



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 667 593 A5

⑤① Int. Cl.⁴: A 61 K 31/70

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer:	4975/84	㉚ Inhaber:	Akira Kaji, Higashikurume-shi/Tokyo (JP)
㉑ Anmeldungsdatum:	17.10.1984		
㉓ Priorität(en):	17.10.1983 JP 58-192350 16.03.1984 JP 59-49321	㉛ Erfinder:	Kaji, Akira, Higashikurume-shi/Tokyo (JP)
㉔ Patent erteilt:	31.10.1988		
㉕ Patentschrift veröffentlicht:	31.10.1988	㉜ Vertreter:	Bovard AG, Bern 25

⑤④ **Arzneimittel zur Behandlung von Virusinfektionen enthaltend Oligodeoxynucleotide und/oder Polydeoxynucleotide.**

⑤⑦ Das Arzneimittel enthält mindestens ein Oligo- und/oder Polydeoxynucleotid aus 9 - 100 Nucleotiden in Form eines (-)-DNA-Stranges, das mindestens ein ganz oder teilweise mit einer während der Virusvermehrung erzeugten mRNA hybridisierendes DNA-Segment enthält und ein zur Behandlung von Virusinfektionen geeignetes, pharmazeutisch verträgliches Exzipiens. Das Mittel dient zur Behandlung von Virusinfektionen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Arzneimittel zur Behandlung von Virusinfektionen enthaltend mindestens ein Oligo- und/oder Polydeoxynucleotid aus 9–100 Nucleotiden in Form eines (–)-DNA-Stranges, das mindestens ein ganz oder teilweise mit einer während der Virusvermehrung erzeugten mRNA hybridisierendes DNA-Segment enthält und ein zur Behandlung von Virusinfektionen geeignetes, pharmazeutisch verträgliches Exzipiens.

2. Arzneimittel nach Anspruch 1 in einer zur Behandlung von RNA-Virus-Infektionen geeigneten Darreichungsform.

3. Arzneimittel nach Anspruch 1 in einer zur Behandlung von Influenza-Virus-Infektionen geeigneten Darreichungsform.

4. Arzneimittel nach Anspruch 1 in einer zur Behandlung von DNA-Virus-Infektionen geeigneten Darreichungsform.

5. Arzneimittel nach Anspruch 1 in einer zur Behandlung von Herpes simplex-Virus-Infektionen geeigneten Darreichungsform.

6. Arzneimittel nach Anspruch 1, enthaltend ein Gemisch der Oligo- und/oder Polydeoxynucleotide.

7. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man aus mindestens einem Fragment aus dem codierenden Bereich des Virus-Genoms ein Oligo- oder Polydeoxynucleotid aus 9–100 Nucleotiden in Form eines (–)-DNA-Stranges isoliert, das mindestens ein ganz oder teilweise mit einer während der Virusvermehrung erzeugten mRNA hybridisierendes DNA-Segment enthält und das Oligo- oder Polydeoxynucleotid mit einem zur Behandlung von Virusinfektionen geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Exzipiens versetzt.

8. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man durch chemische Synthese ein Oligo- oder Polydeoxynucleotid aus 9–100 Nucleotiden in Form eines (–)-DNA-Stranges herstellt, das mindestens ein ganz oder teilweise mit einer während der Virusvermehrung erzeugten mRNA hybridisierendes DNA-Segment enthält und das Oligo- oder Polydeoxynucleotid mit einem zur Behandlung von Virusinfektionen geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Exzipiens versetzt.

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft Arzneimittel zur Behandlung von Virusinfektionen, die entweder ein einzelnes oder ein Gemisch von Oligo- und/oder Polydeoxynucleotiden aus 9–100 Nukleotiden in Form eines (–)-DNA-Stranges enthalten, die mit einem Bereich einer bei der Virusvermehrung synthetisierten mRNA (Messenger RNA) hybridisieren und ein zur Behandlung von Virusinfektionen geeignetes pharmazeutisch verträgliches Exzipiens. Derartige Arzneimittel können beispielsweise als Injektionslösung, als Augentropfen oder als Suppositorien konfektioniert werden. Die genannten Arzneimittel können so eingesetzt werden, dass die verabreichte Wirkstoffmenge entweder 1 bis 20 000 g pro kg und Tag beträgt.

Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung der genannten Arzneimittel.

Bislang werden zur Behandlung von Viruskrankheiten chemisch synthetisierte Arzneimittel und Antibiotika als antivirale Wirkstoffe zur Inhibition der Virusvermehrung verwendet. Das antivirale Spektrum der chemisch synthetisierten Arzneimittel ist jedoch verhältnismässig schmal und häufig haben derartige Arzneimittel schädliche Nebenwirkungen. Andererseits haben die verwendeten Antibiotika den Nachteil, dass ständig neue Antibiotika sowie Anstrengun-

gen zur Verminderung jeglicher schädlicher Nebenwirkungen dieser Antibiotika erforderlich sind, denn im Laufe der Zeit werden die Viren resistent und schliesslich immun gegenüber den verwendeten Antibiotika.

Im Rahmen der neueren Entwicklung der Biotechnologie, insbesondere der Gentechnologie, wurde die Identifizierung von Virus-Struktur-Genen ein grosser Forschungsbe-
reich innerhalb der Studien von Mikroorganismen. 1977 be-
schrieben S. C. Inglis et al. die in vitro Translation cytoplas-
matischer, aus mit Influenza A-Virus infizierten Hühner-
Embryo-Fibroblasten extrahierter RNA im zellfreien Wei-
zenkeim-Protein-Synthesesystem mit dem Ergebnis, dass die
Synthese Virus-spezifischer Polypeptide, die dem hybridi-
sierten v-RNA-Segment entsprechen, vermindert ist (Viro-
logy 78, Seiten 522–536 (1977)). Die in dieser Veröffentlichung
beschriebenen Experimente wurden jedoch in einem
zellfreien System ausgeführt und haben keine Beziehung zur
Untersuchung von Arzneimitteln. Eine solche Strukturgen-
Identifizierung wird auch beschrieben von B. M. Paterson et
al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, Seiten 4370–4374
(1977)). Die Experimente von Paterson et al. wurden eben-
falls im zellfreien System ausgeführt. In den beiden genann-
ten Veröffentlichungen wurde für die Inhibition der Protein-
synthese eine riesige genetische Struktur wie RNA verwen-
det. Im ersten Fall wurde die RNA aus Influenzaviren extra-
hiert, im zweiten Fall aus dem Kaninchen- β -Globin-Clon
p β G1. Es konnte nicht erwartet werden, dass eine solche ries-
ige Struktur die intrazelluläre Proteinsynthese inhibiert.

1978 berichteten P. C. Zamecnik et al. das ein zur 3'- und
5'-terminalen repetitiven Sequenz des Rous-Sarcoma-Virus
(RSV) komplementäres Oligodeoxy-Nucleotid-Tridecamer
ein wirksamer Inhibitor der Proteinsynthese ausgehend von
viraler RNA sowohl im zellfreien Weizenkeim-System (Proc.
Natl. Acad. Sci. USA. 75, Seiten 285–288 (1978)) als auch
in einem in vitro-Gewebe-Kultur-System ist (Proc. Natl.
Acad. Sci. USA. 75, Seiten 280–284 (1978)). In der ersten
Referenz wird das zellfreie System noch wie vorstehend be-
schrieben verwendet. Bezüglich der Verwendung von DNA
ist es jedoch leicht verbessert. Hier wird ein kleineres DNA-
Molekül zur Inhibition der Translation von mRNA verwen-
det. In der zweiten Veröffentlichung werden Experimente
durchgeführt, bei denen in einem Gewebekultursystem zur
Hemmung der Virusreplikation und der Zell-Trans-Forma-
tion des Tridecamer verwendet wird. Die in diesen Arbeiten
zur Inhibition der Replikation und der Transformation ver-
wendete DNA wurde nicht aus einem spezifischen codieren-
den Bereich ausgewählt. Im gleichen Jahr berichteten auch
N. D. Hastie et al., dass die Hybridisierung von Globin
mRNA mit ihrer korrespondierenden cDNA in einem zell-
freien System spezifisch die Translation der mRNA inhibiert
(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, Seiten 1217–1221 (1978)).
Neu ist in dieser Arbeit lediglich, dass eine bestimmte codie-
rende DNA-Region für die Inhibition der Translation mit-
tels Hybridisierung von mRNA ausgewählt wurde. Die dort
erwähnten Versuche wurden jedoch immer noch in einem
zellfreien System ausgeführt. Seit diesen Veröffentlichungen
im Jahre 1978 bestand ein Bedürfnis für die Entwicklung
von Arzneimitteln aufgrund der genannten Hypothesen. Bis
heute gibt es jedoch keine Veröffentlichungen, die die prakti-
sche Anwendung der genannten Theorie in in vivo-Experi-
menten beschreibt.

1983 wurde eine PCT-Anmeldung veröffentlicht, die sich
auf Oligonucleotide als therapeutische Wirkstoffe und Ver-
fahren zu ihrer Herstellung bezieht (Molecular Biosystem
Inc., Nr. WO83/01451 bzw. EP-1 192 574 vom 2. Nov.
1983). In dieser Anmeldung wird jedoch lediglich offenbart,
dass (–)-Strang-DNA aus einem bestimmten codierenden
Bereich SV40-transformierte Zellen inhibierte.

Obwohl die in vivo-Expression im Beispiel 1 dieser Veröffentlichung häufig verwendet wird, legen die dort genannten Beschreibungen aus dem Gesamtzusammenhang heraus betrachtet, nur in vitro-Experimente in Zellkultur-Systemen nahe. Selbst wenn solche in vitro-Experimente als in vivo-Experimente betrachtet werden, fehlen doch entsprechende genaue Angaben für die Bedingungen und sind nichts weiter als die bloße Erwähnung der Erwartung gewünschter Wirkungen. Wie dem auch sei, diese Veröffentlichung legt zum ersten Mal die Anwendung von RNA-DNA-Hybridisierungstechniken in einem Arzneimittel nahe, jedoch fehlen darin detaillierte Beschreibungen zur Verwendung als Arzneimittel. Deshalb ist die in der genannten PCT-Anmeldung gegebene Lehre lediglich eine Zusammenfassung des in den vorgenannten Veröffentlichungen beschriebenen Stand der Technik.

Deshalb bestand ein dringendes Bedürfnis für einen völlig neuen antiviralen Wirkstoff zur Inhibition der Virusvermehrung in vivo in einem lebenden Tier, dessen Funktionsprinzip auf der RNA-DNA-Hybridisierungstechnik und damit auf der Inhibition der Translation viraler mRNA beruht.

Es wurde gefunden, dass die Virusvermehrung am Infektionsort mit einem Oligodeoxynucleotid oder einem Polydeoxynucleotid, welches mit einer während der Virusvermehrung synthetisierten mRNA hybridisiert, gehemmt werden kann, sofern die genannten Wirkstoffe an den Infektionsort gelangen. Durch die Verabreichung der Oligo- und Polydeoxynucleotide an Tiere mit einer Virusinfektion, wird ein antiviraler Wirkstoff bereitgestellt, der die Virusvermehrung in vivo inhibiert.

Wie vorstehend beschrieben, war die Hybridisierung von viraler oder von Globin-RNA mit der entsprechenden DNA zur Inhibition der Protein-Synthese bekannt. Die Mehrzahl der diesbezüglichen Experimente wurde jedoch in einem zellfreien System durchgeführt. Ausnahmen sind Zamecnik's Veröffentlichung (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, Seiten 280–284 (1978)) sowie die Veröffentlichung von Molecular Biosystems Inc. (PCT-Anmeldung Nr. WO 83/01451). In letzterer wird die in vitro-Inhibition der Virus-Vermehrung in einem Zellkultur-System beschrieben. In den in vitro-Experimenten von Zamecnik wird jedoch nicht DNA aus einem spezifischen codierenden Bereich des Virus verwendet. Der Begriff «codierender Bereich» bezeichnet dabei den Bereich viraler Gene, der eine wichtige Rolle bei der Translation viraler Proteine spielt und der durch die RNA-Polymerase in mRNA transkribiert wird. In der Veröffentlichung von Molecular Biosystems Inc. werden keine genauen Hinweise auf die experimentellen Bedingungen gegeben. Der vorliegenden Erfindung liegen sowohl umfassende Forschungsarbeiten und Experimente in in vitro als auch in in vivo-Systemen unter Verwendung spezifischer Oligo- oder Polydeoxynucleotide aus einem spezifischen codierenden Bereich zugrunde. Diese haben es zum ersten Mal ermöglicht, die Virusvermehrung mittels der RNA-DNA-Hybridisierungstechnik in einem praktisch für die Therapie verwertbaren Ausmass zu inhibieren. Dadurch wird die Verwendung bestimmter Oligo- oder Polydeoxynucleotiden als Arzneimittel zur Inhibition der Virusvermehrung möglich. Damit unterscheidet sich die vorliegende Erfindung in zwei wichtigen Punkten vom Stand der Technik, nämlich dadurch, dass mit der Virus mRNA hybridisierende DNA aus einem spezifischen codierenden Bereich ausgewählt wurde und dieses ausgewählte Deoxynucleotid kurz und einzelsträngig ist und ausserdem dadurch, dass die vorstehend genannten Wirkstoffe doch umfassende in vivo-Experimente bis zur praktischen Anwendbarkeit entwickelt wurden.

Gegenstand der Erfindung ist demnach das im Anspruch 1 definierte Arzneimittel zur Behandlung von Virus-Infek-

tionen. Als Wirkstoff wird ein Oligo- oder Polydeoxynucleotid aus 9–100 Nucleotiden in Form eines (–)-DNA-Stranges oder ein Gemisch dieser Moleküle eingesetzt. Diese Oligo- oder Polydeoxynucleotide sind dadurch gekennzeichnet, dass sie komplementär zu einem Bereich einer während der Virusvermehrung synthetisierten mRNA sind und deshalb mit dieser mRNA hybridisieren können.

Es wird zum ersten Mal beschrieben, dass die Proteinsynthese, ausgehend von einer synthetischen RNA als mRNA in einem in vitro-Protein-Synthese-System durch ein mit dieser synthetischen RNA hybridisierendes Oligodeoxynucleotid inhibiert wird (vgl. das nachstehend beschriebene Beispiel 25). Oligodeoxynucleotide, die nicht mit der RNA hybridisieren, inhibierten die Proteinsynthese in diesem System nicht.

Darüber hinaus wurde gefunden, dass dem (–)-Strang der α -Globin- oder β -Globin-DNA entsprechende Oligodeoxynucleotide die Translation der zugehörigen mRNA spezifisch inhibieren (vgl. das nachstehend beschriebene Beispiel 26). Ferner wurde gefunden, dass die β -Globin-DNA in diesem in vitro-System die Translation von β -Globin-mRNA spezifisch inhibiert. Wenn bei diesen Versuchen DNA verwendet wurde, die nicht mit der α -Globin-mRNA hybridisiert, wurde die Bildung von α -Globin nicht inhibiert. Ebenso wurde die β -Globin-Synthese nicht durch DNA inhibiert, die nicht mit der β -Globin-mRNA hybridisiert. Weiterführend wurde gefunden, dass nicht nur langkettige DNA, sondern auch Oligodeoxynucleotide in diesem System aufgrund der Hybridisierung eine stark inhibierende Wirkung haben.

Auf der Grundlage dieser Experimente wurden weitere Experimente mit Herpes-simplex-Virus (HSV)-Infektionen durchgeführt. Es wurde gefunden, dass die Anzahl von Syncytien (Plaque-ähnliche Löcher, die durch HSV mittels der Fusion infizierter Zellen hervorgerufen werden), die durch HSV hervorgerufen wurden, durch Verabreichung von DNA oder von Oligodeoxynucleotiden, die mit der sofort synthetisierten frühen mRNA von HSV hybridisieren an mit diesem Virus infizierten Zellen deutlich vermindert ist.

Bei den vorstehend beschriebenen Experimenten wurde CaCl_2 und Calcium-Phosphat zusammen mit der DNA verwendet, um die DNA-Aufnahme in die Zelle zu stimulieren. In anderen Experimenten wurde jedoch gefunden, dass die Oligodeoxynucleotide auch ohne diese Calciumsalze aufgenommen werden können und, dass sie auch unter diesen Bedingungen die Vermehrung von HSV hemmen und die entsprechenden cytopathischen Effekte unterdrücken (vgl. das nachstehend beschriebene Beispiel 7).

Aus diesen Experimenten wurde deutlich, dass (–)-Strang-DNA durch Hybridisierung an eine HSV-1-mRNA die Bildung von Syncytien durch dieses Virus inhibiert. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die genannte DNA HSV-infizierten Mäusen verabreicht. Dadurch wurde gezeigt, dass eine solche DNA als antivirales Arzneimittel für die Behandlung von Virusinfektionen in vivo verwendet werden kann.

Dabei ist bemerkenswert, dass im erfindungsgemässen Arzneimittel als Wirkstoff mindestens eine (–)-Strang-DNA, die der mRNA eines bestimmten Virus-Gens entspricht, verwendet wird. Aus diesem Grund wird die Biosynthese zellulärer Proteine, die von anderen mRNA-Molekülen gesteuert wird, nicht durch die Verwendung der vorstehend beschriebenen DNA-Moleküle beeinflusst.

Es gibt zwei Gruppen von Viren, nämlich DNA-Viren (Herpes simplex-Virus, Adeno-Virus, Vaccinia-Virus u. a.) und RNA-Viren (Influenza-Virus, Rhino-Virus, Polio-Virus u. a.). RNA-Viren tragen entweder einzelsträngige RNA oder doppelsträngige RNA als Genom. Einzelstrang-RNA-Viren werden in solche klassifiziert, die (+)-Strang-RNA

tragen und in solche, die (–)-Strang-RNA als Genom tragen.

Virale Proteine müssen immer durch Translation einer viralen mRNA mit (+)-Strang-Polarität synthetisiert werden. Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom bilden ausgehend von ihrer (–)-Strang-DNA (+)-Strang-RNA (mRNA). Was die doppelsträngigen RNA-Viren betrifft, so wird (+)-strängige RNA (mRNA) ausgehend vom (–)-RNA-Strang gebildet. Das Genom (+)-strängiger RNA-Viren fungiert selbst als mRNA, während das Genom (–)-strängiger RNA-Viren als Matrize für die Bildung (+)-strängiger RNA (mRNA) dient.

Unabhängig vom Entstehungsmechanismus der mRNA, die Translation einer Virus-mRNA und damit die Synthese viraler Proteine durch eine hybridisierende (–)-Strang-DNA inhibiert. Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung kann allgemein zur Inhibition der Virusvermehrung verwendet werden. Die in den Beispielen beschriebene Verwendung von Herpes-simplex-Virus (Doppelstrang-DNA-Virus) und Influenza-Virus (Einzelstrang-RNA-Virus) dient lediglich der Erläuterung. Durch die erfindungsgemässen Wirkstoffe kann also die Vermehrung von Viren inhibiert werden, wie Influenza-Virus, Adeno-Virus, Leukämie-Virus, Dengue-Virus, Rabies-Virus, Hepatitis-Virus, Masern-Virus, Encephalitis-Virus, Parainfluenza-Virus, Rhino-Virus, Gelbfieber-Virus oder Epstein-Barr-Virus.

Damit können die Wirkstoffe des erfindungsgemässen Arzneimittels allgemein für Prophylaxe oder Behandlung verschiedener Virusinfektionen von Tier, Mensch und Pflanze verwendet werden. Die entsprechenden Arzneimittel sind folglich sehr nützlich für verschiedene Anwendungen.

Aufgrund des Wirkungsprinzips der Wirkstoffe, wird die Vermehrung von RNA- oder DNA-Viren sowie das Auftreten der entsprechenden cytopathischen Effekte blockiert, ohne dabei die Wirtszellen zu beeinflussen. Ausserdem kann durch die Verwendung der erfindungsgemässen Wirkstoffe die Infektion von noch nicht infizierten Wirtszellen verhindert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Anwendung von mit der sofort synthetisierten frühen mRNA des Herpes-simplex-Virus hybridisierenden Oligodeoxynucleotiden weder Auswirkungen auf normale, nichtinfizierte Baby-Hamster-Nierenzellen (BHK-Zellen) noch Auswirkungen auf Mäuse hatte. Daraus wurde gefolgert, dass die Oligodeoxynucleotide weder gefährliche Auswirkungen auf normale Zellen und Tiere haben, noch dass sie die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Zellen in irgendeiner Weise beeinflussen.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten (–)-strängigen Oligo- und oder Polydeoxynucleotide können durch enzymatische Hydrolyse von DNA, Denaturierung und anschliessende Trennung durch Affinitätschromatographie erhalten werden. Andererseits können auch synthetische (–)-strängige Oligodeoxynucleotide verwendet werden. Die bei den Experimenten verwendeten (–)-strängigen Deoxynucleotide können also durch Anwendung verschiedener Verfahren erhalten werden.

Bei der Clonierung eines RNA-Virus-Gens kann die Reverse Transkriptase verwendet werden. In manchen Fällen kann virale DNA verwendet werden, die in den infizierten Zellen vorliegt und vom ursprünglichen RNA-Virus-Genom abgeleitet ist. Als Clonierungsvektor kann beispielsweise der λ -Phage (Charon-Phage) oder das Plasmid pBR 322 verwendet werden. Um eine einzelsträngige (–)-Strang-DNA zu erhalten, wird der M 13-Phage als Vektor verwendet. Es können clonierte Fragmente aus dem codierenden Bereich des gesamten Virus-Genoms verwendet werden. Bevorzugt für die Hemmung der Virus-Vermehrung und der damit einhergehenden cytopathischen Effekte ist jedoch die Verwendung

von Oligo- oder Polydeoxynucleotiden, die den sofort exprimierten frühen Virus-Genen entsprechen. Ein rekombinanter M 13-Phage, der (–)-strängige Virus-DNA enthält, oder ein rekombinanter DNA-Vektor, der doppelsträngige Virus-DNA enthält, kann durch Züchtung grosser Mengen von E. coli-Bakterien die diese Vektoren tragen oder mit dem genannten M 13-Phagen infiziert sind, isoliert werden, die die viralen Gene tragenden Vektoren wurden isoliert und zur Gewinnung der viralen Gene mit Restriktionsendonucleasen geschnitten. Das Gemisch der ausgeschnittenen Virus-Gene und der Vektor-DNA wurde anschliessend einer Agarose-Gel-Elektrophorese oder einer Sephadex-Säulen-Chromatographie zur Trennung des Virusgens von der Vektor-DNA unterzogen. Die so erhaltenen DNA-Moleküle wurden durch partiellen Abbau mit DNA-Restriktionsendonuclease oder durch Ultraschall-Behandlung verkürzt. Mit Hilfe der Gel-Elektrophorese oder der Sephadex-Chromatographie wurden Virus-DNA-Fragmente einer Kettenlänge von 9 bis 100 Nucleotiden isoliert.

Es wird darauf hingewiesen, dass nur der (–)-Strang der Virus-DNA wirksam bei der Inhibition der Virus-Protein-Synthese ist. DNA von Vektoren, wie pBR 322 oder des λ -Phagen oder von der replikativen Form des M 13-Phagen ist doppelsträngige DNA. Deshalb muss diese doppelsträngige DNA vor der Isolierung der (–)-Strang-DNA zunächst in einzelsträngige DNA übergeführt werden. Zu diesem Zweck können verschiedene Methoden angewendet werden. Beispielsweise kann DNA durch 10 Minuten langes Erhitzen auf 100 °C und anschliessendes schnelles Abkühlen denaturiert werden.

Aus einem Gemisch der voneinander getrennten (–)-strängigen und (+)-strängigen DNA kann der (–)-Strang beispielsweise durch Affinitätschromatographie isoliert werden. Zu diesem Zweck wird zunächst der (+)-DNA-Strang durch Clonierung im M 13-Phagen hergestellt. Dieser wird nachfolgend zur Verwendung bei der Chromatographie an einen Träger konjugiert. Ein Gemisch aus (–)- und (+)-Strang-DNA wird dann über eine Säule, die dieses Konjugat enthält, chromatographiert. Der (–)-Strang der DNA wird an diese Säule gebunden, während der (+)-Strang durchläuft. Der gebundene (–)-DNA-Strang wird anschliessend von der Säule eluiert.

In einem anderen Verfahren wird die (–)-Strang-DNA in Form von Oligo- oder Polydeoxynucleotiden durch chemische Synthese erhalten.

Eines der sofort experimentierten frühen Gene des Doppelstrang-DNA-tragenden Herpes-Simplex-Virus, Vmw 175, hat beispielsweise die (+)-Strang-DNA-Sequenz 5'-ATG.GCG.TCG.GAG. . . .) und die (–)-Strang-DNA-Sequenz (3'-TAC.CGC.AGC.CTC. . . .). Nur die (–)-Strang-DNA mit der bei TAC beginnenden Sequenz kann mit einer ausgehend von Vmw 175 synthetisierten mRNA hybridisieren. Deshalb wird für die Oligodeoxynucleotid-Synthese ein DNA-Fragment ausgewählt, das identisch mit einer Partialstruktur des (–)-DNA-Stranges ist. Das Influenza-Virus-Genom enthält das Hämagglutinin-Gen und NS-(nicht-Struktur)-Gene. Das Hämagglutinin-Gen verschiedener Serotypen des Influenza-Virus unterscheidet sich in der RNA-Sequenz. Deshalb wird erfindungsgemäss eine einzelsträngige DNA bevorzugt, die mit mRNA der NS-Gene hybridisiert. Die Verwendung von (–)-Strang-DNA, die mit mRNA der NS-Gene hybridisiert, wird erfindungsgemäss deshalb gegenüber der Verwendung von (–)-Strang-DNA, die mit mRNA des Hämagglutinin-Gens hybridisiert, bevorzugt, weil das Hämagglutinin-Gen sehr häufig mutiert. Eine (–)-Strang-DNA, die mit mRNA des Hämagglutinin-Gens eines bestimmten Influenza-Virus-Stammes hybridisiert, wird deshalb nicht mit mRNA des Hämagglutinin-Gens ei-

nes anderen Serotyps des Influenza-Virus kreuzhybridisieren.

Eine weitere Erläuterung des Influenza-Virus-Gens NS-1 befindet sich in der Veröffentlichung von Lamb et al., (Cell 21, Seite 47 (1980)). Die DNA-Sequenz, die mit einer mRNA des NS-1-Gens hybridisiert, ist 5'-... ACT.TGA.CAC. AGT.GTT.GGA.ATC.CAT...-3'. Deshalb wird ein Teil dieser Sequenz oder die gesamte Sequenz ausgewählt und synthetisiert.

Die Wirkstoffe des erfindungsgemässen Arzneimittels können auch gegen Viren, wie das Rous-Sarcoma-Virus, verwendet werden, die im Bereich der Viehzucht eine wichtige Rolle spielen. Beispielsweise sollte durch eine Inhibition der Expression eines der Gene gag, pol oder env die Vermehrung dieses Virus inhibierbar sein. Wenn beispielsweise die Expression des gag-Gens inhibiert werden soll, wird ein hybridisierendes DNA-Molekül, ein Oligo- oder ein Polydeoxynucleotid verwendet, das einen Teil der Sequenz 5'-... AAT.CAT.CTT.TAT.GAC.GGC.TTC...-3' enthält, ausgewählt und synthetisiert. Die genannte RNA-Sequenz von p19 ist ein Teil des gag-Gens.

Aus den vorstehenden Erläuterungen ergibt sich, dass im Prinzip für die Inhibition der Virusvermehrung mittels eines einzelsträngigen (-)-Strang-DNA-Moleküls mindestens ein solches Molekül verwendet werden muss, dass mit der mRNA des Virus hybridisiert.

Im allgemeinen bezeichnet der Ausdruck «Oligodeoxynucleotid» ein Molekül, das eine kleinere Anzahl von Deoxynucleotid-Einheiten enthält, während der Begriff «Polydeoxynucleotid» ein Molekül beschreibt, das eine grössere Anzahl von Deoxynucleotid-Einheiten enthält. Im Falle der Oligodeoxynucleotide ist die Anzahl der Nucleotid-Einheiten in dieser Erfindung beispielsweise bis zu 25. Deshalb können Deoxynucleotide, die mehr als 25 Deoxynucleotid-Einheiten enthalten in dieser Erfindung als «Polydeoxynucleotide» bezeichnet werden. Die erfindungsgemässen Arzneimittel zur Behandlung von Virusinfektionen enthalten mindestens ein Oligo- und/oder Polydeoxynucleotide aus 9–100 Nucleotiden in Form eines (-)-DNA-Stranges zusammen mit einem geeigneten flüssigen Vehiculum oder Excipienten oder gegebenenfalls mindestens einem Zusatzstoff. Sie werden in an sich bekannten Verfahren beispielsweise als Flüssigpräparate, Injektionspräparate oder Suppositorien hergestellt. Gegebenenfalls können die Oligo- und/oder Polydeoxynucleotide entweder einzeln oder in Kombination mit anderen pharmakologisch wirksamen Substanzen verwendet werden. Dabei ist es selbstverständlich, dass diese anderen pharmakologisch wirksamen Substanzen der antiviralen Wirkung der genannten Oligo- und/oder Polydeoxynucleotide nicht entgegenstehen sollten.

Die Oligo- und/oder Polydeoxynucleotide können gegebenenfalls zu äusserlich anwendbaren Präparaten konfektioniert werden, wie Cremes, Salben, Tropfen oder Pflaster. Zu diesem Zweck werden die Oligo- und/oder Polydeoxynucleotide mit einem geeigneten pharmakologisch inerten Vehiculum oder Excipienten vermischt.

Die flüssigen Träger oder Excipienten sowie die gegebenenfalls verwendeten Zusatzstoffe, die erfindungsgemäss als Zusatz zu den antiviralen Wirkstoffen verwendet werden, sind bekannt und im Handel erhältlich.

Beispiele der in den antiviral wirksamen Arzneimitteln verwendeten flüssigen Träger-Excipienten und Hilfsstoffe sind destilliertes Wasser für Injektionszwecke, physiologische Kochsalzlösung, eine wässrige Dextroselösung, Pflanzenöle für Injektionszwecke, Propylenglykol, Polyäthylenglykol und Benzylalkohol (für Injektions- und flüssige Präparate); Vaseline, Pflanzenöle, tierische Fette sowie Polyäthylenglykol (für äusserlich anwendbare Präparate); isoto-

nisch wirksame Stoffe, die Löslichkeitseigenschaften verbessernde Stoffe, Stabilisatoren, Farbstoffe, Antiseptika, Gleitmittel, und ähnliche Zusatzstoffe. Bei den Injektionspräparaten ist der Wirkstoff vorzugsweise in einem sterilisierten flüssigen Vehiculum gelöst. Es ist selbstverständlich, dass die vorstehend genannten verschiedenen flüssigen Vehicule, Excipienten und Hilfsstoffe weder die antivirale Wirkung der Oligo- und/oder Polydeoxynucleotide inhibieren noch diese stören sollen.

Die Oligo- und/oder Polydeoxynucleotide werden zusammen mit den vorstehend genannten Vehiculi oder Excipienten und gegebenenfalls zusammen mit den vorstehend beschriebenen Hilfsstoffen in an sich bekannter Weise verarbeitet. Injektionspräparate und Suppositorien können 1 bis 10 mg der Oligo- und/oder Polydeoxynucleotide pro Ampulle oder Kapsel enthalten. Bei menschlichen Patienten beträgt die tägliche Dosis etwa 0,1 bis 1000 mg, vorzugsweise 1 bis 100 mg (von 10 bis 20 µg/kg bis 1000 bis 2000 µg/kg Körpergewicht). Die jeweilige Dosis für bestimmte Patienten hängt jedoch von einer Vielzahl von Faktoren ab, beispielsweise von der Wirksamkeit des verwendeten bestimmten Oligo- und/oder Polydeoxynucleotids, vom Alter, vom Gewicht, vom allgemeinen Gesundheitszustand, vom Geschlecht, von der Ernährung, von der Zeit und der Art der Anwendung, von der Abbaugeschwindigkeit, von der Kombination mit anderen in Zusammenhang damit verwendeten Medikamenten sowie von der Schwere der entsprechenden Krankheit, gegen die diese Therapie angewendet wird.

Die erfindungsgemässen antiviralen Arzneimittel werden intravenös angewendet oder direkt auf den mit dem Virus infizierten Körperteil des Patienten aufgebracht, so dass die Oligo- und/oder Polydeoxynucleotide in geeigneter Menge zu den infizierten Körperteilen gelangen.

Um das Verständnis der Grundlagen der vorliegenden Erfindung zu erleichtern, wird im folgenden eine kurze Zusammenfassung der Eigenschaften von für «Oligo- und/oder Polydeoxynucleotiden aus 9–100 Nucleotiden in Form eines (-)-DNA-Stranges» gegeben:

1. Eigenschaften und Struktur von DNA: Eine für die vorliegende Erfindung geeignete DNA muss mit einer mRNA hybridisieren, die während der Virusvermehrung erzeugt wird, wie in Fig. 5 ersichtlich.

DNA (a) die ein Segment enthält, das vollständig mit der mRNA hybridisiert und DNA (b), die ein Segment enthält, das teilweise mit der mRNA hybridisiert, ist für die Zwecke der vorliegenden Erfindung geeignet. Dieses Merkmal wird durch die Definition «ganz oder teilweise mit einer während der Virusvermehrung erzeugten mRNA hybridisierenden DNA» wiedergegeben.

2. Der für die Hybridisierung mit der mRNA gemäss der vorliegenden Erfindung ausgewählte DNA-Bereich muss innerhalb des Segmentes liegen, das vollständig oder zumindest teilweise mit der während der Virusvermehrung erzeugten mRNA hybridisiert, wie dies in Fig. 6 ersichtlich ist.

Im Falle von (c) wird ein Bereich (i) oder (ii) für die Hybridisierung ausgewählt, der vollständig mit der mRNA hybridisiert und damit den Anforderungen entspricht. Im Fall von (d) dagegen wird ein Bereich (iii) für die Hybridisierung ausgewählt, der ausserhalb des Segmentes liegt, welches vollständig oder teilweise mit der mRNA hybridisiert. Der letztere erfüllt die entsprechenden Anforderungen nicht.

3. Daraus ergibt sich, dass die in den Ansprüchen gekennzeichneten erfindungsgemäss verwendeten Oligo- oder Polydeoxynucleotide (A) oder (B) für die Hybridisierung an mRNA und die dadurch verursachte Inhibition der Translation von mRNA, d. h. die Proteinsynthese, in ihrer DNA-Sequenz identisch mit dem Bereich einer mit der mRNA hybridisierenden DNA (c) sein müssen (beispielsweise 5'-

...ACT.TGA.CAC...ATC.CAT...-3'). Zum besseren Verständnis sei auf Fig. 7 verwiesen.

Vorzugsweise ist die Deoxynucleotidkette (A) oder (B) so kurz als möglich, denn die Synthese eines kurzen Deoxynucleotids ist leicht und wirtschaftlich. Die Verwendung bestimmter Eicosamere (d. h. von Oligonucleotiden, die aus 20 Nucleotid-Einheiten bestehen) zum Erhalt einer stabilen Hybridisierung an mRNA, wird in den Beispielen der vorliegenden Erfindung beschrieben.

Die vorteilhafte Wirkung der Wirkstoffe des erfindungsgemässen Arzneimittels ist aus den Diagrammen der Figuren 1 bis 4 und den folgenden Beispielen ersichtlich.

Figur 1 ist eine graphische Darstellung der Resultate von Experimenten, die die inhibitorischen Wirkungen des Oligodeoxynucleotids 20A auf die cytopathischen Effekte von HSV-1 zeigen.

Figur 2 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse von Experimenten, die die inhibitorischen Wirkungen des Oligodeoxynucleotids 20A auf die Virusvermehrung zeigen.

Figur 3 ist eine graphische Darstellung der Wirkung einer bestimmten Kombination von Oligodeoxynucleotiden zur Inhibition der Virusvermehrung und der dadurch verursachten pathogenen Veränderungen im Vergleich mit der Verwendung eines einzelnen Oligodeoxynucleotids.

Figur 4 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse von Experimenten, die durchgeführt wurden, um die in vivo Wirksamkeit der antiviralen Wirkstoffe zu zeigen.

Die Beispiele 1 bis 5 beziehen sich auf die Herstellung von Oligo- und Polydeoxynucleotiden.

Beispiel 1

Herpes simplex-Virus DNA wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Die isolierte DNA wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten.

Die gesplattene DNA wurde dann in Gegenwart von T 4-Phagen-Ligase mit vorher mit BamHI behandelter pBR 322 Plasmid-DNA vermischt.

Das entstandene, ligierte Plasmide enthaltende Gemisch wurde E. coli-Bakterien verabreicht und die Bakterien, die das rekombinante Plasmid enthielten, wurden durch Inkubation auf mit Ampicillin angereicherten Agarplatten, auf denen sie Kolonien bildeten sowie durch Untersuchung auf Tetracyclin-Sensitivität selektiert. Unter den Tetracyclin-sensitiven Kolonien wurden die Bakterien, die Herpes simplex-Virus-DNA enthalten durch die Filter-Hybridisierungsmethode mit ³²P-markierter Herpes-Virus-DNA als Sondenmolekül selektiert. Um DNA des rekombinanten Plasmids zu enthalten, wurden $2 \times 10^6 - 10^7$ E. coli-Zellen, die das rekombinante Plasmid enthalten, in 2 ml TSB eingebracht (Tryptose-Sojabohnenöl-Brühe).

Das inoculierte Medium wurde bei 37 °C in einem 20 ml Probenröhrchen etwa 15 Stunden geschüttelt, bis die optische Dichte (OD) des Kulturmediums bei 540 nm einen Wert von 0,5 (OD₅₄₀ = 0,5) erreichte. Bei dieser optischen Dichte wurde Chloramphenicol zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und die Inkubation wurde weitere 15 Stunden lang fortgesetzt. Die Bakteriensuspension wurde anschliessend zentrifugiert, und das Pellet wurde in einen Puffer, der 25% Saccharose sowie 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) enthielt, resuspendiert. Die Suspension wurde bei 0 °C 5 Minuten stehengelassen. Zu dieser Suspension wurden 4 ml Triton X 100 zugegeben und die sich ergebende viskose Lösung wurde 30 Minuten bei 0 °C und 30 000 g zentrifugiert. Zum Überstand dieser Lösung (8 ml) wurden 8 g CsCl und 1 ml einer Ethidiumbromidlösung (5 µg Ethidiumbromid/ml) zugegeben. Die Mischung wurde weiter 48 Stunden bei 100 000 g zentrifugiert. Die rohe Plasmid-Fraktion, die durch diese Zentrifugation erhalten wurde, wurde mit 2 Vo-

luma Isopropylalkohol vermischt und ein paar Minuten stehengelassen. Die obere Schicht wurde abgenommen und die DNA enthaltende Lösung wurde gegen 0,1 molar Tris-HCl und 10 mM EDTA (pH 8,0) über Nacht dialysiert.

Die dialysierte Lösung wurde konzentriert und die 200 µg DNA enthaltende Lösung wurde mit einem Überschuss des Restriktionsenzym BamHI behandelt. Die gesplattene DNA wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese getrennt und die Herpes Simplex-Virus-DNA wurde aus dem Gel mittels Elektroelution isoliert. Weiterhin wurde die DNA partiell mit DNase verdaut, 10 Minuten auf 100 °C erhitzt und anschliessend schnell abgekühlt. Auf diese Weise wurde DNA mit einer Kettenlänge von 9 bis 100 Oligodeoxynucleotiden erhalten.

Beispiel 2

Die replikative Form der M 13-Phagen-DNA (Doppelstrang-DNA) wurde mit BamHI geschnitten. Die so gesplattete M 13-DNA wurde vorher mit BamHI gesplatteter und wie vorstehend beschrieben isolierter Herpes simplex-Virus-DNA vermischt. Die Ligierung erfolgte mit T 4-Phagen-Ligase. E. coli wurden mit der ligierten DNA in Gegenwart von CaCl₂ transfiziert. Die transfizierten Bakterien wurden auf Agarplatten ausplattiert. Dabei wurde ein Top-Agar verwendet, der IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) und X-gal (ein Indikator) enthielt. Herpes-simplex-Virus DNA enthaltende rekombinante M 13-Phagen bilden innerhalb von 24 Stunden farblose Plaques aus. M 13-Phagen ohne Insertion bilden keine Plaques aus. Deshalb wurden die farblosen Plaques ausgewählt. Um rekombinante M 13-Phagen zu selektieren, die die (–)-Strang-HSV-DNA enthalten, wurden die Phagen auf ihre Fähigkeit der Hybridisierung mit markierter (+)-Strang-HSV-DNA, die chemisch synthetisiert wurde, überprüft. Auf diese Weise wurden M 13-Phagen selektiert, die einen Teil der (–)-Strang-DNA von HSV enthalten. Die gewünschten rekombinanten M 13-Phagen wurden vermehrt und einzelsträngige DNA wurde aus diesen Phagen isoliert. Zur weiteren Reinigung der einzelsträngigen HSV-DNA kann die M 13-Phagen-DNA aus dem Gemisch mit Hilfe einer Spaltung mit einem Restriktionsenzym in Gegenwart bestimmter Oligodeoxynucleotide entfernt werden. Andererseits kann das DNA-Gemisch ohne Reinigung partiell mit DNase gesplatt werden und Oligodeoxynucleotide mit einer Kettenlänge zwischen 9 und 100 können isoliert werden.

Beispiel 3

Eine DNA-Synthese-Vorrichtung (Applied Biosystem Company) wurde verwendet, um (–)-Strang-DNA des sofort exprimierten frühen Gens Vmw 175 oder ICP 4 des Herpes-simplex-Virus zu synthetisieren. In diesem Beispiel wurde die DNA-Sequenz 3'-CGC.AGC.CTC.TTG.TTC.GTC.GC-5' synthetisiert, die mit der mRNA von Vmw 175 hybridisiert. Dieses Deoxynucleotid ist ein Eicosamer und wird nachstehend einfach als 20 A bezeichnet.

Beispiel 4

Eine DNA-Synthesevorrichtung (Applied Biosystem Company) wurde zur Synthese von (–)-Strang-DNA des sofort exprimierten frühen Gens Vmw 12 des Herpes-simplex-Virus verwendet. In diesem Beispiel war die synthetisierte DNA-Sequenz 3'-GCA.CCC.GGG.ACC-TTT-ACC-GC-5'. Diese hybridisiert mit mRNA von Vmw 12. Dieses Deoxynucleotid ist ein Eicosamer und wird nachstehend einfach als 20 B bezeichnet.

Beispiel 5

Eine DNA-Synthesevorrichtung (Applied Biosystem Company) wurde zur Synthese einer (–)-Strang-DNA des NS-1-Gens des Influenza-Virus verwendet. In diesem Beispiel war die synthetisierte DNA-Sequenz 3'-CTA.AGT.TTG.TGA.CAC.AGT.TCA-5'. Diese hybridisiert mit mRNA von NS-1. Dieses Deoxynucleotid ist ein Heneicosamer und wird nachstehend einfach als 20 C bezeichnet.

Beispiel 6

Dieses Beispiel bezieht sich auf einen Versuch, durch den bestätigt wird, dass das Oligodeoxynucleotid die Synthese von Virusprotein in vitro inhibiert.

Tabelle I zeigt den inhibitorischen Effekt von 20 A auf die Vmw 175-Bildung und die entsprechenden cytopathischen Effekte (Syncytium-Bildung) von HSV 1

Tabelle I

20 A Bohrung	Relative Mengen von Vmw 175	Relative Ausprägung des cytopathischen Effekts (Syncytium)
–	1	1
33,6 µg	0,48	0,35

BHK-Zellen ($1,5 \times 10^5$) wurden in jede Bohrung (1,5 cm im Durchmesser) einer Limbro-Platte plattiert und MEM angereichert mit 10% Kälberserum wurde zugegeben. Die Zellen wurden dann in einer 5prozentigen CO₂-Atmosphäre bei 36 °C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 5 moi HSV-1 in Gegenwart oder Abwesenheit von 20 A infiziert. Nach 5 Stunden wurde das Medium entnommen. Die Zellen wurden dann 1 Stunde lang mit ³⁵S-Methionin (100 µCi/µl) in Kontakt gebracht. Anschließend wurde 20 A abgebaut und die Proteine wurden über eine Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit nachfolgender Autoradiographie analysiert. Zur Auswertung des relativen cytopathischen Effekts wurden identische Bedingungen zu den vorstehend beschriebenen angewendet, mit der Ausnahme, dass die Anzahl der Syncytien 13 Stunden nach der Infektion bestimmt wurde. Unter diesen Bedingungen wurde kein Absinken der zellulären Protein-Synthese beobachtet.

Beispiel 7

Dieses Beispiel bezieht sich auf einen Versuch, durch den bestätigt wird, dass das Oligodeoxynucleotid von Zellen aufgenommen wird.

Dieses Beispiel zeigt, dass das einzelsträngige Oligodeoxynucleotid 20 A tatsächlich in kultivierte Zellen eindringt. BHK-Zellen (Baby-Hamster-Nieren-Zellen; $4,4 \times 10^5$ Zellen) wurden mit $7,6 \times 10^4$ PFU von HSV-1/ml infiziert. Kontrollzellen wurden nicht infiziert, jedoch mit der gleichen Menge Kulturmedium versehen. Die Zellen wurden 3 Stunden in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 7,66 pMol ³²P-markiertem 20 A ausgesetzt. Nach der Behandlung mit dem markierten 20 A wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden zweimal mit 0,3 ml PBS gewaschen.

Die Zellen wurden dann 30 Minuten bei 36 °C in einer Lösung mit 0,1 M NaCl, 33 µM ZnCl₂, 3360 Einheiten Nuclease S1 und 33,3 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,5) stehengelassen.

Nachfolgend wurden die Zellen zweimal mit dem vorstehend beschriebenen Puffer, jedoch ohne Nuclease S1, gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in 0,3 ml einer Lösung mit 10 mM EDTA, 0,6% Natriumdodecylsulfat und

10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) aufgeschlossen. An diesem Punkt wurde TCA-unlösliches, Nuclease S1-sensitives radioaktives 20 A gemessen. Es wurde gefunden, dass mindestens $4,68 \times 10^3$ Moleküle 20 A pro Zelle während der Behandlungsdauer von 8 Stunden aufgenommen worden waren. Die tatsächliche Menge ist wahrscheinlich 10 mal höher als dieser Wert, denn die terminalen ³²P-Phosphate werden schnell hydrolysiert.

Das folgende Beispiel 8 veranschaulicht, dass 20 A eine 10 inhibitorische Wirkung auf die Virusvermehrung hat.

Beispiel 8

Etwa $1,5 \times 10^5$ BHK-Zellen wurden pro Bohrung (1,5 cm im Durchmesser) einer Limbro-Platte ausgebracht. Diese 15 Zellen wurden in 5% CO₂ 48 Stunden bei 36 °C inkubiert und mit HSV-1 ($7,6 \times 10^4$ PFU/ml) in 160 µl MEM infiziert. Die Infektion wurde 3 Stunden bei 36 °C in 5% CO₂ ausgeführt. Nach der Infektion wurden die infizierten Zellen mit 20 A behandelt. Nach einer Behandlungsdauer von 8 Stunden 20 wurde das Medium gegen normales MEM mit 10% Kälberserum ausgetauscht. 15 Stunden nach der Infektion wurde das Kulturmedium geerntet und die Virustiter wurden bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle II zusammengefasst.

Tabelle II

Menge von 20 A Bohrungen	Relative Virus-Menge
30 0	100
0,112 µg	45
0,224 µg	35

Die Beispiele 9 bis 13 beziehen sich auf Experimente, durch die bestätigt wird, dass das Oligodeoxynucleotid die Zerstörung von Tier-Zellen in vitro durch das Virus inhibieren.

Beispiel 9

(a) Etwa $1,5 \times 10^5$ BHK-Zellen wurden in jede Bohrung (1,5 cm im Durchmesser) einer Limbro-Platte für Zellkultur ausgebracht. Die Zellen wurden 47 Stunden bei 36 °C in 5% CO₂ inkubiert und anschließend mit 160 µl HSV-1 ($7,6 \times 10^4$ PFU/ml) 3 Stunden bei 36 °C infiziert. Zu diesen infizierten 45 Zellen wurde ein Komplex aus Calciumphosphat und 20 A in verschiedenen Mengen zugegeben. Die Calcium-Konzentration der Medien betrug zwischen 1,36 mMol und 24,8 mMol, je nach 20 A-Konzentration. Der Komplex wurde, wie von Ruddle et al. beschrieben, hergestellt (Loiter et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 79, S. 422 (1982)). Die infizierten Zellen wurden 8 Stunden mit 20 A behandelt. Das Kulturmedium wurde dann entfernt und gegen ein normales Kulturmedium ohne 20 A ausgetauscht. Die Zellen wurden anschließend weitere 13 Stunden gezüchtet.

(b) Die Kontrollzellen wurden auf die gleiche Art und Weise behandelt, mit Ausnahme der Zugabe von 20 A (Ca-Phosphat-Kontrolle).

(c) Als weitere Kontrolle wurde eine infizierte Kultur hergestellt, die weder mit Ca-Ionen noch mit 20 A behandelt wurde (Virus-Kontrolle). Die wie vorstehend beschrieben präparierten Gewebekultur-Zellen (a), (b) und (c) wurden fixiert, gefärbt und die Anzahl der Syncytien wurde bestimmt. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Figur 1 dargestellt. Dabei gibt die X-Achse (Abszisse) die DNA-Menge als zugegebene Menge in µg pro Bohrung an (d.h. «µg DNA Bohrung»). Die Y-Achse (Ordinate) gibt die Anzahl der in einer Zellkultur ausgebildeten Syncytien im Vergleich zu einem Wert an, der im Versuch (c) («Virus-Kontrolle») erhal-

ten wurde (d.h. «% Syncytien-Anzahl»), wobei der letztere Wert immer als 100 angenommen wurde. Die Kurve (a) (—●—) zeigt die Ergebnisse des Experimentes (a), die Kurve (b) (—○—) zeigt die Ergebnisse des Experimentes (b). Wie in Figur 1 gezeigt, wurde die Ausbildung von Syncytien durch 20 A bemerkenswert inhibiert. Calciumphosphat oder Calciumchlorid beeinflussten die Syncytien-Anzahl nicht.

Beispiel 10

(a) Etwa $1,5 \times 10^5$ BHK-Zellen wurden pro Bohrung (1,5 cm im Durchmesser) einer Limbro-Platte ausgebracht. Die Zellen wurden 47 Stunden lang bei 36 °C mit 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Zu diesen Zellen wurden 160 µl HSV-1 ($7,6 \times 10^4$ PFU/ml) zugegeben. Die Infektion wurde 3 Stunden bei 36 °C durchgeführt. Zu auf diese Weise infizierten Zellen wurden verschiedene Mengen 20 A in Form eines Calciumchlorid-Komplexes zugegeben, so dass die End-Calcium-Ionen-Konzentration 4,55 mM betrug. Die Behandlung wurde 8 Stunden fortgesetzt. Die Zellen wurden dann weitere 14 Stunden inkubiert.

(b) Zusätzlich wurde eine zur vorstehend beschriebenen Kultur (a) identische Kultur hergestellt, wobei jedoch ein Oligodeoxynucleotid, hergestellt wurde, das nicht mit der HSV-1-Sequenz 5'-CAC.GAC.AGA.GGG.CGA.-3' verwandt war, und mit diesem inkubiert. Alle anderen Bedingungen waren identisch zum Versuch (a).

(c) Es wurde eine ähnliche Kultur, jedoch ohne 20 A hergestellt und unter den vorstehend genannten Bedingungen inkubiert. Diese wird nachstehend als «Virus-Kontrolle» bezeichnet.

Die Zellen der vorstehend beschriebenen Versuche (a), (b) sowie (c) wurden fixiert, gefärbt und die Anzahl der Syncytien wurde bestimmt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Figur 2 dargestellt. Dabei gibt die X-Achse (Abszisse) die pro Bohrung zugegebene DNA-Menge in µg an (d.h. «µg DNA Bohrung») und die Y-Achse (Ordinate) gibt die Anzahl der in einer Zellkultur ausgebildeten Syncytien im Vergleich zu einem Wert an, der im Versuch (c) («Viruskontrolle») erhalten wurde (d.h. «% Anzahl der Syncytien»), wobei der letztere Wert immer als 100 angenommen wurde. Die Kurve (a) (—●—) zeigt die Resultate des Experimentes (a), die Kurve (b) (—○—) zeigt die Ergebnisse des Experimentes (b).

Wie in Figur 2 gezeigt, hat 20 A eine inhibitorische Wirkung auf die Anzahl der von HSV-1 gebildeten Syncytien. Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass 20 A die Syncytien-Bildung in Gegenwart von 4,55 mM Calcium-Ionen inhibiert. Oligodeoxynucleotide, die nicht mit der bekannten DNA-Sequenz des Herpes-simplex-Virus verwandt sind, hatten keine inhibitorische Wirkung. Aus diesem Experiment wurde deutlich, dass die (—)-Strang-DNA des Herpes simplex-Virus spezifisch die cytopathischen Effekte des Herpes simplex-Virus inhibiert.

Beispiel 11

In Beispiel 9 wird die erzielte Wirkung unter Verwendung des synthetischen Eicosamers 20 A, das mit dem (—)-Strang der HSV-DNA verwandt ist, gezeigt. Dieses Experiment bezieht sich auf die Wirkung clonierter Herpes simplex-Virus-DNA. Es war auch unter Verwendung eines HSV-1-DNA-enthaltenden, rekombinanten pBR 322 Vektors möglich die Syncytium-Bildung durch HSV-1 zu inhibieren (1,45 Megadalton, erhalten durch Spaltung des HSV-1-DNA mit BamHI und Einbau der Fragmente in pBR 322). In diesem Experiment wurde die HSV-1-DNA nicht aus dem rekombinanten Plasmid ausgeschnitten. Die denaturierte und partiell gespaltene HSV-1-DNA-enthaltende, rekombinante pBR 322-DNA wurde wie in Beispiel 9 beschrieben, in

jede Bohrung einer Limbro-Platte eingebracht (0,16 µg). Die Wirkung wurde wie in Beispiel 9 beschrieben ausgewertet und eine Inhibition der Syncytien-Bildung wurde beobachtet. Als Kontrolle wurde für dieses Experiment pBR 322 DNA verwendet. In diesem Kontrollexperiment wurde keine Inhibition beobachtet.

Beispiel 12

Dieses Beispiel zeigt einen synergistischen Effekt eines Gemisches aus Oligodeoxynucleotiden.

Etwa $1,5 \times 10^5$ BHK-Zellen wurden in jede Bohrung (1,5 cm im Durchmesser) einer Limbro-Platte ausgebracht. Die Zellen wurden 47 bis 48 Stunden bei 36 °C in 5% CO₂ inkubiert und mit HSV-1 ($7,6 \times 10^4$ PFU/ml) in 160 µl MEM infiziert. Die Infektion wurde 3 Stunden bei 36 °C in 5% CO₂ ausgeführt. Nach der Infektion wurde 20 A alleine oder im Gemisch mit 20 B (224 : 1) in einem Lösungsmittel gelöst und 0,3 ml dieser Lösung wurden in Gegenwart von 4,55 mM Calcium-Ionen zur Behandlung der Zellen verwendet. Die Behandlung der Zellen mit 20 A und 20 B wurde 8 Stunden durchgeführt.

Andere Zellen wurden wie vorstehend beschrieben behandelt, jedoch wurde kein 20 A und 20 B zugegeben. Dieser Versuch wird nachstehend als «Virus-Kontrolle» bezeichnet.

Die Zellen wurden fixiert, gefärbt und die Anzahl der Syncytien wurde bestimmt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Figur 3 dargestellt. Dabei steht die X-Achse (Abszisse) für die zu jeder Bohrung zugegebene DNA Menge in µg und die Y-Achse (Ordinate) gibt die Anzahl der in einer Zellkultur ausgebildeten Syncytien im Vergleich zu einem Wert an, der im Versuch «Virus-Kontrolle» erhalten wurde (d.h. «% Anzahl der Syncytien»), wobei der letztere Wert immer als 100 angenommen wurde. Die als «20 A» bezeichnete Kurve (—○—) zeigt die Resultate der Experimente mit 20 A allein, die als «20 A + 20 B (224 : 1)» bezeichnete Kurve

(—●—)

zeigt die Resultate der Experimente mit 20 A und 20 B in einem Mischungsverhältnis von 224 : 1. Wie in Figur 3 gezeigt, war der beobachtete in vitro-Effekt bei Verwendung eines Gemisches von 20 A und 20 B stärker als bei Verwendung von 20 A alleine. Aus diesem Ergebnis wird geschlossen, dass die gemeinsame Verwendung (—)-strängiger DNA-Moleküle die verschiedenen Bereichen der DNA-Sequenz (—)-strängiger DNA aus Herpes simplex-Virus entsprechen, die Wirksamkeit als antiviralem Wirkstoff signifikant erhöht.

Beispiel 13

Dieses Beispiel zeigt die Wirkung von (—)-Strang-Oligodeoxynucleotiden von NS-1 auf den von Influenza-Viren hervorgerufenen cytopathischen Effekt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle III zusammengefasst, das experimentelle Vorgehen wird nachstehend genauer beschrieben.

Tabelle III

Oligodeoxynucleotide (µg/ml)	Relativer Wert, bezogen auf die Anzahl überlebender Zellen
0	0,21
0,02	0,49
1,30	0,49
5,00	0,49

Schweine-Nieren-Kitazato (SKK)-Zellen ($1,5 \times 10^5$ /0,1 ml) wurden in 5% fötalem Kälberserum enthaltendem

MEM gezüchtet und in je eine Bohrung (0,5 cm im Durchmesser) einer Mikrotiterplatte ausgebracht. Diese Zellen wurden 24 Stunden bei 35,5 °C in einer 5prozentigen CO₂-Atmosphäre im vorstehend genannten Medium inkubiert. Das Medium wurde dann entfernt und 100 µl eines Mediums, enthaltend verschiedene Mengen des Oligodeoxynucleotids 20 C, wurden in jede Bohrung zugegeben. Anschliessend wurden die Zellen weitere 24 Stunden in einer 5prozentigen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Lösung wurde dann entfernt und 50 µl Medium, enthaltend 10 TCID₅₀ Einheiten Influenza A-Virus, wurden zu jeder Bohrung zugegeben. Ausserdem wurden 50 µl des Kulturmediums, enthaltend verschiedene Mengen 20 C zu jeder Bohrung zugegeben. Anschliessend wurden die Zellen weitere 48 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und 100 µl Hank's Lösung, enthaltend 0,1% Neutral-Rot, wurden zu jeder Bohrung zugegeben und die Zellen wurden 1 Stunde bei 35,5 °C in 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Lösung wurde entnommen und die Zellen wurden mit 10 µl 80prozentigem Äthanol gewaschen und anschliessend wurden 50 µl 0,1 N HCl zugegeben. Die relative Anzahl der überlebenden Zellen wurde durch Messung der optischen Absorption bei 577 nm mit ELISA bestimmt. Die überlebenden Zellen nahmen Neutral-Rot auf, während die Nicht-überlebenden Zellen kein Neutral-Rot aufnahmen. Deshalb entspricht die höhere optische Dichte einer höheren Anzahl überlebender Zellen.

Die nachfolgenden Beispiele 14 bis 20 zeigen die in vivo-Wirkung der Oligodeoxynucleotide als antiviralem Wirkstoff.

Beispiel 14

Etwa 1×10^4 PFU HSV-1 (F-Stamm) in 30 µl MEM wurden die Intracerebralhöhlen von 3 Wochen alten BALB/c-Mäusen injiziert. Die Virus-Suspension enthielt verschiedene Mengen 20 A. Zusätzlich wurden täglich während 3 Tagen 200 µl einer MEM-Lösung, enthaltend 1% Penicillin, Streptomycin und 2 mM Glutaminsäure und verschiedene Mengen 20 A in die Intraperitoneal-Höhlen injiziert, wobei 1 Tag nach der Injektion von HSV-1 begonnen wurde. Für den 7. Tag wurde die Mortalitätsrate in Prozent berechnet. Das Ergebnis des Experiments ist in Figur 4 dargestellt. Dabei gibt die X-Achse (Abszisse) die in jede Maus injizierte DNA-Menge in µg an, d.h. «µg DNA/Maus» und die Y-Achse (Ordinate) die Mortalitäts-Rate in % im Vergleich zu derjenigen an, die in einem Kontroll-Versuch erhalten wurde, bei dem die Mäuse eine Injektion derselben Lösung, jedoch ohne 20 A erhielten, wobei die Mortalitäts-Rate der Kontrolle immer als 100 angenommen wurde. Aus Figur 4 geht hervor, dass die Mortalitätsrate in Abhängigkeit von der angewendeten Menge von 20 A reduziert wurde.

Die Zeichnung gibt die Mortalitätsrate als Prozentsatz im Vergleich mit der Kontroll-Mäuse-Gruppe an, die überhaupt kein 20 A erhielt.

Beispiel 15

Etwa 1×10^4 PFU HSV-1 (F-Stamm) in 30 µl MEM-Lösung, die verschiedene Mengen 20 A enthielt, wurden in die Intracerebralhöhlen 3 Wochen alter BALB/c-Mäuse injiziert. Zusätzlich wurden einmal täglich 200 µl einer Lösung, enthaltend verschiedene Mengen 20 A, 1% Penicillin und Streptomycin sowie 2 mM Glutaminsäure intraperitoneal injiziert. Dabei wurde 1 Tag nach der Injektion von HSV-1 begonnen.

Die Behandlung wurde während 6 aufeinanderfolgender Tage fortgesetzt. Die Mortalität der Mäuse wurde 64 bis 68 Stunden nach der HSV-1-Injektion bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefasst.

Tabelle IV

Dosis	Mortalität der Mäuse
5 –	5/19
0,224 µg/Maus	0/9
2,240 µg/Maus	0/10

Wie aus der Tabelle entnommen werden kann, starben in 10 der Kontrollgruppe 5 von insgesamt 19 Mäusen, wenn kein 20 A verabreicht wurde. Andererseits starben bei Verabreichung von 0,224 µg 20 A oder 2,240 µg 20 A zu diesem Zeitpunkt keine Mäuse (insgesamt wurden 19 Mäuse mit beiden Konzentrationen behandelt).

Beispiel 16

Etwa 5×10^4 PFU HSV-1 (F-Stamm) in 30 µl einer MEM-Lösung, die verschiedene Mengen 20 A enthielt, wurden in die Intracerebralhöhlen von 3 Wochen alten BALB/c-Mäusen injiziert. Die Mortalitätsrate der Mäuse wurde 64 bis 68 Stunden oder 71 bis 78 Stunden nach der Injektion untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengefasst:

Tabelle V

Dosis	Mortalität zwischen 64 und 68 Stunden	Mortalität zwischen 71 und 78 Stunden
–	3/10	3/10
30 1,12 µg/Maus	0/10	2/10
11,2 µg/Maus	0/10	0/10

Aus dieser Tabelle kann entnommen werden, dass in der Kontrollgruppe, die kein 20 A enthielt, 3 Mäuse von insgesamt 10 Mäusen starben. Andererseits war die Mortalität der Mäuse, die das Virus in Gegenwart von 20 A erhielten, stark reduziert.

Beispiel 17

Etwa 5×10^4 PFU HSV-1 (F-Stamm) in 30 µl MEM-Lösung, die bestimmte Mengen 20 A enthielt, wurde in die Intracerebralhöhlen von 3 Wochen alten BALB/c-Mäusen injiziert. Zusätzlich wurden ab dem Tag nach der Injektion 30 µl einer MEM-Lösung, enthaltend verschiedene Mengen 20 A, 1% Penicillin und Streptomycin sowie 2 mM Glutaminsäure in die Intracerebralhöhlen injiziert.

Die Behandlung wurde 2 Tage lang fortgesetzt und die Mortalität der Mäuse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion des Virus untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI zusammengefasst.

Tabelle VI

Dosis	Mortalität		
	Zwischen 64 und 68 Stunden	Zwischen 71 und 78 Stunden	Zwischen 88 und 92 Stunden
–	1/10	3/10	7/10
60 1,12 µg/Maus	0/20	2/20	5/20

Wie aus dieser Tabelle entnommen werden kann, war die Mortalität bei den Kontrollmäusen, die kein 20 A erhielten, signifikant höher als bei den Mäusen, die mit 20 A behandelt wurden. Obwohl die Wirksamkeit von 20 A anscheinend bei 88 bis 92 Stunden nach der Injektion abnimmt, war die Mortalität bei den Kontrollmäusen selbst unter diesen Bedingungen noch höher.

Beispiel 18

Etwa 1×10^6 PFU HSV-1 (F-Stamm) in 200 $\times$ 1 MEM-Lösung, die 1,12 μ g 20 A enthielt, wurden in die Peritonealhöhlen 3 Wochen alter BALB/c-Mäuse injiziert. Zusätzlich wurden etwa 3 oder 2 Stunden vor der HSV-1-Injektion sowie 1 Tag nach der Injektion von HSV-1 200 μ l einer MEM-Lösung, enthaltend verschiedene Mengen 20 A, intraperitoneal in die infizierten Mäuse injiziert. Die intraperitoneale Injektion von 20 A wurde 2 Tage lang fortgesetzt. Die Mortalität wurde 211 und 259 Stunden nach der Injektion von HSV-1 untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle VII zusammengefasst.

Tabelle VII

Dosis	Mortalität bei 211 Stunden	Mortalität bei 259 Stunden
–	1/10	2/10
0,244 μ g Maus	0/10	0/10

Wie aus dieser Tabelle entnommen werden kann, starb eine von 10 Mäusen (bei 211 Stunden nach der Injektion) oder zwei von insgesamt 10 Mäusen (bei 259 Stunden nach der Injektion), wenn 20 A nicht verabreicht wurde. Andererseits starben unter den gleichen Versuchsbedingungen keine Mäuse, die 0,224 μ g 20 A erhielten.

Beispiel 19

Die Cornea 3 Wochen alter BALB/c-Mäuse wurde durch 5-maliges Kratzen mit einer scharfen Injektions-Nadel verletzt. Auf diese verwundete Cornea wurden 30 μ l MEM-Lösung, enthaltend 1% Penicillin, Streptomycin, 2 mM Glutaminsäure, 5% Kälberserum sowie 3×10^4 PFU HSV-1 (F-Stamm) aufgebracht. Die so behandelten Mäuse wurden in vier Gruppen (A), (B), (C) und (D) wie nachstehend beschrieben eingeteilt, die Augen dieser Mäuse wurden untersucht und die Ergebnisse wurden photographisch festgehalten.

(A) Auf die Cornea-Membran dieser Mäuse wurden 10 μ l einer MEM-Lösung, enthaltend 22,4 μ g 20 A/ml 2 Stunden vor dem Aufbringen von HSV-1 (F-Stamm) aufgetropft. Zusätzlich wurde eine solche Behandlung täglich ab dem auf die HSV-1 (F-Stamm) Verabreichung folgenden Tag durchgeführt.

Zusätzlich erhielten diese Mäuse 5 Stunden vor der Injektion von HSV-1 (F-Stamm) Tropfen einer Lösung, enthaltend Cortison-Acetat (2 mg/kg Maus-Körpergewicht). Die Cortisonbehandlung wurde ebenso täglich fortgesetzt.

(B) In die Augen der Mäuse wurden 2 Stunden vor der Verabreichung von HSV-1 (F-Stamm) 10 μ l einer MEM-Lösung, die 22,4 μ g 20 A/ml enthielt, eingebracht. Die Behandlung mit 20 A wurde jeden zweiten Tag fortgesetzt.

(C) Diese Mäuse erhielten wie vorstehend in (A) beschrieben, 30 μ l einer Cortison-Acetat enthaltenden Lösung (2 mg/kg Körpergewicht).

(D) Auf die Cornea-Membran dieser Mäuse wurden 2 Stunden vor der Behandlung mit HSV-1 (F-Stamm) 10 μ g einer MEM-Lösung aufgebracht. Zusätzlich wurde ab dem Tag nach der Behandlung mit HSV-1 (F-Stamm) eine ähnliche Behandlung mit MEM-Lösung jeden zweiten Tag durchgeführt.

Der Zustand der Augen und der die Augen umgebenden Bereiche jeder Maus wurden unter besonderer Beachtung von Entzündungen und der Schliessung der Augen mit pathologischen Symptomen untersucht. Die Untersuchung wurde am 4. 7. oder 12. Tag nach der Behandlung durchgeführt. Die Mäuse der Gruppe (A) und der Gruppe (B) zeigten viel weniger pathologische Symptome an den Augen und

10

den umgebenden Bereichen als die Mäuse der Gruppen (C) und (D), die nicht 20 A erhielten.

Weiterführend kann also gefolgert werden, dass die Wirksamkeit von 20 A nicht durch die Verwendung von 5 Cortison beeinflusst wird.

Die folgenden Beispiele 20 bis 22 erläutern die Herstellung verschiedener erfindungsgemässer antiviraler Arzneimittel.

10 Beispiel 20

Ein Oligodeoxynucleotid identisch zum 20 A, das in Beispiel 3 erhalten wurde, wird gemäss der Triestermethode (unter Verwendung eines Triesters der entsprechenden Nucleotide in flüssiger Phase) synthetisiert. Zu 2 g so hergestelltem 20 A wird eine isotonische MEM-Lösung bis zu einem Endvolumen von 1 Liter Injektions-Lösung zugegeben. Anschliessend wird die Lösung in Ampullen abgefüllt. Dieses Injektions-Präparat enthält 2 mg 20 A/ml und wird subkutan in einer Dosis von 1 bis 5 ml so nahe als möglich zum infizierten Körperteil verabreicht, wenn ein Symptom beobachtet wird.

Beispiel 21

Ein Oligodeoxynucleotid identisch zum 20 B, das in Beispiel 4 erhalten wurde, wird nach der Triestermethode synthetisiert. Zu 10 g des auf diese Weise synthetisierten 20 B wird eine isotonische MEM-Lösung bis zu einem Endvolumen von 1 Liter zugegeben. Dies ist eine Stammlösung für ein 1prozentiges Augentropfen-Präparat. Dieses Augentropfen-Präparat wird mehrfach täglich in einer Dosis von 2 bis 3 Tropfen verabreicht, wenn ein Symptom beobachtet wird.

Beispiel 22

Ein Oligodeoxynucleotid identisch zum 20 A, das in Beispiel 3 erhalten wurde, wird nach der Triester-Methode synthetisiert. 1 g des auf diese Weise synthetisierten 20 A wird zu einem feinen Pulver vermahlen und 999 g gereinigter Kaobutter werden zu diesem feinen Pulver zugegeben. Das Gemisch wird in einem Wasserbad bei 60 °C geknetet und dann zu Suppositorien mit jeweils 2 g verformt. Jedes Suppositorium enthält 2 mg 20 A und wird entsprechend dem Symptom verwendet.

Die folgenden Beispiele 23 und 24 erläutern die Sicherheit der erfindungsgemässen antiviralen Wirkstoffe.

45

Beispiel 23

Wenn 20 A in einer Menge von 100 μ g/kg intraperitoneal BALB/c-Mäusen verabreicht wird, werden bei den Versuchstieren keine Veränderungen beobachtet.

50

Beispiel 24

Als Test für die Bestätigung der im vorstehenden Beispiel beschriebenen Wirkung, wurde der gleiche Test wie in Beispiel 19 beschrieben, ausgeführt, mit der Ausnahme, dass nicht HSV-1 verwendet wurde. Bei diesem Test wird kein Unterschied zwischen der Gruppe der Versuchstiere, der 20 A verabreicht wurde und der Gruppe, der 20 A nicht verabreicht wurde, gefunden.

Im Hinblick auf die vorstehend beschriebenen Beispiele ist es offensichtlich, dass die erfindungsgemässen antiviralen Arzneimittel mit einer wirksamen Dosis des Oligo- und Polydeoxynucleotids sicher sind.

Die nachstehend beschriebenen Beispiele sollen zeigen, dass ein in vitro-Protein-Synthese-System tatsächlich durch die Hybridisierung des (–)-Strang-Oligodeoxynucleotids mit der mRNA inhibiert wird. Diese Ergebnisse untermauern den theoretischen Hintergrund dieser Erfindung.

65

Beispiel 25
(Referenzbeispiel 1)

Dieses Beispiel erläutert die Inhibition der Polyphenylalanin-Synthese in Abhängigkeit von Poly U durch Oligodeoxyadenylsäure.

Das Reaktionsgemisch (40 µl) enthielt 140 µg Poly U, ¹⁴C Phenylalanin (10⁵ cpm, 300 microcurie/Mikromol), E. coli Extrakt, hergestellt nach Nirenberg und Mathaei (Proc. Nat. Acad. Sci USA 47, Seite 1588 (1961)), 13 mM Magnesiumacetat, 1 mM ATP, 1 mM Creatinphosphat, 1 µg Creatinphosphokinase, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) und verschiedene Mengen Oligodeoxyadenylsäure. Die Reaktionsgemische werden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen eingebracht und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Menge synthetisierten Polyphenylalanins wurde durch Messung der in 95 °C heisser, 10prozentiger Trichloressigsäure unlöslichen Radioaktivität bestimmt. Die Zählung wurde in einem Flüssig-Scintillations-Zähler durchgeführt. Die Hemmung in Prozent wurde als Verhältnis zum Polyphenylalanin-Synthese-Wert in Abwesenheit der Oligodeoxyadenylsäure berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle VIII zusammengefasst.

Tabelle VIII

Inhibitor	Dosis (µg)	Inhibition der poly-Phenylalanin-Synthese
Kontrolle		0
poly-Deoxyadenylsäure	50	98
oligo-Deoxyadenylsäure (10 Nucleotide)	100	88
oligo-Deoxyadenylsäure (9 Nucleotide)	100	99

Tabelle VIII (Fortsetzung)

Inhibitor	Dosis (µg)	Inhibition der poly-Phenylalanin-Synthese
oligo-Deoxyadenylsäure (8 Nucleotide)	100	15
oligo-Deoxyadenylsäure (7 Nucleotide)	100	0

Aus Tabelle VIII geht hervor, dass die poly-Deoxyadenylsäure die mit Polyuridylsäure hybridisiert, ein bemerkenswert starker Inhibitor der Polyphenylalanin-Synthese ist.

Weiterhin kann aus dieser Tabelle entnommen werden, dass oligo-Deoxyadenylsäure mit einer Kettenlänge von mehr 9 Nucleotiden eine stark inhibitorische Wirkung hat.

Beispiel 26
(Referenzbeispiel 2)

Das nachstehend beschriebene Experiment ist ein Nachweis dafür, dass Oligodeoxynucleotide eukariontische mRNA-Aktivität durch Ausbildung von Hybriden mit dieser mRNA inhibieren können. Das Reaktionsgemisch (30 µl) enthält 4,2 mM Calciumphosphat, 2 mM Dimethylthiothreit (DTT), 0,08 mM jeder Aminosäure (ausser Methionin) 6 mM Calciumacetat, 8 mM Magnesiumacetat, 4,5 µg Spermidin, 0,1 µCi ³⁵S-Methionin und 10 µl eines Kaninchen-Retikulocyten-Extraktes, das nach Jackson und Pelham hergestellt wurde (Europ. J. Biochem. 67, Seiten 247–256 (1976)). Der Inhibitor wurde in einer 21 mM HEPES-Lösung gelöst und wie in Tabelle IX beschrieben, dem Reaktionsgemisch zugesetzt.

Tabelle IX

Inhibitor	Dosis (µg)	% Inhibition der α-Globin-Synthese	% Inhibition der β-Globin-Synthese
Kontrolle	–	0	0
genomische α-Globin-DNA	0,06	60	0
genomische β-Globin-DNA	0,06	0	65
Kalbsthymus DNA	0,06	10	10
15 Oligodeoxynucleotid von genomischer α-Globin-DNA	0,06	88	0
15-Oligodeoxynucleotid vom M 13	0,06	5	2

Wie aus Tabelle IX hervorgeht, inhibiert (–)-strängige α-Globin-DNA spezifisch die α-Globin-Synthese, während (–)-strängige β-Globin-DNA spezifisch die β-Globin-Synthese inhibiert. Mit Kalbsthymus-DNA wurde keine signifikante Inhibition beobachtet. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass (–)-Strang-DNA eines eukariontischen Gens spezifisch die Synthese des von diesem Gen codierten Proteins inhibiert. Oligodeoxynucleotide mit einer Kettenlänge von 15, die der NH₂-terminalen Aminosäurese-

quenz des α-Globins entsprechen, inhibierten die Synthese von α-Globin. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass einzelsträngige (–)-Strang-DNA mit einer Kettenlänge von nur 15 Nucleotiden ausreicht, um spezifisch die Synthese des entsprechenden Proteins zu inhibieren. Das Kontroll-Oligonucleotid (M 13 Phagen-DNA mit einer Kettenlänge von 15 Nucleotiden) zeigte keine signifikante inhibitorische Wirkung.

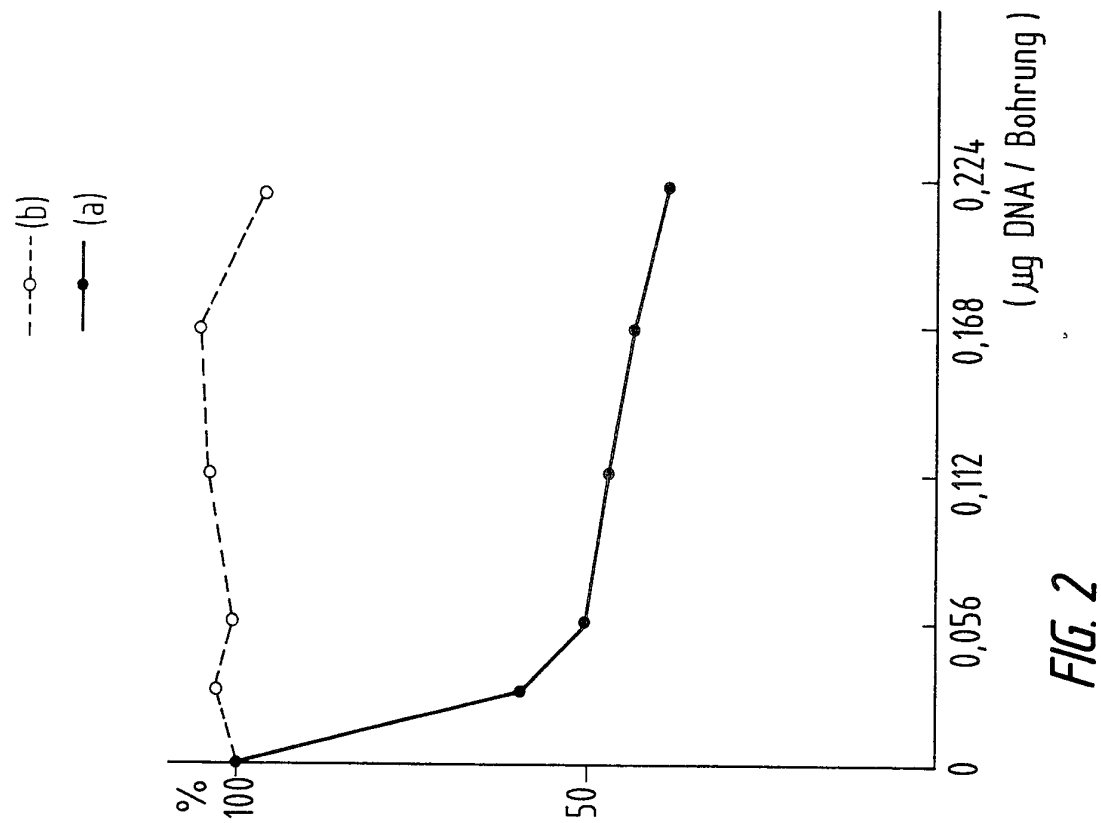


FIG. 2

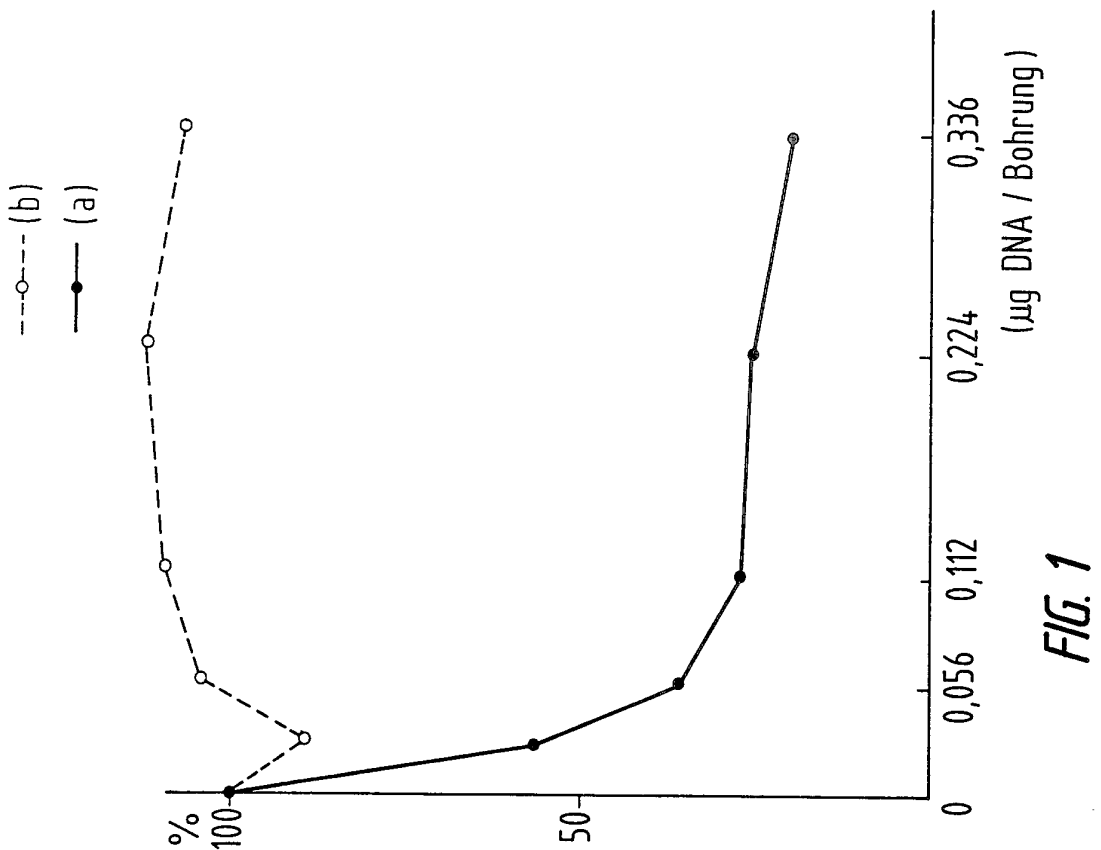
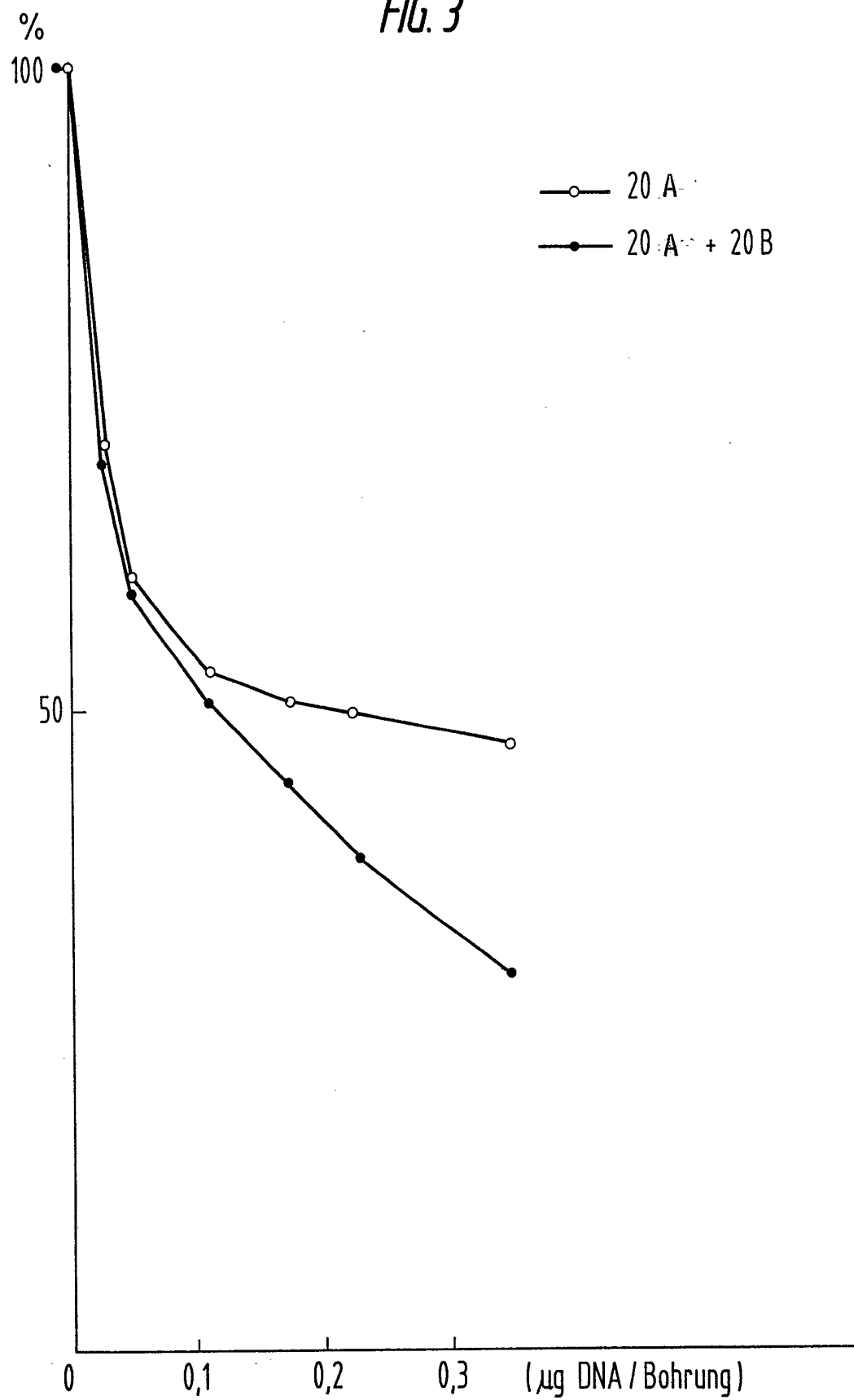


FIG. 1

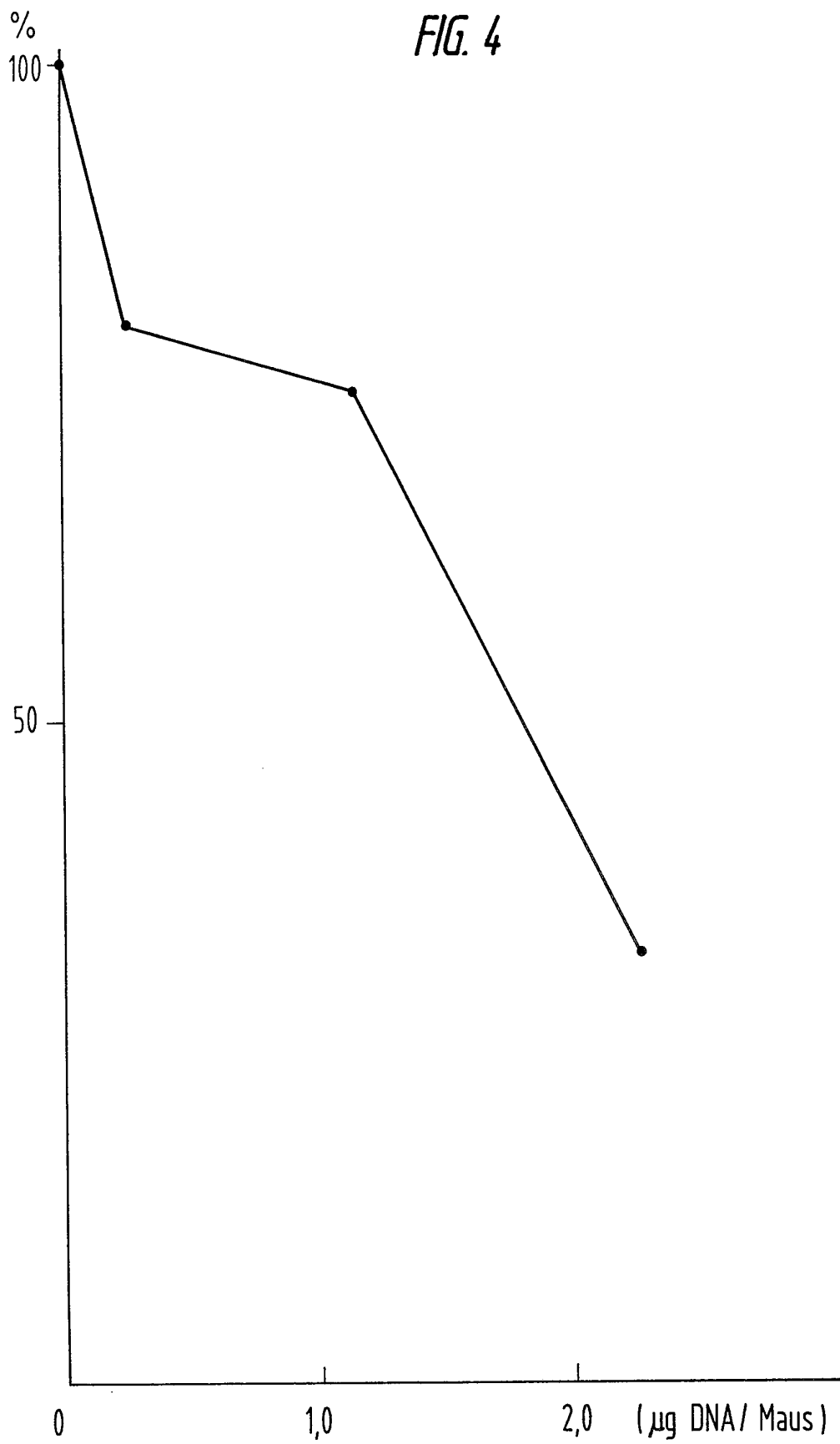
FIG. 3



667 593

4 Blatt Blatt 3

FIG. 4



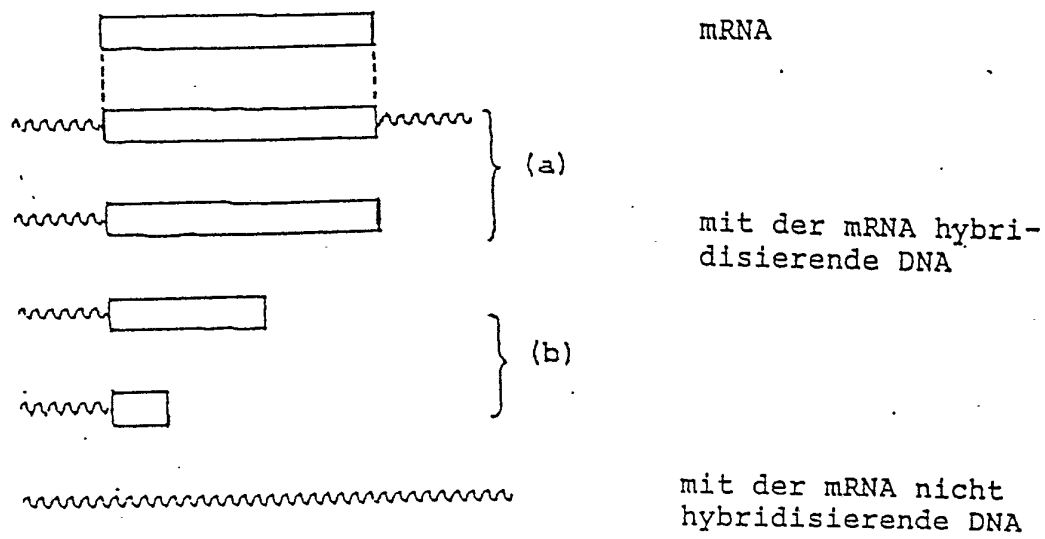


FIG. 5

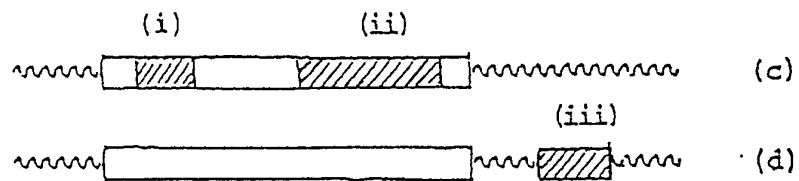


FIG. 6

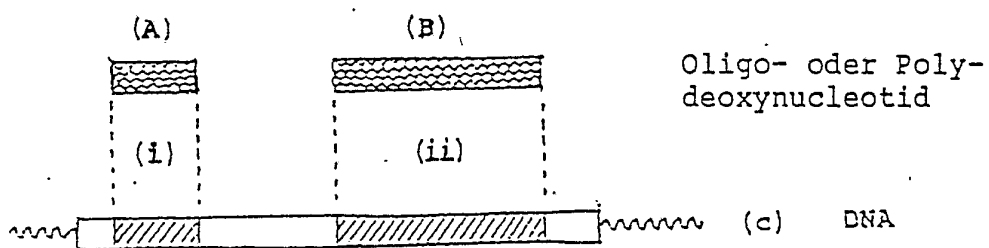


FIG. 7