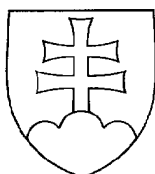


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: 2014-91
(22) Dátum podania: 01.07.1991
(31) Číslo prioritnej prihlášky: P 40 21 019.7
(32) Dátum priority: 02.07.90
(33) Krajina priority: DE
(40) Dátum zverejnenia: 15.01.92
(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: 02.12.98
(86) Číslo PCT:

(11) Číslo dokumentu:

279 544

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶

C 07H 21/00

C 07H 21/04

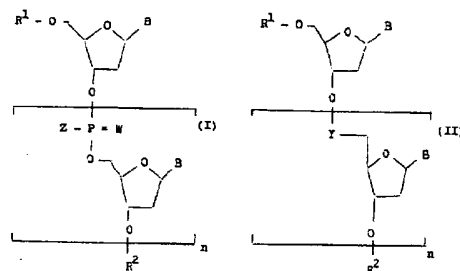
A 61K 31/70

(73) Majiteľ patentu: HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT, Frankfurt am Main, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Rösch Hannelore, Ulm, DE;
Fröhlich Anja, Illerkirchberg, DE;
Ramalho-Ortigao Jose Flavio, Ulm, DE;
Montenarh Matthias, prof. Dr., Senden-Ay, DE;
Seliger Hartmut, prof. Dr., Elchingen-Thalfigen, DE;

(54) Názov vynálezu: **Analógy oligonukleotidov s terminálnymi 3'-3', prípadne 5'-5'-internukleotidovými väzbami, spôsob ich výroby a farmaceutické prostriedky s ich obsahom**

(57) Anotácia:
Terapeuticky použiteľné oligonukleotidy vzorcov (I) a (II), kde význam substituentov je vysvetlený v opise, sa získajú zavedením terminálnych 3'-3', prípadne 5'-5'-väzieb. Tieto proti nukleázam stabilné zlúčeniny potláčajú biologickú funkciu nukleových kyselín.



Oblasť techniky

Vynález sa týka biológie, konkrétne analógov oligonukleotidov s terminálnymi 3'-3', prípadne 5'-5'-internukleotidovými väzbami.

Doterajší stav techniky

Ako oligonukleotidy s reťazcom proti zmyslu kódu sa označujú fragmenty nukleových kyselín, ktorých reťazec je komplementárny ku kódovému reťazcu v zmysle kódu mRNA, prípadne ku kódogénnemu reťazcu DNA. Takéto oligonukleotidy sa vo vzrastajúcej miere používajú na inhibíciu expície génov *in vitro* alebo v bunkových kultúrových systémoch. Použitie týchto látok v medicínsko – terapeutickú oblasť, napríklad ako protívirusových farmák, je predmetom rozsiahleho výskumu.

V biológii sú už dlho známe RNA reťazce proti zmyslu kódu ako prírodné regulátory expície génov v prokaryotických organizmoch (T. Mizuno, M. Y. Chou a M. Inouye, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1966 – 1970 (1984)) a tiež v eukaryotických organizmoch (S. M. Heywood, *Nucleic Acids Res.* 14, 6771 – 6772 (1986)). Spôsobujú inhibovanie translácie hybridizáciou príslušných mRNA. V mnohých experimentoch bolo možné medzitým dokázať, že tieto RNA reťazce proti zmyslu kódu, keď sa injikujú v baktériách (A. Hirashima, S. Sawaki, Y. Inokuchi a M. Inouye, *PNAS USA* 83, 7726 – 7730 (1986)) alebo eukaryotických bunkách (J. G. Izant a H. Weintraub, *Cell* 36, 1007 – 1015 (1984)), i tam môžu brániť expícii génov a ukazujú tak protívirusový (L. J. Chang a C. M. Stolz, *J. Virology* 61, 921 – 924 (1987)), ako aj protinádorový účinok (J. T. Holt, T. V. Gopal, A. D. Mouton a A. W. Nienhuis, *PNAS USA* 83, 4794 – 4798 (1986)). Pre tieto výskumy majú syntetické oligonukleotidy proti biologickým RNA proti zmyslu kódu výhodu väčšej stability a ľahšej prístupnosti. Ľahšia prístupnosť je dôsledkom zlepšenej techniky syntézy v poslednom čase, ktorá dnes relatívne ľahko sprístupňuje kratšie oligoméry (s napr. 12 – 30 bázami) (E. Sonveaux, *Bioorganic Chemistry* 14, 274 – 325 (1986)), *Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, J. S. Cohen, ed. Macmillan Press, 1989, str. 7ff).

Ukázalo sa, že už takéto krátke oligoméry sú účinné ako modulatory expície. Okrem toho môžu tieto oligonukleotidy tiež pôsobiť väzbou na DNA-dvojité reťazce za vzniku trojitého helixu. Aby sa oligonukleotidy s reťazcom proti zmyslu kódu a oligonukleotidy vo forme triplexu mohli nasadiť v biologických systémoch, musia však byť splnené nasledujúce predpoklady (*Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, J. S. Cohen, ed. Macmillan Press, 1989, str. 1ff).

1. musia byť jednak dobre rozpustné vo vode, a jednak ľahko prechádzať lipofilnou bunkovou membránou
2. musia byť vo vnútri bunky dostatočne stabilné proti odbúraniu, t. j. stabilné proti nukleázam
3. musia s intrabunkovými nukleovými kyselinami pri fyziologických teplotách tvoriť stabilné hybridy
4. hybridizácia musí byť selektívna; rozdiel disociačnej teploty k oligonukleotidu, ktorý poskytuje defektné párovanie, musí byť dostatočne veľký, aby sa posledné mohli ešte špecificky vymývať.

V r. 1978 mohli Zamecznik a Stephenson, *PNAS USA* 75, 280 – 284 a 285 – 288 (1978) prvýkrát ukázať, že nemodifikované oligonukleotidy môžu obmedzovať vírusy Rous Sarcom. Oligonukleotidy boli však použité vo veľmi

vysokých koncentráciách, preto boli experimenty väčšinou vykonávané vo vopred vyhriatych médiách, aby sa nukleázy inaktivovali. Nutnosť týchto opatrení sa vysvetľuje rýchlym enzymatickým odbúraním, ktorému sú cudzie nukleové kyseliny v sére a bunkách vystavené.

Preto sa už skôr vykonávali pokusy s cieľom modifikovať oligonukleotidy štruktúrne tak, aby lepšie spĺňali menované požiadavky, hlavne aby boli lepšie chránené proti nukleázovému odbúraniu. Tieto pokusy sa predovšetkým koncentrujú na modifikáciu fosfodiesterovej internukleotidovej väzby, pretože táto je posledným koncom pôsobiska všetkých nukleáz. Štruktúrne modifikované internukleotidové väzby sa zásadne môžu deliť na

a) nukleozidové väzby s fosforom ako centrálnym atómom.

Tieto opäť môžu byť

- iónovo/chirálné

- iónovo/achirálné

- neutrálne/chirálné.

b) neutrálne/achirálné bezfosforové nukleozidové väzby.

K štruktúrne modifikovaným, ako skôr k iónovým internukleozidovým väzbám, patria tiofosfátové a ditiofosfátové väzby. Tiofosfátom modifikované oligonukleotidy (*Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, J. S. Cohen, ed. Macmillan Press, 1989, str. 97ff) ukazujú toho času najlepšie efekty inhibície expície génov v bunkových kultúrach, no nezdá sa, že je táto inhibícia viazaná na špecifický reťazec, pretože i takéto tiofosfátmi modifikované oligonukleotidy ukazujú inhibičné efekty, ktoré pozostávajú len zo základu nukleovej kyseliny, napríklad tiofosfátové analógy oligocytidyldátu. Ohraničením pre nasadenie tiofosfátom modifikovaných oligonukleotidov je ďalej ich chiralita.

Pretože pri príprave oligonukleotidov s n bázu 2ⁿ⁻¹ sa tvoria diastereoméry, má iba najmenší podiel preparátu obsahujúceho tiofosfátové väzby dobré hybridizačné vlastnosti.

Pri oligonukleotidoch s ditiofosfátovými internukleozidovými väzbami (A. Grandas, William S. Marshall, John Nielsen a Martin M. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 20, 543 – 546 (1989), G. M. Porritt, C. B. Reese, *Tetrahedron Lett.* 30, 4713 – 4716 (1989)), sa problém chiralítty obchádza. Tieto zlúčeniny však sú doteraz prístupné iba pomocou komplikovaných a stratových mnohostupňových syntéz. Preto sa doteraz nemohli vykonávať rozsiahle pokusy s ohľadom na hybridizačné správanie predovšetkým v bunkových kultúrach.

Ďalšou triedou chemicky modifikovaných oligonukleotidov sú oligonukleotidy s neiónovými, t. j. neutrálnymi internukleozidovými väzbami. K tomuto druhu modifikovaných štruktúr patria oligonukleotidy s fosfotriesterovými alebo metylfosfonátovými internukleozidovými väzbami (*Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, J. S. Cohen, ed. Macmillan Press, str. 79ff).

Obom triedam zlúčenín je spoločné, že ionizovateľný fosfátový zvyšok je nahradený nenabitou skupinou. Zavedením takejto väzby sa stávajú oligonukleotidové analógy rezistentné proti nukleázam, sú však nevýhodné pre zlú rozpustnosť vo vodnom prostredí.

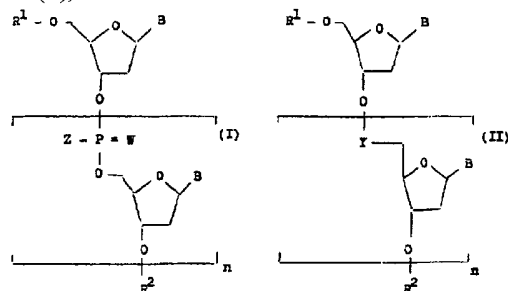
Oligonukleotidy s neutrálne/achirálnou internukleozidovou väzbou sa doteraz mohli získať iba tým, že atóm fosforu internukleozidovej väzby bol nahradený iným centrálnym atómom. Väzba esteru kyseliny fosforečnej je p⁰-dobrá siloxanová väzba. Oligonukleotidy so siloxanovými internukleozidovými väzbami (K. K. Ogilvie, J. F. Cormier, *Tetrahedron Lett.* 26, 4159 (1985), H. Seliger, G. Feger, *Nucl. Nucl.* 6 (1982), 483 – 484 (1987)), boli syntetizované a sú stabilné proti nukleázam.

Oligonukleotidy s uhličitanovými, acetalovými alebo karboxamidovými internukleozidovými väzbami sú známe z M. Matteucci, Tetrahedron Lett. 31, 2385 – 2388 (1990), J. R. Tittensor, J. Chem. Soc. C. 1971, str. 2656 a J. Coull et al., Tetrahedron Lett. 28, 745 (1987).

Nukleázovo rezistentné analógy nukleotidov sa mohli tiež vyrábať bez zmeny fosfodiesterovej internukleotidovej väzby tým, že boli nasadené cukrové zvyšky zmenenej konfigurácie. To sa vykonalo syntézou oligonukleotidových analógov, pri ktorých sú nukleobázy viazané aglykozidicky (Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, J. S. Cohen, ed. Macmillan Press, 1989, str. 119ff). Tieto analógy oligonukleotidov však sú preparatívne ťažko prístupné, pretože sa musia stavať od cukrov a báz. Okrem toho majú, pokiaľ ide o zmysel smeru hybridizácie, čiastočne nenormálne správanie.

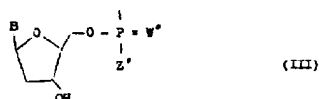
Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu sú oligonukleotidy vzorcov (I) a (II),

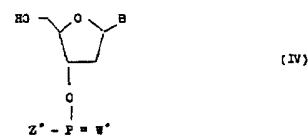


kde

R^1 znamená vodík alebo zvyšok vzorca (III)



R^2 znamená vodík alebo zvyšok vzorca (IV)



pričom však aspoň jeden zo zvyškov R^1 alebo R^2 predstavuje zvyšok vzorca (III) alebo (IV),

B predstavuje bázu, ako napríklad prírodnú bázu ako adenín, tymín, cytozín, guanín alebo neprírodné bázy, ako napríklad purín, 2,6-diaminopurín, 7-deazaadenín, 7-deazaguanín, N^4 -etanocytozín, prípadne ich prekurzorové formy W a W' nezávisle od seba znamenajú kyslík alebo síru, Z a Z' nezávisle od seba znamenajú O; S; alkoxykupinu s 1 až 18 atómami uhlíka, výhodne alkoxykupinu s 1 až 8 atómami uhlíka, obzvlášť výhodne alkoxykupinu s 1 až 3 atómami uhlíka, hlavne metoxykupinu; alkyl s 1 až 18 atómami uhlíka, výhodne alkyl s 1 až 8 atómami uhlíka, hlavne alkyl s 1 až 4 atómami uhlíka alebo alkoxy-alkyl s 1 až 4 atómami uhlíka v alkoxyzvyšku a s 1 až 6 atómami uhlíka v alkylovom zvyšku, výhodne metoxyetyl; NR^3R^4 , kde R^3 má uvedený význam a R^4 znamená výhodne alkyl s 1 až 18 atómami uhlíka, najmä výhodne alkyl s 1 až 8 atómami uhlíka, hlavne alkyl s 1 až 4 atómami uhlíka, alebo

kde R^3 a R^4 spolu s nosným atómom dusíka znamenajú 5-až 6-členný heterocyklický kruh, ktorý môže navyše obsahovať ďalší heteroatóm z radu O, S, N, ako napríklad morfolín,

Y znamená zvyšok z radu $-O-Si(R)_2$, OCH_2 , $C(O)NR$ alebo $OCH_2-C(O)$, kde R predstavuje alkyl s 1 až 6 atómami uhlíka, aryl alebo cykloalkyl s 5, prípadne 6 atómami uhlíka, a

n znamená celé číslo 5 až 60, výhodne 10 až 40 a hlavne 15 až 25,

ako aj ich fyziologicky znášateľné soli.

Pod arylom sa v tejto súvislosti chápu napríklad fenyl, fenyl substituovaný (1- až 3- krát) alkylom s 1 až 6 atómami uhlíka, alkoxykupinou s 1 až 6 atómami uhlíka a/alebo halogénom.

Prednosť majú oligonukleotidy vzorca (I).

Ďalej sú výhodné oligonukleotidy vzorca (I), v ktorom R^2 znamená zvyšok vzorca (IV) a R^1 znamená vodík; R^1 , prípadne R^2 znamená zvyšok vzorcov (III), prípadne (IV); alebo R^2 znamená vodík a R^1 zvyšok vzorca (III), pričom buď W, alebo Z v poslednom prípade neznamenujú kyslík.

Obzvlášť je ďalej potrebné menovať oligonukleotidy vzorca (I), kde W znamená kyslík alebo Z a W obidva predstavujú kyslík.

Celkom obzvlášť výhodné sú oligonukleotidy vzorca (I), kde R^2 predstavuje zvyšok vzorca (IV) a R^1 znamená vodík.

Ďalej je potrebné menovať oligonukleotidy vzorcov (I) a (II), ktoré sú navyše substituované skupinami, ktoré podporujú intrabunkovú absorpciu, ktoré slúžia ako značiacie skupiny in vitro alebo in vivo a/alebo skupiny, ktoré pri hybridizácii oligonukleotidu na biologické DNA alebo RNA tieto molekuly DNA alebo RNA napádajú za viazania alebo štiepenia.

Ako príklad skupín, ktoré podporujú intrabunkovú absorpciu, sú lipofilné zvyšky, ako alkylové zvyšky napríklad až s 18 atómami uhlíka alebo cholesteryl alebo konjugáty, ktoré využívajú prírodné prenášacie systémy, ako napríklad kyselinu žľazovú alebo peptidy pre príslušné receptory (napr. endocytózu).

Príkladmi pre značiacie skupiny sú fluoreskovacie skupiny (napríklad akridín, danzyl, fluoresceín) alebo chemiluminiscenčné skupiny, ako napríklad akridíniumesterové skupiny.

Oligonukleotidové konjugáty, ktoré nukleové kyseliny viažu a/alebo štiepia, obsahujú akridín (N. Thuong et al., Tetrahedron Lett. 29, str. 5905, (1988), psoral (U. Peiles et al., Nucleic Acid Res. zv. 17, str. 285, 1989) alebo chlór-etylaminový konjugát (Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, J. S. Cohen, ed. Macmillan Press, 1989, str. 173ff).

Charakteristická štruktúrna modifikácia oligonukleotidov podľa vynálezu spočíva v tom, že internukleotidové väzby na oboch koncoch reťazca sú zmenené, t. j. sú miesto biologických 3'-5'-väzieb väzby 3'-3', prípadne 5'-5'. Prekvapujúco sa zistilo, že táto minimálna štruktúrna modifikácia stačí, aby sa tieto zlúčeniny stabilizovali proti nukleázovému odbúravaniu.

Ako sa opisuje ďalej, spôsobuje táto iba malá štruktúrna modifikácia hybridizačné správanie, ktoré sa takmer rovná správaniu biologických oligonukleotidov. Z toho tiež vyplýva všeobecná použiteľnosť týchto zlúčenín ako expresie génov v bunkových kultúrach.

Z literatúry nie je doteraz známa žiadna zmienka o výrobe analógov oligonukleotidov s 3'-3'- a 5'-5' internukleozidovými väzbami na oboch koncoch reťazca a ich nasadenie ako antisenzné oligonukleotidy. Analógy dinukleo-

zidfosfátov, ktoré obsahujú 3'-3'- alebo 5'-5'- väzby, boli získané a skúšané už pred mnohými rokmi ako hlavné produkty (A. Myles, W. Hutzenlaub, G. Reits a W. Pfeleiderer, Chem. Ber. 108, 2857 – 2871 (1975); H. Rokos, A. Myles, W. Hutzenlaub a W. Pfeleiderer, Chem. Ber. 2872 – 2877 (1975)), J. Tomasz, Nucl. Nucl. 2(1), 51 – 61 (1983); M. Nemer, N. Theriault, A. Schiffmann a K. K. Ogilvie, VI th International Round Table, Nucleosides, Nucleotides and their biological Applications, La Grande Motte, ed. J. L. Imbach, 94 – 96 (1984)), prípadne ako vedľajšie produkty (R. Letsinger, K. K. Ogilvie, J. Amer. Soc. 89, 4801 – 4802 (1967)). Tieto diméry však na základe príliš nízkej teploty topenia zásadne nie sú spôsobilé na stabilnú hybridizáciu bunkovými nukleovými kyselinami. Oligonukleotidy, ktoré majú 5'-5'-väzbu iba na jednom konci, boli pripravené, aby sa zaviedlo príchytne miesto pre značiacu skupinu pri genetických sondách (S. Agrawal, C. Christodoulou, M. J. Gait, Nucleic Acids Res. 14, 6227 – 6245 (1986)). Doteraz sa však neskúšali na svoje hybridizačné správanie. Na biofyzikálne skúšky sa pripravili samokomplementárne oligonukleotidy, ktoré uprostred molekuly majú jednotlivú 3'-3'-, prípadne 5'-5'- väzbu (J. H. van de Sande, N. B. Ramsin, M. W. German, W. Elhorst, B. W. Kalisch, E. V. Kitzing, R. T. Pon, R. C. Clegg, T. M. Jovin, Science 241, 551 – 557 (1988)).

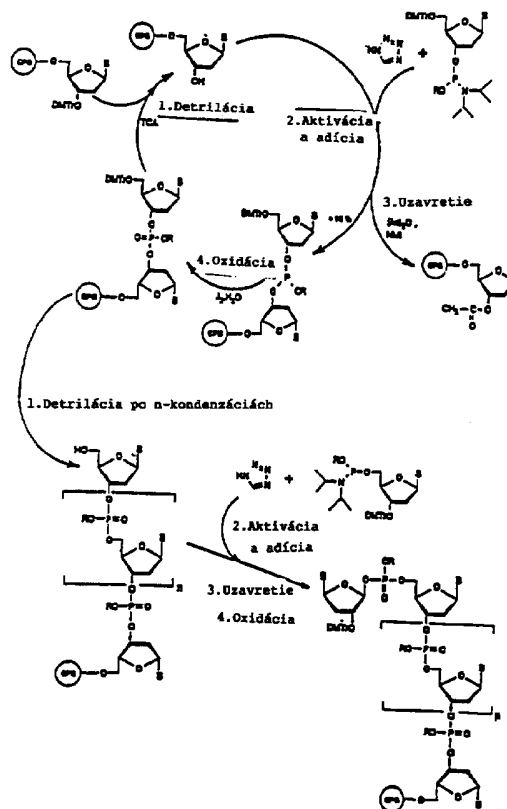
Príprava oligonukleotidov s terminálne invertovanou 3'-3'- a 5'-5'-väzbou sa vykonáva rovnakým spôsobom ako syntéza biologických oligonukleotidov v roztoku alebo v pevnej fáze, prípadne s pomocou automatického syntézného prístroja.

Predmetom vynálezu je teda ďalej spôsob výroby oligonukleotidov vzorca (I), ktorý spočíva v tom, že sa a) nukleotidová jednotka s 3'-, prípadne 5'-terminálnymi skupinami fosforu (III) alebo fosforu (V), alebo jej aktivovaný derivát nechá reagovať s ďalšou nukleotidovou jednotkou s 3'-, prípadne 5'- terminálne voľnou hydroxyskupinou, alebo

b) oligonukleotid pripraví z fragmentov rovnakým spôsobom, v oligonukleotidoch získaných podľa (a) alebo (b), sa prípadne jedna alebo niekoľko ochranných skupín zavedených dočasne na ochranu ostatných funkcií odštiepi a takto získané oligonukleotidy vzorca (I) sa prípadne prevedú na svoju fyziologicky znášateľnú soľ.

Ako východiskový komponent na výrobu oligonukleotidov s terminálne invertovanou 3'-3'-väzbou sa na syntézu pevnej fázy nasadí nosná živica, na ktorej je cez 5'-OH skupinu viazaný prvý nukleozidový monomér. Na výrobu tohto komponentu sa použije nosná živica vyrobená metódami známymi z literatúry (T. Atkinson, M. Smith v Oligonucleotide Synthesis, M. J. Geit (ed.), 35 – 49 (1984)), hlavne silikagél alebo regulované pórovité sklo, ktoré je funkcionizované aminoskupinami. Nechá sa reagovať s nukleozidovým derivátom chráneným na nukleobáze a na 3'-OH skupine, ktorý bol najprv premenený na 5'-p-nitro-fenylsukcinát. Ako bázičné ochranné skupiny sa používajú hlavne acylové skupiny, napríklad benzoyl, izobutyryl alebo fenoxycetyl. Poloha 3' sa výhodne chráni dimetoxytritylovou ochrannou skupinou, ktorá sa môže zavádzať podľa M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, Tetrahedron Letters 21 (1980), str. 3243 – 3246. Ďalšia skladba oligonukleotidového reťazca až k predposlednému reťazcovému členu sa vykonáva metódami známymi z literatúry, výhodne s použitím na 5'-OH skupine dimetoxytritylovými skupinami chránených esteramidov kyseliny nukleozid-3-fosforitej alebo nukleozid-3'-H-fosfonátov. Ako posledný člen reťazca sa opäť nasadí na 3'-OH skupine výhodne dimetoxytritylom chránený esteramid kyseliny nukleozid-5'-fosforitej,

prípadne nukleozid-H-fosfonát. Príprava takéhoto oligonukleotidového reťazca s terminálne prevrátenými internukleotidovými väzbami je ďalej znázornená schematicky (fosforamidicyklus na prípravu oligonukleotidov s 3'-3'- a 5'-5'-väzbami na koncoch). Príprava oligonukleotidov s 3'-3'- alebo 5'-5'-väzbami sa vykonáva zodpovedajúcim spôsobom.



Štruktúrna a reťazcová analýza sa vykonáva tým spôsobom, že sa oligonukleotid s 3'-3'- a 5'-5'-koncami najprv terminálne označí. To sa vykoná rádioaktívnym značkováním, výhodne pomocou 5'-T-³²P-ATP/polynukleotidkinázy. Toto rádioaktívne značkovanie sa vykoná na voľnej 5'-OH-skupine, t. j. proti oligonukleotidu s iba biologickou 3'-5'-väzbou na opačnom konci nukleotidového reťazca. Reťazcová analýza sa potom vykoná postupom známym z literatúry, výhodne pre bázu špecifickým, štatistickým štiepením, ako je opísané (A. M. Maxam a W. Gilbert, Methods in Enzymology 65, 499 – 560 (1980)).

Na základe rádioaktívneho značkovania na „opačnom“ konci molekuly sa teraz vykoná tiež odpočítanie reťazca, porovnaním s oligonukleotidom s biologickou 3'-5'-väzbou v opačnom smere. Opis vykonania testu je uvedený v príklade 6.

Oligonukleotidy vzorcov (I) a (II) sa používajú pre hybridizačno – chemické, na adíciu pri nukleových kyselinách s dvojitém alebo jedným reťazcom spočívajúce postupy regulácie alebo potlačenie biologickej funkcie nukleových kyselín, na selektívne potlačenie exprese virálnych funkcií genómu a na profylaxiu a terapiu vírusových funkcií, na potlačanie nádorových funkcií a na terapiu rakovinových ochorení.

Ako miera stability in vivo sa môže pokladať správanie v krvnom sére rozpusteného, podľa vynálezu stavaného oligonukleotidu vzorca (I) alebo (II). Všeobecný test je opísaný v príklade 7; zodpovedajúci test in vitro s roztokom fosfodiesterázy hadieho jedu v príklade 8. Oligonukleotidy

podľa vynálezu sa v protiklade k 3'-5'-oligonukleotidom odbúravajú oveľa pomalšie.

Príklad 11 demonštruje sérovú stabilitu oligonukleotidov s terminálne invertovanou 3'-3'-väzbou.

Hybridizačné správanie vyplýva z modelových pokusov, ako je opísané v príklade 9, v ktorých rad SV40-špecifických reťazcov, ktoré podľa vynálezu boli pripravené vždy s 3'-3'- a 5'-5'-kocom, v hybridizácii so zodpovedajúcim reťazcom oproti zmyslu kódu SV40-DNA ukazujú teplotu topenia, ktorá je nepodstatne nižšia ako teplota topenia, ktorá sa meria pri hybridizácii so zodpovedajúcim reťazcom, ktorý nebol stavaný podľa vynálezu, t. j. bez 3'-3'- a 5'-5'-koncev.

Účinnosť oligonukleotidov opatrených podľa vynálezu terminálnymi 3'-3', prípadne 5'-5'-väzbami, ako inhibítory exprese génov, vyplýva z potlačenia rastu vírusu SV40 (príklad 10) ako i z inhibície in vitro exprese nádorového produktu p53 (príklad 12).

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 - Autorádiogram analýzy reťazca SV40TS17, SV40TAS17 a SV40TAS17 (3'-3',5'-5')

Obr. 2 - Autorádiogram štiepenia dT₂₀, prípadne dT₂₀ (3'-3',5'-5'), ľudským sérom

zľava :

dT₂₀ : reakcie po 0, 5, 8, 11, 15 a 30 min.

dT₂₀ (3'-3',5'-5') : reakcie po 0, 5, 8, 11, 25, 30 a 90 min.

Obr. 3 - Autorádiogram SVpdE - štiepenia:

zľava : dT₂₀, dT₂₀ (3'-3',5'-5'), štiepenie dT₂₀ (3'-3',5'-5') po 5, 15, 30, 45, 60 a 90 min.

mix z 0 min./15 min., mix z 0 min./30 min.,

štiepenie dT₂₀ po 5, 15, 30 a 45 min.

Obr. 4 - Modulácia exprese T-AG oligonukleotidom s reťazcom proti zmyslu kódu

Línia 1 : celyzát po inhibícii s 30 μM SV40TAS17 (3'-3',5'-5'),

Línia 2 : celyzát bez inhibície

Obr. 5 - Sérová stabilita oligonukleotidu Xelev 1 (Klon 6 a 7) a Xelev 2 (Klon 8 a 10)

Čas inkubácie so sérom

Klon 6 a 8 :	-----	0 minút
	-----	15 minút
	-----	30 minút
	-----	45 minút
Klon 7 a 10 :	-----	60 minút
	-----	8 hodín
	-----	72 hodín
	-----	nepoužitý pruh

Obr. 6 - Zastavenie biosyntézy onkoproteínu p53

TNV - oligonukleotidom s reťazcom proti zmyslu kódu

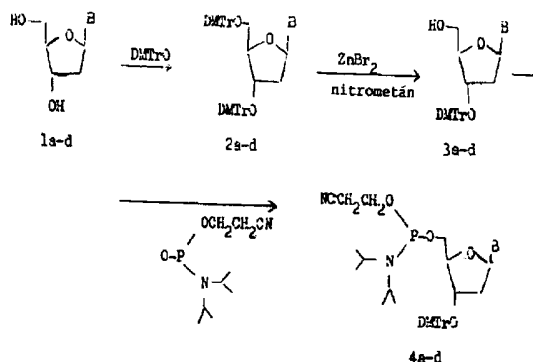
a	-----	: bez oligonukleotidu
b	-----	: 30 μM s reťazcom v zmysle kódu
	-----	25 mer
c	-----	: 1 μM s reťazcom proti zmyslu kódu
	-----	25 mer
d	-----	: 10 μM s reťazcom proti zmyslu kódu
	-----	25 mer

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Syntéza esteramidu kyseliny 3'-O-DMTr-deoxyribonukleozid-5'-(N,N-bis-diizopropyl-amino-β-kyanoetoxy)-fosforitej

Reakčná schéma vychádzajúca z bázami chránených nukleozidov je znázornená takto.



a: B = tymín

b: B = N²-benzoyladenín

c: B = N⁴-benzoylcytozín

d: B = N²-izobutyrylguanín

DMTr = 4,4'-dimetoxytřitřil

A. Příprava 3'-5'-O-bis-DMTr-deoxyribonukleozidu 2

Násada:

6 mmól dT, dA^{bz}, dC^{bz} alebo dG^{ibu}

14,4 mmól DMTr-Cl

14,9 mmól TEA aba.

Deoxyribonukleozid 1 sa rozpustí v 50 ml absolútneho pyridínu a pri 0 °C sa pridá trietylamin a dimetoxytřitřilchlorid. Potom sa 24 hodín mieša pri teplote miestnosti, pričom sa reakcia sleduje chromatografiou na tenkej vrstve (rozpušťađlo: CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1). Reakcia sa skončí pridaním metanolu, rozpušťađlo sa odtiahne a zvyšok sa vyberie do dichlórmetánu. Organická fáza sa niekoľkokrát premyje 1 M roztokom (NH₄)HCO₃ a vodou, suší sa Na₂SO₄ a odstredí sa.

3'-5'-ditřitřilovaný produkt 2 sa môže čistiť od prebytočného tritanolu, prípadne 5'-DMTr-dN stłpcovou chromatografiou (stłpcový materiál: silikagel 60H, eluačný prostriedok: CH₂Cl₂ so stłpajúcim obsahom metanolu, pričom sa pri 1 – 1,5 % MeOH eluujú ditřitřilované deoxynukleozidy.

Výtťažok: 73 – 85 % teórie.

B. Špecifické odštěpenie 5'-dimetoxytřitřilovej skupiny

Literatúra: M. D. Mateucci a M. H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 21, 3243 – 3246 (1980)

Násada:

3 mmól 3'-5'-O-bis-DMTr-dN 2

15 mmól ZnBr₂

200 ml absolútneho nitrometánu

Roztok 3'-5'-O-bis-DMTr-dN 2 v 100 ml nitrometánu sa pri 0 °C dá k suspenzii bromidu zinočnatého v ďalších 100 ml nitrometánu. V prípade chráneného deoxyadenozínu bola reakcia ďalej vedená za chladenia, aby sa zamedzilo depurinizácii. Napriek tomu je pri tomto nukleozide odštěpenie úplné už po 60 minútach, ako je možné zistiť chromatografiou na tenkej vrstve. Pri tymidíne a deoxyguanozine je rovnako reakcia skončená pri teplote miestnosti

po 60 minútach, zatiaľ čo 5'-detritylácia bis-DMTr-deoxycytidínu prebieha len neúplne. Tú sa reakcia prerušila po 3 hodinách, aby sa zabránilo odštiepeniu tiež 3'-dimetoxy-tritylovej skupiny.

Prerušenie reakcie sa vykoná pridaním 200 ml 1 M roztoku NH_4Ac ; produkt 3 sa extrahuje 200 ml CH_2Cl_2 , organická fáza sa ešte premyje nasýteným roztokom NaCl a vodou, suší sa Na_2SO_4 a rozpúšťadlo sa oddestiluje vo vákuu.

Hlavné množstvo tritanolu sa môže oddeliť vyzrážaním surového produktu v cca 500 ml n-hexánu pri -15°C . Čistenie sa vykoná chromatograficky cez stĺpec silikagélu 60H dichlórmetánom so stúpajúcim obsahom metanolu ako elučným prostriedkom.

Hodnoty R_f 3'-MDTr-deoxyribonukleozidov sa odlišujú od zodpovedajúcich 5'-tritylovaných monomérov takto (rozpúšťadlo: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 24 : 1).

	3'-DMTr-dN	5'-DMTr-dN
dT	0,28	0,21
Da ⁰²	0,55	0,29
dC ⁰²	0,53	0,31
dG ¹⁰⁰	0,32	0,14

Výťažky: 48 – 65 % teórie.

C. Príprava esteramidu kyseliny 3'-O-DMTr-deoxytribonukleozid 5'-O-(N,N-diizopropylamino-β-kyanoetoxy)-fosforitej 4.

Literatúra: H. Köster, Nucleic Acids Res. 12, 4539 – 4557 (1984)

Násada:

1 mmól 3'-O-DMTr-deoxyribonukleozidu 3

1,5 mmól chloro-N,N-diizopropylamino-β-kyanoetoxyfosfinu

4 mmól diizopropylamínu

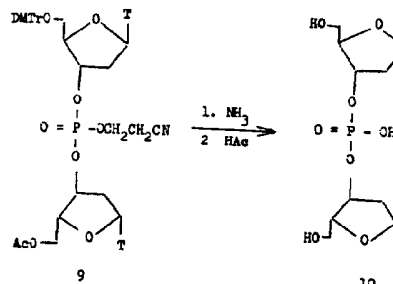
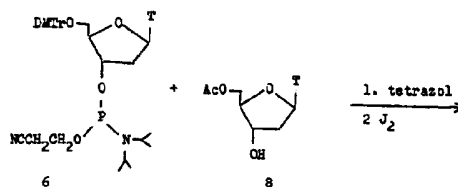
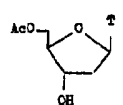
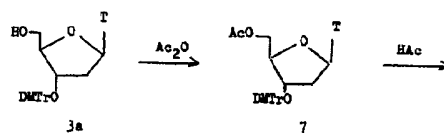
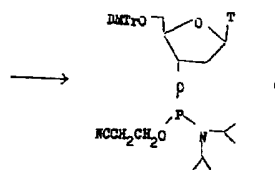
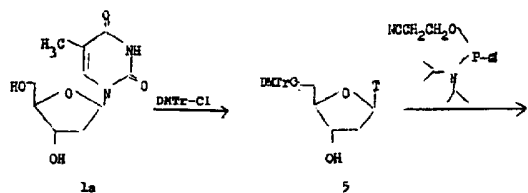
Fosfitylačné reakcie boli vykonané analogicky metóde opísanej Kösterom et al. na výrobu esteramidu kyseliny 5'-O-DMTr-deoxytribonukleozid-3'-O-fosforitej. Na rozpustenie chránených nukleozidov v absolútnom CH_2Cl_2 bol pod argónom pridaný diizopropylamín, potom fosforylačný prostriedok. Po 30 minútach bola reakcia skončená pridaním 30 ml etylacetátu, roztok 3x extrahovaný nasýteným roztokom NaCl , organická fáza sušená Na_2SO_4 a rozpúšťadlo oddestilované vo vákuu. Surový produkt bol čistený stĺpcovou chromatografiou (stĺpcový materiál: silikagél 60H, elučný prostriedok: petroleter/dichlórmetán/trietylamin 45 : 45 : 10).

Výťažok 4a: 93 % teórie.

Príklad 2

Príprava tymidyl-tymidínu a 3'-3'-fosfodiesterovou väzbou

Ďalej je uvedený priebeh reakcie na prípravu dimérneho bloku



A) Príprava 5'-O-dimetoxytrityltymidínu 5

Násada:

20 mmól tymidínu (4,84 g)

24 mmól 4,4'-dimetoxytritylchloridu (8,2 g)

1 mmól dimetylaminopyridínu (122 mg)

28 mmól abs. trietylaminu (3,8 ml)

Príprava sa vykoná metódou R. A. Jonesa (G. S. Ti, B. L. Gaffney and R. A. Jones, H. Amer. Chem. Soc. 104, 1316 – 1319 (1982)). Tymidín sa suší 3-násobným odparením vždy s 50 ml absolútneho pyridínu, vyberie sa do 100 ml pyridínu a za chladenia ľadom sa pridá 4,4'-DMTr-Cl a DMAP ako katalyzátor. Reakcia sa kontroluje chromatografiou na tenkej vrstve (rozpúšťadlo $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9 : 1). Po 4 hodinách je možné reakciu prerušiť pridaním 100 ml vody. Roztok sa 3x extrahuje éterom, organická fáza sa suší a odstredí, a zvyšok sa čistí prekryštalizovaním z benzénu.

Výťažok: 9,68 g DMTr-dT (89 %)

B) Príprava esteramidu kyseliny 5'-O-dimetoxytrityltymidín-3'-O-(N,N-diizopropylamino-β-kyanoetoxy)-fosforitej 6

Príprava a čistenie 6 sa vykonáva primerane syntéze esteru kyseliny 3'-O-DMTr-5'-O-fosforitej 4 (príklad 1, C).

C) Príprava 5'-O-acetyltymidínu 8

Násada:

2,0 mmól 3'-O-DMTr-dT 3a (1,1 g)

0,2 mmól dimetylaminopyridínu (12,2 mg)

4 ml acetanhydridu

Literatúra: A. M. Michelson a A. R. Todd, J. Org. Chem. 1955, 2632 – 2638 (modifikované)

K roztoku 3'-O-DMTr-dT a DMAP v 20 ml absolútneho pyridínu sa za chladenia ľadom prikvapká Ac_2O . Po 3 hodinách reakčnej doby je reakcia úplná (kontrola chromatograficky, rozpúšťadlo $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 24 : 1). Produkt sa vyzráža 400 ml ľadovej vody, biela zrazenina sa odsaje, premyje ľadovou vodou a suší sa.

Výťažok: 1,02 g 3'-O-DMTr-5'-O-Ac-dT (88 %)

Na odštiepenie 4,4'-dimetoxytritylovej skupiny sa 7 pri teplote miestnosti mieša v 10 ml 80 % kyseliny octovej. Pridaním 100 ml ľadovej vody sa reakcia po 3 hodinách skončí; pritom 4,4'-dimetoxytritanol vypadne ako biela zrazenina. Odsaje sa a vodný filtrát sa odstredí. Olejovitý zvyšok sa vyberie do malého množstva CH_2Cl_2 a pri -15°C sa vyzráža v 200 ml n-hexánu.

Výťažok: 455 mg 5'-O-acetyltymidínu (94 %).

D) Príprava tymidilyl-(3'-3')-tymidínu 10

Násada:

1,0 mmól esteramidu kyseliny 5'-O-DMTr-tymidín-3'-O-(N,N-diizopropylamino- β -kyanoetoxy)-fosforitej 6 (705,8 mg)

0,9 mmól 5'-O-acetyltymidínu 8 (253 mg)

2,6 mmól tetrazolu (182 mg)

9,0 mmól J_2 (1,14 g)

Syntéza dimérového bloku 10 sa môže vykonať metódou opísanou Kösterom (H. Köster, Nucleic Acids Res. 12, 4539 – 4557 (1984)) na výrobu 3'-5'-nukleoziddimérov. Zmes 5'-O-acetyltymidínu a tetrazolu sa rozpustí v 30 ml absolútneho CH_3CN a pod argónom sa dá k esteramidu kyseliny fosforitej. Pridá sa 9 mmól J_2 v 30 ml zmesi acetonitril/pyridín/voda (24 : 5 : 1) a po ďalších 15 minútach sa prebytočný jód redukuje 5 ml 40 % roztoku H_2SO_4 . Roztok sa potom zahustí, zvyšok sa vyberie do CH_2Cl_2 , 2x sa premyje nasýteným roztokom NaHCO_3 a rozpúšťadlo sa oddestiluje. Surový produkt sa môže čistiť na stĺpcovej chromatografii (stĺpcový materiál: silikagél 60H, eluačný prostriedok: etylacetát/dichlórmetán 50 : 50).

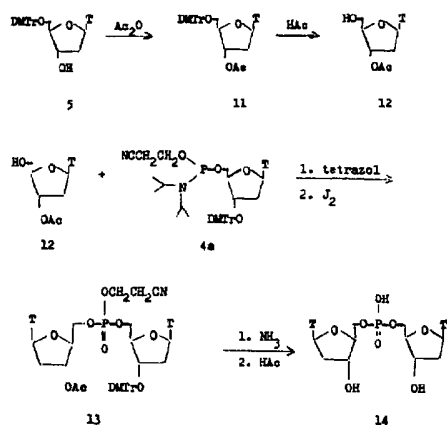
Výťažok: 665 mg (75 %).

Na odštiepenie acetylovej a β -kyanoetylovej skupiny sa na dimér 1 hodinu pôsobí 5 ml koncentrovaného NH_3 pri teplote miestnosti, 4,4'-dimetoxytritylová skupina sa môže odstrániť 80 % kyselinou octovou.

Príklad 3

Príprava tymidilyl-tymidínu a 5'-5-fosfodiesterovou väzbou 14

Nasledujúca schéma ukazuje prípravu 14



Jednotlivé reakčné kroky k syntéze medzistupňov sa vykonávajú metódami zodpovedajúcimi metódam opísaným v príklade 2.

Štruktúra obidvoch dimérových blokov sa môže vykonať FAB-hmotovou spektrometriou a spektroskopiou ^1H -jadrovej rezonancie.

Príklad 4

Prichytenie 3'-O-dimetoxytrityl-deoxyribonukleozid-5'-O-sukcinátu na nosnom materiáli CPG 10-1400

Funkcionalizácia CPG-nosiča 3-aminopropylóvymi reťazcami sa vykonáva podľa predpisu Atkinsona a Smitha (T. Atkinson, M. Smith v Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gait (ed.), 35 – 49 (1984)):

A) Príprava 3'-O-DMTr-deoxyribonukleozid-5'-O-sukcinátu 15

Násada:

1,0 mmól 3'-O-DMTr-dN 3

0,8 mmól anhydridu kyseliny jantárovej (80 mg)

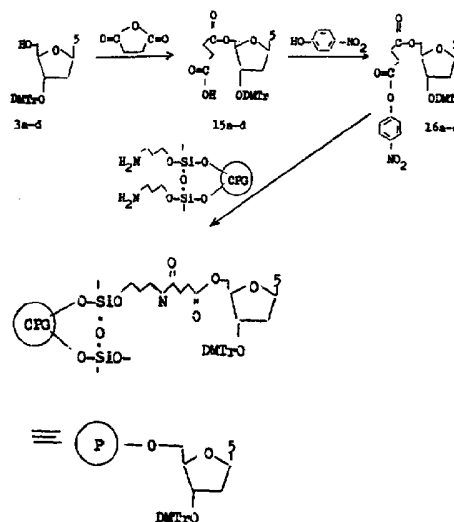
0,5 mmól dimetylaminopyridínu (61 mg)

Reakcia anhydridu kyseliny jantárovej s 5'-OH skupinou deoxyribonukleozidu sa vykonáva cez noc pri teplote miestnosti vždy v 5 ml absolútneho pyridínu s DMAP ako katalyzátorom. Po skončení reakcie sa roztok zahustí a pyridín sa odstráni 3-násobnou azeotropnou destiláciou s toluénom. Zvyšok sa vyberie do dichlórmetánu, premyje sa ľadovo studeným roztokom kyseliny citrónovej (10 %) a H_2O a organická fáza sa odstredí vo vákuu. Surový produkt sa rozpustí v cca 3 ml toluénu a vyzráža sa v 200 ml hexánu.

Výťažok: 79 – 84 %.

B) Príprava 3'-O-DMTr-deoxyribonukleozid-5'-O-sukcinyl-P-nitrofenylesteru

16 a zachytenie na nosiči (pozri nasledujúcu schému)



Násada:

0,8 mmól 3'-O-DMTr-dN-5'-O-sukcinátu 15

0,8 mmól p-nitrofenolu (112 mg)

2,0 mmól dicyklohexylkarbodiimidu (412 mg)

3 g funkcionalizovaného CPG 10-1400

Chránený sukcinylovaný deoxyribonukleozid sa dá k roztoku p-nitrofenolu v 5 ml absolútneho dioxánu a, 0,2 ml pyridínu, a potom sa pridá DCCl ako kondenzačný prostriedok. Po krátkom čase vypadáva dicyklohexylmočovina a po 3 hodinách ukazuje chromatografia na tenkej vrstve ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9 : 1) úplné zreagovanie. Zrazenina sa pod argónom odsaje a filtrát sa priamo dá k suspenzii

funkcionalizovaného nosného materiálu v 15 ml absolútneho DMF. Pridá sa 0,8 ml trietylaminu a násada sa trepe cez noc. Zaťaženie nosiča sa potom odsaje, premyje metanolom a éterom a v exikátore sa suší.

Zaťaženie nosiča sa stanoví spektrometricky. Pôsobením 10 ml 0,1 N roztoku kyseliny p-toluénsulfónovej v acetonitrile na vzorku nosiča (cca 2 mg) sa 4'-4'-dimetoxylitrylkation odštiepi a meraním absorpcie roztoku pri 498 nm sa podľa vzorca

$$\frac{OD_{498}/\text{ml} \times 10 \text{ ml} \times 14,3 \text{ (konšt.)}}{\text{mg nosiča}}$$

nechá vypočítať zaťaženie nosiča v $\mu\text{mol/g}$.

Výsledky:

3'-DMTr-dT-nosič:	23 $\mu\text{mol/g}$
3'-DMTr-dG ^{ibu} -nosič:	21 $\mu\text{mol/g}$
3'-DMTr-dA ^{bz} -nosič:	21 $\mu\text{mol/g}$
3'-DMTr-dC ^{bz} -nosič:	15 $\mu\text{mol/g}$

Na blokovanie nezreagovaných aminoskupín sa zaťažný nosič 1 hodinu pri teplote miestnosti trepe s roztokom 1 ml anhydridu kyseliny octovej a 50 mg dimetylaminopyridínu v 15 ml absolútneho pyridínu, potom sa odsaje, premyje metanolom a éterom a suší sa.

Príklad 5

a) Syntéza oligonukleotidov s terminálnou 3'-3'- a 5'-5'-vázbou

Syntézy sa vykonávajú v DNA-syntetizéri firmy Applied Biosystems, Forster City, USA, Modell 381A, s použitím 0,2 μmol štandardného programu pre kondenzačné kroky. Syntézny cyklus je ukázaný skôr (str. 11). Ako nosný materiál slúži CPG 10-1400 opísaný v príklade 4. Kondenzácie sa vykonávajú s bežnými esterami kyseliny nukleozid-3'-fosforitej, iba v poslednom reakčnom cykle sa nasadia v príklade 1 opísané esteramidy kyseliny 3'-O-DMTr-nukleozid-5'-O-(N,N-diizopropylamino- β -kyanoetoxy)-fosforitej. Po odštiepení oligonukleotidu z nosiča konc. NH_3 a odstránenia všetkých fosfátových a bázičských ochranných skupín zahrievaním amoniakálneho roztoku na 60 °C cez noc sa vzorka odsolí vyzrážaním v etanole a cieľový reťazec sa elektroforézou na polyakrylamidovom géli čistí od kratších fragmentov.

Pre pokusy sa syntetizoval eikosatymidylat s iba 3'-5'-vázbami ako i terminálnymi 3'-3'- a 5'-5'-vázbami. Okrem toho sa zvolili reťazce zo SV40-genómu. Boli syntetizované nasledujúce oligonukleotidy:

dT₂₀;

dT₂₀(3'-3', 5'-5');

SV40TS17: 17-mér, reťazec v zmysle kódu zo SV40-genómu na polohách 5159 – 5176;

5'-AGC TTT GCA AAG ATG GA-3'

SV40TAS17: 17-mér, reťazec proti zmyslu kódu k SV40TS17;

5'-TCC ATC TTT GCA AAG CT-3'

SV40TAS17 (3'-3', 5'-5'): 17-mér, reťazec proti zmyslu kódu k SV40TS17 s 3'-3'-, prípadne 5'-5'-vázbou na koncoch;

3'-T(5'-5')CC ATC TTT GCA AAG C(3'-3')T-5'

SV40TS35: 35-mér, reťazec v zmysle kódu zo SV40-genómu na polohách 5142 – 5176;

5'-AGC TTT GCA AAG ATG GAT AAA GTT TTA AAC AGA AG-3'

SV40AS35: 35-mér, reťazec proti zmyslu kódu k SV40TS35;

5'-TCT CTG TTT AAA ACT TTA TCC ATC TTT GCA AAG CT-3'

SV40TAS35 (3'-3', 5'-5'): 35-mér, reťazec proti zmyslu kódu k SV40TS35 s 3'-3'-, prípadne 5'-5'-vázbou na koncoch;

3'-T(5'-5')CT CTG TTT AAA ACT TTA TCC ATC TTT GCA AAGC(3'-3')T-5'

b) Syntéza oligonukleotidov s terminálnou 3'-3'-vázbou

Ako nosný materiál slúži CPG 10-1400 opísaný v príklade 4. Kondenzácia sa vykoná s bežnými esterami kyseliny nukleozid-3'-fosforitej.

Po odštiepení oligonukleotidu z nosiča konc. NH_3 a odstránení všetkých fosfátových a bázičských ochranných skupín zahrievaním amoniakálneho roztoku na 60 °C cez noc sa vzorka odsolí vyzrážaním v etanole a cieľový reťazec sa elektroforézou na polyakrylamidovom géli čistí od kratších fragmentov.

SV40TAS17(3'-3'): 17-mér, reťazec proti zmyslu kódu k SV40TS17 s 3'-3'-vázbou na konci

3'-TCC ATC TTT GCA AAG C(3'-3')T-5'

c) Syntéza oligonukleotidov s terminálnou 5'-vázbou a 2 terminálnymi tiofosfátovými zvyškami

Ako nosný materiál slúži komerčný CPG-materiál s 5'-O-dimetoxylitryltymidínom viazaným cez 3'-hydroxyskupinu. Kondenzácia sa vykoná s bežnými esterami kyseliny nukleozid-3'-fosforitej; iba v poslednom reakčnom cykle sa nasadia esteramidy kyseliny 3'-O-DMTr-nukleozid-5'-O-(N,N-diizopropylamino- β -kyanoetoxy)-fosforitej opísané v príklade 1.

Pri prvých dvoch reakčných cykloch sa namiesto bežnej oxidácie jódou vykoná oxidácia elementárnou sírou (W. Stec et al. J. A. C. S. 106, str. 6077, 1984).

Po odštiepení oligonukleotidu od nosiča konc. NH_3 a odstránení všetkých fosfátových a bázičských ochranných skupín zahrievaním amoniakálneho roztoku na 60 °C cez noc sa vzorka odsolí vyzrážaním v etanole a cieľový reťazec sa čistí od kratších fragmentov elektroforézou na polyakrylamidovom géli.

Syntetizuje sa nasledujúci oligonukleotid:

SV40TAS17(5'-5'): 17-mér, reťazec proti zmyslu kódu k SV40TS17 s 5'-5'-vázbou na 5'-konci a dvoma tiofosfátinternukleotidovými väzbami na 3'-konci

3'-T(5'-5')CC ATC TTT GCA AAG (P₃) C(P₃)T-3'

Príklad 6

Analýza štruktúry a reťazca oligonukleotidu s terminálnou 3'-3'- a 5'-5'-vázbou

Analýza reťazca oligonukleotidu sa vykonáva metódou Maxama a Gilberta (A. M. Maxam a W. Gilbert, Methods in Enzymology 65, 499 – 560 (1980)). Vždy 100 pmol vzorky sa v prítomnosti (γ -³²P)-ATP/T4-polynukleotidkinázy na 5'-OH-skupine rádioaktívne značí, a potom sa vykonajú nasledujúce bázičsky špecifické reakcie:

(A+G)-reakcia:	protonácia báz kyselinou mravčou
G-reakcia:	reakcia s dimetylsulfátom
(T+C)-reakcia:	hydrazinolýza
C-reakcia:	reakcia s hydrazínom v prítomnosti 5 M NaCl

Pôsobením 1M piperidínu pri 95 °C sa oligonukleotidové reťazce štiepia na modifikovaných miestach; zlomky sa môžu elektroforézou na polyakrylamidovom géli oddeliť (20 % akrylamidu, 7 M močoviny) a autorádiografiou detekovať. Obr. 1 ukazuje autorádiogram analýzy reťazca SV40TS17, SV40TAS17 a SV40TAS17(3'-3', 5'-5') (opis oligonukleotidov pozri príklad 5). Pretože sú reťazce na 5'-OH skupine značené, môže sa sled báz iba pri 3'-5'-vábách odpočítat v smere 3'-5'-smere. V dôsledku 3'-3'-konca má však oligonukleotid SV40TAS17 (3'-3', 5'-5') rádioaktívne značenú 5'-OH skupinu na svojej koncovej

časti; smer odpočítania reťazca sa tým otáča (obr. 1). To je tiež dôkaz pre 5'-5'-fosfodiesterovú väzbu na 5'-koncovej časti reťazca s voľnou 3'-OH skupinou, ktorá sa enzýmom polynukleotidkinázou nemôže fosforylovať.

Příklad 7

Skúška stability oligonukleotidu s 3'-3' a 5'-5'-koncami v teste krvného séra

A) Kinazácia eikosatymidylátu s 3'-3' a 5'-5'-koncami
Literatúra: T. Mizuno, M. Y. Chou a M. Inouye, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1966 – 1970 (1984)

Násada:

1 µl oligonukleotid (0,01 OD₂₆₀)

1 µl 10 x kináza – pufo

1 µl T4-polynukleotidkináza

1 µl γ-³²P-dATP (špec. aktivita: 6000 Ci/mmól)

6 µl H₂O

Násada sa 30 minút inkubuje pri 37 °C, potom sa pridaním 90 µl H₂O skončí a frakcionuje sa cez stĺpec Sephadex G 50. Hydrolytické frakcie sa spoja a lyofilizujú sa.

B) Test krvného séra

Literatúra: S. M. Heywood, Nucleic Acids Res. 14, 6771 – 6772 (1986)

Násada:

0,01 OD₂₆₀ rádioaktívne fosforylovaného oligonukleotidu pre kontrolnú vzorku, 0,01 OD₂₆₀ T₂₀ pre skúšku

0,01 OD₂₆₀ T₂₀ s 3'-3' a 5'-5'-koncovými väzbami

50 µl čerstvého ľudského séra

Sérum sa dá k vzorke a krátko sa ručne trepe. Potom sa hneď kvôli O-hodnote odpipetujú 3 µl a dajú sa do 3 µl pufru s formamidom, aby sa prerušila aktivita enzýmu. Potom sa vzorka inkubuje pri 37 °C.

Pre kinetiku sa po určitých časových úsekoch odoberú 3 µl a preruší sa, ako je opísané.

Kontrolná vzorka: 5 min., 8 min., 11 min., 15 min., 30 min.,

Skúška: 5 min., 8 min., 11 min., 15 min., 30 min., 90 min.

Vzorky sa dajú na 20 % polyakrylamidový gél, delia sa elektroforézou na géli a potom sa autorádiografujú.

Autorádiogram štiepenia s čerstvým ľudským sérom zľava (pozri obr. 2):

Kontrolná vzorka: O – hodnota, 5 min., 8 min., 11 min., 15 min., 30 min.

Skúška: O – hodnota, 5 min., 8 min., 11 min., 15 min., 30 min., 90 min.

Už po 5 minútach sa ukazuje, že začalo odbúravanie prírodného oligonukleotidu. Štiepenie sa zvyšuje s pribúdajúcim časom. Modifikovaný oligonukleotid zostáva i po 90 minútach inkubácie prakticky nezmenený. Slabé pásy, ktoré vidieť pri všetkých hodnotách kinetiky, rezultujú z aktivity endonukleáz, ktoré sú prítomné v sére. Toto štiepenie je dôležité na terapeutické použitie týchto oligonukleotidov, pretože zaručuje pomalé odbúravanie účinnej substancie, a nemôže tým dôjsť k akumulácii týchto substancií v tele.

Příklad 8

Skúška správania oligonukleotidov s terminálnou 3'-3' a 5'-5'-väzbou proti fosfodiesteráze z hadieho jedu

A) Kinazácia eikosatymidylátu s 3'-3' a 5'-5'-koncami

Ako je opísané v príklade 7.

B) Hydrolyza eikosatymidylátu s 3'-3' a 5'-5'-koncami pomocou fosfodiesterázy z hadieho jedu

Literatúra: A. Hirashima, S. Sawaki, Y. Inokuchi a M. Inouye, PNAS USA 83, 7726 – 7730 (1986).

Násada:

5 µl RNA-nosiča

50 µl SQ-pufru

1 µl SVpdE (1,5 µl/µl)

Rádioaktívne fosforylovaná vzorka (štandard: T₂₀, skúška: T₂₀ s terminálnou 3'-3' a 5'-5'-väzbou) sa lyofilizuje, na to sa dá RNA-nosič a SQ-pufo. Od tejto zmesi sa pre O-hodnotu odpipetuje 5 µl, k zvyšku roztoku sa pridá enzým a pri 37 °C sa inkubuje. Pre kinetiku štandardu sa odoberie po 5 min., po 15 min. a po 30 min. po 5 µl, pre kinetiku eikosatymidylátu s 3'-3' a 5'-5'-koncami sa po 5 min., 30 min., 45 min., 60 min. a 90 min. odoberie po 5 µl. K deaktivácii enzýmu sa vzorky priamo po odbere zahrievajú na vodnom kúpeli 2 min. na 95 °C. Vzorky sa lyofilizujú a nanesú sa na analytický 20 % polyakrylamidový gél. Po gelelektrolytickom delení sa autorádiografujú. Autorádiogram SVpdE – štiepenie (pozri obr. 3).

Zľava: T₂₀ (štandard), T₂₀ s terminálnymi 3'-3' a 5'-5'-väzbami,

Kinetika skúšky: po 5 min., 15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 90 min., mix. z 0 min./15 min., mix z 0 min./30 min., kinetika štandardu: po 5 min., 15 min., 30 min., 45 min.

Väzba 5'-5' sa, ako je už opísané, ihneď štiepi. Že ďalšie štiepenie v porovnaní so štandardom pokračuje ešte len veľmi pomaly, je značný štruktúrny dôkaz. Po štiepení 5'-5'-fosfodiesterovej väzby vznikne molekula, ktorá na mieste štiepenia nesie 5'-hydroxylovú funkciu. Na druhej koncovej časti je molekula 5'-fosforylovaná. Obe dve koncové časti sú pre fosfodiesterázu z hadieho jedu nenapadnuteľné. Pomalé, ale veľmi značné ďalšie odbúravanie je pravdepodobne, podľa výrobcu opísaných príslad (J. G. Izant a H. Weintraub, Cell 36, 1007 – 1015 (1984)), možné odvodzovať od jednoreťazcovej špecifickej endonukleázy, ktorá PM2 DNA mení na otvorené formy. Ľahko možno odpočítať dĺžku reťazca. Je však možné odpočítať iba 19 pásov, pretože pri prvej hodnote kinetiky, po 5 min., je 5'-5'-fosfodiesterová väzba už odštiepená.

Příklad 9

Skúšky hybridizačného správania oligonukleotidov opatrených terminálnymi 3'-3' a 5'-5'-koncami

Kvôli skúškam hybridizačného správania sa zaznamenávajú krivky topenia vždy ekvimolárneho množstva (5,23 mmól) SV40TS17 a SV40TAS17 (3'-3', 5'-5'-) (opis oligonukleotidov pozri príklad 5), rozpustia sa v 1 ml 10 nM Na-kakodylátu/100 mM NaCl-pufru, pH 7,0, zahreje sa na 70 °C a priebeh renaturácie sa zisťuje pri pomalom ochladzovaní (1 stupeň/min.) meraním absorpcie roztoku. Na záznam krivky štandardu sa použijú rovnaké množstvá SV40TAS17. Analogicky sa v pufri mieša vždy 4,75 nmól SV40TS35 a SV40TAS35, prípadne SV40TS35 a SV40TAS35(3'-3', 5'-5'-), zahreje sa na 90 °C a absorpcia sa meria pri ochladzovaní. Zistili sa krivky tavenia, ktoré poskytujú nasledujúce hodnoty T_m:

SV40TS17 . SV40TAS17	54,1 °C
SV40TS17 . SV40TAS17(3'-3',5'-5')	53,3 °C
SV40TS35 . SV40TAS35	65,5 °C
SV40TS35 . SV40TAS35(3'-3',5'-5')	64,2 °C

Teploty tavenia sa teda abiologickými väzbami znižujú len o 0,6 °C pri 17-méri, prípadne pri 1,3 °C u 35-mériu.

Příklad 10

Inhibícia biosyntézy SV40 T-antigénu oligonukleotidmi s terminálnou 3'-3' a 5'-5'-väzbou

A) Bunková kultúra

Bunky COS1 sa v Eaglovom prostredí v Dulbeccovej modifikácii (DMEM) kultivujú s 10 % fetálneho telacieho sé-

ra. Misky na tkanivové kultúry sa inkubujú pri 37 °C a 7,5 % CO₂.

B) Rádioaktívne značenie a rozrušenie buniek

Asi 4 x 10⁴ buniek sa ako monolayer dá do misiek na tkanivové kultúry. Bunky sa trikrát premyjú DMEM bez metionínu, a potom sa značia 100 µCi³⁵-S-metionínu. Na skúšky modulácie proti zmyslu kódu sa bunky súčasne 30 min. pri 37 °C inkubujú s oligonukleotidom SV40TAS17 (3'-3',5'-5') a rádioaktívnym metionínom. Potom sa bunky dvakrát premyjú DMEM obsahujúcim 10 % fetálneho teľacieho séra a neznačený metionín a v tomto prostredí sa nechajú ďalších 30 minút. Kvôli rozrušeniu sa na bunky pôsobí ľadovo studeným fosfátom pufrovaným fyziologickým roztokom NaCl (PBS); od misiek sa odškrabnú a 2 minúty sa pri 400 g odstreďujú. Usadenina buniek sa potom 45 minút na ľade lyzuje 0,4 ml rozrušovacieho pufru (0,5 % nonidetu P40, 100 mM tris-HCl, pH 9,0, 0,1 M NaCl) pre 3 x 10⁶ buniek. Na zamedzenie proteolýzy sa k rozrušovaciemu pufru pridá 1 % trazyolu a fenylmetylsulfonylfluorid až do konečnej koncentrácie 0,25 mg/ml. Lyzát sa potom 30 minút pri 4 °C v ultraodstredivke (105 000 g) odstreďuje do čira. Podiel 10 µl sa odoberie a meria sa obsah proteínu metódou Lowryho. Na imunoprecipitáciu sa nasadí rovnaké množstvo celkového proteínu.

C) Imunoprecipitácia

Tak na imunoprecipitáciu SV40 T-antigénu, ako aj mutantov antigénu lokalizovaných v cytoplazme sa použije monoklonálna protilátka Pab108. Protilátka sa chromatografiou na proteíne A-sefáráze čistí od prebytku hybridómu. Bunkový extrakt sa predbežne cez noc pri 4 °C zráža 100 µl 10 % suspenzie teplom inaktivovaných a formaldehydom fixovaných baktérií kmeňa *Staphylococcus aureus* (Cowan 1). Baktérie sa potom odstredia, zvyšok sa aspoň 2 hodiny pri 4 °C inkubuje s monoklonálnou protilátkou a pridaním *S. aureus* sa tvoria vysokošpecifické imunokomplexy. Tento postup sa 3x opakuje, aby sa zaistila úplná precipitácia.

Potom sa imunoprecipitáty premývajú: trikrát 50 mM tris-HCl, pH 8,0, 500 mM LiCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 % trazyolu; dvakrát 50 mM tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 % nonidetu P40 a raz 50 mM NH₄HCO₃. Potom sa 45 minút pri 4 °C eluuje 200 µl eluáčného pufru (50 mM NH₄HCO₃, 1 % SDS, 1 % β-merkaptoetanolu), lyofilizuje sa, 10 minútovým varom sa rozpustí v 20 µl pufru (65 mM tris-HCl, pH 6,8, 5 l β-merkaptoetanolu, 1 % glycerínu, 0,01 % brómfenolovej modrej) a uloží sa na 3 % polyakrylamidový gél (10 % SDS). Proteíny sa rozdelia diskontinuálnou elektroforézou na géli; pásy sa môžu lokalizovať fluorografiou na röntgenovom filme (Kodak X-AR).

S oligonukleotidmi pripravenými podľa vynálezu tak, že predlžia začiatok translácie pre T-antigén bola pri použití extrabunkovej koncentrácie 30 µmolárne registrovaná 70 % inhibícia vírusového rastu. To je protiklad k účinnosti zodpovedajúcich reťazcov, ktoré neboli stavané podľa vynálezu, t.j. reťazcov bez 3'-3'- a 5'-5'-väzieb. Tu pri použití rovnakej koncentrácie nebola zistená žiadna inhibícia. Obr. 4 ukazuje zjavnú inhibíciu T-Ag-biosyntézy pri ošetrení buniek 30 µM SV40TAS17 (3'-3'- a 5'-5').

Príklad 11

Porovnanie sérovej stability oligonukleotidov, ktoré sú modifikované iba na 3'-konci, prípadne iba na 5'-konci invertovanými fosfodiesterovými väzbami

Oligonukleotidy sa nukleázou odbúrávajú od svojej 3'-

-koncovej časti (J. P. Shaw, K. Kent, J. Bird, J. Fishback, B. Froehler, *Nucleic Acids Res.*, 19, 747 – 750 (1991)). Malo by sa preto skúšať, či samotná terminálna 3'-3'-fosfodiesterová väzba stačí na stabilizáciu oligonukleotidu v krvnom sére. Pretože s 32p značený fosfátový zvyšok, hlavne pri dlhšom pôsobení sérom na vzorku, sa fosfotázami odštiepuje, bol na detekciu oligonukleotidov použitý fluoresceín.

Syntetizované boli nasledujúce reťazce z genómu *Xenopus levis*.

Xelev 1: 3'-A(5'-5')GC CTC AAA C*AT GTG TGA CG-3'

Xelev 2: 5'-AGC CTC AAA C*AT GTG TGA C (3'-3')-G-5'

Syntézy sa vykonávajú, ako je opísané v príklade 5, pričom sa pre 10. kondenzáciu nasadí esteramid kyseliny cytidín-fosforitej C*, ktorý umožňuje dodatočnú kovalentnú väzbu s fluoresceínom. Vostavba fluoresceínu sa vykonáva podľa návodu firmy Pharmacia (Pharmacia LKB Biotechnology Auto Primer^(tm) Synthesis Kit Instructions (XY-023-00-01). Modifikované oligonukleotidy sa čistia elektroforézou na polyakrylamidovom géli.

Sérový test:

10 pmól oligonukleotidu

140 µl čerstvého ľudského séra

Vzorky sa inkubujú pri 37 °C. Po 15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 8 hodinách a 72 hodinách sa odoberie vždy 20 µl, 2x sa extrahuje zmesou fenol/chloroform/izomylalkohol 25 : 24 : 1 a oligonukleotidy sa zrazia etanolom. Produkty štiepenia sa delia a detekujú na 16 % polyakrylamidovom géli v automatickom sekvenceri A.L.F. (Pharmacia, Freiburg). Ako ukazuje obr. 5, iba reťazec opatrený na 5'-konci má invertovanú internukleotidovú väzbu už po 15 min. pôsobenia séra produkty odbúrania a po 60 min. je už takmer úplne odbúraný. Oligonukleotid „chránený“ na 3'-konci 3'-3'-väzbou je sám oproti tomu po 72 hodinách len čiastočne odbúraný.

Príklad 12

Inhibícia expresie génov v in vitro-expresnom systéme

Aby sa kvantifikovala expresia génov INV-oligonukleotidmi, skúšal sa účinok zodpovedajúcich oligonukleotidov s reťazcom proti zmyslu kódu na expresiu p53 v systéme in vitro, aby p53 obsahoval mRNA (E. Reihaus, M. Kohler, S. Kraiss, M. Oren, M. Montanari, *Oncogene* 5, 137 – 144 (1990)).

Syntetizovali sa reťazce proti zmyslu kódu

NH₂(CH₂)₆ pTAA TCA GTC GTT GGT CCA CAC CTT (3'-3')T

a ako porovnávací vzorka zodpovedajúci reťazec v zmysle kódu

NH₂(CH₂)₆ pAAA GGT GTG GAC CAA CGA CTG ATT (3'-3')A

Oligonukleotid s reťazcom proti zmyslu kódu je riadený proti začiatku translácie onkoproteínu p53

Skúšali sa expresie proteínu

1. bez pridania oligonukleotidu
2. pri pridani 30 µM reťazca v zmysle kódu
3. pri pridani 1 µM reťazca proti zmyslu kódu
4. pri pridani 10 µM reťazca proti zmyslu kódu

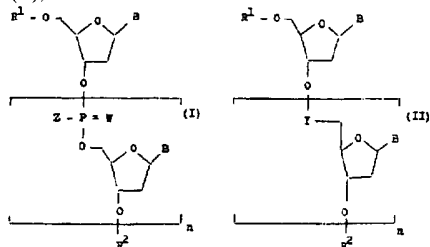
Na kvantifikáciu sa stanovilo čierne sfarbenie proteínových pásov denzitometricky (E. Reihaus, M. Kohler, S. Kraiss, M. Oren, M. Montanari, *Oncogene* 5, 137 – 144 (1990)).

Obr. 6 ukazuje, že prídavkom 10 µM oligonukleotidu s reťazcom proti zmyslu kódu k systému expresie spôsobí cca 70 % inhibíciu. Pri znížení koncentrácie na 1 µM nie je

viac možné zistiť takmer žiadnu inhibíciu, rovnako pri prípravke reťazca v zmysle kódu, ktorý neviaže na mRNA.

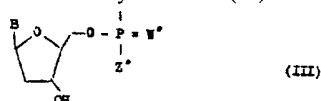
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Analógy oligonukleotidov všeobecného vzorca (I) alebo (II),

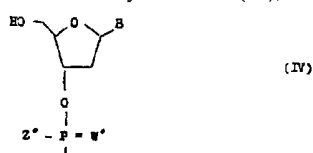


kde

R¹ znamená vodík alebo zvyšok vzorca (III)



R² znamená vodík alebo zvyšok vzorca (IV),



pričom však aspoň jeden zo zvyškov R¹ alebo R² predstavuje zvyšok vzorca (III) alebo (IV),

B predstavuje bázu, vybranú zo skupiny zahrňujúcej adenín, cytozín, guanín alebo neprírodné bázy, purín, 2,6-diaminopurín, 7-deazaadenín, 7-deazaguanín, N⁴-etanocytozín, prípadne ich prekurzorové formy,

W a W' nezávisle od seba znamenajú kyslík alebo síru, Z a Z' nezávisle od seba znamenajú O; S; alkoxy skupinu s 1 až 18 atómami uhlíka, výhodne alkoxy skupinu s 1 až 8 atómami uhlíka, obzvlášť výhodne alkoxy skupinu s 1 až 3 atómami uhlíka, hlavne metoxy skupinu; alkyl s 1 až 18 atómami uhlíka, výhodne alkyl s 1 až 8 atómami uhlíka, najmä výhodne alkyl s 1 až 3 atómami uhlíka, hlavne metyl; NHR³ s R³ znamenajú výhodne alkyl s 1 až 18 atómami uhlíka, obzvlášť výhodne alkyl s 1 až 8 atómami uhlíka, hlavne alkyl s 1 až 4 atómami uhlíka alebo alkoxy-alkyl s 1 až 4 atómami uhlíka v alkoxyzvyšku a s 1 až 6 atómami uhlíka v alkylovom zvyšku, výhodne metoxyetyl; NR³R⁴, kde R³ má uvedený význam a R⁴ znamená výhodne alkyl s 1 až 18 atómami uhlíka, najmä výhodne alkyl s 1 až 8 atómami uhlíka, hlavne alkyl s 1 až 4 atómami uhlíka, alebo kde R³ a R⁴ spolu s nosným atómom dusíka znamenajú 5- až 6-členný heterocyklický kruh, ktorý môže navyše obsahovať ďalší heteroatóm z radu O, S, N, ako napríklad morfolín,

Y znamená zvyšok z radu -O-Si(R)₂, OCH₂, C(O)NR alebo OCH₂-C(O), kde R predstavuje alkyl s 1 až 6 atómami uhlíka, aryl alebo cykloalkyl s 5, prípadne 6 atómami uhlíka, a

n znamená celé číslo 5 až 60, výhodne 10 až 40 a hlavne 15 až 25, ako i ich fyziologicky znášateľné soli.

2. Oligonukleotidy vzorca (I) podľa nároku 1, kde R² predstavuje zvyšok vzorca (IV) a R¹ znamená vodík; R¹, prípadne R², predstavujú zvyšok vzorcov (III), prípadne (IV); alebo R² znamená vodík a R¹ znamená zvyšok vzorca

(III), pričom buď W alebo Z v poslednom prípade neznamenajú kyslík.

3. Oligonukleotidy vzorca (I) podľa nárokov 1 alebo 2, kde W predstavuje kyslík alebo Z a W obidva znamenajú kyslík.

4. Oligonukleotidy vzorca (I) podľa nárokov 1 až 3, kde R² predstavuje zvyšok vzorca (IV) a R¹ znamená vodík.

5. Oligonukleotidy vzorcov (I) a (II) podľa nárokov 1 až 4, obsahujúce skupiny, ktoré podporujú intrabunkový príjem, ktoré slúžia ako značiac skupiny in vitro alebo in vivo a/alebo skupiny, ktoré pri hybridizácii oligonukleotidu na biologické DNA alebo RNA tieto DNA- alebo RNA-molekuly za viazania alebo štiepenia napádajú.

6. Spôsob výroby oligonukleotidov vzorca (I) podľa nárokov 1 až 5, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že sa

a) nukleotidová jednotka s 3', prípadne 5'-terminálnymi skupinami fosforu (III) alebo fosforu (V), alebo jej aktivovaný derivát nechá reagovať s ďalšou nukleotidovou jednotkou s 3', prípadne 5'-terminálne voľnou hydroxyskupinou, alebo

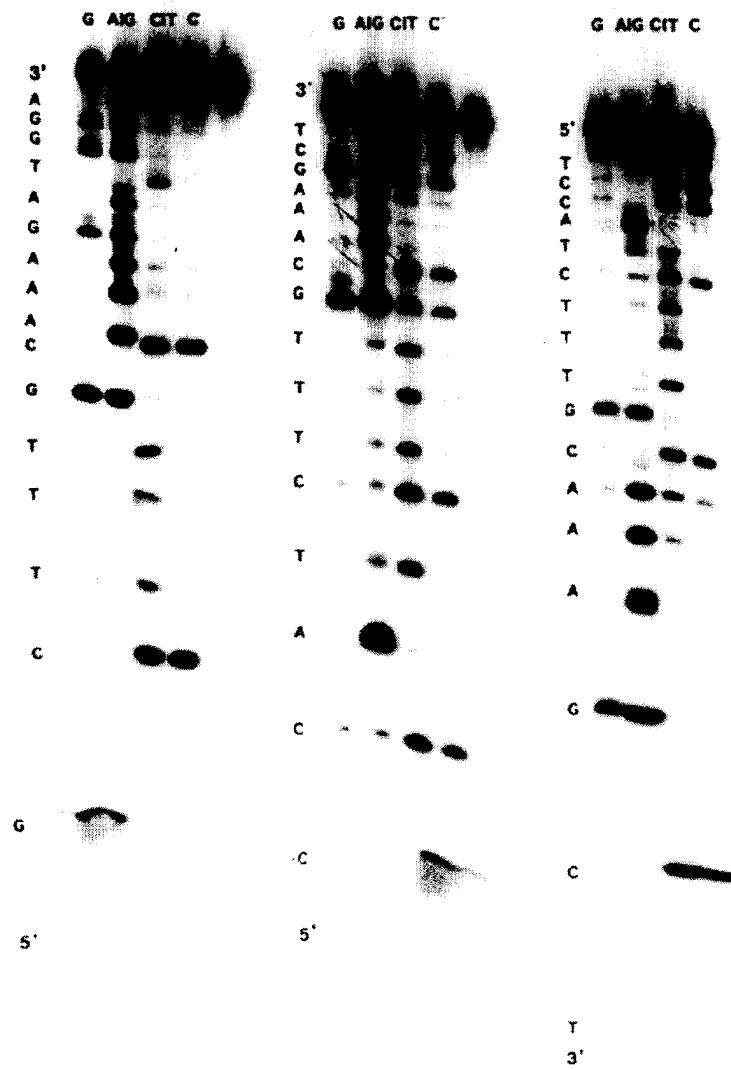
b) oligonukleotid pripraví z fragmentov rovnakým spôsobom, v oligonukleotidoch získaných podľa (a) alebo (b) sa prípadne jedna alebo niekoľko ochranných skupín zavedených dočasne kvôli ochrane ostatných funkcií odštiepi a takto získané oligonukleotidy vzorca (I) sa prípadne prevedú na svoju fyziologicky znášateľnú soľ.

7. Analógy oligonukleotidov vzorca (I) a (II) podľa nárokov 1 až 5, na výrobu liekov pre hybridizačno - chemický postup regulácie alebo na potláčanie biologických funkcií nukleových kyselín spočívajúci na adícii na nukleové kyseliny s dvojitém alebo jednoduchým reťazcom, ako i na selektívne potláčanie exprese funkcií vírusového genómu a na profylaxiu a terapiu vírusových funkcií, na potláčanie nádorovej funkcie a na terapiu rakovinových ochorení.

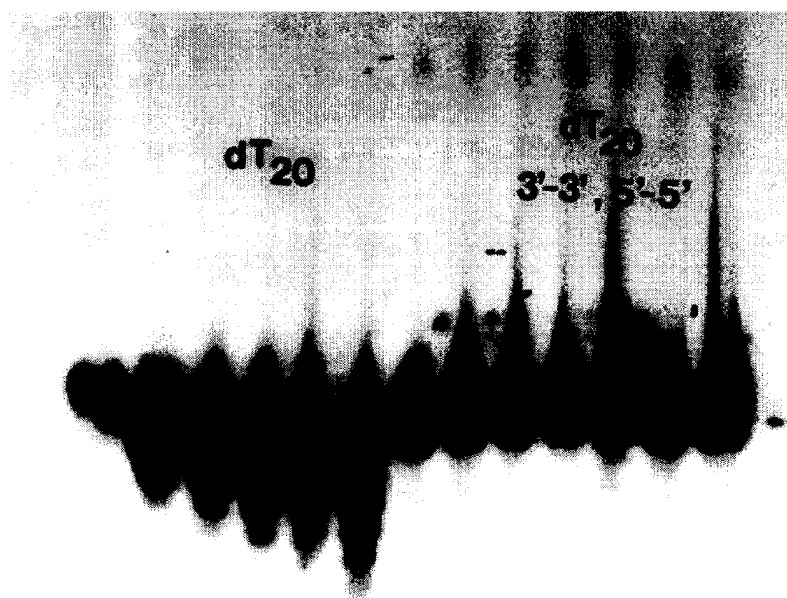
8. Farmaceutické prostriedky, potláčajúce funkciu nukleových kyselín, **v y z n a ě u j ú c e s a t ý m**, že ako účinnú látku obsahujú jeden alebo niekoľko analógov oligonukleotidov podľa nárokov 1 až 6, prípadne spolu s fyziologicky znášateľnými pomocnými a/alebo nosnými látkami, hlavne na intravenóznou alebo topickú aplikáciu.

6 výkresov

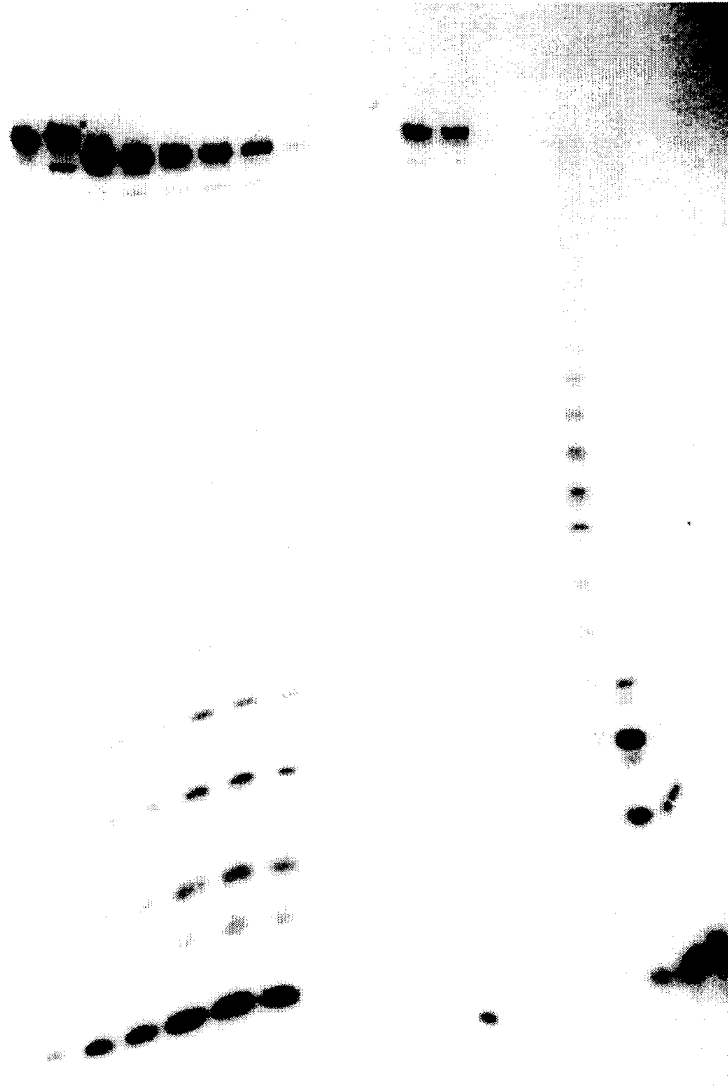
Obr. 1



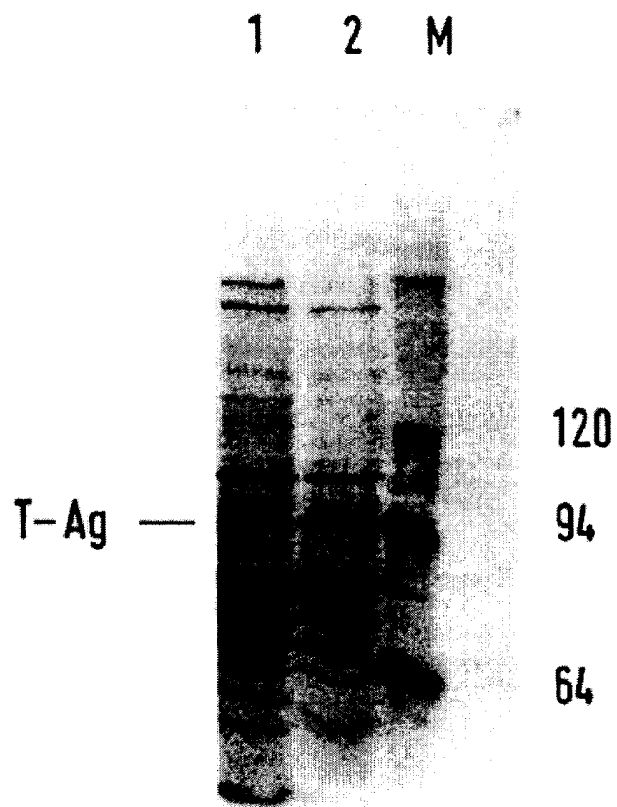
Obr. 2



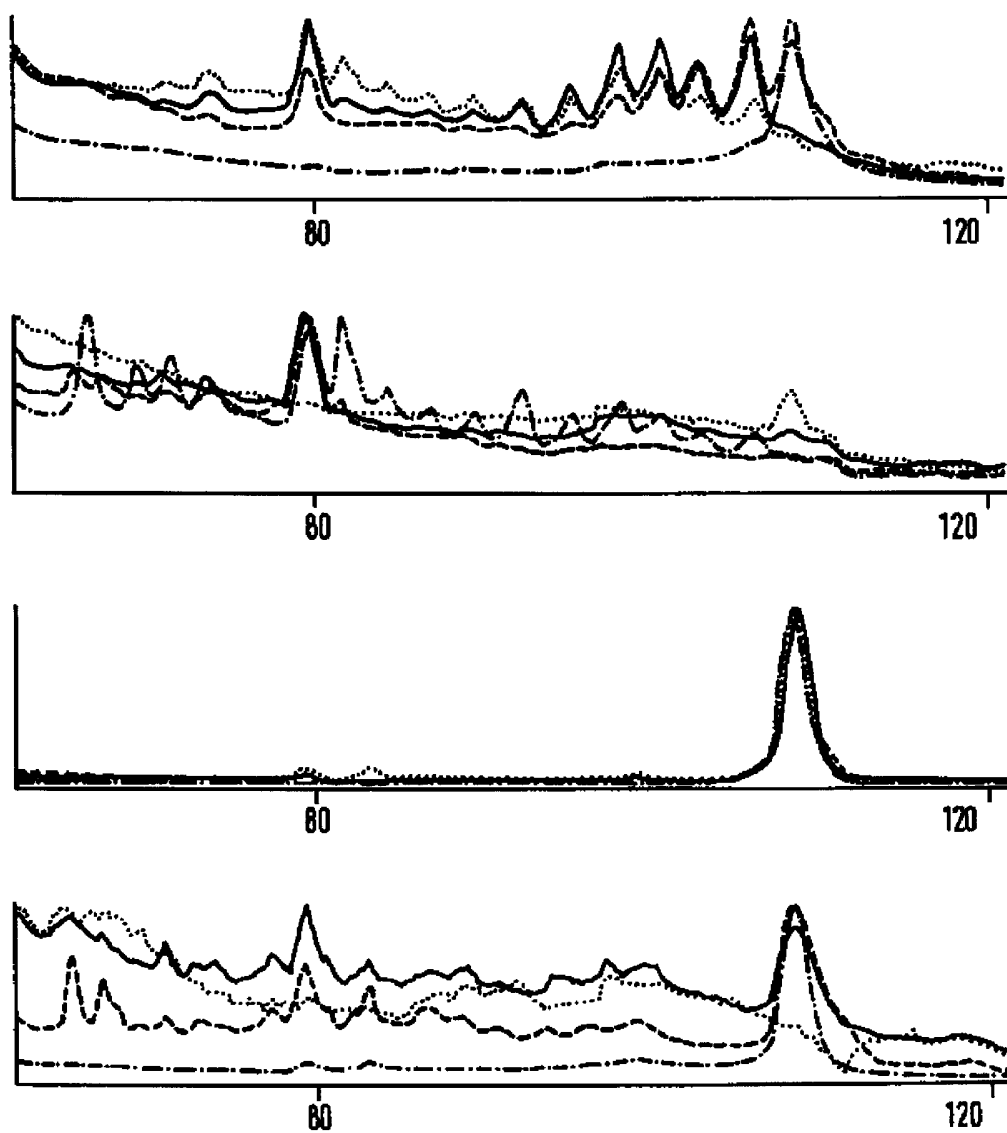
Obr. 3



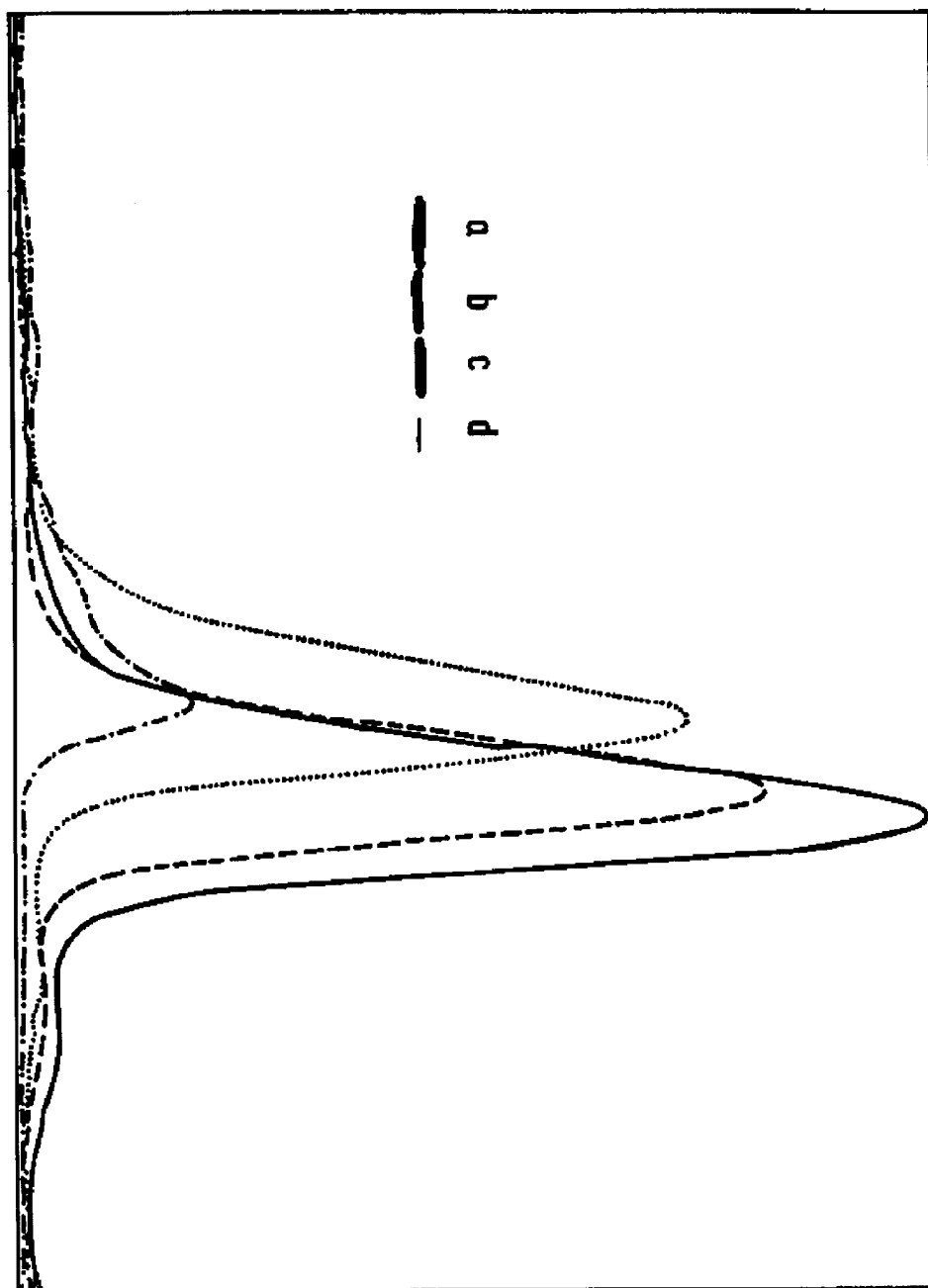
Obr. 4



Obr.5



obr. 6



Koniec dokumentu