(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12Q 1/68

(11) 공개번호 특2003-0070584
(43) 공개일자 2003년08월30일

(21) 출원번호 10-2003-7007904
(22) 출원일자 2003년06월13일
번역문 제출일자 2003년06월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2001/48694
(87) 국제공개번호 WO 2002/48405
(86) 국제출원출원일자 2001년12월13일
(87) 국제공개일자 2002년06월20일

(30) 우선권주장 09/736,920 2000년12월13일 미국(US)

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

(72) 발명자 이버슨패트릭엘.
미국오리건97330코발리스노스웨스트페어옥스플레이스4920

(74) 대리인 정진상
박종혁

심사청구 : 없음

(54) 표적 ＲＮＡ의 비침습적 검출 방법

요약

피험자에서 단일-가닥 표적 RNA를 포함하는 염기-특이적 세포내 결합 사건의 발생을 검출하는 방법이 개시된다. 이 방법은 (i) 표적 RNA의 일부분에 상보하는 표적화 염기 서열을 포함하는 8 내지 40 염기, (ii) 상보성 RNA 서열과의 결합과 관련하여 약 50°C 이상의 Tm, 및 (iii) 포유류 세포에 의해 능동 흡수되는 능력을 가지며, (iv) 이중-가닥 형태로 RNA를 절단할 수 있는 RnaseH 같은 RNase에 대한 이 제제와 혼성화된 상보성 mRNA의 내성을 부여하는, 올리고머 안티센스 화합물을 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다. 화합물이 복합체화되지 않은 형태로 투여된 경우, 그것은 실질적으로 백본을 가지는 것이 바람직하다. 상기 제제 투여 단계 후 선택된 시간에서 피험자로부터 체액 샘플을 얻고, 안티센스 올리고머 및 표적 RNA의 상보성 부분으로 이루어진 뉴클레아제-내성 헤테로듀플렉스의 샘플에서의 존재가 검출된다. 본 방법은 예를 들어 유전자 발현 레벨, 어떤 유전자의 발현을 특징으로 하는 생화학적 또는 생리학적 상태, 유전적 돌연변이의 검출, 및 감염성 바이러스 또는 박테리아 제제의 존재 및 확인에 유용하다. 또한, 본 방법을 수행하는데 사용되는 어레이, 키트 및 항체가 개시된다.

색인어

RNA, 세포, 염기, 특이적, 결합, 상보성, 서열, 안티센스, 항체, 유전자

명세서

기술분야

본 발명은 생체내에서 RNA 표적 서열의 존재를 검출하는 비침습적 방법, 및 이 방법을 실행하는데 유용한 어레이, 키트 및 항체에 관한 것이다.

참고문헌

Bloomers, M., Nuc Acids Res, 22(20):4187 (1994)

Brown, S. et al., Science 265:777 (1994).

Cross, V., et al., Biochem, 36:4096 (1997)

Cruse, W. et al., J. Mol Biol, 192:891 (1986).

Dagle, et al., Nuc Acids Res, 28(10): 2153 (2000).

Ding, D. et al., Nuc Acids Res, 24(2):354 (1996).

Gait, M.J.; Jones, A.S. and Walker, R.T. (1974) J. Chem. Soc. Perkin I, 1684-1686.

Heinemann, U., et al., Nuc Acids Res, 19:427 (1991)

Huie, E.M.; Kirshenbaum, M.R.; and Trainos, G.L. (1992) J. Org. Chem. 57:4569.

Jones, A.S.; MacCross, M. and Walker, R.T. (1973) Biochem. Biophys. Acta 365:365-377.

Kang, H.; Chou, P.J.; Johnson, W.C.; Weller, D.; Huang, S.B; Summerton, J.E. (1992), Biopolymers 32:1351-63.

Lacroix, L., et al., Biochem Biophys Res Commun, 270:363 (2000).

Matteucci, M. (1990) Tetrahedron Lett. 31:2385-2388

McElroy, E.B.; Bandam, R.; Huand, J.; and Widlanski, T.S. (1994) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:1071.

Mertes, M.P. and Coates, E.A. (1969) J. Med. Chem. 12:154-157.

Miller, P.S., Ts'O, P.O.P.; Hogrefe, R.I.; Reynolds, M.A.; and Arnold, L.J. (1993) In: Antisense Research Applications. Crooke, S.T. and Lebleu, B. (eds): Boca Raton: CRC Press, pp. 189.

Mohan, V. et al., Tetrahedron, 51:8655 (1995).

Neilsen, P.E.; Engholm, M.; Berg, R.H.; and Buchardt, O. (1991) Science 254:1497-1500

Olgive, K.K. and Cormier, J.F. (1986) Tetrahedron Lett 26:4159-4162.

Piotto, M. et al., Tetrahedron, 47:2449 (1991)

Ray, A., et al., FASEB 14:1041 (2000)

Roughton; A.L., Portman, S.; Benner, S.A.; and Egli, M. (1995) J. Am. Chem. Soc. 117:7249.

Schroeder, H.W., "Part IV, Principles of Human Genetics", Chapter 23 in *Cecil Textbook of Medicine* (ed. J. Claude Benett and F. Blum) 20th ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1996, pp. 134-165

Stein, C. et al., Pharmacol & Therapeutics, 85:231 (2000).

Stirchak, E., et al., Nuc Acids Res, 17(15):6129 (1989).

Vasseur, J.J.; Debart, F.; Sanghvi, Y.S.; and Cook, P.D. (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:4006.

배경기술

다양한 질환 상태의 진단 및 모니터링은 그 상태에 관련된 펩티드, 단백질, 항체 및/또는 핵산을 분석함으로써 수행된다.

최근에 유전자 및 다른 게놈 서열의 분석이 유전질환이나 그러한 질환에 대한 소인을 확인하고, 특정한 병리 또는 세포 종류의 특징 또는 기능 유전자 발현의 조정을 돕는 약물에 대한 반응으로서 유전자 발현의 레벨을 모니터링하기 위한 중요한 도구가 되고 있다. 현재, 이 종류의 유전자 분석은 생체외적으로 수행되는데, 전형적으로 개체로부터 혈액 샘플의 조직을 얻고, 어떤 서열 돌연변이의 존재 또는 부재, 유전자 발현 레벨의 상승 또는 억제, 또는 바이러스- 또는 박테리아-특이적 서열에 대해, 게놈 DNA, cDNA 또는 mRNA를 분석하는 것이다.

돌연변이나 발현 레벨의 변화를 검출하는 진단 장치, 예를 들어 유전자칩이 현재 이용되고 있으며 새로운 가능성을 개발중에 있다. 유사한 방법이 개체에서의 유전자 발현에 대한 치료 화합물의 효과를 모니터하기 위해 사용될 수 있다. 즉, 화합물을 투여한 후, 조직 생검 또는 혈액 샘플을 치료된 환자로부터 얻어서 하나 이상의 표적 유전자의 발현에 대한 화합물의 효과를 측정할 수 있다.

이들 시험관내 방법에 의한 돌연변이 및 유전자 발현 레벨의 분석은 개체의 유전자 메이크업 및 약물 반응에 대한 중요한 정보를 수득할 수 있는 능력을 가지지만, 이 방법은 대개 비실용적이고 고가이며 및/또는 원하는 정보를 제공할 수 없다. 예를 들어, 어떤 개체의 조직을 생검하여 그 조직에서 유전자 발현을 모니터하는 것은 일반적으로 비실용적인데, 왜냐하면 조직 샘플을 얻는 것의 어려움과 환 자에 대한 위험, 그리고 분석용으로 조직 샘플을 워크업하는 비용 때문이다.

따라서, 개체로부터 조직 또는 세포 샘플을 얻거나, 또는 그러한 세포 또는 조직으로부터 얻어진 핵산 샘플을 분리하여 측정할 필요가 없는 방법에 의해, 유전자 돌연변이를 검출하고 유전자 발현 레벨, 또는 치료제에 대한 반응으로서 유전자의 발현을 모니터할 수 있도록 하는 것이 매우 바람직할 것이다.

세포의 mRNA 레벨을 조정하기 위한 치료적 접근법 중 하나로서 안티센스 치료법이 제안되었다. 전형적으로 이 접근법은 왓슨-크릭 염기쌍에 의해 표적 mRNA 중 기지-서열 영역에, 예를 들어 mRNA 스타트 코돈에 걸쳐 있는 영역

또는 스플라이스 정션 부위에 결합할 수 있는 핵산 또는 핵산 유사체를 사용한다. 안티센스 화합물이 표적-조직 세포를 찾아내어 그것으로 들어가서 mRNA 프로세싱 또는 번역을 불활성화시킬 수 있다면, mRNA의 기능적 발현 산물을 감소시키고 이로써 원하는 치료 효과를 야기하는데 효과적일 것이다.

안티센스 치료법에서, 투여된 안티센스 화합물이 세포에 의해 흡수되고 표적 mRNA 분자에 결합는 것을 (따라서 아마도 불활성화시키는 것을) 확인하는 것이 더 바람직할 것이다.

유전자-서열 분석의 다른 진단적 용도는 감염된 피험자에서 바이러스 또는 박테리아 병인을 확인하는데 있다. 이 분석은 심지어 가장 효과적인 치료 과정을 결정하기 위해서, 항체-내성 유전자의 발현의 존재 또는 레벨을 확인하는데까지 확장될 수 있다. 그러나, 그러한 유전자-서열 분석은 전형적으로 어려운 배양 및/또는 PCR 기술이 필요하다. 따라서, 간단하고 비교적 빠른 분석법에 의해 바이러스 또는 박테리아(또는 진균) 감염인자를 분석하는 방법을 제공하는 것이 바람직할 것이다.

발명의 개요

한 양태로서, 본 발명은 피험자에서 단일-가닥 표적 RNA를 포함하는 염기-특이적 세포내 결합 사건의 발생을 검출하는 방법을 포함한다. 이 방법의 실행에서, (i) 표적 RNA의 일부분에 상보하는 표적화 염기 서열을 포함하는 8 내지 40 염기, (ii) 상보성 RNA 서열과의 결합과 관련하여, 약 50℃ 이상의 Tm, 및 (iii) 포유류 세포에 의해 능동 흡수되는 능력을 가지며, (iv) 이중-가닥 형태로 RNA를 절단할 수 있는 RNaseH 같은 RNase에 대한 이 제제와 혼성화된 상보성 mRNA의 내성을 부여하는, 올리고머 안티센스 화합물이 피험자에게 투여된다. 바람직하게, 이 제제는 실질적으로 하전되지 않은 백본을 가지거나, 또는 예를 들어 세포로의 세포내이입에 의한 능동 흡수에 적합한 복합체를 만드는 화합물, 예를 들어 폴리양이온과 복합체를 이룬다. 화합물이 투여된 후 선택된 시간에서 환자로부터 체액 샘플을 얻고, 이 샘플을 분석하여 안티센스 올리고머와 상보성 RNA 전사체 부분으로 이루어진 뉴클레아제-내성 헤테로듀플렉스의 존재를 검출한다.

다양한 바람직한 구체예에서, 안티센스 화합물은 도 5에 나타낸 화합물 (A)-(D)에 의해 예시된 대로, 하전되지 않은 포스포러스-함유 서브유닛간 결합을 갖는 모르폴리노 안티센스 화합물이다.

검출 단계는 듀플렉스를 헤테로듀플렉스와 결합할 수는 있지만 자유 안티센스 제제와는 결합할 수 없는 지지체-결합된 포착제와 접촉시킴에 의해 헤테로듀플 렉스를 고체 지지체 상에 포착하는 단계, 및 그렇게 포착된 헤테로듀플렉스를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직한 포착제는 (a) 헤테로듀플렉스에 서열-독립적 방식으로 결합할 수 있는 항체, (b) 헤테로듀플렉스에 서열-의존적 방식으로 결합할 수 있는 항체, (c) 안티센스 화합물에 부착된 항원에 결합할 수 있는 항체, (d) 안티센스 화합물에 부착된 리간드 부분에 결합할 수 있는 비-항체 항리간드 분자, 및 (e) 염기-특이적 듀플렉스-결합 올리고머이다.

한 일반적인 구체예에서, 고체 지지체 상의 헤테로듀플렉스의 존재는 지지체 및 결합된 헤테로듀플렉스를 표지된 항체 같은 표지된(검출가능) 헤테로듀플렉스-결합제와 접촉시켜 놓음으로써 검출된다. 다른 일반적인 구체예에서, 지지체-결합된 헤테로듀플렉스는 예를 들어 전기영동 또는 질량분광법에 의해 지지체로부터 용리되어 유리된 형태로 검출된다.

피험자에서 치료제에 대한 반응으로서 표적 유전자의 발현의 변화를 검출하는데 사용하기 위해서, 표적 RNA는 표적 유전자의 발현에 의해 생성된 mRNA이며, 본 발명의 단계는 치료제의 투여 전 선택된 시간에서 수행되고, 그러한 투여 전후의 헤테로듀플렉스 레벨이 비교된다.

(i) 임신, (ii) 심장질환, (iii) 알콜중독, 및 (iv) 암과 같은 주어진 생화학적 또는 병리학적 상태나 그러한 상태에 대한 소인의 진단에 유용한 mRNA의 존재 또는 레벨을 검출하는데 사용하기 위해서, 표적 RNA는 선택된 상태의 진단에 유용한 단백질을 코드하는 mRNA이다.

주어진 유전질환의 진단에 유용한 돌연변이 유전자의 존재를 검출하는데 사 용하기 위해서, 표적 RNA는 이 유전자에 의해 전사된 mRNA이며 유전질환의 특징인 돌연변이 단백질을 코드한다. 안티센스 화합물은 단지 mRNA의 돌연변이된 형태와만 50℃ 이상에서 안정한 헤테로듀플렉스를 형성하도록 디자인될 수 있으며, 검출 단계는 선택적으로, 선택된 온도 예를 들어 50℃ 이상으로 샘플 내의 헤테로듀플렉스를 가열하는 것을 포함할 수 있으며, 이로써 하나 이상의 내부-염기 미스매치를 갖는 헤테로듀플렉스를 변성시킬 수 있다.

피험자에서 감염성 바이러스 또는 박테리아 병인의 존재를 검출하는데 사용하기 위해서, 표적 RNA는 각각 바이러스-특이적 또는 박테리아-특이적 서열을 갖는 단일-가닥 RNA 또는 DNA이다.

한 구체예에서, 안티센스 제제는 이 제제를 환자 피부의 한 영역에 도포함으로써 투여되며, 체샘플이 이 피부 영역에

접착 테이프를 붙임으로써 얻어지고, 샘플 내의 헤테로듀플렉스의 존재가 결합된 헤테로듀플렉스의 존재에 대해 테이프를 분석함에 의해 검출된다.

다른 양태로서, 본 발명은 피험자에서 복수의 표적 RNA를 포함하는 염기-특이적 세포내 결합 사건의 발생을 검출하는 방법을 포함한다. 이 방법은 복수의 상이한-서열 올리고머 안티센스 화합물이 환자에게 투여되고, 검출 단계가 형성될 가능성이 있는 복수의 헤테로듀플렉스 종들에 적용된다는 점에서 상술된 방법과 다르다.

헤테로듀플렉스 종들이 고체 지지체 상에서 검출되는 경우, 지지체는 영역들의 어레이를 가질 수 있으며, 이 경우 각 영역은 선택된 서열의 헤테로듀플렉스 종 들과 특이적으로 결합할 수 있는 서열-특이적 지지체-결합된 포착제를 함유한다. 어레이의 포착제는, 예를 들어 (a) 헤테로듀플렉스에 서열-의존적 방식으로 결합할 수 있는 항체, (b) 안티센스 화합물에 부착된 서열-특이적 항원에 결합할 수 있는 항체, 또는 (c) 서열-특이적 듀플렉스-결합 올리고머일 수 있다.

헤테로듀플렉스가 용질 또는 현탁액 형태로 검출되는 경우, 바람직하게 헤테로듀플렉스 종들은 고체 지지체와 결합됨에 의해 먼저 분리되고, 그후 지지체로부터 유리된 것들이 상이한-서열 종들을 구별할 수 있는 방법, 예를 들어 전기영동 또는 질량분광법에 의해 검출되는데, 이 경우 상이한-서열 헤테로듀플렉스들은 상이한 분자량 및/또는 전하를 가진다.

하나 이상의 기지의 질환 상태에 관련된 복수의 상이한 기지-돌연변이 유전자 서열 중 하나를 검출하는데 사용하기 위해서, 표적 RNA는 이 유전자 서열에 의해 전사된 mRNA이며 선택된 유전질환에 관련된 돌연변이 단백질을 코드한다.

복수의 상이한 바이러스 또는 박테리아 중 하나 이상의 존재를 검출하는데 사용하기 위해서, 본 방법의 단계들은 상대적으로 넓은 부류 및 상대적으로 좁은 부류의 바이러스 또는 박테리아를 각각 대표하는 바이러스 또는 박테리아 서열과 결합하기에 효과적인 제 1 및 제 2 세트의 안티센스 제제를 사용하여 연속적으로 수행될 수 있다. 제 2 세트의 안티센스 제제는 제 1 세트의 제제를 사용하여 형성되고 검출된 헤테로듀플렉스(들)을 기초로 하여 선택된다.

본 발명에 따르는 피부 분석 시스템을 사용하는 다른 구체예에서, 안티센스 제제는, 피험자의 피부에 접착식으로 부착되도록 적합하게 되어 있으며 피부 영역 의 어레이를 노출하도록 적합하게 된 구멍들의 어레이가 한정되어 있는 하부 접착층, 및 하부-층 구멍들에 상응하는 위치에 상이한-서열 안티센스 제제의 어레이를 함유하는 제거가능한 안티센스 송달층 함유하는 접착 패드를 피험자의 피부에 도포함으로써 투여된다. 검출 단계는 송달층을 제거하는 단계, 및 접착 샘플-수집층으로 그것을 재배치하여 구멍에 상응하는 어레이 영역들에 있던 접착층 위의 샘플을 수집하는 단계를 포함한다.

또한, 피험자에서 복수의 표적 RNA를 포함하는 염기-특이적 세포내 결합 사건의 발생을 검출하기 위한 진단용 어레이 장치가 본 발명의 일부를 형성한다. 어레이 장치는 복수의 영역으로 구분된 기판을 포함한다. 각 어레이 영역 상에는 상술된 종류의 특이적-서열 RNA/안티센스 헤테로듀플렉스와 결합할 수 있는 서열-특이적 결합제가 지녀진다. 또한, 어레이 장치 및 하나 이상의 어레이 영역에 결합된 그러한 헤테로듀플렉스 종들과 결합할 수 있는 검출 시약을 함유하는 키트가 개시된다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 상술된 종류의 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스에 대한 특이적 결합 친화성을 갖는 단일클론 항체를 포함한다. 헤테로듀플렉스에 대한 항체의 결합 친화성은 헤테로듀플렉스 서열과 실질적으로 무관할 수 있거나, 또는 이 헤테로듀플렉스의 한 영역에 있는 특이적 서열을 필요로 할 수 있다.

본 발명의 이들 및 다른 목적들과 특징들이 첨부된 도면과 함께 다음의 상세한 설명을 읽음으로써 더욱 완전히 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 신체로부터 배출된 헤테로듀플렉스를 형성하는데 있어서 안티센스 분자의 상호작용을 나타내며, 이는 본 발명의 방법에 따라서 얻어진 생체내 데이타와 일치한다.

도 2는 래트의 혈장에서 시간(분)에 따른 투여된 P450 안티센스 포스포로디티오에이트 모르폴리노 올리고머(PMO)의 소실 및 PMO:mRNA 헤테로듀플렉스의 출현에 대한 플롯이며, 여기서 흰색 네모는 PMO에 해당하고, 검은색 원은 PMO'RNA 듀플렉스에 해당한다.

도 3은 본 발명에 사용될 후보 분자인 하전되지 않은 백본을 가진 여러 가지 안티센스 분자를 나타낸다.

도 4는 본 발명에 사용하기 적합한 안티센스 화합물을 형성하는데 적합한 다양한 연결기들을 갖는 바람직한 안티센스 서브유닛의 한 부류를 나타낸다.

도 5A-5D는 전형적인 모르폴리노 올리고뉴클레오티드의 반복 서브유닛 세그먼트를 나타내며, A 내지 D/E로 지정된 것은 각각 도 4의 서브유닛 A-E를 사용하여 구성된 것이다.

도 6A-6E는 본 발명에 따라서 헤테로듀플렉스 종들을 검출하는데 사용된 다양한 종류의 고체-지지체/헤테로듀플렉스 상호작용을 예시한다.

도 7A-7C는 본 발명의 한 구체예에 따라서 고체 지지체 상에서 헤테로듀플렉스를 검출하는데 사용된 다양한 종류의 검출 시약을 예시한다.

도 8A-8D는 본 발명의 다른 구체예에 따라서, 정제된 용액 형태로 헤테로듀플렉스를 검출하는 단계를 예시하며, 여기서 정제된 또는 부분적으로 정제된 헤테 로듀플렉스는 질량분광법(8C) 또는 겔 전기영동(8D)에 의해 분석된다.

도 9는 본 발명의 양태에 따라서 형성된 어레이 장치의 일부분을 나타낸다.

도 10은 피험자에서 복수의 mRNA 종들 각각의 존재를 측정하기 위한 가설적 시험 결과를 예시한다.

도 11은 본 발명의 경피적 구체예에서 사용된 경피적 어레이 어플리케이터의 단면도이다.

도 12는 선 12-12를 따라 취해진 도 11의 어플리케이터 장치의 확대 단면도이다.

도 13은 본 발명의 경피적 구체예에서 사용된 어레이 수집기의 단면도이다.

도 14는 경피적 구체예에서 사용된 다수-웰 검출 장치의 평면도이다.

발명의 상세한 설명

I. 정의

본원에서 사용된 하기 용어들은 다른 지시가 없다면 아래의 의미를 가진다.

본원에 사용된 용어 '올리고뉴클레오티드'는 용어 '안티센스 올리고뉴클레오티드', '안티센스 제제', '안티센스 화합물', 및 '안티센스 올리고머'와 상호교환하여 사용되며, 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍에 의해 RNA 중의 표적 서열과 혼성화하여 표적 서열 내에 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스를 형성하도록 허용하는 뉴클레오티드 염기 서열 및 서브유닛-대-서브유닛 백본 결합을 갖는 뉴클레오티드-유사체 올리고머로 간주한다. 올리고머는 표적 서열에 대해 정확한 서열 상보성을 가지거나 또는 거의 상보성일 수 있다. 이들 안티센스 올리고머는 표적 서열 을 함유하는 mRNA의 번역을 차단 또는 억제하거나, mRNA 프로세싱, 예를 들어 슬라이스-정션 프로세싱을 차단하거나, 또는 유전자 전사를 억제할 수 있는데, 이 경우 올리고뉴클레오티드는 이중-가닥 결합제이다. 용어 '화합물', '제제', '올리고머' 및 '올리고뉴클레오티드'는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관해 상호교환하여 사용될 수 있다.

본원에 사용된 용어 '안티센스 올리고머 조성물'은 본 발명의 RNA 검출 방법에 사용되는 하나 이상의 안티센스 올리고머를 포함하는 조성물로 간주한다. 어떤 경우 그러한 '안티센스 올리고머 조성물'은 복수의 안티센스 올리고머를 함유한다.

본원에 사용된 '모르폴리노 올리고머'는 전형적인 폴리뉴클레오티드와 수소결합할 수 있는 염기를 지지하는 백본을 가지며, 여기서 중합체 백본 부분이 펜토스 당이 아니라 모르폴리노기인 안티센스 올리고머로 간주한다.

본원에 사용된 용어 'PMO'는 하기 더 설명된 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머로 간주하며, 여기서 올리고머는 약 8-40 염기 길이, 바람직하게 12-25염기 길이의 폴리뉴클레오티드이다. 본 발명의 이런 바람직한 양태가 도 5B에 예시되는데, 이것은 포스포로디아미데이트 결합에 의해 연결된 2개의 그러한 서브유닛을 나타낸다.

본원에 사용된 '뉴클레아제-내성' 올리고머 분자(올리고머)는 그것의 백본이 포스포디에스테르 결합의 뉴클레아제 절단에 대해 민감하지 않은 것이다. 전형적인 뉴클레아제-내성 안티센스 올리고머는 메틸-포스페이트, 모르폴리노, 및 펩티드 핵산(PNA) 올리고뉴클레오티드와 같은 올리고뉴클레오티드 유사체이며, 이들 모두 는 하전되지 않은 백본을 가진다.

본원에 사용된 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고머는 이 올리고머가 실질적으로 37℃ 이상, 바람직하게 적어도 50℃, 전형적으로 60℃-80℃ 또는 그 이상의 Tm을 갖는 생리학적 조건하에서 표적과 혼성화한다면 표적 폴리뉴클레오티드와 '특이적으로 혼성화한다'. 그러한 혼성화는 바람직하게 한정된 이온강도 및 pH에서 특이적 서열의 열용융점(Tm)보다 약 10℃, 바람직하게는 약 5℃ 낮도록 선택된 긴축 혼성화 조건에 해당한다. 주어진 이온강도 및 pH에서 Tm은 50%의 표적 서열이 상보성 폴리뉴클레오티드와 혼성화하는 온도이다.

폴리뉴클레오티드는 혼성화가 2개의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 간에 반대평행 배열로 일어날 때 서로 '상보성'이라고 설명된다. 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 혼성화가 제 1 폴리뉴클레오티드와 제 2 폴리뉴클레오티의 가닥들 중 1개 간에 일어날 때 다른 폴리뉴클레오티드와 '상보성'일 수 있다. 상보성(한 폴리뉴클레오티드가 다른 것과 상보성인 정도)은 일반적으로 승인된 염기쌍 규칙에 따라서 마주한 가닥들에서 서로 수소결합을 형성할 것으로 예상되는 염기 비율로서 정량할 수 있다.

본원에 사용된 제 1 서열은 제 1 서열을 가진 폴리뉴클레오티드가 제 2 서열을 가진 폴리뉴클레오티드와 특이적으로 결합한다면 제 2 서열에 관해 '안티센스 서열'이다.

본원에 사용된 '표적 RNA를 포함하는 염기-특이적 세포내 결합 사건'은 안티센스 올리고머와 세포 내부의 상보성 표적 RNA 서열의 특이적 결합으로 간주한다.

본원에 사용된 '뉴클레아제-내성 헤테로듀플렉스'는 안티센스 올리고머와 그것의 상보성 표적의 결합에 의해 형성된 헤테로듀플렉스로 간주하며, 여기서 안티센스와 RNA의 상보성 영역은 모두 세포내 및 세포외 뉴클레아제에 의한 생체내 분해에 대해 내성이다.

mRNA 또는 다른 RNA 종들, 예를 들어 바이러스 게놈 RNA에 관하여 본원에 사용된 용어 '표적'은 하나 이상의 포유류 세포 종류에서 단일-가닥으로 발현되거나 존재하는 mRNA 또는 다른 RNA로 간주한다. 우선적으로 발현된다는 것은 표적 mRNA가 다른 것에 비하여 어떤 세포 종류에서 더 큰 정도로 발현된 유전자로부터 유래된다는 의미이다.

안티센스 올리고머에 관하여 본원에 사용된 '유효량'은 단일 용량 또는 연속 용량의 일부분으로서 포유류 피험자에 투여된 안티센스 올리고머의 양으로 간주하며, 이것은 이후 피험자의 체액에서 검출될 수 있는 표적 RNA와 안티센스 올리고머 간의 헤테로듀플렉스를 형성하도록 선택된 표적 서열의 전부 또는 일부와 특이적으로 혼성화하는데 효과적인 양이다.

본원에 사용된 용어 '체액'은 소변, 침, 혈장, 혈액, 척수액, 및/또는 피부 세포나 진피 파편과 같은 생물학적 기원의 다른 샘플을 포함해서 피험자로부터 얻어진 여러 가지 샘플 종류를 포함하며, 그것에 현탁된 세포나 세포 단편들, 또는 액체 매질 및 그것의 용질을 포함하는 것으로 간주된다.

용어 '상대량'은 시험 측정치와 대조 측정치를 비교하는 경우 사용된다. 어떤 반응에서 복합체를 형성하는 시약의 상대량은 대조견본과 반응하는 양과 비교하 여 시험견본과 반응하는 양이다. 대조견본은 동일한 분석 중에 별도로 수행될 수 있거나, 또는 동일한 샘플의 일부(예를 들어, 조직절편 내에서 악성영역을 둘러싸고 있는 정상조직)일 수 있다.

안티센스 제제는 '포유류 세포에 의해 능동 흡수되는 능력'을 가지며, 이 제제는 세포막을 가로지르는 수동적 확산과는 다른 메카니즘에 의해 세포로 들어갈 수 있다. 이 제제는 예를 들어, ATP-의존적 수송 메카니즘에 의해 포유류 세포막을 가로질러 제제를 수송하는 '능동 수송'에 의하거나, 또는 이 제제와 수송 단백질의 결합을 필요로 하며, 이후 막을 가로질러 결합된 제제의 통과가 촉진되는 수송 메카니즘에 의해 세포막을 가로질러 안티센스 제제를 수송하는 '촉진 수송'에 의해 수송될 수 있다. 하기 정의된 대로 능동 및 촉진 수송 모두에서 안티센스 제제는 실질적으로 하전되지 않은 백본을 가진다. 또는 달리, 안티센스 화합물은 양이온성 지질 또는 리포솜과 복합체화된 음이온성 백본을 갖는 제제와 같이, 복합체화된 형태로 제조될 수 있으며, 이것은 세포내이입 메카니즘에 의해 세포로 취입된다.

II. 본 발명의 방법

본 발명은 어떤 안티센스 화합물이 포유류 피험자에게 투여되었을 때 안티센스와 상보성 표적 RNA 부분이 듀플렉스 형태로 소변(또는 다른 체액)에서 연속적으로 나타난다는 발견을 기초로 한다. 이 발견의 근간을 이루는 관찰이 실시예 1 및 2에 예시된다.

실시예 1의 연구는 안티센스 제제(이 경우는 PMO)가 상보성 RNA 표적에 혼성 화하여, 아마도 듀플렉스의 더 큰 질량/전하비로 인해 겔 전기영동 상에서 관련된 단일-가닥 RNA(ssRNA)보다 더 느리게 이동하는 뉴클레아제-내성 듀플렉스를 형성한다는 것을 나타낸다.

또한, 실시예 1에서 안티센스 올리고머 제제(PMO)는 포유류에 IP 주사되었고 24시간 후에 소변 샘플이 취해졌다. R

Nase(예를 들어, 3'- 및 5-엑소뉴클레아제)로 샘플을 처리한 후 샘플 내의 핵산을 겔 전기영동에 의해 분석했다. 결과를 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스의 이동속도로 이동한 띠의 존재로 나타낸다(실시예 1의 연구). 듀플렉스 띠의 출현은 용량 의존적이다.

실시예 2는 포유류 피험자(이 경우는 래트)에 안티센스를 투여한 후 안티센스/RNA 듀플렉스 출현의 시간 과정을 시험한다. 래트 P450에 안티센스를 주사한 후 0, 1, 2, 4, 8, 12, 및 24시간에서 혈액 샘플을 취했다. 혈액 샘플 중의 형광-표지된 종들의 전기영동 이동시간 및 질량 스펙트럼 분석은 모두 올리고머:RNA 듀플렉스와 일치한다.

혈액 샘플에서 측정한 표지된 안티센스(흰색 네모) 및 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스(검은색 원)의 레벨이 도 2에 나타난다. 표지된 안티센스 레벨은 주사 후 2시간 내에 혈류에서 빠르게 감소한다. 듀플렉스는 주사 후 4-8시간 사이에 혈액에서 나타나며, 8-24시간 사이에서 가끔 피크에 이른다.

IIA. 듀플렉스 형성 모델

데이타를 함께 취하면 도 1에 예시된 안티센스 메이크업 및 프로세싱 모델과 일치한다. 처음에, 안티센스 제제(12)가 예를 들어 경구, IV, IM, subQ, 또는 경 피 투여로 피험자(14)에게 투여된다. 화합물은 16에 나타낸 대로 혈류를 따라 나아가며 그곳에서 세포(20)와 같은 세포들이 떠 있는 세포외 공간(18)으로 분포된다. 화합물은 바람직하게 능동 또는 촉진 수송에 의해 세포로 흡수되며, 여기서 표적 RNA(24)의 상보성 영역과 혼성화하여 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스(26)를 형성한다. 듀플렉스의 단일-가닥(비-혼성화된) RNA 영역은 RNase 분해에 민감하며, 세포 내에서나 세포로부터 배출된 후 부분적으로 또는 완전히 효소적 절단되어, 단일-가닥 오버행이 거의 없는 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스를 형성한다. '외래' 종들로 인식되는 이 듀플렉스는 그후 세포로부터 주변의 세포외 공간으로 방출되고, 그곳에서 혈류로 다시 돌아가는데, 이 경우 듀플렉스는 소변으로 제거될 수 있다.

상기 데이타는 듀플렉스 형태로 듀플렉스를 흡수하고 프로세싱하는데 필요한 시간이 주사 후 8-24시간 내에 발생한다는 것을 나타낸다.

IIB. 안티센스 제제의 선택

상기 모델은 본 발명에 사용된 안티센스 화합물에 4가지의 기본적 요건을 부여하는데, 하기에 5가지로 세분하여 고찰했다.

B1. 표적 서열 선택

안티센스 화합물은 선택된 RNA 표적 서열에 대해, 염기 서열로 표적화되어야 한다. 안티센스 화합물에서 표적 RNA 서열과 성보성인 영역은 10-12 염기 정도로 짧을 수 있지만 바람직하게는 13-20 염기이다. 통상 15-20 염기의 안티센스 올리고뉴클레오티드가 포유류 게놈에서 한 상보성 서열을 가지기에 충분한 길이이다. 이에 더하여, 최소한의 상보성 염기 길이가 하기 논의된 필수 결합 Tm을 달성하기 위해 필요할 수 있다. 40 염기 정도로 긴 올리고머가 적합할 수 있는데, 이 경우 적어도 최소한의 염기 개수, 예를 들어 10-15 염기가 표적 RNA 서열과 상보하지만, 일반적으로 세포에서의 흡수를 촉진하거나 활발히 하기 위해 약 20 염기 미만의 올리고머 길이로 최적화된다.

표적 RNA 서열은 일반적으로 하기 5가지 상이한 부류의 관심 RNA의 중 하나에 속한다: (i) 치료적 안티센스, 예를 들어 c-myc 또는 p53 안티센스에 의해 발현이 억제되는 유전자; (ii) 발현이 주어진 생화학적 상태, 예를 들어 임신, 간 ALT, 또는 심장-관련 병리에 대한 마커를 나타내는 유전자; (iii) 유전질환 또는 그것에 대한 소인의 진단에 유용한 유전적 돌연변이; (iv) 사람 및 다른 포유류, 예를 들어 수의과 동물을 감염시킬 수 있는 바이러스에 해당하는 바이러스 게놈 서열; 및 (v) 사람 또는 다른 포유류를 감염시킬 수 있는 박테리아(또는 진균)에 해당하는 박테리아(또는 진균) 게놈 서열. 이들 5가지 부류 각각에 대한 표적 RNA 서열이 하기 섹션 D에 상세히 고찰된다.

B2. 높은 Tm

올리고머 화합물은 표적 서열과 안정한 혼성 듀플렉스를 형성해야 한다. 안티센스 화합물은 상보성-서열 RNA에 대해 체온보다 큰 결합 Tm을 가질 것이며, 50℃ 이상이 바람직하다. 60-80℃ 범위나 그 이상의 Tm이 바람직하다. 상보성-서열 RNA에 대하여 안티센스 화합물의 Tm은 Nucleic Acid Hybridization(하메스 등, IRL Press 1985, p. 107-108)에 설명된 것들과 같은 종래의 방법에 의해 측정될 수 있다. 잘 공지된 원리에 따라서, 올리고머 화합물의 Tm은 상보성-염기 RNA 혼성체에 대해 듀플렉스에서 C:G 쌍을 이룬 염기 비율을 증가시킴에 의해, 및/또는 헤테로듀플렉스의 길이(염기쌍)의 길이를 증가시킴에 의해 증가될 수 있다. 동시에, 세포 수송을 최적화기 위해서 올리고머의 크기를 제한하는 것이 유리할 수 있다. 이 이유는 15-20 염기 또는 그 이하의 낮은 Tm(50℃ 이상)을 나타내는 화합물이 높은 Tm 값의 20 + 염기를 필요로 하는 것들에 비해 바람직할 것이기 때문이다.

B3. 세포에 의한 능동 흡수

적합한 세포내 레벨을 달성하기 위해서 안티센스 올리고머는 세포에 의해 능동 흡수되어야 하는데, 이것은 화합물이 자유(비-복합체) 형태로 투여된다면 촉진 또는 능동 수송에 의해 흡수되고, 복합체 형태로 투여된다면 세포내이입 메카니즘에 의해 흡수된다는 의미이다.

제제가 자유 형태로 투여되는 경우, 이 제제는 실질적으로 하전되지 않아야 하는데, 이것은 제제의 서브유닛간 결합의 대부분이 생리학적 pH에서 하전되지 않아야 한다는 의미이다. 또는 달리, 올리고머는 두 반대 전하가 실질적으로 오프셋인 한, 음 및 양으로 하전된 백본 결합을 모두 함유할 수 있으며, 3-5 서브유닛 이상의 런 또는 어느 한쪽 전하는 포함하지 않는 것이 바람직하다. 예를 들어, 올리고머는 주어진 수의 음이온 결합, 예를 들어 N3-N5 포스포라미데이트 결합 및 비슷한 수의 양이온 결합, 예를 들어 N,N-디에틸레렌-디아민 포스포라미데이트(Dagle)를 가질 수 있다.

바람직하게 전하의 수(또는 순전하)는 5개 서브유닛 당 하나 이하의 전하 기이다. 본 발명이 적은 변화, 예를 들어 1-2개의 변화가 하전되지 않은 백본을 가 진 어떤 올리고머의 세포 흡수를 실지로 증진시킬 수 있다는 것을 제시한다는 것을 지지하는 실험이 수행되었다. 이 변화는 올리고머 자체, 예를 들어 백본에 있을 수 있거나, 또는 말단의 하전된-기 부가물일 수 있다.

하전되지 않는 것에 더하여, 안티센스 제제는 세포막을 가로질러서 올리고머의 수송을 촉진하거나 또는 능동 수송할 수 있는 멤브레인 수송제 시스템(멤브레인 단백질 또는 단백질들)에 대한 기질이어야 한다. 후자의 특징은 올리고머 상호작용이나 세포 흡수에 대한 많은 시험 중 하나에 의해 측정될 수 있다.

첫번째 시험은 세포 상에서 선택된 올리고머, 예를 들어 포스포로티오에이트 올리고머를 치환하거나 또는 이것에 의해 치환될 수 있는 올리고머 화합물의 능력을 시험하는 것이다. 이 시험을 위해서, 배양물 중의 포유류 세포나 박테리아 세포 중 하나가 세포 기질로서 사용될 수 있다. 세포는 우선 주어진 양의 시험 제제, 예를 들어 형광-표지된 시험 제제와 함께 약 10-300nM의 최종 올리고머 농도로 인큐베이션된다. 조금 후, 예를 들어 10-30분 후에(시험 화합물에 유의한 내부작용이 일어날 수 있기 전) 제 2 올리고머 화합물, 예를 들어 세포 수용체와 특이적으로 결합한다고 알려진 동일한 서열의 포스포로티오에이트 올리고머(치환 화합물)가 다수의 증가한 농도 각각에서 첨가된다. 시험 화합물이 세포 수용체와 특이적으로 결합한다면, 그것은 농도-의존적 방식으로 치환 화합물에 의해 치환될 것이다. 치환 화합물이 10x 시험 화합물 농도 또는 그 이하(전형적으로 0.5-2x)의 농도에서 50% 치환을 야기할 수 있다면, 그것은 세포 수송 시스템에 대해 동일한 인식 부위에서 적합한 결합을 가질 것이라고 생각된다.

세포 수송에 대한 두번째 시험은 표지된 수용체, 예를 들어 형광 수용체를 세포로 수송하는 시험 화합물의 능력을 직접 시험하는 것이다. 또 세포 기질은 박테리아 또는 배양된 포유류일 수 있다. 세포는 바람직하게 약 10-300nM의 최종 농도로 첨가된 표지된 시험 화합물의 존재하에 인큐베이션된다. 30-120분간 인큐베이션한 후 세포가 세포내 표지에 대해 예를 들어 현미경에 의해 시험된다. 유의한 세포내 표지의 존재는 시험 화합물이 촉진 또는 능동 수송에 의해 수송된다는 증거이다.

세번째 시험은, 박테리아 16S rRNA에 대한 표적이 관찰되었을 때, 박테리아 성장을 효과적으로 억제하는 어떤 안티센스 화합물의 능력에 의존한다. 본 발명이 이 억제가 세포막(이 경우 박테리아 세포)을 가로지르는 능동 또는 촉진 수송을 필요로 한다는 것을 제시한다는 것을 지지하는 연구들이 수행되었다. 시험 화합물은 SEQ ID NO:1-3과 같은 표적 16S 서열을 사용하여 제조되는데, 이 서열들은 박테리아 성장 억제에 효과적이라고 증명된 E. coli 16S rRNA에 대한 대표적인 서열이다. 화합물은 성장 중인 박테리아 배양물, 예컨대 E. coli 배양물에 전형적으로 10nM-1mM 사이의 증가한 농도로 첨가된다. 박테리아 성장을 억제하는 능력은 시험 화합물 첨가 후 24-72시간에서 세포 콜로니 세포수로부터 측정된다. 약 100-500nM 또는 더 낮은 농도에서 50% 억제를 야기할 수 있는 화합물이 포유류 세포내 능동 수송을 위한 좋은 후보로서 고려된다.

안티센스 화합물이 복합체화된 형태로 투여되는 두번째 경우, 제제는 하전된 백본, 예를 들어 음이온성 백본을 가질 수 있으며, 여기서 복합체화제는 전형적으 로 중합체, 예를 들어 양이온성 지질, 폴리펩티드, 또는 비-생물학적 양이온성 중합체로서, 반대 전하를 가진다. 2-층 복합체를 포함해 음이온성 올리고뉴클레오티드와 양이온성 지질 또는 다른 중합체 성분들 간의 복합체를 형성하는 방법이 잘 공지되어 있으며, 본 발명에 적용할 수 있다(예를 들어, DNA/양이온성 지질, 중합체에 대해 참조). 투여 후 복합체는 전형적으로 엔도솜체 내 입자 피막형성을 포함하는 세포내이입 메카니즘을 통해 세포에 의해 흡수된다. 세포 뉴클레아제에 저항하는 안티센스 제제의 능력은 제제의 생존과 궁극적으로는 이 제제의 세포 세포질로의 송달을 촉진한다.

마지막으로, 세포에 의해 흡수되고 표적 RNA와 안정한 헤테로듀플렉스를 형성하는 화합물의 능력이 생체내에서 직접 시험될 수 있다. 본원에서는, 공지된 포유류 mRNA 예컨대 P_{450} 코딩 서열에 대해 표적화된, 표지된 시험 올리고머 화합물 예컨대 형광-표지된 화합물이 동물 예컨대 래트나 마우스에 주사된다. 화합물 투여 후 8-24시간째에 실시예 1 및 2에 주어진 과정에 따라서 소변이 듀플렉스의 존재에 대해 분석된다. 만일 헤테로듀플렉스가 검출된다면, 화

합물은 본 방법에 사용하기에 적합하다.

B4. RNase에 대한 mRNA 내성

안티센스 올리고뉴클레오티드에 의한 발현 억제를 설명하기 위해서 2가지의 일반적 메카니즘이 제안되었다(예를 들어, Agrawal 등, 1990; Bonham 등, 1995; 및 Boudvillain 등, 1997). 첫번째에서, 올리고뉴클레오티드와 mRNA 간에 형성된 헤 테로듀플렉스는 RNaseH에 대한 기질이며 mRNA의 절단을 가져온다. 이 부류에 속하거나 또는 속한다고 제안된 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 및 포스포디에스테르(변형되지 않은 '천연' 올리고뉴클레오티드)를 포함한다. 그러나, 그러한 화합물은 올리고머:RNA 듀플렉스 구조내의 mRNA를 노출시켜 RNaseH에 의해 가수분해시키므로 듀플렉스가 손실되기 때문에, 그것들은 본 발명에서 사용하기에는 약간 덜 최적이다.

두번째 부류의 올리고뉴클레오티드 유사체는 '입체적 차단인자' 또 다르게는 'RNaseH 저항인자'라고 하는데, RNaseH에 대한 기질로서의 작용은 관찰되지 않았으며, 표적 RNA 핵세포질 수송의 입체적 차단, 스플라이싱 또는 번역에 의해 작용하는 것으로 여겨진다. 이 부류에는 메틸포스포네이트(Toulme 등, 1996), 모르폴리노 올리고뉴클레오티드, 펩티드 핵산(PNA), 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오티드(Bonham, 1995), 및 N3'P5'포스포라미데이트(Gee, 1998, Ding)가 포함된다.

시험 올리고머는 Stein 등에 설명된 대로, 먼저 시험 화합물과 함께 올리고머:RNA 듀플렉스를 형성하고, 다음에 이 듀플렉스를 RNaseH와 함께 표준분석조건에서 인큐베이션함에 의해, RNaseH에 대해 mRNA를 보호하는 그것의 능력에 대해 분석될 수 있다. RNaseH에 노출한 후, 실시예 1 및 2에 설명된 대로, 무손상 듀플렉스의 존재 또는 부재가 겔 전기영동이나 질량분광분석에 의해 모니터될 수 있다.

IIC. 하전되지 않은 올리고머 화합물

올리고뉴클레오티드 유사체에 있는 비이온성 결합의 예들이 도 3A-3H에 보여 지며, 카르보네이트(3A, R=O) 및 카르바메이트(3A, R=NH_2) 결합(Mertes, Gait); 알킬 포스포네이트 결합(3B, R=알킬 또는 -O-알킬)(Miller, Jaworska); 아미드 결합 (3C)(Bloomers); 술폰 및 술폰아미드 결합(3D)(Roughten, McElroy, Egli); 및 티오포름아세틸 결합(3E)(Cross)을 포함한다. 나중의 것은 포스포로티오에이트 안티센스 화합물에 관한 증진된 듀플렉스 및 트리플렉스 안정성을 가지는 것으로 보고되었다(Cross). 또, 구조 3F의 3'-메틸렌-N-메틸히드록시아미노 화합물이 보고되었다(Mohan).

PNA(도 3G)는 백본이 디옥시리보스 백본과 구조적으로 동형인 DNA 유사체로서, 피리미딘 또는 푸린 염기가 부착된 N-(2-아미노에틸)글리신 단위로 구성된다. 천연 피리딘 및 푸린 염기를 함유하는 PNA는 왓슨-크릭 염기쌍 규칙에 따라서 상보성 올리고뉴클레오티드와 혼성화하며 염기쌍 인식에 관하여 DNA를 의태한다(Egholm 등, 1993). PNA의 백본은 포스포디에스테르 결합보다는 펩티드 결합에 의해 형성되는데, 이로써 PNA들이 안티센스용으로 적합하게 된다. 백본은 하전되지 않으며, 정상적인 것보다 큰 열안정성을 나타내는 PNA/DNA 또는 PNA/RNA 듀플렉스를 가져온다. PNA는 뉴클레아제 또는 프로테아제에 의해 인식되지 않는다. 그러나, PNA 안티센스 제제는 세포 배양물에서 느린 멤브레인 침투를 나타내는 것으로 관찰되었는데, 이는 아마도 세포로의 불량한 흡수(수송) 때문일 것이다(예를 들어, Ardhammar M 등, 1999 참조).

하기 상세히 설명된 대로, 한 바람직한 올리고머 구조는 3H에서 포스포로디 아미데이트 화합물에 의해 예시된 바와 같은 하전되지 않은 모르폴리고 올리고머이다. 모르폴리노 올리고뉴클레오티드(안티센스 올리고머를 포함하는)는, 예를 들어 공동소유인 미특허번호 5,698,685, 5,217,866, 5,142,047, 5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,521,063 및 5,506,337에 상세히 설명되며, 이것들은 모두 참고자료로서 본원에 특별히 수록된다.

본 발명에의 적합성에 대한 올리고머의 시험에서는 상기 상세히 설명된 특성들이 각각 충족되어야 한다('실질적으로 하전되지 않은' 특징은 결합들이 하전되지 않은 경우 본질적으로 충족되며, 표적-서열 상보성은 염기-서열 디자인에 의해 달성된다는 것을 인정함). 따라서, 화합물은 그것의 (i) 바람직하게 12-20 염기쌍의 듀플렉스 길이에서 표적 RNA에 관한 Tm, (ii) 능동 또는 촉진 수송에 의해 세포막을 가로질러 수송되는 능력, 및 (ii) 듀플렉스 형태에서 RNaseH에 의한 RNA 단백질 가수분해를 방지하는 능력에 관해 시험되어야 한다.

C1. 전형적인 모르폴리노 화합물

본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드용의 전형적인 백본 구조는 도 4A-4E에 나타낸 β-모르폴리노 서브유닛 종류들을 포함하며, 이것들은 각각 하전되지 않은 포스포러스-함유 서브유닛 결합에 의해 연결된다. 도 4의 서브유닛 A는 도 5의 A에서 나타낸 5개의 원자-반복 단위 백본을 형성하는 포스포러스-함유 결합을 가지며, 이 경우 모르폴리노 고리는 1-원자 포스포아미드 결합에 의해 연결된다.

도 4의 서브유닛 B는 도 5의 B에서 나타낸 6-원자 반복-단위 백본용으로 디자인된다. 구조 B에서, 5'모르폴리노 탄소와 포스포러스 기를 연결하는 원자 Y는 황, 질소, 탄소, 또는 바람직하게는 산소일 수 있다. 포스포러스로부터의 펜던트인 X 부분은 다음 중 어느 것일 수 있다: 불소; 알킬 또는 치환된 알킬; 알콕시 또는 치환된 알콕시; 티오알콕시 또는 치환된 티오알콕시; 또는 고리 구조를 포함한 비치환, 일치환, 또는 이치환된 질소.

도 4의 서브유닛 C-E는 도 5에서 C 내지 D/E에 대해 나타낸 7-원자 단위-길이 백본용으로 디자인된다. 구조 C에서, X 부분은 구조 B에서와 같고 부분 Y는 메틸렌, 황, 또는 바람직하게는 산소일 수 있다. 구조 D에서, X 및 Y 부분은 구조 B에서와 같다. 구조 E에서, X는 구조 B에서와 같고 Y는 O, S 또는 NR이다. 도 3A-E에 묘사된 모든 서브유닛에서, Z는 O 또는 S이고, Pi 또는 Pj는 아데닌, 시토신, 구아닌 또는 우라실이다.

한 바람직한 '모르폴리노' 올리고뉴클레오티드는 도 5B에 나타낸 형태의 모르폴리노 서브유닛 구조들로 이루어지며, 여기서 (i) 구조들은 한 서브유닛의 모르폴리노 질소와 인접 서브유닛의 5'고리외 탄소를 잇는 1-3개 원자 길이의 포스포로디아미데이트 함유 결합에 의해 함께 연결되고, (ii) Pi 및 Pj는 염기-특이적 수소결합에 의해 폴리뉴클레오티드 내의 염기와 결합하는데 효과적인 푸린 또는 피리미딘 염기쌍 부분이며, X=NH_2, Y=O, Z=O이다.

모르폴리노-기초 서브유닛의 중요한 화학적 특성들은 안정한 하전되지 않은 백본 결합에 의해 중합체 형태로 연결되는 능력, 표적 RNA를 포함한, 높은 Tm을 갖는 상보성-염기 표적 핵산, 심지어 10-14 염기 정도로 짧은 올리고머와 혼성화하도 록 형성되는 중합체의 능력, 포유류 세포로 능동 수송되는 올리고머의 능력, 및 RNAse 분해에 저항하는 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스의 능력이다.

C2. 올리고머 합성 및 변형

본 발명의 안티센스 화합물은 상기 인용된 참고자료에 상세히 설명된 방법을 사용하여, 단계적 고체상 합성에 의해 합성될 수 있다. 서브유닛 추가 순서는 하기의 선택된 염기 서열(섹션 D 참조)에 의해 결정될 것이다.

어떤 경우, 화합물의 약동학을 증진시키거나, 또는 화합물을 함유하는 헤테로듀플렉스의 포착이나 검출을 용이하게 하기 위해서 올리고머 화합물에 추가의 화학적 부분들을 추가하는 것이 바람직할 수 있다. 이 부분은 표준 합성법에 따라서 전형적으로 올리고머의 5'- 또는 3'-단부에 공유적으로 부착된다.

예를 들어, 폴리에틸렌글리콜 부분 또는 다른 친수성 중합체, 예컨대 10-100 중합체 서브유닛을 갖는 것의 추가는 올리고머 화합물의 용해도를 증진시키는데 유용할 수 있다.

하나 이상의 하전된 기들, 예컨대 유기산 같은 음이온 하전된 기는 세포 흡수를 증진시킬 수 있다.

플루오레세인 또는 방사성표지기와 같은 리포터 부분이 체샘플에서 헤테로듀플렉스의 존재를 검출하기 위해 부착될 수 있다. 또는 달리, 올리고머에 부착된 리포터 표지는 표지된 항체 또는 스트렙토아비딘을 결합시킬 수 있는 항원 또는 바이오틴 같은 리간드일 수 있다.

마지막으로, 올리고머는 2-4 디니트로페놀 및 관련 항원들과 같이 서열-결합 항원과 함께 제공될 수 있으며, 이를 통해서 그 서열을 함유하는 헤테로듀플렉스가 항원-특이적 항체를 사용하여 특이적으로 포착될 수 있다.

올리고머 안티센스의 부착 또는 변형을 위한 부분을 선택하는데 있어서, 일반적으로 생체적합성이며 바람직하지 않은 부작용 없이 피험자가 견뎌내기 쉬운 군들에 속한 화학적 화합물을 선택하는 것이 바람직한 과정이다.

IID. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 표적

이 섹션은 상기 언급된 5가지 부류의 표적 RNA들을 고찰하며, 표적 서열들이 선택될 수 있는 전형적인 서열들을 제공한다. 일반적으로, 하기 구체적으로 언급된 것들과 같은, 관심의 유전자 또는 미생물의 서열은 NCBI GenBank 데이타베이스 (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) 같은 공개 유전자 데이타베이스에서 알 수 있다.

표적 서열이 주어진 RNA 내의 어떤 서열일 수 있는 경우, 예컨대 프로세스된 mRNA 또는 바이러스 게놈일 때, 표적 서열의 선택은 일반적으로 적어도 12-15 염기 길이의 서열, 및 그 크기 범위 내에서, 더 높은 Tm 값을 위한, C:G 염기쌍이 풍부한 서열을 선택함에 의해 만들어진다. 일반적으로, AUG 시작 부위 또는 스플라이스 정션 부위 같은, mRNA 프로세싱이나 번역에 불가결한 표적 서열을 선택하는 것은 중요하지 않거나 또는 심지어 바람직하지 않은데, 이것은 그후 투여된 안티센스가 세포 대사에 대한 잠재적인 붕괴 효과를 가지기 때문이다. 그러나, 본 방법은 치료적 안티센스 치료법의 일부로서 수행될 수 있으며, 그런 경우 투여된 안티센스 제제는 RNA 프로세싱 또는 번역을 붕괴시키도록 디자인되고, 본 발명에 따르면, 동일한 제제가 표적 RNA로의 안티센스 송달을 모니터하거나 또는 확인하기 위해 사용 된다.

안티센스 제제가 단일 염기쌍 돌연변이를 갖는 RNA에 결합하도록 디자인된 경우, 야생형 서열로부터 돌연변이된 것을 식별하기 위한 3가지 전략 중 하나가 이어질 수 있다. 첫번째는 헤테로듀플렉스 내의 염기 미스매치에서 헤테로듀플렉스 RNA를 절단하는 세포내 RNAse의 잠재력에 의존한다. 예를 들어, 안티센스 화합물이 12-14 염기 길이이고 중앙 위치에 돌연변이된 염기에 상보하는 염기를 함유한다면, 헤테로듀플렉스의 RNAse 절단(이것은 야생형에 대해서는 발생하지만 돌연변이된 서열에서는 아니다)이 헤테로듀플렉스를 변성시키는데 효과적일 수 있다. 따라서, 헤테로듀플렉스는 돌연변이-함유 표적 서열이 존재하는 경우에만 검출될 수 있다.

두번째 전략에서, 안티센스 화합물은 돌연변이-부위 염기에 상보하는 염기에 더하여, 돌연변이 부위 가까이에, 예컨대 돌연변이-염기 부위로부터 2-5 염기 떨어진 곳에 미스페어링된 염기를 함유한다. 예를 들어, 14-mer 제제에서 염기-부위 돌연변이는 위치 6일 수 있고 미스페어는 위치 11일 수 있다. 이 화합물은 생리학적 온도에서 단일-염기 미스페어(돌연변이된 표적 서열)를 허락하는 헤테로듀플렉스를 형성하도록 디자인되지만, 2개의 미스페어를 함유하는 서열(야생형 표적 서열)과는 안정한 헤테로듀플렉스를 형성할 수 없다. 비록 헤테로듀플렉스 내의 미스페어링된 염기가 RNAse 절단 부위라 할지라도, 이 헤테로듀플렉스는 헤테로듀플렉스 내의 8 이상 연속된 염기쌍 덕분에 여전히 안정할 것이다.

세번째 전략은 2개 안티센스 제제 간에서 표적 결합에 대한 경쟁을 기초로 하는데, 제 1 제제는 돌연변이된 표적에 상보하는 서열을 가지며 1개의 리포터, 예를 들어 제 1 형광 리포터를 지니고, 제 2 제제는 유사한 야생형 표적 서열에 상보하는 서열을 가지며 구별가능한 제 2 리포터, 예를 들어 제 2 형광 리포터를 지닌다. 돌연변이된 서열을 발현하는 세포에서, 제 1 제제와 형성된 헤테로듀플렉스와 제 2 제제와 형성된 헤테로듀플렉스의 비는 높을 것이고, 상응하여 야생형 서열만 발현되는 경우에는 낮을 것이다.

D1. 치료적 안티센스에 의해 발현이 억제되는 유전자

많은 수의 유전자가 안티센스 치료법에 대한 잠재적 치료 표적이다. 일반적으로, 안티센스 치료법의 이론적 해석은 유전자 전사체(mRNA)의 프로세싱 또는 번역을 붕괴시킴으로써 표적 유전자의 발현을 억제한다는 것이다. 안티센스 치료법에 대한 표적으로서 제안된 다수의 유전자들로는 다음이 있다(해당 GenBank 서열 번호와 함께): 메티오닌 아미노펩티다제 2(NM_006838); 인터류킨-5(J03478); C-myc (X00364); C-myb(M15024); PI3 키나제 p110(S67334); 병소유착 키나제(L13616); 텔로머 반복결합인자 1(NM_017489); PDK-1(L42450); 세포내유착 분자-1(X84737); G-알파-S1(X04409); SRA(AF092038); G-알파-16(M63904); PI3 키나제 p85(AC007192); MEK1(L11284); RAF(X03484); 티미딜레이트 신타제(D00596); 17. X-연결된 세포자살 억제제(U45880); TNF-알파(M16441); MEKK5(AL024508); 서비빈(U75285); 간 글리코겐 포스포릴라제(AF046787); MDMX(AF007111); SMAD5(AF010602); SMAD2 (AF027964); PEPCK-미토콘드리아(NM004563); RhoC(L25081); PTEN(AH007803); RIP-1(U55766); FADD(NM003824); SMAD3(SEGAB004922S); EGR-1(AJ243425); TNFR1(AH003016); mcl- 1(AF118124); 미세관-결합 단백질 4(NM_002375); 센트린(U83117); B-RAF(M95712); 인터류킨-15(U14407); 인테그린 알파 4(L12002); RhoG(NM0016655); RhoB(X06820); her-2(AF177761); MEK2(L11285); 세린/트레오닌 단백질 포스파타제(X97867); ELK-1(Y11432); bcl-xl(Z23115); Atm(SEG_D83244S); DIR1(AF139374); Bcl-2(U16812); RhoA(L25080); mdr1(AF016535); 폴로-형 키나제 1(X73458); 단백질 키나제 C-알파 (NM_002737); TGF-알파(M31172); 텔로머라제(AF047386); 암피레굴린(M30704); TNF-알파(X02910,X02159); IGF-1(A29117); TGF-베타(M60316); TR3 고아수용체(L13740); 토포이소머라제 II(J04088); bcr/abl(AJ131467 부분적); 우로키나제(E00178); 코넥신 43(U64573); p53(AH002918); 염기성 섬유아세포 성장인자(J04513); c-키트 원발암유전자(L04143); ETS-2(J04102); NF-kappa-B p65(L19067).

D2. 발현이 주어진 생화학적 상태를 나타내는 유전자

어떤 상태, 또는 어떤 상태에 대한 소인은 정상 세포에서는 발현되지 않는 RNA 또는 RNA 번역 산물(즉, 펩티드 또는 단백질)의 변경된 발현을 특징으로 한다. 전형적으로, 유전자 산물, 즉 단백질은 환자의 혈액에서 검출되며, 특정 상태나 특정 상태를 향한 성향을 진단하는데 사용된다. 구체적으로, (i) 다양한 암에 대한 소인, (ii) 암환자의 예후 또는 치료반응, (iii) 알콜중독에 대한 소인, (iv) 심장병에 대한 소인, (v) 간 병리, 및 (vi) 신경계 병리, 예를 들어 알쯔하이머병의 진단에 유용한 유전자 단백질이 확인되었다. 하기는 이들 6가지 부류 각각에서 확인된 유전자의 부분적 리스트이며, 해당 GenBank 서열 번호와 함께 나타낸다.

D2(i). 다양한 암에 대한 소인

5. fes(NM002005); fos(K00650); myc; myb; fms(U63963); 다수-약물 내성-관련 단백질(MRP)(L05628); 폐 내성 단백질(LRP); p53 유전자(AH007667); 망막모세포종 유전자(L11910); 윌름즈 종양 유전자(M64241); 및 사람 미스매치 수선 유전자 hMSH2(AH003235).

D2(ii). 암환자의 예후 또는 치료반응

프로 가스트린 유리 펩티드(AH002713); SCC 항원(SCC-Ag)(S66896); PAI-1 (AH002922); UPA(X02419); HER-2(AF177761); 혈관-내피-성장인자(VEGF) (M32977); 인슐린형 성장인자 I(M37484,M29644); IFG-결합 단백질 3(M35878); bcl-2(U16812); HER-2/neu 암유전자(AH002823); 시토케라틴 20(X73501); 성호르몬 결합 글로불린(M31651); IL-2 수용체(E00727); 알파-태아단백(NM001134); 인터페론-유도성 MxA 단백질(NM_002462); TNF-b(D12614); 지방산 신타제(OA-519)(NM_004104); 테트라넥틴(X98121); C-erbB-2(AH001455); P-당단백(M14758); 암배아 항원(M17303); 크로모그라닌 A(AH005196); 합토글로빈-관련 단백질(NM020995); 임신-관련 혈장 단백질 A(NM~002581); 알칼리성 포스파타제(J04948).

D2(iii). 알콜중독에 대한 소인

감마글루타밀 트랜스페라제(J04131); 감마글루타밀 트랜스펩티다제(J04131); D2 도파민 수용체(M29066); 알파-1-안티트립신 PI(KO1396, M11465); 합토글로빈 HP(M69197); CYP1A1(NM000499); 알콜 탈수소효소(ADH)(X76342); 알데히드 탈수소효소(ALDH)(AH002598).

D2(iv). 심장병에 대한 소인

지질단백-관련 포스포리파제 A2(U24577); 아드레노메둘린(NM_001124); C-반응성 단백질(M11880).

D2(v). 간 병리

알파-L-푸코시다제(AH002702); 가스트린(AH005301).

D2(vi). 신경계 병리, 예를 들어 알쯔하이머병

프레세닐린 2(D84149 부분적); 아세틸콜린에스테라제(M55040); 베타 2-미크로글로불린(AF072097); 아포지방단백 E(K00396).

D3. 유전적 돌연변이

유전질환 또는 유전질환에 대한 소인에 관련된 다수의 유전적 돌연변이가 확인되었다. 예를 들어, 본원에 참고자료로 수록된 상기 인용된 Schroeder, H.W. 참조한다. 예를 들어, Schroeder 참고자료의 표 23-3은 보통염색체우성, 보통염색체열성, 및 X-연관에 의해 분류된 가장 흔한 유전적 장애를 기재하고; 표 24-3은 혈장 멤브레인 단백질(들)에서의 돌연변이로 인한 장애를 기재하고; 표 24-4는 사람 포도당 전달체에서 확인된 다양한 돌연변이로 인한 장애를 기재하고; 표 24-5는 사람 인슐린 수용체 유전자에서의 많은 돌연변이를 기재하고 있다.

당업자는 GenBank 서열 자원을 포함하여 광범위하게 이용할 수 있는 이들 및 다른 참고자료로부터 다수의 유전적 장애에 관련된 특정한 돌연변이를 쉽게 측정할 수 있으며, 야생형과 단일-돌연변이 서열을 식별하는 상기 개략된 원리에 따라 돌연변이된 서열을 표적으로 하는 올리고머를 디자인할 수 있다.

D4. 바이러스 게놈 서열

더 나아가서, 본 발명의 방법은 많은 미생물들 중 어느 것에 의한 피험자의 감염 및 그러한 감염에 대한 치료적 중재의 효과를 모니터링하는데 있어서 유용하다고 밝혀졌다. 더 구체적으로, 특정 바이러스, 박테리아 또는 진균으로의 감염이 진단될 수 있으며, 치료법이 본 발명의 방법을 사용하여 그러한 감염에 관련된 RNA 또는 DNA의 발현을 평가함에 의해 모니터될 수 있다. 다수의 감염성 미생물에 관련된 특징적인 핵산 서열은 공개 데이타베이스에서 이용할 수 있으며, 이것은 본 발명의 방법에 사용되는 특이적 안티센스 올리고머의 디자인을 위한 기초로서 사용할 수 있다.

예를 들어, 전형적으로 바이러스 감염(예를 들어, CMV 같은 잠복 바이러스의 발현으로 인한 것들)은 면역형광분석, 중합효소연쇄반응(PCR), 및/또는 효소면역측정법(ELISA)을 사용하여 감염된 조직 또는 혈액의 분석에 의해 모니터된다. 레트로비리다에, 파포바비리다에, 헤르페스비리다에, 및 파라믹소비리다에와 같은 광범위한 부류의 바이러스들에 속한 바이러스의 존재가 측정될 수 있다. 더 나아가서, T 세포 백혈병-관련 바이러스(HTLV-1, HTLV-II), 사람 면역결핍 바이러스(HIV) 1 및 2, 엡스테인 바르 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 및 홍역 바이러스의 존재와 같은, 이들 부류에 속한 특이적 바이러스의 존재가 측정될 수 있다. 표적 바이러스의 서열은 GenBank로부터 얻을 수 있다.

더 구체적으로, 감염된 피험자에서 바이러스 감염인자를 확인하는데 사용되는 일반적인 구체예는 제 1 및 제 2 올리고머 조성물을 포함한다. 제 1 조성물은 광범위한 바이러스 과들 및/또는 속들, 예컨대 레트로비리다에, 파포바비리다에, 헤르페스비리다에 및 파라믹소비리다에를 표적으로 하는 올리고머를 포함한다. 이 조성물 중의 올리고머는 표준

GenBank 바이러스 서열로부터 측정될 수 있으며, 이 경우 바람직한 서열은 (i) 광범위한 바이러스 과/속에 특이적이고, (ii) 사람에서는 발견되지 않는 바이러스 서열이다. 제 2 조성물은 광범위한 과/속에 속한 특이적 속 및/또는 종 및/또는 균주에 상보하는 올리고머를 포함한다. 몇가지 상이한 제 2 올리고머 조성물-제 1 조성물 중의 시험된 광범위한 바이러스 과/속 각각에 대한 것-이 요구된다. 제 2 조성물에 대해서, (i) 시험되는 각각의 속/종/균주에 대해 특이적이고, (ii) 사람에서는 발견되지 않는 서열이 선택된다.

D5. 박테리아 및 진균 서열

더 나아가서, 본 발명 방법은 박테리아 또는 진균 감염인자를 검출하고, 치료에 유용한 정보, 예를 들어 감염성 박테리아가 약물내성인지의 여부와 만일 그렇다면 약물내성 유전자의 종류를 얻기 위해 이용할 수 있다.

바람직한 구체예에서, 본 방법은 감염성 바이러스 병인을 검출하는데 사용되는 것들과 유사한 2가지 올리고머 조성물을 이용한다. 제 1 조성물은 광범위한 박테리아 또는 진균 유기체 과 및/또는 속들, 예컨대 하기 주어진 박테리아 과들을 표적으로 하는 복수의 올리고머 서열을 포함한다. 표적으로 된 광범위한 박테리아 과/속 각각에 대해서, 올리고머 조성물은 (i) 광범위한 과/속 또는 박테리아에 대해 특이적이고, (ii) 사람에서는 발견되지 않는 박테리아 서열에 대해 표적화된 올리고머를 함유한다. 광범위한 과- 또는 속-특이적 서열은 공지이며, 예를 들어 본원에 참고자료로 수록된 2000년 11월 29일자로 제출된 공동소유인 미특허출원 '항 박테리아법 및 조성물'에 상세히 설명된 것과 같이, 박테리아 16S 및 23S rRNA에 대해 공지되어 있다.

제 1 조성물 중의 각 올리고머에 대해서, 제 2 조성물은 광범위한 과/속 군에 속한 특이적 속/종/또는 균주에 관한 복수의 올리고머를 제공한다. 어떤 통상적인 병원성 박테리아 종들 및 그것들에 관련된 GenBank 서열은 다음과 같다:

에스케리키아 콜리(X80725); 살모넬라 티피뮤리움(U88545); 슈도모나스 아에루기노사(AF170358); 비브리오 콜레라(AF118021); 네이세리아 고노로에아(X07714); 스타필로코쿠스 아우레우스(Y15856); 미코박테리움 튜버큘로시스(X52917); 헬리코박터 파이로리(M88157); 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(AF003930); 트레포네마 팔라디움(AJ010951); 클라미디아 트라코마티스(D85722); 바르토넬라 헨셀라에(X89208); 헤모필리스 인플루엔자(M35019); 시겔라 디센테라아(X96966).

다른 유용한 표적은 박테리아 약물내성 유전자에 관한 서열인데, 이것은 치료의가 감염 유기체를 확인하고, 감염 유기체의 약물내성 프로파일을 기초로 치료를 위한 가장 유리한 항생물질을 선택하도록 허락한다.

III. 본 발명의 실행 방식

본 발명의 방법을 실행하는데 있어서, 안티센스 화합물, 또는 달리 복수의 상이한-서열 안티센스 화합물을 함유하는 조성물이 피험자 예컨대 사람 피험자에게 투여된다. 만일 본 방법의 목적이 하나 이상의 유전적 돌연변이의 존재를 검출하는 것이라면, 화합물 또는 조성물은 어떤 편리한 시간에 단 한번만 투여될 수 있다.

본 방법의 목적이 주어진 상태 또는 치료적 치료에 대한 반응으로서 유전자들 중 선택된 유전자가 상향- 또는 하향-조절되는 것을 검출하는 것이라면, 화합물 또는 조성물은 상태 또는 치료 전 및/또는 후의 선택된 시간 또는 시간들에서 제공된다. 예를 들어, 주어진 유전자를 상향-조절하는 약물의 효과를 모니터하기 위해서, 유전자의 mRNA를 표적으로 하는 화합물이 약물의 투여 전에 투여되어, mRNA의 '대조' 레벨을 확립한 후, 이어서 다시 선택된 간격으로, 예컨대 4-24시간에서 약물을 투여한 후 약물에 반응한 mRNA 레벨을 측정한다.

피험자에게 안티센스 화합물 또는 조성물(다수 안티센스 화합물)의 투여 후, 화합물(들)은 도 1에 나타낸 모델에서의 아웃라인처럼 피험자 내에서 생체분포되도록 허락된다. 투여 후 1회 이상의 선택된 시간 간격에서, 체액 샘플이 취해지고, 샘플 중의 하나 이상의 헤테로듀플렉스 종들의 존재 및/또는 양이 결정/측정된다. 샘플링 시간은 전형적으로 투여 후 4-24시간, 바람직하게는 8-16시간 범위 내지만, 일련의 샘플들, 예를 들어 투여 후 24시간까지 4-8시간 마다 취해진 것이 적합할 수 있다.

다음에, 체샘플은 분석되어 샘플 중의 헤테로듀플렉스 또는 상이한 헤테로듀플렉스들의 존재 및/또는 양이 측정된다. 다음의 서브섹션에서 본 방법을 수행하기 위한 상세한 방법 및 장치를 고찰한다.

IIIA. 안티센스 올리고머의 투여

올리고머 화합물의 효과적인 송달은 당업자에게 공지된 많은 방법들 중 어느 것에 의해 달성될 수 있다. 그러한 것들은 제한은 없으나 경구 송달, 비경구 경로 를 포함한 다양한 전신적 경로, 예를 들어 정맥내, 피하, 복강내, 근육내, 및 동맥내 주사 뿐만 아니라, 흡입 및 경피 송달을 포함한다. 어떤 경우 특정한 조직 또는 부위에 직접 투여함에 의한 표적 송달이 바람직하다. 표적 부위에 약물을 송달하거나 또는 혈류로 약물을 도입하는데 효과적인 어떤 방법이 또한

고려된다는 것이 인정된다.

또한, 안티센스 올리고머의 표적화는 특정한 조직 또는 위치로 직접 주사함에 의해 달성될 수 있는데, 즉 종양에 직접 주사함으로써 종양에 관련된 특정 RNA 서열(즉, 종양 억제인자 유전자 또는 암유전자)의 발현의 평가를 용이하게 할 수 있다. 또는 달리, 안티센스 올리고머는 이 올리고머를 특정 조직 또는 세포 종류에 표적화하도록 작용하는 분자와 콘쥬게이트될 수 있는데, 예를 들어 항체/올리고머 콘쥬게이트가 있다.

안티센스 올리고머의 경피 송달은 예를 들어 국소투여에 적합하게 된 제약학적으로 허용되는 담체의 사용에 의해 달성될 수 있다. 하기 더 논의된 한 송달 부형제는 수성 매질 중의 50-90% 에틸렌글리콜 용액, 및 1cm ^{2} 면적 당 0.05-3mg 양의 안티센스 화합물을 포함한다.

경구 투여의 바람직한 용량은 약 1mg 올리고머/환자 내지 약 25mg 올리고머/환자이다(70kg 체중 기준). 어떤 경우, 25mg 올리고머/환자 이상의 용량이 필요할 수 도 있다. IV 투여에 대해서, 바람직한 용량은 약 0.5mg 올리고머/환자 내지 약 10mg 올리고머/환자이다(70kg 성인 체중 기준).

안티센스 화합물은 일반적으로 적어도 200-400nM 안티센스 올리고머의 최고 혈중농도를 가져오기에 효과적인 양 및 방식으로 투여된다. 체액, 예를 들어 소변에서 헤테로듀플렉스 존재는 전형적으로 투여 후 3-24시간, 바람직하게는 투여 후 6-24시간에서 모니터된다.

IIIB. 샘플 수집 및 치료

안티센스 투여 후 선택된 시간(들)에서, 체액을 수집하여 이 샘플 내의 헤테로듀플렉스 종들의 존재를 검출하고 및/또는 그 레벨을 측정한다. 상기 나타낸 대로, 체액 샘플은 소변, 침, 혈장, 혈액, 척수액, 또는 생물학적 기원의 다른 액체 샘플일 수 있으며, 그것에 현탁된 세포나 세포 단편들, 또는 액체 매질 및 그것의 용질을 포함하는 것으로 간주된다. 수집된 샘플의 양은 전형적으로 0.1 내지 10ml 범위, 바람직하게 약 1ml 미만이다. 샘플이 피부 영역으로부터 얻어진 경우(하기 참조), 샘플 '부피'는 피부 영역으로부터 접착제에 의해 제거된 피부의 양이며, 전형적으로 1-25mm ^{2} 의 영역을 가진다.

샘플은 원하지 않는 성분들을 제거하고 및/또는 샘플내의 헤테로듀플렉스 종들을 처리하여 원하지 않는 ssRNA 오버행 영역을 제거하기 위해서 처리될 수 있다. 실시예 1은 헤테로듀플렉스내의 어떤 단일-가닥 RNA 오버행을 제거하기 위해 RNase를 사용하여 샘플을 처리하는 것을 설명한다. 이것은 물론, 헤테로듀플렉스 검출이 크기 분리, 예를 들어 질량분광법의 전기영동에 의존하는 경우 오버행을 제거하기 위해 특히 중요하다.

여러 가지 방법이 원하지 않는 성분들을 제거하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 헤테로듀플렉스가 순음전하를 가지므로 중성 또는 양으로 하전된 물질로부터 헤테로듀플렉스를 분리하기 위해 전기영동 또는 이온교환 기술이 사용될 수 있다. 도 8과 관련하여 하기 더 설명된 더욱 구체적인 기술은 샘플을 표면-결합된 항체를 갖는 고체 지지체 또는 헤테로듀플렉스와 특이적으로 결합할 수 있는 다른 제제와 접촉시키는 것이다. 지지체를 세척하여 결합되지 않은 물질을 제거한 후, 예를 들어 하기 설명된 질량분광법의 전기영동에 의해 더 분석하기 위해, 헤테로듀플렉스는 실질적으로 정제된 형태로 유리될 수 있다.

또는 달리, 도 6 및 7과 관련하여 하기 설명된 대로 검출/측정 단계는 표면-결합된 항체를 갖는 고체 지지체 또는 헤테로듀플렉스 또는 그것의 안티센스 성분과 특이적으로 반응할 수 있는 다른 제제 상에서 수행될 수 있다. 이 구체예에서, 샘플은 헤테로듀플렉스 결합 조건하에서 고체 지지체와 접촉시켜진다. 지지체를 세척하여 결합되지 않은 물질을 제거한 후, 지지체는 지지체-결합된 헤테로듀플렉스와 결합하도록 디자인된 리포터 시약과 더 반응된다. 이 접근법은 도 9 및 10을 참조하여 하기 상세히 설명된 대로, 복수의 상이한-서열 헤테로듀플렉스 종들을 검출하기 위한 어레이 형식에서 특히 유리하다.

IIIC. 헤테로듀플렉스의 검출

소변, 침, 혈액, 머리카락, 또는 피부-세포 샘플에 존재하는 헤테로듀플렉스는 고체상 또는 유체상 분석법에 의해 분석될 수 있다. 일반적으로, 고체상 반응은 먼저 헤테로듀플렉스 분석물질을 고체상 지지체, 예를 들어 입자 또는 중합체 또는 테스트-스트립 기판과 결합시키고, 지지체에 결합된 헤테로듀플렉스의 존재/양을 검출하는 것을 포함한다. 유체상 분석에서, 전형적으로 분석물질 샘플은 전처리되어 방해하는 샘플 성분들이 제거된 후, 용액 또는 기체-현탁 형태, 예를 들어 질량분광법으로 분석된다.

C1. 고체상 형식

도 6A-6E는 고체상 형식에 대해 본 발명에서 유용한 다양한 헤테로듀플렉스 결합제를 예시한다. 도 6A는 기판 또는

지지체(34) 및 표면 결합된 헤테로듀플렉스 결합제(36)를 갖는 장치(32)룰 나타낸다. 이 구체예에서, 결합제는 표적 RNA 및 기지의 올리고머로 이루어진 헤테로듀플렉스에 대해 특이적이지만, 헤테로듀플렉스 염기 서열에 관해서는 비특이적인 결합 친화성을 갖는 항체이다.

본 발명의 항 양태를 형성하는 항체는 실시예 3에 개략된 것과 같은 표준 방법에 의해 형성된다. 간단히 말해서, 3'트리에틸렌글리콜 꼬리를 갖는 PMO 같은 선택된 올리고머 제제는 표준 링커 화학에 의해 열쇠구멍삿갓조개헤모시아닌(KLH)와 같은, 적합한 담체와 그것의 단부 중 하나에서 커플링된다. 올리고머-담체 KLH 콘쥬게이트는 상보성 RNA와 혼성화된 후 마우스에 주사되고, 이어서 마우스를 부스팅하고 출혈시켜 PMO에 대한 강한 항체 역가가 존재하는지를 측정한다. 표준 하이브리도마 기술에 따라서, 하이브리도마 셀라인이 면역화된 동물의 비장세포를 불멸화함으로써 생성된다.

다음에, 다양한 하이브리도마 셀라인으로부터의 단일클론 항체(Mab)는 항원에 대한 특이성에 대해 시험된다. 실시예 3에서 확인된 항체들은 (i) 헤테로다이 머에 대해 특이적이지만 헤테로듀플렉스 염기 서열에 관해서는 비특이적이고, (ii) 헤테로듀플렉스 및 헤테로듀플렉스 서열에 대해 모두 특이적이고, (iii) 헤테로다이머의 트리에틸렌글리콜 꼬리에 대해 특이적인 것들이다. 실시예 3에서 제공된 방법이 어떤 선택된 올리고머 화합물과 함께 형성된 헤테로다이머에 어느 정도 적용될 수 있다는 것이 인정될 것이다.

상기와 같이 형성된 항체는 잘 공지된 단백질 부착법에 의해 기판 표면에 부착되며, 예를 들어 2가 커플링제를 사용하여, 에스테르, 아미드, 티오에스테르, 이황화물 또는 다른 결합을 통해 기판 반응기와 공유 커플링시키는 것이 있다. 미특허번호 5,516,635 및 5,837,551이 고체 지지체에 항체를 커플링시키는 것을 개시하고 있는 대표적인 것이다.

도 6B는 기판(42) 및 선택된 헤테로다이머에 서열-특이적 결합할 수 있는 표면-부착된 결합제(44)를 갖는 유사한 종류의 고체상 장치(40)나타낸다. 즉, 항체는 특정한 듀플렉스 염기 서열을 갖는 특정 올리고머:RNA 헤테로다이머 구조에 대해서만 높은 친화성 결합을 나타낸다. 본 발명의 양태를 형성하는, 그러한 항체를 생성하는 방법이 상기 및 실시예 3에 논의된다.

도 6C에서, 장치(48)는 기판(50) 및 표면-결합된 항체 예컨대 항체(52)를 가지며, 이 항체는 항원(54) 커플링된 올리고머 화합물에 대한 높은 친화성 결합을 나타낸다. 항원은 예를 들어 아미노산 또는 올리고펩티드 또는 소분자량 항원, 예를 들어 디니트로페놀 또는 올리고에틸렌글리콜일 수 있다. 항원은 종래의 커플링법을 사용하여, 헤테로듀플렉스의 올리고머 부분의 한 말단, 예들 들어 3'-말단에 부착된다. 항원에 대한 항체는, 예를 들어 KLH에 커플링된 항원에 대해서만, 또는 올리고머 화합물과 조합된 항원에 대해서 형성될 수 있다. 하기 실시예 3은 유도된 PMO 제제의 트리에틸렌글리콜 부분에 대한 Mab의 생성을 개시한다. 이 항체는 상기 종래의 방법에 의해 기판 표면에 커플링된다.

도 6D의 장치(58)는 유사하지만, 단 올리고머 제제 헤테로다이머(66)에 부착된 리간드는 바이오틴기(64)이고 기판(60)에 부탁된 항리간드 결합제(62)는 아비딘이다. 이 구체예에서, 올리고머 화합물은 공지된 방법에 따라서 하나 이상의 바이오티닐화된 염기와 함께 합성되고, 아비딘은 잘 공지된 방법에 의해 기판 표면에 또한 부착된다.

도 6E의 장치(68)는 헤테로듀플렉스와 염기-특이적 트리플 헬릭스를 형성함에 의해서, RNA 올리고머 헤테로듀플렉스와 서열 특이적 방식으로 결합하도록 디자인된 표면-결합된 올리고머 결합제(72)를 갖는 기판(70)을 가진다. 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드-유사체 듀플렉스와 삼중-가닥 나선형 구조를 형성할 수 있는 올리고머는, 예를 들어 미특허번호 5,844,110에 상세히 설명되며, 이것은 이중-가닥 왓슨-크릭 DNA 구조 내의 가닥간 푸린-피리미딘 염기쌍과 특이적으로 수소결합할 수 있는 퀴놀린- 또는 퀴노졸린-기초 구조를 갖는 뉴클레오티드-유사체 올리고머를 개시한다. 이 특허에 개시된 올리고머 구조는 포스포디에스테르-연결 리보스 또는 디옥시리보스 백본 구조를 가지지만, 이 중합체 백본은 듀플렉스 내의 주요 홈 부위들에 결합할 수 있는 위치에 변형된 염기들을 위치시키는 기능만을 하기 때문에, 하전된 리보스-기초 백본에 대한 필요가 절대적이지는 않다. 따라서, 듀플렉스 구조의 염기-대-염기 공간에 상응하는 바람직한 공간에 변형된 염기들을 지닐 수 있는 어떤 통상적인 백본도 적합할 수 있어야 한다.

듀플렉스 핵산과 안정한 염기-특이적 삼중-가닥 구조를 형성할 수 있는 다른 듀플렉스-결합제는 공동소유인 미특허번호 5,405,938 및 5,166,315에 개시되는데, 이것들은 모두 하전되지 않은 5- 또는 6-원 고리형 백본, 예를 들어 하전되지 않은 리보스 또는 모르폴리노, 및 표적 듀플렉스 구조 내의 상이하게 배향된 염기쌍과 특이적으로 수소결합하도록 디자인된 변형된 염기들을 갖는 중합체 조성물을 개시한다.

듀플렉스 결합 올리고머는 상기 인용된 것들과 같이, 종래의 표면-부착 화학에 의해 고체 지지체에 부착된다. 표면-부착된 올리고머가 고체상에서 서브유닛 추가에 의해 제조되는 경우, 이 입자들이 제조되는 고체상은 장치 기판 또는 지지체 자체일 수 있다.

검출 분석을 수행하는데 있어서, 용액 중의 샘플은 지지체 표면과 접촉하여 위치되며, 분석물질이 결합제 분자와 결

합하도록 허락하는 조건하에서 반응하도록 허락된다. 전형적으로, 결합 반응은 특정한 리간드-항리간드 결합 반응에 따라 생리학적 pH와 24-37℃의 온도에서 5-30분의 반응시간 동안 수행된다. 반응기간의 마지막에, 기판이 1회 이상 완충액 및/또는 온건한 세제로 세척되어 비특이적으로 결합된 샘플 물질이 제거된다.

도 7A-7C는 고체상 형식에서 헤테로듀플렉스가 검출될 수 있는 다양한 방법을 예시한다. 본원에 제시된 장치로서 대표적인 것이 도 6B의 장치(40)이며, 이것 은 헤테로듀플렉스 서열과 관계없이 헤테로듀플렉스에 특이적으로 결합하는 항체인 결합제(42)를 가진다.

도 7A에 나타낸 구체예에서, 검출제는 형광 부분, 금입자, 발색단, 또는 다른 검출가능한 리포터기와 같은 리포터기(82)를 지니는, 상기와 같은 헤테로듀플렉스에 대해 특이적인 항체(80)이다.

도 7B는 유사한 항체 검출제(84)를 예시하지만, 도 6C와 관련하여 상기 논의된 대로, 이 항체가 헤테로듀플렉스 중의 올리고머 화합물 상에 지녀진 항원에 대해 면역특이적인 경우이다.

도 7C에 예시된 검출 형식에서, 도 6D와 관련하여 상기 설명된 대로, 헤테로듀플렉스 중의 올리고머는 하나 이상의 바이오티닐화된 염기(88)를 함유하며, 검출 장치(90)는 리포터기(92)에 콘쥬게이트된 아비딘을 포함한다.

다른 검출제가 지지체-결합된 헤테로듀플렉스의 검출에 사용하기에 적합하다는 것이 인정될 것이다. 예를 들어 도 6C 및 6D에 나타낸 구체예에서, 헤테로듀플렉스가 3'- 또는 5'-단부 리간드를 통해 고체 지지체에 결합된 경우, 결합제는 상술된 종류의 리포터-표지된 삼중-가닥 올리고머, 또는 리포터-표지된 양이온성 중합체, 예를 들어 폴리에틸아민일 수 있으며, 후자는 헤테로듀플렉스의 하전된 RNA 백본과의 전하 상호작용에 의해 헤테로듀플렉스와 결합할 수 있다.

상기 검출제는 헤테로듀플렉스가 어떤 경쟁 헤테로듀플렉스 종들의 부재하에 고체 지지체와 처음에 반응되는 경우 직접-결합 분석으로 디자인된다. 또한, 본 발명은 샘플이 기지의 양/농도의 리포터-표지된 헤테로듀플렉스의 존재하에 고체 지지체와 반응되는 경쟁 분석을 고려하며, 이 경우 고체 지지체에 결합된 표지된 헤테로듀플렉스량은 분석 샘플에 함유된 헤테로듀플렉스량과 역의 관계일 수 있다.

경쟁 분석 형식은 종래대로 샘플 흐름경로에 경쟁하는 표지된 헤테로듀플렉스를 포함하는 테스트 스트립으로서 디자인되며, 이로써 테스트 스트립을 통한 샘플 흐름이 샘플 및 표지된 헤테로듀플렉스를 스트립상의 헤테로듀플렉스 결합 영역으로 동시에 가져오는데 효과적이게 된다. 본 방법이 여러 가지의 다른 공지된 고체상 2-단계 또는 리간드/항리간드 상호작용을 수반하는 동종 분석에 적합하게 될 수 있다는 것이 인정될 것이다.

결합된 리포터의 존재 및/또는 양은 종래의 방법에 의해 측정/결정될 수 있으며, 이것은 시각검사, 또는 리더 기계, 예를 들어 표준 색차계 또는 형광계 카드, 슬라이드 또는 어레이 리더에 의한 정량검출을 포함한다.

본 발명의 다른 양태에 따르며, 선택된 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스를 검출하는데 사용되는 장치 및 검출 시약은 키트를 형성하며, 이것은 또한 적합한 송달 형태로 올리고머 화합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 가정용 임신테스트 키트는 본 발명의 이 양태에 따라서, hCG-특이적 서열, 예를 들어 상기 서열을 갖는 경구 송달용 정제 형태의 PMO 올리고머와, 거기에 함유된 자유(이동가능) 표지된 항-헤테로듀프렉스 항체를 갖는 고체상 테스트 스트립, 및 종래의 샌드위치식 분석을 위해 스트립 상에 결합제 검출 영역을 포함해야 한다.

자가 임신테스트에서, 사용자는 올리고머-함유 정제를 섭취하고, 선택된 시간 후, 예를 들어 투여 후 12-24시간째에 소변 샘플을 수집한다. 텔테일 hCG-서열 헤테로듀플렉스의 존재를 검출하기 위해, 테스트 스트립을 소변 샘플에 담그면, 이것은 헤테로듀플렉스 분석물질이 (i) 자유 표지된 항-헤테로듀플렉스 항체에 결합하여 검출가능한 리포터를 갖는 헤테로듀플렉스를 표지하는 경우, 및 (ii) 고정된 항-헤테로듀플렉스 항체에 결합하여 샘플-검출 영역에서 표지된 분석물질을 결합시키는 경우에 스트립의 길이를 따라 이동하는 것이 허락된다. 표적 hCG의 존재를 나타내는 분석의 판독은 단순히 스트립 상의 검출 부위에 검출가능한 리포터의 존재가 표적 hCG의 존재이다.

상기 나타낸 것들에 상응하는 올리고머 서열을 병용하고, 여러 가지 공지된 분석 형식 중 어느 것을 갖는, 여러 가지의 다른 테스트 키트가 또한, 예를 들어 주어진 유전자 산물의 존재 또는 부재 또는 레벨을 특징으로 하는 하나 이상의 유전적 돌연변이의 존재를 검출하거나, 또는 확인한 주어진 바이러스, 박테리아, 또는 진균 감염인자를 검출하기 위해 본원에서 고려된다.

C2. 유체상 검출

유체상 형식은 광범위하게 액체 매질, 균질 분석용 샘플 용액, 분리 매질, 예를 들어 겔 전기영동 또는 액체-크로마토그래피 분리 매질, 또는 질량분광법에서와 같은 기체-담체상에서의 헤테로듀플렉스의 검출을 의미한다. 일반적으로,

분석될 샘플은 방해 물질을 제거하기 위해 전처리될 것이다.

샘플을 전처리하는 한 일반적인 방법이 도 8A에 예시되는데, 이것은 헤테로듀플렉스 특이적 항체 같은, 표면 결합된 결합제(96)를 갖는 고체 지지체(94)를 나타낸다. 처음에, 헤테로듀플렉스 분석물질을 함유하는 액체 샘플이 분석물질 결합 조건하에서 고체 지지체와 반응되고, 다음에 세척되어 비특이적으로 결합된 샘플 물질이 제거된다. 이후, 헤테로듀플렉스가 예를 들어 종래의 방법에 의해 고체 지지체로부터 유리되고, 예를 들어 전기영동 또는 질량분광법에 의해 헤테로듀플렉스 분석용 용액 또는 기체 담체로 용리될 수 있다. 하기 보여준 대로, 이들 방법은 복수의 상이한-서열 헤테로듀플렉스 분석물질을 함유하는 샘플 혼합물에서 헤테로듀플렉스 분석물질을 확인하는데 특히 적합하다.

IV. 다수-분석물질 샘플법

많은 경우, 복수의 상이한 RNA 표적들을 분석하는 것이 바람직하거나 필요하다. 예를 들어, 유전질환에 대해 개체를 시험할 때, 주로 상이한 유전질환에 대한 한 벌의 시험이, 특히 태아의 유전자 스크리닝에서 수행된다. 유사하게, 유전적 분석에 의해 감염인자를 시험할 때, 일반적으로 다수의 후보 유기체에 대한 서열 프로브들을 포함할 필요가 있다.

한 일반적인 구체예에서, 유전자 스크리닝에 사용하기 위해, 본 발명은 상기 확인된 것들과 같은, 복수의 공지된 유전적 돌연변이 각각에 대해 표적화된 서열을 갖는 복수의 올리고머 화합물을 함유하는 조성물을 포함한다. 조성물이 임부에게 투여되는 경우, 태아 돌연변이에 대한 유전자 스크리닝에 사용하기 위해, 화합물 서열은 다운증후군과 같은, 태아 유전자 스크리닝에 의해 통상 시험되는 유전적 이상성에 대해 표적화된다.

제 2 구체예에서, 본 발명의 조성물은 상기 섹션 II에 기재된 것들과 같은, 암 및 암에 대한 소인에 관련된, 암유전자 또는 억제인자 유전자의 돌연변이에 대 해 표적화된 서열을 갖는 복수의 올리고머 화합물을 포함한다.

다른 구체예에서, 조성물은 상기 주어진, 당뇨병, 간질환, 심장질환, 및 신경학적 장애 같은, 2가지 이상의 병리학적 상태, 또는 병리학적 상태에 대한 소인을 표시하는 것들과 같은, 다양한 유전자에 대해 표적화된 서열을 갖는 복수의 올리고머를 포함한다.

또 다른 구체예에서, 주어진 감염된 바이러스, 박테리아, 또는 진균 병인을 검출 및 확인하는데 사용하기 위해서, 조성물은 미생물의 군 또는 부류에 대해 표적화된 올리고머를 함유한다. 예를 들어, 미지의 바이러스 유기체에 의한 감염을 검출하기 위해서, 환자는 광범위한 과의 바이러스 병원균들에 관한 서열을 함유하는 초기 조성물을 제공받을 수 있다. 바이러스 과의 초기 검출 및 확인 후, 환자는 최초에 확인된 과에 속한 특정한 바이러스 종 또는 균주들을 확인하기 위해, 제 2의 더 특이적인 올리고머 군을 투여받을 수 있다. 마찬가지로, 박테리아 병원균을 검출하기 위해, 제 1 조성물은 박테리아 과 또는 속을 확인하도록 디자인되고, 제 2 조성물은 제 1 부류에 속한 특정한 종 또는 균주를 확인하도록 디자인된다.

관련된 구체예에서, 박테리아 감염을 갖는 환자를 위한 최적의 치료 방법을 확인하기 위해서, 조성물은 어떤 종류의 약물내성에 관련된 공지된 돌연변이에 대해 표적화된 서열을 갖는 올리고머를 포함할 수 있으며, 이로써 박테리아 병원균만 확인되는 것이 아니라, 감염을 치료하는데 가장 효과적일 수 있는 항생물질의 종류도 확인된다.

본 발명의 중요한 양태에 따라서, 표적 RNA 서열의 비침습적 검출을 위한 상 술된 분석 방법 및 키트는 복수의 상이한 표적 서열이 검출 및/또는 정량되는 분석 형식에도 쉽게 적합하게 될 수 있다. 다수-분석물질 분석을 위한 방법 및 키트는 일반적으로 상술된 것들에 따르지만, 다음의 차이점을 가진다.

1. 피험자에게 투여된 올리고머 물질은 상기 나타낸 대로, 복수의 상이한 서열에 대해 표적화된 복수의, 즉 2개 이상의 상이한 올리고머 화합물을 함유한다. 상이한 서열은 다수의 올리고머 화합물을 함유하는 조성물, 예를 들어 경구용 정제 또는 주사용 용액으로서, 또는 하기 섹션 IVC에 상세히 설명된 대로, 경피 송달을 위한 어레이로서 투여될 수 있다.

2. 헤테로듀플렉스 검출은 샘플내에 형성되고 존재하는 각각의 상이한-서열 헤테로듀플렉스를 확인하는 도구 또는 방법을 필요로 한다. 하기 섹션 IVA에 상세히 설명된, 일반적인 유체상 분석 형식에서, 상이한-서열 헤테로듀플렉스는 상이한 물리적-분리 특성을 기초로 검출되며, 이로써 헤테로듀플렉스는, 예를 들어 전기영동도, 질량분광적 특징 또는 크로마토그래피적 특성을 기초로 구별될 수 있다. 실시예 IVB에 상세히 설명된, 일반적인 고체상 분석 형식에서, 샘플 물질은 서열-특이적 듀플렉스 결합제의 어레이와 반응되며, 이로써 각 상이한-서열 분석물질은 어레이의 기지-서열 영역과 결합하게 된다. 피부 분석에 사용되는 변형된 고체상 어레이 형식이 섹션 IVC에 상세히 설명된다.

IVA. 유체상 다수 분석물질 형식

이 일반적인 접근법에서, 하나 이상의 상이한-서열 헤테로듀플렉스를 함유하는 샘플은 도 8A를 참조하여 상술된 대

로, 방해 샘플 성분들을 제거하기 위해 먼저 전처리된다. 또한, 상기 논의된 대로, 헤테로듀플렉스 식별이 크기에 기초하는 경우 샘플을 처리하여 ssRNA 오버행을 제거하는 것이 중요하다.

도 8A에 나타낸 분석물질은 도면에서 H_1, H_2, 및 H_n로 나타낸 복수의 상이한-서열 헤테로듀플렉스를 포함한다. 초기 고체상 포착의 목적이 결합되지 않은 물질을 제거하는 것이므로, 고체 지지체 상에 사용된 결합제는 헤테로듀플렉스에 특이적이어야 하지만, 헤테로듀플렉스 서열에는 비특이적이어야 한다. 바람직하게, 결합제는 또한 자유 올리고머 화합물과의 결합을 거의 나타내지 않는다.

고체 지지체를 세척하여 비특이적으로 결합된 물질을 제거한 후, 헤테로듀플렉스는 무손상 헤테로듀플렉스 또는 변성된 단일-가닥 올리고머 중 하나로서 용리되는데, 후자의 접근법은 변성제 또는 열의 추가에 의해 달성된다. 다음에, 도 8B에서처럼 용리된 헤테로듀플렉스(또는 상응하는 올리고머 화합물)가 수집되고 용리된 분석물질의 분리에 의해 헤테로듀플렉스 확인을 위해 준비된다.

도 8B에 예시된 한 방법에서, 예를 들어 미특허번호 5,770,859, 5,994,696, 5,770,858, 및 5,827,659에 설명된 방법 및 장치에 따라서, 용리된 분석물질은 질량분광법 단편 분석에 기초한 서열 분석을 위해 준비된다. 도 8C는 상이한-서열 올리고머의 가설적 질량 스펙트럼 분석을 나타내는데, 여기서 상이한 피크들은 상이한 서열 올리고머 또는 올리고머 단편에 해당하며, 이것은 샘플내의 특정한 올리고머-화합물 서열을 확인하는데 사용될 수 있다.

다른 일반적인 구체예에서, 상이한-서열 헤테로다이머 또는 올리고머 화합물 은 도 8D에 예시된 대로 겔 전기영동에 의해 분석되며, 이것은 102, 104로 나타낸 것들과 같은, 5개의 상이한-서열 헤테로다이머를 함유하는 샘플을 사용하여 얻어진 추측한 전기영동 패턴(100)을 나타낸다. 전기영동 분리의 기초는 크기 및/또는 전하에 있어서의 서열-특이적 차이일 수 있다. 예를 들어, 각각 주어진 올리고머 염기 서열에 관련된, 상이한 수의 염기, 또는 상이한 수의 하전된 결합, 또는 상이한 크기의 하전된 또는 하전되지 않은 중합체 '꼬리', 또는 중합체 꼬리에 상이한 수의 전하를 가진 올리고머 화합물이 피험자에게 투여되는 조성물에 사용될 수 있다.

분리된 띠의 검출 및/또는 확인은 착색 또는 형광 핵산 삽입제를 사용한 시각화, 용리와 마이크로시퀀싱, 또는 용리와 질량분광분석을 포함해서, 많은 표준 방법 중 하나에 의해 만들어질 수 있다.

IVB. 고체상 다수 분석물질 검출

도 9는 본 발명에 따라서, 상이한 서열 헤테로듀플렉스, 또는 올리고머 화합물을 검출 및 확인하는데 사용되는 어레이 장치(110)의 일부를 나타낸다. 이 장치는 어레이 또는 어레이 영역, 예를 들어 영역(112,114)을 포함하며, 이 각각은 그 영역에서 기판 표면에 결합된 서열-특이적 결합제(BAxy)를 가진다. 샘플 헤테로듀플렉스와의 특이적 결합을 위해서, 결합제는 도 6B, 6C, 및 6E를 참조하여 각각 상술된 대로, 서열-특이적 항-헤테로듀플렉스 항체, 항원-특이적 항체, 또는 서열-특이적 듀플렉스 결합제일 수 있다.

고체상 어레이 방법의 이점은, 어레이 영역에 결합한 분석물질이 헤테로듀플렉스와 헤테로듀플렉스 서열에 모두 특이적일 것이므로, 샘플 크린업 및 전처리를 피할 수 있다는 것이다. 결합 조건하에서 샘플에 어레이를 노출한 후, 어레이 표면은 세척되어 비특이적으로 결합된 물질이 제거되고, 다음에 예를 들어 도 7A-7C를 참조하여 설명된 방법에 의해, 결합된 헤테로듀플렉스의 존재에 대해 분석된다.

따라서, 한 양태에서, 본 발명은 각각 상이한-서열 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스를 결합시킬 수 있는 상이한 결합제를 가진 복수의 영역(또는 입자)를 갖는 어레이 장치를 포함한다. 또한, 어레이 장치 및 장치에 결합된 헤테로듀플렉스의 존재를 검출하기 위한 검출제를 함유하는 키트가 본 발명에 포함된다. 키트는 피험자에게 투여하기 위한 상술된 종류의 올리고머 조성물을 선택적으로 함유한다.

도 10은 본 발명의 키트 및 방법을 사용한 어레이 장치(110)에 대한 추측한 분석 결과를 나타낸다. 8x8 어레이 형식은 64개까지의 상이한 서열을 취하나, 일부 어레이 영역은 대조 및/또는 중복에 사용된다. 본 형식에서, 분석 결과는 영역(112,116)과 같은, 어레이 영역 중 4개에 결합한 검출가능한 헤테로듀플렉스를 나타낸다. 각 어레이 영역에 지녀진 서열에 대한 열쇠를 사용하여, 사용자는 다음에 표적 RNA가 상기 논의된 여러 가지 상태들 중 어느 것의 진단에 유용할 수 있는 4개의 기지 서열에 대해 존재했다는 것을 알 것이다.

IVC. 고체상 피부 분석

단일- 및 다수-분석물질 시험을 목표로 하는 다른 구체예에서, 올리고머 또는 복수의 올리고머가 경피 투여된다. 올리고머(들)의 경피 통과, 피부 표면 아래의 세포, 예를 들어 수지상세포 및 피하 피부세포로 로 올리고머(들)의 진입, 및 피부 표면 근처에서 헤테로듀플렉스의 형성 및 세포 배제를 허락하는 적합한 기간 후, 피부 표면은 헤테로듀플렉스의 존재에 대한 샘플이 된다. 이것은 접착 테이프를 올리고머(들)이 적용되었던 피부 영역(들) 위에 놓음으로써 행

해진다. 그후, 접착 테이프에서 수집된 물질이 상기 논의된 방법 중 어느 것에 의한 검출을 위해 적합한 수성 매질 내로 유리된다. 이 방법은 투여된 올리고머(들)이 피하세포에 의해 흡수되는 능력, 및 피부 투여된 영역에서 방출된 헤테로듀플렉스의 국부화에 의존한다.

도 11은 복수의 올리고머를 환자의 피부 영역에 투여하는데 사용되는 어플리케이터(120)를 나타낸다. 환자의 피부 영역에 도포되는 접착 패치(122)를 어플리케이터는 포함한다. 어플리케이터 패치는 개구, 예컨대 개구들(124,126)의 어레이를 가지며, 이것을 통해 올리고머가 선택된 피부 영역으로 송달될 것이고, 이것을 통해 헤테로듀플렉스가 수집될 것이다. 어플리케이터 패치 위에 있는 것은 어플리케이터 패치의 개구에 상응하여 위치된 영역들의 어레이 예컨대 영역(130)을 갖는 올리고머 어레이 층(128)이다. 각 영역은 적합한 경피-송달 매질 중의 선택된 올리고머를 지니는데, 예를 들어 올리고머, 50-90% 프로필렌글리콜, 5-10% 리놀레산 또는 다른 긴사슬 지방산, 및 나머지 물을 함유하는 유체 조성물을 지닌다. 피부 도포 전에 습한 상태로 영역들을 유지하기 위해, 패치의 아래 표면이 막으로 덮여지고, 이 막은 어플리케이터 사용 바로 전에 제거된다.

어플리케이터가 환자 피부 표면에 두어진 때, 어플리케이터의 어레이 영역들 각각으로부터의 올리고머는 도 12에 보여진 대로 피부 표면과 접촉되며, 이로써 어레이 영역의 올리고머가 환자에게 경피 투여된다. 투여 기간, 즉 층(128)이 피부 와 접촉하여 고정된 동안의 기간은 전형적으로 1-4시간이고, 그후 층이 패치로부터 제거되며, 이 패치는 환자 피부 표면에 보유된다.

샘플을 수집하기 위해서, 접착 받침(134)을 갖는 수집층(132)이 접착면 아래 패치(122) 위에 두어지며, 이로써 도 13에 보여진 대로, 접착제가 패치 개구 영역 내의 피부와 접촉하게 된다. 전형적으로 점착성 중합체형 접착제인 접착제는 피부의 상부 표면층에 접착하는데 효과적이다. 따라서, 패치로부터 수집층의 제거가 세포, 진피 파편, 및 상부 진피층에 함유된 어떤 헤테로듀플렉스를 수집하는데 효과적이다. 이제 수집층은 접착 영역들의 어레이를 형성하며, 각 영역은 패치 개구 중 하나를 통해 수집된 진피 물질을 가진다. 이 방법에서 형성된 헤테로듀플렉스가 투여 부위에 비교적 국소적으로 남아 있을 것이므로, 수집층에 함유된 헤테로듀플렉스는 동일한 피부 영역에서 투여된 특정한 올리고머에 상응할 것이다.

수집층 상에 수집된 헤테로듀플렉스를 검출하기 위해서, 층은 도 14에 보여진, 수집층 상의 수집 영역과 일치하여 위치된 웰(138,140)을 갖는 플레이트(136) 같은, 멀티-웰 플레이트 위에 두어진다. 층이 플레이트(136)의 최상부 표면에 두어진 때, 그것은 플레이트와 층 간의 접착밀봉을 형성하며, 동시에 수집 영역은 플레이트의 개방형 웰에 노출된다. 이들 웰은 적합한 추출 매질, 예를 들어 접착제를 용해하거나 또는 부분적으로 용해하도록 디자인된 수성 계면활성제 매질로 채워지며, 동시에 접착제에 포획된 물질이 매질 내로 유리된다. 이동은 추출 매질 함유된 상응하는 웰과 접촉하여 접착 영역 아래를 프레싱하거나, 플레이트(136)를 교반하거나, 또는 플레이트를 수집 플레이트 아래로 넘김으로써 달성될 수 있다. 적 합한 추출 기간, 예를 들어 실온에서 30-60분 후에, 수집층이 플레이트로부터 제거되어 웰 및 거기에 있는 용액이 노출된다.

어레이 중 어느 것에 있는 헤테로듀플렉스는 상기 상세히 설명된 방법 중 어느 것에 의해 검출되는데, 예를 들어 헤테로듀플렉스 결합제를 통한 웰 표면에서의 헤테로듀플렉스의 포착, 및 리포터-표지된 헤테로듀플렉스 결합제를 사용한 결합된 헤테로듀플렉스의 연속 검출이 있다.

다음의 실시예들은 본 발명을 예시하며, 본 발명을 어떤 식으로도 제한하지 않는다.

실시예

실시예 1

시험관내 및 생체내에서 뉴클레아제-내성 안티센스 올리고:RNA 헤테로듀플렉스의 형성

시험관내 연구

다양한 mRNA와 안티센스 올리고머들을 혼합하여 그것들을 혼성화한 후, 4.75시간동안 36V에서 12% 비변성 아크릴아미드 겔상에 전개하여 듀플렉스 형성을 시각화함으로써 듀플렉스 형성을 평가하고, 에티듐 브로마이드로 염색하여 듀플렉스 형성 및 RNAse 내성을 검출했다. 겔에서 올리고뉴클레오티드의 이동은 전하 대 질량을 기초로 하며, 듀플렉스의 경우 질량은 RNA의 거의 두배지만 PMO가 중성이기 때문에 전하는 추가되지 않는다. 듀플렉스의 이동은 아크릴아미드겔 농도에 따라 변한다.

RNAse의 존재 또는 부재하에, 알파 글로빈 합성 mRNA 25-mer(SEQ ID NO:1)과 c-myc에 대한 비-상보성 PMO 올리고머 안티센스(SEQ ID NO:2), 또는 상보성 알파 글로빈 안티센스 PMO 25-mer(SEQ ID NO:3)를 혼합했다.

알파 글로빈 합성 25-mer를 c-myc에 대한 안티센스 서열을 갖는 비-상보성 PMO 25-mer(PMO 122-126, SEQ ID NO:2)와 혼합했을 때, 겔 전기영동 후 단일 띠만이 관찰되었고 이 띠의 분자량은 합성 mRNA 25-mer의 질량과 일치했다. 그러나, 알파 글로빈 합성 25-mer를 상보성 알파 글로빈 안티센스 PMO 25-mer(SEQ ID NO:3)과 혼합했을 때는 2개 띠가 겔 전기영동 후 관찰되었는데, 이들은 mRNA 25-mer에 대한 예측속도로 이동한 하부 띠와 약 200-염기쌍의 올리고머에 대한 예측속도로 이동한 두번째 띠이다. 하부 띠가 아닌 상부 띠가 로딩 전 RNAseBM 또는 RNAseT1를 사용한 처리에 대해 내성이었다.

결과는 RNAse 내성 듀플렉스가 RNAseBM의 존재하에 알파 글로빈 합성 mRNA 25-mer(SEQ ID NO:1)와 상보성 안티센스 PMO(SEQ ID NO:3) 간에 형성되었다는 것을 나타냈는데, 이는 PMO:RNA 듀플렉스에 대한 예상된 겔이동 지점에서 희미한 띠에 의해, 그리고 RNA만에 대한 띠는 없음에 의해 나타난 대로이다.

더 나아가서, 결과는 RNAse 내성 듀플렉스가 RNAseTM의 존재하에 알파 글로빈 합성 mRNA 25-mer(SEQ ID NO:1)와 상보성 안티센스 PMO(SEQ ID NO:3) 간에 형성되었다는 것을 나타냈는데, 이는 PMO:RNA 듀플렉스에 대한 예상된 겔이동지점에서 띠에 의해, 그리고 RNA만에 대한 띠는 없음에 의해 나타난 대로이며, RNA가 듀플렉스의 부분이 아닌 경우 변성될 수 있다는 것을 나타낸다.

상보성 대 비-상보성 mRNA:안티센스 올리고머 쌍들의 혼합물을 사용한 전기영동 결과의 비교는 듀플렉스가 mRNA와 그것의 상보성 안티센스 PMO 올리고머 간에 형성되고 이 듀플렉스는 RNAse에 의한 분해에 대해 내성이라는 것을 확인시켜 주었다. RNAse의 존재 및 부재하에서 상보성 mRNA:안티센스 올리고머 쌍들의 혼합물의 상대적 겔 전기영동 이동속도는 듀플렉스가 알파 글로빈 합성 mRNA 25-mer(SEQ ID NO:1)과 상보성 안티센스 PMO(SEQ ID NO:3) 간에 형성되며, RNAse의 부재하에서는 과잉의 알파 글로빈 합성 mRNA가 존재한다는 것을 나타낸다.

생체내 연구

안티센스 올리고머를 래트에 복강내 주사한 후, 안정한 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스가 생체내에서 형성되고, 이것을 이어서 래트 소변에서 검출했다.

각 시험 동물에 대해, 투여 후 24시간째에 1ml의 소변을 수집하고, 이것을 6000-8000mw 컷오프 투석관(Spectra/Por)에서 표준 분석 완충액으로 투석하여 염을 제거했다. 투석된 샘플을 10분동안 DNAse 및 RNAse와 함께 인큐베이션하고 Savant Speed-Vac에서 건조시켰다. 건조된 샘플을 50㎕ 물에 용해시키고, 12% 비변성 아크릴아미드 겔 위에 레인 당 25㎕를 로딩했다.

래트에 살린, 또는 3nmole, 75nmole 또는 375nmole의 c-myc에 대한 PMO 122-126 25-mer 안티센스(SEQ ID NO:2)를 부분 간장절제술시 투여했다. 겔전기영동 결과는 200bp DNA 사다리형 띠 근처로 이동한 DNAse 및 RNAse-내성 띠의 존재를 나타내며, 이는 PMO:RNA 헤테로듀플렉스의 것과 일치한다. 이 띠의 출현은 투여된 PMO의 양에 죄우되며 래트에 살린이 주사되었을 때는 존재하지 않는다. 부분 간장절 제술시 375nmole의 c-myc에 대한 PMO 122-126 25-mer 안티센스(SEQ ID NO:2)가 레트에 제공되면 PMO:RNA 듀플렉스의 이동 패턴과 일치하는 띠가 관찰되는데, 이것은 PMO의 생체내 노출 후 PMO:RNA 듀플렉스의 검출을 지지한다.

이들 관찰은 동물에 PMO 투여시 특이적인 검출가능한 안티센스 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스의 생체내 형성을 지지한다. 이 헤테로듀플렉스는 세포내적으로 형성되며, 뉴클레아제에 대한 내성을 유지하고, 신장혈액 공급으로 세포막을 통해 통과되고 신장을 통해 소변으로 클리어런스되는 동안의 삼투농도의 변화에 대해 안정하다.

실시예 2

안티센스 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스를 사용한 생체내 연구

플로오레세인 콘쥬게이트된 올리고머를 검출할 수 있는 기기(어플라이드 바이오시스템즈 모델 672 GeneScanner)를 사용하여 수행된 캘리브레이션 연구를 사용하여 15-mer, 20-mer, 24-mer 및 38-mer의 다양한 길이의 리보자임의 플루오레세인 콘쥬게이트된 올리고머의 이동속도를 측정했다. 이동속도를 GeneScanner 겔상에서 평가했고, 캘리브레이션 연구는 PMO:RNA 듀플렉스의 검출에 대한 GeneScanner 접근법의 타당성을 확인시켜 주었다. 캘리브레이션 연구는 어플라이드 바이오시스템즈 모델 672 GeneScanner이 길이와 농도를 기초로 하여 플루오레세인 콘쥬게이트된 올리고머들을 구별할 수 있다는 것을 나타낸다.

생체내 연구

래트에 래트 시토크롬 P-45032(SEQ ID NO:6)에 대한 안티센스인 카르복시플 루오레세인-콘쥬게이트된 PMO(SEQ ID NO:5)를 주사했다.

주사 후 1시간째에 래트에서 채혈된 혈액으로부터 제조된 혈장 샘플에 대한 GeneScanner 크로마토그램은 270분과 340분(2개의 가능한 카르복시플루오레세인 결합으로 인한 2개 피크이며, 이것들은 상이하게 이동한다)에서 이동한 형광 성분들을 함유했다. 주사 후 24시간째에 래트로부터 제조된 혈장 샘플은 대략 75분과 80분에서 이동한 형광 성분들을 함유했다. 질량 스펙트럼 데이타(나타내지 않음)로 더 짧은 이동시간이 PMO의 변성 때문이 아니라는 것을 확인했으며, PMO:RNA 헤테로듀플렉스가 그 시간을 넘어서 형성되었다는 것을 나타낸다.

도 2는 P450 안티센스 PMO 투여 후 다양한 시간에서 취해진 샘플분석 결과를 표시하며, 그러한 투여 후 래트 혈장에서 PMO 모노머의 소멸 및 상응하는 PMO:RNA 헤테로다이머의 출현을 나타낸다. 혈장에서 듀플렉스의 유의한 양의 출현은 대다수의 비-듀플렉스된 PMO가 혈장을 떠날 때까지(일반적으로 '분포상'이라고 간주)는 일어나지 않았다. PMO 헤테로듀플렉스는 PMO 모노머가 상보성 mRNA 전사체가 국부화되는 피험자의 조직으로 분포된 후까지 혈장에 축적되지 않았다. 이들 조직에서 하전된 PMO:RNA 헤테로듀플렉스가 아마 형성될 것이며, 세포외로 유출되어 혈장으로 돌아온다. 이런 전체 과정은 수 시간 정도 필요하다.

p450 안티센스 PMO(SEQ ID NO:5)의 투여 후 플루오레세인이 신장 및 간에서 검출되었다.

신장조직샘플의 크로마토그램은 비-듀플렉스된 PMO에 일치하는 350분에서의 띠, 및 PMP:RNA 헤테로듀플렉스에 일치하는 80분에서의 추가 띠를 나타냈으며, 이 는 듀플렉스와 모 PMO가 모두 신장 세포들 사이의 공간이나 세포내에 남아있을 수 있다는 것을 나타낸다. 간조직샘플은 비-듀플렉스된 PMO가 본질적으로 없으며 상당히 많은 PMO:RNA 헤테로듀플렉스를 나타냈다. 이들 결과는 P450 mRNA 전사체의 레벨이 간에서보다 신장에서 훨씬 적다는 관찰과 일치한다.

비-듀플렉스된 안티센스 PMO 올리고머 및 안티센스 PMO 올리고머:RNA 헤테로듀플렉스의 소변 클리어런스의 시간과정을 반영하는 연구는 PMO:RNA 헤테로듀플렉스의 형성 및 조직에서부터 혈장으로 이것의 유출과, 이어서 궁극적으로 그것들이 소변에서 나타나는데 수 시간 정도가 필요하다는 것을 나타낸다.

실시예 3

포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)를 인식하는 다수 단일클론 항체의 개발

다음에 본 발명의 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머를 인식하는 다수 단일클론 항체의 제조를 상세히 설명한다. 면역원을 형성하기 위해, PMO의 5'-단부를 표준링커화학에 의해 열쇠구멍삿갓조개헤모시아닌(KLH)에 연결했다. PMO-KLH 콘쥬게이트를 상보성 RNA와 혼성화시킨 후 마우스에 주사하고, 이어서 마우스를 부스팅하고 출혈시켜 PMO에 대한 강한 항체 역가가 존재하는지 측정했다.

강한 항체 반응이 관찰된 마우스에서 비장을 제거하고, 분리된 비장세포를 불멸화된 셀라인과 융합시켜 잘 공지된 방법에 따라서 하이브리도마를 제조했다. 스크리닝된 셀라인 중 10개에서 PMO를 인식하는 항체를 분비하는 것이 관찰되었다. 이들 10개로부터 3개의 일반적 단일클론 항체(MAb) 인식종을 분리했다: (a) 10개 클론 중 3개는 PMO의 5'-단부에 콘쥬케이트된 트리에틸렌글리콜 부분을 인식하는 Mab를 분비했고, (b) 10개 클론 중 7개는 PMO 헤테로듀플렉스 구조를 인식하는 Mab를 가졌다. 이들 7개 중에서, 6개 셀라인은 PMO의 독특한 서열을 인식한다고는 보여지지 않지만 RNA 또는 DNA를 인식하지도 않는 Mab를 생성했다. 또한, PMO를 인식했던 7개 Mab 중 1개는 실질적으로 오히려 다른 PMO 서열을 면역화하는데 사용된 특정한 PMO의 서열에 더 민감했다.

또한, 혈관 송달용으로 개조된 침윤 카테터에 의해 본 발명의 PMO가 주사된 돼지의 혈관벽에서 PMO를 검출하기 위해 다중클론 혈청을 평가했다. 관상혈관의 조직 용해액을 아크릴아미드겔에 로딩하고 전기장을 적용한 후, 겔 내용물을 웨스턴 블롯법에 따라서 Nytran 멤브레인으로 옮겼다. 멤브레인을 PMO 항혈청을 사용하여 조사했고, 겔에서 이동하지 않았던 자유 PMO에 대한 띠들을 볼 수 있었으며, RNA에 관련된 음전하로 인해 겔에서 이동한 RNA:PMO 듀플렉스인 다른 띠를 볼 수 있었다.

본 발명이 특정한 방법 및 구체예를 참조하여 설명되었지만, 다양한 변형 및 변화가 본 발명으로부터 벗어나지 않고 만들어질 수 있다는 것이 인정될 것이다.

서열목록표

설 명	SEQ ID NO
알파 글로빈 mRNA에 상응하는 합성 25-mer (5'-CCA GUC CGU CUG AGA AGG AAC CAC C-3')	1
c-myc에 대한 PMO 25-mer 안티센스 (nt 1-22-126; 5'-ACGTTGAGGGGCATCGTCGC-3')	2
알파 글로빈 mRNA에 대한 PMO 25-mer 안티센스	3
래트 시토크롬 P-4503A2에 대한 PMO 안티센스 (1-0-256; 5'-UGA GAG CUG AAA GCA GGU CCA U-3')	4
래트 시토크롬 P4503A2(1-0-256)에 상보하는 (안티센스) 카르복시플루오레세인 콘쥬게이트된 PMO	5
래트 시토크롬 P-4503A2	6

(57) 청구의 범위

청구항 1.

피험자에서 단일-가닥 표적 RNA를 포함하는 염기-특이적 세포내 결합 사건의 발생을 검출하는 방법으로서,

(a) (i) 표적 RNA의 일부분에 상보하는 표적화 염기 서열을 포함하는 8 내지 40 염기, (ii) 상보성 RNA 서열과의 결합과 관련하여 약 50℃ 이상의 Tm, 및 (iii) 포유류 세포에 의해 능동 흡수되는 능력을 가지며, (iv) RNaseH에 대한 이 제제와 혼성화된 상보성 mRNA의 내성을 부여하는, 올리고머 안티센스 화합물을 피험자에게 투여하는 단계,

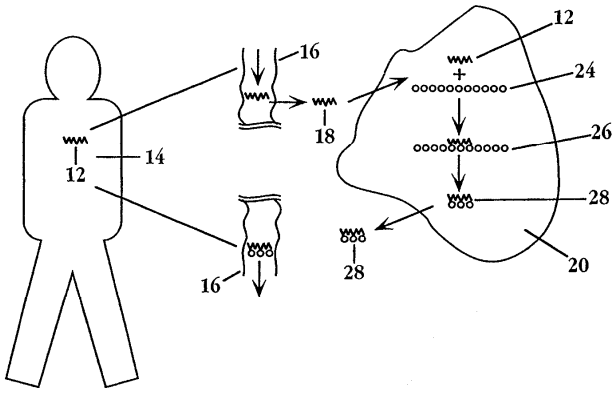
(b) 상기 투여 단계 후 선택된 시간에서 피험자로부터 체액 샘플을 얻는 단계, 및

(c) 샘플에서 안티센스 올리고머 및 표적 RNA 상보성 부분으로 이루어진 뉴클레아제-내성 헤테로듀플렉스의 존재를 검출하는 단계

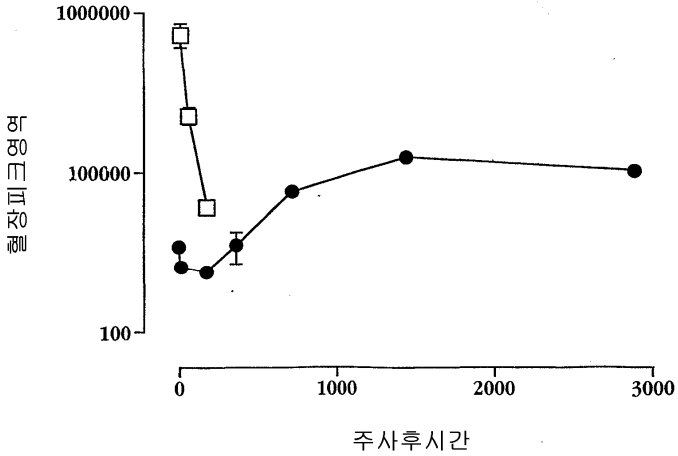
를 포함하는 방법.

도면

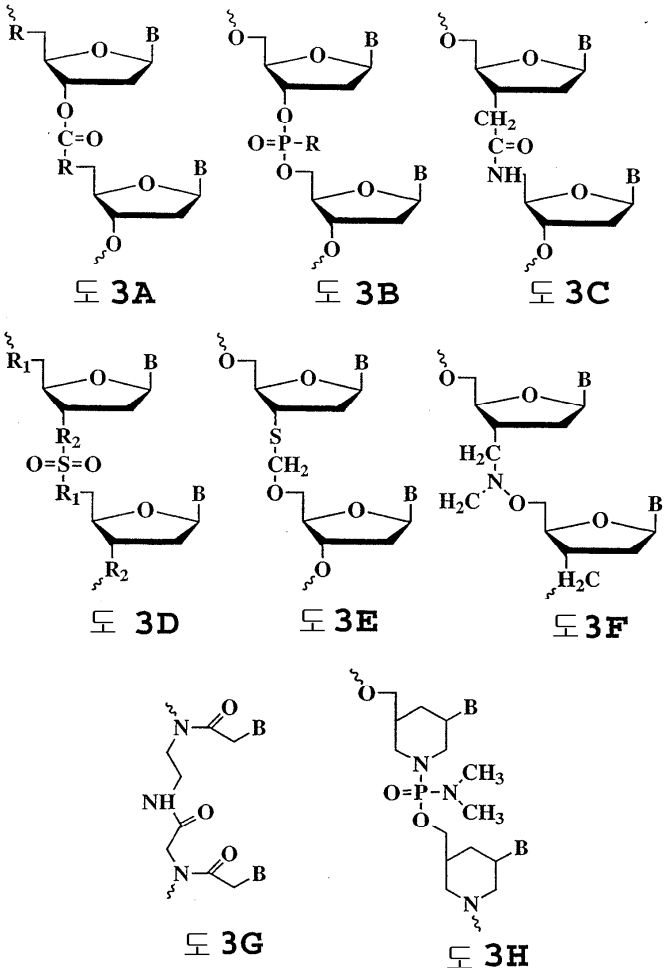
도면1



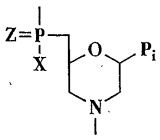
도면2


1000000
100000
100
형광피크강도
0
1000
2000
3000
주사후시간

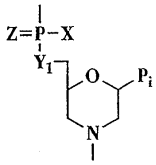
도면3


도 3A
도 3B
도 3C
도 3D
도 3E
도 3F
도 3G
도 3H

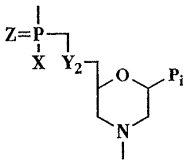
도면4



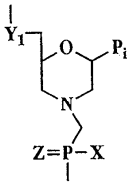
도 4A



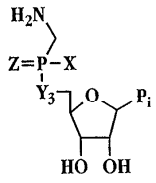
도 4B



도 4C

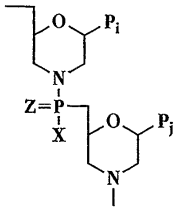


도 4D

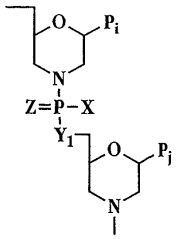


도 4E

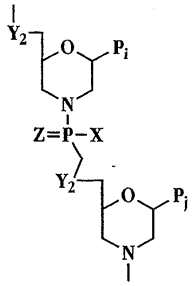
도면5



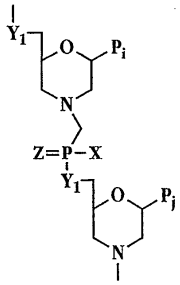
도 5A



도 5B

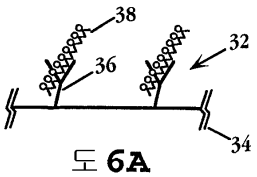


도 5C

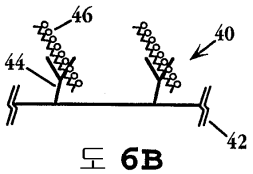


도 5D/E

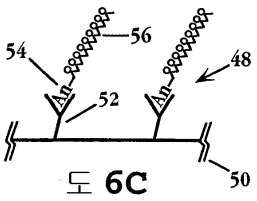
도면6



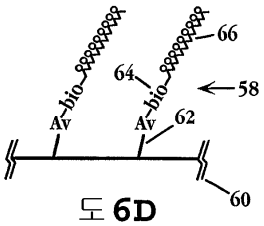
도 6A



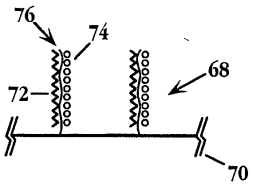
도 6B



도 6C

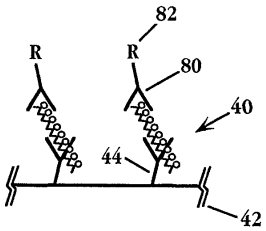


도 6D

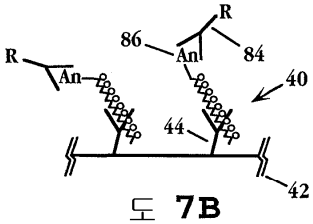


도 6E

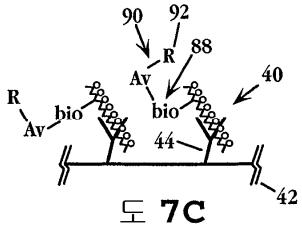
도면7



도 7A

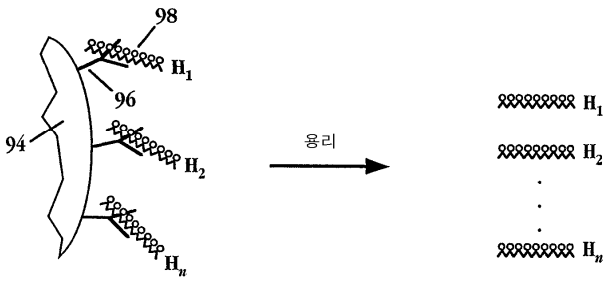


도 7B



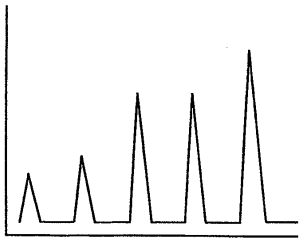
도 7C

도면8

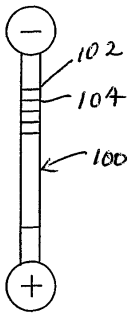


도 8A

도 8B

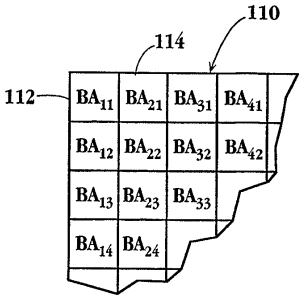


도 8C

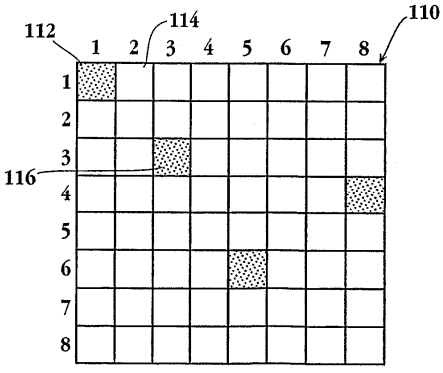


도 8D

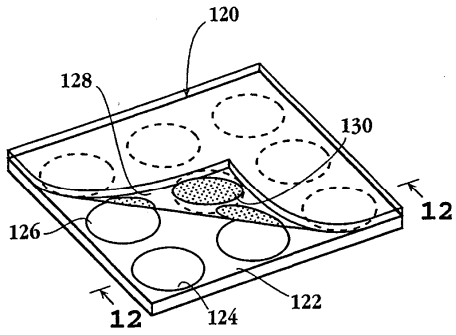
도면9



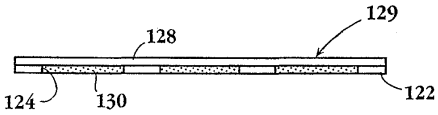
도면10



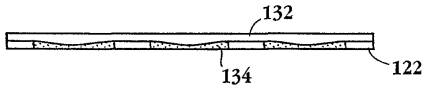
도면11



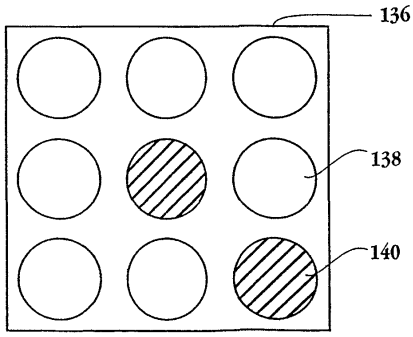
도면12



도면13



도면14



<110> AVI BioPharma, Inc.

<120> Non-Invasive Method for Detecting Target RNA

<150> US 09/736,920

<151> 2000-12-13

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> alpha globin mRNA synthetic 25-mer

<400> 1

ccaguccguc ugagaaggaa ccacc 25

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense

<400> 2

acgttgaggg gcatcgtcgc 20

<210> 3

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense

<400> 3

ggugguuccu ucucagacgg acugg 25

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense

<400> 4

ugagagcuga aagcaggucc au 22

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense

<400> 5

uaccuggacg aaagucgaga gu 22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 6

actctcgact ttcgtccagg ta 22