PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

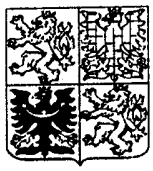
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2745-96

(19)

ČESKÁ REPUBLIKA



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20. 03. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.03.94, 18.03.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/210505, 94/214599**

(33) Země priority: **US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 03. 97**
(Věstník č. 3/97)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/03575**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/25814**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6]:
C 12 Q1/68
A 61 K48/00
C 07 H21/04

(71) Přihlášovatel:
LYNX THERAPEUTICS, INC., Hayward, CA, US;

(72) Původce:
Gryaznov Sergei M., San Mateo, CA, US;
Schultz Ronald G., Hayward, CA, US;
Chen Jer-kang, Palo Alto, CA, US;

(74) Zástupce:
Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Oligonukleotid N3 - P5 fosforamidáty a způsob jejich syntézy a hybridizace

(57) Anotace:
Modifikované oligonukleotid 3'-NHP(O) (O⁻) 0-5' fosforamidáty se syntetizují na nosiči v tuhé fázi. Bylo nalezeno, že fosforamidátové analogy mají významně zvýšenou resistenci vůči diregování fosfodiesterázy. Experimenty s tepelnou disociací dokládají, že tyto sloučeniny tvoří sabilnější dvoušroubovice než fosfodiestery s komplementárními DNA a obzvláště RNA řetězci. Kromě toho fosforamidátové analogy mohou také vytvářet stabilní trojšroubovice s cílovým řetězcem DNA s dvojitým řetězcem, kde za obdobných podmínek základní fosfodiesterové sloučeniny při tom selhávají.

CZ 2745-96 A3

2745-9

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
DOŠLO 17 XII 96
č.j. 092929

Oligonukleotidové N3'——>P5' fosforamidáty a způsob jejich přípravy a hybridizace

Oblast techniky

Tento vynález se týká sloučenin, kterými jsou N3'——> P5' fosforamidáty, prostředků s jejich obsahem, způsobů syntézy a hybridizace a také metod k dosažení resistence k nukleáze, za použití oligonukleotid N3' ——>5P' fosforamidátů.

Dosavadní stav techniky

Oligonukleotidy byly navrženy jako silné diagnostické sloučeniny a jako nové logicky navržené terapeutické prostředky (Uhlman, 1990, Helene a kol., 1990, Helene, 1991). Mechanismus účinku těchto sloučenin je založen na jejich specifické interakci s RNA nebo DNA oblastmi zájmu.

Je zavedeno několik modifikací povahy fosfodiesterové internukleosidové vazby /fosformono- (Eckstein a kol., 1985, Cohen, 1993) nebo -dithioát (Marshall a kol., 1993/, methylfosfonát (Miller, 1991), fosfodiesteramidát (Letsinger a kol., 1988, Froehler a kol., 1988)/

i) ke zlepšení stability oligomerů v biologickém prostředí a

ii) ke zlepšení hybridizačních vlastností oligomerů.

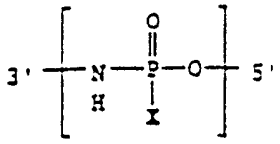
Bohužel rozsáhlá většina těchto analogů projevuje snížené vázání s cílovými RNA a DNA řetězci cestou tvorby dvoušroubovice nebo trojšroubovice (Kibler-Herzog a kol., 1991). Kromě toho přítomnost stereoisomerů na fosforu

u některých těchto analogů může komplikovat vzor vázání s komplementárními nukleovými kyselinami (LaPlauche a kol., 1986, Bower a kol., 1978, Tidd a kol., 1988).

Podstata vynálezu

Způsoby, sloučeniny a prostředky podle tohoto vynálezu se týkají oligodeoxyribonukleotidů, které mají přiléhající nukleosidové subjednotky připojené vzájemnými subjednotkovými vazbami. V oligonukleotidech alespoň 2 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovou vzájemnou subjednotkou nebo více než 3 ze všech vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby.

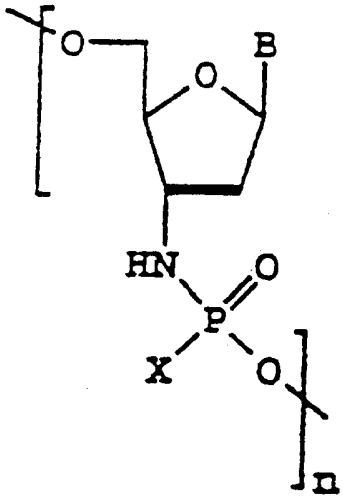
Například N3'——>P5' foaforamidátová vzájemná subjednotková vazba je vyjádřena vzorcem:



kde

X znamená $-O^-$, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny.

Jako příklad N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidu se uvádí skupina vzorce 1



(1)

ve kterém

X znamená $-O^-$, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny,

n znamená číslo do 4 do 100 a

B označuje bázi.

Obvykle kyslík v poloze 5' je buď vázán k atomu vodíku nebo k jinému nukleotidu v oligonukleotidu a kyslík v poloze 3' je vázán k jinému nukleotidu v oligonukleotidu. Pro vymezení těchto příkladných skupin substituentů se odkazuje na část popisující definice, která je uvedena dále.

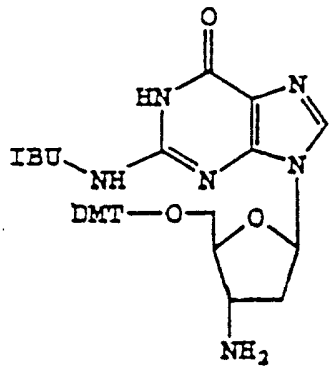
Nukleosidové subjednotky vytvářející oligodeoxyribonukleotidy podle tohoto vynálezu mohou být vybrány tak, že spadají do definovaného řetězce: jako řetězec bází

doplňujících cílový řetězec jednořetězcové nukleové kyseliny nebo řetězec, který umožní tvorbu trojšroubovice mezi oligodeoxyribonukleotidem a cílovou dvoušroubovicí.

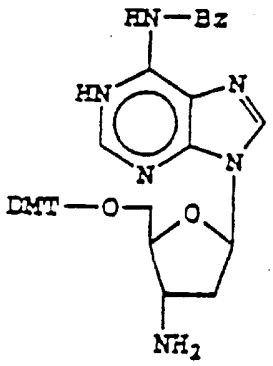
Při jednom provedení oligodeoxyribonukleotid má alespoň 3 přiléhající subjednotky vázané N3'——>P5' fosforamidátovými vazbami. Tato seskupení vazeb mohou být například umístěna na konci 3' oligodeoxyribonukleotidu. V této poloze N3'——>P5' fosforamidátové vazby udělují nukleáze resistenci k oligodeoxyribonukleotidu.

Při jiném provedení podle tohoto vynálezu jsou všechny vzájemné subjednotkové vazby vazbami N3'——>P5' fosforamidátovými.

Tento vynález zahrnuje meziprodukty používané k přípravě oligodeoxyribonukleotidů a způsoby syntézy takových meziproduktů. Meziprodukty mají tyto vzorce:



a



Tento vynález zahrnuje způsoby přípravy dvoušroubovicové molekuly nukleové kyseliny tím, že se připraví oligodeoxyribonukleotid, který má přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde oligodeoxyribonukleotid obsahuje vzájemné subjednotkové vazby obecného vzorce 1 nebo takové vazby v kombinaci s jinými vazbami zde rozebíranými. Oligodeoxyribonukleotid má řetězec nukleosidových subjednotek, který vytváří dvoušroubovici s cílovou molekulou nukleové kyseliny, když se oligodeoxyribonukleotid uvede do styku s cílovou molekulou nukleové kyseliny za podmínek, které dovolují účinnou tvorbu dvoušroubovice.

Tento vynález také zahrnuje způsob blokování vzájemného působení proteinu s polynukleotidem vytvářením oligodeoxyribonukleotidu, který má přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami obecného vzorce 1 nebo takovými vazbami v kombinaci s jinými vazbami zde rozebranými. Oligodeoxyribonukleotid má řetězec nukleotidových subjednotek k vytvoření dvoušroubovice nebo trojšroubovice s cílovou molekulou nukleové kyseliny, pokud se oligonukleotid uvede do styku s cílovou nukleovou kyselinou za podmínek, které dovolují účinnou tvorbu

dvoušroubovice nebo trojšroubovice. Tato metoda se může použít uvnitř buňky.

Tento vynález také zahrnuje oligodeoxyribonukleotidy, kde vzájemné subjednotkové vazby střídají N3'——>P5' fosforamidátové vazby a druhou vazbu. Druhá vazba může být zvolena z jednoho nebo několika rozdílných typů vazeb, například fosfodiesterových vazeb nebo fosfodiesterových nebo fosforthioátových vazeb. Druhá vazba je zvolena například ze souboru sestávajícího z fosfodiesteru, fosfotriesteru, methylfosfonátu, fosforamidátu P3'——>N5' a fosfortioátu. Při jednom provedení alespoň 50 % vzájemných subjednotkových vazeb jsou vazby N3'——>P5' fosforamidátové.

Tento vynález zahrnuje přípravy trojšroubovicové DNA molekuly vytvořením oligodeoxyribonukleotidu, jak je popsáno výše, kde oligodeoxyribonukleotid má řetězec nukleosidových subjednotek účinných k vytvoření trojnásobné šroubovicové struktury s cílovou dvoušroubovicovou DNA. Oligodeoxyribonukleotid se potom uvede do styku s dvoušroubovicovou DNA za podmínek, které jsou účinné k tomu, aby nechaly vzniknout trojšroubovici mezi oligodeoxyribonukleotidem a dvoušroubovicovou cílovou DNA. Tento způsob se může provádět za různých podmínek, například intracelulárně nebo v roztoku.

Tento vynález také zahrnuje trojšroubovicovou DNA molekulu, která má tři řetězce DNA:

i) dvoušroubovicovou DNA molekulu, která má komplementární řetězce a

ii) vazbu k dvoušroubovici třetího řetězce oligodeoxyribonukleotidu, který obsahuje N3'——>P5' fosforamidátové vazby, jak je rozebráno výše. Při jednom provedení 50 % nebo více vzájemných subjednotkových vazeb třetího řetězce

oligodeoxyribonukleotidu jsou N3'——>P5' fosforamidátové vazby, včetně plné modifikovaných oligodeoxyribonukleotidů.

Vynález dále zahrnuje způsob zvyšování resistence oligodeoxyribonukleotidu k digerování nukleázy. Při tomto způsobu se vytvoří oligodeoxyribonukleotid, který má N3'——>P5' fosforamidátové vazby, jak je popsáno výše. Oligodeoxyribonukleotid se vystaví působení nukleázy. Takové oligodeoxyribonukleotidy jsou resistentnější k digerování nukleázy než odpovídající oligodeoxyribonukleotid, který má pouze fosfodiesterové vzájemné subjednotkové vazby. Nukleázová resistence se stejně tak pozoruje intracelulárně.

Oligodeoxyribonukleotidy obsahující N3'——>P5' fosforamidátové vazby, jak již je popsáno výše, mají lepší hybridizační vlastnosti. Tento vynález také zahrnuje způsob zvyšování hybridizace prvního oligodeoxyribonukleotidu na RNA cílový řetězec, kde oligodeoxyribonukleotid má přiléhající nukleosidové subjednotky připojené N3'——>P5' fosforamidátovými vzájemnými subjednotkovými vazbami. Při tomto způsobu se vytvoří druhý oligodeoxyribonukleotid, který má N3'——>P5' fosforamidátové vazby, které mají stejné řetězce přiléhajících nukleosidových subjednotek jako první oligodeoxyribonukleotid. Druhý oligodeoxyribonukleotid je účinný k hybridizaci tohoto cílového RNA řetězce. Druhý oligodeoxyribonukleotid se potom uvede do styku s RNA za podmínek účinných k tomu, že dovolí vytvořit komplex mezi oligodeoxyribonukleotidem a RNA. Takový styk se může provádět za různých podmínek, včetně intracelulárního provedení.

Tento vynález také zahrnuje způsob a soupravu pro izolaci cílové RNA ze vzorku. Souprava zahrnuje oligodeoxyribonukleotid obsahující N3'——>P5' fosforamidátové vazby,

jak popsáno výše, kde oligodeoxyribonukleotid je účinný k hybridizaci na cílový RNA řetězec. Obvykle oligodeoxyribonukleotid je připojen k tuhé nosné látce, jako jsou magnetické kuličky, aby se usnadnila izolace.

Při jiném provedení tento vynález zahrnuje diagnostický způsob stanovení přítomnosti RNA ve vzorku, kde RNA obsahuje zvolený cílový řetězec. Při tomto způsobu se vytvoří oligodeoxyribonukleotid obsahující N3'——>P5' fosforamidátové vazby, který je účinný k vytvoření hybridizačního komplexu s cílovým řetězcem. Oligodeoxyribonukleotid se potom uvede do styku se vzorkem za podmínek, které jsou účinné k tomu, aby se dovolila tvorba hybridizačního komplexu mezi oligodeoxyribonukleotidem a cílovým řetězcem. Potom se stanoví přítomnost hybridizačního komplexu. Detekce hybridizačního komplexu se může provést značením oligodeoxyribonukleotidu s reportážní částí, pokud stanovení zahrnuje detekci reportážní části. Určitý počet reportážních částí je dostupný, včetně radioaktivního značení, značení biotinem a fluorescenčního značení, na které však výčet není omezen. Tato detekční metoda se může provádět za různých podmínek včetně intraceluárního provedení.

Podobné diagnostické způsoby se mohou provádět za použití oligodeoxyribonukleotidu obsahujícího N3'——>P5' fosforamidátové vazby, kde cílové řetězce jsou dvoušroubovicová DNA nebo jednořetězcová DNA. V případě detekce dvoušroubovicové DNA, detekce hybridizačního komplexu se může dosáhnout za použití gelového posunu pásu. Pro detekci jednořetězcové DNA oligodeoxyribonukleotid obvykle obsahuje více než 50 % ze všech vzájemných subjednotkových vazeb jako N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby.

Tento vynález také zahrnuje dvoušroubovicový oligodeoxyribonukleotid, který obsahuje

i) dva komplementární řetězce a

ii) přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde alespoň 2 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovými vzájemnými subjednotkovými vazbami, nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' vzájemné subjednotkové vazby (jak je popsáno výše). Při jednom provedení 50 % nebo více z vzájemných subjednotkových vazeb alespoň jednoho řetězce jsou N3'——>P5' fosforamidátové vazby. Při jiném provedení všechny ze vzájemných subjednotkových vazeb alespoň jednoho řetězce jsou N3'——>P5' fosforamidátové vazby. Takové dvoušroubovicové DNA molekuly mohou také zahrnovat flexibilní pantovou oblast připojenou ke komplementárním řetězcům. Pantová oblast může připojovat řetězce o jakékoli požadované polaritě, například 5' k 3', 3' k 5', 3 k 3' a 5' k 5'.

Tento vynález dále zahrnuje způsob přípravy trojšroubovicového komplexu nukleové kyseliny, který obsahuje dva komplementární DNA řetězce a jeden RNA řetězec s obsahem cílové oblasti, a prostředky s jeho obsahem. Při tomto způsobu se vytvoří oligodeoxyribonukleotid, obsahující přiléhající subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami. Oligodeoxyribonukleotid je schopen vytvořit dvoušroubovicový oligodeoxyribonukleotid, který obsahuje

i) dva komplementární řetězce s 5' a 3' konci,

ii) přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde alespoň dvě přiléhající subjednotky jsou připojeny N3'——>P5' fosforamidátovými vzájemnými subjednotkami nebo více než 3 ze všech vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové

vzájemné subjednotkové vazby (jak je popsáno výše),

iii) kde řetězce jsou připojeny z konce jednoho řetězce ke konci jiného řetězce flexibilní pantovou oblastí a

iv) komplementární oligodeoxyribonukleotidové řetězce, které obsahují řetězec nukleosidových subjednotek jsou účinné k vytvoření trojité šroubovicové struktury s cílovou RNA. Oligodeoxyribonukleotid se potom uvede do styku s cílovou RNA za podmínek účinných k tomu, aby se umožnil vznik trojšroubovice mezi oligodeoxyribonukleotidem a RNA. Tento způsob se může provádět ze různých podmínek, včetně intracelulárního provedení.

Tento vynález také zahrnuje farmaceutické prostředky obsahující oligodeoxyribonukleotidy s obsahem N3'——>P5' fosforamidátových vazeb, jak je popsáno výše. Oligodeoxyribonukleotidy jsou také vhodné při terapeutických aplikacích založených na hybridizaci, jako jsou aplikace při angíně a jako jsou antiseptické aplikace.

Tyto a jiné předměty a znaky tohoto vynálezu budou více zřejmé po přečtení dále uvedeného podrobného popisu, v souvislosti s připojenými výkresy.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1A až 1D znázorňují struktury subjednotek, které jsou vhodné pro syntézu oligonukleotidů obsahujících internukleosidové 3'-NHP(O)(O·)O-5' fosforamidátové vazby (N3'——> P5'). Obr. 1E znázorňuje schematický náčrt syntézy krok za krokem, vedoucí k rovnoměrně modifikovaným oligonukleotidům. Na obr. CE označuje kyanethyl a CPG znamená sklo s regulovanými póry.

Obr. 2A až 2E představují příkladné kombinace 3'-NHP(O)(O')O-5' fosforamidátových vzájemných subjednotkových vazeb s jinými případnými vazbami. Na obr. 2D a 2F R' například znamená nižší alkylovou skupinu. Jiné substituce jsou možné, jak popisuje Goodchild (1990).

Obr. 3 představuje příkladné oligonukleotidy a hodnoty T_m dvoušroubovic a trojšroubovic. Na tomto obrázku:

a znamená T_m komplexů v pufru A,

b znamená T_m pufru, přičemž T_m vlásenkové struktury dvoušroubovice je 55,7 a 61,5 ^oC v pufru A a pufru B a

c označuje, že chybně spárovaný nukleotid je podtržen.

Pokud jde o obr. 4A až 4C, obr. 4A představují profil iontoměničové vysoko účinné kapalinové chromatografie (IE HPLC) reakční směsi po syntéze fosforamidát oligonukleotidu 3. Obr. 4B představuje profil kapilární gelové elektroforézy reakční směsi po syntéze undekafosforamidátu 6. Obr. 4C znázorňuje výsledky ^{31}P-NMR u dekafosforamidátu 3.

Obr. 5A a 5B zobrazují křivky tání pro dvoušroubovice vytvořené fosfodiesterovými a fosforamidátovými oligomery.

Obr. 6 znázorňuje příkladné oligonukleotidové vlásenkové struktury a jejich hodnoty T_m.

Obr. 7A až 7D znázorňuje křivky tání pro trojšroubovice.

Obr. 8 ukazuje výsledek analýzy gelovou elektroforézou oligonukleotidové trojšroubovice, která vznikla za nativních

podmínek.

Obr. 9 ukazuje výsledek analýzy gelovou elektroforézou oligonukleotidové trojšroubovice, která vznikla za nativních podmínek.

Obr. 10 až 19 ukazuje výsledky antimediátorových oligonukleotidů, které obsahují buď fosforamidátové (N3'——> P5') (obr. 10 až 15) nebo fosforthioátové (obr. 16 až 19) vzájemné subjednotkové vazby, na proliferaci leukemických buněk pro odlišné BCR-ABL linie leukemických buněk a kontrolních buněčných linií.

Obr. 20 schematicky představuje přípravu 3'-amino-N^6--benzoyl-5'-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyadenosinu.

Přehled literárních citací

Abergo, D. D. a kol., Biochemistry 20, 1409-1413 (1981).

Agrawal, S. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7790-7794 (1989).

Anfossi, G. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3379 (1989).

Atherton, R. F. a kol., J. Chem. Soc., str. 660 až 663 (1945).

Ausubel, F. M. a kol., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., Media, PA, USA.

Azhayez, A. V. a kol., Bio Organ. Khimiya 8(9), 1218-1224 (1982).

Baer, M. R. a kol., Blood 79(5), 1319-1326 (1992).

Bannwarch, W., Helv. Chem. Acta 71, 1517-1527 (1988).

Bayever, E. a kol., Antisense Research and Development 3, 383-390 (1993).

Birg, F. a kol., Nucleic Acids Research 18(10), 2901-2908 (1990).

Borer, P. N., v Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, sv. 1, 3. vyd., CRC Press, Cleveland, OH, USA, str. 589 (1975).

Bower, M. a kol., Nucl. Acids Res. 15, 4915-4930 (1987).

Calabretta, B. a kol., Seminars in Cancer Biol. 3(6), 391-398 (1992).

Calabretta, B. a kol., Cancer Treatment Rev. 19(2), 169-179 (1993).

Cogswell, P. C. a kol., J. Immunol. t50(7), 2794-2804 (1993).

Cohen, J. S., v Antisense Research and Applications (Crooke, T. S. a kol., vyd.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, str. 205 až 221 (1993).

Collins, S. J. a kol., Nature 270, 347-349 (1977).

Cotlins, S. J. a kol., Science 225, 72 (1984).

Cook, K. S. a kol., Nucleic Acids Res. 19, 1577-1583 (1991).

Cooney, M. a kol., Science 241, 456-459 (1988).

Cordingley, M. G. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8985-8989 (1990).

Cowsert, L. M. a kol., Antimicrob. Agents and Chemo. 37(2), 171-177 (1993).

Cutry, A. F. a kol., J. Biol. Chem. 264(33), 19700-119705 (1989).

Daley, G .Q. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9312-9316 (1988).

Dayton, A. I. a kol., Cell 44, 941-947 (1986).

Dingwall, C. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6925-6929 (1989).

Donia, B. P. a kol., J. Biol. Chem. 268(19), 14514-14522 (1993).

Eckstein, F., Ann. Rev. Biochem. 54, 367-402 (1985).

Fisher, A. G. a kol., Nature 320, 367-371 (1986).

Froehler, B. a kol., Nucl. Acids Res. 16, 4831-4839 (1988).
Gale, R. P. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5648 (1984).
Glinski, R. P. a kol., Chemical Comm., str. 915 až 916 (1970).
Goldberg, M. L. a kol., Methods in Enzymology 68, 206 (1979).
Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1, 165-187 (1990).
Grigoriev, M. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(8), 3501-3505 (1993).
Gryaznov, S. M. a kol., Vest. Mosk. Univ. Ser. 2: Khim. 27, 421-424 (1986).
Gryaznov, S. M. a kol., Tetrahedron Lett. 31, 3205-3208 (1990).
Gryaznov, S. M. a kol., Nucl. Acids Res. 20, 3403-3409 (1992).
Helene, C. a kol., Biochem. Biofys. Acta 1049, 99-125 (1990).
Helene, C. a J.-J. Toulme, Biochimica et Biofysica Acta 1049, 99-125 (1990).
Helene, C., Anti-Cancer Drug Design 6, 569-584 (1991).
Herdewijn, P. a van Aerschot, A., Tetrahedron Lett. 30, 855 (1989).
Higgins, K. A. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9901-9905 (1993).
Holland, S. M. a kol., J. Virol. 64, 5966-5975 (1990).
Kawasaki, A. M. a kol., J. Medicinal Chem. 36(7), 831-841 (1993).
Kibler-Herzog, L. a kol., Nucl. Acids. Res. 19, 2979-2986 (1991).
Kjems, J. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 683-687 (1991).
Kulka, M. a kol., Antiviral Res. 20(2), 115-130 (1993).
LaPlauche, L. A. a kol., Nucl. Acids Res. 14, 9081-9093 (1986).

Letsinger, R. L. a kol., J. Am. Chem. Soc. 110, 4470-4471 (1988).

Letsinger, R. L., US patent č. 4 958 013, vydán dne 18. září 1990.

Lŕ, G. a kol., J. Virol. 67(11), 6882-6888 (1993).

Lui, M. W. a kol., Circulation 79, 1374-1387 (1989).

Mag, M. a kol., Tetrahedron Lett. 33, 7319-7322 (1992).

Malim, M. H. a kol., Nature 338, 254-257 (1989a).

Malim, M. H. a kol., Cell 58, 205-214 (1989b).

Maniatis, T. a kol. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

Marky, L. A. a kol., Biopolymers 26, 1601-1620 (1987).

Marshall, W. S. a kol., Science 259, 1564 (1993).

Matsukura, M. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4244-4248 (1989).

McShan, W. M. a kol., J. Biological Chem. 267(8), 5712-5721 (1992).

Miller, P. S., Bioconjugate Chem. 1, 187-191 (1990).

Miller, P. S., Biotechnology 9, 358-361 (1991).

Mitunobu, O., Synthesis 1, 28 (1981).

Muesing, M. A. a kol., Cell 48, 691-701 (1987).

Mullis, K. B. a kol., US patent č. 4 683 195, vydán dne 28. července 1987.

Mullis, K. B., US patent č. 4 683 202, vydán dne 28. července 1987.

Nishino, S. a kol., Nucleosides Nucleotides 5, 159 (1986).

Orson, F. M. a kol., Nucleic Acids Res. 19, 3435-3441 (1988).

Pegoraro, I. a kol., J. Natl. Cancer Inst. 70, 447-450 (1983).

Pertakey, L. a kol., Anti-Cancer Drug Design 8, 3-14 (1993).

Postel, E. H. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8227-8231 (1991).

Ratajczak, M. Z. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8474-8478 (1992).

Riley, M. J. a kol., J. Mol. Biol. 20, 359-398 (1966).
Rittner, K. a kol., Nucleic Actds Res. 19, 1421-1426 (1991).
Roy, S. a kol., Genes Dev. 4, 1365-1373 (1990).
Sambrook, J. a kol., v Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, sv. 2 (1989).
Sauer, Robert T., vyd., Methods in Enzymology, Protein/DNA Interactions, Academic Press (1991).
Seelig, R. a kol., Leukemia 7(11), 1886-1887 (1993).
Shabarova, Z. A., Biochemie 70, 1323-1334 (1988).
Stein, C. A. a Cheng, Y.-C., Science 261, 1004-1012 (1993).
Szczylik, C. a kol., Science 253, 562-565 (1991).
Tidd, D. M. a kol., Anti-Cancer Drug Design 3, 117-127 (1988).
Uhlman, E. a kol., Chem. Rev. 90, 544-584 (1990).
Vickers, T. a kol., Nuc. Acids Res. 19(12), 3359-3368 (1991).
Weeks, K. M. a kol., Science 249, 1281-1285 (1990).
Wickstrom, E., vyd., Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS, Wiley-Liss, New York, NY, USA (1991).
Wilson, W. D. a kol., Biochemistry 32(40), 10614-10621 (1993).
Zalewski, A. a kol., Circulation Res. 88, 1190-1195 (1993).
Zamecnik, P. C. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4143-4146 (1986).
Zielinski, W. S. a kol., Nucl. Acids Res. 15, 1699-1715 (1987).

Podrobný popis vynálezu

I. Definice

Výraz "alkylová skupina" se vztahuje k alkylové nebo substituované alkylové skupině, která obsahuje od 1 do 20

atomů uhlíku, jako je methyl, ethyl, propyl a podobně. Nižší alkylová skupina se obvykle vztahuje ke skupině obsahující od 1 do 5 atomů uhlíku. Intermediátorová alkylová skupina se běžně týká skupiny se 6 až 10 atomy uhlíku. Podobně "cykloalkylová skupina" se vztahuje k nasycené karbocyklické kruhové skupině, která může obsahovat alkylové, arylové a aralkylové substituenty. Jejich příklady je cyklopropyl, cyklopentyl, cyklohexyl a podobě nebo jejich substituované formy.

"Alkenylová skupina" se týká uhlovodíkové skupiny, která obsahuje dvojnou vazbu uhlík-uhlík, jako je vinyl, allyl, cyklopentenyl a podobně. "Alkenylová skupina" se také vztahuje k substituovaným alkenylům. Nižší alkenylová skupina se obvykle vztahuje ke skupině obsahující 1 až 5 atomů uhlíku. Intermediátorová alkenylová skupina se obvykle vztahuje ke skupině se 6 až 10 atomy uhlíku.

"Arylová skupina" znamená aromatickou kruhovou skupinu obsahující od 5 do 20 atomů uhlíku, jako je fenyl, naftyl, anthryl nebo jako jsou substituované arylové skupiny, které jsou substituovány alkylem nebo arylem, jako je tolyl, ethylfenyl, bifenylyl a podobně. Pod tento pojem se také zahrnují heterocyklické aromatické kruhové skupiny, které obsahují alespoň jeden atom dusíku, kyslíku nebo síry v kruhu.

"Aralkylová skupina" označuje substituovanou alkylovou skupinu, jako skupinu substituovanou arylem, jako je například benzyl, fenethyl, naftyl a podobně, a kde alkyl má význam vymezený výše.

Výrazem "substituovaný" se rozumí skupina, která je

derivatizována alespoň jednou malou chemickou částí, jako je například methoxyskupina, ethoxyskupina, atom halogenu, hydroxyskupina, kyanoskupina, amidoskupina, aminoskupina, a ethylenoxidový zbytek. Kterákoli ze skupin definovaných výše může být substituována a například jde o trifluormethyl.

"Oligonukleotid" obvykle znamená nukleosidovou subjednotku polymerů, která obsahuje od přibližně 4 do zhruba 50 přiléhajících subjednotek. Nukleosidové subjednotky mohou být připojeny různými vzájemnými subjednotkovými vazbami, mezi které se zahrnují vazby znázorněné na obr. 2A až 2E, aniž by byl výčet na tyto možnosti omezen. Kromě toho "oligonukleotidy" zahrnují modifikace, které jsou známé odborníkovi v oboru, na cukrové kostře (například ribózové nebo deoxyrobózové podjednotky), cukru (například substituce v poloze 2'), bázi a koncových skupinách v poloze 3' a 5'. "Oligodeoxyribonukleotidy" zahrnují takové modifikace, jako jsou substituce 2'-cukru fluorem. V obecném vzorci 1 n obvykle znamená číslo od 4 do 100 nebo od 5 do 100, výhodně od 6 do 60, obzvláště od 6 do 40 a nejvýhodněji od 6 do 30. Běžně se celková délka oligonukleotidu bude měnit od 6 do 100 nukleotidů, výhodně od 6 do 50 nukleotidů a obzvláště výhodně od 10 do 30 nukleotidů. V oligonukleotidech obecně alespoň 2 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovou vzájemnou subjednotkou, výhodně tak jsou spojeny alespoň 3 přiléhající subjednotky, výhodněji nejméně 4 přiléhající subjednotky a obzvláště výhodně alespoň 5 přiléhajících subjednotek. Obecně oligonukleotidy podle tohoto vynálezu nebudou mít chybné spárování k cílovému řetězci. Pokud oligonukleotid je delší než přibližně 20 až 30 nukleotidů, je dovoleno chybné spárování 1 nebo 2 nebo 3 bází.

"Nukleosid" je zde definován jako pentózový cukr (ribóza, deoxyribóza nebo jejich modifikace), který je vázán k bázi schopné vytvářet vodíkové vazby (obvykle purin nebo pyrimidin).

"Báze" je zde definována tak, že zahrnuje

i) běžné DNA a RNA báze (uracil, thymin, adenin, guanin a cytosin) a

ii) modifikované báze nebo analogy bází (například 5-methylcytosin, 5-bromuracil nebo inosin). Analog báze je chemická sloučenina, jejíž molekulová struktura napodobuje strukturu typickou pro DNA nebo RNA bázi.

"Trojšroubovice" má tři nukleové a kyselé řetězce. Obvyklé oligonukleotidy podle tohoto vynálezu nebudou mít chybné spárování k cílovému řetězci. Pokud oligonukleotid je delší než přibližně 20 až 30 nukleotidů, je dovoleno chybné spárování 1, 2 nebo 3 bází.

II. Tento vynález

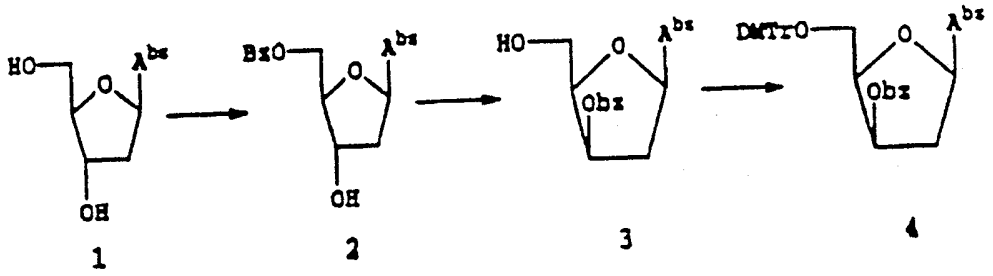
Experimenty prováděné na podporu tohoto vynálezu dokládají, že oligonukleotidy obsahují achirální internukleosidové 3'-NHP(O)(O')O-5' fosforamidátové vazby (N3'——>P5') jsou resistentnější k digerování nukleázy a mají zlepšené RNA a dsDNA hybridizační charakteristiky vzhledem k oligonukleotidům, které neobsahují N3'——>P5' fosforamidátové vazby. Oligonukleotidy, které obsahují N3'——>P5' vazby, mají vynikající antimediátorovou aktivitu proti komplementárním mRNA cílům při testu inhibice růstu buněk in vitro. Kromě toho oligonukleotidy projevují nízkou cytotoxicitu.

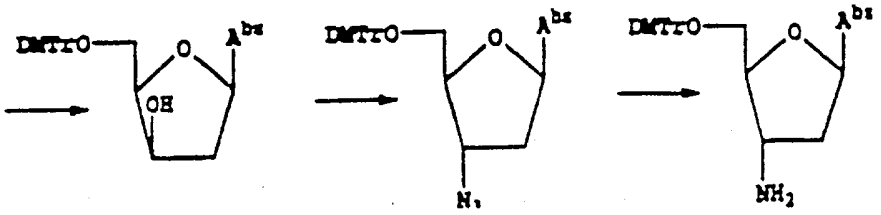
A. Syntéza a charakterizace oligonukleotidů obsahujících

internukleosidové 3'-NHP(O)(O')O-5' fosforamidátové vazby

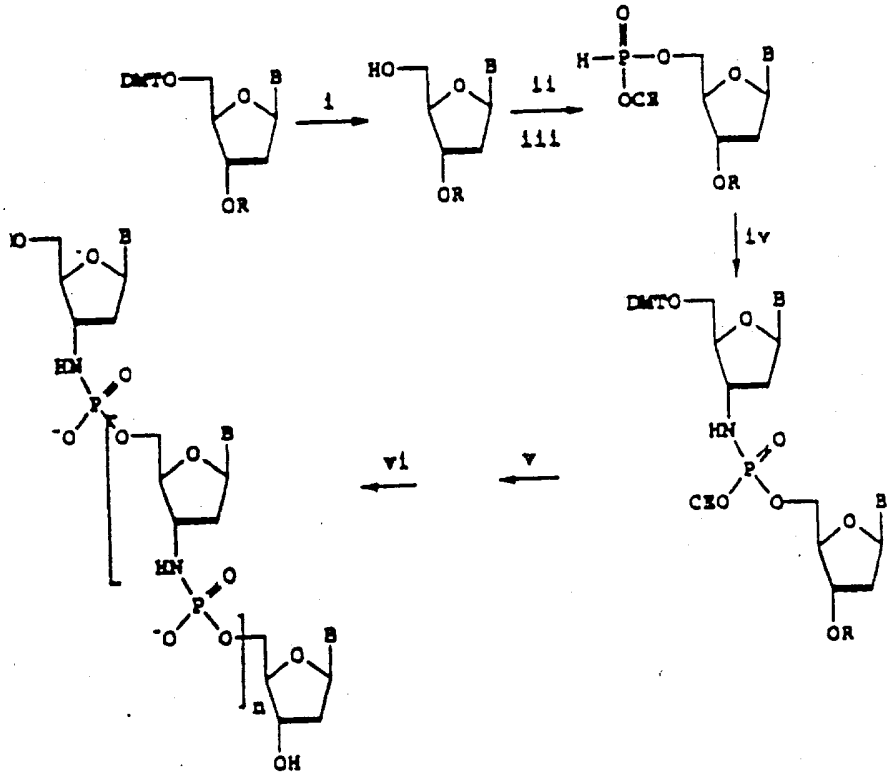
Oligonukleotidy obsahující jedinou N3'——>P5' fosforamidátovou vazbu se připravují chemickou ligací ve vodném prostředí (v podstatě jak popsala Shabarova, 1988). Podle jiného provedení oligonukleotidy obsahující N3'——>P5' vazby mezi dvěma subjednotkami, kde následující vzájemnou subjednotkovou vazbou je alespoň jedna fosfodiesterová vazba, se syntetizují na tuhém základě cestou kondenzace předem vytvořených fosforamidátových dimerních bloků (Gryaznov a kol., 1992, Mag a kol., 1992). Nahodilá velikost ribooligonukleotidových N3'——>P5' fosforamidátů se dosáhne cestou samopolymerace dimerních bloků (Zielinski a kol., 1987). Azhayer a kol. popisuje syntézu definovaných oligoribonukleotidových řetězců.

Tento vynález zahrnuje způsob syntézy na tuhém nosiči, který vede k přípravě oligodeoxyribonukleotidů s přiléhajícími nukleosidovými subjednotky spojenými N3'——>P5' fosforamidátovými vzájemnými subjednotkovými vazbami (np) (příklad 1, obr. 1). Sekvenční syntéza oligodeoxyribonukleotidů využívá 5'-dimethoxytrityl-3'-aminodeoxyribonukleotidových subjednotek. Příprava každé z těchto subjednotek je popsána v příkladu 1 (viz například obr. 20) a dá se nastínit takto:





Oligonukleotidy obsahující přiléhající subjednotky spojené N3'——>P5' fosforamidátovými vzájemnými subjednotkovými vazbami (například rovnoměrně modifikovanými) se syntetizují na tuhém nosiči za použití způsobu prodlužování krok za krokem, naznačeného v příkladu 1 a znázorněného takto:



I) $CHCl_2COOH$

II) $ClP(NiPr_2)(OCE)$

III) TetrH, H_2O

IV) 5'-DMT-3'-NH_2-nukleosid, CCl_4, Et_3N

V) Opakování stupňů I až IV)

VI) NH_3, R-sukcinyl CPG

Syntetický cyklus pro adici jediného aminonukleosidu sestává v podstatě z těchto operací: detritylace (obr. 1, stupeň i), fosfitylace 5'-hydroxyskupiny, za vzniku 5'-H-fosfonát diesteru neseného polymerem (obr. 1, stupně ii) a iii), kondenzace Atherton-Toddova typu (Atherton a kol., 1945, Gryaznov a kol., 1992, Gryaznov a kol., 1986, Gryaznov a kol., 1990) mezi 5'-dimethoxytrityl-3'-aminonukleosidem (Glinski a kol., 1970) a 5'-H-fosforátem v přítomnosti chloridu uhličitého (obr. 1, stupeň iv). Tento cyklus se může opakovat několikrát a po deprotonizaci amoniakem má za výsledek fosforamidát oligonukleotidu (obr. 1, stupně v) a vi)). Průměrný výtěžek kondenzace je 94 až 96 % na stupeň, jak se soudí na základě testování dimethoxytritylového (DMT) kationu.

Příklady oligodeoxyribonukleotidů obsahujících N3' ——>P5' fosforamidátové vazby ("np") jsou uvedeny na obr. 3 a v tomto popisu.

Oligodeoxyribonukleotidy podle tohoto vynálezu obsahují alespoň dvě přiléhající subjednotky spojené N3' ——>P5' fosforamidátovými vzájemnými subjednotkovovými vazbami (například 5'-T-np-G-np-A-3') nebo více než 3 celkově N3'——>P5' fosforamidátovými vzájemnými subjednotkovovými vazbami. Při jednom provedení oligodeoxyribonukleotidy obsahují plně modifikované N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby (například obr. 3, experiment 13, oligonukleotid 6). Při jiném provedení oligodeoxyribonukleotidy mají střídající se N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkovové vazby mezi subjednotkami, které se

obvykle střídají s fosfodiesterovými nebo fosforthioátovými vazbami (viz například vazby níže a v obr. 2). Příklad takového oligodeoxyribonukleotidu obsahujícího střídající se vazby je znázornén na obr. 3, experiment 3, oligonukleotid 2. Syntéza oligonukleotidu 2 je popsána v příkladu 1.

Oligonukleotidy se izolují iontoměničovou vysoko účinnou kapalinovou chromatografií (IE HPLC, příklad 2, obr. 4A). Čistoty izolovaných oligonukleotidových přípravků se hodnotí analýzou na bázi kapilární elektroforézy a deskové elektroforézy (příklad 2, obr. 4B).

Přítomnost fosforamidátových vazeb ve vyčištěných oligonukleotidech je potvrzena ^{31}P NMR spektrem (příklad 2, obr. 4C) a selektivní hydrolýzou fosforamidátových vazeb, která je katalýzována kyselinou (příklad 2).

Kyanetherová skupina na obr. 1 (stupeň i) a iii)) se může nahradit jinými zavěšenými skupinami, včetně alkylové skupiny (obvykle nižší nebo střední alkylové skupiny), alkenylové skupiny, arylové skupiny a aralkylové skupiny (nebo substituovaných skupin, které jsou vybrány z předcházejících skupin). Obvykle takové zavěšené skupiny neruší syntézu oligonukleotidů nebo schopnost oligonukleotidu hybridizovat na cíl. Příkladem zavěšené skupiny je $-CH_3$ (Gryaznov a kol., 1992). Obvyklá opakující se jednotka je znázorněna na obr. 2A, kde "X" znamená "-O·", "-OR" nebo "-R", a "R" znamená například některou z dále uvedených zavěšených skupin nebo jejich substitucí: alkyl, alkenyl, aryl a aralkyl.

Kromě fosforamidátových analogů a chimérických fosforamidát/fosfodiesterových analogů (obr. 2C),

internukleosidové N3'——> P5' fosforamidátové vazby se mohou vpravit do oligonukleotidů, které mají alespoň jednu jinou modifikovanou vzájemné subjednotkovou vazbu (přehled podává Goodchild, 1990), včetně fosfotriesterů (obr. 2D), methyl-fosfonátů (obr. 2B), fosforamidátů (obr. 2F), fosforamidátů P3'——>N5' a fosforthioátů (obr. 2E).

B. Resistence k nukleáze oligonukleotidů obsahujících achirální internukleosidové 3'-NHP(O)(O⁻)O-5' fosforamidátové vazby

Stabilita oligonukleotidových fosforamidátů vůči hydrolýze fosfodiesterázy hadího jedu se hodnotí při porovnání s přírodními fosfodiesterázovými sloučeninami (viz materiály a způsoby). Fosfodiesterový dekamer oligonukleotidu 1 (obr. 3) se zpracuje s fosfodiesterázou hadího jedu. Oligonukleotid 1 se úplně hydrolýzuje po 10 minutách, jak se usoudí podle reversní fáze při vysoko účinné kapalinové chromatografii (HPLC).

Naproti tomu oligonukleotid 3 jako fosforamidátový analog je v podstatě neporušený rovněž po 50 minutách zpracování s fosfodiesterázou hadího jedu. Po přibližně 4,5 hodinách se zhruba 50 % oligonukleotidu 3 konvertuje na předpokládaný 9-mer $(TnpT)_4T_{NH2}$ s koncovou 3'-aminoskupinou. Přítomnost koncové 3'-aminoskupiny omezuje další digerování oligomeru. Po 22 hodinách hydrolýzy se výchozí 10-mer oligonukleotid 3 úplně konvertuje na 3'-amino-koncový 9-mer $/(Tnp)_2T_{NH2}/$. Pozoruje se pouze přibližně 20% další digerování $/(Tnp)_2T_{NH2}/$.

Tyto výsledky dokládají zvýšení resistence k nukleáze u oligonukleotidů obsahujících N3'——>P5' fosforamidátové

vazby ("np"), vzhledem k oligonukleotidům, které mají normální fosfodiesterový hlavní řetězec. Při jednom provedení tohoto vynálezu se resistence k nukleáze u oligodeoxyribonukleotidů vytváří umístěním přibližně 3 přiléhajících subjednotek vázaných N3'——>P5' fosforamidátovými vzájemnými subjednotkovými vazbami na konci 3' oligodeoxyribonukleotidů.

C. Hybridizační vlastnosti oligonukleotidů obsahujících N3'——>P5' fosforamidátové vazby

Hybridizační vlastnosti fosforamidátových analogů se hodnotí vzhledem ke komplementárním DNA nebo RNA řetězcům, které mají fosfodiesterové vzájemné subjednotkové vazby. Hodnoty tepelné stability pro dvoušroubovice vytvořené z fosforamidátových analogů a fosfodiesterových oligomerů jsou shrnuty na obr. 3 (příklad 1).

Hodnoty příkladných křivek tání (obr. 4A) pro dvoušroubovice vytvořené oligomery fosfodiesterového a fosforamidátového analogu jsou uvedeny na obr. 5A a 5B. Na těchto obrázcích křivky (A), (C), (B) a (D) odpovídají experimentům 8, 9, 13 a 14 z obr. 3.

Substituce internukleosidového fosfodiesteru pro N3'——>P5' fosforamidátové vazby výrazně mění hybridizační vlastnosti oligonukleotidů. Teploty tání (T_m) dvoušroubovic vzniklých úplnou modifikací 10-mer oligonukleotidu 3 s poly Da (například DNA) a poly A (například RNA) jsou 36,0 °C a 51,5 °C (obr. 3, experimenty 5 a 6). Tyto T_m jsou o 6,3 °C a 24,5 °C vyšší než u dvoušroubovic vytvořených fosfodiesterovým protějškem oligonukleotidu 1 s poly Da a poly A (obr. 3, experimenty 1 a 2).

Je pravda, že stejný sklon je u undekanukleotidu na smíšené bázi (obr. 3), kde T_m dvoušroubovic s komplementárními DNA a RNA řetězci je 49,2 °C a 72,4 °C (obr. 3, experimenty 13 a 14). Tyto hodnoty jsou o 11,7 °C a 22,9 °C vyšší než pro základní fosfodiesterovou sloučeninu, oligodeoxyribonukleotid 4 (obr. 3, experimenty 8 a 9). Také dvoušroubovice se stejnou cílovou RNA vytvořenou fosforamidát 11-mer oligodeoxyribonukleotidem 6 je stabilnější (18,0 °C) než pokud je vytvořena homologním RNA oligomerem 5 (obr. 3, experiment 11).

Oligodeoxyribonukleotid 2 se střídajícími se fosfodiesterovými a fosforamidátovými vazbami se také váže mnohem těsněji s RNA řetězcem, hodnota T_m odpovídá 33,7 °C (obr. 3, experiment 4), než odpovídající fosfodiesterová sloučenina (oligodeoxyribonukleotid 1, obr. 3, experiment 2). Avšak oligodeoxyribonukleotid 2 se váže méně silně s DNA templátem, hodnota T_m odpovídá 25,8 °C (obr. 3, experiment 3), vzhledem ke svému fosfodiesterovému protějšku (oligodeoxyribonukleotid 1, obr. 3, experiment 1). Hybridizace fosforamidátových oligonukleotidů s komplementárními nukleovými kyselinami je sekvenčně specifická a stanoví se vlastním Watson-Crickovým párováním bází. Dvoušroubovice vytvořená fosforamidátovým oligodeoxyribonukleotidem 6 s jediným chybně spárovaným RNA cílem (obr. 3, experiment 15) je podstatně méně stabilní ($\triangle T_m$ -12,1 °C) než dvoušroubovice vytvořená s plně komplementárním RNA oligomerem (obr. 3, experiment 13). Přibližně stejná selektivita chybného spárování se pozoruje pro fosfodiesterové deoxyribo- a ribooligonukleotidy, kde $\triangle T_m$ je -14,4 °C a -12,4 °C (obr. 3, experimenty 10 a 12).

Předchozí studie s fosforamidátovými analogy

dokládají, že zavedení tří N3'——>P5' fosforamidátových vazeb má za důsledek sklon k destabilizaci, vzhledem ke dvěma takovým vazbám pro heterodvoušroubovice vytvořené s deoxy-ribo-oligonukleotidovými cílovými oblastmi (Gryaznov a kol., 1992). Na rozdíl od sklonu známého z dosavadního stavu, výsledky předložené výše dokládají, že pokud takové sloučeniny obsahují až do 50 % vzájemných subjednotkových vazeb, obvykle klesá stabilita DNA/RNA heterodvoušroubovic. Více než 50 % fosforamidátových vzájemných subjednotkových vazeb na jednom řetězci DNA dvoušroubovice však začne zlepšovat relativní stabilitu dvoušroubovice.

Pokud DNA dvoušroubovic se vytvoří mezi normálním fosfodiesterovým oligonukleotidem a oligonukleotidem plně modifikovaným N3'——>P5' fosforamidátovými vazbami, tepelná stabilita dvoušroubovice je mnohem vyšší než u odpovídající dvoušroubovice, která má pouze fosfodiesterové vazby v obou řetězcích (obr. 3, srovnávací experimenty 1 a 5).

Článek, který publikoval Gryaznov a kol. (1992), obsahuje pouze údaje týkající se hybridizačních vlastností DNA/DNA dvoušroubovic, kde pouze jeden řetězec obsahuje až tři N3'——>P5' fosforamidátové vazby (které nepřiléhají). V ostrém kontrastu k údajům z dosavadního stavu techniky, týkajícím se DNA cílů, experimenty provedené na podporu tohoto vynálezu dokládají, že při zvýšení počtu fosforamidátových analogických vazeb přítomných v oligodeoxyribonukleotidu se zvyšuje stabilita DNA/RNA heterodvoušroubovic. K odsažení stabilizace DNA/RNA heterodvoušroubovic, výhodné provedení tohoto vynálezu zahrnuje oligodeoxyribonukleotid, který má alespoň 2 přiléhající vzájemné subjednotky nebo více než 3 celkem vzájemné subjednotkové vazby modifikované tak, že mají N3'——>P5' fosforamidátové vazby. Výhodnější

oligonukleotidy budou mít alespoň 5 přiléhajících vzájemných subjednotek s N3'——>P5' fosforamidátovými vazbami.

Experimenty se také provádějí k ohodnocení stability dvoušroubovic vytvořených oligonukleotidy obsahujícími fosforamidátové vazby v obou komplementárních řetězcích. Několik chimérických fosforamidát-fosfodiesterových oligomerů vlásenkové struktury (obr. 6) se také připraví synteticky (obr. 6, příklad 4B) a získané sloučeniny mají pantové oblasti obsahující thymidin (T_4, obr. 6). Křivky tání získané pro tyto sloučeniny ukazují, že stabilnější dvoušroubovice se tvoří vlásenkovou strukturou v oligonukleotidech 9 a 12, kde oba řetězce obsahují fosforamidátové vazby v protilehlých polohách (obr. 6, experimenty 3 a 6).

Také dvoušroubovice vzniklé z jednořetězcových DNA molekul (to znamená vlásenkové struktury), kde jeden řetězec obsahuje střídající se fosforamidátové a fosfodiesterové vazby a komplementární řetězce s obsahem pouze fosfodiesterových vazeb, jsou mnohem stabilnější než jejich výlučně fosfodiesterové protějšky (obr. 6, experimenty 1 a 4).

Tyto výsledky naznačují, že pokud oba řetězce DNA/DNA dvoušroubovice obsahují fosforamidátové analogické vazby, dvoušroubovice je stabilizována přítomností N3'——>P5' fosforamidátových vazeb v každém řetězci. Stabilní dvoušroubovice se mohou tvořit s jednou fosforamidátovou vazbou v každém řetězci - při jednom provedení fosforamidátová vazba je ve stejné poloze v každém řetězci.

K dosažení DNA/DNA dvoušroubovicové stabilizace jsou obvykle alespoň 2 vzájemné subjednotkové vazby na každém DNA řetězci dvoušroubovice vytvářejícím oligonukleotid modifiko-

vány, aby se dosáhlo N3'——>P5'. Při jednom provedení jeden řetězec vlásenkové struktury tvořící DNA oligonukleotid může být modifikován, aby se dosáhlo 50 až 100 % N3'——>P5' fosforamidátových vzájemných subjednotkových vazeb.

D. Způsob přípravy trojšroubovice za použití fosforamidátových analogů

Hodnotí se také schopnost fosforamidátových analogů tvořit trojšroubovice s DNA s dvojitým řetězcem (obr. 4). Křivky tání se dostanou pro trojšroubovice vzniklé působením dekathymidilového fosforamidátového oligodeoxyribonukleotidu 6 a dA_{10}:dT_{10} dvoušroubovicové oblasti vlásenkové struktury DNA cíle $d(A_{10}C_4T_{10})$ (obr. 3, experiment 7). Triplex má hodnotu T_m 32 °C za blízkých fyziologických podmínek. Stabilnější trojšroubovice (T_m 42,2 °C) se pozoruje v pufru obsahujícím hořčík (obr. 3, experiment 7).

Stejná hodnota T_m se dostane pro trojšroubovice vytvořené fosforamidát oligonukleotidem 3 s poly dA:poly dT dvoušroubovicí. Tepelná disociace trojšroubovic se sleduje podle změny absorbance při vlnové délce 260 nm (obr. 7A a 7C), stejně jako při 284 nm (obr. 7B a 7D), co je charakteristické pro T:AT trojšroubovice (Riley a kol., 1966).

Výsledky experimentů posunu na gelu za nativních podmínek jsou také doloženy tvorbou stabilní trojšroubovice, při působení fosforamidátového dekameru 3 a dsdna cílové oblasti (obr. 8), stejně jako stabilní trojšroubovice, při působení oligonukleotidu 6 (obr. 9).

Za stejných hybridizačních podmínek ani oligonukleotid

fosfodiesteru kyseliny dekathymidilové 1, ani oligonukleotid 4, netvoří trojšroubovice se stejnými dvojitými řetězci cílových DNA, jak se soudí podle křivek tání a experimentů posunu na gelu (obr. 8). To znamená, že žádná odpovídající trojšroubovice není tvořena oligonukleotidy, které mají fosfodiesterové vzájemné subjednotkové vazby, na základě čeho se předpokládá, že fosforamidátové analogy mohou snáze tvořit trojšroubovice než jejich protějšky obsahující fosfodiester.

Podobné výsledky se dostanou, pokud oligonukleotid 6 a oligonukleotid 1 se hodnotí na jejich schopnost vytvořit trojšroubovicové struktury s dvoušroubovicovou cílovou DNA (obr. 5, příklad 9).

Výsledky předložené výše naznačují, že fosforamidátové oligonukleotidy jsou účinnější pro tvorbu trojšroubovice s dvoušroubovicovým substrátem, než běžné fosfodiesterové oligonukleotidy.

III. Aplikace oligonukleotidů obsahujících internukleosid 3'-NHP(O)(O')O-5' fosforamidátové vazby

Oligonukleotid 3'-NHP(O)(O')O-5' fosforamidáty se získávají synteticky. Tyto sloučeniny jsou resistentní k nukleáze a tvoří překvapivě stabilní komplexy se ssRNA a DNA cílovými oblastmi. N3'——>P5' analogy mají veliký potenciál pro antimediátorové a antigenové diagnostické a/nebo terapeutické aplikace. Při výhodném provedení tohoto vynálezu oligonukleotidy jsou tvořeny oligodeoxyribonukleotidy.

A. Antimediátorové aplikace

Antimediátorová terapie zahrnuje podávání exogenních oligonukleotidů, které se váží k cílové nukleové kyselině, obvykle RNA molekule, umístěné v buňkách. Výraz antimediátor je tak dán, protože oligonukleotidy jsou obvykle komplementární k mRNA molekulám ("negativní řetězce"), které kódují celulární produkt.

Fosforamidátové analogické oligonukleotidy zde popsané jsou vhodné pro antimediátorovou inhibici exprese genu ((Matsukura a kol., 1989, Agrawal a kol., 1989, Zamecnik a kol., 1986, Rittner a Sczakiel, 1991, Stein a Cheng, 1993). Oligonukleotidy obsahující N3'——>P5' fosforamidátové vazby mají terapeutické aplikace pro velký počet lékařsky významných cílů, včetně inhibice proliferace rakovinných buněk a rušivý vliv na infekčními viry, na které však výčet možností není omezen. N3'——>P5' fosforamidátové oligonukleotidy jsou vhodné jak pro veterinární použití, tak pro použití u lidí. Nízká cytotoxicita těchto sloučenin a jejich schopnost působit účinně jako antimediátorové molekuly při nízkých koncentracích (viz dále) způsobuje, že tyto oligonukleotidy jsou vysoce žádoucí jako terapeutické antimediátorové přípravky.

Antimediátorové přípravky obvykle potřebují k nepřetržitému vázání všechny cílové RNA molekuly tak, jak je inaktivují nebo alternativně poskytuje substrát pro endogenní ribonukleázovou H ((Rnase H) aktivitu. Citlivost RNA/oligonukleotidových komplexů, připravovaných způsoby podle tohoto vynálezu, k digerování Rnase H se může hodnotit normalizovanými metodami ((Donia a kol., 1993, Kawasaki a kol., 1993).

Způsoby podle tohoto vynálezu mají řadu výhod proti

obvyklejším antimediátorovým přípravkům. Za prvé, fosforamidátové analogické oligonukleotidy se váží silněji k RNA cílům než odpovídající fosfodiesterové oligonukleotidy. Za druhé, fosforamidátové analogické oligonukleotidy jsou resistentnější k degradaci celulárními nukleázami.

Kromě toho pokud je RNA kódována většinou purinovým řetězcem dvoušroubovicové cílové sekvence, fosforamidátové analogické oligonukleotidy směřované do dvoušroubovice mají také potenciál pro inaktivaci DNA, to znamená schopnost inaktivovat patogen jak ve formě jednoduchého, tak dvojitého řetězce (viz rozbor antigenové terapie, uvedený dále).

Specifické řetězce fosforamidátového analogu vázající molekuly jsou potenciálními silnými terapeutickými prostředky proti v podstatě jakékoli chorobě nebo stavu, který nějakým způsobem zahrnuje RNA. Příkladné způsoby, kterými se takové řetězce mohou zacílit na terapeutické aplikace, zahrnují:

a) zacílení produktů exprimujících RNA řetězce, zahrnutých do propagace a/nebo udržování infekčních přípravků, jako jsou bakterie, viry, kvasinky a jiné houby, například specifické mRNA kódované infekčním přípravkem,

b) přípravu dvoušroubovicové molekuly, která má za výsledek vyvolání štěpení RNA (například Rnase štěpení RNA/DNA hybridních dvoušroubovicových molekul),

c) blokování vzájemného působení proteinu s RNA řetězcem (například interakce TAT a TAR, viz dále) a

d) zacílení řetězců, které způsobují nevhodnou expresi

nebo proliferaci celulárních genů, například genu spojeného s buněčným cyklem regulace, zánětlivými procesy, proliferací buněk hladkého svalstva (SMC), migrací a tvorbou základní hmoty (Liu a kol., 1989), určitými genetickými chorobami a rakovinami (protoonkogeny). Při jednom provedení se blokuje translace neboli se blokuje RNA zpracování nevhodně exprimovaných buněčných genů.

Příklady potenciálních cílových řetězců jsou protoonkogeny, mezi které se například zahrnuje c-myc, c-myb, c-fos, c-kit, ras a BCR/ABL (například Wickstrom, Zalewski a kol., 1993, Calabretta a kol., 1992, 1993), onkogenní/tumorové supresní geny (například p53, Bayever a kol.), transkripční faktory (například NF-*k*B, Cogswell a kol., 1993) a virové geny (například papillomaviry, Cowsert a kol., herpes simplex virus, Kulka a kol.). Pro další ilustraci se uvádí, že dvě RNA oblasti HIV-1 proteinu, které mohou být cílové při způsobech podle tohoto vynálezu, jsou REV-proteinový element vytvářející odezvu (RRE) a TAT-proteinový element transaktivační odezvy (TAR). REV aktivita vyžaduje přítomnost REV elementu odezvy (RRE, SEQ ID č. 23), umístěného v HIV vývojovém genu (Malim a kol., 1989a, 1989b).

RRE je mapována do 234-nukleotidové oblasti přes formu čtyř kmenových smyčkových (stem-loop) struktur a jedné rozvětvené kmenové smyčkové struktury (Malim a kol., 1989a). Data získaná z mapovacích studií (Holland a kol., 1990, Kjems a kol., 1991) naznačují, že REV se váže k šesti párům bází na jedné kmenové struktuře a ke třem nukleotidům ve spojení s kmenovou smyčkovou strukturou RRE. Minimální REV spojující oblasti z přibližně 40 nukleotidů ve kmenové smyčce II

rozpoznal Cook a kol. (1991, SEQ ID č. 24). Tyto spojující oblasti mohou být zacíleny pro vytváření RNA/DNA dvoušroubovic (například Li a kol., 1993), za použití jednoho nebo většího počtu oligonukleotidů, způsoby podle tohoto vynálezu.

HIV-1 TAT je podstatný pro replikaci viru a je silným transaktivátorem exprese virového genu, zaměřeným na dlouhé koncové opakování (LTR) (Dayton a kol., 1986, Fisher a kol., 1986). Transaktivace indukovaná TAT proteinem vyžaduje přítomnost TAR elementu (SEQ ID č. 25), který je umístěn na netranslatovaném 5' konci virového mRNA elementu.

TAR element je schopen vytvářet stabilní kmenovou smyčkovou strukturu (Muesing a kol., 1987). Integrita kmene a 3 nukleotidové (nt) vydutě (bulge) na kmeni TAR je doložena jako podstatná pro specifické a vysoce afinitní vázání TAT proteinu k TAT elementu (Roy a kol., 1990, Cordingley a kol., 1990, Dingwall a kol., 1989, Weeks a kol., 1990). Tato oblast může být cílovou oblastí pro antimediátorovou terapii metodou podle tohoto vynálezu.

Kromě zacílení RNA vázacích míst REC, RRE a TAT proteinů, RNA kódující sekvence pro REV a TAT proteiny samy mohou být cíleny za účelem blokování exprese proteinů.

N3'——>P5' fosforamidátové oligonukleotidy poskytují jedinečnou cílicí schopnost pro RNA oblasti, spíše než samotná teplotní hybridizace za vzniku RNA/RNA hybridů, tak jako kmenových smyčkových struktury RRE, na které však výčet není omezen. N3'——>P5' fosforamidátové oligonukleotidy nahrazují RNA/RNA hybridy v důsledku vysoké afinity vázání N3'——>P5' fosforamidátových oligonukleotidů k jednomu

řetězci RNA/RNA hybridu. Vázání prvního N3'——>P5' fosforamidátového oligonukleotidu k RNA/RNA hybridu způsobuje tvorbu RNA/DNA dvoušroubovice (jeden řetězec RNA a jeden řetězec N3'——>P5' fosforamidátového oligonukleotidu), co brání reasociaci RNA/RNA hybridu a může zabránit vázání nebo rozpoznání RNA/RNA hybridu proteinem. Vázání prvního N3'——> P5' fosforamidátového oligonukleotidu by mělo také za výsledek zvýšené štěpení RNA působením Rnase. Větší stabilita RNA/N3'——>P5' fosforamidátové dvoušroubovice ve srovnání s RNA/RNA hybridem, minimalizuje možnost opětovné teplotní hybridizace RNA za vzniku RNA/RNA hybridu. Podle jiného provedení N3'——>P5' fosforamidátový oligonukleotid vázající se k jednomu řetězci RNA/RNA hybridu otevírá RNA/RNA hybrid, čímž vystavuje druhé RNA místo pro druhý oligonukleotid k vázání. RNA oblasti, které se samy teplotně hybridizují za vzniku RNA/RNA hybridů se mohou rozpoznat empiricky doložením, že N3'——>P5' fosforamidátové oligonukleotidy nahrazují známé RNA vázající proteiny. RNA oblasti s RNA/RNA hybridy, stejně jako kmenové smyčkové struktury, mohou být také identifikovány na základě předpovědi RNA sekundární struktury stanovené pomocí počítače. Programy, jako S. Sixou a kol., Nucleic Acid Res. 22, 662-668 (1994), jehož metody se zde zahrnují do známého stavu techniky, jsou zvláště vhodné pro identifikaci RNA oblastí, které vytvářejí RNA/RNA hybridy, jako jsou palindromové řetězce oddělené alespoň 3 až 7 bázemi.

Původní sledování N3'——>P5' fosforamidátových oligonukleotidů, zaměřené na vázání silných antimediátorových cílových míst, obvykle zahrnuje testování tepelné stability výsledných RNA/DNA dvoušroubovic. Pokud fosforamidátový analogický oligonukleotid je identifikován, že váže zvolené RNA cílové řetězce, analog je dále testován na inhibici RNA

funkce in vitro. Systémy testování buněčné kultury se používají pro takové analýzy in vitro (například herpes simplex virus, Kulka a kol., HIV-1, Li a kol., Vickers a kol., produkt proliferace buněk koronárního hladkého svalstva v restenózách, Zalewski a kol., IL-2R, Grigoriev a kol., c-myb, Baer a kol., c-fos, Cutry a kol., BCR/ABL, Szczylik a kol., 1991).

Příklad 5 představuje výsledky testování fosforamidátových oligonukleotidů v jednom systému buněčné kultury. Při tomto testu se měří selektivní inhibice proliferace buněk způsobujících leukémii pomocí BCR-ABL antimediátorových oligonukleotidů (Szczylik a kol., 1991). BCR-ABL transkripce se nachází hlavně u pacientů trpících chronickou myeloidní leukémii (CML) a u pacientů trpících Ph^+ akutní lymfocytovou leukémií a předpokládá se, že je nezbytné zachovat leukémický fenotyp (Gale a kol., Collins a kol., 1984, Daley a kol.). BCR-ABL transkripce je výsledkem translokace protoonkogenní ABL (chromosom 9) k oblasti shluku zlomových míst (BCR) (chromosom 22), co má za výsledek tvorbu BCR-ABL hybridních genů.

Plně modifikovaný N3'——>P5' fosforamidátový antimediátorový oligonukleotid 11-mer (SEQ ID č. 6), komplementární k identifikovanému BCR-ABL spojení B2A2 (buněčná linie BV173), se připraví synteticky a čistí se. Také se připraví odpovídající oligonukleotid 16-mer (SEQ ID č. 26),

i) obsahující 11-mer sekvenci jak je uvedeno výše a

ii) mající plně modifikované fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby. Oligonukleotidy se podávají do buněk v intervalu 24 hodin po dobu 3 dnů (dny 0, 1 a 2) při koncentracích znázorněných na obr. 10 až 15, 16 a 18. Koncentrace

uvedené na těchto obrázcích mají tento význam: 40/20/20 odpovídá koncentraci, udané v µm/ml, oligonukleotidů přidaných k buněčným kulturám (příklad 5).

Obr. 17 a 18 představují výsledky experimentů dovolené použitím 16-mer, které mají plně modifikované fosforthioátové vzájemné subjednotkové vazby, s chybně spárovanými řetězci k BV173 BCR/ABL sestřihu spojení.

Výsledky uvedené na obr. 10, 12 a 14 dokládají, že fosforamidátové oligonukleotidy jsou mimořádně účinné při inhibici proliferace buněk BV173 leukémie, bez ohledu na koncentraci, při které se oligonukleotid podává.

Výsledky znázorněné na obr. 11, 13 a 15 dokládají, že fosforamidátové oligonukleotidy mají zanedbatelnou cytotoxicitu. V těchto experimentech je buněčná linie buď HL60, která neobsahuje žádná BCR/ABL zlomová místa, nebo K562, která obsahuje B3A2 BCR/ABL zlomová místa, co je částečně nehomologní k B2A2 BCR/ABL zlomovému místu.

Naproti tomu, pokud se provedou podobné experimenty za použití fosforthioátu 16-mer, oligonukleotidy nejsou účinné při inhibici proliferace buněk BV173 leukémie, pokud se podávají ve srovnatelných koncentracích k fosforamidátovému oligonukleotidu (obr. 16 a 18). Zvláště se zdá, že se buňky leukémie začínají vylučovat při inhibici fosforthioátem 16-mer v koncentraci přibližně 1,25/0,625/0,625, v porovnání k podobnému vylučování při projevující se inhibici, pokud se použije fosforamidát oligonukleotid v koncentraci 0,0196/0,0098/0,0098. Proto výsledky dokládají, že fosforamidát oligonukleotidy jsou účinné antimediátorové přípravky při značně nižších koncentracích, než široce používané fosfor-

thioát oligonukleotidy.

Kromě toho inhibiční křivky uváděné při zpracování s fosforamidát oligonukleotidem mají dolů směřující ohyb v pozdějších časových okamžicích, rovněž po částečném vyloučení inhibice (obr. 14). Naproti tomu inhibiční křivky uváděné při zpracování s fosforthioát oligonukleotidem mají příkrý vzestup ohybu v pozdějších časových okamžicích, po částečném vyloučení inhibice (obr. 18). Tyto výsledky naznačují, že vyloučeni inhibice je mnohem výraznější pro fosforthioát oligonukleotidy, v porovnání s fosforamidát oligonukleotidy.

Chybějící cytotoxicita fosforthioát 16-mer se dá srovnat s cytotoxicitou, která je zřejmá u fosforamidát oligonukleotidu, použitého při stejné koncentraci.

Výsledky uvedené výše potvrzují v buněčné kultuře vynikající jakost N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidů, doloženou hybridizačními studiemi popsanými výše. Tyto výsledky podporují vhodnost a účinnost N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidů v antimediátorové terapii a antigenové terapii in vivo.

Kromě toho výsledky dokládají, že N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy poskytují lepší antimediátorovou funkci in vitro než fosforthioát oligonukleotidy. Do dneška se modifikace fosforthioátové základní kostry v oligonukleotidech stala obvyklou pro antimediátorové aplikace. To představuje analogický předmět ve více než 95 % z přibližně 2500 publikací o antimediátorech, které byly zveřejněny v časopisech během roku 1993.

Velké rozmanitost testovacích systémů zahrnuje velký počet mRNA cílů. Antimediátorové fosforthioát oligonukleotidy jsou požadovány při koncentracích od 1 do 15 μM za účelem dosažení podstatných inhibičních účinků. Nicméně inhibiční aktivita při této úrovni je natolik dostatečná, že na US FDA začalo schvalovací řízení pro klinické testy pro tři choroby směřující ke třem rozdílným mRNA: CML (chronická myeloidní leukémie), IND #42974 a AML (akutní myeloidní leukémie) IND #40453 (Antiviral Agents Bulletin, sv. 5, č. 6, str. 161 až 162 (1992), ISSN 0897-9871, Biotechnology Information Institute), stejně jako B viru hepatitidy (HBV).

Údaje uvedené v příkladu 5 dokládají, že N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy jsou účinné antimediátorové přípravky, při mnohem nižších koncentracích než odpovídající fosforthioáty. Kromě toho N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy nemají zřejmou cytotoxicitu ani při nejvyšších použitých koncentracích, které jsou značně vyšší než koncentrace vyžadované pro antimediátorovou aktivitu. Výsledky ukazují, že N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy jsou vynikající přípravky pro terapeutické aplikace.

Účinky in vitro zvoleného fosforamidátového analogického oligonukleotidu se mohou potvrdit v systému in vivo. Takové systémy in vivo zahrnují dále uvedené systémy cíl-model, na které však nejsou omezeny: modely virová hepatitida - šimpanz nebo opice, modely c-myb, c-myc, BCR-ABL - SCID myš (například Ratajczak a kol.), NF-*k*B - myš (Higgins a kol.) a p120 - myš (Perlakey a kol.).

B. Antigenové aplikace

Inhibice exprese genu cestou tvorby trojšroubovice

byla již dříve demonstrována (Cooney a kol., 1989, Orson a kol., 1991, Postel a kol., 1991). Zvýšená stabilita trojšroubovicových struktur, vzniklých pokud se použije třetího řetězce fosforamidátových analogických oligonukleotidů, poskytuje silnější nástroj pro antigenové aplikace, včetně aplikací ve veterinární a humánní terapii.

Volba cílové oblasti je výběrově založena na známých řetězcích za použití normalizovaných pravidel pro přípravu trojšroubovice (Helene a Toulme, 1990). Obvykle je fosforamidátový analogický řetězec nukleové kyseliny zaměřen proti genetickým sekvencím s dvojitým řetězcem, ve kterých jeden řetězec obsahuje převládající puriny a jiný řetězec obsahuje převládající pyrimidiny.

Fosforamidátové analogické oligonukleotidy podle tohoto vynálezu se testují na tvorbu trojšroubovice proti zvoleným dvoušroubovicovým cílovým řetězcům za použití testů s posunem svazků (příklad 4). Obvykle se používá vysoké procento polyakrylamidových gelů pro analýzu posunu svazku a úroveň denaturizujících podmínek (Ausubel a kol., Sauer a kol., Sambrook a kol.) se upraví ke snížení jakéhokoli nespecifického prostředí pro vázání.

Cílová místa dvoušroubovic jsou značena (například za použití radioaktivního nukleotidu) a smíchána s třetím řetězcem oligonukleotidu, který je testován na svou schopnost vytvářet trojšroubovicové struktury s cílovou dvoušroubovicí. Posun mobility značeného dvoušroubovicového oligonukleotidu ukazuje schopnost oligonukleotidu tvořit trojšroubovicové struktury.

Tvorba trojšroubovice se ukáže při testu posunu pásu

poklesem mobility v gelu značené trojšroubovicové struktury, vzhledem k značené dvoušroubovicové struktuře.

Touto metodou se může ohodnotit počet potenciálních cílových míst včetně cílových míst vybraných z celého rozmezí DNA řetězců, stejně jako komplexnost. Specifické řetězce fosforamidátových analogických vázacích molekul jsou potenciálně silné terapeutické přípravky pro v podstatě jakoukoli chorobu nebo stav, který určitým způsobem zahrnuje DNA.

Exemplární cílové sekvence pro terapeutická prostředky zahrnují:

a) DNA řetězce zahrnuté do propagace a/nebo udržování infekčních prostředků, jako jsou bakterie, viry, kvasinky a jiné houby, například poškozující metabolismus infekčního přípravku a

b) řetězce způsobující nevhodnou expresi nebo proliferaci buněčných genů, jako jsou onkogeny, například blokující nebo snižující transkripci nevhodně exprimovaných buněčných genů (jako genů spojených s určitými genetickými chorobami).

Exprese nebo replikace genu se může blokovat vytvářením trojšroubovicových struktur v oblastech, ke kterým vyžadované regulační proteiny (nebo molekuly) jsou známé, aby se dosáhlo vázání (například HIV transkripce spojených faktorů jako iniciačních míst promotoru a SP1 vázacích míst, McShan a kol.). Podle jiného provedení mohou být stejně tak cílovými místy specifické řetězce v oblastech genů kódujících protein (například onkogeny).

Když se u fosforamidátového analogického oligonukleo-

tidu zjistí, že spojuje vybrané sekvenční testy dvoušroubovicové cílové řetězce, například testem gelové mobility pásového posuvu popsaným výše, analog je dále testován na svou schopnost tvořit stabilní trojšroubovicové struktury in vitro. Použije se buněčná kultura a testovací systémy in vivo, jako jsou popsány výše pod "antimediátorovými aplikacemi".

Cílová místa se mohou volit v řízené oblasti genů, například v transkripčním iniciačním místě nebo ve vázacích oblastech regulátorových proteinů (Helene a Toulme, 1990, Birg a kol., 1990, Postel a kol., 1991, Cooney a kol., 1988). Také cílová místa se mohou volit tak, že cíl také existuje v mRNA řetězcích (například transkribované řetězce), co dovoluje oligonukleotidům zaměřeným proti místu stejně tak fungovat jako antimediátory (viz výše).

Také fosforamidátem modifikované DNA molekuly se mohou používat k vytváření trojšroubovicových molekul s třetím řetězcem jako cílovým místem (například jednořetězcová nukleová kyselina). Například se může syntetizovat DNA molekula obsahující dvě oblasti schopné vytvářet trojšroubovicovou strukturu se zvoleným cílovým třetím řetězcem molekuly. Obvykle jsou vázány dvě oblasti prostřednictvím flexibilní oblasti, která dovoluje spojit dvě oblasti s třetím řetězcem za vzniku trojšroubovice. Příkladem takové DNA molekuly je T_{10}(plně fosforamidátem modifikovaná)-C_4(pantová oblast) -T_{10}(fosfodiesterové vazby). Tyto molekuly tvoří trojšroubovicové struktury s polyA RNA cílovými místy. Odpovídající DNA molekula obsahující T_{10}(fosfodiesterové vazby)-C_4(pantová oblast) -T_{10}(fosfodiesterové vazby) netvoří trojšroubovici s poly A RNA cílovým místem.

Pantové oblasti mohou zahrnovat libovolnou flexibilní vazbu, která udržuje oblasti vytvářející dvě trojšroubovice dohromady a nechává je spojit s třetím řetězcem za vzniku trojšroubovice. Třetí řetězcová cílová místa jsou vybrána tak, že mají vhodný obsah purinu/pyrimidinu v takovém rozsahu, že dovolují vytvoření trojšroubovicových molekul.

Flexibilní vazba může spojovat oblasti vytvářející dvě trojšroubovice (obvykle komplementární DNA řetězce) v jakékoli vybrané orientaci, v závislosti na povaze řetězce báze cílového místa. Například u oblasti vytvářející dvě trojšroubovice, z nichž každý má 5' a 3' konce, tyto konce se mohou spojit flexibilní pantovou oblastí s následujícími orientacemi: 5' k 3', 3' k 5', 3' k 3' a 5' k 5'.

Kromě toho dvoušroubovicové DNA molekuly obsahující alespoň jednu fosforamidátovou vazbu v každém řetězci se mohou použít jako návnadové (decoy) molekuly pro transkripční faktor nebo proteiny vázající DNA (například c-myb).

Jednořetězcová DNA se může také použít jako cílová nukleová kyselina pro oligonukleotidy podle tohoto vynálezu, za použití například fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby obsahující vlásenkové struktury (například obr. 6). Dva fosforamidátové analogické oligonukleotidy mohou být vybrány pro spojení směřující do cílového místa jednořetězcové DNA. Vázání dvou řetězců fosforamidátového analogu k cílovému místu jednořetězcové DNA má za výsledek vytvoření trojšroubovice.

C. Farmaceutické prostředky

Tento vynález zahrnuje farmaceutické prostředky, které

jsou použitelné pro antimediátorovou a antigenovou terapii. Prostředky obsahují účinné množství N3'——> P5' fosforamidát oligonukleotidů v kombinaci s farmaceuticky přijatelnou nosnou látkou. V libovolném daném prostředku může být zahrnut jeden nebo větší počet N3'——> P5' fosforamidát oligonukleotidů (které mají různé bázické řetězce).

N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy, které se používají při terapeutických aplikacích, se mohou zpracovávat čisté nebo za přídavku farmaceutické nosné látky. Farmaceuticky přijatelné nosné látky mohou být tuhé nebo kapalné. Prostředky se potom podávají v terapeuticky účinné dávce pacientovi, který to potřebuje.

Pro přípravu roztoků, emulzí, suspenzí a stlačených prostředků se mohou používat kapalné nosné látky. N3'——> P5' fosforamidát oligonukleotidy se rozpustí nebo suspendují ve farmaceuticky přijatelné kapalné nosné látce, jako je voda, organické rozpouštědlo nebo jejich směs, nebo ve farmaceuticky přijatelných olejích nebo tucích. Kapalná nosná látka může obsahovat jiné vhodné farmaceutické přísady včetně solubilizérů, suspenzačních činidel, emulgátorů, pufrů, zahušťovacích přípravků, barviv, regulátorů viskozity, konzervačních látek, stabilizátorů a regulátorů osmotického tlaku, na které však výčet není omezen. Vhodné příklady kapalných nosných látek pro parenterální podání prostředků s obsahem N3'——>P5' oligonukleotidů zahrnují vodu (částečně obsahující přísady, například deriváty celulózy, výhodně roztok natriumkarboxymethylcelulózy), alkoholy (včetně jednomocných a vícemocných alkoholů, jako například glykolů) a jejich derivátů a olejů (například frakcionovaného kokosového oleje a arašidového oleje).

Pro parenterální podání N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidů nosnou látkou může také být olejovitý ester, jako je ethyloleát a isopropylmyristát. Sterilní nosné látky jsou použitelné ve sterilních prostředcích v kapalné formě pro parenterální podání.

Sterilní kapalné farmaceutické prostředky, roztoky nebo suspenze se mohou používat například v intraperitoneálních injekcích, subkutánních injekcích, intravenózně nebo lokálně. Například antimediátorové oligonukleotidy zaměřené proti infekci způsobené retinálním cytomegalovirem se mohou také podávat lokálně jako oční kapky. N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy se mohou také podávat intravaskulárně nebo cestou vaskulárního stentu, který je napuštěn kyselinou mykofenolovou, například během balónové kateterizace, aby se dosáhlo lokalizovaných antirestenózových účinků bezprostředně po poranění.

Kapalnou nosnou látkou pro stlačené prostředky může být halogenovaný uhlovodík nebo jiný farmaceuticky přijatelný propelent. Takové stlačené prostředky mohou být také kapaliny enkapsulované pro uvolňování inhalací. Pro podání intranasální nebo intrabronchiální inhalací nebo insuflací se N3'——> P5' fosforamidát oligonukleotidy může zpracovávat na vodné nebo částečně vodné roztoky, které se potom mohou používat ve formě aerosolu, například pro ošetřování plicních infekcí, jako způsobených Pneumocystis carnii.

N3'——> P5' fosforamidát oligonukleotidy se mohou podávat lokálně, jako roztok, krém nebo lotion, které se získaly zpracováním farmaceuticky přijatelných vehikulí s aktivní látkou, například pro ošetřování bradavice na genitálu.

N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy se mohou podávat v liposomových nosných látkách. Použití liposomů k usnadnění celulární absorpce je popsáno například v US patentu č. 4 897 355 (D. Eppstein a kol., vydaném dne 30. ledna 1990) a č. 4 394 448 (F. Szoka a kol., vydaném dne 19. července 1983). Řada publikací popisuje prostředky a přípravu liposomů.

Dávky vyžadované pro ošetřování N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidem se mění podle zvláštních použitých prostředků, cesty podání, obtížnosti přítomných příznaků, formy N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidů a obzvláště pacienta, který je ošetřován.

Obecně N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy se podávají v koncentraci, která poskytuje účinné výsledky, aniž by byly příčinou nějakých škodlivých nebo zhoubných vedlejších účinků (například účinné množství). Taková koncentrace se může dosáhnout podáním buď jediné jednotkové dávky nebo podáním dávky rozdělené na obvyklé subjednotky ve vhodných intervalech během dne.

D. Diagnostické aplikace

Fosforamidátové analogické oligonukleotidy jsou také vhodné pro diagnostické testy ke stanovení RNA nebo DNA, obsahující daný cílový řetězec. Při jedné obecné aplikaci jsou fosforamidátové analogy značeny (například isotopicky nebo jinou detekovatelnou reportážní skupinou) a používány jako zkušební pro DNA nebo RNA vzorky, které jsou vázány na tuhé nosné látce (například nylonových membránách).

Podle jiného provedení fosforamidátové analogické oligonukleotidy mohou být vázány na tuhou nosnou látku (například na magnetické kuličky) a homologní RNA nebo DNA molekuly ve vzorku odděleném od jiných složek vzorku, co je založeno na jejich hybridizaci k imobilizovaným fosforamidátovým analogům. Vázání fosforamidátových analogů k tuhé nosné látce se může provádět obvyklými způsoby. Přítomnost vázané RNA nebo DNA se může stanovit normalizovanými metodami, například za použití druhé značené reportážní skupiny nebo reakce polymerázového řetězce (Mullis, Mullis a kol.).

Diagnostické testy se mohou provádět podle normalizovaných způsobů, s vhodnou úpravou hybridizačních podmínek, aby se nechal fosforamidátový analog hybridizovat do cílové oblasti. Schopnost fosforamidátových analogických oligonukleotidů vázat se při zvýšené teplotě může také pomoci minimalizovat kompetice pro vázání k cílovému řetězci mezi zkušebním vzorkem fosforamidátového analogu a jakýmkoli odpovídajícím jednořetězcovým fosfodiester oligonukleotidem, který je přítomen v diagnostickém vzorku.

E. Jiné aplikace

Podle jednoho znaku se fosforamidátový analogický oligonukleotid může použít při způsobech podle tohoto vynálezu ke zvýšení izolace RNA nebo DNA ze vzorků. Například jak je rozebráno výše, fosforamidátové analogy se mohou fixovat k tuhé nosné látce a používat k izolaci komplementárních řetězců nukleové kyseliny, například čištěním specifické mRNA z polyA frakce (Goldberg a kol.). Fosforamidátové analogy jsou výhodné pro takové aplikace, protože mohou podléhat stabilnějším interakcím s RNA a dvoušroubovicovou DNA než obvyklé fosfodiester oligonukleotidy.

F. Variace

Obměny na fosforamidátových analogických oligonukleotidech použitých při způsobech podle tohoto vynálezu zahrnují modifikace k usnadnění absorpce oligonukleotidu buňkou, například přidáním cholesterolové části (Letsinger, 1990), produkci chimérických oligonukleotidů za použití jiných vzájemných subjednotkových vazeb (Goodchild), modifikace s vloženými činidly, například trojšroubovicovými stabilizujícími činidly pro vložení (Wilson a kol., 1993) a použití ribózy na místo deoxyribózových subjednotek.

Další modifikace zahrnují modifikace na konci v poloze 5' a 3' k oligonukleotidům (například -OH, -OR, -NHR, NH_2 a zbytek cholesterolu). Kromě toho poloha 2' ribózy může být místem řady modifikací, včetně halogenace (například atom fluoru), na kterou výčet není omezen.

N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy se mohou také modifikovat konjugací k polypeptidu, který je absorbován specifickými buňkami. Takové vhodné polypeptidy zahrnují peptid, hormony, antigeny a protilátky. Například polypeptid se může vybrat tak, že je specificky absorbován neoplastickými buňkami, co má za výsledek specifické uvolňování N3'——> P5' fosforamidát oligonukleotidů do tohoto typu buněk. Polypeptid a oligonukleotid se mohou kondenzovat prostředky známými v oboru (viz například publikovaná PCT mezinárodní přihláška vynálezu PCT/US89/02363, WO 89/12110, zveřejněno dne 14. prosince 1989, K. Ramachandr a kol.).

Vlastnosti takových modifikovaných fosforamidátových analogických oligonukleotidů, pokud se aplikují způsoby podle

tohoto vynálezu, se mohou stanovit způsoby, které jsou zde popsány.

I když výhodná provedení, použití a způsoby provádění tohoto vynálezu budou popsány podrobně, je třeba vzít v úvahu, že rozličná jiná použití, prostředky a způsoby provedení, než jsou zde uvedeny, spadají do úvahy při provedení tohoto vynálezu.

Materiály a způsoby

Methyl- a kyanethylfosforamidáty a H-fosfátová nukleosidová reakční činidla se dají zakoupit od firmy Glen Research (Sterling, VA, USA) a Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA, USA). Nukleosidová methylfosforamidátová reakční činidla se dají zakoupit od firmy Glen Research a DMT-dT-LCAA CPG, 500 A (50 nm) se kupují od firmy Applied Biosystems Inc.

Pro enzymatickou hydrolýzu oligonukleotidů se 0,2 A_{260} jednotky zvoleného oligonukleotidu a 0,22 jednotky fosfodiesterázy od Crotalus durissus (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA) inkubuje ve 100 µl 10 mM Tris.HCl a 10 mM chloridu hořečnatého. Vzorky se odebírají pro analýzu za 0, 10 a 40 minut a za 4,5 a 22 hodiny po přidání fosfodiesterázy. Produkty se analyzují na reversní fázi vysoko účinnou kapalinovou chromatografií v podstatě jak je popsáno v příkladu 2D.

Chemii normálních nukleových kyselin včetně chemické syntézy nukleových kyselin v přehledu uvádí Miller (1990).

Chemické sloučeniny jsou nakoupeny od firmy Aldrich

(Milwaukee, WI, USA), Sigma (St. Luis, MO, USA) a Calbiochem (San Diego, CA, USA).

Vysoko účinná kapalinová chromatografie se obvykle provádí za použití chromatografu Dionex (Sunnyvale, CA, USA). Kolona "HYPERSIL ODS" (4,6 x 200 mm, velikost částic 5 µm, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) a 0,5% minutový gradient acetonitrilu v 0,05 M TEAH pufru, hodnota pH 7,0, se použije pro reversní fázi vysoko účinné kapalinové chromatografie. Pro iontoměničovou chromatografii se použije kolona Dionex "OMNI PAK" NA 100 (4 x 250 mm), za použití 1% minutového gradientu 1,5 M chloridu sodného ve vodě. "NAP 5" kolony od firmy Pharmacia (Uppsala, Švédsko) se použijí pro odsolení oligonukleotidů. Analýza kapilární elektroforézou (CE) se provádí v systému ABI 270A s 10% kapilárami MICROCEL^{TM} (0,1 x 500 mm) v 35 mM Tris-borátovém pufru, hodnota pH 9,0. Experimenty s tepelnou disociací se provádějí na Varian IE spektrofotometru a zařízení sledujícím teplotu. Hodnoty absorbance při vlnové délce 260 nm nebo 284 nm se dostanou v 1-minutových intervalech při zahřívání rychlostí 1,0 ^{o}C/min.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

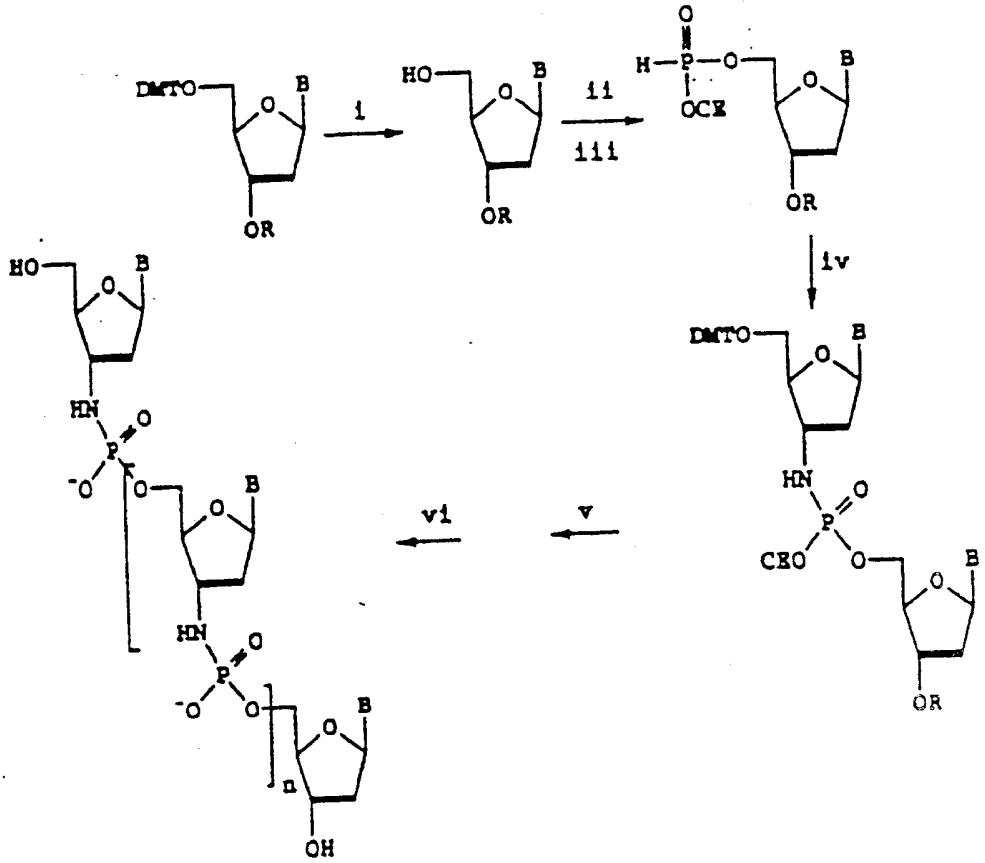
Způsob syntézy oligonukleotidů obsahujících oligodeoxyribonukleotid N3'——>P5' fosforamidáty

A. Obecné způsoby

Syntéza fosforamidátových analogů se provádí buď manuálně v injekční stříkačce nebo automaticky na ABI 384

syntetizéru (ABI, Foster City, CA, USA).

Schematické představení syntézy rovnoměrně modifikovaných oligonukleotidů na tuhém základě, za použití způsobu prodlužování krok za krokem, je znázorněno dále.



I) $CHCl_2COOH$

II) $ClP(NiPr_2)(OCE)$

III) TetrH, H_2O

IV) 5'-DMT-3'-NH_2-nukleosid, CCl_4, Et_3N

V) Opakování stupňů I až IV)

VI) NH_3, R-sukcinyl CPG

Ve výše uvedeném schématu R znamená sukcinyl CPG (sklo s regulovanými póry), B je báze, n představuje číslo od 4 až do 100 a CEO znamená β-kyanethylovou skupinu.

Pro daný cyklus chemických stupňů, reakčních činidel a reakčních dob se

i) detrityluje 3% kyselinou dichloroctovou v dichlormethanu po dobu 90 sekund (obr. 1, stupeň i)),

ii) fosforyluje 0,2M 2-kyanethyl-N,N-diisopropylchlorfosfinem a 0,2M diisopropylethylaminem v dichlormethanu po dobu 10 minut (obr. 1, stupeň ii)),

iii) hydrolýzuje 0,4M tetrazolem ve směsi acetonitrilu a vody v objemovém poměru 9:1 po dobu 5 minut (obr. 1, stupeň iii)),

iv) kondenzuje 0,2M 5'-DMT-3'-aminonukleosidem a 0,2M triethylaminem ve směsi chloridu uhličitého a acetonitrilu v objemovém poměru 1:1 po dobu 20 minut (obr. 1, stupeň iv)).

Normalizované oligonukleotidy obsahující fosfodiesterové vzájemné subjednotkové vazby se syntetizují běžnými způsoby (ABI 384 syntetizér).

Ke konstrukci chimérických oligomerů se použije 5'-DMT-N-chráněný 3'-fosforamidátový dimer vytvářející bloky, obsahující 3'-NHP(O)(OCE)O-5' fosforamidátovou internukleosidovou vázací skupinu, pro syntézu obvyklou fosforamidátovou metodou (v podstatě jak dříve popsal Gryaznov a kol., zde zahrnuto do dosavadního stavu techniky).

Exemplární oligonukleotidy syntetizované způsobem podle tohoto vynálezu jsou uvedeny na obr. 3. Další podrobnosti o syntéze se zde uvádějí dále.

B. Způsob manuální syntézy oligonukleotid N3'——>P5' fosforamidátů

Základ tvořený polymerem na skle s regulovanými póry (CPG), obsahující 1 μmol 5'-DMT-N-chráněného nukleosidu, se umístí do Hamiltonovy injekční stříkačky nepropustné pro plyn, o objemu 1 ml, která je vybavena ve své spodní části vrstvou skleněné vaty.

Pro daný cyklus syntézy se vnesou reakční činidla do injekční stříkačky a z ní se vytlačují podle tohoto pracovního předpisu:

1. Detritylace - 3% kyselina dichloroctová v dichlormethanu, 5 x 0,5 ml, 1,5 minuty.

2. Promytí - acetonitril, 6 x 0,5 ml.

3. Fosfitilace - 0,2 M 2-kyanethyl-N,N-diisopropylchlorfosfinu a 0,2 M diisopropylethylaminu v dichlormethanu, 0,5 ml, 10 minut s periodickým třepáním.

4. Hydrolýza - 0,4 M tetrazolu ve směsi acetonitrilu a vody v objemovém poměru 9:1, 5 minut s periodickým třepáním.

5. Promytí - bezvodý acetonitril, 10 x 0,5 ml.

6. Kondenzace - 0,2 M 5'-DMT-3'-chráněného nukleosidu a 0,2 M triethylaminu ve směsi chloridu uhličitého a acetonitrilu v objemovém poměru 1:1, 20 minut za třepání. Po kondenzaci se roztok zachytí k opětovnému získání nezreagovaného nukleosidu.

7. Promytí - acetonitril, 6 x 0,5 ml.

Stupně 1 až 7 se opakují, až se připraví požadovaný oligonukleotid. Průměrný výtěžek kondenzací činí 94 až 96 %, jak se soudí podle DMT-kationového testu. Po dosažení úplnosti cyklů se oligomer vázaný na nosič detrityluje. Odštěpení z nosiče a N-odstranění chránicí skupiny koncentrovaným hydroxidem amonným poskytne surové oligonukleotidy, které se čistí iontoměničovou vysoko účinnou kapalinovou chromatografií.

C. Způsob manuální syntézy oligonukleotidu 2 obsahujícího alternující N3'——>P5' fosforamidát O3'——>P5' fosfodiestertové vazby

5'-DMT-3'-aminothymidin a 5'-DMT-thymidin-3'-fosforamidátové subjednotky se použijí pro syntézu oligonukleotidů, které mají alternující N3'——>P5' fosforamidátové a O3'——> P5' fosfodiesterové vazby.

Pro syntézu oligonukleotidu 2 (SEQ ID č. 2) se umístí 1 μM T-CPG (thymidinu vázaného na CPG) do Hamiltonovy injekční stříkačky nepropustné pro plyn, o objemu 1 ml. Přidání 5'-DMT-3'-aminothymidonových subjednotek se provádí jak je popsáno výše. Přidání 5'-DMT-3'-fosforamidátových subjednotek se provádí normalizovanými postupy pro syntézu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Po deváté kondenzační reakci se polymerní nosič zpracuje s koncentrovaným hydroxidem amonným, aby se uvolnil surový oligomer. Oligonukleotid se čistí iontoměničovou vysoko účinnou kapalinovou chromatografií (například jako v příkladu 2). Oligonukleotid 2 se analyzuje kapilární elektroforézou a ^{31}P NMR spektrální analýzou (například jako v příkladu 2).

D. Způsob syntézy 5'-DMT-N-isobutyryl-3'-amino-2',3'-dideoxyguanosinu

Dále uvedené kroky popisují způsob syntézy 5'-DMT-N--isobutyryl-3'-amino-2',3'-dideoxyguanosinu analogickým způsobem, jako je zde popsán pro adenosinové subjednotky.

1. Způsob přípravy 5'-O-benzoyl-N-isobutyryl-2'-deoxyguanosinu

Tato sloučenina se připraví z N-isobutyryl-2'-deoxyguanosinu v podstatě způsobem jak popsal Nishino a kol. (1986), přičemž tento způsob se zde zahrnuje do dosavadního stavu techniky. Rozdíl proti popsanému způsobu spočívá v tom, že se produkt čistí dále uvedeným způsobem s tím, že se rozdělí mezi dichlormethan a vodu, dichlormethanová vrstva se odpaří za sníženého tlaku a produkt se krystaluje s etherem. Připravovaná látka se získá filtrací, míchá se přes noc s čerstvým etherem a znovu zachytí filtrací. Celkový výtěžek 5'-O-benzoyl-N-isobutyryl-2'-deoxyguanosinu činí 50 až 80 %.

2. Způsob přípravy 5'-O-Benzoyl-N-isobutyryl-2'-deoxyxyloguanosinu

Tato sloučenina se připraví z 5'-O-benzoyl-N-isobutyryl-2'-deoxyguanosinu v podstatě způsobem, který popsali Herdewijn a van Aerschot (1989), přičemž tento způsob se zahrnuje do dosavadního stavu techniky. Produkt se čistí vysušením surové směsi za sníženého tlaku a potom rozpuštěním v dichlormethanu. Připravovaný 5'-O-benzoyl-N-isobutyryl-2'--deoxyxyloguanosin se spontánně vysráží a dostane se filtrací.

3. Způsob přípravy 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-benzoyl--N-isobutyryl-2'-deoxyxyloguanosinu

7,3 g suchého 3'-O-benzoyl-N-isobutyryl-2'-deoxyxyloguanosinu a 7,9 g 4,4'-dimethoxytritylchloridu se rozpustí ve 150 ml bezvodého pyridinu. Směs se ponechá po dobu 24 hodin a potom se ke směsi přidá 1 ml vody. Reakční směs se poté odpaří za sníženého tlaku na pěnu, která obsahuje připravovaný 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-benzoyl-N-isobutyryl--2'-deoxyxyloguanosin. Pěna se rozpustí ve 300 ml dichlormethanu, promyje 250 ml vody a znovu odpaří za sníženého tlaku.

4. Způsob přípravy 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N-isobutyryl--2'-deoxyxyloguanosinu

Surový 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-benzoyl-N--isobutyryl-2'-deoxyxyloguanosin se rozpustí v 1,2 litru směsi dioxanu, methanolu a vody v poměru 5:4:1 a ochladí na ledové lázni. K této směsi se přidá 120 ml 2-normálního roztoku hydroxidu sodného. Výsledná směs se míchá za teploty 0 ^{o}C po dobu 25 minut a potom neutralizuje iontoměničovou pryskyřicí Dowex 50 v H^{+} formě. Po 2 až 3 minutách se pryskyřice odfiltruje a látka se odpaří na suspenzi za sníženého tlaku. Bílá sraženina v suspenzi (5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N-isobutyryl-2'-deoxyxyloguanosin) se odfiltruje, promyje vodou, suší na vzduchu a vysuší za sníženého tlaku nad oxidem fosforečným.

5. Způsob přípravy 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-amino-N--isobutyryl-2',3'-dideoxyguanosinu

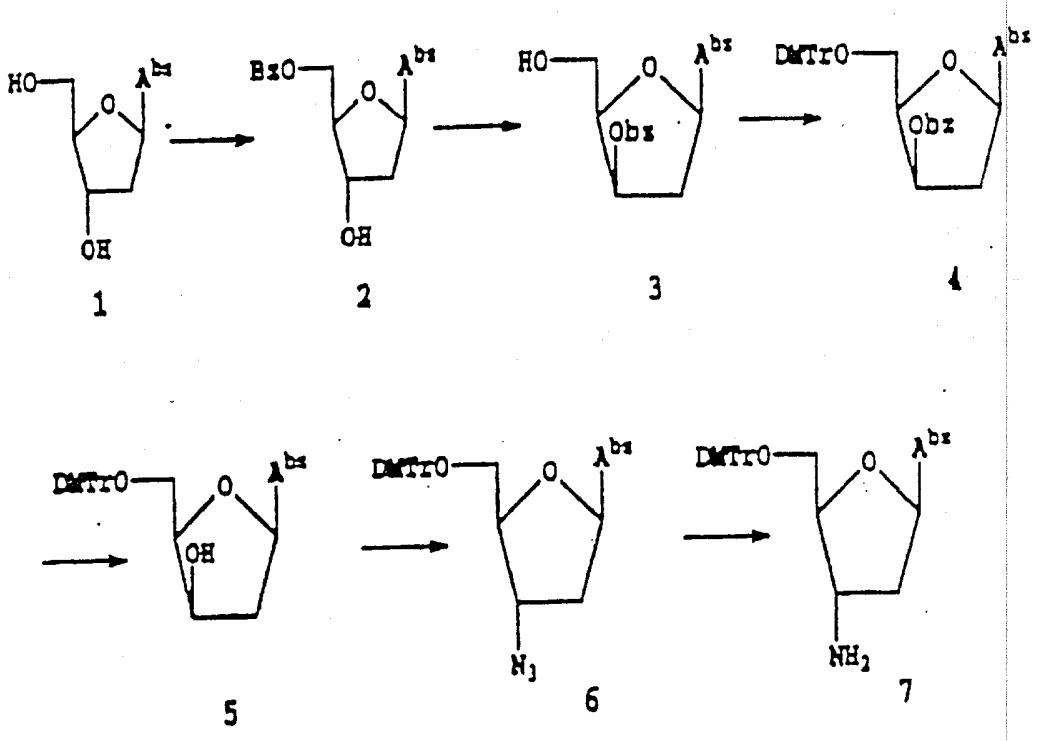
K surovému 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N-isobutyryl--2'-deoxyxyloguanosinu se přidá 7,9 g trifenylfosfinu a 4,8 g nitridu lithia. Směs se dále suší za sníženého tlaku nad oxidem fosforečným po dobu 3 hodin. Získaná suchá sloučenina se rozpustí ve 450 ml bezvodého dimethylformamidu. Ke vzniklému roztoku se přidá 5,3 ml diethyl-azodikarboxylátu. Reakční směs se míchá přes noc, poté se k ní přidá 1 ml vody a rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku.

K suché směsi se přidá 1 litr dichlormethanu a výsledná směs se dvakrát promyje vždy 1 litrem vody. Dichlormethanová vrstva se odpaří za sníženého tlaku na světle hnědý olej, který se potom rozpustí v 600 ml 10% triethylaminu v pyridinu. Tato směs se ochladí na ledové lázni a probublává sirovodíkem. Po 30 minutách se ledová lázeň odstraní a v zavádění proudu sirovodíku se pokračuje další 3 hodiny. Roztok se odpaří za sníženého tlaku na světle hnědý olej.

Velmi rychlá chromatografie oleje na koloně naplněné silikagelem, předem zpracovaným 0,5% pyridinem v dichlormethanu a potom gradientové eluování 0 až 5% methanolem v dichlormethanu, poskytne 3,5 g 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)--3'-amino-N-isobutyryl-2',3'-dideoxyguanosinu (obr. 1C).

E. Způsob přípravy 5'-DMT-N-benzoyl-3'-amino-2',3'-dideoxyadenosinu

Stupně syntézy 3'-amino-N^6-5'-dimethoxytrityl-2',3'--dideoxyadenosinu jsou ilustrovány dále.



1. Způsob přípravy N^6-5'-dibenzoyl-2'-deoxyadenosinu

Roztok 2,45 ml (21 mmol) benzoylchloridu ve 150 ml pyridinu se přikape k roztoku 5 g (14 mmol) N^6-benzoyl-2'--deoxyadenosinu (sloučenina 1, obr. 20) ve 45 ml pyridinu za teploty místnosti během přibližně 1 hodiny. Reakční směs se míchá za teploty místnosti po dobu zhruba 1 hodiny. Reakce se ukončí uvedením reakční směsi do styku s 5 ml methanolu a potom se směs odpaří dosucha.

Odparek se rozpustí v dichlormethanu a potom promyje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou. Organická vrstva se poté vysuší síranem sodným a odpaří dosucha. Tento odparek se rozpustí v dichlormethanu a podrobí sloupcové chromatografii (200 g silikagelu o rozměru částic 0,182 až 0,066 mm, při eluování 5% methanolem v dichlormethanu) a rozpouštědlo se odpaří. Dostane se 6 g požadovaného N^6-5'-dibenzoyl-2'-deoxyadenosinu (sloučenina 2, obr. 20).

Výtěžek odpovídá 93 %.

2. Způsob přípravy N^6-benzoyl-9-(3'-O-benzoyl-2'-deoxy-β-D--threo-pentofuranosyl)adeninu

4,2 ml (25 mmol) anhydridu kyseliny trifluormethansulfonové se přidá k suspenzi 7,5 g (16,3 mmol) N^6-5'--benzoyl-2'-deoxyadeninu ve 150 ml 10% pyridinu v dichlormethanu za teploty 0 °C. Reakční směs se míchá za teploty 0 °C po dobu 30 minut a potom se přidá 26 ml vody. Reakční směs se poté míchá za teploty místnosti přes noc a odpaří dosucha.

Odparek se znovu rozpustí v dichlormethanu, promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a poté vodou a vysuší síranem sodným. Organická vrstva se odpaří dosucha a dostane se hnědý olej, který obsahuje N^6-benzoyl-9--(3'-O-benzoyl-2'-deoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)adenin (sloučenina 3, obr. 20). Tato sloučenina se použije bez dalšího čištění.

3. Způsob přípravy N^6-benzoyl-9-(3'-O-benzoyl-5'-dimethoxytrityl-2'-deoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)adeninu

N^6-Benzoyl-9-(3'-O-benzoyl-2'-deoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)adenin se rozpustí v 60 ml pyridinu. Dimethotytritylchlorid se míchá za teploty místnosti přes noc. Reakce se přeruší přidáním methanolu a směs se odpaří dosucha. Odparek se znovu rozpustí v dichlormethanu, promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou, vysuší síranem sodným a odpaří. Odparek se rozpustí v dichlormethanu a podrobí sloupcové chromatografii (na 400 g silikagelu o rozměru částic 0,182 až 0,066 mm, při eluování 4% methanolem v dichlormethanu). Požadované frakce obsahující

připravovaný N^6-benzoyl-9-(3'-O-benzoyl-5'-dimethoxytrityl--2'-deoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)adenin (sloučenina 4, obr. 20) se zachytí a odpaří dosucha. Výtěžek sloučeniny odpovídá 7 g (56 % z N^6-5'-dibenzoyl-2'-deoxyadenosinu).

4. Způsob přípravy N^6-benzoyl-9-(5'-O-dimethoxytrityl-2'--deoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)adeninu

40 ml 2-molárního roztoku hydroxidu sodného se přidá k roztoku 7 g (9,2 mmol) N^6-benzoyl-9-(3'-O-benzoyl-5'-dimethoxytrityl-2'-deoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)adeninu ve směsi 200 ml p-dioxanu, 160 ml methanolu a 40 ml vody za teploty 0 °C. Reakční směs se míchá za teploty 0 °C po dobu 25 minut a reakce se potom ukončí přidáním iontoměničové pryskyřice Dowex 50 x 2-100 v pyridiniové formě, k neutralizaci roztoku na hodnotu pH 7. Tuhá látka se odfiltruje a rozpouštědlo se odpaří dosucha.

Odparek se rozpustí v dichlormethanu, promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vysuší síranem sodným a odpaří dosucha. Dostane se světle žlutá tuhá látka, která obsahuje N^6-benzoyl-9-(5-O-dimethoxytrityl-2'--deoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)adeninovou sloučeninu (sloučenina 5, obr. 20). Tato sloučenina se použije bez dalšího čištění. Výtěžek produktu z tohoto stupně činí 6 g, co odpovídá 99 %.

5. Způsob přípravy 3'-amino-N^6-benzoyl-5'-dimethoxytrityl--2',3'-dideoxyadenosinu

1,42 ml (9 mmol) diethyl-azodikarboxylátu se přidá k suspenzi 2 g (3 mmol) N^6-benzoyl-9-(5-O-dimethoxytrityl-2'--deoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)adeninu ve 40 ml dimethyl-

formamidu. Suspenze dále obsahuje 2,4 g (9 mmol) trifenylfosfinu a 4,1 g (83,8 mmol) nitridu lithia. Reakční směs se míchá za teploty místnosti a odpaří dosucha. Odparek se rozpustí v dichlormethanu, promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou, vysuší síranem sodným a odpaří, aby se dostal hnědý olej. Tento hnědý olej se rozpustí v dichlormethanu a podrobí sloupcové chromatografii (na 100 g silikagelu o rozměru částic 0,182 až 0,066 mm), při eluování 3% methanolem v dichlormethanu. Tak se dostane sloučenina 6 (obr. 20), která má formu světle hnědého oleje.

Tento olej se rozpustí v 36 ml 15% triethylaminu v pyridinu. Roztokem se za teploty 0 ^{o}C probublává sirovodík po dobu 30 minut. Roztok se míchá za teploty místnosti dalších 30 minut a potom se rozpouštědlo odpaří dosucha. Odparek se rozpustí v dichlormethanu, promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou, vysuší síranem sodným a odpaří dosucha. Odparek se rozpustí v dichlormethanu a podrobí sloupcové chromatografii (na 100 g silikagelu o rozměru o rozměru částic 0,182 až 0,066 mm), při eluování 5% methanolem v dichlormethanu. Tak se dostane konečný produkt, 3'-amino-N^6-5'-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyadenosin (sloučenina 7, obr. 20, vzorec 1e). Výtěžek sloučeniny z předcházejícího stupně činí 1,6 g. Výtěžek odpovídá 80 %. Podle jiného provedení se redukce může provést za použití vodíku v přítomnosti palladia na uhlí jako katalyzátoru.

F. Způsob syntézy jiných DMT-subjednotek

Syntéza 5'-DMT-3'aminothymidinu a 5'-DMT-N-benzoyl-3'-aminocytidinu se provádí podle způsobu, který popsal Glinski a kol. (1970).

Příklad 2

Charakterizace oligonukleotidů obsahujících N3'——>P5' fosforamidátové vazby

Oligonukleotidy syntetizované jak je popsáno v příkladu 1 se hodnotí podle metod, které se uvádějí dále.

A. Čištění iontoměničovou chromatografií

Oligonukleotidy se vyčistí od přebytku reakčních složek iontoměničovou vysoko účinnou kapalinovou chromatografií. Tato analýza iontoměničovou vysoko účinnou kapalinovou chromatografií se provádí na chromatografu Dionex (Sunnyvale, CA, USA). Použije se kolona Dionex "OMNIPAC NA100", 4 x 250 mm, při gradientovém eluování 1%/min nebo 2%/min 1,0M chloridu sodného v 0,03 M TEAA pufru, hodnota pH 7,0, při průtokové rychlosti 1,0 ml/min.

Obr. 4A představuje příkladný chromatogram reakční směsi, pořízený vysoko účinnou kapalinovou chromatografií, po syntéze fosforamidát oligonukleotidu 3 (obr. 3). Největší pík na obr. odpovídá produkovanému oligonukleotidu 3. Doba retence 3'- NHP(O)(O')O-5' fosforamidátů při iontoměničové vysoko účinné kapalinové chromatografii v koloně je o 1,0 až 1,5 minuty kratší než doba retence pro odpovídající fosfodiesterové sloučeniny. Připravená sloučenina se potom vysráží ethanolem a znovu suspenduje ve vodě.

B. Čistota oligonukleotidů

Čistota syntetizovaných oligonukleotidů se obvykle

hodnotí kapilární gelovou elektroforézou. Kapilární elektroforéza se provádí za použití přístroje Applied Biosystems Incorporated Model 270A v kapilární zkumavce "MICKROGEL", v podstatě podle návodu výrobce.

Obr. 4B představuje příkladný profil kapilární gelové elektroforézy reakční směsi po syntéze undekafosforamidátu 6 (obr. 3).

Podle jiného provedení se čistota izolovaných oligonukleotidů hodnotí elektroforézním dělením vzorků při vysokém procentuálním obsahu polyakrylamidových gelů, například 20 % akrylamidu, 5 % bis-akrylamidu (Ausbel a kol., Maniatis a kol.). Oligonukleotidy se vizualizují obarvením ethidiumbromidem a vystavením ultrafialovému záření. Relativní mobility polyakrylamidových gelů po dělení 3'-NHP(O)(O⁻)O-5' fosforamidátů elektroforézou jsou o 10 až 15 % nižší než u odpovídajících fosfodiesterových sloučenin.

C. Analýza jadernou magnetickou resonancí

NMR spektra se zaznamenávají pomocí spektrometru Varian XL-400 (Varian Associates, Palo Alto, CA, USA) při vlnové délce 162 MHz pro ^{31}P s 85% kyselinou fosforečnou v D_2O jako vnějším standardem a při vlnové délce 400 MHz pro ^{1}H spektra s tetramethylsilanem (TMS) jako vnějším standardem.

Příkladné výsledky jsou uvedeny na obr. 4C, kde je znázorněno ^{31}P NMR spektrum vyčištěného dekafosforamidát oligonukleotidu 3 (obr 3). Spektrum uvádí pík při δ ppm 7,12, který je charakteristický pro fosforamidátové skupiny.

D. Analýza hydrolýzovaných produktů vysoko účinnou kapalinovou chromatografií s reversní fází

Vyčištěný fosforamidát 10-mer oligonukleotid 3 (obr. 3) se hydrolýzuje zpracováním s 80% kyselinou octovou po dobu 48 hodin za teploty 25 °C. Hydrolýzované produkty se hodnotí na základně vysoko účinné kapalinové chromatografie prováděné na reversní fázi (RP HPLC). Analýza vysoko účinnou kapalinovou chromatografií s reversní fázi se provádí za použití chromatografu Dionex na "HYPERSIL ODS" 5 μ, na koloně rozměrů 4,6 x 200 mm, od výrobce Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA), za použití 1%/min gradientu acetonitrilu v 0,03 M TEAA pufru, hodnota pH 7,0, průtoková rychlost 1 ml/min. Hydrolýzované produkty se rozpoznají jako kyselina 3'-amino-5'--thymidilová, kyselina 5'-thymidilová a 3'-aminothymidin. Kromě toho přibližně 7 % hydrolýzovaných produktů (celkové píky) jsou minoritní vedlejší produkty. Tyto výsledky potvrzují přítomnost N3'——>P5' fosforamidátových vazeb v oligonukleotidu.

Příklad 3

Tepelná disociace

A. Teplota tání dvoušroubovice

Křivky tepelné disociace se dostanou za použití spektrofotometru Carry 1E (Varian, Palo Alto, CA, USA), který je vybaven prvkem k řízení teploty (Varian). Reakční roztoky obsahující ekvivalentní koncentrace oligomeru a složek (přibližně 6 μM v oligomerním řetězci) v 15 mM fosfátového pufru při hodnotě pH 7,05, s přidaným chloridem sodným, poskytnou celkovou koncentraci Na^+ 100 mM.

Koeficienty molární extinkce, použité pro oligo(dT), poly(dA) a poly(A), činí 8,2, 8,4 a 10,2 A_{260} x 10^3. Koeficient extinkce 109 A_{260} jednotek/μM se použije pro oligomery smíšené báze, přičemž koeficient extinkce se vypočítá z tabulky, kterou sestavil P. N. Borer (1975).

Reakční roztoky se ekvilibrují za teploty 0 °C a sleduje se absorbance při vlnové délce 260 nm, jak se v zařízení zvyšuje teplota o 3 °C za 5 minut. Frakce oligomeru ve vázaném stavu, α, při dané teplotě se určí za použití horních a spodních základních čar, jak popisuje Abergo a kol. (1981). Hodnoty T_m jsou definovány jako teploty, při kterých α je rovno 0,5. Vymezení Ink (Marky a kol., 1987) proti 1/T jsou lineární pro tyto sloučeniny.

Výsledky studií denaturace teplem jsou také vyneseny jako normalizovaná absorbance při vlnové délce 260 nm proti teplotě ve stupních celsia. Obr. 5A a 5B zobrazují příkladné křivky tání pro dvoušroubovice vytvořené fosfodiesterovými a fosforamidátovými oligomery. Na těchto obrázcích (A), (C) a (B), (D) odpovídají obr. 3, experimenty 8 a 9, za použití fosfodiester oligonukleotidu 4) a obr. 3, experimenty 13 a 14, za použití fosforamidát oligonukleotidu 6.

Hodnoty tepelné stability jsou shrnuty na obr. 3 /T_m (°C)/. V tabulce T_m znamená teplotu ve vrcholu křivky tání a np je zkratka pro 3'-NHP(O)(O⁻)O-5' fosforamidátovou vazbu.

Koncentrace oligonukleotidů jsou obvykle při 5 μM oligomerního řetězce. Pro studie tepelné stability dvoušroubovic se používá pufru A (10 mM Tris HCl, 150 mM chloridu sodného, hodnota pH 7,02).

B. Oligonukleotidové vlásenkové struktury

Stabilita dvoušroubovic vytvořených oligonukleotidy obsahujícími fosforamidátové vazby v obou komplementárních řetězcích se hodnotí v podstatě jak je popsáno výše. Syntetizují se chimérické fosforamidát fosfodiester vlásenkové struktury oligomerů fosfodiesteru uvedených na obr. 6.

Všechny molekuly uvedené na obr. 6 jsou konstruovány za použití 2'-deoxyribonukleotidů.

Experimenty s tepelnou disociací se provádějí v podstatě jak je popsáno výše s tím rozdílem, že se použijí tyto reakční podmínky: 10 mM Tris HCl pufru, hodnota pH 7,02, při koncentraci oligonukleotidu 2,5 μM.

Hodnoty T_m získané z těchto experimentů jsou shrnuty na obr. 6.

C. Teplota tání trojšroubovic

Tepelná stabilita trojšroubovic se hodnotí v podstatě jak je popsáno svrchu pro dvoušroubovice. Použije se pufrovaných stavů, buď jak jsou popsány výše (pufr A) nebo se použije druhý pufr, kterým je pufr B (10 mM Tris HCl, 150 mM chloridu sodného a 10 mM chloridu hořečnatého, hodnota pH 7,02).

Obr. 7A až 7D představují příkladné křivky tání trojšroubovic. Obr. 7A a 7C představují normalizovanou absorbanci při vlnové délce 260 nm, vynesenou proti teplotě.

Obr. 7B a 7D představují normalizovanou absorbanci při vlnové délce 284 nm, vynesenou proti teplotě. Na těchto obrázcích trojšroubovice, které jsou vytvořené DNA s dvojitým řetězcem a fosforamidát oligonukleotidem 3, odpovídají čáře proložené černými kroužky a trojšroubovice vytvořené s fosfodiester oligonukleotidem 1 odpovídají čáře proložené nevybarvenými čtverečky.

Údaje korespondují s obr. 3, experiment 7, kde křivky (A) a (C) jsou studie tepelné stability prováděné za použití pufrů A a B, s hyperchromicitou sledovanou při vlnové délce 260 nm. Křivky (B) a (D) jsou shodné s (A) a (C) s tím rozdílem, že se hyperchromicita sleduje při vlnové délce 284 nm.

Údaje ukázané na obr. 7A až 7D ukazují, že fosfodiester oligonukleotid 1 není ve formě trojšroubovic se stejnými cílovými oblastmi DNA s dvojitým řetězcem, jako tvoří fosforamidát oligonukleotid 3.

Příklad 4

Test posuvu mobility gelového pásu

Trojšroubovicové struktury se dále hodnotí za použití testů posuvu mobility gelového pásu.

A. Fosforamidát oligonukleotid 3

Podmínky pro test posuvu mobility gelového pásu jsou tyto: 20% akrylamid, 5 % bis-akrylamidu v 10 mM chloridu hořečnatého, 80 mM tris-borátového pufru, hodnota pH 8,2, teplota 10 ^{o}C. Gely se obvykle zkoušejí za nativních

(nedenaturujících) podmínek. Příkladné výsledky testů takového posuvu mobility gelového pásu jsou uvedeny na obr. 8. Na zmíněném obrázku mají pruhy tyto významy:

1 10-mer fosfodiester oligonukleotid 1,

2 10-mer fosforamidát oligonukleotid 3,

3 24-mer vláseknová struktura cílové oblasti $d(A_{10}C_4T_{10})$ (obr. 3, experiment 7), přičemž v obdélníku 3 pomalu pohybující se minoritní pás pravděpodobně odpovídá bi-molekulární dvoušroubovici $d(A_{10}C_4T_{10})$,

4 vláseknová struktura cílové oblasti a oligonukleotid 1,

5 vláseknová struktura cílové oblasti a oligonukleotid 3.

Gel se barví barvivem STAINS-ALL^{TM} (Kodak, Rochester, NY, USA) a zobrazuje pomocí denzitometru Molecular Dynamics Densitometer (Sunnyvale, CA, USA). Účinnost barvení fosforamidát oligonukleotidu 3 je odlišná od fosfodiesterových sloučenin (oligonukleotid 1 a dvoušroubovice).

Na obrázku mobilita trojšroubovicové struktury je znázorněna šipkou. Jak může být zřejmé z výsledků uvedených na obrázku, výsledky testu posuvu mobility gelového pásu potvrzují výsledky získané ze studií tepelné denaturace, to znamená, že oligonukleotid 1 zeslabuje vznik trojšroubovice se stejnou cílovou oblastí, jako má oligonukleotid 3.

B. Fosforamidát oligonukleotid 6

Příprava trojšroubovice fosforamidát oligonukleotidu 6 analogické s cílovou oblastí DNA s dvojitým řetězcem je také potvrzena testem posuvu mobility gelového pásu.

Podmínky pro test posuvu mobility gelového pásu jsou v podstatě stejné, jako jsou popsány výše. Výsledky analýzy

jsou uvedeny na obr. 9. Na tomto obrázku mají pruhy tyto významy:

1 11-mer fosfodiester oligonukleotid 4,
2 11-mer fosforamidát oligonukleotid 6,
3 26-mer vláseknová struktura cílové oblasti (SEQ ID č. 22),
4 vláseknová struktura cílové oblasti a oligonukleotid 4,
5 vláseknová struktura cílové oblasti a oligonukleotid 6.

Na obrázku mobilita trojšroubovicové struktury je znázorněna šipkou. Jak je zřejmé výše, fosfodiester oligonukleotid 4 zeslabuje vznik trojšroubovice se stejnou cílovou oblastí, jako má oligonukleotid 6.

Příklad 5

Hodnocení fosforamidátových analogů in vitro

Syntetizovaly se antimediátorové oligonukleotidy obsahující N3'——>P5' fosforamidátovou vazbu, které jsou komplementární k BCR/ABL kondenzačnímu spojení (B2A2) v linii BV 173 leukemických buněk. Při následujícím testu se měří proliferace leukemických buněk a to se provádí způsobem, jak v podstatě popsal Anfossi a kol. (1989).

Uvedeno zkráceně, obr. 10 ilustruje účinnost BCR-ABL oligomerů na proliferaci leukemických buněk z linie BV173, nesoucí zlomová místa typu B2A2. BV173 je linie leukemických buněk s B2A2 BCR/ABL kondenzačním spojením (Pegoraro a kol., 1983). HL60 je linie promyelocytových leukemických buněk s normálním c-abl místem (Collins a kol., 1977). K562 je linie leukemických buněk s B3A2 BCR/ABL kondenzačním spojením (Seelig a kol., 1993).

Buňky (5×10^4) se umístí do 0,2 ml kapalné suspenze kultury (Dulbeccovo modifikované prostředí upravené podle Iscove, s 2% lidským AB serem, získáno od Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA).

Oligonukleotidy se přidávají ke kulturám v intervalu 24 hodin po dobu 3 dnů (dny 0, 1 a 2), aby se dosáhlo přírůstkových koncentrací, znázorněných v legendě k obr. 10 až 19 (všechny koncentrace jsou uvedeny v µg/ml), například podle obr. 10: 40/20/20, 20/10/10, 10/5/5 a 5/2,5/2,5. Je třeba poznamenat, že například 40/20/20 odráží konečnou celkovou koncentraci 80 µg/ml v buněčném prostředí po posledním přidání oligonukleotidu. Počítání buněk se provádí normalizovanými způsoby.

Obr. 10 ukazuje výsledky testu za použití plně modifikovaného N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidu 6 (SEQ ID č. 6) při koncentracích znázorněných v legendě k obrázku. Buňky v cílové oblasti jsou buňky BV173. Výsledky dokládají, že fosforamidát oligonukleotid je mimořádně účinný při inhibici růstu leukemických buněk, rovněž při nejnižších použitých koncentracích.

Obr. 11 ukazuje výsledky zpracování buněk HL60, ne-BRC/ABL exprimující buněčné linie, s oligonukleotidem 6. Výsledky dokládají, že buňkami jsou dobře snášeny všechny koncentrace oligonukleotidu. Přitom není zřejmá žádná cytotoxicita.

Obr. 12 a 13 ukazují výsledky podobných experimentů, jako jsou výsledky uvedené na obr. 10 a 11. Rovněž při nejnižší koncentraci (0,3125/0,15625/0,15625) je N3'——>P5'

fosforamidát oligonukleotid 6 mimořádně účinný pro inhibici proliferace leukemických buněk (obr. 12), i když se udržuje nepatrná toxicita (obr. 13).

Obr. 14 a 15 ukazují výsledky podobných experimentů, jako jsou výsledky uvedené na obr. 10 a 11. Avšak při experimentu odpovídajícím hodnotám uvedeným na obr. 15 je cílovou oblastí buňka K562, která obsahuje B3A2 BCR/ABL kondenzační spojení. Na údajích z experimentu uvedeného na obr. 14 jsou zřejmé změny koncentrace projevující se na účinnosti N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidu 6 v kultuře. Zvláště při koncentraci 0,0198/0,0098/0,0098 může být zřejmé, že s oligonukleotidem 6 nastává určité uvolnění inhibice proliferace.

Kromě toho údaje uvedené na obr. 15 dokládají, že fosforamidát oligonukleotid 6 nemá v podstatě žádný účinek na proliferaci buněk K562, které mají B3A2 kondenzační spojení. Tyto výsledky dokládají, že antiproliferační účinek je specificky spojen s B2A2 BCR/ABL kondenzačním spojením, ke kterému je fosforamidátový oligonukleotid 6 komplementární.

V porovnání k tomu, obr. 16 až 19 uvádějí podobné hodnoty pro 16-mer (SEQ ID č. 26), které obsahují plně modifikované fosforthioátové vzájemné subjednotkové vazby. Obr. 16 ukazuje výsledky testu za použití plně modifikované fosforthioátové 16-mer (SEQ ID č. 26) při koncentracích uvedených v legendě na obrázku, kde cílová buněčná linie je BV173. Výsledky jsou podobné jako výsledky ukazující se s oligonukleotidem 6 (obr. 10), ale hodnoty dokládají, že fosforthioát oligonukleotid není tak účinný jako oligonukleotid 6 při inhibici růstu leukemických buněk.

Obr. 17 znázorňuje výsledky zpracování BV173 BRC/ABL buněčné linie s 16-mer fosforthioát oligonukleotidem (SEQ ID č. 27), obsahujícím komplementární řetězce k B3A2 BCR/ABL kondenzačnímu spojení: B3A2 má 2 páry bází s chybným spárováním řetězců k B2A2 BCR/ABL kondenzačnímu spojení. Výsledky dokládají, že při všech koncentracích je oligonukleotid snášen buňkami.

Obr. 18 a 19 ukazují výsledky podobných experimentů, jako poskytují výsledky uvedené na obr. 16 a 17. U hodnot z těchto experimentů se zdá, že uvolnění inhibice buněčné proliferace nastává při mnohem nižších koncentracích fosforthioát oligonukleotidu, než se ukazuje pro N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotid 6.

Tyto výsledky dokládají in vitro, že N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy jsou účinné antimediátorové sloučeniny při nízkých koncentracích. Kromě toho N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy jsou lepší antimediátorové přípravky než fosforthioát oligonukleotidy.

Příklad 6

Antimediátorová inhibice s c-myc

N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidy komplementární k lidské c-myc mRNA se také použijí k inhibici c-myc genové exprese a účinnost N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidu se porovná s fosforthioát oligonukleotidy. Buňky HL60 se inkubují s jedním z těchto c-myc oligonukleotidů:

SEQ ID č. 28 TTTCATTGTT TTCCA (antimediátor)
SEQ ID č. 29 TTTCTATTGT TTCCA (negativní kontrola,

chybně spárováno)
SEQ ID č. 30 AACGTTGAGG GGCAT (antimediátor, druhý exon)
SEQ ID č. 31 AACGAGTTGG GGCAT (negativní kontrola, chybně spárováno)
SEQ ID č. 32 UUUCAUUGUU UUCCA (antimediátor, T nahrazeno U)

Všechny internukleotidové vazby c-myc oligonukleotidů jsou N3'——>P5' fosforamidátové vazby, pokud není uvedeno jinak. Poté, co se každý typ c-myc oligonukleotidu jednotlivě inkubuje při uvedených koncentracích po dobu 72 hodin v kultuře buněk HL60, buňky se testují buď na proliferaci mikroskopickou technikou známou v oboru nebo pro c-myc expresi westernovým přenosem, jak popsal Holt a kol. v Mol. and Gen Bio., 8, 963-973 (1988), přičemž tyto metody se zahrnují do známého stavu techniky. Výsledky jsou uvedeny dále v tabulce 3.

Tabulka 3

Zlepšená inhibice c-myc exprese v buňkách HL60 za použití N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidů, v porovnání k fosforthioát oligonukleotidům

SEQ ID č.	Popis	Oligonukleotid, koncentrace	% z "ne DNA" kontrolního stanovení (westernový přenos, denzitometrie)
-	bez oligonukleotidu	0 μM	100 %
31	thioátová negativní kontrola	10 μM	85 % z kontrolního stanovení
30	thioátový antimediátor	10 μM	35 % z kontrolního stanovení
31	amidátová negativní kontrola	1 μM	81 % z kontrolního stanovení
30	amidátový antimediátor	1 μM	38 % z kontrolního stanovení
28	amidátový antimediátor	1 μM	38 % z kontrolního stanovení
32	amidátový antimediátor, s U nahrazujícím T	1 μM	33 % z kontrolního stanovení

N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotid SEQ ID č. 29 také ukazuje progresivně větší inhibici proliferace buněk HL60 při 0,1, 0,5 a 1 μM (kdy proliferace se měří při každé koncentraci ve dnech 0, 3 a 6), v porovnání k N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidu 31 (negativní kontrola, chybně spárováno), při 0,1, 0,5 a 1 μM, co ukazuje na úroveň proliferace srovnatelnou s ne-DNA kontrolním stanovením. Ve dni 0 kultura obsahuje přibližně 10 000 buněk. Ve dni 6 obě kontrolní kultury obsahují přibližně 50 000 buněk na kulturu a N3'——>P5' fosforamidát 1 μM kultura má přibližně 25 000 buněk na kulturu.

Tyto výsledky dokládají schopnost c-myc N3'——> P5' fosforamidát oligonukleotidů inhibovat buněčnou proliferaci při dávce a řetězci závislém na způsobu a větší účinnost N3'——>P5' fosforamidát oligonukleotidů v porovnání k fosforthioát oligonukleotidům při inhibici c-myc exprese. Tyto údaje jsou v korelaci s c-myc inhibicí, která se projevuje při westernovém přenosu.

I když vynález je popsán v souvislosti se zvláštními způsoby a ztělesněními, je zřejmé, že je možné provést různé modifikace a změny, aniž by se vybočilo z rozsahu tohoto vynálezu.

Seznam řetězců

(1) Obecná informace:

(i) Původce: Gryaznov, Sergei a kol.

(ii) Název vynálezu: Oligonukleotidové N3'——>P5' fosforamidáty a způsob jejich přípravy a hybridizace

(iii) Počet řetězců: 31

(iv) Korespondenční adresa:
(A) Adresát: Cooley Godward
(B) Ulice: 5 Palo Alto Square
(C) Město: Palo Alto
(D) Stát: CA (Kalifornie)
(E) Země: USA
(F) PSČ: 94306

(v) Forma čitelná na počítači:
(A) Typ média: disketa
(B) Počítač: IBM PC kompatibilní
(C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: Paten In Release #1.0, verze #1.25

(vi) Údaje o nynější přihlášce:
(A) Číslo přihlášky:
(B) Datum podání:
(C) Zatřídění:

(vii) Informace o patentovém zástupci:

(A) Jméno: Mendlein, John D.
(B) Registrační číslo: 38 770
(C) Číslo spisu: Lynx-005/01WO

(ix) Telekomunikační informace:
(A) Telefon: (415) 843-5020
(B) Telefax: (415) 857-0663

(2) Informace pro SEQ ID č. 1:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 10 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 1, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 1:

TTTTTTTTTT 10

(2) Informace pro SEQ ID č. 2:

(i) Charakteristiky řetězce:

(A) Délka: 10 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 2, obr. 2

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc-feature
(B) Lokace: 1..2
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 3..4
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc-feature
(B) Lokace: 5..6
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc- feature
(B) Lokace: 7..8
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 9..10
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 2:

TTTTTTTTTT 10

(2) Informace pro SEQ ID č. 3:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 11 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 3, obr. 2

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 1..11
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 3:

TTTTTTTTTT T 11

(2) Informace pro SEQ ID č. 4:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 11 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 4, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 4:

CTTCTTCCTT A 11

(2) Informace pro SEQ ID č. 5:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 11 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: RNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: RNA oligonukleotid 5, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 5:

CTTCTTCCTT A 11

(2) Informace pro SEQ ID č. 6:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 11 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 6, obr. 2

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 1..11
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 6:

CTTCTTCCTT A 11

(2) Informace pro SEQ ID č. 7:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 24 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 7,

obr. 5

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 7:

TATATATATA TTTTTATATA TATA 24

(2) Informace pro SEQ ID č. 8:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 20 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 8, obr. 5

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc-feature
(B) Lokace: 1..2
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 3..4

(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 5..6
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 7..8
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 8:

TATATATATT TTTATATATA 20

(2) Informace pro SEQ ID č. 9:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 24 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 9, obr. 5

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 1..2
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 3..4
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 5..6
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 7..8
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 9..10
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 15..16
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 17..18
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 19..20
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 21..22
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 23..24
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 9:

TATATATATA TTTTTATATA TATA 24

(2) Informace pro SEQ ID č. 10:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 24 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 10, obr. 5

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 10:

TACGTACGTA TTTTTACGTA CGAT 24

(2) Informace pro SEQ ID č. 11:

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 24 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 11, obr. 5

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 1..2
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 3..4
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 5..6
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 7..8
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 9..10
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 11:

TACGTACGTA TTTTTACGTA CGTA 24

(2) Informace pro SEQ ID č. 12:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 24 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA oligonukleotid 12, obr. 5

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 1..2
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 3..4
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 5..6
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 7..8
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 9..10
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 15..16
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature

(B) Lokace: 17..18
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 19..20
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 21..22
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(ix) Znaky:
(A) Jméno/klíč: misc_feature
(B) Lokace: 23..24
(D) Jiné informace: (poznámka = "v případě vzájemné subjednotkové vazby je "np"")

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 12:

TACGTACGTA TTTTTACGTA CGTA 24

(2) Informace pro SEQ ID č. 13:

(i) Popis řetězce:
(A) Délka: 24 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA cílová oblast, experiment 7, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 13:

AAAAAAAAAA CCCCTTTTTT TTTT 24

(2) Informace pro SEQ ID č. 14:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 13 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA cílová oblast, experiment 8, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 14:

ATAAGGAAGA AGC 13

(2) Informace pro SEQ ID č. 15:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 13 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: RNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: RNA cílová oblast, experiment 9, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 15:

AUAAGGAAGA AGC 13

(2) Informace pro SEQ ID č. 16:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 13 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: RNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: RNA cílová oblast, experiment 10, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 16:

AUAAGGUAGA AGC 13

(2) Informace pro SEQ ID č. 17:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 13 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: RNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: RNA cílová oblast, experiment 11, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 17:

AUAAGGAAGA AGC 13

(2) Informace pro SEQ ID č. 18:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 13 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: RNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: RNA cílová oblast, experiment 12, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 18:

AUAAGGUAGA AGC 13

(2) Informace pro SEQ ID č. 19:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 13 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA cílová oblast, experiment 13, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 19:

ATAAGGAAGA AGC 13

(2) Informace pro SEQ ID č. 20:

(i) Popis řetězce:
(A) Délka: 13 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: RNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: RNA cílová oblast, experiment 14, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 20:

AUAAGGAAGA AGC 13

(2) Informace pro SEQ ID č. 21:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 13 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: RNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: RNA cílová oblast, experiment 15, obr. 2

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 21:

AUAAGGUAGA AGC 13

(2) Informace pro SEQ ID č. 22:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 26 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: DNA dvoušroubovicová cílová oblast, obr. 8

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 22:

TTCCTTCTTT CTTTTGAAAG AAGGAA 26

(2) Informace pro SEQ ID č. 23:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 244 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: RNA (genomická)

(iii) Hypoteticky: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: HIV-1 REV element odezvy

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 23:

CAGUGGGAAU AGGAGCUUUG UUCCUUGGGU UCUUGGGAGC AGCAGGAAGC ACUAUGGGCG 60

CAGCGUCAAU GACGCUGACG GUACAGGCCA GACAAUUAUU GUCUGGUAUA GUGCAGCAGC 120

AGAACAAUUU GCUGAGGGCU AUUGAGGCGC AACAGCAUCU GUUGCAACUC ACAGUCUGGG 180

GCAUCAAGCA GCUCCAGGCA AGAAUCCUGG CUGUGGAAAG AUACCUAAAG GAUCAACAGC 240

UCCU 244

(2) Informace pro SEQ ID č. 24:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 69 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: RNA (genomická)

(iii) Hypoteticky: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: kmen II HIV-1 REV elementu odezvy

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 24:

AGCACUAUGG GCGCAGCGUC AAUGACGCUG ACGGUACAGG CCAGACAAUU AUUGUCUGGU 60

AUAGUGCAG 69

(2) Informace pro SEQ ID č. 25:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 58 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: RNA (genomická)

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:-
(C) Individuální izolát: řetězec TAR místa HIV-1

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 25:

GGUCUCUCUG GUUAGACCAG AUCUGAGCCU GGGAGCUCUC UGGCUAACUA GAGAACCC 58

(2) Informace pro SEQ ID č. 26:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 16 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:

(C) Individuální izolát: 16-mer, fosforthioát vzájemných subjednotkových vazeb

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 26:

AAGGGCTTCT TCCTTA 16

(2) Informace pro SEQ ID č. 27:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 16 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Hypoteticky: ne

(iv) Antimediátor: ne

(vi) Původní zdroj:
(C) Individuální izolát: 16-mer, fosforthioát vzájemné subjednotkové vazby

(xi) Popis řetězce: SEQ ID č. 27:

GAGTTCAAAA GCCCTT 16

(2) Informace pro SEQ ID č. 28:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 15 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: obojí
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Popis sekvence: SEQ ID č. 28:

TTTCATTGTT TTCCA 15

(2) Informace pro SEQ ID č. 29:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 15 bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Popis sekvence: SEQ ID č. 29:

TTTCTATTGT TTCCA 15

(2) Informace pro SEQ ID č. 30:

(i) Charakteristiky řetězce:
(A) Délka: 15 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

(iii) Popis řetězce: SEQ ID č. 30:

AACGTTGAGG GGCAT 15

(2) Informace pro SEQ ID č. 31:

(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 15 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Tvar řetězce: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA

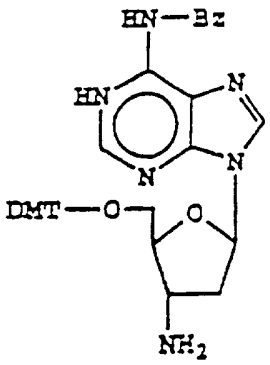
(iii) Popis řetězce: SEQ ID č. 31:

AACGAGTTGG GGCAT 15

2745-96
č.j. 092929
DOŠLO 17 XII 96
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Nukleosidová subjednotka obecného vzorce

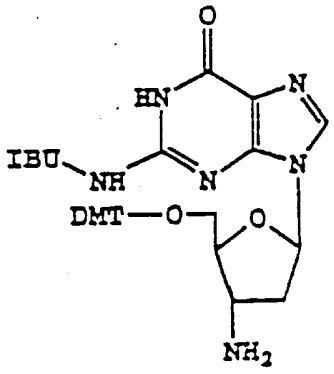


ve kterém

DMT znamená dimethoxytritylovou skupinu a

Bz znamená benzoylovou skupinu.

2. Nukleosidová subjednotka obecného vzorce



ve kterém

DMT znamená dimethoxytritylovou skupinu a

Bz znamená benzoylovou skupinu.

3. Způsob syntézy 5'-DMT-N^6-benzoyl-3'-amino-2',3'--dideoxyadenosinu nebo 5'-DMT-N^2-isobutyryl-3'-amino-2',3'--dideoxyguanosinu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje

5' benzoylaci X,

inverzi 3'-hydroxyskupiny,

tritylaci,

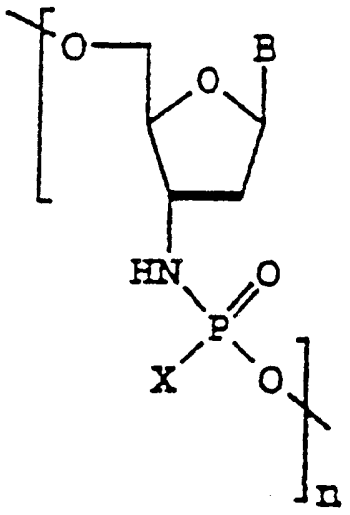
3' debenzoylaci,

transformaci 3'-threo-azidoskupiny na 3'-erythro-azidoskupinu a

redukci této 3'-erythro-azidoskupiny, kde

X znamená buď 5'-O-benzoyl-N-isobutyryl-2'-deoxyguanosin nebo N6-benzoyl-2'-deoxyadenosin.

4. Oligodeoxyribonukleotid, který zahrnuje oligodeoxyribonukleotid obsahující přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami vzorce



ve kterém

X znamená -O·, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny, kde žádné R neobsahuje uhlíkový řetězec delší než 10 atomů uhlíku,

uvedené vzájemné subjednotkové vazby jsou rozptýleny v oligonukleotidech obsahujících alespoň 6 až 100 bází na délku,

n znamená číslo od 4 do 100 a

B představuje bázi.

5. Oligodeoxyribonukleotid podle nároku 4, kde uvedený oligodeoxyribonukleotid obsahuje alespoň 3 přiléhající subjednotky spojené N3'——>P5' fosforamidátovými vazbami.

6. Oligodeoxyribonukleotid podle nároku 5, kde uvedený oligodeoxyribonukleotid má hydroxyskupiny na koncích v poloze 5'a 3' a uvedené přiléhající vazby začínají na konci 3' nukleosidové podjednotky.

7. Oligodeoxyribonukleotid podle nároku 4, kde všechny vzájemné subjednotkové vazby jsou N3'——>P5' fosforamidátovými vazbami.

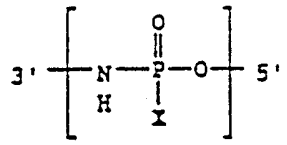
8. Oligodeoxyribonukleotid podle nároku 4, kde ve vzájemných subjednotkových vazbách se střídá N3'——>P5' fosforamidátová vazba a druhá vazba.

9. Oligodeoxyribonukleotid podle nároku 5, kde alespoň 50 % vzájemných subjednotkových vazbách tvoří N3'——>P5' fosforamidátové vazby.

10. Oligodeoxyribonukleotid podle nároku 8, kde druhá vazba je zvolena ze souboru sestávajícího z fosfodiesteru, fosfotriesteru, methylfosfonátu, fosforamidátu P3'——>N5' a fosfortioátu.

11. Oligodeoxyribonukleotid podle nároku 10, kde druhá vazba je fosfodiesterová vazba.

12. Způsob přípravy dvoušroubovicové molekuly nukleové kyseliny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připraví oligodeoxyribonukleotid, který má přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde alespoň 3 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovými vazbami nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



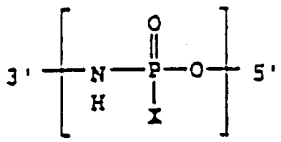
ve kterém

X znamená -O⁻, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny, a

oligodeoxyribonukleotid má řetězec nukleosidových subjednotek

účinný pro vytvoření dvoušroubovice s cílovou molekulou nukleové kyseliny, a obsahuje oligodeoxyribonukleotid s cílovou molekulou nukleové kyseliny za podmínek, které dovolují účinnou tvorbu dvoušroubovice mezi oligodeoxyribonukleotidem a cílovou molekulou nukleové kyseliny.

13. Způsob blokování vzájemného působení proteinu s polynukleotidem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připraví oligodeoxyribonukleotid, který má přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde alespoň 2 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovou vzájemnou subjednotkou nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



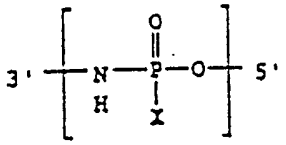
ve kterém

X znamená -O⁻, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny, a

oligodeoxyribonukleotid má řetězec nukleosidových subjednotek účinný pro vytvoření komplexu s tímto polynukleotidem a obsahuje oligodeoxyribonukleotid s polynukleotidem za podmínek, které dovolují účinnou tvorbu komplexu mezi oligodeoxyribonukleotidem a polynukleotidem.

14. Způsob přípravy trojšroubovicové molekuly,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připraví oligodeoxyribonukleotid, který má přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde alespoň 2 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovou vzájemnou subjednotkou nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



ve kterém

X znamená $-O^-$, -OR nebo -R, přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny, a

oligodeoxyribonukleotid má řetězec nukleosidových subjednotek účinný pro vytvoření trojité šroubovicové struktury s cílovou dvoušroubovicovou DNA, a obsahuje oligodeoxyribonukleotid s touto dvoušroubovicovou DNA za podmínek, které dovolují účinnou tvorbu trojšroubovice mezi oligodeoxyribonukleotidem a cílovou dvoušroubovicovou DNA.

15. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že 50 % nebo více vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vazby.

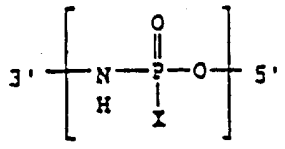
16. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že ve vzájemných subjednotkových vazbách se střídají N3'——>P5' fosforamidátové vazby a druhé vzájemné subjednotkové vazby.

17. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zbývající vzájemné subjednotkové vazby jsou zvoleny ze souboru sestávajícího z fosfodiesteru, fosfotriesteru, methylfosfonátu, fosforamidátu P3'——>N5' a fosfortioátu.

18. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že všechny vzájemné subjednotkové vazby jsou N3'——>P5' fosforamidátové vazby.

19. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se uvedené uvádění do styku provádí intracelulárně.

20. Trojšroubovicová molekula obsahující tři řetězce nukleové kyseliny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje dvoušroubovicovou DNA molekulu, která má dva komplementární řetězce a vazbu k dvoušroubovici třetího řetězce oligodeoxyribonukleotidu, který obsahuje přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde alespoň 2 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovou vzájemnou subjednotkou nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



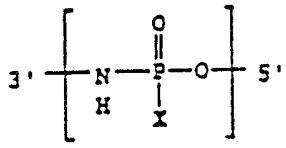
ve kterém

X znamená -O·, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny.

21. Trojšroubovicová molekula podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že 50 % nebo více vzájemných subjednotkových vazeb třetího řetězce jsou N3'——> P5' fosforamidátové vazby.

22. Trojšroubovicová molekula podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že všechny ze vzájemných subjednotkových vazeb třetího řetězce jsou N3'——>P5' fosforamidátové vazby.

23. Způsob zvyšování resistence oligodeoxyribonukleotidu k digerování nukleázy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se
připraví oligodeoxyribonukleotid, který má přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde alespoň 3 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovými subjednotkami nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



ve kterém

X znamená -O·, -OR nebo -R,

přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny, a

oligodeoxyribonukleotid se vystaví nukleáze,

přičemž tento oligodeoxyribonukleotid je více resistentní k digerování nukleázy než odpovídající oligodeoxyribonukleotid, který obsahuje pouze fosfodiesterové vzájemné subjednotkové vazby.

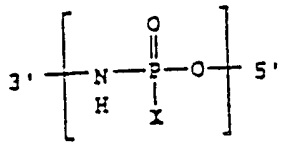
24. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že 50 % nebo více vzájemných subjednotkových vazeb oligodeoxyribonukleotidu jsou N3'——>P5' fosforamidátové vazby.

25. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že všechny ze vzájemných subjednotkových vazeb oligodeoxyribonukleotidu jsou N3'——>P5' fosforamidátové vazby.

26. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se uvedené vystavení provádí intracelulárně.

27. Souprava pro izolaci cílové nukleové kyseliny ze vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje

i) oligodeoxyribonukleotid, který má přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde alespoň 2 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovou vzájemnou subjednotkou nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



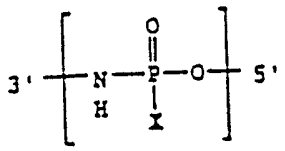
ve kterém

X znamená $-O^-$, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny,

ii) uvedený oligodeoxyribonukleotid je účinný k hybridizaci na cílovou oblast řetězce nukleové kyseliny a

iii) uvedený oligodeoxyribonukleotid je připojen k tuhé nosné látce.

28. Způsob detekce nukleové kyseliny, obsahující cílovou oblast řetězce, ve vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připraví oligodeoxyribonukleotid, který má přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde alespoň 3 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovými vzájemnými subjednotkami nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



ve kterém

X znamená -O^{-}, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny, a

uvedený oligodeoxyribonukleotid je účinný k vytvoření hybridizačního komplexu s touto cílovou oblastí řetězce,

oligodeoxyribonukleotid se uvede do styku s uvedeným vzorkem za podmínek, které dovolují účinnou tvorbu hybridizačního komplexu mezi oligodeoxyribonukleotidem a cílovou oblastí řetězce a

stanoví se přítomnost hybridizačního komplexu.

29. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že oligodeoxyribonukleotid nese reportážní část a stanovení zahrnuje detekci této reportážní části.

30. Způsob podle nároku 29, v y z n a č u j í c í s e t í m, že reportážní část je vybrána ze skupiny zahrnující radioaktivní značení, značení biotinem a fluorescenční značení.

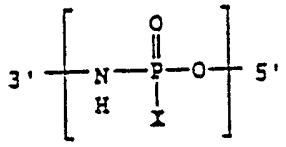
31. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se uvedené uvádění do styku provádí intracelulárně.

32. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nukleová kyselina je jednořetězcová.

33. Způsob detekce dvoušroubovicové DNA, obsahující cílovou oblast řetězce, ve vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připraví oligodeoxyribonukleotid, který má

přiléhající nukleosidové subjednotky a vzájemné subjednotkové vazby, kde

i) alespoň 3 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovými vzájemnými subjednotkami nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



ve kterém

X znamená -O⁻, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny, a

uvedený oligodeoxyribonukleotid je účinný k vytvoření hybridizačního komplexu s touto cílovou oblastí řetězce,

oligodeoxyribonukleotid se uvede do styku s uvedeným vzorkem za podmínek, které dovolují účinnou tvorbu hybridizačního komplexu mezi oligodeoxyribonukleotidem a cílovou oblastí řetězce a

stanoví se přítomnost hybridizačního komplexu.

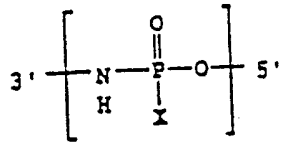
34. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že oligodeoxyribonukleotid nese reportážní část a stanovení zahrnuje detekci této reportážní části.

35. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že hybridizační komplex se určuje za použití gelového posunu pásu.

36. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se uvedené uvádění do styku provádí intracelulárně.

37. Dvoušroubovicový oligodeoxyribonukleotid, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje dva komplementární řetězce a

ii) alespoň jeden řetězec obsahuje přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde alespoň 2 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovou vzájemnou subjednotkou nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



ve kterém

X znamená -O⁻, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny.

38. Dvoušroubovicová molekula podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m, že 50 % nebo více vzájemných subjednotkových vazeb alespoň jednoho řetězce jsou

N3'——>P5' fosforamidátové vazby.

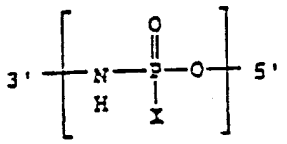
39. Dvoušroubovicová molekula podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m, že všechny ze vzájemných subjednotkových vazeb alespoň jednoho řetězce jsou N3'——> P5' fosforamidátové vazby.

40. Dvoušroubovicová molekula podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m, že komplementární řetězce jsou připojeny flexibilní pantovou oblastí.

41. Dvoušroubovicová molekula, v y z n a č u j í c í s e t í m, že každý komplementární řetězec má své konce v poloze 5' a 3' a flexibilní pantová oblast je připojena ke koncům komplementárního řetězce v jedné z orientací, které jsou zvoleny ze souboru zahrnujícího 5' k 3', 3' k 5', 3 k 3' a 5' k 5'.

42. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje oligodeoxyribonukleotid, který má přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde

i) alespoň 2 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovou vzájemnou subjednotkou nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



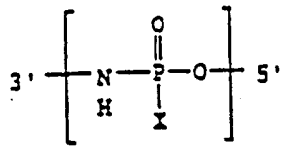
ve kterém

X znamená -O⁻, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny,

ii) uvedený oligodeoxyribonukleotid má řetězec nukleosidových subjednotek účinný k vytvoření trojšroubovice s cílovou oblastí dvoušroubovicové DNA a

farmaceuticky přijatelnou nosnou látku.

43. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje oligodeoxyribonukleotid, který má přiléhající nukleosidové subjednotky spojené vzájemnými subjednotkovými vazbami, kde tento oligodeoxyribonukleotid je schopen vytvořit dvoušroubovici s RNA a kde alespoň 2 přiléhající subjednotky jsou spojeny N3'——>P5' fosforamidátovou vzájemnou subjednotkou nebo více než 3 z celkových vzájemných subjednotkových vazeb jsou N3'——>P5' fosforamidátové vzájemné subjednotkové vazby, jako jsou



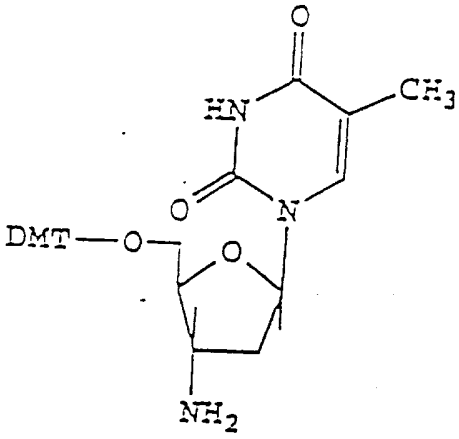
ve kterém

X znamená $-O^{\cdot}$, -OR nebo -R,
přičemž R je zvolen ze souboru sestávajícího z alkylové, alkenylové, arylové a aralkylové skupiny, a

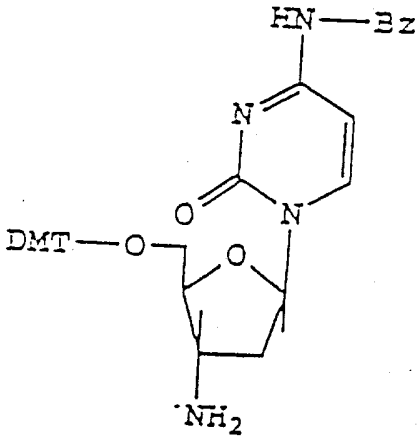
uvedený oligodeoxyribonukleotid má řetězec nukleosidových subjednotek účinný k vytvoření dvoušroubovicové struktury s cílovou oblastí RNA a

farmaceuticky přijatelnou nosnou látku.

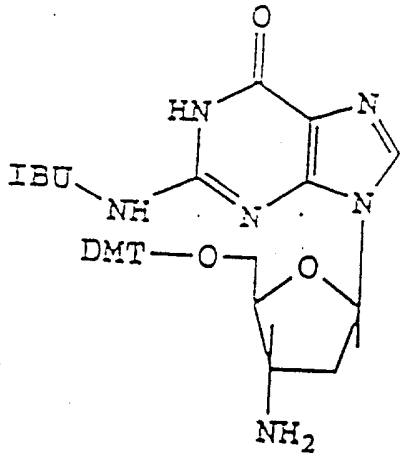
2745-9.
č.j. 0 3 2 9 2 9
DOŠLO 17 XII 96
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



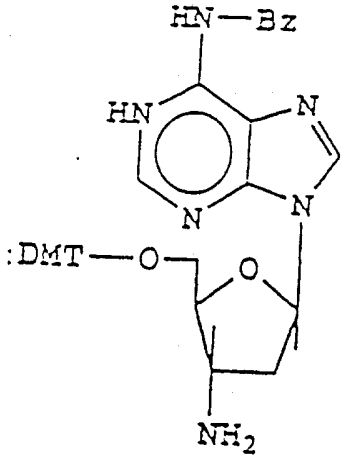
Obr. 1A



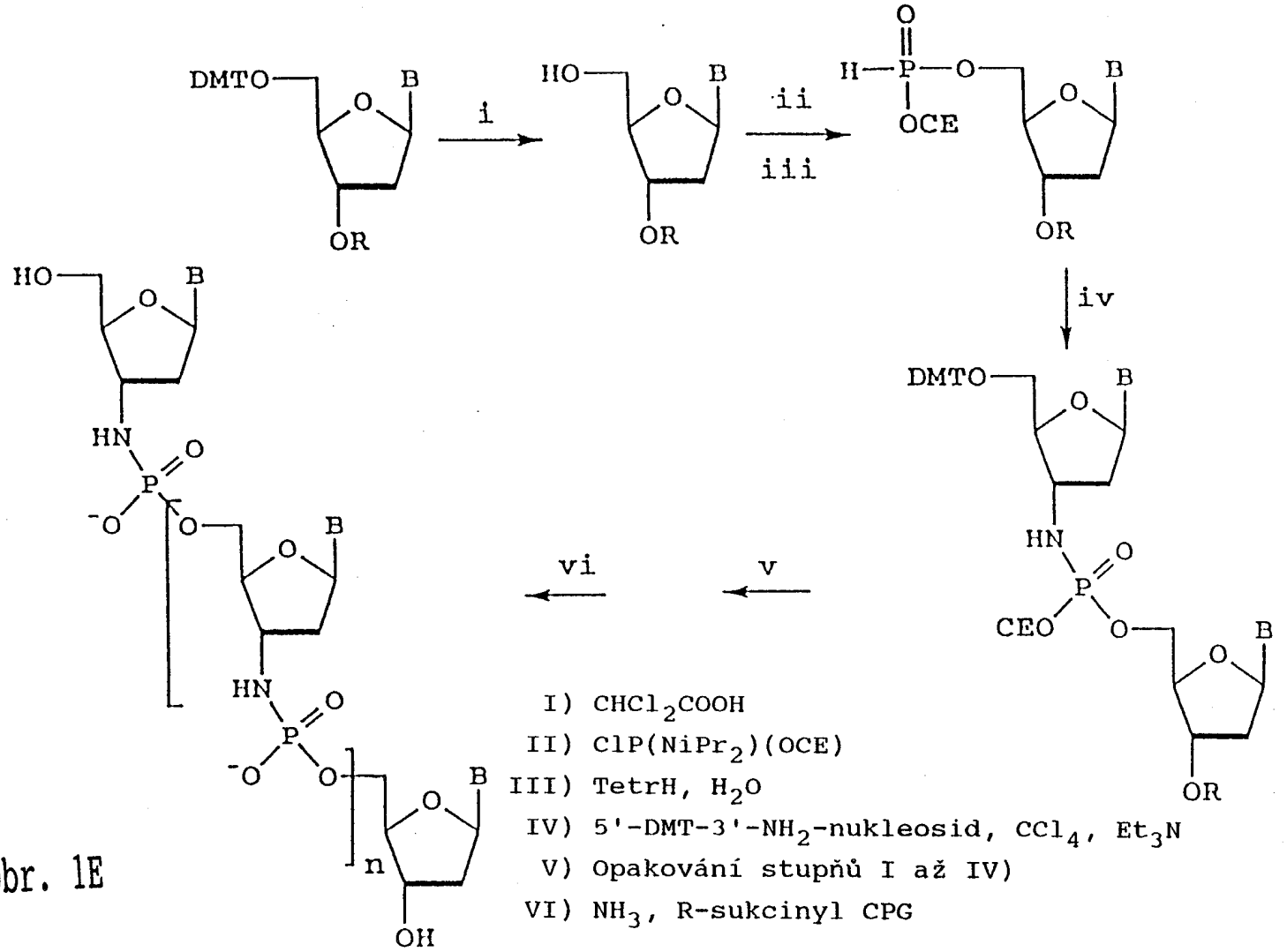
Obr. 1B



Obr. 1C



Obr. 1D

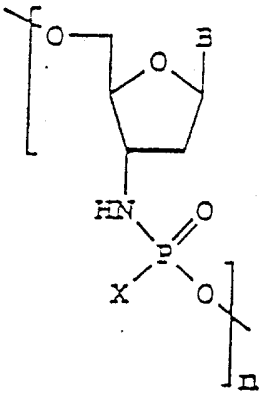


I) $CHCl_2COOH$
II) $ClP(NiPr_2)(OCE)$
III) TetrH, H_2O
IV) 5'-DMT-3'-NH_2-nukleosid, CCl_4, Et_3N
V) Opakování stupňů I až IV)
VI) NH_3, R-sukcinyl CPG

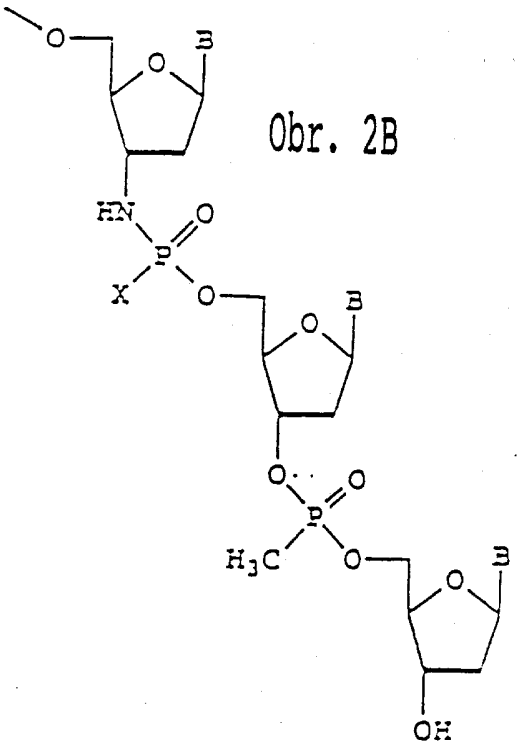
Obr. 1E

ORAD
PRŮMYS OVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
17 XI 96
DOŠLO
0 9 2 9 2 9
č.j.

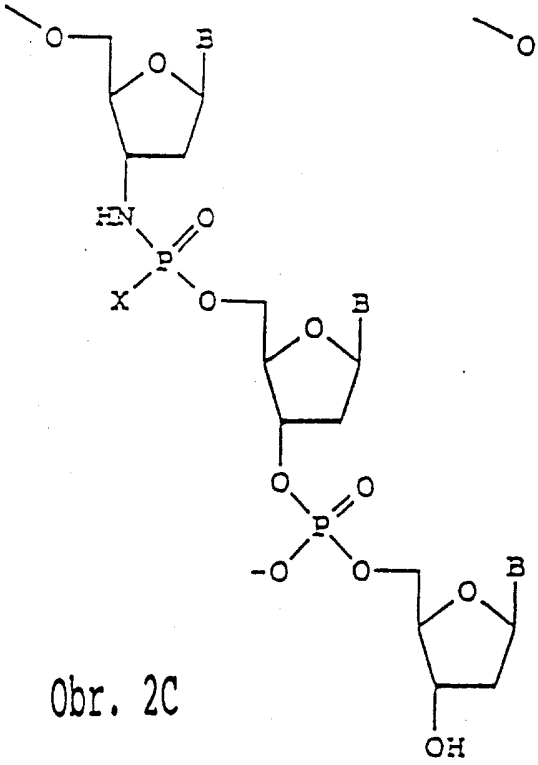
č.j.
092929
DOŠLO
17 XI 96
ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



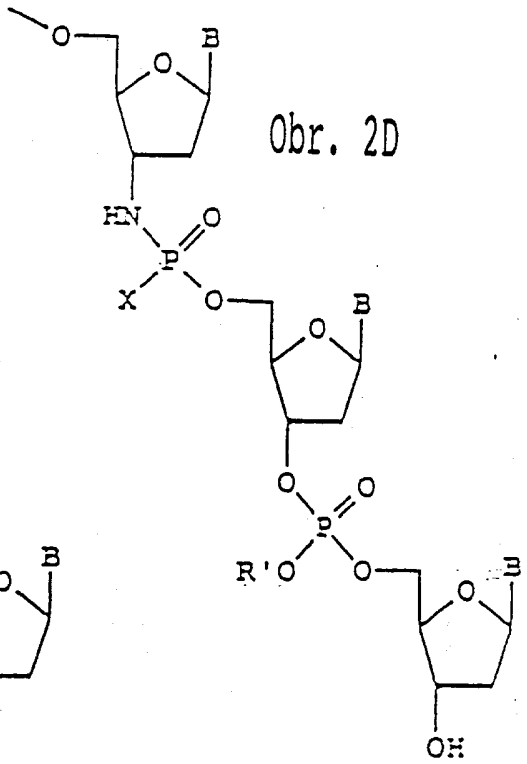
Obr. 2A



Obr. 2B

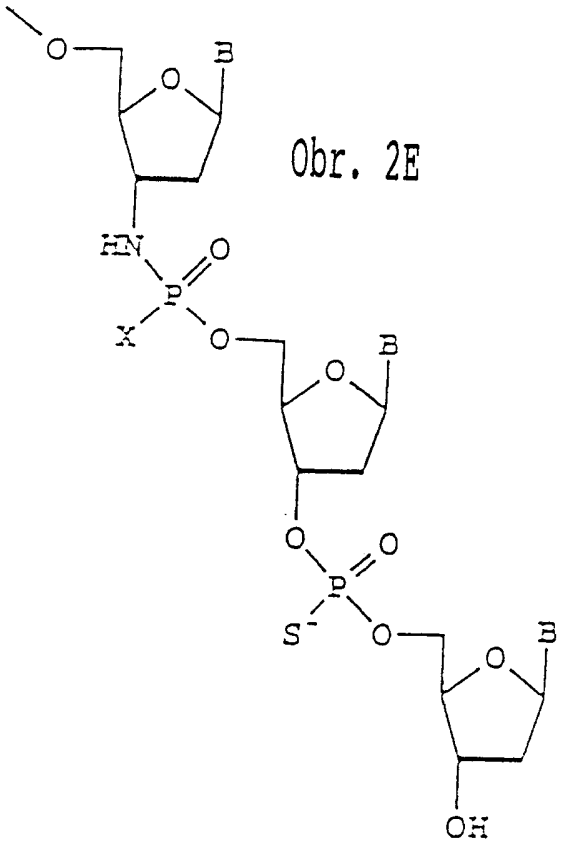


Obr. 2C

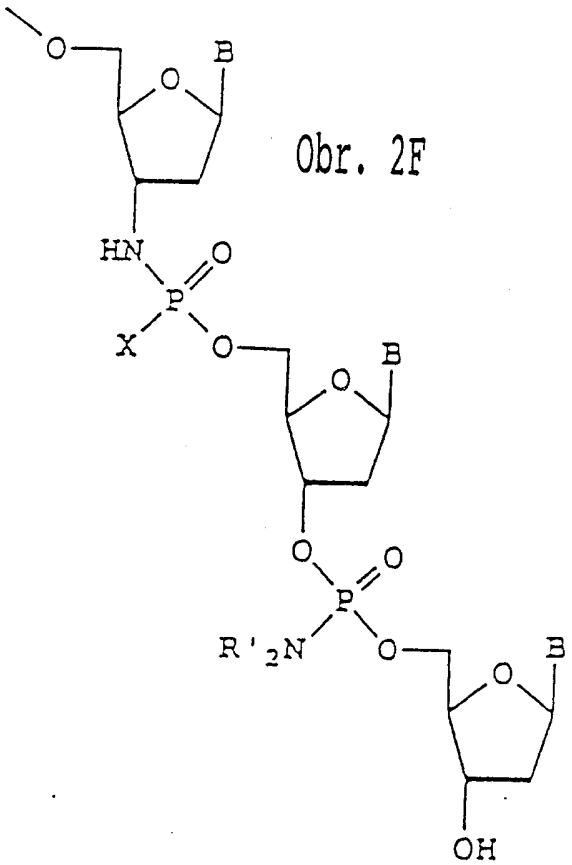


Obr. 2D

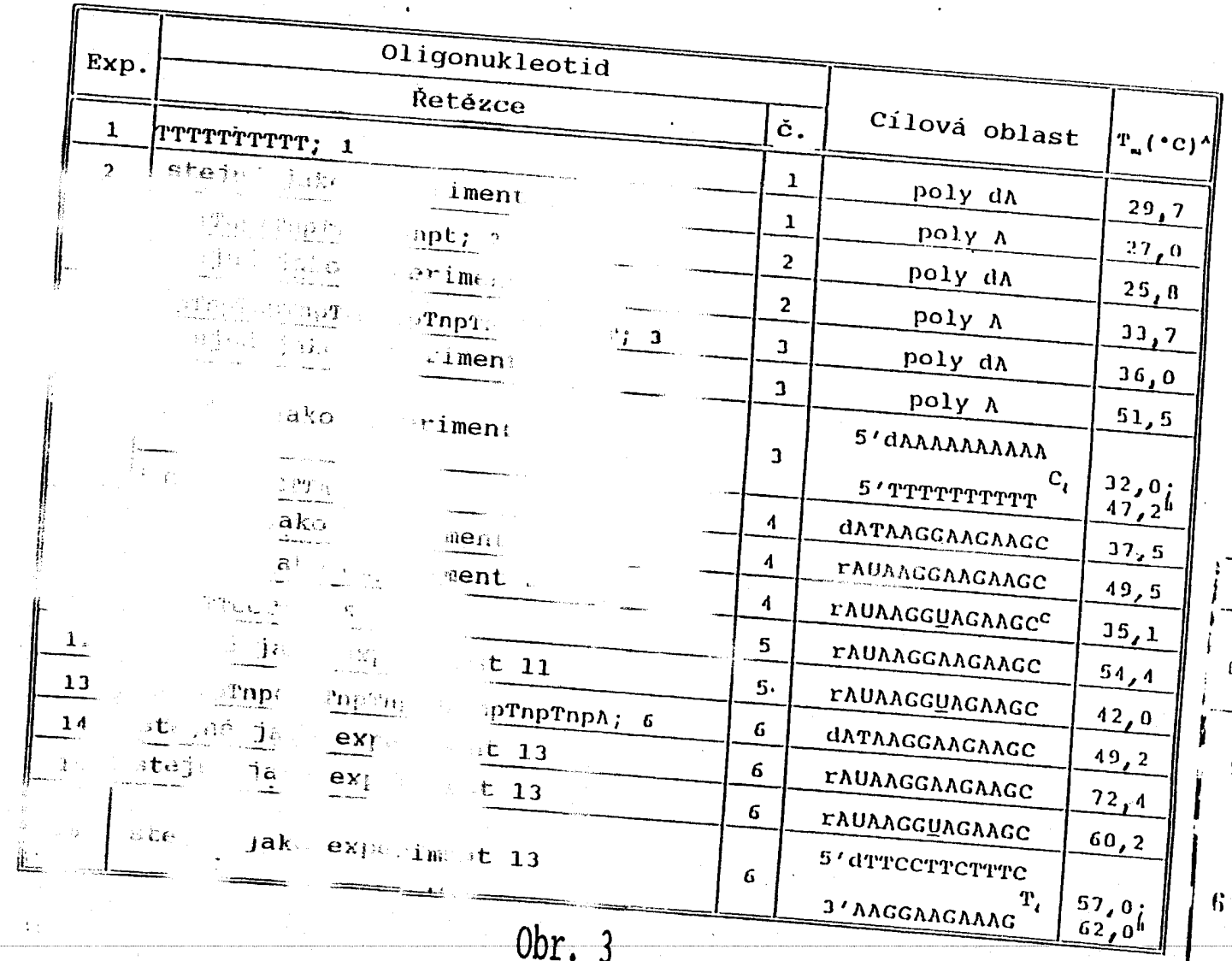
č.j.
092929
DOŠLO
17 XII 96
ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



Obr. 2E



Obr. 2F



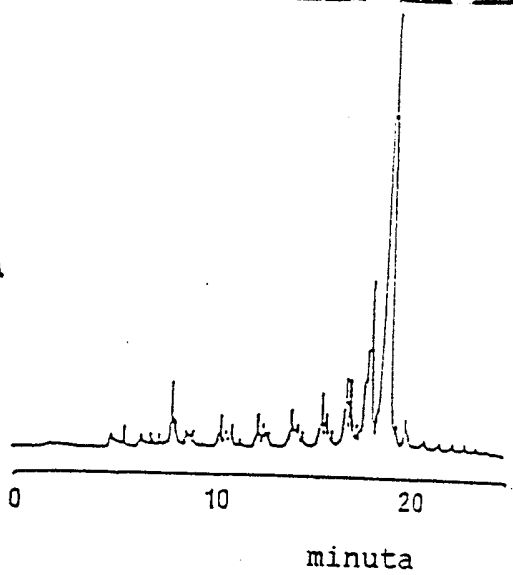
Exp.	Oligonukleotid		Cílová oblast	T_m (°C)^
	Řetězce	č.		
1	TTTTTTTTTT; 1	1	poly dA	29,7
2	stej[illegible] jak[illegible] [illegible]iment	1	poly A	27,0
	[illegible]npt; [illegible]	2	poly dA	25,8
	[illegible]erime[illegible]	2	poly A	33,7
	[illegible]TnpT[illegible]pTnpT[illegible]; 3	3	poly dA	36,0
	[illegible]imen[illegible]	3	poly A	51,5
	[illegible]ako [illegible]rimen[illegible]	3	5'dAAAAAAAAAA 5'TTTTTTTTTT C_l	32,0; 47,2"
	[illegible]ako [illegible]men[illegible]	4	dATAAGGAAGAAGC	37,5
	a[illegible] [illegible]ment [illegible]	4	rAUAAGGAAGAAGC	49,5
	[illegible]	4	rAUAAGGUAGAAGC^c	35,1
1[illegible]	[illegible] ja[illegible] [illegible]t 11	5	rAUAAGGAAGAAGC	54,4
13	[illegible]Tnp[illegible]pTnpTnpA; 6	5	rAUAAGGUAGAAGC	42,0
14	st[illegible]ně ja[illegible] exp[illegible]t 13	6	dATAAGGAAGAAGC	49,2
1[illegible]	stej[illegible] ja[illegible] exp[illegible]t 13	6	rAUAAGGAAGAAGC	72,4
[illegible]	ste[illegible] jak[illegible] exp[illegible]im[illegible]t 13	6	rAUAAGGUAGAAGC	60,2
		6	5'dTTCCTTCTTTC 3'AAGGAAGAAAG T_l	57,0; 62,0"

Obr. 3

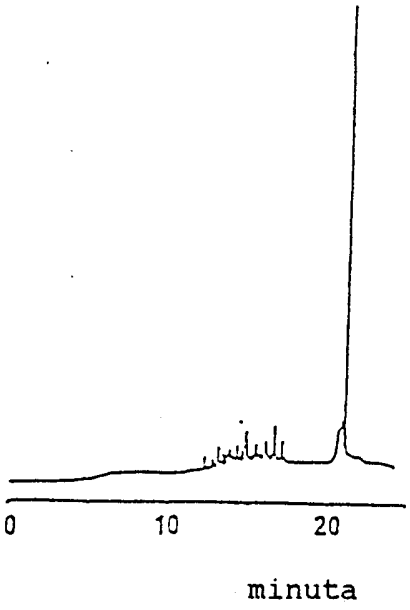
ČJ.
0 9 2 9 2 9
DOŠLO
17 XII 96
ÚŘAD
PRŮMYS OVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

č.j.
092929
DOŠLO
17 X. 96
ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

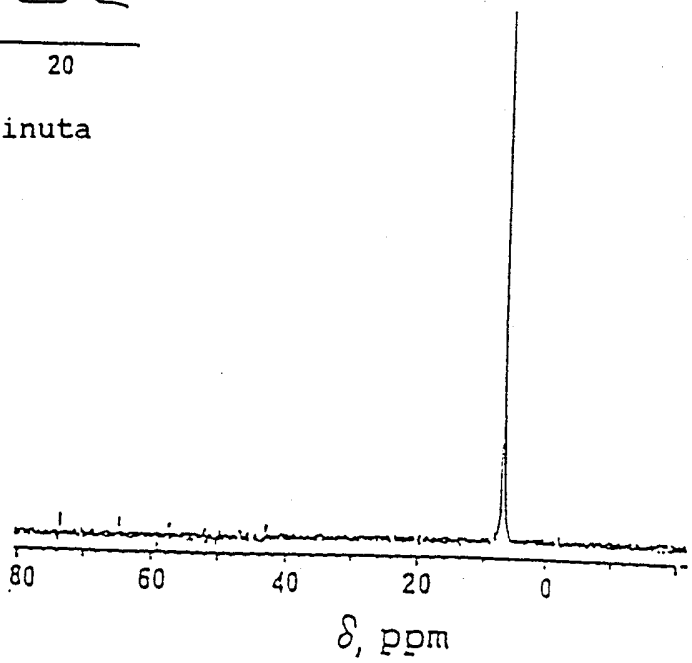
Obr. 4A



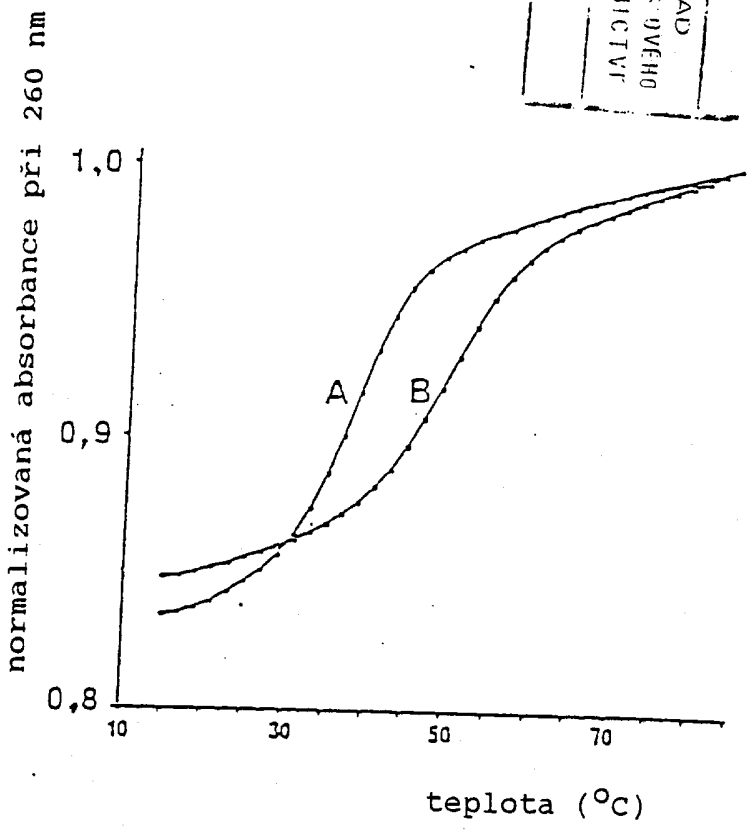
Obr. 4B



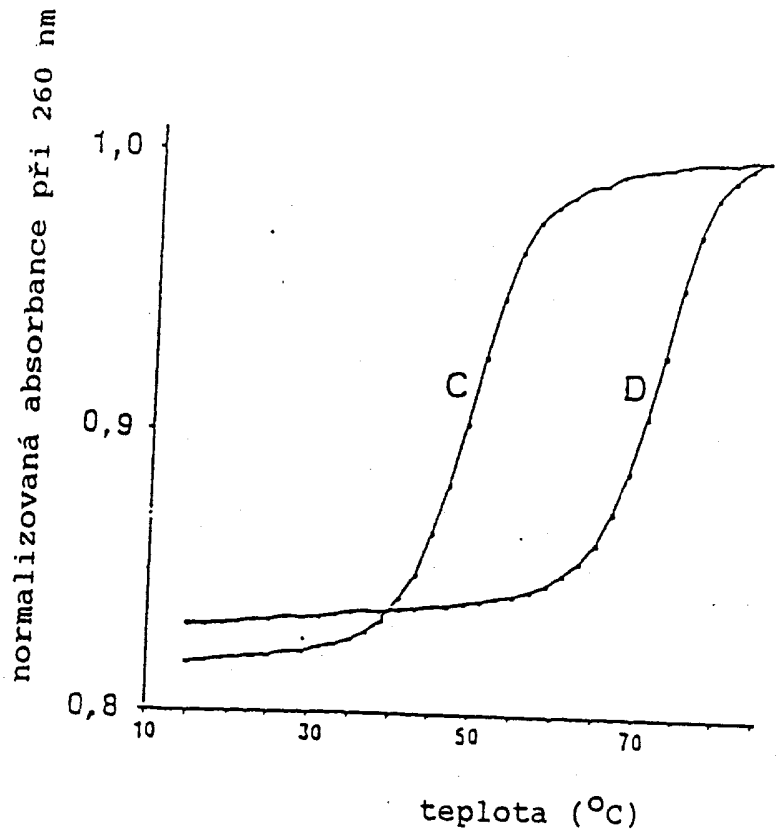
Obr. 4C



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
17 XI 96
DOŠLO
0 9 2 9 2 9



Obr. 5A



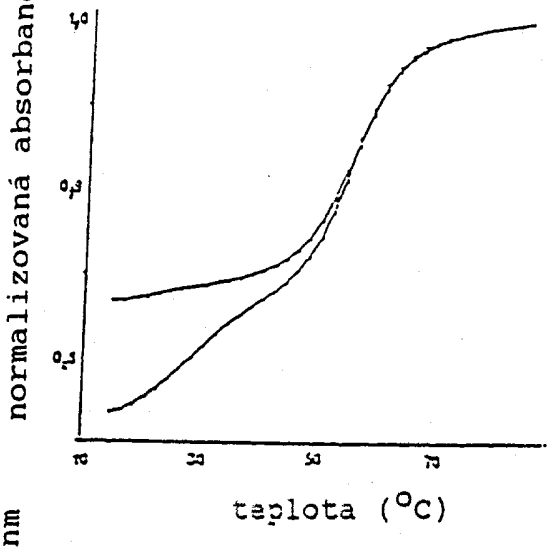
Obr. 5B

Exp.	Oligonukleotid		T_m
1	TATATATATA T4; ATATATATAT	7	37,0
2	TnpATnpATnpATnpA T4; A TA TA TA T	8	42,0
3	TnpATnpATnpATnpATnpA T4; ApnTApnTApnTApnTApnT	9	61,5
4	TACGTACGTA T4; ATGCATGCAT	10	59,5
5	TnpACnpGTnpACnpGTnpA T4; A T G CA TG CA T	11	62,2
6	TnpACnpGTnpACnpGTnpA T4; ApnTGpnCApnTGpnCApnT	12	67,0

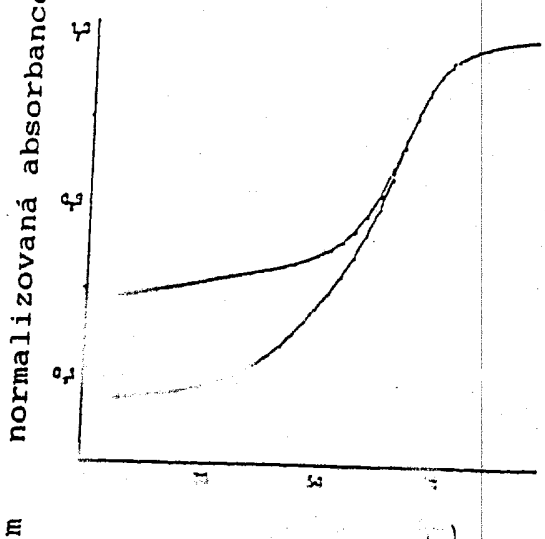
Obr. 6

ČJ. 0 9 2 9 2 9
DOŠLO
17 XI 96
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

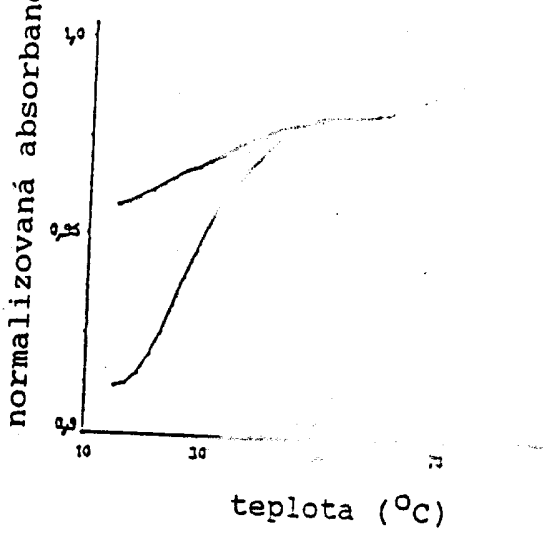
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘIJ.
17 XII 96
DOŠLO
č.j.



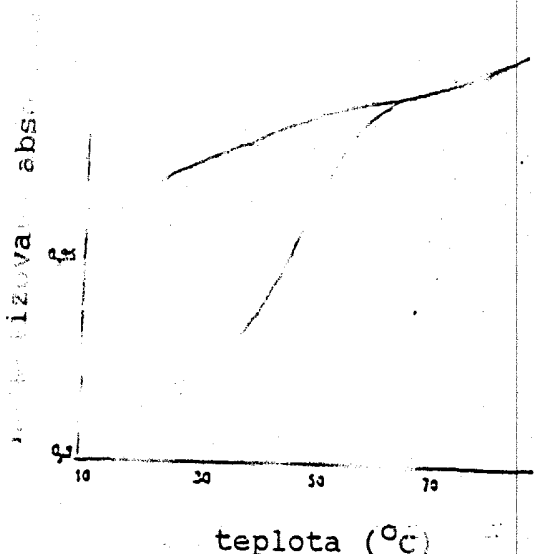
Obr. 7A



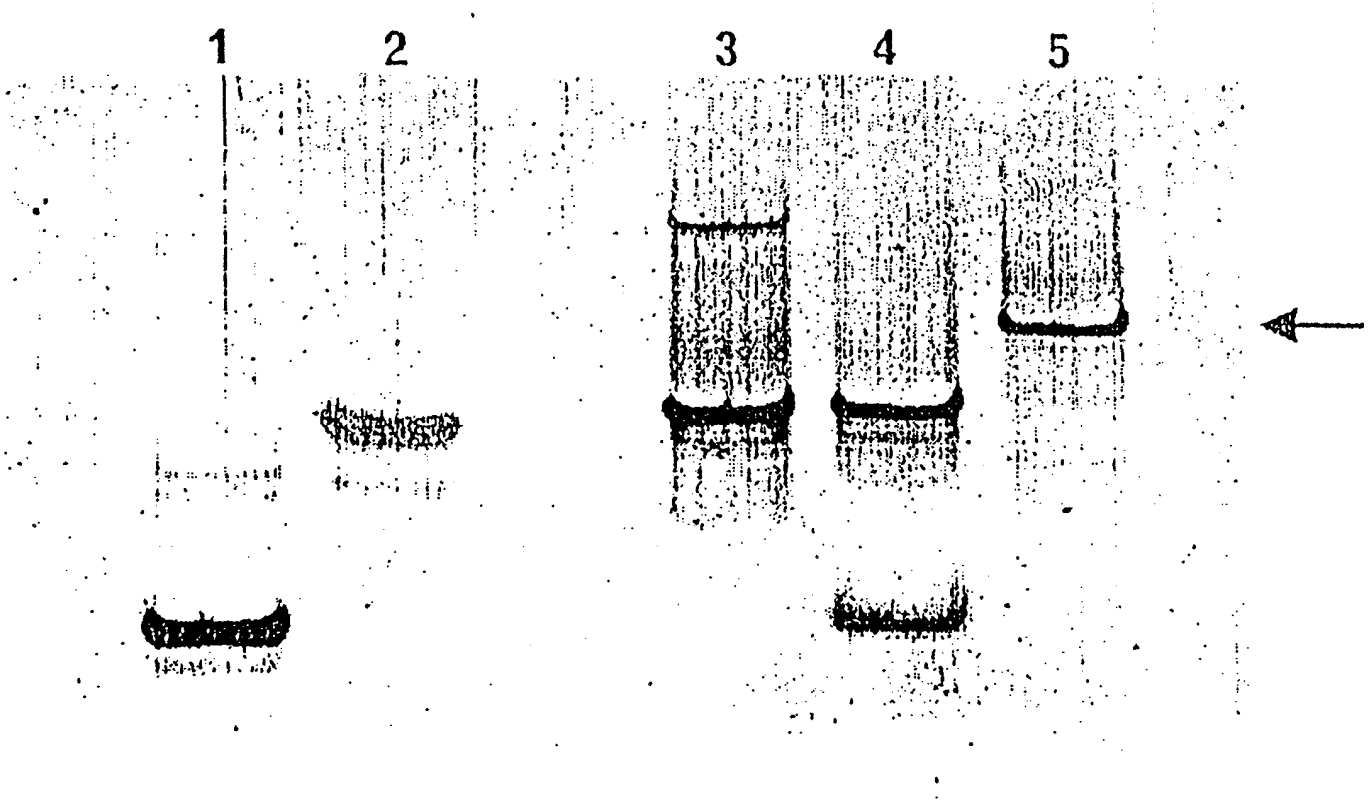
Obr. 7C



Obr. 7B

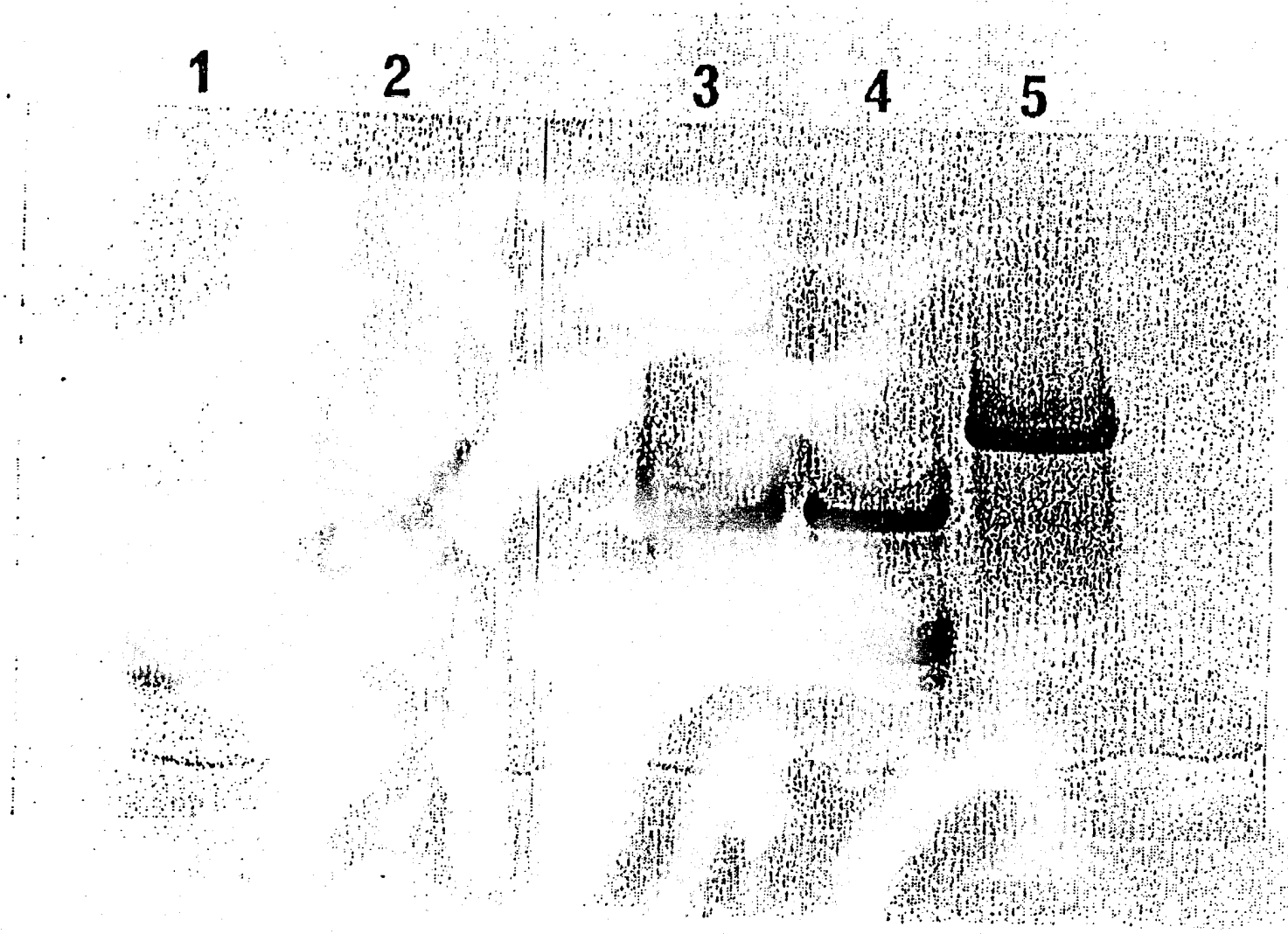


Obr. 7D



Obr. 8

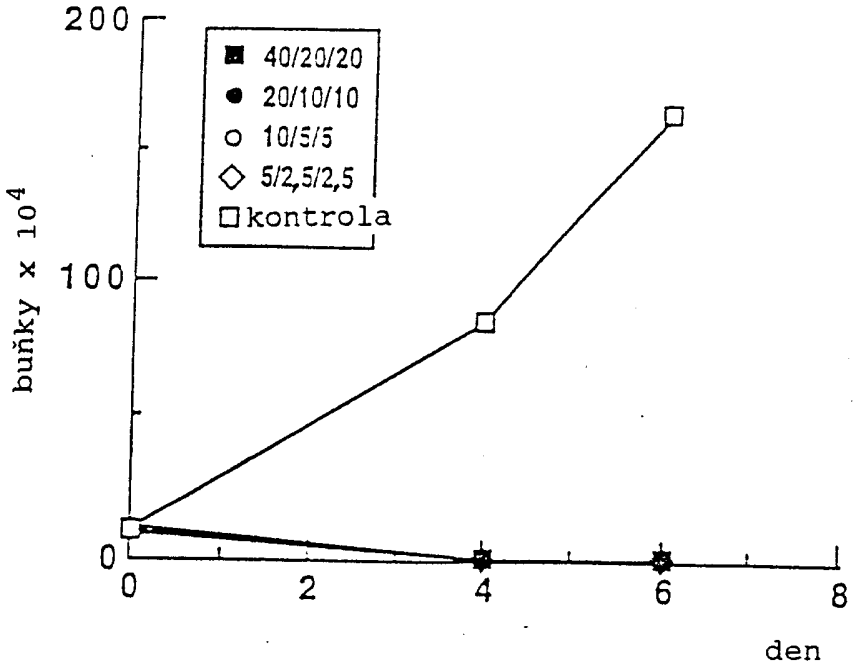
Č.j.
0 9 2 9 2 9
DOČLO
17 XII 96
ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



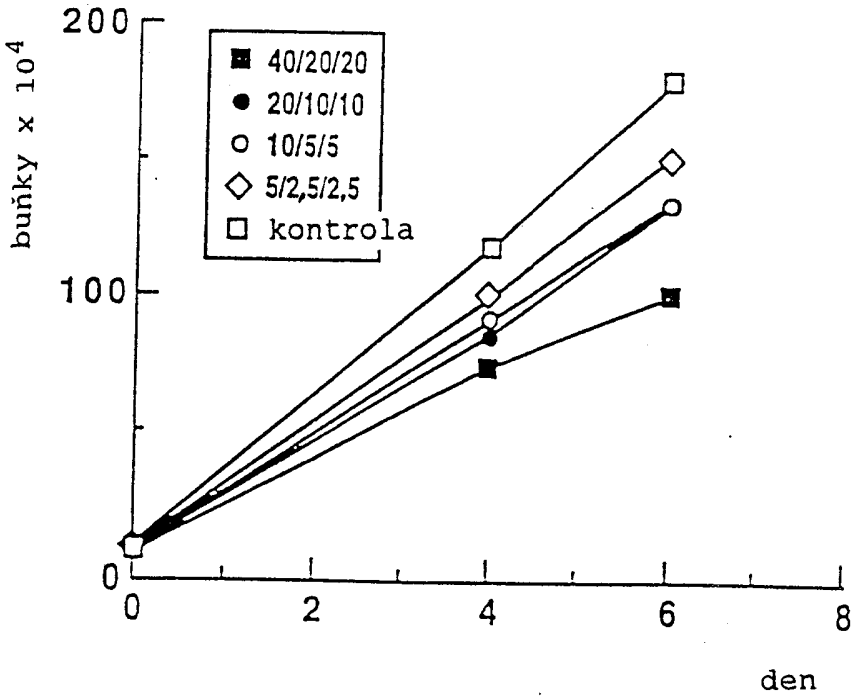
Obr. 9

PŘIL.
ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
17 XII 96
00210
0 9 2 9 2 9
č.j.

č.j.
0 9 2 9 2 9
DOŠLO
17 XII 96
ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

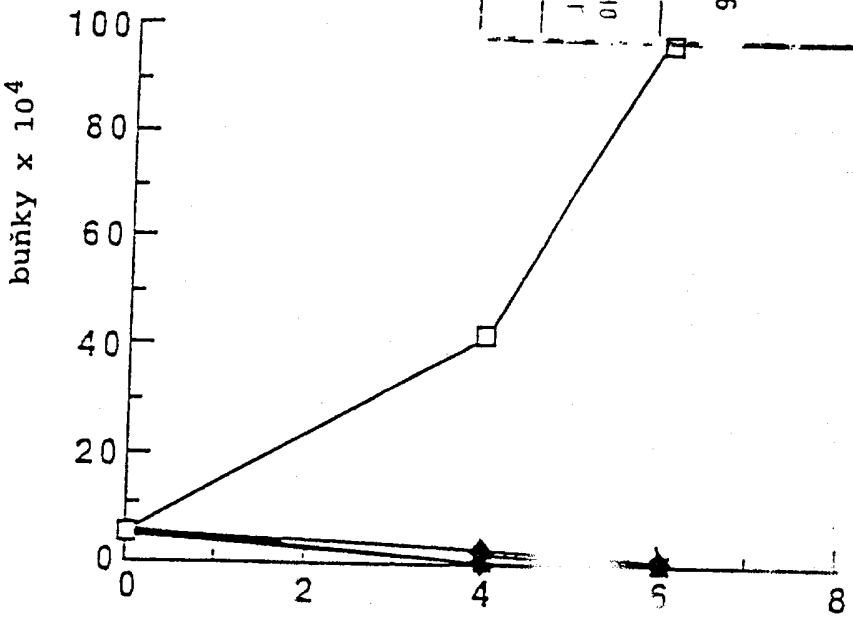


Obr. 10

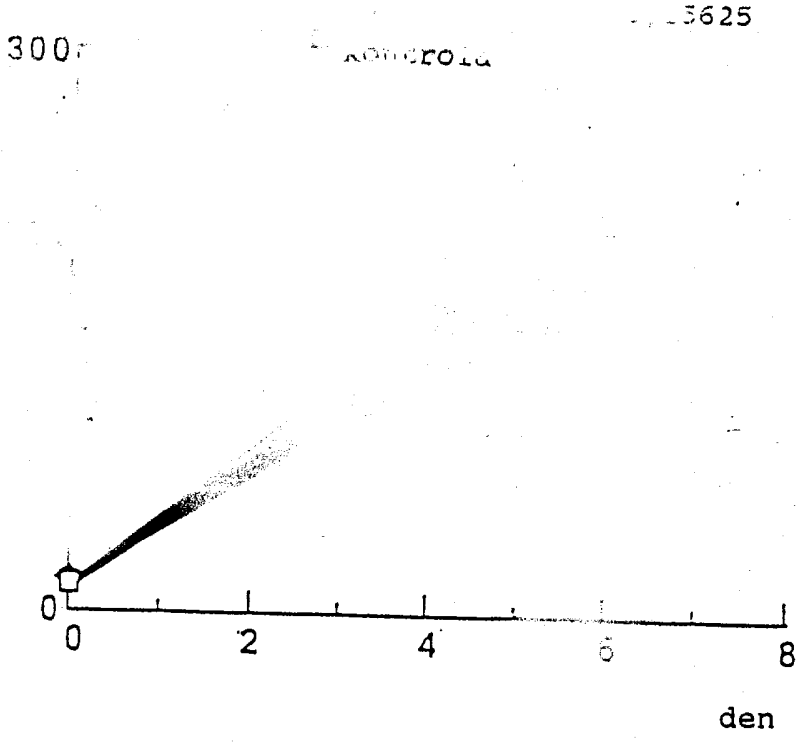


Obr. 11

č.j.
0 9 2 9 2 9
DOŠLO
17 XII 96
ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

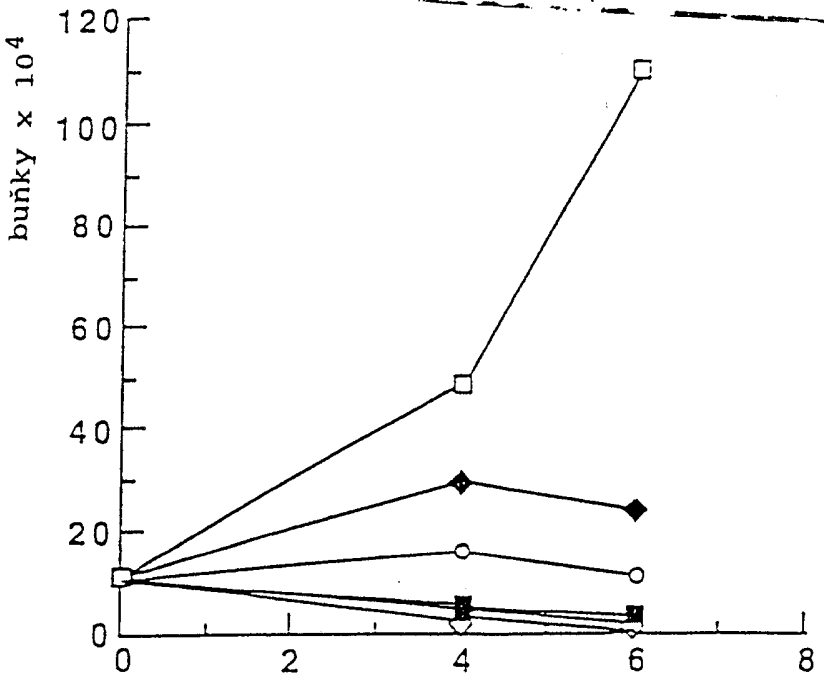


Obr.

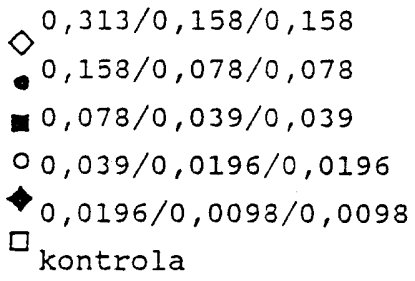


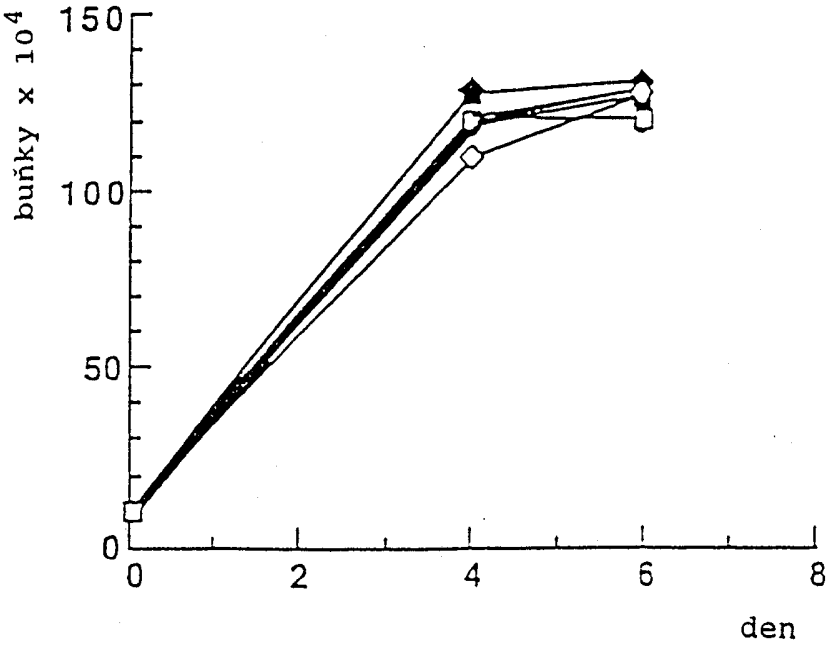
Obr. 13

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
DOŠLO
17 XI 96
č.j.
0 9 2 9 9



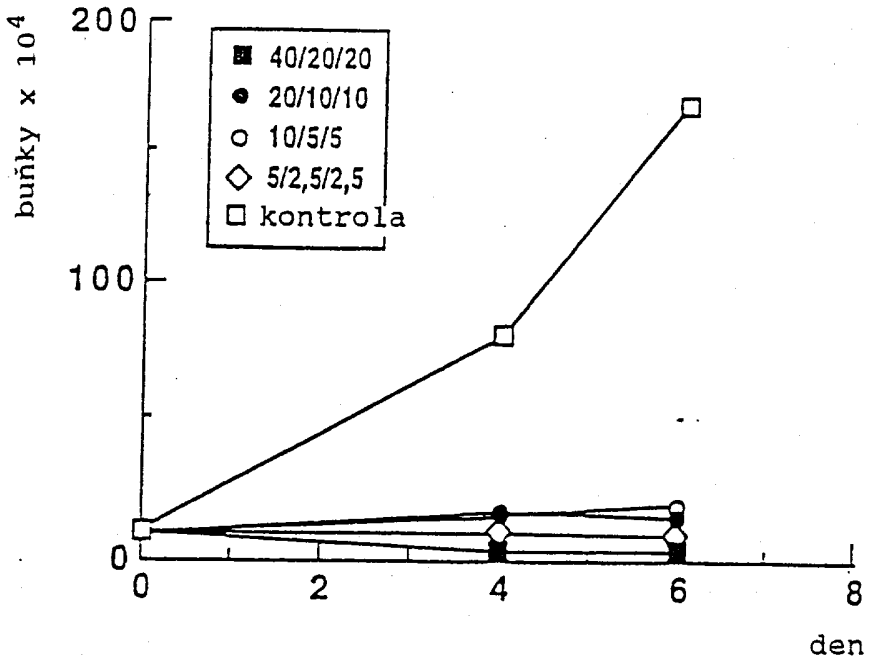
Obr. 14



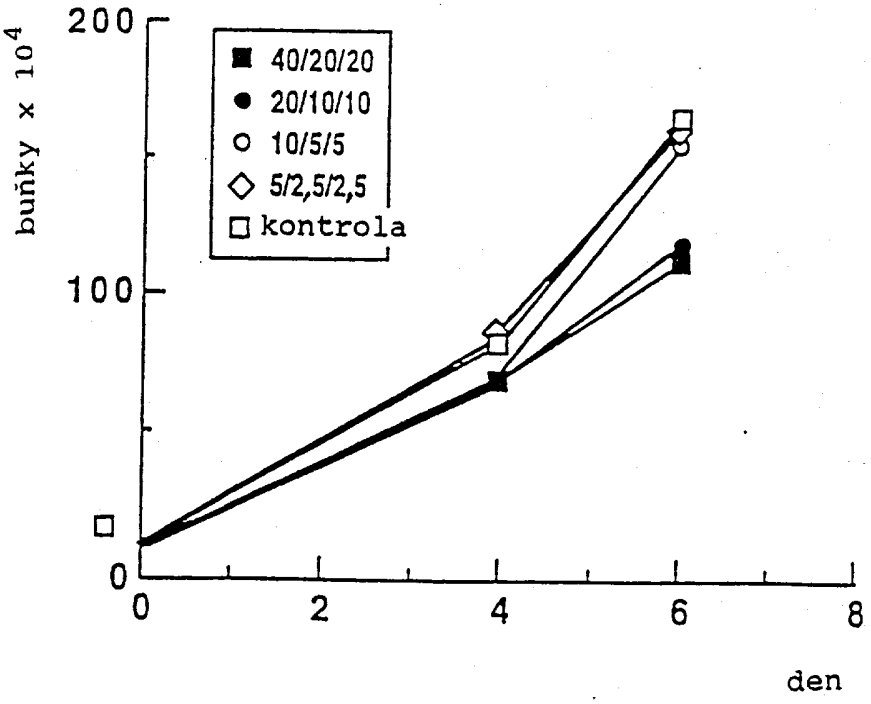


Obr. 15

č.j.
0 9 2 9 2 9
DOŠLO
17 XII 96
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

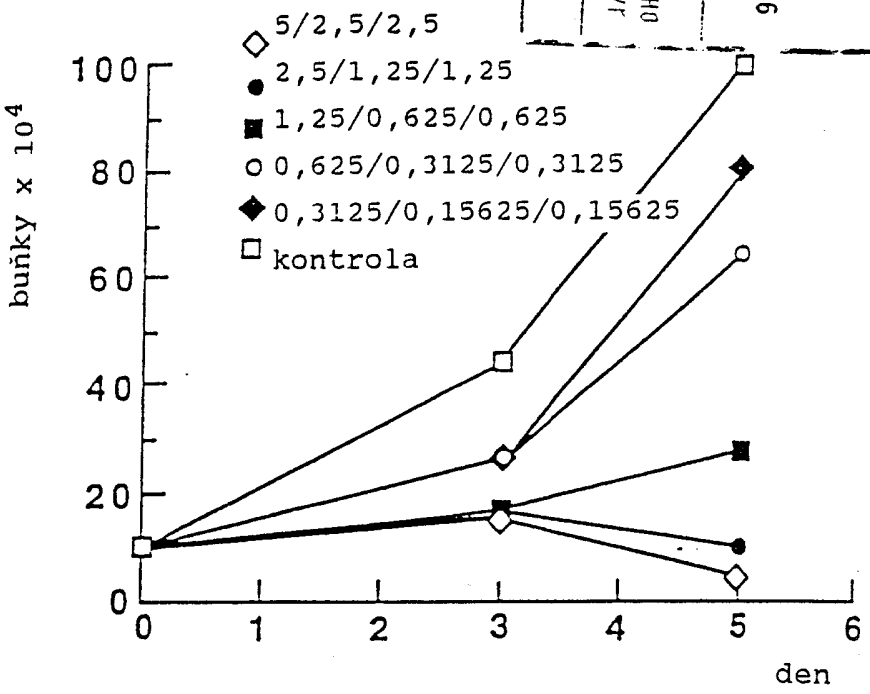


Obr. 16

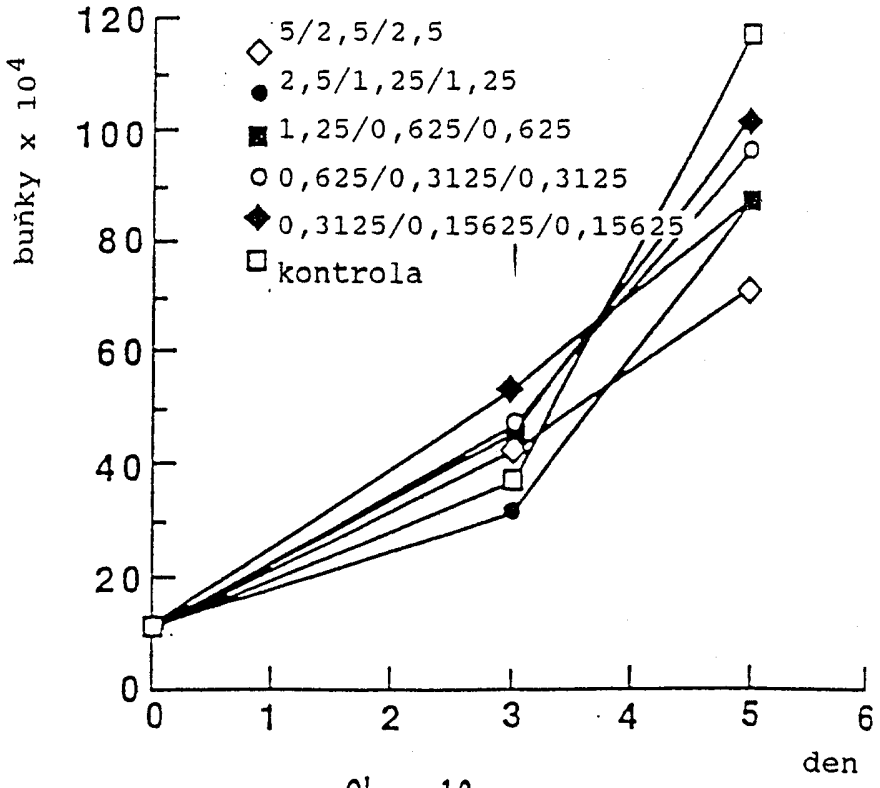


Obr. 17

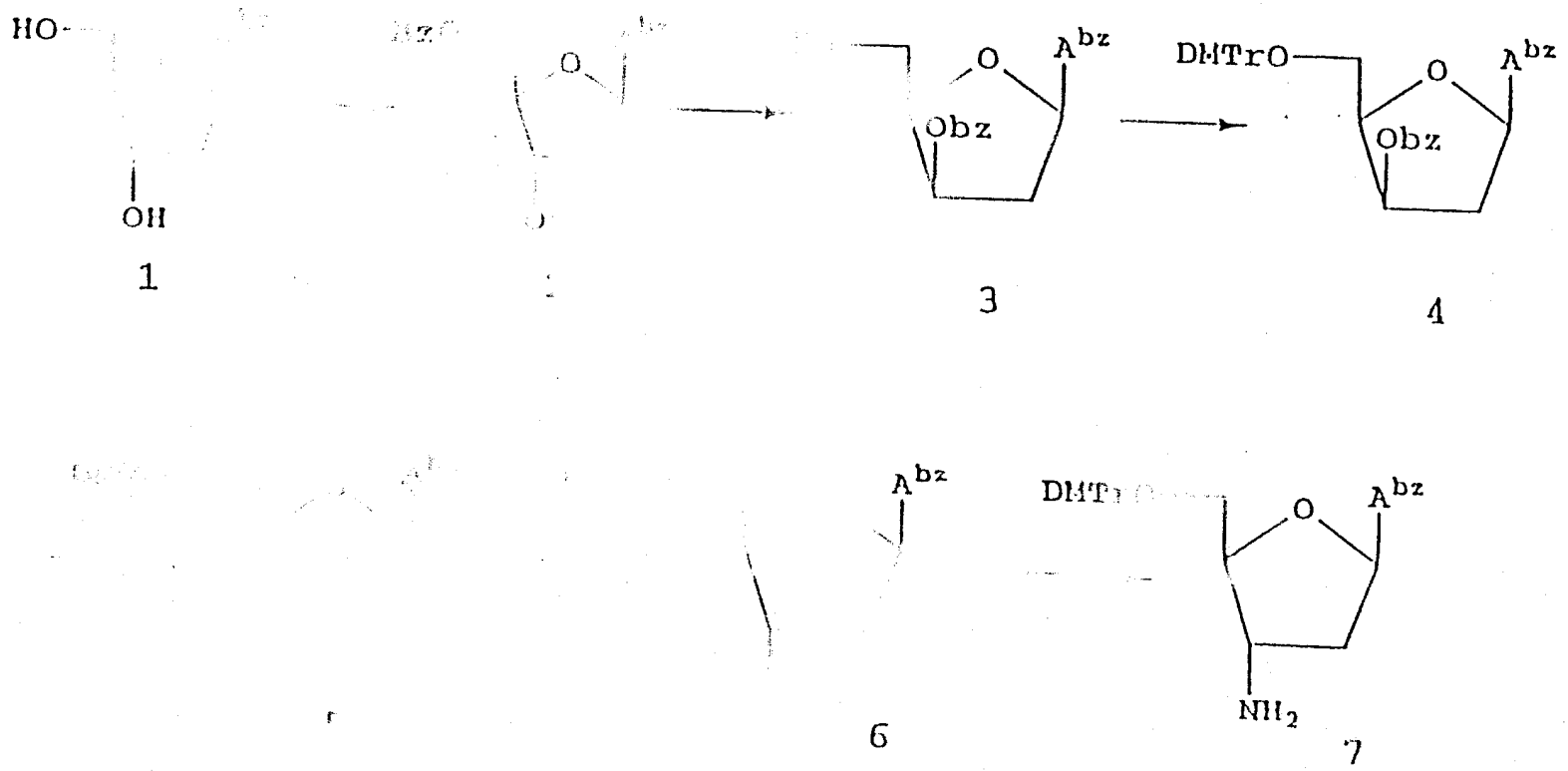
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
17 XII 96
DOŠLO
č.j.
0 9 2 9 2 9



Obr. 18



Obr. 19



Obr. 20

Č.j.
0 9 2 9 2 9
DOŠLO
17 XII 96
ÚRAD
PŘ. M. S. OVĚHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.