자유 광압타머의 제거**

[0200] 이 실시예는 도 3에 도시한 것과 같이 표면상에서의 혼성화 포획 전에 자유 압타머 제거의 선택 단계를 나타낸다. 상기 자유 압타머를 자유 압타머가 용액 내에 남아있는 동안 K^+ /SDS에 의한 단백질 및 압타머-단백질 공유결합 복합체의 침전에 의해 제거하였다. 자유 압타머를 포함하는 상층액을 버리고, 단계를 완성시키기 위하여 펠릿을 현탁시켰다.

[0201] **A. 태그된 광압타머의 제조**

[0202] 실시예 2에 기재된 것과 같이 태그된 광압타머를 제조하였다.

[0203] **B. 아민 반응성 표면상의 포획 프로브의 고정화**

[0204] 포획 태그의 역-상보서열을 실시예 2에 기재된 것과 같이 고정화시켰다.

[0205] 최종농도 2nM의 압타머(단백질을 포함하지 않는 대조군에 더해서 2nM 내지 0.64pM까지의 연속 희석된 표적 단백질을 포함하도록 실시예 1에 기재된 것과 같이 SB18에서 결합 반응을 수행하였다. 상기 반응물을 37℃에서 30분간 배양하고, 실시예 1에 기재된 것과 같이 방사선 조사하였다. 상기 샘플들을 1.5ml의 에펜도르프 튜브에 옮겨담고, 10 µL의 수집된 혈장을 첨가하였다. 30 µL의 하기 SDS 용액을 각 샘플에 첨가하였다 : 1.33% SDS, 1.33 µg/ml tRNA 및 10mM HEPES(pH 7.5)(400 µL 최종 부피). 상기 샘플들을 10초간 강하게 볼텍싱한 후, 37℃에서 10분간 배양하였다. 6 µL의 2.5M KCl을 각 반응물에 첨가하고, 상기 샘플들을 10초간 강하게 볼텍싱한 후, 10분간 얼음에 담가두었다. 마이크로 원심 분리기에서 4℃에서 5분간 8,000g으로 원심분

리함으로써 침전물들을 펠릿화시켰다. 그 결과 생긴 상층액을 폐기하였다. 상기 펠릿을 차가운 200mM KCl, 10mM HEPES(pH 7.5)를 첨가하여 세척하고, 5초간 부드럽게 볼텍싱하여 혼합하였다. 4℃에서 5분간 8,000g으로 원심분리함으로써 침전물을 다시 펠릿화시켰다. 상층액을 폐기하였다. 각 펠릿을 200 μL의 따뜻한(>37℃) 1mM EDTA, 10mM HEPES(pH 7.5)에 현탁시켰다. 실시예 4에 기재된 상자성 비드를 각 샘플에 첨가하고, 비드 현탁액을 50℃에서 30분간 강하게 혼합하였다. 마이크로웰 플레이트 자석(magnet)을 사용하여, 상기 비드를 100 μL SB17, 0.1% 트윈[®]20 버퍼로 3번 세척하였다. 상기 비드를 0.2mg/ml의 아민 반응성 NHS-알렉사647을 포함하는 카보네이트 버퍼(pH 8.5)에 현탁시키고, 지속적으로 혼합하면서 25℃에서 60분간 배양하였다. 실시예 4에 기재된 것과 같이 상기 반응을 중단시키고, 상기 비드를 세척하고, 압타머를 용리시키고 혼성화시켰다. 실시예 1에 기재된 것과 같이 슬라이드들을 스캔하고 정량화하였다.

[0206] 도 10은 자유 압타머를 제거한 것과 제거하지 않은 샘플에 대한 결과를 나타낸다. 샘플을 프로브에 도입하기 전에 비복합된 압타머가 샘플로부터 제거된 경우 시그널이 더 높다.

[0207] **실시예 8 : 압타머 친화 복합체로부터의 시그널에는 영향을 주지만 압타머 공유결합 복합체에는 영향을 주지 않는 조건 하에서의 UPS 검정 시그널의 생성**

[0208] 이 실시예는 복합체가 고체 지지체 상의 프로브에 혼성화되는 동안 세척제 및 높은 염농도가 사용될 때, 광압타머에 대한 표적 분자의 공유적 부착의 효과를 나타낸다. 여기에서 광활성화에 의해 매개된 공유적 교차결합에 의하여 수행된 검정 및 공유적 교차 결합 없이 수행된 검정 결과 모두를 혈장 샘플과 버퍼에 용해시킨 bFGF를 포함하는 샘플과 비교하였다.

[0209] **A. 태그된 광압타머 6-7의 제조**

[0210] 이 실시예에서 사용된 올리고뉴클레오타이드 태그는 SELEX 프로토콜 동안 사용된 3' 고정 영역이다. 실시예 1에 기재된 것과 같이 bFGF 광압타머 6-7을 합성하였다.

[0211] **B. 아민 반응성 표면 상의 포획 프로브의 고정화**

[0212] 포획 태그의 역-상보서열을 실시예 1에 기재된 것과 같이 고정화시켰다.

[0213] 1nM의 6-7을 실시예 1에 기재된 것과 같이 버퍼와 혈장 결합 용액으로 제조하였다. 10nM의 bFGF 단백질을 버퍼 샘플에만 첨가하였다. 상기 샘플들을 부드럽게 혼합하고, 37℃에서 30분간 배양하였다. 한 세트의 샘플을 실시예 1에 기재된 것과 같이 방사선 조사하고, 다른 한 세트의 샘플은 방사선 조사를 하지 않았다. 그 후, 샘플들을 상온에서 3시간 반응시킨 후, 10 μL의 BSA, 25 μL의 5M NaCl 및 5 μL의 10% 트리톤 X-100을 첨가하고 2시간 배양한 것을 제외하고는 실시예 1에 기재된 것과 같이 염색하였다. 슬라이드를 실시예 1과 같이 제조하고, 42℃에서 15분 동안 80 μL의 전혼성화 용액(2mL의 샘플 버퍼에 대하여 500 μL의 5M NaCl 및 100 μL의 10% 트리톤)을 각 웰에 첨가하였다. 상기 전혼성화 용액을 제거하고, 80 μL의 샘플로 교환하였다. 상기 웰을 마이크로웰 'F' 필름으로 봉하고, 그 후 슬라이드를 에펜도르프 써모믹서 R 상에서 40℃에서 2시간 동안 600rpm으로 혼합한 후, 35℃에서 20분간 혼합하였다. 상기 웰을 1XSB17, 0.5% 트리톤, 1M NaCl로 두번 세척한 후, 15분 동안 두번 세척하여 배양하였다. 혼성화 후, 슬라이드를 15분, 2분 및 30초 동안 3번 세척한 것을 제외하고는 실시예 1에 기재된 것과 같이 처리하였다. 실시예 1에 기재된 것과 같이 슬라이드를 건조시키고, 스캔하고 정량화하였다.

[0214] bFGF 광압타머 6-7에 대한 결과를 도 11에 나타내었다. 버퍼와 10% 혈장에 용해시킨 10nM bFGF에 대해 얻어진 시그널은 빛에 좌우됨을 보여주었다. 광압타머에 대한 표적의 공유적 부착이 일어날 수 없는 경우, 빛을 조사하지 않은 샘플상의 시그널은 여기에서 "일반적인 백그라운드(general background)"라 불리는 특성의 외부에서 발견된 시그널에 필적한다. 10% 혈장에서 bFGF의 내생적 농도는 빛을 조사하지 않은 것과 일반적인 백그라운드 반응에 대한 혈장 내의 작은 시그널을 반영하는 것으로서 매우 낮다.

[0215] **실시예 9 : 버퍼에서의 5-벤질-dT 및 5-브로모-dC 뉴클레오타이드로 이루어져 있는 DNA 광압타머에 교차결합된 C4b의 검출**

[0216] 이 실시예는 도 2A, 2B 및 2C에 나타난 검정 형식에서 변경된 뉴클레오타이드를 포함하는 광압타머의 활성을 나타낸다. 단백질 C4b에 대한 DNA 광압타머(1987-74)는 표준 dT 및 dC를 대신하여 5-벤질-dT 및 5-브로모-dC

뉴클레오티드로 이루어져 있다.

[0217] **A. 태그된 광압타머 1987-74의 제조**

[0218] 압타머 고정 영역에 대해 특이적인 프라이머를 사용하여 압타머 서열을 포함하는 벡터 삽입물을 PCR에 의해 대장균 세포로부터 증폭시켰다. 마이원-스트렙타비딘 비드 상의 PCR 산물을 포획할 수 있도록 3' 프라이머를 비오틴화시켰다. 세척한 후, 포획된 중복부위(duplex)의 비오틴화되지 않은 가닥을 20mM NaOH 세척으로 제거하고, 5' 프라이머 서열과 결합된 고유의 포획 태그를 가지는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 프라이머 확장에 의해 압타머를 만들었다. 변경된 뉴클레오티드를 통합시키기 위하여 KOD DNA 폴리머라아제를 사용하여 dATP, 5-Br-dCTP, dGTP 및 5-벤질-dUTP를 포함하는 혼합물에서 스트렙타비딘 비드와 여전히 결합되어 있는 주형 DNA를 사용한 프라이머 확장을 수행하였다. 20mM NaOH 세척으로 비드로부터 압타머를 수집하고, HCl로 중성화시켰다.

[0219] **B. 아민 반응성 표면상의 포획 프로브의 고정화**

[0220] 포획 태그의 역-상보서열을 실시예 1에 기재된 것과 같이 고정화시켰다.

[0221] 최종 농도 2nM의 1987-74를 하기의 농도에서 SB17, 0.1% 트윈®20으로 용해시킨 다양한 희석 비율로 제조된 C4b 단백질을 사용하여 배양하였다 : 25nM, 5nM, 1nM, 0.2nM, 0.04nM 및 단백질을 첨가하지 않은 대조군. 상기 샘플을 평형화시키고, 실시예 1과 같이 방사선 조사한 후, 2 µL의 청어 정액 DNA(10mg/mL)를 첨가하였다. 각 샘플에 7.5 µL NHS-알렉사-647(DMSO에 용해시킨 1.33mg/mL)을 첨가함으로써 C4b 단백질을 형광으로 표지하고, 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 비반응된 표지를 없애고, 비공유성 상호반응을 깨고, 후속 혼성화를 용이하게 하기 위하여, 25 µL의 5M NaCl, 5 µL의 10% 트리톤-100 및 1 µL의 100mM 글리신을 첨가하였다.

[0222] 실시예 1에 기재된 것과 같이 개스킷된 슬라이드를 제조하고, SB17, 0.1% 트윈®20, 0.8M NaCl, 20 µg/mL 청어 정액 DNA 및 0.33% 트리톤 X-100을 포함하는 용액을 사용하여 42°C에서 15분간 배양하였다. 용액을 제거한 후에, 서브어레이 당 하나의 슬라이드에 80 µL의 표지된 샘플을 첨가하고, 42°C에서 30분간 회전 플랫폼 상에서 배양하였다. 샘플들을 제거하고, 전혼성화 용액으로 두번 세척하고, 청어 정액 DNA 또는 트윈®20이 첨가되지 않은 전혼성화 용액으로 한번 세척하고, 1XSB17, 0.1% 트윈®20으로 한번 세척하고, 0.25XSB17로 한번 세척하였다. 그 후, 실시예 1에 기재된 것과 같이 슬라이드를 건조시키고, 스캔하고 정량화하였다.

[0223] 도 12는 검정에서 변경된 뉴클레오티드 압타머의 활성을 나타내는, 표적 농도의 작용으로 얻어진 1987-74의 용량 반응 곡선의 결과를 나타낸다.

[0224] **실시예 10 : 두개의 독립된 염색 방법을 사용한 두개의 서로다른 표면 상에서의 UPS 혼성화 포획 검정법**

[0225] 이 실시예는 서로 다른 조성물, 이전 실시예의 메타크릴레이트 공중합체 표면과 유리 기질 상의 스캇 넥스테리온 아민 반응성 표면(Schott Nexterion amine reactive surface)의 두개의 표면 상에서의 검정의 상관성을 설명한다. 추가로, 알렉사-647을 표적 단백질에 직접 부착하거나 비오틴으로 표적 단백질을 1차로 태깅하고 스트렙타비딘-647로 표지함으로써 표적 단백질 염색 반응을 이전의 실시예와 같이 수행하였다. 상기 검정은 표면 또는 염색 방법을 사용하여 버퍼내에서 VEGF 단백질의 정량적 검출을 가능하게 한다.

[0226] **A. 태그된 광압타머 509-80의 제조**

[0227] 실시예 1에 기재된 것과 같이 태그된 광압타머를 제조하였다.

[0228] **B. 아민 반응성 표면상의 포획 프로브의 고정화**

[0229] 5' 아민을 가지는 포획 프로브를 실시예 1에 기재된 것과 같이 합성하고, 두개의 표면에 고정화시켰다. 300mM 인산 나트륨(pH 8.5), 0.005% 트윈®20 및 0.001% 사르코실(sarkosyl)로 구성된 버퍼에 40 또는 20 µM로 프로브를 용해시킴으로써 스캇 넥스테리온 슬라이드 상의 고정화를 달성하였다. 포획 프로브를 실시예 1에 기재된 것과 같이 두었다. 슬라이드에 프로브를 놓은 후에 드라이 박스 내에서 하루동안 배양한 후, 상온에서 100mM 탄산수소 나트륨(pH 8.5) 및 0.1% 트윈®20을 사용하여 8시간 동안 배양하였다. 그 후, 슬라이드를 물로 10번 세척하고, N₂ 스트림 하에서 건조시켰다. 실시예 1에 기재된 프로토콜에 따라 메타크릴레이트 공중합체 표면에 포획 프로브를 고정화시켰다.

- [0230] VEGF 압타머 509-80을 50nM에서 16pM 까지의 6번의 연속 희석된 VEGF 농도와 검정 희석제(SB17, 0.1% 트윈®20, 0.05% BSA, 100 µg/mL 청어 정액 DNA)에 용해시킨 단백질을 포함하지 않는 대조군을 사용하여 100 µL 부피로 1nM 농도에서 배양하였다. 상기 샘플을 부드럽게 혼합시키고, 37°C에서 15분간 배양한 후, 실시예 1에 기재된 것과 같이 방사선 조사하였다. 상기 샘플을 나누고, NHS-알렉사-647을 직접 사용하거나 NHS-PEO₄-비오틴을 사용하여 반응시킴으로써 염색하고, 그 후 스트렙타비딘 알렉사-647을 사용하여 후속적으로 염색하였다. NHS-알렉사-647을 사용하여 염색하기 위해서, 실온에서 4시간 동안 반응시키는 것을 제외한 실시예 1의 방법을 사용하였다. NHS-PEO₄-비오틴을 사용한 반응을 위해서, DMSO에 용해시킨 1 µL의 20mM NHS-PEO₄-비오틴을 100 µL의 샘플에 첨가하였다. 상기 용액을 혼합시키고, 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 23 µL의 5M NaCl, 11.4 µL의 10% BSA 및 1.1 µL의 10% 트리톤 X-100을 첨가함으로써 두 염색반응 모두를 중단시키고, 2시간 동안 배양하였다.
- [0231] 두개의 서로 다른 슬라이드들을 실시예 1에 기재된 것과 같이 개스킷시키고, 1XSB17, 0.1% 트리톤 X-100, 0.5% BSA 및 100 µg/mL hs DNA를 사용하여 42°C에서 15분 동안 전혼성화시켰다. 그 후, 상기 용액을 제거하고, 80 µL의 샘플로 교환하였다. 웰을 마이크로셀 'F' 필름으로 봉하고, 슬라이드를 에펜도르프 써모믹서 R 상에서 42°C에서 3시간 동안 600rpm으로 혼합시킨 후, 34°C에서 1시간 동안 혼합시켰다. 샘플들을 NHS-알렉사-647로 직접 표지시키기 위하여, 웰들을 1XSB17, 0.5% 트리톤 및 1M NaCl로 3번 세척하였다. 개스킷을 제거하고, 전체 슬라이드를 30mL의 SB17, 0.5% 트리톤, 1M NaCl이 들은 펌프용기에 30분간 방치한 후, 1XSB17, 0.1% 트윈®20으로 2분 세척하고, 0.25XSB17로 20초간 세척하였다. NHS-PEO₄-비오틴과 반응한 샘플에 대해, 웰들을 1XSB17, 0.1% 트윈®20, 0.5M NaCl, 100 µg/mL 청어 정액 DNA, 0.5% BSA(스트렙타비딘 염색 버퍼)로 3번 세척하였다. 4 µg/mL의 스트렙타비딘 알렉사-647 용액을 스트렙타비딘 염색 버퍼로 제조하고, 80 µL의 이 용액을 37°C에서 15분간 각 웰에 첨가하였다. 그 후, 각 웰을 1XSB17, 0.1% 트윈®20으로 3번 세척하였다. 개스킷을 제거하고, 전체 슬라이드를 30분간 1XSB17, 0.1% 트윈®20이 들은 펌프용기에 방치한 후, 0.25XSB17로 20초간 세척하였다. 슬라이드들을 실시예 1에 기재된 것과 같이 건조시키고, 스캔하고 정량화하였다.
- [0232] 도 13은 단백질 농도의 작용과 같은 용량 반응에 대한 스캇 넥스테리온(도 13A) 및 메타크릴레이트 공중합체 표면(도 13B)에 대한 결과를 나타낸다. 두 표면 모두는 유사한 정량적 결과를 제공하며, 표면은 검정법에 독립적이라는 것을 나타낸다. 두개의 염색 단계들도 마찬가지로 동등하게 효과적이라는 것을 보여준다.
- [0233] **실시예 11 : 코팅된 석영 표면상의 에피매트릭스 유전자칩® 테스트3 어레이 상에 광교차결합된 단백질의 혼성화 포획에 의한 버퍼 및 혈청에서의 표적 단백질 VEGF 및 bFGF의 검출**
- [0234] 이 실시예는 검정법의 혼성화 포획 단계를 위한 또 다른 표면, 에피매트릭스 유전자칩® 테스트3 어레이의 유용성을 설명한다. 검정법은 버퍼와 혈청 모두에서 진행하였다.
- [0235] **A. 태그된 광압타머 509-08 및 6-7의 합성**
- [0236] 에피매트릭스 유전자칩® 테스트3 어레이 상에 201 및 1121로 설계된 두 프로브의 역상보서열을 압타머 509-08 및 6-7로 지정하고, 실시예 1에 기재된 것과 같이 제조하였다.
- [0237] **B. 아민 반응성 표면 상의 포획 프로브의 고정화**
- [0238] 유전자칩® 테스트3 어레이를 현지내(in situ)에서 합성한 프로브와 함께 에피매트릭스로부터 구입하였다.
- [0239] 검정 용액(1XSB17, 0.1% 트윈®20, 0.02% BSA, 100 µg/mL 청어 정액 DNA)에 20nM VEGF 및 bFGF 단백질을 용해시켜 각각 2nM의 농도로 100 µL 부피의 VEGF 압타머 509-80 및 bFGF 압타머 6-7를 제조하였다. 샘플들을 부드럽게 혼합시키고, 37°C에서 60분간 배양한 후, 1시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 실시예 9에 기재된 것과 같이 방사선을 조사하고 NHS-PEO₄-비오틴으로 염색하였다. 10 µL의 10% BSA, 1 µL의 10mg/mL 청어 정액 DNA, 5 µL의 10% 트리톤 X-100 및 25 µL의 5M NaCl을 첨가함으로써 상기 반응을 중단시켰다. 한 샘플이 10%의 혈청 샘플과 유사해지도록 10 µL의 혈청을 첨가하였다.

[0240] 에피매트릭스사로부터의 유전자칩[®] 테스트3 어레이를 100 μ L의 검정 용액(10 μ L의 10% BSA, 1 μ L의 10mg/mL 청어 정액 DNA, 25 μ L의 5M NaCl, 5 μ L의 10% 트리톤 X-100 및 7 μ L의 DMSO)으로 구성된 100 μ L의 용액으로 45°C에서 1시간 동안 배양한 후, 100 μ L의 샘플을 테스트3 어레이 챔버에 첨가하여 45°C에서 60분간 배양한 후, 1XSB1, 0.5% 트리톤 X-100 및 1M NaCl로 구성된 버퍼로 세척하였다. 그 후, 어레이를 표준 에피매트릭스 세척 및 염색 단계를 수행한 에피매트릭스 유전자칩[®] 유체 스테이션(fluidics station) 상에 방치하였다. 그 후, 상기 어레이를 에피매트릭스 스캐너로 판독하고 정량화하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다. 버퍼에서(도 14A), VEGF 압타머는 3500 RFU의 세기를 가지는 프로브 201(도면에서 1로 표기함)와 혼성화되고, bFGF 압타머는 23000 RFU의 세기를 가지는 프로브 1121(도면에서 2로 표기함)와 혼성화된다. 혈청에서(도 14B), VEGF 및 bFGF 압타머에 대한 상대적 세기는 5000(1)과 18000(2)이다.

[0241] **실시예 12 : 탈지우유, 슈퍼블록 또는 염색되지 않은 혈장을 사용한 전차단(pre-blocking)에 의한 코팅된 석영 표면 상의 에피매트릭스 유전자칩[®] 테스트3 어레이의 표면 부동태화(passivation)**

[0242] 이 실시예는 탈지우유, 슈퍼블록 또는 염색되지 않은 혈장을 사용한 차단에 의한 에피매트릭스 유전자칩[®] 테스트3 어레이 상의 혈청 및 혈장 흡착을 위한 표면 부동태화를 예를 들어 설명한다.

[0243] **A. 비오틴화된 올리고뉴클레오타이드의 제조**

[0244] 201, 1121 및 108로 표기된 유전자칩[®] 테스트3 어레이 상에 고정화된 3개의 서로 다른 프로브에 어닐링된 비오틴화된 올리고뉴클레오타이드를 실시예 1에 기재된 것과 같이 제조하였다.

[0245] **B. 혈장 비오틴화**

[0246] 160 μ L의 21mM NHS-PEO₄-비오틴을 1XSB18, 0.1% 트윈[®]20에 용해시킨 100mL의 10% 혈장에 첨가하고, 상기 용액을 2시간 동안 반응시킨 후, 1mL의 100mM 글라이신(pH 7.5)를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 상기 비오틴화된 혈장을 -20°C에 보관하였다.

[0247] 제어 버퍼(control buffer)는 0.75XSB17, 0.1% BSA, 100 μ g/mL 청어 정액 DNA, 0.1% 트윈[®]20 및 0.8M NaCl로 구성된다. 제어 버퍼와 비오틴화된 혈장을 사용하여 10% 비오틴화된 혈장을 제조하였다. 1mL의 10% 비오틴화된 혈장에 50 μ L의 10% 트리톤 X-100, 10 μ L의 10% SDS 및 10 μ L의 10mg/mL 청어 정액 DNA를 첨가하고, 95°C에서 10분간 가열한 후, 200 μ L의 5M NaCl을 첨가함으로써 전처리하였다. 1 μ L의 1000x 비오틴화된 프로브 믹스를 1mL의 제어 버퍼 또는 10% 혈장 중 하나에 첨가하였다.

[0248] 4개의 에피매트릭스 테스트 3 어레이를 1XSB17, 1% BSA, 0.4% 트리톤 X-100, 0.1% SDS, 1M NaCl 및 100 μ g/mL 청어 정액 DNA를 사용하여 배양하였다. PBS, 0.1% SDS 및 0.4% 트리톤 X-100에 현탁시킨 2%의 탈지분유(nonfat dry milk; Nestle Carnation, INSTANT NONFAT DRY MILK) 용액을 사용하여 어레이 B를 차단하였다. 0.1% SDS 및 0.4% 트리톤 X-100에 용해시킨 스타터블록(StarterBlock; PIERCE) 용액을 사용하여 어레이 C를 차단하였다. 0.1% SDS 및 0.4% 트리톤 X-100에 용해시킨 10% 수집된 혈장 용액을 사용하여 어레이 D를 차단하였다. 각각의 차단 용액을 95°C에서 10분간 가열하고, 각 어레이에 첨가하기 전 상온에서 냉각시켰다. 45°C에서 1.5시간 동안 100 μ L의 각 차단 용액을 사용하여 각 테스트3 어레이를 차단하였다. 그 후, 100 μ L의 샘플을 각 어레이에 첨가하였다. 어레이 A는 프로브를 가지는 제어 버퍼를 받아들이고, 어레이 B, C 및 D는 프로브를 가진 10% 혈장을 받아들였다. 상기 어레이들을 45°C에서 45분간 배양하였다.

[0249] 그 후, 챔버를 통해 1mL의 세척액, 1XSB17, 0.4% 트리톤 X-100, 0.1% SDS, 1M NaCl, 1% BSA를 흘려넣어 상기 어레이들을 세척하고, 어레이를 5분간 배양한 후, 챔버를 통해 다시 1mL을 흘려넣고 마지막으로 최종 100 μ L의 새로운 세척액으로 교환하였다. 이러한 순서를 3번 수행하였다. 상기 어레이들을 에피매트릭스 유전자칩[®] 유체 스테이션 상에 놓기 전에 대략 1시간 동안 배양하고, 에피매트릭스 스캐너로 판독하였다.

[0250] 그 결과를 도 15A-D에 나타내었다. 4개의 어레이 상의 일반적인 백그라운드는 40, 300, 400 및 500 RFU로, 여기에서 세개의 비오틴화된 프로브들은 어레이상에서 ~17,000, ~34,000 및 18,000으로 나타났다.

[0251] **실시예 13 : 탈지분유로 전차단된 유전자칩[®] 테스트3 어레이 상에 광교차결합된 단백질의 혼성화 포획에 의**

한 표적 단백질의 검출

- [0252] 이 실시예는 탈지분유로 차단된 코팅된 유리 표면 상의 에피매트릭스 유전자칩[®] 테스트3 어레이 상에서의 표적 단백질 IL-1 R4 및 bFGF의 혼성화 표적을 예를 들어 설명한다.
- [0253] **A. 태그된 광압타머 1472-3 및 6-7의 합성**
- [0254] 에피매트릭스 유전자칩[®] 테스트3 어레이 상에 1364 및 1121로 표기된 2개의 프로브의 역상보서열을 압타머 1472-3 및 6-7로 지정하고, 실시예 1에 기재된 것과 같이 합성하였다.
- [0255] 단백질 쌍(IL-1 R4, bFGF)에 대하여 하기의 최종 농도를 제공하기 위해 10%혈장으로 각각 2nM 농도의 각 압타머 1472-3 및 6-7을 포함하는 4개의 용액을 제조하였다: (0,0), (1nM, 30pM), (100pM, 1nM) 및 (10pM, 100pM). 상기 혈장 희석제는 0.9XSB18, 100 µg/mL 청어 정액 DNA, 5 µg/mL (BrdU)₃₀, 0.1% 트윈[®] 20 및 10% 혈장을 포함한다. 샘플을 37℃에서 30분간 배양하고, 실시예 1에 기재된 것과 같이 방사선 조사하였다. DMSO에 용해시킨 1 µL의 5mg/mL NHS-PEO₄-비오틴을 각 샘플에 첨가하고, 상온에서 2시간 동안 배양한 후, 2 µL의 100mM 글라이신(pH 7.5), 1 µL의 10% SDS 및 5 µL의 10% 트리톤 X-100을 첨가하였다. 그 후, 샘플을 95℃에서 10분간 가열하고, 상온에서 냉각시키고, 10 µL의 10% BSA 및 25 µL의 5M NaCl을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 그 후, 대조 서열로서 1 µL의 100X 프로브-108을 첨가하였다.
- [0256] 어레이 B에 대하여 실시예 11에 기재된 것과 같이 탈지분유 용액을 사용하여 45℃에서 3시간 동안 4개의 테스트3 어레이를 차단시켰다. 그 후, 상기 어레이를 PBS, 0.1% SDS 및 0.4% 트리톤 X-100으로 세척한 후, 1XSB17, 1% BSA, 0.5% 트리톤 X-100, 0.1% SDS, 1M NaCl 및 0.1mg/mL 청어 정액 DNA를 사용하여 45℃에서 20분간 배양하였다. 그 후, 각각의 어레이에 100 µL의 각 샘플을 첨가하였다. 상기 어레이를 45℃에서 45분간 배양하였다. 그 후, 실시예 12에 기재된 것과 같이 상기 어레이를 완성시켰다. 그 결과를 도 16에 나타내었으며, 여기에서 전형 용량 반응은 혈장에서의 표적 모두에서 관찰되었다.
- [0257] **실시예 14 : 루미넥스 세로맵[™] 마이크로스피어(Luminex SeroMap[™] Microspheres) 상에 광교차결합된 단백질의 혼성화 포획에 의한 표적 단백질 C5b,6 복합체, 뉴로트로핀-3 및 트로포닌 I의 검출**
- [0258] 이 실시예는 시료에 존재할 수 있는 표적 단백질을 검출하고 선택적으로 정량하기 위한 고체 지지체로서 루미넥스 세로맵[™] 마이크로스피어의 용도를 설명한다. 이 검정은 버퍼에 표적 단백질을 넣어서 수행하였다. 검출 기기는 루미넥스 100IS 기기 시스템을 사용하였다.
- [0259] 광압타머 2184-64(C5b,6 복합체 압타머), 2273-34(뉴로트로핀-3 압타머) 및 2338-12(트로포닌 I 압타머)로 지정된 아민 말단화(amine-terminated)된 프로브를 EDC(1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카보다이미드 하이드로클로라이드)의 화학적 성질을 이용한 -COOH 기능성 세로맵[™] 마이크로스피어에 결합시켰다.
- [0260] 압타머 3' 말단에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 비오틴화시키기 위하여, 2nM의 최종 검정 농도로 광압타머 2184-64, 2273-34 및 2338-12을 전-어닐링시킨 후, 버퍼 SB17, 0.05% 트윈[®] 20에 169fM 내지 3.33nM의 범위로 단백질 C5b,6 복합체, 뉴로트로핀-3 및 트로포닌 I의 혼합물과 접합시켰다. 한 쌍의 단백질을 첨가하지 않은 대조 검정 샘플을 제조하였다. 100 µL 부피의 이 검정 샘플을 37℃에서 15분간 배양한 후 광교차결합시켰다. 다이날 마이원 스트렙타비딘 비드(400 µg)을 각 검정 샘플에 첨가하고, 광압타머:비오틴화된 올리고 및 단백질-광압타머:비오틴화된 올리고 하이브리드를 포획하기 위하여 혼합하면서 25℃에서 10분간 배양하였다. 상기 비드를 각각 100 µL의 100mM 탄화수소 나트륨, 1mM EDTA, 0.02% 트윈[®] 20 및 10 µM D-비오틴(pH 8.5)를 사용하여 30초간 2번 세척하였다. 이 버퍼의 D-비오틴 성분은 자유 스트렙타비딘 결합 부위를 포화시키기 위한 것이다. 비오틴과 함께 광압타머-결합된 표적 단백질을 표지할 목적으로, 세척된 비드를 100 µL의 100mM 탄화수소 나트륨(pH 8.5), 1mM EDTA, 0.02% 트윈[®] 20 및 150 µM 설포-NHS-LC-비오틴(Pierce Biotechnology)에 현탁시켰다. 이 비오틴화 반응은 지속적으로 혼합하면서 25℃에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후, 비드를 100 µL SB17, 3.14M 구아니딘 하이드로클로라이드, 0.05% 트윈[®] 20으로 3번 세척한 후, 100 µL SB17, 0.33% 트리톤 X-100으로 2번 세척하였다. 세척된 비드를 100 µL의 10 µM D-비오틴, 0.05% 트윈[®] 20, 10mM HEPES, pH 7.5에 현탁시킨 후, 비드가 결합된 상보적 비오틴화된 올리고뉴클레오타이드로부터 광압타

머들을 분리하기 위해 70℃에서 5분간 가열하였다. 각각의 검정 샘플에 대하여, 75 µL의 비드 용리 부피를 25 µL의 하기 고농도 염 버퍼와 합하였다: 4M NaCl, 0.4% 트윈® 20, 160mM Tris-Cl, pH 8.0. SDS(11.25 µL, 20%)를 첨가하고, 각 검정 샘플을 30 µL의 적절한 프로브-결합 세로맵™ 마이크로스피어(프로브 당 1500개의 칼라-암호화된 마이크로스피어, 0.1% 트윈® 20, 1M NaCl, 1.25% BSA, 40mM Tris-Cl, pH 8.0) 혼합물로 옮겼다. 마이크로스피어에 결합된 프로브에 대한 광압타머의 혼성화를 촉진시키기 위하여, 검정 샘플들을 지속적으로 혼합하면서 65℃에서 1시간 동안 배양하였다. 65℃에서, 검정 샘플들을 96-웰 미세역가 진공 여과 플레이트(96-well microtiter vacuum filtration plate)로 옮기고, 마이크로스피어를 65℃에서 200mM NaCl, 0.1% 트윈® 20, 40mM Tris-Cl(pH 8.0)으로 4번 세척하였다. 그 후, 마이크로스피어를 80 µL의 200mM NaCl, 0.1% 트윈® 20, 40mM Tris-Cl(pH 8.0)에 현탁시키고, 96-웰 미세역가 플레이트에 옮겼다. 광압타머-교차결합된 비오틴화된 표적 단백질의 검출이 가능하도록 20 µL의 10 µg/ml 스트렙타비딘-R-피코에리트린(Molecular probes #S866)을 첨가하였다. 37℃에서 15분간의 배양이 끝난 후, 검정 샘플을 표준 루미넥스 기기 시그널(R-피코에리트린) 정량화 프로토콜에 따라 처리하였다.

[0261] 도 17은 C5b,6 복합체 광압타머 2184-64(도 17A), 뉴로트로핀-3 광압타머 2273-34(도 17B) 및 트로포닌 I 광압타머 2338-12(도 17C)에 대한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. MFI(median fluorescence intensity) 값은 각각의 압타머에 대하여 단백질을 첨가하지 않은 대조 MFI 값을 뺀으로써 보정하였다.

[0262] 앞서 서술한 것들은 다양한 실시예 및 예에 관한 발명을 기재한 것이다. 어떠한 특정 실시예, 예 또는 특정 실시예 또는 예의 구성 요소도 어떤 청구항의 중요하고, 필요하거나 필수적인 구성요소 또는 부분으로 해석해서는 안된다. 또한, 본원에 기재된 어떠한 구성 요소도 "필수적인" 또는 "중요한"과 같이 명확히 기재되어 있지 않는 한 본 발명의 실행에 필수적인 것은 아니다.

[0263] 하기에 기재된 것과 같은 본 발명의 범위로부터 벗어나는 일 없이 기재된 실시예에 대하여 다양한 변형 및 치환이 일어날 수 있음을 인식해야 할 것이다. 도면과 예시를 포함하는 명세서는 한정하는 수단이 아니라 예시적인 수단으로 간주되어야 하며, 모든 이러한 변형 및 치환들은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 따라서, 본 발명의 범위는 상기에 주어진 실시예에 의해서가 아닌 청구된 청구항 및 그것들의 법률상 동등체에 의해 결정되어야 한다. 예를 들어, 청구항의 임의의 방법 또는 공정으로 한정된 단계는 어떤 실행가능한 단계로 실행될 수 있으며, 임의의 실시예, 예 또는 청구항에 존재하는 순서로 한정되지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0132] 도 1A 및 도 1B는 시료 내 존재할 수 있는 하나 또는 그 이상의 표적 분자의 검출 및/또는 정량을 위한 예시적인 방법을 나타낸다.

[0133] 도 2A, 2B 및 2C는 시료 내 존재할 수 있는 하나 또는 그 이상의 표적 분자의 검출 및/또는 정량을 위한 예시적인 방법을 나타낸다.

[0134] 도 3은 시료 내 존재할 수 있는 하나 또는 그 이상의 표적 분자의 검출 및/또는 정량을 위한 예시적인 방법을 나타낸다.

[0135] 도 4는 도 2A, 2B 및 2C에 도시된 검정법을 사용한, 버퍼(도 4A) 또는 혈장(도 4B)에서의 VEGF의 연속 희석에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다. 두 경우 모두에서 각 데이터 포인트로부터 단백질을 첨가하지 않은 버퍼의 반응을 뺐다.

[0136] 도 5A 내지 5J는 도 2A, 2B 및 2C에 도시된 검정법을 사용한, 버퍼에서의 41개의 압타머들과 복합된 10개의 표적 단백질들의 연속희석에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다. 상기 세트 내에서 각 데이터 포인트로부터 각 압타머들에 대하여 단백질을 첨가하지 않은 버퍼의 반응을 뺐다. 로그변환된 데이터(log transformed data)에 일치하는 최소제곱의 직선(least-squares line) 또한 그래프로 나타내었다. 단지 직선을 일치시키는데 사용된 데이터 포인트만을 나타내었다.

[0137] 도 6A 및 6B는 도 2A, 2B 및 2C에 약술된 검정법으로부터 얻어진 각각 다른 두개의 혈청 샘플에서의 57개의 광압타머의 반응에 대한 반복 측정을 RFU로 나타낸것이다. 두 반복 측정 모두 0.99 보다 더 큰 피어슨 상관 계수(Pearson correlations) 값을 산출하는 측정된 57개의 표적들에 대하여 매우 우수한 재현가능성을 나타내었다.

[0138] 도 7은 선택적 동적 유발(optional kinetic challenge)을 이용하는 UPS 혼성화 포획 검정법(UPS

hybridization capture assay)을 사용한, 버퍼(●) 및 혈장(▲)에서의 tPA에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다. 단백질을 첨가하지 않은 버퍼의 반응들을 평균내고, 두개의 곡선 모두로부터 제외하였다. 표적 단백질을 첨가하지 않은 혈장 샘플에 대하여, 0.1M tPA에서 동적 유발을 하지 않은 희석된 혈장 반응을 (□)로 표시하고, 동적 유발을 한 것을 (△)로 표시하였다. 측정된 반응은 혈장에의 동적 유발 때문에 거의 로그에 의해 감소되었고, 이에 반하여 표적-압타머 반응은 10nM tPA에서 (○)(버퍼) 및 (△)(혈장)에 의해 증명되는 바와 같이 변함없었다.

[0139] 도 8은 경쟁자를 이용한 선택적 동적 유발(■) 및 경쟁자를 이용하지 않는 선택적 동적 유발(●)을 사용한 혈장 내 tPA에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다. 단백질을 첨가하지 않은 혈장의 값을 1 pM[tPA]에서 그래프로 나타내고, 이 값은 경쟁자의 첨가 때문에 70% 감소되었으나, 표적-압타머 반응은 30nM tPA에서 경쟁자의 존재 또는 부재에도 본질적으로 동일한 반응으로 증명되는 바와 같이 변함없었다.

[0140] 도 9는 버퍼(●) 및 혈장(▲)에서의 세개의 표적 단백질(tPA(도 9A), PAI-1(도 9B) 및 IL-6(도 9C))에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다. RFU 값은 각 압타머에 대하여 단백질을 첨가하지 않은 버퍼의 RFU 값을 뺀으로써 보정되었다. 로그변환된 데이터에 일치하는 최소제곱의 직선 또한 버퍼 데이터에 대한 그래프로 나타내었다. 이 압타머들(1 pM에서의 △)에 대하여 보정된 단백질을 첨가하지 않은 혈장의 RFU 값은 각각 66, 26 및 49 RFU이다.

[0141] 도 10A 내지 10D는 자유 압타머(■)를 제거하지 않고 생성된 곡선과 비교하여, 버퍼에서 교차결합되고 K^+ /SDS 침전을 사용하여 자유 압타머를 선택적으로 제거하기 전에 혈장에 첨가된 4개의 표적 단백질(●)에 대한 용량 반응 곡선을 나타낸다. 시그널은 자유 압타머의 제거에 의해 증가되었으며, 측정의 동적 범위는 일반적으로 증가되었다.

[0142] 도 11은 혼성화 동안에 세제 및 높은 염 농도가 사용된 경우, 압타머에 대한 표적 단백질의 빛에 의해 유도되는 화학적 교차결합의 효과를 나타낸다. 빛의 부재와 이로 인한 광압타머에 대한 표적의 공유적 부착의 부재에서, 검정 시그널은 버퍼에서 2등급 이상 감소하였다. bFGF의 내생적 농도는 빛을 조사하지 않은 대조군과 일반적인 백그라운드 반응 이상으로 작은 시그널을 반영하여 극히 낮았다.

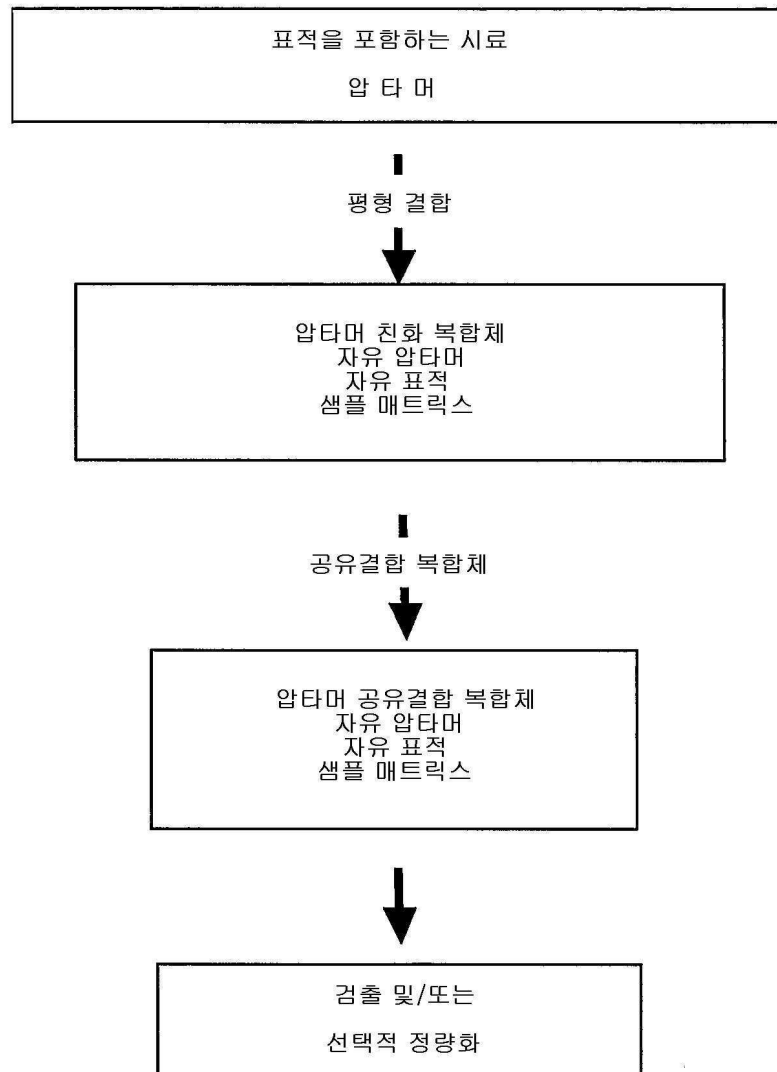
[0143] 도 12는 dT에 위치한 5-벤질-dT의 변형된 라이브러리로 전개시킨 광압타머를 사용한 표적 단백질(C4b)의 버퍼에서의 용량 반응을 나타낸다. 3로그의 표적 농도 이상의 선형 반응은 검정에서 변형된 뉴클레오타이드 압타머의 활성을 나타낸다.

[0144] 도 13은 표적 단백질(▲)을 직접 표지하거나 비오틴화시킨 후 스캇 넥스테리온 표면(도 13A) 또는 메타크릴레이트 공중합체 표면(도 13B) 상에 스트렙타비딘(■)으로 형광 표지하여 생성된 용량 반응 곡선을 나타낸다. 두개의 표면 모두 잘 수행되었고, 두개의 표지 단계와 비교하였다.

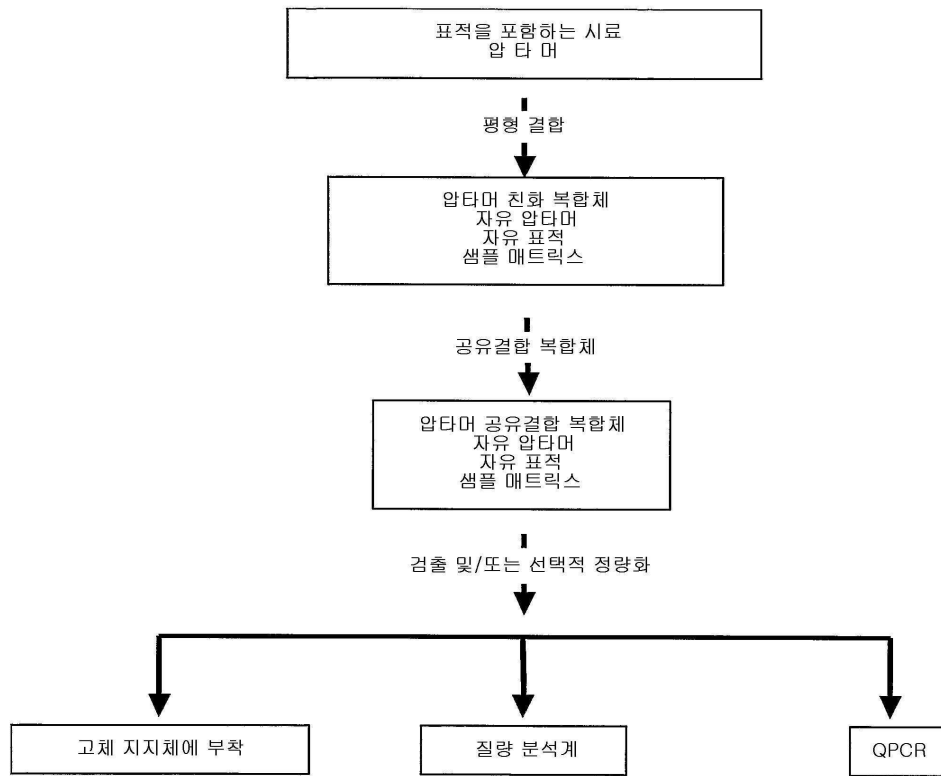
[0145] 도 14는

도면

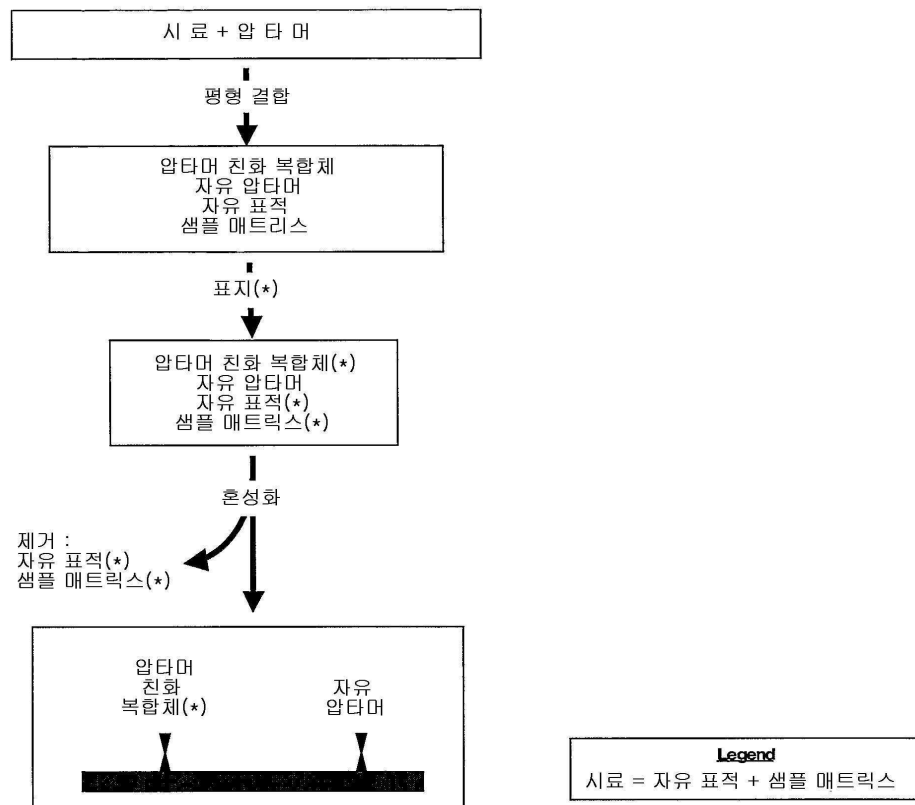
도면1a



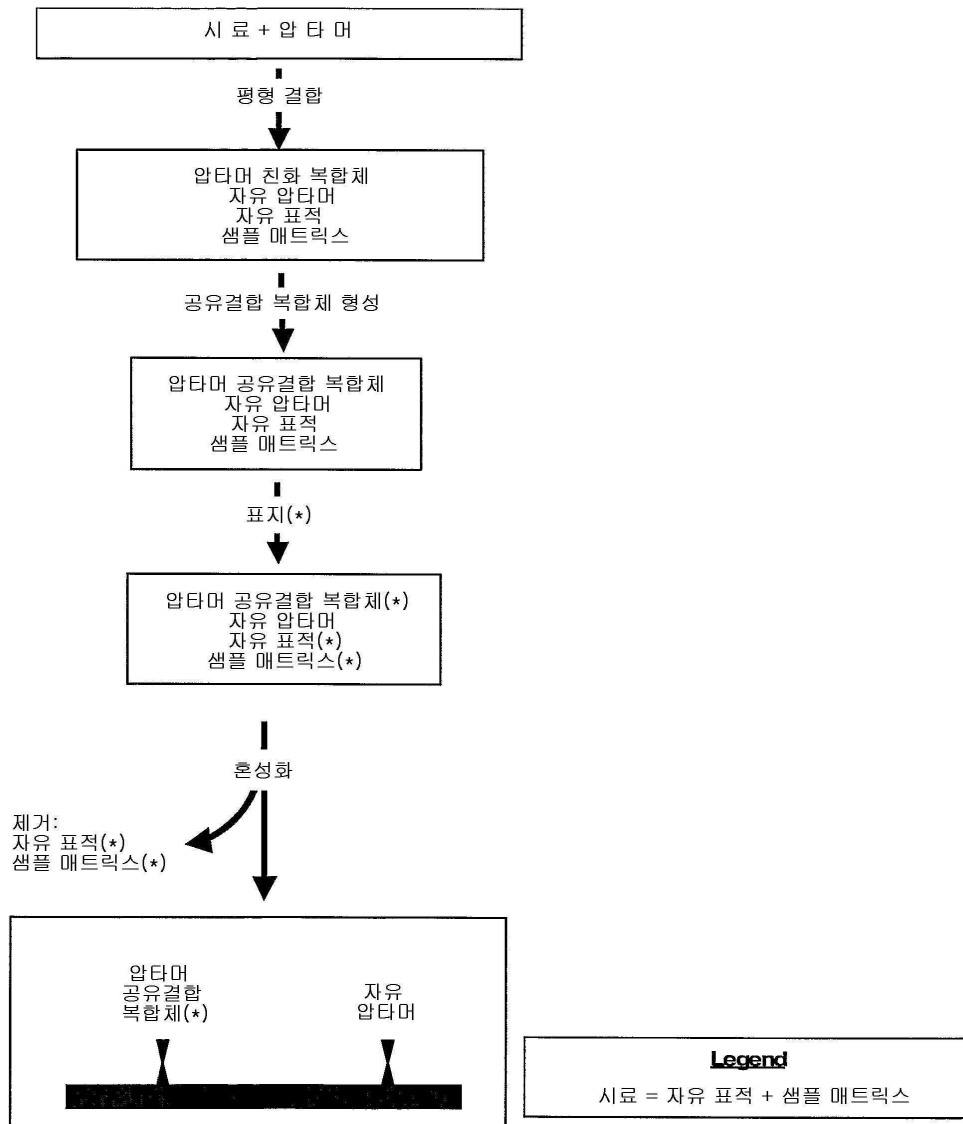
도면1b



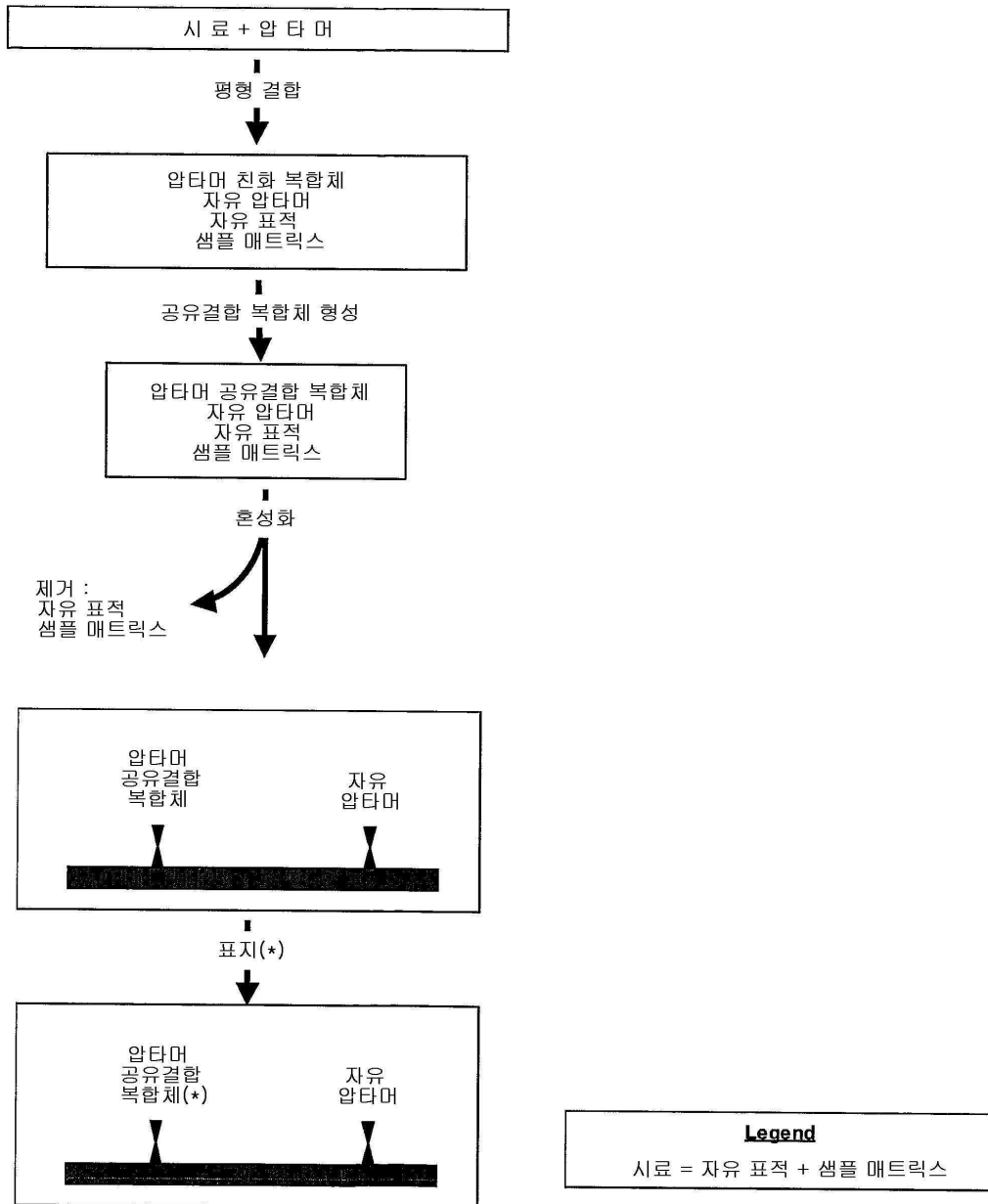
도면2a



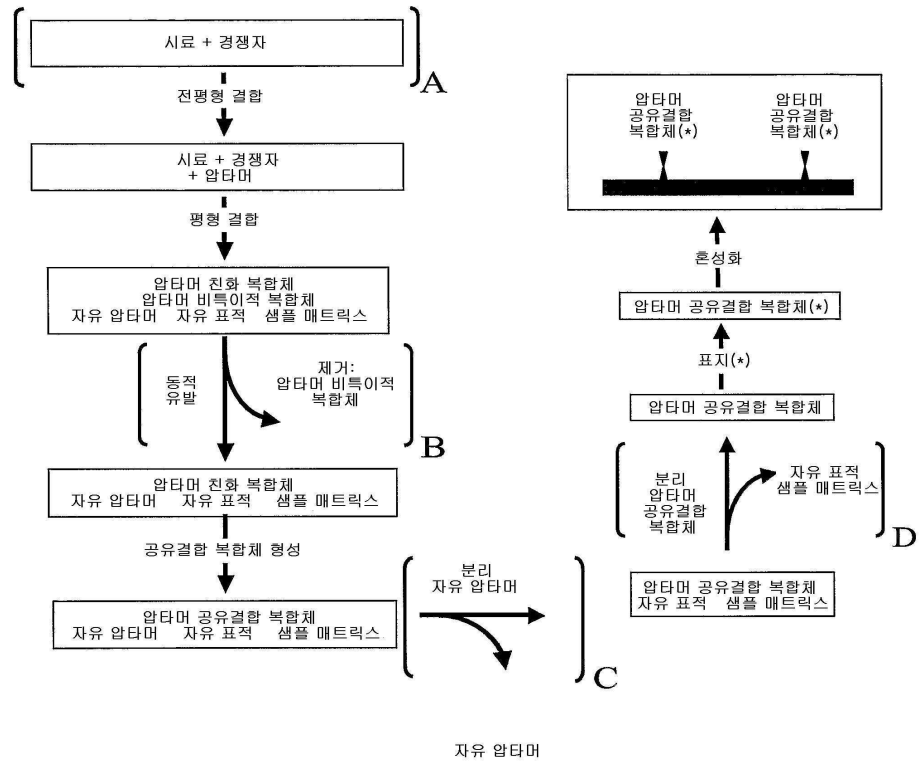
도면2b



도면2c

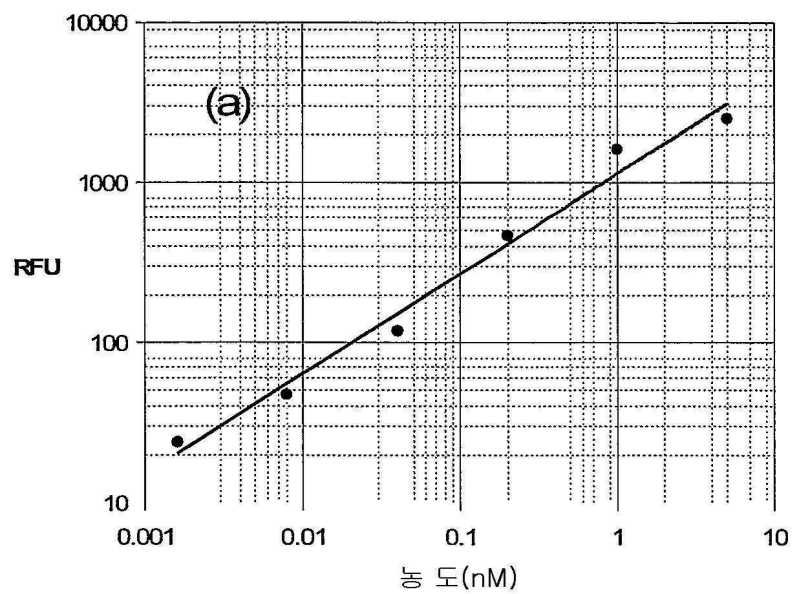


도면3

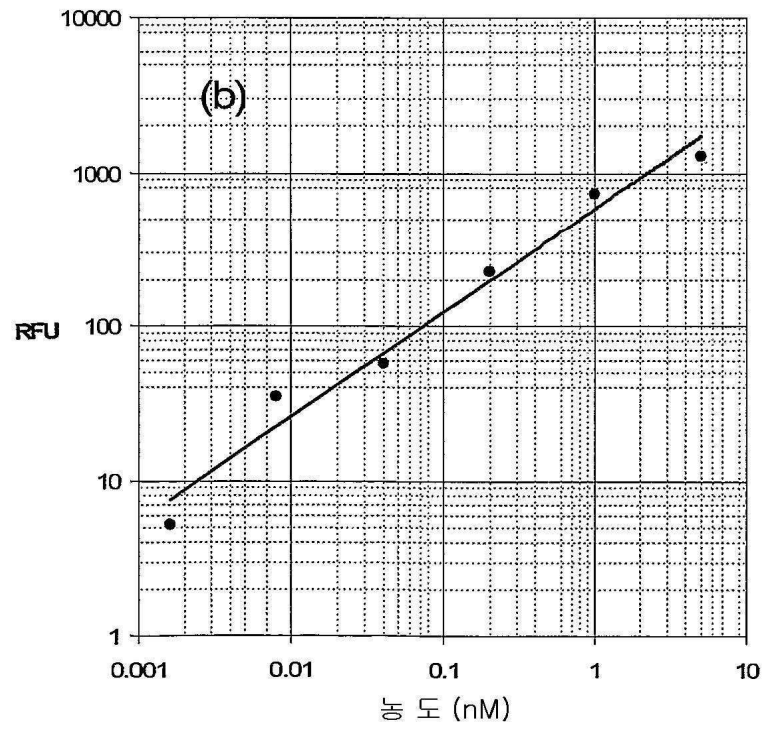


Legend
시료 = 자유 표적 + 샘플 매트릭스

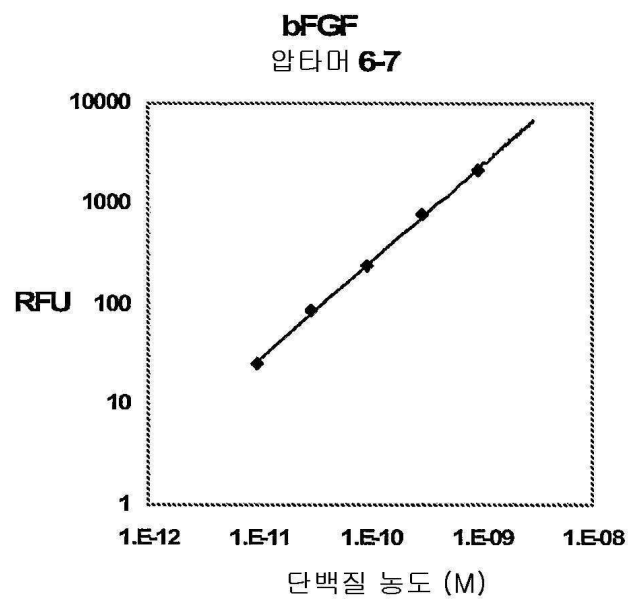
도면4a



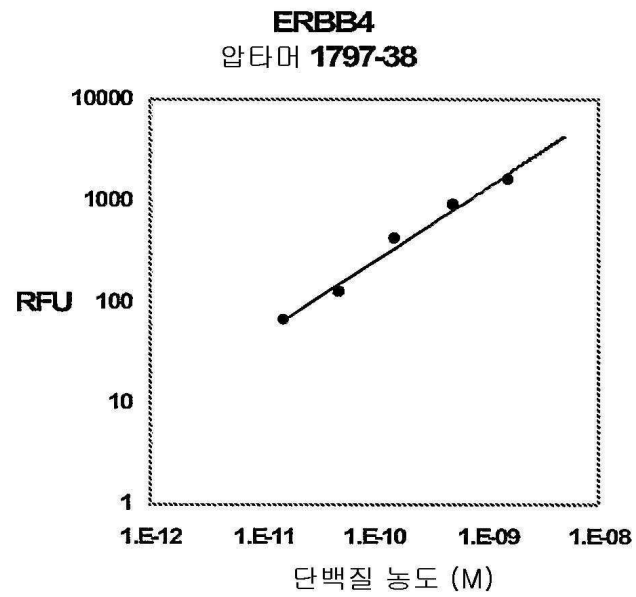
도면4b



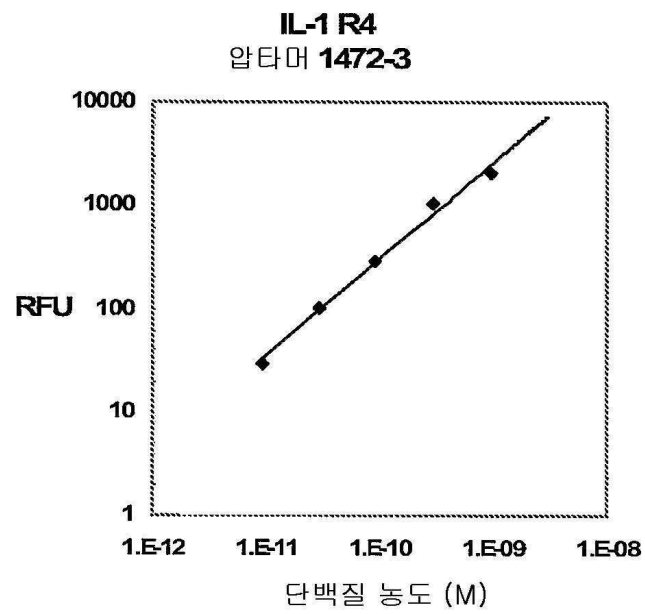
도면5a



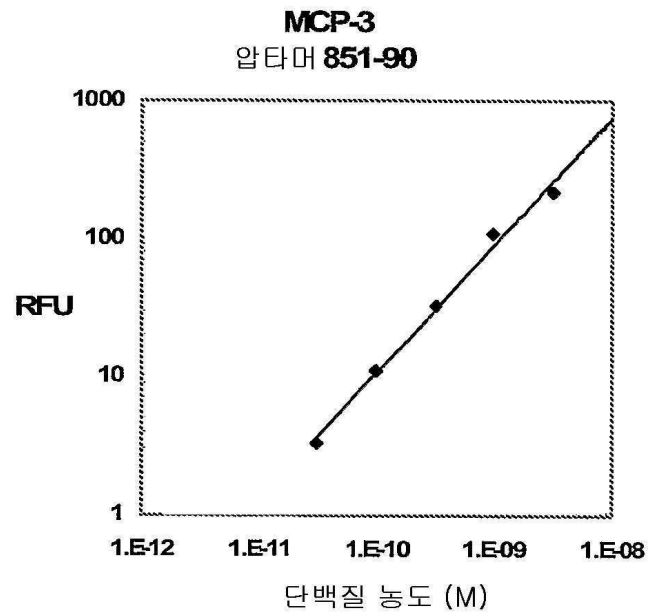
도면5b



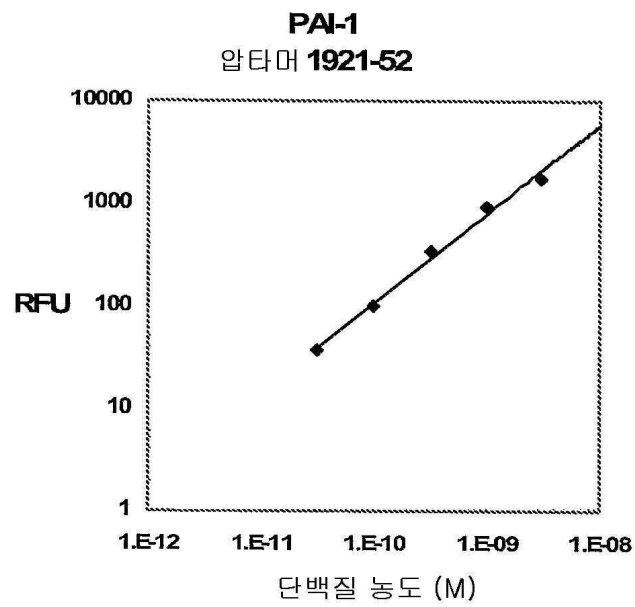
도면5c



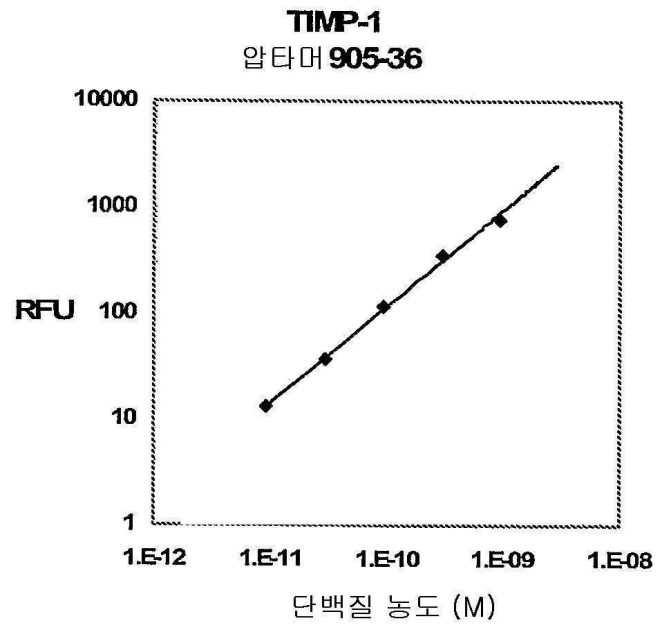
도면5d



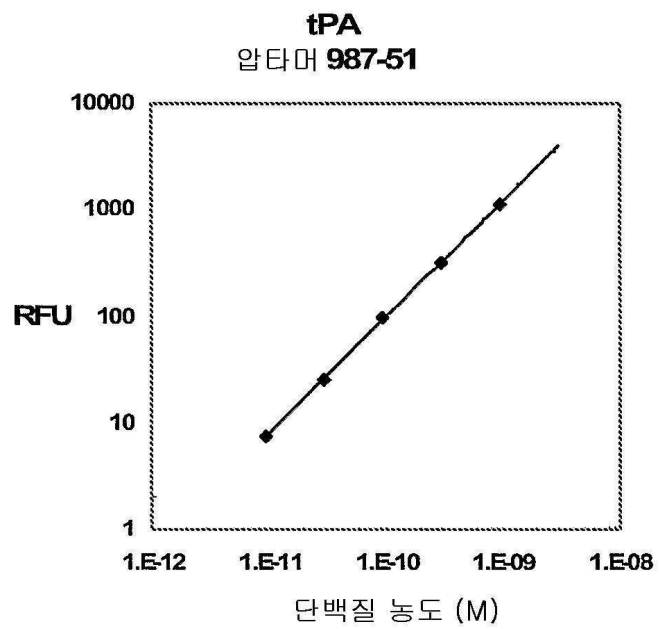
도면5e



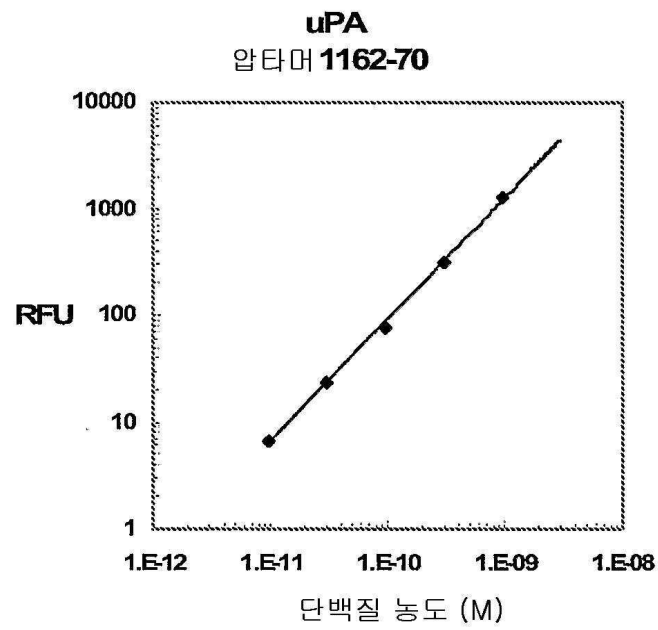
도면5f



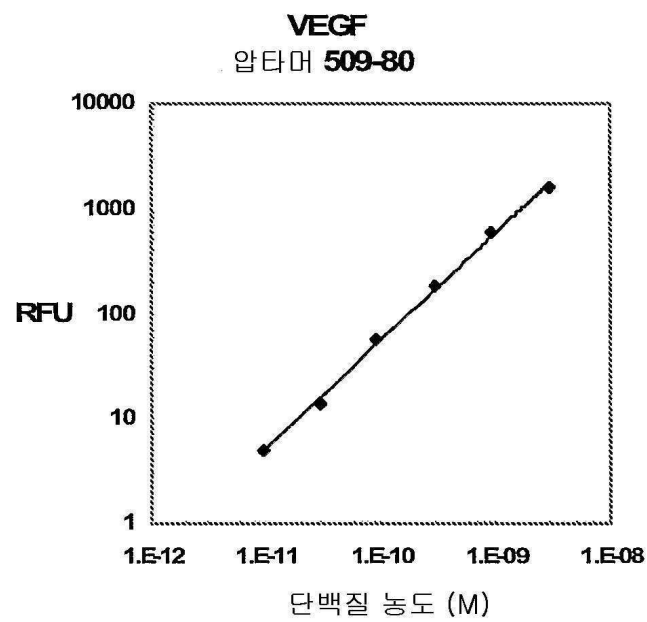
도면5g



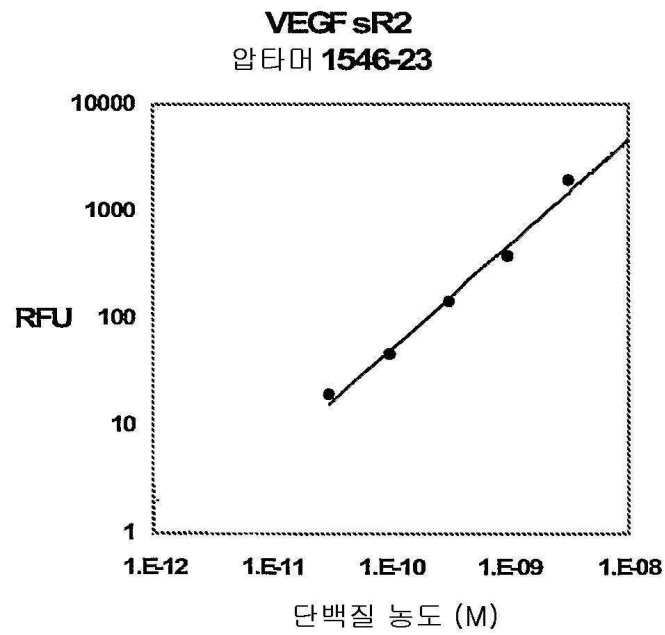
도면5h



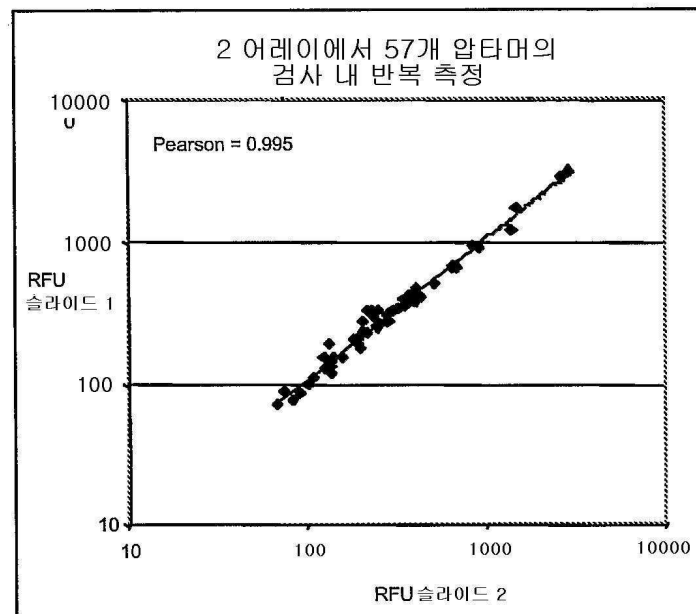
도면5i



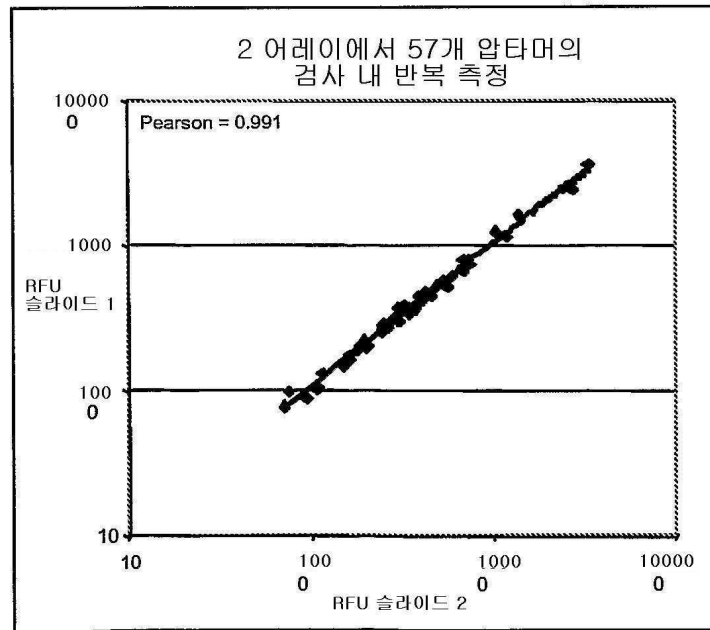
도면5j



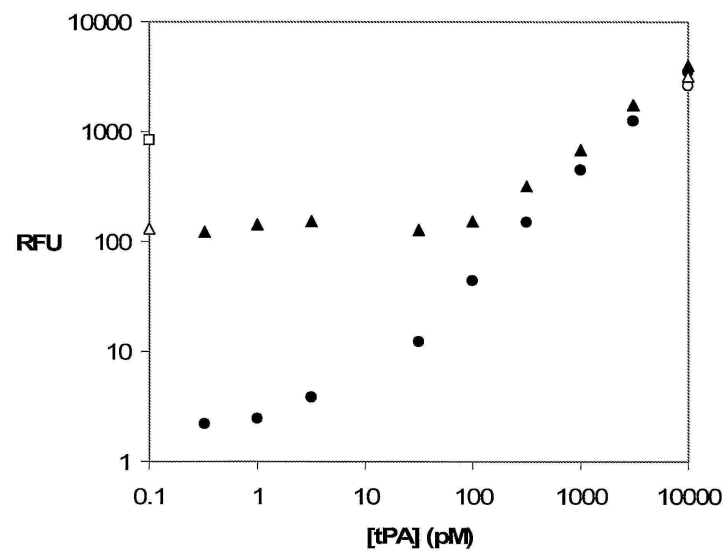
도면6a



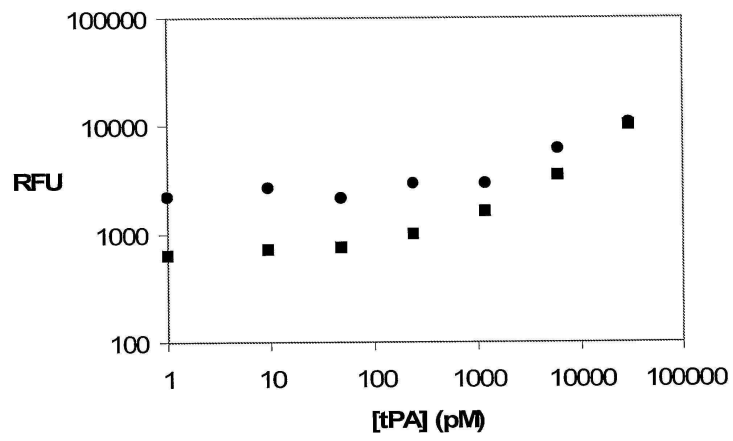
도면6b



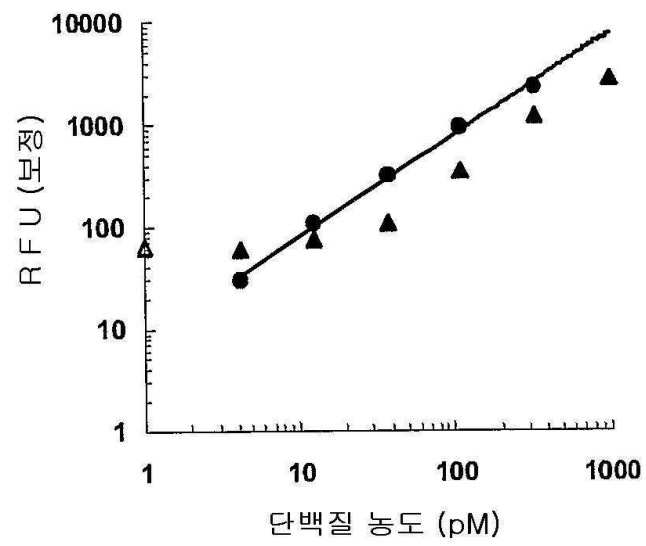
도면7



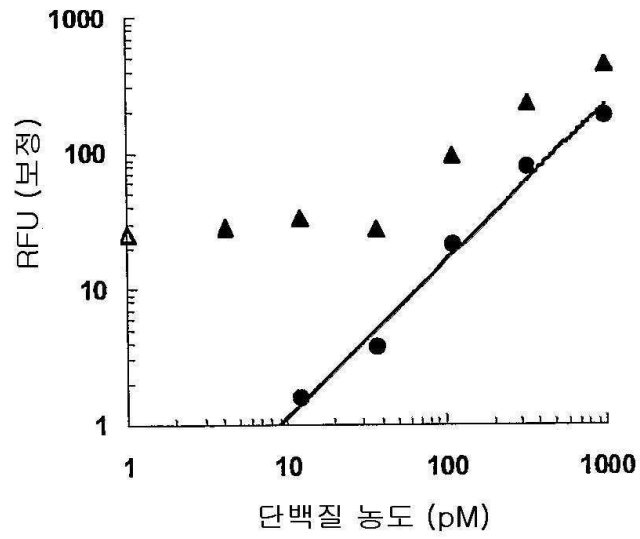
도면8



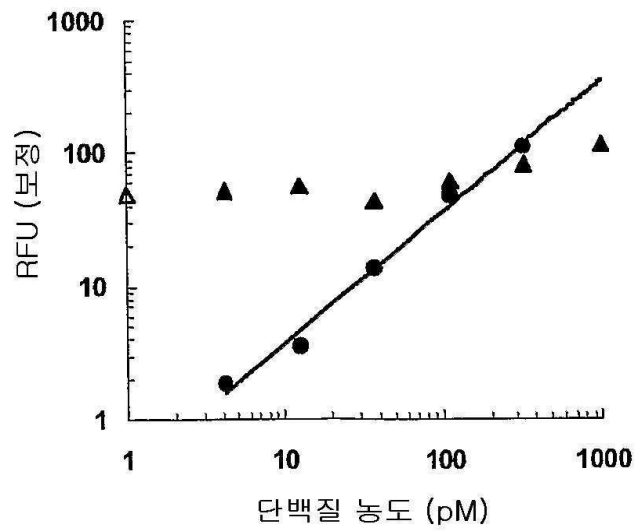
도면9a



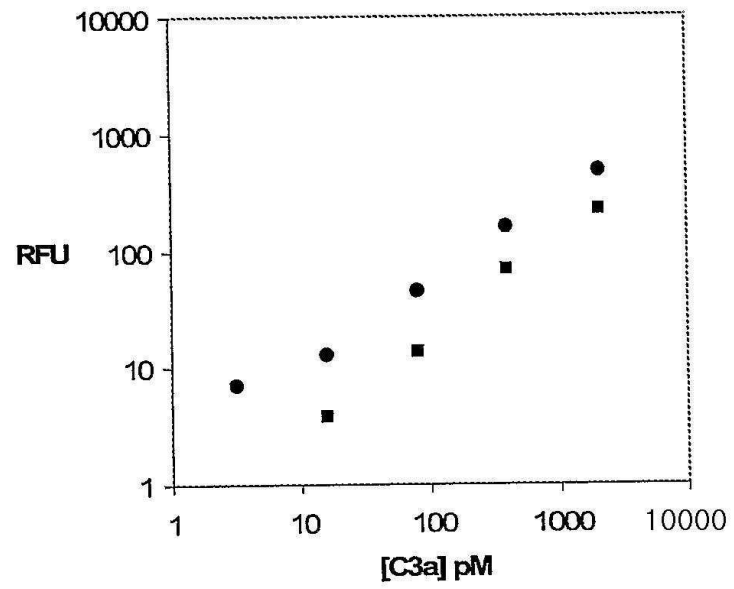
도면9b



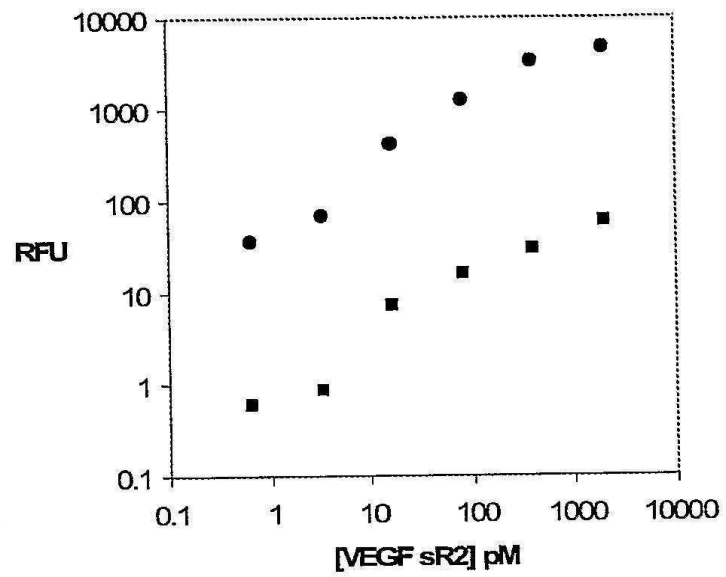
도면9c



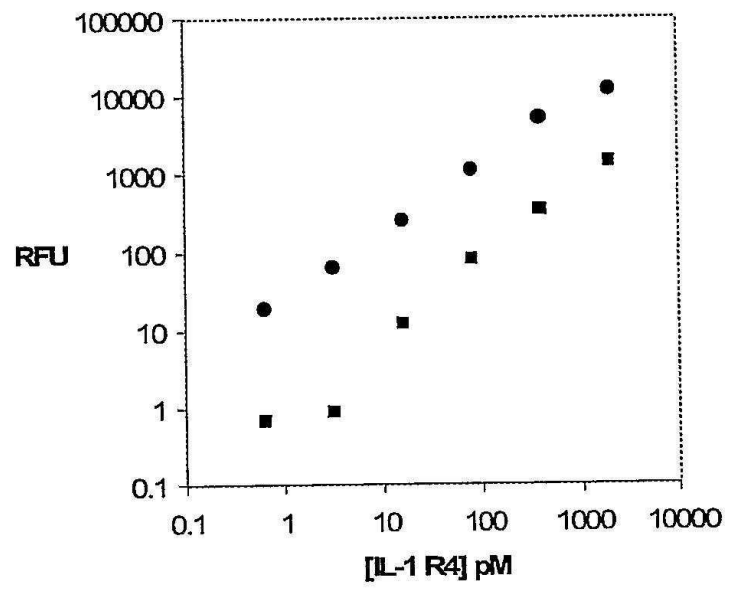
도면10a



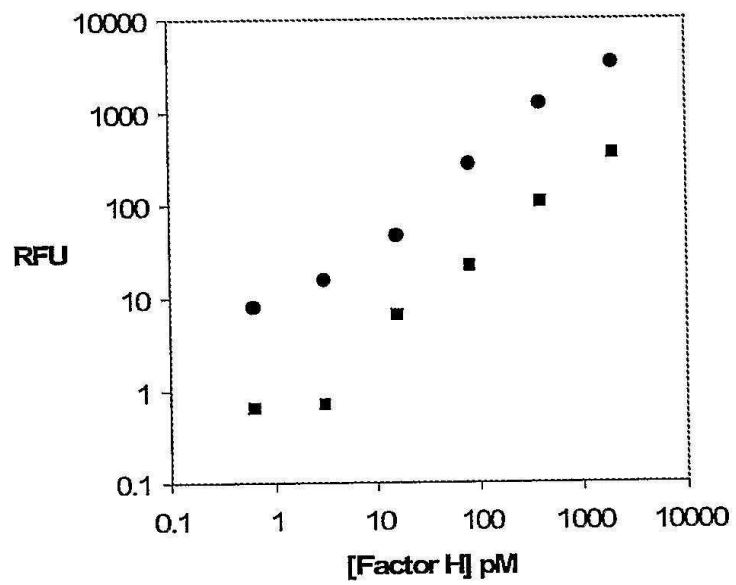
도면10b



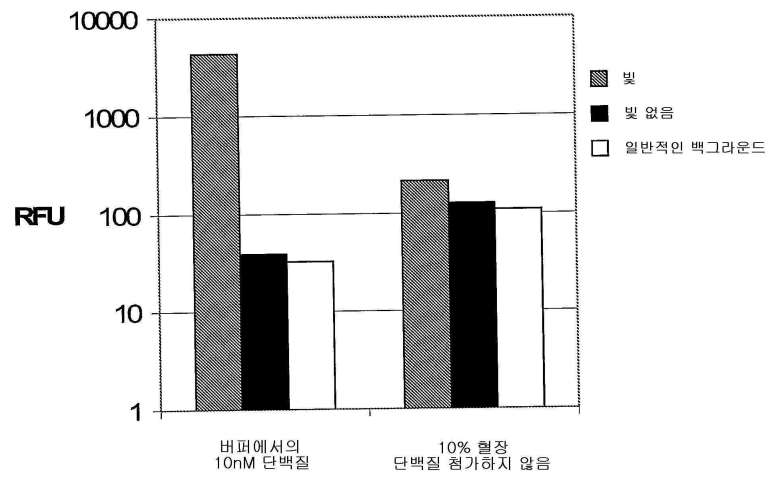
도면10c



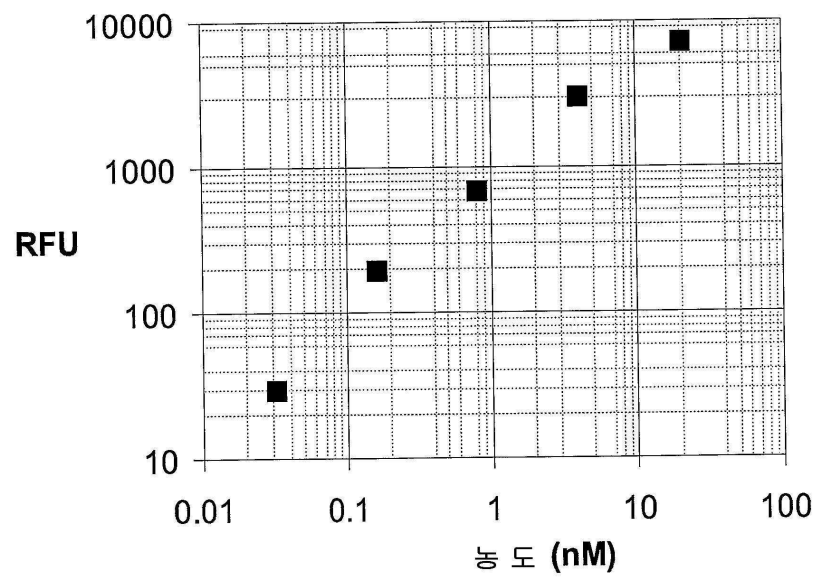
도면10d



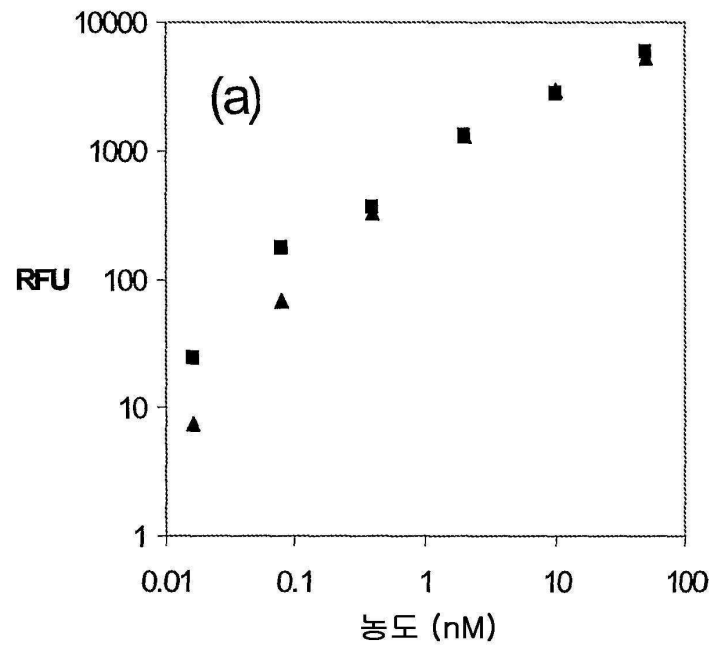
도면11



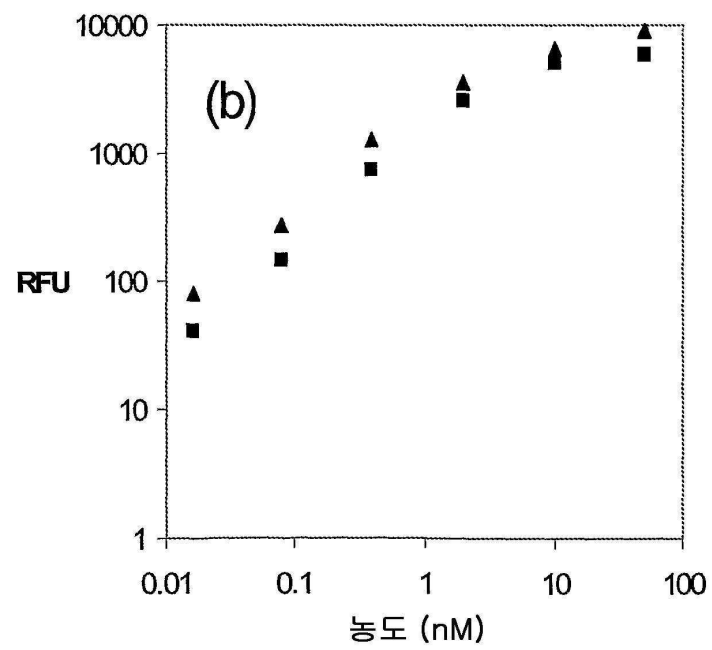
도면12



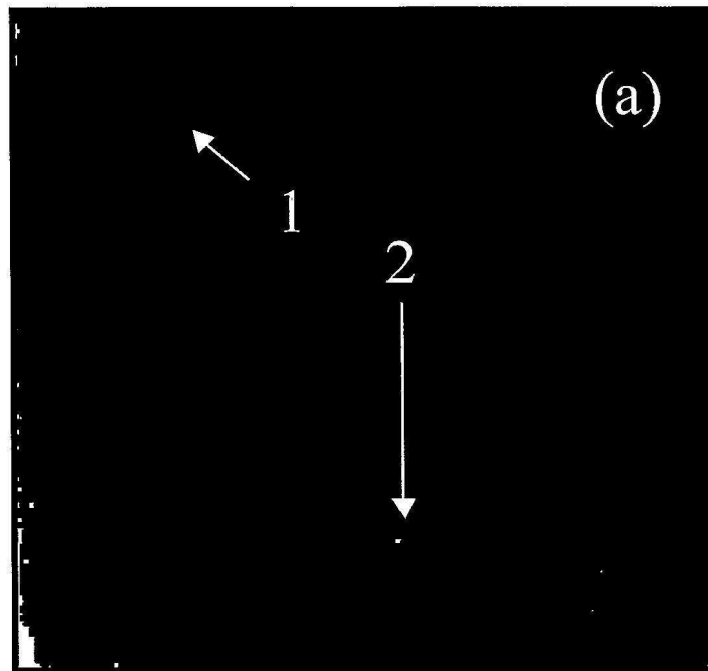
도면13a



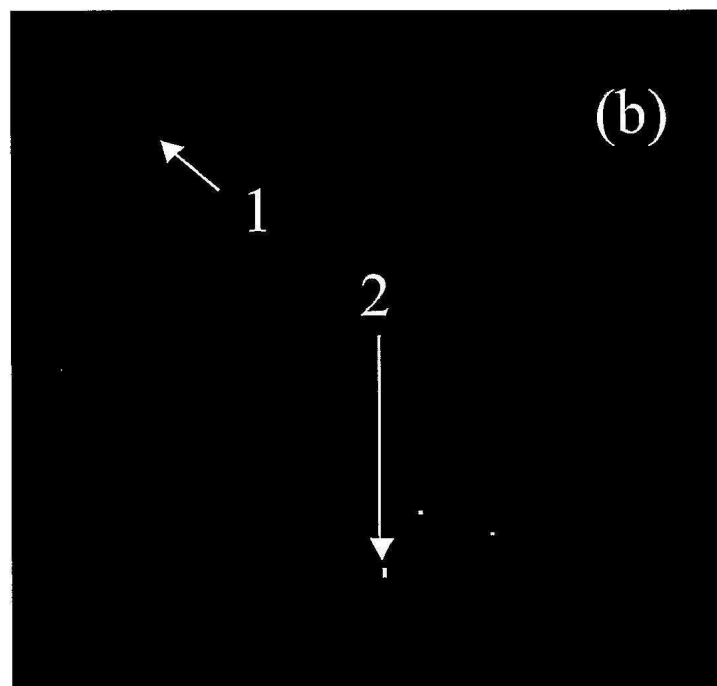
도면13b



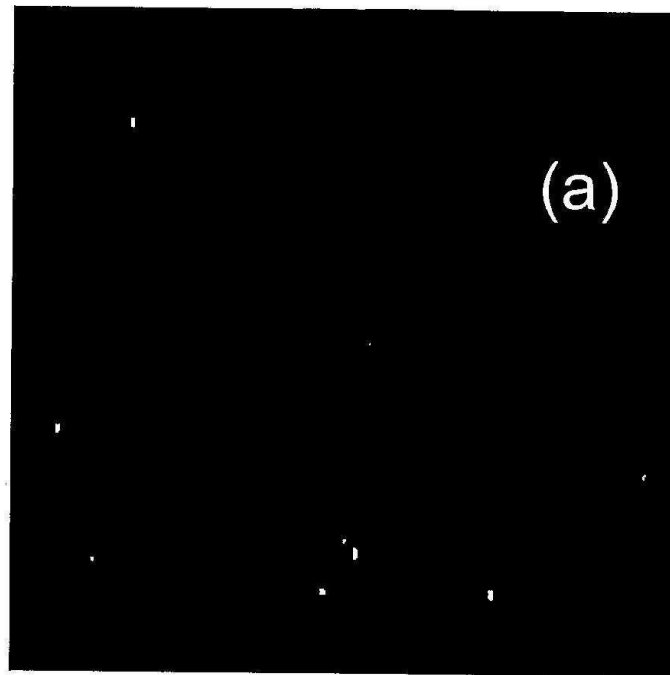
도면14a



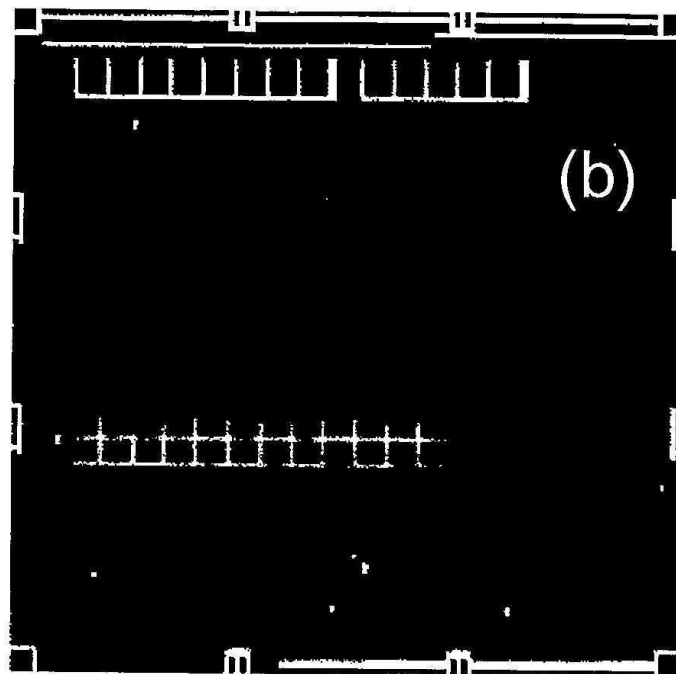
도면14b



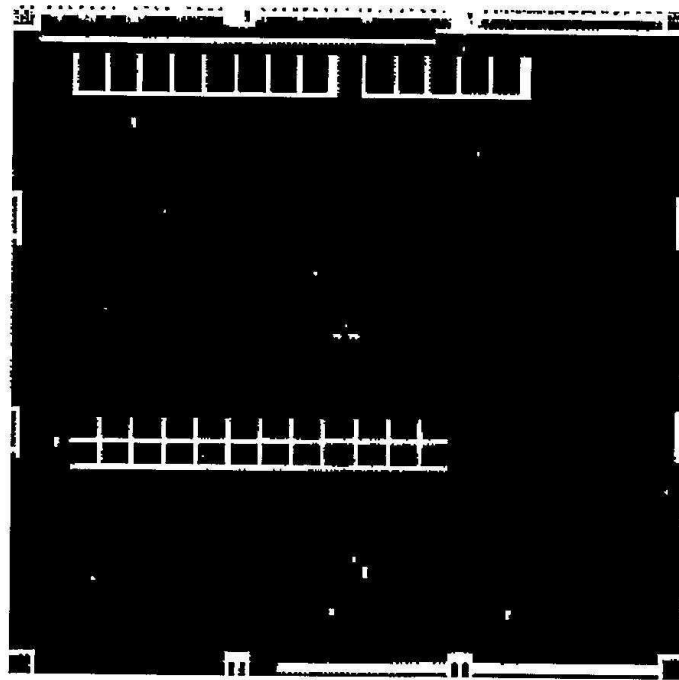
도면15a



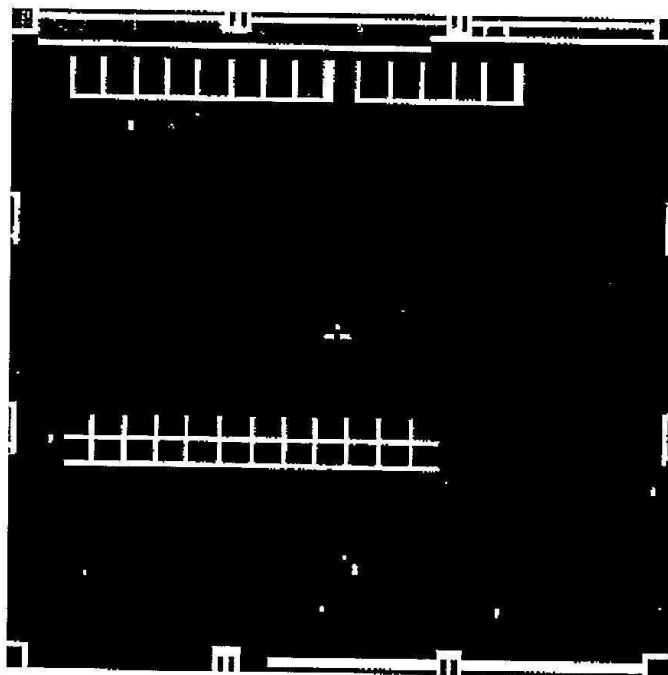
도면15b



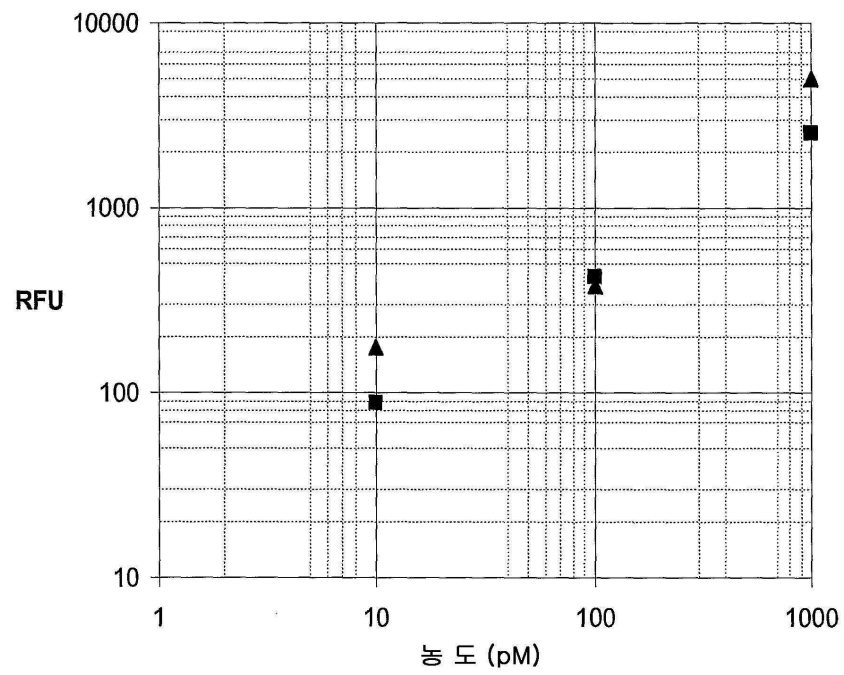
도면15c



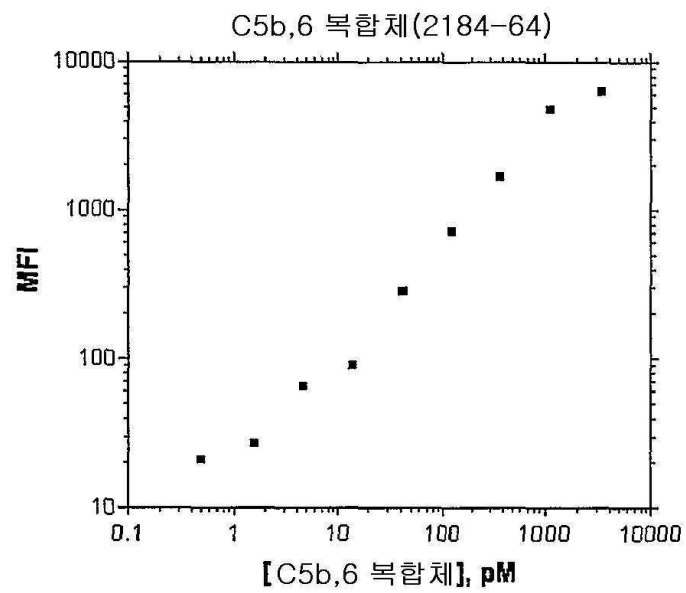
도면15d



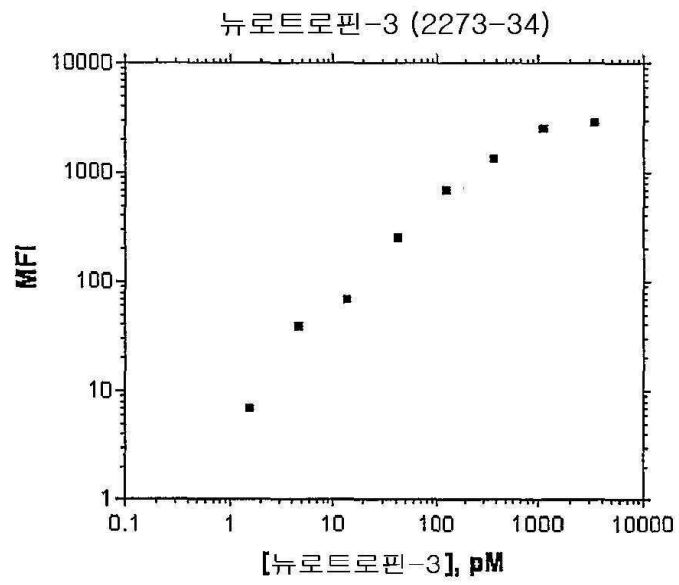
도면16



도면17a



도면17b



도면17c

