



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**219 638 B**

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 02697  
(22) A bejelentés napja: 1993. 09. 24.  
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
P 42 31 949.8 1992. 09. 24. DE

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

**C 07 H 21/02**

A 61 K 31/7125

A 61 P 31/12

(40) A közzététel napja: 1994. 11. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 2001. 06. 28.

(72) Feltalálók:

Kirst, Bernd, Ulm (DE)  
dr. Ortigao, Flavio Ramalho, Ulm (DE)  
dr. Rösch, Hannelore, Erbach (DE)  
dr. Rösch, Rudi, Erbach (DE)  
dr. Seliger, Heinz Hartmut, Elchingen (DE)

(73) Szabadalmaz:

AVENTIS Pharma Deutschland GmbH,  
Frankfurt/Main (DE)

(74) Képvisező:

Topor Gáborné, DANUBIA Szabadalmi  
és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Terminálisan 3'-3'-, illetve 5'-5'-kötésekkel rendelkező oligoribonukleotid-  
és ribozimanalógok,  
valamint eljárás a vegyületek és az ezeket hatóanyagként tartalmazó  
gyógyszerkészítmények előállítására**

KIVONAT

A találmány génkifejezést gátló és RNS-hasító oligo-  
ribonukleotid- és ribozimanalógokra vonatkozik, ame-  
lyekben a terminális egységek 3'-3'-, illetve 5'-5'-kö-  
téssel kapcsolódnak egymáshoz.

A vegyületek az (I) általános képletnek felelnek meg,  
amelyben:

R<sup>1</sup> jelentése hidrogénatom vagy (II) általános képletű  
csoport és

R<sup>2</sup> jelentése hidrogénatom vagy (III) általános képletű  
csoport azzal a megkötéssel, hogy R<sup>2</sup> és R<sup>1</sup> közül  
legalább az egyik (II), illetve (III) általános képletű  
csoportot jelent;

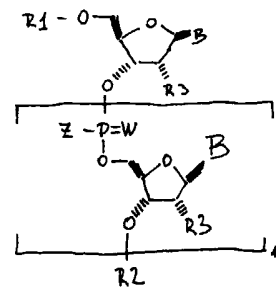
B jelentése természetes ribonukleinsavbázisok (A, C,  
G, U),

X jelentése OH-csoport,

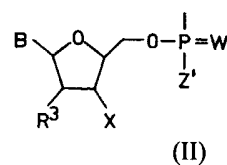
R<sup>3</sup> jelentése fluoratom vagy OH-csoport,

W és W' jelentése egymástól függetlenül oxigén- vagy  
kénatom,

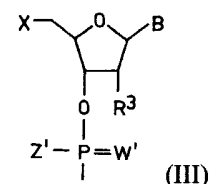
Z és Z' jelentése 2-ciano-etoxi-csoport és  
n értéke 5-től 60-ig, előnyösen 10-től 40-ig, különösen  
előnyösen 15-től 25-ig terjedő egész szám.



(I)



(II)



(III)

A leírás terjedelme 16 oldal (ezen belül 9 lap ábra)

**HU 219 638 B**

A találmány oligoribonukleotid- és ribozimanalógokra vonatkozik, amelyekben a terminális egységek 3'-3', illetve 5'-5'-kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Az így megváltoztatott molekulák, közöttük ribozimek is, stabilizálódnak, anélkül, hogy tulajdonságaik, közöttük adott esetben katalitikus aktivitásuk, hátrányosan megváltoznának.

Ellentétes értelmű oligonukleotidnak azt a nukleinsavfragnetst nevezik, amelynek a szekvenciája egy különönc RNS kódoló- vagy „sense” láncával, illetve a DNS kódolóláncával komplementer. Az ilyen oligonukleotidok növekvő mértékben alkalmazást nyernek a génkifejeződés – többnyire terápiás szempontból kívánatos – gátlására, in vitro, sejtenyészetben és in vivo egyaránt [1. E. Uhlmann, A. Peyman, Chem. Rev. 90 (1990) 543–584; 2. J. Goodchild, Bioconjugate Chem. 1 (1990) 165–187; 3. L. Whitesell, A. Rosolen, L. Neckers, Anti-sense Research and Development 1 (1991) 343].

Az ellentétes értelem elvének az alábbi variációi vannak:

I. Tripel-hélixet képező oligonukleotidok: olyan nukleinsavfragnetsek, amelyek tripla hélixképződése közben a DNS-szállhoz kapcsolódhatnak, és az átírást lehetetlenné téve a génkifejezést modulálják [J. Chubb és M. Hogen, TIBTECH 10 (1992) 132–136].

II. Ribozimek: enzimes aktivitással rendelkező ribonukleinsavfragnetsek; az enzimes aktivitás abban áll, hogy a ribozim, miután fajlagosan odakötődött a cél-RNS-hez, például egy m-RNS-hez, ezt a cél-RNS-t hasítja [T. R. Cech, J. A. Med. Assoc. 260 (1988), 3030].

Ahhoz, hogy ellentétes értelmű oligonukleotidok, tripla hélixet képező oligonukleotidok és ribozimek alkalmazhatók legyenek biológiai rendszerekben, az alábbi előfeltételeknek fenn kell állniuk [E. Uhlmann, A. Peyman, Chem. Rev. 90 (1990) 543–584].

1. A vegyületek vízben jól oldódnak, ugyanakkor a lipofil sejtmembránon kell könnyen keresztüljussanak,
2. sejten belüli lebontással szemben eléggé stabilnak kell lenniük, azaz nukleáz ne bontsa őket,
3. a sejten belüli nukleinsavakkal fiziológiai hőmérsékleten stabil hibrideket kell, hogy alkossanak,
4. a hibridizációnak szelektívnek kell lennie; a jó és a „hibás” párosítást adó oligonukleotidok disszociációs hőmérséklete között annyi különbség kell legyen, hogy az utóbbi még szelektíve lemosható,
5. a ribozim katalitikus aktivitása ne szűnjön meg.

Nem módosított oligonukleotidokat, különösen nem módosított oligoribonukleotidokat a nukleázok erősen bontanak. Ezért már korán kezdték vizsgálni az oligonukleotidok szerkezetének olyan módosításait, amelyek a molekulát a fenti követelményeknek jobban megfelelővé, főleg nukleázokkal szemben védetté teszik. E célból – részben óriási szintézisráfordítással – rengeteg oligonukleotidanalógot állítottak elő [E. Uhlmann, A. Peyman, Chem. Rev. 90 (1990) 543–584]; J. Goodchild, Bioconjugate Chem. 1 (1990) 165–187].

Nemrég megállapították, hogy a terminálisan 3'-3', illetve 5'-5'-kapcsolású oligodezoxinukleotidok, illetve analógaik a nukleázokkal szemben fokozottan stabilak [1. H. Seeliger, A. Fröhlich, M. Montenarh: Nucleosides & Nucleotides 10 (1991) 469–477; 2. H. Rösch, A. Fröhlich, J. Ramalho-Ortiga, J. Flavio, M. Montenarh, H. Seeliger: EP 0464638A2]. Meglepő módon azt találtuk, hogy ez a típusú, könnyen szintetizálható terminális kötés képes

- a) a sokkal kevésbé stabil oligonukleotidokat is stabilizálni a nukleázokkal szemben,
- b) ribozimeket (különös szekvenciájú oligoribonukleotidokat) is stabilizálni nukleázokkal szemben,
- c) kémiai módosítással nukleázokkal szemben védetté tett oligoribonukleotidokat, illetve ribozimeket járulékosan stabilizálni.

A találmány (I) általános képletű oligoribonukleotidokra vonatkozik, ahol

R<sup>1</sup> jelentése hidrogénatom vagy (II) általános képletű csoport és

R<sup>2</sup> jelentése hidrogénatom vagy (III) általános képletű csoport azzal a megkötéssel, hogy R<sup>2</sup> és R<sup>1</sup> közül legalább az egyik (II), illetve (III) általános képletű csoportot jelent;

B jelentése természetes ribonukleinsavbázisok (A, C, G, U),

X jelentése OH-csoport,

R<sup>3</sup> jelentése fluoratom vagy OH-csoport,

W és W' jelentése egymástól függetlenül oxigén- vagy kénatom,

Z és Z' jelentése 2-ciano-etoxi-csoport és n értéke 5-től 60-ig, előnyösen 10-től 40-ig, különösen előnyösen 15-től 25-ig terjedő egész szám.

A találmány a fenti vegyületek fiziológiailag elviselhető sóira is vonatkozik.

Az olyan oligoribonukleotidok előnyösek, amelyek bázissorrendje (B1, B2...Bn) a ribozimek szekvenciájával szemben fennálló követelményeknek megfelel. Itt különösen az alábbiakat emeljük ki: „Hammerhead” ribozimek [lásd például Uhlenbeck, Nature 328 (1987) 596; Haseloff, Gerlach, Nature 334 (1988) 585], a „Hairpin” ribozimek [például Hampel és munkatársai, Nucl. Acids Res. 18 (1990) 299], a humán hepatitis Ó-vírus ribozim [például Branch, Robertson, Proc. Natl. Acad. Sci. Amerikai Egyesült Államok 88 (1991) 10 163] és az RNáz P „external guide sequence”-jelentése [például Forster, Altman, Science 249 (1990) 783], különösen azonban a „hammerhead” ribozimek.

Igen előnyösek az olyan (I) általános képletű oligoribonukleotidok, amelyekben R<sup>2</sup> jelentése (III) általános képletű csoport és R<sup>1</sup> jelentése hidrogénatom. Az (I) általános képletű oligoribonukleotidokat járulékosan a sejten belüli bejutást elősegítő csoportokkal, vagy in vivo vagy in vitro jelzőcsoportként használható csoporttal és/vagy az oligoribonukleotid biológiai DNS-sel vagy RNS-sel történő hibridizációja során ezeket a DNS- vagy RNS-molekulákat kötés vagy bontás útján megtámadó csoportokkal szubsztituálhatjuk.

A sejten belüli bejutást elősegítő csoportok példaként az alábbiakat soroljuk fel: lipofil csoportok, pél-

dául legfeljebb 18 szénatomos alkilcsoportok, vagy a koleszteril- vagy a tirkoleszterilcsoport [E. Uhlmann, A. Peyman, Chem. Rev. 90 (1990) 543–584; J. Goodchild, Bioconjugate Chem. 1 (1990) 165–187; B. Oberhauser, E. Wagner, Nucl. Acids Res. 20 (1992) 533; C. MacKellar és munkatársai, Nucl. Acids Res. 20 (1992) 3411], vagy természetes hordozórendszereket (carrier) hasznosító konjugátumok, például epesav vagy a megfelelő receptorhoz való peptid (például receptor közvetítette endocitózis). Jelzőcsoportok lehetnek például fluoreszkáló csoportok (például akridinil-, denzil-, fluoreszcainilcsoport) vagy kemolumineszkáló csoportok, például akridinium-észter-csoportok.

Nukleinsavakhoz kötődő vagy azokat lebontó oligonukleotidkonjugátumokat az alábbi irodalom ismerteti: E. Uhlmann, A. Peyman, Chem. Rev. 90 (1990) 543–584; J. Goodchild, Bioconjugate Chem. 1 (1990) 165–187; Helene, Toulme, Biochim. Biophys. Acta 1049 (1990) 99. A konjugátumban partnerként egyebek között akridin, pszoralén, klór-etil-amino-aril, fenantridin, azido-fenazil, azido-proflavin, fenazin, fenantrolin/Cu, Porfin/Fe, benzo[e]pirido-indol, EDTA/Fe szerepel [Mergny és munkatársai, Science 256 (1992) 1681].

A találmány szerinti oligoribonukleotidok jellemző szerkezeti módosítása abban áll, hogy a nukleotidok egymás közti összekapcsolódása a láncvégeken megváltozott: a biológiai 3'-5'-kötés helyett 3'-3'-, illetve 5'-5'-kötések vannak jelen. Meglepő módon ez a minimális szerkezeti módosítás elegendő ahhoz, hogy a vegyületeket védetté tegye a nukleázokkal szemben, ugyanakkor más tulajdonságaikat, például az enzimaktivitást nem rontja.

Ahogy az alábbiakban leírjuk, a csak csekély szerkezeti módosítás olyan hibridizációs viselkedést okoz, amely majdnem a biológiai oligoribonukleotidokéval azonos. Ebből adódik a vegyületek génkifejezés-gátlókénti általános alkalmazhatósága is.

Az (I) általános képletű vegyületek előállítása ugyanúgy, mint biológiai oligonukleotidok szintézise oldatban vagy előnyösen szilárd fázison történik, adott esetben automata szintéziskészülék segítségével.

A fentiek értelmében a találmány tárgyához eljárás is tartozik az (I) általános képletű oligoribonukleotidok előállítására, mely eljárásra jellemző, hogy

a) 3'-, illetve 5'-terminális foszfor(III)- vagy foszfor(V)csoporttal rendelkező ribonukleotidegységet vagy aktív és/vagy védett származékát 3'-, illetve 5'-terminális szabad hidroxilcsoporttal rendelkező másik ribonukleotidegységgel vagy védett származékával reagáltatunk, vagy

b) az oligoribonukleotidot az a) eljárással analóg módon, de több ribonukleotidegységet magukban foglaló fragmensekből építjük fel,

majd adott esetben az a) vagy b) eljárás szerint kapott oligoribonukleotidokról egy vagy több ideiglenes védőcsoportot lehasítunk és a kapott (I) általános képletű oligonukleotidokból kívánt esetben fiziológiailag elviselhető sót képzünk.

A terminálisan megfordított (3'-3')-kötést tartalmazó oligoribonukleotidok előállítása során kiindulási kom-

ponensként a szilárd fázisú szintézis esetén hordozógyantát alkalmazunk, amelyhez az első nukleotidmonomer az 5'-OH-csoporton keresztül kapcsolódik. E komponens előállítására az irodalomból ismert módon [T. Atkinson, M. Smith, Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gait (ed), 35–49 (1984)] előállított hordozógyanta, előnyösen kovasavgel vagy aminocsoportokkal funkcionalizált, határozott pórusméretű üveg (controlled pore glass) alkalmazható. A következő nukleozidszármazékot a nukleobázison és a 3'-OH-csoporton védett; 5'-p-nitro-szukcináttá alakítása után a hordozóval reagáltatjuk. A bázis védőcsoportja lehet előnyösen acilcsoport, például benzoil-, izobutil- vagy fenoxi-acetilcsoport. A 3'-helyzetet előnyösen dimetoxi-tritil-védőcsoporttal védjük, mely csoport M. D. Matteucci, M. H. Caruthers Tetrahedron Letters 21 (1980) 3243–3246. oldalán megjelent cikke szerint vezethető be a vegyületbe.

Az oligoribonukleotidlánc további építése, egészen az utolsó előtti láncszemig, az irodalomból ismert módon [Beaucage, Iyer, Tetrahedron 48 (1992) 2223] történik, előnyösen az 5'-OH-csoporton dimetoxi-tritil-csoporttal védett nukleozid-3'-foszforosav-észter-amidok vagy nukleozid-3'-H-foszfonátok felhasználásával. A 2'-hidroxil-csoportot előnyösen terc-butil-metil-szil-csoporttal védjük [M. Lyttle és munkatársai, J. Org. Chem. 56 (1991) 4608; Scaringe és munkatársai, Nucl. Acids Res. 18 (1990) 5433]. A 2'-aminocsoportot (R<sup>3</sup> helyén aminocsoportot tartalmazó vegyületek szintézise) előnyösen trifluor-acetil-csoporttal védjük [Benseler és munkatársai, Nucleosides & Nucleotides 11 (1992) 1333]. Utolsó láncszemket ismét egy, a 3'-OH-csoporton előnyösen dimetoxi-tritil-csoporttal védett nukleozid-5'-foszforosav-észter-amidot vagy nukleozid-H-foszfonátot alkalmazunk. Az oligoribonukleotidlánc itt leírt előállítását, a terminálisan elfordított internukleotidkötés létrehozását az 1. reakcióvázlat ábrázolja (foszfor-amidit-ciklus a végeken 3'-3'- és 5'-5'-kötést tartalmazó oligonukleotidok előállítására). A 3'-3'- vagy 5'-5'-kötésű oligoribonukleotidok előállítása hasonlóképpen történik.

A 2'-módosított ribonukleotidegységek, például a 2'-O-alkil-2'-deoxiribonukleotidok beépítése szintén ismert eljárás szerint történik [Iribarren és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 7747; Sproat, Lamond: Oligonucleotides and Analogues: F. Eckstein (Ed) IRL Press, Oxford (1991)]: 2'-F- és 2'-NH<sub>2</sub>-2'-deoxyribonucleotidon, Benseler és munkatársai, Nucleosides & Nucleotides 11 (1992) 1333; Pieken és munkatársai, Science 253 (1991) 314; Olsen és munkatársai, Biochemistry 30 (1991) 9795].

A szerkezeti és szekvenálólelemzés céljából az oligoribonukleotidokat terminálisan jelöljük, ahogy ezt a 4. példában leírjuk. A jelzés radioaktív, előnyösen 5'-Y<sup>32</sup>-P-ATP/polinukleotid-kinázzal jelöljük a molekulát, mégpedig a szabad 5'-OH-csoporton, azaz csak biológiai 3'-5'-kötéseket tartalmazó oligonukleotidhoz képest a nukleotidlánc átellenes végén.

A 3'-3'-kötéssel rendelkező szekvenciáknak mindkét oldalán van 5'-OH-csoport, így ezek részben mindkét oldalán foszforileződnek.

Az (I) általános képletű oligonukleotidok a hibridizációs kémia területén nyernek alkalmazást olyan eljárásokban, amelyek egy- vagy kétszálú nukleinsavakhoz való kötődésen vagy az ilyen nukleinsavak lebontásán alapulnak, és amelyekkel nukleinsavak biológiai funkcióját szabályozni és gátolni, vírusosgenom-funkció kifejezését szelektíve elnyomni lehet, azaz vírusfunkciók megelőzésére és kezelésére, az onkogén funkciók visszaszorítására és a rák gyógyításában alkalmazhatók a vegyületek.

Az (I) általános képletű oligoribonukleotidok stabilitásának elbírálására megnézzük az oldott vegyület lebontását. A tesztet a 4. példában írjuk le. A 3'-5'-kötésű oligoribonukleotidokhoz képest a találmány szerinti oligoribonukleotidok in vivo sokkal lassabban bomlanak le.

Az 5. példa azt mutatja, hogy a Hammerhead ribozim szekvenciájával kapcsolatos követelményeknek megfelelő találmány szerinti vegyületek enzimikus aktivitása semmiben nem marad el a nem módosított enzimétől.

Az ábrák tartalma:

1. ábra: p53-INV stabilitása szérumban,
2. ábra: a szubsztrátumbontás kinetikája módosított ribozim esetén,
3. ábra: p53-1 és p53-INV nukleolitikus lebontása,
4. ábra: Fp53-INV és p53-F(UC),INV nukleolitikus lebontása.

#### 1. példa

A 2'-fluor-2'-dezinukleozid-egységek szintézise (1. reakcióvázlat)

##### 5'-O-(Dimetoxi-tritil)-2'-fluor-2'-dezoxiuridin

50 ml-es Schlenk-lombikban 0,5 g (körülbelül 2 mmol) 2'-fluor-2'-dezoxiuridin és 2 × 10 ml vízmentes piridint együtt elpárologtatunk. A szárított nukleozidot 25 ml vízmentes piridinben felvesszük, majd szobahőmérsékleten 0,66 g (körülbelül 2,2 mmol) dimetoxi-tritil-kloridot és 10 mg dimetil-amino-piridint adunk hozzá. Három óra elteltével 1 ml metanolt adunk az elegyhez, majd vákuumban szárazra pároljuk. Az olajos maradékot 50 ml diklór-metánban (alumínium-oxiddal savmentesített) oldjuk és az oldatot 3 × 50 ml vízzel extraháljuk. A szerves fázist nátrium-szulfáttal szárítjuk és az oldószert eltávolítjuk. A nyers termék szilárd hab alakjában marad vissza. A több szililsoportot tartalmazó melléktermékek, valamint a tritanol eltávolítása érdekében a nyers terméket 40–50 °C-on 30 ml vízmentes benzollal digeráljuk.

0,75 g (az elméleti hozam 67%-a) cím szerinti terméket kapunk fehér, szilárd anyag alakjában.

##### 4-N-Acetil-2'-fluor-2'-dezoxicitidin

100 ml-es Schlenk-lombikban 1 g (körülbelül 4 mmol) 2'-fluor-2'-dezoxicitidin-hidrokloridot 2 × 20 ml vízmentes piridinnel, majd 2 × 10 ml vízmentes acetonitrillel együtt elpárologtatunk. A szárított nukleozidanyagot 40 ml vízmentes dimetil-formamidban szuszpendáljuk, és a szuszpenzióhoz 0,6 ml (körülbelül 4,4 mmol) ecetsavanhidridet adunk. Egy nap alatt 0,5 ml (4,4 mmol) vízmentes trietil-amint csepegtetjük az elegyhez. Az oldószert olajszivattyús vákuumban eltávolítjuk. A nyers terméket 50 ml dietil-éterrel mossuk,

majd szárítjuk. A terméket oszlopkromatográfiásan tisztítjuk (kovasavgél 60H, 4 × 10 cm-es oszlop, futtatóelegy: 0,1% piridint tartalmazó diklór-metán, metanolgradiens); 8% metanoltartalom mellett eluálódik a termék. Az oldószert eltávolítjuk, 0,83 g (az elméleti hozam 71%-a) termék marad vissza.

##### 5'-O-(Dimetoxi-tritil)-4-N-acetil-2'-fluor-2'-dezoxicitidin

100 ml-es Schlenk-lombikban 4 mmol 4-N-acetil-2'-fluor-2'-dezoxicitidint 25 ml vízmentes piridinben felvesszük, és az elegyhez szobahőmérsékleten 1,3 g (körülbelül 4,4 mmol) dimetoxi-tritil-kloridot és 20 mg 4-dimetil-amino-piridint adunk. Három óra elteltével 1 ml metanolt adagolunk és az elegyet vákuumban szárazra pároljuk. Az olajos maradékot 50 ml diklór-metánban (alumínium-oxiddal savmentesített) oldjuk és az oldatot 3 × 50 ml vízzel extraháljuk. A szerves fázist nátrium-szulfáttal szárítjuk és az oldószert eltávolítjuk. A nyers termék szilárd hab alakjában marad vissza. Tisztítás céljából a nyers terméket kromatografáljuk (kovasavgél 60H, 2 × 20 cm-es oszlop, futtatóelegy: 0,1% piridint tartalmazó diklór-metán, növekvő metanoltartalommal. 3% metanoltartalom mellett a termék eluálódik. Az oldószert eltávolítjuk, 1,39 g (az elméleti hozam 59%-a) termék marad vissza fehér, habszerű szilárd anyag alakjában.

##### A 2'-fluor-2'-dezinukleozidok foszforosav-észter-amidjai

1 mmol védett monomert 5 ml vízmentes diklór-metán és 1 ml vízmentes diizopropil-amin elegyében oldunk, és az oldathoz argonléggör alatt, eldobható fecskendővel 1,2 mmol klór-N,N-diizopropil-amino-β-ciano-etoxi-foszfit adunk. Egy óra elteltével a reakció majdnem teljes, és 0,1 ml metanollal megszakítható. Az elegyet 20 ml etil-acetátban oldjuk és az oldatot 3 × 20 ml telített NaCl-oldattal extraháljuk. A szerves fázist vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, és az oldószert eltávolítjuk. A nyers terméket 5 ml diklór-metánban oldjuk és 400 ml vízmentes petroléterben szobahőmérsékleten kicsapjuk. A csapadékot leszívátjuk, olajszivattyús vákuumban szárítjuk, majd –20 °C-on tároljuk.

##### 5'-O-(Dimetoxi-tritil)-4-N-acetil-2'-fluor-2'-dezoxicitidin-diizopropil-amino-β-ciano-etoxi-foszfin

Kiindulás: 0,59 g (1 mmol) 5'-O-(dimetoxi-tritil-4-N-acetil-2'-fluor-2'-dezoxicitidin

Hozam: 0,60 g (0,78 mmol, az elméleti hozam 78%-a).

##### 5'-O-(Dimetoxi-tritil)-2'-fluor-2'-dezoxiuridin-diizopropil-amino-β-ciano-etoxi-foszfin

Kiindulás: 0,55 g (1 mmol) 5'-O-(dimetoxi-tritil)-2'-fluor-2'-dezoxiuridin

Hozam: 0,61 g (0,83 mmol, az elméleti hozam 83%-a).

#### 2. példa

CPG 10–1400 hordozóanyag és 3'-O-dimetoxi-tritil-dezoxiribonukleozid-egységek reakciója (3. reakcióvázlat)

##### 3'-O-DMTr-dezoxiribonukleozid-5'-O-szukcinát

Reakcióelegy: 1,0 mmol 3'-O-DMTr-dN

0,8 mmol borostyánkősavanhidrid (80 mg)

0,5 mmol dimetil-amino-piridin  
(61 mg)

A borostyánkősavanhidrid és a dezoxiribonukleozid 5'-OH-csoportja közötti reakciót 5 ml vízmentes piridinben, DMAP-katalizátor jelenlétében játszátjuk le egy éjszakán át, szobahőmérsékleten. Miután a reakció teljes, az oldatot betöményítjük, és a piridint toluóllal végzett háromszoros azeotrop desztillálás útján eltávolítjuk. A maradékot diklór-metánban oldjuk és az oldatot 10%-os jéghideg citromsavoldattal, majd vízzel mossuk. A szerves fázist vákuumos rotációs szárítóban oldószermentesítjük. A nyersterméket 3 ml toluolban oldjuk és 200 ml n-hexánban kicsapjuk.

*A hordozóhoz való kapcsolás*

Reakcióelegy: 0,8 mmol 3'-O-DMTr-dezoxiribonukleozid-5'-O-szukcinát  
0,8 mmol p-nitro-fenol (112 mg)  
2,0 mmol diciklohexil-karbodiimid  
3 g amino-propilezett CPG  
10–1400 gyanta

A védett szukcinilezett dezoxiribonukleozidot p-nitro-fenol 5 ml vízmentes dioxánnal és 0,2 ml piridinnel készített oldatához adjuk, majd DCCL-t adagolunk kondenzálószerként. Három óra elteltével a reakció teljes. A kicsapott diciklohexil-karbamidot argonléggör alatt leszívátjuk és a szűrletet közvetlenül a funkcionális hordozóanyag 15 ml vízmentes dimetil-formamidral készített szuszpenziójához adjuk. 0,8 ml trietilamin adagolása után a reakcióelegyet egy éjszakán át rázzuk. A reagált hordozót leszívátjuk, metanollal, majd éterrel mossuk és exsikkátorban szárítjuk. El nem reagált aminocsoportok blokkolása céljából a hordozót 1 ml ecetsavanhidrid és 50 mg dimetil-amino-piridin 15 ml vízmentes piridinnel készített oldatában szobahőmérsékleten egy órán át rázzuk, utána leszívátjuk, metanollal, majd éterrel mossuk és szárítjuk.

*3. példa*

2'-Fluor-2'-dezoxiuridin-egységeket és a 3'-terminálisan 3'-3'-foszfodiészter-kötést tartalmazó oligoribonukleotid szintézise

A módosított „Hammerhead” ribozim (1. táblázat) szintézisét 0,2 μmol-os léptékben a Gene Assembler Plus típusú DNS-szintetizálóban (gyártja: Pharmacia cég) végeztük. A hordozó az 5'-hidroxilcsoporton keresztül kapcsolódó dezoadenozin-építőelemet hordozta; a szintézis során ebből megfordított szerkezet keletkezik az oligonukleotid 3'-terminálásán. A szintézis a foszforosav-észter-amid-eljárásban, az oligonukleotid-szintézisek szabványprotokollja szerint történt.

p53-INV: 5'-r(AAAGA UCGA UGAGG CCGUU  
AGGCC GAAAC AGGG)-3'-3'-dA-5'

Fp53-INV: 5'-rArArArGrA fUrCfUrGrA fUrGrArGrG  
rCrCrGfUfU rArGrGrCrC rGrArArArC  
rArGrGrG-3'-3'-dA-5'

*1. táblázat*

fN: 2'-fluor-2'-dezoxinukleozidok  
rN: ribonukleozidok

A 2'-fluor-2'-dezoxinukleozidok foszforosav-észter-amidjait 0,12 M koncentrációban alkalmazzuk, acetonitrilben. A láncmehosszabbító lépésben 0,1 ml amidofoszfítot 0,37 ml tetrazololdatban (0,5 M) reagáltatunk az oligonukleotidhordozóhoz kapcsolt 5'-OH-csoportjával. 12 perces reakcióidő után szabvány szerint következik a megszakítás, oxidálás és – a következő kondenzálási lépés előkészítése végett – a detritilezés. A kondenzáció hozama átlagosan 99%.

A bázissal szemben érzékeny védőcsoportok lehasítása, valamint a hordozóhoz való kötés megszüntetése érdekében a hordozót csavaros Eppendorf-edénybe visszük át és ott 55 °C-on 12 órán át 32%-os ammónia-oldat és etanol 3:1 arányban készített elegyének 2 ml-ében inkubáljuk. A felülúszó részt leemeljük, –20 °C-ra hűtjük és óvatosan liofilizáljuk. A száraz maradékot 0,4 ml tetrahydrofurános, 1,1 mólos TBAF-oldatban szobahőmérsékleten további 16 órán át inkubáljuk. A reakciót azonos térfogatú trietil-ammónium-acetát-puffer (TEAA-puffer) adagolásával megszakítjuk. Az oldatot –70 °C-ra hűtjük és óvatosan 0,4 ml-re betöményítjük. 40 μl nátrium-acetát, 1,4 ml etanol és 5 μl ecetsav adagolása után a terméket egy éjszaka alatt –20 °C-on kicsapjuk. Centrifugálás után a felülúszót eldobjuk. A száraz oligonukleotidot formamidkékjelző és víz 1:1 arányú elegyében felvesszük és 20%-os 7M karbamidos akrilamid géltre visszük. A terméksáv azonosítása és kivágása céljából a géltre cellofánfóliát helyezünk. A terméket 40 °C-on ammónium-acetát-oldattal eluáljuk. Öt óra elteltével az oldatot a fent megírtak szerint kicsapjuk. Az oligonukleotidot 70%-os etanollal mossuk, 70%-os etanolban újrászuszpendáljuk, majd –70 °C-on tároljuk.

*4. példa*

*A módosított ribozimek stabilitásának vizsgálata vérszérumtesztel*

p53 ribozimet, valamint a p53-INV és az Fp53-INV módosított oligoribonukleotidot enzimesen, T4-polinukleotid-kináz-enzimmel 32-P-dATP (fajlagos aktivitás 4500 Ci/mmol) jelenlétében radioaktív jelzéssel látjuk el.

A 3'-3'-invertált kötéssel rendelkező szekvenciáknak mindkét végén 5'-OH-csoport van, ezért részben mindkét végükön foszforileződnek.

A jelzett ribozimeket friss humán szérummal kezeljük.

Elegy: 1 pmol foszforilezett ribozim  
20 μl szérum

A mintákat 37 °C-on inkubáljuk. Az alábbi időpontokban 2-2 μl-es mintákat veszünk és fenolizálunk:

p53: 0, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 perc

p53-INV és Fp53-INV: 0, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 perc

A fenolizált mintákat liofilizáljuk, 95% formamid-loading-bufferben felvesszük és 20%-os, 8M karbamidos poliakrilamid gélen 55 °C-on elektroforetikus szétválasztjuk.

A röntgenfilmen lévő sávok intenzitását lézerdenzitóméter segítségével határozzuk meg (lásd 1. ábra).

A vizsgált ribozimek felezési ideje ( $t_{1/2}$  Fp53-INV esetén 30 perc, P53-INV esetén 1 perc és p-53, a biológiai oligoribonukleotid (5. példa esetén <1 perc) világosan mutatja a terminális invertálás védőhatását.

### 5. példa

20 egységből álló szubsztrátum-oligoribonukleotidot

– SB-1: 5'-r(GC CCC UGU CAU CUU UUG UCC)-3' T4-polinukleotid-kináz-enzimmel 32-P-ATP (fajlagos aktivitás 4500 Ci/mmol) jelenlétében radioaktív jelzéssel látunk el. Az SB-1-szubsztrátumot különböző ribozimokkal az alábbiak szerint bontjuk: 50 mmol trisz-HCl, pH 7,5, 20 mmol MgCl<sub>2</sub>, 50 °C. A szubsztrátum koncentrációja 0,025 μM (0,05, 0,1 és 0,25 μM variációkkal), a ribozim koncentrációja 0,02 μM. 1 perc, 5 perc, 10 perc, 15 perc, majd 30 perc inkubálás után egy-egy mintát veszünk és loading-bufferrel kezeljük. A mintákat 20%-os, 8M karbamidos poliakrilamid gélen, 55 °C-on elektroforetikus szétválasztjuk. A röntgenfilmen lévő SB-1-sáv intenzitásának csökkenését lézerdenzitóméterrel határozzuk meg. Az alábbi ribozimeket használjuk:

p53: 5'-r(AAGA UCUGA UGAGG CCGUU AGGCC GAAAC AGGGA)-3'

Fp53: 5'-r(AAAGA fUCfUGA fUGAGG CCGfUFU AGGCC GAAAC AGGGA)-3' Az SB-1-szubsztrátum lebontásának sebessége p53 és p53-INV esetén azonos volt. Fp53 és Fp53-INV ugyancsak azonos aktivitást mutat, ez azonban körülbelül a p53 aktivitásának egyötöd része.

### 6. példa

A szubsztrátum bontásának kinetikai mérése

A reakció kezdősebességét 40 nM szubsztrátum és 4 nM enzim 50 nM trisz-HCl-pufferrel készített elegy-

ben (pH 7,5) mérjük. A reakciót 10 nM MgCl<sub>2</sub> adagolásával beindítjuk. A bontási termék mennyiségét 1, 2, 5, 10 és 15 perc elteltével mérjük. E kísérletből megközelítőleg megmértük a K<sub>m</sub>-értéket. A kezdősebesség pontosabb megmérése C. H. Suelter szerint („A practical Guide Enzymology” című monográfiában, J. Wiley, New York 1985, 231. oldal) történik. Ennek során 40 nM enzim és 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, illetve 1000 nM szubsztrátum hat különböző reakcióját vizsgáljuk meg külön-külön. Meghatározott időközönként 2 μl felülűszót vételezünk mintaként, és a reakciót fenol adagolásával megszakítjuk. Ezt követően a mintákat denaturált gélen (20% PAGE, 7M karbamid) szétválasztjuk és elemezzük.

5 Szubsztrátum: SB-1 (5. példa)

Ribozimek: p53-INV (3. példa)

p53-F(U;C)-INV: 5'-rArArArGrA fUfCfUrGrAfUrGrArGrGfCfCrGfUfUrArGrGfCfCrGrArArAfCrArGrGrG-3'-3'-dA-5'

20 p53-1: 5'-r(AAA GAU CUG AUG AGG CCG UUA GGC CGA AAC AGG G)-3'

A kinetikai paraméterek meghatározása

Öt különböző szubsztrátumkoncentráció mellett mérjük a reakció kezdősebességét a progresszív görbe kezdeti szakaszában, abban az időpontban, amikor a termék időegység alatt keletkező mennyisége lineáris görbét ad (a 4. perc után). E kinetikai mérések tipikus eredményét a 2. ábra mutatja. Tekintettel arra, hogy a reakciót két vegyértékű kationok adagolásával beindítottuk és így az enzimkonformáció képződésére nem kerülhetett sor, a lag-fázist általában a reakció kezdete utáni 5–10. percben figyeltük meg. Az alábbi enzimes paramétereket Eadie–Hofstee-eljárással határoztuk meg.

35

2. táblázat

Ribozim	K <sub>m</sub> (nM)	V <sub>max</sub> (perc <sup>-1</sup> )	K <sub>cat</sub> (perc <sup>-1</sup> )	K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (μM <sup>-1</sup> perc <sup>-1</sup> )
p53-1	24	8,6	0,2	8,75
p53-INV	230	52,3	1,30	5,65
p53-F(U,C),INV	180	40,9	1,02	5,56

### 7. példa

Jelzés

A szubsztrátumot és az enzimeket [V-32-P]-ATP és polinukleotid-kináz segítségével jelöltük. Be nem épült nukleotidokat fenollal végzett extrahálás, majd ezt követő etanolos kicsapás útján eltávolítottunk.

A lebontás mértékének meghatározása

A módosított ribozimokkal végzett lebontás kinetikáját úgy határoztuk meg, hogy a radioaktív jelzéssel ellátott oligoribonukleotidot teljes, friss és nem hígított humán szérumban oldottuk 20 000 cpm/μl végkoncentrációig. Kezdeti minta vétele után a reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk. Meghatározott időközönként egy-egy 1 μl-es mintát vettünk a felülűszóból, és a reakciót fenollal megszakítottuk. A fenol extrahálása és az eta-

nolos kicsapás után a mintákat 20 nM EDTA-t, 0,01 brómfenolkéket és 0,01% hilencianátot tartalmazó 80%-os formamidban szuszpendáltuk. A bontási terméket 20%-os, 7 M karbamidos poliakrilamid gélen (PAGE) szétválasztottuk.

50 A p53-1 és p53-INV inkubálásának eredményeit a 3. ábra mutatja. Látható, hogy már a 3'-terminálisan invertált szerkezet önmagában a ribozimek szérumban szembeni stabilitását néhány másodperctől több percig növeli.

60 A vizsgálatokat 1 pmol nem módosított (p53-1) és módosított (p53-INV) ribozimokkal végeztük 10 μm hígítatlan humán szérumban, 37 °C-on. A gél szélén felüntetett számok megfelelő hosszúságú etalonok pozícióinak felelnek meg.

Az Fp53 és p53-F(U,C)-INV inkubálásának eredményeit a 4. ábra mutatja. Látható, hogy p53-F(U,C)-INV, hígítatlan szérumban 4 órán át inkubálva ép marad, nem bomlott le, és 48 óra elteltével a bomlás nem érte el a 10%-ot. A módosított ribozim mennyisége 1 pmol volt. Fp53 a 3'-terminálisan invert szerkezetű, és az U6, U8, U11, U19 és U20 pozíciókban fluorozott. p53-F(U,C)-INV ezen túlmenően még a C7 és C30 citozin-csoportokban fluorozott.

#### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (I) általános képletű oligoribonukleotidok, amelyek képletében

R<sup>1</sup> jelentése hidrogénatom vagy (II) általános képletű csoport és

R<sup>2</sup> jelentése hidrogénatom vagy (III) általános képletű csoport azzal a megkötéssel, hogy R<sup>2</sup> és R<sup>1</sup> közül legalább az egyik (II), illetve (III) általános képletű csoportot jelent;

B jelentése természetes ribonukleinsavbázisok (A, C, G, U),

X jelentése OH-csoport,

R<sup>3</sup> jelentése fluoratom vagy OH-csoport,

W és W' jelentése egymástól függetlenül oxigén- vagy kénatom,

Z és Z' jelentése 2-ciano-etoxi-csoport és

n értéke 5-től 60-ig, előnyösen 10-től 40-ig, különösen előnyösen 15-től 25-ig terjedő egész szám, és fiziológiailag elviselhető sóik.

5 2. Az 1. igénypont szerinti oligoribonukleotidok, *azzal jellemezve*, hogy azok 5'- és/vagy 3'-végükön invertált ribozimek.

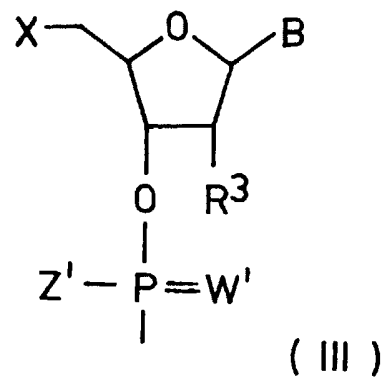
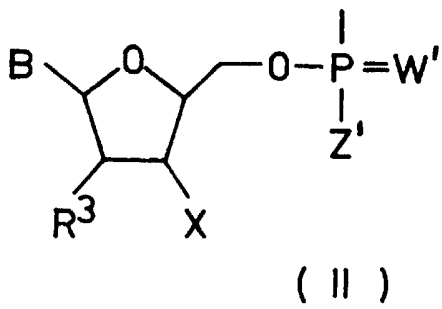
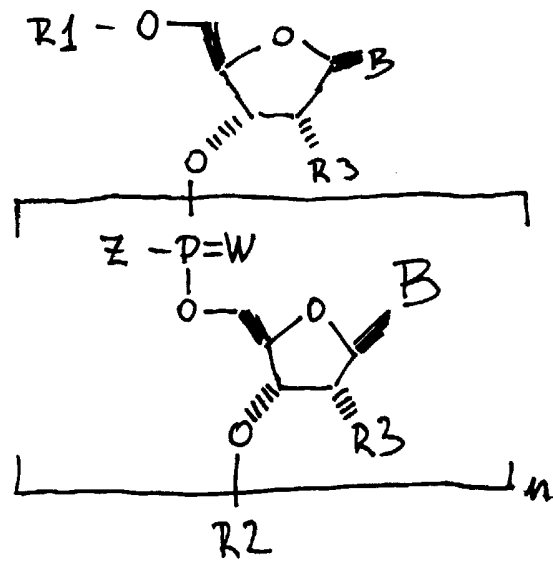
3. Eljárás az 1. igénypont szerinti oligoribonukleotidok és fiziológiailag elviselhető sóik előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

10 a) 3'-, illetve 5'-terminális foszfor(III)- vagy foszfor(V)csoporttal rendelkező ribonukleotidegységet vagy aktív és/vagy származékát 3'-, illetve 5'-terminális szabad hidroxilcsoporttal rendelkező másik ribonukleotid-egységgel vagy védett származékával reagáltatunk, vagy

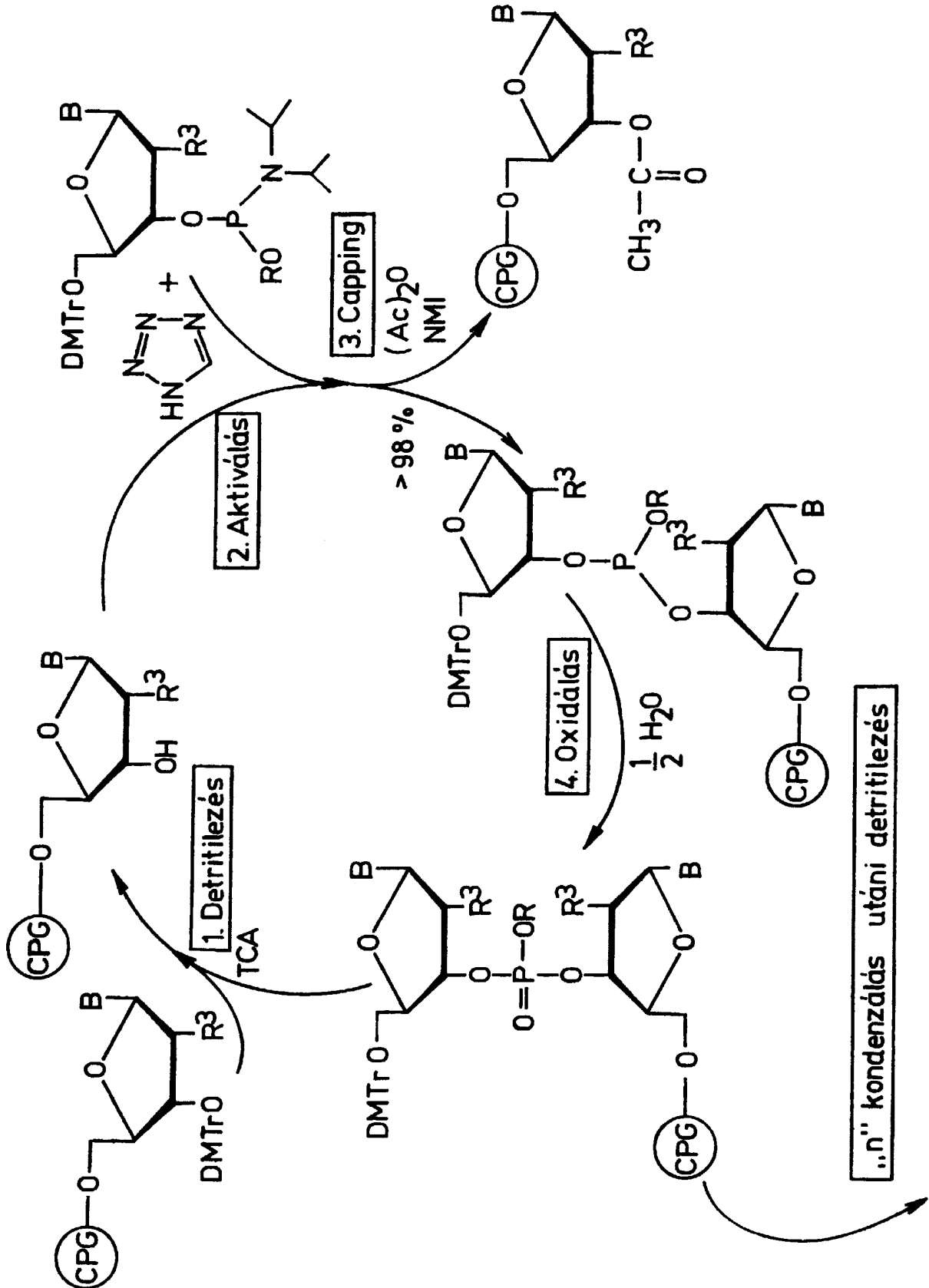
15 b) az oligoribonukleotidot az a) eljárással analóg módon, de több ribonukleotidegységet magukban foglaló fragmensekből építjük fel,

20 majd adott esetben az a) vagy b) eljárás szerint kapott oligoribonukleotidokról egy vagy több, ideiglenes védőcsoportot lehasítunk és a kapott (I) általános képletű oligonukleotidokból kívánt esetben fiziológiailag elviselhető sóit képzünk.

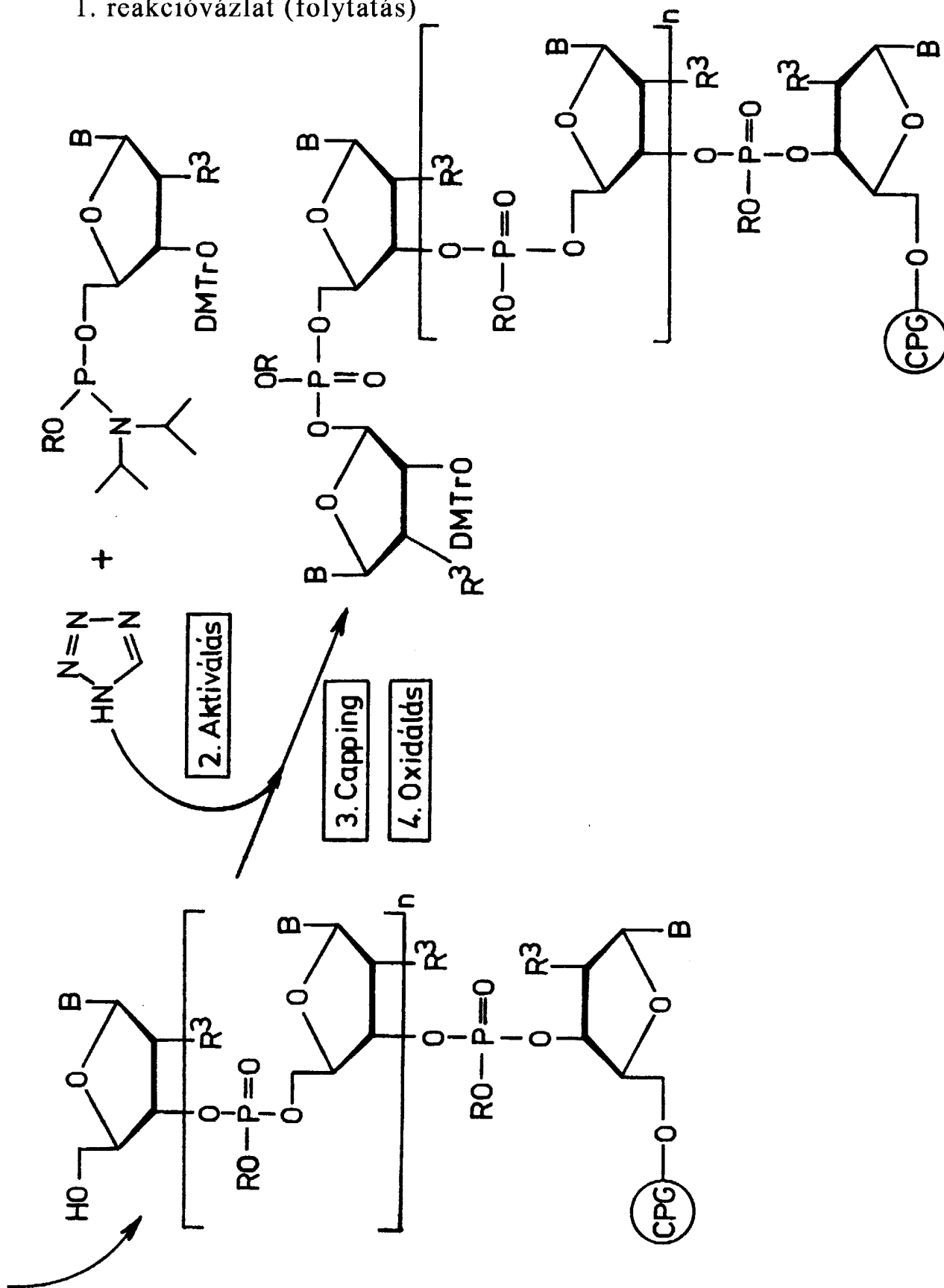
25 4. Eljárás előnyösen intravénásan vagy helyileg alkalmazható gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1. igénypont szerinti (I) általános képletű oligoribonukleotidot fiziológiailag elviselhető segéd- és/vagy hordozóanyagokkal összekeverjük és gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

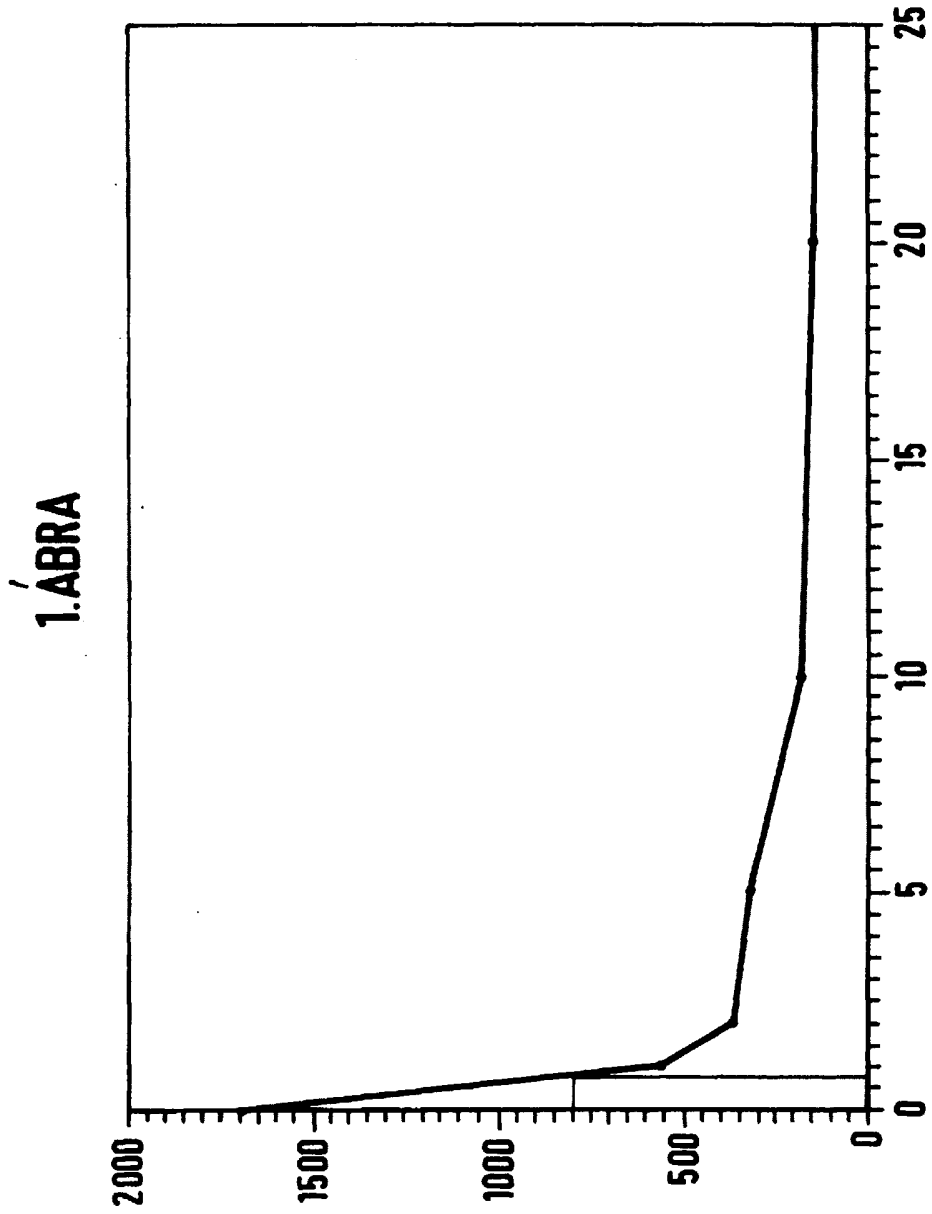


1. reakcióvázlat



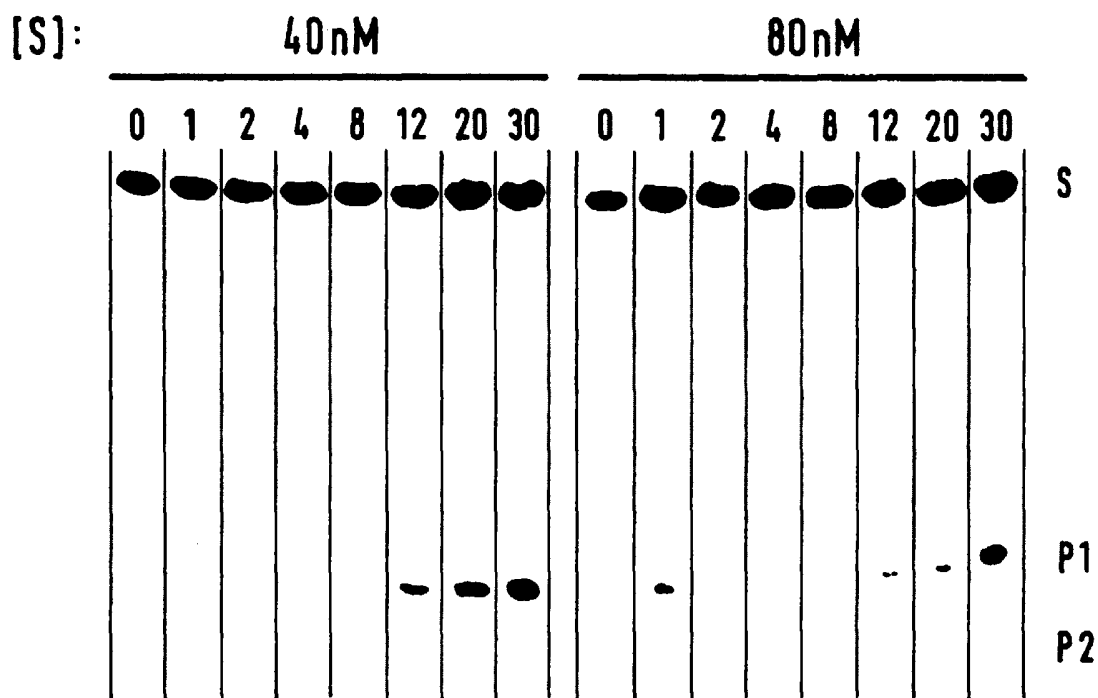
1. reakcióvázlat (folytatás)



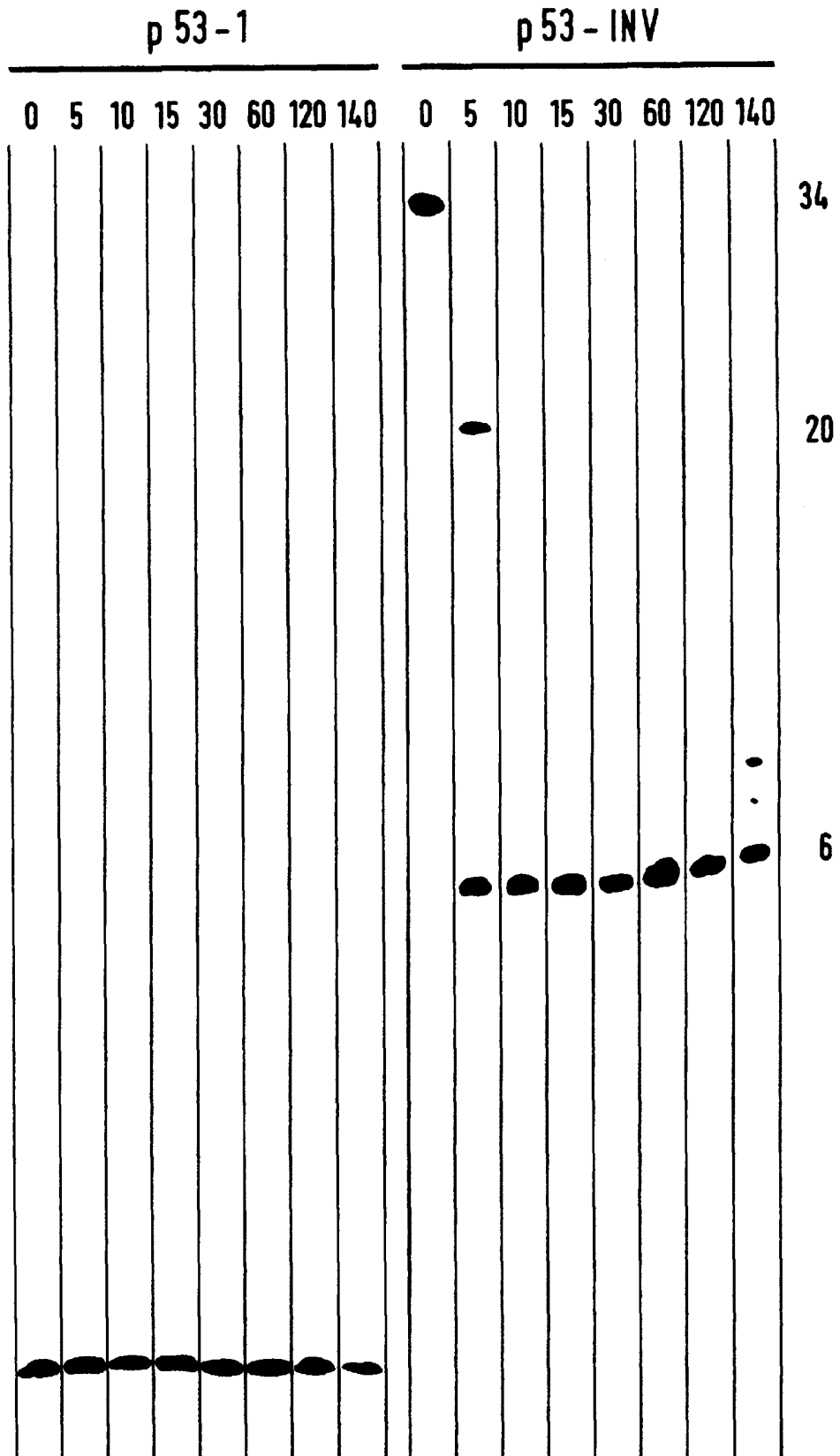


## 2.ÁBRA

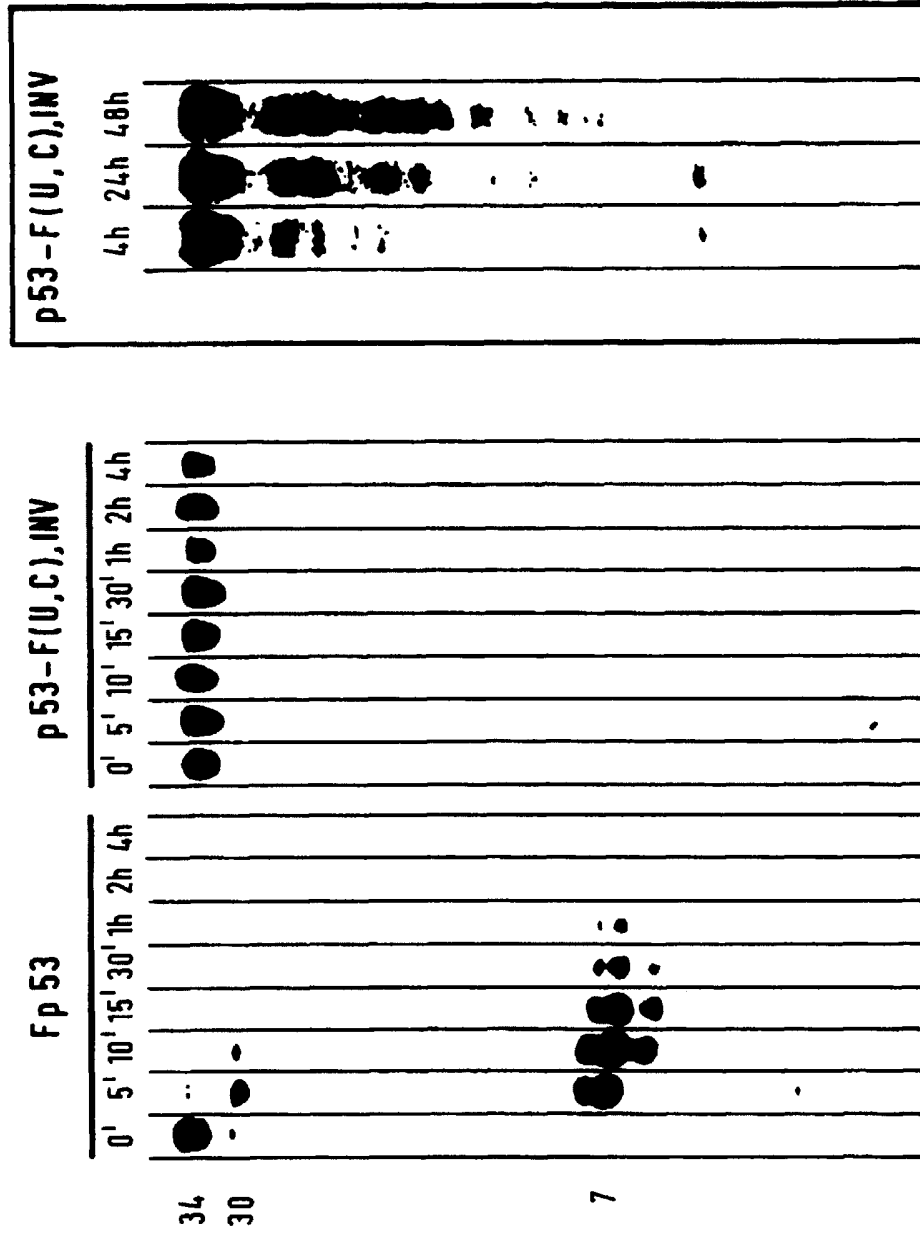
[E]: p53 - INV; 40nM



# 3. ABRA

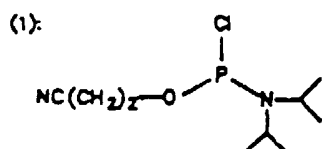
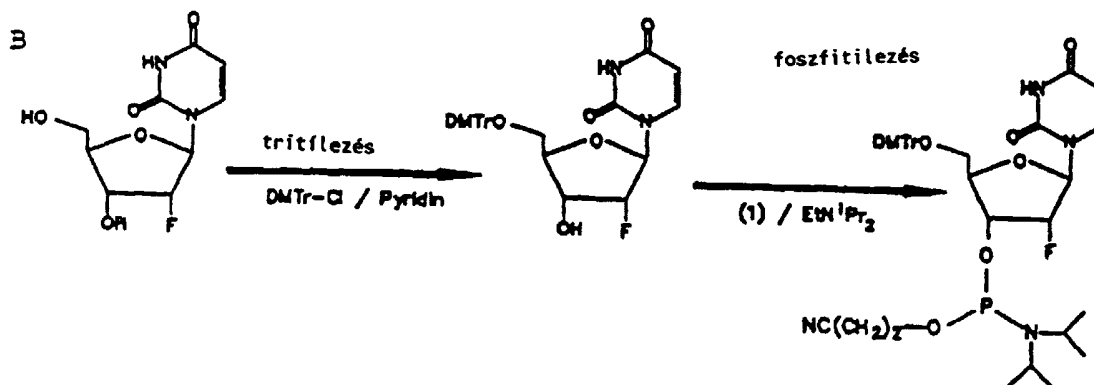
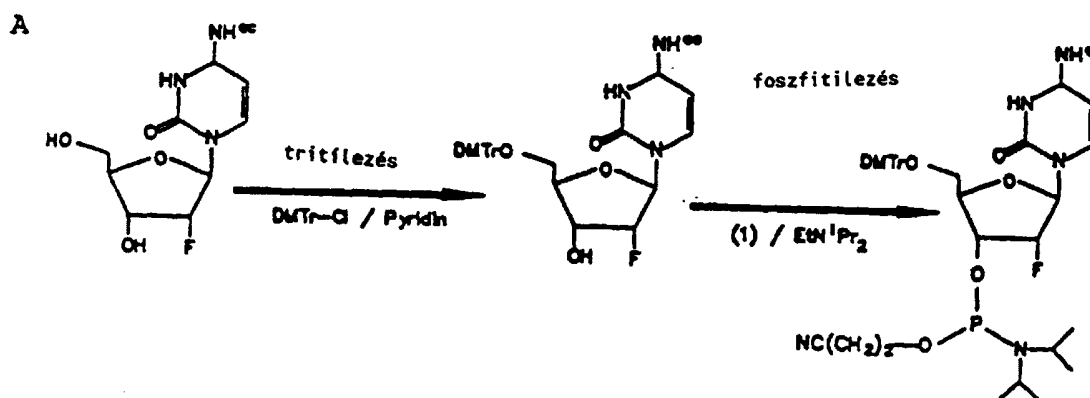


# 4. ÁBRA



## 2. reakcióvázlat

2'-fluor-2'-dezoxicitidin- (A) és 2'-fluor-2'-  
dez-oxiuridin-foszforossav-észteramid (B) szintézise



### 3. reakcióvázlat

3'-O-DMTr-dezoxiribonukleozid-5'-O-szukcinil-p-nitrofenil-észter szintézise és hordozóhoz (controlled pore glass) való kapcsolása

