



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 133037

(51) Int. Cl.² C 07 H 21/02

(21) Patentsøknad nr. 1506/71

(22) Inngitt 22.04.71

(23) Løpedag 22.04.71

(41) Alment tilgjengelig fra 26.10.71

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 17.11.75

(30) Prioritet begjært 23.04.70, Storbritannia, nr. 19448

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive N-oksyder av naturlige dobbelttrådigte ribonukleinsyre og salter av slike.

(71)(73) Søker/Patenthaver BEECHAM GROUP LIMITED,
Beecham House, Great West Road,
Brentford, Middlesex, England.

(72) Oppfinner HARNDEN, Michael Raymond,
Horsham, Sussex, England.

(74) Fullmektig Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner US patent nr. 3317511

133037

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av en ny klasse av interferoninduserende forbindelser som er N-oksyder av naturlige dobbelttrådige ribonukleinsyrer.

Dobbelttrådige ribonukleinsyrer (RNA) fra en rekke kilder har vist seg å ha anti-viral aktivitet hos dyr. Dobbelttrådige RNA kan ekstraheres fra viruspartikler som er tilstede i bestemte infiserte sopparter, f.eks. visse av *Penicillia*, nemlig *P.chrysogenum*, *P.stoloniferum*, *P.funiculosum* og *P.cyaneofulvum*, og slike RNA har vist anti-viral aktivitet.

Noen andre vira fra hvilke anti-virale dobbelttrådige RNA kan ekstraheres, har vært omtalt. Disse er sukkerbetegulvirus, ris-dvergvirus, reovirus 3, og minst ett cytoplasmisk polyhedrose-insektvirus (selvom i sistnevnte tilfelle forfatterne ikke omtaler den nøyaktige kilde for de cytoplasmiske polyhedrose-viruser - *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 132.2, 1969).

I tillegg til de ovennevnte kilder er dobbelttrådige RNA med anti-viral aktivitet blitt ekstrahert fra den replikative form av phage fra MS2 fra *E.coli*, den replikative form av phage fra MU9 fra *E.coli* og den replikative form av phage fra *Pseudomonas aeruginosa*.

Det er i de fleste av de ovennevnte tilfeller blitt fastslått at den anti-virale virkning av dobbelttrådige RNA skyldes stimuleringen av interferon-produksjon i dyrecellene. Således er det ikke den dobbelttrådige RNA selv som er det aktive anti-virale stoff, men heller interferonet som produseres av cellene som et svar på administreringen av RNA. Av denne grunn er det sannsynligvis mer nøyaktig å referere til de dobbelttrådige RNA som

133037

"interferon-induserende midler" heller enn som "anti-virale midler".

Dobbeltrådig ribonukleinsyrer kan være av verdi i profylaksen, og i mindre grad, i behandlingen av virale infeksjoner hos dyr og mennesker. Imidlertid er det rimelig å antyde at den medisinske bruk av dobbeltrådig RNA av naturlig opprinnelse kan være begrenset, da dobbeltrådig RNA i den form som den ekstraheres i fra naturlige kilder oppviser visse toksiske bivirkninger som synes å bli mer tydelige med økende doser. Oppfinnelsen er basert på den oppdagelse at visse derivater av dobbeltrådig ribonukleinsyre av naturlig opprinnelse er mindre toksisk enn mor-RNA og allikevel beholder god interferon-induserende aktivitet.

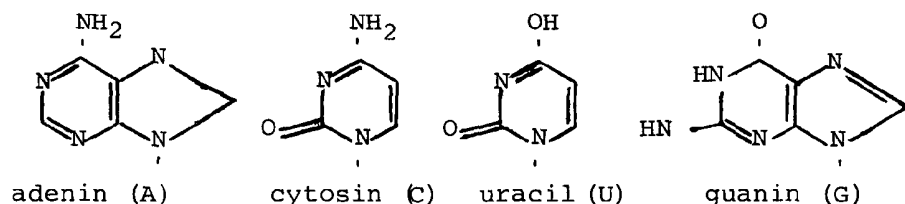
I henhold til oppfinnelsen tilveiebringes N-oksyder av naturlige dobbeltrådig ribonukleinsyrer og salter av disse, idet de nevnte N-oksyder og salter selv er dobbeltrådig.

Saltene som kan fremstilles i henhold til oppfinnelsen kan være ammoniumsalter eller alkalimetallsalter (f.eks. natrium eller kalium), salter med organiske baser såsom aminer og salter med flerbasiske organiske materialer såsom polylysin og D.E.A.E. dekstran. Slik det her brukes refererer uttrykket "naturlige dobbeltrådig ribonukleinsyrer" bare til dobbeltrådig ribonukleinsyrer som stammer fra naturlige kilder, f.eks. slike som er omtalt ovenfor, og omfatter ikke syntetiske dobbeltrådig ribonukleinsyrer som f.eks. polyinosin: polycytidylsyre (Poly I: Poly C), polyadenyl: polyuridylsyre (Poly A: Poly U) eller polyguanyl: polycytidylsyre (Poly G: Poly C). I tillegg refererer betegnelsen "dobbeltrådig" til det karakteristikum hvorved to separate ribonukleinsyremolekyler er knyttet til hverandre ved hydrogenbinding mellom noen eller alle basene langs hvert molekyl. Slike dobbeltrådig ribonukleinsyrer er relativt inerte overfor innvirkning av ribonuklease, ulik den enkelttrådig varietet.

Den kjemiske identitet av N-oksydene som fremstilles i henhold til foreliggende oppfinnelse vil tydelig forstås av den som er familiære med strukturen av ribonukleinsyrer. En ribonukleinsyre er et polynukleotid. Molekylet består av gjentatte ribose/fosfat-enheter som danner en ryggrad, med en pyrimidin- eller purinbase festet til hver ribosedel. I de naturlige ribonukleinsyrer som oppfinnelsen vedrører, er én av fire forskjellige baser festet til hver sukkerdel, nemlig adenin, cytosin, uracil og guanin.

133037

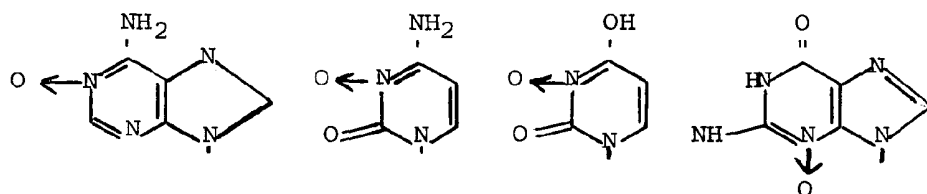
Baseradikalene til ribonukleinsyremolekylet er representert ved formlene:



I hver av ovenstående formler er den frie valens av nitrogenatomet knyttet til en sukkerdel i nukleinsyreryggraden. RNA atskiller seg i molekylvekten og i basesekvensen langs sukker/fosfatryggraden.

I de dobbelttrådlige ribonukleinsyrer er to enkelttrådlige RNA knyttet til hverandre ved hydrogenbinding mellom baser, idet en adeninbase på ene er hydrogenbundet til en uracilbase på den annen, og en cytosinbase på den ene er hydrogenbundet til en guaninbase på den annen.

Teoretisk kan de baseradikaler som er angitt ovenfor, hver omdannes til et N-oksyd:



I teorien kan altså de dobbelttrådlige RNA-N-oksyder i henhold til oppfinnelsen brytes ned til fem hypotetiske grupper:

- Slike hvor adenin er den eneste oksyderte base.
- Slike hvor cytosin er den eneste oksyderte base.
- Slike hvor guanin er den eneste oksyderte base.
- Slike hvor uracil er den eneste oksyderte base.
- Slike hvor to eller flere av de fire baser er oksydert.

Imidlertid antas det i praksis at uracilbasene ikke er oksydert i noen særlig utstrekning, og, med mindre meget milde, selektive oksyderingsbetingelser anvendes, er adenin-, guanin- og cytosinbasene allesammen oksydert i større eller mindre grad i det samme molekyl.

Videre vil det være tydelig at for en gitt dobbelttrådig ribonukleinsyre er det mulig med forskjellige oksydasjonsgrader, varierende fra N-oksyder hvor bare en meget liten del av de totale oksyderbare basestillinger er oksydert, til slike hvor hovedmengden av de oksyderbare basestillinger er oksydert. Det er funnet at når

oksydasjonsgraden øker, dvs. etter hvert som flere og flere av basene oksyderes, er det stadig mer sannsynlig at det dobbelttrådlige molekyl vil spaltes i enkelttrådig materiale. Siden oppfinnelsen bare vedrører de N-oksyder som selv er dobbelttrådlige, følger derav at N-oksydene i henhold til oppfinnelsen har minst noen ikke-oksyderte basestillinger langs molekylet.

Det anvendes en empirisk metode for måling av oksydasjonsgraden av de dobbelttrådlige N-oksyder i henhold til oppfinnelsen. Det ultrafiolette spektrum for en naturlig dobbelttrådig ribonukleinsyre oppviser en sterk absorpsjons-topp ved 258 m. mikron og svak absorpsjon ved 230 m. mikron. Etter hvert som flere og flere av basene i det dobbelttrådlige molekyl oksyderes, øker absorpsjonen ved 230 m. mikron mens absorpsjonen ved 258 m. mikron avtar. Således er forholdet mellom absorpsjons-topp-høydene et mål for graden av N-oksydasjon av den dobbelttrådlige ribonukleinsyre, dvs. forholdet:

<u>absorpsjon ved 230 m.mikron</u>	øker etterhvert som oksydasjons-
<u>absorpsjon ved 258 m.mikron</u>	graden øker.

(NB. dette forhold vil i det følgende skrives slik: $A \frac{230 \text{ m.mikron}}{258 \text{ m.mikron}}$).

To andre parametere som anvendes for måling av oksydasjonsgraden for materialene som fremstilles i henhold til oppfinnelsen, er materialers hyperkromisitet og dets T_m -verdi. Disse parametere oppnås ved å registrere U.V.-absorpsjonen til materialet ved en spesiell frekvens, mens temperaturen i materialet gradvis økes. U.V.-absorpsjonen til en dobbelttrådig RNA eller ved 258 m.mikron er alltid mindre enn absorpsjonen ved den samme frekvens for det samme materiale i enkelttrådig form. Dessuten, etterhvert som temperaturen i det dobbelttrådlige materiale økes, blir hydrogenbindingen mellom trådene svakere og svakere til trådene til slutt skiller seg. Av dette følger derfor at U.V.-absorpsjonsverdien for et dobbelttrådig materiale vil avta med økende temperatur. Forskjellen mellom de to ytterligheter for absorpsjon uttrykt som prosent av absorpsjonen av det dobbelttrådlige materiale, betegnes som materialets "hyperkromisitet".

Som forklart, er det funnet at når U.V.-absorpsjonen ved 258 m.mikron av N-oksydene som fremstilles i henhold til oppfinnelsen avsettes mot temperaturen, at absorpsjonen er høyere ved høye temperaturer enn ved lave temperaturer. Økningen i absorpsjon er gradvis, og det er mulig å lokalisere temperaturen ved hvilken absorpsjonen er halvveis mellom absorpsjonen av det dobbelttrådlige materiale og av det enkelttrådlige materiale. Denne temperatur betegnes T_m for

N-oksudet og er avhengig av oksydasjonsgraden, og man finner at T_m avtar med økende oksydasjonsgrad.

Videre kan et spesifikt N-oksyd som fremstilles i henhold til oppfinnelsen hydrolyseres for degradering av materialet til sine individuelle nukleotidkomponenter (både oksyderte og ikke-oksyderte). De relative forhold mellom uoksyderte baser og oksyderte baser kan da beregnes, hvorved det fremkommer en direkte karakterisering av N-oksydene i henhold til oppfinnelsen.

Som oppsummering av hva som er gått forut, kan det sies at oppfinnelsen tilveiebringer en ny klasse derivater av dobbelttrådig RNA, nemlig N-oksydene. Denne nye klasse N-oksyder inneholder et stort antall forskjellige N-oksyder som varierer i antall base stillinger som er oksydert, dvs. oksydasjonsgrad. Det er funnet at to parametere, nemlig forholdet mellom U.V.-absorpsjon ved 230 m.mikron og ved 258 m.mikron og T_m , kan brukes som et mål for oksydasjonsgraden, mens de relative forhold mellom uoksyderte og oksyderte baser kan beregnes direkte.

Derfor, selvom oppfinnelsen omfatter alle disse N-oksyder av dobbelttrådig RNA og salter av disse som selv er dobbelttrådig, er en spesifikk underklasse av N-oksyder i henhold til oppfinnelsen som viser god anti-viral aktivitet overfor et stort område av virus og som er mindre toksiske enn mor-RNA, slike som er karakterisert som dobbelttrådig N-oksyderte ribonukleinsyrer og salter av disse, hvor uracilbasene er vesentlig uoksydert, fra 5 til 40 % av adeninbasene er oksydert, fra 5 til 60 % av cytosinbasene er oksydert og fra 5 til 70 % av guaninbasene er oksydert. Den dobbelttrådig karakter av N-oksydene går tapt ved høye oksydasjonsgrader, men det er dessverre ikke mulig å sette noen universelt anvendbar øvre grense for oksydasjonsgraden, utover hvilken enkelttrådig materiale oppnås. En slik øvre grense er avhengig av mange faktorer, spesielt temperaturen og identiteten til utgangs-RNA.

Oppfinnelsen omfatter altså en fremgangsmåte for fremstilling av N-oksydene av dobbelttrådig RNA og salter av disse, idet fremgangsmåten omfatter en reaksjon mellom en dobbelttrådig ribonukleinsyre eller et salt av denne med hydrogenperoksyd eller en persyre.

Egnete persyrer omfatter pereddiksyre, perbenzoesyre, monoperftalsyre eller m-klorperbenzoesyre. Av disse persyrer foretrekkes det å bruke en m-klorperbenzoesyre, siden reaksjonen skrider glatt frem og er regulerbar med dette materiale.

133037

Reaksjonen utføres vanligvis i et egnet løsningsmiddel for den dobbelttrådig RNA. Egnete løsningsmidler er vanligvis lett alkaliske for å lette løsningen av RNA, f.eks. kaliumacetat i vann og etanol. pH ca. 8 er vanligvis egnet for reaksjonsmiljøet. I dette tilfelle oppnås produktet i kaliumsaltform.

Temperaturen som reaksjonen finner sted ved, er ikke kritisk for oppfinnelsen. Det foretrekkes å unngå meget lave temperaturer, ved hvilke reaksjonen går ekstremt langsomt, og meget høye temperaturer, ved hvilke det er alvorlig risiko for å ødelegge den dobbelttrådig natur hos RNA. Generelt er romtemperatur (ca. 20-25°C) passende, selv om en temperatur på fra 5°C til 50°C ville være egnet.

Reaksjonstiden vil variere i henhold til oksydasjonsgraden som kreves og temperaturen i reaksjonsblandingen. Når en reaksjonstemperatur på ca. 20°C anvendes og m-klorperbenzoesyre anvendes som oksyderingsmiddel, øker oksydasjonsgraden til produktet gradvis i løpet av flere timer. Under disse betingelser, generelt ved ca. 16 timer, oppnås enkelttrådig N-oksyder selv om det vil forstås at den nøyaktige tid da enkelttrådig materialer oppnås, i høy grad er variabel i henhold til de andre reaksjonsparametere.

N-oksydene som fremstilles i henhold til oppfinnelsen kan gjenvinnes fra reaksjonsmediet ved anti-løsningsmiddelutfylling. Et egnet anti-løsningsmiddel for N-oksydene er etanol. Utfyllingsproduktet selv oppsamles bekvemt ved sentrifugering. Hvilket som helst av de vanlige rensemetoder for nukleinsyrer kan anvendes på produktet i henhold til oppfinnelsen, f.eks. kromatografi og elektroforese.

Det bør kanskje påpekes at det er noen sannsynlighet for at RNA som oppnås fra noen naturlige kilder i virkeligheten er blandinger av to eller flere RNA. Når de separeres ved polyakrylamidgel-elektroforese f.eks., separerer noen fungale RNA i opptil 5 band. Det skal derfor forstås at oppfinnelsen omfatter N-oksydene til slike RNA-blandinger, og det er av og til mulig å separere N-oksydene selv i to eller flere distinkte band ved elektroforese.

Som angitt tidligere, er de dobbelttrådig N-oksyder i henhold til oppfinnelsen i stand til å indusere interferon-produksjon hos dyr og mennesker, og de er generelt mindre toksiske enn mor-RNA som de stammer fra, som vist ved toksisitetsstudier hos dyr, f.eks. mus, og de beholder god anti-viral aktivitet. Siden interferon er i alt vesentlig et ikke-spesifikt anti-viralt middel, følger det av dette at N-oksydene i henhold til oppfinnelsen er av

133037

verdi i profilaksen og behandlingen av et vidt område av virus-infeksjoner som f.eks. skyldes Cocksackie-virus, Semliki Forest-virus, vaksine-virus, munn- og klovsyke-virus, versicolor stomatitis-virus, rabies-virus og influensa-virus.

Oppfinnelsen skal i det følgende illustreres for noen av sine utførelsesformer ved hjelp av eksempler:

Eksempel 1

Penicillium chrysogenum A.T.C.C. 10 002 ble dyrket som følger:

Sporedannelsesagar

Tabell I

Glycerol	7,5	g/l
Sort sukkersirup	7,5	g/l
Gjærekstrakt	5,0	g/l
NaCl	10,0	g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,005	g/l
KH ₂ PO ₄	0,006	g/l
Fe ₂ (SO ₄) ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·24H ₂ O	0,0016	g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0001	g/l
CaSO ₄	0,25	g/l
Agar	20,0	g/l

Substratet tillages med demineralisert vann, og pH-verdien justeres til 6,6. 40 ml av substratet tilsettes til 225 grams medisinflasker som tilstoppes med bomull og steriliseres 15 minutter ved 121°C.

Skråkulturene inokuleres fra forrådiskulturen, som er i jord, og inkuberes ved 26°C til god sporedannelse.

Bygg-kolbekulturer

Thompson-flasker med bomullspropper inneholdende 150 g hele korn av bygg steriliseres i 2 timer ved 121°C. Sporene

133037

fra en 225 g skråkultur suspenderes i 25 ml av en løsning som inneholder glycerol, 3,0 vektprosent, og asparagin, 0,1 %, og dette brukes til å inokulere 5 bygg-flasker hvortil det tilsettes ytterligere 50 ml av suspenderingssubstratet. Kolbene inkuberes ved 26°C og ristes for hånd hver dag til god sporedannelse, vanligvis i løpet av 3 - 4 dager. Kolbene kan lagres i flere måneder ved 2 - 3°C

Fermenteringssubstrat

Tabell II

Glycerol	0,5
Glukose	0,5
Trypton	0,25
Bakteriologisk pepton	0,25
Gjærekstrakt	0,125
Maisstøpevæske	1,25
K ₂ HPO ₄	0,1
NaCl	0,5
Skumdreper	0,03
pH justert til 7,0	

Midlet som brukes, er 10 % "Pluronic" L81 i soya-bønneolje. Substratet tillages med springvann.

Vegetativt frø

75 l fermenteringssubstrat dampsteriliseres i en 100 l fermentator med ledevegger av rustfritt stål. En suspensjon av sporer oppnådd ved tilsetning av 100 ml sterilt vann inneholdende 0,01 % "Tween" 80, til en bygg-flaske og med risting brukes til å inokulere fermentatoren som inkuberes i 56 timer ved 25°C med serasjon og agitering.

Fermentering

1500 l fermenteringssubstrat dampsteriliseres i en 2000 l fermentator av rustfritt stål, fullstendig utstyrt med ledeplater. Denne inokuleres med 75 l av vegetativt frø og inkuberes ved 26°C i opptil 5 dager, med serasjon og agitering.

Hel fermenteringsbuljong (1500 l) klargjøres ved sentrifugering (modell SARR 5036, Westfalia Separator Ltd.), og mycelium vrakes. Til det avkjølte kulturfiltrat tilsettes 300 g handelsvanlig ribonukleinsyre - natriumsalt - oppløst i 20 l vann, hvorefter blandingen surgjøres til pH 4,0 med 25 volumprosent svovelsyre og 0,5 vekt/volumprosent diatomejord-filtermedium ("Dicalite" 438, Berk Chemicals Ltd.) tilsettes. Etter omrø-

ring i 30 minutter filtreres blandingen ved bruk av en filterpresse. Tørrstoffet som blir tilbake i pressen, vaskes med 100 ml citratpuffer med pH 4,0 (1205 g trinatriumcitrat og 1235 g sitronsyre pr. liter), som vrakes. Det vaskete tørrstoff ekstraheres med 2 vekt/volumprosent natriumbikarbonatløsning (150 l) ved å resirkulere løsningen i 1 time gjennom filterpressen.

Den således oppnådde ekstrakt konsentreres til 5 l ved membranfiltrering (Millipore VS membran, totalt areal 2100 cm²), og konsentratet klargjøres ved sentrifugering i 1 time ved 23 000 G. Virusliknende partikler sedimenteres ved 186 000 G. (Beckman type 42 rotor) og renses ved følgende metode.

Rå virusaktige partikler, pellets, resuspenderes i pufferløsning (0,01 M tris-(Hydroksymetyl)aminometan/ 0,15 M sodiumklorid inneholdende 10 mikrogram/ml penicillin G og 50 mikrogram/ml neomycin) og partikkelformete forurensninger fjernes ved sentrifugering ved 12 000 G i 30 minutter. Ytterligere rensning utføres ved sikting av suspensjonen på 10 % sukrose og øyeblikkelig sentrifugering ved 186 000 G i 90 minutter, idet pelletene resuspenderes og sentrifugeres ved 12 000 G som ovenfor.

Dobbeltrådig ribonukleinsyre frigjøres så fra rensede virusaktige partikler ved behandling med vaskemiddel og fenol: natriumdodecylsulfat tilsettes slik at det blir 0,1 vekt/volumprosent, og suspensjonen ekstraheres ved 37° i 45 minutter med like volumdeler fenol mettet med puffer. Fasene separeres ved sentrifugering ved 500 g, og ytterligere fenolekstraksjoner utføres ved romtemperatur til det oppnås et tydelig skille mellom fasene i to påfølgende ekstraksjoner. Når deproteiniseringen er fullstendig, fjernes fenol ved ekstraksjon med eter, og dobbeltrådig RNA utfelles ved tilsetning av 2 volumdeler absolutt etanol, idet løsningen først er gjort 0,2 M med hensyn til natriumacetat. Blandingen lagres ved -20°C til fullstendig utfylling, og materialet kan forlates i denne form til det er behov for det eller det kan alternativt rekonstitueres i tris-puffer og lyofiliseres.

Dobbeltrådig RNA (20 mg) oppnådd på denne måte ble oppløst i 0,4 M kaliumacetat med pH 8,2 (20 ml), og en løsning av en m-klorperbenzoesyre (500 mg) i etanol (10 ml) ble tilsatt. Løsningen fikk stå ved 20°C i 1 time, og deretter ble etanol (60 ml) tilsatt. Det oppnådde N-oksyderte RNA-utfellings-

produkt ble separert ved sentrifugering og vasket med etanol.

En prøve av det N-oksyderte RNA-utfyllingsprodukt ble oppløst i 0,4 M vandig kaliumacetat med pH 8,2, og forholdet $A_{230 \text{ m.mikron}} / A_{258 \text{ m.mikron}}$ ble målt. Forholdet $A_{230 \text{ m.mikron}} / A_{258 \text{ m.mikron}}$ ble deretter målt for den dobbelttrådig RNA som var utgangsmaterialet, og de to resultater ble sammenliknet:

$A_{230 \text{ m.mikron}} / A_{258 \text{ m.mikron}}$ for dobbelttrådig RNA-utgangsmateriale = 0,45
 $A_{230 \text{ m.mikron}} / A_{258 \text{ m.mikron}}$ for N-oksydert produkt = 0,57

En annen prøve av det N-oksyderte produkt ble deretter utsatt for kromatografisk separasjon på en Sepharose 2B kolonne (gelfiltrering). Dette ble utført ved bruk av en kolonne som var 90 cm lang, hadde intern diameter 2,5 cm, og et volum på tilnærmet 500 ml. Kolonnen ble eluert i oppstigende retning med en løsning som inneholdt natriumklorid (0,15 M), tris-puffer (0,05M) og magnesiumklorid (0,005M) med pH 7,5 ved en strømningshastighet av 0,4 ml pr. minutt. Fraksjoner som inneholdt 7,2 ml ble hver oppsamlet og analysert med hensyn på innholdet av N-oksydert produkt, som ble fastslått ved hjelp av styrken på U.V.-absorpsjonen ved 258 m.mikron). Det viste seg at produktet ble eluert fra Sepharose 2B-kolonnen i de samme fraksjoner som ble iaktatt for det dobbelttrådig RNA-utgangsmateriale, hvilket indikerte at det N-oksyderte produkt har samme molekylvekt og gjennomgående form som utgangsmaterialet og derfor var fullstendig dobbelttrådig.

En tredje prøve av det N-oksyderte produkt ble så utsatt for polyakrylamidgel-elektroforese. Denne ble utført ved bruk av 4 % akrylamidgel og en puffer som inneholdt 0,04M tris, 0,02M natriumacetat, 2mM natrium-EDTA, samt eddiksyre for å bringe pH-verdien til 7,8. Forsøket ble utført i et rør med 6,4 mm innvendig diameter og lengde 10 cm ved 20°C. Strøm ble påført opptil 10 V/cm ved 5 mA/gel i 1 - 3 timer. Gelen ble fjernet og stenet med en løsning av metylenblått og båndene iaktatt. Fremgangsmåten ble gjentatt for det dobbelttrådig RNA-utgangsmaterialet og resultatene sammenliknet. Forskjeller ble observert mellom båndene som ble oppnådd i de to tilfeller. Hovedbåndet i det N-oksyderte produkt beveget seg bare litt til gelen, mens utgangsmaterialet hadde høyere mobilitet og separerte seg i 3 bånd. Dette synes å indikere øket aggregering av N-oksydet i sammenlikning med utgangsmaterialet.

En fjerde prøve av det N-oksyderte produkt ble undersøkt i den hensikt å oppnå dets hyperkromisitet og dets T_m -verdi. Målingene ble utført i en 1 cm cellerved bruk av et Unicam SP 800 B spektrometer og en løsning av prøven i 0,03 n vandig natriumklorid inneholdende 1 % etylenglycol. Løsningstemperaturen ble forhøyet med $\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ hvert minutt og U.V.-absorpsjonen avsatt mot temperaturen. Det viste seg at det N-oksyderte produkt hadde en t_m på 79°C og en hyperkromisitet på 34,6 %.

Det N-oksyderte produkt ga mus beskyttelse når det ble administrert ad intraperitoneal vei i en konsentrasjon av 10 γ og 100 γ pr. mus utfordret 24 timer senere med encefalomyokarditis-virus administrert ad den samme vei, idet resultatene ble som følger:

Tabell I

N-oksyd-dose	Virus-dose	Mortalitet innen 12 dager hos dyr som fikk N-oksyd	Mortalitet innen 12 dager hos kontrolldyr som ikke fikk N-oksyd
10 γ	10^{-4}	5/10	9/10
10 γ	10^{-5}	0/10	8/10
100 γ	10^{-5}	2/10	8/10

Beskyttelse ble også gitt mus mot Semliki Forest-virus og Cocksackie-virus:

Aktivitet av N-oksyd mot Semliki Forest-virus (SFV)
og Cocksackie-virus (COX)

Tabell II

N-oksyd-dose	Virus-dose	Mortalitet innen 12 dager hos dyr som fikk N-oksyd	Mortalitet innen 12 dager hos kontrolldyr som ikke fikk N-oksyd
10 γ	SFV 10^{-3}	9/10	10/10
10 γ	SFV 10^{-4}	8/10	10/10
10 γ	SFV 10^{-5}	5/10	10/10
10 γ	COX 10^{-1}	6/10	10/10
10 γ	COX 10^{-2}	5/10	7/10
10 γ	COX 10^{-3}	2/10	4/10

Effekten av det N-oksyderte produkt på den immune respons hos mus ble undersøkt som følger:

Mus ble immunisert ved intravenøs injeksjon av en 10 % suspensjon av røde blodlegemer fra får. Forbindelsen som skulle testes, ble injisert samtidig ad samme vei.

Effekten av forbindelsen ble analysert den tredje dag ved hjelp av "lokalisert hemolyse i gel-teknikk". Denne fremgangsmåte var en modifisert versjon av "Jerne belegganalyse", opprinnelig beskrevet av Jerne, Norden og Henry. ("Cell Bound Antibodies" Wistar Inst. Press, Philadelphia 1963, s. 109 - Ed. Amos og Koprowski).

Mus ble slaktet og milten fjernet. Disse ble revet istykker for å frigjøre lymfoide celler. Miltene fra 5 mus ble slått sammen for hver forbindelse som ble testet. Etter passende fortykning i kultursubstrat ble 0,1 ml suspensjon av miltceller blandet med flytende agar og røde blodlegemer fra får og helt opp i en petriskål så det dannet et tynt skikt. Etter 2 timers inkubering ved 37°C hadde antistoffer diffusert inn i den omgivende agar fra visse celler. Tilsetning av utfyllende tillegg (serum av guinea-svin) for å lysere de røde blodlegemer fra får på områdene hvor antistoff er tilstede. Etter ytterligere inkubering for å tilveiebringe lyse av de røde celler ble platene plassert under en koloniteller (lupe med indirekte lyskilde), og lyse-områdene ("belegg") ble tallet. Disse viser seg som klare områder mot den opake røde bakgrunn av u-lyserte røde celler.

En celletelling ble utført på en prøve av celledensiteten etter platebelegning. Resultatene er uttrykt som beleggdannende celler (PFC) pr. million miltceller eller pr. milt.

Effekten av forbindelsen (den "immunologiske indeks") uttrykkes som forholdet $PFC/10^6$ hos de behandlede dyr: dyrene i kontrollgruppen (dosert med saltvann). Således representerer et forhold på 1,0 ingen effekt. Under 1,0 representerer immunosuppresjon og over 1,0 adjuvans.

Resultater:

Immunologisk indeks: ved 10 γ = 1,07
ved 100 γ = 2,29

Det N-oksyderte produkt viste derfor en adjuvans-effekt på den immune respons.

Toksisitet av den dobbelttrådede RNA som var ut-

gangsmaterialet og av det N-oksyderte produkt ble sammenliknet ved bruk av mus. De relevante eksperimentelle detaljer er som følger:

Dyr:	Mus
Stamme:	Charles River france S.P.F.
Kjønn:	Hankjønn
Tilstand:	Ikke-sultne
Vektområde:	20 - 25 g
Administrert volum:	0,1 ml/10 g mus
Fortynningsmiddel:	Sterilt vann for injeksjon (pyrogenfritt)
Antall/dosenivå:	6

Resultater

Tabell III

Dosering	Mortalitet hos dyr dosert med utgangs- materiale	Mortalitet hos dyr dosert med N-oksydert produkt
30 mg/kg	3/6 - dødsfall inn- treffer 24 - 72 timer etter dosering	0/6
16 "	2/6 "	0/6
12-8 "	0/6 "	0/6
10,4 "	0/6 "	0/6
8 "	0/6 "	0/6

Toksiske symptomer.

ds-RNA-letargi, utsondring rundt nese og øyne,
rynket pels, diaré.

⊗ Modifisert RNA - "anestesi" i tilnærmet 2 minuter etter dosering.

Tilstanden god under observasjonsperioden.

Disse resultater viser tydelig at det N-oksyderte produkt er mindre toksisk hos mus enn utgangsmaterialet.

Eksempel 2

Dobbeltrådig RNA-utgangsmateriale oppnådd som i eksempel 1 ble oksydert med en m-klorperbenzoesyre og ved bruk av de samme betingelser som beskrevet i eksempel 1 med den unntakelse at reaksjonstiden ble utvidet til 2,5 timer. Forholdet

A $\frac{230 \text{ m.mikron}}{258 \text{ m.mikron}}$ for utgangsmaterialet og produktet ble målt som i

133037

eksempel 1.

A $\frac{230 \text{ m.mikron}}{258 \text{ m.mikron}}$ for utgangsmaterialet A = 0,45;A $\frac{230 \text{ m.mikron}}{258 \text{ m.mikron}}$ A $\frac{230 \text{ m.mikron}}{258 \text{ m.mikron}}$ for N-oksydert produkt = 0,61.

Produktet ble fraksjonert på Sepharose 2B som i eksempel 1 og hovedfraksjonen eluert i de samme fraksjoner som var observert for da-RNA-utgangsmaterialet.

Akrylamidgel-elektroforese ved bruk av metoden fra eksempel 1 ga liknende resultater som beskrevet for produktet fra eksempel 1.

Produktet hadde en T_m på $77,5^\circ$, hyperkromisitet 34,6 %, idet begge parametere var målt som i eksempel 1.

Det beskyttelse til mus ved 10γ og 100γ mot Encephalomyocarditis-virus, Semliki Forest-virus og Coxsackie-virus, idet de relevante resultater for Encephalomyocarditis-virus var som følger:

Tabell IV

Dose av forbindelsen	Dose av virus	Mortalitet innen 12 dager hos dyr som fikk forbin- delsen	Mortalitet innen 12 dager hos kont- rolldyr som ikke fikk noen forbindelse
10γ	10^{-4}	5/10	9/10
10γ	10^{-5}	1/40	8/10
100γ	10^{-5}	1/10	8/10

Aktivitet av N-oksyd overfor Semliki Forest-virus (SFV) og Coxsackie-virus (COX)

Tabell V

Dose av N-oksyd	Dose av virus	Mortalitet innen 12 dager hos dyr som fikk N-oksyd	Mortalitet innen 12 dager hos kont- rolldyr som ikke fikk N-oksyd
10γ	SFV 10^{-3}	8/10	10/10
10γ	SFV 10^{-4}	8/10	10/10
10γ	SFV 10^{-5}	4/10	10/10
10γ	COX 10^{-1}	7/10	10/10
10γ	COX 10^{-2}	5/10	8/10
10γ	COX 10^{-3}	2/10	5/10

Immunologisk indeks: 10 γ , 0,63; 100 γ , 1,26 (målt som i eksempel 1). Toksisitetsstudier hos mus som angitt i eksempel 1 indikerer en redusert toksisitet i sammenlikning med umodifisert ds-RNA. De oppnådde resultater var identiske med dem som er angitt i eksempel 1.

Eksempel 3

Dobbeltrådig RNA-utgangsmateriale oppnådd som i eksempel 1 ble oksydert med m-klorperbenzoesyre ved bruk av de samme betingelser som beskrevet ovenfor i eksempel 1, med den unntakelse at reaksjonstiden ble utvidet til 5 timer. Igjen ble de forskjellige parametere målt ved bruk av fremgangsmåtene fra eksempel 1:

A $\frac{230 \text{ m.mikron}}{258 \text{ m.mikron}}$ for utgangsmaterialet = 0,45

A $\frac{230 \text{ m.mikron}}{258 \text{ m.mikron}}$ for N-oksydert produkt = 0,67.

Produktet ble fraksjonert på Sepharose 2B og hovedfraksjonen eluert i de samme fraksjoner som iaktatt for utgangsmaterialet.

Akrylamidgel-elektroforese ga liknende resultater som beskrevet for produktet fra eksempel 1.

Produktet hadde en T_m på 75° , hyperkromisitet 34,1 %.

Det ga beskyttelse til mus ved 10 γ og 100 γ mot EMC-virus:

Tabell VI

Dose av forbindelsen	Dose av virus	Mortalitet innen 12 dager hos dyr som fikk forbin- delsen	Mortalitet innen 12 dager hos kont- rolldyr som ikke fikk noen forb.
10 γ	10^{-4}	2/10	10/10
100 γ	10^{-4}	1/10	10/10

Immunologisk indeks: 10 γ , 1,30; 100 γ , 1,17.

Eksempel 4

Dobbeltrådig RNA-utgangsmateriale oppnådd som i eksempel 1 ble oksydert med m-klorperbenzoesyre ved bruk av de samme betingelser som beskrevet ovenfor i eksempel 1, med den unntakelse at reaksjonstiden ble utvidet til 16 timer.

A $\frac{230 \text{ m.mikron}}{258 \text{ m.mikron}}$ for utgangsmaterialet = 0,45

A $\frac{230 \text{ m.mikron}}{258 \text{ m.mikron}}$ for N-oksydert produkt = 2,22.

Produktet ble fraksjonert på Sepharose 2B og produktet eluert

133037

16

som en enkelt fraksjon med et elueringsvolum tilnærmet 3 x det som var iaktatt for umodifisert utgangsmateriale.

Produktet var i alt vesentlig enkelttrådig og hadde en hyperkromisitet 10 % uten noen definitiv Tm.

Det ga bare svak beskyttelse til mus ved 10 γ mot EMC-virus. Immunologisk indeks: 10 γ , 1,10.

Eksempel 5

N-oksydene som ble oppnådd i eksemplene 1, 2 og 3 (merket h.h.v. INT 9, INT 10 og INT 14) ble undersøkt i den hensikt å bestemme baseforholdene og oksydasjonsgraden.

Baseforholdene ble bestemt ved hydrolyse av dobbelttrådig ribonukleinsyre og dets N-oksydasjonsprodukt INT, 9, 10 og 14 i 0,3n NaOH ved 37° i 18 timer. Hydrolysatet ble nøytralisert med NH₄Cl og blandingen av nukleosid-2', 3'-fosfater separert på en Dowex 1 x 8 kolonne (200 - 400 mesh) eluert med økende konsentrasjoner av saltsyre. Cytidylsyrer ble eluert med 0,003n, adenylsyrer med 0,005n, uridylsyre med 0,007n og guanidylsyrer med 0,1n hydroklorisyre.

Fraksjonene som inneholdt hvert nukleotid, ble kombinert og nukleotidkonsentrasjonen beregnet ut fra dets U.V.-absorpsjon. N-oksydene til puriner og pyrimidiner degraderes av både vandig alkali og syre til et produkt som ikke absorberer i det ultrafiolette område (J. Gangloff og J.B. Ebel, Bull. Soc Chim. Biol. 1968, 50, 2335) og kan derfor ikke bestemmes direkte.

Forbindelse	N-oksydasjon reaksjonstid (timer)	Baseforhold				% oksydert base			
		A	U	C	G	A	U	C	G
ds-RNA (uoksydert)	0	0,97	1,04	0,98	1,00	0	0	0	0
INT 9	1	0,80	1,00	0,74	0,72	20	0	26	28
INT 10	2,5	0,75	1,00	0,70	0,72	25	0	30	28
INT 14	5	0,70	1,00	0,45	0,36	30	0	55	64

a Det totale uridin-2', 3'-fosfat oppnådd ved hydrolyse av en på forhånd bestemt mengde av N-oksydasjonsproduktene, var i hvert tilfelle identisk med det som ble oppnådd fra samme mengde av umodifisert ds-RNA. Dette, koplet med den observasjon at under identiske oksydasjonsbetingelser gjennomgår

polyribouridylsyre ingen merkbar grad av oksydasjon, tillater den konklusjon at uracilrestene av ds.RNA ikke er oksydert, og tallene for % oksydasjon som er angitt for de andre baser, er beregnet på denne forutsetning.

Eksempel 6

Biologiske data

A. Beskyttelse mot Encephalomyocarditis-virus (EMC)

Intraperitoneale injeksjoner på 10 mikro g og 100 mikro g av de N-oksyderte RNA INT 9, 10, 14 og 6 (produktene fra h.h.v. eksemplene 1, 2, 3 og 4) ble administrert i 0,15m NaCl til mus av stammen CD1 som veide 16 - 20 g. 24 timer senere ble musene utsatt for varierende fortynninger av EMC som også ble administrert ad intraperitoneal vei. Mortalitetsforholdene i de følgende 12 dager for N-oksyd-behandlede dyr og ubehandlede kontrolldyr ble bestemt.

Forbindelse	Dose pr. mus (mikro g)	LD ₅₀ for virus som var admi- nistrert	Mortalitet innen 12 dager hos dyr som fikk N-oksyd	Mortalitet innen 12 dager hos kontrolldyr som ikke fik N-oksyd
	10	10	0/10	16/20
	100	10	2/10	16/20
	10	20	6/10	9/9
	1	32	5/10	20/20
	2,5	32	4/10	20/20
INT 9	5	32	3/10	20/20
(eksempel 1)	10	32	3/10	20/20
	20	32	8/10	20/20
	40	32	6/10	20/20
	80	32	3/8	20/20
	10	100	5/10	9/10
	10	200	7/10	10/10
	10	2000	10/10	10/10

133037

Forbindelse	Dose pr. mus (mikro g)	LD ₅₀ for virus som var admi- nistrert	Mortalitet innen 12 dager hos dyr som fikk N-oksyd	Mortalitet innen 12 dager hos kontrolldyr som ikke fikk N-oksyd
	10	1	1/10	5/10
	10	10	3/20	25/30
	100	10	1/10	25/30
	1	32	8/10	20/20
	2,5	32	5/10	20/20
INT 10	5	32	8/10	20/20
(Eksempel 2)	10	32	9/10	20/20
	20	32	7/10	20/20
	40	32	3/10	20/20
	80	32	5/10	20/20
	10	100	14/20	19/20
	10	1000	10/10	10/10
INT 14	10	10	2/10	19/20
(Eksempel 3)	100	10	1/10	19/20
INT 6				
(Eksempel 4)	10	10	5/10	16/20

B. Innvirkning av administrasjonstiden for droge etter beskyttelse mot EMC

Både RNA-N-oksyd (10 mikro g pr. mus) og EMC-utfordring (10 LD₅₀) ble administrert intraperitonealt som tidligere, men administrasjonstiden for drogen m.h.t. for virusutfordringen ble variert.

Forbindelse	Administrasjonstid med hensyn til tid for virusutfordring	Mortalitet innen 12 dager
	3 dager før	6/10
	1 dag før	3/10
INT 9	2 timer før	1/10
(Eksempel 1)	1 dag etter	8/10

Forbindelse	Administrasjonstid med hensyn til tid for virusutfordring	Mortalitet innen 12 dager
-------------	---	------------------------------

	3 dager før	6/10
	1 dag før	3/10
INT 10	2 timer før	1/10
(Eksempel 2)	1 dag senere	9/10

19/20 kontroll dyr som fikk samme virusutfordring, men ingen droge, døde innen 12 dager.

C. Beskyttelse mot Coxsackie B1 (Cox) og Semliki Forest (SFV)-virus

Intraperitoneale injeksjoner av 10 mikro g av INT 9 (eksempel 1) ble administrert i 0,15m NaCl til mus av stammen CD1 med vekt 16 - 20 g. 24 timer senere ble musene utfordret med varierende fortynninger av Cox eller SFV som også ble administrert ad intraperitoneal vei. Mortalitetsforholdene i de følgende 12 dager for behandlede dyr og ubehandlede kontroll dyr ble bestemt.

Virus	LD ₅₀ av administrert virus	Mortalitet innen 12 dager hos dyr som fikk N-oksyd	Mortalitet innen 12 dager hos kontroll dyr som ikke fikk N-oksyd
	50	5/10	11/11
	500	8/10	10/10
SFV	5000	9/10	10/10
	50.000	10/10	10/10
	0,4	2/10	4/10
COX	4	5/10	7/10
	40	6/10	10/10

D. Toksisitetsstudier hos mus

Intravenøst

Toksisiteten av det dobbelttrådige RNA-utgangsmateriale og av det N-oksyderte produkt INT 9 (eksempel 1) og INT 10 (eksempel 2) ble sammenliknet hos hunnmus fra Charles River

133037

20

France S.P.F.-stammen med vekt 20 - 25 g. Nukleinsyrene ble administrert intravenøst i 0,2 ml pyrogenfritt sterilt vann.

Dose-nivå	Umodifisert ds-RNA mortalitet	INT 9 (eksempel 1) mortalitet	INT 10 (eksempel 2) mortalitet
8	0/6	0/6	0/6
10,4	0/6	0/6	0/6
12,8	0/6	0/6	0/6
16	2/6) inntreffer	0/6	0/6
30	3/6) 24 - 72 t.	0/6	0/6

Intraperitoneal

Toksisiteten til det dobbelttrådige RNA-utgangsmateriale og til det N-oksyderte produkt INT 9 (eksempel 1) ble sammenliknet hos mus av stammen CD1 med vekt 16 - 20 g. Nukleinsyrene ble administrert intraperitonealt i 0,15m NaCl.

Dose-nivå	Umodifisert ds-RNA mortalitet innen 10 dager	INT 9 (eksempel 1) mortalitet innen 10 dager
10	0/8	ND
20	0/8	0/2
40	6/8	0/2
60	5/8	ND
70	ND	0/2
80	8/8	ND
110	8/8	ND
120	ND	0/3
125	8/8	ND
150	7/8	0/2
200	ND	1/2

P A T E N T K R A V

Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive N-oksyder av naturlige dobbelttrådig ribonukleinsyrer og salter av disse, k a r a k t e r i s e r t ved at man behandler en naturlig dobbelttrådig ribonukleinsyre eller et salt av denne med hydrogenperoksyd eller persyre ved en temperatur på 5-50°C, idet oksydasjonsgraden måles ved økningen i forholdet mellom UV-absorbsjonen ved 230 m μ og UV-absorbsjonen ved 258 m μ , og ved hyperkromisiteten, samt materialets T_m-verdi.