



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0140338
(43) 공개일자 2023년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/447 (2006.01) C12Q 1/6876 (2018.01)
G01N 33/483 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/44721 (2013.01)
C12Q 1/6876 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0150978
(22) 출원일자 2022년11월11일
심사청구일자 2022년11월11일
(30) 우선권주장
1020220037407 2022년03월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
송은주
서울특별시 용산구 이촌로87길 21, 105동 902호(이촌동, 이촌아파트)
반은미
서울특별시 송파구 올림픽로35길 104, 21동 902호(신천동, 장미아파트)
권해진
서울특별시 송파구 성내천로 95, 201호(오금동, 혜성빌리지)
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

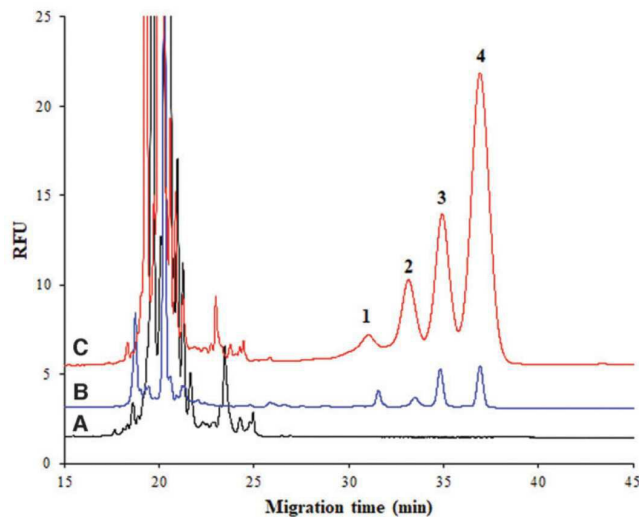
(54) 발명의 명칭 형광검출-모세관 전기영동을 이용하여 G3139 및 이의 대사체를 검출하는 방법

(57) 요약

본 발명은 형광검출-모세관 전기영동을 G3139 및 이의 대사체를 검출하는 방법 및 G3139의 약동학/대사 산물 평가 방법에 관한 것이다.

본 발명의 방법을 이용할 경우, 시료 내 G3139 및 이의 대사체를 매우 민감하고 효율적으로 검출하거나 이를 토대로 약동학 분석 등을 수행할 수 있는 바, 본 발명의 방법은 기존의 방법보다 검출 감도는 향상되면서 수행 방법은 간단하다는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 27/44747 (2013.01)

G01N 33/483 (2013.01)

C12Q 2563/107 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711137211
과제번호	2020R1A4A4079494
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	혁신 항암제 개발을 위한 탈유비퀴틴화 효소 제어 네트워크 연구실
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711141309
과제번호	2019R1A2C2004052
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	세포 성장 조절 관련 탈유비퀴틴화 효소의 세포내 활성조절 네트워크 규명
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

1) 생물학적 시료로부터 핵산을 추출하는 단계;
 2) 상기 단계에서 추출한 핵산과, G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 혼성화시키는 단계; 및
 3) 형광검출-모세관 전기영동(Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence: CE-LIF)을 이용하여 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 검출하는 단계

를 포함하는, 시료 내 G3139 및 이의 대사체를 검출하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 G3139의 대사체는 3'-N-1, 3'-N-2 및 3'-N-3 중 하나 이상을 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 프로브는 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상과 결합할 수 있는 단일가닥 DNA; 및 형광물질을 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 형광검출-모세관 전기영동은 20 cm 이상의 길이를 갖는 모세관을 이용하여 수행하는 것인, 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 형광검출-모세관 전기영동은 100 mM 이상의 농도를 갖는 트리스-보레이트(Tris-borate) 완충액을 이용하여 수행하는 것인, 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 시료에 존재하는 G3139 및 이의 대사체 중 2 이상을 동시에 검출할 수 있는 것인, 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 시료에 존재하는 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상의 농도를 확인할 수 있는 것인, 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 0.5 내지 50 nM의 범위에서 시료 내 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상의 농도를 확인할 수 있는 것인, 방법.

청구항 9

1) G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브;
 2) 혼성화 버퍼; 및
 3) 분리용 버퍼

를 포함하는, 형광검출-모세관 전기영동 시스템에 적용하기 위한 G3139 및 이의 대사체 검출용 키트.

청구항 10

- 1) 개체에 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 투여하는 단계;
 - 2) 상기 개체로부터 수득한 생물학적 시료에서 핵산을 추출하는 단계;
 - 3) 상기 단계에서 추출한 핵산과, G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 혼성화시키는 단계;
 - 4) 형광검출-모세관 전기영동(Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence: CE-LIF)을 이용하여 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 검출하는 단계; 및
 - 5) 상기 검출 결과를 토대로 약동학 데이터 분석을 수행하는 단계
- 를 포함하는, 시료 내 G3139 및 이의 대사체의 약동학 및 대사산물 평가 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 형광검출-모세관 전기영동을 G3139 및 이의 대사체를 검출하는 방법 및 G3139의 약동학/대사 산물 평가 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 안티센스 올리고뉴클레오티드(Antisense oligonucleotides, ASO)는 표적 DNA 또는 RNA 가닥과 결합하는 능력 때문에, 번역 과정을 억제할 수 있는 새로운 효과적인 약물 후보로 거론되고 있으며, 몇몇 ASO가 다양한 질병을 치료하기 위해 임상적으로 연구 및 개발되고 있다. 따라서, 적절한 치료제를 개발하기 위해서는 투여 후 ASO 및 그 대사물의 약동학을 평가하는 것이 중요하다.
- [0003] 현재, 혈장과 같은 생물학적 시료에서 ASO를 분석하는 방법은 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석기(liquid chromatograph-tandem mass spectrometer, LC/MS/MS) 및 효소 결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)이 사용되고 있다. 그러나, LC/MS/MS의 경우 높은 시료 농도를 요구하며, 검출 간섭을 피하기 위해 두 가지 다른 추출 방법을 이용해야 한다는 단점이 있다. 또한, ELISA의 경우 모 ASO와 그 대사산물을 구별하기 어렵다는 단점이 있다. 올리고뉴클레오티드 대사산물은 소분자의 대사와 달리 포스포디에스테르 결합을 가수분해하여 핵산을 분해하는 엔도뉴클레아제와 엑소뉴클레아제에 의해 주로 형성되기 때문에 모체 대사산물과 대사산물의 분자량과 전하가 비슷하기 때문이다.
- [0004] 한편, G3139는 Bcl-2 mRNA의 처음 6개 코돈에 상보적인 18개 염기의 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드이다. G3139 처리는 다양한 암세포주에서 Bcl 2 mRNA와 단백질 수준을 선택적으로 감소시켰고 다양한 고형 종양에서 치료 효능을 보였다. 따라서 G3139 및 그 대사체에 대한 약동학적 평가는 임상 및 제약 분야에서 지속적으로 요구되어 왔다.
- [0005] 이러한 배경 하에, G3139 및 이의 대사체를 효과적으로 검출하고 약동학 분석을 수행할 수 있는 CE-LIF 법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) "G3139, a Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide, induces clinical responses in VAD refractory myeloma" (Leukemia (2004) 18, 1078-1084)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 1) 생물학적 시료로부터 핵산을 추출하는 단계; 2) 상기 단계에서 추출한 핵산과, G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 혼성화시키는 단계; 및 3) 형광검출-모세관 전기영동 (Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence: CE-LIF)을 이용하여 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 시료 내 G3139 및 이의 대사체를 검출하는 방법을 제공한다.

[0008] 다른 양상은 1) G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브; 2) 혼성화 버퍼; 및 3) 분리용 버퍼를 포함하는, 형광검출-모세관 전기영동 시스템에 적용하기 위한 G3139 및 이의 대사체 검출용 키트를 제공한다.

[0009] 또 다른 양상은 1) 개체에 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 투여하는 단계; 2) 상기 개체로부터 수득한 생물학적 시료에서 핵산을 추출하는 단계; 3) 상기 단계에서 추출한 핵산과, G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 혼성화시키는 단계; 4) 형광검출-모세관 전기영동 (Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence: CE-LIF)을 이용하여 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 검출하는 단계; 및 5) 상기 검출 결과를 토대로 약동학 데이터 분석을 수행하는 단계를 포함하는, 시료 내 G3139 및 이의 대사체의 약동학 및 대사산물 평가 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 1) 생물학적 시료로부터 핵산을 추출하는 단계; 2) 상기 단계에서 추출한 핵산과, G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 혼성화시키는 단계; 및 3) 형광검출-모세관 전기영동 (Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence: CE-LIF)을 이용하여 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 검출하는 단계를 포함하는, 시료 내 G3139 및 이의 대사체를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 명세서에서의 용어 "시료" 또는 "생물학적 시료"는 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이들 시료로부터 유전자 및/또는 단백질 시료를 얻을 수 있으며, 유전자 시료는 핵산, 예를 들어, DNA, cDNA, RNA, mRNA, miRNA, siRNA, shRNA 및 ASO 등을 포함할 수 있다.

[0012] 상기 방법에 있어서, 생물학적 시료로부터 핵산을 추출하는 단계는 당업계에서 공지된 기술을 이용할 수 있으며, 구체적으로 페놀-클로로포름 용액을 이용하는 것일 수 있다. 상기 페놀-클로로포름 용액의 페놀:클로로포름 비율은 1:1 내지 7:1일 수 있으며, 구체적으로 1:1 내지 7:1, 1:1 내지 6:1, 1:1 내지 5:1, 2:1 내지 7:1, 2:1 내지 6:1, 2:1 내지 5:1, 3:1 내지 7:1, 3:1 내지 6:1, 3:1 내지 5:1, 4:1 내지 7:1, 4:1 내지 6:1, 4:1 내지 5:1, 5:1 내지 7:1 또는 5:1 내지 6:1의 비율일 수 있다. 또한, 페놀-클로로포름의 용량은 5 내지 50 μ L 일 수 있으며, 구체적으로 5 내지 50 μ L, 5 내지 40 μ L, 5 내지 30 μ L, 10 내지 50 μ L, 10 내지 40 μ L, 10 내지 30 μ L, 20 내지 50 μ L, 20 내지 40 μ L 또는 20 내지 30 μ L 일 수 있다.

[0013] 상기 핵산은 DNA, cDNA, 및 ASO(Antisense oligonucleotides)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 구체적으로 ASO (안티센스 올리고뉴클레오타이드)일 수 있다.

[0014] 본 명세서에서의 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드(Antisense oligonucleotides, ASO)"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하는데, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 효과를 나타낸다.

[0015] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 G3139 및 이의 대사체를 모두 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 본 명세서에서의 용어 "G3139"는 Bcl-2 mRNA의 처음 6개 코돈에 상보적인 18개 염기의 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드이다. G3139 처리는 다양한 암세포주에서 Bcl-2 mRNA와 단백질 수준을 선택적으로 감소시켰고 다양한 고형 종양에서 치료 효능을 보였다. 따라서 G3139 및 그 대사체에 대한 약동학적 평가는 임상 및 제약 분야에서 지속적으로 요구되고 있다.

[0017] 상기 G3139의 대사체는 3'-N-1, 3'-N-2 및 3'-N-3 중 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 3'-N-1, 3'-N-2 및 3'-N-3을 모두 포함하는 것일 수 있다. 상기 G3139는 서열번호 1의 염기서열을 포함하고, 3'-N-1은 서열번호 2의 염기서열을 포함하고, 3'-N-2은 서열번호 3의 염기서열을 포함하고, 3'-N-3는 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 상기 방법은 시료 내 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 검출하는 방법일 수 있으며, 구체적으로 G3139 및

이의 대사체를 동시에 검출하는 방법일 수 있다.

- [0019] 상기 방법에 있어서, 혼성화시키는 단계는 검출하고자 하는 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 이용하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 프로브는 표지된 프로브일 수 있다. 또한, 상기 표지된 프로브는 형광물질 등을 포함하는 다양한 공지 기술로 표지된 것일 수 있다.
- [0020] 본 명세서에서의 용어 "프로브(probe)"는 표적 핵산과 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 특정 핵산의 존재 유무, 함량 및 발현량을 확인할 수 있도록 표지(labeling)되어 있을 수 있다. 상기 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일가닥 DNA (single strand DNA) 프로브, 이중가닥 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다. 상기 프로브는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 프로브는 검출하고자 하는 올리고뉴클레오타이드(구체적으로, G3139 및 이의 대사체)를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다.
- [0022] 상기 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 본 발명에서 이용할 수 있는 적합한 표지는 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia) 등 다양한 형광물질을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 6-카복시플루오레세인(6-FAM)을 이용할 수 있다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션(nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다.
- [0023] 일 구현예에 있어서, 상기 프로브는 G3139 및 이의 대사체와 결합할 수 있는 단일가닥 DNA 및 형광 물질을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 형광물질이 결합 또는 접합된 단일가닥 DNA일 수 있고, 상기 형광물질은 6-카복시플루오레세인(6-FAM)일 수 있다.
- [0024] 상기 방법에 있어서, G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상과 프로브를 혼성화시키는 단계는 혼성화 버퍼를 이용하여 수행하는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 혼성화에 적합한 조건은 "Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)" 및 "Haymes, B. D., et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)"에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건 (stringent condition)은 온도, 이온세기 (버퍼 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 본 발명에서 이용하는 버퍼의 종류는 당업계에 이용되는 다양한 종류의 버퍼를 이용할 수 있으며, 최적의 혼성화 조건은 상기 버퍼 중 가장 혼성화 정도가 높은 버퍼를 선정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 혼성화 버퍼는 TNM(Tris NaCl MgCl₂) 버퍼, PBS(Phosphate Buffered Saline) 버퍼, Tris-Cl 버퍼, SSC(Saline Sodium Citrate) 버퍼, HEN(Hepes EDTA Neocuproine) 버퍼 또는 TEN(Tris EDTA NaCl) 버퍼 등을 이용할 수 있다.
- [0026] 상기 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 검출하는 단계는 구체적으로 상기 2) 단계에서 혼성화된 G3139-프로브 복합체 및/또는 G3139 대사체-프로브 복합체를 분리 및 확인하는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 검출하는 단계는 형광검출-모세관 전기영동(Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence: CE-LIF)을 이용하는 것일 수 있다. 상기 형광검출-모세관 전기영동은 LIF 검출기가 장착된 모세관 전기영동을 의미하는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 형광검출-모세관 전기영동에서 사용되는 모세관은 미처리된 모세관(untreated capillary), 미코팅된 모세관(uncoated capillary) 또는 중성 모세관 (neutral polyacrylamide 또는 polyvinyl alcohol-coated capillary)일 수 있다. 또한, 상기 모세관의 내경은 25 내지 100 μm 인 것일 수 있으며, 구체적으로 70 내지 80 μm 일 수 있으며, 보다 구체적으로 약 75 μm 일 수 있다.
- [0029] 상기 형광검출-모세관 전기영동은 20 cm 이상의 길이를 갖는 모세관을 이용하는 것일 수 있으며, 구체적으로 20 내지 100 cm의 길이를 갖는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로, 20 내지 100 cm, 20 내지 90 cm, 20 내지 80

cm, 20 내지 70 cm, 20 내지 65 cm, 20 내지 60 cm, 30 내지 100 cm, 30 내지 90 cm, 30 내지 80 cm, 30 내지 70 cm, 30 내지 65 cm, 30 내지 60 cm, 40 내지 100 cm, 40 내지 90 cm, 40 내지 80 cm, 40 내지 70 cm, 40 내지 65 cm, 40 내지 60 cm, 50 내지 100 cm, 50 내지 90 cm, 50 내지 80 cm, 50 내지 70 cm, 50 내지 65 cm, 50 내지 60 cm, 55 내지 100 cm, 55 내지 90 cm, 55 내지 80 cm, 55 내지 70 cm, 55 내지 65 cm, 55 내지 60 cm, 60 내지 100 cm, 60 내지 90 cm, 60 내지 80 cm, 60 내지 70 cm, 60 내지 65 cm, 70 내지 100 cm, 70 내지 90 cm 또는 70 내지 80 cm의 길이를 갖는 것일 수 있다.

[0030] 상기 형광검출-모세관 전기영동은 트리스-보레이트(Tris-borate) 완충액, CHES 완충액 또는 트리스-CHES(TRIS-CHES) 완충액을 이용하는 것일 수 있다. 또한, 상기 완충액 (구체적으로, 트리스-보레이트 완충액)은 100 mM 이상의 농도를 갖는 것일 수 있고, 구체적으로, 100 내지 200 mM의 농도를 갖는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 100 내지 200 mM, 100 내지 190 mM, 100 내지 180 mM, 100 내지 170 mM, 100 내지 160 mM, 100 내지 155 mM, 100 내지 150 mM, 120 내지 200 mM, 120 내지 190 mM, 120 내지 180 mM, 120 내지 170 mM, 120 내지 160 mM, 120 내지 155 mM, 120 내지 150 mM, 130 내지 200 mM, 130 내지 190 mM, 130 내지 180 mM, 130 내지 170 mM, 130 내지 160 mM, 130 내지 155 mM, 130 내지 150 mM, 140 내지 200 mM, 140 내지 190 mM, 140 내지 180 mM, 140 내지 170 mM, 140 내지 160 mM, 140 내지 155 mM, 140 내지 150 mM, 145 내지 200 mM, 145 내지 190 mM, 145 내지 180 mM, 145 내지 170 mM, 145 내지 160 mM, 145 내지 155 mM, 145 내지 150 mM, 150 내지 200 mM, 150 내지 190 mM, 150 내지 180 mM, 150 내지 170 mM, 150 내지 160 mM 또는 150 내지 155 mM의 농도를 갖는 것일 수 있다.

[0031] 상기 형광검출-모세관 전기영동은 상기 모세관 내에서 8 내지 20 kV의 전압(positive 또는 negative)을 적용하는 것일 수 있으며, 구체적으로 12 내지 16 kV, 보다 구체적으로 약 14 kV의 전압을 적용하는 것일 수 있다.

[0032] 상기 형광검출-모세관 전기영동에서 LIF 검출기의 파장은 검출하려 하는 형광물질의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 형광물질로 6-카르복시플루오리신을 이용할 경우 여기 파장은 바람직하게는 400-500 nm, 가장 바람직하게는 488 nm를 갖으며, 방출 파장은 바람직하게는 500-600 nm, 가장 바람직하게는 520 nm를 갖는다.

[0033] 상기 방법은 시료에 존재하는 G3139 및 이의 대사체 중 2 이상을 동시에 검출할 수 있는 것일 수 있으며, 구체적으로 G3139 및 이의 대사체들을 동시에 검출할 수 있다.

[0034] 일 구현예에 따르면, 상기 방법을 이용할 경우 G3139 및 이의 대사체들을 동시에 검출할 수 있으며, 구체적으로 사용되는 분리 완충액의 농도가 약 150 mM, 모세관 길이가 약 60 cm인 조건에서 형광검출-모세관 전기영동을 수행할 경우, G3139 및 이의 대사체들 간의 기준선 분리가 효과적으로 이루어질 수 있는 것을 확인하였는 바, 2종 이상의 올리고뉴클레오티드를 동시에 검출할 수 있음을 알 수 있다.

[0035] 상기 방법은, 4) G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상(구체적으로, G3139-프로브 복합체 및/또는 G3139 대사체-프로브 복합체)의 검출 결과를 토대로 시료 내 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상의 존재를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 단계는 프로브 복합체 피크를 확인하여 시료 내 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상의 존재 또는 이의 시료 내 농도를 확인하는 것일 수 있다. 또한, 상기 프로브 복합체 피크를 확인하는 것은, 프로브 복합체에 대한 전기영동도에서 상기 복합체의 피크의 면적에 대한 내부표준물질(대조군)의 면적의 비를 확인하는 것일 수 있다.

[0036] 또한, 상기 방법은 시료 내 극소량으로 존재하는 G3139 및 이의 대사체를 검출할 수 있으며, 구체적으로 시료 내 약 3pM 농도의 G3139 및 이의 대사체까지 검출할 수 있다. 따라서, 상기 방법의 검출 한계는 약 3pM인 것일 수 있다.

[0037] 상기 방법에 있어서, 상기 4) 단계는 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상(구체적으로, G3139-프로브 복합체 및/또는 G3139 대사체-프로브 복합체) 검출 결과를 토대로 시료 내 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상의 농도 수준을 확인하는 것으로서, 검출 신호를 토대로 농도를 계산하는 것을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 방법은 시료 내 0.5-50 nM의 농도 범위의 G3139 및 이의 대사체의 농도 수준을 확인하는 것일 수 있으며, 구체적으로 G3139 및 3'-N-1의 경우 0.5-50 nM의 농도 범위, 3'-N-2 및 3'-N-3의 경우 0.1-20 nM의 농도 범위 내에서 시료 내 잔존 농도 수준을 확인하는 것일 수 있다.

[0038] 일 구현예에 있어서, G3139 및 이의 대사체와 6-FAM으로 표지된 프로브가 혼성화된 G3139-프로브 복합체, 3'-N-1-프로브 복합체, 3'-N-2-프로브 복합체 및 3'-N-3-프로브 복합체는 형광검출-모세관 전기영동을 통해 각각 분리되어 전기영동도(Electropherogram)를 통해 확인될 수 있으며, 프로브에 표지된 6-FAM로 인해 농도 의존적인 흡광도 또는 형광 신호를 나타낸다. 따라서, G3139 및 이의 대사체는 각각 하기의 공식을 토대로 시료 내 존재

농도를 도출할 수 있다.

[0039] - G3139: $y = 0.1522x - 0.0622$

[0040] - 3'-N-1: $y = 0.1629x - 0.075$

[0041] - 3'-N-2: $y = 0.061x - 0.0059$

[0042] - 3'-N-3: $y = 0.0681x - 0.0164$

[0043] (상기에서, x는 각 물질의 시료 내 농도(nM)를 나타내고, y는 G3139 및 이의 대사체와 6-FAM으로 표지된 프로브와의 복합체에 대한 전기영동도에서 각 물질의 피크의 면적과 내부 표준 물질(플루오레세인, 1 nM)의 면적의 비를 나타낸다)

[0044] 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 하기와 같은 단계를 토대로 0.5 내지 50 nM의 범위에서 시료 내 G3139 및 이의 대사체(3'-N-1, 3'-N-2 및 3'-N-3)의 농도를 동시에 확인할 수 있다:

[0045] 1) 생물학적 시료로부터 G3139 및 이의 대사체를 포함하는 핵산을 추출하는 단계;

[0046] 2) 상기 단계에서 추출한 핵산과, 6-FAM이 표지되고 G3139 및 이의 대사체에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA 프로브를 혼성화시키는 단계;

[0047] 3) 형광검출-모세관 전기영동 (CE-LIF)을 이용하여 G3139-프로브 복합체, 3'-N-1-프로브 복합체, 3'-N-2-프로브 복합체 및 3'-N-3-프로브 복합체를 분리 및 확인하는 단계;

[0048] 4) 상기 단계 3)의 결과 G3139 및 이의 대사체 각각의 프로브 복합체 피크를 확인하여 이의 형광신호 또는 흡광도를 확인하는 단계; 및

[0049] 5) 상기의 형광신호 또는 흡광도를 하기의 공식에 입력하여 농도 값을 도출하는 단계

[0050] - G3139: $y = 0.1522x - 0.0622$

[0051] - 3'-N-1: $y = 0.1629x - 0.075$

[0052] - 3'-N-2: $y = 0.061x - 0.0059$

[0053] - 3'-N-3: $y = 0.0681x - 0.0164$.

[0054] (상기에서, x는 각 물질의 시료 내 농도(nM)를 나타내고, y는 G3139 및 이의 대사체와 6-FAM으로 표지된 프로브와의 복합체에 대한 전기영동도에서 각 물질의 피크의 면적에 대한 내부 표준 물질(플루오레세인, 1 nM)의 면적의 비를 나타낸다)

[0056] 다른 양상은 1) G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브; 2) 혼성화 버퍼; 및 3) 분리용 버퍼를 포함하는, 형광검출-모세관 전기영동 시스템에 적용하기 위한 G3139 및 이의 대사체 검출용 키트를 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 키트에도 공히 적용된다.

[0057] 상기 분리용 버퍼는 트리스-보레이트(Tris-borate) 완충액, CHES 완충액 또는 트리스-CHES(TRIS-CHES) 완충액을 이용하는 것일 수 있다. 또한, 상기 완충액 (구체적으로, 트리스-보레이트 완충액)은 100 mM 이상의 농도를 갖는 것일 수 있고, 구체적으로, 100 내지 200 mM의 농도를 갖는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 100 내지 200 mM, 100 내지 190 mM, 100 내지 180 mM, 100 내지 170 mM, 100 내지 160 mM, 100 내지 155 mM, 100 내지 150 mM, 120 내지 200 mM, 120 내지 190 mM, 120 내지 180 mM, 120 내지 170 mM, 120 내지 160 mM, 120 내지 155 mM, 120 내지 150 mM, 130 내지 200 mM, 130 내지 190 mM, 130 내지 180 mM, 130 내지 170 mM, 130 내지 160 mM, 130 내지 155 mM, 130 내지 150 mM, 140 내지 200 mM, 140 내지 190 mM, 140 내지 180 mM, 140 내지 170 mM, 140 내지 160 mM, 140 내지 155 mM, 140 내지 150 mM, 145 내지 200 mM, 145 내지 190 mM, 145 내지 180 mM, 145 내지 170 mM, 145 내지 160 mM, 145 내지 155 mM, 145 내지 150 mM, 150 내지 200 mM, 150 내지 190 mM, 150 내지 180 mM, 150 내지 170 mM, 150 내지 160 mM 또는 150 내지 155 mM의 농도를 갖는 것일 수 있다. 상기 형광검출-모세관 전기영동 시스템에서 사용되는 모세관은 20 cm 이상의 길이를 갖는 것일 수 있으며, 구체적으로 20 내지 100 cm의 길이를 갖는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로, 20 내지 100 cm, 20 내지 90 cm, 20 내지 80 cm, 20 내지 70 cm, 20 내지 65 cm, 20 내지 60 cm, 30 내지 100 cm, 30 내지 90 cm, 30 내지 80 cm, 30 내지 70 cm, 30 내지 65 cm, 30 내지 60 cm, 40 내지 100 cm, 40 내지 90 cm, 40 내지 80 cm, 40 내지 70

cm, 40 내지 65 cm, 40 내지 60 cm, 50 내지 100 cm, 50 내지 90 cm, 50 내지 80 cm, 50 내지 70 cm, 50 내지 65 cm, 50 내지 60 cm, 55 내지 100 cm, 55 내지 90 cm, 55 내지 80 cm, 55 내지 70 cm, 55 내지 65 cm, 55 내지 60 cm, 60 내지 100 cm, 60 내지 90 cm, 60 내지 80 cm, 60 내지 70 cm, 60 내지 65 cm, 70 내지 100 cm, 70 내지 90 cm 또는 70 내지 80 cm의 길이를 갖는 것일 수 있다.

- [0059] 또 다른 양상은 1) 개체에 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 투여하는 단계; 2) 상기 개체로부터 수득한 생물학적 시료에서 핵산을 추출하는 단계; 3) 상기 단계에서 추출한 핵산과, G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 혼성화시키는 단계; 4) 형광검출-모세관 전기영동(Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence: CE-LIF)을 이용하여 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 검출하는 단계; 및 5) 상기 검출 결과를 토대로 약동학 데이터 분석을 수행하는 단계를 포함하는, 시료 내 G3139 및 이의 대사체의 약동학 및 대사산물 평가 방법을 제공한다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.
- [0060] 상기 개체는 개, 고양이, 쥐, 래트, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 조류, 파충류, 양식어류 등을 제한 없이 포함할 수 있으며, 상기 개체는 인간을 제외하는 것일 수 있다.
- [0061] 상기 개체에 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 투여하는 단계는 2.00 mg/kg 이하의 농도로 투여하는 것일 수 있으며, 구체적으로 0.01 내지 2 mg/kg, 0.01 내지 1.5 mg/kg, 0.01 내지 1 mg/kg, 0.01 내지 0.9 mg/kg, 0.01 내지 0.8 mg/kg, 0.1 내지 2 mg/kg, 0.1 내지 1.5 mg/kg, 0.1 내지 1 mg/kg, 0.1 내지 0.9 mg/kg, 0.1 내지 0.8 mg/kg, 0.3 내지 2 mg/kg, 0.3 내지 1.5 mg/kg, 0.3 내지 1 mg/kg, 0.3 내지 0.9 mg/kg, 0.3 내지 0.8 mg/kg, 0.5 내지 2 mg/kg, 0.5 내지 1.5 mg/kg, 0.5 내지 1 mg/kg, 0.5 내지 0.9 mg/kg, 0.5 내지 0.8 mg/kg, 0.7 내지 2 mg/kg, 0.7 내지 1.5 mg/kg, 0.7 내지 1 mg/kg, 0.7 내지 0.9 mg/kg 또는 0.7 내지 0.8 mg/kg의 농도로 투여하는 것일 수 있다.
- [0062] 상기 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 투여하는 단계는 폴리머 기반으로 G3139 및 이의 대사체를 전달하는 것일 수 있으며, 구체적으로 양이온성 선형 폴리에틸렌이민을 기반 폴리머를 이용하는 것일 수 있다.
- [0063] 상기 방법에 있어서, 개체로부터 수득한 생물학적 시료는 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 투여한 후 일정 시간이 지나고 수득한 시료일 수 있으며, 예를 들어, 투여한 후 0, 5, 10, 15, 45, 90, 180, 360, 540, 1,440 및 1,800분이 지난 후 수득한 시료일 수 있다.
- [0064] 상기 방법에 있어서, 약동학 데이터 분석을 수행하는 단계는 G3139 및 이의 대사체 중 하나 이상을 투여한 후 일정 시간이 지나고 수득한 시료 각각에 포함된 G3139 또는 이의 대사체의 농도를 토대로 약동학 데이터를 도출하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 약동학 데이터는 AUC(최종) (nM/h), Cmax (nM), Tmax (hours), T1/2 (hours), CL/F [L/(h·kg)] 및 Vz/F (L/kg)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0065] 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 G3139 또는 이의 대사체 투여 후 30시간까지 개체 내에서의 약동학 및 대사산물을 평가할 수 있다.

- [0067] 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)의 모델로서 G3139와 G3139의 대사산물을 동시에 검출하기 위해 민감하고 특이적인 CE-LIF)을 개발하였다. 이 방법은 3.0pM의 검출 한계와 >84.2%의 회수율로 G3139 및 그 대사 산물에 대해 테스트된 농도 범위 내에서 우수한 선형성을 보여주었다. 본 발명에서 개발한 혈장 추출 방법을 기반으로 G3139를 0.76 mg/kg으로 정맥 투여한 후 쥐의 혈장에서 약동학 및 대사체를 평가했다. 결과는 G3139와 그 대사체가 30시간 테스트 샘플링 시점까지 기준선 분리와 함께 CE-LIF(capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence)를 사용한 단일 실험을 통해 성공적으로 동시에 검출 및 분석되었음을 보여주었다. G3139와 그 대사체의 반감기는 각각 31시간과 68시간에서 관찰되었다. 이 연구는 다양한 질병을 치료하기 위해 ASO를 개발하는 데 필요한 약동학 및 대사 산물 평가를 위한 효과적인 분석 방법을 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0068] 본 발명의 방법을 이용할 경우, 시료 내 G3139 및 이의 대사체를 매우 민감하고 효율적으로 검출하거나 이를 토대로 약동학 분석 등을 수행할 수 있는 바, 본 발명의 방법은 기존의 방법보다 검출 감도는 향상되면서 수행 방법은 간단하다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 G3139 및 그 대사체의 전기영동도를 나타낸 도면이다. A는 블랭크(blank) 쥐 혈장 샘플에서 추출한 결과를 나타낸다. B는 G3139 및 이의 대사체(3'-N-1, 3'-N-2 및 3'-N-3)로 스파이크된 블랭크 혈장에서 추출한 결과를 나타낸다 (농도는 G3139 및 3'-N-1은 0.5 nM, 3'-N-2 및 3'-N-3는 0.1 nM). C는 G3139 (0.76 mg/kg)의 IV 투여 후 15분에 수집된 혈장 샘플(20배 희석)에서 추출한 결과를 나타낸다. 피크 할당; 피크 1, 3'-N-3; 피크 2, 3'-N-2; 피크 3, 3'-N-1; 피크 4, G3139. ssDNA 프로브 및 추출된 ASO를 95 °C에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 40 °C에서 20분 동안 혼성화 완충액에서 혼성화시켰으며, 다음의 조건으로 형광검출-모세관 전기영동을 수행하였다: 미코팅된 모세관 (75 mm id X 60 cm); 분리 전압, 14kV; 주입, 0.5psi에서 15초; 분리 완충액: 2.5M 요소를 함유하는 150mM Tris-borate 완충액(pH 10). 플루오레세인(1 nM)을 내부 표준물질로 사용했다. (RFU, 상대 형광 단위).

도 2는 정맥 주사(0.76mg/kg) 후 쥐에서 G3139와 그 대사 산물인 3'-N-1, 3'-N-2 및 3'-N-3의 혈장 농도-시간 프로필을 나타낸다. 점은 측정된 농도의 평균을 나타내고, 막대는 표준 편차를 나타낸다(n = 2).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 실시예 1: 화학 물질 및 재료

[0073] 5'-카르복시플루오레세인 포스포르아미다이트 [6-카르복시플루오레세인 (6-FAM)]을 포함하는 형광 표지된 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오타이드 프로브, G3139 (MW: 5,411.6) 및 그 대사체, 3'-N-1(MW: 5,107.3), 3'-N-2(MW: 4,794.1) 및 3'-N-3(MW: 4,505.0)은 코스모진텍(서울, 한국)에서 구입했다. 페놀:클로로포름 5:1 시약은 Sigma Aldrich(Carlsbad, CA)에서 구입했다. In vivo jetPEI는 Polyplus Transfection (Illkirch-Graffenstaden, 프랑스)에서 구입했다. G3139 및 이의 대사체의 염기 서열은 하기 표 1에 기재하였다.

표 1

서열 이름	염기 서열 (5'-3')	서열번호
G3139	TCT CCC AGC GTG CGC CAT	1
3'-N-1	TCT CCC AGC GTG CGC CA	2
3'-N-2	TCT CCC AGC GTG CGC C	3
3'-N-3	TCT CCC AGC GTG CGC	4

[0076] 실시예 2: 동물 실험 및 혈액 수집

[0077] Sprague Dawley 수컷 쥐(7주령)는 Raonbio(수원, 한국)에서 구매하였다. 모든 실험 프로토콜은 승인 번호 CE2019063에 따라 차운 센터(경기도, 한국)의 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았다. 2마리의 쥐에게 0.76 mg/kg G3139의 단일 용량이 로딩된 In vivo jetPEI를 투여하였다. G3139을 포함하는 용액과 In vivo jetPEI를 혼합하고(N/P = 7), 제조업체의 프로토콜에 따라 인큐베이션하고, 꼬리 정맥을 통해 0.76 mg/kg의 용량으로 IV 주사하였으며 시간당 3마리의 쥐로부터 주사 후 0, 5, 10, 15, 45, 90, 180, 360, 540, 1,440 및 1,800분 후 각 혈액 샘플을 수집했으며, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 튜브에 수집하였다. 그 후, 4 °C에서 10분 동안 3,000g에서 원심분리하여 혈액 샘플로부터 혈장을 얻었다. 수득한 혈장 샘플은 사용 시까지 -80 °C에서 보관하였다.

[0079] 실시예 3: 올리고뉴클레오타이드 분리

[0080] 혈장(100 μL) 샘플은 DNA를 분리하기 위해 20 μL의 클로로포름 페놀 시약 및 5% 수산화암모늄 100 μL와 혼합 후 60초 동안 볼텍싱하고 4 °C에서 15분 동안 12,000g로 샘플을 원심분리했다. 상층액을 새 튜브로 옮기고, 올리고뉴클레오타이드 침전을 위해 800 마이크로리터의 에탄올을 첨가 후 경우에 따라서는 10mg/mL glycogen 20 uL를 추

가한 후 -80 °C에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 4 °C에서 30분 동안 20,000g로 원심분리한 후 용액을 제거하고 얻어진 펠렛을 30 µl의 혼성화 완충액으로 용해시켰다.

[0082] 실시예 4: 혼성화

[0083] 혼성화를 위해 6-FAM 표지된 DNA 프로브(100nM)와 합성 G3139 및 그 대사체(3'-N-1, 3'-N-2 및 3'-N-3)을 혼성화 완충액(Tris-acetate 50mM, pH 8.0, NaCl 50mM, EDTA 0.1mM 및 Triton X-100 1% 함유)과 혼합했다. 표지된 DNA 프로브를 QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen, Crawley, UK)의 용출 완충액(Tris-Cl 완충액 10mM, pH 8.5)에 용해했다. 변성(denaturation)을 위해 샘플을 열 순환기(Eppendorf)에서 95 °C에서 5분 동안 인큐베이션하였으며, 이후 모세관에 도입하기 전에 40 °C에서 15분 동안 복원(renaturation) 단계를 수행했다.

[0084] 상기 DNA 프로브의 서열은 하기와 같이 표현될 수 있으며, 서열번호 5에 기재하였다.

[0085] - 5`ATG GCG CAC GCT GGG AGA 3` - 6FAM

[0087] 실시예 5: LIF(laser induced fluorescence) 검출기가 장착된 모세관 전기영동 (CE-LIF)

[0088] 추출된 올리고뉴클레오티드는 LIF 검출기가 있는 PA800 plus CE 시스템(Beckman Coulter, Fullerton, CA)을 사용하여 분석되었다. 형광은 3mW 아르곤-이온 레이저를 사용하여 488nm에서 들뜨게 되고 4Hz의 속도로 520nm 방출 필터를 통해 방출되어 감지되었다. 내경 75 µm, 길이 60cm(유효 길이 50cm)의 미처리된(untreated) 모세관(Beckman Coulter)을 사용하여 분리를 수행했다. 분리는 14kV를 적용하여 35 °C에서 2.5M 요소를 포함하는 150mM Tris-borate(pH 10.0) 러닝(running) 완충액을 사용하여 수행하였으며, 샘플 구획은 25 °C에서 유지했다. 샘플은 20초 동안 0.5psi에서 유체역학적으로 도입되었고 주입 부피는 60nL이었다. 전기영동도는 32 Karat 소프트웨어를 사용하여 분석되었다.

[0090] 실시예 6: 약동학 데이터 분석

[0091] 약동학적 매개변수는 WinNonlin 소프트웨어 버전 6.0(Pharsight, Mountain View, CA)으로 추정되었다.

[0093] 실험예 1: CE-LIF를 사용한 혈장 내 G3139 분석

[0094] CE-LIF(capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence)를 이용한 G3139 및 그 대사체의 약동학적 프로파일을 분석하기 전에, 혈장에서 G3139와 이의 주요 대사체인 3'-N-1, 3'-N-2, 3'-N-3의 동시 분석을 위한 조건을 최적화하고자 하였다.

[0095] 먼저 CE-LIF를 사용한 miRNA의 이전 약동학 연구를 기반으로 125mM Tris-borate 완충액과 50cm 모세관을 사용하여 G3139와 그 대사체의 동시 분석을 시도했다. 그러나 3'-N-1과 3'-N-2 사이에서는 기준선 분리가 이루어지지 않았다. 따라서, 모체 G3139 및 이의 대사체 피크를 분리하기 위한 이동 시간을 연장하기 위해, 분리 완충액 농도 및 모세관 길이를 각각 150mM 및 60cm로 변경하였다.

[0096] 상기 변경된 조건을 토대로 G3139와 그 대사체의 분리 및 동시 분석이 수행하였으며, 상기 변경된 CE-LIF 조건에서는 내인성 물질의 명백한 간섭이 관찰되지 않았다. 구체적으로, 빈 혈장 샘플 및 낮은 정량 한계의 분석물질을 포함하는 스파이크 혈장 샘플(G3139 및 3'-N-1의 경우 0.5nM, 3'-N-2 및 3'-N-3의 경우 0.1nM) 및 G3139의 IV 투여 후의 혈장 샘플에 대한 분석 결과를 도 1에 나타냈다. 또한, 상기 CE-LIF 조건은 G3139 투여 후 혈장에서 G3139의 약동학 및 이의 대사 산물을 평가하기 위해 적용되었다.

[0097] 상기의 분석 조건에서 혈장 시료에서 ASO(Antisense oligonucleotides) 및 그 대사 산물의 추출은 효과적이고 간단한 시료 추출을 위해 최적화되었다. 적절한 시료 준비를 설계하는 것은 높은 회수율과 신뢰할 수 있는 분석에 매우 중요하며, 이는 검출 한계와 재현성에 상당한 영향을 미친다. ELISA 분석을 위한 일반적인 ASO 시료 준비 방법에는 시간이 많이 소요되는 반응 과정이 포함된다. 또한, 분석의 민감도와 특이도는 시약의 품질에 따라 달라진다.

[0098] 본 발명에서는 간단하고 빠른 추출 과정을 시도하기 위해 20 µL의 페놀-클로로포름 용액으로 혈장 샘플을 탈단

백화한 후 에탄올 침전을 통해 혈장에서 ASO를 추출했다. 이 추출 과정은 고체상 추출과 같은 집중적인 상 분리나 추가적인 추출 과정을 포함하지 않았다. 상기 방법을 통해 분석을 수행한 결과, CE-LIF 시스템을 사용할 경우 내인성 간섭의 영향 없이 혈장에서 ASO를 성공적으로 분리하고 분석할 수 있음을 보여주었다. 본 발명에서 확인한 추출법은 >84.2%의 높은 회수율을 얻었고 소량의 페놀-클로로포름 용액으로 단순화된 상 분리 과정을 보여주었다.

[0099] 상기에서 확인한 최적화된 시료 추출 및 분석 방법은 0.5-50 nM 범위($R^2=0.9930$)에서 혈장 G3139 선형성을 보여주었다. G3139 대사 산물은 보정 라인에서 선형($R^2 > 0.9990$) 농도 의존 흡광도를 나타냈다(3'-N-1의 경우 0.5-50 nM 및 3'-N-2 및 3'-N-3의 경우 0.1-20 nM). G3139, 3'-N-1, 3'-N-2 및 3'-N-3의 교정 곡선에 대한 일반적인 방정식은 각각 $y = 0.1522x - 0.0622$, $y = 0.1629x - 0.075$, $y = 0.061x - 0.0059$ 및 $y = 0.0681x - 0.0164$ 로 확인되었다 (상기에서, x는 각 물질의 시료 내 농도(nM)를 나타내고, y는 G3139 및 이의 대사체와 6-FAM으로 표지된 프로브와의 복합체에 대한 전기영동도에서 각 물질의 피크의 면적에 대한 내부 표준 물질(플루오레세인, 1 nM)의 면적의 비를 나타낸다). 또한, 혈장 내 G3139 및 대사 산물의 검출 한계는 3pM로 확인되었다.

[0100] 상기 결과를 토대로 본 발명의 CE-LIF 조건 및 추출 공정을 사용하여 혈장 내 G3139 및 그 대사체의 매우 민감하고 구체적인 분석을 수행할 수 있음을 알 수 있다. 따라서, 상기 방법은 LC/MS/MS 방법보다 감도가 10배 향상되었으며 ELISA 방법보다 간단하게 수행할 수 있다는 장점이 있다.

[0102] 실험예 2: G3139의 IV 투여 후 G3139 및 이의 대사체의 약동학 분석

[0103] 상기 실험예 1에서 확인한 최적화된 CE-LIF 조건 및 추출 프로세스를 사용하여 0.76 mg/kg의 G3139를 IV 투여한 후 약동학 연구를 수행했다. 특히, 본 발명에서는 폴리머 기반의 G3139 전달에 대한 약동학을 모니터링하기 위해 양이온성 선형 폴리에틸렌이민을 기반으로 하는 시판되는 in vivo jetPEI(Polyplus Transfection)를 IV 투여에 사용했다. 이는 G3139를 비롯한 많은 ASO가 안정성, 세포 흡수 및 표적화를 개선하기 위해 제형화되기 때문이다.

[0104] 약동학 분석 결과, 모체 G3139와 그 대사 산물인 3'-N-1, 3'-N-2 및 3'-N-3이 예상대로 검출되었다. 또한, G3139와 그 대사체 중 3'-N-3을 제외하고는 투여 후 30시간째에 채취된 시료에서까지 검출되었으며, 3'-N-3은 혈장에서의 농도가 낮기 때문에 투여 후 3시간째에 채취된 시료에서까지 검출되었다 (도 2). 상기 결과는 우리가 적용한 CE-LIF 방법이 낮은 용량에서도 혈장 내 G3139와 그 대사 산물을 분석할 만큼 충분히 민감하다는 것을 나타낸다.

[0105] 구체적으로, G3139의 혈중 농도는 가장 이른 샘플링 시점(5분)에 ~293 nM이었으며, 1.5시간 이내에 ~5.66 nM으로 감소한 것으로 나타났다. 즉 가장 먼저 측정된 시간의 농도에서 약 98.1%가 혈액에서 제거된 것이다. G3139의 반감기와 AUC 값은 각각 31.24h 및 183.83h/nM으로 추정되었다(표 2). 이 반감기는 기존 방법을 사용한 경우보다 연장된 것으로 보인다. 또한, G3139 뿐만 아니라 이의 모든 대사체는 길어진 반감기를 보였고, 특히 3'-N-1은 G3139와 그 대사체 중 가장 긴 반감기를 보였다. 그리고 대사체의 최고 혈장 농도는 IV 주입 후 0.25시간 후에 감소했다(표 2).

표 2

	G3139	3'-N-1	3'-N-2	3'-N-3
AUC(최종) (nM/h)	183.83 ± 5.80	83.22 ± 4.87	63.31 ± 6.20	27.11 ± 3.21
Cmax (nM)	292.77 ± 11.04	84.61 ± 2.15	107.96 ± 4.24	50.55 ± 6.36
Tmax (hours)	0.083	0.25	0.25	0.25
T1/2 (hours)	31.24 ± 4.09	68.79 ± 5.12	18.00 ± 5.69	20.42 ± 2.26
CL/F [L/(h · kg)]	0.41 ± 0.01	0.52 ± 0.53	1.35 ± 0.08	3.72 ± 0.44
Vz/F (L/kg)	18.46 ± 1.81	51.44 ± 1.47	35.33 ± 13.14	105.74 ± 0.87

[0107] * AUC(최종), 시간 0에서 마지막 측정 가능한 농도까지의 혈장 농도-시간 곡선의 아래 면적; CL/F, 겉보기 클리어런스(apparent clearance); Cmax, 최고 혈장 농도 (peak plasma concentration); T1/2, 혈장 말단 반감기 (plasma terminal half-life); Tmax, 최고 혈장 농도까지의 시간(time to peak plasma concentration); Vz/F,

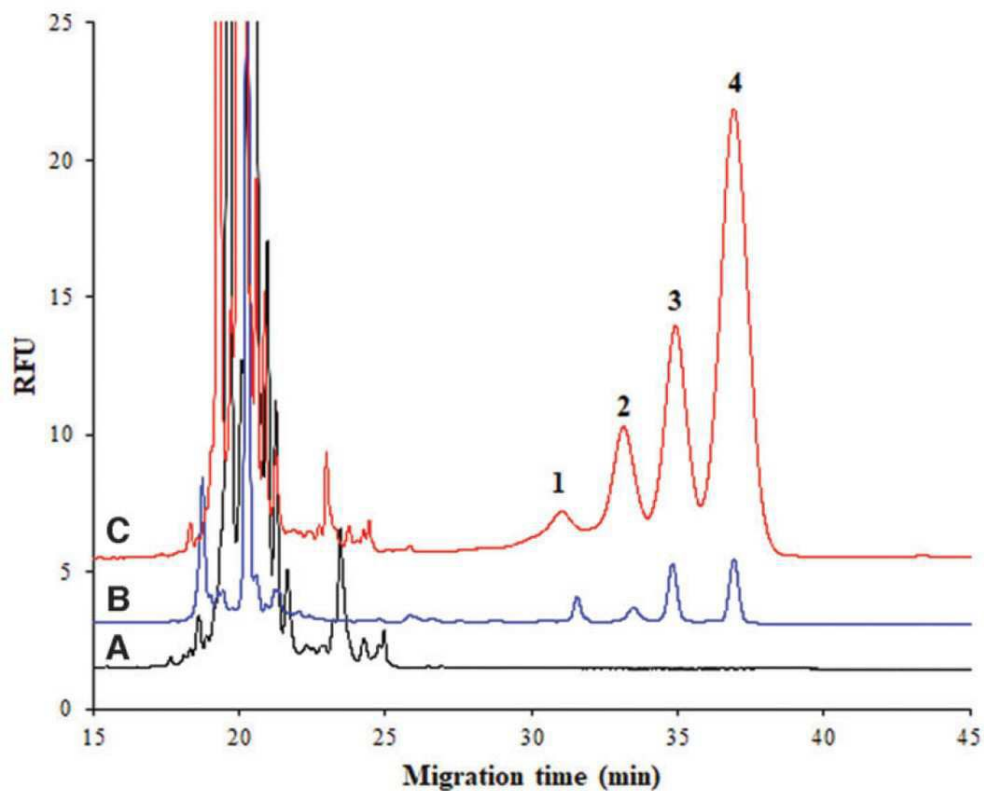
분포의 겉보기 부피 (apparent volume of distribution).

[0109] 본 발명에서는 G3139의 IV 투여 후 간단하고 민감한 CE-LIF 방법을 사용하여 혈장에서 G3139와 그 대사체의 수준을 평가했다. 상기 CE-LIF 방법은 기존의 방법에 비해 매우 낮은 용량(0.76 mg/kg)에서 G3139의 약동학 및 대사체를 평가하는 데 성공적으로 적용되었다. 또한, G3139는 폴리머 기반 G3139 전달의 약동학을 모니터링하기 위해 *in vivo* jetPEI를 이용하여 투여되었다. 이 CE-LIF 방법은 혈장에서 G3139와 그 대사체의 민감하고 신뢰할 수 있는 동시 분석 결과를 입증했다. 우리는 G3139와 그 대사체인 3'-N-1이 3'-N-2 및 3'-N-3에 비해 순환에서 천천히 제거된다는 것을 확인하였다. 특히, 3'-N-1은 G3139와 그 대사체인 3'-N-1, 3'-N-2, 및 3'-N-3 중에서 가장 긴 반감기를 보였다.

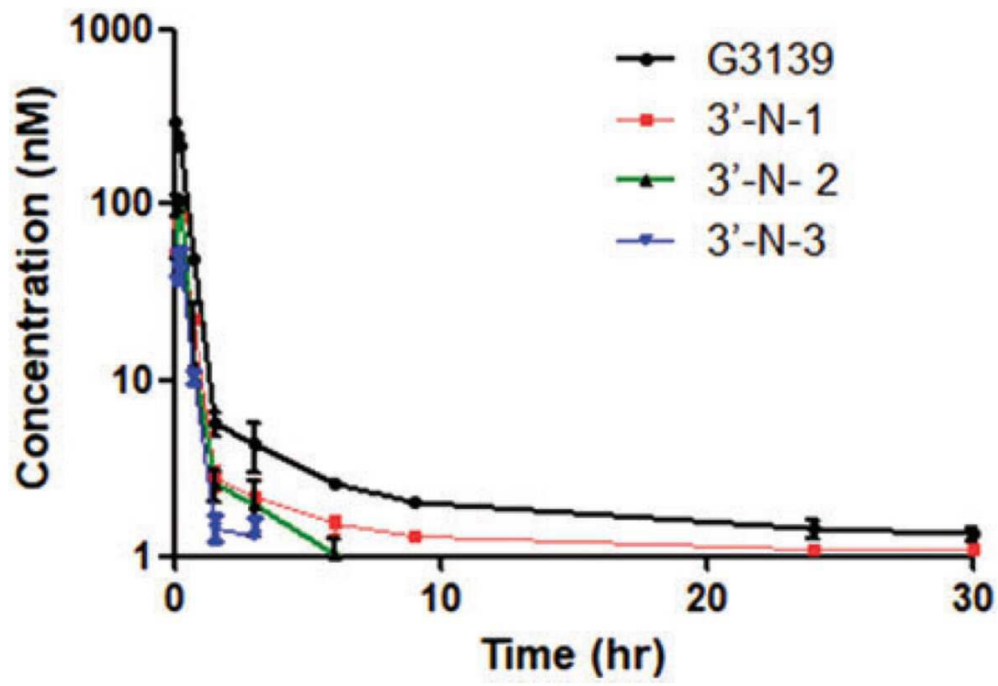
[0111] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.