



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0015347
(43) 공개일자 2023년01월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) C12N 9/22 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01) C12Q 1/6806 (2018.01)
CA0B 50/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/1068 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7040612
- (22) 출원일자(국제) 2021년05월24일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년11월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2021/019685
- (87) 국제공개번호 WO 2021/241528
국제공개일자 2021년12월02일
- (30) 우선권주장
JP-P-2020-090304 2020년05월25일 일본(JP)

- (71) 출원인
닛산 가가쿠 가부시키키가이샤
일본국 도쿄도 주오쿠 니혼바시 2쵸메 5반 1고
- (72) 발명자
니와, 마사토시
일본 2748507 치바켄 후나바시시 츠보이니시 2쵸메 10반 1고 닛산 가가쿠 가부시키키가이샤 붓시츠 가가쿠 켄큐쇼 내
도쿠가와, 무네후미
일본 2748507 치바켄 후나바시시 츠보이니시 2쵸메 10반 1고 닛산 가가쿠 가부시키키가이샤 붓시츠 가가쿠 켄큐쇼 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장수길, 박보현

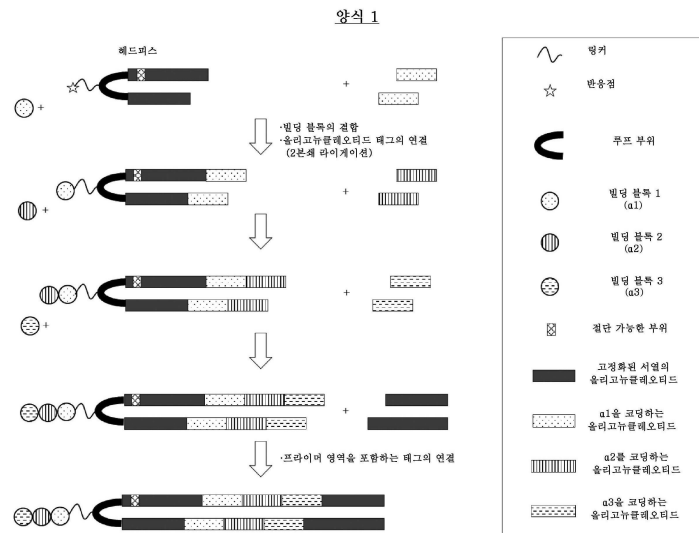
전체 청구항 수 : 총 132 항

(54) 발명의 명칭 절단 가능한 DNA 코드화 라이브러리

(57) 요약

본 발명은, 선택적으로 절단 가능한 부위를 포함하는 핵산 화합물의 이용법에 관한 것이다. 또한 본 발명에서는, 선택적으로 절단 가능한 부위를 포함하는 DNA 코드화 라이브러리, 그 합성용 조성물 및 그 사용 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 9/2497 (2013.01)

C12Q 1/6806 (2018.05)

C40B 50/10 (2013.01)

C12N 2310/531 (2013.01)

C12Q 2531/113 (2013.01)

(72) 발명자

하야시다, 준

일본 3490294 사이타마켄 시라오카시 시라오카
1470 넷산 가가쿠 가부시키키가이샤 세이부츠 가가쿠
겐큐쇼 내

후카노, 하지메

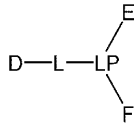
일본 1348630 도쿄도 에도가와쿠 기타카사이 1쵸메
16반 13고 다이이치 산쿄 알디 노바레 가부시키키가
이샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

식 (I)



(I)

(식 중,

E 및 F는, 각각 독립적으로

뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

LP는, 루프 부위이며,

L은, 링커이며,

D는, 반응성 관능기이다.)

로 표시되는 화합물이며,

E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는 화합물.

청구항 2

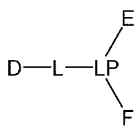
제1항에 기재된 화합물을 포함하는, 화합물 라이브러리의 헤드피스의 조제에 사용하기 위한 조성물.

청구항 3

제1항에 기재된 화합물을 포함하는, DNA 코드화 라이브러리의 헤드피스의 조제에 사용하기 위한 조성물.

청구항 4

식 (I)



(I)

(식 중,

E 및 F는, 각각 독립적으로

뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

LP는, 루프 부위이며,

L은, 링커이며,

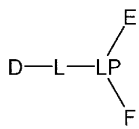
D는, 반응성 관능기이다.)

로 표시되는 화합물이며,

E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖고, 화합물 라이브러리의 헤드피스로서 사용하는 화합물.

청구항 5

식 (I)



(I)

(식 중,

E 및 F는, 각각 독립적으로

뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

LP는, 루프 부위이며,

L은, 링커이며,

D는, 반응성 관능기이다.)

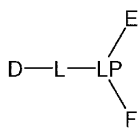
로 표시되는 화합물이며,

E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖고,

DNA 코드화 라이브러리의 헤드피스로서 사용하는 화합물.

청구항 6

식 (I)



(I)

(식 중,

E 및 F는, 각각 독립적으로

뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

LP는, 루프 부위이며,

L은, 링커이며,

D는, 반응성 관능기이다.)

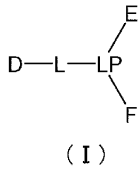
로 표시되는 화합물이며,

E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는 화합물 라이

브러리의 헤드피스.

청구항 7

식 (I)



(식 중,

E 및 F는, 각각 독립적으로

뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

LP는, 루프 부위이며,

L은, 링커이며,

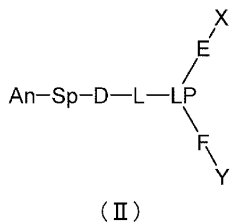
D는, 반응성 관능기이다.)

로 표시되는 화합물이며,

E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는 DNA 코드화 라이브러리의 헤드피스.

청구항 8

식 (II)



(식 중,

X 및 Y는, 올리고뉴클레오티드쇄이며,

E 및 F는, 각각 독립적으로

뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

LP는, 루프 부위이며,

L은, 링커이며,

D는, 반응성 관능기 유래의 2가의 기이며,

Sp는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,

An은, 적어도 하나의 빌딩 블록에 의해 구성되는 부분 구조이다.)

로 표시되는 화합물이며,

X와 Y는, 적어도 일부에서 2중쇄를 형성할 수 있는 서열을 갖고,

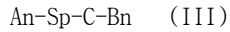
X는 5' 말단에서 E에 결합하고,

Y는 3' 말단에서 F에 결합하고,

E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는 화합물.

청구항 9

제8항에 있어서, 식 (III)

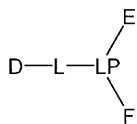


(식 중,

An 및 Sp는, 제8항과 동일한 의미를 나타내고,

Bn은, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y로 형성되는 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그를 나타내고,

C는, 식 (I)



(I)

(식 중, E, LP, L, D 및 F는, 제8항과 동일한 의미를 나타내고, 단, D는 An과 직접 결합하거나, 또는 2관능성 스페이서를 통해 결합하고, E와 F는 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 Bn의 각각 대응하는 말단측에 결합한다.)

로 표시되는,

화합물.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, An이, 제8항과 동일하고, 또한 n개의 빌딩 블록 a₁ 내지 a_n(n은 1 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조이며,

Bn이, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y로 형성되는 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그이며, 또한 An의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 부분 구조인,

화합물.

청구항 11

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, LP가,

(LP1)_p-LS-(LP2)_q로 표시되는 루프 부위이며,

LS는, 이하의 (A) 내지 (C)에 기재되는 화합물군에서 선택되는 부분 구조이며,

(A) 뉴클레오티드

(B) 핵산 아날로그

(C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3가의 기

LP1은, 이하의 (1) 및 (2)에 기재되는 화합물군에서 단독 혹은 다르게 p개 선택되는 각 부분 구조이며,

(1) 뉴클레오티드

(2) 핵산 아날로그

LP2는, 이하의 (1) 및 (2)에 기재되는 화합물군에서 단독 혹은 다르게 q개 선택되는 각 부분 구조이며,

- (1) 뉴클레오티드
- (2) 핵산 아날로그

p와 q의 총 수가 0 내지 40인,
화합물.

청구항 12

제11항에 있어서, p와 q의 총 수가 2 내지 20인, 화합물.

청구항 13

제11항에 있어서, p와 q의 총 수가 2 내지 10인, 화합물.

청구항 14

제11항에 있어서, p와 q의 총 수가 2 내지 7인, 화합물.

청구항 15

제11항에 있어서, p와 q의 총 수가 0인, 화합물.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, LP1, LP2 및 LS가, 각각 이하의 구조:

(A) 뉴클레오티드

또는

(B) 이하의 (B11) 내지 (B15)를 요건으로 하는 핵산 아날로그

(B11) 인산(또는 상당 부위) 및 수산기(또는 그 상당 부위)를 갖는 것,

(B12) 탄소, 수소, 산소, 질소, 인 또는 황에 의해 구성되는 것,

(B13) 분자량이 142 내지 1500인 것,

(B14) 잔기간 원자수가 3 내지 30인 것,

(B15) 잔기간의 원자의 결합 양식은, 모두 단결합이거나, 또는 1 내지 2개의 이중 결합을 포함하며 나머지는 단결합인 것,

에서 단독 혹은 다르게 선택되는 구조인, 화합물.

청구항 17

제11항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, LP1, LP2 및 LS가, 각각 이하의 구조:

(A) 뉴클레오티드

또는

(B) 이하의 (B21) 내지 (B25)를 요건으로 하는 핵산 아날로그

(B21) 인산 및 수산기를 갖는 것,

(B22) 탄소, 수소, 산소, 질소 또는 인에 의해 구성되는 것,

(B23) 분자량이 142 내지 1000인 것,

(B24) 잔기간 원자수가 3 내지 15인 것,

(B25) 잔기간의 원자의 결합 양식은, 모두 단결합인 것,

에서 단독 혹은 다르게 선택되는 구조인, 화합물.

청구항 18

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, LP1, LP2 및 LS가, 각각 이하의 구조:

(A) 뉴클레오티드

또는

(B) 이하의 (B31) 내지 (B35)를 요건으로 하는 핵산 아날로그

(B31) 인산 및 수산기를 갖는 것,

(B32) 탄소, 수소, 산소, 질소 또는 인에 의해 구성되는 것,

(B33) 분자량이 142 내지 700인 것,

(B34) 잔기간 원자수가 4 내지 7인 것,

(B35) 잔기간의 원자의 결합 양식은, 모두 단결합인 것,

에서 단독 혹은 다르게 선택되는 구조인, 화합물.

청구항 19

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, LP1 및 LP2가, 각각 이하:

(B41) d-스페이서(Spacer),

(B5) 폴리알킬렌글리콜인산에스테르

중 어느 것인, 화합물.

청구항 20

제11항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, LP1 및 LP2가, 각각 디에틸렌글리콜인산에스테르 또는 트리에틸렌글리콜인산에스테르인, 화합물.

청구항 21

제11항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, LP1 및 LP2가, 각각 트리에틸렌글리콜인산에스테르인, 화합물.

청구항 22

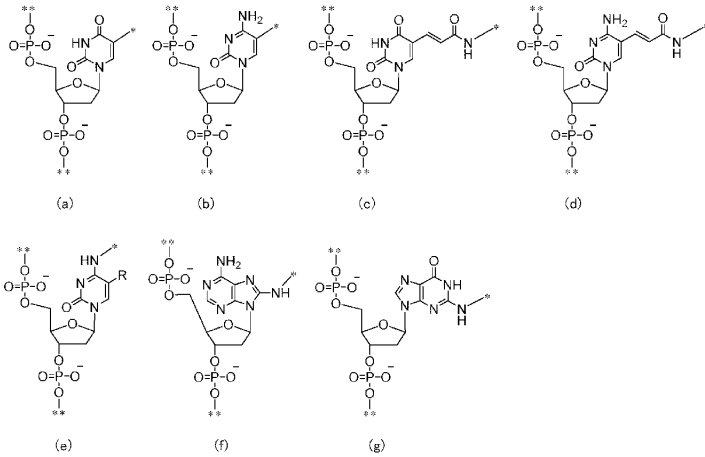
제11항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, LP1 및 LP2가, 각각 d-스페이서인, 화합물.

청구항 23

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, LP1 및 LP2가, 각각 뉴클레오티드인, 화합물.

청구항 24

제11항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, 식 (a) 내지 식 (g):

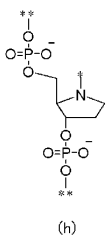


(식 중, *은 링커와의 결합 위치를 의미하고, **은 LP1 또는 LP2와의 결합 위치를 의미하고, R은 수소 원자 또는 메틸기이다.)

중 어느 것인, 화합물.

청구항 25

제11항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, 식 (h):



(식 중, *은 링커와의 결합 위치를 의미하고, **은 LP1 또는 LP2와의 결합 위치를 의미한다.)

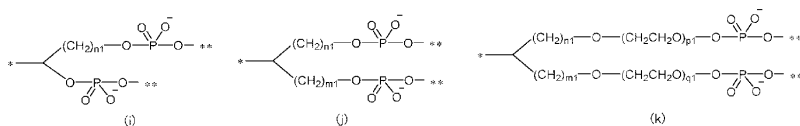
인, 화합물.

청구항 26

제11항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, 폴리알킬렌글리콜인산에스테르인, 화합물.

청구항 27

제11항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, 식 (i) 내지 식 (k):

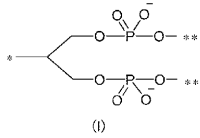


(식 중, n1, m1, p1 및 q1은 각각 독립적으로 1 내지 20의 정수이며, *은 링커와의 결합 위치를 의미하고, **은 LP1 또는 LP2와의 결합 위치를 의미한다.)

인, 화합물.

청구항 28

제11항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, 식 (1):



(식 중, *은 링커와의 결합 위치를 의미하고, **은 LP1 또는 LP2와의 결합 위치를 의미한다.)

인, 화합물.

청구항 29

제11항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, (B42), (B43) 또는 (B44):

(B42) 아미노 C6 dT

(B43) mdC(TEG-아미노)

(B44) Uni-Link(상표 등록) 아미노 모디파이어(Amino Modifier)

중 어느 것인, 화합물.

청구항 30

제11항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, 뉴클레오티드인, 화합물.

청구항 31

제11항 내지 제15항 및 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3가의 기이며, (C)가 이하의 구조:

- (1) 치환기를 가져도 되고, 1 내지 3개의 헤테로 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 10 지방족 탄화수소,
- (2) 치환기를 가져도 되는 C6 내지 14 방향족 탄화수소,
- (3) 치환기를 가져도 되는 C2 내지 9 방향족 복소환, 또는
- (4) 치환기를 가져도 되는 C2 내지 9 비방향족 복소환

중 어느 것인, 화합물.

청구항 32

제11항 내지 제15항 및 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3가의 기이며, (C)가 이하의 구조:

- (1) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 6 지방족 탄화수소,
- (2) 치환기를 가져도 되는 C6 내지 10 방향족 탄화수소, 또는
- (3) 치환기를 가져도 되는 C2 내지 5 방향족 복소환

중 어느 것인 화합물.

청구항 33

제11항 내지 제15항 및 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3가의 기이며, (C)가 이하의 구조:

- (1) C1 내지 6 지방족 탄화수소,
- (2) 벤젠, 또는
- (3) C2 내지 5 질소 함유 방향족 복소환

여기서, 상기 (1) 내지 (3)은 비치환이거나, 또는 치환기군 ST1에서 단독 혹은 다르게 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환되어도 되고, 치환기군 ST1은, C1 내지 6 알킬기, C1 내지 6 알콕시기, 불소 원자 및 염소 원자에 의해 구성되는 군이며, 단, 치환기군 ST1이 지방족 탄화수소로 치환되는 경우, 치환기군 ST1에서 알킬기는 선택되지 않는 것,

중 어느 것인, 화합물.

청구항 34

제11항 내지 제15항 및 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3개의 기이며, (C)가 이하의 구조:

- (1) C1 내지 6 알킬기, 또는
- (2) 비치환이거나 1개 또는 2개의 C1 내지 3 알킬기 혹은 C1 내지 3 알콕시기로 치환된 벤젠

중 어느 것인, 화합물.

청구항 35

제11항 내지 제15항 및 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, LS가, (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3개의 기이며, (C)가 이하의 구조:

- (1) C1 내지 6 알킬기

인, 화합물.

청구항 36

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

E 및 F의 쇠 길이가, 각각 3 내지 40인, 화합물.

청구항 37

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

E 및 F의 쇠 길이가, 각각 4 내지 30인, 화합물.

청구항 38

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

E 및 F의 쇠 길이가, 각각 6 내지 25인, 화합물.

청구항 39

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

E와 F의 2중쇄 올리고뉴클레오티드가, 돌출 말단인, 화합물.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 돌출 말단의 돌출부가, 2 염기 이상의 길이인, 화합물.

청구항 41

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드 또

는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

E와 F의 2중쇄 올리고뉴클레오티드가, 평활 말단인, 화합물.

청구항 42

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, E와 F에 포함되는, 서로 상보적인 염기 서열의 쇠 길이가, 각각 3 염기 이상인, 화합물.

청구항 43

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, E와 F에 포함되는, 서로 상보적인 염기 서열의 쇠 길이가, 각각 4 염기 이상인, 화합물.

청구항 44

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, E와 F에 포함되는, 서로 상보적인 염기 서열의 쇠 길이가, 각각 6 염기 이상인, 화합물.

청구항 45

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드에 의해 구성되는 올리고머인, 화합물.

청구항 46

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오티드가 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드인, 화합물.

청구항 47

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오티드가 데옥시리보뉴클레오티드인 화합물.

청구항 48

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오티드가 테옥시아데노신, 테옥시구아노신, 티미딘 또는 데옥시시티딘인, 화합물.

청구항 49

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, E 및 F가, 각각 독립적으로 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머인, 화합물.

청구항 50

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, L이,

(1) 치환기를 가져도 되고, 1 내지 3개의 헤테로 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 20 지방족 탄화수소,

또는

(2) 치환기를 가져도 되는 C6 내지 14 방향족 탄화수소

인, 화합물.

청구항 51

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, L이, 치환기를 가져도 되는 C1 내지 6 지방족 탄화수소, 1 혹은 2개의 산소 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 6 지방족 탄화수소, 또는 치환기를 가져도 되는 C6 내지 10 방향족 탄화수소인, 화합물.

청구항 52

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, L이, 치환기군 ST1로 치환 가능한 C1 내지 6 지방족 탄화수소, 또는 치환기군 ST1로 치환 가능한 벤젠이며, 여기서 치환기군 ST1은, C1 내지 6 알킬기, C1 내지 6 알콕시기, 불소 원자 및 염소 원자에 의해 구성되는 군인(단, 치환기군 ST1이 지방족 탄화수소로 치환되는 경우, 치환기군 ST1에서 알킬기는 선택되지 않는다.), 화합물.

청구항 53

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, L이, C1 내지 6 알킬기, 또는 비치환이거나 1개 또는 2개의 C1 내지 3 알킬기 혹은 C1 내지 3 알콕시기로 치환된 벤젠인, 화합물.

청구항 54

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, L이 C1 내지 6 알킬기인, 화합물.

청구항 55

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, D의 반응성 관능기가, C-C, 아미노, 에테르, 카르보닐, 아마이드, 에스테르, 우레아, 술피드, 디술피드, 술폭시드, 술폰아מיד, 또는 술포닐 결합을 구성할 수 있는 반응성 관능기인, 화합물.

청구항 56

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, D의 반응성 관능기가, 탈리기를 갖는 C1 탄화수소, 아미노기, 수산기, 카르보닐기의 전구체, 티올기 또는 알데히드기인, 화합물.

청구항 57

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, D의 반응성 관능기가, 할로겐 원자를 갖는 C1 탄화수소, 술폰산계 탈리기를 갖는 C1 탄화수소, 아미노기, 수산기, 카르복시기, 할로겐화 카르복시기, 티올기 또는 알데히드기인, 화합물.

청구항 58

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, D의 반응성 관능기가, $-CH_2Cl$, $-CH_2Br$, $-CH_2OSO_2CH_3$, $-CH_2OSO_2CF_3$, 아미노기, 수산기 또는 카르복시기인, 화합물.

청구항 59

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, D의 반응성 관능기가, 제1급 아미노기인, 화합물.

청구항 60

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 절단 가능한 부위가, 테옥시아데노신, 테옥시구아노신, 티미딘 및 테옥시시티딘 중 어느 것도 아닌 테옥시리보뉴클레오티드인, 화합물.

청구항 61

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 절단 가능한 부위가, 테옥시우리딘, 브로모테옥시우리딘, 테옥시이노신, 8-히드록시테옥시구아노신, 3-메틸-2'-테옥시아데노신, N6-에테노-2'-테옥시아데노신, 7-메틸-2'-테옥시구아노신, 2'-테옥시크산토신, 또는 5,6-디히드록시-5,6디히드로테옥시티미딘인, 화합물.

청구항 62

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 절단 가능한 부위가, 테옥시우리

딘 또는 테옥시이노신인, 화합물.

청구항 63

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 절단 가능한 부위가, 테옥시우리딘인, 화합물.

청구항 64

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 절단 가능한 부위가, 테옥시이노신인, 화합물.

청구항 65

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 절단 가능한 부위가, 테옥시이노신으로부터 3' 방향으로 2번째의 포스포디에스테르 결합인, 화합물.

청구항 66

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 절단 가능한 부위가, 리보뉴클레오시드인, 화합물.

청구항 67

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 절단 가능한 부위가, 하나인, 화합물.

청구항 68

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 절단 가능한 부위를, E 또는 (LP1)_p에 포함하며, 또한 적어도 하나의 절단 가능한 부위를, F 또는 (LP2)_q에 포함하는, 화합물.

청구항 69

제68항에 있어서, E 또는 (LP1)_p에 포함되는 절단 가능한 부위와, F 또는 (LP2)_q에 포함되는 절단 가능한 부위가 다른 조건에서 절단 가능한, 화합물.

청구항 70

제8항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, An이, n개의 빌딩 블록 a₁ 내지 a_n(n은 1 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조인, 화합물.

청구항 71

제8항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, An이, 저분자 유기 화합물인, 화합물.

청구항 72

제8항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, An의 빌딩 블록이, 분자량 500 이하의 화합물인, 화합물.

청구항 73

제8항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, An의 빌딩 블록이, 분자량 300 이하의 화합물인, 화합물.

청구항 74

제8항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, An의 빌딩 블록이, 분자량 150 이하의 화합물인, 화합물.

청구항 75

제8항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, An이, H, B, C, N, O, Si, P, S, F, Cl, Br 및 I로 이루어지는 원소군에서 단독 또는 다르게 선택되는 원소에 의해 구성되는 유기 화합물인, 화합물.

청구항 76

제8항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, An이, 아릴기, 비방향족 시클릴기, 헤테로아릴기 및 비방향족 헤테로시클릴기로 이루어지는 치환기군에서 단독 또는 다르게 선택되는 치환기를 갖는 저분자 유기 화합물인, 화합물.

청구항 77

제8항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, An이 분자량 5000 이하인, 화합물.

청구항 78

제8항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, An이 분자량 800 이하인, 화합물.

청구항 79

제8항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, An이 분자량 500 이하인, 화합물.

청구항 80

제8항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, An이 폴리펩티드인, 화합물.

청구항 81

제8항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, Sp가 결합인, 화합물.

청구항 82

제8항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, Sp가 2관능성 스페이서이며,

해당 2관능성 스페이서가 SpD-SpL-SpX이며,

SpD가, C-C, 아미노, 에테르, 카르보닐, 아마이드, 에스테르, 우레아, 술피드, 디술피드, 술폭시드, 술폰아미드, 또는 술폰닐 결합을 구성할 수 있는 반응성기 유래의 2가의 기이며,

SpL이, 폴리알킬렌글리콜, 폴리에틸렌, 임의로 헤테로 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 20 지방족 탄화수소, 펩티드, 올리고뉴클레오티드 또는 이들의 조합이고,

SpX가, 아미노, 카르보닐, 아마이드, 에스테르, 우레아, 또는 술폰아미드 결합을 형성하는 반응기 유래의 2가의 기인, 화합물.

청구항 83

제8항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, Sp가 2관능성 스페이서이며,

해당 2관능성 스페이서가 SpD-SpL-SpX이며,

SpD가, 제1급 아미노기 유래의 2가의 기이며,

SpL이, 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌이며,

SpX가, 카르복시기 유래의 2가의 기인, 화합물.

청구항 84

제8항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 2중쇄를 형성 가능한 서열인, 화합물.

청구항 85

제8항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 상보적인 염기 서열을 포함하는, 화합물.

청구항 86

제8항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 각각 1 내지 200 염기의 길이인, 화합물.

청구항 87

제8항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 각각 3 내지 150 염기의 길이인, 화합물.

청구항 88

제8항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 각각 30 내지 150 염기의 길이인, 화합물.

청구항 89

제8항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 평활 말단을 갖는, 화합물.

청구항 90

제8항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 돌출 말단을 갖는, 화합물.

청구항 91

제90항에 있어서, 돌출 말단의 돌출부가, 1 내지 30 염기의 길이인, 화합물.

청구항 92

제90항 또는 제91항에 있어서, 돌출 말단의 돌출부가, 2 내지 5 염기의 길이인, 화합물.

청구항 93

제90항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 돌출 말단을 갖고, 당해 돌출 말단에, 또한 특정 분자 식별 서열이 결합되는, 화합물.

청구항 94

제8항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, X 및 Y의 어느 한쪽에, 기능성 분자가 결합된, 화합물.

청구항 95

제8항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, X 및 Y의 어느 한쪽에, 비오틴이 결합된, 화합물.

청구항 96

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제95항 중 어느 한 항에 기재된 화합물을 포함하는 화합물 라이브러리.

청구항 97

제1항, 제4항, 제5항, 제8항 내지 제95항 중 어느 한 항에 기재된 화합물을 포함하는 DNA 코드화 라이브러리.

청구항 98

제96항 또는 제97항에 있어서, 1000 이상의 다른 화합물에 의해 구성되는, 라이브러리.

청구항 99

화합물 An-Sp-C-Bn의 제조 방법이며,

An은, n개의 빌딩 블록 a1 내지 an(n은, 2 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조이며,

Sp는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,

C는, 적어도 하나의 「선택적으로 절단 가능한 부위」를 갖는 헤어핀형의 헤드피스이며,

Bn은, An의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 부분 구조이며,

C에 대하여, 이하의 공정;

(a) a1-Sp를 결합시키는 것, 또는 Sp 및 a1을 결합시키는 것, 및

(b) a1의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 결합시키는 것

에 의해 화합물 A1-Sp-C-B1을 얻는 것,

이어서, A(m-1)-Sp-C-B(m-1)(m은 2 내지 n의 정수이다.)에 대하여, 이하의 공정 (c) 및 (d)를, m이 2 내지 n까지 오름차순으로 반복하는 것;

(c) A 부분에 an을 결합시키는 것, 및

(d) B 부분의 말단에 an의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 결합시키는 것

에 의해 화합물 Am-Sp-C-Bm을 얻는 것을 포함하고,

공정 (a) 및 (b), 공정 (c) 및 (d)는 임의의 순서로 행할 수 있는, 방법.

청구항 100

제9항 내지 제95항 중 어느 한 항에 기재된 화합물인 An-Sp-C-Bn의 제조 방법이며,

An은, n개의 빌딩 블록 a1 내지 an(n은, 2 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조이며,

Sp는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,

C는, 적어도 하나의 「선택적으로 절단 가능한 부위」를 갖는 헤어핀형의 헤드피스이며,

Bn은, An의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 부분 구조이며,

C에 대하여, 이하의 공정;

(a) a1-Sp를 결합시키는 것, 또는 Sp 및 a1을 결합시키는 것, 및

(b) a1의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 결합시키는 것

에 의해 화합물 A1-Sp-C-B1을 얻는 것,

이어서, A(m-1)-Sp-C-B(m-1)(m은 2 내지 n의 정수이다.)에 대하여, 이하의 공정 (c) 및 (d)를, m이 2 내지 n까지 오름차순으로 반복하는 것;

(c) A 부분에 an을 결합시키는 것, 및

(d) B 부분의 말단에 an의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 결합시키는 것

에 의해 화합물 Am-Sp-C-Bm을 얻는 것을 포함하고,

공정 (a) 및 (b), 공정 (c) 및 (d)는 임의의 순서로 행할 수 있는, 방법.

청구항 101

제9항 내지 제95항 중 어느 한 항에 기재된 화합물인 An-Sp-C-Bn(An, Sp, C 및 Bn은 상기와 동일한 의미를 나타냄)의 제조 방법이며,

C에 대하여, 이하의 공정;

(a) a1-Sp를 결합시키는 것, 또는 Sp 및 a1을 결합시키는 것, 및

(b) a1의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 결합시키는 것

에 의해 화합물 A1-Sp-C-B1을 얻는 것,

이어서, $A(m-1)\text{-Sp-C-B}(m-1)$ (m 은 2 내지 n 의 정수이다.)에 대하여, 이하의 공정 (c) 및 (d)를, m 이 2 내지 n 까지 오름차순으로 반복하는 것;

(c) A 부분에 a_n 을 결합시키는 것, 및

(d) B 부분의 말단에 a_n 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 결합시키는 것

에 의해 화합물 $A_m\text{-Sp-C-B}_m$ 을 얻는 것을 포함하고,

공정 (a) 및 (b), 공정 (c) 및 (d)는 임의의 순서로 행할 수 있는, 방법.

청구항 102

적어도 하나의 식 (III)

$A_n\text{-Sp-C-B}_n$ (III)

(식 중,

A_n 은, n 개의 빌딩 블록 a_1 내지 a_n (n 은 1 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조이며,

Sp 는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,

C 는, 적어도 하나의 「선택적으로 절단 가능한 부위」를 갖는 헤어핀형의 헤드피스이며,

B_n 은, A_n 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 부분 구조이다.)

으로 표시되는 화합물을 포함하는 화합물 라이브러리의 평가 방법이며, 이하의 스텝:

(1) 화합물 라이브러리를, 생물학적 표적과, 화합물 라이브러리의 적어도 하나의 라이브러리 분자가 표적과 결합하기 위해 적합한 조건 하에서 접촉시키는 것,

(2) 표적과 결합하지 않은 라이브러리 분자를 제거하고, 생물학적 표적으로 친화성이 있는 라이브러리 분자를 선별하는 것,

(3) 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 것,

(4) B_n 을 구성하는 올리고뉴클레오티드의 서열을 동정하는 것,

(5) (4)에 있어서 결정된 서열을 사용하여, 생물학적 표적과 결합하는 1 이상의 화합물의 구조를 동정하는 것,

에 의해 구성되는 방법.

청구항 103

적어도 하나의 식 (III)

$A_n\text{-Sp-C-B}_n$ (III)

(식 중,

A_n 은, n 개의 빌딩 블록 a_1 내지 a_n (n 은 1 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조이며,

Sp 는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,

C 는, 적어도 하나의 「선택적으로 절단 가능한 부위」를 갖는 헤어핀형의 헤드피스이며,

B_n 은, A_n 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 부분 구조이다.)

으로 표시되는, 제8항 내지 제95항 중 어느 한 항에 기재된 화합물을 포함하는 화합물 라이브러리의 평가 방법이며, 이하의 스텝:

(1) 화합물 라이브러리를, 생물학적 표적과, 화합물 라이브러리의 적어도 하나의 라이브러리 분자가 표적과 결합하기 위해 적합한 조건 하에서 접촉시키는 것,

- (2) 표적과 결합하지 않은 라이브러리 분자를 제거하고, 생물학적 표적으로 친화성이 있는 라이브러리 분자를 선별하는 것,
- (3) 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 것,
- (4) Bn을 구성하는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 동정하는 것,
- (5) (4)에 있어서 결정된 서열을 사용하여, 생물학적 표적과 결합하는 1 이상의 화합물의 구조를 동정하는 것에 의해 구성되는 방법.

청구항 104

제102항 또는 제103항에 있어서, 스텝 (3)과 (4) 사이에, Bn을 구성하는 올리고뉴클레오타이드를 증폭시키는 스텝을 포함하는, 방법.

청구항 105

제102항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 스텝이, 효소에 의해 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 스텝인, 방법.

청구항 106

제102항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 스텝이, 효소와 화학적 조건 변화의 조합에 의해 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 스텝인, 방법.

청구항 107

제105항 또는 제106항에 있어서, 효소가 글리코실라아제 및 뉴클레아제로부터 적어도 하나 선택되는, 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 효소가 우라실 DNA 글리코실라아제인, 방법.

청구항 109

제107항에 있어서, 효소가 엔도뉴클레아제 VIII인, 방법.

청구항 110

제107항에 있어서, 효소가 우라실 DNA 글리코실라아제와 엔도뉴클레아제 VIII의 조합인, 방법.

청구항 111

제107항에 있어서, 효소가 알킬아데닌 DNA 글리코실라아제인, 방법.

청구항 112

제107항에 있어서, 효소가 엔도뉴클레아제 V인, 방법.

청구항 113

제106항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적 조건 변화가, 물을 포함한 용액 중에서의 50 내지 100°C의 가열인, 방법.

청구항 114

제106항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적 조건 변화가, 물을 포함한 용액 중에서의 80 내지 95°C의 가열인, 방법.

청구항 115

제106항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적 조건 변화가, pH 8 내지 13의 염기성 조건인, 방법.

청구항 116

제106항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적 조건 변화가, pH 8 내지 11의 염기성 조건인, 방법.

청구항 117

제106항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적 조건 변화가, pH 9 내지 10의 염기성 조건인, 방법.

청구항 118

제102항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, DNA 태그의 말단 부근에 절단 가능한 부위를 마련하여, 목적에 따라서 당해 부위를 절단하고, 새로운 돌출 말단을 생성하여, 당해 점착 말단에, 특정 분자 식별 서열을 라이게이팅하고, Bn을 구성하는 올리고뉴클레오티드의 서열을 동정하는, 방법.

청구항 119

제118항에 있어서, DNA 태그의 말단 부근에 마련한 절단 가능한 부위와, C에 포함되는 절단 가능한 부위가 다른 조건에서 절단되는, 방법.

청구항 120

절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용하는 방법.

청구항 121

제120항에 있어서, 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는, 2분쇄 핵산보다도 화학적으로 안정된 핵산을 사용하여, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용하는, 방법.

청구항 122

제120항 또는 제121항에 있어서, 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여, 상기 화합물에 화학 구조 변환을 실시한 후, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용하는 방법.

청구항 123

제120항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여, 또한 상기 핵산에 화학 구조 변환을 실시한 후, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용하는, 방법.

청구항 124

제120항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여, 또한 상기 핵산에 핵산 신장 반응을 실시한 후, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용하는, 방법.

청구항 125

제120항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용 가능하게 하여, PCR 반응을 실시하는, 방법.

청구항 126

제120항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물의 기능성 평가를 위해 사용하는, 방법.

청구항 127

제120항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물의 생물 활성 평가를 위해 사용하는, 방법.

청구항 128

제120항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, DEL에 사용하는, 방법.

청구항 129

제120항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, DEL의 제조에 사용하는, 방법.

청구항 130

절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여 합성된 DEL 화합물에 대하여, 절단 가능한 부위를 절단하여, 1본쇄 DNA를 갖는 DEL로 변환하는 방법.

청구항 131

절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여 합성된 DEL 화합물에 대하여, 절단 가능한 부위를 절단하여, 1본쇄 DNA를 갖는 DEL로 변환하고, 크로스 링커 수식 DNA와 2본쇄를 형성시키는 방법.

청구항 132

절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여 합성된 DEL 화합물에 대하여, 절단 가능한 부위를 절단하여, 크로스 링커 수식 프라이머를 부여하고, 부여한 프라이머를 신장시켜, 크로스 링커 수식 2본쇄 DEL 화합물을 합성하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 절단 가능한 부위를 DNA쇄 중에 포함하는 DNA 코드화 라이브러리에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 화합물 라이브러리란, 의약품 후보 화합물 등, 특정한 활성을 가질 가능성이 있는 화합물을 계통적으로 모은 화합물 유도체군이다. 이 화합물 라이브러리는, 많은 경우コンビナトリ알 화학의 합성 기술과 방법론에 기초하여 합성된다.コンビナトリ알 화학이란, 조합론에 기초하여 열거하여 설계된 일련의 화합물 라이브러리를 계통적인 합성 경로로 효율적으로 다품종 합성하기 위한 실험 방법과 그것에 관한 연구 분야이다.

[0003]コンビナトリ알 화학에 기초하는 화합물 라이브러리의 일종으로서, DNA 코드화 라이브러리가 있다. 이하, DNA 코드화 라이브러리를 적절히 DEL로 약칭한다. DEL에서는, 라이브러리화된 각 화합물에, DNA의 태그가 부가된다. DNA의 태그는, 각 화합물의 각 구조를 동정할 수 있도록 서열이 설계되어 있으며, 화합물의 표지로서 기능한다(특허문헌 1 내지 3).

[0004] 종래 알려져 있는 DEL의 DNA쇄 구조는, 2본쇄와 헤어핀쇄의 2가지가 대표적이다.

[0005] 이하, 2본쇄 DEL과 헤어핀쇄 DEL의 개요와 장단점에 대하여 개략적으로 설명한다.

[0006] (1) 헤어핀쇄 DEL

[0007] 헤어핀쇄 DNA를 사용하는 DEL은, 상보적인 2개의 DNA쇄가 연결된 1본쇄 구조이며, 각종 빌딩 블록 도입을 위한 관능기를 갖는 헤어핀형 DNA를 출발 원료(헤드피스)로서 사용하여 합성된다(특허문헌 3, 비특허문헌 1 및 2).

[0008] (A) 장점

[0009] (a) 짧은 DNA 태그를 사용할 수 있다.

[0010] 본 방법에서는, 많은 경우, 2mer의 점착 말단을 갖는 9 내지 13mer 정도의 비교적 짧은 2본쇄 DNA 태그가 사용되고 있으며, 2본쇄 DNA 태그는 DNA 리가아제에 의한 라이게이션 반응에 의해 도입된다. 이러한 짧은 DNA 태그의 사용은, 헤어핀쇄 DNA가 분자 내에서 강하게 2중쇄를 형성하고, 점착 말단 이외의 DNA 부위가 DNA 태그와 간섭하지 않는 것에 의해 가능하게 되었다. 짧은 2본쇄 DNA 태그의 사용은, DEL 합성에 있어서, 몇 가지의 이점을 갖는다. 하나의 이점으로서, DNA 태그의 합성에 소요되는 비용이 낮은 것을 들 수 있다. 또한, 또 하나의 이점으로서, 더 짧은 DNA 태그의 사용은, 동일한 반응 사이클수를 코딩하는 경우, DEL의 전체 길이가 짧게 억제

되는 것을 들 수 있다. 즉, 보다 많은 사이클수를 코딩해도, 차세대 시퀀서에 의해 효율적으로 DNA 서열을 판독 가능한 범위까지 DEL의 전체 길이를 억제할 수 있다. 실제로 비특허문헌 3에서는, 헤어핀쇄 DNA를 사용함으로써, 6 사이클인 반응을 코딩한 헤어핀쇄 DNA를 사용한 DEL의 구축이 달성되었다.

- [0011] (b) 화학적 안정성이 높다
- [0012] 2분쇄와 달리 헤어핀쇄에서는, 가열 반응 중에 2중쇄 구조가 용해되어도, 그 후의 재어닐 조건 하에서, 쇠 교환을 일으키지 않고, 원래의 분자 내에서의 2중쇄가 재형성된다. 따라서, 헤어핀쇄 DNA를 사용하는 DEL은, 보다 광범위한 화학 조건에서 사용 가능하다는 이점을 갖는다(비특허문헌 2). 또한, 일반적으로 핵산쇄는, 동일한 쇠 길이이면 헤어핀쇄쪽이 2분쇄보다도 강하게 2중쇄를 형성한다(Tm값이 높다.). 따라서, 빌딩 블록 도입 시의 다양한 화학적 조건 하에서, 헤어핀쇄 DNA의 각 화학 구조, 특히 염기부의 구조는 2분쇄에 비해 구조 변환에 저항할 것이다.
- [0013] (B) 단점
- [0014] 헤어핀쇄 DNA는, 그의 강한 2중쇄 형성능으로 인해, 2중쇄를 용해시켜 프라이머 올리고뉴클레오티드를 결합시켜 폴리메라아제 반응 개시시키는 것이 어렵고, PCR 효율이 낮다는 과제를 갖고 있다(특허문헌 4).
- [0015] (2) 2분쇄 DEL
- [0016] 2분쇄 DNA를 사용하는 DEL은, 각종 빌딩 블록 도입을 위한 관능기를 갖는 1분쇄 DNA(헤어핀쇄가 아닌 1분쇄 DNA) 또는 2분쇄 DNA를 출발 원료(헤드피스)로 하여 합성된다.
- [0017] (A) 단점
- [0018] 헤어핀쇄 DNA를 사용하는 DEL과 대조적으로, 많은 경우, 4 내지 10mer의 점착 말단을 갖는 20 내지 30mer 정도의 비교적 긴 1분쇄 또는 2분쇄 DNA 태그가 사용되고 있고(특허문헌 2, 비특허문헌 4), 3 사이클 정도의 반응을 코딩한 DEL이 일반적이다.
- [0019] (B) 장점
- [0020] 2분쇄 DNA를 사용하는 DEL은, PCR 효율의 관점에서는 헤어핀쇄 DNA와 같은 과제를 갖지 않는다. 또한, 헤어핀쇄 DNA와 달리, 2분쇄 DNA는 변성에 의해 1분쇄 DNA로 하는 것, 혹은 쇠 교환 반응을 실시하는 것이 가능하고, 각종 용도에 입각한 DNA 구조로 변환함으로써, 폭넓은 평가 방법에 적응할 수 있다는 이점을 갖는다. 예를 들어 DNA의 2분쇄 형성능을 이용한 감도비가 높은 평가 방법이 개발되어 있다(비특허문헌 5 및 6).
- [0021] 이와 같이, 헤어핀쇄 DNA와 2분쇄 DNA는, 각각 DEL의 합성 시, 평가 시에 있어서 장점을 갖기는 하지만, 장점을 양립시키는 기술은 알려져 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0022] (특허문헌 0001) 국제 공개 제93/20243호
- (특허문헌 0002) 국제 공개 제2004/039825호
- (특허문헌 0003) 국제 공개 제2005/058479호
- (특허문헌 0004) 국제 공개 제2010/094036호

비특허문헌

- [0023] (비특허문헌 0001) 네이처 · 케미컬 · 바이올로지, 2009년, 5권, 647-654 페이지
- (비특허문헌 0002) A Handbook for DNA-Encoded Chemistry, Robert A. Goodnow, Jr.편, John Wiley & Sons, Inc.
- (비특허문헌 0003) 에이씨에스 · 케미컬 · 바이올로지, 2018년, 13권, 53-59 페이지
- (비특허문헌 0004) 네이처 · 케미스트리, 2018년, 10권, 441-448 페이지

(비특허문헌 0005) 애뉴얼 · 리뷰 · 오브 · 바이오케미스트리, 2018년, 87권, 479-502 페이지

(비특허문헌 0006) 에이씨에스 · 콘비나트리알 · 사이언스, 2020년, 22권, 204-212 페이지

발명의 내용

해결하려는 과제

[0024] 본 발명은, 절단 가능한 부위를 DNA쇄 중에 포함하는 DEL, 및 DEL의 제조 방법을 제공한다.

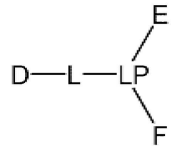
과제의 해결 수단

[0025] DNA 등의 핵산 화학의 하나로서 핵산의 절단 기술이 있다. 예를 들어, DNA쇄 중에 테옥시우리딘을 도입하면, USER(등록 상표) 효소에 의해 선택적으로 절단할 수 있다.

[0026] 본 발명자는 예의 연구의 결과, 예를 들어 테옥시우리딘과 같은 절단 가능한 부위를 DNA쇄 중에 도입함으로써, 헤어핀쇄 DNA와 2본쇄 DNA의 장점을 양립시킬 수 있는 것을 발견하여, 본 발명을 완성시켰다.

[0027] 따라서, 본 발명은 이하와 같다.

[0028] [1] 식 (I)



(I)

[0029]

(식 중,

[0031] E 및 F는, 각각 독립적으로

[0032] 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

[0033] 단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

[0034] LP는, 루프 부위이며,

[0035] L은, 링커이며,

[0036] D는, 반응성 관능기이다.)

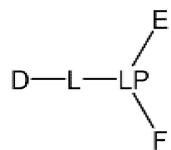
[0037] 로 표시되는 화합물이며,

[0038] E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는 화합물.

[0039] [2] [1]에 기재된 화합물을 포함하는, 화합물 라이브러리의 헤드피스의 조제에 사용하기 위한 조성물.

[0040] [3] [1]에 기재된 화합물을 포함하는, DNA 코드화 라이브러리의 헤드피스의 조제에 사용하기 위한 조성물.

[0041] [4] 식 (I)



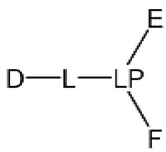
(I)

[0042]

(식 중,

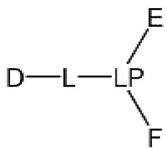
[0043]

- [0044] E 및 F는, 각각 독립적으로
- [0045] 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,
- [0046] 단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,
- [0047] LP는, 루프 부위이며,
- [0048] L은, 링커이며,
- [0049] D는, 반응성 관능기이다.)
- [0050] 로 표시되는 화합물이며,
- [0051] E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖고,
- [0052] 화합물 라이브러리의 헤드피스로서 사용하는 화합물.
- [0053] [5] 식 (I)



(I)

- [0054]
- [0055] (식 중,
- [0056] E 및 F는, 각각 독립적으로
- [0057] 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,
- [0058] 단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,
- [0059] LP는, 루프 부위이며,
- [0060] L은, 링커이며,
- [0061] D는, 반응성 관능기이다.)
- [0062] 로 표시되는 화합물이며,
- [0063] E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖고,
- [0064] DNA 코드화 라이브러리의 헤드피스로서 사용하는 화합물.
- [0065] [6] 식 (I)



(I)

- [0066]
- [0067] (식 중,
- [0068] E 및 F는, 각각 독립적으로
- [0069] 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,
- [0070] 단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,
- [0071] LP는, 루프 부위이며,

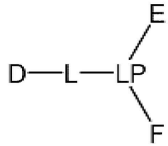
[0072] L은, 링커이며,

[0073] D는, 반응성 관능기이다.)

[0074] 로 표시되는 화합물이며,

[0075] E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는 화합물 라이브러리의 헤드피스.

[0076] [7] 식 (I)



(I)

[0077]

[0078] (식 중,

[0079] E 및 F는, 각각 독립적으로

[0080] 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

[0081] 단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

[0082] LP는, 루프 부위이며,

[0083] L은, 링커이며,

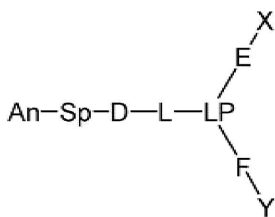
[0084] D는, 반응성 관능기이다.)

[0085] 로 표시되는 화합물이며,

[0086] E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는 DNA 코드화 라이브러리의 헤드피스.

[0087] [8]

[0088] 식 (II)



(II)

[0089]

[0090] (식 중,

[0091] X 및 Y는, 올리고뉴클레오티드체이며,

[0092] E 및 F는, 각각 독립적으로

[0093] 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,

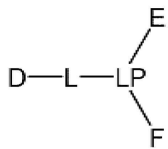
[0094] 단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,

[0095] LP는, 루프 부위이며,

[0096] L은, 링커이며,

[0097] D는, 반응성 관능기 유래의 2가의 기이며,

- [0098] Sp는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,
- [0099] An은, 적어도 하나의 빌딩 블록에 의해 구성되는 부분 구조이다.)
- [0100] 로 표시되는 화합물이며,
- [0101] X와 Y는, 적어도 일부에서 2중쇄를 형성할 수 있는 서열을 갖고,
- [0102] X는 5' 말단에서 E에 결합하고,
- [0103] Y는 3' 말단에서 F에 결합하고,
- [0104] E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는 화합물.
- [0105] [9]
- [0106] 식 (III)
- [0107] An-Sp-C-Bn (III)
- [0108] (식 중,
- [0109] An 및 Sp는, [8]과 동일한 의미를 나타내고,
- [0110] Bn은, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y로 형성되는 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그를 나타내
- [0111] 고, C는, 식 (I)



(I)

- [0112]
- [0113] (식 중, E, LP, L, D 및 F는, [8]과 동일한 의미를 나타내고, 단 D는 Sp에 결합하고, E와 F는 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 Bn의 각각 대응하는 말단측에 결합한다.)
- [0114] 로 표시되는,
- [0115] [8]에 기재된 화합물.
- [0116] [10] An이, [8]과 동일하고, 또한 n개의 빌딩 블록 a₁ 내지 a_n(n은 1 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조이며,
- [0117] Bn이, 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y로 형성되는 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그이며, 또한 An의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 부분 구조인,
- [0118] [8] 또는 [9]에 기재된 화합물.
- [0119] [11] LP가,
- [0120] (LP₁)_p-LS-(LP₂)_q로 표시되는 루프 부위이며,
- [0121] LS는, 이하의 (A) 내지 (C)에 기재되는 화합물군에서 선택되는 부분 구조이며,
- [0122] (A) 뉴클레오티드
- [0123] (B) 핵산 아날로그
- [0124] (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3가의 기
- [0125] LP₁은, 이하의 (1) 및 (2)에 기재되는 화합물군에서 단독 혹은 다르게 p개 선택되는 각 부분 구조이며,
- [0126] (1) 뉴클레오티드

- [0127] (2) 핵산 아날로그
- [0128] LP2는, 이하의 (1) 및 (2)에 기재되는 화합물군에서 단독 혹은 다르게 q개 선택되는 각 부분 구조이며,
- [0129] (1) 뉴클레오티드
- [0130] (2) 핵산 아날로그
- [0131] p와 q의 총 수가 0 내지 40인,
- [0132] [1], [4], [5], [8] 내지 [10] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0133] [12] p와 q의 총 수가 2 내지 20인, [11]에 기재된 화합물.
- [0134] [13] p와 q의 총 수가 2 내지 10인, [11]에 기재된 화합물.
- [0135] [14] p와 q의 총 수가 2 내지 7인, [11]에 기재된 화합물.
- [0136] [15] p와 q의 총 수가 0인, [11]에 기재된 화합물.
- [0137] [16] LP1, LP2 및 LS가, 각각 이하의 구조:
- [0138] (A) 뉴클레오티드
- [0139] 또는
- [0140] (B) 이하의 (B11) 내지 (B15)를 요건으로 하는 핵산 아날로그
- [0141] (B11) 인산(또는 상당 부위) 및 수산기(또는 그 상당 부위)를 갖는 것,
- [0142] (B12) 탄소, 수소, 산소, 질소, 인 또는 황에 의해 구성되는 것,
- [0143] (B13) 분자량이 142 내지 1500인 것,
- [0144] (B14) 잔기 원자수가 3 내지 30인 것,
- [0145] (B15) 잔기간의 원자의 결합 양식은, 모두 단결합이거나, 또는 1 내지 2개의 이중 결합을 포함하며 나머지는 단결합인 것,
- [0146] 에서 단독 혹은 다르게 선택되는 구조인, [11] 내지 [15] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0147] [17] LP1, LP2 및 LS가, 각각 이하의 구조:
- [0148] (A) 뉴클레오티드
- [0149] 또는
- [0150] (B) 이하의 (B21) 내지 (B25)를 요건으로 하는 핵산 아날로그
- [0151] (B21) 인산 및 수산기를 갖는 것,
- [0152] (B22) 탄소, 수소, 산소, 질소 또는 인에 의해 구성되는 것,
- [0153] (B23) 분자량이 142 내지 1000인 것,
- [0154] (B24) 잔기 원자수가 3 내지 15인 것,
- [0155] (B25) 잔기간의 원자의 결합 양식은, 모두 단결합인 것,
- [0156] 에서 단독 혹은 다르게 선택되는 구조인, [11] 내지 [16] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0157] [18] LP1, LP2 및 LS가, 각각 이하의 구조:
- [0158] (A) 뉴클레오티드
- [0159] 또는
- [0160] (B) 이하의 (B31) 내지 (B35)를 요건으로 하는 핵산 아날로그
- [0161] (B31) 인산 및 수산기를 갖는 것,

[0162] (B32) 탄소, 수소, 산소, 질소 또는 인에 의해 구성되는 것,

[0163] (B33) 분자량이 142 내지 700인 것,

[0164] (B34) 잔기인 원자수가 4 내지 7인 것,

[0165] (B35) 잔기인 원자의 결합 양식은, 모두 단결합인 것,

[0166] 에서 단독 혹은 다르게 선택되는 구조인, [11] 내지 [17] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0167] [19] LP1 및 LP2가, 각각 이하:

[0168] (B41) d-스페이서(Spacer),

[0169] (B5) 폴리알킬렌글리콜인산에스테르

[0170] 중 어느 것인, [11] 내지 [18] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0171] [20] LP1 및 LP2가, 각각 디에틸렌글리콜인산에스테르 또는 트리에틸렌글리콜인산에스테르인, [11] 내지 [19] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0172] [21] LP1 및 LP2가, 각각 트리에틸렌글리콜인산에스테르인, [11] 내지 [20] 중 어느 것에 기재된 화합물.

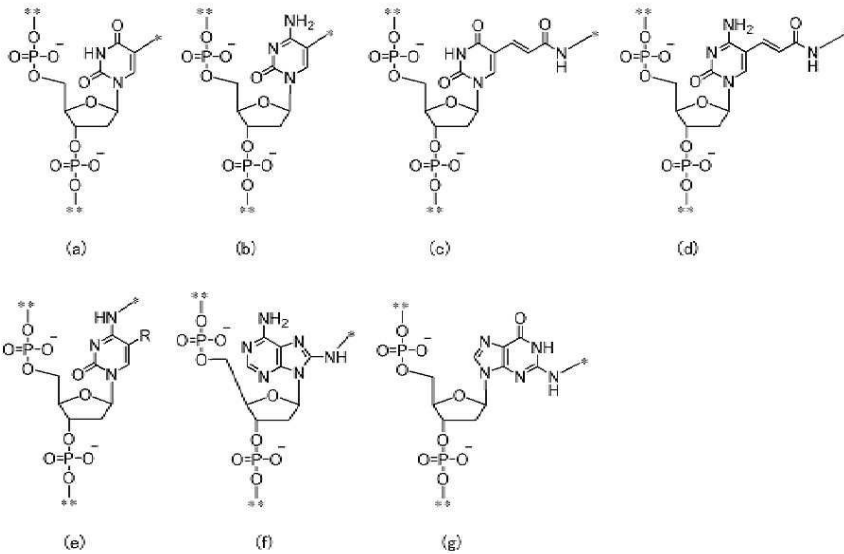
[0173] [22] LP1 및 LP2가, 각각 d-스페이서인, [11] 내지 [19] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0174] [23]

[0175] LP1 및 LP2가, 각각 뉴클레오티드인,

[0176] [11] 내지 [18] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0177] [24] LS가, 식 (a) 내지 식 (g):

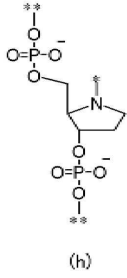


[0178]

[0179] (식 중, *은 링커와의 결합 위치를 의미하고, **은 LP1 또는 LP2와의 결합 위치를 의미하고, R은 수소 원자 또는 메틸기이다.)

[0180] 중 어느 것인, [11] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0181] [25] LS가, 식 (h):



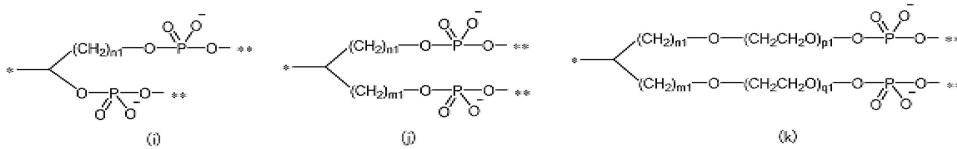
[0182]

[0183] (식 중, *은 링커와의 결합 위치를 의미하고, **은 LP1 또는 LP2와의 결합 위치를 의미한다.)

[0184] 인, [11] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0185] [26] LS가, 폴리알킬렌글리콜인산에스테르인, [11] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0186] [27] LS가, 식 (i) 내지 식 (k):

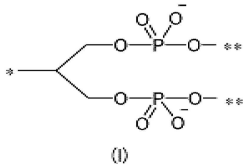


[0187]

[0188] (식 중, n1, m1, p1 및 q1은 각각 독립적으로 1 내지 20의 정수이며, *은 링커와의 결합 위치를 의미하고, **은 LP1 또는 LP2와의 결합 위치를 의미한다.)

[0189] 인, [11] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0190] [28] LS가, 식 (l):



[0191]

[0192] (식 중, *은 링커와의 결합 위치를 의미하고, **은 LP1 또는 LP2와의 결합 위치를 의미한다.)

[0193] 인, [11] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0194] [29] LS가, (B42), (B43) 또는 (B44):

[0195] (B42) 아미노 C6 dT

[0196] (B43) mdC(TEG-아미노)

[0197] (B44) Uni-Link(상표 등록) 아미노 모디파이어(Amino Modifier)

[0198] 중 어느 것인, [11] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0199] [30] LS가, 뉴클레오티드인,

[0200] [11] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.

[0201] [31] LS가, (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3개의 기이며, (C)가 이하의 구조:

[0202] (1) 치환기를 가져도 되고, 1 내지 3개의 헤테로 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 10 지방족 탄화수소,

[0203] (2) 치환기를 가져도 되는 C6 내지 14 방향족 탄화수소,

[0204] (3) 치환기를 가져도 되는 C2 내지 9 방향족 복소환, 또는

[0205] (4) 치환기를 가져도 되는 C2 내지 9 비방향족 복소환

- [0206] 중 어느 것인, [11] 내지 [15] 및 [19] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0207] [32] LS가, (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3가의 기이며, (C)가 이하의 구조:
- [0208] (1) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 6 지방족 탄화수소,
- [0209] (2) 치환기를 가져도 되는 C6 내지 10 방향족 탄화수소, 또는
- [0210] (3) 치환기를 가져도 되는 C2 내지 5 방향족 복소환
- [0211] 중 어느 것인, [11] 내지 [15] 및 [19] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0212] [33] LS가, (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3가의 기이며, (C)가 이하의 구조:
- [0213] (1) C1 내지 6 지방족 탄화수소,
- [0214] (2) 벤젠, 또는
- [0215] (3) C2 내지 5 질소 함유 방향족 복소환
- [0216] 여기서, 상기 (1) 내지 (3)은 비치환이거나, 또는 치환기군 ST1에서 단독 혹은 다르게 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환되어도 되고, 치환기군 ST1은, C1 내지 6 알킬기, C1 내지 6 알콕시기, 불소 원자 및 염소 원자에 의해 구성되는 군이며, 단, 치환기군 ST1이 지방족 탄화수소로 치환되는 경우, 치환기군 ST1에서 알킬기는 선택되지 않는 것,
- [0217] 중 어느 것인, [11] 내지 [15] 및 [19] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0218] [34] LS가, (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3가의 기이며, (C)가 이하의 구조:
- [0219] (1) C1 내지 6 알킬기, 또는
- [0220] (2) 비치환이거나 1개 또는 2개의 C1 내지 3 알킬기 혹은 C1 내지 3 알콕시기로 치환된 벤젠
- [0221] 중 어느 것인, [11] 내지 [15] 및 [19] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0222] [35] LS가, (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3가의 기이며, (C)가 이하의 구조:
- [0223] (1) C1 내지 6 알킬기
- [0224] 인, [11] 내지 [15] 및 [19] 내지 [23] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0225] [36] E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,
- [0226] E 및 F의 쇠 길이가, 각각 3 내지 40인,
- [0227] [1], [4], [5], [8] 내지 [35] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0228] [37] E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,
- [0229] E 및 F의 쇠 길이가, 각각 4 내지 30인,
- [0230] [1], [4], [5], [8] 내지 [36] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0231] [38] E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,
- [0232] E 및 F의 쇠 길이가, 각각 6 내지 25인,
- [0233] [1], [4], [5], [8] 내지 [37] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0234] [39] E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,
- [0235] E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,
- [0236] E와 F의 2중쇄 올리고뉴클레오티드가, 돌출 말단인,
- [0237] [1], [4], [5], [8] 내지 [38] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0238] [40] 상기 돌출 말단의 돌출부가, 2 염기 이상의 길이인, [39]에 기재된 화합물.

- [0239] [41] E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,
 [0240] E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,
 [0241] E와 F의 2중쇄 올리고뉴클레오티드가, 평활 말단인,
 [0242] [1], [4], [5], [8] 내지 [38] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0243] [42] E와 F에 포함되는, 서로 상보적인 염기 서열의 쇠 길이가, 각각 3 염기 이상인,
 [0244] [1], [4], [5], [8] 내지 [41] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0245] [43] E와 F에 포함되는, 서로 상보적인 염기 서열의 쇠 길이가, 각각 4 염기 이상인,
 [0246] [1], [4], [5], [8] 내지 [42] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0247] [44] E와 F에 포함되는, 서로 상보적인 염기 서열의 쇠 길이가, 각각 6 염기 이상인,
 [0248] [1], [4], [5], [8] 내지 [43] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0249] [45] E 및 F가, 각각 독립적으로 뉴클레오티드에 의해 구성되는 올리고머인, [1], [4], [5], [8] 내지 [44] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0250] [46] 뉴클레오티드가 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드인,
 [0251] [1], [4], [5], [8] 내지 [45] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0252] [47] 뉴클레오티드가 데옥시리보뉴클레오티드인,
 [0253] [1], [4], [5], [8] 내지 [46] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0254] [48] 뉴클레오티드가 테옥시아데노신, 테옥시구아노신, 티미딘 또는 테옥시시티딘인,
 [0255] [1], [4], [5], [8] 내지 [47] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0256] [49] E 및 F가 각각 독립적으로 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머인, [1], [4], [5], [8] 내지 [44] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0257] [50] L이,
 [0258] (1) 치환기를 가져도 되고, 1 내지 3개의 헤테로 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 20 지방족 탄화수소,
 [0259] 또는
 [0260] (2) 치환기를 가져도 되는 C6 내지 14 방향족 탄화수소
 [0261] 인, [1], [4], [5], [8] 내지 [49] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0262] [51] L이, 치환기를 가져도 되는 C1 내지 6 지방족 탄화수소, 1 혹은 2개의 산소 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 6 지방족 탄화수소, 또는 치환기를 가져도 되는 C6 내지 10 방향족 탄화수소인, [1], [4], [5], [8] 내지 [50] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0263] [52] L이, 치환기군 ST1로 치환 가능한 C1 내지 6 지방족 탄화수소, 또는 치환기군 ST1로 치환 가능한 벤젠이며, 여기서 치환기군 ST1은, C1 내지 6 알킬기, C1 내지 6 알콕시기, 불소 원자 및 염소 원자에 의해 구성되는 군인(단, 치환기군 ST1이 지방족 탄화수소로 치환되는 경우, 치환기군 ST1에서 알킬기는 선택되지 않는다.), [1], [4], [5], [8] 내지 [51] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0264] [53] L이, C1 내지 6 알킬기, 또는 비치환이거나 1개 또는 2개의 C1 내지 3 알킬기 혹은 C1 내지 3 알콕시기로 치환된 벤젠인, [1], [4], [5], [8] 내지 [52] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0265] [54] L이 C1 내지 6 알킬기인, [1], [4], [5], [8] 내지 [53] 중 어느 것에 기재된 화합물.
 [0266] [55] D의 반응성 관능기가,
 [0267] C-C, 아미노, 에테르, 카르보닐, 아미드, 에스테르, 우레아, 술피드, 디술피드, 술폭시드, 술폰아미드, 또는 술포닐 결합을 구성할 수 있는 반응성 관능기인, [1], [4], [5], [8] 내지 [54] 중 어느 것에 기재된 화합물.

- [0268] [56] D의 반응성 관능기가, 탈리기를 갖는 C1 탄화수소, 아미노기, 수산기, 카르보닐기의 전구체, 티올기 또는 알데히드기인, [1], [4], [5], [8] 내지 [55] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0269] [57] D의 반응성 관능기가, 할로젠 원자를 갖는 C1 탄화수소, 술폰산계 탈리기를 갖는 C1 탄화수소, 아미노기, 수산기, 카르복시기, 할로겐화 카르복시기, 티올기 또는 알데히드기인, [1], [4], [5], [8] 내지 [56] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0270] [58] D의 반응성 관능기가, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CF}_3$, 아미노기, 수산기 또는 카르복시기인, [1], [4], [5], [8] 내지 [57] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0271] [59] D의 반응성 관능기가, 제1급 아미노기인, [1], [4], [5], [8] 내지 [58] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0272] [60] 선택적으로 절단 가능한 부위가, 데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 티미딘 및 데옥시시티딘 중 어느 것도 아닌 데옥시리보뉴클레오티드인,
- [0273] [1], [4], [5], [8] 내지 [59] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0274] [61] 선택적으로 절단 가능한 부위가, 데옥시우리딘, 브로모데옥시우리딘, 데옥시이노신, 8-히드록시데옥시구아노신, 3-메틸-2'-데옥시아데노신, N6-에테노-2'-데옥시아데노신, 7-메틸-2'-데옥시구아노신, 2'-데옥시크산토신 또는 5,6-디히드록시-5,6디히드로데옥시티미딘인,
- [0275] [1], [4], [5], [8] 내지 [60] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0276] [62] 선택적으로 절단 가능한 부위가, 데옥시우리딘 또는 데옥시이노신인,
- [0277] [1], [4], [5], [8] 내지 [61] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0278] [63] 선택적으로 절단 가능한 부위가, 데옥시우리딘인,
- [0279] [1], [4], [5], [8] 내지 [62] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0280] [64] 선택적으로 절단 가능한 부위가, 데옥시이노신인,
- [0281] [1], [4], [5], [8] 내지 [62] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0282] [65] 선택적으로 절단 가능한 부위가, 데옥시이노신으로부터 3' 방향으로 2번째의 포스포디에스테르 결합인,
- [0283] [1], [4], [5], [8] 내지 [59] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0284] [66] 선택적으로 절단 가능한 부위가, 리보뉴클레오시드인,
- [0285] [1], [4], [5], [8] 내지 [59] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0286] [67] 선택적으로 절단 가능한 부위가, 하나인,
- [0287] [1], [4], [5], [8] 내지 [66] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0288] [68] 적어도 하나의 절단 가능한 부위를, E 또는 (LP1)_p에 포함하며, 또한 적어도 하나의 절단 가능한 부위를, F 또는 (LP2)_q에 포함하는,
- [0289] [1], [4], [5], [8] 내지 [66] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0290] [69] E 또는 (LP1)_p에 포함되는 절단 가능한 부위와, F 또는 (LP2)_q에 포함되는 절단 가능한 부위가 다른 조건에서 절단 가능한, [68]에 기재된 화합물.
- [0291] [70] An이, n개의 빌딩 블록 a₁ 내지 a_n(n은 1 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조인, [8] 내지 [69] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0292] [71] An이, 저분자 유기 화합물인, [8] 내지 [70] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0293] [72] An의 빌딩 블록이, 분자량 500 이하의 화합물인, [8] 내지 [71] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0294] [73] An의 빌딩 블록이, 분자량 300 이하의 화합물인, [8] 내지 [72] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0295] [74] An의 빌딩 블록이, 분자량 150 이하의 화합물인, [8] 내지 [73] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0296] [75] An이, H, B, C, N, O, Si, P, S, F, Cl, Br 및 I로 이루어지는 원소군이 단독 또는 다르게 선택되는 원소

에 의해 구성되는 유기 화합물인, [8] 내지 [74] 중 어느 것에 기재된 화합물.

- [0297] [76] An이, 아릴기, 비방향족 시클릴기, 헤테로아릴기 및 비방향족 헤테로시클릴기로 이루어지는 치환기군에서 단독 또는 다르게 선택되는 치환기를 갖는 저분자 유기 화합물인, [8] 내지 [75] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0298] [77] An이 분자량 5000 이하인, [8] 내지 [76] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0299] [78] An이 분자량 800 이하인, [8] 내지 [77] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0300] [79] An이 분자량 500 이하인, [8] 내지 [78] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0301] [80] An이 폴리펩티드인, [8] 내지 [70] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0302] [81] Sp가 결합인, [8] 내지 [80] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0303] [82] Sp가 2관능성 스페이서이며,
- [0304] 해당 2관능성 스페이서가 SpD-SpL-SpX이며,
- [0305] SpD가, C-C, 아미노, 에테르, 카르보닐, 아미드, 에스테르, 우레아, 술폰아미드, 디술폰아미드, 술폰아미드, 또는 술폰아미드 결합을 구성할 수 있는 반응성기 유래의 2가의 기이며,
- [0306] SpL이, 폴리알킬렌글리콜, 폴리에틸렌, 임의로 헤테로 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 20 지방족 탄화수소, 펩티드, 올리고뉴클레오티드 또는 이들의 조합이고,
- [0307] SpX가, 아미드, 아미노, 또는 술폰아미드 결합을 형성하는 반응성기 유래의 2가의 기인,
- [0308] [8] 내지 [80] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0309] [83] Sp가 2관능성 스페이서이며,
- [0310] 해당 2관능성 스페이서가 SpD-SpL-SpX이며,
- [0311] SpD가, 제1급 아미노기 유래의 2가의 기이며,
- [0312] SpL이, 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌이며,
- [0313] SpX가, 카르복시기 유래의 2가의 기인,
- [0314] [8] 내지 [81] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0315] [84] 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 2중쇄를 형성 가능한 서열인, [8] 내지 [83] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0316] [85] 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 상보적인 염기 서열을 포함하는, [8] 내지 [84] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0317] [86] 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 각각 1 내지 200 염기의 길이인, [8] 내지 [85] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0318] [87] 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 각각 3 내지 150 염기의 길이인, [8] 내지 [86] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0319] [88] 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 각각 30 내지 150 염기의 길이인, [8] 내지 [87] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0320] [89] 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 평할 말단을 갖는, [8] 내지 [88] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0321] [90] 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 돌출 말단을 갖는, [8] 내지 [88] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0322] [91] 돌출 말단의 돌출부가, 1 내지 30 염기의 길이인, [90]에 기재된 화합물.
- [0323] [92] 돌출 말단의 돌출부가, 2 내지 5 염기의 길이인, [90] 또는 [91]에 기재된 화합물.
- [0324] [93] 올리고뉴클레오티드쇄 X와 올리고뉴클레오티드쇄 Y가, 돌출 말단을 갖고, 당해 돌출 말단에, 또한 특정 분

자 식별 서열이 결합되는, [90] 내지 [92] 중 어느 것에 기재된 화합물.

- [0325] [94] X 및 Y의 어느 한쪽에, 기능성 분자가 결합된, [8] 내지 [93] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0326] [95] X 및 Y의 어느 한쪽에, 비오틴이 결합된, [8] 내지 [93] 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0327] [96] [1], [4], [5], [8] 내지 [95] 중 어느 것에 기재된 화합물을 포함하는 화합물 라이브러리.
- [0328] [97] [1], [4], [5], [8] 내지 [95] 중 어느 것에 기재된 화합물을 포함하는 DNA 코드화 라이브러리.
- [0329] [98] 1000 이상의 다른 화합물에 의해 구성되는, [96] 또는 [97]에 기재된 라이브러리.
- [0330] [99] 화합물 $A_n\text{-}S_p\text{-}C\text{-}B_n$ 의 제조 방법이며,
- [0331] A_n 은, n개의 빌딩 블록 a_1 내지 a_n (n은, 2 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조이며,
- [0332] S_p 는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,
- [0333] C는, 적어도 하나의 「선택적으로 절단 가능한 부위」를 갖는 헤어핀형의 헤드피스이며,
- [0334] B_n 은, A_n 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 부분 구조이며,
- [0335] C에 대하여, 이하의 공정;
- [0336] (a) $a_1\text{-}S_p$ 를 결합시키는 것, 또는 S_p 및 a_1 을 결합시키는 것, 및
- [0337] (b) a_1 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 태그를 결합시키는 것
- [0338] 에 의해 화합물 $A_1\text{-}S_p\text{-}C\text{-}B_1$ 을 얻는 것,
- [0339] 이어서, $A_{(m-1)}\text{-}S_p\text{-}C\text{-}B_{(m-1)}$ (m은 2 내지 n의 정수이다.)에 대하여, 이하의 공정 (c) 및 (d)를, m이 2 내지 n까지 오름차순으로 반복하는 것;
- [0340] (c) A 부분에 a_n 을 결합시키는 것, 및
- [0341] (d) B 부분의 말단에 a_n 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 태그를 결합시키는 것
- [0342] 에 의해 화합물 $A_m\text{-}S_p\text{-}C\text{-}B_m$ 을 얻는 것을 포함하고,
- [0343] 공정 (a) 및 (b), 공정 (c) 및 (d)는 임의의 순서로 행할 수 있는, 방법.
- [0344] [100] [9] 내지 [95] 중 어느 것에 기재된 화합물인 $A_n\text{-}S_p\text{-}C\text{-}B_n$ 의 제조 방법이며,
- [0345] A_n 은, n개의 빌딩 블록 a_1 내지 a_n (n은, 2 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조이며,
- [0346] S_p 는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,
- [0347] C는, 적어도 하나의 「선택적으로 절단 가능한 부위」를 갖는 헤어핀형의 헤드피스이며,
- [0348] B_n 은, A_n 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 부분 구조이며,
- [0349] C에 대하여, 이하의 공정;
- [0350] (a) $a_1\text{-}S_p$ 를 결합시키는 것, 또는 S_p 및 a_1 을 결합시키는 것, 및
- [0351] (b) a_1 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 태그를 결합시키는 것
- [0352] 에 의해 화합물 $A_1\text{-}S_p\text{-}C\text{-}B_1$ 을 얻는 것,
- [0353] 이어서, $A_{(m-1)}\text{-}S_p\text{-}C\text{-}B_{(m-1)}$ (m은 2 내지 n의 정수이다.)에 대하여, 이하의 공정 (c) 및 (d)를, m이 2 내지 n까지 오름차순으로 반복하는 것;
- [0354] (c) A 부분에 a_n 을 결합시키는 것, 및
- [0355] (d) B 부분의 말단에 a_n 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 태그를 결합시키는 것
- [0356] 에 의해 화합물 $A_m\text{-}S_p\text{-}C\text{-}B_m$ 을 얻는 것을 포함하고,

- [0357] 공정 (a) 및 (b), 공정 (c) 및 (d)는 임의의 순서로 행할 수 있는, 방법.
- [0358] [101] [9] 내지 [95] 중 어느 것에 기재된 화합물인 $A_n-Sp-C-B_n$ (A_n , Sp , C 및 B_n 은 상기와 동일한 의미를 나타냄)의 제조 방법이며,
- [0359] C 에 대하여, 이하의 공정;
- [0360] (a) a_1-Sp 를 결합시키는 것, 또는 Sp 및 a_1 을 결합시키는 것, 및
- [0361] (b) a_1 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 결합시키는 것
- [0362] 에 의해 화합물 $A_1-Sp-C-B_1$ 을 얻는 것,
- [0363] 이어서, $A_{(m-1)}-Sp-C-B_{(m-1)}$ (m 은 2 내지 n 의 정수이다.)에 대하여, 이하의 공정 (c) 및 (d)를, m 이 2 내지 n 까지 오름차순으로 반복하는 것;
- [0364] (c) A 부분에 a_n 을 결합시키는 것, 및
- [0365] (d) B 부분의 말단에 a_n 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그를 결합시키는 것
- [0366] 에 의해 화합물 $A_m-Sp-C-B_m$ 을 얻는 것을 포함하고,
- [0367] 공정 (a) 및 (b), 공정 (c) 및 (d)는 임의의 순서로 행할 수 있는, 방법.
- [0368] [102] 적어도 하나의 식 (III)
- [0369] $A_n-Sp-C-B_n$ (III)
- [0370] (식 중,
- [0371] A_n 은, n 개의 빌딩 블록 a_1 내지 a_n (n 은 1 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조이며,
- [0372] Sp 는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,
- [0373] C 는, 적어도 하나의 「선택적으로 절단 가능한 부위」를 갖는 헤어핀형의 헤드피스이며,
- [0374] B_n 은, A_n 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 부분 구조이다.)
- [0375] 로 표시되는 화합물을 포함하는 화합물 라이브러리의 평가 방법이며, 이하의 스텝:
- [0376] (1) 화합물 라이브러리를, 생물학적 표적과, 화합물 라이브러리의 적어도 하나의 라이브러리 분자가 표적과 결합하기 위해 적합한 조건 하에서 접촉시키는 것,
- [0377] (2) 표적과 결합하지 않은 라이브러리 분자를 제거하고, 생물학적 표적으로 친화성이 있는 라이브러리 분자를 선별하는 것,
- [0378] (3) 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 것,
- [0379] (4) B_n 을 구성하는 올리고뉴클레오티드의 서열을 동정하는 것,
- [0380] (5) (4)에 있어서 결정된 서열을 사용하여, 생물학적 표적과 결합하는 1 이상의 화합물의 구조를 동정하는 것,
- [0381] 에 의해 구성되는 방법.
- [0382] [103] 적어도 하나의 식 (III)
- [0383] $A_n-Sp-C-B_n$ (III)
- [0384] (식 중,
- [0385] A_n 은, n 개의 빌딩 블록 a_1 내지 a_n (n 은 1 내지 10의 정수이다.)에 의해 구축되는 부분 구조이며,
- [0386] Sp 는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,
- [0387] C 는, 적어도 하나의 「선택적으로 절단 가능한 부위」를 갖는 헤어핀형의 헤드피스이며,
- [0388] B_n 은, A_n 의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 부분 구조이다.)

- [0389] 으로 표시되는, [8] 내지 [92] 중 어느 것에 기재된 화합물을 포함하는 화합물 라이브러리의 평가 방법이며, 이하의 스텝:
- [0390] (1) 화합물 라이브러리를, 생물학적 표적과, 화합물 라이브러리의 적어도 하나의 라이브러리 분자가 표적과 결합하기 위해 적합한 조건 하에서 접촉시키는 것,
- [0391] (2) 표적과 결합하지 않은 라이브러리 분자를 제거하고, 생물학적 표적으로 친화성이 있는 라이브러리 분자를 선별하는 것,
- [0392] (3) 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 것,
- [0393] (4) Bn을 구성하는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 동정하는 것,
- [0394] (5) (4)에 있어서 결정된 서열을 사용하여, 생물학적 표적과 결합하는 1 이상의 화합물의 구조를 동정하는 것,
- [0395] 에 의해 구성되는 방법.
- [0396] [104] 스텝 (3)과 (4) 사이에, Bn을 구성하는 올리고뉴클레오타이드를 증폭시키는 스텝을 포함하는, [102] 또는 [103]에 기재된 방법.
- [0397] [105] 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 스텝이, 효소에 의해 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 스텝인, [102] 내지 [104] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0398] [106] 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 스텝이,
- [0399] 효소와 화학적 조건 변화의 조합에 의해 선택적으로 절단 가능한 부위를 절단하는 스텝인, [102] 내지 [104] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0400] [107] 효소가 글리코실라아제 및 뉴클레아제로부터 적어도 하나 선택되는, [105] 또는 [106]에 기재된 방법.
- [0401] [108] 효소가 우라실 DNA 글리코실라아제인, [107]에 기재된 방법.
- [0402] [109] 효소가 엔도뉴클레아제 VIII인, [107]에 기재된 방법.
- [0403] [110] 효소가 우라실 DNA 글리코실라아제와 엔도뉴클레아제 VIII의 조합인, [107]에 기재된 방법.
- [0404] [111] 효소가 알킬아데닌 DNA 글리코실라아제인, [107]에 기재된 방법.
- [0405] [112] 효소가 엔도뉴클레아제 V인, [107]에 기재된 방법.
- [0406] [113] 화학적 조건 변화가, 물을 포함한 용액 중에서의 50 내지 100°C의 가열인, [106] 내지 [112] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0407] [114] 화학적 조건 변화가, 물을 포함한 용액 중에서의 80 내지 95°C의 가열인, [103] 내지 [113] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0408] [115] 화학적 조건 변화가, pH 8 내지 13의 염기성 조건인, [106] 내지 [114] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0409] [116] 화학적 조건 변화가, pH 8 내지 11의 염기성 조건인, [106] 내지 [115] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0410] [117] 화학적 조건 변화가, pH 9 내지 10의 염기성 조건인, [106] 내지 [116] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0411] [118] DNA 태그의 말단 부근에 절단 가능한 부위를 마련하여, 목적에 따라서 당해 부위를 절단하고, 새로운 돌출 말단을 생성하여, 당해 점착 말단에, 특정 분자 식별 서열을 라이게이팅하고, Bn을 구성하는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 동정하는, [102] 내지 [117] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0412] [119] DNA 태그의 말단 부근에 마련한 절단 가능한 부위와, C에 포함되는 절단 가능한 부위가 다른 조건에서 절단되는, [118]에 기재된 방법.
- [0413] [120] 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용하는 방법.
- [0414] [121] 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는, 2분쇄 핵산보다도 화학적으로 안정된 핵산을 사용하여, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용하는, [120]에 기재된 방법.
- [0415] [122] 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여, 상기 화합물에 화학 구조 변

환을 실시한 후, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용하는, [120] 또는 [121]에 기재된 방법.

- [0416] [123] 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여, 또한 상기 핵산에 화학 구조 변환을 실시한 후, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용하는, [120] 내지 [122] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0417] [124] 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여, 또한 상기 핵산에 핵산 신장 반응을 실시한 후, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용하는, [120] 내지 [123] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0418] [125] 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여, 절단 가능 부위를 절단함으로써 2분쇄 핵산으로서 이용 가능하게 하여, PCR 반응을 실시하는, [120] 내지 [124] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0419] [126] 화합물의 기능성 평가를 위해 사용하는, [120] 내지 [125] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0420] [127] 화합물의 생물 활성 평가를 위해 사용하는, [120] 내지 [126] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0421] [128] DEL에 사용하는, [120] 내지 [127] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0422] [129] DEL의 제조에 사용하는, [120] 내지 [124] 중 어느 것에 기재된 방법.
- [0423] [130] 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여 합성된 DEL 화합물에 대하여, 절단 가능한 부위를 절단하여, 1분쇄 DNA를 갖는 DEL로 변환하는 방법.
- [0424] [131] 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여 합성된 DEL 화합물에 대하여, 절단 가능한 부위를 절단하여, 1분쇄 DNA를 갖는 DEL로 변환하고, 크로스 링커 수식 DNA와 2분쇄를 형성시키는 방법.
- [0425] [132] 절단 가능 부위 및 헤어핀 구조를 갖는 화합물과 결합하는 핵산을 사용하여 합성된 DEL 화합물에 대하여, 절단 가능한 부위를 절단하여, 크로스 링커 수식 프라이머를 부여하고, 부여한 프라이머를 신장시켜, 크로스 링커 수식 2분쇄 DEL 화합물을 합성하는 방법.

발명의 효과

- [0426] 본 발명에서는, 절단 가능한 부위를 DNA쇄 중에 포함하는 DEL, 및 그 합성용 조성물을 제공하고, 종래보다도 편리성이 높은 DEL의 제조가 가능해진다.

도면의 간단한 설명

- [0427] 도 1은 양식 1의 예시적인 DEL 제조 방법을 나타낸다. 절단 가능한 부위를 DNA쇄 중에 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드쇄, 루프 부위 및 제2 올리고뉴클레오티드쇄를 포함하는 헤드피스를 출발 원료로 하여, 빌딩 블록의 결합과, 해당 빌딩 블록에 대응하는 올리고뉴클레오티드 태그의 2분쇄 라이게이션을 반복하고(도 1에서는 3회), 또한 원한다면 프라이머 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그의 2분쇄 라이게이션을 행함으로써, DEL의 제조가 달성된다.
- 도 2는 양식 1의 예시적인 DEL의 사용 방법을 나타낸다. 절단 가능한 부위를 헤드피스의 제1 올리고뉴클레오티드쇄 중에 포함하는 DEL에 대하여, 효소 등의 절단 수단을 사용하여 절단 가능한 부위를 절단하고, 루프 부위에서 결합되지 않은 2분쇄 올리고뉴클레오티드로 유도함으로써, 높은 효율로 PCR을 행할 수 있다.
- 도 3은 양식 2의 예시적인 DEL의 사용 방법을 나타낸다. 절단 가능한 부위를 헤드피스의 제2 올리고뉴클레오티드쇄 중에 포함하는 DEL에 대하여, 효소 등의 절단 수단을 사용하여 절단 가능한 부위를 절단하고, 루프 부위에서 결합되지 않은 2분쇄 올리고뉴클레오티드로 유도함으로써, 높은 효율로 PCR을 행할 수 있다.
- 도 4는 양식 3의 예시적인 DEL의 사용 방법을 나타낸다. 절단 가능한 부위를 헤드피스의 제1 올리고뉴클레오티드쇄 중 및 제2 올리고뉴클레오티드쇄 중에 포함하는 DEL에 대하여, 효소 등의 절단 수단을 사용하여 절단 가능한 부위의 양쪽을 절단하고, 루프 부위가 결합되지 않은 2분쇄 올리고뉴클레오티드로 유도함으로써, 높은 효율로 PCR을 행할 수 있다.
- 도 5는 양식 4의 예시적인 DEL의 사용법을 나타낸다. 서로 다른 2종의 절단 가능한 부위를 헤드피스의 제1 올

리고뉴클레오티드쇄 중 및 제2 올리고뉴클레오티드쇄 중에 포함하는 DEL에 대하여, 절단 조건을 선택함으로써, 제1 올리고뉴클레오티드쇄 중 또는 제2 올리고뉴클레오티드쇄의 한쪽을 선택적으로 절단할 수 있다.

도 6은 양식 5의 예시적인 DEL의 사용법을 나타낸다. DNA 태그의 말단 부근에 절단 가능한 부위를 마련하여, 목적에 따라서 당해 부위를 절단함으로써, 새로운 돌출 말단을 생성할 수 있다. 당해 돌출 말단은 점착 말단으로서 이용하여, 원하는 핵산 서열, 예를 들어 UMIs(특정 분자 식별 서열) 등을 라이게이팅할 수 있고, 새로운 기능을 부여할 수 있다.

도 7은 양식 6의 예시적인 DEL의 사용법을 나타낸다. 본 발명에서는, 절단 가능한 부위와, 수식기나 기능성 분자를 조합하여 사용할 수 있고, 예를 들어 헤어핀쇄 DNA를 1본쇄 DNA로 변환한 DEL을 조제하는 것이 가능하다. 예를 들어, 합성된 DEL 화합물에 대하여, 3' 말단에 기능성 분자(예를 들어 비오틴)를 갖는 2본쇄 올리고뉴클레오티드쇄를 라이게이팅하고(A), 절단 가능한 부위를 절단하고(B), 기능성 분자의 기능에 따른 처리를 더한다(C). 예를 들어 기능성 분자가 비오틴인 경우, 비오틴 친화성을 갖는 스트렙트아비딘 비즈 등을 사용하여, 비오틴이 결합된 올리고뉴클레오티드쇄를 선택적으로 계 중에서 제거한다. 그것에 의해, 1본쇄 DNA를 갖는 DEL을 취득하는 것이 가능하다.

도 8은 양식 6에서 취득한 DEL의 예시적인 사용법을 나타낸다. 양식 6에서 취득한 1본쇄 DNA를 갖는 DEL은, 원하는 기능 부위를 갖는 수식 올리고뉴클레오티드(예를 들어 광반응성 크로스 링커 등의 크로스 링커 수식 DNA)와 2본쇄를 형성시킴으로써, 새로운 기능을 부여하는 것이 가능해진다.

도 9는 양식 7의 예시적인 DEL의 사용법을 나타낸다. 본 발명에서는, 절단 가능한 부위를 이용하여, 크로스 링커를 도입할 수 있다. 합성된 DEL 화합물에 대하여, 절단 가능한 부위를 절단하고(A), 수식 프라이머를 부여하고(B), 부여한 프라이머를 바탕으로, 크로스 링커 수식 2본쇄 DEL 화합물을 합성할 수 있다(C). 크로스 링커 수식 2본쇄 DEL 화합물은, DEL 라이브러리의 스크리닝에 있어서 검출 감도를 현저하게 향상시킬 수 있다(비특히 문헌 5, 6 등 참조).

도 10은 실시예 1에 있어서, 데옥시우리딘을 포함하는 헤어핀형 DEL의 부분 구조(U-DEL1-sh, U-DEL2-sh, U-DEL3-sh, U-DEL4-sh, U-DEL5-HP, U-DEL6-HP, U-DEL7-HP, U-DEL8-HP, U-DEL9-HP 및 U-DEL10-HP의 10종)의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응의 검증을 실시하였을 때의, 각 인큐베이션 시간에 있어서의 절단 반응의 전화를 나타낸 그래프이다.

도 11은 실시예 2, 3, 4, 5 및 7에 있어서, 각종 헤어핀 DEL(U-DEL1, U-DEL2, U-DEL4, U-DEL7, U-DEL8, U-DEL9, U-DEL10, H-DEL, U-DEL5, U-DEL11, U-DEL12, U-DEL13, I-DEL1, I-DEL2, I-DEL3, R-DEL1 및 BIO-DEL)의 합성 수순을 나타내는 개략도이다. 각각에 대응하는 헤드피스를 원료로 하여, 2본쇄 올리고뉴클레오티드 Pr_TAG, 및 CP와의 2단계의 2본쇄 라이게이션에 의해 헤어핀 DEL 합성이 달성된다.

도 12는 실시예 2에 있어서, 8종의 헤어핀 DEL(U-DEL1, U-DEL2, U-DEL4, U-DEL7, U-DEL8, U-DEL9, U-DEL10 및 H-DEL), 및 2본쇄 DEL(DS-DEL)의 리얼타임 PCR에 의해 측정된 Ct 값을 나타내는, 샘플량마다의 그래프이다. 각종 DEL을 USER(등록 상표) enzyme에 의해 처리한 시료를 "USER(+)"로 표시하고, 미처리 시료를 "USER(-)"로 표시하고 있다. 데옥시우리딘을 포함하는 절단 가능한 헤어핀 DEL(U-DEL1, U-DEL2, U-DEL4, U-DEL7, U-DEL8, U-DEL9 및 U-DEL10)은, USER(등록 상표) enzyme 처리 후에 2본쇄 DEL(DS-DEL)과 동등한 Ct 값을 나타내고 있다.

도 13은 실시예 3에 있어서, 6종의 데옥시우리딘을 포함하는 헤어핀 DEL(U-DEL5, U-DEL7, U-DEL9, U-DEL11, U-DEL12 및 U-DEL13)의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응의 진행을 나타내는, 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의해 얻어진 겔의 화상이다. 또한, 도면 중의 숫자는 각 레인의 번호를 나타내고 있다.

도 14는 실시예 4에 있어서, 4종의 데옥시이노신을 포함하는 헤어핀 DEL(I-DEL1, I-DEL2, I-DEL3 및 I-DEL4)의 엔도뉴클레아제 V에 의한 절단 반응의 진행을 나타내는, 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의해 얻어진 겔의 화상이다. 또한, 도면 중의 숫자는 각 레인의 번호를 나타내고 있다.

도 15는 실시예 5에 있어서, 리보뉴클레오티드를 포함하는 헤어핀 DEL(R-DEL1)의 RNaseHIII에 의한 절단 반응의 진행을 나타내는, 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의해 얻어진 겔의 화상이다. 또한, 도면 중의 숫자는 각 레인의 번호를 나타내고 있다.

도 16은 U-DEL9-HP를 원료로 한, 3×3×3(27) 화합물종을 포함하는 모델 라이브러리의 합성 수순을 나타내는 개략도이다. 실시예 6에 있어서, U-DEL9-HP를 원료로 하여, 3회(사이클 A, B, C)의 스플릿·앤드·풀 공정에 의해 모델 라이브러리의 합성이 달성된다. 또한, 각 사이클에서는, 2본쇄 올리고뉴클레오티드 태그의 라이게이션

반응과, 빌딩 블록 도입을 위한 화학 반응이 포함되어 있다.

도 17은 실시예 6의 모델 라이브러리 합성에 있어서의, 각 사이클의 라이게이션 반응의 진행을 나타내는, 아가로오스 겔 전기 영동에 의해 얻어진 겔의 화상이다. 또한, 도면 중의 숫자는 각 레인의 번호를 나타내고 있다.

도 18의 A는, 실시예 6의 모델 라이브러리 합성에 있어서의, 사이클 C 완료 후의 샘플로부터 얻어진 크로마토그래프이다. 도 18의 B는, 실시예 6의 모델 라이브러리 합성에 있어서의, 사이클 C 완료 후의 샘플로부터 얻어진 MS 스펙트럼의 디콘볼루션 결과이다.

도 19는 실시예 6에 있어서, 모델 라이브러리의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응의 진행을 나타내는, 변성 폴리악릴아미드 겔 전기 영동에 의해 얻어진 겔의 화상이다. 또한, 도면 중의 숫자는 각 레인의 번호를 나타내고 있다.

도 20은 실시예 7에 있어서, 3' 말단에 비오틴을 갖는 DEL 화합물 「BIO-DEL」의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응의 진행을 나타내는, 변성 폴리악릴아미드 겔 전기 영동에 의해 얻어진 겔의 화상이다. 또한, 도면 중의 숫자는 각 레인의 번호를 나타내고 있다.

도 21은 실시예 7에 있어서, 1분쇄 DNA를 갖는 DEL 화합물 「SS-DEL」, 및 광반응성 크로스 링커 수식 프라이머 「PXL-Pr」을 사용하여, 프라이머 신장 반응을 실시한 결과를 나타내는, 폴리악릴아미드 겔 전기 영동에 의해 얻어진 겔의 화상이다. 또한, 도면 중의 숫자는 각 레인의 번호를 나타내고 있다.

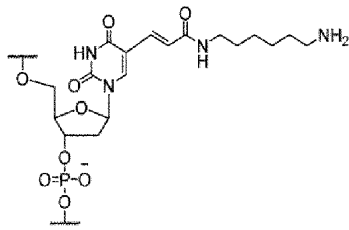
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0428] 상술한 바와 같고, 또한 당업자에게 주지된 개념이지만, 본 발명에 있어서 화합물 라이브러리란, 의약품 후보 화합물 등, 특정한 활성을 가질 가능성이 있는 화합물을 계통적으로 모은 화합물 유도체군을 의미한다. 이 화합물 라이브러리는, 많은 경우コンビナトリ알 화학의 합성 기술과 방법론에 기초하여 합성된다.コンビナトリ알 화학이란, 조합론에 기초해서 열거하여 설계된 일련의 화합물 라이브러리를 계통적인 합성 경로로 효율적으로 다품종 합성하기 위한 실험 방법과 그것에 관한 연구 분야이다.
- [0429] 상술한 바와 같고, 또한 당업자에게는 주지되어 있지만,コンビナトリ알 화학에 기초하는 화합물 라이브러리의 일종으로서, DNA 코드화 라이브러리가 있다. DNA 코드화 라이브러리는 적절히 DEL로 약칭된다. 또한 DEL은 DNA 코드화 화합물 라이브러리와도 본질적으로 동일한 의미이다.
- [0430] 본 발명에 있어서, DNA 코드화 라이브러리는, 라이브러리화된 각 화합물에, DNA의 태그가 부가된 라이브러리를 의미한다. DNA의 태그는, 각 화합물의 각 구조를 동정할 수 있도록 서열이 설계되어 있으며, 화합물의 표지로서 기능한다.
- [0431] 뉴클레오티드란, 일반적으로 뉴클레오시드에 인산기가 결합된 물질로서 이해된다. 뉴클레오티드나 뉴클레오시드는 당업자에게 주지된 용어이지만, 뉴클레오시드는 하나의 일반적인 양태로서, 5단당 등의 당의 1위에, 퓨린 염기 또는 피리미딘 염기 등의 핵산 염기가 글리코시드 결합된 것으로서 이해된다. 뉴클레오시드나 뉴클레오티드는, DNA나 RNA 등의 핵산을 구성하는 단위이기도 하다.
- [0432] 또한, 핵산도 당업자에게 주지된 개념이지만, 일반적인 양태로서, 뉴클레오티드의 폴리머로서 이해된다.
- [0433] 하나의 양태로서, 본 발명의 핵산이란, 후술하는 뉴클레오티드 및 핵산 아날로그에 의해 구성되는 폴리머이다.
- [0434] 또한, 본 명세서 중에 있어서, 뉴클레오티드나 핵산 아날로그에 의해 구성되는 핵산폴리머 이외에도, 뉴클레오티드나 핵산 아날로그 등의 핵산 모노머도 간단히 핵산이라고 기재되는 경우가 있다. 후자의 용법도 기술 상식에 따른 용법이며, 당업자라면 적절히 문맥을 따라서 이해할 수 있다.
- [0435] 광의의 뉴클레오티드에는, 천연 뉴클레오티드(본래의 뉴클레오티드) 이외에도, 인공 뉴클레오티드(각종 핵산 아날로그)도 포함된다.
- [0436] 본 발명에 있어서의 광의의 뉴클레오티드는, 이하의 양태를 포함한다.
- [0437] (A) 천연 뉴클레오시드의 뉴클레오티드
- [0438] (당해 뉴클레오시드의 예로서는, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 테옥시아데노신, 테옥시우리딘, 테옥시구아노신, 테옥시시티딘, 이노신 또는 디아미노퓨린테옥시리보시드를 들 수 있다.)
- [0439] (B) 핵산 염기의 아날로그를 갖는 뉴클레오시드의 뉴클레오티드

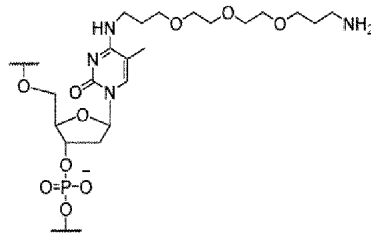
- [0440] (당해 핵산 염기 아날로그를 갖는 뉴클레오시드의 예로서는, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 피롤로피리미딘 테옥시리보시드, 3-메틸아데노신, C5-프로피닐시티딘, C5-프로피닐우리딘, C5-브로모우리딘, C5-플루오르우리딘, C5-요오도우리딘, C5-메틸시티딘, 7-테아자아데노신, 7-테아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, 6-0-메틸구아노신 또는 2-티오시티딘을 들 수 있다.)
- [0441] (C) 인터칼레이트된 핵산 염기를 갖는 뉴클레오티드
- [0442] (D) 리보오스 또는 2'-데옥시리보오스를 갖는 비천연 뉴클레오티드
- [0443] (E) 수식된 당을 당 부분에 갖는 뉴클레오티드
- [0444] (당해 수식된 당의 예로서는, 수식된 리보오스, 수식된 2'-데옥시리보오스, 2'-0-메틸리보오스, 2'-플루오로리보오스, D-트레오니놀, 아라비노오스, 핵소오스, 안히드로핵시톨, 아르톨리톨 또는 만니톨을 들 수 있다.)
- [0445] (F) 핵산 유사체
- [0446] (당해 핵산 유사체의 예로서는, 시클로핵사닐핵산, 시클로핵세닐핵산, 모르폴리노핵산(PMO), 록드핵산(LNA), 글리콜핵산(GNA), 트레오스핵산(TNA), 세리놀핵산(SNA), 아사이클릭스레오니놀핵산(aTNA) 또는 리보오스 중의 산소가 치환된 핵산을 들 수 있다.)
- [0447] 이하, 각 핵산 유사체에 대하여 상세하게 설명한다.
- [0448] (F1) PMO
- [0449] PMO는, 당부에 모르폴린환을, 인산디에스테르 부위에 전하가 없는 포스포로디아미데이트 구조를 갖는 핵산 유사체이다.
- [0450] (F2) LNA
- [0451] LNA는, 당 부분에 가교 구조를 갖는 핵산 유사체이며, 가장 전형적인 예로서는, 리보오스의 2'-히드록실기 동일 한 리보오스당의 4'-탄소에 C1 내지 6 알킬렌 또는 C1 내지 6 헤테로알킬렌에 의해 가교되어 있다. 가교 구조의 예로서는, 메틸렌, 프로필렌, 에테르 또는 아미노 가교 구조를 들 수 있다.
- [0452] 전형적인 LNA로서는, 2',4'-BNA(2'-0,4'-C-메타노 가교 핵산)를 들 수 있다.
- [0453] (F3) GNA
- [0454] 글리콜 핵산은 GNA라고도 칭한다. 예를 들어 R-GNA 또는 S-GNA를 들 수 있다. 이 경우, 리보오스는 포스포디에스테르 결합에 결합된 글리콜 단위에 의해 치환된다.
- [0455] (F4) TNA
- [0456] 트레오스핵산은 TNA라고도 칭한다. 이 경우, 리보오스는 α-L-트레오파라노실-(3'→2')로 치환된다.
- [0457] (F5) SNA
- [0458] 세리놀 핵산은 SNA라고도 칭한다. 이 경우, 리보오스는 포스포디에스테르 결합에 결합된 세리놀 단위에 의해 치환된다.
- [0459] (F6) aTNA
- [0460] 아사이클릭스레오니놀핵산은 aTNA라고도 칭한다. 예를 들어, D-aTNA 또는 L-aTNA를 들 수 있다. 이 경우, 리보오스는 포스포디에스테르 결합에 결합된 스레오니놀 단위에 의해 치환된다.
- [0461] (F7) 리보오스 중의 산소가 치환된 당
- [0462] 구체적인 예로서는, 산소의, S, Se 또는 알킬렌(예를 들어, 메틸렌 혹은 에틸렌을 들 수 있다.)과의 치환체를 들 수 있다.
- [0463] (G) 골격이 수식된 뉴클레오티드
- [0464] (당해 골격이 수식된 뉴클레오티드의 예로서는, 캡티드핵산(해당 캡티드핵산은 PNA라고도 칭한다. 이 경우, 2-아미노에틸-글리신 링키지가 리보오스 및 포스포디에스테르 골격을 대신한다.)을 들 수 있다.)
- [0465] (H) 인산기가 수식된 뉴클레오티드

- [0466] (당해 인산기가 수식된 뉴클레오티드의 예로서는, 포스포로티오에이트, 5'-N-포스포로아미다이트, 포스포로셀레네이트, 보라노인산, 보라노인산에스테르, 수소포스포네이트, 포스포로아미다이트, 포스포로디아미다이트, 알킬 혹은 아릴포스포네이트, 포스포트리에스테르, 가교 포스포로아미다이트, 가교 포스포로티오에이트 또는 가교 메틸렌-포스포네이트 등을 들 수 있다.)
- [0467] 이하의 설명에 있어서의, 본 발명의 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드쇄, 2분쇄 올리고뉴클레오티드, 2분쇄 올리고뉴클레오티드쇄 및 2분쇄 DNA는, 상기 정의된 뉴클레오티드이다.
- [0468] 본 발명에 있어서, 특별히 한정없이 뉴클레오티드라 기재하는 경우에는, 천연 뉴클레오티드를 의미한다. 천연 뉴클레오티드는 당업자에게 주지된 용어이며, 본질적으로 천연에 존재하는 뉴클레오티드라면 특별히 한정되지 않는다. 하나의 양태로서, 본 발명에 있어서의 천연 뉴클레오티드는, 상기 (A)에 기재된 뉴클레오티드이다.
- [0469] (핵산 아날로그)
- [0470] 핵산 아날로그란 당업자에게 주지된 용어이며, 본 발명에 있어서의 핵산 아날로그의 구조는, 본 발명의 효과를 갖는 한 한정은 되지 않는다.
- [0471] 하나의 양태로서, 핵산 아날로그란, 상기 (B) 내지 (H) 양태의 화합물이다.
- [0472] 하나의 양태로서, 본 발명에 있어서의 핵산 아날로그란, 핵산 모노머에 있어서의 인산 상당 부위와 수산기 상당 부위를 갖는 화합물이다. 핵산 아날로그는, 보다 바람직하게는 인산 부위와 수산기를 갖는 화합물이다.
- [0473] 하나의 양태로서, 본 발명에 있어서의 핵산 아날로그란, 핵산 합성기에 있어서 모노머로서 이용 가능한 화합물이다. 당업자에게는 주지되어 있지만, 핵산 합성기에서는, 핵산 아날로그의 인산(또는 상당 부위)를 포스포로아미다이트화하고, 수산기(또는 그 상당 부위)를 보호기로 보호한 모노머로서 이용함으로써, 핵산 올리고머를 합성할 수 있다.
- [0474] 또한, 핵산 아날로그에 있어서의, 인산 부위(또는 상당 부위) 및 수산기(또는 상당 부위) 이외의 부분 구조는, 핵산 아날로그 잔기라고 할 수 있다. 핵산 아날로그 잔기의 구조는, 본 발명의 효과를 갖는 한 한정되지 않지만, 여기에서 참조로서 천연 핵산(데옥시아데노신, 티미딘, 데옥시시티딘, 데옥시구아노신) 각각의 구조의 특징을 확인하면, 분자량이 322(티미딘1인산) 내지 347(데옥시구아노신1인산) 정도이며, 또한 핵산쇄를 구성하는 3'위의 수산기 산소 원자로부터 5'위의 인 원자 사이의 원자수(산소 원자 및 인 원자를 포함한다. 이하 잔기간 원자수라고도 칭한다.)가 6개인 것을 들 수 있다. 또한, 핵산 합성기에 이용 가능한 핵산 아날로그로서, 이하가 알려져 있다.
- [0475] 아미노 C6 dT 분자량: 476, 잔기 원자수: 6
- [0476] mdC(TEG-아미노) 분자량: 526, 잔기 원자수: 6
- [0477] Uni-Link(상표 등록) 아미노 모디파이어 분자량: 227, 잔기 원자수: 6
- [0478] (문헌 뉴클레익 애시드 리서치, 1992년, 20권, 6253-6259 페이지 참조)
- [0479] d-스페이서 분자량: 198, 잔기 원자수: 6
- [0480] 트리에틸렌글리콜인산에스테르(스페이서9) 분자량: 230, 잔기 원자수: 11

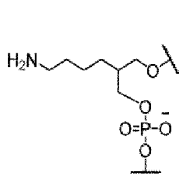
[0481] 참고로서 각 핵산 아날로그의 구조를 이하에 기재한다.



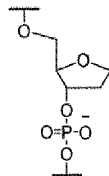
아미노 C6 dT



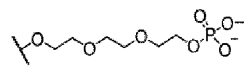
mdC(TEG-아미노)



Uni-Link 아미노 모디파이어



d-스페이스



스페이스 9

[0482]

[0483] 따라서, 하나의 양태로서, 핵산 아날로그는, 이하를 특징으로 하는 화합물 (B1)이다.

[0484] (B11) 인산(또는 상당 부위) 및 수산기(또는 그 상당 부위)를 갖는다.

[0485] (B12) 탄소, 수소, 산소, 질소, 인 또는 황에 의해 구성된다.

[0486] (B13) 분자량이 142 내지 1500이다.

[0487] (B14) 잔기 원자수가 5 내지 30이다.

[0488] (B15) 잔기 원자의 결합 양식은, 모두 단결합이거나, 또는 1 내지 2개의 이중 결합을 포함하며 나머지는 단결합이다.

[0489] 하나의 양태로서, 핵산 아날로그는, 이하를 특징으로 하는 화합물 (B2)이다.

[0490] (B21) 인산 및 수산기를 갖는다.

[0491] (B22) 탄소, 수소, 산소, 질소 또는 인에 의해 구성된다.

[0492] (B23) 분자량이 142 내지 1000이다.

[0493] (B24) 잔기 원자수가 5 내지 20이다.

[0494] (B25) 잔기 원자의 결합 양식은, 모두 단결합이다.

[0495] 하나의 양태로서, 핵산 아날로그는, 이하를 특징으로 하는 화합물 (B3)이다.

[0496] (B31) 인산 및 수산기를 갖는다.

[0497] (B32) 탄소, 수소, 산소, 질소 또는 인에 의해 구성된다.

[0498] (B33) 분자량이 142 내지 700이다.

[0499] (B34) 잔기 원자수가 5 내지 12이다.

[0500] (B35) 잔기 원자의 결합 양식은, 모두 단결합이다.

[0501] 하나의 양태로서, 핵산 아날로그는, 이하의 화합물 (B41), (B42), (B43), (B44), (B5), (B51) 또는 (B52)이다.

[0502] (B41) d-스페이스

[0503] (B42) 아미노 C6 dT

[0504] (B43) mdC(TEG-아미노)

[0505] (B44) Uni-Link(상표 등록) 아미노 모디파이어

- [0506] (B5) 폴리알킬렌글리콜인산에스테르
- [0507] (B51) 디에틸렌글리콜인산에스테르 또는 트리에틸렌글리콜인산에스테르
- [0508] (B52) 트리에틸렌글리콜인산에스테르
- [0509] 본 발명에서 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드쇄란, 5' 말단과 3' 말단 및 5' 말단과 3' 말단 사이의 내부 위치에 1개 이상의 뉴클레오티드를 갖는 뉴클레오티드의 중합체를 의미한다.
- [0510] 서로 상보적인 염기 서열이란, 핵산의 2개의 올리고뉴클레오티드 사이에서, 아데닌과 티민(또는 우라실), 또는 구아닌과 시토신이라는 결정된 조합을 만들고, 수소 결합으로 연결되는 소위 상보적 염기쌍을 형성할 수 있는 뉴클레오티드의 서열을 의미한다. 상보적 염기쌍의 형성은 하이브리다이징이라고도 불린다.
- [0511] 또한, 상보적 염기쌍은, 일반적으로 「왓슨·크릭형 염기쌍」 「천연형 염기쌍」이라고 불리는 개념이다. 단, 염기쌍은 왓슨·크릭형이어도, 후그스틴형 염기쌍, 혹은 다른 수소 결합 모티프(예를 들어, 디아미노퓨린과 T, 5-메틸 C와 G, 2-티오티민과 A, 6-히드록시퓨린과 C, 푸소이드이소시토신과 G) 형성에 의한 염기쌍 등이어도 된다. 2개의 올리고뉴클레오티드가 2분쇄를 조립할 수 있는 서열이며, 본 발명의 목적에 이용 가능한 한, 「서로 상보적인 염기 서열」의 서열에 제한은 없고, 2개의 서열의 상동성에도 제한은 없다. 상동성은, 보다 바람직한 순으로, 99% 이상, 98% 이상, 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 70% 이상, 60% 이상 또는 50% 이상인 것이 바람직하다.
- [0512] 반복되지만, 본 발명에서 하이브리다이징한다는 것은, 서로 상보적인 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드쇄끼리 2분쇄를 형성시키는 행위, 및 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드쇄끼리 2중쇄를 형성하는 현상을 의미한다.
- [0513] 본 발명에서 2중쇄란, 2개의 핵산쇄가 상보적 염기쌍을 형성하고 있는(하이브리다이징되어 있는) 상태를 의미한다. 2개의 핵산쇄는 2개의 핵산쇄에서 유래하는 것이어도 되고, 1개의 핵산쇄 분자 내에 2개의 핵산 서열에서 유래하는 것이어도 된다.
- [0514] 본 발명에서 2분쇄 올리고뉴클레오티드 및 2분쇄 올리고뉴클레오티드쇄란, 2개 이상의 다른 올리고뉴클레오티드쇄가 하이브리다이징함으로써 형성되는 2차 구조체를 의미한다. 2개의 올리고뉴클레오티드의 쇠 길이는 달라도 되고, 하이브리다이징되지 않은 영역을 갖고 있어도 된다.
- [0515] 또한, 2분쇄가 하이브리다이징되어 있는 영역은, 2중쇄이다.
- [0516] 본 발명에서 2분쇄 DNA란, 2개의 다른 DNA쇄가 하이브리다이징함으로써 형성되는 2차 구조체를 의미한다. 각각의 DNA쇄의 쇠 길이는 달라도 되고, 하이브리다이징되지 않은 영역을 갖고 있어도 된다. DNA쇄는 천연에 존재하는 데옥시리보뉴클레오티드에 한정되지 않고, DNA 폴리메라아제에 의해 증폭 가능한 올리고뉴클레오티드쇄 전 반을 의미한다.
- [0517] 본 발명에서 「2중쇄를 형성하는」이란, 예를 들어 4 내지 40℃의 온도, 수성 용매, pH 4 내지 10과 같은, 올리고뉴클레오티드를 취급할 때에 표준적인 조건에 있어서 2중쇄를 형성하면 된다. 예를 들어, 특정한 용매, 조건에 의해 2중쇄를 형성하지 않는 경우가 있어도, 당해 핵산이 표준적인 조건에 있어서 2중쇄를 형성하는 것이면, 당해 핵산은 2중쇄를 형성하는 핵산이다.
- [0518] 본 발명에서 Tm값이란, DNA 분자의 반수가, 상보쇄와 어닐할 때의 온도를 말한다.
- [0519] 본 발명에서 평활 말단이란, 2분쇄 올리고뉴클레오티드의 말단이, 어느 쪽이라도 돌출되지 않고 쌍으로 되어 있는 것을 의미한다.
- [0520] 본 발명에서 돌출 말단이란, 2분쇄 올리고뉴클레오티드의 말단 중, 한쪽 쇠가 돌출부를 갖고 있는 것을 의미한다. 돌출 말단의 돌출부는, 임의의 길이일 수 있지만, 바람직하게는 1 내지 50 염기, 보다 바람직하게는 1 내지 30 염기, 더욱 바람직하게는 1 내지 15 염기, 가장 바람직하게는 2 내지 6 염기의 길이이다. 특정한 양태에서는, 상기 돌출부는, 점착 말단의 라이게이션을 실시할 때의 하이브리다이징 영역으로서 사용하는 것이 가능하다.
- [0521] PCR이란, 폴리메라아제 연쇄 반응을 의미한다. PCR은 올리고뉴클레오티드쇄의 증폭 수단이며, 당업자에게 주지된 기술이다. PCR의 프로세스의 개략을 설명하면, PCR에서는, (1) 증폭 대상의 2분쇄 올리고뉴클레오티드쇄를 가열 처리 등에 의해 2개의 1분쇄에 해리시키고, (2) 효소 반응에 적합한 온도로 조정된 후, 반응계 중에 존재

시키고 있는 효소(DNA 폴리메라아제 등)에 의해, 각각의 1본쇄에 상보적인 쇠를 합성한다. 즉, 1개의 2본쇄 올리고뉴클레오티드를 2개로 증폭시킬 수 있다. PCR에서는, (1)과 (2)의 프로세스를 온도 조절에 의해 반복함으로써, 높은 효율로 올리고뉴클레오티드쇄를 증폭시킬 수 있다.

- [0522] 본 발명에서 프라이머란, 주형이 되는 올리고뉴클레오티드쇄에 어닐하고, 주형 의존적으로 폴리메라아제에 의해 신장될 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [0523] 본 발명에서 PCR용의 프라이머 서열이란, 올리고뉴클레오티드쇄 중에 있어서, 프라이머가 어닐하는 부분의 서열을 의미하고, 당해 분야에서 공지된 PCR에 적합한 서열인 것이 바람직하고, 올리고뉴클레오티드쇄의 말단에 존재하는 것이 바람직하다.
- [0524] 본 발명에서 닉이란, 2본쇄 올리고뉴클레오티드쇄에 있어서, 뉴클레오티드간 결합이 결여되어 있으며, 올리고뉴클레오티드쇄가 단열(斷裂)되어 있는 부분을 의미한다. 이 결여부의 5'측은, 인산기를 갖고 있어도, 인산기를 갖지 않아도 된다.
- [0525] 본 발명에서 갭이란, 2본쇄 올리고뉴클레오티드쇄에 있어서, 1개 이상 연속된 뉴클레오티드가 결실되어 있으며, 올리고뉴클레오티드쇄가 괴리되어 있는 부분을 의미한다. 결실부의 5'측에, 인산기를 갖고 있어도, 인산기를 갖지 않아도 된다.
- [0526] 본 발명에서 헤어핀쇄란, 상보적인 2개의 핵산쇄가 연결된 1본쇄 구조이며, 헤어핀쇄나 헤어핀쇄 DEL의 특징은 상기한 바와 같다. 본 발명에서 사용되는 「헤어핀 부위」, 「헤어핀 구조」, 「헤어핀형」이라는 용어는, 전문 용어인 「헤어핀쇄」와 동 개념의 헤어핀에서 유래하는 용어로서 이해된다.
- [0527] 본 발명에서 핵산 연결 반응 및 라이게이션이란, 핵산의 말단끼리를 연결하는 반응을 의미한다.
- [0528] 효소에 의한 핵산 연결 반응 및 효소적 라이게이션이란, 효소를 사용하여 핵산의 말단끼리를 연결하는 반응을 의미한다.
- [0529] 핵산 연결 반응에 사용할 수 있는 효소는, 예를 들어 DNA 리가아제, RNA 리가아제, DNA 폴리메라아제, RNA 폴리메라아제 또는 토포이소머라아제이다.
- [0530] 하나의 양태로서, DNA 리가아제는 DNA쇄의 말단끼리를 인산디에스테르 결합으로 연결하는 효소이다. 하나의 양태로서, DNA 리가아제는 EC 번호: 6.5.1.1 또는 6.5.1.2에 속하는 리가아제로서 이해된다. DNA 리가아제는 폴리데옥시리보뉴클레오티드 신타아제 또는 폴리뉴클레오티드 리가아제 등이라고도 불린다. DNA 리가아제의 예로서는, DNA 리가아제 I, II, III, IV나 T4DNA 리가아제 등을 들 수 있다.
- [0531] 하나의 양태로서, RNA 리가아제는 RNA쇄의 말단끼리를 인산디에스테르 결합으로 연결하는 효소이다. 하나의 양태로서, RNA 리가아제는 EC 번호: 6.5.1.3에 속하는 리가아제로서 이해된다. 또한, 하나의 양태로서, RNA 리가아제는 폴리(리보뉴클레오티드):폴리(리보뉴클레오티드)리가아제의 계통에 속한다. RNA 리가아제는 폴리리보뉴클레오티드 신타아제 또는 폴리리보뉴클레오티드 리가아제라고도 불린다.
- [0532] 본 발명에서 화학적 라이게이션이란, 핵산의 말단끼리를, 효소를 사용하지 않고 결합하는 반응을 의미한다.
- [0533] 화학적 라이게이션에 있어서는, 화학 반응의 쌍이 되는 관능기를 갖는 핵산의 말단끼리가 반응함으로써 연결부가 형성된다. 화학 반응의 쌍이 되는 관능기는, 예를 들어 치환되어 있어도 되는 알킬닐기와 치환되어 있어도 되는 아지드기의 쌍, 4π 전자계를 갖는 치환되어 있어도 되는 디엔(예를 들어, 치환되어 있어도 되는 1,3-불포화 화합물, 예를 들어 치환되어 있어도 되는 1,3-부타디엔, 1-메톡시-3-트리메틸실릴옥시-1,3-부타디엔, 시클로펜타디엔, 시클로헥사디엔 또는 푸란을 들 수 있다.)과 2π 전자계를 갖는 치환되어 있어도 되는 디에노필 또는 치환되어 있어도 되는 헤테로디에노필(예를 들어, 치환되어 있어도 되는 알케닐기 또는 치환되어 있어도 되는 알킬닐기를 들 수 있다.)의 쌍, 치환되어도 되는 아미노기와 카르복실산기의 쌍, 포스포로티오에이트기와 요오드기(예를 들어, 3' 말단의 포스포로티오에이트기와 5' 말단의 요오드기를 들 수 있다.)의 쌍 또는 인산기와 히드록시기의 쌍(예를 들어, 5' 말단의 인산기와 3' 말단의 히드록시기의 쌍 또는 5' 말단의 히드록시기와 3' 말단의 인산기의 쌍을 들 수 있다.)이다.
- [0534] 화학적 라이게이션은, 당업자에게 주지된 개념이며, 당업자는 기술 상식에 기초하여 적절히 화학적 라이게이션을 달성할 수 있다. 상기 이외에도, 아티피셜·DNA; PNA&XNA, 2014년, 5권, e27896, 커런트·오피니언·인·케미컬·바이올로지, 2015년, 26권, 80-88 페이지 등도 참조된다.
- [0535] 본 발명에서 「선택적으로 절단 가능」이란, 어느 화합물에 있어서, 화합물의 기타 분자 구조에 변화를 부여하

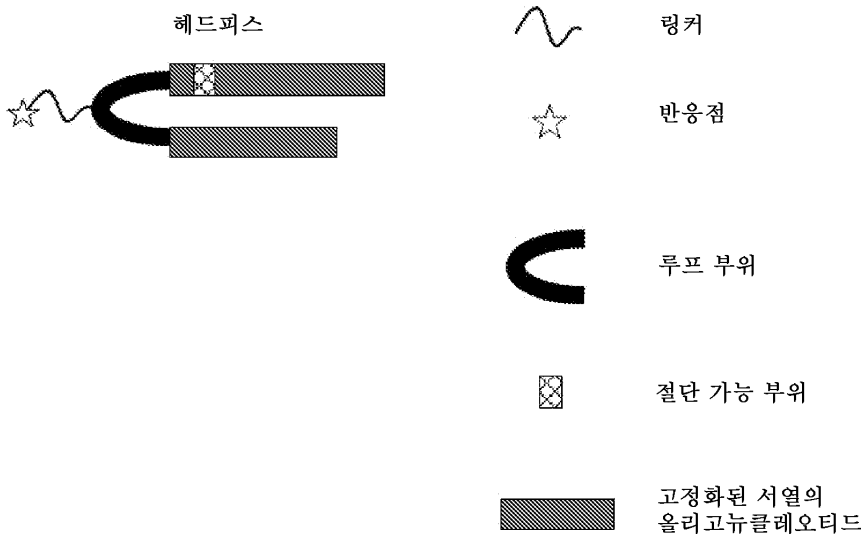
지 않고, 소정의 조건에서 특정한 부위만 선택적으로 절단할 수 있는 것을 의미한다.

- [0536] 본 발명에서 「선택적으로 절단 가능한 부위」란, 어느 화합물에 있어서, 소정의 조건에서 선택적으로 절단할 수 있는 부위를 의미한다.
- [0537] 하나의 양태로서, 본 발명에 있어서의 「선택적으로 절단 가능한 부위」의 바람직한 구조는, 「선택적으로 절단 가능한 핵산」이다. 당해 부위는, 복수의 핵산에 의해 구성되어 특정한 서열이 주공(奏功)되어 절단되는 부위 여도 되고, 단일의 핵산에 의한 부위여도 된다. 절단 가능한 부위가 핵산인 경우, (1) 핵산 합성기 등의 확립된 제조 방법을 이용할 수 있어 제조 효율이 좋은 것, (2) DEL의 빌딩 블록 구축의 반응 조건은, DNA 태그 부분의 핵산이 분해되지 않는 것이 필수적이기 때문에, 절단 가능한 부위가 핵산이면 역시 분해되지 않는 것 등의 관점에서 바람직하다.
- [0538] 상기 「선택적으로 절단 가능한 핵산」의 보다 바람직한 구조는, DEL의 DNA 태그의 서열에 포함되지 않는 뉴클레오티드를 포함하는 핵산이다. 절단 가능한 부위가 DNA 태그의 서열에 포함되지 않는 뉴클레오티드라면, DNA 태그 부분의 절단을 피하기 때문에, DNA 태그의 서열을 한정하지 않고 이용 가능해진다.
- [0539] DNA 태그의 서열에 사용하는 핵산으로서는, 데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 티미딘 및 데옥시시티딘이 바람직하다. 따라서, 선택적으로 절단 가능한 부위의 바람직한 구조는, 데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 티미딘 및 데옥시시티딘 중 어느 것도 아닌 핵산이다.
- [0540] 「선택적으로 절단 가능한 부위」의 예로서, 「절단 가능한 염기를 갖는 뉴클레오티드」를 들 수 있다. 예를 들어, DEL 중의 「절단 가능한 염기를 갖는 뉴클레오티드」는, DNA 글리코실라아제의 작용에 의해, 염기부와 당부 사이의 N-글리코시드 결합이 절단되어, 탈염기 부위를 남긴다. 탈염기 부위에 인접하는 포스포디에스테르 결합은, 화학적 조건 변화(예를 들어 온도 상승, 염기성 가수 분해 등), 또는 탈퓨린/탈피리미딘(AP) 엔도뉴클레아제 활성이나 AP 리아제 활성을 갖는 효소(예를 들어, 엔도뉴클레아제 III, 엔도뉴클레아제 IV, 엔도뉴클레아제 V, 엔도뉴클레아제 VI, 엔도뉴클레아제 VII, 엔도뉴클레아제 VIII, APE1(인간 유래 AP 엔도뉴클레아제), Fpg(포름아미드피리딘-DNA 글리코실라아제) 등)에 의해 절단되어, 1 염기분의 갭, 혹은 Nick을 형성한다.
- [0541] 「절단 가능한 염기를 갖는 뉴클레오티드」의 예로서는, 데옥시우리딘, 브로모데옥시우리딘, 데옥시이노신, 8-히드록시데옥시구아노신, 3-메틸-2'-데옥시아데노신, N6-에테노-2'-데옥시아데노신, 7-메틸-2'-데옥시구아노신, 2'-데옥시크산토신, 5,6-디히드록시데옥시티미딘 등을 들 수 있다. 다른 절단 가능한 염기를 갖는 뉴클레오티드는, 당업자에 있어서 명백하다. 이들 「절단 가능한 염기를 갖는 뉴클레오티드」를 DEL 중에 도입하고, 그 구조를 특이적으로 인식하는 DNA 글리코실라아제를 사용함으로써 DEL은 선택적으로 탈염기된다.
- [0542] 본 발명에서 DNA 글리코실라아제란, 글리코실라아제 활성을 갖는 임의의 효소이며, 올리고뉴클레오티드 중의 임의의 핵산 염기부를 인식하고, 그 염기부와 당부 사이의 N-글리코시드 결합을 절단하여, 탈염기 부위를 제작하는 효소이다. 예를 들어, 우라실 DNA 글리코실라아제(데옥시우리딘을 인식), 알킬아데닌 DNA 글리코실라아제(3-메틸-2'-데옥시아데노신, 7-메틸-2'-데옥시구아노신 및 데옥시이노신을 인식), Fpg(8-히드록시데옥시구아노신을 인식), 엔도뉴클레아제 VIII(5,6-디히드록시데옥시티미딘이나 우라실글리콜 등이 분해된 피리미딘 염기를 인식), SUMG1(1본쇄 선택적 우라실 DNA 글리코실라아제의 약칭, 데옥시우리딘을 인식) 등을 들 수 있다.
- [0543] 본 발명에서 「선택적으로 절단 가능한 부위」의 보다 바람직한 예로서, 데옥시이노신, 데옥시우리딘을 들 수 있다.
- [0544] 본 발명에서 「선택적으로 절단 가능한 부위」의 특히 바람직한 예로서, 데옥시우리딘을 들 수 있다.
- [0545] 하나의 양태로서, 본 발명에 있어서의 「선택적으로 절단 가능한 부위」는, 바람직하게는 효소를 사용하여 절단된다. 효소는 일반적으로 기질 특이성이 높고, DEL의 DNA 태그 부분, 및 복수의 빌딩 블록에 의해 구축된 화합물 부분을 기질로서 인식하지 않고, 「선택적으로 절단 가능한 부위」만을 인식하여 작용시킬 수 있기 때문에, 바람직하다. 또한, 상기 효소를 사용한 절단은, 「선택적으로 절단 가능한 부위」를 효소에 의해 구조 변화시킨 후에, 화학적 조건을 변화시킴으로써 달성되어도 된다. 해당 효소의 예로서는, 글리코실라아제 및 뉴클레아제를 들 수 있다.
- [0546] 본 발명에서 글리코실라아제란, 글리코시드 결합(당분자와 다른 유기 화합물이 탈수 축합하여 형성하는 공유 결합)을 가수 분해하는 기능을 갖는 효소이다. 그 중에서도 DNA 글리코실라아제는, 진술한 바와 같이, 올리고뉴클레오티드 중의 핵산 염기부를 인식하고, 그 글리코시드 결합을 가수 분해하는 효소이다.
- [0547] 본 발명에서 뉴클레아제란, 핵산의 당과 인산 사이의 포스포디에스테르 결합을 가수 분해하는 기능을 갖는 효소

이다. 뉴클레아제에는, 예를 들어 AP 엔도뉴클레아제, 닉킹 엔도뉴클레아제, 리보뉴클레아제가 포함된다.

- [0548] AP 엔도뉴클레아제는, 전술한 바와 같이, 임의의 DNA 글리코실라아제의 작용에 의해 생성된 탈염기 부위에 인접하는 포스포디에스테르 결합을 절단한다. 따라서, 본 발명에 있어서, DNA 글리코실라아제와 AP 엔도뉴클레아제를 병용하는 것이 바람직하다.
- [0549] 닉킹 엔도뉴클레아제(예를 들어, Nb.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI 등)는, 특정한 DNA 서열을 인식하고, 2분쇄 중 한쪽 쇄만 포스포디에스테르 결합이 절단된 닉을 발생시킨다. 또한, 엔도뉴클레아제 V는, 데옥시이노신으로부터 3' 방향으로 2번째의 포스포디에스테르 결합이 절단된 닉을 발생시키는 것이 가능하며, 본 발명의 실시에 있어서 유용하다.
- [0550] 리보뉴클레아제는 RNA를 분해하는 효소이다. 본 발명에 있어서는, 리보뉴클레오시드를 「선택적으로 절단 가능한 부위」로서 사용하여, 리보뉴클레아제를 작용시킴으로써 이용이 가능하다. 리보뉴클레아제의 일종인 RNaseHII는, DNA 서열 중에 도입된 리보뉴클레오티드의 5'측의 포스포디에스테르 결합이 절단된 닉을 발생시키는 것이 가능하며, 본 발명의 실시에 있어서 유용하다.
- [0551] 본 발명에서 USER(등록 상표)이란, 「Uracil-Specific Excision Reagent(우라실 특이적 절제 시약)」 Enzyme를 의미한다. USER는, 우라실 DNA 글리코실라아제(UDG)와 엔도뉴클레아제 VIII을 포함하는 우라실을 제거하는 엔도뉴클레아제 콕테일이다. USER는, 2분쇄 DNA 중의 우라실을 제거하여 1 염기의 갭을 발생하고, DNA쇄를 절단한다. USER에 의한 프로세스에서는, 먼저 UDG가 우라실 염기를 제거하여 탈염기 부위를 만든다. 계속해서 엔도뉴클레아제가 포스포디에스테르 결합을 분해하여 염기가 없는 데옥시리보오스를 유리하여 1 염기분의 갭을 만든다.
- [0552] 본 명세서의 설명에 있어서의, USER(등록 상표) 효소 및 USER(등록 상표) Enzyme는 상기 정의된 USER(등록 상표)이다.
- [0553] 본 발명에서 빌딩 블록이란, 관능기를 갖고, 화합물의 일부를 구성할 수 있는 부분이며, 화합물의 형태여도 된다.
- [0554] 본 발명에서 각각의 빌딩 블록을 동정할 수 있는 염기 서열이란, 각각의 빌딩 블록의 구조에 대응하도록 설계된 특정한 염기 서열을 의미한다. 서열을 설계한다는 것은, 예를 들어 빌딩 블록 구조 A에는 핵산 염기 서열 AAA를, 구조 B에는 핵산 염기 서열 TTT를, 구조 C에는 핵산 염기 서열 CGC와 같이, 구조마다 핵산 염기 서열을 할당하는 것을 의미한다. 서열은, 본 발명의 목적이 달성되는 한 자유롭게 설계할 수 있다. 예를 들어, 임의의 수의 염기 서열을 1개의 빌딩 블록에 할당할 수 있다.
- [0555] 본 발명에서 올리고뉴클레오티드 태그란, 빌딩 블록에 의해 구축되는 부분 구조의 구조를 동정할 수 있는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 부분 구조이다. 본 발명에서 올리고뉴클레오티드 태그란, 각 빌딩 블록에 대응하는 올리고뉴클레오티드여도 되고, 복수의 빌딩 블록에 대응하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 보다 장쇄의 올리고뉴클레오티드여도 된다.
- [0556] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 태그를 구성하는 뉴클레오티드는, 본 발명의 효과를 달성하는 한 제한되지 않지만, PCR에 의한 증폭이나 시퀀서에 의한 해석의 용이함이라는 관점에 있어서, 이들 조작에 적응한 뉴클레오티드인 것이 바람직하다. 이러한 바람직한 뉴클레오티드의 예로서는, 염기부로서 상기한 천연 핵산 염기를 갖고, 당부로서 상기한 리보오스 또는 2'-데옥시리보오스를 갖는 뉴클레오티드를 들 수 있고, 보다 바람직한 예로서는 데옥시아데노신, 티미딘, 데옥시시티딘 또는 데옥시구아노신을 들 수 있다.
- [0557] (헤드피스)
- [0558] 본 발명에서 헤드피스란, DEL 등의 화합물 라이브러리 제조를 위한 출발 화합물을 의미한다. 본 발명의 헤드피스의 구조는, 본 발명의 목적을 달성하는 한 한정을 받지 않지만, 가장 전형적인 양태로서, 빌딩 블록이 연결될 수 있는 적어도 하나의 부위와, 올리고뉴클레오티드 태그가 연결될 수 있는 적어도 하나의 부위를 갖고, 또한 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 구조 중에 포함한다.
- [0559] 후술한 대로, DNA 태그는 바람직하게는 2분쇄 올리고뉴클레오티드쇄이며, 올리고뉴클레오티드 태그가 연결될 수 있는 부위는, 바람직하게는 2개이다.

[0560] 하나의 양태로서, 헤드피스는 하기 모식도로 나타내지는 화합물이다.



[0561]

[0562] 하나의 양태로서, 헤드피스는, 화학적으로 안정된 것이 바람직하다.

[0563] 또한, 하나의 양태로서, 헤드피스는, DNA 태그와 빌딩 블록을 적절한 공간에 배치할 수 있는 구조인 것이 바람직하다.

[0564] 하나의 양태로서, 헤드피스는, 적당한 플렉시빌리티를 갖는 것이 바람직하다.

[0565] 여기서, 더욱 적당한 공간 배치나 플렉시빌리티(헤드피스의 구조 특성)에 대하여 설명한다. 또한, 여기에서 설명하는 헤드피스의 구조 특성은, 헤드피스 단체로 달성되어도 되고, 헤드피스와 2관능성 스페이서를 결합시킴으로써 달성되어도 된다.

[0566] 하나의 양태로서, 바람직한 헤드피스의 구조 특성은, 빌딩 블록의 형성 반응을 헤드피스나 DNA 태그가 저해하지 않는, 반대로 DNA 태그의 신장 반응을 헤드피스나 빌딩 블록이 저해하지 않는 구조 특성이다.

[0567] 하나의 양태로서, 바람직한 헤드피스의 구조 특성은, 빌딩 블록 화합물(라이브리리 화합물)과 타깃(표적 단백질 등)의 상호 작용에 대하여, 헤드피스나 DNA 태그 부분이 영향을 주지 않는 구조 특성이다.

[0568] 하나의 양태로서, 바람직한 헤드피스의 구조 특성은, DNA 태그와 빌딩 블록 부위를, 반대측(예를 들어 90도 이상 반대측)으로 배향하는 구조 특성이다.

[0569] 하나의 양태로서, 바람직한 헤드피스의 구조 특성은, 헤드피스의 루프 부위와 빌딩 블록을, 유기 화합물의 골격 환산으로 수원자로부터 수십원자분 이격시키는 구조 특성이다.

[0570] 하나의 양태로서, 헤드피스는, DNA 태그 부분, 빌딩 블록 부분과 적당한 친화성을 갖는 것이 바람직하다. 적당한 친화성이란, 예를 들어 본 발명을 실시하기 위해서, 원하는 조건에서 결합을 형성하여 유지하고, 절단할 수 있는 화학적 반응성 및 안정성을 의미한다.

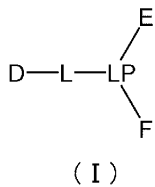
[0571] 또한, 본 발명에 있어서, 2관능성 스페이서란, 빌딩 블록 부위와 헤드피스의 결합을 가능하게 하는 적어도 2개의 반응기를 갖는 스페이서 부분을 의미한다.

[0572] 본 발명의 설명에 있어서, 「헤드피스」, 「헤드피스 화합물」, 「헤드피스를 위한 화합물」이라는 용어는, 동 개념의 화합물을 나타내는 용어이다.

[0573] 본 발명의 설명에 있어서, 「헤드피스로서 사용하는 화합물」은, 사용의 관점에서 보면 「화합물의 헤드피스로서의 사용」과 본질적으로 마찬가지로 이해할 수 있고, 방법의 관점에서 보면 「화합물을 헤드피스로서 사용하는 방법」과 본질적으로 마찬가지로 이해할 수 있다. 화합물 라이브러리에 대해서도 마찬가지이다.

[0574] 이하, 바람직한 헤드피스의 구조를 설명하지만, 헤드피스의 구조는 본 발명의 효과를 달성하는 한, 한정은 되지 않는다.

- [0575] 하나의 양태로서, 헤드피스는,
- [0576] (D) 빌딩 블록과 직접 연결하거나, 또는 2관능성 스페이서를 통해 간접적으로 연결할 수 있는 적어도 하나의 부위를 갖는 반응성 관능기,
- [0577] (L) 반응성 관능기로부터 신장되는 링커,
- [0578] (E) 올리고뉴클레오타이드 태그의 한쪽 쇠와 연결될 수 있는 1개의 결합 부위를 갖는 제1 올리고뉴클레오타이드쇄,
- [0579] (F) 올리고뉴클레오타이드 태그의 다른 한쪽 쇠와 연결될 수 있는 1개의 결합 부위를 갖는 제2 올리고뉴클레오타이드쇄, 및
- [0580] (LP) 상기 링커와 2개의 올리고뉴클레오타이드쇄에 결합하는 루프 부위에 의해 구성되고,
- [0581] E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는다.
- [0582] 하나의 양태로서, 헤드피스는 다음 식 (I)로 나타내지는 화합물이다.



- [0584]
- [0585] (식 중, E 및 F는, 각각 독립적으로
- [0586] 뉴클레오타이드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,
- [0587] 단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오타이드를 형성하고,
- [0588] LP는, 루프 부위이며,
- [0589] L은, 링커이며,
- [0590] D는, 반응성 관능기이다.)
- [0591] 로 표시되는 화합물이며,
- [0592] E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는 화합물.
- [0593] 또한, 본 발명에 있어서, 루프 부위 중, 링커와 결합하는 부위의 부분 구조를 연결 부위 또는 (LS)라 칭하는 경우가 있다.
- [0594] 또한, 본 발명에 있어서 E-LP-F를 아울러 헤어핀 부위라 칭하는 경우가 있다.
- [0595] (제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드쇄)
- [0596] 이하에, 제1 올리고뉴클레오타이드쇄(E) 및 제2 올리고뉴클레오타이드쇄(F)의 바람직한 형태에 대하여 설명한다.
- [0597] 제1 올리고뉴클레오타이드쇄(E)와 제2 올리고뉴클레오타이드쇄(F)는, 루프 부위(LP)를 통해 분자 내에서 2중쇄를 형성하고, 헤드피스가 헤어핀 구조를 형성하는 것이 바람직하다. 분자 내에서의 2중쇄의 형성에 바람직한 쇠 길이는 3 염기 이상이며, 보다 바람직하게는 4 염기 이상이며, 더욱 바람직하게는 6 염기 이상이다.
- [0598] E 및 F의 쇠 길이는, 하나의 양태로서 각각 3 내지 40이다.
- [0599] E 및 F의 쇠 길이는, 하나의 양태로서 각각 4 내지 40이다.
- [0600] E 및 F의 쇠 길이는, 하나의 양태로서 각각 6 내지 25이다.
- [0601] 올리고뉴클레오타이드 태그가 연결되는 부위는, 효소적 라이게이션 또는 화학적 라이게이션에 적합한 구조인 것이 바람직하다. 하나의 양태로서, 헤드피스와 올리고뉴클레오타이드 태그의 연결은, 효소를 사용한 2분쇄 라이게이션에 의해 실시된다. 그 경우, 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드쇄는 라이게이션을 위한 돌출 말단을 형성하는

것이 바람직하다. 상기 해당 돌출 말단의 쇠 길이는, 바람직하게는 2 염기 이상이며, 보다 바람직하게는 2 내지 10 염기이며, 더욱 바람직하게는 2 내지 5 염기이다. 따라서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드쇄의 한쪽은, 다른 한쪽 쇠보다도 돌출 말단의 쇠 길이만큼 긴 것이 바람직하다. 또한, DNA 리가아제에 의한 라이게이션을 위해서는, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드쇄 중, 헤드피스의 5' 말단을 갖고 있는 쇠의 5' 말단은 인산화되어 있는 것이 바람직하다.

- [0602] 또한, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드쇄는 PCR을 위한 프라이머 결합 서열의 일부 또는 전부를 포함하고 있어도 된다. 프라이머 결합 서열로서 적절한 쇠 길이는 17 내지 25 염기이다.
- [0603] (링커)
- [0604] 이하에, 링커(L)의 바람직한 형태에 대하여 설명한다.
- [0605] 링커는, 상기한 대로, 반응성 관능기로부터 신장되고, 연결 부위와 결합하는 부위이다. 전형적으로는, 링커는 이하의 양태에서 유래하는 2가의 기(-L-)이다.
- [0606] 하나의 양태로서, 링커는 이하의 양태 (L1)이다.
- [0607] (L1) 치환기를 가져도 되고, 1 내지 3개의 헥사로 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 20 지방족 탄화수소, 또는 (2) 치환기를 가져도 되는 C6 내지 14 방향족 탄화수소.
- [0608] 기타 양태로서, L은, 이하의 양태 (L2), (L3), (L4) 또는 (L5)이다.
- [0609] (L2)
- [0610] 치환기를 가져도 되는 C1 내지 6 지방족 탄화수소, 1 혹은 2개의 산소 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 6 지방족 탄화수소, 또는 치환기를 가져도 되는 C6 내지 10 방향족 탄화수소.
- [0611] (L3)
- [0612] 치환기군 ST1로 치환 가능한 C1 내지 6 지방족 탄화수소, 또는 치환기군 ST1로 치환 가능한 벤젠. 여기서, 치환기군 ST1은, C1 내지 6 알킬기, C1 내지 6 알콕시기, 불소 원자 및 염소 원자에 의해 구성되는 군이다. 단, 치환기군 ST1이 지방족 탄화수소로 치환되는 경우, 치환기군 ST1에서 알킬기는 선택되지 않는다.
- [0613] (L4)
- [0614] C1 내지 6 알킬, 또는 비치환이거나 1개 또는 2개의 C1 내지 3 알킬기 혹은 C1 내지 3 알콕시기로 치환된 벤젠.
- [0615] (L5)
- [0616] C1 내지 6 알킬.
- [0617] (반응성 관능기)
- [0618] 이하에, 반응성 관능기(D)의 바람직한 형태에 대하여 설명한다.
- [0619] 반응성 관능기는, 상기한 대로, 빌딩 블록과 직접 연결하거나, 또는 2관능성 스페이서를 통해 간접적으로 연결할 수 있는 적어도 하나의 부위를 갖고, 링커기와 결합하는 부위이다. 전형적으로는, 반응성 관능기는, 헤드피스에 있어서 1가의 기(D-)가 되고, DEL에 있어서는 상기 (D-)에 기초하는 「반응성 관능기 유래의 2가의 기」(-D-)가 된다.
- [0620] 예를 들어, D가 아미노기인 경우, (D-)의 구체적 구조는 (R-HN-)이다(R은 이하에 설명되는 치환기). 예를 들어, 활성화 카르복시기, 반응성 술폰닐기 또는 이소시아네이트기와 반응하여, 각각 아미드 결합, 술폰아미드 결합 또는 우레아 결합을 형성한다. 그 때 (-D-)의 구체적 구조는 (-NR-)가 된다.
- [0621] R은, 본 발명의 효과를 달성하는 한 한정되지 않지만, 이하의 (D1) 내지 (D5)의 양태에 있어서, R은, 바람직하게는 (1) 수소 원자, 또는 (2) 비치환이거나 또는 C1 내지 6 알콕시기, 불소 원자 및 염소 원자로 이루어지는 치환기군에서 단독 혹은 다르게 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된 C1 내지 6 알킬기이다.
- [0622] R은, 보다 바람직하게는 수소 원자 또는 C1 내지 3 알킬기이며, 더욱 바람직하게는 수소 원자이다.
- [0623] 또한, 예를 들어 (D-)가, 탈리기(X-)를 갖는 메틸렌기인 경우, (D-)의 구체적 구조는 (X-CH₂-)이며, 예를 들어 아미노기, 히드록시기 또는 티올기와 같은 구핵 시약과 반응하여, 탄소-질소 결합, 탄소-산소 결합 또는 탄소-

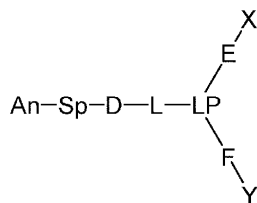
황 결합을 형성한다. 그 때, (-D-)의 구체적 구조는 (-CH₂-)가 된다. 또한, 예를 들어 (D-)가 알데히드기인 경우, (D-)의 구체적 구조는 (HOC-)이다. 알데히드기는, 예를 들어 아미노기와 환원적 아미노화 반응에 의해, 탄소-질소 결합을 형성하고, 그 때 (-D-)는 -CH₂-가 되고, 예를 들어 인일리드기와 반응에 의해 탄소-탄소 이중 결합을 형성하고, 그 때 (-D-)는 -CH=가 되고, 예를 들어 α-디아조포스포네이트기와 반응에 의해 탄소-탄소 삼중 결합을 형성하고, 그 때 (-D-)는 -C≡가 된다.

- [0624] 하나의 양태로서, 부위(D-)는 이하의 양태 (D1)이다.
- [0625] (D1)
- [0626] C-C, 아미노, 에테르, 카르보닐, 아마이드, 에스테르, 우레아, 술피드, 디술피드, 술피옥사이드, 술피온아미드, 또는 술피오닐 결합을 구성할 수 있는 관능기.
- [0627] (문자 의미 그대로이지만, 이 경우, (-D-)는 C-C, 아미노, 에테르, 카르보닐, 아마이드, 에스테르, 우레아, 술피드, 디술피드, 술피옥사이드, 술피온아미드, 또는 술피오닐 결합이 된다.)
- [0628] 기타 양태로서, (D-)는 이하의 양태 (D2), (D3), (D4) 또는 (D5)이다.
- [0629] (D2)
- [0630] 탈리기를 갖는 C1 탄화수소, 아미노기, 수산기, 카르보닐기의 전구체, 티올기 또는 알데히드기.
- [0631] 또한, 이 경우, (-D-)는 -(C1 탄화수소)-, -NR-, -O-, -(C=O)-, -S-, -CH₂-, -CH=, 또는 -C≡ 등이 될 수 있다.
- [0632] (D3)
- [0633] 할로젠 원자를 갖는 C1 탄화수소, 술피산계 탈리기를 갖는 C1 탄화수소, 아미노기, 수산기, 카르복시기, 할로젠화 카르복시기, 티올기 또는 알데히드기.
- [0634] 또한, 이 경우, (-D-)는 -(C1 탄화수소)-, -NR-, -O-, -(C=O)-, -S-, -CH₂-, -CH=, 또는 -C≡ 등이 될 수 있다.
- [0635] (D4)
- [0636] -CH₂Cl, -CH₂Br, -CH₂OSO₂CH₃, -CH₂OSO₂CF₃, 아미노기, 수산기 또는 카르복시기.
- [0637] 또한, 이 경우, (-D-)는 각각 -CH₂-, -NR-, -O- 또는 -(C=O)-가 된다.
- [0638] (D5)
- [0639] 제1급 아미노기.
- [0640] 또한, 이 경우, (-D-)는 -NH-가 된다.
- [0641] 이하에, 루프 부위(LP)의 바람직한 형태에 대하여 설명한다.
- [0642] 루프 부위(LP)는, 제1 올리고뉴클레오티드쇄(E)와 제2 올리고뉴클레오티드쇄(F)가 분자 내에서 2중쇄를 형성하고, 헤드피스가 헤어핀 구조를 형성 가능하도록 설계되는 것이 바람직하다. 즉, 루프 부위(LP)는, 루프 구조가 열역학적으로 안정이 되는 쇠 길이, 및 결합의 유연성을 갖고 있는 것이 바람직하다.
- [0643] 따라서, 하나의 양태로서, 루프 부위(LP)는 이하이다.
- [0644] LP가,
- [0645] (LP1) p-LS-(LP2)_q로 표시되는 루프 부위이며,
- [0646] LS는, 이하의 (A) 내지 (C)에 기재되는 화합물군에서 선택되는 부분 구조이며,
- [0647] (A) 뉴클레오티드
- [0648] (B) 핵산 아날로그
- [0649] (C) 치환기를 가져도 되는 C1 내지 14의 3가의 기

- [0650] LP1은, 이하의 (1) 및 (2)에 기재되는 화합물군에서 단독 혹은 다르게 p개 선택되는 각 부분 구조이며,
- [0651] (1) 뉴클레오티드
- [0652] (2) 핵산 아날로그
- [0653] LP2는, 이하의 (1) 및 (2)에 기재되는 화합물군에서 단독 혹은 다르게 q개 선택되는 각 부분 구조이며,
- [0654] (1) 뉴클레오티드
- [0655] (2) 핵산 아날로그
- [0656] p와 q의 총 수가 0 내지 40이다.
- [0657] 루프 부위의 더욱 바람직한 양태는, 상기 설명과 같다.
- [0658] 이하, 또한 루프 부위의 구조에 대하여 보충한다.
- [0659] 여기서, 뉴클레오티드는 상기 설명한 천연 뉴클레오티드이며, 핵산 아날로그는 상기 설명과 같다.
- [0660] 여기서, LP1은, 이하의 (1) 및 (2)에 기재되는 화합물군에서 단독 혹은 다르게 p개 선택되는 각 부분 구조이며, LP2는, 이하의 (1) 및 (2)에 기재되는 화합물군에서 단독 혹은 다르게 q개 선택되는 각 부분 구조이다.
- [0661] (1) 뉴클레오티드
- [0662] (2) 핵산 아날로그
- [0663] 단독 혹은 다르게 p개 선택된다는 것은, 예를 들어 p가 4인 경우, LP1은 AATG, ATCG, TC(d-스페이서)G 혹은 A(d-스페이서)(d-스페이서)C와 같이, (1)과 (2)에 기재된 화합물군에서 단독 혹은 다르게 선택할 수 있다. LP2도 마찬가지이다.
- [0664] 또한, 루프 부위는, PCR을 위한 프라이머 결합 서열의 일부 또는 전부를 포함하고 있어도 된다.
- [0665] (LS에 대해서)
- [0666] 하나의 양태로서, LS는 (A) 뉴클레오티드 또는 (B) 핵산 아날로그이다.
- [0667] LS가 (A) 뉴클레오티드 또는 (B) 핵산 아날로그인 경우, 루프 부위는 핵산 올리고머가 된다. 본 발명의 핵산 올리고머란, 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그를 모노머로서 연결시킨 올리고머이다. 올리고머는 쇠상 화합물이라고도 할 수 있다.
- [0668] 따라서, 본 발명의 핵산 올리고머란, 올리고뉴클레오티드쇄, 핵산 아날로그쇄 또는 뉴클레오티드와 핵산 아날로그의 혼합쇄 중 어느 것이다.
- [0669] LS가 (A) 뉴클레오티드 또는 (B) 핵산 아날로그인 경우, 루프 부위는 핵산 올리고머가 된다. 그 경우, 헤드피스는 핵산 합성기로 제조 가능하게 되어, 실무상, 현저하게 바람직하다.
- [0670] LS가 (A) 뉴클레오티드 또는 (B) 핵산 아날로그인 경우, 헤드피스의 제조에 있어서는, 하나의 양태로서, 링커 부위(L) 및 반응성 관능기 부위(D)가 LS와 결합한 핵산 합성용 모노머를 조제하고, 그 후 핵산 올리고머를 합성할 수 있다.
- [0671] 그러한 핵산 합성 모노머의 예로서는, 전술한 아미노 C6 dT, mdC(TEG-아미노), Uni-Link(상표 등록) 아미노 모디파이어 등을 들 수 있다.
- [0672] 이 양태의 경우, 예를 들어 당해 모노머인 mdC(TEG-아미노)의 구조 중, 뉴클레오티드 부분이 연결 부위(LS)에 상당하고, 염기로부터 신장되는 측쇄 부분이 링커 부위(L) 및 반응성 관능기 부위(D)에 상당한다.
- [0673] 조제에 있어서, 반응성 관능기(D)는 보호기로 보호되어 있어도 된다.
- [0674] 그 경우, 하나의 양태로서, 핵산 아날로그는 이하의 화합물 (B6)이다.
- [0675] (B6) 뉴클레오티드의 염기부에, 상기 (-L-D)가 결합된 화합물.
- [0676] 하나의 양태로서, 핵산 아날로그는 이하의 화합물 (B61), (B62), (B63), (B64) 또는 (B65)이다.
- [0677] (B61) (-L-D)가 (-L1-D1)이다(B6)

- [0678] (B62) (-L-D)가 (-L2-D2)이다(B6).
- [0679] (B63) (-L-D)가 (-L3-D3)이다(B6).
- [0680] (B64) (-L-D)가 (-L4-D4)이다(B6).
- [0681] (B65) (-D)가 (-D5)인 (B61) 내지 (B64) 중 어느 것에 기재된 화합물.
- [0682] LS가 (A) 뉴클레오티드 또는 (B) 핵산 아날로그인 경우, 헤드피스의 제조에 있어서는, 하나의 양태로서, 먼저 핵산 올리고머를 합성하고, 그 후 상기 링커 부위(L) 및 반응성 관능기 부위(D)를 결합시킬 수 있다.
- [0683] 그 경우에 있어서, 링커 부위가 결합하는 상대의 「특정한 핵산 아날로그」를, 연결 부위(LS)로서 헤어핀 부위(핵산 아날로그 올리고머) 중에 넣어 두는 것이 바람직하다. 당해 「특정한 핵산 아날로그」의 예로서는, 전술한 아미노 C6 dT, mdC(TEG-아미노), Uni-Link(상표 등록) 아미노 모디파이어를 들 수 있다.
- [0684] 이 양태의 경우, 예를 들어 mdC(TEG-아미노) 자체가 연결 부위(LS)에 상당하고, 염기 측쇄로부터, 또한 결합하는 부가 부위가 링커 부위(L) 및 반응성 관능기 부위(D)에 상당한다.
- [0685] (p와 q에 대해서)
- [0686] 전술한 바와 같이, 상기 루프 부위의 쇠 길이는, 제1 올리고뉴클레오티드쇄(E)와 제2 올리고뉴클레오티드쇄(F)가 분자 내에서 2중쇄를 형성하고, 헤드피스가 헤어핀 구조를 형성하는 쇠 길이인 것이 바람직하다.
- [0687] 하나의 양태로서, p와 q의 총 수는 1 내지 40이다.
- [0688] 하나의 양태로서, p와 q의 총 수는 2 내지 20이다.
- [0689] 하나의 양태로서, p와 q의 총 수는 2 내지 10이다.
- [0690] 하나의 양태로서, p와 q의 총 수는 2 내지 7이다.
- [0691] 하나의 양태로서, 본 발명의 루프 부위는,
- [0692] (A) 뉴클레오티드
- [0693] 및 이하의 핵산 아날로그(B41), (B42), (B43), (B44) 또는 (B52)에 의해 구성된다.
- [0694] (B41) d-스페이서
- [0695] (B42) 아미노 C6 dT
- [0696] (B43) mdC(TEG-아미노)
- [0697] (B44) Uni-Link(상표 등록) 아미노 모디파이어
- [0698] (B52) 트리에틸렌글리콜인산에스테르
- [0699] 하나의 양태로서, LS는 B42, B43 또는 B44가 바람직하다.
- [0700] 또 하나의 양태로서, LP1 및 LP2는, A, B41 또는 B52가 바람직하다.
- [0701] 하나의 양태로서, 루프 부위는, 이하의 (X1) 내지 (X9)에 기재된 서열에 의한 핵산 올리고머이다.
- [0702] (X1) A-B41-B42-B41-A
- [0703] (X2) A-B41-B43-B41-A
- [0704] (X3) A-B41-B44-B41-A
- [0705] (X4) B41-B41-B42-B41-B41
- [0706] (X5) B41-B41-B43-B41-B41
- [0707] (X6) B41-B41-B44-B41-B41
- [0708] (X7) B52-B42-B52
- [0709] (X8) B52-B43-B52

- [0710] (X9) A52-A44-A52
- [0711] 상기한 헤드피스에 있어서, 절단 가능한 부위의 수는, 바람직하게는 5개 이내이며, 1 내지 2개가 보다 바람직하다.
- [0712] 상기한 헤드피스에 있어서, 절단 가능한 부위가 2개 이상인 경우, 적어도 하나의 절단 가능한 부위는, 제1 올리고뉴클레오티드쇄 중에 있거나, 제1 올리고뉴클레오티드쇄와 링커 결합 부위 사이에 있고, 또한 적어도 하나의 절단 가능한 부위는, 제2 올리고뉴클레오티드쇄 중에 있거나, 제2 올리고뉴클레오티드쇄와 링커 결합 부위 사이에 있는 것이 바람직하다.
- [0713] 하나의 양태로서, 상기한 헤드피스에 있어서, 절단 가능한 부위의 위치는, 루프 부위와, 제1 올리고뉴클레오티드쇄 혹은 제2 올리고뉴클레오티드쇄의 결합 부분을 기점으로 하여, 바람직하게는 20 염기 이내이며, 보다 바람직하게는 10 염기 이내이며, 더욱 바람직하게는 3 염기 이내이다.
- [0714] 만약을 위한 설명이지만, 「선택적으로 절단 가능한 부위」의 바람직한 형태와, 예를 들어 E, F 또는 LP 등의 바람직한 형태는, 각각 다른 개념이다. 즉, 「선택적으로 절단 가능한 부위」의 위치가, E에 포함된 경우에도, E의 바람직한 형태가, 「선택적으로 절단 가능한 부위」에 적용되는 것은 아니다.
- [0715] 하나의 양태로서, 본 발명의 DEL을 구성하는 화합물은 다음 식 (II)로 나타내지는 화합물이다.



(II)

- [0716]
- [0717] (식 중,
- [0718] X 및 Y는, 올리고뉴클레오티드쇄이며,
- [0719] E 및 F는, 각각 독립적으로
- [0720] 뉴클레오티드 또는 핵산 아날로그에 의해 구성되는 올리고머이며,
- [0721] 단, E와 F가 서로 상보적인 염기 서열을 포함하고, 2중쇄 올리고뉴클레오티드를 형성하고,
- [0722] LP는, 루프 부위이며,
- [0723] L은, 링커이며,
- [0724] D는, 반응성 관능기 유래의 2개의 기이며,
- [0725] Sp는, 결합 또는 2관능성 스페이서이며,
- [0726] An은, 적어도 하나의 빌딩 블록에 의해 구성되는 부분 구조이다.)
- [0727] 로 표시되는 화합물이며,
- [0728] X와 Y는, 적어도 일부에서 2중쇄를 형성할 수 있는 서열을 갖고,
- [0729] X는 5' 말단에서 E에 결합하고,
- [0730] Y는 3' 말단에서 F에 결합하고,
- [0731] E, F 또는 LP 중 적어도 어느 하나의 부위에, 적어도 하나의 선택적으로 절단 가능한 부위를 갖는 화합물.
- [0732] 하나의 양태로서, 전술한 식 (II)로 나타내지는 화합물에 있어서의 E, F, LP, L 및 D의 바람직한 형태는, 전술한 식 (I)에 관해 설명한 E, F, LP, L 및 D의 바람직한 형태와 마찬가지로이다.
- [0733] X, Y, Sp 및 An의 바람직한 형태는 별도로 설명된다.
- [0734] (2관능성 스페이서)

- [0735] 상기한 대로, 2관능성 스페이서는, 화합물 라이브러리의 부분 구조 An과 헤드피스의 결합을 가능하게 하는 적어도 2개의 반응기를 갖는 스페이서 부분이다. 하나의 양태로서, 2관능성 스페이서는 SpD-SpL-SpX이다.
- [0736] SpX는, 헤드피스의 반응성 관능기와 공유 결합을 형성하는 반응기이다.
- [0737] SpD는, 화합물 라이브러리의 부분 구조 An과 공유 결합을 형성하는 반응기이다.
- [0738] SpL은, 화학적으로 불활성의 스페이싱 부분이다.
- [0739] 또한, 반응성 관능기(D)와 마찬가지로, 반응기(SpX)는 2관능성 스페이서 단체(헤드피스와 결합시키기 전의 시약 상태)에 있어서 1개의 기(-SpX)가 되고, DEL(헤드피스와 결합한 상태)에 있어서는 상기 (-SpX)에 기초하는 「반응기 유래의 2개의 기」(-SpX-)가 된다.
- [0740] 또한 마찬가지로, 반응기(SpD)는 An과 결합시키기 전의 상태에 있어서 1개의 기(SpD-)가 되고, DEL(An과 결합한 상태)에 있어서는 상기 (SpD-)에 기초하는 「반응기 유래의 2개의 기」(-SpD-)가 된다.
- [0741] SpX의 바람직한 형태는, 아미노, 카르보닐, 아미드, 에스테르, 우레아, 또는 술폰아미드 결합을 형성하는 반응성기이다. 하나의 양태로서, SpX는 헤드피스의 반응성 관능기가 아미노기였을 경우에 적합한 반응성기인, 이하의 (SpX1), (SpX2) 또는 (SpX3)의 구조이다.
- [0742] (SpX1): 카르복시기, 할로젠화 카르복시기, 알데히드기 또는 할로젠화 술폰닐기
- [0743] (SpX2): 카르복시기 또는 할로젠화 술폰닐기
- [0744] (SpX3): 카르복시기
- [0745] SpD의 바람직한 형태는, 전술한 D와 동일하다.
- [0746] 하나의 양태로서, SpD는 전술한 (D1), (D2), (D3), (D4) 또는 (D5)이다.
- [0747] SpL의 바람직한 형태는, 하기 양태이다.
- [0748] 하나의 양태로서, SpL은 전술한 (L1), (L2), (L3), (L4) 또는 (L5)이다.
- [0749] 하나의 양태로서, SpL은 이하의 (SpL1), (SpL2) 또는 (SpL3)이다.
- [0750] (SpL1) 폴리알킬렌글리콜, 폴리에틸렌, 임의로 헤테로 원자로 치환되어도 되는 C1 내지 20 지방족 탄화수소, 펩티드, 올리고뉴클레오티드 또는 이들의 조합.
- [0751] (SpL2) 폴리알킬렌글리콜, 폴리에틸렌, C1 내지 10 지방족 탄화수소 또는 펩티드
- [0752] (SpL3) 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌
- [0753] 하나의 양태로서, 2관능성 스페이서는 이하와 같다.
- [0754] (Sp1): (D4)-(SpL1)-(SpX1)
- [0755] (Sp2): (D4)-(SpL2)-(SpX2)
- [0756] (Sp3): (D4)-(SpL3)-(SpX3)
- [0757] (Sp4): (D5)-(SpL1)-(SpX1)
- [0758] (Sp5): (D5)-(SpL2)-(SpX2)
- [0759] (Sp6): (D5)-(SpL3)-(SpX3)
- [0760] 하나의 양태로서, DEL을 구성하는 화합물의 (Sp-D-L) 부분은, 이하의 (SpDL1), (SpDL2), (SpDL3)(SpDL4), (SpDL5), (SpDL6), (SpDL7), (SpDL8), (SpDL9) 또는 (SpDL10)과 같이 구성된다.
- [0761] (SpDL1): (D4)-(L1)
- [0762] (SpDL2): (D5)-(L1)
- [0763] (SpDL3): (D4)-(L2)
- [0764] (SpDL4): (D5)-(L2)

- [0765] (SpDL5): (Sp1)-(D5)-(L5)
- [0766] (SpDL6): (Sp2)-(D5)-(L5)
- [0767] (SpDL7): (Sp3)-(D5)-(L5)
- [0768] (SpDL8): (Sp4)-(D5)-(L5)
- [0769] (SpDL9): (Sp5)-(D5)-(L5)
- [0770] (SpDL10): (Sp6)-(D5)-(L5)
- [0771] 또한, (SpDL1), (SpDL2), (SpDL3), (SpDL4)에 있어서, Sp는 결합을 의미한다.
- [0772] 본 발명의 실시예에 있어서, 헤드피스는 핵산 합성 장치로 합성할 수 있으면 유리하다. 당해 실시예에 있어서는, 전술한 바와 같이, 하나의 양태로서, 링커 부위(L) 및 반응성 관능기 부위(D)가, LS와 결합한 핵산 합성용 모노머를 조제하고, 그 후 핵산 올리고머를 합성할 수 있다. 그러한 핵산 합성 모노머의 예로서는, 전술한 아미노 C6 dT, mdC(TEG-아미노), Uni-Link(상표 등록) 아미노 모디파이어 등을 들 수 있다.
- [0773] 한편, 상기와 같은 시판되고 있는 핵산 합성 모노머 또는 핵산 합성기에서 사용 가능한 핵산 아날로그를 사용한 경우, 링커 부위의 길이가 제한될 가능성이 있다. 그러한 경우, 하나의 양태로서, 적절한 2관능성 스페이서를 도입함으로써, 헤드피스와 An의 거리를 조정하는 것이 가능해져, 발명의 실시예에 있어서 유리해진다.
- [0774] 본 발명의 설명에 있어서, 「C1 내지 C6의 알킬기」나 「C1 내지 6 알킬기」와 같은 용어에 있어서의 「C1 내지 C6의」나 「C1 내지 6」이란 탄소수가 1 내지 6개인 것을 의미한다. 마찬가지로 m, n이 정수인 경우에, 「Cm 내지 Cn의」나 「Cm 내지 n」라는 기재가 있었을 경우, 당해 기재는 탄소수가 m 내지 n개인 것을 의미한다. 따라서 「C1 내지 C6의 알킬기」나 「C1 내지 6 알킬기」란 탄소수가 1 내지 6개인 알킬기를, 「C1 내지 C6의 알킬렌」이나 「C1 내지 6 알킬렌」이란 탄소수가 1 내지 6개인 알킬렌을 의미한다.
- [0775] 본 발명에서 「C1 내지 6 알킬」이란, 탄소 원자수가 1 내지 6개인 직쇄 또는 분지쇄상의 알킬기를 의미한다. 구체예로서는, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 펜틸, 헥실 등을 들 수 있다.
- [0776] 본 발명에서 「C1 내지 3 알킬」이란, 탄소 원자수가 1 내지 3개인 직쇄 또는 분지쇄상의 알킬기를 의미한다. 구체예는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필이다.
- [0777] 본 발명에서 「C1 내지 6 알콕시」란, 탄소 원자수가 1 내지 6개인 직쇄 또는 분지쇄상의 알콕시를 의미한다. 구체예로서는, 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, 부톡시, 이소부톡시, sec-부톡시, tert-부톡시, 펜틸옥시, 헥실옥시 등을 들 수 있다.
- [0778] 본 발명에서 「C1 내지 3 알콕시」란, 탄소 원자수가 1 내지 3개인 직쇄 또는 분지쇄상의 알콕시를 의미한다. 구체예는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시이다.
- [0779] 본 발명에서 「탄화수소」란, 탄소 원자 및 수소 원자만으로 구성되는 쇠상, 분지쇄상 또는 환상의 포화 또는 불포화의 화합물을 의미한다.
- [0780] 본 발명에서 「지방족 탄화수소」란, 탄화수소 중, 지방족의 것을 의미한다. 「지방족 탄화수소」는 쇠상, 분지쇄상 또는 환상이어도 되고, 또한 포화 또는 불포화이면 된다. 구조의 구체예로서는, 알킬, 알케닐, 알케닐, 시클로알킬 혹은 시클로알케닐, 또는 이들의 조합에 의한 구조를 들 수 있다.
- [0781] 본 발명에서 「C1 내지 20 지방족 탄화수소」란, 탄소 원자수가 1 내지 20개인 지방족 탄화수소를 의미한다.
- [0782] 본 발명에서 「C1 내지 10 지방족 탄화수소」란, 탄소 원자수가 1 내지 10개인 지방족 탄화수소를 의미한다.
- [0783] 본 발명에서 「C1 내지 6 지방족 탄화수소」란, 탄소 원자수가 1 내지 6개인 지방족 탄화수소를 의미한다.
- [0784] 본 발명에서 「방향족 탄화수소」란, 탄화수소 중, 방향족의 것을 의미한다.
- [0785] 본 발명에서 「C6 내지 14 방향족 탄화수소」란, 탄소 원자수가 6 내지 14개인 방향족 탄화수소를 의미한다. 구체예로서는, 벤젠, 나프탈렌, 안트라센을 들 수 있다.
- [0786] 본 발명에서 「C6 내지 10 방향족 탄화수소」란, 탄소 원자수가 6 내지 10개인 방향족 탄화수소를 의미한다. 구체예는 벤젠 또는 나프탈렌이다.

- [0787] 본 발명의 방향족 복소환은, 환 구조 내에 헤테로 원자로서, 질소, 산소 및 황으로 이루어지는 군에서 단독 또는 다르게 선택되는 원소를 갖는 방향족의 복소환이다.
- [0788] 하나의 양태로서, 방향족 복소환은 탄소 원자를 1 내지 9개 갖는 「C1 내지 9 방향족 복소환」이며, 하나의 양태로서, 「C1 내지 9 방향족 복소환」은 5 내지 10원의 방향족 복소환」이다.
- [0789] 하나의 양태로서, 방향족 복소환은 탄소 원자를 1 내지 5개 갖는 「C1 내지 5 방향족 복소환」이며, 하나의 양태로서, 「C1 내지 5 방향족 복소환」은 5 내지 6원의 방향족 복소환」이다.
- [0790] 하나의 양태로서, 방향족 복소환은 탄소 원자를 2 내지 9개 갖는 「C2 내지 9 방향족 복소환」이며, 하나의 양태로서, 「C2 내지 9 방향족 복소환」은 5 내지 10원의 방향족 복소환」이다.
- [0791] 하나의 양태로서, 방향족 복소환은 탄소 원자를 2 내지 5개 갖는 「C2 내지 5 방향족 복소환」이며, 하나의 양태로서, 「C2 내지 5 방향족 복소환」은 5 내지 6원의 방향족 복소환」이다.
- [0792] 본 발명의 질소 함유 방향족 복소환은, 환 구조 내에 헤테로 원자로서, 질소를 갖는 방향족의 복소환이다.
- [0793] 하나의 양태로서, 질소 함유 방향족 복소환은 탄소 원자를 1 내지 5개 갖는 「C1 내지 5 질소 함유 방향족 복소환」이며, 하나의 양태로서, 「C1 내지 5 질소 함유 방향족 복소환」은 5 내지 6원의 방향족 복소환」이다.
- [0794] 하나의 양태로서, 질소 함유 방향족 복소환은 탄소 원자를 2 내지 5개 갖는 「C2 내지 5 질소 함유 방향족 복소환」이며, 하나의 양태로서, 「C2 내지 5 질소 함유 방향족 복소환」은 5 내지 6원의 방향족 복소환」이다.
- [0795] 본 발명의 비방향족 복소환은, 환 구조 내에 헤테로 원자로서, 질소, 산소 및 황으로 이루어지는 군에서 단독 또는 다르게 선택되는 원소를 갖는 비방향족의 복소환이다.
- [0796] 비방향족 복소환은 부분 불포화 결합을 포함해도 된다.
- [0797] 하나의 양태로서, 비방향족 복소환은 탄소 원자를 2 내지 9개 갖는 「C2 내지 9 비방향족 복소환」이며, 하나의 양태로서, 「C2 내지 9 비방향족 복소환」은 5 내지 10원의 비방향족 복소환」이다.
- [0798] 본 발명에서 「C1 내지 14의 3개의 기」란, 탄소 원자수가 1 내지 14개인 화합물에서 유래하는 3개의 기를 의미한다. 본 발명의 효과를 달성하는 한, 구조는 한정되지 않는다.
- [0799] 본 발명에서 「헤테로 원자로 치환되어도 된다」라는 기재가 있었을 경우, 헤테로 원자란, 탄소 및 수소 이외의 원자를 의미한다.
- [0800] 당해 헤테로 원자는, 바람직하게는 산소 원자, 질소 원자, 규소 원자, 인 원자 또는 황 원자이며, 보다 바람직하게는 산소 원자, 질소 원자 또는 황 원자이다.
- [0801] 따라서, 예를 들어 탄화수소의 예로서 프로필(-CH₂-CH₂-CH₃)을 들면, 「헤테로 원자로 치환되어도 되는 프로필」이란, 알킬 중의 메틸렌(-CH₂-)가 산소로 치환된 에테르((-CH₂-O-CH₃) 혹은 (-O-CH₂-CH₃))나, 질소로 치환된 아민((-CH₂-NH-CH₃) 혹은 (-NH-CH₂-CH₃)) 등의 구조를 함유하는 개념이다.
- [0802] 본 발명에서 「치환기를 가져도 된다」라는 기재가 있었을 경우, 그 치환기는, 본 발명의 목적을 달성하는 한 한정되지 않는다.
- [0803] 당해 치환기는, 바람직하게는 C1 내지 6 알킬기, C1 내지 6 알콕시기, 아미노기, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 옥소기 혹은 할로젠 원자이다.
- [0804] 당해 치환기는, 보다 바람직하게는 C1 내지 6 알킬기, C1 내지 6 알콕시기, 불소 원자 혹은 염소 원자이다.
- [0805] 본 발명에서 폴리펩티드 및 펩티드란, 아미노산이 연결되어 형성되는 화합물 또는 부분 구조를 의미한다. 아미노산이란, 아미노기와 카르복시기의 양쪽 관능기를 갖는 유기 화합물의 총칭이다. 본 발명의 폴리펩티드 및 펩티드를 구성하는 아미노산은, 특별히 한정되지 않고, 수식 아미노산 등을 포함한다. 생명 과학 분야에 있어서의 일반적인 용법에 따라서, 본 발명에서는 프롤린(이미노산으로 분류됨)도 아미노산에 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드 및 펩티드를 구성하는 아미노산은, 바람직하게는 α아미노산이며, 보다 바람직하게는 「단백질을 구성하는 아미노산」이다.
- [0806] 본 발명의 할로젠 원자는 불소 원자, 염소 원자, 브롬 원자 및 요오드 원자를 들 수 있다.

- [0807] C-C, 아미노, 에테르, 카르보닐, 아미드, 에스테르, 우레아, 술폰드, 디술폰드, 술폰시드, 술폰아미드 및 술폰닐 결합이란, 각각의 명칭에 의해 이해되는 화학 구조를 갖는 화학 결합이다. 당업자는, 예를 들어 에테르 결합은 일반적으로 "-O-"로 표현될 수 있는 결합이며, 카르보닐 결합은 일반적으로 "-C(=O)-"로 표현될 수 있는 결합인 것을 이해한다. 아미노, 아미드 및 우레아 결합은, 질소 원자 상에 수소 원자 또는 기타 치환기를 갖지만, 본 발명의 효과를 갖는 한 질소 원자 상의 구조는 한정되지 않는다. 상기 질소 원자 상의 치환기는, 바람직하게는 C1 내지 6 알킬기 또는 수소 원자이며, 보다 바람직하게는 수소 원자이다. 또한, 언급할 것까지도 없지만, C-C 결합과는 탄소-탄소 결합을 의미한다. C-C 결합에는 단결합, 이중 결합 및 삼중 결합이 포함된다. 하나의 양태로서, 본 발명의 제조 방법의 공정 a 및/또는 c에서는, 상기 11종에서 적절히 선택되는 결합이 구축된다. 이들 11종의 결합은, 유기 화학에 있어서의 특히 기본적인 결합 양식이며, 그들을 구축하기 위한 반응도 당업자에게 주지되어 있다. 따라서 본 발명의 화합물 라이브러리의 부분 구조 An을 설계·구축함에 있어서, 당업자라면 이들 11종의 결합을 적절히 조합하여 사용할 수 있다.
- [0808] H, B, C, N, O, Si, P, S, F, Cl, Br 및 I로 이루어지는 원소군에서 단독 또는 다르게 선택되는 원소에 의해 구성되는 유기 화합물이란, 상기 12종의 원소의 결합에 의해 구축되는 유기 화합물이다.
- [0809] 하나의 양태로서, 본 발명의 화합물 라이브러리의 부분 구조 An은, 상기 12종의 원소에 의해 구축된다. 이들 12종의 원소는, 유기 화합물에 있어서의 특히 기본적인 원소이며, 그들을 구축하기 위한 반응도 당업자에게 주지되어 있다. 따라서 본 발명의 화합물 라이브러리의 부분 구조 An을 설계·구축함에 있어서, 당업자라면 이들 12종의 원소를 적절히 조합시켜 사용할 수 있다.
- [0810] 아릴기, 비방향족 시클릴기, 헤테로아릴기 및 비방향족 헤테로시클릴기로 이루어지는 치환기군에서 단독 또는 다르게 선택되는 치환기를 갖는 저분자 유기 화합물이란, 각각의 명칭에 의해 이해되는 화학 구조를 갖는 저분자 유기 화합물이다. 저분자 화합물은 당업자에게 주지된 개념이며, 본 발명에 있어서의 저분자 화합물의 바람직한 분자량의 예는, 별도로 언급된다.
- [0811] 본 발명의 아릴기는, 바람직하게는 C6 내지 10 아릴기이며, 보다 바람직하게는 페닐기이다.
- [0812] 본 발명의 비방향족 시클릴기는, 바람직하게는 5원 내지 8원의 비방향족 시클릴기이며, 보다 바람직하게는 5원 또는 6원의 비방향족 시클릴기이다. 당해 비방향족 시클릴기는 부분 불포화 결합을 포함해도 된다.
- [0813] 본 발명의 헤테로아릴기 및 비방향족 헤테로시클릴기는, 환 구조 내에 헤테로 원자로서, 질소, 산소 및 황으로 이루어지는 군에서 단독 또는 다르게 선택되는 원소를 갖는 기이다. 본 발명의 헤테로아릴기, 비방향족 헤테로시클릴기는, 바람직하게는 5원 내지 8원의 기이며, 보다 바람직하게는 5원 또는 6원의 기이며, 비방향족 헤테로시클릴기는 부분 불포화 결합을 포함해도 된다.
- [0814] 하나의 양태로서, 본 발명의 화합물 라이브러리의 부분 구조 An은, 상기 4종의 기를 갖는다. 이들 4종의 기는, 유기 화합물에 있어서의 특히 기본적인 부분 구조이며, 그들을 화합물 중에 구축하기 위한 반응도 당업자에게 주지되어 있다. 따라서 본 발명의 화합물 라이브러리의 부분 구조 An을 설계·구축함에 있어서, 당업자라면 이들 4종의 기를 적절히 조합하여 사용할 수 있다.
- [0815] 상기 바람직한 형태, 즉, 11종의 결합, 12종의 원소 및/또는 4종의 기로 구축되는 화합물 라이브러리는, 특히 핵심적인 가치를 갖는다. 따라서, 이들 바람직한 형태를 벗어나서 구축한 화합물 라이브러리는, 일반적으로는 용도가 한정되고, 많은 경우에 상업적 가치도 한정된 것이 되는 것을, 당업자는 이해할 것이다.
- [0816] An의 합성 이력이란, An이, 합성될 때까지 행해진 조작 전반의 기록을 의미하고, 특히 An이, 합성될 때까지 사용된 빌딩 블록의 구조와 그 순서를 의미한다. 예를 들어, 2개 이상의 별개의 반응 용기에서, 각각 다른 빌딩 블록의 사용, 및/또는 다른 반응 조건에 의해 반응이 진행되는 경우에, 반응 전 혹은 후에, 미리 정해 둔 서열의 올리고뉴클레오티드쇄를, 각각의 반응 용기 중의 생성물에 연결시킴으로써, 합성 이력이 올리고뉴클레오티드의 서열 정보로서 부여된다. 이러한 조작을 An이, 구축될 때까지 동안, 반복함으로써, An의 합성 이력을 갖는 Bn의 올리고뉴클레오티드가 구축된다.
- [0817] 스플릿·앤드·폴 합성이란, 게이센 등이 콘비나트리알 화학의 창성기에 고상 합성법을 이용한 펩티드 라이브러리의 콘비나트리알 화학적인 구축법으로서 개발한 합성법이다. 스플릿·앤드·폴 합성은, 스플릿·믹스법 등이라고도 불린다.
- [0818] 상기 경위에 따라서, 고상 합성법을 이용한 펩티드 라이브러리의 합성을 예로 설명하면, 스플릿·앤드·폴 합성에서는, 펩티드 증단(増端)의 단계마다, 아미노산을 펩티드 결합시킨 고상 담체로부터 샘플을 잘라낼 수 없어,

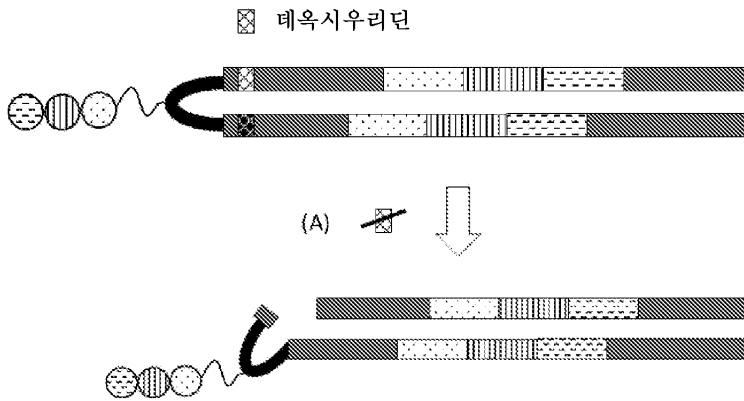
일단 N종의 담체를 혼합 균일화시킨 후에 등분하여 다음 N종의 아미노산을 증단시킨다.

- [0819] 즉, 담체마다 1종류의 펩티드쇄가 생성됨으로써, 각 단계에서 천연 아미노산 20종 모두를 적용하면 특정한 길이의 펩티드에 대하여 모든 조합 가능한 펩티드 라이브러리를 구축하게 된다.
- [0820] 이 펩티드 라이브러리는 항원 제시나 수용체 결합으로 스크리닝하는 것이면, ELISA법 등을 이용하면 고상 담체상의 펩티드를 이용하여 어세이를 실시할 수 있다. 즉, 담체로부터 시료의 펩티드를 잘라낼 필요는 없고, 어세이에 반응한 담체 입자를 골라낸다(예는 광학 현미경에서 0.1mm 정도의 형광 표지된 담체 입자를 골라낸다). 그리고 그 입자의 펩티드를 기기 분석 장치(펩티드 애널리저 등)에서 목적으로 하는 펩티드 서열을 결정하거나, 다른 콤비나트리알 화학적 동정 방법(예를 들어 태그법) 등으로 간접적으로 스크리닝의 후보가 된 펩티드 서열을 결정하거나 할 수 있다.
- [0821] 또한 본 발명의 제조 방법에 있어서, m이 2일 때에 v종류, m이 3인 경우에 w종류의 구조를, 스플릿·앤드·폴 합성으로 합성하는 경우를 예로서 설명한다. 또한, 본 설명에서는, 공정을 (c) (d)의 순으로 반복한다.
- [0822] (m=2)
- [0823] m=2의 스텝은, A1-Sp-C-B1에 대하여, 공정 (c)에서 α_2 를, 공정 (d)에서 β_2 를 각각 부가하고, A2-Sp-C-B2를 제조한다.
- [0824] 여기서, v종류의 구조인 $\alpha_2(\alpha_2(a-v))$ 와 그것에 대응하는 v종류의 $\beta_2(\beta_2(a-v))$ 를 준비하고, 각 구조에 대하여, 공정 (c) (d)를 각각 행하면, v종류의 A2-Sp-C-B2(A2(a)-Sp-C-B2(a), A2(b)-Sp-C-B2(b)...A2(v)-Sp-C-B2(v): 즉, A2(a-v)-Sp-C-B2(a-v))가 얻어진다. 스플릿·앤드·폴 합성에서는, v종류의 A2-Sp-C-B2를 혼합한 후, w개로 분할한다. 분할이란, 가장 구체적으로는 w개의 반응 용기에 소분하는 것을 의미한다.
- [0825] (m=3)
- [0826] m=3의 스텝은, A2-Sp-C-B2에 대하여, 공정 (c)에서 α_3 을, 공정 (d)에서 β_3 을 각각 부가하여, A3-Sp-C-B3을 제조한다.
- [0827] 여기서, w종류의 구조인 $\alpha_3(\alpha_3(a-w))$ 과, 그것에 대한 w종류의 $\beta_3(\beta_3(a-w))$ 을 준비하고, w개의 (A2(a-v)-Sp-C-B2(a-v) 혼합물)에 대하여, 각각 공정 (c) (d)를 실시한다. 그러면, n=2와 3의 스텝을 통해, (v+w)회의 합성으로, (v×w)종류의 A3-Sp-C-B3이 효율적으로 합성 가능하게 된다.
- [0828] (생물 평가)
- [0829] 얻어진 w개의 생성물을 혼합하면, (v×w)종류의 A3-Sp-C-B3 화합물 라이브러리의 혼합물이 얻어진다. 예를 들어, 이 혼합물에 대하여 약물 수용체의 결합 시험을 행하면, (v×w)종류의 화합물의 스크리닝을 1회로 실시할 수 있게 된다. 약물 수용체에 결합하지 않은 화합물을 씻어냄으로써, 결합한 화합물만을 단리할 수 있다. 본 발명과 같은 DEL에서는, 단리한 A3-Sp-C-B3 화합물의 DNA를 서열 해독 가능한 양까지 증폭시키고, 그 서열 정보에 의해 A3의 구조를 파악할 수 있게 된다.
- [0830] 또한, 화합물 라이브러리, 빌딩 블록, 스플릿·앤드·폴 등은, 콤비나트리알 화학 등의 분야에서 당업자에게 주지된 용어이며, 이하의 문헌 등을 참고로 적시에 행할 수 있다.
- [0831] (1) 다카바시 다카시, 도이 다카유키 「콤비나트리얼 케미스트리」, 유기 합성 화학 협회지, 2002년, 60권, 426-433 페이지
- [0832] (2) 콤비나트리얼 케미스트리 연구회편, 「콤비나트리얼 케미스트리」, 가가꾸 도진
- [0833] DNA 코드화 라이브러리(또는 DEL)란, DNA, 혹은 DNA와 실질적으로 동등한 기능을 갖는 올리고뉴클레오티드에 의해 표지된 화합물(DNA 코드화 화합물)의 군으로 이루어지는 화합물 라이브러리이다. 상기에 기재한 스플릿·앤드·폴 합성에 의해, 표지 DNA에는 각 화합물의 구조, 혹은 합성 이력이 서열 정보로서 부여된다. 이러한 특성으로부터, DNA 코드화 라이브러리는 10^2 내지 10^{20} 종의 화합물의 혼합물의 형태로, 스크리닝하고, 취득된 화합물에 포함되는 DNA 서열을 당 기술 분야에서 알려진 방법(예를 들어, 차세대 시퀀서의 사용 및/또는 마이크로어레이의 사용)에 의해 동정함으로써, 화합물의 구조를 동정하는 것이 가능해진다. 상기 스크리닝의 방법 중 하나의 양태로서, 단백질 등의 표적을 DNA 코드화 라이브러리와 접촉시켜, 표적과 결합한 화합물을 선별한다는 방법이 선택될 수 있다.
- [0834] 「생물학적 표적」이란 당업자에게 주지된 용어이지만, 하나의 양태로서, 본 발명에 있어서, 「생물학적 표적」

이란, 의농약으로 대표되는 약제 등의 개발이 있어서 표적이 될 수 있는 생물학적인 물질군을 말하고, 예를 들어 효소(예를 들어, 키나아제, 포스포타아제, 메틸라아제, 데메틸라아제, 프로테아제 및 DNA 수복 효소), 단백질: 단백질 상호 작용에 관계하는 단백질(예를 들어, 수용체의 리간드), 수용체 표적(예를 들어, GPCR), 이온 채널, 세포, 세균, 바이러스, 기생충, DNA, RNA, 프리온 또는 당질이 포함된다.

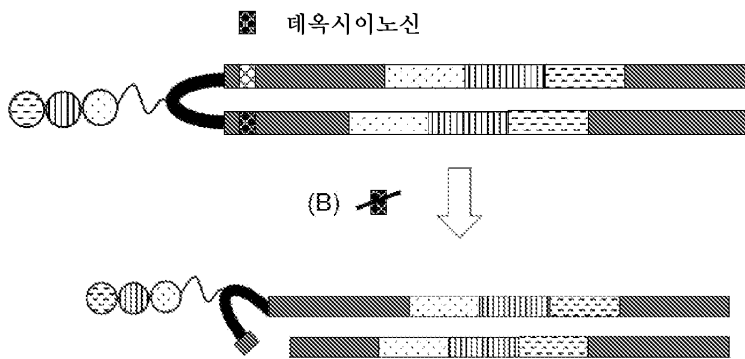
- [0835] 「생물 활성 평가」란 당업자에게 주지된 용어이지만, 하나의 양태로서, 본 발명에 있어서 「생물 활성 평가」란, 화합물이 갖는 생물 활성(예를 들어, 생물학적 표적과의 결합능, 효소 활성의 저해 기능, 효소 활성의 촉진 기능 등)의 유무, 또는 강약을 평가하는 것이다. 생물 활성 평가의 구체예로서, 전술한 특허문헌 2 및 3, 비특허문헌 1 내지 6 등도 참조할 수 있다.
- [0836] 「기능성 평가」란 당업자에게 주지된 용어이지만, 하나의 양태로서, 본 발명에 있어서 「기능성 평가」란, 화합물이 갖는 특정한 기능(예를 들어, 결합능, 생물 활성, 발광 특성 등)의 유무, 또는 강약을 평가하는 것이다.
- [0837] 본 발명은, 절단 가능한 부위를 갖는 DNA쇄를 사용함으로써, DEL 및 DEL의 제조 방법에 대해서, 몇 가지의 이점을 갖는 복수의 방법을 제공한다. 양식 1 내지 7을 이하에 상세하게 기술한다.
- [0838] 양식 1
- [0839] 본 발명은, 상기한 「절단 가능한 부위를 갖는 헤어핀형의 헤드피스」를 사용한 DEL을 제공한다.
- [0840] 도 1에서 예시되는 바와 같이, 양식 1에서는, 절단 가능한 부위를 DNA쇄 중에 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드쇄, 루프 부위 및 제2 올리고뉴클레오티드쇄를 포함하는 헤드피스를 출발 원료로 하여, 빌딩 블록의 결합과, 해당 빌딩 블록에 대응하는 올리고뉴클레오티드 태그의 2분쇄 라이게이션을 반복하고(도 1에서는 3회), 또한 원한다면 프라이머 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드 태그의 2분쇄 라이게이션을 행함으로써, DEL의 제조가 달성된다.
- [0841] 도 2에서 예시되는 바와 같이, 양식 1에서는, 절단 가능한 부위를 헤드피스의 제1 올리고뉴클레오티드쇄 중에 포함하는 DEL에 대하여, 효소 등의 절단 수단을 사용하여 절단 가능한 부위를 절단하고, 루프 부위에서 결합되지 않은 2분쇄 올리고뉴클레오티드로 유도함으로써, 높은 효율로 PCR을 행할 수 있다.
- [0842] (양식 2에 대해서)
- [0843] 도 3에서 예시되는 바와 같이, 「절단 가능한 부위를 갖는 헤어핀형의 헤드피스」를 사용한 DEL에서는, 절단 가능한 부위가 제2 올리고뉴클레오티드쇄에 존재해도 된다. 양식 2의 특징은, 절단 가능한 부위 이외에는, 양식 1과 마찬가지로이다.
- [0844] (양식 3에 대해서)
- [0845] 도 4에서 예시되는 바와 같이, 「절단 가능한 부위를 갖는 헤어핀형의 헤드피스」를 사용한 DEL에서는, 절단 가능한 부위가 제1과 제2 양쪽의 올리고뉴클레오티드쇄에 존재해도 된다. 본 형태에서는, 루프 부위가 양쪽의 올리고뉴클레오티드쇄로부터 절단됨으로써, PCR 효율이 더욱 향상될 것이 기대된다.
- [0846] (양식 4에 대해서)
- [0847] 도 5에서 예시되는 바와 같이, 본 발명에서는, 절단 가능한 부위가 제1 올리고뉴클레오티드쇄(E)와 제2 올리고뉴클레오티드쇄(F)의 양쪽에 존재해도 되고, 또한 절단 가능한 부위의 구조는 달라도 된다. 그러한 경우, 2개의 (또는 그 이상의) 절단 가능한 부위의 특성의 차를 이용하여, 절단 부위를 제어할 수 있다.
- [0848] 예를 들어, 제1 올리고뉴클레오티드쇄(E)에서의 절단 가능한 부위로서 테옥시우리딘을, 제2 올리고뉴클레오티드쇄(F)에서의 절단 가능한 부위로서 테옥시이노신을 사용해도 된다.

[0849] 이 경우 USER 효소를 사용하면, 제1 올리고뉴클레오타이드쇄(E)의 테옥시우리딘을 선택적으로 절단할 수 있다.



[0850]

[0851] 한편, 알킬아데닌 DNA 글리코실라아제와 엔도뉴클레아제 VIII을 사용하면, 제2 올리고뉴클레오타이드쇄(F)에 있어서, 테옥시이노신을 기점으로 하는 절단 부위를 선택적으로 절단할 수 있다.



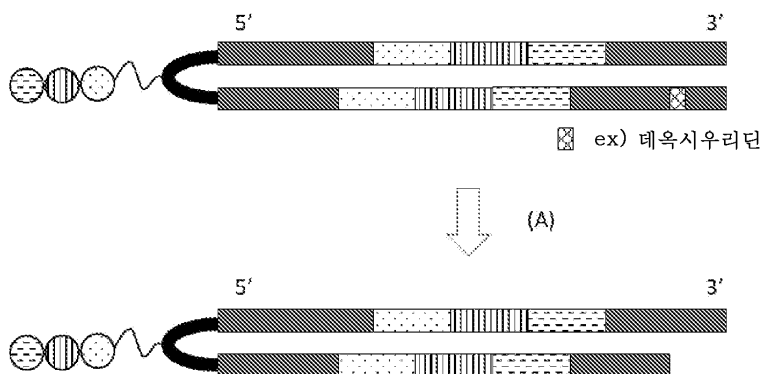
[0852]

[0853] 이와 같이, 절단 부위를 원함에 따라서 선택함으로써, 더 폭넓은 DEL의 수식이 가능해져, 그 후의 평가도 보다 폭넓은 방법이 적용 가능해진다.

[0854] 를 기대할 수 있다.

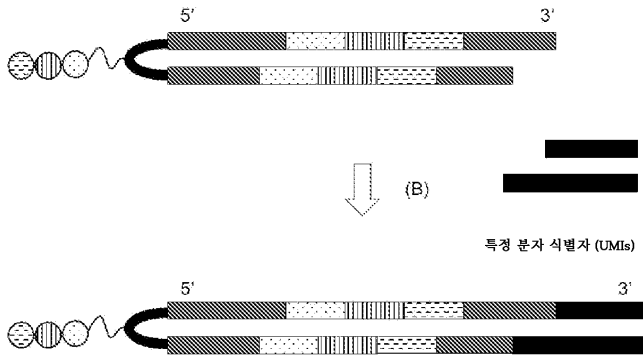
[0855] (양식 5에 대해서)

[0856] 도 6에서 예시되는 바와 같이, 본 발명에서는, 절단 가능한 부위를, DNA 태그 부분(예를 들어 올리고뉴클레오타이드쇄(Y))에 가질 수도 있다. DNA 태그의 말단 부근에 절단 가능한 부위를 마련하여, 목적에 따라서 당해 부위를 절단함으로써, 새로운 돌출 말단을 생성할 수 있다.



[0857]

[0858] 당해 돌출 말단은 점착 말단으로 이용하여, 원하는 핵산 서열, 예를 들어 UMIs(특정 분자 식별 서열) 등을 라이케이팅할 수 있다.



[0859]

[0860]

생물 평가 후, 선발된 DEL 화합물에 대하여, 상기와 같이 UMIs 영역을 부여하여, DNA 시퀀싱함으로써, PCR에 의한 증폭 바이어스가 감소된 해석이 가능해진다.

[0861]

이와 같이, 본 발명에서는, 핵산 서열에 선택적으로 절단 가능한 부위를 가짐으로써, DEL 화합물의 제조나 사용의 국면에서, 종래에 없던 성능을 부여할 수 있다.

[0862]

여기서 UMIs(특정 분자 식별 서열)란, 어떤 샘플 중에 포함되는 DNA에 부여함으로써, DNA 분자 하나 하나에 개별의 DNA 서열을 부여하는 분자 식별자이다(문헌 네이처 메소드, 2012년, 9권, 72-74 페이지 참조). 이러한 분자 식별자를 PCR 증폭 전에 부여함으로써, 샘플 중의 특정 서열을 갖는 DNA 분자수를 정량할 때, PCR 증폭(동일 분자 유래 서열)의 식별이 가능해져, PCR 증폭 바이어스를 감소시킨 정량이 가능해진다.

[0863]

(양식 6에 대해서)

[0864]

도 7에서 예시되는 바와 같이, 본 발명에서는, 절단 가능한 부위와, 수식기나 기능성 분자를 조합하여 사용할 수 있고, 예를 들어 헤어핀쇄 DNA를 1분쇄 DNA로 변환한 DEL을 조제하는 것이 가능하다.

[0865]

도 7에 따라서, E 부분에 절단 가능한 부위를 갖는 헤드피스를 사용한 DEL 화합물을 예로 든다.

[0866]

(스텝 A) 합성된 DEL 화합물에 대하여, 3' 말단에 고상 담지 제거 가능한 수식기(예를 들어 비오틴)를 갖는 2분쇄 올리고뉴클레오티드쇄를 라이게이팅한다.

[0867]

(스텝 B) 절단 가능한 부위를 절단한다.

[0868]

(스텝 C) 수식기의 기능에 따른 처리를 더한다. 예를 들어 비오틴의 경우, 비오틴 친화성을 갖는 스트렙트아비딘 비즈 등을 사용하여, 비오틴이 결합된 올리고뉴클레오티드쇄를 선택적으로 계 내에서 제거한다. 그것에 의해, 1분쇄 DNA를 갖는 DEL을 취득하는 것이 가능하다.

[0869]

여기서 기능성 분자란, 특정한 화학적 또는 생물학적 기능(예를 들어, 용해성, 광반응성, 기질 특이적 반응성, 표적 단백질 분해 유도 특성)을 갖는 분자이며, DEL에 부여함으로써, 기능에 따른 DEL의 평가나 정제가 가능해진다.

[0870]

여기서 비오틴이란, 아비딘과 결합하는 비오틴류 전반을 의미하고, 비타민 B₇뿐만 아니라, 예를 들어 테스티오비오틴도 포함한다.

[0871]

도 8에서 예시되는 바와 같이, 1분쇄 DNA를 갖는 DEL은, 원하는 기능 부위를 갖는 수식 올리고뉴클레오티드(예를 들어 광반응성 크로스 링커 등의 크로스 링커 수식 DNA)와 2분쇄를 형성시킴으로써, 새로운 기능을 부여하는 것이 가능해진다.

[0872]

(양식 7에 대해서)

[0873]

도 9에서 예시되는 바와 같이, 본 발명에서는, 절단 가능한 부위를 이용하여, 크로스 링커를 도입할 수 있다.

[0874]

도 9에 따라서, E 부분에 절단 가능한 부위를 갖는 헤드피스를 사용한 DEL 화합물을 예로 든다.

[0875]

(스텝 A) 합성된 DEL 화합물에 대하여, 절단 가능한 부위를 절단한다.

[0876]

(스텝 B) 원하는 기능 부위를 갖는 수식 프라이머(예를 들어 광반응성 크로스 링커 등의 크로스 링커 수식 프라이머)를 부여한다.

[0877] (스텝 C) 부여한 프라이머를 신장하여, 크로스 링커 수식 2분쇄 DEL 화합물을 합성한다.

[0878] DEL 평가의 장면에 있어서, 크로스 링커 수식 2분쇄 DEL 화합물은, 빌딩 블록 화합물(라이브러리 저분자 화합물)이 표적 단백질에 결합할 때, 또한 크로스 링크 구조를 표적 단백질에 결합시킬 수 있어, 검출 감도를 현저하게 향상시킬 수 있다(비특허문헌 5, 6 등 참조). 매우 다수의 라이브러리 화합물을 평가하는 DEL 기술의 실무상, 라이브러리 화합물의 어피니티를 증강시켜, 검출 감도를 향상시키는 것은, 매우 유용하다.

[0879] 본 발명은, 참신하며 고효율인 크로스 링커 수식 2분쇄 DEL 화합물의 제조법을 제공하는 것이며, 매우 유용하다.

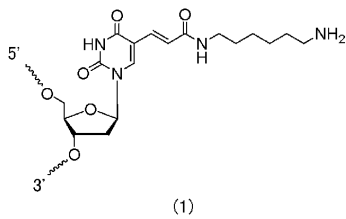
[0880] 이하에 실시예를 나타내어, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명이 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0881] 또한, 실시예에 있어서의 각종 서열의 핵산은, 예를 들어 핵산 자동 합성기에 의해 통상적인 방법에 따라서 조절할 수 있다. 핵산 자동 합성기의 예로서는, nS-8II(진디자인사제) 등을 들 수 있다. 또한, 핵산의 조절에는, 위탁 합성이나 콘택 라보 등을 이용할 수도 있다. 당업자에게 주지된 콘택 라보로서는, 진디자인사나 LGC Biosearch Technologies사 등을 들 수 있다. 일반적으로 이들 콘택 라보는, 비밀 보장 계약 하에 위탁자의 지정한 서열의 핵산을 조절하여, 위탁자에 납입한다.

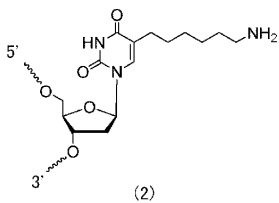
[0882] 실시예 1

[0883] [테옥시우리딘을 포함하는 헤어핀형 DEL의 부분 구조의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응의 검증]

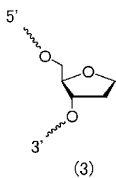
[0884] 표 1에 나타내는 서열의 화합물을, 핵산 자동 합성기 nS-8II(진디자인사제)를 사용하여 조절하였다. 또한, 표 1 중의 서열 표기에 있어서, 당업자에게는 명확하지만, 각 서열 단위간은 인산디에스테르 결합으로 결합되어 있고, 「A」는 테옥시아데노신을 의미하고, 「T」는 티미딘을 의미하고, 「G」는 테옥시구아노신을 의미하고, 「C」는 테옥시시티딘을 의미하고, 「(dU)」는 테옥시우리딘을 의미하고, 「(p)」는 인산을 의미하고, 「(아미노-C6-dT)」는 다음 식 (1)



[0885] 로 표시되는 수식 핵산을 의미하고, 「(아미노-NC6-dT)」은 다음 식 (2)

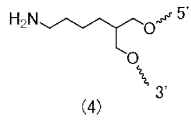


[0887] 로 표시되는 수식 핵산을 의미하고, 「(d스페이서)」은 다음 식 (3)



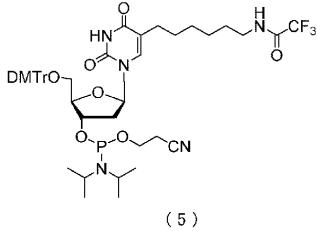
[0889]

[0890] 으로 표시되는 기를 의미하고, 「(아미노C7)」은 다음 식 (4)



[0891]

[0892] 로 표시되는 기를 의미한다. 또한, 아미노-NC6-dT는 (미국 화학회지, 1993년, 115권, 7128-7134공)에 기재된 방법에 준하여 합성한 다음 식 (5)



[0893]

[0894] 의 핵산 합성 시약을 사용하여 도입하였다.

[0895] 표 1 중, 좌측 칼럼의 "No."은 서열 번호를 나타내고, 우측 칼럼의 "Seq."은 서열을 나타낸다. 서열은 좌측이 5'측을 나타내고, 우측이 3'측을 나타낸다. 또한, 각 서열 번호(No.)에 해당하는 화합물의 명칭은 이하와 같다.

[0896] No.1: U-DEL1-sh No.2: U-DEL2-sh

[0897] No.3: U-DEL3-sh No.4: U-DEL4-sh

[0898] No.5: U-DEL5-HP No.6: U-DEL6-HP

[0899] No.7: U-DEL7-HP No.8: U-DEL8-HP

[0900] No.9: U-DEL9-HP No.10: U-DEL10-HP

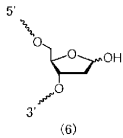
표 1

No.	Seq.
1	CATCGATTTGGGAGTCA (dU)T (Am ino-C6-dT)TTTGA CTCCCAAATCGATGTG
2	CATCGATTTGGGAGTCATT (Am ino-C6-dT)T (dU)TGACTCCCAAATCGATGTG
3	CATCGATTTGGGAGTCATT (Am ino-C6-dT)TTTGA CTCCCAAATCGA (dU)GTG
4	CATCGATTTGGGAGTCA (dU)T (Am ino-C6-dT)T (dU)TGACTCCCAAATCGATGTG
5	(p)GAGTCATT (Am ino-NC6-dT)T (dU)TGACTCCC
6	(p)GAGTCA (dU)T (Am ino-NC6-dT)T (dU)TGACTCCC
7	(p)GAGTCA (dU)T (dSpacer) (dSpacer) (Am inoC7) (dSpacer) (dSpacer)TTTGA CTCCC
8	(p)GAGTCATT (dSpacer) (dSpacer) (Am inoC7) (dSpacer) (dSpacer)T (dU)TGACTCCC
9	(p)GAGTCAA (dSpacer) (dSpacer) (Am inoC7) (dSpacer) (dSpacer) (dU)TGACTCCC
10	(p)GAGTCAT (dSpacer) (Am inoC7) (dSpacer) (dU)TGACTCCC

[0901]

- [0902] 표 1에 나타내는 서열의 화합물 각각 0.1mM 수용액을 조제하고, 이하의 수순으로 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응의 검토를 행하였다.
- [0903] PCR 튜브에, 1 μ L의 표 1에 나타내는 서열의 화합물 0.1mM 수용액; 10 μ L의 CutSmart(등록 상표) Buffer(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 B7204S) 및 79 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 10 μ L의 USER(등록 상표) enzyme(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 M5505S)을 첨가하여, 얻어진 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션을 개시하였다.
- [0904] 각 반응 용액을 인큐베이션 개시 후, 1시간 및 3시간 경과한 후에, 각각 20 μ L 샘플링하였다. U-DEL1-sh, U-DEL5-HP, U-DEL6-HP, U-DEL7-HP, U-DEL8-HP, U-DEL9-HP 및 U-DEL10-HP는 20시간 경과 후에도 각각 20 μ L 샘플링하였다. U-DEL8-HP 및 U-DEL9-HP는 또한 90 $^{\circ}$ C에서 1시간 인큐베이션한 후에, 각각 20 μ L 샘플링하였다.
- [0905] 샘플링한 용액 중, U-DEL1-sh, U-DEL2-sh, U-DEL3-sh 및 U-DEL4-sh는 이하에 나타내는 분석 조건 1에서 분석을 하고, U-DEL5-HP, U-DEL6-HP, U-DEL7-HP, U-DEL8-HP, U-DEL9-HP 및 U-DEL10-HP는 이하에 나타내는 분석 조건 2에서 분석을 하였다.
- [0906] 분석 조건 1:
- [0907] 장치: maXis(Bruker제), UltiMate 3000(Dionex제)
- [0908] 칼럼: ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18 Column(130 \AA , 1.7 μ m, 2.1 \times 50mm)
- [0909] 칼럼 온도: 50 $^{\circ}$ C
- [0910] 용매:
- [0911] A액: 물(0.75% v/v 헥사플루오로이소프로판올; 0.038% v/v 트리에틸아민; 5 μ M 에틸렌디아민4아세트산)
- [0912] B액: 90% v/v 메탄올 수용액(0.75% v/v 헥사플루오로이소프로판올; 0.038% v/v 트리에틸아민; 5 μ M 에틸렌디아민4아세트산)
- [0913] 구배 조건:
- [0914] 유속 0.36mL/min, A액과 B액의 혼합비를 95/5(v/v)로 고정하여 측정 개시하고, 0.56분 후에 5.5분간에 A액과 B액의 혼합비를 40/60(v/v)으로 직선적으로 변화시켰다.
- [0915] 검출 파장: 260nm
- [0916] 분석 조건 2:
- [0917] 장치: Waters ACQUITY UPLC/SQ Detector
- [0918] 칼럼: ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18 Column(130 \AA , 1.7 μ m, 2.1 \times 50mm)
- [0919] 칼럼 온도: 50 $^{\circ}$ C
- [0920] 용매:
- [0921] A액: 물(0.75% v/v 헥사플루오로이소프로판올; 0.038% v/v 트리에틸아민; 5 μ M 에틸렌디아민4아세트산)
- [0922] B액: 90% v/v 메탄올 수용액(0.75% v/v 헥사플루오로이소프로판올; 0.038% v/v 트리에틸아민; 5 μ M 에틸렌디아민4아세트산)
- [0923] 구배 조건:
- [0924] 유속 0.36mL/min, A액과 B액의 혼합비를 95/5(v/v)로 고정하여 측정 개시하고, 0.56분 후에 5.5분간에 A액과 B액의 혼합비를 40/60(v/v)으로 직선적으로 변화시켰다.
- [0925] 검출 파장: 260nm
- [0926] 각 반응 용액에 있어서 상정되는 생성물(테옥시우리딘 부분의 탈염기체, 및 절단된 프래그먼트)의 서열과 이론 분자량, 및 각 반응 용액에 있어서 검출된 분자량을 표 2, 표 3에 나타낸다. 또한, 표 2, 표 3 중의 각 칼럼의 표기는 이하와 같다.

- [0927] "Entry"(가장 좌측):
- [0928] 실험 번호를 나타내고, 각 실험 번호(Entry)에 해당하는 기질은 이하와 같다.
- [0929] Entry.1: U-DEL1-sh Entry.2: U-DEL2-sh
- [0930] Entry.3: U-DEL3-sh Entry.4: U-DEL4-sh
- [0931] Entry.5: U-DEL5-HP Entry.6: U-DEL6-HP
- [0932] Entry.7: U-DEL7-HP Entry.8: U-DEL8-HP
- [0933] Entry.9: U-DEL9-HP Entry.10: U-DEL10-HP
- [0934] "No."(좌측으로부터 2번째):
- [0935] 서열 번호를 나타낸다. 또한, 각 서열 번호(No.) 중 No.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10은 각 반응 용액의 기질이며, No.11, 14, 17, 20, 22, 25, 29, 31, 33 및 35는, 각 기질의 데옥시우리딘 부분의 탈염기체이며, 나머지 서열 번호는 각 기질이 절단된 프래그먼트이다.
- [0936] "Seq."(좌측으로부터 3번째):
- [0937] 서열을 나타내고, 좌측이 5'측을 나타내고, 우측이 3'측을 나타낸다.
- [0938] 또한, 서열 표기에 있어서, 「(B)」는 다음 식 (6)



- [0939] 으로 표시되는 기(탈염기 부위)를 의미하고, 기타 표기는 표 1과 동일하다.
- [0940] "Expected MW."(좌측으로부터 4번째):
- [0941] 각 서열의 이론 분자량(Da)의 수치를 나타낸다.
- [0942] "Observed MW."(가장 우측):
- [0943] 각 서열로서 동정한 검출된 분자량(Da)의 수치를 나타낸다. 또한, 「-」표기는 미검출인 것을 나타낸다.

표 2

Entry	No.	Seq.	Expected MW.	Observed MW. (더큰분류선)
1	1	CATCGATTGGGAGTCA(dU)T(amino-C6-dT)T TTGACTCCCAAATCGATGTG	12736.4	12736.3
	11	CATCGATTGGGAGTCA(B)T(amino-C6-dT)T TTGACTCCCAAATCGATGTG	12642.2	12643.3
	12	CATCGATTGGGAGTCA(p)	5305.4	5303.8
	13	(p)T(amino-C6-dT)TTTACTCCCAAATCGATG TG	7238.8	7239.3
2	2	CATCGATTGGGAGTCATT(amino-C6-dT)T (dU)TGACTCCCAAATCGATGTG	12736.4	12735.2
	14	CATCGATTGGGAGTCATT(amino-C6-dT)T (B)TGACTCCCAAATCGATGTG	12642.2	-
	15	CATCGATTGGGAGTCATT(amino-C6-dT)T(p)	6676.4	6676.1
	16	(p)TGACTCCCAAATCGATGTG	5867.8	5866.0
3	3	CATCGATTGGGAGTCATT(amino-C6-dT)TT TGACTCCCAAATCGA(dU)GTG	12736.4	12736.2
	17	CATCGATTGGGAGTCATT(amino-C6-dT)TT TGACTCCCAAATCGA(B)GTG	12642.2	-
	18	CATCGATTGGGAGTCATT(amino-C6-dT)TT TGACTCCCAAATCGA(p)	11563.6	11562.1
	19	(p)GTG	980.6	-
4	4	CATCGATTGGGAGTCA(dU)T(amino-C6-dT)T (dU)TGACTCCCAAATCGATGTG	12722.4	12721.2
	20	CATCGATTGGGAGTCA(B)T(amino-C6-dT)T (B)TGACTCCCAAATCGATGTG	12534.0	-
	12	CATCGATTGGGAGTCA(p)	5305.4	5304.9
	16	(p)TGACTCCCAAATCGATGTG	5867.8	5867.0
	21	(p)T(amino-C6-dT)T(p)	1164.8	-
5	5	(p)GAGTCATT(amino-NC6-dT)T(dU)TGACTCCC	5895.9	5896.7
	22	(p)GAGTCATT(amino-NC6-dT)T(B)TGACTCCC	5801.7	5801.7
	23	(p)GAGTCATT(amino-NC6-dT)T(p)	3278.1	3278.7
	24	(p)TGACTCCC	2425.6	2425.9
6	6	(p)GAGTCA(dU)T(amino-NC6-dT)T(dU)TGACT CCC	5881.8	5882.0
	25	(p)GAGTCA(B)T(amino-NC6-dT)T(B)TGACTCCC	5693.5	5693.5
	26	(p)GAGTCA(B)T(amino-NC6-dT)T(p)	3170.0	3171.0
	27	(p)GAGTCA(p)	1976.2	1977.1
	24	(p)TGACTCCC	2425.6	2425.3
	28	(p)T(amino-NC6-dT)T(p)	1095.7	-

[0945]

[0958] No.41: U-DEL8 No.42: U-DEL9

[0959] No.43: U-DEL10 No.44: H-DEL

표 4

No.	Seq.	Expected MW	Observed MW (더큰분리선)
37	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAAC CACCATCGCACTTCTGACCACATCGATTGGGAGT CA (dU)T (Am no-C6-dT)TTTGA CTCCCAAATCGATG TG GTCAGGAAGTGCGATGGTGTTCCAGAAAGCAGTCT TCAGACAAGCTTCACCTGC	46707.3	46702.9
38	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAAC CACCATCGCACTTCTGACCACATCGATTGGGAGT CATT (Am no-C6-dT) (dU)TGACTCCCAAATCGATG TG GTCAGGAAGTGCGATGGTGTTCCAGAAAGCAGTCT TCAGACAAGCTTCACCTGC	46707.3	46711.8
39	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAAC CACCATCGCACTTCTGACCACATCGATTGGGAGT CA (dU)T (Am no-C6-dT)T (dU)TGACTCCCAAATCGATG T GGTCAGGAAGTGCGATGGTGTTCCAGAAAGCAGTCT TTCAGACAAGCTTCACCTGC	46693.2	46695.5
40	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAAC CACCATCGCACTTCTGACCACATCGATTGGGAGT CA (dU)T (dSpacer) (dSpacer) (Am noC7) (dSpacer) (dSpacer)TTTGA CTCCCAAATCGATG TG GTCAGGAAG TGCGATGGTGTTCCAGAAAGCAGTCTTCAGACAAG CTTCACCTGC	47178.4	47184.8
41	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAAC CACCATCGCACTTCTGACCACATCGATTGGGAGT CATT (dSpacer) (dSpacer) (Am noC7) (dSpacer) (dSpacer)T (dU)TGACTCCCAAATCGATG TG GTCAGGAAGTGCGA TGGTGTTCCAGAAAGCAGTCTTCAGACAAGCTTCAC CTGC	47178.4	47189.7
42	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAAC CACCATCGCACTTCTGACCACATCGATTGGGAGT CAA (dSpacer) (dSpacer) (Am noC7) (dSpacer) (dSpacer) (dU)TGACTCCCAAATCGATG TG GTCAGGA GTCGATGGTGTTCCAGAAAGCAGTCTTCAGACAA GCTTCACCTGC	46579.1	46592.0
43	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAAC CACCATCGCACTTCTGACCACATCGATTGGGAGT CAT (dSpacer) (Am noC7) (dSpacer) (dU)TGACTCCCAA TCGATGTGGTCAGGAAGTGCGATGGTGTTCCAGAA AGCAGTCTTCAGACAAGCTTCACCTGC	46209.9	46220.0
44	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAAC CACCATCGCACTTCTGACCACATCGATTGGGAGT CAS (Am noC7)STGACTCCCAAATCGATG TG GTCAGG AAGTGCGATGGTGTTCCAGAAAGCAGTCTTCAGAC AAGCTTCACCTGC	45679.6	45666.6

[0960]

[0961] 또한, 각 헤어핀 DEL을 합성하기 위한 원료 헤드피스의 화합물명은 각각 이하와 같다.

[0962] 헤어핀 DEL: 원료 헤드피스

[0963] U-DEL1: U-DEL1-HP

[0964] U-DEL2: U-DEL2-HP

[0965] U-DEL4: U-DEL4-HP

[0966] U-DEL7: U-DEL7-HP

- [0967] U-DEL8: U-DEL8-HP
- [0968] U-DEL9: U-DEL9-HP
- [0969] U-DEL10: U-DEL10-HP
- [0970] H-DEL: H-DEL-HP

[0971] 또한, U-DEL1-HP, U-DEL2-HP, U-DEL4-HP 및 H-DEL-HP의 서열 번호 "No." 및 서열 "Seq"은 이하의 표 5와 같다.

표 5

	No.	Seq.
U-DEL1-HP	45	(p)GAGTCA (dU)T (am no-C6-dT)TTGACTCCC
U-DEL2-HP	46	(p)GAGTCATT (am no-C6-dT)T (dU)TGACTCCC
U-DEL4-HP	47	(p)GAGTCA (dU)T (am no-C6-dT)T (dU)TGACTCCC
H-DEL-HP	48	(p)GAGTCAS (Am noC7)STGACTCCC

[0972]

[0973] 표 5에 나타내는 원료 헤드피스를, 실시예 1과 마찬가지로 핵산 자동 합성기 nS-8II(진디자인사제)를 사용하여 조제하였다.

[0974] PCR 튜브에, 2.0 μL의 각종 원료 헤드피스의 1mM 수용액; 2.4 μL의 Pr_TAG의 1mM 수용액(실시예 1과 마찬가지로 합성한 Pr_TAG_a와 Pr_TAG_b를 어닐링하여 조제, 표 6에 서열을 나타냄); 0.8 μL의 10X 리가아제 완충액(500mM 트리스염산, pH 7.5; 500mM 염화나트륨; 100mM 염화마그네슘; 100mM 디티오프레이트; 20mM 아테노신3인산) 및 2.0 μL의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 0.8 μL의 T4DNA 리가아제(서모피셔제, 카탈로그 번호 EL0013)의 10배 희석수 용액을 첨가하여, 얻어진 용액을 16°C에서 24시간 인큐베이션하였다. 또한, 표 6 중의 서열 표기는 표 1과 동일하다. 또한, 각 서열 번호(No.)에 해당하는 화합물의 명칭은 이하와 같다.

[0975] No.49: Pr_TAG_a No.50: Pr_TAG_b

표 6

No.	Seq.
49	(p)GACTGCTTCTGGAACCACCATCGCACTTCTGACCACATCGATTGG
50	(p)AAATCGATGTG GTCAGGAAGTGCGATGGTGGTTCCAGAAGCAGTCTT

[0976]

[0977] 반응 용액을, 0.8 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 17.6 μL의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 2시간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 풍건시켰다. 각 펠릿에 2.0 μL 탈이온수를 첨가하여 용액을 조제하였다.

[0978] 얻어진 각 용액에, 2.4 μL의 CP의 1mM 수용액(실시에 1과 마찬가지로 합성한 CP_a와 CP_b를 어닐링하여 조제, 표 7에 서열을 나타냄); 0.8 μL의 10X 리가아제 완충액(500mM 트리스염산, pH 7.5; 500mM 염화나트륨; 100mM 염화마그네슘; 100mM 디티오프레이트; 20mM 아데노신3인산) 및 2.0 μL의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 0.8 μL의 T4DNA 리가아제(서모퍼서제, 카탈로그 번호 EL0013)의 10배 희석수 용액을 첨가하여, 얻어진 용액을 16°C에서 24시간 인큐베이션하였다. 또한, 표 7 중의 서열 표기는 표 1과 동일하다. 또한, 각 서열 번호(No.)에 해당하는 화합물의 명칭은 이하와 같다.

[0979] No.51: CP_a No.52: CP_b

표 7

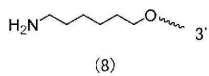
No.	Seq.
51	GCAGGTGAAGCTTGTCTGAA
52	(p)CAGACAAGCTTCACCTGC

[0980]

[0981] 반응 용액을, 0.8 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 17.6 μL의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 2시간 정지하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 풍건시켰다. 펠릿에 10 μL 탈이온수를 첨가하여 용액으로 하였다.

[0982] 얻어진 용액 중 1.0 μL를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 실시에 1의 분석 조건 2의 조건에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 행하여, 목적물을 동정하였다(각 서열의 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 4 중에 나타냄). 용액의 잔여물을 동결 건조시킨 후, 각각 탈이온수를 첨가하여, 20 μM으로 조제하였다.

[0983] 상기에서 얻어진 8종 헤어핀형 DEL 중, H-DEL은 중래형 헤어핀 DEL이며, 나머지 7종은 데옥시우리딘을 포함하는 절단 가능한 헤어핀 DEL이다. 각종 헤어핀형 DEL의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 처리 전의 PCR 효율과, 처리 후의 PCR 효율을 비교하기 위해서, 리얼타임 PCR 해석을 실시하였다. 또한, 비교 대상의 2분쇄 DEL로서 표 7에 나타내는 DS-DEL(서열 No.47과 No.48의 화합물을 어닐링하여 조제)을 사용하였다. 또한, 표 8 중의 서열 표기에 있어서, 「(아미노-C6-L)」은 다음 식 (8)



[0984]

[0985] 로 표시되는 기를 의미하고, 기타 표기는 표 1과 동일하다.

표 8

	No.	Seq.
DS-DEL	53	(amino-C6-L)TGACTCCCAAATCGATGTGGTCAGGAAGTCCGATGGTGGTCCAGAAGCAGTC TTCAGACAAGCTTCACCTGC
	54	GCAGGTGAAGCTTGTCTGAAGACTGCTTCTGGAACCACCATCGCACTTCTGACCACATCGA TTTGGGAGTCA

[0986]

[0987] <USER(등록 상표) enzyme에 의한 처리 공정>

- [0988] 8종의 헤어핀 DEL, 및 2분쇄 DEL(DS-DEL)의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 처리를 이하의 수순으로 행하였다.
- [0989] PCR 튜브에, 1 μ L의 각종 DEL 20 μ M 수용액; 1 μ L의 CutSmart(등록 상표) Buffer(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 B7204S) 및 7 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 1 μ L의 USER(등록 상표) enzyme(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 M5505S)을 첨가하여, 얻어진 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 인큐베이션하였다.
- [0990] <DEL 시료의 조제>
- [0991] 각종 DEL의 USER(등록 상표) enzyme 처리 전의 샘플, 및 처리 후의 반응 용액을 각각 탈이온수로 희석하여, 0.05pM, 0.5pM 및 5pM의 DEL 시료를 조제하였다.
- [0992] <리얼타임 PCR에 의한 Ct값의 측정>
- [0993] 상기에서 얻어진 각종 DEL 시료를, 리얼타임 PCR에 의해 Ct값을 측정하고, PCR 효율을 비교하였다. 조건은 이하와 같고, 결과를 도 12에 나타낸다. 또한, Ct값이란, 리얼타임 PCR에 있어서, DNA의 증폭에 수반하여 발생하는 형광 시그널이 임의의 역치에 도달하는 사이클수이다. 즉, 초기의 DNA 분자수가 동등한 경우, PCR 효율이 높을수록 Ct값이 낮아진다.
- [0994] 장치: 7500 리얼타임 PCR 시스템(Applied Biosystems사제)
- [0995] 플레이트: MicroAmp 96-Well 플레이트(Applied Biosystems사제, 카탈로그 번호 N8010560)
- [0996] PCR 반응 용액:
- [0997] · TB Green Premix Ex taqII(다카라 바이오사제, 카탈로그 번호 RR820): 10 μ L
- [0998] · 정방향 프라이머(표 9, 서열 번호 55): 0.80 μ L
- [0999] · 역방향 프라이머(표 9, 서열 번호 56): 0.80 μ L
- [1000] · ROX Reference DyeII(다카라 바이오사제, 카탈로그 번호 RR39LR): 0.40 μ L
- [1001] · 각종 DEL 시료의 수용액(0.05pM, 0.5pM, 5pM)*1: 2.0 μ L
- [1002] · 탈이온수: 6.0 μ L
- [1003] *1: DEL 시료의 몰수는, 0.1amol, 1amol, 10amol이 된다.
- [1004] 온도 조건:
- [1005] · 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 유지한 후, 이하의 사이클을 35 사이클 반복하였다.
- [1006] · 95 $^{\circ}$ C, 5초간
- [1007] · 52 $^{\circ}$ C, 30초간
- [1008] · 72 $^{\circ}$ C, 30초간

표 9

No.	Seq.
55	TGACTCCCAAATCGA
56	GCAGGTGAAGCTTGTC

- [1009]
- [1010] 또한, 표 9 중의 서열 표기는 표 1과 동일하다.
- [1011] 도 12에 나타내는 바와 같이, 종래형 헤어핀 DEL(H-DEL)은 USER(등록 상표) enzyme 처리 전후에 Ct값이 변화되지 않지만, 테옥시우리딘을 포함하는 절단 가능한 헤어핀 DEL(U-DEL1, U-DEL2, U-DEL4, U-DEL7, U-DEL8, U-DEL9 및 U-DEL10)은, USER(등록 상표) enzyme 처리 후에 2분쇄 DEL인 DS-DEL과 동등까지 Ct값이 저하되었다.

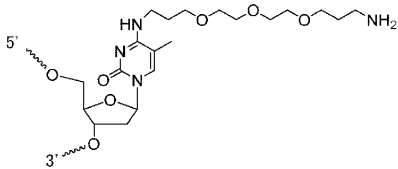
[1012] 본 결과는, USER(등록 상표) enzyme에 의해 절단된 DEL은, 절단 전보다도 PCR 효율이 향상되어 있는 것, 및 테옥시우리딘을 포함하는 절단 가능한 헤어핀 DEL은, USER(등록 상표) enzyme에 의해 고효율, 고선택적으로 절단되어 있는 것을 나타내고 있다.

[1013] 실시예 3

[1014] [테옥시우리딘을 포함하는 헤어핀 DEL의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응의 검증]

[1015] <4종의 헤어핀 DEL(U-DEL5, U-DEL11, U-DEL12 및 U-DEL13)의 합성>

[1016] 표 10에 나타내는 서열의 화합물(헤어핀 DEL)을 이하의 수순으로 합성하였다. 또한, 표 10 중의 서열 표기에 있어서, 「[mdC(TEG-아미노)]」는 다음 식 (9)



(9)

[1017]

[1018] 로 표시되는 기를 의미하고, 기타 표기는 표 4와 동일하다.

[1019] 각 서열 번호(No.)에 해당하는 화합물의 명칭은 이하와 같다.

[1020] No.57: U-DEL5 No.58: U-DEL11

[1021] No.59: U-DEL12 No.60: U-DEL13

표 10

No.	Seq.	Expected MW.	Observed MW. (디클로발루엔)
57	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAACCACCATCGCACTTCCTGACC ACATCGATTGGGAGTCATT[m ho-N C6-dT]T (dU)TGACTCCCAAATCGATG TG GTC AGG AAG TG CG ATG G TG G TTCCAG AAG CAG TC TTCAG ACAAG C TTCACCTGC	46638.2	46674.1
58	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAACCACCATCGCACTTCCTGACC ACATCGATTGGGAGTCAAS [m ho-C 7]S (dU)TGACTCCCAAATCGATG TG GTCAGG AAG TG CG ATG G TG G TTCCAG AAG CAG TC TTCAG ACAAG C TTCACCTGC	46283.0	46311.0
59	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAACCACCATCGCACTTCCTGACC ACATCGATTGGGAGTCAA [m dC (TEG-am ho)](dU)TGACTCCCAAATCGATG TG GTC CAGG AAG TG CG ATG G TG G TTCCAG AAG CAG TC TTCAG ACAAG C TTCACCTGC	46156.0	46174.6
60	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAACCACCATCGCACTTCCTGACC ACATCGATTGGGAGTCATT [m dC (TEG-am ho)](dU)TGACTCCCAAATCGATG TG GTC TCAGG AAG TG CG ATG G TG G TTCCAG AAG CAG TC TTCAG ACAAG C TTCACCTGC	46755.4	46769.6

[1022]

[1023] 또한, 각 헤어핀 DEL을 합성하기 위한 원료 헤드피스의 화합물명은 각각 이하와 같다.

[1024] 헤어핀 DEL: 원료 헤드피스

[1025] U-DEL5: U-DEL5-HP

[1026] U-DEL11: U-DEL11-HP

[1027] U-DEL12: U-DEL12-HP

[1028] U-DEL13: U-DEL13-HP

[1029] 또한, U-DEL11-HP, U-DEL12-HP 및 U-DEL13-HP의 서열 번호 "No." 및 서열 "Seq"은 이하의 표 11와 동일하다.

또한, 표 11 중의 표기는 표 10과 동일하다.

표 11

	No.	Seq.
U-DEL11-HP	61	ϕ)G AG TCAAS (am inoC 7)S (dU)TG ACTC CC
U-DEL12-HP	62	ϕ)G AG TCAA [n dC (TEG -am ino)](dU)TG ACTC CC
U-DEL13-HP	63	ϕ)G AG TCATT [n dC (TEG -am ino)](dU)TTG ACTC CC

[1030]

[1031]

표 11에 나타내는 원료 헤드피스 중 U-DEL12-HP 및 U-DEL13-HP는, 실시예 1과 마찬가지로 핵산 자동 합성기 nS-8II(진디자인사제)를 사용하여 조제하였다. U-DEL11-HP도 마찬가지로 통상적인 방법을 따라 조제하였다.

[1032]

실시예 2와 마찬가지로, 각종 원료 헤드피스를 사용하여, 2분쇄 올리고뉴클레오티드 Pr_TAG, 및 CP와의 2단계의 2분쇄 라이게이션을 실시하였다.

[1033]

얻어진 용액의 일부를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 이하에 나타내는 분석 조건 3에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 행하여, 목적물을 동정하였다(각 서열의 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 10 중에 나타냄). 용액의 잔여물을 동결 건조시킨 후, 각각 탈이온수를 첨가하여, 20 μM으로 조제하였다.

[1034]

분석 조건 3:

[1035]

장치: Waters ACQUITY UPLC/SQ Detector

[1036]

칼럼: ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18 Column(130Å, 1.7μm, 2.1×50mm)

[1037]

칼럼 온도: 60℃

[1038]

용매:

[1039]

A액: 물(0.75% v/v 헥사플루오로이소프로판올; 0.038% v/v 트리에틸아민; 5 μM 에틸렌디아민4아세트산)

[1040]

B액: 90% v/v 메탄올 수용액(0.75% v/v 헥사플루오로이소프로판올; 0.038% v/v 트리에틸아민; 5 μM 에틸렌디아민4아세트산)

[1041]

구배 조건:

[1042]

유속 0.36mL/min, A액과 B액의 혼합비를 95/5(v/v)로 고정하여 측정 개시하고, 0.56분 후에 5.5분간에 A액과 B액의 혼합비를 40/60(v/v)으로 직선적으로 변화시켰다.

[1043]

검출 파장: 260nm

[1044]

디콘볼루션:

[1045]

이온 시그널을 ProMass for MassLynx Software(Waters제)를 사용하여 해석하였다.

[1046]

<USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응>

[1047]

6종의 데옥시우리딘을 포함하는 헤어핀 DEL(U-DEL5, U-DEL7, U-DEL9, U-DEL11, U-DEL12 및 U-DEL13)의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응의 검토를 이하의 수순으로 행하였다.

[1048]

PCR 튜브에, 2 μL의 각종 헤어핀 DEL 20 μM 수용액; 2 μL의 CutSmart(등록 상표) Buffer(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 B7204S) 및 14 μL의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 2 μL의 USER(등록 상표) enzyme(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 M5505S)을 첨가하여, 얻어진 용액을 37℃에서 16시간 인큐베이션한 후, 또한 90℃에서 1시간 인큐베이션하였다.

[1049]

<LC-MS 측정에 의한 절단 후의 생성물의 확인>

[1050]

얻어진 반응 용액 중 5.0 μL를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 분석 조건 3에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을

하였다. 각 반응 용액에 있어서 상정되는 절단 후의 생성물의 서열과 이론 분자량, 및 각 반응 용액에 있어서 검출된 분자량을 표 12에 나타낸다. 또한, 각 실험 번호(Entry)에 해당하는 기질은 이하와 같고, 기타 표기는 표 10과 동일하다.

- [1051] Entry.1: U-DEL5 Entry.2: U-DEL7
- [1052] Entry.3: U-DEL9 Entry.4: U-DEL11
- [1053] Entry.5: U-DEL12 Entry.6: U-DEL13

표 12

Entry	No.	Seq.	Expected M W	Observed M W (다분분리)
1	64	GCAGGTGAAGCTTGTCTGAAGACTGCTTCTGGAAACCACCATCGCACTTCTGACCA CATCGATTGGGAGTCAATT(6m no-NCG-DT)(p)	23829.5	23831.6
	65	(p)TGACTCCAAAATCGATGTGTCAGGAAGTGCGATGGTGGTTCCAGAAAGCAGTCT TCAGACAAGCTTACCGTGC	22616.6	22617.4
2	66	GCAGGTGAAGCTTGTCTGAAGACTGCTTCTGGAAACCACCATCGCACTTCTGACCA CATCGATTGGGAGTCA(p)	22527.5	22527.6
	67	(p)T(ΔSpacer)(ΔSpacer)(6m noC7)(ΔSpacer)(ΔSpacer)TTGACTCCAAAATCGATGTG TCAGGAAAGTGGATGGTGGTTCCAGAAAGCAGTCTTACCGTGC	24458.7	24459.9
3	68	GCAGGTGAAGCTTGTCTGAAGACTGCTTCTGGAAACCACCATCGCACTTCTGACCA CATCGATTGGGAGTCAA(ΔSpacer)(ΔSpacer)(6m noC7)(ΔSpacer)(ΔSpacer)(p)	23770.3	23780.4
	65	(p)TGACTCCAAAATCGATGTGTCAGGAAGTGCGATGGTGGTTCCAGAAAGCAGTCT TCAGACAAGCTTACCGTGC	22616.6	22615.8
4	69	GCAGGTGAAGCTTGTCTGAAGACTGCTTCTGGAAACCACCATCGCACTTCTGACCA CATCGATTGGGAGTCAAS(6m noC7S)(p)	23474.2	23475.7
	65	(p)TGACTCCAAAATCGATGTGTCAGGAAGTGCGATGGTGGTTCCAGAAAGCAGTCT TCAGACAAGCTTACCGTGC	22616.6	22617.7
5	70	GCAGGTGAAGCTTGTCTGAAGACTGCTTCTGGAAACCACCATCGCACTTCTGACCA CATCGATTGGGAGTCAA(6m noC7EG-am no)(p)	23347.2	23327.2
	65	(p)TGACTCCAAAATCGATGTGTCAGGAAGTGCGATGGTGGTTCCAGAAAGCAGTCT TCAGACAAGCTTACCGTGC	22616.6	22614.6
6	71	GCAGGTGAAGCTTGTCTGAAGACTGCTTCTGGAAACCACCATCGCACTTCTGACCA CATCGATTGGGAGTCAATT(6m noC7EG-am no)(p)	23642.4	23646.3
	72	(p)TGACTCCAAAATCGATGTGTCAGGAAGTGCGATGGTGGTTCCAGAAAGCAGTCT TTCAACAAGCTTACCGTGC	22920.8	22929.0

- [1054]
- [1055] 어느 샘플도 기질의 MS는 검출되지 않고, 절단 후의 생성물의 MS가 메인 피크로서 관측되었다.
- [1056] <겔 전기 영동에 의한 절단 반응의 확인>
- [1057] 또한, 얻어진 반응 용액 중 일부를 샘플링하여, 이하에 나타내는 조건에서, 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의한 분석을 하였다. 도 13에 나타내는 결과로부터, 어느 기질도 고수율로 절단 반응이 진행되고 있는 것이 확인되었다. 또한, 도 13의 각 레인의 샘플은 이하와 같다.
- [1058] 레인 1: 20bp DNA 래더(론자제, Lonza 20 bp DNA Ladder, 카탈로그 번호 50330)
- [1059] 레인 2: U-DEL5
- [1060] 레인 3: U-DEL5의 절단 반응 실시 후 샘플
- [1061] 레인 4: U-DEL7
- [1062] 레인 5: U-DEL7의 절단 반응 실시 후 샘플
- [1063] 레인 6: U-DEL9
- [1064] 레인 7: U-DEL9의 절단 반응 실시 후 샘플
- [1065] 레인 8: U-DEL11
- [1066] 레인 9: U-DEL11의 절단 반응 실시 후 샘플
- [1067] 레인 10: U-DEL12
- [1068] 레인 11: U-DEL12의 절단 반응 실시 후 샘플
- [1069] 레인 12: U-DEL13
- [1070] 레인 13: U-DEL13의 절단 반응 실시 후 샘플
- [1071] 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동:

- [1072] 겔: Novex(상품 상표) 10% TBE-우레아 겔(Invitrogen by ThermoFisher SCIENTIFIC제, 카탈로그 번호 EC68755BOX)
- [1073] 로딩 버퍼: Novex(상품 상표) 10% TBE-Urea Sample Buffer(2×)(Invitrogen by ThermoFisher SCIENTIFIC제, 카탈로그 번호 LC6876)
- [1074] 온도: 60℃
- [1075] 전압: 180V
- [1076] 영동 시간: 30분
- [1077] 염색 시약: SYBER(상품 상표) GreenII Nucleic Acid Gel Stain(다카라 바이오사제, 카탈로그 번호 5770A)
- [1078] 이상의 결과로부터, 각종 데옥시우리딘을 포함하는 헤어핀형 DEL은, 데옥시우리딘 부위에서 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응이 진행되는 것이 나타내졌다.
- [1079] 실시예 4
- [1080] [데옥시이노신을 포함하는 헤어핀 DEL의 엔도뉴클레아제 V에 의한 절단 반응의 검증]
- [1081] <4종의 데옥시이노신을 포함하는 헤어핀 DEL(I-DEL1, I-DEL2, I-DEL3 및 I-DEL4)의 합성>
- [1082] 표 13에 나타내는 서열의 화합물(헤어핀 DEL)을 이하의 수순으로 합성하였다. 또한, 표 13 중의 서열 표기에 있어서, 「I」는 데옥시이노신을 의미하고, 기타 표기는 표 2와 동일하다.
- [1083] 각 서열 번호(No.)에 해당하는 화합물의 명칭은 이하와 같다.
- [1084] No.73: I-DEL1 No.74: I-DEL2
- [1085] No.75: I-DEL3 No.76: I-DEL4

표 13

No.	Seq.	Expected M W .	Observed M W . (다관불루신)
73	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAACCACCATCGCACCTTCCTGACC ACATCGATTGGGAGTCAA (dSpacer) (dSpacer) (m noC7) (dSpacer) (dSpacer)TTG A CTCCC AAATCGATGTGGTCAGGAAGTGCATGGTGGTTCCAG AAGCAGTCTTCA GACAAGCTTCACCTGC	47211.5	47241.5
74	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAACCACCATCGCACCTTCCTGACC ACATCGATTGGGAGTCAT (dSpacer) (dSpacer) (m noC7) (dSpacer) (dSpacer)TTG A CTCCC AAATCGATGTGGTCAGGAAGTGCATGGTGGTTCCAG AAGCAGTCTTCA GACAAGCTTCACCTGC	46594.1	46621.2
75	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAACCACCATCGCACCTTCCTGACC ACATCGATTGGGAGTCAAT (dSpacer) (dSpacer) (m noC7) (dSpacer) (dSpacer)TTG A CTCCC AAATCGATGTGGTCAGGAAGTGCATGGTGGTTCCAG AAGCAGTCTTCA GACAAGCTTCACCTGC	47211.5	47249.6
76	GCAGGTGAAGCTTGCTGAAGACTGCTTCTGGAACCACCATCGCACCTTCCTGACC ACATCGATTGGGAGTCATA (dSpacer) (dSpacer) (m noC7) (dSpacer) (dSpacer)TTG A CTCCC AAATCGATGTGGTCAGGAAGTGCATGGTGGTTCCAG AAGCAGTCTTCA GACAAGCTTCACCTGC	47211.5	47356.8

- [1086]
- [1087] 또한, 각 헤어핀 DEL을 합성하기 위한 원료 헤드피스의 화합물명은 각각 이하와 같다.
- [1088] 헤어핀 DEL: 원료 헤드피스
- [1089] I-DEL1: I-DEL1-HP
- [1090] I-DEL2: I-DEL2-HP
- [1091] I-DEL3: I-DEL3-HP
- [1092] I-DEL4: I-DEL4-HP

[1093] 또한, I-DEL1-HP, I-DEL2-HP, I-DEL3-HP 및 I-DEL4-HP의 서열 번호 "No." 및 서열 "Seq"은 이하의 표 14와 같다. 또한, 표 14 중의 표기는 표 13과 동일하다.

표 14

	No.	Seq.
HE L1-HP	77	(p)G A G T C A A (dSpacer) (dSpacer) (am hoC 7) (dSpacer) (dSpacer) I T T G A C T C C C
HE L2-HP	78	(p)G A G T C A T (dSpacer) (dSpacer) (am hoC 7) (dSpacer) (dSpacer) I I G A C T C C C
HE L3-HP	79	(p)G A G T C A A T (dSpacer) (dSpacer) (am hoC 7) (dSpacer) (dSpacer) I I T G A C T C C C
HE L4-HP	80	(p)G A G T C A T A (dSpacer) (dSpacer) (am hoC 7) (dSpacer) (dSpacer) I I I G A C T C C C

[1094]

[1095] 표 14에 나타내는 원료 헤드피스는, 통상적인 방법을 따라 조제하였다.

[1096] 실시예 2와 마찬가지로, 각종 원료 헤드피스를 사용하여, 2분쇄 올리고뉴클레오티드 Pr_TAG, 및 CP와의 2단계의 2분쇄 라이게이션을 실시하였다.

[1097] 얻어진 용액의 일부를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 분석 조건 3에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 행하여, 목적물을 동정하였다(각 서열의 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 13 중에 나타냄). 용액의 잔여물을 동결 건조시킨 후, 각각 탈이온수를 첨가하여, 20 μM으로 조제하였다.

[1098] <엔도뉴클레아제 V에 의한 절단 반응>

[1099] 4종의 데옥시이노신을 포함하는 헤어핀 DEL(I-DEL1, I-DEL2, I-DEL3, I-DEL4)의 엔도뉴클레아제 V에 의한 절단 반응의 검토를 이하의 수순으로 행하였다.

[1100] PCR 튜브에, 1 μL의 각종 헤어핀 DEL 20 μM 수용액; 2 μL의 NEBuffer(등록 상표) 4 (New England BioLabs제, 카탈로그 번호 B7004) 및 15 μL의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 2 μL의 Endnuclease V(New England BioLabs 제, 카탈로그 번호 M0305S)를 첨가하여, 얻어진 용액을 37°C에서 24시간 인큐베이션하였다.

[1101] <LC-MS 측정에 의한 절단 후의 생성물의 확인>

[1102] 얻어진 반응 용액 중 8.0 μL를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 분석 조건 3에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 하였다. 각 반응 용액에 있어서 상정되는 절단 후의 생성물의 서열과 이론 분자량, 및 각 반응 용액에 있어서 검출된 분자량을 표 15에 나타낸다. 또한, 각 실험 번호(Entry)에 해당하는 기질은 이하와 같고, 기타 표기는 표 13과 동일하다.

[1103] Entry.1: I-DEL1 Entry.2: I-DEL2

[1104] Entry.3: I-DEL3 Entry.4: I-DEL4

표 15

Entry	No.	Seq.	Expected MW	Observed MW (다분봉추선)
1	81	G C A G G T G A A G C T T G T C T G A A G A C T G C T T C T G G A A C C A C C A T C G C A C T T C C T G A C C A C A T C G A T T T G G G A G T C A	22761.7	22758.0
	82	(p)A (dSpacer) (dSpacer) (am hoC 7) (dSpacer) (dSpacer) I T T G A C T C C C A A A T C G A T G T G T C A G A A G T G C G A T G T G G T T C C A G A A G C A G T C T T C A G A A G C T T C A C C T G C	24467.8	24464.7
2	83	G C A G G T G A A G C T T G T C T G A A G A C T G C T T C T G G A A C C A C C A T C G C A C T T C C T G A C C A C A T C G A T T T G G G A G T C A T (dSpacer) (dSpacer) (am hoC 7) (dSpacer) (dSpacer) I I	24299.7	24297.5
	84	(p)G A C T C C C A A A T C G A T G T G T C A G G A A G T G C G A T G T G G T T C C A G A A G C A G T C T T C A G A A A G C T T C A C C T G C	22312.4	22316.7
3	85	G C A G G T G A A G C T T G T C T G A A G A C T G C T T C T G G A A C C A C C A T C G C A C T T C C T G A C C A C A T C G A T T T G G G A G T C A A T (dSpacer) (dSpacer) (am hoC 7) (dSpacer) (dSpacer) I I	24612.9	24614.4
	65	(p)T G A C T C C C A A A T C G A T G T G T C A G G A A G T G C G A T G T G G T T C C A G A A G C A G T C T T C A G A C A A G C T T C A C C T G C	22616.6	22615.0
4	86	G C A G G T G A A G C T T G T C T G A A G A C T G C T T C T G G A A C C A C C A T C G C A C T T C C T G A C C A C A T C G A T T T G G G A G T C A T A (dSpacer) (dSpacer) (am hoC 7) (dSpacer) (dSpacer) I I I	24917.1	24920.5
	84	(p)G A C T C C C A A A T C G A T G T G T C A G G A A G T G C G A T G T G G T T C C A G A A G C A G T C T T C A G A C A A G C T T C A C C T G C	22312.4	22310.3

[1105]

- [1106] 어느 샘플도 기질의 MS는 검출되지 않고, 절단 후의 생성물의 MS가 메인 피크로서 관측되었다.
- [1107] <겔 전기 영동에 의한 절단 반응의 확인>
- [1108] 또한, 얻어진 반응 용액 중 일부를 샘플링하여, 실시예 3과 동일 조건에서 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의한 분석을 하였다. 도 14에 나타내는 결과로부터, 어느 기질도 고수율로 절단 반응이 진행되고 있는 것이 확인되었다. 또한, 도 14의 각 레인의 샘플은 이하와 같다.
- [1109] 레인 1: 20bp DNA 래더(론자제, Lonza 20 bp DNA Ladder, 카탈로그 번호 50330)
- [1110] 레인 2: I-DEL1
- [1111] 레인 3: I-DEL1의 절단 반응 실시 후 샘플
- [1112] 레인 4: I-DEL2
- [1113] 레인 5: I-DEL2의 절단 반응 실시 후 샘플
- [1114] 레인 6: I-DEL3
- [1115] 레인 7: I-DEL3의 절단 반응 실시 후 샘플
- [1116] 레인 8: I-DEL4
- [1117] 레인 9: I-DEL4의 절단 반응 실시 후 샘플
- [1118] 이상의 결과로부터, 각종 데옥시이노신을 포함하는 헤어핀형 DEL은, 엔도뉴클레아제 V에 의해, 데옥시이노신으로부터 3' 방향으로 2번째의 포스포디에스테르 결합이 절단되는 것이 나타내졌다.
- [1119] 실시예 5
- [1120] [리보뉴클레오시드를 포함하는 헤어핀 DEL의 RNaseHII에 의한 절단 반응의 검증]
- [1121] <리보뉴클레오시드를 포함하는 헤어핀 DEL(R-DEL1)의 합성>
- [1122] 표 16에 나타내는 서열의 화합물(헤어핀 DEL)을 이하의 수순으로 합성하였다. 또한, 표 16 중의 서열 표기에 있어서, 「u」는 우리딘을 의미하고, 기타 표기는 표 2와 동일하다.
- [1123] 서열 번호(No.)에 해당하는 화합물의 명칭은 이하와 같다.
- [1124] No.87: R-DEL1

표 16

No.	Seq.	Expected MW.	Observed MW. (다관불루신)
87	G C A G G T G A A G C T T G T C G A A G A C T G C T T C T G G A A C C A C C A T C G C A C T T C C T G A C C A C A T C G A T T T G G G A G T C A A A (dSpacer) (dSpacer) (am inoC 7) (dSpacer) (dSpacer) T u T G A C T C C C A A A T C G A T G T G T C A G G A A G T G C G A T G T G T T C C A G A A G C A G T C T T C A G A C A A G C T T C A C C T G C	47212.5	47237.7

- [1125]
- [1126] 또한, 각 헤어핀 DEL을 합성하기 위한 원료 헤드피스의 화합물명은 이하와 같다.
- [1127] 헤어핀 DEL: 원료 헤드피스
- [1128] R-DEL1: R-DEL1-HP
- [1129] 또한, R-DEL1-HP의 서열 번호 "No." 및 서열 "Seq"는 이하의 표 17와 동일하다. 또한, 표 17 중의 표기는 표 16과 동일하다.

표 17

	No.	Seq.
R-DEL1-HP	88	(p)GAGTCAA (dSpacer) (dSpacer) (am noC 7) (dSpacer) (dSpacer) TuTGACTCC

[1130]

[1131] 표 17에 나타내는 원료 헤드피스는, 통상적인 방법을 따라 조제하였다.

[1132] 실시예 2와 마찬가지로, 원료 헤드피스를 사용하여, 2분쇄 올리고뉴클레오티드 Pr_TAG, 및 CP와의 2단계의 2분쇄 라이게이션을 실시하였다.

[1133] 얻어진 용액의 일부를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 분석 조건 3에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 행하여, 목적물을 동정하였다(각 서열의 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 16 중에 나타냄). 용액의 잔여물을 동결 건조시킨 후, 각각 탈이온수를 첨가하여, 200 μM으로 조제하였다.

[1134] <RNaseHII에 의한 절단 반응>

[1135] 리보뉴클레오시드를 포함하는 헤어핀 DEL(R-DEL1)의 RNaseHII에 의한 절단 반응의 검토를 이하의 수순으로 행하였다.

[1136] PCR 튜브에, 0.5 μL의 헤어핀 DEL 200 μM 수용액; 4.9 μL의 ThermoPol(등록 상표) Reaction Buffer Pack(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 B9004) 및 43.6 μL의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 1 μL의 RNase HII(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 M0288S)를 첨가하여, 얻어진 용액을 37°C에서 8시간 인큐베이션하였다.

[1137] <LC-MS 측정에 의한 절단 후의 생성물의 확인>

[1138] 얻어진 반응 용액 중 10 μL를 샘플링하고, 분석 조건 3에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 하였다. 상정되는 절단 후의 생성물의 서열과 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 18에 나타낸다. 또한, 실험 번호(Entry)에 해당하는 기질은 이하와 같고, 기타 표기는 표 16과 동일하다.

[1139] Entry.1: R-DEL1

표 18

Entry	No.	Seq.	Expected MW	Observed MW (다관불투선)
1	89	GCAGGTGAAGCTTGTCTGAAGACTGCTTCTGGAAACCACCATCGCACTTCCTGACCA CATCGATTGGGAGTCAA (dSpacer) (dSpacer) (am noC 7) (dSpacer) (dSpacer)T	24307.7	24303.6
	90	(p)TGACTCCAAATCGATGTGGTCAGGAAGTGGATGGTGGTTCCGAAAGCAGTC TTCAGACAAGCTTCACTGC	22922.8	22918.3

[1140]

[1141] 어느 샘플도 기질의 MS는 검출되지 않고, 절단 후의 생성물의 MS가 메인 피크로서 관측되었다.

[1142] <겔 전기 영동에 의한 절단 반응의 확인>

[1143] 또한, 얻어진 반응 용액 중 일부를 샘플링하여, 실시예 3과 동일 조건에서 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의한 분석을 하였다. 도 15에 나타내는 결과로부터, 어느 기질도 고수율로 절단 반응이 진행되고 있는 것이 확인되었다. 또한, 도 15의 각 레인의 샘플은 이하와 같다.

[1144] 레인 1: 20bp DNA 래더(론자제, Lonza 20 bp DNA Ladder, 카탈로그 번호 50330)

[1145] 레인 2: R-DEL1

[1146] 레인 3: R-DEL1의 절단 반응 실시 후 샘플

[1147] 이상의 결과로부터, 리보뉴클레오시드를 포함하는 헤어핀형 DEL은, RNaseHII에 의해, 리보뉴클레오티드의 5'측의 포스포디에스테르 결합이 절단되는 것이 나타내졌다.

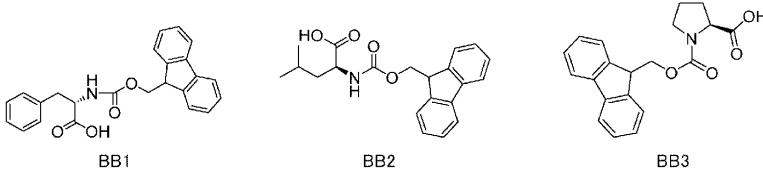
[1148] 실시예 6

[1149] [U-DEL9-HP를 원료로 한 모델 라이브러리의 제작]

[1150] 도 16에 나타내는 개략도와 같이, U-DEL9-HP를 원료로 하여, 스플릿·앤드·폴 합성에 의해 3×3×3(27) 화합물 중을 포함하는 모델 라이브러리의 합성을, 이하의 시약을 사용하여 실시하였다.

[1151] · U-DEL9-HP

[1152] · 빌딩 블록 3종(BB1, BB2 및 BB3):



[1153]

[1154] · 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 10종(표 19의 태그 번호: Pr, A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2 및 C3)

[1155] 표 19 중, "Tag No."(제일 좌측)는 태그 번호를 나타내고, "No."(좌측으로부터 2번째)는 서열 번호를 나타내고, "Seq."(좌측으로부터 3번째)는 서열을 나타낸다. 또한, 서열 표기는 표 1과 동일하다.

[1156] 또한, 각 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그는, 표 19 중에 나타내는 바와 같이, 각 태그 번호에 대응하는 서열 번호 2종의 올리고뉴클레오티드를 어닐링하여 조제하였다.

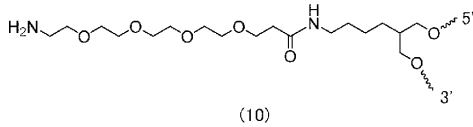
표 19

Tag No.	No.	Seq.
Pr	91	φ)TCCTG ACCACATCGATTGG
	92	φ)AAATCGATG TGGTCAGGAAG
A1	93	φ)GCAACCACT
	94	φ)TGGTTGCCGT
A2	95	φ)GGAGCACT
	96	φ)TGTCTCCGT
A3	97	φ)TAGGCCACT
	98	φ)TCGCC TAGT
B1	99	φ)CACGCCATAC
	100	φ)ATGCCGTGGA
B2	101	φ)CGTCAACAC
	102	φ)GTTGACGGA
B3	103	φ)GCATGTCAC
	104	φ)GACATGCCGA
C1	105	φ)CTCTCCTTC
	106	φ)AGGAGAGTT
C2	107	φ)GGATCGTTC
	108	φ)ACGATCCTT
C3	109	φ)TGAACGCTC
	110	φ)GCGTTCATT

[1157]

[1158] <화합물 「AOP-U-DEL9-HP」의 합성>

[1159] 표 20 중에 나타내는 서열의 화합물 「AOP-U-DEL9-HP」를 이하의 수순으로 합성하였다. 또한, 표 20 중의 서열 표기에 있어서, 「(AOP-아미노C7)」은 다음 식 (10)



- [1160]
- [1161] 으로 표시되는 기를 의미하고, 기타 표기는 표 2와 동일하다.

표 20

No.	Seq.	Expected MW .	Observed MW . (더콘블루션)
111	(p)G AG TCAA (dSpacer) (dSpacer) (AOP-Am inoC 7) (dSpacer) (dSpacer) (dU)TG ACTCC	6084.0	6082.9

- [1162]
- [1163] 4개의 비오라모 원침관 튜브에, 10℃로 냉각시킨 붕산나트륨 완충액(150mM, pH 9.4)의 U-DEL9-HP의 용액(2.5mL, 1mM)을 첨가하였다. 각각의 튜브에, 40 당량의 N-Fmoc-15-아미노-4,7,10,13-테트라옥사옥타데칸산(250 μL, 0.4M N,N-디메틸아세트아미드 용액), 계속해서 40 당량의 염화4-(4,6-디메톡시[1.3.5]트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 수화물(DMTMM)(200 μL, 0.5M 수용액)을 첨가하여, 얻어진 용액을 10℃에서 5시간 진탕하였다.
- [1164] 상기 용액을, 각각 295 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 9.7mL의 냉각된 (-20℃) 에탄올에 의해 처리하고, -78℃에서 철야 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 풍건시켰다. 펠릿에 각각 2.75mL의 탈이온수를 첨가하여 용해시키고, 0℃에서 306 μL의 피페리딘을 첨가하여, 10℃에서 3시간 진탕하였다. 혼합물을 원심 분리한 후, 침전물을 여과에 의해 제거하고, 1.47mL의 탈이온수로 2회 세정하였다. 얻어진 여액을, 각각 600 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 19.8mL의 냉각된 (-20℃) 에탄올에 의해 처리하고, -78℃에서 철야 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 풍건시켰다.
- [1165] 얻어진 펠릿에, 10mL의 탈이온수를 첨가하여 용액으로 하였다. 얻어진 용액 중, 일부를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 실시예 1의 분석 조건 2의 조건에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 행하여, 목적물을 동정하였다(화합물의 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 20 중에 나타냄). 용액의 잔여물을 동결 건조시킨 후, 탈이온수를 첨가하고, 5mM으로 조제하였다.
- [1166] <2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 「Pr」의 도입>
- [1167] 화합물 「AOP-U-DEL9-HP」와 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 「Pr」을 라이게이션함으로써 표 21 중에 나타내는 서열의 화합물 「AOP-U-DEL9-HP-Pr」을 이하의 수순으로 합성하였다. 또한, 표 21 중의 서열 표기는 표 20과 동일하다.

표 21

No.	Seq.	Expected MW .	Observed MW . (더콘블루션)
112	(p)TCCTG ACCACATCGATTTGGGAGTCAA (dSpacer) (dSpacer) (AOP-Am inoC 7) (dSpacer) (dSpacer) (dU)TG ACTCCCAAATCGATGTG TCA GGAAG	18506.0	18501.4

- [1168]
- [1169] 비오라모 원침관 튜브에, 40 μL의 화합물 「AOP-U-DEL9-HP」의 5mM 수용액; 160 μL의 100mM 탄산수소나트륨 수용액 물; 240 μL의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 「Pr」의 1mM 수용액; 80 μL의 10X 리가아제 완충액(500mM 트리스염산, pH 7.5; 500mM 염. 화나트륨; 100mM 염화마그네슘; 100mM 디티오프레이트; 20mM 아데노신3인산) 및 272 μL의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 8.0 μL의 T4DNA 리가아제(서모피서제, 카탈로그 번호 EL0013)를 첨가하여, 얻어진 용액을 16℃에서 24시간 인큐베이션하였다.
- [1170] 반응 용액을, 80 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 2640 μL의 냉각된 (-20℃) 에탄올에 의해 처리하고, -78℃에

서 2시간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 400 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 얻어진 용액을 Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(30kD 컷오프)에 의해 농축하였다. 얻어진 용액의 일부를 샘플링하고, 분석 조건 2의 조건에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 행하여, 목적물을 동정하였다(화합물의 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 21 중에 나타냄). 이상의 공정에 의해, 순도 84.5%의 화합물 「AOP-U-DEL9-HP-Pr」이 133nmol 얻어졌다. 얻어진 화합물 「AOP-U-DEL9-HP-Pr」에 100mM 탄산수소나트륨 수용액 물을 첨가하여, 1mM으로 조제하였다.

[1171] <사이클 A>

[1172] 3개의 각 PCR 튜브에, 20 μ L의 상기에서 얻어진 화합물 「AOP-U-DEL9-HP-Pr」의 1mM 용액; 30 μ L의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 A1 내지 A3 중 하나의 1mM 수용액; 8.0 μ L의 10X 리가아제 완충액(500mM 트리스염산, pH 7.5; 500mM 염화나트륨; 100mM 염화마그네슘; 100mM 디티오프레이톨; 20mM 아데노신3인산) 및 21.6 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 0.4 μ L의 T4DNA 리가아제(서모피셔제, 카탈로그 번호 EL0013)를 첨가하여, 얻어진 용액을 16°C에서 18시간 인큐베이션하였다.

[1173] 반응 용액을 각각 8.0 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 264 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 각각 20 μ L의 150mM 붕산나트륨 완충액(pH 9.4)에 용해시켰다.

[1174] 각각의 튜브에, 40 당량의 빌딩 블록 BB1 내지 BB3(4.0 μ L, 200mM N,N-디메틸아세트아미드 용액) 중 하나, 계속해서 40 당량의 염화4-(4,6-디메톡시[1.3.5]트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 수화물(DMTMM)(4.0 μ L, 200mM 수용액)을 첨가하여, 10°C에서 2시간 진탕하였다. 또한, 각각의 튜브에, 20 당량의 빌딩 블록(2.0 μ L, 200mM N,N-디메틸아세트아미드 용액), 계속해서 20 당량의 DMTMM(2.0 μ L, 200mM 수용액)을 첨가하여, 10°C에서 30분간 진탕하였다.

[1175] 반응 용액을 각각 3.2 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 106 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 각각 18 μ L의 탈이온수를 첨가한 후, 3종의 용액을 1개의 PCR 튜브에 혼합하였다.

[1176] 혼합한 용액에, 0°C에서 6.0 μ L의 피페리딘을 첨가하여, 실온에서 1시간 진탕하였다. 반응 용액을, 6.0 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 198 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 18시간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 400 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 얻어진 용액을 Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(30kD 컷오프)에 의해 농축하고, 100mM 탄산수소나트륨 수용액을 첨가하여, 1mM으로 조제하고, 다음 공정의 출발 원료로서 사용하였다.

[1177] <사이클 B>

[1178] 3개의 각 PCR 튜브에, 13.7 μ L의 사이클 A에서 얻어진 출발 원료 1mM 용액; 20.6 μ L의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 B1 내지 B3 중 하나의 1mM 수용액; 5.5 μ L의 10X 리가아제 완충액(500mM 트리스염산, pH 7.5; 500mM 염화나트륨; 100mM 염화마그네슘; 100mM 디티오프레이톨; 20mM 아데노신3인산) 및 14.8 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 0.3 μ L의 T4DNA 리가아제(서모피셔제, 카탈로그 번호 EL0013)를 첨가하여, 얻어진 용액을 16°C에서 16시간 인큐베이션하였다.

[1179] 반응 용액을 각각 5.5 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 181 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 각각 13.7 μ L의 150mM 붕산나트륨 완충액(pH 9.4)에 용해시켰다.

[1180] 각각의 튜브에, 80 당량의 빌딩 블록 BB1 내지 BB3(5.5 μ L, 200mM N,N-디메틸아세트아미드 용액) 중 하나, 계속해서 80 당량의 DMTMM(5.5 μ L, 200mM 수용액)을 첨가하여, 10°C에서 1시간 진탕하였다. 또한, 각각의 튜브에, 40 당량의 빌딩 블록(2.3 μ L, 200mM N,N-디메틸아세트아미드 용액), 계속해서 40 당량의 DMTMM(2.3 μ L, 200mM 수용액)을 첨가하여, 10°C에서 2시간 진탕하였다.

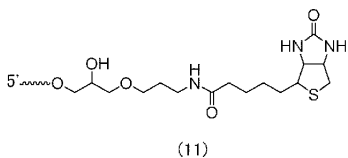
[1181] 반응 용액을 각각 2.5 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 81.4 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 각각 12.3 μ L의 탈이온수를 첨가한 후, 3종의 용액을 1개의 PCR 튜브에 혼합하였다.

[1182] 혼합한 용액에, 0°C에서 4.1 μ L의 피페리딘을 첨가하여, 실온에서 3시간 진탕하였다. 반응 용액을, 4.1 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 136 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 3시간 정치하였다.

원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 400 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 얻어진 용액을 Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(30kD 컷오프)에 의해 농축하고, 100mM 탄산수소나트륨 수용액을 첨가하여, 0.48mM으로 조제하고, 다음 공정의 출발 원료로서 사용하였다.

- [1183] <사이클 C>
- [1184] 3개의 각 PCR 튜브에, 14.5 μ L의 사이클 B에서 얻어진 출발 원료 0.48mM 용액; 10.5 μ L의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 C1 내지 C3 중 하나의 1mM 수용액; 및 2.8 μ L의 10X 리가아제 완충액(500mM 트리스염산, pH 7.5; 500mM 염화나트륨; 100mM 염화마그네슘; 100mM 디티오프레이톨; 20mM 아데노신3인산)을 첨가하였다. 용액에 0.14 μ L의 T4DNA 리가아제(서모피셔제, 카탈로그 번호 EL0013)를 첨가하여, 얻어진 용액을 16°C에서 16시간 인큐베이션하였다.
- [1185] 반응 용액을 각각 2.8 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 92 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 각각 7.0 μ L의 150mM 붕산나트륨 완충액(pH 9.4)에 용해시켰다.
- [1186] 각각의 튜브에, 80 당량의 빌딩 블록 BB1 내지 BB3(2.8 μ L, 200mM N,N-디메틸아세트아미드 용액) 중 하나, 계속해서 80 당량의 DMTMM(2.8 μ L, 200mM 수용액)을 첨가하여, 10°C에서 1시간 진탕하였다. 또한, 각각의 튜브에, 40 당량의 빌딩 블록(1.4 μ L, 200mM N,N-디메틸아세트아미드 용액), 계속해서 40 당량의 DMTMM(1.4 μ L, 200mM 수용액)을 첨가하여, 10°C에서 2시간 진탕하였다.
- [1187] 반응 용액을 각각 1.3 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 41.4 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 각각 6.3 μ L의 탈이온수를 첨가한 후, 3종의 용액을 1개의 PCR 튜브에 혼합하였다.
- [1188] 혼합한 용액에, 0°C에서 2.1 μ L의 피페리딘을 첨가하여, 실온에서 2시간 진탕하였다. 반응 용액을, 2.1 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 69 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 3시간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 400 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 얻어진 용액을 Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(30kD 컷오프)에 의해 농축하고, 100mM 탄산수소나트륨 수용액을 첨가하여, 0.41mM으로 조제하고, 다음 공정의 출발 원료로서 사용하였다.
- [1189] <CP의 라이게이션>
- [1190] PCR 튜브에, 12.2 μ L의 사이클 C에서 얻어진 출발 원료 0.41mM 용액; 6.0 μ L의 CP의 1mM 수용액(실시에 2에서 사용한 것과 동일함); 2.1 μ L의 10X 리가아제 완충액(500mM 트리스염산, pH 7.5; 500mM 염화나트륨; 100mM 염화마그네슘; 100mM 디티오프레이톨; 20mM 아데노신3인산) 및 0.7 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 0.1 μ L의 T4DNA 리가아제(서모피셔제, 카탈로그 번호 EL0013)를 첨가하여, 얻어진 용액을 16°C에서 16시간 인큐베이션하였다.
- [1191] 반응 용액을, 2.1 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 69.6 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 400 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 얻어진 용액을 Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(30kD 컷오프)에 의해 농축하고, 탈이온수를 첨가하여 20 μ M으로 조제하였다.
- [1192] <결과>
- [1193] 각 사이클에 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그의 라이게이션 후의 샘플을 2.2% 아가로오스 겔(론자제, FlashGel(등록 상표) 카세트, 카탈로그 번호 57031)을 사용하여, 전기 영동에 의해 분석하였다. 도 17에 나타내는 결과로부터, 각 사이클에 있어서, 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그에 의한 코드화가, 고효율로 달성된 것이 확인되었다. 또한, 도 17의 각 레인의 샘플은 이하와 같다.
- [1194] 라인 1: AOP-U-DEL9-HP-Pr
- [1195] 라인 2: 사이클 A의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 A1 라이게이션 후의 샘플
- [1196] 라인 3: 사이클 A의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 A2 라이게이션 후의 샘플
- [1197] 라인 4: 사이클 A의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 A3 라이게이션 후의 샘플
- [1198] 라인 5: 사이클 B의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 B1 라이게이션 후의 샘플

- [1199] 레인 6: 사이클 B의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 B2 라이게이션 후의 샘플
- [1200] 레인 7: 사이클 B의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 B3 라이게이션 후의 샘플
- [1201] 레인 8: 사이클 C의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 C1 라이게이션 후의 샘플
- [1202] 레인 9: 사이클 C의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 C2 라이게이션 후의 샘플
- [1203] 레인 10: 사이클 C의 2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그 C3 라이게이션 후의 샘플
- [1204] 레인 11: CP 라이게이션 후의 샘플
- [1205] 레인 12: 20bp DNA 래더(론자제, Lonza 20 bp DNA Ladder, 카탈로그 번호 50330)
- [1206] 사이클 C 완료 후의 샘플을, 분석 조건 3에서 분석을 하였다. 도 18에 크로마토그래프와 매스 스펙트럼의 결과를 나타낸다. 얻어진 매스 스펙트럼의 디콘볼루션에 의해, 평균 분자량으로서 35532.4가 관측되었다. 이 결과는, 사이클 C 완료 후에 예상되는 평균 분자량(35514.2)과 일치하고, 라이브러리 합성을 위한 반응(2분쇄 올리고뉴클레오티드 태그의 라이게이션 및 빌딩 블록의 도입)이 고효율로 달성되고 있는 것이 나타내졌다.
- [1207] 이상에 의해, 상기 합성 수순으로, U-DEL9-HP를 원료로 한 3×3×3(27) 화합물종을 포함하는 모델 라이브러리의 합성이 달성되었다.
- [1208] <얻어진 모델 라이브러리의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단>
- [1209] 상기에서 얻어진 모델 라이브러리의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응을 이하의 수순으로 실시하였다.
- [1210] PCR 튜브에, 2.0 μL의 모델 라이브러리 20 μM 수용액; 2 μL의 CutSmart(등록 상표) Buffer(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 B7204S) 및 14 μL의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 2 μL의 USER(등록 상표) enzyme(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 M5505S)을 첨가하여, 얻어진 용액을 37℃에서 16시간 인큐베이션한 후, 또한 90℃에서 1시간 인큐베이션하였다.
- [1211] 얻어진 반응 용액 중 일부를 샘플링하여, 실시예 3과 동일 조건에서 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의한 분석을 하였다. 도 19에 나타내는 결과로부터, U-DEL9-HP를 원료로 한 모델 라이브러리가, USER(등록 상표) enzyme에 의해, 고효율로 절단 반응이 진행되는 것이 확인되었다. 또한, 도 19의 각 레인의 샘플은 이하와 같다.
- [1212] 레인 1: 20bp DNA 래더(론자제, Lonza 20 bp DNA Ladder, 카탈로그 번호 50330)
- [1213] 레인 2: 모델 라이브러리
- [1214] 레인 3: 모델 라이브러리의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응 실시 후 샘플
- [1215] 실시예 7
- [1216] [DEL 화합물의 헤어핀 DNA로부터 1분쇄 DNA로의 변환, 및 새로운 기능의 부여]
- [1217] <3' 말단에 비오틴을 갖는 DEL 화합물 「BIO-DEL」의 합성>
- [1218] 실시예 2와 마찬가지로, 표 22에 나타내는 서열의 DEL 화합물 「BIO-DEL」을 이하의 수순으로 합성하였다. 또한, 표 22 중의 서열 표기에 있어서, 「(BIO)」은 다음 식 (11)



- [1219]
- [1220] 로 표시되는 기를 의미하고, 기타 표기는 표 20과 동일하다.

표 22

No.	Seq.	Expected MW.	Observed MW. (디폴트조건)
113	GCAGGTGAAGCTTGCTGAATACTCGGTCACCTTGCCACTGCCTTGCTTCTGA CCACATCGATTGGAGTCAA (dSpacer)(dSpacer)(AOP-Am noC7) (dSpacer)(dSpacer)(U)TGACTCCAAATCGATGTGGTCAGGAAQCAAGGCAGT GGCAAGTGACCGAGTATTCAGACAAGCTTCACCTGCBD)	47263.8	47288.8

[1221]

[1222]

PCR 튜브에, 20 μL의 AOP-U-DEL9-HP(실시예 6에서 합성)의 1mM 수용액; 24 μL의 Pr_TAG2에 1mM 수용액(실시예 1과 마찬가지로 합성한 Pr_TAG2_a와 Pr_TAG2_b를 어닐링하여 조제, 표 23에 서열을 나타냄); 8 μL의 10X 리가아제 완충액(500mM 트리스염산, pH 7.5; 500mM 염화나트륨; 10mM 염화마그네슘; 100mM 디티오프레이톨; 20mM 아데노신3인산) 및 20 μL의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 8 μL의 T4DNA 리가아제(서모피셔제, 카탈로그 번호 EL0013)의 10배 희석수 용액을 첨가하여, 얻어진 용액을 16°C에서 22시간 인큐베이션하였다. 또한, 표 23 중의 서열 표기는 표 1과 동일하다. 또한, 각 서열 번호에(No.)에 해당하는 화합물의 명칭은 이하와 같다.

[1223]

No.114: Pr_TAG2_a No.115: Pr_TAG2_b

표 23

No.	Seq.
114	(φ)TACTCGGGTCACCTTGCCACTGCCTTGCTTCTGACACATCGATTGG
115	(φ)AAATCGATGTGGTCAGGAAGCAAGGCAGTGGCAAGTGACCGAGTATT

[1224]

[1225]

반응 용액을, 8 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 264 μL의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 철야 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 풍건시켰다. 펠릿을 탈이온수에 용해시켜, Phenomenex Gemini C18 칼럼을 사용하는 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 2원 이동상 구배 프로파일을 사용하여, 50mM 아세트산트리에틸암모늄 완충액(pH 7.5) 및 아세트니트릴/50mM 아세트산트리에틸암모늄 완충액(9:1, v/v)을 사용하여, 목적물을 용출시켰다. 목적물을 포함하는 분획을 수집하여, 혼합하고 농축하였다. 얻어진 용액을 Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(3kD 컷오프)에 의해 탈염하고, 에탄올 침전을 실시한 후, 펠릿에 25 μL의 탈이온수를 첨가하여 용액으로 하였다.

[1226]

얻어진 용액 중, 일부를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 실시예 1의 분석 조건 2의 조건에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 행하여, 목적물을 동정하였다(화합물의 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 d 중에 나타냄). 용액의 잔여물을 동결 건조시킨 후, 각각 100mM 탄산수소나트륨 수용액을 첨가하여, 1mM으로 조제하였다.

[1227]

상기에서 얻어진 용액 6.2 μL에, 7.4 μL의 CP-BIO의 1mM 수용액(실시예 1과 마찬가지로 합성한 CP_a와 CP-BIO_b를 어닐링하여 조제, 표 24에 서열을 나타냄); 2.5 μL의 10X 리가아제 완충액(500mM 트리스염산, pH 7.5; 500mM 염화나트륨; 10mM 염화마그네슘; 100mM 디티오프레이톨; 20mM 아데노신3인산) 및 6.2 μL의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 2.47 μL의 T4DNA 리가아제(서모피셔제, 카탈로그 번호 EL0013)의 10배 희석수 용액을 첨가하여, 얻어진 용액을 16°C에서 16시간 인큐베이션하였다. 또한, 표 24 중의 서열 표기는 표 23과 동일하다. 또한, 각 서열 번호에(No.)에 해당하는 화합물의 명칭은 이하와 같다.

[1228]

No.51: CP_a No.116: CP-BIO_b

표 24

No.	Seq.
51	G C A G G T G A A G C T T G T C T G A A
116	(ϕ)CAGACAAGCTTCACCTGC (BD)

[1229]

[1230]

반응 용액을, 2.5 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 81.5 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 풍건시키고, 펠릿을 탈이온수에 용해시켰다. 얻어진 용액을 Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(3kD 컷오프)에 의해 탈염하였다.

[1231]

얻어진 상청 중, 일부를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 실시예 3의 분석 조건 3에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 행하여, 목적물을 동정하였다(이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 22 중에 나타냄). 용액의 잔여물을 동결 건조시킨 후, 탈이온수를 첨가하고, 120 μ M으로 조제하여, BIO-DEL을 얻었다.

[1232]

<BIO-DEL의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단>

[1233]

상기에서 얻어진 DEL 화합물 「BIO-DEL」의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응을 이하의 수순으로 행하여, 표 25에 나타내는 서열에 2분쇄 핵산을 갖는 DEL 화합물 「DS-BIO-DEL」을 합성하였다. 또한, 표 25 중의 서열 표기는 표 22와 동일하고, DS-BIO-DEL이 서열 번호 118과 서열 번호 119의 올리고뉴클레오티드쇄에 2분쇄에 의해 형성되어 있는 것을 의미한다.

표 25

	No.	Seq.	Expected M W .	Observed M W . (다론불투선)
DS-BIO-DEL	117	(ϕ)TGACTCCCAAATCGATGTGGTCAGGAAGCAAGGCAGTGGCAAGTGACCGAGTATTCAGACAAGCTTCACCTGC (BD)	23081.1	23083.6
	118	GCAGGTGAAGCTTGCTGAATACTCGGTCCTTGCCACTGCCTTGCTTCTGACACATCGATTTGGAGTCAA (dSpacer)(dSpacer)(AOP-Am inoC7)(dSpacer)(dSpacer)(ϕ)	23990.5	24002.0

[1234]

[1235]

3개의 PCR 튜브에, 각각 10 μ L의 DEL 화합물 「BIO-DEL」 120 μ M 수용액; 100 μ L의 CutSmart(등록 상표) Buffer(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 7240S) 및 860 μ L의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 각각 30 μ L의 USER(등록 상표) enzyme(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 5505S)을 첨가하여, 얻어진 용액을 37°C에서 24시간 인큐베이션하였다.

[1236]

얻어진 반응 용액을, 각각 Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(3kD 컷오프)에 의해 탈염하고, 탈이온수를 첨가하여, 60 μ L의 용액에 조제하였다. 그 후, 각각의 용액을 6 μ L의 5M의 염화나트륨 수용액 및 198 μ L의 냉각된 (-20°C) 에탄올에 의해 처리하고, -78°C에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 탈이온수를 첨가하여 용액으로 하고, 하나의 튜브에 통합하였다.

[1237]

얻어진 용액의 일부를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 실시예 3의 분석 조건 3에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 하고, 목적으로 하는 2분쇄 핵산을 갖는 DEL 화합물 「DS-BIO-DEL」을 동정하였다(화합물의 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 25 중에 나타냄)

[1238]

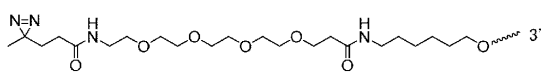
또한, 얻어진 반응 용액 중 일부를 샘플링하여, 실시예 3과 동일 조건에서 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의한 분석을 하였다. 도 20에 나타내는 결과로부터, BIO-DEL이 고수율로 절단되어, DS-BIO-DEL로 변환되어

있는 것이 확인되었다. 또한, 도 20의 각 레인의 샘플은 이하와 같다.

- [1239] 레인 1: BIO-DEL(농도 1: BIO-DEL이 약 40ng이 되도록 조제)
- [1240] 레인 2: BIO-DEL(농도 2: BIO-DEL이 약 80ng이 되도록 조제)
- [1241] 레인 3: BIO-DEL의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응 실시 후의 샘플(농도 1: 목적물이 약 40ng이 되도록 조제)
- [1242] 레인 4: BIO-DEL의 USER(등록 상표) enzyme에 의한 절단 반응 실시 후의 샘플(농도 2: 목적물이 약 80ng이 되도록 조제)
- [1243] 레인 5: 20bp DNA 래더(론자제, Lonza 20 bp DNA Ladder, 카탈로그 번호 50330)
- [1244] <스트렙트아비딘 비즈를 사용한 1분쇄 DNA를 갖는 DEL의 조제>
- [1245] 상기에서 얻어진 2분쇄 핵산을 갖는 DEL 화합물 「DS-BIO-DEL」을, 스트렙트아비딘 비즈로 처리하고, 이하의 수순으로 1분쇄 DNA를 갖는 DEL 화합물 「SS-DEL」로 조제하였다. 또한, SS-DEL은 표 25 중의 서열 번호 119의 올리고뉴클레오티드쇄이다.
- [1246] 2개의 PCR 튜브에, 각각 450 μL의 Magnosphere(상품 상표) MS160/Streptavidin(스트렙트아비딘)(JSR Life Sciences, 카탈로그 번호 J-MS-S160S)을 첨가하고, 자기 분리에 의해 상청을 제거한 후, 900 μL의 1×바인딩 완충액(10mM 트리스염산, pH 7.5; 0.5mM 에틸렌디아민4아세트산; 1M 염화나트륨; 0.05% v/v Tween20)을 첨가하여 자기 분리에 의해 상청을 제거하였다. 얻어진 입자에 각각 DS-BIO-DEL 수용액 k(700pmol, 450 μL), 및 450 μL의 2×바인딩 완충액(20mM 트리스염산, pH 7.5; 1mM 에틸렌디아민4아세트산; 2M 염화나트륨; 0.1% v/v Tween20)을 첨가하여 혼합하고, 실온에서 20분간 진탕하였다.
- [1247] 혼합물로부터 자기 분리에 의해 상청을 제거하고, 900 μL의 1×바인딩 완충액(10mM 트리스염산, pH 7.5; 0.5mM 에틸렌디아민4아세트산; 1M 염화나트륨; 0.05% v/v Tween20)을 사용한 입자의 세정 및 자기 분리에 의한 상청의 제거를 각각 3회 반복하였다. 그 후, 각각 900 μL의 수용액(0.1M 수산화나트륨; 0.1M 염화나트륨)을 첨가하고, 자기 분리에 의해 상청을 회수하였다.
- [1248] 얻어진 상청에, 각각 900 μL의 3-(N-모르폴리노)프로판술폰산 완충액(1.0M, pH 7.0)을 첨가하고, Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(3kD 컷오프)에 의해 탈염하였다. 얻어진 상청을 하나의 튜브에 통합하고, 13.6 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 448 μL의 냉각된 (-20℃) 에탄올에 의해 처리하고, -78℃에서 60분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 풍건시켰다. 펠릿에 60 μL의 탈이온수를 첨가하여 용액으로 하였다.
- [1249] 얻어진 용액 중, 일부를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 실시예 3의 분석 조건 3의 조건에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 한 바, 분자량 23984.8이 관측되고, 목적으로 하는 1분쇄 DNA를 갖는 DEL 화합물 「SS-DEL」을 동정하였다.

[1250] <광반응성 크로스 링커 수식 프라이머의 합성>

[1251] 26에 나타내는 서열의 광반응성 크로스 링커 수식 프라이머 「PXL-Pr」을 이하의 수순으로 합성하였다. 또한, 표 26 중의 서열 표기에 있어서, 「(X)」는 다음 식 (12)



(12)

[1253] 로 표시되는 기를 의미하고, 기타 표기는 표 2와 동일하다.

표 26

	No.	Seq.	Expected M W .	Observed M W . (디온블루션)
PXL-Pr	119	XTTGACTGCCAAATCGATGTG	6628.6	6627.6

[1254]

[1255]

PCR 튜브에, 10℃로 냉각시킨 붕산나트륨 완충액(150mM, pH 9.4)의 L-Pr(실시에 1과 마찬가지로 합성, 표 27에 서열을 나타냄)의 용액(200 μL, 1mM)을 첨가하였다. 튜브에, 40 당량의 N-Fmoc-15-아미노-4,7,10,13-테트라옥사옥타데칸산(20 μL, 0.4M N,N-디메틸아세트아미드 용액), 계속해서 40 당량의 염화4-(4,6-디메톡시[1.3.5]트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 수화물(DMTMM)(16 μL, 0.5M 수용액)을 첨가하고, 발생한 혼합물을 10℃에서 5시간 진탕하였다. 또한, 표 27 중의 서열 표기는 표 8과 동일하다.

표 27

	No.	Seq.
L-Pr	120	(amino-C6-L)TTGACTGCCAAATCGATGTG

[1256]

[1257]

반응액을, 23.6 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 778.8 μL의 냉각된 (-20℃) 에탄올에 의해 처리하고, -78℃에서 철야 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 풍건시켰다. 펠릿에 180 μL의 탈이온수를 첨가하여 용액으로 한 후, 20 μL의 피페리딘을 첨가하여, 10℃에서 3시간 진탕하였다.

[1258]

얻어진 용액을, 20 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 660 μL의 냉각된 (-20℃) 에탄올에 의해 처리하고, -78℃에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 200 μL의 탈이온수를 첨가하여 1mM의 용액으로 하였다.

[1259]

상기에서 얻어진 용액 100 μL에, 75 μL의 트리에틸아민염산 완충액(500mM, pH 10), 계속해서 50 당량의 1-((3-(3-메틸-3H-디아지린-3-일)프로파노일)옥시)-2,5-디옥소피롤리딘-3-술폰산나트륨(Sulfo-SDA)(25 μL, 200mM 수용액)을 첨가하여, 37℃에서 2시간 진탕하였다.

[1260]

얻어진 용액을, 20 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 660 μL의 냉각된 (-20℃) 에탄올에 의해 처리하고, -78℃에서 30분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 100 μL의 탈이온수를 첨가하고, 계속해서 75 μL의 트리에틸아민염산 완충액(500mM, pH 10), 50 당량의 Sulfo-SDA(25 μL, 200mM 수용액)를 첨가하여, 37℃에서 1시간 20분 진탕하였다. 또한 50 당량의 Sulfo-SDA(25 μL, 200mM 수용액)를 첨가하여, 37℃에서 40분간 진탕하였다.

[1261]

얻어진 용액을, 22.5 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 743 μL의 냉각된 (-20℃) 에탄올에 의해 처리하고, -78℃에서 철야 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿에 100 μL의 탈이온수를 첨가하고, 계속해서 75 μL의 트리에틸아민염산 완충액(500mM, pH 10), 계속해서 50 당량의 Sulfo-SDA(25 μL, 200mM 수용액)를 첨가하여, 37℃에서 3시간 진탕하였다.

[1262]

얻어진 용액을, 20 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 660 μL의 냉각된 (-20℃) 에탄올에 의해 처리하고, -78℃에서 철야 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 풍건시켰다. 펠릿을 50mM 아세트산트리에틸암모늄 완충액(pH 7.5)에 용해시켜, Phenomenex Gemini C18 칼럼을 사용하는 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 2원 이동상 구배 프로파일을 사용하여, 50mM 아세트산트리에틸암모늄 완충액(pH 7.5) 및 아세토니트릴/물(100:1, v/v)을 사용하여, 목적물을 용출시켰다. 목적물을 포함하는 분획을 수집하여, 혼합하고 농축하였다. 얻어진 용액을 Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(3kD 컷오프)에 의해 탈염하고, 에탄올 침전을 실시한 후, 펠릿에 100 μL의 탈이온수를 첨가하여 용액으로 하였다.

[1263] 얻어진 용액 중, 일부를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 실시예 3의 분석 조건 3의 조건에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 행하여, 목적물의 광반응성 크로스 링커 수식 프라이머 「PXL-Pr」을 동정하였다(화합물의 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 26 중에 나타냄).

[1264] <광반응성 크로스 링커 수식 2분쇄 DEL의 합성>

[1265] 상기에서 얻어진 SS-DEL, 및 PXL-Pr을 사용하여 프라이머 신장 반응을 이하의 수순으로 행하여, 표 28에 나타내는 서열의 광반응성 크로스 링커 수식 2분쇄 DEL 「PXL-DS-DEL」을 합성하였다. 또한, 표 28 중의 서열 표기는 표 26과 동일하고, PXL-DS-DEL이 서열 번호 122와 서열 번호 119의 올리고뉴클레오티드쇄의 2분쇄에 의해 형성되어 있는 것을 의미한다.

표 28

	No.	Seq.	Expected MW	Observed MW (다분쇄후)
PXL-DS-DEL	121	XTTGA CTCCCAAATCGATGTGGTCAGGAAGCAAAGGCAGTGGC AAGTGACCGAGTATTCAGACAAGCTTCACCTGC	23404.4	23400.4
	118	GCAGGTGAAGCTTGTCTGAATACTCGGTCACCTTGCCACTGCCT TGCTTCCTGACACATCGATTGGGAGTCAA (Spacer) (Spacer) (AOP-Am inoC 7) (Spacer) (Spacer) (p)	23990.5	23987.8

[1266]

[1267] PCR 튜브에, 50 μL의 「SS-DEL」 8 μM 수용액; 0.673 μL의 「PXL-Pr」 594 μM 수용액; 80 μL의 10×NEBuffer (상품 상표) 2(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 B7002S) 및 645 μL의 탈이온수를 첨가하였다. 용액에 8 μL의 DNA 폴리메라아제(Polymerase) I, Large(Klenow) Fragment(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 M0210) 및 16 μL의 데옥시뉴클레오티드(Deoxynucleotide)(dNTP) Solution Mix(New England BioLabs제, 카탈로그 번호 N0447)를 첨가하여, 얻어진 용액을 25℃에서 90분간 인큐베이션하였다.

[1268] 얻어진 용액을, Amicon(등록 상표) Ultra Centrifugal 필터(3kD 컷오프)에 의해 탈염하였다. 얻어진 상청에, 17 μL의 탈이온수를 첨가하고, 그 후 6 μL의 5M의 염화나트륨 수용액 및 198 μL의 냉각된 (-20℃) 에탄올에 의해 처리하고, -78℃에서 60분간 정치하였다. 원심 분리 후, 상청을 제거하여, 얻어진 펠릿을 풍건시켰다. 펠릿에 40 μL의 탈이온수를 첨가하여 용액으로 하였다.

[1269] 얻어진 용액 중, 일부를 샘플링하여, 탈이온수로 희석한 후, 실시예 3의 분석 조건 3의 조건에서 ESI-MS에 의한 질량 분석을 행하여, 목적물의 광반응성 크로스 링커 수식 2분쇄 DEL 「PXL-DS-DEL」을 동정하였다(화합물의 이론 분자량, 및 검출된 분자량을 표 28 중에 나타냄).

[1270] 또한, 얻어진 반응 용액 중 일부를 샘플링하여, 이하에 나타내는 조건에서, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의한 분석을 하였다. 도 21에 나타내는 결과로부터, 프라이머의 신장 반응에 의해, 고수율로 PXL-DS-DEL이 생성되어 있는 것이 확인되었다. 또한, 도 21의 각 레인의 샘플은 이하와 같다.

[1271] 레인 1: 20bp DNA 래더(론자제, Lonza 20 bp DNA Ladder, 카탈로그 번호 50330)

[1272] 레인 2: DS-BIO-DEL

[1273] 레인 3: SS-DEL

[1274] 레인 4: SS-DEL의 프라이머 신장 반응 실시 후의 샘플(PXL-DS-DEL)

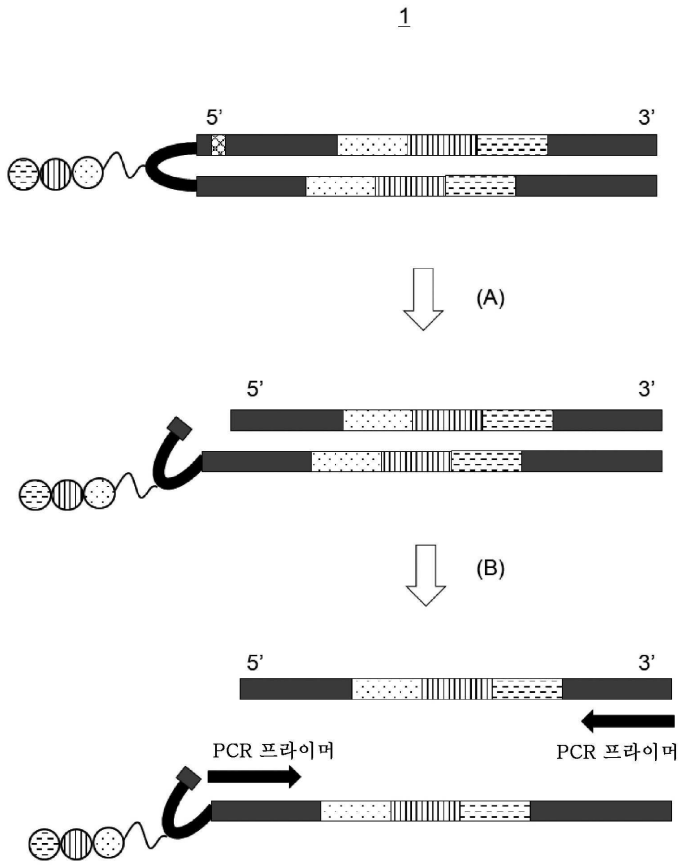
[1275] 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동:

[1276] 겔: SuperSep(상품 상표) DNA 15% TBE 겔(후지 필름 와코 준야쿠제, 카탈로그 번호 190-15481)

[1277] 로딩 버퍼: 6×Loading Buffer(다카라 바이오사제, 카탈로그 번호 9156)

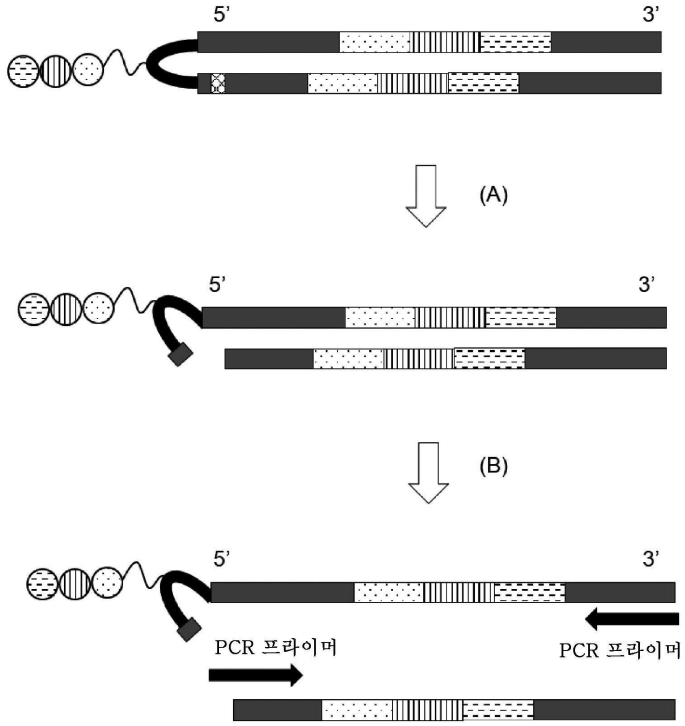
[1278] 온도: 실온

도면2



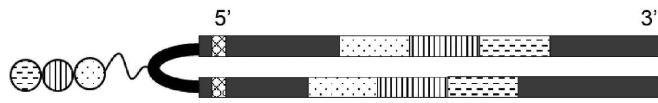
도면3

2

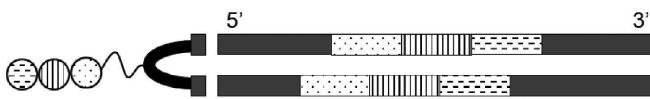


도면4

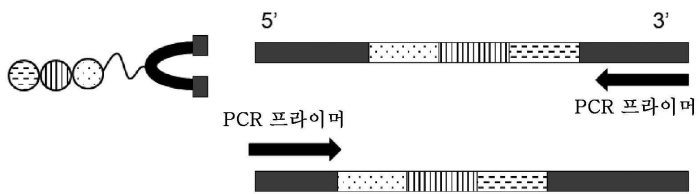
3



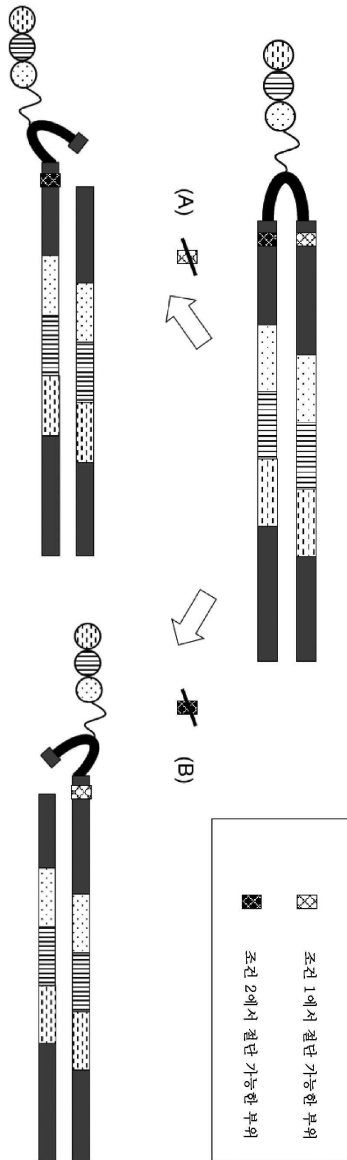
(A)



(B)



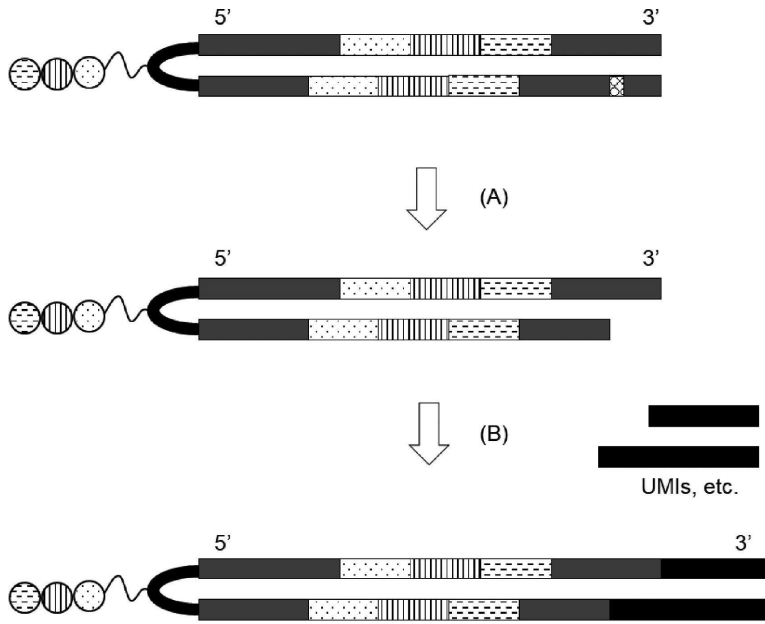
도면5



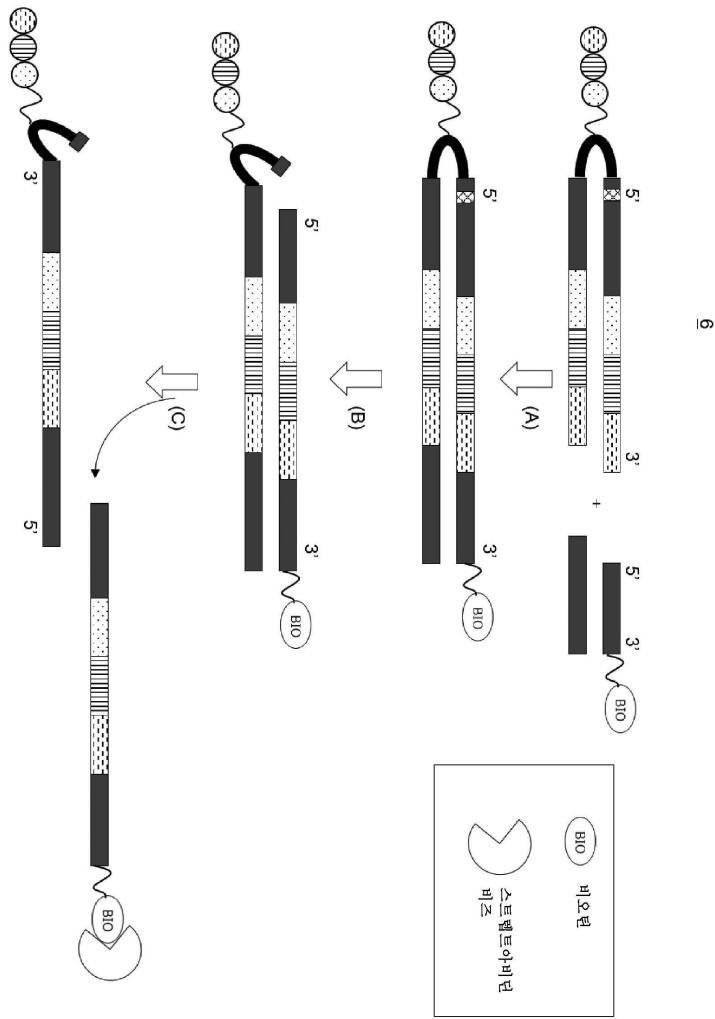
4

도면6

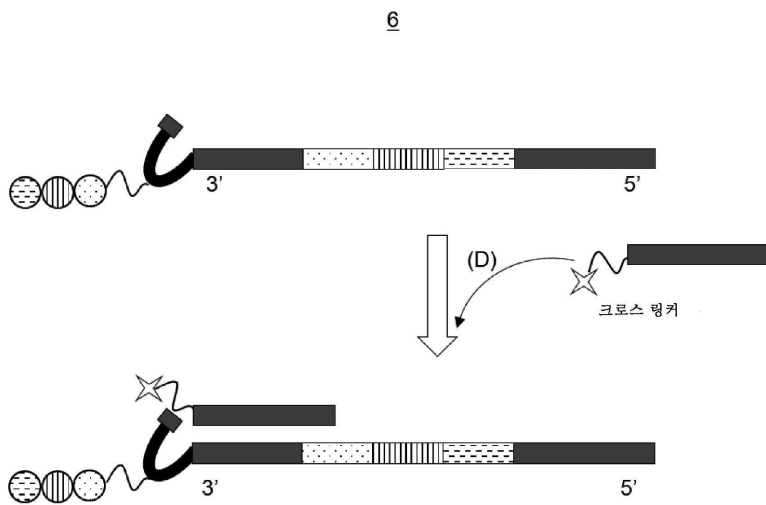
5



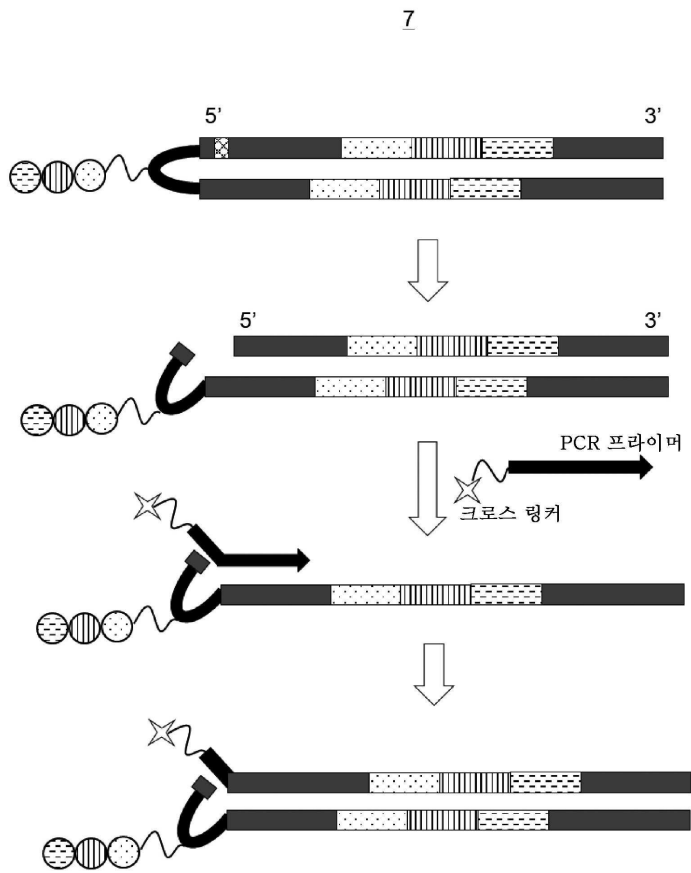
도면7



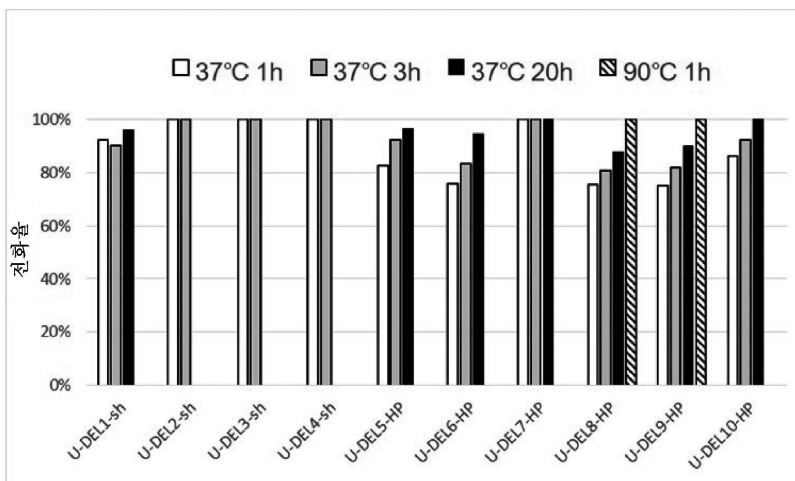
도면8



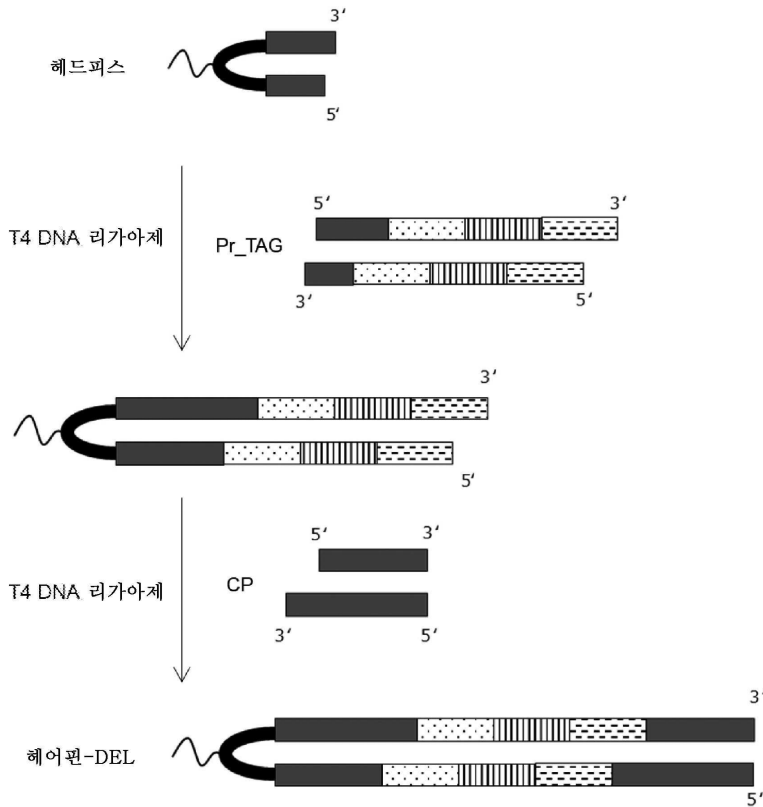
도면9



도면10

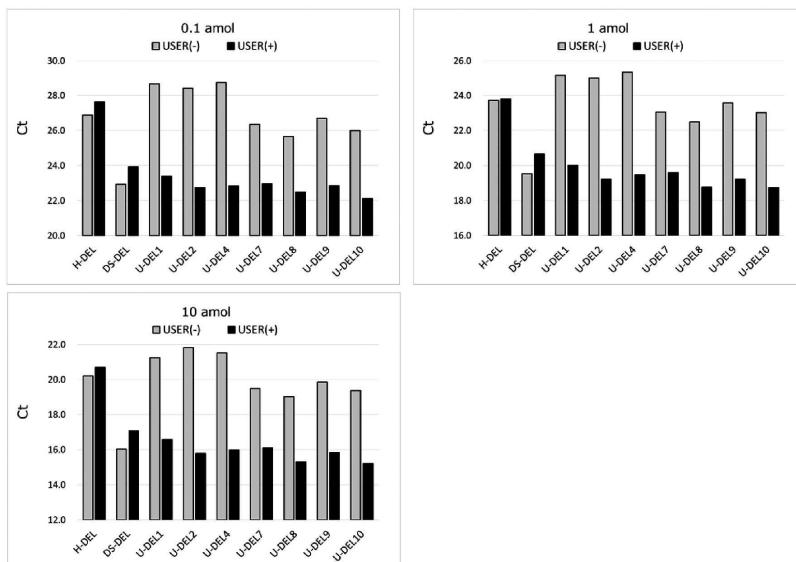


도면11

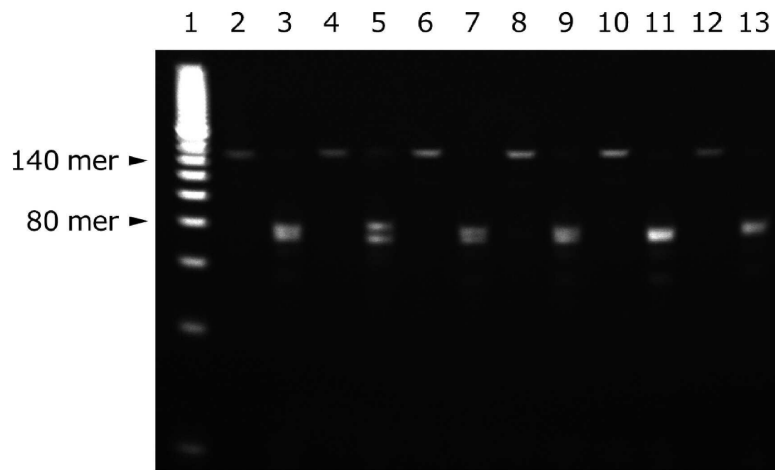


도면12

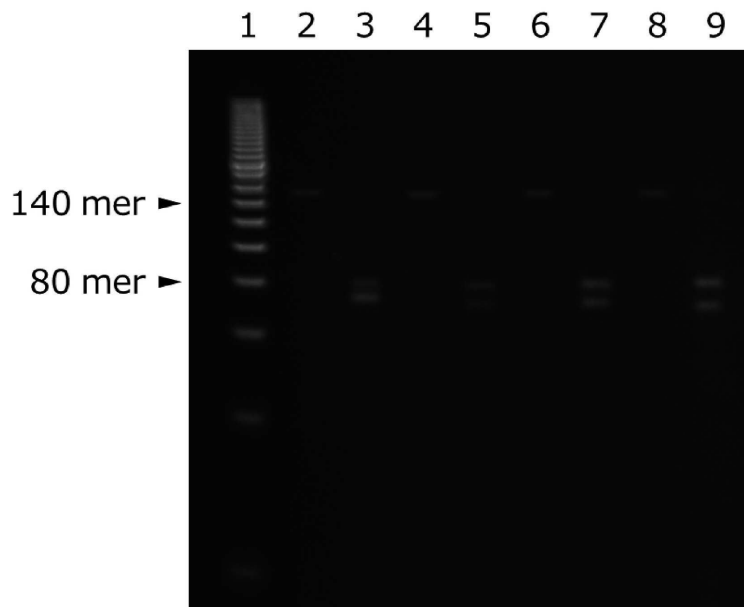
PCR 효율의 비교



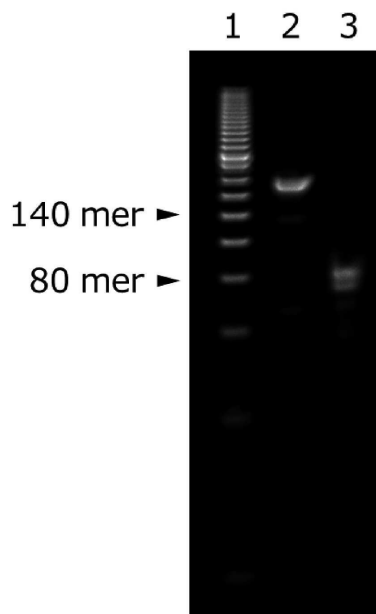
도면13



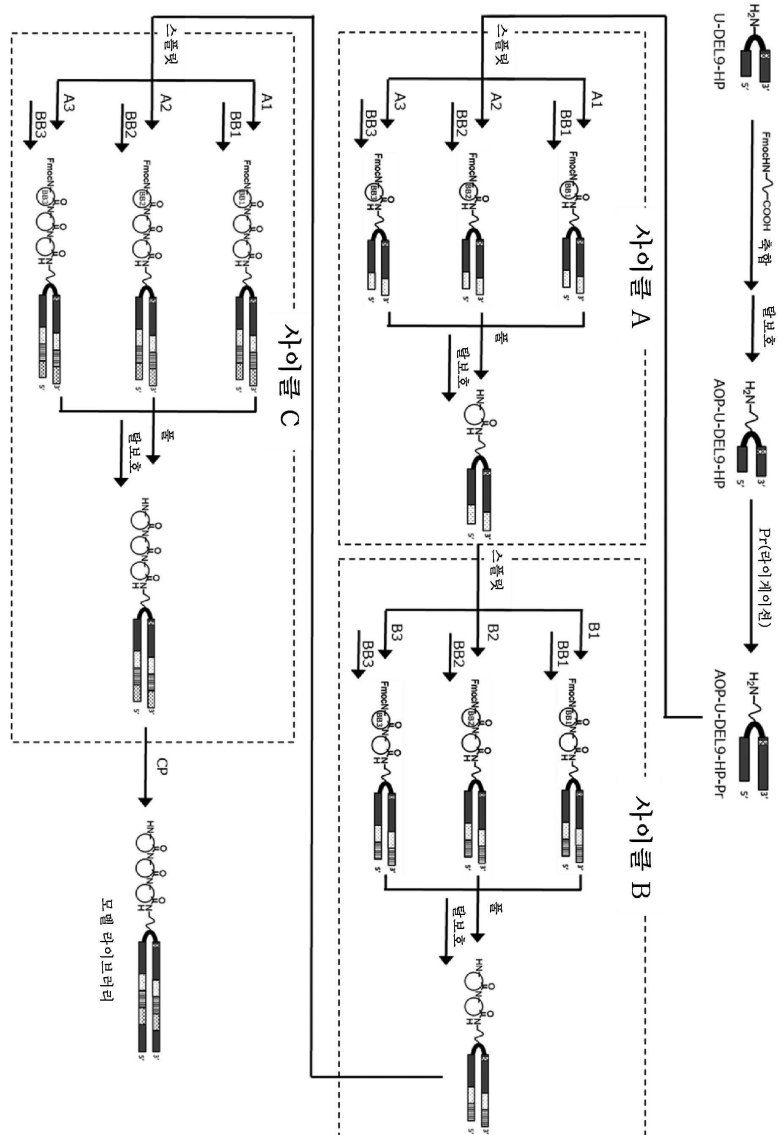
도면14



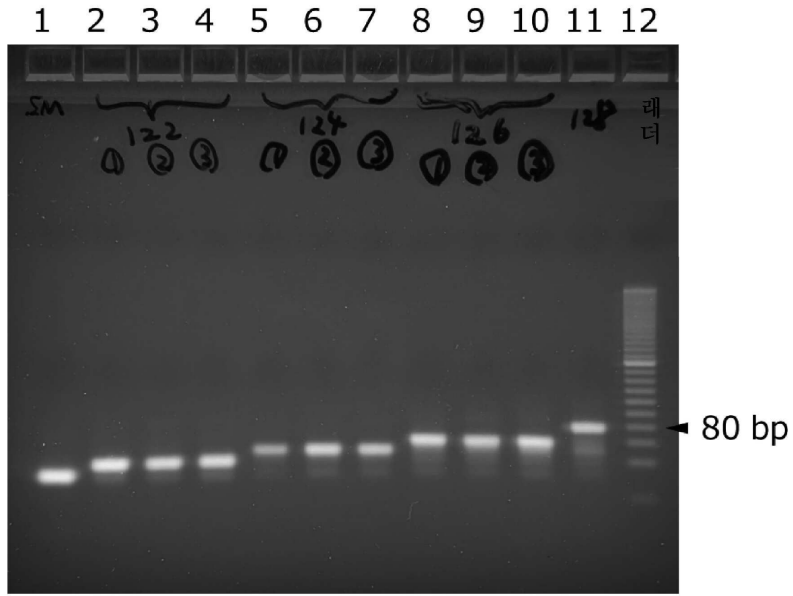
도면15



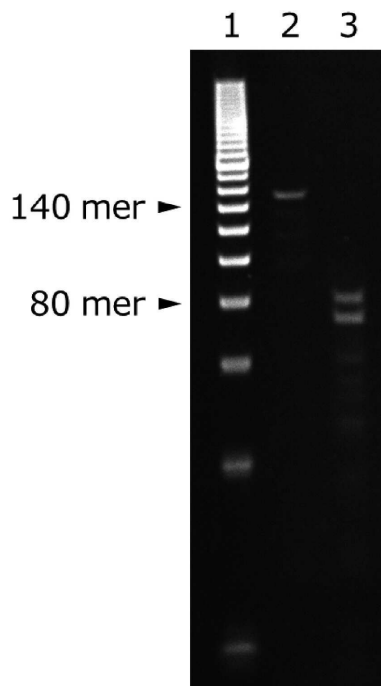
도면16



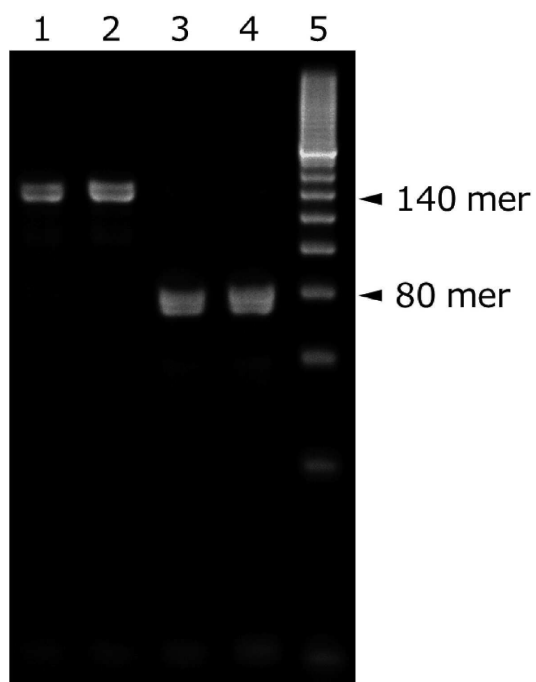
도면17



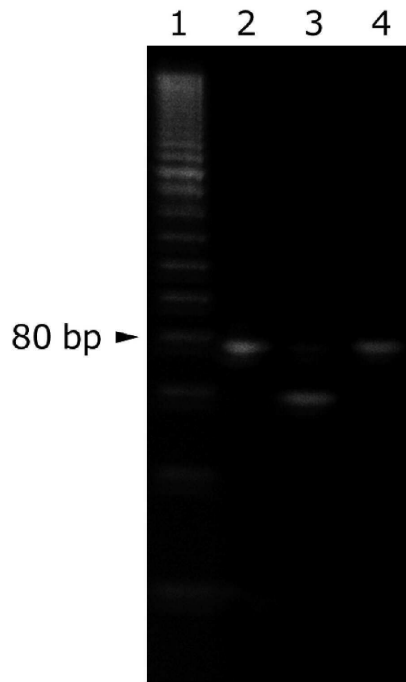
도면19



도면20



도면21



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Nissan Chemical Corporation

<120> Cleavable DNA-Encoded Library

<130> FP4675

<160> 94

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> dT

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> amino-C6-dT

<400> 1

catcgatttg ggagtcantn ttgactccc aaatcgatgt g 41

<210> 2

<211> 41

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> amino-C6-dT

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> dU

<400> 2

catcgatttg ggagtcattn tntgactccc aaatcgatgt g 41

<210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> amino-C6-dT

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> dU

<400> 3

catcgatttg ggagtcattn ttgactccc aaatcgangt g 41

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> dU

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> amino-C6-dT

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> dU

<400> 4

catcgatttg ggagtcantn tntgactccc aaatcgatgt g

41

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> amino-NC6-dT

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> dU

<400> 5

gagtcattnt ntgactccc

19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> dU

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> amino-NC6-dT

<220><221>

> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> dU

<400> 6

gagtcantnt ntgactccc

19

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> dU

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> dSpacer-dSpacer-AminoC7-dSpacer-dSpacer

<400> 7

gagtcanttt tgactccc

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> dSpacer-dSpacer-AminoC7-dSpacer-dSpacer

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> dU

<400> 8

gagtcatttn tgactccc

18

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> dSpacer-dSpacer-AminoC7-dSpacer-dSpacer-dU

<400> 9

gagtcaantg actccc

16

<210> 10

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> dSpacer-AminoC7-dSpacer-dU

<400> 10
 gagtcatntg actccc 16

<210> 11
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> B
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> amino-C6-dT

<400> 11
 catcgatttg ggagtcatnt ttgactccca aatcgatgtg 40

<210> 12
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> p
 <400> 12
 catcgatttg ggagtca 17

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> p

<220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> amino-C6-dT
 <400> 13
 tntttgactc ccaaatcgat gtg 23
 <210> 14
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> amino-C6-dT
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(22)

 <223> B
 <400> 14
 catcgatttg ggagtcattn ttgactccca aatcgatgtg 40
 <210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> amino-C6-dT
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> p
 <400> 15
 catcgatttg ggagtcattn t 21
 <210> 16
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<400> 16

tgactcccaa atcgatgtg

19

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> amino-C6-dT

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> B

<400> 17

catcgatttg ggagtcattn tttgactccc aaatcgagtg

40

<210> 18

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> amino-C6-dT

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> p

<400> 18

catcgatttg ggagtcattn tttgactccc aaatcga

37

<210> 19

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> B

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> amino-C6-dT

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> B

<400> 19

catcgatttg ggagtcant tgactccaa atcgatgtg

39

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> amino-NC6-dT

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> B

<400> 20

gagtcattnt tgactccc

18

<210> 21

<211> 10

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> p
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> amino-NC6-dT
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> p
 <400> 21
 ggtcattnt

 <210> 22
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> p
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> B

 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> amino-NC6-dT
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> B
 <400> 22
 ggtcatntt gactccc

10

17

<210> 23
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> p
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> B
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> dSpacer-dSpacer-AminoC7-dSpacer-dSpacer

<400> 23
 gagtcatttt gactccc 17

<210> 24
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> p
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> dSpacer-dSpacer-AminoC7-dSpacer-dSpacer

<400> 24
 ttttgactcc c 11

<210> 25
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> dSpacer-dSpacer-AminoC7-dSpacer-dSpacer

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> B

<400> 25

gagtcatttt gactccc

17

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> dSpacer-dSpacer-AminoC7-dSpacer-dSpacer-B

<400> 26

gagtcaatga ctccc

15

<210> 27

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> dSpacer-AminoC7-dSpacer-B
 <400> 27
 gagtcattga ctccc 15
 <210> 28
 <211> 151
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library

 <220><221> misc_feature
 <222> (74)..(74)
 <223> dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (76)..(76)
 <223> amino-C6-dT
 <400> 28
 gcaggatgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcantntttg actcccaaat cgatgtggtc aggaagtgcg atggtggttc 120
 cagaagcagt cttcagacaa gcttcacctg c 151
 <210> 29
 <211> 151
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (76)..(76)

 <223> amino-C6-dT
 <220><221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> dU
 <400> 29
 gcaggatgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcattntntg actcccaaat cgatgtggtc aggaagtgcg atggtggttc 120
 cagaagcagt cttcagacaa gcttcacctg c 151
 <210> 30
 <211> 151
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (74)..(74)
 <223> dU
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (76)..(76)
 <223> amino-C6-dT
 <220><221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> dU
 <400> 30
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcantntntg actcccaaat cgatgtggtc aggaagtgcg atggtggttc 120
 cagaagcagt cttcagacaa gcttcacctg c 151
 <210> 31
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (74)..(74)
 <223> dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (76)..(76)
 <223> dSpacer-dSpacer-AminoC7-dSpacer-dSpacer
 <400> 31
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcanttttga ctcccaaatic gatgtggtca ggaagtgcga tgggtgttcc 120
 agaagcagtc ttcagacaag cttcacctgc 150
 <210> 32
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (76)..(76)
 <223> dSpacer-dSpacer-AminoC7-dSpacer-dSpacer
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (77)..(77)
 <223> dU
 <400> 32
 gcaggatgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcattnttga ctcccaaatic gatgtggtca ggaagtgcga tgggtgttcc 120
 agaagcagtc ttcagacaag cttcacctgc 150
 <210> 33
 <211> 148
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..(75)
 <223> dSpacer-dSpacer-AminoC7-dSpacer-dSpacer
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..(75)
 <223> dU
 <400> 33
 gcaggatgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcaantgact cccaaatcga tgtggtcagg aagtgcgatg gtggttccag 120
 aagcagtcctt cagacaagct tcacctgc 148
 <210> 34

<211> 148
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..(75)
 <223> dSpacer-AminoC7-dSpacer
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..(75)
 <223> dU

<400> 34
 gcaggatgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcatntgact cccaaatcga tgtggtcagg aagtgcgatg gtggttccag 120
 aagcagtctt cagacaagct tcacctgc 148

<210> 35
 <211> 146
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (73)..(74)
 <223> S-amino-C7-S

<400> 35
 gcaggatgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcatgactcc caaatcgatg tggtcaggaa gtgcgatggt ggttccagaa 120

gcagtcttca gacaagcttc acctgc 146

<210> 36
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> p
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> dU
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> amino-C6-dT
 <400> 36
 gagtcantnt ttgactccc 19
 <210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> p
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> amino-C6-dT
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> dU
 <400> 37
 gagtcattnt ntgactccc 19
 <210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> p
 <220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> dU

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> amino-C6-dT

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> dU

<400> 38

gagtcantnt ntgactccc

19

<210> 39

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> S-amino-C7-S

<400> 39

gagtcatgac tccc

14

<210> 40

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> p

<400> 40

gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc gatttgg

47

<210> 41
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> p
 <400> 41
 aaatcgatgt ggtcaggaag tgcgatggtg gttccagaag cagtctt 47
 <210> 42
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <400> 42
 gcaggtgaag cttgtctgaa 20
 <210> 43
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> p
 <400> 43
 cagacaagct tcacctgc 18
 <210> 44
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220>
 ><221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> amino-C6-L
 <400> 44
 tgactcccaa atcgatgtgg tcaggaagtg cgatgggtgt tccagaagca gctttcagac 60
 aagcttcacc tgc 73
 <210> 45
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <400> 45
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tca 73
 <210> 46
 <211> 15

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <400> 46
 tgactcccaa atcga 15
 <210> 47
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <400> 47
 gcaggtgaag cttgtc 16
 <210> 48
 <211> 149
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..()

<223> amino-C6-dT

<220><221> misc_feature

<222> (77)..()

<223> dU

<400> 48

gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcattttgac tcccaaatcg atgtggtcag gaagtgcgat ggtggttcca 120

gaagcagtct tcagacaagc ttcacctgc 149

<210> 49

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (74)..()

<223> S(amino-NC6-dT)S(dU)

<400> 49

gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcaatgactc ccaaatcgat gtggtcagga agtgcgatgg tggttccaga 120

agcagcttcc agacaagctt cacctgc 147

<210> 50

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (74)..()

<223> [mdC(TEG-amino)](dU)

<400> 50

gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcaatgactc ccaaatcgat gtggtcagga agtgcgatgg tggttccaga 120

agcagcttcc agacaagctt cacctgc 147

<210> 51
 <211> 149
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..()
 <223> [mdC(TEG-amino)](dU)
 <400> 51
 gcagggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcattttgac tcccaaatcg atgtggtcag gaagtgcgat ggtggttcca 120
 gaagcagtct tcagacaagc ttcacctgc 149
 <210> 52
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..()
 <223> (p)
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..()
 <223> S(aminoC7)S(dU)
 <400> 52
 gagtcaatga ctccc 15
 <210> 53
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..()
 <223> (p)
 <220><221> misc_feature

<222> (8)..()
 <223> [mdC(TEG-amino)](dU)
 <400> 53
 gagtcaatga ctccc 15

<210> 54
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..()
 <223> (p)
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..()
 <223> [mdC(TEG-amino)](dU)
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..()
 <223> [mdC(TEG-amino)](dU)
 <400> 54
 gagtcathtt gactccc 17

<210> 55
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature

<222> (75)..()
 <223> (amino-NC6-dT)T(p)
 <400> 55
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcattcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcatt 75

<210> 56
 <211> 73

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..()
 <223> (p)
 <400> 56
 tgactccaa atcgatgigg tcaggaagtg cgatgggtgt tccagaagca gtcttcagac 60
 aagcttcacc tgc 73

<210> 57
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (73)..()
 <223> (p)
 <400> 57
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tca 73

<210> 58
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..()
 <223> (p)
 <220><221> misc_feature
 <222>
 (1)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)
 <400> 58
 ttttgactcc caaatcgatg tggtcaggaa gtgcgatggt ggttcagaa gcagtcttca 60

gacaagcttc acctgc 76

<210> 59

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (75)..()

<223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)(p)

<400> 59

gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcattcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcaa 74

<210> 60

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (74)..()

<223> S(aminoC7)S(p)

<400> 60

gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcattcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcaa 74

<210> 61

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<

<220><221> misc_feature

<222> (75)..()

<223> [mdC(TEG-amino)](p)

<400> 61

gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcattcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcaa 74

<210> 62

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (75)..()

<223> [mdC(TEG-amino)](p)

<400> 62

gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcattcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcatt 75

<210> 63

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..()

<223> (p)

<400> 63

ttgactccca aatcgatgtg gtcaggaagt gcgatggtgg ttccagaagc agtcttcaga 60

caagcttcac ctgc 74

<210> 64

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (72)..()

<223> IAA(dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)

<400> 64

gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcattcc tgaccacatc 60

gatttgggag tctttgactc ccaaatcgat gtggtcagga agtgcgatgg tggttccaga 120
 agcagtcttc agacaagctt cacctgc 147
 <210> 65
 <211> 147
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (72)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)I
 <400> 65
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcattgactc ccaaatcgat gtggtcagga agtgcgatgg tggttccaga 120
 agcagtcttc agacaagctt cacctgc 147
 <210> 66
 <211> 149
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <400> 66
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcaatttgac tcccaaatcg atgtggtcag gaagtgcgat ggtggttcca 120
 gaagcagtct teagacaagc ttcacctgc 149
 <210> 67
 <211>
 > 149
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)I
 <400> 67
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60

gatttgggag tcatattgac tcccaaatcg atgtggtcag gaagtgcgat ggtggttcca 120
gaagcagtct tcagacaagc ttcacctgc 149
<210> 68
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> DNA-Encoded Library
<220><221> misc_feature
<222> (1)..()
<223> (p)
<220><221> misc_feature
<222> (5)..()
<223> I
<220><221> misc_feature
<222> (7)..()
<223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)
<400> 68
gagtcaattt gactccc 17
<210> 69
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> DNA-Encoded Library
<220><221> misc_feature
<222> (1)..()
<223> (p)
<220><221> misc_feature
<222> (7)..()
<223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)I
<400> 69
gagtcattga ctccc 15
<210> 70
<211> 17

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..()
 <223> (p)
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)I

<400> 70

gagtcaattt gactccc

17

<210> 71

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..()
 <223> (p)

<220><221> misc_feature

<222> (8)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)

<220><221> misc_feature

<222> (9)..()
 <223> I

<400> 71

gagtcattt gactccc

17

<210> 72

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (73)..()

<223> I
 <400> 72
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60

gatttgggag tca 73
 <210> 73
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..()
 <223> (p)
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)
 <400> 73
 atttgactcc caaatcgatg tggtcaggaa gtgcgatggt ggttcagaa gcagtcttca 60
 gacaagcttc acctgc 76
 <210> 74
 <211>
 > 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)I
 <400> 74
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcatt 75
 <210> 75
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..()
 <223> (p)
 <400>
 75
 gactcccaaa tcgatgtggc caggaagtgc gatgggtggt ccagaagcag tcttcagaca 60
 agcttcacct gc 72
 <210> 76
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)I
 <400> 76
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcaatt 76

 <210> 77
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)
 <220><221> misc_feature
 <222> (76)..()
 <223> I
 <400> 77
 gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcatatt 77
 <210> 78

<211> 149
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature
 <222> (75)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)
 <220><221> misc_feature
 <222> (77)..()
 <223> u
 <400> 78

gcaggtgaag cttgtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60
 gatttgggag tcaaattgac tcccaaatcg atgtggtcag gaagtgcgat ggtggttcca 120
 gaagcagtct tcagacaagc ttcacctgc 149

<210> 79
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..()
 <223> (p)
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..()
 <223> u
 <400> 79

gagtcaaatt gactccc 17

<210> 80
 <211> 76
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (75)..()
 <223> (dSpacer)(dSpacer)(aminoC7)(dSpacer)(dSpacer)
 <400> 80
 gcagggtgaag ctigtctgaa gactgcttct ggaaccacca tcgcacttcc tgaccacatc 60

 gatttgggag tcaaat 76
 <210> 81
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..()
 <223> (p)u
 <400> 81
 tgactcccaa atcgatgtgg tcaggaagtg cgatgggtgt tccagaagca gtcttcagac 60
 aagcttcacc tgc 73
 <210> 82
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA-Encoded Library
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..()
 <223> (p)
 <400> 82
 aaatcgatgt ggtcaggaag 20
 <210> 83
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> GAGTCAATGACTCCC

<220><221> misc_feature

<222> (1)..()

<223> (p)

<220><221> misc_feature

<222> (7)..()

<223> (dSpacer)(dSpacer)(AOP-AminoC7)(dSpacer)(dSpacer)(dU)

<400> 83

gagtcaatga ctccc

15

<210> 84

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..()

<223> (p)

<220><221> misc_feature

<222> (27)..()

<223> (dSpacer)(dSpacer)((AOP-AminoC7)(dSpacer)(dSpacer)(dU)

<400> 84

tcctgaccac atcgatttgg gagtcaatga ctccc aaatc gatgtgtca ggaag

55

<210> 85

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (74)..()

<223> (dSpacer)(dSpacer)(AOP-AminoC7)(dSpacer)(dSpacer)(dU)

<220><221> misc_feature

<222> (147)..()

<223> (BIO)

<400> 85
gcaggtgaag cttgtctgaa tactcggta cttgccactg cttgcttcc tgaccacatc 60
gatttgggag tcaatgactc ccaaatcgat gtggtcagga agcaaggcag tggcaagtga 120
ccgagtattc agacaagctt cacctgc 147

<210> 86
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> DNA-Encoded Library
<220><221> misc_feature
<222> (1)..()
<223> (p)

<400> 86
tactcggta cttgccactg cttgcttcc tgaccacatc gatttgg 47

<210> 87
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> DNA-Encoded Library
<220><221> misc_feature
<222> (1)..()
<223> (p)

<400> 87
aaatcgatgt ggtcaggaag caaggcagtg gcaagtgacc gagtatt 47

<210> 88
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> DNA-Encoded Library

<400> 88
gcaggtgaag cttgtctgaa 20

<210> 89
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..()

<223> (p)

<220><221> misc_feature

<222> (18)..()

<223> (BIO)

<400> 89

cagacaagct tcacctgc

18

<210> 90

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (1)..()

<223> (p)

<220><221> misc_feature

<222> (73)..()

<223> (BIO)

<400> 90

tgactccaa atcgatgtgg tcaggaagca aggcagtggc aagtgaccga gtattcagac

60

aagcttcacc tgc

73

<210> 91

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA-Encoded Library

<220><221> misc_feature

<222> (74)..()

<223> (dSpacer)(dSpacer)(AOP-AminoC7)(dSpacer)(dSpacer)(p)

<400> 91

gcaggtgaag cttgtctgaa tactcgggtca cttgccactg ccttgcttcc tgaccacatc 60
gatttgggag tcaa 74
<210> 92
<400> 92
000
<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> DNA-Encoded Library
<220><221>
misc_feature
<222> (1)..()
<223> (amino-C6-L)
<400> 93
ttgactccca aatcgatgtg 20
<210> 94
<400> 94
000