(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 15/11

(11) 공개번호 특2002-0097241
(43) 공개일자 2002년12월31일

(21) 출원번호 10-2002-7014612
(22) 출원일자 2002년10월31일
번역문 제출일자 2002년10월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2001/14410
(86) 국제출원출원일자 2001년05월04일
(87) 국제공개번호 WO 2001/83740
(87) 국제공개일자 2001년11월08일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 캐나다, 일본, 대한민국,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스, 터어키,

(30) 우선권주장 60/202,376 2000년05월04일 미국(US)

(71) 출원인 에이브이아이 바이오파마 인코포레이티드
미국 오리건주 97258 포틀랜드 사우스웨스트 콜롬비아 원 스위트 1105

(72) 발명자 아이버슨,패트릭,엘.
미국오레곤97330코발리스노스웨스트페어오크스플레이스5902
허드지악,로버트
미국오레곤97326블로드게트피.오.박스585하이웨이2020244

(74) 대리인 정진상
박종혁
이기석

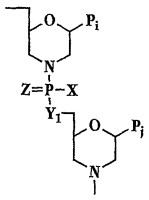
심사청구 : 없음

(54) 스플라이스-영역 안티센스 조성물 및 방법

요약

선택된 단백질의 mRNA 서열에 대항하여, 사전프로세싱된 mRNA에서 정상적인 스플라이스 수용체 접합부의 10 내지 약 25 염기쌍 하류에 그것의 5'말단을 갖는 영역에, 표적화되는 안티센스 조성물이 개시된다. 안티센스 화합물은 RNA 분해효소-불활성이고, 바람직하게는 포스포로디아미데이트-결합 모르폴리노 올리고뉴클레오티드이다. 이러한 표적화는 자연적 mRNA 스플라이스 프로세싱과정을 저해하여, 스플라이스 변이체 mRNA를 생산하고, 단백질의 정상적인 발현을 저해하는데 효과적이다.

대표도



색인어

안티센스 화합물, 표적 서열, 스플라이스 수용체 지점

명세서

기술분야

본 발명은 세포 내에서 전장 단백질의 발현을 저해하는 치료적 조성물과 방법, 및 특히 사전프로세싱된 mRNA에서 정상 스플라이스 수용체 접합부의 1 내지 25 염기쌍 하류에 그것의 5'말단을 가지는 mRNA에 대하여 표적화되는 안티센스 조성물에 관한 것이다. 이러한 표적화는 자연적 mRNA 스플라이스 프로세싱과정을 억제하고 스플라이스 변이체 mRNA를 생산하는데 효과적이다.

배경기술

단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA의 안티센스 표적화에 의한 단백질 발현의 저해는 광범위한 연구의 주제가 되어 왔다. 많은 보고된 방법이, 본래 DNA의 하전 핵산분해효소-내성 유사체인 포스포로티오에이트-결합 올리고뉴클레오티드를 채택했다. 관계된 안티센스 기작은 올리고머가 결합하는 표적 핵산을 절단하는, RNA분해효소의 활성에 기초를 둔다. 이러한 화합물은 높은 활성을 보임과 동시에, 그것은 또한 단백질에 대한 비특이적 결합과 같은, 비-표적 RNA의 절단 또는 비-안티센스 기작에 의한 높은 수준의 부작용을 보이는 경향이 있다.

RNA분해효소-불활성으로 불리우는 안티센스 올리고머의 또다른 부류는, 결합된 RNA의 절단을 촉진하지 않고, 표적 서열의 전사, 프로세싱과정, 또는 번역으로부터 분자적 기구를 입체적으로 차단함으로써 작용한다고 믿어진다. 이 화합물은 포스포로티오에이트 올리고머보다, 비선택적 분해같은, 더 적은 부반응을 생산하는 경향이 있는 반면, 성공적인 저해를 위해, AUG 개시 코돈과 같은, RNA의 특정 영역을 표적화하는 것이 일반적으로 필요하다.

더욱 최근에, RNA분해효소-불활성 올리고머에 의해 핵(스플라이스되지 않은) RNA의 스플라이스 수용체 접합부를 표적화하는 것이 보고되었다. Kole 및 Dominski (미국 특허 번호 5,665,593)은, 이러한 변종 스플라이싱의 결과인 β-지중해빈혈의 변이체와 싸우기 위해, β-글로빈의 잘못된 스플라이싱의 억제를 보고했다. 이 경우에서, 스플라이싱을 정상 지점으로 되돌리기 위해, 변종 스플라이스 접합부가 표적화되었다. RV Giles et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.9:213-220 (1999)에서는 c-myc mRNA의 잘못된 스플라이싱을 유도하기 위해 스플라이스 접합부를 표적화하였다. 이들 각각의 경우에서, 안티센스 올리고머가 사전-mRNA의 인트론/엑손 스플라이스 접합에 걸쳐 있다는 점에서, 표적화된 영역은 여전히 어느 정도 제한된다. 비하전 RNA분해효소-불활성 올리고뉴클레오티드의 사용에 따른 이점으로 인하여, 표적화에 있어서 더 나아간 융통성을 나타냄이 매우 유용할 수 있다.

발명의 요약

한 양태에서, 본 발명은 안티센스 화합물, 및 이러한 안티센스 화합물과 세포를 접촉시킴으로써, 진핵세포에서 사전프로세싱된 RNA의 정상적인 스플라이싱을 저해하는 대응 방법을 제공한다. 화합물은:

(a1):비하전 모르폴리노 백본;

(a2):12 내지 25 뉴클레오티드 염기의 염기-서열 길이;및

(a3):표적 영역의 5'말단은 사전프로세싱된 mRNA에서 정상 스플라이스 수용체 지점의 1 내지 25 염기 하류쪽에 위치하는 것을 특징으로 하는, 선택된 단백질을 코딩하는 선택된 사전프로세싱 mRNA와 상보적인 염기 서열을 특징으로 하고,

(b1):화합물은 진핵세포에 의해 흡수되고;

(b2):화합물은 이러한 세포내 사전프로세싱된 mRNA의 표적영역에 혼성화되고,

(b3):이와 같이 표적 사전-mRNA와 혼성화된 화합물은 정상적인 수용체 스플라이스 지점에서의 스플라이싱을 방해하여, 스플라이스 기작은 사전프로세싱된 mRNA내 스플라이스 수용체 지점 하류로 진행되어, 일부 절단된 코딩 서열을 갖는 스플라이스 변종 프로세싱된 mRNA를 생산하는 성질을 갖는다.

더 구체적인 구체예에서, 표적 영역의 5'말단은 정상적인 스플라이스 수용체 지점의 2 내지 20 염기, 또는 2 내지 15염기 하류에 있다. 표적화 화합물의 길이는 바람직하게 약 15 내지 20 뉴클레오티드 염기이다.

한 구체예에서, 화합물은 도 2AA-2EE에 도시한 구조로 구성된 군으로부터 선택된 서브유닛간 결합을 가진다. 바람직한 구체예에서, 결합은, X=NH_2, NHR, 또는 NRR', Y=O, 및 Z=O인, 도 2B-B에 나타낸 것과 같은 포스포로디아미데이트 결합으로부터, 그리고 X=OR, Y=NH 또는 NR, 및 Z=O인, 도 2B-B에 나타낸 것과 같은 대안의 포스포로디아미데이트 결합으로부터 선택된다. R 및 R'은 표적 결합을 방해하지 않는 기이다. 바람직하게, R 및 R'은 알킬 및 폴리알킬렌옥시(예로, PEG; $(CH_2CH_2O)_n$), 또는 그것의 조합으로부터 독립적으로 선택된다. 알킬/폴리알킬렌옥시 사슬은, 바람직하게는 말초 말단에, 하이드록시, 알콕시, 아미노, 알킬아미노, 티올, 알칸티올, 할로겐, 옥소, 카르복실산, 카르복실산 에스테르, 및 무기 에스테르(예로, 인산염 또는 술폰산염)으로부터 선택된 기에 의해 치환될 수 있다. 바람직하게, (치환기에 독립적인)사슬은 1 내지 12 원자길이, 및 더 바람직하게는 1 내지 6 원자 길이다. 선택된 구체예에서, R 및 R'은 독립적으로 메틸 또는 에틸이다. 한 구체예에서, X=$N(CH_3)_2$, Y=O 그리고 Z=O이다.

NRR'은 질소, 탄소, 산소, 및 황으로부터 선택된 5 내지 7개의 고리원자를 가지고, 적어도 비-탄소 고리 원자만큼의 탄소 고리 원자를 가지는 질소 헤테로환을 나타낸다. 예는 모르폴린, 피롤리딘, 피페리딘, 피리딘, 피리미딘, 피라진, 트리아진, 트리아졸, 피라졸, 피롤, 이소피롤, 이미다졸, 옥사졸, 이소옥사졸 등을 포함한다.

하류 스플라이스 수용체 지점이 정상적인 스플라이스 수용체 지점의 3 염기 하류 전체 다수일 때, 스플라이스 변이체 mRNA는 정상적으로 스플라이스되었을 때 프로세싱된 mRNA의 그것과 프레임이 맞는 코딩 서열을 갖는다.

단백질은 myc, myb, rel, fos, jun, abl, bcl, p53, 인테그린, 카테드린, 텔로머라제, hCG, 수용체 단백질, 사이토카인, 키나아제, HIV rev, 인간 파필로마 바이러스, 및 인간 파르보바이러스 B19로 구성된 집단으로부터 바람직하게 선택된다. 선택된 구체예에서, 단백질은 myc, myb, abl, p53, hCG-β 서브유닛, 안드로겐 수용체 단백질, 및 HIV-1 rev로부터 선택된다.

더욱 선택된 구체예에서, 선택된 단백질은, 대부분의 전사인자에서와 같은, 구별되는 결합 영역 다수를 갖고, 일부절단된 코딩 서열은 이와 같은 결합 영역 중 하나가 무력화된 변이체 단백질을 암호화한다. 바람직하게, 변이체 단백질은 우성 네가티브 단백질이다. 한 예는, 변이체 단백질이 N-말단 일부절단된 c-myc인 경우의 인간 c-myc이다. 이 구체예에서, 채택된 안티센스 화합물은 여기 SEQ ID NO:16내지 32로 구성된 군으로부터 선택된 염기서열을 갖는다. 채택된 안티센스 화합물이 SEQ ID NO:34로부터 선택된 연속적인 서열인 염기 서열, 예를 들어 SEQ ID NO:33을 갖는 18-

내지 20-중합체일 경우, 변이체 단백질은 C-말단 변형 c-myc일 수 있다.

그 외의 대표적인 구체예에서, 선택된 단백질과 사전-mRNA를 표적화하는 대응 안티센스 염기 서열(군)은:

(a)인간 융모성 성선자극호르몬, β서브유닛: SEQ ID NO:15로부터 선택된 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열;예를 들어 SEQ ID NO:14;

(b)인간 안드로겐 수용체: SEQ ID NO:9 또는 SEQ ID NO:13으로부터 선택된 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열;예를 들어 각각 SEQ ID NO:8 또는 12;

(c)인간 p53: SEQ ID NO:36으로부터 선택된 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열;예를 들어 SEQ ID NO:35;

(d)인간 abl: SEQ ID NO:38로부터 선택된 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열;예를 들어 SEQ ID NO:37; 및

(e)HIV-1 rev: SEQ ID NO:41로부터 선택된 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열;예를 들어 SEQ ID NO:40으로 구성된 군으로부터 선택된다.

이들 및 다른 목적과 본 발명의 특징은 하기 발명의 상세한 설명이 첨부된 도면과 병행하여 읽혀질 때 보다 완전하게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 중합체를 형성하기에 적합한, 5-원자, 6-원자, 및 7-원자 연결기를 가진 몇개의 바람직한 서브유닛을 도시한다

도 2A-A부터 2E-E는, 각각 도 1의 서브유닛 A-E를 사용하여 제작되고 A-A부터 E-E로 표시되는, 대표적인 모르폴리노 올리고뉴클레오티드의 반복되는 서브유닛 단편을 도시한다.

발명의 상세한 설명

I.정의

여기 사용될 때, 하기 용어는, 다른 지시가 없을 경우, 하기 의미를 갖는다.

" 안티센스" 는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍형성에 의해 RNA내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적 서열 내에서, 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오티드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 지칭한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다. 이 안티센스 올리고머는 mRNA의 번역을 차단 또는 저해, 하고/또는 mRNA의 스플라이스 변이체를 생산하는 mRNA의 프로세싱과정을 변화시킬 수 있다.

여기 사용될 때, 용어 " 화합물" , " 작용제" , " 올리고머" 및 " 올리고뉴클레오티드" 는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드에 대해서 호환적으로 사용될 수 있다.

여기 사용될 때, "모르폴리노 올리고머"는 전형적인 폴리뉴클레오티드와 수소결합 가능한 염기를 지지하는 백본을 가진 중합체적 분자로서, 펜토오스 당 백본 부분, 및 더 구체적으로 뉴클레오티드 및 뉴클레오사이드의 전형인 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 리보오스 백본이 결여되었지만, 대신 중합체가 고리 질소를 통해 결합하고 있는 고리 질소를 함유하는 것을 특징으로 하는, 중합체 분자를 지칭한다. 본 발명에서 사용되는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 대표적인 구조는, 도 2A-A에서 2E-E에 도시된 결합을 갖는, 도 1A-E에 도시된 모르폴리노 서브유닛 타입을 포함한다. 이런 구조들은, 예로, Hudziak et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev.6:267-272 (1996) 및 Summerton and Weller, Antisense Nucleic Acid Drug Dev.7:187-195 (1997)에 기술된다.

도 1의 서브유닛 A는, 모르폴리노 고리가 1-원자 포스포아미드 연결에 의해 연결되는, 도 2에 도시된 5 원자 반복-유닛 백본을 형성하는 1-원자 인-함유 연결을 함유한다.

바람직한 모르폴리노 올리고뉴클레오티드는 도 2B-B에 도시된 한 서브유닛의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유닛의 5'원구조 바깥쪽 탄소에 합류시키는 형태의 모르폴리노 서브유닛 구조로서, 구조가 포르포로디아미데이트 결합으로써 함께 결합되고, Pi 및 Pj는, 염기-특이적 수소 결합에 의해, 폴리뉴클레오티드 내의 염기와 결합하는데 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-쌍형성 부분인 것을 특징으로 하는, 서브유닛 구조로 구성된다. 바람직한 구체예에서, 결합은 X=NH_2, NHR, 또는 NRR', Y=O, 및 Z=O인, 도 2B-B에 도시된 것과 같은 포스포로디아미데이트 결합, 및 X=OR, Y=NH 또는 NR, 및 Z=O인, 도 2B-B에 도시된 것과 같은 대안적 포스포로디아미데이트 결합으로부터 선택된다. R 및 R'은 표적 결합을 방해하지 않는 군이다. 바람직하게, R 및 R'은 알킬 및 폴리알킬렌옥시 (예로, PEG; $(CH_2CH_2O)_n$), 또는 그것의 조합으로부터 독립적으로 선택된다. (이러한 조합의 예는 $-(CH_2)_3(CH_2CH_20)_3-$가 있다.) 알킬/폴리알킬렌옥시 사슬은, 바람직하게는 말초 말단(즉, 올리고머 백본과 접촉하지 않는 말단)에서, 하이드록시, 알콕시, 아미노, 알킬아미노, 티올, 알칸티올, 할로겐, 옥소, 카르복실산, 카르복실산 에스테르, 및 무기 에스테르 (예로, 인산염 또는 술폰산염)에 의해 치환될 수 있다. 바람직하게, (치환기에 독립적인)사슬은 1 내지 12 원자길이고, 더 바람직하게는 1 내지 6 원자길이다. 선택된 구체예에서, R 및 R'은 독립적으로 메틸 또는 에틸이다. 한 구체예에서, X=$N(CH_3)_2$, Y=O 그리고 Z=O이다. NRR'은 또한 질소, 탄소, 산소, 및 황으로부터 선택된 5 내지 7개의 고리원자를 가지고, 적어도 비-탄소 고리 원자 수만큼의 탄소 고리 원자를 가지는 질소 헤테로환을 나타낸다. 예는 모르폴린, 피롤리딘, 피페리딘, 및 피리딘을 포함한다.

도 1의 서브유닛 C-E는 도 2의 C-C에서 E-E까지 보여진 것 같은 7-원자 유닛-길이 백본을 위해 설계되었다.구조 C에서, X 부분은 구조 B에서의 것과 같고 Y 부분은 메틸렌, 황, 또는 바람직하게 산소가 될 수 있다. 구조 D에서 X 및 Y 부분은 구조 B에서의 것과 같다. 구조 E에서, X는 구조 B에서의 것과 같고 Y는 O, S, 또는 NR이다. 도 1A-E에 묘사된 모든 서브유닛에서, Z는 O 또는 S이고, Pi 또는 Pj는 아데닌, 시토신, 구아닌 또는 우라실이다.

"핵산분해효소-내성" 올리고머 분자(올리고머)는 핵산분해효소 절단을 받아들이지 않는 백본을 가진 것이다.

여기에 사용될 때, 올리고머가, 실질적으로 37℃이상, 바람직하게는 적어도 50℃, 그리고 전형적으로는 60℃ 내지 80℃ 혹은 그 이상의 Tm을 갖는 생리학적 조건하에서 표적과 혼성화 한다면, 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고머는 표적 폴리뉴클레오티드와 "특이적으로 혼성화 한다". 이러한 혼성화는 정의된 이온강도 및 pH상에서 특이적 서열의 녹는 점(T[m])보다 약 10℃, 바람직하게는 약 50℃ 더 낮게 선택된, 긴축 혼성화 조건에 바람직하게 대응한다. 주어진 이온강도와 pH상에서, T[m]은 50%의 표적 서열이 상보적 폴리뉴클레오티드와 혼성화하는 온도이다.

혼성화가 두개의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 사이에서 역평행 입체구조로 발생할 때, 폴리뉴클레오티드는 서로에 대해 "상보적"이라고 기술된다. 혼성화가 제 1의 폴리뉴클레오티드의 가닥 중 하나와 제 2의 것 사이에서 일어날 수 있다면, 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 다른 폴리뉴클레오티드에 대해 "상보적"일 수 있다. 상보성 (한 폴리뉴클레오티드가 또 다른 것과 상보적인 정도)은, 일반적으로 받아들여지는 염기-쌍형성 법칙에 따라 서로 수소결합을 형성할 것으로 기대되는 반대쪽 가닥에서의 염기 비율에 의해 양을 정할 수 있다.

" RNA분해효소-불활성" 또는 " RNA분해효소-무력" 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 유사체는, 포스포로티오에이트와 같은 RNA분해효소-활성 올리고뉴클레오티드와는 달리, RNA분해효소-독립적 기작을 통해 작용하는 것이다. 이는 핵세포질 수송 또는 번역같은 표적 RNA 형성을 입체적으로 차단함으로써 작용한다고 여겨지므로, " 입체적 차단제" 라고도 또한 지칭된다. 이런 부류는, 예를 들어, 메틸포스포네이트, 모르폴리노 올리고뉴클레오티드, 여기에서 기술될 때, 펩티드 핵산(PNA's), 및 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

" 펩티드 핵산" 에서, 올리고뉴클레오티드 백본의 디옥시리보오스 인산 유닛은 폴리아미드 연결로 대체된다. 적당한 백본 간격은, 메틸레네카르보닐 군을 통해 각 2-아미노 군에 부착된 뉴클레오티드 염기를 가진, 2-아미노에틸 글리신 유닛의 사용에 의해 얻어진다.

" 2-O-알릴(또는 알킬) 변형된 올리고뉴클레오티드" 는 2'하이드록실이 알릴 또는 알킬 에테르로 프로세싱된 올리고리보뉴클레오티드이다. 알킬 에테르는 전형적으로 메틸 에테르이다.

" 알킬" 은, 분지성 또는 직선 사슬일 수 있는, 탄소 및 수소를 함유한 완전 포화된 비환상 1가의 라디칼을 지칭한다. 알킬군의 예는 메틸, 에틸, n-부틸, t-부틸, h-헵틸, 및 이소프로필이다. " 저급 알킬" 은, 메틸, 에틸, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, 및 t-부틸로써 예시되는, 1 내지 6개의 탄소원자, 바람직하게는 1 내지 4개의 탄소원자를 갖는 알킬기를 지칭한다.

" 일부 절단된" 단백질 또는 코딩 서열은 한쪽 또는 다른 쪽 말단, 내부 영역, 또는 위의 조합으로부터 제거된 정상 단백질 또는 서열의 어떤 부분을 가진다.

아미노-일부절단된(N-일부절단된) 또는 카르복시-일부절단된(C-일부절단된) 단백질은, 스플라이스 변이체 mRNA의 번역으로부터 일어난, 비정상적 또는 삭제된 아민 말단 또는 카르복시 말단을 각각 갖는 것이다.

II.안티센스 화합물

본 발명에 의해서, 표적 영역의 5'말단은 프로세싱된 mRNA내 정상 스플라이스 수용체 지점의 1 내지 25 염기 하류, 바람직하게는 2 내지 20 염기 하류, 더욱 바람직하게는 2 내지 15 염기 하류에 있는 것을 특징으로 하는, 선택된 단백질을 코딩하는 선택된 프로세싱 mRNA의 표적 영역에 상보적인 표적화 염기 서열을 포함하는, 12 내지 25의 뉴클레오티드를 갖는 안티센스 화합물이, 정상 스플라이스 수용체 지점에서의 스플라이싱을 저해하여, 일부절단된 또는 그렇지 않으면 번역 후 선택된 단백질의 변형 이형체를 유발하는, 스플라이스 변이체 mRNA를 생산하는데 효과적이라는 것이 발견되었다. 이 전략의 이점은 아래에서 설명된다.

본 발명에 채택된 안티센스 화합물은 RNA분해효소 H를 활성화하지 않는 것이다. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드가 가장 두드러진 예가 되는, RNA분해효소-H 활성 올리고머는 표적 mRNA가 절단되는 기작에 의해 일차적으로 작용한다. RNA분해효소-무력 올리고머는, 이에 반하여, 입체적 차단 기작에 의해 작용하는 것으로 여겨진다. 이러한 화합물은 모르폴리노 올리고머, PNA's(펩티드 핵산), 메틸포스포내이트, 및 2'-O-알킬 또는 -알릴 변형 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 이 모두는 당업계에 알려졌다. 본 발명의 바람직한 안티센스 올리고머(화합물)은 모르폴리노 올리고머로, 여기 참고문헌에 모두 통합된, 미국 특허 번호 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,521,063,및 5,506,337에 도시된 형태의 모르폴리노 서브유닛으로 구성된다. 모르폴리노 올리고머의 합성, 구조 및 결합 특성 결정이 이 발명에 상술된다. 모르폴리노 올리고머에서, (i)모르폴리노 기는 1 내지 3 원자 길이로, 인접 서브유닛의 5'원구조 바깥쪽 탄소에 한 서브유닛의 모르폴리노 질소를 결합시킨, 비하전 인-함유 결합에 의해 연결되고, (ii)모르폴리노 기에 부착된 염기는, 염기-특이적 수소결합에 의해, 폴리뉴클레오티드 내의 염기에 결합하는 것에 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-쌍형성 부분이다. 퓨린 또는 피리미딘 염기-쌍형성 부분은 전형적으로 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실 또는 티민이다. 이런 올리고머의 준비는, 그 전문이 참고문헌으로써 여기에 수록된, 미국 특허 번

호 5,185,444(Summerton and Weller,1993)에 자세히 기술된다. 참고문헌에서 나타난 바와 같이, 비이온성 결합의 여러 유형은 모르폴리노 백본을 제작하는데 이용될 수 있다.

이런 모르폴리노 올리고머는 RNA 표적에 대해 강한 결합 친화도를 보였고, 비하전 백본은 세포내로의 흡수를 도와서, 포스포로티오에이트같은 하전 유사체와 관련된, 비-특이적 결합 상호작용을 줄인다. 그들은, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드와 비교해 볼때, 표적화된 서열의 번역을 저해하는데에 두드러지게 개선된 활성 및 선택성을 제공하는 것으로 보여졌다. 예로, Summerton et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.7(2):63-70, Apr 1997을 참조한다. 모르폴리노 올리고머는 매우 높은 핵산분해효소 내성과 양호한 수용성를 가지므로, 생체내 이용에 훌륭한 후보자가 된다. 생체내에서 세포에 의한 효과적인 흡수는 공동소유되고 공동계류중인 출원 일련 번호 09/493,427 및 이에 상응하는 PCT 공보 번호 WO 0044897에 설명된다. 이에 기술된 것 같이, 포스포르아미데이트 연결을 가진 모르폴리노 올리고뉴클레오티드는 표적 RNA와 헤테로이중체를 형성하는데, 이 이중체 상태에서는 핵산분해효소의 분해로부터 보호된다. 이러한 이중체는 세포로부터 배출되고, 표적 RNA는 실험체의 체액 표본에서 후에 검출될 수 있다. 이런 결과는 모르폴리노 올리고머가 (i)이동하여 체내의 세포로 들어가고 (ii)높은 친화도로, 왓슨-크릭 염기-쌍형성을 통해, 표적 핵산 영역에 결합한다는 것을 증명한다.

본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드에 대한 대표적인 백본 구조는, 상기된 바와 같이, 도 1A-E에 도시된 β-모르폴리노 서브유닛 유형을 포함한다. 폴리뉴클레오티드가 하나 이상의 결합유형을 함유할 수 있다는 것이 인정될 것이다.

바람직한 모르폴리노 올리고뉴클레오티드는, 한 서브유닛의 모르폴리노 질소를 인접한 서브유닛의 5'엑소시클릭 탄소에 연결시키는 포르포로디아미데이트 연결로 구조체가 함께 연결되고, Pi 및 Pj는 염기-특이적 수소 결합에 의해 폴리뉴클레오티드 내의 염기와 결합하는데 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-쌍형성 일부인, 도 2B-B에 도시된 형태의 모르폴리노 서브유닛 구조체로 구성된다. 바람직한 구체예에서, 연결은, X=NH_2, NHR, 또는 NRR', Y=O, 및 Z=O인, 도 2B-B에 나타낸 것과 같은 포스포로디아미데이트 연결, 및 X=OR, Y=NH 또는 NR, 및 Z=O인, 도 2B-B에 나타낸 것과 같은 대안의 포스포로디아미데이트 결합으로부터 선택된다. R 및 R'은 표적 결합을 방해하지 않는 기이다. 바람직하게, R 및 R'은 알킬 및 폴리알킬렌옥시 (예로, PEG; $(CH_2CH_2O)_n$), 또는 그것의 조합으로부터 독립적으로 선택된다. 알킬/폴리알킬렌옥시 사슬은 하이드록시, 알콕시, 아미노, 알킬아미노, 티올, 알칸티올, 할로겐, 옥소, 카르복실산, 카르복실산 에스테르, 및 무기성 에스테르 (예로, 인산염 또는 술폰산염)에 의해, 바람직하게는 말초 말단에서 치환될 수 있다. 바람직하게, (치환기에 독립적인)사슬은 1 내지 12 원자 길이고, 더 바람직하게는 1 내지 6 원자 길이다. 한 구체예에서, X=$N(CH_3)_2$, Y=O 그리고 Z=O이다. NRR'은 질소, 탄소, 산소, 및 황으로부터 선택된 5 내지 7개의 고리원자를 가지고, 적어도 비-탄소 고리원자만큼의 탄소 고리원자를 가지는 질소 헤테로환을 나타낸다. 예는 모르폴린, 피롤리딘, 피페리딘, 피리딘, 피리미딘, 피라진, 트리아진, 트리아졸, 피라졸, 피롤, 이소피롤, 이미다졸, 옥산졸, 이소옥사졸, 등을 포함한다.

안티센스 화합물의 용해도, 및 용액내에서 저장하는 동안 침전에 저항하는 화합물의 능력은 친수성 올리고머 같은 가용성 부분, 또는 하전 아미노산이나 유기산 같은 하전 부분으로 올리고머를 유도화시킴으로써 더 증강될 수 있다. 부분은, 안티센스 화합물과 짝을 이룰 수 있고 화합물이 표적 서열과 결합하는 것을 방해하지 않는, 어떠한 생체적으로 잘 교합할 수 있는 친수성 또는 하전 부분일 수 있다. 부분은 주지의 유도화 방법에 의해, 안티센스 화합물, 예를 들어, 그것의 5'말단에 화학적으로 부착될 수 있다. 한 바람직한 부분은, 제 2의 피페라진 질소가 안티센스의 5'말단 포스포로디아미데이트 결합과 결합하는 것을 특징으로 하는, 트리에틸렌글리콜과 함께 카르바메이트 결합을 형성하는 피페라진 연결기를 통해, 탄산염 결합을 통해 안티센스 화합물의 5'말단과 공유적으로 결합되는 트리에틸렌글리콜과 같은, 정의된 길이의 올리고 에틸렌 글리콜 부분이다. 대안으로, 또는 부가적으로, 화합물은, 포스포디에스테르 결합 같은 작은 수의 하전 백본 결합을, 바람직하게는 화합물의 말단 중 하나에 근접해서 포함하도록 설계될 수 있다. 첨가된 부분은 수성 매질에서 적어도 약 30mgs/ml까지, 바람직하게는 적어도 50mgs/ml까지, 화합물의 용해도를 증강시키는데 바람직하게 효과적이다.

화합물은 실질적으로 37℃이상, 예를 들어, 적어도 50℃ 및 바람직하게 60℃-80℃의 Tm을 가진 생리학적 조건하에

서 표적 서열과 혼성화 하도록 설계된다. 화합물이 표적 서열과 100% 상보적일 필요는 없지만, 표적 서열의 발현이 조정되도록 표적 서열에 안정하게 그리고 특이적으로 결합하는 것이 효과적이다. 양호한 특이성과 조합되어 안정하고 효과적으로 결합하도록 허용하는 올리고머의 적당한 길이는 약 8 내지 40 뉴클레오티드 염기 유닛, 및 바람직하게 약 12 내지 25 염기 유닛이다. 미스매치가, 만약 존재한다면, 중간보다 혼성 이중체의 말단 영역쪽을 덜 불안정화한다. 표적과의 염기-쌍형성 특이성이 유지된다는 가정하에, 표적 염기와의 축퇴성 염기 쌍형성을 허용하는 올리고머 염기가 또한 고려된다.

III.표적 서열의 선택

A.RNA 스플라이싱:배경기술

전사 후 핵 RNA의 프로세싱과정은 사실상 모든 살아있는 세포에서 관찰된다. 포유동물의 게놈은 7 내지 8개의 엑손을 함유하는 대략 16,000 염기 길이의 전사체를 만드는 유전자를 함유한다. 스플라이싱의 프로세싱은 mRNA의 길이를 평균 2,200 염기로 감소시킨다. 최초의 전사체는 이형 핵 RNA(hnRNA) 또는 사전-mRNA로 지칭된다. hnRNA의 프로세싱과정은, 스플라이싱 및 핵으로부터의 mRNA 수송을 수행하는, 총괄적으로 스플라이시오좀이라 지칭되는, 대략 20여 단백질의 응집체를 포함한다. 스플라이시오좀은 모든 전사체에 대해 공통 방향으로부터 스캔하는 것으로 나타나지 않는다; 인트론은 방향성 순서가 아닌 재생 순서로 제거될 수 있다. 예로, 인트론 3과 4가 먼저 제거되고, 인트론 2와 5의 제거 후, 인트론 1과 6의 제거가 후행한다. 인트론 제거의 순서는 관찰 전에 예측할 수 없다. 프로세싱과정을 위한 서열 인식은 소수인데, 이는 프로세싱과정 지점의 오류 또는 다중성이 예견될 수 있음을 제안하며, 실제로 더 많은 유전자가 연구됨에 따라, 더 많은 hnRNA 프로세싱과정에서의 변화가 관찰된다.

사전프로세싱된 mRNA에서, 엑손/인트론 접합부의 2-염기 서열 모티프는 변화하지 않는다. 상류(5') 스플라이스 공여체(SD) 접합부은 엑손-/GT-인트론의 형태인 반면, 하류(3') 스플라이스 수용체(SA) 접합은 인트론-AG/엑손의 형태이다. 양쪽에 인접하는 염기는 변화하지 않는다; 그러나, 스플라이스 수용체 AG 서열의 바로 위 상류는 약 80%가 C이다.

인트론 서열 인식에 대한 현재의 이해는 다음과 같다:

5'-엑손$A_{(64)}$ $G_{(73)}$ /$G_{(100)}$ $T_{(100)}$ $A_{(62)}$ $A_{(68)}$ $G_{(84)}$ $T_{(63)}$ ...TACTAA AC...$C_{(80)}$ $A_{(100)}$ $G_{(100)}$ /엑손-NN...-3'

스플라이스 공여체(SD) 스플라이스 수용체(SA)

괄호안의 숫자는 한 지점에서 염기의 대략적인(< 100% 일때) 이용 백분율을 나타낸다. 인트론의 중간에 굵은A A는 스플라이스 공여체 유래 G가, 라리에트 (lariat)라 지칭되는, 분지된 2'-5'-구조를 형성하는 지점(branch point ;분지점)이다. 지시된 서열(TACTAAAC)은 효모에서 관찰되는 보존 서열이다. 포유동물 세포에서 보존 서열은, Py가 피리미딘(U/T 또는 C)을 나타내고 Pu가 퓨린(A 또는 G)을 나타내는, PyNPy(80)Pu(75)APy(75)이다. 분지점에서의 A는 변화하지 않으며, AG 지점에서 약 12 내지 50 염기 상류에서 전형적으로 발견된다. 피리미딘-풍부 영역(위에는 도시하지 않음)은 AG지점에서 약 10 내지 15 염기 상류에, 인트론의 3' 말단 근처에서 일반적으로 발견된다.

일단 스플라이스좀이 라리에트를 형성하면, 두 트랜스에스테르화 반응은:1) 인트론 내 분지점AA의 2'-OH를 SD 인트론의 5'-인산염으로, 2)SD엑손 G의 3'-OH를 SA엑손 첫번째 염기의 5'-인산염으로 대체시킨다. 제거된 인트론은 대부분의 경우 빠르게 분해되고, 리보솜에 의해서 단백질로 번역되기 위해 핵 외로 수송되는, 연결된 엑손은 이제 성숙 mRNA로 지칭된다.

B.표적화 전략

다양한 접근이 안티센스 올리고머에 의한 mRNA의 프로세싱과정(스플라이싱)을 표적화하기 위해 채택되었다. 하기 지점이 표적화될 수 있다:

1. SD 프로세싱과정을 방해하기 위한, SD 엑손의 엑손만 존재하는 부분(SD 지점의 상류).

2. SD 프로세싱과정을 방해하기 위한, SD 엑손/인트론 접합부.

3. SA 엑손의 상류에서 스플라이스좀의 인식을 차단하기 위한, 인트론내의 라리에트 형성 지점.

4. SA 프로세싱과정을 방해하기 위한, SA 인트론/엑손 접합부.

5. SA 프로세싱과정을 방해하기 위한, SA 엑손의 엑손만 존재하는 부분(SA 지점의 하류).

종래 기술의 방법은 전략 2 또는 4를 이용했다 (SD 또는 SA 접합부의 표적화). 예로, c-myc 유전자에서 스플라이스 수용체 지점에 걸쳐 있는 모르폴리노 안티센스 올리고머가 기술된, RV Giles et al.,을 참조한다.

본 발명을 지지하는 실험은 스플라이스 수용체를 향한 위의 표적화 전략 4 및 5가 스플라이스 공여체를 향한 전략 1 및 2 보다 신뢰성있게 효과적임을 발견했다.

예를 들어, 생체내(전체 동물)에서 표적화된 래트 CYP3A2 사전-mRNA을 가지고 연구를 수행했다. 인산염완충식염수내의 100μg (도 2B-B에 도시된 것 같이, Y_1 및 Z는 산소이고 X는 $N(CH_3)_2$ 인) PMO를 동물에 복강내 주사하였다. 에리트로마이신 O-디메틸라아제의 마이크로좀 대사 감소 비율은 안티센스 저해에 의해 야기되는, 기대된 표현형을 반영하기 위해 모니터링 되었다. 나타난 바와 같이, 스플라이스 공여체(SD) 표적화는 스플라이스 수용체(SA) 전략보다 덜 효과적이었다.

전 략	안티센스 서열(/는 스플라이스 접합부를 지시한다)	SEQ ID NO:	대조군의 ERDEM%
대조군	식염수	--	100 ± 10.2 (N=7)
SD	3'-AAGAGATGGC/CACTCACTGG-5'	4	94.7 ± 5.4 (N=3)
SA	3'-GGAAATATC/TGAACCTTGGG-5'	5	86.5 ± 3.8 (N=3)

c-myc mRNA에 대해 안티센스인 올리고머로 한 실험은, 배양된 래트 NRK 세포에서, 삼중수소 티미딘의 결합을 모니터링함으로써 세포성 DNA 합성의 저해를 평가하여 수행되었다. Genbank Acc. No. Y00396(래트) 및 J00120(인간)인 서열은, 엑손2의 시작부(스플라이스 공여체를 표적화하는 SEQ ID NO:1은 제외)의 스플라이스 수용체 지역을 표적화했다. 지시된 래트 및 인간 서열은 이 지역에서 매우 상동적이다. 여러 증식 검정을 이용하여, 아래 표 1에 열거된 올리고머를 항증식 효과에 대해 스크리닝했다. 두 종, 래트 와 인간 유래 제1섬유모세포, NRK 및 WI-38, 각각을 스크리닝에 이용했다. 표 1에 도시된 데이터는 NRK 세포를 채용했다.

(도 2B-B에 도시된 것 같이, Y_1 및 Z는 산소이고 X는 $N(CH_3)_2$ 인) 20μM PMO를 이용한 [^{3}H]티미딘 결합 검정의 결과를 표 1에 나타낸다. 백분율은 운반체(H_2O)대조군에 상대적인 [^{3}H]티미딘 통합을 지칭한다. 그러므로, 숫자가 낮을수록, 항증식 효과는 크다. 검사된 모든 올리고머는 적어도 약간의 항증식 활성을 나타냈다. 저해 활성의 범위는 대조군 32% 농도에서의 항증식 약물인 택솔(Paclitaxel, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ)에 비하여 낮다. 세포의 10% 내지 20%가 스크레이프 로딩(scrape loading) 절차에 영향을 받지 않았고, 잔여 [^{3}H]티미딘 통합 활성에 기여할 것이므로, 가장 효과있는 올리고머를 함유한 대부분 또는 모든 세포가 성장 저해되었던 것으로 보인다.

안티-c-myc 및 대조군 서열에 의한 세포 성장 저해

SEQ ID NO:	안티센스 서열(5'-->3')	표적화 구역*	통합 VS. 매개체 대조구
1	CTGTGCTTAC/CGGGTTTTCCACCTCCC (/ = SD지점)	2553-2579	51 ± 8%
2	ATCGTCGTGACTGT/CTGTTGGAGGG (/ = SA지점)	4140-4164	27 ± 3%
3	GCTCACGTTGAGGGGCATCG	4161-4180	38 ± 2%
25	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	J00120 4515-34	29%
42	GGGGCAUCGUCGUGACUGU/CUGUUGGAGGG	4140-4169	20%
43	CGUCGUGACUGU/CUGUUGGAGG	4141-4162	45%
44	CGTCGTGACTGT/CTGTTGGAGG	4141-4162	21%
45	GGCAUCGUCGCGGGAGGCUG/CUGGAGCG	J00120 4498-4505	22%
46	CCGCGACAUAGGACGGAGAGCAGAGCCC	4364-4391	56%
47	ACTGTGAGGGCGATCGCTGC (뒤섞인)	--	~100%
48	ACGATGAGTGGCATAGTCGC (3염기 미스매치)	--	>100%
49	CTCCGCAATGCTGAAAGGTG (래트 BCL-2)	--	>100%
50	GGCGUGCCUCAAACAUGGUGGCGG (래트 PCNA-1)	--	~100%

* Genbank Y00396(래트)다른 지시가 없을 경우

두 부적절한-서열 올리고머(래트 BCL-2,SEQ ID NO:49 및 래트 PCNA-1, SEQ ID NO:50)는 검정된 가장 높은 농도(20μM)에서도 NRK세포를 저해하지 않았다. SEQ ID NO:25의 미스매치되고 뒤섞인 서열(각각 SEQ ID NO 48 및 47)은 20μM의 농도에서 WI-38(인간) 섬유모세포의 증식에 어떠한 효과도 갖지 않았다.

인간 myc 사전-mRNA의 제 1의 인트론 3'-스플라이스 수용체 지점에 걸쳐 있는 SEQ ID NO:45는, Giles et al.(1999)에 의해 myc 사전-mRNA의 비정상적 스플라이싱을 야기한다고 보여졌다. 정상 스플라이스 수용체 위치에서 44 bp 떨어진, 잠복성 또는 숨어있는 스플라이스 수용체가 44-bp 결실된 비정상적 스플라이스 mRNA를 생산하는데 사용되었다. 이런 잘못 스플라이스된 mRNA는 개시 AUG가 결여되어 정상 myc 단백질을 생산하지 않았다.

SEQ ID NO:25는, 첫번째 잠재적인 상보성 염기쌍이 3'스플라이스 수용체로부터 10번째 뉴클레오티드에 있기 때문에, 인트론 1-엑손 2 경계부에 걸쳐있지 않다. 유사하게, SEQ ID NO:3은 래트 c-myc mRNA 서열에서 그것의 5'말단을 스플라이스 수용체의 11 염기 하류에 갖는다. 데이커가 나타내는 바와 같이, 두 서열은 모두 세포 성장을 저해하는데 효과적어었다. SEQ ID NO:45에서 나타난 바와 같이, 이 올리고머가 정상 스플라이싱을 저해했는지를 결정하는 것이

관심사였다. 따라서, SEQ ID NO:25 뿐만 아니라 포지티브(SEQ ID NO:45) 및 네가티브(SEQ ID NO:50) 대조 올리고머로 처리된 인간 세포 유래의 RNA를 준비했다. 역전사효소로 DNA 복사본을 만든 후 양쪽에 인접하는 DNA 프라이머로 PCR을 수행함으로써 RNA의 구조를 분석했다(아래 재료 및 방법 참조). RT-PCR 절차의 산물은 아가로스 겔 전기영동법에 의해 분석되었다.

미처리 또는 부적절한 올리고머-처리 세포에서, 사용된 프라이머 및 c-myc 뉴클레오티드 서열로부터, 304bp 밴드가 예측되고, 관찰되었다. SEQ ID NO:25로 처리된 세포에서, 두 DNA 밴드가 관찰되었다. 미처리된 또는 네가티브 대조군 세포 유래의 절편과 같이 이동한 상위 밴드는, 이용된 흡수 절차에 의해 스크레이프 로딩되지 않은 10% 내지 20%의 세포 유래 mRNA와, 처리된 세포에서 올바르게 스플라이스된 mRNA의 파편을 나타낸다. 하위 밴드는 잘못 스플라이스되어, 44-bp결실된 mRNA를 나타낸다.

SEQ ID NO:25가 실린 세포는 또한 RT-PCR과정으로부터 두개의 밴드를 만드는데, 하나는 정상적으로 스플라이스된 mRNA의 크기이고 하나는 더 작다. 그러므로, 스플라이스 수용체 지점에 직접 겹치지 않더라도, SEQ ID NO:25는 잘못된 스플라이싱을 야기할 수 있다고 결론 내릴 수 있다. 부적절한 PMO(SEQ ID NO: 50)는 미처리 세포의 그것과 동일한 패턴을 mRNA 구조에 부여하는데, 이는 잘못된 스플라이싱이 서열 특이적이라는 것을 증명한다.

SEQ ID NO:25에 대한 분량-반응 연구는 3μM의 IC_{50} 을 결과하였다. 저해 효과가 10μM에서 정체되기 시작하였고, 10μM에서 20μM까지 더 이상의 변화는 거의 없었다.

Myc 단백질은 세포주기의 G_0/G_1에서 S 시기로 변천되는데 중요하게 관련되었다(MK Mateyak et al., Cell Growth Differ.8:1039-48,1997). 그러므로, myc 단백질 농도가 감소되면, 세포는 G_1에 정지될 것이라고 기대되었다. 이 효과는 Telford et al. (Cytometry13:137-43, 1993)의 방법(재료 및 방법 참조)을 이용하여, G_1 및 G_2 상태의 세포수를 측정함으로써 관찰되었다. 가수분해에 의한 RNA의 제거 후, DNA-특이적 형광 염료인 프로피디움 요오다이드로 세포를 염색했다. 세포 당 DNA 양 분포는 FACS 분석에 의해 결정되었다. FACS 강도 분석 프로필은 두개의 정점을 나타내었는데, 이는 2N DNA(G_1) 및 4N DNA(G_2)에 대응한다. SEQ ID NO:25를 가진 PMO로 처리한 세포는 G_2 시기(21%인 운반체 대조군에 비교해서 9%)에 비해 G_1 시기 세포 비율의 증가(66%인 운반체 대조군에 비교해서 79%)를 보였다. 성장 인자 결핍에 의해 얻은 활동정지된 세포의 포지티브 대조군는 80%의 G_1 세포와 8%의 G_2 세포를 보였다.

안티-c-myc 올리고머 SEQ ID NO:25가 안티센스 기작에 의해 c-myc mRNA 발현을 저해한다는 더 나아간 증거를 얻기 위해, 한 유전자(루시퍼라제) 및 그의 활성(광생성)을 직접 시험하도록, 리포터 유전자 모델 시스템을 제작하였다. myc-루시퍼라제 리포터 플라스미드는 인간 c-myc의 전체 2.2kb 5' 영역을 함유했고 myc 단백질의 첫 6 아미노산 코돈은 곤충 루시퍼라제 cDNA와 융합되었다(Hudzial et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev.10:163-76 (2000) 참조). 이를 Hela 세포로 트랜스펙션시키고, 루시퍼라제-생산 클론을 선택하여 클론 L6으로 명명했다. 이 세포주는 지시된 농도의 PMO로 스크레이프 로딩된 후 재플레이팅되었다. 24 내지 30시간후, 세포는 세포용해되고, 루시퍼라제 활성이 측정되었다(재료 및 방법 참조).

결과는, 300nM의 IC_{50} 에서, 루시퍼라제 생산의 강한 저해를 보였다. 관찰된 루시퍼라제 합성의 저해가 PMO에 의한 서열-특이적 저해 때문인지를 결정하기 위해 몇가지 대조 실험이 수행되었다. SEQ ID NO:25 및 상기된 두 서열 치환(SEQ ID NO:47 및 48)이 비교되었다. 뒤섞인 변형체 및 3-염기 미스매치인 올리고머 중 어느 것도 루시퍼라제 생산에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 다른 대조 실험은, SEQ ID NO:25가 루시퍼라제 검정의 30-시간 인큐베이션 기간동안 Hela 증식에 어떠한 영향도 미치지 않았고, 서열 상보성 작용제가 70%의 저해를 준 조건하에서 비관련 표적 리포터 시스템(토끼 α-글로빈; J Summerton et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.7:63-70, 1997)에 어떠한 영향도 미치지 않았다는 것을 보였다. 3 내지 4개의 연속적인 구아닌(G) 염기를 함유한 다른 서열은 상기된 NRK 세포 증식 검정에서 검사되었고, 20μM이하의 농도에서 세포 증식에 중요한 저해를 주지 않았다.

래트 c-myc의 스플라이스 수용체(SA) 영역에 향하는 PMO 안티센스의 "기능적 풋프린팅"의 평가에서, SA의 -44 상류에서 SA로부터 +36 하류(표적화 영역의 3'말단)까지의 영역을 표적화하는 PMO군을 가지고 스플라이싱에서의 방해를 관찰했다. 표적 서열이 하류로 움직임에 따라, 정상 c-myc에 상대적인, 저분자량 단백질의 비율이 증가되는 것으로 관찰되었다.

아래 논의된 이유로, 스플라이스 수용체 접합부의 하류, 즉 엑손내에서 표적화하는 것이 일반적으로 바람직하다.

IV.SA지점 방해의 중요성

만약 결합하는 올리고머가 SA 지점에서 정상적인 mRNA 스플라이싱을 방해한다면, 스플라이스좀은 영역내에서 다음으로 잘 차단되지 않은 후보 지점으로 나아갈 것이다. 이런 지점은 10 내지 15 염기 상류에 짧은 피리미딘 가닥 및 더 상류에 적당한 분지점을 가지는 [C]AG 서열인 경향이 있다.

결과적인 프로세싱 mRNA는 일반적으로 정상 스플라이스 수용체 지점과 대안적(또는 "잠복성") 스플라이스 수용체 지점 사이의 서열이 결실된 스플라이스 변이체 mRNA일 것이다. 결과적인 변이체 단백질은 결실된 서열에 의존하여 상이한 형태를 취할 수 있다. 예로, 만약 결실된 서열이 완전한 세 염기쌍의 배수를 함유한다면(즉, 하류 스플라이스 수용체 지점이 정상 스플라이스 수용체 지점의 완전한 세 염기 배수 하류에 있다면), 순차적인 서열은 정상 서열과 프래임이 맞을 것이고, 원래 단백질의 일부 절단된 형태가 결과로 나타날 것이다. 이는, 예로서 아래 실시예 C에 기술된 것 같이, 주된 네가티브 단백질의 형성을 허용한다. 그러나, 만약 잠복성 지점이 정상 지점과 프래임이 맞지 않는다면, 비관련 "넌센스" 단백질이 생산될 것이다. 비판독 프레임 서열내에서 정지 코돈의 빈번한 발생(약 20 코돈당 하나)으로 인해, 이러한 스플라이스 변이체 mRNA의 결과로 번역의 조기 종료가 생긴다.

만약 결실된 서열이 AUG 개시 코돈을 포함한다면, 번역은 더 하류에서 발견되는 대안적 AUG 지점에서 일어날 수 있다. 이 경우에도 또한, 이 대체 지점이 정상 AUG 지점과 프레임이 맞는다면, 결과적 단백질은 원래 단백질로부터 몇개의 아미노산의 결실을 가질 것이다. 만약 대안적 지점이 프레임이 맞지 않는다면, 전형적으로 번역 초기에 일부 절단되는 "넌센스" 단백질이 생길 것이다.

한 구체예에서, 아래 실시예 A 및 B에 예시되듯이, 카르복시-말단 일부 절단된 단백질이 야기된다. 또 다른 구체예에서, 아래 실시예 C 및 D에 예시되듯이, 비정상 또는 결실된 아미노 말단을 가진 단백질이 생산된다. 후자는 AUG 번역 개시 지점이 엑손 2 또는 mRNA의 다수에 있을 경우 성립될 수 있다.

그러므로, 원하는 단백질을 위한 사전-mRNA의 서열을 알 때, 안티센스 표적은 단백질의 원하는 영역을 변경시키도록 설계될 수 있다. 바람직하게는, 단백질의 결합 도메인 또한 알려져서, 그런 단백질의 선택된 기능이 변경될 수 있다.

하기 단계는, 발명에 의해서, 다수의 엑손을 가진 유전자를 표적화하는데 이용될 수 있다.

단계 1. 문제의 단백질의 기능적 도메인을 식별한다. 과학적 논문은 이 정보의 대부분을 제공할 수 있다. 한 우수한 자료는, 암 관련 단백질이 재검토되고 그들의 기능적 도메인이 맵핑된, Robin Hesketh, Academic Press, London, 1995에 의한 "The Oncogene FactsBook"이다. 유사하게, "Cytokine FactsBook" (RE Callard 및 AJH Gearing, Academic Press)는 사이토카인의 기능적 도메인을 기술한다. 같은 시리즈의 다른 연구는 "The Protein Kinase Factsbook", "The G-Protein Linked Receptor Factsbook" 및 "The Extracellular Matrix Factsbook"을 포함한다.

단계 2. 엑손/인트론 서열 및 접합부를 포함하는, 유전자 서열에 대한 GenBank 또는 유사한 핵산 데이터베이스를 검색한다.

단계 3. 바람직한 안티센스 표적은 스플라이스 수용체 지점의 대략 35 내지 40 염기 하류에 있다. 바람직하게, 표적 영역은 그의 5'말단을 SA 접합부로부터 1 내지 25 염기 하류의 위치에, 더 바람직하게는 2 내지 20 염기 하류에, 가장 바람직하게는 2 내지 15 염기 하류에 갖는다.(서열이 [C]AG 스플라이스 수용체 지점과 겹치지 않고 한 염기 하류에 직접 접경하고 있으며, 정상 엑손의 첫 염기를 포함하는 것에 주목한다.) 바람직하게, 잠복성 SA의 10 내지 15 염기 상류에 짧은 피리미딘-풍부 영역이 있어야한다.

단계 5. 일단 잠재적 잠복성 SA지점이 식별되면, 그것의 사용이 확실한 지점 및 잠복성 지점간 염기의 수를 3으로 나눔으로써 " 프레임에 맞게 판독" 되는 결과를 낳을지 결정한다. 만일 몫이 정수이면, 결과의 단백질은 " 프레임에 맞을" 것이고, 아마도 주된 네가티브 단백질일 것이다(아래 참조).

따라서, 한 바람직한 구체예에서, 안티센스 표적은 스플라이싱이 프레임에 맞게 판독되는 결과를 낳는 잠복성 지점으로 향하도록 선택된다.

V.표적 단백질 및 선택된 실시예

적당한 표적 단백질은, 예로, 전사 인자, 특히 myc, myb, rel, fos, jun, abl, bcl, 및 p53과 같은 암유발 또는 전구-암유발 단백질; 인테그린 및 카테드린과 같은 기질 단백질; hCG 같은 다른 종양-발현 단백질; 텔로머라제; 수용체 단백질; 사이토카인; 키나아제; 및 HIV rev, 인간 파필로마 바이러스, 인간 파르보바이러스 B19같은 바이러스성 단백질을 포함한다. 이런 단백질의 저해는 수많은 치료적 적용을 갖는다는 것이 인정된다. 이는, 예로 세포 분열 및 세포 주기 조절의 다양한 양태에 관련된 전사인자와 같은, 단백질의 표적화에 의한 항종양 치료법; 감염성 작용제의 복제 및 다른 중요 기능에 본질적인 단백질의 표적화에 의한 항바이러스성 또는 항세균성 치료법; 및 세포의 증식을 지지하는 단백질의 저해에 의한, 재협착 또는 다른 증식이상의 저해를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

전사인자는, 전형적으로 DNA 결합 영역 및 단백질-단백질 결합 영역을 가진, 다중도메인 단백질이다. 이들 영역 중 하나를 방해하는 것은, 단백질 고유의 기능(DNA 결합)에 중요한 또 다른 활성을 저해하는 반면 한 활성(단백질 결합 같은 것)을 유지함(또는 그 반대)으로써 본래 단백질의 활성에 대항하는, 주된 네가티브 단백질을 생산할 수 있다. 아래 기술된 c-myc 예를 참조하라.

위에 언급된 바와 같이, 상기된 많은 표적 단백질의 기능적 도메인은 널리 연구되었고, 논문에 보고되었다. 인트론, 엑손, 및 AUG 개시 코돈의 위치를 포함하는, 사전-mRNA의 서열은, GenBank 서열 데이터베이스 또는 당업자에게 손쉽게 이용가능한 기술의 다른 발행된 자료에서 찾을 수 있다.

다음은, 번역 후에, 특정 변경을 가지고 단백질을 생산하는, 스플라이스변이체 mRNA를 생산하는 선택된 단백질에서 스플라이스 수용체 도메인의 하류에 표적화하는 안티센스의 몇가지 실시예이다.

한 구체예에서, 실시예 A 및 B에 예시되듯이, 카르복시-말단 일부 절단된 단백질이 야기된다. 또 다른 구체예에서, 실시예 C 및 D에 예시되듯이, 비정상 또는 결실된 아미노 말단을 가진 단백질이 생산된다.

A.인간 안드로겐 수용체(GenBank M35845, M35846)

전립선암 분자생물학의 한 재검토는 안드로겐 제거가 당업계 치료법의 상태임을 지적한다. 본 발명에 따라서, 이는 안드로겐 수용체의 불활성에 의해 성취될 수 있다. 엑손 2의 유전자 중앙을 표적화 함으로써, 기능하는 안드로겐 수용체의 발현을 저해하는데 다양한 선택사양이 이용가능하다. 엑손 2(SEQ ID NO:8; GenBank M35845) 및 엑손 3(SEQ ID NO:11; GenBank M35846)에서 스플라이스 수용체의 제안된 표적화가 지시된다.

엑손 1의 말단: 5'-...TGTGTCTTTTCCAG/ ←스플라이스 수용체 지점(SEQ ID NO: 6)
엑손 2: 5'-TTTGGAGACTGCCAGGGACCATG...-3' (SEQ ID NO: 7)
표적 안티센스 서열 :5'-CATGGTCCCTGGCAGTCTCC-3' (SEQ ID NO: 8)

이 올리고머(SEQ ID NO:8)는 정상 스플라이스 수용체 지점의 4 염기 하류에 있는, 염기 48에서 시작하는 서열을 표적화한다. 다음으로 유망한 잠복성 스플라이스 지점은 100번째 염기(97-99의 CAG; 80에서의 분지점 A; 87-92의 피리미딘 영역 상류)이다. 이 지점은 정상 지점의 프레임이 맞지 않으므로 단백질의 조기 종료를 일으킨다.

스플라이스 수용체의 1 내지 약 18 염기 하류에 5'말단을 갖는 서열을 표적화하는 유사한 길이의 올리고머가 또한 사용된다. 이는 서열 5'-TCA ATG GGC AAA ACA TGG TCC CTG GCA GTC TCC AAA-3'(SEQ ID NO:9;GenBank Acc. NO. M35845에 게재된 서열의 염기 45-80과 상보적임)으로부터 선택된 약 18개의 연속적인 뉴클레오티드 길이를 가진 올리고머를 포함한다.

엑손 2의 말단: 5'-...TTTGTGTTCTCCCAG/ ←스플라이스 수용체 지점(SEQ ID NO: 10)

엑손 3: 5'-GGAAACAGAAGTACCTGTGCGCC...-3' (SEQ ID NO: 11)

안티센스 서열 : 5'-GGC GCA CAG GTA CTT CTG-3' (SEQ ID NO: 12)

이 올리고머(SEQ ID NO:12)는, 정상 스플라이스 수용체 지점의 6 염기 하류에 있는, 염기 49에서 시작되는 서열을 표적화한다. 가능한 잠복성 스플라이스 지점은 145번 염기(143-145의 CAG; 114의 분지점 A; 123-127의 피리미딘 영역)이다. 이 지점은 정상 스플라이스 지점과 프레임이 맞으므로 본래 단백질의 카르복시-일부절단 변형체를 일으킨다.

스플라이스 수용체의 1 내지 약 18 염기 하류에 5'말단을 갖는 서열을 표적화하는 유사한 길이의 올리고머가 또한 이용된다. 이는, 예로, 서열 5'-AAT CAT TTC TGC TGG CGC ACA GGT ACT TCT GTT TCC-3'(SEQ ID NO:13;GenBank Acc. NO. M35846에 게재된 서열의 염기 44-79와 상보적임)으로부터 선택되는 약 12 내지 20개의 연속적인 뉴클레오티드 길이를 가진 올리고머를 포함한다.

B.인간 융모성 성선자극호르몬 (β서브유닛)(GenBank X00266)

hCG의 β서브유닛은, hCG에 신장된 COOH말단을 제외하면 황체형성 호르몬(LH)과 거의 동일하다. 이런 신장은 유전자의 엑손 3에 있다. 엑손 3의 SA 지점을 방해함으로써, hCG는, 양 쪽 단백질에서 고도로 보존된 AUG 번역 개시지점의 표적화와는 달리, LH를 표적화하지 않고 일부절단될 수 있다.

서열 5'-CCC CTG CAG CAC GGG GGT-3'(SEQ ID NO:14)를 가진 올리고머는, 1321-1338 염기 유래의 서열을 표적화하는, SA(1318-1320의 CAG)에 인접한(직접 접경한) 엑손 3에 결합하고, 이 지점에서 스플라이싱을 방해한다. 5'말단을 1322, 1323, · · · 약 1340 염기에 가지는 서열을 표적화하는 유사한 길이의 올리고머가 또한 이용될 수 있다. 이는, 예로, 5'-GAG GCA GGG CCG GCA GGA CCC CCT GCA GCA CGC GGG T-3'(SEQ ID NO:15; Genbank Acc. No. X00266에 주어진 서열의 1321-57 염기에 상보적) 서열로부터 선택되는 약 18 내지 20 개의 연속적인 뉴클레오티드 길이를 가진 올리고머를 포함한다.

가능한 잠복성 SA 지점은 1393번째 염기(1391-2의 AG; 1370 또는 1373의 분지점 A; 프레임이 맞음) 및 1458번째 염기(1455-7의 CAG; 1427의 분지점 A; 프레임이 맞지 않음)이다. 어느 한쪽에서의 스플라이싱은 단백질에서 적어도 24개의 아미노산을 결실시키며, 프레임이 맞지 않는 지점이 사용될 경우, 더 많은 수가 가능하다. hCG는 오직 종양세포에서만 발현되므로, 이는 더 적은 단백질이 발현되고, 단백질이 더 짧은 생물학적 반감기를 가진다는 점에서, 치료적으로 유익하다. 더구나, 일부 절단된 단백질은 COOH말단에, hCG에 대한 면역반응을 생산하여 백신화 전략에 유용한, 보기드문 아미노산을 가질 수 있다.

C.인간c-myc(GenBank J00120)

c-myc은 세포 성장 및 분화를 조절하고 혈관 개작, 평활근 세포 증식, 세포외적 기질 합성 및 아폽토시스의 과정에 관련된 원-종양유전자다. c-myc의 탈선적 발현은 인간 암에서 빈번하게 관찰된다. c-myc의 탈선적, 구성적 또는 과발현은 폐암, 결/직장암, 유방암, 방광암, 백혈병 등을 포함하는 수많은 인간 암에 연관된다. c-myc의 저해가 재협착의 발병률 및 심각성을 줄인다는 것이 또한 증명되었다.

c-myc 단백질은 서열의 아민-말단 부위에 DNA 결합 도메인 및 카르복시-말단 부위에 단백질-단백질 상호작용 도메인을 가진다. E-Box(5'-CACGTG-3')이라고 알려진 DNA 서열과 결합할 수 있는 이형이합체를 형성하기 위해, c-myc이 카르복시 도메인의 Max와 결합한다고 알려졌다. myc:max가 이런 방식으로 결합할 때, 표현형은 성장 자극성이고 아폽토시스를 유발할 수 있다.

만일 myc 농도가 낮으면, max는 트랜스활성화 하지 않는 동형이합체를 형성한다. 만일 mad 단백질이 유도되면, max는 mad와 결합하여, 분화를 유도하는 경향이 있고 항-아폽토시스성, mad:max 이형이합체를 형성한다.

그러므로, c-myc를 단순히 저해하는 것은, 항-아폽토시스성, mad:max 표현형의 결과가 되는 경향이 있다. 그러나, 단백질-단백질 결합(카르복시-말단) 도메인은 그대로 남겨진 반면, 만일 c-myc의 DNA 결합(아민-말단) 도메인이 저해되면, 결과는 max와의 결합은 가능하지만 트랜스활성화는 불가능한 주된 네가티브 단백질이다. 유리한 표현형은 성장 자극성 활동의 손실이겠지만, max 단백질이 여전히 myc COOH 도메인과 결합할 수 있기 때문에, mad:max의 보상성 항-아폽토시스 활성은 유력하지 않다.

아민-말단 도메인의 저해는 스플라이싱의 변환을 지도하는 안티센스 화합물의 적절한 설계에 의해 성취될 수 있다. 잠복성 (대안적) SA 지점은:

4547 가능 후보; 4554에 있는 다음 AUG는 프레임이 맞지 않고, 그러므로

비관련(" 넌센스") 단백질을 생산한다. (SEQ ID NO:13보다 더하류쪽에

표적화되는 올리고머에 의해 차단될 수 있다.)

4578 상류의 적은 피리미딘으로 인해, 불량한 SA 후보

4617 양호한 SA 후보; AUG 하류의 다음이, 4521에 있는 정상 AUG의 프레임

과 맞는, 4821에 있다.

상기된 바, 4504-5에 있는 스플라이스 수용체 지점 AG의 10 염기 하류(SEQ ID NO:25, 5'-ACG TTG AGG GGC ATC GTC GC-3'), 인간 c-myc mRNA 서열(Genbank Acc. No. J00120)의 4515에서 4534의 염기와 상보적인 서열을 갖는 모르폴리노 올리고머(PMO)는 이 지점에서의 적당한 스플라이싱 및 4521에 있는 정상 AUG 번역 개시 지점의 사용을 방해하는 것으로 발견된다. 생산되는 mRNA의 분석은 위에 지적된 4617 지점의 사용을 지적한다. 정상 AUG의 300 염기 하류인, 4821에 있는 AUG에서의 번역 개시는 N-말단에 100 아미노산 결실을 가진 (Giles et al.에 의해 또한 보고된 것과 같은) 단백질을 생산한다. myc의 COOH 말단에 대한 항체의 이용은, 실질적으로 안티센스 올리고머로 처리된 세포 유래의 실질적으로 더 작은 단백질 뿐만 아니라, 이 단백질도 드러냈다. 이들 N-말단 일부 절단된 단백질은 max와 결합하고 DNA와는 결합하지 않을 것으로 기대된다.

이러한 결과는, 프라이머-증폭된 mRNA의 실험과 더불어, 4617의 잠복성 스플라이시 지점 뿐만 아니라 더 하류쪽의 다른 잠복성 지점의 사용을 증명한다.

위에 언급된 바와 같이, SA의 상류 -44에서 SA로부터 하류 +36까지의 영역에 표적화된 PMO 올리고머는 래트 c-myc에서 스플라이싱 방해의 증거를 보였다. 올리고머의 길이를 약 20 염기로 가정하여, 다음 안티센스 염기가 인간 c-myc의 표적화에 이용될 수 있다:

안티센스 서열	SA지점의 하류 염기 (서열의 5'말단)	SEQ ID NO:
5'-GGCATCGTCGCGGGAGGCTG-3'	1	16
5'-GGGCATCGTCGCGGGAGGCT-3'	2	17
5'-GGGGCATCGTCGCGGGAGGC-3'	3	18
5'-AGGGGCATCGTCGCGGGAGG-3'	4	19
5'-GAGGGGCATCGTCGCGGGAG-3'	5	20
5'-TGAGGGGCATCGTCGCGGGA-3'	6	21
5'-TTGAGGGGCATCGTCGCGGG-3'	7	22
5'-GTTGAGGGGCATCGTCGCGG-3'	8	23
5'-CGTTGAGGGGCATCGTCGCG-3'	9	24
5'-ACGTTGAGGGGCATCGTCGC-3'	10	25
5'-AACGTTGAGGGGCATCGTCG-3'	11	26
5'-TAACGTTGAGGGGCATCGTC-3'	12	27
5'-CTAACGTTGAGGGGCATCGT-3'	13	28
5'-GCTAACGTTGAGGGGCATCG-3'	14	29
5'-AGCTAACGTTGAGGGGCATC-3'	15	30
5'-AAGCTAACGTTGAGGGGCAT-3'	16	31
5'-GAAGCTAACGTTGAGGGGCA-3'	17	32

myc의 단백질-단백질 결합 (카르복시 말단) 도메인은 또한 다음과 같이 변환될 수 있다. 안티센스 서열 5'-TCC TCA TCT TCT TGT TCC TC-3'(SEQ ID NO:33)을 가진 올리고머는, 염기 6654-5에 있는 스플라이스 수용체의 하류, 염기 6656을 표적화한다. 잠복성 SA 지점은 염기 6704, 6710, 및 6729(6702-3의 AG; 6707-09의 CAG; 6726-8의 CAG; 6684의 분지점 A; 6690에서 시작하는 피리미딘-풍부 영역) 하류에 있을 가능성이 높다. 이들에 있어서, 첫 두개는 프레임이 맞지 않고 세번째는 프레임이 맞는다. 세번째 지점의 이용은 mRNA로부터 75 염기쌍의 결실을 생산하여, myc 단백질의 단백질-단백질 결합 도메인에서 25 아미노산 결실을 일으킬 것으로 기대된다. DNA 결합은 가능할 수 있지만 어떠한 myc:max 트랜스활성화도 없을 것이므로, 이 단백질은 역주된 네가티브가 될 수 있다. myc의 기능은 상실되지만, mad:max 이형이합체는 촉진되어, 분화 및 항-아폽토시스 표현형이 관찰될 것이다.

위에 언급한 바와 같이, SEQ ID NO:33과 관련된, 점진적으로 더 먼 하류에서 표적화되는 올리고머들 또한 이용될 수 있다. 이는, 예로, 서열 5'-AAC AAC ATC GAT TTC TTC CTC ATC TTC TTG TTC CTC-3'(SEQ ID NO:34; Genbank Acc. No. J00120에 게재된 서열의 염기 6656-91과 상보적임)으로부터 선택되는 약 18 내지 20의 연속적인 뉴클레오티드의 길이를 가진 올리고머를 포함한다. 발명에 따라서, 충분히 하류에 표적화되어 위에 언급된 첫번째 두 잠복성 지점에서의 스플라이싱을 저해할 수 있는 올리고머는 세번째 잠복성 지점에서의 스플라이싱을 촉진시키는데 효과적일 수 있다.

D.인간 p53(GenBank X54156)

c-myc와 같이, p53은 비-코딩 엑손1, 긴 인트론 1 및 엑손 2의 SA 지점 근처에 AUG 개시 코돈을 가진다. 예로, 그것의 5'말단을, SA 지점의 3 염기 하류인, 염기 11691에 가진 영역에 표적화된 올리고머(5'-CCC GGA AGG CAG TCT GGC-3'; SEQ ID NO:35)는 엑손 2의 정상적인 스플라이싱 뿐만 아니라 AUG 개시 지점에서의 번역도 방해할 것으로 기대된다. c-myc에 대해 위에서 언급한 바와 같이, 다른 적당한 올리고머는 SA 지점의 하나 또는 두개의 염기 하류에 표적화되는 것, 또는 예를 들어, 염기 11691, 11692등에서의 시작되는, 점진적으로 더 먼 하류에 표적화되는 것, 및 염기 11689(정상 엑손 2의 첫 염기) 및 염기 11725 간 영역의 어떤 부분을 표적화하는 것을 포함한다. 이는, 예로, 서열5'-TCC TCC ATG GCA GTG ACC CGG AAG GCA GTC TGG CTG-3'(SEQ ID NO:36; Genbank Acc. No. X54156에 게재된 서열의 염기 11689-11724에 상보적임)으로부터 선택되는 약 18 내지 20 의 연속적인 뉴클레오티드 길이를 갖는 올리고머를 포함한다.

잠복성 SA 지점은 염기 11761(11759-60의 AG)및 염기 11765(11762-4의 CAG)(11736의 분지점A; 11750-57의 피리미딘 영역)에서 이용가능하다. 염기 11782의 다음 AUG는 프레임이 맞지 않아서, 넌센스 단백질을 일으킬 것이다. 대안으로, 개시가 엑손 3에서 시작되어, p53 아미노 말단이 없는 일부 절단된 p53-형 단백질을 생산할 수 있다.

다음은 스플라이스 수용체의 표적화가 특히 유리한 곳에서의 예이다.

E.인간 (Abl) (GenBank AJ131466)

만성 골수 백혈병(CML)에서, bcr 유전자가 분해되고 abl과 융합하여, bcr-abl 융합 단백질을 형성하기 때문에, 이는 안티센스 저해의 표적이 된다. abl에 대하여, 융합은 다양한 위치에서 일어날 수 있다; 즉, bcr의 엑손 1,2 및 3의 분열 후 abl의 엑손 2와 융합한다. 그러나, abl 스플라이스 수용체의 표적화에 의해, 오직 하나의 올리고머만이 모든 CML 환자의 치료에 요구된다.

bcr-abl 융합점은 염기 373-374의 접합부이다. 그러므로, abl 스플라이스 수용체는, 이 접합부의 3 염기 하류에 있는 다음 서열에 의해 표적화될 수 있다: 5'-CTA CTG GCC GCT GAA GGG C-3'(SEQ ID NO:37).

게다가, 스플라이스 접합부와 스플라이스 접합부의 약 35 내지 40 염기 하류 사이의 영역을 표적화하는 다른 올리고머가 또한 이용될 수 있다. 이는, 예로, 서열 5'-GCT CAA AGT CAG ATG CTA CTG GCC GCT GAA GGG CTT-3'(SEQ ID NO:38; Genbank Acc. No. AJ131466에 게재된 서열의 염기 374-409에 상보적임)으로부터 선택된 약 18 내지 20의 연속적인 뉴클레오티드의 길이를 갖는 올리고머를 포함한다. 가능한 잠복성 스플라이스 지점(양쪽 모두 프레임이 맞지 않음)은, 453-459에 상류 피리미딘 영역 및 421에 A 분지점을 가진 468-70 및, 507-510에 상류 피리미딘 영역 및 485에 A 분지점을 가진 516-518의 CAG 모티프를 포함한다.

F.HIV-1(GenBank L39106)

이 실시예는 발명의 방법이 특별한 이점을 제공하는; 즉, 표적 바이러스 및 숙주(인간) 둘 모두 같은 mRNA 서열을 가진 유전자를 발현하는 상황을 설명한다. 단백질 산물은 바이러스와 숙주 둘 모두의 기능에 중요하지만 상이한 기능을 제공한다.

바이러스성 복제에 결정적인 단백질(H Mitsuya et al., Science249:1533-1543, 1990 참조)을 암호화하는 HIV-1 rev의 mRNA는 숙주에서도 또한 발생하는 것으로 발견되어, 이 서열이 안티센스에 의해 저해받을 때 독성 효과를 유도한다. 구체적으로, 서열 5'-TCG TCG GTC TCT CCG CTT CTT CTT GCC-3'(SEQ ID NO:39)을 갖는 포스포로티오에이트 올리고머는 HIV-1 rev를 저해하는데 이용되었다 (Matsukura et al., PNAS USA86:4244-4248, 1989). rev의 이 영역은 HIV에서 고도로 보존적이다; 따라서, 매우 다양한 바이러스 분리체가 저해될 수 있게 하기 위해 이것이 표적화되었다.

그러나, 이 27-합체의 예비임상적 개발은 연속적 주입에 의해 처리된 붉은털 원숭이의 2/3가 기회감염으로 보이는 것에 의해 죽었을 때 종결되었다. 과도한 내부독소양이 의심되어, 내부독소의 제거를 주의하며, 실험이 반복되었다. 그러나, 두 게잡이 원숭이 또한 반복된 연구에서 연속적인 주입의 8 및 9일째 죽었다. 내부독소가 고려할 사항으로부터 효과적으로 제거되었기 때문에, 면역억제가 이유로서 제시되었다. 세 붉은털 원숭이에서 백혈구(WBC)의 수는 HIV-rev에 대한 안티센스 포스포로티오에이트를 주입하기 전에는 9.5±0.7이었고, 주입 중에는 6.9±0.6으로 떨어졌다. 적혈구 또는 적혈구용적률에는 어떤 연관된 변화도 없었다. 나아가, 면역 반응에 관계된 세포에 대한 표면 마커 연구가 영향을 미쳤다: CD2는 88에서 76으로 감소했고, CD8은 45에서 36으로 떨어졌으며, CD20은 14에서 18로 증가했다.

인간과 원숭이의 게놈에서 관찰되는 HIV-rev에 대한 상동영역은 J. Virology66:2170-2179(1992)에 보고되어서, 이 독성 효과를 설명했다.

본 방법에 따라서, 숙주의 프로세싱을 덜 방해할 것 같은 대안적 서열이 선택될 수 있다. 본 발명에 따라서, HIV-rev는 다음과 같이 억제될 수 있다.

단백질은 두 엑손: 엑손 1, 5493..5568, 76 염기; 및 엑손 2, 7885..8180, 296 염기; 총 124 아미노산 (Genbank L39106)에 의해 암호화된다. 스플라이스 접합부(즉 정상 엑손 2의 첫 염기) 및 스플라이스 접합부의 약 35 내지 40 염기 하류사이 영역에 표적화되는 RNA분해효소 H-무력 올리고머는 사전-mRNA의 스플라이싱을 방해할 것으로 기대된다. 위에 명기한 바와 같이, 표적화되는 영역의 5'말단은 바람직하게 스플라이스 접합부의 1 내지 약 25 염기 하류에 있다. 이러한 올리고머의 한 예는, 서열 5'-CTC TGG TGG TGG GTA AGG GT-3'을 가진, 염기쌍 7885-7904에 표적화되는 PMO이다. 다른 후보는 서열 5'-CGG GTC TGT CGG GTT CCC TCT GGT GGT GGG TAA GGG T-3' (SEQ ID NO:41; Genbank Acc. No. L39106)으로부터 선택된 약 18 내지 20의 연속적인 뉴클레오티드 길이를 갖는 올리고머를 포함한다.

잠복성 스플라이스 수용체의 가장 유망한 지점은, AG로부터 10 염기 이상 상류에 다수의 피리미딘이 AG서열을 선행하는, 염기 7975 지점이다. 만일 이 잠복성 스플라이스 수용체가 사용되면, 90 염기,또는 30 아미노산의 결실이 일어날 것이다. 이 결실은 효과적인 바이러스성 rev 유전자 기능을 방해할 것이다.

VI.스플라이스 수용체 표적화의 효과 분석

스플라이스 변이체 mRNA를 생산하는 특정 안티센스 서열의 효과는 알려진 분석 방법에 의해 결정될 수 있다. 예로, 암호화된, 전장 단백질 및 일부 절단된 또는 다른 변이체 단백질의 존재 또는 부재는 ELISA 또는 웨스턴 블라팅같은 표준 기술에 의해 모니터링 될 수 있다. 단백질의 특이적 영역, 예들 들어 카르복시 또는 아미노 말단에 표적화된 항체가 또한 채택될 수 있다.

mRNA구조가 분석되어 안티센스 올리고머로 유도되는 잘못된 스플라이싱을 평가할 수 있다. 핵 RNA의 회복은, 핵이 인트론 제거의 장소이므로, 인트론-함유 hnRNA를 관찰하는데 필수적이다. 핵 RNA의 준비는 " Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (T. Maniatis, E.F. Fritsch and J.Sambrook, eds., Cold Spring Harbor Press) 또는 " Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc)와 같은 서적에 기술된다. hnRNA의 분석은 노던 블럿 또는 S1 맵핑에 의해 가장 잘 수행된다. 특정 스플라이스 변이체 성숙 mRNA의 존재는, 특이적 스플라이스 변이체 (또는 정상) 프로세싱 mRNA에서 일어날 것으로 예상되는 서열을 가진, 선택된 프라이머 쌍을 이용한 PCR 증폭을 수행함으로써 결정될 수 있다. 한 프라이머는 스플라이스 지점의 상류 SD(스플라이스 공여체) 엑손에 위치하고, 두번째는 스플라이스 지점의 하류, SA(스플라이스 수용체)에 위치한다. 올리고머가 SA지점을 방해하므로, 하류 프라이머는 SA 스플라이스 지점으로부터 50 염기 이상 하류에 있어야 한다. 아가로스 겔 상에서 에티디움 브로미드로 염색된 PCR 반응의 분석은, 올리고머에 의한 SA 지점의 차단 증거로서, 미처리 대조군 세포로부터 관찰되는 밴드보다 더 작은 크기의 증폭된 밴드를 드러낼 것이다.

VII. 방법의 이점

본 발명은 단백질 발현의 저해 또는 변경이, 사전-mRNA의 코딩 영역에서 비-RNA분해효소 무력 올리고머를 이용하여, 스플라이스 수용체의 하류 영역을 표적화하는 안티센스에 의해 성취될 수 있음을 설명한다. 본 조성물 및 방법은, 표적화하는 안티센스 화합물이 스플라이스 수용체 서열에 걸쳐있고 이와 혼성화하는 (예로, Giles, 상기 인용된; Kole 및 Dominski, 미국 특허 번호 5,665,593), 종래 기술의 안티센스 저해 방법보다 여러가지 이점을 가진다.

이러한 이점 중 하나는 엑손 서열이 인트론보다 종간에 훨씬 더 고도로 보존되는 경향이 있다는 점이다. 이는 동물 모델에 대한 방법 같은 시험에 있어서 더욱 광대한 예측가능성을 허용한다.

더구나, 올리고머는 스플라이스 수용체 접합부 또는 AUG 개시 코돈과 같은 바로 그 지점에 실제로 결합하는데 요구되지 않으므로, 더 광대한 유동성이 표적화를 위한 서열의 선택에 있어 허용된다. 그러므로 본 발명은 안티센스 적용에서 성공적으로 표적화될 수 있는 서열의 범위를 증가시킨다. 이러한 유동성은, 대상에서 비-표적 단백질의 의도되지 않은 표적화, 또는 바이러스나 세균과 같은 감염성 작용제를 공격할 때 숙주 단백질의 표적화에 의해 야기되는 것 같은, 바람직하지 않은 부반응을 피하는데 유리할 수 있다. 이것은 위의 실시예 F에서 증명된다.

본 전략에 있어서, 스플라이스 접합부를 직접 표적화하는 방법과는 대조적으로, SA 지점의 하류쪽 엑손의 다양한 영역이 차단될 수 있다. 이는 정상 SA의 하류쪽 상이한 잠복성 스플라이스 지점으로 스플라이싱을 지시함으로써, 상이한 변이체 단백질의 생산 가능성을 연다. 위에 기술된 바와 같이, 주된 네가티브 단백질 같은, 어떤 변이체 단백질은 고유의 이점을 가질 수 있다. 따라서, 안티센스는, 원하는 변이체 단백질로 되는, 특정 잠복성 스플라이스 지점에서 스플라이싱을 촉진시키도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 정상 SA 지점과 근접한 덜 바람직한 잠복성 스플라이스 지점은 더 하류쪽 지점에 의해 방해될 수 있다.

설계의 유동성의 나아간 장점은 합성의 편리함 또는 증강된 결합 친화도를 포함할 수 있다. 더구나. 엑손 내에서 완전히 표적화하는 본 전략을 이용함으로써, 표적 RNA는 핵 또는 세포질 중 하나에 있는 안티센스 올리고머에 의하여 식별될 수 있는데, 이는 분석의 목적에 유리할 수 있다.

VIII. 치료 방법

한 관련된 양태에서, 발명은 표적 단백질의 발현을 저해 또는 변경시킴으로써 병적 상태를 치료하거나 예방하는 방법을 포함한다. 이러한 병적 상태는 바이러스성, 세균성 또는 균성 감염, 암성 종양 및, 재협착, 과증식성 피부이상, 또는 염증 같은 세포성 증식에 의해 특성 결정되는 다른 조건을 포함한다. 위에 언급된 바와 같이, 표적화된 단백질은, 다수의 암유전자. 수용체 단백질, 기질 단백질, 및 바이러스성 단백질을 포함하는, 전사 인자를 포함한다. 이러한 단백질의 저해는 일반적으로 세포주기의 방해, 바이러스성 복제, 또는 다른 결정적 기능을 일으킨다.

(i)표적 영역의 5'말단이, 사전프로세싱된 mRNA에서 정상 스플라이스 수용체 지점의 1 내지 25 염기 하류, 바람직하게는 2 내지 25 염기 하류에 있는, 선택된 사전프로세싱된 mRNA의 표적 영역과 상보적인 염기서열, 및 (ii)비하전 모르폴리노 백본, 바람직하게, X, Y, 및 Z가 위에 정의된 것과 같은 도 2B-B에서 도시된 포스포로디아미데이트 백본을 가진, 12 내지 25 뉴클레오티드 길이의 안티센스 올리고머를 피험체에 주입함으로써 방법을 수행했다. 바람직하게, 화합물은 화합물의 용해도를, 바람직하게는 수성 배지에서 25 내지 50mgs/ml 또는 그 이상, 증강시키는 부분을 또한 포함한다. 한 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 사슬이다.

일반적으로, 방법은, 정상 스플라이스 수용체 지점에서 스플라이싱을 방해하기에 효과적인 안티센스 작용제의 양을, 적당한 약제학 담체 중에서, 피험체에게 투여하는 것, 및 그럼으로써 단백질의 정상 발현을 억제하는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 방법은 단백질의 주된 네가티브 변이체의 발현을 일으켰다. 방법의 한 양태에서, 피험체는 사람이다.

표적 mRNA에 대한 안티센스 올리고머의 효과적인 전달은 방법의 중요한 양태이다. PMO는 효과적인 세포 유입을 보였다 (J Summerton et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev.7:63-70, 1997 및 공동계류중이고 공동소유된 미국 가출원 60/117,846 참조). 항바이러스성 치료에의 이용을 위해, 흡입, 경피적 및 국부성 전달 뿐만 아니라 경구 및 비경구, 예로 정맥내, 피하, 복강내 및 근육내 경로를 포함하는, 전달의 다양한 전신경로가 이용될 수 있다.

전형적으로, 약 1 내지 2주의 정기적인 간격에서, 하나 이상의 안티센스 올리고머 복용량이 투여된다. 경구투여를 위한 바람직한 복용량은 약 1mg 올리고머/환자에서 약 25mg 올리고머/환자(체중 70kg에 기준)이다. 몇몇 경우에서, 25mg 올리고머/환자보다 더 많은 복용량이 필요할 수 있다. IV 투여를 위해, 바람직한 복용량은 약 0.5mg 올리고머/환자에서 약 10mg 올리고머/환자(성인 체중 70kg 기준)이다. 투여량은 환자의 나이, 건강, 성별, 신장 및 체중, 투여 경로, 및 특정한 병적 상태에 대한 올리고뉴클레오티드 작용제의 효능에 따라서 변화할 것이다. 감염성 작용제의 치료를 위해, 바람직한 투여량은 전형적으로 약 0.01에서 약 1μM, 및 더 바람직하게는 약 200 내지 400nM의 혈중 안티센스 올리고머 농도에 이르는데 필요한 양이다. 이 농도는 다양한 방법으로 이루어질 수 있다; 연속적인 IV주입에 의한 약 0.05와 약 0.2mg/kg/시 간의 복용량이 허용되는 것으로 밝혀졌다. 더 과량 또는 더 소량의 올리고뉴클레오티드가 필요에 의해 투여될 수 있다.

과증식성 피부이상의 치료를 위해, 국소 투여가 지시된다. 재협착의 치료에 있어서, 영향받은 세포, 즉 동맥 손상의 지점으로의 안티센스 올리고머 전달이 권장된다. 공동소유이고 공동계류중인 미국 출원 번호 09/493,427에 기술된 것과 같은, 분야에 알려진 전달 방법은 올리고머를 환자의 혈관확장술 지점에 전달하는데 이용될 수 있다. 성인에 있어서, 권장되는 투여량은 안티센스 올리고머의 1 내지 25μmol, 바람직하게는 2 내지 15μmol 이다. 치료될 조직의 표면 영역에 대하여, 효과적인 복용량은 전형적으로 혈관벽의 ㎠ 당 30 내지 300μg, 더욱 바람직하게는 약 300 내지 1500μg/㎠ 이다. 환자는 재협착을 더욱 저해하기에 충분한 투여량 정도로, 혈관확장술 후 주기적인 기초상의 조성물을 받을 수 있다.

본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용하는 효과적인 생체내 치료 섭생은 치료 중에 있는 대상의 상태 뿐만 아니라, 투여의 빈도 및 경로에 따라서 다양해질 것이다. 주어진 경로로의 최적 투여량은 당업계에 알려진 방법에 따른 일상적인 실험에 의해서 결정될 수 있다. 이러한생체내 치료법은 일반적으로 치료중인 병의 특정 유형에 적당한 검사에 의해 모니터링되고, 최적 치료상의 결과를 이루기 위해 투여량 또는 치료 섭생에서의 대응하는 조정이 만들어질 수 있다.

모르폴리노 올리고머의 세포내 유입 및 그의 표적 RNA와의 결합은, 여기 참고문헌으로 수록된, 공동계류중이고 공동소유인 미국 가출원 60/117,846에 상세히 명시되어 있는 기술에 의해 입증될 수 있다. 여기 개시된 유형의 모르폴리노 안티센스 화합물은, 생체내로 투여되었을 때, 안티센스 화합물 및 그것의 RNA 상보일부분을 구성하는 헤테로이중체 형태로 수여되는 피험체의 소변에서 검출된다. 이는 안티센스 화합물이 표적 조직에 의해 흡수되었다는 것을 증명하고 당업자로 하여금 치료방법의 효과, 예를 들어 다양한 투여 양식의 효과 및 소변내 헤테로이중체의 최대 또는 근-최대 농도를 부여하는 투여량을 모니터하도록 허용한다.

IX. 제제

모르폴리노 안티센스 올리고뉴클레오티드 화합물은 어떠한 편리하고 생리학적으로 허용가능한 매체로 투여될 수 있다. 표준 약제학적으로 허용가능한 담체의 예는 식염수, 인산완충 식염수(PBS), 물, 수성 에탄올, 기름/물 에멀젼, 트리 글리세리드 에멀젼, 습윤제, 정제 및 캡슐을 포함한다. 적당하고 생리학적으로 허용가능한 담체의 선택은 투여의 선택된 양식에 따라 다양해질 것으로 이해될 것이다.

일반적으로, 활성 화합물 외에, 본 발명의 약제학적 조성물은 활성 화합물을 약제학적으로 사용할 수 있는 제제로 프로세싱시키는 것을 용이하게 하는 적당한 첨가제 및 보조제를 함유할 수 있다. 적당한 첨가제는 당류, 예를 들어 유당, 자당, 마니톨 또는 소르비톨, 셀룰로오스 제제, 인산칼슘과 같은 충전제, 및 녹말, 겔라틴, 메틸 셀룰로오스, 수산화프로필메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 및/또는 폴리비닐 피롤리돈과 같은 결합제를 포함한다. 필요하다면, 카르복시메틸 녹말, 가교-결합된 폴리비닐 피롤리돈, 한천, 알긴산, 또는 그것의 염 뿐만 아니라, 위에 언급된 녹말과 같은 붕괴성 작용제가 첨가될 수 있다. 보조제는 유체-조절 작용제 및 윤활제, 예로 규토, 활석, 스테아르 산 또는 그것의 염기, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

경구 투여를 위해서, 위액에 내성이 있는 적당한 코팅과 더불어 당의정이 제공될 수 있다. 위액에 내성이 있는 코팅을 생산하기 위해, 아세틸셀룰로오스 프탈산염 또는 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 프탈산염 같은, 적당한 셀룰로오스 제제의 수용액이 이용된다. 농축된 당 용액이 또한 이용될 수 있는데, 이는 아라비아 고무, 휘석, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌글리콜, 및/또는 티타늄 디옥시드, 래커 수용액, 및 적당한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 선택적으로 포함할 수 있다.

경구적으로 이용될 수 있는 다른 약제학적 제제는 젤라틴 및 글리세롤 또는 소르비톨 같은 가소제로 만든 연질, 봉합 캡슐뿐만 아니라, 젤라틴으로 만든 푸쉬-핏(push-fit) 캡슐을 포함한다. 푸쉬-핏 캡슐은 유당과 같은 충전제, 녹말과 같은 결합제, 및/또는 활석 또는 스테아르산 마그네슘과 같은 윤활제 및, 선택적으로, 안정제와 혼합될 수 있는 과립의 형태로 활성 화합물은 함유할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 화합물은, 지방유, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜과 같은, 적당한 액체에 바람직하게 용해되거나 현탁된다. 그 위에, 안정화제도 첨가될 수 있다.

직장으로 이용될 수 있는 약제학적 제제는 예로, 활성 화합물과 좌약 기본물질의 조합으로 구성된 좌약을 포함한다. 적당한 좌약 기본물질은 자연산 또는 합성 트리글리세리드, 파라핀 하이드로카본, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 고급 알카놀을 포함한다. 더구나, 활성 화합물과 기본물질의 조합으로 구성된 젤라틴 직장 캡슐을 이용하는 것이 가능하다. 가능한 기본물질 재료는 액체 트리글리세리드, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 파라핀 하이드로카본을 포함한다.

비경구적 투입을 위한 적당한 액체 제제는 수용성 또는 수분해가능 형태인 활성 화합물의 수성 용액을 포함한다. 또한, 적절한 유성 주사 현탁액과 같은 활성 화합물의 현탁액이 투여될 수 있다. 적당한 친유성 용매 또는 매개체는 지방유, 예로, 참기름, 또는 합성 지방유 에스테르, 예로, 에틸 올레산염 또는 트리글리세리드를 포함한다. 수성 주사 현탁액은 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨, 및/또는 덱스트란과 같은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 현탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다.

전통적인 담체와의 투여외에, 활성 성분은 다양하고 특수화된 송달 기술에 의해 투여될 수 있다. 예로, 본 발명의 화합물은 리포솜에 캡슐화되어 투여될 수 있다.(예로, Williams,S.A,. Leukemia10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen et al., Antiviral Res.23:119, 1994; Uhlmann et al., " Antisense Oligo-nucleotides:A New Therapeutic Principle" , in Chemical Reviews, Volume 90, No. 4, pp544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, " Liposomes" ,in Drug Carriers in Biology and Medicine, pp287-341, Academic Press, 1970 참조.) 활성 성분은, 그것의 용해도에 따라, 수성 상태 및 지질 막(군) 양쪽, 또는 일반적으로 리포솜 현탁액이라 불리우는 것중에 존재할 수 있다. 지질 막은 일반적으로, 레시틴 또는 스핑고미엘린과 같은 인지질, 콜레스테롤과 같은 스테로이드, 디아세틸포스페이트와 같은 이온성 계면활성제, 스테아릴아민, 또는 포스파티딕 산, 및/또는 다른 소수성 물질을 포함한다. 리포솜의 지름은 일반적으로 약 15nm 내지 약 5미크론 범위이다.

하이드로겔은, 예로 WO 93/01286에 기술된 것과 같이, 안티센스 올리고머 투여를 위한 운반체로써 또한 이용될 수 있다. 대안으로, 올리고뉴클레오티드는 미세구상체 또는 미세입자로 투여될 수 있다.(예로, Wu GY and Wu CH, J. Biol. Chem.262:4429-4432, 1987 참조.) 이러한 매개체는 특히 국소 투여 또는 재협착의 치료에 적당하다.

안티센스 올리고머의 경피적 송달은, 국부성 투여에 적응된, 약제학적으로 허용 가능한 담체의 사용에 의해 달성될 수 있다. 모르폴리노 올리고머 송달의 한 예는 PCT 특허 출원 WO 97/40854에 기술된다. 다른 지속 배출 조성물은 이 출원의 범위 내에서 또한 고려된다. 이는 필름 또는 미세캡슐과 같이 형상화된 물체의 형태로 반투과성 중합체적 기질을 포함할 수 있다.

이러한 투여량 형식을 제작하는 방법은 당업계 숙련자들에게 알려지거나 명백해질 것이다; 예로, Remington's Pharmaceutical Sciences (19th Ed., Williams & Wilkins, 1995)를 참조하라. 약제학적 제제는 당업계 주지인 절차에 따라 제조된다. 예로, 그것은 종래의 혼합, 과립화, 당의-생성, 용해, 또는 동결건조 과정에 의해 제조된다. 이용되는 과정은 이용되는 활성 성분의 물리적 특징에 궁극적으로 의존될 것이다.

실시예

재료 및 방법

올리고머

PMO는, 예로 Summerton and Weller, Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.7:187-95, 1993; 미국 특허 번호 5,185,444, 1997에 기술된 방법에 의해 AVI BioPharma에서 합성되었다. 올리고머는 이온교환 크로마토그래피에 의해 정제되었고 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 및 질량분석법에 의해 순도 분석되었다. 전장 산물의 양은 일반적으로 > 90%이었다. 사용에 앞서, 증류수에 농축된 원액으로 제작하여 4℃에 보관하였다.

세포배양

세포는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC, Rockville, MD)로부터 얻거나, 본 연구실 유래이었다. 글루타민(2mM), 스트렙토마이신(100μg/ml), 및 페니실린(U/ml)이 보충된 Dulbecco's 변형 Eagle's 배지(DMEM) 및, Ham's 영양 혼합물 F-12의 1:1 혼합물에서 이를 배양하였다. 투석시킨 태아 소 혈청(FBS)는 Sigma(St. Louis, MO) 또는 Hyclone(Ogden, UT)로부터 구입했다. WI-38 및 Hela 세포는 10% 혈청 중에서 배양했고 NRK 세포는 4% 혈청 중에서 배양했다.

재조합 플라스미드 및 세포주

인간 myc 게놈의 클론 pHSR-1은 M.Bishop으로부터 ATCC로의 기탁물이었다. 2.2kb 5'-말단은 프라이머(Scharf, 1990)에 통합된 적당한 제한효소 지점을 이용한 PCR에 의해 루시퍼라제 벡터로의 클로닝용으로 적합화시켰다. Clontech Inc. (Palo Alto, CA)에 의해 공급된 것으로부터 루시퍼라제 벡터를 개조하여 곤충 루시퍼라제와의 N-말단 융합 단백질을 허용하게 했다. 리포펙틴 프로토콜 및 네오마이신 유전자/ 제네티신 선택 방법(F Clobere Garapin et al., J. Mol Biol.150:1-14, 1981)을 이용한 Life Science Technologies(Gaithersburg, MD)의 시약을 이용하여 Hela 세포로 플라스미드를 도입했다. 토끼 α-글로빈-루시퍼라제 구성체-함유 세포주는 M Partidge et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.6:169-75, 1995에 기술되었다.

[^{3}H] 티미딘 통합 검정

세포를 트립신처리하고, 계수한 후, 6-웰 접시에 400,000 세포/2ml/웰로 플레이팅하였다. 제 2 일에, PMO 안티센스 제를 소망의 농도로 첨가하고, 고무채집기로 부드럽게 쓸어내려 세포를 스크레이프 로딩했다(PL McNeil et al., J. Cell Biol.98:1556-64, 1984; Partridge et al., 상기). 형성된 덩어리를 부분적으로 분산시키기 위해 세포현탁액을 한번 피펫팅했고, 추가적인 1ml/웰의 신선한 배지를 함유한 24-웰 접시에 1ml을 옮겼다. NRK 세포에 대하여는, 제 4 일에, 1μCi의 [^{3}H]티미딘 (DuPont, NEN, Wilmington, DE)(NET-027)을 웰마다 첨가하고, 6시간 후, 인산염 완충식염수(PBS)로 두차례 세척, 5% 트리클로로아세트 산으로 침전시키고, PBS로 두차례 더 세척, 0.2 N NaOH/0.1% SDS로 용해시킨 후, 신틸레이션 카운터에서 정량된 DNA로 방사능 양을 통합했다. 정량 절차는 통합을 위한 인큐베이션 기간이 15시간인 것을 제외하면 WI-38 세포와 동일하다. 일반적으로, 각각의 작용제 또는 농도는 이중으로 검정했고, 값은 평균화값을 취하였다. 복사본은 보통 서로 10% 이내에 있었다.

루시퍼라제 검정

정상 섬유모세포와 유사한 방법으로 다음의 변화를 갖는 myc-루시퍼라제 Hela 세포를 스크레이프 로딩했다. 6-웰 접시에 백만개의 세포를 플레이팅하고, 제 2 일에 전체 2ml 부피를 또다른 6-웰 접시로 옮겼다. 30시간후, 세포를 수집하여 Partridge et al., 1996; Summerton et al., 1997;(상기)에 기술된 것과 같이 루시퍼라제 광생산 검정하였다.

세포주기 분석

유동세포 계측법에 의해 세포주기 단계에 대하여 세포를 분석하였다. 세포는 기술된 바와 같이 스크레이프 로딩하고, 두 웰을 결합시켜 형광표지세포 분취기(FACS)에 의한 분석에 충분한 세포를 얻기 위해 10-cm 접시에 재플레이팅했다. 2일 후, 세포를 트립신처리하고, PBS로 세척한 후 냉각된 80% 에탄올에 적어도 2시간동안 재현탁시켰다. 고정 단계 이후, 세포를 원심분리로 수집하여 DNA 플루오로크롬 프로피디움 요오다이드로 염색했다(Telford et al., 상기). 에탄올-처리 펠릿을 1ml의 1mM EDTA, 50μg/ml의 프로피디움 요오다이드, 1μℓ/ml Triton X-100, 및 10μg/ml RNA분해효소에 재현탁했다. 상온에서 적어도 1시간후, 세포 현탁액을 Coulter Epic XL-MCL 유동세포 계측기(Coulter Electronics, Hialeah, FL)을 이용하여 488nm의 여자 파장으로 분석했다. Phoenix System (San Jose, CA) 다주기 프로그램 소프트웨어를 이용하여 데이터를 분석했다.

mRNA 역전사효소-중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 검정

myc RNA에 미치는 모르폴리노 올리고머의 영향을 조사하기 위해, Hela 세포를 6-웰 접시에 1 백만 세포/웰로 플레이팅하였다. 익일, 최종농도 20μM의 올리고머를 배지에 첨가하고, 앞서 자세히 기술한 것과 같이 세포내로 스크레이프 로딩했다. 24시간 후, 로딩된 세포를 트립신처리에 의해 수확하고 RNA를 준비했다. 두개의 웰을 각 표본을 위해 결합시켰다. " 동물세포의 세포질로부터 RNA의 분리" 를 위한 지시에 따라 Qiagen Rneasy Mini Kit (Chartsworth, CA) 를 이용하여 Triton X-100 용해 절차에 의해, 세포질성 (성숙) RNA를 세포 펠릿으로부터 추출했다. 약 10 내지 20μg의 생산량인 RNA를 30μℓ의 물에 녹여 용출했다.

6㎕의 RNA(2 내지 3㎍)을 1XPCR 완충액(10mM Tris, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$)(Perkin-Elmer, Norwalk, CT), 1mM dNTP, 0.75㎍ 9-합체 무작위 프라이머, 및 250U 몰로니 마우스 백혈병 바이러스(MmuLV)RT(New England BioLabs, Beverly, MA)의 최종 20㎕ 반응 혼합물에서 역전사 시켰다. 효소 첨가 후, 25℃에서 10분간, 42℃에서 30분간 인큐베이션 시킨 후, 94℃에서 4분간 중합체를 변성시켰다.

2-단계 내부 PCR 절차를 사용하여 엑손 1-엑손 2 PCR을 수행했다. 단계 1 프라이머는 서열 5'-CGG GCA CTT TGC ACT GAA ACT TAC AAC ACC(SEQ ID NO:51) 및 5'-GGT CGC AGA TGA AAC TCT GGT T(SEQ ID NO:52)를 갖는다. 각 프라이머의 1㎍을 20㎕ RT 반응에 첨가하고, 부피를 1XPCR 완충액으로 100㎕에 맞췄다. 4 유닛의 Amplitaq(Perkin-Elmer) Taq 중합효소를 첨가하고, 94℃로 30초, 62℃로 30초, 72℃로 40초간의 단계로 30주기를 수행했다. 단계 2는 프라이머 서열 5'-CTC CTT GCA GCT GCT TAG ACG CTG G(SEQ ID NO:53) 및 5'-GAA GGG TGT GAC CGC AAC GTA GGA G(SEQ ID NO:54)를 사용했다. 단계1의 반응 혼합물(4㎕)을 200nM의 dNTP 및 1㎕의 각 프라이머를 지닌 96㎕의 1XPCR 완충액에 첨가했다. 단계2 PCR조건은 94℃로 30초, 68℃로 40초, 및 74℃로 30초간 30주기였다. 그 후 분주한 것을 아가로스 겔 전기영동법에 의해 분석했다.

서열표서열표

SEQ ID NO	서 열 (5'→3')	표 적++	Genbank Acc. No.	위 치
1	CTGTGCTTAC/CGGGTTTTCCACCTCCC	래트 *c-myc* (SD)	Y00396	2553-79
2	ATCGTCGTGACTGT/CTGTTGGAGGG	래트 *c-myc* (SA)		4140-64
3	GCTCACGTTGAGGGGCATCG	래트 *c-myc* (ds of SA)		4161-80
4	GGTCACTCAC/CGGTAGAGAA	래트 CYP3A2 (SD)	X62087	1155-74
5	GGGTTCCAAGT/CTATAAAGG	래트 CYP3A2 (SA)		1526-45
6*	TGTGTCTTTTCCAG	인간 안드로겐 수용체 액손 2	M35845	31-44
7*	TTTGGAGACTGCCAGGGACCATG	"		45-67
8	CATGGTCCCTGGCAGTCTCC	"		48-67
9	TCAATGGGCAAAACATGGTCCCTGGC AGTCTCCAAA	"		45-80
10*	TTTGTGTTCTCCCAG	인간 안드로겐 수용체 액손 3	M35846	28-43
11*	GGAAACAGAAGTACCTGTGCGCC	"		44-66
12	GGCGCACAGGTACTTCTG	"		49-66
13	AATCATTTCTGCTGGCGCACAGGTACT TCTGTTTCC	"		44-79
14	CCCCTGCAGCACGCGGGT	인간 HCG-β	X00266	1321-38
		서브유닛		
15	GAGGCAGGGCCGGCAGGACCCCCTGC AGCACGCGGGT	"		1321-57
16	GGCATCGTCGCGGGAGGCTG	인간 *c-myc*	J00120	4506-25
17	GGGCATCGTCGCGGGAGGCT	"		4507-26
18	GGGGCATCGTCGCGGGAGGC	"		4508-27
19	AGGGGCATCGTCGCGGGAGG	"		4509-28
20	GAGGGGCATCGTCGCGGGAG	"		4510-29
21	TGAGGGGCATCGTCGCGGGA	"		4511-30
22	TTGAGGGGCATCGTCGCGGG	"		4512-31
23	GTTGAGGGGCATCGTCGCGG	"		4513-32
24	CGTTGAGGGGCATCGTCGCG	"		4514-33
25	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	"		4515-34
26	AACGTTGAGGGGCATCGTCG	"		4516-35
27	TAACGTTGAGGGGCATCGTC	"		4517-36
28	CTAACGTTGAGGGGCATCGT	"		4518-37
29	GCTAACGTTGAGGGGCATCG	"		4519-38
30	AGCTAACGTTGAGGGGCATC	"		4520-39
31	AAGCTAACGTTGAGGGGCAT	"		4521-40
32	GAAGCTAACGTTGAGGGGCA	"		4522-41
33	TCCTCATCTTCTTGTTCCTC	"		6656-75
34	AACAACATCGATTTCTTCCTCATCTTC TTGTTCCTC	"		6656-91
35	CCCGGAAGGCAGTCTGGC	인간 p53	X54156	11691-708
36	TCCTCCATGGCAGTGACCCGGAAGGC AGTCTGGCTG	"		11689-724
37	CTACTGGCCGCTGAAGGGC	인간 abl (bcl-abl 융합지점의 하류)	AJ131466	376-94
38	GCTCAAAGTCAGATGCTACTGGCCGC TGAAGGGCTT	"		374-409
39	TCGTCGGTCTCTCCGCTTCTTCTTGCC	HIV-1 rev (초대 업계)	U69590	5517-43
40	CTCTGGTGGTGGGTAAGGGT	HIV-1 rev	L39106	7885-7904
41	CGGGTCTGTCGGGTTCCCTCTGGTGGT GGGTAAGGGT	"		7885-7921

42	GGGGCAUCGUCGUGACUGU/CUGUUG GAGGG	래트 *c-myc* (SA)	Y00396	4140-69
43	CGUCGUGACUGU/CUGUUGGAGG	"	Y00396	4141-62
44	CGTCGTGACTGT/CTGTTGGAGG	"	Y00396	4141-62
45	GGCAUCGUCGCGGGAGGCUG/CUGGA GCG	인간 *c-myc* (SA)	J00120	4498-4505
46	CCGCGACAUAGGACGGAGAGCAGAG CCC	래트 *c-myc*	Y00396	4364-91
47	ACTGTGAGGGCGATCGCTGC (scrambled)	SEQ ID NO: 25 유래		
48	ACGATGAGTGGCATAGTCGC (3 mismatches)	SEQ ID NO: 25 유래		
49	CTCCGCAATGCTGAAAGGTG	래트 BCL-2 (cntrl)		
50	GGCGUGCCUCAAACAUGGUGGCGG	래트 PCNA-1 (cntrl)		
51	CGGGCACTTTGCACTGAAACTTACAA CACC	프라이머 서열		
52	GGTCGCAGATGAAACTCTGGTT	"		
53	CTCCTTGCAGCTGCTTAGACGCTGG	"		
54	GAAGGGTGTGACCGCAACGTAGGAG	"		

* 안티센스가 아닌, 본래 서열

++ 다른 지시가 없을 경우, 안티센스 표적은 스플라이스 수용체 접합부의 하류이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

비하전 모르폴리노 백본 및 myc, myb, rel, fos, jun, abl, bcl, p53, 인테그린, 카테드린, 텔로머라제, 사이토카인, 키나아제, 수용체 단백질, hCG, HIV rev, 인간 파필로마 바이러스, 및 인간 파르보바이러스 B19로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질을 코딩하는 선택된 사전프로세싱된 mRNA 표적 영역에 상보적인 12 내지 25 뉴클레오티드 염기 길이 사이의 염기 서열을 갖는 안티센스 화합물로서, 표적 영역의 5'말단은 상기 사전프로세싱된 mRNA에서 정상 스플라이스 수용체 지점의 1 내지 25 염기 하류에 있는 것을 특징으로 하는, 안티센스 화합물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 도 2AA-EE에 도시된 구조로 구성된 군으로부터 선택되는 서브유닛간 연결을 갖는 화합물.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, 결합은, X=NH_2, NHR, 또는 NRR', Y=O이고 Z=O, 또는 X=OR, Y=NH 또는 NR'이고 Z=O, 그리고 R과 R'은 표적 결합을 방해하지 않는 기인, 도 2B-B에 도시된 것과 같은 포스포로디아미데이트 연결인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, R 과 R'은, 하이드록시, 알콕시, 아미노, 알킬아미노, 티올, 알칸티올, 할로겐, 옥소, 카르복실산, 카르복실산 에스테르, 및 무기 에스테르로부터 선택되는 하나 이상의 기로 치환되어 있을 수 있는, 알킬, 폴리알킬렌옥시, 및 그것의 조합으로부터 독립적으로 선택되는 부분인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, 치환에 독립적인, 상기 각 부분 R 과 R'는 1 내지 6 원자 길이인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6.

제 3 항에 있어서, NRR'은 질소, 탄소, 산소, 및 황으로부터 선택되는 5 내지 7 고리 원자를 가지고, 적어도 비-탄소 고리 원자 수만큼의 탄소 고리 원자를 가진 질소 헤테로환구조를 나타내는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 7.

제 6 항에 있어서, 표적 영역의 5'말단은 정상 스플라이스 수용체 지점의 10 내지 15 염기 하류에 있는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 선택된 단백질은 인간 c-myc인 것을 특징으로 하는 화합물

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 염기 서열은 SEQ ID NO:16 내지 32로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 10.

제 9 항에 있어서, 염기 서열은 SEQ ID NO:25인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 11.

제 8 항에 있어서, 염기 서열은 SEQ ID NO:34로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 염기 서열은 SEQ ID NO:33인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 13.

제 1 항에 있어서, 선택된 단백질은 인간 안드로겐 수용체이고, 염기 서열은 SEQ ID NO:9 또는 SEQ ID NO:13으로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 14.

제 13 항에 있어서, 염기 서열은 SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:12인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 15.

제 1 항에 있어서, 선택된 단백질은 HCG-β 서브유닛이고, 염기 서열은 SEQ ID NO:15로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 16.

제 15 항에 있어서, 염기 서열은 SEQ ID NO:14인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 17.

제 1 항에 있어서, 선택된 단백질은 인간 p53이고, 염기 서열은 SEQ ID NO:36으로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 18.

제 17 항에 있어서, 염기 서열은 SEQ ID NO:35인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 19.

제 1 항에 있어서, 선택된 단백질은 인간 abl이고, 염기 서열은 SEQ ID NO:38로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 20.

제 19 항에 있어서, 염기 서열은 SEQ ID NO:37인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 21.

제 1 항에 있어서, 선택된 단백질은 HIV-1 rev이고, 염기 서열은 SEQ ID NO:41로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 22.

제 21 항에 있어서, 염기 서열은 SEQ ID NO:40인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 23.

비하전 모르폴리노 백본 및 선택된 단백질을 코딩하는 선택된 사전프로세싱된 mRNA 표적 영역에 상보적인 12 내지 25 뉴클레오티드 염기 길이의 염기 서열을 갖으며, 표적 영역의 5'말단은 상기 사전프로세싱된 mRNA에서 정상 스플라이스 수용체 지점의 1 내지 25 염기 하류에 있는, 화합물은: 세포에 의해 흡수되고; 세포내에서 사전프로세싱된 mRNA의 표적 영역과 혼성화되며, 그렇게 혼성화되면, 상기 정상 수용체 스플라이스 지점에서의 스플라이싱을 방해하여, 스플라이스 기작이 mRNA내의 하류 스플라이스 수용체 서열로 옮겨가게 하여, 일부절단된 코딩 서열을 가진 스플라이스 변이체 프로세싱된 mRNA를 생산하도록 하는 것을 특징으로 하는, 안티센스 화합물과 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 진핵세포에서 mRNA의 정상적인 스플라이싱을 저해하는 방법.

청구항 24.

제 23 항에 있어서, 단백질은 myc, myb, rel, fos, jun, abl, bcl, p53, 인테그린, 카테드린, 텔로머라제, hCG, 수용체 단백질, 사이토카인, 키나아제, HIV rev, 인간 파필로마 바이러스, 및 인간 파르보바이러스 B19로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.

제 24 항에 있어서, 화합물은 도 2AA-EE에 도시된 구조로 구성된 군으로부터 선택되는 서브유닛간 결합을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.

제 25 항에 있어서, 결합은, X=NH_2, NHR, 또는 NRR', Y=O이고 Z=O, 또는 X=OR, Y=NH 또는 NR'이고 Z=O, 그리고 R과 R'은 표적 결합을 방해하지 않는 기인, 도 2B-B에 도시된 포스포로디아미데이트 연결인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.

제 26 항에 있어서, R 과 R'은, 하이드록시, 알콕시, 아미노, 알킬아미노, 티올, 알칸티올, 할로겐, 옥소, 카르복실산, 카르복실산 에스테르, 및 무기 에스테르로부터 선택되는 하나 이상의 기로 치환되어 있을 수 있는, 알킬, 폴리알킬렌옥시, 및 그것의 조합으로부터 독립적으로 선택되는 부분인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.

제 27 항에 있어서, 치환에 독립적인, 상기 각 부분 R 과 R'는 1 내지 12 원자 길이인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.

제 26 항에 있어서, NRR'은 질소, 탄소, 산소, 및 황으로부터 선택되는 5 내지 7 고리 원자를 가지고, 적어도 비-탄소 고리 원자 수만큼의 탄소 고리 원자를 가진 질소 헤테로환구조를 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.

제 23 항에 있어서, 표적 영역의 5'말단은 정상적인 스플라이스 수용체 지점의 10 내지 15 염기 하류에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31.

제 23 항에 있어서, 상기 하류 스플라이스 수용체 지점은 정상적인 스플라이스 수용체 지점의 완전한 3염기 배수 하류이어서, 상기 스플라이스 변이체 mRNA는 정상적으로 스플라이스 되었을 때의 프로세싱된 mRNA의 그것과 프레임이 맞는 코딩 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.

제 23 항에 있어서, 선택된 단백질은 구별되는 결합 영역 다수를 갖고, 상기 일부절단된 코딩 서열은 결합 영역이 무력하게 된 곳에서 변이체 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33.

제 32 항에 있어서, 상기 변이체 단백질은 주된 네가티브 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34.

제 33 항에 있어서, 상기 선택된 단백질은 인간 c-myc이고, 상기 변이체 단백질은 N-말단 일부절단된 c-myc 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35.

제 34 항에 있어서, 안티센스 화합물은 SEQ ID NO:16 내지 32로 구성된 군으로부터 선택되는 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36.

제 35 항에 있어서, 안티센스 화합물은 SEQ ID NO:25의 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37.

제 23 항에 있어서, 선택된 단백질 및 대응하는 안티센스 염기 서열은:

(a)인간 융모성 성선자극호르몬 β서브유닛: SEQ ID NO:15로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열;

(b)인간 안드로겐 수용체: SEQ ID NO:9 또는 SEQ ID NO:13으로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열;

(c)인간 c-myc: SEQ ID NO:34로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열;

(d)인간 p53: SEQ ID NO:36으로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열;

(e)인간 abl: SEQ ID NO:38로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열; 및

(f)HIV-1 rev: SEQ ID NO:41로부터 선택되는 연속적인 18- 내지 20-뉴클레오티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38.

제 37 항에 있어서, 선택된 단백질 및 대응하는 안티센스 염기 서열은:

(a)인간 융모성 성선자극호르몬, β서브유닛: SEQ ID NO:14;

(b)인간 안드로겐 수용체: SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:12;

(c)인간 c-myc: SEQ ID NO:33;

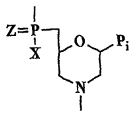
(d)인간 p53: SEQ ID NO:35;

(e)인간 abl: SEQ ID NO:37;및

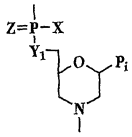
(f)HIV-1 rev: SEQ ID NO:40로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

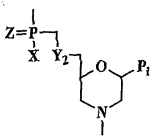
도면 1



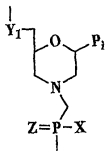
도 1A



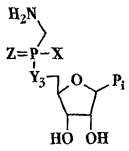
도 1B



도 1C

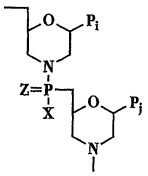


도 1D

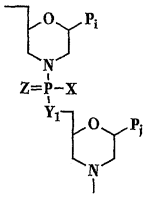


도 1E

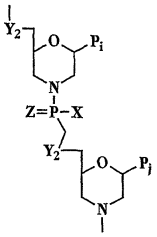
도면 2



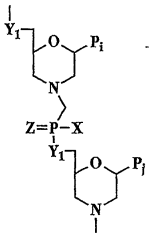
도 2A-A



도 2B-B



도 2C-C



도 2D-D/E-E

<110> AVI BioPharma, Inc.
<120> Splice-Region Antisense Composition and Methods
<150> US 60/202,376
<151> 2000-05-04
<160> 54
<170> KopatentIn 1.71
<210> 1
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 1
ctgtgcttac cgggttttcc acctccc 27
<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense
<400> 2
atcgtcgtga ctgtctgttg gaggg 25
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 3
gctcacgttg aggggcatcg 20
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 4
ggtcactcac cggtagagaa 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 5
gggttccaag tctataaagg 20
<210> 6
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 6
tgtgtctttt ccag 14
<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 7
tttggagact gccagggacc atg 23
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense

<400> 8
catggtccct ggcagtctcc 20
<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 9
tcaatgggca aaacatggtc cctggcagtc tccaaa 36
<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 10
tttgtgttct cccag 15
<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 11
ggaaacagaa gtacctgtgc gcc 23
<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 12
ggcgcacagg tacttctg 18
<210> 13
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 13
aatcatttct gctggcgcac aggtacttct gtttcc 36
<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 14
cccctgcagc acgcgggt 18

<210> 15
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 15
gaggcagggc cggcaggacc ccctgcagca cgcgggt 37
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 16
ggcatcgtcg cgggaggctg 20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 17
gggcatcgtc gcgggaggct 20
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 18
ggggcatcgt cgcgggaggc 20
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 19
aggggcatcg tcgcgggagg 20
<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 20
gaggggcatc gtcgcgggag 20
<210> 21
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 21
tgaggggcat cgtcgcggga 20
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 22
ttgaggggca tcgtcgcggg 20
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 23
gttgaggggc atcgtcgcgg 20
<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 24
cgttgagggg catcgtcgcg 20
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 25
acgttgaggg gcatcgtcgc 20
<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 26
aacgttgagg ggcatcgtcg 20
<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense
<400> 27
taacgttgag gggcatcgtc 20
<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 28
ctaacgttga ggggcatcgt 20
<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 29
gctaacgttg aggggcatcg 20
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 30
agctaacgtt gaggggcatc 20
<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 31
aagctaacgt tgaggggcat 20
<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 32
gaagctaacg ttgaggggca 20
<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense

<400> 33
tcctcatctt cttgttcctc 20
<210> 34
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 34
aacaacatcg atttcttcct catcttcttg ttcctc 36
<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 35
cccggaaggc agtctggc 18
<210> 36
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 36
tcctccatgg cagtgacccg gaaggcagtc tggctg 36
<210> 37
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 37
ctactggccg ctgaagggc 19
<210> 38
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 38
gctcaaagtc agatgctact ggccgctgaa gggctt 36
<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 39
tcgtcggtct ctccgcttct tcttgcc 27

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 40
ctctggtggt gggtaagggt 20
<210> 41
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> antisense
<400> 41
cgggtctgtc gggttccctc tggtggtggg taagggt 37
<210> 42
<211> 30
<212> RNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 42
ggggcaucgu cgugacuguc uguuggaggg 30
<210> 43
<211> 22
<212> RNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 43
cgucgugacu gucuguugga gg 22
<210> 44
<211> 22
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 44
cgtcgtgact gtctgttgga gg 22
<210> 45
<211> 28
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 45
ggcaucgucg cgggaggcug cuggagcg 28
<210> 46
<211> 28
<212> RNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 46
ccgcgacaua ggacggagag cagagccc 28
<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> scrambled version of SEQ ID NO: 25
<400> 47
actgtgaggg cgatcgctgc 20
<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> SEQ ID NO: 25 with three mismatched nucleotides
<400> 48
acgatgagtg gcatagtcgc 20
<210> 49
<211> 20
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 49
ctccgcaatg ctgaaaggtg 20
<210> 50
<211> 24
<212> RNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 50
ggcgugccuc aaacauggug gcgg 24
<210> 51
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 51
cgggcacttt gcactgaaac ttacaacacc 30
<210> 52
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 52
ggtcgcagat gaaactctgg tt 22
<210> 53
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 53
ctccttgcag ctgcttagac gctgg 25
<210> 54
<211> 25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 54
gaagggtgtg accgcaacgt aggag 25